

# Indice

---

<b>1. Introduzione .....</b>	<b>6</b>
1.1. Le prolilendopeptidasi.....	7
1.1.1. La prolina .....	7
1.1.2. Aspetti strutturali delle prolilendopeptidasi .....	8
1.1.3. Aspetti funzionali: specificità .....	11
1.1.4. Stabilità termica e proteolitica .....	12
1.1.5. Distribuzione e funzione fra le differenti specie .....	13
1.1.6. Altre endopeptidasi prolina specifiche .....	14
1.2. Gli attinomiceti.....	15
1.2.1. <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2).....	16
1.2.2. <i>Amycolatopsis balhimycina</i> .....	17
1.3.Strategie enzimatiche per la detossificazione del glutine .....	18
1.3.1. Il glutine .....	18
1.3.2. La celiachia .....	20
1.3.3. Immunogenicità della gliadina .....	22
1.3.4. Terapia enzimatica .....	23
<b>2. Scopo della ricerca .....</b>	<b>25</b>
<b>3. Procedure sperimentali... .....</b>	<b>28</b>
3.1. Materiali .....	30
3.1.1. Ceppi batterici utilizzati .....	30
3.1.2. Terreni di coltura... .....	30
3.1.3. Antibiotici .....	32
3.1.4. Molecole.....	33
3.1.5. Enzimi .....	33
3.1.6. Primers .....	34
3.1.7. Plasmidi.....	34
3.1.7.1. pGEM-T Easy .....	34
3.1.7.2. pRSET-B .....	35
3.1.8. Soluzioni .....	36
3.2. Metodi .....	39
3.2.1. Colture cellulari.....	39
3.2.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	39
3.2.1.2. <i>S. coelicolor</i> A3(2) .....	39
3.2.1.3. <i>A. balhimycina</i> .....	39
3.2.1.4. <i>F. capsulatum</i> .....	40
3.2.2. Manipolazione degli acidi nucleici .....	40
3.2.2.1. Estrazione di DNA cromosomale.....	40
3.2.2.2. Trattamento con fenolo-cloroformio e precipitazione .....	40
3.2.2.3. Quantizzazione degli acidi nucleici.....	42
3.2.2.4. Amplificazione di un frammento di DNA mediante PCR .....	42
3.2.2.5. Purificazione di un prodotto di PCR .....	43
3.2.2.6. Elettroforesi su gel di agarosio.....	44
3.2.2.7. Estrazione di DNA plamidico .....	45
3.2.2.8. Digestione con enzimi di restrizione .....	47
3.2.2.9. Defosforilazione di un frammento di DNA.....	47

3.2.2.10. Drop-dialisi..	47
3.2.2.11. Reazione di ligase.....	47
3.2.2.12. Estrazione dell'RNA .....	48
3.2.2.13. Trattamento con DNase.....	48
3.2.2.14. RT-PCR.....	49
3.2.2.15. Conversione dell'RNA in cDNA .....	50
3.2.2.16. qRT-PCR.....	50
3.2.3. Proteomica.....	51
3.2.3.1. Overespressione di una proteina di fusione con His-tag in <i>E. coli</i> .....	51
3.2.3.2. Estrazione di proteine totali.....	52
3.2.3.3. Purificazione di una proteina di fusione.....	52
3.2.3.4. Quantizzazione di proteine mediante saggio Bradford .....	53
3.2.3.5. Elettroforesi di proteine mediante SDS-PAGE.....	54
3.2.3.6. Western blot .....	55
3.2.3.7. Saggio di attività enzimatica .....	57
<b>4. Risultati .....</b>	<b>58</b>
4.1. Crescita di <i>A. balhimycina</i> e <i>S. coelicolor</i> A3(2) in presenza di glutine .....	59
4.2. Analisi <i>in silico</i> per l'identificazione delle putative PEPs .....	64
4.3. Analisi dell'espressione dei geni.....	69
4.3.1. Espressione del gene <i>Pep-Amy</i> di <i>A. balhimycina</i> .....	69
4.3.2. Espressione dei geni <i>SCO3610</i> e <i>SCO2761</i> di <i>S. coelicolor</i> A3(2) .....	75
4.4. Espressione dei geni <i>Pep-Amy</i> , <i>SCO3610</i> e <i>SCO2761</i> in <i>E. coli</i> .....	79
4.5. Studio <i>in vitro</i> dell'attività enzimatica.....	90
<b>5. Conclusioni .....</b>	<b>92</b>
<b>6. Bibliografia .....</b>	<b>96</b>

# 1. Introduzione

---

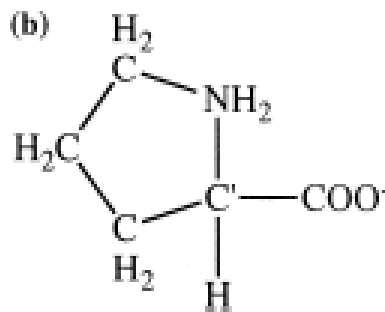
## 1.1 Le prolilendopeptidasi

---

Le prolilendopeptidasi sono enzimi che riconoscono peptidi e proteine e li scindono a livello di residui di prolina interni.

### 1.1.1. La prolina

La prolina è l'unico dei 20 amminoacidi ad avere una struttura ciclica. Il gruppo alifatico R (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), che costituisce la catena laterale, è legato covalentemente all'atomo di azoto del gruppo amminico e al carbonio alfa, a formare un anello pirrolidinico (Fig.1).



**Fig.1. Struttura ciclica della prolina**

Questa struttura ciclica, in un legame peptidico limita l'angolo di rotazione tra il carbonio alfa e l'azoto, imponendo rigidi vincoli conformazionali che implicano due conseguenze: la prima è che ogni residuo di prolina introduce, in una struttura ad alfa elica, un ripiegamento destabilizzante e la seconda è che poiché l'atomo di azoto di una prolina non ha l'atomo di idrogeno sostituito, necessario per formare un legame idrogeno con altri residui; la prolina è solo raramente presente all'interno di una alfa elica. Queste restrizioni strutturali conferiscono particolari proprietà biologiche a una vasta gamma di biomolecole fisiologicamente importanti (neurotrasmettitori ad esempio) che grazie ai residui di prolina, sono protette dalla degradazione proteolitica.

Non è sorprendente, tuttavia, che la natura abbia sviluppato nel corso dell'evoluzione, delle peptidasi prolina-specifiche (proliloligopeptidasi) capaci di

riconoscere la struttura ciclica della prolina e idrolizzare peptidi e proteine a livello di tale residuo (Damian F. *et al.*, 1997).

### **1.1.2. Aspetti strutturali delle prolilendopeptidasi**

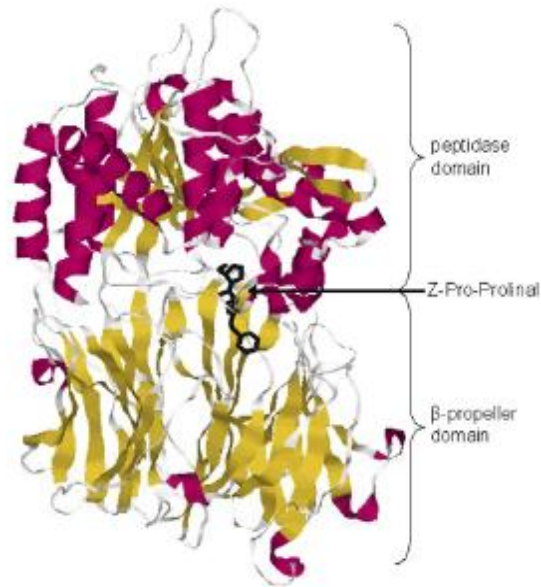
Le proliloligopeptidasi costituiscono una famiglia di serino-proteasi, che includono: le proliloligopeptidasi (POPs, EC 3.4.21.26), dipeptidilpeptidasi IV (DPPIV, EC 3.4.14.5), acilaminoacilpeptidasi (ACPH, EC 3.4.19.1) e oligopeptidasi B (OB, EC 3.4.21.83) (Rawlings *et al.*, 1991).

Questa famiglia di enzimi differisce dalle classiche serino-proteasi, tripsina e subtilisina, per la loro specificità a riconoscere il substrato peptidico e per la loro diversa triade catalitica.

In particolare, le proliloligopeptidasi (EC 3.4.21.26 POPs) (75KDa), conosciute anche come prolil-endopeptidasi (PEPs), sono un membro della sottofamiglia S9 (<http://merops.sanger.ac.uk>), capaci di idrolizzare substrati peptidici di circa 30 residui amminoacidici sul dominio C-terminale di residui di prolina interni (Shan L. *et al.*, 2005).

L'attività di PEPs è stata riportata per la prima volta nel 1971 da Walter e collaboratori, i quali osservarono l'idrolisi a livello di un legame peptidico prolil-leucina nell'ormone peptidico ossitocina in omogenati di utero umano (Walter *et al.*, 1971). Da allora, numerose proliloligopeptidasi sono state isolate da batteri, funghi, piante e animali (Venalainen, J. I. *et al.*, 2004).

L'analisi della struttura cristallina della prima PEP di muscolo di maiale ha messo in evidenza che questa proteina ha una forma cilindrica con altezza di circa 60Å e un diametro di 50Å. Essa consiste di due domini: il dominio peptidasico  $\alpha/\beta$ -idrolase N-terminale comprendente i residui 1-72 e 428-710 connesso covalentemente al dominio "β-propeller" comprendente i residui 73-427 (Bocskei Z. *et al.*, 1998) (Fig.2).



**Fig. 2. Struttura terziaria della proliloligopeptidasi porcina**

All'interfaccia tra il dominio catalitico e il dominio  $\beta$ -propeller è presente la triade catalitica comprendente Asp-His-Ser (Ser554, Asp641, His680). Il residuo di serina è localizzato in quello che è chiamato “gomito nucleofilo” ed è circondato da residui, che provvedono a un piccolo ingombro sterico (Fulop *et al.*, 1998).

Il dominio catalitico consiste di due piccoli foglietti  $\beta$  antiparalleli e due lunghe  $\alpha$ -eliche; esso è connesso al segmento C-terminale mediante legami a idrogeno, ponti salini e interazioni idrofobiche. Il dominio  $\beta$ -propeller consiste, invece, di sette ripetizioni di quattro foglietti  $\beta$  antiparalleli e regola l'accesso del substrato al sito attivo.

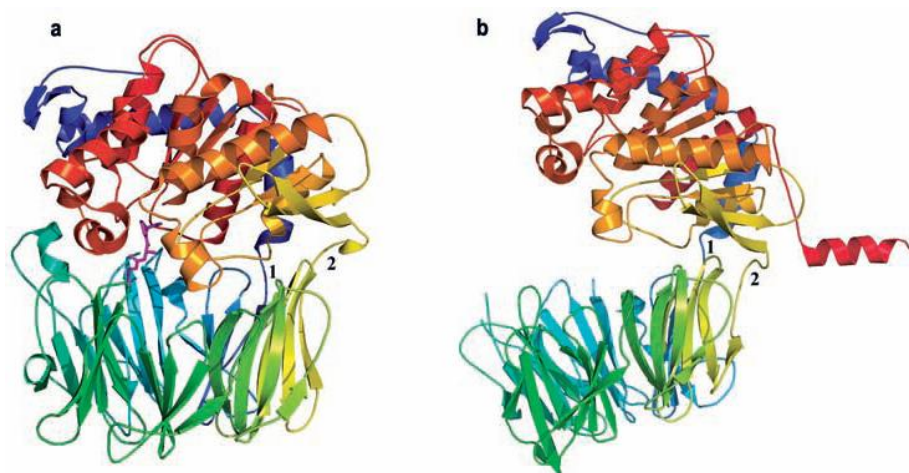
Un confronto della sequenza amminoacidica di queste quattro proliloligopeptidasi mostra come questi enzimi abbiano un antenato comune e questo elevato livello di conservazione fra le differenti specie suggerisce il loro importante ruolo in processi fisiologici a oggi non del tutto chiari.

Il dominio peptidasico, in particolare, è molto più conservato del dominio  $\beta$ -propeller; 65 residui (18%) del dominio catalitico sono universalmente conservati a differenza del  $\beta$ -propeller dove ce ne sono solo 7 (2%). I residui conservati includono, ovviamente, anche quelli della triade catalitica e quelli di legame al substrato (Venalainen *et al.*, 2004).

È stato dimostrato che la catalisi delle PEPs è controllata da un meccanismo “gating filter” che permette l’accesso al sito catalitico solo di piccoli peptidi ed esclude invece peptidi più grandi e proteine che, così, risultano protetti dalla proteolisi (Fulop *et al.*, 2000). La struttura 3D delle PEPs ha anche aiutato a capire il meccanismo di specificità per piccoli substrati e a descrivere come il cambiamento conformazionale indotto dall’ingresso del substrato è lo step limitante la velocità di catalisi (Polgar *et al.*, 1993).

Il sito attivo dell’enzima è situato in una larga cavità all’interfaccia dei due domini ed è stato proposto che al centro del dominio  $\beta$ -propeller ci sia una fessura attraverso cui entra il substrato. Tuttavia, l’apparente struttura rigida del  $\beta$ -propeller non spiega come il substrato possa avvicinarsi al sito attivo; ma studi sulla struttura cristallina e analisi cinetiche di varianti mutate di PEPs hanno fortemente suggerito che esiste un percorso alternativo per il substrato (Szeltner *et al.*, 2004). Questi studi, infatti, indicano che una volta introdottosi nel sito attivo, il substrato induce un’apertura a livello dell’interfaccia dei due domini, il cui movimento è facilitato dai residui 192-205 del  $\beta$ -propeller e il segmento N-terminale del dominio peptidasico (Fuxreiter, M. *et al.*, 2005).

In particolare, la struttura cristallina della PEP di *Sphingomonas capsulata* (SC-PEP) ha messo in evidenza una configurazione aperta del sito attivo, mentre il legame di PEP di *Myxococcus xanthus* (MX-PEP) a un inibitore (Z-Ala-prolinal) spinge l’enzima ad assumere una conformazione chiusa (Fig. 3).



**Fig.3. Struttura terziaria di PEPs di *Myxococcus xanthus* e *Sphingomonas capsulata*.  
A) Conformazione chiusa B) Conformazione aperta.**





miglior il 13-mer piuttosto che il 33-mer; mentre FM-PEP mostra specificità per entrambi (Shan *et al.*, 2004).

Fino a poco tempo fa, era opinione comune che la specificità per la lunghezza della catena fosse limitata a 30 amminoacidi. Questa ipotesi era supportata, anche, dalla teoria secondo cui il dominio  $\beta$ -propeller agisce da “gating filter” per limitare l’accesso al sito attivo solo di piccoli peptidi.

Tuttavia, recenti dati strutturali dimostrano che il limite di lunghezza della catena almeno per alcune PEPs, può essere molto più lungo, basti pensare ad esempio, che alcune PEPs sono in grado di digerire peptidi 33-mer glutine derivati con una specificità paragonabile a quella di peptidi più corti (Shan *et al.*, 2002).

#### **1.1.4. Stabilità termica e proteolitica**

Le PEPs hanno un ampio range di stabilità termica; basti pensare ad esempio che quella isolata da *P. furiosus* (PF-PEP) ha un optimum di temperatura tra 85°C e 90°C e per 24 ore è stabile a 4°C e a 37°C (Harwood, V. J. *et al.*, 1997). Inoltre, la PF-PEP presenta omologia con FM-PEP (30% identità, 52% similarità) e con la PEP porcina (32% identità, 54% similarità) (Robinson, K. A. *et al.*, 1995) sebbene questi ultimi due enzimi hanno temperature ottimali di gran lunga differenti rispetto a PF-PEP (Harris M.N. *et al.*, 2001).

Per quanto concerne la stabilità proteolitica, la proteolisi della PEP porcina con tripsina determina un taglio a livello di Lys196-Ser197, che è una regione del dominio  $\beta$ -propeller che interagisce con il sito catalitico ed è stato dimostrato che questa proteolisi rende l’enzima più attivo rispetto alla forma native in condizioni di basso pH (Polgar L. *et al.*, 1992). La stabilità di due PEPs batteriche (FM-PEP e MX-PEP) è stata valutata a pH 6.5 con tripsina, chimotripsina, elastasi e carbossipeptidasi A. In entrambi i casi, l’attività è rimasta dopo 60min a 37°C (Shan L. *et al.*, 2004).

### 1.1.5. Distribuzione e funzione fra le differenti specie

Come è stato già accennato, le PEPs sono state isolate da un'ampia varietà di organismi inclusi batteri, protozoi, piante e animali (Yoshimoto *et al.*, 1988; Rennex *et al.*, 1991; Yoshimoto *et al.*, 1991; Chevallier *et al.*, 1992; Shirasawa *et al.*, 1994; Vanhoof *et al.*, 1994; Robinson *et al.*, 1995; Yoshimoto *et al.*, 1997; Ishino *et al.*, 1998; Kabashima *et al.*, 1998) ma non nel lievito dove non è stata trovata nessuna omologia di sequenza.

Nei mammiferi, questi enzimi sono presenti a livello citoplasmatico (Dresdner, K. *et al.*, 1982), nel siero e legate alla membrana (O'Leary R. M. *et al.*, 1996).

Nei batteri, invece, alcune PEPs sono legate alla membrana, altre sono attive, invece, a livello extracellulare (Xie *et al.*, 2004) e questa distribuzione la si ritrova anche in molti protozoi (Grellier *et al.*, 2001).

Le PEPs batteriche sono in grado di idrolizzare lunghi peptidi, proteine e alle volte sono capaci di autoproteolisi (Harwood *et al.*, 1997; Harwood e Schreier, 2001), a dispetto di quanto accade in quelle dei mammiferi che non riescono a tagliare peptidi più lunghi di 30 amminoacidi. Esistono, infatti, delle evidenze strutturali che dimostrano come sia stericamente impossibile, per questi enzimi, ospitare proteine più grandi (Fulop *et al.*, 1998, Fuxreiter *et al.*, 2005).

Nei mammiferi, l'attività delle PEPs è stata ritrovata in tutti gli organi e tessuti. Nel topo, ad esempio, è presente una elevata attività nel cervello con una diminuzione a livello del fegato, del cuore e del rene (Irazusta, J. *et al.*, 2002). La distribuzione dell'mRNA di PEP nel sistema nervoso di topi è stata determinata usando qRT-PCR e ibridazione *in situ* e questi studi hanno messo in evidenza l'implicazione delle PEP nell'inattivazione di neuropeptidi (Bellemere, G. *et al.*, 2004).

A oggi, il preciso ruolo delle PEPs rimane comunque sconosciuto; l'attività delle PEPs nell'idrolisi di neuropeptidi, ha portato a studiare la loro correlazione in alcune malattie neurodegenerative ed è stato scoperto che probabilmente controllano la sintesi dell'inositolo, regolando negativamente la proteina inositolo-polifosfato-polifosfatasi (MInsPP), importante nella formazione dell'IP3 da IP5/6.

Così, l'inibizione delle PEPs, attiva MInsPP, aumentando i livelli di IP3 (Schulz, I. *et al.*, 2002).

Un'altra importante funzione fisiologica delle PEPs è quella riguardante la relazione con la tubulina. La co-localizzazione di PEPs con la tubulina suggerisce che potrebbe essere implicata in processi associati ai microtubuli (traffico intracellulare, secrezione delle proteine) (Schulz, I. *et al.*, 2005).

### **1.1.6. Altre peptidasi prolina-specifiche**

Nei mammiferi, le PEPs sono state ampiamente studiate e più recentemente invece sono risultate essere degne di attenzione anche le PEPs microbiche e fungine. In letteratura, infatti, sono riportati degli studi su una metalloproteasi da *Penicillium citrinum*, una peptidase di *Lactobacillus helveticus* e una proteasi di *Aspergillus niger*.

La metalloproteasi di *P. citrinum* appartiene alla famiglia S35 e idrolizza peptidi contenenti prolina come: la sostanza P, dinorfina-A e neurotensina (Yamaguchi, M. *et al.*, 1993). La peptidasi di *L. helveticus* taglia invece  $\beta$ -caseina and  $\alpha$ S1-caseina del formaggio (Sridhar, V. R. *et al.*, 2005).

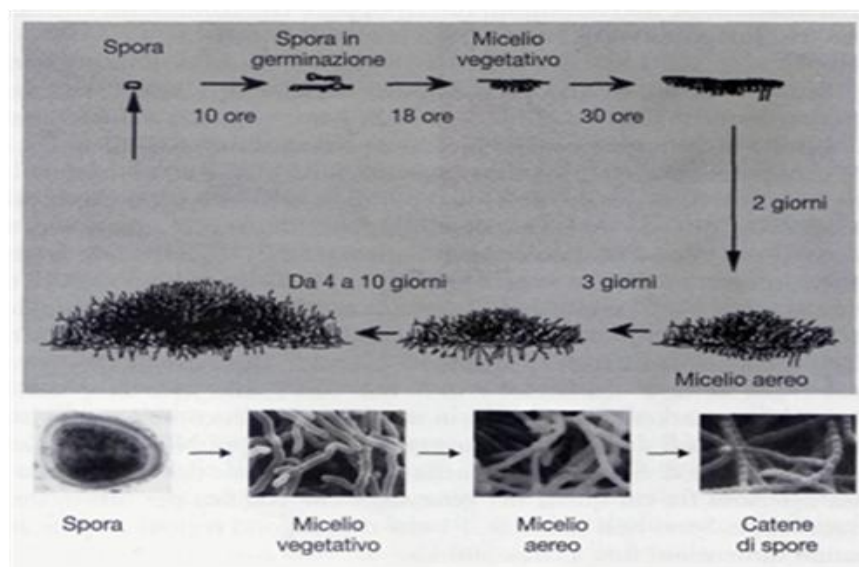
L'endoproteasi di *A. niger* appartiene invece alla famiglia delle serino-proteasi S28. Il pH ottimale di questo enzima è circa 4-5 (Edens, L. *et al.*, 2005).

Altri studi hanno anche messo in evidenza che questa proteasi è in grado di idrolizzare le proteine del glutine (ricche in prolina) e quindi potrebbe essere un potenziale strumento contro la malattia celiaca (Stepniak, D. *et al.*, 2006).

## 1.2 Gli attinomiceti

Gli attinomiceti sono batteri gram-positivi, aerobi, non motili (Stackebrandt *et al.*,1997), molto diffusi in natura e in particolare nel suolo. La sorprendente adattabilità di questi batteri al loro habitat è dovuta essenzialmente alla presenza di numerosi geni che codificano enzimi litici per la degradazione di diversi substrati, utilizzati come fonti di nutrimento.

Questi microrganismi sono noti per la loro capacità di differenziare sia dal punto di vista morfologico che fisiologico. Il differenziamento morfologico si osserva in genere durante la crescita su terreno solido ed è caratterizzato, dopo lo sviluppo del micelio substrato, dalla formazione di ife aeree e spore (Chater, 2001) (Fig.4). Il differenziamento fisiologico, invece, si manifesta con la sintesi di metaboliti secondari, molti dei quali trovano impiego come antibiotici e antitumorali.



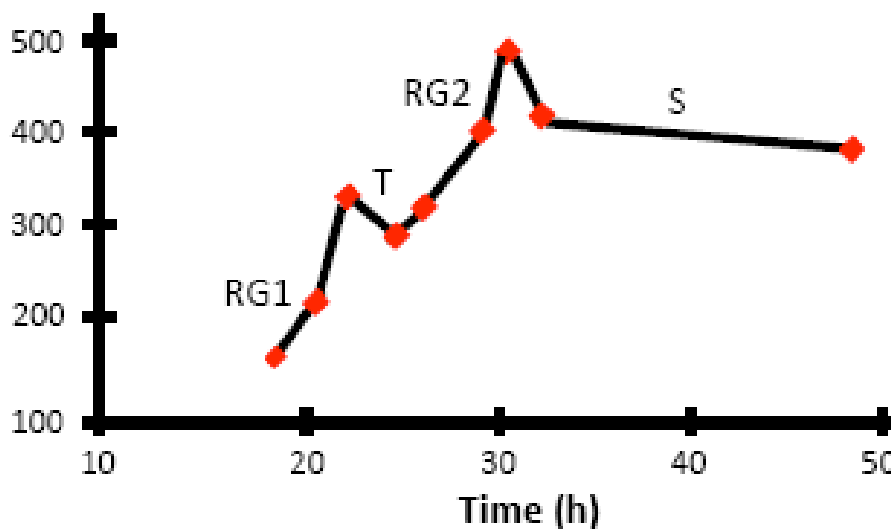
**Fig. 4. Ciclo vitale di *S. coelicolor* A3(2).**

La maggior parte degli studi sugli attinomiceti è focalizzata sulla produzione di antibiotici; meno consuete sono, invece, le ricerche sulle proteasi sintetizzate da questi microrganismi rispetto ad altri batteri e ai funghi. Eppure, è noto come le proteasi siano un gruppo di enzimi importanti dal punto di vista commerciale e industriale, basti pensare che i due terzi degli enzimi proteolitici, prodotti commercialmente, hanno origine microbica.

### 1.2.1. *Streptomyces coelicolor* A3(2)

*S. coelicolor* A3(2) è tra gli streptomiceti il batterio maggiormente caratterizzato dal punto di vista genetico; presenta un cromosoma lineare di 8.6Mb con un contenuto in G+C del 72% che è stato completamente sequenziato (Bentley *et al.*, 2002).

La curva di crescita di *S. coelicolor* si presenta discontinua ed caratterizzata da quattro fasi (Puglia *et al.*, 1995): RG1 (Rapid Growth), T (Transition Phase), RG2 (Rapid Growth) e S (Stationary phase) (Fig.5).



**Fig. 5.** Curva di crescita in terreno liquido di *S. coelicolor* A3(2).

Durante la prima fase di crescita rapida (RG1) avviene la produzione di acidi organici (Madden *et al.*, 1996) con conseguente diminuzione del pH del mezzo di crescita. Dopo circa 20-22 ore inizia la fase di transizione (T) che corrisponde a una fase di stress causata dalla mancanza di nutrienti o da stress fisiologici interni alla colonia (Puglia *et al.*, 1995). In questo periodo è rallentata la produzione di acidi nucleici e proteine e contemporaneamente vengono espressi geni biosintetici degli antibiotici (Holt *et al.*, 1992) e geni codificanti per proteine “heat shock” (Puglia *et al.*, 1995). Alla fase di transizione segue una seconda fase di crescita rapida (RG2) caratterizzata dalla neutralizzazione del pH del mezzo di coltura e che precede l’ingresso in fase stazionaria (S).

Nelle condizioni di crescita di laboratorio, *S. coelicolor* sintetizza gli antibiotici metilenomicina, l'undecilprodigiosina, di colore rosso, il lipopeptide calcio-dipendente (CDA) e l'actinorodina, polichetide diffusibile il cui colore blu dà il nome alla specie. Nonostante queste molecole non siano usate in terapia, lo studio dei loro cluster biosintetici e della relativa regolazione dell'espressione genica fornisce informazioni importanti sulla biosintesi di antibiotici con struttura simile, in ceppi di attinomiceti difficilmente manipolabili.

### **1.2.2. *Amycolatopsis balhimycina***

*Amycolatopsis balhimycina* appartiene alla famiglia degli attinomiceti Pseudonocardiaaceae (Lechevalier *et al.* 1986) ed è il produttore dell'antibiotico glicopeptidico balimicina. E' un batterio non sporulante con la tendenza a formare colonie giallo/arancione su differenti terreni di coltura agarizzati. Molti studi sono stati condotti sulla regolazione della sintesi dell'antibiotico, sulla variazione della morfologia in relazione alla sintesi di esso e sul proteoma espresso in diverse condizioni di crescita.

La balimicina, i cui geni per la sintesi si trovano nel cluster *bal*, consiste in un core eptapeptidico formato da amminoacidi proteinogenici (Leu e Asn) e da amminoacidi non proteinogenici (3,5-diidrossifenilglicina, 4-idrossifenilglicina,  $\beta$ -idrossitirosina).

Il genoma, di circa 10Mb, è stato sequenziato nell'ambito del progetto "Combinatorial Biosynthesis of Industrial Glicopeptides: Technology, Optimization and Production" (COMBIG TOP) finanziato dall'Unione Europea, ma non è stato ancora pubblicato. Quindi molti dati, relativi al suo genoma, sono sconosciuti alla gran parte della comunità scientifica; inoltre poco si sa dei profili di espressione genica di questo ceppo nei diversi terreni di crescita.

Ciò che invece è noto sul suo genoma è che mostra molti geni ortologhi con quelli di *S. erythraea* e da *S. coelicolor* e la gran parte dei geni sono omologhi con quelli di *Amycolatopsis mediterranei* U32.

## 1.3. Strategie enzimatiche per la detossificazione del glutine

---

### 1.3.1. Il glutine

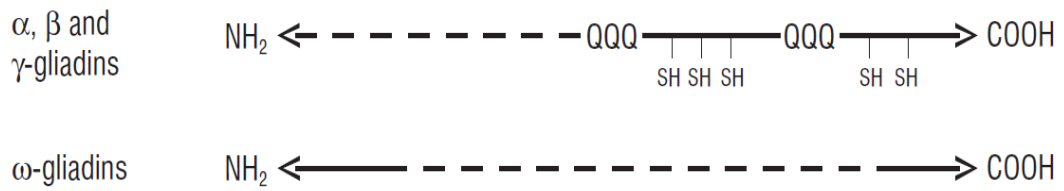
Il glutine, che comprende circa il 78-85 per cento del totale delle proteine presenti nell'endosperma del grano, è un grosso complesso di proteine classificate come prolamine e composte da gliadine monomeriche e glutenine polimeriche (stabilizzate da ponti disolfuro). Gliadine e glutenine sono le maggiori responsabili delle caratteristiche tecnologiche e nutrizionali dei prodotti a base di farina di frumento; in particolare le gliadine sono responsabili dell'estensibilità degli impasti e le glutenine della viscosità ed elasticità.

Le gliadine costituiscono la principale frazione proteica di riserva dei chicchi e hanno un elevato contenuto in glutammina (30-50%) e prolina (15-30%), ma uno scarso contenuto in lisina e amminoacidi ionici (istidina, arginina, lisina e gruppi carbossilici liberi di acido aspartico e glutammico) (Rocher *et al.*, 1995).

Le gliadine sono proteine monomeriche in quanto naturalmente prive di residui di cisteina o perché tutti i residui di cisteina presenti, sono impegnati in legami disolfuro intramolecolari. Le gliadine hanno un peso molecolare compreso tra 30 e 70KDa e sono state classificate in  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\omega$ -gliadine in base alla loro mobilità elettroforetica in ambiente acido (Qi P. F. *et al.*, 2006).

Le  $\alpha$ - e  $\beta$ -gliadina presentano: un dominio N-terminale seguito da un dominio centrale contenente sequenze ripetute di uno o due motivi costituiti da glutammina, prolina e amminoacidi idrofobici e infine un dominio C-terminale formato da segmenti di poli-glutammine e sequenze uniche ricche in lisina e arginina, che contengono residui di cisteina. Una simile struttura la si ritrova anche nella  $\gamma$ -gliadina, solo che  $\alpha$ - e  $\beta$ -gliadina hanno le seguenti sequenze ripetute: Pro-Gln-Gln-Pro-Phe-Pro e Pro-Gln-Gln-Pro-Tyr mentre la ripetizione della  $\gamma$ -gliadina è Pro-Gln-Gln-Pro-Phe-Pro-Gln. Infine, le  $\omega$ -gliadine differiscono dalle altre per l'assenza dei residui di cisteina e la sequenza ripetuta è uguale quella della  $\gamma$ -gliadina ma con una Gln in più (Pro-Gln-Gln-Pro-Phe-Pro-Gln-Gln) (Tatham *et al.*, 1990) (Fig.6).





**Fig.6. Catene polipeptidiche  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\omega$ -gliadine. Le linee continue indicano le regioni specifiche, le linee tratteggiate indicano le sequenze ripetute. Sono indicati anche i segmenti di poli-glutammina (QQQ) e i residui di cisteina (SH).**

Le glutenine sono proteine polimeriche con un peso molecolare che può variare da 60KDa fino a milioni di Da, costituendo i polimeri di maggiori dimensioni presenti in natura. Queste proteine sono costituite da una miscela eterogenea di polimeri uniti da legami disolfuro e possono essere classificate in quattro gruppi in base alla loro mobilità elettroforetica dopo riduzione dei legami S-S. Il gruppo A ha un PM compreso tra 80 e 120KDa e corrisponde alle subunità delle glutenine ad alto peso molecolare (HMW-GS). I gruppi B e C hanno un PM compreso tra 30 e 40KDa, corrispondono alle subunità delle glutenine a basso peso molecolare (LMW-GS) e comprendono proteine simili alle  $\alpha$ - e  $\gamma$ -gliadine. Il gruppo D è costituito prevalentemente da proteine acide simili alle  $\omega$ -gliadine. Le glutenine ad alto PM contengono una lunga regione centrale di sequenze ripetute tra il dominio N-terminale e quello C-terminale e contrariamente a quanto accade nelle  $\omega$ -gliadine presentano dei residui di cisteina (Fig.7).



**Fig.7. Catena polipeptidica delle glutenine ad alto PM. Le linee continue indicano le regioni specifiche, le linee tratteggiate indicano le sequenze ripetute. Sono indicati anche i residui di cisteina (SH).**

### 1.3.2. La celiachia

La malattia celiaca (CD) è una malattia di tipo autoimmune dell'intestino tenue, caratterizzata da un'intolleranza nei confronti del glutine, in individui geneticamente predisposti. E' il risultato di complesse interazioni tra fattori intrinseci (genetici) ed estrinseci (ambientali) ed è caratterizzata, nella sua forma classica, da atrofia dei villi intestinali, iperplasia delle cripte, infiltrazioni di linfociti T nella mucosa intestinale e conseguente sindrome da malassorbimento (R. Presutti *et al.*, 2007) (Fig.8).



**Fig.8. Sezione al SEM di un intestino di un soggetto sano (sinistra) e un soggetto celiaco (destra).**

Poiché la malattia celiaca colpisce individui geneticamente predisposti ed è caratterizzata da processi immunomediati, diretti contro il glutine, può essere definita come una patologia di tipo multifattoriale, in cui l'intestino (sede della risposta immunitaria e, allo stesso tempo, organo bersaglio) agisce da interfaccia tra i fattori genetici e quelli ambientali.

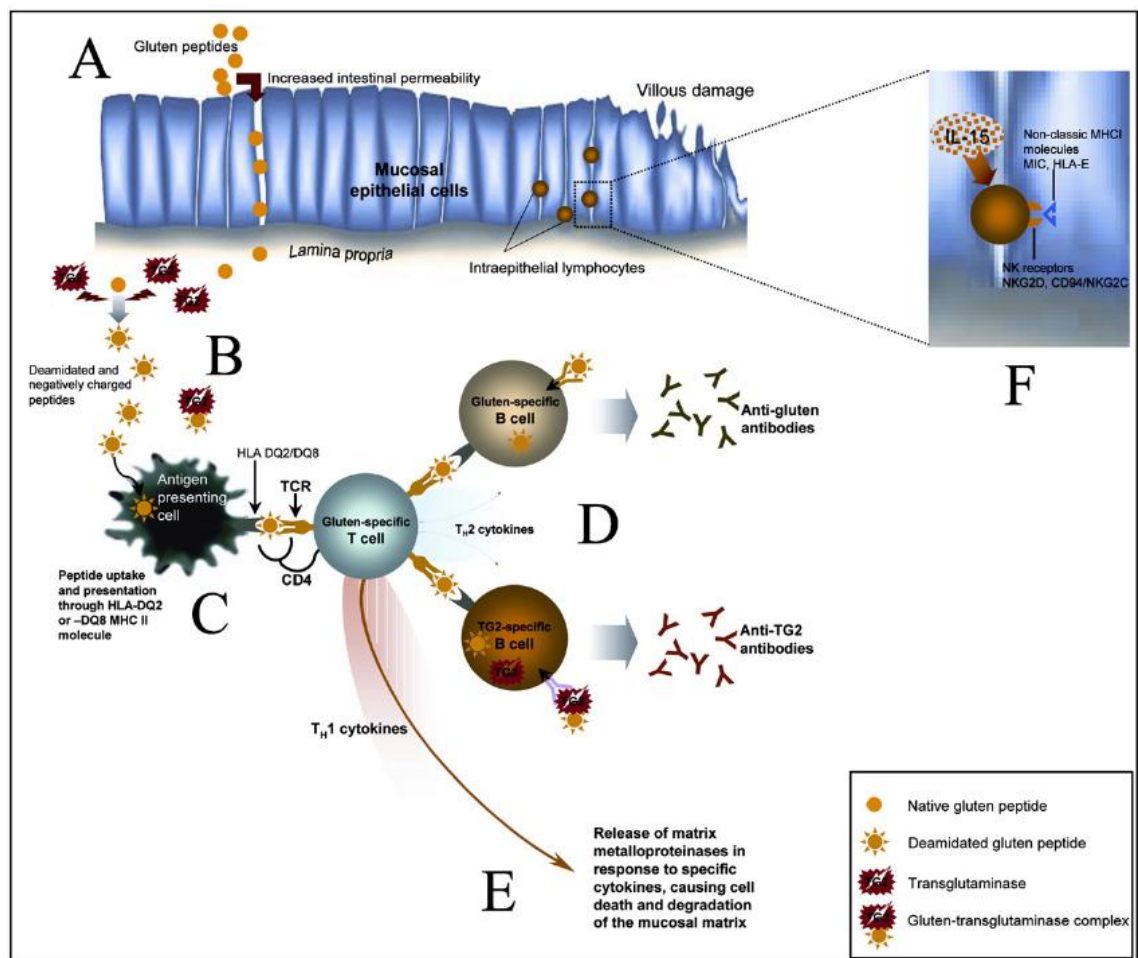
In condizioni fisiologiche normali, le giunzioni serrate (tight junction) dell'epitelio intestinale rappresentano una barriera selettiva per il passaggio di macromolecole come la gliadina. Il suo trasporto è di tipo transcellulare, in cui l'azione litica dei lisosomi sui peptidi gliadinici, li rende più piccoli e di conseguenza non immunogenici.

Nella mucosa intestinale dei pazienti celiaci, invece, il trasporto dei peptidi gliadinici sembra avvenire attraverso una via paracellulare, per cui i peptidi stessi, non venendo a contatto con i lisosomi, passerebbero come tali, mantenendo quindi le loro proprietà immunogeniche (Perry *et al.*, 1999).

Il cambiamento della via di trasporto sembra essere una conseguenza dell'aumento della permeabilità intestinale, causata dall'alterata integrità delle giunzioni serrate (Schulzke JD *et al.*,1998). Alcuni autori suggeriscono, infatti, che le citochine rilasciate nella mucosa possano ridurre i livelli di trascrizione dell'E-caderina, allentando così le giunzioni (Perry *et al.*, 1999).

Un ulteriore studio, ha invece messo in evidenza che la zonulina, proteina che regola la polimerizzazione dell'actina e l'apertura delle giunzioni serrate, interagendo con uno specifico recettore di superficie intestinale, riesca ad alterare la polimerizzazione con conseguente aumento della permeabilità intestinale (Clemente, M. G., *et al.*, 2003).

Nella patogenesi della CD, il meccanismo proposto che sviluppa l'autoimmunità è spiegato in figura 9.



**Fig.9. Meccanismo proposto per la patogenesi della malattia celiaca (Briani *et al.*, 2008).**

Alcuni peptidi del glutine, resistenti alla degradazione proteolitica, sono in grado di attraversare la barriera epiteliale intestinale e raggiungere la lamina propria della mucosa, dove le transglutaminasi (TG2) convertono i residui di glutamina in acido glutammico e li rendono immunogenici. Questi peptidi deamidati, infatti, vengono riconosciuti dalle cellule dendritiche (APC) che esprimono HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e li presentano alle cellule T CD4+, le quali innescano sia una reazione di tipo Th1 che una reazione di tipo Th2.

Le reazioni di tipo Th1, tramite la produzione di specifiche citochine (interleuchina 2, interleuchina 4, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) promuovono il rilascio di metalloproteasi di matrice (MMP) che causano il danneggiamento del tessuto epiteliale e l'apoptosi cellulare.

Le reazioni di tipo Th2, invece, tramite l'attivazione dei linfociti B portano alla produzione di anticorpi di tipo IgA diretti contro la gliadina e la transglutaminasi tissutale. D'altra parte, la risposta ai peptidi del glutine scatena anche la risposta immunitaria innata, con secrezione di IL-15 ed espressione di molecole appartenenti al complesso MHC I (Briani *et al.*, 2008).

### **1.3.3. Immunogenicità della gliadina**

Diversi studi (Wieser 1996, Ciccocioppo *et al.*, 2005), relativi alla attivazione della risposta immunitaria contro il glutine hanno dimostrato che la struttura tridimensionale della gliadina non è indispensabile a tale scopo e hanno spostato l'attenzione sui peptidi della gliadina che, a questo proposito, sono stati distinti in:

1. tossici, in grado di indurre danni tissutali alla mucosa intestinale indipendentemente dall'attivazione dei linfociti T *helper*. Questi esplicano la loro funzione attraverso l'attivazione della risposta immunitaria innata;
2. immunogenici, in grado di stimolare in modo specifico linee cellulari di linfociti T HLA-DQ2/DQ8 e linfociti B e quindi attivano la risposta immunitaria acquisita.

Sottoponendo i linfociti T a test di proliferazione in presenza di frazioni purificate di gliadina, sono stati individuati dei frammenti proteici che contengono gli epitopi riconosciuti dai linfociti; fra questi è bene ricordare il frammento 33-mer corrispondente alla regione 56-88 dell' $\alpha$ -gliadina.

Il frammento 33-mer è generato dalla digestione *in vitro* della gliadina con proteasi gastriche e pancreatiche, è un substrato della tTG e la sua deamidazione sito-specifica potenzia l'attivazione dei linfociti T sensibili.

In generale, confrontando tutti gli epitopi isolati, sono state individuate delle caratteristiche comuni ai peptidi immunogenici:

1. sono localizzati in regioni ricche in prolina; questa caratteristica risulta importante in quanto peptidasi e proteasi di mammifero non riescono a scindere il legame peptidico in posizione N- o C-terminale rispetto ad una prolina.
2. sono substrati della tTG e la deamidazione potenzia il riconoscimento; infatti la risposta contro i peptidi non deamidati è pari al 50% della risposta contro la forma deamidata.
3. sono riconosciuti dai linfociti T HLA-DQ2 e presentati ai linfociti CD4+;
4. si trovano all'interno di peptidi più lunghi e multivalenti; a causa della diminuzione della degradazione del glutine che si osserva nei pazienti celiaci, da questi peptidi multivalenti vengono rilasciati frammenti oligopeptidici, tra cui quelli immunogenici e quelli tossici.

#### **1.3.4. Terapia enzimatica**

Fino ad oggi, non esiste una cura specifica per la celiachia e la reversibilità della patologia è strettamente correlata alla non assunzione da parte del soggetto affetto, di alimenti contenenti glutine o comunque da esso contaminati. Una dieta completamente priva di glutine, infatti, è fondamentale per mantenere sotto controllo i sintomi, ma soprattutto per prevenire lo sviluppo di complicanze (neoplasie) associate a questa malattia. Tutto ciò, però, può avere un impatto negativo sulla qualità della vita dei soggetti celiaci; che oltre ad essere condizionati in maniera rilevante dalla dieta (che ne limita la vita sociale) sono vincolati dal fatto che, in commercio, esistono prodotti non alimentari (farmaci, cosmetici) che espongono involontariamente i celiaci al glutine.

Per tutti questi motivi, alternative terapeutiche sicure ed efficaci per soppiantare la dieta "gluten-free" sono, a oggi, oggetto di molti studi.

Tra questi si ricorda la:

- Somministrazione orale di endopeptidasi batteriche:

Dopo ingestione, il glutine raggiunge l'intestino tenue, ma a causa dell'elevato contenuto in prolina, questo non riesce ad essere degradato dagli enzimi del tratto gastrointestinale.

Prolilendopeptidasi batteriche di *F. meningosepticum*, *S. capsulata*, *M. xanthus*, sono capaci di degradare i peptidi del glutine *in vitro*. Tuttavia, questi enzimi sono inattivati irreversibilmente dal pH acido dello stomaco, fallendo quindi nella degradazione, prima ancora che arrivino nell'intestino e quindi sono difficilmente utilizzabili a scopo terapeutico. Tuttavia, Stepniak *et al.* hanno identificato una nuova endoprotease da *Aspergillus niger*. Infatti, questa proteasi è in grado di degradare efficientemente peptidi del glutine anche a pH acido, è resistente alla degradazione della pepsina dello stomaco ed è anche disponibile su scala industriale (Stepniak *et al.*, 2006).

- Pretrattamento del glutine con peptidasi batteriche:

Un approccio simile consiste nell'utilizzare ceppi di lattobacilli, produttori di prolilendopeptidasi, nei normali processi di lievitazione del pane in modo che questi enzimi digeriscano il glutine durante la panificazione. Di Cagno *et al.*, per esempio, hanno selezionato quattro ceppi di lattobacilli (*L. alimentarius* 15M, *L. brevis* 14G, *L. sanfrancescis* 7A e *L. hilgaardi* 51B) con la capacità di idrolizzare albumina, globulina e le frazioni di gliadina. Per tale ragione, questo gruppo di ricerca ha indagato sulla possibilità di ridurre la tossicità del glutine grazie alla produzione di impasti con lattobacilli selezionati (Di Cagno *et al.*, 2004).

Più recentemente, Rizzello *et al.* hanno dimostrato che lattobacilli selezionati insieme a proteasi fungine sono capaci di migliorare la panificazione, rendendo ancora più tollerabili gli impasti per i soggetti celiaci (Rizzello *et al.*, 2007).

## **2. Scopo della ricerca**

---

Oggi la celiachia è riconosciuta come malattia sociale; infatti, con la legge n. 123 del 4 luglio 2005, lo Stato ha previsto una serie di interventi per favorire il normale inserimento dei soggetti affetti da celiachia nella vita sociale. Tuttavia, nonostante l'indiscutibile miglioramento della qualità di vita, legato alla maggiore consapevolezza sociale della malattia celiaca e ai successi in campo normativo-istituzionale, allo stato attuale l'unica terapia del tutto sicura ed efficace è una dieta che esclude completamente il glutine. Questo è il motivo per cui, nel campo della ricerca scientifica, la sfida è tutta incentrata sulla scoperta di una terapia alternativa alla dieta priva di glutine.

Come precedentemente descritto, nei soggetti affetti da celiachia, i peptidi del glutine non possono essere digeriti dagli enzimi proteolitici presenti nel lume intestinale perché hanno un elevato contenuto di residui di prolina interni.

Molte ricerche, infatti, sono focalizzate a promuovere la digestione dei frammenti immunogenicamente attivi prima che essi arrivino nell'intestino, per impedire l'attivazione dei linfociti e la cascata di reazioni infiammatorie. A tal fine, gli enzimi batterici ad attività prolilendopeptidasica risulterebbero dei buoni candidati terapeutici, grazie alla loro capacità di scindere i residui di prolina presenti nel glutine.

Sulla base di tali premesse, considerando che le attuali conoscenze sugli enzimi, ad attività prolilendopeptidasica, isolati dai batteri (*F.meningosepticum*, *S. capsulata*, *M. xanthus*) (Yoshimoto T. *et al.*, 1991, Kabashima T. *et al.*, 1998, Shan L.U. *et al.*, 2004), mettono in evidenza la loro abilità a degradare le proteine del glutine, il punto di partenza del mio progetto di dottorato è stato quello di identificare nuove possibili prolilendopeptidasi in altri microrganismi. In particolare, poiché nulla si conosce circa la funzione delle prolilendopeptidasi negli actinomiceti, nel nostro gruppo di ricerca, presso la sezione di "Biologia Cellulare" del Dipartimento di Scienze e Tecnologie molecolari e biomolecolari (STEMBIO) dell'Università degli Studi di Palermo, è stato intrapreso uno studio volto a identificare enzimi con putativa attività prolilendopeptidasica in *Amycolatopsis balhimycina* e *Streptomyces coelicolor* A3(2), entrambi batteri appartenenti all'ordine degli Actinomycetales. Per questi batteri, infatti, è presente, in letteratura, un solo studio inerente alla purificazione e



caratterizzazione di una tripeptidil- e tetrapeptidil-peptidasi prolina specifica da *Streptomyces mobaraensis* (Umezawa Y. *et al.*, 2004).

Dopo avere avuto la certezza che i due ceppi erano in grado di crescere e utilizzare il glutine come fonte di proteine e di mostrare attività enzimatica nei confronti del substrato Z-Gly-Pro-pNA, già utilizzato in altri studi, sono stati fatti degli studi *in silico*. Analisi bioinformatiche, infatti, hanno suggerito che in questi batteri, il gene *PEP-Amy* di *A. baohimycina* e due geni, *SCO3610* e *SCO2761*, di *S. coelicolor* potevano codificare per proteine con attività peptidasica prolina specifica.

Sono state fatte, quindi, delle analisi sulla cinetica di espressione dei geni mediante qRT-PCR, per verificare se questa era influenzata da differenti condizioni di crescita, soprattutto in presenza di glutine.

I singoli geni sono stati, poi, clonati nel vettore di espressione pRSET-B al fine di ottenere proteine ricombinanti con una coda N-terminale di sei istidine necessaria per la purificazione. Le proteine purificate sono state poi sottoposte a saggi enzimatici.

# **3. Procedure sperimentali**

---

Questo capitolo è dedicato ai materiali e ai metodi utilizzati durante questa ricerca.

<b>Abbreviazioni:</b>	
<b>Bp</b>	paia di basi
<b>DMSO</b>	Dimetilsolfossido
<b>dNTP</b>	deossiribonucleotide trifosfato
<b>EDTA</b>	acido etilen-diammino-tetracetico
<b>IPTG</b>	isopropil-tio- $\beta$ -D-galattoside
<b>Kb</b>	kilo basi
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>MCS</b>	sito di clonaggio multiplo
<b>NTA</b>	acido nitrilo-triacetico
<b>OD</b>	densità ottica
<b>PCR</b>	reazione a catena della polimerasi
<b>RNA</b>	acido ribonucleico
<b>RPM</b>	rotazioni per minuto
<b>SDS-PAGE</b>	Elettroforesi su gel di poliacrilammide sodio-dodecil-solfato
<b>Sol</b>	Soluzione
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA
<b>Taq-polymerase</b>	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerasi
<b>U</b>	Unità

## 3.1 Materiali

---

### 3.1.1. Ceppi batterici utilizzati:

<b><i>E. coli</i> DH10B</b>
<b><i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS</b>
<b><i>E. coli</i> BL21 AI System</b>
<b><i>S. coelicolor</i> M145</b>
<b><i>A. balhimycina</i> DSM5908</b>
<b><i>F. capsulatum</i></b>

### 3.1.2. Terreni di coltura

#### LB

Bacto Triptone	5 g
Estratto di lievito	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O distillata fino a 1 litro.	

#### LB Agar

Bacto Agar (Difco)	15g
Bacto Triptone	5 g
Estratto di lievito	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O distillata fino a 1 litro.	

#### JM

Saccarosio	100 g
Tryptone soya broth	30 g
Estratto di lievito	10 g
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	10 g
H <sub>2</sub> O distillata fino a 1 litro.	

**R2YED** (Hopwood *et al.*, 2000)

Saccarosio	103 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	10,12 g
Glucosio	10 g
Casamminoacidi	0,1 g
Estratto di lievito (Difco)	5 g
H <sub>2</sub> O distillata fino ad 1 litro.	

Al momento dell'uso sciogliere il terreno e in condizione di sterilità aggiungere:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.5%)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (3.68%)	8 ml
L-proline (20%)	1.5 ml
TES buffer (5.73%, pH7.2)	10 ml
Soluzione di elementi in tracce	0.2 ml
NaOH (1N)	0.5 ml

Soluzione di elementi in tracce (l<sup>-1</sup>):

ZnCl <sub>2</sub>	40 mg
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	200 mg
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	10 mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10 H <sub>2</sub> O	10 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	10 mg

**MG medium**

Maltosio	50 g
MOPS	21 g
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,01 g
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,001 g
NaCl	0,001 g
Glutammato (0,6M)	100 ml
Minerali in tracce dell'R2YED	4,5 ml
Tampone PO <sub>4</sub> pH 6,5 (0,1 M)**	150 ml

Portare a pH 6,5 con NaOH.

Sterilizzare in autoclave a 121°C e 1 atm per 20 minuti.

\*\*Tampone PO<sub>4</sub> pH 6,5 (0,1 M):

Sol A: 10,88g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Portare a 400 ml con H<sub>2</sub>O distillata

Sol B: 13,94g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Portare a 400 ml con H<sub>2</sub>O distillata

Aggiungere 137 ml dalla soluzione A a 63 ml della soluzione B; portare il pH a 6,5 con NaOH e portare il volume a 400 ml con H<sub>2</sub>O distillata.

### **Nutrient Broth**

Difco nutrient broth 8 g

Agar 20 g

H<sub>2</sub>O distillata fino ad 1 litro.

### **Minimal medium (MM) (Hopwood, 1960)**

L-asparagina 0.5g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0. g

MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 0,2 g

FeSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 0,01 g

Glucosio 10g

Portare a pH 7-7.2 (senza glucosio) e H<sub>2</sub>O distillata fino a 1000ml.

### **Minimal medium (MM) (Hopwood, 1960) senza glucosio**

### **Minimal medium (MM) (Hopwood, 1960) senza glucosio e on glutine 1%**

### **Minimal medium (MM) (Hopwood, 1960) con glucosio e glutine 1%**

### **3.1.3. Antibiotici**

Cloramfenicolo (25µg/ml) SIGMA-ALDRICH

Ampicillina (100µg/ml) SIGMA-ALDRICH

### 3.1.4. Molecole

#### **X-Gal**

Sciogliere 20 mg di X-Gal (bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside) in 1 ml di Dimetilformamide e filtrare. Conservare a -20°C in tubi sterili.

#### **IPTG**

Sciogliere 2 gr IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) in 20 ml di acqua distillata e filtrare. Conservare a -20°C in tubi sterili.

#### **Z-Gly-Pro-pNA**

Per preparare una soluzione 5mM di Z-Gly-Pro-pNA (MW= 426.43), bisogna sciogliere 21,3 mg di questo substrato in 8 ml di diossano al 40% in un bagno caldo a 60°C, dopo si abbassa la temperatura a 25°C e si raggiunge un volume finale di diossano di 10 ml.

### 3.1.5. Enzimi

#### Enzimi di restrizione:

*BamHI* Invitrogen

*HindIII* Invitrogen

*SacI* Invitrogen

#### Altri enzimi:

Fosfatasi alcalina Roche

*Taq*-polymerase High-Fidelity Invitrogen

RT/Platinum<sup>®</sup> *Taq* Invitrogen

Multiscribe RT Enzyme (Applied Biosystem)

T4-ligase Invitrogen

Dnase RNasi free Roche

### 3.1.6. Primers (5'--- 3')

Overespressione dei geni in pRSET-B	
POP3610FOR	AAAGGATCCTATGACTGAGAGCAACGGGTT
POP3610REV	AAAAAGCTTCTACGGCTTCGGGAGGTTTC
F2_AMY_PEP	GAGCTCGCAGTCAGCCAAGCAATATC
R_AMY_PEP	AAGCTTGACGCGCTTCACGGACTT
2761_FOR	AAAGGATCCTATGCGCAAGGCGCTCAGATG
2761_REV	AAAAAGCTTCTACGGGCGCAGCGCCGGCT

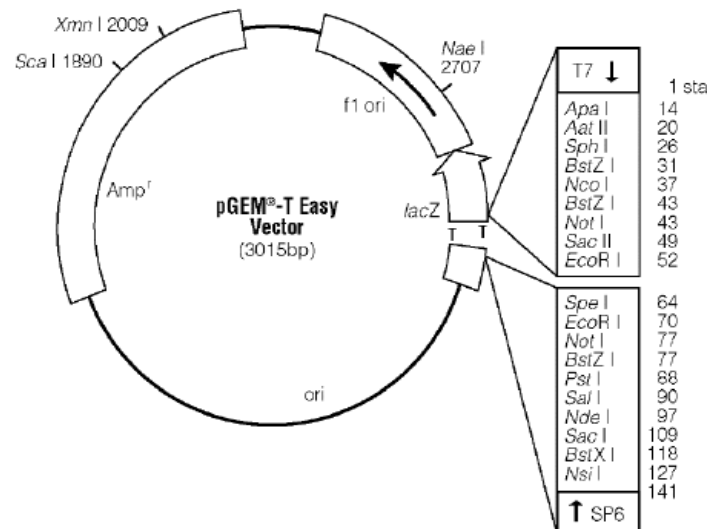
qRT-PCR	
hrdB-S FOR	CGCGAGCCCATCTCGCTG
hrdB-S REV	CGTCGAGGGTCTTCGGCTG
RT-3610For	GGCAGCGTGGAGTACCTGTG
RT-3610Rev	GGTACGCGGTGACGTAGTCG
2761RT_FOR	CTGGCGCTCGTGGTGCTCATA
2761RT_REV	TGCTGGAACGTGCCCTTGGA
hrdB-A FOR	CCTGGTGGAACAGGTGAACA
hrdB-A REV	CCTCGGAGTCCTCGATGAAG
PEP-RT-For	GGCCTCTCCGCACTCGAATT
PEP-RT-Rev	TCGCCGGGTAGGTCCAGCTC

### 3.1.7. Plasmidi

#### 3.1.7.1. pGEM-T Easy (Promega):

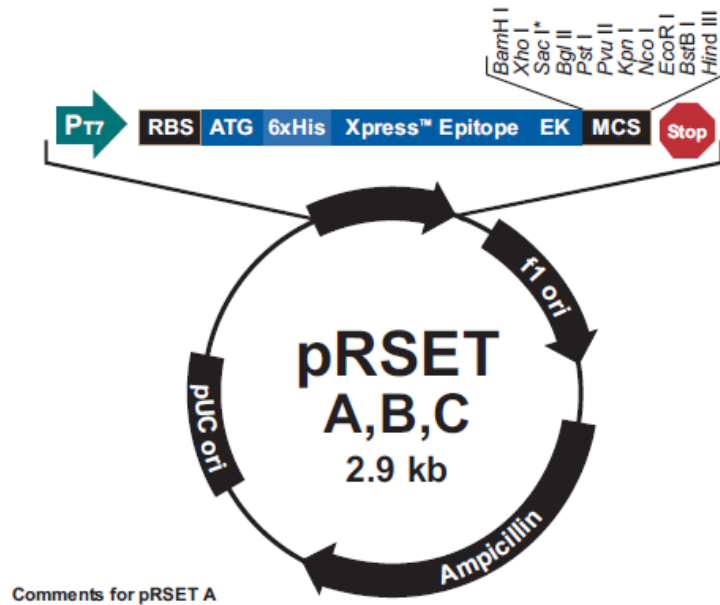
E' un vettore che presenta alle estremità 3' terminali due timidine che permettono la ligasi dei prodotti di PCR. Il sito di multiclonaggio, affiancato ai promotori T7 ed SP6, è inserito nell' $\alpha$ -peptide della  $\beta$ -galattosidasi permettendo, in caso di inserzione, lo screening bianco/blu per  $\alpha$ -complementazione. Conferisce resistenza all'ampicillina in *E. coli*.





### 3.1.7.2. pRSET-B (Invitrogen):

Derivante dalla famiglia di vettori d'espressione pUC, è stato messo a punto per l'overespressione di proteine in *E. coli*. Alti livelli di espressione sono resi possibili grazie alla presenza del promotore T7. I frammenti di DNA sono clonati a valle e "in frame" con una sequenza codificante per un peptide di fusione N-terminale; la sequenza include un codone ATG di inizio della traduzione e una coda di poli-istidine, che consente una rapida purificazione della proteina ricombinante per cromatografia di affinità con resine coniugate al nichel. Conferisce resistenza all'ampicillina in *E. coli*.



### 3.1.8. Soluzioni

#### TAE 50X

Tris base	242 g
Acido acetico glaciale	57,1 ml
EDTA 0,5M pH 8	100 ml

Portare a un volume finale di 1 litro.

#### Per l'SDS-PAGE:

##### Tampone di scorrimento

Tris	3 g
SDS 10%	10 ml
Glicina	14,4 g

Portare a un volume finale di 1 litro

##### Colorante Blue di Comassie

Coomassie	0,25 g
Metanolo	45 ml
Acido acetico	10 ml
H <sub>2</sub> O	45 ml

##### Decolorante gel di poliacrilammide

Metanolo 225 ml

Acido acetico 50 ml

H<sub>2</sub>O distillata fino a 1 litro.

**Per il western blot:**

**TBS**

Trizma base 4.84 g

NaCl 16 g

Portare a pH 7,5 e poi ad un volume finale di un litro con H<sub>2</sub>O distillata.

**TBST**

TBS 2000 ml

Tween 20 2 ml

**Blocking Buffer**

TBST 30 ml

Latte in polvere 1.5 g

**Transfer Buffer 10X**

Glicina 5 g

Trizma base 119 g

SDS 10% 74 ml

H<sub>2</sub>O Fino a 2000 ml

Portare a pH 8,3.

**Per l'estrazione dell'RNA:**

**P Buffer**

Saccarosio 103 g

K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 g

MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 2,02 g

Elementi in tracce 2 ml

H<sub>2</sub>O distillata fino a 800 ml.

Dopo avere autoclavato aggiungere per ogni 80 ml di terreno:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5%) 1 ml

CaCl<sub>2</sub>\*H<sub>2</sub>O (3,68%) 10 ml

TES buffer (5,73% pH7.2) 10 ml



## 3.2. Metodi

---

### 3.2.1. Colture cellulari

#### 3.2.1. *Escherichia coli*

I ceppi di *E. coli* sono comunemente coltivati su terreno liquido o agarizzato LB con l'antibiotico di selezione aggiunti direttamente nella bottiglia dopo la sterilizzazione del terreno o sono stati spatolati nella capsula Petri prima della semina. L'incubazione deve avvenire a 37°C per una notte.

#### 3.2.2. *Streptomyces coelicolor*

Il ceppo è in grado di crescere su terreno liquido o agarizzato a 30°C.

##### Preparazione di una sospensione di spore

La raccolta delle spore è eseguita facendo riferimento al protocollo standard da Kieser *et al.* (2000) con qualche modificazione.

Versare su piastre di MS agar, nella quale sono cresciute a confluenza colonie di *S. coelicolor*, 3-6ml di acqua sterile e raschiare la superficie. Filtrare ciò che è stato recuperato con una siringa riempita di cotone idrofilo sterile e centrifugare 10min a 3000rpm. Eliminare il supernatante e risospendere il pellet (spore) in un uguale volume di glicerolo 40%. Conservare a -80°C.

##### Crescita di una sospensione di spore su cellophane

Al fine di estrarre l'RNA da terreno contenente glutine (pastoso e difficilmente manipolabile in coltura liquida) il ceppo è stato piastrato su un disco di cellophane posizionato sopra la capsula Petri che consente la diffusione di nutrienti ed evita la penetrazione su agar del micelio vegetativo (Kieser & al. 2000).

#### 3.2.3. *Amycolatopsis balhimycina* DSM5908

##### Preparazione di una sospensione di cellule

Prelevare da terreno agarizzato, ove è stato seminato il batterio, le colonie mediante un'ansa sterile e porre ciò che è stato prelevato in un criotubo contenente 500µl di glicerolo 40%. Risospendere e conservare a -80°C.

In alternativa, prelevare 3ml dal terreno di coltura liquida ove si è accresciuto il batterio e centrifugare 15min a 4000rpm. Eliminare il surnatante ed aggiungere al pellet batterico un volume pari di glicerolo 40%. Conservare a -80°C.

#### Misura del peso secco per costruire una curva di crescita

I due ceppi, *A. balhimycina* e *S. coelicolor*, dopo un preinoculo di 40h in terreno JM, sono inoculati in un dato terreno di coltura, quale può essere un terreno minimo o uno ricco. La crescita è monitorata attraverso misurazione del peso secco ottenuto da prelievi di 1ml. Il valore del peso secco di ciascun punto della curva è calcolato come la media del peso secco di tre prelievi differenti allo stesso tempo (l'errore è dato dalla deviazione standard). Ogni prelievo è poi centrifugato a 14.000rpm per 20 minuti e il pellet è conservato a 65°C per tutta la notte.

#### **3.2.4. *Flavobacterium capsulatum***

E' un batterio gram-negativo, aerobio, a forma di bastoncino ampiamente distribuito nel suolo e nell'acqua. Cresce su Nutrient broth a 25°C.

### **3.2.2. Manipolazione degli acidi nucleici**

#### **3.2.2.1. Estrazione di DNA cromosomale**

- Inoculare 0.1 ml di una sospensione di cellule, in 25-30 ml di YEME medium contenente 0.5% di glicina (o JM medium) ed incubare a 30°C per 40 ore in uno shaker orbitale a 200 r.p.m.
- Raccogliere il micelio mediante centrifugazione per 10 minuti a 3000 r.p.m., a temperatura ambiente, e risospenderlo in 5 ml di SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20mM Tris, pH 7.5).
- Aggiungere 100 µl di liozima (50 mg/ml) e incubare a 37°C per 30-60 minuti.
- Aggiungere una quantità di 10% SDS pari ad 1/10 del volume e 140 µl di proteinasi K (20 mg/ml).
- Incubare a 55°C per 2 ore.

- Aggiungere 1/3 del volume di 5 M NaCl ed 1 volume di fenolo-cloroformio; incubare a temperatura ambiente per trenta minuti capovolgendo frequentemente il tubo.
- Centrifugare a 4500 g per 15 minuti e trasferire la fase acquosa in un nuovo tubo utilizzando una pipetta Pasteur con la punta tagliata, al fine di ridurre gli stress meccanici a cui potrebbe essere sottoposto il DNA. Precipitare il DNA mediante l'aggiunta di un volume di isopropanolo.
- Rimuovere il DNA precipitato mediante la punta di una pipetta Pasteur (tecnica dello "spooling") e trasferirlo in un eppendorf.
- Lavare il DNA con 70% etanolo, asciugare facendo evaporare l'etanolo presente, quindi, aggiungere un volume di 1 ml di H<sub>2</sub>O distillata (o TE).

### **3.2.2.2. Trattamento con fenolo-cloroformio e precipitazione**

Questo protocollo consente di separare gli acidi nucleici e le proteine presenti all'interno di una stessa soluzione; si utilizza generalmente per la purificazione del DNA. Il fenolo causa la denaturazione delle proteine mentre il trattamento col cloroformio permette di eliminare ogni traccia di fenolo che, essendo in parte solubile in acqua, potrebbe portare alla denaturazione degli enzimi utilizzati in esperimenti successivi.

#### Step della purificazione:

- Portare il volume del campione a 500 µl
- Aggiungere un volume di Fenolo-Cloroformio neutro e vortexare vigorosamente finchè la soluzione non diventi lattiginosa
- Centrifugare a 4°C a 14000 rpm per 5 minuti e recuperare la fase acquosa dispensandola in un nuovo tubo
- Recuperare la fase acquosa e porla in un nuovo tubo
- Aggiungere un volume di Cloroformio e vortexare vigorosamente finchè la soluzione non diventi lattiginosa
- Centrifugare a 4°C a 14000 rpm per 5 minuti e recuperare la fase acquosa dispensandola in un nuovo tubo

#### Step di precipitazione:

- Aggiungere due volumi di etanolo 100%, 1/10 del volume di sodio acetato 3M pH 5,7 e miscelare per inversione del tubo
- Porre il campione a -80°C per un'ora od overnight a -20°C
- Centrifugare a 4°C a 14000 rpm per 30 minuti e rimuovere il surnatante
- Aggiungere 500 µl di etanolo 70% e centrifugare per 15 minuti a 14000 rpm, rimuovere il surnatante
- Seccare completamente il pellet in speed-vacuum per 30-45 minuti
- Risospendere il DNA in acqua. Nel caso di RNA utilizzare acqua commerciale od autoclavata 2 volte (RNasi-free) addizionata a 2 µl di RNasiGuard

### 3.2.2.3. Quantizzazione degli acidi nucleici

La quantizzazione del DNA (e dell'RNA) è stata fatta mediante correlazione dell'intensità di fluorescenza delle bande del campione separate su gel di elettroforesi contenente etidio bromuro, paragonato ad un Marker (O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix commercializzato Fermentas) caricato nello stesso gel, contenente DNA di lunghezza e concentrazione nota. Un altro metodo prevede l'utilizzo del Nanodrop che è un particolare tipo di spettrofotometro adatto alla misurazione di piccole quantità di campione; 1µl di ogni campione è stato letto al NanoDrop. Questo strumento misura l'assorbanza del campione ad una determinata lunghezza d'onda (260nm per gli acidi nucleici) e ne calcola la concentrazione secondo la legge di Lambert-Beer, permettendo inoltre di valutarne la purezza calcolando il rapporto tra l'assorbanza a 260nm e quella a 280nm.

### 3.2.2.4. Amplificazione di un frammento di DNA mediante PCR

La PCR ricostruisce in vitro uno specifico passaggio della riproduzione cellulare: la sintesi di un segmento di DNA "completo" (a doppia elica) a partire da un filamento a singola elica. Questo processo viene svolto in natura da enzimi chiamati DNA polimerasi, che sono in grado di sintetizzare progressivamente un nuovo filamento di DNA nelle seguenti condizioni: devono essere disponibili i



nucleotidi da polimerizzare, sotto forma di desossiribonucleotidi trifosfati (dNTP); il DNA deve essere *denaturato*, ovvero le due eliche che compongono i filamenti devono essere già separate; il segmento da sintetizzare può essere soltanto *allungato*, ovvero non è possibile sintetizzare un nuovo filamento a partire da zero; devono inoltre essere rispettate opportune condizioni di temperatura, pH e concentrazione salina.

Le reazioni di amplificazione mediante PCR sono effettuate in un volume di reazione totale di 50µl, nelle seguenti condizioni:

- 1X Buffer di PCR
- MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM;
- 50 µM dNTP;
- 2 µM oligonucleotide forward;
- 2 µM oligonucleotide reverse;
- 20 ng- 100ng di DNA stampo;
- 0,5 U di Taq polimerasi.

La temperatura e la durata delle fasi dei cicli sono state stabilite in base alla lunghezza dei frammenti da amplificare ed alla composizione in base degli oligonucleotidi. Le condizioni utilizzate per la PCR sono state:

- Denaturazione iniziale: 95°C, 5 min
- Denaturazione: 95°C, 1 min
- Annealing: 60°C, 1 min
- Estensione: 72°C, 2 min
- Estensione finale: 72°C, 10 min

Dallo step 2 allo step 4 per 30 cicli.

### **3.2.2.5. Purificazione di un prodotto di PCR**

La purificazione dei prodotti di PCR si effettua utilizzando un kit commerciale di estrazione come il Nucleo Spin Extract II della Macherey Nagel®:

- Mixare 1 volume di campione con 2 volumi di Buffer NT.
- Porre la colonna di NucleoSpin® Extract II in un tubo da 2 ml e caricare il campione.

- Centrifugare per un 1 minuto a 11,000 x g. Eliminare il liquido che passa attraverso il filtro di resina e porre la colonna in un nuovo tubo.
- Aggiungere 700  $\mu$ l di Buffer NT3 nella colonna di NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II. Centrifugare per un minuto a 11,000 x g . Eliminare il liquido che passa attraverso il filtro di resina e porre la colonna in un nuovo tubo.
- Centrifugare per 2 minuti a 11,000 x g per rimuovere completamente il Buffer NT3.
- Porre la colonna di NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II in un nuovo tubo da 1.5 ml. Aggiungere 15-50  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O e incubare a temperatura ambiente(18-25° C) per 1 minuto. Centrifugare per 1 minuto a 11,000 x g. Conservare il DNA purificato a -20° C.

### 3.2.2.6. Elettroforesi su gel di agarosio

Per controllare la qualità e/o la quantità del DNA estratto o l'avvenuta reazione enzimatica (amplificazione, digestione con enzimi di restrizione), un certo volume di DNA viene caricato in elettroforesi su gel di agarosio di opportuna concentrazione in TAE 1X insieme ad uno standard di peso molecolare come riferimento. Il DNA viene caricato sul gel insieme ad una soluzione di caricamento, contenente glicerolo e il blu di bromo fenolo. Il glicerolo facilita il caricamento del campione nel pozzetto poiché ne aumenta la densità, mentre il colorante consente di seguire la migrazione del DNA caricato, durante il processo di elettroforesi, essendo molecole cariche negativamente che migrano nella stessa direzione del DNA. Inoltre, al gel è aggiunto l'etidio bromuro (agente intercalante del DNA) che migra in direzione opposta a quella del DNA, legandosi ad esso. Questa sostanza, essendo fluorescente, è in grado di assorbire la radiazione ultravioletta emettendo fluorescenza, ed è quindi possibile visualizzare gli acidi nucleici esponendo il gel ai raggi UV. In genere, la corsa viene condotta nello stesso tampone ad un voltaggio non superiore ai 7.5 V/cm.

### 3.2.2.7. Estrazione del DNA plasmidico

#### **Metodo della lisi alcalina**

- Trasferire 1.5 ml di una coltura cresciuta over night in un tubo eppendorf e centrifugare per dieci minuti a 12000 rpm
- Decantare il supernatante e risospendere il pellet in 100 µl di Sol I lasciando a temperatura ambiente per cinque minuti
- Aggiungere 200 µl di Sol II preparata al momento, chiudere e agitare dolcemente capovolgendo alcune volte i tubi; incubare in ghiaccio per cinque minuti
- Aggiungere 150 µl di Sol III, chiudere e agitare dolcemente invertendo i tubi: incubare in ghiaccio per cinque minuti
- Centrifugare per dieci minuti a 12000 rpm
- Trasferire il supernatante in un nuovo tubo eppendorf e aggiungere un volume di etanolo 100%
- Centrifugare per dieci minuti a 12000 rpm e rimuovere il supernatante e aggiungere un volume di etanolo al 70%
- Centrifugare per dieci minuti a 12000 rpm
- Decantare il supernatante e successivamente asciugare completamente il pellet in stufa a 65°C o in speed vacuum per 20 minuti.
- Risospendere il pellet in H<sub>2</sub>O+RNasi (10 µg/ml).

#### **Metodo via colonne della SIGMA-ALDRICH®**

Il kit della SIGMA-ALDRICH®, GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, viene utilizzato per l'estrazione di DNA plasmidico privo di contaminazioni da DNA genomico, RNA e di sali. Il DNA recuperato, dopo eluizione dalla colonna, è pronto per l'impiego immediato in varie applicazioni quali sequenziamento, trasformazione, trascrizione, clonaggio, restrizione enzimatica e PCR. I vari step dell'estrazione sono riportati nel manuale d'uso del kit.

#### **Maxiprep del DNA plasmidico di *E. coli***

Le maxipreparazioni di DNA plasmidico sono state realizzate seguendo le indicazioni riportate nel QUIAGEN Plasmid Handbook 11/2005.

Questa tecnica si basa sulla lisi alcalina del pellet batterico e sulla capacità che ha la resina anionica a scambio ionico, presente nelle colonne di estrazione, di legare

il DNA plasmidico da purificare in appropriate condizioni di pH e bassa concentrazione di sali. Rna, proteine e molecole a basso peso molecolare, vengono eluite attraverso una soluzione di lavaggio contenente una concentrazione salina media (*medium salt-wash*), mentre il DNA plasmidico viene eluito attraverso una soluzione ad alta concentrazione salina (*high-salt buffer*). Il primo punto del protocollo *QIAGEN* prevede la preparazione di un preinoculo (5ml di LB + 50 µg/ml di antibiotico) del ceppo batterico contenente il DNA plasmidico da estrarre, messo a crescere per 8h a 37°C in un agitatore orbitale a ~200 rpm. Successivamente si effettua l'inoculo per la maxiprep che consiste in una coltura batterica in 200ml di terreno liquido. L'inoculo viene messo a crescere a 37°C, overnight. La coltura viene in seguito centrifugata a 6000 g per 15 minuti a 4°C, per ottenere il pellet batterico. Questo viene risospeso mediante l'utilizzo del primo buffer di lisi (*Buffer P1*) che contiene RNasi A. Successivamente bisogna aggiungere il secondo buffer di lisi (*Buffer P2*), mescolare il tutto per inversione 4-6 volte e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente. Se tutto è stato eseguito correttamente, il lisato dovrebbe apparire viscoso. La precipitazione di DNA genomico, proteine e residui cellulari è causata dall'incubazione in ghiaccio per 5 minuti del campione in presenza del *Buffer P3*. A precipitazione avvenuta, la centrifugazione consente di sedimentare e separare il lisato cellulare dal supernatante che contiene il DNA plasmidico. La preparazione della resina a scambio anionico contenuta nelle colonne di estrazione avviene attraverso l'eluizione per gravità del *Buffer QBT*. Successivamente viene aggiunto il supernatante recuperato, in modo tale che il DNA plasmidico si leghi alla resina a scambio ionico (bisogna prestare attenzione che questa non si essicchi). L'eluizione del *Buffer QC*, a base di isopropanolo, attraverso la resina ne permette il lavaggio consentendo la purificazione del DNA plasmidico (il trattamento viene eseguito due volte). In seguito si aggiunge il *Buffer QF* che media l'eluizione del DNA plasmidico purificato in un tubo di vetro chiamato "*corex*". Il campione presente all'interno del "*corex*" viene centrifugato a 10000g per 10 minuti, così da precipitare il DNA plasmidico estratto; questo viene quindi estratto successivamente con 5 ml di etanolo al 70%.

### 3.2.2.8. Digestione con enzimi di restrizione

La digestione del DNA plasmidico con gli enzimi di restrizione è stata effettuata seguendo le indicazioni della ditta fornitrice. I volumi sono stati scelti in funzione della concentrazione del DNA e l'incubazione è avvenuta a 37°C per 1-2h.

### 3.2.2.9. Defosforilazione di un frammento di DNA

La reazione di ligation tra frammenti di DNA diversi, richiede necessariamente la presenza di gruppi 5'-fosfato all'estremità delle molecole di DNA da ligare. Se il gruppo fosfato viene rimosso da una delle due molecole, le estremità di questa non possono più essere unite insieme. Comunemente estremità di vettori da utilizzare per clonaggi e trasformazioni, vengono defosforilati prima della reazione di ligation, per ridurre enormemente la quantità di vettore che possa andare incontro a ricircolarizzazione (*self-ligation*) senza l'inserimento dell'inserto. La rimozione del 5'-fosfato si ottiene con una reazione enzimatica mediata dalla fosfatasi alcalina. La fosfatasi alcalina utilizzata è la fosfatasi alcalina I (Roche); la reazione è stata condotta seguendo le indicazioni della ditta produttrice.

### 3.2.2.10. Drop dialisi

La drop dialisi permette l'eliminazione di sali e piccole molecole da un campione di DNA in soluzione. Il filtro Millipore, grazie alla presenza di pori sulla superficie, permette per osmosi il passaggio di sali dalla soluzione contenente il DNA verso la soluzione comunicante, consistente in acqua distillata, diminuendo nel campione la concentrazione salina del 90%. I campioni che devono essere utilizzati per reazioni di ligation o trasformazione sono dializzati con un filtro di da 0,025µm (Millipore).

### 3.2.2.11. Reazione di ligase

Frammenti di DNA differenti che abbiano estremità complementari, possono essere ligati attraverso la T4 ligasi, enzima che è in grado di formare un legame fosfodiesterico fra i nucleotidi all'estremità dei frammenti che si sono appaiati.

Per allestire una reazione di ligase è importante considerare:

- **Rapporto inserto/vettore:** per una buona reazione di ligase, la quantità di inserto deve infatti essere tre volte superiore a quella del vettore. Ponendo una quantità eccessiva di vettore, si favorisce la reazione di self-ligation. Il rapporto molare inserto/ vettore può essere però variato a seconda delle necessità.
- **Calcolo dei ng di inserto da utilizzare:**

$$\frac{\text{ng di vettore} * \text{dimensione dell'inserto in Kb}}{\text{dimensione del vettore in Kb}} * \frac{\text{inserto}}{\text{vettore}} = \text{ng di inserto da utilizzare}$$

### 3.2.2.12. Trasformazione di cellule di *E. coli* per elettroporazione

10-50µl di cellule di *E. coli* elettrocompetenti sono state miscelate con 10µl della miscela di ligase fino a un volume di 45µl. La sospensione di cellule è stata quindi trasferita in una cuvetta da 2cm, messa in ghiaccio e poi nell'elettroporatore (capacità di 25µF, voltaggio di 2.5 kV) (EC2) (Biorad). Successivamente i batteri sono stati incubati per un'ora a 37°C in 500µl di LB e poi piastrati su piastre di LB-agar contenenti gli antibiotici di selezione.

### 3.2.2.13. Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto da micelio proveniente da colture liquide utilizzando il kit *Qiagen Rneasy midi kit*. Questo kit permette il recupero di tutte le molecole più lunghe di 200bp, pertanto RNA come 5S e i tRNA sono selettivamente esclusi dall'isolamento. Il protocollo è stato così modificato: i pellet cellulari ottenuti in seguito a centrifugazione (4000 rpm per 15 minuti) sono stati risospesi in P-buffer e lisozima (10 mg/ml). Le successive fasi sono state: separazione e purificazione dell'RNA mediante colonna RNeasy ed eluizione del campione con acqua RNase-free.

### 3.2.2.14. Trattamento con DNAsi I

La reazione è stata condotta nel seguente modo:

- 1µg di RNA

- 1µl di 10X DNAsi I reaction buffer
- 0,5µl di DNAsi (Roche), 1 U/µl

La miscela di reazione è stata portata a volume con H<sub>2</sub>O deionizzata (V<sub>f</sub>= 10µl). Le miscele così preparate sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente.

### 3.2.2.15. RT-PCR

L'RT-PCR è una tecnica che permette di ottenere copie di DNA utilizzando come stampo l'RNA. Questa tecnica si basa sulla retrotrascrizione di un pool di RNA in cDNA mediante l'uso di una trascrittasi inversa a cui seguono le fasi della PCR. L'RT-PCR è stata condotta su RNA totali estratti da *A. balhimycina* e *S. coelicolor* M145. Per ogni reazione sono inclusi i seguenti controlli: un controllo negativo con Taq polimerasi ed RNA come templatò per valutare la completa eliminazione del DNA dal campione, un controllo positivo con Taq polimerasi e DNA genomico e un controllo negativo con Taq polimerasi e acqua. Per le reazioni di RT-PCR è stato utilizzato il sistema *SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq* della Invitrogen. Questo kit consente di realizzare le due reazioni, ossia la sintesi del cDNA e la PCR, in un'unica fase. La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume totale di 20µl con 80ng di RNA totale; la concentrazione finale dei primer utilizzati è stata 0,2 µM. L'assenza di DNA genomico nella preparazione di RNA è stata verificata sostituendo la RT/Platinum® Taq con la Taq DNA polimerasi.

Le condizioni usate nelle reazioni di RT-PCR sono state le seguenti:

- sintesi del cDNA: 50°C per 30 min seguita da 5 min a 95°C;
- amplificazione: da 25 a 30 cicli di denaturazione a 95°C per 1 min;
- annealing per 1 min (temperatura scelta in base alla T<sub>m</sub> della coppia di primers);
- allungamento a 72°C per 1 min;
- allungamento finale a 72°C per 10 min.

### 3.2.2.16. Preparazione dei campioni di cDNA

L'RNA totale estratto, trattato e analizzato, è stato retrotrascritto con l'utilizzo del kit High Capacity archive commercializzato dalla Applied Biosystems. A ciascun campione di RNA (3µg) è stata aggiunta una miscela costituita da:

Buffer 10X	10µl
dNTP 25X	4µl
Random primers (10X)	10µl
Multiscribe RT Enzyme (5U/µl)	5µl
H <sub>2</sub> O Rnase free	fino a 100µl finali.

La mix è incubata in termociclatore per 10 minuti a 25°C e due ore a 37°C.

### 3.2.2.17. qRT-PCR

L'analisi PCR è stata effettuata in triplicato tramite Real Time PCR system 7300 AbiPrism di Applied Biosystem. L'analisi degli amplificati è stata effettuata utilizzando il software SDS 1.2 di Applied Biosystem, mediante il quale ciascun campione viene analizzato rispetto a un campione di riferimento detto calibratore, e ad un controllo interno rappresentato dal gene *hrdB*.

Per ciascun gene da analizzare viene preparata una mix (in triplicato) in un volume finale di 25µl:

12,5µl SYBR® Green mix (AmpliTaq Goldpolymerase, dNTP e buffer di reazione).

200nM primers.

H<sub>2</sub>O Rnase free fino a volume di 25µl.

I cicli di reazione prevedono le seguenti fasi:

1. hot start a 95°C per 10 minuti
2. 40 cicli di denaturazione a 95°C per 15 secondi
3. annealing dei primers e allungamento a 60°C per 1 minuto.

Lo strumento è in grado di rilevare la fluorescenza emessa dal SYBR® Green e di registrare la variazione del segnale, all'interno di ogni campione, durante i cicli di amplificazione. Il SYBR® Green è una molecola capace di legare in maniera stechiometrica il dsDNA e, in queste condizioni, è in grado di emettere



fluorescenza, se viene eccitato da radiazioni elettromagnetiche ad una certa lunghezza d'onda. In questo modo la variazione della fluorescenza ( $\Delta R_n$ ), risulta proporzionale alla quantità di amplificato ottenuto in funzione del numero di cicli. L'output di amplificazione è rappresentato da una curva logaritmica (amplification plot), in cui si segue l'andamento di  $\Delta R_n$ : si tiene conto che all'intensità di fluorescenza registrata in ciascun ciclo, viene sottratto un valore relativo al segnale di fondo (baseline), corrispondente a piccole variazioni di emissione nelle fasi iniziali di amplificazione.

Attraverso il software SDS1.2 di Applied Biosystem, è possibile analizzare ciascun campione di amplificazione, rispetto ad un controllo interno detto "endogeno", in modo che i dati ottenuti siano standardizzati e non dipendenti dalla quantità iniziale del campione.

### **3.2.3. Proteomica**

#### **3.2.3.1. Overespressione di una proteina con l'His-tag in *E. coli***

Una volta eseguita la trasformazione batterica del ceppo, si procede con le seguenti fasi:

##### Preparazione dei preinoculi:

Picchettare da una piastra una colonia in un tubo da inoculo contenente 10ml di LB con 10 $\mu$ l di ampicillina (100 mg/ml), la cui resistenza è portata dal plasmide di overespressione pRSET-B e 10 $\mu$ l di cloramfenicolo (25 mg/ml) (nel caso delle BL21 DE3 pLysS). Lasciare crescere a 37°C per una notte.

##### Preparazione degli inoculi:

2ml di coltura proveniente dal preinoculo viene aggiunto a 250ml di LB contenente ampicillina e cloramfenicolo. La coltura viene messa a crescere a 37°C fino al raggiungimento di un  $OD_{600} \cong 0,4-0,6$ .

##### Induzione con IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside) o con arabinosio:

Quando la coltura ha raggiunto l'OD desiderata, si procede con l'espressione della proteina di fusione mediante aggiunta dell'attivatore della trascrizione IPTG (100mM) alla coltura, concentrato 1mM (BL21 DE3 pLys) o con arabinosio 0.2% (BL21 AI System). La coltura è incubata in presenza dell'induttore per 3 ore a

30°C. Inoltre si prepara un campione controllo, consistente nella medesima coltura che però non viene indotta, al fine di comparare i livelli dell'espressione basale con quelli indotti. Parallelamente, le stesse condizioni di crescita sono adoperate per le cellule contenenti il vettore di overespressione privo di inserto. Al termine dell'induzione, sia i campioni indotti che i non indotti sono centrifugati a 4000rpm per 20 minuti, il surnatante è rimosso e il pellet batterico conservato a -20°C

### **3.2.3.2. Estrazione di proteine totali**

Il protocollo adoperato per l'estrazione di proteine sintetizzate dai batteri indotti e non indotti prevede la risospensione del pellet batterico con 8ml di Native Purification Buffer (Imidazolo 3M pH 6.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 250 Mm, NaCl 2,5 M) e l'aggiunta di 8mg di lisozima.

Successivamente i campioni sono lisati tramite il sonicatore VibraCell con sei impulsi di 10 secondi intervallati da altrettanti secondi in ghiaccio. Il lisato quindi è centrifugato per 20min a 4000rpm in modo da separare la frazione solubile da quella insolubile: entrambe vengono conservate a -20°C.

### **3.2.3.3. Purificazione della proteina di fusione**

La purificazione della proteina di fusione dall'estratto proteico totale, è stata fatta mediante il kit Ni-NTA Purification System (Invitrogen). La purificazione è stata condotta seguendo dei protocolli specifici che ne mantengano intatta la struttura nativa della proteina, al fine di poterne saggiare l'attività enzimatica. Il kit Ni-NTA prevede l'utilizzo di una colonna cromatografica contenente una resina di agarosio al 6%, in cui l'acido nitrilotriacetico (NTA) lega ioni Ni<sup>2+</sup> attraverso a siti di coordinazione. La separazione della proteina di fusione dalla miscela proteica è possibile perché in quanto gli ioni Ni<sup>2+</sup> presenti in soluzione formano dei legami di coordinazione, oltre che con i residui della matrice, con gli anelli imidazolici delle istidine della proteina di fusione. La procedura prevede l'impaccamento della resina nella colonna e la successiva aggiunta del lisato cellulare. Dopo aver rimosso la fase liquida contenente le proteine prive dell'His-

tag, e dopo aver adeguatamente lavato la resina in fase mobile, la proteina di fusione viene eluita utilizzando soluzioni contenenti concentrazioni crescenti di imidazolo. L'imidazolo compete con l'His-tag per la chelazione del metallo, determinando il rilascio della proteina di fusione dalla resina, che può essere così recuperata.

#### **3.2.3.4. Quantizzazione di proteine mediante saggio Bradford**

Le proteine totali sono state quantizzate con Protein Determination Reagent fornito dalla USB Corporation secondo il metodo di Bradford (Bradford, 1976). Il legame del colorante alle proteine determina uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide. Tale colorante forma forti complessi non covalenti con le proteine tramite interazioni elettrostatiche con gruppi amminici e carbossilici e tramite forze di Van der Waals. Il metodo è un semplice procedimento costituito da un unico passaggio in cui il colorante è aggiunto ai campioni e si determina l'assorbanza a 595 nm. La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione. Pertanto l'intensità del colore blu (e dunque l'assorbimento) è proporzionale alla concentrazione proteica. In genere quantità uguali di proteine differenti legano la stessa quantità di colorante, pertanto il saggio è indipendente dal tipo di proteina. Poiché l'intensità della colorazione non è lineare in una vasta gamma di concentrazioni di proteine, si raccomanda fortemente di preparare una curva *standard*, soluzioni a concentrazione nota di siero albumina bovina (BSA), per esempio, per ogni saggio.

I vantaggi di questo metodo sono:

- Semplicità di preparazione del reattivo
- Sviluppo del colore immediato
- Stabilità del complesso
- Elevata sensibilità (fino a 22 µg/ml)
- Il saggio è compatibile con la maggior parte dei tamponi comuni, degli agenti denaturanti come guanidina·HCl 6M e urea 8 M e dei preservanti come sodio azide

Gli svantaggi di questo metodo sono:

-Il reagente colora le cuvette ed è piuttosto difficile da rimuovere

-La quantità di colorante che si lega alla proteina dipende dal contenuto in aminoacidi basici ciò rende difficile la scelta di uno *standard*

-Molte proteine non sono solubili nella miscela di reazione acida

- Agitare a temperatura ambiente fino alla comparsa delle bande di ibridazione, quindi effettuare un lavaggio con acqua distillata.

### 3.2.3.5. Elettroforesi di proteine in SDS-PAGE

L'SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, ossia elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato) è una tecnica sia analitica sia preparativa che consente di analizzare estratti proteici attraverso la separazione di molecole cariche, quando sottoposte ad un campo elettrico, all'interno di una matrice porosa. La tecnica si basa sulla denaturazione del campione proteico SDS mediata, il quale detergente si lega saldamente e in quantità stechiometrica (1,4 g SDS ogni grammo di proteina) provocandone la denaturazione reversibile. In tal modo le proteine acquistano tutte la stessa forma e lo stesso rapporto carica massa, pertanto la loro separazione si risolve in funzione del loro peso molecolare. Il movimento del complesso proteina-SDS può essere paragonato al movimento di complessi formati da proteine standard il cui peso molecolare è noto. Il marker di peso molecolare impiegato è il SeeBlue®Plus2 Pre-Stained Standard commercializzato dall'Invitrogen. La risoluzione in bande di peso molecolare decrescente dall'alto verso il basso, fornisce un'informazione qualitativa sulle proteine che si stanno studiando. I campioni proteici, prima del caricamento, devono essere adeguatamente preparati aggiungendo il *loading Buffer* (*sample Buffer*: Tris 0,5 M a pH 6,8, SDS al 10%, glicerolo all'88%, BFB allo 0,1%,  $\beta$ -mercaptoetanolo) e denaturando ad una temperatura di circa 100°C per 5 minuti. Per la preparazione di un gel di poliacrilammide in presenza di SDS, degli opportuni buffer e delle soluzioni necessarie, sono stati eseguiti tutti i protocolli presenti nel manuale "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" di Sambrook J, Fritsch EF e Maniatis T, edito

dalla Cold Spring Harbor Laboratory (1982). L'apparecchiatura per l'elettroforesi è il Mini-PROTEAN®Tetra Cell commercializzata dalla Biorad.

L'elettroforesi è stata condotta secondo Laemli (1970), utilizzando una concentrazione di acrilammide pari al 12% e un rapporto acrilammide/bisacrilammide di 30:1.

Il resolving gel al 12% è stato preparato, ottenendo un volume finale di 10 ml, miscelando:

H <sub>2</sub> O	30% mix acrilamide	Tris 1.5 M pH 8.8	SDS 10%	APS 10%	TEMED
3.3 ml	4.0 ml	2.5 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.004 ml

Per preparare un volume di 4 ml di stacking gel al 12% sono stati mescolati:

H <sub>2</sub> O	30% mix acrilamide	Tris 1.5 M pH 8.8	SDS 10%	APS 10%	TEMED
2.7 ml	0.67 ml	0.5 ml	0.04 ml	0.04 ml	0.004 ml

I campioni, prima del caricamento, devono essere adeguatamente preparati, aggiungendo la soluzione di caricamento (sample buffer: Tris 0.5 M a pH 6.8, SDS al 10%, glicerolo all'88%, BFB allo 0.1%,  $\beta$ -mercaptoetanol) e denaturando ad una temperatura di circa 100°C per 5 minuti.

La corsa elettroforetica è stata condotta a 30mA per circa 1h e 30 minuti. Dopo la corsa elettroforetica il gel viene staccato dai supporti e immerso nella soluzione di colorazione blu di Coomassie O.N. a 37 °C e successivamente trattato con la soluzione di decolorazione.

### 3.2.3.6. Western Blot

Il western blot è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine trasferite su una membrana, mediante il riconoscimento da parte di un anticorpo specifico. L'anticorpo

utilizzato è l'anti-HisTag (Invitrogen), diretto contro il tag di His<sub>6</sub> fuso alle proteine studiate.

- SDS-PAGE 20mA per circa 90' in Running buffer 1X
- Recuperare il gel e sciacquarlo per 10' in Transfer buffer 1X
- Tagliare due fogli di carta 3mm e il filtro Hybond-cextra (Amersham) delle stesse dimensioni del gel
- Sciacquare i due fogli di carta 3mm, il filtro Hybond-c extra e le spugne dell'apparecchio in Transfer buffer
- Assemblare il sandwich (polo nero – spugne - 3mm – gel – membrana - 3mm – spugne - polo rosso) eliminando ad ogni passaggio le possibili bolle
- Riempire la camera con transfer buffer
- Blot a 4°C (o in ghiaccio) a 50 V, 300 mA per 2h
- Aprire l'apparecchio e recuperare il filtro. Il filtro a contatto col gel deve essere rivolta verso l'operatore
- Colorare il filtro con circa 20 ml di rosso Ponceau su un agitatore oscillante per 5 minuti, al fine di verificare il trasferimento delle proteine, drenare il colorante e decolorare rapidamente con acqua distillata. Il colorante può essere riusato più volte
- Opzionalmente si può colorare anche il gel di poliacrilammide residuo in Coomassie blu per verificare l'efficienza di trasferimento
- Incubare il filtro con Blocking buffer (30ml) per 1h a temperatura ambiente in agitazione
- Togliere 20ml del Blocking buffer e ai 10ml che rimangono aggiungere 5µl di anticopro anti-His (Invitrogen) e incubare a 4°C o.n. in agitazione
- Sciacquare il filtro con tre lavaggi di TBST di 5' ciascuno
- Lavaggio finale in TBST per 10'
- Aggiungere la soluzione contenente i substrati NBT (Nitro-blue-tetrazolium) e BCIP (Bromochloroindolyl phosphate) (Invitrogen).

### 3.2.3.7. Saggio di attività enzimatica

Il saggio di attività enzimatica è un saggio spettrofotometrico basato su un aumento di assorbanza a 405nm per la liberazione di p-nitroanilina.



Esso è stato effettuato utilizzando una miscela di reazione composta da:

- Buffer fosfato 50mM pH 7 (50µl)
- Substrato Z-Gly-PropNA 2mM risospeso in metanolo 60% (100µl)
- Campione (Spent medium o proteina purificata).
- H<sub>2</sub>O fino a 1ml.

# 4. Risultati

---



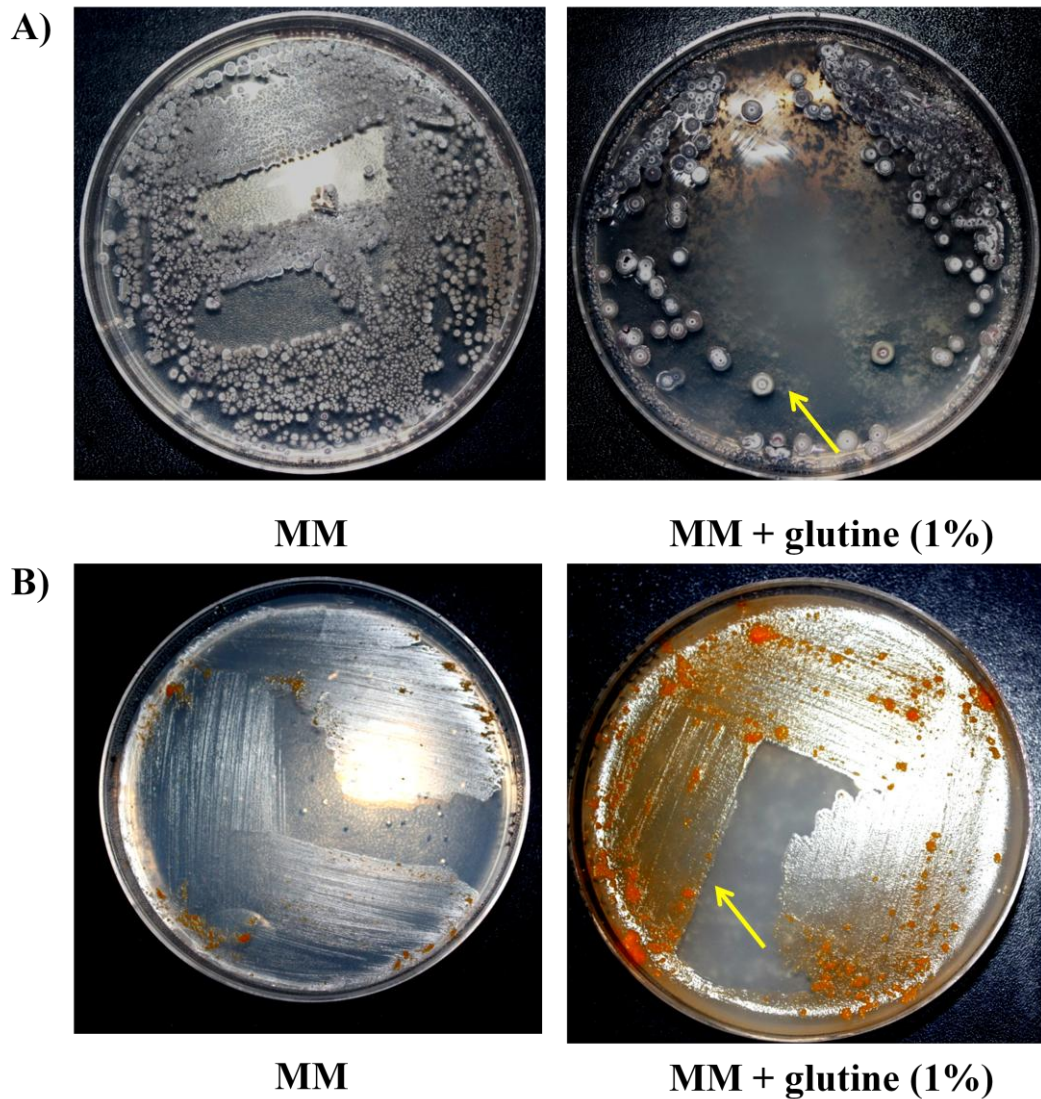
## 4.1. Crescita di *A. balhimycina* e *S. coelicolor* A3(2) in presenza di glutine

---

Poiché in letteratura è riportato che alcune prolilendopeptidasi microbiche sono in grado di digerire peptidi glutine-derivati, il primo passo nello studio di questi enzimi negli attinomiceti, è stato quello di capire se *A. balhimycina* e *S. coelicolor* A3(2) sono in grado di crescere in presenza di glutine e di utilizzarlo come fonte di amminoacidi.

A tal fine, i due ceppi sono stati fatti crescere su un terreno minimo (MM) con o senza glutine (1%) come fonte di azoto.

Com'è possibile notare dalla figura 10, sia *S. coelicolor* che *A. balhimycina* sono capaci di crescere quando nel terreno è presente il glutine. In particolare, esaminando le piastre dove è presente il glutine, è possibile osservare degli aloni di degradazione del glutine, attorno al micelio dei ceppi (Fig.10).

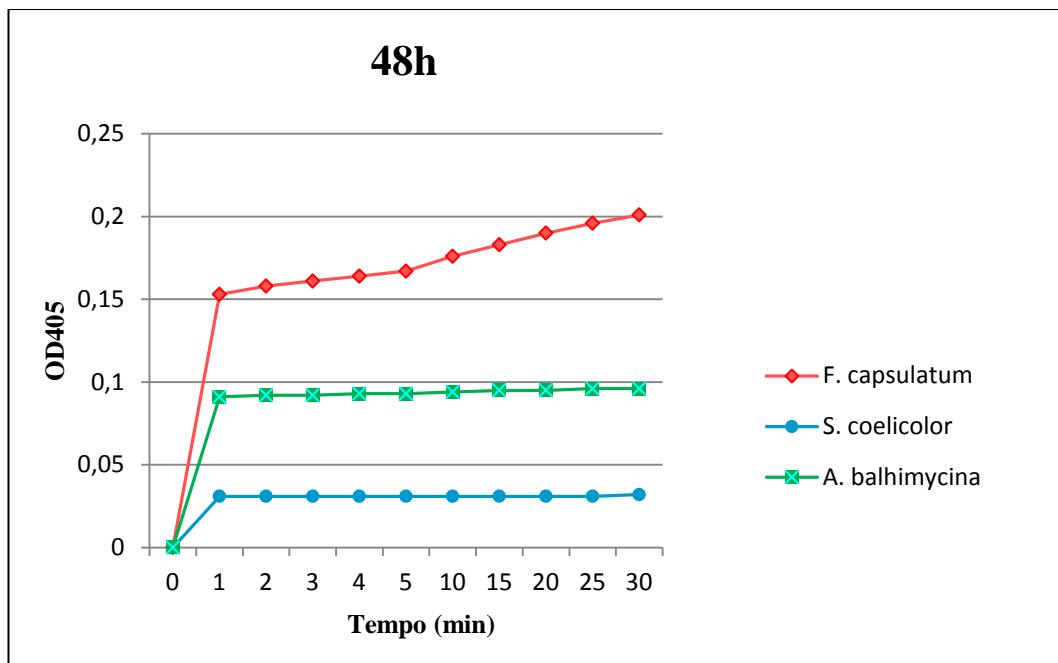


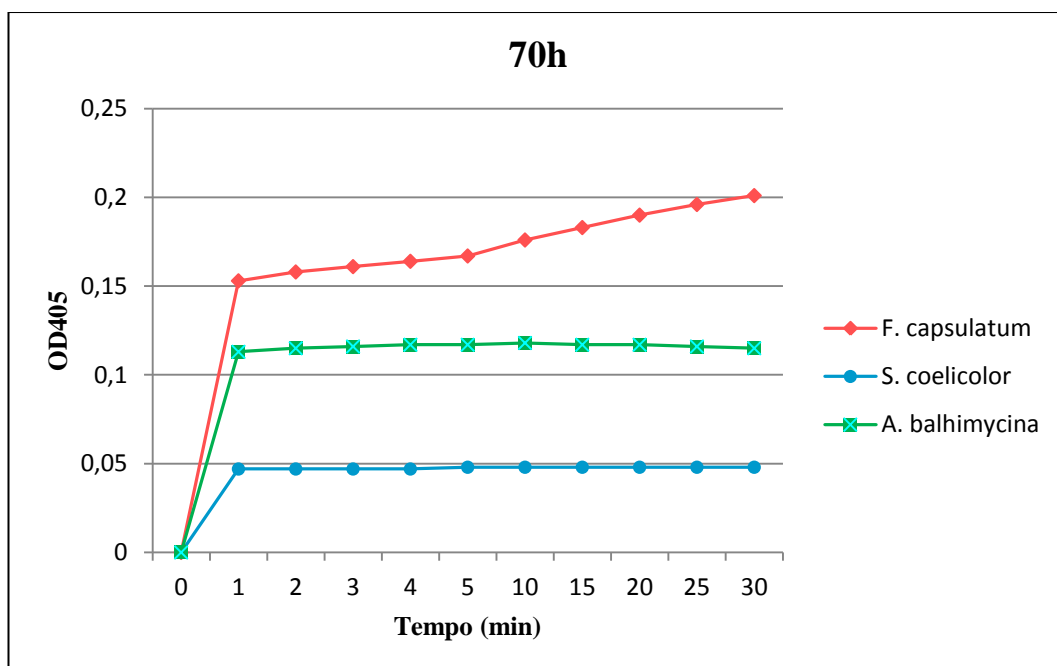
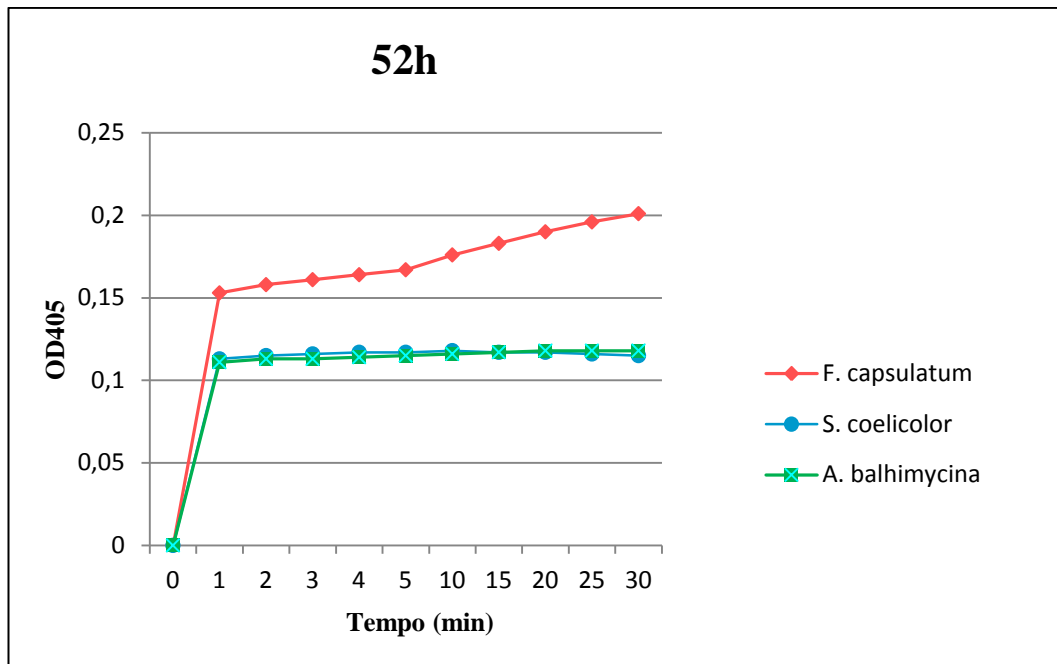
**Fig.10. A) Crescita di *S. coelicolor* A3(2) e B) *A. baohimycina* su terreno minimo (MM) e MM con glutine.**

Inoltre, per confermare questo risultato, sono stati fatti crescere su MM e MM con glutine dei ceppi mutanti del metabolismo del triptofano di *S. coelicolor* A3(2) e in particolare: M145  $\Delta trpA$  e  $\Delta trpB$ .  $\Delta trpA$  e  $\Delta trpB$ , infatti, codificano per le subunità  $\alpha$  e  $\beta$ , rispettivamente, della triptofano-sintetasi, un enzima che catalizza la reazione biosintetica finale del triptofano. Una delle caratteristiche di questi mutanti è che su un terreno minimo non riescono a crescere a causa dell'assenza di una fonte di triptofano a differenza di quanto accade quando si aggiunge glutine al mezzo di coltura (Fig.11).



Il saggio enzimatico è basato su un aumento dell'assorbanza a 405nm dovuto alla degradazione del substrato che, in presenza di un enzima ad attività prolilendopeptidasica, libera p-nitroanilina. *A. balhimycina* e *S. coelicolor* mostrano una buona attività prolilendopeptidasica soprattutto a 52h, come si evince da un aumento dell'assorbanza in funzione del tempo (30 minuti) riportato in figura 12. I valori di assorbanza superano 0.1 anche se non raggiungono livelli paragonabili a quelli di *Flavobacterium capsulatum*, ceppo controllo. L'attività enzimatica di *A. balhimycina* è presente a 70h a differenza di quanto accade per *S. coelicolor*.





**Fig.12. Saggi enzimatici delle proteine totali di *F. capsulatum*, *A. balhimycina* e *S. coelicolor* A3(2) estratte dopo 48h, 52h e 70h di crescita.**



## 4.2. Analisi in silico per l'identificazione delle putative PEPs

---

Al fine di identificare nel genoma di questi due ceppi, geni che potessero codificare per proteine con attività prolilendopeptidasica, sono state percorse due strade diverse e sono stati fatti poi degli allineamenti multipli di sequenze mediante ClustalW 2.0.

In particolare, nel caso della prima via, è stata utilizzata come punto di partenza la sequenza amminoacidica della prolilendopeptidasi di *Thermobifida fusca* (ZP\_00058751.1) (Venalainen et al., 2004); questa proteina è stata scelta perché presenta, spesso, sequenze simili a quelle di *S. coelicolor* A3(2).

La sequenza di questo enzima, pertanto, è stata allineata con tutte le sequenze proteiche presenti in banca dati di *S. coelicolor* A3(2), *S. avermitilis*, *S. griseus* e *A. balhimycina*. Mediante questa ricerca sono state identificate:

- una proteina arbitrariamente chiamata PEP-Amy di *A. balhimycina* e
- una putativa proteina peptide idrolase di *S. coelicolor* A3(2) codificata dal gene *SCO3610* (Fig.13).

---

CLUSTAL W 2.0 multiple sequence alignment

```
S.coelicolor -----
S.avermitilis -----
Amycolatopsis -----
T.fusca -----
S.griseus -----
VLEQPVGKRHVDARVGERQVRRRHQEVHCGPSGAAGGRAGQRHLTGVEVDARHPRLGGQ
-----MSRLP-----SY
-----MTSAARPAPHAY

S.coelicolor -----MTE5NG----L
S.avermitilis -----MTE5TGSTSQE
Amycolatopsis -----
T.fusca -----
S.griseus -----
AQGDRAGTAAQVDHPRARPEQGLGERRALRGRARGHHRNRVSPVARRVTLQHPAHSTARR
PFAERWELTDVLHGQTVADPYRWLEQTDLAATKEWSQSQDALFTAASAMWSATDWFRTTL
PRTARQDVVDELHGVPVDPYRWLEDARTDAVIRWDAEQEALYAAERAAWPGRERWEAEV

S.coelicolor -----VPD-----WEKRFAPRVSLPDWAEDAPDRSLFVSN
S.avermitilis -----MPD-----WEKRFAPRVSLPDWAEDAPHRALFVSN
Amycolatopsis -----
T.fusca -----
S.griseus -----
RQDQGVSTQSAKQYPPAVVPDRLFDDAEAEENRWRARFHAPRISVPEWARDAPEACVYASN
RALMNAGS-----VGAPVWRGQRRLFVRRRAADQEHAVLYVQD
AALTAVDR-----ATPPRVRGGRVFWLRQDAGQEQPVLMAE
.. * . . . .
```

```

S.coelicolor      ATGTGYELIYAWDRSSGGEQRQVTRDPNGTTDGVLPDGDWIWFFDDKDKGDEFVWVRRQPFAG
S.avermitilis    ATGTGYELIYAWDRTTGEQRQVTRDPNGTTDGVLPDGDGEIWWFDDTDGDEFGIWRQRFTG
Amycolatopsis    ASGVWEVYAWNRRATDEHRRVTRDPNGTLHATPSPDGEIWWFDDTDGDEFGSWVREPF
T.fusca          -GSGPERVLIDPTELN----PEGTTTTLDSWVVDWEGRLLAYQLSDNGDEQSRLWVMDIOT
S.griseus        PGAESGRVLLDPQVLD----PSGRTVLDAWQPSLEGELLALQTSRDGTEDSRLQVIDVAT
.                :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
.                :      :      :      :      :      :      :      :      :      :

S.coelicolor      -----GPDEEAVPGLDPSYPAG-----LALGRDGRTAIVIGRSTDEDEGTTIHLARGDGGAPA
S.avermitilis    GGTADGPDEPAADGLEPSPYPAG-----LAIGRDGGTAVVGRSTDEDEGTVHVVR-AGQEPV
Amycolatopsis    TE--GSEPEKAVPDVHDGYQAG----LEIG--AKIVAVGVSTD-DGS--ELFARVAGETH
T.fusca          GENIDGPIIDRCSSYSPVAWLPGRDAFYVYVRLAPELVPEGEEQYHRRVYLHRVGTSPEDT
S.griseus        GKVVDPVDFVRKSSVAWLPGGGAFYVYVRLDPRLNP-GEEQYHRRVYLHRVGTAPGADA
.                :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
.                :      :      :      :      :      :      :      :      :      :

S.coelicolor      EIY---RHRESAGVGDLSHDGSLIAIEHTEHGDAMHSALRVLRPDG-STVAELDDTRGGE
S.avermitilis    EIY---RHRESAGVGDLSHDGSLIAVEHTEHGDAMHSALRVLRLDG-STVAELDDTKGGS
Amycolatopsis    RFY---SHPDDAGISSLSRDESLIAISHSEHGDSRHPALRVLATDGFETVAEKWDGEGK-
T.fusca          LIFGEGRDKTEYFGVAVSRDGRWLTLTASPGTAPRNDAWIADLTVSAPEAPRFTETIQTGV
S.griseus        LVFGEGRDRTQFYVSVSGSADGRWLGIRATLTGRRRTDLYLADLTAGPLERPLLVPVQNT
.                :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
.                :      :      :      :      :      :      :      :      :      :

S.coelicolor      EELGLEVLGFAPVDGDTRLLIHQRRGRWEPLVWDVATGEQ-----TDLALELPGDVSAE
S.avermitilis    VELGLEVLGFAPVDGDTRLLIHQRRGRWEPLVWDVASGEE-----TDLALELPGDVGAE
Amycolatopsis    ---GLSALEFSPPLPGDQRLVLHERRGREELLVWDVRAATE-----TEIELDLPGEVVAG
T.fusca          DAETFPHVGR----DGRLYLFDTLDAPRGRLCVADPASPT--PDHWQTLIASDPDAVLSG
S.griseus        PAATRLHVAPGTGPRDPVWLRDTHGAARGHVACPPDALHRGPEAWREVVEGRPDVAVLTD
.                :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
.                :      :      :      :      :      :      :      :      :      :

S.coelicolor      WYP-----DGSGLLIVHGFEARSELFRYDFAE-RGLTEIDTP-AGTVSGATARPDG--S
S.avermitilis    WYP-----DGSALLVAHSFEARSELFRYDLAS-RELVVRVPTP-AGTVSGATARPDG--S
Amycolatopsis    WYP-----DARALLVVFHFEGRSSLRYDLDT-AELSSVDTP-AGRIGGAGVVRPDG--T
T.fusca          YAILDGAELDTPVLLARWERHALSELVHHLATGERIRNLPPLPGLGSGVGSITARPEGGTE
S.griseus        FAVVTGPELDHPLGLAAWTRHTVAEVTVHDLTDGTRVGSVPLPGSGTVGGFAAGPAGSHE
.                :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
.                :      :      :      :      :      :      :      :      :      :

S.coelicolor      VEYLWSSAAEPSAVRSTTGR----VVLDP---PGLKSPRSVPVEDVWVEGPGGRIHALVQ
S.avermitilis    VEYLWSSAAEPSVVRSTSGG----IVLDP---PGMKSPGSVPVEDVWVEGPGGRVHALVQ
Amycolatopsis    VEYSWSSAAEPAAVRARTTDGTDAILLEP---PGERAPGSEPVTDAFVEGVGGRRIHALVS
T.fusca          AWFTYTDYTSPTAVYRYDARTHVVVWQK-SPGTVEAPPVTRTEQVITYSRDGTVPVRMLVV
S.griseus        AWFTYTDYFATPTRVLRFDGRTRRVTVGWEHGARSAPAEAGAVTRQVAFPSRDGTTVRMFI
.                :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
.                :      :      :      :      :      :      :      :      :      :

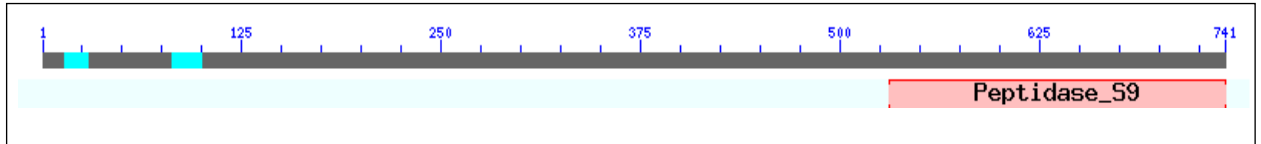
S.coelicolor      KPAGAA-GPLPTVFDIHGGPTWHDSDSFAAGPAAWVDHGYAVVRVNYRGSTGYGRAWTDA
S.avermitilis    RPAGAS-GPLPTVFDIHGGPTWHDSDSFAAGPAAWLDHGYAVVRVNYRGSTGYGREWTD
Amycolatopsis    RPSGAPDGPLPTVFLHGGPAAADEDRFSAYRATWLDAGFAVVEVNYRGSTGYGSAWRDA

```

**Fig.13. Allineamento multiplo delle sequenze amminoacidiche delle possibili prolilendopeptidasi (PEPs) di diversi organismi.**

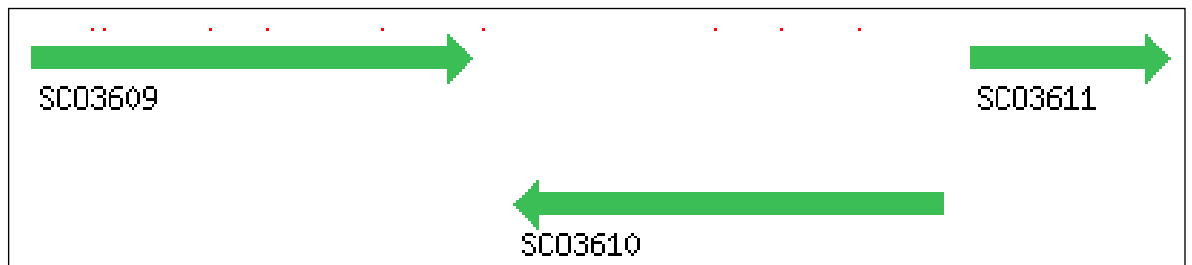
Il software utilizzato è ClustalW 2.0. “\*” indica le posizioni che hanno un aa completamente conservato, “:” indica un elevato livello di conservazione mentre “.” Indica debole conservazione.

Il gene di *A. balhimycina* codifica per una proteina di 741 amminoacidi. Allineamenti di sequenza amminoacidica tramite il software Blastp hanno mostrato che tale proteina presenta una omologia dell’83% con una putativa peptide idrolase (AMED\_8857) di *A. mediterranei* U32 e contiene un dominio conservato della famiglia delle peptidasi S9 (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=s9>) (Fig.14).



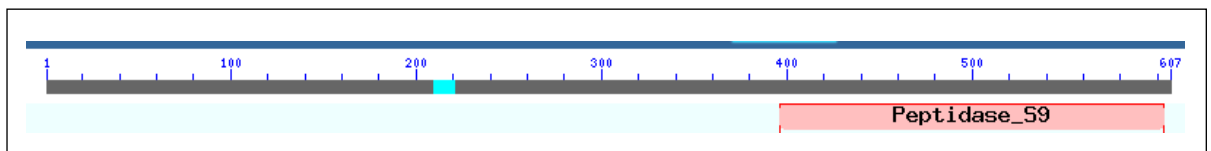
**Fig.14. Dominio conservato della putativa proliendopeptidasi di *A. balhimycina***

Il gene *SCO3610* di *Streptomyces coelicolor* A3(2), è un gene monocistronico, la cui proteina è stata classificata come una putativa peptide idrolasi di 606 amminoacidi e massa molecolare di 68KDa. Il gene è fiancheggiato da *SCO3609* e *SCO3611* che codificano entrambi per proteine di membrana a funzione sconosciuta (Fig. 13).



**Fig.15. Localizzazione del gene *SCO3610* sul genoma di *S. coelicolor* A3(2).**

Come per *A. balhimycina*, questa proteina di *Streptomyces coelicolor* A3(2) presenta un dominio conservato della famiglia delle peptidasi S9 (Fig.16).



**Fig.16. Dominio conservato della putativa peptide idrolasi di *S. coelicolor* A3(2).**

Per quanto concerne, invece, la seconda via è stata considerata una proteasi extracellulare prolina-specifica di *Aspergillus niger* appartenente alla famiglia delle serino-proteasi S28 (piuttosto che alla S9 delle PEPs) (Edens et al., 2005). Questa sequenza amminoacidica è stata scelta perché l'enzima è in grado di degradare peptidi del glutine più efficientemente rispetto ad altre proliendopeptidasi e a pH acido; in più presenta omologia di sequenza con una proliil-tripeptidil-amminopeptidasi di *S. mobaraensis* (EMBL acc. nr. AB159671) (Stepniak et al., 2006). Questa peptidasi purificata e caratterizzata da *S.*



*mobaraensis* presenta il 65% di omologia con le tripeptil-peptidasi di *S. lividans*, *S. coelicolor* e *S. avermitilis* e studi di specificità del substrato hanno dimostrato che l'enzima ha una attività tripeptidil- e tetrapeptidil-peptidasi prolina specifica (Umezawa Y. *et al.*, 2004).

Grazie a questa ricerca è stata identificata una putativa tripeptidil-ammino-peptidasi secreta di *S. coelicolor* A3(2) fino ad oggi mai studiata (Fig.17).

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

mobaraensis   MRKALRSLLAASMLIGAIG-AGSATAEAA SITAPQADIKDRILKIPGMKFVEEKPYQGYR 59
SCO2761       MRKALRWLLALNVLIGTVSTAGAATAAEP----KAVDIKDRLLSIPGMSLIEEKPYTG YR 56
A.niger       ----MRSFSVVAASLALSWSLAQAARP-----RLVPKPI SRPASSKSAATTGEAY- 48
              :* : .      :: * . * * .      : : : . * .      .. *

mobaraensis   YLWMTYRQFVDHRNPGKGTFEQR---FILLHKDIDRPTVFFFTSG-----YN--VSTNPS 108
SCO2761       FFVLNNTQFVDHRHPSKGT FQQR---ITVLHKDVNRPTVFFYTG-----YN--VSTNPS 105
A.niger       ----FEQLLDHHNPEKGTFSQRYWWSIEYWGGPGSPVVLFNPGEV SADGYEGYLNDTL 103
              : * : ** : * * * * . *      . . * . * : *      * : : : : .

mobaraensis   RSEPTRIVDGNQVSM EYRFFTPSRP----QPADWSKLDI WQAASDQHRLYQALKPVYGKN 164
SCO2761       RREPTQIVDGNQVSM EYRYFTPSRP----APADWSKLDI WQAASDQHRIFKALKPLYSKN 161
A.niger       TGVYAQEIQQAVILIEHRYWGDSSPYEVLNAETLQYLTLDQSI LDMTYFAETVKLQFDNS 163
              :: : * : : * : * : *      . . * : * : * : : * : : .

mobaraensis   -----WLAIGGSKGGM TATYFRFYPNDMNGTVAYVAPNDVNDKEDSAYDKFFQNV 215
SCO2761       -----WISTGGSKGGM TATYFRFYPRDMDGVVAYVAPNDVWNKEDSAYDRFFARV 212
A.niger       SRSNAQNAPWVMVGG S YSGALTANTESIAPGTFWAYHATSAPVEAIYDFWQYFYPIQQGM 223
              * : . * * . * : : : . : * : . * * * : . . : : :

mobaraensis   GDKACRTQ-----LNSVQREALVRRDEIVARYEKWAKENGKTFKV VGSADKAYENVVLD 269
SCO2761       GTDECRDK-----LNGVQREALVRRAPLEKKYAAAYAAENG YTFDTIGSLDRAYEAVVLD 266
A.niger       AQNC SKDVSLVAEYVDKIGKNGTAKEQQELKELPGLGAV EHYDDFAAVLPNGPYLWQDND 283
              . . . :      : : : : . . .      . . :      . : . *      *

mobaraensis   LVNSFWQYHLQSDC ASVP---ATKASTDELYKFIDDISGFDGYTDQGLER-FTPYY---- 321
SCO2761       YVWGFQYSTLADCADI PAD-AKNATDDAIWGSVD AISGFSAYTDQGLET-YTPYY---- 320
A.niger       FVTGYSSFFQFCDAVEGVEAGAAVTPGPEGVGLKALANYANWFNSTILPNYCAS YGYWT 343
              * . : : . * . . .      * : .      . : : : : : : : : . *

mobaraensis   -----YQAGTQLGAPT VKNPHLKGVLRYPGINQPRSYVPRDIPMTFRPGAMADVD 371
SCO2761       -----YQAGTQLGAPT IHFPHIEKKYIRYGYQPPRN FVPRSIPMKFEPWAMRDVD 370
A.niger       DENSVACFDSYNASSPI FTDT SVGNFVDRQW EWFLENEPFFFWQDGAPEGTSTIVPRLVS 403
              * : . : : : *      : .      : * : . *      . . *

```

```

mobaraensis  RWVREDSRNMLFVYGQNDPWSGEP-----FRLGKGAARHDYRFYAPGGNHGSNIA 422
SCO2761      TWVRHNARHMLFVYGENDPWGAER-----FRLGHG--ARDSYVLTAPGMNHGANVA 419
A.niger      ASYWQRQCPLYFPEVINGYTYGSAMGKNSATVNSWITGGWDMTRNTRLIWINGQYDPWRDS 463
              .   : *   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
              :   : *   : : : : : : : : : : : *   :   : : *   .   : :

mobaraensis  QLVADER-----AKATAEVLKWAGVAPQAVQKDEKAAPLAPFDAKLDKRVKNDKQSA 474
SCO2761      GLVDPQK-----ARATARILDWAGVAPAKVQENPSAARPLATFDARLDQRDVEREPA 471
A.niger      GVSSTFRPGGPLVSTANEPVQIIPGGFHCSDLYMEDYYANEGVRKVVNDNEVQIKKEWEE 523
              :   :   *   . . . . : :   . .   : : *   :   .   :   :

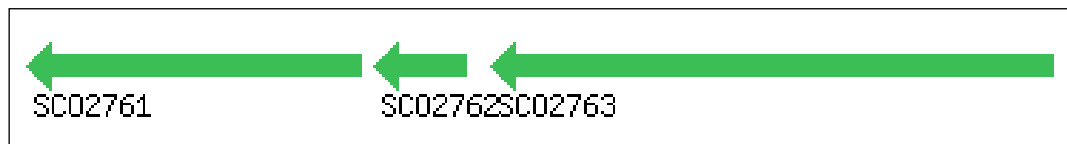
mobaraensis  LRP 477
SCO2761      LRP 474
A.niger      YYA 526

```

**Fig.17. Allineamento multiplo delle sequenze amminoacidiche di putative aminopeptidasi prolina-specifiche di *A. niger*, *S. mobaraensis* e *S. coelicolor*.**

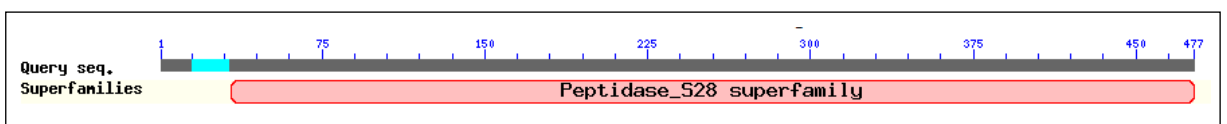
Il software utilizzato è ClustalW 2.0. “\*” indica le posizioni che hanno un aa completamente conservato, “:” indica un elevato livello di conservazione mentre “.” Indica debole conservazione.

Questa putativa tripeptidilamminopeptidasi è codificata dal gene *SCO2761* (1425bp) fiancheggiato da *SCO2762* (putativa proteina secreta) e *SCO2763* (ABC-transporter) (Fig.18).



**Fig.18. Localizzazione del gene *SCO2761* sul genoma di *S. coelicolor* A3(2).**

La proteina è costituita da 474 amminoacidi e contiene un dominio conservato appartenente alla famiglia delle peptidasi S28 (Fig. 19).



**Fig.19. Dominio conservato della putativa tripeptidilamminopeptidasi di *S. coelicolor* A3(2).**

### 4.3. Analisi dell'espressione dei geni *Pep-Amy*, *SCO3610* e *SCO2761*

#### 4.3.1. Espressione del gene *Pep-Amy* di *A. balhimycina*

Per valutare il profilo trascrizionale del gene *PEPAmy* è stata condotta una analisi RT-PCR quantitativa. L'analisi qRT-PCR, come descritto in materiali e metodi, si basa sulla retrotrascrizione in cDNA degli RNA totali estratti e sulla reazione di PCR condotta con una coppia di primer che amplifica una regione specifica interna al gene.

A tal fine, gli RNA sono stati inizialmente estratti da biomassa di *A. balhimycina* cresciuto nei seguenti terreni di coltura: R2YED (Fig.20), Nutrient broth (Fig.21) e MG, (Fig.22) a differenti ore di crescita.

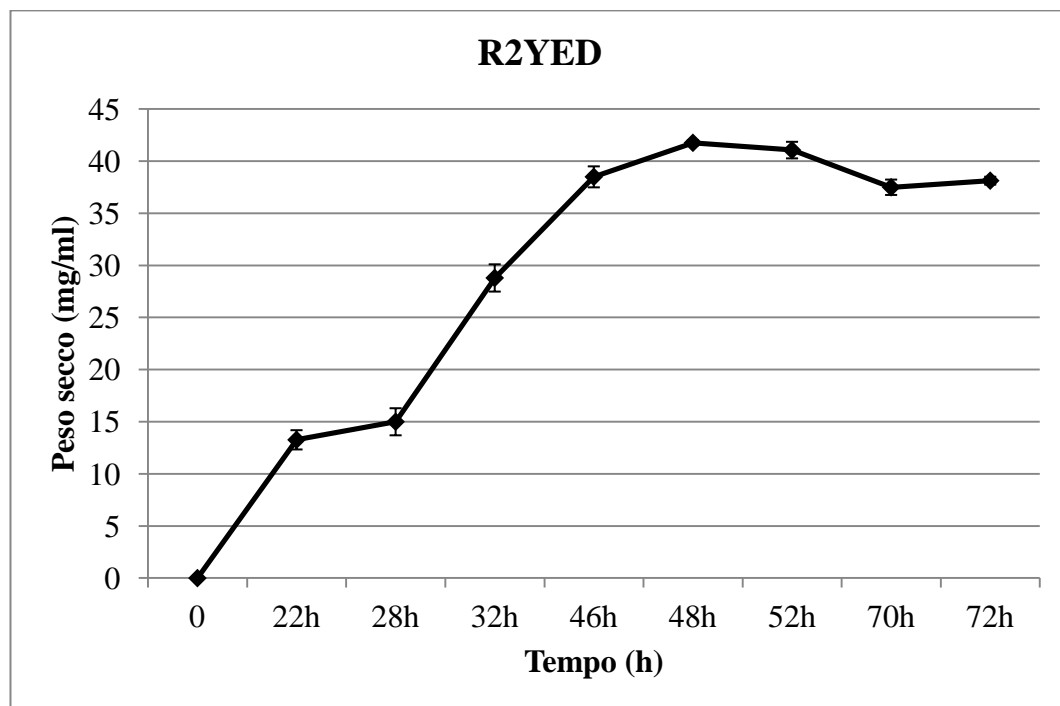
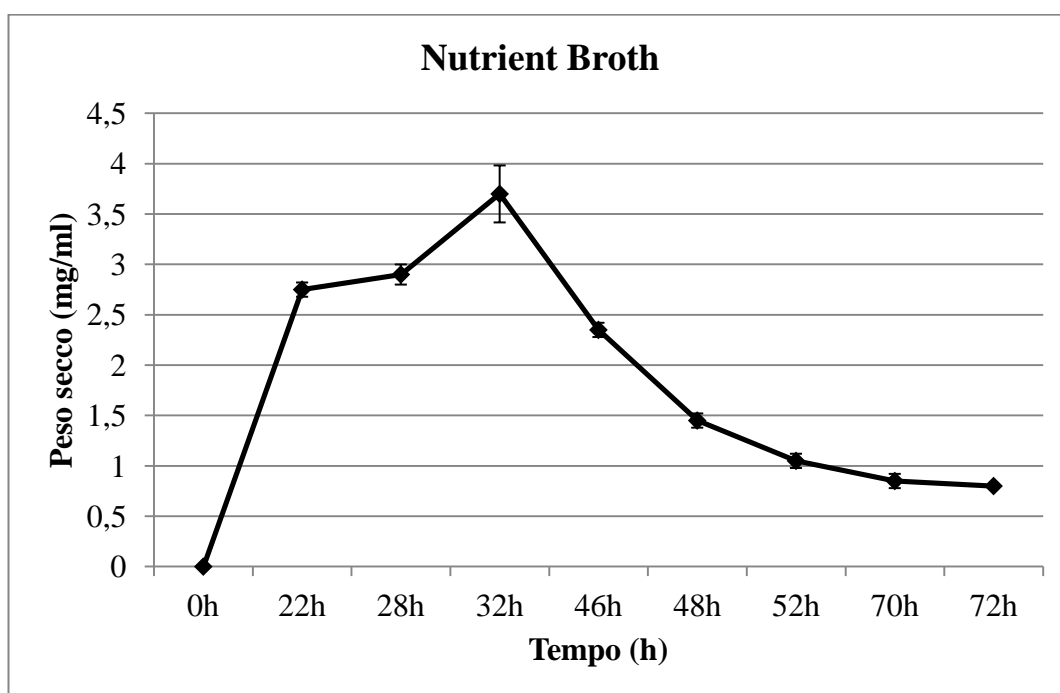
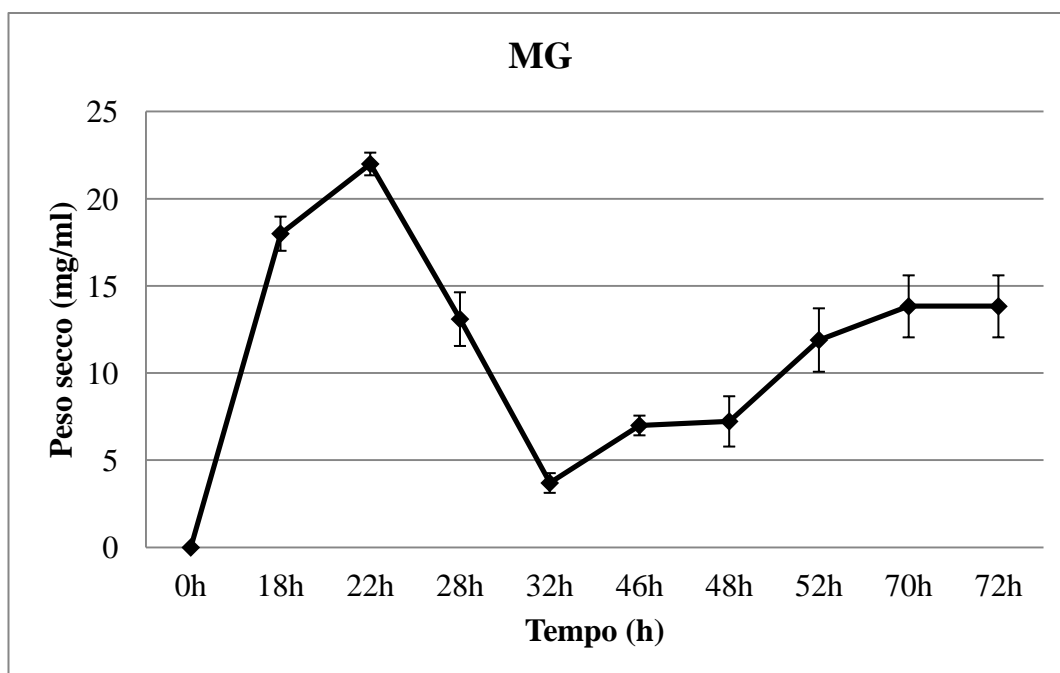


Fig.20. Curva di crescita di *A. balhimycina* in terreno R2YED

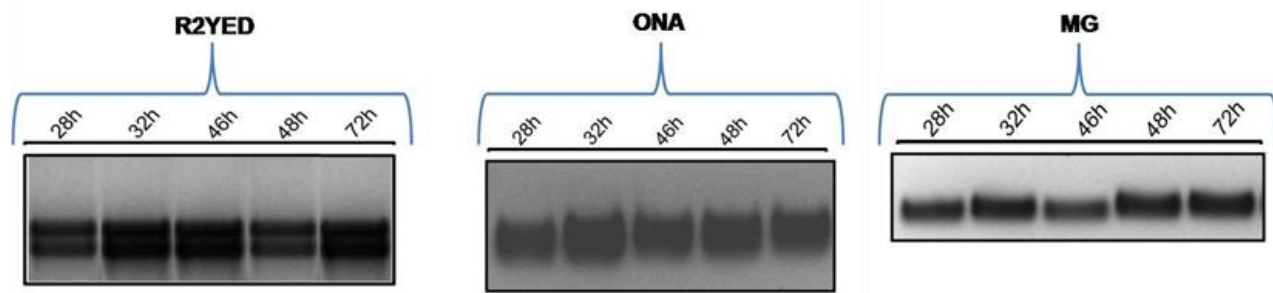


**Fig.21.** Curva di crescita di *A. balhimyicina* in terreno Nutrient broth



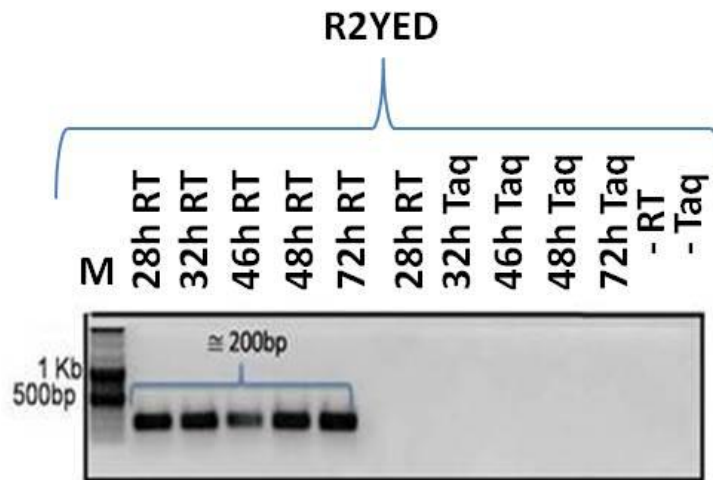
**Fig.22.** Curva di crescita di *A. balhimyicina* in terreno MG.

Gli RNA estratti sono stati sottoposti a una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% per verificarne la qualità (Fig.23).

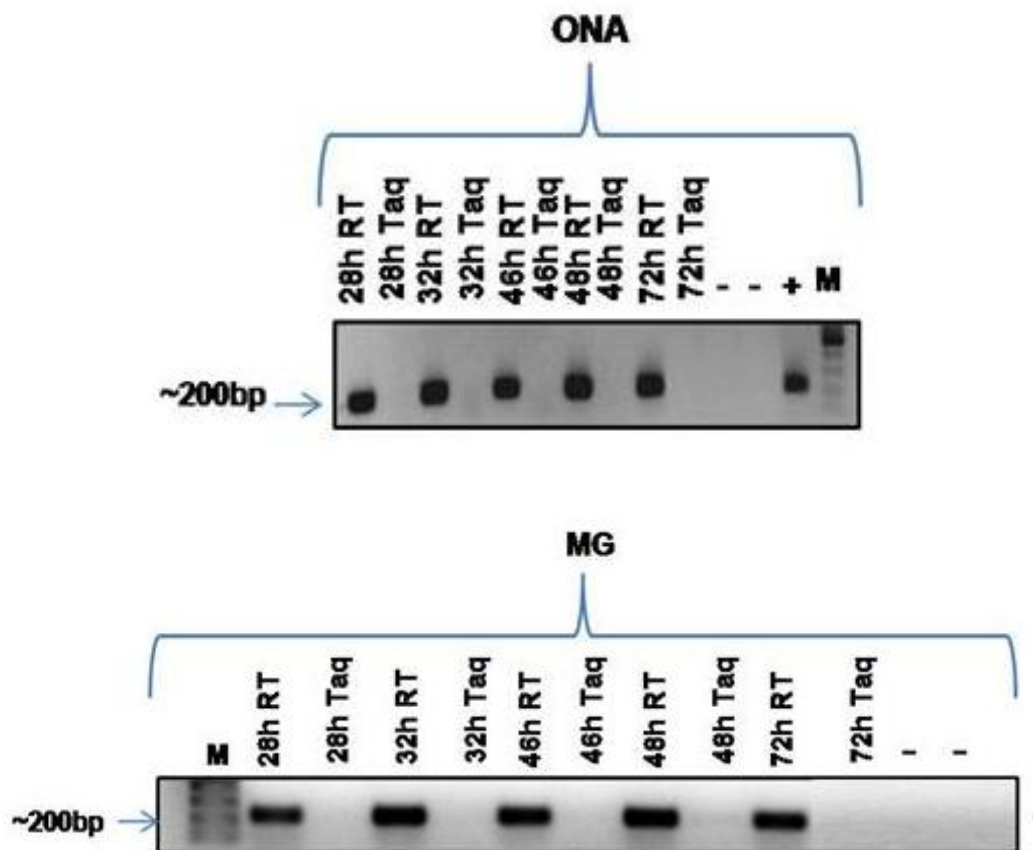


**Fig.23.** Analisi elettroforetica su gel di agarosio all'1% dell'RNA estratto da *A. balhimycina* a diverse ore di crescita e cresciuto in differenti terreni di coltura.

Poiché la misura dell'espressione dei geni riflette l'abbondanza dei corrispondenti cDNA, è fondamentale che l'RNA estratto sia privo di DNA, per impedire che possa alterare l'abbondanza relativa di ciascun cDNA. Per tale motivo, gli RNA sono stati trattati con DNase RNase free e l'assenza di DNA genomico è stata verificata con una PCR utilizzando i primer per *hrdB* (gene che codifica un fattore  $\sigma$  costitutivo) (Fig.24 e Fig.25).



**Fig.24.** Analisi RT-PCR del gene *hrdB*. L'RNA stampo è quello isolato a diverse ore di crescita da *A.balhimycina* in R2YED. Controllo negativo miscela senza RNA. M: Gene Ruler DNA ladder mix (Fermentas).



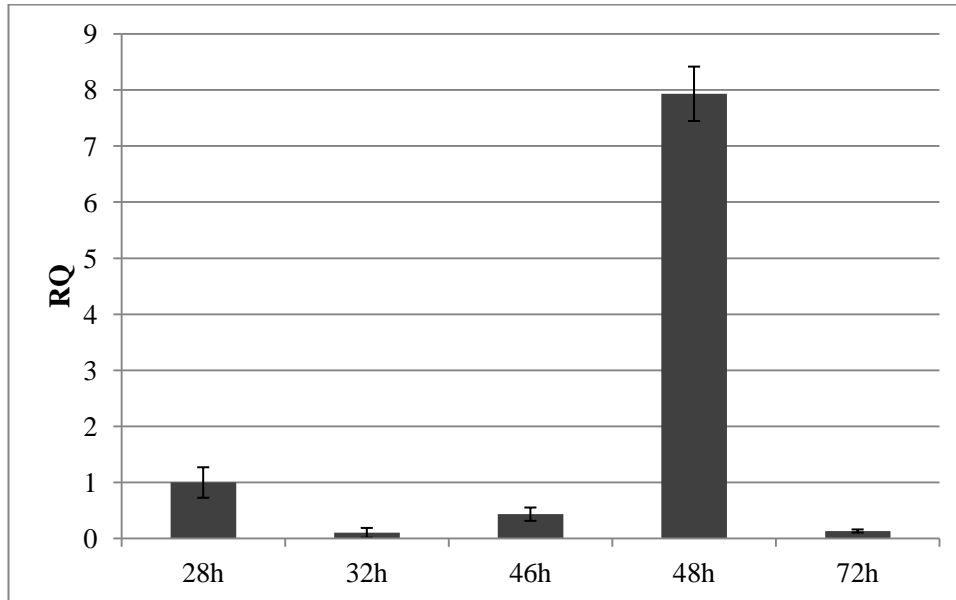
**Fig.25.** Analisi RT-PCR del gene *hrdB*. L'RNA stampo è quello isolato a diverse ore di crescita da *A.balhimycina* in Nutrient broth ed MG. (+) Controllo positivo, DNA genomico di *A.balhimycina*. (-) Controllo negativo miscela senza RNA o DNA stampo. M: Gene Ruler DNA ladder mix (Fermentas).

Dopo avere effettuato l'analisi qualitativa degli RNA estratti, questi sono stati retrotrascritti e la popolazione di cDNA ottenuta è stata analizzata mediante Real-Time PCR utilizzando dei primer opportunamente disegnati (PepAmy\_For e PepAmy\_Rev), per amplificare il gene *PEPAmy*.

La RT-PCR Real Time relativa two-step è stata effettuata usando come controllo endogeno il gene *hrdB*. Ogni campione è stato analizzato in triplicato; la miscela di reazione in presenza di DNA genomico ha rappresentato il controllo positivo mentre la miscela senza alcuno stampo il controllo negativo.

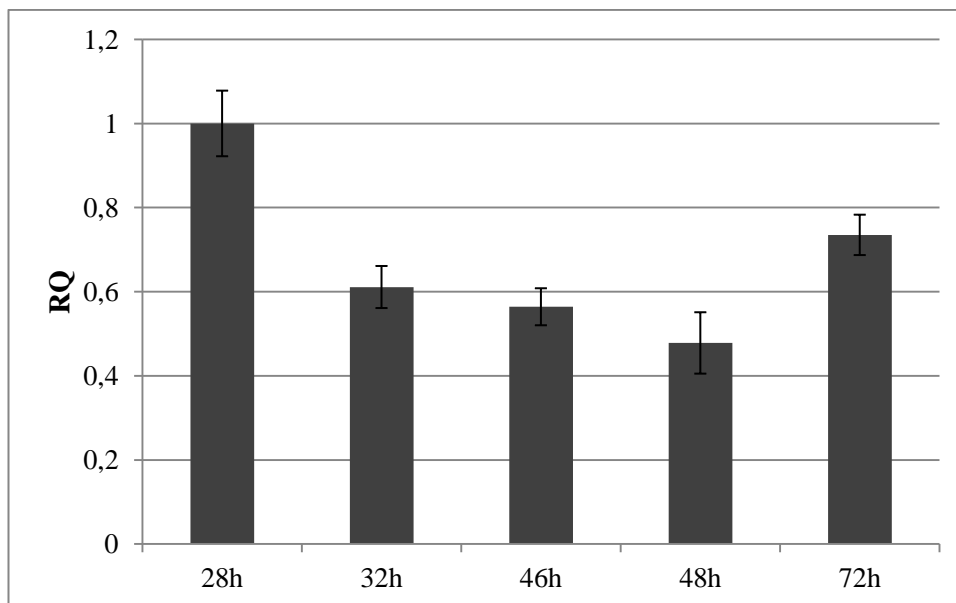
I dati raccolti sono stati elaborati dall'apposito software, SDS 1.2 di Applied Biosystem, attraverso cui è stata effettuata l'analisi di ciascun campione rispetto a un controllo endogeno rappresentato dal gene *hrdB*.

Per quanto riguarda l'espressione in terreno R2YED, il gene *PEPAmy* è trascritto a livelli basali durante la crescita tranne che a 48h (Fig.26).



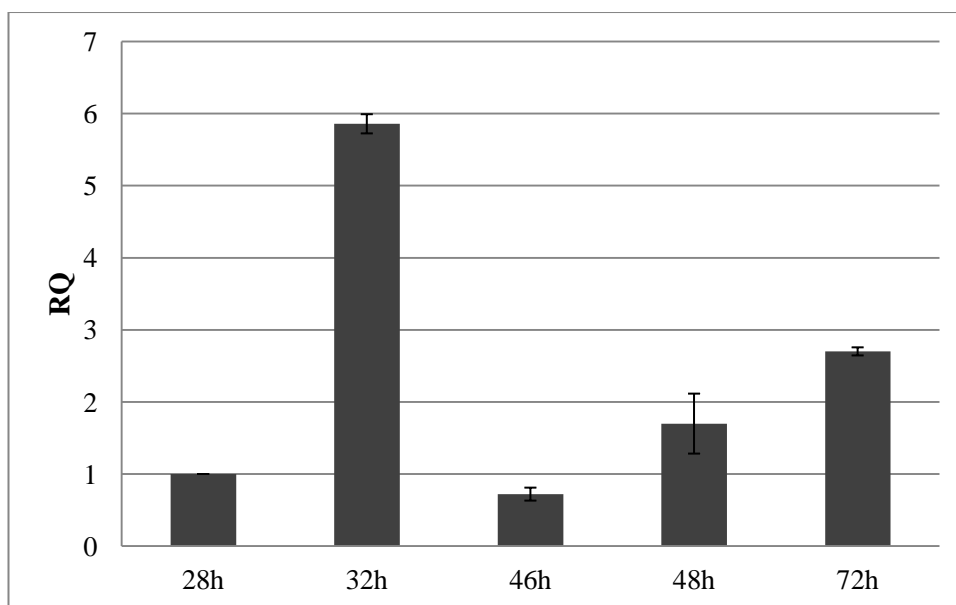
**Fig.26. Analisi qRT- PCR dell'espressione del gene *PEPAmy* in *A.balhimycina* cresciuto in terreno R2YED. I dati sono stati normalizzati usando *hrdB* come gene di riferimento.**

In Nutrient Broth , lo studio dell'espressione del gene mostra che, analogamente a quella in terreno R2YED (tranne per le 48h), l'espressione del gene in questo terreno sembra essere costitutiva (Fig.27).



**Fig.27.** Analisi qRT-PCR dell'espressione del gene *PEPAmy* in *A.balhimycina* cresciuto in terreno Nutrient Broth. I dati sono stati normalizzati usando *hrdB* come gene di riferimento.

Un aumento della trascrizione che è quasi 6-volte di più, si osserva in terreno MG solo dopo 32h di crescita. (Fig.28).



**Fig.28.** Analisi qRT-PCR dell'espressione del gene *PEPAmy* in *A.balhimycina* cresciuto in terreno MG. I dati sono stati normalizzati usando *hrdB* come gene di riferimento.



#### 4.3.2. Espressione dei geni *SCO3610* e *SCO2761* di *S. coelicolor* A3(2)

L'espressione del gene *SCO3610* e *SCO2761* in *S. coelicolor* è stata studiata, inizialmente, facendo crescere il ceppo su terreno MG. L'RNA è stato estratto da biomassa cresciuta a differenti ore di crescita (28h, 32h, 46h, 48h, 72h) (Fig.29).

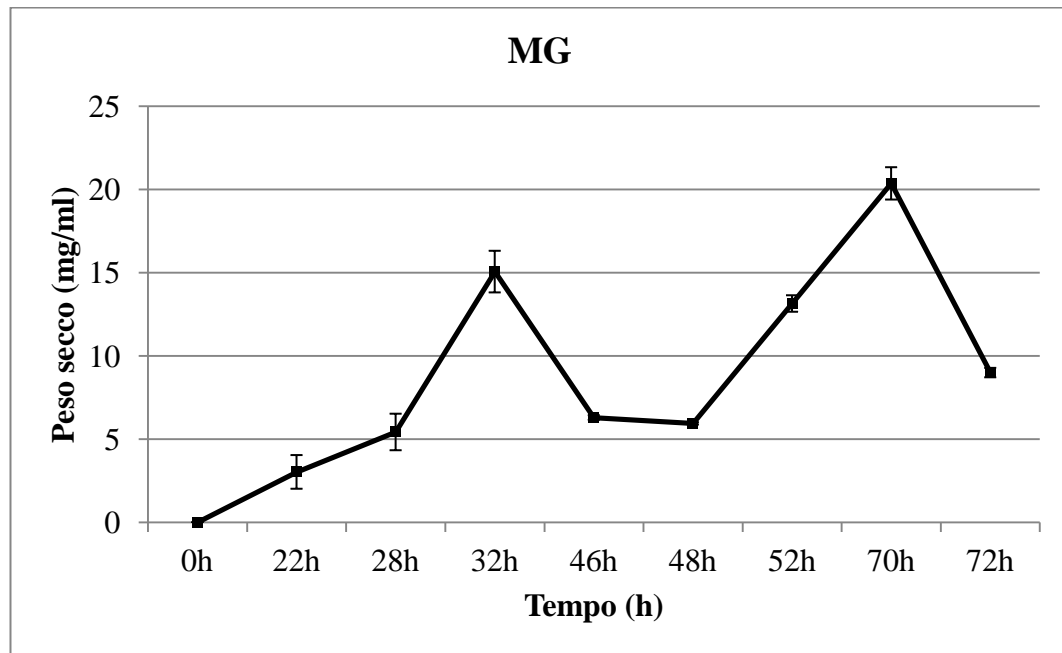
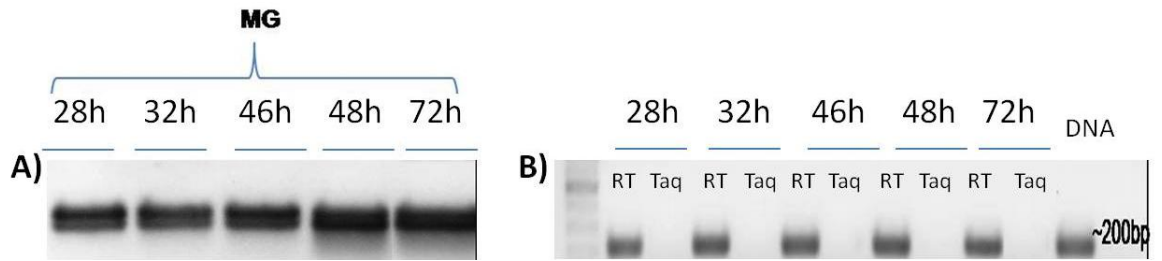


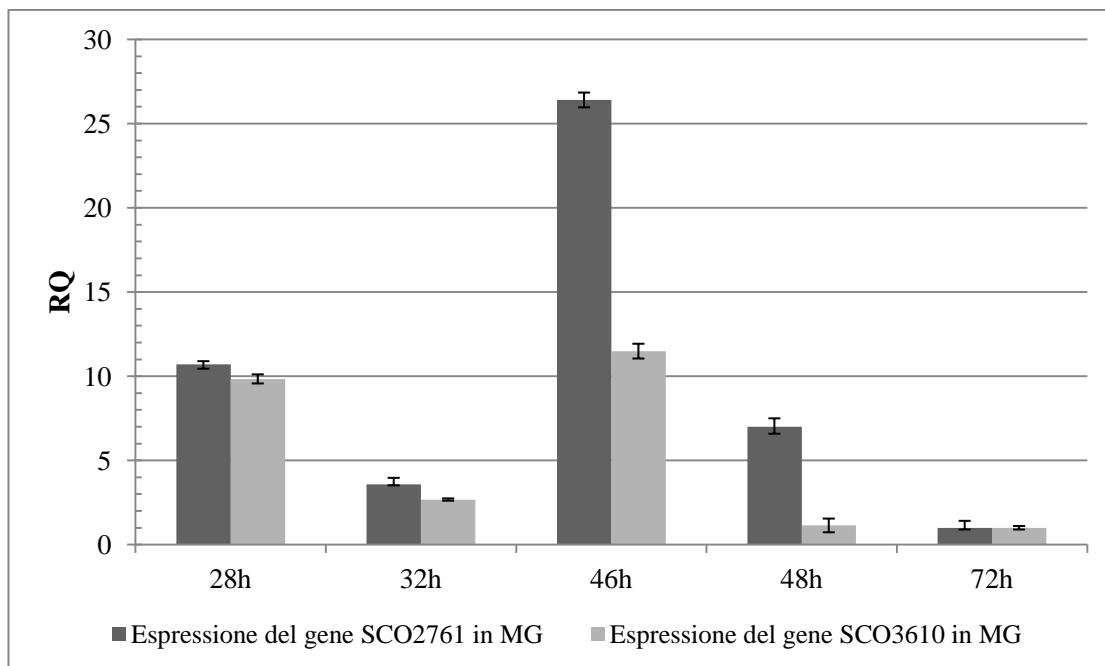
Fig.29. Curva di crescita di *S. coelicolor* in terreno MG.

Gli RNA estratti sono stati trattati con DNase per eliminare ogni traccia di DNA residuo e sottoposti a una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% per verificarne l'effettiva qualità (Fig.30A). Per verificare l'eventuale presenza di DNA residuo, gli RNA sono stati analizzati tramite RT-PCR, utilizzando i primer per *hrdB*. L'assenza di DNA genomico nella preparazione di RNA è stata verificata con una PCR utilizzando i primer per *hrdB* (gene che codifica un fattore  $\sigma$  costitutivo) (Fig.30B).



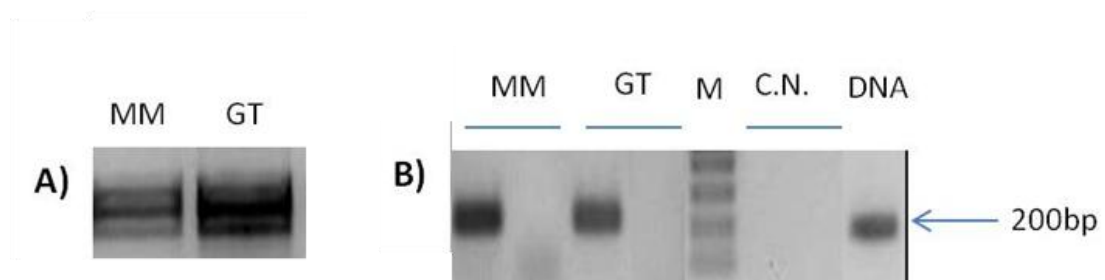
**Fig.30.** A) Analisi elettroforetica su gel di agarosio all'1% dell'RNA estratto da *S. coelicolor* in MG. B) Analisi RT-PCR del gene *hrdB*. L'RNA stampo è quello isolato a diverse ore di crescita da *S. coelicolor* in MG. Controllo positivo, DNA genomico di *S. coelicolor*. Controllo negativo miscela senza RNA o DNA stampo. M: Gene Ruler DNA ladder mix (Fermentas).

Successivamente, gli RNA sono stati retrotrascritti e la popolazione di cDNA ottenuta è stata analizzata mediante Real-Time PCR, per amplificare *SCO3610* e *SCO2761*. Per ciò che concerne *SCO3610* c'è un aumento della trascrizione a 28h e a 46h (10-volte e quasi 12-volte rispettivamente); a 32h, 48h e 72h invece no. Tuttavia, il livello di espressione aumenta notevolmente a 46h per il gene *SCO2761* (quasi 27-volte), diminuisce a 28h e 48h (11-volte e 7-volte rispettivamente) e ancor di più a 32h e a 72h (3-volte e 1-volta rispettivamente) (Fig.31).



**Fig.31.** Analisi qRT-PCR dell'espressione dei geni *SCO3610* e *SCO2761* in *S. coelicolor* cresciuto in terreno MG. I dati sono stati normalizzati usando *hrdB* come gene di riferimento.

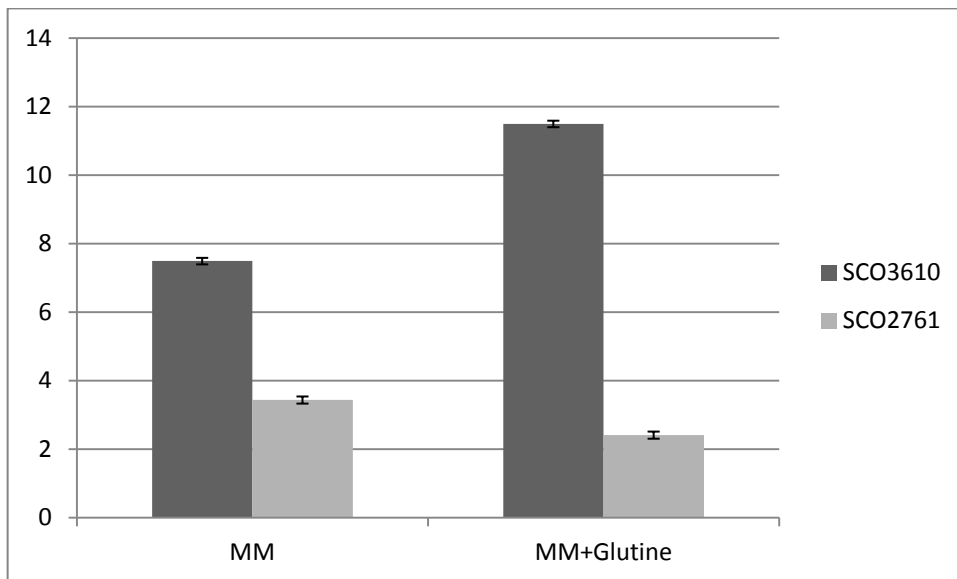
Successivamente, l'espressione di questi due geni è stata valutata anche su terreno MM con o senza glutine. L'RNA è stato estratto da micelio ottenuto dopo crescita su piastra. Gli RNA totali sono stati quindi caricati su gel di agarosio (Fig.32A) e dopo analizzati tramite RT-PCR. L'assenza di DNA genomico nella preparazione di RNA è stata verificata con una PCR utilizzando i primer per *hrdB* (Fig.32B).



**Fig.32.** A) Analisi elettroforetica su gel di agarosio all'1% dell'RNA estratto da MM con o senza glutine. B) Analisi RT-PCR del gene *hrdB*. L'RNA stampo è quello isolato da *S.coelicolor*. Controllo positivo, DNA genomico di *S.coelicolor*. Controllo negativo (C.N.) miscela senza RNA o DNA stampo. M: Gene Ruler DNA ladder mix (Fermentas).

L'RNA è stato quindi retrotrascritto in cDNA che è stato utilizzato per allestire la reazione di amplificazione mediante real-time PCR.

Lo studio dell'espressione dei due geni in *S. coelicolor*, ha mostrato che *SCO3610* è indotta in presenza di glutine. Per quanto riguarda, invece, il gene *SCO2761* la trascrizione sembra essere costitutiva in tutte e due le condizioni di crescita considerate (Fig.33).



**Fig.33. Analisi qRT-PCR dell'espressione dei geni *SCO3610* e *SCO2761* in *S. coelicolor* cresciuto in terreno MM, MM+glutine.-I dati sono stati normalizzati usando *hrdB* come gene di riferimento.**

## 4.4. Espressione dei geni *Pep-Amy*, *SCO3610* e *SCO2761* in *E. coli*

Per dimostrare che le attività prolilendopeptidasiche identificate in *A. balhimycina* e *S. coelicolor* sono codificate dai geni ipotizzati, questi sono stati clonati nel vettore pRSET-B e overespressi nel ceppo BL21(DE3) pLysS (His6-PepAmy e His6-SCO3610) e BL21 AI System (His6-SCO2761). Le proteine ricombinanti ottenute possiedono una coda di sei istidine in posizione N-terminale, utile per la loro purificazione (Fig.34).

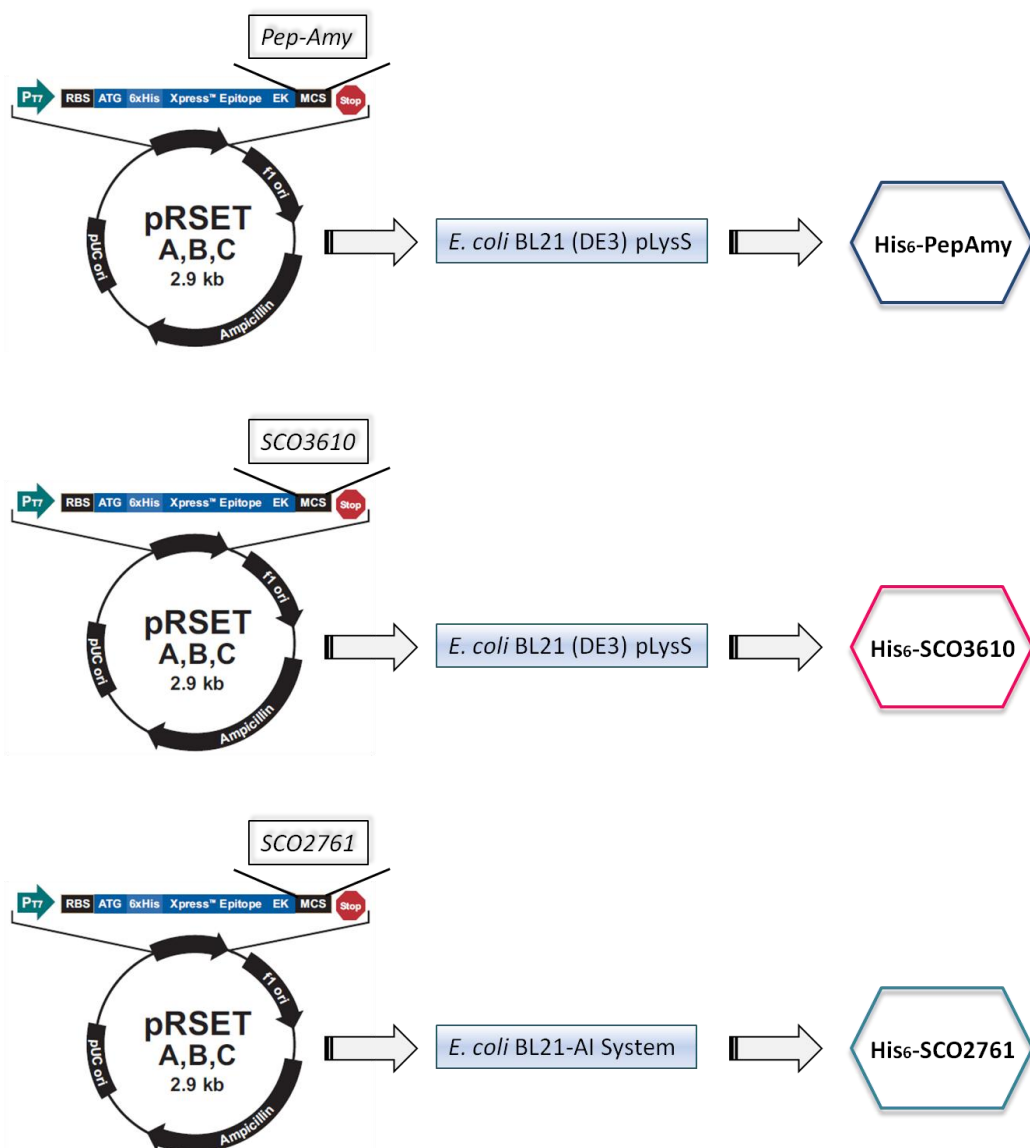
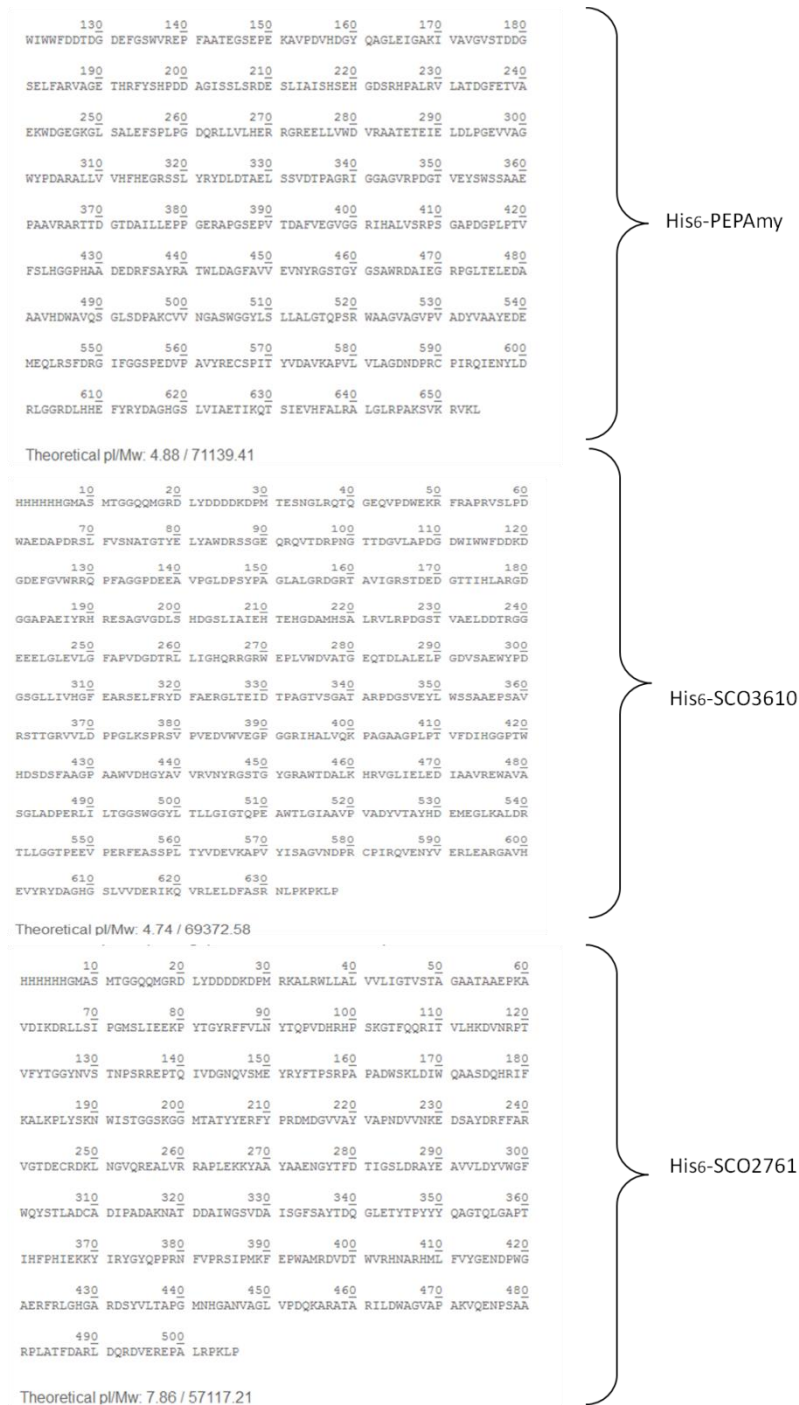


Fig.34. Schema del protocollo utilizzato per l'overespressione dei geni *PEP-Amy*, *SCO3610* e *SCO2761*.

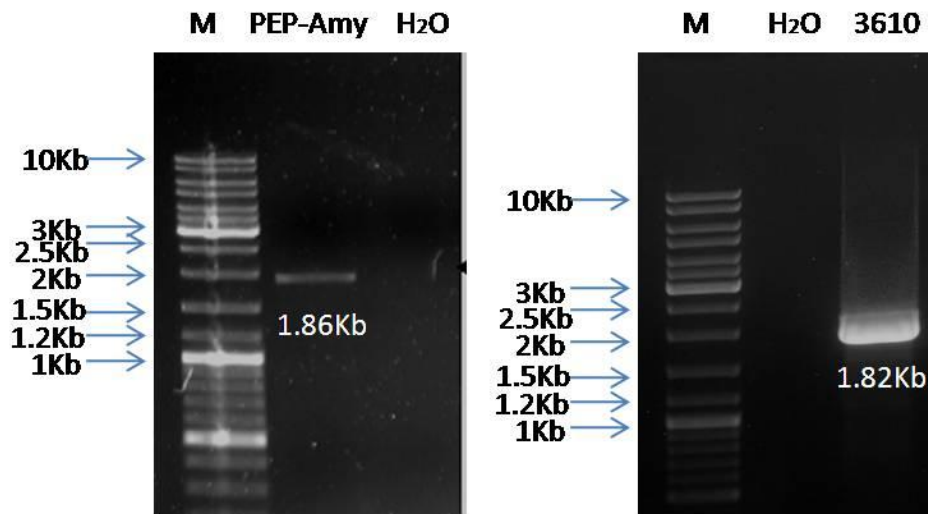
Prima di raggiungere l'obiettivo preposto, è stato, inizialmente, utilizzato il server ExPASy Proteomics ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)) per conoscere i rispettivi pesi molecolari delle tre proteine di fusione. Grazie a questo strumento di bioinformatica sono stati calcolati i seguenti PM: ~71KDa per His6-PepAmy, ~69KDa per His6-SCO3610 e ~57KDa per His6-SCO2761 (Fig.35).



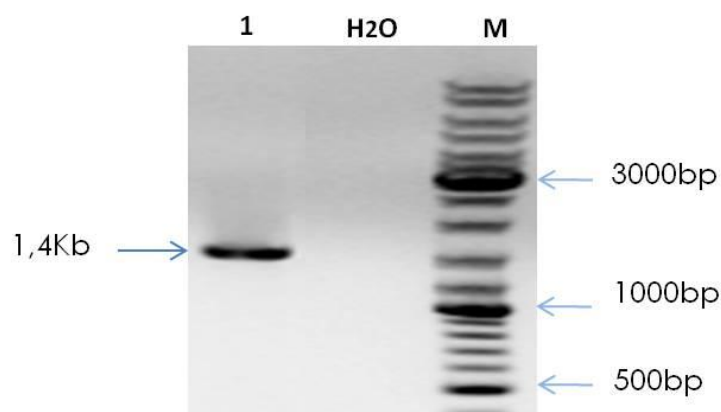
**Fig.35. Sequenza amminoacidica delle tre proteine di fusione con i PM calcolati mediante il server ExPASy.**

Successivamente, sono stati disegnati i primer per amplificare i frammenti di DNA che codificano per i geni *PEP-Amy*, *SCO3610* e *SCO2761*, in modo da permettere il clonaggio in frame nel vettore di espressione.

Ai primer sono stati aggiunti: al 5' i siti di restrizione *SacI* e *HindIII* per *PEP-Amy* e *BamHI* e *HindIII* per *SCO3610* e *SCO2761* (si veda materiali e metodi). L'analisi elettroforetica dei prodotti di PCR ha messo in evidenza una banda delle dimensioni attese di circa: 1.86Kb per *PEP-Amy*, 1.82Kb per *SCO3610* (Fig.36) e 1.42Kb per *SCO2761* (Fig.37).



**Fig.36.** Analisi elettroforetica del prodotto di amplificazione del gene *PEP-Amy* e *SCO3610* M: Gene Ruler DNA ladder mix (Fermentas).

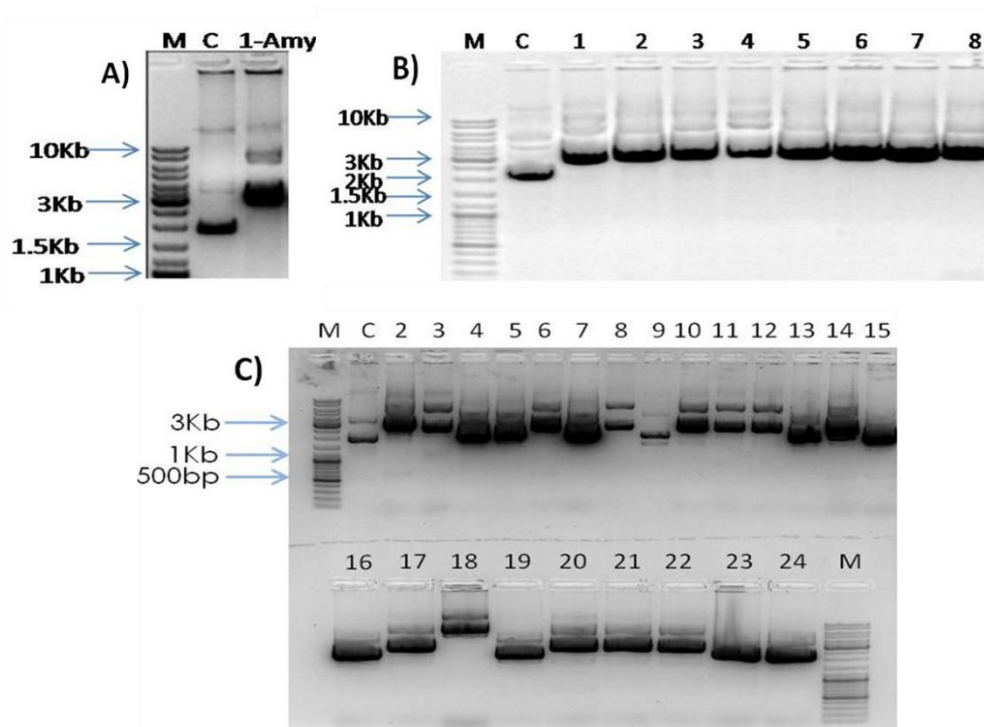


**Fig.37.** Analisi elettroforetica del prodotto di amplificazione del gene *SCO2761* M: Gene Ruler DNA ladder mix (Fermentas).

Dopo purificazione dei prodotti di amplificazione, si è proceduto al clonaggio nel vettore linearizzato pGEM-T Easy e successivamente in pRSET-B.

Per quanto riguarda il clonaggio in pGEM-T Easy, le miscele di ligase (pGEM-T Easy + inserto) dopo incubazione a 4°C o.n. sono state drop-dializzate per rimuovere i sali contenuti nel buffer di reazione e sono state fatte le relative trasformazioni delle cellule *E. coli* DH10B, ad alta efficienza, mediante elettroporazione.

Dopo incubazione o.n. a 37°C su terreno selettivo, contenente, X-Gal e ampicillina (marker di selezione per il pGEM-T Easy), sono stati ottenuti: un clone positivo per il pGEM::*PEP-Amy* (Fig.38 A), 8 cloni positivi contenenti il pGEM::*SCO3610* (Fig.38 B) e 23 cloni positivi contenenti il pGEM::*SCO2761* (Fig.38 C).



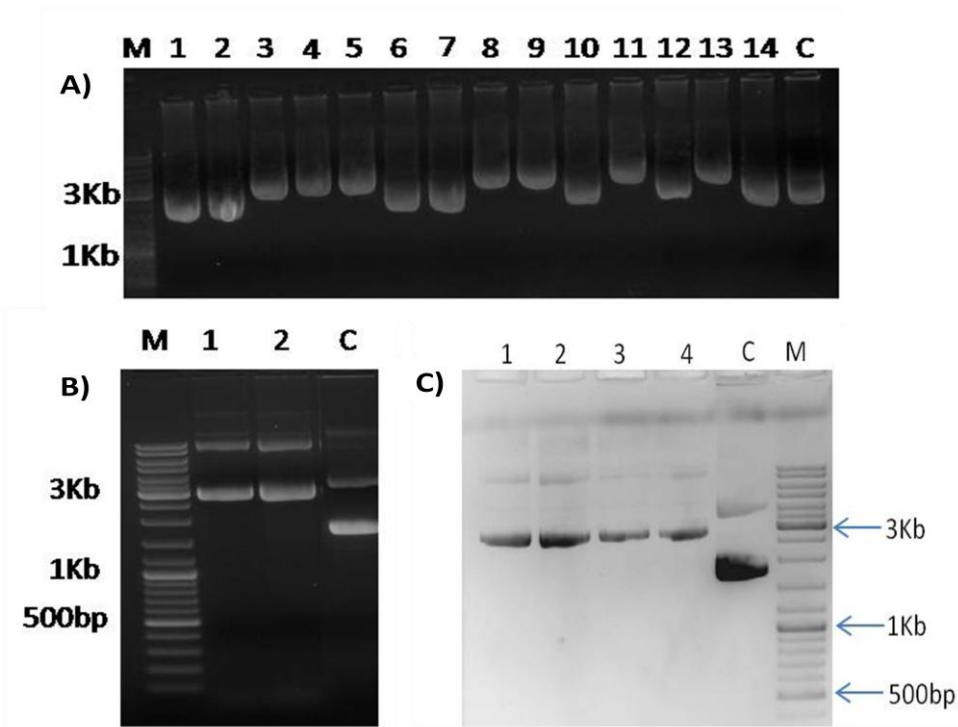
**Fig.38. Analisi elettroforetica del DNA plasmidico ricombinante. (A) Lane C: pGEM-T Easy vuoto (controllo negativo), lane 1-Amy: pGEM-T::*PEPAmy* .(B) Lane C: pGEM-T Easy vuoto, Lane da 1 a 8: pGEM::*SCO3610*. (C) Lane C: pGEM-T Easy vuoto, lane da 2 a 24: pGEM-T::*SCO2761*. M: Gene Ruler DNA ladder mix (Fermentas).**



La presenza dei tre inserti all'interno del plasmide, è stata appurata digerendo alcuni dei cloni positivi, con i rispettivi enzimi di restrizione (dati non mostrati); cosicché alcuni degli inserti presenti nei plasmidi ricombinanti, sono stati fatti sequenziare presso i laboratori della BMR Genomics e quelli privi di errori di sequenza sequenza (clone 1 del pGEM::*PEP-Amy*, clone 2 del pGEM::*SCO361* e clone 11 pGEM::*SCO2761*) sono stati utilizzati per il clonaggio, in frame con l'N-terminal His-tag, nel vettore di espressione pRSET-B.

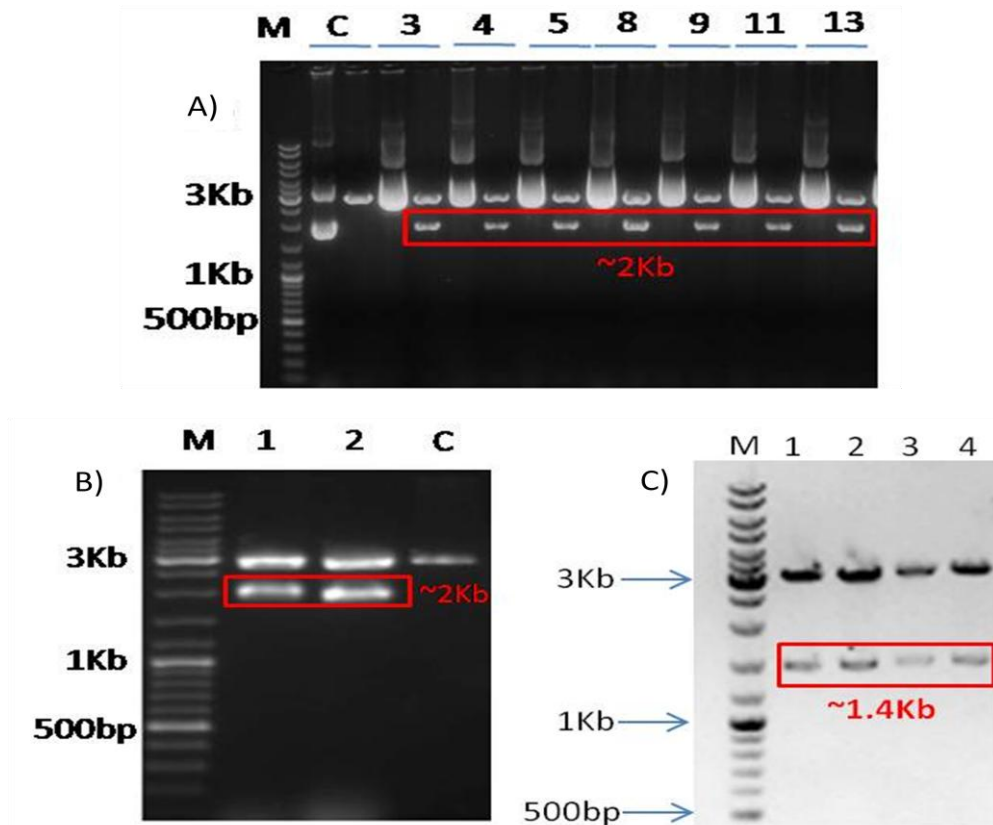
Il vettore d'espressione pRSET-B è stato estratto da cellule di *E. coli* DH5 $\alpha$  e linearizzato con gli enzimi di restrizione *SacI* e *HindIII* per *PEP-Amy* e *BamHI* e *HindIII* per *SCO3610* e *SCO2761*, al fine di produrre estremità complementari a quelle dei due inserti. Al fine di clonare gli inserti in pRSET-B, i plasmidi ricombinanti pGEM::*PEP-Amy* (clone 1), pGEM::*SCO3610* (clone 2), pGEM::*SCO2761* (clone 11), sono stati digeriti con *SacI* / *HindIII* (*PEP-Amy*) e *BamHI* *HindIII* (*SCO3610* e *SCO2761*) al fine di separare l'inserto dal vettore (dati non mostrati). Gli inserti sono stati poi purificati dal gel di agarosio per la reazione di ligase nel pRSET-B e trasformazione di *E. coli* DH10B.

Dalla trasformazione sono stati selezionati 14 cloni per pRSET::*SCO3610* (Fig.39 A), 2 cloni positivi per pRSET::*PEP-Amy* e (Fig.39B) e 4 cloni pRSET::*SCO2761* (Fig.39 C).



**Fig.39. Analisi elettroforetica del DNA plasmidico ricombinante. (A) Lane da 1 a 14 pRSET::*SCO3610*, lane C: pRSET-B vuoto (controllo negativo). (B) Lane 1 a 2 pRSET-T::*PEPAmy*, lane C: pRSET-B vuoto. (C) Lane da 1 a 4: pRSET-B::*SCO2761*, lane C: pRSET-B vuoto. M: Gene Ruler DNA ladder mix (Fermentas).**

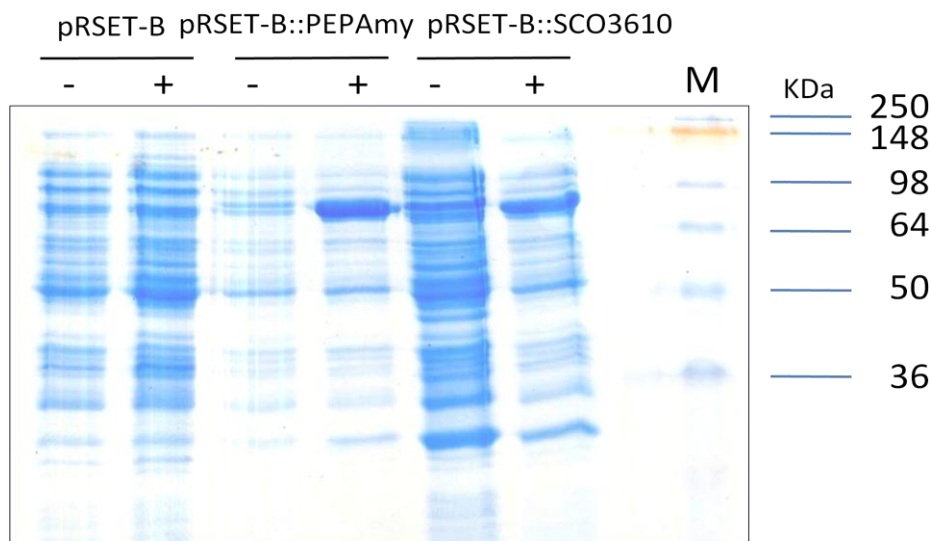
Il DNA plasmidico di questi cloni è stato digerito con quegli enzimi di restrizione per confermare la presenza dei tre inserti: *SCO3610* (Fig.40 A), *Pep-Amy* (Fig.40 B) e *SCO2761* (Fig.40 C).



**Fig.40. Analisi elettroforetica della digestione del DNA plasmidico ricombinante. (A)** Lane C: pRSET-B vuoto non digerito e digerito *Bam*HI e *Hind*III. Lane da 3, 4, 5, 8, 9, 11, 13 pRSET-B::*SCO3610* rispettivamente non digerito e digerito *Bam*HI e *Hind*III. **(B)** pRSET-T::*Pep-Amy* digerito *Sac*I e *Hind*III. Lane C: pRSET-B vuoto non digerito e digerito *Sac*I e *Hind*III. **(C)** Lane da 1 a 4: pRSET-B::*SCO2761* digerito con *Bam*HI e *Hind*III. M: Gene Ruler DNA ladder mix (Fermentas).

Successivamente, il DNA plasmidico del clone 2 di pRSET::*PEP-Amy* e del clone 3 di pRSET::*SCO3610* sono stati quindi stati usati per trasformare il ceppo di *E. coli* BL21(DE3) pLysS, mentre il DNA plasmidico del clone 4 di pRSET::*SCO2761* è stato utilizzato per trasformare il ceppo di *E. coli* BL21 AI System. Per quanto concerne il ceppo di *E. coli* BL21(DE3) pLysS, l'aggiunta di IPTG al terreno di coltura induce il gene per la T7 RNA polimerasi posto sotto il controllo del promotore *lacUV5*; la polimerasi lega il promotore T7 e attiva la trascrizione dei geni da overesprimere. L'espressione basale del gene (che potrebbe ridurre la velocità di crescita o portare alla morte cellulare) è ridotta dalla presenza del lisozima T7, il cui gene si trova nel pLysS.

Le colture di *E. coli* BL21(DE3) pLysS/pRSET-B::*PEP-Amy*, BL21(DE3) pLysS/pRSET-B::*SCO3610*, e BL21(DE3) pLysS/pRSET-B (controllo), una volta raggiunta una O.D.600nm compresa fra 0.4 e 0.6, sono state incubate tre ore a 30°C in presenza di IPTG 1mM. Dopo l'induzione le cellule sono state lisate e l'estratto proteico totale (frazione solubile) è stato analizzato mediante elettroforesi SDS-PAGE al 12% (Fig.41).

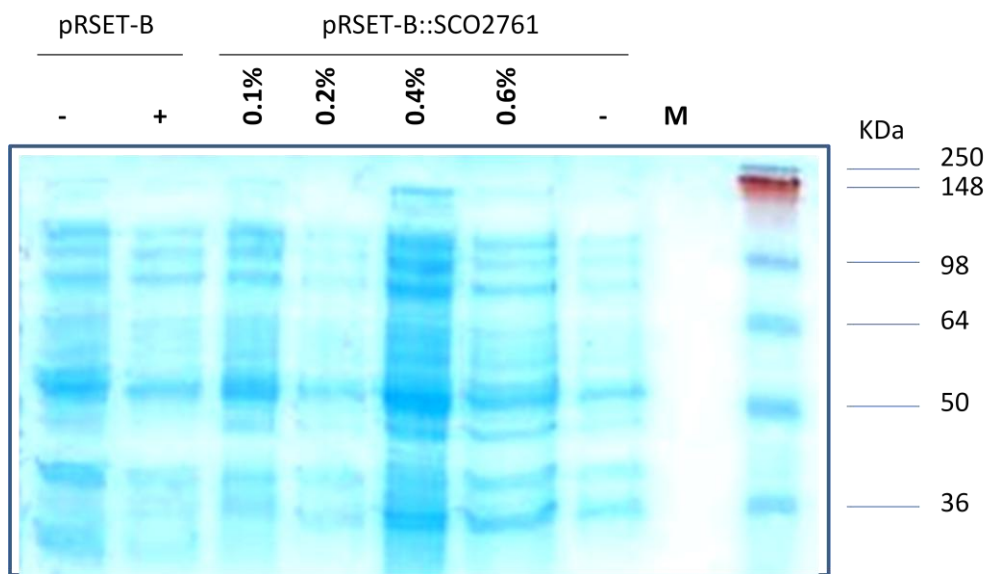


**Fig.41. Analisi SDS-PAGE 12% delle proteine estratte dal ceppo di *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, pRSET-B, pRSET-B::*PEP-Amy*, pRSET-B::*SCO3610*. (-) indica le proteine totali estratte da cellule non indotte, (+) indica le proteine totali estratte da cellule, indotte con IPTG 1mM. M: Marker SeeBlue Plus 2 Prestained Standard (Invitrogen).**

Per quanto concerne, invece, l'overespressione della proteina His<sub>6</sub>-SCO2761, è stato utilizzato come ospite il ceppo di *E. coli* BL21-AI™ One Shot® Competent (Invitrogen). Questo ceppo è inducibile dall'arabinosio, in quanto è altamente regolato dal promotore AraBAD situato a monte del gene della T7 RNA polimerasi. Il promotore *araBAD* (PBAD) è usato per controllare l'espressione della T7 RNA polimerasi sia positivamente che negativamente mediante il prodotto del gene *araC*. *AraC* è un regolatore trascrizionale che forma un complesso con l'L-arabinosio. In assenza di arabinosio, il dimero *AraC* contatta l'operone AraBAD (siti O2 e I1), formando un loop. Affinché ci sia l'attivazione della trascrizione sono necessari due eventi:

- Il legame dell'L-arabinosio ad araC per determinare il rilascio di quest'ultimo dal sito O2 del DNA e il legame al sito I2
- Il legame del complesso CAP-cAMP al DNA per stimolare il legame di AraC ai siti I1 e I2 del DNA.

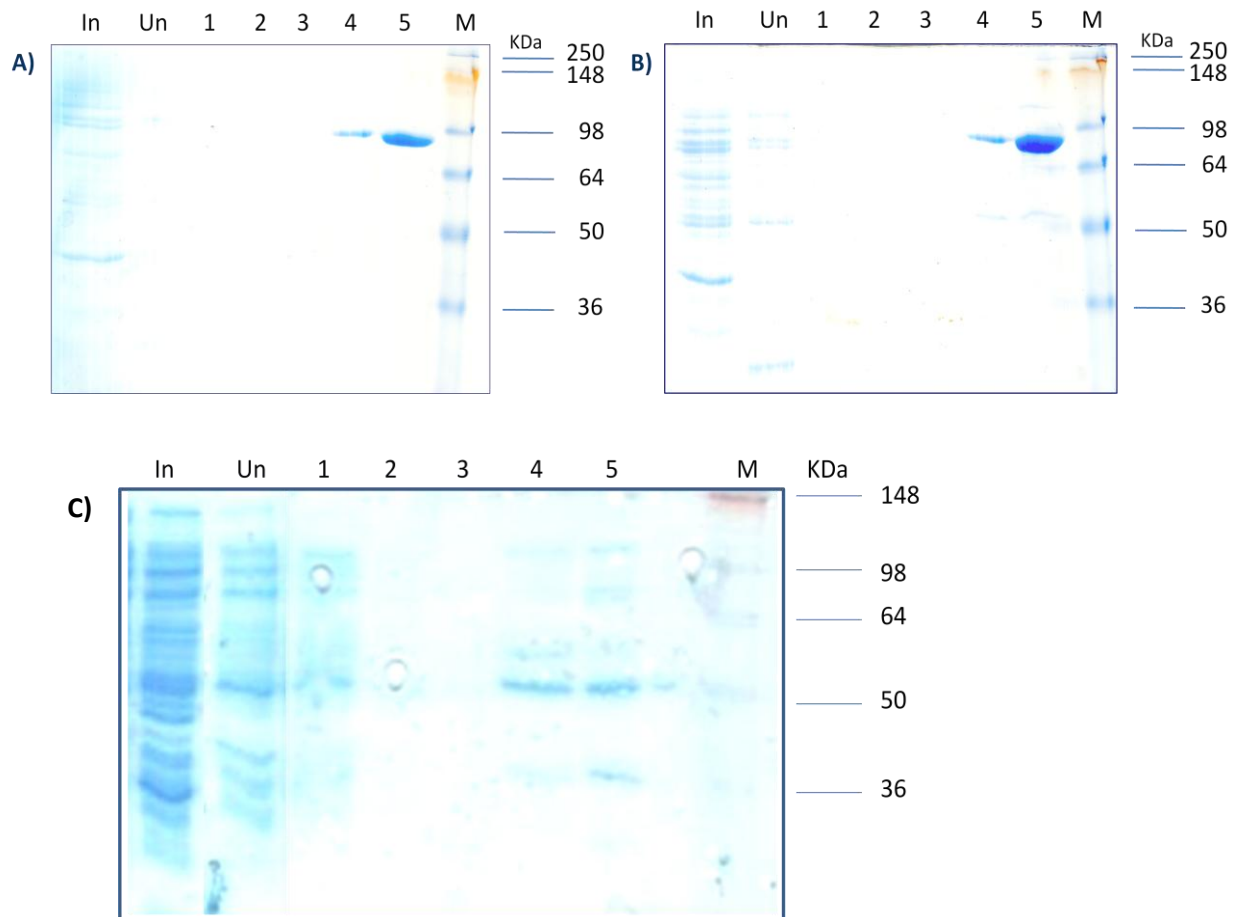
Le colture di *E. coli* BL21 AI/pRSET-B::*SCO2761* e BL21 AI/pRSET-B (controllo), una volta raggiunta una O.D.600nm pari a 0.4-0.6, sono state incubate tre ore a 30°C a differenti concentrazioni di L-arabinosio (0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.6%). Dopo l'induzione le cellule sono state lisate e l'estratto proteico totale è stato analizzato mediante elettroforesi SDS-PAGE al 12% (Fig.42).



**Fig.42. Analisi SDS-PAGE 12% delle proteine estratte dal ceppo di *E. coli* BL21 AI System, pRSET-B, pRSET-B::*SCO2761*. (-) indica le proteine totali estratte da cellule non indotte, (+) indica le proteine totali estratte da cellule, indotte con arabinosio. M: Marker SeeBlue Plus 2 Prestained Standard (Invitrogen).**

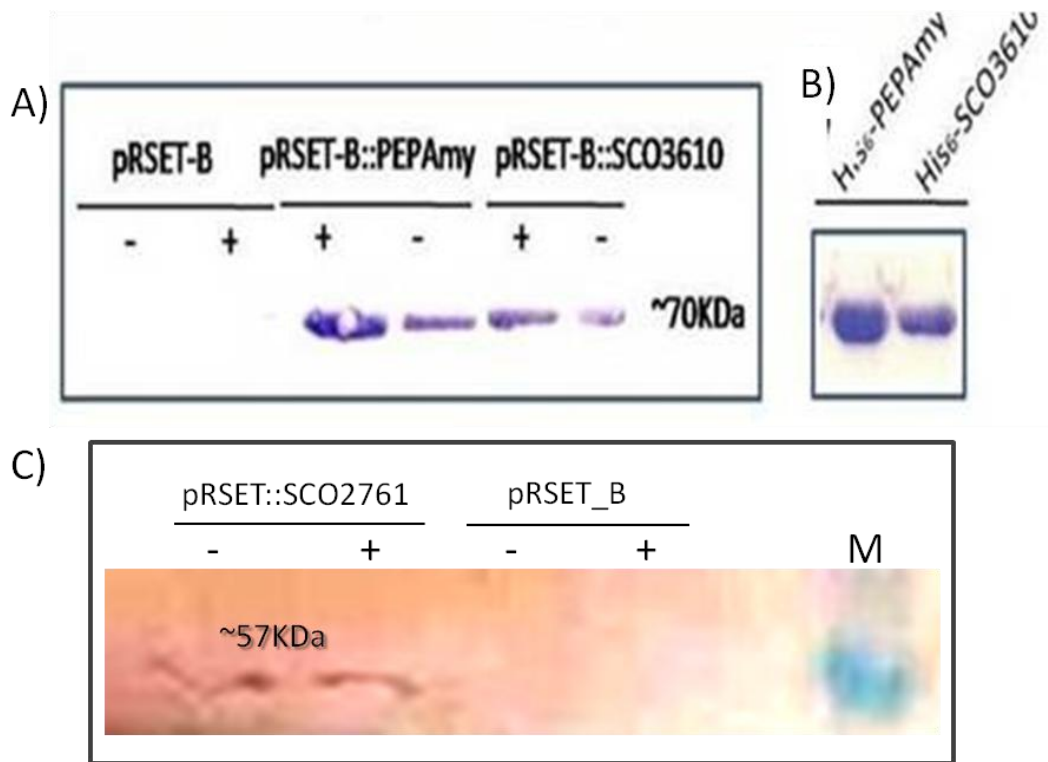
Nonostante siano state utilizzate differenti concentrazioni di arabinosio per l'induzione delle proteina di fusione, in nessuno dei casi considerati si è ottenuta una massiva overespressione corrispondente a una banda di ~57KDa. Questo dato, tuttavia, è stato ricondotto solo ed esclusivamente al fatto che questo gene in *S. coelicolor* codifica per un prodotto proteico che probabilmente è secreto all'esterno della cellula. Nonostante tutto, infatti, si è proceduto alla purificazione, in condizioni native, di questa proteina e delle altre due overesprese. Per fare ciò è stata utilizzata una resina Ni-NTA agarose (Invitrogen) che permette il legame

della coda di sei istidine delle proteine ricombinanti agli ioni nichel contenuti nella resina della colonna cromatografica. L'imidazolo è un competitore di questo legame e viene aggiunto a concentrazioni crescenti per l'eluizione dei polipeptidi legati. Le proteine purificate, His<sub>6</sub>-PEPAmy, His<sub>6</sub>-SCO3610 e His<sub>6</sub>-SCO2761, sono state analizzate per SDS-PAGE al 12% (Fig.43).



**Fig.43. SDS-PAGE 12% delle proteine His<sub>6</sub>-PEP-Amy (A) e His<sub>6</sub>-SCO3610 (B) e (C) His<sub>6</sub>-SCO2761 ottenute dopo purificazione. In: Input; Un: Unbound. Lane 1, 2, 3 wash 1, 2, 3 rispettivamente. Lane 4 eluizione con imidazolo 500mM, lane 5 eluizione con imidazolo 1M. M: Marker SeeBlue Plus 2 Prestained Standard (Invitrogen).**

Il western blot, con un anticorpo anti-His-tag delle proteine totali estratte e purificate mostra bande della dimensione attese (~70KDa e ~57KDa). Proteine che reagiscono con l'anticorpo sono assenti nel controllo (Fig.44).



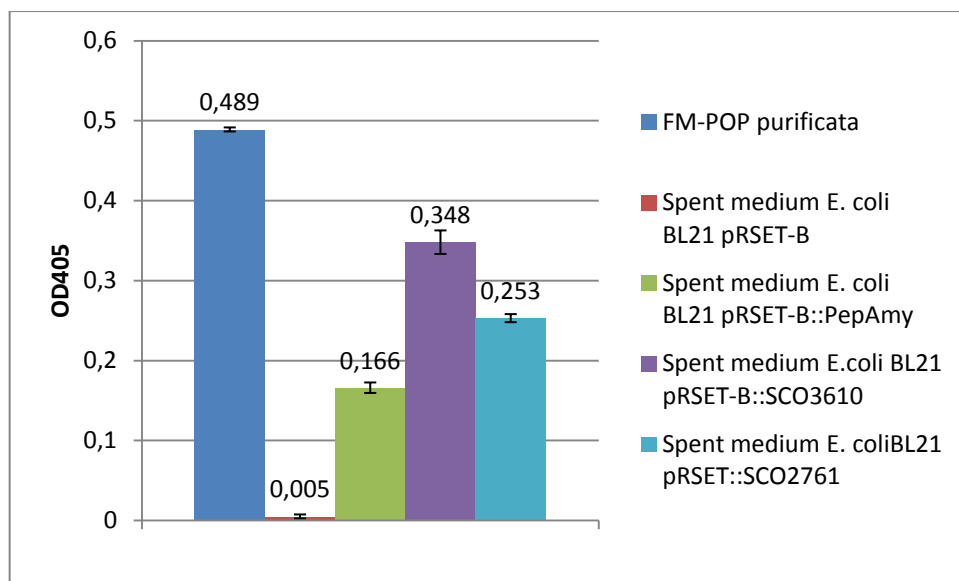
**Fig.44. Analisi western blot. (A) Proteine totali estratte da *E. coli* BL21(DE3)pLysS pRSET-B, pRSET-B::PEP-Amy e pRSETB::SCO3610 (B) Proteine purificate His<sub>6</sub>-PEP e His<sub>6</sub>-SCO3610 (C) Proteine totali estratte da *E. coli* BL21 AI system pRSET-B, pRSET-B::SCO2761.**

## 4.5. Studio *in vitro* dell'attività enzimatica

Per confermare i risultati ottenuti dagli studi *in silico* e per verificare se le proteine His<sub>6</sub>-PEPAmy, His<sub>6</sub>-SCO3610 e His<sub>6</sub>-SCO2761 hanno attività prolilendopeptidasica, sono stati condotti dei saggi di attività enzimatica utilizzando il substrato Z-Gly-Pro-pNA.

I saggi sono stati eseguiti utilizzando gli “spent medium” (perché questi enzimi e in particolare SCO2761, sono secreti) delle colture di *E. coli* BL21 che overesprimono queste proteine e le proteine purificate. Come controllo positivo è stata usata, invece, la PEP isolata da *F. meningosepticum* fornita dalla casa produttrice.

In funzione dei valori di assorbanza a 405nm, i valori letti per gli “spent medium” sono stati quelli riportati nella figura 45:



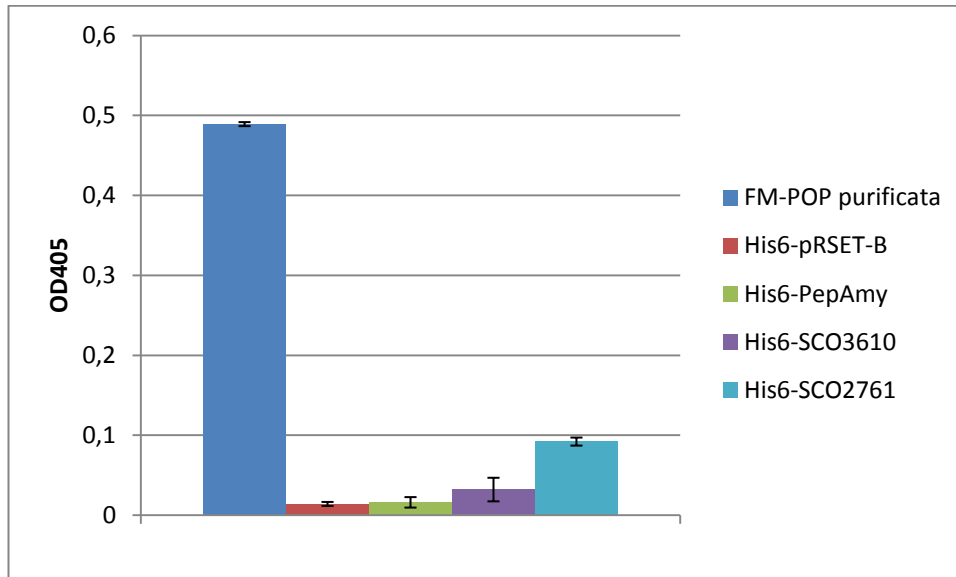
**Fig.45. Saggi enzimatici degli spent medium.**

Come risulta dall'istogramma, è palese, anche se a livelli diversi, l'attività di degradazione del substrato Z-Gly-Pro-pNA nello spent medium dei ceppi BL21 pRSET::SCO3610, BL21 pRSET::SCO2761, e pRSET::PepAmy. L'attività è, invece, assente nel controllo negativo BL21 pRSET-B.

Per quanto riguarda, invece, i valori di assorbanza delle proteine purificate dagli estratti proteici totali (His<sub>6</sub>-PEPAmy, His<sub>6</sub>-SCO3610 e His<sub>6</sub>-SCO2761), questi



sono inferiori rispetto a quelli riportati negli spent medium. Infatti, come è evidente dal grafico in figura 46, l'attività delle proteine di fusione è molto più bassa rispetto al controllo positivo (FM-PEP).



**Fig.46. Saggi enzimatici condotti sulle proteine di fusione contenenti l'His-tag e purificate da *E. coli*.**

Questo risultato, potrebbe essere ricondotto alla presenza dell'imidazolo nelle proteine purificate, che probabilmente inibisce la reazione enzimatica.

Inoltre e soprattutto per quanto concerne la His<sub>6</sub>-SCO2761, l'apparente bassa attività potrebbe anche essere dovuta al fatto che questa proteina in *S. coelicolor* è una putativa tripeptidil-amminopeptidasi secreta e questo spiegherebbe anche i valori positivi ottenuti per i saggi effettuati sugli spent medium.

# 5. Conclusioni

---

La prolina è un amminoacido che gioca un ruolo chiave nel proteggere i peptidi dalla degradazione proteolitica. Le proliloligopeptidasi (PEPs) sono enzimi evolutivamente conservati, capaci di idrolizzare legami peptidici sul versante C-terminale di residui di prolina interni. Per esempio, nell'uomo sono al centro dell'attenzione perché sono coinvolte nell'insorgenza di patologie a carico del sistema nervoso e non solo. Per quanto riguarda invece le PEPs batteriche, a oggi, pochi studi sono stati fatti su questi enzimi e le attuali conoscenze mettono in evidenza la loro abilità a degradare le proteine del glutine. Nei soggetti affetti da malattia celiaca, gli elevati livelli di prolina presenti nella gliadina e nella glutenina, rendono queste proteine resistenti alla degradazione proteolitica da parte degli enzimi digestivi.

Grazie alla loro capacità di accelerare la digestione del glutine nel tratto gastrointestinale, le prolilendopeptidasi microbiche potrebbero risultare dei buoni candidati farmacologici per il trattamento della malattia celiaca. Infatti, studi inerenti alle prolil-endopeptidasi di *F. meningosepticum* e di *A. niger* hanno suggerito il loro utilizzo come terapia, per via orale. Altri studi hanno anche dimostrato che la degradazione dei peptidi di gliadina ricchi di prolina, durante la fermentazione, ad opera delle peptidasi batteriche influenza positivamente la tolleranza dell'uomo alle proteine del glutine.

Sulla base di tali premesse, nel laboratorio dove ho svolto il dottorato di ricerca è stato avviato uno studio riguardante l'identificazione di enzimi con probabile attività prolilendopeptidasica negli attinomiceti *Amycolatopsis balhimycina* e *Streptomyces coelicolor* A3(2). In particolare, il lavoro è stato articolato in più fasi. Nella prima fase, *A. balhimycina* e *S. coelicolor* A3(2) sono stati fatti crescere su un terreno minimo contenente glutine per comprendere se erano in grado di utilizzarlo come fonte di amminoacidi.

Dimostrato quanto detto con questo risultato preliminare, sono stati, poi, messi a punto dei saggi di attività enzimatica *in vitro* sugli estratti proteici totali dei due attinomiceti. Dai dati ottenuti è risultato che le proteine totali estratte a differenti ore di crescita, avevano la capacità di degradare il substrato Z-Gly-Pro-pNA e questa capacità era data da un aumento di assorbanza a una lunghezza d'onda di 405nm, seppur in misura minore rispetto al controllo positivo (*F. capsulatum*).

Pertanto, nella seconda fase del lavoro sono stati fatti degli studi di omologia di sequenza per individuare i geni che potevano codificare per proteine con attività peptidasica prolina specifica. Mediante questa ricerca sono stati identificati: il gene *PEP-Amy* di *A. balhimycina* e due geni, *SCO3610* e *SCO2761* di *S. coelicolor*. Per verificare se l'espressione di questi geni è influenzata dalle diverse condizioni di crescita, sono state fatte delle analisi mediante PCR quantitativa (qRT-PCR). Per quanto riguarda, il gene *PEPAmy* l'analisi di espressione genica ha messo in evidenza che in terreno R2YED si esprime 8-volte di più a 48h di crescita rispetto alle altre ore. In Nutrient broth, durante tutte le fasi di crescita, non c'è un netto incremento della trascrizione, mentre in terreno MG alle 32h, la trascrizione è quasi 6-volte di più rispetto agli altri tempi considerati. I dati dei livelli trascrizionali per i geni *SCO3610* e *SCO2761* di *S. coelicolor* A3(2), invece, sono stati fatti su terreno MG e in un terreno minimo (MM) con e senza glutine. Per ciò che concerne il terreno MG, a 28h e a 46h *SCO3610* mostra un aumento della trascrizione a differenza delle 32h, 48h e 72h. Per il gene *SCO2761*, il livello di espressione aumenta notevolmente a 46h (quasi 27-volte), diminuisce a 28h e 48h (11-volte e 7-volte rispettivamente) e ancor di più a 32h e a 72h (3-volte e 1-volta rispettivamente).

Per quanto riguarda invece il terreno minimo con e senza glutine, per *SCO3610* c'è un aumento della trascrizione in MM e ancor di più su MM con glutine (11-volte). Il gene *SCO2761* invece sembra essere costitutivo in entrambe le condizioni di crescita considerate.

Nella fase finale di questo studio, i tre geni sono stati overespressi in *E. coli* e i loro prodotti proteici (*His<sub>6</sub>-PEPAmy*, *His<sub>6</sub>-SCO3610* e *His<sub>6</sub>-SCO2761*) purificati. L'attività enzimatica è stata quindi saggiata sugli "spent medium" (dove i ceppi di *E. coli* che overesprimevano queste putative peptidasi erano cresciuti) e sulle proteine purificate dagli estratti proteici totali. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'attività proteolitica cercata è presente maggiormente negli spent medium e in misura minore nelle proteine purificate. Questo è il motivo per cui si potrebbe cercare di purificare queste proteine dal terreno di coltura perché questi enzimi sono probabilmente secreti, oppure si potrebbe cercare di eliminare l'imidazolo

dalle proteine di fusione purificate, perché questo interferisce con la reazione enzimatica.

Nonostante ciò, questi risultati hanno permesso di descrivere per la prima volta dei geni che non erano mai stati studiati negli attinomiceti e hanno dato l'input per successivi studi. In futuro, infatti, si potrebbe valutare l'azione di queste PEPs su altri substrati enzimatici o direttamente sui peptidi tossici della gliadina.

Per concludere, la costruzione di mutanti in questi geni, attualmente in corso nel nostro laboratorio, potrebbe chiarire definitivamente il loro ruolo, durante lo sviluppo morfologico e fisiologico di questi microrganismi.

## 6. Bibliografia

---

- Bellemere, G., Vaudry, H., Mounien, L., Boutelet, I., Jegou, S., 2004. Localization of the mRNA encoding prolyl endopeptidase in the rat brain and pituitary". *J. Comp. Neurol.* 471, 128–143.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J., and Hopwood, D. A. (2002). "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *Nature* 417(6885), 141–147
- Bocskei Z, Fuxreiter M, Naray-Szabo G, Szabo E, Polgar L. "Crystallization and preliminary X-ray analysis of porcine muscle prolyl oligopeptidase". *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1998 Nov 1;54(Pt 6 Pt 2):1414-5.
- Briani C, Samaroo D, Alaedini A. "Celiac disease: from gluten to autoimmunity". *Autoimmun Rev.* 2008 Sep;7(8):644-50. Epub 2008 Jun 25. Review.
- Chater, K. F. (2001). "Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex?" *Curr. Opin. Microbiol.* 4(6), 667–673.
- Chevallier, S., Goeltz, P., Thibault, P., Banville, D., Gagnon, J., 1992. Characterization of a prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. Complete sequence and localization of the active-site serine. *J. Biol. Chem.* 267, 8192–8199.
- Ciccocioppo, R., A. Di Sabatino, and G.R. Corazza, The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol*, 2005. 140(3): p. 408-16.
- Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, et al. "Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function". *Gut.* Feb 2003;52(2):218-223
- Damian F. Cunningham, Brendan O'Connor. (1997). Proline specific peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1343: 160–186.
- Di Cagno R., M. De Angelis, S. Auricchio, "Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in Celiac Sprue patients," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 2, pp.1088–1096, 2004.

- Dresdner, K., Barker, L.A., Orłowski, M., Wilk, S., 1982. Subcellular distribution of prolyl endopeptidase and cation-sensitive neutral endopeptidase in rabbit brain. *J. Neurochem.* 38, 1151–1154.
- Edens, L., Dekker, P., van der Hoeven, R., Deen, F., de Roos, A. and Floris, R. (2005) Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7950–7957.
- Fülöp V., Szeltner Z. and Polgár L. (2000) Catalysis of serine oligopeptidases is controlled by a gating filter mechanism. *EMBO Reports* 1: 277–281
- Fülöp, V., Böcskei, Z. and Polgár, L. (1998) Prolyl oligopeptidase: an unusual  $\beta$ -propeller domain regulates proteolysis. *Cell*, 94, 161–170.
- Fuxreiter, M., Magyar, C., Juhasz, T., Szeltner, Z., Polgar, L., Simon, I., 2005. Flexibility of prolyl oligopeptidase: molecular dynamics and molecular framework analysis of the potential substrate gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 358, 141–148.
- Grellier, P., Vendeville, S., Joyeau, R., Bastos, I.M., Drobecq, H., Frappier, F., Teixeira, A.R., Schrevel, J., Davioud-Charvet, E., Sergheraert, C., Santana, J.M., 2001. Trypanosoma cruzi prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J. Biol. Chem.* 276, 47078–47086
- Harris, M. N., Madura, J. D., Ming, L. J. and Harwood, V. J. (2001) Kinetic and mechanistic studies of prolyl oligopeptidase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* 276, 19310–19317.
- Harwood, V.J., Denson, J.D., Robinson-Bidle, K.A., Schreier, H.J., 1997. Overexpression and characterization of a prolyl endopeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 179, 3613–3618.
- Harwood, V.J., Schreier, H.J., 2001. Prolyl oligopeptidase from *Pyrococcus furiosus*. *Method. Enzymol.* 330, 445–454.
- Holt TG, Chang C, Laurent-Winter C, Murakami T, Garrels JI, Davies JE, Thompson CJ: “Global changes in gene expression related to antibiotic synthesis in *Streptomyces hygrosopicus*.” *Mol Microbiol* 1992, 6:969-980.
- Irazusta, J., Larrinaga, G., Gonzalez-Maeso, J., Gil, J., Meana, J.J., Casis, L., 2002. Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain. *Neurochem. Int.* 40, 337–345.



- Ishino, T., Ohtsuki, S., Homma, K., Natori, S., 1998. cDNA cloning of mouse prolyl endopeptidase and its involvement in DNA synthesis by Swiss 3T3 cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 123, 540–545.
- Kabashima, T., Fujii, M., Meng, Y., Ito, K. and Yoshimoto, T. (1998) Prolyl endopeptidase from *Sphingomonas capsulata*: isolation and characterization of the enzyme and nucleotide sequence of the gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 358, 141–148
- Lechevalier, M. P., Prauser, H., Labeda, D. P. & Ruan, J.-S. “Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov”. *Int J Syst Bacteriol* 36, 29–37 (1986).
- Madden, T., Ward, J.M. and Ison, A.P. (1996) “Organic acid excretion by *Streptomyces lividans* TK24 during growth on defined carbon and nitrogen sources”. *Microbiology* 142, 3181–3185.
- O’Leary, R.M., Gallagher, S.P., O’Connor, B., 1996. Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolylendopeptidase from bovine brain. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28, 441–449.
- Perry I, Tselepis C, Hoyland J, Iqbal TH, Sanders DSA, Cooper BT, Jankowski JAZ. “Reduced Cadherin/Catenin complex expression in celiac disease can be reproduced in vitro by cytokine stimulation”. *Lab Invest* 1999;79:1489-1499.
- Polgár L., Kollát E. and Hollósi M. (1993) Prolyl oligopeptidase catalysis: reactions with thiono substrates reveal substrate- induced conformational change to be the rate-limiting
- Polgar, L. (1992) Unusual secondary specificity of prolyl oligopeptidase and the different reactivities of its two forms toward charged substrates. *Biochemistry* 31, 7729–7735.
- Presutti RG, Cangemi JR, Cassidy HD. “Celiac disease”. *Am Fam Phys* 2007; 76:1795-1802.
- Puglia AM, **Vohradsky J** and Thompson CJ: “Developmental control of the heat-shock stress regulon in *Streptomyces coelicolor*”. *Molecular Microbiology.* 17: 737-746, 1995
- Qi PF, Wei YM, Yue YW, Yan ZH, Zheng YL “Biochemical and molecular characterization of gliadins”. *Mol Biol*, 2006. 40(5): p. 796-807.
- Rawlings N. D., Polgár L. and Barrett A. J. (1991) A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. *Biochem. J.* 279: 907–908

- Rennex, D., Hemmings, B.A., Hofsteenge, J., Stone, S.R., 1991. cDNA cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and identification of the active-site seryl residue. *Biochemistry* 30, 2195–2203.
- Rizzello C.G., M. De Angelis, R. Di Cagno., “Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 14, pp. 4499–4507, 2007.
- Robinson, K. A., Bartley, D. A., Robb, F. T. and Schreier, H. J. (1995) A gene from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* whose deduced product is homologous to members of the prolyloligopeptidase family of proteases. *Gene* 152, 103–106.
- Rocher, Soriano F, Molina E., González-Limas G, Méndez E., Characterization of distinct alpha- and gamma-type gliadins and low molecular weight components from wheat endosperm as celiac immunoreactive proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1995. 1247(1): p. 143-8.
- Schulz I, Gerhartz B, Neubauer A, Holloschi A, Heiser U, Hafner M, Demuth HU. Modulation of inositol 1,4,5-triphosphate concentration by prolyl endopeptidase inhibition. *Eur J Biochem* 2002;269:5813–5820.
- Schulz, I., Zeitschel, U., Rudolph, T., Ruiz-Carrillo, D., Rahfeld, J.U., Gerhartz, B., Bigl, V., Demuth, H.U., Rossner, S., 2005. Subcellular localization suggests novel functions for prolyl endopeptidase in protein secretion. *J. Neurochem.* 94, 970–979.
- Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M. “Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue”. *Pediatr Res* 1998;43:435-441.
- Shan L, Marti T, Sollid L.M., Gray GM, Khosla C. “Comparative biochemical analysis of three bacterial prolylendopeptidases: implications for coeliac sprue”. *BiochemJ.* 2004 Oct 15;383(Pt 2):311-8.
- Shan L, Mathews II, Khosla C. “Structural and mechanistic analysis of two prolyl endopeptidases: role of interdomain dynamics in catalysis and specificity” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Mar 8;102(10):3599-604.
- Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, and Khosla C (2002) Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science (Wash DC)* 297:2275–2279.

- Shirasawa, Y., Osawa, T., Hirashima, A., 1994. Molecular cloning and characterization of prolyl endopeptidase from human T cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 115, 724–729.
- Sridhar, V. R., Hughes, J. E., Welker, D. L., Broadbent, J. R. and Steele, J. L. (2005) Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3025–3032.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. “Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov.” *Int J Syst Bacteriol* 47, 479±491 (1997).
- Stepniak, D., Spaenij-Dekking, L., Mitea, C., Moester, M., de Ru, A., Baak-Pablo, R., van Veelen, P., Edens, L. and Koning, F. (2006) Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolylendoprotease: implications for celiac disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291, G621–G629.
- Szeltner, Z., Rea, D., Juhasz, T., Renner, V., Fu'lo' p, V., Polga' r, L., 2004. Concerted structural changes in the peptidase and the propeller domains of prolyl oligopeptidase are required for substrate binding. *J. Mol. Biol.* 340, 627–637.
- Tatham A.S., Marsh M.N., Wieser H., Shewry P.R.”Conformational studies of peptides corresponding to the coeliac-activating regions of wheat  $\alpha$ -gliadin”. *Biochem. J.*, 1990 a, 270, 313–318.
- Umezawa Y., Yokoyama K., Kikuchi Y., Date M., Ito K., Yoshimoto T. Matsui H. “Novel Prolyl Tri/Tetra-Peptidyl Aminopeptidase from *Streptomyces mobaraensis*: substrate Specificity and Enzyme Gene Cloning” *J. Biochem.* 136, 293–300 (2004).
- Vanhoof, G., Goossens, F., Hendriks, L., De Meester, I., Hendriks, D., Vriend, G., Van Broeckhoven, C., Scharpe, S., 1994. Cloning and sequence analysis of the gene encoding human lymphocyte prolyl endopeptidase. *Gene* 149, 363–366.
- Venalainen, J. I., Juvonen, R. O. and Mannisto, P. T. (2004) “Evolutionary relationships of the prolyl oligopeptidase family enzymes”. *Eur. J. Biochem.* 271, 2705–2715.
- Walter R., Shlank H., Glass J. D., Schwartz I. L. and Kerenyi T. D. (1971) Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science* 173: 827–829.
- Wieser H., Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr.*, 1996, Suppl. 412, 3–9.

- Xie, H. X., Nie, P. & Sun, B. J. (2004). Characterization of two membrane-associated protease genes obtained from screening outmembrane protein genes of *Flavobacterium columnare* G4. *J Fish Dis* 27, 719–729.
- Yamaguchi, M., Hanzawa, S., Hirano, K., Yamagata, Y. and Ichishima, E. (1993) Specificity and molecular properties of penicillolysin, a metalloproteinase from *Penicillium citrinum*. *Phytochemistry* 33, 1317–1321.
- Yoshimoto, T., Fischl, M., Orłowski, R. C. and Walter, R. (1978) Post-proline cleaving enzyme and post-proline dipeptidyl aminopeptidase. Comparison of two peptidases with high specificity for proline residues. *J. Biol. Chem.* 253, 3708–3716.
- Yoshimoto, T., Kanatani, A., Shimoda, T., Inaoka, T., Kokubo, T., Tsuru, D., 1991. Prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*: cloning and sequencing of the enzyme gene. *J. Biochem. (Tokyo)* 110, 873–878.
- Yoshimoto, T., Miyazaki, K., Haraguchi, N., Kitazono, A., Kabashima, T., Ito, K., 1997. Cloning and expression of the cDNA encoding prolyl oligopeptidase (prolyl endopeptidase) from bovine brain. *Biol. Pharm. Bull.* 20, 1047–1050.
- Yoshimoto, T., Nishimura, T., Kita, T. and Tsuru, D. (1983) Post-proline cleaving enzyme (prolyl endopeptidase) from bovine brain. *J. Biochem. (Tokyo)* 94, 1179–1190.
- Yoshimoto, T., Sattar, A.K., Hirose, W., Tsuru, D., 1988. Studies on prolyl endopeptidase from shakashimeji (*Lyophyllum cinerascens*): purification and enzymatic properties. *J. Biochem. (Tokyo)* 104, 622–627.