

---

**ANALISI DEI MECCANISMI  
MOLECOLARI DI DETOSSIFICAZIONE DA  
ALDEIDI AROMATICHE IN  
*S. SOLFATARICUS* PER LO SVILUPPO  
DI BIOSENSORI BATTERICI**

---

**Raffaele Ronca**

Dottorato in Scienze Biotechologiche – XIX ciclo  
Indirizzo Biotecnologie Molecolari  
Università di Napoli Federico II





Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XIX ciclo  
Indirizzo Biotecnologie Industriali  
Università di Napoli Federico II



---

**ANALISI DEI MECCANISMI  
MOLECOLARI DI DETOSSIFICAZIONE DA  
ALDEIDI AROMATICHE IN  
*S. SOLFATARICUS* PER LO SVILUPPO  
DI BIOUSENSORI BATTERICI**

---

**Raffaele Ronca**

Dottorando: Raffaele Ronca

Relatore: Prof.ssa Simonetta Bartolucci

Coordinatore: Prof. Gennaro Marino



*Ai miei genitori*  
*e*  
*a Margherita*



## INDICE

<b>ABBREVIAZIONI</b>	pag. 1
<b>RIASSUNTO</b>	pag. 3
<b>SUMMARY</b>	pag. 4
<b>INTRODUZIONE</b>	pag. 9
La trascrizione negli archaea	pag. 9
La regolazione della trascrizione negli <i>Archaea</i>	pag. 11
Sistemi di detossificazione	pag. 16
Biomonitoraggio e Bioremediation	pag. 19
Sistemi reporter e loro applicazioni	pag. 21
Stato dell'arte e scopo della tesi	pag. 23
<b>MATERIALI E METODI</b>	pag. 25
Ceppi, plasmidi, enzimi e reagenti	pag. 25
Tecniche di biologia molecolare	pag. 29
Analisi delle proteine	pag. 34
Analisi delle interazioni proteina-DNA	pag. 39
Analisi delle interazioni proteina-proteina	pag. 42
Realizzazione dei costrutti reporter	pag. 43
<b>RISULTATI</b>	pag. 45
Analisi trascrizionale dell'operone <i>Mar-like</i> di <i>S. solfataricus</i> ceppo P2	pag. 45
Clonaggio e prove di espressione del gene <i>bald16</i> in <i>E. coli</i>	pag. 47
Caratterizzazione strutturale e funzionale della proteina Bald16	pag. 51
Analisi dell'interazione tra Bald16 e la benzaldeide	pag. 59
Espressione in <i>E. coli</i> e purificazione della proteina Lrs14	pag. 61
Caratterizzazione funzionale di Lrs14	pag. 63
Analisi dei livelli di espressione di Bald16 e Lrs14 "in vivo"	pag. 66
Analisi dell'interazione Bald16-Lrs14	pag. 69
Competizione di Lrs14-Bald16 per l' <i>Ssadh-pr</i>	pag. 74
Realizzazione di sistemi reporter per il monitoraggio di Aldeidi aromatiche	pag. 78
Analisi dei livelli di espressione dei costrutti repoter	pag. 83
<b>DISCUSSIONE</b>	pag. 86
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 95
<b>PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSO</b>	pag. 101

## ABBREVIAZIONI

<b>ADH</b>	Alcool deidrogenasi
<b>APS</b>	ammonio persolfato
<b>BDH</b>	benzaldeide
<b>bp</b>	coppie di basi
<b>BRE</b>	elemento di riconoscimento del fattore di trascrizione TFB
<b>BSA</b>	albumina di siero bovino
<b>CDH</b>	cinnamaldeide
<b>Da</b>	Dalton
<b>dATP</b>	deossiadenosintrifosfato
<b>DNA</b>	acido deossiribonucleico
<b>dNTP</b>	deossiribonucleosiditrifosfati
<b>DSM</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
<b>DTT</b>	ditiotreitolo
<b>EDTA</b>	acido etilendiamminotetracetico
<b>EGFP</b>	Enhanced green fluorescent protein
<b>EMSA</b>	elettrophoretic mobility shift assay
<b>FPLC</b>	Fast Protein Liquid Chromatography
<b>GTE</b>	glucosio-Tris-EDTA
<b>INR</b>	elemento iniziatore
<b>KCl</b>	cloruro di potassio
<b>K<sub>d</sub></b>	costante di dissociazione
<b>Lrp</b>	leucine-responsive regulation protein
<b>Mezzo Luria-Bertani</b>	10 g/l bacto-triptone, 5 g/l estratto di lievito, 10 g/l NaCl
<b>min</b>	minuti
<b><i>ml-pr</i></b>	Promotore dell'operone <i>Mar-like</i>
<b>msec</b>	millisecondi
<b>OD</b>	densità ottica
<b><i>orf</i></b>	open reading frame
<b>PCR</b>	reazione di polimerizzazione a catena
<b>PEG</b>	polietilenglicole



<b>PMFS</b>	parametilsulfonilfluoruro
<b>PVDF</b>	polivinildienefluoruro
<b>RNA</b>	acido ribonucleico
<b>RNasi A</b>	RNasi da pancreas bovino
<b>RNasi T1</b>	RNasi da <i>Aspergillus oryzae</i>
<b>rRNA</b>	RNA ribosomale
<b>tRNA</b>	RNA di trasferimento
<b>SDS</b>	sodio-dodecil-solfato
<b>SDS-PAGE</b>	Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS
<b><i>Ssadh</i></b>	alcol deidrogenasi da <i>S. solfataricus</i>
<b><i>Ssadh-pr</i></b>	Promotore del gene <i>Ssadh</i> da <i>S. solfataricus</i>
<b>TBE</b>	45 mM Tris-borato, 1mM EDTA pH 8.0
<b>TBP</b>	proteina che lega la TATA-box
<b>TE</b>	10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0
<b>TEMED</b>	N, N, N', N' – tetrametilendiammina
<b>TFB</b>	fattore trascrizionale B
<b>TFIIB</b>	fattore trascrizionale B della RNA polimerasi II
<b>TFE</b>	fattore trascrizionale E
<b>TFS</b>	fattore trascrizionale S
<b>TFIIS</b>	fattore trascrizionale S della RNA polimerasi II
<b>Tris</b>	(Tris[idrossimetil]amminometano)
<b>UV</b>	raggi ultravioletti
<b>VDH</b>	veratrilaldeide

## RIASSUNTO

Obiettivo di questo progetto di dottorato è stata la realizzazione di un sistema microbico per il biomonitoraggio di composti tossici quali le aldeidi aromatiche in campioni di acqua e suolo. Per la realizzazione di tale biosensore si è scelto di utilizzare quale reporter il gene *gfp*, codificante la *Green Fluorescent Protein*, da porre sotto il controllo di due differenti sequenze geniche identificate nel crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* e coinvolte nella risposta alla presenza di aldeidi aromatiche.

Preliminare alla realizzazione del sistema di biomonitoraggio è stato lo studio approfondito del meccanismo di risposta alla presenza di aldeidi aromatiche e la caratterizzazione delle componenti proteiche coinvolte. Precedentemente a questo progetto di dottorato, erano state identificate diverse proteine capaci di interagire con le sequenze regolative di un gene codificante una alcool deidrogenasi (Sso2536) da *S. solfataricus*, specifica per le aldeidi aromatiche. Due di queste proteine, Bald16 ed Lrs14, sembrano essere buoni candidati per svolgere un'attività di regolazione all'interno di un putativo pathway per la detossificazione da aldeidi di natura aromatica. Analisi trascrizionali hanno dimostrato che la proteina Bald16 (omologa ai membri della famiglia di regolatori trascrizionali MarR) è parte di un mini-operone in cui è presente una proteina di membrana deputata all'efflusso di sostanze tossiche. Così come avveniva per l'Adh, anche la trascrizione di tale operone, definito operone *Mar-like*, è regolata positivamente dalla presenza di differenti aldeidi aromatiche nel mezzo di coltura. Ciò lascia presupporre dunque un suo effettivo coinvolgimento nel meccanismo detossificativo proposto.

Le due proteine sono state espresse in cellule di *E. coli*, purificate all'omogeneità e sottoposte ad un'ampia caratterizzazione. Relativamente alla proteina Bald16, ne è stata determinata la struttura quaternaria, e mediante dicroismo circolare è stata dimostrata la capacità di interagire con la benzaldeide. Saggi EMSA condotti in presenza di benzaldeide hanno evidenziato che l'interazione Bald16/aldeide aumenta l'affinità della proteina per il DNA. Saggi EMSA e di DNasil footprinting hanno dimostrato che entrambe le proteine legano specificamente la regione regolativa dell'operone *Mar-like* e che le regioni legate da Lrs14 e Bald16 sono sovrapponibili.

Esperimenti di co-immunoprecipitazione hanno dimostrato che le due proteine interagiscono tra loro e che tale interazione non è mediata da DNA o da altre proteine, mentre saggi di supershift hanno permesso l'identificazione di un complesso ternario DNA/Bald16/Lrs14. Analisi mediante Western blot hanno permesso di calcolare l'abbondanza relativa di Bald16 ed Lrs14 in cellule di *S. solfataricus*. Da tale analisi è risultato che Lrs14 è circa 10 volte più abbondante di Bald16 e che si accumula nella cellula non in dipendenza della presenza di benzaldeide, ma della fase di crescita (più abbondante in fase stazionaria).

La visione d'insieme di tutti i dati raccolti in questo studio ha permesso di proporre un possibile meccanismo d'azione in cui Bald16 svolge un ruolo di "sensore" della presenza di aldeidi aromatiche e di effettore della risposta. I costrutti realizzati, sebbene le sequenze regolatrici si siano dimostrate capaci di dirigere l'espressione del gene reporter, non si sono dimostrati sensibili alla presenza delle aldeidi, probabilmente in virtù della mancanza in *E. coli* di una proteina capace di svolgere la funzione di Bald16 in *Sulfolobus*. Sono attualmente in realizzazione altri costrutti genici capaci di produrre nell'ospite mesofilo la proteina Bald16 in modo da rendere il sistema pienamente funzionante.

## SUMMARY

The production and the large scale use of synthetic compounds in the last century made environmental pollution as one of the main problems to solve.

Environmental pollutants are compounds toxic for living organisms; they are released into the ecosystem at high concentrations, usually as a consequence of anthropic activities.

Among the several polluting substances, those representing the greater risk for the biosphere are either compounds of industrial origin (the greater part of which is extremely recalcitrant) containing chemical structures "alien" to the biosphere (xenobiotics), e.g. polychlorobiphenyls (PCBs), polychlorodioxins, trinitrotoluene (TNT), pesticides, and azo dyes, or natural compounds that have been mobilized to a bioavailable form toxic for organisms, e.g. nitrosamines, aromatic hydrocarbons found in fossil fuels and heavy metals present in minerals.

Removal of such pollutants from the environment via natural physico-chemical and biological processes (natural attenuation), although possible, is in general, extremely slow and unpredictable.. Therefore, the main, if not the only, successful strategy of counteracting anthropogenic pollution and irreversible damage to the biosphere is the use of the metabolic detoxification abilities (opportunistically manipulated and improved) of living organisms (bioremediation).

Although microorganisms like bacteria algae etc., in order to gain of energy or like carbon source, developed (during million years) abilities to metabolize virtually every existing compound, they turned out less efficient in degrading xenobiotics. This because they have begun to encounter such molecules less than a century ago. Therefore, it is very important to study deeply the physiology, the metabolism and the genetics of those microorganisms displaying potentially useful degradation pathways, so to be able, through genetic engineering, to improve the efficiency and to render them suitable for biotechnological applications like biomonitoring, biotransformation and bioremediation.

Generally, the traditional approach in order to verify the presence of chemical compounds in the atmosphere is based on chemical or physical analysis that allows a precise and sensitive identification of the exact composition of any sample. However, the complete necessary instrumentation for these kind of analyses is rather complicated and expensive and moreover it prevents to determine the effects of the analyzed pollutants on the living systems and their synergic or antagonist effect when they are together to other substances.

These evidences suggest the necessity to use a complementary approach based on living systems.

Next to glucosyl residues, the benzene ring is the unit of chemical structure most widely spread in nature. Moreover, the intrinsic thermodynamic stability of the benzene ring increases its persistence in the environment; therefore, many aromatic compounds are major environmental pollutants.

The goal of this work is to study the molecular mechanisms adopted by the crenarchaeon *S. solfataricus* in response to the exposure to toxic compounds, like aromatic aldehydes. We have chosen to study such organism for its ability to grow in presence of various aromatic compound and indeed to use them as the only carbon source.

The ability to use such molecules is maybe correlated to the fact that the greater part of these compounds, also if in reduced concentrations, are commonly present in the environment as a result of the recycling of plant-derived material inside of the volcanic pools in which such *Sulfolobus* lives.

The laboratory where the present work was performed is studying since many years the molecular mechanisms underlying transcriptional regulation in *S. solfataricus*. In particular, it was chosen as model a gene encoding for an alcohol dehydrogenase, whose levels increase in cells grown in the presence of benzaldehyde.

In a previous study, some proteins had been identified that were able to interact with the regulative sequences of this gene.

Two of the identified proteins, seemed to be good candidates to play an important role in regulating a pathway involved in the detoxification of aromatic aldehydes. One of them, Lrs14, corresponds to a transcriptional factor already known in literature for its ability to bind to its own promoter and to regulate it by a negative feedback mechanism.

The second protein identified for its ability to specifically bind to the *alcohol dehydrogenase* regulatory sequences, named Bald16 (encoded by the *orf Sso1352*), seems to be a putative transcriptional factor too. Bald has bacterial homologues belonging to the Mar (Multiple Antibiotic Resistance) family of regulators, involved in the control of gene expression of aromatic compound metabolism, antibiotic resistance and virulence factor production.

The detailed understanding of the functions carried out from these proteins and the identification of eventual other partners involved in the same detoxification mechanism, is to the base of the realization of a good system of environmental biomonitoring and bioremediation.

Transcriptional analyses have demonstrated that *bald16* is transcribed as a dicistronic mRNA comprising the sequence of the upstream *orf Sso1351*. The Sso1351 protein is annotated on the genome sequence of *S. solfataricus* (<http://www-arch-bac.u-psud.fr/projects/sulfolobus/>) as a multidrug pump efflux. The majority of the genes encoding MarR homologs are part of a gene cluster containing, other than themselves, genes under their regulation. Often the gene adjacent to the MarR homolog codes for a multisubstrate efflux pump. Since this typical gene array is conserved also for Sso1351-Sso1352 operon we called it "*Mar-like* operon".

"Northern blot" analyses performed on RNAs from *S. solfataricus* cells, grown in presence of different aldehydes, have demonstrated, moreover, that the transcription of the *Mar-like* operon is positively regulated by benzaldehyde and other aromatic aldehydes, like cinnamaldehyde (CDH) and veratrylaldehyde.

In order to determine the transcriptional start site of the *Mar-like* operon a primer extension analysis was performed on RNAs from non treated cells and cells grown in

presence of benzaldehyde. In both cases a single transcription initiation site was identified, corresponding to the A residue, belonging to the ATG translation start codon; therefore, basal promoter sequences could be assigned.

Once verified that the *Mar-like* operon was transcriptionally regulated by aromatic aldehydes, the gene encoding Bald16 was cloned, expressed in *E. coli* and the protein purified to homogeneity for functional and structural characterization. The Lrs14 recombinant protein was also purified to homogeneity.

Regarding the structural characterization of Bald16, the quaternary structure of the protein has been determined. Molecular size exclusion chromatography of the purified Bald16 yielded one protein peak corresponding to the apparent molecular mass of 32000 Da. By comparing the deduced molecular weight with results of SDS-PAGE (16000 Da) it was possible to assign to the protein an omodimeric structure, according to the composition of other members of the MarR family. The protein has been crystallized and the obtained crystals have been subjected to X-ray diffraction. The analysis of the obtained data is currently in progress.

The two proteins were characterized for the ability to bind the regulatory sequences at the *Mar-like* promoter (*ml-pr*).

By EMSA assay it was demonstrated the specificity of the interaction. Moreover they were determined the affinity constants ( $K_d$ ) for the binding to DNA, that turned out to be of the same order for both proteins.

DNAseI footprinting experiments carried out on the *Mar-like* promoter defined the zone of interaction of the two proteins with the DNA. It turned out that the zones of interaction of the two proteins with the DNA are overlapped, even if the print left from Bald16 is more extended, expanding to the residue +1.

In order to verify if the increased levels of the specific *Sso1352* transcript corresponded to an increase of the levels of the Bald16 protein, equal amounts of proteic extracts from cells grown in presence or absence of various aromatic aldehydes, were subject to analysis by Western-blot. Such experiments confirmed that the presence of aromatic aldehydes in the growing medium lead to an increase of the levels of Bald16 protein, even if the induction trends are inferior to those observed for the transcriptional analysis.

Experiments of semiquantitative Western-blot allowed to establish the abundance of the two proteins in *S. solfataricus* cells, both in normal conditions or upon induction by benzaldehyde. Results obtained showed that in normal condition the Lrs14 representativity is ten times greater than Bald16, further suggesting an involvement of the first one in a more general regulatory network.

In order to establish if the "signaling" generated from the benzaldehyde had in Bald16 protein the direct target, two different experimental approaches were used. Circular dichroism experiments carried out in presence of increasing concentration of benzaldehyde, evidenced a conformational variation of the Bald16 secondary structure, indicating a direct interaction between benzaldehyde and the protein. As a confirmation of the validity of the obtained data, the PfPDO protein (protein disulfide oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus*) was subjected to the same type of analysis but didn't showed any variation of the dichroic spectra.

The same negative result was obtained with the Lrs14 protein, confirming that even though involved in the same pathway, unlike Bald16 it is not regulated by benzaldehyde.

In order to characterize at functional level the interaction between Bald16, the benzaldehyde and the *Sso2536* promoter, electrophoretic mobility shift assays were carried out in presence of increasing amounts of benzaldehyde. Such experiments, evidenced an increased affinity of Bald16 for the target DNA sequence upon benzaldehyde binding, allowing therefore to attribute a biological role to the protein-aldehyde interaction.

Since DNaseI footprinting experiments demonstrated that both proteins Bald16 and Lrs14 are able to interact specifically with the same region of the promoter of the Mar-like operon, it was decided to verify an eventual direct interaction between the two proteins.

In order to perform such experiments, proteic extracts from *S. solfataricus* cells grown either in presence or in absence of benzaldehyde were subjected to immunoprecipitation with antibodies  $\alpha$ -Bald16 and the immunoprecipitated analyzed revealed by  $\alpha$ -Lrs14 antibodies. The presence of a specific signal for Lrs14 protein, has allowed to assert that in fact the two proteins are able to interact "in vivo". Specular experiments (immunoprecipitation by  $\alpha$ -Lrs14 and detection by  $\alpha$ -Bald16) lead to the same result confirming the interaction between the two proteins.

Since the interaction between Bald16 and Lrs14 could be mediated by DNA or from other protein factors, "in vitro" interaction assays with the two purified proteins were also performed, through co-immunoprecipitation or alternatively by pull-down assay (taking advantage of the presence of the His-tag in recombinant Lrs14). In both cases, experiments demonstrated that the two proteins are able to interact without the aid of other partners.

The characterization of the interaction between the two transcriptional factors and the DNA has been completed by experiments of competition for the binding to the *Ssadh-pr* and by "supershift" experiments. Competition EMSA assays, have demonstrated that the Bald16 protein is able to replace Lrs14 bound to the *Sso2536* promoter; vice versa, Lrs14 does seem not to be able to compete for the binding to the DNA when the Bald16/promoter complex already exists; indeed, it seems to further improve the formation of such complex.

Despite of these results, "supershift" assays have allowed to establish that the formation of a ternary complex between the two proteins and the DNA is also possible. In fact, when Bald16 and Lrs14 were preincubated with the *Sso2536* promoter and the formed complex was probed by  $\alpha$ -Lrs14 antibody, the signal observed was more shifted than the corresponding signal of a Lrs14/promoter/  $\alpha$ -Lrs14 complex.

At the same time, in order to complete the functional characterization of the Bald16 protein and definitively attribute to it the role of transcriptional activator, we are trying to set-up an "in vitro" transcription system for *S. solfataricus*. Preliminary experiments

indicated that in the presence of Bald16 the general levels of transcription increase. These data must be still confirmed, by analysis of the transcription product.

This thesis work was also focused on the setup of a reporter system responsive to aromatic aldehydes. Having identified two regulative sequences implied in the response to chemical stress due to aromatic aldehydes, we decided to use them to drive transcription of a reporter gene, and therefore its expression.

For our purposes, we choose to use the gene encoding for the Green Fluorescent Protein (GFP), because of different advantages. First of all, the fluorescent product is easily detectable also in entire cells; secondly, the GFP protein is very stable and so is the produced fluorescence. The third advantage is that the GFP protein does not require addition of external substrates.

Therefore, we proceeded in realizing different vectors in which the orientation of two promoter positioned upstream of the gene *egfp* (encoding an enhanced version of the GFP thirty fold more fluorescent than the wild-type protein) also differs. Such promoter-gene fusions have been inserted in a pUC28 plasmid from which all the regulative sequences that could interfere with the transcription of the reporter gene had been previously removed.

Observations by fluorescence microscopy of *E. coli* cells transformed with the several plasmids, allowed to establish preliminarily, that the two archaeal promoters are able to direct transcription in the mesophilic host. These cells, had, in fact, a fluorescence not present in untransformed cells. Despite of this positive indication, the levels of fluorescence of the transformed cells did not vary when benzaldehyde was added to the growing cells. Presumably, such behaviour is due to the lack in *E. coli* cells of a protein that can carry out the function attributed to Bald16 in *S. solfataricus*.

In order to solve this problem, we decided to make a recombinant *E. coli* strain carrying both the *bald16* gene and the different reporter constructs. For this purpose the *bald16* gene has been transferred in a plasmid compatible with *MinipUC28*, in order to co-transform *E. coli* cells with both plasmids.

## INTRODUZIONE

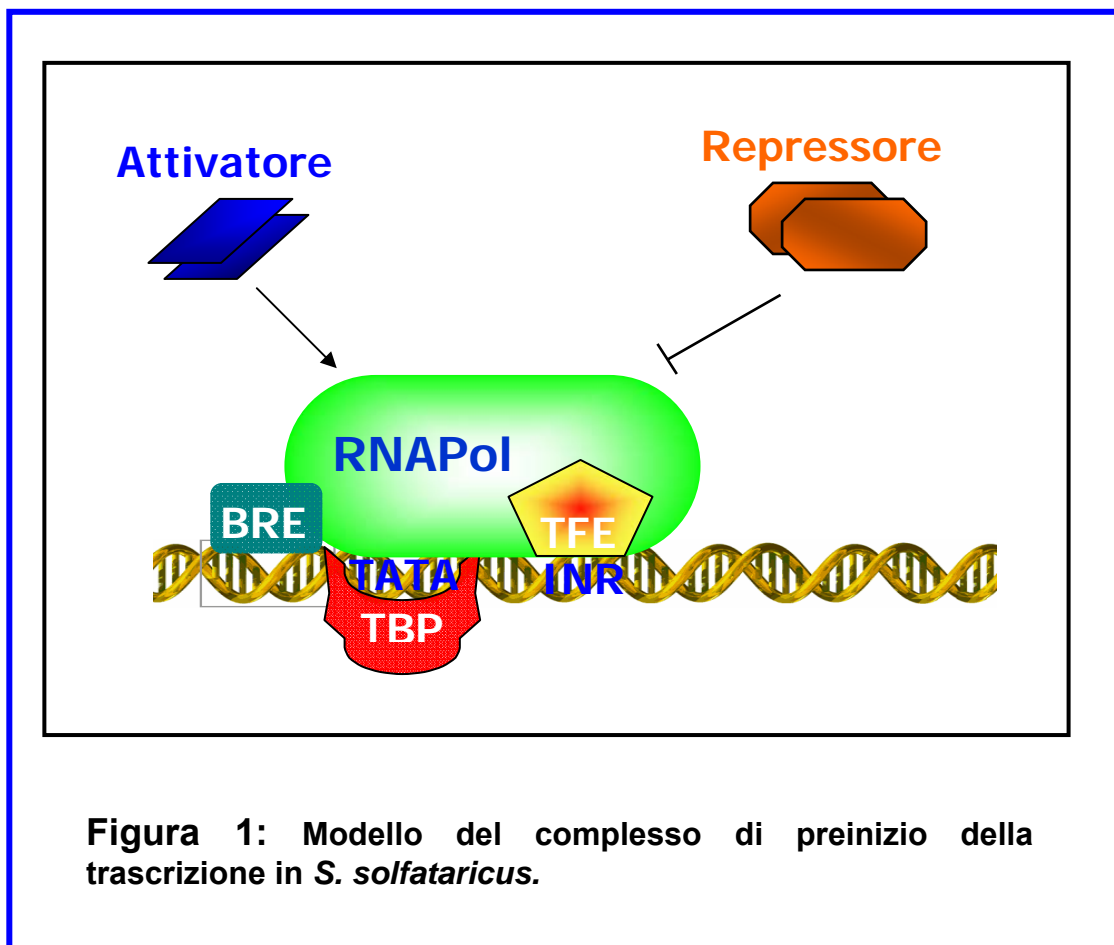
### La trascrizione negli *Archaea*

Gli *Archaea* costituiscono un distinto dominio filogenetico, altamente variegato che assieme a caratteristiche uniche, presenta caratteri condivisi sia con gli Eucarioti, che con i Batteri (Fox *et al.* 1977).

La prima evidenza che la trascrizione negli *Archaea* ha caratteristiche simili a quella eucariotica è stata fornita dal lavoro pionieristico di Wolfram Zillig e collaboratori (Zillig *et al.*, 1979).

Studi recenti su *Sulfolobus* ed altre specie archeali hanno fatto luce sulla composizione, funzione e regolazione del macchinario di trascrizione in questi organismi e sugli aspetti di questo processo conservati sia negli *Eucarya* che negli *Archaea* (Bell e Jackson, 2001). Tale analisi ha messo in luce la natura chimerica del meccanismo trascrizionale, con le componenti basali di tipo eucariotico e quelle regolative di tipo batterico.

Il complesso d'inizio della trascrizione negli *Archaea* (Bell e Jackson, 2001) è una versione semplificata di quello eucariotico. I promotori contengono un elemento di sequenza simile alla TATA box, fiancheggiato da un elemento di 6 bp del tipo BRE (B Responsive element); il primo viene riconosciuto dalla proteina TBP ("TATA Binding Protein", omologa del fattore che lega la TATA-box negli Eucarioti), il secondo da TFB ("Transcriptional Factor B", l'omologo del fattore trascrizionale TFIIIB) (Figura 1).





In sistemi di trascrizione *in vitro*, tali sequenze sono sufficienti in presenza di TBP, TFB ed RNA polimerasi purificate per dare un corretto inizio della trascrizione (Quershi e Jackson, 1998). Vi sono evidenze funzionali e strutturali che l'interazione di TFB con la sequenza BRE sia il principale determinante della polarità della trascrizione negli *Archaea*. La struttura tridimensionale della TBP archeale è simile a quella delle TBP eucariotiche, con la rilevante differenza che la molecola eucariotica mostra asimmetria tra le due sequenze ripetute nel suo dominio carbossi-terminale, mentre la TBP archeale è altamente simmetrica. Dal momento che questa asimmetria è di importanza cruciale nel definire la polarità della trascrizione, la TBP archeale potrebbe non essere in grado di adempiere da sola a tale ruolo.

La struttura cristallografica della TBP archeale col core C-terminale del TFB complessati con un frammento di promotore contenente la TATA box e l'elemento BRE ha mostrato che il complesso di preinizio ha la stessa polarità di quello eucariotico ed ha rivelato la conservazione di interazioni tra TFB e BRE che potrebbero influenzare la polarità della trascrizione sia negli *Archaea* che negli eucarioti (Bell *et al.*; 1999 a; Littlefield *et al.*; 1999).

Studi in *S. acidocaldarius* hanno mostrato che il TFB gioca un ruolo chiave non solo nel reclutamento dell'RNA polimerasi al promotore negli stadi precoci dell'inizio della trascrizione, ma anche negli stadi più tardivi, successivi alla formazione del complesso aperto, durante il processo di "clearance" del promotore (Bell e Jackson; 2000).

*S. solfataricus*, ed anche altri *Archaea* i cui genomi sono stati sequenziati, contiene un omologo della subunità  $\alpha$  del fattore di trascrizione eucariotico TFIIE, chiamato TFE (Bell *et al.*; 2001). Tale fattore è stato individuato per la prima volta nell'archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*, dove è codificato dal gene *Mth1669*. In sistemi ricostituiti *in vitro* (contenenti RNA polimerasi, TBP e TFB), ed in particolari circostanze TFE agisce da attivatore trascrizionale stimolando la trascrizione a partire da determinati promotori. L'effetto di TFE è più evidente in condizioni di ridotta attività trascrizionale (per esempio a livello di promotori che portano TATA box imperfette o in presenza di concentrazioni subottimali di TBP), mentre è trascurabile in condizioni di attiva trascrizione, suggerendo che TFE stabilizzi il legame di TBP al promotore (Hanzelka *et al.*; 2001).

Gli altri fattori basali degli *Eucarya* (TFIIA, TFIIH, TFIIF e TFIIE $\beta$ ) sono assenti in *Sulfolobus* e in tutti gli altri *Archaea* finora analizzati. Inoltre, mentre la TBP eucariotica viene ritrovata in grandi complessi proteici, in associazione con fattori che legano TBP (TAF), non è stata fornita alcuna evidenza della presenza di TAF negli *Archaea*.

Nel 2000 è stata analizzata la funzione di una proteina archeale, (TFS) che mostra similarità di sequenza con il fattore di trascrizione eucariotico IIS (TFIIS) ed anche con subunità piccole delle RNA polimerasi I (A12.6), II (B12.2), e III (C11) eucariotiche. Analisi di "Western blot" con anticorpi contro TFS ricombinante hanno dimostrato che questa proteina non è una subunità dell'RNA polimerasi, mentre esperimenti di trascrizione *in vitro* mostrano che essa è in grado di indurre l'attività di taglio nell'RNA polimerasi archeale in modo simile a TFIIS. Inoltre, TFS riduce l'ammontare di complessi di allungamento "non-chaseable". Queste evidenze indicano che questa proteina ha una funzione simile al TFIIS eucariotico (Hausner *et al.*, 2000).

In un recente lavoro Goede e collaboratori, mediante esperimenti di "Far-Western blot", sono riusciti a definire il complesso network di interazioni esistente tra le varie

subunità della RNA polimerasi di *Pyrococcus furiosus* (Goede B *et al.* 2006), permettendo l'attribuzione di un ruolo prioritario della subunità B (Rpb2) nel reclutamento della RNA polimerasi sul complesso promotore/TFB/TBP.

## La regolazione della trascrizione negli *Archaea*

Gli studi funzionali sulla regolazione dell'espressione genica negli *Archaea* condotti finora sono ancora relativamente pochi. Il sequenziamento dei genomi ha rivelato inaspettatamente che gli *Archaea* non contengono fattori trascrizionali di tipo eucarotico; al contrario, essi presentano un gran numero di *orf* codificanti per ipotetici regolatori trascrizionali, molto simili a quelli batterici contenenti motivi strutturali di tipo *helix-turn-helix*. Data la loro abbondanza nei genomi batterici ed archaeali, queste proteine sono state definite regolatori Batterici-Archaeali (BA) (Bell e Jackson; 2000).

La velocità di produzione dei trascritti è determinata in gran misura (ma non esclusivamente) dalla forza intrinseca del promotore e dall'interazione tra l'apparato trascrizionale basale e le proteine regolatorie che legano il DNA. Come nei batteri, il meccanismo mediante il quale un repressore o attivatore influenza l'inizio della trascrizione appare essere determinato, principalmente, dal posizionamento delle regioni di DNA a cui si lega (siti operatori) rispetto agli elementi del promotore (Ouhammouch, 2004 e 2005 a).

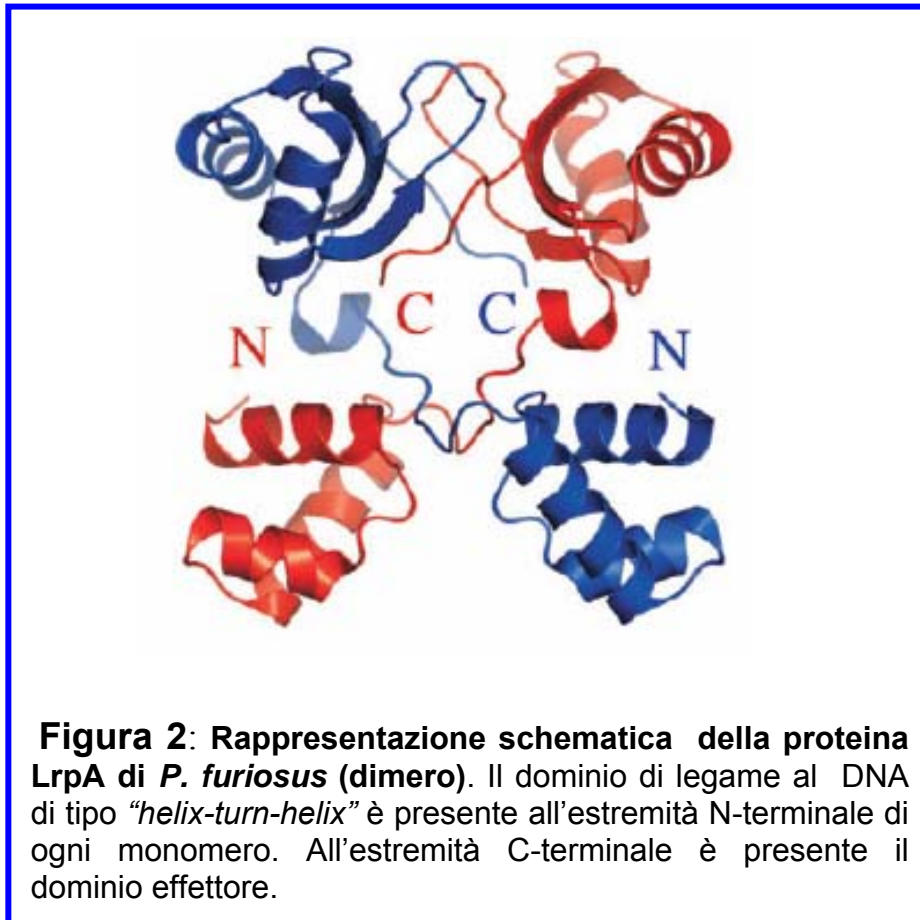
I repressori trascrizionali archaeali sembrano agire essenzialmente mediante due meccanismi. Un primo meccanismo prevede che possano reprimere specificamente la trascrizione legandosi a regioni di DNA che contengono la TATA box e la sequenza BRE, impedendo così il riconoscimento da parte di TBP o TFB, quindi mediante un meccanismo di repressione per competizione (Lrs14) (Bell e Jackson; 2000). Alternativamente i repressori trascrizionali possono legarsi a valle del sito d'inizio della trascrizione prevenendo così uno stabile reclutamento dell'RNA polimerasi, ma non il legame del complesso TBP-TFB (MDR1) (Bell *et al.*; 1999b).

Molto poco si conosce invece circa l'attivazione trascrizionale in *Archaea*. A tutt'oggi infatti, risulta veramente esiguo il numero di fattori trascrizionali ai quali sia stato possibile attribuire una sicura funzione di attivatore ed ancor meno si conosce circa le modalità con cui essi svolgono tale ruolo. Una delle ipotesi più plausibili prevede che gli attivatori trascrizionali, legandosi a monte delle sequenze regolatrici potrebbero facilitare il reclutamento di TBP a TATA box non ottimali (Ouhammouch *et al.*; 2003). A conferma di tale ipotesi, in molti dei casi studiati sono state identificate sequenze ripetute posizionate in vicinanza dei promotori (Baliga *et al.*, 2001; Ouhammouch *et al.*, 2005 c; Kessler *et al.* 2006)

## Le famiglie di regolatori trascrizionali

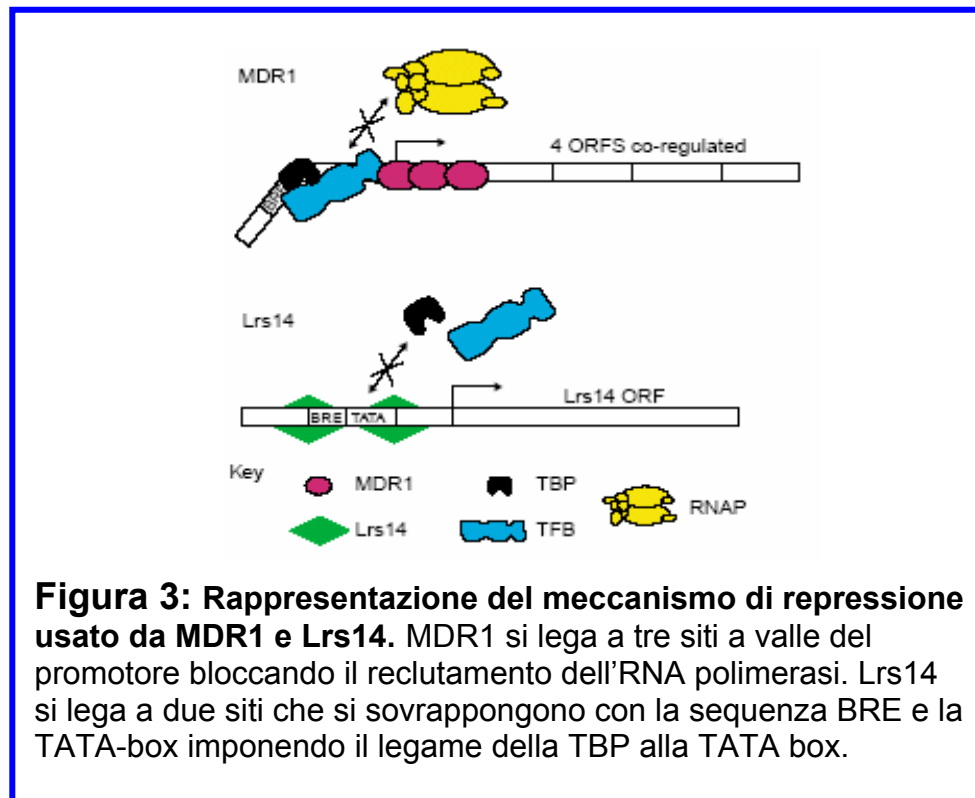
La maggior parte delle proteine archeali che legano il DNA di cui è conosciuta o almeno ipotizzata una funzione regolatoria sono membri della famiglia Lrp/AsnC (Brinkman *et al.*, 2003). La Lrp (facente parte della famiglia delle proteine regolative di risposta alla leucina) di *Escherichia coli* è il prototipo meglio studiato; è una proteina abbondante, un regolatore globale della biosintesi degli amminoacidi, del trasporto, della degradazione proteica, del metabolismo anabolico/catabolico ed il suo effettore principale è la leucina (**Fig. 2**). Tutti i membri della famiglia Lrp contengono un dominio *helix-turn-helix*, localizzato nella regione N-terminale, coinvolto nel legame al DNA e connesso mediante un *linker* ad un dominio effettore

C-terminale. I ligandi che interagiscono con tale porzione della proteina possono modulare l'associazione proteica, il legame al DNA e la funzione regolatoria. Il numero dei geni batterici e archaeali codificanti proteine della famiglia Lrp varia ampiamente a seconda delle specie. Alcuni genomi archaeali inoltre codificano per omologhi dei domini effettori di Lrp che non sono connessi ai domini di legame al DNA. In soluzione, le proteine della famiglia Lrp sono presenti come dimeri o come oligomeri di dimeri, in un equilibrio concentrazione dipendente. Esse generalmente si legano a sequenze ripetute e invertite, come è stato dimostrato per le proteine Lrp di *E. coli* e per due proteine Lrp-like archeali da *M. iannaschii*, Ptr1 e Ptr2 (Ouhammouch *et al.*; 2004).



Uno dei primi regolatori Batterico-Archaeali caratterizzati è stato Lrs14 da *S. solfataricus*, una proteina che lega il DNA correlata alla famiglia batterica Lrp-AsnC. Lrs14 si lega specificamente a sequenze multiple presenti all'interno del proprio promotore ed è stato suggerito un meccanismo di autoregolazione negativa (Napoli *et al.*, 1999). Esperimenti di trascrizione *in vitro* hanno dimostrato che Lrs14 reprime specificamente la trascrizione del proprio gene, legandosi ad un sito che si sovrappone alla TATA box ed impedendo così il riconoscimento del promotore da parte di TBP e TFB (Bell *et al.*, 2000) (**Fig. 3**). Altri membri della famiglia Lrp reprimono la trascrizione usando un differente meccanismo. LrpA di *Pyrococcus furiosus* (Brinkman *et al.*, 2000) e Ss-LrpB di *Sulfolobus solfataricus*, appartenenti alla famiglia Lrp, reprimono la trascrizione dei loro geni impedendo il reclutamento dell'RNA polimerasi. Ss-LrpB si lega cooperativamente a tre siti a monte della TATA

box e della sequenza BRE. E' ipotizzato che Ss-LrpB possa regolare la trascrizione del suo gene imponendo differenti stati topologici al promotore in funzione della sua concentrazione cellulare (Peeters *et al.*, 2004). Un ulteriore lavoro dello stesso gruppo di ricerca, ha evidenziato mediante microscopia a forza atomica, la presenza di diversi tipi di strutture nucleoproteiche globulari in funzione della concentrazione di Ss-LrpB. Tali diverse strutturazioni permetterebbero una fine modulazione tra repressione (alte concentrazioni di Ss-LrpB) ed attivazione trascrizionale (basse concentrazioni di Ss-LrpB) (Peeters *et al.*, 2006).



In *Thermococcus litoralis* la repressione trascrizionale avviene impedendo il riconoscimento del promotore da parte di TBP e TFB mediante TrmB, che è un regolatore trascrizionale dell'operone del trasportatore di tipo ABC del maltosio/trealosio (operone *malE*). In *P. furiosus* la medesima proteina regola l'espressione dell'equivalente operone e dei geni che codificano per un trasportatore separato delle maltodestrine (operone *mdxE*). TrmB si lega ai siti operatori a monte del gene *malE* e reprime l'inizio della trascrizione, probabilmente attraverso l'inibizione della formazione del complesso ternario TBP-TFB-DNA (Lee *et al.*; 2003). Gli induttori degli operoni *malE* e *mdxE* (maltosio/trealosio e maltodestrine rispettivamente) legandosi a TrmB ne diminuiscono l'affinità per il DNA (Lee *et al.*; 2003-2005). Questo meccanismo di repressione per competizione nel legame alla TATA box e alla sequenza BRE si differenzia da quello riportato per il repressore metallo-dipendente MDR1 da *Archaeoglobus fulgidus* (Bell *et al.*; 1999 b), che si lega a siti multipli che si sovrappongono e si estendono a valle del sito d'inizio della trascrizione, prevenendo pertanto uno stabile reclutamento dell'RNA polimerasi, ma non il legame del complesso TBP-TFB (Fig. 3). Quest'ultimo meccanismo è stato ipotizzato anche per Phr, un nuovo regolatore archeale della risposta allo shock termico in *P. furiosus*. Phr reprime specificamente la trascrizione del suo stesso gene

in vitro, come pure quella di due geni heat shock *hsp20* e  $AAA^+ATPase$  (Vierke *et al.*; 2003).

La regolazione positiva può essere esplicitata attraverso differenti meccanismi, tra cui l'interazione del promotore con una proteina "attivatore", l'alterazione della conformazione del DNA intorno al promotore o l'uso di coppie alternative dei fattori basali TBP-TFB. Contrariamente ai batteri e agli eucarioti, poco si conosce circa il ruolo di tali fattori nella regolazione della trascrizione archaeale e gran parte delle informazioni note sono dovute a studi sugli alofili.

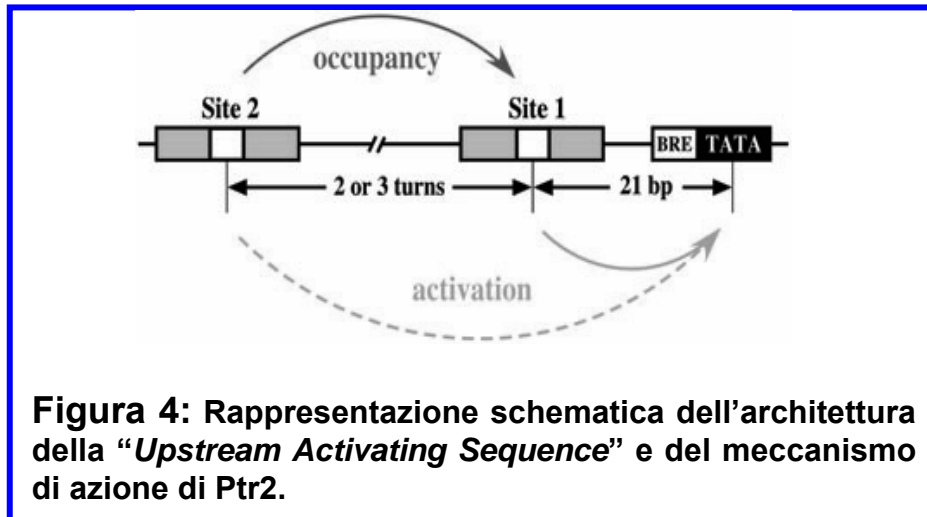
Negli *Archaea* alofili *Halobacterium salinarum* e *Haloferax mediterranei*, la produzione delle vescicole gassose coinvolge quattordici geni *gvp* (*gvpACNO* e *gvpDEFGHIJKLM*) ed è dipendente dalla fase di crescita e da fattori ambientali, come la luce, la forza ionica e l'ossigeno. GvpE, un omologo della famiglia bZIP (basic leucin-zipper) dei regolatori eucariotici della trascrizione, è stato identificato come un attivatore trascrizionale in quanto riesce a dirigere la trascrizione a partire dal promotore situato a monte del gene *gvpA* che codifica per la principale proteina strutturale delle vescicole gassose (GvpA). L'esatto meccanismo dell'attivazione trascrizionale mediata da GvpE non è ancora ben compreso, ma la sua attività è inibita dal repressore GvpD probabilmente attraverso un'interazione diretta proteina-proteina (Zimmermann and Pfeifer, 2003).

In *Halobacterium sp.* il regolatore trascrizionale Bat coordina la sintesi di una proteina strutturale e di un cromoforo per la biogenesi della membrana viola in risposta alla luce e all'ossigeno. E' caratterizzato dalla presenza di un dominio GAF "photo responsive-cGMP-binding" e di un motivo di legame al DNA *helix-turn-helix* di tipo AraC. Bat attiva la trascrizione legandosi alle sequenze a monte del gene bacterio-rodopsina (*bop*) e di altri geni attraverso meccanismi non noti, ma con una marcata preferenza per il DNA superavvolto. E' stato ipotizzato che sequenze ripetitive purina-pirimidina (RY boxes) poste in vicinanza del promotore del gene *bop*, concorrano a regolarne la trascrizione in risposta a variazioni dello stato di superavvolgimento del DNA, modulando o la formazione del complesso aperto o il legame della TBP alla TATA box (Baliga *et al.*; 2001).

Come menzionato precedentemente molti dei genomi archaeali codificano per ortologhi dei regolatori batterici della famiglia Lrp. La proteina LysM da *S. solfataricus* è stata proposta come un regolatore trascrizionale positivo di un *cluster* genico coinvolto nella biosintesi della leucina. Brinkman e collaboratori hanno dimostrato che in assenza di leucina nel mezzo di coltura, LysM lega una regione di DNA a monte degli elementi TATA/BRE del promotore dell'operone LysWXJK (Brinkman *et al.*; 2002). Un'altra proteina di tipo Lrp da *M. jannaschii*, Ptr2 (*putative transcriptional regulator*) attiva la trascrizione *in vitro* di un piccolo numero di geni che codificano per proteine partecipanti a processi di trasferimento elettronico. Questo putativo regolatore trascrizionale si lega a monte del promotore del gene della ferredossina A (*fdxA*), del promotore del gene della rubredossina 2 (*rb2*) e del gene della rubreritina (*rbr*). Recenti esperimenti hanno dimostrato che la proteina Ptr 2 si lega a due siti a monte (UAS, "upstream activating site") della sequenze BRE e TATA box, ciascuno dei quali devia dall'ideale sequenza consenso di Ptr2 (Ouhammouch *et al.*, 2005 b). Posizionando tali sequenze a monte di un promotore eterologo si attiva la trascrizione conferendogli specificità per Ptr2. E' stato ipotizzato che Ptr2 promuova l'inizio della trascrizione attraverso il reclutamento diretto di TBP (Ouhammouch *et al.*, 2003). A tal fine la geometria delle UAS sembra di essere di notevole importanza. In particolare la distanza che intercorre tra il centro del sito e quello della TATA box deve essere di 21 bp, in quanto variazioni di questa distanza riducono fortemente

l'attivazione trascrizionale di *rb2* (Fig. 4). E' inoltre importante anche che i due siti di legame siano separati da due o tre giri di elica del DNA (Ouhammouch *et al.*, 2005 c). Recentemente sono state identificate due proteine omologhe a Ptr2 nel microrganismo termofilo *Methanothermococcus thermolithotropicus* (Mth) e in quello mesofilo *Methanococcus maripaludis* (Mma).

L'utilizzo della metodica della trascrizione *in vitro* ha permesso di dimostrare che Ptr2 e il suo omologo da *M. thermolithotropicus* attivano la trascrizione sia in presenza



delle loro TBP che di quelle eterologhe. L'altro omologo di Ptr2 da Mma è alquanto inefficiente come attivatore, sebbene la sua specificità di legame si sovrapponga con quella di Ptr2. L'allineamento della struttura primaria di Ptr2 e dell'omologo da Mma ha evidenziato nel dominio effettore un "cluster" di amminoacidi che potrebbe essere il determinante dell'attività trascrizionale di Ptr2. Sostituendo i residui della corrispondente regione di Mma Lrp con quelli di Ptr2 si conferisce infatti a Mma Lrp la capacità di attivatore trascrizionale. Ciò suggerisce che questo sub-dominio di Ptr2 sia fondamentale per l'attivazione. Rimane da chiarire se questo "cluster" di attivazione di Lrp, sia un sito diretto d'interazione con TBP o TFB oppure se sia coinvolta nella dimerizzazione di Lrp.

Esperimenti di trascrizione *in vitro* hanno permesso anche di osservare che le TBP di *M. thermolithotropicus*, *M. maripaludis* e *M. jannaschii* differiscono per la loro capacità di supportare l'attivazione trascrizionale mediata dalle tre Lrp omologhe. TBP da Mja è chiaramente il partner più efficiente per l'attivazione trascrizionale sia in combinazione con la propria RNA polimerasi e TFB che con quelle eterologhe (Ouhammouch *et al.*, 2005 c).

Recentemente è stato identificato il primo attivatore trascrizionale di *S. solfataricus* (Kessler *et al.* 2006), Sta1 (Sulfolobus transcription activator 1), per la sua capacità di attivare la trascrizione di geni virali del rudivirus SIRV1 di *S. islandicus*. Sono stati identificati due distinti siti di legame per Sta1; un primo sito posizionato in prossimità della TATA-box ed un secondo a circa 30 nt a monte del primo. In entrambi è stata evidenziata la presenza di sequenze ripetute invertite imperfette di 16 bp; esperimenti di trascrizione "in vitro" hanno permesso di ipotizzare che il meccanismo di attivazione trascrizionale preveda il reclutamento da parte di Sta1 del fattore TBP. La maggior parte dei genomi archeali contengono *orf* multiple codificanti per differenti TBPs e TFBs; nelle specie *Halobacteria* sono stati ritrovati fino a sei diversi geni *tbp* e sette *tfb*. Paraloghi di TBP e di TFB esistono anche negli eucarioti ma la famiglia batterica del fattore  $\sigma^{70}$  si presta ad essere l'equivalente funzionale più

prossimo. Fattori  $\sigma$  alternativi consentono il riconoscimento di promotori coinvolti nella trascrizione di geni associati a funzioni specializzate come ad esempio la produzione dei flagelli, l'adattamento alla fase stazionaria, il rifornimento degli ioni metallici, la risposta a shock termici e a differenti "signaling" extracellulari. Una conferma della strategia di regolazione genica mediante l'utilizzo di fattori TFB e TBP alternativi è stata data dagli studi di Ouhammouch e colleghi, che hanno messo in evidenza un aumento della trascrizione dei geni *tfb* e *tbp* in risposta a irradiazioni da UV e dei geni *tfb* in seguito a shock termico (Ouhammouch *et al.*, 2004 e 2005 a).

L'esistenza di un sistema di regolazione genica globale in *S. solfataricus* che coinvolga un'attivazione trascrizionale è suggerito dall'espressione coordinata di tre glicosil-idrolasi non correlate in risposta a cambiamenti nelle fonti di carbonio. Tuttavia, il meccanismo e gli elementi che prendono parte a questa regolazione restano ignoti (Haseltine *et al.*, 1999).

Esiste, infine, evidenza di un ulteriore livello di regolazione dell'espressione genica che metterebbe in relazione gli *Archaea* ancora una volta con gli *Eucarya*: la modulazione dell'attività trascrizionale mediante rimodellamento cromatinico dovuto ad acetilazione della proteina Alba ("Acetylation lowers binding affinity"). Tale proteina, conservata in tutti gli *Archaea*, appartiene alla famiglia Sac10b, che include i principali componenti della cromatina ed è anche in grado di indurre superavvolgimento negativo nel DNA (Lurz *et al.*, 1986; Forterre *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2000). Alba è stata trovata in forma acetilata *in vivo* e viene deacetilata in *Sulfolobus* da Sir2, omologo della deacetilasi istonica eucariotica (Bell *et al.*, 2002). La deacetilazione di Alba riduce la sua affinità per il DNA e quindi la sua capacità di reprimere la trascrizione. Recentemente è stata identificata un'acetiltransferasi (Pat) di *S. solfataricus* che è responsabile dell'acetilazione di Alba a livello della lisina 16. Questa acetiltransferasi è conservata non solo negli *Archaea* ma anche nei batteri, dove è coinvolta nella regolazione metabolica (V. Marsh; S. Bell *et al.*; 2005). Le proteine Sir2 e Pat sono funzionalmente conservate nel batterio *S. enterica* dove regolano lo stato di acetilazione e la conseguente attività dell'acetil-CoA sintetasi (Starai *et al.*; 2002). *S. solfataricus* utilizzerebbe dunque questo sistema di regolazione di tipo batterico per generare una forma rudimentale di regolazione cromatinica (V. Marsh; S. Bell *et al.*; 2005).

## Sistemi di detossificazione

Repentine alterazioni nella temperatura, concentrazione ionica, disponibilità di ossigeno, osmolarità, oppure nella concentrazione di metalli e sostanze inquinanti, normalmente rappresentano per una cellula causa di forte stress, compromettendone la capacità di sopravvivenza. Gli *Archaea* si sono dimostrati straordinariamente abili nel contrastare gli effetti di qualsiasi tipo di stress, sia esso chimico, fisico o biologico. Tuttavia, ad oggi i meccanismi molecolari responsabili della risposta agli stress ambientali negli *Archaea* sono stati solo parzialmente chiariti, mediante l'identificazione di proteine/enzimi e vie metaboliche direttamente coinvolte nel contrastare l'effetto degli agenti di stress (Conway de Macario, 2003).

Il recente intenso sviluppo nel sequenziamento dei genomi archaeali, disponibili in specifiche banche dati (Makarova e Koonin, 2003), ha permesso analisi *in silico* focalizzate sulla identificazione di complessi "pathway" biochimici regolati. Questi nuovi strumenti, accanto a studi di genomica comparativa e di genomica funzionale, possono aiutare a capire come questi microrganismi sopravvivano e si adattino alle specifiche e caratteristiche nicchie ambientali occupate.

Dall'omologia con controparti batteriche meglio conosciute, è emerso che le strategie difensive si correlano con lo stile di vita dell'organismo. Per esempio, *Archaea* anaerobici come *Pyrococcus furiosus* ed *Archaeoglobus fulgidus* si proteggono dallo stress ossidativo attivando vie metaboliche finemente regolate, con caratteristiche uniche sia a livello molecolare che evolutivo (Ward *et al.*, 2001; Kengen *et al.*, 2001).

### Resistenza multipla a droghe (MDR)

La "Multidrug resistance" (resistenza multipla a sostanze tossiche) può essere definita come la capacità di una cellula di resistere contemporaneamente a dosi tipicamente letali, di sostanze nocive strutturalmente diverse tra loro (Grkovic *et al.*, 2002). Tale fenomeno è ben noto in campo medico in quanto diversi importanti patogeni umani e vari tipi di cellule tumorali hanno evoluto meccanismi che li rendono ampiamente resistenti a tutti i regimi chemioterapeutici attualmente disponibili.

L'azione dei composti tossici può essere contrastata a vari livelli:

- produzione di enzimi che inattivino le molecole per idrolisi o per formazione di derivati inattivi, per esempio le  $\beta$ -lattamasi e gli enzimi che modificano antibiotici aminoglicosidici (Davies, 1994; Shaw *et al.*, 1993);
- alterazione del bersaglio cellulare mediante mutazione o modificazione enzimatica, in modo da ridurre ad esempio l'affinità di un antibiotico per il suo "target" (Spratt, 1994);
- impiego di vie metaboliche alternative per by-passare il sito di azione della sostanza tossica.

Importanti attori del processo di risposta multipla alle droghe sono le proteine appartenenti alla famiglia dei regolatori trascrizionali MarR (regolatori della resistenza multipla ad antibiotici) che svolgono funzioni cruciali per il controllo della produzione dei fattori di virulenza, per il catabolismo dei composti aromatici, per la risposta ad antibiotici e a stress ossidativi. Il ruolo delle proteine MarR in tali processi e l'isolamento, in ambito clinico, di ceppi resistenti ad antibiotici ha generato un crescente interesse per questa famiglia. Studi strutturali hanno dimostrato che il motivo di legame al DNA dei membri di questa famiglia è di tipo "winged-helix" (elica alata).

L'identificazione della famiglia dei geni *Mar* è incominciata con il riconoscimento di un meccanismo di resistenza multiplo a droghe in *Escherichia coli*-K12. Sono stati identificati mutanti di tale ceppo che mostravano resistenza ad un ampio spettro d'antibiotici come ad esempio tetracicline, cloramfenicolo, puromicina, penicilline (fenotipo *Mar*). Studi approfonditi di questi individui resistenti hanno portato all'identificazione dell'operone *marRAB* quale responsabile del fenotipo *Mar*. In particolare, hanno permesso di comprendere che il fenotipo *Mar* è conferito, in principalmente dall'espressione deregolata di *marA* che codifica un attivatore trascrizionale appartenente alla famiglia AraC. MarA induce l'espressione di numerosi geni responsabili della resistenza ad antibiotici e a stress ambientali, come ad esempio il sistema di efflusso multiplo per le droghe *AcrAB-ToiC*. Il fenotipo *mar* e l'aumento dell'espressione di *marRAB in vivo* sono indotti da un ampio spettro di antibiotici e composti anionici lipofili come il 2,4-dinitrofenolo, l'acido salicilico etc (Wilkinson *et al.*, 2006).

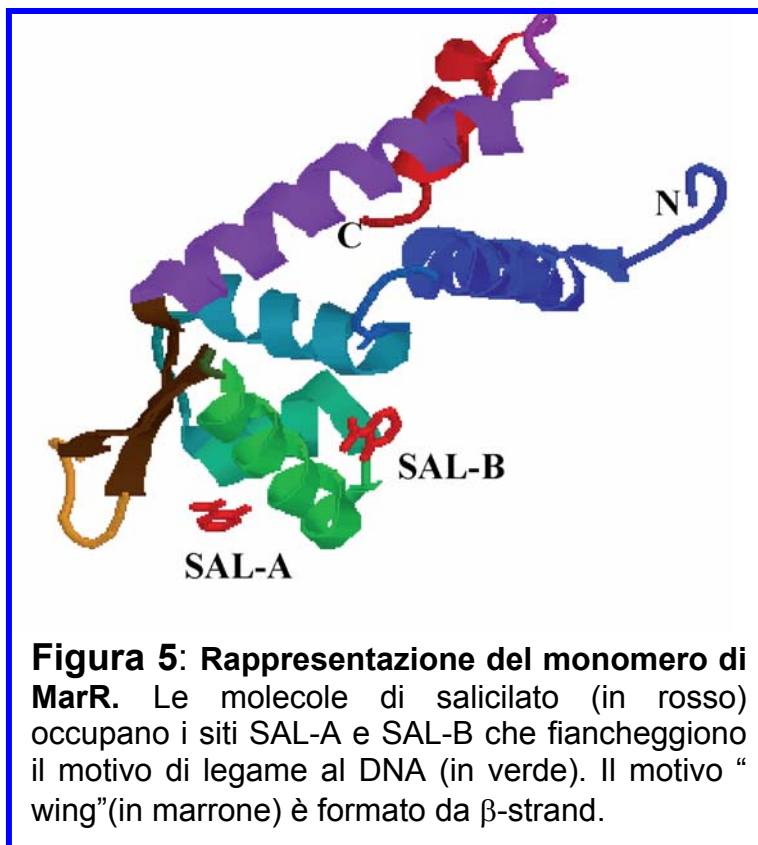
Il prodotto del primo gene dell'operone *marRAB* è MarR, un repressore trascrizionale che con un meccanismo a feedback negativo ne autoregola la trascrizione. MarR si



lega come un omodimero a due siti nella regione promotore/operatore dell'operone. Il primo sito di legame si sovrappone agli elementi -35 e -10 del promotore mentre il secondo sito si sovrappone a quello di legame dei ribosomi e finisce a monte del codone d'inizio di MarR. La repressione trascrizionale è rimossa dalla presenza di differenti composti fenolici strutturalmente correlati tra loro (incluso diversi agenti antimicrobici) che interagendo con il repressore ne diminuiscono l'affinità per il DNA. Questi risultati indicano la presenza di un sistema di resistenza intrinseca in *E. coli* che è sotto il controllo del repressore trascrizionale MarR che risponde a composti fenolici (Wilkinson *et al.*, 2006).

Gli omologhi appartenenti alla famiglia MarR sono presenti sia nel dominio degli archaea che dei batteri ed è stato proposto che questa sia una delle nove famiglie di regolatori trascrizionali che si sono evolute prima della divergenza dei due domini. La maggior parte delle proteine MarR finora caratterizzate sono repressori trascrizionali, ma sono state identificate anche proteine con funzione di attivatore, quali ExpG e BadR, o con entrambe le funzioni (SlyA). Nei batteri e negli Archaea, dunque, si sono evolute proteine di tipo MarR per regolare geni critici per la risposta a cambiamenti ambientali. Ad esempio, alcuni membri della famiglia MarR quali HpaR e HpcR regolano il catabolismo dei composti aromatici, come la degradazione dell'acido 4-idrossifenilacetico in *E. coli* e dell'acido 3,4-didrossifenilacetico rispettivamente (Wilkinson *et al.*, 2006).

La struttura del capostipite della famiglia MarR, è stata risolta a 2.3 Å mediante cristallografia ai raggi X in presenza del ligando (salicilato) (Alekhshun *et al.* 2001).



I dati sperimentali hanno mostrato che la proteina è presente come dimero ed hanno evidenziato la presenza di due siti di legame per il salicilato che sono stati denominati SAL-A e SAL-B. Questi due siti di legame sono costituiti da residui critici

per il legame al DNA, evidenziando una parziale sovrapposizione del sito di legame al DNA e al ligando. Il legame delle molecole di salicilato induce una variazione conformazionale che altera l'orientazione relativa dei residui coinvolti nell'interazione con il DNA con la conseguente variazione del legame della proteina MarR alla sequenza promotore/operatore. Questa è una caratteristica di tutta la famiglia MarR, che include gli unici regolatori trascrizionali batterici che utilizzano un tale meccanismo di riconoscimento di differenti droghe (Wilkinson *et al.*, 2006) (**Fig. 5**). Generalmente, i membri appartenenti alla famiglia dei geni *Mar* (così come descritto per *marR*) sono presenti all'interno di cluster genici che sono soggetti al loro diretto controllo trascrizionale, in genere con un meccanismo a feedback negativo. La composizione di tali cluster genici è variabile, ma comprende sempre delle permeasi di membrana a largo spettro di substrato, che contribuiscono alla "multidrug resistance".

## Biomonitoraggio e Bioremediation

L'utilizzo estensivo e sconsiderato negli ultimi cento anni dei derivati del petrolio e di sostanze chimiche di sintesi, ha prodotto una crescita esponenziale dei livelli di inquinamento ambientale. Tra i principali inquinanti di origine naturale vanno sicuramente annoverati gli idrocarburi presenti nei depositi di carburanti fossili e i metalli pesanti presenti nei minerali, che con l'avvento dell'industrializzazione sono stati mobilitati dal sottosuolo e rilasciati in forme "bio-disponibili" nella biosfera. A questi vanno poi aggiunti tutti quei composti non naturali (xenobiotici) quali ad esempio i policloro-bifenili (PCB), il trinitrotoluene (TNT), i coloranti azotati ecc. che vengono rilasciati nell'ambiente principalmente dalle industrie chimiche e farmaceutiche, dalla lavorazione della carta ("pulp and paper bleaching") e dalla diffusione di una agricoltura intensiva che fa sempre più largo uso di pesticidi e diserbanti (Dua M. *et al.*, 2002; Rieger PG. *et al.*, 2002) (**Fig. 6**)

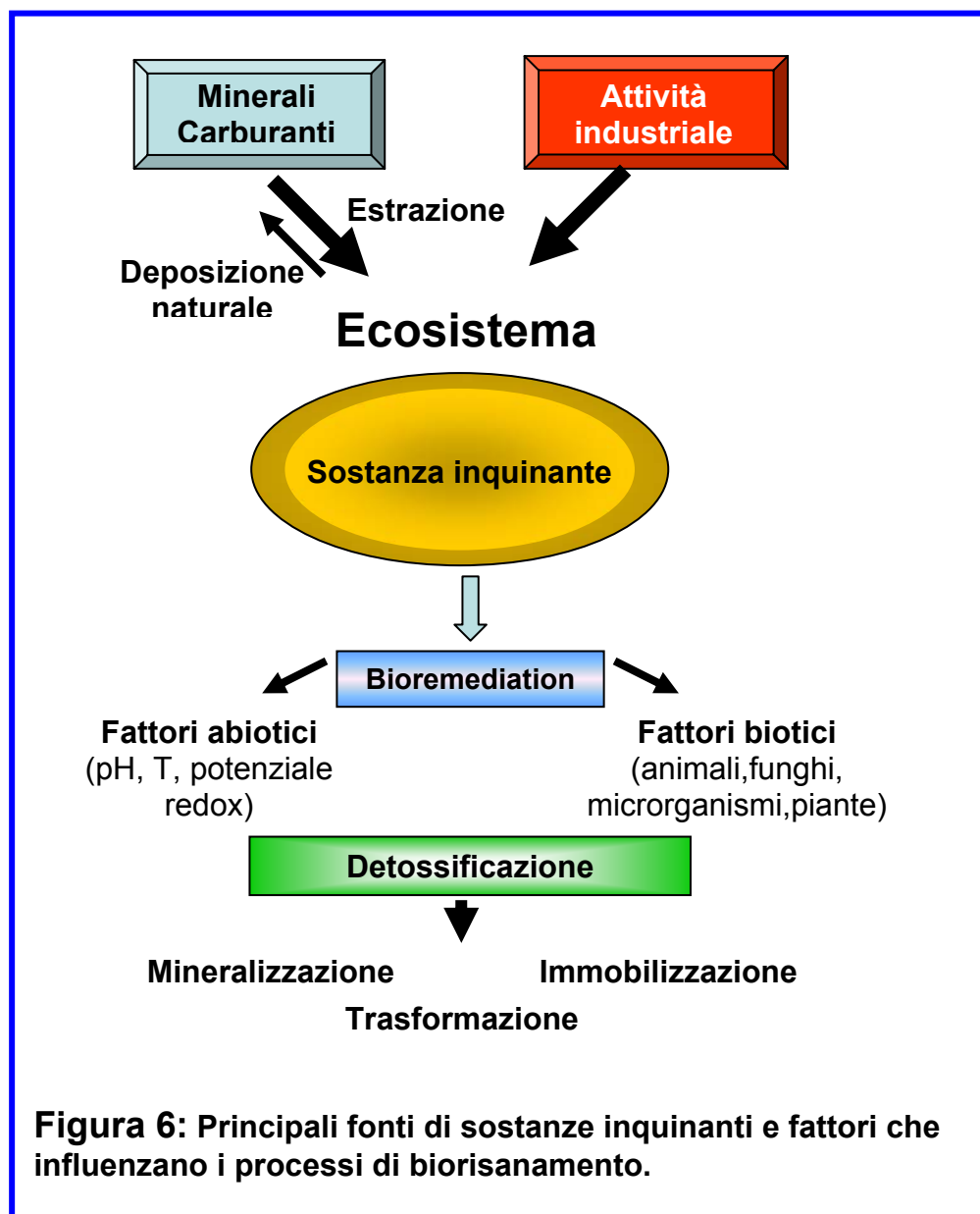
La rimozione di tali inquinanti dalla biosfera mediante i processi chimico-fisici e biologici naturali, sebbene possibile, risulta estremamente lenta e quindi difficilmente praticabile; d'altra parte i batteri, evolutisi più di tre miliardi di anni fa, hanno evoluto la capacità di ricavare energia praticamente da ogni composto col quale vengono a contatto. Tale innata versatilità, unita alla facilità ed alla velocità di crescita, li rende un importante strumento utilizzabile nel risanamento ambientale.

In natura, l'ottimizzazione dell'utilizzo (come fonte di energia e di carbonio), di molecole tossiche ed incompatibili ad alte dosi con la vita, ha richiesto e richiede una lunga e lenta evoluzione. Si capisce dunque facilmente, perchè il set di enzimi e strategie a disposizione dei vari microrganismi per metabolizzare molecole comparse da meno di un secolo, risulti poco efficiente o comunque non capace di reggere il ritmo con cui l'uomo immette tali sostanze nella biosfera.

Diventa cruciale dunque, lo studio approfondito della fisiologia, del metabolismo e della genetica di quei microrganismi che presentano pathways degradativi potenzialmente utili. In tal modo, successivamente, mediante tecniche di ingegneria proteica, si può accelerare il processo evolutivo, al fine di ottenere degli efficienti biocatalizzatori utilizzabili in differenti applicazioni biotecnologiche quali:

- il biorisanamento di siti inquinati,
- la bioconversione di composti tossici in "fine chemicals" ed altri prodotti ad alto valore aggiunto (green chemistry),

- lo sviluppo di dispositivi per il biomonitoraggio “*in situ*” e di biosensori per monitorare la biodisponibilità degli inquinanti (Diaz E., 2004).



La creazione di nuovi pathways ibridi, mediante combinazione delle vie cataboliche provenienti da differenti microrganismi, può inoltre permettere il metabolismo completo delle sostanze xenobiotiche. Un esempio è dato dalla realizzazione di batteri capaci di mineralizzare i PCB, prevenendo la formazione di intermedi non ulteriormente metabolizzabili o comunque tossici (Pieper DH *et al.*, 2000; Timmis KN *et al.* 1999).

A differenza dei composti organici, i metalli pesanti quali Hg, Cd ed As (una delle principali cause di inquinamento), non possono essere né distrutti, né biodegradati. Gli organismi hanno evoluto delle strategie naturali per rispondere ad aumenti intracellulari di tali metalli pesanti, ad esempio attraverso reazioni di ossido-riduzione che ne cambiano lo stato redox trasformandoli in specie meno tossiche. Sono stati poi sviluppati dei microrganismi ricombinanti capaci di accumulare e/o immobilizzare

i metalli pesanti presenti nelle acque e nei suoli inquinati (Mejare M *et al.* 2001; Valls M *et al.* 2002). Poiché differenti metalli possono essere utilizzati come accettori terminali di elettroni nelle catene respiratorie di microrganismi anaerobi, questi sono stati sfruttati per convertire le forme ossidate dei vari metalli nel loro stato ridotto (insolubile) e quindi prevenirne l'ulteriore diffusione nell'ambiente.

Un ulteriore vantaggio dell'utilizzo dei microrganismi nel biorisanamento, consiste nella possibilità di manipolarli in modo che essi possano aumentare la biodisponibilità di alcuni inquinanti, in modo che possano essere poi biodegradati.

Una delle principali ragioni, infatti, della persistenza nell'ambiente dei composti aromatici ad esempio, è proprio la loro scarsa disponibilità (rimangono fortemente legati alle particelle del suolo). Gli organismi possono essere opportunamente ingegnerizzati in modo da ottenere ceppi con una elevata chemotassi per gli inquinanti e/o molecole di superficie capaci di legarli con elevata efficienza (Dua M. *et al.*, 2002; Reineke W. 1998).

Una delle maggiori limitazioni all'utilizzo di microrganismi modificati nel biorisanamento, è quella del rischio biologico collegato alla diffusione nell'ambiente degli OGM. Per ovviare a tale problema, sono stati sviluppati una serie di sistemi genetici di contenimento basati sulla capacità dei microrganismi di sopravvivere solo in presenza del contaminante, o basati sull'uso di tossine e di antitossine (Ramos JL. *et al.* 1995; Torres B. *et al.* 2004).

## Sistemi reporter e loro applicazioni

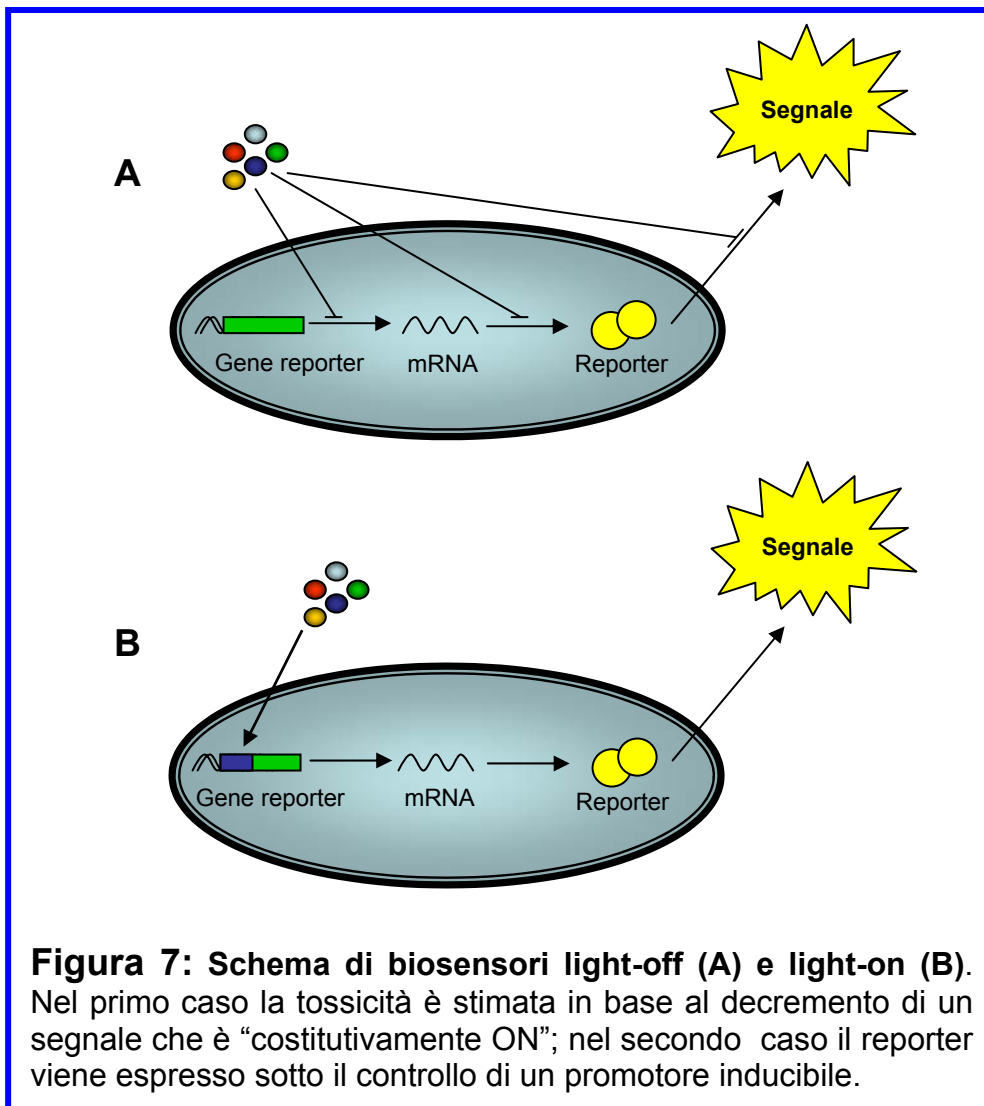
L'approccio tradizionale per verificare la presenza di sostanze chimiche nell'ambiente è basato su analisi di tipo chimico o fisico che permettono un'identificazione precisa e sensibile dell'esatta composizione di ogni campione. Tuttavia, la completa strumentazione necessaria per queste analisi è piuttosto complicata, costosa e richiede l'intervento di laboratori specializzati, rendendo quindi impossibile l'analisi "in situ". Altra limitazione di tali metodiche consiste nella mancanza di informazioni circa la "biodisponibilità" dei composti, dei loro effetti sugli organismi viventi e dell'effetto sinergico o antagonista che possono avere quando sono presenti insieme ad altre sostanze. Da queste esigenze è nata la necessità di utilizzare un approccio complementare basato sui sistemi viventi (Belkin, 2003).

Nell'accezione classica il termine "biosensore" indica l'accoppiamento di materiale biologico (enzimi, recettori, DNA ecc.) con un sistema microelettronico o una strumentazione che permetta la rapida e precisa identificazione e misurazione di varie sostanze presenti in acqua, aria e fluidi biologici (On-line Medical Dictionary).

Gli ultimi 10-15 anni hanno visto lo sviluppo di una nuova classe di "strumenti" per il monitoraggio della presenza nell'ambiente di sostanze inquinanti: si tratta di microrganismi geneticamente modificati che sono in grado di rispondere, in maniera dose-dipendente, a specifiche sostanze.

Uno dei vantaggi dell'utilizzo di cellule intere come biosensori è la possibilità di stabilire non solo la presenza di inquinanti in un determinato campione, ma anche la sua tossicità (correlata alla disponibilità stessa della sostanza). Nel caso di biosensori per la misura di tossicità, questi possono essere divisi in due classi fondamentali: quelli di tipo "light off" e quelli di tipo "light on" (**Fig. 7**).

Nei sistemi di tipo light off, i microrganismi sono stati ingegnerizzati in modo da produrre costitutivamente una bioluminescenza, in conseguenza della presenza di geni o cluster genici tipo *lux-CDABE* di *Vibrio fischeri* (Horsburgh AM *et al.* 2002; Tiensing T *et al.* 2002). La misura della tossicità in questo caso è data dalla diminuzione di luminosità dovuta alla inibizione della produzione della molecola reporter o del segnale da essa generato. Nei sistemi di tipo light on, al contrario la bioluminescenza aumenta in funzione della presenza della sostanza tossica in quanto la cassetta genica è direttamente posta sotto il controllo di promotori inducibili capaci di rispondere a stress tossici e/o genotossici (Min J. *et al.* 2003).



Oltre che per studi di tossicità, biosensori basati su cellule intere sono stati realizzati per l'identificazione e la quantizzazione di specifici inquinanti o per misurare la disponibilità di nutrienti in campioni di H<sub>2</sub>O o suolo.

Con un lavoro pionieristico, Burlage e colleghi realizzarono un costrutto per il biomonitoraggio del naftalene e del salicilato (Burlage RS *et al.* 1990). In poco più di dieci anni, sono stati numerosissimi i sistemi che si sono affiancati al primo, capaci di monitorare la presenza di composti organici e non di vario tipo. Tra questi, i più numerosi riguardano i derivati del benzene (Stiner L. *et al.* 2002; Abd-El-Haleem D. *et al.* 2002) e i metalli pesanti (Abd-El-Haleem D. *et al.* 2006; Ren S. *et al.* 2003).

Turpeiner R. *et al.* 2003). Con poche eccezioni in cui si è utilizzata l'attività  $\beta$ -galattosidasica, nella quasi totalità dei casi, come reporter si è utilizzata la bioluminescenza generata dalla luciferasi (*lux-CDABE* di *Vibrio fischeri* o *luc* da *Photinus pyralis*).

## Stato dell'arte e scopo della tesi

Nel laboratorio presso cui è stato svolto questo progetto di dottorato, da diversi anni si studiano i meccanismi di regolazione trascrizionale dell'Archaeon *S. solfataricus*. Precedentemente a questo lavoro, dallo studio delle sequenze regolative di un gene codificante una alcool deidrogenasi (*Sso2536*) specifica per le aldeidi aromatiche, erano state identificate diverse proteine capaci di interagire con la regione posta immediatamente a monte del gene (Fiorentino G. *et al.* 2003). Delle proteine identificate, due sembrano poter essere coinvolte nella regolazione trascrizionale del gene *Sso2536*. Studi precedenti avevano inoltre dimostrato che l'espressione di tale gene è regolata positivamente dalla presenza di benzaldeide nel mezzo di coltura (Cannio R. *et al.* 1999).

Delle due proteine identificate, la prima (Lrs14) corrisponde ad un fattore trascrizionale già noto in letteratura per la capacità di legare il proprio promotore e regolarlo tramite un meccanismo a feedback negativo (Bell S.D. *et al.* 2000). L'altra proteina identificata per la capacità di legare il promotore dell'alcool deidrogenasi, da noi denominata Bald16, risulta essere, secondo la classificazione presente sul sito, <http://www-arch-bac.u-psud.fr/projects/sulfolobus/> (che fornisce l'accesso al genoma di *S. solfataricus* P2), anch'esso un putativo fattore trascrizionale appartenente alla famiglia dei geni *Mar* (Multiple Antibiotic Resistance).

Tutti questi dati uniti alla capacità di *S. solfataricus* di crescere in presenza di concentrazioni di benzaldeide 2 mM, hanno fatto ipotizzare la presenza nel microrganismo di un possibile pathway per la detossificazione da aldeidi di natura aromatica.

Con questo progetto di dottorato ci si propone di verificare ed analizzare il pathway detossificativo ipotizzato e di mettere a punto sistema di biomonitoraggio / biorisanamento.

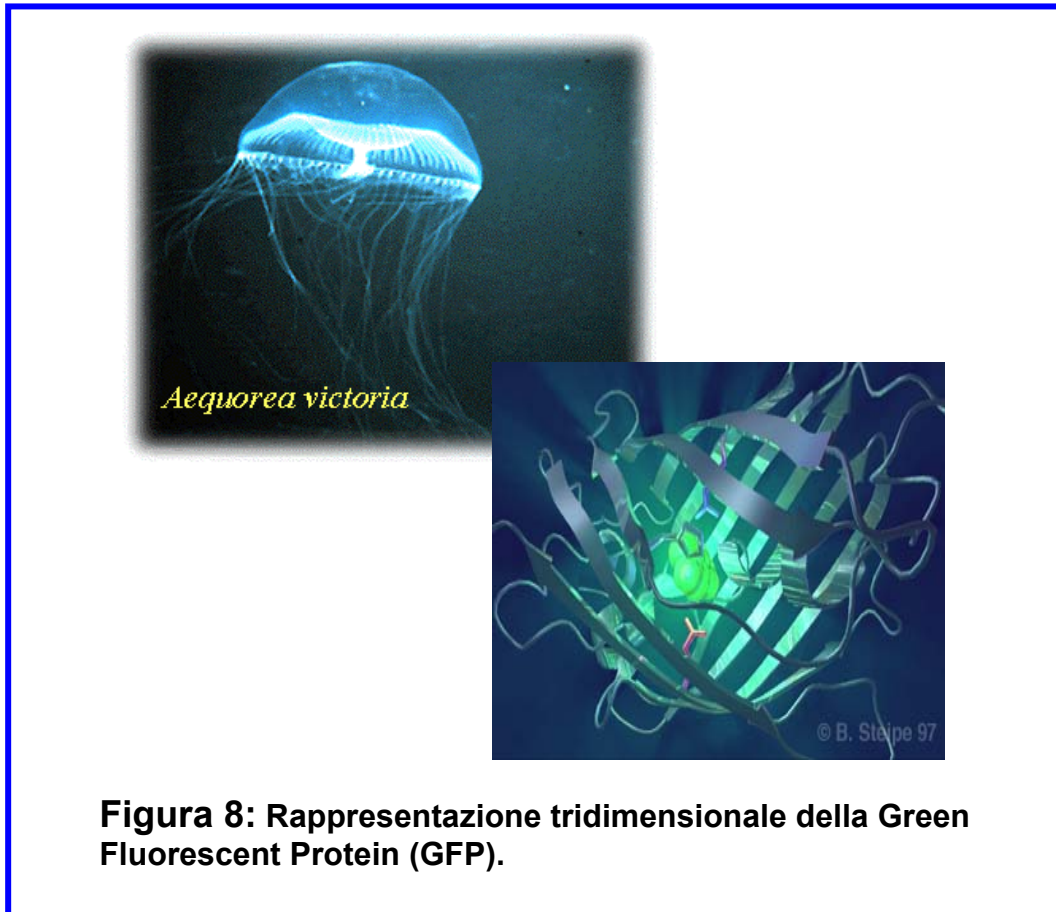
Per far ciò è necessario effettuare un'analisi fisiologica dettagliata del meccanismo di detossificazione proposto e ciò comprende lo studio della regolazione genica; l'analisi delle funzioni svolte dalle due proteine (caratterizzazione delle interazioni con il DNA e di quelle proteina-proteina); lo studio delle relazioni struttura-funzione; l'identificazione di ulteriori partner coinvolti.

Tale studio preliminare risulta necessario al fine di realizzare un buon sistema di biomonitoraggio / biorisanamento.

Per la realizzazione di un biosensore per le aldeidi aromatiche, si è scelto di utilizzare quale reporter il gene *gfp*, codificante la *Green Fluorescent Protein*, una proteina monomeric di 27-29 kDa (**Fig. 8**), isolata dalla medusa *Aequorea victoria*, nella cui struttura primaria sono presenti tre residui che le conferiscono la capacità di agire da fluoroforo (Chalfie and Kain, 1998). Il ruolo di questa proteina *in vivo* è quello di trasdurre, per trasferimento di energia, la chemiluminescenza blu di un'altra proteina, l'aequorina, in luce verde fluorescente; nel fare ciò non richiede proteine addizionali, substrati o cofattori.

Recentemente la fluorescenza prodotta dalla proteina GFP e dalle varianti da essa derivate si è affiancata alla bioluminescenza nella realizzazione di biosensori. La

bioluminescenza permette una più veloce e più sensibile misurazione dell'analita in esame rispetto alla fluorescenza. Ciò non deve stupire, visto che la prima è una misura di un'attività enzimatica, mentre la seconda è data dalla quantità di proteina prodotta. Il vantaggio dell'utilizzo della GFP e delle altre proteine fluorescenti consiste d'altra parte nella loro elevata stabilità.



## MATERIALI E METODI

### Ceppi, plasmidi, enzimi e reagenti

I reagenti utilizzati per la preparazione dei tamponi e delle soluzioni saline e i costituenti dei terreni per la crescita di *Sulfolobus solfataricus* sono stati acquistati alla SIGMA, ad eccezione dell'estratto di lievito e dei casaminoacidi che sono prodotti DIFCO.

La benzaldeide e la cinnamaldeide sono prodotti FLUKA, la 3,4-dimetossibenzaldeide (veratrilaldeide) è stata acquistata dalla ALDRICH.

I reagenti per le elettroforesi su gel di poliacrilammide sono stati forniti dalla Bio-Rad. Il vettore plasmidico pUC19 digerito con l'enzima *Sma*I e defosforilato è della MBI Fermentas. Gli enzimi di restrizione con i relativi tamponi, gli enzimi di modificazione (fosfatasi alcalina, T4 DNA ligasi, T4 DNA polimerasi, DNA polimerasi *large fragment* polinucleotide chinasi, trascrittasi inversa) e gli standard di peso molecolare per acidi nucleici (Marker III e Marker VI) sono stati acquistati dalla Roche.

La *Taq* DNA polimerasi è stata acquistata dalla Promega.

Il kit di sequenza utilizzato è l'*fmol DNA Cycle Sequencing System* distribuito dalla Promega o il *T7 Sequenase version 2.0* distribuito dall'Amersham. La sintesi degli oligonucleotidi è stata commissionata alla MWG-Biotech; il materiale radioattivo è stato fornito dall'Amersham o dalla Perkin Elmer.

Tutti gli altri reagenti sono del massimo grado di purezza disponibile in commercio.

Ceppo	Organismo	Genotipo	Provenienza
P2	<i>S. solfataricus</i> (W. Zillig, Volcanic hot spring; Italy, Campi flegrei)	Wild type	DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen)
TOPF'10	<i>E. coli</i>	F{ <i>lacI<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)</i> } <i>mcrA</i> Δ ( <i>mrr-hsdRMSmcrBC</i> ) φ80Δ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR</i> <i>araD139</i> Δ ( <i>ara-leu</i> ) 7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
BL21-Codon Plus (DE3) RIL	<i>E. coli</i>	F- <i>ompT hsdS(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-)</i> <i>dcm+ Tet<sup>r</sup> gal</i> λ ( <i>DE3</i> ) <i>endA Hte</i> [ <i>argU ileY leuW</i> <i>Cam<sup>r</sup></i> ]	Stratagene
Rb791	<i>E. coli</i>	W3110/ <i>lacI<sup>q</sup>L8</i>	Prof. G. Sannia

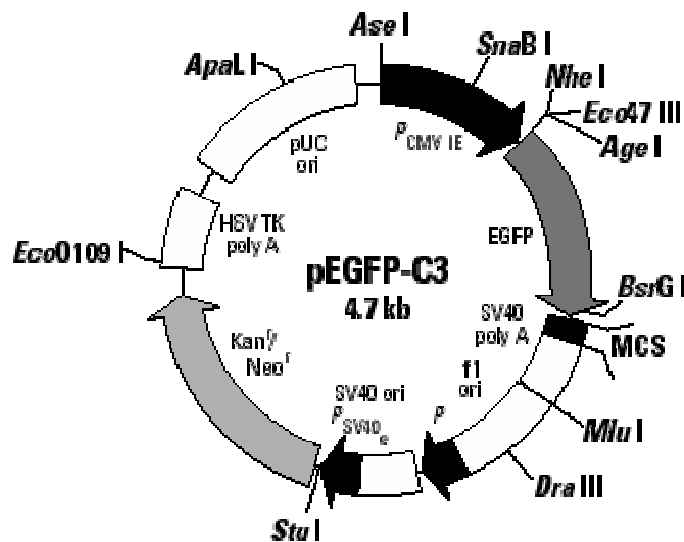


Gli anticorpi a-Bald16 ed a-Lrs14 prodotti in coniglio sono stati commissionati alla ditta **Igtech** pscarl (Paestum, Salerno).

**Plasmidi utilizzati in questo studio**

I vettori plasmidici (e le mappe di alcuni di essi) utilizzati in questo lavoro di tesi sono riportati nella seguente tabella:

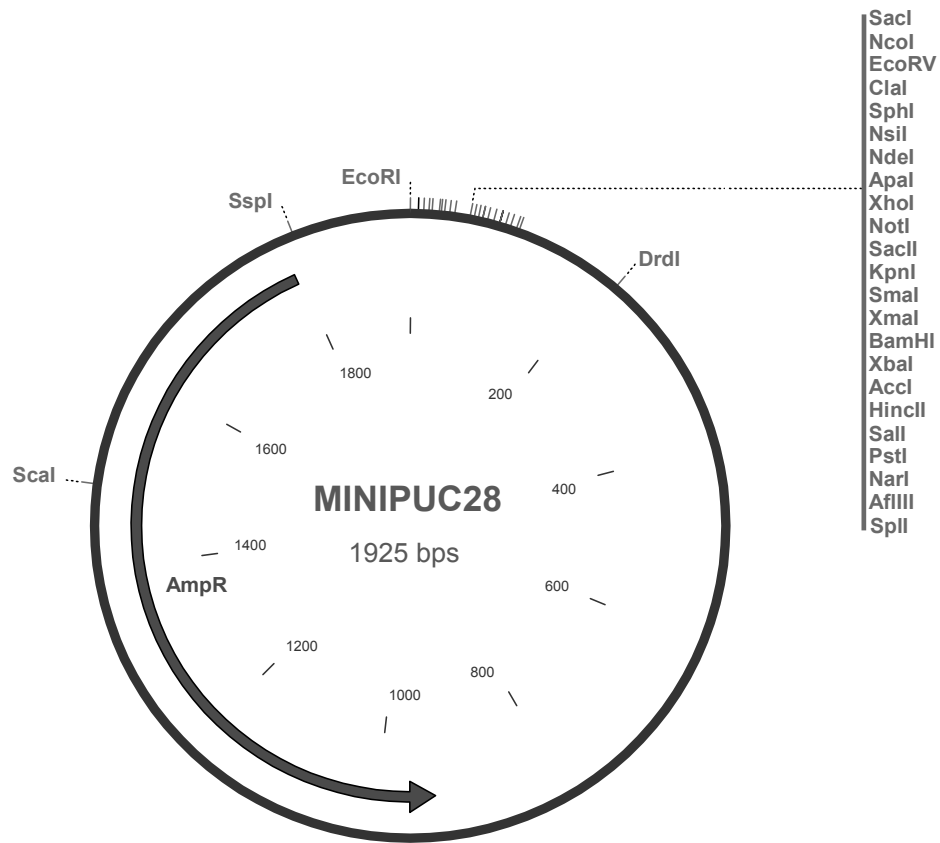
Plasmide utilizzato	Provenienza
pUC18-SsAdhpr	Già presente in laboratorio
pMar-likepr	Questo lavoro
pEGFP-C3	Clontech
MinipUC28	Gentilmente concesso dal Dr. Cannio R.
pTrcbald16	Questo lavoro
pSsAdh-prEGFP	Questo lavoro
pMI-prEGFP	Questo lavoro
pET-Lrs	Gentilmente concesso dal Dr. Bell SP.



**pEGFP-C3 MCS**



**Figura 1: Schematizzazione e siti di clonaggio multipli del vettore pEGFP-C3**



**Figura 2: Schematizzazione e siti di clonaggio multipli del vettore MinipUC28**

### Condizioni di crescita di *Sulfolobus solfataricus*

Il ceppo di *S. solfataricus* P2 è cresciuto a 80°C e pH 3.8 nel terreno indicato dal catalogo DSM come mezzo n°182. Un litro di terreno di coltura contiene:

DSM182 1x (1 litro)	
Estratto di lievito	1g
Casaminoacidi	1g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.1g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25g
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.8 mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	4.5 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.22 mg
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.03 mg
VO <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.03 mg
CoSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05 mg

Il terreno è tamponato a pH 3.8 con 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e successivamente sterilizzato in autoclave.

Le cellule vengono prelevate da una coltura di riserva conservata a -80°C in 15% glicerolo con un'ansa sterile ed inoculate in 5 ml di DSM 182; sono poi fatte crescere per circa 36 ore in un bagnetto oscillante mantenuto a 80°C ad una velocità di 116 rpm min<sup>-1</sup>.

Le cellule sono quindi trasferite in 50 ml di terreno fresco e propagate nelle medesime condizioni fino al raggiungimento dei valori desiderati di densità ottica a 600 nm.

Per analizzare l'effetto sulla crescita di alcuni substrati, le cellule prelevate in fase di crescita esponenziale sono inoculate a 0.08 OD in DSM 182 supplementato con alternativamente benzaldeide, cinnamalaldeide o veratrilaldeide alla concentrazione di 1 mM, 0.35 mM e 1 mM rispettivamente. Le curve di crescita del microrganismo in presenza di tali sostanze si ottengono monitorando nel tempo l'incremento di densità ottica a 600 nm; in tal modo si determinano anche le concentrazioni inibitorie minime delle stesse.

Aliquote delle stesse cellule sono raccolte in fase esponenziale, a 0.3 OD<sub>600nm</sub> e in fase stazionaria, quando l'assorbimento a 600 nm è pari a 0.7 OD.

Le cellule, cresciute nelle condizioni desiderate, sono raccolte mediante centrifugazione per 15 minuti a 6000 x g a 4°C.

### Condizioni di crescita di *E. coli*

La crescita di *E. coli* è condotta in un incubatore alla temperatura di 37°C in agitazione orbitale. Per la crescita in mezzo liquido è utilizzato il terreno LB (Luria-Bertani) contenente: 10 g di bacto-triptone, 5 g di estratto di lievito e 10 g di NaCl.

Per la crescita su mezzo solido sono preparate piastre Petri di LB contenenti agar all'1.5%.

Dove richiesto sono aggiunti i seguenti antibiotici: ampicillina (100 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), cloramfenicolo (33 µg/ml), tetraciclina (15µg/ml).

## Tecniche di biologia molecolare

### Preparazione di cellule di *E. coli* competenti alla trasformazione per elettroporazione

1 ml di una coltura in fase esponenziale di crescita di cellule di *E. coli* TOP10F' è inoculato in un litro di LB (Luria-Bertani medium) contenente tetraciclina 15 µg/ml. La crescita della coltura, che avviene su piastra agitante a 37°C, è seguita spettrofotometricamente aspettando che le cellule raggiungano un'assorbanza a 600 nm pari a 0.7 OD . Si lascia la coltura in ghiaccio per 15 minuti e si centrifuga a 5000 x g per 15 minuti a 4°C. Si rimuove il soprannatante e si risospese il pellet cellulare in un litro di acqua fredda sterile. Si centrifuga come nel passaggio precedente.

Il pellet cellulare è risospeso in 0.5 l di acqua fredda e si centrifuga come sopra. Le cellule poi sono risospese in 20 ml di 10% glicerolo freddo ed ancora centrifugate nelle medesime condizioni. Infine, i pellet cellulari sono ripresi in un volume finale di 2 ml di 10% glicerolo in modo da raggiungere la concentrazione di circa  $1 \times 10^{10}$  cellule/ml. La sospensione è congelata in ghiaccio secco e acetone e conservata a -80°C.

### Trasformazione per elettroporazione

Le cellule competenti alla trasformazione per elettroporazione sono scongelate in ghiaccio; 1 µl della miscela di ligasi (generalmente 10 ng di plasmide) è mescolato a 50 µl di cellule e si lascia in ghiaccio per 1 minuto.

La miscela (DNA e cellule) viene trasferita in una opportuna elettrocuvetta preraffreddata.

L'elettroporazione è eseguita con l'elettroporatore della Bio-Rad (Gene Pulser™), regolando il generatore di impulsi a 25 µF, 2.5 V e 200 Ohm. Dopo che l'elettrocuvetta è stata disposta tra i due elettrodi, si genera l'impulso di corrente e si controlla il tempo dell'impulso (4.0-4.5 msec). Successivamente, si aggiunge 1 ml di LB e le cellule sono risospese delicatamente prima di essere trasferite in un tubo eppendorf sterile e incubate, sotto agitazione, per 1 ora a 37°C. Al termine della crescita, le cellule vengono piastrate sull'appropriato terreno selettivo.

### Mini preparazione di DNA plasmidico

Singole colonie batteriche ben isolate vengono prelevate da terreno solido, inoculate in 5 ml di LB contenente l'antibiotico per la selezione nelle opportune concentrazioni e lasciate crescere a 37°C per 16 ore in agitazione.

Aliquote da 1.5 ml sono trasferite in tubi da microcentrifuga e centrifugate a 12000 x g per 60 secondi e il DNA plasmidico estratto mediante QIAprep® Spin Miniprep Kit della Qiagen. In alternativa è stato utilizzato il metodo della lisi alcalina.

Tale protocollo prevede che il pellet batterico sia risospeso in 100 µl di GTE (50 mM glucosio, 10 mM EDTA pH 8.0, 25 mM Tris-HCl pH 8.0) contenente 400 µg di lisozima e la miscela è incubata per 5 minuti a temperatura ambiente; si aggiungono

quindi 200 µl di una soluzione 0.2 N NaOH, 1% SDS, si inverte velocemente e si tiene in ghiaccio per 5 minuti.

Vengono poi addizionati 150 µl di una soluzione composta da 5 M K-acetato, 11.5% acido acetico glaciale. Si inverte lentamente e si tiene ancora in ghiaccio per 5 minuti prima di centrifugare per altri 5 minuti a 12000 x g a 4°C.

Il sovrantante è recuperato ed estratto due volte con un uguale volume di fenolo:cloroformio:alcool isoammilico (25:24:1 v/v).

Dalle fasi acquose si precipitano gli acidi nucleici per aggiunta di due volumi di etanolo al 96% mantenendo per 20 minuti la soluzione a temperatura ambiente e centrifugando per 20 minuti, sempre a temperatura ambiente.

Il pellet è lavato in etanolo al 70% e lasciato asciugare all'aria; viene quindi risospeso in 50 µl di una soluzione di RNasi T1 (2.4 U/µl), RNasi A (50 ng/µl) in TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ed incubato a 37°C per 30 minuti per permettere l'eliminazione dell'RNA. I campioni sono quindi analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio in tampone TBE1x (0.09 M Tris-borato, 0.002 M EDTA) condotta a 100V costanti per circa 30 minuti .

### **Maxi preparazione di DNA plasmidico**

Preinoculi da 5 ml di coltura sono diluiti in 250 ml di LB contenente il corretto antibiotico ed incubati a 37°C su agitatore orbitale per 16 ore.

Le cellule batteriche sono raccolte per centrifugazione a 5400 x g a 4°C per 10 minuti. Il DNA plasmidico viene estratto mediante il *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* della Qiagen.

### **Determinazione della sequenza nucleotidica di un frammento di DNA**

I plasmidi ricombinanti, isolati dai cloni trasformati e selezionati su piastra, sono sottoposti ad analisi di restrizione e a determinazione della sequenza nucleotidica degli inserti seguendo il metodo della terminazione di catena in presenza dei dideossinucleosidi trifosfato (ddNTP) (Sanger *et al.*, 1977). La determinazione della sequenza nucleotidica è stata eseguita utilizzando il kit *fmol DNA Cycle Sequencing System* o il kit *T7 Sequenase version 2.0* e come tracciante radioattivo  $\alpha$ -[<sup>35</sup>S]-dATP.

### **Analisi computazionale**

Per stabilire relazioni di similarità tra le sequenze delle proteine di nostro interesse e le sequenze amminoacidiche della Swiss Prot Data Bank, è stata effettuata un'analisi computazionale consultando il sito <http://www-arch-bac.u-psud.fr/projects/sulfolobus/>, che fornisce l'accesso al genoma di *S. solfataricus* P2, e utilizzando i programmi Blast, disponibili su Internet. Gli allineamenti multipli di sequenza sono stati generati mediante l'uso del programma MultAlign, disponibile sul sito <http://us.expasy.org/>. Le predizioni di struttura secondaria sono state ottenute mediante l'utilizzo dei programmi Predictprotein e Psipred (Memsat), mentre le predizioni di struttura terziaria sono state ottenute tramite il programma HHpred, entrambi reperibili sul sito <http://us.expasy.org/>.

### **Estrazione di DNA totale**

I pellet cellulari provenienti da una coltura di 50 ml sono risospesi in 1 ml di una soluzione di lisi contenente 100 mM LiCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7.8, 1% SDS (*LETS buffer*). Alla sospensione cellulare si aggiunge un uguale volume di fenolo:cloroformio:alcool isoammilico (25:24:1 v/v); si mescola gentilmente e si centrifuga a 8000 x g a 4°C per 15 minuti. Si effettuano altre due estrazioni, quindi la

fase acquosa recuperata è precipitata a  $-80^{\circ}\text{C}$  per 20 minuti per aggiunta di 2.5 volumi di etanolo al 96% e 0.1 volumi di 2 M LiCl e centrifugata a  $8000 \times g$  per 20 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ . Il precipitato è lavato poi con etanolo al 70% e lasciato asciugare all'aria. Il pellet è risospeso in 100-200  $\mu\text{l}$  di una soluzione di RNasi T1 (2.4 U/ $\mu\text{l}$ ), RNasi A (50 ng/ $\mu\text{l}$ ) in TE e incubato per 30 minuti a  $37^{\circ}\text{C}$  per permettere la degradazione dell'RNA.

### **Estrazione di RNA totale**

Cellule di *S. solfataricus* P2 cresciute nelle condizioni precedentemente descritte in un volume di 50 ml vengono raccolte in fase esponenziale ( $0.3 \text{ OD}_{600\text{nm}}$ ) e in fase stazionaria ( $0.7 \text{ OD}_{600\text{nm}}$ ) per centrifugazione a  $6000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti.

I pellet cellulari (ciascuno proveniente da 50 ml di coltura) vengono risospesi in 1 ml di una soluzione contenente 4 M guanidina tiocianato; 25 mM sodio citrato pH 7.0; 0.5% sarcosil; 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol e 10 mM EDTA.

Si effettua una prima estrazione con un volume di fenolo acido e 0.2 volumi di cloroformio:alcool isoammilico (49:1 v/v) e una seconda estrazione con un volume di fenolo:cloroformio:alcool isoammilico (25:24:1 v/v). L'RNA è dunque precipitato a  $-80^{\circ}\text{C}$  per un'ora dopo aggiunta di 2 volumi di etanolo freddo al 96% e 0.1 volumi di 3M Na-acetato pH 5.2.

I campioni sono centrifugati a  $8000 \times g$  per 40 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ ; i pellet vengono lavati con etanolo freddo al 70 % e risospesi in 50-60  $\mu\text{l}$  di H<sub>2</sub>O DEPC.

Un'aliquota di ciascun campione è caricata su gel di agarosio 2% in TBE 1x; un'altra aliquota viene letta allo spettrofotometro per determinarne la concentrazione e verificarne il grado di purezza.

### **Northern blotting**

#### **Trasferimento su filtro**

All'RNA (15  $\mu\text{g}$ ) estratto da *S. solfataricus* P2, come sopra descritto, si aggiungono 3 volumi di tampone di elettroforesi (50% formammide, 1x MOPS, 6% formaldeide, 7% glicerolo, 0.05% xilene cianolo, 0.05% blu di bromofenolo). La miscela è riscaldata a  $65^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti e successivamente incubata in ghiaccio. Si aggiunge poi ai campioni 1  $\mu\text{l}$  di bromuro di etidio 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e si carica su gel di agarosio 1.5% contenente formaldeide ad una concentrazione finale del 2%.

La corsa è condotta per 18 ore a 30 V in tampone MOPS 1x (0.02 M MOPS pH 7.0, 8 mM Na-acetato, 1 mM EDTA pH 8.0), dopodichè il gel è equilibrato in SSC 10x. Il trasferimento degli RNA su filtro è effettuato per capillarità (16 ore) utilizzando una soluzione SSC 10x come tampone di trasferimento. L'RNA trasferito è fissato sul filtro mediante esposizione di 5 minuti ai raggi UV (254 nm).

#### **Preparazione delle sonde**

Le sonde utilizzate per l'ibridazione o come competitori nei saggi EMSA sono ottenute per PCR utilizzando come stampo i seguenti vettori e come primers le corrispondenti coppie di oligonucleotidi:

1. per il gene codificante il fattore trascrizionale Bald16 di *S. solfataricus* P2 (Fiorentino *et al.*, 2003) il vettore pTrc99A-*bald16* e gli oligonucleotidi AAAup (5' - CAA AAA ATA GAT GAA AAA CTC CAA TTA A - 3') e AAAdw (5' - CAT TAC ATT GGG ATC CCT AGT CC - 3');

2. per il gene codificante il fattore Sso7d di *S. solfataricus* P2, il plasmide pGEM T<sup>®</sup>-easySso7d, e gli oligonucleotidi Ss07dUp (5' – CTT GAA GAA ATA TGG CAA CAG - 3') e ssO7dDw (5' – TTA GTT TAC TTC TTT TGC TTC TC - 3').
3. per il gene codificante il fattore Sso10b di *S. solfataricus* P2, il plasmide pTrc99A-Sso10b, e gli oligonucleotidi 10KDN<sub>2</sub> (5' - GGT GGA AAC CAT GGG CAG CGG AAC C - 3') e 10KDC (5' - AGT CCA AAA ACT GCA GAC ACT TAC TTT - 3').

La reazione di PCR è eseguita nelle condizioni descritte nel successivo paragrafo "Amplificazione per PCR del promotore" con la sola differenza della temperatura di annealing utilizzata, pari a 45 °C.

La marcatura delle sonde è effettuata mediante Random Primed DNA-labelling kit (Roche) ed  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] d-ATP. I prodotti di marcatura sono purificati mediante utilizzo di una colonnina Nick<sup>™</sup> column (Pharmacia) e la radioattività misurata mediante scintillatore Beckman

### Ibridazione

La preibridazione è condotta per tre ore ad una temperatura di 65°C in 0.5 M Na-fosfato dibasico, 1mM EDTA, 7% SDS, 1% BSA. Al termine della preibridazione, alla miscela si aggiungono le sonde marcate (2x10<sup>6</sup> cpm/ml di soluzione di ibridazione) previamente denaturate per ebollizione di 5 minuti a 100°C e si prosegue l'incubazione per la notte. La membrana è poi lavata nelle seguenti condizioni di stringenza: 1 lavaggio breve in 5x SSC, 0.1% SDS, 2 lavaggi di 20 minuti in 2x SSC, 0.1% SDS e 1 lavaggio in 1x SSC, 0.1% SDS a 65°C. Al termine dei lavaggi i segnali di ibridazione sono rivelati mediante esposizione di una lastra autoradiografica per 12 ore a -80°C o mediante acquisizione con il Personal Molecular Imager (Bio-Rad) dopo esposizione di 2 ore. L'analisi densitometrica delle bande è effettuata al densitometro (modello GS-710 Bio-Rad).

### Clonaggio della sequenza al 5' dell'operone *Mar-like* di *S. solfataricus*

#### Amplificazione per PCR del promotore

La regione al 5' della "orf" Sso1351 di *S. solfataricus* P2 è stata amplificata mediante PCR utilizzando come stampo il DNA genomico di *S. solfataricus* P2 e come iniziatori le coppie di oligonucleotidi *Marfw* e *Marrv* o alternativamente *Marfw* e *Marext*, disegnati sulla base della sequenza dello stesso gene di *S. solfataricus*. Le sequenze degli oligonucleotidi sono rispettivamente:

*Marfw* 5' - CTATTGGATCGATGGGTTGC - 3' che contiene un sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione *Cla*I (sottolineato nella sequenza) ed è in grado di appaiarsi a partire dalla posizione -271 rispetto al codone di inizio della traduzione del gene della putativa permeasi;

*Marrv* 5' - GGCAACCCATTTGTAATGCATA - 3' che contiene un sito di riconoscimento per l'endonucleasi di restrizione *Nsi*I (sottolineato nella sequenza) ed è in grado di appaiarsi in prossimità del codone di inizio della traduzione del gene della permeasi (indicato in grassetto sulla sequenza);

*Marext* 5' - GGTACTGAAATGAGGTAAAGGGG - 3' che è in grado di appaiarsi a partire dalla posizione +139 rispetto al codone di inizio della traduzione dello stesso gene.

L'amplificazione è eseguita in un apparecchio *Eppendorf Mastercycler personal* con la procedura ed il programma descritti in seguito.

Si prepara una miscela di reazione contenente il DNA stampo il prime diretto *Marfw* e alternativamente i primer reverse *Marrv* o *Marext* così composta:

- DNA 100 ng
- oligo *Marfw* 1 $\mu$ M
- oligo *Marrv* / *Marext* 1 $\mu$ M
- H<sub>2</sub>O a 50  $\mu$ l

La miscela contenente lo stampo e i primers è sottoposta a denaturazione a 94°C per 10 minuti, dopodiché si aggiungono 50  $\mu$ l della soluzione mastermix contenente:

- tampone PCR 10x 10  $\mu$ l
- MgCl<sub>2</sub> 5 mM
- dNTP 0,5mM
- Taq DNA polimerasi 5 U
- H<sub>2</sub>O a 50  $\mu$ l

La reazione di amplificazione è automatizzata secondo il seguente programma:

- Denaturazione 1 min a 94°C
- Annealing 1 min a 55°C
- Polimerizzazione 1 min a 72°C

con estensione di 5 secondi per ciclo e con 15 minuti finali di estensione della polimerizzazione. Si ripete per 35 cicli.

I prodotti di amplificazione sono rivelati tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1%, purificati mediante il *QIAquick PCR Purification Kit* ed è risospesi in 30  $\mu$ l di acqua sterile.

### **Adattamento dei frammenti amplificati e clonaggio nel vettore pUC19/*Sma*I-BAP**

Le porzioni di DNA amplificate per PCR (2  $\mu$ g), sono fosforilate all'estremità 5' con 20 U di T4 polinucleotide chinasi in un tampone contenente imidazolo (50 mM imidazolo, 18 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT) ATP (50 pmoli) e PEG 8000 (6%). Successivamente i frammenti sono purificati mediante due estrazioni con fenolo: cloroformio: alcool isoammilico (25:24:1 v/v) e precipitati con etanolo al 96% in presenza di 0.1 volumi di 3M Na-acetato pH 5.2 e ligati nel vettore pUC19 *Sma*I BAP (MBI Fermentas).

I cloni risultanti positivi allo *screening* blu-bianco sono stati propagati in coltura liquida, in terreno LB contenente ampicillina (100  $\mu$ g/ml), e da questi è stato purificato il DNA plasmidico e sottoposto ad analisi di restrizione con gli enzimi *Eco*RI-*Pst*I. Il DNA isolato dai cloni ricombinanti è stato sequenziato presso la MWG-Biotech. I costrutti definitivi ottenuti sono stati indicati come **p*Mar-like*pr** (-271/+1) e **p*Mar-like*prext** (-271/+139)

### **Primer extension**

Per l'identificazione dell'estremità 5' del trascritto dell'operone *Mar-like* mediante la tecnica di "primer extension" è stato utilizzato l'oligonucleotide *Marext* (5'-GGTACTGAAATGAGGTAAAGGGG -3') disegnato in modo che la sua sequenza



fosse complementare, in direzione 3'-5', alla regione localizzata 139 bp a valle del codone di inizio della traduzione del gene della putativa permeasi *Sso1351* di *S. solfataricus* P2.

L'oligonucleotide è fosforilato all'estremità 5' utilizzando T4 chinasi (10 U) e  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (5  $\mu$ l, 3000 Ci/mmol).

L'oligonucleotide marcato (1 pmole) e 30  $\mu$ g di RNA, preparati da cellule cresciute in condizioni differenti (in presenza e non di aldeidi aromatiche) sono coprecipitati, a -80°C per 30 minuti, per aggiunta di 0.1 volumi di Na-acetato pH 5.2 e 2.5 volumi di etanolo al 96%. Dopo centrifugazione e lavaggio del pellet con etanolo al 70%, il precipitato è risospeso in 6  $\mu$ l di tampone 1x dell'enzima trascrittasi inversa (50 mM Tris-HCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM KCl, 1 mM DTT, pH 8.5). La miscela è denaturata per 3 minuti a 65°C e poi trasferita rapidamente in ghiaccio secco per 1 minuto; si fa scongelare in ghiaccio, quindi si procede con l'*annealing* dell'oligonucleotide con il trascritto complementare a 37 °C per 30 minuti. La reazione di polimerizzazione è effettuata in un volume finale di 10  $\mu$ l, aggiungendo alla miscela contenente l'ibrido primer-RNA 12 U di trascrittasi inversa (AMV), ciascun dNTP 0.2 mM finale, 15 U di inibitore di RNasi e incubando a 48°C per 30 minuti. La reazione è bloccata per aggiunta di 5  $\mu$ l di *stop solution* (10 mM NaOH, 0.5% formammide, 0.05% blu di bromofenolo, 0.05 xilene cianolo). La miscela è denaturata per 3 minuti a 85°C e posta in ghiaccio prima di essere caricata su gel di poliacrilammide/urea al 6%.

Come riferimento per localizzare il sito di inizio della trascrizione, è utilizzato un "ladder" di sequenza effettuato sul plasmide *pMar-like prext* contenente la porzione 5' fiancheggiante il gene *Sso1351*, utilizzando come primer lo stesso oligonucleotide *Marext* e come tracciante radioattivo L' $\alpha$ -[<sup>35</sup>S]-dATP.

L'elettroforesi è stata condotta in TBE1x, applicando una potenza costante di 40 W. Al termine della corsa il gel è seccato in Gel-Dryer per un'ora a 80°C ed è esposto per autoradiografia a -80°C per 16 ore o al Molecular Personal Imager (Biorad) per tre ore.

## Analisi delle proteine

### Preparazione degli estratti cellulari di *S. solfataricus*

I pellet cellulari di *S. solfataricus* sono risospesi in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 e sottoposti a sonicazione in ghiaccio, ad una frequenza di 20 KHz nell'apparecchio SONICATOR Ultrasonic liquid Processor (Heat System-Ultrasonics Inc., N.Y.), per 6 minuti totali con impulsi di 1 minuto alternati ad intervalli di 30 sec. Alle aliquote sonicate si aggiunge l'inibitore di proteasi parametilsulfonilfluoruro (PMSF) per una concentrazione finale pari a 1 mM. Il prodotto della sonicazione è successivamente ultracentrifugato per 60 min a 4°C in un rotore SW-41 (Beckman) a 25000 rpm ed il surnatante recuperato per le ulteriori analisi.

### Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica è determinata attraverso il metodo di Bradford (Bradford, 1976) utilizzando il reattivo Coomassie Brilliant (Bio-Rad) che si complessa alle proteine producendo un cromoforo con un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 595 nm. Come standard si utilizzano quantità note di una soluzione di albumina da siero bovino (BSA) 1  $\mu$ g/ $\mu$ l.

### **Analisi elettroforetica delle proteine (SDS-PAGE)**

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE) è condotta secondo il protocollo di Laemmli (Laemmli, 1970). I campioni sono denaturati a 100°C per 10 minuti in 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoetanolo, 0.001% blu di bromofenolo, 10% glicerolo (loading buffer 1x). I campioni denaturati sono quindi caricati su di un gel di poliacrilammide alla opportuna concentrazione e sottoposti ad elettroforesi verticale in tampone 0.025 M Tris-HCl, 0.2 M glicina pH 8.3, 0.1% SDS. L'elettroforesi è condotta a 25 mA costanti per circa due ore. Al termine della separazione le proteine sono rilevate mediante colorazione con coomassie brilliant blue. A tal scopo il gel è immerso per 30 minuti in una soluzione 0.1% Coomassie Brilliant-Blue R250, 25% alcool isopropilico, 10% acido acetico in lenta agitazione. L'eccesso di colorante è allontanato mediante una serie di lavaggi con una soluzione contenente 30% etanolo e 10% acido acetico; il gel decolorato viene infine conservato in una soluzione 10% acido acetico. Alternativamente le proteine sono trasferite per elettroblot dal gel ad una membrana di polivinildienefluoruro (PDVF) come descritto successivamente nel paragrafo "Analisi mediante Western blot" per le successive analisi.

### **Espressione e purificazione della proteina ricombinante Bald16**

Una singola colonia di cellule di *E. coli* Rb791 trasformato con il plasmide pTrc99Bald16 è cresciuta in 1 l di LB ampicillina (100  $\mu$ g/ml). La crescita è seguita monitorando l'incremento di densità ottica a 600 nm fino al valore di 1 OD, valore al quale le cellule sono state indotte con 1 mM IPTG per 16 h.

Le cellule sono raccolte per centrifugazione di 15 min ad una velocità di 6000 rpm a 4°C, utilizzando un rotore JA14 (Beckman). I pellet cellulari sono risospesi in 10 ml di 50 mM Tris-HCl pH 7.0 e sottoposti a sonicazione, in ghiaccio, ad una frequenza di 20 KHz, per un tempo totale di 6 minuti (impulsi di 1 minuto intervallati da pause di 30 secondi) nell'apparecchio SONICATOR Ultrasonic liquid Processor (Heat System-Ultrasonics Inc., N.Y.). Terminata la sonicazione, all'omogenato così ottenuto viene aggiunto PMSF (parametilsulfonilfluoruro) alla concentrazione finale di 1 mM. L'omogenato è quindi sottoposto ad ultracentrifugazione, ad una velocità di 25000 rpm, a 4°C, per 1 h, utilizzando il rotore a braccia oscillanti SW41 (Beckman). Il surnatante da qui recuperato viene sottoposto al frazionamento al calore mediante riscaldamento per 10 min a 65°C e poi centrifugato per 10 min a 8000 rpm a 4°C. Dopo la precipitazione frazionata al calore, il campione è concentrato fino a 2 ml mediante ultrafiltrazione, utilizzando una membrana YM10 (Millipore) con "cut-off" di 10 kDa.

### **Cromatografia a scambio cationico**

Il primo passaggio di purificazione consiste in una cromatografia a scambio cationico utilizzando una colonna Resource S (Amersham Pharmacia), connessa ad un sistema AKTÄ Explorer ed equilibrata con 50 mM Tris-HCl pH 7.0. La cromatografia viene condotta ad un flusso di 1 ml/min.

Il campione, equilibrato in 50 mM Tris-HCl pH 7.0, è caricato in colonna equilibrata nello stesso tampone. Dopo aver raccolto la frazione di proteine non legate, si procede all'eluizione delle proteine legate applicando un gradiente lineare di forza ionica 0-0.8 M KCl in 50 mM Tris-HCl pH 7.0.

Aliquote delle frazioni così raccolte vengono analizzate per la presenza di Bald16 mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 15%. Il pool frazioni di interesse è riunito e dializzato in un tubo da dialisi con "cut-off" di 6000-8000 Da (Spectrapore),

contro una soluzione 50 mM Tris-HCl pH 7.0, per tutta la notte a 4°C in agitazione, e quindi sottoposto al successivo passaggio di purificazione.

### **Cromatografia d'affinità su Eparina-Sepharose**

Il secondo passaggio cromatografico è costituito da una cromatografia d'affinità utilizzando una colonna HiTrap Eparina-Sepharose (Amersham Pharmacia), sempre collegata ad un sistema AKTÄ Explorer ed equilibrata con 50 mM Tris-HCl pH 7.0.

Il campione, equilibrato nello stesso, è caricato in colonna sotto un flusso di 0.5 ml/min. Dopo aver raccolto la frazione di proteine non legate, si procede all'eluizione delle proteine legate applicando un gradiente lineare di forza ionica 0-0.8 M KCl in 50 mM Tris-HCl pH 7.0 ad un flusso di 1 ml/min.

Aliquote delle frazioni raccolte vengono analizzate per SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 15% per evidenziare la presenza della proteina Bald16.

La frazione cromatografica di interesse viene dializzata come nel precedente passaggio, dopodiché se ne determina la concentrazione proteica.

### **Espressione e purificazione della proteina Bald16 marcata con selenometionina**

Per la produzione di proteina marcata con L-selenometionina una singola colonia di cellule di *E. coli BL21 (DE3) RIL* trasformate con il plasmide pTrc99Bald16 è stata inoculata in 10ml di terreno liquido LB + antibiotico e lasciata crescere per una notte.

Al mattino le cellule sono state recuperate per centrifugazione e inoculate in 500 ml di terreno liquido minimo M9 (Sambrook J. *et al.* 1989) supplementato con 100 µg/ml ampicillina, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.4% glucosio e 1 µg/ml delle varie vitamine tiammina, riboflavina, niacinammide e piridossina. Al raggiungimento di una densità ottica pari a 0.6 OD<sub>600nm</sub> alla coltura sono stati aggiunti gli amminoacidi isoleucina, leucina e valina ad una concentrazione di 50 µg/ml e lisina, fenilalanina e treonina alla concentrazione di 100 µg/ml. La coltura è stata lasciata crescere per ulteriori 40 minuti dopodiché si è aggiunta la L-selenometionina ad una concentrazione di 60 µg/ml. Dopo ulteriori 40 minuti le cellule sono state indotte con 1mM IPTG per 16 h. La purificazione della proteina è stata poi eseguita come precedentemente descritto.

### **Espressione e purificazione della proteina ricombinante Lrs14**

Una singola colonia di cellule di *E. coli BL21 (DE3) RIL*, trasformate con il plasmide pETLrs è cresciuta in 1 l di LB kanamicina (50 µg/ml) e cloramfenicolo (33 µg/ml). La crescita è seguita monitorando l'incremento di densità ottica a 600 nm fino a 0.4 OD valore al quale le cellule sono indotte con 1 mM IPTG per 3 h.

Le cellule sono raccolte dopo centrifugazione a 6000 rpm in rotore JA14 (Beckman) per 15 min e successivamente risospese in 10 ml di 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoetanolo, 10% glicerolo. Le cellule sono lisate mediante sonicazione nell'apparecchio SONICATOR Ultrasonic liquid Processor (Heat System-Ultrasonics Inc., N.Y.) con impulsi di 60 sec ad una potenza di 20 kHz intervallati da pause di 30 sec, per una durata totale del processo di 6 min. L'omogenato è ultracentrifugato nel rotore SW41 (Beckman) a 25000 rpm per 60 min a 4°C. Il surnatante da qui recuperato viene sottoposto ad un frazionamento al calore per 15 min a 75°C e poi centrifugato per 10 min a 8000 rpm a 4°C per allontanare le proteine denaturate.

### **Cromatografia d'affinità His-Trap**

L'estratto proteico dopo precipitazione frazionata al calore è sottoposto ad una cromatografia d'affinità utilizzando una colonna His-Trap (Amersham Pharmacia), connessa ad un sistema AKTÄ Explorer ed equilibrata in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl 15 mM imidazolo (tampone A). La fase stazionaria della colonna è costituita dalla matrice Sepharose a cui sono legati ioni Nichel in grado di interagire con la coda di istidine presenti nella proteina ricombinante. La cromatografia viene condotta ad un flusso di 1 ml/min.

Prima della carica al campione è aggiunto imidazolo 15 mM finale. Dopo aver raccolto la frazione di non legato, si allontanano le proteine debolmente legate alla colonna mediante lavaggio in tampone A, 40 mM Imidazolo. Le proteine legate sono successivamente eluite in tampone A, 250 mM Imidazolo.

Aliquote delle frazioni così raccolte vengono analizzate per la presenza di Lrs14 mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 15%. Le frazioni di interesse sono riunite e dializzate contro una soluzione 50 mM Tris-HCl pH 7.0 ed il campione concentrato mediante ultrafiltrazione (membrana YM10 (Millipore) con "cut-off" di 10 kDa.

### **Determinazione della massa molecolare della proteina Bald16 in condizioni native**

Al fine di determinarne la struttura quaternaria, la proteina ricombinante Bald16 è sottoposta ad una cromatografia per esclusione molecolare in condizioni native, usando come riferimento degli standard proteici a peso molecolare noto.

La colonna Superdex 75 PC 3.2/30 (Amersham Pharmacia Biotech) è collegata ad un sistema FPLC AKTÄ Explorer ed equilibrata in 50mM Tris-HCl, 0.2M KCl. Per misurare il volume escluso della colonna si caricano 50 µl di una soluzione 1 mg/ml di Blu Destrano 2000 ad un flusso di 40 µl/min.

Per la costruzione della retta di taratura, si caricano separatamente i seguenti marker di peso molecolare: albumina di siero bovino (65.4 kDa), ovalbumina (48.9 kDa), chimotripsinogeno (22.8 kDa), RNAsi A (15.6 kDa). Si caricano 10 µl di ciascuna soluzione (10 mg/ml) ad un flusso di 40 µl/min. Dopo aver determinato i volumi di eluizione dei vari standard, si caricano 50 µg della proteina purificata Bald16 nelle stesse condizioni e si determina il volume di eluizione. Tale valore è quindi interpolato con la retta di taratura ottenuta precedentemente, permettendo quindi la determinazione della massa molecolare della proteina.

### **Dicroismo circolare**

Gli spettri di dicroismo circolare sono registrati con uno spettropolarimetro Jasco810, adoperando il programma "Spectrum Measurement".

In ogni saggio sono utilizzati 20 µg delle proteine purificate Bald16, Lrs14 o Glx (una disolfuro-ossidoreduttasi di *Pyrococcus furiosus*) in 20 mM Tris-HCl pH 7.0, in un volume finale di 300 µl. Alle miscele proteiche sono aggiunte, di volta in volta, quantità crescenti di benzaldeide, per concentrazioni finali comprese tra 0.25 e 20 µM. Ai valori di ellitticità molare misurati sono sottratti i valori registrati per soluzioni contenenti la sola benzaldeide disciolta in 300 µl di 20 mM Tris-HCl pH 7.0, nelle concentrazioni finali utilizzate (bianco).

Tutti gli spettri sono registrati ad una temperatura di 25°C, in un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 190 e 260 nm. Per l'elaborazione dei dati raccolti si è utilizzato il programma "Spectrum Analysis", mentre le curve di saturazione sono costruite ricorrendo al programma "GraphPad" (Prism).

### **Analisi mediante Western blot**

I campioni proteici da analizzare per Western blot (10 µg) sono separati mediante SDS-PAGE. Al termine della corsa elettroforetica, il gel è equilibrato in tampone di trasferimento (25 mM Tris pH 8.0, 190 mM Glicina, 10% Metanolo). I campioni sono quindi trasferiti mediante "elettroblot" su membrana di polivinildiene fluoruro (PVDF) Immobilon P (Millipore) precedentemente immersa in metanolo per 10 sec allo scopo di favorire la perdita delle proprietà idrofobiche, lavata in acqua per 2 min e quindi equilibrata in tampone di trasferimento per 5 min. Il trasferimento su membrana è condotto per tutta la notte a 4°C a 48 mA costanti. Per apprezzare l'efficienza del trasferimento, il filtro è poi recuperato e colorato con una soluzione di rosso Ponceau 0.1% e quindi decolorato in H<sub>2</sub>O.

Allo scopo di saturare i siti aspecifici di interazione su filtro, quest'ultimo è incubato con la soluzione di "blocking" (5% polvere di latte non grasso in TTBS 1X: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20) in agitazione costante a temperatura ambiente per 1 h e 30 min. La membrana è poi reincubata per 1.5 h nella stessa soluzione in presenza di siero di coniglio contenente l'anticorpo diretto contro la proteina di interesse (Lrs14 o Bald16) in diluizione 1:15000. Per eliminare l'eccesso di anticorpo il filtro è sottoposto a tre lavaggi di 10 min in TTBS 1X. La membrana è quindi incubata in soluzione di "blocking" in presenza dell'anticorpo secondario, diretto contro la porzione costante Fc degli anticorpi primari di coniglio (Santa Cruz Biotechnology) e coniugato alla perossidasi di rafano, in diluizione 1:10000. Dopo un'incubazione di un'ora, per rimuovere l'eccesso di anticorpo si effettuano tre lavaggi in TTBS 1X di 15 min ciascuno. Per lo sviluppo della chemiluminescenza è utilizzato il kit ECL Plus (Amersham Pharmacia). L'acquisizione e la quantizzazione dei segnali di chemiluminescenza prodotti è effettuata mediante Chemi-doc (Biorad) utilizzando il programma Quantity One (Biorad).

### **Western blot semi-quantitativo**

Per determinare la rappresentatività di Bald16 e Lrs14 "in vivo" sono allestiti esperimenti di western blotting semi-quantitativi in cui nello stesso esperimento sono utilizzate quantità crescenti delle proteine ricombinanti purificate e due quantità degli estratti proteici di *S. solfataricus* cresciuti in presenza o in assenza di benzaldeide. Per la determinazione della rappresentatività di Bald16 "in vivo" sono utilizzati 10 ng, 20 ng, 30 ng e 40 ng di proteina ricombinante e 5 µg o 10 µg di estratto proteico di *S. solfataricus* cresciuto in assenza o in presenza di 1 mM benzaldeide. Per Lrs14, invece, sono utilizzati 5 ng, 10 ng, 15 ng, 20 ng di proteina ricombinante e 3 µg o 6 µg di estratti da *S. solfataricus* cresciuti nelle medesime condizioni. La chemiluminescenza prodotta è rivelata e quantizzata mediante Chemi-Doc (Biorad) utilizzando il programma Quantity One (Biorad). I segnali di chemiluminescenza delle proteine ricombinanti purificate sono analizzati, quantizzati ed utilizzati per costruire le rette di taratura relative alle rispettive proteine. Interpolando tali rette con i valori dei segnali ottenuti per gli estratti è possibile determinare la rappresentatività "in vivo" delle proteine d'interesse.

## Analisi delle interazioni proteina-DNA

### Preparazione dei frammenti di DNA dal promotore dell'operone Mar-like e dal promotore del gene *Ssadh* di *S. solfataricus*.

10 µg del vettore *pMar-likepr* sono digeriti con 30 U degli enzimi di restrizione *NsiI-EcoRI* nell'opportuno tampone, in un volume finale di 60 µl a 37°C per 2 ore. Dopo la digestione, i campioni sono precipitati con 3 M Na-acetato pH 5.2 e 2.5 volumi di etanolo freddo al 96% a -80°C e risospesi, dopo lavaggio con etanolo al 70%, in 20 µl di H<sub>2</sub>O deionizzata. Il promotore del gene *Ssadh*, clonato nel pUC18 (Cannio *et al.*, 1999), è invece digerito con la coppia di enzimi di restrizione *EcoRI-SacI*.

I frammenti d'interesse sono recuperati mediante elettroforesi in condizioni non denaturanti su gel di poliacrilammide al 5% in TBE 1x e successiva elettroeluzione in tubi da dialisi nello stesso tampone di corsa per 15 minuti a 120 V costanti.

Il contenuto dei tubi è raccolto ed estratto due volte con una soluzione di fenolo:cloroformio:alcool isoammilico (25:24:1 v/v) prima di essere precipitato a -80°C, centrifugato a 10000 x g a 4°C e risospeso in tampone TE o H<sub>2</sub>O sterile.

### Marcatura delle sonde *NsiI-EcoRI* ed *EcoRI-SacI*.

Le estremità dei frammenti ottenuti sono marcate mediante "fill-in" in una miscela di reazione contenente:

- 50 ng di DNA
- 1 µl del tampone Klenow 10x
- 1 mM di ciascun dNTP non marcato
- 1 µl di α-[<sup>32</sup>P]-dATP (3000 Ci/mmol)
- 2 U di frammento di Klenow
- H<sub>2</sub>O a 10 µl.

Le reazioni sono incubate a 37°C per 30 minuti, si aggiunge un altro µl di Klenow (2 U/µl) e si continua l'incubazione per ulteriori 15 minuti; i nucleotidi non incorporati sono rimossi mediante cromatografia per esclusione molecolare su una colonnina cromatografica G-50 (*nick-column*) equilibrata con TE. Aliquote delle frazioni raccolte sono analizzate allo scintillatore per la determinazione della radioattività incorporata (cpm).

### Saggio di ritardo della mobilità elettroforetica (EMSA).

Quantità variabili (0.04-6µM) di proteina Bald16 o Lrs14 (Bell and Jackson, 2000) risospese in tampone 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT e 5% glicerolo a cui si aggiunge 1µg di poli d-[I-C] in un volume finale di 15µl. La miscela è incubata a 60°C per 15 minuti prima di aggiungere 15000 cpm della sonda marcata e continuare l'incubazione a 60°C per ulteriori 30 min. Al termine dell'incubazione ai campioni si aggiungono 3 µl di colorante 6x (0.25% blu di bromofenolo, 0.25% xilene cianolo, 30% glicerolo) I campioni sono poi sottoposti ad elettroforesi in condizioni native, in tampone TBE 1x a 100 V costanti per circa un'ora su gel di poliacrilammide al 5%. Alla fine della corsa il gel è seccato in Gel-Dryer per 50 min a 80°C ed è esposto in presenza di una lastra autoradiografica a -80°C per la notte o al Personal Molecular Imager per tre ore.

Gli esperimenti per la determinazione della specificità di legame sono condotti nelle medesime condizioni, utilizzando 0.9 µM di proteina Lrs14 o 0.8 µM di Bald16 e

aggiungendo alla miscela di reazione quantità crescenti (0.8, 8, 80, 400 ng) di competitore non marcato (specifico o aspecifico). Come competitore specifico si utilizza un frammento contenente il promotore *ml-pr*, ottenuta mediante PCR a partire dal DNA genomico di *S. solfataricus* P2.

Come competitori aspecifici si utilizzano, alternativamente due frammenti di DNA, uno corrispondente alla regione codificante del gene *bald16*, l'altro relativo alla "coding sequence" del gene *Sso10b*.

Nei saggi EMSA per le determinazioni dei valori di  $K_d$ , sono stati utilizzate concentrazioni di proteina comprese tra 0.4  $\mu$ M e 4.2  $\mu$ M per Bald16 e tra 0.5  $\mu$ M e 4.8  $\mu$ M per Lrs14.

I saggi EMSA in presenza di benzaldeide sono stati condotti secondo il protocollo appena descritto utilizzando una concentrazione di proteina 2  $\mu$ M. In tal caso però, prima della preincubazione a 60°C, alle miscele di reazione sono aggiunte quantità variabili di BDH, per concentrazioni finali pari a 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 8  $\mu$ M e 10  $\mu$ M.

### Esperimenti di competizione di Lrs14-Bald16 per l'SsAdh-promotore

Per saggiare la competizione delle proteine Bald16 e Lrs14 per il promotore "SsAdh" sono allestiti saggi di ritardo della mobilità elettroforetica in cui una delle due proteine (2  $\mu$ M Bald16 o 2.4  $\mu$ M Lrs14) è fatta interagire nelle condizioni precedentemente descritte, mentre l'altra è aggiunta nelle varie mix di reazione alternativamente al tempo zero, dopo 10 o 20 minuti. I campioni così ottenuti sono lasciati incubare per un tempo totale di 30 min a 60°C. Al termine della reazione, i campioni sono sottoposti ad elettroforesi come descritto in precedenza.

### Super shift

Il saggio di "super-shift" è effettuato nelle stesse condizioni descritte per il saggio EMSA (utilizzando 2.4  $\mu$ M di Lrs14 e 2 $\mu$ M di Bald16) ad eccezione che al termine dell'incubazione di 30 min a 60°C sono aggiunti gli anticorpi (2 $\mu$ l di antisiero) diretti contro Bald16 e/o Lrs14 e si prosegue l'incubazione per 15 min a temperatura ambiente prima di sottoporli ad elettroforesi in condizioni native, in tampone TBE 1x.

## Footprinting

### Preparazione promotore dell'operone *Mar-like* marcato.

Il frammento *Mar-like pr* è stato ottenuto tramite PCR utilizzando un oligonucleotide marcato terminalmente. La regione di DNA amplificata è di circa 340 bp ed è ottenuta utilizzando la coppia di oligonucleotidi:

*Marfw* 5' - CTATTGGATCGATGGGTTGC - 3'  
*foot pUC19p* 5' - CGGCCAGTGAATTTCGAGCT - 3'.

Questi due primers complementano su uno stampo di DNA costituito dal plasmide *pMar-likepr* in cui, come descritto precedentemente è clonata la regione posta al 5' dell'operone *Mar-like*.

L'oligonucleotide *foot pUC19p* è marcato all'estremità 5' con T4 Polinucleotide chinasi (PNK, Roche) e  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP secondo il protocollo di seguito descritto.

Si prepara una miscela di reazione così costituita:

- *foot pUC19p* 100 ng
- $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP 30  $\mu$ Ci (3 $\mu$ l)
- PNK *buffer* 1x

- PNK 10 U  
a 10 µl con acqua.

La miscela viene incubata per 30 minuti a 37 °C, dopodiché si inattiva la PNK a 95°C per due minuti. Quindi si allestisce la reazione di PCR:

- *foot pUC19p* marcato 5 µl (~50 ng)
- *Marfw* non marcato 50 ng
- DNA stampo 25 ng
- *Taq buffer* 1x
- dNTP *mix* 0,2 mM
- *Taq* DNA polimerasi 5 U
- a 50 µl con acqua.

La reazione di polimerizzazione a catena è automatizzata secondo il programma precedentemente visto.

Il prodotto di amplificazione è rivelato tramite elettroforesi su gel d'agarosio 1%, è purificato mediante il *QIAquick PCR Purification Kit* della Qiagen ed è risospeso in 30 µl di acqua sterile.

### Preparazione dei campioni.

Le miscele di reazione sono così composte:

- *Marfw* marcato 500/1000 cps
- Poli d-[I-C] 1 µg
- tampone di reazione 1x
- proteina 1.5-4 µg
- a 50 µl con acqua.

Il tampone di reazione è così composto: 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 5% glicerolo.

I campioni sono incubati per 30 minuti a 60 °C per consentire alle proteine di interagire con il frammento marcato di interesse. Al termine dell'incubazione ai campioni sono aggiunte 500 mU di enzima DNAsil RNasi-free e si incuba per un ulteriore minuto a 60°C. La reazione viene poi bloccata per aggiunta di 250 µl di soluzione TENS (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 750 mM NaCl, 0.5% SDS). I campioni sono quindi sottoposti a purificazione mediante estrazione con fenolo: cloroformio: alcool isoammilico e precipitazione con etanolo in presenza di 10 µg di tRNA. Il pellet viene infine ripreso in 20 µl di TE pH 8.0. 200/300 cps di ogni campione sono poi sottoposte, dopo denaturazione per 3 minuti a 85°C, ad elettroforesi in condizioni denaturanti su gel di poliacrilammide/urea al 6%.

Sullo stesso gel è caricato anche un ladder di sequenza realizzato sul plasmide contenente il promotore *ml-pr*, utilizzando come primer d'innescio l'oligonucleotide *foot pUC19p* e come tracciante radioattivo α-[<sup>35</sup>S]-dATP.

La corsa si effettua con le stesse modalità seguite per la reazione di "primer extension". Il gel è seccato in Gel-Dryer per un'ora a 80°C ed è esposto per autoradiografia a -80°C per la notte o al Personal Molecular Imager per tre ore.



## Analisi delle interazioni proteina-proteina

### Co-immunoprecipitazione di estratti proteici

Per gli esperimenti di co-immunoprecipitazione 200 µg di estratto proteico totale di *S. solfataricus* P2 (ottenuto da colture cresciute in presenza e in assenza di BDH) sono incubati in presenza di 5 µl di siero immune contenente gli anticorpi primari α-Bald16, α-Lrs14 o un anticorpo non specifico per le proteine d'interesse (usato come controllo negativo) in un volume finale di 1 ml di tampone "Co-Ip buffer" così composto: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerolo e 0.1% Triton X-100.

L'incubazione dei campioni con i rispettivi anticorpi è condotta per 2 h, in agitazione continua a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione ad ogni campione sono aggiunti 40 µl di resina proteina-A Sefarosio (Amersham Pharmacia) e l'incubazione è quindi protratta per 16 ore a 4°C in rotazione continua. Successivamente, i campioni sono sottoposti ad una breve centrifugazione. Allontanato il surnatante, si sottopone la resina immunoprecipitata a 3 lavaggi di 15 min con tampone "Co-Ip buffer" freddo. Al termine dei lavaggi, i campioni sono risospesi in 35 µl di tampone di caricamento sottoposti ad SDS-PAGE e trasferimento su membrana di PVDF per la successiva analisi per Western-blot. Al fine di verificare l'interazione delle proteine in esame, i campioni che erano stati immunoprecipitati con anticorpi α-Bald16 sono rivelati con anticorpi α-Lrs14 e viceversa.

### Co-immunoprecipitazione in presenza di DNasil e bromuro d'etidio

Per determinare se l'interazione tra le proteine d'interesse possa essere mediata dal DNA esperimenti di co-immunoprecipitazione sono condotti in presenza di bromuro di etidio. Ai campioni è aggiunto infatti l'agente intercalante ad una concentrazione di 50 µg/ml. Alternativamente gli estratti proteici da sottoporre ad immunoprecipitazione sono preventivamente sottoposti a trattamento con DNasil (0.5 U/µl di reazione) per 30 min a 37°C. Gli esperimenti di co-immunoprecipitazione proseguono poi come precedentemente descritto.

### Co-immunoprecipitazione con proteine ricombinanti

Per verificare se l'interazione tra le proteine Bald16 ed Lrs14 possa essere mediato da altri fattori proteici si sono allestiti saggi di co-immunoprecipitazione con le proteine ricombinanti purificate. Per favorirne l'interazione, 5 µg delle proteine Bald16 ed Lrs14 o alternativamente di SsPdo (controllo negativo) sono incubati per 2 h in agitazione continua in un volume finale di 1 ml di tampone Co-Ip buffer. Il campione Bald16/Lrs14 è immunoprecipitato alternativamente con anticorpi α-Bald16 o α-Lrs14, i campioni Bald16/SsPdo e Lrs14/SsPDO sono immunoprecipitati con anticorpi α-SsPDO. Tutti i campioni sono immunoprecipitati per 3 h a temperatura ambiente. Dopodichè ad ogni campione sono aggiunti 15 µl di resina proteina-A Sefarosio e l'incubazione prolungata per tutta la notte a 4°C in rotazione continua. Si procede quindi come descritto in precedenza ad un'analisi per Western-blot.

### Saggio di Pull-Down

Il saggio di pull-down, per verificare l'interazione diretta proteina-proteina, sfrutta la presenza della coda di istidine della proteina ricombinante Lrs14 e quindi la sua affinità per la resina Ni-NTA (Qiagen). Le proteine purificate Lrs14 (20 µg o 40 µg) e Bald16 (20 µg) sono pre-incubate (in presenza o in assenza del promotore dell'alcool deidrogenasi, 80 ng) a 60°C per 15 min in tampone di legame (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT e 5% glicerolo). Al termine della pre-

incubazione, ai campioni sono aggiunti 20  $\mu$ l di resina Ni-NTA (Qiagen), precedentemente saturata (per evitare interazioni aspecifiche) con una soluzione di BSA 3%. I campioni sono quindi incubati per ulteriori 10 min a temperatura ambiente in agitazione continua. Uguali quantità di resina sono aggiunte anche ai campioni contenenti la proteina Bald16 20 ( $\mu$ g) o Chimotripsinogeno (20  $\mu$ g) singolarmente (quali controlli negativi). Al termine dell'incubazione la resina è lasciata decantare e quindi sottoposta a tre lavaggi con 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Terminati i lavaggi i campioni di resina sono risospesi in adeguato volume di loading buffer 1x, riscaldati a 100°C per 5 minuti e quindi sottoposti ad SDS-PAGE e colorazione con Coomassie Brilliant blue.

## Realizzazione dei costrutti reporter

### Realizzazione del costrutto *MinipUC28-EGFP*

#### Isolamento del gene *egfp*

Il gene *egfp* è stato "recuperato" dal plasmide commerciale pEGFP-C3, effettuando delle singole digestioni con gli enzimi di restrizione *NheI/XbaI* ad estremità compatibili. Poiché nel vettore originario il sito riconosciuto da *XbaI* cade in una sequenza di metilazione, per poter effettuare la digestione con l'enzima di restrizione è stato necessario trasformare il plasmide in un ceppo di *E. coli* (GM2163  $\text{Dam}^-$ ) che fosse privo di attività metilasi. In seguito alla digestione del plasmide pEGFP-C3 con le due endonucleasi, si è ottenuto un frammento di circa 800 bp, corrispondente al gene *egfp* più una parte del "polylinker" a valle del gene. Tale frammento di DNA è stato purificato dopo elettroforesi su gel di agarosio al 1% mediante l'utilizzo del "QIAEX II gel extraction Kit" (Qiagen) e ne è stata determinata la concentrazione.

#### Ligasi del gene *egfp* nel vettore *MinipUC28*

Il vettore *minipUC28* (gentilmente fornito dal Dr. Cannio) è un vettore plasmidico di circa 1.9 kb costituito dalle sole sequenze polylinker, *pBR322 ori* e *Amp<sup>r</sup>* dal quale sono state eliminate tutte le sequenze di regolazione. Tale vettore è stato adattato tramite opportune digestioni in modo da poter fungere, in un primo momento, come vettore recipiente del gene reporter *egfp*.

10  $\mu$ g del vettore sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *XbaI*. Il plasmide linearizzato è stato poi defosforilato, purificato e ligato in un rapporto molecolare di 1:1 al gene *egfp* precedentemente isolato. 2  $\mu$ l della miscela di ligasi sono stati utilizzati per trasformare, mediante elettroporazione, cellule *TOPF<sup>10</sup>* di *E. coli* e le cellule trasformate sono state piastrate su LB-agar-ampicillina (100  $\mu$ g/ml). La reazione della ligasi è avvenuta con buona efficienza e le colonie selezionate sono state poste a crescere in 5 ml di terreno contenente ampicillina. Da tali colonie è stato estratto il DNA plasmidico che è stato sottoposto ad analisi di restrizione per verificare l'esito del clonaggio. Uno dei cloni ricombinanti è stato poi scelto per il successivo clonaggio dell'*Ssadh-pr* e del promotore *ml-pr*.

### Realizzazione del costrutto *pSsAdh-prEGFP*

#### Isolamento della sequenza *Ssadh-pr* e ligasi nel vettore *MinipUC28-EGFP*

10  $\mu$ g del vettore pUC18-*Ssadhpr*, sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *HindIII* il cui sito di taglio si trova subito a monte dell'*Ssadh-pr*. Dopo tale digestione, il plasmide linearizzato è stato digerito con l'enzima *NcoI* che taglia all'estremità 3' del promotore. Il frammento così ottenuto è stato poi sottoposto a reazione di "fill-in"

mediante l'utilizzo del frammento di Klenow della DNA polimerasi. In seguito, il frammento è stato purificato e ne è stata determinata la concentrazione.

Contemporaneamente, 10 µg di vettore *minipUC28-EGFP* sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *NcoI* il cui unico sito di restrizione è posizionato a monte del gene *egfp*. Il DNA è stato estratto, precipitato e le estremità rese nette mediante "fill-in". Il plasmide linearizzato è stato poi defosforilato e legato con il frammento *Ssadh-pr* in un rapporto molecolare di 1:2.

La miscela di ligasi (2µl) è stata utilizzata per trasformare, mediante elettroporazione, cellule TOPF'10 di *E.coli* e le cellule trasformate sono state piastrate su LB-agar-ampicillina (100 µg/ml). Le colonie selezionate sono state poste a crescere in terreno contenente ampicillina. Da tali colonie è stato estratto il DNA plasmidico che è sottoposto ad analisi di restrizione con l'enzima di restrizione *BamHI* per individuare i cloni ricombinanti e stabilirne l'orientamento.

### **Realizzazione del costrutto *pMI-prEGFP***

#### **Isolamento della sequenza *ml-pr* e ligasi nel vettore *MinipUC28-EGFP***

Il promotore dell'operone "Mar-like" di *Sulfolobus solfataricus*, è stato isolato dal vettore *pMar-likepr* (10 µg) mediante doppia digestione con la coppia degli enzimi di restrizione *EcoRI/XbaI* ed il risultante frammento di circa 300 bp *ml-pr*, è stato purificato ed adattato per il successivo clonaggio mediante riempimento delle estremità "5' protruding" con il frammento di Klenow.

Il vettore *minipUC28-EGFP* è stato invece linearizzato mediante digestione con l'enzima di restrizione *EcoRV* e successivamente defosforilato alle estremità 5' e purificato mediante elettroeluizione. Il vettore è stato poi legato con il frammento del promotore *ml-pr* in un rapporto molecolare di 1:2.

La miscela di ligasi è stata utilizzata per trasformare, mediante elettroporazione, cellule TOPF'10 di *E.coli*, e le cellule trasformate sono state piastrate su terreno selettivo. Le colonie ottenute sono state poste a crescere in terreno LB contenente ampicillina. A partire da tali crescite è stata effettuata una minipreparazione del DNA plasmidico sottoposto poi ad analisi di restrizione con l'enzima *SacI* al fine di controllare l'orientamento dell'inserto.

#### **Analisi dei livelli di espressione della EGFP**

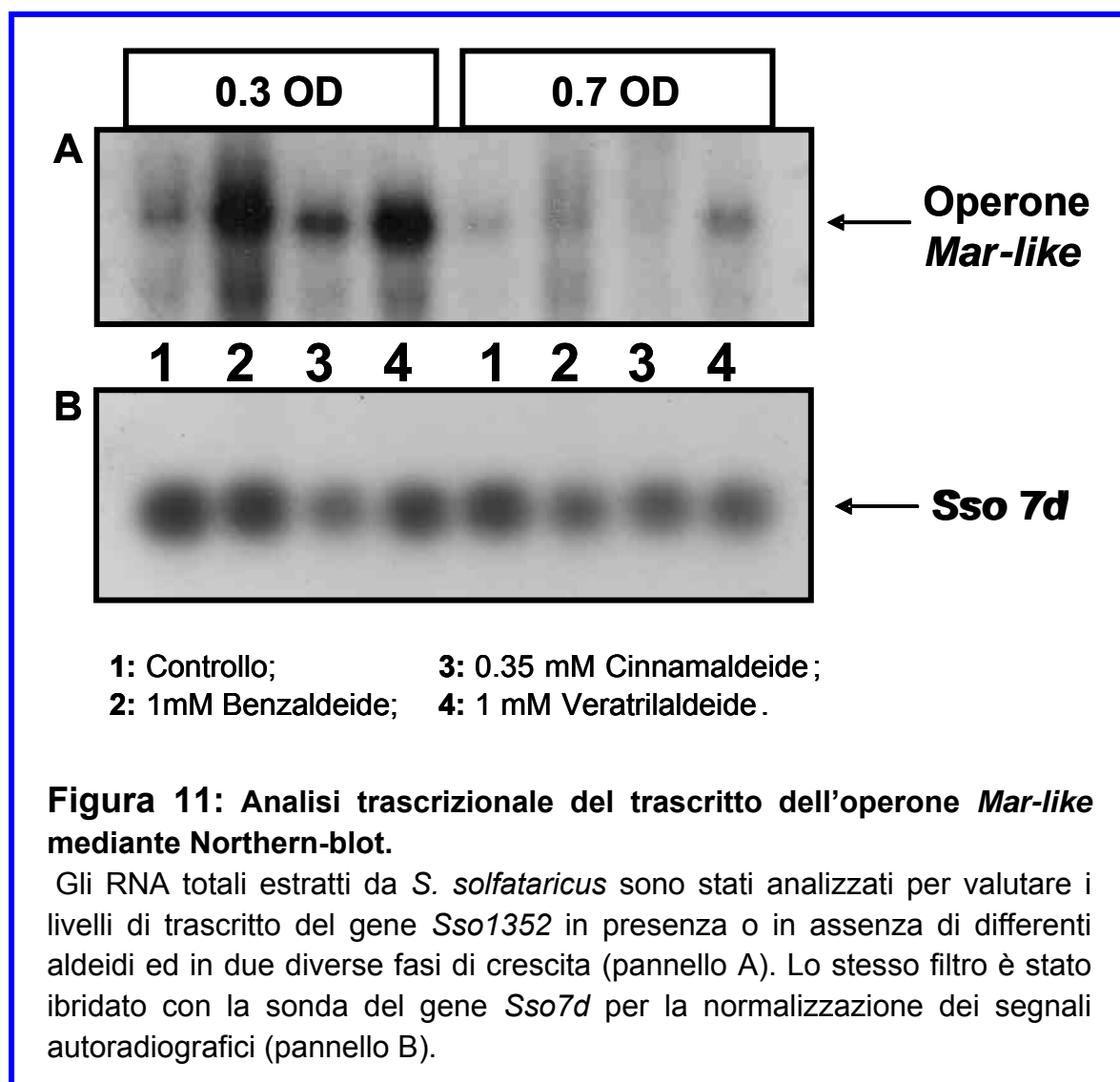
Aliquote di 1 ml da colture cellulari di *E. coli* trasformate con i vari costrutti plasmidici, contenenti il gene *egfp* sono centrifugate a 4000 rpm in una microcentrifuga da banco per 10 minuti, a temperatura ambiente. Le cellule sono in seguito risospese in un ugual volume di PBS (Phosphate Buffer Saline) contenente paraformaldeide 4% per essere fissate. Il fissaggio è protratto per 10 minuti al termine dei quali, i batteri sono stati ricentrifugati come indicato sopra e lavati tre volte in PBS. I campioni da osservare al microscopio si ottengono risospedendo i batteri fissati e lavati, in 200 µl di PBS. Aliquote di 10 µl si dispongono su vetrini di microscopia e si immobilizzano con agarosio 1% sciolto in PBS. I campioni sono osservati al microscopio a fluorescenza (OLYMPUS U-RFL-T), con un obiettivo ad immersione (100x) ed un set di filtri per fluorescenza.

## RISULTATI

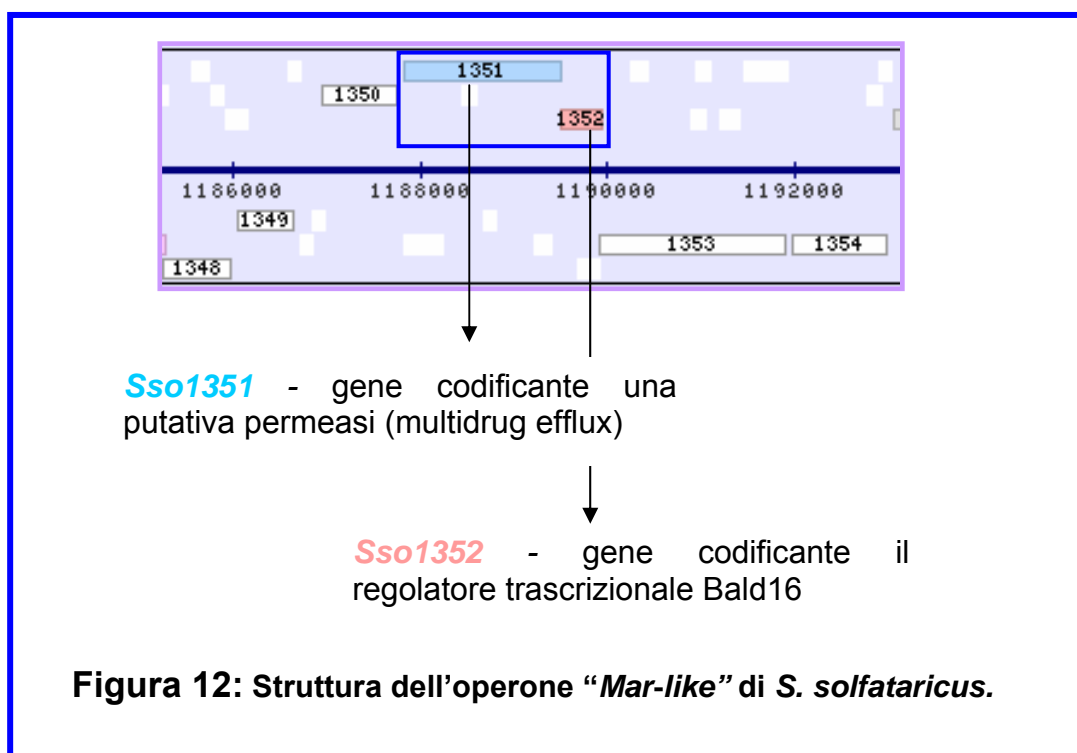
### Analisi trascrizionale dell'operone *Mar-like* di *S. solfataricus* ceppo P2

#### Determinazione dei livelli di trascritto mediante Northern blot

Al fine di valutare l'effetto di diverse aldeidi aromatiche sull'espressione del gene codificante la proteina Bald16 (annotato sul genoma di *S. solfataricus* P2 come *Sso1352*), sono stati analizzati i livelli dello specifico trascritto in cellule del ceppo P2 di *S. solfataricus* cresciute in terreno DSM182 pH 3.8 in presenza di differenti aldeidi aromatiche e raccolte sia in fase di crescita esponenziale sia in fase stazionaria. Precedentemente erano state determinate le concentrazioni delle varie aldeidi, tali da rallentare ma non inibire la crescita cellulare (dati non mostrati). Gli RNA totali estratti sono stati analizzati mediante Northern blot utilizzando come sonda il gene *bald16* di *S. solfataricus* P2 (Figura 11).



L'ibridazione ha evidenziato un'unica banda, di peso molecolare diverso da quello atteso, presente in tutte le condizioni di crescita analizzate, notevolmente più abbondante in fase di crescita esponenziale. Considerando, infatti, gli RNA ribosomali come marcatori di peso molecolare, la banda di interesse presenta una migrazione pari a quella di un trascritto di circa 2100 nucleotidi; un segnale più alto di quello relativo al trascritto del gene *bald* che codifica per una proteina di 144 amminoacidi. L'analisi del genoma nella regione di interesse ha di fatto evidenziato la presenza di due putative "orf" sovrapposte di 1 bp, la cui lunghezza totale risulta compatibile con le dimensioni del segnale osservato. A monte del gene *bald* è presente una cornice di lettura aperta, annotata sul genoma come *Sso1351*, codificante per una putativa permeasi deputata all'efflusso di droghe (**Figura 12**). Tali dati hanno quindi evidenziato l'esistenza di un trascritto bi-cistronico che oltre a contenere il messaggero del gene *bald16* contiene anche il messaggero della putativa permeasi di membrana. Tale strutturazione genica contribuisce ulteriormente ad attribuire la proteina Bald alla famiglia dei geni *Mar* e l'operone identificato è stato pertanto da noi indicato come operone *Mar-like*.



Dall'analisi dell'intensità dei segnali autoradiografici risulta evidente che l'induzione più elevata del gene *bald16* (e quindi anche della permeasi) si osserva in cellule cresciute in presenza di benzaldeide (BDH) e di veratrilaldeide (VDH), sia in fase esponenziale che in fase stazionaria; un segnale di intensità inferiore rispetto a questi ultimi, ma comunque superiore al controllo si è avuto anche per la crescita con cinnamalaldeide (CDH), ma solo nella fase esponenziale di crescita cellulare. L'analisi densitometrica (Personal Fx Phosphorimager Bio-Rad) ha permesso di quantizzare i livelli di induzione dell'operone *mar-like*. Da tale analisi risulta che, in fase di crescita esponenziale, i livelli di trascritto sono circa 10 volte maggiori in cellule cresciute in presenza di BDH e VDH e circa 4 volte maggiori in cellule cresciute in presenza di CDH rispetto al controllo rappresentato da cellule non trattate con alcuna aldeide.

Per normalizzare i segnali autoradiografici, lo stesso filtro è stato ibridato con una sonda relativa al gene codificante per la proteina Sso7d di *S. solfataricus*, la cui espressione risulta essere costitutiva. Tale normalizzazione è stata ulteriormente validata dall'osservazione che la quantità di RNA ribosomale trasferito sul filtro era paragonabile all'intensità dei segnali relativi al trascritto Sso7d.

### **Determinazione del sito di inizio della trascrizione dell'operone *Mar-like* mediante primer extension**

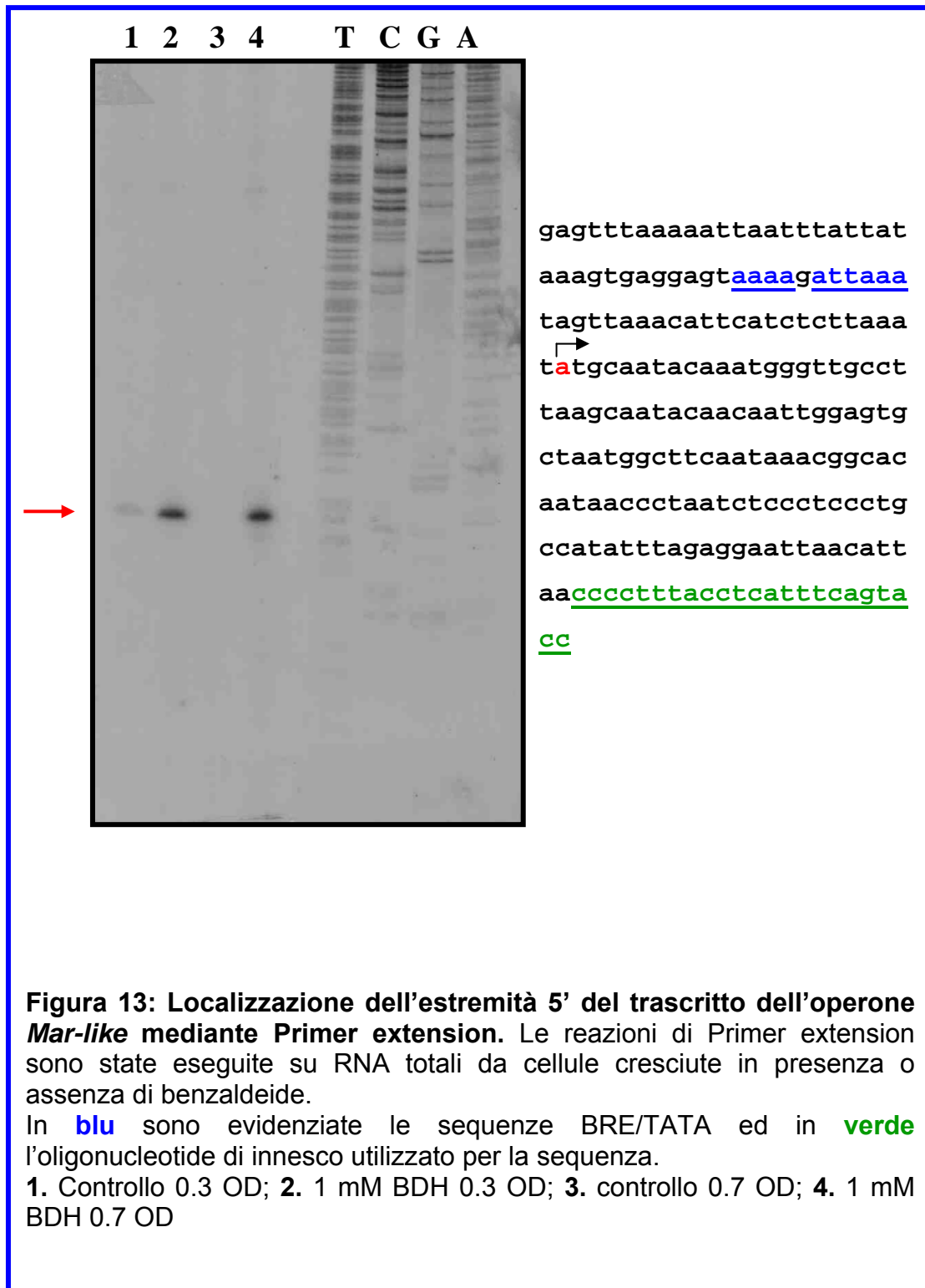
Allo scopo di identificare il sito di inizio della trascrizione dell'operone *Mar-like* si è effettuato un esperimento di "primer extension".

Tale analisi è stata condotta sugli stessi RNA totali utilizzati per il Northern blot. Sulla base dei risultati di tale esperimento, si è deciso di analizzare gli mRNA provenienti da cellule di controllo e da cellule cresciute in presenza di benzaldeide. I risultati ottenuti mediante primer extension (**Figura 13**) hanno confermato che la trascrizione del gene *Sso1351* è incrementata in cellule cresciute in presenza di BDH (corsie 2 e 4) rispetto al controllo non trattato (corsie 1 e 3). Lo stesso andamento si verifica sia per le cellule raccolte in fase esponenziale (corsie 1 e 2), sia per quelle raccolte in fase stazionaria (corsie 3 e 4). Questi dati, dunque, confermano pienamente quelli già ottenuti tramite Northern blot.

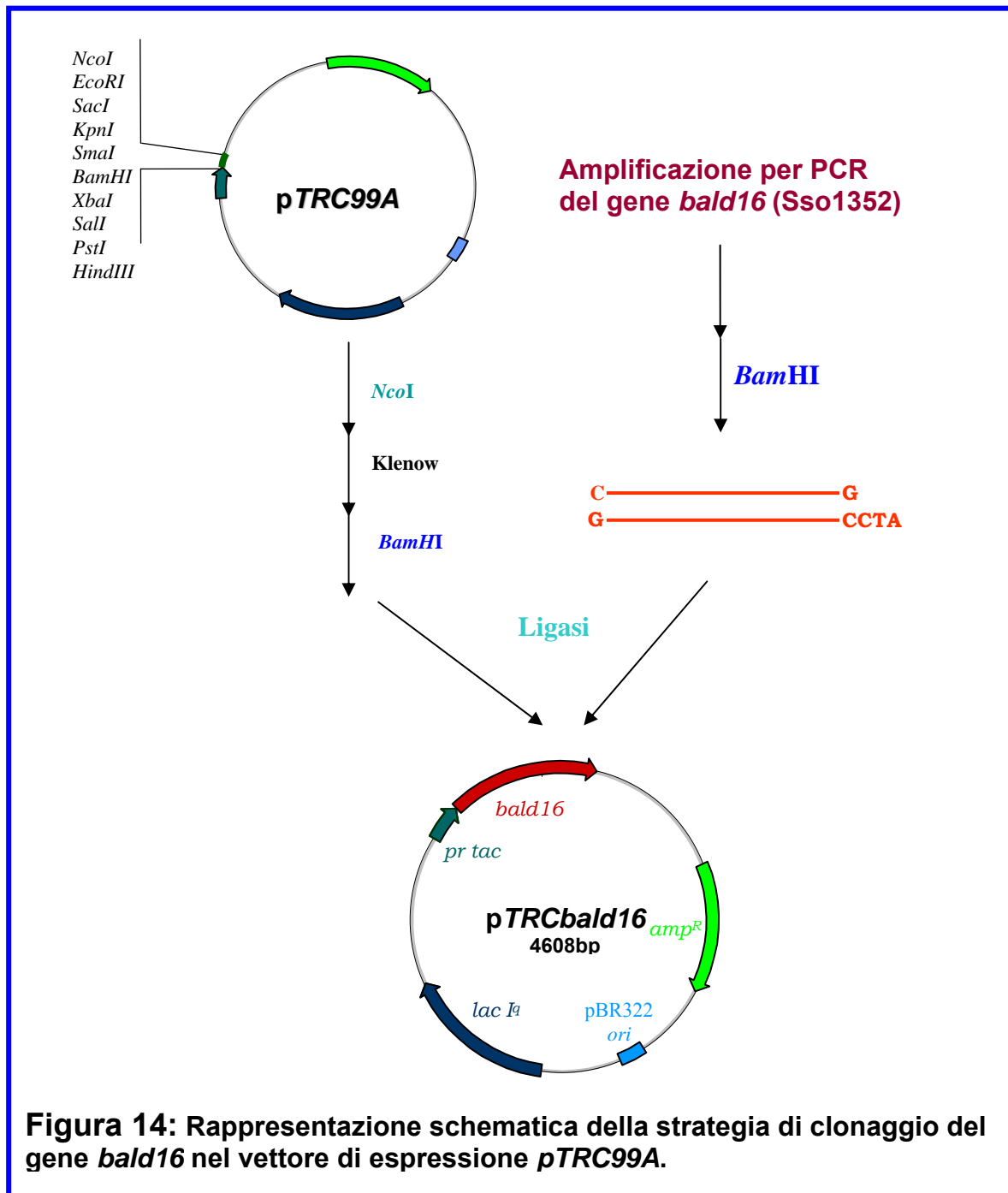
La reazione di sequenza eseguita sul plasmide, contenente la regione del promotore dell'operone *Mar-like* (*pMar-like prext*) ed ottenuta utilizzando lo stesso oligonucleotide (*Marext*) sfruttato per la reazione di primer extension, ha altresì consentito l'identificazione del sito di inizio della trascrizione dell'operone. Come è possibile osservare in figura, tale sito coincide con il residuo nucleotidico di adenina appartenente al codone di inizio della traduzione. Dall'analisi della regione posta immediatamente a monte si è riusciti ad identificare la putativa sequenza TATA (ATTAAA). Tale sequenza, che presenta un *consensus* dell'83.3% rispetto alla sequenza canonica ( ${}^T/C TTA {}^T/A A$ ) di altri promotori archaeali (Dalgaard and Garrett, 1993), risulta centrata a -27 nt rispetto al sito di inizio trascrizionale. A -33 nt rispetto allo stesso sito si è potuto poi individuare uno *stretch* di adenine (AAAA) in cui è identificabile la sequenza BRE, principale responsabile dell'orientamento del complesso di inizio della trascrizione.

### **Clonaggio e prove di espressione del gene *bald16* in *E. coli***

Il gene *bald16* è stato amplificato dal DNA genomico di *S. solfataricus* P2 mediante reazione di PCR con l'utilizzo di una coppia di oligonucleotidi disegnati sulla base della sequenza della *orf1352* (She *et al.*, 2002). L'oligonucleotide a monte (Bald16up) fosforilato al 5' è stato disegnato a partire dal secondo codone, in maniera tale che come ATG d'inizio della traduzione venisse usato quello del plasmide pTrc99a; al 3' è stato utilizzato un oligonucleotide (Bald16dw) che a valle del codone di terminazione traduzionale, inseriva il sito di restrizione per l'enzima *Bam*HI. Per consentire l'inserimento del prodotto di amplificazione, il vettore di



espressione *pTrc99A* è stato digerito con l'enzima di restrizione *NcoI*, sottoposto a reazione di riempimento dell'estremità 5' "protruding" mediante reazione con l'enzima Klenow e successivamente digerito con l'enzima *BamHI*. Il prodotto di amplificazione è stato anch'esso digerito con l'enzima *BamHI* e quindi inserito nel vettore di espressione (**Figura 14**); i cloni ricombinanti selezionati su terreno solido contenente l'antibiotico ampicillina, sono stati identificati mediante analisi di restrizione e sequenziamento. Uno dei cloni aventi la sequenza nucleotidica corretta (di seguito indicato come *pTrcbald16*) è stato utilizzato per trasformare cellule di *E. coli* RB791.





Per l'ottenimento della massima quantità di proteina ricombinante sono state determinate le condizioni ottimali di espressione variando sia le concentrazioni di induttore (IPTG) che il tempo di induzione e la fase di crescita cellulare in cui avveniva l'induzione.

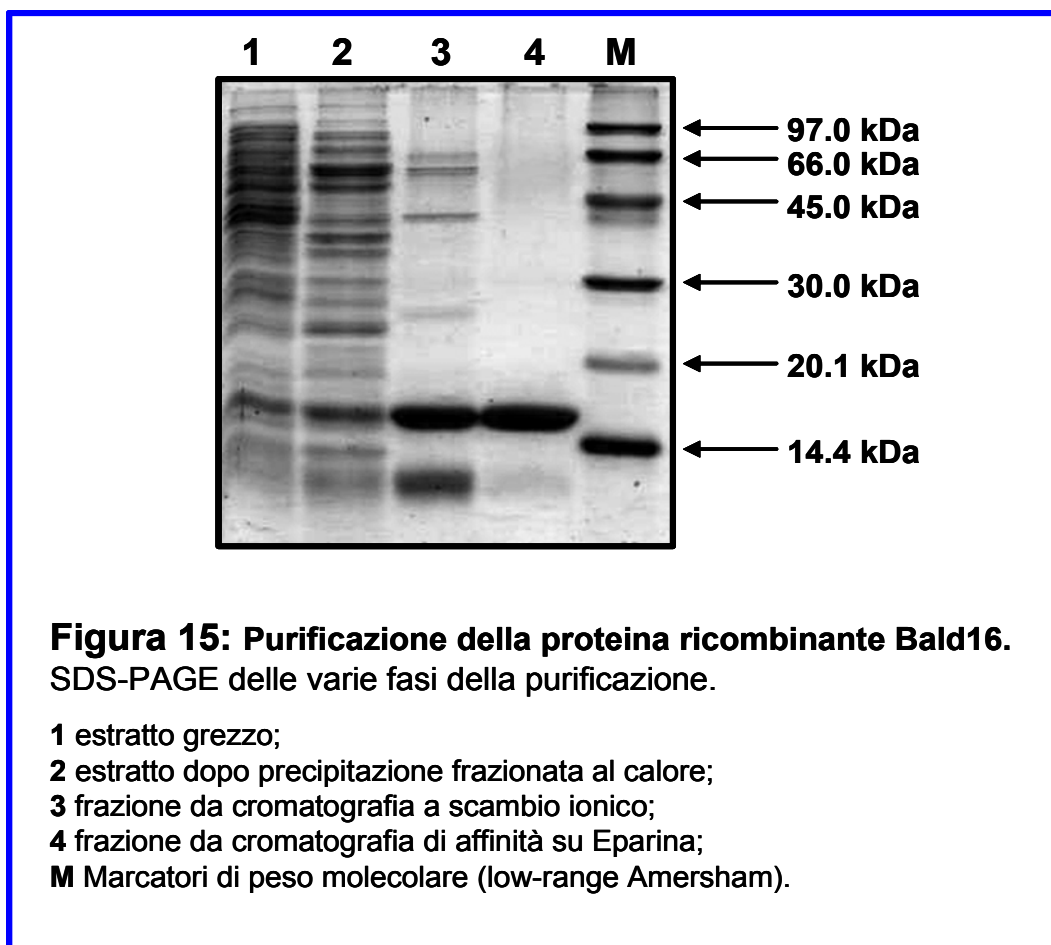
Dall'analisi di tutti gli esperimenti è emerso che le condizioni ottimali per l'espressione del gene codificante la proteina Bald16 risultano essere quelle in cui le cellule sono indotte al raggiungimento di circa 1 OD<sub>600nm</sub> con una concentrazione di induttore di 1 mM e per un tempo di induzione pari a una notte (16 h); condizioni che sono poi state utilizzate per l'espressione su larga scala.

### Espressione e purificazione della proteina ricombinante Bald16

Per la caratterizzazione funzionale della proteina ricombinante Bald16, è stato necessario disporre di quantità soddisfacenti della proteina pura; a tal scopo si è messo a punto un protocollo di purificazione su scala preparativa.

Una singola colonia di cellule *E. coli* RB791 contenente il plasmide *pTrcbald16* è stata cresciuta su terreno selettivo solido, è stata inoculata in un litro di terreno LB con l'opportuno antibiotico e l'espressione della proteina indotta come descritto precedentemente.

L'estratto proteico ottenuto, è stato sottoposto ad una serie di passaggi di purificazione, volti ad isolare la proteina ricombinante Bald16 sfruttando le sue caratteristiche di termostabilità, di carica e la sua capacità di legame al DNA. Quale primo passaggio di purificazione, l'estratto grezzo è stato sottoposto a precipitazione



frazionata al calore mediante riscaldamento a 65°C per 10' al fine di ottenere la denaturazione e il conseguente allontanamento delle proteine termolabili dell'ospite mesofilo. Successivamente, il campione è stato sottoposto ad una cromatografia a scambio cationico a pH 7.0 affinché la proteina ricombinante Bald16, con un punto isoelettrico calcolato di 9.4, risultasse carica positivamente e potesse legare i gruppi scambiatori della fase stazionaria. Le frazioni cromatografiche risultanti sono state analizzate mediante SDS-PAGE e quelle contenenti la proteina d'interesse riunite, dializzate e sottoposte ad un ulteriore passaggio di purificazione.

Il secondo passaggio cromatografico è stato effettuato su una colonna di Eparina-Sefarosio i cui gruppi funzionali della fase stazionaria sono dei polisaccaridi che mimano la struttura del DNA. Bald16 è stata anche in questo caso trattenuta dalla fase stazionaria, permettendo l'allontanamento delle altre proteine contaminanti. Da 1 l di coltura di *E.coli Rb791*, trasformata con il costrutto pTrc99Bald16, è stato possibile in media ottenere 3 mg di proteina omogenea (**Figura 15**). Per identificare le frazioni attive al termine di ogni passaggio di purificazione sono stati eseguiti saggi EMSA in presenza del promotore *SsoAdh*.

## Caratterizzazione strutturale e funzionale della proteina Bald16

### Analisi bioinformatiche

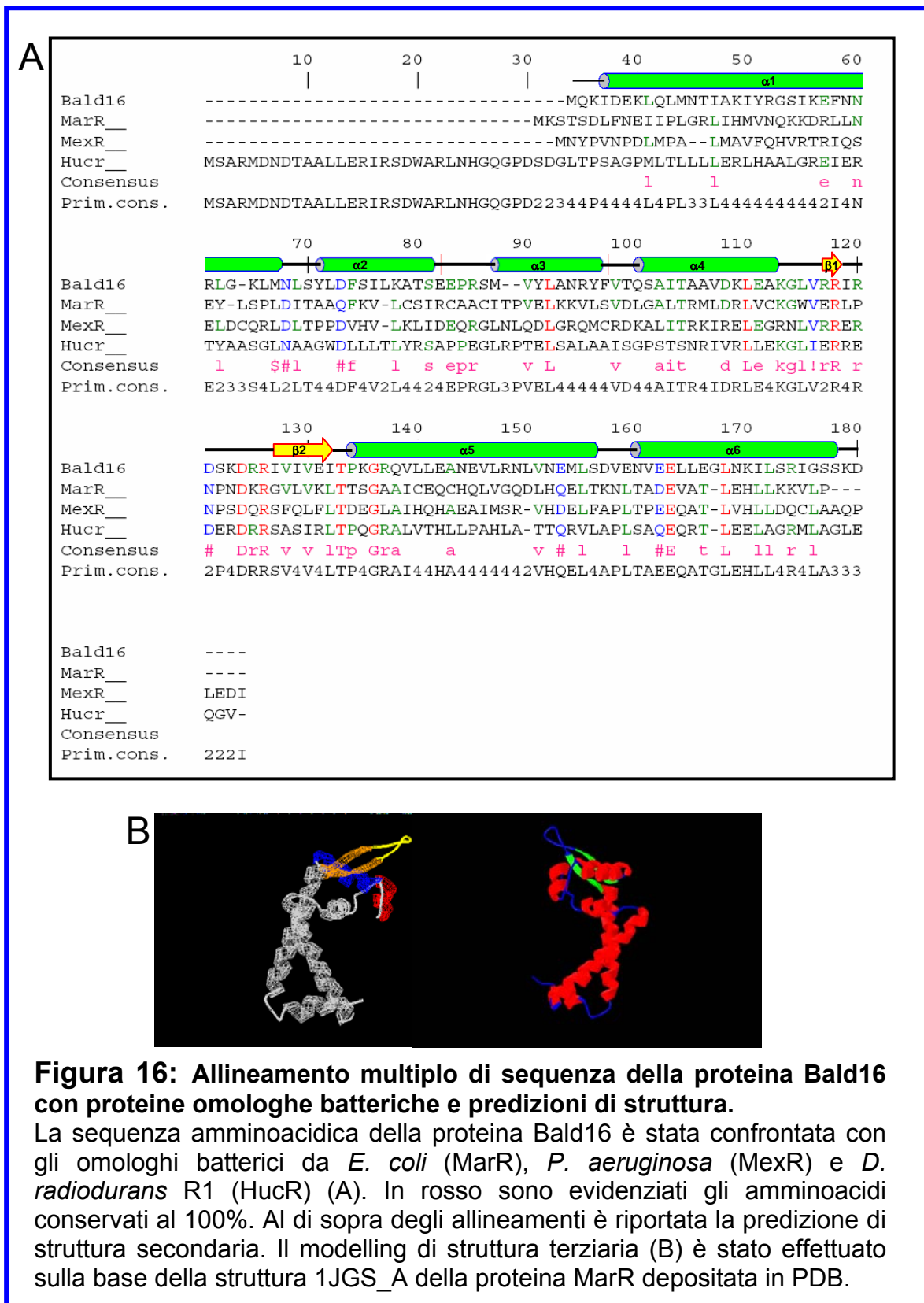
L'ORF *Sso1352* di *Sulfolobus solfataricus* codifica per una proteina di 144 aa attribuita alla famiglia dei geni *MarR* (per la presenza del dominio strutturale conservato di legame al DNA **HTH\_MARR Helix Turn Helix Multiple Antibiotic Resistance**). Allineamenti di sequenza tra la proteina in questione, da noi denominata Bald16, ed il capostipite di tale famiglia, il fattore trascrizionale MarR di *E. coli* (Alekhun M.N. et al. 2001), hanno mostrato una identità del 18% ed una similarità del 33%.

Il confronto in banca dati, mediante l'uso del programma BlastP, della sequenza amminoacidica ha restituito una lunga lista di proteine omologhe, la maggioranza delle quali appartenenti alla famiglia *Mar*, i cui i valori di identità maggiori sono risultati essere relativi a proteine archeali o di batteri Gram positivi, anche se con valori di identità inferiori. Allineamenti multipli di sequenza tramite il programma MultAlign ristretti alla componente archeale, hanno dato un elevato grado di identità, dal 55% del crenarchaeota *S. tokodaii*, al 33% di *Aeropyrum pernix*. Da tale allineamento è risultata evidente la presenza di diversi residui amminoacidici conservati al 100%.

La presenza in banca dati di diversi omologhi batterici caratterizzati sia strutturalmente che funzionalmente ha permesso di ottenere allineamenti multipli con alcuni di essi, da cui è stato possibile estrapolare diverse utili informazioni (**Figura 16**). In particolare dall'allineamento è risultato che 5 dei 9 residui conservati al 100% cadono nel dominio responsabile dell'interazione con il DNA, 3 nel "wing motif" e due nell' $\alpha$ -elica immediatamente adiacente.

Il confronto diretto delle sequenze amminoacidiche di Bald16 e MarR ha inoltre evidenziato che i residui importanti in MarR per l'interazione con il ligando (salicilato) (ref) risultano conservati in Bald16. In particolare si tratta dei residui Thr<sup>72</sup> ed Arg<sup>86</sup> del sito SAL-A, ed Ala<sup>70</sup> nel sito SAL-B. L'altro residuo interessato nel legame al salicilato nel sito SAL-B, Arg<sup>77</sup>, risulta sostituito in Bald16 da una lisina. Ugualmente mantenuta è la presenza di due residui idrofobici che si vanno a posizionare al di sotto dell'anello aromatico. In questo caso però, la Pro<sup>57</sup> e la Met<sup>74</sup> sono sostituite rispettivamente da metionina ed alanina.

Mediante l'utilizzo dei programmi Predictprotein e Swiss-model entrambi disponibili in rete sul sito <http://us.expasy.org>, si sono ottenute inoltre, predizioni di struttura secondaria e terziaria. In base a tali predizioni è emerso che la proteina Bald16 sarebbe organizzata in 7  $\alpha$ -eliche e 2  $\beta$ -foglietti, così come avviene per MarR.

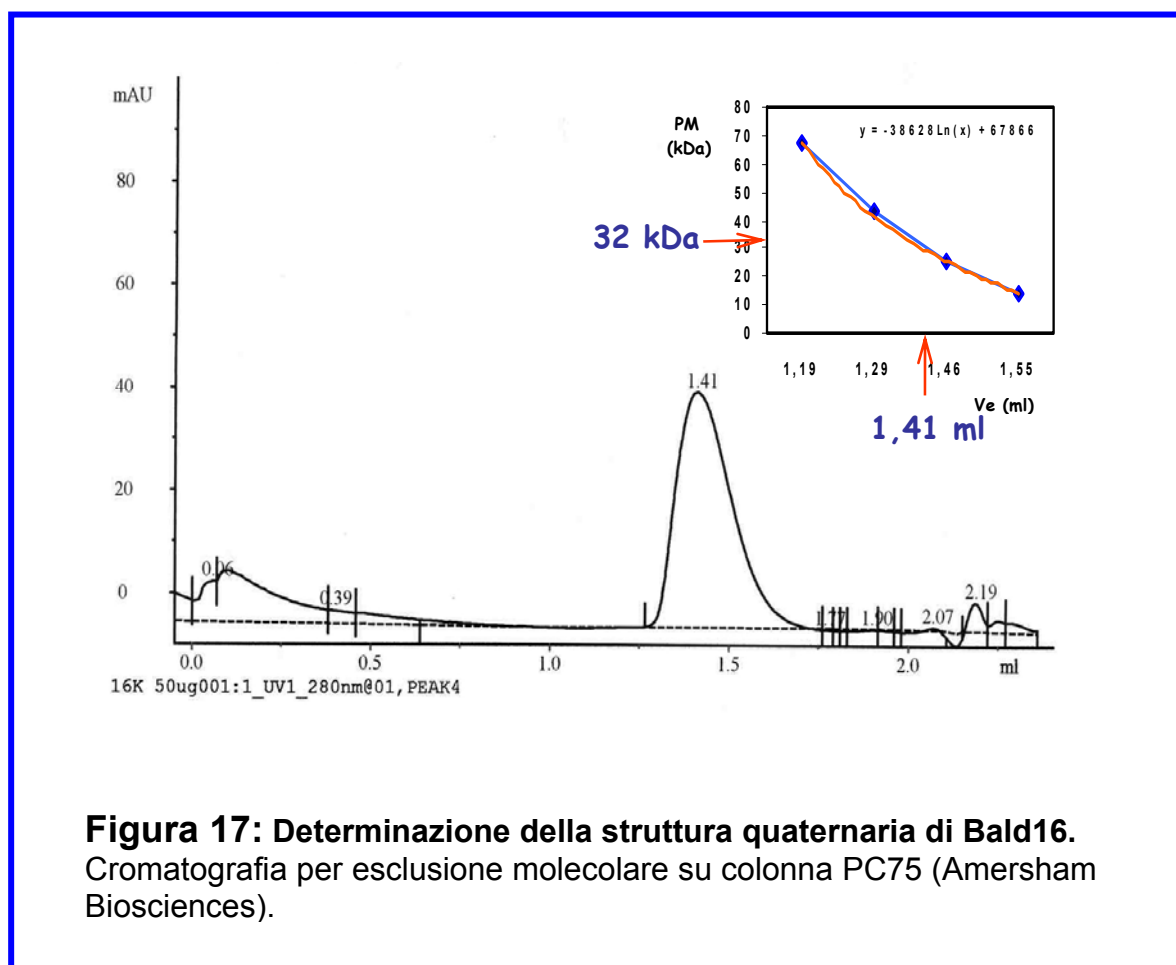


**Figura 16: Allineamento multiplo di sequenza della proteina Bald16 con proteine omologhe batteriche e predizioni di struttura.**

La sequenza amminoacidica della proteina Bald16 è stata confrontata con gli omologhi batterici da *E. coli* (MarR), *P. aeruginosa* (MexR) e *D. radiodurans* R1 (HucR) (A). In rosso sono evidenziati gli amminoacidi conservati al 100%. Al di sopra degli allineamenti è riportata la predizione di struttura secondaria. Il modelling di struttura terziaria (B) è stato effettuato sulla base della struttura 1JGS\_A della proteina MarR depositata in PDB.

### Determinazione della struttura quaternaria

Per determinarne la struttura quaternaria della proteina Bald16 è stata effettuata una cromatografia per esclusione molecolare in condizioni native su colonna analitica PC75 (Amersham Biosciences), usando come riferimento degli standard proteici a peso molecolare noto. Dopo aver determinato il volume escluso ed i volumi di eluizione dei vari marcatori di peso molecolare, è stato possibile costruire una retta di taratura per la cromatografia in questione. Si è poi misurato il volume di eluizione della proteina purificata Bald16, risultato pari a 1.41 ml e per interpolazione nella regione lineare della retta di taratura, si è determinato il peso molecolare che è risultato essere pari a circa 32 kDa (**Figura 17**). Poiché la stessa proteina sottoposta ad SDS-PAGE è presente come una singola banda di massa molecolare di circa 16 kDa, si è potuto concludere che la proteina, in condizioni native, è presente in forma omodimerica.



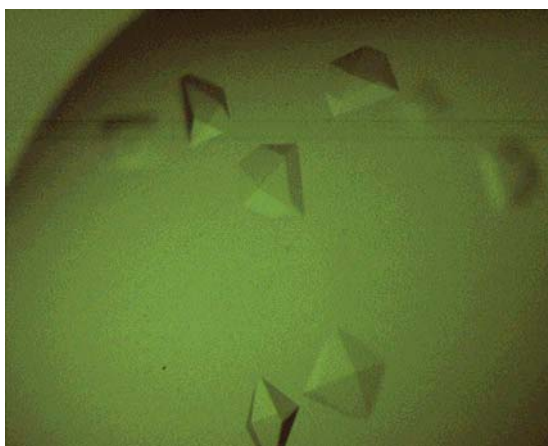
**Figura 17: Determinazione della struttura quaternaria di Bald16.** Cromatografia per esclusione molecolare su colonna PC75 (Amersham Biosciences).

### Determinazione della struttura terziaria della proteina Bald16

Per completare l'analisi strutturale di Bald16 si decise di determinare la struttura terziaria della proteina mediante cristallografia per diffrazione ai raggi X. Per far ciò è stato necessario ottenere la proteina con il maggior grado di purezza possibile e determinare le condizioni di cristallizzazione. Sono stati preparati sia cristalli di proteina nativa, sia di proteina Bald16 marcata con L-seleniometionina. Questi ultimi sono stati prodotti per ovviare alla difficoltà di operare un modelling dei dati di diffrazione basato su strutture note di omologhi che presentano un valore di identità non sufficientemente elevato. L'incorporazione di L-seleniometionina è stata ottenuta

crescendo le cellule di *E. coli* recante il plasmide codificante Bald16 in terreno minimo M9 supplementato con L-selenometionina. La produzione di metionina da parte di *E. coli* è stata bloccata inibendone la via biosintetica mediante aggiunta di un largo eccesso degli amminoacidi leucina, isoleucina, valina, treonina, fenilalanina e lisina che assieme alla metionina ne rappresentano i prodotti.

La tecnica di cristallizzazione utilizzata è quella della diffusione in fase vapore (metodo della “hanging drop” o della goccia sospesa). I cristalli della proteina nativa su cui è stata effettuata la raccolta dati erano nati da Ammonio solfato 1.8 M, Cacodilato di Sodio 0.1 M pH 6.5, mentre i cristalli della proteina con seleniomietionina (**Figura18**) da Ammonio solfato 2.0 M, TRIS-HCl 0.1 M pH 8.0 e Ammonio solfato 2.2 M, Hepes 0.1 M pH 7.5.



**Figura 18: Immagine dei cristalli della proteina Bald16 marcata con L-seleniomietionina.**

In sintesi, l'agente precipitante è il solfato di ammonio (da 1.8 M a 2.2 M), mentre il tampone può essere variato senza disturbare troppo il processo di cristallizzazione.

La cristallizzazione è stata effettuata alla temperatura di 20 °C. I tempi per la formazione dei cristalli sono dell'ordine di tre-quattro giorni. L'analisi dei dati di diffrazione dei cristalli ottenuti è attualmente in corso. Questa parte del lavoro di tesi è stata condotta in collaborazione con la Dr.<sup>ssa</sup> Giusi De Simone e la Dr.<sup>ssa</sup> Anna Di Fiore del dipartimento di Bioimmagini e Biostrutture del CNR di Napoli.

## **Analisi dell'interazione tra Bald16 e il promotore *Mar-like***

### **Specificità di legame**

Con lo scopo di definire le sequenze di DNA coinvolte nella regolazione dell'espressione del gene *bald16*, sono stati effettuati esperimenti di ritardo della mobilità elettroforetica (EMSA) utilizzando un frammento di DNA contenente la regione del promotore dell'operone *Mar-like* compresa tra il nucleotide -271 ed il nucleotide +1 e diverse quantità di proteina ricombinante Bald16 precedentemente purificata.

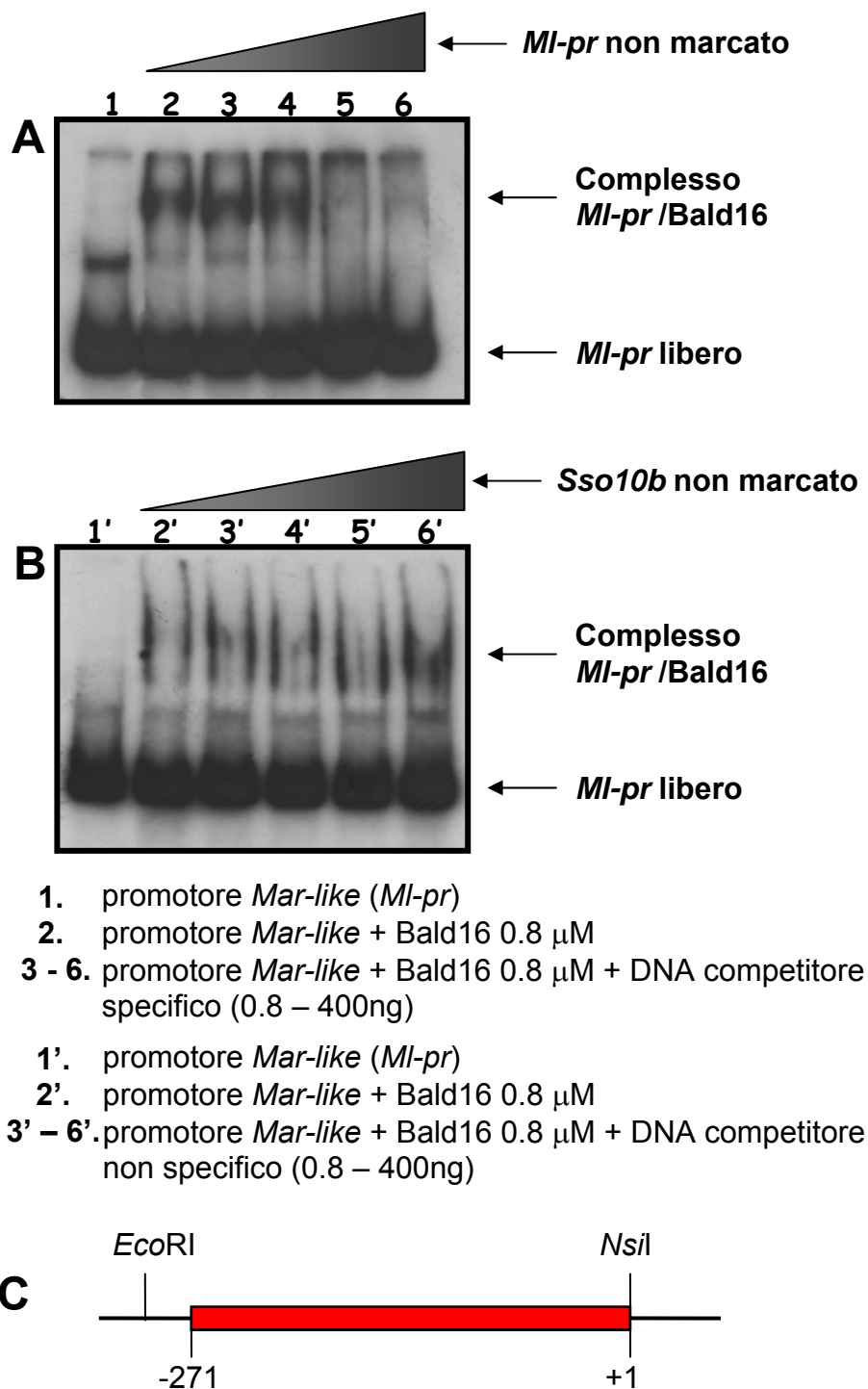
Inizialmente, per verificare la capacità della proteina di interagire con la sequenza promotrice in esame, è stato effettuato un primo esperimento EMSA utilizzando il promotore dell'operone *Mar-like* (*ml-pr*), (recuperato dal plasmide *pMar-likepr* inseguito a digestione con gli enzimi di restrizione *NsiI* ed *EcoRI*) e quantità di

proteina Bald16 comprese tra 0.04 e 6  $\mu\text{M}$ . La sonda è stata marcata all'estremità 3' con  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-dATP.

I segnali autoradiografici hanno mostrato un ritardo significativo nella mobilità elettroforetica del frammento *Nsil-EcoRI* per concentrazioni di proteina comprese tra 0.8 e 6  $\mu\text{M}$  : questo risultato suggerisce che il fattore Bald16 si lega alla regione esaminata. Quando si incuba il frammento *Nsil-EcoRI* con 0.8  $\mu\text{M}$  di proteina e si carica il complesso su gel nativo di poliacrilammide al 5%, si osserva un ritardo della mobilità significativo, ma che non comporta ancora una titolazione completa della sonda marcata, si è scelto dunque per tale ragione di utilizzare per i saggi successivi questa concentrazione di proteina. Per verificare se il complesso ritardato fosse dovuto ad un'interazione sequenza-specifica tra la stessa proteina e la regione in esame si è effettuato un esperimento di competizione in cui si è aggiunto alla proteina il frammento non marcato contenente la regione promotrice ad una concentrazione fino a 500 volte maggiore prima di incubare la miscela con la medesima sonda radioattiva. I risultati ottenuti hanno fornito l'evidenza della specificità di legame tra il fattore Bald16 e il promotore *ml-pr*, visto il graduale spiazzamento prodotto dal competitore specifico non marcato (**Figura 19 A**). Tale evidenza è stata ulteriormente confermata da un terzo esperimento EMSA condotto utilizzando, questa volta, un competitore non marcato aspecifico costituito da un amplificato di PCR relativo al gene della proteina *Sso10b* di *S. solfataricus* P2. In questo caso (**Figura 19 B**) non si è avuto alcuno spiazzamento, a conferma di un legame specifico tra il fattore Bald16 e il promotore saggiato.

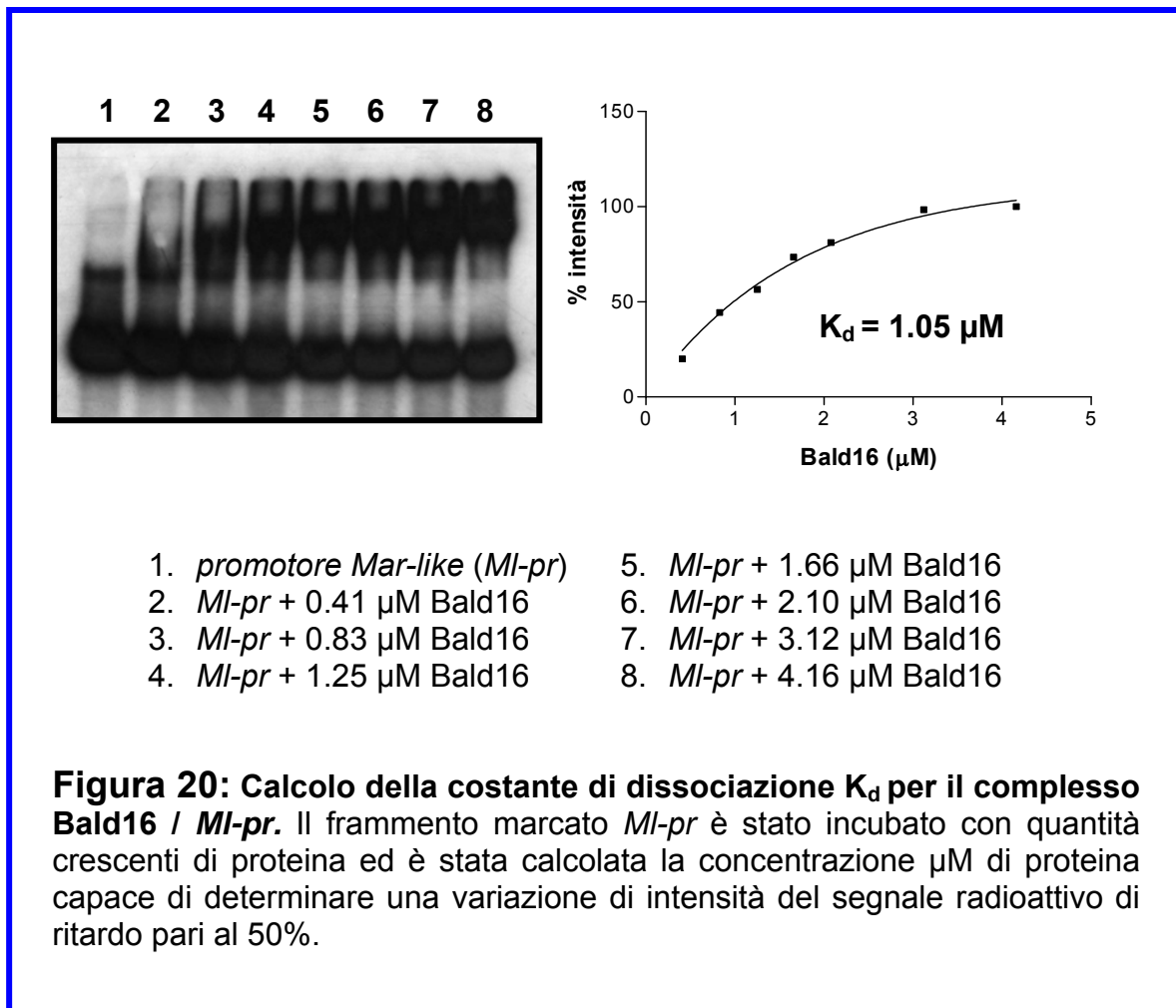
#### **Affinità di legame Bald16 / *ml-pr*: calcolo della $K_d$ .**

Al fine di ottenere una stima numerica dell'affinità della proteina Bald16 per il promotore dell'operone *mar-like*, è stato allestito (in triplicato) un esperimento EMSA in cui il frammento *Nsil-EcoRI* marcato è stato incubato con quantità crescenti di proteina (0.4-4  $\mu\text{M}$ ). I segnali autoradiografici ottenuti sono stati analizzati al densitometro per determinarne l'intensità di radioattività e riportati in percentuale rispetto al valore massimo di intensità misurato, ovvero per concentrazioni saturanti di proteina. Come mostrato in **figura 20**, tali valori ottenuti sono stati riportati in funzione della concentrazione ( $\mu\text{M}$ ) della proteina saggiata, al fine di calcolare graficamente la costante di dissociazione del complesso proteina\DNA ( $K_d$ ), cioè la concentrazione  $\mu\text{M}$  di proteina capace di determinare una variazione di intensità del segnale radioattivo di ritardo pari al 50%. I dati sono stati elaborati mediante utilizzo del programma Graph Pad Prism ed il valore di  $K_d$  ottenuto per l'interazione tra la proteina Bald16 ed il *ml-pr* è risultato essere pari a 1.05  $\mu\text{M}$ . Le concentrazioni  $\mu\text{M}$  riportate per Bald16 ed in seguito per Lrs14 sono riferite alle proteine nel loro stato dimerico.



**Figura 19: Analisi della specificità di legame di Bald16 al promotore *Mar-like*.**

Per verificare la specificità dell'interazione tra Bald16 ed il promotore dell'*operone Mar-like* sono stati effettuati saggi EMSA (**A**) in presenza di competitore specifico (frammento *MI-pr* non marcato) o (**B**) di competitore non specifico (frammento del gene *Sso10b*). Schema del frammento contenente la sequenza promotrice (**C**).

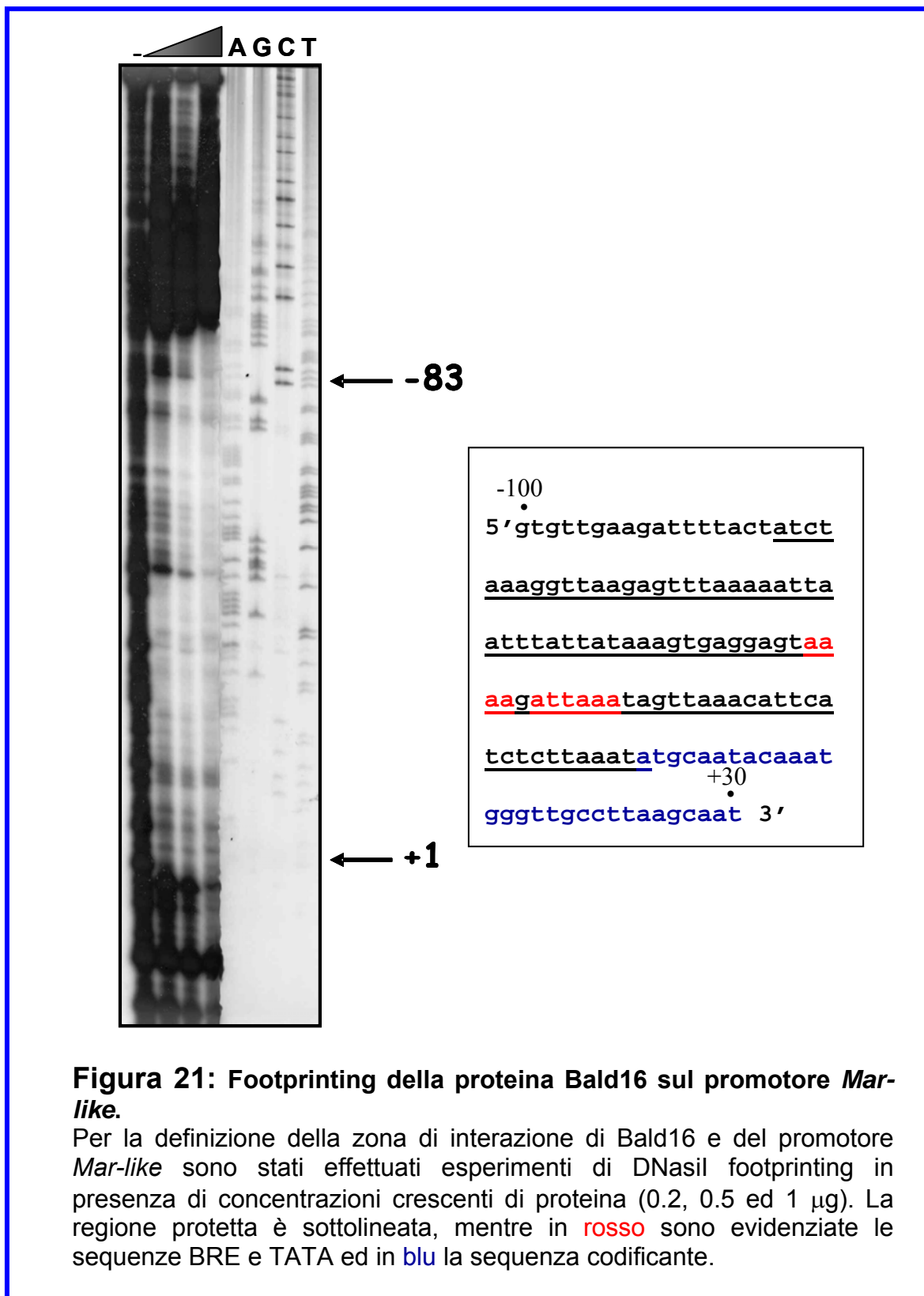


### Footprinting del fattore Bald16 sul *ml-pr*

Una volta verificata la specificità di legame tra la proteina Bald16 ed il promotore dell'operone *Mar-like*, si è definita la regione occupata dalla proteina sul DNA; a tal scopo sono stati allestiti esperimenti di DNasil-footprinting.

Il frammento di DNA ottenuto per PCR, marcato all'estremità 5' e comprensivo della sequenza regolativa di interesse, è stato incubato con quantità crescenti di proteina Bald16 (0.2, 0.5 e 1 μg) e successivamente sottoposto all'azione dell'enzima DNasil. La reazione di sequenza eseguita sul plasmide contenente il promotore *ml-pr* è stata ottenuta con lo stesso oligonucleotide marcato in 5' utilizzato nell'amplificazione del promotore, consentendo quindi l'identificazione della regione di DNA protetta dalla proteina Bald16. Come mostrato in **figura 21**, la proteina occupa una regione molto ampia di circa 80 residui nucleotidici che si estende a coprire gli elementi regolatori della TATA-box e del sito BRE, fino al residuo nucleotidico di adenina dell'ATG di inizio della traduzione.



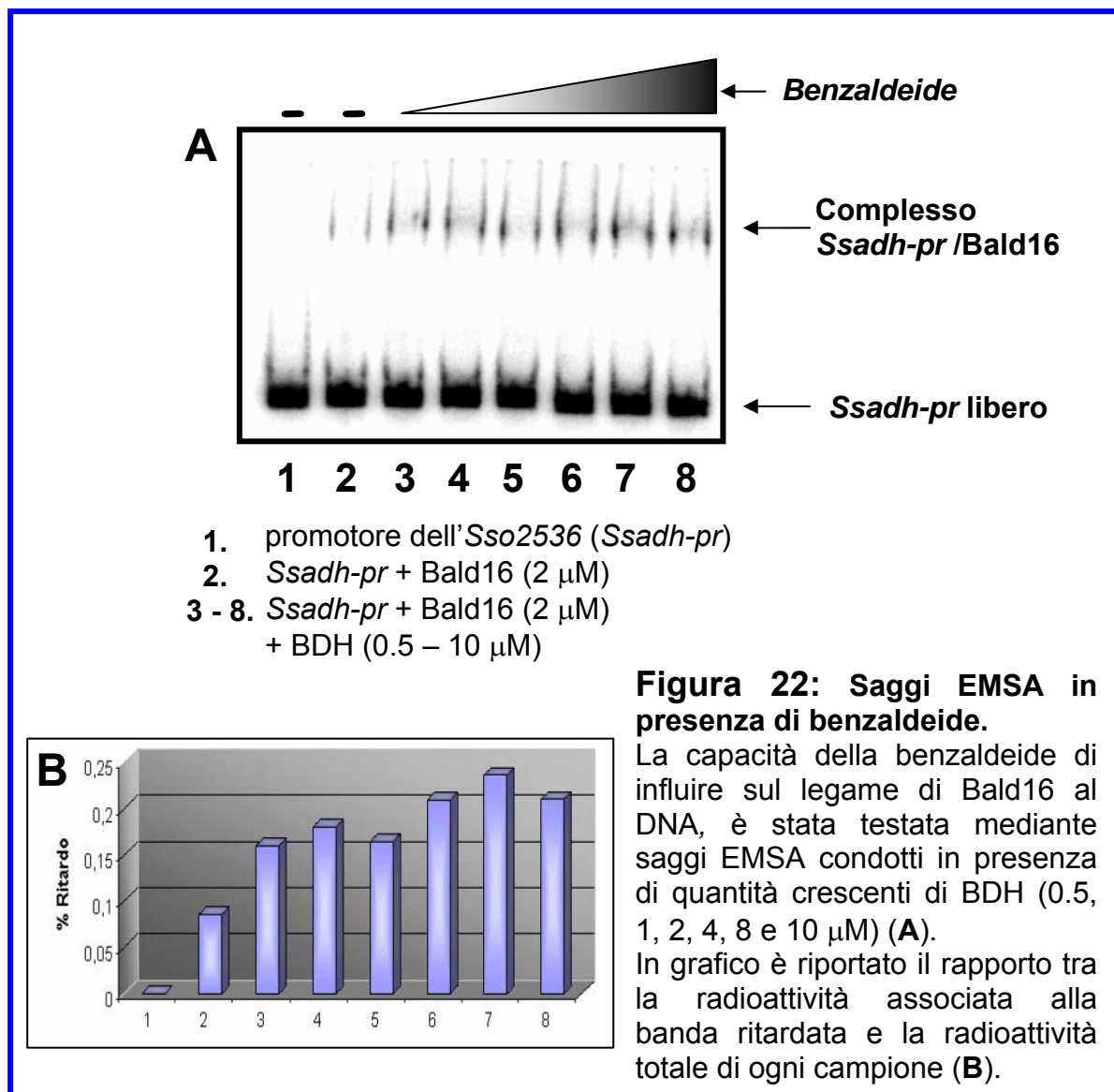


## Analisi dell'interazione tra Bald16 e la benzaldeide

Come precedentemente descritto, l'espressione dell'operone *Sso1351/Sso1352* e del gene *Ssadh Sso2536* è regolata positivamente dalla presenza di benzaldeide nel mezzo di coltura, in risposta alla quale è stato ipotizzato che nella cellula si inneschi un complesso meccanismo di detossificazione che vede direttamente coinvolto il fattore trascrizionale Bald16. Allo scopo di stabilire se il "signaling" generato dalla benzaldeide abbia come bersaglio diretto proprio la proteina Bald16, sono stati seguiti due diversi approcci sperimentali.

### Saggio EMSA in presenza di benzaldeide

Al fine di evidenziare un'interazione più o meno diretta tra il fattore Bald16 e la benzaldeide, si condottò un saggio EMSA incubando la proteina Bald16 con l'aldeide aromatica ed il frammento di DNA in esame. Alle miscele di reazione è stata aggiunta la proteina Bald16 in concentrazione 2  $\mu\text{M}$  e quantità variabili di BDH, in modo da ottenere rapporti molarari pari a 1: 0.25; 1: 0.5; 1: 1; 1: 2; 1: 4 e 1: 5. Il saggio è stato quindi condotto come da protocollo, in presenza del frammento marcato del promotore *Ssadh-pr*.

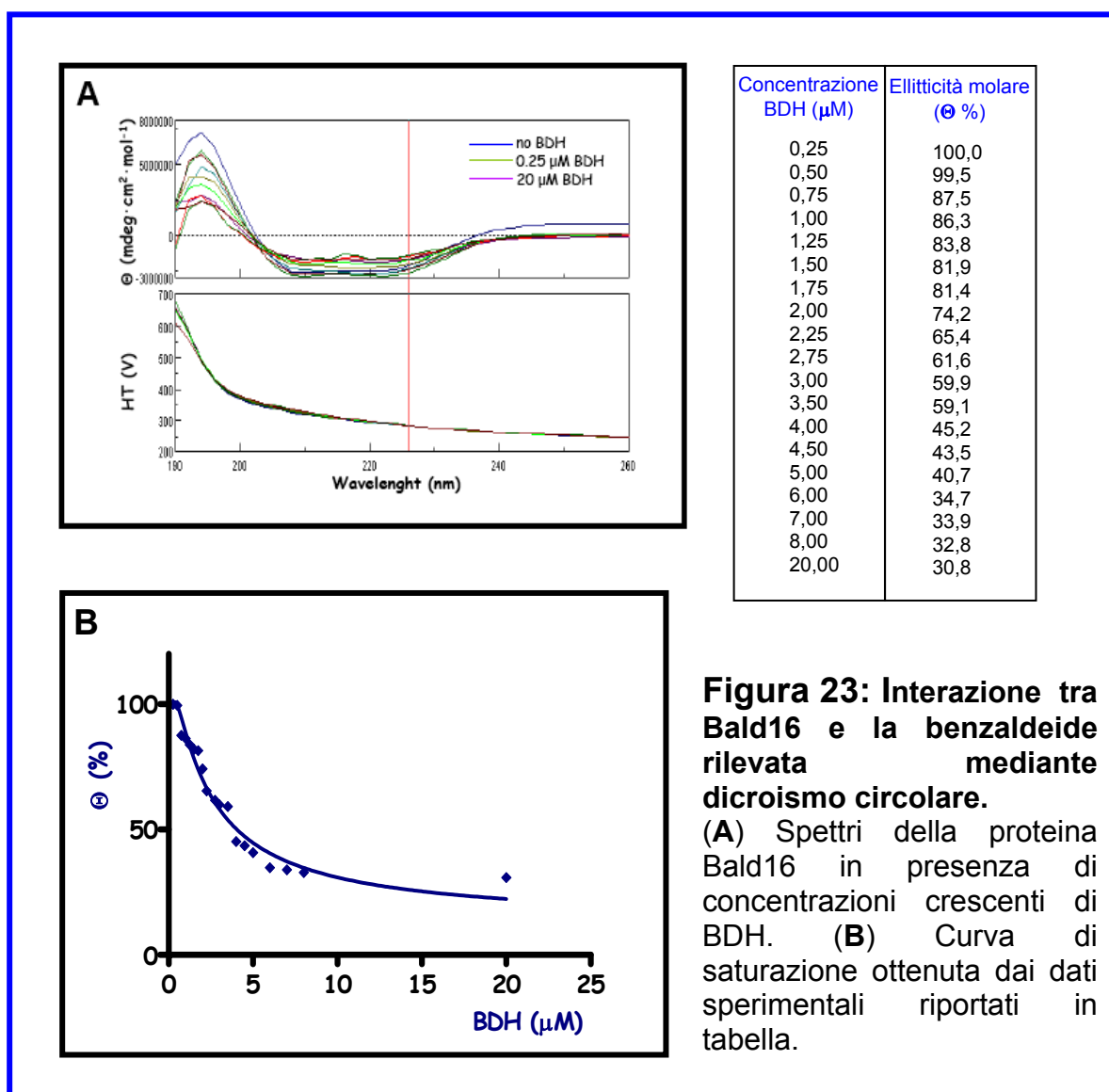


Come mostrato in **figura 22**, l'intensità dei segnali autoradiografici mostra un aumento dell'affinità della proteina per il DNA in funzione dell'aumento di concentrazione della BDH nell'intervallo compreso tra 0.5 e 10  $\mu\text{M}$ . L'esperimento è stato ripetuto in duplicato, mostrando in entrambi i casi lo stesso andamento.

### Dicroismo circolare

Per analizzare l'interazione tra Bald16 e la benzaldeide, sono stati allestiti esperimenti di dicroismo circolare.

Si è registrata la variazione dell'ellitticità molare di Bald16 in funzione della lunghezza d'onda, in presenza di diverse concentrazioni di benzaldeide. Alla proteina (2  $\mu\text{M}$ ) sono state aggiunte quantità crescenti di BDH in modo da raggiungere concentrazioni finali comprese tra 0.25 e 20  $\mu\text{M}$ ; per ciascun valore di concentrazione sono stati registrati gli spettri. Come bianchi si sono utilizzate miscele di BDH alle stesse concentrazioni ma prive di proteina. Tutti gli spettri sono stati ottenuti alla temperatura di 25°C e nell'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 190 e 260 nm.



Dopo aver sottratto a ciascuno spettro il bianco corrispondente, i grafici ottenuti sono stati confrontati dando il risultato mostrato in **figura 23 A**. Per concentrazioni di BDH crescenti si può notare, nella regione degli spettri corrispondente al picco massimo (intorno a 190 nm), un sensibile calo dei valori di ellitticità molare, cui sembra corrispondere uno speculare aumento degli stessi in prossimità della regione dei minimi a 210 nm.

Dal momento che l'ellitticità molare è una proprietà ottica delle molecole proteiche strettamente correlata al loro stato conformazionale, in particolare alla distribuzione relativa delle  $\alpha$ -eliche e dei  $\beta$ -strands, una simile evidenza ha spinto a concludere che la benzaldeide sia realmente in grado di provocare dei cambiamenti conformazionali nella proteina Bald16, con effetti più o meno rilevanti a seconda del rapporto molare stabilito tra le due molecole. L'utilizzo del programma GraphPad ha poi consentito di determinare il modello matematico più adatto a descrivere tale interazione. I dati ricavati dagli spettri dicroici sono stati analizzati, riportando i valori percentuali di ellitticità molare, calcolati rispetto al valore massimo registrato a 190 nm ( $7.20 \times 10^6 = 100\%$ ), in funzione delle concentrazioni di BDH utilizzate. La **figura 23 B** mostra una curva di saturazione con andamento iperbolico. Si può osservare, in particolare, che per concentrazioni di BDH inferiori a 5  $\mu\text{M}$  viene già raggiunto un "plateau", suggerendo che la saturazione del legame della benzaldeide alla proteina avviene a concentrazioni di ligando molto basse. Altro dato interessante è che l'equazione, relativa a questa curva, calcolata dal programma sfruttando un algoritmo di regressione non lineare, è specifica per proteine con due siti di legame per il substrato, in accordo con l'organizzazione dimerica di Bald16. Con lo stesso algoritmo sono stati calcolati i valori di  $K_d$  per i due siti di legame previsti per la proteina: essi risulterebbero pari a 0.075  $\mu\text{M}$  ( $K_{d1}$ ) e 1.647  $\mu\text{M}$  ( $K_{d2}$ ) e quindi a differente affinità.

Al fine di convalidare i risultati ottenuti, è stato allestito un esperimento di controllo in cui la proteina Glx, una disolfuro-ossidoreduttasi di *Pyrococcus furiosus*, è stata sottoposta ad un'analisi di dicromismo circolare nelle medesime condizioni adoperate per Bald16. Tale proteina è stata scelta in quanto non correlata al metabolismo delle aldeidi aromatiche, e quindi non propensa ad interagire funzionalmente con la benzaldeide. L'andamento degli spettri dicroici ottenuti per la Glx ha evidenziato l'assenza di significativi cambiamenti nell'ellitticità molare, per tutte le concentrazioni di BDH considerate. Ciò conferma dunque che gli effetti indotti dalla benzaldeide sulle proprietà strutturali di Bald16 si possono considerare specifici.

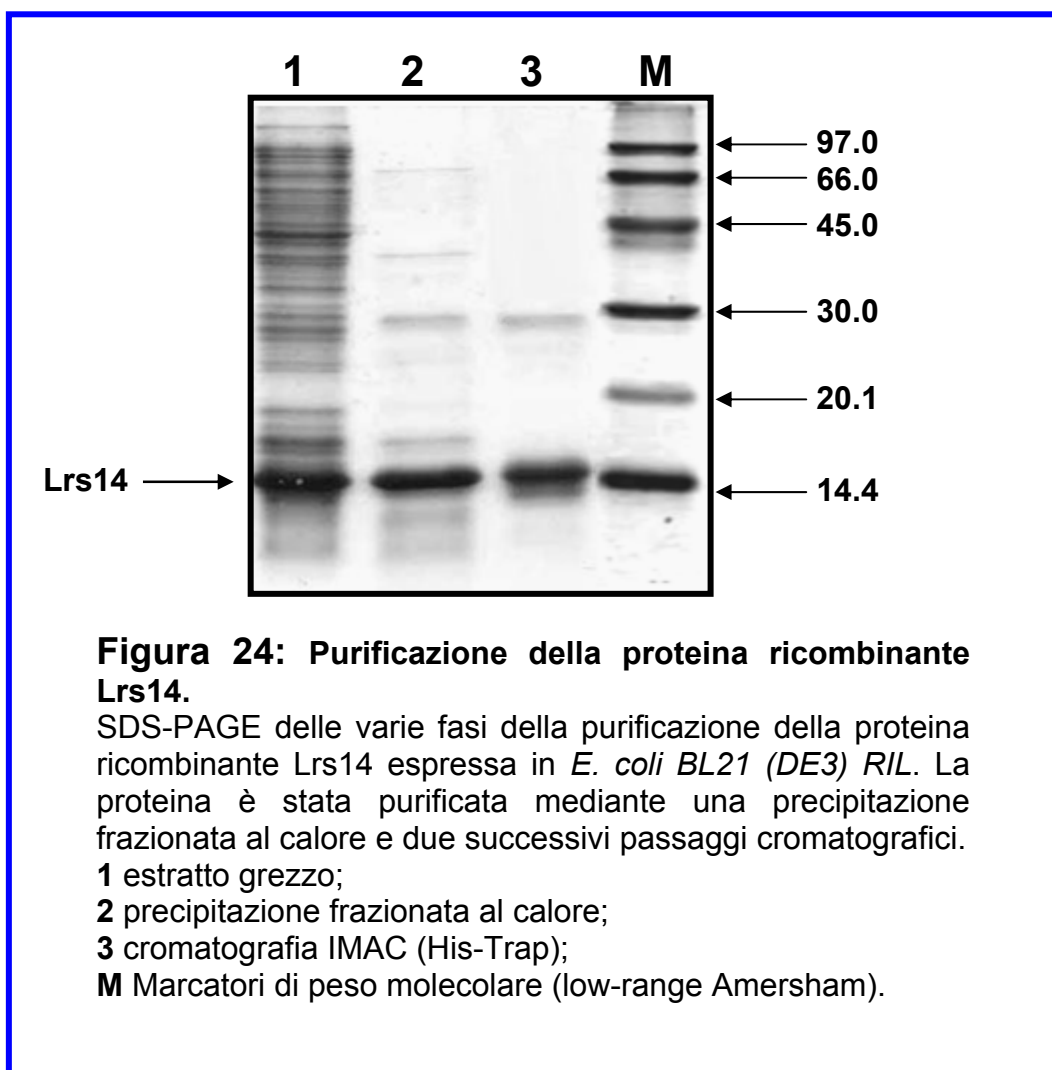
## **Espressione in *E. coli* e purificazione della proteina Lrs14**

La proteina ricombinante Lrs14, necessaria per la caratterizzazione dell'interazione molecolare con la proteina Bald16 e per lo studio funzionale del suo ruolo nel sistema di detossificazione proposto, è stata ottenuta mediante espressione eterologa in *E. coli* e successiva purificazione. Il ceppo di *E. coli* BL21 (DE3) RIL è stato trasformato con il vettore ricombinante *pET30Lrs14* (Bell SD e Jackson SP, 2000) e cresciuto a 37°C in un litro di terreno LB, contenente kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e cloramfenicolo (33  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), fino al raggiungimento di un valore di assorbanza pari a 0.4  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ; l'espressione del gene eterologo *lrs14* è stata indotta con 1 mM IPTG per 3 h (condizioni ottimali già precedentemente determinate). Dalla coltura è stato preparato un estratto proteico, che è stato sottoposto al frazionamento al calore per 15 min a 75°C per ottenere la precipitazione delle proteine termolabili dell'ospite

mesofilo. Con questo trattamento è stata allontanata la maggior parte delle proteine di *E. coli*.

La proteina Lrs14 è stata purificata mediante un unico passaggio cromatografico, rappresentato da una cromatografia di affinità su una colonna His-Trap (Amersham) alla cui matrice sono coordinati ioni Nichel in grado di interagire con la coda di istidine presente nella proteina ricombinante. Le frazioni contenenti la proteina di interesse, eluite in tampone contenente 250 mM imidazolo, sono state riunite, concentrate e dializzate mediante ultrafiltrazione.

In **figura 24** è riportata l'analisi per SDS-PAGE dei differenti passaggi di purificazione. Dopo l'ultimo passaggio di purificazione la proteina con massa molecolare di ~14 kDa appare omogenea, sebbene si continui ad osservare una banda da 28 kDa dovuta al dimero di Lrs14. Da 1 l di coltura di *E.coli* BL21 (DE3) RIL, trasformata con il costrutto *pET30Lrs14* sono stati in media ottenuti 1.7 mg di proteina omogenea.



## Caratterizzazione funzionale di Lrs14

### Analisi dell'interazione tra il fattore Lrs14 e l'*ml-pr*

#### Specificità di legame

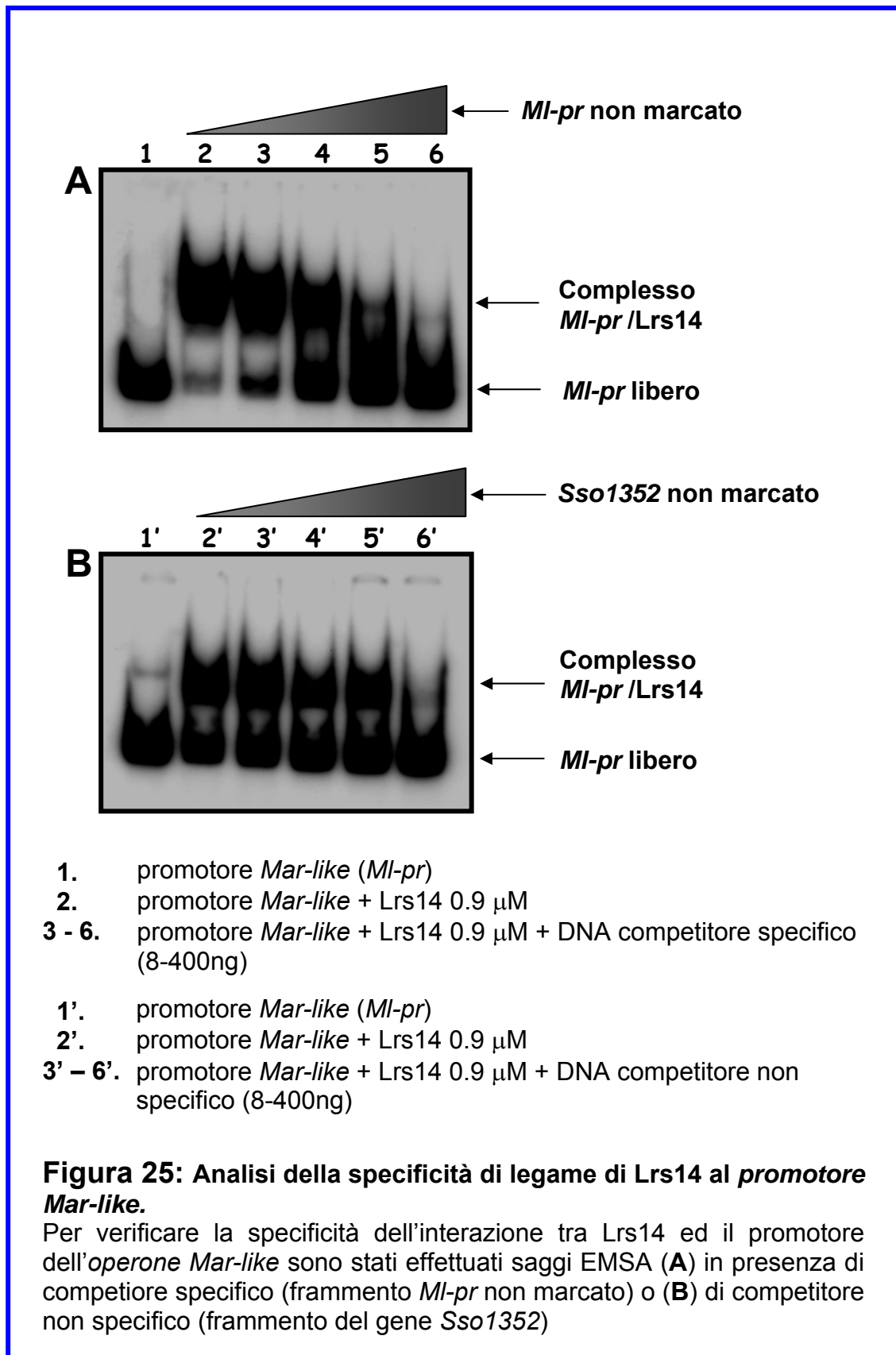
Essendo già noto in letteratura il legame di Bald16 ed Lrs14 al promotore del gene dell'alcool deidrogenasi di *S. solfataricus* (Fiorentino *et al.*, 2003), ci siamo proposti di verificare se Lrs14, come Bald16, fosse in grado di legarsi anche al *ml-pr*. La proteina Lrs14 è stata purificata come precedentemente descritto; è stato quindi effettuato un esperimento EMSA utilizzando sempre il frammento di restrizione *Nsil-EcoRI* e quantità di Lrs14 comprese tra 0.16 e 7  $\mu\text{M}$ . I segnali autoradiografici, anche in questo caso, hanno mostrato un ritardo nella mobilità del frammento *Nsil-EcoRI* che è massimo per 7  $\mu\text{M}$  di proteina. Analogamente a quanto effettuato per la proteina Bald16, si è verificato se il legame al promotore fosse sequenza-specifico. A tal fine 0.9  $\mu\text{M}$  di proteina Lrs14 sono stati incubati con il *ml-pr* (*Nsil-EcoRI*), in presenza di una concentrazione di frammento non marcato fino a 500 volte maggiore rispetto a quella dello stesso frammento marcato. I risultati ottenuti (**Figura 25 A**) hanno mostrato uno spiazzamento del tutto paragonabile a quello ottenuto incubando il fattore Bald16 con il *ml-pr* non marcato; al contrario, quando come competitore si è saggiato un frammento aspecifico (questa volta relativo ad un amplificato di PCR del gene *bald16*), si è osservato un decremento del segnale autoradiografico solo quando si aggiungevano concentrazioni del competitore aspecifico pari a 500 volte quelle della sonda marcata (**Figura 25 B**). Questo risultato testimonia dunque che anche per la proteina Lrs14 il legame all'*ml-pr* è sequenza specifico.

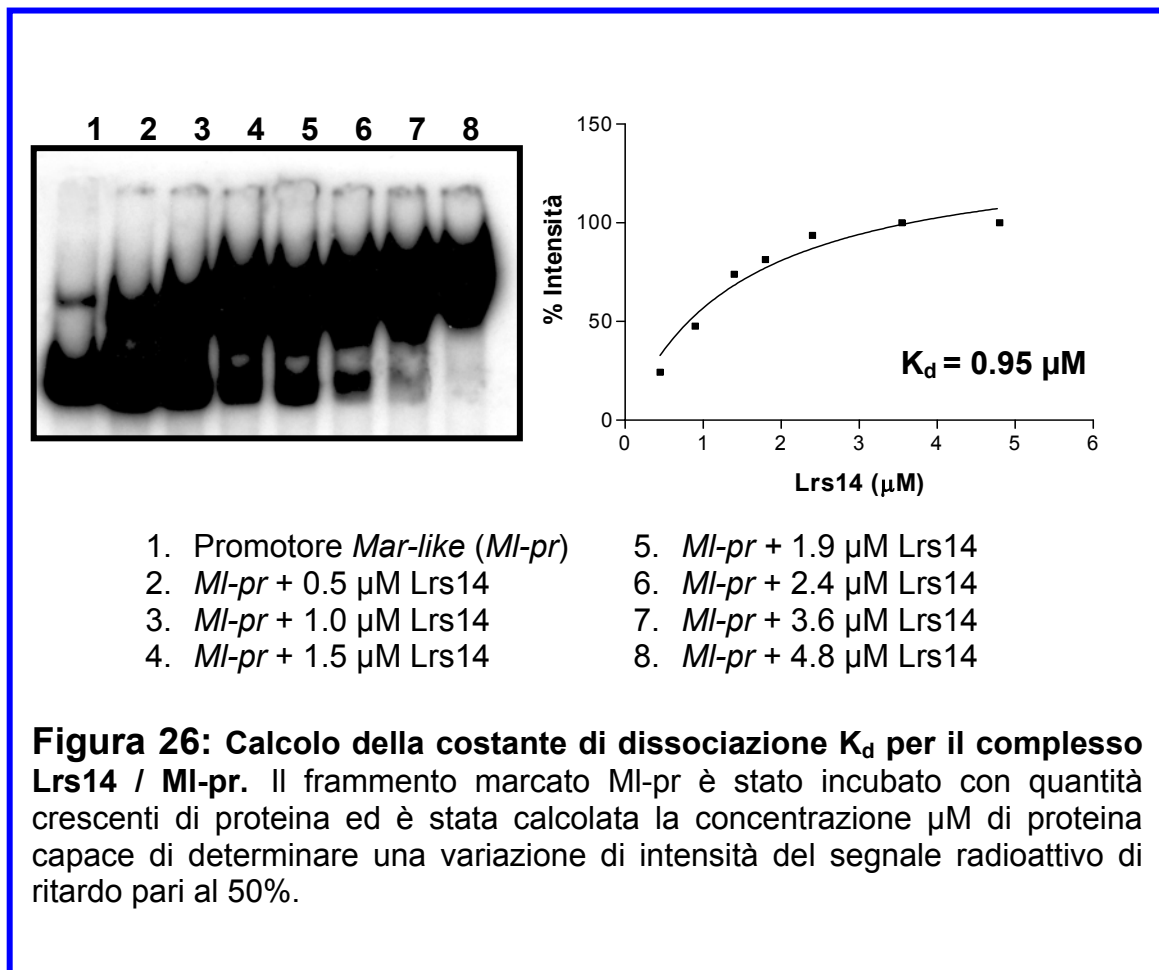
#### Affinità di legame Lrs14 / *ml-pr*: calcolo della $K_d$

Anche in questo caso, come già illustrato per il fattore Bald 16, è stata calcolata l'affinità dell'interazione Lrs14-*ml-pr*. A tale scopo è stato allestito in doppio un esperimento EMSA incubando il frammento *Nsil-EcoRI* marcato con concentrazioni crescenti di proteina (0.46-4.6  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 26**). I campioni sono stati caricati su un gel nativo di poliacrilammide al 5% ed i segnali autoradiografici sono stati analizzati al densitometro per determinarne l'intensità della radioattività. Riportando in grafico tali dati in funzione della concentrazione  $\mu\text{M}$  di Lrs14 abbiamo calcolato il valore di  $K_d$ , adottando gli stessi criteri considerati già per il calcolo della  $K_d$  di Bald16. Tale valore è risultato pari a 0.95  $\mu\text{M}$ , del tutto paragonabile, rimanendo nell'ambito dell'errore sperimentale, a quello ottenuto per la proteina Bald16. Anche in questo caso, i valori di mM sono calcolati sulla base della natura dimerica della proteina.

#### Footprinting del fattore Lrs14 sul *ml-pr*

Anche per il fattore Lrs14 è stato allestito un esperimento di DNasil-footprinting, al fine di completare lo studio sulla caratterizzazione dell'interazione tra la proteina ed il *ml-pr*, attraverso l'individuazione della regione occupata dalla proteina sul promotore in esame. Il frammento di DNA, marcato all'estremità 5' e comprensivo della sequenza regolativa di interesse, è stato incubato con quantità crescenti di Lrs14 (1.5, 2 e 3  $\mu\text{g}$ ) e sottoposto a trattamento con DNasil così come descritto in materiali e metodi (**Figura 27**). Anche in questo caso si è osservata un'impronta di protezione da parte della proteina sul DNA piuttosto ampia, anche se inferiore a quella





**Figura 26: Calcolo della costante di dissociazione  $K_d$  per il complesso Lrs14 / MI-pr.** Il frammento marcato MI-pr è stato incubato con quantità crescenti di proteina ed è stata calcolata la concentrazione  $\mu\text{M}$  di proteina capace di determinare una variazione di intensità del segnale radioattivo di ritardo pari al 50%.

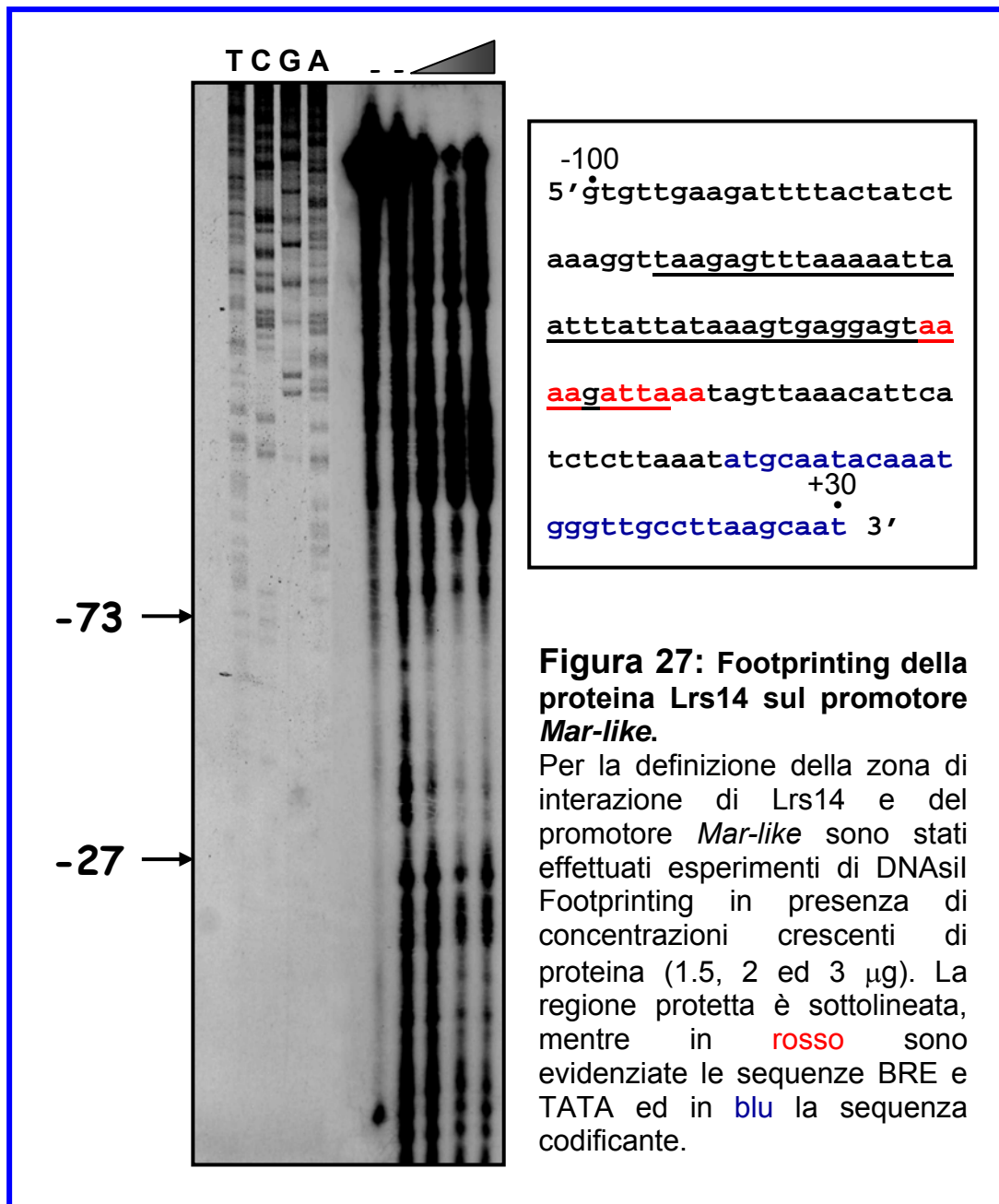
determinata dalla proteina Bald16. Tale regione si estende infatti dalla posizione -73 rispetto al sito di inizio della traduzione del gene della putativa permeasi (*Sso1351*) fino alla posizione -27, coprendo una regione che comprende le sequenze TATA e BRE.

#### Dicroismo circolare

Per verificare se anche il fattore trascrizionale Lrs14 fosse capace di interagire con la benzaldeide, la proteina è stata saggiata in esperimenti di dicroismo circolare nelle stesse condizioni descritte precedentemente per la proteina Bald16.

Gli esperimenti condotti, in questo caso non hanno però evidenziato alcuna variazione degli spettri dicroici registrati, ad indicazione che la proteina Lrs14 non interagisce con l'aldeide aromatica (dati non mostrati) pur essendo coinvolta insieme a Bald16 nella regolazione del "pathway" di detossificazione.





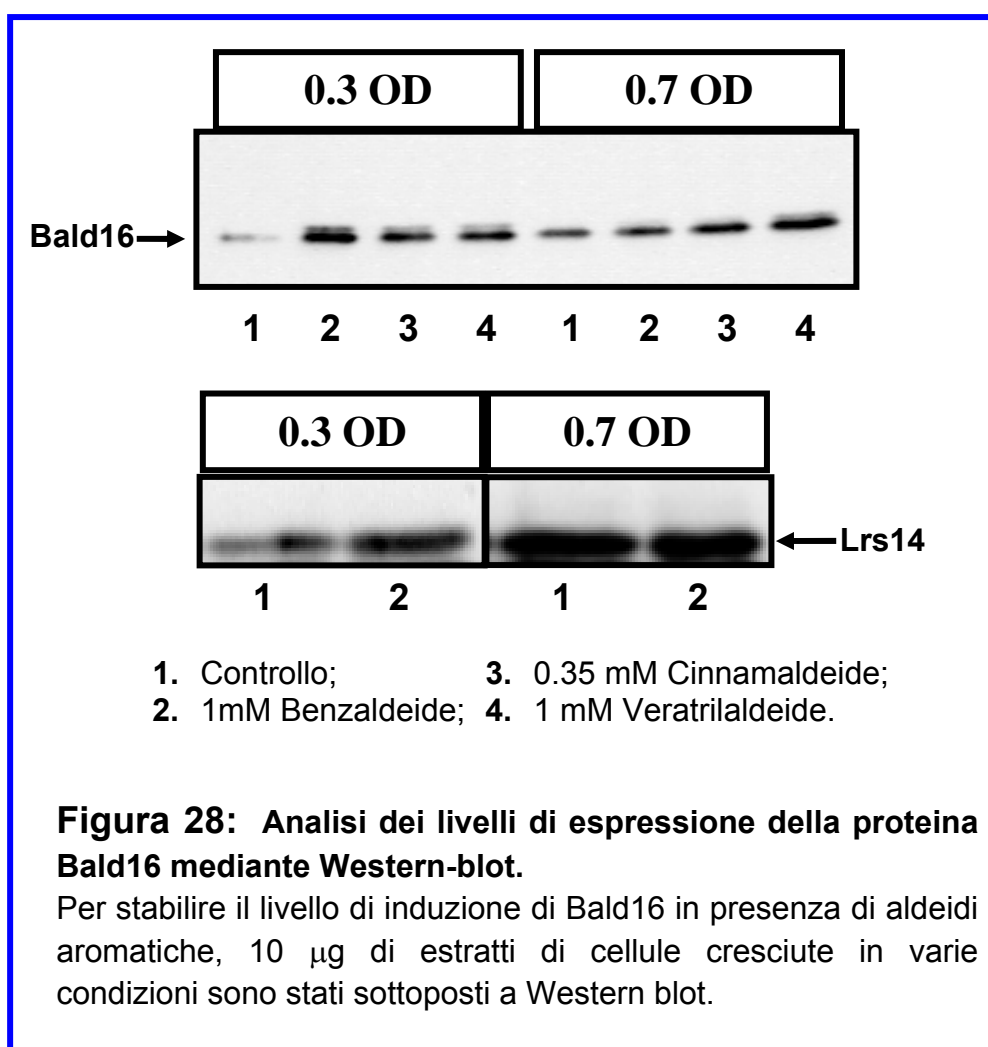
### Analisi dei livelli di espressione di Bald16 e Lrs14 “in vivo”

Come precedentemente riportato, la trascrizione dell'operone *Mar-like* (*Sso1351/Sso1352*) risulta significativamente stimolata dalla presenza di aldeidi aromatiche nel mezzo di coltura. Sono stati quindi effettuati esperimenti volti a verificare se all'aumento dei livelli di trascritto corrispondesse un aumento dei livelli della proteina Bald16. A tal scopo, uguali quantità di estratti proteici ottenuti da cellule cresciute in presenza o in assenza delle diverse aldeidi aromatiche, sono state sottoposte ad analisi mediante Western-blot. La presenza delle proteine Bald16 e Lrs14 è stata evidenziata mediante l'utilizzo di anticorpi primari ottenuti in coniglio ( $\alpha$ -Bald16 o  $\alpha$ -Lrs14). La produzione di tali anticorpi, ottenuti immunizzando i conigli con le due proteine ricombinanti purificate all'omogeneità, era stata precedentemente

commissionata alla ditta IGTECH pscarl. Come mostrato in **figura 28**, è possibile osservare sia in fase esponenziale che stazionaria, un incremento dei livelli di proteina Bald16 in estratti provenienti da cellule cresciute in presenza delle varie aldeidi. A differenza di quanto avveniva però per il trascritto, i cui livelli diminuivano drasticamente in fase stazionaria, i livelli della proteina nelle due fasi di crescita sembrano paragonabili.

Relativamente ad Lrs14, non è invece possibile evidenziare un aumento dei livelli di proteina in cellule cresciute in presenza di benzaldeide; si nota in questo caso un accumulo di proteina in fase stazionaria.

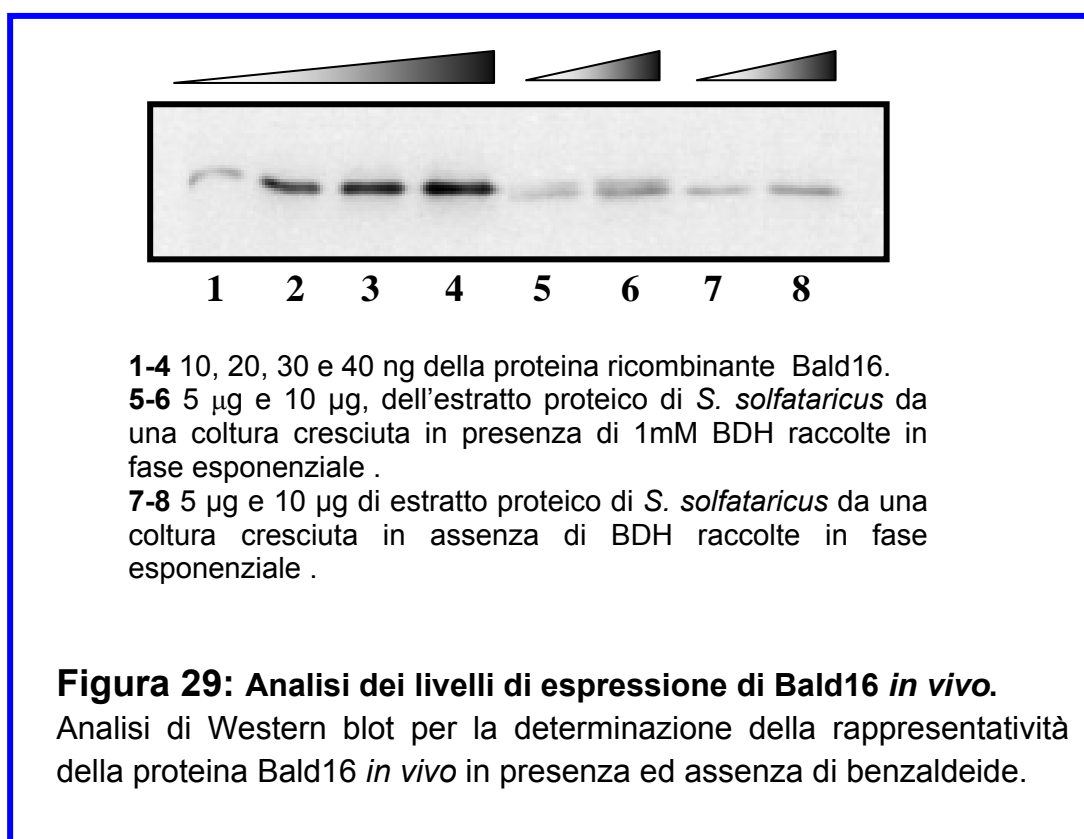
Altro dato interessante, nei campioni da cellule cresciute in presenza di aldeidi, la proteina Bald16 è rappresentata da un doppietto molto ravvicinato anziché da un segnale singolo (cellule non trattate).



Si è quindi deciso di cercare di determinare la rappresentatività delle proteine Bald16 ed Lrs14 *in vivo*, ovvero in estratti cellulari di *S. solfataricus* cresciuti sia in condizioni basali che in presenza di benzaldeide. A tal scopo quantità note della proteina ricombinante Bald16 o Lrs14 sono state sottoposte a Western blot semi-quantitativo. I segnali di chemiluminescenza ottenuti sono stati quantizzati mediante Chemi-doc (Biorad) utilizzando il programma Quantity One (Biorad) ed utilizzati per costruire le rette di taratura per le rispettive proteine.

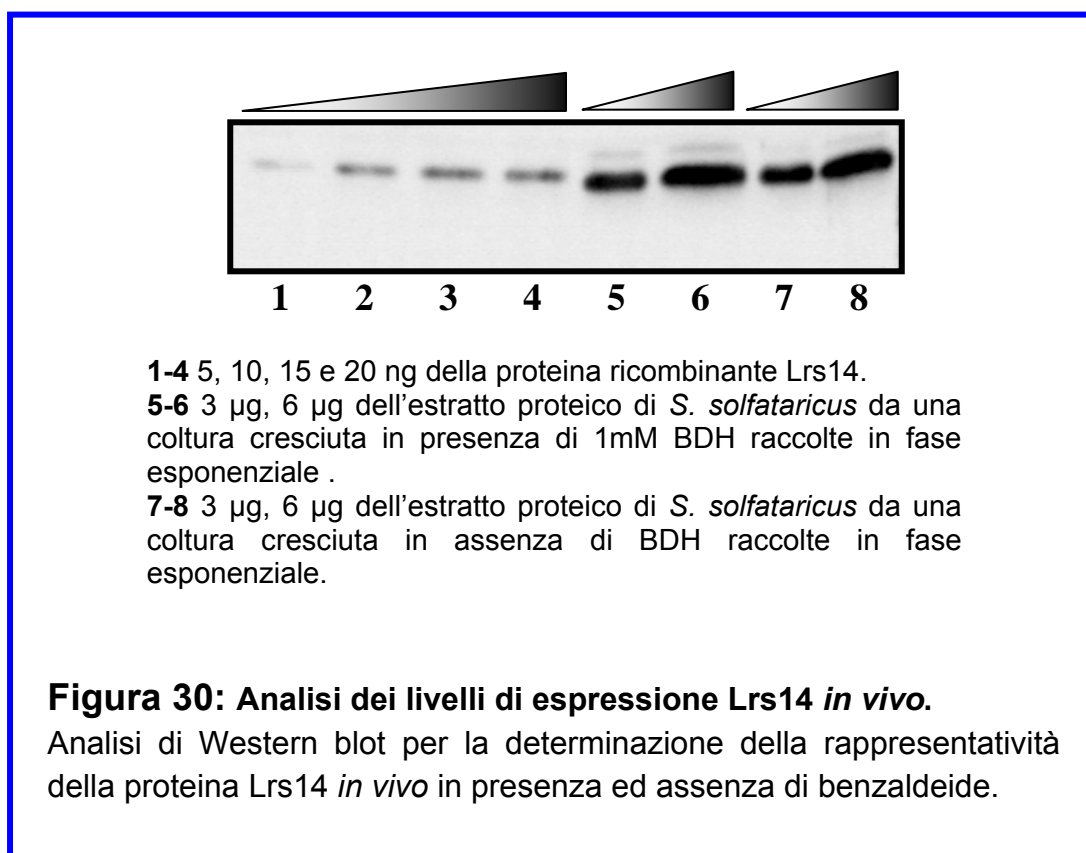
Sono stati quindi analizzati estratti proteici preparati da cellule di *S. solfataricus* P2 cresciute in presenza o in assenza di benzaldeide. I valori di chemiluminescenza relativi alle proteine Bald16 ed Lrs14 presenti negli estratti sono stati quindi interpolati con le rispettive rette di taratura. Nelle **figure 29** e **30** sono riportati i risultati degli esperimenti.

Come è possibile osservare in figura 29, i livelli della proteina Bald16 aumentano in presenza di benzaldeide. Interpolando i valori dei segnali di chemiluminescenza, ottenuti quando gli estratti sono stati sottoposti a Western blot, con la retta di taratura di Bald16 è stato possibile determinare che la rappresentatività di Bald16 è pari allo 0.13% negli estratti proteici da cellule cresciute in assenza di BDH e raccolte in fase di crescita esponenziale. Tale valore raddoppia in cellule cresciute in presenza di 1 mM BDH. Negli estratti indotti da benzaldeide, si osserva ancora la presenza di un doppietto relativo alla proteina Bald16 che potrebbe indicare una modifica post-traduzionale della proteina in seguito allo stress indotto dall'aldeide aromatica.



Lo stesso esperimento condotto utilizzando anticorpi  $\alpha$ -Lrs14 non ha evidenziato, al contrario, alcuna variazione rilevabile dei livelli proteici di Lrs14 in risposta all'aggiunta dell'aldeide aromatica (**figura 30**). Dai calcoli effettuati è risultato inoltre che Lrs14 rappresenta l'1.6%-1.8% circa delle proteine totali solubili, sia in assenza che in presenza di BDH. Inoltre, a differenza di quanto detto per Bald16, i livelli di proteina Lrs14 risultano maggiori in fase stazionaria rispetto a quella esponenziale (dati non mostrati). Le differenze dei livelli e dei tempi d'espressione di Bald16 e Lrs14 hanno spinto a pensare che Bald16 possa svolgere un ruolo regolativo più specificamente limitato all'ambito del metabolismo delle aldeidi aromatiche, e che Lrs14 sia implicata in un "pathway" di regolazione più ampio. Questa osservazione troverebbe riscontro anche nel dato, noto in letteratura, che i sistemi di

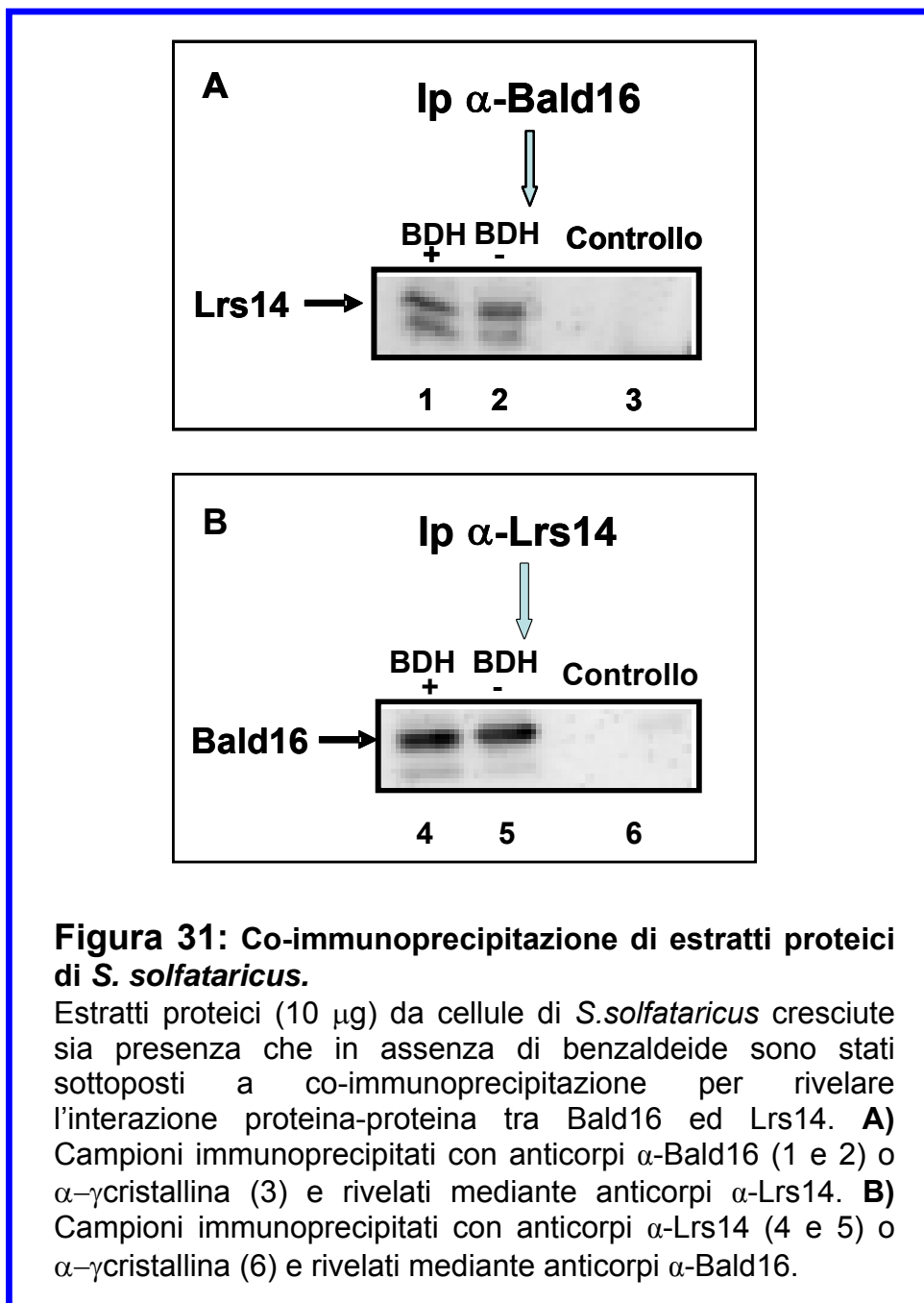
detossificazione, in particolare quelli batterici, sono spesso soggetti a complessi meccanismi di regolazione che vedono coinvolti sia regolatori locali che globali che garantiscono in tal modo una fine modulazione della risposta cellulare alle sostanze tossiche (Gkrovic, 2002).



## Analisi dell'interazione Bald16-Lrs14

### Co-immunoprecipitazione di estratti proteici di *S. solfataricus*

Come fin qui dimostrato, le proteine Bald16 ed Lrs14 sono in grado di legare in maniera sequenza specifica sia il promotore dell'alcool deidrogenasi Sso2536 sia quello del promotore dell'operone *mar-like*. Tale evidenza ha lasciato ipotizzare una eventuale interazione tra i due fattori trascrizionali, per la modulazione dell'espressione di uno o di entrambi i geni coinvolti. Per verificare tale ipotesi, sono stati allestiti degli esperimenti di co-immunoprecipitazione cimentando con anticorpi primari  $\alpha$ -Bald16 o  $\alpha$ -Lrs14 gli estratti proteici di *S. solfataricus* P2, ottenuti da colture cresciute in assenza o in presenza di BDH raccolte in fase di crescita esponenziale. Brevemente, agli estratti cellulari si aggiunge siero immune, contenente anticorpi policlonali diretti contro una delle due proteine d'interesse e il complesso anticorpo-proteina è precipitato usando la resina proteina-A sefarosio. L'immunoprecipitato è analizzato successivamente mediante Western Blot utilizzando l'anticorpo per la seconda proteina. I risultati ottenuti negli esperimenti di co-immunoprecipitazione sono mostrati in **figura 31**.

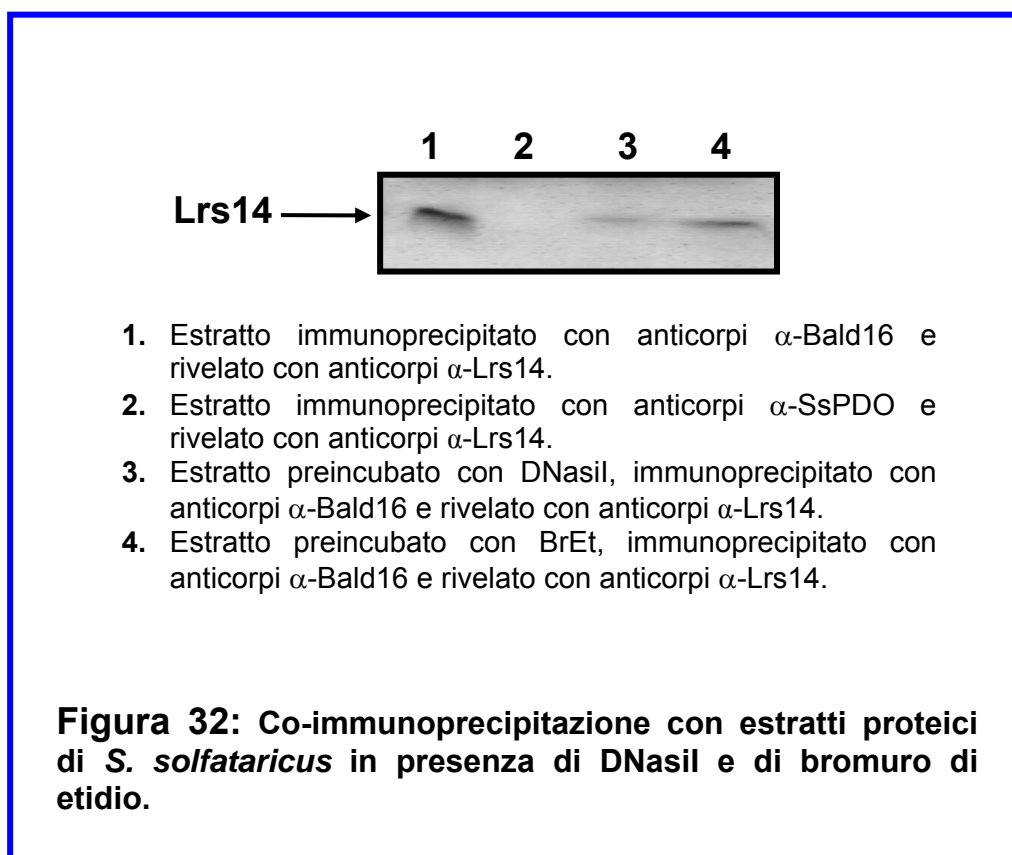


In un primo esperimento gli estratti proteici di *S. solfataricus* P2, da colture cresciute con o senza BDH (figura 31 A, campioni 1 e 2 rispettivamente) sono stati immunoprecipitati con anticorpi  $\alpha$ -Bald16 e la rivelazione è stata effettuata con anticorpi  $\alpha$ -Lrs14. Dal momento che si osserva una banda di peso molecolare corrispondente alla proteina Lrs14 (campioni 1 e 2), è stato possibile concludere che la proteina Lrs14 è immunoprecipitata perchè legata a Bald16 e dunque le due proteine interagiscono tra loro "in vivo". La specificità dell'interazione è stata confermata dall'assenza di segnale nel controllo negativo (campione 3), dove l'estratto (da una coltura cresciuta senza benzaldeide) è stato immunoprecipitato con anticorpi non specifici per nessuna delle due proteine (anticorpi  $\alpha$ - $\gamma$  cristallina).

Questi risultati sono stati confermati da un esperimento complementare, in cui gli estratti di *S. solfataricus* P2, da colture cresciute con o senza benzaldeide (figura 31 B, campioni 4 e 5 rispettivamente) sono stati immunoprecipitati con anticorpi  $\alpha$ -Lrs14 e rivelati con anticorpi  $\alpha$ -Bald16. Anche in questo caso è stato possibile evidenziare una banda corrispondente alla proteina Bald16 in entrambe le condizioni di crescita (campioni 4 e 5). Anche in questo caso, l'assenza di segnali nel controllo negativo (campione 6) ha confermato la specificità delle interazioni osservate. I risultati di questi due esperimenti permettono dunque di affermare che Lrs14 e Bald16 interagiscono tra loro "in vivo".

### Co-immunoprecipitazione in presenza di bromuro di etidio e di DNasil

Gli esperimenti precedentemente illustrati hanno dimostrato che *in vivo*, in cellule di *S. solfataricus*, le proteine Bald16 ed Lrs14 possono trovarsi insieme a formare un complesso multiproteico. Essendo entrambe delle "DNA-binding proteins" si è andati a determinare se l'interazione tra i due fattori trascrizionali potesse o meno essere mediata dal DNA. A tale scopo sono stati effettuati dei saggi di co-immunoprecipitazione dopo trattamento degli estratti proteici con DNasil, che digerisce il DNA genomico grazie alla sua attività nucleasica. Gli stessi saggi sono stati condotti alternativamente in presenza di bromuro di etidio che è noto distruggere gran parte delle interazioni proteina-DNA. Tale molecola, infatti, intercalandosi tra le basi azotate del DNA, è capace di indurre alterazioni topologiche tali da non consentire più il legame delle proteine al DNA. I risultati dell'esperimento sono mostrati in **figura 32**.



Com'è possibile osservare, sia nel caso in cui gli estratti sono stati pretrattati con DNAsil e successivamente immunoprecipitati con anticorpi  $\alpha$ -Bald16 (campione 3), sia in quello in cui alternativamente sono stati preincubati con bromuro di etidio e immunoprecipitati con anticorpi  $\alpha$ -Bald16 (campione 4), è possibile osservare una banda di peso molecolare corrispondente al segnale dato dalla proteina Lrs14. Tale dato indica che l'interazione non è mediata dal DNA. La specificità dell'interazione è confermata dall'assenza del segnale relativo a Lrs14 nel controllo negativo (campione 2), in cui l'estratto è stato immunoprecipitato con anticorpi diretti contro una proteina disolfuro ossido-riduttasi (*Sso0192*) di *S. solfataricus* (anticorpi  $\alpha$ -SsPDO).

Quindi, nonostante l'assenza del DNA genomico, dovuta a digestione enzimatica con DNAsil (campione 3) o l'impossibilità dei due fattori trascrizionali di legarsi al DNA in presenza di BrEt (campione 4), l'interazione tra le proteine Bald16 ed Lrs14 risulta conservata.

### **Interazione “in vitro” con le proteine ricombinanti: saggi di co-ip e di pull down**

Una volta dimostrato che l'interazione proteina-proteina non è mediata dal DNA, si è cercato di comprendere se l'interazione dei due fattori trascrizionali potesse avvenire con o senza mediazione di altri fattori proteici in *S. solfataricus*. Per far ciò si sono seguiti due diversi approcci sperimentali.

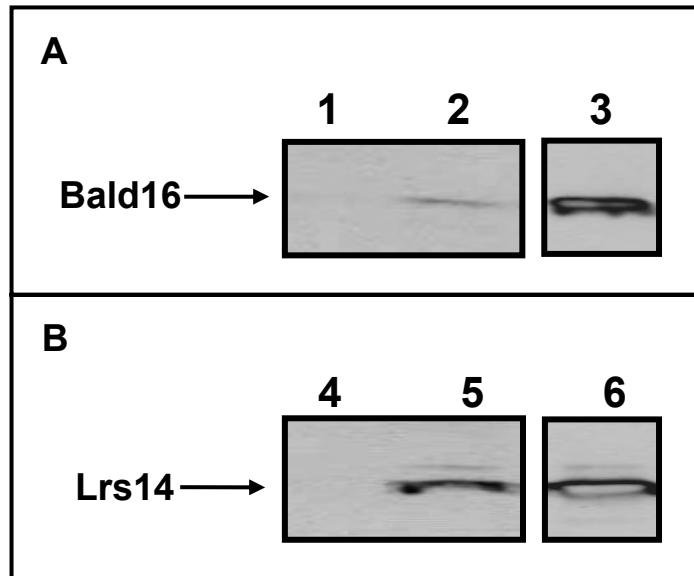
In un primo caso, si sono allestiti saggi di co-immunoprecipitazione con le sole proteine ricombinanti purificate Bald16 e Lrs14. La co-immunoprecipitazione è stata condotta secondo protocollo, dopo che le due proteine purificate erano state fatte interagire in un opportuno tampone di incubazione (vedi materiali e metodi). Gli immunoprecipitati sono stati separati mediante SDS-PAGE ed analizzati per Western Blot. In **figura 33** sono mostrati i risultati ottenuti.

Quando è stata allestita la co-immunoprecipitazione di Bald16 e Lrs14 con anticorpi  $\alpha$ -Lrs14 seguita dalla rivelazione con anticorpi  $\alpha$ -Bald16 (figura 33 A, campione 2), si è osservata la presenza di una banda corrispondente a Bald16 a conferma dell'interazione diretta. Quale controllo negativo si è deciso di allestire la co-immunoprecipitazione delle proteine Bald16 e SsPDO con anticorpi  $\alpha$ -SsPDO (campione 1). La rivelazione del controllo negativo con anticorpi  $\alpha$ -Bald16 non ha dato nessun segnale, ad indicazione che nelle condizioni testate non vi è la formazione di complessi dovuti ad interazioni aspecifiche.

Parallelamente è stato condotto un saggio di co-immunoprecipitazione reciproco a quello descritto (figura 33 B). Analogamente al primo esperimento, si osserva una banda relativa a Lrs14 quando le proteine ricombinanti Bald16 e Lrs14 sono state immunoprecipitate con anticorpi  $\alpha$ -Bald16 (campione 5). Anche in questo caso l'interazione osservata è specifica dal momento che nel controllo negativo (campione 4) non si rivela la presenza di nessuna banda di 14 kDa.

Il secondo tipo di approccio sperimentale utilizzato si è basato su un esperimento di pull-down. In questo caso si è sfruttata la presenza della coda di istidine all'estremità C-terminale della proteina Lrs14 e quindi la sua affinità per la resina Ni-NTA. Quando Lrs14 è preincubata con la proteina d'interesse (Bald16) o con una proteina di controllo (chimotripsinogeno), l'eventuale complesso proteico formatosi può essere precipitato in seguito all'aggiunta di resina Ni-NTA. I complessi proteina/proteina possono essere poi separati mediante SDS-PAGE e rivelati mediante colorazione con Blue-Coomassie. In **figura 34** sono illustrati i risultati ottenuti. Allo scopo di verificare se l'eventuale interazione tra Bald16 e Lrs14 (campioni 1 e 2) fosse

dipendente dalla presenza di DNA, Lrs14 è stata incubata con Bald16 sia in presenza dell'*Ssadh-pr* (sequenza di legame specifica di entrambe le proteine) che di un frammento di DNA corrispondente alla sequenza codificante del gene *Sso7d* di *S. solfataricus*, non riconosciuto dalle proteine d'interesse.



1. Co-immunoprecipitazione di Bald16 e SsPDO con anticorpi  $\alpha$ -SsPDO e rivelazione con anticorpi  $\alpha$ -Bald16.
2. Co-immunoprecipitazione di Bald16 e Lrs14 con anticorpi  $\alpha$ -Lrs14 e rivelazione con anticorpi  $\alpha$ -Bald16.
3. Proteina ricombinante Bald16.
4. Co-immunoprecipitazione di Lrs14 e SsPDO con anticorpi  $\alpha$ -SsPDO e rivelazione con anticorpi  $\alpha$ -Lrs14.
5. Co-immunoprecipitazione di Bald16 e Lrs14 con anticorpi  $\alpha$ -Bald16 e rivelazione con anticorpi  $\alpha$ -Lrs14.
6. Proteina ricombinante Lrs14.

**Figura 33: Co-immunoprecipitazione delle proteine ricombinanti purificate.**

**A)** Rivelazione con anticorpi  $\alpha$ -Bald16. **B)** Rivelazione con anticorpi  $\alpha$ -Lrs14.

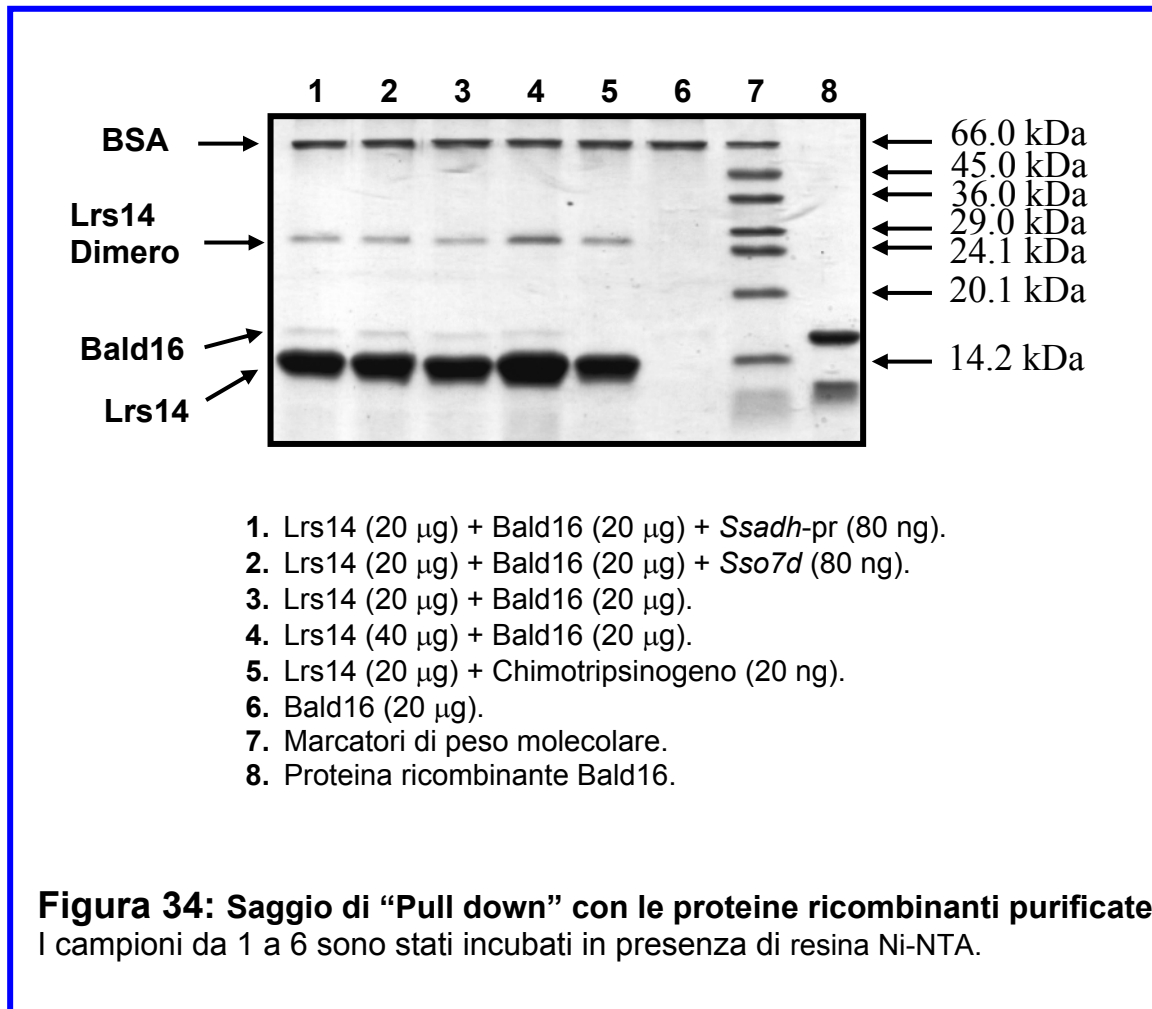
Quando questi campioni sono precipitati con la resina ed analizzati per SDS-PAGE, si osservano le bande corrispondenti a Bald16 ed a Lrs14 indipendentemente dal frammento di DNA usato ed anche quando uguali quantità di Bald16 e Lrs14 sono incubate in assenza di DNA (campione 3). Ciò indica che il DNA non è essenziale per l'interazione proteina - proteina. Inoltre, raddoppiando la quantità di Lrs14 rispetto a quella di Bald16 (campione 4), si osserva un leggero aumento corrispondente della banda relativa a Bald16, a conferma della specificità dell'interazione.

Quale controllo negativo, la proteina Lrs14 è stata incubata con il chimotripsinogeno prima di essere precipitata con la resina (campione 5). Un ulteriore controllo negativo



(campione 6) è stato effettuato incubando la proteina Bald16 (priva di una coda di istidine all'estremità C-terminale) con la resina.

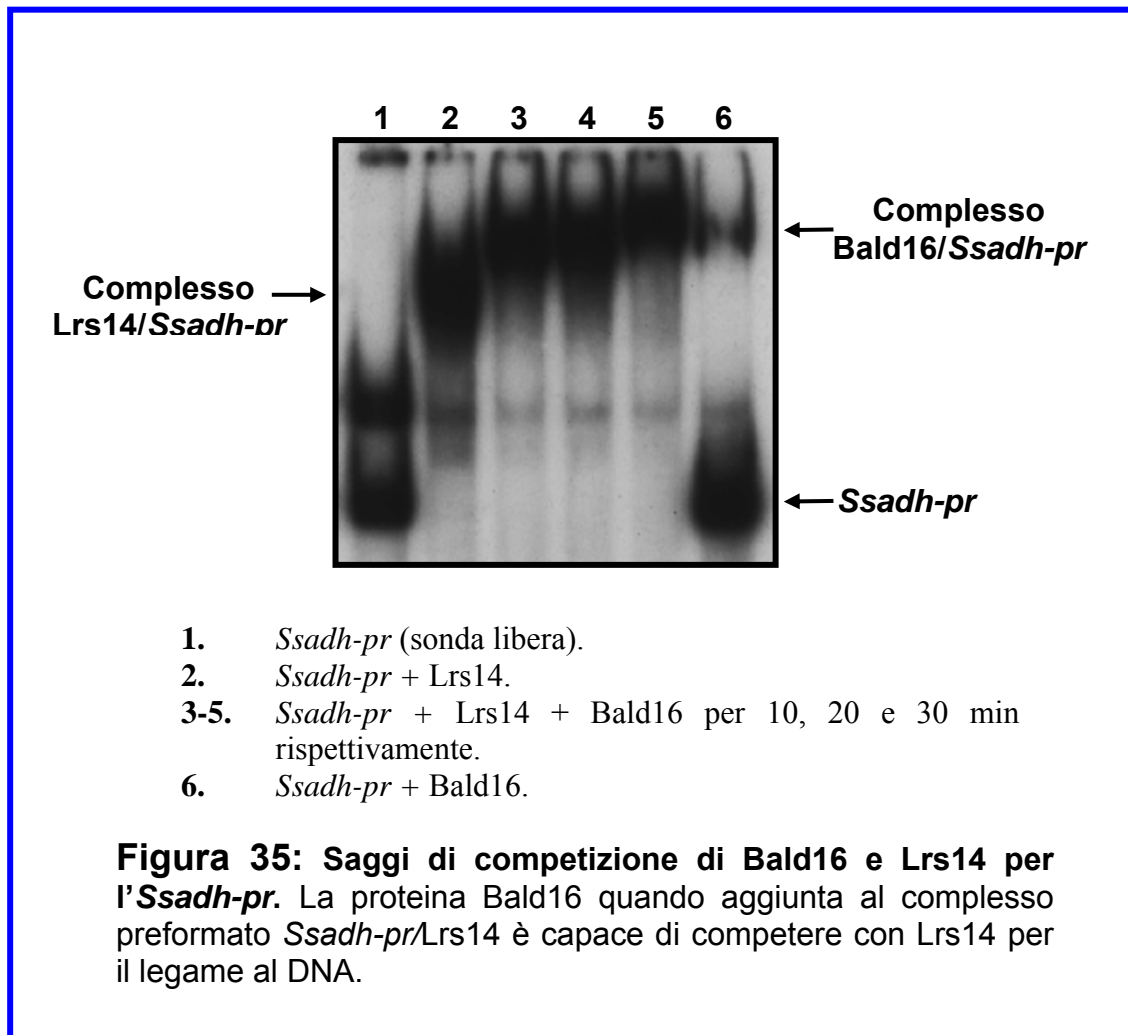
Il saggio di pull-down conferma i risultati ottenuti negli esperimenti di co-immunoprecipitazione ovvero che Bald16 ed Lrs14 nelle condizioni da noi testate, sono capaci di interagire fisicamente tra di loro senza l'ausilio del DNA o di altri fattori proteici.



### Competizione di Lrs14-Bald16 per l'*Ssadh-pr*

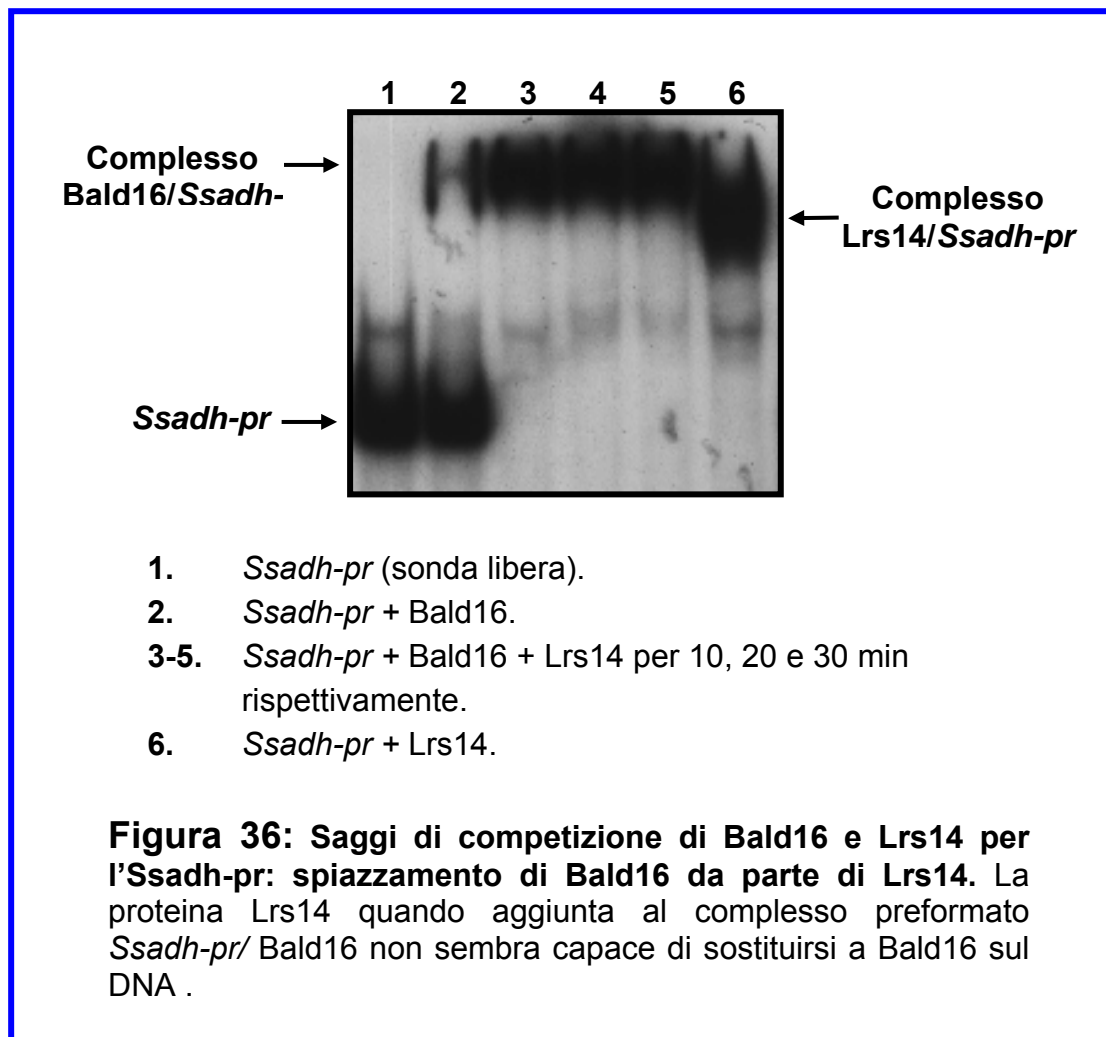
Gli esperimenti di footprinting condotti sul promotore dell'operone *mar-like* (figure 21 e 27) e sull' *Ssadh-pr* (Fiorentino *et al.*, 2003) hanno evidenziato che la regione di legame di Lrs14 si sovrappone a quella di Bald16 anche se la prima è meno estesa. Allo scopo di delucidare la rete di interazioni molecolari che ha luogo nell'attivazione trascrizionale del gene *Ssadh* si è tentato di stabilire se le due proteine fossero capaci di competere per il legame ai promotori. In particolare si è scelto di testarle per il legame all' *Ssadh-pr*. Sono stati dunque allestiti esperimenti di ritardo della mobilità elettroforetica dell'*Ssadh-pr*, in cui una delle due proteine è stata dapprima preincubata con la sequenza di regolazione e l'altra è stata aggiunta a tempi successivi. I risultati degli esperimenti di competizione sono mostrati in **figura 35 e 36**.

In un primo esperimento è stato analizzato l'eventuale spiazzamento di Lrs14 da parte della proteina Bald16 (figura 35). Quando Lrs14 è stata preincubata con l'*Ssadh-pr* (campione 2) ed è stata aggiunta Bald16 ad intervalli di tempo crescenti, si è osservato un graduale spostamento del segnale di ritardo della mobilità elettroforetica (campioni 3-4-5). Il segnale autoradiografico osservato sembrerebbe corrispondere a quello dato dalla proteina Bald16. Dal momento che il segnale è comunque più intenso di quello osservato per la sola proteina Bald16 (campione 6) si potrebbe concludere che Bald16 sia in grado di competere con Lrs14 per il legame al promotore e che la presenza contemporanea di Lrs14 possa favorire il reclutamento di Bald16 sull'*Ssadh-pr*.



In un esperimento parallelo è stato verificato lo spiazzamento di Bald16 da parte di Lrs14 sul medesimo promotore (figura 36). In questo caso, quando Bald16 è stata preincubata con l'*Ssadh-pr* (campione 2) ed è stata aggiunta Lrs14 a tempi successivi (campioni 3-4-5), si è continuato ad osservare un segnale autoradiografico di ritardo della mobilità elettroforetica ascrivibile alla proteina Bald16 e non alla proteina Lrs14. Anche in questo caso si osserva un'intensificazione del segnale di ritardo.

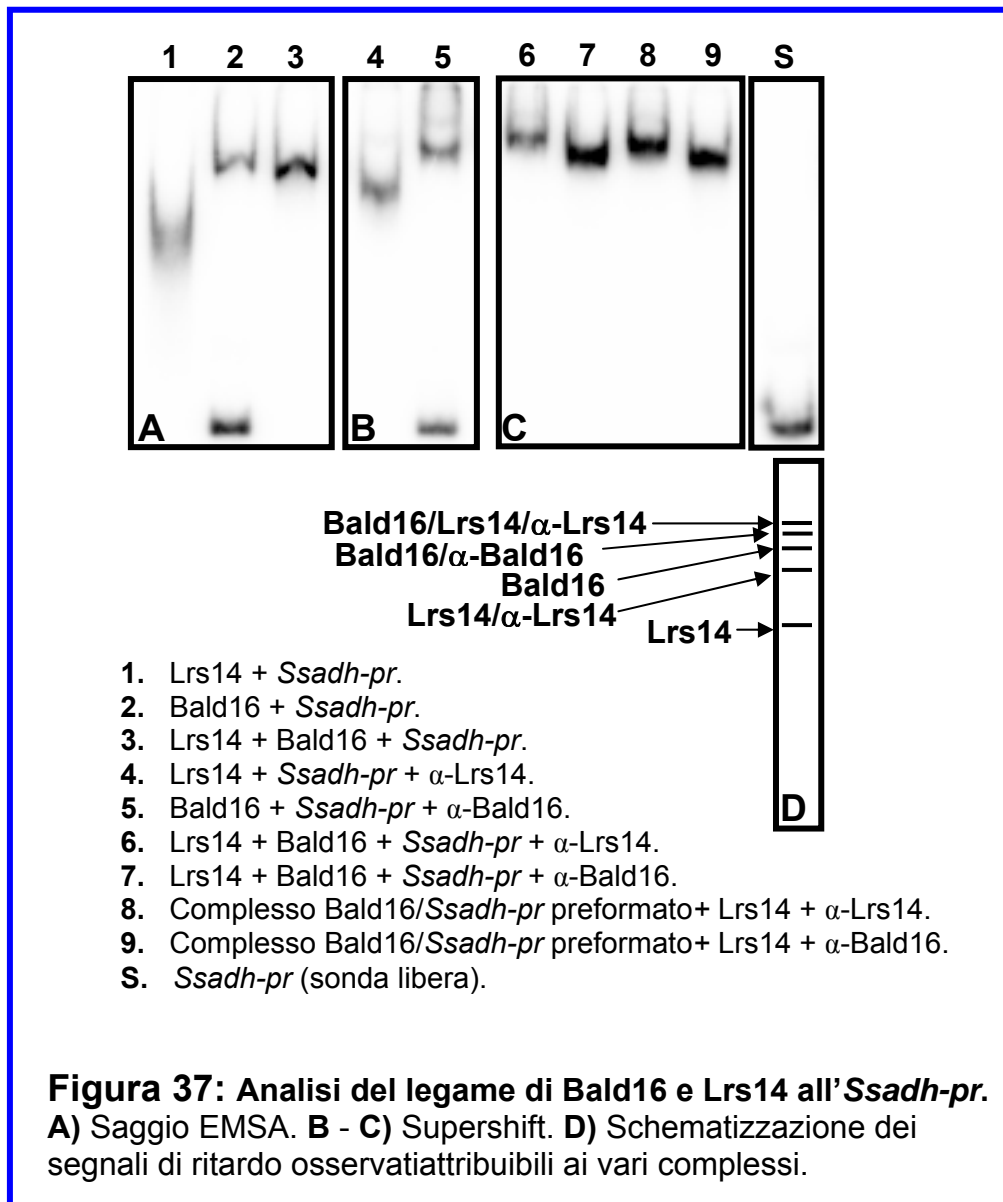
I risultati di questi esperimenti sembrerebbero dunque indicare che l'interazione, più che la competizione tra le due proteine, potrebbe essere volta ad incrementare la capacità di legame di Bald16 sull'*Ssadh-pr*.



### Super shift

Le variazioni della mobilità elettroforetica dei complessi proteina/DNA non consentono di identificare le proteine coinvolte in tali complessi, laddove l'identificazione può essere ottenuta aggiungendo anticorpi specifici per le proteine in questione. La mobilità elettroforetica del complesso proteina/DNA aumenterà in seguito al legame dell'anticorpo. Per chiarire le interazioni molecolari che avvengono tra Bald16 e Lrs14, quando competono per l'*Ssadh-pr*, sono stati allestiti esperimenti di *supershift* utilizzando gli anticorpi  $\alpha$ -Bald16 o  $\alpha$ -Lrs14. A tal scopo sono stati allestiti saggi EMSA dell'*Ssadh-pr* in due differenti condizioni sperimentali: sia incubando contemporaneamente Bald16 e Lrs14 con il promotore, sia preincubando Bald16 con il DNA per 30 min a 60°C ed aggiungendo in seguito Lrs14. Al termine dell'incubazione con il DNA, sono stati aggiunti alternativamente gli anticorpi diretti contro le due proteine d'interesse e l'incubazione è stata proseguita per ulteriori 15 min a temperatura ambiente. In **figura 37** sono mostrati i risultati degli esperimenti di *supershift*.

Gli anticorpi  $\alpha$ -Bald16 e  $\alpha$ -Lrs14 riconoscono specificamente le proteine d'interesse e il legame anticorpo/proteina non interferisce con la capacità delle proteine di legarsi al DNA. Infatti, quando Lrs14 è stata preincubata con l'*Ssadh-pr* ed è stato aggiunto



l'anticorpo  $\alpha$ -Lrs14 (campione 4), si osserva un segnale autoradiografico più alto rispetto al normale segnale del complesso *Ssadh-pr*/Lrs14 (campione 1). Un segnale di supershift è osservabile anche quando il complesso Bald16/*Ssadh-pr* è stato incubato con anticorpi  $\alpha$ -Bald16 (campione 5) dal momento che si forma un complesso macromolecolare di dimensioni maggiori del solo complesso Bald16/*Ssadh-pr* (campione 2).

Quando Bald16 e Lrs14 sono state incubate contemporaneamente con l'*Ssadh-pr* e il complesso è rivelato con i due anticorpi, è sempre possibile osservare un segnale di "supershift". Tuttavia, con anticorpi  $\alpha$ -Lrs14 si evidenzia un segnale a più alto peso molecolare rispetto a quello evidenziato con la sola proteina Lrs14 (campione 6). Questo porterebbe ad ipotizzare che Bald16 resti legata al promotore. Quando invece si analizza il supershift con anticorpi  $\alpha$ -Bald16 è possibile osservare una banda alla stessa altezza del "supershift" di Bald16 (campione 7). Questi risultati possono essere spiegati ammettendo che l'anticorpo  $\alpha$ -Bald16 mascheri il sito d'interazione Bald16-Lrs14 impedendo la formazione di un complesso ternario Bald16/Lrs14/DNA.

Parallelamente è stata verificata la capacità di Lrs14 di competere con Bald16 per il legame all'*Ssadh-pr* e l'identificazione delle proteine legate al promotore è stata effettuata usando anticorpi  $\alpha$ -Lrs14 o  $\alpha$ -Bald16. Quando è stato aggiunto l'anticorpo  $\alpha$ -Lrs14 (campione 8), si osserva un segnale più alto rispetto a quello del *super-shift* di Lrs14 ad indicazione che Lrs14 è legato all'*Ssadh-pr* e che si è formato probabilmente un complesso ternario con Bald16. Viceversa, quando è stato aggiunto l'anticorpo  $\alpha$ -Bald16 (campione 9), si osserva un segnale all'altezza del *super-shift* di Bald16, concludendo che anche in questo caso l'anticorpo  $\alpha$ -Bald16 interferisce con il legame di Bald16 con Lrs14 non consentendo la formazione di un complesso ternario. Questi risultati sembrerebbero confermare i dati ottenuti dall'esperimento precedente di competizione; che entrambe le proteine si legano contemporaneamente all'*Ssadh-pr* e che Lrs14 non è in grado di spostare Bald16 dal promotore.

## Realizzazione di sistemi reporter per il monitoraggio di Aldeidi aromatiche

Parallelamente agli studi volti a verificare il meccanismo presunto di detossificazione, si è provato a mettere a punto un sistema reporter in grado di rilevare la presenza di aldeidi aromatiche in campioni di acque e/o terreni contaminati da tali molecole. A tal scopo si è deciso di utilizzare le sequenze di regolazione al 5' dell'operone "*Mar-like*" (*Sso1351-Sso1352*) ed a monte dell'*alcohol deidrogenasi* (*Sso2536*) di *S.solfataricus* P2. Le due sequenze sono state ottenute dai vettori plasmidici *pMar-likepr* (Mat e met) e *pUC18-SsAdhpr*, rispettivamente in cui erano stati clonati precedentemente e trasferiti nel vettore plasmidico *minipUC28*, un vettore dal quale sono state eliminate tutte le sequenze di regolazione che avrebbero potuto interferire con la funzionalità dei promotori analizzati.

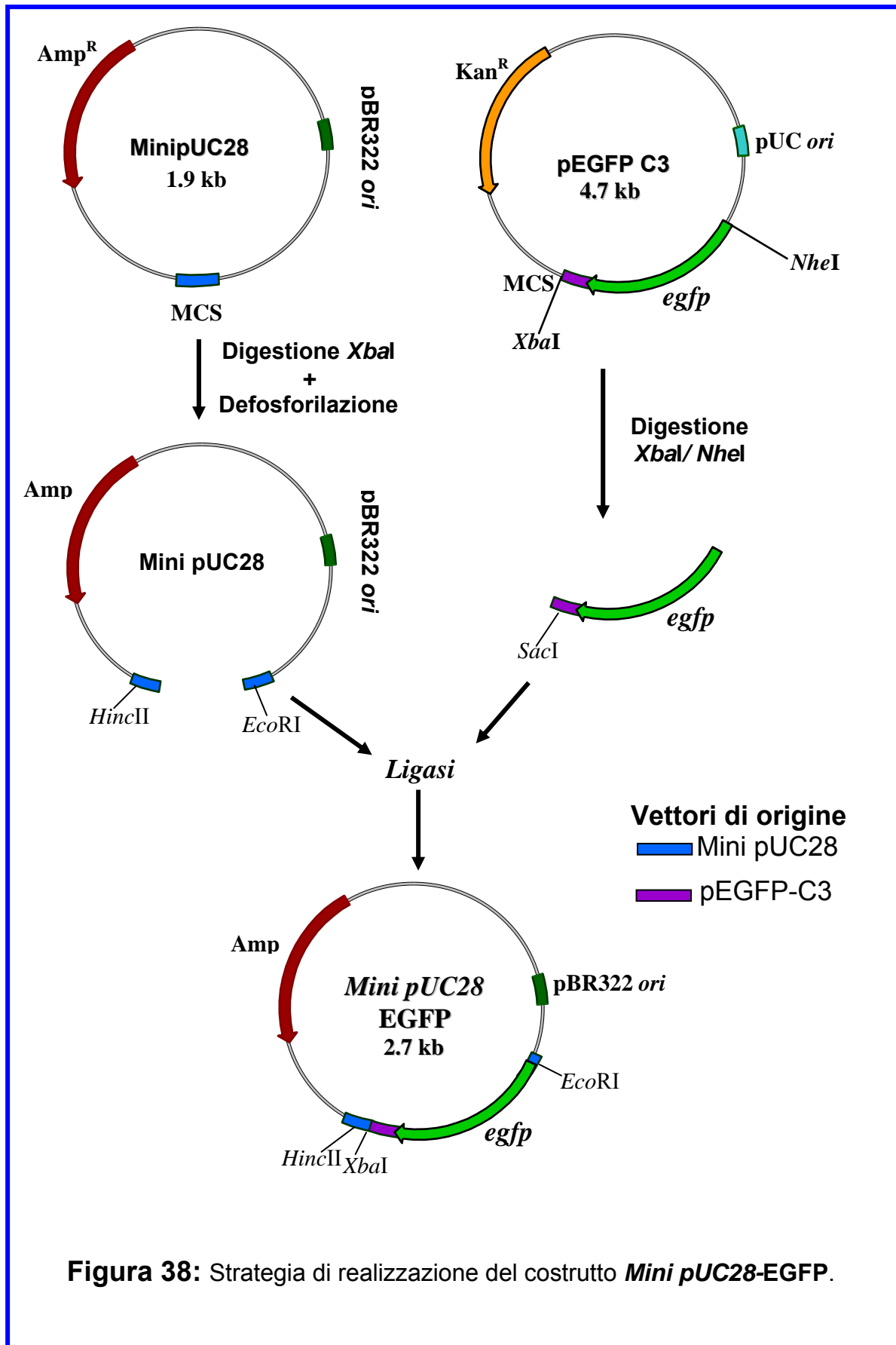
Per saggiare l'attività eterologa di tali promotori si è scelto di impiegare come gene reporter il gene *egfp*, ottenuto dal plasmide commerciale *pEGFP-C3*, codificante per una versione "enhanced" della green fluorescent protein che mostra una sensibilità fino a trenta volte superiore rispetto a quella della proteina wild-type. Tale gene (*egfp*) è stato inserito nel plasmide *minipUC28* (gentilmente fornito dal Dr. Cannio), a valle dei due promotori in modo tale da osservare la sua espressione regolata dal DNA archaeale.

Il vettore *minipUC28* è un vettore plasmidico di circa 1.9 kb costituito dalle sole sequenze polylinker, *pBR322 ori* e *Amp<sup>r</sup>* dal quale sono state eliminate tutte le sequenze di regolazione. Il gene *egfp* è stato "recuperato" dal plasmide commerciale *pEGFP-C3*, effettuando delle singole digestioni con gli enzimi di restrizione *NheI/XbaI*. Il plasmide opportunamente linearizzato è stato ligato in un rapporto molecolare di 1:1 al gene *egfp* per produrre il costrutto intermedio *minipUC28-EGFP* che è stato utilizzato per il successivo clonaggio dell'*Ssadh-pr* e del promotore *ml-pr*. (Figura 38).

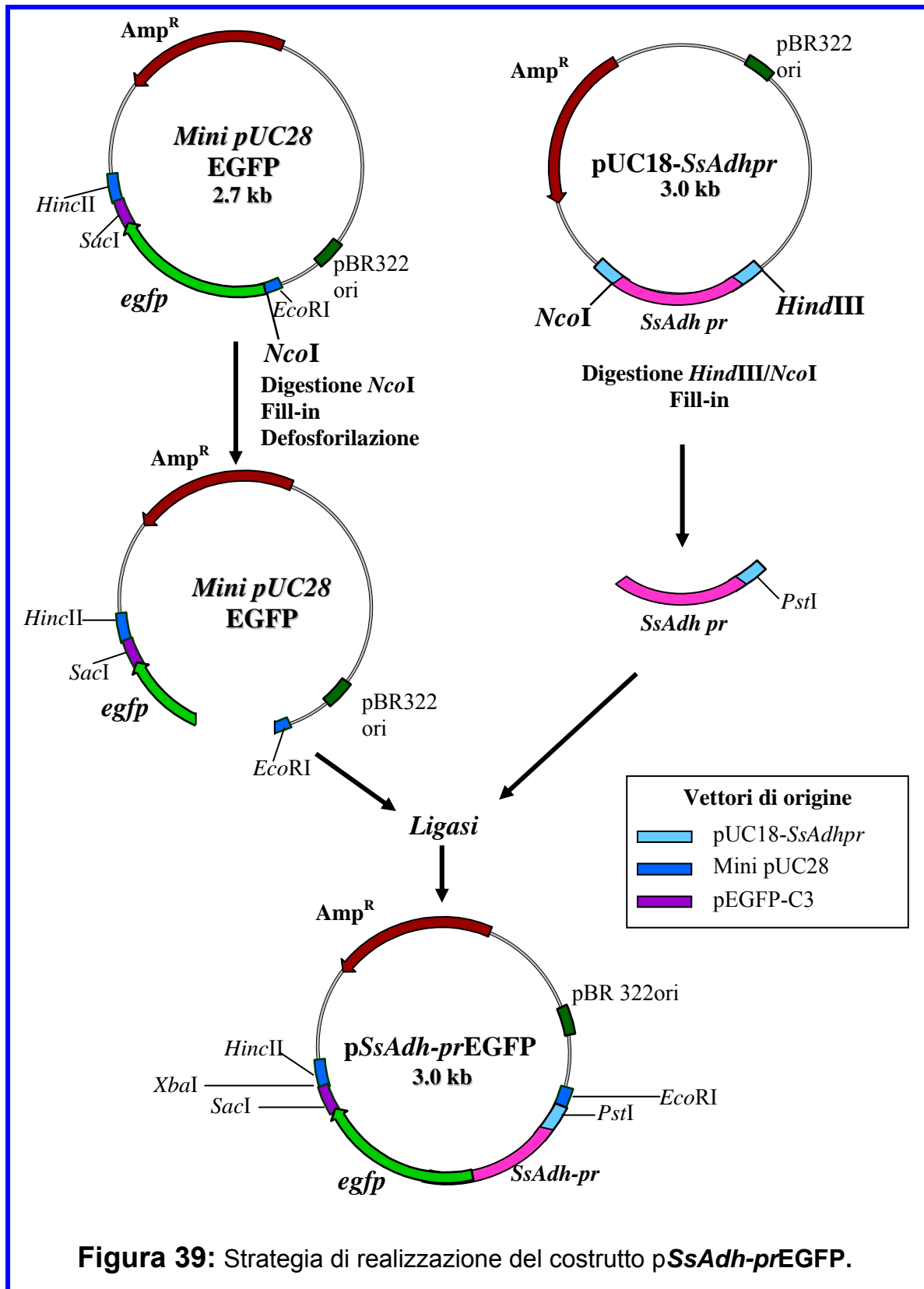
Per ciascuno dei due plasmidi ottenuti sono stati realizzati dei controlli rappresentati da costrutti che avevano i promotori clonati nell'orientamento opposto a monte del gene reporter e da costrutti che presentavano solo il gene reporter, in assenza del promotore in esame.

La strategia per la realizzazione dei costrutti (riportata in dettaglio in Materiali e Metodi) è riassunta nelle figure 39 e 40.

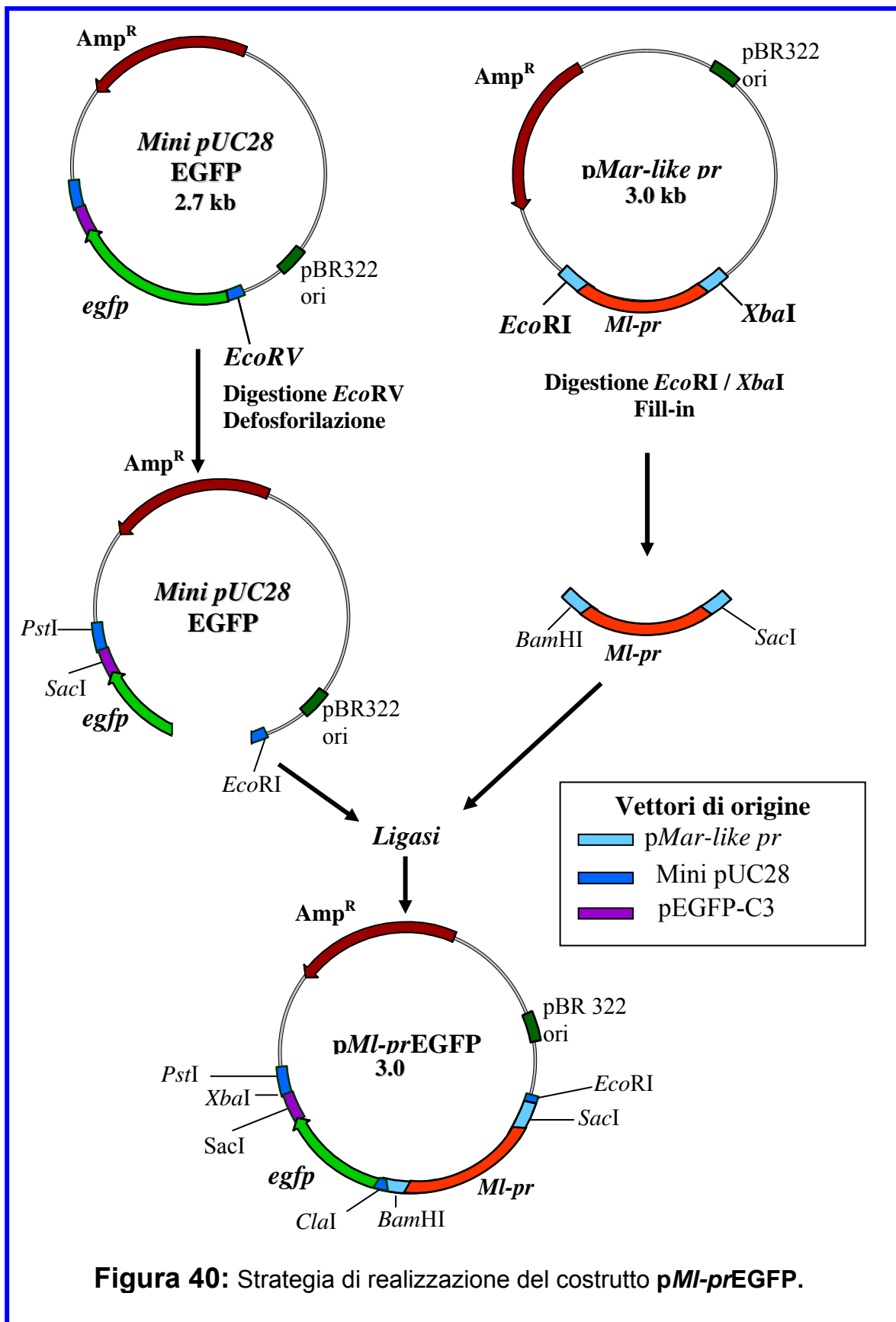
Brevemente, per la realizzazione dei costrutti *pSsAdh-prEGFP* e *pMI-prEGFP*, il promotore del gene dell'*alcohol deidrogenasi* (*Ssadh-pr*) e



**Figura 38:** Strategia di realizzazione del costrutto *Mini pUC28-EGFP*.



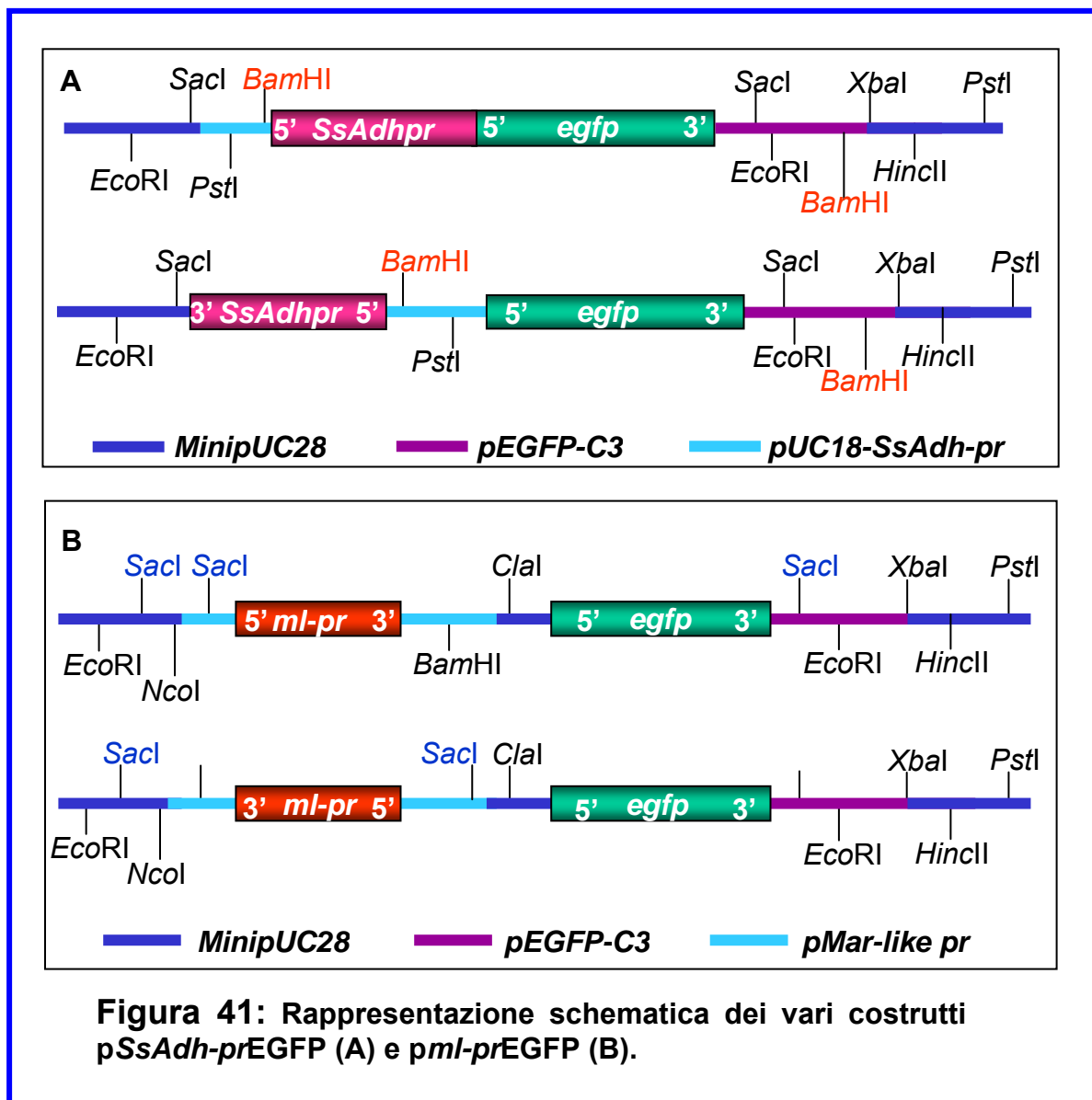
quello dell'operone *Mar-like* di *Sulfolobus solfataricus* sono stati isolati dai vettori pUC18-SsAdhpr e pMar-likepr in cui erano rispettivamente clonati, mediante digestione enzimatica e ligati al vettore *minipUC28-EGFP* linearizzato in rapporto molecolare di 2:1. Le miscele di ligasi sono state utilizzate per trasformare, mediante





elettroporazione, cellule TOPF'10 di *E.coli* e le cellule trasformate sono state piastrate su LB-agar-ampicillina (100 µg/ml). Dalle colonie selezionate per entrambi i costrutti è stato estratto il DNA plasmidico che è stato sottoposto ad analisi di restrizione per individuare i cloni ricombinanti e stabilirne l'orientamento.

Per il costrutto *pSsAdh-prEGFP* si è scelto di utilizzare l'enzima *BamHI* in quanto è presente un primo sito di riconoscimento nel frammento *egfp* ed un secondo sito nel polylinker del vettore pUC18, proveniente dall'*Ssadh-pr*. Nel caso del plasmide non ricombinante (plasmide *minipUC28-EGFP*, privo del promotore), la digestione con tale enzima ha dato luogo alla sola linearizzazione del plasmide, corrispondente ad una banda di circa 2700 bp. Invece, nel caso in cui l'*Ssadh-pr* si era inserito nel corretto orientamento 5'-3' rispetto al gene *egfp*, si sono ottenuti due frammenti, uno di circa 1200 bp, corrispondente a quella parte del costrutto che comprende l'*Ssadh-pr* ed il gene *egfp* ed un secondo di 1800 bp, corrispondente alla parte rimanente del vettore *minipUC28*. Infine, nel caso in cui il promotore era inserito nell'orientamento 3'-5' rispetto al gene *egfp* si sono ottenuti due frammenti; uno di 800 bp, corrispondente al gene *egfp* ed uno di circa 2200 bp, corrispondente alla somma della lunghezza del vettore *minipUC28-EGFP* e dell'*Ssadh-pr*.



Per il costrutto *pMI-prEGFP*, al fine di controllare l'orientamento dell'inserito, è stato invece utilizzato l'enzima *SacI*. L'enzima *SacI* presenta nel costrutto tre siti di restrizione: uno nel polylinker del vettore *minipUC28*, un secondo a monte dell'estremità 5' dell'*ml-pr* (in quella parte derivante dal polylinker del vettore *pUC19*) ed un terzo sito di taglio a valle del gene *egfp*. Di conseguenza, dopo la digestione con l'enzima *SacI* nel caso dei cloni non ricombinanti si sono ottenuti due frammenti corrispondenti, in seguito ad analisi elettroforetica, ad una banda di 800 bp ed un'altra di 1900 bp. Il primo frammento di 800 bp corrisponde al gene *egfp* mentre il secondo, quello di 1900 bp, corrisponde al vettore *minipUC28*. Nel caso in cui l'*ml-pr* risultava inserito nel vettore recipiente in orientamento 5'-3' rispetto al gene *egfp*, in seguito a digestione con *SacI*, sono state ottenute tre bande di cui: una di circa 1100 bp corrispondente alla somma della lunghezza del gene *egfp* e di quella dell'*ml-pr*, una seconda banda di circa 20 bp (non visibile) e un'ultima banda di circa 1860 bp corrispondente alla lunghezza del rimanente vettore *minipUC28*. Nel caso in cui invece il promotore risultava inserito nell'orientamento opposto (3'-5'), la digestione con l'enzima *SacI* dava luogo a tre bande di cui una di 319 bp corrispondente al promotore, una seconda di circa 800 bp corrispondente al gene *egfp* ed una terza di 1900 bp corrispondente alla lunghezza del vettore *minipUC28*. Per controllare ulteriormente le regioni di giunzione, i cloni che sono risultati positivi in seguito a tale analisi di restrizione, sono stati sottoposti a sequenziamento presso la ditta MWG Biotech. La schematizzazione dei costrutti ottenuti è riportata in **figura 41**.

### **Analisi dei livelli di espressione dei costrutti repoter**

Al fine di testare la funzionalità dei costrutti reporter ottenuti come precedentemente descritto, si sono allestite delle crescite di cellule di *E. coli* trasformate con i vari plasmidi.

Le cellule sono state cresciute sia in presenza che in assenza di benzaldeide.

Per le crescite in presenza di benzaldeide è stato naturalmente necessario determinare preventivamente la concentrazione ottimale di aldeide, tale da rallentare ma non inibire la crescita cellulare dell'organismo ospite. Tale concentrazione è risultata essere pari a 5mM (dati non mostrati).

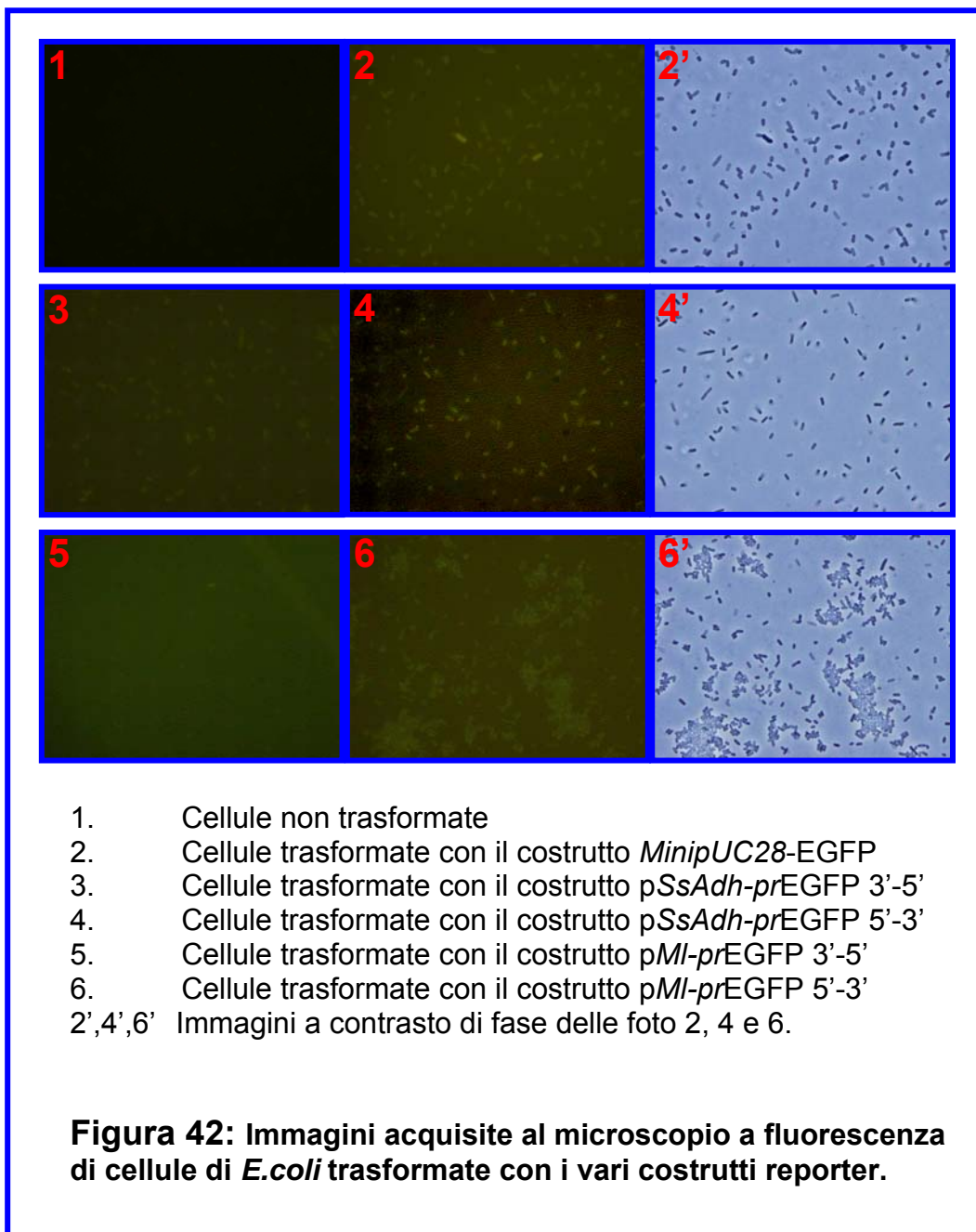
In un primo esperimento, si è andati a verificare anzitutto la capacità delle sequenze promotrici archeali di dirigere la trascrizione in cellule di *E. coli*.

Singole colonie di *E.coli* TOPF'10 trasformate con i costrutti *pSsAdh-prEGFP*, *pMI-prEGFP*, o *minipUC28-EGFP* (controllo negativo) e cellule non trasformate sono state inoculate in 10 ml di terreno di coltura LB contenente ampicillina (100 µg/ml) e lasciate crescere per circa 16 ore. Trascorso tale tempo, le varie colture sono state reinoculate in modo da partire da un valore di concentrazione cellulare pari a 0.25 OD, e se ne è seguita la crescita monitorando la variazione di assorbanza a 600 nm ogni 30 minuti.

Aliquote di 1 ml delle cellule cresciute in tali condizioni, sono state raccolte dopo 90 minuti, tempo questo corrispondente ad un valore di assorbanza pari a 1 O.D e ad una fase esponenziale di crescita e quindi osservate mediante microscopio a fluorescenza.

In **figura 42** sono riportate le fotografie, ottenute al microscopio a fluorescenza, delle cellule TOPF'10 di *E. coli* non trasformate (**immagine 1**) e delle stesse cellule trasformate con il costrutto *minipUC28-EGFP* (costrutto contenente solo il gene reporter *egfp*, senza sequenze regolatrici) (**immagine 2**). Accanto a tali foto è

riportata anche l'immagine a contrasto di fase della corrispondente popolazione cellulare (**immagine 2'**). Come si può notare, nel caso delle cellule di *E.coli* non trasformate non si osserva nessun segnale di fluorescenza mentre nel caso delle stesse cellule trasformate con il costrutto *minipUC28-EGFP* si osservano dei bassi segnali di fluorescenza ad indicazione di un livello basale di espressione, inatteso, probabilmente dovuto a sequenze di regolazione presenti altrove nel plasmide *minipUC28*.



Nella stessa figura sono riportate le immagini acquisite al microscopio a fluorescenza delle cellule di *E.coli* trasformate con il costrutto *pSsAdh-prEGFP 3'-5'* (costrutto contenente l'*SsAdh-pr* in orientamento 3'-5', a monte del gene *egfp*) (**immagine 3**) e delle stesse cellule trasformate con il costrutto *pSsAdh-prEGFP 5'-3'* (costrutto contenente l'*SsAdh-pr* in orientamento 5'-3', a monte del gene reporter *egfp*)

**(immagine 4)**. Confrontando le due immagini, si può osservare che nel caso delle cellule trasformate con il costrutto pSsAdh-prEGFP 5'-3', i segnali di fluorescenza emessi dalla EGFP sono di intensità leggermente maggiore rispetto a quelli ottenuti dalle stesse cellule trasformate con il costrutto pSsAdh-prEGFP 3'-5'. I livelli di fluorescenza emessi risultano più elevati anche rispetto alle cellule di controllo trasformate con il solo plasmide *minipUC28-EGFP* (**immagine 2**) ad indicazione che il promotore *SsAdh-pr* è in grado di dirigere l'espressione della EGFP in cellule batteriche.

Infine, per quanto riguarda il costrutto pMI-prEGFP sono riportate le immagini di fluorescenza di cellule di *E.coli* trasformate con i costrutti pMI-prEGFP 3'-5' (costrutto contenente l'*ml-pr* promotore in orientamento 3'-5', a monte del gene reporter) e pMI-prEGFP 5'-3' (costrutto contenente l'*ml-pr* promotore in orientamento 5'-3', a monte del gene *egfp*) (**immagini 5 e 6**). Si può notare che i livelli di fluorescenza della EGFP, ottenuti dalle cellule trasformate con il costrutto pMI-prEGFP 5'-3', sono leggermente più elevati rispetto a quelli ottenuti dalle stesse cellule trasformate con il costrutto pMI-prEGFP 3'-5', anche se in questo caso, la differenza nella fluorescenza emessa è inferiore rispetto a quella osservata nel caso delle cellule trasformate con i costrutti SsAdh-prEGFP 5'-3' e SsAdh-prEGFP 3'-5'.

Per testare la capacità della benzaldeide di modulare anche in cellule batteriche di *E. coli* l'espressione del gene reporter posto sotto il controllo trascrizionale dei due promotori archeali, si sono allestite delle crescite cellulari nelle stesse condizioni descritte in precedenza ma in presenza di benzaldeide (5mM) nel mezzo di coltura. Sono stati analizzati i cloni pSsAdh-prEGFP 5'-3', pMI-prEGFP 5'-3' ed i controlli pSsAdh-prEGFP 3'-5' e pMI-prEGFP 3'-5' (cloni con le sequenze promotrici in senso contrario al gene reporter).

Aliquote di 1 ml delle cellule cresciute in presenza del composto aromatico, sono state raccolte dopo 90 e 180 minuti, tempi corrispondenti a valori di densità ottica pari a 0.5 e 0.8 OD<sub>600 nm</sub>, fissate e poi osservate al microscopio.

Dall'osservazione non si è riusciti ad osservare una differenza nei livelli di espressione della EGFP in seguito all'aggiunta dell'aldeide aromatica, in quanto la fluorescenza emessa era di intensità paragonabile a quella contenuta nelle cellule cresciute in assenza dell'aldeide aromatica.

## DISCUSSIONE

Scopo di questo lavoro di tesi è stato la realizzazione di un sistema reporter, basato sull'uso di elementi genetici identificati nel crenarchaeota *Sulfolobus solfataricus*, per il biomonitoraggio in campioni di acque e suolo di molecole fortemente inquinanti quali le aldeidi aromatiche.

Composti aldeidici di natura aromatica, sono naturalmente presenti in natura in quanto possono derivare dalla degradazione di polimeri naturali quali la lignina. Numerosi microrganismi hanno pertanto evoluto meccanismi più o meno complessi per rispondere all'aumento intracellulare di tali sostanze estremamente tossiche. L'origine naturale di tali molecole non deve però trarre in inganno, in quanto, data la loro estrema persistenza nell'ambiente esse rappresentano una delle principali cause di inquinamento. Se si considera inoltre che simili molecole sono prodotte in grandi quantità dalle industrie chimiche e farmaceutiche, dall'utilizzo di combustibili fossili e di pesticidi, si capisce perché negli ultimi anni la concentrazione di tali inquinanti sia aumentata vertiginosamente.

La via d'elezione, nonché la più praticabile per il monitoraggio e l'eliminazione di queste molecole dall'ambiente, sembra essere l'utilizzo di microrganismi appositamente modificati. E' in quest'ottica che il presente lavoro si inserisce con l'idea di realizzare un ceppo di *E. coli* ingegnerizzato, recante un plasmide in cui un gene reporter è posto sotto il controllo di sequenze regolative che "rispondono" alla presenza delle aldeidi aromatiche.

Nel laboratorio presso cui questo progetto è stato svolto, da diversi anni si studia la regolazione dell'espressione genica negli archaea, utilizzando quale gene modello una *orf* codificante per una alcool deidrogenasi, annotata sul genoma di *Sulfolobus solfataricus* come *Sso2536*. Studi condotti su tale gene, hanno evidenziato che la sua trascrizione è regolata positivamente dalla presenza di benzaldeide nel mezzo di coltura (Cannio et al., 1999). La caratterizzazione dell'enzima ha inoltre dimostrato che la benzaldeide rappresenta il suo substrato naturale e che l'alcool deidrogenasi (ADH) presenta una elevata specificità per le aldeidi aromatiche. Successivamente, con il sequenziamento del genoma di *S. solfataricus* sono state identificate altre 12 differenti *orf* codificanti per altrettante putative alcool deidrogenasi. Una tale ridondanza genica ha fatto ipotizzare che differenti e specifiche funzioni assolate dalle varie alcool deidrogenasi ne hanno permesso la loro conservazione nel corso dell'evoluzione. E' stato quindi supposto che a differenza di altre alcool deidrogenasi, l'ADH 2536 possa svolgere, più che un ruolo metabolico, una funzione di difesa in risposta a stress di natura chimica.

A parziale conferma di quanto appena riportato, precedentemente a questo lavoro di tesi, erano state identificate due proteine con putativa funzione di regolazione trascrizionale capaci di legare la regione regolativa posta a monte del gene *Sso2536*: il repressore trascrizionale *Lrs14* (Bell et al., 2000) ed un putativo fattore trascrizionale non precedentemente descritto in letteratura, denominato *Bald16* i cui livelli sembravano aumentare in presenza di benzaldeide (Fiorentino G. et al. 2003). Questi dati, assieme alla capacità di *S. solfataricus* di crescere in presenza di composti di natura fenolica e di poterli utilizzare quale unica fonte di carbonio (Izzo V. et al., 2005) hanno portato ad ipotizzare la presenza nel microrganismo di un possibile meccanismo di detossificazione da aldeidi aromatiche, nonché di una via metabolica in cui tali composti aromatici possano essere indirizzati. Per verificare tale ipotesi, si è proceduto quindi ad una approfondita caratterizzazione molecolare, strutturale e funzionale delle componenti coinvolte e delle loro interazioni.

L'analisi comparativa in banca dati ha rivelato che la proteina Bald16 appartiene alla famiglia delle proteine Mar (Multiple Antibiotic Resistance), il cui capostipite è il repressore trascrizionale MarR. A questa famiglia appartengono numerose proteine responsabili del controllo della virulenza, della resistenza a numerosi agenti antimicrobici, della risposta a stress ossidativi e del metabolismo di composti aromatici (Alekshun MN. *et al.*, 2001).

I geni codificanti omologhi di MarR fanno parte in genere di cluster genici da essi regolati ed invariabilmente alcuni di essi codificano per delle proteine di membrana deputate all'efflusso di differenti sostanze tossiche (Grkovic S. *et al.*, 2002).

Tale organizzazione genica, come evidenziato mediante analisi per "Northern-blot", è risultata conservata anche per il gene *Sso1352*. La presenza infatti del segnale autoradiografico, ottenuto quando le cellule sono cresciute in presenza di benzaldeide, corrisponde ad un trascritto le cui dimensioni risultano maggiori di quelle attese. Dall'analisi del genoma è risultato che l'*orf Sso1352* si sovrappone per 1 nucleotide all'*orf Sso1351*, posta immediatamente a monte di essa e codificante per una putativa "permease multidrug efflux". Un'ulteriore conferma dell'esistenza di un operone (da noi indicato come operone "*Mar-like*") è data dall'osservazione che le dimensioni del trascritto evidenziato corrispondono esattamente a quelle attese per un trascritto di-cistronico contenente entrambe le *orf*.

L'analisi per "Northern-blot" ha mostrato inoltre che la trascrizione dell'operone è indotta dalla presenza nel mezzo di coltura di differenti aldeidi aromatiche. I segnali di ibridazione relativi agli RNA estratti da cellule cresciute in presenza benzaldeide, veratrilaldeide e cinnammaldeide risultano infatti notevolmente più intensi del segnale relativo a RNA isolato da cellule cresciute in solo terreno M182.

L'analisi mediante "Primer extension" della regione al 5' dell'operone *Mar-like* ha permesso di determinare il sito di inizio della trascrizione e di identificare gli elementi basali della trascrizione. Come già verificato per altri geni archaeali (in particolare in rappresentanti del dominio Crenarchaeota) il trascritto non presenta una regione 5' non tradotta, in quanto il primo nucleotide ad essere trascritto coincide con il residuo nucleotidico di adenina della tripletta ATG di inizio della traduzione.

Si è quindi identificata la TATA-box (ATTA<sub>AA</sub>), che mostra un consensus dell'83%, centrata 27 nucleotidi a monte della posizione +1 e la sequenza BRE centrata in posizione -33.

L'attenta analisi della regione 5' regolativa dell'operone *Mar-like* ha permesso l'identificazione di una sequenza di 4 basi ripetute invertite separate da due residui nucleotidici (TAATXXATTA) che potrebbe rappresentare un sito di interazione per un ipotetico fattore trascrizionale. Il precedente lavoro in cui la proteina Bald16 era stata identificata (Fiorentino G. *et al.*, 2003) aveva dimostrato che la proteina lega il promotore del gene *Sso2536* in una regione di DNA contenente la stessa sequenza palindromica, con la sola differenza che i due emisiti sono separati da tre residui anziché due. La distanza di queste sequenze dalle rispettive TATA box risulta pressoché identica, essendo infatti posizionate entrambe a circa 21-22 nucleotidi a monte di queste.

Le modalità con cui i regolatori trascrizionali finora identificati svolgono il loro importante ruolo, sono per la maggior parte ancora da chiarire. Una delle caratteristiche comuni a diversi di essi sembra essere appunto la presenza nelle regioni regolative di brevi sequenze ripetute invertite disposte a distanze ben precise dalla TATA box. Ouhammouch e collaboratori hanno ad esempio dimostrato che l'attivatore trascrizionale Ptr2 di *Methanococcus jannaschii* si lega al DNA in

corrispondenza di una sequenza palindromica di 6 basi intervallata da tre nucleotidi (Ouhammouch M., 2004).

Per procedere nella caratterizzazione della proteina Bald16, l'*orf Sso1352* è stata clonata a partire dal DNA gnomico di *S. solfataricus* ceppo P2. Per la proteina Lrs14 non è stato invece necessario clonare il gene codificante, in quanto il plasmide *pET-Lrs* (Bell SD. *et al.* 2000) è stato gentilmente fornito dal Dr. Bell. Le due proteine sono state quindi espresse in forma ricombinante in cellule di *E. coli* e purificate all'omogeneità.

La proteina Bald16 purificata è stata sottoposta a cromatografia per esclusione molecolare su colonna analitica Superdex 75 PC, mostrando un massa apparente di circa 32 KDa. Poiché, la stessa proteina, analizzata per SDS-PAGE è presente come un'unica banda dal peso di 16 KDa, si è potuto concludere che la proteina Bald16 ha una struttura dimerica.

Tale struttura quaternaria è in accordo con quelle descritte in letteratura per la maggior parte degli omologhi della famiglia MarR finora caratterizzati (Alekhshun MN. *et al.*, 2001; Lim D. *et al.*, 2002; Wu R. *et al.*, 2003; Bordelon T. *et al.* 2006). Bisogna inoltre ricordare che la maggior parte dei fattori trascrizionali, siano essi repressori o attivatori, svolgono la propria funzione legandosi al DNA in forma dimerica.

Come precedentemente riportato, i membri appartenenti alla famiglia MarR svolgono una azione di regolazione sui cluster genici posti sotto il loro controllo e più della metà di questi hanno una funzione autoregolatoria (Wilkinson SP. *et al.*, 2006). Per verificare se anche Bald16 fosse capace di autoregolare la trascrizione dell'operone *Mar-like*, la regione a monte dell'*orf 1351* è stata utilizzata in saggi EMSA in presenza della proteina. Effettivamente i saggi di ritardo della mobilità elettroforetica hanno evidenziato la formazione di un complesso proteina/DNA, la cui specificità è stata verificata mediante saggi di competizione utilizzando frammenti di DNA non marcati.

Mediante saggi EMSA è stata calcolata l'affinità della proteina per il promotore dell'operone *Mar-like*. La costante di dissociazione ( $K_d$ ) del complesso promotore/proteina è risultata essere pari a 1.05  $\mu$ M. Tale valore risulta essere notevolmente più elevato, se confrontato con i valori riportati in letteratura per altri omologhi della famiglia Mar già caratterizzati. Proteine quali MarR, PecS, HucR ecc. presentano infatti valori di  $K_d$  che oscillano tra 0.29 nM e 200 nM (Wilkinson SP. *et al.*, 2006). La proteina Bald16 mostra quindi una affinità per il DNA bersaglio di un ordine di grandezza inferiore rispetto agli altri omologhi.

Allineamenti multipli di sequenze della proteina Bald16 con vari omologhi archaeali e batterici hanno poi evidenziato una elevata conservazione del dominio di legame al DNA. Tale dominio, consistente in un motivo "winged helix-turn-helix", risulta tipico di una larga parte di regolatori trascrizionali procariotici e sembra implicato, oltre che nel legame al DNA, anche nel "sensing" delle molecole effettrici.

Dati strutturali e funzionali relativi alle proteine MarR (Alekhshun MN. *et al.*, 2001), MexR (Lim D. *et al.*, 2002) e HucR (Wilkinson SP. *et al.* 2005) hanno evidenziato infatti che la regione di interazione tra le proteine ed i rispettivi ligandi si sovrappone al dominio di legame al DNA.

L'analisi funzionale di sistemi di detossificazione di tipo MDR (multi drug resistance) presenti in vari genomi, ha dimostrato che le proteine con funzione di regolazione trascrizionale sono spesso capaci di legare le stesse molecole per le quali le proteine di membrana deputate all'efflusso presentano specificità (Grkovic S. *et al.*, 2002). Tale interazione risulta inoltre fondamentale per la modulazione dell'attività trascrizionale, sia essa di attivazione o di repressione (Wilkinson SP. *et al.* 2006).

In accordo con questi risultati, l'allineamento multiplo di sequenze ha evidenziato la presenza in Bald16 dei residui critici presenti nel regolatore trascrizionale MarR nei due siti (SAL-A e SAL-B) deputati al legame con la molecola effettrice (salicilato).

Avendo presupposto per la proteina Bald16 il duplice ruolo di sensore e di attivatore trascrizionale, gli esperimenti successivi sono stati volti a verificare tale ipotesi. Immaginando che l'interazione con la benzaldeide potesse indurre in Bald16 una variazione conformazionale, si è pensato di valutare tale variazione mediante misure di dicroismo circolare.

Gli spettri di ellitticità molare hanno evidenziato nella regione compresa intorno a 195 nm, che in funzione di concentrazioni crescenti di benzaldeide è possibile osservare un sensibile calo dei valori di ellitticità molare, cui corrisponde uno speculare aumento degli stessi in prossimità della regione a 210 nm. Tali regioni dello spettro sono correlate direttamente alla strutturazione in  $\alpha$ -eliche e  $\beta$ -strand.

Questo ci ha permesso di concludere che la benzaldeide rappresenta uno dei possibili ligandi di Bald16 e che l'interazione proteina-ligando modifica la distribuzione dei residui amminoacidici in  $\alpha$ -eliche e  $\beta$ -strand, o quanto meno la distribuzione spaziale di dette strutture. Gli stessi esperimenti di dicroismo circolare hanno inoltre permesso la determinazione della costante di dissociazione ( $K_d$ ) di Bald16 per la benzaldeide, pari a 1.6  $\mu$ M.

Resta da stabilire se le molecole di benzaldeide interagiscano con la proteina Bald16 in uno solo o in entrambi i siti di legame. I dati riportati in letteratura per gli altri omologhi appartenenti alla famiglia MarR sono a tal riguardo discordanti, lasciando ipotizzare che le diverse proteine si comportino in maniera differente.

Esperimenti di dialisi all'equilibrio condotti per la proteina EmrR hanno infatti suggerito l'esistenza di un unico sito di legame dell'effettore per monomero, pur essendo conservati i residui corrispondenti ai siti SAL-A e SAL-B di MarR (Brooun A. *et al.*, 1999). Al contrario, Wilkinson e colleghi hanno riportato per HucR una cooperatività negativa di legame del l'acido urico (l'effettore di HucR) ai due siti. Un modello proposto prevede che il legame di una molecola di effettore al sito a maggiore affinità (SAL-A) potrebbe avere un effetto cooperativo di tipo negativo sul legame di una seconda molecola. Ciò accrescerebbe la sensibilità alle basse concentrazioni di effettori degli omologhi di MarR, aumentando la loro capacità di regolazione trascrizionale (Wilkinson SP. *et al.* 2006).

Saggi EMSA condotti in presenza di benzaldeide hanno dimostrato che alla variazione conformazionale indotta dall'aldeide aromatica in Bald16 corrisponde un effetto sull'affinità con cui la proteina si lega al DNA bersaglio. Gli esperimenti condotti su un frammento di DNA contenente la regione promotrice del gene dell'*alcool deidrogenasi* (*SsAdh*), hanno infatti mostrato, che in presenza di quantità crescenti di benzaldeide la proteina Bald16 lega il DNA con un'efficienza più che raddoppiata. I valori sperimentali, quando sono riportati in grafico in funzione della concentrazione di benzaldeide, sembrano adattarsi ad una curva con andamento bimodale con un punto di flesso compreso tra le concentrazioni 1-2  $\mu$ M. Un tale andamento, lascia ipotizzare la presenza su ogni monomero della proteina di due siti di legame con diversa affinità per la molecola effettore.

Si può dunque immaginare che in normali condizioni di crescita, la bassa affinità di Bald16 per il promotore contribuisca a tenere bassi i livelli di espressione dell'operone. In seguito a stress dovuto agli aumentati livelli intracellulari di benzaldeide si ha un aumento dei livelli di trascrizione in quanto la benzaldeide interagendo fisicamente con la proteina Bald16 ne aumenterebbe l'affinità per il DNA.



Esperimenti di “DNasil-footprinting” condotti sul promotore dell’operone *Mar-like* hanno permesso di determinare la regione di DNA interessata al legame con Bald16. Tale regione è risultata notevolmente estesa, coprendo una zona compresa tra il nucleotide -83 e il nucleotide +1. Un’impronta così ampia, potrebbe essere spiegata assumendo che Bald16 si leghi al DNA in maniera cooperativa. La regione palindromica precedentemente identificata, è risultata essere compresa nella zona protetta dall’azione della DNasi.

I dati finora riportati sembrano dunque concordare con l’ipotesi che Bald16 giochi un ruolo di primo piano nel meccanismo di risposta allo stress chimico causato da aldeidi aromatiche; resta però da chiarire quale possa essere il ruolo svolto dall’altra proteina identificata, Lrs14, in questo pathway detossificativo.

A tal scopo la proteina Lrs14 è stata oggetto dello stesso tipo di caratterizzazione. Saggi EMSA hanno dimostrato che anch’essa è capace di legare il promotore dell’operone *Mar-like*, in modo specifico e con un’affinità di legame ( $K_d=0.95 \mu\text{M}$ ) paragonabile a quella di Bald16. Quando saggiata invece in esperimenti di “DNasil footprinting”, Lrs14 ha prodotto un’impronta di protezione sul DNA che si estende tra i residui nucleotidici che vanno dalla posizione -73 alla posizione -27, più ristretta di quella relativa a Bald16, ma perfettamente sovrapponibile ad essa.

Esperimenti di dicroismo circolare condotti nelle stesse condizioni testate per Bald16 non hanno evidenziato, al contrario, alcuna variazione conformazionale della proteina in presenza di benzaldeide, portando dunque ad escludere che Lrs14 possa interagire fisicamente con essa e ricoprire un ruolo nel “sensing” della molecola.

La caratterizzazione è poi proseguita col definire quale fosse la situazione “in vivo” in *S. solfataricus*.

Analisi di Western-blot eseguite su campioni di estratti proteici da cellule di *Sulfolobus*, hanno confermato che i livelli di proteina Bald16 aumentano quando le cellule sono esposte ad aldeidi aromatiche. Tale aumento però è ridotto se confrontato al rapporto di induzione osservato a livello trascrizionale. Mentre infatti i livelli di trascritto aumentavano nelle cellule indotte di circa 10 volte, i segnali relativi alla proteina mostravano un’intensità poco più che doppia rispetto al controllo.

Un simile risultato, lascia ipotizzare che l’operone *Mar-like* possa essere soggetto ad una duplice livello di regolazione: un controllo di tipo trascrizionale ed uno post-trascrizionale. Coerentemente a tale ipotesi, si è osservato che in estratti da cellule trattate con benzaldeide il segnale relativo alla proteina Bald16 è rappresentato da un doppietto, mentre al contrario, in estratti da cellule non trattate, è presente un’unica banda. Attualmente si sta cercando di isolare per poi caratterizzare la proteina corrispondente al segnale a più alto peso molecolare e chiarire se effettivamente possa trattarsi di una modifica post-traduzionale note in *S. solfataricus* del tipo fosforilazione, acetilazione, glicosilazione etc (Lower BH *et al.* 2002).

Al contrario, la crescita condotta in presenza di benzaldeide, non ha prodotto alcuna modifica dei livelli proteici di Lrs14, in accordo con quanto già ipotizzato.

Mediante esperimenti di Western blot semiquantitativi si è poi proceduto a determinare la rappresentatività “in vivo” delle due proteine. In condizioni normali di crescita la proteina Bald16 rappresenta circa lo 0.13% delle proteine solubili totali e tale valore aumenta come atteso per cellule cresciute in presenza di benzaldeide. La proteina Lrs14 rappresenta invece, indipendentemente dalle condizioni di crescita, l’1.6% circa delle proteine di *Sulfolobus*. Questa notevole differenza nella rappresentatività delle due proteine indica che il ruolo di regolazione di Bald16 possa essere limitato più specificamente al metabolismo delle aldeidi aromatiche e che la proteina Lrs14 possa essere invece implicata in un “pathway” di regolazione più

ampio. Questa osservazione troverebbe riscontro infatti nel dato, che i sistemi di detossificazione batterici, sono spesso soggetti a complessi meccanismi di regolazione che vedono coinvolti sia regolatori locali che globali, garantendo una fine modulazione della risposta cellulare alle sostanze tossiche (Gkrovic, 2002).

L'osservazione che entrambe le proteine Bald16 ed Lrs14 si legano a regioni di DNA perfettamente sovrapponibili, sia sul promotore dell'*orf 2536 SsAdh* sia su quello dell'operone *Mar-like*, ci ha portato a chiederci se esse competano per il legame al DNA, svolgendo quindi funzioni antagoniste, o se invece siano in grado di legarsi contemporaneamente espletando un'azione sinergica sulla trascrizione.

Saggi EMSA, in cui le due proteine erano testate per la capacità di competere nel legame al promotore dell'*alcohol deidrogenasi*, hanno contribuito almeno in parte a chiarire questo punto, indicando che la proteina Bald16 sembra effettivamente capace di sostituirsi ad Lrs14 nel legame al DNA. Al contrario, Lrs14 non sembra capace di fare altrettanto; si osservava però una intensificazione del segnale autoradiografico, come se l'aggiunta della proteina Lrs14 favorisse un ulteriore reclutamento di proteina Bald16 sul DNA.

Le evidenze sinora raccolte sembrano dunque indicare che la proteina Bald16 possa ricoprire il ruolo principale nella regolazione trascrizionale, ma anche che Lrs14 possa avere un importante ruolo di supporto, quanto meno nel favorire l'interazione Bald16/DNA in assenza di benzaldeide.

Nell'ottica di confermare e completare quelle che erano state le indicazioni fornite dai saggi di competizione per il legame al promotore dell'*SsAdh*, si è passati ad analizzare le interazioni tra le due proteine ed il promotore mediante saggi di "supershift". Il dato che più di tutti si intendeva chiarire era quello dell'intensificazione del segnale relativo al complesso Bald16/promotore, in seguito all'aggiunta della proteina Lrs al complesso preformato. In particolare si intendeva capire se in quelle condizioni fosse ipotizzabile la formazione di un complesso ternario Bald16/Lrs14/promotore. Saggi condotti utilizzando anticorpi  $\alpha$ -Lrs14 hanno permesso di osservare una banda di ritardo corrispondente alla formazione di un complesso ternario tra Bald16/Lrs14/promotore. Al contrario, l'utilizzo di anticorpi  $\alpha$ -Bald16 non ha mostrato evidenze dell'esistenza di un tale complesso. Il differente risultato ottenuto con i due anticorpi potrebbe essere spiegato ipotizzando che il legame dell'anticorpo  $\alpha$ -Bald16 possa interferire con la formazione del complesso ternario Bald16/Lrs14/promotore.

I dati raccolti da questi esperimenti pur avendo dato delle utili indicazioni circa la possibile formazione di un complesso di ordine superiore tra le due proteine e la sequenza promotrice, risultano comunque preliminari, necessitando ulteriori e più approfondite indagini.

Un ulteriore tassello nella definizione delle interazioni intercorrenti tra i vari partner coinvolti nella risposta alla presenza di aldeidi aromatiche, è stato fornito da analisi volte a verificare la possibile interazione proteina-proteina tra Bald16 ed Lrs14. Esperimenti di co-immunoprecipitazione condotti con estratti proteici da cellule di *S. solfataricus* con gli anticorpi  $\alpha$ -Bald16 o  $\alpha$ -Lrs14, hanno dimostrato che i fattori trascrizionali Bald16 e Lrs14 interagiscono fisicamente tra loro "in vivo". Gli esperimenti hanno dato lo stesso risultato, sia che gli estratti fossero immunoprecipitati con anticorpi  $\alpha$ -Lrs14 e l'immunoprecipitato rivelato con anticorpi  $\alpha$ -Bald16, sia che gli anticorpi fossero usati nell'ordine inverso (immunoprecipitazione con  $\alpha$ -Bald16 e rivelazione con  $\alpha$ -Lrs14). In quest'ultimo caso però i segnali relativi alla proteina Lrs14 risultavano di intensità minore. Ciò sembrerebbe essere in accordo con quanto ipotizzato in seguito agli esperimenti di

“supershift” e cioè che gli anticorpi policlonali  $\alpha$ -Bald16 possano interferire con la formazione di complessi di vario tipo in cui la proteina risulta coinvolta; d'altra parte la minore efficienza di questi anticorpi nel co-immunoprecipitare le due proteine potrebbe essere addotta alla minore abbondanza relativa di Bald16 (10 volte in meno) rispetto ad Lrs14.

Per valutare se l'interazione tra le due proteine fosse mediata anche da altri fattori, in particolar modo il DNA, sono stati allestiti esperimenti di co-immunoprecipitazione in presenza di BrEt, che intercalandosi alle basi azotate porta alla perdita della maggior parte delle interazioni DNA-proteina. Alternativamente, gli estratti proteici da immunoprecipitare sono stati sottoposti a trattamento con *DNasI* al fine di eliminare il DNA in essi contenuto. In entrambi i casi, l'interazione tra le due proteine è stata mantenuta, indicando che la presenza del DNA non è indispensabile; essendo però i segnali di intensità ridotta si può immaginare che “in vivo” il DNA possa contribuire alla stabilizzazione dell'interazione tra Bald16 ed Lrs14.

Per escludere che a mediare l'interazione tra i due fattori trascrizionali potesse essere invece un'altra proteina, si è proceduto con un esperimento di co-immunoprecipitazione in cui sono state utilizzate le due proteine purificate. Anche in questo caso, Bald16 ed Lrs14 hanno dimostrato di poter interagire senza l'ausilio di ulteriori “partner” molecolari. Allo stesso risultato si è giunti mediante un esperimento di “pull-down” con le proteine purificate in cui si è sfruttata la capacità della proteina Lrs ricombinante (dotata di un “Tag” di istidine) di interagire con una resina contenente ioni nichel.

Quale sia il significato funzionale di questa interazione tra i due fattori trascrizionali resta per il momento ancora oggetto di speculazione. Gli unici dati certi sono che entrambe le proteine legano con affinità simile il promotore dell'operone *Mar-like*, che entrambe interagiscono con la stessa regione di DNA all'interno del promotore e che sono capaci di interagire tra loro.

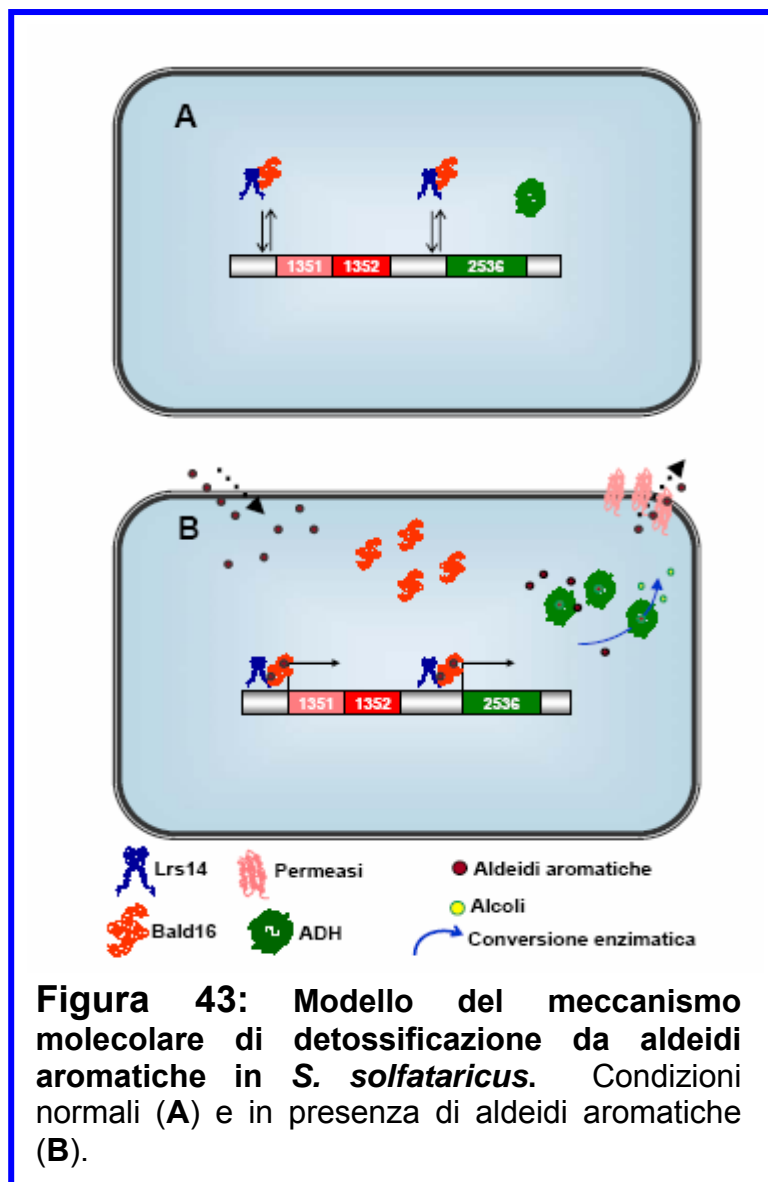
Sebbene sia riportato in letteratura che la proteina Lrs14 sia un fattore trascrizionale con funzione di autorepressore (Bell SD *et al.*, 2000), la nostra ipotesi è che nel caso specifico possa invece fungere da co-attivatore trascrizionale in combinazione con Bald16 favorendone il reclutamento sul promotore.

In letteratura, sono già stati riportati casi di regolatori trascrizionali capaci di svolgere a seconda del contesto, la funzione di attivatore o di repressore trascrizionale. Un esempio è dato dal fattore trascrizionale SlyA appartenente alla famiglia MarR. In *S. Typhimurium* SlyA ed il sistema regolatorio a due componenti PhoP/PhoQ co-regolano l'espressione di diversi geni coinvolti nella virulenza e nella resistenza a peptidi con funzione antimicrobica. Per spiegare in che modo SlyA possa passare dalla funzione di repressore a quella di attivatore sono stati postulati due diversi meccanismi (non mutuamente esclusivi) supportati ciascuno da diversi dati sperimentali.

Secondo un primo modello, l'attivazione del sistema PhoP/PhoQ porterebbe all'aumento della concentrazione intracellulare di un piccolo ligando di SlyA. L'interazione tra il ligando e SlyA conferirebbe a quest'ultimo la capacità di attivare la trascrizione di un subset di geni quali *ssrB* e *pagC*. Il secondo meccanismo d'azione prevede invece che entrambe le proteine SlyA e PhoP si leghino contemporaneamente ai promotori da essi regolati. In seguito a tale azione combinata SlyA attiverrebbe la trascrizione di geni quali *pagC* e *ssrB* antagonizzando l'attività del repressore H-NS o di fattori simili (Navarre WW *et al.* 2005).

Il meccanismo d'azione con cui Bald16 ed Lrs14 regolano la trascrizione potrebbe essere molto simile a quest'ultimo modello. Nel nostro caso, l'interazione tra le due

proteine permetterebbe un livello di espressione basale. Bald16, in seguito all'interazione con l'aldeide, subirebbe una variazione conformazionale che ne aumenterebbe la capacità di legame ai promotori. Si instaurerebbe così un meccanismo a feedback positivo che porterebbe ad un aumento concomitante dell'espressione sia della permeasi deputata all'efflusso delle molecole tossiche, sia dell'alcool deidrogenasi che convertendo l'aldeide nel corrispondente alcool (generalmente meno tossico) ne permetterebbe l'accumulo o la metabolizzazione attraverso l'apertura dell'anello aromatico (**Figura 43**).



Il meccanismo d'azione concertato appena proposto necessita indubbiamente di ulteriori esperimenti tesi a verificarne la validità. Un punto fondamentale sembra, a nostro avviso, quello di verificare quali siano effettivamente le capacità di regolare la trascrizione da parte delle due proteine. Chiarire cioè se effettivamente esse funzionino da attivatori o da repressori della trascrizione, sia singolarmente che in combinazione. Si sta a tal scopo cercando di allestire un sistema di trascrizione in vitro utilizzando le due proteine purificate ed estratti di *S. solfataricus*. Sebbene il sistema necessiti di un ulteriore messa a punto, dati preliminari relativi alla proteina

Bald16 sembrano essere incoraggianti. Nonostante infatti una mancanza nella specificità di inizio della trascrizione, si è osservato che in presenza della proteina Bald16 i livelli dei segnali corrispondenti ai vari trascritti generatisi, risultano di intensità maggiore se confrontati con gli stessi ottenuti in assenza della proteina.

Lo studio del meccanismo di risposta alle aldeidi aromatiche in *S. solfataricus* è risultato dunque preliminare ma fondamentale per la realizzazione di un sistema di biomonitoraggio. L'aver identificato due sequenze promotrici ed i fattori coinvolti nella risposta alla presenza di aldeidi aromatiche ci ha spinto infatti a tentare di utilizzarle per la realizzazione di biosensori capaci di rilevare e quantizzare la presenza di tali molecole in campioni di acque e suolo.

Le metodiche utilizzate fino ad oggi per rilevare la presenza di sostanze inquinanti nell'ambiente sono principalmente basate sull'utilizzo di metodiche fisiche e chimiche costose e normalmente non eseguibili sul posto. D'altra parte, l'ultimo decennio ha visto la nascita di un numero sempre maggiore di biosensori, ossia di microrganismi geneticamente modificati facili da maneggiare e capaci di rilevare la presenza di uno svariato numero di sostanze tossiche (Hansen LH. *et al.* 2001).

Al fine di realizzare un sistema efficiente e che richiedesse il minimo apporto esterno per la sua funzionalità, si è valutato il possibile utilizzo di diversi geni reporter da porre sotto il controllo delle sequenze regolative di *Sulfolobus*. La scelta è caduta in fine sulla GFP (Green Fluorescent Protein) in quanto tale molecola emette una fluorescenza facilmente rilevabile e, a differenza di altri sistemi reporter quali la  $\beta$ -galattosidasi o la luciferasi, non richiede l'utilizzo di alcun substrato.

Sono stati dunque realizzati dei costrutti di fusione tra il promotore dell'operone *Mar-like* o il promotore dell'*SsAdh* con il gene *egfp*, codificante per una versione "Enhanced" della GFP, caratterizzata principalmente da una fluorescenza 30 volte maggiore della proteina wild-type. Una delle incognite nella realizzazione dei biosensori riguardava la capacità delle sequenze promotrici di origine archaeale di dirigere la trascrizione anche nell'ospite mesofilo *E. coli*. Colture di cellule trasformate con i vari costrutti realizzati, hanno mostrato un livello di fluorescenza basale non presente in cellule controllo ad indicazione che le sequenze regolatrici restano funzionali anche in *E. coli*. Quando però le cellule contenenti i plasmidi reporter sono state cresciute in presenza di benzaldeide, non si è potuto apprezzare alcun aumento della fluorescenza. Possibilmente, la spiegazione della mancata risposta alla presenza dell'aldeide aromatica è da attribuire alla mancanza in *E. coli* della controparte batterica della proteina Bald16. Per aggirare tale ostacolo si è provveduto a clonare il gene codificante la proteina Bald16 (sotto il controllo di un promotore costitutivo) in un vettore plasmidico compatibile con il *MinipUC28* (in cui i nostri costrutti sono inseriti). Lo scopo è quello infatti di co-trasformare le cellule di *E. coli* con entrambi i plasmidi in modo da fornire in trans la proteina indispensabile all'espressione regolata dei costrutti reporter. Un esempio simile è infatti riportato in letteratura relativamente alla realizzazione di un biosensore per il monitoraggio del toluene, in cui però i geni erano presenti sullo stesso plasmide (Casavant NC. *et al.* 2003).

Sebbene dunque il sistema reporter debba ancora essere messo a punto, i risultati preliminari ottenuti incoraggiano a proseguire nel lavoro. Non è inoltre da sottovalutare il fatto che essendo oramai disponibili i primi sistemi genetici per l'espressione eterologa in *Sulfolobus* (Aucelli T. *et al.*, 2006), ci si possa svincolare dalla necessità di utilizzare un ospite "imperfetto" quale *E. coli* e trasferire i costrutti reporter in cellule che dispongono di tutto il necessario per la funzionalità del sistema.

## BIBLIOGRAFIA

- Abd-El-Haleem D, Ripp S, Scott C, Sayler GS. (2002) **"A luxCDABE-based bioluminescent bioreporter for the detection of phenol"**. *J Ind Microbiol Biotechnol.* Nov;29(5):233-7.
- Abd-El-Haleem D, Zaki S, Abulhamd A, Elbery H, Abu-Elreesh G. (2006) **"Acinetobacter bioreporter assessing heavy metals toxicity"**. *J Basic Microbiol.*;46(5):339-47.
- Alekshun MN, Levy SB, Mealy TR, Seaton BA, Head JF. (2001) **"The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution"**. *Nat Struct Biol.* Aug;8(8):710-4.
- Aucelli T, Contursi P, Girfoglio M, Rossi M, Cannio R. **"A spreadable, non-integrative and high copy number shuttle vector for *Sulfolobus solfataricus* based on the genetic element pSSVx from *Sulfolobus islandicus*"**. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(17):e114.
- Baliga N.S., Kennedy S.P., Ng W.V., Hood L. e Das-Sarma, S., (2001) **"Genomic and genetic dissection of an archaeal regulon"**. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 2521–2525.
- Bell SD, Kosa PL, Sigler PB, Jackson SP, (1999a) **"Orientation of the transcription preinitiation complex in Archaea"**. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**:13662-13667.
- Bell S.D., Cairns S.S., Robson R.L., and Jackson S.P. (1999b) **"Transcriptional regulation of an archaeal operon *in vivo* and *in vitro*"**. *Mol Cell* **4**: 971–982.
- Bell SD e Jackson SP, (2000) **"Mechanism of autoregulation by an Archaeal Transcriptional Repressor"** *J Biol Chem* **275**: 31624-31629.
- Bell SD e Jackson SP, (2001) **"Mechanism and regulation of transcription in Archaea"**. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 208-213.
- Brooun A, Tomashek JJ, Lewis K., (1999) **"Purification and ligand binding of EmrR, a regulator of a multidrug transporter"**. *J Bacteriol.* Aug;181(16):5131-3.
- Bult CJ, White O, Olsen G, Zhou L, Fleischmann RD, *et al.* (1996), **"Complete genome sequence of the methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii*"**. *Science* **273**: 1058-1073.
- Brinkman AB, Dahlke I, Tuininga JE, Lammers T, Dumay V, de Heus E, Lebbink JH, Thomm M, de Vos WM, Van der Oost J, (2000) **"An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* negatively autoregulated"**. *J.Biol. Chem.* **275**: 38160-38169.
- Brinkman, A.B., Bell, S.D., Lebbink, R.J., de Vos, W.M., and van der Oost, J., (2002) **"The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like protein LysM regulates lysine biosynthesis in response to lysine availability"**. *J Biol Chem* **277**: 29537–29549.
- Brinkman, A.B., Ettema, T.J., de Vos, W.M., e van der Oost, J., (2003) **"The Lrp family of transcriptional regulators"**. *Mol Microbiol* **48**: 287–294.

- Burlage RS, Saylor GS, Larimer F (1990) **“Monitoring of naphthalene catabolism by bioluminescence with nah-lux transcriptional fusions”**. *J Bacteriol.* ;172(9):4749-57.
- Cannio R, Fiorentino G, Rossi M e Bartolucci S, (1999) **“The alcohol dehydrogenase gene: distribution among *Sulfolobales* and regulation in *Sulfolobus solfataricus*.”** *FEMS Microbiol Lett* **170**: 31-39.
- Casavant NC, Thompson D, Beattie GA, Phillips GJ, Halverson LJ. (2003) **“Use of a site-specific recombination-based biosensor for detecting bioavailable toluene and related compounds on roots”**. *Environ Microbiol.* Apr;5(4):238-49.
- Conway de Macario e Macario AJL, (2003) **“Molecular biology of stress genes in methanogens: potential for bioreactor technology.”** *Adv Biochem Eng Biotechnol* **81**: 95-150.
- Davies J, (1994) **“Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes”** *Science* **264**: 375-382.
- Diaz E. (2004) **“Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility”**. *Int Microbiol.* **7(3)**:173-80.
- Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK. **“Biotechnology and bioremediation: successes and limitations”**. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002 Jul;59(2-3):143-52.
- Fiorentino G, Cannio R, Rossi M e Bartolucci S, (2003) **“Transcriptional regulation of the gene encoding an alcohol dehydrogenase in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* involves multiple factors and control elements”** *J Bacteriol* **185**: 3926-3934.
- Forterre, P., F. Confalonieri, e S. Knapp, (1999). **“Identification of the gene encoding archaeal-specific DNA-binding proteins of the Sac10b family”**. *Mol. Microbiol.* **32**:669–670.
- Geiduschek E. P. e Mohamed Ouhammouch. **“Archaeal transcription and its regulators”**, (2005 a) *Molecular Microbiology* **56**: 1397–1407.
- Goede B, Naji S, von Kampen O, Ilg K, Thomm M. (2006) **“Protein-Protein Interactions in the Archaeal Transcriptional Machinery: BINDING STUDIES OF ISOLATED RNA POLYMERASE SUBUNITS AND TRANSCRIPTION FACTORS”**. *J Biol Chem.* Oct 13;281(41):30581-30592.
- Grkovic S, Brown MH e Skurray RA, (2002) **“Regulation of bacterial drug export systems.”** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**: 671-701.
- Guagliardi A, Cerchia L, Moracci M e Rossi M, (2000) **“The chromosomal protein Sso7d of the Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* rescues aggregated proteins in an ATP hydrolysis-dependent manner”** *J. Biol. Chem.* **275**: 31813-31818.
- Hansen LH, Sorensen SJ. **“The Use of Whole-Cell Biosensors to Detect and Quantify Compounds or Conditions Affecting Biological Systems”**. *Microb Ecol.* 2001 Dec;42(4):483-494.

- Hanzelka BL, Darcy TJ e Reeve JN (2001), “**TFE, an Archaeal Transcription Factor in *Methanobacterium thermoautotrophicum* Related to Eucaryal Transcription Factor TFIIIE**”. *Journal of Bacteriology* **183**: 1813-1818.
- Hausner W, Lange U e Musfeldt M, (2000) “**Transcription Factor S, a Cleavage Induction Factor of the Archaeal RNA Polymerase**” *J Biol Chem* **275**: 12393-12399.
- Horsburgh AM, Mardlin DP, Turner NL, Henkler R, Strachan N, Glover LA, Paton GI, Killham K. (2002) “**On-line microbial biosensing and fingerprinting of water pollutants**”. *Biosens Bioelectron.* Jun;17(6-7):495-501.
- Cynthia Haseltine, Rafael Montalvo-Rodriguez, Elisabetta Bini, Audrey Carl, e Paul Blum, (1999) “**Coordinate Transcriptional Control in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus***” *Journal of bacteriology.* **1981**: 3920–3927.
- Izzo V, Notomista E, Picardi A, Pennacchio F, Di Donato A. (2005) “**The thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is able to grow on phenol**”. *Res Microbiol.* Jun-Jul;156(5-6):677-89.
- Kessler A, Sezonov G, Guijarro JI, Desnoues N, Rose T, Delepierre M, Bell SD, Prangishvili D. “**A novel archaeal regulatory protein, Sta1, activates transcription from viral promoters**”. *Nucleic Acids Res.* 2006 Sep 14;
- Littlefield O, Korkhin Y, Sigler PB, (1999) “**The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex**”. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**:13668-13673.
- Lee S.J., Engelmann A., Horlacher R., Qu Q., Vierke G., Hebbeln C., *et al.*, (2003) “**TrmB, a sugar-specific transcriptional regulator of the trehalose/maltose ABC transporter from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis***.” *J Biol Chem* **278**: 983–990.
- Lee S.J, Moulakakis C., Koning S. M., Hausner W., Thomm M., Boos W., (2005): “**TrmB, a sugar sensing regulator of ABC transporter genes in *Pyrococcus furiosus* exhibits dual promoter specificity and is controlled by different inducers**” *Molecular Microbiology* **57**: 1797-1807.
- Lower BH, Kennelly PJ. (2002) “**The membrane-associated protein-serine/threonine kinase from *Sulfolobus solfataricus* is a glycoprotein**”. *J Bacteriol.* ;184(10):2614-9.
- Lurz, R., M. Grote, J. Dijk, R. Reinhardt e B. Dobrinski., (1986). “**Electron microscopic study of DNA complexes with proteins from archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius***”. *EMBO J.* **5**: 3715–3721.
- Makarova KS e Koonin EV, (2003) “**Comparative genomics of Archaea: how much have we learned in six years, and what’s next?**” *Genome Biol* **4**: 115.
- Victoria L. Marsh, Sew Yeu Peak-Chew e Stephen D. Bell (2005) “**Sir2 and the Acetyltransferase, Pat, Regulate the Archaeal Chromatin Protein, Alba.**” **20**: 21122–21128.
- Mejare M, Bulow L. (2001) “**Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals**”. *Trends Biotechnol.* Feb;19(2):67-73.



- Min J, Pham CH, Gu MB, (2003) "**Specific responses of bacterial cells to dioxins**". *Environ Toxicol Chem.* Feb;22(2):233-8.
- Napoli A, van der Oost J, Sensen CW, Charlebois RL, Rossi M, Ciaramella M, (1999) "**An Lrp-like protein of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* which binds to its own promoter.**" *J Bacteriol*, **181**: 1474-1480.
- Navarre WW, Halsey TA, Walthers D, Frye J, McClelland M, Potter JL, Kenney LJ, Gunn JS, Fang FC, Libby SJ., (2005) "**Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ**". *Mol Microbiol.* Apr;56(2):492-508.
- On-line Medical Dictionary:** © 1997-98 Academic Medical Publishing & CancerWEB. On World Wide Web URL:<http://cancerweb.ncl.ac.uk/omd/index.html>.
- Ouhammouch M., Robert E. Dewhurst, Winfried Hausner, Michael Thomm, e E. Peter Geiduschek (2003) "**Activation of archaeal transcription by recruitment of the TATA-binding protein**" *PNAS* **9**: 5097–5102.
- Ouhammouch M. (2004) "**Transcriptional regulation in Archaea**" *Current Opinion in Genetics & Development* **14**: 133-138
- Ouhammouch M., Geoffrey E. Langham, Winfried Hausner, Anjana J. Simpson, Najib M.A. El-Sayed and E. Peter Geiduschek (2005 b) "**Promoter architecture and response to a positive regulator of archaeal transcription**" *Molecular Microbiology* **56** : 625–637.
- Ouhammouch M. e E. Peter Geiduschek, (2005 c) "**An expanding family of archaeal transcriptional activators**" *PNAS* **43**: 15423–15428.
- Pedone E., Bartolucci S. e Fiorentino G., (2004) "**Sensing and adapting to environmental stress: the archaeal tactic**" *Frontiers in Bioscience* **9**: 2909-2926.
- Peeters E, Willaert R, Maes D, Charlier D. (2006) "**Ss-LrpB from *Sulfolobus solfataricus* condenses about 100 base pairs of its own operator DNA into globular nucleoprotein complexes**". *J Biol Chem.* Apr 28;281(17):11721-8.
- Peeters E., Thia-Lin Thia-Toong, Daniel Gigot, Dominique Maes e Daniel Charlier., (2004) "**Ss-LrpB, a novel Lrp-like regulator of *Sulfolobus solfataricus* P2, binds cooperatively to three conserved targets in its own control region**" *Molecular Microbiology* **54**: 321–336.
- Pieper DH, Reineke W. (2000) "**Engineering bacteria for bioremediation**". *Curr Opin Biotechnol.* Jun;11(3):262-70.
- Qureshi SA e Jackson SP, (1998) "**Sequence specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strenght**". *Mol. Cell.* **1**: 389-400.
- Rella R, Raia CA, Pensa M, Pisani FM, Gambacorta A, De Rosa M, Rossi M., (1987) "**A novel archaeobacterial NAD<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenase. Purification and properties.**" *Eur J Biochem.* **167**: 475-479.
- Ramos JL, Andersson P, Jensen LB, Ramos C, Ronchel MC, Diaz E, Timmis KN,

- Molin S. (1995) **"Suicide microbes on the loose"**. *Biotechnology (N Y)*. Jan;13(1):35-7.
- Reineke W. (1998) **"Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly"**. *Annu Rev Microbiol.*;52:287-331.
- Rieger PG, Meier HM, Gerle M, Vogt U, Groth T, Knackmuss HJ. (2002) **"Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence"**. *J Biotechnol.* 14;94(1):101-23.
- Ren S, Frymier PD. (2003) **"The use of a genetically engineered *Pseudomonas* species (Shk1) as a bioluminescent reporter for heavy metal toxicity screening in wastewater treatment plant influent"**. *Water Environ Res.* Jan-Feb;75(1):21-9.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) **"Molecular cloning. A laboratory manual"**. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- She Q, Singh RK, Confalonieri F, Zivanovic Y, Allard G, *et al.*, (2001) **"The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2"**. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **98**(14): 7835-7840.
- Smith DR, Doucette-Stamm LA, Deloughery C, Lee H, Dubois J *et al.*, (1997) **"Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΦH: functional analysis and comparative genomics"**. *J. Bacteriol.* **179**: 7135-7155.
- Spratt BG, (1994) **"Resistance to antibiotics mediated by target alterations."** *Science* **264**: 388-393.
- Starai VJ, Celic I, Cole RN, Boeke JD, Escalante-Semerena JC, (2002) **"Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine"** *J. Mol. Biol* **298**: 2390-2396.
- Tiensing T, Strachan N, Paton GI, (2002) **"Evaluation of interactive toxicity of chlorophenols in water and soil using lux-marked biosensors"**. *J Environ Monit.* Aug;4(4):482-9.
- Timmis KN, Pieper DH. (1999) **"Bacteria designed for bioremediation"**. *Trends Biotechnol.* May;17(5):200-4.
- Torres B, Garcia JL, Diaz E. (2004) **"Plasmids as tools for containment"**. In *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington: 589-601.
- Turpeinen R, Virta M, Haggblom MM. (2003) **"Analysis of arsenic bioavailability in contaminated soils"**. *Environ Toxicol Chem.* Jan;22(1):1-6.
- Valls M, de Lorenzo V. (2002) **"Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution"**. *FEMS Microbiol Rev.* Nov;26(4):327-38.
- Vierke, G., Engelmann, A., Hebbeln, C. e Thomm, M., (2003) **"A novel archaeal transcriptional regulator of heat shock response"**. *J Biol Chem* **278**: 18–26.
- Wilkinson Steven P. and Grove Anne, (2006) **"Ligand-responsive Transcriptional Regulation by Members of the MarR Family of Winged Helix Proteins"** *Curr. Issues Mol. Biol.* **8**: 51–62.

Wilkinson SP, Grove A. (2005) **“Negative cooperativity of uric acid binding to the transcriptional regulator HucR from *Deinococcus radiodurans*”**. *J Mol Biol.* Jul 22;350(4):617-30.

Wilkinson SP, Grove A. (2004) **“HucR, a novel uric acid-responsive member of the MarR family of transcriptional regulators from *Deinococcus radiodurans*”**. *J Biol Chem.* Dec 3;279(49):51442-50.

Woese CR, (2002) **“On the evolution of cell”** *PNAS* **99**: 8742-8747.

Hong Xue, Rong Guo, Yunfei Wen, Danxu Liu, e Li Huang, (2000) **“An Abundant DNA Binding Protein from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus shibatae* Affects DNA Supercoiling in a Temperature-Dependent Fashion”** *Journal of Bacteriology* **182**: 3929- 3933.

Zillig W, Stetter K., Janekovic D., (1979) **“DNA-dependent RNA polymerase from the Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*”**. *Eur. J. Biochem.* **96**: 597-604.

Zimmermann P.e Pfeifer F., (2003) **“Regulation of the expression of gas vesicle genes in *Haloflex mediterranei*: interaction of the two regulatory proteins GvpD and GvpE”**. *Mol Microbiol* **49**: 783–794.

## Pubblicazioni

**“An auto-regulated Mar-like transcription factor activates the alcohol dehydrogenase and an efflux pump gene expression in response to exogenous addition of aromatic aldehydes in *Sulfolobus solfataricus*”.**

Gabriella Fiorentino, Raffaele Ronca, Raffaele Cannio, Mosè Rossi and Simonetta Bartolucci. (Submitted to JBC)

## Comunicazioni a congresso

G. Fiorentino, R. Ronca and S. Bartolucci

**“Detoxification of aromatic aldehydes in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is regulated by a Mar-like transcription factor”.**

Proteine 2004, Viterbo 20-22 Maggio, 2004.

G. Fiorentino, R. Ronca, R. Cannio, M. Rossi and S. Bartolucci

**“Coordinate expression of a *mar-like* operon and an *alcohol dehydrogenase* gene contributes to detoxification by aromatic aldehydes in *Sulfolobus solfataricus*”.**

Extremophiles 2004: 5th International Conference on Extremophiles September 19 - 23, 2004, Cambridge, Maryland, USA

Gabriella Fiorentino, Raffaele Ronca, Simonetta Bartolucci.

**“Bald16, a Mar-like transcriptional regulator is involved in the detoxification of aromatic compounds in *Sulfolobus solfataricus*”**

Vth European Symposium of The Protein Society, 30 April - 4 May 2005, Barcelona

R. Ronca, G. Fiorentino and S. Bartolucci

**“Detoxification of benzaldehyde in *Sulfolobus solfataricus* is assisted by regulated expression of an alcohol dehydrogenase gene and a Mar-like operon.”**

8<sup>th</sup> National Biotechnology Congress, September 7-9, 2005, Siena, Italy.

G. Fiorentino, R. Ronca, M. Rossi and S. Bartolucci

**“Coordinate regulation for chemical stress response in *Sulfolobus solfataricus*.”**

Extremophiles 2006: 6th International Congress on Extremophiles, September 17 - 21, 2006, Brest, France.

# Ringraziamenti

Desidero ringraziare vivamente la Prof.<sup>ssa</sup> Simonetta Bartolucci per la fiducia accordatami e per i consigli elargitimi durante tutto il periodo di dottorato.

Un ringraziamento caloroso va alla Dr.<sup>ssa</sup> Gabriella Fiorentino, per essere stata una guida costante e preziosa durante il mio percorso formativo e per l'affetto che mi ha dimostrato in questi tre anni di lavoro.

I più affettuosi ringraziamenti vanno alle Dott.<sup>sse</sup> Danila Limauro, Emila Pedone, Patrizia Contursi, Santina Prato e Tiziana Aucelli; per il loro aiuto e per aver creato un clima di amicizia e familiarità fondamentale per lo svolgimento di questo lavoro di tesi.

Un grazie di cuore va a tutti i miei colleghi di laboratorio (Romina, Ilaria, Elena e tanti altri) che con la loro amicizia e la loro giovialità mi hanno sostenuto ed aiutato in questo mio percorso.

Uno speciale ringraziamento è dovuto alla futura Dott.<sup>ssa</sup> Sharon Cinquegrana che più di tutti mi ha supportato e "sopportato" nella realizzazione di questo lavoro.

Il ringraziamento principale va però ai miei genitori che hanno sempre creduto in me e che mi hanno permesso di arrivare dove sono oggi e alla mia Margherita, che mi è sempre stata accanto e col suo amore mi ha ridato vigore nei momenti di maggiore stanchezza.

*Grazie*