

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale "Toso Montanari"

Corso di Laurea Magistrale in

**Chimica Industriale**

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Attività enzimatica ed inibizione  
della tirosin-fosfatasi A (MptpA) di  
*Mycobacterium tuberculosis* in funzione del pH

Tesi di laurea sperimentale

**CANDIDATO**

Chiara Palazzetti

**RELATORE**

**Dott.ssa** Alessandra Stefan

**CORRELATORI**

**Prof.** Alejandro Hochkoepler

**Prof.** Luca Bernardi

## ABSTRACT

La tubercolosi è una malattia infettiva causata dal batterio patogeno *Mycobacterium tuberculosis*. Tale micobatterio è in grado di secernere due importanti tirosin-fosfatasi, MptpA e MptpB, che esplicano un importante ruolo come fattori di virulenza permettendo la sopravvivenza del batterio all'interno dell'ospite mediante evasione della risposta immunitaria. In particolare, MptpA è un membro della famiglia delle tirosin-fosfatasi a basso peso molecolare ed è composta da 163 amminoacidi (17,9 kDa). L'enzima impedisce la normale maturazione del fagosoma e la fusione fagosoma-lisosoma, attraverso la defosforilazione della proteina VPS33B, inibendo così la risposta cellulare all'infezione.

Obiettivo del seguente lavoro di tesi è stato analizzare il comportamento catalitico di MptpAW152F, variante caratterizzata dalla presenza di un solo triptofano, in funzione del pH. È stata inoltre valutata l'eventuale inibizione dell'attività enzimatica ad opera di alcuni composti naturali, i glucosinolati e di un inibitore di sintesi (L335-M34).

Lo studio cinetico effettuato in presenza del substrato fosfotirosina ha evidenziato la presenza di un secondo sito allosterico, adiacente al sito attivo dell'enzima, che influenza l'attività di MptpAW152F. Questo risulta essere un promettente bersaglio per la progettazione di nuovi farmaci ed inibitori selettivi. La valutazione di alcuni tra questi, come l'inibitore sintetico L335-M34 ha riportato risultati promettenti. I saggi di attività in *pre-steady-state* in funzione del pH e le analisi SPR hanno permesso di indagare ulteriormente l'affinità di legame tra MptpAW152F e la fosfotirosina e di evidenziare il riarrangiamento strutturale dell'enzima da una forma aperta ad una forma chiusa, cataliticamente attiva.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a serious infectious disease of the lungs caused by the pathogenic bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. This mycobacterium can secrete two important tyrosine phosphatases, MptpA and MptpB, which play an important role as virulence factors allowing the survival of the bacterium within the host by evasion of the immune response. MptpA is a member of the low molecular weight tyrosine-protein phosphatase family (PTPs) and is composed of 163 amino acids (17.9 kDa). This enzyme prevents the normal maturation of the phagosome and the phagosome-lysosome fusion, through the dephosphorylation of the VPS33B protein, thus inhibiting the cellular response to infection.

The aim of this research was to analyze the catalytic behavior of MptpAW152F, a variant characterized by the presence of only one tryptophan, as a function of pH. The inhibition of its enzymatic activity by some natural molecules (glucosinolates) and by a synthetic inhibitor (L335-M34) was also evaluated.

The kinetic study of phosphotyrosine hydrolysis revealed the presence of a second allosteric site, adjacent to the active site of the enzyme, which influences the activity of MptpAW152F. This appears to be a promising target for the design of novel drugs and specific inhibitors. In detail, we demonstrated the inhibitor effect on enzyme activity exerted by the synthetic molecule L335-M34. Moreover, *pre-steady-state* stopped-flow studies and SPR analysis allowed to deeply investigate the binding between MptpAW152F and phosphotyrosine as a function of pH. Our results indicate a structural rearrangement of the enzyme from an open form to a catalytically competent closed form.

# Indice

<b>1. INTRODUZIONE</b>	1
1.1 Le tirosin-fosfatasi	1
1.1.1 HMW: tirosin-fosfatasi ad alto peso molecolare	3
1.1.2 LMW: tirosin-fosfatasi a basso peso molecolare	5
1.2 MptpA: struttura	7
1.3 MptpA: meccanismo catalitico	12
1.4 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e adattamento a pH acidi	13
1.5 Inibitori di tirosin-fosfatasi	15
1.6 Produzione di proteine ricombinanti in <i>Escherichia coli</i>	17
1.6.1 Sistema di espressione <i>pET</i>	19
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	21
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	22
3.1 Vettore di espressione	22
3.2 Mutante di MptpA	23
3.3 Ceppo batterico e terreni di coltura	23
3.4 Protocollo di espressione della proteina	24
3.5 Purificazione della proteina	25
3.5.1 Precipitazione con ammonio solfato	25
3.5.2 Cromatografia ad interazione idrofobica: HiTrap Phenyl FF	26
3.5.3 Cromatografia ad esclusione molecolare: Superdex 200	27
3.6 Concentrazione mediante ultrafiltrazione	27
3.7 Elettroforesi SDS-PAGE	28
3.8 Quantificazione proteica: metodo Micro-Bradford	30
3.9 Sintesi dell'inibitore L335-M34	31
3.10 Saggi di attività enzimatica	32
3.10.1 Saggi di attività in <i>steady-state</i>	34
3.10.1.1 Studio cinetico con <i>p</i> -NPP	34
3.10.1.2 Studio cinetico con pTyr	34
3.10.1.3 Prove di inibizione cinetica con Glucosinolati: GST e GTL	35
3.10.1.4 Prove di inibizione cinetica con tirosina	36

3.10.1.5 Saggi di attività in presenza di tirosinasi.....	36
3.10.1.6 Prove di inibizione cinetica con inibitore sintetico L335-M34.....	37
3.10.2 Stopped-flow .....	37
3.11 SPR – Surface Plasmon Resonance .....	39
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>41</b>
4.1 Verifica della corretta espressione proteica .....	41
4.2 Purificazione di MptpAW152F.....	42
4.2.1 Cromatografia ad interazione idrofobica del I° lotto di produzione .....	42
4.2.2 Cromatografia ad esclusione molecolare (GF) del I° lotto di produzione .	45
4.2.3 Cromatografia ad interazione idrofobica del II° lotto di produzione .....	47
4.2.4 Cromatografia ad esclusione molecolare (GF) del II° lotto di produzione	50
4.2.5 Confronto della purezza .....	52
4.3 Saggi di attività enzimatica in regime di <i>steady-state</i> .....	54
4.3.1 Studio cinetico con <i>p</i> -nitrofenil fosfato ( <i>p</i> -NPP) .....	54
4.3.2 Studio cinetico con fosfotirosina (pTyr) .....	56
4.4 Inibizione di MptpAW152F.....	59
4.4.1 Effetto inibitorio della tirosina .....	59
4.4.2 Prove di inibizione con i Glucosinolati .....	64
4.4.2.1 Prove di inibizione con GST .....	65
4.4.2.2 Prove di inibizione con GTL .....	68
4.4.3 Prove di inibizione con L335-M34 .....	68
4.5 Saggi di attività enzimatica in <i>pre-steady-state</i> .....	75
4.5.1 Stopped-flow a pH 6 .....	76
4.5.2 Stopped-flow a pH 7 .....	78
4.5.3 Stopped-flow a pH 8 .....	81
4.6 SPR – Surface Plasmon Resonance .....	84
<b>5. CONCLUSIONI .....</b>	<b>86</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>89</b>
<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>91</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 – LE TIROSIN-FOSFATASI

È noto che le proteine tirosin-fosfatasi (PTPs) sono implicate in un gran numero di eventi di segnalazione che regolano processi biologici fondamentali come la crescita cellulare, il differenziamento, l'apoptosi e il movimento cellulare <sup>[1]</sup>. Il corretto funzionamento di queste vie è controllato dalle attività, bilanciate e contrapposte, delle proteine tirosin-chinasi (PTKs) e delle proteine tirosin-fosfatasi (PTPs) che svolgono ruoli cruciali in molteplici processi cellulari fisiologici basilari come il metabolismo, il ciclo cellulare, la comunicazione cellula-cellula, la migrazione cellulare, la trascrizione genica, l'attività dei canali ionici, la risposta immunitaria e la sopravvivenza. Un sistema frequentemente adottato per controllare la trasduzione del segnale è proprio la fosforilazione reversibile delle proteine. Questa rappresenta una delle modificazioni post-traduzionale chiave per il controllo di molte funzioni cellulari.

In particolare, la fosforilazione reversibile dei residui di tirosina è un evento regolatorio caratteristico degli eucarioti rispetto agli altri processi di fosforilazione ed è di cruciale rilevanza per la regolazione e l'avanzamento di diverse vie di segnalazione a cascata <sup>[2]</sup>. Tale modificazione, inoltre, permette di realizzare nuovi motivi di riconoscimento per le interazioni proteina-proteina, verificare la stabilità proteica e, cosa ancora più importante, consente la regolazione dell'attività enzimatica. Un eventuale funzionamento scorretto di questa via di trasduzione del segnale comporta un'anomala fosforilazione della tirosina bersaglio, evento che può contribuire all'evoluzione di numerose malattie, tra cui cancro e il diabete <sup>[3]</sup>.

Inizialmente si riteneva che le tirosin-fosfatasi (PTPs) comprendessero una piccola quantità di enzimi non specifici capaci di contrapporsi all'azione delle tirosin-chinasi (PTKs). In realtà, si capì in seguito che le PTPs costituiscono una grande famiglia di enzimi in grado di svolgere ruoli ben specifici e definiti. Tali enzimi presentano una grande diversità strutturale, a volte anche molto complessa ed articolata <sup>[4]</sup>. Numerosi studi biochimici e genetici, inoltre, hanno dimostrato che le PTPs esercitano effetti sia positivi che negativi sulle vie di segnalazione ed esplicano ruoli fisiologici critici in differenti tipologie di tessuti e cellule di mammiferi <sup>[5]</sup>.

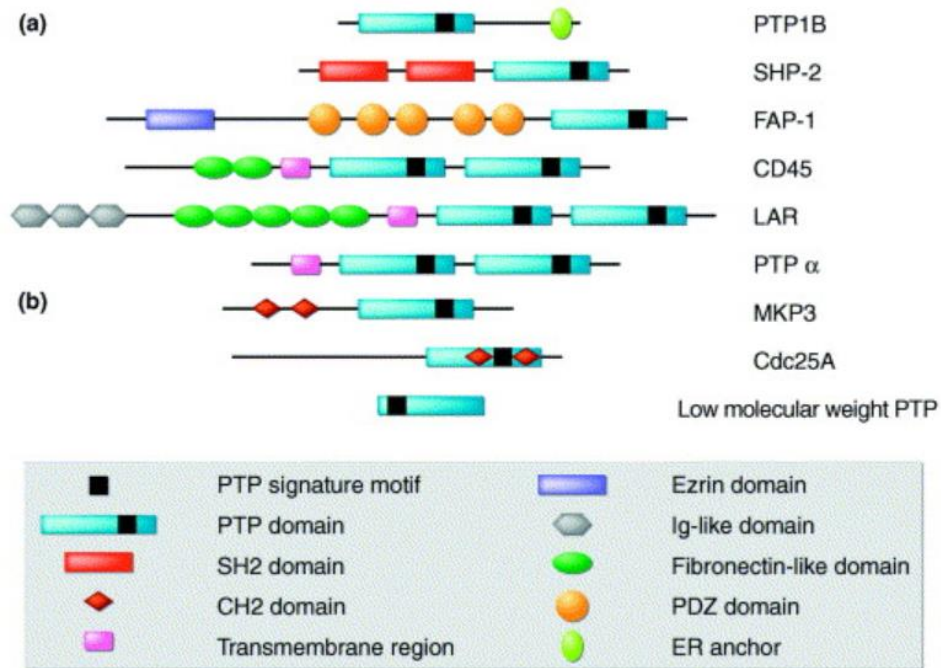
La superfamiglia delle fosfatasi comprende diverse categorie di enzimi, suddivisi in base alla struttura, alla specificità di substrato o alle dimensioni. Esistono, pertanto, diverse classificazioni. Una di queste suddivide le fosfatasi in due classi in base al tipo di fosfoproteine

utilizzate come substrati: i) fosfatasi serin/treonin-specifiche; ii) fosfatasi tirosin-specifiche. Le prime rimuovono il gruppo fosforilico dai residui di serina o treonina, mentre le seconde defosforilano specificatamente i residui di tirosina presenti nel substrato. Se si confronta la sequenza dei domini catalitici contenuti nelle fosfatasi tirosin- o serin/treonin-specifiche non si evidenzia alcuna somiglianza. Diverso è il risultato se si analizzano le proteine chinasi, dal momento che le due categorie di enzimi (tirosin- e serin/treonin-specifiche) sono accumulate da una discreta omologia di sequenza [6].

L'analisi del genoma umano conta 112 PTPs [7]. Dal punto di vista strutturale è possibile suddividere quest'ultime in tre principali sottofamiglie: 1) fosfatasi tirosin-specifiche; 2) fosfatasi duali (a doppia specificità) e 3) fosfatasi a basso peso molecolare (LMW) (fig. 1.1.1). Le fosfatasi tirosin-specifiche e quelle LMW processano esclusivamente proteine contenenti fosfotirosina, come descritto prima, mentre le fosfatasi a doppia specificità scindono i legami fosfoestere dei substrati proteici che contengono indifferentemente fosfotirosina, fosfoerina e fosfotreonina.

Le fosfatasi tirosin-specifiche possono essere ulteriormente divise in due gruppi diversi: le fosfatasi di membrana (*receptor-like*) e quelle intracellulari. Le prime (come il recettore CD45 e PTP $\alpha$ ) presentano un dominio extracellulare, putativo del legame del ligando, una singola regione transmembrana e uno o due domini PTP citoplasmatici che svolgono funzioni varie. Le fosfatasi intracellulari, invece, come ad esempio PTP1B e Src homology 2 (SH2), includono un singolo dominio catalitico e diverse estensioni terminali amminiche o carbossiliche, come i domini SH2, che possono avere funzioni di targeting o funzioni regolatorie [8].

I membri della superfamiglia delle PTP sono contraddistinti dallo stesso motivo strutturale CX<sub>5</sub>R presente nel dominio catalitico, definito anche motivo consenso (*PTP signature motif*, figura 1.1.1). In tale motivo è inclusa una cisteina, essenziale per la catalisi. La differenza principale risiede nella profondità della tasca del sito attivo: ~ 9 Å per le fosfatasi tirosin-specifiche e ~ 6 Å di profondità per le fosfatasi a doppia specificità. La prima tasca, più profonda, permette di accogliere esclusivamente substrati contenenti fosfotirosina, mentre la seconda riesce a legare anche fosfoerina e fosfotreonina.



**Figura 1.1.1.** Rappresentazione schematica delle PTPs. (a)-PTPs tirosina specifiche, (b)-PTPs duali e LMW<sup>[3]</sup>.

Le fosfatasi tirosin-specifiche vengono convenzionalmente distinte anche in base al loro peso molecolare in:

- Tirosin-fosfatasi ad alto peso molecolare (HMW, > 30 kDa)
- Tirosin-fosfatasi a basso peso molecolare (LMW,  $\leq$  20 kDa)

Tutte le PTPs sono proteine  $\alpha/\beta$  con strutture terziarie composte da un unico foglietto  $\beta$  fiancheggiato da  $\alpha$ -eliche su entrambi i lati<sup>[9]</sup>.

Sebbene presentino differenze nella sequenza amminoacidica e nella specificità di substrato, le strutture cristallografiche delle tirosin-fosfatasi mostrano elevate somiglianze. Inoltre, il dominio catalitico costituito da  $\sim$  250 residui mantiene inalterato il motivo CX<sub>5</sub>R, altamente conservato in tutte le PTPs. Molteplici studi enzimatici hanno, inoltre, sottolineato che tutte le reazioni catalizzate da PTP riportano lo stesso meccanismo catalitico di defosforilazione.

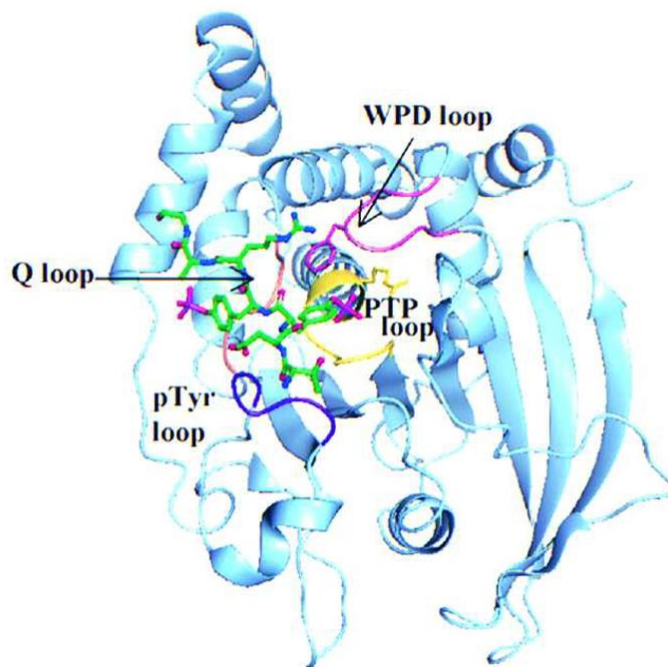
### **1.1.1 – HMW: TIROSIN-FOSFATASI AD ALTO PESO MOLECOLARE**

La tirosin-fosfatasi ad alto peso molecolare più studiata è l'enzima intracellulare umano PTP1B (human placental protein tyrosine phosphatase 1B). Negli anni 2000 è stato pubblicato uno



studio (Barford et al.) che descrive la struttura cristallografica della tirosin-fosfatasi umana PTP1B complessata con il fosfopeptide IRK, recettore dell'insulina, che ha permesso di analizzare e comprendere in maniera ancora più accurata la struttura ed il meccanismo catalitico degli enzimi in esame <sup>[9]</sup>. Come descritto in precedenza, la verifica della corretta defosforilazione proteica previene l'insorgere di specifiche patologie o ne contiene l'evoluzione; in questo caso, la proteina PTP1B è una componente critica del controllo della segnalazione dei livelli di insulina nell'uomo.

L'enzima è formato un foglietto  $\beta$  centrale e da 9 alfa eliche. La figura 1.1.1.1 consente di visualizzare le diverse strutture coinvolte. La maggior parte delle PTPs presenta un comportamento analogo a quanto descritto per l'enzima umano PTP1B.



**Figura 1.1.1.1.** Struttura cristallografica dell'enzima PTP1B complessato con il fosfopeptide IRK, recettore dell'insulina. In *giallo* viene mostrato il *loop PTP* (residui 215-222), il *loop WPD* in *magenta* (residui 179-185), il *loop pTyr* in *viola* (residui 45-49) e il *loop Q* in *rosa* (residui 258-262) <sup>[10]</sup>.

Il dominio è altamente conservato ed è caratterizzato dal peculiare motivo (I/V)HCXAGXXR(S/T)G contenente i residui di cisteina ed arginina essenziali per la catalisi (PTP-loop). Il sito catalitico di PTP1B è formato da una profonda tasca situata sulla superficie della proteina. La base di questa racchiude i residui dell'ansa PTP con il gruppo fosfato del substrato (pTyr) coordinato ai gruppi ammidici della catena principale, ed il residuo Arg<sup>221</sup>

presente nella catena laterale. All'interno della cavità vi è la cisteina catalitica (Cys<sup>215</sup>) correttamente posizionata al fine di promuovere l'attacco nucleofilo al gruppo fosfato situato nel substrato. La profondità di questa cavità viene definita dalla presenza della Tyr<sup>46</sup>, nel pTyr-loop, che risulta essere un elemento fondamentale per il riconoscimento e la specificità del substrato. Il legame che viene ad instaurarsi tra quest'ultimo e l'enzima promuove un cambiamento conformazionale della proteina per cui il loop WPD, costituito dai residui 179-187, va a chiudersi sull'anello fenilico del substrato, permettendo al residuo di aspartato 181 (Asp<sup>181</sup>) di trovarsi nella giusta posizione per effettuare la catalisi. Tale modifica conformazionale, quindi, genera la forma cataliticamente competente dell'enzima <sup>[10]</sup>.

### **1.1.2 – LMW: TIROSIN-FOSFATASI A BASSO PESO MOLECOLARE**

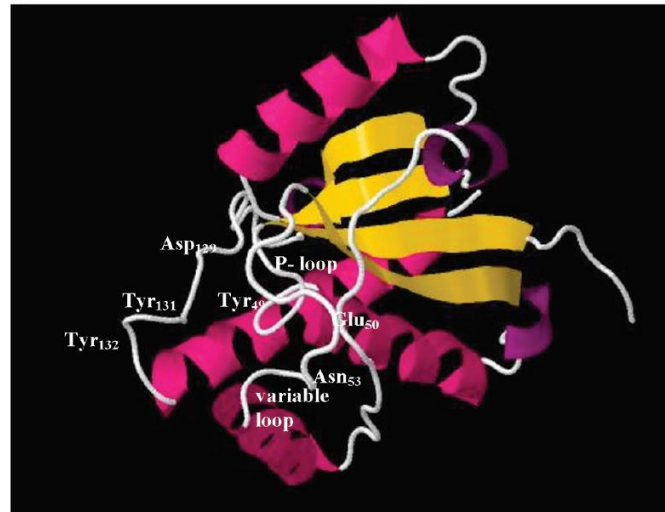
Le tirosin-fosfatasi a basso peso molecolare (LMW-PTPs) comprendono enzimi solubili con un peso molecolare medio di circa 18 kDa. Questi enzimi sono stati identificati ed isolati in numerosi procarioti ed eucarioti, quali batteri, lieviti e mammiferi. Nell'uomo, le LMW-PTPs risultano essere ubiquitarie e sono state individuate in numerosi tessuti e organi, come ad esempio eritrociti, cellule endoteliali e muscolari, tessuti connettivi e nervosi, fegato e placenta <sup>[11]</sup>. Tali enzimi, inoltre, esercitano un controllo sulla crescita cellulare e il differenziamento tramite la modulazione delle vie di trasduzione del segnale. La loro sovraespressione è spesso implicata nell'insorgenza di tumori.

Le LMW-PTPs presentano un elevato grado di omologia, soprattutto nella struttura terziaria, mentre le loro sequenze amminoacidiche risultano differenti rispetto alle fosfatasi ad alto peso molecolare (HMW-PTP). La somiglianza risiede principalmente nel loop che lega il fosfato (P-loop) e che mostra il tipico motivo delle PTPs, altamente conservato in tutti i membri della famiglia, CX<sub>5</sub>R(S/T). I residui di arginina e cisteina, inclusi nella sequenza del motivo consenso, si rivelano cruciali per il meccanismo di defosforilazione comune a tutte le tirosin-fosfatasi <sup>[11]</sup>.

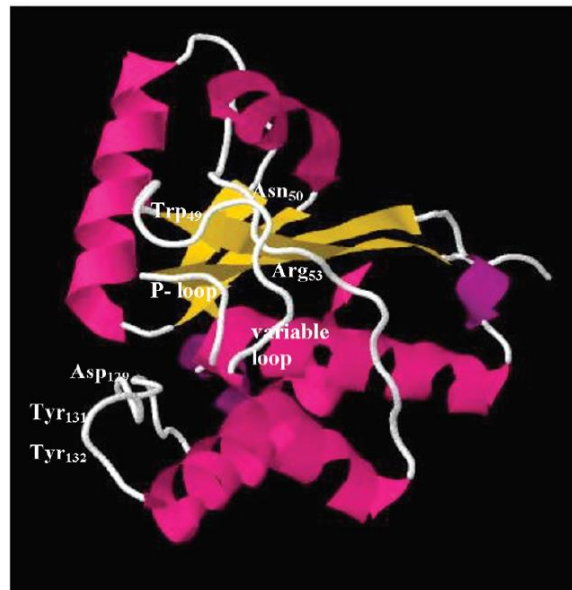
Nel 1998, le ricerche condotte da Marzocchini ed il suo gruppo di ricerca, hanno permesso di isolare il gene della LMW-PTP umana nella sua isoforma 1 (IF1) ed isoforma 2 (IF2). Tale gene è stato clonato nel vettore pGEX ed espresso in *E. coli*. Grazie alla produzione eterologa, è stato possibile indagare la struttura cristallina dell'enzima tramite raggi X (risoluzione di 2.4 Å) <sup>[12]</sup>. Entrambe le isoforme sono costituite da una singola catena peptidica di circa 157

amminoacidi, che differisce esclusivamente per i residui 40-73, inclusi in un loop denominato loop variabile, che riporta soltanto un 41% di omologia.

Di seguito è riportata la struttura tridimensionale delle due isoforme (figura 1.1.2.1).



A.



B.

**Figura 1.1.2.1.** Struttura degli isoenzimi della LMW-PTP umana. **A**-Isoforma IF1, **B**-Isoforma IF2 <sup>[12]</sup>.

Come si evince dall'immagine (fig. 1.1.2.1), la struttura è composta da un corpo centrale formato da quattro filamenti  $\beta$  paralleli circondato, su entrambi i lati, da  $\alpha$  eliche. Il sito attivo,

definito P-loop, collega il filamento  $\beta_1$  all'elica  $\alpha_1$ , ed è collocato nella parte inferiore della tasca catalitica presente sulla superficie proteica, vicino all'estremità N-terminale. I residui 12-19, che compongono tale loop, formano la sequenza CLGNICRS, conservata in tutti i mammiferi. La profondità della cavità del sito attivo permette di catalizzare selettivamente la reazione di defosforilazione dei substrati contenenti fosfotirosina, impedendo l'azione su quelli contenenti fosfoserina o fosfotreonina. Questo elemento strutturale garantisce, quindi, un'elevata specificità di substrato.

I legami a idrogeno formatosi tra l'Asn<sup>15</sup> del sito attivo ed i residui Ser<sup>19</sup>, Ser<sup>43</sup> e His<sup>72</sup> consentono al P-loop di avere una buona stabilità strutturale, ottimale ai fini del legame col substrato. Il riconoscimento dei substrati proteici fosforilati viene effettuato anche dal gruppo guanidinio, carico positivamente, dell'Arg<sup>18</sup> che si contrappone alla carica negativa del gruppo fosfato.

La tirosin-fosfatasi A (MtpA), prodotta dall'organismo patogeno *Mycobacterium tuberculosis* e oggetto di questo progetto di Tesi, è un componente di questa classe di PTPs. MtpA svolge un fondamentale ruolo come fattore di virulenza per consentire la sopravvivenza del batterio patogeno nell'ospite. La sua struttura proteica, il meccanismo catalitico e la sua importanza biologica verranno descritti nel dettaglio nei paragrafi successivi.

## 1.2 – MPTPA: STRUTTURA

*Mycobacterium tuberculosis* è in grado di produrre e secernere un'importante tirosin-fosfatasi, MtpA, appartenente alla famiglia delle PTPs a basso peso molecolare. Questa proteina, infatti, pesa 17,9 kDa.

Nel 2012 è stato pubblicato un importante lavoro nel quale viene dettagliatamente descritta la struttura della forma inattiva dell'enzima (apoenzima) tramite spettroscopia NMR e NOE [13]. I dati indicano che MtpA adotta una tipica configurazione strutturale di Rossmann formata da un foglietto  $\beta$  centrale che consiste di 4 filamenti  $\beta$  paralleli così distribuiti:

1.  $\beta_1$ : residui Leu<sup>5</sup> - Cys<sup>11</sup>
2.  $\beta_2$ : residui Ala<sup>37</sup> – Ala<sup>43</sup>
3.  $\beta_3$ : residui Leu<sup>85</sup> – Leu<sup>89</sup>
4.  $\beta_4$ : residui Arg<sup>106</sup> – Leu<sup>110</sup>

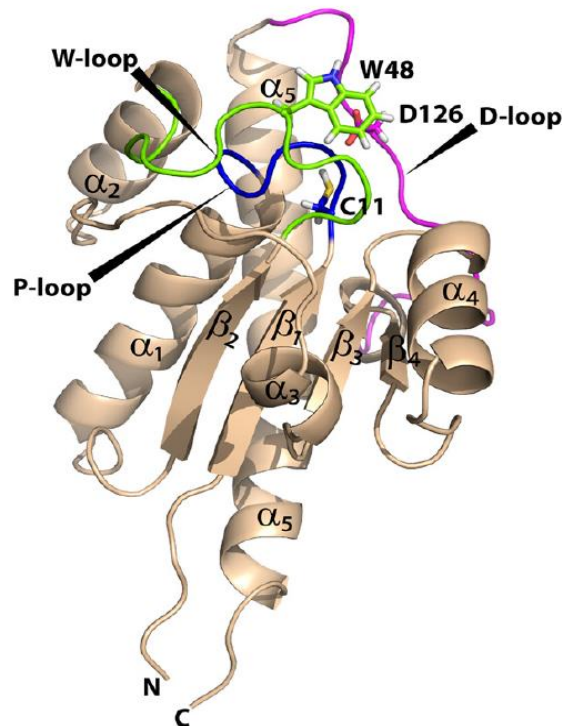
Questi filamenti sono collegati tramite cinque  $\alpha$  eliche:

1.  $\alpha_1$ : residui Cys<sup>16</sup> – Arg<sup>32</sup>
2.  $\alpha_2$ : residui Asp<sup>55</sup> – His<sup>65</sup>
3.  $\alpha_3$ : residui Gly<sup>77</sup> – Ala<sup>82</sup>
4.  $\alpha_4$ : residui Asp<sup>90</sup> – Leu<sup>100</sup>
5.  $\alpha_5$ : residui His<sup>132</sup> – Asn<sup>160</sup>

Il motivo <sup>11</sup>CTGNICRS<sup>18</sup> è altamente conservato. Il sito attivo contiene al suo interno la cisteina catalitica in posizione 11 (Cys<sup>11</sup>), nascosta all'interno di una tasca fiancheggiata da tre loop, di rilevante importanza per la catalisi, che accolgono i residui idrofobici Trp<sup>48</sup>, Tyr<sup>128</sup>, Tyr<sup>129</sup>. I tre loop sono così denominati:

- **W-loop**: contiene un triptofano in posizione 48 (W<sup>48</sup>), da cui prende il nome (loop  $\beta^2$ - $\alpha^2$ , Gly<sup>44</sup>-Asp<sup>55</sup>)
- **D-loop**: identificato dal residuo Asp<sup>126</sup> (loop  $\beta^4$ - $\alpha^5$ , Arg<sup>111</sup>-Asp<sup>131</sup>)
- **P-loop**: è localizzato vicino all'estremità N-terminale ed è in grado di legare il fosfato presente nel substrato

La figura sottostante riporta la struttura di MptpA.



**Figura 1.2.1.** Struttura catalitica di MptpA in forma apo ottenuta tramite spettroscopia NMR. In blu viene evidenziato il P-loop, in verde il W-loop ed in magenta il D-loop<sup>[13]</sup>.

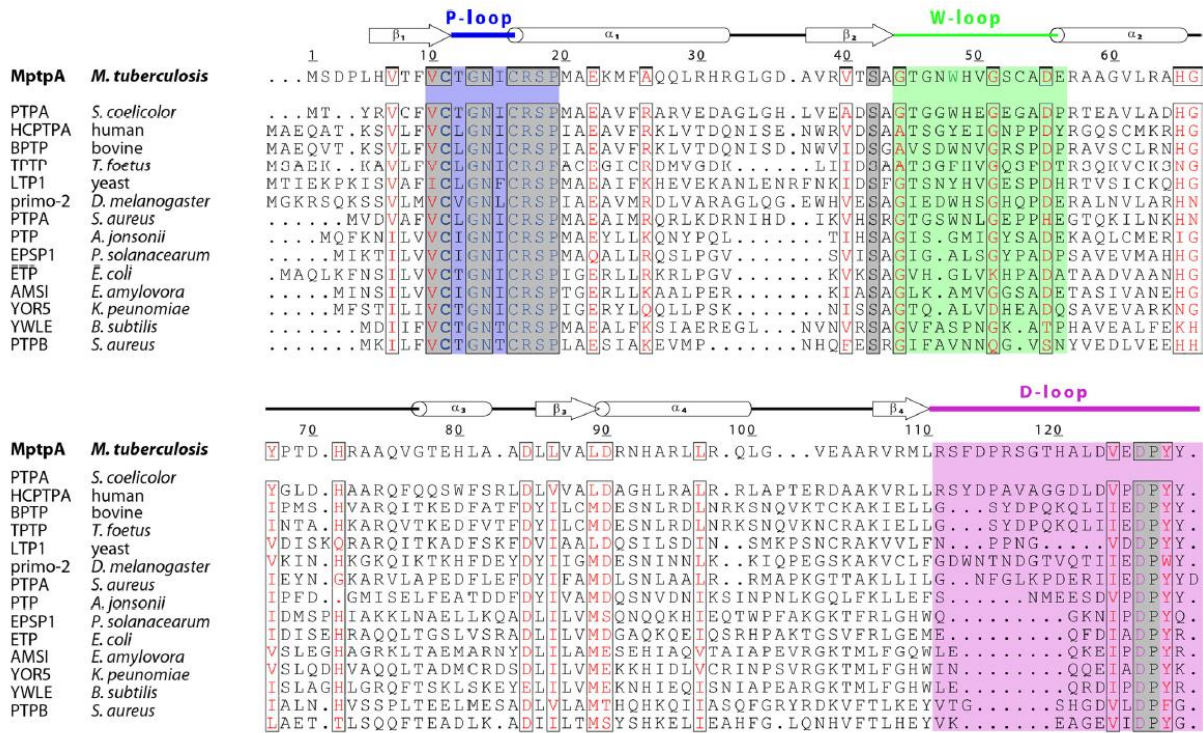
Il W-loop e il D-loop risultano essere spazialmente vicini al P-loop e contengono i residui principali per la specificità di substrato (Trp<sup>48</sup> e His<sup>49</sup>), così come quelli implicati nel meccanismo catalitico (Asp<sup>126</sup>). I gruppi ammidici di numerosi residui che compongono il sito attivo (Thr<sup>12</sup>, Gly<sup>13</sup>, Asn<sup>14</sup>, Ile<sup>15</sup>, Cys<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>, and Ser<sup>18</sup>) sono rivolti verso il P-loop <sup>[13]</sup>.

Questa conformazione presenta delle analogie rispetto alla struttura dei due isoenzimi IF1 e IF2 della LMW-PTP umana (fig. 1.1.2.1). I residui Cys<sup>11</sup>, Arg<sup>17</sup>, and Asp<sup>126</sup> di MptpA, ad esempio, presentano lo stesso ruolo catalitico dei residui Cys<sup>12</sup>, Arg<sup>18</sup>, and Asp<sup>129</sup> delle due isoforme umane. In analogia ai due isoenzimi, inoltre, il sito attivo controlla la specificità di substrato consentendo la defosforilazione esclusivamente dei substrati contenenti fosfotirosina, stabilizzati dai legami a idrogeno formatosi tra i residui Asn<sup>14</sup>, Ser<sup>18</sup>, Ser<sup>42</sup>, and His<sup>71</sup>.

Il loop variabile dell'isoforma F1 della LMW-PTP umana risulta, invece, essere più stabile grazie alla presenza di due residui di prolina in posizione 53 e 54, assenti nella sequenza di MptpA <sup>[2]</sup>.

Le similitudini sono confermate anche dal confronto tra la sequenza di MptpA e quella di altre fosfatasi LMW presenti in organismi come lievito (LTP1 di *Saccharomyces cerevisiae*), uomo (HCPTP-A), bovino (BPTP), parassita eucariote (TPTP da *Tritrichomonas foetus*), e batterio (YwiE da *Bacillus subtilis*). Nelle sequenze confrontate sono identificabili i residui che compongono i 3 loop fondamentali per il corretto funzionamento e l'attività enzimatica.

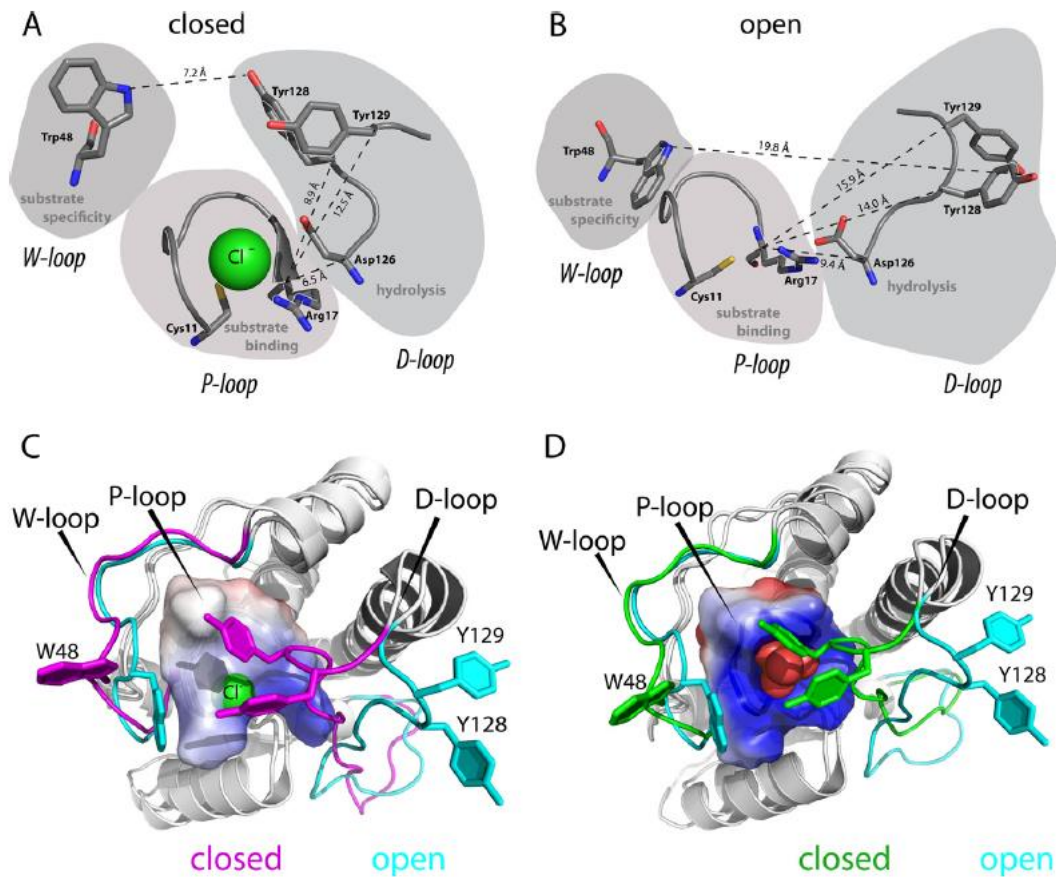
Come visibile in figura 1.2.2. l'analisi delle sequenze di diverse LMW-PTPs presenti in organismi differenti rivela un'identità compresa tra il 26 ed il 38%.



**Figura 1.2.2.** Allineamento multipla della sequenza di LMW-PTP, con alcuni elementi di struttura secondaria di MptpA. I loop vengono evidenziati con colori differenti; il P-loop in blu, il W-loop in verde ed il D-loop in magenta. La figura è stata ricavata tramite ESPript2.2, applicando come matrice punteggio BLOSUM62 [13].

La sequenza del sito attivo (H/V)CX<sub>5</sub>R(S/T) risulta altamente conservata in tutte le specie in esame, così come il motivo del D-loop (Asp<sup>126</sup> e Pro<sup>127</sup> in MptpA) ed i residui idrofobici Tyr<sup>128</sup> e Tyr<sup>129</sup>. È possibile notare che anche la Ser<sup>42</sup>, residuo che aiuta a stabilizzare lo scheletro del P-loop attraverso la rete di legami a idrogeno, viene mantenuta inalterata in tutte le specie, come pure il Glu<sup>22</sup> presente nella stessa ansa. La differenza principale risiede nella presenza, in MptpA, di un triptofano in posizione 48 (Trp<sup>48</sup>) nel W-loop che è scarsamente presente in altre LMW-PTP.

Il gruppo di ricerca di Stehle è stato anche in grado di ottenere la struttura dell'oloenzima di MptpA complessato con un atomo di cloro [13]. Questa struttura è stata confrontata con la conformazione dell'apoenzima al fine di valutare gli eventuali riarrangiamenti spaziali e strutturali dati dai movimenti dei 3 loop (P, W e D), a seconda delle variazioni nell'ambiente di reazione (fig. 1.2.3).



**Figura 1.2.3.** Transizione dalla forma aperta a quella chiusa di MptpA. I tre loop vengono messi in risalto. A) Forma chiusa (-olo) di MptpA (PDB: 1U2P) complessata con lo ione cloro legato a Cys<sup>11</sup> del P-loop. B) Forma aperta di MptpA (-apo) (PDB: 2LUO). C) Sovrapposizione strutturale tra apo-MptpA, in *azzurro*, e olo-MptpA, in *magenta*. D) Sovrapposizione strutturale tra apo-MptpA, in *azzurro*, e olo-BTPP (PDB: 1PNT), in *verde*. Le immagini sono state generate con PyMOL <sup>[13]</sup>.

Il confronto tra le due strutture NMR permette di visualizzare l'effettiva transizione che si verifica dalla forma aperta (-apo) alla forma chiusa (-olo) dell'enzima. Il D-loop, che comprende le due tirosine 128 e 129, è il principale elemento coinvolto in questa transizione. Come osservabile in figura, infatti, tale loop va a ripiegarsi verso il P-loop e il W-loop.

Il calcolo delle distanze tra i residui coinvolti nella catalisi ha, infatti, evidenziato un loro avvicinamento nel caso dell'oloenzima, indice di un riarrangiamento strutturale che avviene in presenza del substrato. I due residui Asp<sup>126</sup> e Arg<sup>17</sup>, ad esempio, sono distanziati di circa 9 Å quando l'enzima si trova nella forma non complessata mentre si avvicinano di 3 Å nella forma chiusa. Anche la distanza tra Trp<sup>48</sup> e Tyr<sup>128</sup> aumenta nettamente nell'apoenzima (circa 12 Å).



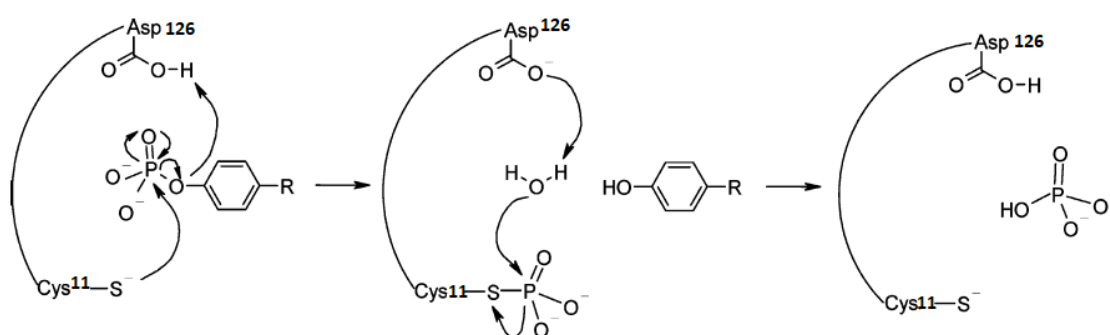
### 1.3 – MPTPA: MECCANISMO CATALITICO

Come descritto nelle precedenti sezioni, il meccanismo catalitico di defosforilazione dei substrati contenenti fosfotirosina è comune a tutte le PTPs, inclusa anche MptpA.

Numerosi sono gli studi effettuati negli ultimi anni volti ad indagare dettagliatamente il comportamento catalitico di questi enzimi. Tutte le proteine tirosin-fosfatasi idrolizzano le tirosine fosforilate generando, come prodotti di reazione, il residuo amminoacidico libero ed il fosfato inorganico. La loro struttura proteica è idonea a promuovere tale reazione.

Il meccanismo catalitico di idrolisi del fosfato, descritto in figura 1.3.1. viene suddiviso in due stadi <sup>[14]</sup>. Il primo stadio consiste nell'attacco nucleofilo della cisteina catalitica (Cys<sup>11</sup>), presente nel P-loop, al gruppo fosfato della tirosina, presente nel substrato di reazione. Contemporaneamente, l'acido aspartico<sup>126</sup> del D-loop, correttamente posizionato, funge da acido cedendo un protone all'ossigeno del gruppo fosfato in esame, rompendo così il legame P-O e generando il primo prodotto di reazione, ovvero la tirosina. Tale sostituzione lascia il gruppo fosfato legato covalentemente al nucleofilo tramite un legame tioestere.

Durante il secondo stadio della reazione, l'aspartato<sup>126</sup> si comporta invece da base, strappando un protone ad una molecola d'acqua presente nel mezzo, attivandola. Questa, quindi, è libera di idrolizzare, mediante attacco nucleofilo, l'intermedio cistenil-fosfato formatosi in precedenza, andando a rilasciare il secondo prodotto di reazione, il fosfato inorganico (Pi). L'enzima viene infine rigenerato per effettuare un secondo ciclo di reazione.



**Figura 1.3.1.** Meccanismo catalitico di defosforilazione catalizzato da PTP <sup>[14]</sup>.

Il secondo stadio della reazione viene considerato il *rate limiting step*, ovvero lo stadio più lento, limitante la reazione.

La normale pKa della cisteina in soluzione è pari a 8.3-8.5. In realtà numerosi studi riguardanti diverse fosfatasi riportano valori inferiori di pKa come, ad esempio, 4.67 per la PTP di *Yersinia*, 5.57 per la PTP1 di ratto, 6.75-7.52 per LMPTP di fegato bovino [14]. Dunque, le cisteine catalitiche delle PTPs risultano essere più acide delle cisteine libere e possono quindi essere ionizzate a pH fisiologico.

La forma tiolato della cisteina del sito attivo viene stabilizzata grazie all'azione del gruppo ossidrilico della serina e dei residui di treonina presenti nella sequenza conservata del sito attivo. Questo viene agevolato anche dal fatto che il P-loop si trova vicino all'estremità N-terminale di una  $\alpha$  elica. La serina<sup>19</sup> della tirosin-fosfatasi BPTP, ad esempio, forma un legame idrogeno con la cisteina<sup>12</sup> del sito attivo e questo causa un decremento della pKa. Mutazioni che alterano in qualche modo la stabilizzazione della cisteina catalitica causano, quindi, un aumento della pKa del gruppo tiolico ed un'alterazione della conformazione del sito attivo.

Anche l'acido aspartico (Asp<sup>126</sup>) del D-loop è di rilevante importanza, infatti la mutazione di questo residuo provoca un *turnover* alterato. Tale residuo funge da base nel secondo stadio della reazione, portando all'attivazione di una molecola d'acqua che consente l'idrolisi dell'intermedio di reazione.

In alcuni studi (Pannifer et al.) è stato osservato che il residuo che coordina l'acqua in PTP1B (1.1.1) e *Yersinia* PTP è un residuo di glutammina [15]. La mutazione di questo residuo porterebbe all'accumulo dell'intermedio di reazione. La stessa cosa potrebbe succedere in MptpA se l'Asp<sup>126</sup> venisse sostituito da un residuo di alanina, portando l'energia del cistenil-fosfato ad un valore inferiore a quello del complesso enzima-substrato [14].

#### 1.4 – MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS E ADATTAMENTO A pH ACIDI

La sopravvivenza in ambiente acido è stata ampiamente indagata in patogeni enterici, come *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* e *Helicobacter pylori*, capaci di resistere al pH estremamente acido (pH da 2 a 3) dello stomaco durante la digestione. Molto meno è noto nel caso di patogeni batterici intracellulari obbligati o facoltativi, come *Mycobacterium tuberculosis*. In particolare, poco si sa della loro risposta al sistema immunitario dell'ospite e di come resistono nell'ambiente moderatamente acido del fagosoma/fagolisosoma.

Studi *in vivo* ed *in vitro* indicano che molte specie di *Mycobacterium*, tra cui anche *M. tuberculosis*, sono in grado di contrastare la maturazione del fagosoma all'interno dei macrofagi, inibendo la fusione dei fagosomi con i lisosomi, e risiedendo quindi in un ambiente leggermente acido con pH ~ 6,2 [16].

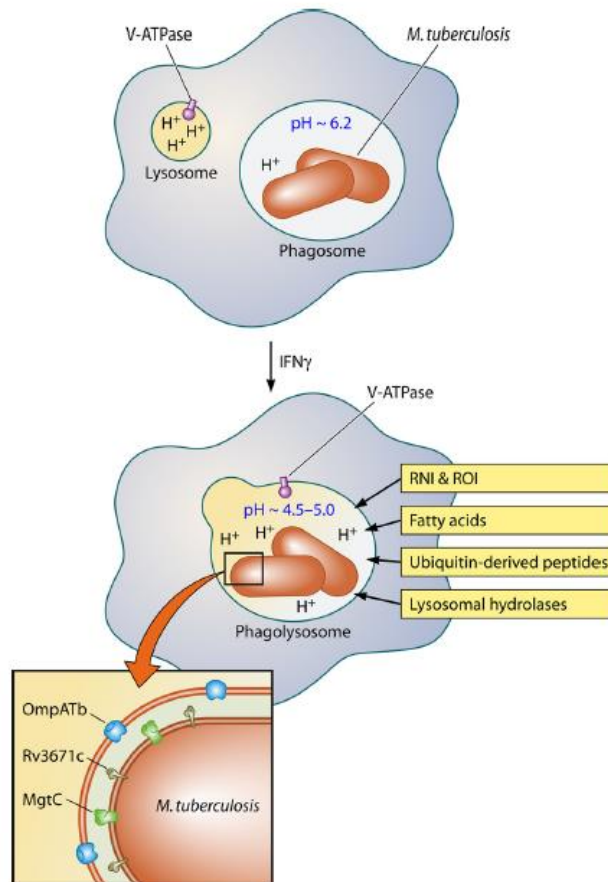
Le condizioni di crescita adottate *in vitro*, influenzate da alcuni fattori come la densità batterica e la composizione del terreno di coltura, possono compromettere la sopravvivenza e lo sviluppo dei batteri a pH acidi.

Per quanto riguarda *Mycobacterium tuberculosis*, l'unica via di infezione nell'uomo avviene per inalazione attraverso le vie polmonari. Studi *in vitro* indicano che *M. tuberculosis* prolifera bene a pH compreso tra 5.8 e 6.7 mentre non mostra replicazione a pH uguali, o inferiori, a 5.5. Questa evidenza è correlabile a ciò che si osserva *in vivo* nel fagolisosoma dove le condizioni di vita del batterio vengono alterate dal basso pH presente.

Come anticipato, il micobatterio è in grado di bloccare il normale processo di maturazione del fagosoma dei macrofagi, evento fondamentale per assicurare la propria sopravvivenza. Il compartimento fagosomiale viene acidificato tramite una pompa protonica (V-ATPasi vacuolare) di conseguenza l'assenza o l'inattivazione di tale pompa porta ad una mancata acidificazione del fagosoma.

In condizioni normali, inoltre, è stato osservato che la presenza dell'interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) induce una corretta attivazione immunologica del macrofago, evento che determina l'acidificazione del compartimento fagosomiale (pH 4.5-5.0). Poiché l'IFN- $\gamma$  induce l'attivazione dei macrofagi e l'acidificazione dei fagosomi contenenti *M. tuberculosis in vitro*, è probabile che ciò avvenga anche *in vivo*. È stato dimostrato, infatti, che i pazienti affetti da tubercolosi mostravano bassi livelli di IFN- $\gamma$ , insufficienti per abbassare il pH dell'ambiente e distruggere l'agente patogeno.

*Mycobacterium tuberculosis* è in grado di secernere due importanti tirosin-fosfatasi, MtpA e MtpB, che esplicano un importante ruolo come fattori di virulenza permettendo la sopravvivenza del batterio all'interno dell'ospite mediante evasione della risposta immunitaria. Di fondamentale importanza per l'infezione dei macrofagi è l'enzima MtpA, oggetto di questo studio, poiché impedisce direttamente la normale maturazione del fagosoma e la fusione fagosoma-lisosoma che permetterebbe l'eliminazione del micobatterio, come descritto in precedenza. In particolare, l'enzima riesce a defosforilare la proteina VPS33B (*vacuolar protein sorting 33B*), presente nella membrana del macrofago, responsabile del controllo della fusione fagosoma-lisosoma. La defosforilazione di VPS33B da parte di MtpA è mediata dalla subunità H della pompa vacuolare H<sup>+</sup>-ATPasi, un complesso proteico composto da più subunità e coinvolto nell'acidificazione del fagosoma, come descritto prima. L'inattivazione di VPS33B tramite defosforilazione porta quindi al blocco della fusione fagosoma-lisosoma, inibendo così la risposta cellulare all'infezione [13,16].



**Figura 1.4.1.** *M. tuberculosis* all'interno del macrofago. Nei macrofagi a riposo, *M. tuberculosis* compromette la maturazione del fagosoma e risiede in un compartimento leggermente acido. L'attivazione con l'interferone IFN- $\gamma$  porta alla maturazione del fagosoma e alla fusione del fagosoma-lisosoma <sup>[16]</sup>.

MptpA riveste, quindi, un ruolo essenziale nel processo di infezione di *Mycobacterium tuberculosis* e proprio per questo motivo può rappresentare un bersaglio ideale per l'identificazione di nuovi farmaci o inibitori.

## 1.5 – INIBITORI DI TIROSIN-FOSFATASI

Molteplici patologie umane derivano da un funzionamento non corretto delle vie di trasduzione del segnale correlate frequentemente alla fosforilazione delle proteine. Un'anomala fosforilazione della tirosina, che costituisce una delle principali vie di trasduzione del segnale, può infatti portare all'insorgere di malattie come cancro e diabete <sup>[3]</sup>.

Numerose PTPs sono associate alla manifestazione di disfunzioni e patologie nell'uomo. Ad esempio, come già visto nel capitolo 1.1.1, il complesso PTP1B-fosfopeptide IRK risulta essere una componente critica del controllo della segnalazione dei livelli di insulina, mentre il gene soppressore PTEN risulta mutato in diversi tipi di tumori, compresi il tumore al cervello, alla mammella e alla prostata. Un altro esempio è dato dal gene *EPM2A*, che codifica per una fosfatasi a doppia specificità (Laforina), la cui mutazione provoca epilessia progressiva, contraddistinta da convulsioni e deterioramento neurologico cumulativo [17].

Considerato l'elevato numero di PTPs umane [7] è ragionevole affermare che l'individuazione di specifici inibitori per ciascun membro di tale famiglia porterebbe allo sviluppo di terapie fondamentali per contrastare numerose patologie umane.

In maniera analoga ad altre PTPs, anche MptpA è da anni oggetto di studio come bersaglio per la ricerca di nuovi farmaci dato il suo ruolo chiave nella patogenesi di *M. tuberculosis*. L'approccio più utilizzato per la formulazione e la progettazione di inibitori è basato sull'individuazione di molecole capaci di inattivare il sito attivo. In alternativa, è possibile ipotizzare anche degli inibitori che non legano il sito attivo ma che sono specifici per altri siti adiacenti. Numerosi studi condotti su PTP1B, infatti, hanno evidenziato la presenza di un secondo sito, vicino al sito attivo, che risulta essere un buon bersaglio per la progettazione di nuovi farmaci ed inibitori selettivi.

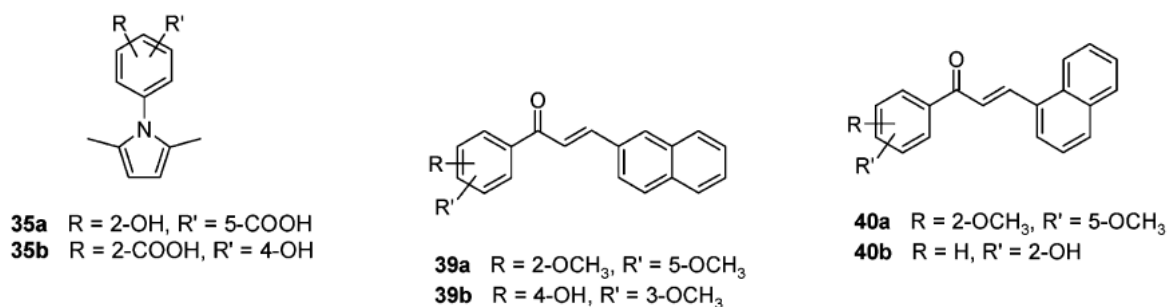
Come descritto in lavori precedenti [18,20] MptpA presenta un secondo sito allosterico ed è soggetto ad attivazione da substrato. Questo è evidente dall'andamento sigmoidale della cinetica enzimatica che non segue il classico modello di Michaelis-Menten ma è tipico di enzimi allosterici con una cinetica di Hill. L'elevata affinità che tale sito secondario presenta nei confronti del substrato risulta di notevole importanza per la realizzazione di inibitori specifici o di farmaci anti-tubercolosi innovativi rispetto a quelli indirizzati al solo sito attivo.

La progettazione di inibitori per MptpA prende spunto dalla struttura del substrato fosfotirosina, al fine di identificare composti naturali, o sintetizzare nuove molecole, caratterizzati da una struttura analoga in grado di mimare il substrato. Un vantaggio nella ricerca di inibitori di MptpA è dovuto al fatto che la proteina viene secreta da *M. tuberculosis*, di conseguenza non è richiesta la loro penetrazione attraverso la poco permeabile parete cellulare batterica.

Molte molecole, naturali e di sintesi, sono state analizzate negli ultimi anni. Tra queste, acidi benzoici con una componente pirrolica sostituiti principalmente con gruppi OH hanno mostrato una forte inibizione nei confronti di MptpA (composti 35 a e b, fig. 1.5.1), con valori di IC<sub>50</sub>

pari a 1.9 e 1.6  $\mu\text{M}$ , rispettivamente. Analogamente, anche strutture fluorurate con ammidi sembrano essere promettenti inibitori.

Altre ricerche hanno indagato con successo calconi, chetoni ed enoni aromatici (composti 39 a/b e 40 a/b fig. 1.5.1), dotati di un *core* naftalenico centrale e della presenza di gruppi -idrossi o -metossi capaci di instaurare legami a idrogeno con il sito attivo [2].



**Figura 1.5.1.** Strutture di inibitori di *Mptpa* [2].

Un limite nell'utilizzo di queste categorie di inibitori risiede nel fatto che la sequenza consenso del sito catalitico, essenziale per il legame col substrato, è altamente conservata in tutte le PTPs, di conseguenza ottenere una specificità nei confronti di una sola fosfatasi è pressoché impossibile.

## 1.6 – PRODUZIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI IN *ESCHERICHIA COLI*

L'ingegneria genetica comprende tutte quelle tecniche di manipolazione del DNA *in vitro* con lo scopo di modificare geni preesistenti, inserire nuovi geni all'interno di un microrganismo o addirittura introdurre specifiche mutazioni. Questo provoca, di conseguenza, cambiamenti nel genoma dell'organismo sottoposto a manipolazione.

La denominazione venne introdotta dal genetista R.D. Hotchkiss nel 1965 per identificare quelle tecniche capaci di trasferire in una cellula di un organismo vivente alcune informazioni genetiche che altrimenti non sarebbero presenti.

L'avvento della tecnologia del DNA ricombinante ha segnato, quindi, la linea di demarcazione fra biotecnologie tradizionali (basate su mutagenesi classica, incroci e selezione) e biotecnologie innovative, che consentono la manipolazione di frammenti di DNA differenti per ottenere un prodotto d'interesse. A partire dagli anni '70-80 è diventato perciò possibile

modificare in maniera mirata le informazioni genetiche di un organismo, generando un organismo geneticamente modificato (OGM) capace di produrre molecole di interesse o effettuare biotrasformazioni utili all'uomo. Un esempio è la produzione di insulina, a partire dal 1982, sfruttando il batterio *Escherichia coli*.

La produzione di proteine ricombinanti permette di studiare la funzione/struttura di determinate proteine di interesse oltre che consentirne la produzione su scala industriale. A tale scopo, il gene eterologo, che può derivare da un organismo donatore o avere origine sintetica, viene clonato in un vettore di espressione e trasferito in un organismo ricevente, detto ospite, in grado di moltiplicarlo in grande quantità. Il vettore, o plasmide, di espressione è una molecola di DNA circolare indipendente dal cromosoma batterico che consente il clonaggio del gene d'interesse. Le fasi del clonaggio prevedono la digestione del vettore e del gene da clonare (taglio con enzimi di restrizione) e la successiva ligazione (DNA ligasi). Il costrutto ricombinante così ottenuto viene inserito nell'ospite prescelto mediante trasformazione e si procede alla selezione delle cellule che hanno ricevuto correttamente il costrutto e che sono in grado di moltiplicarlo mediante crescita in coltura. L'ultimo stadio del processo consiste nella corretta espressione del gene eterologo in modo da ottenere la proteina di interesse, la quale verrà purificata sfruttando diverse metodiche (ad esempio tecniche cromatografiche).

Il trasferimento di un plasmide all'interno dell'organismo ospite non avviene in maniera naturale, bensì attraverso un processo artificiale eseguito *in vitro* detto elettroporazione, che sfrutta un campo elettrico per creare dei pori temporanei nella membrana cellulare che consentono la penetrazione del materiale genetico al suo interno.

Uno degli organismi più utilizzati per la corretta espressione di geni eterologhi è il batterio gram-negativo *Escherichia coli*. Il vantaggio dell'utilizzo di quest'ultimo è dovuto a diverse sue caratteristiche quali la piccola dimensione (1  $\mu\text{m}$ ), che garantisce velocità di crescita, e la facilità di manipolazione dovuta alla presenza di un genoma di dimensioni ridotte. La genetica di *E. coli* è stata ampiamente studiata da anni e sono note le sue condizioni ottimali di crescita, anche in terreni semplici ed economici, che consentono elevata produzione di biomassa in tempi brevi. Inoltre, i sistemi di espressione adatti a questo batterio sono numerosi e ormai consolidati e consentono di ottenere alte rese del prodotto di interesse (mg-g/L).

Uno svantaggio, tuttavia, dell'utilizzo di *E. coli* come ospite per la produzione di proteine ricombinanti è dovuto al fatto che il batterio non è in grado di effettuare modifiche post-traduzionali (ad esempio fosforilazione, glicosilazione, acetilazione ecc) delle proteine

sovraesprese <sup>[19]</sup>. Una mancata modificazione post-traduzionale potrebbe causare inattività enzimatica.

### **1.6.1 – SISTEMA DI ESPRESSIONE *PET***

Un vettore di espressione opportunamente progettato deve possedere alcuni elementi fondamentali per garantire una corretta espressione proteica. Fra questi rientra il promotore, elemento che consente l'inizio della trascrizione, tipicamente situato a monte della sequenza che codifica per la proteina d'interesse. Il promotore è una sequenza specifica di DNA, riconosciuta dalla RNA polimerasi endogena. Solitamente i vettori più utilizzati contengono promotori forti per garantire un elevato livello di messaggero (mRNA) e, quindi, di proteina di interesse. I promotori più comuni sono, inoltre, inducibili, ossia vengono attivati in base alla necessità grazie all'aggiunta nel terreno di coltura di un componente, detto induttore, che consente l'attivazione del promotore stesso. Molto utilizzato è il promotore forte ed inducibile *lac* (promotore dell'operon del lattosio) che viene indotto tramite IPTG o lattosio.

Un altro elemento importante per controllare l'espressione genica è il terminatore, ovvero una sequenza posta a valle del gene target che determina la fine del processo di trascrizione.

Ogni vettore di espressione contiene, inoltre, un'origine di replicazione (*ori*) che consente la duplicazione ad opera della DNA polimerasi e un gene che conferisce resistenza ad un antibiotico (marcatore di resistenza), per la selezione delle cellule che hanno ricevuto il plasmide di interesse. Infine, devono essere presenti i siti di clonaggio, ovvero brevi sequenze di DNA riconosciute da specifici enzimi di restrizione che procedono al taglio del plasmide per il successivo clonaggio del gene d'interesse.

Il sistema di espressione impiegato in questo studio è un sistema a cascata a due stadi basato sull'utilizzo di un plasmide di espressione della serie pET (pET-Duet1, Novagen) e del ceppo BL21(DE3) di *Escherichia coli* come ospite batterico. Tale sistema sfrutta la RNA polimerasi del fago T7, il promotore T7 e il promotore *lac*.

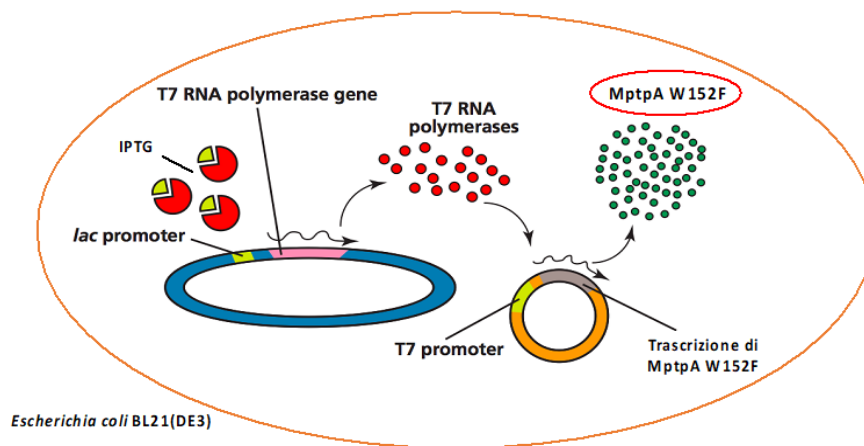
In dettaglio, il gene codificante la T7 RNA polimerasi (gene 1) è stato stabilmente integrato nel genoma del ceppo BL21(DE3), opportunamente ingegnerizzato, sotto il controllo del promotore inducibile *lac* (indotto da IPTG o lattosio). Il gene d'interesse, codificante per MtpA, è stato clonato nel plasmide pET-Duet1 a valle del promotore del fago T7. Tale promotore virale è un promotore forte riconosciuto specificatamente dalla RNA polimerasi virale e non da quella batterica. L'espressione del gene di interesse viene attivata solo in seguito



all'aggiunta, nel terreno di coltura, dell'induttore IPTG, che provoca a sua volta la sintesi della RNA polimerasi fagica. Una volta prodotto tale enzima, viene di conseguenza attivata la trascrizione del gene di interesse clonato a valle del promotore T7.

Si parla di sistema a cascata proprio perché devono avvenire più passaggi per ottenere il prodotto di interesse: 1) l'IPTG lega il promotore *lac*, induce la trascrizione dell'RNA messaggero per la RNA polimerasi T7 virale e tale mRNA viene tradotto in proteina; 2) l'RNA polimerasi T7 lega il promotore specifico T7, trascrive il messaggero che viene poi tradotto nella proteina d'interesse, MptpAW152F. Lo schema del sistema di espressione è riportato in figura 1.6.1.1.

Se il sistema funziona in maniera ottimale, è possibile ottenere una quantità di proteina ricombinante che corrisponde a circa il 30-40% delle proteine totali di *E. coli*.



**Figura 1.6.1.1.** Sistema di espressione a cascata per la produzione di MptpA basato sull'impiego della RNA polimerasi e il promotore del fago T7.

## 2. SCOPO DELLA TESI

La tubercolosi è una malattia infettiva trasmissibile per via aerea che colpisce i polmoni e che rientra ancora oggi tra le dieci principali cause di morte in tutto il mondo. Ogni anno almeno 9-10 milioni di persone sviluppano la TBC, il cui agente eziologico è il batterio patogeno *Mycobacterium tuberculosis*.

Tale micobatterio è in grado di secernere due importanti tirosin-fosfatasi, MtpA e MtpB, che esplicano un importante ruolo come fattori di virulenza permettendo la sopravvivenza del batterio all'interno dell'ospite mediante evasione della risposta immunitaria. In particolare, l'enzima MtpA impedisce la normale maturazione del fagosoma e la fusione fagosoma-lisosoma, attraverso la defosforilazione della proteina VPS33B, inibendo così la risposta cellulare all'infezione.

MtpA è un membro della famiglia delle tirosin-fosfatasi a basso peso molecolare ed è composta da 163 amminoacidi (17,9 kDa). La sua struttura presenta tre fondamentali regioni: il W-loop, il D-loop ed il P-loop, che fiancheggiano il sito attivo dell'enzima altamente specifico per substrati contenenti tirosine fosforilate. Il riarrangiamento strutturale ed il movimento di questi loop permettono all'enzima di catalizzare efficacemente la reazione di defosforilazione del substrato.

Obiettivo del seguente lavoro di tesi è stato analizzare il comportamento catalitico di MtpA in funzione del pH e valutare l'eventuale inibizione dell'enzima ad opera di alcune molecole naturali e di sintesi.

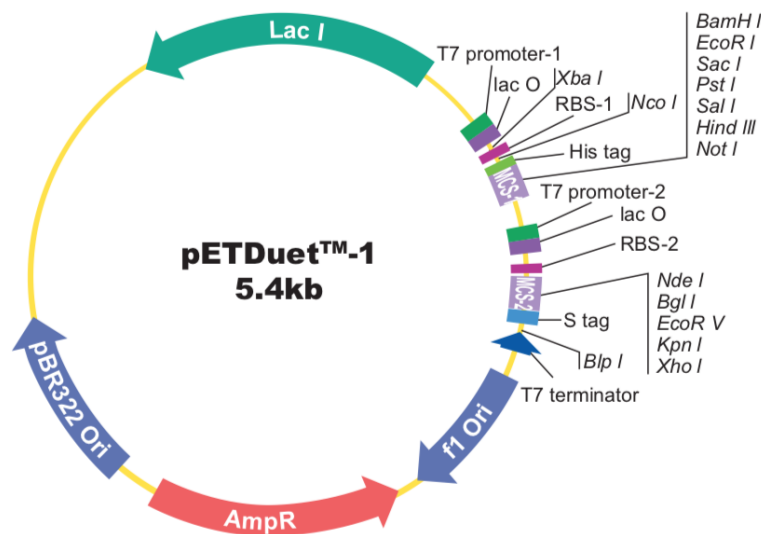
A tale scopo è stata prodotta la variante MtpAW152F, caratterizzata dalla presenza di un solo triptofano, utilizzando procedure ottimizzate in precedenti lavori di Tesi <sup>[20]</sup> <sup>[21]</sup>. La seconda parte del lavoro ha previsto lo studio dell'attività enzimatica mediante saggi di attività in *steady-state* e *pre-steady-state* utilizzando, a seconda dei casi, il substrato commerciale *p*-NPP o la fosfotirosina. È stata, inoltre, studiata l'affinità di legame tra enzima e substrato tramite analisi SPR per ricavare le costanti di dissociazione in funzione del pH di reazione. Infine, considerato il ruolo chiave svolto da MtpA nella patogenesi, è stata valutata l'eventuale inibizione dell'attività enzimatica ad opera di composti naturali, i glucosinolati, e di un inibitore di sintesi (L335-M34).

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 – VETTORE DI ESPRESSIONE

Un vettore di espressione è un plasmide, cioè una molecola di DNA circolare indipendente dal cromosoma batterico che permette il clonaggio del gene eterologo e la sua successiva espressione all'interno di un organismo ospite in grado di moltiplicarlo.

Il vettore scelto per l'espressione della proteina MtpA ricombinante è il plasmide *pETDuet-1* (GenScript, Piscataway, USA). I plasmidi della serie *pET* presentano caratteristiche utili per il clonaggio e l'espressione di proteine ricombinanti in una vasta serie di ceppi di *Escherichia coli*. Di seguito è riportata la mappa del vettore utilizzato in questo lavoro di Tesi:



**Figura 3.1.1.** Plasmide *pETDuet-1*. Si notino il promotore T7, l'operone *lac*, i siti di restrizione utilizzati per clonaggio (*NcoI* e *PstI*) e il gene di resistenza all'ampicillina.

Il vettore *pETDuet-1* consente di clonare il gene d'interesse a valle del promotore del fago T7: si tratta di un promotore forte ed inducibile riconosciuto dalla RNA polimerasi T7. In questo caso, per il clonaggio di MtpA, sono stati utilizzati i siti di restrizione *NcoI* e *PstI* (MCS1). Nel vettore è presente anche il gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina, che consente la selezione delle cellule contenenti il plasmide. Tramite induzione con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalattopiranoside) è possibile attivare l'espressione a cascata del gene d'interesse.

### 3.2 – MUTANTE DI MptpA

La proteina MptpA è costituita da 163 amminoacidi. La sequenza amminoacidica della proteina *wild-type* è riportata di seguito:

MSDPLHVTFVCTGNICRSPMAEKMFAQQLRHRGLGDAVRVTSAGTGNWHVGSCAD  
ERAAGVLR AHGYPTDHRAAQVGTEHLAADLLVALDRNHARLLRQLGVEAARVRML  
RSFDPRSGTHALDVEDPYYGDHSDFEVFAVIESALPGLHDWVDERLARNGPS

Nella struttura primaria vengono evidenziati in rosso i due unici triptofani presenti (W<sup>48</sup> e W<sup>152</sup>) ed una cisteina in posizione 11 che è di fondamentale importanza nel meccanismo catalitico.

Oggetto di questo studio risulta essere il mutante MptpAW152F, contraddistinto dalla mutazione del triptofano in posizione 152 in fenilalanina. Di seguito si riporta la sequenza amminoacidica di MptpAW152F ed in blu viene visualizzata la mutazione W152F:

MSDPLHVTFVCTGNICRSPMAEKMFAQQLRHRGLGDAVRVTSAGTGNWHVGSCAD  
ERAAGVLR AHGYPTDHRAAQVGTEHLAADLLVALDRNHARLLRQLGVEAARVRML  
RSFDPRSGTHALDVEDPYYGDHSDFEVFAVIESALPGLHDFVDERLARNGPS

La presenza di un solo triptofano nella struttura proteica permette di effettuare studi di fluorescenza, come descritto di seguito (3.9.2). La sequenza genica codificante per il mutante MptpAW152F è stata clonata nel vettore di espressione *pETDuet-1* (3.1).

### 3.3 – CEPPO BATTERICO E TERRENI DI COLTURA

Il costrutto ricombinante *pETDuet-1-MptpAW152F* è stato introdotto mediante elettroporazione all'interno del ceppo BL21(DE3) di *E. coli* (Novagen) caratterizzato dal seguente genotipo: F<sup>-</sup> *ompT hsdSB* (rB<sup>-</sup>mB<sup>-</sup>) *gal dcm* DE3 (*lacI::PlacUV5::T7 gene1*). Il ceppo di *E. coli* BL21(DE3) è opportunamente ingegnerizzato in modo da possedere, integrato nel proprio genoma, il gene codificante la T7 RNA polimerasi sotto il controllo del promotore *lac* (inducibile da IPTG o lattosio).

I batteri ricombinanti sono stati coltivati in terreno ricco LB (Luria-Bertani), solido o liquido, avente la composizione descritta nelle tabelle 3.3.1 e 3.3.2. I terreni vengono sterilizzati tramite un ciclo in autoclave a 120 °C per 20 minuti prima di aggiungere ampicillina alla concentrazione finale di 100 µg/mL.

<b>Terreno LB solido</b>	
Triptone	10 g/L
Estratto lievito	5 g/L
NaCl	10 g/L
Agar	15 g/L

Tabella 3.3.1. Composizione del terreno LB solido.

<b>Terreno LB liquido</b>	
Triptone	10 g/L
Estratto lievito	5 g/L
NaCl	10 g/L
-	-

Tabella 3.3.2. Composizione del terreno LB liquido.

### **3.4 – PROTOCOLLO DI ESPRESSIONE DELLA PROTEINA**

Il protocollo di espressione riportato di seguito è stato messo a punto nei precedenti lavori di tesi <sup>[20]</sup> <sup>[21]</sup>. Allo scopo di ottenere colonie singole su piastre Petri, lo stock di *E. coli* BL21(DE3)/pET-Duet-1-MptpAW152F, conservato in glicerolo a -20 °C, è stato scongelato in terreno solido LB in presenza di ampicillina e cresciuto per una notte a 37 °C.

La procedura prevede poi di effettuare il pre-inoculo di una colonia singola in 1,5 mL di terreno LB con ampicillina a 37 °C per 8 ore in incubatore con agitazione (180 rpm). Si prosegue con una diluizione 1:1000 in 5 mL di terreno fresco LB addizionato di ampicillina e la coltura viene incubata overnight a 37 °C. Il giorno successivo viene misurata l'Assorbanza cellulare a 600 nm (OD<sub>600nm</sub>) utilizzando lo spettrofotometro monoraggio GeneQuant (Pharmacia-Amersham) per valutare l'avvenuta crescita della coltura. Si procede, quindi, all'inoculo di 3 beute contenenti 250 mL di terreno fresco LB e ampicillina diluendo la coltura overnight 1:500. Le colture vengono cresciute a 30 °C per circa 7-8 ore fino all'ottenimento di un valore di OD<sub>600nm</sub> compreso tra 1.3-1.4. Una volta ottenuta tale condizione, le colture vengono indotte aggiungendo 500 µL di IPTG (1 mM finale) e le beute vengono incubate in agitazione per 16 ore a 15 °C in incubatore termostato Dubnoff TRM 750.

Conclusa l'induzione, le cellule vengono raccolte mediante centrifugazione a 4400 rpm per 20 minuti a 4 °C e aliquotate in falcon in modo da ottenere dei pellet cellulari da 250 mL. Mediante pesata viene infine calcolata la resa in biomassa per 1 litro di coltura.

Come controllo, un'aliquota di 1 mL di coltura indotta viene prelevata, centrifugata a 4500 rpm per 15 minuti a 4 °C e utilizzata per verificare la corretta espressione proteica tramite corsa elettroforetica SDS-PAGE (3.7).

### **3.5 – PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA**

La fase di purificazione proteica, ottimizzata in precedenti lavori di tesi <sup>[20][21]</sup>, prevede più stadi: un primo frazionamento proteico tramite ammonio solfato seguito da due diversi passaggi cromatografici. Questi vengono condotti grazie all'apparato cromatografico GradiFrac (Pharmacia Biotech) munito di detector UV-Vis, impostato a 280 nm, in grado di rilevare gli amminoacidi aromatici presenti all'interno delle proteine. L'apparato è collegato ad un registratore a carta REC 102 (Pharmacia LKB) per la visualizzazione dei cromatogrammi.

La purificazione prevede la risospensione di un pellet cellulare da 250 mL di coltura indotta (3.4) in 25 mL di tampone di lisi (Tabella 3.5.1) addizionato di fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM finale per inibire le eventuali serin-proteasi presenti in soluzione. Il campione viene sottoposto a 3 cicli di sonicazione di 2 minuti con apparato Sonicator® 3000 (Misonix). Il ciclo è suddiviso in fasi di 15 secondi di impulso (18 W) seguito da 15 secondi di pausa. Il campione viene mantenuto in ghiaccio ad ogni ciclo di sonicazione effettuato. Conclusa la fase di sonicazione, la frazione proteica solubile viene recuperata mediante centrifugazione a 12.000 rpm a 4 °C per 30 minuti. Un'aliquota del campione viene analizzato mediante corsa elettroforetica e quantificato tramite MicroBradford (3.8).

**Tampone di LISI (pH 8.0)**

TrisHCl	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM

**Tabella 3.5.1.** *Composizione del tampone di lisi.*

#### **3.5.1 - PRECIPITAZIONE CON AMMONIO SOLFATO**

La frazione proteica solubile è stata sottoposta a frazionamento proteico preliminare tramite l'aggiunta di ammonio solfato  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 60% del valore di saturazione con lo scopo di eliminare proteine contaminanti a diversa idrofobicità. Il sale viene aggiunto lentamente mantenendo il campione in ghiaccio in agitazione per circa 1 ora. Il pellet proteico, ottenuto mediante centrifugazione a 12.000 rpm per 30 minuti a 4 °C, viene risospeso in 20 mL di tampone A (Tabella 3.5.1.1) e lasciato in agitazione per circa 15 minuti. Segue, quindi, un

nuovo ciclo di centrifugazione a 12.000 rpm per 30 minuti a 4 °C, al termine della quale è possibile prelevare il surnatante per il successivo caricamento in colonna.

Un'aliquota del campione introdotto in colonna viene analizzato mediante SDS-PAGE al fine di verificare la corretta estrazione della proteina di interesse (3.7). Il tampone A viene filtrato e degasato prima dell'utilizzo.

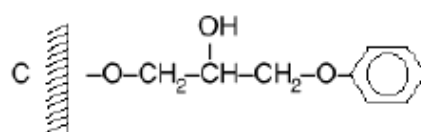
**Tampone A (pH 7.5)**

TrisHCl	50 mM
NaCl	3 M
EDTA	1 mM

**Tabella 3.5.1.1.** *Composizione tampone A.*

### **3.5.2 – CROMATOGRAFIA AD INTERAZIONE IDROFOBICA: HiTRAP PHENYL FF**

Il primo passaggio di purificazione consiste in una cromatografia ad interazione idrofobica condotta utilizzando la colonna HiTrap Phenyl FF da 5 mL (GE Healthcare). La matrice è a base di agarosio altamente reticolato (6%) e funzionalizzato con gruppi fenilici idrofobici (figura 3.5.2.1). Questo tipo di cromatografia permette la separazione delle proteine sulla base della loro diversa idrofobicità e sfrutta, quindi, la presenza di zone idrofobiche nella struttura terziaria proteica in grado di interagire con gruppi idrofobici presenti sulla matrice utilizzata come fase stazionaria.



**Figura 3.5.2.1.** *Fase stazionaria colonna cromatografica HiTrap Phenyl FF* <sup>[22]</sup>.

La colonna HiTrap Phenyl FF viene preventivamente lavata con 50 mL di acqua, filtrata e degasata, e condizionata con un uguale volume di tampone A (tab. 3.5.1.1). Il flusso viene mantenuto costante per tutto il processo di purificazione a 1 mL/min (pompa peristaltica P1, Pharmacia Biotech). Una volta caricato il campione in colonna, viene eseguito nuovamente un lavaggio con il tampone A per staccare le proteine debolmente legate alla fase stazionaria. L'eluizione viene effettuata tramite un gradiente inverso di NaCl (da 3 a 0 M) impiegando il tampone B (tabella 3.5.2.2) che permette di rimuovere dalla resina le proteine a crescente

idrofobicità. Aliquote delle frazioni da 1 mL, raccolte durante l'eluizione, vengono in seguito analizzate tramite elettroforesi per verificare la presenza della proteina d'interesse (3.7). Infine, la resina viene rigenerata con il tampone B (100 %) e successivamente viene lavata con acqua prima di eseguire un lavaggio finale con EtOH 20 %.

**Tampone B (pH 7.5)**

TrisHCl	50 mM
EDTA	1 mM

**Tabella 3.5.2.2.** *Composizione tampone B.*

Tutte le soluzioni vengono filtrate e degasate tramite apparato Millipore prima dell'utilizzo.

### **3.5.3 – CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE MOLECOLARE: SUPERDEX 200**

Il secondo passaggio di purificazione consiste in una cromatografia ad esclusione molecolare che utilizza una colonna Superdex 200 (GE Healthcare, h=64 cm, diametro = 1,6 cm,  $V_t = 128,6$  mL). Tale cromatografia consente di separare le molecole a seconda della loro dimensione, permettendo così l'eliminazione di tutte le proteine con pesi molecolari maggior o minori rispetto a MtpA. La colonna viene refrigerata a 4 °C per tutto il processo ed il flusso viene mantenuto costante a 0,62 mL/min tramite una pompa a pistoncini P50 (GE Healthcare). Prima del caricamento del campione, la colonna viene lavata con acqua e condizionata con il tampone TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 8.

Il pool di frazioni scelte sulla base dell'analisi elettroforetica eseguita successivamente alla cromatografia ad interazione idrofobica (3.5.2) viene opportunamente concentrato mediante ultrafiltrazione (3.6). Il campione così ottenuto (ca 2 mL) viene centrifugato a 12.000 rpm per 20 minuti a 4 °C e caricato in colonna Superdex200 mediante un loop iniettore da 2 mL. Durante l'eluizione vengono raccolte frazioni da 0,9 mL poi analizzate mediante SDS-PAGE insieme ad un'aliquota del campione pre-colonna. Ultimata la separazione, la colonna viene lavata con acqua degasata ed EtOH 20 %.

### **3.6 – CONCENTRAZIONE MEDIANTE ULTRAFILTRAZIONE**

L'ultrafiltrazione (UF) consiste in un metodo fisico di filtrazione che opera attraverso l'utilizzo di una membrana semi-permeabile. La forza motrice sfrutta un flusso d'azoto che permette il



passaggio delle proteine più piccole attraverso i pori della membrana in uso e la ritenzione delle proteine a peso molecolare più elevato. L'ultrafiltrazione consente la concentrazione di un campione proteico oltre alla diluizione di particolari molecole contenute nel campione stesso; nel nostro caso, la procedura di ultrafiltrazione è stata impiegata, quando necessario, anche per abbassare la concentrazione salina del campione utilizzando come diluente il tampone TrisHCl 50 mM, EDTA 1 mM.

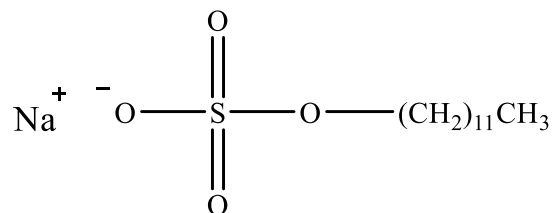
Per effettuare l'analisi è stata utilizzata una cella Amicon (Millipore) equipaggiata di membrana in cellulosa rigenerata YM10 caratterizzata da un cut-off di 10 kDa adatto a trattenere la proteina di interesse (peso molecolare pari a 17,9 kDa). A seconda dei volumi da gestire è stata utilizzata una cella Amicon da 50 mL o 10 mL, eseguendo il processo a 4 °C.

Aliquote dei campioni pre e post ultrafiltrazione sono state prelevate per la quantificazione tramite MicroBradford (3.8).

### 3.7 – ELETTROFORESI SDS-PAGE

L'analisi SDS-PAGE è una metodica elettroforetica eseguita in condizioni denaturanti che consente di verificare la corretta espressione della proteina d'interesse, la dimensione ed il livello di purezza.

Questa analisi, a differenza dell'elettroforesi nativa, permette di separare le proteine unicamente sulla base del loro peso molecolare, utilizzando come denaturante l' SDS (Sodio Dodecil Solfato, figura 3.7.1), un detergente anionico che si lega fortemente alle proteine in rapporto di circa una molecola di SDS ogni due residui amminoacidici. La presenza del detergente, insieme alla bollitura del campione, destabilizzano la struttura terziaria, di conseguenza le proteine assumono una forma lineare dotata di carica netta negativa su tutta la superficie, rendendo trascurabile la carica intrinseca delle proteine native.



**Figura 3.7.1.** *Struttura dell' SDS (Sodio Dodecil Solfato) (ChemDraw).*

La corsa elettroforetica sfrutta un gel di poliacrilammide che, in base al grado di reticolazione o porosità, funziona da setaccio molecolare facendo migrare più velocemente le proteine di

piccole dimensioni e rallentando le proteine più grandi. La separazione proteica, in soluzione (*running buffer* TrisHCl 25 mM, glicina 200 mM, SDS 5 mM), sfrutta la presenza di un campo elettrico ottenuto mediante applicazione di una differenza di potenziale tra i due elettrodi della cella elettroforetica (Mini-Protean, BioRad).

I gel di poliacrilammide vengono preparati tramite polimerizzazione radicalica tra monomeri di acrilammide e piccole quantità di N,N'-metilene bis-acrilammide, agente in grado di formare legami crociati (cross-linking agent). La reazione ha luogo grazie all'aggiunta di ammonio persolfato (APS, BioRad), che viene decomposto a ione persolfato con la produzione del corrispondente radicale libero grazie all'iniziatore radicalico N,N,N',N'-tetrametilendiammina (TEMED, BioRad).

In questo lavoro di Tesi sono stati utilizzati gel di poliacrilammide reticolati al 15 % poiché MtpA è una proteina di piccole dimensioni (17,9 kDa). I gel, discontinui, sono composti da due parti ben distinte con funzioni differenti:

- *Stacking gel* (4%) a pH 6.8: porzione che serve per il caricamento dei campioni ed il loro compattamento
- *Running gel* (15%) a pH 8.8: porzione che funge da setaccio molecolare in cui avviene la reale separazione proteica

La loro composizione viene riportata nella tabella sottostante:

	<b>Running gel (15%)</b>	<b>Stacking gel (4%)</b>
Acqua	2,38 mL	3,05 mL
Tris-HCl (pH 8.8)	2,5 mL	-
Tris-HCl (pH 6.8)	-	1,25 mL
SDS (10%)	100 µL	50 µL
Acrilammide	5 mL	665 µL
APS (10%)	50 µL	25 µL
Temed	10 µL	5 µL
<b>Volume finale</b>	<b>10 mL</b>	<b>5 mL</b>

**Tabella 3.7.2.** *Composizione del gel denaturante (reagenti Bio-Rad).*

I campioni da separare in gel vengono preparati aggiungendo un'opportuna quantità di *sample buffer* 5X (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 40% glicerolo, 10% SDS, 5% β-mercaptoetanol 500 mM,

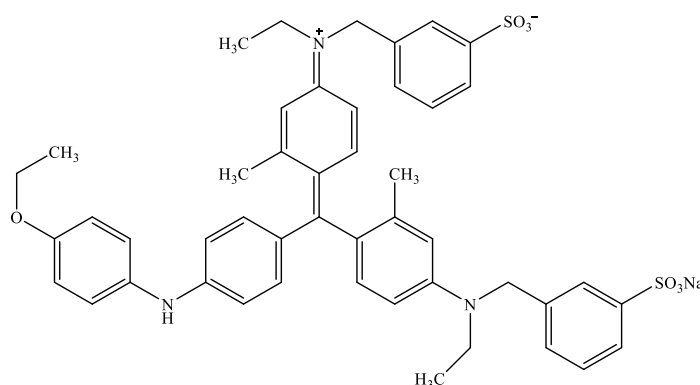
0,1% blu bromofenolo, acqua) prima di procedere alla bollitura per 5-6 minuti. Nei pozzetti del gel vengono caricati 18  $\mu\text{L}$  di ciascun campione. Parallelamente, viene separata in gel anche una soluzione di marcatori a peso molecolare noto (116 kDa, 66.2 kDa, 45.0 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18.4 kDa, 14.4 kDa, Thermo Scientific) utili come standard per il riconoscimento della proteina d'interesse e la verifica del suo peso molecolare.

Viene quindi impostato un voltaggio costante di 100-120 V per una durata di circa 2 ore. Per la corretta visualizzazione delle bande proteiche, a fine corsa il gel viene immerso in una soluzione di Coomassie Brilliant Blue R250 (fase di *staining*) per almeno 2 ore al fine di favorire il legame colorante-proteina. Il gel viene poi lavato in acqua e immerso in una soluzione decolorante (*destaining*, 10% acido acetico, 30% etanolo) per circa 1 ora fino alla comparsa delle bande.

### 3.8 – QUANTIFICAZIONE PROTEICA: METODO MICRO-BRADFORD

Per la quantificazione proteica viene utilizzato il metodo micro-Bradford (BioRad) che permette di rilevare concentrazioni di proteine nell'ordine di  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e si effettua in micropiastre da 96 pozzetti (volume totale pari a 200  $\mu\text{L}$ ).

Il saggio impiega il colorante aspecifico Coomassie Brilliant Blue G250 (figura 3.8.1) che contiene nella sua struttura gruppi  $\text{SO}_3^-$  in grado di interagire, mediante legami elettrostatici, con gli amminoacidi basici delle proteine, in particolare con i residui di arginina. Il colorante possiede, inoltre, anche anelli aromatici capaci di interagire con amminoacidi idrofobici. Quando il reattivo è libero in soluzione presenta un massimo di assorbimento a 465 nm (rosso), mentre quando il colorante si lega alle proteine in ambiente acido, il picco massimo si sposta a 595 nm. La soluzione proteica si colora di blu, la cui intensità aumenta a seconda della concentrazione di proteina contenuta all'interno del campione in analisi.



**Figura 3.8.1.** *Struttura colorante Coomassie Brilliant Blue G250 (ChemDraw).*

L'assorbanza viene letta utilizzando il lettore di micropiastre Microplate reader 550 (BioRad) ed ogni misurazione viene condotta in duplicato al fine di mediare i valori e minimizzare gli errori. Il bianco viene effettuato diluendo 5 volte il colorante Coomassie in acqua.

Per ricavare la concentrazione proteica di ogni campione incognito si utilizza la retta di taratura costruita impiegando concentrazioni note di albumina di siero bovino (BSA) (0.1 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.0250 mg/mL, 0.0125 mg/mL, 0.00625 mg/mL, 0.003125 mg/mL). L'equazione della retta di calibrazione è riportata di seguito:

$$y = 0,0133x - 0,0093$$

Dove:

- $y$  = assorbanza a 595 nm
- $x$  = concentrazione di proteina

### 3.9 – SINTESI DELL' INIBITORE L335-M34

La sintesi dell'inibitore L335-M34 è stata eseguita come da letteratura <sup>[23]</sup>, mentre la fase di purificazione è stata modificata.

Tutta l'apparecchiatura necessaria (pallone, pipa, tappi, ancoretta) viene posta in stufa al fine di asciugarla nel miglior modo possibile. Per prima cosa viene montato il pallone di reazione sotto atmosfera inerte di azoto ed aggiunto velocemente acido sulfacetico in quanto composto instabile. Viene quindi immessa all'interno del pallone la DMF (solvente) tramite siringa e nell'ordine descritto in letteratura vengono successivamente addizionati tutti i reagenti secondo le quantità annotate in tabella 3.10.1 (HBTU, 3,5-dibromo-4-metilnilina, DIEA, DMAP). La reazione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente, sotto atmosfera inerte per circa 3 ore.

Reagenti	PM (g/mol)	$\rho$ (g/mL)	gr.	mmol
Acido sulfacetico	140,12	/	0,14	1
DMF (5 mL)				
HBTU	379,25	/	0,379	1
3,5-dibromo-4-metilnilina	264,95	/	0,265	1
DIEA	129,24	0,742	0,52 mL	3
DMAP	122,17	/	0,012	0,1

**Tabella 3.10.1.** *Reagenti utilizzati per la reazione di coupling ammidico.*

Vengono quindi eseguite 3 estrazioni in imbuto separatore con diclorometano (DCM) e acqua con 2,5 mL della miscela di reazione ottenuta. Si è successivamente acidificato l'ambiente tramite l'aggiunta di HCl concentrato al 37%. La fase acquosa derivante da tali operazioni viene travasata in un pallone da 100 mL a cui viene collegata una trappola, mantenuta a freddo in azoto liquido, che permette la condensazione dell'HCl con lo scopo di evitare che questo finisca nella pompa da vuoto collegata al sistema dopo la trappola. Condensata la maggior parte di questo, viene smontata la trappola e mandato il contenuto al rotavapor e poi in pompa a vuoto per evaporare la maggior parte del solvente. La fase organica invece, viene anidrificata con MgSO<sub>4</sub>, filtrata tramite filtro a pieghe e portata al rotavapor. In ultimo passaggio questa viene posta in pompa a vuoto. Si eseguono quindi gli spettri NMR 300 MHz delle due fasi; fase organica sciolta in CDCl<sub>3</sub> e fase acquosa in DMSO. La prima fra queste ha riportato picchi corrispondenti al prodotto d'interesse, per questo viene sfruttata per procedere con la sintesi.

Alla fase organica d'interesse viene aggiunto DCM e HCl 1 M in provetta che porta alla formazione di due fasi liquide e di un precipitato bianco solido sul fondo filtrato tramite filtro Büchner. Di questo viene effettuato lo spettro NMR 300 MHz in DMSO che ha riportato segnali corrispondenti al prodotto d'interesse. L'analisi ESI-MS, eseguita in seguito, conferma che il composto ottenuto è sotto forma di sale di anilinio. Si è pertanto utilizzata la resina acida solfonica Dowex50WX8-100 al fine di scambiare l'anilinio (non presente nel composto voluto) con un protone H<sup>+</sup>. Maneggiando quantità piccole si è utilizzata una pipetta Pasteur riempita per circa 1,5-2 cm di resina, che viene condizionata con MeOH. Il precipitato d'interesse viene sciolto in metanolo e caricato su resina, raccogliendo il contenuto in un pallone da 100 mL sottostante. Effettuata questa operazione, la resina posta nella pipetta Pasteur viene eluita con MeOH, al fine di poter staccare via più quantitativo possibile di prodotto. Il pallone viene quindi portato a rotavapor. L'analisi NMR 300 MHz in CD<sub>3</sub>OD ha convalidato l'ottenimento del prodotto voluto.

### **3.10 – SAGGI DI ATTIVITÀ ENZIMATICA**

Lo spettrofotometro è uno strumento in grado di effettuare analisi quali-quantitative utilizzando una sorgente luminosa. Tale fonte emette luce che viene filtrata da un monocromatore che consente di selezionare la lunghezza d'onda a cui si desidera lavorare. La radiazione investe il campione contenuto in cuvetta e parte di questa viene assorbita, di conseguenza il raggio

incidente e il raggio trasmesso avranno intensità luminose diverse. Quest'ultimo termina nel detector che consente di valutarne l'intensità.

Lo spettrofotometro è in grado di rilevare l'assorbanza, definita come:  $A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$

Dove:

- $A$  = assorbanza del campione
- $I_0$  = intensità della luce incidente
- $I$  = intensità della luce trasmessa

Le determinazioni quantitative sono basate sul principio secondo il quale quando una radiazione attraversa un campione, questa verrà assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione della soluzione in esame. Assorbanza e concentrazione sono correlate attraverso la legge di Lambert-Beer che permette, quindi, di calcolare la concentrazione di un campione incognito misurandone l'assorbanza:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

In cui:

- $A$  = assorbanza del campione
- $\varepsilon$  = coefficiente di estinzione molare
- $c$  = concentrazione del campione
- $d$  = cammino ottico, per la cuvetta solitamente si considera 1 cm

I saggi di attività enzimatica in esame sono stati condotti utilizzando lo spettrofotometro a doppio raggio Cary 300 (Agilent Technologies) e cuvette in quarzo da 1 cm di cammino ottico.

Per visualizzare le tracce e gli andamenti cinetici è stato utilizzato il programma "*Kinetics*" in grado di effettuare interpolazioni del tratto lineare delle curve ottenute. Tale dato sperimentale rappresenta la velocità della reazione enzimatica espressa come  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ , valore che viene poi utilizzato per calcolare le velocità di reazione in nM/sec. I parametri cinetici  $V_{\text{max}}$ ,  $K_m$  e  $k_{\text{cat}}$  vengono ricavati grazie all'utilizzo del software Sigma-Plot attraverso l'interpolazione dei dati mediante l'equazione di Michaelis-Menten o di Hill.

Per la caratterizzazione di MptpAW152F sono stati utilizzati due substrati differenti: par-nitrofenilfosfato (*p*-NPP, Sigma-Aldrich) e fosfotirosina (pTyr, Sigma-Aldrich). I saggi sono stati eseguiti nel tampone universale 2X (tabella 3.9.1) a diversi pH a seconda della prova

condotta. Per diluire il tampone è stata utilizzata acqua priva di fosfato inorganico, inibitore dell'enzima.

#### **Tampone universale 2X**

Tris	50 mM
BisTris	50 mM
EDTA	4 mM

**Tabella 3.9.1.** *Composizione del tampone universale 2X.*

### **3.10.1 – SAGGI DI ATTIVITÀ IN STEADY-STATE**

La caratterizzazione cinetica di MptpA è stata inizialmente eseguita mediante saggi di attività in condizioni di *steady-state*, ovvero dopo la formazione del complesso enzima-substrato. Le analisi sono state effettuate utilizzando lo spettrofotometro Cary UV-Vis 300 (Agilent).

#### **3.10.1.1 – STUDIO CINETICO CON P-NPP**

Sono stati effettuati dei saggi preliminari per verificare l'attività enzimatica del lotto di proteina prodotto in presenza del substrato commerciale *p*-NPP. I saggi, condotti alla lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) di 405 nm per una durata totale di 600 secondi, sono stati eseguiti mantenendo costante la concentrazione di enzima (420 nM) e variando il substrato *p*-NPP a partire da uno stock 100 mM. In dettaglio, sono state utilizzate le concentrazioni 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 e 25 mM di substrato ed il saggio è stato eseguito nel tampone universale 2X (tab. 3.9.1) a pH 7.5 al fine di favorire la conversione del para-nitrofenolo in para-nitrofenolato.

Dai dati sperimentali sono stati ricavati i valori di  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  con lo scopo di calcolare, attraverso la legge di Lambert-Beer ed il coefficiente di estinzione molare del para-nitrofenolato ( $\epsilon=18.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), le velocità di reazione in nM/sec. Tramite software SigmaPlot è stato infine possibile effettuare l'interpolazione dei dati ottenuti e ricavare i parametri cinetici  $V_{\text{max}}$ ,  $K_m$ ,  $k_{\text{cat}}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_m$ .

#### **3.10.1.2 – STUDIO CINETICO CON P-TYR**

Analogamente alle prove condotte con il *p*-NPP sono stati effettuati dei saggi enzimatici per verificare l'attività della proteina in esame in presenza di un altro substrato, la fosfotirosina

(pTyr). Lo studio cinetico è stato condotto allo spettrofotometro impostando una lunghezza d'onda di 282 nm per una durata totale dell'analisi di 2400 secondi. La caratterizzazione cinetica è stata eseguita mantenendo costante la concentrazione di enzima (420 nM) e variando quella di substrato pTyr a partire da uno stock 50 mM disciolto in NaOH 100 mM: 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3.5, 5, 7.5, 10 e 15 mM. Il saggio è stato eseguito a pH 7.5 nel tampone universale 2X (tab. 3.9.1).

Dai dati sperimentali è stato possibile ricavati i valori di  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  utili per calcolare le velocità di reazione in nM/sec, sfruttando la legge di Lambert-Beer ed il coefficiente di estinzione molare ( $\Delta\epsilon$  Tyr-pTyr pari a  $0,96 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ). Usando tali valori, posti in grafico contro le diverse concentrazioni di substrato, è stata ottenuta la curva che descrive il comportamento cinetico dell'enzima. Tramite software SigmaPlot è stata infine effettuata l'interpolazione mediante equazione di Hill per ricavare i parametri cinetici  $V_{\text{max}}$ , coefficiente di Hill,  $K_m$ ,  $k_{\text{cat}}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_m$ .

### **3.10.1.3 – PROVE DI INIBIZIONE CINETICA CON GLUCOSINOLATI: GST E GTL**

È stata analizzata l'attività inibitoria di due glucosinolati (glucosidi solforati), metaboliti secondari prodotti da alcune piante della famiglia delle *Brassicaceae* (cavolo, broccolo, verza, ecc) e caratterizzati da elevata attività antiossidante naturale: gluconasturtina (GST) e glucotropolina (GLT). I due glucosinolati sono stati estratti e liofilizzati dal Centro di Ricerca per le colture industriali (CREA-CIN) di Bologna. Le molecole sono state disciolte in acqua priva di fosfati in modo da ottenere una soluzione 100 mM.

È stata eseguita la cinetica completa in presenza di concentrazioni costanti di MtpA (420 nM), GST (1 mM e 10 mM) e concentrazioni crescenti di substrato *p*-NPP (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 e 25 mM). I saggi, condotti a 405 nm per una durata di 600 secondi nel tampone universale a pH 7.5 (tab. 3.9.1), hanno previsto l'esecuzione di reazioni di controllo in assenza di inibitore. Concluse le prove, gli andamenti cinetici e i relativi parametri sono stati ricavati come descritto nei paragrafi precedenti. Il saggio è stato ripetuto nelle stesse condizioni anche in presenza del glucosinolato GTL alla concentrazione finale pari a 1 mM e 10 mM.

Nel caso del glucosinolato GST, sono state eseguite delle prove ulteriori utilizzando come substrato la fosfotirosina. A tale scopo i saggi sono stati condotti alla lunghezza d'onda di 282 nm, nel tampone universale, mantenendo costanti la concentrazione di enzima (420 nM) e di pTyr (1 mM) ed aggiungendo GST 1 mM o 10 mM.



#### **3.10.1.4 – PROVE DI INIBIZIONE CINETICA CON TIROSINA**

Sono stati effettuati dei saggi di attività per valutare l'eventuale effetto inibitorio della tirosina, prodotto di reazione, nei confronti di MptpA.

Le prove sono state condotte utilizzando alternativamente una concentrazione di pTyr pari a 1 mM e 10 mM in presenza di tirosina 1 mM e 0,1 mM nel tampone universale a pH 7.5 con una concentrazione costante di enzima (420 nM). Le reazioni di controllo sono state realizzate in maniera analoga ma in assenza di inibitore.

Le reazioni sono state preparate in cuvetta aggiungendo tampone, enzima, tirosina e acqua. Eseguita un'incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente, è stato aggiunto il substrato pTyr per innescare la reazione. L'incremento di Assorbanza, a 282 nm, è stato misurato per una durata totale di 2400 secondi. Le tracce ottenute sono state utilizzate per ricavare i valori di  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  (interpolazione con il programma *Kinetics*).

Saggi analoghi sono stati eseguiti variando il pH del tampone a 6.5.

#### **3.10.1.5 – SAGGI DI ATTIVITÀ IN PRESENZA DI TIROSINASI**

Per eliminare un'eventuale inibizione dovuta alla formazione di tirosina durante la reazione di idrolisi di pTyr catalizzata da MptpA sono stati eseguiti dei saggi in presenza di tirosinasi (Sigma T3820). L'enzima (25.000 U) è stato disciolto in 1 mL di TrisHCl 50 mM pH 7.5 e sono state utilizzate 50 unità/saggio (2  $\mu\text{L}$ ). Le misurazioni, della durata di 1200 secondi, sono state eseguite a 282 nm, nel caso dei controlli in assenza di tirosinasi, oppure a 295 nm in presenza di tirosinasi.

Sono state eseguite due prove con una concentrazione crescente di MptpA, pari a 420 e 840 nM, mantenendo costante il substrato pTyr (10 mM) nel tampone universale a pH 7.

Il saggio con i due enzimi accoppiati, MptpA (primario) e tirosinasi (accoppiante), è stato eseguito a 295 nm utilizzando due cuvette. È stata preparata una miscela di reazione da 2,2 mL contenente: 1100  $\mu\text{L}$  di tampone universale 2X pH 7, 440  $\mu\text{L}$  di pTyr, 4,4  $\mu\text{L}$  di tirosinasi, 665  $\mu\text{L}$  di acqua senza Pi. Un'uguale aliquota della miscela è stata aggiunta in entrambe le cuvette per registrare lo zero. Nella cuvetta "campione" è stato quindi aggiunto l'enzima MptpA (420 o 840 nM) mentre nella cuvetta di riferimento è stato aggiunto un ugual volume di acqua. Dalle tracce ottenute, tramite interpolazione con il programma *Kinetics*, è stato possibile ricavare i valori di  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ .

### **3.10.1.6 – PROVE DI INIBIZIONE CINETICA CON INIBITORE SINTETICO L335-M34**

Per valutare l'effetto inibitorio del composto sintetico L335-M34 (3.10) sono stati condotti dei saggi spettrofotometrici in presenza, alternativamente, del substrato *p*-NPP e pTyr. L'inibitore è stato disciolto in 1 mL di MeOH (stock 11 mM) e diluito nel tampone universale a pH 7.5 in modo da preparare una soluzione 25  $\mu$ M da utilizzare nelle prove.

#### **SUBSTRATO P-NPP**

I saggi sono stati condotti nel tampone universale a pH 7.5 mantenendo costante la concentrazione di enzima (5 nM), utilizzando come substrato il *p*-NPP 1 mM e variando le concentrazioni di inibitore: 12.5, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 250 nM. La reazione di controllo è stata realizzata nelle stesse condizioni ma in assenza di inibitore. Le misurazioni, a 405 nm per una durata di 900 secondi, sono state eseguite aggiungendo le esatte quantità di tampone, enzima, acqua e inibitore in cuvetta ed incubando la miscela per 5 minuti prima di aggiungere il substrato. Le tracce sono state analizzate con il programma *Kinetics* per ricavare i valori di  $\Delta$ Abs/min.

#### **SUBSTRATO P'TYR**

Saggi analoghi ai precedenti sono stati effettuati in presenza del substrato pTyr. Le condizioni utilizzate in questo caso sono le seguenti: 420 nM di enzima, 10 mM di substrato e concentrazioni crescenti di inibitore pari a 100, 200, 400, 600 e 800 nM. Le misure sono state eseguite a 282 nm per una durata totale dell'analisi compresa tra i 2400 e i 3600 secondi. Le reazioni sono state preparate aggiungendo le esatte quantità di tampone, enzima, acqua e inibitore in cuvetta ed è stato effettuato il bianco dopo 10 minuti di incubazione. Al termine di questa operazione è stato aggiunto il substrato ed è iniziata la misurazione. Dall'analisi delle tracce ottenute è stato possibile ricavare i valori di  $\Delta$ Abs/min (programma *Kinetics*).

Il saggio con la fosfotirosina è stato ripetuto a 3 pH differenti (6, 7 e 8) nel tampone universale 2X (tab. 3.9.1).

### **3.10.2 – STOPPED-FLOW**

Lo stopped-flow è uno strumento che permette di seguire la cinetica di una reazione enzimatica in condizioni di *pre-steady-state*, diversamente dallo spettrofotometro classico che riesce a

rilevare solamente la fase di *steady-state*, quando il complesso enzima-substrato si è già formato. A tale scopo, l'apparato è munito di due siringhe che permettono di mescolare rapidamente le soluzioni in esame nella camera di reazione (cella ottica), consentendo di seguire l'andamento della reazione fin dai primi millisecondi. Lo strumento contiene inoltre due fotomoltiplicatori e consente di registrare variazioni di assorbanza e fluorescenza.

Lo strumento utilizzato in questo studio è lo stopped-flow SF2004 (KinTek, Snow Shoe, PA, USA) dotato di due siringhe separate (A e B) che vengono riempite con la soluzione contenente l'enzima (A) e il substrato (B). È presente una lampada UV-Vis (xenon-mercurio, potenza 200 W) per irradiare il campione nella cella ottica posta sul fondo dello strumento e mediante il monocromatore si seleziona la lunghezza d'onda ottimale per l'analisi. Quando le siringhe vengono spinte verso il basso tramite un pistone meccanico, uguali quantità delle due soluzioni presenti nelle siringhe passano nella cuvetta da 40  $\mu\text{L}$  ( $d=0,5$  cm). La luce, quindi, eccita il campione.

Per le misure in assorbanza è stata utilizzata una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 290 nm. Per misurare la fluorescenza emessa dal triptofano (eccitazione a 290 nm) è stato utilizzato un filtro “*long-pass*” capace di selezionare lunghezze d'onda superiori a 340 nm.

Le prove sono state condotte a 37 °C a 3 pH differenti (6, 7 e 8) nel tampone universale 2X (tab. 3.9.1) utilizzando una concentrazione finale di enzima pari a 15  $\mu\text{M}$ . Di seguito sono riportate le composizioni delle sue siringhe (1,5 mL). Il substrato utilizzato in queste prove è la fosfotirosina (pTyr) alla concentrazione finale di 10 mM nella cella ottica. Le soluzioni sono state filtrate (0,45  $\mu\text{m}$ ) prima del caricamento in siringa ed il sistema è stato lasciato a termostatare per circa 30 minuti prima di eseguire l'analisi.

<b>Siringa A</b>		<b>Siringa B</b>	
Buffer universale 2X (pH 6, 7 e 8)	750 $\mu\text{L}$	Buffer universale 2X (pH 6,7 e 8)	750 $\mu\text{L}$
Enzima [30 $\mu\text{M}$ ]	300 $\mu\text{L}$	pTyr [20 mM]	600 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O no Pi	450 $\mu\text{L}$	H <sub>2</sub> O no Pi	150 $\mu\text{L}$

**Tabella 3.9.2.1.** *Composizione delle siringhe A e B (1,5 mL)*

### 3.11 – SPR – SURFACE PLASMON RESONANCE

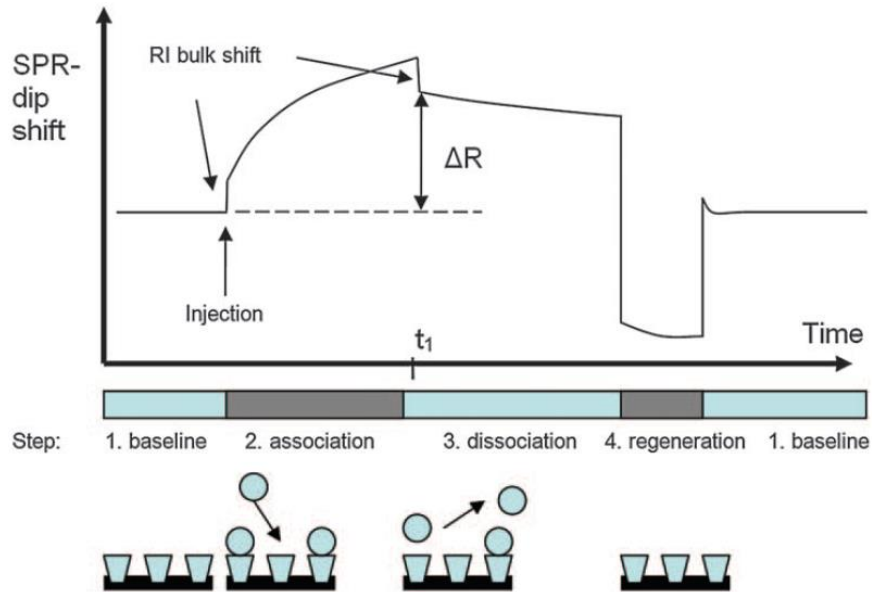
Il fenomeno SPR si verifica quando un fascio incidente di luce polarizzata  $p$  ad una data lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) colpisce una superficie metallica, tipicamente costituita di oro o argento, ad un dato angolo  $\theta$  attraverso un prisma. In queste condizioni vengono a crearsi all'interfaccia metallo/dielettrico delle onde elettromagnetiche superficiali fotone-plasmone (SPP). Queste si propagano parallelamente all'interfaccia ed il campo elettrico associato decade esponenzialmente e questo si traduce in un'intensità ridotta della luce riflessa a tale angolo  $\theta$  che viene rilevato dal detector <sup>[24]</sup>.

L'SPR misura, quindi, il cambiamento dell'indice di rifrazione e dell'angolo  $\theta$  (angolo di luce riflessa) sulla superficie metallica provocata dall'interazione di due partner biospecifici. Esperimenti di SPR consentono, perciò, di ricavare informazioni sul *binding* tra enzima-substrato e di determinare le costanti di dissociazione. Questa tecnica, infatti, si basa sull'analisi real-time dell'interazione cinetica tra due biomolecole in assenza di tracciante (marcatura). Questo è possibile immobilizzando uno dei due elementi della coppia, ad esempio la proteina, sulla superficie metallica (chip, sensore) mentre il ligando viene fatto fluire sulla superficie del supporto.

In questo studio, MptpAW152F è stata immobilizzata al biosensore e successivamente il substrato fosfotirosina, in soluzione, è stato fatto fluire sulla superficie. Il legame enzima-substrato è stato analizzato utilizzando lo strumento Biacore 3000 (GE Healthcare) presente a Salerno, dove è stata condotta l'analisi.

In dettaglio, la proteina MptpAW152F [100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 10 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (pH 5,0)] è stata immobilizzata sul chip sensore CM5 (GE Healthcare) utilizzando un protocollo standard di accoppiamento amminico; questa procedura ha portato a una densità osservata di 3,5 kRU. Il substrato pTyr è stato sciolto e diluito in tampone HPS-EP [0,01 M HEPES (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA e 0,005% (v/v) tensioattivo P20] per ottenere campioni a cinque diverse concentrazioni (25, 65, 150, 400 e 1000 nM). Gli esperimenti di legame sono stati eseguiti a 25 ° C, utilizzando una velocità di flusso di 50 mL/min, con 20 s di tempo di associazione e 100 s di tempo di dissociazione.

Di seguito viene riportato un tipico esempio di sensorgramma ottenuto dall'analisi SPR dove si distinguono le varie fasi (cicli) che costituiscono ogni esperimento.



**Figura 3.11.1.** Sensorgramma che mostra le fasi d'analisi. (1) Il sensore viene condizionato con la soluzione tampone (baseline), (2) la soluzione campione contenente l'analita viene iniettata ed alcune molecole vengono catturate sulla superficie (associazione), (3) Il tampone viene iniettato sul sensore e i componenti non legati in modo specifico vengono eliminati. In questa fase anche alcune molecole di analita potrebbero dissociarsi (dissociazione), (4) la soluzione di rigenerazione viene fatta fluire sulla superficie, andando a rompere il legame tra analita e ligando (rigenerazione) <sup>[25]</sup>.

Per analizzare i sensorgrammi ottenuti si utilizza un software dedicato che permette di fornire informazioni riguardanti l'affinità di legame tra biomolecole e la cinetica di associazione/dissociazione.

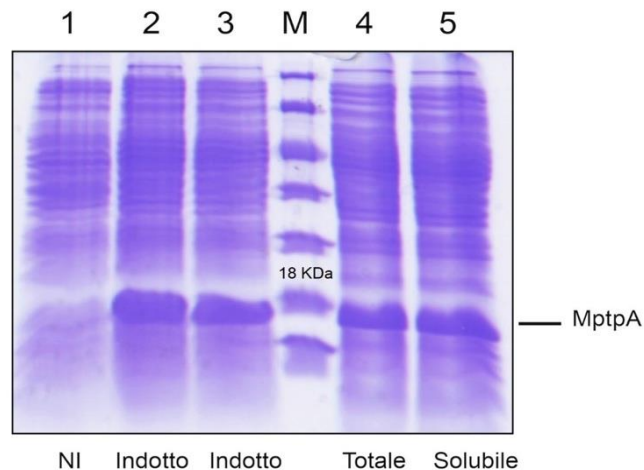
## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 – VERIFICA DELLA CORRETTA ESPRESSIONE PROTEICA

La produzione di MptpAW152F ha previsto la crescita in coltura liquida del ceppo di *E. coli* BL21(DE3)/pET-Duet1-MptpAW152F e la successiva induzione con IPTG, seguendo la procedura descritta nel paragrafo 3.4. Questa fase ha permesso di ottenere mediamente 5-5,2 g/L di biomassa microbica.

Prima di procedere alla fase di purificazione, è stata effettuata una prova preliminare per verificare l'avvenuta espressione della proteina d'interesse e controllarne la solubilità e l'eventuale aggregazione. Per questo motivo, sono state confrontate aliquote di una coltura indotta con IPTG e di una coltura non indotta come controllo negativo (campione NI in figura). A tale scopo, i pellets cellulari raccolti tramite centrifugazione sono stati sottoposti ad un ciclo di sonicazione (paragrafo 3.5) al fine di recuperare un'aliquota della sospensione corrispondente alla frazione proteica totale. La frazione solubile è stata, invece, recuperata a seguito di un ulteriore ciclo di centrifugazione.

I campioni d'interesse sono stati analizzati tramite elettroforesi SDS-PAGE utilizzando un gel di poliacrilammide al 15%. In figura 4.1.1. è riportato il gel di verifica dell'espressione proteica:



**Figura 4.1.1.** SDS-PAGE. Schema di caricamento: 1) NI: controllo non indotto, 2) Indotto, 3) Indotto, M: Marker (miscela di proteine a peso molecolare noto), 4) frazione totale, 5) frazione solubile.

Come evidenziato dall'analisi SDS-PAGE, MptpAW152F viene espressa correttamente utilizzando il protocollo descritto in precedenza che prevede una crescita a 15 °C per 16 ore in

presenza di IPTG 1 mM. Nel gel in figura 4.1.1 si nota, infatti, una banda intensa nelle corsie 2 e 3 in corrispondenza del marcatore di 18 kDa (MtpA ~ 17,9 kDa). Il campione non indotto (NI) non riporta invece la banda d'interesse, segno dell'assenza della proteina in esame. Inoltre, le frazioni totale e solubile (corsie 4 e 5) mostrano un'analogia intensità della banda proteica, indicando che la proteina è stata espressa in forma solubile e non aggregata.

## **4.2 – PURIFICAZIONE DI MPTPAW152F**

Come definito nel paragrafo 3.5, la purificazione della proteina ha previsto più stadi: un primo frazionamento proteico tramite ammonio solfato e due diversi passaggi cromatografici (cromatografia ad interazione idrofobica e cromatografia ad esclusione molecolare).

Tale procedura è stata eseguita due volte con lo scopo di ottenere due diversi lotti di produzione: uno da dedicare agli esperimenti di caratterizzazione cinetica, e l'altro da spedire al Dipartimento di Chimica dell'Università di Costanza (Germania) per effettuare analisi NMR.

In entrambi i casi, la purificazione ha seguito il medesimo protocollo con l'unica differenza di avere raddoppiato, nel secondo ciclo di produzione, il volume della coltura di partenza allo scopo di ottenere un'elevata quantità di MtpA necessaria per gli studi NMR.

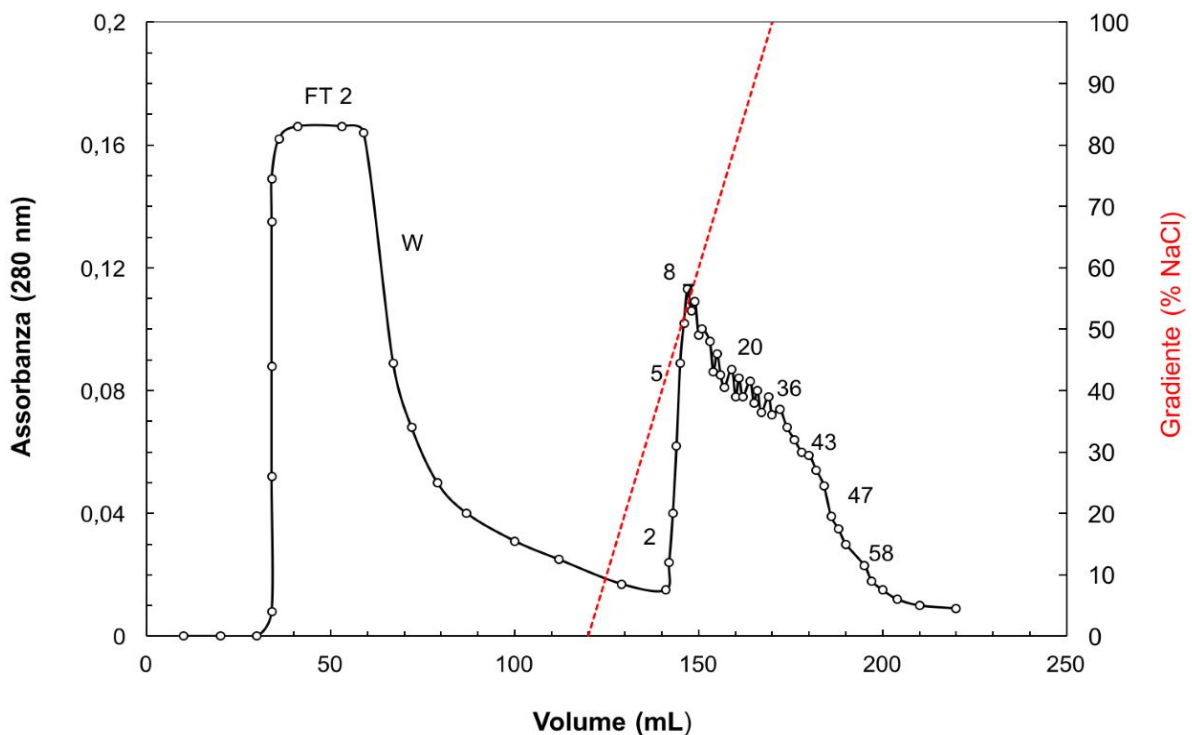
Per il primo lotto di produzione è stato utilizzato un pellet cellulare ottenuto da 250 mL di coltura indotta. Le cellule sono state sottoposte a lisi tramite sonicazione al fine di ottenere la frazione proteica solubile alla quale è stato aggiunto ammonio solfato al 60% del valore di saturazione (paragrafo 3.5.1). Tale passaggio consente il recupero di MtpA e l'eliminazione di altre proteine contaminanti a diversa idrofobicità. Il precipitato proteico ottenuto è stato, infine, risospeso in 20 mL di tampone A (tabella 3.5.1.1) per la successiva fase di purificazione.

### **4.2.1 – CROMATOGRAFIA AD INTERAZIONE IDROFOBICA DEL I° LOTTO DI PRODUZIONE**

Il primo passaggio cromatografico per purificare MtpAW152F consiste in una cromatografia ad interazione idrofobica che utilizza la colonna HiTrap Phenyl FF (5 mL) preventivamente condizionata con lo stesso tampone impiegato per risospendere il pellet proteico (tampone A). Tale tampone contiene un elevato quantitativo di sale (NaCl 3 M) allo scopo di favorire il legame tra la proteina di interesse e i gruppi idrofobici presenti sulla matrice utilizzata come fase stazionaria.

Il campione derivante dal frazionamento proteico con ammonio solfato, contenente 186,4 mg di proteina totali in 20 mL (9,32 mg/mL), è stato caricato in colonna ad un flusso costante di 1 mL/min. Conclusa la fase di lavaggio della colonna, l'eluizione è stata effettuata mediante gradiente inverso di sale utilizzando il tampone B (tabella 3.5.2.2). Il decremento della concentrazione salina consente di rimuovere dalla resina proteine con crescente idrofobicità, eluendo in primo luogo quelle debolmente legate alla fase stazionaria. Conclusa questa fase, l'eluizione è proseguita utilizzando acqua.

Il cromatogramma relativo alla separazione cromatografica è riportato in figura 4.2.1.1: il tracciato indica la presenza di proteine che escono dalla colonna per mancato legame alla matrice o in seguito all'eluizione.



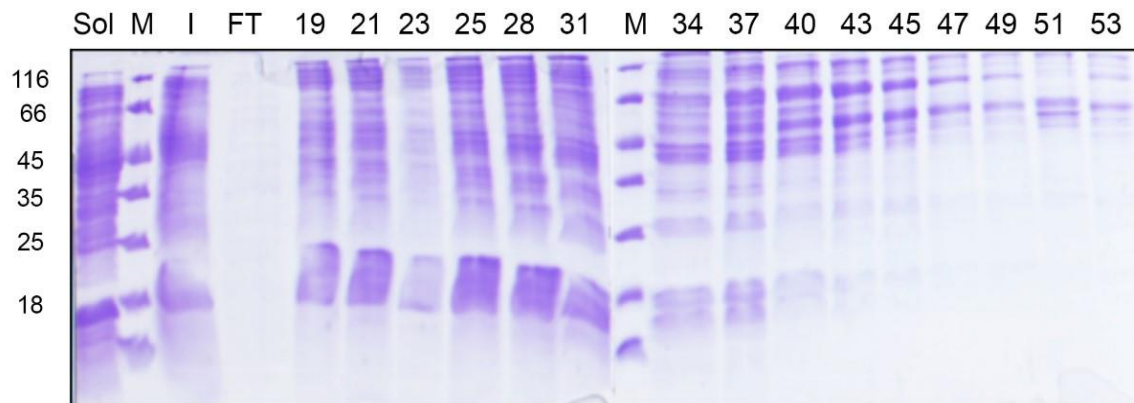
**Figura 4.2.1.1.** Cromatogramma relativo alla purificazione mediante colonna ad interazione idrofobica del 1° lotto di produzione.

In particolare, il primo picco di eluizione visibile nel grafico corrisponde alla frazione *flow-through* (FT), ovvero alle proteine non legate alla matrice; segue la fase di lavaggio (*wash*, W) che consente di staccare proteine debolmente legate alla colonna. Infine, l'eluizione con un gradiente inverso di sale (3-0M NaCl) permette di rimuovere proteine a crescente idrofobicità, evidenziate dai diversi picchi del cromatogramma. La traccia rossa indica il gradiente di



eluizione durato 50 minuti. Conclusa tale fase, la colonna è stata lavata con il tampone privo di sali (Tris 50 mM pH 8, EDTA 1 mM) per altri 30 minuti fino a riportare il cromatogramma alla linea di base.

Durante l'analisi sono state raccolte frazioni da 1 mL da analizzare mediante elettroforesi SDS-PAGE per verificare la presenza di MptpAW152F. Il gel ottenuto è riportato di seguito:



**Figura 4.2.1.2.** Gel SDS-PAGE dei campioni eluiti dalla colonna ad interazione idrofobica del I° lotto di produzione (fig. 4.2.1.1). Sol: solubile, M: marker, I (input): campione caricato in colonna. A sinistra è possibile visualizzare i pesi molecolari della miscela proteica utilizzata come standard.

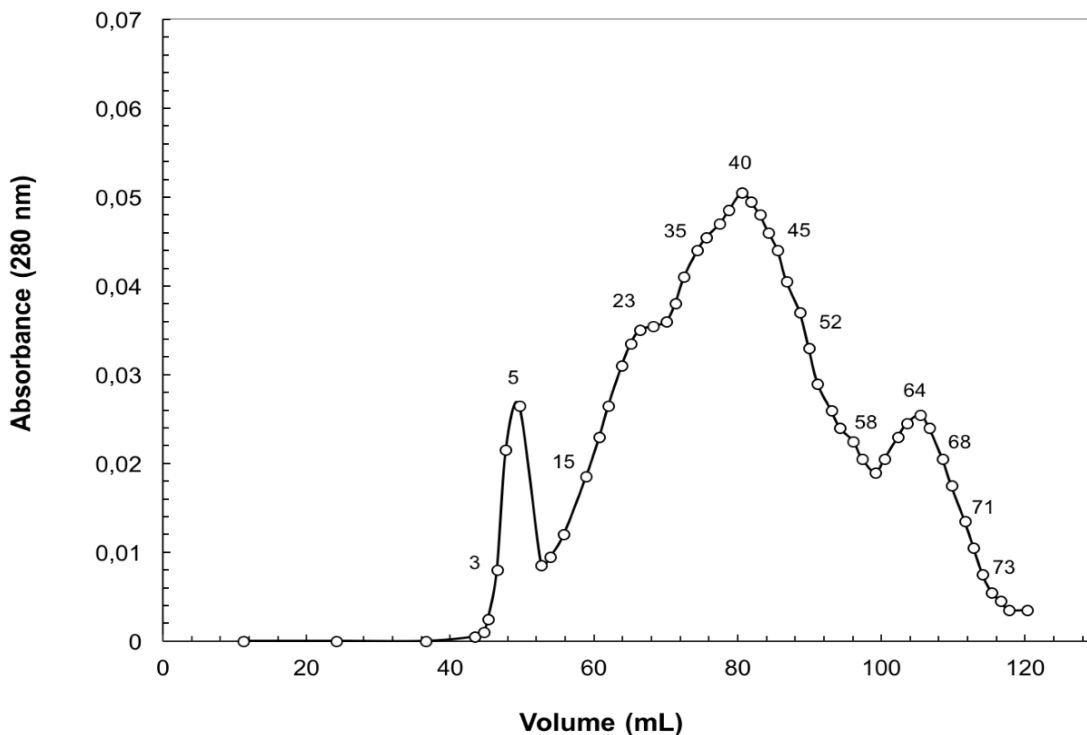
L'analisi elettroforetica ha permesso di individuare la presenza della proteina d'interesse, in corrispondenza del marcatore di 18 kDa, nelle frazioni eluite durante il gradiente inverso di NaCl a partire dal 70% della concentrazione di tampone B (pari a 900 mM NaCl). Le frazioni 19-38, che contengono MptpAW152F, sono state raccolte e riunite in un'unica provetta (ca 18 mL), contenente una quantità di proteina pari a 47,9 mg totali (resa di 2,66 mg/mL) ed una concentrazione media salina di 390 mM.

La miscela proteica è stata, quindi, diluita per abbassare la concentrazione di NaCl a 150 mM, quantità presente nel tampone usato per il successivo stadio cromatografico. Il campione è stato poi concentrato mediante ultrafiltrazione (cella Amicon YM10, paragrafo 3.6) ottenendo un volume finale di 2,3 mL contenente una quantità di proteina pari a 37,7 mg (concentrazione di 16,4 mg/mL).

#### **4.2.2 – CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE MOLECOLARE (GF) DEL I° LOTTO DI PRODUZIONE**

Il secondo stadio di purificazione ha previsto una cromatografia ad esclusione molecolare (gel filtrazione) utilizzando la colonna Superdex 200 (paragrafo 3.5.3). Tale processo consente di separare le proteine in base alla loro dimensione, in quanto la resina si comporta da setaccio molecolare facendo eluire per prime proteine di grande dimensione, e per ultime quelle di dimensioni ridotte che possono facilmente permeare ed essere trattenute nelle maglie della resina.

Il campione, precedentemente concentrato mediante ultrafiltrazione, è stato caricato in colonna tramite un loop iniettore da 2 mL (quantità di proteina pari a circa 32 mg). Il cromatogramma ottenuto è riportato in figura 4.2.2.1:

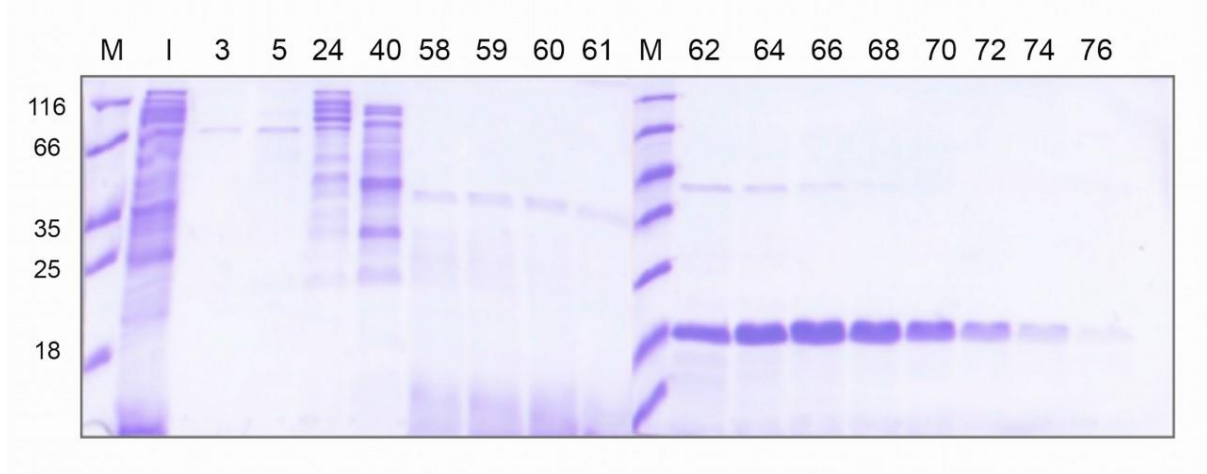


**Figura 4.2.2.1.** Cromatogramma relativo alla cromatografia ad esclusione molecolare (Gel Filtrazione - Superdex 200) del I° lotto di produzione.

Come visibile in figura, il tracciato rileva diversi picchi dall'inizio alla fine del processo cromatografico. I primi picchi di eluizione corrispondono a proteine di elevate dimensioni o ad aggregati proteici, mentre picchi successivi identificano proteine più piccole. Tesi di Laurea

precedenti<sup>[20,21]</sup> hanno indicato che MtpAW152F eluisce verso la fine del cromatogramma, in corrispondenza dell'ultimo picco visibile, comprendente le frazioni 59/60-72/73.

Durante la separazione cromatografica sono state raccolte frazioni da 0,9 mL e aliquote di alcune di queste sono state analizzate mediante elettroforesi SDS-PAGE. Il gel corrispondente è riportato in figura 4.2.2.2:



**Figura 4.2.2.2.** Gel SDS-PAGE eseguito dopo la gel filtrazione (Superdex 200). I: input, M: Marker. A sinistra vengono riportati i pesi molecolari della miscela proteica utilizzata come standard.

Come atteso, l'analisi SDS-PAGE evidenzia la presenza della proteina d'interesse nelle frazioni 62-73 e mostra, inoltre, un elevato grado di purezza dato dall'assenza di altre bande proteiche contaminanti. La cromatografia ad esclusione molecolare ha permesso pertanto di purificare in modo corretto MtpAW152F, ottenendo 3,78 mg di proteina in 10,5 mL (concentrazione pari a 0,36 mg/mL).

Considerando il volume di eluizione di queste frazioni e utilizzando l'equazione della retta di taratura della colonna Superdex 200 ( $y = -0,354 \cdot x + 2,166$ ) è stato possibile valutare il peso molecolare della proteina in esame, congruente con quello atteso di 17,9 kDa. Inoltre, dato che MtpAW152F è assente nelle frazioni ad alto peso molecolare eluite all'inizio della cromatografia, questo risultato indica che la proteina è stata eluita in forma monomerica e non si è verificata alcuna aggregazione proteica.

Il pool delle migliori frazioni raccolte dalla colonna (62-73) è stato concentrato mediante ultrafiltrazione sino ad un volume di 2,3 mL. La concentrazione proteica finale, determinata tramite saggio Micro-Bradford (paragrafo 3.8), è risultata pari a 1,37 mg/mL, corrispondenti a 3,15 mg totali di proteina.

In tabella 4.2.2.3 vengono riportati i risultati ottenuti e le rese di ogni passaggio di purificazione del primo lotto di MptpAW152F:

Stadio di purificazione	Volume di campione	Concentrazione proteica	Quantità totale di proteina	Resa %
Estratto proteico	25 mL	[9,59 mg/mL]	240 mg	100
Frazionamento con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 mL	[9,32 mg/mL]	186,4 mg	77,6
HiTrap Phenyl Sepharose FF	18 mL	[2,66 mg/mL]	47,9 mg	19,9
Ultrafiltrazione (Amicon YM10)	2,3 mL	[16,4 mg/mL]	37,7 mg	15,7
Gel Filtrazione	10,8 mL	[0,36 mg/mL]	3,89 mg	1,62
Ultrafiltrazione (Amicon YM10)	2,3 mL	[1,37 mg/mL]	<b>3,15 mg</b>	<b>1,31</b>

**Tabella 4.2.2.3.** Tabella di purificazione di MptpAW152F del I° lotto di produzione. Vengono riportati in tabella i volumi, la concentrazione proteica, la quantità di proteina ottenuta e la resa associata ad ogni stadio di purificazione.

Come si può osservare dalla tabella, la quantità di proteina in ogni passaggio di purificazione cala poiché vengono eliminate numerose proteine contaminanti. Il ciclo di purificazione a partire da 250 mL di coltura batterica indotta ha permesso di ottenere 3,15 mg della proteina di interesse: questo indica una resa di ca 12 mg per litro di coltura.

Il primo lotto di produzione (concentrazione finale pari a 76 µM) è stato utilizzato per i saggi di caratterizzazione cinetica, come descritto successivamente.

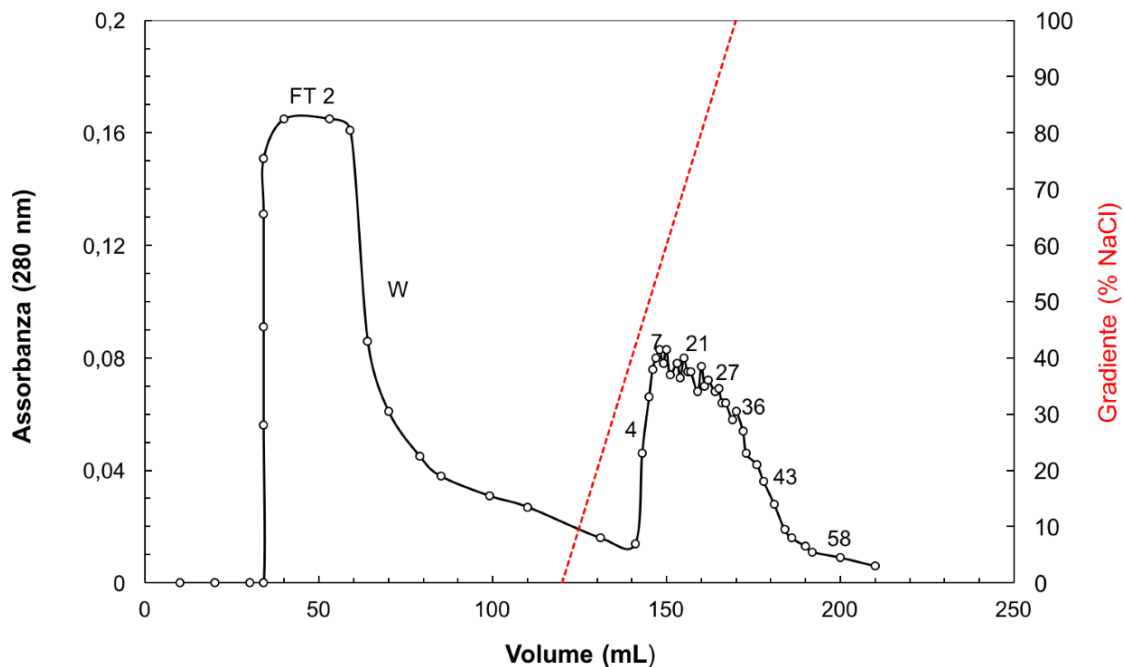
#### **4.2.3 - CROMATOGRAFIA AD INTERAZIONE IDROFOBICA DEL II° LOTTO DI PRODUZIONE**

La procedura di purificazione descritta nelle sezioni precedenti è stata impiegata anche per produrre il secondo lotto di enzima a partire da 500 mL di coltura batterica indotta. Per evitare di sovraccaricare la colonna idrofobica, sono state eseguite due estrazioni indipendenti, ciascuna da 250 mL di coltura, e due purificazioni parziali mediante cromatografia idrofobica. In seguito, le frazioni ottenute dalle due colonne idrofobiche, che costituiscono il primo

passaggio cromatografico, sono state unite per eseguire un'unica gel filtrazione.

L'estrazione delle proteine dai due pellet cellulari ed il frazionamento preliminare con ammonio solfato al 60% del valore di saturazione sono state effettuate come descritto per il primo lotto di produzione (paragrafo 3.5.1). Questa fase ha permesso di ottenere due campioni contenenti rispettivamente 186 e 222 mg di proteina in 20 mL di tampone A.

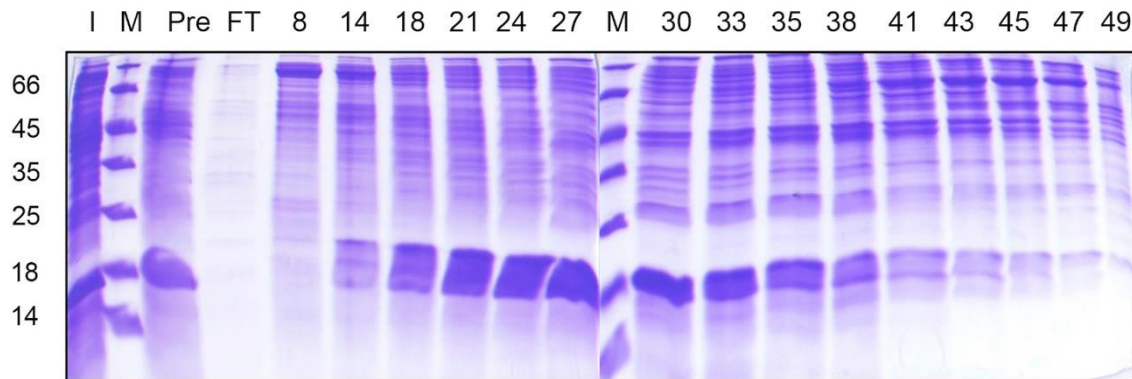
Di seguito è riportata la descrizione di una delle due purificazioni. Il campione proteico in esame (9,3 mg/mL) è stato caricato in colonna idrofobica HiTrap Phenyl FF ed è stato eseguito un gradiente inverso di NaCl per eluire le proteine. Il cromatogramma ottenuto è riportato in figura 4.2.3.1:



**Figura 4.2.3.1.** Cromatogramma relativo alla cromatografia ad interazione idrofobica del II° lotto di produzione.

In analogia a quanto osservato nel cromatogramma precedente (figura 4.2.1.1), i primi picchi di eluizione corrispondono al *flow-through* e alla fase di lavaggio con il tampone A (*wash*, W). Durante queste fasi si eliminano proteine che non si legano, o si legano debolmente, alla resina della colonna. L'eluizione, indicata dalla linea rossa, è stata effettuata tramite un gradiente inverso di sale (3-0 M NaCl) che permette di eluire proteine a idrofobicità crescente, come indicato dai numerosi picchi del cromatogramma. Il lavaggio successivo (100% tampone B) consente infine di ritornare alla linea di base.

Aliquote delle frazioni da 1 mL raccolte durante la cromatografia sono state analizzate mediante elettroforesi SDS-PAGE per verificare la presenza della proteina d'interesse. Il gel di poliacrilammide al 15% è riportato di seguito:



**Figura 4.2.3.2.** SDS.PAGE delle frazioni eluite dalla cromatografia ad interazione idrofobica del II° lotto di produzione (fig. 4.2.3.1). I: solubile, M: marker, Pre: pre-colonna, FT: flow-through. A sinistra vengono riportati i pesi molecolari della miscela proteica che compone il marker.

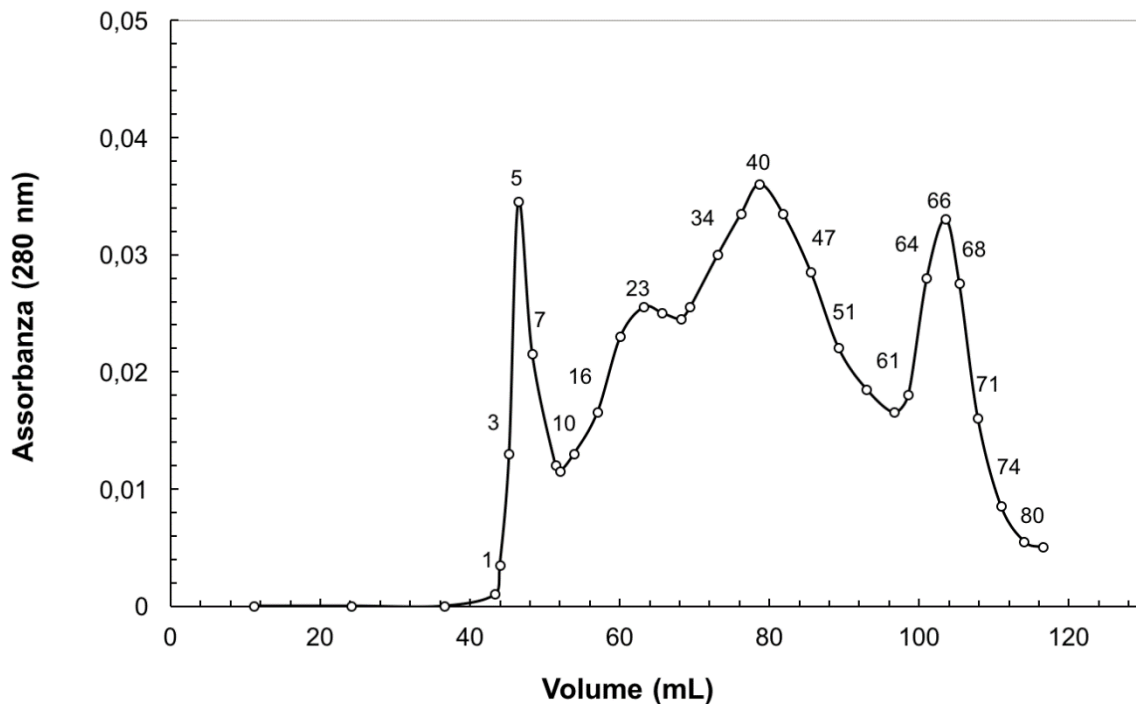
L'analisi elettroforetica indica la presenza di MtpAW152F (17,9 kDa) nelle frazioni eluite a partire dal 69 % del gradiente salino effettuato con il tampone B, privo di sale. Le frazioni 20-38, nelle quali risulta ben visibile la presenza della banda corrispondente alla proteina d'interesse, sono state raccolte e riunite in un unico pool.

A questo campione (19 mL) sono state successivamente unite anche le frazioni proteiche derivanti dalla seconda purificazione. Il campione così ottenuto conteneva 79,9 mg di proteina in 36 mL (2,22 mg/mL) e una concentrazione media di NaCl pari a 350 mM.

Per poter proseguire con il successivo passaggio cromatografico la concentrazione salina è stata abbassata a 150 mM diluendo il campione con un tampone privo di sale. Il campione è stato infine concentrato mediante ultrafiltrazione fino ad ottenere un volume finale di 2,3 mL contenente 73,81 mg di proteina (concentrazione proteica di 32,1 mg/mL).

#### 4.2.4 - CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE MOLECOLARE DEL II° LOTTO DI PRODUZIONE

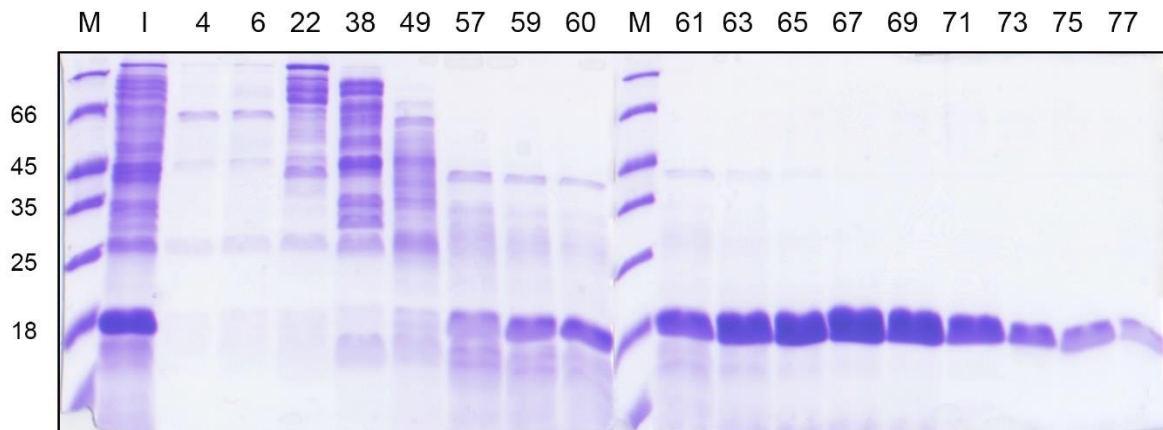
Il campione proteico concentrato, ottenuto da 2 estrazioni successive, è stato caricato in colonna Superdex 200 mediante un loop iniettore da 2 mL. Sono stati caricati in colonna 64 mg di proteina. Di seguito, in figura 4.2.4.1, è riportato il cromatogramma ottenuto:



**Figura 4.2.4.1.** Cromatogramma relativo alla cromatografia ad esclusione molecolare (Gel filtrazione) eseguita per purificare il II° lotto di MptpAW152F.

Nella parte sinistra del grafico è possibile visualizzare un picco relativo alle proteine eluite in forma di aggregati proteici (frazioni 1-7). La dimensione delle proteine cala gradualmente verso la parte destra del cromatogramma. In questa zona è visibile un picco netto e separato (frazioni 60-72) corrispondente a proteine con dimensioni analoghe a MptpA.

Durante l'intero processo cromatografico sono state raccolte frazioni da 0,9 mL da analizzare mediante SDS-PAGE per identificare la localizzazione della proteina d'interesse. Il gel di corsa è riportato di seguito:



**Figura 4.2.4.2.** Gel SDS-PAGE delle frazioni eluite dalla cromatografia ad esclusione molecolare del II° lotto di produzione. M: marker, I: pre-colonna. Sulla sinistra vengono visualizzati i pesi molecolari delle proteine che compongono il marker.

L'analisi del gel rivela la presenza di bande proteiche corrispondenti alla proteina d'interesse a partire dalla frazione 59, in prossimità del marcatore con peso molecolare di 18 kDa. Per assicurare elevata purezza si è deciso di unire le frazioni da 61 a 77, scartando altre frazioni caratterizzate dalla presenza di contaminanti e con un livello inferiore di purezza. Le aliquote scelte sono state riunite in un unico pool da 15 mL contenente 11,4 mg di proteina (concentrazione di 0,76 mg/mL).

Considerando il volume di eluizione, anche in questo caso la proteina di interesse eluisce dalla colonna in forma monomericamente e non aggregata. Il peso molecolare calcolato (pari a 17,4 kDa) risulta infatti perfettamente coerente con quello atteso.

Il campione è stato infine concentrato mediante ultrafiltrazione a 3,6 mL e quantificato con il metodo Micro-Bradford (3.8): il secondo ciclo di produzione di MptpA W152F ha permesso di ottenere 11 mg totali di proteina da 500 mL di coltura indotta (cioè 22 mg/L).

Tale lotto (171  $\mu$ M) è stato inviato al Dipartimento di Chimica dell'Università di Costanza, in Germania, per effettuare analisi NMR e analizzare il comportamento della proteina a diversi pH.

I passaggi della purificazione del II° lotto di proteina e le rese di ogni stadio sono riportati nella tabella sottostante (tab. 4.2.4.3). I dati relativi ai primi stadi (frazionamento con sale e



cromatografia idrofobica) corrispondono alla somma dei valori ottenuti dalle due estrazioni indipendenti.

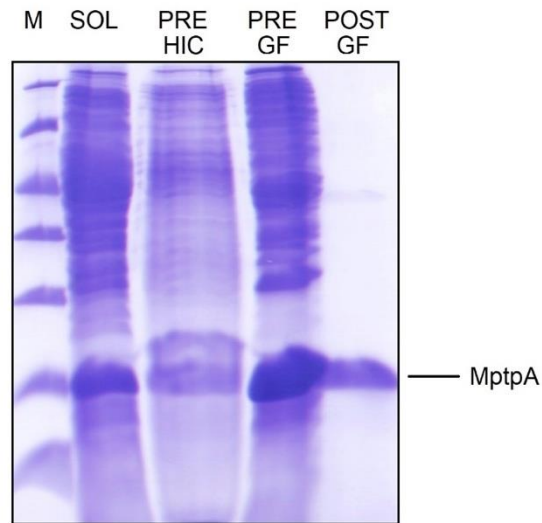
Stadio di purificazione	Volume di campione	Concentrazione proteica	Quantità totale di proteina	Resa %
Estratto proteico	50 mL	[12,3 mg/mL]	615 mg	100
Frazionamento con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40 mL	[10,2 mg/mL]	408 mg	66,3
HiTrap Phenyl Sepharose FF	36 mL	[2,22 mg/mL]	79,9 mg	12,9
Ultrafiltrazione (Amicon YM10)	2,3 mL	[32,1 mg/mL]	73,81 mg	12
Gel Filtrazione	15 mL	[0,76 mg/mL]	11,4 mg	1,85
Ultrafiltrazione (Amicon YM10)	3,6 mL	[3,06 mg/mL]	<b>11 mg</b>	<b>1,79</b>

**Figura 4.2.4.3.** Tabella di purificazione relativa al II° lotto di MptpAW152F. Vengono riportati i volumi di campione, la concentrazione proteica, la quantità totale di proteina ottenuta e la resa di ogni stadio di purificazione.

Anche in questo caso, come si osserva in tabella 4.2.4.3, la resa ad ogni stadio di purificazione diminuisce poiché vengono eliminati molte proteine contaminanti. La resa finale, pari a 1,79% è confrontabile con quella ottenuta per il primo lotto (1,31%).

#### **4.2.5 – CONFRONTO DELLA PUREZZA**

Per verificare l'efficacia dei vari passaggi cromatografici è stato eseguito un gel SDS-PAGE di confronto del livello di purezza dei campioni ottenuti dai diversi stadi del ciclo di purificazione. Come campione di riferimento è stata caricata in gel un'aliquota della frazione solubile (SOL) ottenuta dopo la lisi dei pellet cellulari. Di seguito, in figura 4.2.5.1, viene riportato il risultato dell'analisi:



**Figura 4.2.3.1.** Gel SDS-PAGE di analisi dei vari stadi della purificazione. *M*: marker, *SOL*: frazione solubile, *PRE HIC*: campione pre-idrofobica, *PRE GF*: campione pre-gel filtrazione, *POST GF*: campione post gel filtrazione. Sulla destra è indicata la banda che corrisponde a *MptpA*.

Come si evince facilmente dall'osservazione del gel, ogni stadio di purificazione consente l'eliminazione di numerosi contaminanti, sino ad arrivare all'ultimo stadio del processo (campione POST GF) che permette di ottenere un campione puro caratterizzato da un'unica banda in gel.

### **4.3 – SAGGI DI ATTIVITÀ ENZIMATICA IN REGIME DI STEADY-STATE**

La caratterizzazione cinetica di MptpAW152F è stata effettuata inizialmente mediante saggi di attività in condizioni di *steady-state*. Mediante analisi allo spettrofotometro è stato possibile seguire l'andamento della reazione di idrolisi del substrato.

Come descritto nel paragrafo 4.2.2, per eseguire lo studio cinetico è stato utilizzato il primo lotto di produzione della proteina, con concentrazione finale pari a 76  $\mu\text{M}$ , e due substrati differenti: *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) e fosfotirosina (pTyr).

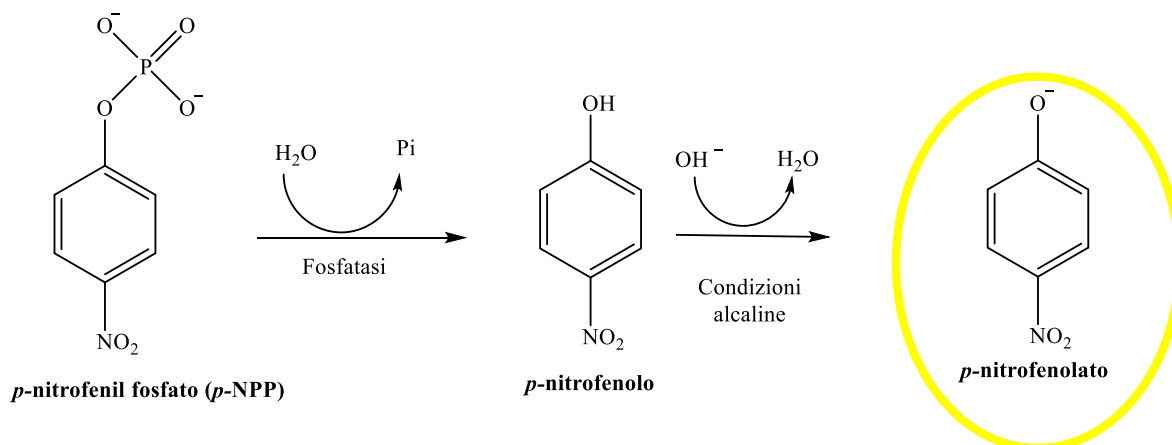
Per visualizzare gli andamenti cinetici è stato impiegato il programma *Kinetics* che permette l'interpolazione degli andamenti osservati mediante equazioni di velocità di ordine zero, o di ordini superiori. Le costanti cinetiche, invece, sono state ricavate grazie all'utilizzo del software Sigma-Plot, interpolando i dati mediante l'equazione di Michaelis-Menten o di Hill.

#### **4.3.1 – STUDIO CINETICO CON P-NITROFENIL FOSFATO (P-NPP)**

Sono stati effettuati saggi preliminari per valutare l'attività enzimatica del primo lotto di proteina utilizzando il substrato commerciale *p*-NPP. Come descritto nel paragrafo 3.10.1.1, le prove hanno previsto singole misurazioni a concentrazione crescente di substrato mantenendo costante quella di MptpAW152F (pari a 420 nM).

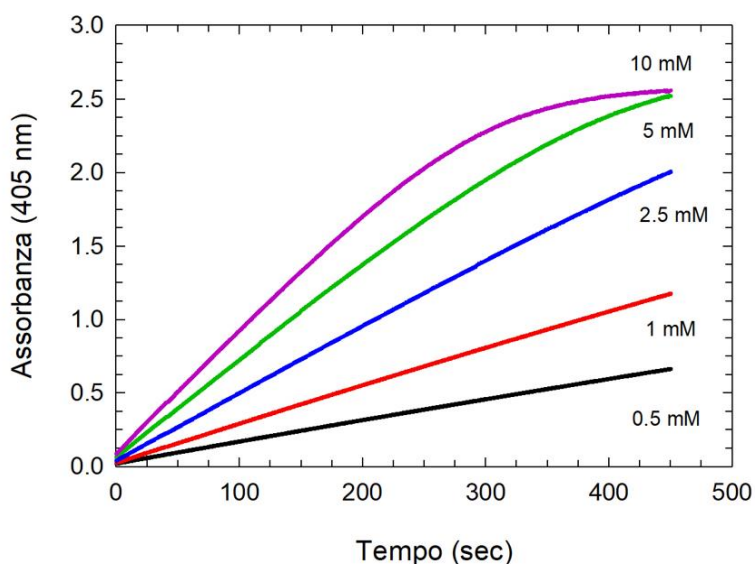
Le prove sono state condotte per 600 secondi alla lunghezza d'onda di 405 nm, corrispondente alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento del *p*-nitrofenolato (prodotto di reazione). La reazione è stata quindi innescata dall'aggiunta di enzima.

Il saggio è stato eseguito nel tampone universale Tris 50 mM, BisTris 50 mM, EDTA 4 mM a pH 7.5, valore necessario a favorire la conversione del para-nitrofenolo in para-nitrofenolato. Il para-nitrofenolo è il prodotto dell'idrolisi enzimatica di diversi substrati, come il *p*-NPP. La determinazione dell'attività enzimatica richiede che il prodotto para-nitrofenolo venga completamente deprotonato a para-nitrofenolato. Lo schema è riportato di seguito (figura 4.3.1.1):



**Figura 4.3.1.1.** Conversione del substrato *p*-NPP (*p*-nitrofenil fosfato) in *p*-nitrofenolato (ChemDraw).

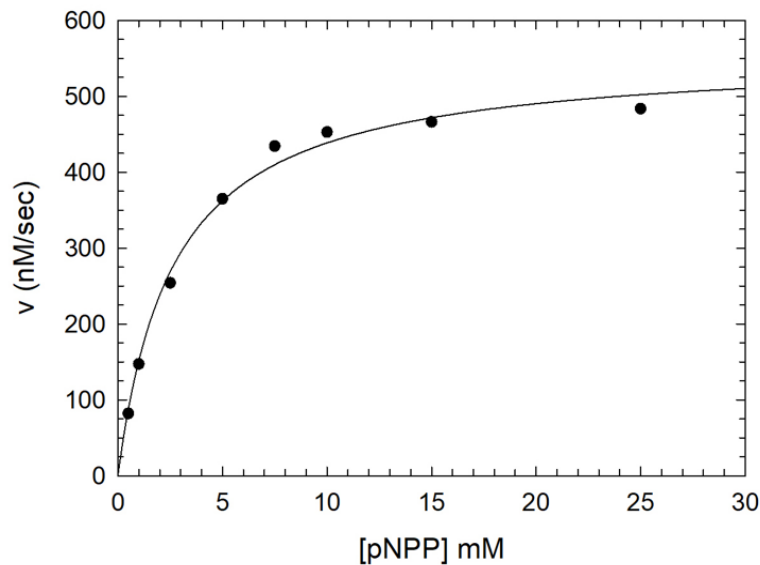
Il colore giallo del *p*-nitrofenolato, visibile in cuvetta, è infatti dovuto al suo massimo di assorbimento a 405 nm in ambiente alcalino ( $\epsilon$  *p*-nitrofenolato =  $18.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Al contrario, il *p*-nitrofenolo possiede un'assorbanza molto debole alla stessa lunghezza d'onda ( $\epsilon$  *p*-nitrofenolo =  $0.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). L'andamento delle reazioni condotte a pH 7.5 con diverse concentrazioni di substrato è riportato in figura 4.3.1.2:



**Figura 4.3.1.2.** Andamento delle reazioni a concentrazioni crescenti di substrato *p*-NPP.

Dai dati sperimentali sono stati ricavati i valori di  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  per calcolare, mediante la legge di Lambert-Beer, le velocità di reazione in nM/s. I valori ottenuti sono stati interpolati utilizzando l'equazione di Michaelis-Menten e, come visibile in figura 4.3.1.3, la curva ottenuta ha

evidenziato un tipico andamento iperbolico, in analogia con quanto osservato in studi precedenti [20,21].



**Figura 4.3.1.3.** Cinetica della reazione (nM/sec) con diverse concentrazioni di substrato *p*-NPP: 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 e 25 mM. I dati sono stati interpolati tramite software Sigma-Plot con l'equazione di Michaelis-Menten.

L'analisi dei dati ha permesso di ricavare i seguenti parametri cinetici utili per definire le proprietà dell'enzima come, ad esempio, l'affinità per il substrato ( $K_m$ ) e la sua efficienza catalitica ( $k_{cat}/K_m$ ):

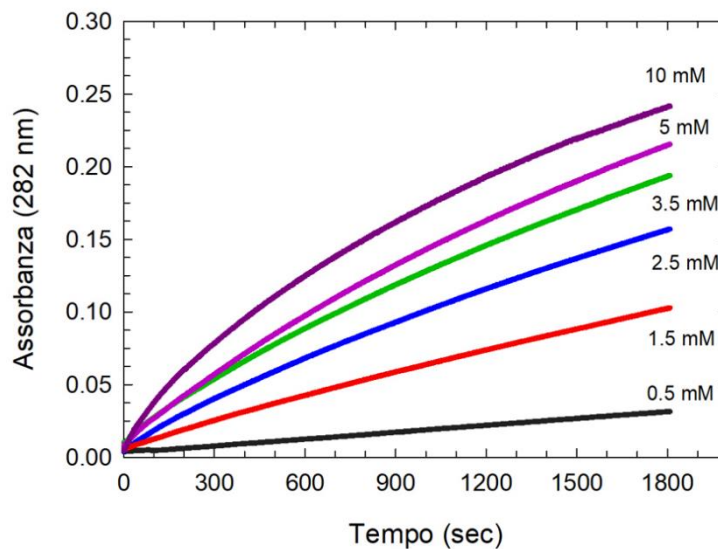
$V_{max}$	$555.79 \pm 15.85$ nM/sec
$K_m$	$2.67 \pm 0.28$ mM
$k_{cat}$	$1.32$ sec <sup>-1</sup>
$k_{cat}/K_m$	$0.495$ mM <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup>

#### **4.3.2 – STUDIO CINETICO CON FOSFOTIROSINA (pTYR)**

Uno studio analogo per verificare la presenza di attività enzimatica è stato condotto in presenza di un altro substrato, la fosfotirosina (pTyr), derivato fosforilato della tirosina. A differenza del *p*-NPP, che consiste in un substrato artificiale, la pTyr rappresenta un modello dei substrati naturali di MptpA e di tutte le PTPs.

L'analisi è stata eseguita alla lunghezza d'onda di 282 nm, una lunghezza d'onda prossima al massimo dello spettro di differenza tra l'assorbanza della tirosina (prodotto di reazione) e della fosfotirosina. Le prove, della durata totale di 2400 secondi, sono state eseguite mantenendo invariata la concentrazione di MtpAW152F (420 nM) e variando quella di substrato. La reazione, anche in questo caso, è stata innescata dall'aggiunta di enzima.

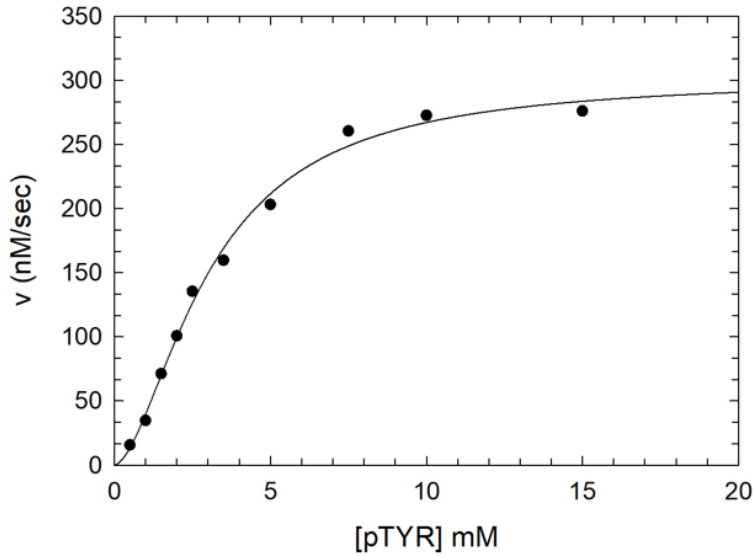
Il saggio è stato condotto a pH 7.5 nello stesso tampone universale usato per le prove con il *p*-NPP. L'andamento delle reazioni di defosforilazione a concentrazioni crescenti di substrato pTyr è mostrato in figura 4.3.2.1:



**Figura 4.3.2.1.** Andamento delle reazioni a concentrazioni crescenti di substrato pTyr a pH 7.5.

Come per il *p*-NPP, è stata poi calcolata la velocità di reazione (nM/s) usando i valori di  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  ricavati dai dati sperimentali e il  $\Delta\epsilon$  Tyr-pTyr, pari a  $0,96 \text{ mM}^{-1}\text{sec}^{-1}$  (fig. 4.3.2.1). Le velocità di reazione sono state riportate in grafico in funzione della concentrazione di substrato e i valori osservati sono stati interpolati, in questo caso, con l'equazione di Hill. La curva ottenuta mostra un andamento sigmoidale a differenza del classico andamento iperbolico di Michaelis-Menten.

In figura 4.3.2.2 è riportata la cinetica di MtpAW152F a pH 7.5 in presenza di fosfotirosina:



**Figura 4.3.2.2.** Cinetica della reazione (nM/sec) con diverse concentrazioni di substrato pTyr: 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3.5, 5, 7.5, 10 e 15 mM. I dati sono stati interpolati tramite software Sigma-Plot con l'equazione di Hill.

L'andamento sigmoidale, visibile soprattutto a concentrazioni limitanti di substrato, è indice di un comportamento allosterico dell'enzima, confermato anche dalle relative costanti cinetiche, in particolare dal coefficiente di Hill che è risultato pari a 1.7:

<b>V<sub>max</sub></b>	302.52 ± 12.22 nM/sec
<b>Hill</b>	1.70 ± 0,15
<b>K<sub>m</sub></b>	3.04 ± 0.22 mM
<b>k<sub>cat</sub></b>	0.720 sec <sup>-1</sup>
<b>k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub></b>	0.237 mM <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup>

Il valore del coefficiente di Hill dà una misura del grado di cooperatività da substrato: se è maggiore di 1 indica cooperatività positiva, se risulta minore di 1 indica cooperatività negativa, mentre se è uguale a 1 la cooperatività è assente e la cinetica enzimatica seguirà il tipico andamento iperbolico di Michaelis-Menten. In questo caso il coefficiente di Hill risulta maggiore di 1, indice di cooperatività positiva.

I risultati delle prove eseguite con pTyr indicano, quindi, che MptpAW152F possiede un comportamento allosterico, generalmente presente in enzimi costituiti da più subunità nei quali queste cooperano tra loro. Poiché MptpA è un enzima monomero, l'allosteria in questo caso

è spiegabile con la presenza di un secondo sito di legame del substrato, diverso dal sito attivo dove avviene la catalisi. Tale sito allosterico influenza positivamente l'attività della proteina poiché l'associazione del legando al primo sito incrementa l'affinità di legame di altre molecole di substrato. Il risultato di questo fenomeno è l'attivazione dell'enzima.

#### **4.4 – INIBIZIONE DI MPTPAW152F**

MtpA è da anni oggetto di studio come bersaglio per la ricerca di nuovi farmaci anti-tubercolosi dato il suo ruolo chiave nella patogenesi di *M. tuberculosis*. Proprio la presenza di un secondo sito allosterico e l'elevata affinità che tale sito secondario presenta nei confronti del substrato risulta di notevole importanza per la realizzazione di inibitori specifici e innovativi.

Il numero di inibitori di MtpA è ancora molto limitato e poco è noto del loro meccanismo d'azione. La realizzazione di inibitori di tirosin-fosfatasi prende spunto dalla struttura del substrato fosfotirosina per tentare di individuare composti naturali, o di origine sintetica, caratterizzati da gruppi funzionali o da strutture analoghe. Inibitori che mimano la fosfotirosina sono, tuttavia, poco selettivi.

In questo lavoro di Tesi è stata valutata l'attività inibitoria nei confronti di MtpA da parte di alcune molecole: la tirosina, prodotto di reazione, due glucosinolati (come esempio di composti naturali) e l'inibitore sintetico L335-M34.

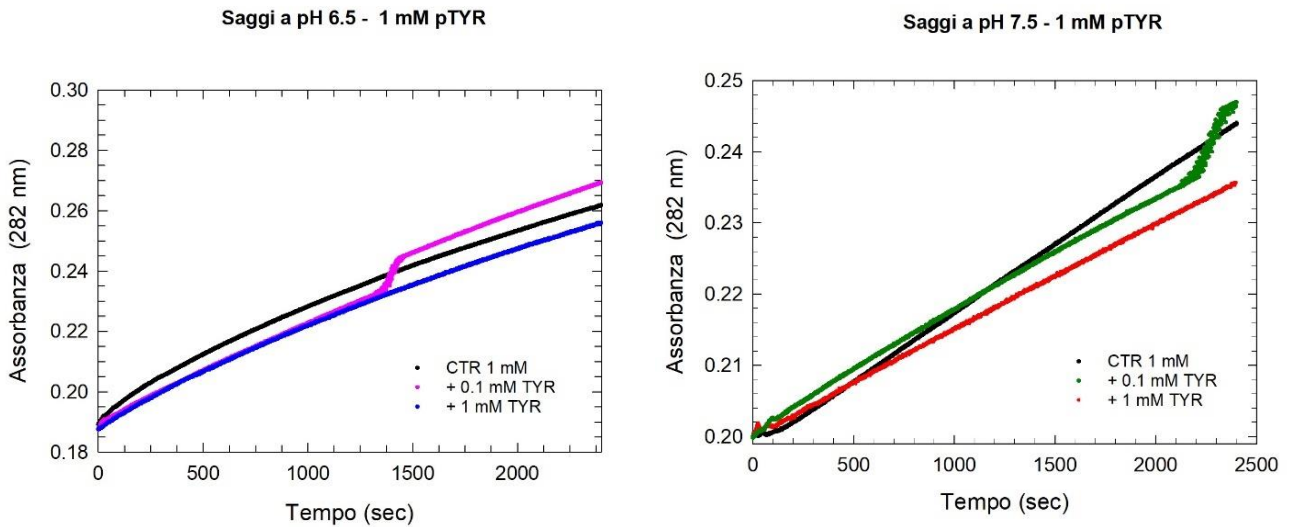
##### **4.4.1 – EFFETTO INIBITORIO DELLA TIROSINA**

Studi precedenti hanno evidenziato un effetto inibitorio da parte del fosfato, prodotto della reazione [18,20]. In questo studio si è voluto verificare se anche la tirosina, altro prodotto di reazione, fosse in grado di inibire l'attività enzimatica di MtpAW152F.

A tale scopo sono stati effettuati saggi di attività in presenza di fosfotirosina (1 o 10 mM) e di tirosina 1 o 0,1 mM. L'aumento di assorbanza a 282 nm è stato osservato per 2400 secondi e le analisi sono state ripetute a pH 6.5 e 7.5 in presenza di enzima 420 nM. La miscela di reazione, priva del substrato, è stata incubata per 5 minuti a temperatura ambiente.

Di seguito sono riportate le tracce, ai due pH, che descrivono la reazione di defosforilazione della pTyr da parte di MtpAW152F. Il controllo (CTR) corrisponde ad un saggio eseguito in assenza di tirosina.

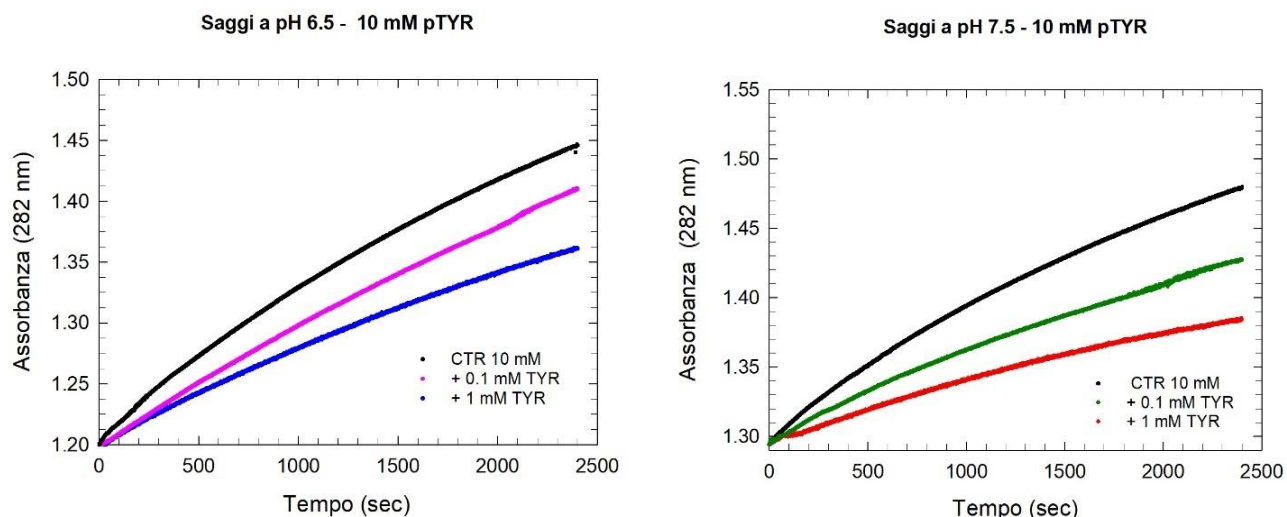




**Figura 4.4.1.1:** Andamenti cinetici della reazione tra enzima e substrato (1 mM) in presenza di tirosina (1 e 0,1 mM) a pH 6.5 e 7.5. La curva nera rappresenta la reazione di controllo (assenza di inibitore).

Come visibile dagli andamenti ottenuti a basse concentrazioni di substrato (1 mM), la tirosina non evidenzia un effetto inibitorio apprezzabile. Infatti, le curve in presenza di inibitore sono paragonabili alla curva del controllo (curva nera). Il pH del tampone, inoltre, non influenza in alcun modo l'effetto della tirosina.

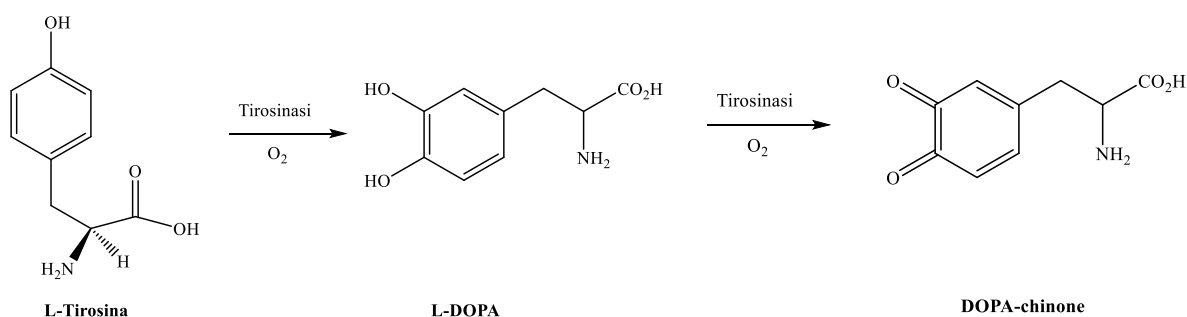
La stessa prova è stata eseguita aumentando la concentrazione di fosfotirosina a 10 mM. In questo caso, come visibile nella figura sottostante, la tirosina è in grado di inibire l'attività enzimatica soprattutto alla concentrazione 1 mM (curva blu a sinistra, curva rossa a destra). Inoltre, a pH 7.5 il suo effetto inibitorio sembra essere maggiore rispetto a quello osservato all'altro pH in analisi, indipendentemente dalla concentrazione usata.



**Figura 4.4.1.2:** Andamenti cinetici della reazione tra enzima e substrato (10 mM) in presenza di tirosina (1 e 0,1 mM) a pH 6.5 e 7.5. La curva nera rappresenta la reazione di controllo (assenza di inibitore).

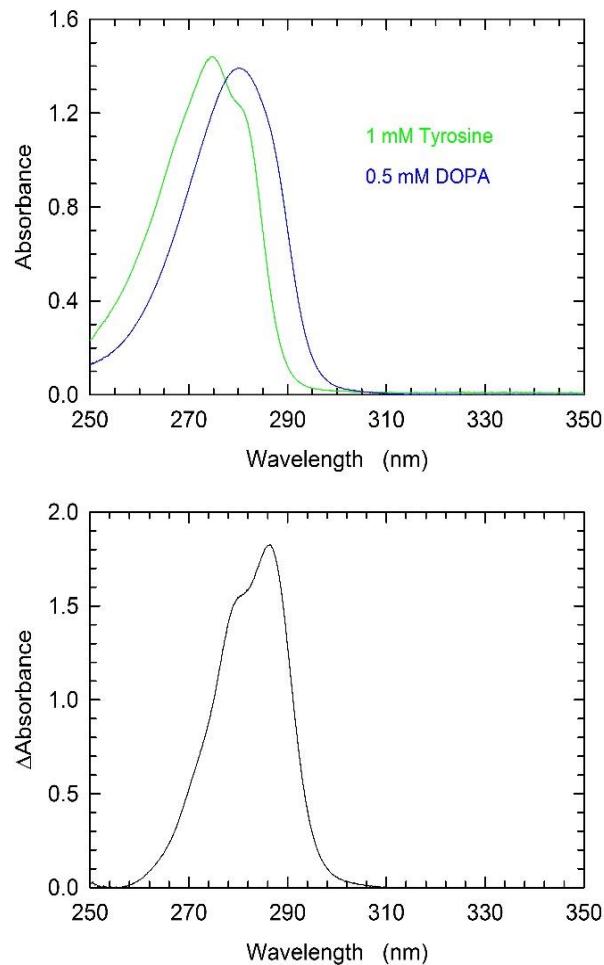
Un modo per confermare l'effettiva inibizione da prodotto causata dalla tirosina consiste nella sua conversione ad altro prodotto di reazione durante la defosforilazione della pTYR. Condizione essenziale per eliminare il contributo della tirosina è generare un composto caratterizzato da assorbimento in una regione dello spettro diversa dalla tirosina stessa.

A tale scopo è stato utilizzato l'enzima tirosinasi, cuproenzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, in grado di ossidare la tirosina a diidrossifenilalanina (L-DOPA), la quale funge ulteriormente da substrato dell'enzima e viene ossidata a DOPA-chinone. I chinoni, derivanti dall'ossidazione dei fenoli, presentano generalmente una colorazione gialla e assorbono nella regione del visibile a circa 420/430 nm. In figura 4.4.1.3 è riportata la conversione della tirosina a DOPA-chinone ad opera dell'enzima tirosinasi:



**Figura 4.4.1.3:** Conversione di L-tirosina a DOPA-chinone ad opera dell'enzima tirosinasi (ChemDraw).

Per verificare l'eventuale sovrapposizione dei massimi di assorbimento è stato determinato, in maniera indipendente, lo spettro di assorbimento di una soluzione di L-DOPA e di L-Tyr:



**Figura 4.4.1.4:** Spettro di assorbimento di L-DOPA (soluzione 0.5 mM) e di L-TYR (soluzione 1 mM) in tampone universale pH 7. Viene anche visualizzato lo spettro di differenza nel secondo pannello.

Dall'analisi degli spettri è possibile osservare che i due profili non sono perfettamente sovrapponibili quindi la tirosinasi può essere utilizzata nei saggi di attività per convertire la tirosina in L-DOPA. In figura è riportato anche lo spettro di differenza che consente di identificare la lunghezza d'onda migliore a cui eseguire le prove per eliminare il contributo della tirosina. In tabella sono riportate le diverse lunghezze d'onda e i corrispondenti massimi di assorbimento relativi agli spettri in figura 4.4.1.4:

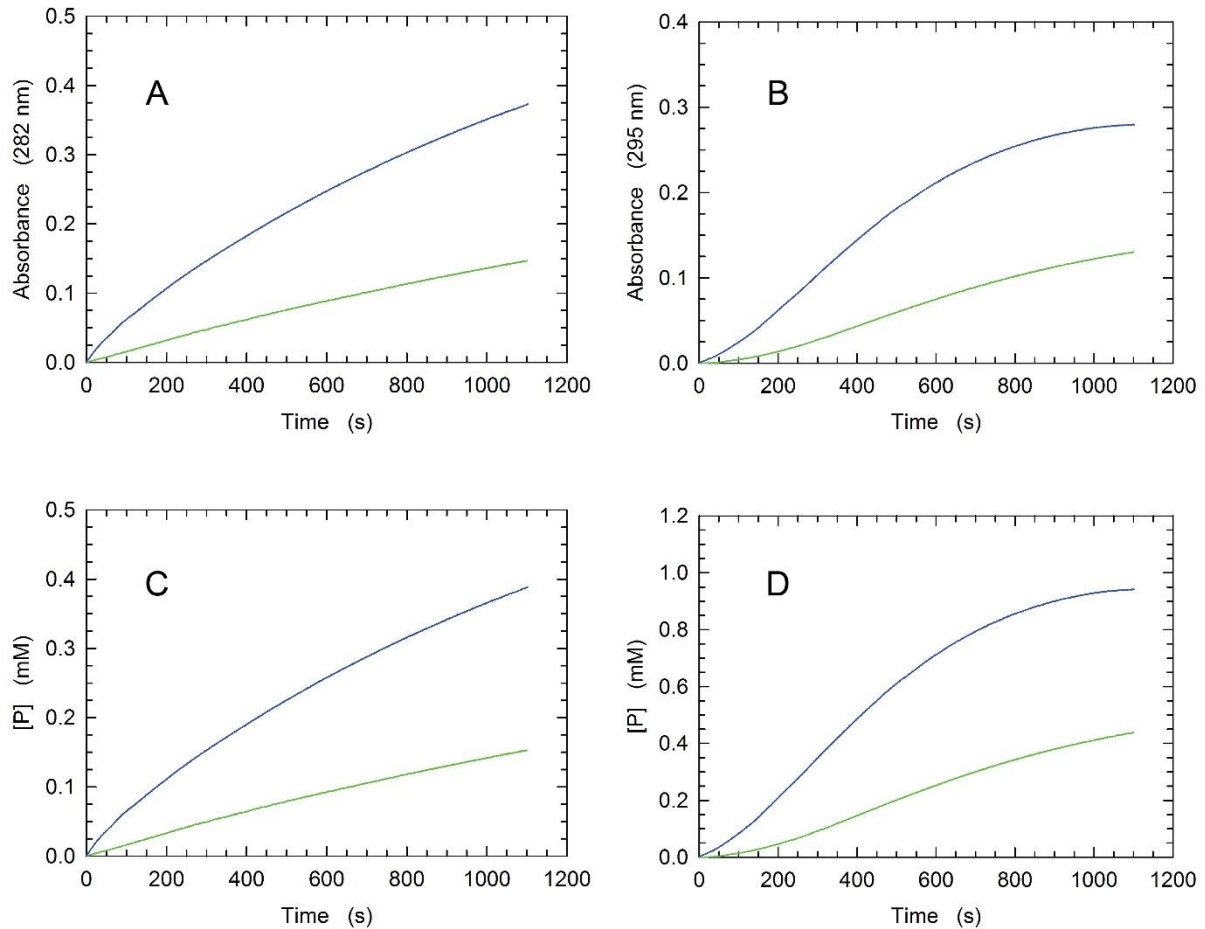
Wavelength (nm)	$\epsilon$ Tyrosine ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	$\epsilon$ L-DOPA ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	$\Delta\epsilon$ DOPA - Tyrosine ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
275	1437	2439	1002
280	1239	2781	1543
286	507	2330	1823
295	29	326	297

- $\lambda$  275 nm: massimo assorbimento della tirosina
- $\lambda$  280 nm: massimo assorbimento di L-DOPA
- $\lambda$  286 nm:  $\Delta\epsilon$

I saggi per verificare un'eventuale inibizione da prodotto sono stati condotti a 282 nm, in assenza di inibitore, e a 295 nm in presenza di tirosinasi nella miscela di reazione. La lunghezza d'onda di 295 nm è stata scelta per seguire la formazione di L-DOPA e minimizzare l'assorbimento della tirosina, ottenendo comunque dei segnali apprezzabili ( $\Delta\epsilon$  pari a  $297 M^{-1}cm^{-1}$ ). Gli esperimenti hanno avuto una durata di 1200 secondi.

Il saggio accoppiato è stato eseguito utilizzando due concentrazioni dell'enzima primario, MptpAW152F, pari a 420 e 840 nM e 50 unità di tirosinasi. In entrambe le prove è stata mantenuta costante la concentrazione di substrato pTyr (10 mM) e la composizione del tampone universale a pH 7. Tale valore di pH è favorevole sia per l'attività di MptpA che per evitare l'ossidazione dell'L-DOPA a chinone, prodotto indesiderato.

Le miscele di reazione sono state preparate aggiungendo MptpAW152F come ultimo componente prima dell'avvio della misurazione. Gli andamenti ottenuti, visibili nella figura sottostante, sono stati elaborati grazie al programma *Kinetics*. I valori ottenuti indicano un aumento della velocità di reazione in seguito all'aggiunta di tirosinasi: si passa da un  $\Delta Abs/min$  pari a 0,0094 per la reazione di controllo a valori di  $\Delta Abs/min = 0,029$  e  $0,075$  in presenza, rispettivamente, di 420 e 840 nM enzima.



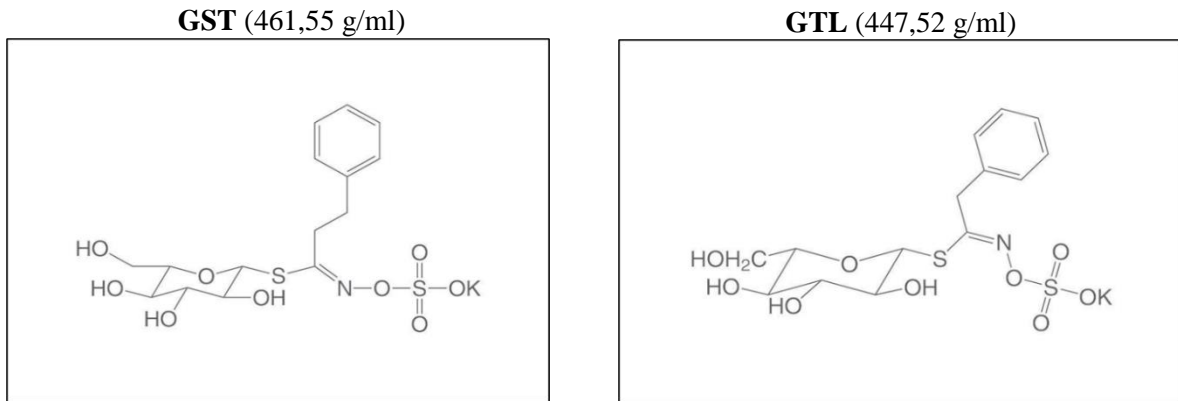
**Figura 4.4.1.5.** **A:** andamenti delle reazioni di controllo (assenza di enzima accoppiante); **B:** andamenti delle reazioni in presenza di tirosinasi; **C:** reazioni di formazione del prodotto finale, fosfato, in assenza di tirosinasi, **D:** reazioni di formazioni del prodotto finale in presenza di tirosinasi. In ogni pannello la *curva blu* rappresenta le reazioni con una concentrazione di MptpA pari a 840 nM, la *curva verde* riporta l'utilizzo di una concentrazione di MptpA pari a 420 nM.

Dal confronto degli andamenti cinetici (pannelli A-B e C-D) è visibile un cambiamento della forma delle curve dovuto all'ossidazione della tirosina a L-DOPA, ad opera della tirosinasi, che ha portato ad un aumento dell'attività enzimatica come conseguenza dell'eliminazione della fonte di inibizione. Questo dimostra che MptpA è inibito dal prodotto di reazione.

#### **4.4.2 – PROVE DI INIBIZIONE CON I GLUCOSINOLATI**

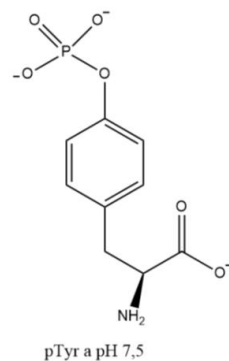
I glucosinolati sono metaboliti contenenti gruppi sulfidrilici prodotti da alcune piante della famiglia delle *Brassicaceae* (come cavolo, broccolo, rafano, ecc) e possiedono elevata attività antiossidante. In dettaglio, si tratta di  $\beta$ -tioglucosidi N-idrosolfati con una catena laterale (R) variabile. Sono noti moltissimi glucosinolati che differiscono per tale catena laterale. In questo

lavoro è stata analizzata l'attività inibitoria di due glucosinolati: GST (gluconasturzina-fenilettilglucosinolato) e GTL (glucotropeolina-benzilglucosinolato), estratti e liofilizzati dal Centro di Ricerca per le colture industriali (CREA-CIN) di Bologna. Le strutture dei due composti esaminati sono riportate in figura 4.4.2.1:



**Figura 4.4.2.1:** Struttura chimica dei glucosinolati analizzati, GST e GTL, con il relativo peso molecolare.

Come si evince dalla struttura, i glucosinolati in esame condividono lo stesso gruppo solfonato ed un fenile che dovrebbero mimare la composizione del substrato naturale (figura 4.4.2.2).

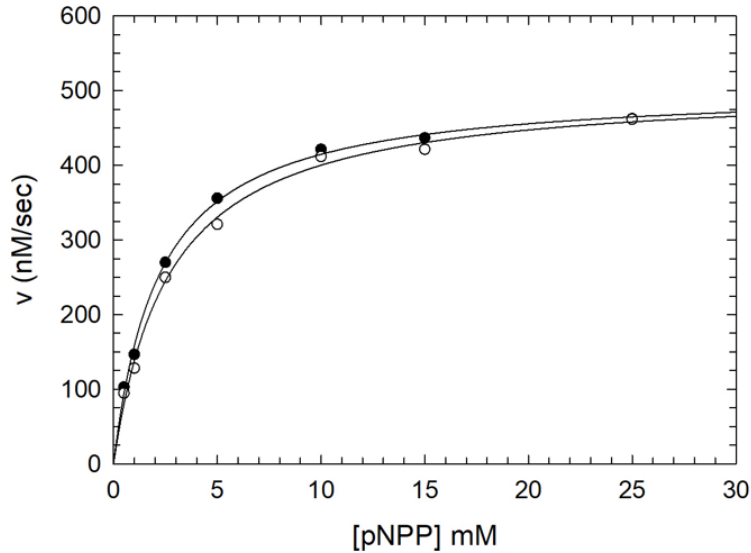


**Figura 4.4.2.2:** Struttura del substrato fosfotirosina (pTyr) a pH 7.5 (ChemDraw).

#### **4.4.2.1 – PROVE DI INIBIZIONE CON GST**

I saggi per valutare eventuale inibizione da parte dei glucosinolati sono stati eseguiti utilizzando il *p*-NPP come substrato. La cinetica è stata misurata in presenza di 420 nM enzima, concentrazioni costanti di GST, alternativamente 1 mM e 10 mM, e concentrazioni crescenti di substrato *p*-NPP. Come descritto in precedenza, i saggi sono stati condotti a 405 nm per 600

secondi nel tampone universale a pH 7.5. Le reazioni di controllo, in assenza di inibitore, sono state eseguite in maniera analoga. L'andamento cinetico in presenza di GST 1 mM ed i relativi parametri cinetici, ricavati tramite Sigma-Plot, sono riportati di seguito:

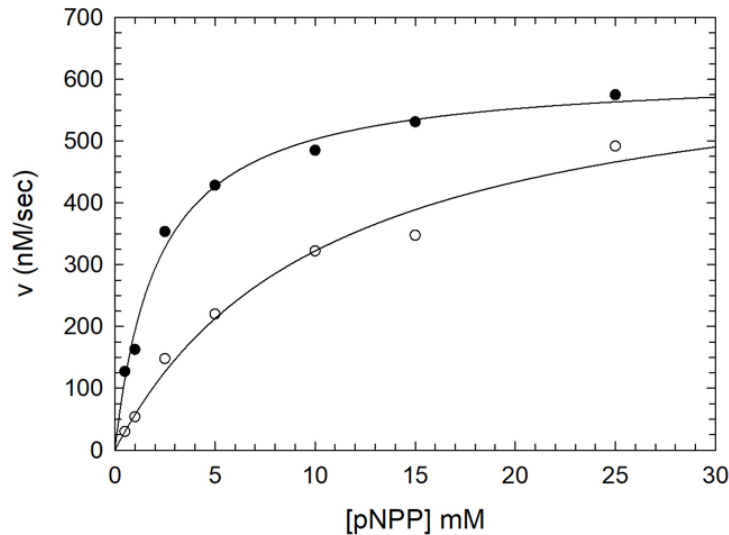


**Figura 4.4.2.1.1:** Cinetica di reazione tra enzima e substrato in presenza di GST 1 mM. I pallini neri riportano la curva del controllo (assenza di GST), i pallini bianchi rappresentano l'andamento cinetico in presenza di inibitore. Le concentrazioni di substrato variano da: 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 e 25 mM.

Come si osserva dalla figura il GST, alla concentrazione pari a 1 mM, non ha alcun effetto nei confronti di MptpAW152F poiché le due curve sono sovrapponibili. Ciò è in accordo anche con i parametri cinetici, i cui valori non presentano una differenza significativa:

Senza GST		con GST 1 mM	
$V_{\max}$	$505.44 \pm 7.29$ nM/sec	$V_{\max}$	$507.00 \pm 11.82$ nM/sec
$K_m$	$2.19 \pm 0.12$ mM	$K_m$	$2.67 \pm 0.23$ mM
$k_{\text{cat}}$	$1.20$ sec <sup>-1</sup>	$k_{\text{cat}}$	$1.21$ sec <sup>-1</sup>
$k_{\text{cat}}/K_m$	$0.548$ mM <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup>	$k_{\text{cat}}/K_m$	$0.452$ mM <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup>

Lo studio cinetico è stato ripetuto nelle stesse condizioni utilizzando il glucosinolato alla concentrazione 10 mM. I risultati ottenuti sono visualizzati nel grafico sottostante:



**Figura 4.4.2.1.2:** Cinetica di reazione tra enzima e substrato in presenza di GST 10 mM. I pallini neri riportano la curva del controllo (assenza di GST), i pallini bianchi rappresentano l'andamento cinetico in presenza di inibitore. Le concentrazioni di substrato variano da: 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 e 25 mM.

Come osservabile in figura, alte concentrazioni di GST mostrano effetto inibitorio, come evidenziabile anche dal confronto dei parametri cinetici:

Senza GST		con GST 10 mM	
$V_{\max}$	$612.33 \pm 19.64$ nM/sec	$V_{\max}$	$663.89 \pm 68.84$ nM/sec
$K_m$	$2.18 \pm 0.27$ mM	$K_m$	$10.61 \pm 2.46$ mM
$k_{\text{cat}}$	$1.46$ sec <sup>-1</sup>	$k_{\text{cat}}$	$1.58$ sec <sup>-1</sup>
$k_{\text{cat}}/K_m$	$0.669$ mM <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup>	$k_{\text{cat}}/K_m$	$0.149$ mM <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup>

In particolare, la  $K_m$  (cioè l'affinità enzima-substrato) ha subito un aumento, mentre la  $V_{\max}$  rimane invariata. Il GST in queste condizioni si comporta quindi come un inibitore competitivo capace di legarsi al sito attivo dell'enzima, impedendo al substrato di legarsi e di essere convertito in prodotto.

Considerato tale effetto, l'attività inibitoria da parte di GST è stata esaminata anche in presenza del substrato fosfotirosina 1 mM finale, a pH 6.5 e 7.5. Le prove sono state condotte a 282 nm in presenza di una concentrazione costante di enzima (420 nM). I risultati, espressi in  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ , sono riportati in tabella:



pH 7.5	pH 6.5	
0,0018	0,0020	<b>CTR pTyr 1 mM</b>
0,0015	0,0015	<b>1 mM pTyr + 1 mM GST</b>
0,0004	0,0004	<b>1 mM pTyr + 10 mM GST</b>

Come si osserva dai dati sperimentali, il pH non influisce sull'attività inibitoria di GST nei confronti di MptpAW152F e solo alte concentrazioni del glucosinolato (10 mM) sono in grado di ridurre l'attività enzimatica, in maniera analoga a quanto osservato in presenza di *p*-NPP.

#### **4.4.2.2 – PROVE DI INIBIZIONE CON GTL**

Le prove di inibizione sono state effettuate anche per il secondo glucosinolato a disposizione, glucotropeolina, nelle stesse condizioni descritte per il GST: concentrazione di enzima costante (420 nM), di GTL pari a 1 mM e 10 mM, e substrato *p*-NPP. L'attività enzimatica è stata misurata a 405 nm per una durata di 600 secondi nel tampone universale a pH 7.5. I risultati, come  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ , vengono riportati di seguito:

- Controllo	+ GTL 1 mM	+ GTL 10 mM
0,1786 (1 mM <i>p</i> -NPP)	0,1864	0,1430
0,5323 (10 mM <i>p</i> -NPP)	0,5446	0,5157

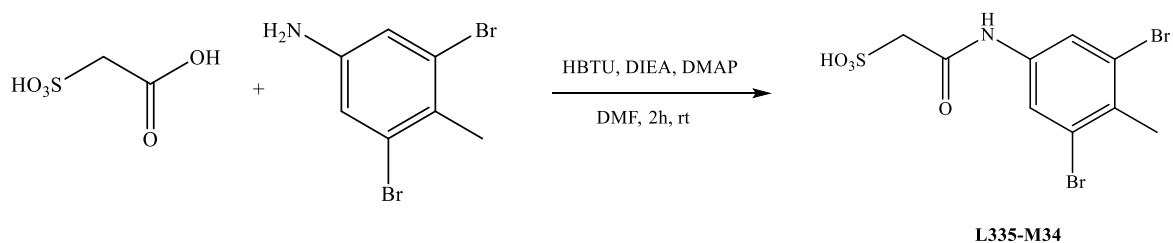
Basse concentrazioni di GTL non hanno effetto inibitorio indipendentemente dalla concentrazione di substrato presente nella miscela di reazione. Una debole inibizione si osserva solamente ad alta concentrazione di GTL e in presenza di substrato 1 mM.

#### **4.4.3 – PROVE DI INIBIZIONE CON L335-M34**

È noto dalla letteratura <sup>[23]</sup> che il composto L335-M34 è un inibitore reversibile e competitivo di MptpA caratterizzato da un valore di  $\text{IC}_{50}$  pari a 160 nM e una  $K_i$  di  $56 \pm 2.0$  nM. La sua azione è, inoltre, altamente specifica nei confronti di MptpA rispetto a numerose altre tirosin-fosfatasi analizzate. Nel lavoro di Dutta et al. l'inibizione è stata valutata eseguendo dei saggi

di attività a pH 7 in presenza di 1 mM *p*-NPP come substrato, 5 nM di enzima e concentrazioni crescenti di L335-M34.

Per approfondire le informazioni relative a tale inibitore, in questo progetto di Tesi si è deciso di indagarne il comportamento in presenza del substrato naturale, la fosfotirosina. A tale scopo, il composto L335-M34 è stato sintetizzato secondo i passaggi descritti nel paragrafo 3.9. Lo schema di reazione è riportato di seguito:

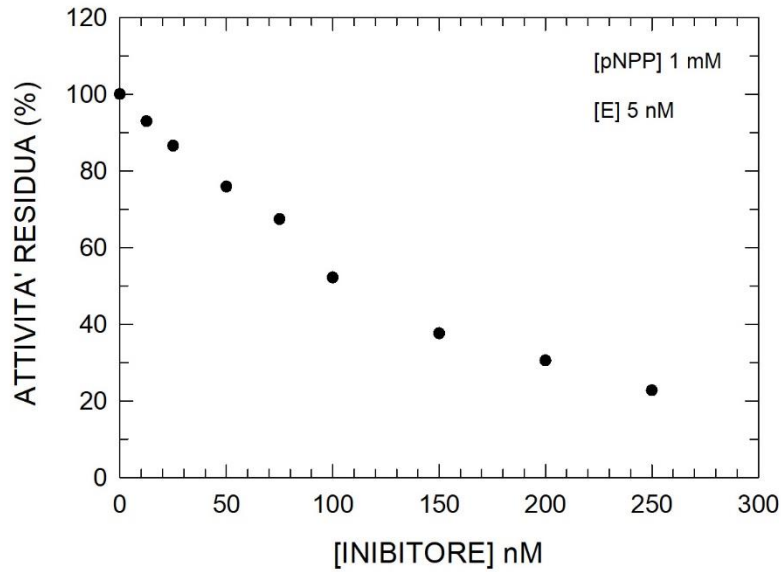


**Figura 4.4.3.1.** Schema di reazione di coupling amidico per ottenere L335-M34.

Come si può notare dalla struttura, anche il prodotto L335-M34 presenta un gruppo solfonico  $\text{SO}_3\text{H}$ , in analogia con i glucosinolati analizzati precedentemente, che dovrebbe favorire il legame all'enzima mimando il substrato naturale. Seguendo la procedura di sintesi e di purificazione descritta nella sezione dei materiali e metodi è stato possibile ottenere 4,5 mg di prodotto puro al 95% a partire da 13 mg di sale di partenza.

Inizialmente sono state condotte prove per verificare la corretta sintesi di L335-M34 e valutare l'eventuale inibizione nei confronti di MptpA. A tale scopo è stato eseguito un saggio di attività analogo a quello descritto da Dutta et al. utilizzando, quindi, concentrazioni costanti di substrato (1 mM *p*-NPP) e di enzima (5 nM di MptpAW152F). Alle reazioni, eseguite nel tampone universale a pH 7.5, sono state aggiunte quantità crescenti di inibitore (12.5, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 250 nM) e l'aumento di assorbanza a 405 nm è stato misurato successivamente ad una incubazione di 5 minuti tra l'enzima e l'inibitore.

Le tracce sono state analizzate con il programma *Kinetics* per ricavare i valori di  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  per il calcolo dell'attività enzimatica. Il grafico sottostante riporta l'attività residua dell'enzima in funzione delle diverse concentrazioni di inibitore utilizzato nei saggi:



**Figura 4.4.3.2.** Attività residua (%) dell'enzima *MtpAW152F* in funzione delle diverse concentrazioni di inibitore *L335-M34* (12,5, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 nM). Le prove sono state condotte a pH 7.5 misurando l'assorbanza a 405 nm per 900 secondi.

Se si confronta l'attività del campione di controllo, privo di inibitore, con quella misurabile nei campioni contenenti *L335-M34*, è possibile calcolare la percentuale d'inibizione ad ogni concentrazione di utilizzo:

[Inibitore]	% Inibizione
12,5 nM	- 8%
25 nM	- 13%
50 nM	- 24%
75 nM	- 36%
100 nM	- 63%
150 nM	- 66%
200 nM	- 69%
250 nM	- 77%

I risultati ottenuti indicano che *L335-M34* esplica una importante inibizione nei confronti di *MtpA*, sino a provocare una diminuzione di attività del 77% quando presente alla

concentrazione pari a 250 nM. Rispetto ai precedenti esperimenti condotti con i glucosinolati l'attività inibitoria è nettamente superiore, considerando anche che le quantità di enzima e di inibitore utilizzate nei saggi sono molto inferiori: 5 nM di enzima (rispetto a 420 nM) e 12.5-250 nM di L335-M34 (rispetto a 1-10 mM di GST). L'effetto inibitorio osservato è, inoltre, assolutamente paragonabile con quanto studiato da Dutta et al., a conferma del fatto che la preparazione di L335-M34 è avvenuta correttamente.

Considerati questi risultati preliminari, si è deciso di approfondire lo studio analizzando il comportamento dell'inibitore sintetico in presenza del substrato fosfotirosina.

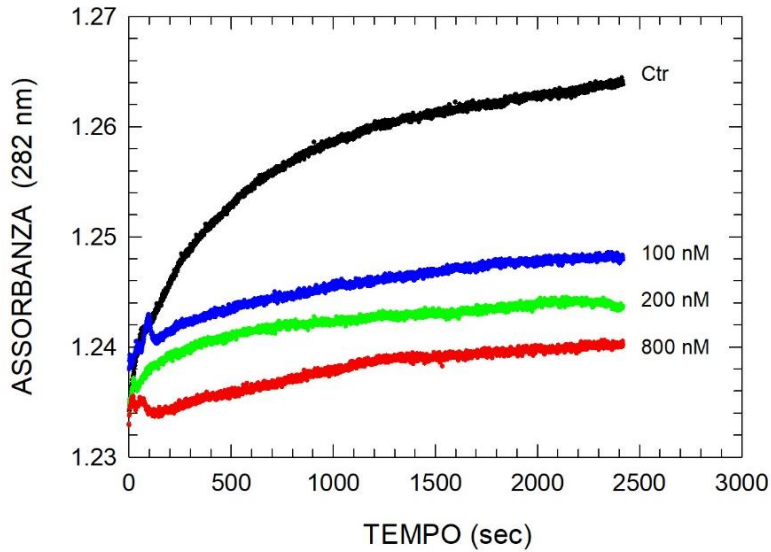
A tale scopo i saggi sono stati eseguiti in presenza di pTyr 10 mM, mantenendo costante la concentrazione di MptpA (420 nM) e modificando quella di inibitore: 100, 200, 400, 600 e 800 nM. In questo caso l'assorbanza è stata misurata a 282 nm per una durata totale dell'analisi compresa tra i 2400 e i 3600 secondi. Le miscele, prive del substrato, sono state incubate per 10 minuti per favorire l'interazione tra enzima e inibitore. Come controllo è stata eseguita una reazione in assenza di L335-M34.

Dato che l'attività enzimatica di MptpA dipende dal pH dell'ambiente di reazione, sono stati ripetuti dei saggi analoghi utilizzando lo stesso tampone universale a diversi pH: 6, 7 e 8. Di seguito sono riportati i risultati ottenuti nelle tre diverse prove.

#### Saggi a pH 6

Come evidenziato in uno studio precedente<sup>[21]</sup> l'attività enzimatica di MptpA a pH 6 è difficile da rilevare di conseguenza sono state eseguite solamente analisi qualitative in presenza di tre concentrazioni di inibitore: 100, 200 e 800 nM.

In figura 4.4.3.3. sono visibili gli andamenti della reazione di defosforilazione del substrato pTyr in presenza o assenza di L335-M34. Nonostante una scarsa attività enzimatica che porta ad avere bassi segnali, è comunque visibile una forte inibizione anche a questo valore di pH. La curva del controllo, infatti, si discosta notevolmente dalle altre; la variazione di assorbanza registrata in 2400 secondi è di circa 30 mAbs mentre, in presenza dell'inibitore, si misurano variazioni non superiori a 6-8 mAbs.



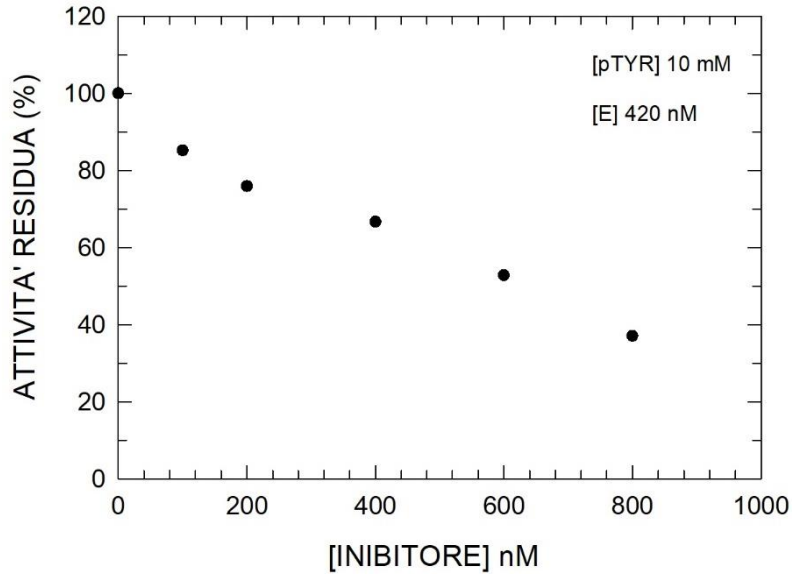
**Figura 4.4.3.3.** Andamento delle reazioni di idrolisi di pTyr in presenza dell'inibitore L335-M34 (100, 200, 800 nM) a pH 6 nel tampone universale. La curva nera rappresenta la reazione eseguita in assenza di inibitore (controllo, Ctr).

L'inibizione osservata è coerente ai risultati ottenuti in precedenza in base ai quali la  $K_m$  per la fosfotirosina, a pH 6, presenta un valore pari a  $55,04 \pm 24,79$  mM<sup>[21]</sup>. Se consideriamo che la  $K_m$  calcolata ad altri pH varia tra 3-5 mM, un valore così elevato indica una bassa affinità per il substrato. Questo fa supporre che l'inibitore L335-M34 riesca a legarsi a MtpA meglio della fosfotirosina.

#### Saggi a pH 7

Lo stesso saggio descritto nel paragrafo precedente è stato eseguito a pH 7, condizione ottimale per l'attività dell'enzima, mantenendo invariate le concentrazioni di MtpAW152F (420 nM) e substrato (10 mM). In questo caso è stato valutato l'effetto delle seguenti concentrazioni di inibitore: 100, 200, 400, 600 e 800 nM.

Di seguito è riportato il grafico che descrive la variazione dell'attività enzimatica in funzione della concentrazione di inibitore. In particolare, viene riportata l'attività residua (in percentuale) rispetto al campione di controllo privo di inibitore. Tali valori sono stati ottenuti interpolando i dati sperimentali per ricavare i valori di  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  da confrontare (programma *Kinetics*).



**Figura 4.4.3.4.** Attività residua di MptpAW152F (%) in funzione delle diverse concentrazioni di inibitore: 100, 200, 400, 600, 800 nM. Le prove vengono condotte a pH 7 nel tampone universale, a 282 nm per 2400 secondi.

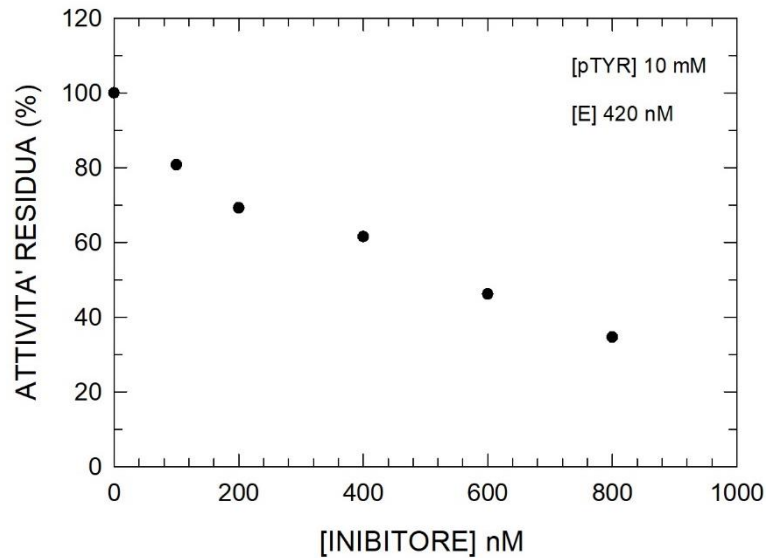
L'analisi della figura 4.4.3.4. indica chiaramente che l'attività di MptpAW152F è fortemente inibita dalla presenza di L335-M34 anche a pH 7. A differenza di quanto osservato a pH 6, si nota inoltre un calo proporzionale aumentando la concentrazione d'inibitore. Sono state calcolate le percentuali di inibizione, come indicato in tabella:

[Inibitore]	% Inibizione
100 nM	- 14,8%
200 nM	- 24,1%
400 nM	- 33,3%
600 nM	- 47,2%
800 nM	- 62,9%

In analogia a quanto osservato a pH 7.5 in presenza del substrato *p*-NPP, l'inibitore L335-M34 si comporta da inibitore in grado di legare efficacemente l'enzima. L'effetto si verifica sempre a concentrazioni nM confermando, quindi, che L335-M34 è un forte inibitore di MptpA. Le percentuali di inibizioni osservate nei due esperimenti non sono, tuttavia, confrontabili tra loro dal momento che nei saggi sono state utilizzate concentrazioni diverse di enzima (5 o 420 nM) e substrati differenti (*p*-NPP o *p*Tyr) dotati di diversa affinità di legame per l'enzima.

Saggi a pH 8

È stata infine valutata l'inibizione dell'attività enzimatica a pH 8. Le condizioni dei saggi sono state mantenute identiche alle prove eseguite a pH 7: 420 nM enzima, 10 mM pTyr e inibitore a concentrazione crescente da 100 a 800 nM. L'andamento dell'attività inibitoria viene riportato nel grafico sottostante come attività residua in funzione delle diverse concentrazioni di inibitore:



**Figura 4.4.3.5.** Attività residua di *MptpAW152F* (%) in funzione di diverse concentrazioni di inibitore: 100, 200, 400, 600, 800 nM. Le prove vengono condotte a pH 8 nel tampone universale, a 282 nm per 3600 secondi.

La percentuale di inibizione calcolata per ogni concentrazione di inibitore è elencata in tabella:

[Inibitore]	% Inibizione
100 nM	- 19%
200 nM	- 31%
400 nM	- 38%
600 nM	- 54%
800 nM	- 65%

Anche a pH 8 si osserva una elevata attività inibitoria di L335-M34 nei confronti di *MptpAW152F*, con valori confrontabili a quelli ottenuti a pH 7. Il leggero aumento dell'effetto

inibitorio può dipendere dal fatto che il pH 8 non è quello ottimale per l'attività enzimatica, di conseguenza l'inibitore può risultare più affine del substrato al sito di legame di MtpA.

In conclusione, gli esperimenti eseguiti in questo studio hanno confermato le evidenze precedenti (Dutta et al.) rafforzando l'importanza del composto L335-M34 come inibitore competitivo specifico della tirosin-fosfatasi A di *Mycobacterium tuberculosis*. La struttura chimica di L335-M34 può essere perciò di supporto per la progettazione e la sintesi di ulteriori inibitori.

#### **4.5 – SAGGI DI ATTIVITÀ ENZIMATICA IN PRE-STEADY-STATE**

La cinetica della reazione di idrolisi di un substrato in condizioni di *pre-steady-state* e gli eventuali cambiamenti conformazionali dell'enzima in esame possono essere efficacemente analizzati mediante uno spettrofotometro stopped-flow. Tale strumento, diversamente dalla classica analisi spettrofotometrica che è in grado di rilevare solo la fase di *steady-state*, consente di analizzare e seguire l'andamento della reazione sin dai primi millisecondi. Questo è possibile grazie a due siringhe che permettono di mescolare rapidamente le soluzioni in esame nella camera di reazione (cella ottica).

In questo studio le analisi con lo stopped-flow sono state eseguite per valutare il legame tra l'enzima di interesse e il suo substrato (pTyr) misurando la fluorescenza emessa dall'unico triptofano presente in MtpAW152F, ovvero il W<sup>48</sup> situato nel W-loop e fondamentale per la catalisi. Una variazione di fluorescenza durante la reazione è correlabile con un cambiamento della conformazione dell'enzima che si verifica durante la defosforilazione del substrato.

Le variazioni di assorbanza, misurate ad una lunghezza d'onda d'eccitazione pari a 290 nm, permettono di osservare la formazione della tirosina, prodotto di reazione. Luce della stessa  $\lambda$  è stata utilizzata per l'eccitazione del triptofano dell'enzima la cui emissione è stata osservata grazie alla presenza di un filtro "long-pass" capace di selezionare lunghezze d'onda superiori a 340 nm. Queste condizioni di analisi permettono di minimizzare il contributo dato dagli altri amminoacidi presenti nella proteina (tre tirosine), favorendo l'eccitazione del triptofano catalitico.

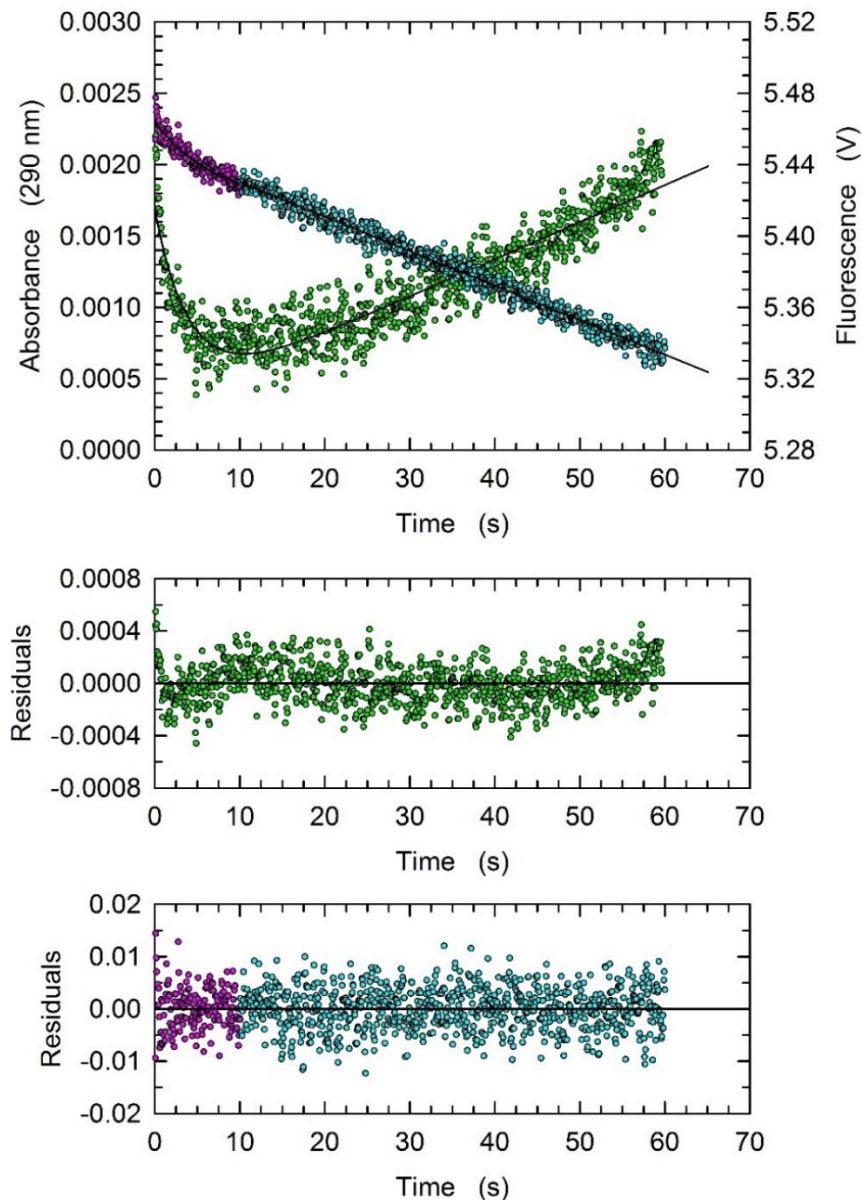
Le prove sono state eseguite a tre diversi valori di pH (6, 7 e 8) utilizzando il tampone universale Tris 50 mM, BisTris 50 mM, EDTA 4 mM (2X) e termostatando l'apparato a 37 °C per favorire



la reazione enzimatica. Tutti gli esperimenti hanno utilizzato, nella cella ottica, la stessa concentrazione finale di fosfotirosina (10 mM) di MptpAW152F (15  $\mu$ M).

#### **4.5.1 – STOPPED-FLOW A PH 6**

Le analisi a pH 6 sono riportate in figura 4.5.1.1 che riporta anche l'interpolazione dei dati effettuata mediante software Sigma-Plot:



**Figura 4.5.1.1.** Reazione d'idrolisi del substrato fosfotirosina (10 mM) catalizzata da MptpAW152F (15  $\mu$ M) a pH 6 nel tampone universale. I punti verdi rappresentano la misura di assorbanza, i punti magenta e azzurro indicano la variazione di fluorescenza del triptofano W<sup>48</sup>. Le curve nere che attraversano i grafici riportano il best fit dei dati sperimentali. Viene riportato anche il grafico dei residui, che rappresenta la differenza tra il dato osservato ed il teorico.

Nel pannello in alto è visualizzabile, in verde, l'aumento di assorbanza dovuta alla formazione del prodotto di reazione, mentre la curva in magenta-azzurro rappresenta la variazione di fluorescenza del triptofano W<sup>48</sup>. L'interpolazione dei dati sperimentali è stata eseguita attraverso equazioni diverse, riportate in tabella, per ricavare i seguenti parametri:

- $y_0$  = intercetta dell'equazione di regressione
- $a$  = ampiezza
- $b$  = costante di velocità
- $c$  = costante di velocità

<b>pH 6.0</b>	
<b>Absorbance, <math>f = y_0 + a \cdot \exp^{-bx} + c \cdot x</math></b>	
$y_0 = (2.982 \pm 0.178) \cdot 10^{-4}$	
$a = (100.00 \pm 3.78) \cdot 10^{-5}$	
$b = 0.246 \pm 0.013$	
$c = (259.9 \pm 4.4) \cdot 10^{-7}$	
<b>Fluorescence (0-10 seconds), <math>f = y_0 + a \cdot \exp^{-bx}</math></b>	
$y_0 = 5.418 \pm 0.005$	
$a = 0.046 \pm 0.004$	
$b = 0.138 \pm 0.027$	
<b>Fluorescence (10-60 seconds), <math>f = y_0 + a \cdot x</math></b>	
$y_0 = 5.45 \pm 3.71 \cdot 10^{-4}$	
$a = -(2000 \pm 9.78) \cdot 10^{-6}$	

Per quanto riguarda l'assorbanza, l'interpolazione è stata eseguita tramite equazione con un esponente (decadimento) e una componente lineare (positiva). La reazione di produzione della tirosina è molto lenta: in 60 secondi si è osservato un incremento di 1,6 mAbs paragonabile al valore di decremento iniziale dell'assorbanza. Se si analizza la forma del grafico, si può distinguere un primo tratto che descrive un decadimento esponenziale che probabilmente rappresenta un cambiamento conformazionale della proteina. L'assorbanza diminuirebbe a causa di questo riarrangiamento strutturale dovuto alla chiusura dell'enzima in seguito al legame del substrato (*closed-form*). Conclusa tale fase, MptpAW152F catalizza la reazione di defosforilazione del substrato e rilascia la tirosina come prodotto, provocando così un aumento di assorbanza (incremento di assorbanza nel grafico).

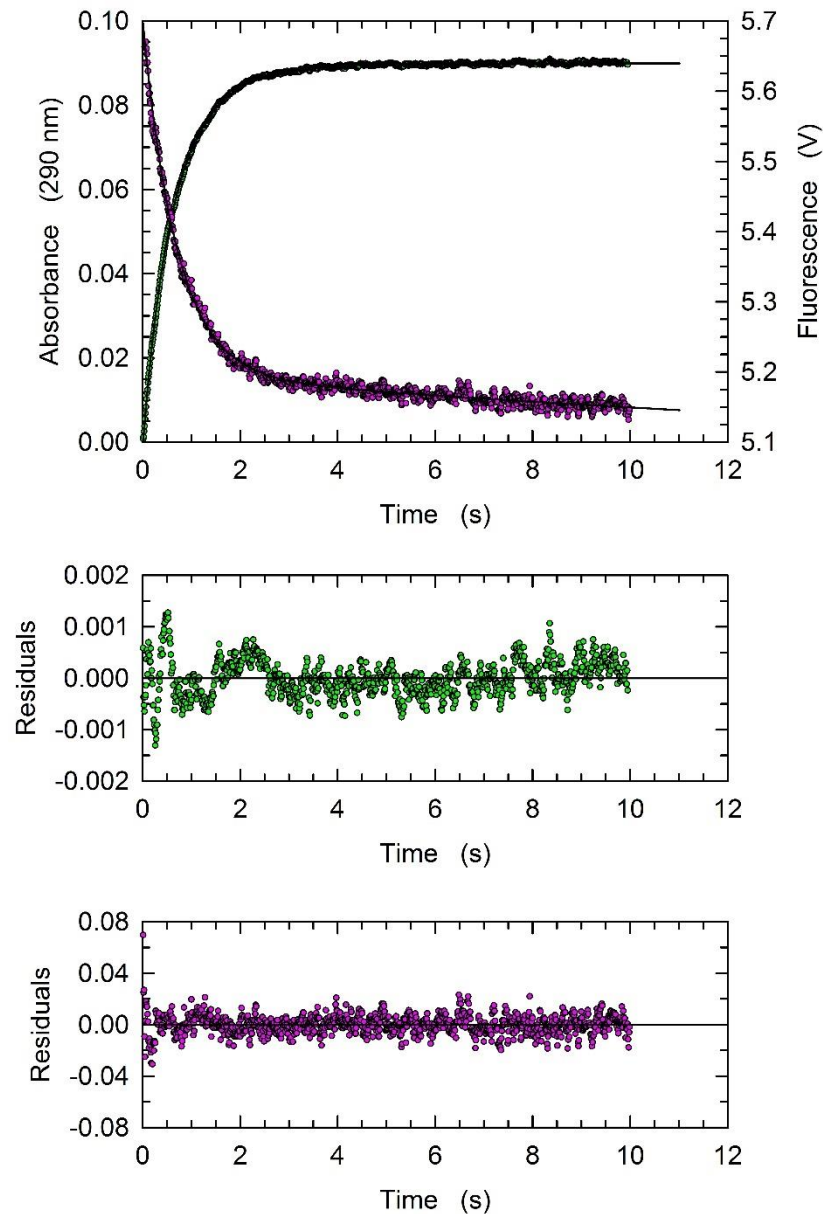
In accordo con tali osservazioni, anche le misure in fluorescenza indicano una reazione molto lenta, con un decadimento di circa 140 mV in 60 secondi. Come si evince dal grafico, è possibile

notare due andamenti differenti, una prima fase veloce (0-10 secondi) seguita da una seconda fase più lenta (10-60 secondi) che sembra raggiungere uno stato stazionario. Tali osservazioni sono confermate dalle interpolazioni fatte, esponenziale per il primo tratto e lineare per il secondo tratto. Il decremento di fluorescenza osservato è correlabile con il cambiamento conformazionale di MtpAW152F che si riarrangia da forma aperta a forma chiusa quando lega la fosfotirosina. In questa fase il D-loop va a chiudersi sul W-loop, contenente il W<sup>48</sup> catalitico. La presenza di una prima parte del grafico (in magenta) con una velocità più elevata rispetto alla fase successiva è probabilmente dovuto ad una sottopopolazione di molecole di enzima capaci di catalizzare bene la reazione. Il secondo tratto (in azzurro) evidenzia, invece, una fase molto lenta della reazione che non arriva a compimento.

Gli andamenti osservati sia in assorbanza che in fluorescenza e le corrispondenti velocità, indicate dalle costanti riportate in tabella, riflettono la limitata attività di MtpAW152F a pH 6. Come descritto anche in precedenza, infatti, a questo valore di pH MtpA catalizza con difficoltà la reazione di defosforilazione del substrato.

#### **4.5.2 – STOPPED-FLOW A PH 7**

Analogamente alle prove eseguite a pH 6, è stata studiata la reazione di idrolisi della fosfotirosina anche a pH 7, valore favorevole per l'attività enzimatica. Dal momento che la reazione in questo caso è molto veloce, i saggi sono stati effettuati in un intervallo di 10 secondi. La figura 4.5.2.1 riporta il grafico degli andamenti di assorbanza e fluorescenza:



**Figura 4.5.2.1.** Reazione d'idrolisi del substrato fosfotirosina (10 mM) catalizzata da MptpAW152F (15  $\mu$ M) a pH 7 nel tampone universale. I punti verdi rappresentano l'assorbanza dovuta alla formazione del prodotto, i punti magenta indicano la variazione di fluorescenza del triptofano  $W^{48}$ . Le curve nere che attraversano i grafici riportano il best fit dei dati sperimentali. Viene riportato anche il grafico dei residui, rappresentante la differenza tra il dato osservato ed il teorico.

L'interpolazione dei dati sperimentali è stata eseguita mediante programma Sigma-Plot utilizzando, per entrambe le misure di assorbanza e di fluorescenza, un'equazione con due esponenti per ricavare i parametri cinetici e le relative costanti ( $k_{obs}$ ):

<b>pH 7.0</b>	
<b>Absorbance, <math>f = y_0 + a \cdot (1 - \exp^{-bx}) + c \cdot (1 - \exp^{-dx})</math></b>	
$y_0 = (-10.0 \pm 1.3) \cdot 10^{-4}$	
$a = 0.042 \pm 0.003$	
$b = 2.259 \pm 0.075$	
$c = 0.049 \pm 0.003$	
$d = 1.109 \pm 0.024$	
<b>Fluorescence, <math>f = y_0 + a \cdot \exp^{-bx} + c \cdot \exp^{-dx}</math></b>	
$y_0 = 5.017 \pm 0.161$	
$a = 0.504 \pm 0.003$	
$b = 1.433 \pm 0.017$	
$c = 0.179 \pm 0.158$	
$d = 0.030 \pm 0.033$	

Le reazioni a pH 7 risultano essere molto più veloci rispetto a quelle osservate a pH 6, a conferma del fatto che l'attività enzimatica di MptpA presenta il suo *optimum* a questo valore di pH. Sia in assorbanza che in fluorescenza è visibile una componente iniziale veloce (*burst*) seguita da una fase lenta della reazione. I grafici risultano essenzialmente speculari.

In particolare, la misura dell'assorbanza mostra un *burst* iniziale della reazione dovuto al fatto che il prodotto viene generato molto velocemente nei primi 2 secondi di reazione. Il confronto delle costanti cinetiche (b e d) sembra indicare che il cambiamento di assorbanza sia più rapido rispetto a quello osservato per la fluorescenza: la costante di velocità della fase veloce (b) risulta  $2.259 \pm 0.075$  in assorbanza e  $1.433 \pm 0.017$  in fluorescenza, mentre la costante di velocità della fase lenta (d) è pari a  $1.109 \pm 0.024$  (in assorbanza) rispetto a  $0.030 \pm 0.033$  (in fluorescenza). Questa differenza è dovuta probabilmente alla diversità e alla complessità dei due fenomeni osservati.

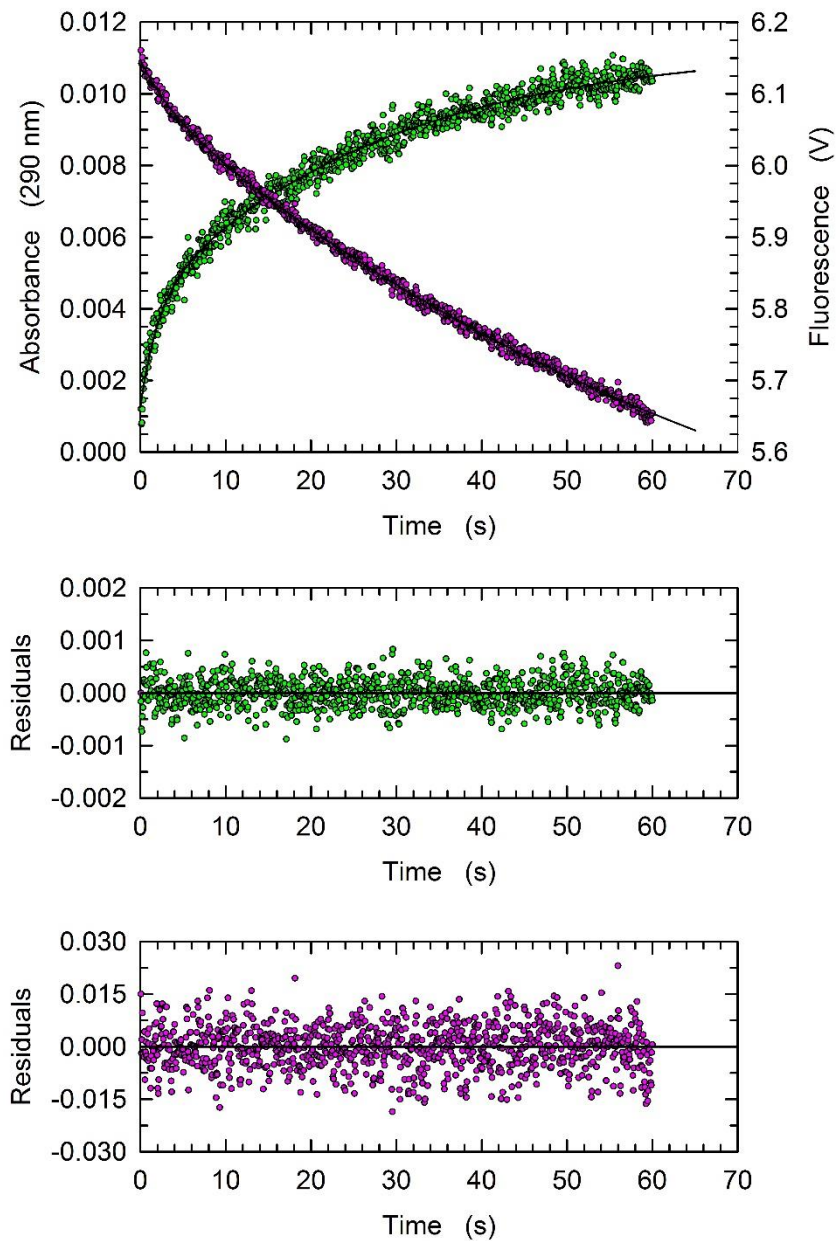
È possibile calcolare la concentrazione di tirosina generata durante la fase veloce della reazione misurando la differenza di assorbanza tra il tempo 0 ( $t_0$ ), pari a -0.001, e il tempo infinito ( $t_\infty$ ), pari a 0,042. Considerando il  $\Delta\epsilon$  Tyr-pTyr a 290 nm ( $0,217 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e il cammino della cella ottica di reazione (0,5 cm) si ottiene un valore di 387  $\mu\text{M}$ . Poiché la concentrazione di enzima utilizzato nei saggi è 15  $\mu\text{M}$  si può concludere che MptpAW152F ha effettuato 26 turnover durante la fase veloce.

Anche l'andamento della fluorescenza, che riflette la transizione dell'enzima dalla forma aperta a quella chiusa in seguito del legame con la fosfotirosina, mostra due fasi distinte, una molto veloce che prosegue con il raggiungimento di una fase lenta.

L'ampiezza del segnale di fluorescenza in 10 secondi è risultato circa 560 mV. Quando si verifica il legame del substrato, la fluorescenza diminuisce rapidamente a causa del riarrangiamento strutturale dell'enzima che comporta il ripiegamento del D-loop sul W-loop; questo movimento maschera il triptofano W<sup>48</sup>, diminuendo l'intensità di fluorescenza.

### **4.5.3 – STOPPED-FLOW A PH 8**

A completamento dello studio in regime di *pre-steady-state* è stato analizzato il comportamento di MtpAW152F anche a pH 8. Le condizioni del saggio sono state mantenute inalterate rispetto alle prove precedenti (10 mM substrato e 15  $\mu$ M enzima). I saggi sono stati effettuati per 60 secondi, come visibile nella figura 4.5.3.1:



**Figura 4.5.3.1.** Reazione d'idrolisi del substrato fosfotirosina (10 mM) catalizzata da MptpAW152F (15  $\mu$ M) a pH 8 nel tampone universale. I punti verdi rappresentano la misura di assorbanza (produzione del prodotto), i punti magenta indicano la variazione di fluorescenza del triptofano  $W^{48}$ . Le curve nere che attraversano i grafici riportano il best fit dei dati sperimentali. Viene riportato anche il grafico dei residui, rappresentante la differenza tra il dato osservato ed il teorico.

L'interpolazione dei dati sperimentali ottenuti, in assorbanza e in fluorescenza, è stata effettuata mediante una interpolazione con una equazione a due esponenti. I parametri sono riportati nella tabella sottostante:

<b>pH 8.0</b>	
<b>Absorbance, <math>f = y_0 + a \cdot (1 - \exp^{-bx}) + c \cdot (1 - \exp^{-dx})</math></b>	
$y_0 = (10 \pm 1) \cdot 10^{-4}$	
$a = (30 \pm 1) \cdot 10^{-4}$	
$b = 0.491 \pm 0.038$	
$c = (700 \pm 5) \cdot 10^{-5}$	
$d = 0.036 \pm 0.001$	
<b>Fluorescence, <math>f = y_0 + a \cdot \exp^{-bx} + c \cdot \exp^{-dx}</math></b>	
$y_0 = 5.280 \pm 0.016$	
$a = 0.047 \pm 0.002$	
$b = 0.293 \pm 0.030$	
$c = 0.819 \pm 0.014$	
$d = 0.0130 \pm 0.0004$	

Come si deduce facilmente dai valori delle costanti cinetiche e dall'osservazione della figura 4.5.3.1, la reazione di idrolisi della fosfotirosina a pH 8 appare più lenta rispetto a quanto osservato a pH 7 ma decisamente più veloce rispetto a pH 6. Questo comportamento conferma ulteriormente che l'attività di MtpA cambia in funzione del pH.

Le curve che descrivono l'assorbanza e la fluorescenza a pH 7 e 8 sono simili e mantengono un andamento speculare. In entrambi i casi si possono distinguere due fasi distinte della reazione, una prima più rapida seguita da una fase più lenta. A pH 8, tuttavia, la fase veloce dura circa 10 secondi, mentre a pH 7 la si osserva durante i primi 2 secondi. Il confronto delle costanti cinetiche, in assorbanza e fluorescenza, conferma tale evidenza. Ad esempio, la costante cinetica della fase veloce in fluorescenza a pH 8 ( $b = 0.293 \pm 0.030$ ) è inferiore a quella rilevata a pH 7 ( $b = 1.433 \pm 0.017$ ) ma superiore a quella a pH 6 ( $b = 0.138 \pm 0.027$ ).

L'ampiezza del segnale di assorbanza, indicativo della formazione di tirosina, raggiunge un valore di circa 10 mAbs in 60 secondi mentre la diminuzione di fluorescenza è pari a 500 mV. Analogamente a quanto osservato a pH 7, queste variazioni sono dovute al riarrangiamento di MtpAW152F in seguito al legame della fosfotirosina (l'enzima cambia forma, da aperta a chiusa in seguito al legame del substrato).



#### **4.6 – SPR - SURFACE PLASMON RESONANCE**

Esistono numerose metodiche per studiare l'interazione tra molecole. Una tecnica quantitativa innovativa è l'SPR (Surface Plasmon Resonance) che si basa sull'analisi real-time dell'interazione cinetica tra due biomolecole in assenza di marcatura. Questo è possibile immobilizzando uno degli interattori della coppia, ad esempio la proteina, su una superficie metallica (chip o sensore) mentre il ligando viene fatto fluire sulla superficie del supporto. Come descritto nel capitolo 3.11, la tecnica valuta il cambiamento dell'indice di rifrazione e dell'angolo  $\theta$  (angolo della luce riflessa dalla superficie) provocato dall'interazione tra le due molecole. Il detector dello strumento rileva tali variazioni e i segnali (sensorgrammi) vengono rielaborati. Le variazioni dell'angolo  $\theta$  possono essere dovute a vari fattori quali: la lunghezza d'onda dell'analisi ( $\lambda$ ), l'indice di rifrazione del mezzo e lo spessore dello strato metallico del sensore ( $d$ ).

In questo studio gli esperimenti di SPR sono stati eseguiti per ricavare informazioni sul legame enzima-substrato e determinare la costante di dissociazione ( $K_D$ ) del complesso in funzione del pH. Tale parametro definisce l'affinità di legame: valori bassi indicano elevata affinità tra enzima e ligando, mentre valori elevati ( $\mu\text{M}$  o  $\text{mM}$ ) denotano un debole legame tra le due molecole.

A tale scopo MptpAW152F è stata immobilizzata sulla superficie del chip mentre il substrato (pTyr), presente in soluzione, è stato fatto fluire in corrispondenza del sensore utilizzando concentrazioni crescenti (25, 65, 150, 400 e 1000 nM). Gli esperimenti di *binding* sono stati eseguiti a 25 °C impostando un tempo di associazione di 20 secondi e un tempo di dissociazione di 100 secondi.

Sono stati eseguiti diversi saggi utilizzando le stesse condizioni (concentrazione di proteina e substrato, tempo dell'analisi, forza ionica) ma cambiando il pH del tampone in modo da valutare la formazione del complesso enzima-substrato a pH 5, 5.5, 6, 7 e 8.

La tabella sottostante riporta le costanti di dissociazione ( $K_D$ ) ottenute dall'analisi SPR effettuata presso l'università degli Studi di Salerno utilizzando lo strumento Biacore 3000:

<b>pH</b>	<b>K<sub>D</sub></b>
5.0	$6.4 \pm 0.9 \cdot 10^{-5}$
5.5	$7.4 \pm 0.7 \cdot 10^{-6}$
6.0	$1.1 \pm 0.3 \cdot 10^{-6}$
7.0	$4.3 \pm 0.5 \cdot 10^{-7}$
8.0	$7.3 \pm 0.9 \cdot 10^{-8}$

Dalle cinetiche di associazione e dissociazione a diverse concentrazioni di substrato è stato possibile calcolare la costante di dissociazione ( $K_D$ ). Come visibile in tabella i valori ottenuti della costante di dissociazione diminuiscono all'aumentare del pH. Questo indica un aumento di affinità tra MptpAW152F e la fosfotirosina, in accordo con quanto osservato in studi precedenti <sup>[21]</sup>.

## 5. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stato analizzato il comportamento catalitico della tirosin-fosfatasi A di *Mycobacterium tuberculosis*, MtpA, che ricopre un ruolo essenziale nella patogenesi del batterio. In dettaglio, la variante proteica MtpAW152F è stata caratterizzata mediante saggi di attività in condizioni di *steady-state* e *pre-steady-state* in presenza del substrato commerciale *p*-NPP o di quello naturale fosfotirosina.

Lo studio cinetico effettuato utilizzando la pTyr come substrato ha evidenziato la presenza di un secondo sito allosterico, adiacente al sito attivo dell'enzima, che influenza positivamente l'attività di MtpAW152F. Questo è evidente dall'andamento sigmoidale della cinetica enzimatica, visibile a concentrazioni limitanti di substrato, che non segue il classico modello di Michaelis-Menten ma è tipico di enzimi allosterici con una cinetica di Hill. Questo risultato è in accordo con quanto osservato in studi precedenti.

L'andamento della reazione di idrolisi della fosfotirosina e l'eventuale cambiamento conformazionale dell'enzima durante tale reazione è stato indagato a tre diversi valori di pH (6, 7 e 8) mediante analisi con lo stopped-flow. Gli andamenti della fluorescenza e dell'assorbanza hanno evidenziato la presenza di due fasi, una veloce seguita da una più lenta, che riflettono la transizione dell'enzima dalla forma aperta (inattiva) a quella chiusa (attiva). L'analisi delle curve e delle costanti cinetiche conferma, inoltre, che l'attività enzimatica è legata al pH di reazione. In particolare, la reazione di idrolisi della pTyr a pH 8 appare più lenta rispetto a quanto osservato a pH 7, ma decisamente più veloce rispetto a pH 6.

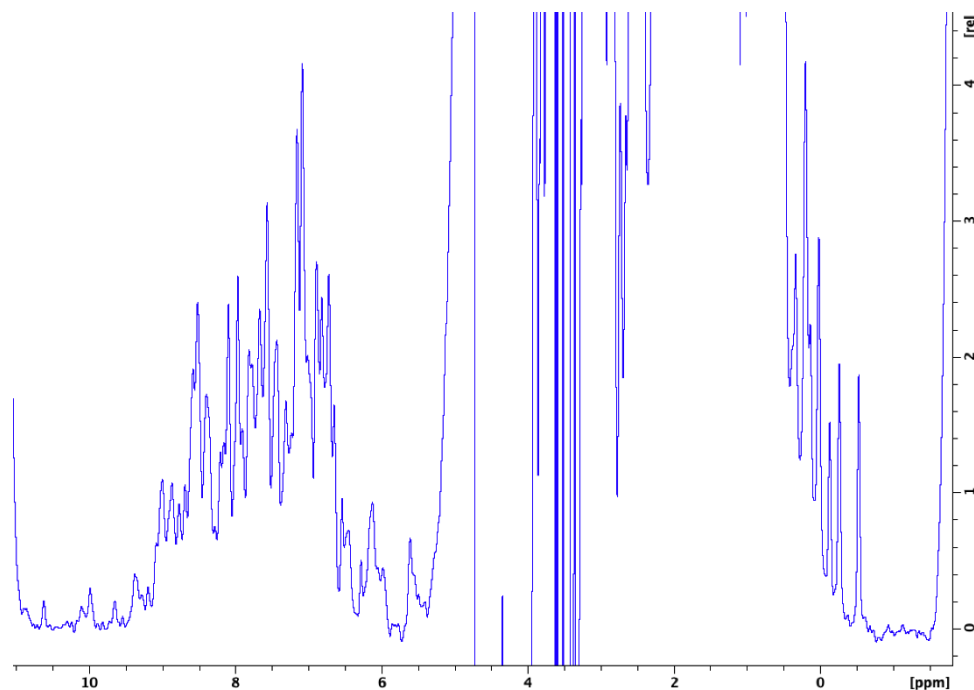
Per indagare ulteriormente la formazione del complesso tra MtpAW152F e fosfotirosina sono stati eseguiti esperimenti di SPR a diversi pH: 5, 5.5, 6, 7 e 8. Le costanti di dissociazione ( $K_D$ ) calcolate nelle diverse prove indicano un incremento di affinità di legame all'aumentare del pH.

Infine, considerato il ruolo chiave di MtpA nella patogenesi di *M. tuberculosis*, è stata valutata l'attività inibitoria nei confronti di MtpAW152F da parte di alcune molecole come la tirosina, prodotto di reazione, due glucosinolati (come esempio di composti naturali) e l'inibitore sintetico L335-M34. Come osservato in studi precedenti, l'enzima è inibito da fosfato, prodotto dalla reazione di defosforilazione della fosfotirosina. Le prove eseguite in questo lavoro hanno evidenziato che anche la tirosina, altro prodotto di reazione, provoca inibizione dell'attività enzimatica.

Inoltre, la presenza di attività inibitoria da parte dei glucosinolati, potenti antiossidanti naturali, è stata riscontrata solamente da parte di gluconasturtina (GST) ad alte concentrazioni (10 mM), indipendentemente dal pH in esame.

Per quanto riguarda l'inibitore sintetico L335-M34, le prove condotte hanno evidenziato una notevole diminuzione della velocità di reazione in presenza di pTyr, indipendentemente dal pH utilizzato (6, 7 e 8). Tali risultati confermano evidenze precedenti (Dutta et al.), ottenute con il substrato artificiale *p*-NPP, rafforzando l'importanza del composto L335-M34 come inibitore competitivo specifico della tirosin-fosfatasi A di *M. tuberculosis*. La struttura chimica di L335-M34 può essere perciò di supporto per la progettazione e la sintesi di ulteriori inibitori.

Sono in corso ulteriori studi NMR per indagare variazioni strutturali di MtpA in funzione del pH. Considerando, infatti, che l'enzima in esame è caratterizzato da piccole dimensioni (17,9 kDa), tale proteina può essere analizzata mediante NMR e, a tale scopo, è stato preparato un secondo lotto di produzione. Di seguito è riportato un primo spettro acquisito a pH 8 (analisi eseguita presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Costanza, Germania):



**Figura 5.1.** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di *MtpAW152F* [ $100\ \mu\text{M}$ ] in acqua deuterata  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 8. È possibile notare a 10 ppm il picco relativo al triptofano e tra 4 e 3 ppm la presenza del TRIS. Tra i 10 e i 6 ppm vengono evidenziati i picchi dei protoni ammidici, mentre la parte alifatica è situata tra 1 e 2 ppm.

Sono tuttora in corsa ulteriori analisi NMR, in funzione del pH, per comprendere più dettagliatamente il comportamento catalitico di MptpA ed i cambiamenti conformazionali ad esso associati.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. M. Soulsby, A.M. Bennett, Physiological signaling specificity by protein tyrosine phosphatases, *Physiology*, 24 (2009), 281-289.
2. R. Maccari and R. Ottanà, Low Molecular Weight phosphotyrosine protein phosphatases as emerging targets for the design of novel therapeutic agents, *Journal Medicinal Chemistry*, 55 (2019), 2-22.
3. Zhong-Yin Zhang, Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics, *Chemical Biology*, 5 (2001), 416-423.
4. B.G. Neel, N.K. Tonks, Protein tyrosine phosphatases in signal transduction, *Current Opinion in Cell Biology*, 9 (1997), 193-204.
5. D. Van Vactor, A.M. O'Reilly, B.G. Neel, Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases, *Curr Opin Genet Dev*, 8 (1998), 112-126.
6. S.S. Taylor, E. Radzio-Andzelm, T. Hunter, How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase, *FASEB Journal*, 9 (1995), 1255-1266.
7. International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 49 (2001), 860-921.
8. Zhong-Yin Zhang, Bo Zhou, Laiping Xie, Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors, *Pharmacology & Therapeutics*, 93, Issues 2-3, (2002), 307-317.
9. D. Barford, Structural studies of reversible protein phosphorylation and protein phosphatases, *Biochem Soc Trans*, 27 (1999), 751-766.
10. Salmeen, J.N. Andersen, M.P. Myers, N.K. Tonks, Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B, *Molecular Cell*, 6 (2000), 1401-1412.
11. G. Ramponi, M. Stefani, Structural, catalytic, and functional properties of low M(r), phosphotyrosine protein phosphatases. Evidence of a long evolutionary history, *Int J Biochem Cell Biol*, 29 (1997), 279-92.
12. R. M. Marzocchini, M. Bucciantini, M. Stefani, N. Taddei, M.G. Thunnissen, P. Nordlund, G. Ramponi, Expression, purification and preliminary crystal analysis of the human low Mr phosphotyrosine protein phosphatase isoform 1, *FEBS Letters*, 426 (1998), 52-56.

13. T. Stehle, S. Sreeramulu, F. Löhr, C. Richter, K. Saxena, H.R.A. Jonker, H. Schwalbe, The Apo-structure of the low molecular weight protein-tyrosine phosphatase A (MptpA) from *Mycobacterium tuberculosis* allows for better target-specific drug development, *The Journal of biological chemistry*, 287 (2012), 34569–34582.
14. K. Kolmodin, J. Åqvist, The catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases revisited, *FEBS Letters*, 498 (2001), 208-213.
15. A.D.B. Pannifer, A. J.Flint, N. K.Tonks, D. Barford, Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by X-ray crystallography, *Journal of biological chemistry*, 273 (1998), 10454-10462.
16. O.H. Vandal, C.F. Nathan, S. Ehrt, Acid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of bacteriology*, 191 (2009), 4714–4721.
17. B.A. Minassian, L. Ianzano, M. Meloche, E. Andermann, G.A. Rouleau, A.V. Delgado-Escueta, S.W. Scherer, Mutation spectrum and predicted function of laforin in Lafora's progressive myoclonus epilepsy, *Neurology*, 55 (2000), 341-346.
18. Stefan, F. Dal Piaz, A. Girella, A. Hochkoepller, Substrate activation of the low-molecular weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*, *Biochemistry*, 59 (2020), 1137-1148.
19. DST Unisannio, Sintesi ed espressione di proteine ricombinanti, [online], <http://www.dstunisannio.it/sites/default/files/2020-03/Lezione%2013.pdf>, 2013.
20. Antonio Girella, Comportamento catalitico della tirosin-fosfatasi di *Mycobacterium tuberculosis* (MptpA) e di alcune varianti sito-specifiche, A.A. 2018-2019.
21. Valentina Cimone, Analisi del comportamento cinetico della tirosin-fosfatasi A di *Mycobacterium Tuberculosis* (MptpA) in funzione del pH, A.A. 2019-2020.
22. M. Bolognesi, Metodi di purificazione delle proteine, *Biochimica delle proteine*, A.A. 2006-2007.
23. N.K. Dutta, R. He, M. L. Pinn, Y. He, F. Burrows, Zhong-Yin Zhang, P. C. Karakousis, Mycobacterial protein tyrosine phosphatases A and B inhibitors augment the bactericidal activity of the standard anti-tuberculosis regimen, *ACS Infect. Dis.*, 11 (2016), 231-239.
24. P. Englebienne, A. Van Hoonacker, M. Verhas, Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences, *Spectroscopy*, 17 (2003), 255–273.
25. R.B.M. Schasfoort, Introduction to Surface Plasmon Resonance, *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, 2nd Edition, Published by the Royal Society of Chemistry, [www.rsc.org](http://www.rsc.org).

## RINGRAZIAMENTI

È con questa tesi che si conclude dopo cinque anni uno dei percorsi più belli e formativi della mia vita, che spero sia solo un punto d'inizio per costruire il mio futuro.

Va alla mia famiglia, pilastro e fondamenta della mia vita, il pensiero ed il ringraziamento più grande. Con la vostra profonda dedizione nel rendermi felice avete reso possibile la realizzazione di questo momento. Grazie a mia madre, mia confidente e compagna di vita, che con la sua tenacia e la sua forza mi ha insegnato a non abbattermi di fronte a nessun ostacolo, incoraggiandomi a fare sempre del mio meglio. Grazie a Davide, il mio fratellino e grillo saggio della famiglia, che nei momenti più bui con la sua spontaneità ha saputo sempre trovare il modo di farmi ridere. Grazie a tutte le mie zie, i miei zii e cugini, vicini e lontani, che considero e riterrò sempre la mia seconda famiglia. Un grazie speciale è rivolto a mio padre, appoggio costante nel mio percorso, che ha creduto in me e nelle mie scelte prima ancora che lo facessi io stessa.

Ringrazio la dott.ssa Alessandra Stefan che ha accettato di guidarmi in questo percorso e che con pazienza e disponibilità è riuscita a trasmettermi consigli e conoscenze nuove che mi hanno arricchito professionalmente, spronandomi a superare difficoltà e a raggiungere risultati importanti.

Grazie anche al prof. Alejandro Hochkoepler e al prof. Luca Bernardi che in questi mesi di lavoro sono riusciti a dispensarmi suggerimenti e nozioni, aprendomi gli occhi su nuove strade e percorsi da intraprendere.

A Francesco, tassello importante della mia vita, grazie per essere stato al mio fianco ad ogni passo, ad ogni inciampo e ad ogni gioia di questo percorso condiviso a metà. Grazie per non avermi mai lasciato la mano ed averla sempre tenuta stretta a te accompagnandomi verso questa meta.

Grazie a Elisa, con cui ho iniziato e concluso quello che a volte è sembrato impossibile raggiungere. Grazie per aver camminato insieme a me in questi anni di vita, che nella nostra casa hanno visto pianti disperati, ma anche tanti abbracci e splendide risate, che ci hanno permesso di diventare grandi.

Grazie a Sara, che seppur lontana a volte, non è mai stata distante nell'appoggio, nel supporto e nell'ascolto di tutto quello che ha significato per me il raggiungimento di questo obiettivo.



Ringrazio i miei compagni di corso senza i quali non avrei superato esami che sembravano insormontabili e paure di un nuovo percorso di vita, rendendo questo cammino più leggero.

Grazie anche ai miei nuovi compagni di laboratorio che in questi mesi mi hanno fatto sentire meno sola, condividendo con me i risultati raggiunti e i piccoli fallimenti.

Va a me stessa un ringraziamento speciale. Sin dal primo momento ho sempre desiderato diventare un chimico, grazie per non esserti mai arresa nonostante la vita non sia andata sempre come hai desiderato. Persegui sempre con determinazione i tuoi sogni perché prima o poi si avverano, il primo è proprio qui di fronte a me.

Grazie a tutti per il vostro amore.

Chiara