UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia

ELABORATO DI LAUREA

LA SERINA PROTEASI Rv2569c FAVORISCE LA TRASMISSIONE DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ATTRAVERSO LA ROTTURA DELLA BARRIERA EPITELIALE MEDIANTE SCISSIONE DELL'E-CADERINA

Tutor: Prof.ssa Roberta Provvedi
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Zoe Tessarolo

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

INDICE

ABSTRACT

INTRODUZIONE

1. LA TUBERCOLOSI: EPIDEMIOLOGIA E CARATTERISTICHE DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
   1.1. Epidemiologia della tubercolosi
   1.2. Il Batterio *Mycobacterium tuberculosis*
2. E-CADERINE E L'INTEGRITA' DELLA BARRIERA EPITELIALE
   2.1. Struttura e funzione delle E-caderine
   2.2. Meccanismi di degradazione delle E-caderine da parte di batteri
3. RUOLO DELLE SERINE PROTEASI
4. MATERIALI E METODI
   4.1. Produzione e purificazione della proteina Rv2569c
   4.2. Saggi enzimatici in vitro e in cellule epiteliali A549
   4.3. Costruzione di ceppi knockout e complementati
   4.4. Modello murino e infezione per aerosol
   4.5. Analisi statistica
5. RISULTATI
   5.1. Esperimenti in vitro
   5.2. Analisi funzionale tramite costruzione di ceppi knockout
   5.3. Esperimenti in vivo in topi C57BL/6
6. DISCUSSIONE
7. CONCLUSIONE

BIBLIOGRAFIA

ABSTRACT

La barriera epiteliale costituisce la prima linea di difesa contro la diffusione sistemica dei patogeni. Nel caso di *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb), il meccanismo molecolare responsabile del superamento di tale barriera non era stato completamente definito. Questo studio ha identificato Rv2569c, una serina proteasi localizzata sulla parete cellulare di *M. tuberculosis* come fattore chiave nella degradazione dell'E-caderina, proteina essenziale per la coesione tra cellule epiteliali. Mediante l'impiego di proteina ricombinante espressa in *E. coli*, è stata dimostrata la sua attività proteolitica selettiva, ottimale a 37°C, pH 9 e in presenza di $MgCl_2$. Esperimenti in vitro, attraverso ceppi knockout e complementati, hanno confermato il ruolo di Rv2569c nel superamento della barriera epiteliale e nella trasmigrazione batterica, senza influenzare la vitalità cellulare. In modelli murini, l'assenza del gene Rv2569c ha comportato una riduzione significativa della carica infettiva, del danno polmonare e della diffusione sistemica.

Questi risultati evidenziano Rv2569c come determinante molecolare della virulenza micobatterica e ne suggeriscono il potenziale come bersaglio terapeutico o vaccinale.

INTRODUZIONE

La tubercolosi (TB) continua a rappresentare una delle principali sfide per la sanità pubblica mondiale, a causa della sua elevata mortalità e della capacità di persistenza del suo agente eziologico, *Mycobacterium tuberculosis*. Questo microrganismo ha sviluppato sofisticati meccanismi di adattamento al microambiente dell'ospite, sfruttando la capacità di eludere le risposte immunitarie dell'ospite e di alterare strutture chiave come le barriere epiteliali, considerate la prima linea di difesa contro l'invasione batterica. Tra i processi che ne caratterizzano la patogenicità, l'invasione dei tessuti apre nuove prospettive per comprendere i meccanismi di virulenza e trasmissione. In particolare, studi recenti hanno identificato la serina proteasi Rv2596c come un fattore chiave nella comprensione delle barriere epiteliali, agendo attraverso la proteolisi di proteine strutturali come le caderine.

Questa Tesi di Laurea si pone l'obiettivo di approfondire il ruolo della serina proteasi Rv2569c, recentemente identificata e collegata alla compromissione della barriera epiteliale mediante la scissione dell'E-caderina, glicoproteina fondamentale per l'integrità delle giunzioni aderenti tra cellule epiteliali, con l'obiettivo di contribuire alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base dell'infezione. L'articolo centrale di riferimento, "Serine protease Rv2569c facilitates transmission of *Mycobacterium tuberculosis* via disrupting the epithelial barrier by cleaving E-cadherin" [1], costituisce un punto di partenza per approfondire come l'attività proteolitica di Rv2569c si associ da un lato alla perdita di coesione delle cellule epiteliali e dall'altro al potenziale aumento della traslocazione e disseminazione di *Mycobacterium tuberculosis* nei tessuti dell'ospite.

Sebbene il ruolo delle serina proteasi nella compromissione delle barriere epiteliali sia stato studiato anche in altri patogeni come *Helicobacter pylori* e *Campylobacter jejuni*, solo recentemente la funzione specifica di Rv2569c nel contesto della tubercolosi è stata esplorata in modo sistematico.

1. TUBERCOLOSI: EPIDEMIOLOGIA E CARATTERISTICHE DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

1.1. Epidemiologia della tubercolosi

La tubercolosi rappresenta una delle principali cause di mortalità infettiva a livello globale, con oltre un milione di decessi ogni anno attribuiti a *Mycobacterium tuberculosis*. L'impatto della malattia risulta particolarmente severo nei Paesi a basso reddito, dove le condizioni socioeconomiche precarie favoriscono la vulnerabilità delle popolazioni immunocompromesse. In questi contesti, il patogeno manifesta un'elevata capacità di diffusione, amplificata dalla sua spiccata virulenza. La tubercolosi è nota per la sua capacità di disseminazione sistemica, che si manifesta in circa il 15% dei casi come tubercolosi extrapolmonare. Questa forma della malattia è particolarmente frequente tra i bambini e i pazienti immunocompromessi [2].

Nonostante i progressi compiuti negli ultimi decenni, la tubercolosi continua a rappresentare una minaccia per la salute globale. Secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), nel 2023 circa 10,8 milioni di persone si sono ammalate di tubercolosi, in aumento rispetto ai 10,7 milioni del 2022, 10,4 milioni del 2021 e 10,1 milioni del 2020 [3].
Dal punto di vista geografico, la maggior parte dei casi nel 2023 si è concentrata nelle regioni OMS del Sud-Est asiatico (45%), Africa (24%) e Pacifico occidentale (17%). Quote minori si sono registrate nel Mediterraneo orientale (8,6%), nelle Americhe (3,2%) e in Europa (2,1%) [3] con un tasso di incidenza della tubercolosi a livello nazionale molto variabile (Fig.1).
Un dato parzialmente positivo riguarda la mortalità: nel 2023, ha causato circa 1,25 milioni di decessi, in calo per il secondo anno consecutivo. Tuttavia, con il ridimensionamento dell'impatto del COVID-19, la tubercolosi è tornata a essere la principale causa di morte al mondo da un singolo agente infettivo [3].

Questi numeri sottolineano l'urgenza di approfondire la ricerca scientifica sulla patogenesi, la farmacoresistenza e lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche e vaccinali contro la tubercolosi.

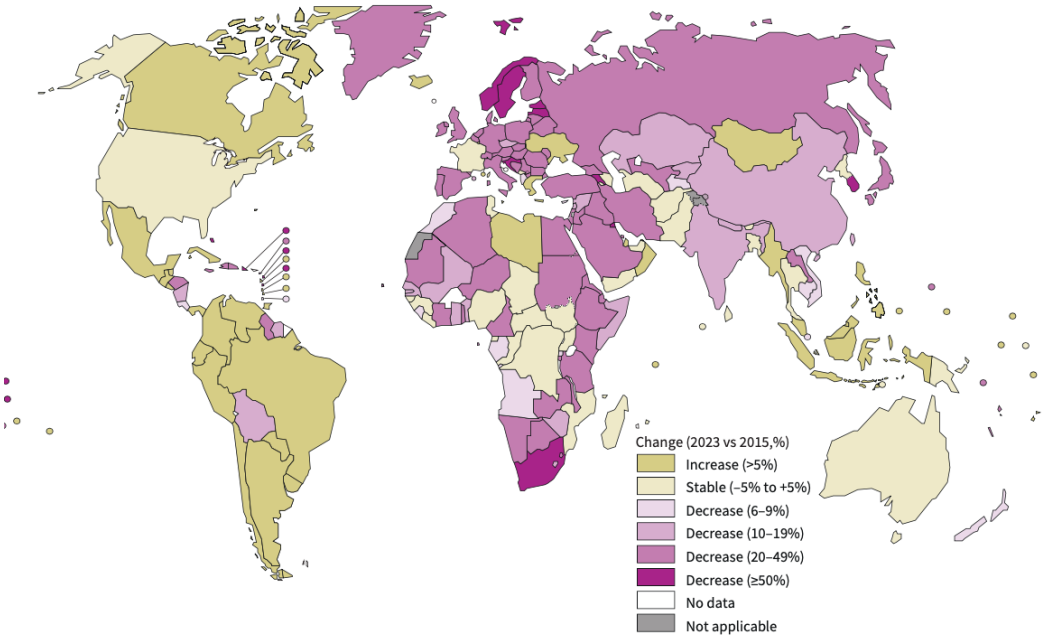

Figura 1. Variazione (%) nell'incidenza stimata della tubercolosi (nuovi casi ogni 100.000 abitanti), 2023 rispetto al 2015 [3]

1.2 Il Batterio *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis è un microrganismo patogeno caratterizzato da una parete cellulare ricca di lipidi, in particolare di acidi micolici. Questa peculiare struttura agisce da barriera fisica, conferendo al batterio una straordinaria resistenza, che lo protegge non solo dagli antibiotici convenzionali, ma anche da detergenti chimici ed enzimi litici generati dall'ospite. Questa struttura consente al microrganismo di sopravvivere a lungo sia nell'ambiente esterno che all'interno dell'organismo infetto, permettendo di eludere e manipolare i meccanismi di difesa dell'ospite [4]. Tale resistenza rappresenta una sfida cruciale nella lotta contro la tubercolosi, richiedendo una comprensione più approfondita dei meccanismi che regolano la funzione e l'integrità della parete cellulare.

Un altro aspetto rilevante riguarda alcune proteine caratteristiche della parete cellulare di *Mycobacterium tuberculosis*, in particolare, quelle appartenenti alle famiglie PE/PPE e le serina proteasi. Queste macromolecole rivestono un ruolo cruciale nella disseminazione intercellulare del patogeno, poiché ne facilitano l'attraversamento delle barriere fisiche e immunitarie dell'ospite. Alterando l'integrità delle giunzioni cellulari, tali proteine contribuiscono alla propagazione dell'infezione, rappresentando possibili bersagli per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche mirate [4] [5].

2. E-CADERINE E L'INTEGRITA' DELLA BARRIERA EPITELIALE

2.1. Struttura e funzione delle E-caderine

Le E-caderine sono glicoproteine transmembrana essenziali per la mediazione dell'adesione cellula-cellula nei tessuti epiteliali. Questa adesione avviene tramite la formazione di giunzioni aderenti che conferiscono coesione e stabilità strutturale al tessuto. Mediante l'instaurazione di legami omofilici calcio-dipendenti, esse garantiscono la coesione tra cellule adiacenti, contribuendo in modo cruciale al mantenimento della polarità e dell'architettura tissutale [6].

Dal punto di vista molecolare, la struttura dell'E-caderina include una regione extracellulare composta da cinque domini EC ripetuti, un singolo dominio transmembrana e una coda citoplasmatica. Quest'ultima interagisce direttamente con catenine come p120-catenina e β-catenina, stabilendo un collegamento tra la giunzione aderente e il citoscheletro di actina. Questo complesso sistema di interazioni non solo stabilizza l'adesione cellulare, ma funge anche da piattaforma per la trasduzione di segnali intracellulari implicati nella regolazione di processi fisiologici quali la proliferazione, la migrazione e la differenziazione cellulare [6].

Mutazioni nell'E-caderina o alterazioni della sua espressione possono determinare gravi disfunzioni nell'organizzazione tissutale, con conseguenti perdite di coesione cellulare. La perdita dell'integrità delle E-caderine può generare segnali di stress,

modifiche nel citoscheletro e attivazione di vie infiammatorie, tutti eventi che influiscono sulla risposta ospite-patogeno [7].
In questo contesto, numerosi patogeni hanno evoluto strategie per colpire le E-caderine, dimostrando l'importanza di queste glicoproteine nell'omeostasi tissutale e nelle difese immunitarie degli organismi.

2.2 Meccanismi di degradazione delle E-caderine da parte di batteri

Diversi batteri patogeni hanno sviluppato strategie evolutive per compromettere l'integrità della barriera epiteliale dell'ospite, bersagliando selettivamente la porzione extracellulare delle E-caderine. Queste glicoproteine, fondamentali per la coesione cellulare, rappresentano infatti un punto vulnerabile nel sistema di difesa dell'epitelio.
Mycobacterium tuberculosis rappresenta un esempio significativo di patogeno che sfrutta proteasi specifiche per degradare componenti chiave della barriera epiteliale. La capacità di degradare l'E-caderina non è esclusiva di *M. tuberculosis*, ma è condivisa anche da altre proteasi batteriche, come le metalloproteasi prodotte da *Enterococcus faecalis* [8]. Un altro esempio è rappresentato da *Helicobacter pylori* e *Campylobacter jejuni*, i quali secernono la serina proteasi HtrA. Questa proteasi agisce clivando l'E-caderina, favorendo la traslocazione intercellulare del patogeno attraversando le giunzioni aderenti [7][9].

In sintesi, la degradazione dell'E-caderina ad opera di batteri patogeni costituisce una strategia cruciale per compromettere la coesione epiteliale e favorire l'invasione microbica. L'approfondimento dei meccanismi molecolari coinvolti, in particolare delle proteasi batteriche, rappresenta un punto chiave nella comprensione dell'interazione ospite-patogeno. Questa conoscenza potrebbe aprire la strada allo sviluppo di terapie mirate volte a proteggere l'integrità della barriera epiteliale e contrastare efficacemente le infezioni associate.

3. RUOLO DELLE SERINE PROTEASI

Le serine proteasi sono enzimi capaci di degradare specifiche proteine bersaglio mediante un meccanismo che coinvolge un residuo di serina nel sito attivo. Nel contesto dell'infezione da *Mycobacterium tuberculosis*, queste proteasi svolgono un ruolo cruciale nel facilitare l'invasione e la persistenza del patogeno all'interno dell'ospite [1].
La capacità delle serine proteasi di degradare proteine strutturali non è un fenomeno isolato. Studi condotti su *Campylobacter jejuni* e *Helicobacter pylori* hanno dimostrato che la presenza di proteasi è essenziale per la progressione dell'infezione. Ad esempio, HtrA, una serina proteasi prodotta da *H. pylori* e *C. jejuni*, agisce clivando l'E-caderina e altre proteine di giunzione, facilitandone l'invasione dei tessuti sottostanti [9][10].

Un altro esempio emblematico è la proteasi Rv2569c, che agisce direttamente sulla barriera epiteliale polmonare, compromettendone l'integrità. Questo enzima è in grado di degradare l'E-caderina, una proteina chiave nelle giunzioni cellulari epiteliali, favorendo così la traslocazione batterica attraverso la barriera e facilitando la disseminazione del patogeno [1].

Oltre alla disgregazione strutturale, Rv2569c esercita un'azione immunomodulante, alterando il microambiente del tessuto infetto e contribuendo alla soppressione della risposta infiammatoria locale. Questo duplice effetto — distruzione fisica della barriera ed evasione immunitaria — rappresenta una strategia sofisticata di *M. tuberculosis* per eludere le difese dell'ospite e garantire la propria sopravvivenza [11].

4. MATERIALI E METODI

Le metodologie adottate in questo studio sono fondamentali per approfondire il ruolo della serina proteasi Rv2569c nella patogenesi di *Mycobacterium tuberculosis*. Ogni passo consente di analizzare le attività e le interazioni molecolari chiave.

4.1. Produzione e purificazione della proteina Rv2569c

Nel presente studio, la proteina ricombinante Rv2569c è stata prodotta utilizzando sistemi di espressione in *Escherichia coli*, un organismo modello ampiamente utilizzato per la rapida replicazione di plasmidi contenenti geni target. Questo approccio consente di ottenere quantità consistenti di enzima, essenziali per analisi biochimiche e funzionali.

La sequenza codificante del gene *rv2569c* (gene Bank: NC_000962.3) di *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv è stata amplificata tramite PCR con primer specifici e clonata nel vettore pET-28a, contenente un tag His_6 in N-terminale. Questo tag facilita la purificazione tramite cromatografia di affinità su resina Ni-NTA. Il tag His6, costituito da sei residui di istidina, possiede alta affinità con gli ioni nichel, consentendo l'isolamento selettivo. Questa tecnica, utilizzata in biologia molecolare, consente di ottenere campioni altamente puri, riducendo al minimo la contaminazione da altre proteine batteriche.

Il costrutto ricombinante pET28a-Rv2569c è stato trasformato in cellule di *Escherichia coli BL21*. L'espressione proteica è stata indotta mediante l'aggiunta di IPTG (1 mM) che, analogo non metabolizzabile del lattosio, si lega al repressore LacI, causando il rilascio del promotore lac e attivando la trascrizione del gene ricombinante. Questo sistema di espressione è tipico dei vettori pET.

L'identificazione della proteina Rv2569c è stata eseguita tramite Western blot (Fig.2A).

Dopo l'induzione dell'espressione della proteina Rv2569c, le cellule batteriche sono state sottoposte a lisi per sonificazione. Il lisato è stato quindi caricato su una colonna Ni-NTA, sfruttando l'elevata affinità tra il tag His_6 e gli ioni Ni^{2+}. Successivi lavaggi con tampone contenente basse concentrazioni di imidazolo hanno permesso la rimozione delle proteine aspecifiche, mentre l'eluizione della proteina Rv2569c è stata ottenuta con tampone contenente 250 mM imidazolo, in grado di competere con il tag His_6 per il legame al nichel.

La purezza e concentrazione della proteina ottenuta sono state valutate tramite SDS-PAGE e analisi spettrofotometriche. In particolare, l'analisi densitometrica delle bande proteiche ha consentito di determinare la resa e la specificità del processo di purificazione (Fig.2B).

La proteina purificata è stata successivamente utilizzata per la produzione di un anticorpo policlonale anti-Rv2569c, impiegato per la determinazione della localizzazione subcellulare della proteasi in *M. tuberculosis* H37Rv. Le tecniche adottate includono Western Blot e immunomicroscopia elettronica, essenziali per comprendere la distribuzione e il ruolo di Rv2569c nel contesto cellulare.

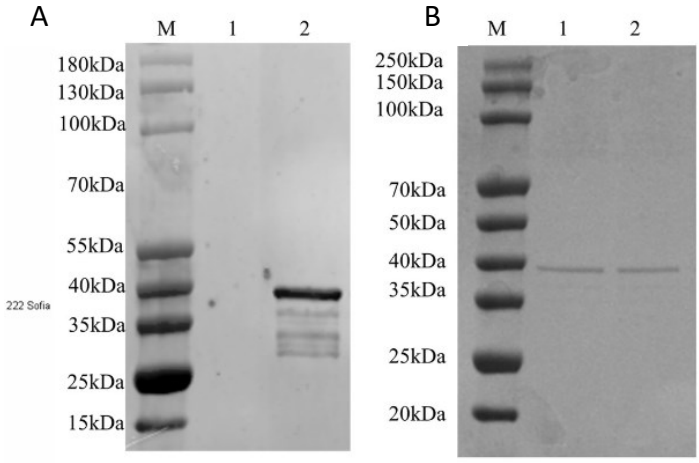

Figura 2. (A) identificazione di Rv2569c mediante Western blot. linea M: proteina marker, linea 1: vettore vuoto, linea 2: vettore pET28a-Rv2569c. **(B)** Purificazione di Rv2569c mediante cromatografia di affinità su colonna di nichel tramite SDS-PAGE [1]

4.2. Saggi enzimatici in vitro e in cellule epiteliali A549

La serina proteasi ricombinante Rv2569c, ottenuta da *M. tuberculosis*, è stata sottoposta a una serie di saggi enzimatici in vitro volti a testare la capacità di degradazione di substrati epiteliali rilevanti. I substrati scelti - caseina, fibrinogeno, fibronectina ed E-caderina - rappresentano modelli sperimentali funzionali per esplorare l'attività catalitica dell'enzima su proteine sia generiche che specifiche della matrice extracellulare e delle giunzioni cellulari (Fig. 3A, 3B).

- La caseina, proteina del latte, è stata utilizzata come substrato generico per verificare la presenza di attività proteolitica.
- Il fibrinogeno e la fibronectina, coinvolti rispettivamente nella coagulazione e nell'adesione cellulare, offrono indizi sul potenziale ruolo patogenico della proteasi.
- L'E-caderina, elemento essenziale nelle giunzioni epiteliali, rappresenta il bersaglio chiave per valutare la capacità dell'enzima di danneggiare la barriera epiteliale.

Le reazioni sono state eseguite incubando 1 μg di Rv2569c con 10 μg di substrato specifico in tampone di reazione a 37°C per 1 ora per favorire l'attività enzimatica. Quest'ultima è stata arrestata mediante l'aggiunta di un tampone di caricamento contenete SDS (Sodio Dodecil Solfato), e i campioni sono stati analizzati tramite SDS-PAGE. I prodotti di digestione dei substrati caseina, fibronectina e fibrinogeno sono stati visualizzati con colorazione blu di Coomassie. Per l'E-caderina, invece, è stato eseguito un Western blot utilizzando un anticorpo specifico per il dominio extracellulare. Come controlli negativi, sono stati utilizzati campioni incubati con enzima denaturato mediante riscaldamento e campioni privi di proteina.

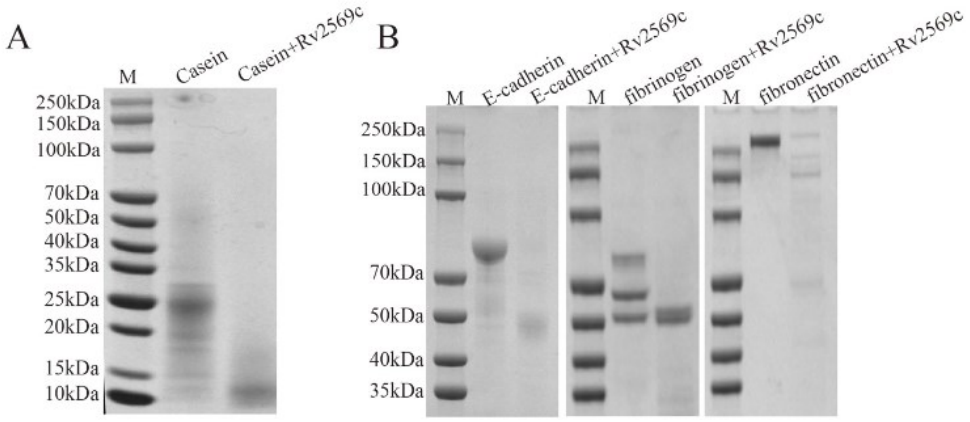

Figura 3. (A) L'attività proteasica di Rv2569c è stata valutata digerendo la caseina come substrato. **(B)** vari substrati proteici - E-caderina, fibrinogeno e fibronectina - sono stati degradati da Rv2569c [1]

I saggi proteasici in vitro sono stati condotti in condizioni sperimentali controllate. In un secondo momento, sono stati effettuati esperimenti su cellule epiteliali umane A549, al fine di osservare se la proteasi fosse in grado di degradare l'E-caderina endogena in condizioni cellulari. Le cellule sono state coltivate in piastre a 6 pozzetti in terreno di coltura DMEM contenente siero fetale bovino (FBS) al 10% e antibiotici, incubate a 37°C.

Successivamente, le cellule sono state infettate con *Mycobacterium smegmatis*, utilizzato come sistema eterologo per l'espressione della proteina Rv2569c, facilmente manipolabile e non patogeno, oppure direttamente infettate con il sopranatante filtrato della coltura batterica.

Dopo l'incubazione di 12 ore a 37°C, le cellule sono state lisate con tampone RIPA (HaiGene) contenente 1% di PMSF, un inibitore delle proteasi, e incubate a 4°C per 1 ora. I campioni sono stati centrifugati e il surnatante è stato utilizzato per analizzare la frammentazione di E-caderina endogena nei lisati cellulari tramite Western Blot. In concomitanza, è stata eseguita un'analisi di immunofluorescenza per visualizzare la distribuzione dell'E-caderina nelle giunzioni cellulari.

Parallelamente, è stato condotto un saggio transwell sulla permeabilità epiteliale. Le cellule A549 sono state coltivate su inserti transwell fino a formare un monostrato confluente.

Successivamente sono state trattate con *M. smegmatis–Rv2569c* o con il relativo sopranatante. La migrazione cellulare nella camera inferiore è stata quantificata come misura funzionale della permeabilità epiteliale. L'aumento della migrazione è indicativo di una disgregazione della barriera cellulare, presumibilmente causata dalla degradazione dell'E-caderina.

4.3. Costruzione di ceppi knockout e complementati

Per generare i ceppi knockout H37RvΔRv2569c e H37RaΔRv2569c, derivati rispettivamente dai ceppi *M. tuberculosis* H37Rv e H37Ra, è stata utilizzata la tecnica della trasduzione specializzata mediata da fago, secondo il protocollo descritto da Jain et al., 2014 [12].
L'eliminazione del gene *rv2569c* è stata ottenuta tramite ricombinazione omologa con un costrutto di scambio allelico (AES) contenente:

- Sequenze omologhe a monte (LHS) e a valle (RHS) del gene target
- Una cassette selezionabile/controselezionabile sacB-hyg:
    - *hyg*: gene di resistenza all'antibiotico igromicina
    - *sacB*: gene che conferisce sensibilità al saccarosio, utile per controselezione.

Per costruire l'AES, è stato impiegato un sistema di clonaggio semplificato basato sull'enzima di restrizione Van91I, che consente una manipolazione efficiente delle regioni omologhe [12].

Questa strategia permette di creare una sequenza di DNA artificiale utilizzata per sostituire un gene di interesse nel genoma di *Mycobacterium tuberculosis* tramite ricombinazione omologa. L'assenza del gene *rv2569c* nei ceppi mutati è stata verificata tramite PCR e Southern blot.
I ceppi knockout sono stati successivamente trasformati con il plasmide pMV361-Rv2569c, generando ceppi complementati, anch'essi confermati tramite PCR.

Inoltre, per analizzare l'effetto del gene in un batterio non patogeno facile da coltivare, Rv2569c è stato introdotto in *Mycobacterium smegmatis* tramite plasmide pAIN-Rv2569c per ottenere il ceppo Rv2569c_Ms, confermato tramite Western blot con anticorpo anti-Rv2569c.

Tabella 1: ceppi di *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* utilizzati

Ceppo	Descrizione
H37Rv	Ceppo wild type virulento di *M. tuberculosis*
H37RvΔRv2569c	Ceppo H37Rv con delezione del gene Rv2569c (mutante knock-out)
H37RvΔRv2569c + Rv2569c	Ceppo H37RvΔRv2569c in cui è stato reintrodotto il gene Rv2569c (complementato)
H37Ra	Ceppo attenuato (non virulento) di *M. tuberculosis*
H37RaΔRv2569c	Ceppo H37Ra con delezione del gene Rv2569c
H37RaΔRv2569c + Rv2569c	Ceppo H37RaΔRv2569c con Rv2569c reintrodotto
Rv2569c_Ms	Ceppo di *M. smegmatis* trasformato con pAIN-Rv2569c (overesprimente)
pAIN_Ms	Ceppo di *M. smegmatis* con vettore pAIN vuoto (controllo negativo)

4.4. Modello murino e infezione per aerosol

Il modello murino di infezione per aerosol rappresenta uno strumento cruciale per lo studio della trasmissione e della patogenesi di *Mycobacterium tuberculosis*, poiché riproduce fedelmente le condizioni di esposizione naturale dell'agente patogeno. In questo studio sono state utilizzate femmine di topo della linea C57BL/6, di età compresa tra 6 e 8 settimane, infettate per inalazione con circa 200 CFUs di tre ceppi distinti:

- Wild-type (H37Rv)
- Knockout (H37RvΔRv2569c)
- Ceppo complementato (H37RvΔRv2569c + Rv2569c)

Questo approccio ha permesso di valutare il contributo funzionale diretto della serina proteasi Rv2569c nel processo infettivo.

I topi sono stati soppressi a 1, 14, 30 e 45 giorni dall'infezione. Il polmone sinistro, il fegato e la milza sono stati rimossi, fotografati e omogeneizzati con PBST.

Successivamente, sono state effettuate diluizioni seriali su piastre 7H10 e incubate a 37°C per 3-4 settimane per valutare la carica batterica mediante il conteggio delle unità formanti la colonia.
A 14, 30 e 45 giorni post-infezione, i livelli di E-caderina nel tessuto polmonare sono stati analizzati mediante Western blot, utilizzando proteine totali estratte dagli organi. I campioni polmonari sono stati fissati e sottoposti ad analisi istologica, per valutare alterazioni morfologiche, edema e infiltrazione cellulare, indicativi di compromissione della barriera epiteliale.

4.5. Analisi statistiche

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato indipendente al fine di garantire la riproducibilità e la robustezza dei risultati ottenuti.
L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software GraphPad Prism, uno strumento comunemente impiegato per l'elaborazione di dati biologici e l'esecuzione di test statistici parametrici. La significatività statistica è stata valutata mediante analisi della varianza (ANOVA) bidirezionale, considerando l'effetto di più variabili indipendenti e le loro possibili interazioni.
I valori di *p* inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi. Dove applicabile, sono stati utilizzati test post-hoc per analisi multiple.

5. RISULTATI

L'integrazione di saggi biochimici, modelli cellulari epiteliali e studi murini ha evidenziato in modo coerente il ruolo funzionale e patogenico della serina proteasi Rv2569c di *M. tuberculosis*. L'enzima si conferma determinante nella compromissione della barriera epiteliale, sia attraverso la degradazione diretta di substrati chiave come l'E-caderina, sia mediante la modulazione dell'ambiente infiammatorio locale.

L'insieme dei dati raccolti e analizzati fornisce una prospettiva dettagliata sui meccanismi molecolari che facilitano la traslocazione batterica, la sopravvivenza del patogeno e la progressione dell'infezione tubercolare. Queste osservazioni pongono le basi per futuri studi mirati all'identificazione di potenziali target terapeutici.

5.1. Esperimenti in vitro

L'attività proteasica in vitro di Rv2569c ha messo in evidenza la capacità di degradare substrati proteici quali caseina, fibrinogeno, fibronectina ed E-caderina. Tra questi, la proteasi ha dimostrato una particolare efficienza nel clivaggio della porzione extracellulare dell'E-caderina, confermata attraverso analisi di Western blot e immunofluorescenza. Questo risultato rafforza l'ipotesi attraverso cui Rv2569c contribuisca alla compromissione della barriera epiteliale.

Per determinare la classe proteasica di appartenenza sono stati utilizzati inibitori di serina proteasi (AEBSF e PMSF) e di cisteina proteasi (E-64 e N-etilmaleimide). L'attività proteolitica di Rv2569c è stata completamente inibita solo da AEBSF e PMSF e ciò suggerisce che la proteasi Rv2569c sia classificabile come serina proteasi. Inoltre, l'attività enzimatica di Rv2569c è risultata ottimale a pH 9,0 e temperatura di 37°C, in presenza di $MgCl_2$.

Per determinare la localizzazione subcellulare di Rv2569c è stato generato un anticorpo policlonale generato contro la proteina purificata. Dall'analisi del Western Blot su frazioni subcellulari di *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, Rv2569c è risultata localizzata principalmente nella parete cellulare (Fig. 4A).
A conferma di ciò, l'immunomicroscopia elettronica ha evidenziato Rv2569c sulla superficie delle cellule H37Rv (Fig.4B).

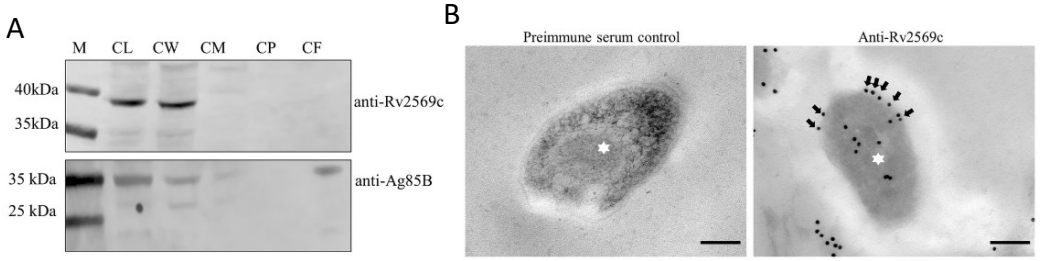

Figura 4. (A) localizzazione subcellulare di Rv2569c in H37Rv. CL: intera componente batterica, CW: parete cellulare, CM: membrana cellulare, CP: citoplasma, CF: surnatante di coltura. **(B)** immunomicroscopia elettronica di Rv2569c [1]

5.2. Analisi funzionali tramite costruzione di ceppi knockout

La costruzione di ceppi knockout privi del gene *rv2569c* in *Mycobacterium tuberculosis* ha reso possibile investigare il ruolo specifico di questa serina proteasi nella patogenesi della tubercolosi.

Per esaminare l'eventuale impatto della delezione genica sulla fisiologia del batterio, sono state confrontate la morfologia delle colonie e il tasso di crescita dei ceppi wild-type, knockout e complementati. L'assenza di differenze significative tra i gruppi suggerisce che Rv2569c non sia essenziale per la crescita batterica né per la formazione delle colonie.

Successivamente, per analizzare il ruolo funzionale di Rv2569c nella degradazione dell'E-caderina, cellule epiteliali A549 sono state trattate con proteina ricombinata purificata Rv2569c o infettate direttamente con diversi ceppi batterici, tra cui H37Rv/H37Ra (wild type), H37Rv/H37RaΔRv2569c (knockout), H37Rv/H37RaΔRv2569c + Rv2569c (complementato) e Rv2569_Ms (M. *smegmatis* esprimente Rv2569c). Dopo 8 ore di incubazione, l'analisi mediante Western blot ha mostrato:

- una riduzione dell'E-caderina full-lenght (E-cadherin^{FL}) nei lisati cellulari;
- un aumento del frammento N-terminale solubile (E-cadherin^{NTF}) nei sovranatanti, in presenza di Rv2569c.

Questo pattern è stato riscontrato sia nel trattamento diretto con la proteina purificata (Fig.5A), sia nei ceppi esprimenti Rv2569c (Fig.5B, C, D).

Non è stato, invece, osservato lo stesso pattern nei ceppi knockout H37Rv/H37RaΔRv2569c privi del gene, confermando che Rv2569c è in grado di clivare l'E-caderina e di rilasciare il frammento extracellulare.

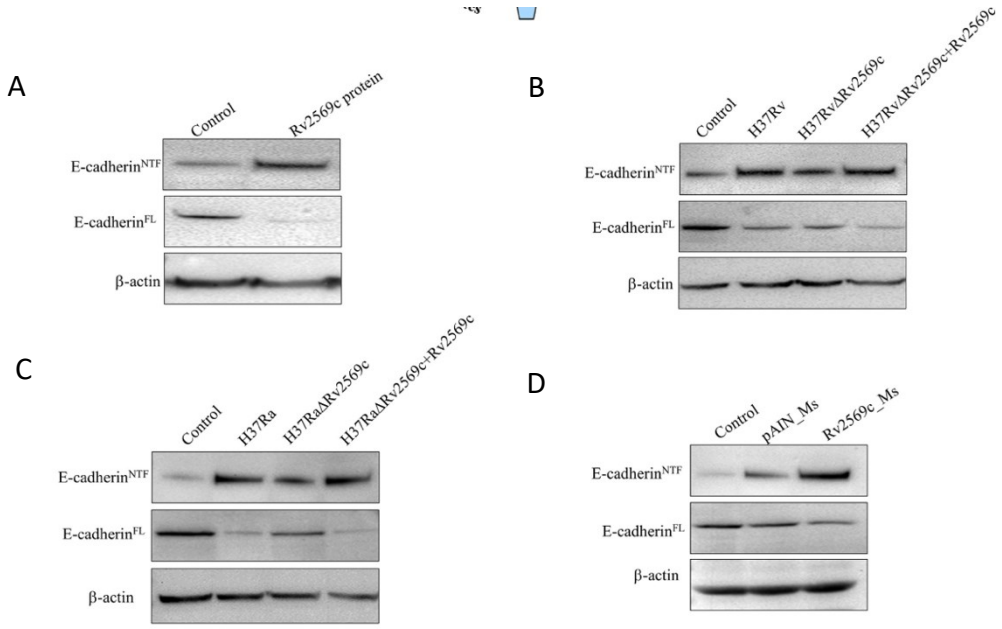

Figura 5. Western blot del clivaggio di E-caderina da parte di Rv2569c in cellule epiteliali A549. **(A)** trattamento con proteina Rv2569c purificata **(B)** trattamento con ceppo H37Rv **(C)** trattamento con ceppo H37Ra **(D)** trattamento con *M. smegmatis* esprimente Rv2569c [1]

Mediante microscopia confocale con un anticorpo anti-E-caderina è stato poi possibile visualizzare la scissione dell'E-caderina in cellule A549 infettate con i ceppi H37Rv, H37RvΔRv2569c e H37RvΔRv2569c + Rv2569c (Fig.6).

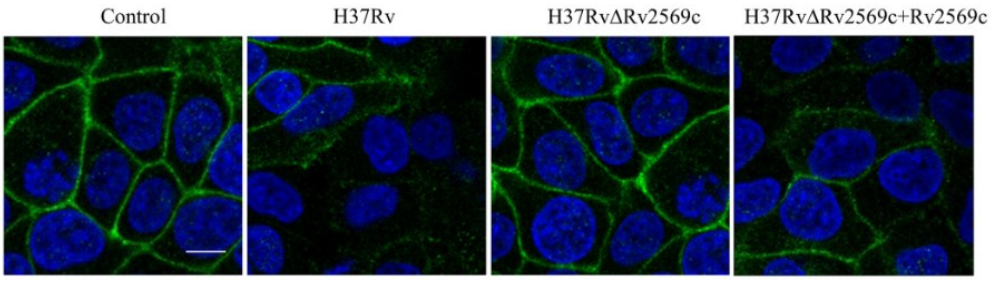

Figura 6. Visualizzazione dell'E-caderina degradata mediante microscopia ad immunofluorescenza in vitro [1]

Infine, l'analisi dell'espressione genica tramite qRT-PCR dei livelli di mRNA per l'E-caderina non ha mostrato alterazioni dopo l'incubazione con ceppi H37Rv, H37RvΔRv2569c e H37RvΔRv2569c + Rv2569c, suggerendo che Rv2569c non ha esercitato alcuna influenza sull'espressione genica della E-caderina nelle cellule epiteliali A549.

A supporto dell'effetto barriera, i saggi transwell hanno confermato che l'eliminazione di Rv2569c riduce significativamente la permeabilità epiteliale al passaggio batterico diminuendo la traslocazione di *Mycobacterium tuberculosis* (Fig.7A, B).

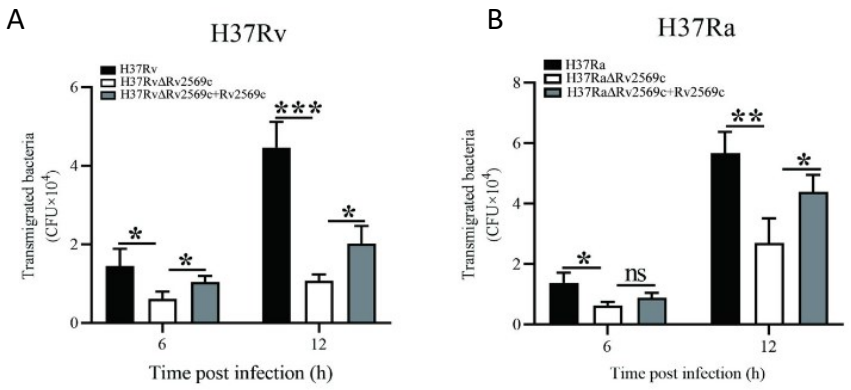

Figura 7. Rv2569c contribuisce alla traslocazione di Mycobacterium tuberculosis. **(A)** Traslocazione batterica dopo l'infezione con H37Rv, H37RvΔRv2569c e H37RvΔRv2569c + Rv2569c. **(B)** Traslocazione batterica dopo l'infezione con H37Ra, H37RaΔRv2569c e H37RaΔRv2569c + Rv2569c [1]

5.3. Esperimenti in vivo in topi C57BL/6

La determinazione quantitativa della carica batterica tramite la conta delle unità formanti colonia (CFU) nei polmoni dei topi consente una valutazione oggettiva e comparativa della capacità di traslocazione e replicazione di *Mycobacterium tuberculosis*. La conta delle unità formanti colonia ha rivelato significative differenze tra i gruppi sperimentali. I topi infettati con ceppi esprimenti Rv2569c mostravano un carico batterico polmonare significativamente maggiore rispetto ai topi infettati con il ceppo knockout (Fig.8). Questi risultati evidenziano che la

presenza della proteasi favorisce la colonizzazione, la sopravvivenza e la replicazione di *Mycobacterium tuberculosis* nei tessuti polmonari.

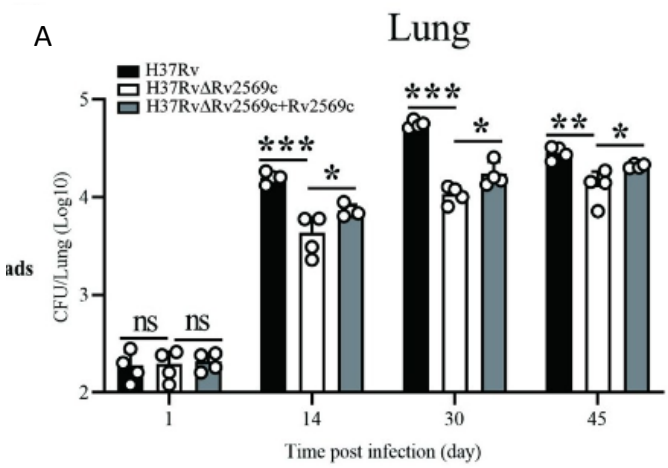

Figura 8. La carica batterica polmonare è stata valutata mediante il conteggio delle CFUs a 1, 14, 30 e 45 giorni dall'infezione [1]

Le analisi istopatologiche hanno evidenziato una marcata degradazione dell'E-caderina nei polmoni dei topi infettati con ceppi esprimenti Rv2569c. In questi gruppi, è stato osservato un maggior sanguinamento dopo l'infezione con i ceppi H37Rv e H37RvΔRv2569c + Rv2569c rispetto ad H37RvΔRv2569c (Fig.9).

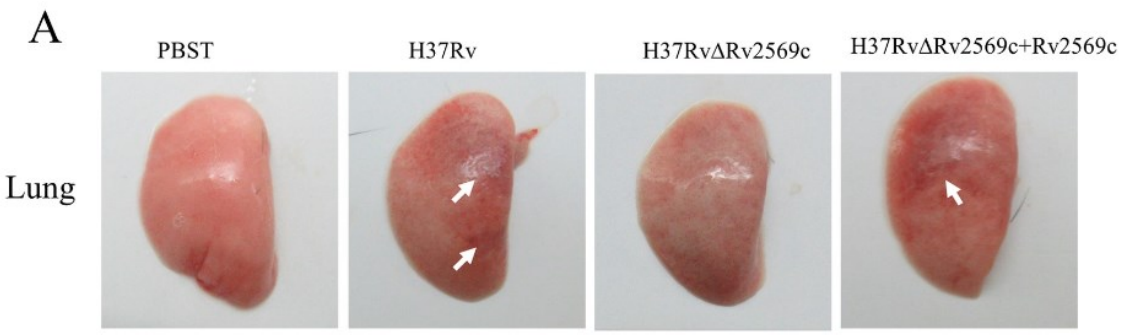

Figura 9. Aspetto macroscopico dei polmoni di topo dopo l'infezione con i ceppi H37Rv, H37RvΔRv2569c e H37RvΔRv2569c + Rv2569c [1]

Inoltre, si è osservata una maggiore infiltrazione di cellule infiammatorie e aggregazione macrofaga nel polmone infetto con i ceppi H37Rv e H37RvΔRv2569c + Rv2569 (Fig.10).

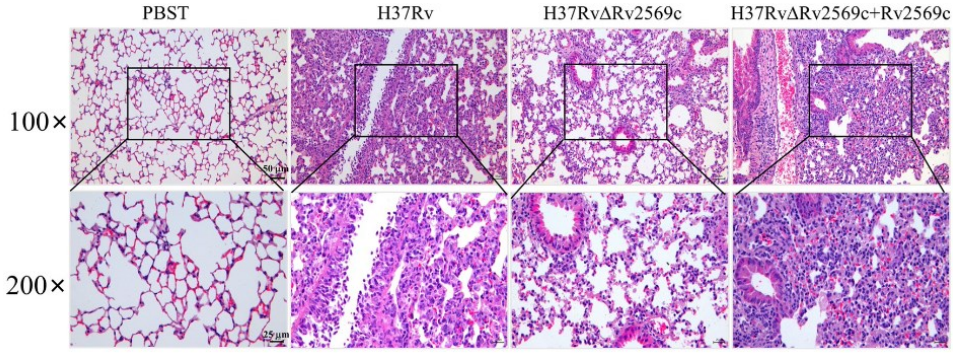

Figura 10. Analisi istopatologica del polmone murino per valutare il danno patologico [1]

6. DISCUSSIONE

I dati raccolti in questo studio offrono una solida dimostrazione del ruolo patogenico della serina proteasi Rv2569c di *Mycobacterium tuberculosis*, evidenziando una duplice funzione: degradativa sulla barriera epiteliale e immunomodulante sul microambiente infettivo.

L'attività proteolitica in vitro ha mostrato una selettiva capacità di clivaggio della porzione extracellulare dell'E-caderina, proteina chiave nelle giunzioni aderenti epiteliali. Questa attività è stata confermata nei modelli cellulari A549, in cui si è osservata una frammentazione dell'E-caderina e una diminuzione del segnale giunzionale, suggerendo che Rv2569c contribuisca attivamente alla disgregazione della barriera epiteliale.
La costruzione di ceppi knockout H37RvΔRv2569c ha permesso di attribuire specificità funzionale a Rv2569c: in assenza dell'enzima, il batterio perde la capacità di degradare l'E-caderina e mostra una ridotta capacità di traslocazione nei saggi Transwell. Il ripristino del fenotipo con ceppi complementati sottolinea ulteriormente l'importanza di Rv2569c come fattore di virulenza.
Nel modello murino, la proteasi si è confermata determinante nel favorire la replicazione e la colonizzazione polmonare, con cariche batteriche significativamente aumentate nei ceppi esprimenti Rv2569c rispetto ai knockout. Le analisi istopatologiche hanno evidenziato una marcata degradazione dell'E-caderina, associata a danni tissutali, sanguinamenti alveolari e infiltrati infiammatori, indicando una compromissione dell'integrità polmonare.

Nel complesso, Rv2569c emerge come elemento chiave nella patogenesi tubercolare, implicato nella alterazione della barriera epiteliale, nella traslocazione batterica, e nella persistenza tissutale. Tali evidenze pongono le basi per esplorare Rv2569c come potenziale target terapeutico o come biomarcatore di virulenza, aprendo nuovi scenari nella lotta alla tubercolosi.

Nonostante l'eliminazione di Rv2569c riduca significativamente la traslocazione batterica e la virulenza, la sua assenza non la azzera completamente. Questo suggerisce la presenza di meccanismi compensatori e una ridondanza funzionale tra altri fattori di virulenza. Di conseguenza, l'inibizione mirata della sola Rv2569c potrebbe non essere sufficiente a bloccare completamente l'infezione o la trasmissione, evidenziando la necessità di strategie terapeutiche che considerino simultaneamente molteplici bersagli molecolari.

I modelli cellulari A549 offrono un metodo efficace per studiare le interazioni tra *M. tuberculosis* e la barriera epiteliale, ma presentano anche limitazioni. Essi non tengono conto della complessità delle risposte immunitarie o delle dinamiche cellulari osservabili nei tessuti vivi. Questi limiti evidenziano la necessità di integrare i dati con studi su modelli sperimentali più complessi [13].

Analogamente, i modelli murini, seppur fondamentali per dimostrare il ruolo della proteasi in vivo, non riproducono fedelmente l'architettura polmonare o le risposte immunitarie umane. Questa limitazione richiede ulteriori validazioni su modelli sperimentali che considerino meglio le caratteristiche specifiche dell'infezione nell'ospite umano.

Le interazioni tra diverse proteasi batteriche e tra proteasi e substrati epiteliali sono ancora poco conosciute. Identificare tali meccanismi potrebbe rappresentare un avanzamento significativo nello sviluppo di terapie mirate. I futuri studi dovranno concentrarsi su sistemi integrati che riflettano la complessità delle infezioni umane.

7. CONCLUSIONE

La tubercolosi (TB) continua a rappresentare una delle più gravi sfide sanitarie globali, non solo per la sua alta mortalità, ma per la straordinaria capacità di adattamento e persistenza del suo agente eziologico, *Mycobacterium tuberculosis*. Questa tesi ha esplorato in profondità il ruolo della serina proteasi Rv2569c, un fattore di virulenza emergente, in grado di compromettere la barriera epiteliale dell'ospite attraverso il clivaggio selettivo dell'E-caderina, glicoproteina fondamentale per l'integrità delle giunzioni cellulari.

I dati sperimentali hanno dimostrato che:

- Rv2569c possiede attività proteolitica specifica verso substrati epiteliali
- Nei modelli cellulari, la proteasi induce la frammentazione della E-caderina e altera la coesione epiteliale
- Nei modelli murini, è associata a incremento del carico batterico, danneggiamento polmonare e aumentata traslocazione patogena

L'uso di ceppi knockout e complementati, unito a saggi in vitro e in vivo, ha permesso di chiarire la funzione specifica di Rv2569c nel contesto dell'infezione tubercolare, evidenziando il legame tra la disgregazione delle barriere epiteliali e l'efficienza trasmissiva del patogeno.

Nel contesto più ampio delle proteasi batteriche già note in altri patogeni epiteliali come *Helicobacter pylori* e *Campylobacter jejuni*, questo studio contribuisce ad affermare la centralità delle serina proteasi nella strategia invasiva di *M. tuberculosis*. In particolare, l'analisi di Rv2569c fornisce nuovi indizi per lo sviluppo di approcci terapeutici mirati a bloccare la traslocazione batterica, e apre prospettive per l'identificazione di target molecolari contro la virulenza micobatterica.

BIBLIOGRAFIA

1. Zang, X., Zhang, L., Wang, Z., et al. (2024). *Serine protease Rv2569c facilitates transmission of Mycobacterium tuberculosis via disrupting the epithelial barrier by cleaving E-cadherin*. PLOS Pathogens, 20(5), e1012214. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012214

2. Moule, M. G., & Cirillo, J. D. (2020). Mycobacterium tuberculosis dissemination plays a critical role in pathogenesis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10, 65. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00065

3. World Health Organization. (2024). Global tuberculosis report 2024. World Health Organization. https://www.who.int/publications/i/item/9789240089747

4. Brennan, P. J. (2003). *Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis, 83(1-3), 91-97. https://doi.org/10.1016/S1472-9792(02)00089-6

5. Rahlwes, K. C., Dias, B.R.S., Campos, P.C., Alvarez-Arguedas, S., & Shiloh, M.U. (2023). *Pathogenicity and virulence of Mycobacterium tuberculosis*. Virulence, 14(1), 2150449. https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150449

6. Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2008). *Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1778(3), 660–669. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012

7. Devaux, C. A., Mezouar, S., & Mege, J.-L. (2019). *The E-Cadherin cleavage associated to pathogenic bacteria infections can favor bacterial invasion and transmigration, dysregulation of the immune response and cancer induction in humans.* Frontiers in Microbiology, 10, 2598. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02598

8. Steck, N., Hoffmann, M., Sava, I. G., Kim, S. C., Hahne, H., Tonkonogy, S. L., ... & Hensel, M. (2011). *Enterococcus faecalis metalloprotease compromises epithelial barrier and contributes to intestinal inflammation.* Gastroenterology, 141(3), 959–971. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.05.035

9. Wessler, S., Schneider, G., & Backert, S. (2017). *Bacterial serine protease HtrA as a promising new target for antimicrobial therapy?* Cell Communication and Signaling, 15(4), 1-5. https://d-nb.info/1124938087/34

10. Ali, M. Q., Kohler, T. P., Schulig, L., Burchhardt, G., Wüst, A., Henck, N., … Hammerschmidt, S. (2021). *Pneumococcal extracellular serine proteases: Molecular analysis and impact on colonization and disease*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11, 763152. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.763152

11. Zang, X., Jiang, Y., Zhang, J., Feng, T., Cui, Y., Wang, H., … Liu, S. (2025). *Serine protease Rv2569c inhibits inflammatory response and promotes intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis by targeting the RhoG–NF-κB–NLRP3 pathway*. International Journal of Biological Macromolecules. Advance online publication. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.117295

12. Jain P, Hsu T, Arai M, Biermann K, Thaler DS, Nguyen A, et al. *Specialized transduction designed for precise high-throughput unmarked deletions in Mycobacterium tuberculosis.* mBio. 2014; 5: e01245– 01214. https://doi.org/10.1128/mBio.01245-14

13. Franco, C., & Rezzani, R. (2025). *Methods and Models for Studying Mycobacterium tuberculosis in Respiratory Infections*. International Journal of Molecular Sciences, 26(1), 1-15. https://doi.org/10.3390/ijms26010018