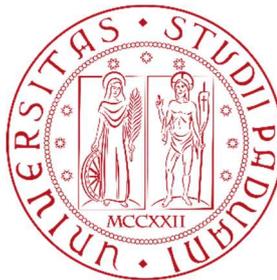


Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea in Biologia



Elaborato di Laurea

**Analisi dell'interazione tra le proteine SigC e Rv0093c di *Mycobacterium tuberculosis* mediante saggio di complementazione proteica**

Tutor: Prof.ssa Roberta Provvedi

Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott.ssa Greta Segafreddo

Dipartimento di Medicina Molecolare

Laureanda: Elisabetta Pozza

Anno Accademico 2021/2022



# INDICE

## ABSTRACT

### 1. INTRODUZIONE

1.1 Il genere *Mycobacterium*

1.2 *Mycobacterium tuberculosis* e la tubercolosi

1.3 I fattori  $\sigma$

1.3.1 Il fattore  $\sigma^C$  di *Mycobacterium tuberculosis*

1.4 Il saggio PFC

1.4.1 Il saggio M-PFC

### 2. SCOPO DELLA TESI

### 3. MATERIALI E METODI

3.1 Condizioni di crescita batterica

3.2 Preparazione delle cellule elettro-competenti

3.3 Trasformazione

3.4 Espansione e verifica genetica delle colonie trasformanti

3.5 Saggio M-PFC e verifica genetica delle colonie

### 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Crescita di *Mycobacterium smegmatis*

4.2 Trasformazione e verifica genetica delle colonie

4.3 Saggio M-PFC e verifica genetica delle colonie

### 5. CONCLUSIONI

### BIBLIOGRAFIA



## ABSTRACT

*Mycobacterium tuberculosis* è uno dei patogeni più antichi e temibili nella storia dell'umanità. La sua particolare resilienza si deve ad una serie di caratteristiche, tra cui spicca la rapida modulazione della risposta trascrizionale ai vari stress a cui è sottoposto nel corso dell'infezione.

Il grande numero di fattori  $\sigma$  codificati dal genoma del patogeno, ha sicuramente un ruolo fondamentale in questo processo. Tra questi, il fattore  $\sigma^C$  è fra i meno conosciuti. Nello specifico, la sua regolazione è ancora piuttosto ignota, infatti non sembra associato ad alcun fattore anti- $\sigma$  specifico. La proteina tubercolare Rv0093c rappresenta però un buon candidato, sulla base di studi di omologia con altre specie micobatteriche.

In questo lavoro di tesi è stato sfruttato il saggio di complementazione proteica M-PFC per testare l'interazione tra  $\sigma^C$  ed Rv0093c. La tecnica permette di sfruttare un enzima reporter modulare, mDHFR, i cui domini sono stati associati alle proteine in esame. Nel micobatterio modello *M. smegmatis*, l'interazione tra le due proteine ha permesso l'avvicinamento dei domini di mDHFR e dunque la sua ricostituzione funzionale, garantendo al batterio la resistenza all'antibiotico Trimetoprim. La conferma di questa interazione suggerisce dunque che la proteina finora sconosciuta Rv0093c possa effettivamente essere il fattore anti- $\sigma^C$  specifico.

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Il genere *Mycobacterium*

Il genere *Mycobacterium* comprende più di duecento specie batteriche, tra cui si annovera uno dei più importanti e letali patogeni umani, *Mycobacterium tuberculosis*, l'agente eziologico della tubercolosi. I micobatteri sono microrganismi ubiquitari, ampiamente distribuiti nell'ambiente. Essi sono aerobi obbligati, alcol-acido resistenti, e caratterizzati da un genoma particolarmente ricco in G-C. Le cellule micobatteriche hanno forma bastoncellare, con diametro compreso tra 0.3 e 0.5  $\mu\text{m}$ , e lunghezza variabile.

I micobatteri hanno evoluto una parete cellulare complessa, molto spessa e impermeabile, che rappresenta un'efficace barriera contro diverse sostanze utilizzate nella terapia medica, rendendo così i micobatteri intrinsecamente resistenti a molti farmaci. La parete micobatterica può essere divisa in due foglietti: uno strato più interno chiamato *core* o strato basale, costituito da un copolimero di peptidoglicano e arabinogalattano, ed un foglietto esterno bi-stratificato costituito da cere e acidi micolici (60-90C). Questi ultimi contribuiscono nel ridurre la fluidità del plasmalemma, mentre le cere sono dei glicolipidi complessi e ramificati che legano gli acidi micolici attraverso legami non covalenti. A causa di questi particolari elementi, le cellule micobatteriche tendono particolarmente ad aggregarsi, sia *in vitro* che *in vivo*. Nella pratica di laboratorio, ciò rende necessario l'utilizzo di terreni di coltura appositi, contenenti piccole quantità di detergenti.

A causa della particolare parete, inoltre, non è possibile utilizzare la tradizionale colorazione di Gram per la classificazione dei micobatteri, che risultano come detto acido-alcol resistenti. Viene invece utilizzata la colorazione di Ziehl-Neelsen, messa a punto verso la fine del XIX secolo da Franz Ziehl e Friedrich Neelsen. Questa prevede un iniziale trattamento a caldo con carbolfucsina, che penetra nel citoplasma dei micobatteri e viene ritenuta durante il successivo passaggio di decolorazione con alcol acido,

utile per decolorare tutti gli altri batteri eventualmente presenti nel campione. Infine, si effettua una colorazione di contrasto con blu di metilene, colorante che non viene assorbito dai micobatteri. Al microscopio ottico, i micobatteri appaiono dunque rossi, mentre gli altri batteri sono colorati di blu [1].

Lo studio dei micobatteri risulta piuttosto complesso. Infatti alcune specie presentano crescita lenta e producono colonie visibili su terreno solido solo dopo 10-28 giorni. Oltre alle elevate tempistiche di crescita, ulteriori difficoltà sono rappresentate dai rischi derivanti dalla manipolazione di agenti patogeni, quali *M. tuberculosis*, classificato come agente di rischio di tipo 3 [2]. Per ovviare a queste problematiche, il saprofito ambientale non patogeno *M. smegmatis* viene generalmente utilizzato come modello per lo studio del patogeno tubercolare, grazie ai suoi tempi di replicazione più rapidi, e alla maggior sicurezza nella manipolazione.

## 1.2 *Mycobacterium tuberculosis* e la tubercolosi

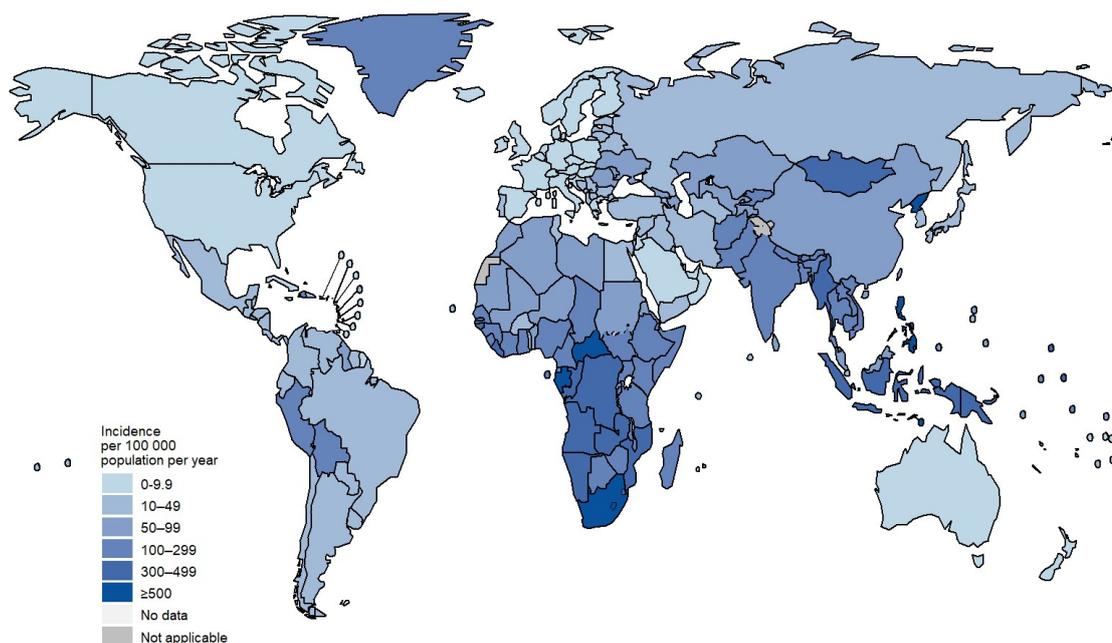
*M. tuberculosis* è un parassita intracellulare facoltativo a crescita lenta [3], ed è tra gli agenti patogeni più antichi e presenti nella popolazione umana. Il suo successo può essere attribuito sia alla sua grande capacità di adattamento alle diverse condizioni che si possono instaurare nel corso dell'infezione (privazione dei nutrienti, ipossia, fagocitosi o altri stress esogeni), sia alle sue abilità nel nascondersi al sistema immunitario dell'ospite [2].

In particolare, *M. tuberculosis* si è evoluto per impedire la maturazione dei fagosomi in fagolisosomi, fatto che ne permette la replicazione all'interno dei macrofagi dell'ospite. La sua sopravvivenza è perciò facilitata dall'alterazione della sua cellula ospite primaria, il macrofago alveolare. Inoltre, è stato osservato che il patogeno è in grado di adattarsi a molte sostanze battericide liberate a livello del fagolisosoma, ed è quindi in grado di fronteggiare efficacemente i diversi stress a cui va in contro se fagocitato da un macrofago attivato dalla risposta immunitaria [4]. *M. tuberculosis* è

perciò in grado di replicarsi all'interno dei macrofagi e diffondersi, quindi, ad altri tessuti e organi (ad esempio ossa, linfonodi, sistema nervoso centrale, pelle, articolazioni ecc.) o in tutto il corpo, provocando in questo caso una forma disseminata della malattia chiamata tubercolosi miliare [3].

La tubercolosi (TB) è una malattia infettiva che viene trasmessa per via aerea, attraverso l'inalazione di aerosol infetti emessi da individui contagiosi, che generalmente colpisce i polmoni ma può interessare anche altri organi. Al giorno d'oggi è curabile e prevenibile, tuttavia è ancora molto diffusa e mortale in varie aree del mondo: infatti, fino a prima della pandemia di COVID-19, la TB era classificata come la principale causa di morte a livello mondiale per singolo agente infettivo [5].

Tra le categorie maggiormente esposte a contrarre questa patologia ci sono gli individui già immunodepressi, per esempio i soggetti diabetici, tabagisti, malnutriti, o positivi al virus dell'HIV. Nel 2020 sono stati rilevati 9.9 milioni di nuovi casi in tutto mondo, di questi il 56% era rappresentato da uomini adulti, il 33% da donne e per il restante 11% da bambini. La malattia colpisce quindi individui di tutte le età e appartenenti ad entrambi i sessi, con un'incidenza maggiore, però, nei maschi adulti. Geograficamente, la tubercolosi interessa tutti i paesi mondiali (**Figura 1**). Secondo i dati riportati dall'OMS, nel 2020 era maggiormente diffusa nel sud-est Asiatico (India, Pakistan, Cina), seguiva poi l'Africa (Nigeria e Sud-Africa) e, infine, i territori del Pacifico Occidentale (Indonesia, Filippine). C'era, invece, una bassa incidenza nelle Americhe e in Europa [5].



**Figura 1** Tassi di incidenza stimati ogni 100.000 individui alla fine del 2020 (*Global tuberculosis report 2020*. OMS, 2021 [5])

*M. tuberculosis* è in grado di causare sia un'infezione acuta, che un'infezione latente asintomatica (LTBI, *Latent Tuberculosis Infection*) [6]. Si stima che, in seguito all'esposizione, il 20-25% degli individui risulti infetto. Di questi, il 5-10% sviluppa la malattia entro i primi 5 anni, mentre il sistema immunitario del restante 90% riesce a controllare la replicazione del patogeno [7]. La forma latente può persistere per anni a livello dei tessuti profondi, prima di riattivarsi e provocare la malattia. Si stima che circa un terzo della popolazione mondiale porti un'infezione latente da *M. tuberculosis*. Questi soggetti hanno un rischio del 2-23% di sviluppare la malattia in forma attiva e rappresentano perciò un problema per il controllo di questa patologia [6].

### 1.3 I fattori $\sigma$

La capacità di adattamento e di sopravvivenza alle diverse condizioni ambientali di *M. tuberculosis* è permessa grandemente da una continua regolazione dell'espressione genica, che consente il mantenimento

dell'omeostasi cellulare [8]. Negli ultimi anni è stato dimostrato il ruolo fondamentale dei fattori sigma ( $\sigma$ ) in questo processo.

I fattori  $\sigma$  sono delle subunità intercambiabili dell'RNA polimerasi batterica. Essi sono essenziali per l'inizio della trascrizione, e per determinare la specificità del promotore, dirigendo la trascrizione di geni specifici [9]. Tutti i genomi batterici codificano almeno un fattore  $\sigma$  essenziale, responsabile della trascrizione dei geni costitutivi, ossia fondamentali per la sopravvivenza, e altri fattori  $\sigma$  alternativi che permettono cambiamenti trascrizionali in risposta a stimoli distinti. L'abbinamento di diversi fattori  $\sigma$  all'RNA polimerasi rappresenta, pertanto, una strategia molto efficace per modulare l'espressione genica. Inoltre, i livelli di espressione sono ulteriormente regolati dall'azione di attivatori e repressori che agiscono sui fattori  $\sigma$  stessi. In particolare, l'attività di alcuni fattori  $\sigma$  può essere regolata post-traduzionalmente tramite l'interazione con proteine antagoniste, i fattori anti- $\sigma$ . Questi ultimi sequestrano fisicamente i fattori  $\sigma$ , ostacolandone l'associazione all'RNA polimerasi, e impedendo dunque la trascrizione dei geni a valle. Questa situazione di stallo persiste fino a quando si rende necessaria l'azione dei fattori  $\sigma$ , che vengono perciò liberati [8].

In termini filogenetici, i fattori sigma possono essere classificati in due distinte famiglie:  $\sigma^{54}$  e  $\sigma^{70}$ , identificati per la prima volta nel batterio modello *Escherichia coli*. Nei micobatteri sono presenti solo fattori appartenenti alla famiglia  $\sigma^{70}$  che, a differenza dei membri della famiglia  $\sigma^{54}$ , sono codificati in tutti i genomi batterici. Le proteine appartenenti alla famiglia  $\sigma^{70}$  sono suddivise in ulteriori quattro gruppi: al primo gruppo appartengono i fattori  $\sigma$  che codificano geni *housekeeping*, mentre il secondo gruppo comprende fattori  $\sigma$  coinvolti nella risposta generale allo stress, o alla sopravvivenza in fase stazionaria. Il terzo gruppo include proteine coinvolte, ad esempio, nello *shock* termico o nella sporulazione. Infine, il quarto gruppo è il più eterogeneo e comprende svariati fattori  $\sigma$  con ruoli anche molto diversificati, denominati fattori ECF (*Extra-cellular function*). Nonostante la funzione della maggior parte dei fattori  $\sigma$  appartenenti a questo gruppo sia ancora

sconosciuta, quelli conosciuti sono coinvolti nella risposta a diverse condizioni di stress, come lo stress ossidativo o la limitazione di ferro [8]. Il genoma di *M. tuberculosis* codifica ben 13 fattori  $\sigma$ . Di questi, il fattore  $\sigma^A$  appartiene al primo gruppo,  $\sigma^B$  al secondo e  $\sigma^F$  al terzo. I dieci restanti, cioè  $\sigma^C$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^G$ ,  $\sigma^H$ ,  $\sigma^I$ ,  $\sigma^J$ ,  $\sigma^K$ ,  $\sigma^L$  e  $\sigma^M$ , appartengono al quarto gruppo. Escluso  $\sigma^A$ , almeno sei degli altri fattori  $\sigma$  sono coinvolti nella virulenza, e la maggior parte nella patogenesi: il loro studio risulta dunque di notevole importanza per comprendere i meccanismi di adattamento di questo patogeno all'ospite [9].

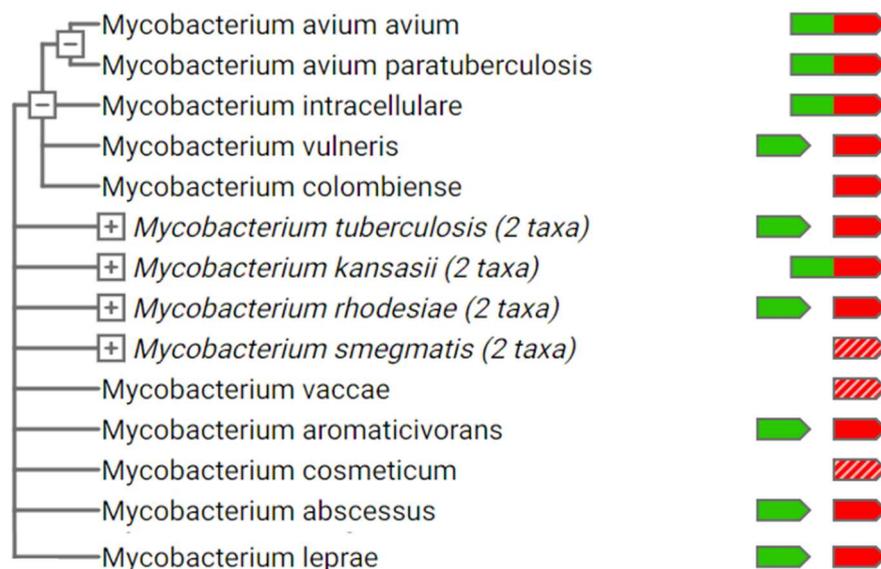
### 1.3.1 Il fattore $\sigma^C$ di *Mycobacterium tuberculosis*

Il fattore  $\sigma^C$  appartiene al quarto gruppo della famiglia  $\sigma^{70}$ , è assente nei micobatteri non patogeni ed è invece codificato nel genoma altamente ristretto del patogeno *M. leprae*, che si considera contenga solo geni essenziali. Nonostante sia la sua funzione che la sua regolazione siano ancora piuttosto sconosciute,  $\sigma^C$  sembra essere fondamentale per la virulenza e la fisiologia di *M. tuberculosis*.

È stato innanzitutto dimostrato come l'espressione del suo gene strutturale *sigC* (*rv2069*) sia abbondante durante la fase esponenziale della curva di crescita batterica, mentre diminuisca drasticamente durante la fase stazionaria, oppure in seguito a diverse condizioni di stress, come shock termico o stress ossidativo. Questo particolare *pattern* di espressione è inverso rispetto a quello degli altri fattori sigma alternativi e ciò suggerisce che l'espressione di *sigC* sia necessaria quando i micobatteri sono in crescita attiva, non quando la crescita è rallentata da diverse condizioni di stress [8]. Secondo un articolo recentemente pubblicato,  $\sigma^C$  sembrerebbe coinvolto nell'omeostasi del rame, metallo fondamentale per la vitalità di *M. tuberculosis*, se presente in quantità ottimali per il microrganismo.  $\sigma^C$  infatti, avrebbe un ruolo come regolatore trascrizionale per l'acquisizione del metallo quando questo è presente in scarsa quantità [9]. Inoltre, il fattore  $\sigma^C$  sembrerebbe avere un ruolo nella modulazione della risposta

immunitaria dell'ospite durante il processo patologico. Resta, invece, poco chiaro se sia coinvolto direttamente nell'espressione di geni codificanti importanti proteine associate alla virulenza [9].

Per la maggior parte dei fattori  $\sigma$  del quarto gruppo, la trascrizione del gene che codifica il fattore  $\sigma$  avviene insieme a quella del gene che codifica il corrispondente fattore anti- $\sigma$ , questo perché i due geni fanno parte della stessa unità trascrizionale. Tuttavia, *sigC*, non è associato a nessun gene codificante un anti- $\sigma$  putativo. È stato però osservato che in *M. avium* e negli altri micobatteri appartenenti al *Mycobacterium avium complex* (MAC), il gene *sigC* comprende una regione C-terminale omologa al gene *sigC* di *M. tuberculosis*, con una % di identità pari al 85%, e una regione N-terminale omologa ad un altro gene tubercolare, *rv0093c*, con identità pari al 42% (Figura 2). All'interno di *rv0093c* è stato inoltre identificato un possibile dominio zf-HC2, un putativo *zinc-finger* già identificato all'interno di alcuni fattori anti- $\sigma$ . Per questa ragioni, la proteina trans-membrana Rv0093c, dalla funzione tuttora ignota, rappresenta un possibile anti- $\sigma$  specifico per il fattore  $\sigma^C$  [9].



**Figura 2** L'albero filogenetico mostra che i geni *sigC* (rosso) e *rv0093c* (verde) sono fusi in alcune specie micobatteriche, ad esempio *M. avium*, e separati in altre, ad esempio *M. tuberculosis* (adattato da ©STRING).

## 1.4 Il saggio PFC

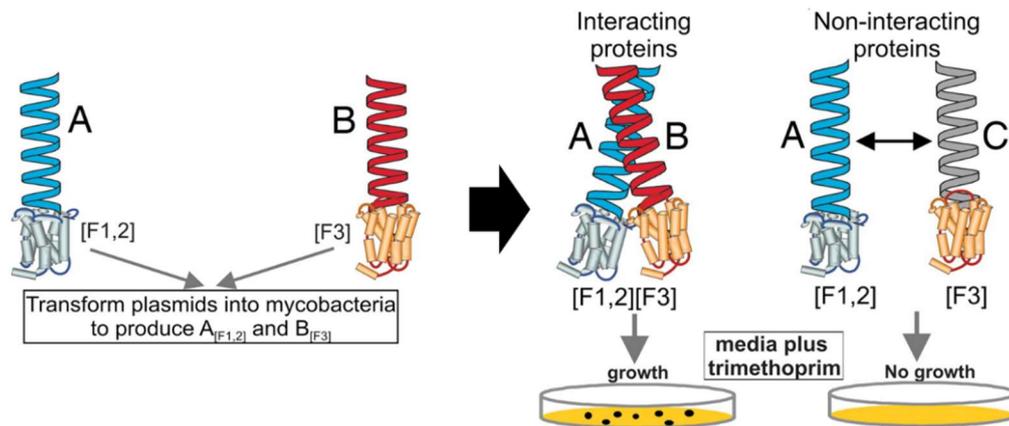
Il saggio PFC (*Protein Fragment Complementation*) è una tecnica di biologia molecolare che permette di verificare l'interazione proteina-proteina in cellule vive. La metodica prevede la fusione di due frammenti di un enzima *reporter* (come la  $\beta$ -lattamasi, la DHFR ecc.) alle due proteine di interesse. L'avvicinamento dei frammenti dell'enzima *reporter*, e la sua ricostituzione funzionale, risulta possibile solo nel caso in cui le due proteine siano effettivamente interagenti. L'attività dell'enzima perciò funge da segnale di avvenuta interazione [10].

### 1.4.1 Il saggio M-PFC

Come detto, per lo studio del bacillo tubercolare, viene generalmente utilizzato come modello il micobatterio ambientale *M. smegmatis*. Al fine di indagare l'interazione proteica *in vitro* in un modello micobatterico, sfruttando appunto *M. smegmatis*, è stato sviluppato un saggio chiamato M-PFC (*Mycobacterial Protein Fragment Complementation*) [11].

In questo saggio viene utilizzato come *reporter* la diidrofolato reduttasi (DHFR), un enzima ubiquitario presente sia nei batteri che nei mammiferi, essenziale per la vita dell'organismo. Questa proteina, infatti, catalizza la reazione di conversione del diidrofolato in tetraidrofolato ed è coinvolta nella sintesi del timidato e delle purine. L'importanza della DHFR è osservabile sperimentalmente con l'utilizzo di farmaci antifolati, come il Trimetoprim (Trim), che impendendone l'attività inibiscono indirettamente la sintesi del DNA e, quindi, anche la proliferazione cellulare [12]. La mDHFR (diidrofolato reduttasi murina) è costituita da tre moduli strutturali indipendenti, chiamati F[1], F[2] ed F[3]. Il saggio M-PFC si basa sul riavvicinamento del dominio F[1,2] con il dominio F[3], in seguito all'interazione tra due proteine d'interesse, alle quali i due domini sono indipendentemente fusi. Poiché mDHFR ha un'affinità per il Trim di circa

12.000 volte inferiore rispetto a quello batterico endogeno, la ricostruzione funzionale di mDHFR conferisce ai micobatteri ricombinanti resistenza all'antibiotico. L'analisi dell'interazione tra le proteine d'interesse è dunque tradotta in uno *screening* di crescita in terreno di coltura contenente Trim, come schematizzato in **Figura 3 [11]**.



**Figura 3** Rappresentazione schematica del funzionamento del saggio M-PFC. Le proteine di interesse A e B sono fuse ai domini F[1,2] ed F[3] rispettivamente, e co-trasformate in *M. smegmatis*. In caso di interazione, l'avvicinamento dei frammenti di mDHFR permette la crescita dei ricombinanti in terreno contenente Trim; al contrario la non-interazione ne provoca la morte (adattato da Singh *et al.* 2006 [11]).

## SCOPO DELLO STUDIO

La tubercolosi è una malattia cronica infettiva che interessa l'uomo fin dall'antichità e rappresenta oggi una patologia ancora molto diffusa in tutto il mondo.

Il grande successo del suo agente eziologico, *Mycobacterium tuberculosis*, si deve soprattutto alla capacità di questo microrganismo di adattarsi rapidamente ai meccanismi di difesa dell'ospite. Questo è reso possibile grazie ad un'efficace modulazione dell'espressione genica, che permette il mantenimento dell'omeostasi intracellulare anche in condizioni di forte stress. Un ruolo chiave in questo processo è svolto dal gran numero di fattori  $\sigma$  alternativi codificati dal genoma del patogeno. Questi sono delle subunità accessorie ed intercambiabili dell'RNA polimerasi, che determinano la specificità promotoriale dell'enzima.

Tra i vari fattori  $\sigma$  del patogeno, il fattore  $\sigma^C$  è ancora poco conosciuto, così come la sua funzione e la sua regolazione. Nello specifico, non si conosce l'identità del suo fattore anti- $\sigma$ , ossia l'antagonista che ne blocca l'azione quando questa non è necessaria, ostacolandone l'associazione al core dell'RNA polimerasi. Un buon candidato è però Rv0093c, una proteina trans-membrana non ancora caratterizzata, la cui sequenza codificante contiene un potenziale dominio zinc-finger, ritrovato in alcuni fattori anti  $\sigma$ , ed il cui omologo si trova associato alla sequenza di  $\sigma^C$  in altre specie micobatteriche

Lo scopo di questo lavoro di tesi è la verifica dell'interazione specifica tra le proteine  $\sigma^C$  ed Rv0093c di *M. tuberculosis*, utilizzando un saggio di complementazione proteica *in vitro* denominato M-PFC.

## MATERIALI E METODI

### 3.1 Condizioni di crescita batterica

*Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 e ceppi derivati sono stati cresciuti in terreno liquido Middlebrook 7H9 e solido Middlebrook 7H11 (Difco), arricchiti con 0.2% di Glicerolo (Sigma) e 0.05% di Tween80 (Sigma), a 37°C in agitazione orbitale a 100 rpm. Quando necessari, i seguenti antibiotici sono stati utilizzati alle concentrazioni indicate: Kanamicina 20 µg/mL (Km, Sigma), Irgomicina B 50 µg/mL (Hyg, Invitrogen) e Trimetoprim 40 µg/mL (Trim, Sigma). Il terreno TSB (*Tryptic soy broth*, Sigma), addizionato con 20% di Glicerolo, è stato invece utilizzato per la preparazione degli *stock* batterici da conservare a -80°C.

Nome ceppo	Caratteristiche	Provenienza
mc <sup>2</sup> 155	Ceppo <i>wildtype</i>	Ceppo di laboratorio
Ms166	mc <sup>2</sup> 155 GCN4 <sub>[F1,2]</sub> /GCN4 <sub>[F3]</sub> Controllo positivo del saggio	Ceppo di laboratorio
Ms169	mc <sup>2</sup> 155 <i>hsp60</i> <sub>[F1,2]</sub> / <i>hsp60</i> <sub>[F3]</sub> Controllo negativo del saggio	Ceppo di laboratorio
Ms327	mc <sup>2</sup> 155 SigC <sub>[F1,2]</sub> /Rv0093C <sub>[F3]</sub>	Questo lavoro di tesi
Ms328	mc <sup>2</sup> 155 <sub>[F1,2]</sub> SigC/ <sub>[F3]</sub> Rv0093c	Questo lavoro di tesi
Ms329	mc <sup>2</sup> 155 SigC <sub>[F1,2]</sub> / <sub>[F3]</sub> Rv0093c	Questo lavoro di tesi
Ms330	mc <sup>2</sup> 155 <sub>[F1,2]</sub> SigC/Rv0093C <sub>[F3]</sub>	Questo lavoro di tesi

**Tabella 1** Ceppi di *M. smegmatis* utilizzati e sviluppati in questo lavoro di tesi.

### 3.2 Preparazione delle cellule elettro-competenti

Per la preparazione delle cellule elettro-competenti, il ceppo mc<sup>2</sup>155 di *M. smegmatis* è stato cresciuto in 30 mL di terreno liquido, in agitazione a 37°C,

a partire da un inoculo iniziale di  $10^7$  CFU/mL (CFU: *Colony Forming Units*), corrispondenti ad  $OD_{600}$ : 0.1 misurata allo spettrofotometro (Eppendorf). Una volta raggiunta la fase di crescita esponenziale ( $OD_{600}$ : 0.4-0.6) la coltura è stata centrifugata per 5 minuti a 3500 rpm a 4°C. Successivamente è stato eliminato il surnatante e sono stati effettuati due lavaggi successivi in 15 mL di Glicerolo 10%, centrifugando nelle medesime condizioni. Al termine del secondo lavaggio, le cellule sono state risospese in 1 mL di Glicerolo 10% e centrifugate nuovamente per 3 minuti a 3000 rpm. Il *pellet* è stato infine risospeso in 800  $\mu$ L di Glicerolo 10%, e aliquote di 50  $\mu$ L sono state conservate a -80°C.

### 3.3 Trasformazione

Le aliquote di cellule competenti precedentemente preparate sono state sciolte in ghiaccio, e addizionate di diverse combinazioni di DNA plasmidico da elettroporare: rispettivamente 500 ng di plasmide replicativo e 1000 ng di plasmide integrativo. È stata effettuata la trasformazione utilizzando la tecnica dell'elettroporazione: i volumi di cellule competenti e DNA sono stati trasferiti in cuvette da elettroporazione (Eppendorf), ed elettroporati impostando i seguenti parametri: voltaggio 2500 V, resistenza 200  $\Omega$ , capacità 25  $\mu$ F. I campioni sono stati incubati in ghiaccio e rapidamente risospesi in 800  $\mu$ L di terreno 7H9 senza antibiotici. In seguito, sono stati incubati in agitazione per 3,5 ore (che rappresenta circa un tempo di replicazione) a 37°C. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati piastrati su piastre di terreno 7H11 contenente gli antibiotici Kanamicina e Igromicina B (7H11/Km/Hyg) per selezionare solo le cellule trasformanti, ovvero solo i batteri che hanno incorporato entrambi i plasmidi. Le piastre sono state incubate a 37°C per 3-5 giorni. Come controllo negativo della trasformazione è stata utilizzata un'aliquota di sole cellule competenti, trattate esattamente come i campioni ma senza l'aggiunta di DNA.

I plasmidi costruiti per effettuare il saggio M-PFC, già presenti in laboratorio, derivano dai plasmidi commerciali pUAB100/200/300/400 [11], modificati per inserire le sequenze codificanti il fattore  $\sigma^C$  ed il putativo anti- $\sigma$  Rv0093c,

sia a monte che a valle dei frammenti di mDHFR. I plasmidi replicativi sono pGRE6 e pGRE8, contengono la sequenza di *sigC* rispettivamente a monte e a valle del frammento F[1,2] ed hanno una cassetta per la resistenza all'Igromicina B. I plasmidi integrativi, pGRE7 e pGRE9, contengono invece la sequenza di *rv0093c* rispettivamente a monte e a valle del frammento F[3], e la cassetta per la resistenza alla Kanamicina. Nelle cellule competenti, sono state trasformate le seguenti combinazioni di plasmidi: pGRE6 + pGRE7; pGRE8 + pGRE9; pGRE6 + pGRE9; pGRE8 + pGRE7. Tutti i plasmidi descritti sono elencati nella **Tabella 2**.

Plasmide	Caratteristiche	Provenienza
pUAB100	$P_{hsp60-gcn4-mDHFR_{[F1,2]}}$ , $hyg^R$	Singh <i>et al</i> , PNAS 2006 [11]
pUAB200	$P_{hsp60-gcn4-mDHFR_{[F3]}}$ , $km^R$	Singh <i>et al</i> , PNAS 2006 [11]
pUAB300	$P_{hsp60-mDHFR_{[F1,2]}}$ , $hyg^R$	Singh <i>et al</i> , PNAS 2006 [11]
pUAB300	$P_{hsp60-mDHFR_{[F3]}}$ , $km^R$	Singh <i>et al</i> , PNAS 2006 [11]
pGRE6	$P_{hsp60-sigC-mDHFR_{[F1,2]}}$ , $hyg^R$	Ottenuto a partire da pUAB100
pGRE7	$P_{hsp60-rv0093c-mDHFR_{[F3]}}$ , $km^R$	Ottenuto a partire da pUAB200
pGRE8	$P_{hsp60-mDHFR_{[F1,2]-sigC}}$ , $hyg^R$	Ottenuto a partire da pUAB300
pGRE9	$P_{hsp60-mDHFR_{[F3]-rv0093c}}$ , $km^R$	Ottenuto a partire da pUAB400

**Tabella 2** Plasmidi utilizzati in questo lavoro di tesi.

### 3.4 Espansione e verifica genetica delle colonie trasformanti

Al termine del periodo di incubazione post-trasformazione, sono state selezionate 6 colonie per ciascun campione. Il materiale proveniente da ciascuna di esse è stato espanso su un quadrante di una piastra 7H11 contenente gli stessi antibiotici utilizzati per selezionare la trasformazione, quindi Km/Hyg. In seguito all'affioramento dei campioni sulle nuove piastre, sono stati preparati degli stock. Per la preparazione di questi, è stato prelevato del materiale dalle piastre con un tampone sterile, poi stemperato in tubini contenenti 300  $\mu$ L di TSB 20% glicerolo. Gli stock sono stati conservati a -80 °C.

### 3.5 Saggio M-PFC e verifica genetica delle colonie

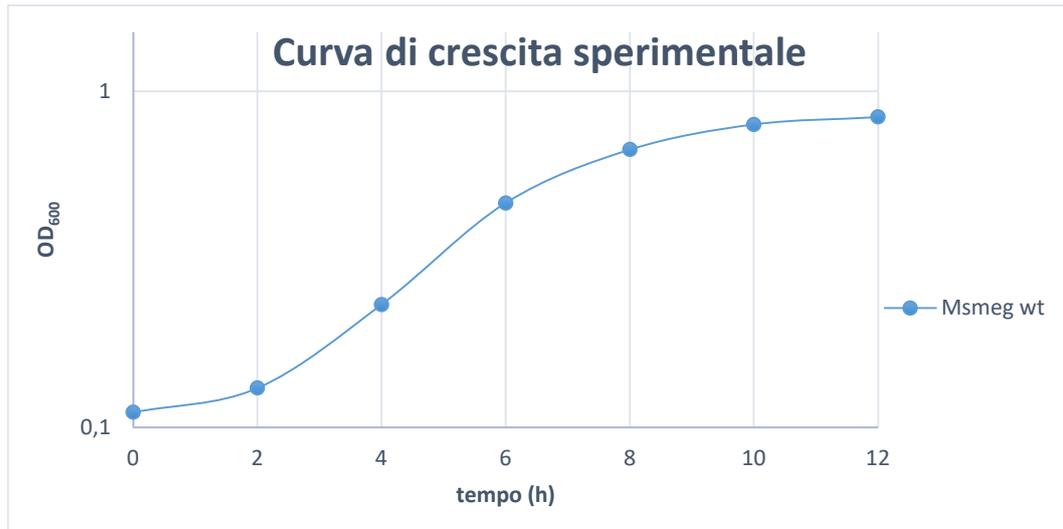
Per effettuare il saggio M-PFC sono state predisposte delle piastre di terreno 7H11 contenenti Trim. Con un tampone è stato prelevato del materiale dalle piastre di espansione ed è stato trasferito sulle piastre del saggio. In ogni piastra sono stati depositati anche il controllo positivo (Ms166) e il controllo negativo (Ms169) del saggio, entrambi già disponibili in laboratorio perché precedentemente preparati.

Per ogni colonia campione cresciuta in 7H11/Trim sono stati effettuati dei passaggi in 7H11/Km, 7H11/Hyg, 7H11 Km/Hyg e 7H11/Trim.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Crescita di *Mycobacterium smegmatis*

La curva di crescita di una popolazione microbica ottenuta in condizioni di laboratorio è caratterizzata da una prima fase di latenza (fase *lag*), durante la quale i microrganismi si adattano al nuovo substrato fornito. A questa segue la fase di crescita esponenziale (fase *log*, logaritmica), in cui i microrganismi si trovano in condizioni ottimali e la proliferazione cellulare avviene per scissione binaria in un tempo di replicazione specie-specifico. All'aumentare delle dimensioni della popolazione batterica, iniziano ad instaurarsi condizioni di stress, dovute all'aumentare della concentrazione di sostanze di rifiuto, e alla diminuzione dei nutrienti. Queste determinano un *plateau* di crescita, che caratterizza la fase stazionaria della curva. Nel caso in cui tali condizioni persistano, segue una fase di declino dovuta alla morte delle cellule batteriche in coltura.



**Figura 4** Curva di crescita di *M. smegmatis*, effettuata in terreno liquido 7H9 in agitazione a 37°C. In ascissa sono indicati i tempi di crescita, in ordinata la densità ottica (OD<sub>600</sub>).

Nella curva mostrata in **Figura 4**, ottenuta sperimentalmente a partire da un inoculo di ca.  $10^7$  CFU/mL di *M. smegmatis* (OD<sub>600</sub>= 0.1), si notano le tre fasi sopra descritte. La fase *lag* caratterizza chiaramente le prime due ore della curva di crescita. Tra le due e le sei ore invece si nota un aumento repentino della torbidità misurata allo spettrofotometro, indice della crescita esponenziale dei batteri. È proprio durante questa fase di crescita che le cellule batteriche sono state prelevate e trattate per divenire elettrocompetenti. La curva inizia infine a diminuire oltre le sei ore iniziando la fase di *plateau*.

## 4.2 Trasformazione e verifica genetica delle colonie

La trasformazione delle cellule competenti è stata effettuata tramite elettroporazione. Questa tecnica consiste nella trasmissione di brevi impulsi elettrici alle cellule in sospensione, determinando così la temporanea permeabilizzazione della membrana plasmatica. Gli stimoli elettrici causano un riarrangiamento dei lipidi di membrana, determinando la formazione di micropori, attraverso cui avviene il passaggio del DNA plasmidico.

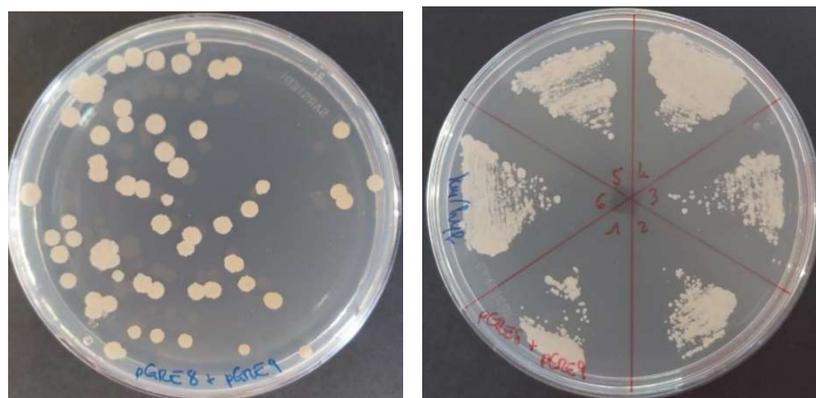
Per verificare l'effettiva incorporazione dei plasmidi da parte delle cellule competenti, i campioni sono stati piastrati in terreno contenente gli antibiotici

Kanamicina e Igromicina B. Questo passaggio è necessario per selezionare i batteri che hanno incorporato i plasmidi e mantenerli in coltura. Infatti, se le cellule non si trovassero a crescere sotto pressione antibiotica, i plasmidi non sarebbero necessari per la loro sopravvivenza, e verrebbero espulsi.

Combinazione trasformata	Colonie ottenute
pGRE6 + pGRE7	131
pGRE8 + pGRE9	78
pGRE6 + pGRE9	33
pGRE8 + pGRE7	181

**Tabella 3** Numero di colonie ottenute da ogni combinazione di plasmidi trasformata in cellule elettro-competenti di *M. smegmatis*.

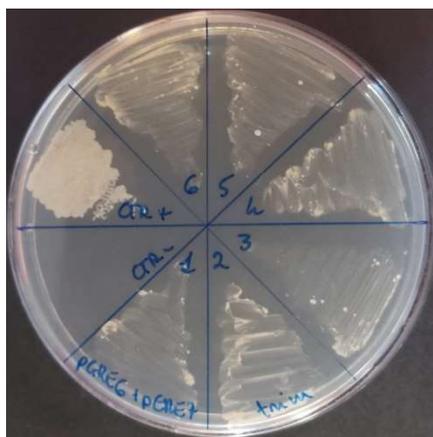
Sono state prelevate 6 colonie per combinazione, scelte in modo casuale, e sono state ampliate in Km/Hyg. Questo passaggio va effettuato per verificare che le cellule siano effettivamente dei trasformanti, la resistenza agli antibiotici deve essere dovuta solo all'incorporazione dei plasmidi e non alla presenza di micobatteri intrinsecamente resistenti.



**Figura 5** Colonie batteriche ottenute dalla co-trasformazione di pGRE8 e pGRE9 in mc<sup>2</sup>155 (sinistra) ed espansione di 6 colonie della stessa trasformazione (destra) in piastre 7H11/Km/Hyg.

### 4.3 Saggio M-PFC e verifica genetica delle colonie

Per effettuare il saggio M-PFC, è stato prelevato del materiale dalle piastre di espansione delle colonie trasformanti, che è stato trasferito nelle piastre del saggio, contenenti l'antibiotico Trim. Oltre alle 6 colonie precedentemente analizzate, su queste piastre sono stati inclusi i ceppi Ms166 e Ms169, che rappresentano rispettivamente il controllo positivo e negativo del saggio [11]. Ms166 è stato trasformato con i plasmidi originali pUAB100 e pUAB200. Questi contengono la sequenza codificante il dominio GCN4 di una *leucine zipper* di *Saccharomyces cerevisiae*, che forma dimeri con alta affinità, a monte dei domini F[1,2] ed F[3] di mDHFR rispettivamente. Nelle cellule trasformanti avviene sicuramente l'interazione tra i due domini GCN4, con conseguente avvicinamento dei due domini di mDHFR. Il controllo positivo, perciò, cresce in piastre contenenti Trim. Il controllo negativo del saggio invece, Ms169, contiene i plasmidi pUAB300 e pUAB400, che non contengono alcun gene associato ai domini di mDHFR. In questi trasformanti, perciò, non può avvenire la ricostituzione di mDHFR, e le cellule non sopravvivono in Trim.



**Figura 6** Esempio di saggio M-PFC effettuato su 6 colonie della trasformazione pGRE6 + pGRE7, Ms166 (CTR+) ed Ms169 (CTR-), in piastra 7H11/Trim.

Nella **Figura 6** si può osservare l'affioramento tutte le colonie in esame, meno il controllo negativo, come atteso. Questo risultato sembra dunque confermare l'interazione tra le due proteine in esame,  $\sigma^C$  ed Rv0093. Inoltre,

si può notare che il controllo positivo ha avuto un'efficienza di crescita maggiore rispetto agli altri ceppi saggiati, ciò è probabilmente dovuto al fatto che l'interazione tra i domini GCN4 è molto solida e duratura, mentre quella tra Rv0093 e  $\sigma^C$  potrebbe esserlo in misura minore.

Grazie al risultato positivo del saggio, è stato scelto di selezionare una colonia per trasformazione, da conservare nel database batterico a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e i ceppi sono stati nominati come mostrato nella **Tabella 1**.

I successivi passaggi di verifica genetica delle colonie del saggio, si eseguono ancora una volta per verificare che la resistenza al Trim delle colonie cresciute sia dovuta solo all'interazione tra le due proteine in esame e non all'insorgenza di batteri resistenti. Queste si effettuano in 7H11/Km, 7H11/Hyg e 7H11/Trim. Le colonie campione e il controllo positivo sono cresciute in tutte le condizioni, mentre il controllo negativo, è cresciuto in tutte le condizioni tranne in 7H11/Trim, come atteso.

## 5. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi si è voluta verificare l'interazione specifica proteina-proteina tra il fattore  $\sigma^C$  e la proteina transmembrana Rv0093c di *Mycobacterium tuberculosis*, attraverso un saggio di complementazione proteica *in vitro* denominato M-PFC.

Per il saggio è stato utilizzato il ceppo non-patogeno *Mycobacterium smegmatis*, spesso sfruttato come micobatterio modello per ragioni di sicurezza e grazie alla sua relativa rapidità di crescita. *M. smegmatis* è stato trasformato con diverse coppie di plasmidi, recanti ciascuno un frammento dell'enzima reporter mDHFR, associato a  $\sigma^C$  oppure Rv0093c. L'eventuale interazione tra le due proteine d'interesse avrebbe portato alla ricostituzione funzionale dei frammenti enzimatici, di fatto permettendo la crescita dei batteri quando coltivati in terreno addizionato dell'antibiotico Trimetoprim.

Il risultato ottenuto sperimentalmente indica l'effettiva interazione tra le due proteine, supportando l'ipotesi iniziale che la proteina Rv0093c possa essere il fattore anti- $\sigma^C$ . Tuttavia, sono necessari ulteriori studi attraverso altre metodiche per poter affermare con sicurezza tale ipotesi. Per esempio, la verifica di questo risultato può essere effettuata attraverso la tecnica di co-immunoprecipitazione, in cui le proteine Rv0093c e  $\sigma^C$  vengono marcate, prodotte e isolate in *E. coli*, e attraverso l'HPCL o un Western Blot esse vengono poi separate dalle altre e visualizzate, mantenendo il complesso proteina-proteina nel caso in cui siano effettivamente interagenti.

Un altro tipo di verifica, funzionale più che d'interazione, potrebbe essere lo studio dell'espressione dei geni controllati dal fattore  $\sigma^C$  in assenza della proteina Rv0093c, per esempio tramite la generazione di un mutante delecto del gene codificante il putativo anti- $\sigma$ . Il risultato atteso, se l'ipotesi fosse verificata, sarebbe infatti un aumento della trascrizione dei geni controllati dal fattore  $\sigma^C$ .

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Dehò G. Galli E. *Biologia dei microrganismi* 3, Casa editrice ambrosiana, 56-58 (2018)
- [2] Cook G.M et al. *Physiology of Mycobacteria. Advances in Microbial Physiology*, 55:81-319 (2009).
- [3] Manganelli R. et al. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 31(2): 715-724 (2002).
- [4] Ehrt S. And Schnappinger D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cellular Microbiology*, 11(8): 1170-1178 (2009).
- [5] Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>
- [6] Parrish N.M et al. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology* 6(3):107-112 (1998).
- [7] Migliori G.B. et al. The definition of tuberculosis infection based on the spectrum of tuberculosis disease. *Breathe*, 17(3) (2021).
- [8] Rodrigue S. et al. The  $\sigma$  factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(6): 926-941 (2006).
- [9] Manganelli R. Sigma factors: Key Molecules in *Mycobacterium tuberculosis* Physiology and Virulence. *Microbiology Spectrum*, 2(1) (2014)
- [10] Remy I. et al. Using the beta-lactamase protein-fragment complementation assay to probe dynamic protein-protein interactions. *Nature protocols*, 2(9): 2302-2306 (2007).
- [11] Singh A. et.al. Dissecting virulence pathways of *Mycobacterium tuberculosis* through protein-protein association. *Pnas*, 103(30): 11346-11351 (2006)
- [12] Anjana S. Nair A. S. Paliwal A. *Inflammation and Natural Products*, Academic Press, 283-319 (2021)