



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche
BIO/19 – Microbiologia Generale

La small protein TrpM è coinvolta nel differenziamento morfo-fisiologico di Streptomyces coelicolor

IL DOTTORE
ALBERTO VASSALLO

IL COORDINATORE
PROF.SSA PATRIZIA DIANA

IL TUTOR
PROF.SSA ANNA MARIA PUGLIA

CICLO XXXI
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2019

Sommario

1. Introduzione	4
1.1 Il genere <i>Streptomyces</i> come fonte di molecole biologicamente attive	4
1.2 <i>Streptomyces coelicolor</i>	5
1.3 <i>Small open reading frames</i> (smORFs) e <i>small open reading frame-encoded peptides</i> (SEPs)	11
1.4 La smORF <i>trpM</i> di <i>S. coelicolor</i>	13
2. Materiali e metodi	17
2.1 Ceppi utilizzati	17
2.1.1 <i>E. coli</i>	17
2.1.2 <i>S. coelicolor</i>	17
2.2 Terreni di coltura	17
2.2.1 LB	17
2.2.2 <i>Minimal Medium</i> (MM)	18
2.2.3 <i>Mannitol-Soy medium</i> (MS)	19
2.2.4 <i>J medium</i> (JM)	19
2.3 Primer	20
2.4 Plasmidi	21
2.5 Preparazione di cellule competenti di <i>E. coli</i>	21
2.6 Trasformazione di cellule competenti di <i>E. coli</i>	22
2.7 Preparazione di <i>stock</i> in glicerolo di <i>E. coli</i>	23
2.8 Preparazione di sospensione di spore di <i>S. coelicolor</i> M145	23
2.9 Estrazione di DNA plasmidico (<i>miniprep</i>) da colture liquide di <i>E. coli</i>	24
2.10 Estrazione di DNA cromosomale da colture liquide di <i>S. coelicolor</i> M145 (<i>salting out</i>)	25
2.11 Purificazione del DNA genomico di <i>S. coelicolor</i> M145 estratto tramite <i>salting out</i>	26
2.12 <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	27
2.12.1 Clonaggio di <i>trpM</i> nel pIJ8600	27
2.12.2 Amplificazione del sito di clonaggio multiplo (MCS) contenuto nel pIJ8600	28
2.12.3 Amplificazione del gene per la resistenza all'apramicina (<i>aac3IV</i>)	28
2.12.4 Amplificazione del gene per la resistenza al tiostreptone (<i>tsr</i>)	29

2.12.5 Amplificazione del gene codificante l'rDNA 16S	29
2.12.6 Clonaggio di <i>pepA</i> nel pRSET-B	30
2.13 Elettroforesi su gel di agarosio	30
2.14 Coniugazione interspecifica tra <i>E. coli</i> e <i>S. coelicolor</i> M145.....	30
2.15 Southern blot.....	31
2.16 Estrazione di RNA da micelio di <i>S. coelicolor</i> M145.....	32
2.17 Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).....	32
2.18 Real-time PCR quantitativa (qRT-PCR).....	33
2.19 Preparazione dei campioni per osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM)	35
2.20 Determinazione delle curve di crescita in colture liquide di <i>S. coelicolor</i> M145	35
2.21 Saggio della produzione di actinorodina	35
2.22 Saggio della produzione di undecilprodigosina	36
2.23 Estrazione di proteine da <i>S. coelicolor</i> M145 cresciuto su terreno solido.....	36
2.24 Saggio di Bradford	37
2.25 Analisi proteomica 2D-DIGE	38
2.25.1 Marcatura delle proteine con CyDye.....	38
2.25.2 Isoelettrofocalizzazione (IEF)	38
2.25.3 SDS-PAGE bidimensionale	39
2.25.4 Acquisizione delle mappe proteomiche.....	40
2.25.5 Colorazione delle mappe proteomiche con AgNO ₃	40
2.25.6 Analisi con <i>software</i> ImageMaster	41
2.25.7 Identificazione delle proteine differenzialmente abbondanti mediante spettrometria di massa....	41
2.26 Analisi dei metaboliti prodotti	42
2.27 Over-espressione di PepA in <i>E. coli</i> BL21-AI	44
2.28 Estrazione di proteine da <i>E. coli</i> BL21-AI	44
2.29 SDS-PAGE delle proteine estratte da <i>E. coli</i> BL21-AI.....	45
2.30 Analisi western blot delle proteine estratte da <i>E. coli</i> BL21-AI.....	45
2.31 Saggio di attività leucil-amminopeptidasi	45
3. Risultati	47

3.1 Costruzione del ceppo <i>S. coelicolor</i> M145 pIJ8600/trpM.....	47
3.2 Espressione della smORF <i>trpM</i> in <i>S. coelicolor</i> M145 pIJ8600/trpM	49
3.3 Cinetica di crescita del ceppo <i>S. coelicolor</i> M145 pIJ8600/trpM.....	50
3.4 Produzione di actinorodina ed undecilprodigosina	52
3.5 Analisi proteomica 2D-DIGE di <i>S. coelicolor</i> M145 pIJ8600/trpM	53
3.6 Analisi dei metaboliti prodotti da <i>S. coelicolor</i> M145 pIJ8600/trpM.....	60
3.7 Espressione del gene <i>pepA</i> in <i>S. coelicolor</i> M145 pIJ8600/trpM.....	62
3.8 <i>Over</i> -espressione della proteina PepA in <i>E. coli</i> BL21-AI.....	62
3.9 Attività amminopeptidasica di PepA.....	65
4. <i>Discussione</i>	67
5. <i>Bibliografia</i>	70

1. Introduzione

1.1 Il genere *Streptomyces* come fonte di molecole biologicamente attive

Il genere *Streptomyces* appartiene all'ordine degli *Actinomycetales* che comprende batteri Gram positivi il cui genoma è caratterizzato da un elevato contenuto in G+C (70%). A livello ecologico gli streptomiceti sono responsabili del riciclo del carbonio attraverso la degradazione di lignocellulosa e chitina che costituiscono la parete cellulare di piante e funghi, rispettivamente (Bentley *et al.*, 2002). Inoltre, instaurano simbiosi sia con insetti che con piante e conferiscono al suolo il suo tipico odore grazie alla produzione di geosmina (Chater, 2016) (Figura 1).

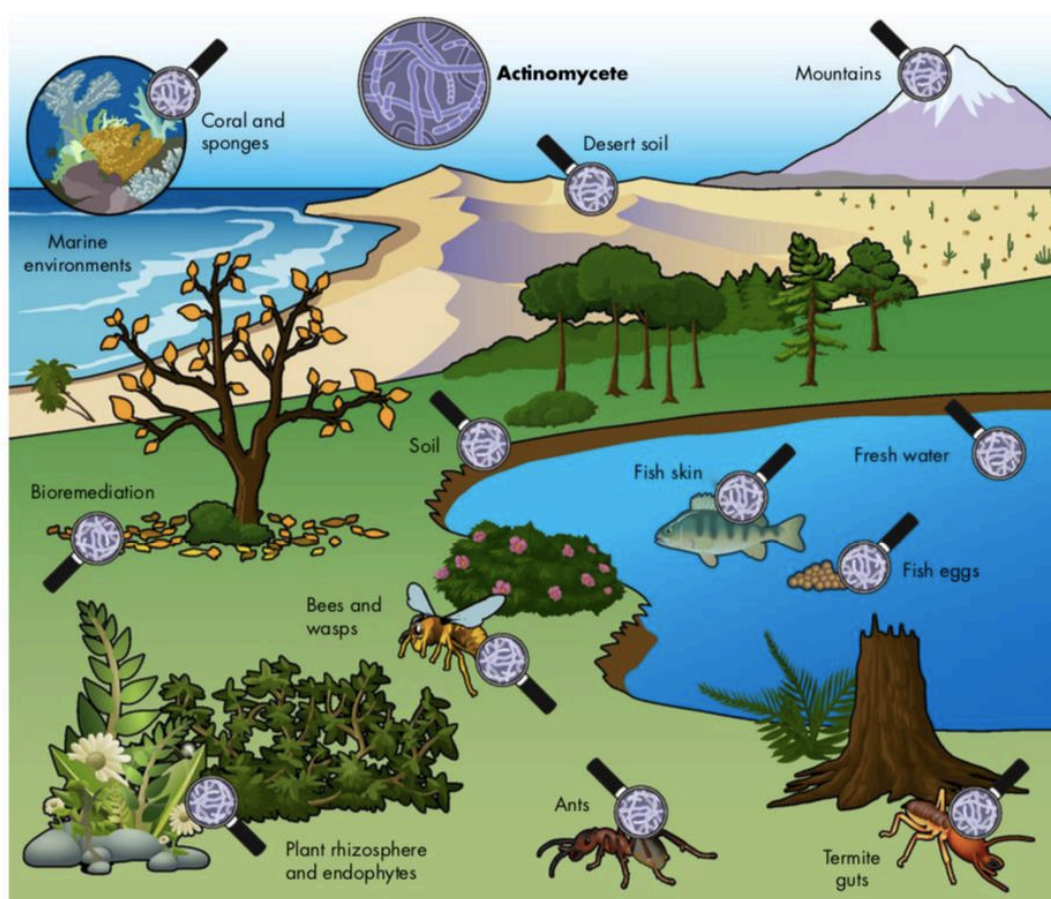


Figura 1: Presenza degli attinomiceti nell'ecosistema. Adattato da van der Meij *et al.*, 2017.

Dopo l'isolamento negli anni quaranta dei primi due antibiotici prodotti da streptomiceti (actinomicina e streptomycin), questi batteri sono stati sempre più studiati ed essi sono ormai considerati come la maggiore fonte naturale di composti bioattivi (Mitchell, 2011).

Le molecole biologicamente attive prodotte da *Streptomyces* sono considerate metaboliti secondari perché non sono essenziali per la crescita batterica e sono generalmente prodotte dopo la fase di crescita vegetativa (Challis *et al.*, 2003). Oltre ad avere azione antibiotica contro altri batteri, questi composti possono avere un ruolo nel differenziamento dell'organismo produttore, nel trasporto di ioni metallici (siderofori) e possono esercitare un effetto tossico anche nei confronti di organismi superiori quali invertebrati e piante (Challis *et al.*, 2003). Il sequenziamento di alcuni genomi di streptomiceti, insieme allo sviluppo di *software* che consentono di realizzare previsioni *in silico* (Blin *et al.*, 2017; Medema *et al.*, 2011), ha permesso di individuare *cluster* genici detti “criptici” che non sono espressi nelle comuni condizioni di crescita adottate in laboratorio: le reali capacità produttive e la quantità di metaboliti prodotti da *Streptomyces* sono quindi sottostimate (Liu *et al.*, 2013). Per tale motivo, organismi modello, che sono stati caratterizzati a livello fisiologico e genetico, come *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces venezuelae* e *Streptomyces lividans*, sono utilizzati come sistemi di espressione eterologhi per la produzione di composti naturali. Questo approccio si rende spesso necessario perché non è possibile produrre queste sostanze nell'organismo di origine in quanto questo non è geneticamente manipolabile o perché necessita di condizioni di coltura particolari (Mitchell, 2011; Bekiesch *et al.*, 2016; Nepal *et al.*, 2018).

1.2 *Streptomyces coelicolor*

Streptomyces coelicolor è lo streptomicete meglio caratterizzato geneticamente ed è sicuramente il principale rappresentante del genere (Hopwood, 1999). Possiede un cromosoma lineare di 8,7 Mb con un contenuto in G+C del 72%, un plasmide lineare di 365 kb (SCP1) e un plasmide circolare di 31 kb (SCP2). Il sequenziamento del genoma ha evidenziato che il cromosoma presenta una regione centrale detta “core” (4,9 Mb), arricchita dei geni del metabolismo primario (ad esempio quelli necessari per la divisione cellulare, la replicazione del DNA, la trascrizione, la traduzione e la sintesi di amminoacidi), e due “braccia” (rispettivamente di 1,5 Mb e 2,3 Mb) più ricche invece di “geni della contingenza”, come quelli necessari per la sintesi di alcuni metaboliti secondari e quelli codificanti enzimi idrolitici (Bentley *et al.*, 2002) (Figura 2).

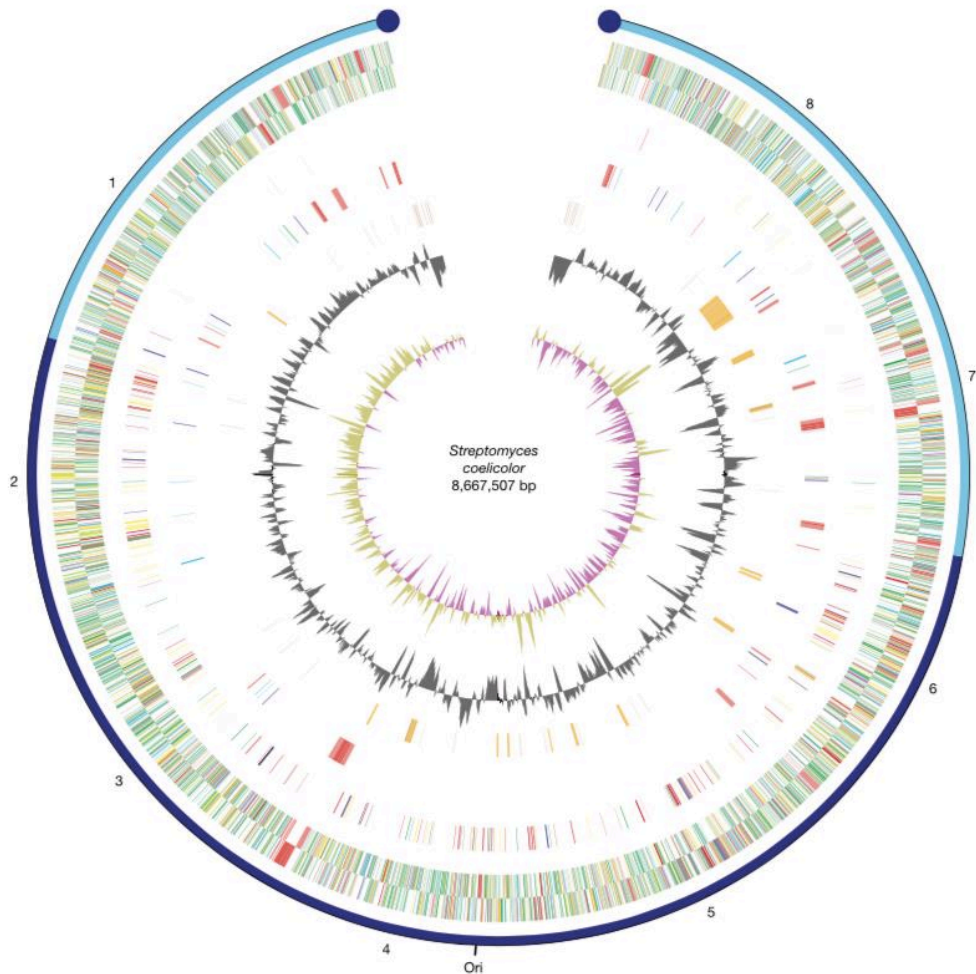


Figura 2: Mappa del cromosoma di *S. coelicolor*. In blu scuro è indicata la regione *core*, mentre in azzurro sono indicate le due braccia. Adattato da Bentley *et al.*, 2002.

Inoltre, la regione *core* è maggiormente conservata a livello filogenetico rispetto alle braccia, i cui geni sono stati probabilmente acquisiti durante l'evoluzione in risposta ad eventi di pressione selettiva. È interessante notare però che i *cluster* genici *act* e *red*, pur essendo *cluster* biosintetici di metaboliti secondari, rispettivamente dell'actinorodina e dell'undecilprodigiosina, sono localizzati nella regione *core* (Figura 3): questa eccezione è una prova di quanto alcuni metaboliti secondari possano avere un ruolo chiave nel differenziamento morfo-fisiologico di *S. coelicolor*.

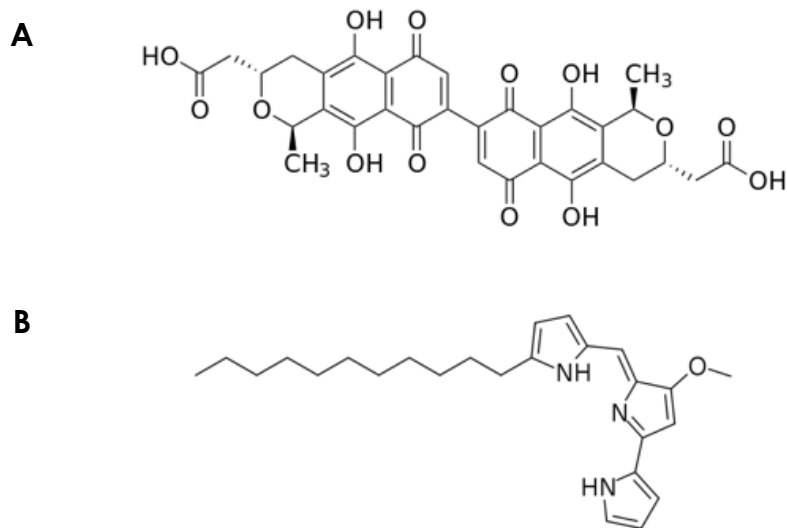


Figura 3: Struttura dell'actinorodina (A) e dell'undecilprodigiosina (B).

Il sequenziamento del cromosoma di *S. coelicolor* ha evidenziato la presenza di 7825 potenziali geni, un numero decisamente elevato in confronto ad altri microrganismi modello come *Escherichia coli* (4289), *Bacillus subtilis* (4099) e *Saccharomyces cerevisiae* (6203). In particolare, notevole è la frequenza di geni coinvolti nella regolazione dell'espressione genica, nel trasporto di membrana e nella degradazione di composti extra-cellulari. L'arricchimento di geni appartenenti a queste classi funzionali rispecchia la capacità di *S. coelicolor* di adattarsi ad un ambiente variabile e ricco di potenziali fenomeni di *stress* come il suolo. Non è un caso, ad esempio, che siano presenti 65 geni codificanti per fattori σ , di cui ben 45 sono fattori σ con funzione extra-citoplasmatica (ECF), e sistemi di regolazione a due componenti, in cui una proteina integrale di membrana è capace di raccogliere un segnale dall'ambiente esterno e trasdurlo attraverso il legame con un effettore citoplasmatico che può attivare la trascrizione di geni specifici (Bentley *et al.*, 2002).

È stato previsto inoltre che nel cromosoma siano presenti 22 *cluster* genici implicati nella biosintesi di metaboliti secondari tra cui antibiotici, siderofori, pigmenti e lipidi (Bentley *et al.*, 2002). Tra questi, i più studiati sono quelli coinvolti nella sintesi degli antibiotici actinorodina, undecilprodigiosina e antibiotico calcio-dipendente (CDA).

Un'altra caratteristica del genoma di *S. coelicolor* è la presenza di numerosi geni paraloghi: l'espressione di questi geni è spesso regolata sia nel tempo che nello spazio, essendo legata a determinati momenti del ciclo vitale di questo batterio o a tipi cellulari specifici (Bentley *et al.*, 2002). Infatti, il ciclo vitale di *S. coelicolor*, come quelli degli altri streptomiceti, è piuttosto complesso sia perché è regolato da molteplici fattori ambientali sia perché prevede la formazione di cellule e tessuti specializzati (Figura 4).

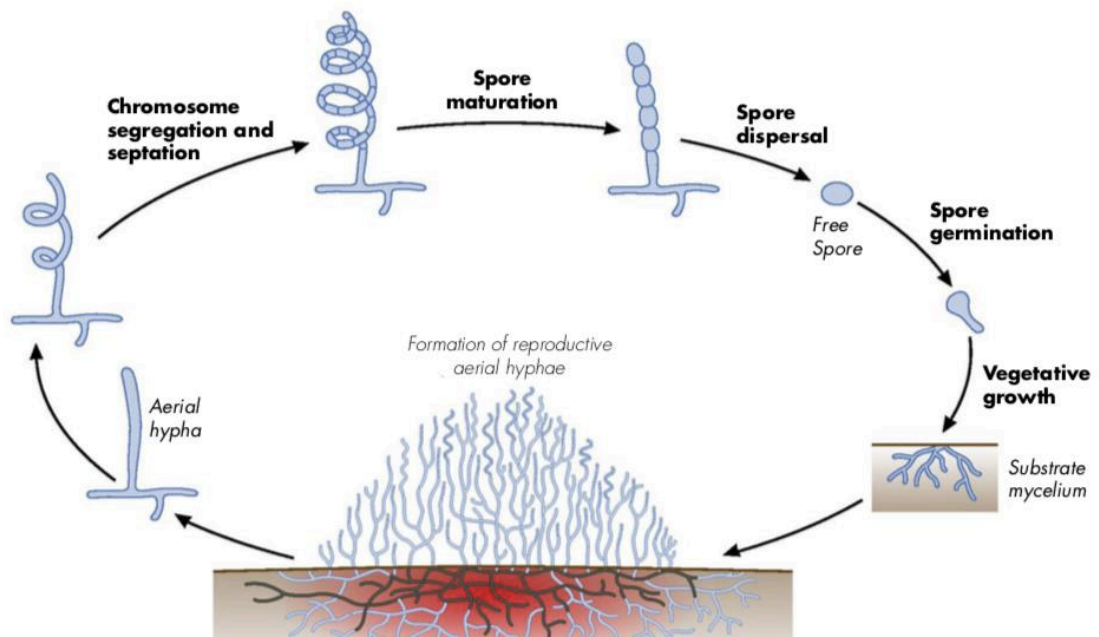


Figura 4: Ciclo vitale di *S. coelicolor*. Adattato da van der Meij *et al.*, 2017.

In seguito alla germinazione di una spora, si ha la crescita di ife vegetative che si allungano e si ramificano nel substrato, formando il micelio vegetativo. La crescita e l'allungamento di queste ife avviene asimmetricamente attraverso la sintesi di nuovo peptidoglicano esclusivamente all'estremità. La polarità della crescita è determinata dalla localizzazione di un complesso proteico chiamato "polarisoma" o "*tip-organizing-complex*" (TIPOC) all'estremità delle ife e in corrispondenza dei punti di ramificazione (Flärdh, 2003; Hempel *et al.*, 2008; Flärdh *et al.*, 2012; Celler *et al.*, 2016; Kois-Ostrowska *et al.*, 2016), di cui fanno parte le proteine DivIVA, FtsZ e Scy. Durante questa prima fase di crescita si formano occasionalmente dei setti di peptidoglicano che suddividono le ife in compartimenti multi-genomici. La replicazione del cromosoma e la localizzazione delle copie di nuova sintesi sono però coordinate (i) dalla formazione di setti membranosi transitori, che delimitano zone dell'ifa prive di DNA in cui avvengono il rimodellamento del peptidoglicano o eventi di morte cellulare programmata (Celler *et al.*, 2016), e (ii) dall'intervento delle proteine ParA e ParB (Wolanski *et al.*, 2011; Kois-Ostrowska *et al.*, 2016). In particolare, ParB lega e ricopre le singole copie del cromosoma, mentre ParA ancora una singola copia del cromosoma all'estremità dell'ifa in accrescimento legando l'origine di replicazione (*oriC*).

La superficie delle ife vegetative è idrofilica e permette al micelio vegetativo di crescere all'interno del substrato. Prima che inizi la fase riproduttiva del ciclo vitale che terminerà con la formazione di nuove spore, una porzione del micelio vegetativo va incontro a eventi di morte cellulare programmata. In questa fase avviene un rallentamento della crescita e

questo fenomeno apoptico probabilmente permette di fornire nutrienti per la prosecuzione del ciclo vitale. Durante questa fase di transizione inizia la produzione di metaboliti biologicamente attivi, compresi l'actinorodina e l'undecilprodigosina. Grazie allo studio del processo biosintetico e dell'espressione dei geni necessari per la sua produzione, l'actinorodina è considerata la molecola modello per lo studio della sintesi di polichetidi negli streptomiceti, mentre l'undecilprodigosina è invece di notevole interesse a causa delle sue proprietà anti-tumorali, immunosoppressive e anti-infiammatorie. La produzione di questi metaboliti probabilmente rappresenta una strategia per difendere i nutrienti, liberati in seguito alla lisi cellulare, dagli organismi competitori presenti nell'ambiente circostante. Si ritiene che i segnali che inducono l'inizio della fase di transizione siano molteplici, come l'assenza di nutrienti, l'ipossia e il *quorum-sensing*. Recentemente è stato proposto che l'inizio della fase di transizione, con la conseguente apoptosi di una parte del micelio vegetativo, sia dovuto proprio alla produzione di undecilprodigosina nella parte a più alta densità cellulare del micelio (Tenconi *et al.*, 2018): questa ipotesi è surrogata dalla (i) contemporanea espressione dei geni *red* (responsabili della biosintesi di undecilprodigosina) e della comparsa di morte cellulare, (ii) dall'insolita mancanza di un gene della resistenza nel *cluster* genico *red* e (iii) dall'accumulo di undecilprodigosina all'interno della cellula quando, al contrario, la sua secrezione nell'ambiente circostante costituirebbe un'arma efficace contro gli organismi competitori. Secondo questa ipotesi quindi *S. coelicolor* produrrebbe questo antibiotico per indurre selettivamente la morte delle ife più vecchie.

Durante la fase successiva del ciclo vitale si formano le ife aeree che, al contrario di quelle vegetative, non presentano ramificazioni e sono idrofobiche grazie alla presenza sulla loro superficie delle proteine chaplins e SapB. L'idrofobicità permette al micelio aereo di fuoriuscire dal substrato e di resistere all'essiccamento a contatto con l'aria (Figura 5). La formazione del micelio aereo è regolata dai geni *bld*, che codificano per fattori di trascrizione pleiotropici che dirigono la sintesi di proteine specifiche per lo sviluppo delle ife aeree.

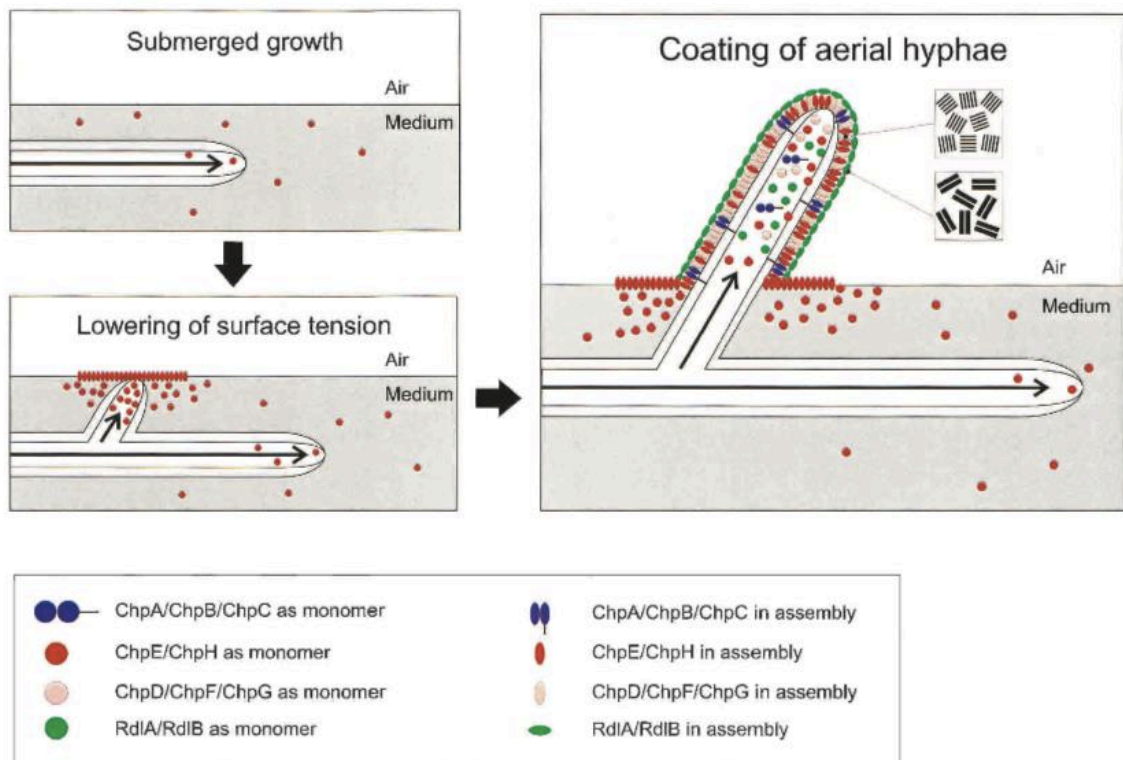


Figura 5: Modello del ruolo delle proteine chaplins e SapB nella formazione del micelio aereo di *S. coelicolor*. Adattato da Claessen *et al.*, 2003.

Alla fine del ciclo vitale, alcune ife aeree subiscono un processo di compartimentalizzazione e segregazione dei cromosomi che porta alla formazione di esospore unigenomiche. Le divisioni cellulari, la segregazione del DNA e la maturazione delle spore è regolata dai geni *whi*.

Il ciclo vitale illustrato sin qui è considerato il modello classico dello sviluppo di *S. coelicolor* e si adatta bene alle osservazioni eseguite in laboratorio su colture pure cresciute su terreno solido. In natura però *S. coelicolor* vive in presenza di altri organismi che competono per l'utilizzo dei nutrienti. Esperimenti di co-cultura con lieviti hanno infatti dimostrato che *S. coelicolor* è in grado di formare un terzo tipo di micelio, detto "esplorativo" (Jones *et al.*, 2017a, 2017b): in presenza di lievito e in carenza di glucosio, si ha la produzione di composti organici volatili (VOCs) che causano un innalzamento del pH e inducono la formazione di ife esplorative che sono idrofiliche come quelle vegetative ma non ramificate come quelle aeree. Questo tipo cellulare permetterebbe quindi una colonizzazione rapida dell'ambiente circostante per sopperire alla mancanza di nutrienti, considerata anche la ridotta motilità di questo microrganismo in confronto ad altri batteri dotati di flagelli e pili che si spostano tramite *swarming* e *twitching*, rispettivamente. È interessante notare che la comparsa delle ife esplorative è anticipato dalla formazione di

spore: questo probabilmente assicura la persistenza della specie anche in caso di fallimento nella colonizzazione dell'ambiente circostante.

1.3 *Small open reading frames (smORFs) e small open reading frame-encoded peptides (SEPs)*

Il sequenziamento di genomi insieme allo sviluppo di tecniche che permettono l'analisi qualitativa e quantitativa dei componenti molecolari contenuti complessivamente in una cellula hanno profondamente modificato l'approccio sperimentale dello studio degli organismi viventi. L'annotazione dei genomi ha infatti permesso di determinare la posizione di geni e regioni codificanti ed associare putative funzioni a molti di essi. In particolare, uno dei criteri principali per l'identificazione di queste sequenze è stata la scelta di una lunghezza soglia per discriminare sequenze codificanti da quelle non codificanti, e la lunghezza di 100 codoni è stata adottata a tale scopo, perché erano note poche proteine composte da meno di 100 amminoacidi (Chugunova *et al.*, 2018). Questa scelta ha determinato che molte sequenze codificanti di lunghezza inferiore a quella soglia non venissero annotate nei *database* dedicati, il cui utilizzo è necessario, ad esempio, per l'analisi dei dati derivati da esperimenti di proteomica accoppiati a spettrometria di massa. Questo rappresenta un limite dell'utilizzo di questi *database* considerato che non è possibile identificare elementi che non sono presenti nel *database* stesso (Delacourt *et al.*, 2017).

Non è un caso quindi che piccole sequenze codificanti e le relative proteine derivanti da esse siano state a lungo ignorate e, a tale proposito, non stupisce la considerazione che molte di esse siano state scoperte fortuitamente (Chu *et al.*, 2015). In letteratura queste piccole sequenze codificanti sono indicate in diversi modi come *short ORFs (sORFs)*, *small ORFs (smORFs)*, *uORFs* nel caso di quelle presenti nelle regioni non tradotte 5'UTR e *dORFs* nel caso di quelle localizzate nelle regioni non tradotte 3'UTR. Analogamente, le proteine codificate da queste sequenze sono chiamate *small proteins*, *sORF-encoded peptides (SEPs)*, *micropeptides* e *microproteins* (Delacourt *et al.*, 2017). In questo lavoro sono stati scelti rispettivamente gli acronimi smORFs e SEPs per identificare le piccole sequenze codificanti e le piccole proteine.

Considerato che la scelta del *cut-off* per individuare le smORFs è relativamente arbitraria, in letteratura sono presenti affermazioni discordanti su quale sia la lunghezza massima per classificare una sequenza codificante come smORF. Il valore soglia più frequente sembra essere quello dei 100 codoni, ma in alcuni lavori questo limite è spostato a 150 codoni (Delacourt *et al.*, 2017). È interessante sottolineare che se da un lato esiste un presunto limite

massimo della lunghezza che una smORF può avere per essere definita tale, dall'altro non esiste una lunghezza minima: probabilmente porre un tale limite sarebbe persino controproducente per l'identificazione di nuove smORFs se si considera, ad esempio, che la più piccola SEP conosciuta, codificata dal gene *polished rice (pri)* di *Drosophila melanogaster*, è costituita solamente da 11 amminoacidi (Galindo *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2016).

L'individuazione delle smORFs, oltre che dal limite della lunghezza menzionato in precedenza, è stata anche resa più difficile dalla loro localizzazione rispetto ad ORFs e sequenze codificanti (CDSs) già annotate: infatti, sono state identificate smORFs nelle regioni UTR di mRNAs, all'interno di CDSs in *frame* diversi rispetto a quello annotato, in lunghi RNA non codificanti (lncRNAs), nei precursori dei miRNAs (pri-miRNAs) e persino nell'rRNA 16S mitocondriale (Pueyo *et al.*, 2016; Chugunova *et al.*, 2018). La scoperta di nuove smORFs è stata agevolata dall'utilizzo di una tecnica chiamata *ribosome profiling* o Ribo-Seq che consiste nel sequenziamento *next-generation sequencing* (NGS) di frammenti di mRNAs protetti dal legame coi ribosomi. Accorgimenti sperimentali, quali l'utilizzo della frazione di frammenti associati a polisomi (Poly-Ribo-Seq), permettono inoltre di distinguere mRNAs attivamente tradotti da RNA non codificanti (ncRNAs) associati transitoriamente a complessi ribonucleoproteici o a ribosomi che stanno scansionando l'RNA alla ricerca del codone di inizio della traduzione o che impiegano più tempo per dissociarsi dalle regioni 3'UTR. Un ulteriore sviluppo di questa tecnica è l'associazione con analisi proteogenomiche che permettono di identificare le proteine tramite spettrometria di massa e l'utilizzo di *database* costruiti *de novo* a partire da dati ottenuti tramite ad esempio Ribo-Seq (Delacourt *et al.*, 2017; Chugunova *et al.*, 2018). Le sequenze contenute in questi *database* costruiti *ad hoc* possono essere ulteriormente filtrate se si tiene conto che è altamente probabile che le smORFs siano filogeneticamente conservate e che la loro composizione nucleotidica sia diversa da quella di sequenze non codificanti (Chugunova *et al.*, 2018). Questi accorgimenti hanno quindi permesso l'identificazione di smORFs che sono effettivamente tradotte in SEPs. Inoltre, l'utilizzo di inibitori della traduzione (harringtonina e lactidomicina) che causano uno stallo dei ribosomi in corrispondenza del codone di inizio ha messo in evidenza che il codone di inizio delle smORFs spesso non è canonico (Chugunova *et al.*, 2018).

Anche se è ormai chiaro che le SEPs sono coinvolte in processi cellulari importanti come morfogenesi, divisione cellulare, trasporto di membrana, risposte a segnali di *stress*, regolazione di attività enzimatiche, ecc. (Storz *et al.*, 2014), studiare il loro ruolo funzionale

non è semplice. Infatti, spesso la delezione o l'inattivazione delle smORFs non causa fenotipi evidenti che permettono di capire facilmente la funzione delle proteine corrispondenti. Inoltre, le ridotte dimensioni di queste proteine non permettono l'utilizzo delle tecniche che sono impiegate comunemente per lo studio di proteine più grandi. Per esempio, è più difficile ottenere anticorpi che riconoscano le SEPs, e la loro produzione come proteine ricombinanti contenenti *tag* può alterare la loro funzionalità o persino influenzarne negativamente il *folding* considerando che i *tag* più comuni sono più grandi della proteina oggetto di studio (Storz *et al.*, 2014).

Come detto in precedenza, le SEPs sono coinvolte in molti processi cellulari rilevanti. Di seguito sono riportati 3 esempi riguardanti gli organismi modello *B. subtilis* ed *E. coli* anche se sono note smORFs e SEPs in altri microrganismi (Storz *et al.*, 2014). SpoVM di *B. subtilis* è coinvolta nella sporulazione ed è una proteina di membrana di appena 26 amminoacidi che riconosce in modo specifico la superficie dell'endospora in formazione e recluta altre proteine coinvolte nella deposizione del *cortex* e della tunica da parte della cellula madre (van Ooij *et al.*, 2003; Ramamurthi *et al.*, 2006). Un altro esempio riguardante *B. subtilis* è MciZ una SEP di 40 amminoacidi che inibisce la polimerizzazione di FtsZ (una delle proteine principali che forma il complesso proteico chiamato divisoma) permettendo la localizzazione, ad un polo cellulare, di un setto che divide in modo asimmetrico il citoplasma e che separa la futura endospora dalla cellula madre (Handler *et al.*, 2008). Un esempio riguardante la regolazione del trasporto di membrana è SgrT di *E. coli*: questa proteina di 43 amminoacidi è tradotta da quella che era ritenuta essere la regione 5'UTR di un mRNA policistronico. La trascrizione di questo operone avviene in risposta a concentrazioni elevate di glucosio e SgrT interagisce, inattivandolo, con il trasportatore di membrana EIICB^{Glc}, riducendo l'effetto citotossico di una concentrazione elevata di glucosio-6-fosfato (Wadler *et al.*, 2007; Kosfeld *et al.*, 2012).

1.4 La smORF *trpM* di *S. coelicolor*

Nel genoma di *S. coelicolor* sono state identificate smORFs nei *cluster* genici coinvolti nella biosintesi di amminoacidi come l'L-istidina (L-His) e l'L-triptofano (L-Trp) (Limauro *et al.*, 1990; Hu *et al.*, 1999). Una di queste è *trpM* (SCO2038) che codifica per una SEP di 63 amminoacidi e fa parte del *locus trpCIMBA*, comprendente alcuni dei geni necessari per la biosintesi di L-Trp. In *S. coelicolor* i geni biosintetici del triptofano non sono organizzati in un unico operone come in *E. coli* e *B. subtilis* e sono presenti geni paraloghi (Figura 6 e Figura 7).

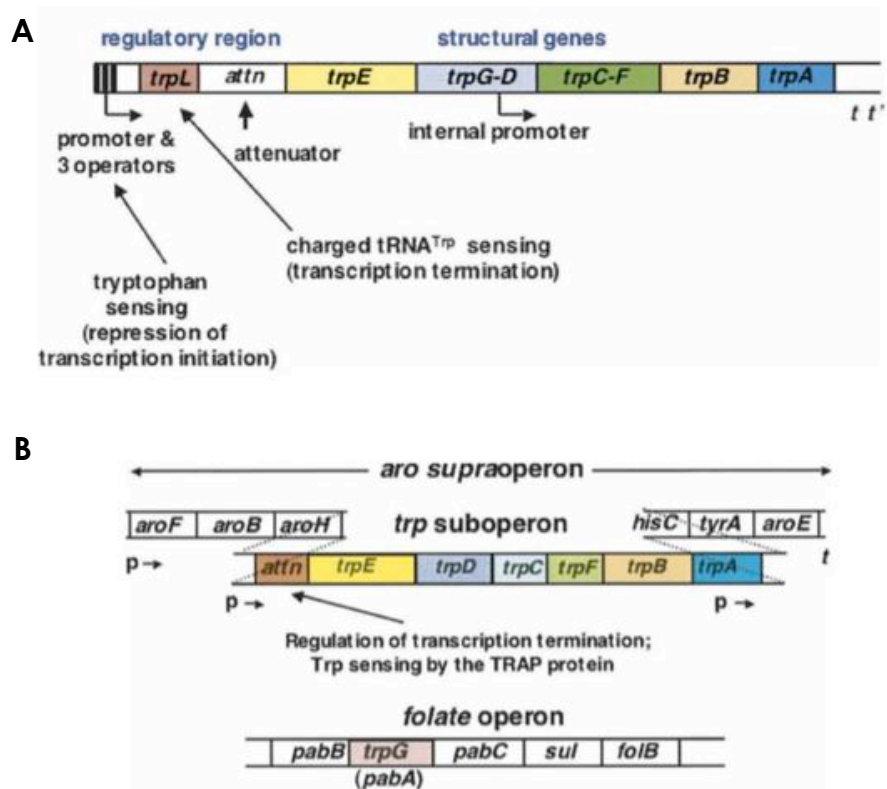


Figura 6: Organizzazione dei geni *trp* in *E. coli* (A) e *B. subtilis* (B). Adattato da Yanofsky, 2007.

Inoltre, mentre in *E. coli* e *B. subtilis* la regolazione dell'espressione dei geni *trp* è regolata dalla concentrazione di L-Trp libero nel citoplasma e dalla quantità di tRNA^{Trp} carichi, grazie alla presenza di un repressore e di meccanismi di attenuazione trascrizionale (Yanofsky, 2007), in *S. coelicolor* l'espressione di questi geni non è regolata negativamente dalla presenza del prodotto finale (Hu *et al.*, 1999; Palazzotto *et al.*, 2015).

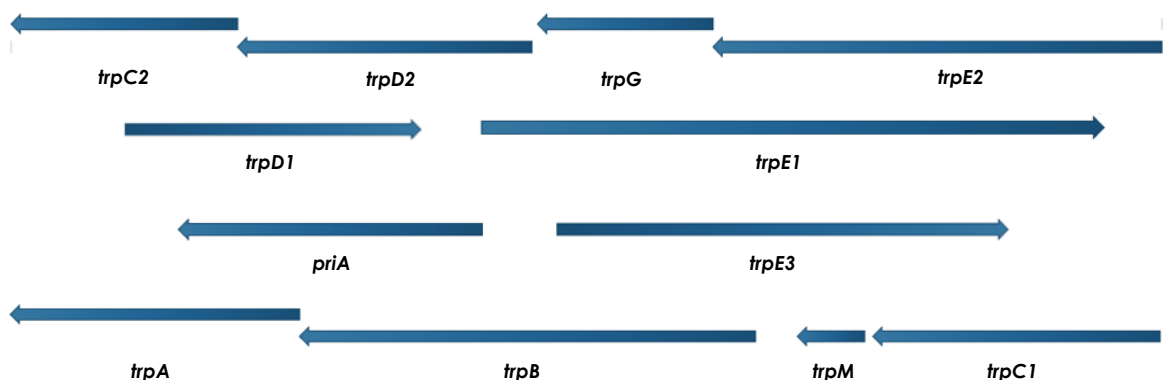


Figura 7: Organizzazione dei geni *trp* in *S. coelicolor*.

È stato dimostrato che *trpM* è implicata nel metabolismo del triptofano (Palazzotto *et al.*, 2016). Infatti un mutante *knock-out* ($\Delta trpM$), in cui parte del gene è stata sostituita con una cassetta di resistenza all'apramicina, mostra una crescita più lenta quando coltivato su terreno minimo (MM) in confronto al ceppo selvatico *S. coelicolor* M145 (wt). La normale velocità di crescita è però ripristinata se l'L-Trp è aggiunto al terreno di coltura. Lo stesso effetto si osserva se sono aggiunti L-serina (L-Ser) o indolo (Ind) che sono i diretti precursori del triptofano, mentre la presenza di altri amminoacidi, come la L-prolina (L-Pro), ad esempio, non ha questo effetto (Figura 8).

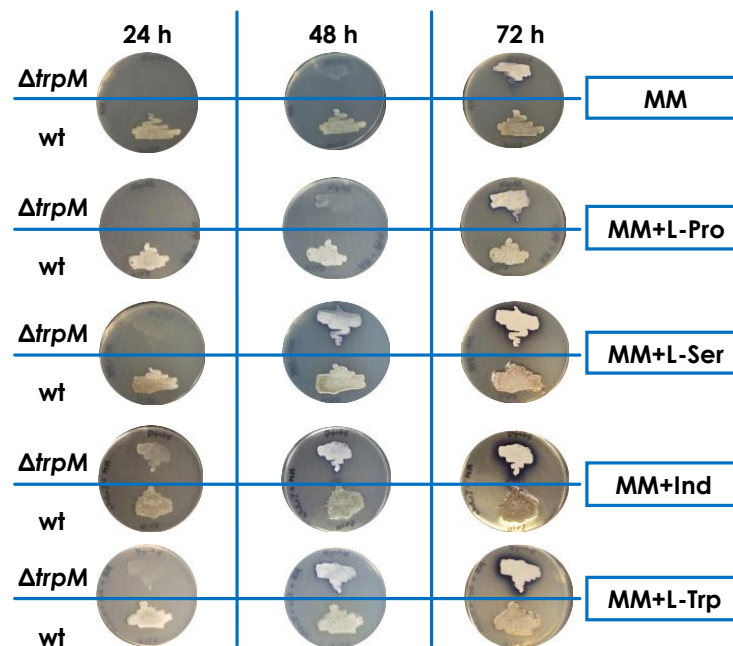


Figura 8: Fenotipo del ceppo *knock-out* di *trpM* su terreno solido minimo in presenza o meno di amminoacidi. Adattato da Palazzotto *et al.*, 2016.

Inoltre, un'analisi proteomica differenziale basata su gel bidimensionale di poliacrilammide (2D-DIGE) e spettrometria di massa ha permesso di confrontare questo mutante *knock-out* e il ceppo selvatico e ha evidenziato che la maggior parte delle proteine differenziali appartiene alle classi del metabolismo di amminoacidi, carbonio e proteine. Alcune di queste proteine sono coinvolte direttamente nel metabolismo del triptofano (Palazzotto *et al.*, 2016).

È stato anche dimostrato che l'inattivazione di *trpM* nel ceppo *knock-out* causa una riduzione della produzione di actinorodina e spore (Palazzotto *et al.*, 2016). Per cercare di capire il meccanismo d'azione di TrpM, è stato poi condotto un esperimento di *pull-down* per identificare putative proteine interagenti. In questo modo è stata individuata la putativa

amminopeptidasi citosolica PepA (SCO2179) e, successivamente, è stata dimostrata *in vitro* l'interazione tra le due proteine tramite *bacterial two-hybrid assay* (Palazzotto *et al.*, 2016).

I principali obiettivi di questo lavoro sono stati (i) costruire un ceppo *knock-in* di *trpM* con una copia aggiuntiva del gene integrata nel cromosoma, (ii) caratterizzare la sua cinetica di crescita e (iii) la sua produzione di antibiotici, (iv) identificare i *pathway* metabolici influenzati dall'espressione di *trpM* attraverso lo studio del proteoma e della produzione di metaboliti e (v) ipotizzare un possibile meccanismo d'azione che spieghi la funzione di TrpM.

2. Materiali e metodi

2.1 Ceppi utilizzati

2.1.1 *E. coli*

CEPPO	GENOTIPO	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Thermo Scientific (a)
<i>E. coli</i> S17-1	<i>TpR SmR recA, thi, pro, hsdR-</i> <i>M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λpir</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> BL21-AI	F- <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> <i>araB::T7RNAP-tetA</i>	Thermo Scientific (b)

2.1.2 *S. coelicolor*

CEPPO	GENOTIPO	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
<i>S. coelicolor</i> M145	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻	Kieser <i>et al.</i> , 2000
<i>S. coelicolor</i> M145 pIJ8600	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , <i>attB</i> Φ C31::pIJ8600	Questo lavoro
<i>S. coelicolor</i> M145 pIJ8600/trpM	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , <i>attB</i> Φ C31::pIJ8600/trpM	Questo lavoro

2.2 Terreni di coltura

2.2.1 LB

Il terreno LB (Sambrook *et al.*, 2001) è stato utilizzato per la coltivazione di *E. coli*:

Bacto triptone	10 g
Estratto di lievito	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	1 l

Il terreno LB agarizzato è stato ottenuto aggiungendo Bacto agar alla concentrazione finale di 15 g/l.

Per la selezione di ceppi ricombinanti di *E. coli* sono stati aggiunti i seguenti antibiotici:

ANTIBIOTICO	CONCENTRAZIONE FINALE	SOLVENTE
Ampicillina	100 µg/ml	H ₂ O
Apramicina	50 µg/ml	H ₂ O

Il terreno è stato sterilizzato a 121°C e 1 atm per 20 minuti. Gli antibiotici sono stati sterilizzati separatamente (con filtri a membrana di acetato di cellulosa aventi pori con diametro 0,2 µm) e aggiunti al terreno già sterile.

2.2.2 Minimal Medium (MM)

Il terreno MM (modificato da Kieser *et al.*, 2000) è stato utilizzato per la coltivazione di *S. coelicolor* M145 e per la maggior parte degli esperimenti descritti in questo lavoro:

NaNO ₃	1 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Elementi in traccia	1 ml
H ₂ O	1 l

La soluzione di elementi in traccia ha la seguente composizione:

FeSO ₄ *7H ₂ O	1 g
ZnCl ₂	1 g
Biotina	0,1 mg
H ₂ O	100 ml

Il pH è stato aggiustato a 7 con una soluzione di KOH 1N ed il terreno è stato sterilizzato a 121°C e 1 atm per 20 minuti. Dopo la sterilizzazione è stata aggiunta una soluzione di

glucosio 50% (sterilizzata separatamente a 121°C e 1 atm per 20 minuti), utilizzato alla concentrazione finale dell'1%.

Il terreno MM agarizzato è stato ottenuto aggiungendo Bacto agar alla concentrazione finale di 15 g/l.

I seguenti antibiotici sono stati sterilizzati separatamente (con filtri a membrana di acetato di cellulosa aventi pori con diametro 0,2 µm) e aggiunti al terreno già sterile per la selezione dei ceppi ricombinanti di *S. coelicolor* M145:

ANTIBIOTICO	CONCENTRAZIONE FINALE	SOLVENTE
Tiostreptone	12 µg/ml	DMSO
Apramicina	50 µg/ml	H ₂ O

2.2.3 Mannitol-Soy medium (MS)

Il terreno MS (Kieser *et al.*, 2000) è stato utilizzato per la preparazione di sospensioni di spore di *S. coelicolor* M145:

Mannitolo	20 g
Farina di soia	20 g
Bacto agar	20 g
H ₂ O	1 l

Il terreno è stato sterilizzato a 121°C e 1 atm per 20 minuti.

2.2.4 J medium (JM)

Il terreno JM (Kieser *et al.*, 2000) è stato utilizzato per la preparazione di colture di *S. coelicolor* M145 utilizzate per l'estrazione del DNA genomico.

Saccarosio	100 g
Tryptone soya broth	30 g
Estratto di lievito	10 g
MgCl ₂ *6H ₂ O	10 g
H ₂ O	1 l

2.3 Primer

NOME	SEQUENZA (5' > 3')	APPLICAZIONE
trpM_exp_F	CGGAC <u>CATATG</u> ATGACGCTCC	Costruzione del plasmide pIJ8600/trpM
trpM_exp_R	CGGGGATCCTCAATACAGC	
F_pIJ8600	CACTCCGCTGAAACTGTTGA	Selezione di cloni di <i>S. coelicolor</i> M145 pIJ8600 e <i>S. coelicolor</i> M145 pIJ8600/trpM
R_pIJ8600	GAAGGGAGCGGACATATGA	
Faac3IV	GTCCACAGCTCCTTCCGTAG	
Raac3IV	ACCAACTTGCCATCCTGAAG	
FtsrR	CCTGTGATCCTCTCGTGCAG	
RtsrR	TGACTGAGTTGGACACCATCGC	
pepA_exp_F	ATAAG <u>GATCC</u> GTGACTGCTC	
pepA_exp_R	GATCA <u>AGCTT</u> CTAGCCCAG	
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	PCR (rDNA 16S) dopo trattamento con DNasi
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	
hrdB_F	GGTCGAGGTCATCAACAAGC	qRT-PCR (<i>hrdB</i>)
hrdB_R	CTCGATGAGGTCACCGAACT	
SCO2038_F	CGCTCCCGCTCGTCCC	qRT-PCR (<i>trpM</i>)
SCO2038_R	CCTGATGGGGCGCTTGA	
SCO2179_F	CGCCAGGCCGTGGACA	qRT-PCR (<i>pepA</i>)
SCO2179_R	CCACGACGACGGGAGCCT	

I nucleotidi sottolineati nelle sequenze dei *primer* corrispondono ai siti di restrizione utilizzati per il clonaggio nei vettori di espressione utilizzati:

PRIMER	SITO DI RESTRIZIONE
trpM_exp_F	<i>Nde</i> I
trpM_exp_R	<i>Bam</i> HI
pepA_exp_F	<i>Bam</i> HI
pepA_exp_R	<i>Hind</i> III

2.4 Plasmidi

NOME	RESISTENZA	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
pIJ8600	Apramicina, tiostreptone	Sun <i>et al.</i> , 1999
pIJ8600/trpM		Questo lavoro
pRSET-B	Ampicillina	Thermo Scientific (c)
pRSET-B/pepA		Questo lavoro

2.5 Preparazione di cellule competenti di *E. coli*

Il seguente protocollo è stato applicato per la preparazione di cellule competenti sia di *E. coli* TOP10 che di *E. coli* S17-1.

1. Inoculare 10 ml di LB con una colonia singola prelevata da una piastra inocolata recentemente, o con 200 μ L di uno *stock* in glicerolo conservato a -80°C , in una beuta da 50 ml. Incubare a 37°C e 200 rpm *overnight*.
2. Inoculare 50 ml di LB pre-riscaldato a 37°C con la coltura incubata *overnight* fino ad ottenere $\text{OD}_{600}=0,1$.
3. Incubare a 37°C e 200 rpm fino ad ottenere $\text{OD}_{600}=0,8$
4. Porre le cellule in ghiaccio per 15 minuti. Mantenere le cellule a 0°C (in ghiaccio) durante i passaggi successivi e raffreddare tutti i contenitori e le soluzioni utilizzate prima di aggiungere le cellule.
5. Trasferire la coltura in un tubo e centrifugare a 4000 g per 15 minuti a 4°C .
6. Decantare il *pellet*.
7. Risospendere il *pellet* in 16 ml di soluzione RF-1.
8. Porre la sospensione in ghiaccio per 15 minuti.
9. Centrifugare a 4000 g per 10 minuti a 4°C .
10. Rimuovere il supernatante con una pipetta.
11. Risospendere il *pellet* in 4 ml di soluzione RF-2.
12. Porre la sospensione in ghiaccio per 15 minuti.
13. Aliquotare 100 μ l della sospensione in tubi da 1,5 ml.
14. Conservare le aliquote a -80°C fino all'utilizzo.

Soluzione RF-1:

KCl 100 mM

MnCl₂*4 H₂O 50 mM

Potassio acetato 30 mM

CaCl₂*2 H₂O 10 mM

Glicerolo 15% (w/v)

Aggiustare il pH a 5,8 con acido acetico 200 mM e sterilizzare con filtro a membrana avente pori con diametro 0,2 µm.

Soluzione RF-2:

MOPS 10 mM

KCl 10 mM

CaCl₂*2 H₂O 50 mM

Glicerolo 15% (w/v)

Aggiustare il pH a 6,8 con NaOH 1 M e sterilizzare con filtro a membrana avente pori con diametro 0,2 µm.

2.6 Trasformazione di cellule competenti di *E. coli*

Il seguente protocollo è stato applicato per la trasformazione delle cellule competenti sia di *E. coli* TOP10 che di *E. coli* S17-1.

NOTA: Lavorare attenendosi alle temperature indicate per garantire un'efficienza di trasformazione elevata.

1. Riscaldare il terreno LB a 42°C.
2. Incubare le aliquote di cellule competenti di *E. coli* in ghiaccio per 5 minuti.
3. Aggiungere alle aliquote di cellule competenti 10 µl di DNA (20-200 ng) e miscelare accuratamente.
4. Incubare in ghiaccio per 20 minuti. Agitare per inversione ogni 5 minuti.

5. Porre le aliquote di cellule competenti in un termoblocco (precedentemente riscaldato a 42°C) per 45 secondi. Quindi incubarle immediatamente in ghiaccio per 2 minuti.
6. Aggiungere 900 µL di LB precedentemente riscaldato a 42°C e incubare a 37°C e 150 rpm per 1 h.
7. Spatolare 100 µL di ogni campione su piastre contenenti l'antibiotico di selezione.
8. Centrifugare a 13000 g per 3 minuti e rimuovere 800 µL di supernatante.
9. Risospendere il *pellet* nel supernatante rimasto e spatolare su piastre contenenti l'antibiotico di selezione.
10. Incubare le piastre a 37°C *overnight* (in alternativa le piastre possono essere incubate a 30°C per 48 h oppure a temperatura ambiente per 72 h).

2.7 Preparazione di *stock* in glicerolo di *E. coli*

Dopo avere ottenuto i cloni ricombinati desiderati, *stock* in glicerolo sono stati preparati eseguendo il protocollo riportato:

1. Inoculare una colonia in 5 ml di LB contenente l'antibiotico di selezione appropriato. Incubare a 37°C *overnight* e 200 rpm.
2. Trasferire 750 µL della coltura in un criotubo sterile e aggiungere 750 µL di glicerolo 40% (v/v) sterile.
3. Miscelare delicatamente per inversione.
4. Incubare a temperatura ambiente per 1 h.
5. Conservare a -80°C.

2.8 Preparazione di sospensione di spore di *S. coelicolor* M145

Le sospensioni di spore di *S. coelicolor* M145 sono state ottenute applicando il seguente protocollo:

1. Spatolare $5 \cdot 10^7$ spore di *S. coelicolor* M145 su terreno MS ed incubare a 30° C per circa 7 giorni.
2. Versare 5-10 ml di acqua sterile sulla superficie della piastra e attendere 5 minuti.
3. Raschiare la superficie del micelio con un'ansa sterile per staccare le spore dalla superficie.

4. Trasferire, con una pipetta sterile, la sospensione di spore ottenuta in una siringa precedentemente riempita con cotone idrofilo e sterilizzata. Se necessario, aggiungere altri 2-5 ml di acqua sterile e lavare la superficie della piastra per raccogliere ulteriormente le spore.
5. Filtrare la sospensione attraverso il cotone della siringa per rimuovere i residui di micelio e terreno agarizzato.
6. Centrifugare a 3000 g per 15 minuti.
7. Decantare il *pellet* e risospenderlo nella goccia di acqua residua.
8. Aggiungere un volume di una soluzione di glicerolo al 40%.
9. Conservare la sospensione di spore a -20°C per brevi periodi o a -80°C per periodi più lunghi.

2.9 Estrazione di DNA plasmidico (*miniprep*) da colture liquide di *E. coli*

Nel caso di DNA plasmidico utilizzato come substrato per la costruzione del pIJ8600/trpM e del pRSET-B/pepA, e per la trasformazione di cellule competenti di *E. coli*, è stato utilizzato il “GenElute Plasmid Miniprep Kit” (Sigma). In questo caso sono state seguite le indicazioni fornite dal produttore.

Per lo *screening* dei putativi cloni ricombinanti, è stato eseguito il seguente protocollo adattato da Sambrook *et al.*, 2001:

1. Inoculare 2-3 ml di LB, contenente l'antibiotico di selezione opportuno, con una colonia singola di *E. coli* prelevata da piastra e incubare a 37°C e 200 rpm *overnight*.
2. Centrifugare a 13000 g per 5 minuti.
3. Decantare il *pellet* e risospendere in 100 µl di Sol1.
4. Aggiungere 200 µl di Sol2 preparata al momento e miscelare gentilmente per inversione 2-3 volte.
5. Aggiungere 150 µl di Sol3 e miscelare gentilmente per inversione 2-3 volte.
6. Centrifugare alla massima velocità per 6 minuti.
7. Trasferire il supernatante in un nuovo tubo e aggiungere 1 mL di etanolo assoluto.
8. Miscelare per inversione 2-3 volte e centrifugare alla massima velocità per 6 minuti.
9. Decantare il *pellet* di DNA e lavare con 500 µL di etanolo 70%.
10. Centrifugare alla massima velocità per 6 minuti.
11. Decantare delicatamente il *pellet* di DNA ed eliminare l'etanolo residuo tramite l'utilizzo di *speed-vacuum* (per 10-15 minuti).

12. Risospendere il *pellet* in 50 μ L di una soluzione di acqua e RNasi A (utilizzata alla concentrazione finale di 20 μ g/ml).
13. Incubare 10 minuti a 37°C.

Sol1:

Glucosio 50 mM

EDTA pH 8 10 mM

Tris-HCl pH 8 25 mM

Sol2:

NaOH 0,2 M

SDS 1%

Sol3:

Potassio acetato 7,5 M

Acido acetico glaciale 28,7%

NOTA: Sol1 e Sol3 possono essere preparate e conservate a 4°C. Sol2 deve essere preparata al momento.

2.10 Estrazione di DNA cromosomale da colture liquide di *S. coelicolor* M145 (*salting out*)

Il seguente protocollo è stato adattato da Kieser *et al.*, 2000:

1. Risospendere il *pellet* cellulare in 5 ml di Set Buffer.
2. Aggiungere 100 μ l di liozima 50 mg/ml.
3. Incubare a 37°C per 1 h.
4. Aggiungere 140 μ l di Proteinasi K 20 mg/ml e 600 μ l di SDS 10%.
5. Incubare per 2 h a 55°C.
6. Aggiungere 2 ml di NaCl 5 M e fare raffreddare per 10 minuti a 37°C.

7. Aggiungere 5 ml di cloroformio e agitare per inversione per 30 minuti.
8. Centrifugare a 4000 g per 15 minuti.
9. Trasferire il supernatante in un nuovo tubo.
10. Aggiungere 0,6 volumi di isopropanolo.
11. Raccogliere il DNA ruotando una bacchetta di vetro nella soluzione.
12. Lavare il DNA recuperato immergendolo per 1-2 secondi in etanolo 70%.
13. Lasciare asciugare il DNA sotto flusso laminare.
14. Fare solubilizzare il DNA in un volume opportuno di H₂O incubandolo *overnight* a 4°C.

Set Buffer:

NaCl 75 mM

EDTA pH 8 25 mM

Tris-HCl pH 7,5 20 mM

2.11 Purificazione del DNA genomico di *S. coelicolor* M145 estratto tramite *salting out*

1. Trasferire 500 µl di DNA genomico estratto in un tubo da 1,5 ml.
2. Aggiungere 500 µl di fenolo-cloroformio-alcol isoamilico (25:24:1) e miscelare con l'aiuto di un *vortex*.
3. Centrifugare a 13000 g per 7 minuti a 4° C.
4. Prelevare la fase acquosa e trasferirla in un nuovo tubo.
5. Aggiungere un volume di cloroformio e miscelare con l'aiuto di un *vortex*.
6. Centrifuga a 13000 g per 7 minuti a 4° C.
7. Prelevare la fase acquosa e trasferirla in un nuovo tubo.
8. Aggiungere 1/10 di volume di sodio acetato 3M pH 5,2 e 2 volumi di etanolo assoluto.
9. Incubare *overnight* a -20°C oppure 2 h a -80°C.
10. Centrifugare 20 minuti a 13000 g e 4°C.
11. Decantare il *pellet*.
12. Aggiungere 500 µl di etanolo 70% e centrifugare per 10 minuti a 13000 g e 4°C.

13. Decantare il *pellet* ed eliminare l'etanolo residuo tramite l'utilizzo di *speed-vacuum* (per 10-15 minuti).
14. Risospendere il *pellet* di DNA in una soluzione di acqua e RNasi A (utilizzata alla concentrazione finale di 10 µg/ml).
15. Incubare 30 minuti a 37°C.

2.12 Polymerase chain reaction (PCR)

Le PCR sono state eseguite con i *primer* riportati nella sezione 2.3 e in tutti i casi la *mix* di reazione ha avuto la seguente composizione (nella tabella sottostante sono riportate le concentrazioni finali dei reagenti):

10X PCR RxN Reaction Buffer	1X
MgCl ₂ 50 mM	1,5 mM
dNTPs 10 mM	200 µM
Primer Fw 10 µM	0,2 µM
Primer Rv 10 µM	0,2 µM
<i>Taq</i> DNA Polymerase, Recombinat (Invitrogen)	1 U
DNA stampo	1-500 ng
H ₂ O	Fino a 25 µl

È stato utilizzato un "T Personal Thermocycler" (Biometra) e di seguito sono riportati i programmi utilizzati per le PCR descritte in questo lavoro.

2.12.1 Clonaggio di *trpM* nel pIJ8600

Questa PCR è stata eseguita per amplificare il gene *trpM* dal genoma di *S. coelicolor* M145 e inserire i siti di restrizione *NdeI* e *BamHI* alle estremità del DNA amplificato.

Denaturazione iniziale	94°C	3'
30 cicli	94°C	45''
	50,9°C	30''
	72°C	20''
Estensione finale	72°C	10'
Pausa	4°C	

2.12.2 Amplificazione del sito di clonaggio multiplo (MCS) contenuto nel pIJ8600

Questo programma è stato applicato per l'amplificazione di una regione del pIJ8600 comprendente il MCS. In particolare è stata eseguita sia per verificare che fosse avvenuta l'inserzione del gene *trpM* nel pIJ8600, sia per verificare indirettamente la presenza del plasmide (pIJ8600 o pIJ8600/*trpM*) nel DNA cromosomico dei cloni ex-coniuganti.

Denaturazione iniziale	98°C	5'
1° ciclo	96°C	1'
	68°C	1'
	72°C	1'
2° ciclo	96°C	1'
	66°C	1'
	72°C	1'
3° ciclo	96°C	1'
	64°C	1'
	72°C	1'
4° ciclo	96°C	1'
	62°C	1'
	72°C	1'
5° ciclo	96°C	1'
	60°C	1'
	72°C	1'
35 cicli	96°C	1'
	58°C	1'
	72°C	1'
Estensione finale	72°C	10'
Pausa	4°C	

Nel caso di questa PCR è stato aggiunto DMSO, utilizzato ad una concentrazione finale del 2,5% (v/v), alla *mix* di reazione.

2.12.3 Amplificazione del gene per la resistenza all'apramicina (*aac3IV*)

Questa PCR è stata eseguita per verificare indirettamente la presenza del pIJ8600 o del pIJ8600/*trpM* nel DNA cromosomico dei cloni ex-coniuganti.

Denaturazione iniziale	98°C	5'
30 cicli	94°C	45''
	58°C	30''
	72°C	45''
Estensione finale	72°C	10'
Pausa	4°C	

2.12.4 Amplificazione del gene per la resistenza al tiostreptone (*tsr*)

Anche questa PCR è stata eseguita per verificare indirettamente la presenza del pIJ8600 o del pIJ8600/trpM nel DNA cromosomico dei cloni ex-coniuganti.

Denaturazione iniziale	98°C	5'
30 cicli	95°C	30''
	58°C	30''
	72°C	1'30''
Estensione finale	72°C	10'
Pausa	4°C	

2.12.5 Amplificazione del gene codificante l'rDNA 16S

Al fine di confermare l'assenza di DNA nei campioni utilizzati per gli esperimenti di qRT-PCR, è stato utilizzato il seguente programma per amplificare il gene codificante l'rDNA 16S dall'RNA trattato con DNasi:

Denaturazione iniziale	94°C	3'
30 cicli	94°C	45''
	50°C	1'
	72°C	1'30''
Estensione finale	72°C	10'
Pausa	4°C	

2.12.6 Clonaggio di *pepA* nel pRSET-B

Questo programma è stato applicato per amplificare il gene *pepA* dal genoma di *S. coelicolor* M145 e inserire i siti di restrizione *Bam*HI e *Hind*III alle estremità del DNA amplificato.

Denaturazione iniziale	94°C	5'
30 cicli	94°C	45''
	48°C	30''
	72°C	2'20''
Estensione finale	72°C	10'
Pausa	4°C	

2.13 Elettroforesi su gel di agarosio

I gel di agarosio sono stati preparati come riportato da Sambrook *et al.* (2001) con una percentuale di agarosio dell'1% (w/v) in soluzione di Tris-Acetato-EDTA (TAE). L'etidio bromuro, utilizzato alla concentrazione finale di 0,5 µg/ml, è stato utilizzato come agente intercalante. I prodotti "MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use" (Thermo Scientific) e "DNA Molecular Weight Marker II" (Roche) sono stati utilizzati come *ladder*, mentre il "BlueJuice Gel Loading Buffer (10X)" (Invitrogen) è stato addizionato ai campioni come tampone di caricamento. Le elettroforesi sono state eseguite a voltaggio costante.

2.14 Coniugazione interspecifica tra *E. coli* e *S. coelicolor* M145

I ceppi *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM e *S. coelicolor* M145 pIJ8600 sono stati ottenuti attraverso coniugazione interspecifica tra ceppi di *E. coli* S17-1 e *S. coelicolor* M145, adattando il protocollo riportato da Kieser *et al.* (2000).

1. Diluire 1:100 una coltura di *E. coli* S17-1 (contenente il plasmide di interesse) cresciuta a 37°C e 200 rpm *overnight* in 50 ml di LB contenente l'antibiotico selettivo.
2. Incubare a 37°C e 200 rpm fino ad ottenere OD₆₀₀=0.6.
3. Centrifugare la coltura a 13000 g per 5 minuti, decantare il *pellet* e lavare 2 volte con LB (senza antibiotici).
4. Risospendere il *pellet* in 5 ml di LB.

5. Raccogliere il micelio da una coltura di *S. coelicolor* M145 (incubata per 6 giorni a 30°C) su terreno MS utilizzando 2 ml di una soluzione sterile di glicerolo 20%.
6. Omogeneizzare il micelio raccolto con un *potter* sterile e miscelare 0,5 ml di questa sospensione con 0,5 ml della sospensione di *E. coli* S17-1 ottenuta in precedenza.
7. Centrifugare a 4000 g per 5 minuti, decantare il *pellet* e risospenderlo nella goccia residua.
8. Spatolare gentilmente la sospensione su piastre di MS contenenti MgCl₂ alla concentrazione finale di 10 mM.
9. Incubare a 30°C per 16-20 h.
10. Ricoprire le piastre con 1 ml di una soluzione dell'antibiotico selettivo opportuno e acido nalidixico (utilizzato alla concentrazione finale di 20 µg/mL).
11. Incubare a 30°C per 7-15 giorni o fino a quando le colonie di *S. coelicolor* M145 non sono visibili.
12. Piastrare i putativi cloni ex-coniuganti su terreno contenente l'antibiotico di selezione.

2.15 Southern blot

L'analisi Southern *blot* è stata eseguita per verificare l'integrazione dei plasmidi pIJ8600 e pIJ8600/trpM nel sito *attB* del genoma di *S. coelicolor* M145.

I DNA genomici dei ceppi *S. coelicolor* M145 pIJ8600 e *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM sono stati digeriti utilizzando l'enzima di restrizione *Bam*HI (Thermo Scientific). La restrizione (di ≈ 20 µg di DNA genomico) è stata condotta a 37°C per 4 ore.

Il *blotting* è stato eseguito per capillarità e in condizioni di neutralità secondo il protocollo riportato da Sambrook *et al.* (2001) e utilizzando una membrana di *nylon* carica positivamente (“Nylon Membranes - positively charged”, Roche).

Per la preparazione della sonda, il plasmide pIJ8600 (≈ 20 µg) è stato digerito con l'enzima di restrizione *Sty*I (Thermo Scientific) e il frammento di interesse (quello di 1480 bp) è stato purificato da gel di agarosio utilizzando il “PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit” (Invitrogen).

Per la marcatura della sonda e l'ibridazione con il DNA trasferito su membrana è stato utilizzato il “Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit I” (Roche). È stato applicato il protocollo fornito dal produttore e la temperatura dell'ibridazione è stata 50°C.

2.16 Estrazione di RNA da micelio di *S. coelicolor* M145

$1,5 \cdot 10^7$ spore di *S. coelicolor* M145 pIJ8600 e *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM sono state spatolate su piastre di MM su cui era stato posto un disco di *cellophane* (“Cellophane Membrane Backing”, Bio-rad) sterile. È stato deciso di utilizzare lo strato di *cellophane* per facilitare il recupero della biomassa ed evitare di raccogliere anche il terreno. Le piastre sono state incubate a 37°C per 7 giorni a 30°C. Il micelio è stato lisato risospingendolo in 500 µl di una soluzione di lisozima 50 mg/ml in TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA pH 8 1 mM) condizionata con 2 µl di “RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor” (Invitrogen) ed incubato a 37°C per 1 h. L’RNA è stato estratto utilizzando il “Illustra RNAspin Midi RNA Isolation Kit” (GE Healthcare), applicando il protocollo fornito dal produttore. Alla soluzione di RNA eluito è stato aggiunto 1 µl di “RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor” (Invitrogen).

Dopo avere verificato, tramite elettroforesi su gel di agarosio, la presenza di RNA estratto dal micelio, è stato eseguito un trattamento con “DNase I Recombinant, RNase-free” (Roche) per rimuovere le tracce di DNA eventualmente presente. Una PCR coi *primer* universali 27F e 1492R (per amplificare l’rDNA 16S) è stata utilizzata per valutare la presenza di DNA residuo. Per rimuovere la DNase dalla soluzione di RNA è stata eseguito il protocollo riportato nella sezione 2.11.

2.17 Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Prima di procedere con gli esperimenti di qRT-PCR, è stata eseguita una RT-PCR per controllare la qualità dell’RNA estratto dal micelio di *S. coelicolor* M145 pIJ8600 e *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM. A tale scopo, sono stati utilizzati *primer* specifici per il gene *hrdB* (SCO5820), considerato che esso codifica per il principale fattore σ vegetativo. Di seguito sono riportati la composizione (è specificata la concentrazione finale o il volume o la massa dei singoli reagenti) della *mix* di reazione e il programma utilizzato:

2X Reaction Mix	1X
hrdB_F	0,2 µM
hrdB_R	0,2 µM
SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)	2 µl
RNA	50 ng
H ₂ O	Fino a 50 µl

Retro-trascrizione in cDNA	50°C	30'
Inattivazione della trascrittasi inversa	95°C	10'
40 cicli	95°C	1'
	60°C	1'
	72°C	45''
Estensione finale	72°C	15'
Pausa	4°C	

L'esito della RT-PCR è stato verificato tramite elettroforesi su gel di agarosio.

2.18 Real-time PCR quantitativa (qRT-PCR)

Gli esperimenti di qRT-PCR sono stati eseguiti in due *step*. Nel primo, l'RNA è stato convertito in cDNA con il "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor" (Applied Biosystems), e di seguito sono riportati i dettagli relativi (i volumi riportati si riferiscono ai singoli campioni):

10X RT Buffer	2 µl
25X dNTPs 100 mM	0,8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
Multiscribe Reverse Transcriptase	1 µl
RNase Inhibitor	1 µl
RNA	10 µl (1 µg)
H ₂ O	3,2 µl
Totale	20 µl

Step 1	25°C	10'
Step 2	37°C	120'
Step 3	85°C	5'
Step 4	4°C	

Dopo la conversione dell'RNA in cDNA, è stato utilizzato il "Power SYBR Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems) per la quantizzazione relativa del cDNA. Il cDNA del gene *hrdB* è stato utilizzato come controllo interno per quantificare l'espressione relativa dei geni *target* (*trpM* e *pepA*). H₂O e gli RNA non retro-trascritti sono stati utilizzati come controlli negativi per verificare rispettivamente l'assenza di DNA nella *master-mix* e l'assenza di DNA che non fosse il cDNA nei campioni utilizzati. Come controllo positivo è stato invece utilizzato DNA genomico di *S. coelicolor* M145. Di seguito sono riportati i dettagli relativi alla preparazione dei campioni (i volumi riportati si riferiscono ai singoli volumi di reazione) e al programma utilizzato:

2X Power SYBR Green PCR Master Mix	25 µl
Primer Fw	1 µl
Primer Rv	1 µl
cDNA	10 µl (500 ng)
H ₂ O	13 µl
Totale	50 µl

	50°C	2'
Attivazione della AmpliTaq Gold Polymerase	95°C	10'
40 cicli	95°C	15''
	60°C	1'

Sono state utilizzate "MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate" (Applied Biosystems) e il "7300 Real-Time PCR System" (Applied Biosystems).

Infine, per validare i risultati dell'esperimento e verificare l'identità degli amplificati, è stata generata una curva di dissociazione tra 60°C e 98°C.

Dissociazione	95°C	15'
	60-98°C	30'
	98°C	15'

2.19 Preparazione dei campioni per osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM)

1. Prelevare dalla piastra di *S. coelicolor* M145 un tassello con superficie di circa 1 cm² e porlo su un vetrino porta-oggetto dentro una piastra Petri.
2. Fare 3 lavaggi con 1 ml di PBS (3 minuti ciascuno).
3. Fissare con 1 ml di glutaraldeide 4% per 5-10 minuti in gentile agitazione a temperatura ambiente.
4. Rimuovere la glutaraldeide e lavare con etanolo 15% per 3 minuti.
5. Essiccare il campione a 65°C fino ad ottenere uno strato sottile.

I campioni sono stati ricoperti d'oro tramite polverizzazione catodica (*sputtering*) utilizzando uno "Sputtering Scancoat Six" (Edwards) e successivamente sono stati osservati utilizzando un "Phenom ProX" (PhenomWorld). Tali osservazioni sono state eseguite presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale, Aerospaziale, dei Materiali (DICAM) dell'Università degli Studi di Palermo.

2.20 Determinazione delle curve di crescita in colture liquide di *S. coelicolor* M145

4*10⁸ spore di *S. coelicolor* M145 pIJ8600 e *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM sono state inoculate in 25 ml di JM in una beuta con setti da 250 ml e incubate a 30°C e 200 rpm per 30 ore. Dopo avere centrifugato la coltura a 3000 g per 15', sono stati effettuati due lavaggi con H₂O sterile e il micelio è stato risospeso in 50 ml di H₂O sterile. 3 ml di questa sospensione sono stati inoculati in 200 ml di MM in una beuta con setti da 1 l e la coltura è stata incubata a 30°C e 200 rpm per 4 giorni. Ogni 12 ore sono state prelevate 3 aliquote da 1 ml ciascuna per la determinazione del peso secco e 5 ml per la misurazione del pH. Per la misurazione del peso secco, i campioni sono stati centrifugati a 13000 g per 20 minuti, i *pellet* decantati e incubati a 65°C per 24 h e infine pesati.

2.21 Saggio della produzione di actinorodina

Il protocollo riportato da Kieser *et al.* (2000) è stato eseguito per valutare la produzione di actinorodina totale da parte di *S. coelicolor* M145 pIJ8600 e *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM. Il saggio è stato eseguito con aliquote prelevate da colture in MM e con colture su piastre di MM agarizzato (queste ultime sono state incubate *overnight* a -20°C prima di procedere col protocollo riportato di seguito).

1. Aggiungere KOH per ottenere la concentrazione finale 1N.

2. Centrifugare a 3000 g per 5 minuti.
3. Aliquotare 200 µl di supernatante in piastre *multi-well* da 96 pozzetti.
4. Misurare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 640 nm.

2.22 Saggio della produzione di undecilprodigosina

Il saggio per valutare la produzione di undecilprodigosina (Kieser *et al.*, 2000) da parte di *S. coelicolor* M145 pIJ8600 e *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM è stato sempre eseguito dopo avere estratto l'actinorodina totale (vedi sezione 2.21).

1. Lavare il *pellet* con Tris-HCl pH 7,5 1 M.
2. Centrifugare a 4000 g per 10 minuti.
3. Ripetere i primi due passaggi.
4. Decantare il *pellet* e aggiungere una soluzione di HCl 0,5 M in metanolo (20 ml nel caso di colture su terreno solido e 5 ml per quelle in terreno liquido).
5. Centrifugare a 4000 g per 10 minuti.
6. Aliquotare 200 µl di supernatante in piastre *multi-well* da 96 pozzetti.
7. Misurare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 530 nm.

2.23 Estrazione di proteine da *S. coelicolor* M145 cresciuto su terreno solido

$1,5 \cdot 10^7$ spore di *S. coelicolor* M145 pIJ8600 e *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM sono state spatolate su piastre di MM su cui era stato posto un disco di *cellophane* ("Cellophane Membrane Backing", Bio-rad) sterile. Le piastre sono state incubate a 30°C per 7 giorni e, dopo avere raccolto il micelio, è stato applicato il protocollo adattato da Puglia *et al.* (1995):

1. Lavare il micelio con 1 ml di Wash Solution.
2. Centrifugare a 3000 g per 10' a 4°C.
3. Decantare il *pellet* e ripetere altre 2 volte i primi due passaggi.
4. Risospendere il *pellet* in 1 ml di Wash Solution condizionata con SDS 3% (w/v).
5. Sonicare in ghiaccio 4 volte per 10'' (*output control* 4, intervallando gli impulsi con 10'' di pausa).
6. Incubare a 100°C per 5'.
7. Aggiungere 500 µl di DNasi e RNasi (le concentrazioni finali sono rispettivamente di 100 e 50 µg/ml) in Wash Solution e incubare in ghiaccio per 15'.
8. Centrifugare a 12000 g per 15' a 4°C.

9. Dializzare il supernatante con tubi di cellulosa aventi *cut-off* di 3,5 kDa contro H₂O purificata e deionizzata a 4°C *overnight*.
10. Recuperare la soluzione di proteine e precipitare aggiungendo 3 volumi di acetone.
11. Incubare a -20°C *overnight*.
12. Centrifugare a 13000 g per 20' a 4°C.
13. Decantare il *pellet* e asciugare tramite l'utilizzo di *speed-vacuum* per 25'.
14. Risospendere il *pellet* in DIGE Buffer pH 8,4 (non pipettare e non utilizzare il *vortex*).

Wash Solution:

Tris-HCl pH 7,5 10 mM

EDTA 5 mM

PMSF 0,5 mM

DTT 1mM

Benzamidina 4 µg/ml

Leupeptina 5 µg/ml

Pepstatina 7 µg/ml

DIGE Buffer pH 8,4:

Urea 7 M

Tiourea 2 M

Tris 30 mM

CHAPS 4% (w/v)

2.24 Saggio di Bradford

La concentrazione dei campioni proteici è stata determinata utilizzando il “Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit” (Thermo Scientific) e costruendo una curva di taratura con soluzioni di albumina sierica bovina (BSA).

2.25 Analisi proteomica 2D-DIGE

Per identificare i *pathway* metabolici influenzati dall'espressione di *trpM* in *S. coelicolor* M145 è stata eseguita un'analisi proteomica 2D-DIGE accoppiata a spettrometria di massa. A tale scopo l'analisi ha confrontato i proteomi di *S. coelicolor* M145 pIJ8600/*trpM* e di *S. coelicolor* M145 pIJ8600. L'esperimento è stato condotto con 3 replicati biologici e 2 replicati tecnici per ognuno dei due ceppi.

2.25.1 Marcatura delle proteine con CyDye

Le proteine estratte dal micelio di *S. coelicolor* M145 pIJ8600 e *S. coelicolor* M145 pIJ8600/*trpM* sono state diluite in DIGE Buffer per avere una concentrazione di 5 µg/µl in un volume finale di 50 µl. 10 µl di ogni campione proteico sono stati uniti per avere una *mix* di tutti i campioni da utilizzare come *standard* interno. 2 aliquote da 10 µl di ogni campione proteico e 10 µl dello *standard* interno sono stati marcati incubandoli 1 h in ghiaccio con 0,5 µl di Cy3, Cy5 e Cy2 (“Amersham CyDye DIGE Fluors Minimal Dyes for 2D DIGE”, GE Healthcare), precedentemente ricostituiti con dimetilformammide (DMF), rispettivamente. La marcatura è stata bloccata aggiungendo 0,5 µl di una soluzione di L-lisina 10 mM e incubando ulteriormente per 10' in ghiaccio. Infine, i campioni marcati sono stati uniti seguendo lo schema riportato sotto:

	Cy3	Cy5	Cy2
1	<i>S. coelicolor</i> pIJ8600 #1	<i>S. coelicolor</i> pIJ8600/ <i>trpM</i> #1	<i>Standard</i> interno
2	<i>S. coelicolor</i> pIJ8600 #2	<i>S. coelicolor</i> pIJ8600/ <i>trpM</i> #2	<i>Standard</i> interno
3	<i>S. coelicolor</i> pIJ8600 #3	<i>S. coelicolor</i> pIJ8600/ <i>trpM</i> #3	<i>Standard</i> interno
4	<i>S. coelicolor</i> pIJ8600/ <i>trpM</i> #1	<i>S. coelicolor</i> pIJ8600 #2	<i>Standard</i> interno
5	<i>S. coelicolor</i> pIJ8600/ <i>trpM</i> #2	<i>S. coelicolor</i> pIJ8600 #3	<i>Standard</i> interno
6	<i>S. coelicolor</i> pIJ8600/ <i>trpM</i> #3	<i>S. coelicolor</i> pIJ8600 #1	<i>Standard</i> interno

La marcatura delle proteine è stata eseguita al buio a causa della fotosensibilità dei fluorofori.

2.25.2 Isoelettrofocalizzazione (IEF)

307 µl di “DeStreak Rehydration Solution” (GE Healthcare), completato con DTT 20 mM, e 2,3 µl di “IPG-Buffer, pH 3-10 NL” (GE Healthcare), sono stati aggiunti ai campioni proteici marcati con i fluorofori. I campioni così completati sono stati posti sul fondo di sarcofagi in ceramica (Amersham) e su di essi sono state posizionate le “Immobiline DryStrip pH 3-10 NL, 18 cm” (GE Healthcare). Dopo avere pipettato l'olio minerale

(utilizzato per evitare l'evaporazione del campione proteico) sulla superficie della *strip* non a contatto con le proteine, i sarcofagi sono stati chiusi e posti all'interno del "Ettan IPGphor 3 IEF System" (GE Healthcare). Per la separazione delle proteine secondo il proprio pI è stato eseguito il programma seguente, impostando l'intensità di corrente a 40 mA/*strip* e la temperatura a 20°C:

FASE	VOLTAGGIO	TEMPO	TIPO DI VOLTAGGIO
Reidratazione	/	1 h	/
1	30 V	10 h	Step
2	200 V	1 h	Step
3	300 V	30'	Step
4	3500 V	3 h	Gradiente
5	3500 V	1 h	Step
6	8000 V	30'	Gradiente
7	8000 V	8 h	Step

2.25.3 SDS-PAGE bidimensionale

Prima di procedere con la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare, le *strip* sono state incubate con Equilibration Buffer contenente DTE 2% (w/v) per 10' (per ridurre i legami disolfuro) e successivamente con Equilibration Buffer contenente iodoacetamide 2,5% (w/v) per altri 10' (per metilare i gruppi tiolici).

Per la preparazione di 6 gel di poliacrilammide al 12,5% (w/v) è stato utilizzato un "Ettan DALTsix Large Vertical System" (GE Healthcare) e i seguenti reagenti:

Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution	188 ml
Tris-HCl pH 8,8 1,5 M	113 ml
H ₂ O	140 ml
SDS 10% (w/v)	4,5 ml
Ammonio persolfato (APS) 10% (w/v)	4,5 ml
Temed	62 µl
Totale	450 ml

Il tampone di corsa ha la seguente composizione (è riportata la ricetta per la preparazione di una soluzione *stock* 10X):

Tris	250 mM
Glicina	1,92 M
SDS	1% (w/v)

La camera elettroforetica inferiore è stata riempita con tampone di corsa 1X, mentre quella superiore con tampone di corsa 2X. La corsa elettroforetica è avvenuta a 10°C, 40 mA/gel e 110 V per circa 17 h.

Equilibration Buffer:

Urea 6 M

Glicerolo 30% (v/v)

SDS 2% (w/v)

Tris-HCl pH 6,8 50 mM

2.25.4 Acquisizione delle mappe proteomiche

Le mappe proteomiche sono state acquisite con un “Typhoon FLA 9500” (GE Healthcare), impostando i *pixel* a 100 μm e i tempi di esposizione a 0,650 (Cy2) 0,680 (Cy3) e 0,550 (Cy5) secondi/*pixel*.

2.25.5 Colorazione delle mappe proteomiche con AgNO_3

Il seguente protocollo (Shevchenko *et al.*, 1996) è stato utilizzato per marcare le *spot* proteiche sulle mappe bidimensionali prima di procedere alla raccolta manuale delle *spot* corrispondenti a proteine differenzialmente abbondanti (identificate successivamente tramite spettrometria di massa).

1. Lavare il gel con acqua deionizzata su un agitatore orbitale per 5’.
2. Incubare il gel con 250 ml di soluzione di fissaggio contenente metanolo, acido acetico ed acqua deionizzata (in rapporto 40:10:50) in agitatore orbitale per 30’.
3. Lavare 4 volte con acqua deionizzata per 45’.

4. Sensibilizzare il gel con una soluzione di tiosolfato di sodio 0,08% (w/v) per 5'.
5. Lavare 2 volte con acqua deionizzata per 1'.
6. Incubare il gel con una soluzione di AgNO₃ 0,4% (w/v) per 1 h a 4 °C.
7. Sviluppare con una soluzione di formaldeide 0,04% (v/v) e di carbonato di sodio 2% (w/v).
8. Fermare lo sviluppo aggiungendo acido acetico 1% (v/v).
9. Conservare il gel in acido acetico 1% (v/v) a 4°C.

2.25.6 Analisi con *software* ImageMaster

Il *software* “ImageMaster 2D Platinum 7.0 DIGE” (GE Healthcare) è stato utilizzato per l’analisi differenziale delle mappe proteomiche bidimensionali. Le *spot* sono state rilevate automaticamente e il *match* tra le *spot* corrispondenti nei 6 gel è stato eseguito dal *software* dopo avere segnato manualmente almeno 50 punti di riferimento (“ancore”) nelle mappe. Questi punti di riferimento sono stati scelti dall’operatore utilizzando come riferimento le mappe delle proteine marcate con Cy2 (*standard* interno). L’analisi quantitativa ha permesso di calcolare il volume di ogni *spot* come funzione integrale della densità ottica sull’area (il volume è stato espresso come volume percentuale della somma dei volumi di tutte le *spot* presenti nel gel). Questo valore è stato quindi normalizzato sull’intensità delle *spot* dello *standard* interno.

Dopo avere creato la cartella delle classi con le mappe acquisite, è stata eseguita l’analisi quantitativa differenziale per determinare la variazione dell’abbondanza delle specie proteiche nelle due condizioni studiate (*S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpm vs *S. coelicolor* M145 pIJ8600). Sono state considerate differenzialmente abbondanti le *spot* proteiche con una variazione del volume percentuale $\geq 1,3$ e $p < 0,05$ (ANOVA).

2.25.7 Identificazione delle proteine differenzialmente abbondanti mediante spettrometria di massa

L’identificazione delle proteine differenzialmente abbondanti è stata condotta presso il Laboratorio di Proteomica e Spettrometria di Massa dell’Istituto per il Sistema Produzione Animale in Ambiente Mediterraneo (ISPAAM) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) (Napoli).

Le *spot* proteiche di interesse sono state escisse dai gel, alchilate, digerite con tripsina ed identificate mediante spettrometria di massa (Gallo *et al.*, 2010a; Gallo *et al.*, 2010b). Le

miscele peptidiche sono state trattate con “ μ ZipTipC₁₈” (Millipore) usando una soluzione di acetonitrile 50% (v/v) e acido formico 5% (v/v) come eluente prima dell'analisi nLC-ESI-LIT-MS/MS. La digestione mediante tripsina è stata analizzata utilizzando uno spettrometro di massa “LTQ XL” (Thermo) dotato di una sorgente di nanotrasmissione Proxeon collegata ad un “EASY-nLC” (Thermo). Le miscele peptidiche sono state separate mediante una colonna “Easy C₁₈” (Thermo). Le fasi mobili sono state acido formico acquoso 0.1% (v/v) e acido formico in acetonitrile 0,1% (v/v), con portata totale di 300 nL/min. Il gradiente lineare è stato avviato 20' dopo il caricamento del campione. Il solvente B è passato dal 5% al 35% in 15' e dal 35% al 95% in 2'. Gli spettri sono stati acquisiti in un *range* m/z 400-1800. L'acquisizione è stata controllata da una procedura di scansione di ioni valutando i dati sui tre ioni più abbondanti, consentendo l'esclusione dinamica (conteggio ripetuto 1 e durata di esclusione 1'). La finestra di isolamento di massa e l'energia di collisione sono stati impostati rispettivamente a m/z 3 ed al 35%.

La versione 2.2.06 del motore di ricerca “Mascot” (Matrix Science) è stata utilizzata per identificare le *spot* proteiche dal *database* NCBI contenente anche sequenze proteiche di *S. coelicolor* M145, utilizzando dati nLC-ESI-LIT-MS/MS. La ricerca nel *database* è stata eseguita scegliendo la tripsina come enzima proteolitico, con un valore massimo di mancato taglio di 2, la carbamidometilazione di cisteina come modificazione fissa e l'ossidazione di metionina come modificazione variabile. I candidati con almeno 2 peptidi assegnati con un punteggio individuale MASCOT > 25, entrambi aventi $p < 0,05$, sono stati ulteriormente valutati confrontandoli con i valori di peso molecolare e pI sperimentali ricavati dalle mappe proteomiche bidimensionali.

I risultati dell'identificazione sono stati usati per eseguire uno studio di *Gene Ontology*. I *pathway* metabolici sono stati ricostruiti utilizzando i *database* di proteine “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (KEGG) e “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST).

2.26 Analisi dei metaboliti prodotti

Le colture di *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM e *S. coelicolor* M145 pIJ8600 utilizzate per l'estrazione dei metaboliti sono state preparate come descritto nella sezione 2.23. I profili metabolici sono stati determinati tramite LC-MS/MS in modalità *multiple reaction monitoring* (MRM) accoppiata ad un protocollo di precipitazione delle proteine ed estrazione dei metaboliti utilizzando solventi organici. Sia l'estrazione dei metaboliti che la loro

identificazione sono state eseguite dal Centro di Ingegneria Genetica (CEINGE) – Biotecnologie avanzate (Napoli).

100 mg di biomassa sono stati risospesi in 250 µl di una soluzione contenente NH₄CO₃ 10 mM, NaF 10 mM, urea 7M, NaCl 75 mM e omogeneizzati. I lisati cellulari sono stati diluiti di un fattore 5 in una soluzione di acetonitrile/metanolo (50:50) contenente acido acetico 0,1% (v/v). La sospensione è stata quindi sonicata per 10' e centrifugata a 12000 g per 10' a 4°C. I supernatanti sono stati essiccati e risospesi in 500 µl di una soluzione di acetonitrile/metanolo/acqua milliQ (40:40:20) contenente acido acetico 0,1% (v/v). Dopo avere centrifugato a 12000 g per 10', i supernatanti sono stati filtrati con filtri centrifughi aventi pori di 0,22 µm e analizzati tramite LC-MS/MS.

L'analisi quantitativa è stata eseguita con una calibrazione esterna: le soluzioni standard di triptofano, arginina, acido glutammico, uracile e glucosio-6-fosfato sono state preparate solubilizzando 1 mg di analita in 1 ml di una soluzione di acetonitrile 5% (v/v), mentre la soluzione *stock* di undecilprodigiosina è stata disciolta in una soluzione di acetonitrile 50% (v/v). Le soluzioni ottenute (1000 ppm) sono state diluite (50 ppb, 100 ppb, 250 ppb, 500 ppb, 1000 ppb and 10 ppm nel caso di triptofano, arginina, acido glutammico, uracile e glucosio-6-fosfato, e 0,25 ppb nel caso dell'undecilprodigiosina) e utilizzate per generare curve di calibrazione.

1 µl di campione è stato analizzato con un "6420 Triple Quadrupole System" e un "HPLC 1100 Series Binary Pump" (Agilent). Gli analiti sono stati separati utilizzando una "Kinetex 5µm C18 Analytical Column 100 mm x 2.1 mm" (Phenomenex). La fase mobile è stata generata miscelando l'eluente A (acido acetico 0,1% v/v, ammonio acetato 3 mM) e l'eluente B (acetonitrile, 2-propanolo, acido acetico 0,1% v/v). La velocità del flusso è stata 0,3 ml/minuto e il gradiente di eluizione è variato da 5% a 95% di B in 7'.

L'analisi MS/MS è stata eseguita utilizzando una sorgente *turbo ion spray* operante in modalità negativa e la modalità MRM è stata usata per gli analiti selezionati.

Le concentrazioni riportate nella Tabella 2 (sezione 3.6) derivano da misure effettuate con due repliche biologiche e tre repliche tecniche per entrambi i ceppi di *S. coelicolor* M145 studiati.

2.27 Over-espressione di PepA in *E. coli* BL21-AI

1. Inoculare 4 ml di LB con ampicillina con 10 μ l di *stock* in glicerolo di *E. coli* BL21 AI pRSET-B/pepA ed incubare a 37°C e 200 rpm *overnight*.
2. Diluire la coltura cresciuta *overnight* 1:20 in 50 ml di LB con ampicillina e incubare a 37°C e 200 rpm fino ad ottenere OD₆₀₀=0,8.
3. Aggiungere una soluzione di L-arabinosio (sterilizzata per filtrazione) per ottenere una concentrazione finale dello 0,1%.
4. Incubare a 30°C e 200 rpm per 3 h.
5. Centrifugare la coltura a 4000 g per 10' e decantare il *pellet*.
6. Conservare il *pellet* a -20°C o utilizzarlo direttamente per l'estrazione delle proteine.

Come controlli negativi dell'*over*-espressione di PepA sono stati utilizzati sia *E. coli* BL21 AI pRSET-B (*empty vector*) sia aliquote delle colture prelevate prima di aggiungere l'L-arabinosio (colture non indotte).

2.28 Estrazione di proteine da *E. coli* BL21-AI

1. Risospendere il *pellet* in 2 mL di Lysis Buffer e sonicare in ghiaccio con 3 impulsi da 10'' ciascuno (*output control* 4, intervallando gli impulsi con 10'' di pausa).
2. Prelevare un'aliquota del lisato totale da utilizzare per l'SDS-PAGE.
3. Centrifugare a 7000 g per 30' a 4°C.
4. Trasferire il supernatante in un nuovo tubo ed utilizzarlo direttamente per l'SDS-PAGE e per il saggio dell'attività leucil-amminopeptidasi.
5. Risospendere il *pellet* in 1 ml di Lysis Buffer ed utilizzarlo direttamente per l'SDS-PAGE.

Lysis Buffer:

NaCl 100 mM

Tris-HCl 25 mM

Benzamidina 0,1 mM

PMSF 0,1 mM

2.29 SDS-PAGE delle proteine estratte da *E. coli* BL21-AI

Le SDS-PAGE sono state eseguite utilizzando il “Mini-PROTEAN Tetra Cell System” (Bio-Rad) e vetrini con spaziatori da 0,75 mm integrati. I gel (con *resolving gel* al 12% w/v di poliacrilammide), il tampone di corsa e quello di caricamento sono stati preparati come riportato da Sambrook *et al.* (2001). Il “SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard” (Invitrogen) è stato utilizzato come marcatore dei pesi molecolari.

I gel di poliacrilammide sono stati colorati utilizzando il colorante “SimplyBlue SafeStain” (Invitrogen) e applicando il protocollo fornito dal produttore.

2.30 Analisi *western blot* delle proteine estratte da *E. coli* BL21-AI

Per l’analisi *western blot* sono stati utilizzati il “Mini Trans-Blot Cell” (Bio-Rad), la “Immun-Blot PVDF Membrane” (Bio-Rad), il “Anti-His G-AP Antibody” (Invitrogen) e il “BCIP/NBT Kit” (Invitrogen).

Tutte le soluzioni utilizzate per il *western blot* sono state preparate come descritto da Sambrook *et al.* (2001).

2.31 Saggio di attività leucil-amminopeptidasica

Per verificare che la frazione solubile del lisato cellulare di *E. coli* BL21 AI pRSET-B/pepA contenesse enzimi con attività di leucil-amminopeptidasi (LAP), è stato applicato il saggio descritto da Kuo *et al.* (2003): come fonte di cationi bivalenti sono stati utilizzati sia il CoCl₂ che il MnCl₂. Il saggio utilizza la L-Leucina-*p*-nitroanilide (L-Leu-*p*-NA) come substrato, che in presenza di LAP è idrolizzata in L-Leu e *p*-nitroanilina. La frazione solubile del lisato cellulare di *E. coli* BL21 AI pRSET-B è stata utilizzata come controllo negativo per dimostrare che l’attività enzimatica osservata fosse dovuta proprio a PepA. Di seguito sono riportate le concentrazioni finali dei reagenti contenuti nella *mix* di reazione (il volume finale è stato 500 µl) e il protocollo per l’esecuzione del saggio:

L-Leu- <i>p</i> -NA	0,25 mM
CoCl ₂ oppure MnCl ₂	1 mM
Proteine	400 µg
Tris-HCl pH 8	50 mM

1. Incubare la *mix* di reazione a 60°C per 10'.
2. Aggiungere un volume di acido acetico 10% (v/v).
3. Incubare a 100°C per 5'.
4. Centrifugare a 13000 g per 5' a 4°C.
5. Incubare in ghiaccio fino all'utilizzo.
6. Aliquotare 200 µl di supernatante in piastre *multi-well* da 96 pozzetti.
7. Misurare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 405 nm.

3. Risultati

3.1 Costruzione del ceppo *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM

Per studiare il ruolo del gene *trpM* nel differenziamento morfo-fisiologico di *S. coelicolor* M145, è stato costruito un ceppo *knock-in* in cui una copia del gene è stata inserita nel sito Φ C31 *attB* presente nel cromosoma. A tale scopo, *trpM* è stato amplificato tramite PCR utilizzando *primer* che hanno permesso di inserire i siti di restrizione *NdeI* e *BamHI* alle estremità, e il prodotto di PCR è stato quindi inserito nel sito di clonaggio multiplo del vettore di espressione pIJ8600. Quest'ultimo è stato scelto sia perché può essere trasferito in *S. coelicolor* attraverso coniugazione interspecifica con *E. coli*, grazie alla presenza dell'origine di trasferimento *oriT*, sia perché è un vettore integrativo (Figura 9).

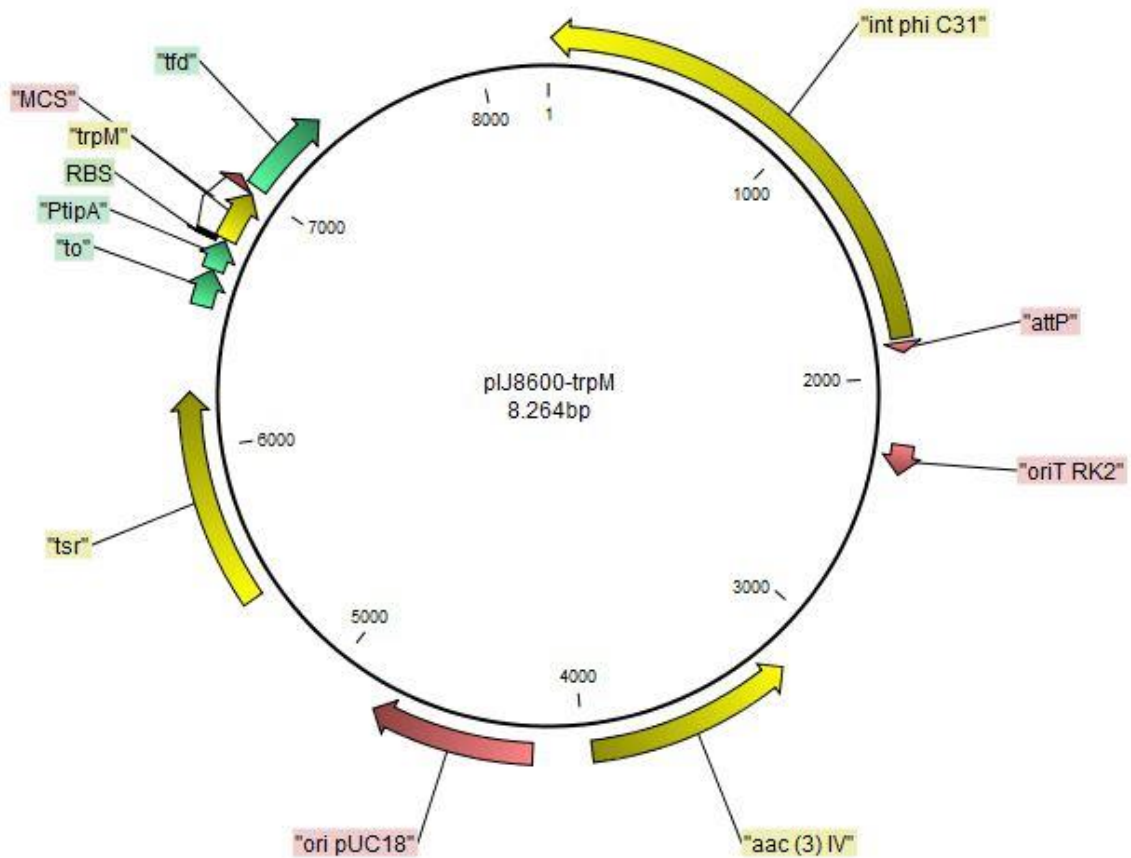


Figura 9: Mappa del plasmide pIJ8600/trpM. *int phi C31*: gene codificante l'integrasi del fago Φ C31; *attP* sito riconosciuto dall'integrasi; *oriT RK2*: origine di trasferimento; *aac(3)IV*: cassetta di resistenza all'apramicina; *ori pUC18*: origine di replicazione in *E. coli*; *tsr*: cassetta di resistenza al tiostreptone; *to*: terminatore della trascrizione del fago *to*; *PtipA*: promotore del gene *tipA* di *S. coelicolor*; *RBS*: sequenza di Shine-Dalgarno; *trpM*: SCO2038 di *S. coelicolor*; *MCS*: sito di clonaggio multiplo; *tfd*: terminatore della trascrizione del fago *fd*.

In particolare, l'integrazione del plasmide nel cromosoma di *S. coelicolor* avviene grazie alla presenza, nel pIJ8600, del gene codificante l'integrasi del fago Φ C31 e la sequenza *attP* (Raush *et al.*, 1991): infatti questa integrasi catalizza la ricombinazione della sequenza *attB*, presente nel genoma dell'ospite, e la sequenza *attP* (Combes *et al.*, 2002).

La costruzione del ceppo *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM, ottenuto tramite coniugazione interspecifica tra *S. coelicolor* M145 e *E. coli* S17-1, è stata verificata attraverso PCR e sequenziamento di regioni *target* del plasmide integrato nel genoma e analisi Southern blot. Lo stesso processo di *screening* è stato eseguito sul ceppo *S. coelicolor* M145 pIJ8600, utilizzato come controllo durante gli esperimenti successivi (Figura 10 e Figura 11).

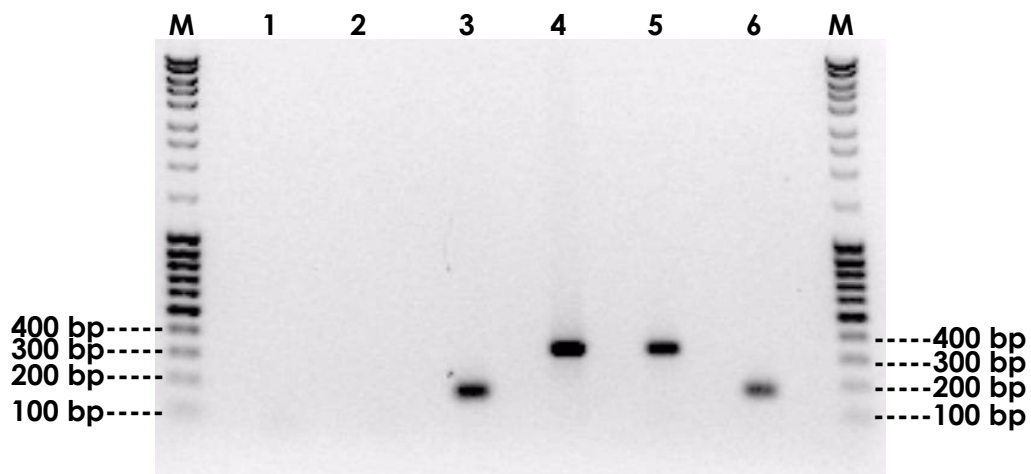


Figura 10: Analisi PCR di *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM e *S. coelicolor* M145 pIJ8600 dopo amplificazione della regione comprendente il MCS del pIJ8600. Di seguito è riportato, per ogni campione, il DNA utilizzato come stampo. M: MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Scientific); 1: Controllo negativo della PCR; 2: DNA genomico di *S. coelicolor* M145; 3: Miniprep di *E. coli* TOP10 pIJ8600; 4: Miniprep di *E. coli* TOP10 pIJ8600/trpM; 5: DNA genomico di *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM; 6: DNA genomico di *S. coelicolor* M145 pIJ8600. La grandezza prevista dei prodotti di PCR è 170 bp nel caso del pIJ8600 e 332 bp nel caso del pIJ8600/trpM.

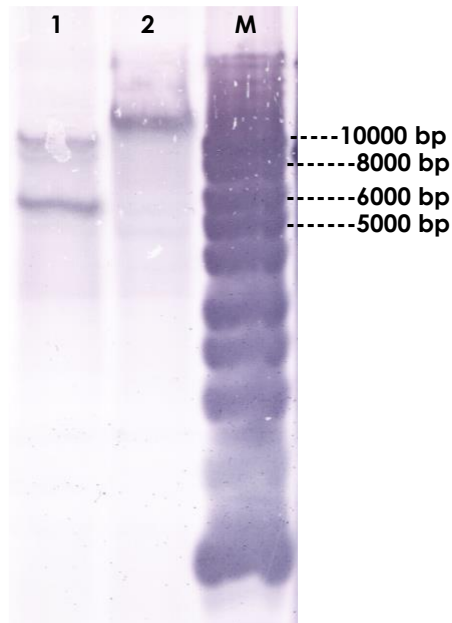


Figura 11: Analisi Southern blot. 1: *S. coelicolor* M145 pIJ8600; 2: *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM; M: MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Scientific). Il DNA dei ceppi è stato digerito con l'enzima di restrizione *Bam*HI e ibridato con il frammento di restrizione *Sty*I-*Sty*I di 1480 bp del pIJ8600. La grandezza prevista per le bande di ibridazione è 5228 bp e 9995 bp per *S. coelicolor* M145 pIJ8600 (1); 5228 bp e 10157 bp per *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM (2).

3.2 Espressione della smORF *trpM* in *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM

Esperimenti di qRT-PCR relativa sono stati condotti per verificare l'espressione di *trpM* nel ceppo *knock-in*. Come mostrato in Figura 12, nel ceppo *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM l'espressione del gene *trpM* è stata maggiore rispetto a *S. coelicolor* M145 pIJ8600 anche in assenza dell'induttore (tiostreptone) nel terreno di coltura (Figura 12).

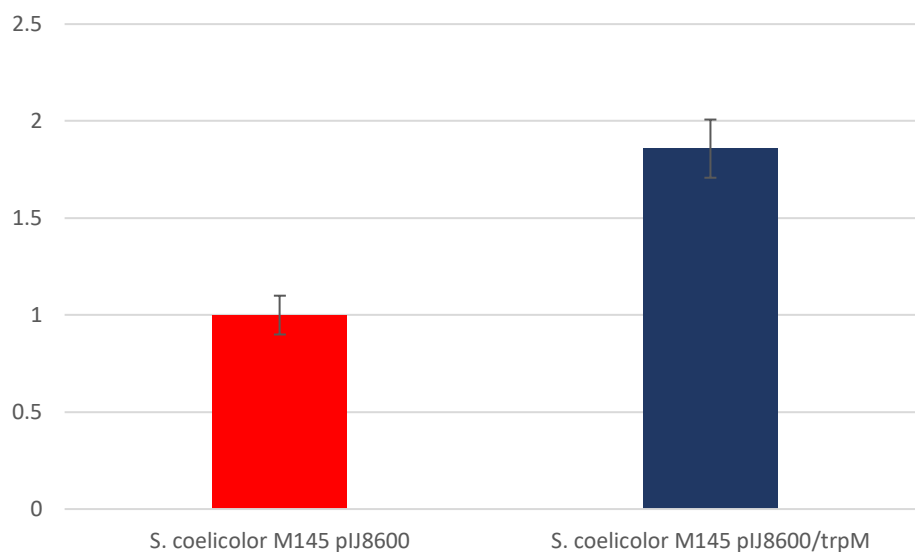


Figura 12: Espressione relativa del gene *trpM* nei ceppi *S. coelicolor* M145 pIJ8600 e *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM.

Questi dati hanno mostrato che il plasmide pIJ8600/trpM si è integrato nel cromosoma del ceppo *knock-in* e che il gene *trpM* si è espresso.

3.3 Cinetica di crescita del ceppo *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM

A livello fenotipico, *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM ha mostrato una cinetica di crescita più rapida rispetto al ceppo controllo, sia quando coltivato su terreno solido che in terreno liquido. Infatti, osservazioni eseguite con un microscopio elettronico a scansione (SEM) hanno rivelato che il ceppo *knock-in* mostra, già dopo 24 ore di crescita su terreno minimo solido, un micelio vegetativo più sviluppato rispetto al controllo (Figura 13).

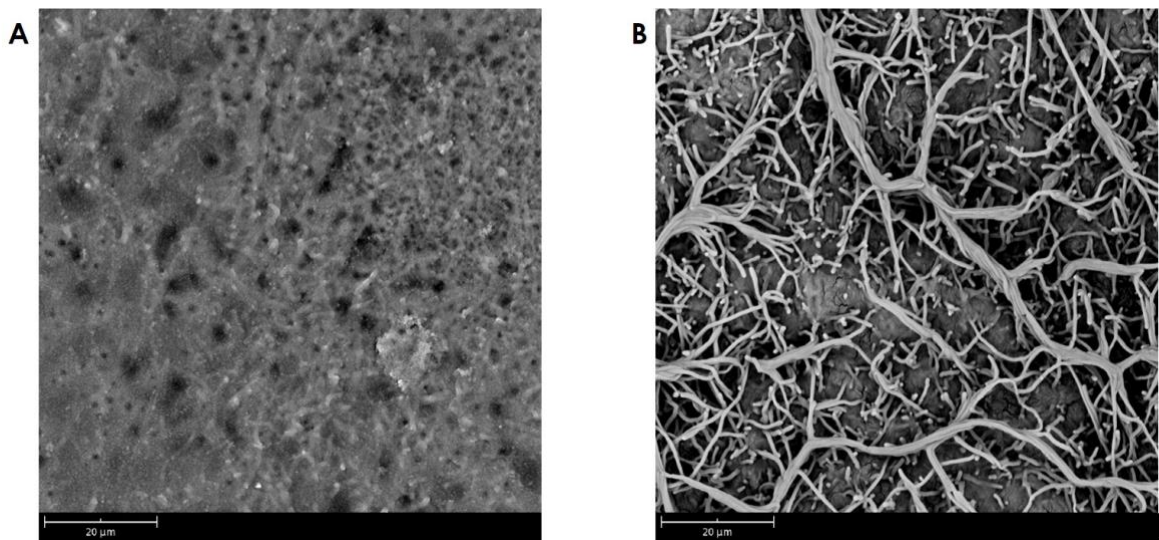


Figura 13: Immagini SEM di *S. coelicolor* M145 pIJ8600 (A) e *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM (B) dopo 24 ore di crescita su terreno solido MM.

Nonostante il ceppo *knock-in* abbia mostrato una crescita più rapida, alla fine della crescita, la produzione di spore è stata paragonabile tra i due ceppi (Figura 14), suggerendo che l'espressione del gene influenzi la velocità di crescita delle ife e quindi del differenziamento morfo-fisiologico.

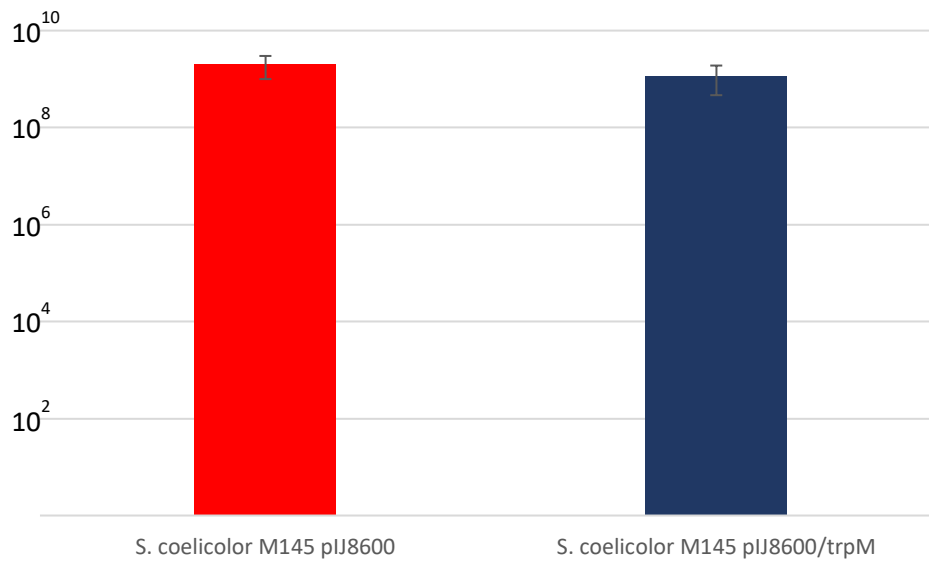


Figura 14: Numero di spore prodotte da *S. coelicolor* M145 pIJ8600 e *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM cresciuti su terreno MM solido per 7 giorni.

In coltura liquida, *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM ha prodotto più biomassa rispetto a *S. coelicolor* M145 pIJ8600 e, in questo caso, anche il diverso andamento del pH durante la crescita ha suggerito che i due ceppi avessero un utilizzo differente dei nutrienti (Figura 15).

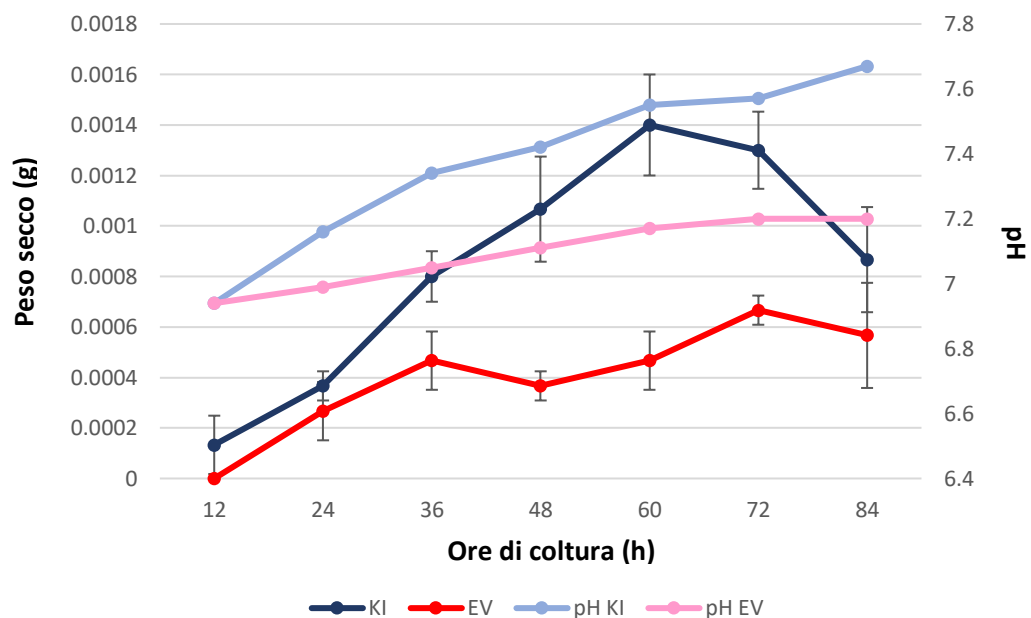


Figura 15: Curva di crescita e andamento del pH in *S. coelicolor* pIJ8600/trpM (KI) e in *S. coelicolor* M145 pIJ8600 (EV).

3.4 Produzione di actinorodina ed undecilprodigosina

L'espressione del gene *trpM* nel ceppo *knock-in* ha influenzato positivamente la produzione dell'antibiotico actinorodina: infatti è stato riscontrato un aumento, rispetto al ceppo controllo, da 2 a 4 volte circa della produzione di ACT sia in colture su terreno solido che in terreno liquido (Figura 16).

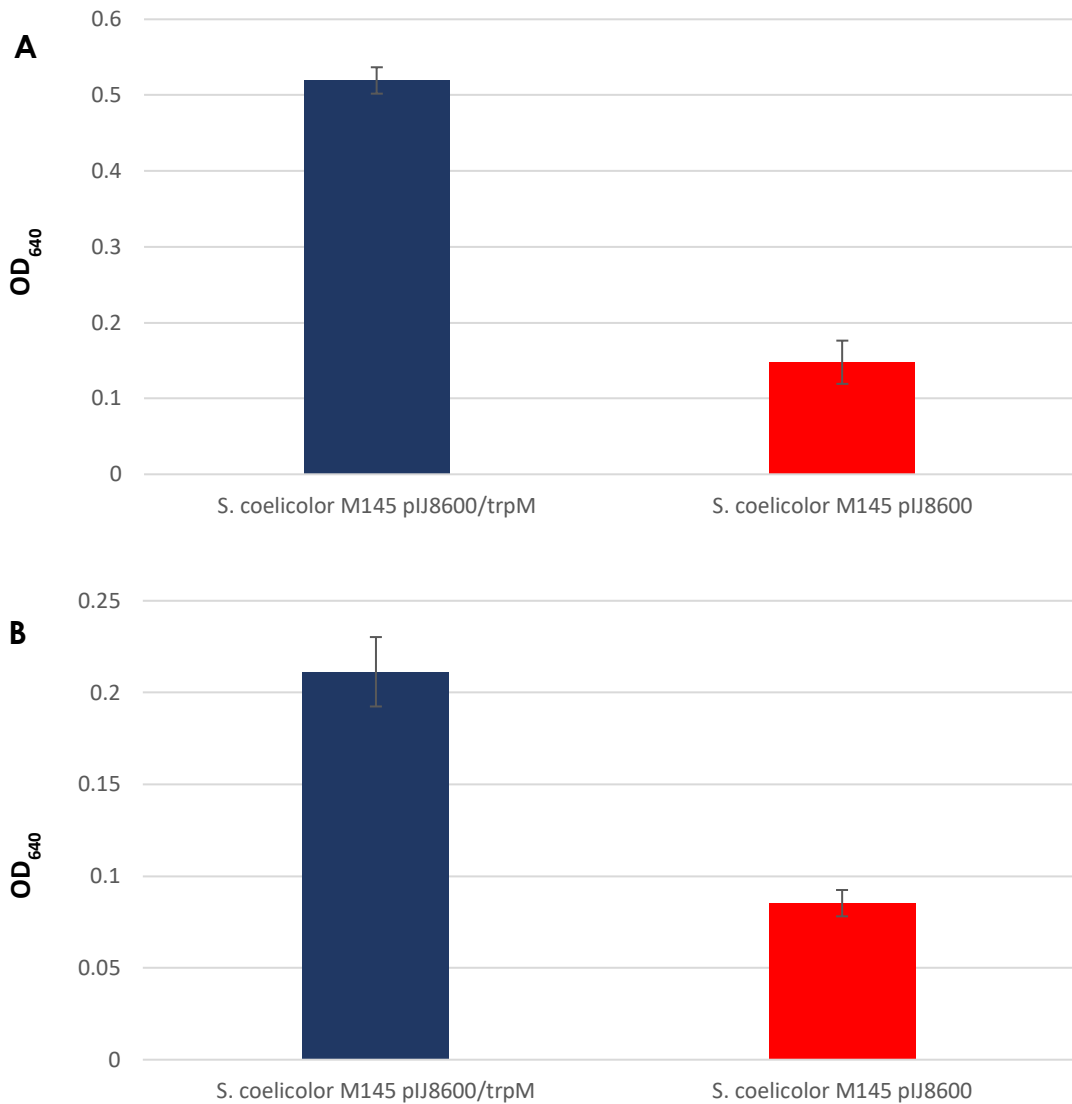


Figura 16: Actinorodina prodotta da *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM in terreno MM liquido (A) e su terreno MM solido (B).

Al contrario, la produzione dell'antibiotico undecilprodigosina non è stata influenzata dall'*over*-espressione di *trpM* (Figura 17).

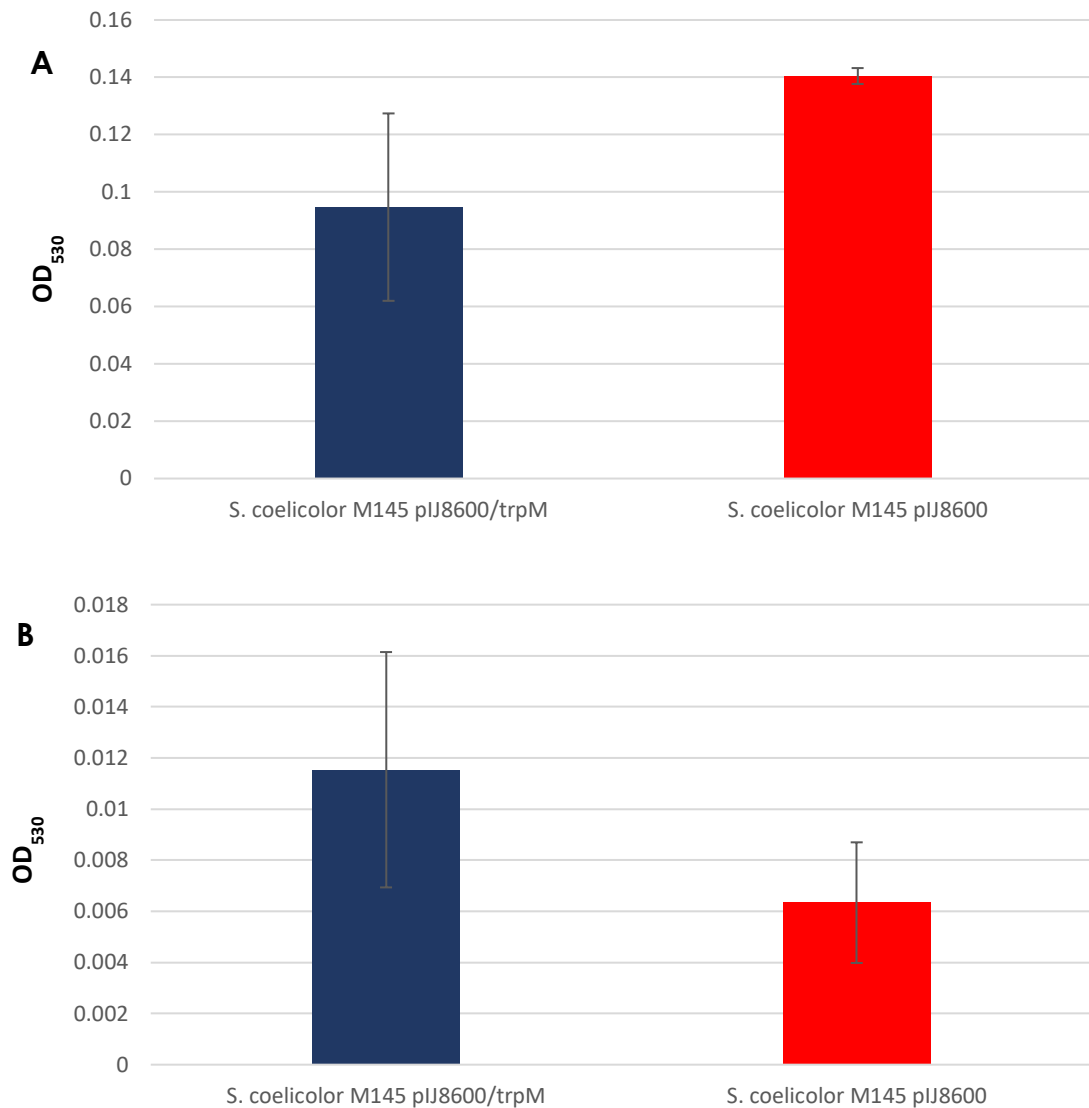


Figura 17: Undecilprodigiosina prodotta da *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM in terreno MM liquido (A) e su terreno MM solido (B).

3.5 Analisi proteomica 2D-DIGE di *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM

Per capire quali fossero i *pathway* metabolici influenzati dall'*over*-espressione di *trpM*, è stata eseguita un'analisi proteomica 2D-DIGE, accoppiata a spettrometria di massa, di *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM. Questa analisi ha evidenziato la presenza di 40 proteine differenzialmente abbondanti (Figura 18).

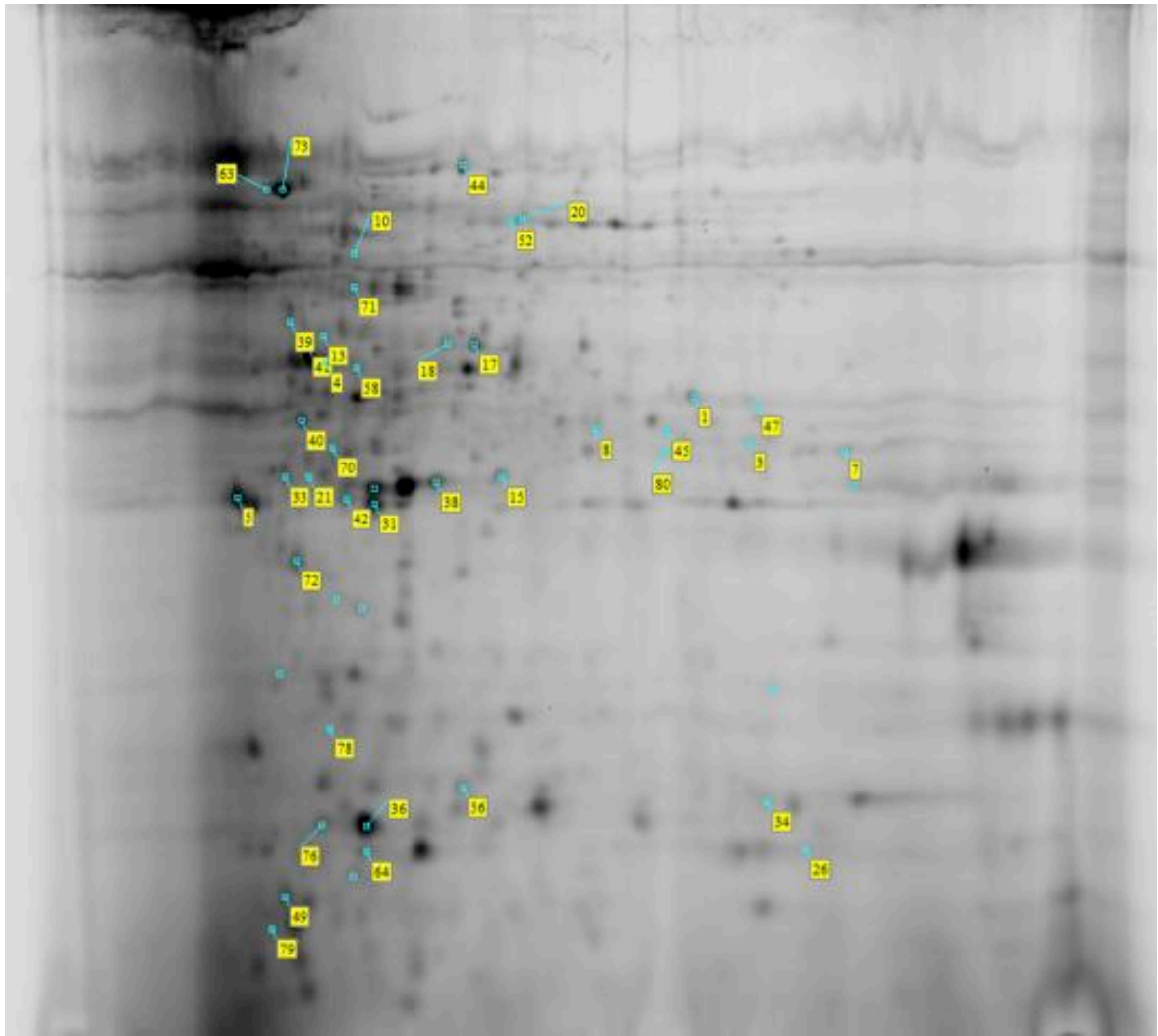


Figura 18: Mappa proteomica ricavata da analisi 2D-DIGE. Nell'immagine sono indicate le proteine differenzialmente abbondanti in *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM rispetto a *S. coelicolor* M145 pIJ8600.

In particolare, di queste specie proteiche, 23 sono più rappresentate nel ceppo *knock-in* rispetto al ceppo *S. coelicolor* M145 pIJ8600 utilizzato come controllo, mentre le restanti 17 sono meno abbondanti (Tabella 1). In ordine di abbondanza decrescente, queste proteine differenziali appartengono alle seguenti classi: traduzione (27%), metabolismo del carbonio (15%), *folding-sorting*-degradazione delle proteine (12%), ossidoriduzione (8%), altro (8%), metabolismo energetico (7%), metabolismo di cofattori e vitamine (7%), metabolismo degli amminoacidi (5%), crescita e morte cellulare (3%), trascrizione (3%), replicazione e riparazione del DNA (3%), metabolismo nucleotidico (2%) (Figura 19).

Spot	UniProt accession number	Descrizione	Punteggio Mascot	Peso molecolare teorico (Da)	pI teorico	Abbondanza relativa	SCO	KEGG	KEGG Orthology
52	AMPA_STRCO	Probable cytosol aminopeptidase	147	52022	5,45	-1,31	SCO2179	K01255	Metabolismo degli aminoacidi
20	GLYA_SALTO	Serine hydroxymethyltransferase	102	51057	5,83	-1,3	SCO4837	K00600	
71	G3P_STRCO	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	499	36417	5,24	-1,32	SCO1947	K00134	Metabolismo del carbonio
18	ALF_STRCO	Fructose-bisphosphate aldolase	349	37018	5,42	-1,52	SCO3649	K01624	
17	ALF_STRCO	Fructose-bisphosphate aldolase	735	37018	5,42	-1,61	SCO3649	K01624	
45	GPMA_STRCO	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	224	28319	6,08	-1,37	SCO4209	K01834	
13	MDH_STRCO	Malate dehydrogenase	356	34679	5	-1,54	SCO4827	K00024	
10	FUMC_STRCO	Fumarate hydratase class II	96	49038	5,3	2,14	SCO5042	K01679	
72	CLPP1_STRCO	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 1	401	23215	5,54	1,7	SCO2619	K01358	Crescita e morte cellulare
1	FOLD_STRCO	Bifunctional protein FOLD	258	30000	5,91	4,61	SCO4824	K01491	Metabolismo energetico
44	ATPA_RICB8	ATP synthase subunit alpha	164	56616	5,57	1,35	SCO5371	K02111	
36	ATPE_STRCO	ATP synthase epsilon chain	204	13010	5,28	1,9	SCO5374	K02114	
40	PSB_STRCO	Proteasome subunit beta	771	30067	4,92	1,75	SCO1644	K03433	Folding, sorting e degradazione
63	CH602_STRCO	60 kDa chaperonin 2	1124	56795	4,79	1,35	SCO4296	K04077	
73	CH602_STRCO	60 kDa chaperonin 2	2043	56795	4,79	1,52	SCO4296	K04077	
39	CH602_STRCO	60 kDa chaperonin 2	783	56795	4,79	2,33	SCO4296	K04077	
33	CH602_STRCO	60 kDa chaperonin 2	633	56795	4,79	1,63	SCO4296	K04077	
41	PDXS_STRCO	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS	560	32296	5,15	-1,83	SCO1523	K06215	Metabolismo di cofattori e vitamine
4	PDXS_STRCO	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS	520	32296	5,15	-2,23	SCO1523	K06215	
58	PDXS_STRCO	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS	275	32296	5,15	-1,31	SCO1523	K06215	
21	UPP_STRCO	Uracil phosphoribosyltransferase	257	22908	5,28	2,05	SCO4041	K00761	Metabolismo nucleotidico
64	SAPA_STRCO	Spore-associated protein A	198	15860	8,34	1,45	SCO0409	NO KO	Altro
26	SAPA_STRCO	Spore-associated protein A	174	15860	8,34	-2,42	SCO0409	NO KO	
78	Y4636_STRCO	UPF0336 protein SCO4636	341	16142	4,93	-1,34	SCO4636	NO KO	

3	SODF_STRCO	Superoxide dismutase [Fe-Zn] 1	166	23513	5,15	2,08	SCO2633	K04564	Ossidoriduzione
42	SODF_STRCO	Superoxide dismutase [Fe-Zn] 1	207	23513	5,15	-1,47	SCO2633	K04564	
31	SODF_STRCO	Superoxide dismutase [Fe-Zn] 1	456	23513	5,15	-1,69	SCO2633	K04564	
34	SSB2_STRCO	Single-stranded DNA-binding protein 2	136	19952	5,27	1,77	SCO3907	K03111	Replicazione e riparazione del DNA
79	CSPF_STRCO	Cold shock protein ScoF	126	7174	4,7	-1,5	SCO0527	K03704	Trascrizione
15	RS4_STRCO	30S ribosomal protein S4	141	23654	10,15	1,82	SCO1505	K02986	Traduzione
49	RL35_STRCO	50S ribosomal protein L35	127	7018	11,67	-1,59	SCO1599	K02916	
70	RL3_STRCO	50S ribosomal protein L3	173	22812	10,2	1,47	SCO4702	K02906	
80	RL3_STRCO	50S ribosomal protein L3	227	22812	10,2	-1,27	SCO4702	K02906	
7	RL3_STRCO	50S ribosomal protein L3	170	22812	10,2	2,53	SCO4702	K02906	
38	RL4_STRCO	50S ribosomal protein L4	143	23629	10,03	1,46	SCO4703	K02926	
76	RS17_STRCO	30S ribosomal protein S17	131	10714	9,91	1,53	SCO4711	K02961	
56	RL24_STRCO	50S ribosomal protein L24	186	11583	10,05	1,3	SCO4713	K02895	
5	RS9_STRCO	30S ribosomal protein S9	248	18688	9,24	1,61	SCO4735	K02996	
47	RS2_STRCO	30S ribosomal protein S2	176	33602	5,17	1,32	SCO5624	K02967	
8	RS2_STRCO	30S ribosomal protein S2	133	33602	5,17	1,96	SCO5624	K02967	

Tabella 1: Proteine differenzialmente abbondanti identificate tramite 2D-DIGE accoppiata a LC-MS/MS. Nella colonna dell'abbondanza relativa è riportata la variazione delle proteine di *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM rispetto a *S. coelicolor* M145 pIJ8600. Nella tabella sono elencati solo le proteine la cui abbondanza relativa è almeno 1,3 in valore assoluto.

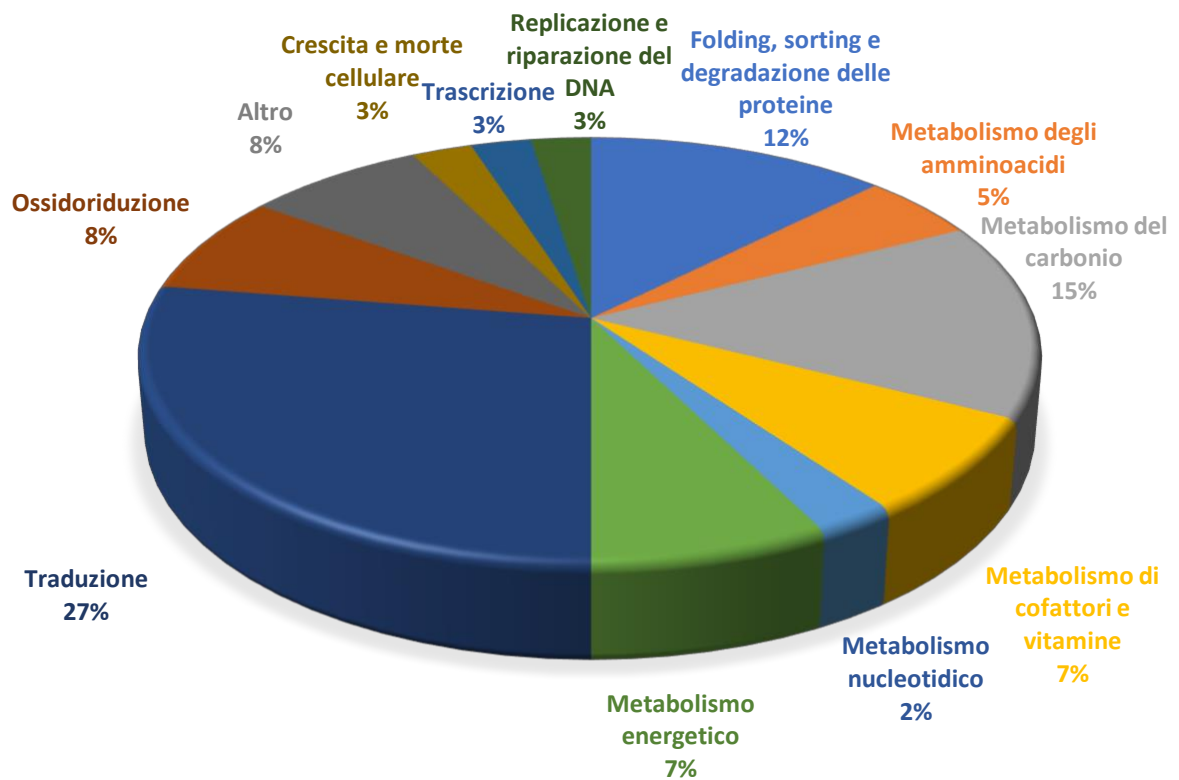


Figura 19: Abbondanza delle classi di proteine differenzialmente abbondanti in *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM rispetto a *S. coelicolor* M145 pIJ8600.

L'*over*-espressione di *trpM* ha un effetto positivo sulla crescita di *S. coelicolor*. Infatti, è stata osservata una maggiore abbondanza nel ceppo *knock-in* di proteine coinvolte nella sintesi proteica (i.e. proteine appartenenti alle classi (i) traduzione e (ii) *folding-sorting-degradazione*), nella sintesi di DNA (i.e. proteine appartenenti alle classi (i) crescita e morte cellulare, (ii) metabolismo nucleotidico e (iii) replicazione e riparazione del DNA) e nel metabolismo energetico (Figura 20).

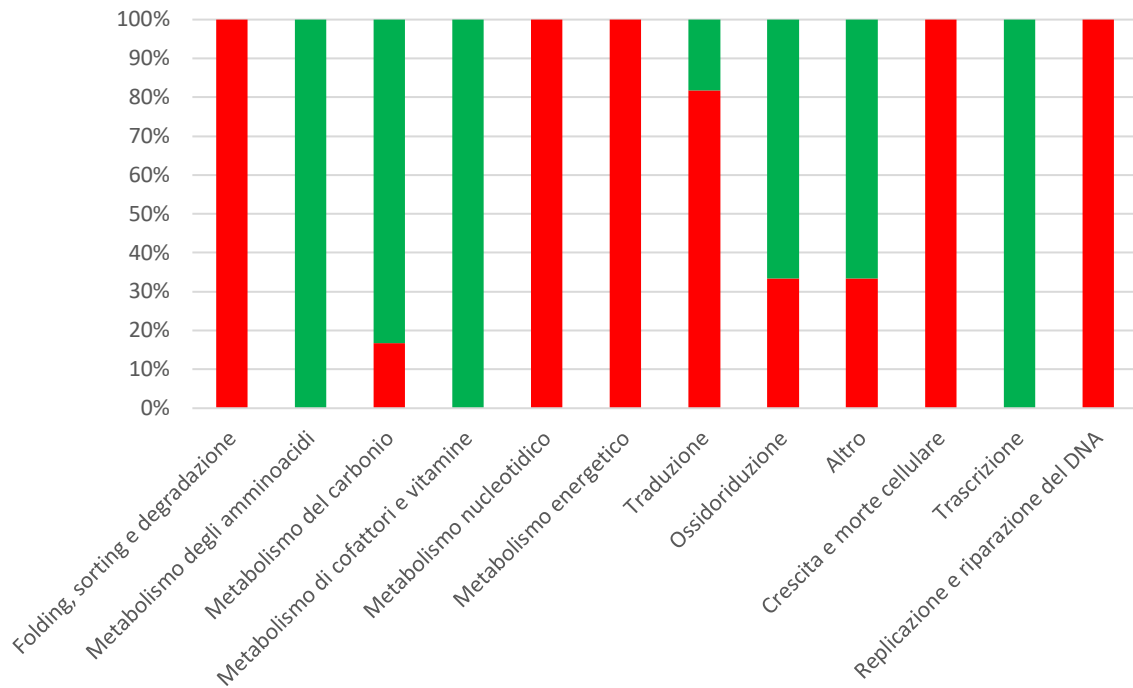


Figura 20: Distribuzione delle proteine differenzialmente abbondanti in *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM rispetto a *S. coelicolor* M145 pIJ8600. In rosso sono indicate quelle più abbondanti, mentre in verde quelle meno abbondanti.

Un'analisi più approfondita delle proteine differenziali coinvolte nel metabolismo del carbonio (la maggior parte delle quali sono meno abbondanti nel ceppo *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM rispetto al controllo) avvalorava questa ipotesi ed è coerente coi risultati riportati. In particolare, la *down*-regolazione di enzimi glicolitici causa un accumulo di precursori, quali il fruttosio-6-fosfato (fruttosio-6P) e il glicerato-3-fosfato (glicerato-3P), con conseguente spostamento dell'equilibrio chimico verso la sintesi di composti necessari per la sintesi di nucleotidi, quali il ribosio-5-fosfato (ribosio-5P) e il fosforibosilpirofosfato (PRPP) (Figura 21).

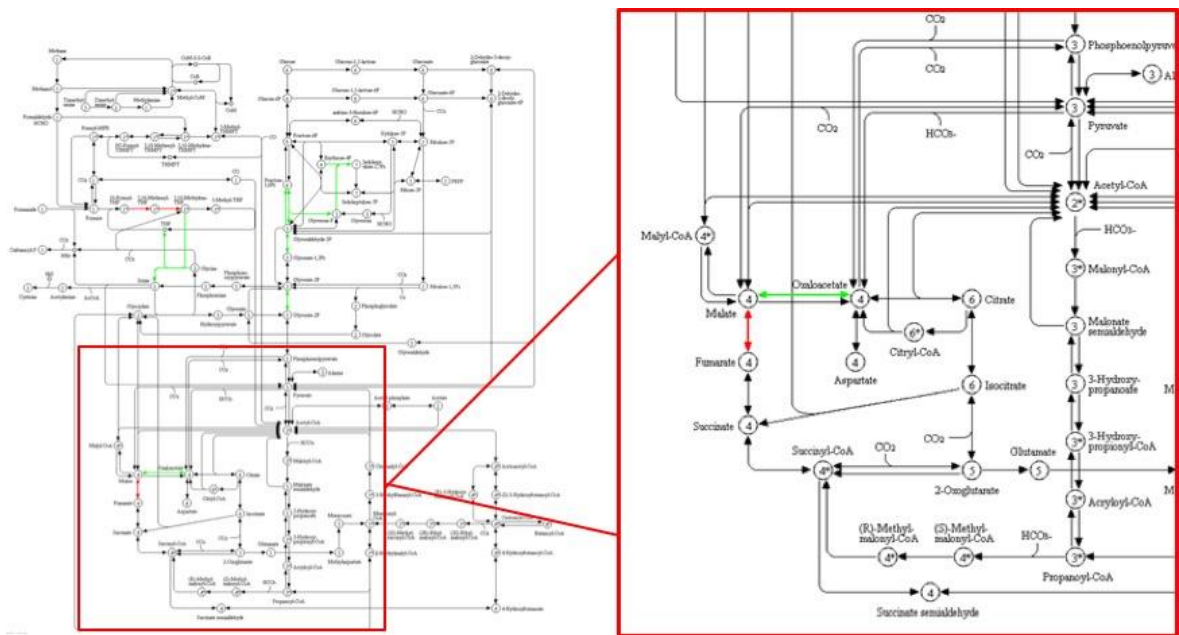


Figura 22: Metabolismo del carbonio con zoom sul ciclo di Krebs. Le frecce rosse e verdi indicano rispettivamente reazioni catalizzate da enzimi *up*-regolati e *down*-regolati in *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM rispetto a *S. coelicolor* M145 pIJ8600.

3.6 Analisi dei metaboliti prodotti da *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM

Per corroborare i risultati dell'analisi proteomica è stata eseguita un'analisi quantitativa dei metaboliti estratti da *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM e *S. coelicolor* M145 pIJ8600. I risultati hanno evidenziato che tra i metaboliti differenzialmente abbondanti (con un'abbondanza relativa $\geq 1,2$ volte in valore assoluto) nel ceppo *knock-in* rispetto al controllo ci sono amminoacidi (tirosina, arginina, fenilalanina, istidina, acido glutammico, glutammina, acido aspartico, ornitina), prodotti intermedi sia della glicolisi che del ciclo di Krebs (glucosio-6-fosfato, fruttosio-6-fosfato, glucosammina-6-fosfato, 3-fosfoglicerato, 6-fosfogluconato, 2-ossoglutarato, malato, fumarato, ossalato, citrato, succinato) e composti coinvolti nel metabolismo nucleotidico (uracile, guanosina, inosina, GMP, AMP, UMP, CMP) (Tabella 2).

Questi risultati sono in ottima correlazione con quelli derivati dall'analisi proteomica, confermando, ad esempio, una *down*-regolazione del metabolismo del carbonio. È infatti interessante notare come la maggior parte dei metaboliti differenziali sia presente in concentrazioni minori nel ceppo *knock-in* rispetto al ceppo controllo. L'istidina e l'inosina rappresentano però un'eccezione a questo andamento generale. Questa osservazione è in accordo con i dati derivati dall'analisi proteomica, in particolare con il probabile accumulo di fosforibosilpirofosfato (PRPP) causato dalla minore abbondanza di enzimi glicolitici nel ceppo *knock-in*. Infatti, il PRPP è utilizzato direttamente per la sintesi sia dell'istidina che

delle purine e, inoltre, sembra essere coerente la maggiore concentrazione contemporanea dell'istidina e dell'inosina se si considera che le due vie anaboliche sono collegate tra loro anche attraverso la formazione dell'intermedio 5-amminoimidazolo-4-carbossamide ribonucleotide (AICAR). Quest'ultimo è un prodotto della sintesi di istidina che non prende parte agli ultimi due *step* biosintetici e che viene utilizzato come substrato per la sintesi di IMP (Vázquez-Salazar *et al.*, 2018).

Metaboliti	<i>S. coelicolor</i> M145 pIJ8600	<i>S. coelicolor</i> M145 pIJ8600/trpM	Abbondanza relativa
Tirosina	13,8	9,0	-1,53
Arginina	50,8	37,1	-1,37
Fenilalanina	624,5	360,2	-1,73
Istidina	<0,1	8,5	*
Acido glutammico	1264,1	925,1	-1,37
Glutamina	52,4	31,0	-1,69
Acido aspartico	37,9	11,7	-3,23
Ornitina	335,9	280,6	-1,20
Glucosio-6-fosfato	457,1	145,8	-3,13
Fruttosio-6-fosfato	151,3	90,5	-1,67
Glucosammina-6-fosfato	18,4	8,2	-2,26
3-fosfoglicerato	16,5	8,6	-1,91
6-fosfogluconato	48,9	26,5	-1,84
2-ossoglutarato	110,3	67,6	-1,63
Malato	3344,4	1763,0	-1,90
Fumarato	84,7	<0,1	*
Ossalato	53,6	<0,1	*
Citrato	19,5	14,3	-1,36
Succinato	2269,0	3904,9	1,72
Metil-malonato	3426,5	5814,7	1,70
Uracile	177,9	82,8	-2,15
Guanosina	4,7	3,5	-1,34
Inosina	75,4	154,0	2,04
GMP	2,3	<0,1	*
AMP	<0,1	1,0	*
UMP	9,9	2,9	-3,37
CMP	6,1	2,0	-2,97

Tabella 2: Metaboliti differenzialmente abbondanti identificati tramite LC-MS/MS. Nella tabella sono riportate le concentrazioni espresse in ppm. Nella colonna dell'abbondanza relativa è riportata la variazione dei metaboliti di *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM rispetto a *S. coelicolor* M145 pIJ8600. Nel caso dei metaboliti la cui abbondanza relativa è indicata con *, non è stato possibile determinare tale valore perché in uno dei due ceppi il composto non è stato rilevato (<0,1 ppm). Nella tabella sono elencati solo i metaboliti la cui abbondanza relativa è almeno 1,2 in valore assoluto.

3.7 Espressione del gene *pepA* in *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM

Dati precedenti (Palazzotto *et al.*, 2016) hanno dimostrato che TrpM interagisce *in vitro* con la proteina PepA (SCO2179), una leucil-amminopeptidasi (LAP) appartenente alla famiglia M17 delle metallo-proteasi.

L'analisi proteomica 2D-DIGE ha evidenziato che la proteina PepA è meno abbondante in *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM rispetto a *S. coelicolor* M145 pIJ8600 (Tabella 1). È stato quindi eseguito un esperimento di qRT-PCR relativa per confrontare l'espressione del gene *pepA* nei due ceppi. Come mostrato in Figura 23, *pepA* è espresso circa 2,5 volte in più nel ceppo *knock-in* rispetto al controllo. È quindi interessante notare come, nel caso di questo gene, a maggiori livelli di mRNA non corrisponda una maggiore abbondanza di proteina, suggerendo la presenza di meccanismi di regolazione post-trascrizionali e/o post-traduzionali.

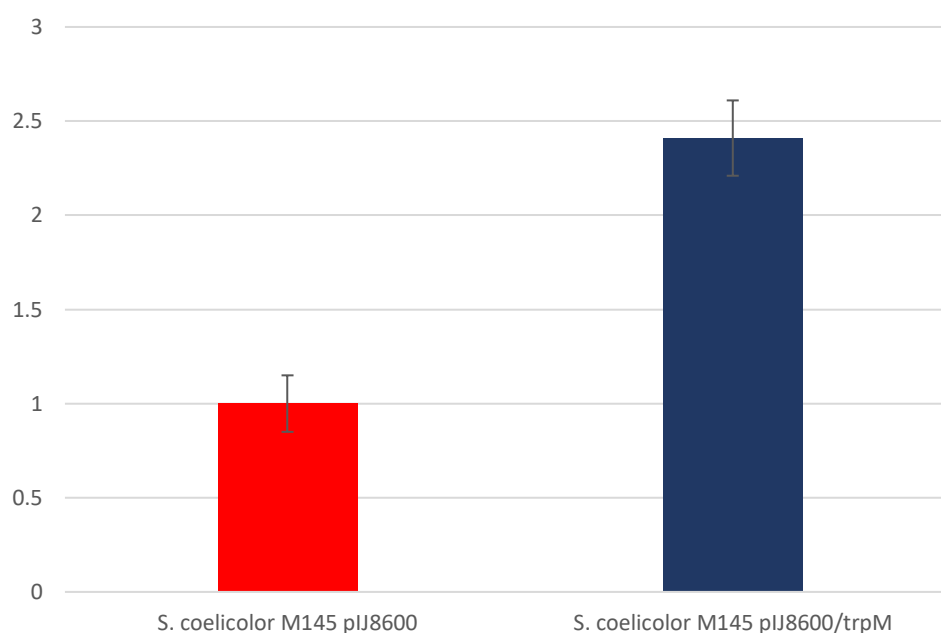


Figura 23: Espressione relativa del gene *pepA* nei ceppi *S. coelicolor* M145 pIJ8600 e *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM.

3.8 Over-espressione della proteina PepA in *E. coli* BL21-AI

Secondo dati presenti in letteratura (Song *et al.*, 2013), PepA non ha l'attività catalitica di LAP prevista attraverso omologia di sequenza e, inoltre, la sua delezione in *S. coelicolor* causa un aumento della produzione di spore e soprattutto di actinorodina. Per capire il ruolo funzionale dell'interazione tra TrpM e PepA, il gene *pepA* è stato clonato nel sito di clonaggio multiplo del vettore di espressione pRSET-B, dopo avere introdotto i siti di

restrizione *Bam*HI e *Hind*III tramite PCR, ed *over*-espresso in *E. coli* BL21-AI (Figura 24). Questo vettore di espressione ha permesso di ottenere la sintesi di PepA come proteina di fusione contenente un esamero di istidine (6xHis-tag) all'estremità N-terminale.

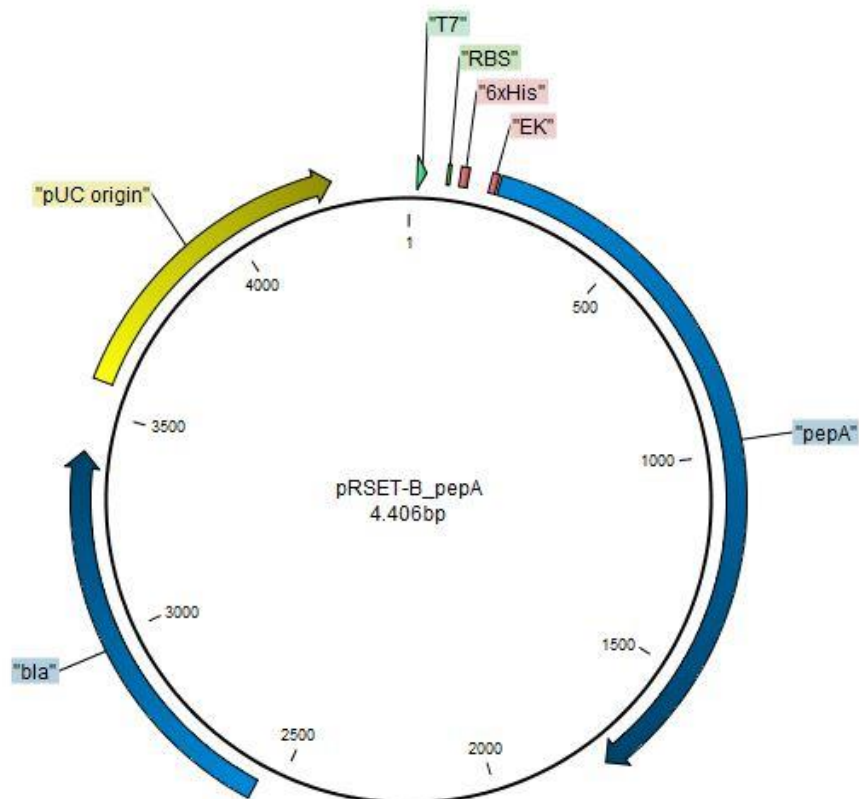


Figura 24: Mappa del plasmide pRSET-B/pepA. *T7*: promotore T7; *RBS*: sequenza di Shine-Dalgarno; *6xHis*: esamero di istidine; *pepA*: gene SCO2179 di *S. coelicolor* M145; *bla*: gene della resistenza all'ampicillina; *pUC origin*: origine di replicazione.

Nonostante l'ottimo esito dell'*over*-espressione, in seguito a lisi cellulare e separazione, per centrifugazione, della frazione solubile del lisato dai detriti cellulari, la maggior parte di PepA si è sempre accumulata nella frazione insolubile in tutti gli esperimenti condotti, probabilmente a causa della formazione di corpi di inclusione (Figura 25 e Figura 26). Di conseguenza, la resa di proteina purificata attraverso cromatografia per affinità con metallo immobilizzato (IMAC) dalla frazione solubile del lisato cellulare è stata trascurabile. Per questo motivo si è deciso di utilizzare il lisato cellulare crudo per verificare l'attività catalitica.

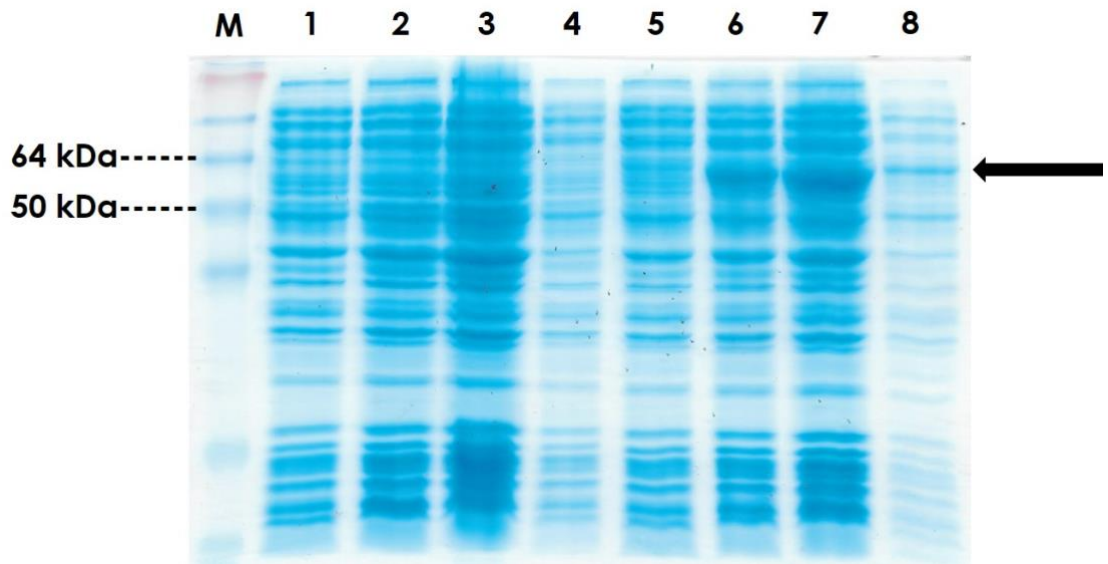


Figura 25: *Over*-espressione di PepA in *E. coli* BL21-AI. M: SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard (Invitrogen); 1: lisato totale di *E. coli* BL21-AI pRSET-B (prima dell'induzione); 2: lisato totale di *E. coli* BL21-AI pRSET-B (dopo l'induzione); 3: frazione insolubile del lisato totale di *E. coli* BL21-AI pRSET-B (dopo l'induzione); 4: frazione solubile del lisato totale di *E. coli* BL21-AI pRSET-B (dopo l'induzione); 5: lisato totale di *E. coli* BL21-AI pRSET-B/pepA (prima dell'induzione); 6: lisato totale di *E. coli* BL21-AI pRSET-B/pepA (dopo l'induzione); 7: frazione insolubile del lisato totale di *E. coli* BL21-AI pRSET-B/pepA (dopo l'induzione); 8: frazione solubile del lisato totale di *E. coli* BL21-AI pRSET-B/pepA (dopo l'induzione). La freccia indica la banda corrispondente a PepA, il cui peso molecolare teorico è 55 kDa.

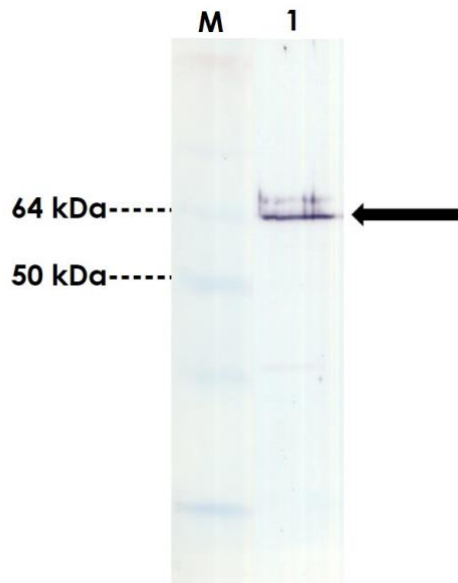


Figura 26: Analisi *western blot* di proteine estratte da *E. coli* BL21 AI pRSET-B/pepA utilizzando un anticorpo anti His-tag. M: SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard (Invitrogen); 1: frazione solubile del lisato totale di *E. coli* BL21-AI pRSET-B/pepA (dopo l'induzione). La freccia indica la banda corrispondente a PepA, il cui peso molecolare teorico è 55 kDa.

3.9 Attività aminopeptidasica di PepA

Per verificare l'attività catalitica di PepA è stato eseguito un saggio spettrofotometrico utilizzando la L-leucina-para-nitroanilide (L-Leu-*p*-NA), un substrato che viene idrolizzato in L-leucina (L-Leu) e para-nitroanilina (*p*-NA) dalle leucina-amminopeptidasi (Figura 27).

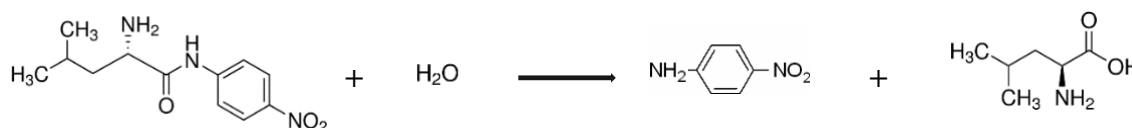


Figura 27: Idrolisi della L-Leu-*p*-NA in *p*-NA e L-Leu.

Considerato che non si potesse escludere la presenza di altri enzimi, propri di *E. coli* BL21-AI, con attività catalitica nei confronti di questo substrato, è stato utilizzato come controllo il lisato cellulare ricavato dal ceppo *E. coli* BL21-AI pRSET-B. In letteratura è riportato che la famiglia M17 delle metallo-proteasi utilizza due ioni Mn^{2+} come cofattori e, per tale motivo, il saggio è stato condotto sia in presenza di $MnCl_2$ che di $CoCl_2$: quest'ultimo sale è stato utilizzato per riprodurre l'esperimento descritto da Song *et al.* (2013). Questo esperimento ha rivelato come, effettivamente, in presenza di ioni Co^{2+} non sia riscontrabile l'attività catalitica di PepA, in accordo con quanto riportato da Song *et al.* (2013). Al contrario, la presenza di Mn^{2+} ha messo in evidenza che PepA possiede l'attività catalitica prevista (Figura 28).

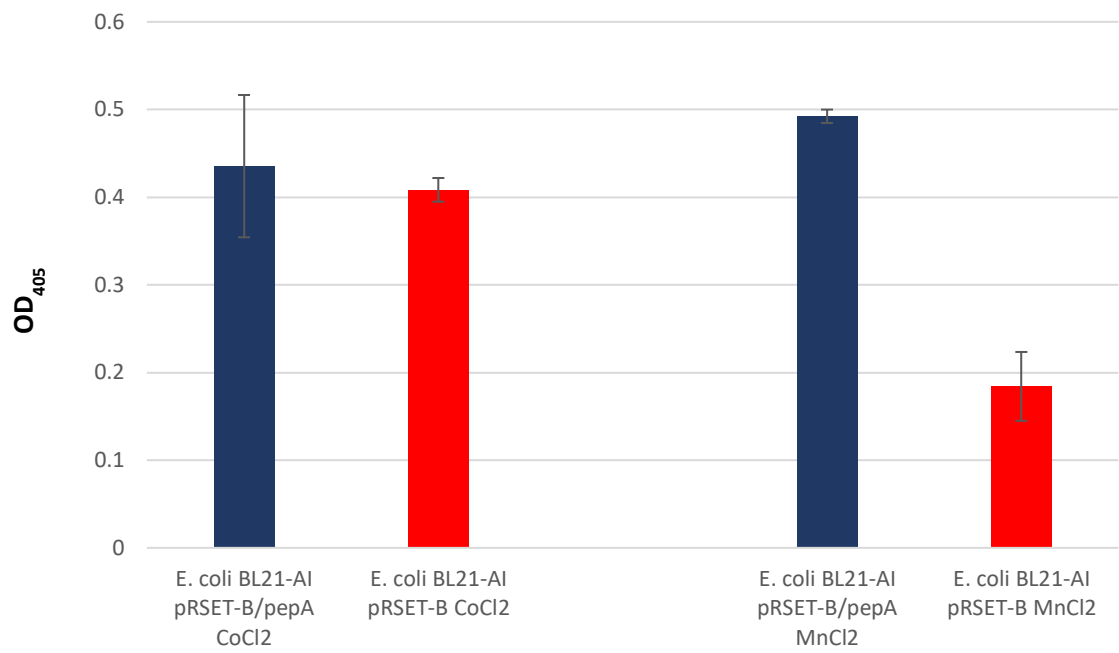


Figura 28: Attività delle leucina-amminopeptidasi utilizzando i lisati totali di *E. coli* BL21-AI pRSET-B/pepA ed *E. coli* BL21-AI pRSET-B in presenza di CoCl₂ e MnCl₂.

4. Discussione

In questo lavoro è stata descritta la costruzione di un ceppo *knock-in* del gene *trpM* di *S. coelicolor* M145. La corretta inserzione del plasmide pIJ8600/*trpM* nel genoma è stata verificata tramite PCR, sequenziamento e Southern *blot*, e l'espressione del gene inserito nel vettore di espressione è stata confermata tramite qRT-PCR.

Lo studio della cinetica di crescita di *S. coelicolor* M145 pIJ8600/*trpM* ha evidenziato che l'espressione di questa smORF stimola lo sviluppo morfo-fisiologico di *S. coelicolor* M145. Questo risulta evidente dal confronto sia delle fotografie SEM di colture su terreno solido sia dall'andamento della produzione di biomassa in terreno liquido: infatti il ceppo *knock-in* inizia a formare il micelio aereo almeno 24 ore prima rispetto al controllo ed è in grado di produrre circa il doppio di biomassa rispetto ad esso. È interessante notare però che la maggiore produzione di biomassa non è parallela ad una maggiore produzione di spore da parte del ceppo *knock-in*. Questa osservazione potrebbe essere dovuta ad una minore espressione del gene SCO0409 codificante per la *Spore-associated protein A* (SapA), come messo in evidenza dall'analisi 2D-DIGE. SapA infatti, insieme a SapB, è espressa nel micelio aereo maturo ed è localizzata sulla superficie delle spore di *S. coelicolor* M145 (Guijarro *et al.*, 1988; Willey *et al.*, 1991).

È stata anche analizzata la produzione dei due antibiotici più studiati di *S. coelicolor* M145, l'actinorodina e l'undecilprodigiosina. Il ceppo *knock-in* di *trpM* produce da 2 a 4 volte più actinorodina rispetto al controllo. Questo dato è in ottima correlazione con risultati riportati in precedenza riguardanti un ceppo *knock-out* di *trpM* (Palazzotto *et al.*, 2016), in cui l'inattivazione del gene causa una drammatica diminuzione della produzione di actinorodina. L'effetto dell'espressione di *trpM* sul *pathway* biosintetico dell'actinorodina potrebbe essere indiretto, attraverso la regolazione della disponibilità dei precursori. A conferma di questa ipotesi, i risultati dell'analisi 2D-DIGE hanno evidenziato che, tra le proteine coinvolte nel metabolismo del carbonio, SCO4827 e SCO5042 sono rispettivamente meno e più abbondante nel ceppo *knock-in* rispetto al controllo: entrambe sono coinvolte nel ciclo degli acidi tricarbossilici e sono rispettivamente una malato-deidrogenasi e una fumarato-idratasi. I loro profili di abbondanza suggeriscono che nel sistema studiato ci sia un accumulo di acetil-CoA e malonil-CoA che sono utilizzati come substrato per la sintesi appunto di actinorodina (Revill *et al.*, 1995; Hopwood 1997; Rawlings 1999). La produzione di undecilprodigiosina non è stata invece influenzata dall'espressione di *trpM*: questo risultato suggerisce che TrpM agisca, almeno indirettamente, in modo specifico sul *pathway*

biosintetico dell'actinorodina e che non abbia un effetto pleiotropico nella produzione di altri metaboliti secondari.

L'identificazione e la classificazione funzionale delle proteine differenzialmente abbondanti ha evidenziato che in *S. coelicolor* M145 pIJ8600/trpM si ha soprattutto una maggiore presenza di proteine coinvolte nella sintesi proteica. In particolare, sono più espresse sia proteine ribosomali sia chaperonine. Tra quest'ultime, non sorprende che sia anche presente SCO4296 (GroEL2), che è nota per essere coinvolta nel metabolismo della fase stazionaria, nel differenziamento morfo-fisiologico e nella produzione di metaboliti secondari quali l'actinorodina (Kim *et al.*, 2008).

Oltre alle proteine coinvolte nella sintesi proteica, la maggiore abbondanza, nel ceppo *knock-in*, di proteine implicate nel metabolismo nucleotidico e nella replicazione e riparazione del DNA conferma le osservazioni dirette del micelio tramite SEM e l'andamento della produzione di biomassa in colture liquide. Infatti questi risultati corroborano l'ipotesi che l'espressione di TrpM induca una maggiore proliferazione cellulare e un'accelerazione del differenziamento morfo-fisiologico di *S. coelicolor* M145.

Come riportato da Palazzotto *et al.* (2016), TrpM interagisce *in vitro* con PepA: l'analisi proteomica 2D-DIGE ha permesso di dimostrare che nel ceppo *knock-in* questa proteina è meno abbondante, nonostante la trascrizione del gene *pepA* sia maggiore rispetto al controllo. Questi andamenti opposti suggeriscono che esistano dei meccanismi di regolazione post-trascrizionale e/o post-traduzionale che influenzano la presenza di PepA nella cellula: a tale proposito, sarebbe interessante chiarire se questa regolazione è mediata proprio dall'interazione con TrpM.

In questo lavoro il gene *pepA* è stato clonato in un vettore di espressione e *over*-espresso in *E. coli*. La proteina ottenuta è stata utilizzata per verificare l'attività di PepA. Smentendo risultati precedenti (Song *et al.*, 2013), è stato dimostrato per la prima volta che la proteina è realmente un enzima e questa conferma apre nuovi scenari e fa sorgere nuovi quesiti sul ruolo funzionale dell'interazione con TrpM: sarà fondamentale capire se questa interazione ha un effetto positivo o negativo sull'attività catalitica. Nel primo caso, TrpM potrebbe influenzare il metabolismo di *S. coelicolor* M145 regolando direttamente l'apporto di amminoacidi, ottenuti attraverso la degradazione delle proteine ad opera di PepA; nel secondo caso, TrpM potrebbe inibire l'attività aminopeptidasica di PepA oppure potrebbe persino indurre la degradazione in seguito alla formazione del complesso proteico. Questa seconda ipotesi rappresenterebbe un possibile meccanismo di regolazione post-traduzionale

che giustificerebbe i livelli divergenti di mRNA e proteina osservati in questo lavoro. L'interazione con TrpM, oltre ad influenzare o meno l'attività di PepA, potrebbe avere un ruolo ben più cruciale per la normale progressione del ciclo vitale di *S. coelicolor*. Infatti, nei batteri, il differenziamento può essere controllato attraverso la degradazione selettiva di proteine regolatrici da parte di proteasi, che generalmente sono proteasi ATP-dipendenti (Gottesman *et al.*, 1992; Baker *et al.*, 2006). In *S. coelicolor* sono state identificate le proteasi ClpP (serina-proteasi ATP-dipendenti) che hanno un ruolo nel differenziamento di *Streptomyces* e la cui inattivazione causa sia la comparsa di un fenotipo *bald* (assenza o formazione aberrante del micelio aereo) che la mancata produzione di antibiotici pigmentati (actinorodina e undecilprodigiosina) (de Crécy-Lagard *et al.*, 1999; Bellier *et al.*, 2004). Anche se PepA appartiene ad una classe (metallo-proteasi) di proteasi diversa da quella citata, considerato che la sua delezione in *S. coelicolor* causa un aumento della produzione di spore e di actinorodina, e quindi ha un effetto sul differenziamento morfo-fisiologico, (Song *et al.*, 2013), è possibile che TrpM controlli direttamente la progressione del ciclo vitale attraverso la regolazione dell'attività di PepA. Per dimostrare questa ipotesi sarà necessario individuare quali siano le proteine *target* dell'attività proteolitica di PepA.

In conclusione, i dati ottenuti dimostrano ulteriormente che TrpM svolge un ruolo nel differenziamento morfo-fisiologico di *S. coelicolor* M145. Saranno necessari ulteriori esperimenti per comprendere quale sia il meccanismo molecolare che permette a questa proteina di svolgere le sue funzioni e di influenzare contemporaneamente sia il metabolismo primario (ad esempio la disponibilità di amminoacidi) sia il metabolismo secondario (come nel caso della biosintesi di actinorodina). Tenuto conto del grado di conservazione della sequenza genica in altri streptomiceti, sarà necessario chiarire se queste funzioni sono conservate anche in altri organismi. Per questo motivo, potrebbe essere di notevole interesse studiare ceppi utilizzati a livello industriale e verificare se la resa della produzione dei metaboliti di interesse, in particolare polichetidi, è influenzata dai livelli di espressione di *trpM*.

5. Bibliografia

Baker T. A., Sauer R. T. (2006).

ATP-dependent proteases of bacteria: recognition logic and operating principles.

Trends in Biochemical Sciences 31 (12): 647-653.

Bekiesch P., Basitta P., Apel A. K. (2016).

Challenges in the heterologous production of antibiotics in *Streptomyces*.

Archiv der Pharmazie 349 (8): 594-601.

Bellier A, Mazodier P. (2004).

CigR, a novel regulator of *clp* and *lon* expression in *Streptomyces*.

Journal of Bacteriology 186 (10): 3238-3248.

Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeño-Tárraga A. M., Challis G. L., Thomson N. R., James K. D., Harris D. E., Quail M. A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C. W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C. H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M. A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B. G., Parkhill J., Hopwood D. A. (2002).

Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).

Nature 417 (6885):141-147.

Blin K., Kim H. U., Medema M. H., Weber T. (2017).

Recent development of antiSMASH and other computational approaches to mine secondary metabolite biosynthetic gene clusters.

Briefings in Bioinformatics, 2017, 1-11.

Challis G. L., Hopwood D.A. (2003).

Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species.

PNAS 100 (2): 14555-14561.

Chater K. F. (2016).

Recent advances in understanding *Streptomyces*.

F1000Research 2016, 5(F1000 Faculty Rev): 2795.

Chu Q., Ma J., Saghatelian A. (2015).

Identification and characterization of sORF-encoded polypeptides.

Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 50 (2): 134-141.

Chugunova A., Navalayeu T., Dontsova O., Sergiev P. (2018).

Mining for small translated ORFs.

Journal of Proteome Research 17 (1): 1-11.

Claessen D., Rink R., de Jong W., Siebring J., de Vreugd P., Boersma F. G., Dijkhuizen L., Wosten H. A. (2003).

A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils.

Genes and Development 17 (14): 1714-1726.

Combes P., Till R., Bee S., Smith M. C. (2002).

The streptomyces genome contains multiple pseudo-attB sites for the Φ C31-encoded site-specific recombination system.

Journal of Bacteriology 184 (20): 5746-5752.

de Crécy-Lagard V., Servant-Moisson P., Viala J., Grandvalet C., Mazodier P. (1999).

Alteration of the synthesis of the Clp ATP-dependent protease affects morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*.

Molecular Microbiology 32 (3): 505-517.

Delcourt V., Staskevicius A., Salzet M., Fournier I., Roucou X. (2018).

Small proteins encoded by unannotated ORFs are rising stars of the proteome, confirming shortcomings in genome annotations and current vision of an mRNA.

Proteomics 8 (10): e1700058.

Flärdh K (2003).

Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2).

Molecular Microbiology 49 (6): 1523-1536.

Flärdh K., Richards D. M., Hempel A. M., Howard M., Buttner M. J. (2012).

Regulation of apical growth and hyphal branching in *Streptomyces*.

Current Opinion in Microbiology 15 (6): 737-743.

Galindo M. I., Pueyo J. I., Fouix S., Bishop S. A., Couso J. P. (2007).

Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family.

PLoS Biology 5 (5): e106.

Gallo G., Alduina R., Renzone G., Thykaer J., Bianco L., Eliasson-Lantz A., Scaloni A., Puglia A. M. (2010a).

Differential proteomic analysis highlights metabolic strategies associated with balhimycin production in *Amycolatopsis balhimycina* chemostat cultivations.

Microbial Cell Factories 9: 95.

Gallo G., Renzone G., Alduina R., Stegmann E., Weber T., Lantz A. E., Thykaer J., Sangiorgi F., Scaloni A., Puglia A. M. (2010b).

Differential proteomic analysis reveals novel links between primary metabolism and antibiotic production in *Amycolatopsis balhimycina*.

Proteomics 10: 1336-1358.

Gottesman S., Maurizi M. R. (1992).

Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets.

Microbiological Reviews 56 (4): 592-621.

Guijarro J., Santamaria R., Schauer A., Losick R. (1988).

Promoter determining the timing and spatial localization of transcription of a cloned *Streptomyces coelicolor* gene encoding a spore-associated polypeptide.

Journal of Bacteriology 170 (4): 1895-1901.

Handler A. A., Lim J. E., Losick R. (2008).

Peptide inhibitor of cytokinesis during sporulation in *Bacillus subtilis*.

Molecular Microbiology 68 (3): 588-599.

Hempel A. M., Wang S. B., Letek M., Gil J. A., Flårdh K. (2008).

Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*.

Journal of Bacteriology 190 (22): 7579-7583.

Hopwood D. A. (1997).

Genetic contributions to understanding polyketide synthases.

Chemical Reviews 97 (7): 2465-2498.

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., Hood D. W., Heidstra R., Hodgson D. A. (1999).

The expression of the *trpD*, *trpC* and *trpBA* genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is regulated by growth rate and growth phase but not by feedback repression.

Molecular Microbiology 32 (4): 869-880.

Jones S. E., Ho L., Rees C. A., Hill J. E., Nodwell J. R., Elliot M. A. (2017a).

Streptomyces exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals.

eLife 6: e21738.

Jones S. E., Elliot M. A. (2017b).

Streptomyces exploration: competition, volatile communication and new bacterial behaviours.

Trends in Microbiology 25 (7): 522-531.

Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A (2000).

Practical *Streptomyces* genetics.

The John Innes Foundation, Norwich, UK.

Kim Y.J., Moon M. H., Song J. Y., Smith C. P., Hong S. K., Chang Y. K. (2008).

Acidic pH shock induces the expressions of a wide range of stress-response genes.

BMC Genomics 9: 604.

Kois-Ostrowska A., Strzałka A., Lipietta N., Tilley E., Zakrzewska-Czerwińska J., Herron P., Jakimowicz D. (2016).

Unique function of the bacterial chromosome segregation machinery in apically growing *Streptomyces* - targeting the chromosome to new hyphal tubes and its anchorage at the tips.

PLoS Genetics 12 (12): e1006488.

Kosfeld A., Jahreis K. (2012).

Characterization of the interaction between the small regulatory peptide SgrT and the EIICB^{Glc} of the glucose-phosphotransferase system of *E. coli* K-12.

Metabolites 2 (4): 756-774.

Kuo L. Y., Hwang G. Y., Lai Y. J., Yang S. L., Lin L. L. (2003).

Overexpression, purification, and characterization of the recombinant Leucine Aminopeptidase II of *Bacillus stearothermophilus*.

Current Microbiology 47: 40-45.

Limauro D., Avitabile A., Cappellano C., Puglia A. M., Bruni C.B. (1990).

Cloning and characterization of the histidine biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2).

Gene 90 (1): 31-41.

Liu G., Chater K. F., Chandra G., Niu G., Tan H. (2013).

Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*.

Microbiology and Molecular Biology Reviews 77 (1): 112-143.

Medema M. H., Blin K., Cimermancic P., de Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M. A., Weber T., Takano E., Breitling R. (2011).

antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences.

Nucleic Acids Research 39: W339-W346.

Mitchell W. (2011).

Natural products from synthetic biology.

Current Opinion in Chemical Biology 15 (4): 505-515.

Nepal K. K., Wang G. (2018).

Streptomyces: surrogate hosts for the genetic manipulation of biosynthetic gene clusters and production of natural products.

Biotechnology Advances, in stampa.

Palazzotto E., Renzone G., Fontana P., Botta L., Scaloni A., Puglia A. M., Gallo G. (2015).

Tryptophan promotes morphological and physiological differentiation in *Streptomyces coelicolor*.

Applied Microbiology and Biotechnology 99 (23): 10177-10189.

Palazzotto E., Gallo G., Renzone G., Giardina A., Sutura A., Silva J., Vocat C., Botta L., Scaloni A., Puglia A. M. (2016).

TrpM, a small protein modulating tryptophan biosynthesis and morpho-physiological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2).

PLoS ONE 11 (9): e0163422.

Pueyo J. I., Magny E. G., Couso J. P. (2016).

New peptides under the s(ORF)ace of the genome.

Trends in Biochemical Sciences 41 (8): 665-678.

Puglia A. M., Vohradsky J., Thompson C. J. (1995).

Developmental control of the heat-shock stress regulon in *Streptomyces coelicolor*.

Molecular Microbiology 17 (4): 737-746.

Ramamurthi K. S., Clapham K. R., Losick R. (2006).

Peptide anchoring spore coat assembly to the outer forespore membrane in *Bacillus subtilis*.

Molecular Microbiology 62 (6): 1547-1557.

Rausch H., Lehmann M. (1991).

Structural analysis of the actinophage phi C31 attachment site.

Nucleic Acids Research 19 (19): 5187-5189.

Rawlings B. J. (1999).

Biosynthesis of polyketides (other than actinomycete macrolides).

Natural Products Reports 16: 425-484.

Revoll W. P., Bibb M. J., Hopwood D. A. (1995).

Purification of a malonyltransferase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) and analysis of its genetic determinant.

Journal of Bacteriology 177 (14): 3946-3952.

Sambrook J. and Russell D. W. (2001).

Molecular cloning: a laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996).

Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.

Analytical Chemistry 68 (5): 850-858.

Simon R., Priefer U., Pühler A. (1983).

A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria.

Biotechnology 1: 784-791.

Song E., Rajesh T., Lee B. R., Kim E. J., Jeon J. M., Park S. H., Park H. Y., Choi K. Y., Kim Y. G., Yang Y. H., Kim B.G. (2013).

Deletion of an architectural unit, leucyl aminopeptidase (SCO2179), in *Streptomyces coelicolor* increases actinorhodin production and sporulation.

Applied Microbiology and Biotechnology 97 (15): 6823-6833.

Storz G., Wolf Y. I., Ramamurthi K. S. (2014).

Small proteins can no longer be ignored.

Annual Review of Biochemistry 83: 753-777.

Sun J., Kelemen G. H., Fernandez-Abalos J. M., Bibb M. J. (1999).

Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2).

Microbiology 145: 2221-2227.

Tenconi E., Traxler M. F., Hoebreck C., van Wezel G. P., Rigali S. (2018).

Production of prodiginines is part of a programmed cell death process in *Streptomyces coelicolor*.

Frontiers in Microbiology 9: 1742.

Thermo Scientific (a).

One Shot TOP10 competent cells, user guide.

Revision A.0

Thermo Scientific (b).

BL21-AI One Shot chemically competent *E. coli*, user guide.

Revision date: 7 June 2010.

Thermo Scientific (c).

pRSET A, B, and C, user guide.

Revision date: 18 June 2010.

van der Meij A., Worsley S. F., Hutchings M. I., van Wezel G. P. (2017).

Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes.

FEMS Microbiology Reviews 41 (3): 392-416.

van Ooij C., Losick R. (2003).

Subcellular localization of a small sporulation protein in *Bacillus subtilis*.

Journal of Bacteriology 185 (4): 1391-1398.

Vázquez-Salazar A., Becerra A., Lazcano A. (2018).

Evolutionary convergence in the biosyntheses of the imidazole moieties of histidine and purines.

PLoS ONE 13 (4): e0196349.

Wadler C. S., Vanderpool C. K. (2007).

A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide.

PNAS 104 (51): 20454-20459.

Willey J., Santamaria R., Guijarro J., Geistlich M., Losick R. (1991).

Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*.

Cell 65 (4): 641-650.

Wolński M., Wali R., Tilley E., Jakimowicz D., Zakrzewska-Czerwinska J., Herron P. (2011).

Replisome trafficking in growing vegetative hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2).

Journal of Bacteriology 193 (5): 1273-1275.

Yanofsky C. (2007).

RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and degradation, in bacteria.

RNA 13 (8): 1141-1154.

