

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Molecolare

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE

CURRICOLO: BIOMEDICINA

CICLO XXX

**MAPPATURA E CARATTERIZZAZIONE DEI G-QUADRUPLEX
IN PROMOTORI DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Coordinatore: Ch.mo Prof. Stefano Piccolo

Supervisore: Ch.mo Prof Riccardo Manganelli

Co-Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Roberta Provvedi

Dottoranda: Riello Erika

Sommario

1. ABSTRACT (versione in italiano)	3
1.1 ABSTRACT (versione in inglese)	5
2. INTRODUZIONE.....	7
2.1 TUBERCOLOSI	7
2.1.1 <i>M. tuberculosis</i>	7
2.1.2 EPIDEMIOLOGIA DELLA TUBERCOLOSI	9
2.1.3 PATOGENESI DELLA TUBERCOLOSI.....	10
2.1.4 DIAGNOSI DELLA TUBERCOLOSI	11
2.1.5 VACCINAZIONE	12
2.1.6 TERAPIA DELLA TUBERCOLOSI.....	13
2.1.7 PROBLEMATICHE RELATIVE ALLA TERAPIA ANTITUBERCOLARE	16
2.1.8 SVILUPPO DI NUOVI FARMACI ANTITUBERCOLARI	20
2.2 G-QUADRUPLEX.....	21
2.2.1 STRUTTURA.....	21
2.2.2 VARIABILITA' STRUTTURALE DELLE STRUTTURE G4	22
2.2.3 LOCALIZZAZIONE E FORMAZIONE DELLE STRUTTURE G QUADRUPLEX	24
2.2.4 G QUADRUPLEX NEI BATTERI	30
2.2.5 LEGANTI DEL G-QUADRUPLEX	32
2.3 G-QUADRUPLEX IN <i>M. tuberculosis</i>	35
3. SCOPO.....	38
4. MATERIALI E METODI	39
4.1 CEPPI BATTERICI, TERRENI E CONDIZIONI DI CRESCITA	39
4.2 PLASMIDI	39
4.3 AMPLIFICAZIONE DEL DNA	40
4.4 CLONAGGIO GENICO	41
4.4.1 TECNICHE UTILIZZATE PER IL CLONAGGIO	41
4.4.2 STRATEGIA DI CLONAGGIO.....	43
4.5 CELLULE COMPETENTI ED ELETTROPORAZIONE IN <i>M. tuberculosis</i>	45
4.6 MUTAGENESI SITO DIRETTA	45
4.7 ANALISI DELLA FLUORESCENZA	47
4.8 DETERMINAZIONE MIC E MBC	48
4.9 METODO DEL CHECKERBOARD.....	48
4.10 ANALISI SOPRAVVIVENZA IN PRESENZA DI STRESS	51
4.11 ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA.....	51

4.11.1 ESTRAZIONE DI RNA DA COLTURA BATTERICA.....	51
4.11.2 RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA IN cDNA.....	52
4.11.3 REAL-TIME PCR	53
4.12 DICROISMO CIRCOLARE.....	55
5. RISULTATI.....	57
5.1 EFFETTI DEI LEGANTI DEL G4 SULLA CRESCITA DI <i>M. tuberculosis</i>	57
5.1.1 EFFETTI DEI LEGANTI DEL G4 SULLA CRESCITA DI <i>M. tuberculosis</i> IN PRESENZA DI ACQUA OSSIGENATA (H ₂ O ₂).....	59
5.2 VALUTAZIONE DELL'INTERAZIONE TRA BRACO-19 E FARMACI ANTITUBERCOLARI	60
5.3 STUDIO DELL'INFLUENZA DELLE STRUTTURE G-QUADRUPLIX NELL'ESPRESSIONE GENICA IN <i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	61
5.3.1 ANALISI IN VITRO DELLE MUTAZIONI NEI PROMOTORI DI <i>clpX</i> e <i>zwf1</i>	62
5.3.2 MUTAGENESI DEL PROMOTORE DI <i>zwf1</i> IN <i>M. tuberculosis</i>	65
5.3.3 CONFRONTO ATTIVITA' DI P <i>zwf1</i> MUTATO E WILD-TYPE	65
5.3.4 CONFRONTO DELL'ATTIVITA' DEL PROMOTORE DI <i>zwf1</i> WILD-TYPE E MUTATO IN CONDIZIONI DI STRESS	67
6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	71
7. BIBLIOGRAFIA	74

1. ABSTRACT (versione in italiano)

La tubercolosi è una malattia infettiva causata da *Mycobacterium tuberculosis*. Lo sviluppo di ceppi resistenti ai farmaci antitubercolari normalmente utilizzati rende necessaria la ricerca di nuovi composti per la cura di tale malattia.

I G-quadruplex (G4), strutture secondarie che possono formarsi in regioni del DNA ricche in guanina, sono state trovate in promotori di geni umani e virali dove influenzano processi biologici importanti come la trascrizione e la replicazione del DNA. I G4 sono considerati target promettenti per il trattamento di malattie tumorali e infezioni virali grazie alla scoperta di piccole molecole che legano e stabilizzano la loro struttura, inibendo il processo di trascrizione.

Recentemente sono stati identificati nel genoma di *M. tuberculosis* più di 10000 motivi ricchi in guanina che potrebbero formare strutture G-quadruplex. Quarantacinque di essi si trovano a monte o sovrapposti al sito di inizio della trascrizione di geni distribuiti tra diverse categorie funzionali. Analisi *in vitro* hanno confermato la formazione delle strutture G-quadruplex in quattro di questi geni (*mosR*, *zwf1*, *clpX* e *ndhA*).

Per saggiare la possibilità che le strutture G4 possano essere utilizzate come bersagli terapeutici, è stato valutato l'effetto di due molecole, in grado di legare e stabilizzare la struttura G4 (BRACO-19 e c-exNDI 2), sulla crescita di *M. tuberculosis*. Abbiamo dimostrato che tali composti riescono ad inibire la crescita micobatterica con una minima concentrazione inibente nel range micromolare rendendo anche il batterio più sensibile allo stress ossidativo. Inoltre sono state studiate le interazioni tra BRACO-19 e alcuni farmaci antitubercolari, il legante del G4 ha un effetto additivo se usato assieme all'isoniazide, mentre in combinazione con l'etambutolo ha un effetto indifferente.

Per studiare l'influenza delle strutture G4 nella trascrizione, è stata valutata l'espressione dei geni *mosR*, *zwf1*, *clpX* e *ndhA* in presenza di BRACO-19. Uno studio più approfondito è stato svolto sul promotore del gene *zwf1*. Oligonucleotidi a singolo filamento con la stessa sequenza della regione promotoriale di *zwf1* interessata alla formazione della struttura G4 sono stati mutati e analizzati con dicroismo circolare: una singola mutazione era richiesta per distruggere la struttura G-quadruplex nel promotore di *zwf1*. Tale mutazione è stata utilizzata in *M. tuberculosis* per caratterizzare *in vivo* l'attività del promotore attraverso la misurazione dell'espressione della proteina reporter eGFP (posta sotto il controllo del promotore *wild-type* e mutato) dopo trattamento del batterio con H₂O₂ o BRACO-19. I dati ottenuti suggeriscono, che almeno nelle

condizioni da noi utilizzate, la struttura G4 a monte di tale gene non ha un ruolo preminente nella regolazione genica.

1.1 ABSTRACT (versione in inglese)

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. The development of strains resistant to antitubercular drugs, makes it necessary to find new compounds against this pathogen in order to treat such disease.

G-quadruplexes (G-4s), secondary structures that may form in G-rich regions, were found in promoter regions of several human and viral genes where they influence processes such as transcription and replication of DNA. G-4s are considered as promising targets for anticancer and antiviral chemotherapy thanks to the discovery of small molecules that bind and stabilize their structure, decreasing gene expression levels (G-4 ligands).

Recently, bioinformatics analysis identified in *M. tuberculosis* 10,000 motifs with the potential to fold into G-4 structure, 45 of them are localized upstream or overlapping the transcription start site of genes distributed among different functional categories. Analysis in vitro (circular dichroism, UV spectroscopy and Taq polymerase stop assay) confirmed the formation of G4 structures in four of these genes: *mosR*, *zwf1*, *clpX* and *ndhA*.

To test the possibility to use G-quadruplex structures as therapeutic targets, we evaluated the effect of two G-4 ligands (BRACO-19 e c-exNDI 2) on *M. tuberculosis*. Results showed that these compounds can inhibit the mycobacterial growth with a minimal inhibitory concentration (MIC) in the micromolar range and make the bacteria more sensitive to oxidative stress. We also evaluated the interactions between BRACO-19 and two well characterized antitubercular drugs (ethambutol and isoniazid), while interaction with isoniazid was shown to be additive, that with ethambutol was indifferent.

To study the influence of G4 structures on gene transcription, the *zwf1*, *mosR*, *clpX*, *ndhA* expression was evaluated in presence of BRACO-19. In particular the G4 sequence in *zwf1* promoter was better characterized. Single strand oligonucleotides containing the sequence of the putative G-4 localized at the promoter region of *zwf1* with different mutations were analyzed by circular dichroism, allowing us to identify a single point mutation able to disrupt the G-4 structure. This mutation was introduced in the *zwf1* promoter and the final construct was cloned upstream a promoterless eGFP gene in a reporter plasmid. eGFP expression from this plasmid was compared to that of a similar plasmid in which the reporter gene was transcribed from the wild-type *zwf1* promoter in physiologic conditions or after treatment of bacterium with BRACO-19 and H₂O₂.The

results suggested that the G-quadruplex structure upstream of *zwf1*, at least in the observed conditions, hasn't a preeminent role in gene regulation.

2. INTRODUZIONE

2.1 TUBERCOLOSI

La tubercolosi è una patologia infettiva causata dai membri del *M. tuberculosis complex* (MTBC), di cui fanno parte *M. tuberculosis* (Mtb, agente eziologico della tubercolosi nell'uomo), *Mycobacterium africanum* (responsabile della tubercolosi nell'uomo solo in certe regioni dell'Africa), *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii* (tubercolosi nei mammiferi domestici e selvatici) e *Mycobacterium microti* (tubercolosi nei roditori) (Delogu G et al, 2013).

2.1.1 *M. tuberculosis*

M. tuberculosis, isolato per la prima volta da Robert Kock nel 1882, è un batterio di forma bastoncellare con lunghezza di 1-4 µm e larghezza di 0,3-0,6 µm, immobile per la mancanza di un flagello e asporigeno (Ducati RG, 2006).

M. tuberculosis sembra essere evoluto da ceppi ancestrali di micobatteri ambientali che possono essere isolati ancora oggi da pazienti immunocompromessi in certe zone dell'Africa orientale e che sono incapaci di provocare infezioni croniche in persone immunocompetenti (Delogu G et al).

Nel 1998 è stato completato il sequenziamento del genoma del ceppo H37Rv di *M. tuberculosis*. Il genoma è formato da 4411529 paia di basi (pb) ed è per il 65,6% costituito da guanine e citosine. Contiene 4000 geni, la maggior parte codifica per enzimi coinvolti nella lipolisi (importanti per la sopravvivenza di *M. tuberculosis* all'interno dell'ospite) e nella lipogenesi (per la sintesi dei componenti della parete micobatterica) e 190 codificano per proteine regolatorie che permettono al batterio di rispondere ai diversi stress ai quali viene sottoposto durante l'infezione (stress ossidativo, ipossia, stress da pH acido, stress di superficie da parte del surfactante alveolare e altri). Una parte dei geni (10%) codificano per proteine PE e per PPE (fattori di virulenza coinvolti nella variazione antigenica durante l'infezione) (Ducati RG, 2006).

M. tuberculosis presenta una parete cellulare molto peculiare, ricca in molecole lipidiche che costituiscono più del 60% della massa totale della cellula. È costituita da due strati (fig. 1). Lo strato più interno è composto da peptidoglicano (polimero composto da unità disaccaridiche

alternate di N-acetilglucosamina e acido N-glicosilmuramico), arabinogalattano (polisaccaride ramificato costituito da D- arabinosio e D-galattosio) e acidi micolici (acidi grassi contenenti lunghe catene carboniose), legati covalentemente a formare il complesso *mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan* (mAGP) (Brennan PJ, 2003). Studi di diffrazione mediante raggi X hanno dimostrato che gli acidi micolici sono orientati parallelamente tra di loro e perpendicolarmente alla membrana plasmatica localizzata internamente alla parete cellulare (Kaur D et al, 2009). Lo strato più esterno è costituito da lipidi (fosfatidil-inositolomannoside, trealosio dimicolato, lipomannani e lipo-arabinomannani), polisaccaridi, lipoglicani e proteine (Brennan PJ, 2003). Quest'ultime formano dei canali selettivi, le porine, che controllano la diffusione di piccole molecole idrofiliche (Ducati RG, 2006).

Esternamente alla parete cellulare è presente una struttura simile ad una capsula composta da polisaccaridi, proteine (97% del materiale totale) e una piccola quantità di lipidi. I polisaccaridi sembra abbiano un ruolo nell'immunopatogenesi, infatti potrebbero aiutare il batterio ad eludere le difese del sistema immunitario (Kaur D et al, 2009).

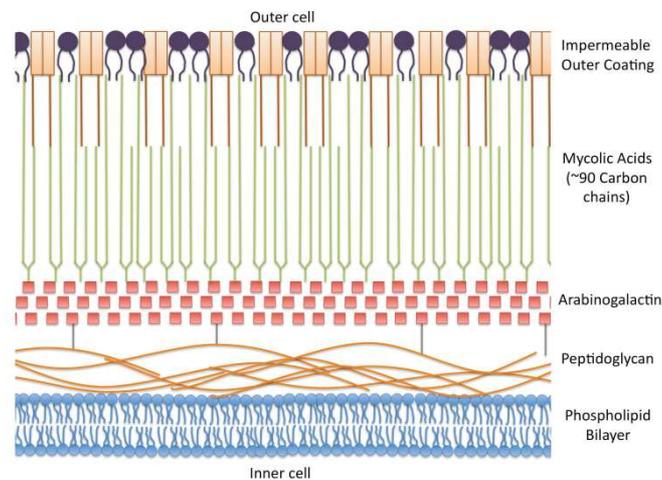


Figura 1: struttura della parete cellulare di *M. tuberculosis* (Smith JP, 2011)

L'elevato contenuto lipidico rende la parete dei micobatteri una barriera impermeabile a numerosi antibiotici, composti acidi e alcalini presenti nei fagosomi, inoltre protegge il batterio dall'essiccamento (Ducati RG, 2006).

2.1.2 EPIDEMIOLOGIA DELLA TUBERCOLOSI

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 2015 sono stati stimati 10,4 milioni di casi di tubercolosi e 1,4 milioni di decessi nel mondo. I continenti più colpiti sono l'Asia (26% di casi) e l'Africa (26%), l'incidenza è minore in Europa (10%) e in America (3%). I paesi dove la tubercolosi è maggiormente presente sono India, Cina, Nigeria, Pakistan e gli stati del Sud Africa (fig. 2).

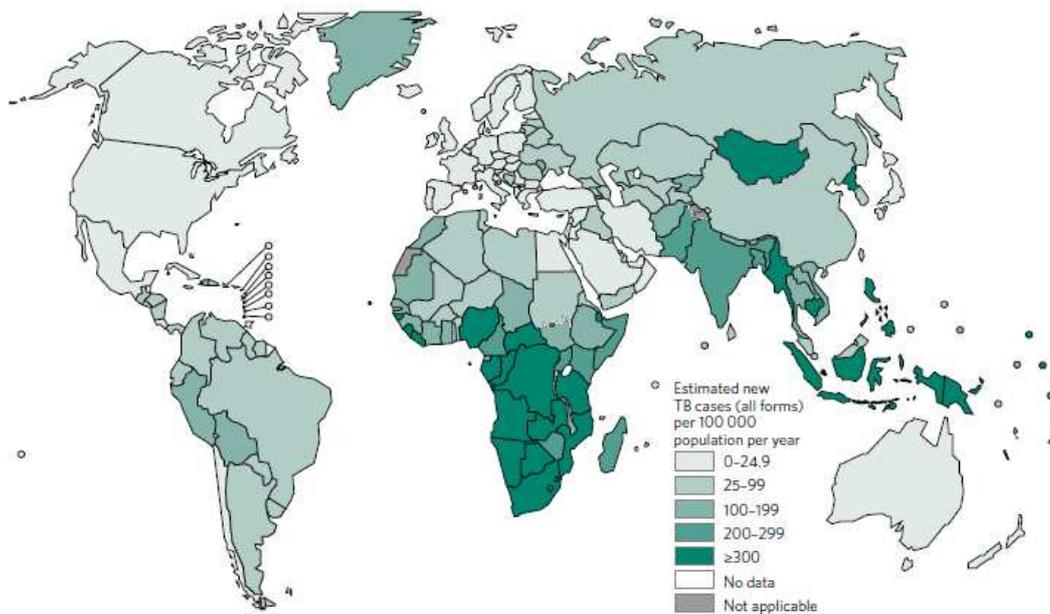


Figura 2: Diffusione della tubercolosi nel mondo (WHO report, 2016)

La distribuzione geografica della tubercolosi è associata ad alcuni fattori, tra i quali il livello di povertà della popolazione e l'infezione causata dal virus dell'HIV.

L'associazione tra tubercolosi e povertà è ben nota, infatti i casi più numerosi di malattia causata da *M. tuberculosis* sono riscontrati nei paesi più poveri. La povertà, causando malnutrizione e costringendo le persone a vivere in pessime condizioni di vita e di igiene, comporta alterazioni al sistema immunitario che aumentano il rischio di sviluppo e di trasmissione della tubercolosi (Zaman K, 2010).

La probabilità di sviluppo della tubercolosi è maggiore nei pazienti infettati dal virus dell'HIV. E' stimato che l'11% delle persone con la patologia tubercolare sono anche contagiate dal virus dell'HIV. Nel Sud Africa è stato stimato che metà delle persone positive all'HIV presentano una confezione con la tubercolosi (WHO report, 2016).

2.1.3 PATOGENESI DELLA TUBERCOLOSI

La tubercolosi è una malattia infettiva che viene trasmessa attraverso l'inalazione di goccioline di diametro compreso tra 1 e 5 μM contenenti *M. tuberculosis*, espettorate attraverso un colpo di tosse da pazienti con tubercolosi polmonare attiva. Tali particelle possono rimanere sospese in aria per diverso tempo, da diversi minuti ad alcune ore (Ahmad S, 2011). Sperimentazioni con modelli animali hanno dimostrato che le particelle in sospensione contengono fino a 10 batteri, numero che è sufficiente per causare un'infezione tubercolare (Ducati RG, 2006).

I bacilli inalati riescono a superare le difese dei bronchi grazie alle loro piccole dimensioni e penetrano negli alveoli dove vengono fagocitati da cellule del sistema immunitario (macrofagi alveolari e cellule dendritiche) (Ahmad S, 2011). Molti batteri vengono eliminati immediatamente, in quanto una volta internalizzati nel macrofago risiedono nel fagosoma, vacuolo endocitico che normalmente si fonde con il lisosoma con conseguente degradazione del suo contenuto. *M. tuberculosis* ha sviluppato delle strategie che gli permettono di sopravvivere e di replicare all'interno del macrofago, tra le quali impedire la fusione tra fagosoma e lisosoma, alterare il reclutamento e l'associazione di varie proteine alla membrana del fagosoma e il blocco della maturazione del fagosoma con conseguente acidificazione del suo interno (Zahrt TC, 2003). Durante questa fase di infezione, *M. tuberculosis* può diffondere in altri organi attraverso il flusso sanguigno e il sistema linfatico polmonare (Delogu G et al, 2013).

Le chemochine prodotte dai macrofagi e rilasciate durante la fagocitosi dei batteri richiamano linfociti T, macrofagi e altre cellule del sistema immunitario con la conseguente formazione del granuloma (fig. 3). Il granuloma è una struttura formata da cellule del sistema immunitario che circondano tessuto infetto allo scopo di limitare la crescita e la disseminazione di *M. tuberculosis*. Inizialmente il granuloma è composto da fagociti mononucleati immaturi circondati da linfociti, successivamente i fagociti differenziano in macrofagi che si aggregano in cellule giganti multinucleate (*giant cells*) e in cellule epitelioidi (Zahrt TC, 2003).

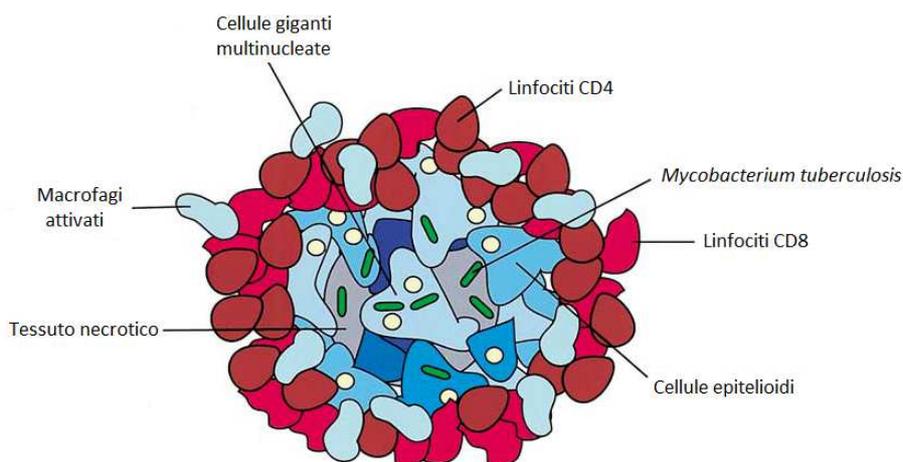


Figura 3: Composizione del granuloma maturo (Zahrt TC, 2003)

La maggior parte dei batteri vengono uccisi all'interno del granuloma, un numero minore riesce a rimanere vitale per moltissimo tempo in uno stato di quiescenza (tubercolosi latente). La riattivazione dei bacilli latenti con comparsa di tubercolosi attiva si potrebbe verificare in seguito a compromissione dell'efficienza del sistema immunitario dovuta ad alcuni fattori, tra i quali l'età, la malnutrizione, l'infezione da virus dell'HIV, l'utilizzo di droghe, il cancro e l'assunzione di farmaci immunosoppressori (Ducati RG, 2006).

2.1.4 DIAGNOSI DELLA TUBERCOLOSI

La diagnosi di laboratorio dell'infezione tubercolare si basa sulla ricerca di *M. tuberculosis* in campioni biologici attraverso l'utilizzo di diverse tecniche microbiologiche.

La diagnosi di tubercolosi attiva viene eseguita sia mediante microscopia che mediante esame colturale. La microscopia ha il vantaggio di essere molto veloce, ma ha una bassa sensibilità. L'analisi colturale, pur necessitando di tempi lunghi per la risposta, rappresenta ancora il gold standard della diagnostica della tubercolosi in quanto è il test più sensibile e permette, dopo l'isolamento del ceppo, di valutarne la resistenza ai farmaci. La diagnosi delle forme di tubercolosi non polmonare presentano dei problemi legati sia alla difficoltà nella scelta dei campioni biologici da analizzare sia alla bassa sensibilità dei metodi di rilevamento microbiologici nei campioni non polmonari. La ricerca di *M. tuberculosis* nelle urine potrebbe essere utilizzata per diagnosticare infezioni sistemiche nei soggetti con infezione HIV-*M. tuberculosis* ma non potrebbe essere utilizzata nei soggetti immunocompetenti (Delogu G et al, 2013).

I metodi molecolari, vista la loro ancora bassa sensibilità rispetto all'esame colturale, sono utilizzati principalmente per confermare il risultato positivo ottenuto dai campioni analizzati con la microscopia.

Per la diagnosi di tubercolosi latente, si usano test immunologici indiretti quali il test di Mantoux (test cutaneo della tubercolina) e i test di rilascio dell'interferone gamma (IGRA).

Il test di Mantoux consiste nell'iniezione intradermica nella parte interna dell'avambraccio di una soluzione di PPD (derivato proteico purificato della tubercolina, ottenuto dalla filtrazione di colture di bacilli tubercolari sterilizzati con il calore) per valutare l'eventuale reazione dopo 48-72 ore dall'iniezione. Il test risulta positivo se il tessuto in cui è stata iniettata la tubercolina sviluppa un rigonfiamento duro con diametro variabile da 5 a 15 mm. Questa reazione è causata dai linfociti T che, sensibilizzati da una precedente infezione, vengono reclutati nel sito dell'iniezione e rilasciano le linfocine che provocano un indurimento del tessuto attraverso vasodilatazione locale, edema e reclutamento di altre cellule infiammatorie nell'area. Tale test, può dare dei falsi positivi in persone precedentemente sottoposte a vaccinazione contro la tubercolosi (vaccino BCG) o infettate da micobatteri non tubercolari o dei falsi negativi in pazienti immunodepressi, quindi incapaci di sviluppare una reazione immunitaria (Nayak S and Achariya, 2012).

I test IGRA misurano il rilascio di interferone gamma da parte dei leucociti presenti nel campione di sangue del paziente in seguito alla loro esposizione ad uno specifico antigene di *M. tuberculosis*. Il test IGRA più usato è il Quantiferon, il quale è molto più specifico del test di Mantoux (Delogu G et al, 2013).

2.1.5 VACCINAZIONE

BCG (*Bacille Calmette Guerin*), unico vaccino esistente per la prevenzione della tubercolosi, è stato sviluppato in Francia tra il 1908 e il 1921 da Albert Calmette (1863-1933) e Camille Guerin (1872-1961) attraverso coltivazione per 13 anni con 230 passaggi sterili in terreno selettivo di un ceppo patogeno bovino del ceppo tubercolare, *M. bovis*. Tale ceppo attenuato, BCG, nel 1921 venne somministrato per la prima volta ai bambini francesi, provocando una diminuzione della mortalità per tubercolosi del 90% (Vasconcelos Junior AC et al, 2009). Da allora 3 miliardi di persone sono state vaccinate con BCG ed è diventato il vaccino più utilizzato nel mondo. BCG è somministrato ai neonati nei paesi dove la tubercolosi è endemica e in alcune zone dove c'è un basso tasso di malattia. Una volta inoculato, BCG causa una leggera e spesso asintomatica infezione sistemica che conferisce protezione all'esposizione da *M. tuberculosis* (Vaudry W, 2003).

La diffusione di tale vaccino è data dalla facile somministrazione (iniezione intradermica o per via orale), dall'immunità a lunga durata ottenuta da una singola dose, dal basso costo di produzione e dall'assenza di tossicità nell'uomo.

Negli anni sono sorte delle controversie legate alla somministrazione di BCG. Il problema principale è dovuto al fatto che tale vaccino previene il contagio dalla meningite tubercolare (infiammazione delle meningiti causata da *M. tuberculosis*) e dalla tubercolosi miliare (forma di infezione in cui *M. tuberculosis* dopo aver infettato il polmone attraverso l'apparato circolatorio si diffonde nell'organismo colpendo tutti gli organi e il sistema osseo), ma non conferisce protezione dalla tubercolosi polmonare negli adulti (Ducati RG, 2006). Inoltre BCG sembra conferire protezione variabile nei diversi luoghi geografici: minore efficacia nelle regioni equatoriali e maggiore negli stati nordici. Un altro problema legato alla vaccinazione è che BCG provoca un'interpretazione errata del risultato del test di Mantoux per la diagnosi tubercolare. Nella maggior parte dei soggetti vaccinati, BCG induce un falso positivo nel test di Mantoux, rendendo così difficile la diagnosi e il controllo della trasmissione della malattia nella comunità (Vaudry W, 2003).

2.1.6 TERAPIA DELLA TUBERCOLOSI

Il trattamento terapeutico della tubercolosi consiste in una fase iniziale di somministrazione di un cocktail di farmaci antitubercolari di prima linea (isoniazide, rifampicina, pirazinamide ed etambutolo) per la durata di due mesi, seguita dalla combinazione di isoniazide e rifampicina per i seguenti 4 mesi. L'utilizzo di tale terapia riesce a curare in sei mesi il 95% di persone infettate da *M. tuberculosis* sensibile ai farmaci antitubercolari (Koul A et al, 2011).

ISONIAZIDE

L'isoniazide è uno tra i più importanti e specifici farmaci antitubercolari, introdotto nella terapia contro la tubercolosi dal 1952. Si ottiene per sintesi chimica a partire dall'acido isonicotinico per trattamento con idrazina (fig. 4).

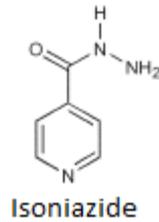


Figura 4: struttura chimica dell'isoniazide (Ducati RG et al, 2006)

L'isoniazide è un farmaco con attività battericida nei confronti dei bacilli tubercolari in fase di replicazione, mentre ha un'azione batteriostatica con i batteri in stato quiescente.

L'isoniazide è un profarmaco che entra nella cellula micobatterica attraverso diffusione passiva e viene attivato attraverso l'enzima catalasi ossidasi codificato dal gene *KatG*. Tale farmaco inibisce la sintesi degli acidi micolici attraverso l'inattivazione dell' Enoil-ACP reductasi (ACP: *Acyl Carrier Protein*), enzima codificato dal gene *inhA* ed essenziale nella produzione degli acidi grassi (Jnawali HN and Ryoo S, 2013).

La somministrazione di isoniazide può indurre effetti avversi, in particolare epatotossicità e neurotossicità (Arbex MA et al, 2010).

RIFAMPICINA

La rifampicina, introdotta nella terapia antitubercolare nel 1972, è considerato uno dei farmaci più importanti nel trattamento della tubercolosi grazie alla sua potente attività battericida sia nei confronti dei bacilli in fase di replicazione sia in quelli con metabolismo ridotto (stato di quiescenza) (Arbex MA et al, 2010).

La struttura della rifampicina (fig. 5) presenta un ossidrilico fenolico acido e un anello piperazinic.

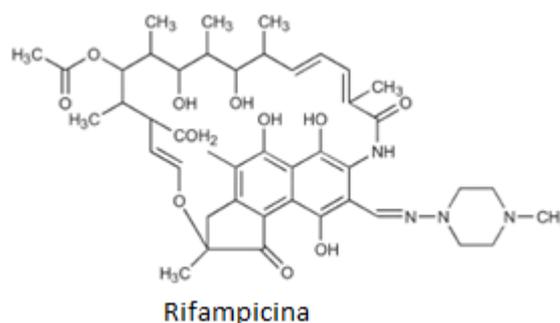


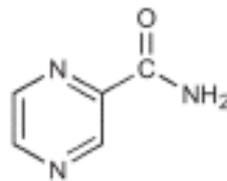
Figura 5: struttura chimica della rifampicina (Ducati RG et al, 2006)

La rifampicina agisce legandosi alla subunità β dell'RNA polimerasi DNA dipendente causando così l'inibizione della trascrizione dei geni micobatterici e la successiva traduzione in proteine, con conseguente morte del batterio (Jnawali HN and Ryoo S, 2013).

PIRAZINAMIDE

La pirazinamide, composto con struttura chimica molto simile all'isoniazide (fig. 6), è un farmaco sintetizzato per la prima volta nel 1936 e introdotto nella terapia tubercolare a partire dal 1952.

Svolge un'azione batteriostatica nei confronti di *M. tuberculosis* in fase di latenza e, quando usata in combinazione con la rifampicina, permette la riduzione del trattamento antitubercolare da 1 anno a 6 mesi (Somoskovi A et al, 2001).



Pirazinamide

Figura 6: struttura chimica della pirazinamide (Ducati RG et al, 2006)

Il meccanismo d'azione della pirazinamide non è ancora ben conosciuto. Si suppone che, essendo un profarmaco, quando entra nel batterio venga convertita nella sua forma attiva, l'acido pirazinoico, dall'enzima pirazinamidasi. L'accumulo di acido pirazinoico, dovuto a un inefficiente sistema di efflusso, sembra causare una diminuzione del valore di pH intracellulare che porta all'inattivazione di enzimi che giocano un ruolo fondamentale nella sintesi degli acidi grassi e di conseguenza un'inibizione della biosintesi degli acidi micolici (Arbex MA et al, 2010).

ETAMBUTOLO

L'etambutolo (fig. 7) è un farmaco che è stato introdotto nella terapia antitubercolare dal 1966. Ha un'azione batteriostatica nei batteri in attiva replicazione, ma non è in grado di agire su bacilli in fase latente.

report 2016). Studi mostrano una correlazione tra la prevalenza di MDR e gli anni di disponibilità dei farmaci di seconda linea. I paesi dove tali antibiotici sono disponibili da più di 20 anni mostrano un maggior numero di casi di MDR rispetto a quelli osservati nei paesi in cui i farmaci sono disponibili da minor tempo (Parida SK et al, 2014).

Gli ***extensively-drug resistant (XDR)*** sono ceppi resistenti non solo all'isoniazide e alla rifampicina, ma anche ai fluorochinoloni e ad altri farmaci antitubercolari di seconda linea, tra i quali gli aminoglicosidici (Koul A et al, 2011).

I ***totally-drug resistant (TDR)*** sono ceppi che presentano resistenza *in vitro* a tutti i farmaci antitubercolari di prima e seconda linea. Infezioni causate da TDR sono state osservate per la prima volta in Italia nel 2003.

Recentemente sono stati approvati all'Agencia Europea per i Medicinali 3 nuovi farmaci che potrebbero offrire una soluzione terapeutica per la cura dei ceppi TDR: Bedaquilina (inibisce l'ATP sintetasi batterica, enzima essenziale per la produzione di energia), Delamanid (agisce inibendo la sintesi di alcuni componenti della parete batterica) e Linezolid (inibisce la sintesi proteica) (Parida SK et al, 2014).

Lo sviluppo di resistenza di *M. tuberculosis* nei confronti dei farmaci antitubercolari è dovuto a due cause: mutazioni spontanee e mutazioni indotte.

Le mutazioni spontanee sono causate da errori nei processi di replicazione del DNA e di traduzione in proteine, in particolare nella produzione di enzimi coinvolti nella replicazione e nella riparazione del DNA. *M. tuberculosis* presenta differenti tassi di mutazione per ogni farmaco di prima linea. La frequenza di mutazione è maggiore per l'isoniazide (1 mutazione ogni 10^5 - 10^6 batteri) e minore per gli altri farmaci antitubercolari (rifampicina: 1 mutazione ogni 10^8 batteri, etambutolo: 1 mutazione ogni 10^7 batteri). Mutazioni che coinvolgono sia l'isoniazide che la rifampicina avvengono molto raramente (1 caso ogni 10^{14} batteri), quindi è quasi impossibile che un ceppo di *M. tuberculosis* presenti resistenza per entrambi i farmaci antitubercolari (Ducati RG et al, 2006).

Le mutazioni indotte sono dovute a diversi fattori esterni tra i quali gli antibiotici (fattore più importante), la terapia antiretrovirale, l'inquinamento e il fumo. A concentrazioni subinibenti, gli antibiotici potrebbero agire come mutageni, aumentando il rischio di farmaco resistenza. *M. tuberculosis* potrebbe entrare in contatto con farmaci antitubercolari a concentrazioni subinibenti in alcune condizioni: diminuzione della *compliance* del paziente, basso assorbimento del farmaco attraverso il tratto gastrointestinale, scarsa penetrazione e attività in certe parti del polmone e

fattori genetici del paziente che potrebbero influenzare il metabolismo del farmaco. Gli antibiotici, inoltre, potrebbero indurre mutazioni nel genoma di *M. tuberculosis* in quanto la loro azione potrebbe indurre danni al DNA. Alcuni studi hanno riportato che l'azione di alcuni farmaci antitubercolari (fluorochinoloni e aminoglicosidici) porta alla produzione di radicali ossidrilici che danneggiano il DNA batterico, aumentando il rischio di mutazioni e quindi di farmaco resistenza (McGrath M et al, 2013).

B) LUNGHEZZA DEL TRATTAMENTO

Il secondo problema del trattamento antitubercolare riguarda la durata della terapia: 6 mesi per infezioni causate dai ceppi sensibili ai farmaci e 18-24 mesi per quelle provocate da ceppi MDR e XDR.

La lunghezza del trattamento è dovuta al fatto che *M. tuberculosis* sviluppa uno stato dormiente in condizioni di mancanza di ossigeno e di esaurimento di nutrienti. Popolazioni batteriche di *persisters*, che possono sopravvivere per più di 100 giorni dall'inizio della terapia, sono tolleranti a molti farmaci antitubercolari, quindi per la loro eliminazione è necessaria una terapia che richiede la somministrazione di farmaci per molti mesi.

La lunghezza della terapia, nonostante sia indispensabile per la cura della tubercolosi, è associata ad un alto tasso di non aderenza da parte del paziente con conseguente aumento della mortalità e di sviluppo di ceppi resistenti ai farmaci antitubercolari. Per migliorare l'aderenza del paziente alla terapia è necessaria la scoperta di nuovi antibiotici che riducano sia la durata (massimo due mesi) che la frequenza di somministrazione dei farmaci (Zumla AI et al, 2014).

c) EFFETTI COLLATERALI

I farmaci antitubercolari possono dare effetti collaterali che dipendono da diversi fattori tra i quali la dose somministrata giornalmente (fattore più importante), l'età e lo stato nutrizionale del paziente, la presenza di preesistenti malattie o disfunzioni (alterata funzionalità di rene e fegato, la coinfezione con il virus dell'HIV, l'alcolismo). Gli effetti collaterali contribuiscono ad una diminuzione dell'aderenza del paziente alla terapia e alla sostituzione dei farmaci antitubercolari con antibiotici che potrebbero essere meno attivi contro *M. tuberculosis* ma più tossici.

Tre dei farmaci antitubercolari di prima linea (rifampicina, isoniazide e pirazinamide) sono epatotossici. Le epatiti indotte da questi antibiotici potrebbero essere causate da un meccanismo

di ipersensibilità o dalla produzione di metaboliti tossici che il fegato non è in grado di eliminare (Arbex MA et al, 2010).

Gli altri effetti collaterali associati alla somministrazione di farmaci di prima linea sono elencati in tabella 1.

FARMACO	EFFETTI COLLATERALI
Isoniazide	Epatite, neurite periferica, lupus indotto da farmaco, convulsioni, ipersensibilità con eruzione cutanea e febbre
Rinfampicina	Sindrome da influenza, epatite, trombocitopenia, nausea, anoressia, diarrea
Pirazinamide	Iperuricemia, epatite, eruzione cutanea, nausea e anoressia
Etambutolo	Neurite ottica e disagi gastrointestinali

Tabella 1: Effetti collaterali dei farmaci antitubercolari di prima linea(Chan ED and Iseman, 2002; modificata)

Anche i farmaci di seconda linea possono dare gravi effetti collaterali ad esempio nefrotossicità, epatotossicità e ototossicità (Koul A et al, 2011).

D) INTERAZIONE CON ALTRE TERAPIE

La terapia antitubercolare può interagire con i farmaci somministrati per il trattamento di altre patologie tra le quali il diabete, le malattie legate a difetti della coagulazione e le infezioni causate da virus (in particolare il virus dell'HIV).

L'interazione tra farmaci antitubercolari e per il trattamento dell'HIV pone un enorme problema soprattutto in Africa dove la mortalità per coinfezione tubercolosi-AIDS è molto elevata. Il farmaco antitubercolare responsabile di tale interazione è soprattutto la rifampicina che è un potente induttore dell'espressione di enzimi epatici della famiglia del citocromo P450 (proteine coinvolte nella detossificazione dell'organismo da farmaci, tossine e da prodotti di scarto dell'organismo). Tale induzione provoca un aumento del metabolismo dei farmaci antiretrovirali con conseguente inefficacia terapeutica (Koul A et al, 2011).

2.1.8 SVILUPPO DI NUOVI FARMACI ANTITUBERCOLARI

La terapia tubercolare in uso presenta numerose problematiche, quindi è necessario migliorare il trattamento attraverso la scoperta di nuovi farmaci antitubercolari che presentano le caratteristiche indicate nella tabella 2.

COSA DOVREBBE FARE UN NUOVO FARMACO	CARATTERISTICHE RICHIESTE
Semplificare trattamento o ridurre durata trattamento	Forte attività battericida Riduzione numero di pillole Consentire una terapia intermittente
Avere un profilo di tossicità accettabile	Bassa incidenza di effetti collaterali che limitano il trattamento
Essere attivo contro MDR/XDR	No cross-resistenza con farmaci antitubercolari di prima linea
Essere utile in pazienti con coinfezione HIV- <i>M.tuberculosis</i>	Minima interazione con farmaci antiretrovirali Non tossicità sovrapposta con quella dei farmaci antiretrovirali
Essere attivo contro la tubercolosi latente	Attività contro i bacilli latenti

Tabella 2:caratteristiche richieste dai nuovi farmaci antitubercolari

Lo sviluppo di nuovi farmaci antitubercolari presenta degli ostacoli: il costo per la produzione di nuovi antibiotici da parte delle aziende farmaceutiche (stimato attorno ai 115-240 milioni di dollari), la difficoltà nell'identificare nuovi composti in grado di uccidere *M. tuberculosis* sia in fase di crescita che di latenza e la mancanza di modelli animali per valutare con accuratezza la durata del trattamento richiesto. I porcellini d'India potrebbero sostituire i topi come modelli animali perché, infettati da *M. tuberculosis*, sviluppano una patologia molto simile alla tubercolosi umana (Boogaard J et al, 2009).

Un approccio utilizzato per la scoperta di nuovi farmaci antitubercolari è lo screening di librerie di composti per valutare la loro capacità di inibire la crescita di *M. tuberculosis*. Utilizzando tale strategia sono stati individuati dei composti che, superando le diverse fasi di sperimentazione preclinica e clinica, potrebbero essere utilizzati nella terapia antitubercolare.

Alcuni dei composti in fase di studio sono Q203, PBTZ-169 e BTZ-043.

Q203 è un composto della famiglia delle imidazopiridine che riesce ad inibire la crescita micobatterica bloccando il complesso del citocromo bc1, essenziale per mantenere il gradiente protonico e quindi importante per la sintesi dell'ATP. Q203 è attivo sia con ceppi di *M. tuberculosis* sensibili ai farmaci antitubercolari in uso sia con i MDR e gli XDR.

PBTZ-169 e BTZ-043, due benzotiazinoni, sono in fase clinica di sperimentazione. Entrambi riescono ad inibire DprE in *M. tuberculosis*. L'inibizione di tale enzima previene la formazione di un

precursore di un componente della parete micobatterica, provocando la lisi del batterio e la quindi la sua morte. PBTZ-169 e BTZ-043 agiscono contro *M. tuberculosis* sia in fase di replicazione sia in stato latente (Zumla AI et al, 2014).

2.2 G-QUADRUPLEX

Oltre alla struttura a doppia elica proposta da Watson e Crick in cui due catene parallele sono tenute assieme attraverso legami idrogeno tra basi complementari (due legami idrogeno per unire adenina e timina e tre per citosina e guanina), il DNA può adottare strutture biologicamente importanti come la struttura a G-quadruplex (G4).

Nel 1910 il chimico tedesco Bang aveva osservato che soluzioni di acido guanilico ad alta concentrazione formavano un gel, ma solo 50 anni dopo Gellert dimostrò che le sequenze di DNA ricche in basi guanina potevano ripiegarsi e formare delle strutture G4 (Bochman ML et al, 2012).

2.2.1 STRUTTURA

I G4 sono strutture secondarie ricche in basi guanina che sono costituite da tetradi impilate, ciascuna di esse è formata da 4 guanine che sono connesse tra di loro mediante legami idrogeno di Hoogsteen (fig. 8). L'energia di legame che tiene unite le tetradi che formano la struttura G4 è dovuta a tre fattori:

- 1) legami idrogeno di Hoogsteen tra le guanine in ciascuna tetrad
- 2) le interazioni π - π tra le guanine in tetradi adiacenti
- 3) le interazioni tra le cariche negative dell'ossigeno delle guanine e la carica del catione posizionato tra le tetradi (Hupper JL, 2010).

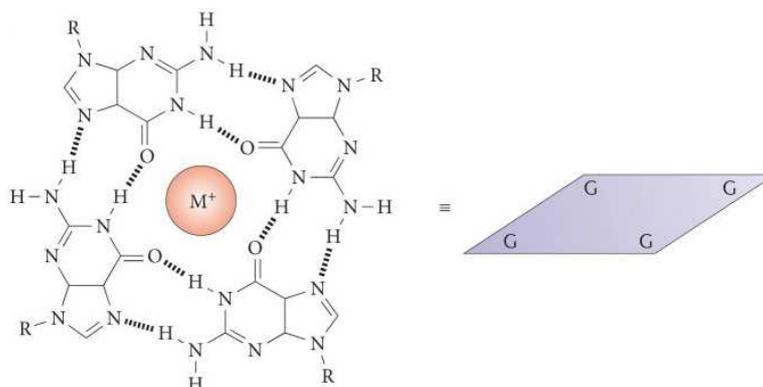


Figura 8: Rappresentazione di una tetrad che compone la struttura G4 (Bochman ML et al, 2012)

La formazione e la stabilizzazione delle strutture G4 è dovuta a cationi monovalenti (Na^+ o K^+), situati nella cavità centrale tra le tetradi, che neutralizzano le cariche negative degli 8 atomi di ossigeno presenti tra due tetradi impilate. I G4 possono adottare strutture differenti in base al tipo di catione che le stabilizza: la struttura con elevata probabilità di formazione è quella contenente il K^+ per la maggiore concentrazione di questo ione all'interno della cellula (140 mM) rispetto alla struttura con il Na^+ (5-15 mM). La precisa localizzazione dei cationi tra le tetradi dipende dal tipo di ione: Na^+ si posiziona principalmente nel piano delle tetradi, mentre K^+ si trova tra due tetradi (Yang D and Okamoto K, 2010).

2.2.2 VARIABILITA' STRUTTURALE DELLE STRUTTURE G4

Recenti studi hanno dimostrato che i G4 presentano elevato polimorfismo strutturale dovuto a diversi fattori: il numero di quartetti di guanine, l'orientamento dei filamenti, la natura dei loop (lunghezza, composizione in basi e posizione) e la torsione dell'angolo glicosidico delle guanine che formano le tetradi. Inoltre la presenza di ioni metallici (K^+ o Na^+) e di ligandi potrebbero influenzare la topologia della struttura G4 (Ou TM et al, 2008).

Le strutture G4 possono essere costituite dal ripiegamento di un singolo filamento oligonucleotidico (G4 intramolecolare), da due filamenti (G4 bimolecolare) o da 4 filamenti (G4 tetramolecolare) (fig. 9).

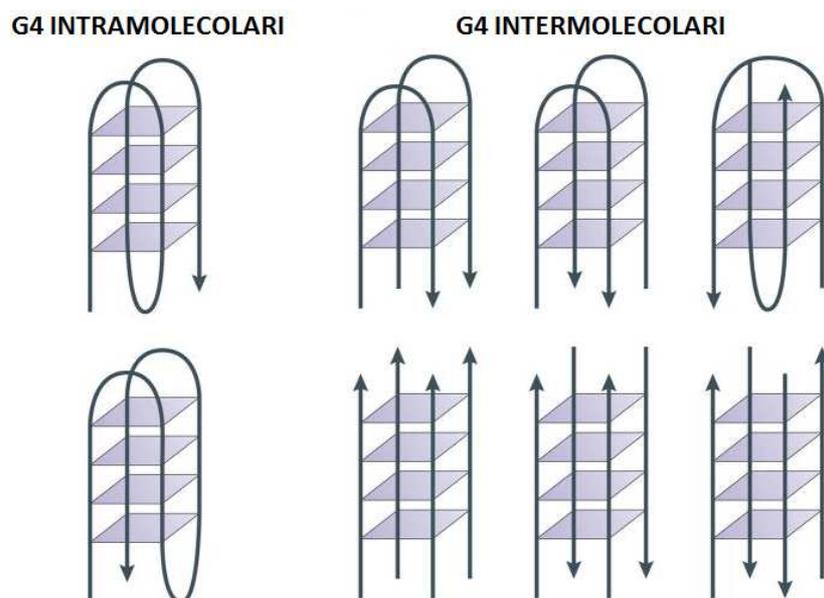


Figura 9: Rappresentazione di strutture G4 intramolecolari (a sinistra) e G4 intermolecolari (a destra). Le frecce indicano l'orientamento dei filamenti di DNA (Bochman ML et al, 2013).

Le strutture G4 assumono diverse tipologie in base all'orientamento delle catene del DNA: tutte e quattro le catene possono essere parallele (stesso orientamento), tre parallele e una antiparallela definita conformazione ibrida 3+1, due catene adiacenti parallele e due catene adiacenti antiparallele oppure si possono trovare strutture con due catene parallele e due antiparallele alternate tra loro (fig 9) (Hupper JL, 2008). L'orientamento delle catene dipende da come si posizionano i *loop* che permettono di connettere le guanine appartenenti alla stessa tetrad o a tetradi differenti. I loop possono essere classificati in quattro categorie (fig 10):

- loop laterali (edge-wise) che connettono due catene antiparallele adiacenti
- loop diagonali che collegano due catene antiparallele opposte
- *propeller* loop (double-chain-reversal) che uniscono due catene parallele adiacenti

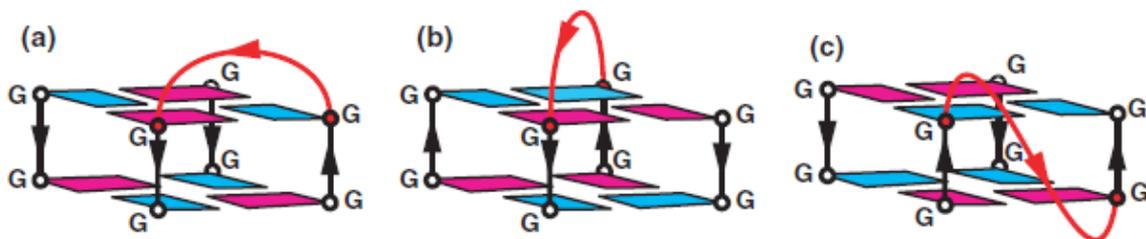


Figura 10: rappresentazione delle diverse tipologie di loop a) loop laterale; b) loop diagonale; c) *propeller* loop (Patel DJ et al, 2007).

Un altro parametro importante che caratterizza la topologia delle strutture G4 è l'angolo di torsione glicosidico tra le guanine che compongono le tetradi e lo zucchero. Può presentarsi in conformazione *anti* o *syn* (fig. 11).

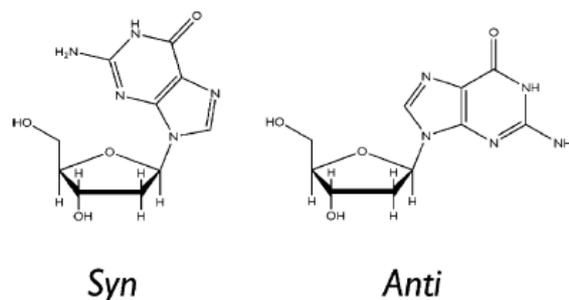


Figura 11: Conformazioni in cui si può presentare l'angolo di legame tra una guanina e lo zucchero (Huppert JL, 2008).

In una struttura G4 costituita da quattro catene parallele, l'angolo di torsione glicosidico tra le guanine e lo zucchero si trova in conformazione *anti*. In G4 con catene antiparallele, l'angolo di

torsione deve essere in conformazione *syn* per permettere la corretta formazione del legame idrogeno di Hoogsteen tra le guanine di ciascuna tetrate (Huppert JL, 2008).

2.2.3 LOCALIZZAZIONE E FORMAZIONE DELLE STRUTTURE G QUADRUPLEX

Studi computazionali hanno rivelato che le strutture G4 non sono localizzate casualmente e in tutto il genoma degli organismi analizzati, ma tendono a raggrupparsi in particolari regioni. Tale distribuzione non casuale e la loro conservazione tra specie differenti suggerisce che queste strutture potrebbero svolgere funzioni importanti nelle cellule (Bochman ML et al, 2013).

Diversi studi hanno rilevato la presenza delle strutture G4 a livello dei telomeri umani, nei promotori di geni, negli enhancers, nei siti di legame dei fattori di trascrizione e nei micro e macro satelliti (Holder IT and Hartig JS, 2014).

Nel DNA a doppio filamento la probabilità che si formino strutture G4 aumenta durante i processi biologici (replicazione e trascrizione) quando il DNA diventa temporaneamente a singola elica per la rottura dei legami di Watson e Crick tra le basi e le regioni ricche in guanina potrebbero ripiegarsi e formare strutture G4 (fig. 12). I G4 possono formarsi anche nell'mRNA ed essere coinvolti nel controllo della traduzione.

La formazione delle strutture G4 può essere favorita da condizioni di stress e da molecole che riconoscono e si legano ai G4 (Rhodes D et Lipps H, 2015).

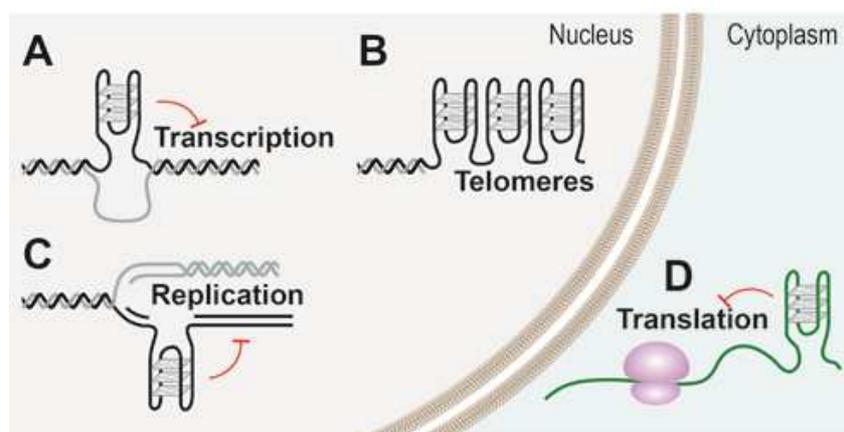


Figura 12: Le strutture G4 si formano con maggiore probabilità quando il DNA diventa temporaneamente a singolo filamento durante i processi di trascrizione (A) ed replicazione (C). Le strutture G4 si possono formare anche a livello telomerico (B) e negli mRNA dove controllano la traduzione (D).

A) G-QUADRUPLIX NEI TELOMERI

I telomeri, regioni di DNA non codificante localizzate nella parte terminale di un cromosoma lineare, sono costituiti da un tratto a doppio filamento formato da sequenze ripetute (5'-TTAGGG-3') circa 1000 volte e da una breve protrusione a singolo filamento all'estremità 3' ricca in basi guanina. La loro funzione è quella di proteggere la parte terminale del cromosoma dalla degradazione e dalla fusione con altri cromosomi. Ad ogni replicazione cellulare il telomero si accorcia di circa 30-100 paia di basi. Quando diventa troppo corto raggiungendo una lunghezza definita critica, si verifica l'arresto della replicazione della cellula che va incontro a senescenza e successiva morte (Huppert JL, 2008). Alcune cellule sono considerate immortali in quanto riescono a mantenere costante la lunghezza dei telomeri mediante l'azione dell'enzima telomerasi. La telomerasi è normalmente attiva nelle cellule staminali, nelle cellule somatiche presenta livelli minimi che non consentono il mantenimento della lunghezza del telomero, mentre è overespressa nell'80-85% di cellule tumorali (Ou TM et al, 2008).

La sequenza telomerica 5'-TTAGGG-3' a singolo filamento dell'estremità 3' ha una tendenza molto elevata a ripiegarsi e formare strutture G4 intramolecolari: le ripetizioni di basi GGG formano le tetradi che sono connesse da loops (TTA) (Huppert JL, 2008). Le strutture G4 a livello telomerico possono influenzare la lunghezza e di conseguenza la normale regolazione telomerica nel ciclo cellulare. Studi *in vitro* hanno inoltre dimostrato che la formazione della struttura G4 impedisce il legame della telomerasi al telomero, evitando così l'immortalizzazione della cellula (Ou TM et al, 2008) (fig. 13). Il legame tra i G4 e piccole molecole leganti (ad esempio la telomestatina) permette la stabilizzazione di queste strutture e di conseguenza un'elevata capacità di inibire l'attività della telomerasi, quindi G4 potrebbero essere considerati target promettenti per farmaci antitumorali.

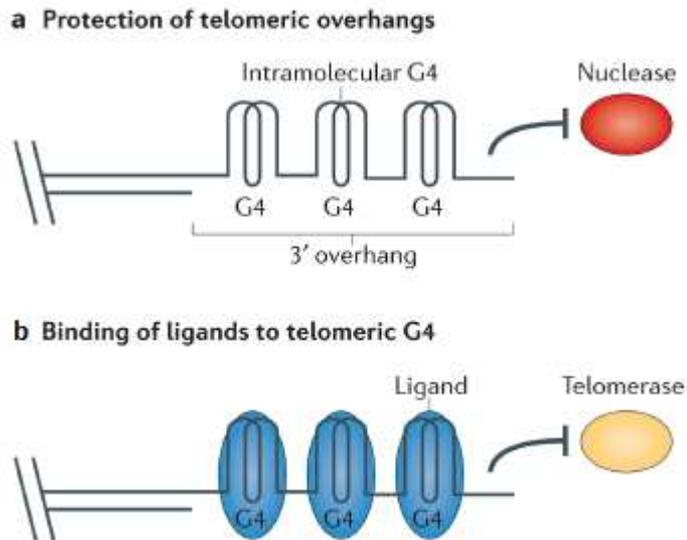


Figura 13: Ruolo della struttura G4 a livello telomerico. A) G4 può proteggere i telomeri dalla degradazione per mezzo delle nucleasi (in rosso). B) Il legante del G4 (in blu) che lega la struttura G4 a livello telomerico influenza la lunghezza del telomero alterando l'attività della telomerasi (in giallo) (Bochman ML et al, 2012).

B) G4 DURANTE LA REPLICAZIONE DEL DNA

Durante la replicazione del DNA, la doppia elica viene denaturata dall'enzima elicasi: un filamento è utilizzato come stampo per la sintesi del filamento veloce (*leading strand*) e l'altro è usato come template per la formazione del filamento lento (*lagging strand*). Il *leading strand* è sintetizzato dalla DNA polimerasi in forma continua, mentre il *lagging strand*, prodotto sotto forma di piccoli frammenti discontinui definiti frammenti di Okazaki, ha una maggiore probabilità di ripiegarsi e formare strutture G4 in prossimità di regioni particolarmente ricche in guanina. Per il completamento del processo di replicazione (fig. 14), lo srotolamento della struttura G4, mediato dall'enzima elicasi, è necessario affinché il filamento di DNA possa essere utilizzato dalla DNA polimerasi come stampo per la formazione di nuovi filamenti di DNA (Bochman ML et al, 2012).

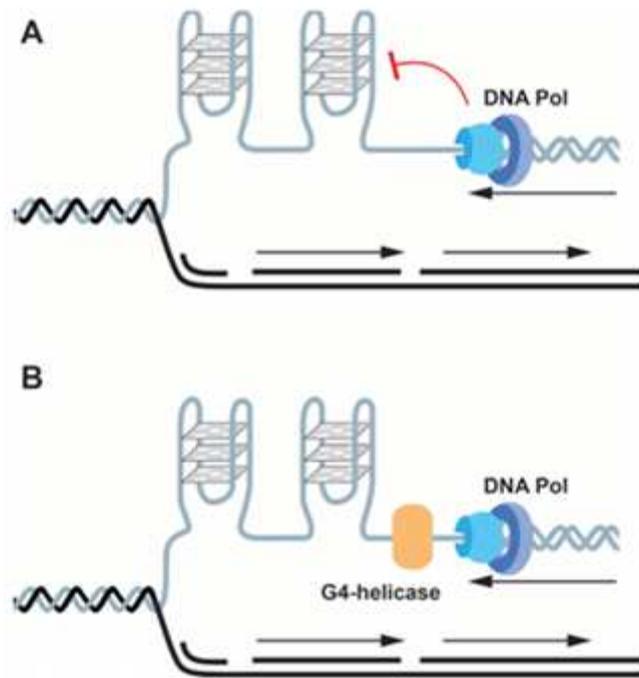


Figura 14: Ruolo del G quadruplex nella replicazione del DNA. Il G4 che si forma durante la replicazione del DNA quando è a singola elica impedisce la replicazione (A). Lo srotolamento della struttura G4 ad opera dell'enzima elicasi è fondamentale per far procedere la replicazione del DNA (B).

In *E.coli* sono state scoperte 22 diverse elicasi che hanno la capacità di legare e srotolare la struttura G-quadruplex *in vitro* per permettere la replicazione del DNA.

Molte delle elicasi umane che srotolano la struttura G-quadruplex durante la replicazione del DNA sono associate a malattie che causano instabilità genomica come ad esempio l'elicasi RecQ che è collegata all'invecchiamento precoce e le elicasi FANCI, PIF1 e BLM connesse ad un aumentato rischio di sviluppare cancro. Tali patologie sembrano causate dal mancato srotamento della struttura G-quadruplex ad opera delle elicasi. La conferma di tale teoria è stata ottenuta dalla scoperta, analizzando linee cellulari provenienti da pazienti affetti da anemia di Fanconi, di una delezione nel gene codificante per l'elicasi FANCI che aumenta la probabilità di formare strutture G-quadruplex durante il processo di replicazione. La telomestatina, una molecola in grado di riconoscere e legare con elevata affinità i G4, provoca un aumento dell'apoptosi e danni al DNA in cellule con mutazione dell'elicasi FANCI (Bochman ML et al, 2012).

C) G4 DURANTE LA TRASCRIZIONE

Studi computazionali hanno evidenziato l'elevata concentrazione di strutture G quadruplex in regioni promotoriali a monte del sito di inizio della trascrizione, suggerendo una probabile influenza dei G4 nella regolazione dell'espressione genica. I geni coinvolti nei processi di

regolazione come ad esempio quelli che codificano per i fattori di trascrizione contengono con maggiore probabilità motivi G-quadruplex nella loro sequenza a differenza dei geni *housekeeping* che risultano essere impoveriti di sequenze G4 (Huppert JL, 2010).

A livello promotoriale le strutture G quadruplex, la cui formazione potrebbe essere causata dallo stress indotto dal superavvolgimento negativo del DNA, potrebbero influenzare in modo positivo o negativo il processo di trascrizione del DNA a seconda del filamento interessato nella formazione del G4. Se tale struttura si forma a livello del filamento che funge da stampo, il G4 potrebbe impedire l'attività della RNA polimerasi, bloccando così il processo di trascrizione (fig. 15a). Se il ripiegamento nella struttura G4 avviene nel filamento che non viene utilizzato come stampo, l'azione della RNA polimerasi potrebbe essere facilitata dal fatto che il filamento trascritto viene mantenuto a singola elica (fig. 15b). Inoltre anche proteine che si legano alla struttura G-quadruplex potrebbero influenzare il processo di trascrizione stimolando (fig. 15c) o bloccando (fig. 15d) l'attività dell'RNA polimerasi (Bochman ML et al, 2012).

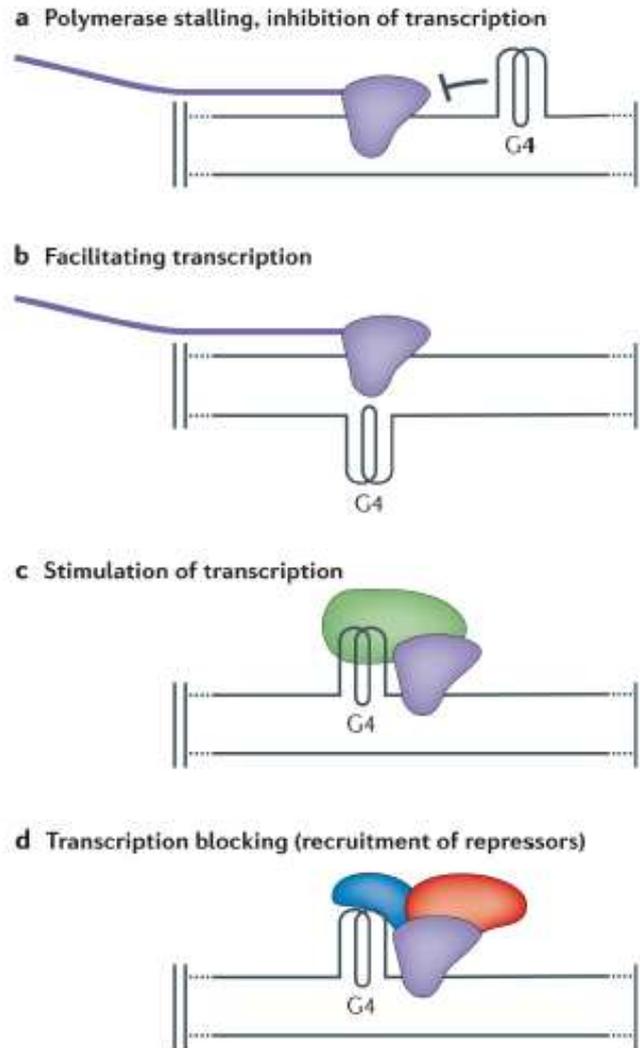


Figura 15: Ruolo nella trascrizione della struttura G-quadruplex che si forma in promotori di geni. A) G4 inibisce la trascrizione bloccando la RNA polimerasi (in viola); B) G4 favorisce la trascrizione mantenendo il filamento trascritto a singola elica; C) G4 stimola la trascrizione reclutando proteine (in verde) che stimolano la RNA polimerasi; D) G4 blocca la trascrizione reclutando proteine (in blu) che direttamente o indirettamente (in rosso) reprimono la trascrizione(Bochman ML et al, 2012).

Le strutture G quadruplex sono state individuate in alcuni promotori di geni umani, tra i quali *c-myc*, *Bcl-2* e *c-kit*, *VEGF* e *RB*.

Il gene *c-myc* codifica per un fattore trascrizionale che controlla il 10-15% dei geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nella differenziazione cellulare. L' aumento dei livelli di espressione di *c-myc* è stato osservato nell'80% di cellule cancerogene, infatti tale gene sembra essere in grado di attivare l'enzima telomerasi (Ou TM et al, 2008).

La maggior parte della trascrizione di *c-myc* (85-90%) è controllata da una regione di 115-142 paia di basi situata a valle del promotore del gene, NHEIII₁ (nuclease hypersensitive element III₁). Studi *in vitro* hanno dimostrato che la sequenza di NHEIII₁ d(GGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG), molto ricca in basi guanina, è in grado di ripiegarsi e formare una struttura G-quadruplex che

reprime la trascrizione di *c-myc* (Huppert JL, 2008). La stabilizzazione del G4 grazie all'aggiunta di un legante, TMPyP4 (tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin) diminuisce ulteriormente i livelli di trascrizione di *c-myc*, inibendo così la proliferazione della cellula e inducendo l'apoptosi (Bochman ML et al, 2012).

Il gene *Bcl-2* codifica per una proteina mitocondriale di membrana che è coinvolta, assieme ad altre, nel controllo della morte programmata della cellula (apoptosi), inibendo tale processo. Un aumento dei livelli di tale gene è stato trovato nell'uomo in un ampio *range* di tumori (linfoma dei linfociti B e T, carcinoma al seno, alla prostata, ai polmoni e all'intestino). Il promotore P1, importante nel controllare l'espressione di *Bcl-2*, contiene una regione ricca in basi guanina che è in grado di ripiegarsi e formare una struttura G-quadruplex. Studi hanno dimostrato che alcune molecole (ad esempio il legante 12459) che legano e stabilizzano tale struttura, provocano una diminuzione dell'espressione di *Bcl-2* e quindi della morte della cellula per apoptosi (Ou TM et al, 2008).

Il processo di trascrizione potrebbe essere alterato anche da proteine (fattori di trascrizione) che, legando la struttura G quadruplex, influenzano la formazione e lo srotolamento del G4. La famiglia delle proteine della miosina D (MyoD) sono fattori trascrizionali che legano le E-box nei promotori di geni muscolo specifici, importanti nel regolare lo sviluppo muscolare. *In vitro* MyoD ha molta affinità per le strutture G quadruplex che si formano nei promotori di tali geni. E' stato ipotizzato che quando i G4 si formano nei promotori, MyoD lega preferibilmente le strutture G4 rispetto a E-box e questo causa un'inibizione della trascrizione genica. Invece quando MyoD dimerizza con la miosina E (MyoE) non riesce a legare la struttura G quadruplex, quindi riconosce E-box, inducendo così un aumento della trascrizione genica.

2.2.4 G QUADRUPLEX NEI BATTERI

Nel genoma umano sono state trovate sequenze ricche in guanina potenzialmente in grado di ripiegarsi e formare strutture G quadruplex, capaci di influenzare l'espressione genica.

I G4 sono stati trovati anche nei genomi virali (HIV, Epstein-Barr Virus, virus dell'epatite A, Papillomavirus) e batterici (*Neisseria gonorrhoeae*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*).

Il batterio *Neisseria gonorrhoeae* contiene i pili, strutture antigeniche associate alla virulenza batterica e composte da unità proteiche ripetute, le piline, la cui espressione è regolata dal complesso genico *pil*. La variazione antigenica delle piline è il processo attraverso il quale il

patogeno esprime versioni strutturalmente diverse dei suoi epitopi di superficie in modo da eludere il sistema immunitario dell'ospite. Durante tale processo solo il gene residente al locus *pilE* è espresso e può essere rimpiazzato da un gene del pool dei loci *pilS* (i loci *pilS* contengono sequenze diverse che vengono utilizzate per la ricombinazione con *pilE* per generare differenti molecole di piline). Il sito di inizio della ricombinazione è stato mappato 16 pb a monte del locus *pilE* in una regione ricca in basi guanina capace di ripiegarsi e formare un G4 parallelo intramolecolare. La distruzione della struttura G-quadruplex impedisce la formazione di *nicks* a singolo filamento necessari per iniziare la ricombinazione, impedendo così la variazione antigenica. La ricombinasi RecA lega in modo specifico la struttura G quadruplex a monte di *pilE*, favorendo la ricombinazione *in vitro*. Questo suggerisce che il G4 può reclutare fattori di ricombinazione al locus *pilE* (fig. 16) (Harris LM and Merrick CJ, 2015).

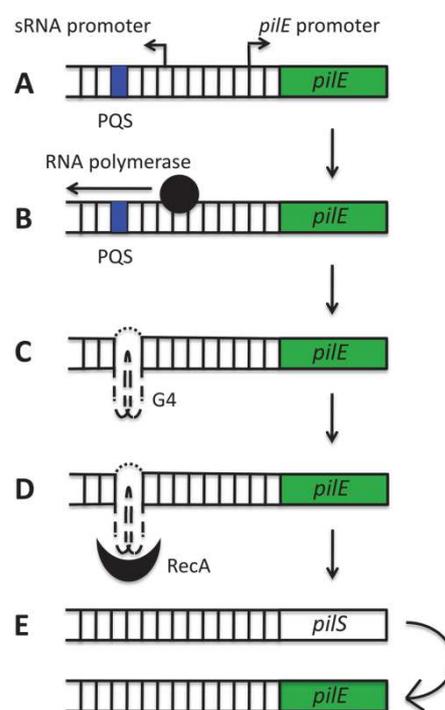


Figura 16: Modello schematico del ruolo del G-quadruplex in *pilE* in *N. gonorrhoeae* durante la variazione antigenica. Una putativa struttura G-quadruplex e il promotore di un piccolo RNA (sRNA) sono localizzati a monte del locus *pilE* (A). Durante la trascrizione (B) si creano le condizioni che favoriscono la formazione del G-quadruplex (C). Il G4 recluta RecA (C) e altri fattori di ricombinazione che stimolano la ricombinazione tra i loci *pilS* e *pilE* (Harris LM and Merrick CJ, 2015).

Studi rivelano che più di 140 specie batteriche contengono in regioni promotoriali sequenze in grado di formare strutture G4. In *Deinococcus radiodurans* (batterio estremofilo in grado di resistere a dosi di radiazioni di gran lunga superiori a quelle necessarie per uccidere un qualsiasi animale) sono state scoperte strutture G-quadruplex a livello di promotori di geni coinvolti nel

proteggere la cellula batterica dalle radiazioni. La stabilizzazione dei G4 attraverso il legame con piccoli composti ha evidenziato un'attenuazione della radioresistenza. Anche in *E.coli* sono state individuate delle sequenze a livello delle regioni promotoriali in grado di formare strutture G-quadruplex ed è stato dimostrato che queste influenzano l'espressione genica (Holder IT and Hartig JS, 2014). In *M. tuberculosis*, batterio con genoma particolarmente ricco in basi guanina, sono state trovate più di diecimila motivi che potrebbero formare strutture G-quadruplex (argomento trattato nei prossimi paragrafi) (Perrone R et al, 2017).

2.2.5 LEGANTI DEL G-QUADRUPLEX

Le strutture G-quadruplex influenzano processi biologici importanti come la trascrizione, la replicazione e la traduzione, inoltre contribuiscono a proteggere i telomeri dall'azione della telomerasi. Proprio per l'importanza che rivestono all'interno delle cellule, è stata valutata la possibilità di utilizzare i G4 come *target* per la scoperta di nuovi composti in grado di legare e stabilizzare tali strutture. Da diversi anni numerosi gruppi di ricerca stanno cercando di studiare e caratterizzare piccole molecole organiche (leganti del G4) in grado di legare le strutture G4 al fine di bloccare l'attività della telomerasi (quando i G4 si trovano a livello telomerico) o di inibire l'espressione di geni (per G4 localizzati in promotori).

I leganti del G4 possono riconoscere e legare le strutture G4 in modi diversi: intercalandosi tra due tetradi, legandosi lateralmente alle tetradi o nella superficie esterna di una tetrade (fig. 17) (Ou TM et al, 2008).

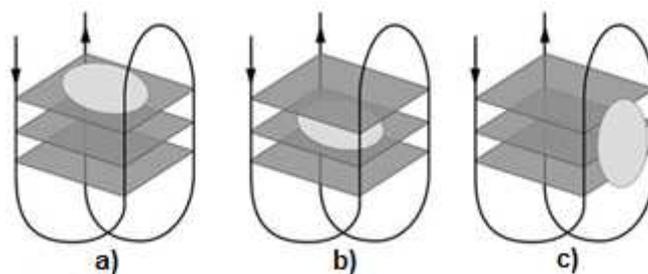


Figura 17: Modalità con cui i leganti del G4 si legano alla struttura: a) legame nella superficie esterna di una tetrade b) inserzione tra le pile di G-tetradi e c) legame nella superficie laterale delle tetradi (Ou TM et al, 2008).

I composti sintetici, identificati e studiati come leganti per le strutture G-quadruplex, sono derivati da antrachinoni (BSU-1051), acridine (BRACO-19, AS1410, RHPS4), quinacrine (BOQ1, NCQ), porfirine (TMPyP4, NMM, TMPyP2), perilene (PIPER) e triazine (12459). Anche alcuni composti

naturali macrocicli (telomestatina, leganti derivati da alcaloidi naturali, poliammine naturali) sono stati caratterizzati.

Nonostante molti di questi composti presentano un'elevata affinità per le strutture G-quadruplex, alcuni possiedono delle caratteristiche non favorevoli che limitano il loro studio e la loro caratterizzazione. Questo è il motivo per cui negli ultimi anni sono stati studiati numerosi composti che, oltre ad essere in grado di legare le strutture G4, presentano dei vantaggi come ad esempio la stabilità chimica, la facilità di sintesi, un'elevata solubilità in acqua, l'abilità di penetrare nelle cellule, la bassa tossicità e la capacità di indurre la formazione delle strutture G4 (Dolinnaya NG et al, 2016).

BRACO-19

Il BRACO-19 (fig. 18), composto appartenente alla famiglia delle acridine, è in grado di legare e stabilizzare le strutture G-quadruplex.



Figura 18: struttura del BRACO-19 (Ohnmacht SA and Neidle S, 2014)

BRACO-19 lega con molta specificità le strutture G4 che si formano a livello dei telomeri, impedendo così l'azione della telomerasi e la successiva trasformazione neoplastica della cellula, quindi tale composto presenta un'azione antitumorale.

Nonostante la sua bassa citotossicità, i maggiori limiti del BRACO-19 sono la mancanza di permeabilità attraverso la membrana cellulare e la sua limitata finestra terapeutica (Yang D and Okamoto K, 2010).

TMPyP4 E TMPyP2

TMPyP4 e TMPyP2 (fig. 19), composti derivanti dalle porfirine, legano e stabilizzano le strutture G quadruplex.

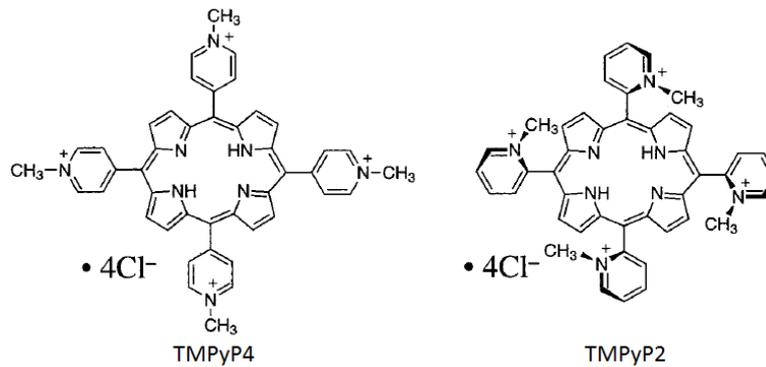


Figura 19: struttura di TMPyP4 e TMPyP2 (Han FX et al, 1999)

TMPyP4 possiede delle caratteristiche fisiche (la grandezza della molecola, la carica positiva e l'idrofobicità) che gli permettono di legare con maggiore affinità (2 volte maggiore) le strutture G-quadruplex (sia a conformazione parallela che antiparallela) rispetto al DNA a doppia elica.

Studi recenti hanno dimostrato che TMPyP4 è in grado di legare le strutture G quadruplex a livello telomeric, inibendo così l'attività della telomerasi.

TMPyP2 ha una struttura chimica molto simile al TMPyP4, i due composti differenziano solo per la posizione di un gruppo metile. La differenza strutturale dei due composti sta alla base della diversa affinità per le strutture G-quadruplex: TMPyP4 lega con alta affinità il G4 a differenza di TMPyP2 che interagisce con il G4 con bassa affinità e non esercita un effetto considerevole in termini di stabilizzazione, quindi viene di solito considerato come un controllo negativo (Han FX et al, 1999).

c-exNDI 2

c-exNDI 2 (fig. 20), composto sintetizzato di recente, è stato dimostrato essere in grado di legare e stabilizzare le strutture G-quadruplex presenti nel genoma virale di HIV ad una concentrazione non tossica per le cellule (Perrone R et al, 2015).

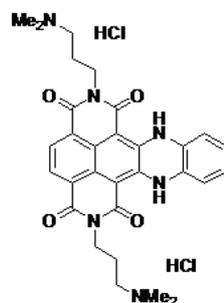


Figura 20: struttura di c-exNDI 2

TELOMESTATINA

La telomestatina (fig. 21), composto naturale isolato da *Streptomyces anulatus*, è la più potente molecola identificata finora in grado di inibire la telomerasi. Interagisce maggiormente con strutture G-quadruplex intramolecolari rispetto a quelle intermolecolari e presenta una affinità per i G4 70 volte superiore a quella per il DNA a doppia elica.

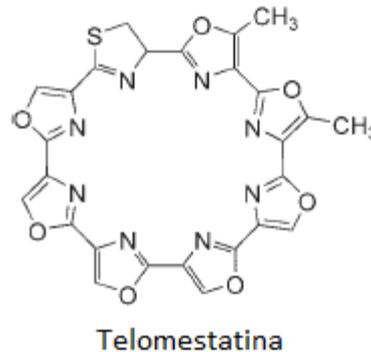


Figura 21: struttura della telomestatina (Ou TM et al, 2008)

La telomestatina presenta attività antitumorale, infatti il trattamento di differenti linee cellulari di mieloma multiplo per tre-cinque settimane con questo composto, causa una riduzione della lunghezza telomerica e la morte delle cellule per apoptosi (Yang D and Okamoto K, 2010).

2.3 G-QUADRUPLEX IN *M. tuberculosis*

In *M. tuberculosis*, batterio con genoma particolarmente ricco in basi guanina e citosina (65%), sono stati trovati diecimila motivi ricchi in guanina che hanno la capacità di ripiegarsi e formare strutture G-quadruplex (Thakur RS et al, 2014).

Analisi bioinformatiche hanno permesso di identificare 45 geni con putativi G4 localizzati nelle regioni immediatamente a monte o nei siti di inizio della trascrizione. Tali geni in base al ruolo che svolgono in *M. tuberculosis* sono stati divisi in quattro categorie funzionali:

- a) geni coinvolti nei processi cellulari e nella formazione della parete cellulare
- b) geni che codificano per proteine ipotetiche conservate (la funzione di alcune non è del tutto conosciuta)
- c) geni che codificano per proteine regolatorie
- d) geni che codificano per intermediari del metabolismo e della respirazione cellulare

Tra i 45 geni che presentano un putativo G4 nella regione promotoriale, 4 sono stati selezionati per analisi *in vitro*: *zwf1*, *clpX*, *mosR* e *ndhA* (Perrone R et al, 2017).

Il gene *zwf1* codifica per la glucosio-6-fosfato deidrogenasi, enzima che catalizza la prima reazione della via metabolica dei pentoso fosfati che permette la produzione sia di ribosio 5-fosfato, precursore per la sintesi dei nucleotidi e quindi degli acidi nucleici, sia di NADPH. Il NADPH funge da cofattore alla reazione catalizzata dalla micotione reductasi, enzima che converte il micotione in micotiole, potente antiossidante che protegge le cellule dagli effetti negativi delle specie reattive dell'ossigeno (Hayward D et al, 2004).

Il gene *mosR* (*M. tuberculosis oxidation-sensing regulator*) codifica per un regolatore trascrizionale che in condizione di stress ossidativo fa aumentare la trascrizione di alcuni geni (ad esempio Rv1050) per favorire la sopravvivenza del batterio all'interno dei macrofagi. Studi hanno dimostrato che durante l'internalizzazione di *M. tuberculosis* nei macrofagi attivati, *mosR* induce un aumento di due volte dell'espressione del gene Rv1050 che codifica per una proteina la cui funzione non è ancora nota ma che è ipotizzato potrebbe influenzare il metabolismo degli acidi grassi durante l'infezione (Brugarolas P et al, 2012).

Il gene *ndhA* codifica per la NADH deidrogenasi, un enzima che permette il trasferimento degli elettroni dal NADH alla catena respiratoria (si pensa che l'accettore di elettroni sia l'ubichinone) con conseguente formazione di NAD. NADH deidrogenasi potrebbe avere un ruolo cruciale mantenendo costante all'interno del micobatterio il rapporto tra le concentrazioni di NAD/NADH, una variazione di quest'ultimo influirebbe negativamente sulla vitalità cellulare.

In *M. tuberculosis* sono stati riconosciuti due tipi di NADH deidrogenasi: NADH deidrogenasi di tipo I, importante per la virulenza e la sopravvivenza intracellulare dei micobatteri, e NADH deidrogenasi di tipo 2 che è formata dai due isoenzimi NdhA e Ndh, quest'ultimo è essenziale per la sopravvivenza di *M. tuberculosis* (Awasthy D et al, 2014).

Il gene *clpX* codifica per un componente del proteosoma Clp. ClpX appartiene alla famiglia delle ATPasi AAA e ha il ruolo di chaperone, mentre in associazione con la proteasi ClpP permette l'eliminazione di proteine non funzionali. Inoltre *clpX* interagisce con *FtsZ*, proteina omologa alla tubulina degli eucarioti, importante nella divisione cellulare della cellula batterica in particolare per la formazione di un anello (l'anello Z) nel sito dove si formerà il setto di separazione tra le due nuove cellule (Dziedzic R et al, 2010).

La formazione delle strutture G-quadruplex nei promotori dei geni appena descritti è stata confermata *in vitro* utilizzando il saggio di stop della Taq polimerasi, la spettroscopia UV e il dichroismo circolare. Mediante quest'ultima tecnica è stata inoltre stabilita la topologia della

struttura G-quadruplex che si forma nella regione promotoriale dei 4 geni presi in esame: *clpX* forma una struttura G-quadruplex di tipo parallelo, *zwf1* e *mosR* mostrano una conformazione di tipo misto, *ndhA* si ripiega a produrre una struttura mista in assenza di potassio e antiparallela in presenza dello ione.

Inoltre studi di dicroismo circolare e il saggio di stop della Taq polimerasi hanno evidenziato che dei leganti del G-quadruplex (BRACO-19 c-exNDI 2) sono in grado di legare e di stabilizzare in modo significativo la struttura G4 (Perrone R et al, 2017).

La presenza di un elevato numero di sequenze G4 nel genoma di *M. tuberculosis*, potrebbe far pensare alle strutture G-quadruplex come bersagli promettenti per la scoperta di nuovi farmaci antitubercolari.

3. SCOPO

La tubercolosi è una malattia causata da *M. tuberculosis*. Lo sviluppo di ceppi resistenti ai farmaci antitubercolari in uso rende necessaria la scoperta di nuovi potenziali *target* per lo sviluppo di nuovi composti in grado di poter trattare efficacemente tale malattia.

I G-quadruplex sono strutture secondarie formate da tetradi di guanine, ciascuna di esse è formata da 4 guanine che sono connesse tra di loro mediante legami idrogeno di Hoogsteen. Sono presenti in telomeri, ma sono state anche individuate in promotori di geni umani e virali dove influenzano i processi di trascrizione e di replicazione genica. I G4 sono considerati promettenti *target* farmacologici grazie alla scoperta di molecole che legano e stabilizzano la loro struttura, interferendo con l'espressione genica (Bochman ML et al, 2012). La loro identificazione e caratterizzazione nei batteri è ancora in fase iniziale.

Recentemente analisi bioinformatiche hanno identificato nel genoma di *M. tuberculosis* (molto ricco in basi guanina e citosina) più di diecimila motivi in grado di ripiegarsi e formare strutture G-quadruplex, 45 sono state trovate in promotori di geni coinvolti nella divisione e nella respirazione cellulare, nella formazione di componenti della parete cellulare e nella difesa allo stress ossidativo. Mediante analisi in vitro la formazione delle strutture G4 è stata confermata nella regione promotoriale di quattro geni: *zwf1*, *mosR*, *clpX* e *ndhA* (Perrone R et al, 2017).

Lo scopo della tesi è caratterizzare il ruolo fisiologico delle strutture G-quadruplex in *M. tuberculosis* attraverso la valutazione dell'effetto che i leganti del G4 hanno sia sulla crescita micobatterica in assenza e in presenza di stress ossidativo indotto da acqua ossigenata sia sulla trascrizione dei quattro geni nella cui regione promotoriale è stata confermata essere presente una sequenza G4. In particolare è stata studiata in maniera più approfondita l'influenza della struttura G4 nell'attività del promotore del gene *zwf1* quando *M. tuberculosis* è esposto a stress ossidativo con H₂O₂ o quando è trattato con BRACO-19 (composto in grado di stabilizzare la struttura del G4).

Inoltre è stata valutata l'interazione tra il BRACO-19 e alcuni farmaci antitubercolari per poter prendere in considerazione la possibilità di utilizzare i leganti del G-quadruplex come farmaci antitubercolari non convenzionali.

4. MATERIALI E METODI

4.1 CEPPI BATTERICI, TERRENI E CONDIZIONI DI CRESCITA

Per i clonaggi molecolari è stato utilizzato il ceppo di *E. coli* JM110, fatto crescere a 37°C in terreno liquido e in piastre di Luria Bertani LB (Sigma). Quando necessario sono stati aggiunti al terreno gli antibiotici kanamicina (Sigma) e igromicina (Invitrogen) rispettivamente alle concentrazioni finali di 50 µg/ml e 200 µg/ml.

Il ceppo di *M. tuberculosis* H37Rv è stato fatto crescere a 37°C in terreno Middlebrook liquido 7H9 (Difco) e in piastre di 7H10 (Difco) a cui sono stati aggiunti lo 0,2% di glicerolo, lo 0,05% di Tween-80 e il 10% di ADN (albumina di siero bovina, destrosio e NaCl). Se richiesto, l'antibiotico kanamicina è stato aggiunto al terreno alla concentrazione finale di 20µg/ml.

4.2 PLASMIDI

Per i clonaggi molecolari i plasmidi utilizzati e già disponibili in laboratorio sono:

- 1) pMV306: plasmide integrativo micobatterico di 3995 pb che contiene il sito fagico L5 attP, *aph* del trasposone Tn903 (gene che conferisce la resistenza alla kanamicina), un gene che codifica per l'integrasi e un *multiple cloning site*.
- 2) pMV4-36: plasmide replicativo contenente il gene per la resistenza all'igromicina, il gene codificante per la proteina reporter eGFP posto sotto il controllo del promotore del gene Rv1818c e 2 terminatori (Tcter e TrTer) posti a monte del promotore di Rv1818c e a valle del gene codificante per la eGFP.
- 3) PCR-Blunt II Topo (Invitrogen): plasmide replicativo commerciale di 3519 pb usato per clonare prodotti di PCR, fornito in forma lineare grazie al legame covalente tra la topoisomerasi I del virus Vaccinia e l'estremità 3' di ogni filamento di DNA. Tale plasmide è costituito dai geni per la resistenza alla kanamicina e alla zeocina, l'origine di replicazione pUC, il promotore *P_{lac}* e il gene *ccdB* (letale in *E. coli*) fuso al frammento C-terminale di *lacZα*. Il plasmide consente la selezione dei ricombinanti in quanto l'inserimento di un prodotto di PCR impedisce l'espressione del gene di fusione, permettendo la crescita dei batteri dopo la trasformazione in cellule competenti. Invece il mancato inserimento del prodotto di PCR porta all'espressione del gene di fusione *lacZα-ccdB* che, essendo tossico, uccide il batterio.

4.3 AMPLIFICAZIONE DEL DNA

Per l'amplificazione del DNA è stato utilizzato l'enzima Q5 High Fidelity DNA Polymerase (NEB) (DNA polimerasi termostabile con attività esonucleasica 3' → 5' che produce prodotti di PCR con estremità *blunt*) e come template il DNA genomico di *M. tuberculosis* H37Rv.

Le quantità dei reagenti utilizzati per allestire le reazioni di PCR sono indicati nella tabella 3.

REAGENTE	QUANTITA'
DNA	50 ng
Q5 Buffer (5X)	5 µl (1X)
dNTPs (10 mM)	0,5 µl (200 µM)
Primer Forward (12,5 µM)	1 µl (0,5 µM)
Primer Reverse (12,5 µM)	1 µl (0,5 µM)
Q5 DNA Polymerase	0,25 µl (0,02 U/µl)
H ₂ O	fino a 25 µl

Tabella 3: componenti che costituiscono la miscela di reazione della PCR. Nella colonna di sinistra tra parentesi sono indicate le concentrazioni iniziali di reagente, nella colonna di destra tra parentesi sono indicate le concentrazioni finali.

Il DNA è stato amplificato grazie all'utilizzo del termociclatore (Mastercycler, Eppendorf) dopo aver impostato le seguenti condizioni di reazione:

Denaturazione iniziale	98°C per 30 secondi	} x 35 cicli
Denaturazione	98°C per 10 secondi	
Appaiamento	T° ann. per 30 secondi	
Estensione	72°C per 30 secondi	
Estensione finale	72°C per 2 minuti	

Per l'amplificazione del promotore del gene *zwf1* sono stati utilizzati i primers RP 1750 e RP 1751. I primers sono stati disegnati in modo tale da poter aggiungere alla sequenza del promotore 2 siti di restrizione: all'estremità 5' il sito riconosciuto dall'enzima di restrizione HindIII (RP 1750) e all'estremità 3' il sito riconosciuto dall'enzima di restrizione NheI (RP 1751).

RP 1750: aaaagctttattcacgaccacccgacagcatt

RP1751:aagctagcaccgcacctccagacttgct

4.4 CLONAGGIO GENICO

4.4.1 TECNICHE UTILIZZATE PER IL CLONAGGIO

LIGAZIONE

Per la reazione di ligazione è stata utilizzata la T4 DNA ligasi (400000 unità/ml) (NEB). Per calcolare la quantità appropriata di inserto per la reazione di ligazione, è stata utilizzata la seguente formula:

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{ng vettore} \times \text{Kb grandezza inserto}}{\text{Kb grandezza vettore}} \times \text{inserto/vettore}$$

La reazione è stata effettuata in 10-20 µl di volume totale contenenti vettore ed inserto in rapporto 1:3 e la T4 DNA ligasi in un opportuno tampone (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1mM, ditioeritritolo 5 mM, KCl 60 mM, glicerolo 50%, pH 7.5) diluito 1:10. La reazione è stata fatta procedere per 12-16 ore a 16°C (temperatura ottimale per l'attività della T4 DNA ligasi).

CELLULE COMPETENTI DI *E. coli* E TRASFORMAZIONE

Per rendere il ceppo di *E. coli* JM110 competente, i batteri sono stati fatti crescere fino alla fase esponenziale (OD₆₀₀ 0,4-0,5) e il *pellet* di batteri, ottenuto tramite centrifugazione, è stato risospeso in CaCl₂ 0,1M. I batteri sono stati nuovamente centrifugati e risospesi in CaCl₂ e glicerolo 10%. Le aliquote sono state conservate a -80°C.

Per l'inserimento del plasmide all'interno delle cellule JM110 è stato utilizzato il metodo della trasformazione per *heat shock*: il DNA plasmidico mescolato con cellule competenti e tenuto in ghiaccio per circa 30 minuti, è stato incubato per 2 minuti a 37°C per permettere l'ingresso del plasmide all'interno delle JM110. Le cellule, diluite in terreno LB liquido, sono state incubate per un'ora a 37°C e poi piastrate in terreno LB solido contenente l'antibiotico kanamicina.

ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI DNA PLASMIDICO

Per l'estrazione di DNA plasmidico da grandi volumi (100 ml) e da piccoli volumi (5 ml) di coltura sono stati utilizzati due kit: Pure Link HiPure Plasmid Filter Purification Kits (Invitrogen) e QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen).

Il *pellet*, ottenuto mediante centrifugazione della coltura cellulare, è stato mescolato con il tampone di risospensione (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, 2.5 mg di Rnasi A, pH8). Le cellule sono

state lisate con il tampone di lisi (NaOH 0,2 M, 1% SDS) e alla soluzione è stato poi aggiunto il tampone di neutralizzazione (cloridrato di guanidina 4 M, acetato di potassio 0,5 M, pH 4,2) che permette la precipitazione delle frazioni cellulari insolubili e del DNA genomico, che vi rimane intrappolato, e neutralizza il pH basico della soluzione di lisi. Il surnatante, ottenuto mediante 10 minuti di centrifugazione a 13000 rpm, è stato trasferito in colonnine dotate di resina che riescono a legare il DNA carico negativamente. Successivamente il DNA plasmidico contenuto nella colonnina è stato lavato con il tampone di lavaggio (NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM, etanolo 90%, pH 7,5) ed eluito con acqua.

DIGESTIONE DEL DNA

Per le reazioni di restrizione del DNA sono stati utilizzati enzimi forniti dall'azienda NEB.

Per il calcolo della quantità di enzima da utilizzare nelle reazioni è stata utilizzata tale proporzione:

$$\text{N° siti taglio su fago lambda} : 1 = \left(\frac{\text{N° siti taglio enzima} \times \text{pb fago lambda}}{\text{pb vettore}} \right) : \text{unità enzima per } \mu\text{g di DNA}$$

Le reazioni di digestione contenenti DNA plasmidico, buffer specifico, enzimi e acqua sono state incubate per 1-2 ore a 37°C. Al termine delle reazioni, gli enzimi sono stati inattivati con un'incubazione per 20 minuti a 80 °C o mediante precipitazione con l'utilizzo di una miscela di sodio acetato ed etanolo 96%.

ELETTROFORESI DEL DNA

Per l'elettroforesi del DNA, l'agarosio (Sigma) è stato sciolto nel tampone TAE (tris-acetato 0,04 M ed EDTA 0,001 M, pH 8) in modo da ottenere una concentrazione finale tra lo 0,8 e l'1,4%.

Per la visualizzazione del DNA mediante l'irradiazione con luce ultravioletta è stato utilizzato il colorante GelGreen (EuroClone), capace di intercalarsi nella struttura del DNA e che, a differenza dell'etidio bromuro, non presenta tossicità.

Per la corsa elettroforetica, iniziata dopo il caricamento in gel di agarosio dei campioni a cui è stato aggiunto il Gelpilot LoadingDye 5X (Qiagen), è stato impostato un valore costante di voltaggio compreso tra 50 e 90 Volt.

RECUPERO E PURIFICAZIONE DI FRAMMENTI DI DNA DA GEL

Frammenti di acidi nucleici separati mediante elettroforesi sono stati recuperati dal gel di agarosio utilizzando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Il gel di agarosio, sciolto a 50°C in 3 volumi-peso di una soluzione ad alta concentrazione salina e pH>7,5 (Buffer QG) e mescolato con l'isopropanolo, è stato purificato in colonnine con resine di silice. La soluzione di DNA introdotta in colonnina è stata centrifugata 1' a 13000 rpm per permettere l'eliminazione dell'agarosio e dei sali e consentire il legame tra la resina e il DNA. Quest'ultimo è stato poi lavato con una soluzione contenente etanolo (Buffer PE) ed eluito dalla colonnina con l'acqua.

ELIMINAZIONE DI UN SITO DI RESTRIZIONE DAL DNA PLASMIDICO

Per eliminare dal plasmide pMV306 il sito riconosciuto dall'enzima di restrizione NheI, è stato utilizzato l'enzima Mung bean nuclease (10000 unità/ml) (NEB), endonucleasi in grado di degradare in una sequenza di DNA le estremità 5' o 3' a singolo filamento con conseguente formazione di estremità piatte.

La soluzione contenente l'enzima Mung bean nuclease in opportuno tampone (sodio acetato 50 mM, NaCl 30 mM, ZnSO₄ 1 mM) diluito 1:10 e il plasmide (precedentemente digerito con l'enzima NheI) è stata incubata per 30 minuti a 30°C. L'inattivazione della Mung bean nuclease è stata ottenuta mediante estrazione con la miscela fenolo/cloroformio.

4.4.2 STRATEGIA DI CLONAGGIO

Il promotore del gene *zwf1* (*Pzwf1*), amplificato con primers (RP 1750 e RP 1751) che hanno permesso l'inserimento nella sequenza promotoriale dei siti di restrizione riconosciuti dagli enzimi HindIII e NheI rispettivamente alle estremità 5' e 3', è stato clonato all'interno del vettore PCR Blunt II TOPO ottenendo così il plasmide pERK2. *Pzwf1* estratto dal plasmide pERK2 mediante digestione con gli enzimi HindIII/NheI, è stato clonato nel plasmide pMV4-36 precedentemente privato del promotore del gene Rv1818c attraverso digestione con gli stessi enzimi, ottenendo il plasmide pERK4. La regione comprendente il terminatore, *Pzwf1* e il gene codificante per la proteina reporter eGFP è stata estratta mediante digestione con gli enzimi ClaI e BamHI da pERK4 ed è stata clonata nel vettore integrativo pMV306 precedentemente privato del sito NheI mediante l'azione dell'enzima Mung Bean e dei siti StuI e SpeI. Il plasmide finale così ottenuto, pERK 10, è costituito dal gene codificante per la proteina reporter eGFP posto sotto il controllo del promotore del gene *zwf1*, il gene che conferisce la resistenza alla kanamicina, 2 terminatori posti rispettivamente a monte del promotore e a valle del gene codificante per la eGFP e il gene

codificante per l'integrasi (enzima che permette di integrare il plasmide all'interno del genoma del batterio in corrispondenza dei sito di integrazione del micobatteriofago L5) (fig 22).

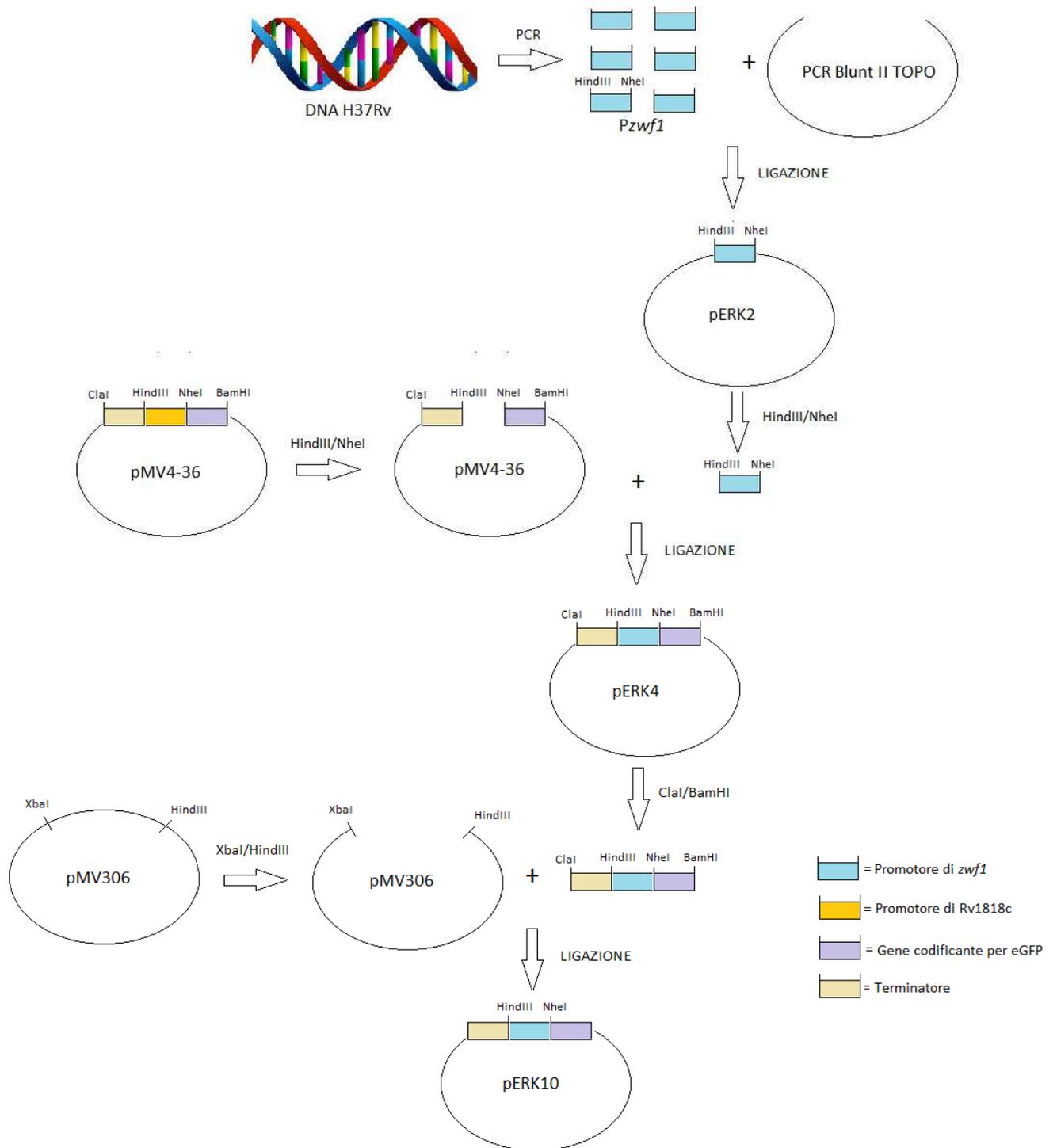


Figura 22: strategia di clonaggio utilizzata per ottenere il plasmide pERK10. L'eliminazione dei siti NheI, StuI, SpeI dal plasmide pMV306 non è stata rappresentata in figura.

Per la costruzione del plasmide pERK 14 contenente la eGFP privata del promotore del gene *zwf1*, il plasmide pERK10 è stato digerito con gli enzimi HindIII e NheI e successivamente ricircolarizzato mediante reazione di ligazione (fig. 23).

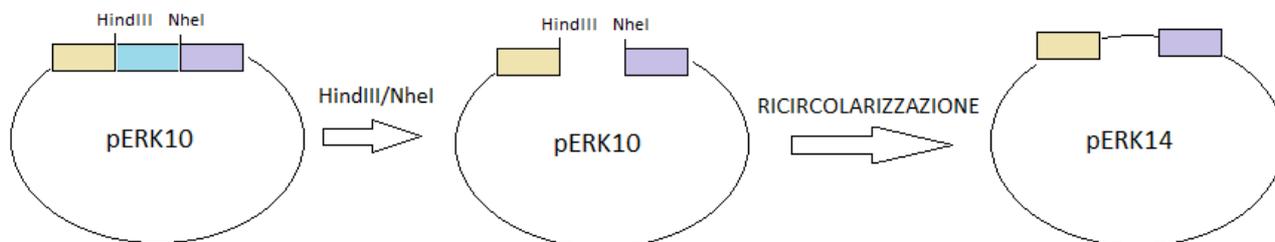


Figura 23: strategia di clonaggio utilizzata per ottenere il plasmide pERK14.

4.5 CELLULE COMPETENTI ED ELETTROPORAZIONE IN *M. tuberculosis*

M. tuberculosis H37Rv, cresciuto in piastre di terreno 7H10/ADN e inoculato in terreno liquido 7H9/ADN, è stato fatto crescere fino a OD₅₄₀ 0,4-0,6. Per rendere competenti le cellule micobatteriche il pellet, ottenuto mediante centrifugazione della coltura a 5000 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente, è stato lavato per due volte con 1 volume di glicerolo (Sigma-Aldrich) sterile al 10% e per una volta con 1 ml di glicerolo, infine è stato risospeso in 800 µl di glicerolo.

50 µl di cellule competenti sono state mescolate con 500 ng di plasmide e successivamente trasferite in una cuvetta da elettroporazione (Biorad). Quest'ultima è stata inserita nell'elettroporatore (Eppendorf; 10µF di capacitanza, 200 Ω di resistenza, voltaggio 25KVcm⁻¹) che con una scarica elettrica ha permesso di creare dei pori nella parete del micobatterio per permettere l'entrata del plasmide nella cellula. Dopo lo shock elettrico, le cellule sono state diluite con 800 µl con terreno 7H9/ADN, messe ad incubare per 24 ore a 37°C e poi piastrate in piastre contenenti l'antibiotico kanamicina.

4.6 MUTAGENESI SITO DIRETTA

La mutagenesi sito diretta di un intero plasmide è una metodica che permette di inserire nel DNA plasmidico delle mutazioni attraverso sostituzione, inserimento o delezione di uno o più basi (Laible M and Boonrod K, 2009). Questa tecnica è stata utilizzata per mutagenizzare la sequenza del promotore del gene *zwf1*.

La reazione di mutagenesi è stata allestita mescolando il vettore plasmidico da mutagenizzare con i reagenti indicati nella tabella 4.

REAGENTE	QUANTITA'
Pfu reaction buffer 10x	2,5 µl
dsDNA templatato	50 ng
Primer Forward	125 ng
Primer Reverse	125 ng
dNTPs	1 mM
H2O	fino a 25 µl

Tabella 4: componenti che compongono la miscela di reazione della PCR mutagenesi sito diretta.

Dopo l'aggiunta di 2,5 U/µl di Pfu DNA Polymerase (Agilent), la reazione è stata incubata nel termociclatore (Mastercycler, eppendorf) ai tempi e alle temperature indicate nel seguente schema:

Denaturazione iniziale	95°C per 2 minuti	} x 16 cicli
Denaturazione	95°C per 30 secondi	
Appaiamento	65°C per 1 minuto	
Estensione	72°C per 4 minuti	
Estensione finale	72°C per 10 minuti	

I primers utilizzati per mutagenizzare il promotore del gene *zwf1* sono RP 1793 (primerforward) e RP 1794 (primer reverse):

RP 1793: 5' gggttgctcgggccaatgAgctaggggttgagttcggc 3'

RP 1794: 5' gccgaactcaacctagcTcattggcccgacaacc 3'

Nei primers, che si appaiano all'interno del promotore del gene *zwf1* in entrambi i filamenti del DNA plasmidico, è stata inserita la mutazione desiderata (indicata in azzurro). L'estensione dei primers durante la reazione di PCR ad opera dell'enzima Pfu DNA Polymerase ha generato un plasmide contenente dei *nicks* che è stato successivamente trattato con DpnI (Agilent), enzima che digerisce il DNA metilato e seleziona il DNA non metilato di nuova sintesi contenente la mutazione (fig. 24). Il plasmide è stato poi trasformato nelle cellule competenti di *E. coli* JM110 e piastrato in piastre di LB agar. Dopo 24 ore di incubazione le colonie ottenute sono state fatte crescere in terreno liquido LB e il DNA plasmidico, estratto con il QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) è stato sequenziato per confermare l'inserimento della mutazione nella sequenza plasmidica.

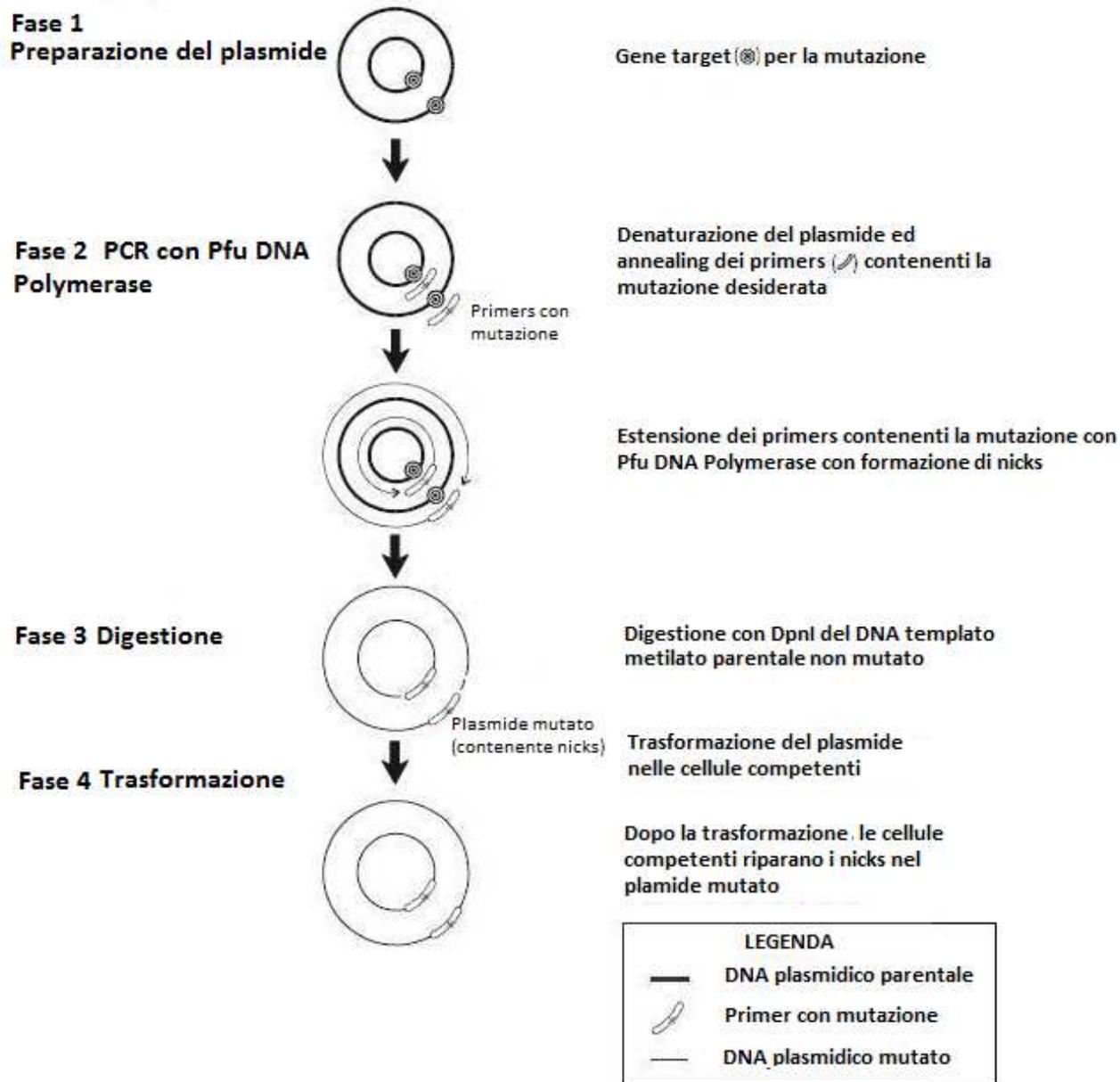


Figura 24: Fasi della mutagenesi sito specifica (Quick Change Site Direct Mutagenesis Kit, Strategene).

4.7 ANALISI DELLA FLUORESCENZA

I ceppi di *M. tuberculosis*, fatti crescere in piastre di 7H10/ADN, sono stati inoculati a partire da OD₅₄₀ 0,05 in terreno 7H9/ADN e fatti crescere fino a OD₅₄₀ di 1 (10⁸ cellule). In una piastra da 96 pozzetti (96 well FluoroNunc™ black bottom plates) sono stati aggiunti 100 µl di ciascuna coltura batterica e la fluorescenza emessa dalla proteina reporter eGFP è stata misurata con il lettore di piastre (Tecan Infinite 200 Pro). La fluorescenza è stata misurata impostando questi valori di

lunghezze d'onda: 475 nm (lunghezza d'onda di eccitazione) e 505 nm (lunghezza d'onda di emissione).

4.8 DETERMINAZIONE MIC E MBC

M. tuberculosis, fatto crescere in piastre di 7H10/ADN, è stato preinoculato in terreno liquido 7H9/ADN a partire da OD₅₄₀ 0,05. La coltura è stata fatta crescere fino alla fase esponenziale e diluita a OD₅₄₀ di 0,01.

In piastre da 96 pozzetti (96 well FluoroNunc™ black bottom plates) il composto da testare (BRACO-19 o c-exNDI 2) è stato diluito con diluizioni 1:2 in un *range* di concentrazioni comprese tra 100 µM e 0,078 µM ottenendo per ciascun pozzetto un volume finale di 50 µl a cui sono stati aggiunti 50 µl di coltura batterica. Nell'allestimento della piastra è stato fatto anche un controllo positivo (batteri senza composto) per determinare la massima fluorescenza che si sarebbe potuta ottenere e un controllo negativo (solo 7H9/ADN).

La piastra è stata poi incubata per una settimana a 37°C e, dopo l'aggiunta del reagente Alamar Blue (Invitrogen), è stata nuovamente incubata a 37°C per 24 ore. La fluorescenza è stata letta attraverso il lettore di piastre (lunghezza d'onda di eccitazione: 535 nm e lunghezza d'onda di emissione: 590 nm). Per il calcolo della MIC (la più bassa concentrazione di composto in grado di inibire la crescita batterica) il valore di fluorescenza ottenuto dai pozzetti in cui i batteri erano cresciuti con diversa concentrazione di composto (a cui è stato sottratto il valore di fluorescenza misurato nel pozzetto contenente solo 7H9/ADN) è stato diviso per la fluorescenza misurata nel pozzetto in cui i batteri erano cresciuti in assenza di composto.

Per determinare la MBC (la concentrazione più bassa di composto in grado di provocare la morte di più del 99,9% dei batteri) i batteri cresciuti in presenza di concentrazioni pari e superiori alla MIC sono stati piastrati in piastre di 7H10/ADN e messi ad incubare a 37°C. Dopo 3-4 settimane sono state contate le colonie. La MBC è stata calcolata mettendo in relazione il numero di CFU (unità formanti colonia) ottenute dalla coltura trattata con concentrazioni pari e superiori alla MIC e la coltura non trattata piastrata al momento dell'allestimento della piastra da 96 pozzetti.

4.9 METODO DEL CHECKERBOARD

Per valutare la possibile interazione tra farmaci antitubercolari e il legante del G-quadruplex BRACO-19 è stato utilizzato il metodo del Checkerboard, chiamato anche tecnica delle diluizioni

crociate (Bruhn DF et al,2015). I farmaci antitubercolari testati sono stati: isoniazide (Sigma) ed etambutolo (Sigma).

M. tuberculosis H37Rv fatto crescere in piastre 7H10/ADN è stato inoculato in terreno liquido 7H9/ADN a partire da OD₅₄₀ di 0,05-0,1. Al raggiungimento della fase esponenziale, è stato diluito a OD₅₄₀ pari a 0,01.

Il BRACO-19 è stato diluito in eppendorf da 1,5 ml con diluizioni seriali 1:2 in modo da poter testare 7 diverse concentrazioni di *range* compreso tra 100 µM e 0,78 µM (per le diluizioni in eppendorf sono state considerate concentrazioni 6 volte maggiori a quelle da testare a causa delle successive diluizioni che verranno fatte mescolando il BRACO-19 con le diverse concentrazioni di farmaco antitubercolare e con i batteri). 50 µl della concentrazione maggiore di BRACO sono stati trasferiti in una piastra (96 well FluoroNuncTMblack bottom plates) in ciascun pozzetto della colonna 9. Tale operazione è stata ripetuta per le altre 6 concentrazioni di BRACO a partire dalla colonna 8 fino alla colonna 3 (fig. 25).

Il farmaco antitubercolare è stato diluito in eppendorf da 1,5 ml con diluizioni seriali 1:2 di range diverso a seconda del composto utilizzato (concentrazioni 6 volte maggiori come spiegato per il BRACO-19). 50 µl di ogni concentrazione di farmaco antitubercolare sono stati distribuiti nella piastra allestita con le concentrazioni di BRACO-19 a partire dalla riga A (concentrazione maggiore) fino alla riga G (concentrazione minore). Seguendo tale schema di caricamento ogni concentrazione di composto antitubercolare è stato mescolato con ogni concentrazione di BRACO-19. Nei pozzetti della fila H sono state aggiunte solo le concentrazioni di BRACO-19, nella colonna 2 solo quelle del farmaco antitubercolare.

50 µl di batteri (OD₅₄₀ pari a 0,01) sono stati aggiunti a tutti i pozzetti della piastra (tranne nella colonna 10).

Nell'allestimento della piastra sono stati fatti anche un controllo positivo nella colonna 11 (batteri e terreno 7H9/ADN) e un controllo negativo nella colonna 10 (solo 7H9/ADN).

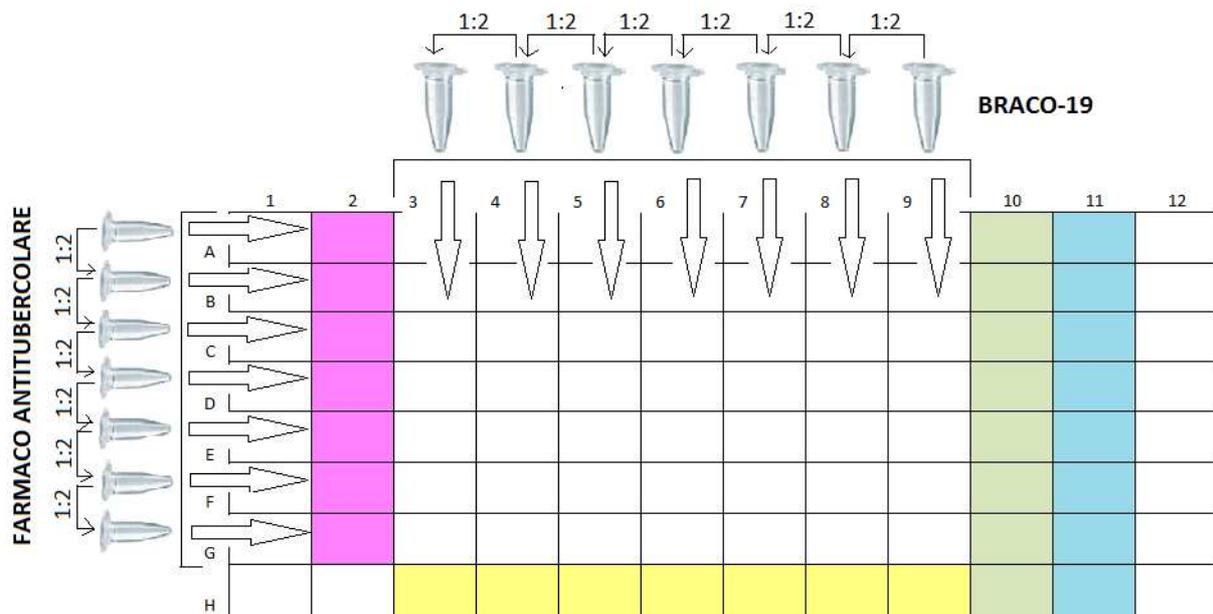


Figura 25: schema di allestimento della piastra per studiare l'interazione tra BRACO-19 e farmaco antitubercolare. In viola la colonna con le concentrazioni del solo farmaco antitubercolare, in giallo i pozzetti con le concentrazioni di solo BRACO-19, in verde i pozzetti del controllo negativo (solo 7H9/ADN) e in azzurro i pozzetti del controllo positivo (batteri diluiti in 7H9/ADN).

La piastra è stata messa ad incubare a 37°C per una settimana e dopo l'aggiunta del reagente Alamar Blue, è stata nuovamente incubata per 24 ore. Dopo la lettura della fluorescenza, l'interazione tra i due composti analizzati è stata valutata attraverso la determinazione dell'indice di concentrazione frazionaria inibitoria (indice FIC) che è stato calcolato mediante questa formula:

$$\text{INDICE FIC} = \text{FICA} + \text{FICB}$$

$$\text{FICA} = \frac{\text{MIC BRACO-19 IN PRESENZA DI FARMACO ANTITUBERCOLARE}}{\text{MIC BRACO-19}}$$

$$\text{FICB} = \frac{\text{MIC FARMACO ANTITUBERCOLARE IN PRESENZA DI BRACO-19}}{\text{MIC FARMACO ANTITUBERCOLARE}}$$

La tabella di seguito è stata utilizzata per l'interpretazione del valore di FIC ottenuto dall'interazione tra i due composti.

FIC	
< 0,5	SINERGICO
>0,5-<1	ADDITIVO
>1, <4	INDIFFERENTE
>4	ANTAGONISTA

4.10 ANALISI DELLA SOPRAVVIVENZA BATTERICA IN PRESENZA DI STRESS

M. tuberculosis cresciuto in piastre 7H10/ADC, è stato inoculato in 20 ml di terreno liquido 7H9/ADC a partire da OD₅₄₀ 0,05 in presenza e in assenza di concentrazioni subinibenti di leganti del G-quadruplex BRACO-19 (3,1 µM) (Endotherm) o c-exNDI 2 (0,31 µM) (sintetizzato dal professor Mauro Freccero dell' Università di Pavia). Al raggiungimento di OD₅₄₀ 0,3-0,4 le colture sono state incubate per quattro ore in presenza di 10 mM di H₂O₂ (Sigma-Aldrich) a 37°C in assenza di agitazione. Le colture sono state piastrate (spot di 5 µl della coltura non diluita e diluita 1:10) e le piastre sono state messe ad incubare a 37°C per quattro settimane.

4.11 ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA

Per studi di espressione genica, l'RNA isolato da colture cellulari di *M. tuberculosis* è stato retrotrascritto in cDNA e poi analizzato mediante la tecnica della real-time PCR.

4.11.1 ESTRAZIONE DI RNA DA CULTURA BATTERICA

La patina di batteri è stata inoculata in 35 ml di terreno 7H9/ADN e fatta crescere fino alla fase esponenziale (OD₅₄₀ 0,2-0,3). La coltura batterica è stata centrifugata a temperatura ambiente (RT) per 5 minuti a 2800 rpm e il *pellet*, ottenuto e mescolato con 1 ml di Trizol (Ambion), è stato trasferito in tubi da *bead beater* contenenti 0,5 ml di zirconia/silica *beads* 0,1mm di diametro (BioSpecProducts). Le cellule sono state lisate grazie a 3 impulsi da 30 secondi nello strumento *bead beater* intervallati da 30 secondi di ghiaccio e poi sono state incubate per 5 minuti a RT.

Per separare la sospensione dalle zirconia *beads* è stata fatta una centrifugazione per 45 secondi e al surnatante, trasferito in tubi contenenti Heavy Phase Lock Gel (Qiagen) sono stati aggiunti 300 µl di una soluzione di cloroformio:alcol isoamilico in rapporto 24:1 (Carlo Erba). Dopo incubazione di 2 minuti e una centrifugazione di 10 minuti, la fase acquosa contenente gli acidi nucleici (DNA e RNA) è stata trasferita in una provetta contenente 270 µl di isopropanolo e 270 µl di *High SaltSolution* (soluzione ad alta concentrazione salina costituita da 0,8 M di citrato di sodio e 1,2 M di cloruro di sodio) e incubata *overnight* a 4°C.

Per rimuovere l'isopropanolo, la soluzione è stata centrifugata a 13000 rpm per 10 minuti e il *pellet* è stato lavato con 1 ml di etanolo 75%. Dopo l'eliminazione dell'etanolo grazie a centrifugazione, il *pellet* è stato lasciato asciugare all'aria e risospeso in 90 µl di H₂O DEPC (H₂O con

aggiunta di dietilpirocarbonato (Sigma), agente che legandosi covalentemente ad eventuali RNasi presenti nell'H₂O riesce ad inattivarle).

Al campione poi sono stati aggiunti 10 µl di DNasi I buffer 10X (Ambion) e 2 µl di Dnasi I (ambion) per degradare il DNA. Dopo un'incubazione di 1 ora a 37°C, l'RNA è stato purificato con il kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen): la soluzione di RNA, mescolata con 350 µl di buffer RTL (precedentemente addizionato con 10 µl di B-mercaptoetanololo per ogni ml di buffer RTL) e 265 µl di etanolo 95% è stata trasferita in una colonnina RNeasy. Quest'ultima è stata centrifugata a 13000 rpm per 15 secondi per permettere il legame tra la resina e l'RNA e per consentire l'eliminazione dell'etanolo e del buffer RTL. Dopo il lavaggio con 500 µl di buffer RPE (in precedenza addizionato ad etanolo 96%), l'RNA è stato eluito dalla colonnina con 40 µl di H₂O DEPC.

L'RNA è stato poi sottoposto a un secondo trattamento con l'enzima DNasi I (Ambion) per eliminare eventuali resti di contaminazione di DNA ed è stato quantizzato sia mediante gel di agarosio all' 1,3% con tampone TBE (tris-borato 0,045 M, EDTA 0,001 M, pH 8) sia con misurazione allo spettrofotometro (Nanodrop 1000 Spectrophotometer).

4.11.2 RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA IN cDNA

Per la retrotrascrizione dell'RNA in cDNA è stato utilizzato ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis kit (NEB). Tale kit è costituito dai *random primers*, da ProtoScript II Reaction Mix (contenente il *buffer* per la retrotrascrittasi e i dNTPs) e da ProtoScript II Enzyme Mix (contenente la trascrittasi inversa M-MuLV e l'inibitore per le RNasi).

Per ciascun campione di RNA da retrotrascrivere sono state allestite due diverse mix di reazione. Come indicato in tabella 5, la mix per Rt⁺, diversamente da quella per Rt⁻, conteneva il reagente ProtoScript II Enzyme Mix. Rt⁻ è stato usato come controllo negativo per rilevare eventuali contaminazioni della preparazione di RNA da parte di DNA genomico.

REAGENTE	Rt ⁺	RT ⁻
RNA	100 ng	100 ng
Random primers (60 µM)	2 µl	2 µl
ProtoScript II Reaction Mix (2X)	10 µl	10 µl
ProtoScript II Enzyme Mix (10X)	2 µl	
H2O	fino a 25 µl	fino a 25 µl

Tabella 5: Reagenti e quantità utilizzate per la reazione di retrotrascrizione.

Nel termociclatore sono state impostate le seguenti condizioni di reazione:

25°C per 5 minuti
42°C per 1 ora
80°C per 5 minuti (inattivazione dell'enzima)

4.11.3 REAL-TIME PCR

La real-time PCR è una tecnica che permette la simultanea amplificazione e quantificazione del DNA. La quantificazione del DNA è possibile attraverso la misurazione della fluorescenza emessa dai fluorofori, coloranti fluorescenti capaci di legarsi alle molecole di DNA prodotte ad ogni ciclo di amplificazione.

Il fluoroforo utilizzato nelle reazioni di real-time PCR è il Sybr Green, molecola fluorescente in grado di intercalarsi nelle molecole di DNA a doppio filamento (dsDNA). L'intensità di fluorescenza emessa dal Sybr Green dipende dalla quantità di dsDNA formato durante la reazione di PCR, quindi dalla quantità di DNA iniziale. Il principale svantaggio del Sybr Green è che, essendo una molecola aspecifica, è in grado di legarsi a tutte le molecole di DNA a doppio filamento che si formano durante la reazione di PCR, quindi anche ai dimeri di primers e ai prodotti non specifici (Arya M. et al, 2005). Per valutare la presenza di prodotti aspecifici è stato necessario procedere con l'analisi delle curve di dissociazione (o curve di *melting*) al termine dei cicli di amplificazione.

Le reazioni di real-time PCR sono state allestite mescolando il cDNA ottenuto dalla reazione di retrotrascrizione (Rt⁺ e Rt⁻), i primers (disegnati in modo tale da avere una temperatura di *annealing* di 60°C), il Power SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems) e l'H₂O, aggiunta per portare la reazione ad un volume finale di 25 µl.

I *primers* utilizzati nelle reazioni di real-time PCR sono indicati nella tabella 6.

OLIGONUCLEOTIDE	SEQUENZA (5'→3')	GENE AMPLIFICATO
RP 1516 (Fw)	ccatcccgaaaaggaagacc	<i>sigA</i> (Rv2703)
RP1517 (Rv)	aggctctggttcagcgtcgag	<i>sigA</i> (Rv2703)
RP1769 (Fw)	agcagcacgacttcttcaa	<i>eGFP</i>
RP1770 (Rv)	gcttgctggccatgatata	<i>eGFP</i>
RP1771 (Fw)	tgccgtggaaaagccggt	<i>zwf1</i> (Rv1121)
RP1772 (Rv)	cggagatgctgttgcat	<i>zwf1</i> (Rv1121)
RP1773 (Fw)	agccaaaaacagggtcaagaa	<i>clpx</i> (Rv2457c)
RP1774 (Rv)	tccgctttagtggttgta	<i>clpx</i> (Rv2457c)
RP1849.2 (Fw)	atttcgtgaccagggtggtgt	Rv1050
RP1850.2 (Rv)	acgtcaatgcgaccaaactc	Rv1050
RP1851 (Fw)	gcaagccgttccattacttc	<i>ndhA</i> (Rv0392c)
RP1852 (Rv)	acctggcgtagatcatctgg	<i>ndhA</i> (Rv0392c)
RP1872 (Fw)	tgacgaacacccaattcagca	<i>mosR</i> (Rv1049)
RP1873 (Rv)	ggtagcgtcgtgcgttcaa	<i>mosR</i> (Rv1049)

Tabella 6: primers utilizzati nelle reazioni di real time PCR.

Le reazioni sono state incubate nello strumento (ABI PRISM7000 Sequence Detection System, Applied Biosystem) dopo aver impostato le seguenti condizioni:

Denaturazione iniziale	95°C per 10 minuti] per 40 cicli
Denaturazione	95°C per 1 minuto	
Annealing	60°C per 30 secondi	
Estensione	72°C per 30 secondi	

Per la determinazione del numero di copie di ciascun gene nei diversi campioni è stato necessario costruire le curve standard, ottenute analizzando diluizioni seriali del plasmide pERK 10 (per il gene *eGFP*) e del DNA genomico del ceppo H37Rv (per tutti gli altri geni) a concentrazione nota.

Dal confronto tra le curve standard e i valori di Ct (*threshold cycle*), forniti dallo strumento ed elaborati dal software 7000 System Software (Applied Biosystem), è stato possibile risalire al numero di copie iniziali di ogni gene in ciascun campione analizzato. Al numero di copie ottenute dalla reazione Rt+ sono state sottratte quelle ottenute dalla reazione Rt- per eliminare l'eventuale contaminazione di DNA genomico. I valori ottenuti sono stati normalizzati per il numero di copie di *sigA*, gene utilizzato come controllo interno perché costitutivamente espresso nei micobatteri e per la sua espressione che rimane invariata quando *M. tuberculosis* è esposto a diverse tipologie di stress (Manganelli R et al, 1999).

Il valore di induzione (*fold induction*) è stato calcolato attraverso la seguente formula:

$$\text{VALORE DI INDUZIONE} = \frac{\frac{\text{Quantità di mRNA del gene d'interesse nel campione trattato}}{\text{Quantità di mRNA di } sigA \text{ nel campione trattato}}}{\frac{\text{Quantità di mRNA del gene di interesse nel campione non trattato}}{\text{Quantità di mRNA di } sigA \text{ nel campione non trattato}}}$$

4.12 DICROISMO CIRCOLARE

Il dicroismo circolare è una spettroscopia di assorbimento basata sull'interazione tra un campione otticamente attivo (chirale) e la luce polarizzata. Le sostanze chirali possono assorbire la luce polarizzata circolarmente con verso destrorso o sinistrorso, gli spettri di dicroismo circolare misurano questa differenza di assorbimento.

Tale tecnica è molto utilizzata per identificare e studiare la topologia delle strutture G-quadruplex, in particolare per distinguere tra strutture parallele (spettro dicroico con un picco massimo a 260 nm e uno minimo a 240 nm), strutture antiparallele (spettro dicroico con un picco negativo a 260 nm e due positivi a 240 e 290 nm) e strutture miste (spettro dicroico con due picchi positivi a 260 e 290 nm e uno negativo a 240 nm) (Huppert JL, 2008).

Gli oligonucleotidi, aventi la sequenza della regione promotoriale micobatterica di *clpX* e *zwf1* interessata alla formazione della struttura G4 con alcune basi guanina sostituite con delle timine (tabella 7), sono stati acquistati dall'azienda Sigma-Aldric e diluiti ad una concentrazione finale di 4 µM in un buffer contenente litio cacodilato (10 mM, pH 7,4) e KCl 100 mM. I campioni, dopo essere stati mescolati con gli oligonucleotidi, sono stati denaturati a 95°C per 5' e lasciati a temperatura ambiente *overnight* per permettere l'eventuale formazione della struttura G-quadruplex, infatti il DNA è in grado di assumere la conformazione secondaria più stabile a seconda degli ioni presenti in soluzione. I campioni sono stati posti in una cuvetta di quarzo con cammino ottico di 5 mm e gli spettri sono stati registrati nell'intervallo di lunghezze d'onda 230-320 nm utilizzando lo spettropolarimetro ChirascanTM-Plus (Applied Photophysics), dotato di un sistema di temperatura Pertier. Allo spettro registrato per ogni oligonucleotide analizzato è stato sottratto lo spettro relativo al buffer. Lo strumento aveva fornito la misura del segnale in mdeg e la conversione in ellitticità molare è stata ottenuta tenendo conto della concentrazione degli oligonucleotidi.

Oligonucleotide	Sequenza (5' →3')
zwf1(T) MUT01	TG T GTTGTCGGGCCAATGGGCTAGGGT
zwf1(T) MUT02	TGGGTTGTCG T GCCAATGGGCTAGGGT
zwf1(T) MUT03	TGGGTTGTCGGGCCAATG T GCTAGGGT
zwf1(T) MUT04	TG T GTTGTCGGGCCAATG T GCTAGGGT
clpX(T) MUT01	TG T T T CCGGAGCAAGCGGGTAGCGTCG GGGCATACACGGGGT
clpX(T) MUT02	TGGGGGGCCCGGAGCAAGCG T GTAGCGTCG GGGCATACACGGGGT
clpX(T) MUT03	TGGGGGGCCCGGAGCAAGCGGGTAGCGTCG T G T CATACACGGGGT
clpX(T) MUT04	TGGGGGGCCCGGAGCAAGCGGGTAGCGTCG GGGCATACACG T G T
clpX(T) MUT05	TG T G T GCCCGGAGCAAGCGGGTAGCGTCG G T G CATACACG T G G T
clpX(T) MUT06	TG T G T G TGCCCGGAGCAAGCG T GTAGCGTCG G T G CATACACG T G G T

Tabella 7: oligonucleotidi mutati impiegati negli studi di dicroismo circolare. Le basi mutate sono riportate in rosso.

5. RISULTATI

5.1 EFFETTI DEI LEGANTI DEL G4 SULLA CRESCITA DI *M. tuberculosis*

Nel genoma di *M. tuberculosis*, attraverso studi di bioinformatica, sono stati identificati più di diecimila motivi per cui è prevista la capacità di ripiegarsi e formare strutture G-quadruplex. Tra questi putativi G4, 45 sono localizzati in promotori di geni prevalentemente coinvolti nella risposta allo stress ossidativo, nella divisione cellulare e nella formazione di componenti della parete micobatterica (Perrone R et al, 2017).

Studi mediante dicroismo circolare e Taq *polymerase stop assay* hanno evidenziato che molecole come BRACO-19 (composto con attività antitumorale) o c-ex NDI 2 (composto di recente sintesi) presentano un'elevata affinità per le strutture G-quadruplex e le stabilizzano in modo significativo (Perrone R et al, 2017). Per valutare l'effetto che tali composti hanno sulla crescita di *M. tuberculosis* è stata determinata la loro minima concentrazione inibente (MIC).

Per la determinazione della MIC del BRACO e del c-exNDI 2, *M. tuberculosis* H37Rv è stato fatto crescere in presenza di 8 concentrazioni di ciascun composto, in un *range* compreso tra 100 μM e 0,78 μM .

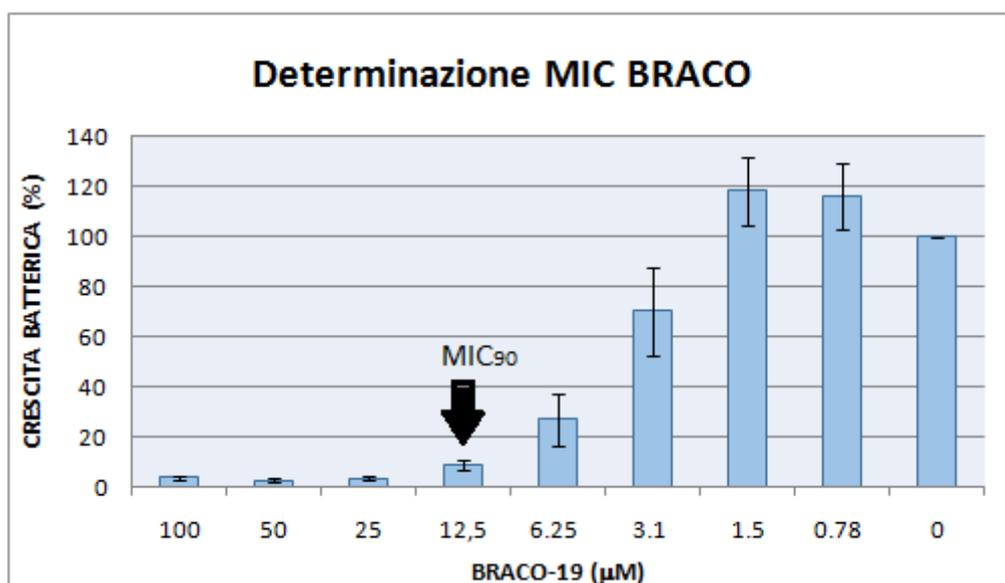


Figura 26: Determinazione della minima concentrazione inibente di BRACO in *M. tuberculosis*.

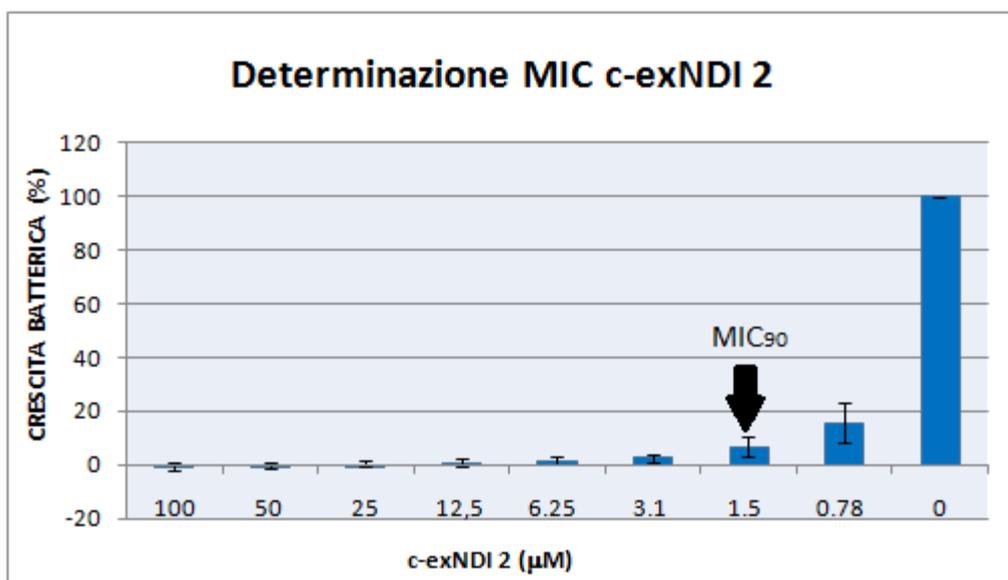


Figura 27: Determinazione della minima concentrazione inibente di c-exNDI 2 in *M. tuberculosis*.

Dai risultati ottenuti si può osservare che la concentrazione minima di BRACO-19 (fig. 26) in grado di inibire la crescita del 90% dei batteri è 12,5 µM, mentre quella per c-exNDI2 (fig. 27) è circa 10 volte minore (1,5 µM).

Per comprendere se l'effetto dei due composti è battericida o batteriostatico è stata determinata la minima concentrazione richiesta in grado di uccidere il 99,9% dei batteri (MBC). La MBC del BRACO-19 è risultata essere 25 µM, quella di c-exNDI 2 è risultata essere 3,1 µM, quindi i due composti sono battericidi. Di seguito è presentata la tabella 8 in cui sono stati riassunti i valori di MIC e di MBC di ciascun composto.

	BRACO-19	c-exNDI 2
MIC	12,5 µM	1,5 µM
MBC	25 µM	3,1 µM

Tabella 8: Valori di MIC e MBC di BRACO-19 e c-exNDI 2 in *M. tuberculosis*.

5.1.1 EFFETTI DEI LEGANTI DEL G4 SULLA CRESCITA DI *M. tuberculosis* IN PRESENZA DI ACQUA OSSIGENATA (H₂O₂)

Molti dei geni, con putative sequenze G-quadruplex localizzate a livello promotoriale, sono coinvolti nella risposta allo stress ossidativo o nella divisione cellulare, quindi le strutture G-quadruplex potrebbero regolare l'arresto della crescita cellulare in seguito a esposizione a stress.

Per valutare l'effetto dei leganti BRACO-19 e c-exNDI 2 sulla crescita di *M. tuberculosis* in presenza di stress ossidativo indotto da H₂O₂, il ceppo H37Rv di *M. tuberculosis* è stato fatto crescere in presenza e in assenza di concentrazioni subinibenti dei due composti (3,1 μM di BRACO-19 e 0,31 μM di c-exNDI 2) e poi è stato trattato per quattro ore con 10 mM di H₂O₂. Aliquote di ogni coltura sono poi state diluite e seminate in spot su terreno solido per valutarne la sopravvivenza.

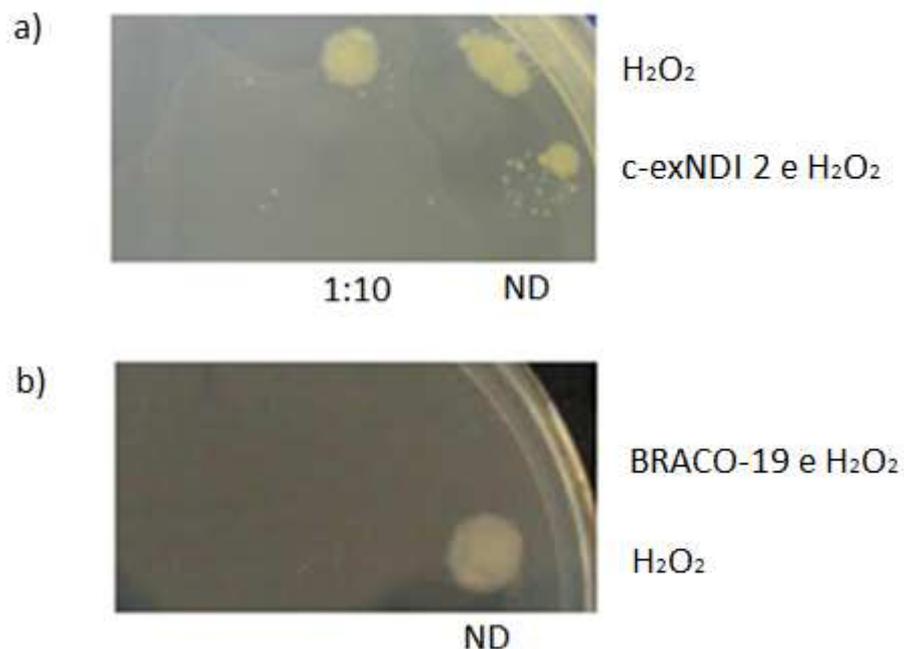


Figura 28: Crescita in piastra (spot di batteri non diluiti ND e dopo diluizione 1:10) delle colture di H37Rv cresciute in presenza o meno di di c-exNDI2 (a) o di BRACO (b) e trattate con H₂O₂.

Come si può vedere in Figura 28 dopo trattamento con l'H₂O₂ la sopravvivenza in presenza di c-exNDI 2 è minore (crescita presente solo nello spot non diluito) se confrontata con quella della coltura cresciuta in assenza del legante G4 (patina batterica negli spot con coltura diluita 1:10 e coltura non diluita). Non è presente la patina batterica nella coltura batterica cresciuta in presenza di BRACO-19 e trattata con H₂O₂. Dai risultati ottenuti si può dedurre che questi leganti del G4 rendono il batterio più sensibile allo stress ossidativo.

5.2 VALUTAZIONE DELL'INTERAZIONE TRA BRACO-19 E FARMACI ANTITUBERCOLARI

La terapia antitubercolare prevede la somministrazione di una combinazione di antibiotici: isoniazide, etambutolo, rifampicina e pirazinamide. La lunghezza e gli effetti collaterali del trattamento, l'interazione tra farmaci antitubercolari e antiretrovirali e lo sviluppo di ceppi resistenti rende necessaria la scoperta di nuovi farmaci per la cura della tubercolosi.

I leganti del G-quadruplex, avendo come bersaglio le strutture G4 che sembrano influenzare alcuni processi biologici importanti per la funzionalità cellulare negli organismi eucarioti e procarioti, potrebbero essere presi in considerazione e studiati come possibili farmaci antitubercolari da utilizzare assieme a quelli già esistenti. Risulta quindi importante valutare l'effetto che potrebbe avere l'uso combinato di farmaci antitubercolari e leganti del G4. L'interazione potrebbe essere di quattro tipi:

- a) sinergica: i due farmaci agiscono assieme contro un target producendo un effetto totale che è maggiore della somma degli effetti individuali di ciascun composto
- b) additivo: l'effetto totale prodotto dai due farmaci è uguale alla somma degli effetti individuali di ciascun composto
- c) antagonista: i due farmaci hanno effetti opposti nell'organismo, uno potrebbe ridurre o bloccare l'azione dell'altro
- d) indifferenti: i due composti non interagiscono tra di loro

Le interazioni tra il legante del G4 BRACO-19 e i farmaci antitubercolari (isoniazide ed etambutolo) sono state studiate mediante il metodo del *Checkerboard*. Per valutare l'interazione tra i due composti è stato calcolato l'indice di concentrazione frazionaria inibitoria (indice FIC). L'indice FIC rappresenta la somma degli indici FIC di ogni composto testato. Ciascun indice FIC è calcolato dividendo la MIC del composto usato in combinazione con l'altro farmaco con la MIC del composto usato da solo. I valori di indice FIC ottenuti sono così interpretabili: effetto sinergico ($FIC < 0,5$), additivo ($FIC > 0,5$ e $FIC < 1$), indifferente ($FIC > 1$ e $FIC < 4$) e antagonista ($FIC > 4$) (Meletiadis J et al, 2010).

Nel valutare l'effetto combinato di BRACO-19 e isoniazide, *M. tuberculosis* è stato incubato con 7 concentrazioni con un *range* compreso tra 100 μM e 0,78 μM per il BRACO-19 ($MIC = 12,5 \mu\text{M}$) e tra 1,08 $\mu\text{g/ml}$ e 0,017 $\mu\text{g/ml}$ per l'isoniazide ($MIC = 0,135 \mu\text{g/ml}$). L'esperimento è stato ripetuto e

confermato per 2 volte. Il valore di FIC ottenuto è 0,81, quindi i 2 composti hanno un effetto additivo.

Successivamente è stata valutata l'interazione tra il BRACO-19 e un altro farmaco antitubercolare, l'etambutolo. *M. tuberculosis* è stato fatto crescere in presenza di 7 concentrazioni con un range compreso tra 100 µM e 0,78 µM per il BRACO-19 e tra 20 µg/ml a 0,31 µg/ml per l'etambutolo (MIC=2,5 µg/ml).

L'indice di concentrazione frazionaria inibitoria ottenuto è 2,13, i due composti hanno quindi un effetto indifferente.

Di seguito (tabella 9) sono stati riassunti i valori di FIC delle interazioni farmacologiche studiate.

	VALORE INDICE FIC	EFFETTO
BRACO-19+ISONIAZIDE	0,81± 0,23	ADDITIVO
BRACO-19+ETAMBUTOLO	2,13	INDIFFERENTE

Tabella 9: Valori di indice FIC ottenuti dall'interazione tra BRACO-19 e farmaci antitubercolari (isoniazide ed etambutolo).

5.3 STUDIO DELL'INFLUENZA DELLE STRUTTURE G-QUADRUPLIX NELL'ESPRESSIONE GENICA IN *M. tuberculosis*

Nel genoma di *M. tuberculosis* sono stati identificati più di diecimila motivi ricchi in guanina in grado di ripiegarsi e formare putative strutture G-quadruplex (Thakur RS et al, 2014). Tra queste, 45 sono localizzate in promotori o nel sito di inizio della trascrizione di geni coinvolti nello stress ossidativo, nella divisione e nella respirazione cellulare e nella nella sintesi di componenti della parete cellulare. Analisi in vitro (dicroismo circolare, saggio di stop della Taq polimerasi, spettroscopia UV) hanno confermato la formazione di strutture G quadruplex nei promotori di 4 geni: *zwf1*, *clpX*, *ndhA*, *mosR* (Perrone R et al, 2017) (fig. 29):

```

zwf1      GGGTTGTCGGGCCAATGGGCTAGGG
ndhA     GGGCCTTGTGGGCCTTGTGGGCCTTGTGGG
ClpX     GGGGGGCCGGAGCAAGCGGGTAGCGTCGGGGCATAACGGGG
mosR     GGGCTAGCTCTAGGGGGCAGGGCTTTGACGGG
  
```

Figura 29: Sequenze delle regioni promotoriali di *zwf1*, *mosR*, *clpX*, *ndhA* contenenti ripetizioni di guanine (indicate in grassetto) che sono in grado di ripiegarsi e formare strutture G-quadruplex.

Per valutare se il BRACO-19, legando e stabilizzando le strutture G-quadruplex nei quattro geni, ne influenza la trascrizione, l'espressione di *zwf1*, *mosR*, *clpX* e *ndhA* è stata confrontata mediante real-time PCR nel ceppo H37Rv di *M. tuberculosis* dopo essere stato esposto o meno per due ore a 25 μ M di BRACO-19. Il livello di induzione di ciascun gene è stato ottenuto confrontando l'espressione dei geni ottenuta in presenza e in assenza del legante del G-quadruplex.

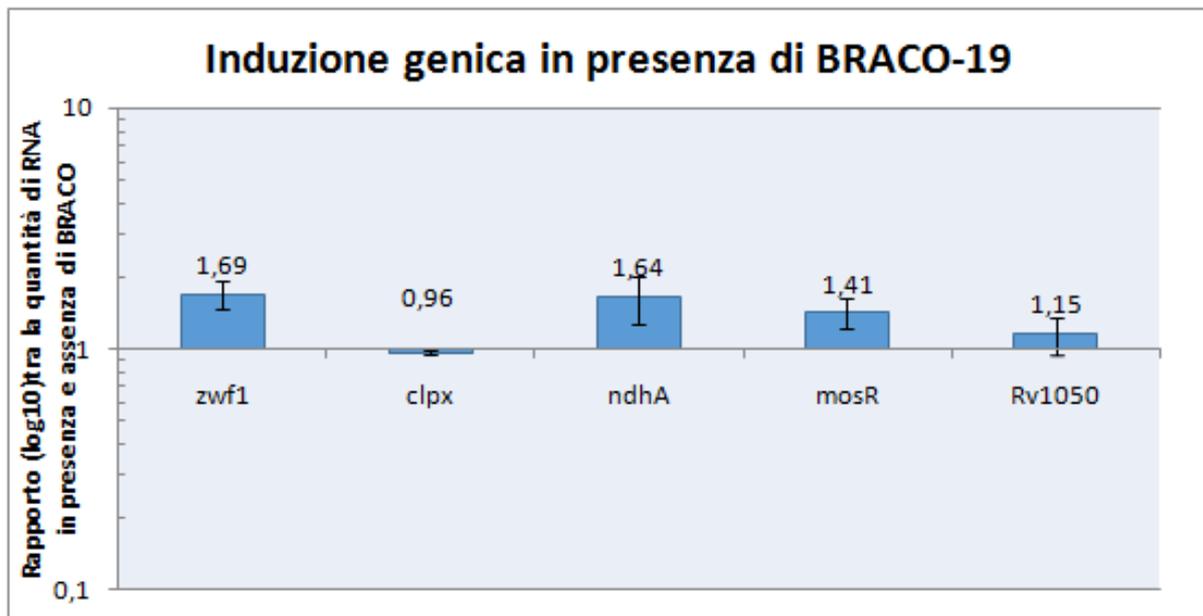


Figura 30: Induzione dei geni *zwf1*, *clpX*, *ndhA*, *mosR* e *Rv1050* in *M. tuberculosis* dopo trattamento con BRACO-19.

I risultati (fig. 30) mostrano che *zwf1*, *ndhA* e *mosR* presentano un'espressione leggermente aumentata in presenza del legante del G4, solo in *zwf1* la minima induzione risulta essere statisticamente significativa ($p > 0,002$). *clpX*, invece, non mostra differenza di espressione in presenza e assenza di BRACO-19. Anche *Rv1050*, gene di controllo in quanto nella sua regione promotoriale non sono presenti G4 putativi, non mostra induzione in presenza del legante.

5.3.1 ANALISI IN VITRO DELLE MUTAZIONI NEI PROMOTORI DI *clpX* e *zwf1*

Le strutture G4 localizzate in regioni promotoriali possono modulare il livello di trascrizione. Per esempio sono presenti in letteratura dati che mostrano come, a seguito di mutagenesi volta ad impedire la formazione di strutture G4, il livello di espressione del gene a valle del G4 cambiava considerevolmente (Bochman ML et al, 2012).

Per studiare l'influenza delle strutture G-quadruplex nell'espressione genica in *M. tuberculosis*, è stato deciso di mutagenizzare la sequenza dei promotori dei geni *zwf1* e *clpX*, tale studio verrà poi esteso anche a *mosR* e *ndhA*.

Inizialmente sono stati disegnati per *zwf1* 4 oligonucleotidi a singolo filamento con la stessa sequenza della regione promotoriale interessata alla formazione della struttura G4 ma con una base guanina sostituita da una timina all'interno della stessa ripetizione di guanine. In *clpX* è presente un elevato numero di guanine nella sequenza promotoriale in grado di formare strutture G-quadruplex, quindi è stato necessario disegnare 6 oligonucleotidi in cui sono state introdotte più mutazioni all'interno della stessa ripetizione di guanine per creare più combinazioni.

Nella scelta delle basi da mutare si è prestato attenzione a non inserire mutazioni all'interno delle sequenze *consensus* (-10 e -35) dei due promotori, in modo da non alterarne l'attività.

Gli oligonucleotidi mutati e non mutati (con la sequenza *wild-type* della regione promotoriale in esame) sono stati analizzati mediante dicroismo circolare (analisi svolte in collaborazione con il gruppo della Professoressa Richter dell'Università di Padova).

Le analisi dei quattro mutanti di *zwf1* mostrano che le mutazioni provocano una diminuzione dell'ellitticità molare rispetto alla sequenza *wild-type* (fig. 31). Inoltre si osserva anche un cambiamento nei punti massimi dello spettro ad una lunghezza d'onda dai 290 nm ai 280 nm. Questi dati indicano che per impedire la formazione della struttura G-quadruplex nel promotore del gene *zwf1* è sufficiente mutare una sola guanina. La mutazione contenuta nell'oligonucleotide numero 3, che impedisce con maggiore efficacia la formazione della struttura G-quadruplex rispetto alle altre, è stata presa in considerazione negli studi di caratterizzazione della struttura G-quadruplex *in vivo*.

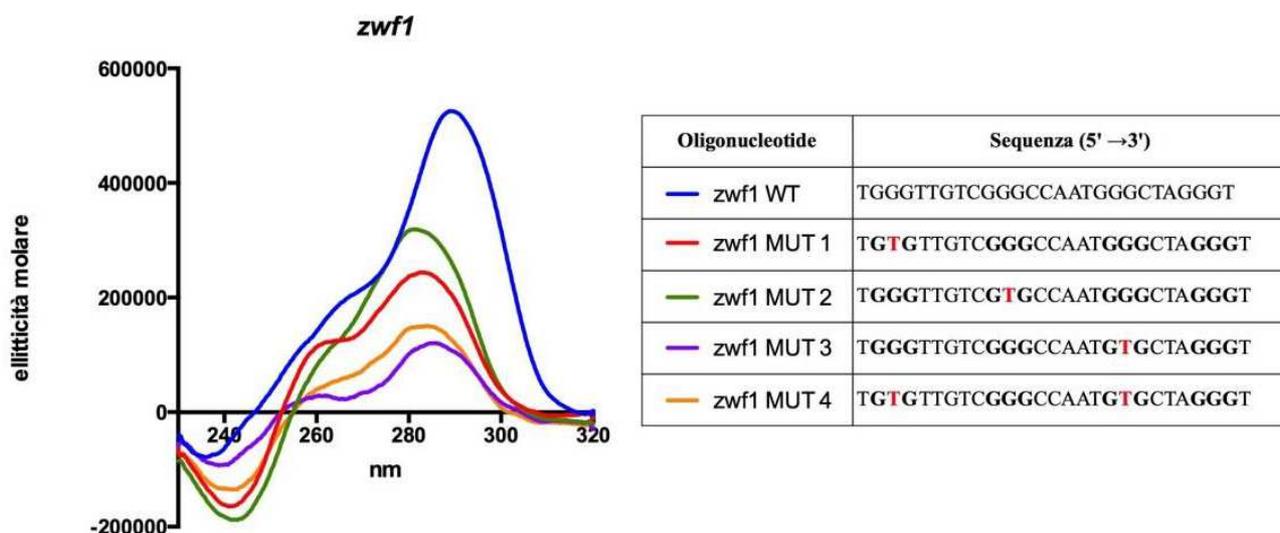


Figura 31: spettri di dicroismo circolare degli oligonucleotidi di *zwf1* mutati (4 μ M) con buffer litio cacodilato pH 7,4 e K^+ 100 mM.

Le analisi mediante dicroismo circolare degli oligonucleotidi disegnati per *clpX* mostrano che i mutanti numero 2 e 3 producono uno spettro molto simile a quello della sequenza *wild-type*, mentre nei mutanti 1 e 4 si osserva una diminuzione dell'ellitticità molare e una parziale modificazione dello spettro dicroico che tuttavia mantiene un punto massimo a 260 nm e un minimo a 240 nm. Gli spettri relativi ai mutanti 5 e 6 non sono attribuibili ad una conformazione G-quadruplex (fig. 32), quindi per impedire la formazione della struttura G4 nel promotore di *clpX* è necessaria la sostituzione di almeno 4 guanine situate nelle diverse ripetizioni di guanine che compongono la sequenza G4.

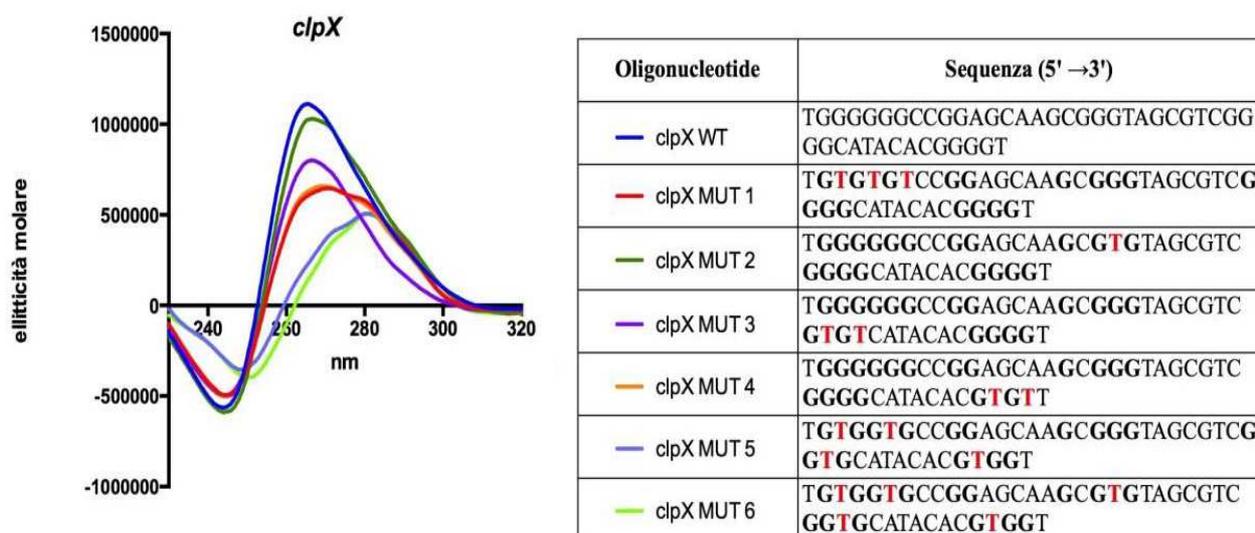


Figura 32: spettri di dicroismo circolare degli oligonucleotidi di *clpX* mutati (4 μ M) con buffer litio cacodilato pH 7,4 e K^+ 100 mM.

482, contenente il plasmide vuoto (pERK14), è stato usato come controllo negativo cui valori di fluorescenza sono stati poi sottratti da quella dei due ceppi *reporter*.

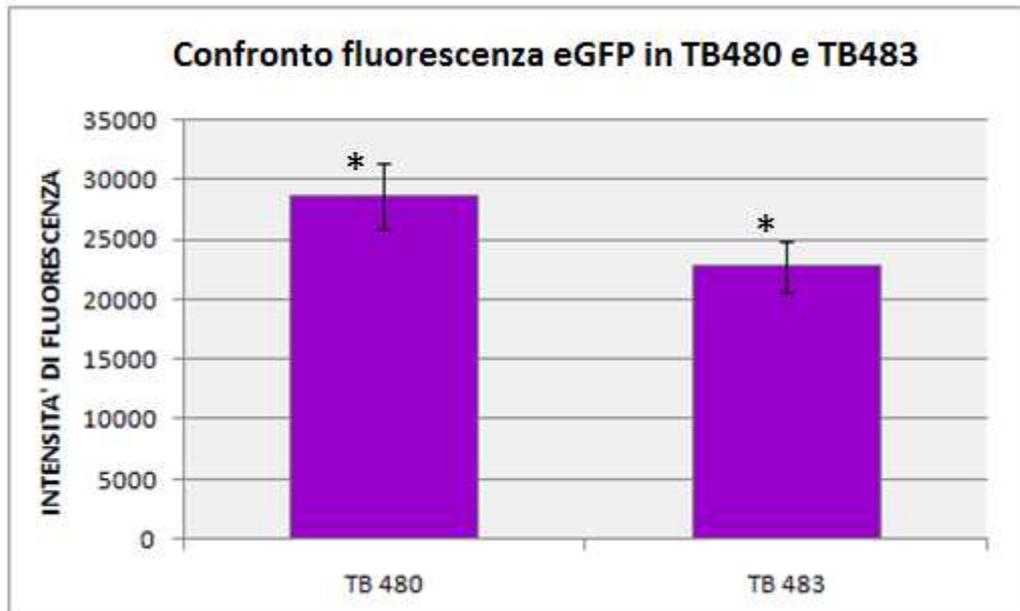


Figura 34: Confronto della fluorescenza tra i due ceppi con *Pzwf1 wild-type* (TB 480) e mutato (TB 483)

I risultati ottenuti (fig. 34) mostrano che la fluorescenza emessa dal ceppo con *Pzwf1 wild-type* è leggermente maggiore di quella misurata per il ceppo con *Pzwf1* mutato. Tale differenza è significativa dal punto di vista statistico ($p > 0,01$).

La proteina reporter eGFP una volta prodotta si accumula all'interno della cellula, questo potrebbe portare a un'errata interpretazione dei risultati. Per confermare il risultato ottenuto dall'analisi della fluorescenza, l'espressione della eGFP nei ceppi TB 480 e TB 483 è stata determinata mediante real-time PCR (fig. 35).

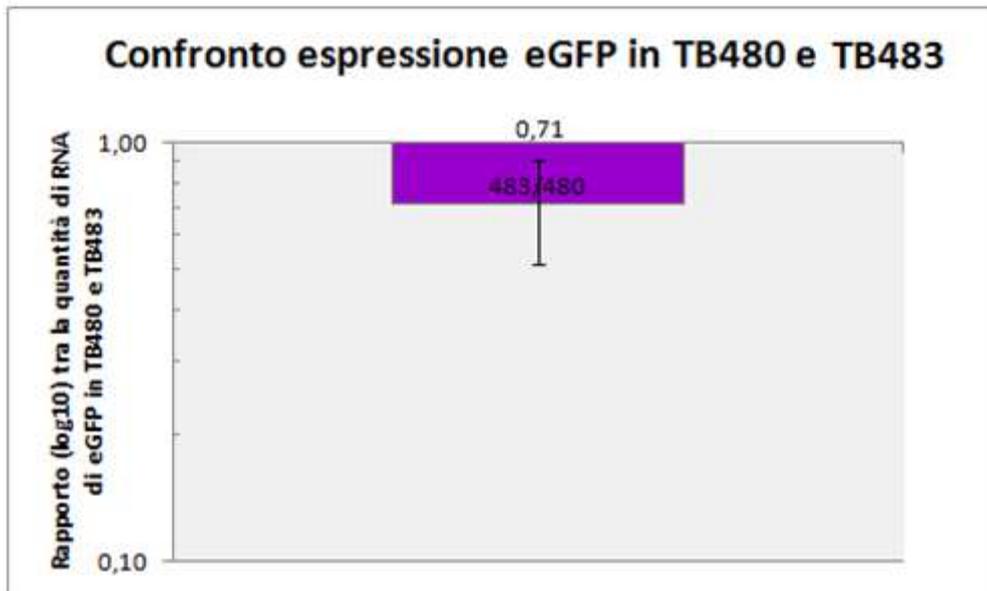


Figura 35: confronto dell'espressione della eGFP tra ceppi con *Pzwf1* mutato (TB 483) e *wild-type* (TB 480).

I risultati ottenuti mostrano che il rapporto tra l'espressione della eGFP nel ceppo TB 483 e TB 480 è 0,71. Questo conferma, assieme ai dati ottenuti dall'analisi della fluorescenza, che l'attività del promotore *wild-type* è leggermente maggiore di quella del promotore mutato.

5.3.4 CONFRONTO DELL'ATTIVITA' DEL PROMOTORE DI *zwf1* WILD-TYPE E MUTATO IN CONDIZIONI DI STRESS

Nel DNA a doppia elica, la possibilità di formare strutture G-quadruplex aumenta durante i processi di replicazione e di trascrizione quando il DNA si trova temporaneamente a singolo filamento per la rottura dei legami di Watson e Crick tra le basi e le regioni ricche in guanina potrebbero ripiegarsi e formare strutture G4. Condizioni di stress inducono variazione nei livelli di trascrizione, aumentando così la probabilità di formare strutture G4 in promotori di geni a causa del cambiamento del grado di superavvolgimento del DNA indotto dallo stress (Rhodes D and Lipps HJ, 2015).

Per capire se la sequenza G4 nel promotore di *zwf1* ne influenza la trascrizione genica, l'espressione della eGFP è stata confrontata nei ceppi con il promotore *wild-type* e mutato in condizioni di stress (H₂O₂ e BRACO-19).

H₂O₂

zwf1 è un gene che sembra essere coinvolto nella difesa allo stress ossidativo.

TubercuList -Mycobacterium tuberculosis Database- riporta che l'espressione del gene *zwf1*, e quindi l'attività del suo promotore, aumenta di circa tre volte durante lo stress ossidativo indotto dal trattamento di *M. tuberculosis* per 40 minuti con 10 mM di H₂O₂.

Per confermare la risposta del gene *zwf1* a tale stress, è stata confrontata l'espressione di *zwf1* nel ceppo H37Rv in assenza e dopo trattamento per 40 minuti con 10 mM di acqua ossigenata (fig. 36).

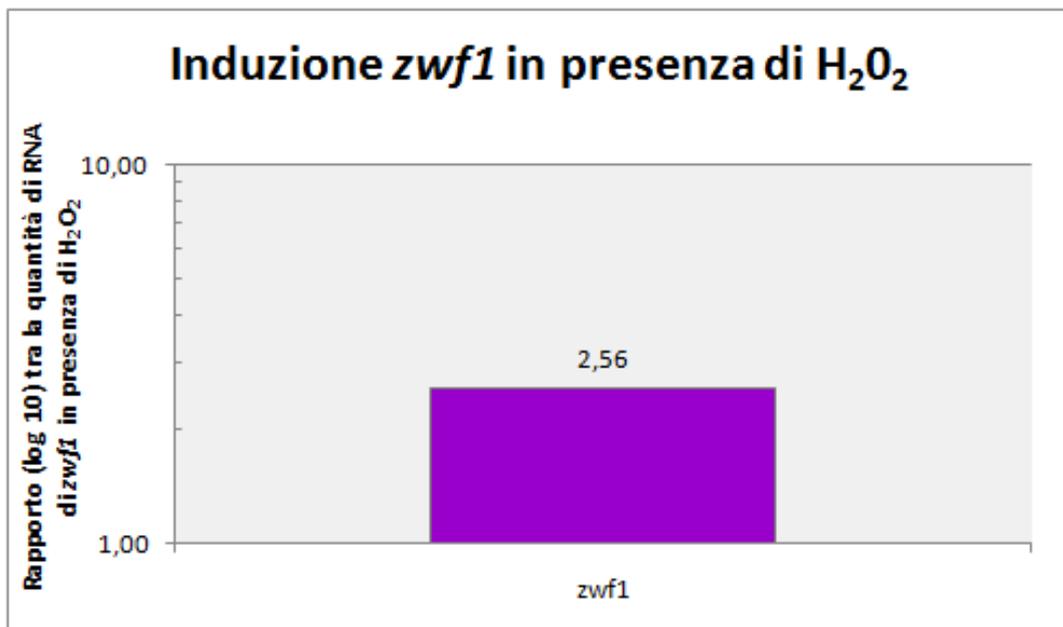


Figura 36: Induzione del gene *zwf1* in *M. tuberculosis* dopo esposizione a stress con H₂O₂.

La figura 33 mostra che il gene *zwf1* è indotto di circa di due volte e mezzo quando il batterio viene esposto a stress con H₂O₂.

Per valutare l'influenza della struttura G4 nella trascrizione, l'espressione della proteina *reporter* eGFP è stata confrontata nei ceppi TB 480 e TB 483 trattati o meno con H₂O₂ nelle condizioni testate precedentemente e riportate in letteratura.

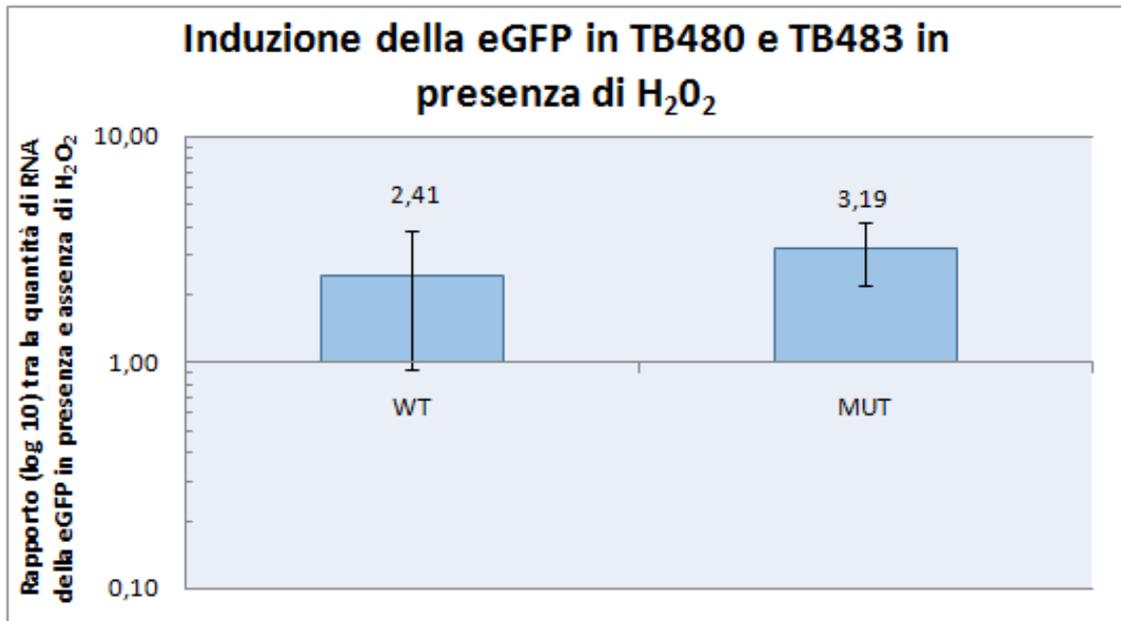


Figura 37: Induzione del gene codificante per eGFP in TB480 (WT) e TB483 (MUT) dopo esposizione a stress con H₂O₂.

Dal grafico (fig. 37) si può osservare che in entrambi i ceppi l'espressione della eGFP è aumentata dopo che il batterio è esposto a stress. Tale aumento è leggermente più elevato nel ceppo in cui la eGFP è stata posta sotto il controllo del promotore mutato. Tale minima differenza non risulta essere statisticamente significativa, quindi la presenza della struttura G-quadruplex nel promotore del gene *zwf1* non sembra influenzarne l'attività.

BRACO-19

Dati in letteratura riportano che i leganti del G4 legano e stabilizzano le strutture G-quadruplex, inibendo la trascrizione e quindi l'espressione genica (Bochman ML et al, 2012).

Per valutare se la struttura G4 nel promotore del gene *zwf1* ne influenza la trascrizione, l'espressione della eGFP è stata confrontata mediante real-time PCR nei ceppi TB480 e TB483 trattati o meno per 2 ore con 25 µM di BRACO-19 (condizione precedentemente testata e presentata nel paragrafo 5.3 capace di indurre leggermente l'espressione del gene *zwf1*).

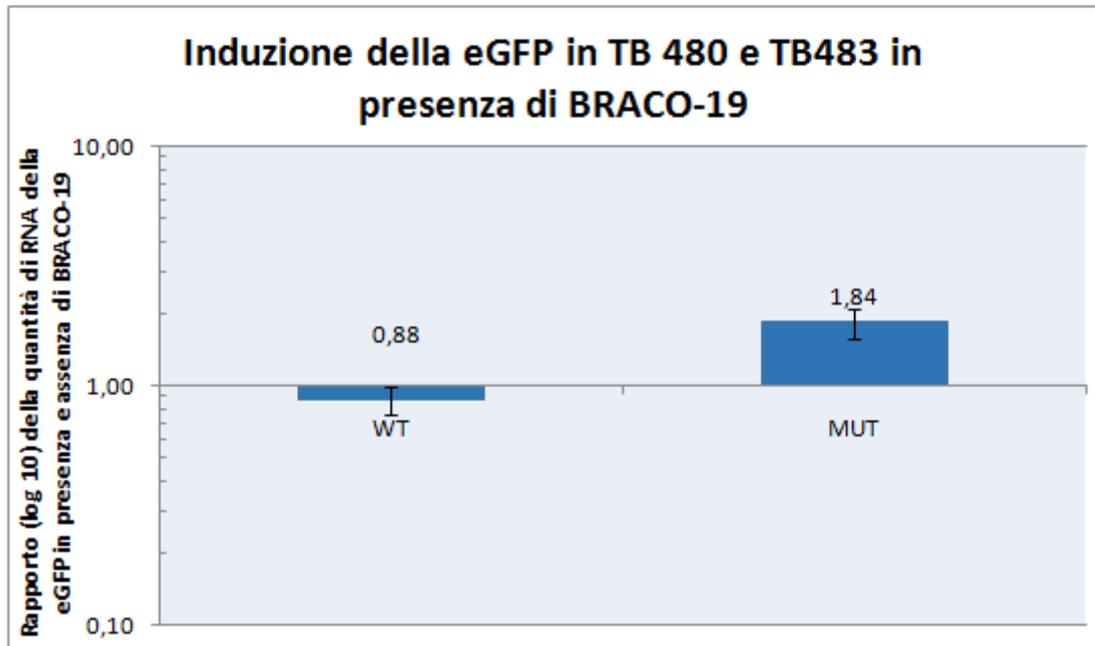


Figura 38: Induzione del gene codificante per eGFP in TB480 (WT) e TB483 (MUT) dopo esposizione a stress con BRACO-19.

Dal grafico (fig. 38) si vede che nel ceppo con il promotore *wild-type* la presenza del BRACO-19 non influenza l'espressione della eGFP (a differenza di quanto visto in H37Rv dove la presenza del legante provocava una leggera induzione del gene *zwf1*). Nel ceppo con *Pzwf1* mutato la eGFP è leggermente indotta. La differenza di espressione della eGFP tra i due ceppi non è statisticamente significativa.

In entrambe le condizioni (H_2O_2 e BRACO-19) l'attività di *Pzwf1* mutato e *wild-type* non mostrano delle differenze biologicamente importanti. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che la struttura G-quadruplex potrebbe non influenzare l'attività di tale promotore oppure potrebbe non formarsi in vivo.

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La tubercolosi, malattia infettiva causata da *M. tuberculosis*, rimane ancora oggi molto diffusa nel mondo. La comparsa di ceppi resistenti ai farmaci antitubercolari in uso rende necessaria la scoperta di target per lo sviluppo di nuovi composti in modo da poter trattare efficacemente tale malattia.

Il DNA può assumere una conformazione diversa rispetto a quella a doppia elica proposta da Watson e Crick, la struttura G-quadruplex. I G4 sono strutture secondarie ricche in guanina costituite da tetradi impilate, ciascuna di esse è formata da quattro guanine connesse tra di loro mediante legami idrogeno di Hoogsteen. Le strutture G-quadruplex sono state trovate in promotori di geni umani e virali dove influenzano processi biologici importanti come la trascrizione e la replicazione del DNA. I G4 sono considerati promettenti target farmacologici grazie alla scoperta di molecole che legano e stabilizzano la loro struttura, interferendo con l'espressione genica (Bochman ML et al, 2012).

Nel genoma di *M. tuberculosis* sono stati individuati più di 10000 motivi ricchi in basi guanina per cui è prevista la capacità ripiegarsi e formare strutture G-quadruplex. Tra questi putativi G4, quarantacinque sono stati trovati in promotori di geni coinvolti nella divisione e nella respirazione cellulare, nella formazione di componenti della parete cellulare e nella difesa dallo stress ossidativo. La formazione delle strutture G-quadruplex è stata poi confermata *in vitro* nei promotori di quattro geni: *zwf1*, *clpX*, *mosR*, *ndhA*.

Gli scopi del progetto erano di caratterizzare il ruolo delle strutture G-quadruplex in *M. tuberculosis* e di valutare il potenziale uso dei leganti del G4 come possibili farmaci antitubercolari. Come modello abbiamo usato due leganti: c-exNDI 2 e BRACO-19. Dalla determinazione della MIC, è emerso che il c-exNDI 2 ha una MIC₉₀ 10 volte inferiore rispetto al BRACO-19. La maggiore capacità del c-exNDI 2 di inibire la crescita di *M. tuberculosis* potrebbe essere almeno in parte dovuta alla sua più alta efficienza nel legare e stabilizzare le strutture G-quadruplex presenti nel genoma batterico. Inoltre con la tecnica utilizzata per la determinazione delle MIC non è possibile stabilire la concentrazione intracellulare raggiunta dai due composti in esame, quindi la sensibilità di *M. tuberculosis* nei confronti del BRACO-19 e del c-exNDI 2 potrebbe essere influenzata anche dalla diversa capacità dei composti di attraversare la parete cellulare micobatterica. E' interessante notare che i valori di MIC ottenuti per entrambi i composti sono minori della

concentrazione dimostrata essere tossica per le cellule eucariote (la concentrazione citotossica per il BRACO-19, valutata nei linfociti T umani isolati in un paziente con leucemia, è 42 μM) (Perrone R et al, 2014). Inoltre è stato determinato che i due composti hanno attività battericida. L'effetto dei leganti del G4 è stato valutato anche sulla sopravvivenza micobatterica in presenza di stress ossidativo indotto da acqua ossigenata. La minore crescita di *M. tuberculosis* in presenza dei due composti porta a concludere che BRACO-19 e c-exNDI 2 rendono il batterio più sensibile allo stress ossidativo probabilmente legando e stabilizzando strutture G-quadruplex in promotori di geni che sono coinvolti nel controllo della crescita cellulare. Tali composti, inoltre, potrebbero legare il DNA a livello di sequenze geniche prive di strutture G4 coinvolte nella produzione di proteine il cui ruolo potrebbe essere quello di influenzare la crescita e la replicazione di *M. tuberculosis*. Dallo studio dell'interazione tra il BRACO-19 e i farmaci antitubercolari è stato determinato che il legante del G4 ha un effetto additivo se usato assieme all'isoniazide, mentre in combinazione con l'etambutolo ha un effetto indifferente. Anche l'interazione tra BRACO-19 e gli altri farmaci antitubercolari di prima linea (rifampicina e pirazinamide) verrà in seguito valutata.

Dati in letteratura riportano che le strutture G4 in regioni promotoriali riescono ad influenzare l'espressione genica. Per studiare il ruolo delle strutture G4 nella trascrizione genica, l'espressione dei geni *zwf1*, *mosR*, *clpX*, *ndhA* è stata valutata in seguito al trattamento di *M. tuberculosis* con BRACO-19. Tutti i geni, tranne *ClpX* la cui espressione non cambia, in seguito all'esposizione con BRACO-19 mostrano una leggera induzione che potrebbe non avere un significato biologico.

Il ruolo della struttura G4 presente nel promotore del gene *zwf1* è stato ulteriormente studiato.

Pzwf1 è stato mutagenizzato per impedire la formazione della struttura G-quadruplex e i promotori *wild-type* e mutato, dopo essere stati clonati a monte del gene codificante per la eGFP, sono stati elettroporati in *M. tuberculosis* ottenendo i ceppi TB 480 e TB483. Per capire se la mutazione nel *Pzwf1* ne abbia alterato l'attività, la fluorescenza emessa dalla eGFP è stata confrontata nei due ceppi e il risultato è stato poi confermato attraverso l'analisi dell'espressione del gene reporter mediante RT-PCR quantitativa. L'attività del promotore *wild-type* (TB 480) è risultata essere leggermente maggiore di quella del promotore mutato (TB 483). Ulteriori studi sono necessari per determinare se tale piccola differenza ha un significato biologico oppure no.

Dati presenti in letteratura riportano che i G4 hanno una maggiore probabilità di formarsi in condizioni di stress, quindi l'espressione della eGFP è stata confrontata nei ceppi TB480 e TB 483 dopo trattamento con acqua ossigenata o BRACO-19. I risultati ottenuti mostrano che in entrambe le condizioni testate l'espressione della eGFP nei due ceppi presenta una minima differenza non

significativa dal punto di vista statistico. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che la struttura G-quadruplex non influenza l'attività del promotore studiato o non si forma in vivo.

E' necessario continuare lo studio dell'influenza delle strutture G-quadruplex nell'espressione genica mediante un nuovo approccio. L'*RNA sequencing* potrebbe essere utilizzato per identificare le strutture G4 presenti nelle regioni promotoriali di *M. tuberculosis* in cui si lega il legante BRACO-19 e studiare l'impatto di tale legame sulla trascrizione.

In conclusione possiamo dire che molecole leganti i G4 (BRACO-19 e c-exNDI 2) hanno una buona attività micobattericida, che potrebbe essere ulteriormente studiata per verificarne la possibilità di un futuro utilizzo in terapia. Per quanto riguarda invece il ruolo fisiologico dei G4 in *M. tuberculosis*, possiamo affermare che i nostri risultati suggeriscono un ruolo nella regolazione di alcuni geni, che però dovrà essere confermata da ulteriori studi.

7. BIBLIOGRAFIA

Ahmad S: Pathogenesis, immunology and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Clin Dev Immunol 2011; doi:10.1155/2011/814943.

Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR: Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Rev. Mol. Diagn 2005; 5(2): 209-219.

Arbex MA, Castro Lima Varella M, Siqueira HR, Mello AFA: Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects and use in special situations. Part 1: first-line drugs. J Bras Pneumol 2010; 36(5): 626-640.

Awasthy D, Ambady A, Narayana A, Morayya S, Sharma U: Roles of the two type II NADH dehydrogenases in the survival of *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. Gene 2014; 550: 110–116.

Bochman ML, Paeschke K, Zakian VA: DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. Nat Rev Genet 2012; 13(11): 770-780.

Boogaard J, Kibiki GS, Kisanga ER, Boeree MJ, Aarnoutse RE: New Drugs against tuberculosis: problems, progress and evaluation of agents in clinical development. Antimicrob. Agents Chemother 2009; 53(3): 849-862.

Brennan PJ: Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis 2003; 83:91-97.

Brugarolas P, Movahedzadeh F, Wang Y, Zhang N, Bartek IL, Gao YN, Voskuil MI, Franzblau S, He C: The oxidation-sensing regulator (MosR) is a new redox-dependent transcription factor in *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem 287(45): 37703-37712.

Bruhn DF, Scherman MS, Liu J, Scherbakov D, Meibohm B, Bottger EC, Lenaerts AJ, Lee RE: *In vitro* and *in vivo* Evaluation of Synergism between Anti-Tubercular Spectinamides and Non-Classical Tuberculosis Antibiotics. Sci Rep 2015; 5:13985.

Campbell IA, Bah-Sow O: Pulmonary tuberculosis: diagnosis and treatment. *BMJ* 2006; 332: 1194-1197.

Chan ED, Iseman MD: Current medical treatment for tuberculosis. *BMJ* 2002; 325: 1282-1286.

Chan ED, Iseman MD: Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review. *Curr. Opin. Infect. Dis* 2008; 21:587-595.

Delogu G, Sali M, Fadda G: The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013; 5(1): e2013070.

Dolinnaya NG, Ogloblina AM, Yakubovskaya MG: Structure, properties, and biological relevance of the DNA and RNA G-quadruplexes: overview 50 years after their discovery. *Biochemistry* 2016;81(13): 1602-1649.

Ducati G.A, Netto A.R, Basso L.A, Santos S.D: The resumption of consumption-A review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101 (7):697-714.

Dziedzic R, Kiran M, Plocinski P, Ziolkiewicz M, Brzostek A, Moomey M, Vadrevu IS, Dziadek J, Madiraju M, Rajagopalan M: *Mycobacterium tuberculosis clpX* interacts with *FtsZ* and interferes with *FtsZ* assembly. *PLoS ONE* 2010; 5: e11058.

Hayward D, Wiid I, Helden P: Differential expression of mycothiol pathway genes: are they affected by antituberculosis drugs? *IUBMB Life* 2004, 56(3): 131–138.

Han FX, Wheelhouse RT, Hurley LH: Interactions of TMPyP4 and TMPyP2 with quadruplex DNA. Structural basis for the differential effects on telomerase inhibition. *J Am Chem Soc* 1999; 121 (15): 3561-3570.

Harris LM, Merrick CJ: G-Quadruplexes in Pathogens: A Common Route to Virulence Control? *PLoS Pathogens* 2015; 11(2): e1004562.

Holder IT, Hartig JS: A matter of location: influence of G-quadruplexes on *Escherichia coli* gene expression. *ChemBiol* 2014; 21: 1511-1521.

Huppert JL: stranded nucleic acids: structure, function and targeting of G-quadruplexes. *ChemSoc Rev* 2008; 37: 1375-1384.

Hupper JL: Structure, location and interactions of G-quadruplexes. *FEBS J* 2010; 277: 3452-3458.

Kaur D, Guerin ME, Skovierova H, Brennan PJ, Jacson M: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Appl Microbiol* 2009; 69:23-78.

Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K: The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* 2011; 469:483-490.

Laible M, Boonrod K: Homemade Site Directed Mutagenesis of whole plasmids. *J Vis Exp* 2009; 27: e1135.

Nayak S, Acharjya B: Mantoux test and its interpretation. *Indian Dermatol Online J* 2012; 3(1): 2-6.

Mahboud BH, Vats MG: Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management. *InTech* 2013, capitolo 10.

Manganelli R, Dubnau E, Tyagi S, Kramer F. R, Smith I: Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 1999;31(2): 715–724.

McGrath M, Gen van Pittius NC, Van Helden PD, Warren RM, Warner DF: Mutation rate and emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:292-302.

Meletiadis J, Pournaras S, Roilides E, Walsh TJ: Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation

analysis, and in vitro-in vivo correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigates*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(2):602-609.

Ohnmacht SA, Neidle S: Small-molecule quadruplex-targeted drug discovery. *Bioorg Med Chem* 2014; 24: 2602-2612.

Ou T, Lu Y, Tan J, Huang Z, Wong K, Gu L: G-quadruplexes: targets in anticancer drug design. *Chem Med Chem* 2008; 3:690-713.

Parida SK, Axelsson-Robertson R, Rao MV, Singh N, Master I, Lutckii A, Keshavjee S, Andersson J, Zumla A, Maeurer M: Totally drug-resistant tuberculosis and adjunct therapies. *J Intern Med* 2015; 277: 388-405.

Patel DJ, Phan AT, Kuryavyi V: Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTRG-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(22): 7429-7455.

Perrone R, Butovskaya E, Daelemans D, Palù G, Pannecouque C, Richter SN: Anti-HIV-1 activity of the G-quadruplex ligand BRACO-19. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 3248-3258.

Perrone R, Doria F, Butovskaya E, Frasson I, Botti S, Scalabrin M, Lago S, Grande V, Nadai M, Freccero M, Richter SN: Synthesis, binding and antiviral properties of potent core-extended naphthalene diimides targeting the HIV-1 long terminal repeat promoter G-quadruplexes. *Med Chem* 2015; 58: 9639-9652.

Perrone R, Lavezzo E, Riello E, Manganelli R, Palù G, Toppo S, Provvedi R, Richter S: Mapping and characterization of G-quadruplexes in *Mycobacterium tuberculosis* gene promoter regions. *Sci Rep* 2017; 7: 5743.

Rhodes D, Lipps HJ: G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res* 2015; doi: 10.1093/nar/gkv862.

Smith JP: Nanoparticle delivery of Anti-tuberculosis chemotherapy as a Potential Mediator Against drug-resistant tuberculosis. *Yale J Biol Med* 2011; 84: 361-369.

Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M: The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* 2001; 2: 164-168.

Takur RS, Desingu A, Basavaraju S, Subramanya S, Rao DN, Nagaraju G: *Mycobacterium tuberculosis* DinG is a structure-specific helicase that unwinds G4 DNA: implications for targeting G4 DNA as a novel therapeutic approach. *J Biol Chem* 2014; 289: 25112-25136.

Vasconcelos-Junior AC, Araújo-Filho JA, Batista da Silva E, Martins de Sousa E, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP: Limitations of the BCG vaccine and new prophylaxis strategies against human tuberculosis. *Einstein* 2009; 7(3):383-389.

Vaudry W: "To BCG or not to BCG, that is the question!". The challenge of BCG vaccination: why can't we get it right? *J Paediatr Child Health* 2003; 8(3):141-144.

WHO Global Tuberculosis Report 2016.

Yang D, Okamoto K: Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs. *Future Med Chem* 2010; 2(4):619-646.

Zahrt TC: Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microb Infect* 2003; 5: 159-167.

Zaman K: Tuberculosis: a global health problem. *J Health Popul Nutr* 2010; 28(2): 111-113.

Zumla AI, Gillespie SH, Hoelscher M, Philips PPJ, Cole ST, Abubakar I, McHugh TD, Schito M, Maeurer M, Nunn AJ: New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances and future prospects. *Lancet Infect Dis* 2014; 14:327-340.

Sito consultato in internet: tuberculist.epfl.ch/ (Tuberculist-*Mycobacterium tuberculosis* Database)

Elenco pubblicazioni:

1) Serafini A, Riello E, Trojan D, Cogliati E, Palù G, Manganelli R, Paolin A: Evaluation of new antibiotic cocktails against contaminating bacteria found in allograft tissues. *Cell Tissue Bank* 2016; 17:619–628.

2) Perrone R, Lavezzo E, Riello E, Manganelli R, Palù G, Toppo S, Provvedi R, Richter S: Mapping and characterization of G-quadruplexes in *Mycobacterium tuberculosis* gene promoter regions. *Sci Rep* 2017;7:5743.