

Dottorato in Scienze Chimiche XXII ciclo
Università di Napoli Federico II



Caratterizzazione di proteine importanti per la patogenicità del *Mycobacterium tuberculosis*

Dottoranda Carla Esposito

Relatore Prof. Giancarlo Morelli
Tutore Prof.ssa Gabriella D'Auria
Co-tutore Dott.ssa Emilia Pedone

Dottorato in Scienze Chimiche XXII ciclo
Università di Napoli Federico II



Caratterizzazione di proteine importanti per la patogenicità del *Mycobacterium tuberculosis*

Dottoranda Carla Esposito

Relatore Prof. Giancarlo Morelli
Tutore Prof.ssa Gabriella D'Auria
Co-tutore Dott.ssa Emilia Pedone

INDICE

SUMMARY	1
1.INTRODUZIONE	
1.1 La Tubercolosi	8
1.2 Il <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
1.2.1 Heparin Binding Haemagglutinin Adhesin (HBHA)	
1.2.2 Rpf-interacting protein A (RipA)	
1.2.3 Cold Shock protein A (CspA)	
1.3 Obiettivo del progetto di ricerca	18
2.RISULTATI	
2.1 Analisi strutturale e funzionale del <i>Heparin Binding Haemagglutinin Adhesin</i> (HBHA)	21
2.1.1 Clonaggio ed espressione della proteina HBHA e di tre sue forme tronche HBHA Δ C e HBHA ₁₀₋₁₆₀ e HBHA ₂₅₋₁₆₀	
2.1.2 Purificazione di HBHA e delle forme tronche HBHA Δ C, HBHA ₁₀₋₁₆₀ e HBHA ₂₅₋₁₆₀	
2.1.3 Analisi dello stato oligomerico	
2.1.4 Studio della natura coiled-coil di HBHA	
2.1.4.1 Analisi spettroscopiche	
2.1.4.2 Analisi bioinformatiche	
2.1.4.3 Studio della stabilità del <i>coiled-coil</i>	
2.1.5 Studio del processo di dimerizzazione	
2.1.5.1 Sintesi di peptidi mimetici della regione di dimerizzazione	
2.1.5.2 Studi di calorimetria a scansione differenziale (DSC)	
2.1.5.3 Valutazione dell'importanza della regione N-terminale nella dimerizzazione	
2.1.6 Studio dell'interazione HBHA-Actina	
2.1.6.1 Esperimenti di <i>Surface Plasmon Resonance</i> (SPR)	
2.1.6.2 Analisi di potenziale di superficie dell'actina	

2.2 Espressione ricombinante e cristallizzazione della <i>Resuscitation Interacting Protein A (RipA)</i>	39
2.2.1 Analisi bioinformatiche	
2.2.2 Clonaggio ed espressione dei costrutti di RipA	
2.2.3 Purificazione	
2.2.4 Esperimenti di cristallizzazione	
2.3 Studi preliminari della <i>Cold Shock Protein A (CspA)</i>	44
2.3.1 Clonaggio ed espressione della proteina CspA	
2.3.2 Purificazione della proteina CspA	
2.3.3 Analisi bioinformatiche e spettroscopiche	
2.3.4 Analisi di spettroscopia NMR	
2.3.5 Studi di interazione proteina-DNA	
3.DISCUSSIONE	52
4.MATERIALI E METODI	
4.1 Clonaggio dei geni codificanti le proteine HBHA, RipA e CspA e loro forme tronche	59
4.1.1 Amplificazione dei geni mediante reazione a catena della DNA polimerasi (PCR)	
4.1.2 Digestione enzimatica e purificazione dei geni e dei vettori di espressione	
4.1.3 Realizzazione dei costrutti ricombinanti e minipreparazione di DNA plasmidico	
4.2 Espressione delle proteine ricombinanti	62
4.2.1 Proprietà dei vettori di espressione	
4.1.3 Espressione su larga scala	
4.3 Purificazione	65
4.3.1 Purificazione mediante cromatografia di affinità	
4.3.2 Digestione con proteasi TEV	
4.3.3 Cromatografia ad esclusione molecolare	
4.4 Analisi delle proteine	66
4.4.1 Determinazione della concentrazione proteica	
4.4.2 Elettroforesi in condizioni denaturanti SDS-PAGE	
4.4.3 Esperimenti di ritardo elettroforetico	
4.4.4 Misure di <i>Light Scattering</i>	
4.4.5 Small angle X-ray Scattering (SAXS)	

4.4.6	Analisi spettroscopiche: dicroismo circolare	
4.4.7	Misure termodinamiche di calorimetria a scansione differenziale (DSC)	
4.4.8	Sintesi peptidica	
4.4.9	Esperimenti di <i>Surface Plasmon Resonance</i> (SPR)	
4.4.10	Cristallizzazione	
4.4.11	Spettroscopia NMR	
4.4.12	Analisi bioinformatiche e database	
4.5	Materiali	73
	ABBREVIAZIONI	75
	BIBLIOGRAFIA	77
	PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI	82

Summary

Characterization of proteins involved in pathogenesis of *M. tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (MTB) is the etiological agent of human tuberculosis, a disease that causes in the world about 2 million of deaths by year. It has been estimated that it infects approximately one-third of the world's population.

Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guèrin (BCG) is presently the only available vaccine against TB and has been extensively administrated over the last 80 years. It is a cheap, safe and widely used vaccine, but several studies have demonstrated that BCG shows variable efficacies, ranging from 0 to 80%, against adult pulmonary TB. Furthermore, until now, only five drugs are used in TB treatment. This aspect is really dramatic because MTB has developed drug and multidrug resistant strains. No new classes of drugs for TB have been projected in the last 30 years, reflecting the inherent difficulties in discovery and clinical testing of new agents and the lack of pharmaceutical industry research in the area. Its top priority is the development of a new agent that will shorten the duration of chemotherapy from the current 6–8 months to two months or less, and that have activity against MDR-TB and TB. The development of new drugs implicates the knowledge of the mechanisms underlying infection.

MTB presents two different mechanisms of infection: pulmonary and extra-pulmonary. In the first case, the bacterium enters in the lungs by breathing in air droplets of bacilli from a cough or sneeze of an infected person. Here, alveolar macrophages ingest tubercle bacilli that survive to host responds by inactivation of macrophages and remodelling the site of infection into a cellular mass, the 'tubercle' or granuloma that has given the disease its name. In the extra-pulmonary mechanism, instead, the bacteria interact directly with the epithelial cells. However, infection with *M. tuberculosis* most frequently results in a latent form of TB, without any clinical manifestation. The mechanisms that underlie latency and subsequent reactivation are poorly understood.

The aim of this PhD project was the biochemical characterization of three important proteins involved otherwise in pathogenesis of *M. tuberculosis*.

The first one was the Heparin Binding Haemagglutinin Adhesin (HBHA), the only virulence factor associated to the extrapulmonary dissemination. Infact, this protein binds to

heparan sulfate proteoglycans on the surface of epithelial cells thought its C-terminal lysine-rich domain, which is exposed on the mycobacterial cell surface. Like other bacterial adhesins, HBHA also expresses hemagglutination activity. This process has been proposed to be due to interactions among HBHA molecules on the surface of mycobacteria. In particular, hemagglutination has been correlated with the ability of the N-terminal region of HBHA to form multimers. Recently, intranasal administration of rHBHA has been shown to induce antibodies that impair extrapulmonary dissemination, thus providing immune protection against mycobacterial infections and supporting the notion that rHBHA is a potential candidate for subunit vaccines. However, despite the interest in HBHA both as a potential antigen against tuberculosis and as a diagnostic tool for latency TB, no structural data are so far available, nor has detailed information on the protein oligomerization state yet been provided.

The genes coding for HBHA and its truncated forms HBHA Δ C (lacking residues 161 to 199), HBHA₁₀₋₁₆₀ (aa 10-160) and HBHA₂₅₋₁₆₀ (aa 25-160), were amplified from the *M. tuberculosis* (strain H37Rv) genome. The recombinant proteins were expressed with success and purified to homogeneity.

In order to determinate the oligomeric state of HBHA, it was carried out a size exclusion chromatography on HBHA and HBHA Δ C: gel filtration profiles of freshly purified proteins show the existence of species with molecular masses of 88 kDa for HBHA and 66 kDa for HBHA Δ C, that are compatible with a tetrameric arrangement of the proteins. However, since estimates of molecular masses by gel filtration depend on the protein shape, other approaches have been taken in consideration. First, cross-linking experiments were performed with HBHA Δ C, followed by gel electrophoresis in denaturant conditions, carried out using both glutaraldehyde and BS3 as cross-linking agents. These studies indicated a molecular mass for HBHA Δ C of 34 kDa, which corresponds to a dimer. In order to further validate this result and to understand its inconsistency with results from gel filtration, we performed light scattering measurements. HBHA Δ C was analysed by Light Scattering in-chromatography mode obtaining a weight-average molar mass value of 37630 Da, which corresponds to a dimeric organisation of the molecule. To check if the molecular size distribution of protein changes at increasing protein concentrations, we also performed Dynamic Light Scattering (DLS) in batch-mode. This analysis was carried out using different HBHA Δ C concentrations ranging from 0.2 to 2.8 mg/mL. In all conditions, a population of 2.7 ± 0.3 nm hydrodynamic radii particles dominated (close to 90% as a mass percent of the sample). This R_h value is compatible with the dimeric state of protein. Furthermore, no significant variations of

polydispersity, nor of Rh were observed as a function of concentration. These findings show that HBHA oligomeric state does not depend on the protein concentration and that no larger species exist in solution. Finally, these results were unambiguously validated by SAXS experiments carried out with both HBHA and HBHA Δ C. SAXS experiments unambiguously have shown that HBHA exists in solution as a dimer with an elongated shape with a peripheral location of the C-terminal positively charged arms of HBHA. The protrusion of C termini toward the same side of the protein is consistent with the role attributed to the HBHA C terminus in driving the binding of bacteria by establishing electrostatic interactions with epithelial heparin sulfates.

In order to experimentally assess the secondary structure content of HBHA, we performed CD experiments with both HBHA and HBHA Δ C. The spectra of the two proteins are quite similar and are characterized by two negative broad peaks at about 208 and 220 nm. These spectra, with an α -helix band intensity at 208 nm stronger than that at 222 nm, are typical of proteins with a coiledcoil structure. To validate this result, we performed chemical denaturation, using urea as a denaturing agent, of HBHA Δ C. The urea denaturation profile of HBHA Δ C is characteristic of a two-state helix-coil transition with a single inflection point, C_m , centered at 1.8 M urea. This denaturation profile, with a peculiarly low urea C_m , has often been encountered in denaturation studies of coiled-coil systems. A coiled-coil propensity of HBHA is also predicted by sequence analysis. Indeed, the HBHA sequence reveals the typical pattern of left-handed coiled-coils, with a periodicity of seven (heptad repeats, abcdefg). As expected for left-handed coiled coils, residues in positions a and d are mainly hydrophobic, whereas those in positions e and g are mainly charged. The highest propensity to form a coiled coil was calculated for the region from residue 24 to 69 that was also predicted to have a high propensity to form two-stranded coiled coils. The evidenced coiled-coil nature of HBHA accords well with the agglutination function of HBHA, since coiled coils are folding motifs which guide oligomerization in a variety of systems.

Since the stability of coiled-coils is strongly affected by ionic strength, it was performed a CD characterisation of the protein in various physical chemical conditions. CD spectra recorded at different pH values show that at pH of 3.5 the intensity at 222 nm is stronger than that at 208 nm, corresponding to an α -helix band but not to a coiled-coil motif. Thermal denaturation experiments in the presence of various salt concentrations have shown that HBHA is strongly stabilised by increasing ionic strength: a dramatic change in the protein melting temperature was observed upon salt addition.

To validate that the region from residue 24 to 69 is really involved in dimerization, two peptides, corresponding to amino acids 20-40 and 41-70, were synthesized and used to perform competition experiments with protein subunits. Both peptides show the ability to bind a single molecule of HBHA. All these data suggest that bacterial aggregation is to be associated with HBHA dimerisation. CD and DSC measurements indicate that the thermal unfolding of HBHA Δ C can be described as a reversible two-state transition with concomitant dissociation and unfolding of the dimeric structure, which implies that HBHA monomers are not stable in solution. This finding excludes a possible aggregation mechanism in which HBHA monomers associate on bacterial surfaces to form coiled-coil locked dimers. This result is supported by CD experiments carried out on HBHA₁₀₋₁₆₀ and HBHA₂₅₋₁₆₀.

CD spectrum recorded on HBHA₂₅₋₁₆₀ presented a deep minimum at 200 nm and a shoulder at 222 nm, indicating that HBHAC₂₅₋₁₆₀ adopts mainly a random coil conformation, with a small amount of α helices. Differently, HBHAC₁₀₋₁₆₀ presented a CD spectrum which was completely superimposable to that of HBHA Δ C. These results unambiguously showed that the N-terminal region embedded between residues 10 and 24 is of fundamental importance for the formation of the dimeric coiled coil. Furthermore, they show that hampering N-terminal coiled coil formation strongly affects protein structure integrity. Consistent with DSC data, destabilisation of the dimerisation coiled-coil does not result in protein monomerisation but in its unfolding. Recently it was shown that HBHA causes cytoskeleton reorganization, by a mechanism that has not yet been elucidated. Previous single-molecule AFM studies have shown that HBHA is able to bind actin, although the nature of this interaction remains unknown. Given the medical relevance of bacterial binding to actin through HBHA, it was investigated the interaction mode and affinity between the two proteins via Surface Plasmon Resonance (SPR). Actin was immobilized on CM5 BIAcore sensorchip and both binding affinities of recombinant full length HBHA and of its truncated form HBHA Δ C were measured. As a result we observed that HBHA interacts with actin with a calculated $K_d = 19 \pm 5 \mu\text{M}$, whereas HBHA Δ C is not able to bind actin. These data indicate that HBHA interacts with actin through its C-terminal positively charged domain. To corroborate this hypothesis, it carried out a SPR titration experiment, using heparin as a competitor: an increase in heparin concentration produces a strong decrease in R_{Umax} values. This result clearly shows that heparin competes with actin in the binding to HBHA. By electrostatic surface potential analysis of actin, it was identified two clear negatively charged patches. These areas are those involved in the polymerization of G-actin in F-actin.

Based on this observation, it could propose that HBHA interferes with cytoskeleton formation by inhibiting actin polymerization.

The Resuscitation promoting factor Interacting Protein (RipA), an essential protein for bacterial growth, has been another topic in this PhD thesis. Together with the Resuscitation Promoting Factors RpfB, RipA has been proposed to degrade the peptidoglycan layer shared by two daughter bacterial cells. Recently, it was shown that depletion of *ripA* resulted in long chains of cells. This phenotype was reversed upon induction of *ripA*, indicating that cell wall expansion and septum formation can be decoupled from the process of septum resolution. Since RipA is a fundamental growth factor for *M. tuberculosis*, this makes this protein an excellent candidate as a drug target against Tuberculosis.

In RipA sequence, four distinct regions can be identified: a signal peptide at its N-terminal, two domains of unknown function denoted in PFAM-B as PB07342 and PB015164, which are mainly distributed in mycobacteria, and a predicted catalytic domain of the NlpC/P60 family at its C-terminus. Based on sequence analysis, three constructs were cloned and expressed: RipA deprived of its signal peptide (RipA₄₀₋₄₇₂), a shorter construct containing both the PB015164 and the catalytic domains (RipA₂₆₃₋₄₇₂) and the sole C-terminal catalytic domain (RipA₃₃₂₋₄₇₂). RipA catalytic domain contains a core of about 70 amino-acid residues (residues 385-445) which shares a sequence identity of about 35% with cysteine proteases of the NlpC/P60 family. The PB010495 is instead both of unknown structure and function.

All recombinant proteins were found to be monomeric in solution, as evidenced by size exclusion chromatographies results (or profiles).

Crystallization trials of all three recombinant protein were performed at 293 K using the hanging-drop vapour-diffusion method. Preliminary crystallization conditions were carried out using commercially available sparse-matrix kits. Optimization of the crystallization conditions was performed by fine-tuning the protein and precipitant concentrations. The initial screenings revealed several promising conditions for crystallization of RipA₂₆₃₋₄₇₂. All favorable conditions were characterized by the presence of PEG4000 as precipitating agent. The quality of the crystals was improved by fine-tuning the concentration of the protein and of the precipitants. RipA₂₆₃₋₄₇₂ crystals suitable for X-ray diffraction data collection were obtained using 5–10 mg mL⁻¹ protein solution and 8% (v/v) 2-Propanol, 16% (w/v) PEG4000 in 60 mM Sodium citrate trihydrate buffer, pH 5.6. Diffraction data were recorded to 0.95 Å resolution. Manual model-building sessions aimed at defining the complete RipA₂₆₃₋₄₇₂ structure are in progress.

Finally, in this work it's reported the first characterization of CspA from *M. tuberculosis*. CspAs are a family of cold shock genes coding for proteins that function as transcription antiterminators or translational enhancers at low temperature by destabilizing RNA and DNA secondary structure, which is thought to affect the efficiencies of mRNA translation, transcription and DNA replication. For example, CspA may facilitate translation by acting as an RNA chaperone to block the formation of secondary structures in mRNAs. The response of prokaryotes to low temperature stress has been extensively studied in *E. coli* and is characterized by the accumulation of cold shock proteins. Bacterial CSPs are small proteins that consist of a single nucleic acid-binding domain, which is termed the cold shock domain. In this PhD thesis the cloning, expression and purification of CspA from *M. tuberculosis* are described. CspA exhibits an unusual far UV-CD spectrum for a predominantly β -sheet protein, but this could be attributed to the aromatic chromophores, that could mask the peptide backbone optical activity typically seen for β -sheet proteins. However, this spectra is quite similar to CspA from *E. coli*, with which the protein is homologue. So 1D-NMR and 2D-NMR spectra were recorded that show low level in secondary structure. To corroborate the hypothesis that the few secondary elements in CspA structure could be enough to get activity at the protein, it was carried out electrophoretic mobility shift assay between ssDNA and CspA. As observed, CspA is able to bind ssDNA, proving that the protein is functionally active.

All the results obtained and reported in this PhD thesis could represent an important start point for the design of new anti-tubercular drugs able to block mycobacterium growth.

Capitolo I

Introduzione

1.1 La Tuberculosis

La Tuberculosis (TB) è una malattia contagiosa, causata dal *Mycobacterium tuberculosis*. Essa colpisce circa un terzo della popolazione mondiale, causando nel mondo la morte di circa due milioni di persone ogni anno (Fig.1.1-1). E' infatti, dopo l'HIV, la seconda causa di morte nel mondo per malattie infettive.

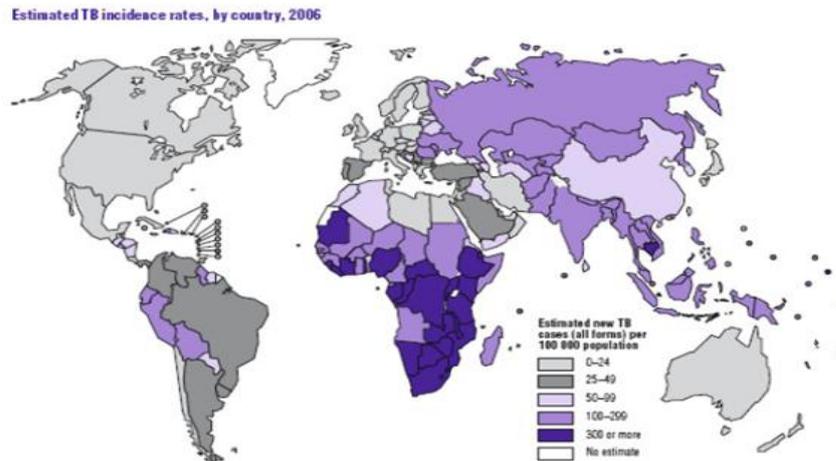


Figura 1.1-1 Stima dell'incidenza della TB nel 2006, dati diffusi dall'OMS.

Nonostante sia una malattia prevenibile e nella maggioranza dei casi curabile, la TB costituisce oggi una delle emergenze sanitarie più drammatiche, tanto da essere stata dichiarata nel 1993 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) “un'emergenza globale” per l'enorme carico sanitario, economico e sociale che l'accompagna. La TB infatti è una malattia fortemente associata a scarse condizioni igienico-sanitarie, malnutrizione e un cattivo stato di salute degli individui. Ecco perché il maggior numero di casi di TB si riscontra nei paesi in via di sviluppo e in particolare nelle aree dove è molto diffusa l'HIV. Per cercare di ridurre l'incidenza della malattia nel mondo è nata nel 2000 l'alleanza “Stop TB”, un *network* di circa 400 associazioni internazionali pubbliche e private coordinate dall'OMS, che ha lanciato due piani globali per fermare il continuo diffondersi della malattia (il piano 2001-2005 e quello tuttora in corso 2006-2015) (Raviglione M. C.,2007). L'obiettivo è quello, da una parte, di mettere a punto nuovi *test* diagnostici sempre più rapidi ed accurati, dall'altra quella di studiare più approfonditamente il *Mycobacterium tuberculosis* per la progettazione di nuovi vaccini e farmaci. La TB infatti è ancora trattata con strumenti di vecchia concezione, e con farmaci messi in commercio oltre trent'anni fa. Attualmente esistono solo

cinque antibiotici comunemente utilizzati nella terapia anti-TB: la rifampicina, l'isoniazide, l'etanbutolo, la streptomina e la pirazinamide (farmaci di prima linea). Esiste poi un'altra classe di medicinali, detti di seconda linea, usati nel caso di antibiotico-resistenza. Questi però, oltre ad essere più costosi, presentano anche maggiori effetti collaterali.

Uno dei grandi problemi associati alla TB è lo sviluppo di ceppi resistenti ai farmaci. Sono ceppi batterici che vengono classificati sotto l'unico nome di MDR-TB (*Multidrug resistant TB*), e sono quelli che mostrano nella maggioranza dei casi resistenza all'isoniazide alla rifampicina. Secondo i dati riportati dall'OMS, la MDR-TB è oramai presente in tutte le aree del pianeta. In alcuni casi, la MDR-TB si è trasformata in ceppi "*extensively drug resistant*" (XDR-TB), che causano una forma di TB resistente a tutti i fluorochinoni e ad alcuni farmaci di seconda classe, principalmente capreomicina, kanamicina, e amicacina. Recentemente l'OMS ha pubblicato che i casi di MDR-TB sono in costante aumento, mentre i ceppi XDR-TB sono presenti ormai in ben 45 paesi! Lo sviluppo dei ceppi antibiotico-resistenti avverrebbe in quei pazienti che già in passato hanno, per ragioni diverse, utilizzato gli antibiotici anti-TB o in quelli che non seguono correttamente la posologia indicata dal medico, ovvero in quei pazienti che non prendono i farmaci regolarmente come loro prescritto. Dal 1921 è disponibile anche un vaccino anti-TB, il BCG (*Bacillus of Calmette and Guèrin*, dal nome dei suoi due scopritori francesi), uno *strain* non patogeno del *Mycobacterium bovis*, il responsabile della TB bovina. In generale il *Mycobacterium bovis* è in grado di infettare l'uomo e di procurare una malattia del tutto simile per sintomi e virulenza alla TB umana. Per questo il BCG è sembrato da subito uno strumento utile ed adeguato alla vaccinazione umana. Ad oggi, circa l'80% della popolazione mondiale è vaccinato con il bacillo BCG ma dato l'elevato tasso di mortalità che la malattia ancora presenta è evidente che il vaccino non sia del tutto efficace. È stato stimato infatti che nei soggetti adulti l'efficacia protettiva del vaccino vari dallo zero all'80%, mentre nei bambini il valore si attesta intorno al 50%. Tale valore non si modifica se in età adolescente gli stessi soggetti sono sottoposti ad una seconda vaccinazione (MacShane H., 2009). Nonostante ciò la vaccinazione con BCG è ancora raccomandata in molti paesi (Rahman R.J. et al,2009). Inoltre è da sottolineare che lo stesso bacillo BCG presenta una serie di aspetti negativi, uno tra tutti quello di interferire con il test della tubercolina (Vordermeier H.M. et al,2004). Attualmente molti laboratori stanno lavorando per cercare di produrre un vaccino efficace nella prevenzione della malattia, ma ancora oggi il solo vaccino approvato resta il *bacillus* BCG. Il problema della formulazione di nuovi vaccini è infatti connesso alla considerevole variabilità della risposta immunitaria dei soggetti esposti al micobatterio. Basti pensare che solo il 30%

di essi viene realmente infettato e che l'80-90% di tali individui è capace di contenere l'infezione iniziale e confinare il micobatterio in uno stato di latenza. I soggetti che presentano tubercolosi latente (LTBI) sono costantemente a rischio di riattivazione del bacillo. È ciò che avviene quando ad esempio si ha un improvviso indebolimento del sistema immunitario o alla concomitanza di altre malattie, una tra tutte l'HIV. Il restante 10-20% invece sviluppa la malattia vera e propria (Bhatt K et al, 2007).

1.2 Il *Mycobacterium tuberculosis*

Il *Mycobacterium tuberculosis* (noto anche come bacillo di Koch, dal nome dello scienziato che nel 1882 isolò per la prima volta il batterio) è un bacillo aerobio obbligato, immobile e asporigeno, delle dimensioni di 0.2-0.6 x 1-10 μm (Figura 1.2-1).

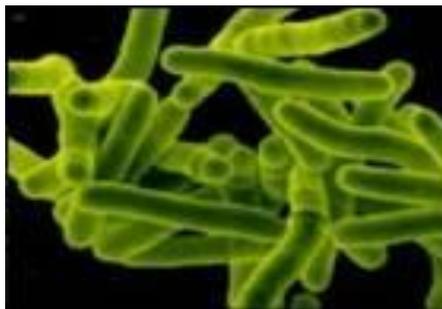


Figura 1.2-1. Immagine del *Mycobacterium tuberculosis* ottenuta mediante microscopia elettronica

Presenta un lento ciclo cellulare che lo porta a duplicarsi in circa 24-36 ore e un genoma ricco di guanine e citosine che costituiscono ben il 70% del suo DNA. Viene comunemente considerato un batterio Gram-positivo nonostante un sottile strato di peptidoglicano e una scarsa colorazione al test di Gram. È invece un batterio alcol-acido resistente, poiché trattiene particolari coloranti anche quando è trattato con detergenti acidi o alcolici. Infatti, uno dei metodi per l'identificazione dei micobatteri si basa proprio su questo fenomeno ed è noto come colorazione Ziehl-Neelsen (Gordon C. et al, 2009). E' inoltre un batterio molto resistente agli agenti chimici e fisici, con una moderata resistenza al calore e all'essiccamento. Ma la vera peculiarità del *M. tuberculosis* è la composizione della sua parete cellulare che risulta spessa e con una struttura del tutto insolita. Essa presenta uno strato relativamente sottile di

peptidoglicano legato ad una serie di molecole quali (nell'ordine) arabino-galattani, acidi micolici e glicolipidi fenolici (Figura 1.2-2).

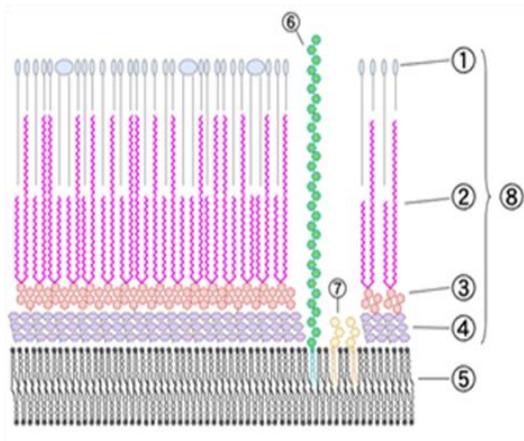


Figura 1.2-2 Struttura della parete cellulare.

- 1) Glicolipidi fenolici;
- 2) Acidi micolici;
- 3) Arabinogalattani;
- 4) Peptidoglicano;
- 5) Membrana cellulare;
- 6) Lipido arabinomannani;
- 7) Fosfatidil inositolo mannoside;
- 8) Scheletro della parete cellulare

La struttura della parete si mostra quindi a strati: il peptidoglicano è legato agli arabinogalattani, a loro volta ancorati agli acidi micolici a formare un complesso chiamato MAPc (acronimo di *mycolic acid-arabinogalactan-peptidoglycan complex*). Segue un involucro composto da un'ampia varietà di molecole come lipidi, glicani, peptidi e proteine, che però non sono legati covalentemente alla parete cellulare (Crick D.C. et al, 2001). È così che i lipidi rappresentano il 60% del peso secco della parete cellulare (30% del peso secco del batterio), mentre le proteine ne costituiscono il 15%. Esse sono comunque una parte importante della parete in quanto presentano una potente attività antigenica. La complessità della parete chiarisce e giustifica tutte le caratteristiche del micobatterio, come la resistenza a fattori ambientali (essiccamento), l'alcol-acido resistenza, l'elevato tempo di replicazione, le caratteristiche di crescita in vitro (colonie visibili solo dopo 40 giorni), la particolare antigenicità e la resistenza a molti antibiotici, causata dall'elevato grado di impermeabilità della parete.

L'infezione da *Mycobacterium tuberculosis* avviene principalmente per via aerea, attraverso l'esposizione del bacillo presente nelle goccioline di segreto bronchiale di un soggetto infetto. (Più rara è invece la trasmissione cosiddetta cutaneo-mucosa, che avviene per contatto diretto di materiale infetto con lesioni cutanee). I bacilli infetti, dunque, sono inalati come nuclei di goccioline presenti nell'atmosfera. Si stima che ogni nucleo sia composto da goccioline contenenti circa 3 bacilli e che basti anche un solo bacillo a scatenare l'infezione. Attraverso le vie respiratorie, dunque, i batteri raggiungono i polmoni, dove saranno fagocitati dai macrofagi alveolari (tubercolosi polmonare) (Figura 1.2-3).

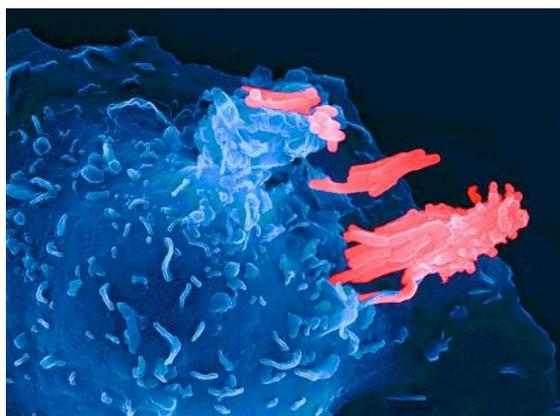


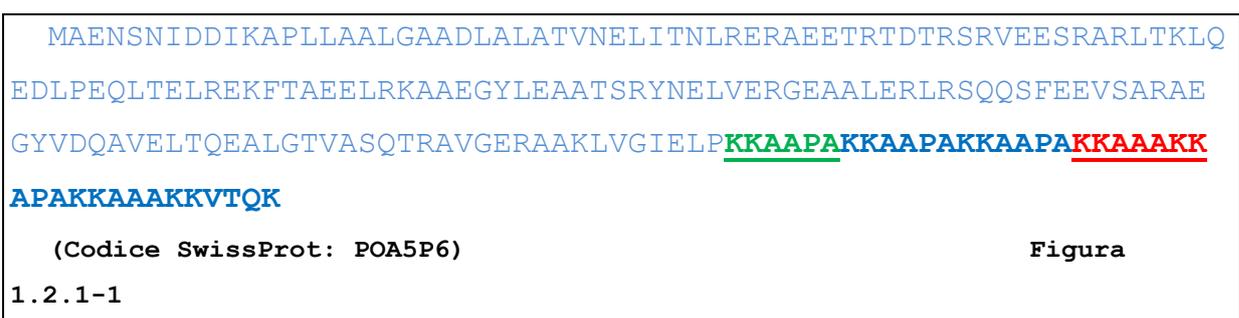
Figura 1.2-3. Un macrofago (in blu) ingloba Micobatteri della tubercolosi (in rosa)

L'ingresso dei batteri induce una risposta pro-infiammatoria localizzata che porta al reclutamento di cellule mononucleari dai vicini vasi sanguigni. Tali macrofagi saranno circondati da altri macrofagi, da fagociti mononucleari e da un rivestimento di leucociti in associazione ad un manto fibroso costituito da collagene e da altri componenti della matrice extracellulare. Si genera così una struttura granulosa detta tubercolo. Quella che si scatena è una vera e propria cascata di eventi: i macrofagi infetti stimolano la produzione di chemochine e del fattore $TNF-\alpha$ che guidano a loro volta il reclutamento delle cellule neutrofile, cellule NKT, linfociti T $CD4+$ e $CD8+$, ognuna delle quali a sua volta induce la produzione di citochine e interferone $IFN-\gamma$. Tutto ciò determina la formazione di un granuloma stabile, all'interno del quale il batterio resta vitale in uno stato di quiescenza (Russell D.G.,2007). È l'inizio della fase di latenza (LTBI). La funzione del granuloma è quindi quella di segregare l'infezione per evitare che essa diffonda dai polmoni ad altri organi concentrando in un unico sito la risposta immunitaria. Esso permane nell'organismo infetto probabilmente grazie ad una stimolazione cronica del sistema immunitario, che tuttavia contiene ma non elimina l'infezione. Bacilli vivi infatti sono stati isolati da pazienti con LTBI, indicando chiaramente che essi possono sopravvivere all'interno del tubercolo anche per molti anni. Comunque quello che sembra certo è che la continua stimolazione della produzione di citochine da parte delle cellule T sia fondamentale: i soggetti affetti da HIV infatti, mancando di cellule T $CD4+$ attive, sono fortemente a rischio TB in quanto incapaci di produrre sufficienti quantità di $IFN-\gamma$. L'espressione di $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$ è infatti fondamentale per l'attivazione dei macrofagi e per la formazione e il mantenimento del tubercolo (Flynn J.L. et al,2001).

Esiste tuttavia un secondo meccanismo di infezione batterica che va sotto il nome di tubercolosi extrapolmonare. Si tratta di una modalità di infezione che prevede l'interazione diretta del batterio alle cellule epiteliali e riguarda anche altri organi, come fegato, intestino e reni. La TB extrapolmonare sembra avere un ruolo importante anche nel fenomeno di riattivazione del batterio dallo stato di latenza: infatti è stato osservato che la riattivazione della malattia coinvolge aree dei polmoni non interessate dalla presenza dei granulomi. È stato comunque dimostrato *in vitro* che il *Mycobacterium tuberculosis* è capace di invadere e crescere all'interno delle cellule epiteliali, mentre *in vivo* è presente nelle cellule alveolari di tipo II (cellule epiteliali polmonari) (Bermudez L.E. et al, 1996).

1.2.1 Heparin Binding Haemagglutinin Adhesin (HBHA)

Il meccanismo alla base dell'infezione extrapolmonare del *M. tuberculosis* coinvolge direttamente una particolare proteina nota come *Heparin Binding Haemagglutinin Adhesin* (HBHA) (Pethe K. et al, 2001). Il suo nome deriva dal fatto che essa promuove *in vitro* l'agglutinazione degli eritrociti di coniglio e induce l'aggregazione dei micobatteri in colonie mediante l'interazione batterio-batterio (Menozzi F.d. et al, 1996). Si tratta di una proteina di membrana di 199 aa, responsabile del legame del batterio ai gruppi solfati dei glicosamminoglicani dell'eparina delle cellule epiteliali umane.



Il legame di HBHA a tali gruppi avviene mediante il dominio C-terminale della proteina (aa 160-199, in grassetto in Fig. 1.2.1-1) carico positivamente e caratterizzato da una particolare sequenza amminoacidica, in cui si ripetono due sequenze: KKAAPA (che si ripete tre volte, ed è mostrata in verde in figura) e KKAAAKK (che si ripete due volte intervallata dalla sequenza APA, ed è mostrata in rosso in figura). Una rimozione progressiva di tali ripetizioni in proteine ricombinanti espresse in *E.coli* ha mostrato, attraverso esperimenti di

Surface Plasmon Resonance, un progressivo decremento nella costante di *binding* delle rHBHA. Contestualmente è stato dimostrato che una forma tronca della proteina priva del dominio C-terminale (rHBHAΔC) è incapace di interagire con l'eparina (Pethe K. et al, 2000).

HBHA presenta anche due modifiche post-traduzionali estremamente importanti: la glicosilazione e la metilazione.

La glicosilazione è una caratteristica non molto comune nelle proteine di membrana batteriche, tuttavia è già stata osservata in particolari fattori di virulenza di altre specie batteriche, come ad esempio nelle proteine dei pili di *Neisseria gonorrhoeae*. In HBHA la porzione glicidica rappresenta circa il 2,8 % dell'intera massa della proteina nativa, ed è composta prevalentemente da glucosio, xilosio, mannosio, arabinosio e galattosio. Nonostante sia ben nota la composizione in zuccheri della regione oligosaccaridica della proteina, ancora oggi non è nota l'architettura e i legami con cui tali zuccheri sono uniti tra loro. È stato ipotizzato che la glicosilazione possa essere coinvolta nel meccanismo di secrezione di HBHA: essa infatti, pur essendo una proteina di membrana, non presenta alcun peptide segnale e di fatto è traslocata sulla membrana attraverso un meccanismo di secrezione alternativo ancora sconosciuto. La glicosilazione sembra avere anche un ruolo molto importante nel proteggere HBHA dall'attacco delle serin proteasi. Per questo motivo si suppone che la porzione oligosaccaridica sia collocata sul dominio C-terminale, il più suscettibile alla degradazione proteolitica perché ricco di lisine (Menozzi F. et al, 1998).

La metilazione è la seconda modifica post-traduzionale che caratterizza HBHA e riguarda le lisine del dominio C-terminale, che nella proteina nativa sono mono e di metilate. Insieme alla glicosilazione, anche la metilazione svolge un ruolo importante nella protezione del dominio C-terminale dall'attacco delle proteasi.

È stato mostrato che specifici anticorpi sono in grado di riconoscere HBHA ma non la proteina ricombinante rHBHA espressa in *E.coli*, suggerendo la possibilità che le modifiche post-traduzionali facciano parte dell'epitopo riconosciuto da tali anticorpi. In particolare è stato osservato che metilando enzimaticamente la proteina ricombinante rHBHA, alcuni anticorpi sono ugualmente in grado di riconoscere la proteina (Pethe K. et al 2002). Ciò proverebbe che la metilazione conferisce importanti proprietà immunogeniche alla proteina. Per questo motivo sono stati condotti diversi studi immunologici su HBHA. È stato ad esempio osservato che la proteina reagisce debolmente con le IgG del siero dei pazienti affetti da TB, mentre reagisce molto fortemente con le IgM, che sono quelle espresse durante le prime fasi di infezione del batterio (Shin A. R. et al, 2006). Ciò suggerisce che HBHA possa

avere un ruolo importante nell'indurre la produzione di anticorpi nella prima fase di infezione e che tali anticorpi siano quelli in grado di arginare l'infezione. Inoltre, analisi condotte sul siero di topi vaccinati con HBHA e poi infettati, mostrano un livello di protezione paragonabile a quello ottenuto usando il bacillo BCG (Locht C. et al 2006). Questi aspetti sono molto importanti perché gettano le basi per la messa a punto di nuovi *test* diagnostici della TB, sia attiva che latente.

Infine, recentemente è stato osservato che HBHA è in grado di interagire con l'actina e di indurre una riorganizzazione del citoscheletro, favorendo la diffusione del batterio nelle cellule epiteliali (Menozzi F.D. et al,2006).

1.2.2 Rpf-interacting protein A (RipA)

È evidente che l'esistenza di una fase di latenza (che può durare anche anni) costituisca uno dei principali problemi nel controllo della TB. Come accennato precedentemente, la maggior parte degli individui infetti presentano tubercolosi latente, e ciò determina un rischio altissimo di contagio in tutte le aree del pianeta. Negli ultimi dieci anni, ad esempio, i casi di TB in Europa sono cresciuti del 5% (dati OMS), anche a causa dell'aumento del numero di immigrati provenienti dai paesi più poveri e maggiormente colpiti dalla malattia. Inoltre si deve sempre tener conto che tutti i dati sull'incidenza della Tubercolosi riportati si riferiscono solo ai casi accertati. L'esistenza di LTBI implica di per sé un'oggettiva difficoltà nel monitorare completamente la diffusione della malattia.

I meccanismi molecolari alla base del risveglio del batterio dalla fase di latenza sono rimasti a lungo sconosciuti. Solo negli ultimi anni è stato dimostrato che durante la fase di quiescenza, lo strato di peptidoglicano (PG) risulta ispessito per la presenza di un elevato numero di legami peptidici crociati, che ostacolano la fase di divisione cellulare.

MTB possiede cinque geni che codificano altrettante proteine coinvolte direttamente nella riattivazione batterica dalla fase di latenza ad una fase metabolicamente attiva. Si tratta delle *Resuscitation promoting factor* (Rpfs, RpfA-E) proteine classificate come peptidoglicano glicosidasi, in quanto il loro dominio C-terminale è simile a quello del lisozima e perchè esse promuovono il risveglio di colture batteriche quiescenti, attraverso una parziale idrolisi della parete cellulare del micobatterio (Mukamolova G.V. et al, 2002). Delle cinque proteine di questa famiglia la più importante sembra essere la RpfB, l'unica proteina indispensabile per

riattivare la crescita batterica. Oggi è disponibile la struttura cristallografica della proteina Δ_{DUF} RpfB, e grazie ad essa è stato possibile osservare che, per forma e dimensioni la struttura di RpfB è compatibile con il modello della parete cellulare batterica, suggerendo che il PG possa essere il naturale substrato della proteina (Ruggiero A. et al, 2008). Solo recentemente è stata identificata una proteina *partner* di RpfB, nota appunto come *Rpf-interacting protein A* (RipA). Esperimenti di microscopia di fluorescenza hanno dimostrato che entrambe le proteine sono collocate lungo il setto mitotico della cellula batterica (Hett et al., 2007). Inoltre è stato osservato che mutanti di delezione del gene *ripA* mostrano un fenotipo anormale, in cui le cellule batteriche sono particolarmente allungate e incapaci di dividersi (Hett et al., 2008) (Figura 1.2.2-1).

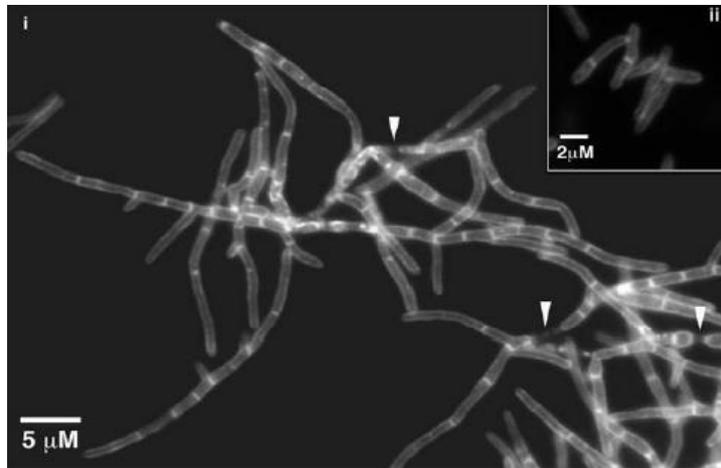


Figura 1.2.2-1. Micrografia di ceppi cellulari del fenotipo wildtype (ii) e di mutanti di delezione del gene *RipA* (i);

Pertanto è stato ipotizzato che la proteina RpfB agisca idrolizzando i legami glicidici, mentre la proteina RipA degrada i legami peptidici crociati del PG.

1.2.3 Cold Shock protein A (CspA)

Le proteine appartenenti alla famiglia delle Rpf(A-E) sono tutte considerate fattori di crescita per il *Mycobacterium tuberculosis*, in quanto esse promuovono il passaggio da una fase metabolicamente poco intensa (detta quiescenza o latenza) ad uno stato attivo della crescita batterica. Studi di *microarray* condotti su singoli mutanti di delezione dei cinque geni mostrano differenti profili di espressione genica. In particolare è stato osservato che i mutanti $\Delta rpfB$, $\Delta rpfD$ e $\Delta rpfE$ presentano una sovraespressione del gene *cspA*, che codifica una *hypothetical cold shock protein* (Downing K.J et al. 2004). Le *cold shock protein* sono una famiglia di proteine (ben rappresentata sia nei procarioti che negli eucarioti), sovraespresse quando si viene a verificare un abbassamento della temperatura ambientale. Esse agiscono come veri e propri *chaperon* di acidi nucleici, in quanto legano l'mRNA e il ssDNA evitando la formazione di strutture secondarie che possano interferire con i processi di duplicazione, trascrizione e traduzione (Yamanaka K., et al 1998). In *E.coli*, ad esempio, si conoscono ben nove geni *csp* (*cspA-I*), corrispondenti ad altrettante proteine le cui funzioni sono simili tra loro. In particolare, le proteine CspA e CspB, note anche come *major cold shock protein*, sono le proteine principali di questo *set* di geni: mutanti di delezione del gene *cspA*, ad esempio, porta una sovra-espressione del gene *cspB*.

Le proteine *Csp-like* sono circa cinquanta e presentano tutte una sequenza di circa settanta amminoacidi. La loro struttura è caratterizzata da un β *barrel* formato da 5 β *strand*, sulla cui superficie si affacciano nove residui aromatici responsabili dell'interazione con gli acidi nucleici e conservati nelle sequenze delle proteine omologhe (Max K et al,2007). È stato inoltre osservato che queste proteine legano preferibilmente le basi timina e citosina. Il *Mycobacterium tuberculosis* possiede solo due geni *csp* (*cspA* e *cspB*) che codificano proteine classificate come *hypothetical cold shock protein*. In particolare, la proteina CspA è stata isolata per la prima volta, mediante tecniche di proteomica funzionale, da un estratto proteico totale del micobatterio, ma non è mai stata caratterizzata (Weldingh K., et al, 2000).

1.3 Obiettivo del progetto di ricerca

Nonostante la tubercolosi sia una malattia conosciuta oramai da alcuni secoli, ancora oggi essa rappresenta una delle principali cause di morte per malattie infettive. Sebbene essa colpisca principalmente le aree più disagiate del pianeta (dove la povertà e le scarse condizioni igienico-sanitarie fanno da terreno fertile al diffondersi della malattia) la TB oramai si riaffaccia anche nei paesi cosiddetti industrializzati e rappresenta, oggi più che mai, una vera e propria “emergenza globale” (OMS). La difficoltà nella diagnosi della LTBI, unita all’esistenza di ceppi MDR e XDR e allo scarso numero di farmaci anti-TB, richiedono un grosso sforzo da parte della comunità scientifica nel ricercare nuovi e più specifici antibiotici e vaccini. Per questo motivo diventa fondamentale la conoscenza dei meccanismi che sono alla base della patogenicità del *M. tuberculosis*.

In questo contesto si colloca il mio progetto di dottorato, volto allo studio di sistemi proteici riconosciuti come fattori di virulenza del *M. tuberculosis*. In particolare, il seguente studio ha previsto la caratterizzazione biochimica e biofisica di tre proteine:

1. HBHA, unico fattore di virulenza associato alla TB extra-polmonare;
2. RipA, un importante e nuovo fattore di crescita del micobatterio;
3. CspA, una *cold shock* batterica identificata ma mai caratterizzata.

In particolare, lo studio di HBHA ha riguardato principalmente l’analisi dello stato oligomerico della proteina, coadiuvato da analisi spettroscopiche e bioinformatiche; ha previsto l’analisi della sua struttura in soluzione mediante tecniche di *Small Angle X-ray Scattering* (SAXS), indagini calorimetriche attraverso misure di calorimetria differenziale a scansione (DSC) e studi di *binding* con l’actina attraverso esperimenti di *Surface Plasmon Resonance*.

La caratterizzazione di RipA, invece, ha previsto il clonaggio, l’espressione e la purificazione di tre diversi costrutti della proteina con il fine di risolverne la struttura cristallografica.

Inoltre, è stato realizzato il clonaggio, l’espressione e la purificazione della proteina CspA. In particolare, sono stati condotti studi strutturali preliminari attraverso analisi NMR monodimensionale e analisi spettroscopiche (dicroismo circolare). Infine, è stata valutata

l'affinità di legame della proteina al ssDNA mediante esperimenti di ritardo elettroforetico (EMSA).

La caratterizzazione di queste tre proteine, coinvolte direttamente o indirettamente nei meccanismi di patogenicità batterica può gettare le basi per la progettazione e il *design* di nuovi farmaci anti-tubercolosi.

CAPITOLO II

Risultati

2.1 Analisi strutturale e funzionale del *Heparin Binding Haemagglutinin Adhesin* (HBHA)

2.1.1 Clonaggio ed espressione della proteina HBHA e di tre sue forme tronche HBHA Δ C e HBHA₁₀₋₁₆₀ e HBHA₂₅₋₁₆₀

I geni codificanti la proteina HBHA e le sue forme tronche HBHA Δ C (priva del dominio C-terminale, aa 1-160), HBHA₁₀₋₁₆₀ (aa 10-160) e HBHA₂₅₋₁₆₀ (priva della regione N-terminale, aa 25-160) sono stati amplificati dal genoma del *M. tuberculosis* (ceppo H37Rv) e inseriti in due distinti vettori di espressione, mediante reazione di ligasi. In particolare, il gene *hbha* è stato clonato nel vettore pET28a(+), in modo che non fosse introdotta alcuna sequenza di fusione. I geni *hbha* Δ c, *hbha*₁₀₋₁₆₀ e *hbha*₂₅₋₁₆₀, invece, sono stati inseriti nel vettore di espressione pETM11.

Ciascun vettore ricombinante, dopo il controllo della sequenza, è stato introdotto nel ceppo batterico *E.coli* BL21(DE3). Sono state saggiate diverse condizioni di espressione per le quattro proteine, variando i tempi e la temperatura di induzione ed in presenza di concentrazioni diverse di induttore.

Le condizioni di espressione utilizzate hanno portato a soddisfacenti livelli di espressione per tutte le proteine ricombinanti, ad eccezione del costrutto His₆-HBHA₂₅₋₁₆₀, per il quale comunque sono risultate le migliori (Figura 2.1.1-1). In particolare, ciascuna crescita è stata condotta a 37°C, utilizzando una quantità di induttore (IPTG) alla concentrazione finale di 1mM, per un tempo di induzione di circa 5h.

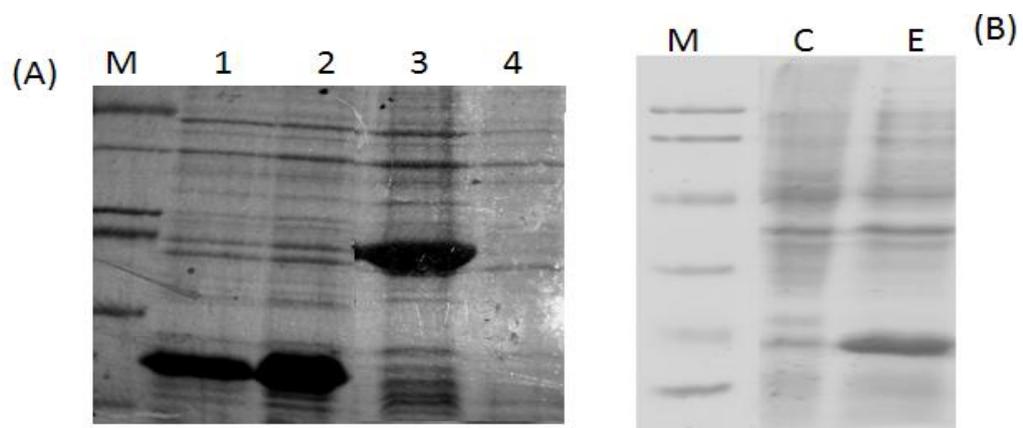


Figura 2.1.1-1. Livelli di espressione in *E.coli* BL21(DE3). In A: M) marcatore di peso molecolare; 1) His₆-HBHA₁₀₋₁₆₀ 2) HBHA Δ C 3) HBHA 4) controllo, non indotto; **In B:** M) marcatore di peso molecolare C) controllo, non indotto E) His₆-HBHA₂₅₋₁₆₀.

2.1.2 Purificazione di HBHA e delle forme tronche HBHA Δ C, HBHA₁₀₋₁₆₀ e HBHA₂₅₋₁₆₀

La purificazione di HBHA è stata eseguita utilizzando una cromatografia di affinità con colonnine del tipo Hi-trap. In particolare è stata scelta una colonnina funzionalizzata con eparina, in quanto la funzione di HBHA è quella di legare proprio questa macromolecola attraverso il suo dominio C-terminale carico positivamente (Pethe K et al, 2000). La purificazione ha quindi previsto l'incubazione dell'estratto proteico solubile, delle cellule *E.coli* BL21(DE3) ricombinanti per HBHA, su colonna di eparina. In questa fase, solo le proteine che presentano affinità per l'eparina interagiscono con essa, mentre le altre attraversano semplicemente la colonnina senza legarsi. Dopo una serie di lavaggi con un tampone a bassa forza ionica, necessario per allontanare legami aspecifici di altre proteine, HBHA è stata eluita con un gradiente salino. Un'elevata concentrazione salina del tampone di purificazione è infatti in grado di interferire con il legame HBHA-eparina (Fig.2.1.2-1). La proteina eluita dalla colonna è stata poi concentrata e caricata su una colonna per cromatografia ad esclusione molecolare, per rimuovere eventuali aggregati e contaminanti proteici di diverso peso molecolare (Fig.2.1.2-2). La resa per la produzione ricombinante di HBHA è stata di circa 17 mg/L.

Per le proteine His₆-HBHA Δ C, HBHA₁₀₋₁₆₀ e His₆-HBHA₂₅₋₁₆₀ è stato utilizzato un altro tipo di cromatografia di affinità, quella che sfrutta la presenza della coda di sei istidine posta all'N-terminale delle sequenze proteiche. In questo caso, sono state utilizzate per la purificazione colonne del tipo NiNTA, ovvero colonnine funzionalizzate con ioni Ni²⁺ in grado di interagire con gli anelli imidazolici delle istidine presenti. Quindi, ciascun lisato proteico solubile e ricombinante per le proteine His₆-HBHA Δ C, HBHA₁₀₋₁₆₀ e His₆-HBHA₂₅₋₁₆₀ è stato caricato sulla rispettiva colonnina, lavato con un tampone contenente una bassa concentrazione di imidazolo (molecola competitore del legame tra gli ioni Ni²⁺ e la coda di istidine) per rimuovere le proteine legate aspecificamente alla resina, ed infine ciascuna proteina è stata eluita con un opportuno tampone contenente un'elevata concentrazione di imidazolo (in Fig. 2.1.2-3 è mostrato a titolo di esempio la purificazione della His₆-HBHA Δ C). Quindi si è proceduto con una seconda fase della purificazione, che prevede l'idrolisi della coda di istidine mediante idrolisi con la proteasi TEV.

Infine, ciascuna proteina è stata ulteriormente purificata su cromatografia ad esclusione molecolare, per ottenere proteine in forma pura ed omogenea (in Fig. 2.1.2-4 il risultato della cromatografia ad esclusione molecolare per HBHA Δ C). Ciascuna proteina è stata ottenuta con

rese finali soddisfacenti (per entrambe, circa 12 mg/L), ad eccezione della proteina HBHA₂₅₋₁₆₀, per la quale già i livelli di espressione non erano stati particolarmente alti (circa 6 mg/L).

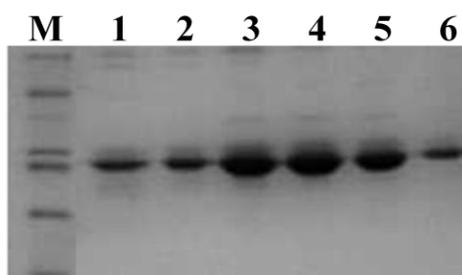


Figura 2.1.2-1 Analisi SDS-PAGE delle frazioni corrispondenti al picco di eluizione di HBHA dopo cromatografia di affinità. M= marcatore di peso molecolare; 1-6 frazioni eluite dalla cromatografia.

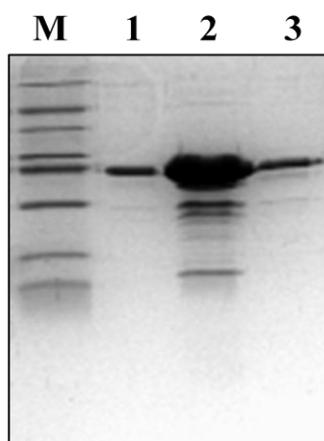


Figura 2.1.2-2. Analisi SDS-PAGE delle frazioni corrispondenti al picco di eluizione di HBHA dopo cromatografia ad esclusione molecolare per la proteina HBHA. M = marcatore di peso molecolare; 1-3 frazioni eluite dalla cromatografia ad esclusione molecolare.

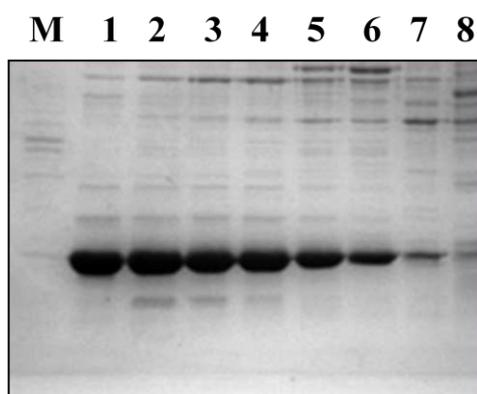


Figura 2.1.2-3. Analisi SDS-PAGE delle frazioni corrispondenti al picco di eluizione della proteina His₆-HBHAΔC dopo cromatografia di affinità. M = marcatore di peso molecolare; 1-8 frazioni corrispondenti all'eluizione della proteina His₆-HBHAΔC.

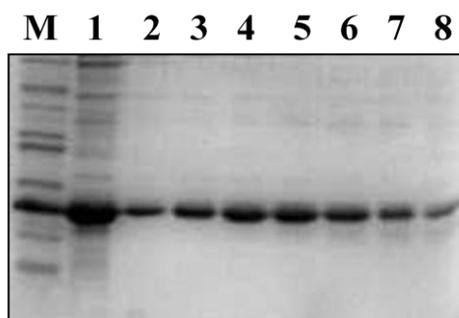


Figura 2.1.2-4 Analisi SDS-PAGE delle frazioni corrispondenti al picco di eluizione della proteina His₆-HBHAΔC dopo cromatografia ad esclusione molecolare. M = marcatore di peso molecolare; 1) campione di HBHAΔC caricato su colonna; 2-8 frazioni di HBHAΔC eluite da cromatografia ad esclusione molecolare.

2.1.3 Analisi dello stato oligomerico

2.1.3.1 Cromatografia ad esclusione molecolare

Per caratterizzare lo stato oligomerico di HBHA sono state condotte cromatografie ad esclusione molecolare sia della proteina HBHA, che della forma tronca HBHAΔC. Comparando i profili di eluizione con quelli di proteine a peso molecolare noto, è stato possibile stabilire, in prima analisi, che sia HBHA che HBHAΔC sono omotetrameri, con un peso molecolare rispettivamente di circa 88 kDa e 66 kDa (Fig. 2.1.3.1-1).

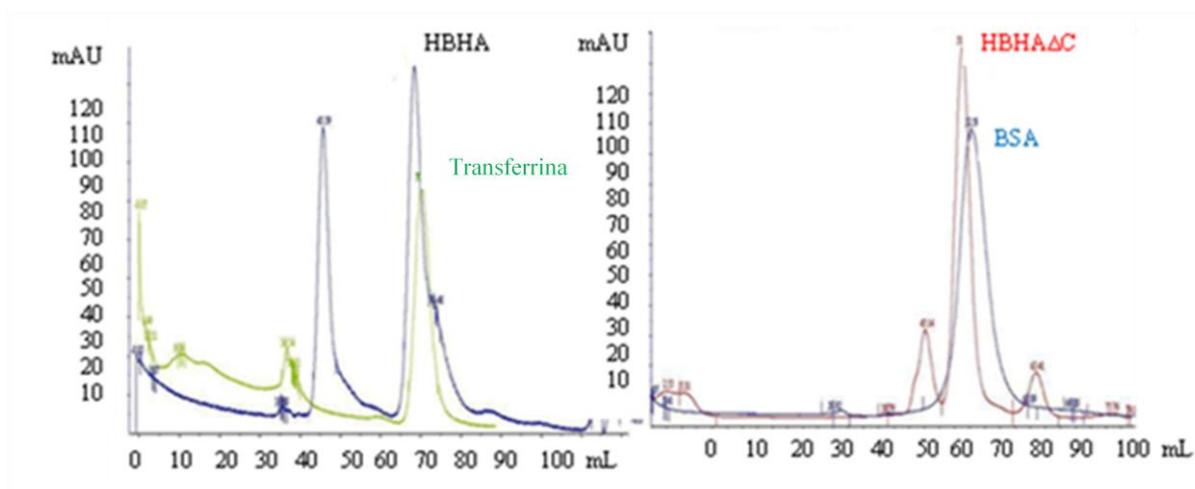


Figura 2.1.3.1-1. Profili cromatografici della proteina HBHA (a sinistra) e della proteina HBHAΔC (a destra), confrontati rispettivamente con quelli della transferrina (81 kDa) e della BSA (66,5 kDa)

2.1.3.2 Esperimenti di *cross-linking*

Sulla proteina HBHA Δ C sono stati condotti esperimenti di *cross-linking*. Questo metodo consente di legare covalentemente due macromolecole vicine nello spazio, attraverso l'uso di un reattivo bifunzionale, che interagisce con i gruppi amminici primari delle molecole in esame. Utilizzando due diversi reattivi (la glutaraldeide e il reattivo BS3) e analizzando su gel SDS-PAGE il risultato della reazione, si ottiene una massa molecolare indicativa di circa 34 kDa, consistente con un dimerico (Fig. 2.1.3.2-1). Tuttavia, in presenza di un largo eccesso di reattivo BS3 si osservano anche tracce di specie tetrameriche (Fig. 2.1.3.2-1B).

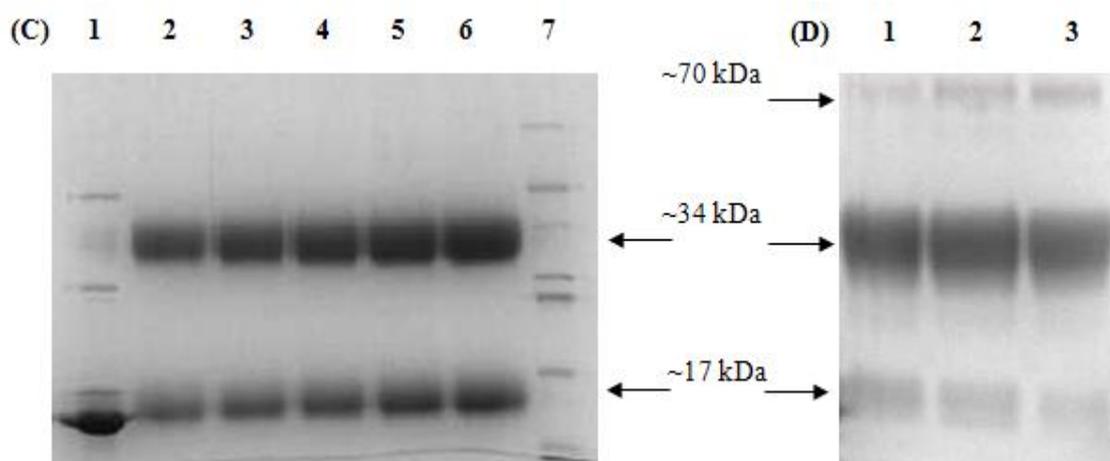


Figura 2.1.3.2-1. Analisi SDS-PAGE degli esperimenti di *cross-linking* condotti con glutaraldeide (A) e BS3 (B): 1) HBHA Δ C controllo; 2-4 quantità crescenti di HBHA Δ C (50, 60, 75, 90 e 100 μ g); 7) M= marcatore di peso molecolare; in B) 1-3, 30 μ g HBHA Δ C e un rapporto proteina/BS3 1:10, 1:20, 1:30.

2.1.3.3 *Static e Dynamic Light Scattering*

Studi di *light scattering* sono stati condotti sulla proteina HBHA Δ C, utilizzando il *software* ASTRA in dotazione allo strumento ed elaborando i dati con lo *Zimm model*, è stato estrapolato un valore di massa molecolare medio di 37630 Da, compatibile con la massa molecolare di un dimerico.

Inoltre, sono state realizzate analisi di *Dynamic Light Scattering* (DLS) per valutare la distribuzione del peso molecolare al variare della concentrazione proteica. In particolare, si è voluto controllare se, all'aumentare della concentrazione proteica si venissero a formare specie a più alto peso molecolare.

Gli esperimenti condotti su campioni di proteina a concentrazione crescente (0,2 mg/mL-2,8 mg/mL) hanno mostrato che la quasi totalità delle macromolecole (corrispondente sempre

a circa il 90% del campione) presenta un raggio idrodinamico (R_h) di 2.7 ± 0.3 nm (Figura 2.1.3.3-1). Quindi, non è stata osservata in nessuna condizione, né una variazione dell'indice di polidispersità del campione, né una variazione del raggio idrodinamico delle molecole. Questo dato indica che il processo di dimerizzazione della proteina non dipende dalla concentrazione e che non esistono altre specie in soluzione.

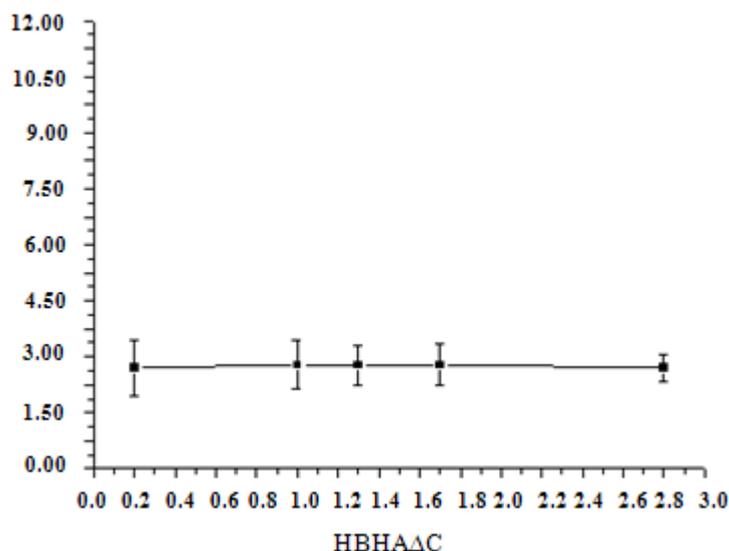


Figura 2.1.3.3-1. Misure di DLS: dipendenza del raggio idrodinamico (R_h) di HBHA Δ C dalla concentrazione proteica

2.1.3.4 Esperimenti di *Small Angle X-Ray Scattering* (SAXS)

Gli studi di SAXS sono stati realizzati in collaborazione con il Dottor Dmitri Svergun presso la beamline X33 del sincrotrone DESY di Amburgo.

Gli esperimenti di SAXS sono stati condotti su diversi campioni di HBHA e di HBHA Δ C, con concentrazioni nell'intervallo 2.0-7.7 mg/mL, utilizzando un tampone 50mM TrisHCl pH8, 150 mM NaCl.

I dati SAXS sono stati analizzati utilizzando il software ATSAS 2.2, messo a punto dal gruppo del Dr. Svergun (Bernardò P. et al, 2007). Una prima analisi di questi ha fornito parametri strutturali della molecola, riportati in Tabella 2.1. Questi parametri, e in particolare il raggio di girazione della molecola (R_g) e la sua dimensione massima (D_{max}) mostrano

inequivocabilmente che la molecola adotta uno stato dimerico (Fig. 2.1.3.4-1). Dal confronto dei parametri ottenuti per HBHA e HBHA Δ C si evince che le due molecole adottano forme (*envelope*) simili. Le differenze evidenziate nei valori di R_g e D_{max} corrispondenti a HBHA e a HBHA Δ C sono ragionevolmente attribuibili alle estremità C-terminale di HBHA.

I dati SAXS sono stati interpretati con un modello *ab initio* (*dummy residue*) utilizzando il programma GASBOR (Svergun D.I. et al, 2001) tutte le simulazioni sono state effettuate assumendo diversi stati di oligomerizzazione (monometrico, dimerico, trimerico, tetrameric). Per ogni simulazione è stato calcolato l'accordo (χ) con i dati sperimentali. Consistentemente con quanto indicato dai parametri strutturali R_g e D_{max} , il migliore accordo tra il modello e i dati sperimentali è stato ottenuto nell'assunzione di una molecola dimerica (Tab 2.1).

I modelli strutturali ottenuti per HBHA e HBHA Δ C, riportati in Fig. 2.1.3.4-1, dimostrano che le molecole presentano una forma molto allungata, con le estremità C-terminale sono localizzate in posizioni periferiche. Ciò giustifica anche il dato cromatografico discordante, in quanto l'analisi dei pesi molecolari delle proteine mediante cromatografia ad esclusione molecolare ha senso solo se le proteine hanno forma globulare.

Protein	R_g (nm) ^b	D_{max} (nm)	V_p (nm ³) ^b	χ	χ_{mon}	χ_{dim}	χ_{tri}	χ_{tet}
HBHA Δ C	3.36 \pm 0.05	12.0	69 \pm 10	1.24	1.32	1.11	1.47	2.25
HBHA	3.73 \pm 0.12	13.5	107 \pm 10	1.44	1.41	1.34	1.41	1.55

Tabella 2.1. Parametri SAXS. R_g , raggio di girazione; D_{max} , dimensione massima; V_p , volume escluso; χ , discrepanza tra i dati sperimentali e teorici calcolati per i modelli del monomero (χ_{mon}), dimerico (χ_{dim}), trimerico (χ_{tri}), tetramero (χ_{tet}).

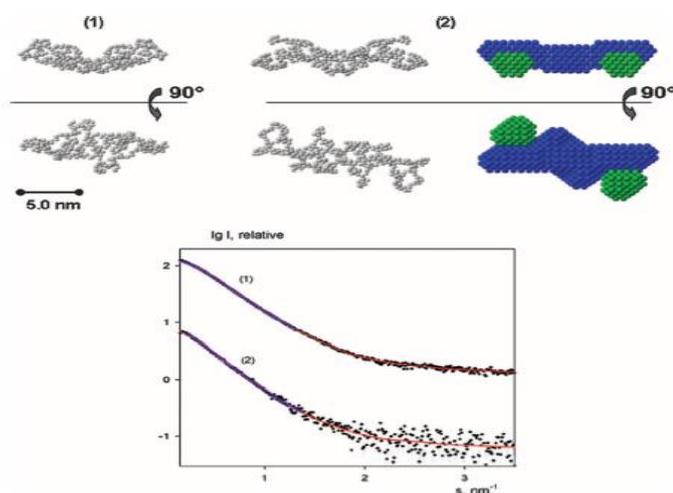


Figura 2.1.3.4-1 .Struttura in soluzione mediante SAXS: il modello *ab initio* della proteina HBHA Δ C (1) e HBHA (2) generati usando i programmi GASBOR (in grigio). Sulla destra è mostrata una rappresentazione a sfera delle proteina: la struttura di HBHA Δ C è in blu, il dominio C-terminale in verde. Nel riquadro: profili dell'intensità dello scattering per la proteina HBHA Δ C (1) e HBHA (2).

2.1.4 Studio della natura *coiled-coil* di HBHA

2.1.4.1 Analisi spettroscopiche

Per determinare la struttura secondaria della proteina sono stati condotti esperimenti di dicroismo circolare (CD), sia sulla proteina *full length* che sulla forma tronca HBHA Δ C. Per entrambe, gli spettri di dicroismo circolare (Fig. 2.1.4.1-1), presentano due minimi negativi a 208 e 222 nm, tipici delle proteine con struttura ad α -elica. Questo risultato è in accordo con le previsioni di struttura secondaria calcolate attraverso programmi di predizione disponibili in rete (ad esempio JUFO, la cui predizione è riportata in figura 2.1.4.1-2).

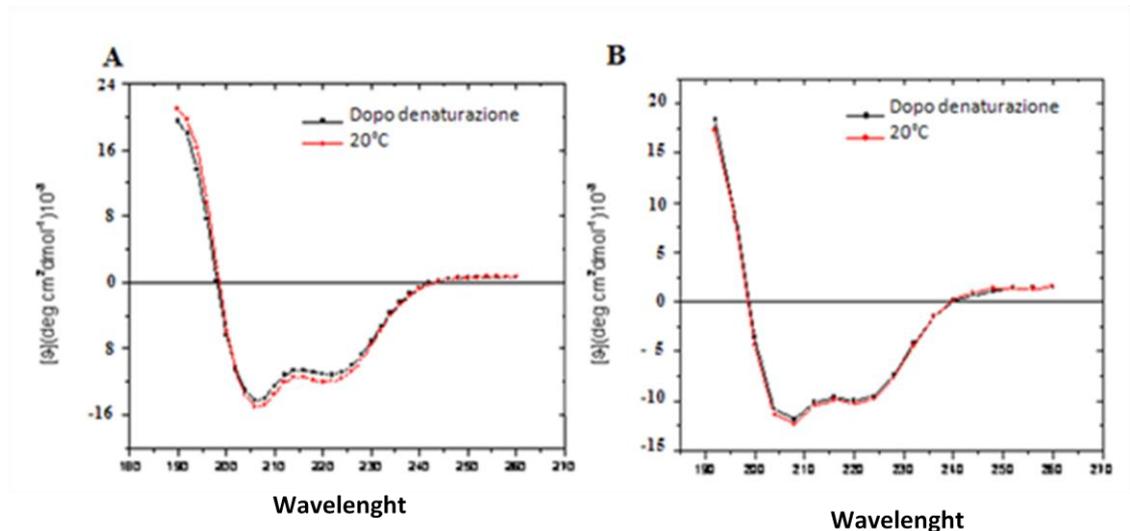


Figura 2.1.4.1-1. Spettri CD della proteina HBHA (A) e HBHA Δ C (B) registrati a 20°C (rosso) e dopo denaturazione termica (nero).



Figura 2.1.4.1-2. Previsione degli elementi di struttura secondaria presenti nella sequenza di HBHA. In rosso sono riportati i residui predetti essere in α -elica

Sono state anche registrate curve di denaturazione termica, misurando la variazione di ellitticità molare a 222 nm in funzione della temperatura (Figura 2.1.4.1-3). Le temperature di *melting* (T_m) estrapolate di HBHA e HBHA Δ C sono rispettivamente di 47°C e 37°C.

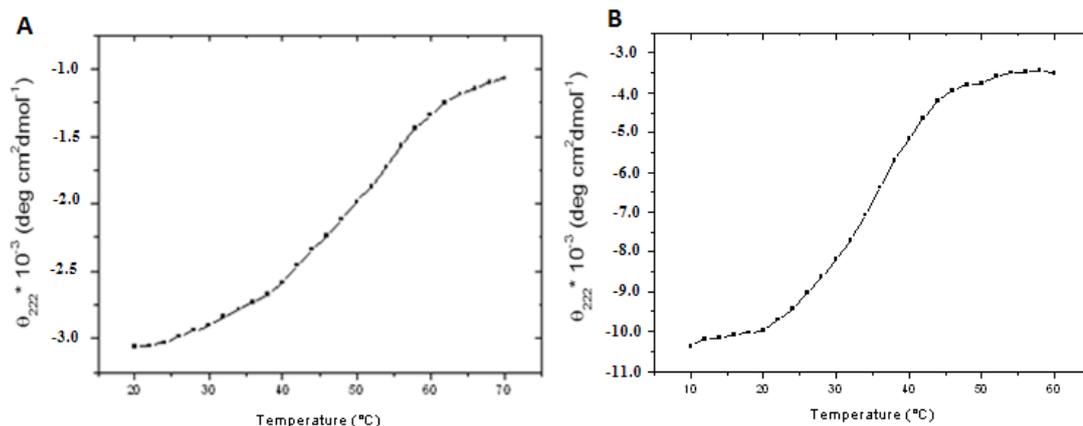


Figura 2.1.4.1-3. Curve di denaturazione termica registrate a 222 nm per HBHA (A) e HBHAΔC (B).

Se si osservano con maggiore attenzione gli spettri CD, essi presentano il minimo a 208 nm più profondo di quello a 222 nm. Questa caratteristica è tipica delle proteine con struttura *coiled-coil* (Liu J. et al, 2006).

Per validare questo risultato, è stato condotto un esperimento di denaturazione chimica, utilizzando ancora la spettroscopia CD e utilizzando l'urea come agente denaturante. Riportando in grafico (Fig. 2.1.4.1-4) la variazione di ellitticità molare in funzione della concentrazione di urea si ottiene una curva con un valore estrapolato di C_m particolarmente basso (1,8M). Un valore così basso di C_m è tipico delle proteine con struttura *coiled-coil* (Krammerer R.A. et al, 2006).

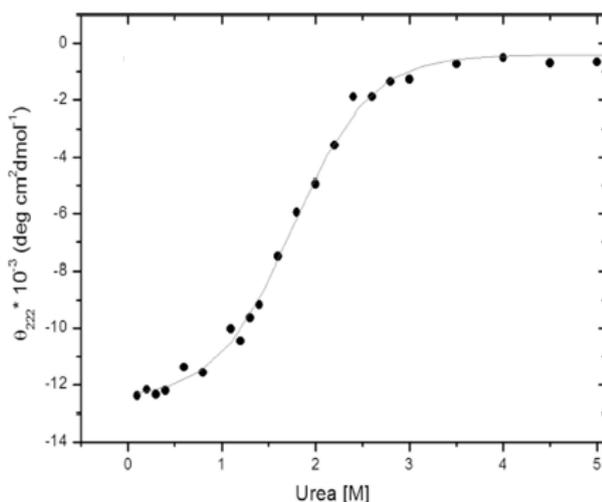


Figura 2.1.4.1-4. Denaturazione chimica: variazione dell'ellitticità molare θ in funzione della concentrazione di urea

2.1.4.2 Analisi bioinformatiche

La propensione a formare *coiled-coil* è stata poi predetta anche attraverso analisi bioinformatiche: la sequenza di HBHA rivela il tipico *pattern* dei *coiled-coil* levogiri, con una periodicità di sette amminoacidi (eptadi abcdefg) in cui le posizioni “a” e “d” sono occupate da amminoacidi idrofobici, e quelle “e” e “g” sono occupate da residui carichi (Fig. 2.1.4.2-1A). Questi dati sono in accordo con quelli calcolati attraverso opportuni *software* disponibili in rete (COILS, PCOILS e MULTICOIL) che hanno predetto un’elevata tendenza a formare *coiled-coil* dimerici nella regione compresa tra gli amminoacidi 24 e 69 (Fig. 2.1.4.2-1B).

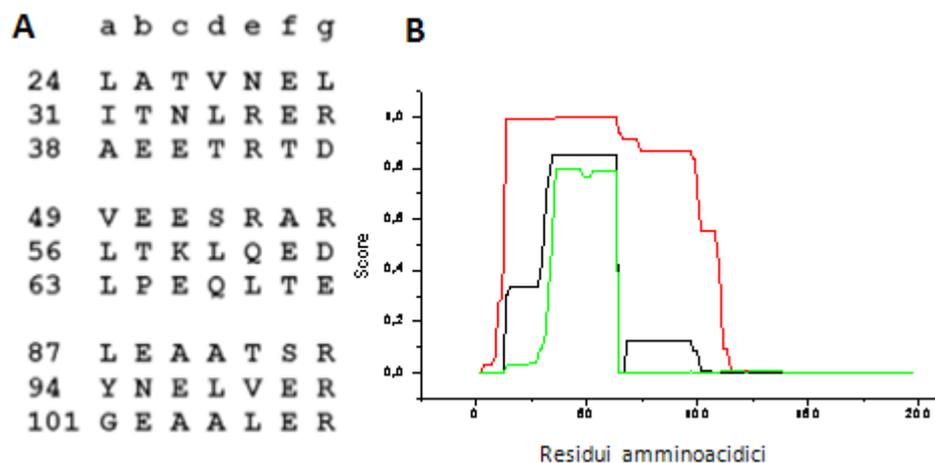


Figura 2.1.4.2-1 Analisi bioinformatiche. A) Eptadi ripetute nella sequenza di HBHA. A sinistra sono indicati i numeri corrispondenti alla sequenza amminoacidica ; B) Predizione della tendenza a formare *coiled-coil* condotta con i programmi COIL (rosso), PCOIL (nero) e MULTICOIL (verde).

2.1.4.3 Studio della stabilità del *coiled-coil*

Poiché è noto che la stabilità dei *coiled-coil* è influenzata dalla forza ionica e dal pH (Kenar K.T. et al, 1995) sono stati condotti esperimenti di dicroismo circolare al variare di queste condizioni. In particolare, sono state registrate curve di denaturazione termica al variare della concentrazione salina e registrati spettri CD al variare del pH.

Gli esperimenti di denaturazione termica sono stati realizzati sulla proteina HBHA Δ C in presenza di quantità crescenti di NaCl e di diversi altri sali come KCl, CaCl₂, Mg Cl₂, MgSO₄ e K₂SO₄. Come mostrato in figura 2.1.4.3-1A, all’aumentare della concentrazione di NaCl, si ha un forte incremento della stabilità termica della proteina, che passa dai 37° C in assenza di sale ai circa 56°C in presenza di 0,3M NaCl. Lo stesso andamento si osserva con l’aggiunta di una concentrazione 0,3 M degli altri sali, con la T_m che raggiunge anche i 64°C in presenza di

K_2SO_4 (Figura 2.1.4.3-1B). In tabella 2.2 sono riportati i valori di T_m estrapolati da ogni misura.

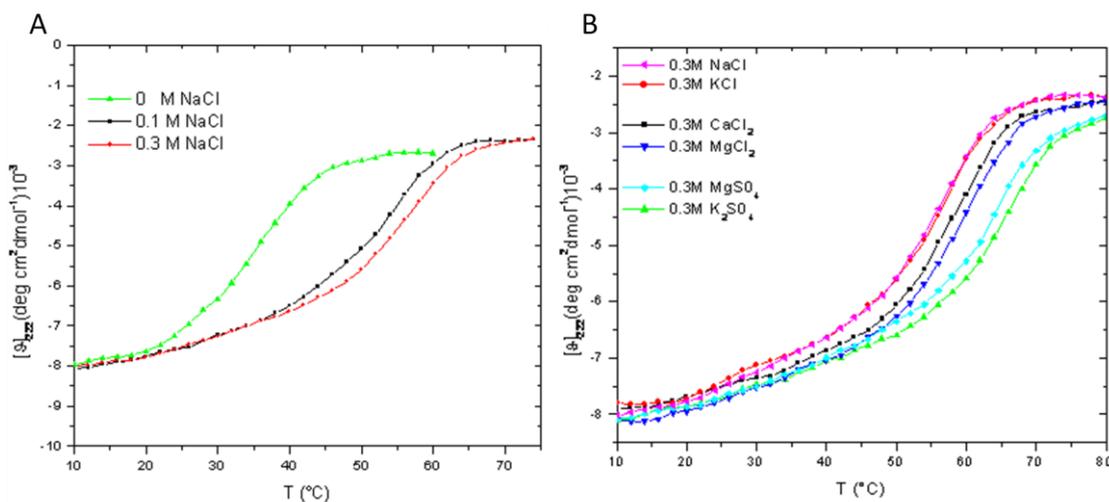


Figura 2.1.4.3-1. Studi spettroscopici di denaturazione termica al variare della concentrazione salina, in presenza di concentrazioni crescenti di NaCl (A) e di diversi sali (B).

SALE	[SALE]	T_m
Assente	-	37°C
NaCl	0,1 M	54°C
NaCl	0,3 M	56°C
KCl	0,3 M	56°C
CaCl ₂	0,3 M	59°C
MgCl ₂	0,3 M	60°C
MgSO ₄	0,3 M	62°C
K ₂ SO ₄	0,3 M	64°C

Tabella 2.2. Valori delle T_m misurati in funzione della forza ionica in assenza e in presenza di sali.

Infine sono stati registrati spettri di dicroismo circolare al variare del pH, nell'intervallo 3,5-9,5. Come mostrato in figura 2.1.4.3-2 a pH 3.5 si ha un'inversione della profondità dei minimi a 208 e 222nm.

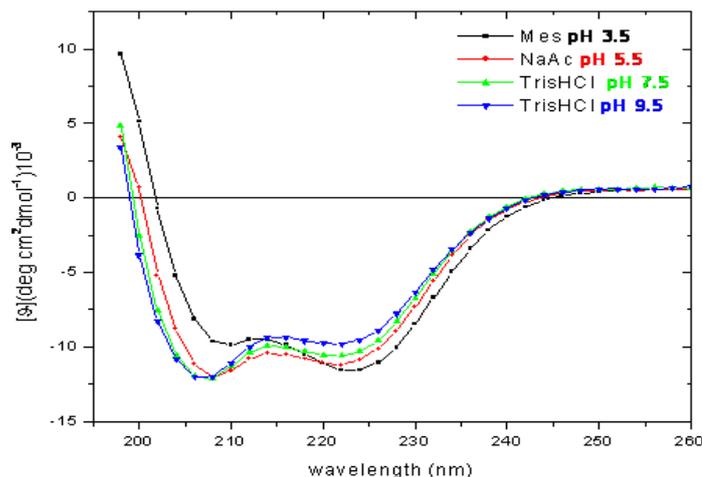


Figura 2.1.4.3-2. Spettri CD della proteina HBHAΔC misurati al variare del pH.

2.1.5 Studio del processo di dimerizzazione

2.1.5.1 Sintesi di peptidi mimetici della regione di dimerizzazione

Le analisi bioinformatiche precedentemente descritte hanno predetto che la regione compresa tra gli amminoacidi 24 e 69 è quella coinvolta nella formazione di un *coiled-coil* dimerico. Per verificare questa predizione, sono stati sintetizzati due peptidi mimetici della sequenza amminoacidica 20-40 e 41-70 (Fig. 2.1.5.1-1), e con essi sono stati eseguiti esperimenti di spiazzamento. In particolare, ciascun peptide è stato incubato con la proteina HBHAΔC, e la miscela così ottenuta è stata sottoposta a un processo di denaturazione / rinaturazione allo scopo di formare molecole ibride proteina-peptide. La miscela è stata poi sottoposta ad analisi su cromatografia ad esclusione molecolare analitica su colonna PC75 (Fig. 2.1.5.1-2). Rispetto al profilo di eluizione di riferimento (quello della sola proteina HBHAΔC), si osserva in entrambi i casi una variazione dei volumi di ritenzione cromatografici. In particolare, si passa da un volume di ritenzione di 1,15 mL ad un volume di 1,36 mL per il peptide 20-40 e un volume di 1,41 mL per il peptide 41-70.

AENSNIDDIKAPLLAALG²⁰**AADLALATVNELITNLRERAE**⁴⁰**ETRTDTRSRVEE**
SRARLTKLQEDLPEQLTE⁷⁰**LREKFTAELRKAEGYLEAATSRYNELVERGEA**
ALERLRSQQSFEEVSARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVG
IELPKKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKVTQK

Figura 2.1.5.1-1. Sequenza dei peptidi mimetici sintetizzati: il peptide 20-40 (in blu) e il peptide (41-70 in rosa)

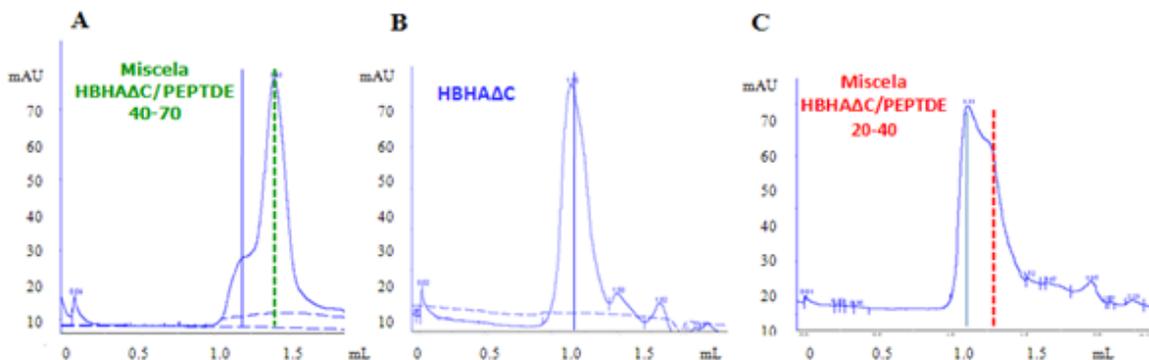


Figura 2.1.5.1-2. Confronto dei profili di eluizione cromatografici delle miscele proteina-peptide:
 A) Miscela HBHAΔC/peptide 20-40; B) HBHAΔC, controllo; C) Miscela HBHAΔC/peptide 41-70.

2.1.5.2 Studi di calorimetria a scansione differenziale

Gli studi di calorimetria a scansione differenziale (DSC) sono stati condotti sulla proteina HBHAΔC in collaborazione con la Professoressa Pompea Del Vecchio dell'Università di Napoli, Federico II.

Le misure termodinamiche del processo di denaturazione termica di HBHAΔC sono state realizzate su campioni di proteina a diversa concentrazione (2.5, 4.0 e 6.0 mg/mL) nel suo tampone di purificazione. L'analisi dei profili delle misure di DSC mostrano un processo di denaturazione totalmente reversibile (Fig. 2.1.5.2-1) associata a valori di capacità termica particolarmente bassi (Fig. 2.1.5.2-1). Tuttavia, essi aumentano all'aumentare della concentrazione proteica, indicando che la stabilità termica della proteina dipende dalla concentrazione, come avviene nei sistemi proteici con struttura dimerica non covalente. Questi dati sono in accordo con gli esperimenti di denaturazione termica condotti mediante misure spettroscopiche di dicroismo circolare al variare della concentrazione proteica. I valori della temperatura di denaturazione infatti aumentano all'aumentare della concentrazione di proteina (Fig. 2.1.5.2-3).

Calcolando i valori di entalpia del processo di denaturazione termica a partire dalle misure di DSC (ΔH_{Td}), assumendo che la stechiometria del processo sia $N_2 \rightleftharpoons 2D$, si ottengono valori paragonabili a quelli calcolati dalle misure di dicroismo circolare (entalpia di Vant'Hoff, ΔH_{Td}^{vH}). Ad esempio, alla concentrazione di 6 mg/mL, $\Delta H_{Td} = 360$ kJ/mol and $\Delta H_{Td}^{vH} = 380$ kJ/mol. Il fatto che il rapporto tra il ΔH_{Td} e ΔH_{Td}^{vH} sia prossimo a 1 è indice del fatto che il processo di denaturazione termica può essere descritto da una transizione a due stadi reversibile (Zhou Y et al, 1999).

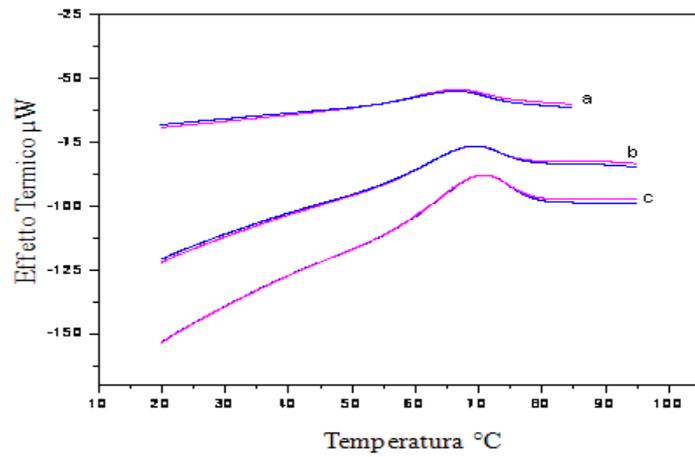


Figura 2.1.5.2-1. Misure di DSC registrate a diverse concentrazioni proteiche: a) 2,5 mg/mL; b) 4,0 mg/mL; c) 6,0 mg/mL. In blu, sono riportate le curve registrate durante un primo processo di denaturazione; in rosa, quelle registrate nuovamente dopo rinaturazione.

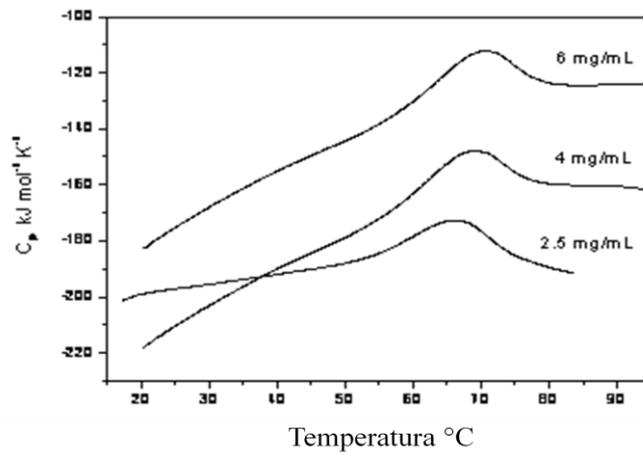


Figura 2.1.5.2-2. Variazione della capacità termica C_p in funzione di temperatura.

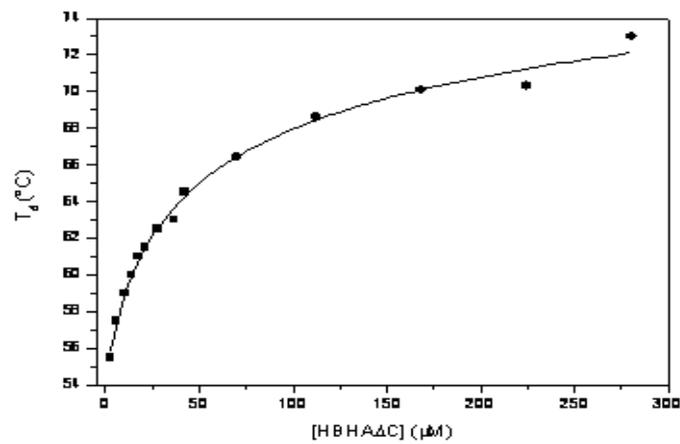


Figura 2.1.5.2-3. Variazione della temperatura di denaturazione T_d in funzione della concentrazione proteica

2.1.5.3 Valutazione dell'importanza della regione N-terminale nella dimerizzazione

HBHA è una proteina esterna di membrana e come tale deve possedere una regione transmembrana. Analisi bioinformatiche condotte sulla sequenza di HBHA con diversi *software* disponibili in rete (TMpred, MEMSAT e Phobius), hanno mostrato che tale regione è compresa complessivamente tra gli amminoacidi 15 e 30.

Sono stati registrati e confrontati spettri di dicroismo circolare dei tre costrutti tronchi della proteina HBHA, ovvero di HBHA Δ C, HBHA₁₀₋₁₆₀ e HBHA₂₅₋₁₆₀. Come mostrato in figura 2.1.5.3-1 la proteina HBHA₂₅₋₁₆₀ presenta uno spettro CD caratteristico di proteine poco strutturate, con un debole segnale a 222 nm indicativo della presenza di pochi elementi di struttura α -elicoidale.

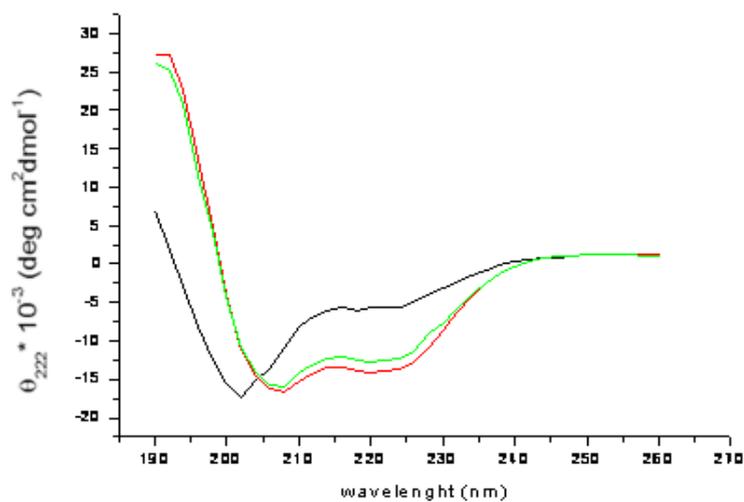


Figura 2.1.5.3-1. Confronto degli spettri di dicroismo circolare delle proteina HBHA Δ C (rosso), HBHA₁₀₋₁₆₀ (verde) e HBHA₂₅₋₁₆₀ (nero)

2.1.6 Studio dell'interazione HBHA-Actina

2.1.6.1 Esperimenti di *Surface Plasmon Resonance* (SPR)

Recentemente è stato mostrato che HBHA lega l'actina determinando una riorganizzazione del citoscheletro (Menozzi F.D. et al, 2006). Poiché non è nota la natura di tale legame sono stati eseguiti esperimenti di *Surface Plasmon Resonance* (SPR), utilizzando come ligando l'actina e come analita sia la proteina HBHA che HBHA Δ C.

L'actina è stata efficientemente immobilizzata sulla superficie di un opportuno sensore di tipo CM5 e successivamente soluzioni a concentrazione crescente di proteina HBHA e HBHA Δ C sono state iniettate sul *chip* per valutare la loro capacità di legare l'actina.

In figura 2.1.6.1-1 sono riportati i sensorgrammi relativi agli esperimenti di interazione actina-HBHA e actina-HBHA Δ C.

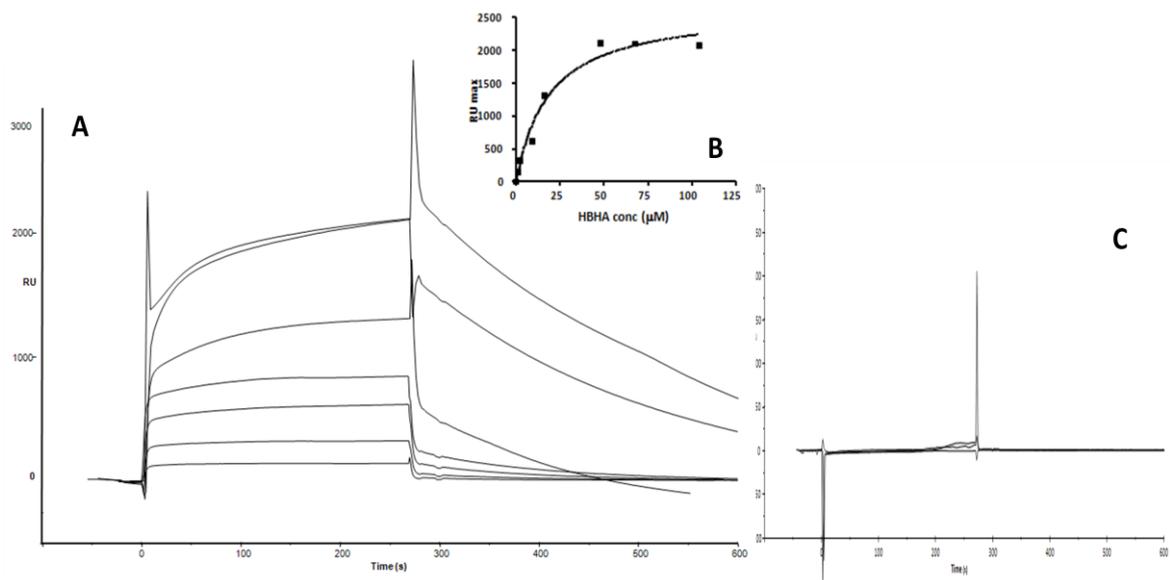


Figura 2.1.6.1-1 Sensorgrammi per il legame tra l'actina e le proteine HBHA (A) e HBHA Δ C (C) a varie concentrazioni. In (B) è mostrata la variazione di RU_{max} in funzione della concentrazione di HBHA.

Come mostrano i sensorgrammi, solo la proteina *full length* HBHA, ma non la forma tronca HBHA Δ C, interagisce con l'actina (Fig. 2.1.6.1-1A e B). La costante di dissociazione del complesso actina-HBHA è stata determinata iniettando concentrazioni crescenti di HBHA (fino a 140 μM). I valori di K_D sono stati poi calcolati usando sia il *software* in dotazione allo strumento (BIAevaluation v.4.1), sia analizzando i singoli esperimenti di interazione,

valutando cioè i singoli valori di RU_{max} in funzione della specifica concentrazione di HBHA testata (Fig. 2.1.6.1-1B).

L'elaborazione dei dati eseguita con il programma GraphPad suggerisce una stechiometria di legame 1:1 con un valore della K_D di $19 \pm 5 \mu M$.

Questi esperimenti suggeriscono che la proteina HBHA interagisce con l'actina attraverso il suo dominio C-terminale; per confermare questa ipotesi è stato realizzato un esperimento di competizione del complesso actina-HBHA.

Tali esperimenti sono stati condotti preincubando quantità crescenti di eparina con una concentrazione definita di HBHA ($9 \mu M$). E' noto in letteratura che una delle funzioni principali della proteina HBHA è quella di interagire con l'eparina mediante il suo dominio C-terminale (Menozzi F.D. et al, 2002).

Come atteso, all'aumentare del numero di equivalenti di eparina, si osserva un chiaro e progressivo decremento dei valori di RU_{max} che si traduce in un abbassamento dell'affinità di HBHA per l'actina (Fig. 2.1.6.1-2A). Riportando in grafico la variazione di RU_{max} in funzione del numero di equivalenti di eparina (Fig. 2.1.6.1-2B), si osserva saturazione a circa 1,3 equivalenti. Questo suggerisce una stechiometria 1: 1 anche nel legame tra HBHA e l'eparina.

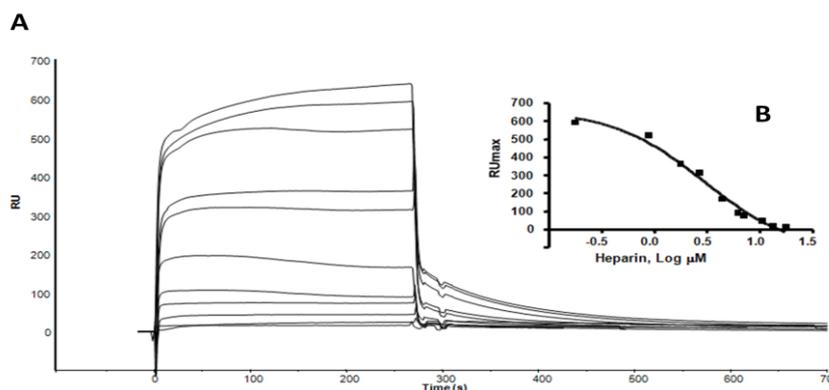
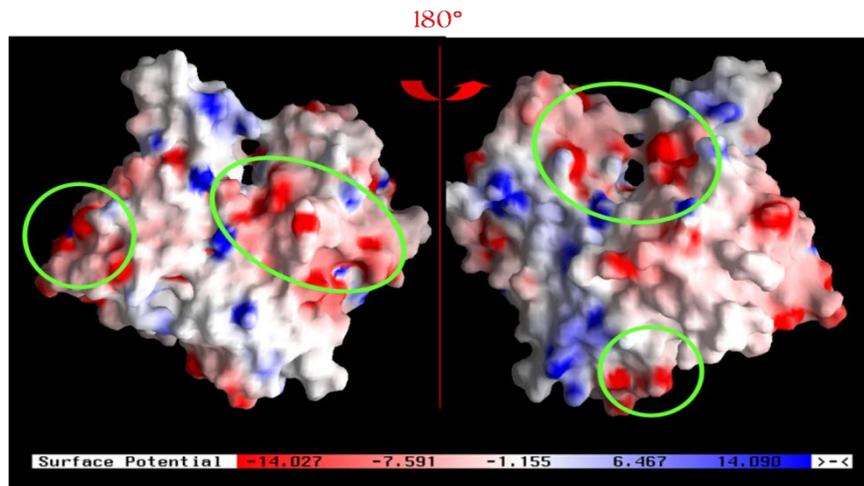


Figura 2.1.6.1-2. Sensorgrammi per l'esperimento di competizione con l'eparina (A) e grafico della variazione dei valori di RU_{max} in funzione del numero di equivalenti dell'oligosaccaride.

2.1.6.2 Analisi di potenziale di superficie dell'actina

Per cercare di prevedere la regione di interazione dell'actina con HBHA, è stata fatta una valutazione del potenziale di superficie dell'actina utilizzando il programma GRASP (Nicholls A. et al 1991). Come mostrato in figura 2.1.6.2-1, l'actina presenta due regioni a potenziale negativo che si prestano bene al legame dell'actina con il dominio C-terminale della proteina, che invece è carico positivamente.



**Figura 2.1.6.2-1. Analisi del potenziale di superficie dell'actina.
Sono cerchiati in verde le regioni con il potenziale negativo**

Queste regioni sono proprio quelle coinvolte nella polimerizzazione della G-actina in F-actina (figura 2.1.6.2-2).

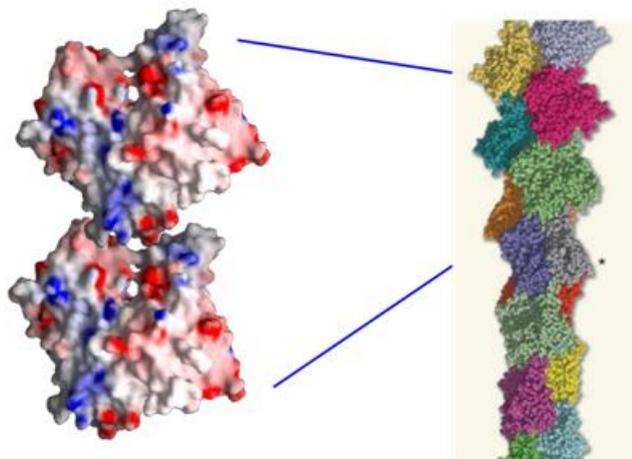


Figura 2.1.6.2-2. Due molecole di G-actina (sinistra) interagiscono per formare la fibra di F-actina (destra)

2.2 Espressione ricombinante e cristallizzazione della *Resuscitation Interacting Protein A (RipA)*

La proteina RipA rappresenta un nuovo fattore di crescita del *M. tuberculosis* e pertanto può essere considerata un *target* ideale per la progettazione di nuovi farmaci anti-tubercolosi. Per questa ragione si è scelto di esprimere, purificare e condurre esperimenti di cristallizzazione su tale proteina. La conoscenza della struttura infatti può essere considerato un primo passo verso il *design* di molecole inibitori della sua funzione.

2.2.1 Analisi bioinformatiche

La proteina RipA presenta una lunga sequenza composta da 472 amminoacidi. Analisi di tale sequenza condotte attraverso l'utilizzo di diversi *software* come BLAST e PFAM hanno evidenziato la presenza di quattro regioni distinte (Fig. 2.2.1-1):

- un peptide segnale collocato nei primi 40 residui all'N terminale (SP);
- due domini di funzione ignota denominati dal database PFAM-B, PB07342 e PB015164;
- un putativo dominio catalitico nella regione C-terminale, che presenta omologia di sequenza con cisteine proteasi appartenenti alla famiglia NlpC/P60 (residui 332 - 472);

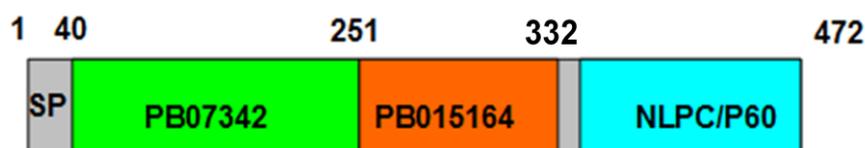


Figura 2.2.1-1 Struttura modulare della proteina RipA

Data la complessità dell'enzima e le note difficoltà nel cristallizzare proteine multidominio, è stato adoperato un approccio sistematico, che ha previsto il clonaggio, l'espressione e la purificazione di tre diversi costrutti della proteina:

1. RipA₄₀₋₄₇₂, costruito privato del peptide segnale (SP);
2. RipA₂₆₃₋₄₇₂, contenente il dominio PB015164 e il dominio catalitico al C terminale;
3. RipA₃₃₂₋₄₇₂, contenente solo il dominio catalitico al C-terminale;

2.2.2 Clonaggio ed espressione dei costrutti di RipA

Per poter esprimere come prodotto ricombinante i tre costrutti della proteina RipA sono stati realizzati tre distinti clonaggi. I tre costrutti genici sono stati amplificati mediante PCR a partire dal genoma del *M. tuberculosis*. A titolo d'esempio è riportato il risultato dell'amplificazione del costrutto genico *ripA*₂₆₃₋₄₇₂ (Fig. 2.2.2-1).

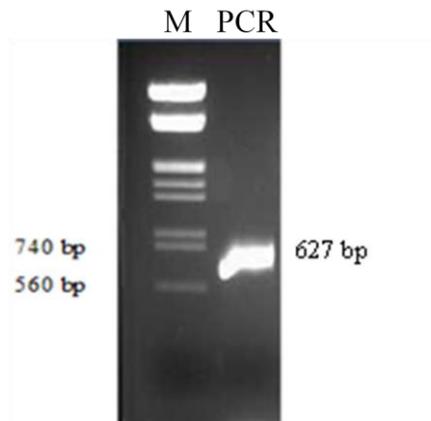


Figura 2.2.2-2. Analisi su gel di agarosio della reazione di PCR del gene *ripA*₂₆₃₋₄₇₂.
M= DNA marker III (0.1-21.2kbp); PCR=frammento gene *ripA*₂₆₃₋₄₇₂ (627bp)

I tre frammenti genici, idrolizzati con gli opportuni enzimi di restrizione sono stati inseriti, mediante reazione di ligasi, in due diversi vettori di espressione: il pETM11 e il pETM30. Quest'ultimo consente di ottenere proteine ricombinanti come prodotto di fusione della proteina GST. Dopo il controllo della loro sequenza, ciascun vettore ricombinante per i costrutti *ripA*₄₀₋₄₇₂, *ripA*₂₆₃₋₄₇₂, *ripA*₃₃₂₋₄₇₂ è stato inserito, mediante trasformazione, in opportuni ceppi batterici adatti all'espressione proteica. Per ciascun costrutto sono state condotte diverse prove di espressione, variando il ceppo cellulare batterico, la temperatura di crescita delle cellule, la concentrazione di induttore e il tempo di induzione.

In particolare, sono stati ottenuti soddisfacenti livelli di espressione per i costrutti pETM11-*ripA*₄₀₋₄₇₂ e pETM30- *ripA*₂₆₃₋₄₇₂ nelle cellule del ceppo di *E.coli* BL21(DE3) e per il costrutto pETM30- *ripA*₃₃₂₋₄₇₂ nel ceppo batterico BL21Star(DE3). In tutti i casi è stato osservato che le migliori condizioni di espressione si ottengono utilizzando una temperatura di crescita cellulare di 22°C per un tempo di induzione di circa 16h ed una concentrazione finale di induttore (IPTG) pari a 1mM.

In figura 2.2.2-2 è riportata la differenza dei livelli di espressione della proteina RipA₂₆₃₋₄₇₂ nei diversi ceppi batterici a parità di condizioni di espressione.

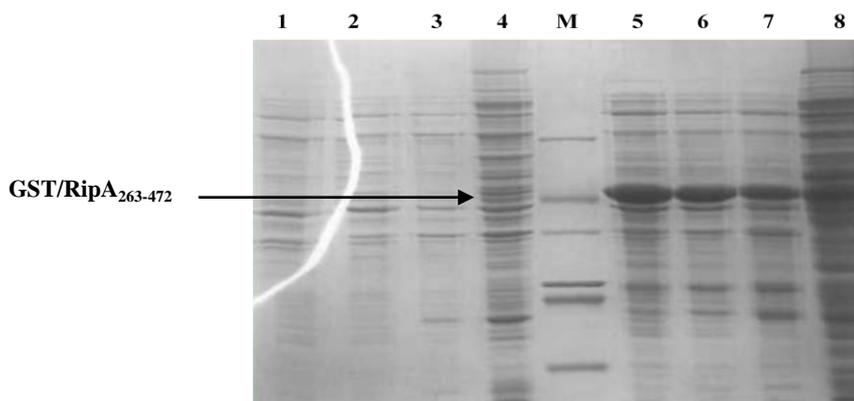


Figura 2.2.2-2. Analisi SDS-PAGE dei livelli di espressione (frazioni solubili) del prodotto His₆GST-RipA₂₆₃₋₄₇₂ ottenuti a 22°C , dopo 16h di induzione con IPTG 1mM: 1-4, estratti proteici dei ceppi batterici non indotti. Nell'ordine: 1) BL21(DE3); 2) BL21(DE3)RIL; 3) BL21(DE3)Star; 4) Rosetta(DE3) pLysS; M = marker; 5-8, estratti proteici dei ceppi batterici indotti. Nell'ordine: 5) BL21(DE3); 6) BL21(DE3) RIL; 7) BL21(DE3) Star; 8) Rosetta(DE3)pLysS,.

E' importante sottolineare che i costrutti pETM11- *ripA*₂₆₃₋₄₇₂ e pETM11- *ripA*₃₃₂₋₄₇₂ non hanno portato all'espressione di prodotti ricombinanti in forma solubile.

2.2.3 Purificazione

Ciascun prodotto proteico ottenuto per via ricombinante è stato purificato attraverso cromatografia di affinità, sfruttando le code di istidine inserite durante la fase di clonaggio all'N-terminale dei tre costrutti e utilizzando colonnine del tipo NiNTA. La fase di eluizione delle proteine è stata effettuata mediante un tampone ad alto contenuto di imidazolo, capace di competere con la coda di istidine al legame dello ione Ni²⁺. Per stimare la qualità della purificazione è stata condotta un'analisi elettroforetica delle frazioni proteiche ottenute dalla cromatografia. In figura 2.2.3-1 riporto il risultato della purificazione del costrutto His₆GST-RipA₂₆₃₋₄₇₂.

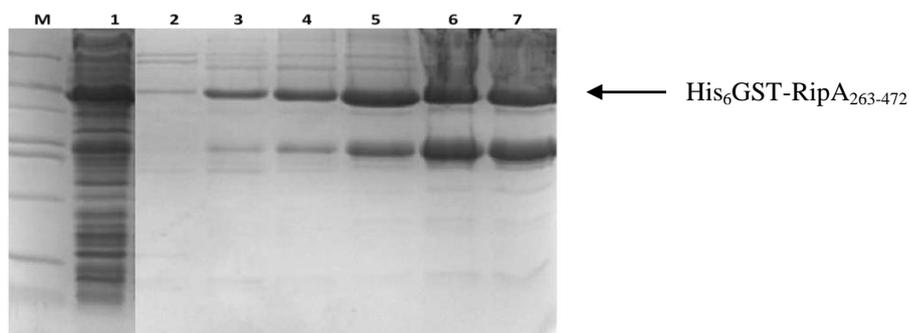


Figura 3.2.3-1 Analisi SDS-PAGE della purificazione della proteina His₆GST-RipA₂₆₃₋₄₇₂: M=Marker; 1=Campione applicato (lisato cellulare); 2-7= frazioni proteiche eluite dalla colonna.

La purificazione prosegue con la rimozione della coda di istidine (per la proteina RipA₄₀₋₄₇₂) e della His₆-GST (per le proteine RipA₂₆₃₋₄₇₂ e RipA₃₃₂₋₄₇₂), mediante idrolisi con proteasi TEV (Fig. 2.2.3-2). A questo punto una nuova cromatografia di affinità viene eseguita: caricando il digerito sulla colonnina Ni-NTA essa tratterrà la coda di istidine o la 6His-GST, mentre la proteina di interesse viene raccolta all'uscita dalla colonna. La proteina così recuperata subisce un ultimo passaggio di purificazione mediante cromatografia ad esclusione molecolare, al fine di separare prodotti di diverso peso molecolare ed eventuali aggregati molecolari (Fig. 2.2.3-3).

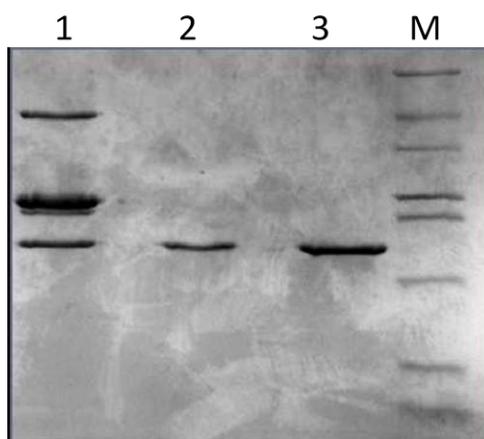


Figura 2.2.3-2. Analisi SDS-PAGE dell'idrolisi con proteasi TEV per la proteina RipA₂₆₃₋₄₇₂.
1= campione idrolizzato; 2-3= RipA₂₆₃₋₄₇₂dopo il taglio con la proteasi TEV e rimozione della 6His-GST.

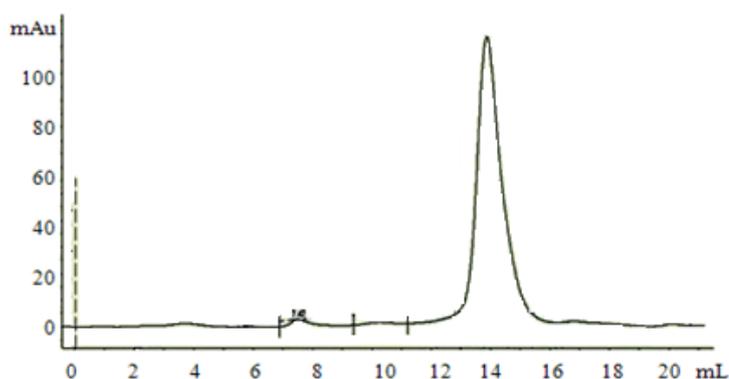


Figura 2.2.3-3 Cromatografia ad esclusione molecolare delle proteina RipA₂₆₃₋₄₇₂

Ciascuna proteina eluisce come un singolo picco cromatografico. Da calibrazione effettuata con proteine di peso molecolare noto esse risultano in forma monomeric.

2.2.4 Esperimenti di cristallizzazione

Esperimenti di cristallizzazione sono stati condotti sulle tre proteine ottenute in forma pura. In particolare, è stato effettuato uno *screening* delle condizioni di cristallizzazione, utilizzando una procedura robotizzata di 'High Throughput Crystallisation', disponibile presso l'Istituto di Biostrutture e Bioimmagini (IBB) del CNR di Napoli. Dagli *screening* sono emerse delle condizioni sperimentali promettenti per il costrutto RipA₂₆₃₋₄₇₂. Queste condizioni sono poi state ottimizzate manualmente utilizzando la tecnica della diffusione in fase vapore (*hanging drop*). Cristalli adatti ad un'indagine diffrattometrica sono stati ottenuti utilizzando una concentrazione di proteina di 7 mg/mL e, come soluzione precipitante, 8% (v/v) 2-Propanolo, 16% (w/v) PEG4000 in 60 mM Sodio Citrato tri-idrato (pH 5.6). I cristalli, di dimensioni pari a 0,2x0,3x0,2 (Fig. 2.2.4-1A) sono stati utilizzati per la registrazione dei dati di diffrazione presso il sincrotrone ESRF di Grenoble, Francia. Il pattern di diffrazione, riportato in Fig. 2.2.4-1B, mostra che i cristalli diffrangono a risoluzione atomica (1.0 Å). La soluzione della struttura cristallografica è tuttora in corso.

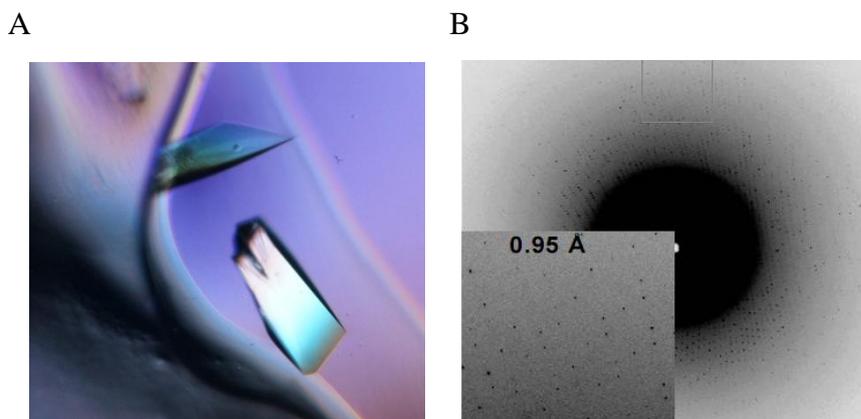


Figura 2.2.4-1. A) Cristalli della proteina RipA₂₆₃₋₄₇₂; B) *Pattern* di diffrazione

2.3 Studi preliminari della *Cold Shock Protein A* (CspA)

2.3.1 Clonaggio ed espressione della proteina CspA

Per studiare e caratterizzare la proteina CspA (codice SwissProt P63848; *locus* genico Rv3648) è stato innanzitutto necessario realizzare il clonaggio del suo gene. Il gene amplificato mediante PCR a partire dal genoma del *M tuberculosis* (Fig. 2.3.1-1), digerito con gli opportuni enzimi di restrizione, è stato inserito all'interno del vettore di espressione pETM11, mediante reazione di ligasi.

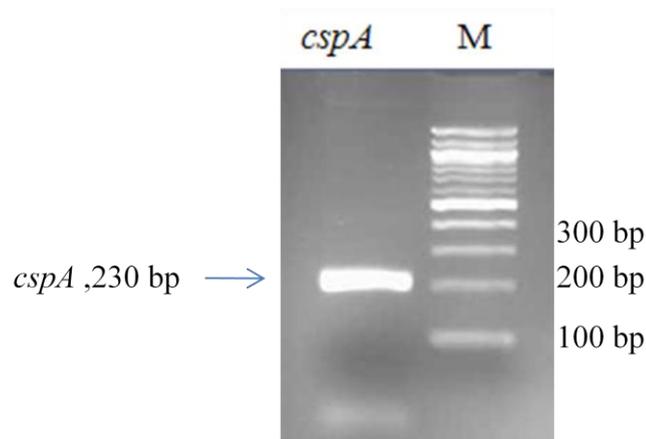


Figura 2.3.1-1. Controllo della reazione di PCR del gene *cspA* su gel di agarosio al 2%.
CspA = frammento amplificato; M = marcatore di peso molecolare

Dopo aver controllato la sequenza nucleotidica del costrutto mediante sequenziamento, il vettore ricombinante pETM11-*cspA* è stato introdotto per trasformazione all'interno del ceppo cellulare batterico di *E. coli* BL21(DE3).

Analizzando i profili di espressione della proteina His₆-CspA alle temperature di induzione di 37°C e 22°C, in due diverse fasi della crescita cellulare (esponenziale e stazionaria), è stata ottenuta una buona sovra-espressione di proteina ricombinante nelle cellule indotte con una concentrazione finale di IPTG pari a 1mM, dopo 16h di induzione sia a 22° che a 37°C (Fig. 2.3.1-2). Pertanto, per la produzione in larga scala della proteina, si è deciso di utilizzare la condizione di espressione a 22°C, temperatura alla quale il processo di strutturazione delle proteine può essere favorito.

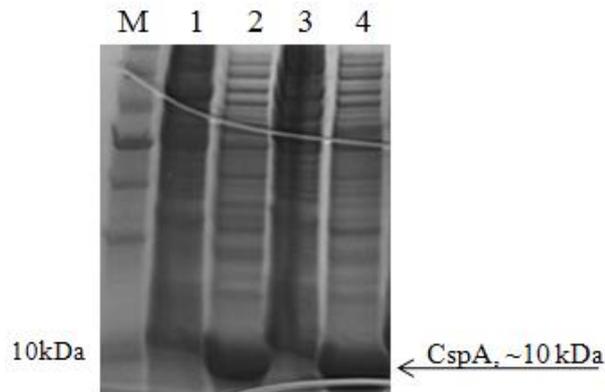


Figura 2.3.1-2. Analisi SDS-PAGE dei profili dell' espressione della proteina ricombinante His₆-CspA in *E.coli* BL21(DE3). M = marcatore di peso molecolare; 1) induzione di 3h a 37°C; 2) induzione di 16h a 37°C; 3) induzione di 3h a 22°C; 4) induzione di 16h a 22°C;

2.3.2 Purificazione della proteina CspA

Dopo aver ottimizzato le condizioni di espressione, per purificare la proteina CspA, anche in questo caso, è stata sfruttata la coda di sei istidine introdotta all'N-terminale della proteina con il clonaggio nel vettore pETM11.

La purificazione della His₆-CspA è stata realizzata come già precedentemente descritto per le proteine His₆-HBHAΔC, e His₆-RipA₄₀₋₄₇₂ His₆GST-RipA₂₆₃₋₄₇₂ e His₆GST-RipA₃₃₂₋₄₇₂.

Essa quindi ha previsto i seguenti passaggi di purificazione:

- Purificazione per cromatografia di affinità su colonne Ni-NTA (Fig.2.3.1-1);
- Taglio enzimatico con la proteasi TEV, per rimuovere selettivamente la coda di sei istidine;
- Seconda cromatografia di affinità per allontanare la proteina dal *tag* rimosso;
- Cromatografia ad esclusione molecolare per allontanare eventuali aggregati proteici, macromolecole a diverso peso molecolare (Fig.2.3.2-2 e 2.3.2-3).

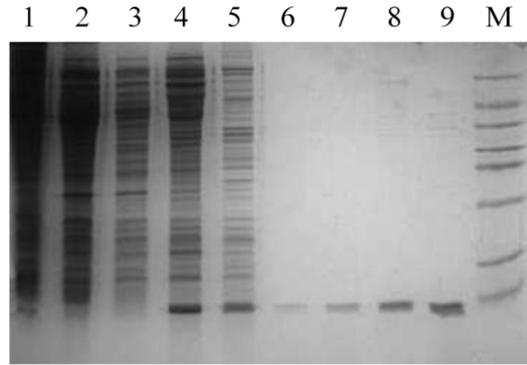


Figura 2.3.2-1. Purificazione mediante cromatografia di affinità: 1) Estratto proteico ricombinante applicato; 2) Frazione di proteine non interagenti con la colonna; 3) lavaggio colonna; 4-9 eluati della proteina CspA mediante gradiente di imidazolo; M) Marcatore di peso molecolare.

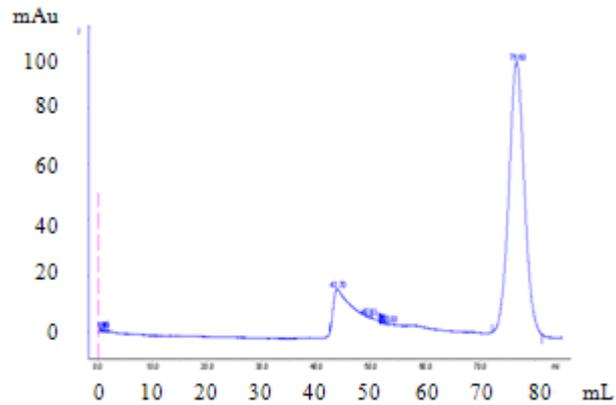


Figura 2.3.2-2 Cromatografia ad esclusione molecolare delle proteina CspA

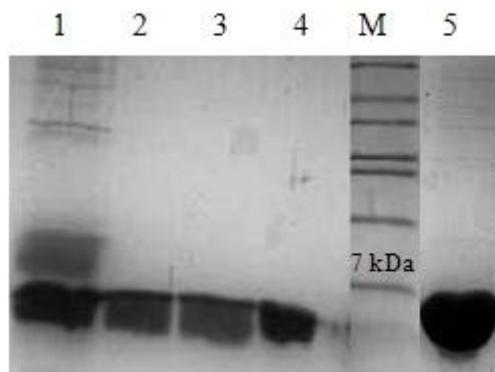


Figura 2.3.2-3 Analisi SDS-PAGE delle frazioni proteiche eluite dalla cromatografia ad esclusione molecolare. 1) campione applicato; 2-4 campioni di CspA eluiti da cromatografia ad esclusione molecolare; M= marcatore di peso molecolare; 5) campione proteico di CspA concentrato (70 µg totali) omogeneo.

2.3.3 Analisi bioinformatiche e spettroscopiche

Analisi bioinformatiche condotte con diversi *software* disponibili in rete (BLAST e ALIGN) mostrano che la proteina CspA da *M. tuberculosis* presenta un'elevata identità di sequenza con molte *Cold shock protein* di diverse specie batterie (Fig. 2.3.3-1).

```
MP---QGTVKWFNAEKGFGFIAPEDGSADVFVHYTEIQGTGFRTLEENQKVEFEIGHSPKGPQATGVRSL CSPA_MYCTU
MP---QGTVKWFNAEKGFGFIAPEDGSADVFVHYTEIQGTGFRTLEENQKVEFEIGHSPKGPQATGVRSL CSPA_MYCBO
ME---TGVVKWFNAEKGYGFITPEAGGKDLFAHFSEIQANGFKSLEENQRVSFVTAMGPKGPQATKIQIL CSPA_BORPE
MSGKMTGIVKWFNADKGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQNDGYKSLDEGQKVSFTIESGAKGPAAGNVTSL CSPA_ECOLI
MT--VTGQVKWFNEKGFGFIEVP-GENDVFVHFSAIETDGFKSLEEGQKVSFEIEDGNRGPQAKNVIKL CSPA_BACCE
```

Figura 2.3.3-1. Analisi di allineamento di sequenze tra Cold Shock Protein di diverse specie batteriche: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *B. pertossi*, *E. coli*, *B. cereus*. In grassetto sono mostrati gli amminoacidi conservati. In azzurro gli amminoacidi coinvolti nell'interazione con gli acidi nucleici.

Come mostrato in figura molti sono gli amminoacidi conservati tra le diverse specie, compresi soprattutto quelli deputati all'interazione con il DNA o l'RNA (Mayer B. et al, 1996).

A questi tipo di indagine è stato associato uno studio spettroscopico della proteina, mediante dicroismo circolare (CD) (Fig. 2.3.3-2). Lo spettro CD della proteina CspA presenta caratteristiche simili a quello delle proteine destrutturate. Tuttavia, allo stesso tempo, esso risulta paragonabile a quello registrato per l'omologa proteina di *E. coli*.

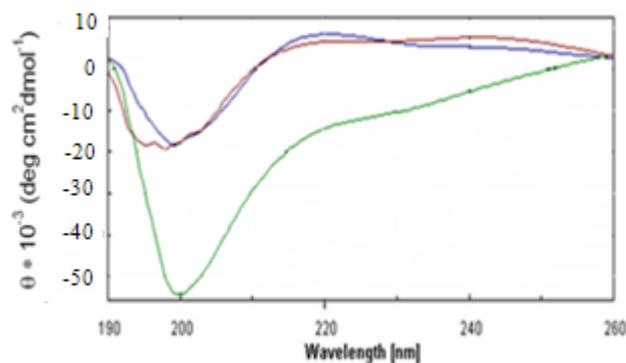


Figura 2.3.3-2. Spettri di Dicroismo Circolare registrati nella regione del far-Uv a 20°C (lu), a 70°C (verde) e a 20°C dopo denaturazione (rosso).

2.3.4 Analisi di spettroscopia NMR

Lo spettro monodimensionale acquisito per CspA-MTB in H₂O-D₂O 90:10 (v:v) è mostrato in Fig. 2.3.4-1. Con l'eccezione del segnale a 10.40 ppm, attribuibile per tipicità della posizione al protone NH indolico di Trp⁸ (unico triptofano della sequenza) tutte le risonanze della proteina appaiono in un intervallo di *chemical shift* compreso tra 8.8 e 0.5 ppm. Esperimenti di correlazione omonucleare 2D hanno messo in evidenza una distribuzione delle risonanze dei protoni NH ammidici in un intervallo di frequenze piuttosto contenuto (circa 1 ppm). La caratterizzazione spettrale della molecola è stata estesa alla proteina uniformemente marcata in ¹⁵N. Lo spettro di correlazione 2D [1H,¹⁵N]-HSQC (Fig. 2.3.4-2) mostra che circa l'80% dei segnali dovuti ai protoni NH-ammidici occupa una regione piuttosto ristretta della mappa. Questo aspetto è risultato definitivamente critico nella fase di assegnazione delle risonanze (fase obbligata e preliminare a quella di definizione della struttura 3D) pur tentata attraverso l'analisi degli spettri 3D di tipo [1H,¹⁵N] TOCSY-HSQC e [1H,¹⁵N] NOESY HSQC.

Contenute variazioni nelle caratteristiche del mezzo solvente, in particolare variazioni di pH nell'intervallo 6-7 e nella forza ionica, non hanno prodotto effetti misurabili dal punto di vista spettrale.

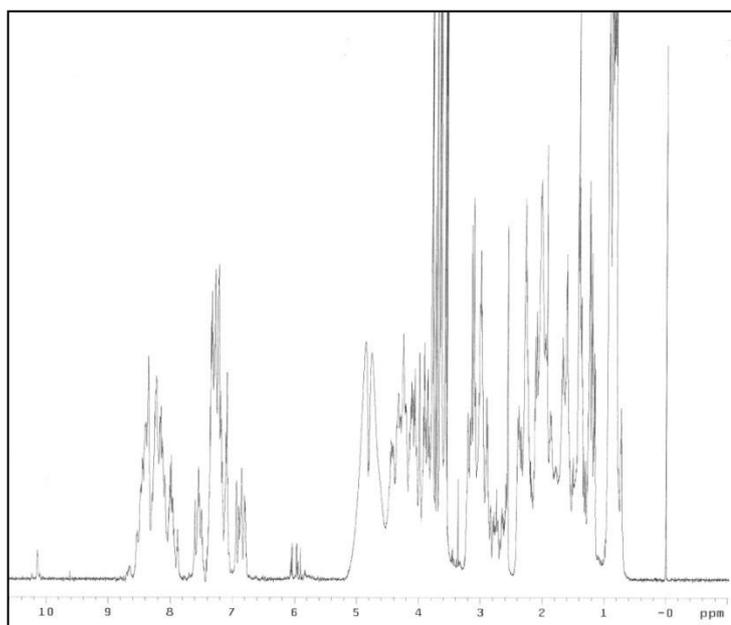


Fig. 2.3.4-1 Spettro ¹H NMR di CspA-MTB 0.5 mM in H₂O/D₂O 90%, pH 7, T=298 K

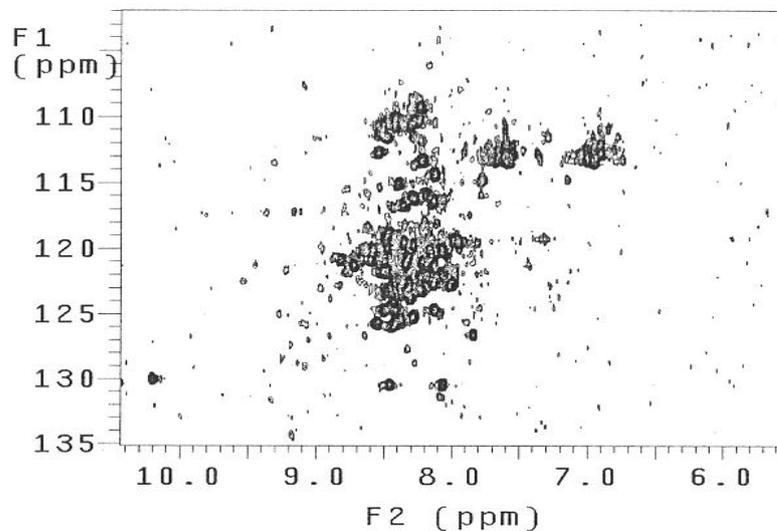


Fig. 2.3.4-2 Spettro 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC di CspA-MTB, 0.5 mM in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 90% (v:v), pH 7, T=298 K.

2.3.5 Studi di interazione proteina-DNA

Poiché le analisi spettroscopiche *via* dicroismo circolare ed NMR danno indicazioni circa una parziale strutturazione della proteina, sono stati condotti esperimenti di interazione proteina-DNA, al fine di comprendere se, i pochi elementi di struttura secondaria ipotizzati, siano proprio quelli deputati all'interazione con il DNA, come accade nelle *Cold shock protein* di altre specie batteriche.

Per questa ragione sono stati realizzati esperimenti di ritardo elettroforetico (EMSA) tra la proteina CspA purificata e ssDNA o dsDNA (Fig. 2.3.5-1a e 2.3.5-1b). La scelta della sequenza nucleotidica degli acidi nucleici è stata assolutamente casuale, dato che le Csp legano queste macromolecole in modo aspecifico. È da sottolineare, tuttavia, che il dsDNA utilizzato come controllo negativo presenta la stessa sequenza in basi (direzione 5'-3') dell'oligonucleotide scelto come ssDNA.

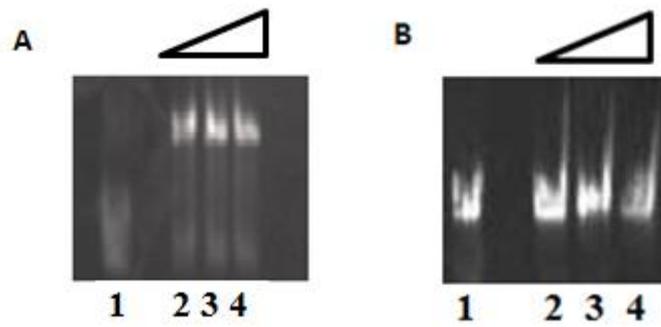


Figura 2.3.5-1. Esperimenti di interazione tra un ssDNA (A) e un dsDNA (B) con quantità crescenti di CspA. 1) 20 pmol di ssDNA/dsDNA; 2) 100 pmol CspA; 3) 200 pmol CspA; 4) 400 pmol CspA

Come osservato in figura, al pari delle altre CspA batteriche, anche la CspA da *M. tuberculosis* è in grado di interagire con il ssDNA, ma non con il dsDNA.

CAPITOLO III
Discussione

3. Discussione

Il *Micobacterium tuberculosis* è l'agente eziologico della tubercolosi umana, una malattia che ancora oggi causa nel mondo la morte di circa due milioni di persone l'anno (Stewart G.R. et al 2003). Nonostante sia una malattia conosciuta da diversi decenni, essa viene curata con soli cinque farmaci, peraltro progettati ben oltre trent'anni fa. Inoltre, ancora oggi esiste un solo vaccino riconosciuto, il bacillo BCG, efficace non nella totalità dei casi (Locht C., 2008). Per questa ragione è sempre più forte la richiesta di nuovi farmaci e vaccini, che risultino maggiormente efficaci e con minori effetti collaterali (Gomez J.E. et al, 2004).

Per poter progettare nuovi farmaci è fondamentale la conoscenza e la comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base della patogenicità batterica.

In questo contesto si colloca il mio progetto di ricerca, volto alla caratterizzazione di tre sistemi proteici coinvolti direttamente o indirettamente nei meccanismi di infezione del *Micobacterium tuberculosis*.

Il primo sistema analizzato è quello della proteina HBHA, unico fattore di virulenza associato al meccanismo di infezione extrapolmonare (Kohama H. et al, 2008). HBHA è una proteina di membrana caratterizzata da un dominio C-terminale carico positivamente deputato all'interazione della proteina con i gruppi eparan-solfato delle cellule epiteliali (Dupres V. et al, 2009). Inoltre, tale proteina è stata a lungo studiata per le sue proprietà antigeniche, in quanto è stata osservata una buona produzione di anticorpi anti-HBHA nel siero dei pazienti affetti da tubercolosi latente, aprendo la strada alla messa a punto di nuovi test diagnostici (Savolainen L. et al, 2008; Hougardy J.M. et al, 2007). HBHA è responsabile anche di un altro processo fondamentale, l'agglutinazione, ovvero di quel processo di aggregazione batterio-batterio che porta i batteri a formare le colonie, un evento fondamentale per la sopravvivenza dei batteri (Menozzi F.D. et al, 1998).

È stato proposto che HBHA induca l'agglutinazione batterica attraverso l'interazione di molecole della proteina esposte sulla superficie del micobatterio (Menozzi F.D. et al, 1996). In particolare, questa funzione è stata correlata alla capacità della regione N-terminale della proteina di formare multimeri (Delogu G. et al, 1999). Infatti, precedenti studi di microscopia a forza atomica avevano indicato che HBHA potesse assumere strutture multimeriche (Verbene C. et al, 2007).

Per questa ragione un primo studio di HBHA ha riguardato proprio l'analisi dello stato oligomero della proteina, utilizzando approcci diversi. Per prima cosa è stato realizzato un

esperimento di *cross-linking* che ha invece stabilito che le proteine presentano uno stato dimerico. Questo dato è stato confermato da studi di *light scattering*, che hanno permesso anche di stabilire che non esistono ulteriori specie multimeriche in soluzione, anche al crescere della concentrazione proteica. Infine questo risultato è stato inequivocabilmente confermato dagli esperimenti di Small Angle Scattering (SAXS): attraverso tali studi è stato possibile ottenere le prime informazioni strutturali sia di HBHA che della sua forma tronca HBHA Δ C, stabilendo che entrambe le proteine sono dimeri in soluzione con una forma allungata (Esposito et al, 2008). Inoltre, gli esperimenti di SAXS indicano anche che i bracci C-terminali della proteina sono collocati in una posizione periferica della molecola e che essi protendono dallo stesso lato. Ciò è consistente con il ruolo attribuito al dominio C-terminale di HBHA che è quello di interagire con le cellule epiteliali umane attraverso l'interazione elettrostatica con i gruppi solfato dell'eparina (Pethe K. et al, 2000).

Attraverso un accurato studio spettroscopico di HBHA è stato inoltre possibile valutare la natura *coiled-coil* della proteina. HBHA infatti presenta un caratteristico spettro CD con un minimo a 208 nm più profondo che a 222 nm. Il dato è stato anche confermato dagli esperimenti di denaturazione chimica. Il profilo della denaturazione con urea è infatti proprio delle transizioni elica-*coil* a due stati, con un punto di flesso a bassi valori di agente denaturante. Queste sono chiare indicazioni della presenza di *coiled-coil* (Kammerer R.A. et al, 2006). La propensione a formare *coiled-coil* è stata anche predetta utilizzando diversi programmi (Gruber M. et al, 2006). In particolare l'analisi della sequenza di HBHA mostra le tipiche eptadi ripetute dei *coiled-coil* levogiri, e un'elevata probabilità di formare *coiled-coil* dimerici tra gli amminoacidi 24 e 69. Essa si distingue quindi, da molte adesine batteriche che presentano invece strutture di *coiled-coil* trimerici (Serruto D. et al, 2009). Inoltre, come accade per tutti i *coiled-coil*, anche la stabilità di HBHA dipende fortemente dal pH e dalla forza ionica del mezzo (Apostolovic B. et al, 2008). La natura *coiled-coil* di HBHA è consistente con la funzione agglutinante di questa proteina in quanto i *coiled-coil* sono motivi di *fold* che regolano l'oligomerizzazione di diversi sistemi proteici (Apgar J.R. et al, 2008).

Per verificare che la regione compresa tra gli amminoacidi 24 e 69 sia realmente quella coinvolta nella dimerizzazione, sono stati sintetizzati due peptidi mimetici del tratto di sequenza dall'amminoacido 20 al 40 e dal 41 al 70. Questi peptidi sono stati utilizzati per esperimenti di spiazzamento tra le subunità della proteina. Entrambi i peptidi hanno mostrato questa abilità in accordo con le analisi bioinformatiche.

Poiché gli esperimenti di SAXS e *light scattering* hanno confermato inequivocabilmente che la proteina è presente in soluzione come dimero sembra evidente che l'agglutinazione

batterica dipenda dalla dimerizzazione. Un possibile meccanismo di aggregazione batterica potrebbe prevedere l'associazione di monomeri di HBHA, presenti sulle superfici batteriche. Per studiare questa ipotesi, sono stati condotti esperimenti di calorimetria a scansione differenziale allo scopo di comprendere se la dissociazione dei dimeri di HBHA e il loro *unfolding* fossero due eventi distinti. Questi esperimenti hanno ben chiarito che la transizione tra lo stato nativo e quello denaturato può essere descritta solo da un meccanismo a due stadi in cui la specie intermedia monomerica non esiste. Indicazioni di questo tipo erano già state osservate registrando le curve di denaturazione termica mediante dicroismo circolare. Tali dati dimostrano che certamente l'agglutinazione non può avvenire per interazioni tra subunità monomeriche di HBHA disposte sulla superficie del batterio e suggerisce un meccanismo, in corso di validazione sperimentale, di *swapping* tra porzioni di *coiled-coil* di dimeri.

Al fine di comprendere i determinanti strutturali della stabilità dei dimeri di HBHA, sono stati condotti esperimenti di dicroismo circolare su due costrutti della proteina privi delle porzioni N-terminali 1-9 e 1-24, denominati rispettivamente HBHA₁₀₋₁₆₀ e HBHA₂₅₋₁₆₀. Gli spettri registrati mostrano che la proteina HBHA₂₅₋₁₆₀ non presenta un contenuto significativo di struttura secondaria mentre la rimozione dei primi nove amminoacidi della sequenza non determina alcuna variazione sostanziale nella struttura secondaria della proteina (Fig. #). Ciò permette di stabilire che l'integrità della regione N-terminale compresa tra i residui amminoacidici 10 – 24 è essenziale affinché la proteina si strutturi nel modo corretto.

Recentemente è stato mostrato che HBHA interagisce con l'actina del citoscheletro inducendo una riorganizzazione dei filamenti di actina nelle cellule endoteliali intorno al sito di adesione del batterio (Menozzi F.D. et al, 2006). Poiché in altre specie batteriche, l'interazione e il rimodellamento dell'actina veicola la specie patogena all'interno di un tessuto per endocitosi (Carabeo R.A., et al 2002), l'interazione di HBHA con l'actina apre uno scenario nuovo in cui anche il *M. tuberculosis* potrebbe propagarsi negli altri organi utilizzando questo meccanismo. Per questa ragione studiare la natura del legame HBHA-actina è estremamente importante. Un recente articolo di *Atomic Force Microscopy* (AFM), infatti, aveva indicato che le forze di interazione tra i monomeri di HBHA fossero comparabili con quelle dell'interazione HBHA-actina, suggerendo che l'adesina interagisce con l'actina come monomero, in analogia ad altre *actin binding protein* (ad esempio la miosina e la tropomiosina) con le quali HBHA presenta omologia di sequenza nella regione N-terminale (Verbelen C., et al 2008). Per queste ragioni, gli autori ipotizzavano anche che la porzione N-terminale di HBHA svolgesse un ruolo importante nell'interazione con l'actina.

Per poter comprendere il meccanismo di adesione di *M. tuberculosis* all'actina, sono stati condotti esperimenti di *Surface Plasmon Resonance* (SPR) volti alla determinazione delle affinità di legame tra l'actina e HBHA o tra l'actina e HBHA Δ C.

Gli studi condotti hanno invece dimostrato che solo la proteina HBHA, e non HBHA Δ C, presenta affinità per l'actina. Se ne deduce che la porzione di HBHA deputata al legame con l'actina sia il dominio C-terminale, lo stesso che interagisce con l'eparina delle cellule epiteliali. Per confermare questo dato sono stati anche realizzati esperimenti di competizione, utilizzando proprio l'eparina. Titolando HBHA con quantità crescenti di eparina, è stata osservata una diminuzione dell'affinità di HBHA per l'actina, confermando il dato che HBHA interagisce con l'actina attraverso il suo dominio C-terminale. Questi risultati sono consistenti con quelli condotti sulle cellule endoteliali (Menozzi F.D. et al, 2006). Infine, è possibile ipotizzare che HBHA determini una riorganizzazione del citoscheletro perché essa potrebbe interagire con l'actina interferendo con la sua polimerizzazione in fibra. Questa ipotesi è supportata dallo studio della superficie di potenziale dell'actina: le regioni dell'actina a potenziale negativo, quelle cioè che potrebbero interagire con le cariche positive del dominio C-terminale di HBHA, coincidono con le zone di interazione delle molecole di G-actina durante il processo di polimerizzazione in F-actina. Sono in corso studi di polimerizzazione della G-actina volti a comprendere l'effetto di HBHA sulla formazione di F-actina.

Il secondo sistema proteico analizzato è quello della proteina RipA, una proteina recentemente identificata come *partner* di un importante fattore di crescita quale la peptidoglicano idrolasi RpfB (Ruggiero A. et al, 2009; Hett E.C. et al, 2007). Poiché è stato osservato che mutanti di delezione del gene *ripA* mostrano un fenotipo anormale, caratterizzato da cellule batteriche allungate e incapaci di dividersi, è stato ipotizzato che questa proteina possa essere una peptidasi del peptidoglicano (Hett E.C. et al., 2008). RipA rappresenta quindi un *target* ideale per la messa a punto di nuovi farmaci anti-tubercolosi, perché inibire la sua attività potrebbe voler dire inibire una delle funzioni vitali per il batterio (Kana B.D., 2009).

Lo studio di RipA ha avuto da subito come obiettivo quello di riuscire a cristallizzare la proteina, con lo scopo di determinarne la struttura mediante cristallografia a raggi X. La conoscenza della struttura cristallografica è infatti un primo passo verso la progettazione di farmaci che possano inibire la sua funzione. Uno studio bioinformatico della sequenza di RipA ha consentito di identificare tre domini principali, in cui il dominio catalitico si colloca nella porzione C-terminale della proteina e presenta una significativa identità di sequenza (circa il 33%) con cisteine-proteasi della famiglia NIC/P60. Questo dato è consistente con la

funzione proposta per RipA di degradare i legami crociati del peptidoglicano. Poiché è difficile cristallizzare proteine multidominio, sono stati realizzati tre diversi costrutti della proteina: uno contenente tutti e tre i domini e privato del peptide segnale N-terminale (RipA₄₀₋₄₇₂), uno contenente il solo dominio C-terminale (dominio catalitico, RipA₃₃₂₋₄₇₂), ed un costrutto intermedio contenente il secondo e il terzo dominio (RipA₂₆₃₋₄₇₂). I tre costrutti sono stati clonati ed espressi con successo, e le rispettive proteine ricombinanti sono state purificate in forma omogenea e utilizzate per esperimenti di cristallizzazione. Sono stati ottenuti cristalli ordinati e con buone caratteristiche diffrattometriche per il costrutto RipA₂₆₃₋₄₇₂. I cristalli sono stati utilizzati per la registrazione dei dati di diffrazione presso il sincrotrone ESRF di Grenoble, ad una risoluzione atomica (1.0 Å). La soluzione della struttura cristallografica è tuttora in corso (Ruggiero A. et al, *In Press*).

Infine, l'ultimo sistema studiato è quello della *Cold Shock Protein A*, una proteina sovra-espressa in seguito ad un abbassamento della temperatura ambientale (Phadtare S. et al, 2004). In questo lavoro di tesi, la proteina CspA da *Micobacterium tuberculosis* è stata per la prima volta clonata, espressa e purificata. Quindi, la proteina ottenuta in forma pura è stata analizzata mediante dicroismo circolare (CD). Lo spettro CD presenta caratteristiche simili a quelle delle proteine destrutturate, con un minimo a 202 nm. Tuttavia, uno spettro molto simile è stato riportato per l'omologa proteina di *E.coli* (Reid K.L. et al 1998). È tuttavia noto che le proteine che contengono un elevato numero di residui aromatici possano presentare spettri CD di questo tipo (Chatterjee S. et al, 1993; Kelly S.M et al, 2000). Per tali ragioni, per avere una prima indicazione sul grado di struttura della proteina sono stati registrati spettri NMR mono e bi-dimensionali. In particolare, gli esperimenti di correlazione omonucleare registrati presentano una distribuzione dei segnali relativi ai protoni ammidici in un intervallo di frequenza di circa 1 ppm, una caratteristica che in generale viene considerata indice di una elevata percentuale di struttura flessibile e non ordinata. Contemporaneamente, anche lo spettro di correlazione 2D [¹H,¹⁵N]-HSQC, presenta i segnali dei protoni NH-ammidici in una regione piuttosto ristretta della mappa, impedendo l'assegnazione delle risonanze necessarie per la determinazione della struttura tridimensionale della proteina. Nel complesso, il comportamento spettrale osservato per la CspA appare significativamente diverso da quello riportato in letteratura per proteine della stessa famiglia in condizioni sperimentali strettamente analoghe (Jaravine V.A., 2000; Newkirk K. et al, 1994). E' possibile che nonostante l'elevato grado di omologia esibito dalla proteina CspA rispetto ad altre *cold shock* di struttura nota, le residue differenze di composizione e sequenza siano sufficienti a determinarne un profilo conformazionale e di stabilità specifico.

Per questa ragione, si è deciso di realizzare anche un saggio di mobilità elettroforetica per stabilire se i pochi elementi di struttura presenti nella molecola possano essere sufficienti affinché la CspA da *M. tuberculosis* sia ugualmente attiva e quindi in grado di legare acidi nucleici. In effetti, gli esperimenti di legame al ssDNA mostrano che la proteina presenta affinità di legame per oligonucleotidi. Questo può essere spiegato immaginando che le regioni flessibili della molecola siano comunque importanti per la sua attività, come avviene nel caso di molte altre DNA *binding protein* ed RNA *chaperon* (Neira J.L., 2009; Mayer O. et al, 2007; Tompa P. et al, 2004) e che i pochi elementi di struttura presenti siano proprio quelli coinvolti nel *binding*.

I risultati raccolti nel presente lavoro di dottorato sono un utile punto di partenza per aprire la strada alla progettazione di farmaci anti-tubercolari. I dati ottenuti su HBHA, ad esempio, hanno permesso di ampliare la conoscenza dei meccanismi molecolari che inducono l'agglutinazione del batterio e quindi potranno essere di aiuto per la realizzazione di inibitori del processo di agglutinazione, vitale per il batterio. Analogamente la conoscenza della struttura della proteina RipA potrà essere un importante punto di inizio per confermare la sua funzione di peptidasi del peptidoglicano e per il *design* di molecole che possano bloccare, per esempio, il sito attivo dell'enzima impedendo la duplicazione batterica. Infine, la conoscenza della struttura e dell'attività della proteina CspA è interessante perché tale proteina è implicata indirettamente in diversi meccanismi molecolari, come l'adattamento ambientale, ma anche la regolazione genica di proteine come il fattore di crescita RpfB, *partner* della proteina RipA. Una sua modulazione potrebbe, quindi, interferire con diversi processi cellulari importanti per la sopravvivenza del batterio.

CAPITOLO IV
Materiali e metodi

4.1 Clonaggio dei geni codificanti le proteine HBHA, RipA e CspA e loro forme tronche

4.1.1 Amplificazione dei geni mediante reazione a catena della DNA polimerasi (PCR)

I geni *hbha*, *hbha* Δ *c*, *hbha*₁₀₋₁₆₀, *hbha*₂₅₋₁₆₀, *CspA*, *RipA*₄₀₋₄₇₂, *RipA*₃₃₂₋₄₇₂, *RipA*₂₆₃₋₄₇₂ sono stati amplificati a partire dal genoma del *M. tuberculosis*, ceppo H37Rv, mediante reazione di PCR.

Per ciascun gene sono stati disegnati opportuni oligonucleotidi di innesco per la reazione di PCR, sulla base della sequenza dei singoli geni (o frammenti di geni) da amplificare. La scelta di ciascun *primer* ha anche previsto l'inserimento a monte di essi di siti di restrizione specifici per il riconoscimento di endonucleasi utili per il clonaggio della sequenza d'interesse nell'opportuno vettore plasmidico di espressione.

Di seguito sono riportati le coppie di oligonucleotidi (*forward* e *reverse*) scelte per l'amplificazione di ogni singolo gene.

1) *hbha*:

Fw: 5' – ATACCCATGGCTGAAAAC TCG – 3'

Rv: 5' – TTCGGAAAGCTTCTACTTCTGGGTGA-3'

2) *hbha* Δ *c*:

Fw: 5' – ATACCCATGGCTGAAAAC TCG – 3'

Rv: 5' – GCCGGAGCAAGCTTCTAAGGCAGCGAT-3'

3) *hbha*₁₀₋₁₆₀:

Fw: 5' - CATCCATGGGAAAGGCTCCGTTGCTTGCCG-3'

Rv: 5' – GCCGGAGCAAGCTTCTAAGGCAGCGAT-3'

4) *hbha*₂₅₋₁₆₀:

Fw: 5' -CATGCCATGGGAGCCACTGTCAACGAGTTGGAT-3'

Rv: 5' – GCCGGAGCAAGCTTCTAAGGCAGCGAT-3'

5) *CspA*:

Fw : 5' – CATGCCATGGGACCACGGGAACTGTG – 3'

Rv: 5' – CCCAAGCTTATCAGAGCGAGCGGACTCC – 3'

6) *RipA*₄₀₋₄₇₂:

Fw: 5' – CATGCCATGGGAGATCCACAGACGGACACCA -3'

Rv :5'- CCCAAGCTTACTAGTACTCGATGTATCGGAC - 3'

7) *RipA*₂₆₃₋₄₇₂:

Fw: 5' - CATGCCATGGGATGGGATGGCTTGTGGGAC - 3'
Rv :5' - CCCAAGCTTACTAGTACTCGATGTATCGGAC - 3'

8) *RipA*₃₃₂₋₄₇₂:

Fw: 5' - CATGCCATGGGACGGATTCCGCGAGTT TATG - 3'
Rv :5' - CCCAAGCTTACTAGTACTCGATGTATCGGAC - 3'

Si può osservare che in tutti i *primer forward* è stato inserito il sito di restrizione per l'enzima *NcoI* (in blu), mentre in tutti i *primer reverse* è stato introdotto il sito di restrizione specifico per l'enzima *HindIII* (in lilla). Sono invece sottolineate le triplete codificanti i codoni di *stop*.

Per allestire ciascuna reazione, 50 ng di DNA stampo sono fatti reagire in presenza della specifica coppia di *primer* (25 pmol ciascuno), di una miscela di dNTP (0.25 mM ognuno), dell'enzima *Pfu turbo DNA polimerasi* (5U), 1µl di formammide e del *buffer* dell'enzima. I campioni preparati sono stati quindi sottoposti al seguente programma di PCR:

preciclo:

2 min a 95°C

fase di denaturazione

Ciclo (ripetuto 20 volte) :

30 sec a 95°C

fase di denaturazione

90 sec a T

fase di *annealing*

90 sec a 72°C

fase di polimerizzazione

12 min a 72°C

estensione finale

Dove T è la temperatura di *annealing*, e dipende dalle temperature di *melting* dalla specifica coppia di *primer*.

I prodotti ottenuti dall'amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio (Euroclone) all'1.5 % per poter controllare che i frammenti genici d'interesse nella miscela di reazione fossero visibili come un'unica banda. In particolare sono stati analizzati 5 µL di ciascuna reazione. La corsa elettroforetica è stata condotta a 100Volt in buffer TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA, pH 7.2).

4.1.2 Digestione enzimatica e purificazione dei geni e dei vettori di espressione

Tutti i prodotti di PCR sono stati purificati usando il *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) e successivamente sottoposti a digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione *NcoI* e *HindIII*.

Ogni frammento amplificato (circa 1µg) è stato digerito con 4 U di enzima per circa 3h a 37°C, in un tampone contenente 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT pH 7.9 (*buffer* NEB2, BioLabs). Contemporaneamente anche i vettori di espressione pET28 a(+), pETM11 e pETM30 sono stati digeriti nelle medesime condizioni e con gli stessi enzimi di restrizione.

Ciascun vettore poi è stato sottoposto ad un'ulteriore reazione con la fosfatasi alcalina CIP (calf intestine phosphatase), per rimuovere i gruppi fosfato in posizione 5', per prevenire la reazione intra-molecolare di circolarizzazione del vettore. La reazione di defosforilazione del vettore digerito è stata condotta utilizzando 10U di enzima (CIP, NEB BioLabs) , a 37°C per un'ora. L'enzima è successivamente inattivato a 75°C per 10 min. Quindi si procede ad un'ulteriore purificazione sia dei frammenti di PCR che dei vettori di espressione, a seguito della digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione. In particolare, per i frammenti genici è stato ancora utilizzato il *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), mentre per i vettori il *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

4.1.3 Realizzazione dei costrutti ricombinanti e minipreparazione di DNA plasmidico

Per realizzare i costrutti ricombinanti dei geni amplificati, ogni singolo gene è stato introdotto nel relativo vettore di espressione, mediante reazione di ligasi. Per ciascuna reazione, una miscela di vettore e inserto (nel rapporto molare 1:3) è stata fatta reagire in presenza della T4 DNA Ligase (400 U/µL), utilizzando 20 U di enzima per ogni µg di DNA, in a volume finale di 10 µL, per 4 h a 16°C.

La miscela di reazione è stata quindi utilizzata per trasformare i cloni ricombinanti in cellule di *E.coli DH5'α* chimicamente competenti¹.

In particolare metà del volume di reazione di ligasi (5 µL) è stato utilizzato per trasformare le cellule competenti. Per facilitare l'ingresso del DNA ricombinante all'interno delle cellule si è eseguito un breve *shock* termico sulle cellule con un'incubazione a 42°C per 45 secondi.

Le cellule trasformate sono state piastrate su terreno solido contenente l'antibiotico selettivo, kanamicina (50 µg/mL) per i vettori pET28a(+) e pETM11, e ampicillina (100 µg/mL) per il vettore pETM30, al fine di permettere solo la crescita delle cellule che hanno incorporato il costrutto ricombinante. Lo sviluppo dei cloni richiede l'incubazione a 37 °C per una notte. Dalle piastre sono state prelevate diverse colonie batteriche isolate, che sono state incubate in 10 mL di LB (*Luria Broth*) e antibiotico a 37 °C per una notte. I *pellet* cellulari di questi inoculi sono stati utilizzati per la purificazione del DNA plasmidico mediante estrazione per lisi alcalina realizzata con il kit “*QIAquick miniprep Kit*” (QIAGEN). Il DNA ricombinate ottenuto è stato sequenziato dalla MWG-Biotech per il controllo della corretta sequenza genica.

Nota 1: Protocollo per la realizzazione di cellule chimicamente competenti.

Un singolo clone di un ceppo di *E. coli*, cresciuto su LB agar a 37°C, viene inoculato in 3 mL di terreno e lasciato crescere a 37 °C sotto agitazione (180 rpm) per una notte. Queste cellule sono poi utilizzate per inoculare 250 mL di terreno LB a 37 °C e far crescere le cellule fino ad una fase medio esponenziale, corrispondente a 0.6 OD_{600nm}. Raggiunto tale valore di densità ottica, si lasciano riposare le cellule per 30 min in ghiaccio, per poi centrifugarle (6000 rpm, 10 min, 4 °C). I *pellet* cellulari sono risospesi in 125 mL di una soluzione fredda di CaCl₂ 50 mM e lasciate in ghiaccio ancora per 30 min. Successivamente, le cellule sono nuovamente centrifugate e riprese in un volume di 16 mL di CaCl₂ 50 mM freddo.

A questo punto, le cellule sono aliquotate in frazioni da 200 µL e conservate a -80°C o utilizzate direttamente per la trasformazione.

4.2 Espressione delle proteine ricombinanti

4.2.1. Proprietà dei vettori di espressione

I vettori plasmidici scelti per l'espressione ricombinante delle proteine sono vettori della serie pET. Questi vettori presentano caratteristiche utili per il clonaggio e l'espressione di proteine ricombinanti in una vasta serie di ceppi di *E. coli*. Essi contengono un promotore forte (il promotore fagico T7) per l'induzione chimica dell'espressione delle proteine codificate dal

gene clonato all'interno del *polilinker*, ovvero di un sito di clonaggio multiplo contenente un cospicuo numero di siti di restrizione.

In particolare, i vettore scelti pETM11 e pETM30 presentano anche altre due caratteristiche: il pETM11 (Fig. 4.2.1-1) possiede a monte del *polilinker* una sequenza che codifica un peptide composto da sei istidine, utili ai fini delle successive fasi di purificazione; il pETM30 (Fig. 4.2.1-2) possiede invece una proteina di fusione, quale la His₆-GST, a sua volta contenente la coda di sei istidine. In entrambi i casi, i prodotti di fusione possono essere rimossi in quanto è presente anche un sito di riconoscimento specifico per la proteasi TEV.

In figura 4.2.1-3 è riportata anche la mappa del vettore pET28a(+).

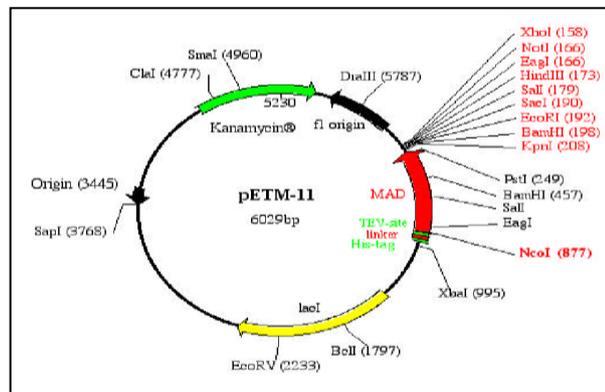


Figura 4.2.1-1 Mappa del vettore di espressione pETM11

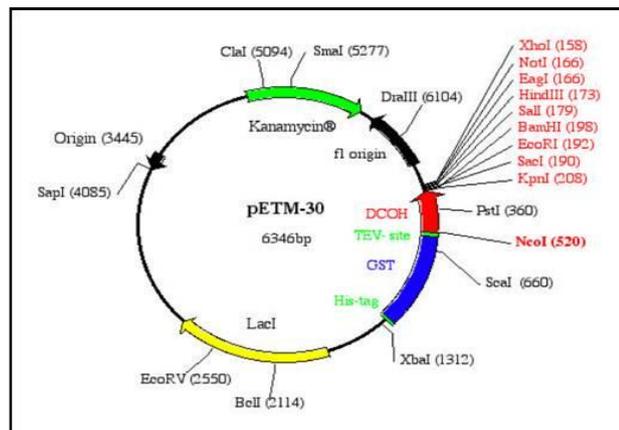


Figura 4.2.1-2 Mappa del vettore di espressione pETM30

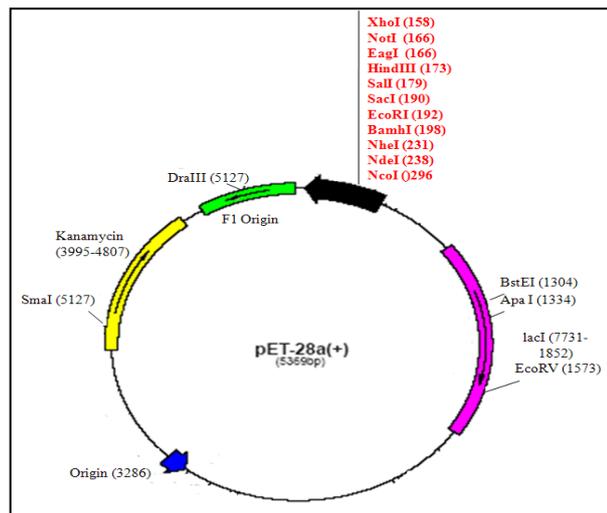


Figura 4.2.1.3 Mappa del vettore di espressione pET28a(+)

4.1.3 Espressione su larga scala

L'espressione su larga scala delle singole proteine ricombinanti è stata realizzata partendo dalla trasformazione chimica di ogni singolo costrutto in appropriati ceppi batterici di *E. coli* per l'espressione proteica. La procedura di trasformazione chimica è quella descritta nel paragrafo 4.1.3. Una singola colonia è stata cresciuta in 10 mL di LB e antibiotico a 37°C per circa 16h sotto agitazione (180 rpm). Questo pre-inoculo è stato poi utilizzato per inoculare 1L di terreno LB con antibiotico. Le cellule sono cresciute a 37°C sotto agitazione fino al raggiungimento di una media fase esponenziale corrispondente a valori di densità ottica compresa tra 0,6 e 0,8 OD_{600nm}. A questo punto si procede con l'induzione dell'espressione proteica aggiungendo una quantità di induttore (IPTG) pari ad una concentrazione finale di 1mM. La crescita procede a 22°C (per le proteine RipA e CspA) o a 37°C per un tempo variabile, di circa 4-5h per la proteina HBHA e tutti i suoi altri costrutti, per 16h per le proteine RipA e CspA.

Quindi le cellule sono centrifugate a 6000 rpm per 15min a 4°C. I *pellet* cellulari sono risospesi in un tampone contenente 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, e inibitori di proteasi (*Roche Diagnostic*). La sospensione è poi sonicata per circa 15 min usando il Misonix Sonicator 3000 utilizzando una microsonda e impulsi di circa 9-12 Watt. Il lisato cellulare viene centrifugato a 16000 rpm per 30 min a 4°C e le frazioni solubili raccolte sono analizzate mediante elettroforesi in condizioni denaturanti per verificare la presenza del prodotto ricombinante.

4.3 Purificazione

4.3.1 Purificazione mediante cromatografia di affinità

Il lisato cellulare contenente le proteine ricombinanti, ottenuto come descritto precedentemente, è stato filtrato con filtri da 0.22 μm (Millipore) e caricato su colonnina Ni-NTA (*GE Healthcare*) da 5 mL equilibrata in un tampone A (10 mM imidazolo, 300 mM NaCl e 50 mM Tris-HCl a pH 8.0). Dopo il caricamento del lisato, la colonnina è stata montata su un sistema cromatografico AKTA-FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) e lavata con circa 50 mL di tampone A per allontanare le proteine che si sono legate alla colonnina in maniera aspecifica. L'eluizione della proteina è stata eseguita impostando un gradiente lineare da 10mM a 300mM di imidazolo e raccogliendo frazioni di 2 mL. Le frazioni recuperate sono state analizzate su gel SDS-PAGE e rivelate con colorazione al Coomassie Brilliant Blue R-250. Le frazioni di interesse sono state riunite e dializzate a 4°C contro un tampone contenente 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, utilizzando una membrana Spectrapor con l'opportuno MWCO.

Per la sola proteina HBHA la procedura di purificazione ha previsto l'utilizzo di una colonnina del tipo Heparin Hi-trap (*GE Healthcare*), sfruttando la funzione naturale della proteina di legare questo oligosaccaride con il suo dominio C-terminale. Per tale ragione, con la fase di clonaggio non era stato introdotto alcun peptide di fusione. I tamponi utilizzati per equilibrare e lavare la colonnina dopo il caricamento del lisato cellulare è un tampone 10mM NaP pH7.0. L'eluizione della proteina è stata realizzata con un gradiente di NaCl da 0 a 500mM. La purificazione ha previsto le stesse procedure appena descritte per le colonnine NiNTA.

4.3.2 Digestione con proteasi TEV

Le proteine espresse come prodotto di fusione della coda di istidine o della His₆-GST, purificate mediante cromatografia di affinità, sono trattate con la proteasi TEV per la rimozione specifica del costrutto di fusione. In particolare, a ciascuna proteina è stata aggiunta una quantità di proteasi tale da avere un rapporto molare enzima-substrato di 1:50. La reazione è stata condotta per 3h a 30°C o per 16h a 22°C in un tampone 50mM TrisHCl, pH 8.0 e 100 mM NaCl. La digestione è controllata su gel SDS-PAGE. La miscela di reazione

viene poi caricata nuovamente sulla colonnina NINTA, per procedere ad una nuova cromatografia di affinità: in questo caso il prodotto di fusione resta legato alla resina di Ni²⁺, mentre la proteina attraversa la colonna e può essere recuperata all'uscita della colonna. Come descritto precedentemente, per eluire la coda di istidine e la His₆-GST si utilizza un gradiente di imidazolo.

4.3.3 Cromatografia ad esclusione molecolare

La cromatografia ad esclusione molecolare è stata condotta su tutti i campioni proteici per rimuovere eventuali aggregati o contaminanti. Sono state utilizzate diverse colonne: Superdex 200 16/60 e Superdex 75 16/60, o Superdex 200 10/30 e Superdex 75 10/30 (*Pharmacia*). Ogni colonna è stata collegata ad un sistema AKTA Purifier ed equilibrata con un tampone 50mM TrisHCl, pH 8.0, 150mM NaCl, utilizzato anche per la corsa cromatografica. Per la calibrazione delle colonne sono state utilizzate diverse proteine a peso molecolare noto (*GE Healthcare*). I campioni di proteina d'interesse sono raccolti e concentrati in *Amicon-Ultra membranes* (Millipore).

Per l'esperimento di spiazzamento con i peptidi è stata utilizzata una colonna per cromatografia ad esclusione molecolare analitica, quale la PC75 3.2/30 (*Pharmacia*).

4.4 Analisi delle proteine

4.4.1 Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica è stata determinata mediante il metodo Bradford, utilizzando il BIO-RAD *Protein Assay* come reagente e l'albumina di siero bovina (BSA) come *standard* di calibrazione. Il reattivo viene aggiunto ad una soluzione diluita di proteina e viene analizzato spettroscopicamente (Jasco V-550 UV-VIS) misurando l'assorbimento a 595nm. Comparando i valori di assorbimento con quelli di soluzioni a concentrazione nota di BSA, si determina la concentrazione della proteina esaminata.

La determinazione della concentrazione proteica è stata anche determinata misurando direttamente l'assorbimento di un campione proteico a 280 nm in una cuvetta di quarzo da 1 cm. La concentrazione del campione viene poi calcolata dalla legge di Lambert-Beer:

$A_{280\text{nm}} = \epsilon bc$, dove ϵ è il coefficiente di estinzione molare a 280nm ed è caratteristico per ogni proteina; b è il cammino ottico della cella utilizzata; c è la concentrazione proteica.

4.4.2 Elettroforesi in condizioni denaturanti SDS-PAGE

L'elettroforesi in condizioni denaturanti è stata realizzata su gel di poliacrilammide al 12,5%, 15% e 18% secondo il protocollo di Laemmli (Laemmli, 1970). I campioni da analizzare sono sciolti in un tampone contenente 1% SDS (Applichem), 5% β -mercaptoetanololo (Sigma), 0.001% blu di bromofenolo (ICN Biomedicals) e 10% glicerolo (Applichem), e poi denaturati per 5 min a 100°C. Quindi, i campioni sono caricati su gel in un tampone di corsa 0.025 M Tris-HCl, 0.2 M glicina a pH 8.3 e 0.1% SDS. La corsa elettroforetica è condotta a 180 Volt costanti. Al termine della corsa le proteine sono rivelate con il colorante Coomassie Brilliant-Blue (Applichem) nel modo seguente: il gel viene immerso in una soluzione contenente lo 0.1% di Coomassie Brilliant-Blue R250, il 25% di alcol isopropilico e un 10% acido acetico per 30 min sotto blanda agitazione. Quindi, il gel viene lavato con una soluzione composta dal 30% di alcol etilico e 10% di acido acetico per 5 min e poi trasferito in acqua.

4.4.3 Esperimenti di ritardo elettroforetico

Per l'esperimento di ritardo elettroforetico sono stati utilizzati due oligonucleotidi con sequenza casuale ma complementare:

ssDNA₁: 5' – CGCGCGCGCGCGACCAAAGCGCAGGAAGATC -3'

ssDNA₂: 5' – GATCTTCCTGCGCTTTGGTCGCGCGCGCGCG – 3'

I due sono stati anche utilizzati per generare un frammento di dsDNA, da utilizzare come controllo negativo. La procedura di *annealing* degli oligonucleotidi ha previsto il seguente protocollo: 100 μ M di ciascun oligonucleotide sono stati incubati in un tampone 200mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM MgCl₂, a 90°C per 5 min. Successivamente si lascia raffreddare il campione lentamente fino al raggiungimento della temperatura ambiente.

Per la corsa elettroforetica è stato preparato un gel nativo al 15% in tampone TBE (45 mM Tris-HCl pH 8.0, 45mM acido borico, 1mM EDTA) applicando un voltaggio di 100V.

Ciascun campione caricato sul gel è stato preparato con 20pmol di DNA per un volume finale di 20 μ l in un tampone 20mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 6% glicerolo, aggiungendo, ove richiesto, una quantità crescente di proteina CspA (100pmol, 200pmol e 400pmol). La corsa elettroforetica viene condotta in tampone TBE a 100Volt costanti. Al termine della corsa, per la rivelazione delle bande si immerge il gel in una soluzione di tampone TBE con l'aggiunta di bromuro di etidio (5 μ L / 50 mL di tampone) per 10 min e poi si rivela il DNA sotto la luce di raggi UV.

4.4.4 Misure di *Light Scattering*

Per le misure di *light scattering* è stato utilizzato un MiniDAWNTMTreos (Wyatt Instrument Technology) dotato di un laser con $\lambda=658$ nm. In particolare, per le misure in modalità di *static light scattering* (SLS), una colonna semipreparativa per cromatografia ad esclusione molecolare è stata montata su un sistema AKTA Purifier. 500 μ L di campione (1mg/mL) sono stati caricati su una colonna Superdex-200 10/30 (Pharmacia) equilibrata in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 e 0.15 M NaCl, applicando un flusso di 0.5 mL/min. I profili di eluzione del campione sono stati determinati utilizzando come *detector* un rifrattometro Shodex e il sistema MiniDAWNTMTreos. I valori dei pesi molecolari medi sono stati ottenuti elaborando i dati con l'algoritmo di Zimm presente nel software ASTRA (versione 5.0, Wyatt Technology Corp., U.S.A.) in dotazione allo strumento. I dati sono stati analizzati attraverso il software Astra 5.3.4.14 software (Wyatt Technology).

Le misure di *Dynamic light scattering* (DLS) hanno permesso di derivare il raggio idrodinamico delle molecole grazie al sistema WyattQELS, un amplificatore del segnale di *scattering* indispensabile per determinare la dimensione di particelle piccole fino a 1nm o comunque più piccole di 10nm. La normalizzazione e la calibrazione dello strumento sono state eseguite usando un campione di toluene e BSA.

I campioni di HBHA Δ C utilizzati per le misure sono stati preparati diluendo la proteina in tampone 50mM TrisHCl, 150 mM NaCl buffer, pH 8.0. Sia la proteina che il tampone sono stati filtrati con filtri da 0,02 μ m (Millipore) prima di essere utilizzati.

A partire da una soluzione 6 mg/mL di proteina sono state preparate diluizioni alle seguenti concentrazioni: 0.2, 1.0, 1.3, 1.7, 2.8 mg/mL. Tutte le misure sono state registrate in triplicato per almeno due minuti di acquisizione. Il raggio idrodinamico calcolato da queste misure è stato derivato dal coefficiente di diffusione, attraverso l'equazione di Einstein–Stokes, inserita in uno specifico programma del software ASTRA.

4.4.5 Small Angle X-ray Scattering (SAXS)

Le misure di SAXS sono state raccolte presso la *beamline* X33 del sincrotrone DESY di Amburgo. Gli esperimenti sono stati condotti sia sulla proteina HBHA che sulla forma tronca HBHA Δ C misurando i *pattern* di diffrazione a diverse concentrazioni, comprese tra 2.0 e 7.7 mg/mL, e con un momento di *transfer* (*s*) compreso tra 0.6 e 5.0 nm⁻¹. Questo parametro è correlato all'angolo del raggio diffratto attraverso la formula: $s = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$ dove 2θ è l'angolo di *scattering* e $\lambda = 0.15$ nm è la lunghezza d'onda del raggio incidente. Tutti i dati sono stati processati usando il programma PRIMUS (Konarev P. et al 2003). Le masse molecolari dei soluti sono state determinate a partire dal volume di Porod (V_p) (Porod G. 1982) ovvero del volume escluso. I modelli a bassa risoluzione di HBHA e HBHA Δ C sono stati generati da due modelli *ad initio* mediante il programma GASBOR (Svergun D.I. et al, 2001). Questo *software* genera un modello della proteina a partire da un assemblaggio casuale dei residui amminoacidici (*dummy residue*) all'interno di un involucro sferico con un diametro corrispondente alla misura massima della molecola (D_{max}). Quindi si procede col modificare localmente la molecola fino a quando non si ottiene un modello con la più bassa energia potenziale.

4.4.6 Analisi spettroscopiche: dicroismo circolare

Gli spettri CD sono stati registrati a temperature ambiente utilizzando una spettropolarimetro Jasco J-715 dotato di un sistema per il controllo della temperatura (Peltier) PTC-423S/15, in una cuvetta di quarzo da 0,1 mm. Tutti gli spettri sono stati registrati con i seguenti parametri: far UV *range* compreso tra 190-260 nm; ampiezza della banda di 1 nm, risposta ogni 8 sec, acquisizione dei dati ogni 0.2 nm e una velocità di scansione di 10 nm/min; tre acquisizioni per spettro. Per ogni misura è stata scelta una concentrazione di proteina pari a 0,3 mg/mL in 10mM TrisHCl, pH8.0. Le curve di denaturazione termica sono state registrate a 222nm tra 20°C e 90 °C, con una velocità di scansione di 60°/h, in un tampone privo di sale (10mM TrisHCl, pH8.0.) o in presenza di : 0.1, 0.3 M NaCl; 0.3 M KCl/CaCl₂/K₂SO₄/MgSO₄. Tutti i dati sono stati espressi come ellitticità molare per residuo (θ).

4.4.7 Misure termodinamiche di calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Le misure di DSC sono state realizzate utilizzando un calorimetro nano-DSC 6300 (CSC - USA), impostando una velocità di scansione di 1.0 K/ min e analizzando campioni di proteina HBHAΔC a diversa concentrazione (da 2.5 a 10 mg/mL). I dati raccolti come effetto termico in funzione della temperatura sono stati convertiti in capacità termica apparente sottraendo la curva calorimetrica registrata per il tampone in cui era solubilizzata la proteina (50mM TrisHCl, pH 8.0, 150mM NaCl) e dividendo ciascun valore per la concentrazione molare proteica. La variazione dell'entalpia di vant'Hoff è stata calcolata utilizzando la seguente formula (Freire E. et al 1978; Privalov P.L., 1979):

$$\Delta dH(T_d)_{vH} = nR T_d^2 \Delta C_p(T_d) / \Delta_d H(T_d)$$

dove T_d la temperatura di denaturazione corrispondente al massimo del picco del DSC, $\Delta C_p(T_d)$ è la corrispondente capacità termica, $\Delta_d H(T_d)$ è l'intera entalpia di denaturazione calcolata integrando l'area del picco DSC, R è la costante dei gas, mentre n è 4 o 6 a seconda della stechiometria del processo: $N \rightleftharpoons D$ or $N_2 \rightleftharpoons 2D$.

4.4.8 Sintesi peptidica

La sintesi peptidica è stata realizzata su di un sintetizzatore automatico di peptidi Syro I (Multisyntech GmbH), utilizzando come resina Rink Amide (NovaBiochem). La sintesi è stata condotta su scala 0,05 mmol per ciascun peptide, con un grado di sostituzione della resina di 0,5 mmol/g.

Ciascun ciclo di sintesi ha previsto le seguenti fasi:

1. Accoppiamento dell'amminoacido x
2. Lavaggio della resina
3. 2° accoppiamento dell'amminoacido x
4. Lavaggio della resina
5. De protezione dell'N-terminale
6. Lavaggio della resina

Per le reazioni di accoppiamento sono stati utilizzati i seguenti reattivi in quantità equivalenti rispetto alla scala di sintesi: 4 equivalenti di amminoacido; 4 equivalenti di HOBt; 4 equivalenti di HBTU; 8 equivalenti di DIEPA in NMP.

Le reazioni di accoppiamento sono state condotte due volte per ogni amminoacido (INBIOS), impostando un tempo di acilazione di 25 min. Al termine della seconda reazione di

accoppiamento si prosegue con la deprotezione del gruppo Fmoc- utilizzando una soluzione di piperidina (Fluka) al 40% in DMF (Sigma Aldrich) che si lascia reagire per circa 10 min.

Completata la sintesi, prima di effettuare il distacco del peptide dalla resina, è stata effettuata una reazione di acetilazione sull'N-terminale, utilizzando una soluzione di anidride acetica 4.7%/ DIPEA 9%/ Hobt 1%/ DMF 85.3%.

Il distacco del peptide dalla resina e la contemporanea deprotezione delle catene laterali è stata effettuata utilizzando una soluzione costituita da TFA 90%, Tioanisolo 5%, EtanDiTiolo3%, anisolo2% per circa 3h. Successivamente la resina è stata filtrata ed i peptidi precipitati con etere etilico freddo. Il precipitato è stato ripreso con acqua e liofilizzato.

I peptidi sintetizzati sono stati purificati su HPLC Shimadzu class-LC8A, equipaggiato con un rivelatore UV Lambda Max Mod. SPD-10A. I campioni sono stati caricati su una colonna Phenomenex C₁₈ (2.2 mm * 250 mm, 5 µm). La cromatografia a fase inversa è stata eseguita impiegando come solventi una soluzione di H₂O/TFA 0.1% (solvente A) e una soluzione di CH₃CN/TFA 0.1% (solvente B) ed utilizzando un gradiente d'eluizione lineare da 5 al 70% di B. Le frazioni contenenti i prodotti desiderati sono state riunite e liofilizzate. L'identità dei peptidi purificati è stata confermata utilizzando uno spettrometro di massa LC-MS della ditta Thermo Electron MSQ Surveyor.

4.4.9 Esperimenti di *Surface Plasmon Resonance* (SPR)

Gli esperimenti SPR sono stati condotti su uno strumento BIACORE 3000 (Biacore AB, Uppsala, Svezia). Un biosensore CM5 è stato impiegato per immobilizzare l'actina (Sigma Aldrich) usando la procedura *standard* di accoppiamento di ammino-gruppi primari su gruppi carbossilici esterificati presenti su di una matrice di destano (Johnsson B. et al 1991): 30 µL di una miscela costituita da N-idrossisuccinimmide (NHS) e da N-etil-N'(dimetilamminopropil)-carbodiimmide (EDC) sono stati iniettati ad un flusso di 5 µL /min per attivare la superficie del sensore. I gruppi reattivi residui sono inattivati trattando il *chip* con una soluzione 1M di etanolamina-HCl, pH 8.5. La stessa procedura è stata eseguita sul canale di riferimento.

I saggi di *binding* sono stati realizzati in tampone HBS (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, pH 7.4), ad un flusso di 20 µL/min. I campioni di proteina HBHA, HBHAΔC e la miscela HBHA-eparina sono stati preparati per diluizione in tampone HBS e successivamente filtrati in filtri da 0,02 µm (Millipore). Le iniezioni di HBHA sono state fatte

con 90 μL di campione preparato alle seguenti concentrazioni: 1.0, 2.0, 9.0, 16, 48, 68, 104 μM (calcolata come se la proteina fosse monomero). Per gli esperimenti di competizione è stata usata sempre una concentrazione di HBHA 8.9 μM . La proteina è stata preincubata con quantità equivalenti di eparina (da 0 a 2).

L'analisi dei dati è stata realizzata con il programma *BIAevaluation analysis* (versione 4.1, GE Healthcare) in dotazione allo strumento e con il programma *GraphPad Prism*, (versione 4.00, GraphPad Software, San Diego, California).

4.4.10 Cristallizzazione

Per la ricerca delle condizioni di cristallizzazione è stato utilizzato un approccio a matrice sparsa, utilizzando numerosi precipitanti e variando parametri quali la concentrazione di proteina e di precipitante. In particolare, sono stati impiegati precipitanti forniti dai kit commerciali (*Crystal Screen Kits I e II*, Hampton Research). L'intervallo di concentrazioni di proteina utilizzata va da 5mg/mL a 10mg/mL. Per le prove di cristallizzazione è stata utilizzata la tecnica *hanging drop*, depositando 1 μL di precipitante su 1 μL di proteina. Le piastre così ottenute sono state conservate in una stanza termostata a 20°C.

4.4.11 Spettroscopia NMR

L'analisi NMR è stata condotta utilizzando campioni di CspA o ^{15}N -CspA in concentrazioni 0.5-0.7 mM in H_2O - D_2O 90% v:v, in presenza di tampone fosfato 20 mM (pH 6-7), NaCl 100-150 mM, NaN_3 1 mM ed EDTA 0.1 mM.

Tutti gli esperimenti sono stati realizzati utilizzando uno spettrometro Varian Unity 600 operante a 14 T, equipaggiato con *cryoprobe* presso l'Istituto di Biostrutture e Bioimmagini del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Napoli, It). Le misure sono state effettuate a 298K. Come riferimento interno è stato utilizzato (trimetilsilil)-propionato di sodio. La soppressione del segnale del solvente è stata ottenuta via Watergate. Per gli esperimenti 2D-NOESY e 3D [^1H , ^{15}N] NOESY HSQC (Marion D. et al, 1989) sono stati utilizzati valori di mixing time nell'intervallo 50-150 ms. Per gli esperimenti 2D-TOCSY e 3D [^1H , ^{15}N] TOCSY-HSQC (Kupce E. et al, 2003) sono stati utilizzati valori di *mixing time* nell'intervallo 50-70 ms.

Per la preparazione della proteina ^{15}N -CspA si è proceduto nel modo seguente: un singolo clone di cellule JM101 è stato cresciuto in 5 mL di terreno LB (senza antibiotico) per 3h a 37°C. Le cellule sono poi state inoculate nel terreno minimo M9 (10mM MgSO_4 , 1mM CaCl_2 , 0,01% tiamina, 2% glucosio) contenente $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (1 g/l), come unica fonte di azoto, e cresciute a 37°C per circa 18h. Quindi, le cellule sono state centrifugate e risospese in una soluzione al 37% di HCl per circa 8h per ottenere una miscela di singoli amminoacidi marcati. Tale miscela è stata utilizzata per preparare un nuovo terreno M9 arricchito dagli amminoacidi marcati con ^{15}N . Questo terreno è stato utilizzato per la preparazione della proteina ricombinante ^{15}N -CspA, nelle modalità già descritte precedentemente (paragrafo 4.1.3).

4.4.12 Analisi bioinformatiche e database

Tutte le sequenze geniche utilizzate per clonare i geni codificanti le proteine oggetto di questo studio sono state raccolte dal *server* TBsgc (<http://www.doe-mbi.ucla.edu/TB/>), un sito *web* specifico per tutto ciò che riguarda i geni e le proteine del *M.tuberculosis*.

Tutte le analisi di sequenza sono state realizzate a partire dal *server* ExpASy (<http://www.expasy.org/>), all'interno del quale è possibile trovare una vasta serie di *link* per accedere a programmi di predizione.

4.5 Materiali

I reagenti utilizzati per preparare i tamponi e i terreni di crescita dei ceppi di *Escherichia coli*, quelli per preparare i gel di poliacrilammide per le analisi elettroforetiche (Acrilammide, APS, TEMED, SDS, Tris, glicina) sono stati acquistati presso la Sigma Aldrich, Euroclone, Applichem and ICN Biomedicals, mentre tutti i reagenti utilizzati negli esperimenti di SPR sono GEHealthcare.

I marcatori di peso molecolare per proteine sono Sigma Aldrich. Gli enzimi di restrizione e tutti gli enzimi di modificazione del DNA (la CIP e la T4 DNA ligase) sono New England Biolabs (NEB). Mentre i marcatori di peso molecolare per acidi nucleici sono sia NEB che Roche. L'enzima *Pfu Turbo* polymerase (2.5 U/ μL) é Stratagene. La sintesi degli oligonucleotidi di innesco della PCR sono stati commissionati alla Sigma-Genosys.

I vettori plasmidici di espressione pETM11, pETM20, pET28a(+) sono Novagen;

I ceppi di *E.coli* DH5 α , JM101 BL21(DE3) e BL21*CodonPlus*(DE3)RIL sono Invitrogen, mentre il ceppo Rosetta-GAMI(DE3) è Novagen.

Il *cocktail* di inibitori di proteasi (EDTA free) sono Roche.

L'etanolo, l'alcol isopropilico e l'acido acetico sono della J.T. Baker. Il TFA è Fluka.

Per quanto riguarda gli antibiotici Kanamicina (sale di solfato) e Ampicillina (sale di sodio) sono Sigma Aldrich. Ognuno di essi è stato sciolto in acqua deionizzata e conservato a -20°C. All'occorrenza, sono stati utilizzati alla concentrazione di 50 $\mu\text{g/mL}$ (kanamicina) o 100 $\mu\text{g/mL}$ (Ampicillina) sia in terreno solido che liquido.

Abbreviazioni

APS	Ammonio per solfato
BSA	Albumina di siero bovino
CIP	Calf intestine phosphatase
DIEPA	N,N diisopropilettilammina
DCM	Diclorometano
DMF	N,N-dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
DNA	Acido deossiribonucleico
DSC	Calorimetria a scansione differenziale
dNTP	Deossiribonucleoside trifostato
DTT	Ditiotrietolo
EDC	N-etil-N'(dimetil-amminopropil)-carbodiimide
EDTA	Acido etilendiamminotetracetico
Fmoc	9-fluorenilmetossicarbonile
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GST	Glutathione S-Transferasi
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HBS	10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, pH 7.4
HBTU	O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalattoside
LB	Luria Broth
NHS	N-idrossisuccinimide
NMP	N-metil-pirrolidone
O.D.	Densità ottica
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
PAGE	Poliacrilammide Gel Elettroforesi
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polietilenglicole
RNA	Acido ribonucleico

Rpm	Rivoluzioni per minuto
SDS	Sodio dodecilsolfato
SPR	Surface Plasmon Resonance
TEMED	N, N, N', N'- tetrametilendiammina
TAE	Tris acetato EDTA
TBE	Tris borato EDTA
TEV	Tobacco Etch virus protease
TFA	Acido trifluoro acetico
Tris-HCl	Tris (idrossimetil) ammino metano

BIBLIOGRAFIA

- Apgar J.R., Gutwin K.N., Keating E.. Predicting helix orientation for coiled-coil dimers. *Proteins*. 2008. 72(3):1048-65
- Apostolovic B. and Klok H.A. pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil *Biomacromolecules* 2008, 9, 3173–3180.
- A-Rum Shin, Kil-Soo Lee, Ji-Sook Lee, Su-Young Kim, Chang-Hwa Song, Saet-Byel Jung, Chul-Su Yang, Eun-Kyeong Jo, Jeong-Kyu Park, Tae-Hyun Paik, and Hwa-Jung Kim. *Mycobacterium tuberculosis* HBHA Protein Reacts Strongly with the Serum Immunoglobulin M of Tuberculosis Patients. *Clinical and vaccine immunology* 2006; 13 (8):869-875.
- Bermudez L.E., Goodman J.. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect. Immun* 1996; 64:1400-6.
- Bernardò P., Mylonas E., Petoukhov M.V., Blackledge M., Svergun D.I. Structural characterization of flexible proteins using Small Angle X-ray Scattering. *J.Am. Chem.Soc.* 2007; 129: 5656-5664.
- Bhatt K, Salgame P. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol.* 2007;27(4):347–62.
- Carabeo R.A., Grieshaber S.S., Fischer E., Hackstadt T.. *Chlamydia trachomatis* induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells, *Infect. Immun.* 2002. 70:3793–3803.
- Crick D.C., Mahapatra S., Brennan P.J.. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* 2001. 11: 107R-118R.
- Delogu G., Brennan M.J. Functional Domains Present in the Mycobacterial Hemagglutinin, HBHA. *J. Bact* 1999. 181(24): 7464–7469
- Downing K.J., Betts J.C., Young D.I., McAdam R.A., Kelly F., Young M., Mizrahi V. Global expression profiling of strains harbouring null mutations reveals that the five *rpf*-like genes of *Mycobacterium tuberculosis* show functional redundancy. *Tuberculosis* (2004) 84, 167–179.
- Dupres V., Verbelen C., Raze D., Lafont F., and Dufrène Y.F.. Force Spectroscopy of the Interaction Between Mycobacterial Adhesins and Heparan Sulphate Proteoglycan Receptors. *ChemFisChem* 2009 13;10(9-10):1672-5.

- Esposito C., Pethoukov M.V., Svergun D.I., Ruggiero A., Pedone C., Pedone E., Berisio R. Evidence for an elongated dimeric structure of heparin-binding hemagglutinin from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 2008;190(13):4749-53.
- Flynn J.L., Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect. Immun* 2001; 69 (7): 4195-4201.
- Gomez J.E., McKinney J.D. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug Tolerance *Tuberculosis* 2004. 84: 29–44.
- Gordon C., Van Deun A, Lumb R. Evaluating the performance of basic fuchsin for the Ziehl-Neelsen stain. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009; 13(1):130–135.
- Gruber, M., J. Soding, and A. N. Lupas. 2006. Comparative analysis of coiled-coil prediction methods. *J. Struct. Biol.* 155:140–145.
- Hett E.C., Chao M.C., Steyn A.J., Fortune S.M., Deng L.L. & Rubin E.J. A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2007 (66): 658–668.
- Hett EC, Chao MC, Deng LL & Rubin EJ A mycobacterial enzyme essential for cell division synergizes with resuscitationpromoting factor. *PLoS Pathog* 2008 (4): e1000001.
- Hougardy J.M., Schepers K., Place S., Drowart A., Lechevin V., Verscheure V., Debrie A.S., Doherty T.M., Van Vooren J.P., Loch C., Mascart F. Heparin-binding-hemagglutinin-induced IFN-gamma release as a diagnostic tool for latent tuberculosis. *PLoS One.* 2007 3;2(10):e926.
- Kammerer R.A., and Steinmetz M.O. De novo design of a twostranded coiled-coil switch peptide. *J. Struct. Biol.* 2006;155:146–153.
- Kana B.D. & Mizrahi V. Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009. 1–12
- Kenar K.T., Garcia Moreno B., Freire E. A calorimetric characterization of the salt dependence of the stability of the GCN4 leucine zipper 1995 *Protein Science.*(4):1934-1938.
- Kohamaa H., Umemuraa M., Okamotoa Y., Yahagia A., Goga H., Harakunia T., Matsuzaki G., Arakawaa T. Mucosal immunization with recombinant heparin-binding haemagglutinin adhesin suppresses extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Gu´erin (BCG) in infected mice. *Vaccine* 2008 (26):924—932.

- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- Liu J., Zheng Q., Deng Y., Cheng C. S., Kallenbach N. R., and Lu M.. A seven-helix coiled coil. *PNAS USA* 2006; 103:15457–15462.
- Locht C.. A common vaccination strategy to solve unsolved problems of tuberculosis and pertussis? *Microbes Infect.* 2008. 10(9):1051-6. Review
- Locht C., Houhardy JM., Rouanet C., Place S., Mascart F. Heparin-binding hemagglutinin, from an extrapulmonary dissemination factor to a powerful diagnostic and protective antigen against tuberculosis. *Tuberculosis* 2006; 86: 303-309.
- MacShane H., Vaccine strategies against tuberculosis. *Swiss Med Wkly* 2009 ;1 3 9 (11-12) 156 – 160.
- Manabe Y.C., Bishai WR. Latent *Mycobacterium tuberculosis*-persistence, patience, and winning by waiting. *Nat Med.* 2000;6(12):1327–9.
- Max K.E.A., Zeeb M., Bienert R., Balbach J., and Heinemann U. Common mode of DNA binding to cold shock domains Crystal structure of hexathymidine bound to the domain-swapped form of a major cold shock protein from *Bacillus caldolyticus*. *FEBS* 2007 (274): 1265–1279.
- Mayr B., Kaplan T., Lechner S. and Scheren S. Identification and Purification of a Family of Dimeric Major Cold Shock Protein Homologs from the Psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. *J Bact* 1996; 178 (10): 2916-2925.
- Menozzi F.D., Reddy V.M., Cayet D., Raze D., Debrie A.S., Dehouck M.P., Cecchelli R., Locht C. Mycobacterium tuberculosis heparin-binding haemagglutinin adhesion (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions. *Clinical and vaccine immunology* 2006; 8: 1-9.
- Menozzi F.D., Pethe K., Bifani P., Soncin F., Brennan M.J. and Locht C.. Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. *Mol. Microbiol* (2002); 43(6): 1379–1386
- Menozzi F.D., Bischoff R., Fort E., Brennan M.J. Locht C. Molecular characterization of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, a mycobacterial adhesion. *PNAS* 1998; 95: 12625-12630.
- Menozzi F.D., Rouse j.H., Alavi M., Laude-Sharp M., Muller J., Bischoff R., Brennan M.J., Locht C. Identification of a Heparin-binding Hemagglutinin Present in Mycobacteria. *J Exp Med* 1996; 184: 993-1001.

- Mukamolova, G. V., Kaprelyants, A. S., Young, D. I., Young, M. & Kell, D. B. A bacterial cytokine. *PNAS* 1998 (95): 8916–8921.
- Pethe K., Alonso S., Biet F., Delogu G., Brennan M.G., Locht C. and Menozzi F.D.. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature* 2001; 412: 190-194.
- Pethe K., Aumercier M., Fort E., Gatot C., Locht C., Menozzi F. Characterization of the Heparin-binding site of the Mycobacterial heparin-binding Hemagglutinin Adhesin. *JBC* 2000; 275(19): 14273-14280.
- Pethe K., Bifani P., Drobecq H., Sergheraet C., Debrie A.S., Locht C. Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis. *PNAS* 2002; 99(16): 10759-10764.
- Phadtare S., Inouye M. and Severinov K The Mechanism of Nucleic Acid Melting by a CspA Family Protein . *J. Mol. Biol.* 2004. 337: 147–155.
- Rahaman M., Jubayer., Fernández C.. Neonatal vaccination with Mycobacterium bovis BCG: Potential effects as a priming agent shown in a heterologous prime-boost immunization protocol. *Vaccine* 2009; 27: 4038-4046.
- Raviglione Mario C. The new Stop TB Strategy and the Global Plan to Stop TB, 2006-2015. *Bull World Health Organ* 2007; 85 (5): 327.
- Ruggiero A., Squeglia F., Esposito C., Marasco D., Pedone E., Pedone C., Berisio R. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the Resuscitation promoting factor Interacting Protein RipA from *M. tuberculosis*. *Protein Pept Lett.* (In press).
- Ruggiero A., Tizzano B., Pedone E., Pedone C., Wilmanns M., and Berisio R. Crystal Structure of the Resuscitation-Promoting Factor Δ DUF604 from *M. tuberculosis*. *JMB* 2009; 385: 153–162.
- Russell D.G.. Who put the tubercle in tuberculosis?. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5: 39-41.
- Savolainen L., Pusa L., Kim H.J., Sillanpa H., Seppa I., Tuuminen T.. Pilot Study of Diagnostic Potential of the Mycobacterium tuberculosis Recombinant HBHA Protein in a Vaccinated Population in Finland. *Plos One* 2008. 3 (9): 2(10):e3272.
- Serruto D., Spadafina T., Scarselli M., Bambini S., Comanducci M., Höhle S., Kilian M., Veiga E., Cossart P., Oggioni M.R., Savino S., Ferlenghi I., Taddei A.R., Rappuoli R., Pizza M., Masignani V., Aricò B. HadA is an atypical new

- multifunctional trimeric coiled-coil adhesin of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*, which promotes entry into host cells. *Cell Microbiol.* 2009. 11(7):1044-63
- Stewart G.R., Robertson B.D. and Young D.B. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat. Reviews Microbiol.* 2003; (1)97-105.
 - Svergun, D. I., M. V. Petoukhov, and M. H. J. Koch. 2001. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys J* 80:2946-53.
 - Verbelen C., Dupres V., Raze D., Bompard C., Locht C., Dufrêne Y.F. Interaction of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin with actin, as evidenced by single-molecule force spectroscopy. *J Bacteriol.* 2008 Dec;190 (23):7614-20.
 - Verbelen C., Raze D., Dewitte F., Locht C. and Dufrêne Y.F. Single-Molecule Force Spectroscopy of Mycobacterial Adhesin-Adhesin Interactions. *J.Bact.* 2007. 189 (24): 8801-8806.
 - Vordermeier H.M., Rohdes S.G., Dean G, Goonetilleke N., Huygen N K., Hill A.V. S., Hewinson R.G., Gilbert S.C. Cellular immune responses induced in cattle by heterologous prime-boost vaccination using recombinant viruses and bacille Calmette-Guérin. *Immunology* , 2004; 112: 461–470.
 - Weldingh K., Hansen A., Jacobsen S. and Andersen P.. High Resolution Electroelution of Polyacrylamide Gels for the Purification of Single Proteins from *Mycobacterium tuberculosis* Culture Filtrate. *Scand. J. Immunol* 2000 (51):79–86.
 - Yamanaka K., Fang L. and Inouye M. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Molecular Microbiology* 1998; 27(2), 247–255.
 - Zhou Y., Hall C.K., Karplus M. The calorimetric criterion for a two-state process revisited. *Protein Sci.* 1999; 5: 1064-1074.

Publicazioni e comunicazioni

Publicazioni su riviste internazionali

1. Ruggiero Alessia ,Squaglia Flavia , **Esposito Carla**, Marasco Daniela, Pedone Emilai, Pedone Carlo, and Berisio Rita. “ Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the Resuscitation promoting factor Interacting Protein RipA from *M. tuberculosis*”. Protein and Peptide Letters (2009) . *IN PRESS*
2. **Esposito Carla**, Pethoukov Maxim V., Svergun Dmitri I., Ruggiero Alessia, Pedone Carlo, Pedone Emilia and Berisio Rita. Evidence for an elongated dimeric structure of heparin-binding haemagglutinin from *M. tuberculosis*. *J Bacteriol.* (2008)

Comunicazioni pubblicate su atti di congressi

1. **Carla Esposito**, Daniela Marasco, Alessia Ruggiero, Paola Carullo, Pompea Del Vecchio, Emilia Pedone, Rita Berisio. “Heparin binding hemagglutinin adhesin binds actin through its C-terminal domain”. SCI, Sorrento (Napoli) 2009.
2. **Carla Esposito**, , Rita Berisio, Emilia Pedone, Paola Carullo, Giuseppe Graziano, Pompea Del Vecchio. “Thermal unfolding of the heparin-binding hemagglutinin (HBHA) from *Mycobacterium tuberculosis*”. SCI, Sorrento (Napoli) 2009.
3. **Carla Esposito**, Alessia Ruggieroa, Lucia Falcigno, Luisa Calvanese, Livio Paolillo, Carlo Pedone, Rita Berisio, Emilia Pedone and Gabriella D’Auria. “CspA from *Mycobacterium tuberculosis*”. SCI, Sorrento (Napoli) 2009.
4. **Carla Esposito**, Alessia Ruggiero, Maxim V.Pethoukov, Dmitri I Svergun., Carlo Pedone, Emilia Pedone and Rita Berisio. “Evidence for an elongated dimeric structure of heparin-binding haemagglutinin from *M. tuberculosis*”. 11th Workshop on Bioactive Peptide, Napoli, Maggio, 2008.