

ABSTRACT

Most enzymes involved in tryptophan catabolism are evolutionarily conserved. Tryptophan and its degradation products are under investigation because they are implicated in a lot of Nervous System pathologies (Fujigaki *et al.*, 1998; Wonodi *et al.*, 2010) and in psoriasis (Ito *et al.*, 2004). Variations of these pathways have also been recently related to antimicrobial and immunoregulatory strategies (Schmidt *et al.*, 2009). Moreover, in the antibiotic producing *Streptomyces*, tryptophan has an important role in the production of different lipopeptide antibiotics (Kim *et al.*, 2004).

Studies on tryptophan catabolism could be useful both to increase antibiotic production in *Actinomycetes* and to characterize enzymes implicated in different human pathologies.

In *Streptomyces coelicolor* all genes involved in tryptophan biosynthesis have been described, however only a few genes involved in the catabolism of this amino acid have been identified. Furthermore, regulation mechanisms remain almost unclear. Tryptophan is incorporated in the lipopeptide calcium dependent antibiotic (CDA), that is produced by this bacterium and its biosynthesis is not controlled by feedback regulation.

This work describes a cluster of three genes, *SCO3644* (*kynB*), *SCO3645* (*kynU*) e *SCO3646* (*kynA*), involved in tryptophan degradation. In particular, they code for the three enzymes of the pathway that uses tryptophan to produce anthranilate.

Enzymatic assays of purified recombinant proteins confirmed that *SCO3644* codes for a kynurenine formamidase, *SCO3645* for a kynureninase and *SCO3646* for a tryptophan 2,3-dioxygenase. These genes are homologous respectively to *kynB*, *kynU* and *kynA* of other microorganisms.

Recently, it has been demonstrated that protein extracts from *S. coelicolor* induced by tryptophan 2,5 mM show high kynureninase and kynurenine formamidase activities (Keller *et al.*, 2010). The qRT-PCR analysis revealed that *kynA* and *kynU* expression is increased when tryptophan 0,25 mM is added to cultures. This concentration doesn't seem enough to increase *kynB* transcription nor to change levels of enzyme activities in protein extracts. This result suggests that tryptophan degradation starts with low concentration of the amino acid. Transcription analysis revealed that only *kynU* and *kynA* belong to the same operon. On the other hand, *kynB* is not co-transcribed with them.

Interestingly, *S. coelicolor* Δ *kynU* produces higher amounts of CDA compared to the wt strain. This phenotype seems not to be due to an increased transcription of CDA biosynthetic genes, but it's likely to be dependent on an increase of the tryptophan pool inside the cell.

INTRODUZIONE

Catabolismo del triptofano

La degradazione del triptofano nei diversi organismi avviene tramite un meccanismo molto complesso che coinvolge più vie cataboliche. Questo aminoacido può essere utilizzato per produrre acetil-CoA sia attraverso il piruvato (tramite la sua iniziale conversione in alanina) che attraverso l'acetoacetil-CoA; può entrare nella via di degradazione del benzoato; può essere infine utilizzato per la produzione di indolo (Sasaki-Imamura *et al.*, 2010). Ancora, alcuni degli intermedi del catabolismo del triptofano sono precursori per la biosintesi di importanti biomolecole tra cui il nicotinato (precursore del NAD e del NADP), la serotonina, neurotrasmettitore dei vertebrati e il fattore di crescita indoloacetato nelle piante.

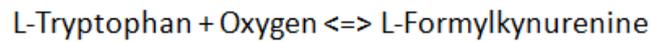
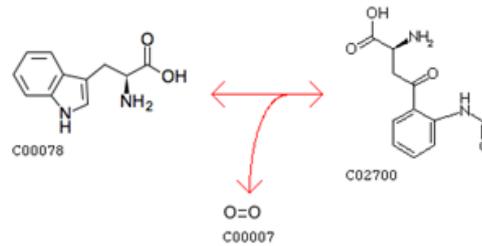
Nei batteri, la degradazione del triptofano può essere realizzata tramite l'enzima triptofanasi che catalizza il taglio del triptofano a indolo, acido piruvico e ammoniaca (Vederas *et al.*, 1978). L'operone *tna* consiste principalmente di due geni strutturali: *tnaA*, che codifica per la triptofanasi, e *tnaB* che codifica per una permeasi del triptofano. In alcuni ceppi di *E. coli*, inoltre, sembra che i prodotti dell'operone della triptofanasi siano richiesti per la patogenesi; è stato dimostrato che l'indolo, generato dalla degradazione del triptofano, funziona come "molecola segnale" nel quorum sensing e nella formazione del biofilm (Wang *et al.* 2001).

Da molti anni è noto che il triptofano viene catabolizzato da tutti i ceppi di *Streptomyces* saggiati ma che solo *S. exfoliatus* (A5) è in grado di degradarlo completamente: la maggior parte delle specie accumulano antranilato e formil-antranilato (Teuscher, 1967; Hodgson, 2000). Nonostante siano note le attività enzimatiche coinvolte, solo in alcuni casi i corrispondenti geni sono stati identificati (Koushik *et al.*, 1997; Kurnasov *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2010).

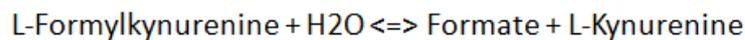
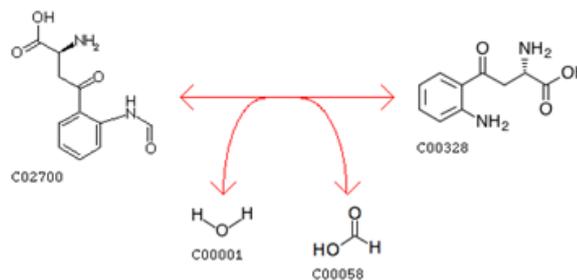
Le tappe enzimatiche della via catabolica che utilizza triptofano per produrre antranilato sono state caratterizzate in *S. parvulus*, il quale incorpora un derivato di uno dei cataboliti di questa via nell'actinomicina D (Brown *et al.*, 1986; Hodgson, 2000).

Il primo enzima del pathway, la triptofano diossigenasi (TDO), trasforma il substrato in N-formil-chinurenina. In *S. parvulus*, durante la fase di produzione degli antibiotici, l'attività di questo enzima aumenta di 40 volte. L'induzione è dovuta alla presenza di d- o l-

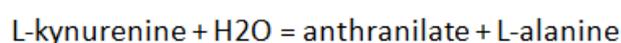
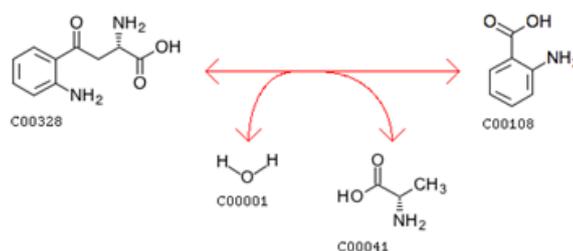
glutammato nel mezzo mentre l'idrossi-chinurenina causa una inibizione del 60% (Foster e Katz, 1981; Hitchcock e Katz, 1988).



La rimozione del gruppo formilico da parte dell' N-formil-chinurenina formamidasi (KFA) produce la chinurenina. In *S. parvulus* (A12) e in *S. chrysomallus* è presente sia la chinurenina formamidasi I, costitutiva e presente a bassi livelli, sia la chinurenina formamidasi II, indotta durante la produzione di actinomicina. Enzimi con attività equivalente a quella della chinurenina formamidasi I sono stati individuati in diversi streptomiceti, come *S. antibioticus* (A31), *S. avermitilis*, *S. coelicolor* (A1A), *S. grisou*, *S. lividans* (A21) e *S. chrysomallus*. (Brown et al., 1986; Keller et al., 2010).



La chinurenina è infine trasformata in antranilato dalla chinureninasi (KYN). L'allineamento delle sequenze delle chinureninasi di *E. coli*, *P. fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae* e di ratto mostra una regione altamente conservata che corrisponde al sito di legame del piridossal- 5'- fosfato (PLP). Questi enzimi sono quindi membri del sottogruppo IV della famiglia delle aminotrasferasi PLP- dipendenti (Koushik et al., 1997).



Pathway della chinurenina

La triptofano diossigenasi, la N-formil-chinurenina formamidasi e la chinureninasi sono molto conservate: proteine omologhe si trovano anche negli eucarioti dove sono coinvolti nella biosintesi del NAD^+ . È noto infatti da tempo che, negli organismi superiori, il triptofano viene convertito in chinolato (precursore del NAD^+) tramite il pathway della chinurenina, via metabolica di cinque reazioni, tre delle quali coinvolgono gli enzimi TDO, KFA e KYN (Panozzo *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2010) (figura 1).

La prima reazione del pathway prevede il taglio del triptofano da parte della triptofano 2,3- diossigenasi (TDO) (codificata dal gene *kynA*) a formare N-formil-chinurenina. In alcuni organismi, come nell'uomo, oltre alla TDO è presente un enzima omologo, l'indoleamina 2,3- diossigenasi (IDO), coinvolto in diverse patologie umane (Samikkannu *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010).

L'enzima N-formilchinurenina formamidasi (KFA), codificata dal gene *kynB*, catalizza la successiva rimozione del gruppo formile dall' N-formil-chinurenina, formando la L-chinurenina. *kynB* nei diversi organismi può trovarsi in due forme non ortologhe: una di queste possiede un dominio ciclasico o idrolasico metallo- dipendente, come in *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia metallidurans* e *Bacillus cereus* (Kurnasov, Goral, *et al.* 2003; Kurnasov, Jablonski, *et al.* 2003). L'altra forma possiede un dominio esterasi/lipasi, caratterizzata negli eucarioti (Pabarcus e Casida 2002, 2005) ma posseduta anche da diversi microrganismi (Lima *et al.*, 2009).

La L-chinurenina può essere:

1. idrolizzata dalla chinureninasi (KYN) codificata dal gene *kynU*, portando alla formazione di antranilato (ramificazione del pathway, via di degradazione del triptofano) (Farrow e Pesci, 2007);
2. idrossilata dall'enzima chinurenina-3-monoossigenasi (KMO), codificata dal gene *kmo*, a formare la 3-idrossichinurenina e da qui procedere lungo il pathway della chinurenina.

Il passaggio che segue quest'ultima reazione prevede il taglio della catena amminoacidica laterale catalizzato dalla chinureninasi a formare 3-idrossi antranilato e L-alanina; quest'ultima viene convertita in piruvato o in altri intermedi del ciclo di Krebs.

Nell'ultimo step del pathway la 3-idrossi antranilato 3,4-diossigenasi (HAD), codificata dal gene *haaO*, converte il 3-idrossi-antranilato in un composto alifatico piuttosto instabile che tende a ciclizzare formando l'acido chinolinico. Questo può essere quindi utilizzato per la sintesi del NAD^+ .

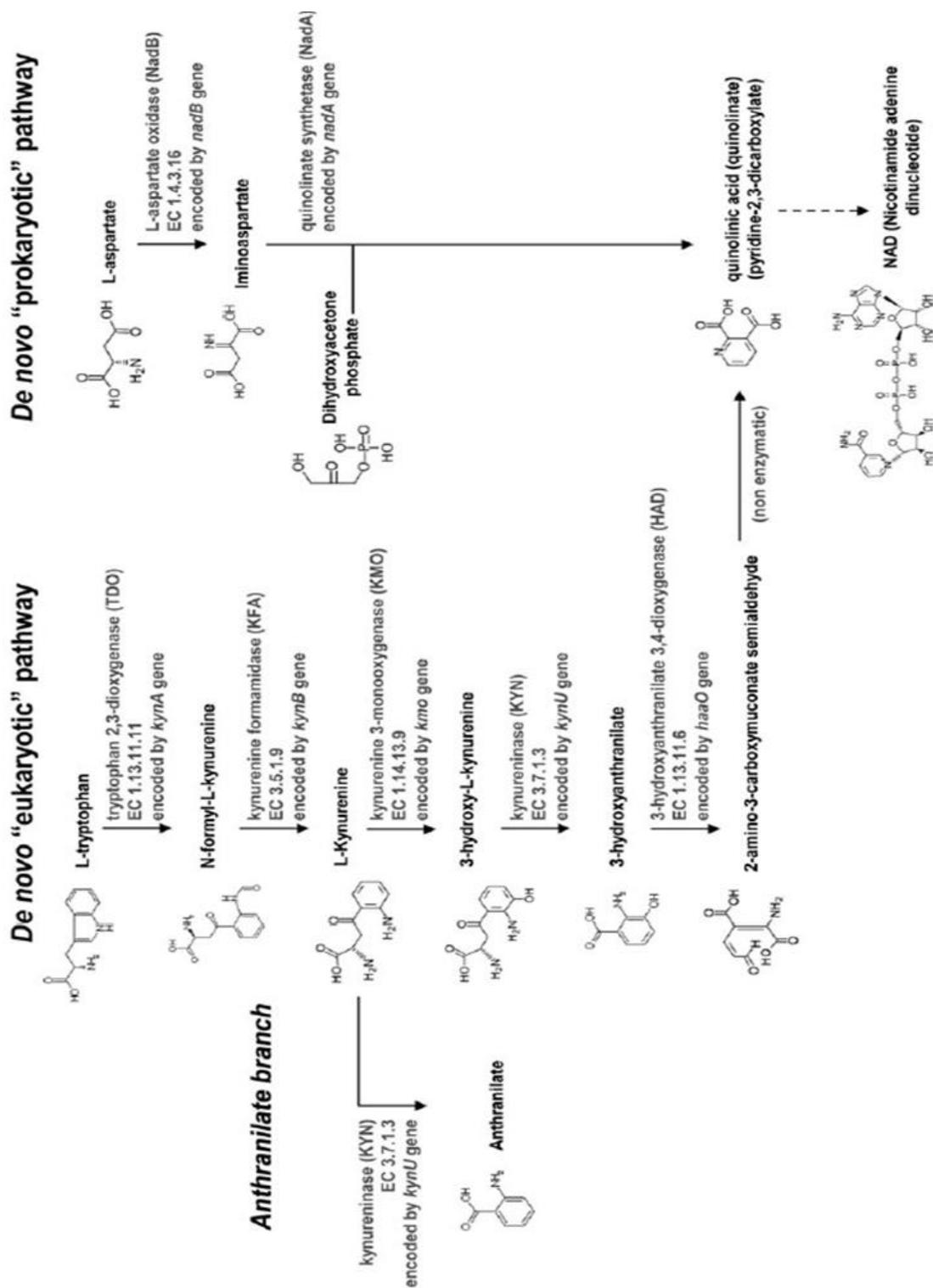


Figura 1. Pathway di degradazione del triptofano in antranilato, via della chinurenina e pathway "procariotico" di sintesi del NAD (Lima *et al.*, 2010).

La produzione *de novo* del chinolato può avvenire anche mediante un'altra via (Begley *et al.*, 2001). Nei procarioti infatti in passato si riteneva che questo fosse sintetizzato a partire dall'aspartato, utilizzando le attività enzimatiche codificate dai geni *nadA* e *nadB* (Hughes *et al.*, 1988; Katoh and Hashimoto, 2004) (figura 2).

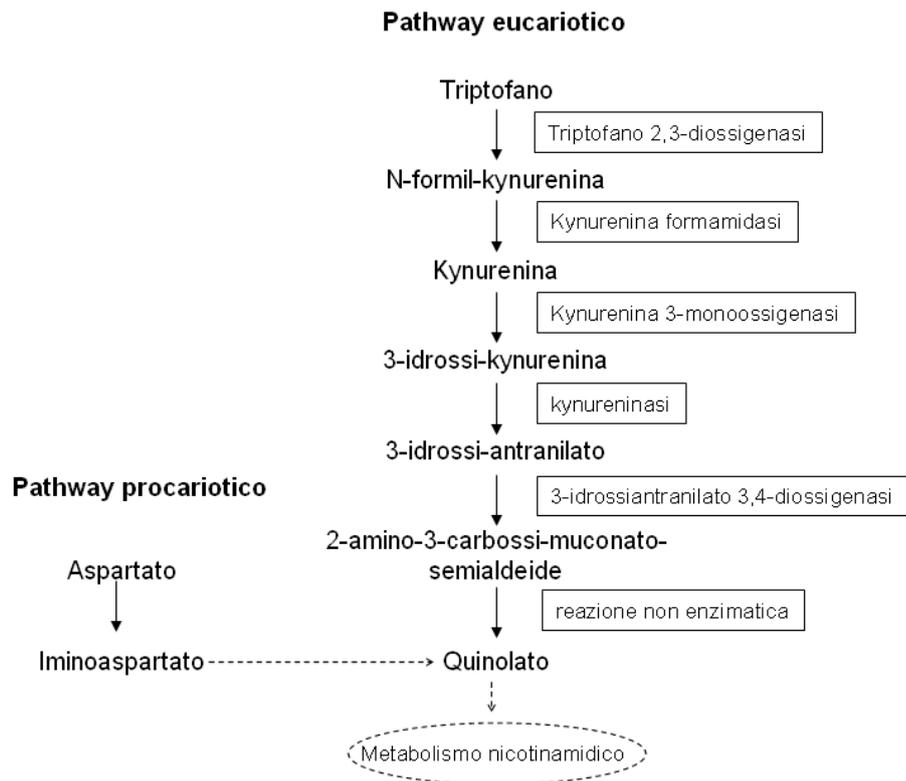


Figura 2. Via per la produzione di chinolato nei procarioti e negli eucarioti.

Recentemente è stato scoperto che la via della chinurenina è presente anche in alcuni microrganismi. Enzimi del pathway sono stati identificati (tramite analisi genomica comparativa) in *Ralstonia metallidurans*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus* e in diversi streptomiceti (Kurnasov *et al.*, 2003). Tra gli studi precenti, quelli effettuati su *Streptomyces antibioticus* (usando triptofano marcato con carbonio radioattivo) hanno dimostrato che questo organismo può utilizzare il triptofano per la biosintesi di acido quinolinico (Hodgson, 2000). In un articolo del 2009 Lima e collaboratori, tramite studi *in silico*, sostengono invece che la presenza del pathway della chinurenina in un gruppo di microrganismi coincide con la mancanza nel loro genoma dei geni del classico pathway procariotico della sintesi del chinolinato (*nadA* e *nadB*). Secondo gli autori soltanto *Flavobacteriales* e *Xanthomonas* presentano l'intero set di geni responsabili del pathway della chinurenina (*kynA*, *kynB*, *kmo*, *kynU*, *haaO*) (figura 3). Nei procarioti che possiedono solo i geni codificanti per TDO, KFA e KYN è presente invece solo la via di degradazione del triptofano in antranilato.

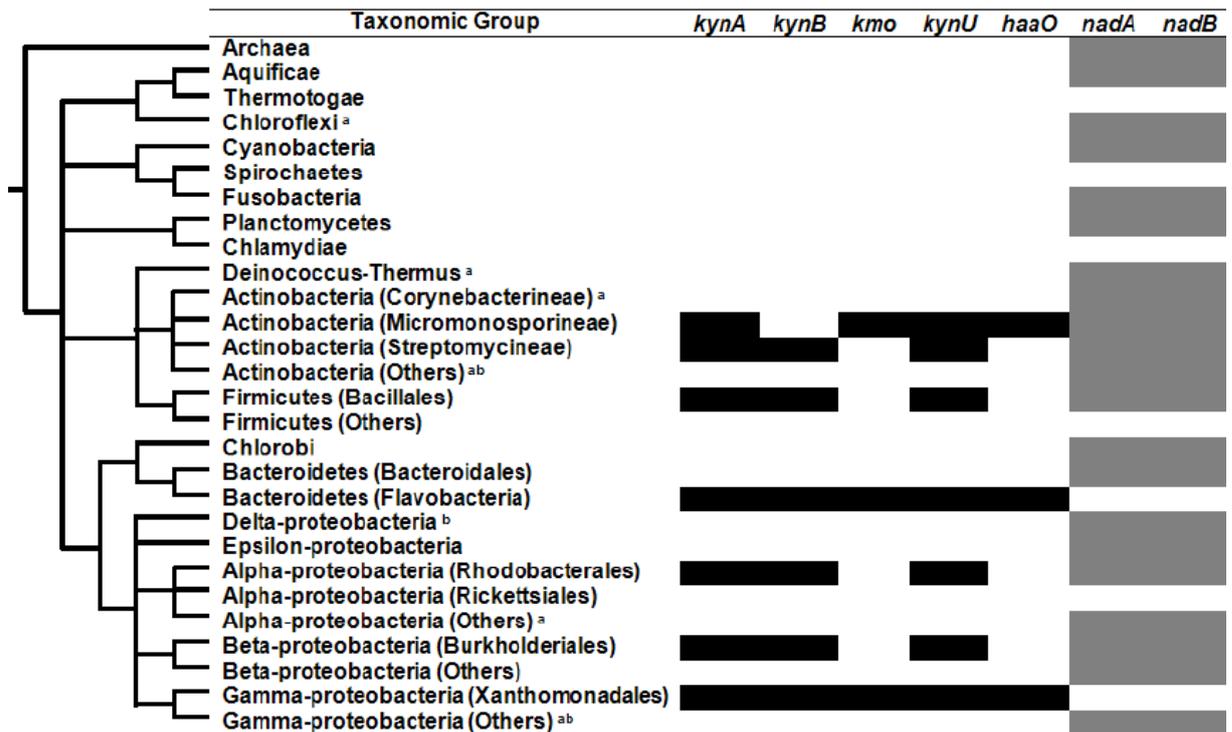


Figura 3. Pathway della chinurenina (*kynA*, *kynB*, *kmo*, *kynU* e *haaO*) e pathway dell'aspartato (*nadA* e *nadB*) in alcuni batteri (Lima et al., 2009).

La via della chinurenina gioca un ruolo importante in molti processi biologici. In particolare diversi studi effettuati sull'uomo hanno permesso di correlare alterazioni a livello del pathway con varie patologie a livello del Sistema Nervoso Centrale (Fujigaki et al., 1998; Allegri et al., 2002; Wonodi et al., 2010) e alla psoriasi (Ito et al., 2004). Per esempio alterazioni nei livelli di serotonina, causati dalla variazione della disponibilità di triptofano, sembrano dipendenti dall'attività della triptofano-2,3-diossigenasi epatica. I livelli di 3-idrossichinurenina e chinolato sono elevati in molte malattie neurologiche, tra cui la Corea di Huntington (Forrest et al., 2010) e il morbo di Alzheimer (Bonda et al., 2010; Kincses et al., 2010), e malattie a carico del sistema immunitario come l'AIDS (Murray, 2010). Ancora, il chinolato è un composto che svolge un'azione eccitatoria a livello del sistema nervoso centrale, agendo come agonista alla classe di recettori per il glutammato NMDA, causando danno neuronale e morte (Koushik et al., 1997). Recentemente è stato inoltre dimostrato che la TDO specifica del fegato umano ha funzione antimicrobica e proprietà immunoregatorie. Cellule HeLa in cui viene indotta l'espressione di una TDO ricombinante sono capaci di inibire batteri (*Staphylococcus aureus*), parassiti (*Toxoplasma gondii*) e virus (*Herpes simplex*) (Schmidt et al., 2009).

Metabolismo primario e sintesi degli antibiotici in Streptomyces

Gli aminoacidi hanno, negli streptomiceti, anche la funzione di precursore chiave della sintesi di molti metaboliti secondari (Hodgson, 2000). Il triptofano è importante per la sintesi, tra gli altri, dell'actinomicina D (Hitchcock and Katz, 1988) e della streptonigrina (Hartley and Speedie, 1984), entrambe ad azione antitumorale. Questo aminoacido viene inoltre incorporato in due molecole lipopetidiche simili tra loro (figura 4), l'antibiotico Calcio- dipendente (CDA) prodotto da *Streptomyces coelicolor* e la daptomicina, sintetizzata da *Streptomyces roseosporus* e utilizzata oggi contro l'infezione di batteri Gram-positivi con il nome commerciale di cubicina (Doekel *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2009; Schmitto *et al.*, 2009).

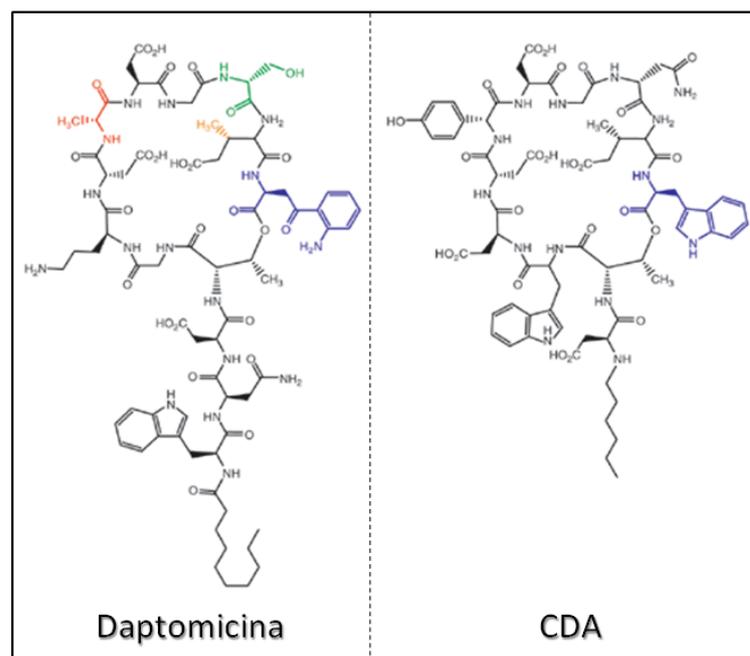


Figura 4. Struttura della Daptomicina e del CDA.

Lo studio dei pathway descritti può essere quindi utile sia per incrementare la sintesi o produrre nuovi antibiotici, sia per ottenere informazioni utili per la cura delle patologie umane in cui queste reazioni enzimatiche sono coinvolte.

Streptomyces coelicolor A3(2) è un batterio del suolo Gram-positivo appartenente all'ordine degli *Actinomycetales* (Garrity *et al.* 2002), microrganismi produttori di metaboliti secondari bioattivi utilizzati per scopi terapeutici (Gunnarsson *et al.*, 2004) e in

ambito agricolo e industriale. La capacità di crescita su terreni diversi in tempi brevi, la produzione di antibiotici pigmentati, la sua facile manipolazione genica e il genoma sequenziato (Bentley *et al.*, 2002), oltre alle conoscenze ottenute negli anni dallo studio dei suoi pathway, hanno fatto di *S. coelicolor* il modello per lo studio degli attinomiceti (figura 5).

In questo gruppo di microrganismi esiste una stretta correlazione tra le molecole del metabolismo primario e quelle del metabolismo secondario da esse derivate. A differenza di altri microrganismi studiati, *S. coelicolor* non possiede il meccanismo di regolazione a feedback della biosintesi degli aminoacidi che si trova nei batteri enterici, probabilmente come forma di adattamento all'ambiente in cui vive, povero di fonti di azoto e fosfato (Hodgson, 2000). Come risultato di questa mancanza di inibizione da prodotto, secondo la teoria del sink, maggiore è la disponibilità di aminoacidi maggiore è la sintesi di antibiotici peptidici (Hood *et al.*, 1992).

Nelle condizioni di crescita di laboratorio, *S. coelicolor* sintetizza gli antibiotici metilenomicina, l'undecilprodigiosina, di colore rosso, il lipopeptide calcio-dipendente (CDA, calcium dependent antibiotic) 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. Le scoperte in questo ambito sono state e sono attualmente applicate sia per la creazione di ceppi "iperproduttori" sia per la sintesi di nuove molecole a funzione antibiotica.

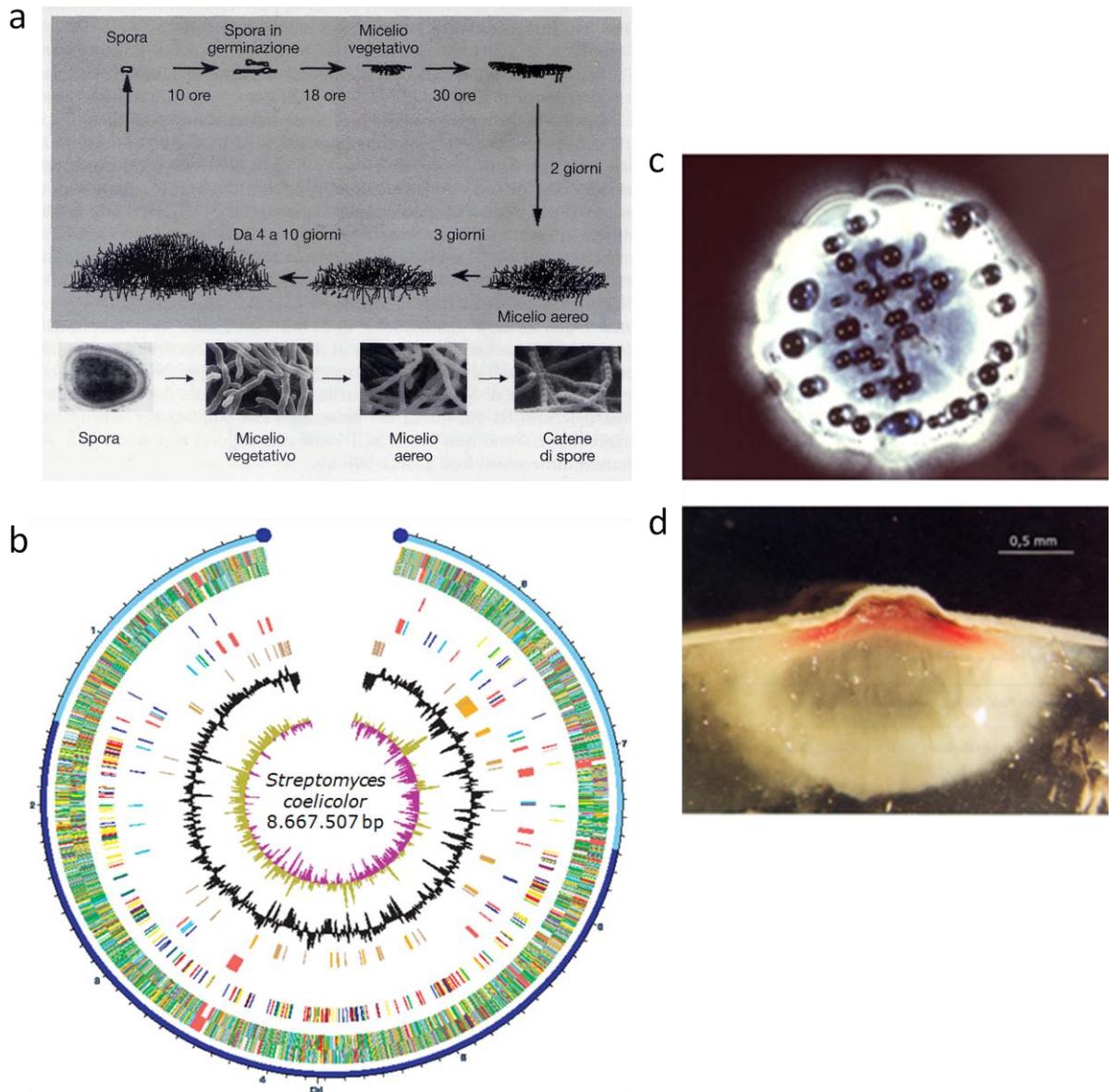


Figura 5. **a)** Ciclo vitale di *Streptomyces coelicolor*. **b)** Cromosoma lineare di *S. coelicolor* A3(2). **c)** Colonia in cui sono visibili gocce blu, costituite dall'antibiotico diffusibile actinorodina. **d)** Sezione trasversale di una colonia dopo 4 giorni di crescita su terreno R2YE (Chater, 1998).

SCOPO DELLA RICERCA

I geni di *S. coelicolor* coinvolti nella biosintesi del triptofano vengono regolati in maniera dipendente dalla fase di crescita e dalla disponibilità dei nutrienti; essi non sono inoltre repressi in presenza di triptofano (Hu *et al.*, 1999). Di contro non sono ancora chiari i meccanismi che permettono a *S. coelicolor* di degradare questo aminoacido.

Le attività enzimatiche coinvolte nella produzione di antranilato dal triptofano sono state individuate negli estratti totali già nel 1967 da Teuscher, che include il batterio tra gli streptomiceti che accumulano antranilato e formil- antranilato. I geni coinvolti in questo pathway non erano però stati identificati.

Nel 2008 analisi bioinformatiche suggerirono che i geni di *S. coelicolor* SCO3645 e SCO3646 potessero codificare rispettivamente per una chinureninasi (KYN, 3.7.1.3) e una triptofano 2,3-diossigenasi (TDO, 1.13.11.11) (www.kegg.com).

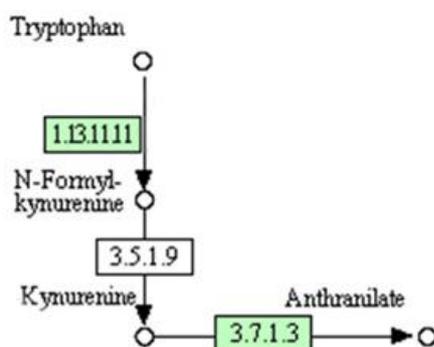


Figura 6. Via di degradazione del triptofano in antranilato in *S. coelicolor*; in verde sono indicate le attività enzimatiche codificate da un gene identificato per omologia di sequenza.

Il mio progetto di Dottorato ha riguardato lo studio di geni coinvolti nel metabolismo del triptofano in *S. coelicolor*. In particolare ho iniziato lo studio del pathway che dal triptofano porta all'antranilato, partendo da un'analisi del locus contenente SCO3645 e SCO3646 per individuare il terzo gene coinvolto nel pathway.

Per lo studio del locus "kyn" ho utilizzato sia un approccio *in vitro* che *in vivo*.

I singoli geni sono stati clonati nel vettore di espressione pRSETB; la loro overespressione mi ha permesso di ottenere proteine ricombinanti con una coda N-terminale di sei istidine necessaria per la purificazione. Le proteine purificate sono state quindi sottoposte a saggi enzimatici.

Ho inoltre condotto un'analisi della cinetica di espressione dei geni nel ceppo di *S. coelicolor* M145 (wt) mediante qRT-PCR, per verificare se questa sia influenzata dalla presenza dell'aminoacido nel terreno di coltura. Contemporaneamente ho costruito, complementato e caratterizzato il ceppo $\Delta kynU$, in cui manca l'attività enzimatica che permette la formazione dell'antranilato.

Fino all'inizio del mio lavoro di tesi non era stato dimostrato che i geni *SCO3644*, *SCO3645* e *SCO3646* siano omologhi dei geni *kynB*, *kynU* e *kynA*.

MATERIALI E METODI

Ceppi utilizzati

Streptomyces coelicolor

- M145 (wild type) (SCP1⁻ SCP2⁻) Kieser et al., (2000).
- Δ kynU
- M145/pIJ8006
- Δ kynU /pIJ8006
- Δ kynU/pIJkynU

Micrococcus luteus wild type

Escherichia coli

- BW25113/pIJ790
Plasmide: pIJ790 [oriR101], [repA101(ts)], araBp-gam-bet-exo
Cromosoma: (Δ (araD-araB)567, Δ lacZ4787(::rrnB-4), lacI_p-4000(lacIQ), λ -, rpoS369(Am), rph-1, Δ (rhaD-rhaB)568, hsdR514;(Datsenko and Wanner, 2000).
- BW25141/pKD78
Plasmide: pKD78 [oriR101], [repA101(ts)], araBp-gam-bet-exo
Cromosoma: (lacI_q rrnBT14 Δ lacZWJ16 DphoBR580 hsdR514 DaraBADAH33 DrhaBADLD78 galU95 end- ABT333 uidA(DM1ul)::pir1 recA1)
- DH5 α /pIJ773
Plasmide: pBluescript KS (+),aac(3)IV, oriT (RK2), FRT sites
Cromosoma: (F- Φ 8odlacZ Δ M15 Δ (lacZY A-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 λ -gyrA96 relA1)
- ET12567/pUZ8002
Plasmide: Paget et al., 1999
Cromosoma: (F- dam-13::Tn9 dcm- 6hsdM hsd R zjj -202::Tn10 recF143 galK2 galT22 ara14 lacY1 xyl-5 leuB6)
- DH5 α
F, Φ 8odlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk⁻, mk⁺), phoA, supE44, λ , thi-1, gyrA96, relA1.
- TOP10: F⁻mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 8olacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
- DH10B: F⁻mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 8olacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 (ara-leu)7967 galU galK λ rpsL nupG tonA
- BL21(DE3) pLys
F⁻dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ (DE3) [pLysS Cam^r]
- BL21(DE3)pLysS/pRSETB, BL21(DE3)pLysS/pRSETB-SCO3644, BL21(DE3)pLysS/pRSETB-SCO3645, BL21(DE3)pLysS/pRSETB-SCO3646

Terreni solidi

Mannitol Soya flour Medium (MS) Hobbs et al. (1989)

Agar	20 g
Mannitolo	20 g
Farina di soia	20 g

H₂O distillata fino ad 1 litro.

Difco nutrient agar (DNA)

Difco nutrient broth	8 g
Agar	20 g

H₂O distillata fino ad 1 litro.

R2YED (Hopwood et al., 2000)

Saccarosio	103 g
K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	10,12 g
Glucosio	10 g
Casamminoacidi	0,1 g
Estratto di lievito (Difco)	5 g
Agar (bactoagar)	20 g

H₂O distillata fino ad 1 litro

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

KH ₂ PO ₄ (0.5%)	1 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ 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⁻¹):

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

LB Agar

Bacto Agar (Difco)	15g
Bacto Triptone	5 g
Estratto di lievito	5 g
NaCl	5 g

H₂O distillata fino a 1 litro.

Soft agar

Difco nutrient broth	8 g
Agar	5 g
H ₂ O distillata fino a 1 litro.	

MM

NaNO ₃	1 g
MgSO ₄	0,5 g
KCl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Sostanze in tracce	1 ml
Agar	20 g
H ₂ O distillata fino a 1 litro.	

Terreni liquidi

LB

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

SOB

bacto-tryptone	20 g
bacto-yeast extract	5 g
NaCl	0.5 g
KCl 250 mM	10 ml

H₂O distillata fino a un litro. Prima dell'uso aggiungere 5 ml di una soluzione sterile di MgCl₂ 2 M.

JM

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

2 X YT

Difco Bacto tryptone	16 g
Estratto di lievito	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O distillata fino a 1 litro	

SPMR

Saccarosio	41,2 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	8,54 g
TES 1M pH 7.6	20 ml
Estratto di lievito	2g
Glucosio	2g
Elementi in tracce	0,8 ml

H₂O distillata fino a 400 ml

Aggiungere in condizioni di sterilità 0,8 ml di CaCl₂ 5M.

SMMS

Difco casaminoacidi	2g
TES buffer	5,73g

H₂O distillata fino a 1 litro; pH 7.2.

Dopo avere autoclavato aggiungere per ogni 200 ml di terreno:

NaH ₂ PO ₄ + K ₂ HPO ₄ (50 mM)	2 ml
MgSO ₄ (1M)	1 ml
Glucosio (50% p/v)	3,6 ml
Elementi in tracce	0,2 ml

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

TBE 5X

Tris base	54 g
Acido borico	27,5 g
EDTA 0,5M pH 8	20 ml

Portare a un volume finale di 1 litro

Tampone di scorrimento per l'SDS-PAGE

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

Portare a un volume finale di 1 litro

Colorante blu di Comassie

Coomassie	0,25 g
Metanolo	45 ml
Acido acetico	10 ml
H ₂ O	45 ml

Decolorante gel di poliacrilammide

Metanolo	225 ml
Acido acetico	50 ml
H ₂ O distillata fino a 1 litro.	

P buffer

Saccarosio	103 g
K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂ *6H ₂ O	2,02 g
Elementi in tracce	2 ml
H ₂ O distillata fino a 800 ml.	

Dopo avere autoclavato aggiungere per ogni 80 ml di terreno:

KH ₂ PO ₄ (0,5%)	1 ml
CaCl ₂ *H ₂ O (3,68%)	10 ml
TES buffer (5,73% pH7.2)	10 ml

Crack buffer per l'estrazione di proteine totali di attinomiceti (Alduina *et al.*, 2007)
10mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.5mM EDTA, 0.3 DTT.

Tampone A per FPLC

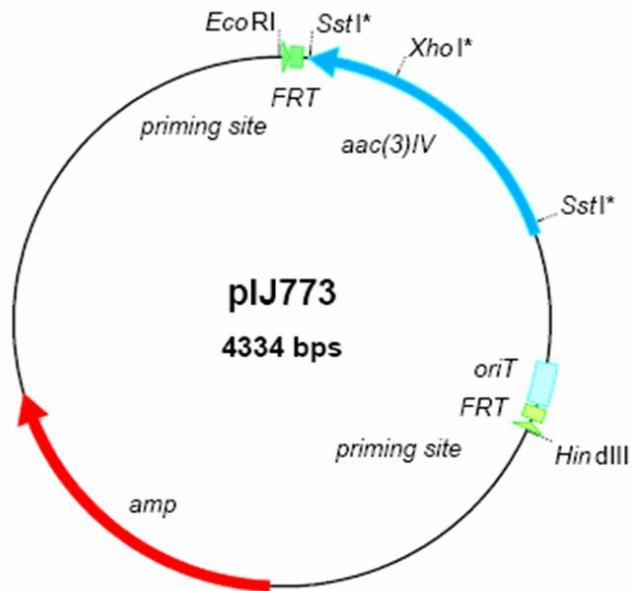
50mM TRIS, pH 7.4, 300 mM NaCl, 1mM MgCl₂.

Tampone B per FPLC

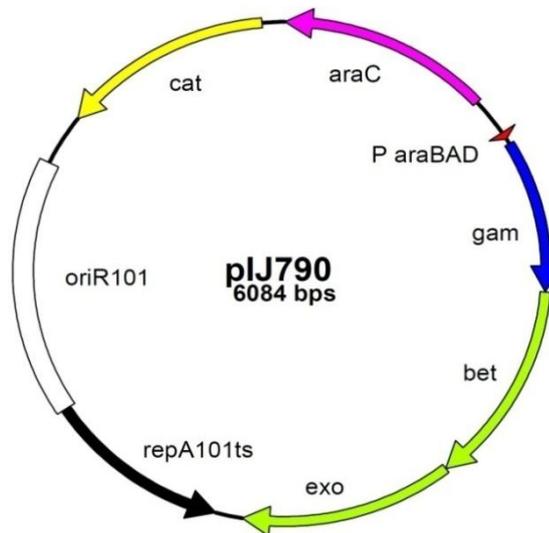
50mM TRIS, pH 7.4, 300 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 400 mM imidazolo.

TABELLA PRIMER	
Overespressione dei geni SCO3644, SCO3645 e SCO3646 in pRSETB	
3644ovB-BamFOR	AAAGGATCCTATGCCGGACGCCGCC
3644ovB-HindREV	AAAAAGCTTTCACCAGGCCAACTGCGCGA
3645ovB-BamFOR	AAAGGATCCTATGTCTGAGCCGACGAGCCT
3645ovB-HindREV	AAAAAGCTTTCAGCCGGCCAGTGTCGGAG
3646ovB-BamFOR	AAAGGATCCTATGTCCCACGACGCCCC
3646ovB-HindREV	AAAAAGCTTTCAGACATACGACCGCGCCG
RT-PCR delle regioni intergeniche <i>kynB-kynU</i> e <i>kynU-kynA</i>	
<i>kynB-kynU</i> For	GCGGAGGTGATGAAGCGGCTGAT
<i>kynB-kynU</i> Rev	GCGCGGCAGGTAGAAGTCGATCAC
<i>kynU-kynA</i> For	CGGGGTGGCCTGGCTGGAG
<i>kynU-kynA</i> Rev	GGGAAGGTGGTGGCGTCCGAC
<i>hrdB-For</i>	CGTCCCCGCTCGTCCC
<i>hrdB-Rev</i>	CCTGATGGGGCGCTTGA
qRT-PCR	
<i>kynB</i> RTfor	CGCGGCGGAGGAGAAATCG
<i>kynB</i> RTrev	CGCGGCAGGTAGAAGTCGATCA
<i>kynU</i> RTfor	GGCCCGTGGAGTCCGTGA
<i>kynU</i> RTrev	AAGCCGAAGCGCAGCACGTC
<i>kynA</i> RTfor	CTGGAGAAGGCGCTGCACGAG
<i>kynA</i> RTrev	CGGGTGAGGTCGCGCTGGA
<i>cdaR</i> for	CGGCGGGGCAGGTCAACGA
<i>cdaR</i> rev	CTGACCCGGCCCGACGATCA
<i>PSI</i> for	CGCGCTTCCTCACCGACGA
<i>PSI</i> rev	CGCGGTCCCGGTCCATCC
<i>trpE2</i> for	CGGCCACTGGGACATCATGAGC
<i>trpE2</i> rev	CCAGCGGGGTCAGCGTGTACTC
<i>hrdB-For</i>	CGTCCCCGCTCGTCCC
<i>hrdB-Rev</i>	CCTGATGGGGCGCTTGA
Costruzione del mutante Δ<i>kynU</i>	
Δ <i>kynU</i> For	TGTTCCCCGAGCTGTGGACGGCGGGTCTGTCTGAGATTCCGGGGATCCGTCGACC
Δ <i>kynU</i> Rev	CCCGCCCCGGCCCCGGCCGCGACTCAGCCGGCCAGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>Apra</i> for	TTCTTCGCATCCCCCCTCTG
<i>Apra</i> rev	GGCGGTGTGCTGCTGGTCCA
Complementazione del mutante Δ<i>kynU</i>	
Δ <i>kynU</i> compl. For	AAACATATGTCTGAGCCGACGAGCC
Δ <i>kynU</i> compl. Rev	GGATCCTCAGCCGCCAGTGT

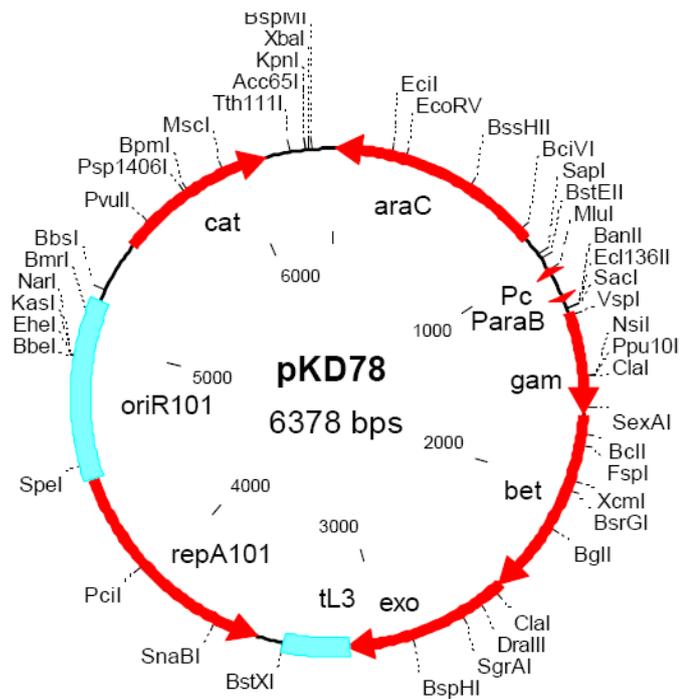
Vettori utilizzati



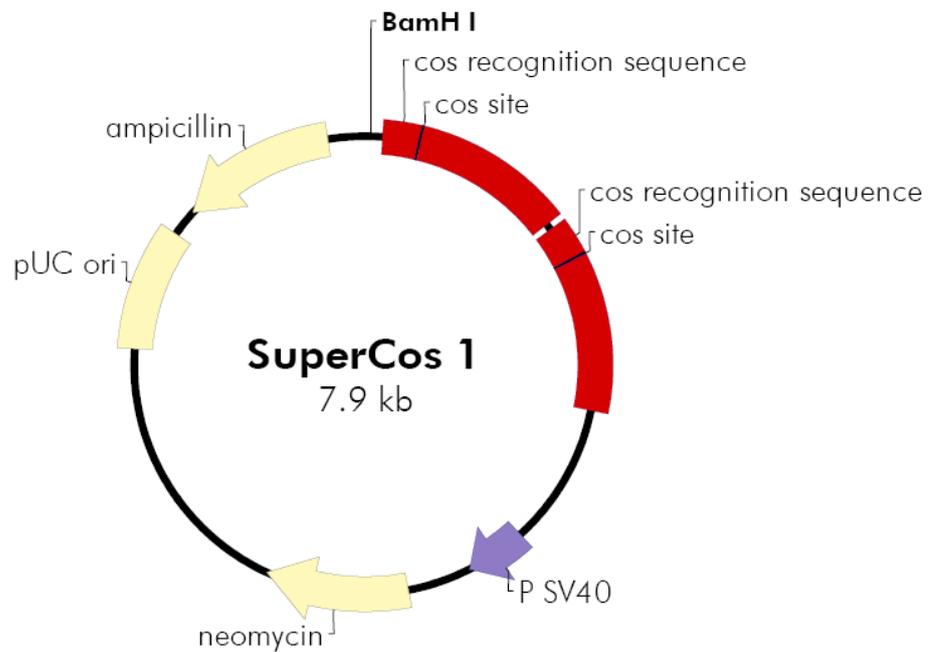
Mappa del plasmide pIJ773. Il gene *aac(3)IV* è stato amplificato per ottenere la cassetta di distruzione (Gust *et al.*, 2002).



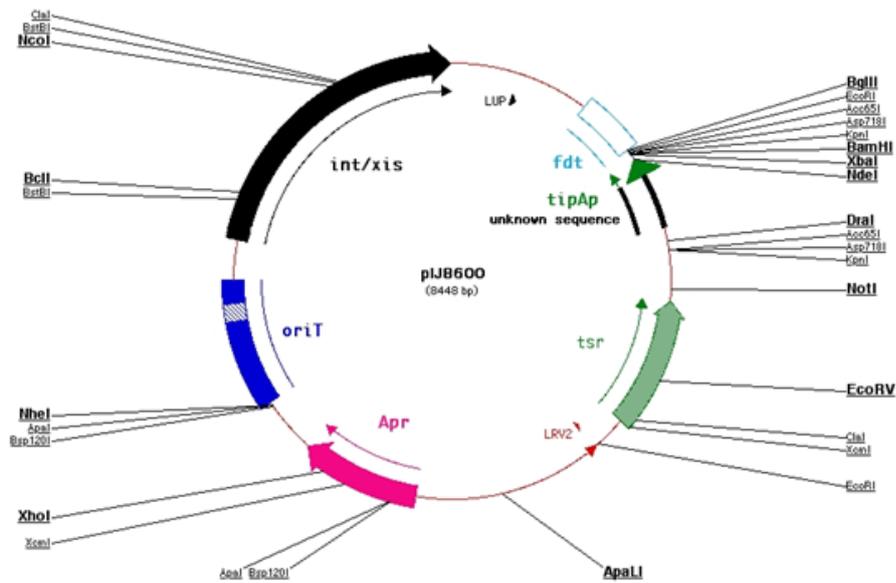
Mappa del plasmide pIJ790. Il plasmide è stato utilizzato per la ricombinazione tra la cassetta di distruzione e il cosmide StH10 (Gust *et al.*, 2002).



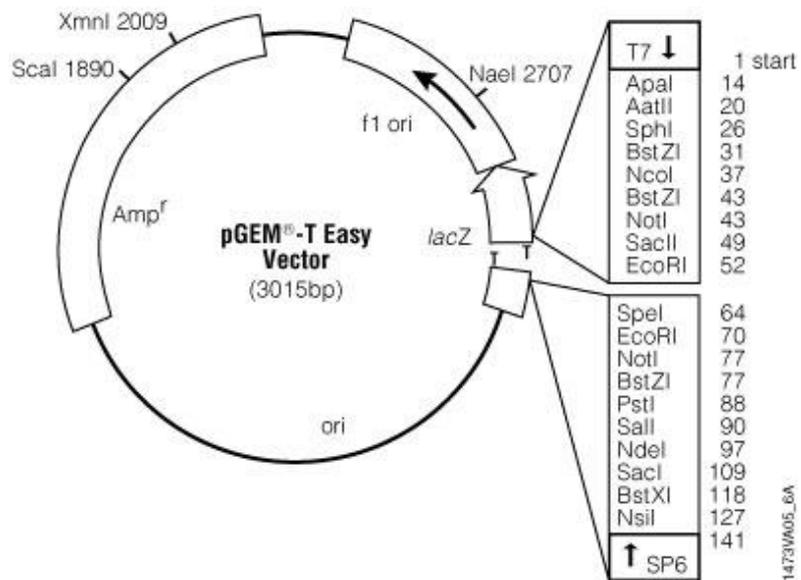
Mappa del plasmide pKD78. Il plasmide è stato utilizzato per la ricombinazione tra la cassetta di distruzione e il cosmide StH10.



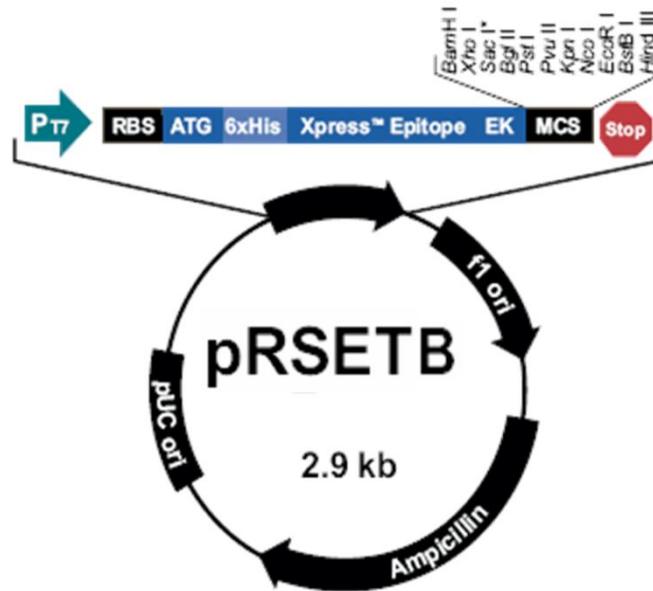
Mappa del vettore SuperCos1. Il plasmide è stato utilizzato per la costruzione della libreria genomica di *S. coelicolor* (Redenbach et al., 1996).



Mapa del plasmide pIJ8600. Il plasmide è stato utilizzato per la complementazione del gene *kynU* in *S. coelicolor*.



Mapa del plasmide pGEM®-T-easy Vector (Promega). Questo vettore permette di effettuare il clonaggio con il metodo T-A ed è stato utilizzato per il clonaggio dei frammenti di DNA ottenuti per PCR.



Mappa del plasmide pRSETB. Il vettore di espressione è servito per iperesprimere i geni SCO3644, SCO3645 e SCO3646 in *E.coli*.

METODI

Curva di crescita di *S. coelicolor*

Sono stati inizialmente effettuati preinoculi in 25 ml di terreno 2XYT, per la germinazione delle spore; i batteri sono stati quindi inoculati nel terreno minimo SMMS e SMMS più triptofano (37 µg/ml) o nel terreno completo SpMR (200 ml). Tutti gli inoculi sono stati preparati aggiungendo cellule pregerminate fino a raggiungere un'assorbanza della coltura pari a $OD_{600}=0,1$. La curva di crescita è stata ottenuta mediante misurazione del peso del micelio essiccato. Per ogni punto della curva sono state prelevate e conservate a -80°C aliquote di micelio utilizzate per l'estrazione dell'RNA totale.

Saggio microbiologico di produzione del CDA

- Concentrare in *speed vacuum* un'aliquota di 200 µl di brodo esausto del ceppo da saggiare fino al raggiungimento di un volume di 30 µl circa.
- Mettere la soluzione concentrata in dischetti di carta sterili e fare asciugare.
- Preparare una sospensione del ceppo tester *Micrococcus Luteus* in acqua sterile e misurare la densità ottica 600 nm.
- Prelevare 100 µl della sospensione di *M. Luteus* (con una $OD_{600}= 1,2$), unire a 12 ml di soft agar (liquido, ma ad una temperatura tale da non uccidere il ceppo utilizzato) e 144 µl di nitrato di calcio 1M.
- Versare questa miscela su una piastra di DNA e aspettare che solidifichi.
- Porre i dischetti imbevuti di brodo esausto sulla piastra.
- Mettere a crescere per una notte a 37°C .

Preparazione di cellule elettro-competenti

Soluzioni: HEPES 1mM, pH7

Glicerolo 10%

- Inoculare una singola colonia di *E.coli* in 5 ml di LB e far crescere a 37°C , 300 r.p.m. overnight.
- Inoculare 2,5 ml della coltura in 500 ml di LB in una beuta da 2 litri. Fare crescere a 37°C , 300 r.p.m. fino ad un OD_{600} di $\sim 0,5$
- Porre la beuta in ghiaccio per 10-15 minuti.
- Centrifugare le cellule a 4500 r.p.m. a 2°C per 20 minuti.
- Eliminare il supernatante e risospendere il pellet in 5 ml di HEPES (1Mm, pH 7), aggiungerne altri 500 ml freddi, mescolare bene, quindi centrifugare a 5000 r.p.m. per 20 minuti.
- Versare attentamente il supernatante e risospendere il pellet nel liquido rimanente.
- Aggiungere 500 ml di acqua fredda e centrifugare tra 5500 e 6000 r.p.m.
- Versare il supernatante immediatamente e risospendere il pellet nel liquido rimanente.
- Passare le cellule in tubi da 50 ml
- Aggiungere 40 ml di glicerolo freddo 10% e mescolare bene
- Centrifugare per 10 minuti a 6000 r.p.m., 2°C .

- Versare il supernatante e risospendere le cellule nelle gocce di supernatante che rimangono adese alla parete del tubo.
- Prelevare aliquote da 40 µl ciascuna mettendole in eppendorf tenuti a -20°C.
- Congelare passando i tubi con le cellule in ghiaccio secco per circa 10 minuti, quindi conservare a -80°C.

Al fine di controllarne l'efficienza di trasformazione si può provare ad elettroporare un'aliquota con 1 ng di plasmide pUC 18 a 200 Ohm, 2,5 kV e 25 µFa.

Trasformazione di cellule elettro-competenti

La presenza di un campo elettrico destabilizza le membrane di *E. coli* ed induce la formazione di pori transienti dal diametro di alcuni nanometri. Le molecole di DNA passano attraverso questi pori applicando impulsi di voltaggio elevato (12,5-15 kV/cm).

- Lasciare scongelare le cellule in ghiaccio.
- Aggiungere 1-2µl di DNA (circa 50 ng) precedentemente dializzato.
- Settare l'elettroporatore a 25 µF, 2.5 KV e 200 ohm.
- Trasferire la soluzione di cellule e DNA nella cuvette di elettroporazione fredda, inserirla nell'elettroporatore e dare l'impulso elettrico.
- Immediatamente dopo l'impulso estrarre la cuvetta dall'elettroporatore e aggiungervi 1 ml di terreno LB privo di antibiotico.
- Recuperare tutto il contenuto della cuvetta, porlo in un tubo e incubare per 1 ora a 37°C.
- Seminare le cellule su piastre selettive

Preparazione di cellule calcio-competenti

Soluzioni: CaCl₂*H₂O 70mM

Freezing solution (per 20 ml): 14,28 ml di CaCl₂ 70 mM, 4 ml di glicerolo 100%, 1,72 ml di H₂O;

- Aggiungere 3 ml di preinoculo, incubato O.N. a 37°C, a 200 ml di LB. Incubare a 37°C con agitazione a 150 r.p.m. fino ad O.D.₆₅₀=0,6.
- Versare il contenuto della beuta in 4 falcon. Incubare in ghiaccio per 1-2 h.
- Eliminare il supernatante e sciogliere il pellet in 25 ml di CaCl₂ 70 mM (freddo) e incubare 1 h in ghiaccio.
- Centrifugare a 3400 r.p.m. per 7 minuti, a 4°C.
- Eliminare il supernatante e sciogliere il pellet in 5 ml di Freezing Solution
- Aliquotare le cellule in eppendorf sterili in aliquote da 400 µl
- Conservare a -80° C

Trasformazione di cellule calcio-competenti

I cationi Ca⁺⁺ hanno lo scopo di neutralizzare le cariche negative dei fosfolipidi della membrana cellulare, creando le prime fratture della membrana stessa, mentre la continua e rapida variazione di temperatura ne aumenta le permeabilità. In questo modo il plasmide riesce a penetrare attraverso la membrana.

- Aliquotare in tubi sterili preraffreddati 100-200 µl di cellule competenti scongelate lentamente in ghiaccio.
- Aggiungere 20 µl di ligation, o 1-2 µl di DNA plasmidico e mescolare.
- Incubare per 40 minuti in ghiaccio
- Incubare a 37°C per 3 minuti
- Aggiungere 1 ml di LB a temperatura ambiente e incubare 1 h a 37°C.
- Seminare le cellule in piastre selettive

Iperespressione dei geni *kynA*, *kynB* e *kynU* in *E.coli* BL21(DE3)pLysS

Un ml di ciascun preinoculo in LB selettivo, cresciuto o.n. a 37°C è inoculato in 50 ml di LB con ampicillina (100 mg/ml) e cloramfenicolo (34 mg/ml) e messo a crescere a 37°C fino ad ottenere una assorbanza di 0,4 a 590 nm. 10 ml di ciascun campione sono stati aliquotati in tubi falcon per la successiva induzione.

All'inoculo si aggiunge IPTG (200 mg/ml) per indurre la sintesi delle proteine di fusione con la code di istidine. Condizioni di induzione:

IPTG 0,1 mM tre ore a 30°C;

IPTG 1 mM tre ore a 30°C;

Inoltre si è preparato un campione "controllo", contenente la coltura non indotta, allo scopo di comparare i livelli di espressione basale con quelli indotti.

Parallelamente le stesse condizioni di crescita sono state utilizzate per cellule di BL21 (DE3)pLysS contenenti il plasmide pRSETB privo di inserto.

Dopo le tre ore di induzione, sia il campione non indotto che quello indotto sono stati centrifugati 10 minuti a 3000 rpm per rimuovere il terreno di coltura. Il sovrantante è stato rimosso e i pellet sono stati conservati a -80°C.

Miniprep del DNA plasmidico di *E. coli*

- 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 risospesare 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 eppendorf, aggiungere un volume di fenolo e agitare al vortex.
- Centrifugare per cinque minuti a 12000 rpm.
- Recuperare la fase acquosa, aggiungere un volume di cloroformio e agitare al vortex.
- Centrifugare per cinque minuti a 12000 rpm.
- Recuperare la fase acquosa.

- Aggiungere 0,1 volumi di sodio acetato (3 M pH 5,2) e 2 volumi di etanolo assoluto freddo e lasciare precipitare un'ora a -80°C.
- Centrifugare a 12000 rpm per quindici minuti.
- Decantare il surnatante e, successivamente, asciugare completamente (speed vacuum per 20 minuti).
- Risospendere il pellet in H₂O.

Sol I: glucosio 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10mM (pH 8).

Sol II: NaOH 0.2 N, SDS 1%.

Sol III: Acido acetico glaciale, Potassio Acetato 3 M (pH 4.8).

Maxiprep del DNA plasmidico di *E. coli*

Le maxipreparazioni di DNA plasmidico sono state realizzate seguendo le indicazioni riportate nel QUIAGEN Plasmid Handbook 09/2000.

Estrazione di DNA cromosomale di *Streptomyces* mediante "salting out"

- Inoculare 0.1 ml di una sospensione di spore di *Streptomyces*, 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 risospendere in 5 ml di SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20mM Tris, pH 7.5).
- Aggiungere 100 µl di lisozima (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 H₂O distillata (o TE).

Southern hybridization

La marcatura della sonda di DNA con digossigenina, la determinazione dell'efficienza di marcatura e il protocollo di ibridazione sono stati effettuati seguendo la procedura descritta nel manuale del kit "DIG High-Prime DNA Labeling and Detection Starter kit II" (Roche).

Colony PCR

La colony PCR è una particolare PCR che permette l'amplificazione di uno specifico frammento di DNA a partire da batteri prelevati dalle colonie cresciute su terreno agarizzato.

La reazione di amplificazione avviene nelle condizioni standard: 1X buffer della Taq; MgCl₂ 1,5 mM; 200 nM dNTP; 0,4-1,2 µM oligonucleotide forward; 0,4-1,2 µM oligonucleotide reverse;; 0,5 U di Taq polimerasi.

Al posto del DNA stampo, purificato, si aggiunge una sospensione poco concentrata di batteri provenienti da colonia singola.

Estrazione di RNA

L'RNA totale è stato estratto da micelio proveniente da colture liquide utilizzando il kit *Qiagen Rneasy midi kit*. Il protocollo è stato così modificato: i pellet cellulari ottenuti in seguito a centrifugazione (4000 rpm per 15 minuti) sono stati risospesi in *RNA protect bacteria reagent* (Qiagen). Ai campioni è stato aggiunto P-buffer e lisozima (10 mg/ml) e, dopo una incubazione di 10 minuti a 37°C per permettere la formazione dei protoplasti, sono stati trattati secondo protocollo. L'RNA purificato è stato risospeso in 200 µl di acqua RNAsi-free.

Trattamento con DNAsi I

Sono stati preparati i campioni di RNA da purificare, per una futura RT-PCR, e sono stati aggiunti in un tubo RNAsi free da 500 µl:

- 1 µg di RNA sample
- 1 µl di 10X DNAsi I reaction buffer
- 0,5 µl di DNAsi I (Amp Grade), 1 U/ µl

La miscela di reazione è stata portata a volume con H₂O deionizzata (V_f= 10 µl). Le miscele così preparate sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente.

Alla fine è stata inattivata la DNAsi I con 1 µl di EDTA 25mM (pH 8) mettendo 10 minuti a 65°C.

RT-PCR

Per le reazioni di RT-PCR è stato utilizzato il sistema *SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq* della Invitrogen. La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume totale di 20 µl con 20-100 ng di RNA totale; la concentrazione finale dei primer utilizzati è stata 0,2 µM (tabella 2). 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_m della coppia di primers);
- allungamento a 72°C per 1 min;
- allungamento finale a 72°C per 10 min

Preparazione dei campioni di cDNA per le analisi di qRT-PCR

L'RNA totale di ciascun campione è stato retrotrascritto utilizzando il kit "High-Capacity cDNA Archive" di Applied Biosystem. A ciascun campione di RNA (2 µg) viene aggiunta una mix costituita da:

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

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

Analisi di Real-time RT-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* (che codifica per una fattore sigma costitutivo di *S. coelicolor*).

Per ciascun gene da analizzare viene preparata una mix (in triplicato) in un volume finale di 25 µl: 12,5 µl SYBR® Green mix (AmpliTaQ Goldpolymerase, dNTP e buffer di reazione).

200 nM primers.

H₂O Rnase free fino a volume di 25 µl.

I cicli di reazione prevedono le seguenti fasi:

hot start a 95°C per 10 minuti

40 cicli di denaturazione a 95°C per 15 secondi

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 (ΔR_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 ΔR_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.

SDS- PAGE

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 ₂ O	30% mix acrilammide	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 ₂ O	30% mix acrilammide	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%, β -mercaptoetanol) e denaturando ad una temperatura di circa 100°C per 5 minuti.

Estrazione di proteine totali da *S. coelicolor*

Il pellet batterico è stato risospeso in Crack buffer e sonicato tramite il sonicatore VibraCell con sei impulsi di 10 secondi intervallati da altrettanti secondi in ghiaccio. Il lisato quindi è stato centrifugato per 15' a 3000 x g: il supernatante ottenuto è stato conservato a -20°C per essere utilizzato nelle successive analisi (Alduina *et al.*, 2007).

Estrazione di proteine totali da *E. coli*

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 Binding Buffer (Imidazolo 3M pH 6.0, NaH₂PO₄ 250 Mm, NaCl 2,5 M) e l'aggiunta di 8 mg di lisozima.

Successivamente i campioni sono stati lisati tramite il sonicatore VibraCell con sei impulsi di 10 secondi intervallati da altrettanti secondi in ghiaccio. Il lisato quindi è stato centrifugato per 15' a 3000 x g in modo da separare la frazione solubile da quella insolubile: entrambe vengono conservate a -20°C.

Purificazione delle proteine ricombinanti mediante resina Agarose Ni- NTA (Invitrogen®)

Per purificare le proteine con la coda di istidine è stato seguito il protocollo suggerito dalla casa produttrice della resine Agarose Ni- NTA (Invitrogen®).

Il kit prevede l'utilizzo di una colonna cromatografica contenente una resina di agarosio al 6%, in cui l'acido nitrilotriacetico (NTA) lega ioni Ni²⁺ attraverso quattro siti di coordinazione.

Purificazione delle proteine ricombinanti mediante FPLC

Gli esperimenti di cromatografia eseguiti sono controllati da un sistema FPLC (AKTA Purifier Amersham Pharmacia Biotech); questa tecnica è un'applicazione della HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) per la purificazione veloce ed efficiente delle proteine (Fast Performance Liquid Chromatography). Il sistema è formato da due pompe peristaltiche che garantiscono un flusso continuo alla colonna di purificazione scelta, una lampada UV che rivela le proteine presenti in colonna posta a 280 nm, lunghezza d'onda alla quale assorbono gli amminoacidi aromatici ed una valvola per determinare il gradiente di concentrazione. Il tutto è collegato e gestito dal software Unicorn per l'elaborazione dei risultati.

- CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

Questa tecnica di purificazione sfrutta alcune proprietà di interazione estremamente specifiche. Consente di effettuare la separazione delle proteine, ma è necessario che il materiale da isolare sia in grado di legarsi reversibilmente ad un ligando specifico legato a sua volta ad una matrice insolubile. Pertanto la fase stazionaria è costituita da granuli di resina coniugata al ligando, mentre la fase mobile è costituita da solventi acquosi. L'analisi procede aggiungendo il campione alla sommità della colonna. Quando la miscela contenente il campione da isolare viene aggiunto alla fase stazionaria, soltanto la molecola di interesse rimarrà legata al ligando mentre tutte le altre molecole verranno lavate via. Dopo aver ottenuto un legame tra proteina e ligando si passa ad una eluizione con variazione del pH o della forza ionica, per permettere alla proteina di staccarsi dal ligando.

La cromatografia è stata condotta con AKTA Purifier Amersham Pharmacia Biotech; è stata utilizzata la colonna cromatografica His-Trap HP (High Performance) da 5ml ed il seguente programma di eluizione:

- Tampone A: 50mM TRIS, pH 7.4, 300 mM NaCl, 1mM MgCl₂
- Tampone B: 50mM TRIS, pH 7.4, 300 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 400 mM imidazolo
- Gradiente: 0-100%B
- Flusso: 0,5 ml/minuto
- Frazioni di eluato: 0,5 ml

- CROMATOGRAFIA PER ESCLUSIONE MOLECOLARE

La tecnica permette di separare macromolecole, esclusivamente in base alla loro massamolecolare. La separazione viene realizzata utilizzando una matrice porosa in cui le molecole, per questioni di ingombro sterico, hanno diverse possibilità di accesso (le molecole più piccole hanno più accesso rispetto alle molecole più grandi). Come fase stazionaria vengono usati i Sephadex[®], sostanze di natura polisaccaridica (destrani) che formano dei reticoli tridimensionali. Il reticolo di destrano rende le sferette porose; all'interno di queste vi sono dei "canali" dove si inseriscono le molecole di acqua. Facendo scorrere la fase mobile (acqua o soluzione tampone) le varie sostanze della miscela, in funzione della loro dimensione molecolare, si inseriranno all'interno dei canali oppure, se le loro dimensioni sono al di sopra del cosiddetto limite di esclusione, non riusciranno ad inserirsi all'interno dei suddetti canali e verranno trascinate dall'eluente attraverso gli interstizi che si sono formati tra le sferette.

Western Blot

L'anticorpo utilizzato è l'anti-HisTag (Invitrogen), diretto contro il tag di His₆ fuso alle proteine studiate.

- SDS-PAGE 20mA per circa 90' in Running Buffer 1X
- Recuperare il gel e sciacquarlo per 10' in Towbin completo
- 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 Towbin completo
- Assemblare e riempire la camera con Towbin completo
- Corsa a 4°C a 50 V, 300 mA per 2h
- Smontare e verificare il trasferimento delle proteine sul filtro
- Incubare il filtro con una soluzione di Albumina per 1h a temperatura ambiente
- Aggiungere 5 µl di anticopro Anti-His (Invitrogen) e incubare a 4°C O.N.
- Sciacquare il filtro con tre lavaggi di TBST di 5' ciascuno
- Lavaggio finale in TBST per 10'
- Aggiungere la soluzione contenente i substrati NBT e BCIP (Invitrogen)
- Agitare a temperatura ambiente fino alla comparsa delle bande di ibridazione, quindi effettuare un lavaggio con acqua distillata.

Saggi enzimatici

Saggio della triptofano diossigenasi: si basa sull'aumento di assorbanza a 321 nm dovuto alla conversione del triptofano in formil-chinurenina, è stata effettuato utilizzando una miscela di reazione composta da buffer fosfato 20 mM pH 7.2, ascorbato 20 µM, D-triptofano 6 mM, L-triptofano 6 mM (oppure i singoli enantiomeri a concentrazione 12 mM).

Saggio della chinureninasi. Saggio spettrofotometrico: si basa sulla diminuzione di assorbanza a 365 nm dovuto alla conversione della chinurenina in antranilato, è stata effettuato secondo Kurnasov *et al.*, 2003. La miscela di reazione è composta da Tris-HCl 20 mM pH 8.0, chinurenina 200 µM, PLP 10 µM. Saggio spettrofluorimetrico: l'andamento della reazione è stato seguito misurando la fluorescenza dell'antranilato formato a una lunghezza d'onda di emissione di 405 nm (lunghezza d'onda di eccitazione 340 nm) a intervalli di 10 secondi per due ore. La miscela di reazione è composta da Tris-HCl 20 mM pH 8.0, chinurenina 200 µM, PLP 10 µM. La curva di taratura è stata effettuata utilizzando campioni a concentrazioni crescenti di antranilato e decrescenti di chinurenina.

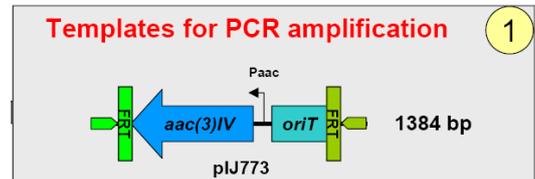
Saggio della chinurenina formamidasi: si basa sull'incremento di assorbanza a 365 nm dovuto alla conversione della N-formil chinurenina in chinurenina, è stata effettuato secondo Kurnasov *et al.*, 2003. La miscela di reazione è composta da Tris-HCl 100 mM pH 7.4, N-formil chinurenina 1 mM, ZnCl₂ 20 µM.

1. Purificazione dello stampo per la PCR (gene *aac(3)IV*)

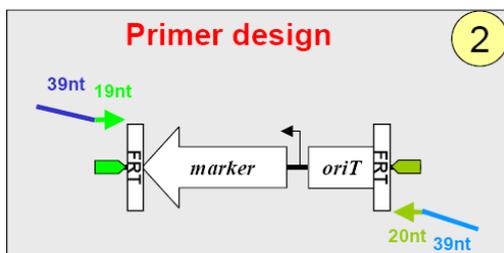
Digerire ~ 10 µg DNA plasmidico con 50 U EcoRI e 50 U HindIII in 1 X buffer B (Roche) in 100 µl di reazione. Effettuare un'elettroforesi del DNA plasmidico digerito a 5 V/cm per 2-3h in TAE (1x).

Tagliare la banda corrispondente alla cassetta di distruzione e purificare il DNA in esso contenuto con il kit di estrazione Qiagen secondo il protocollo

consigliato dal produttore. Il DNA così purificato va conservato a una concentrazione di 100 ng/µl a -20°C. Utilizzare 100 ng del DNA così ottenuto per trasformare cellule E. coli DH5α competenti. Piastrare su LB contenente 100 µg/ml ampicillina. Se compaiono trasformanti ripetere dallo step 2.



2. Costruzione dei primer



Per ogni sostituzione genica sono necessari due primer "lunghi", di 58 e 59 nucleotidi. Ognuno deve possedere al 5' 39 nucleotidi corrispondenti alla sequenza adiacente il gene da inattivare; al 3' 19 o 20 nucleotidi devono appaiarsi all'estremità destra o sinistra della cassetta di distruzione.

La sequenza da 39 nucleotidi del forward primer deve trovarsi nel filamento codificante il gene di interesse e il 3' deve essere in frame rispetto al gene da sostituire. Il 5' dei 39 nucleotidi del primer reverse deve essere costruito sul filamento complementare.

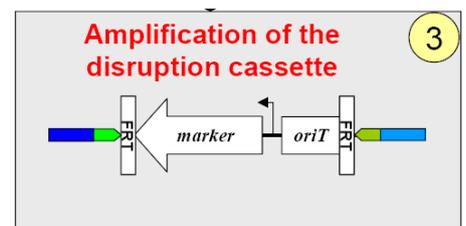
3. Amplificazione della cassetta di resistenza

Le condizioni utilizzate per i reagenti della PCR sono state:

Primers (100 pmoles/µl)	0.5 µl each	50 pmoli ciascuno
DNA stampo(100 ng/µl)	0.5 µl	50 ng ≈ 0.06 pmoli
Buffer (10x)	5 µl	1 x
dNTPs (10 mM)	1 µl each	50 µM ciascuno
DMSO (100 %)	2.5 µl	5%
DNA polimerasi (2.5 U/µl)	1 µl	2.5 Unità
Acqua	36 µl	
Volume totale	50 µl	

Le condizioni utilizzate per la reazione di PCR sono state:

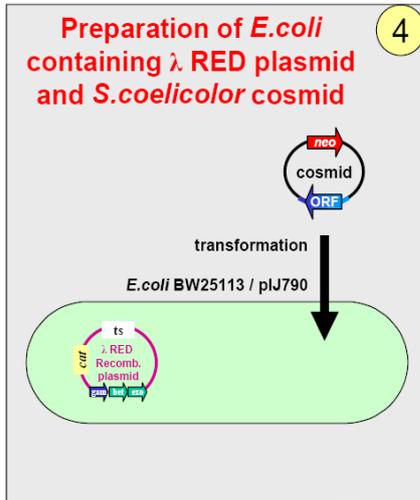
1. Denaturazione iniziale:	94°C, 2 min	
2. Denaturazione:	94°C, 45 sec	} 10 cicli
3. Annealing:	50°C, 45 sec	
4. Estensione:	72°C, 90 sec	
5. Denaturazione:	94°C, 45 sec	
6. Annealing:	55°C, 45 sec	
7. Estensione:	72°C, 90 sec	
8. Estensione:	72°C, 5 min	



5 µl del prodotto di PCR sono stati caricati su gel d'agarosio per controllare la qualità e la quantità dell'amplificato. I restanti 45 µl sono stati purificati con il kit di estrazione Qiagen secondo il

protocollo consigliato dal produttore. La concentrazione finale di DNA dovrebbe essere di ~200 ng/μl.

4. Trasformazione di cellule di *E. coli* BW25113/pIJ790 λ RED con un cosmide della libreria di *S. coelicolor* contenente il gene SCO3645



Far crescere *E. coli* BW25113/pIJ790 overnight a 30°C in 10 ml di LB contenente cloramfenicolo (25 μg/ml).

Inoculare 100 μl *E. coli* BW25113/pIJ790 della precedente coltura in 10 ml di SOB (Hanahan, 1983) contenente 20 mM MgSO₄ (aggiungere 200 μl di uno stock 1M a 10 ml di SOB) e cloramfenicolo (25 μg/ml).

Lasciar crescere per 3-4 h a 30°C in agitatore orbitale a 200 rpm fino ad una OD₆₀₀ di ~ 0.4.

Raccogliere le cellule tramite centrifugazione a 4000 rpm per 5 minuti a 4°C in un rotore Sorvall GS3 (o equivalente).

Decantare il mezzo e risospendere il pellet mescolando delicatamente in 10 ml di glicerolo 10 % freddo.

Centrifugare come sopra e risospendere il pellet in 5 ml di glicerolo 10 % freddo, centrifugare e decantare. Risospendere il pellet di cellule nei rimanenti ~ 100 μl di glicerolo 10 %.

Mescolare 50 μl di sospensione di cellule con ~ 100 ng (1-2 μl) di DNA cosmidico. Effettuare l'elettroporazione in una cuvette da 0.2 cm fredda, usando un elettroporatore BioRad GenePulser Il regolato a: 200 Ω, 25 μF e 2,5 kV. La costante di tempo attesa è di 4.5 – 4.9 ms.

Aggiungere immediatamente 1 ml di LB freddo alle cellule elettroporate ed incubare in agitatore orbitale per 1h a 30°C. Seminare su LB agarizzato contenente carbenicillina (100 μg/ml), kanamicina (50 μg/ml) e cloramfenicolo (25 μg/ml). Incubare per almeno 16h a 30°C. Trasferire una colonia singola in 5 ml di LB contenente antibiotici come sopra. Incubare per almeno 16h a 30°C. Questa coltura si userà come preinoculo per generare le cellule elettrocompetenti da trasformare con la cassetta di distruzione ottenuta tramite PCR.

5. "PCR targeting" del cosmide della libreria di *S. coelicolor*

E. coli BW25113/pIJ790 contenente il cosmide di *S. coelicolor* deve essere trasformato, mediante elettroporazione, con la cassetta di distruzione.

Inoculare 10 ml di SOB – MgSO₄ contenente carbenicillina (100 μg/ml), kanamicina (50 μg/ml) e cloramfenicolo (25 μg/ml) con 1% della coltura di almeno 16h di *E. coli* BW25113/pIJ790 con il cosmide di the *S. coelicolor*. Aggiungere 100 μl della soluzione di stoccaggio 1M di L-arabinosio (la concentrazione finale è 10 mM, induce i geni λ red).

Far crescere per 3-4h a 30°C in agitatore orbitale at 200 rpm fino ad una OD₆₀₀ di ~ 0.4.

Raccogliere le cellule per centrifugazione a 4000 rpm per 5 min a 4°C in un rotore Sorvall GS3 (o equivalente).

Decantare il mezzo e risospesndere il pellet e risospesndere il pellet miscelando gentilmente in 10 ml di glicerolo 10% freddo.

Centrifugare come sopra e risospesndere il pellet in 5 ml di glicerolo freddo 10 %, centrifugare e decantare. Risospesndere il pellet di cellule nei rimanenti ~ 100 µl di glicerolo 10 %.

Mescolare 50 µl di sospensione cellulare con ~ 100 ng (1-2 µl) di prodotto di PCR (Cassetta di distruzione).

Effettuare l'elettroporazione in una cuvette da 0.2 cm fredda, usando un elettroporatore BioRad GenePulser II regolato a: 200 Ω, 25 µF e 2,5 kV. La costante di tempo attesa è di 4.5 – 4.9 ms.

Aggiungere immediatamente 1 ml di LB freddo alle cellule scioccate ed incubare in agitatore orbitale per 1h a 37°C (o a 30°C se si devono effettuare successive delezioni geniche sullo stesso cosmide).

Seminare su LB agar contenente carbenicillina (100 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml) and apramicina (50 µg/ml). Se non si devono effettuare successive distruzioni geniche sul cosmide, incubare a 37°C per favorire la perdita del pIJ790. (Se si devono effettuare altre delezioni, crescere a 30°C ed aggiungere cloranfenicolo (25 µg/ml) in modo da non perdere il pIJ790).

Isolamento del CCC DNA cosmidico

Risospesndere il pellet di cellule da 1 ml di coltura agitando in vortex in 100 µl soluzione I (50 mM Tris/HCl, pH 8; 10 mM EDTA).

Aggiungere immediatamente 200 µl di soluzione II (200 mM NaOH; 1% SDS) e mescolare invertendo i tubi 10x.

Aggiungere immediatamente 150 µl di soluzione III (3 M potassio acetato, pH 5.5) e mescolare invertendo i tubi 5x.

Centrifugare a velocità massima in una microcentrifuga per 5 min a temperatura ambiente.

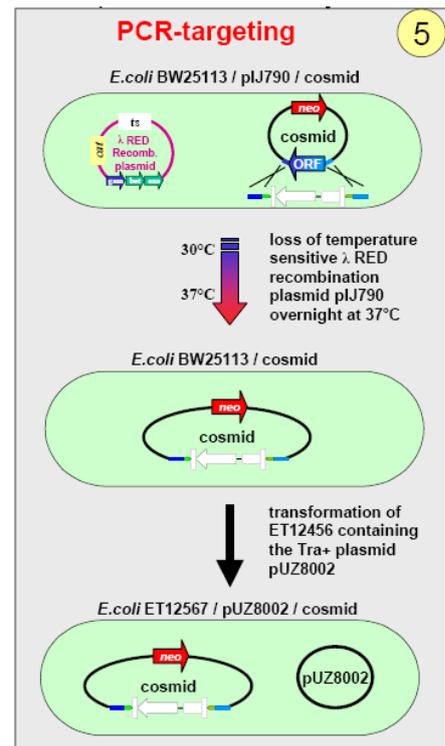
Estrarre immediatamente il supernatante con 400 µl di fenolo/cloroformio, agitando in vortex 2 min e centrifugare a massima velocità in microcentrifuga per 5 min.

Trasferire il supernatante e aggiungere 600 µl di 2-propanolo. Lasciare i tubi in ghiaccio per min.

Centrifugare come sopra e lavare il pellet con 200 µl di etanolo 70%.

Centrifugare come sopra e lasciare il tubo aperto per 5 a temperatura ambiente per seccare il pellet. Risospesndere il pellet in 50 µl 10mM Tris/HCl (pH 8) e usarne 10 µl per la restrizione enzimatica.

La verifica di trasformanti positivi tramite PCR richiede una coppia addizionale di primers di controllo di 18 – 20 nt che appaiano a 100 – 200 bp a monte e a valle della regione di ricombinazione di 39 bp. (Questi primers potranno essere utilizzati anche in seguito per verificare l'escissione della cassetta di resistenza mediata dalla ricombinasi FLP).



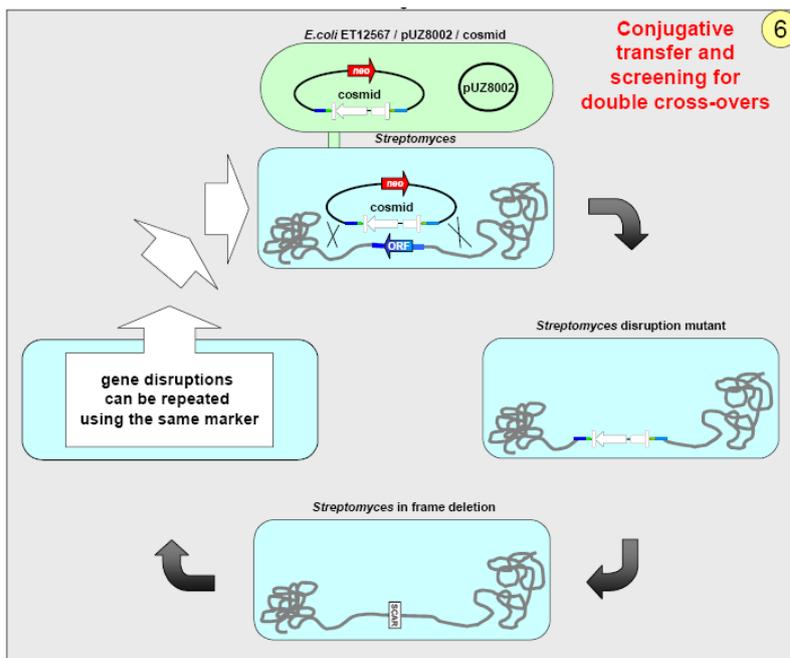
Primers (100 pmoles/ μ l)	0.2 μ l each	20 pmoles each
Template DNA (~50 ng/ μ l)	1 μ l	50 ng
Buffer (10x)	5 μ l	1 x
dNTPs (10 mM)	1 μ l each	50 μ M each
DMSO (100 %)	2.5 μ l	5%
DNA polymerase (2.5 U/ μ l)	1 μ l	2.5 Units
Water	36.1 μ l	
Total volume	50 μ l	

Condizioni del ciclo:

- | | | |
|----------------------|--------------|------------|
| 1. Denaturation: | 94°C, 2 min | } 30 cicli |
| 2. Denaturation: | 94°C, 45 sec | |
| 3. Primer annealing: | 55°C, 45 sec | |
| 4. Extension: | 72°C, 90 sec | |
| 5. Final extension: | 72°C, 5 min | |

5 μ l of the PCR product is used for gel electrophoresis.

6. Trasferimento del cosmide mutato in *Streptomyces*



Preparare cellule competenti di *E. coli* ET12567/pUZ8002 cresciute a 37°C in LB contenente kanamicina (25 μ g/ml) and cloranfenicolo (25 μ g/ml) per mantenere la selezione del pUZ8002 e la mutazione *dam*, rispettivamente. (ET12567 ha un tempo di duplicazione > 30 min.)

Trasformare le cellule competenti contenenti il clone del cosmide contenente l'*oriT*, selezionare per il cosmide usando solo apramicina (50 μ g/ml) e carbenicillina (100

μ g/ml).

Inoculare una colonia in 10 ml di LB contenente apramicina (50 μ g/ml), cloramfenicolo (25 μ g/ml) e kanamicina (50 μ g/ml). Lasciare crescere o.n. a 37°C.

Inoculare 100 μ l della coltura di almeno 16h in 10 ml di LB fresco con gli antibiotici come sopra e crescere per ~ 4 h a 37°C fino ad una OD600 of 0.4.

Lavare le cellule due volte in 10 ml di LB per rimuovere gli antibiotici che possono inibire *Streptomyces* e risospendere in 1 ml di LB.

Mentre si lavano le cellule di *E. coli*, per ciascuna coniugazione aggiungere 10 μ l (10^8) spore di *Streptomyces* a 500 μ l di 2xYT. "Heat-shock" a 50°C per 10 min, quindi lasciare raffreddare

Mescolare 0.5 ml di sospensione cellulare di *E. coli* e 0.5 ml di spore scioccate termicamente e centrifugare brevemente. Separare la maggior parte del surnatante, quindi risospendere il pellet nei rimanenti c. 50 µl di liquido residuo.

Fare una diluizione seriale da 10^{-1} a 10^{-4} di ogni passaggio in un totale di 100 µl d'acqua.

Piastrare 100 µl di ciascuna diluizione su MS agar contenente 10mM $MgCl_2$ (senza antibiotici) ed incubare a 30°C per 16-20 h.

Ricoprire la piastra con 1 ml d'acqua contenente 0.5 mg di acido nalidixico (20 µl of 25 mg/ml stock; uccide selettivamente *E. coli*) e 1.25 mg apramicina (25 µl of 50 mg/ml stock). Usare una spatola per distribuire delicatamente la soluzione di antibiotico ed eventualmente continuare l'incubazione a 30°C.

Replicare ogni piastra di MS con colonie singole, su piastre con DNA contenenti acido nalidixico (25 µg/ml) e apramicina (50 µg/ml) con e senza kanamicina (50 µg/ml). I ricombinanti in cui è avvenuto un doppio crossing-over sono kanamicina^S e apramicina^R. (DNA da crescita veloce del micelio vegetativo e rallenta la formazione del micelio aereo).

I cloni kanamicina^S sono raccolti dalle piastre di DNA e strisciati a colonia singola su MS (che promuove la formazione delle spore) contenente acido nalidixico (25 µg/ml) e apramicina (50 µg/ml).

Confermare la sensibilità alla kanamicina replicando le piastre su DNA contenente acido nalidixico (25 µg/ml) con e senza kanamicina (50 µg/ml).

I cloni sensibili alla kanamicina purificati sono quindi verificati con PCR e analisi Southern blot.

Antibiotic	Stock mg/ml	µl for 1 ml overlay	Final conc. after flooding µg/ml	Concentration	
				MS,DNA µg/ml	R2YE µg/ml
Kanamycin	50	100	200	50	200
Spectinomycin	200	25	200	400	400
Streptomycin	10	25	10	10	10
Nalidixic acid	25 in 0.3 M NaOH	20	20	25	25

Concentrazione degli antibiotici per la selezione di *S. coelicolor* coniuganti su MS, su piastre di DNA per repliche o su R2YE per la rigenerazione dei protoplasti (Nota: vi è qualche piccola differenza da Kieser et al., 2000).

RISULTATI

Analisi della sequenza aminoacidica della proteina SCO3644

Gli studi di omologia di sequenza riportati nella banca dati Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) indicano che i geni SCO3645 e SCO3646 potrebbero codificare rispettivamente per una chinureninasi (KYN) e una triptofano deossigenasi (TDO). Sulla base di queste informazioni è stata inizialmente effettuata l'analisi di sequenza della proteina SCO3644; questa ha suggerito che il gene SCO3644 possa codificare per una chinurenina formamidasi (KFA). A supporto di questa ipotesi è stato successivamente evidenziato come in SCO3644 siano conservati tutti i residui aminoacidici del dominio catalitico e di quello di legame del substrato delle chinurenina formamidasi presenti in altri organismi (Lima *et al.*, 2009) (Figura 7).

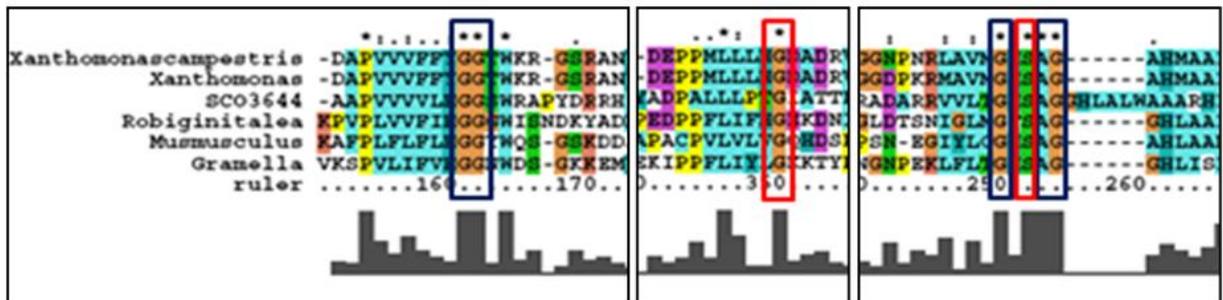


Figura 7. Allineamento multiple delle sequenze aminoacidiche dell'enzima chinurenina formamidasi (KFA) di diversi organismi e la proteina SCO3644 di *S. coelicolor*. In tutte le sequenze è presente un dominio esterasi/lipasi. Nei box rossi sono indicati i residui del dominio catalitico; nei box blu quelli necessari per il legame del substrato. Il software utilizzato è ClustalX 2.0.

È stato così supposto che i geni SCO3644, SCO3645 e SCO3646 (Figura 8) siano rispettivamente *kynB*, *kynU* e *kynA*, codificanti per i tre enzimi coinvolti nella conversione del triptofano in antranilato (rispettivamente KFA, TDO e KYN).

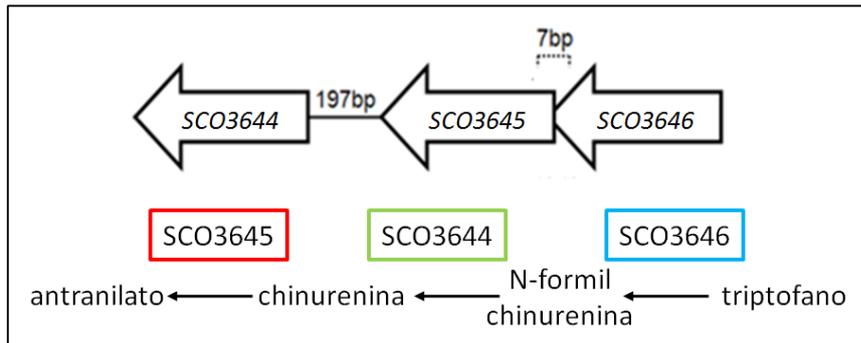


Figura 8. Organizzazione del locus SCO3644-46 e pathway dell'antranilato.

Inoltre tramite l'MBGD (Microbial Genome Database for Comparative Analysis), una banca dati che consente l'allineamento di intere regioni del cromosoma, la regione del genoma di *S. coelicolor* in cui si trova SCO3644 è stata paragonata con le regioni adiacenti al corrispondente gene di diversi microrganismi, il cui genoma è stato sequenziato, per comprendere se l'organizzazione genica presente in *S. coelicolor* è conservata. In alcuni batteri i geni sono localizzati in differenti regioni del cromosoma mentre in altri sono organizzati in un operone. Il programma inoltre, basandosi sulla sequenza, individua in SCO3644 il gene per la chinurenina formamidasi e in SCO3645 quello per la chinureninasi (Figura 9).

Genome Region Map

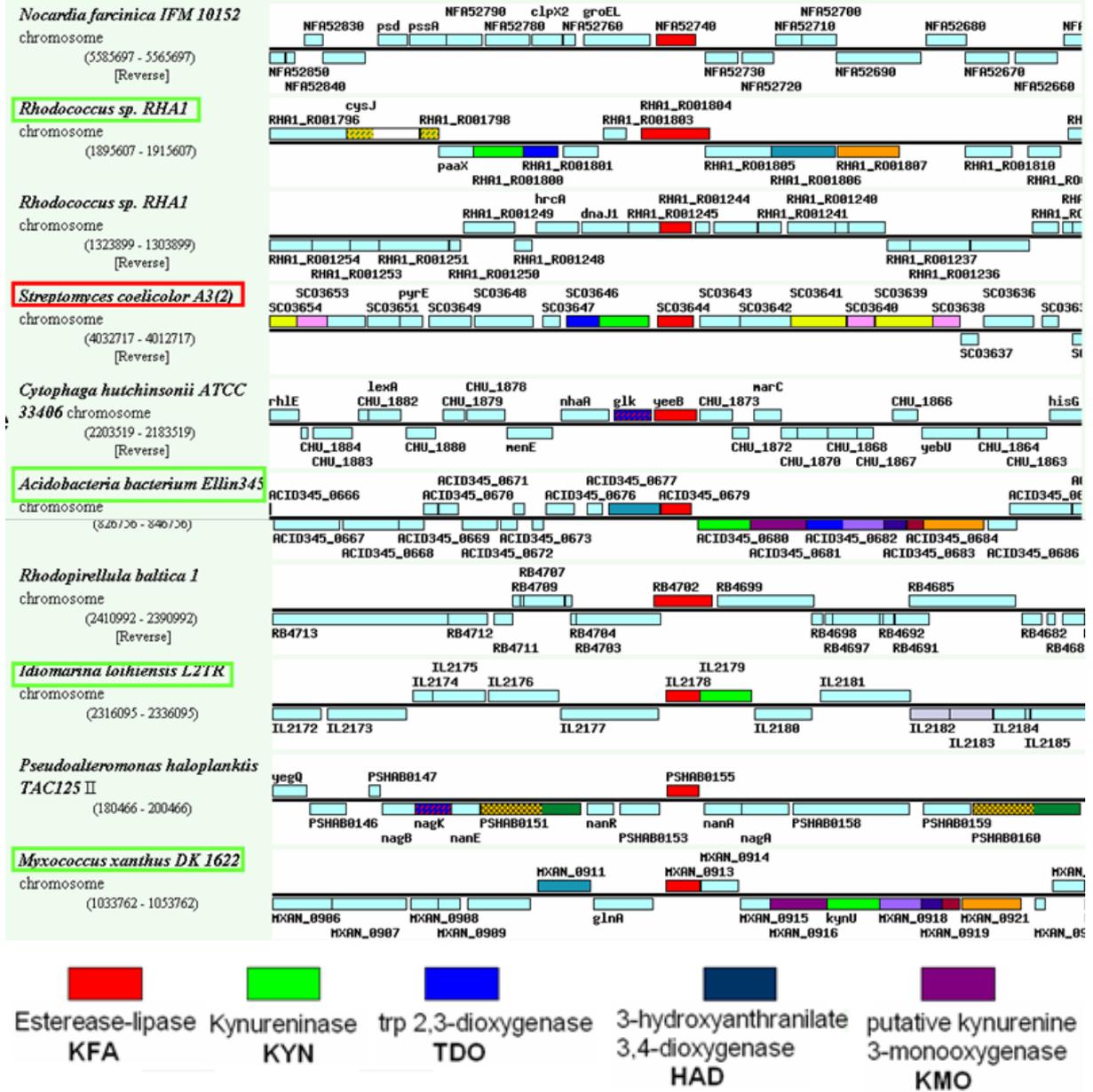


Figura 9. Analisi comparativa della regione SCO3644-46 di *S. coelicolor* e di geni ortologhi in altri microrganismi.

Studio *in vitro* dell'attività enzimatica delle proteine SCO3644, SCO3645 e SCO3646

- Saggi enzimatici di estratti proteici totali di *S. coelicolor*

Il primo passo nello studio del pathway in *S. coelicolor* è stato quello di verificare la presenza delle tre attività enzimatiche nelle condizioni di crescita usate.

I primi saggi sono stati condotti utilizzando proteine totali estratte da *S. coelicolor* M145 cresciuto in un terreno minimo liquido (SMMS) in presenza di triptofano 0,25 e 2,5 mM e in assenza dell'aminoacido.

Sorprendentemente tutti i saggi effettuati per evidenziare l'attività della triptofano 2,3-diossigenasi (TDO) non hanno dato risultati significativi. Nonostante i risultati pubblicati da Hitchcock e Katz nel 1988, a una conclusione simile è arrivato anche il gruppo di Keller secondo il quale "l'attività bassa e instabile della triptofano 2,3-diossigenasi ha impedito lo studio di questo enzima" (Keller *et al.*, 2010).

La presenza nel terreno di coltura di triptofano 2,5 mM, ma non 0,25 mM (dati non mostrati), causa un incremento dell'attività della chinurenina formamidasi (KFA) (figura 10) e della chinureninasi (KYN) (figura 11). In entrambi i casi viene rilevata spettrofotometricamente la presenza di chinurenina, prodotto della reazione catalizzata dalla KFA e substrato della KYN (figura 1).

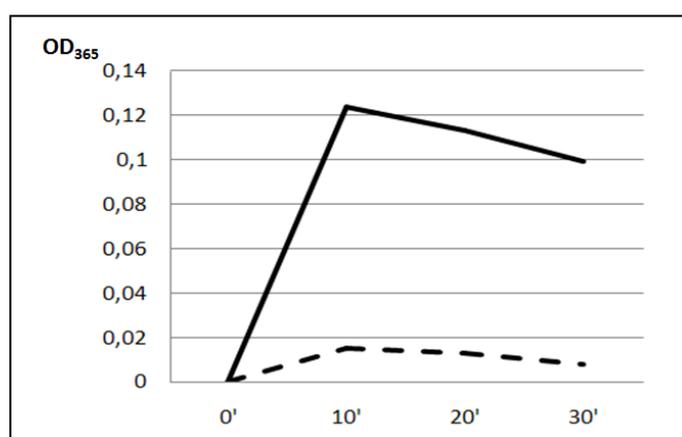


Figura 10. Saggio della chinurenina formamidasi utilizzando oroteine totali estratte da *S. coelicolor* M145 cresciuto in SMMS (-----) e SMMS con triptofano 2,5 mM (—).

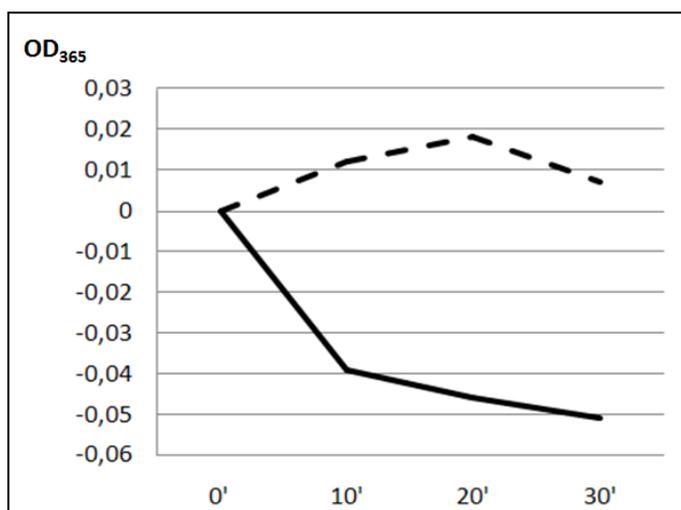


Figura 11. Saggio della chinureninasi utilizzando proteine totali estratte da *S. coelicolor* M145 cresciuto in SMMS (-----) e SMMS con triptofano 2,5 mM (—).

Sintesi della N-formil-chinurenina

Prima di effettuare il saggio della chinurenina formamidasi si è reso necessario sintetizzarne il substrato, l'N-formil-chinurenina. A questo scopo ho lavorato in collaborazione con il Dott. Andrea Pace del Dipartimento di Chimica Organica dell'Università di Palermo. Il protocollo utilizzato (Kurnasov *et al.*, 2003) prevede la reazione di formilazione della L-chinurenina in presenza di anidride acetica e acido formico. Oltre alla chinurenina formilata è stata ottenuta la forma acetilata. La separazione delle due molecole è stata effettuata mediante TLC preparativa. La purificazione del substrato è stata verificata mediante TLC in metanolo- cloroformio-acido acetico 90:5:5 (figura 12).

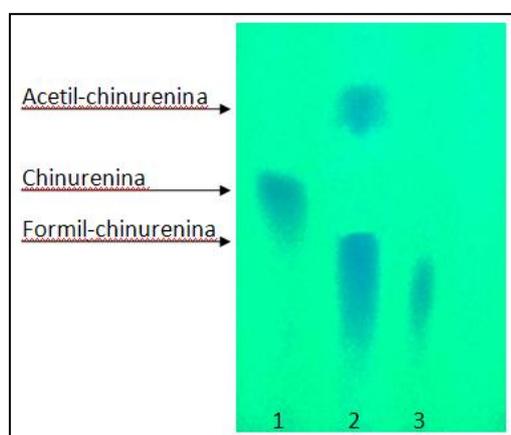


Figura 12. TLC della chinurenina (1), della miscela di reazione (2) e della formil- chinurenina purificata (3).

- Overespressione dei geni SCO3644, SCO3645 e SCO3646 in *E. coli*

Per dimostrare che le attività enzimatiche identificate in *S. coelicolor* sono effettivamente codificate dai geni ipotizzati, questi sono stati clonati nel vettore di *E. coli* pRSETB e overespressi nel ceppo BL21(DE3)pLysS (figura 13). Le proteine ricombinanti che si ottengono possiedono una coda di sei istidine in posizione N-terminale utile per la loro purificazione.

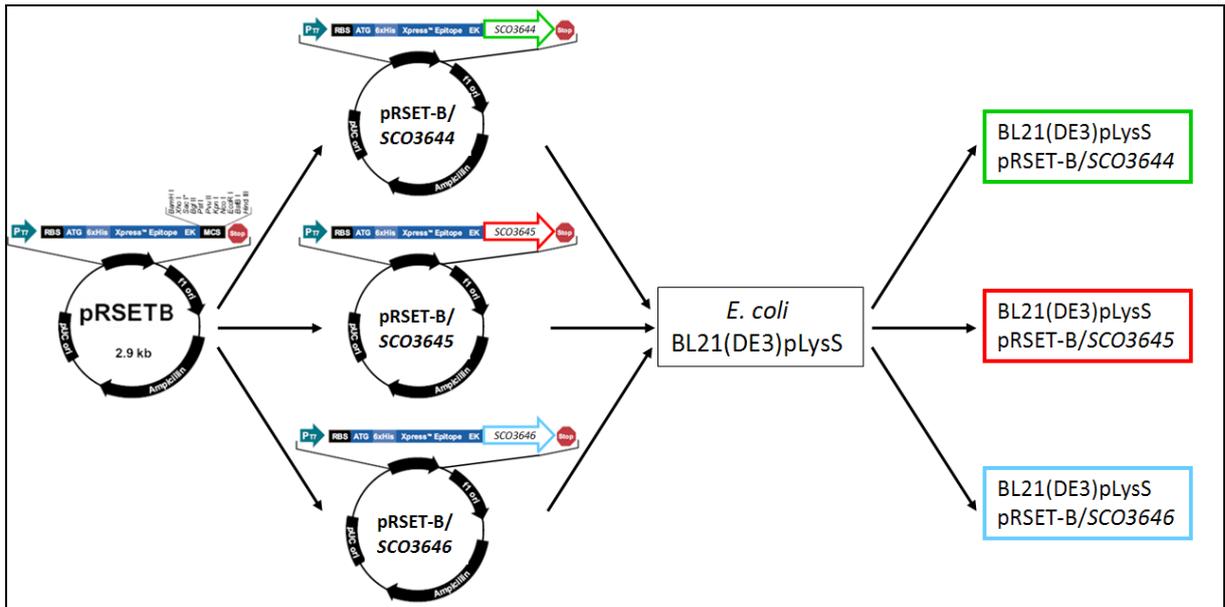


Figura 13. Schema del protocollo utilizzato per l'overespressione dei geni SCO3644, SCO3645 e SCO3646.

I frammenti di DNA che codificano per le tre proteine sono stati ottenuti mediante PCR utilizzando primer disegnati in modo da permettere il clonaggio in frame nel vettore di espressione. Ai primer sono stati aggiunti al 5' i siti di restrizione di *Bam HI* (primer for) e di *Hind III* (primer rev). Gli inserti contenuti nei plasmidi pRSETB-SCO3644, pRSETB-SCO3645 e pRSETB-SCO3646 di alcuni cloni sono stati fatti sequenziare. Quelli privi di errori di sequenza sono stati quindi inseriti nel ceppo di *E. coli* BL21(DE3)pLysS. In queste cellule l'aggiunta di IPTG al terreno di coltura induce l'espressione del 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/pRSETB-SCO3644, BL21(DE3)pLysS/pRSETB-SCO3645, BL21(DE3)pLysS/pRSETB-SCO3646 e BL21(DE3)pLysS/pRSETB (controllo), una volta

raggiunta un $O.D._{600} = 0.4-0.6$, sono state incubate tre ore a $30^{\circ}C$ in presenza di IPTG 0,1 o 1 mM, per trovare le condizioni migliori di induzione.

Il western blot con un anticorpo anti-His₆ tag delle proteine totali estratte dai quattro ceppi mostra bande della dimensione attesa corrispondenti a His₆-SCO3644 (34 KDa), His₆-SCO3645 (47 KDa) e His₆-SCO3646 (33 KDa). Proteine che reagiscono con l'anticorpo sono assenti nel controllo (figura 14).

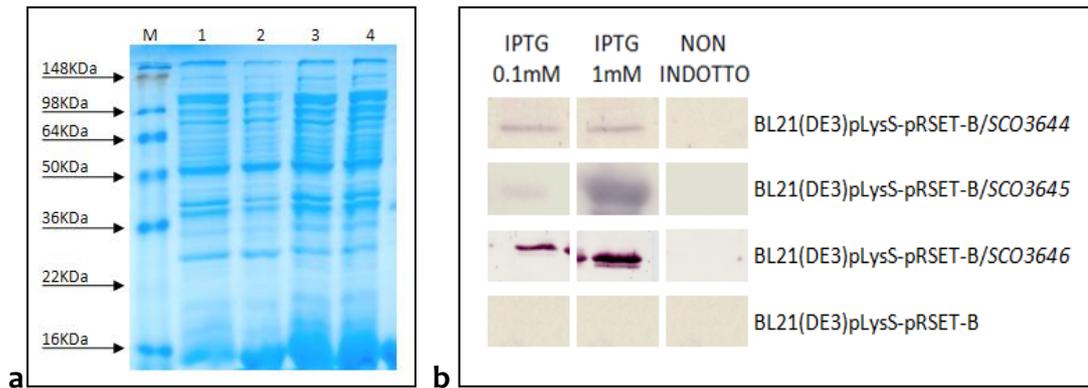


Figura 14. SDS-PAGE (a) e Western Blot (b) delle proteine totali estratte dai ceppi di *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pRSET-B/SCO3644 (1), BL21(DE3)pLysS-pRSET-B/SCO3645 (2), BL21(DE3)pLysS-pRSET-B/SCO3646 (3) e BL21(DE3)pLysS-pRSET-B (4).

- Saggi enzimatici degli estratti proteici di ceppi di *E. coli* in cui sono stati overespressi i geni SCO3644, SCO3645 e SCO3646

Le proteine totali estratte dai ceppi di *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pRSETB-SCO3644, BL21(DE3)pLysS/pRSETB-SCO3645, BL21(DE3)pLysS/pRSETB-SCO3646 e BL21(DE3)pLysS/pRSETB (controllo) sono state sottoposte a saggi enzimatici. Il saggio della triptofano diossigenasi mostra un incremento di assorbanza (dovuta alla comparsa della N-formil-chinurenina) nel ceppo in cui è overespresso il gene SCO3646 ma non nel controllo (figura 15a). In questo primo saggio è stata utilizzata una miscela contenente il triptofano sia nella forma L- che in quella D-. Una successiva analisi ha permesso di scoprire che entrambe le forme dell'aminoacido sono convertite in N-formil-chinurenina e che l'enzima sembra reagire meglio con la forma D- (figura 15b).

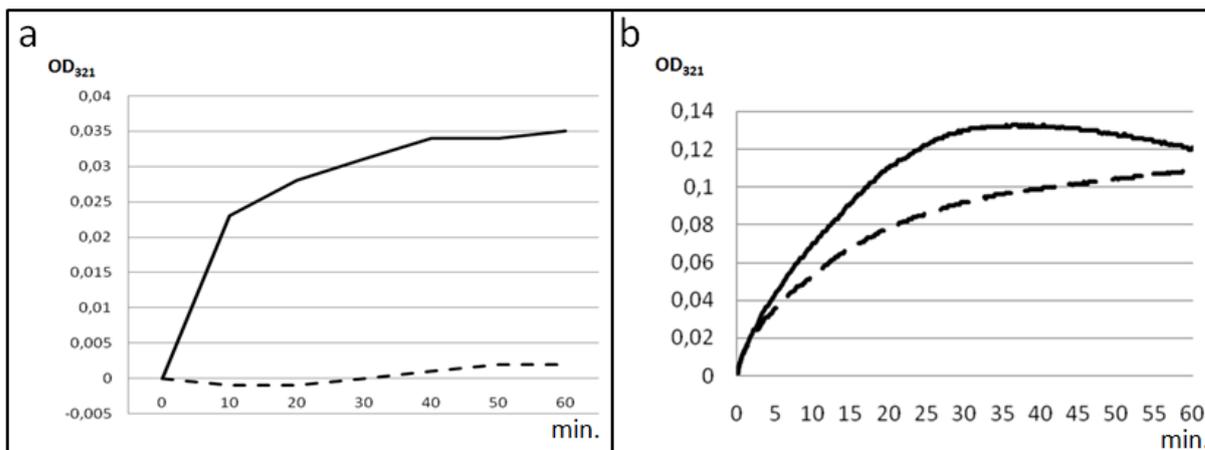


Figura 15. Saggio della triptofano diossigenasi utilizzando: a) Proteine totali dei ceppi di E. coli BL21(DE3)pLysS-pRSET-B/SCO3646 (—) e BL21(DE3)pLysS-pRSET-B (-----). b) Proteine totali estratte da BL21(DE3)pLysS-pRSET-B/SCO3646 in presenza di L-triptofano (-----) o di D-triptofano (—).

Come per la TDO, i saggi della chinurenina formamidasi (figura 16a) e della chinureninasi (figura 16b) mostrano attività enzimatica solo negli estratti dei ceppi che overesprimono rispettivamente i geni *SCO3644* e *SCO3645*.

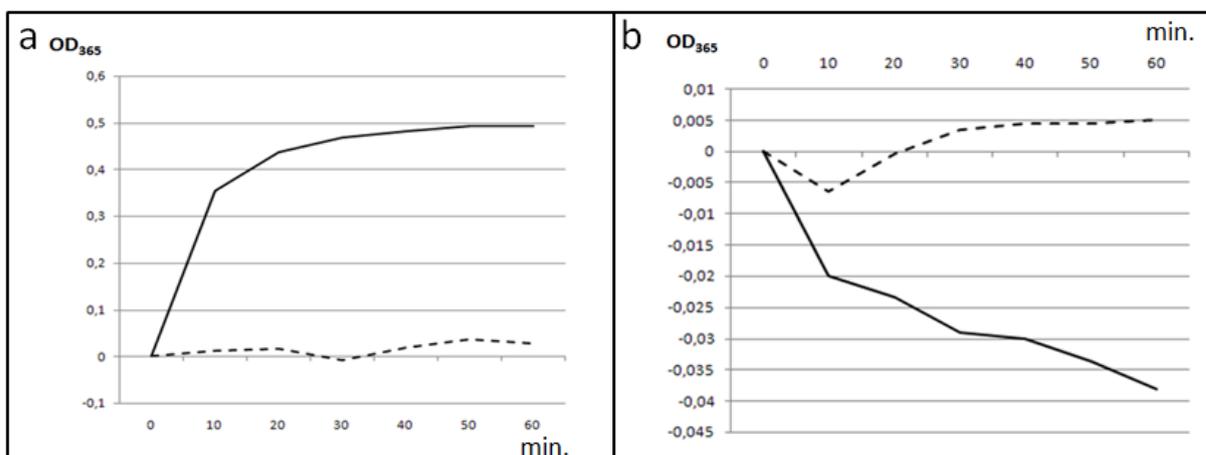


Figura 16. a) Saggio della chinurenina formamidasi utilizzando proteine totali dei ceppi di E. coli BL21(DE3)pLysS-pRSET-B/SCO3644 (—) e BL21(DE3)pLysS-pRSET-B (-----). b) Saggio della chinureninasi utilizzando proteine totali dei ceppi di E. coli BL21(DE3)pLysS-pRSET-B/SCO3645 (—) e BL21(DE3)pLysS-pRSET-B (-----).

- Purificazione delle proteine ricombinanti

La purificazione delle proteine con l'His₆Tag è stata effettuata tramite una colonna HisTrap per FPLC o utilizzando una resina Ni-NTA agarose (Invitrogen): in entrambi i casi viene sfruttato il legame tra la coda di sei istidine delle proteine ricombinanti e gli 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 ricombinanti dei ceppi BL21(DE3)pLysS-pRSET-B/SCO3644 e BL21(DE3)pLysS-pRSET-B/SCO3646 sono state in un primo momento purificate per FPLC. L'eluizione delle proteine che hanno interagito con la matrice di ioni nichel è stata effettuata impostando un gradiente fino a una concentrazione di imidazolo 400 mM. I campioni ottenuti dopo la separazione sono stati caricati su SDS-PAGE.

Il cromatogramma risultante dall'eluizione delle proteine estratte dal ceppo BL21(DE3)pLysS-pRSET-B/SCO3646 legate alla colonna HisTrap ha mostrato due picchi di assorbimento a 280 nm (figura 17). Il primo corrisponde a proteine che hanno interagito con la matrice in maniera aspecifica e che sono state quindi staccate dalla resina con una bassa concentrazione di imidazolo (figura 18, dal campione 18 al 32). Il secondo coincide con la proteina His₆-SCO3646 (33 KDa) che è stata così purificata (figura 18, dal campione 52 al 72).

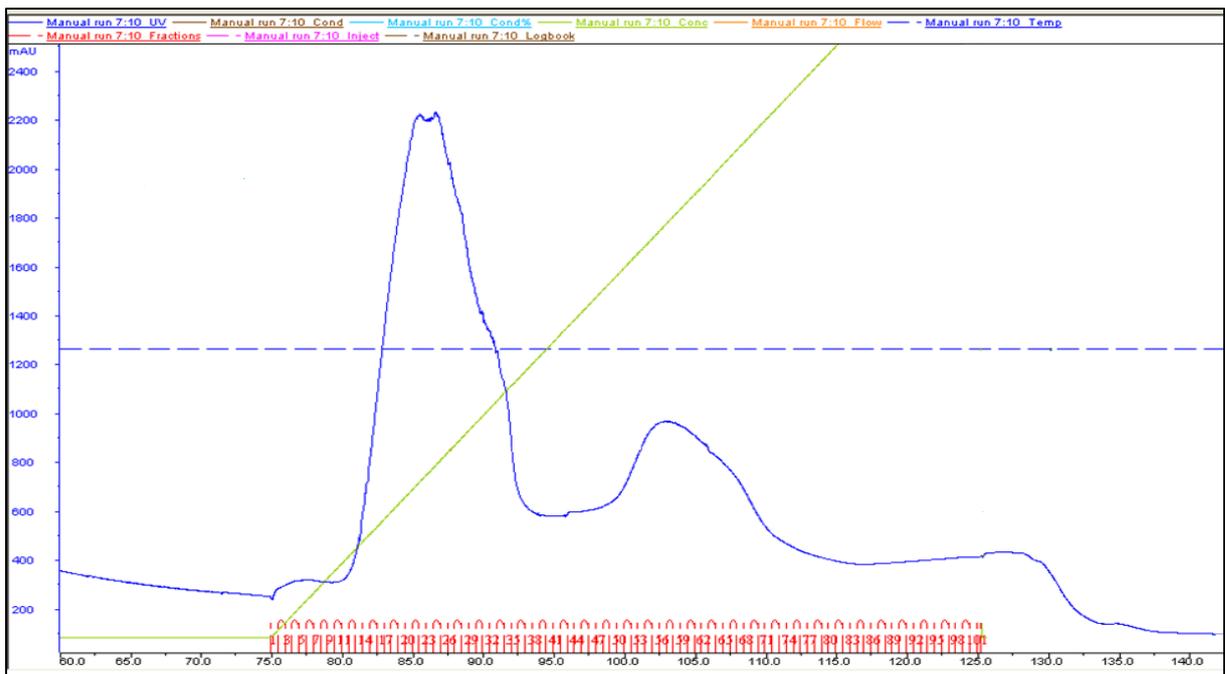


Figura 17. cromatogramma della proteina His₆-SCO3646 su His-Trap; la curva blu rappresenta l'assorbimento UV a 280 nm; la retta verde l'andamento della concentrazione di imidazolo; in rosso sono indicate le frazioni.

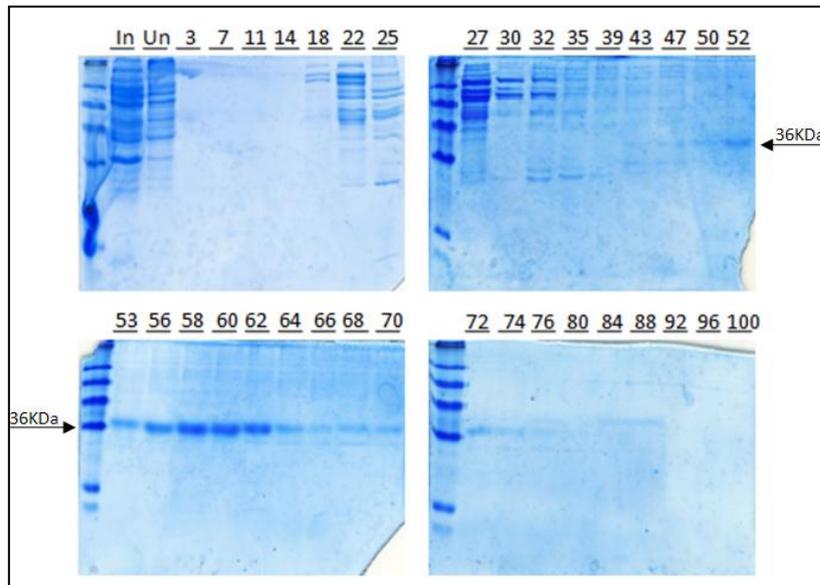


Figura 18. SDS-PAGE delle proteine ottenute dalla purificazione. In: input; Un: unbound. Dal campione 52 al 72 è presente una banda di meno di 36 KDa corrispondente a His₆-SCO3646 (33 KDa).

Il cromatogramma ottenuto dalla purificazione delle proteine del ceppo BL21(DE3)pLysS-pRSET-B/SCO3644 (figura 19) è molto simile a quello mostrato per His₆-SCO3646. In questo caso però His₆-SCO3644 (di 34 KDa) viene eluita insieme a una proteina di circa 64 KDa e a un'altra di 50 KDa, più rappresentata (campioni 40, 43, 45 e 47 in figura 20).

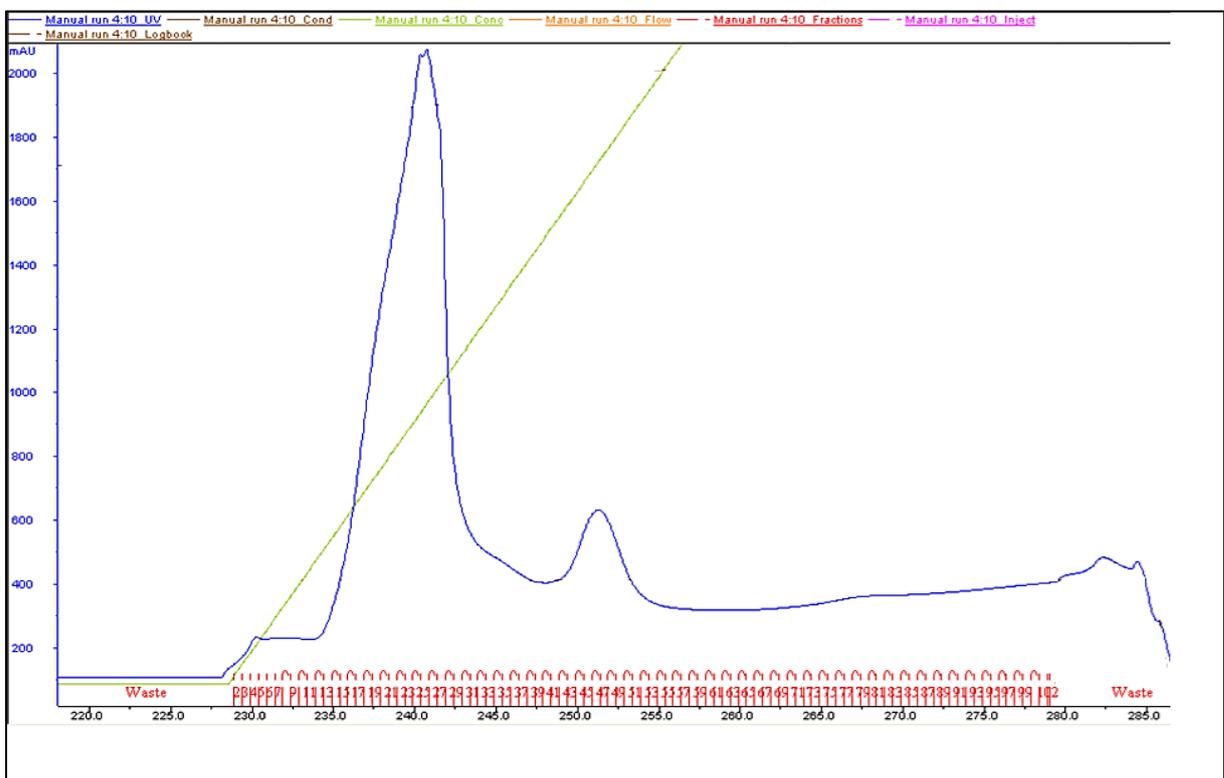


Figura 19. cromatogramma della proteina His₆-SCO3644 su His-Trap; la curva blu rappresenta l'assorbimento UV a 280 nm; la retta verde l'andamento della concentrazione di imidazolo; in rosso sono indicate le frazioni.

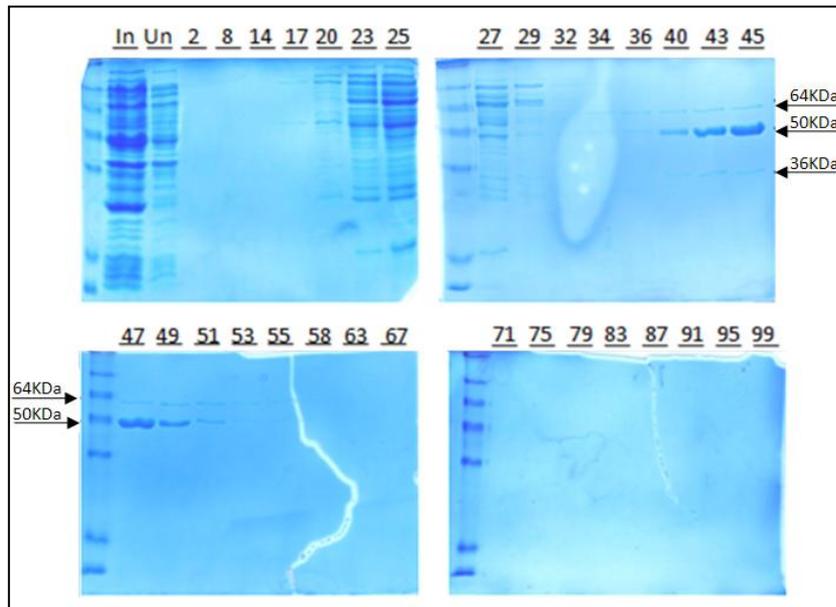


Figura 20. SDS-PAGE delle proteine ottenute dalla purificazione. In: input; Un: unbound. Nei campioni 40, 43, 45 e 47 sono presenti tre bande di circa 64, 50 e 36 KDa. Nei campioni 49, 51 e 53 appaiono solo le bande da 64 e 50 KDa.

Per questo motivo si è quindi ritenuto opportuno variare il metodo utilizzato per la purificazione, ricorrendo al kit Ni-NTA della Invitrogen. Questo ha consentito il recupero di un campione più puro: nei campioni 2, 3 e 4 è presente una banda di circa 36 KDa corrispondente a His₆-SCO3644 (34 KDa). (figura 21).

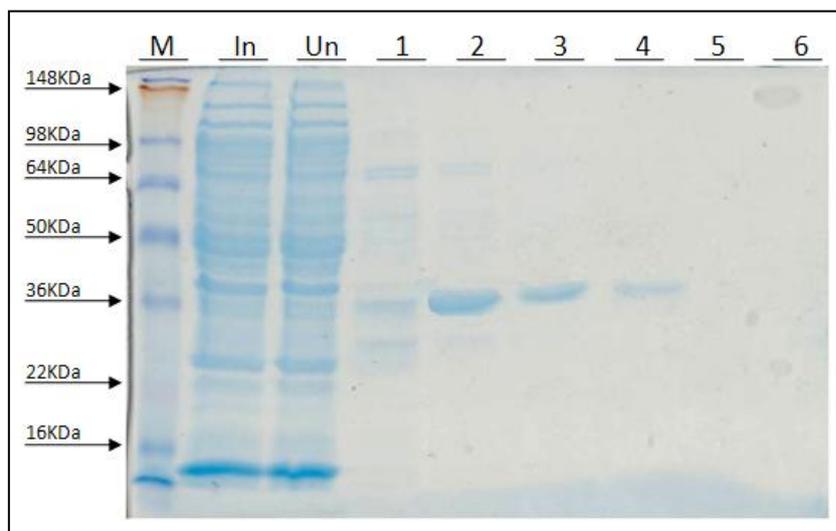


Figura 21. SDS-PAGE delle proteine ottenute dalla purificazione. In: input; Un: unbound. Da 1 a 6: Proteine eluite con concentrazioni di imidazolo 50, 100, 150, 200, 250 e 400 mM.

Anche la purificazione di HIS₆-SCO3645 è stata condotta mediante il kit Ni-NTA; nei campioni 1, 2, 3 e 4 è presente una banda di circa 50 KDa corrispondente a His₆-SCO3645 (47 KDa) (figura 22).

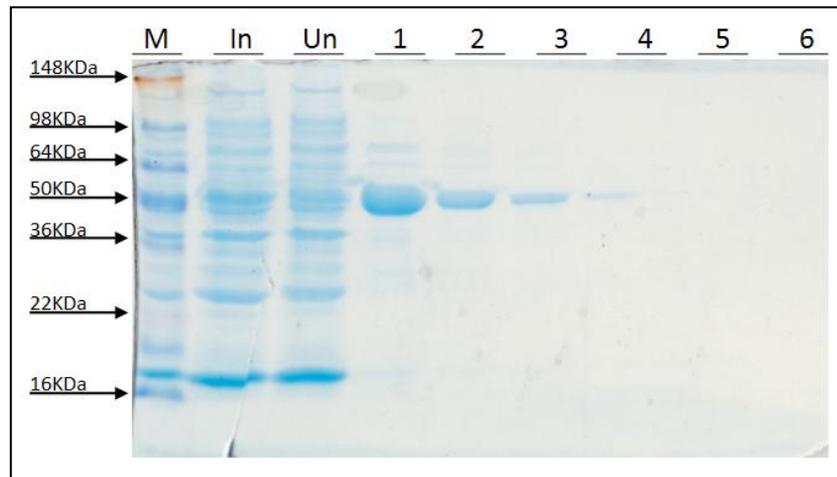


Figura 22. SDS-PAGE delle proteine ottenute dalla purificazione. In: input; Un: unbound. Da 1 a 6: Proteine eluite con concentrazioni di imidazolo 50, 100, 150, 200, 250 e 400 mM.

- Saggi enzimatici delle proteine His₆-SCO3644, His₆-SCO3645 e His₆-SCO3646

Saggio della Triptofano 2,3-diossigenasi (TDO)

La proteina di circa 36KDa ottenuta per FPLC è stata utilizzata per il saggio della TDO. La reazione è stata monitorata per 60 minuti in lettura continua ponendo come bianco l'assorbanza misurata subito dopo l'aggiunta del substrato. Come controllo, la stessa reazione è stata allestita con le proteine estratte dal ceppo BL21(DE3)pLysS/pRSETB. L'aumento di assorbanza a 321nm è dovuta alla conversione del triptofano in formilchinerina (figura 23).

Come in molti altri microrganismi la TDO di *S. coelicolor* è in grado di utilizzare entrambe le isoforme del triptofano e mostra una maggiore attività in presenza della forma D-. Essendo nullo l'assorbimento del triptofano nel buffer di reazione alla lunghezza d'onda considerata, l'attività specifica calcolata è di $\sim 4,4 \mu\text{MOL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgPROT}^{-1}$ con il D-triptofano e di $\sim 3,2 \mu\text{MOL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgPROT}^{-1}$ con la forma L-.

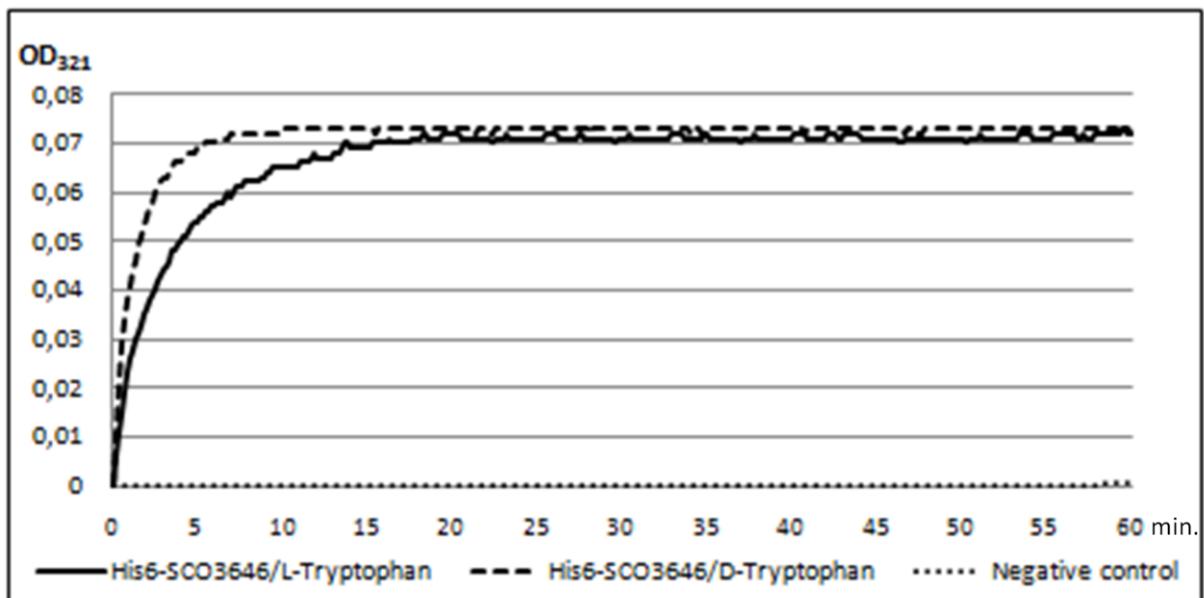


Figura 23. Saggio della triptofano 2,3-diossigenasi. His₆-SCO3646 utilizzando come substrato L-triptofano (—) o D-triptofano (-----) e proteine totali estratte dal ceppo BL21(DE3)pLysS/pRSETB (.....).

Il calcolo della KM è stato condotto secondo il metodo di Lineweaver-Burk o dei doppi reciproci, utilizzando concentrazioni di substrato da 0,05mM a 1,6mM. La KM misurata è uguale a 0,08mM per il D-trp e 0,12mM per L-trp (figura 24).

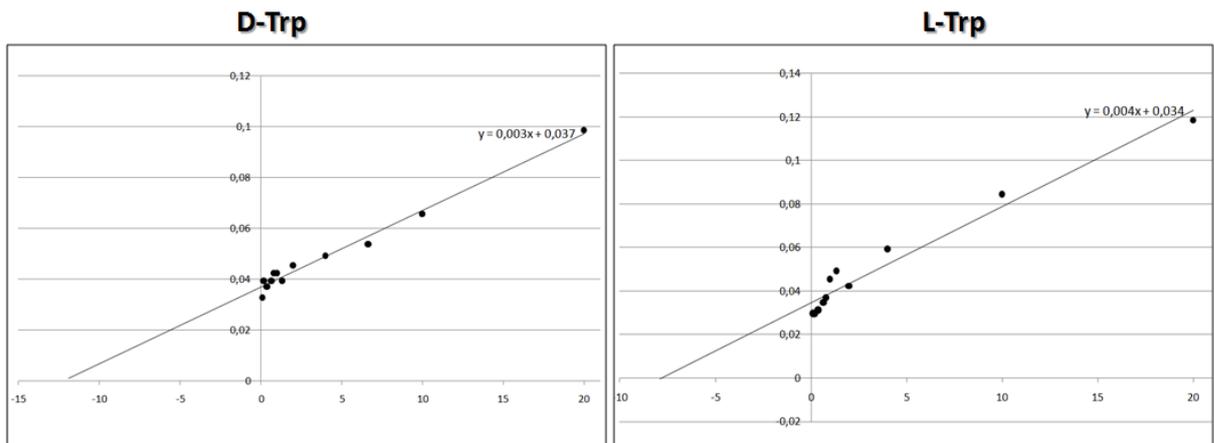


Figura 24. Diagramma di Lineweaver-Burk per il calcolo della KM della triptofano 2,3-diossigenasi di *S. coelicolor*.

Saggio della chinurenina formamidasi (KFA)

La proteina His₆-SCO3644 purificata è stata utilizzata per il saggio della chinurenina formamidasi. La reazione è stata monitorata per 60 minuti in lettura continua ponendo come bianco l'assorbanza misurata subito dopo l'aggiunta del substrato. Come controllo, la stessa reazione è stata allestita con le proteine estratte dal ceppo BL21(DE3)pLysS/pRSETB (figura 25).

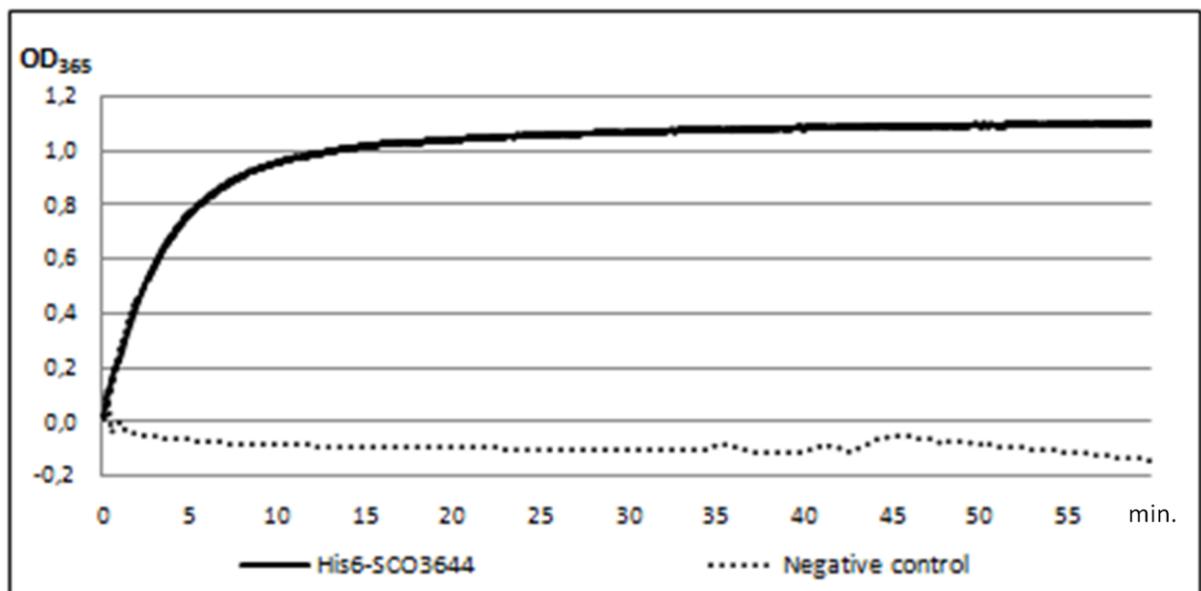


Figura 25. Saggio della chinurenina formamidasi utilizzando His₆-SCO3644 (—) o proteine totali estratte dal ceppo BL21(DE3)pLysS/pRSETB (-----).

Dal grafico si osserva un rapido incremento di assorbanza a 365 nm, corrispondente alla formazione della chinurenina.

Per calcolare in maniera precisa l'attività specifica dell'enzima è stato prima analizzato lo spettro di assorbimento della N-formil-chinurenina (substrato) e della chinurenina (prodotto della reazione) nel buffer di reazione utilizzato. Poiché il substrato mostra assorbanza a 365 nm (figura 26), questa è stata considerata nei calcoli effettuati per stabilire l'attività specifica dell'enzima.

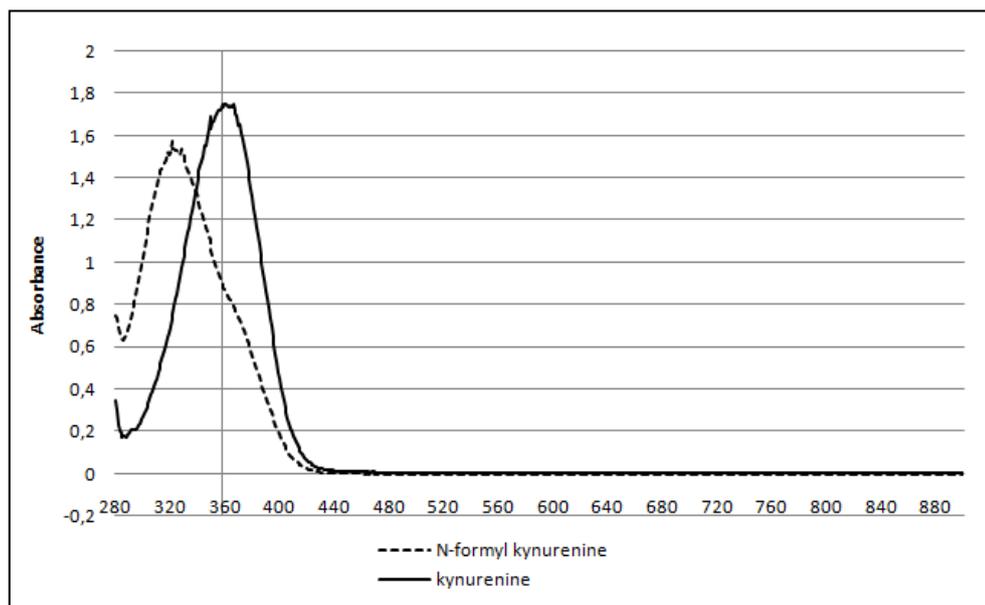


Figura 26. Spettro di assorbimento della N-formil-chinurenina (-----) e della chinurenina (—) nel buffer di reazione per il saggio della KFA.

I dati ottenuti hanno permesso di calcolare l'attività specifica dell'enzima di *S. coelicolor*: questa è pari a $\sim 3 \mu\text{MOL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgPROT}^{-1}$, simile a quanto ottenuto per lo stesso enzima di *Pseudomonas aeruginosa* ($\sim 4,7$), *Ralstonia metallidurans* ($\sim 3,5$) e *Bacillus cereus* ($\sim 5,9$) (Kurnasov et al., 2003).

Il calcolo della KM è stato condotto utilizzando concentrazioni di substrato da 0,05mM a 2mM (figura 27). La KM misurata è uguale a 0,23mM (in *S. parvulus* lo stesso enzima ha una KM pari a 0,31mM).

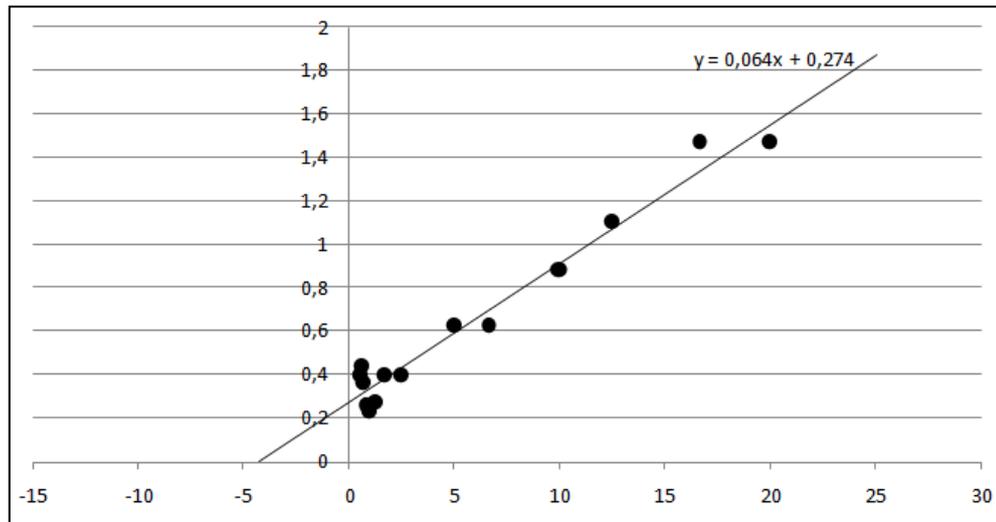


Figura 27. Diagramma di Lineweaver-Burk per il calcolo della KM della chinurenina formamidasi di *S. coelicolor*.

Saggio della chinureninasi (KYN)

La proteina ricombinante his₆-SCO3645 è stata utilizzata per effettuare il saggio spettrofotometrico della chinureninasi. La reazione è stata monitorata per 120 minuti in lettura continua ponendo come bianco l'assorbanza misurata subito dopo l'aggiunta del substrato. Come controllo, la stessa reazione è stata allestita con le proteine estratte dal ceppo BL21(DE3)pLysS/pRSETB (figura 28). La diminuzione di assorbanza è dovuta alla conversione della chinurenina (che assorbe a 365 nm) in antranilato. La scansione degli spettri di assorbimento dell'antranilato e dell'L-alanina, nel buffer di reazione della chinureninasi, mostra un'assorbanza a 365 nm trascurabile rispetto a quella della chinurenina.

Utilizzando una curva di taratura a concentrazioni crescenti di substrato, è stato visto che alla fine delle due ore di reazione la concentrazione di chinurenina passa da 0,2 mM a 0,16 mM.

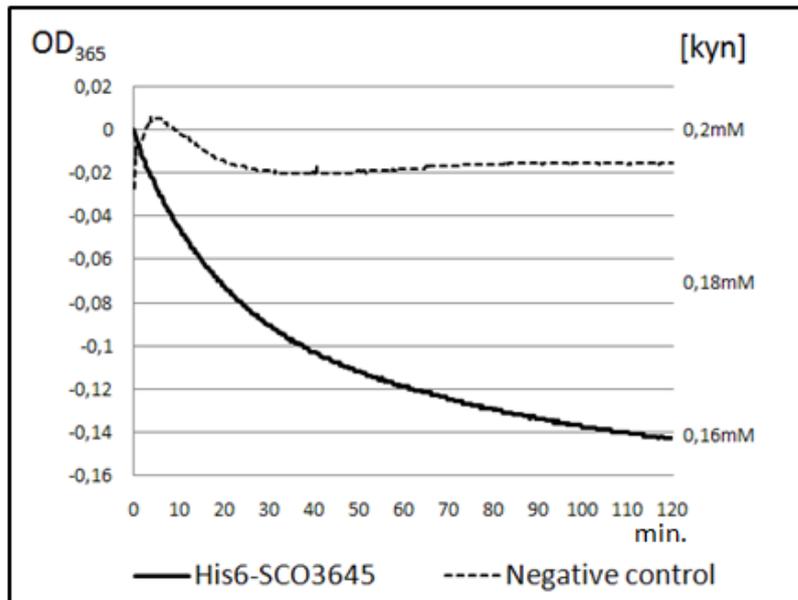


Figura 28. Saggio spettrofotometrico della chinureninasi utilizzando His₆-SCO3645 (—) o le proteine totali estratte dal ceppo BL21(DE3)pLysS-pRSET-B (-----).

Per verificare che tutto il substrato utilizzato viene convertito in prodotto il saggio della chinureninasi è stato ripetuto (nelle stesse condizioni) utilizzando uno spettrofluorimetro: in questo caso viene quantizzato l'antranilato prodotto sfruttando la sua capacità di emettere fluorescenza a 405 nm se eccitato a 340 nm (figura 29). La concentrazione di antranilato dopo due ore di reazione è 0,04 mM: questo ha confermato che il substrato utilizzato viene convertito nel prodotto finale. La proteina SCO3645 è quindi una chinureninasi; l'attività specifica calcolata ed è di $\sim 0,54 \mu\text{MOL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgPROT}^{-1}$.

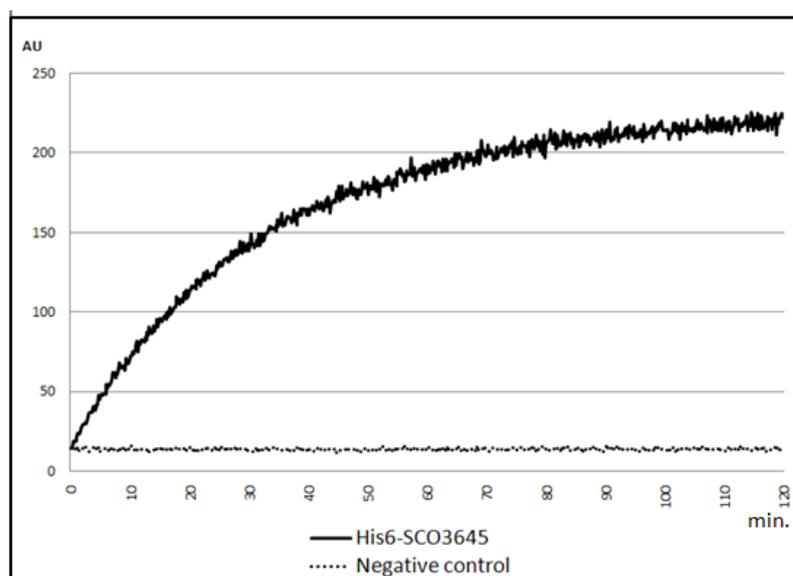


Figura 29. Saggio spettrofluorimetrico della chinureninasi utilizzando His₆-SCO3645 (—) o le proteine totali estratte dal ceppo BL21(DE3)pLysS-pRSET-B (-----).

Il calcolo della K_M è stato condotto utilizzando concentrazioni di substrato da 0,02 mM a 0,4 mM (figura 30). La K_M misurata è 0,04 mM.

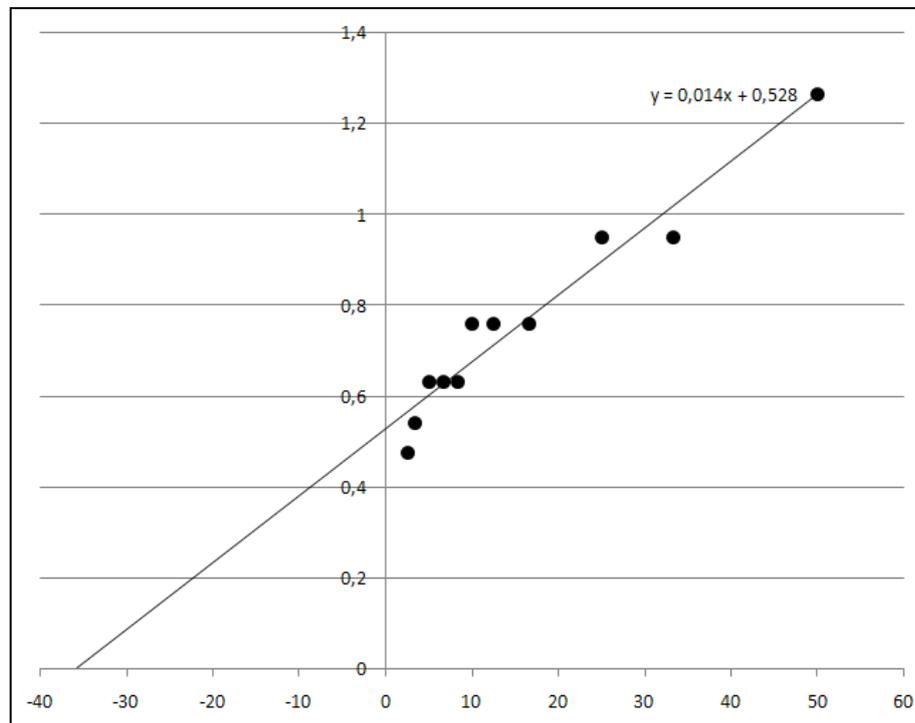


Figura 30. Diagramma di Lineweaver-Burk per il calcolo della K_M della chinureninasi di *S. coelicolor*.

Questi risultati dimostrano che le proteine codificate dai geni *SCO3644*, *SCO3645* e *SCO3646*, d'ora in poi chiamati *kynB*, *kynU* e *kynA*, sono rispettivamente una chinurenina formamidasi (KFA), una chinureninasi (KYN) e una triptofano diossigenasi (TDO). Inoltre è stato dimostrato che questa via metabolica è in grado di degradare sia l'L- che il D-triptofano.

Analisi trascrizionale del locus *kyn*

- Organizzazione del locus *kyn*

I geni *kynA*, *kynB* e *kynU* sono adiacenti, appartengono allo stesso filamento di DNA e hanno lo stesso orientamento. Per scoprire se essi appartengono a un operone, è stata condotta un'analisi RT-PCR delle regioni intergeniche *kynB-kynU* e *kynU-kynA*. Questa ha mostrato che i geni *kynA* e *kynU* sono cotrascritti; *kynB* non fa invece parte della stessa unità trascrizionale (figura 31).

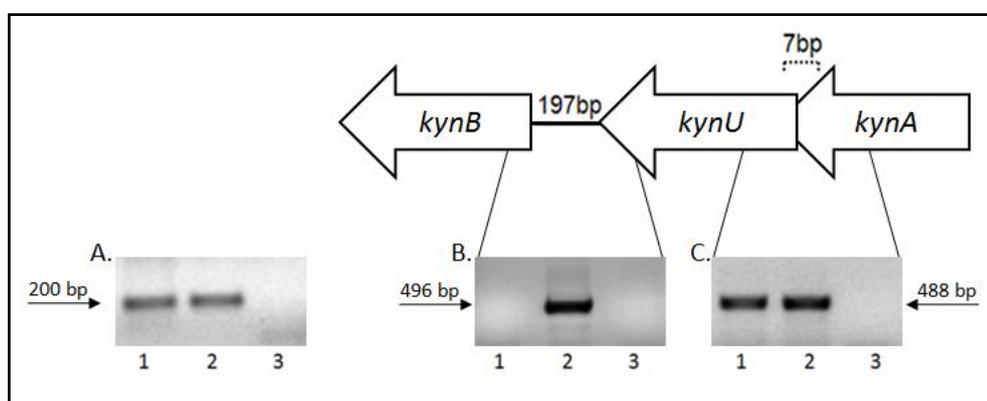


Figura 31. Analisi RT-PCR del gene *hrdB*, costitutivo (controllo) (A.), della regione intergenica *kynB-kynU* (B.) e *kynU-kynA* (C.). 1: RNA stampo; 2: controllo positivo, DNA genomico; 3: controllo negativo, miscela di reazione senza DNA o RNA stampo.

- Analisi qRT-PCR dei geni *kynB*, *kynU* e *kynA* nel ceppo di *S. coelicolor* wt cresciuto in terreno minimo in presenza e assenza di triptofano

I tre geni del locus *kyn* codificano per le tre attività enzimatiche coinvolte nel pathway di conversione del triptofano in antranilato.

I saggi enzimatici delle proteine totali di *S. coelicolor*, cresciuto in terreno minimo in assenza e in presenza di triptofano 0,25 e 2,5 mM, hanno evidenziato che è possibile rilevare un'attività di chinurenina formamidasi e di chinureninasi soltanto ad alte concentrazioni dell'aminoacido.

Inoltre, è stato recentemente visto che l'induzione con una concentrazione 2,5 mM di triptofano fa aumentare l'attività della KYN e della KFA rispettivamente di dieci e di due

volte mentre quella della TDO non risulta invece incrementata (Keller *et al.*, 2010). Tutti questi dati mostrano come sia necessaria un'alta concentrazione di aminoacido per rilevare l'attività di questi enzimi. Per determinare se questa maggiore attività sia causata da attivazione dell'espressione genica ho condotto un'analisi qRT-PCR su RNA estratti dal ceppo *S. coelicolor* M145 (wt) cresciuto in terreno minimo liquido in assenza e a bassa concentrazione dell'aminoacido. In particolare ho utilizzato una concentrazione dieci volte inferiore a quella necessaria per rilevare attività negli estratti proteici. L'RNA è stato estratto da micelio ottenuto dopo 14 e 24 ore di crescita (figura 32).

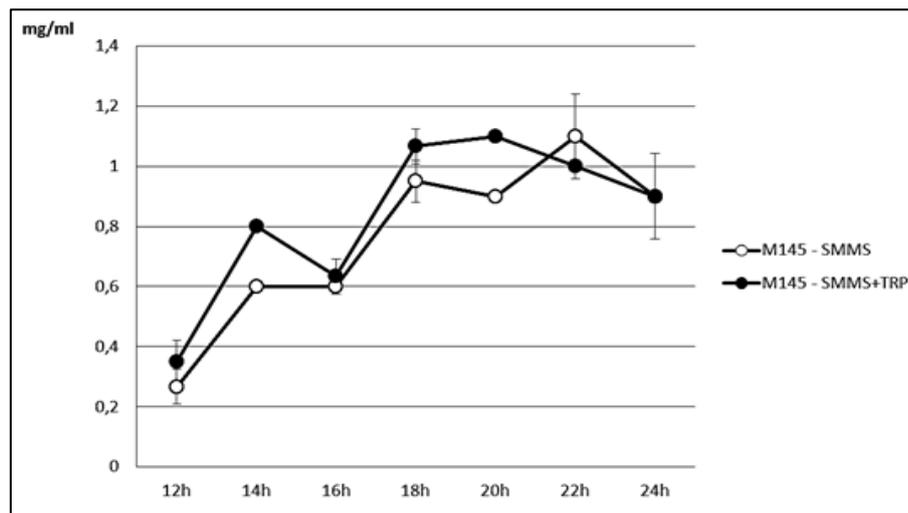


Figura 32. Curva di crescita di *S.coelicolor* M145 in SMMS (o) e SMMS+TRP (•).

Gli RNA totali sono stati quindi caricati su gel di agarosio (figura 33A), trattati con DNasi e dopo analizzati tramite PCR per verificare l'assenza di DNA contaminante (figura 33B). L'assenza di DNA genomico nella preparazione di RNA è stata verificata sostituendo la RT/Platinum® Taq con l'enzima Taq DNA polimerasi.

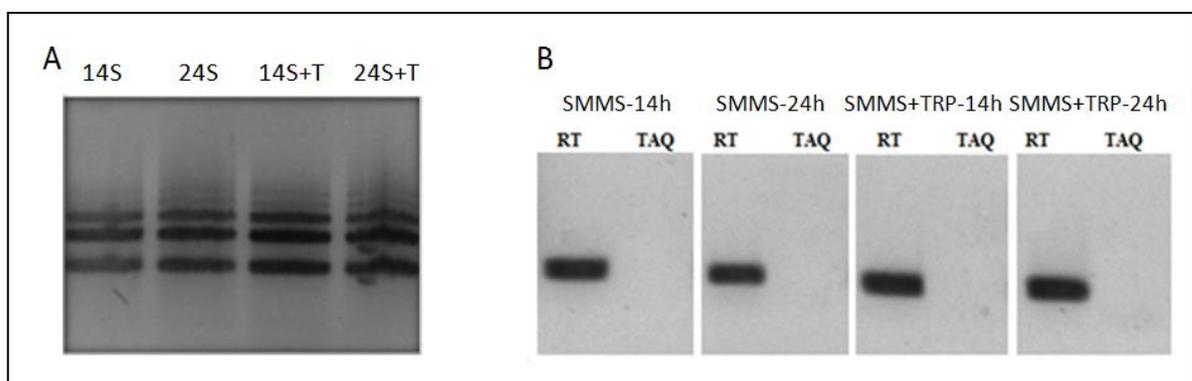


Figura 33. A) RNA estratti dalle colture di *S. coelicolor* cresciuto in SMMS e in SMMS + Tryptofano dopo 14 e 24 ore di crescita. B) RT-PCR degli RNA dopo trattamento con DNasi.

L'RNA è stato quindi retrotrascritto in cDNA che è stato utilizzato per allestire la reazione di amplificazione.

Lo studio dell'espressione dei tre geni in *S. coelicolor*, ha mostrato che non c'è un incremento della loro trascrizione durante le prime fasi di crescita in presenza di triptofano 0,25 mM. In fase tardiva invece *kynA* e *kynU* sono più espressi quando il batterio cresce in presenza dell'aminoacido; l'espressione di *kynB* non sembra aumentare significativamente (figura 34).

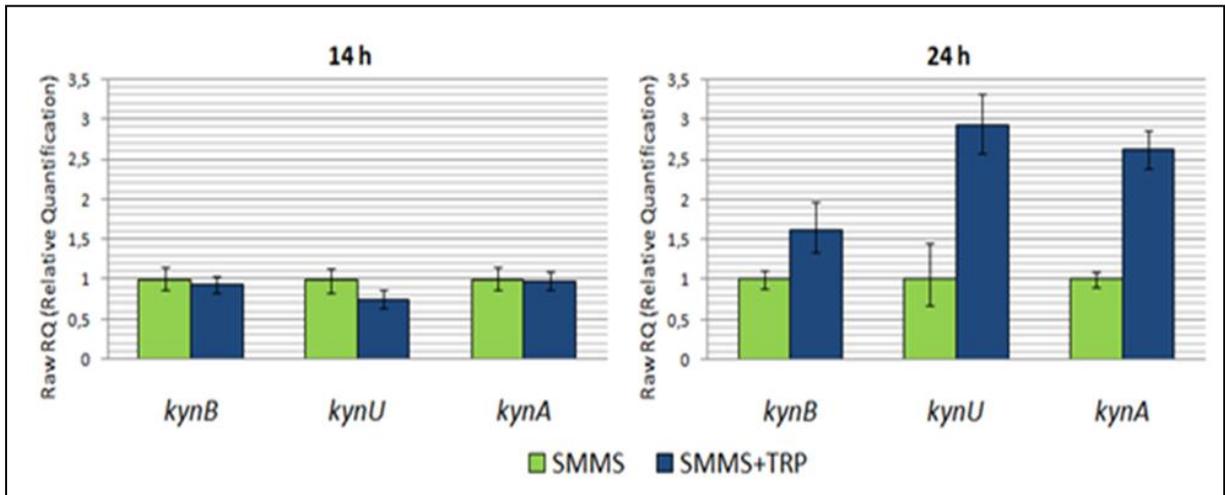


Figura 34. Analisi qRT-PCR dei geni *kynB*, *kynU* e *kynA*.

I risultati mostrano come l'aumento dell'attività degli enzimi in presenza di triptofano sia riconducibile a un aumento della loro espressione genica. Questa inoltre aumenta anche a una concentrazione bassa di aminoacido che non causa differenze rilevabili quando si analizzano le attività enzimatiche dalle proteine totali estratte.

Costruzione, complementazione e caratterizzazione del mutante *S. coelicolor* Δ kynU

Gli aminoacidi, oltre al ruolo nella sintesi proteica e all'essere una potenziale fonte di carbonio e azoto, hanno negli streptomiceti la funzione di precursore chiave della sintesi di molti metaboliti secondari (Hodgson, 2000). In *S. coelicolor* entrambi gli isomeri del triptofano vengono incorporati nell'antibiotico Calcio- dipendente (CDA) e inoltre all'interno del suo cluster biosintetico si trovano quattro geni coinvolti nella sintesi dell'aminoacido (*trpC2*, *trpD2*, *trpE2* e *trpG*) (Kim *et al.*, 2004).

Il CDA appartiene al gruppo degli antibiotici acidi lipopeptidici ed è formato da una catena ciclica di undici amminoacidi alla quale è legata una porzione lipidica (Kempter *et al.*, 1997); viene prodotto per via non ribosomale da enzimi multifunzionali (detti NRPS). Agisce contro un ampio spettro di batteri Gram positivi e la sua attività dipende fortemente dalla presenza di ioni calcio. Questi, permettendo l'aggregazione di più molecole di CDA (tramite interazioni tra residui acidi), portano alla formazione di un canale transmembrana nelle membrane batteriche (Hopwood e Wright, 1983; Grunewald *et al.*, 2003).

La biosintesi del CDA rappresenta un ottimo esempio di come metabolismo primario e secondario siano interconnessi. L'importanza del triptofano in qualità di precursore è stata confermata nel laboratorio in cui ho svolto il mio Dottorato, dove è stato dimostrato che l'iperespressione dei geni per la biosintesi del triptofano induce un aumento della produzione di CDA (Giardina *et al.*, dati non pubblicati).

Una volta dimostrato che i tre geni codificano gli enzimi del pathway e che la loro espressione aumenta in presenza di triptofano, mi sono interessato alla funzione di questa via catabolica in *S. coelicolor* e alla sua influenza nella sintesi del CDA. A tale scopo ho costruito un mutante knock-out per il gene *kynU*: in questo ceppo viene così a mancare l'enzima necessario per la produzione di antranilato tramite questa via.

- Costruzione del ceppo mutante di *S. coelicolor* Δ kynU tramite Redirect[®] Technology

Per la costruzione di un ceppo mutante nel gene *kynU* è stato utilizzato il protocollo della Redirect[®] Technology (Gust *et al.*, 2002), una metodica che permette la sostituzione di un gene selvatico con un gene che conferisce la resistenza a un antibiotico, sfruttando regioni di omologia con le porzioni fiancheggianti il gene da distruggere.

Per la trasformazione è stato utilizzato DNA lineare; in molti batteri questo viene degradato dalle esonucleasi *RecBCD* e ciò rende impossibile questo tipo di trasformazione. Per superare questo ostacolo viene utilizzato il sistema di ricombinazione “ λ RED” (REcombination Defective) derivante dal genoma fagico, che ha incrementato la frequenza di ricombinazione tra il DNA cosmidico circolare e le molecole di DNA lineare (Datsenko *et al.*, 2000). Il sistema λ RED è costituito da tre geni essenziali per la ricombinazione del genoma fagico:

- *gam*: codifica per una proteina che, legandosi in forma dimerica al complesso *RecBCD*, inibisce l'attività nucleasica;
- *exo*: la cui proteina lega come trimero il DNA lineare a doppia elica degradandolo in direzione 5'-3' e lasciando lunghe estremità a singola elica al 3'
- *bet*: il cui prodotto si lega al DNA a singola elica lungo più di 35 nucleotidi venendo così riconosciuto dal complesso di ricombinazione batterico.

La strategia di mutagenesi PCR-mediata di *S. coelicolor* prevede la sostituzione di una sequenza cromosomale all'interno di un cosmide di *S. coelicolor* (Redenbach *et al.*, 1996) con un marker selezionabile generato per PCR usando primer con 39 nucleotidi di omologia.

Poiché il DNA estratto dalle cellule di *E. coli* DH5 α e trasferito in *S. coelicolor* è soggetto a restrizione, il cosmide ricombinante è stato inserito, mediante elettroporazione, nel ceppo *E. coli* ET12567 (*dam*⁻ *dcm*⁻ *hsdS*⁻), mancante del sistema di metilazione (MacNeil *et al.*, 1992).

Il cosmide, dopo l'integrazione della cassetta di distruzione, contiene l'origine di replicazione *oriT* che ne permette l'inserimento in *E. coli*. Il trasferimento mediante coniugazione interspecifica avviene grazie al vettore non trasmissibile pUZ8002, che media il passaggio *in trans* dei vettori contenenti *oriT* ma manca della funzione *cis*-agente, per il suo stesso trasferimento (Kieser *et al.*, 2000). La coniugazione è infatti più efficiente della trasformazione dei protoplasti (Matsushima *et al.*, 1994). Per aumentare l'efficienza di trasformazione con il cosmide ingegnerizzato, il ceppo di *E. coli* BW25113 / pIJ790 è stato sostituito con il ceppo BW25141 / pKD78 (Datsenko *et al.*, 2000), il cui genotipo vede mutati, oltre ai geni del primo ceppo, *recA1*, una ricombinasi, e *endA9*, un'endonucleasi.

La cassetta di distruzione per il gene *kynU* è stata costruita utilizzando come stampo il gene per la resistenza alla apramicina *aac(3)IV*, contenuto nel plasmide pIJ773.

Le cellule BW25141/pKD78 sono state trasformate per elettroporazione con il cosmide StH10 (che possiede il gene *kynU*) e selezionate su terreno contenente ampicillina (100 µl/ml), kanamicina (50 µl/ml) e cloramfenicolo (25 µl/ml): la resistenza per i primi due antibiotici è portata dal cosmide, l'ultima dal plasmide pKD78.

I trasformanti sono stati elettroporati con la cassetta di distruzione e seminati su LB con ampicillina, kanamicina e apramicina (il gene per la resistenza a questo antibiotico si trova all'interno della cassetta di distruzione). L'incubazione a 37°C e la mancanza di cloramfenicolo nel mezzo di coltura sono servite all'eliminazione del pKD78. Una volta verificata, tramite restrizione enzimatica, la sostituzione del gene *kynU* con il gene *aac(3)IV* nel cosmide, questo è stato trasferito in *E. coli* ET12567/pUZ8002 (*dam⁻ dcm⁻ hsdS⁻*).

Il trasferimento del cosmide da *E. coli* a *Streptomyces* è stato effettuato mediante coniugazione interspecifica (coltura mista).

Poiché i cosmidi contengono la cassetta di resistenza alla kanamicina, i cloni in cui si è verificato il doppio evento di crossing-over (necessario per la sostituzione della copia integra del gene con quella distrutta per escissione del cosmide) dovevano essere *apra^r kan^s* (figura 35). Sono stati identificati così quattro cloni *apra^r kan^s*.

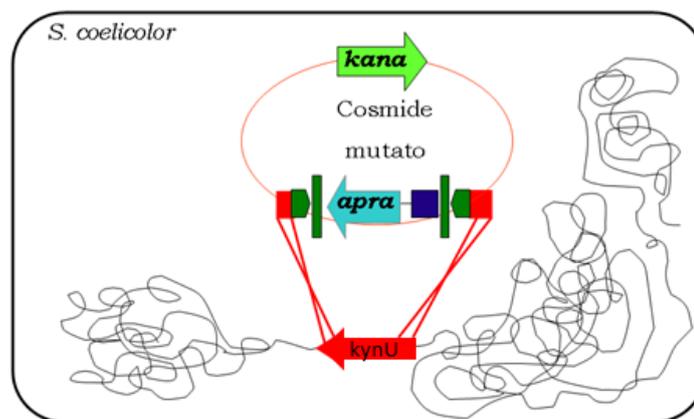


Figura 35. Schema dei due eventi di crossing over necessari per la sostituzione del gene *kynU* cromosomale con il gene per la resistenza alla apramicina.

La ricombinazione nei quattro diversi cloni è stata verificata sia tramite PCR che mediante analisi Southern Blot Hybridization.

La PCR è stata effettuata utilizzando primer interni al gene *kynU* (figura 36A) e primer interni al gene *aac(3)IV*. L'analisi elettroforetica (figura 36B) degli amplificati ottenuti dal DNA dei nostri campioni ha mostrato per il ceppo M145 un amplificato di 370bp a dimostrazione del fatto che in questi batteri è presente il gene *kynU*; per i mutanti, come

atteso, non è visibile alcun amplificato (figura 36A). Questi dati sono stati confermati dai risultati della seconda PCR che mostrano un amplificato di 700bp, corrispondente al gene *aac(3)IV*, per i ceppi mutanti e per il plasmide controllo e nessun amplificato per il wt (figura 36B).

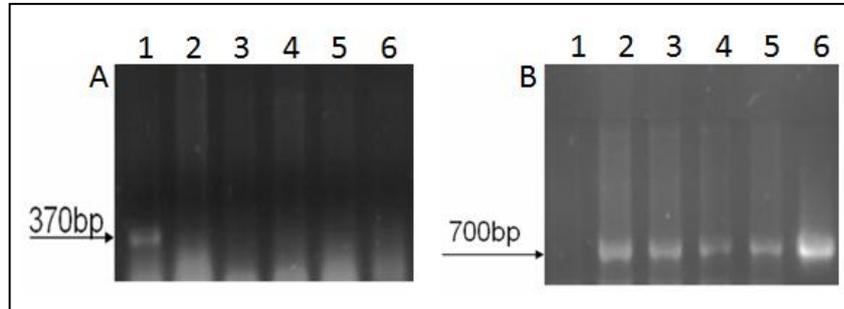


Figura 36. Analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione ottenuti con A) primer interni al gene *kynU* B) primer interni al gene per la resistenza all'apramicina. Lo stampo è DNA cromosomale di *S. coelicolor* M145 (1), e di quattro mutanti Δ *kynU* (2, 3, 4, 5) o DNA di un plasmide contenente il gene *aac(3)IV* (6).

La sostituzione del gene è stata verificata mediante analisi Southern che ha confermato la sostituzione del gene *kynU* con la cassetta di distruzione (figura 42).

- Caratterizzazione fenotipica del mutante $\Delta kynU$

Il ceppo knock-out per il gene *kynU* non mostra differenze nella crescita su terreno minimo solido in presenza e in assenza di glucosio e triptofano rispetto al ceppo wild type (figura 37).

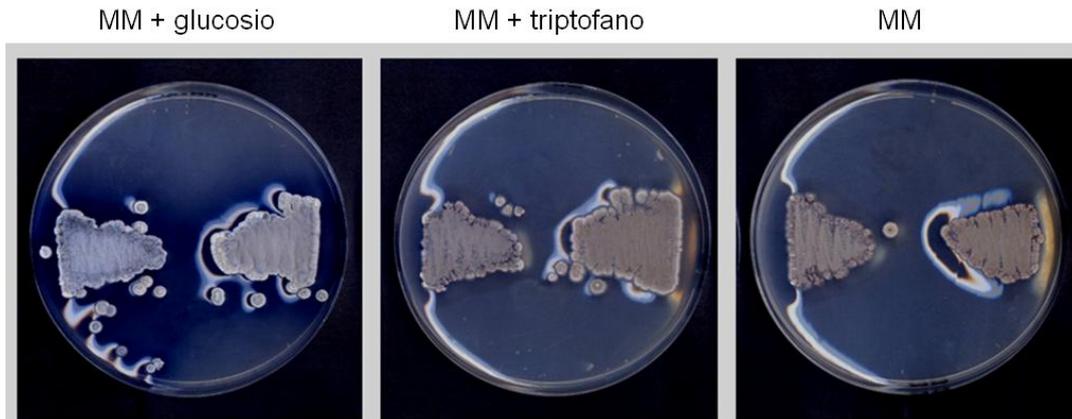


Figura 37. Analisi fenotipica del ceppo di *S. coelicolor* $\Delta kynU$ (a sinistra). Come controllo è stato usato il ceppo M145 (wt, a destra).

La curva di crescita in liquido dei due ceppi conferma i dati ottenuti su solido: le biomasse sono infatti paragonabili in ogni punto (figura 38).

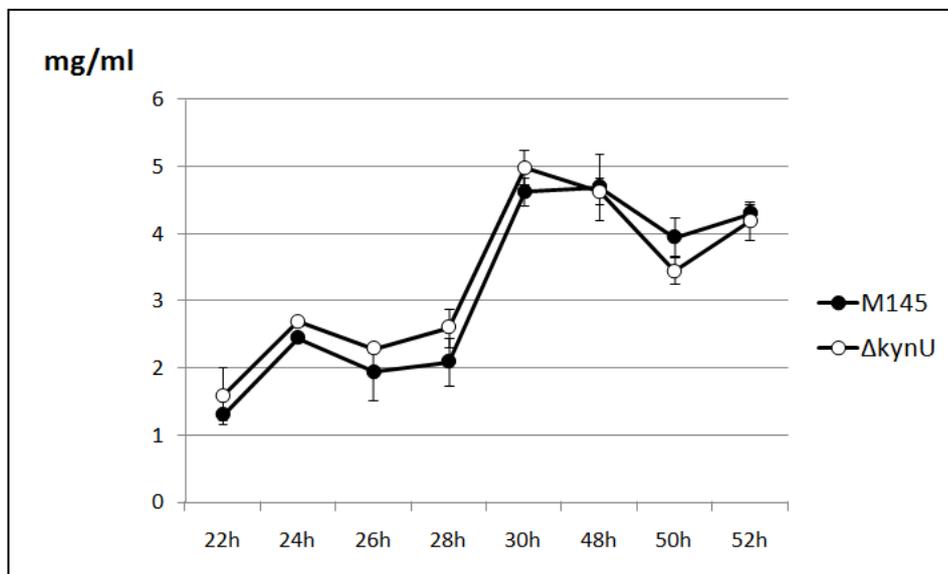


Figura 38. Curva di crescita di *S. coelicolor* M145 (•) e del mutante $\Delta kynU$ (o) cresciuti in SpMR in presenza di $CaCl_2$.

Poiché il triptofano viene incorporato nella molecola dell'antibiotico CDA sia nella forma D- che nella forma L-, un'alterazione nel metabolismo dell'aminoacido potrebbe causare

una sua maggiore concentrazione all'interno della cellula e in una maggiore produzione di antibiotico.

Partendo da questa ipotesi sono state quindi cercate differenze nella produzione di CDA tra il ceppo wt e il mutante.

Il ceppo knock-out del gene *kynU* mostra sia una produzione precoce che un accumulo in fase tardiva di CDA rispetto al ceppo selvatico. L'accumulo di antibiotico è stato dimostrato mediante saggio microbiologico (figura 39A) e quantizzato tramite HPLC: il mutante mostra una quantità di CDA doppia rispetto al wt già dopo 34 ore di crescita (figura 39B).

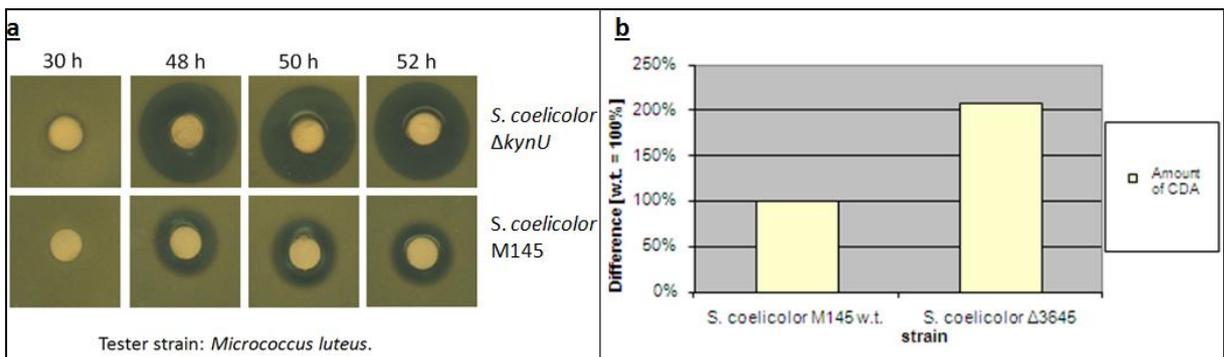


Figura 39 A. Saggi microbiologici dei ceppi *S. coelicolor* $\Delta kynU$ e wt. Il ceppo tester utilizzato è *Micrococcus luteus* cresciuto su ONA + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. B. Quantità di CDA presente nel mutante $\Delta SCO3645$ rispetto al wt dopo 34 ore di crescita.

- Complementazione della mutazione $\Delta kynU$ di *Streptomyces coelicolor*

L'unico fenotipo evidenziato del mutante *S. coelicolor* $\Delta kynU$ è una maggiore produzione dell'antibiotico calcio-dipendente. Per dimostrare che l'assenza della chinureninasi codificata da *kynU* ha un ruolo nell'aumento della sintesi di CDA si è deciso di complementare la mutazione. Data l'organizzazione dei geni all'interno dell'operone (figura 31) per assicurare l'espressione di *kynU* questo è stato clonato in frame a valle del promotore *ptipA* (inducibile da tiostreptone) del vettore pIJ8006 (figura 40).

Il vettore pIJ8006-*kynU*, il cui inserto non presenta errori nella sequenza, è stato utilizzato per trasformare cellule di *E. coli* ET12567/pUZ8002.

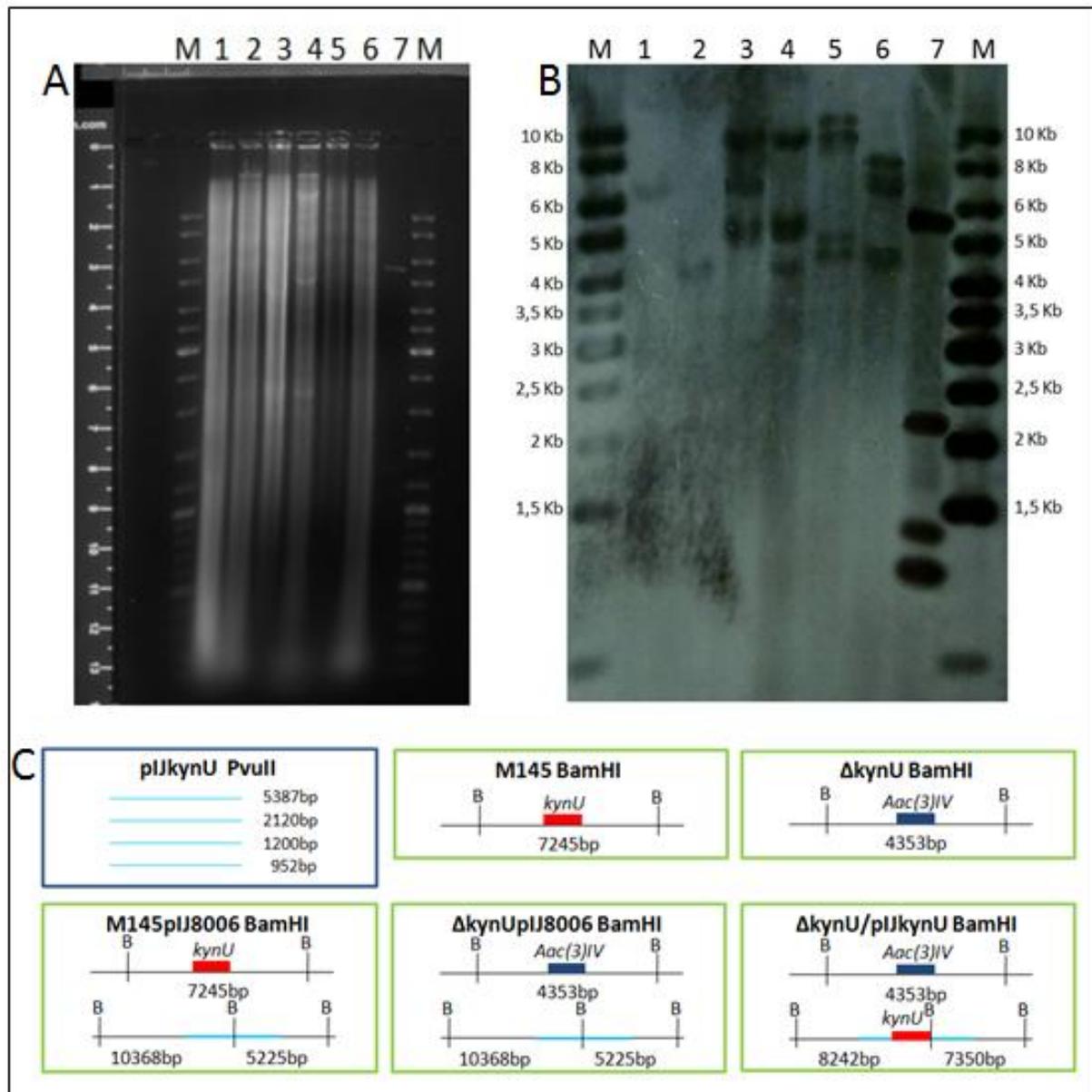


Figura 42. Analisi Southern del DNA dei cloni Δ kynU e Δ kynU/pIJkynU 7.1. A. Gel elettroforetico prima del blotting B. analisi Southern del DNA cromosomale digerito con BamHI di: 1: M145; 2: Δ kynU; 3: M145/pIJ8006; 4: Δ kynU/pIJ8006; 5: Δ kynU/pIJkynU 7.1; 6: Δ kynU/pIJkynU 7.3. M:DNA ladder mix. La sonda utilizzata è il plasmide pIJ8006-kynU digerito con PvuII (7). C. Schema delle bande attese nell'analisi Southern.

In seguito a queste analisi è stato eliminato il clone 7.1 e selezionato il clone *S. coelicolor* Δ kynU/pIJkynU 7.3, che è stato utilizzato per effettuare saggi microbiologici di produzione dell'antibiotico CDA. La curva di crescita di M145, Δ kynU, M145/pIJ8006, Δ kynU/pIJ8006 e Δ kynU/pIJkynU 7.3 mostra un andamento simile per tutti i ceppi considerati (figura 43).

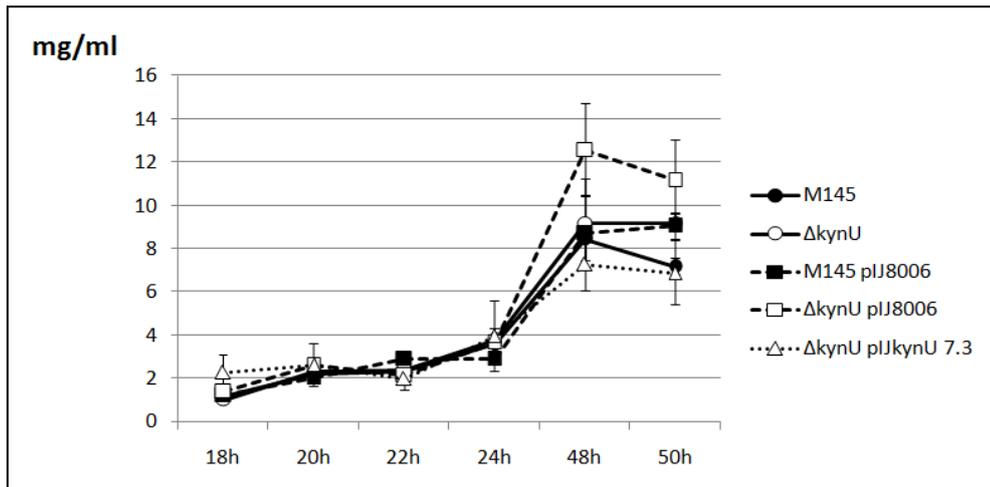


Figura 43. Curva di crescita dei ceppi Δ kynU e wt cresciuti in SpMR in presenza di CaCl_2 .

Δ kynU così come Δ kynU/pIJ8006, in cui è stato inserito il vettore vuoto, mostrano livelli di CDA simili e aloni di inibizione maggiori a quelli causati dal brodo di coltura del ceppo wt. Nel supernatante della coltura di Δ kynU/pIJkynU 7.3 è presente invece una quantità di antibiotico paragonabile a quella del wt e di M145 in cui è stato inserito il vettore pIJ8006 vuoto (figura 44). Questo dato indica che la mancanza del gene *kynU* in *S. coelicolor* causa un maggiore accumulo di CDA.

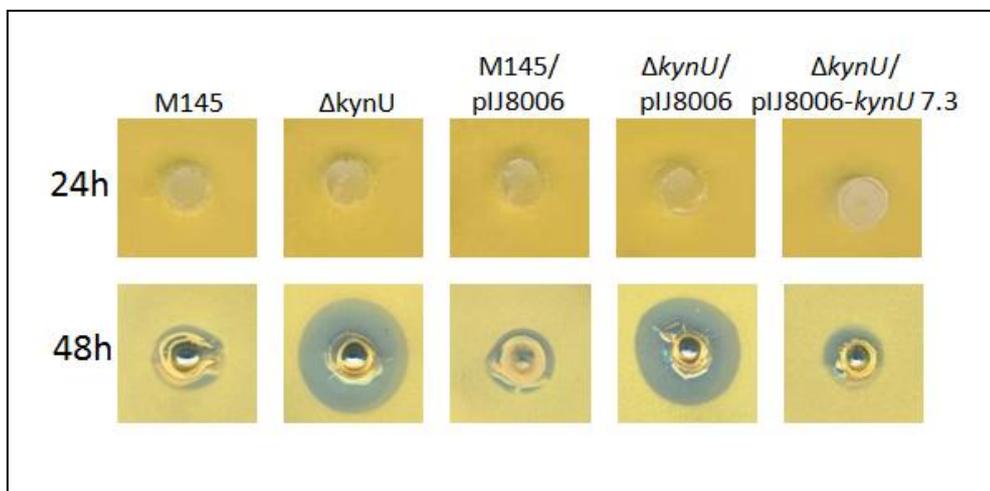


Figura 44. Saggi microbiologici. Il ceppo tester utilizzato è *Micrococcus luteus* cresciuto su ONA + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

- Analisi qRT-PCR dei geni *cdaR*, *trpE2* e *PSI* appartenenti al cluster biosintetico del CDA

Considerati i diversi livelli di CDA dei ceppo wt e del mutante quantizzati per HPLC (figura 39B), è stata effettuata un'analisi qRT-PCR di alcuni geni appartenenti al cluster biosintetico dell'antibiotico. Sono stati scelti per questo studio il gene *cdaR*, regolatore positivo dei geni del cluster (McKenzie *et al.*, 2007), *trpE2*, coinvolto nella biosintesi del triptofano, e *PSI*, codificante per una delle tre peptide sintetasi del CDA. Gli RNA sono stati estratti da micelio ottenuto dalle curve di crescita utilizzate per la quantizzazione dell'antibiotico tramite HPLC e sono state analizzate le stesse ore di crescita.

L'accumulo di CDA nel mutante Δ *kynU* non sembra essere causato da una regolazione a livello trascrizionale dei geni necessari alla sintesi dell'antibiotico (figura 45). Questo dato è in accordo con quanto dimostrato nel nostro laboratorio per altri mutanti del metabolismo primario. L'incremento dei livelli di antibiotico nel mutante potrebbe essere dovuto a una maggiore attività degli enzimi biosintetici coinvolti, causata da una maggiore disponibilità di substrato.

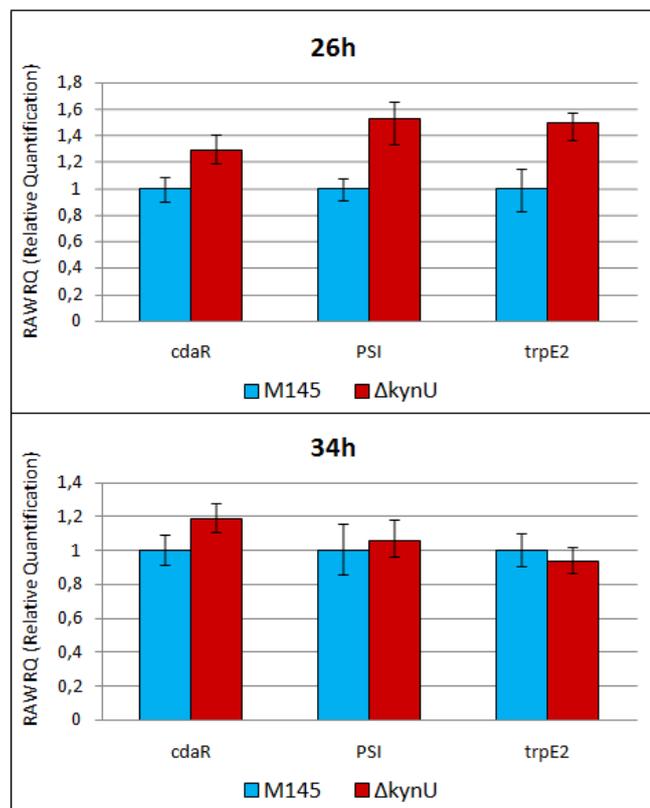


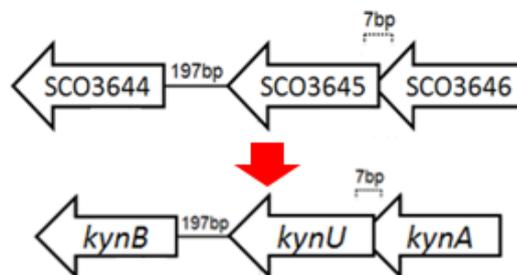
Figura 45. Analisi qRT-PCR dei geni *cdaR*, *PSI* e *trpE2*.

CONCLUSIONI

Molti degli enzimi coinvolti nella degradazione del triptofano sono evolutivamente conservati. Il triptofano e i suoi intermedi di degradazione sono oggi al centro dell'attenzione in quanto coinvolti nell'insorgenza o nella risposta a patologie del sistema nervoso e non solo. Alterazioni nel catabolismo di questo aminoacido sono state recentemente collegate a funzioni antimicrobiche e immunoregatorie (Schmidt *et al.*, 2009). Inoltre negli streptomiceti il triptofano ha un ruolo fondamentale nella produzione di alcuni antibiotici lipopeptidici (Kim *et al.*, 2004).

Lo studio di questo pathway può quindi essere utile sia come strategia per incrementare la produzione di antibiotici sia per caratterizzare enzimi che potrebbero essere utili in campo medico.

All'inizio del mio Dottorato studi di omologia di sequenza indicavano che in *S. coelicolor* i geni SCO3645 e SCO3646 codificassero per due enzimi del catabolismo del triptofano. Il mio studio è cominciato ipotizzando che anche il gene posto a valle fosse coinvolto nello stesso pathway.



L'overespressione dei tre geni in *E. coli* ha permesso di dimostrare che essi sono effettivamente omologhi dei geni *kynA*, *kynB* e *kynU* e che codificano per i tre enzimi della via che, partendo dal triptofano, produce antranilato. È stato inoltre dimostrato come il pathway possa metabolizzare sia la forma L- che la D- dell'aminoacido.

L'analisi RT-PCR delle regioni intergeniche *kynB-kynU* e *kynU-kynA* indica che i geni *kynA* e *kynU* fanno parte di un operone e che *kynB* appartiene a una diversa unità trascrizionale.

I saggi enzimatici delle proteine totali di *S. coelicolor*, cresciuto in terreno minimo in assenza e in presenza di triptofano 0,25 e 2,5 mM, hanno evidenziato che è possibile rilevare un aumento dell'attività di chinurenina formamidasi e di chinureninasi soltanto ad alte concentrazioni dell'aminoacido. Sorprendentemente invece l'operone contenente i geni *kynA* e *kynU* viene maggiormente trascritto già a basse concentrazioni di triptofano. Il mancato incremento di espressione dei geni durante le prime ore di crescita, potrebbe

essere dovuta alla tendenza del batterio ad accumulare, e non degradare, l'amminoacido all'interno della cellula poiché abituato a vivere in un ambiente povero di fonti di azoto e carbonio, quale il suolo (Hogson, 2000).

Al fine di comprendere la funzione del pathway *in vivo*, ho costruito il mutante *S. coelicolor* Δ *kynU* utilizzando il protocollo della Redirect[®] Technology. Questo ceppo non mostra differenze di crescita rispetto al wt nelle condizioni utilizzate. Il saggio microbiologico di produzione del CDA e le analisi HPLC effettuate (in collaborazione con il Dott. Nachtigall della Technische Universität, Berlin) indicano la presenza di quantità maggiori di antibiotico rispetto al wild type. La complementazione di questa mutazione ha dimostrato che è la mancanza del gene *kynU* a causare il fenotipo. Questo risultato potrebbe essere spiegato da un incremento del pool di aminoacido all'interno della cellula del mutante (in cui non viene degradato tramite il pathway interrotto) che potrebbe causare una sua maggiore disponibilità per la sintesi del CDA. Questa infatti non sembra dipendere da una maggiore espressione dei geni biosintetici quanto piuttosto a una maggiore concentrazione dei substrati o a un incremento di attività degli enzimi.

Questi risultati hanno permesso di descrivere per la prima volta tre geni coinvolti nella degradazione del triptofano in *S. coelicolor*, la dipendenza della loro espressione dalla presenza dell'amminoacido nel terreno di coltura e la relazione tra questo pathway e la sintesi dell'antibiotico CDA.

BIBLIOGRAFIA

- Alduina R, Lo Piccolo L, D'Alia D, Ferraro C, Gunnarsson N, Donadio S, Puglia AM.
Phosphate-controlled regulator for the biosynthesis of the dalbavancin precursor A40926.
J Bacteriol. 2007 Nov;189(22):8120-9. Epub 2007 Sep 14.
- Allegri G, Ragazzi E, Costa C, Caparrotta L, Biasiolo M, Comai S, Bertazzo A.
Tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in diet-induced and genetic hypercholesterolemic rabbits.
Clin Chim Acta.350(1-2):41-9. 2004
- Begley TP, Kinsland C, Mehl RA, Osterman A, Dorrestein P.
The biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotides in bacteria.
Vitam Horm. 61:103–119. 2001
- 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., Rabbinowitsch, 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. Gparchill, J. &. Hopwood, D. A. (2002)
Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).
Nature 417: 141-147.
- Bibb MJ. (2005)
Regulation of secondary metabolism in streptomycetes.
Curr Opin Microbiol. 8(2):208-15.
- Bonda, David¹; Mailankot, Maneesh²; Stone, Jeremy¹; Garrett, Matthew³; Staniszewska, Magdalena⁴; Castellani, Rudy⁵; Siedlak, Sandra¹; Zhu, Xiongwei¹; Lee, Hyoung-gon¹; Perry, George⁶; Nagaraj, Ram²; Smith, Mark⁷
Indoleamine 2,3-dioxygenase and 3-hydroxykynurenine modifications are found in the neuropathology of Alzheimer's disease
Redox Report, Volume 15, Number 4, August 2010 , pp. 161-168(8)
- Brown D, Hitchcock MJ, Katz E. (1986)
Purification and characterization of kynurenine formamidase activities from *Streptomyces parvulus*.
Can J Microbiol. 32(6):465-72.
- Chater, K.C. (1998)
Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony.
Microbiology 144: 1465-1478.
- Chater KF, Horinouchi S. (2003)
Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species.
Mol Microbiol. 48(1):9-15.

- Chater KF. (2006)
Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics.
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 361(1469):761-8.
- Datsenko KA, Wanner BL. (2000)
One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.
Proc Natl Acad Sci U S A. 6;97(12):6640-5.
- DOEKEL Sascha ⁽¹⁾ ; COEFFET-LE GAL Marie-Francoise ⁽¹⁾ ; GU Jian-Qiao ⁽¹⁾ ; MIN CHU ⁽¹⁾ ;
BALTZ Richard H. ⁽¹⁾ ; BRIAN Paul ⁽¹⁾
Non-ribosomal peptide synthetase module fusions to produce derivatives of daptomycin in
Streptomyces roseosporus
Microbiology 2008, vol. 154 (9), pp. 2872-2880 [9 page(s) (article)] (3/4 p.)
- Farrow JM 3rd, Pesci EC. 2007. Two distinct pathways supply
anthranilate as a precursor of the Pseudomonas quinolone
signal. J Bacteriol. 189:3425–3433.
- Forrest C., Mackay G., Stoy N., Spinden S., Taylor R., Stone T. and Darlington L.
Blood levels of kynurenines, interleukin-23 and soluble leucocyte antigen-G at different stages of
Huntington's disease
JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY | 2010 | 112 | 112–122 doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06442.x
- Foster JW, Katz E. (1981)
Control of actinomycin D biosynthesis in Streptomyces parvullus: regulation of tryptophan
oxygenase activity.
J Bacteriol. 148(2):670-7.
- Fujigaki S, Saito K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M. (1998)
Species differences in L-tryptophan-kynurenine pathway metabolism: quantification of anthranilic
acid and its related enzymes.
Arch Biochem Biophys. 358(2):329-35.
- Garrity, G.M. (2002)
“Bergey's manual of systematic bacteriology”
Springer-Verlag, New-York.
- Grunewald J, Sieber SA, Marahiel MA. (2004)
Chemo- and regioselective peptide cyclization triggered by the N-terminal fatty acid chain length:
the recombinant cyclase of the calcium-dependent antibiotic from Streptomyces coelicolor.
Biochemistry16;43(10):2915-25.
- Gunnarsson, Nina; Mortensen, Uffe H.; Sosio, Margherita; Nielsen, Jens (2004)
Identification of the Entner–Doudoroff pathway in an antibiotic-producing actinomycete species
Molecular Microbiology 52(3): 895-902.
- Hitchcock MJ, Katz E. (1998)
Purification and characterization of tryptophan dioxygenase from Streptomyces parvulus.
Arch Biochem Biophys. 261(1):148-60.

- Hood DW, Heidstra R, Swoboda UK, Hodgson DA.
Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): interaction between primary and secondary metabolism--a review.
Gene. 1992 Jun 15;115(1-2):5-12.
- Hodgson DA, (2000)
Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria.
Adv Microb Physiol., 42:47-238.
- Hopwood DA, Wright HM. (1983)
CDA is a new chromosomally-determined antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2).
J Gen Microbiol. 129(12):3575-9.
- Hopwood D.A. (1999)
Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico.
Microbiology.145: 2183-2202.
- Hu D.S.J., Hood D.W., Heidstra R. and Hodgson D.A.,
Mol. Microbiol. 1999, 32: 869-880.
- Hughes, Olivera and Roth
Structural Gene for NAD Synthetase in *Salmonella typhimurium*
JOURNAL OF BACTERIOLOGY, May 1988, p. 2113-2120
- Johnson, Kahler, Baban, Chandler, Kang, Shimoda, Koni, Pihkala, Vilagos, Busslinger, Munn and Mellor
B-lymphoid cells with attributes of dendritic cells regulate T cells via indoleamine 2,3-dioxygenase
10644–10648 | *PNAS* | June 8, 2010 | vol. 107 | no. 23
- Katoh, Hashimoto.
Molecular biology of pyridine nucleotide and nicotine biosynthesis.
*Front Biosci.*9:1577–1586 2004
- Keller U.
Acyl pentapeptide lactone synthesis in actinomycin-producing streptomycetes by feeding with structural analogs of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid.
J Biol Chem. 1984 Jul 10;259(13):8226-31.
- Keller U., Lang M., Crnovcic I., Pfennig F., and Schauwecker F.
The Actinomycin Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces chrysomallus*: a Genetic Hall of Mirrors for Synthesis of a Molecule with Mirror Symmetry
Journal of Bacteriology, May 2010, p. 2583-2595, Vol. 192, No. 10
- Kempter C., Kaiser D., Haags S. (1997)
Angew Chem Int Ed Engl 36: 498-501.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. and Hopwood, D.A. (2000)
Practical Streptomyces Genetics: John Innes Foundation, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, UK.

- Kim H.B., Smith C.P., Micklefield and Mavituna F. (2004)
Metabolic flux analysis for calcium dependent antibiotic (CDA) production in *Streptomyces coelicolor*.
Metabolic Engineering 6: 313-325.
- Kincses¹, Toldi², Vécsei^{1,*}
Kynurenines, neurodegeneration and Alzheimer's disease
Article first published online: 12 JUL 2010 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01123.x
Journal of Cellular and Molecular Medicine Volume 14, Issue 8, pages 2045–2054, August 2010
- Koushik SV, Sundararaju B, McGraw RA, Phillips RS. (1997)
Cloning, sequence, and expression of kynureninase from *Pseudomonas fluorescens*.
Arch Biochem Biophys. 344(2):301-8.
- Kurnasov O, Goral V, Colabroy K, Gerdes S, Anantha S, Osterman A, Begley
NAD biosynthesis: identification of the tryptophan to quinolinate pathway in bacteria.
Chem Biol. 10:1195–1204. 2003
- Kurnasov O, Goral V, Colabroy K, Gerdes S, Anantha S, Osterman A, Begley TP (2003)
NAD biosynthesis: identification of the tryptophan to quinolinate pathway in bacteria.
Chem Biol. 10(12):1195-204.
- Mikito Ito^a, Kaoru Ogawa^a, Kaori Takeuchi^a, Akiko Nakada^a, Masayuki Heishi^a, Hajime Suto^{b, c},
Kouichi Mitsuishi^{b, c}, Yuji Sugita^a, Hideoki Ogawa^{b, c} and Chisei Ra^{b, d}
Gene expression of enzymes for tryptophan degradation pathway is upregulated in the skin
lesions of patients with atopic dermatitis or psoriasis
Journal of Dermatological Science Volume 36, Issue 3, December 2004, Pages 157-164
- Lima, Varani and Menck (2009)
NAD Biosynthesis Evolution in Bacteria: Lateral Gene Transfer of Kynurenine
Mol. Biol. Evol. 26(2):399–406. 2009
- MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, MacNeil T.(1992)
Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel
integration vector.
Gene. 111(1):61-8.
- Matsushima P, Broughton MC, Turner JR, Baltz RH. (1994)
Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*: effects of
chromosomal insertions on macrolide A83543 production.
*Gene.*146(1):39-45.
- Murakami T, Holt TG, Thompson CJ.
Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*.
J Bacteriol. 1989 Mar;171(3):1459-66.
- Murray MF.
Insights into therapy: tryptophan oxidation and HIV infection.
Sci Transl Med. 2010 May 19;2(32):32ra36.

- McKenzie and Nodwell*
Phosphorylated AbsA2 Negatively Regulates Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* through Interactions with Pathway-Specific Regulatory Gene Promoters
JOURNAL OF BACTERIOLOGY, July 2007, p. 5284–5292 Vol. 189, No. 14
- Pabarcus MK, Casida JE. 2002.
Kynurenine formamidase: determination of primary structure and modeling-based prediction of tertiary structure and catalytic triad.
Biochim Biophys Acta. 1596:201–211.
- Pabarcus MK, Casida JE. 2005.
Cloning, expression, and catalytic triad of recombinant arylformamidase.
Protein Expr Purif. 44:39–44.
- Panozzo C, Nawara M, Suski C, Kucharczyka R, Skoneczny M, Becam AM, Rytka J, Herbert CJ.
Aerobic and anaerobic NAD⁺ metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.
FEBS Lett. 517(1-3):97-102. (2002)
- Redenbach M, Kieser HM, Denapaite D, Eichner A, Cullum J, Kinashi H, Hopwood DA. (1996)
A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome.
Mol Microbiol. 21(1):77-96.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T.
Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn
Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
- Samikkannu, Saiyed, Rao, Kadiyala Babu, Rodriguez, Papuashvili and Nair
Differential Regulation of Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO) by HIV Type 1 Clade B and C Tat Protein
AIDS Res Hum Retroviruses. 2009 March; 25(3): 329–335.
- Sasaki-Imamura, Yano and Yoshida
Production of Indole from L-Tryptophan and Effects of These Compounds on Biofilm Formation by *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586
Appl Environ Microbiol. 2010 July; 76(13): 4260–4268.
- Schmidt S., Muller A., Heseler K., Woite C., Spekker K., MacKenzie C. and Daubener W.
Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase
Eur. J. Immunol. 2009. 39: 2755-2764
- Jan D Schmitto, Aron F Popov, Samuel T Sossalla, Kasim O Coskun, Suyog A Mokashi, Anton Wintner, and Friedrich A Schoendube
Daptomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* saphenectomy wound infection after coronary artery bypass graft operation (CABG): a case report
J Cardiothorac Surg. 2009; 4: 47. Published online 2009 September 11. doi: 10.1186/1749-8090-4-47. PMCID: PMC2753312
- Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM, Tally FP (2005)
Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections
J Antimicrob Chemother. 55(3):283-8.

- Teuscher G. (1967)
Studies on the tryptophan metabolism of streptomycetes. I. Catabolism of tryptophan and resulting metabolites
Z Allg Mikrobiol.7(5):393-401.
- Teuscher G, Teuscher E. (1967)
Studies on the tryptophan metabolism of Streptomycetes. II. Quantitative determination of appearing tryptophan metabolites and their metabolism.
Acta Biol Med Ger. 19(2):211-9.
- Troost T, Hitchcock MJ, Katz E. (1980)
Distinct kynureninase and hydroxykynureninase enzymes in an actinomycin-producing strain of *Streptomyces parvulus*.
Biochim Biophys Acta. 612(1):97-106.
- Vederas JC, Schleicher E, Tsai MD, Floss HG.
Stereochemistry and mechanism of reactions catalyzed by tryptophanase from *Escherichia coli*.
J Biol Chem 253:5350-4. 1978
- Dandan Wang,¹ Xuedong Ding,¹ and Philip N. Rather^{1,2,*}
Indole Can Act as an Extracellular Signal in *Escherichia coli*
Journal of Bacteriology, July 2001, p. 4210-4216, Vol. 183, No. 14 DOI:10.1128/JB.183.14.4210-4216.2001
- Elizabeth C. Weiss, Agnieszka Zielinska, Karen E. Beenken, Horace J. Spencer, Sonja J. Daily, and Mark S. Smeltzer
Impact of *sarA* on Daptomycin Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Biofilms In Vivo
Antimicrob Agents Chemother. 2009 October; 53(10): 4096–4102. Published online 2009 August 3.
doi: 10.1128/AAC.00484-09.
PMCID: PMC2764180
- Wonodi I, Schwarcz R.
Cortical kynurenine pathway metabolism: a novel target for cognitive enhancement in Schizophrenia.
Schizophr Bull. 2010 Mar;36(2):211-8. Epub 2010 Feb 10.

INDICE

ABSTRACT	Pag. 1
INTRODUZIONE	Pag. 2
• Catabolismo del triptofano	Pag. 2
• Pathway della chinurenina	Pag. 4
• Metabolismo primario e sintesi degli antibiotici in <i>Streptomyces</i>	Pag. 8
SCOPO DELLA RICERCA	Pag. 11
MATERIALI E METODI	Pag. 13
RISULTATI	Pag. 37
• Analisi della sequenza aminoacidica della proteina SCO3644	Pag. 37
• Studio <i>in vitro</i> dell'attività enzimatica delle proteine SCO3644, SCO3645 e SCO3646	Pag. 40
- Saggi enzimatici di estratti proteici totali di <i>S. coelicolor</i>	Pag. 40
- Overespressione dei geni SCO3644, SCO3645 e SCO3646 in <i>E. coli</i>	Pag. 42
- Saggi enzimatici degli estratti proteici di ceppi di <i>E. coli</i> in cui sono stati overespressi i geni SCO3644, SCO3645 e SCO3646	Pag. 43
- Purificazione delle proteine ricombinanti	Pag. 45
- Saggi enzimatici delle proteine His ₆ -SCO3644, His ₆ -SCO3645 e His ₆ -SCO3646	Pag. 49
• Analisi trascrizionale del locus <i>kyn</i>	Pag. 55
- Organizzazione del locus <i>kyn</i>	Pag. 55
- Analisi qRT-PCR dei geni <i>kynB</i> , <i>kynU</i> e <i>kynA</i> nel ceppo di <i>S. coelicolor</i> wt cresciuto in terreno minimo in presenza e assenza di triptofano	Pag. 55
• Costruzione, complementazione e caratterizzazione del mutante <i>S. coelicolor</i> Δ <i>kynU</i>	Pag. 58
- Costruzione del ceppo mutante di <i>S. coelicolor</i> Δ <i>kynU</i> tramite Redirect [®] Technology	Pag. 59
- Caratterizzazione fenotipica del mutante Δ <i>kynU</i>	Pag. 62
- Complementazione della mutazione Δ <i>kynU</i> di <i>Streptomyces coelicolor</i>	Pag. 63
- Analisi qRT-PCR dei geni <i>cdaR</i> , <i>trpE2</i> e <i>PSI</i> appartenenti al cluster biosintetico del CDA	Pag. 67

CONCLUSIONI

Pag. 68

BIBLIOGRAFIA

Pag. 70

INDICE

Pag. 76