



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Scienze MM. FF. NN.

*Laurea di primo livello in
Biologia Molecolare*

Elaborato di laurea

**COINVOLGIMENTO DI UNA PROTEINA PspA-LIKE DI
MYCOBACTERIUM SMEGMATIS NELLO STRESS DA pH ALCALINO**

TUTOR: DOTT.SSA ROBERTA PROVVEDI (Dip. di Biologia)

CO-TUTOR: DOTT.SSA AGNESE SERAFINI (Dip. di Istologia, Microbiologia
e Biotecnologie Mediche)

LAUREANDA: CHIARA GALANTE

Anno Accademico 2008/2009

INDICE

Pag. 5 : ABSTRACT

Pag. 6 : 1 - INTRODUZIONE

Pag. 6 : 1.1 – I micobatteri

Pag. 6 : 1.2 – Mycobacterium tuberculosis e patogenesi della tubercolosi

Pag. 7 : 1.3 – Il sistema Phage-shock protein e la proteina PspA

Pag. 9 : 1.4 – Il sistema Psp in Mycobacterium tuberculosis

Pag. 9 : 1.5 – Scopo della tesi

Pag. 10 : 2 – MATERIALI E METODI

Pag. 10 : 2.1 – Ceppi batterici, terreni di coltura e condizioni di incubazione

**Pag. 10 : 2.2 – Costruzione del ceppo complementato per i geni *ms2619-
ms2620***

Pag. 10 : 2.2.1 – Amplificazione del locus target mediante PCR

Pag. 11 : 2.2.2 – Ligazione del frammento di PCR in *pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]*

Pag. 12 : 2.2.3 – Taglio del frammento con *ScaI* e sua inserzione in *pMV306*

Pag. 13 : 2.2.4 – Trasformazione di *pAGN13* in *Ms110*

Pag. 13 : 2.3– Analisi fenotipica dei mutanti

Pag. 13 : 2.3.1 – Saggio di sopravvivenza dei mutanti esposti a pH alcalino

Pag. 14 : 2.4 – Saggi di beta-galattosidasi

Pag. 14 : 2.4.1 – Saggi di beta-galattosidasi in *M. smegmatis*

Pag. 14 : 2.4.2 – Determinazione della concentrazione proteica

Pag. 15 : 3 – RISULTATI E DISCUSSIONE

Pag. 15 : 3.1 – Costruzione e verifica del ceppo *Ms110c*

Pag. 15 : 3.2 – Saggio di sopravvivenza a pH alcalino

Pag. 16 : 3.3 - Saggi di beta-galattosidasi

Pag. 17 : 3.4 – Conclusioni e sviluppi futuri

Pag. 18 : BIBLIOGRAFIA

ABSTRACT

Il *Phage shock protein system* (Psp) di *Escherichia coli* è indotto da stress di superficie in grado di dissipare la forza motrice protonica cellulare, ed è codificato dall'operone *pspABCDE*, da *pspF* e *pspG*. Questo sistema è altamente conservato in molti batteri Gram-negativi, ma diversi genomi contengono esclusivamente l'omologo del gene *pspA*. Questa conservazione indica che la proteina PspA da sola può svolgere un importante ruolo in questi batteri.

Anche in vari batteri Gram-positivi si è individuato un sistema *Psp-like*. In *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium smegmatis* ad esempio sono stati identificati due *clusters* genici simili al sistema Psp (*ms2618*, *ms2619* e *ms2620* in *M. smegmatis*).

In questo lavoro viene descritta la costruzione del ceppo di *Mycobacterium smegmatis* Ms110c, che complementa la mutazione del ceppo Ms110 (Δ *ms2619*–*ms2620*), e la valutazione della percentuale di sopravvivenza di tali ceppi rispetto al *wild type* in ambiente a pH10. Sono inoltre riportati i dati ottenuti mediante saggi di beta-galattosidasi per valutare il ruolo della proteina *PspA-like* Ms2619 nella regolazione dell'espressione del proprio operone. Tali dati mostrano che l'operone *pspA-like* è direttamente coinvolto nel mantenimento della vitalità dei batteri, e che Ms2619 sembra agire da regolatore positivo per la trascrizione del proprio operone.

1 – INTRODUZIONE

1.1 – I Micobatteri

I Micobatteri appartengono al genere *Mycobacteriaceae*. Sono microrganismi asporigeni immobili, aerobi obbligati o microaerofili. Presentano forma bastoncellare con lunghezza di 2-4 μ m e diametro 0.3-0.5 μ m. Sebbene vengano classificati come batteri Gram-positivi hanno un involucro esterno particolarmente ricco in lipidi, oltre alla membrana plasmatica formata dal doppio strato fosfolipidico. La parete cellulare (Fig.1.1) è costituita da due parti, delle quali la interna è formata da peptidoglicano (PG) legato covalentemente ai polisaccaridi arabino-galattani (AG), esterificati con acidi micolici. Questo è il core della parete, detto *mycolyl arabinogalactan-peptidoglycan (mAGP) complex* (Brennan, 2003). Gli acidi micolici si estendono poi perpendicolarmente agli AG/PG, intercalati ad altri glicolipidi (Chatterjee, 1997) costituenti la parte superiore. Si tratta di glicolipidi fenolici, ed interspersi troviamo anche proteine di membrana, lipo-arabino-mannani, fosfoinositido-mannani, lipomannani.

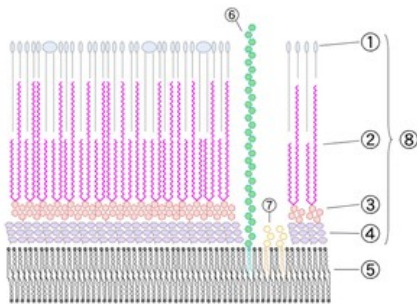


Fig. 1.1: Struttura della parete cellulare micobatterica. 1. glicolipidi fenolici, 2. acidi micolici, 3. arabinogalattani, 4. peptidoglicano, 5. membrana cellulare, 6. lipo-arabinomannani, 7. fosfatidilinositolo mannoside, 8. scheletro della parete cellulare. L'elevato contenuto lipidico della parete conferisce ai Micobatteri delle caratteristiche peculiari, in primis l'acido-alcool resistenza sfruttata nella colorazione di Ziehl-Neelsen.

Inoltre sono resistenti a molti antibiotici e ai composti acidi e alcalini presenti nei fagosomi, ed hanno elevata idrofobicità e impermeabilità. Questo elevato contenuto lipidico porta anche ad un rallentamento degli scambi nutrizionali con l'ambiente esterno, che si pensa correlato ad una più lenta replicazione cellulare (La Placa, 2005). Difatti molti micobatteri (come *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*) rientrano nella categoria dei micobatteri a crescita lenta, aventi tempo di replicazione di 18-24 ore. Le specie di micobatteri non tubercolari sono invece in gran parte classificati come micobatteri a crescita rapida, aventi tempo di replicazione di 2-4 ore (come *Mycobacterium smegmatis*).

1.2 – *Mycobacterium tuberculosis* e patogenesi della tubercolosi

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) è noto anche come “Bacillo di Koch” perché fu Robert Koch a isolarlo per la prima volta, nel 1882, ed è l'agente eziologico della tubercolosi (TB) umana. Questo micobatterio aerobio obbligato a crescita lenta appartiene al “*Mycobacterium tuberculosis complex*”, un gruppo di micobatteri molto simili tra loro e probabilmente derivanti da un'unica specie originaria (con Mtb ne fanno parte anche *Mycobacterium africanum* e *M. bovis*). L'infezione tubercolare si contrae principalmente per via aerea tramite inalazione di particelle infette provenienti da soggetti infetti e colpisce soprattutto le vie respiratorie. I bacilli innescano un processo infiammatorio nei polmoni con accumulo di cellule fagocitarie; quelli che non vengono uccisi dai fagociti

sopravvivono uccidendo le cellule del sistema immunitario, e vengono liberati nell'organismo. Il seguente processo infiammatorio granulomatoso porta alla formazione di lesioni denominate "tubercoli" circoscritte da una reazione connettivale. Se il soggetto è resistente il complesso infiammatorio resta circoscritto, con la formazione di un complesso primario, altrimenti la lesione granulomatosa iniziale diventa un'infezione cronica asintomatica con persistenza dei micobatteri anche per decenni. Può capitare che una diminuzione dell'efficienza del sistema immunitario, dovuta ad esempio ad una sindrome da immunodeficienza come quella conseguente all'infezione da HIV, riattivi il complesso primario con la ripresa della moltiplicazione dei micobatteri (La Placa, 2005).

L'elemento centrale dell'azione patogena di Mtb è la sua capacità di resistere al *killing* intracellulare. Ciò avviene modulando la normale maturazione del fagocita a compartimento acidificato e idroliticamente attivo (inibendo l'aumento del numero di ATPasi vacuolari e la fusione del complesso fagosoma-lisosoma), impedendo così una risposta immunitaria produttiva nell'ospite (Russel, 2001).

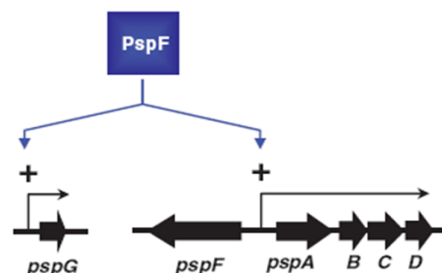
1.3 – Il sistema Phage shock protein e la proteina PspA

I batteri patogeni hanno evoluto vari metodi di sopravvivenza nei tessuti dell'ospite, tra i quali sistemi di risposta agli stress extracitoplasmatici che colpiscono la membrana. Un ESR (*extracytoplasmic stress response*) altamente conservato nei batteri gram-negativi è il *Phage shock protein system* (Psp), il cui effettore principale è la proteina PspA (Rowley *et al.*, 2006).

Nel 1990 il gruppo di Peter Model identificò per la prima volta un polipeptide di ~25kDa studiando la variazione della risposta trascrizionale in cellule di *Escherichia coli* infettate con fagi filamentosi; tale proteina, assente in cellule non infette, è stata successivamente denominata PspA (*Phage shock protein A*). Il tasso di induzione della proteina risultò notevolmente aumentato in risposta all'espressione della secretina pIV, una proteina prodotta dall'ospite durante l'infezione ma codificata dal fago (Brissette *et al.*, 1990).

L'inserzione di proteine nella membrana esterna deve essere generalmente assistita da una *chaperone-like protein*, altrimenti si ha una mislocalizzazione delle secretine (Hardie *et al.*, 1996). La secretina pIV invece non è assistita da chaperonine, per cui è in parte naturalmente mislocalizzata e ciò comporta un forte segnale di induzione per il sistema Psp. La PspA è stata però dimostrata essere indotta anche in seguito ad altri stress: *heat shock* estremo, esposizione a etanolo o altri solventi organici, shock iperosmotico e incubazione delle cellule a pH alcalino, tutti eventi che portano alla dissipazione della forza motrice protonica.

Fig. 1.2: Organizzazione del locus *psp* in *E. coli*. La proteina PspF una volta liberata attiva la trascrizione dai promotori di PspA e PspG. PspD e PspG non fanno parte del sistema di traduzione del segnale e la loro funzione non è nota. (da Darwin, 2005)



Il gene *pspA* fa parte dell'operone *pspABCDE* in *E. coli* (Fig. 1.2), la cui trascrizione è iniziata dalla σ^{54} -RNAPolimerasi; l'operone è affiancato ai geni *pspF* e *pspG* costituendo il locus *psp*. L'unità funzionale *pspABC* è altamente conservata, ciò nonostante il gene *pspG* non è conservato in tutti i batteri aventi tale unità.

Le varie proteine coinvolte nel sistema *psp* hanno caratteristiche differenti:

PspA: proteina di 25,3 kDa localizzata a livello citosolico e della membrana interna, che oligomerizza formando un anello a nove domini distinti di 1023kDa composto ognuno da quattro subunità PspA (Hankamer *et al.*, 2004).

PspB: proteina formata da un segmento N-terminale idrofobico, che la ancora alla membrana interna, e da un dominio C-terminale citoplasmatico.

PspC: proteina costituita da un dominio N-terminale citoplasmatico, da un segmento transmembrana e da un dominio C-terminale periplasmico contenente un *leucine zipper motif* (Kleerebezem *et al.*, 1996).

PspD: proteina legata alla membrana interna a funzione ignota.

PspE: proteina di circa 11kDa appartenente al gruppo delle rodanasi (Adams *et al.*, 2002).

PspF: *enhancer-binding protein*, membro della famiglia delle proteine AAA⁺; lega l'ATP e lo idrolizza usando l'energia derivata per far avvenire la transizione a stato aperto della σ^{54} -RNAPolimerasi.

PspG: proteina a funzione ignota, regolata positivamente da PspA e negativamente da PspF.

Il modello di funzionamento del sistema (Fig. 1.3) prevede l'inibizione dell'attività ATPasica di PspF, in condizioni fisiologiche, tramite il legame con l'oligomero PspA presente a livello basale, ed il conseguente silenziamento dell'operone (Darwin, 2005). In risposta alla dissipazione della forza motrice protonica le regioni C-terminali di PspC, normalmente dimerizzate tramite i *leucine zipper motives*, si dissociano e interagiscono con PspB (Adams *et al.*, 2003) inducendone il legame con PspA. La modifica conformazionale subita dall'oligomero PspA porta al rilascio di PspF, che è ora libero di contattare l'RNAPolimerasi permettendo la trascrizione dell'operone *pspABCDE*.

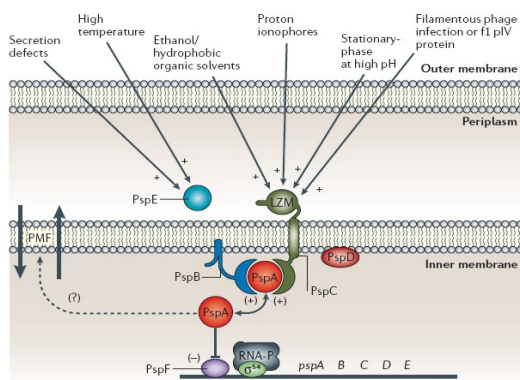


Fig. 1.3: Modello di risposta del Psp system in *E. coli*. In condizioni di non induzione il livello di PspA citoplasmatica consente di inibire PspF tramite legame diretto con il dominio ATPasico di PspF. In condizioni di induzione PspB e PspC formano un complesso proteico che lega PspA, facendo rilasciare PspF. L'*enhancer binding protein* promuove la trascrizione dell'operone e la PspA prodotta si lega alla membrana interna stabilizzandola. (da Rowley *et al.*, 2006)

Il gruppo di Kobayashi ha scoperto nel 2007 che l'oligomero formato dalla

PspA

lega preferenzialmente i fosfolipidi di membrana, in particolare fosfatidilglicerolo (PG) e fosfatidilserina (PS), riparando la perdita del gradiente protonico. Ciò indica quindi anche una funzione fisiologica di mantenimento dell'integrità di membrana, oltre che di regolatore negativo della trascrizione dell'operone *pspABCDE*, della proteina PspA. Il meccanismo con cui si pensa che tale proteina

ripari le membrane danneggiate prevede che l'oligomero PspA interagisca con i PG e le PS di membrana limitandone la mobilità ed alterando quindi le proprietà fisiche della membrana plasmatica stessa.

1.4 – Il sistema Psp in *Mycobacterium tuberculosis*

Nel genoma di *Mycobacterium tuberculosis* è presente un *cluster* genico la cui organizzazione è simile al sistema *psp* contenente il gene *rv2744c* (Fig. 1.4a). Questo gene codifica per una proteina di 270 aminoacidi (aa) del peso di 35 kDa, avente una similarità pari all'83% con la proteina PspA di *E. coli*. Del *cluster* fanno parte anche altri due geni: *rv2743c* codifica per una proteina transmembrana di 270 aa ricca in alanine, mentre *rv2745c* codifica per una proteina di 112 aa avente un motivo HTH (*helix-turn-helix*) all'estremità N-terminale che presenta omologia con la famiglia degli *xenobiotic response elements*. Si pensa che la proteina Rv2745c abbia funzione di regolatore trascrizionale, similmente a PspF (Manganelli *et al.*, 2001). Tale *cluster* genico è presente con la stessa organizzazione anche in *M. smegmatis* ed è rappresentato dalle proteine Ms2618 (regolatore trascrizionale), Ms2619 (*PspA-like*) e Ms2620 (proteina transmembrana) (Fig. 1.4b).

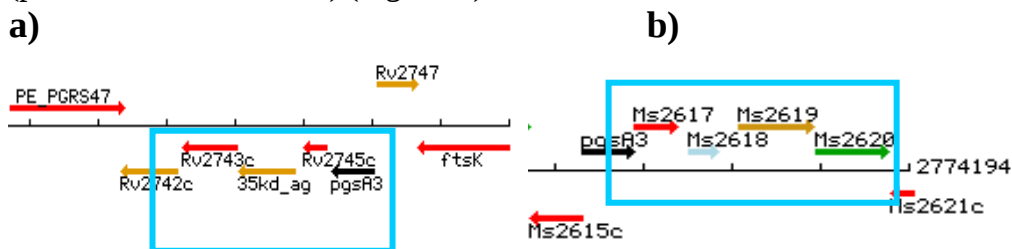


Fig. 1.4: a) Cluster dei geni *rv2743c*, *rv2744c*, *rv2745c* in *M. tuberculosis*. b) Cluster dei geni *ms2618*, *ms2619* e *ms2620* in *M. smegmatis*.

I geni appartenenti a questo *cluster* risultano sovraespressi in seguito a stress di superficie indotti da heat shock, SDS, agenti ossidanti o vancomicina, antibiotico avente come bersaglio la parete batterica (Manganelli *et al.*, 2001; Provvedi *et al.*, 2008).

1.5 – Scopo della tesi

Nel laboratorio in cui ho svolto il tirocinio era stato precedentemente costruito un ceppo di *M. smegmatis* in cui i geni *ms2619* e *ms2620* sono stati silenziati mediante inserimento di una cassetta di igromicina, chiamato Ms110.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di costruire il ceppo che complementa questa mutazione (Ms110c), e di analizzarlo fenotipicamente con il ceppo di *M. smegmatis* Ms110 su cui è stato effettuato il *gene-knockout* di *ms2619* e di *ms2620*.

2 – MATERIALI E METODI

2.1 – Ceppi batterici, terreni di coltura e condizioni di incubazione

Per la costruzione del ceppo complementato si è partiti dal ceppo mutante Ms110, in cui i geni *ms2619* e *ms2620* sono stati silenziati mediante l'inserimento di una

cassetta di igromicina. I micobatteri sono stati cresciuti sia in terreno liquido Middlebrock 7H9 che in terreno solido Middlebrock 7H10, entrambi contenenti 0.2% di glicerolo e 0.05% di Tween 80, e incubati a 37°C. Le cellule di *E. coli* chimicamente competenti usate (One shot® Competent Cells) sono state piastrate su terreno Luria-Bertani (LB) agar solido, contenente 1% bacto-triptone, 0.5% estratto di lievito, 1% NaCl, 1.5% bacto-agar e incubate *overnight* a 37°C.

Il ceppo *wild type* di *M. smegmatis* usato nella costruzione della curva di sopravvivenza è mc²155; assieme al ceppo Ms110 e al ceppo complementato è stato cresciuto in terreno 7H9 addizionato con il tampone AMPSO e NaOH per portare a pH10. L'incubazione è durata 8 ore a 37°C. Successivamente i micobatteri sono stati piastrati su terreno 7H10 e incubati tre giorni a 37°C.

I saggi di beta-galattosidasi sono stati svolti usando i ceppi di *M. smegmatis* Ms113, Ms114 e Ms115, derivanti rispettivamente dai ceppi mc²155, Ms110 e Ms111 e ottenuti mediante inserimento del gene per la beta-galattosidasi (*lacZ*) in fusione con la *promoter region* di *ms2619-ms2620*. Nel ceppo Ms111 è stato silenziato il gene *ms2620* mediante inserimento di una cassetta di igromicina. I ceppi sono stati manipolati in terreno 7H9/H₂O e 7H9/NaOH+AMPSO (pH10) a 37°C.

2.2 – Costruzione del ceppo complementato per i geni *ms2619-ms2620*

2.2.1 – Amplificazione delle regioni fiancheggianti il locus target mediante PCR

Per amplificare il frammento usato per complementare il ceppo Ms110 sono stati usati primers oligonucleotidici disegnati basandosi sulla sequenza del genoma di *M. smegmatis*. Le sequenze dei primers sono le seguenti:

Primer upper RP800:

Sequenza (5' → 3') AGT ACT AGG TGG TCA TCC CGC AGG TGT

Primer lower RP801:

Sequenza (5' → 3') AGT ACT CCA CGA CAT CTG AGC CGA GTT

Entrambi contengono il sito ScaI in 5'; il prodotto di PCR generato è lungo 1992bp e contiene la *promoter region* dei geni *ms2619* e *ms2620* e i geni stessi; la temperatura di annealing degli oligonucleotidi è di circa 64°C.

Le reazioni di PCR sono state condotte in un volume finale di 25µl contenenti:

DNA genomico di <i>M. smegmatis</i> (50ng/µl)	1µl
<i>Pfu</i> Reaction Buffer 10X	2.5µl
dNTPs (2.5mM each)	2µl
DMSO	2.5µl
Primer upper RP800 (250 pmoli/µl)	0.5µl
Primer lower RP801 (250 pmoli/µl)	0.5µl
<i>Pfu</i> (2.5 unità/µl)	0.25µl
H ₂ O	15.75µl
	<hr/>
	25µl

Si è seguito il seguente schema di amplificazione:

Denaturazione: 95°C per 10'

Aggiunta enzima *Pfu* a 80°C

Per 5 cicli:

Denaturazione: 95°C per 30''

Annealing: 63°C per 30''

Estensione: 72°C per 1'
 Per 28 cicli:
 Denaturazione: 95°C per 30''
 Annealing: 65°C per 30''
 Estensione: 72°C per 2'
 Estensione finale: 72°C per 10'
 Blocco reazione a 4°C

La DNA polimerasi usata è la *Pfu* (Stratagene), isolata da *Pyrococcus furiosus*. L'elevata capacità di *proofreading* la rende la polimerasi termostabile col più basso tasso di errore. Il Reaction Buffer 10X contiene 200mM tris-HCl (pH8.8), 20mM MgSO₄, 100mM KCl, 100mM (NH₄)SO₄, 1% Triton x-100, 1mg/ml *nuclease-free BSA*.

2.2.2 – Ligazione del frammento di PCR in pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]

Il frammento ottenuto è stato sottoposto a ligazione con il vettore TOPO[®] del ZERO Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit (Invitrogen) (Fig.2.1). Il kit contiene il vettore linearizzato con la topoisomerasi I del virus *Vaccinia* legata covalentemente all'estremità 3' di ogni filamento. Questo enzima riconosce specificamente la sequenza 5' (C/T)CCTT 3' e lega covalentemente il gruppo fosfato della timidina in 3'. Poi taglia il DNA in un solo filamento per svolgerlo, così da poterlo poi riligare e rilasciarlo. In tal modo si possono inserire agevolmente frammenti di PCR nel vettore. La reazione avviene in un volume finale di 6µl contenenti il prodotto di PCR in quantità variabile a seconda della concentrazione (0.5-4µl), 1µl di soluzione salina, 1µl di vettore TOPO[®] e acqua sterile per portare a volume. Dopo 5' a temperatura ambiente il prodotto della reazione viene trasformato in cellule di *E. coli* (ceppo One shot[®] TOP10) chimicamente competenti seguendo il protocollo fornito dal kit. Si è così ottenuto il plasmide pAGN9, contenente il frammento di PCR.

Le cellule trasformanti sono state poi piastrate su terreno LB agar, contenente 1% bacto-triptone, 0.5% estratto di lievito, 1% NaCl, 1.5% bacto-agar, e incubate a 37°C. Al terreno è stata aggiunta kanamicina (50µg/µl) per selezionare i cloni contenenti il plasmide.

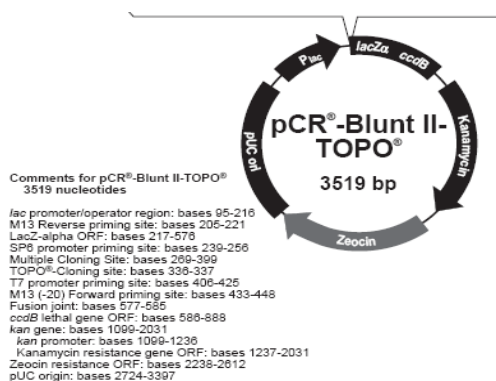


Fig. 2.1: Mappa plasmidica del vettore pCR[®]-BluntII-TOPO.

Il plasmide è stato quindi estratto dai cloni positivi mediante purificazione su larga scala (*midi-prep*) utilizzando il kit Invitrogen (PureLink[™] HiPure Plasmid Filter Purification Kits). L'estrazione del DNA plasmidico è stata effettuata seguendo il protocollo fornito dalla ditta.

2.2.3 – Taglio del frammento con *ScaI* e sua inserzione in pMV306

Tramite digestione enzimatica con l'enzima ScaI si è tagliato il frammento da pAGN9, sfruttando i siti ScaI posti alle estremità. Tutti gli enzimi usati sono stati forniti dalla New England BioLabs, e tutte le digestioni sono state effettuate in un volume di 100µl seguendo questo protocollo: DNA (6-7µg), NEBuffer specifico in concentrazione 10X, enzima (circa 10u/µgDNA), acqua milliQ quanto basta per portare a volume. Dopodichè i campioni sono stati incubati 2 ore a 37°C.

Il buffer indicato per l'enzima ScaI è NEBuffer 3 e dopo l'incubazione è stato inattivato mediante *heat-shock* a 80°C per 20'. L'enzima riconosce il sito 5' AGT ACT 3' e genera estremità *blunt*.

Il frammento ottenuto è stato inserito nel plasmide integrativo pMV306 digerito con PvuII in NEBuffer 2. Dopo l'incubazione l'enzima è stato inattivato mediante precipitazione con fenolo-cloroformio, dal momento che non è possibile la *heat-shock inactivation*. Si è proceduto aggiungendo 1 volume di fenolo-cloroformio (100µl) e, dopo agitazione, centrifugando 10' a temperatura ambiente per separare fase fenolica e fase acquosa. Si è quindi prelevato il sovrnatante e lo si è precipitato con sodio acetato (1/10 volume) e Et-OH 96% (2 volumi) a -20°C per circa 2 ore. Si è poi centrifugato il campione per 15' a 4°C e si è raccolto il pellet, che è stato lavato risospesendolo in Et-OH 70%. Dopo un ulteriore ciclo di centrifugazione di 5' a 4°C il sovrnatante è stato eliminato e il pellet risospeso in H₂O.

L'enzima PvuII riconosce il sito 5' CAG CTG 3' e genera estremità *blunt*.

La reazione di ligazione del frammento in pMV306 è stata eseguita in 20µl con una ligasi del fago T4, incubando a 16°C per tutta la notte. In parallelo è stato allestito un campione privo di frammento, usato come controllo negativo.

Frammento – ScaI <i>cut</i>	4µl
pMV306 - PvuII <i>cut</i>	0.8µl
Buffer T4 DNA ligasi 10X	2µl
T4 DNA ligasi	1µl
<u>H₂O milliQ</u>	<u>12.2µl</u>
	20µl

Controllo negativo:

pMV306	4µl
Buffer T4 DNA ligasi	2µl
T4 DNA ligasi	1µl
<u>H₂O milliQ</u>	<u>13µl</u>
	20µl

Il giorno seguente la ligasi è stata inattivata a 60°C per 20'.

Il plasmide ottenuto è stato chiamato pAGN13.

2.2.4 – Trasformazione di pAGN13 in Ms110

Il plasmide ottenuto è stato trasformato nel ceppo Ms110 mediante elettroporazione.

Le cellule di Ms110 stoccate a -80°C sono state piastrate su terreno 7H10. Le piastre sono state incubate due giorni a 37°C, dopodichè con un tampone si è

prelevata un po' di patina e la si è trasferita in 5ml di terreno liquido 7H9. Le cellule sono state messe a crescere *over night* a 37°C e il mattino seguente si è misurata la OD₆₀₀.

La coltura è stata quindi ringiovanita a una OD₆₀₀=0.15 in 50ml di 7H9 ed è stata messa nuovamente in incubazione a 37°C, fino al raggiungimento di una OD₆₀₀=0.4-0.6; a questo punto le cellule sono state centrifugate a 5000rpm per 15' a temperatura ambiente.

Il pellet è stato lavato due volte in 10ml di glicerolo 10%, quindi è stato risospeso in 1ml di glicerolo 10%. Dopo un altro step di centrifugazione a 13000rpm per 5' a temperatura ambiente il pellet è stato risospeso in 800µl di glicerolo 10% e aliquotato (50µl per eppendorf sterile da 1,5ml). In ogni aliquota di cellule sono stati aggiunti 500ng di pAGN13 e si è aggiunto 7H9.

I campioni sono stati sottoposti a elettroporazione, applicando una differenza di potenziale di 2500V e una capacità di 25µF. Poi sono stati incubati per 3 ore a 37°C al fine di consentire l'espressione del gene per la resistenza alla igromicina. Successivamente i micobatteri sono stati piastrati su terreno 7H10 contenente igromicina (50µg/µl) per selezionare i trasformanti.

2.3 – Analisi fenotipica dei mutanti

2.3.1 – Saggio di sopravvivenza dei ceppi mutanti esposti a pH alcalino

Per analizzare fenotipicamente i mutanti di *M. smegmatis* è stata valutata la percentuale di sopravvivenza del ceppo mutante e del complementato rispetto al *wild type* in seguito ad esposizione a pH alcalino.

Con i tre ceppi si è eseguito un preinoculo in 5ml di 7H9. Dopo una notte di incubazione i ceppi sono stati ringiovaniti ad una OD₆₀₀=0,1 in terreno fresco 7H9 a pH10, e fatti crescere fino a una OD₆₀₀=0.3.

Agli intervalli di 0 e 8 ore di incubazione si è misurata la OD₆₀₀ e si sono piastrati 10µl di ognuna delle opportune diluizioni seriali in terreno 7H10.

Dopo tre giorni di incubazione a 37°C sono state contate le unità formanti colonie/ml (cfu/ml), necessarie per stabilire la percentuale di sopravvivenza di Ms110 e Ms110c rispetto al *wild type*.

2.4 – Saggi di beta-galattosidasi

2.4.1 – Saggi di beta-galattosidasi in *M. smegmatis*

I ceppi utilizzati per i saggi di beta-galattosidasi sono Ms113, Ms114 e Ms115, derivanti rispettivamente dai ceppi mc²155, Ms110 e Ms111 in cui è stato inserito in fusione con la *promoter region* il gene della beta-galattosidasi *lacZ*.

Ms111 è un ceppo mutante ottenuto precedentemente nel laboratorio in cui ho svolto il tirocinio in cui è stato silenziato il gene *ms2620*.

I tre ceppi sono stati cresciuti in 7H9 fino ad una OD₆₀₀=0,3. Poi si sono divisi i batteri in due colture, delle quali una è stata lasciata crescere in 7H9 e l'altra in terreno a pH10 per provocare lo stress di superficie. Dopo un'incubazione a 37°C per 90' i batteri sono stati centrifugati 10' a 5000rpm, quindi risospesi in 600µl di bufferZ (NaH₂PO₄ 0,5M, Na₂HPO₄ 0,5M, MgSO₄ 1M). Con due cicli di

ultrasonificatore da 45'' l'uno si sono lisate le cellule, che poi sono state centrifugate 5' a 13000rpm per separare l'estratto dai detriti cellulari.

Un'aliquota di 100µl di ogni estratto proteico è stata portata a volume finale di 800µl con bufferZ, aggiungendo poi 6µl di beta-mercaptoetanololo e 200µl di ONPG (Orto-Nitro-Parafenol-Galattosidasi).

La struttura simile a quella del lattosio che ha l'ONPG ne permette l'idrolisi in presenza di enzima beta-galattosidasi, formando galattosio e orto-nitro-parafenolo che determina un viraggio della soluzione da incolore a giallo paglierino.

Si sono incubati dunque i campioni a 37°C misurando il tempo necessario al viraggio del colore, raggiunto il quale la reazione è stata bloccata con 500µl di Na₂CO₃.

Infine si è misurata l'assorbanza a 420nm e si è calcolata l'attività in unità miller con la seguente formula:

$$A = \frac{377.77 * OD_{420}}{C_{proteine} * \Delta t * Vol_{estratto}}$$

2.4.2 – Determinazione della concentrazione proteica

Tramite il "Biorad-Protein assay", basato sul metodo colorimetrico di Bradford, si è determinata la concentrazione proteica. Tale metodo sfrutta l'uso della soluzione colorante acida Coomassie Brilliant Blue G-250[®], il cui picco di assorbimento si sposta da 465nm a 595nm in seguito al legame con proteine. Quindi l'aggiunta del reagente rosso nel campione provoca il viraggio del colore al verde oliva/blu, a seconda della quantità di proteine presenti in soluzione.

La concentrazione proteica si estrapola, dopo aver misurato l'assorbanza allo spettrofotometro, da una retta di taratura ottenuta con campioni a quantità note di BSA (1-2.5-5-10-15-25 µg/ml).

Il volume finale in cui si svolge il saggio è 1ml, di cui 200µl di reagente e 800µl di campione diluito in acqua milliQ.

3 – **RISULTATI E DISCUSSIONE**

3.1 – **Costruzione e verifica del ceppo Ms110c**

Dopo la produzione del ceppo mutante Ms110 si è costruito il ceppo complementato Ms110c.

Un frammento di 1992bp contenente i geni *ms2619* e *ms2620* a valle del loro promotore è stato amplificato mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) usando i primers RP800 (*upper primer*) e RP801 (*lower primer*) (Fig. 3.1).

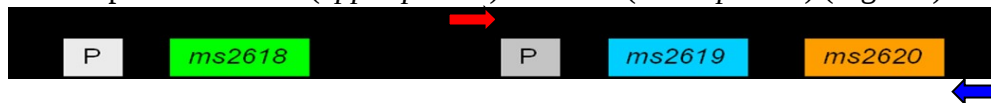


Fig. 3.1: Rappresentazione del locus *psp-like* in *M. smegmatis*. Sono indicate le posizioni dei primers RP800 (rosso) e RP801 (blu) usati per l'amplificazione del frammento di 1992bp.

Il prodotto di PCR così ottenuto è stato clonato nel vettore pCR®-Blunt II-TOPO® ottenendo il plasmide pAGN9 e successivamente trasferito nel vettore pMV306, contenente il gene che conferisce la resistenza all'antibiotico igromicina e un sito attP capace di integrarsi nel sito attB presente nel genoma batterico.

Il plasmide ricombinante così ottenuto è stato denominato pAGN13.

La presenza effettiva del frammento corrispondente all'operone *ms2619-ms2620* in pAGN13 è stata verificata tramite elettroforesi su gel di agarosio, in seguito alla digestione del plasmide con XhoI. Questo enzima di restrizione presenta due siti di taglio nel plasmide ricombinante ottenuto: uno si trova all'interno dell'inserto e l'altro all'interno del vettore, provocando il rilascio di due frammenti la cui lunghezza corrisponde a 3154bp e a 2833bp nei cloni positivi.

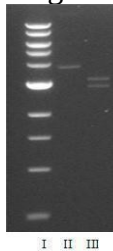


Fig. 3.2: Gel di controllo di inserimento dell'operone *ms2619-ms2620* in pAGN13. L'elettroforesi su gel è stata effettuata in seguito a digestione con l'enzima XhoI. Lane I: Marker di peso molecolare (1Kb ladder). Lane II: pAGN13 *uncut*. Lane III: pAGN13 digerito con XhoI. Nel pozzetto III sono visibili le due bande generate dalla digestione con XhoI, di 3154bp e 2833bp.

Come indicato nella figura 3.2, dall'analisi del pattern elettroforetico, in base al confronto con il marker di peso molecolare (pozzetto I), si evidenzia la presenza dei due frammenti attesi nel pozzetto III. Ciò conferma che il plasmide pAGN13 contiene il frammento con i geni *ms2619-ms2620* e il loro promotore.

In seguito pAGN13 è stato introdotto mediante elettroporazione nel mutante Ms110 ($\Delta ms2619-ms2620$) ed è stata eseguita una selezione dei trasformanti per la resistenza all'igromicina.

I cloni positivi ottenuti sono stati analizzati tramite sequenziamento al fine di verificare l'assenza di mutazioni che eventualmente potevano essere state introdotte durante la reazione di PCR (dati non mostrati).

Si è così ottenuto il ceppo complementato Ms110c.

3.2 – Saggio di sopravvivenza a pH alcalino

Basandosi su dati presenti in letteratura (Vrancken K. *et al.*, 2008) si è deciso di analizzare la possibile differenza di vitalità a pH alcalino dei ceppi mutanti in confronto al ceppo WT. Studi condotti in *Streptomyces lividans* dimostrano infatti che il ceppo WT e il mutante PspA cresciuti in mezzo tamponato non mostrano differenze di crescita. Quando invece vengono cresciuti su un terreno non tamponato il mutante rivela una cospicua riduzione della crescita in fase stazionaria. A 72h di incubazione il pH del mezzo di coltura non tamponato risulta pari a 9.2, in contrasto con quello del terreno tamponato (pH8.2).

Questi dati dimostrano che il mutante PspA in *S. lividans* è più sensibile allo stress da pH alcalino, per cui si può supporre un coinvolgimento del gene nella crescita e sopravvivenza in tali condizioni anche nei micobatteri.

Al fine di valutare un possibile ruolo dell'operone *psp-like* in *M. smegmatis* nella resistenza da pH alcalino, il ceppo Ms110 è stato incubato per 8 ore nel terreno di coltura tamponato a pH10 e la sua percentuale di sopravvivenza è stata calcolata rispetto a quella del ceppo *wild type* sottoposto allo stesso trattamento.

Come possiamo vedere nella figura 3.3, mentre le cellule del *wild type* sopravvivono con una percentuale dello 0.52%, in Ms110 tale percentuale si riduce allo 0.072%. Nel ceppo complementato Ms110c la percentuale di sopravvivenza delle cellule risale allo 0.24%.

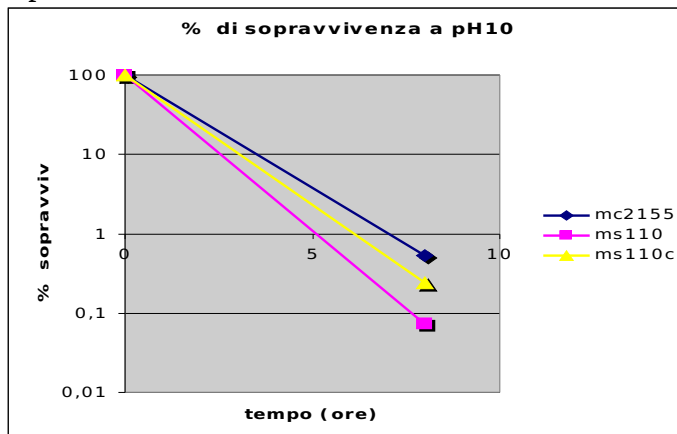


Fig. 3.3: Stima della percentuale di sopravvivenza del ceppo mutante Ms110 e del suo complementato Ms110c rispetto al WT (mc²¹⁵⁵) a pH10.

Questi risultati, in accordo con quanto rilevato in *S. lividans*, suggeriscono un diretto coinvolgimento di *ms2619* e *ms2620* nel garantire al batterio la sopravvivenza in un ambiente a pH alcalino.

Il fatto che la complementazione del fenotipo del ceppo Ms110 sia solo del 50% potrebbe essere spiegato dalla presenza di un *read-through* che parte dal promotore di *ms2618* e che nel ceppo *wild type* genera un RNA messaggero che copre i geni *ms2618*, *ms2619* e *ms2620* (Dott.ssa Anna Milano, Università di Pavia, comunicazione personale).

3.3 – Saggi di beta-galattosidasi

Partendo dai risultati ottenuti su *E. coli* il gruppo di Hankamer (Hankamer *et al.*, 2004) ha ipotizzato che l'assemblaggio dell'oligomero PspA svolga tra le varie funzioni quella di inibire PspF in condizioni fisiologiche, e quindi di inibire l'operone *psp*. L'inibizione negativa su PspF sarebbe esercitata tramite il legame dell'oligomero PspA all'ATPasi.

Al fine di valutare se tale interazione avviene anche nei micobatteri abbiamo allestito dei saggi di beta-galattosidasi su *M. smegmatis* utilizzando i ceppi Ms113, Ms114 e Ms115, precedentemente ottenuti in laboratorio. Questi ceppi derivano rispettivamente dai ceppi *wild type* mc²¹⁵⁵, da Ms110 ($\Delta ms2619$ – $ms2620$) e da Ms111 ($\Delta ms2620$), in cui è stato introdotto un plasmide integrativo contenente una fusione trascrizionale tra il promotore dell'operone *ms2619*–*ms2620* e il gene *lacZ*.

Come si può vedere dal grafico (Fig. 3.4) in condizioni di non induzione non si sono osservate notevoli variazioni nell'attività beta-galattosidasi tra il ceppo WT Ms113 e i due mutanti (Ms114 e Ms115).

Si può dunque ipotizzare che PspA in *M. smegmatis* non agisca da regolatore negativo di PspF, come invece avviene in *E. coli*. Se infatti il sistema di funzionamento presentasse omologia con quello in *E. coli* il mutante Ms114 dovrebbe presentare un aumento dell'attività beta-galattosidasi rispetto al WT.

In condizioni di stress da pH alcalino si osserva un aumento dell'attività beta-galattosidasi per i ceppi WT e Ms115 rispetto alle condizioni di non induzione. Il mutante Ms114 mostra invece una riduzione dell'attività.

In base a ciò si può ipotizzare un coinvolgimento diretto della proteina Ms2619 (*PspA-like*) nell'attivare il promotore a monte del gene *ms2619* solo in condizioni di stress da pH alcalino, mentre l'assenza della proteina transmembrana Ms2620 non sembra esercitare alcuna influenza sulla regolazione di tale promotore.

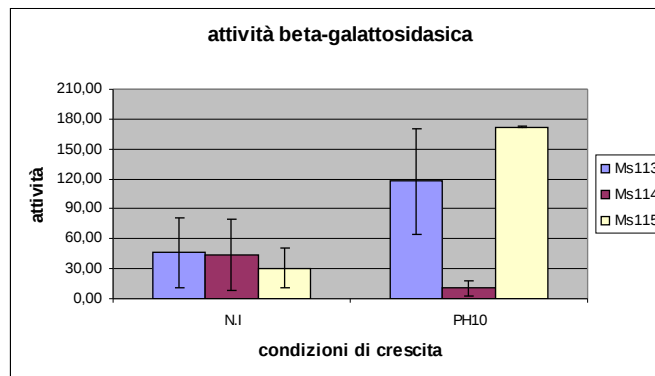


Fig. 3.4: Attività beta-galattosidasi in condizioni di non induzione e in condizioni di induzione a pH 10. I valori ottenuti derivano da due esperimenti indipendenti.

3.4 – Conclusioni e sviluppi futuri

Per studiare il ruolo dell'operone *PspA-like* di *Mycobacterium smegmatis* nella difesa da stress da pH alcalino sono stati svolti saggi di sopravvivenza e saggi di beta-galattosidasi su cellule cresciute in terreno a pH10.

I risultati hanno mostrato che tale operone è coinvolto nella resistenza da pH alcalino.

Sembra inoltre dai saggi di beta-galattosidasi che la proteina *PspA-like* Ms2619 intervenga anche nella regolazione dell'attività trascrizionale del suo operone, ma solo in seguito ad esposizione a pH alcalino.

In laboratorio è in corso la costruzione di un nuovo ceppo mutante, in cui sarà silenziato il gene regolatore *ms2618*; è stata inoltre creata una nuova fusione trascrizionale in cui il promotore del gene regolatore è stato clonato a monte del gene *lacZ*.

Successivamente verranno ripetuti i saggi di beta-galattosidasi in questo mutante, al fine di verificare se *ms2618* è coinvolto nella regolazione dell'operone *pspA-like* di *M. smegmatis*.

BIBLIOGRAFIA

1. **Brennan P.J.** (2003), “*Structure, function and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*”, Tuberculosis (83, 91-97).
2. **Chatterjee D.** (1997), “*The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action*”, Current Opinion in Chemical Biology (1, 579-588).
3. **La Placa M.** (2005), “*Principi di Microbiologia medica*”, Società editrice Esculapio, Decima Edizione.
4. **Russel D.G.** (2001), “*Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow*”, Nature Reviews Molecular Biology (2, 1-9).
5. **Rowley G. et al.** (2006), “*Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens*”, Nature Reviews Microbiology (4, 383-394).
6. **Brisette J.L. et al.** (1990), “*Phage shock protein, a stress protein of Escherichia coli*”, Proc Natl Acad Sci (87, 862-866).
7. **Hardie K.R. et al.** (1996), “*Insertion of an outer membrane protein in Escherichia coli requires a chaperone-like protein*”, The EMBO Journal (15, 978-988).
8. **Hankamer B.D. et al.** (2004), “*Organization of the AAA⁺ adaptor protein PspA is an oligomeric ring*”, The Journal of Biological Chemistry (279, 8862-8866).
9. **Kleerebezem M. et al.** (1996), “*Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of Escherichia coli in maintenance of the protonmotive force under stress conditions*”, The EMBO Journal (15, 162-171).
10. **Adams et al.** (2002), “*PspE (phage-shock protein E) of Escherichia coli is a rhodanese*”, FEBS Letters (518, 173-176).
11. **Darwin A.J.** (2005), “*The phage-shock protein response*”, Molecular Microbiology (57, 621-628).
12. **Kobayashi R. et al.** (2007), “*Escherichia coli phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes*”, Molecular Microbiology (66, 100-109).
13. **Vismara et al.** (1990), “*Identification of a 35-kilodalton Mycobacterium tuberculosis protein containing B- and T-cells epitopes*”, Infection and Immunity (58, 245-251).
14. **Vranken et al.** (2008) “*Characterization of the Streptomyces lividans PspA response*”, Journal of Bacteriology (190, 3475-3481).
15. **Manganelli et al.** (2001), “*The Mycobacterium tuberculosis ECF sigma factor σ^E : role in global gene expression and survival in macrophages*”, Molecular Microbiology (41, 423-437).