





UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA  
Dottorato di Ricerca in Biochimica e Biologia Molecolare  
XXVI ciclo

**Effetti sinergici ed antagonisti dei modulatori  
della risposta stringente ppGpp e DksA sulla struttura  
del complesso di inizio della trascrizione batterica**

**Nicola Doniselli**

Dipartimento di Bioscienze

Coordinatore:

Prof. Andrea Mozzarelli

Tutor:

Prof. Claudio Rivetti

2011-2013



***A Valeria e Giacomo,  
Cesira e Aldo***



# INDICE

<b>SOMMARIO</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1. L'RNA polimerasi batterica e la trascrizione</b> .....	<b>5</b>
1.1.1. La subunità $\sigma$ e le interazioni oloenzima-DNA .....	8
1.1.2. L'inizio della trascrizione .....	10
1.1.3. La regolazione dell'espressione genica nei batteri avviene principalmente nelle prime fasi del processo di trascrizione.....	13
<b>1.2. La risposta stringente permette un efficace adattamento all'ambiente ed è mediata dagli effettori ppGpp e DksA</b> .....	<b>17</b>
1.2.1. ppGpp e DksA agiscono legando direttamente l'RNAP .....	20
1.2.2. ppGpp e DksA determinano effetti fisiologici a livello globale .....	22
1.2.3. Il ppGpp influenza l'attività dell'RNAP batterica mediante un meccanismo indiretto basato sulla competizione dei fattori $\sigma$ .....	24
1.2.4. ppGpp, DksA e iNTPs agiscono sulle fasi iniziali del processo di trascrizione influenzando la cinetica di formazione di $RP_0$ con meccanismi promotore-specifici.....	25
<b>1.3. La microscopia a forza atomica</b> .....	<b>29</b>
1.3.1. La microscopia a forza atomica per lo studio dei complessi nucleoproteici.....	31
1.3.2. La microscopia a forza atomica applicata allo studio dei complessi di inizio della trascrizione batterica .....	33
<b>2. SCOPO DELLA RICERCA</b> .....	<b>37</b>
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONI</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1. Strategia sperimentale</b> .....	<b>43</b>
3.1.1. Formazione dei complessi di inizio della trascrizione, deposizione sulla mica, visualizzazione ed analisi del DNA libero e legato dall'RNAP mediante AFM.....	43
3.1.2. Requisiti strutturali dei frammenti di DNA per l'analisi AFM.....	47
3.1.3. Clonaggio, espressione e purificazione della proteina DksA di <i>E. coli</i> .....	48

3.1.4. Determinazione della costante di dissociazione ( $K_D$ ) del legame del ppGpp alla RNAP .....	50
<b>3.2. I promotori <i>rrn</i> di <i>E. coli</i> .....</b>	<b>51</b>
3.2.1. Struttura e regolazione dei promotori <i>rrn</i> .....	51
3.2.2. Analisi AFM dei complessi di inizio della trascrizione e degli effetti di ppGpp e DksA sui promotori <i>rrnB</i> P1 e <i>rrnA</i> P1 .....	54
3.2.3. Le analisi AFM evidenziano nuovi dettagli circa il meccanismo d'azione di ppGpp e DksA sui promotori per gli rRNA di <i>E. coli</i> .....	63
<b>3.3. Il promotore <math>P_R</math> del batteriofago <math>\lambda</math> .....</b>	<b>72</b>
3.3.1. Struttura e regolazione del promotore $P_R$ .....	72
3.3.2. Analisi AFM dei complessi di inizio della trascrizione e degli effetti di ppGpp e DksA sul promotore $P_R$ .....	75
3.3.3. Le analisi AFM contribuiscono a comprendere il meccanismo d'azione alla base degli effetti antagonisti di ppGpp e DksA sul promotore fagico $P_R$ ....	83
<b>3.4. Risvolti fisiologici del <i>wrapping</i> e degli effetti di ppGpp e DksA su <i>wrapping</i> e <i>promoter occupancy</i> dei promotori <i>rrn</i> e <math>P_R</math> .....</b>	<b>89</b>
<b>4. CONCLUSIONI .....</b>	<b>95</b>
<b>5. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>101</b>
<b>5.1. Preparazione dei templati plasmidici e dei frammenti di DNA per l'AFM .....</b>	<b>103</b>
5.1.1. <i>rrnB</i> P1.....	103
5.1.2. <i>rrnA</i> P1.....	103
5.1.3. $P_R$ .....	104
5.1.4. Purificazione dei frammenti di DNA per l'analisi AFM.....	104
<b>5.2. Clonaggio, espressione e purificazione del fattore trascrizionale DksA di <i>E. coli</i> 104</b>	
<b>5.3. Determinazione della <math>K_D</math> del legame del ppGpp alla RNAP .....</b>	<b>106</b>
<b>5.4. Procedura sperimentale per l'analisi AFM.....</b>	<b>106</b>
5.4.1. Formazione dei complessi di inizio della trascrizione.....	107
5.4.2. Deposizione sulla mica e raccolta delle immagini .....	107
5.4.3. Analisi della lunghezza delle molecole di DNA libere e legate dall'RNAP, determinazione della <i>promoter occupancy</i> , analisi statistica dei dati .....	108

<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>113</b>
<b>ALLEGATO .....</b>	<b>125</b>
<b>APPENDICE I: Studio del meccanismo d'azione del bis (S-citronellaltiosemicarbazonato) nickel(II), un tiosemicarbazone ad attività antiproliferativa .....</b>	<b>127</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>127</b>
<b>2. SCOPO DELLA RICERCA.....</b>	<b>133</b>
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONI.....</b>	<b>134</b>
3.1. Risposta cellulare al trattamento con [Ni(tcitr) <sub>2</sub> ]: induzione dell'apoptosi .	134
3.2. Stress ossidativo indotto dal [Ni(tcitr) <sub>2</sub> ] .....	136
3.3. Attività genotossica e mutagenica del [Ni(tcitr) <sub>2</sub> ] .....	139
3.4. Individuazione del bersaglio molecolare del [Ni(tcitr) <sub>2</sub> ] .....	142
<b>4. CONCLUSIONI .....</b>	<b>157</b>
<b>5. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>161</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>167</b>
<b>APPENDICE II .....</b>	<b>171</b>
<b>PUBBLICAZIONI.....</b>	<b>171</b>







## SOMMARIO

In condizioni favorevoli alla crescita ed alla proliferazione i batteri utilizzano buona parte delle risorse energetiche per la sintesi proteica. Tuttavia, l'adattamento a situazioni ambientali non ottimali è stato garantito dall'evoluzione di meccanismi che permettono un rapido cambiamento del profilo di espressione genica, rendendoli capaci di indirizzare le scarse risorse disponibili verso nuove esigenze metaboliche. In *E. coli* e nella maggior parte dei procarioti questo fenomeno prende il nome di "risposta stringente" ed è mediato da due modulatori che agiscono direttamente sull'RNA polimerasi (RNAP): l'alarmone ppGpp e la proteina DksA. Mentre la DksA è sempre presente nelle cellule ad una concentrazione costante, la concentrazione intracellulare di ppGpp dipende dalle condizioni ambientali, venendo prodotto ad elevati livelli solo in condizioni di stress. Inoltre, in base al principio secondo il quale l'attivazione della risposta stringente è indicativa delle condizioni metaboliche della cellula ospite, alcuni batteriofagi temperati, tra cui il batteriofago  $\lambda$ , hanno evoluto meccanismi di regolazione dell'espressione genica legati alla scelta lisi-lisogenia mediati dal ppGpp e dalla DksA.

In letteratura sono riportate numerose evidenze a supporto dell'ipotesi secondo cui ppGpp e DksA agiscono influenzando la cinetica di formazione del complesso aperto; tuttavia, rimangono ancora da chiarire i dettagli strutturali alla base di tale effetto. Allo scopo di investigare le modificazioni conformazionali dell'RNAP associate al legame degli effettori della risposta stringente, in questo lavoro di tesi è stata impiegata la microscopia a forza atomica per effettuare un'approfondita analisi conformazionale dei complessi di inizio della trascrizione, valutando in particolare l'estensione dell'interazione tra l'RNAP e le sequenze *upstream* di diversi promotori (*wrapping* del DNA). Sono stati presi in considerazione due dei sette promotori che controllano la sintesi degli rRNA in *E. coli*, *rnnB* P1 e *rnnA* P1, ed il promotore  $P_R$  del batteriofago  $\lambda$ , responsabile dell'attivazione del ciclo litico. La scelta di questi promotori è motivata da diversi fattori, tra cui il fatto che essi risultano fortemente regolati da ppGpp e DksA, che sono stati estensivamente caratterizzati sia *in vivo* che *in vitro* e che mostrano differenze significative nella stabilità del complesso aperto e nell'interazione tra RNAP e regioni *upstream*.

L'analisi e l'interpretazione dei dati raccolti ha permesso di dimostrare che il ppGpp e la DksA, a concentrazioni saturanti, modificano l'affinità tra l'RNAP ed i promotori, anche se

ciò dipende dallo specifico promotore considerato e dalla concentrazione dei nucleotidi iniziatori. Sui promotori *rrnB* P1 e *rrnA* P1 il ppGpp non influenza il *wrapping* del DNA che, al contrario, risulta significativamente ridotto dalla DksA, sia quando questa viene aggiunta da sola che quando viene aggiunta insieme all'alarmone. Inoltre, è stato osservato che l'aggiunta di un largo eccesso di nucleotidi iniziatori elimina l'effetto della DksA. Sul promotore  $P_R$  il ppGpp provoca una riduzione significativa del *wrapping* del DNA, mentre la DksA non sembra avere effetti, ma mitiga l'effetto negativo dell'alarmone quando aggiunta contestualmente ad esso.

Questi risultati supportano un modello secondo il quale il ppGpp riduce l'affinità tra RNAP e promotore legandosi all'interfaccia tra le subunità  $\beta'$  ed  $\omega$ , riducendo la mobilità relativa tra le subunità  $\beta$  e  $\beta'$  ed impedendo il corretto alloggiamento del DNA nel sito attivo dell'enzima con conseguente inibizione dell'isomerizzazione a complesso aperto. La DksA sembra invece interferire con il corretto posizionamento dei nucleotidi nel sito attivo dell'RNAP riducendo in questo modo la stabilità del complesso aperto, ma solo a livello di promotori che presentano un complesso aperto instabile, come per esempio i promotori *rrn*.

## **1. INTRODUZIONE**

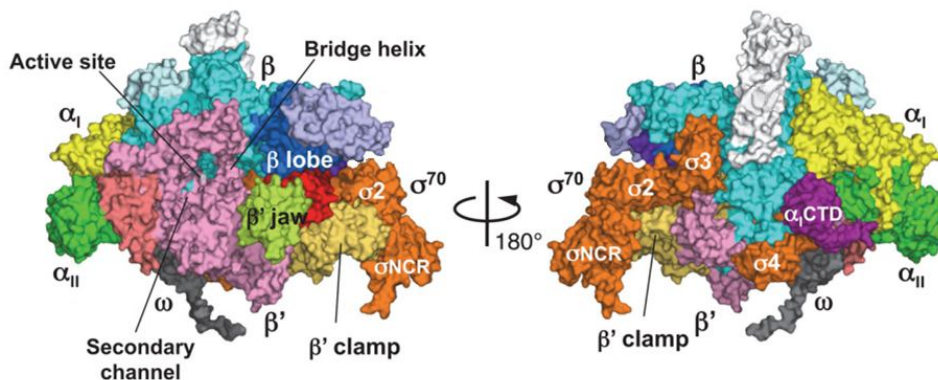


## 1.1. L'RNA polimerasi batterica e la trascrizione

In tutti gli organismi viventi l'espressione genica è garantita dall'attività di RNA-polimerasi DNA-dipendenti note con il nome generico di RNA polimerasi (RNAP). Mentre negli eucarioti tre diverse RNAP ed un elevato numero di regolatori mediano la trascrizione di tutti gli RNA necessari al metabolismo cellulare, nei procarioti un solo enzima è in grado di provvedere alla conversione dell'informazione contenuta nel genoma sotto forma di DNA in molecole di RNA aventi diverse funzioni (Lane and Darst, 2010; Werner and Grohmann, 2011). Il *core* dell'RNAP batterica (~400 kDa) è composto da cinque subunità: due subunità  $\alpha$  ognuna costituita da un dominio N-terminale necessario per l'assemblaggio dell'intero enzima ed un dominio C-terminale in grado di interagire con alcuni elementi regolativi sia *cis*- che *trans*-agenti, separati da un *linker* flessibile di circa 15 aminoacidi; una subunità  $\beta$  ed una subunità  $\beta'$  che insieme compongono il sito attivo dell'enzima; una quinta subunità, chiamata subunità  $\omega$ , importante per l'assemblaggio dell'RNAP e recentemente identificata come fondamentale per l'attività di alcuni modulatori trascrizionali (Ventras *et al*, 2005). La sequenza aminoacidica, la struttura terziaria e le funzioni di queste subunità risultano altamente conservate in tutti i batteri. Come suggerito inizialmente dalla struttura cristallografica dell'RNAP di *Thermus aquaticus* e confermato dall'analisi di tutte le RNAP cristallizzate successivamente, la struttura generale può essere paragonata a quella di una chela di granchio, con le subunità  $\beta$  e  $\beta'$  a comporre la pinza in grado di interagire con porzioni di DNA a valle rispetto al sito in cui è legato l'enzima, allo scopo di stabilizzare il complesso nucleoproteico e di formare un profondo canale in cui si trova il sito attivo (Zhang *et al*, 1999). Oltre al canale principale, l'enzima presenta un canale secondario, più stretto, attraverso il quale i ribonucleotidi possono accedere al sito attivo quando questo è occupato dal DNA (Landick, 2005). I due canali sono separati da una struttura metastabile ad  $\alpha$ -elica altamente conservata e fondamentale per il processo catalitico chiamata *bridge helix*, appartenente alla subunità  $\beta'$  (Weinzierl, 2011).

Al *core* enzimatico possono associarsi differenti fattori  $\sigma$ , ognuno in grado di interagire con specifici elementi di sequenza; questa subunità rende dunque l'RNAP capace di legare specifiche sequenze presenti nel genoma, poste a monte rispetto al sito di inizio della trascrizione dei geni, chiamate promotori. In *E. coli* il fattore  $\sigma$  più abbondante e per questo

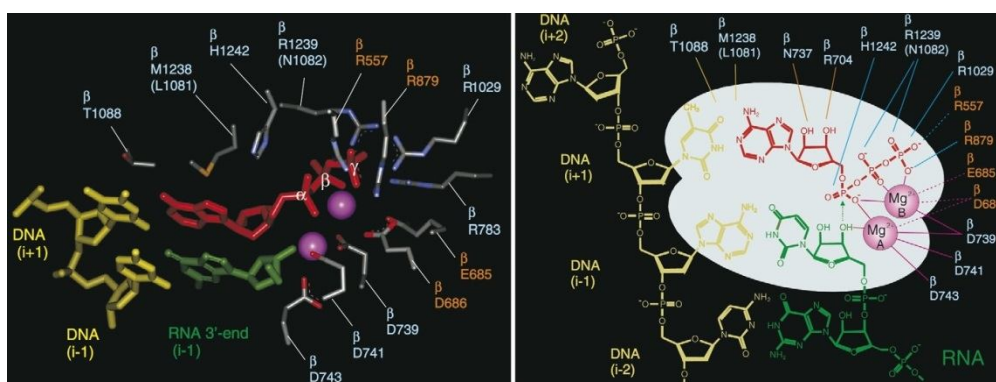
chiamato fattore  $\sigma$  costitutivo è  $\sigma^{70}$ . L'associazione di una di queste subunità al *core* genera l'oloenzima dell'RNAP (~500 kDa) (Ghosh *et al*, 2010).



**Figura 1.1.** Struttura cristallografica dell'RNAP di *E. coli*. Sono indicate le subunità che costituiscono l'oloenzima- $\sigma^{70}$  e le posizioni del sito attivo e del canale secondario (adattata da Murakami, 2013).

Il processo di trascrizione può essere suddiviso in tre fasi principali: l'inizio, l'allungamento e la terminazione. Nella fase di inizio l'RNAP oloenzima lega il DNA e scorre lungo la sequenza mediante un meccanismo di *groove tracking* finché non incontra uno specifico promotore riconosciuto e legato dalla subunità  $\sigma$ , capace così di bloccare l'intero enzima sul sito dove dovrà iniziare la trascrizione (Sakata-Sogawa and Shimamoto, 2004); il legame al promotore genera il complesso chiuso ( $RP_C$ ), in cui il DNA viene mantenuto nella conformazione a doppia elica. Successivamente, una serie di modificazioni conformazionali a carico sia del DNA che dell'enzima permettono l'isomerizzazione verso il complesso aperto ( $RP_O$ ), caratterizzato dalla formazione di una regione di DNA denaturata lunga circa 13 bp attorno al sito di inizio della trascrizione (TSS). I cambiamenti conformazionali descritti sono spesso seguiti dalla sintesi di corte molecole di RNA chiamate trascritti abortivi (Goldman *et al*, 2009); in questa fase l'RNAP rimane legata al promotore contraendo il DNA a valle all'interno del suo sito attivo mediante il cosiddetto *scrunching*. Si ritiene che l'accumulo di energia generato da questo processo possa permettere la successiva fase di *promoter escape*, durante la quale l'RNAP lascia il promotore e comincia la sintesi processiva dell'intero trascritto (Revyakin *et al*, 2006); non è ancora del tutto chiaro se il fattore  $\sigma$  rimanga inizialmente associato al promotore, all'enzima o venga rilasciato nel citoplasma, anche se numerose evidenze suggeriscono che ciò possa dipendere dalla specifica sequenza

del promotore o da quella posta immediatamente a valle rispetto al TSS (Reppas *et al*, 2006). L'allungamento dell'RNA avviene grazie ad un meccanismo di tipo *step-by-step* nel quale la velocità di avanzamento dell'enzima è dipendente dall'incorporazione del nucleotide che deve essere legato alla catena nascente (Abbondanzieri *et al*, 2005), mentre la molecola di neosintesi fuoriesce dal canale d'uscita dell'enzima. Dal punto di vista chimico, l'allungamento consiste in una polimerizzazione basata sulla ripetizione di una reazione nella quale il gruppo 3'-OH dell'ultimo nucleotide del trascritto in fase di sintesi opera un attacco nucleofilo sul fosfato in  $\alpha$  dell'NTP che deve essere aggiunto, con distacco del gruppo pirofosfato; questa reazione è catalizzata da due cationi  $Mg^{2+}$  che posizionano correttamente i nucleotidi e ne aumentano la reattività (Borukhov and Nudler, 2008).



**Figura 1.2.** Rappresentazione "a bastoncini" del sito attivo dell'RNAP durante la formazione di un legame fosfodiesterico (sinistra). Formule di struttura delle specie coinvolte nella reazione di polimerizzazione (destra). In giallo è rappresentato il DNA stampo, in verde l'RNA in fase di sintesi, in rosso il ribonucleotide che deve essere aggiunto al trascritto, in viola i cationi  $Mg^{2+}$ . Sono specificati i residui aminoacidici dell'enzima coinvolti nella reazione (adattata da Borukhov and Nudler, 2008).

Durante la sintesi del trascritto l'RNAP risulta saldamente associata al DNA, che rimane denaturato per circa 13 bp all'interno del sito attivo ed appaiato per 8-9 nt al 3' dell'RNA di neosintesi; questo appaiamento è essenziale per evitare il fenomeno noto come *backtracking*, consistente in ripetuti movimenti di avanzamento e retrocessione dell'RNAP lungo lo stampo che possono causare una riduzione della sua processività (Nudler *et al*, 1997). Il complesso di allungamento (*Transcriptional Elongation Complex*, TEC) è molto stabile, ma si dissocia una volta raggiunta la sequenza del terminatore, grazie a meccanismi intrinseci o dipendenti da specifici fattori proteici che portano alla terminazione della

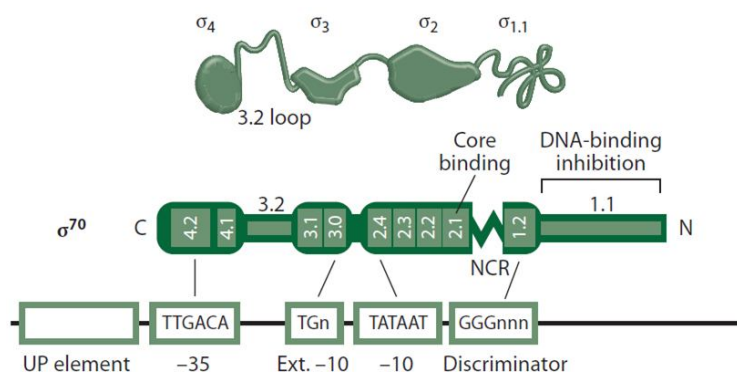
trascrizione; l'RNAP, rilasciati il trascritto ed il DNA, risulta così disponibile per un nuovo ciclo di sintesi dell'RNA (Peters *et al*, 2011).

### 1.1.1. La subunità $\sigma$ e le interazioni oloenzima-DNA

Mentre l'RNAP apoenzima è in grado di iniziare la trascrizione a partire da sequenze non-specifiche lungo il DNA, l'oloenzima generato dall'associazione del fattore  $\sigma$  al *core* dell'RNAP può riconoscere specifiche sequenze promotrici (Campbell *et al*, 2008). In *E. coli* durante la fase di crescita esponenziale il fattore  $\sigma$  maggiormente rappresentato è  $\sigma^{70}$ ; esistono però sei fattori  $\sigma$  alternativi necessari per l'adattamento del batterio a diverse condizioni ambientali. L'abbondanza relativa di ciascuno di essi determina il profilo globale di espressione genica; per questo motivo i batteri hanno evoluto sofisticati sistemi in grado di regolare finemente la presenza dei diversi fattori  $\sigma$  nelle diverse situazioni in cui le cellule possono trovarsi (Mooney *et al*, 2005). La subunità  $\sigma^{70}$  (e per analogia quelle appartenenti alla famiglia  $\sigma^{70}$ ), dopo essersi saldamente ancorata al *core* dell'RNAP attraverso una serie di interazioni ampiamente caratterizzate che coinvolgono oltre 8200 Å<sup>2</sup> di superficie enzimatica (Burgess and Anthony, 2003), può favorire il legame dell'oloenzima al DNA grazie al riconoscimento di specifici elementi di sequenza che costituiscono il promotore: i domini  $\sigma_2$  e  $\sigma_4$  interagiscono rispettivamente con gli elementi -10 e -35, due sequenze esameriche conservate nei promotori riconosciuti dai fattori  $\sigma$  di questa famiglia; il subdominio  $\sigma_{1.2}$  (appartenente al dominio  $\sigma_2$ ) contatta il discriminatore, ovvero la sequenza posta tra l'elemento -10 ed il TSS (+1) (Haugen *et al*, 2008). Quando non è presente un elemento -35 riconoscibile, si riscontra spesso un elemento -10 esteso che, grazie ad una corta sequenza posta poche coppie di basi a monte dell'elemento -10, viene riconosciuto dal dominio  $\sigma_3$  (Österberg *et al*, 2011). Anche la distanza tra gli elementi -10 e -35 (*spacer*) e la lunghezza del discriminatore contribuiscono a determinare la capacità dell'RNAP- $\sigma^{70}$  di legare il promotore (Hook-Barnard and Hinton, 2009). La corrispondenza tra la sequenza di questi elementi (e la loro distanza relativa) con la situazione ideale definita "consenso" determina il grado di affinità tra l'RNAP e il promotore e, conseguentemente, i livelli trascrizionali associati a quest'ultimo. Tuttavia, se gli elementi costituenti un promotore fossero esattamente uguali al consenso, lo stesso risulterebbe così forte da essere difficilmente modulabile; per questo motivo tutti i promotori batterici differiscono in maniera più o meno marcata dal consenso, rendendo in tal modo possibile una fine

modulazione della loro attività in senso positivo o negativo, in diversi momenti e situazioni, grazie all'intervento di fattori trascrizionali in grado di accrescere o ridurre la capacità dell'enzima di riconoscere e legare il DNA.

Oltre alle porzioni interessate al contatto con specifiche sequenze di DNA, esistono alcune regioni del fattore  $\sigma$  coinvolte in diversi aspetti della regolazione delle fasi iniziali della trascrizione. Una porzione non conservata all'interno del dominio  $\sigma_2$ , chiamata NCR (*Non-Conserved Sequence*), sembra in grado di favorire il distacco del fattore  $\sigma$  dal *core* enzimatico nelle fasi successive al *promoter escape* e si ritiene che ciò possa ridurre gli eventi di pausa durante la fase di allungamento (Leibman and Hochschild, 2007). La porzione N-terminale di  $\sigma$ , definita subdominio 1.1, risulta invece implicata in un meccanismo di auto-inibizione necessario ad evitare il legame al DNA di un fattore  $\sigma$  libero: quando esso non è legato al *core* dell'RNAP, questa porzione può interagire direttamente con i domini  $\sigma_2$  e  $\sigma_4$  dando vita ad una struttura compatta ed incompatibile con il legame alle sequenze promotrici (Schwartz *et al*, 2008).



**Figura 1.3.** Rappresentazione schematica della subunità  $\sigma^{70}$  e delle interazioni delle porzioni che la costituiscono con le sequenze di un generico promotore batterico. Sono indicate le sequenze consenso del discriminatore e degli elementi -10, -10 esteso e -35 (adattata da Österberg *et al*, 2011).

Alcuni promotori possiedono delle sequenze aggiuntive situate a monte dell'elemento -35, genericamente chiamate "elementi UP", che permettono una più estesa interazione con l'RNAP e danno vita ai cosiddetti promotori estesi. Questa interazione, mediata da motivi *helix-hairpin-helix* presenti nei domini C-terminali delle subunità  $\alpha$  dell'enzima, capaci di legare il solco minore del DNA, determina un ripiegamento della doppia elica tale da favorirne la denaturazione necessaria all'apertura della bolla di trascrizione (Gourse *et al*,

2000; Ross *et al*, 2001). Saggi di *footprinting* del DNA condotti su promotori variamente mutati nell'elemento UP hanno dimostrato che esso risulta suddivisibile in due porzioni, una prossimale ed una distale; tali porzioni vengono legate ognuna da uno dei due  $\alpha$ -CTDs dell'RNAP. La presenza di una sola porzione o di entrambe ed il loro grado di somiglianza alla sequenza consenso contribuiscono a determinare la forza del promotore (Estrem *et al*, 1999).

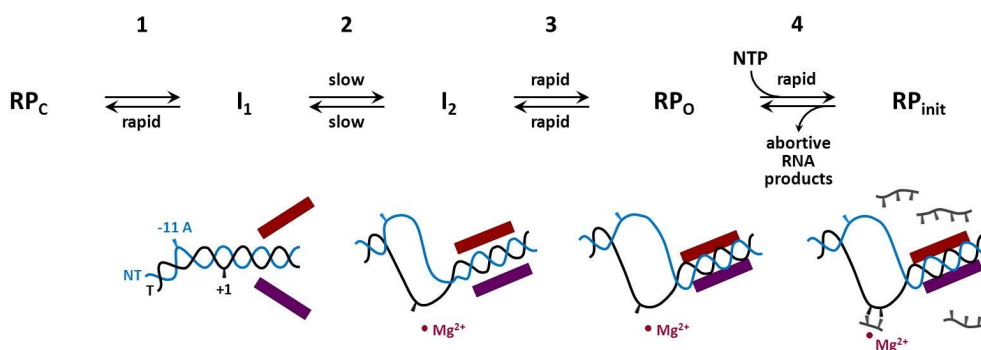
	-59	-49	-39
UP completo	<b>nnAAAWWTWTTTTnnAAAAnnn</b>		
UP distale	<b>nnAWWWWWTTTTTn</b>		
UP prossimale	<b>AAAAAARnR</b>		

**Figura 1.4.** Sequenze consenso dell'elemento UP completo, distale e prossimale. W = A o T; R = A o G (estrapolata da Estrem *et al*, 1999).

### 1.1.2. L'inizio della trascrizione

Il legame dell'RNAP oloenzima al promotore dà vita al complesso chiuso (RP<sub>C</sub>), nel quale il DNA non risulta denaturato e la struttura complessiva dell'enzima appare simile ad una chela di granchio che mantiene le pinze, rappresentate da porzioni delle subunità  $\beta$  e  $\beta'$ , separate di circa 80 Å; in questo modo il solco principale che compone il sito attivo ha una larghezza superiore a 20 Å e può accomodare un doppio filamento di DNA. Una serie di modificazioni conformazionali che interessano sia l'RNAP che il DNA determinano l'isomerizzazione verso il complesso aperto (RP<sub>O</sub>), nel quale il DNA viene denaturato per circa 13 bp attorno al sito di inizio della trascrizione (nella maggior parte dei casi dalla posizione -11 alla posizione +3) e le subunità  $\beta$  e  $\beta'$  dell'enzima si avvicinano fino a circa 60 Å, riducendo lo spazio disponibile nel solco del sito attivo a circa 12 Å, sufficienti per accogliere solamente il filamento stampo del DNA. Il filamento non-stampo viene invece a trovarsi all'esterno del sito attivo, risultando inserito in un solco formato dall'interfaccia tra subunità  $\beta$  e  $\sigma$  ed interagendo con il dominio 1.2 di quest'ultima (Chakraborty *et al*, 2012). La conversione da RP<sub>C</sub> a RP<sub>O</sub> è un processo complesso che, a seconda del promotore considerato, può passare attraverso uno o più intermedi di reazione; questi intermedi, la cui formazione rappresenta il vero *rate-limiting step* dell'isomerizzazione, vengono definiti genericamente I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, ..., I<sub>n</sub>. Prendendo in considerazione il promotore P<sub>R</sub> del batteriofago  $\lambda$ ,

utilizzato in questo ed in molti altri studi di caratterizzazione del processo di trascrizione come promotore modello, è possibile osservare due intermedi di reazione durante la conversione da  $RP_C$  a  $RP_O$ :  $I_1$  e  $I_2$ ; la conversione dal primo al secondo intermedio prevede la denaturazione del DNA ed è lo step limitante dell'intero processo, dal momento che il complesso aperto, una volta formatosi, risulta estremamente stabile con un'emivita di svariate ore. Mediante esperimenti di reattività al permanganato in grado di fornire risultati in tempo reale sulla denaturazione del DNA (*fast  $MnO_4^-$  footprinting*), associati a studi di reattività del DNA ai radicali ossidrilici capaci di evidenziare i contatti tra questo e l'enzima (*OH- footprinting*), è stato possibile dimostrare che la doppia elica rimane intatta all'interno del canale principale dell'RNAP fino all'intermedio  $I_1$ , venendo poi denaturata durante la conversione all'intermedio instabile  $I_2$  che rapidamente isomerizza verso il complesso aperto stabile  $RP_O$  (Craig *et al*, 1998). Durante l'apertura della bolla di trascrizione si assiste ad una delocalizzazione della porzione 1.1 della subunità  $\sigma$  che, inizialmente posizionata ad occludere il canale principale dell'enzima, si sposta permettendo l'alloggiamento del filamento stampo (Kontur *et al*, 2006); quest'ultimo risulta perciò sepolto nel canale principale, mentre il filamento non stampo subisce una delocalizzazione durante la formazione di  $RP_O$ ; ciò è probabilmente dovuto all'avvicinamento delle porzioni distali delle subunità  $\beta$  e  $\beta'$  le quali, interagendo con il DNA a valle fino alla posizione +25, contribuiscono fortemente alla stabilizzazione del complesso aperto.



**Figura 1.5.** Rappresentazione schematica dell'associazione tra RNAP e promotore  $P_R$  e dell'isomerizzazione verso  $RP_O$  per l'inizio della trascrizione: 1- piegamento della sequenza *upstream* del promotore ed alloggiamento del DNA nel canale principale; 2- denaturazione del DNA, posizionamento del +1 del filamento stampo (in nero) nel sito attivo, esclusione del filamento non stampo (in azzurro) dal canale principale; 3- Interazione delle subunità  $\beta$  e  $\beta'$  (in rosso e viola) con porzioni a valle del +1 per la stabilizzazione del complesso aperto; 4- fase di inizio abortivo cui segue il *promoter escape* (adattata da Saeker *et al*, 2011).

Altri promotori, come quelli che regolano l'espressione degli rRNA in *E. coli* ed il cui modello è rappresentato da *rrnB* P1, mostrano un solo intermedio ( $I_1$ ) durante il processo di isomerizzazione; in tale intermedio il DNA non risulta denaturato e la formazione della bolla di trascrizione porta ad un complesso aperto che appare simile all' $I_2$  del promotore  $P_R$ , sia per quanto riguarda la stabilità e l'emivita, sia per quanto concerne le interazioni tra DNA ed RNAP, se si esclude il fatto che le subunità  $\beta$  e  $\beta'$  contattano il DNA a valle solo fino alla posizione +12, al contrario di quanto osservato sul promotore fagico (Gries e tal, 2010). Queste differenze strutturali riflettono le differenze cinetiche dei diversi promotori e rispecchiano le esigenze fisiologiche della cellula: un complesso troppo stabile sui promotori per gli rRNA determinerebbe un difficile controllo del loro livello di espressione in risposta a cambiamenti delle condizioni di crescita del batterio; al contrario, l'intrinseca instabilità del complesso aperto permette una rapida variazione dei livelli di espressione, anche grazie all'intervento di modulatori trascrizionali. E' invece interessante notare come il fago temperato utilizzi promotori in grado di formare complessi aperti molto stabili che gli permettono di reclutare un gran numero di RNAP dell'ospite, favorendo la sua natura di parassita endocellulare.

La denaturazione del DNA durante la formazione della bolla di trascrizione richiede un dispendio energetico significativo: per il promotore  $P_R$  si calcola che la barriera energetica di attivazione da superare per la conversione di  $I_1$  in  $I_2$  sia di circa 34 Kcal. Dal momento che l'RNAP non idrolizza molecole ad alto contenuto energetico, l'energia necessaria deriva dalle numerose interazioni tra RNAP e DNA che, favorendo il ripiegamento di quest'ultimo attorno all'enzima, facilitano la successiva fase di denaturazione della doppia elica. Il *wrapping* del DNA attorno alla polimerasi, proposto in numerosi lavori di caratterizzazione strutturale del complesso aperto (Coulombe and Burton, 1999; Rivetti *et al*, 1999) potrebbe rappresentare un evento chiave per l'isomerizzazione da  $RP_C$  a  $RP_O$  e quindi di fondamentale importanza per la regolazione dell'inizio della trascrizione.

Una volta formatosi il complesso aperto l'RNAP può iniziare la sintesi del trascritto; anche il passaggio alla fase di allungamento, che ha inizio con il *promoter escape*, è un processo promotore-specifico e dipende dalla sequenza posta subito a valle del TSS: considerando i promotori *rrnB* P1 e  $P_R$  è possibile dimostrare che la diversa stabilità di  $RP_O$  determina una più rapida *clearance* del promotore a partire dal primo, senza la sintesi di corti trascritti abortivi (Gourse, 1988); al contrario a partire da  $P_R$  è necessario un maggior numero di

tentativi prima che l'enzima possa lasciare definitivamente la sequenza del promotore (Hsu *et al*, 2003). In fase di allungamento l'RNAP, anche grazie alla formazione di un esteso ibrido DNA:RNA, diventa processiva e può procedere fino al termine della sequenza codificante.

### **1.1.3. La regolazione dell'espressione genica nei batteri avviene principalmente nelle prime fasi del processo di trascrizione**

Per sopravvivere, i batteri devono poter rispondere in modo rapido ed efficiente a repentini cambiamenti delle condizioni ambientali; per questa ragione sono stati evoluti efficaci sistemi di regolazione dell'espressione genica che garantiscono l'attivazione della sintesi dei prodotti utili in una determinata situazione e la contemporanea repressione di quelli non richiesti. Ogni passaggio necessario alla conversione dell'informazione genetica nel prodotto finale (RNA funzionale o proteina) è soggetto a meccanismi regolativi, ma per ragioni di economia energetica lo step più strettamente regolato è rappresentato dall'inizio del processo di trascrizione, ossia dagli eventi che vanno dal riconoscimento tra RNAP e DNA fino all'entrata nella fase di allungamento.

E' possibile individuare diversi meccanismi molecolari utili al corretto indirizzamento dell'apparato trascrizionale su specifici promotori: oltre che dal già discusso coinvolgimento di differenti subunità  $\sigma$  in grado di riconoscere e legare specifici elementi del promotore e dalla sequenza di questi ultimi, l'inizio della trascrizione è finemente regolato anche dalla struttura e compattazione del cromosoma, che rende più o meno accessibili determinate regioni, da specifici fattori trascrizionali, che legano direttamente il DNA nei pressi del promotore reclutando l'RNAP o impedendone il legame, e da piccole molecole e proteine modulatrici in grado di legarsi direttamente all'enzima, inducendo o reprimendo la sua attività (Browning and Busby, 2004).

In *E. coli* esistono dodici diverse proteine chiamate NAPs (*Nucleoid-associated proteins*) coinvolte nella compattazione del cromosoma e necessarie alla formazione del nucleotide (Dame, 2005; Browning *et al*, 2010); alcune di queste legano il DNA senza specificità di sequenza, determinando un'organizzazione del genoma a livello locale con conseguente attivazione o repressione trascrizionale di interi *loci*; un esempio è fornito da H-NS (*Histone-like Nucleoid-Structuring*), una proteina che agisce come dimero condensando il DNA grazie alla capacità di interagire contemporaneamente con la doppia elica e con altri dimeri legati lungo la sequenza in posizioni anche molto distanti tra loro (Dame *et al*, 2000). Altre NAPs

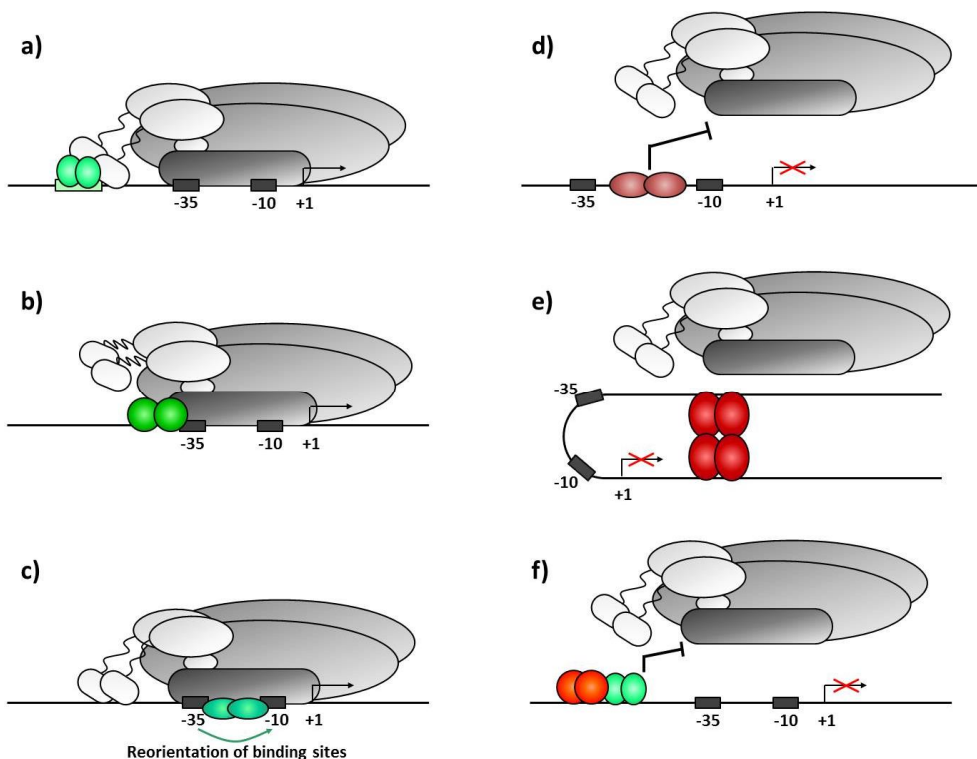
possono agire anche come fattori trascrizionali sequenza-specifici, attivando o reprimendo l'espressione di determinati geni in diverse condizioni ambientali e di crescita; è questo il caso di Fis (*Factor for Inversion Stimulation*), che può reclutare l'apparato trascrizionale su specifici promotori, come quelli che controllano la sintesi degli rRNA (Appleman *et al*, 1998). Analogamente a Fis, numerose altre proteine agiscono legando specifiche sequenze di DNA nei pressi di siti di inizio della trascrizione di centinaia di geni, agendo da attivatori o repressori della trascrizione. Alcuni di questi possono regolare l'attività di decine di promotori differenti: si stima che sette diverse proteine siano coinvolte nella regolazione dell'espressione di oltre il 50% dei geni di *E. coli*. Esistono però più di 60 regolatori che agiscono modulando ognuno la trascrizione a partire da un unico promotore (Faith *et al*, 2007). I fattori trascrizionali correlano l'attività trascrizionale della cellula alle condizioni in cui essa si trova, spesso come conseguenza della loro stessa induzione o inibizione da parte di piccole molecole regolatrici; emblematico è il caso del repressore Lac, utilizzato come modello per lo studio dei fattori trascrizionali inducibili, la cui funzione dipende dalla presenza dell'allolattosio che agisce come induttore allosterico del repressore (Lewis, 2005). L'attività di altri regolatori è modulata invece da specifiche modificazioni post-traduzionali: NarL per esempio lega il DNA solo dopo essere stato fosforilato da una specifica chinasi, a sua volta attivata dal legame di ioni nitrati o nitriti presenti nello spazio extracellulare (Baikalov *et al*, 1996). Inoltre, l'azione di molti fattori trascrizionali può essere finemente modulata dalla loro concentrazione intracellulare; in questo caso la loro stessa sintesi è soggetta a regolazione e la proteina, una volta prodotta, può essere efficacemente proteolizzata oppure sequestrata da altri fattori proteici.

Un fattore trascrizionale può quindi attivare oppure reprimere la trascrizione a partire da un determinato promotore; alcuni agiscono solo in un senso, altri possono essere attivatori o repressori a seconda del contesto genico in cui intervengono (Lee *et al*, 2012; Pérez-Rueda and Collado-Vides, 2000) (Figura 1.6). La maggior parte degli attivatori batterici agisce legando sequenze poste a monte dell'elemento -35 e reclutando in questo modo l'RNAP sul promotore grazie ad interazioni dirette con i domini C-terminali delle subunità  $\alpha$  dell'enzima; è questo il caso di CRP sul promotore dell'operone *lac* (Ebright, 1993). Altri, legando l'elemento -35, aumentano l'affinità dell'RNAP per il promotore grazie all'interazione con una porzione del dominio 4 della subunità  $\sigma^{70}$ ; un esempio è fornito dall'attivatore cI del promotore  $P_{RM}$  del batteriofago  $\lambda$  (Nickels *et al*, 2002). Un meccanismo

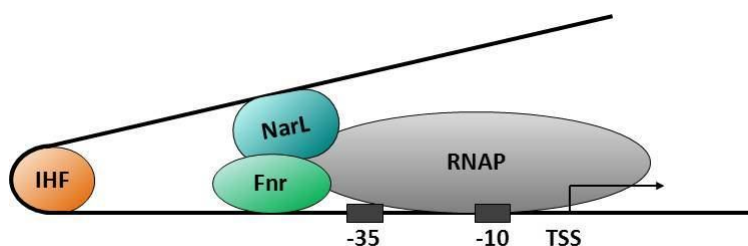
strutturalmente più complesso è quello sfruttato dai membri della famiglia degli attivatori MerR che legano *spacers* subottimali modificando la doppia elica in modo da rendere la posizione degli elementi -10 e -35 ottimale per il legame dell'RNAP (Brown *et al*, 2003).

Anche la repressione a livello del complesso di inizio della trascrizione si esplica mediante tre meccanismi principali. Il più semplice si basa sull'ingombro sterico da parte di un repressore nei confronti dell'RNAP: il paradigma di questo meccanismo d'azione è rappresentato dal repressore Lac il quale, legando l'operatore dell'operone *lac*, impedisce l'avanzamento dell'enzima fino al sito di inizio della trascrizione, inibendo così il processo di trascrizione (Lewis, 2005). In altri casi la repressione è causata da un fenomeno di *looping* del DNA che impedisce il riconoscimento del promotore da parte dell'RNAP; un esempio è fornito dal repressore GalR: legando due regioni fisicamente separate di DNA situate a monte del TSS e formando un omotetramero esso determina un forte piegamento della doppia elica, rendendola inaccessibile all'apparato trascrizionale (Lyubchenko *et al*, 1997). Più complesso è il meccanismo repressivo di alcune proteine in grado di agire come anti-attivatori; è il caso di CytR che, legando l'attivatore CRP, lo rende incapace di reclutare l'RNAP sul promotore trasformandolo così in un repressore agente mediante il meccanismo dell'ingombro sterico (Shin *et al*, 2001). Spesso più attivatori o repressori agiscono di concerto su uno stesso promotore, permettendo alla cellula di integrare diversi segnali e di rispondere ad essi mediante uno stretto e fine controllo dell'espressione genica.

Un altro aspetto chiave della regolazione della trascrizione che ne coinvolge le fasi iniziali riguarda la struttura del DNA a livello locale e le modificazioni a carico della doppia elica mediate sia da proteine leganti il DNA, che dal legame dell'RNAP al promotore. Il caso più semplice riguarda il *looping* del DNA che, a seconda dei fattori che lo determinano, può garantire l'attivazione o la repressione della trascrizione; un esempio di repressione *looping*-mediata è fornito dal già citato repressore GalR, mentre l'attivazione garantita da questo tipo di meccanismo richiede spesso il coinvolgimento delle NAPs: grazie alla loro intrinseca capacità di piegare il DNA possono favorire l'interazione tra fattori che legano sequenze anche distanti tra loro; è questo il caso dell'operone *narG*: le proteine NarR e Fnr agiscono da attivatori su di esso solo quando, grazie al piegamento del DNA mediato da IHF, possono interagire tra loro pur riconoscendo siti di legame non adiacenti (Figura 1.7) (Schröder *et al*, 1993).



**Figura 1.6.** Rappresentazione schematica dei principali meccanismi di attivazione della trascrizione nei batteri (sinistra): a) reclutamento dell’RNAP attraverso l’interazione con gli  $\alpha$ -CTDs; b) reclutamento dell’RNAP attraverso l’interazione con la subunità  $\sigma$ ; c) riposizionamento degli elementi -10 e -35. Rappresentazione schematica dei principali meccanismi di repressione della trascrizione nei batteri (destra): d) repressione per ingombro sterico; e) repressione *looping*-mediata; f) repressione mediata da un anti-attivatore (adattata da Browning and Busby, 2004).



**Figura 1.7.** Attivazione *looping*-mediata dell’operone *narG* (adattata da Schröder *et al*, 1993).

Una volta che l’RNAP è stata reclutata sul promotore, l’attivazione trascrizionale non può prescindere dalla struttura topologica locale del DNA, definita “superelicità effettiva” per distinguerla dalla “superelicità globale” del cromosoma. La superelicità negativa a cui è normalmente sottoposto il cromosoma batterico determina un cambiamento significativo

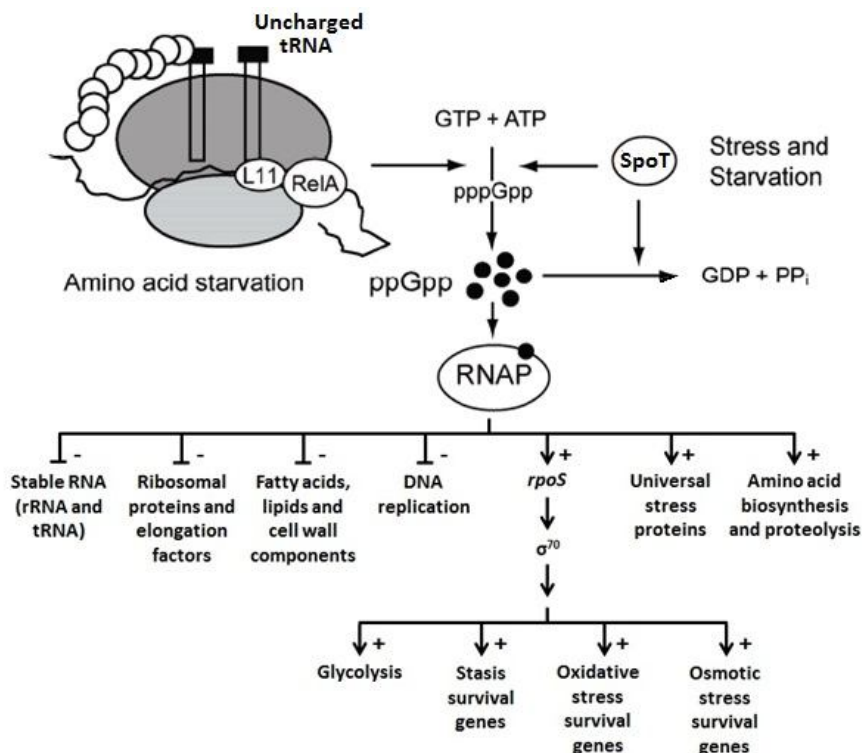
dell'energia richiesta per l'apertura della bolla di trascrizione e, conseguentemente, per l'isomerizzazione da  $RP_C$  a  $RP_O$ . Va però considerato che la trascrizione a partire da differenti promotori può essere più o meno influenzata da questo aspetto: un discriminatore ricco in G+C rende la denaturazione del DNA energeticamente meno favorita rispetto ad uno ricco in A+T; allo stesso modo una distanza non ottimale tra gli elementi -35 e -10, alterando la corretta interazione tra la subunità  $\sigma$  dell'RNAP ed il DNA, riduce la capacità dell'enzima di svolgere la doppia elica attorno al sito di inizio della trascrizione. Questi fattori rendono la superelicità effettiva determinante per la formazione della bolla di trascrizione. Un importante esempio di promotori che presentano queste caratteristiche e che quindi risentono in maniera significativa della topologia del DNA a livello locale è fornito dai promotori per gli rRNA di *E. coli* (Travers and Muskhelishvili, 2005). In questo contesto, nel quale risulta fondamentale il ruolo delle NAPs, si inserisce il fenomeno del *wrapping* del DNA mediato dal legame dell'RNAP a specifiche sequenze promotrici: un avvolgimento negativo del DNA attorno all'enzima favorisce la denaturazione della doppia elica, fornendo un importante contributo alla formazione del complesso aperto. Piccoli modulatori trascrizionali in grado di agire mediante legame diretto all'RNAP possono modificare allostericamente la struttura dell'enzima, influenzando la sua abilità di riconoscere e legare il promotore e di interagire più o meno estesamente con esso; ciò modifica l'entità del *wrapping* e quindi il suo contributo alla formazione del complesso aperto. E' questo il caso degli effettori della risposta stringente ppGpp e DksA, che agiscono legando direttamente l'RNAP e alterando il profilo di espressione di centinaia di geni. L'attività di questi due modulatori è il punto centrale del presente lavoro di tesi.

## **1.2. La risposta stringente permette un efficace adattamento all'ambiente ed è mediata dagli effettori ppGpp e DksA**

La risposta stringente, anche nota come controllo stringente, è un meccanismo adattativo altamente conservato nel regno procariotico grazie al quale le cellule possono rispondere a differenti situazioni di stress, modificando l'espressione di centinaia di geni. In seguito a deprivazione aminoacidica, lipidica, di fonti di carbonio, di fosforo, di azoto o di metalli, ma anche in situazioni di stress ambientale determinate da cambiamenti del pH, della temperatura e della quantità di cellule presenti in uno spazio limitato, si assiste ad una

profonda modificazione dell'attività metabolica cellulare. Questa si esplica a diversi livelli anche se buona parte dei meccanismi coinvolti influenzano l'inizio del processo trascrizionale; l'effetto più evidente è il blocco della sintesi degli RNA stabili (rRNA e tRNA) con conseguente inibizione della crescita cellulare e attivazione di meccanismi utili all'adattamento alle nuove condizioni ambientali (Chatterji and Ojha, 2001). I due effettori molecolari della risposta stringente sono il ppGpp (guanosina-3',5'-bispirofosfato) e la piccola proteina DksA. Il primo rappresenta l'archetipo degli alarmoni, piccole molecole che agiscono da segnalatori intracellulari e che vengono sintetizzate ad alti livelli in risposta a stimoli esterni. RelA e SpoT in *E. coli* ed i loro omologhi in altri batteri e nei cloroplasti delle cellule vegetali (*RSH, RelA/SpoT Homologs*) sono in grado di sintetizzare sia la guanosina tetrafosfato (ppGpp) che la guanosina pentafosfato (pppGpp), poi idrolizzata a ppGpp, utilizzando come substrati l'ATP ed il GDP o il GTP (Atkinson *et al*, 2011; Braeken *et al*, 2006). RelA è la ppGpp sintetasi I (PS I), enzima che mostra solamente attività sintetica e che viene attivato dall'interazione con la proteina ribosomiale L11 appartenente ad un ribosoma bloccato dal legame di un tRNA scarico al sito A; dopo la sintesi dell'allarmone RelA si dissocia da L11 e può legare un altro ribosoma in stallo. Questo tipo di meccanismo garantisce una stretta correlazione tra la disponibilità di aminoacidi ed i livelli di ppGpp, permettendo l'attivazione della risposta stringente in condizione di deplezione aminoacidica (Wendrich *et al*, 2002). Meno informazioni risultano attualmente disponibili circa l'attivazione di SpoT (ppGpp sintetasi II, PS II) in seguito a diverse condizioni di stress. Essa, al contrario di RelA, presenta attività sia sintetica che idrolasica ed è quindi coinvolta con duplice funzione nel mantenimento di adeguati livelli intracellulari di ppGpp; per questo motivo molti batteri sono in grado di modulare la risposta stringente utilizzando solo un omologo di SpoT, senza la necessità di proteine omologhe a RelA. L'attività idrolasica di SpoT è prevalente in condizioni di crescita ideali per il batterio, mentre una modificazione di tipo allosterico non ancora ben caratterizzata determina l'attivazione del meccanismo sintetico in risposta a stress di diverso tipo, in particolare da carenza di fonti di carbonio e di acidi grassi (Murray and Bremer, 1996). Per questo motivo è stata prima proposta e successivamente confermata un'interazione diretta tra SpoT e l'ACP (*Acyl Carrier Protein*), proteina coinvolta nella biosintesi degli acidi grassi, in grado spiegare la capacità della PS II di sintetizzare il ppGpp in risposta a deplezione di fonti lipidiche e di carbonio (Battesti and Bouveret, 2006). Un ceppo privo dei geni codificanti per RelA e SpoT (o per i

loro omologhi) non è in grado di ridurre la sintesi degli rRNA e dei tRNA in situazioni stressogene; tale ceppo viene definito ppGpp<sup>0</sup> ed il conseguente accumulo di RNA stabili nella cellula determina una situazione chiamata “risposta rilassata” (Magnusson *et al*, 2005).



**Figura 1.8.** Biosintesi ed idrolisi del ppGpp ed effetti dell’alarmone sull’espressione genica in *E. coli* (adattato da Magnusson *et al*, 2005).

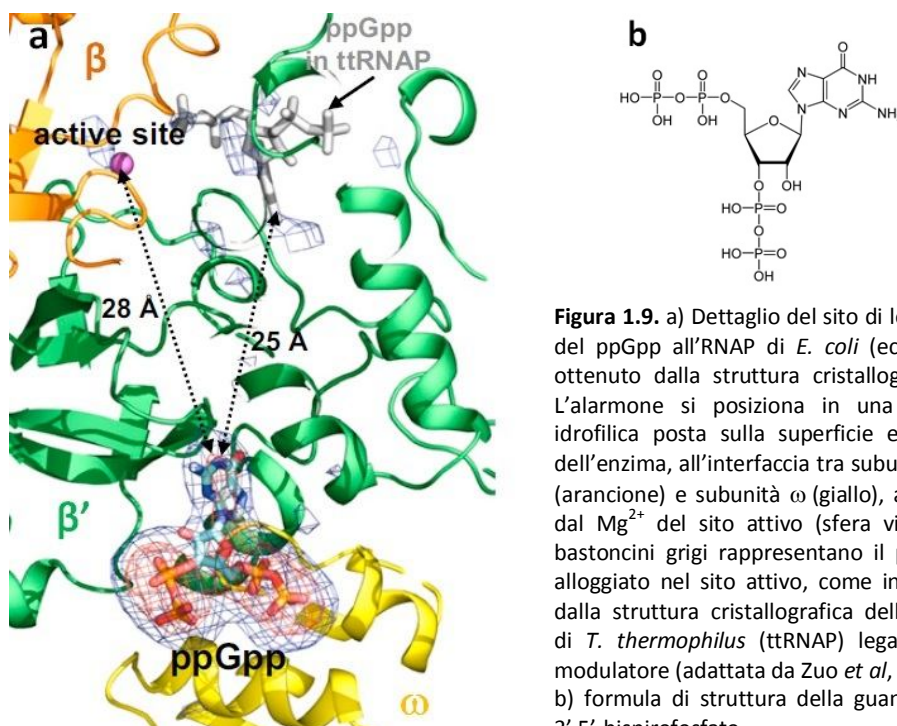
Subito dopo essere stato isolato alla fine degli anni '60 (Cashel, 1969), il ppGpp è stato impiegato in numerosi esperimenti *in vitro* atti a definirne i bersagli molecolari, il meccanismo d’azione e gli effetti (Cashel and Gallant, 1969); inaspettatamente, in sistemi altamente purificati, l’alarmone sembrava non essere in grado di determinare una variazione dell’espressione genica simile a quella riscontrata *in vivo*. Fu quindi proposta l’esistenza di cofattori cellulari necessari all’attività del ppGpp (Aboud and Pastan, 1975). Tuttavia, solo 30 anni più tardi è stato identificato il reale cofattore dell’alarmone: ceppi deleti nel gene per la proteina di 151 a.a. DksA non risultavano in grado di rispondere efficacemente a variazioni della disponibilità di aminoacidi e tale proteina mostrava *in vitro*

attività sinergica a quella dell'alarmone sui promotori dei geni per gli rRNA e per la biosintesi degli aminoacidi (Vassilyeva *et al*, 2004; Paul *et al*, 2004). Dopo tale scoperta gli sforzi di molti gruppi di ricerca si sono concentrati sulla caratterizzazione strutturale e funzionale degli effettori della risposta stringente a tutti i livelli su cui essi agiscono. Sebbene lo scopo del presente lavoro di tesi riguarda principalmente gli aspetti strutturali e funzionali legati all'attività di ppGpp e DksA sulla regolazione dell'inizio della trascrizione, non va dimenticato che questi modulatori partecipano, direttamente o indirettamente, a numerosi altri aspetti riguardanti la sopravvivenza delle cellule batteriche: dalla replicazione alla traduzione, fino all'interazione con organismi ospiti ed alla patogenesi (Srivatsan and Wang, 2008; Dalebroux and Swanson, 2012).

### **1.2.1. ppGpp e DksA agiscono legando direttamente l'RNAP**

Mentre la struttura cristallografica della DksA ed evidenze biochimiche e genetiche hanno fin da subito stabilito la sua capacità di legare direttamente l'RNAP di *E. coli* a livello del canale secondario dell'enzima, sono stati necessari quasi 45 anni per arrivare ad una determinazione definitiva del sito di legame del ppGpp. Infatti, se da un lato la struttura cristallografica dell'RNAP di *Thermus thermophilus* mostrava l'alarmone alloggiato a livello del sito catalitico, in una posizione sovrapposta a quella di legame dei ribonucleotidi (Artsimovitch *et al*, 2004), dall'altro evidenze biochimiche e genetiche sembravano indicare l'importanza della subunità  $\omega$ , non coinvolta nella formazione del sito attivo, per il legame del ppGpp all'enzima; inoltre mutazioni a carico di aminoacidi situati nel sito attivo dell'RNAP di *E. coli* non modificavano la sua sensibilità al ppGpp, indicando che il sito di legame dell'alarmone a tale enzima non poteva essere quello identificato nella struttura dell'RNAP di *T. thermophilus* (Vrentas *et al*, 2008). La risposta definitiva è stata ottenuta all'inizio del 2013: la determinazione della struttura cristallografica dell'RNAP di *E. coli* legata al ppGpp, unitamente ad esperimenti di *crosslinking*, mappatura mediante proteasi e studio di varianti mutate dell'enzima, hanno evidenziato che il sito di legame dell'alarmone corrisponde ad una piccola tasca idrofila posta sulla superficie esterna della polimerasi, all'interfaccia tra la subunità  $\beta'$  e la subunità  $\omega$ . Queste osservazioni hanno posto le basi per la comprensione del reale meccanismo d'azione del modulatore nei confronti del processo trascrizionale: legandosi a circa 28 Å di distanza dal sito catalitico, esso deve necessariamente agire mediante una modificazione allosterica del suo bersaglio (Zuo *et al*,

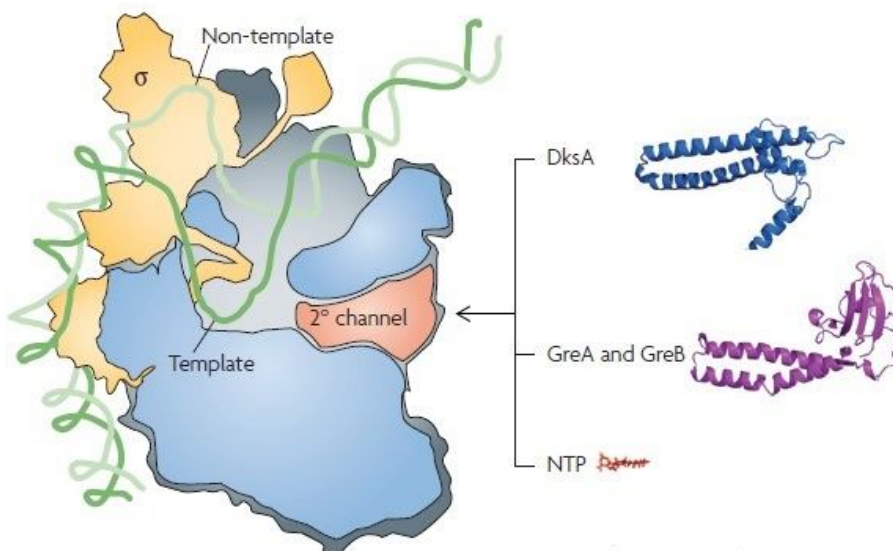
2013; Ross *et al*, 2013). L'individuazione del reale sito di legame all'RNAP ha spinto molti ricercatori a rivalutare le loro osservazioni circa i suoi effetti a livello molecolare: per questo motivo e per il suo ruolo centrale nella fisiologia dei batteri, ogni contributo alla comprensione di questi aspetti risulta oggi più che mai di estremo interesse.



**Figura 1.9.** a) Dettaglio del sito di legame del ppGpp all'RNAP di *E. coli* (ecRNAP) ottenuto dalla struttura cristallografica. L'alarmone si posiziona in una tasca idrofilica posta sulla superficie esterna dell'enzima, all'interfaccia tra subunità  $\beta'$  (arancione) e subunità  $\omega$  (giallo), a 28 Å dal  $Mg^{2+}$  del sito attivo (sfera viola). I bastoncini grigi rappresentano il ppGpp alloggiato nel sito attivo, come indicato dalla struttura cristallografica dell'RNAP di *T. thermophilus* (ttRNAP) legata dal modulatore (adattata da Zuo *et al*, 2013). b) formula di struttura della guanosina-3',5'-bispirofosfato.

L'identificazione del ruolo della DksA come cofattore del ppGpp ha risolto uno dei paradossi più longevi nell'ambito della biologia molecolare dei procarioti: il ppGpp *in vitro* non permetteva di riprodurre gli effetti della risposta stringente sul processo trascrizionale che erano invece così evidenti *in vivo*. La DksA è una proteina di 151 a.a. (~17,5 kDa) che, al contrario del ppGpp, è presente nella cellula a livelli pressoché costanti in ogni fase del ciclo cellulare. La determinazione della struttura cristallografica ed una serie di evidenze di tipo genetico, molecolare e biochimico ne hanno chiarito il meccanismo d'azione: essa è composta da un dominio globulare contenente un motivo *zinc-finger* a quattro residui di cisteina che determina il folding proteico globale e mantiene il corretto orientamento di un dominio *coiled-coil*. Questa organizzazione generale permette alla DksA di interagire direttamente con l'RNAP inserendo il secondo dominio all'interno del canale secondario

dell'enzima, lo stesso attraverso il quale hanno accesso i ribonucleotidi, raggiungendo così il profondo solco che costituisce il sito attivo: ciò permette a due residui di acido aspartico (Asp71 e Asp74), posizionati sul *loop* flessibile che unisce le due  $\alpha$ -eliche componenti il dominio *coiled-coil*, di interagire direttamente con il magnesio catalitico (Lee *et al*, 2008). Questa particolare interazione tra la DksA e l'RNAP rende possibile l'azione del modulatore sia direttamente sull'attività catalitica dell'enzima che allostericamente sulla sua struttura (Perederina *et al*, 2004; Lennon *et al*, 2012). L'eccezionale somiglianza conformazionale con i fattori di allungamento batterici GreA e GreB e la medesima modalità di legame all'enzima (Rutherford *et al*, 2007; Nickels and Hochschild, 2004) suggeriscono che la DksA possa agire anche in questa fase del processo trascrizionale; la sua attività in questo ambito risulta però differente e si ipotizza quindi che essa possa avere un ruolo in momenti distinti durante la sintesi del trascritto; questo argomento è attualmente dibattuto (Furman *et al*, 2012).



**Figura 1.10.** Rappresentazione schematica del complesso aperto. E' evidenziato il canale secondario dell'RNAP attraverso il quale i ribonucleotidi accedono al sito attivo e nel quale si inseriscono i domini *coiled-coil* della DksA e di due fattori di allungamento (adattata da Haugen *et al*, 2008).

### 1.2.2. ppGpp e DksA determinano effetti fisiologici a livello globale

Mentre la concentrazione di DksA all'interno della cellula rimane pressoché costante nelle diverse condizioni di crescita, il ppGpp viene sintetizzato ad alti livelli solo in risposta a situazioni di stress. In *E. coli* sono presenti dalle 3000 alle 10000 copie/cellula di DksA; essa

risulta piuttosto stabile e la sua quantità è regolata mediante un meccanismo a *feedback* ad opera dello stesso modulatore che, sinergicamente all'alarmone, inibisce l'inizio della trascrizione del suo mRNA (Chandrangsu *et al*, 2011). I livelli intracellulari di ppGpp aumentano sensibilmente, da concentrazioni  $\mu\text{M}$  a concentrazioni mM, grazie all'attivazione di RelA e/o SpoT in risposta a diversi stimoli (Wagner, 2002).

Questa tesi si focalizza sugli effetti strutturali del ppGpp e della DksA a carico del complesso di inizio della trascrizione; è però importante sottolineare come essi agiscano a vari livelli, legando non solo l'RNAP, ma anche altri bersagli intracellulari. La maggior parte delle informazioni attualmente disponibili a tal proposito riguardano l'alarmone, mentre la DksA è stata studiata quasi esclusivamente per la sua implicazione nel processo trascrizionale e per i suoi effetti indiretti su alcuni aspetti molecolari, come il suo ruolo nella riduzione dell'interferenza dell'apparato trascrizionale nei confronti di quello replicativo (Trautinger *et al*, 2005; Tehranchi *et al*, 2010). Il ppGpp ed il pppGpp (che mostra effetti identici al primo, ma solo a più alta concentrazione) regolano l'espressione di centinaia di geni implicati nelle più svariate funzioni cellulari (Mechold *et al*, 2013). L'aumento della concentrazione intracellulare di alarmone porta ad un riassetto del profilo trascrizionale per buona parte ancora da spiegare, sia nei meccanismi che negli effetti (Durfee *et al*, 2008). Il principale bersaglio del ppGpp risulta essere l'RNAP e l'inizio del processo di trascrizione è sicuramente lo step maggiormente coinvolto; in esso l'attività dell'alarmone è strettamente correlata alla presenza della DksA. Altri enzimi ed altri aspetti cellulari vengono però influenzati dai suoi livelli intracellulari: numerose evidenze ne sottolineano la capacità di inibire l'inizio della replicazione mediante un'azione diretta sull'espressione della DnaA e mediante il legame ad una DNA primasi in *E. coli*; al contrario in *B. subtilis* (e per analogia nei batteri gram positivi) si ritiene che il ppGpp agisca da inibitore della replicazione legando direttamente una delle RTPs (*Replication Termination Proteins*) (Levine *et al*, 1991). L'alarmone ha effetti anche a livello traduzionale: IF2 è un fattore di inizio della traduzione la cui azione dipende dal legame del GTP; durante la risposta stringente l'aumento dei livelli di ppGpp ed il contemporaneo calo dei livelli di GTP determinano il legame del modulatore al sito di legame del nucleotide su IF2; tale *switch* causa il blocco del fattore proteico e, di conseguenza, della traduzione. IF2 può fungere quindi da sensore molecolare delle condizioni energetiche cellulari, correlando ad esse la sintesi proteica (Milon *et al*, 2006). Di grande interesse è inoltre il ruolo del ppGpp in numerosi aspetti legati alla patogenesi di un

elevato numero di batteri patogeni per l'uomo (Dalebroux and Swanson, 2012); in questo contesto esso agisce spesso mediante modulazione di diversi fattori trascrizionali (Dalebroux *et al*, 2010). L'alarmone è poi coinvolto in aspetti quali la degradazione dei messaggeri negli attinomiceti (Gatewood and Jones, 2010), la tolleranza a condizioni di pH acido nei gammaproteobatteri (Kanjee *et al*, 2011) e nell'accumulo dei polifosfati in *E. coli* (Rao *et al*, 2009).

### 1.2.3. Il ppGpp influenza l'attività dell'RNAP batterica mediante un meccanismo indiretto basato sulla competizione dei fattori $\sigma$

Il ppGpp e la DksA agiscono legando direttamente l'RNAP; ciò determina una modificazione dell'espressione genica indotta dalla risposta stringente di tipo sia diretto che indiretto: nel primo caso gli effettori modificano l'interazione tra enzima e promotore, la cinetica di formazione del complesso aperto ed il passaggio alla successiva fase di allungamento. Gli effetti indiretti riguardano invece la competizione dei diversi fattori  $\sigma$  per il legame all'RNAP. Come già descritto, in *E. coli* sono presenti sette differenti fattori  $\sigma$ :  $\sigma^{70}$ , detto anche RpoD, è il più abbondante in normali condizioni di crescita; gli altri (Tabella 1.1) vengono sintetizzati in risposta a modificazioni dell'ambiente extracellulare ed hanno un'affinità per l'RNAP *core* significativamente inferiore a quella di  $\sigma^{70}$  (Maeda *et al*, 2000). Ognuno di essi riconosce specifiche classi di promotori grazie ai loro differenti elementi di sequenza.

FATTORE	GENE	MW (kDa)	FUNZIONE
$\sigma^{70}$	<i>rpoD</i>	70	Fattore $\sigma$ costitutivo
$\sigma^{19}$	<i>fecI</i>	19	Trasporto ed utilizzo del ferro
$\sigma^{24}$	<i>rpoE</i>	24	Fattore $\sigma$ extracitoplasmatico
$\sigma^{28}$	<i>rpoF</i>	28	Regolazione della biosintesi dei flagelli
$\sigma^{32}$	<i>rpoH</i>	32	Risposta allo stress termico
$\sigma^{38}$	<i>rpoS</i>	38	Fattore $\sigma$ della fase stazionaria
$\sigma^{54}$	<i>rpoN</i>	54	Risposta alla carenza di azoto

**Tabella 1.11.** I sette fattori  $\sigma$  di *E. coli*.

La limitata disponibilità di RNAP *core* libere nel citoplasma determina una forte competizione per il legame da parte dei diversi fattori  $\sigma$ ; ciò permette una rapida modulazione del profilo di espressione genica attraverso la variazione delle loro

concentrazioni relative, che può essere ottenuta con differenti meccanismi: mediante l'aumento o la diminuzione della trascrizione dei geni che codificano per le subunità  $\sigma$  alternative, attraverso la proteolisi di specifiche subunità  $\sigma$  oppure grazie all'attività di fattori anti-sigma in grado di legarne ed inattivarne specificamente una classe (Haugen *et al*, 2008).

Numerose evidenze indicano che il ppGpp può intervenire sulla competizione tra i fattori  $\sigma$  modificando la loro espressione o influenzandone l'attività. In *E. coli* elevati livelli di ppGpp sono associati ad una ridotta affinità tra  $\sigma^{70}$  e RNAP core; ciò determina una minore competitività di  $\sigma^{70}$  nei confronti di fattori  $\sigma$  associati allo stress quali  $\sigma^S$  e  $\sigma^H$ . A conferma di ciò, ceppi ppGpp<sup>0</sup> mostrano un'alterazione dello scambio dei fattori  $\sigma$ , ma tale fenomeno può essere compensato, con la stessa efficacia, da una over-espressione di fattori anti- $\sigma^{70}$  o da una down-regolazione della sintesi  $\sigma^{70}$ . Si ipotizza inoltre che la forte inibizione ppGpp-mediata della trascrizione degli rRNA e dei tRNA (che in condizioni normali di crescita impegna oltre il 60% delle RNAP) renda disponibile un gran numero di RNAP- $\sigma^{70}$  nel citoplasma, favorendo la trascrizione di altri geni controllati da promotori riconosciuti dallo stesso fattore  $\sigma$ , ma normalmente espressi a bassi livelli a causa del coinvolgimento degli oloenzimi nella sintesi degli RNA stabili (Jishage *et al*, 2002). Infine, è interessante osservare come il fattore anti- $\sigma^{70}$  Rsd (*Regulator of Sigma-D*) risulti over-espresso in presenza di elevate concentrazioni di ppGpp (Jishage and Ishihama 1999).

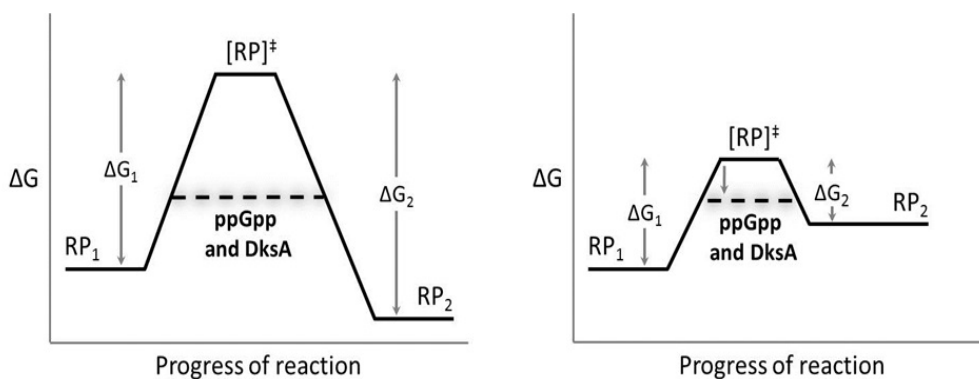
#### **1.2.4 ppGpp, DksA e iNTPs agiscono sulle fasi iniziali del processo di trascrizione influenzando la cinetica di formazione di RP<sub>o</sub> con meccanismi promotore-specifici**

Il ppGpp è presente praticamente in tutte le specie batteriche e nei cloroplasti di numerose cellule vegetali; al contrario la DksA e proteine omologhe non risultano così ampiamente diffuse. Questa proteina, inizialmente identificata come soppressore multicopia del fenotipo temperatura-sensibile osservato in ceppi privi del gene *dnaKJ* (Kang and Craig, 1990), si è in seguito rivelata necessaria per riprodurre gli effetti che il ppGpp mostrava *in vivo* anche in sistemi *in vitro* altamente purificati (Paul *et al*, 2004). Da allora sono stati studiati molti promotori in riferimento agli effetti di ppGpp e DksA sull'espressione di diversi geni; oltre a confermare che la loro attività si esplica soprattutto nelle fasi iniziali della trascrizione, è stato possibile dimostrare che nella maggior parte dei casi essi agiscono sinergicamente, con effetti attivatori o inibitori a seconda dei geni considerati. Tuttavia,

sono stati identificati anche casi in cui i due modulatori hanno effetti antagonisti sulla regolazione della trascrizione (Magnusson *et al*, 2007).

La conseguenza principale dell'attivazione della risposta stringente in condizioni di deplezione aminoacidica risulta essere il blocco della sintesi degli rRNA e dei tRNA e la concomitante espressione di proteine coinvolte nel trasporto e nella biosintesi degli aminoacidi. Questi effetti sono dovuti ad una repressione sinergica da parte di ppGpp e DksA nei confronti della trascrizione degli RNA stabili e ad un'attivazione sinergica della trascrizione dei geni necessari al recupero ed alla sintesi degli aminoacidi (Roberts, 2009). Tra i meccanismi proposti finora, quello che meglio spiega questa regolazione trascrizionale si basa sulle diverse caratteristiche cinetiche di formazione del complesso aperto e sulla differente emivita che esso mostra a livello dei diversi promotori. Promotori in cui il complesso aperto ha un'emivita di pochi minuti (come i promotori *rrn* degli rRNA di *E. coli*) subiscono un'ulteriore riduzione della stabilità di  $RP_o$  da parte di ppGpp e DksA, con conseguente inibizione dell'inizio della trascrizione; al contrario, sui promotori in cui il complesso aperto è stabile (con un'emivita di alcune ore, come i promotori che regolano l'espressione delle proteine coinvolte nella biosintesi degli aminoacidi) gli effetti di ppGpp e DksA non sono sufficienti ad impedire il *promoter escape* prima del ritorno verso il complesso chiuso; ciò si traduce in un aumento dell'espressione dei geni da essi controllati, visto che la destabilizzazione del complesso aperto mediata da ppGpp e DksA favorisce il distacco dell'RNAP dal promotore per l'entrata nella fase di allungamento. La regolazione positiva di questi promotori potrebbe derivare anche dalla maggior disponibilità di RNAP, dovuta alla dissociazione della stessa dai promotori dei geni per gli RNA stabili: i promotori che guidano la biosintesi degli aminoacidi richiedono infatti un'elevata concentrazione di oloenzima per essere efficacemente attivati, mentre quelli per gli rRNA presentano caratteristiche tali da mostrare alta affinità per il legame da parte dell'apparato trascrizionale (Barker *et al*, 2001). Esistono però alcune evidenze che risultano in contrasto con queste osservazioni: a basse concentrazioni di ppGpp i livelli intracellulari di RNAP disponibili sembrano maggiori rispetto a quelli osservati durante l'attivazione della risposta stringente (Bremer *et al*, 2003); l'effetto dovuto alla dissociazione dell'RNAP dai promotori per gli rRNA risulta quindi essere controverso. Confermato è invece l'effetto di repressione trascrizionale indiretta nei confronti dei promotori per gli rRNA causato da un'inibizione ppGpp-mediata dell'espressione del gene per Fis che, come già accennato, è un attivatore

di tipo classico che lega sequenze a monte dell'elemento UP dei promotori *rrn* reclutando su di essi l'RNAP (Zhang *et al*, 2002). Su questi promotori ppGpp e DksA non sembrano dunque agire influenzando la cinetica di formazione del complesso chiuso, ovvero l'iniziale legame dell'RNAP al DNA, quanto piuttosto la successiva fase di isomerizzazione verso il complesso aperto e la stabilità di quest'ultimo (Paul *et al*, 2005).



**Figura 1.12.** Modello cinetico proposto per spiegare gli effetti sinergici positivi (sinistra) o negativi (destra) dei modulatori della risposta stringente. ppGpp e DksA, legando l'RNAP, riducono il  $\Delta G$  di formazione di un intermedio instabile o dello stato di transizione ( $[RP]^\ddagger$ ) che separa  $RP_1$  da  $RP_2$  (che possono rappresentare, a seconda del promotore considerato,  $RP_C$  e  $RP_O$  oppure intermedi di formazione di questi, come  $I_1$  e  $I_2$ ). Le conseguenze sull'inizio della trascrizione dipendono dalle proprietà cinetiche intrinseche del promotore. I promotori regolati positivamente (come quelli che guidano l'espressione dei geni i cui prodotti sono coinvolti nella biosintesi degli a.a.) presentano un  $RP_2$  stabile, con un'energia libera inferiore a quella di  $RP_1$ , mentre la barriera energetica di attivazione della conversione da  $RP_1$  a  $RP_2$  risulta elevata: la sua riduzione mediata dal legame di ppGpp e DksA all'RNAP favorisce la trascrizione a partire da promotori di questo tipo. Al contrario, su promotori la cui conversione da  $RP_1$  a  $RP_2$  richiede il superamento di una barriera energetica di attivazione inferiore e sui quali  $RP_2$  (che tipicamente corrisponde ad  $RP_O$ ) risulta meno stabile di  $RP_1$  (normalmente rappresentato da  $RP_C$ ), ppGpp e DksA non sono richiesti per un efficace inizio della trascrizione (è il caso dei promotori per gli rRNA); la presenza dei modulatori della risposta stringente, abbassando il  $\Delta G$  di formazione dell'intermedio  $[RP]^\ddagger$ , destabilizza il complesso aperto ( $RP_O$  o  $RP_2$ ) favorendo il ritorno al complesso chiuso ( $RP_C$  o  $RP_1$ ) (adattata da Paul *et al*, 2005).

Il fatto che gli effetti di ppGpp e DksA sui promotori da essi modulati dipenda dalle loro caratteristiche cinetiche fa chiaramente emergere il ruolo della sequenza del promotore nella regolazione da parte degli effettori della risposta stringente. Un promotore la cui sequenza determina una cinetica di formazione di  $RP_O$  favorevole subirà un'attivazione in condizioni di stress, come nel caso dei promotori dei geni coinvolti nella biosintesi degli aminoacidi; al contrario promotori la cui sequenza permette la formazione di complessi

aperti con un'emivita breve risulteranno inibiti da ppGpp e DksA; è questo il caso dei promotori *rrn*.

Un altro fattore fondamentale per la regolazione della trascrizione, che interviene nella formazione del complesso aperto, risulta essere la concentrazione intracellulare di NTPs. Elevati livelli di iNTPs (i ribonucleotidi iniziatori) sono infatti necessari per stabilizzare i complessi aperti con emivita breve. I promotori che regolano la sintesi degli rRNA in *E. coli* sono paradigmatici in questo senso: in assenza di iNTPs, l'emivita di  $RP_0$  scende a poche decine di secondi (Gaal *et al*, 1997) e ciò di fatto ne impedisce la formazione. Al contrario, l'effetto stabilizzante mediato dalla presenza degli iNTPs non risulta necessario per i complessi aperti già intrinsecamente stabili. È questo il caso del promotore  $P_R$  del batteriofago  $\lambda$ , coinvolto nell'attivazione del ciclo litico. Tale promotore rappresenta il primo esempio identificato in cui ppGpp e DksA hanno effetti antagonisti sull'inizio della trascrizione, sia *in vivo* che *in vitro*: l'ormone provoca una forte inibizione della sintesi del trascritto mentre il modulatore proteico risulta fondamentale per l'attivazione del ciclo litico.  $P_R$  si discosta quindi dal modello precedentemente illustrato secondo il quale il ppGpp sarebbe in grado di inibire la trascrizione a partire da promotori il cui complesso aperto ha un'emivita breve: su di esso l'ormone mostra un forte effetto inibitorio nonostante l'emivita di  $RP_0$  sia di alcune ore; tuttavia, tale effetto si esplica ad uno step differente da quelli visti per i promotori dei geni per gli rRNA: su  $P_R$  l'ormone sembra inibire la formazione del legame fosfodiesterico tra il primo ed il secondo ribonucleotide dell'RNA nascente (Potrykus *et al*, 2002). La DksA mostra invece effetti positivi sull'attivazione della trascrizione a partire da  $P_R$ ; evidenze sperimentali indicano che la proteina è in grado di favorire l'associazione tra RNAP e DNA in sistemi *in vitro*, probabilmente attraverso una modificazione allosterica dell'oloenzima che ne aumenta l'affinità per il promotore. Inoltre, la DksA risulta fondamentale, *in vivo*, per l'attivazione del ciclo litico ed i suoi effetti attivatori sull'espressione dei geni controllati da  $P_R$  sono superiori a quelli inibitori mediati dal ppGpp, sia *in vivo* che *in vitro* (Łyżek *et al*, 2009).

Nonostante sia stato recentemente scoperto il sito di legame del ppGpp all'RNAP di *E. coli* (Zuo *et al*, 2013) e sia stata definita la modalità di interazione della DksA con l'oloenzima, molti aspetti circa il loro meccanismo d'azione durante le fasi iniziali della trascrizione sono ancora da chiarire (Potrykus and Cashel, 2008), soprattutto per quanto riguarda i promotori sui quali i due effettori mostrano effetti antagonisti anziché sinergici.

### 1.3. La microscopia a forza atomica

Il microscopio a forza atomica (AFM) appartiene alla categoria dei microscopi a scansione di sonda (SFM) (Binnig *et al*, 1986) nei quali una punta di dimensioni nanometriche fissata ad una leva flessibile (*cantilever*) esegue la scansione di una superficie: le deboli forze di interazione che si instaurano tra la punta ed il campione provocano una deflessione del *cantilever* che viene rilevata grazie ad un sistema a leva ottica (Rugar and Hansma, 1990). La scansione viene eseguita posizionando il campione su un tubo piezoelettrico che consente i movimenti lungo gli assi  $x$ ,  $y$ ,  $z$  (Tamer and Dahleh, 1994); mentre il movimento  $x$ ,  $y$  stabilisce il campo di osservazione, il movimento  $z$ , controllato da un sistema elettronico a *feedback*, rivela le asperità del campione e permette di ricostruire l'immagine topografica della superficie scansionata (Figura 1.13).

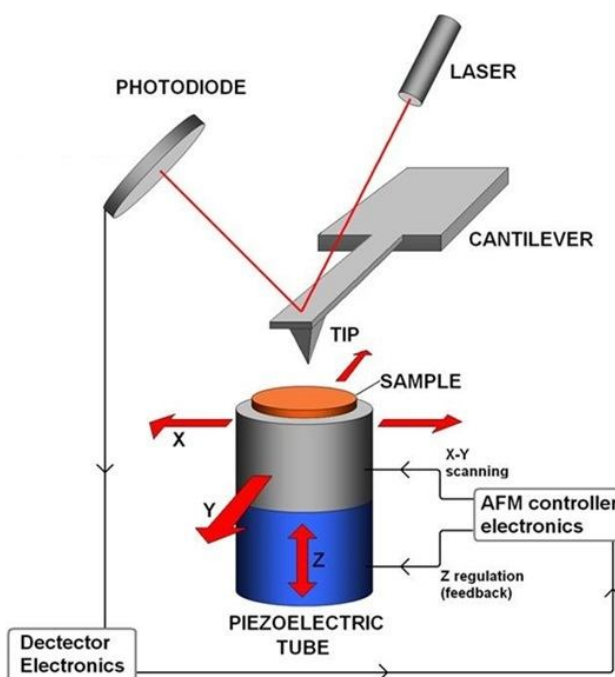
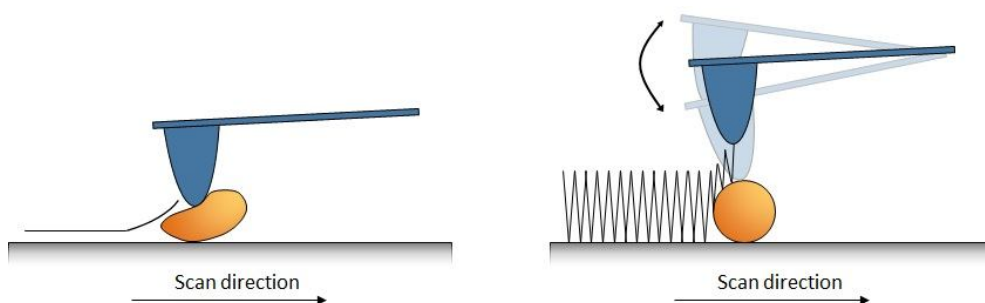


Figura 1.13. Schema di funzionamento del microscopio a forza atomica (AFM).

L'AFM può operare sia in *contact* che in *tapping mode*. Nella modalità *contact* la punta rimane sempre in contatto con la superficie e la topografia viene ricostruita sulla base delle deflessioni subite dal *cantilever*. Le forze di taglio che si generano tra punta e campione

tendono però a deformare le delicate macromolecole biologiche, rendendo la modalità *contact* non sempre idonea al loro studio. Nella modalità *tapping*, anche chiamata a contatto intermittente, il *cantilever* viene invece fatto oscillare ad alta frequenza durante la scansione (centinaia di kHz) ed il profilo del campione viene generato misurando le variazioni dell'ampiezza di oscillazione; in questo modo si riduce il rischio di danneggiamento degli oggetti scansionati.

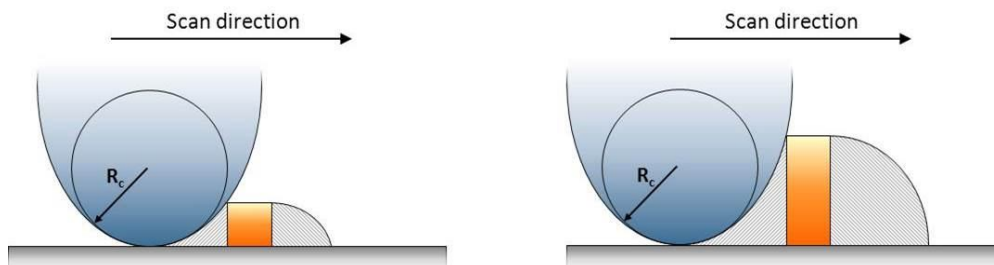


**Figura 1.14.** Effetto del contatto tra punta e macromolecola biologica che può verificarsi se si opera in *contact mode* (sinistra). La modalità *tapping* (destra) risulta più adatta all'applicazione dell'AFM in campo biologico.

Un fattore determinante delle tecniche di microscopia è il potere risolutivo del microscopio che, generalmente, determina la risoluzione dell'immagine. Nella microscopia a forza atomica la risoluzione dipende invece sia dalle caratteristiche del microscopio che da quelle del campione; l'immagine AFM rappresenta infatti una convoluzione tra la forma dell'oggetto ed il profilo della punta. Per questo motivo, maggiore è il raggio di curvatura della punta ( $R_c$ ), maggiore sarà l'effetto di allargamento da essa generato nella definizione del profilo dell'oggetto (Figura 1.15). Allo stesso modo, tanto più alto è l'oggetto scansionato, tanto maggiore sarà l'effetto di allargamento (Figura 1.16) (Bustamante and Rivetti, 1996).



**Figura 1.15.** Maggiore è il raggio di curvatura della punta ( $R_c > R'_c$ ), maggiore sarà il "cono d'ombra" generato attorno all'oggetto scansionato ed il conseguente effetto di allargamento provocato dalla punta durante la creazione dell'immagine.



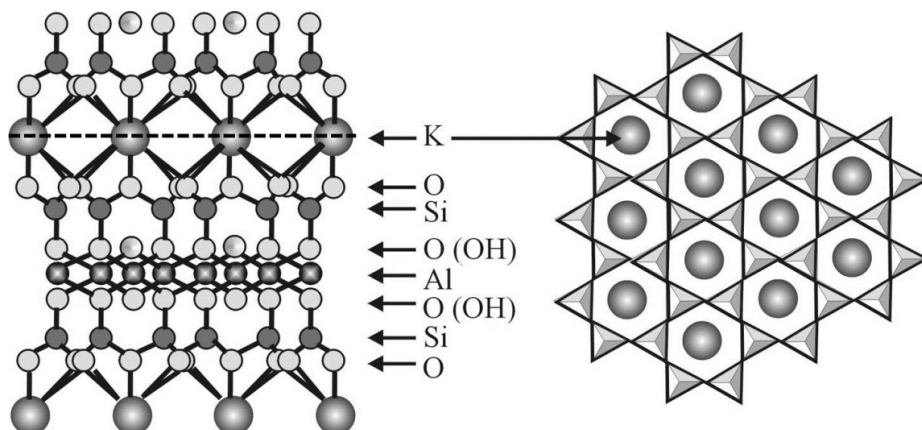
**Figura 1.16.** A parità di raggio di curvatura della punta, maggiore è l'altezza di un oggetto depositato sulla superficie, maggiore è il "cono d'ombra" che si forma attorno ad esso durante la scansione e che determina l'effetto di allargamento.

### 1.3.1. La microscopia a forza atomica per lo studio dei complessi nucleoproteici

Fino alla prima metà degli anni '80 la microscopia elettronica (EM) ha rappresentato la principale metodologia impiegata per l'analisi strutturale dei complessi nucleoproteici. Le loro dimensioni, comprese tra 10 e 200 nm, li rendono infatti difficilmente analizzabili mediante tecniche di risonanza magnetica nucleare (NMR) e cristallografia a raggi X e, allo stesso tempo, essi risultano troppo piccoli per l'osservazione al microscopio ottico. Lo sviluppo della microscopia a forza atomica ha fornito una valida alternativa strumentale per lo studio di questi sistemi biologici.

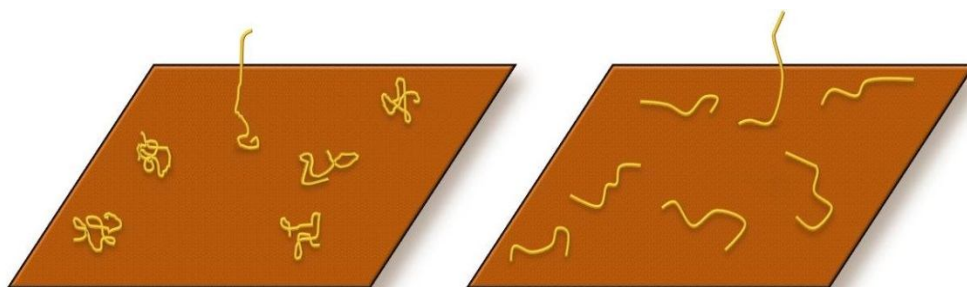
Per poter essere visualizzate mediante AFM, le macromolecole biologiche devono essere depositate su supporti idonei, ai quali devono poter aderire stabilmente; nel corso degli anni sono stati messi a punto numerosi protocolli per il legame del DNA e delle proteine a superfici adatte a tale scopo. Uno dei metodi maggiormente impiegati consiste nell'utilizzo di un substrato di mica, un fillosilicato che può essere facilmente sfogliato lungo piani cristallini (Figura 1.17 sinistra) garantendo così una superficie idrofilica perfettamente liscia, ideale per la rivelazione di strutture nanometriche.

La rimozione dello strato superficiale di mica determina l'esposizione degli atomi di ossigeno ed essa risulta quindi elettricamente negativa; al fine di permettere l'adesione di polianioni come il DNA a tale superficie è necessario adottare specifiche strategie, alcune delle quali consistono nella funzionalizzazione con composti in grado di creare uno strato superficiale carico positivamente, come la polilisina o l'amminopropiltrietossisilano (APTES) (Shlyakhtenko *et al*, 1999). In alternativa è possibile utilizzare cationi bivalenti capaci di sostituirsi agli atomi di potassio della mica in modo tale da permettere la formazione di interazioni elettrostatiche tra la superficie ed il DNA (Figura 1.17 destra, vedi didascalia).



**Figura 1.17.** Sezione trasversale della mica; la linea tratteggiata indica l'asse di rottura durante la rimozione dello strato superiore (sinistra). Nella visione dall'alto (destra) gli atomi di K sono mostrati come sfere grigie; prima della deposizione questi devono essere sostituiti da cationi bivalenti come il  $Mg^{2+}$  in modo da potervi legare molecole di DNA attraverso interazioni di tipo elettrostatico.

E' stato dimostrato che la deposizione di frammenti di DNA su mica in presenza di  $Mg^{2+}$  permette alle molecole di raggiungere una situazione di equilibrio termodinamico durante il legame alla stessa, così che esse non risultino distorte dal cambiamento di dimensionalità che si verifica durante il loro passaggio dalla soluzione al supporto bidimensionale (Figura 1.18). Ciò rende possibile correlare i parametri strutturali delle molecole depositate, quali la distanza tra le estremità di ciascun frammento (*end-to-end distance*) e la lunghezza (*contour length*) con le proprietà fisiche delle stesse, come la *persistence length*, un indice della loro rigidità.

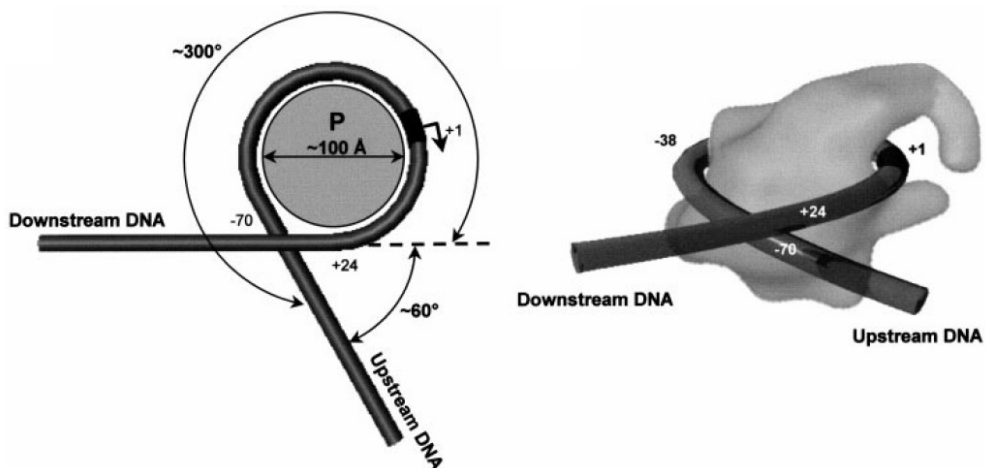


**Figura 1.18.** Confronto della deposizione su mica di molecole di DNA mediante un meccanismo di *trapping*, nel quale la molecola legata alla superficie rappresenta la proiezione ortogonale della struttura che aveva in soluzione (sinistra); oppure attraverso il raggiungimento di una situazione di equilibrio termodinamico da parte del polimero nelle due dimensioni (destra). L'una o l'altra modalità di deposizione dipendono dalle condizioni utilizzate per ottenere il legame del DNA alla superficie (estrapolata da Rivetti *et al*, 1996).

Nelle condizioni di deposizione descritte le molecole raggiungono la mica per semplice diffusione ed il legame ad essa risulta irreversibile; questo determina una correlazione diretta tra il numero di molecole presenti sulla superficie, la concentrazione che esse avevano in soluzione ed il tempo di deposizione. Inoltre, è stato dimostrato che il legame di una proteina ad una o ad entrambe le estremità del DNA non modifica la modalità con cui esso raggiunge la superficie; ciò permette di utilizzare la strategia descritta anche per lo studio dei complessi nucleoproteici e fa sì che la situazione che si osserva nelle immagini AFM sia rappresentativa di quella presente nella soluzione depositata (Rivetti *et al*, 1996).

### **1.3.2. La microscopia a forza atomica applicata allo studio dei complessi di inizio della trascrizione batterica**

In passato numerosi studi biochimici e strutturali hanno indicato che l'estensione della regione di DNA interagente con l'RNAP durante la formazione del complesso aperto risulta significativamente superiore al diametro dell'enzima (~10 nm). In particolare, esperimenti di *footprinting* con DNasi I e con idrossiradicali hanno evidenziato una protezione di circa 70-95 bp (24-32 nm) da parte dell'RNAP sul promotore  $P_R$  in seguito alla formazione del complesso aperto (Craig *et al*, 1995). Inoltre, esperimenti di *gel mobility*, *neutron scattering* e l'utilizzo dell'AFM hanno permesso di identificare un piegamento del DNA indotto dal legame dell'enzima, differente su diversi promotori. La caratterizzazione strutturale mediante microscopia a forza atomica del complesso aperto formato sul promotore  $P_R$  ha evidenziato una riduzione della lunghezza del frammento di DNA contenente il promotore pari a circa 30 nm, corrispondenti ad un giro di avvolgimento intorno all'RNAP. L'analisi della posizione dell'enzima lungo il frammento ha poi dimostrato che circa i 2/3 di tale accorciamento interessano il DNA *upstream* ed 1/3 quello *downstream* (Rivetti *et al*, 1999). Questi risultati hanno permesso di proporre un modello secondo il quale il DNA si avvolge attorno all'enzima durante la formazione del complesso aperto, attraverso un fenomeno definito *wrapping* del DNA. Il conseguente superavvolgimento negativo favorisce la denaturazione del doppia elica necessaria alla formazione della bolla di trascrizione durante il processo di isomerizzazione da  $RP_C$  a  $RP_O$  (Davis *et al*, 2005).



**Figura 1.19.** Rappresentazione schematica (a sinistra) e tridimensionale (a destra) del *wrapping* del promotore  $P_R$  attorno all'RNAP- $\sigma^{70}$  di *E. coli*. Le posizioni del DNA riportate rispetto al TSS e l'angolo di piegamento indicato sono coerenti con quanto emerso da analisi mediante microscopia a forza atomica e saggi di *gel retardation* (adattata da Rivetti *et al*, 1999).

Ulteriori indagini condotte utilizzando l'AFM hanno dimostrato che l'entità dell'accorciamento del DNA dovuto al *wrapping* è promotore-specifica: l'assenza di elementi UP a monte del promotore *lacUV5* impedisce un'interazione tra DNA ed RNAP simile a quella vista per  $P_R$ ; di conseguenza, la differenza di lunghezza tra il DNA libero ed il DNA legato dall'enzima è pressoché nulla. La conferma del coinvolgimento delle sequenze a monte degli elementi centrali del promotore (-10 e -35) nel *wrapping* è stata fornita dall'osservazione secondo cui la sostituzione di tale regione di  $P_R$  con la corrispondente regione di *lacUV5* annulla l'accorciamento; come controprova, l'aggiunta di una sequenza corrispondente al consenso dell'elemento UP a monte dell'elemento -35 di *lacUV5* determina un aumento della regione interagente con l'RNAP. Inoltre, polimerasi mutate e prive dei domini C-terminali delle subunità  $\alpha$  o nelle quali tali domini siano stati avvicinati a quelli N-terminali attraverso la riduzione della lunghezza dei *linker* flessibili, interagiscono con il DNA senza riuscire a determinare un suo esteso avvolgimento, indipendentemente dalla presenza di elementi UP del promotore (Cellai *et al*, 2007).

In questo paragrafo è stata posta l'attenzione sul contributo che la microscopia a forza atomica può dare alla caratterizzazione strutturale di complessi nucleoproteici, con particolare riferimento ai complessi di inizio della trascrizione batterica. Infatti, nonostante i limiti risolutivi dell'AFM non permettano di visualizzare i dettagli della struttura dei

complessi tra RNAP e promotori, la possibilità di analizzare diversi parametri riguardanti un numero molto elevato di molecole, potendole nello stesso tempo prendere in considerazione singolarmente, rendono l'AFM un ottimo *tool* per poterne caratterizzare la morfologia (Rivetti *et al*, 1999) e per valutare gli effetti di mutazioni del promotore (Mangiarotti *et al*, 2009), di alterazioni dell'RNAP (Cellai *et al*, 2007) o della presenza di fattori trascrizionali che agiscono legando il DNA (Maurer *et al*, 2006). Finora nessun lavoro aveva però previsto l'utilizzo dell'AFM per lo studio degli effetti di modulatori della trascrizione agenti direttamente sull'RNAP; in questa tesi verranno presentati i risultati ottenuti dall'analisi di complessi di inizio della trascrizione in presenza dei due effettori della risposta stringente, ppGpp e DksA.



## **2. SCOPO DELLA RICERCA**



Da oltre un secolo e mezzo molti ricercatori hanno indirizzato i propri studi verso una sempre più approfondita conoscenza e comprensione dei meccanismi alla base dell'adattamento cellulare alle condizioni ambientali. Tale aspetto risulta infatti di primaria importanza per lo sviluppo dei microrganismi e per la loro capacità di sopravvivere in diverse condizioni ambientali, influenzando quindi indirettamente anche la loro virulenza. Dagli anni '60 è noto che l'adattamento all'ambiente da parte di numerose specie batteriche va ricondotto a meccanismi molecolari basati principalmente sulla sintesi di un alarbone, il ppGpp, in grado di modificare l'espressione genica a livello globale, attraverso l'attivazione di un processo noto come risposta stringente. Tuttavia, è solo grazie alla recente identificazione di un secondo effettore della risposta stringente, la proteina DksA, che sono state gettate le basi per la comprensione del loro meccanismo d'azione. Sebbene alcuni aspetti siano già stati chiariti, rimangono molti punti ancora da spiegare, soprattutto per quanto riguarda gli effetti strutturali indotti sui complessi di inizio della trascrizione a livello di diversi promotori, sui quali ppGpp e DksA possono avere effetti sinergici o antagonisti a seconda degli elementi che compongono la sequenza *upstream*.

Il presente lavoro di tesi si pone come obiettivo quello di caratterizzare le modificazioni conformazionali provocate dai modulatori della risposta stringente sui complessi di inizio della trascrizione batterica. L'utilizzo di un approccio basato sulla microscopia a forza atomica, il cui impiego permette di ottenere i parametri strutturali di complessi nucleoproteici attraverso un'analisi *in singulo* di frammenti di DNA che contengono l'intera sequenza del promotore ed estese sequenze fiancheggianti, rende possibile estrapolare numerose informazioni riguardanti le loro caratteristiche conformazionali. In particolare, l'analisi dei complessi di trascrizione, in assenza ed in presenza di ppGpp e DksA, ed il confronto della lunghezza dei frammenti di DNA liberi con quella dei frammenti legati dall'RNAP specificamente al promotore, possono fornire una serie di informazioni utili per la comprensione del meccanismo d'azione di questi modulatori.

In questo lavoro di tesi sono stati presi in considerazione tre promotori fortemente regolati dagli effettori della risposta stringente: due dei sette promotori per gli rRNA di *E. coli*, *rrnB* P1 e *rrnA* P1, ed il promotore fagico  $P_R$ , coinvolto nell'attivazione del ciclo litico. I promotori *rrn* sono regolati sinergicamente da ppGpp e DksA, che su di essi hanno un forte effetto inibitorio, sia *in vivo* che *in vitro*, come dimostrato da numerosi lavori indipendenti.  $P_R$  è invece il primo esempio di promotore su cui i due effettori hanno un effetto antagonista:

l'alarmone ne riduce fortemente l'espressione mentre la DksA ha su di esso un importante effetto attivatorio.

Il presente studio si auspica di contribuire alla definizione dei meccanismi molecolari alla base della regolazione genica durante la risposta stringente.

### **3. RISULTATI E DISCUSSIONI**

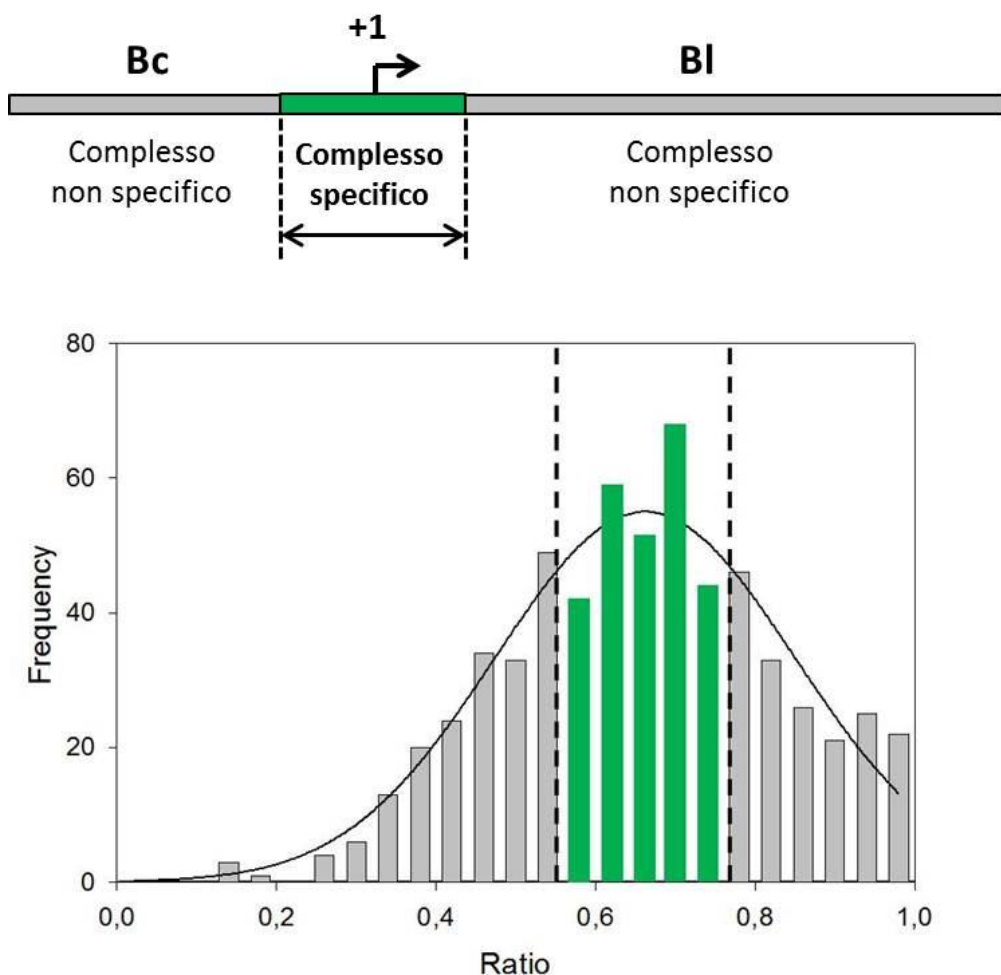


### 3.1. Strategia sperimentale

#### 3.1.1. Formazione dei complessi di inizio della trascrizione, deposizione sulla mica, visualizzazione ed analisi del DNA libero e legato dall'RNAP mediante AFM

Per caratterizzare gli effetti strutturali indotti da ppGpp e DksA sui complessi di inizio della trascrizione batterica utilizzando la microscopia a forza atomica, ad una soluzione contenente 20 nM di RNAP di *E. coli*, eventualmente preincubata con i modulatori della risposta stringente in combinazioni e concentrazioni differenti (descritte più avanti in questo capitolo), sono stati aggiunti frammenti di DNA contenenti lo specifico promotore da analizzare, in concentrazione equimolare ed in un buffer di trascrizione (per la cui composizione si rimanda al capitolo Materiali e Metodi), permettendo in questo modo la formazione dei complessi nucleoproteici. La scelta di preincubare l'enzima con i modulatori deriva dalle osservazioni riportate in letteratura secondo cui essi sarebbero in grado di legare l'RNAP libera con maggiore affinità rispetto all'enzima già associato al DNA (Lennon *et al*, 2009).

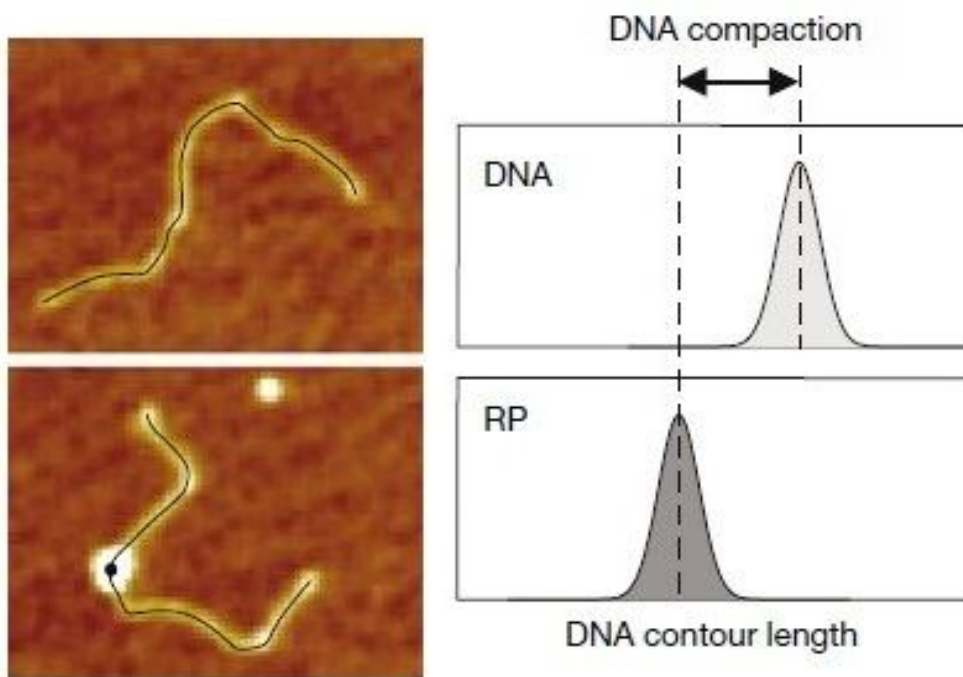
Dopo l'incubazione, la reazione di formazione dei complessi è stata diluita in un buffer di deposizione (per la cui composizione si rimanda al capitolo Materiali e Metodi) e depositata su mica appena sfogliata, procedendo quindi all'eliminazione delle molecole non legate alla superficie mediante risciacquo con acqua milliQ ed alla successiva asciugatura con un flusso di azoto. Per ogni esperimento sono state raccolte oltre 100 immagini di dimensioni pari a 2X2  $\mu\text{m}$ , dalle quali si è ricavata la misura della lunghezza di circa 1000 molecole di DNA, suddivise tra libere e legate dall'RNAP, utilizzando un software dedicato e secondo la procedura descritta in Materiali e Metodi. Un numero di molecole così elevato è richiesto per avere risultati statisticamente significativi e riproducibili. La registrazione della posizione dell'RNAP eventualmente legata lungo il frammento di DNA ha permesso, durante la successiva analisi dei risultati, di distinguere i complessi specifici da quelli non specifici: sono considerati specifici i complessi per i quali, calcolando il rapporto tra la lunghezza del braccio corto e quella del braccio lungo rispetto alla posizione dell'RNAP ( $B_c/B_l$ ), si ottiene un valore che rientra in un *range* ristretto rispetto al valore atteso, pari a  $\pm 0,12$  (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Strategia utilizzata per discriminare i complessi specifici da quelli non specifici: in alto è rappresentato un frammento di DNA contenente un promotore: in verde è evidenziata la regione legata dall'RNAP a dare un complesso specifico. L'istogramma rappresenta la distribuzione dei rapporti  $Bc/BI$  ottenuta in un esperimento di analisi dei complessi di inizio della trascrizione: le barre verdi indicano i complessi considerati specifici, quelle grigie indicano invece i complessi la cui posizione dell'RNAP permette di escluderne la specificità al promotore.

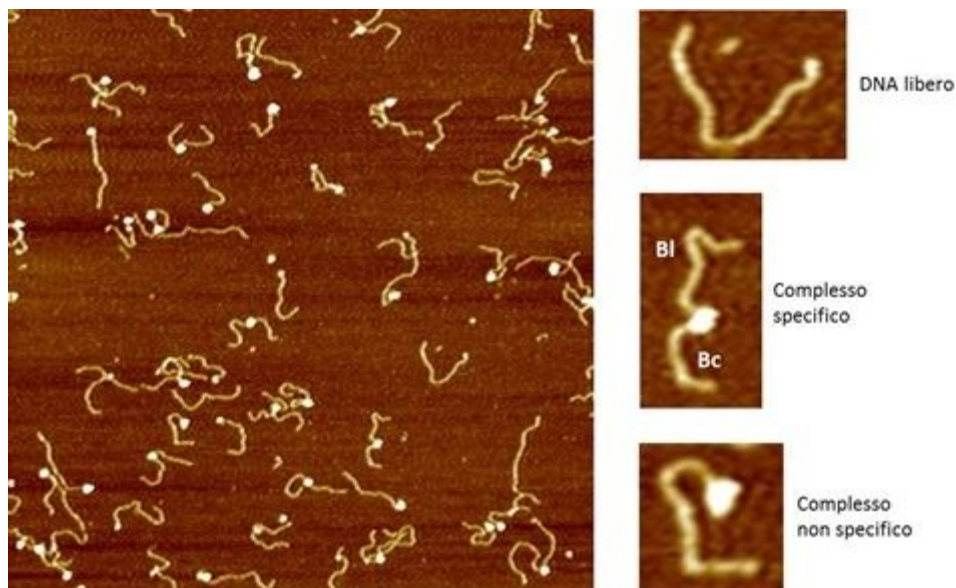
Le due serie di misure ricavate tracciando manualmente il profilo delle molecole di DNA libere e di quelle legate dall'RNAP specificamente al promotore sono state sottoposte ad analisi statistica così da ottenere per ciascuna di esse una distribuzione fittata con una funzione gaussiana (Figura 3.2). La differenza tra la lunghezza media delle molecole di DNA libere e di quelle legate specificamente al promotore rappresenta l'indice della compattazione del DNA, indotta dal legame dell'enzima al promotore. Se il valore della

compattazione risulta significativo, può essere considerato come un'indicazione dell'estensione delle interazioni tra l'enzima e la regione del promotore: ad una compattazione maggiore corrisponde una più estesa interazione enzima-promotore.



**Figura 3.2.** Dettagli di un'immagine AFM che mostrano il profilo tracciato per la misura della lunghezza (*contour length*) di una molecola di DNA libera (in alto a sinistra) e di una legata dall'RNAP specificamente al promotore (in basso a sinistra). Rappresentazione schematica della trattazione statistica delle due serie di misure realizzate: dal confronto dei valori medi delle due distribuzioni si ricava il valore di compattazione del DNA indotto dal legame dell'enzima (adattata da Cellai *et al*, 2007).

Per esigenze di tipo costruttivo, i diversi promotori analizzati in questo lavoro sono contenuti in frammenti aventi differenti dimensioni, comunque tutte vicine a 1000 bp. Tuttavia, ciò non costituisce un ostacolo alla procedura sperimentale in quanto il confronto tra la lunghezza delle molecole di DNA libere con quella del DNA legato dall'RNAP specificamente al promotore avviene nell'ambito delle stesse immagini raccolte per ciascun esperimento, come mostra la Figura 3.3. Questo permette di confrontare tra loro i risultati relativi all'accorciamento eventualmente indotto dall'enzima legato al DNA, ottenuti sui diversi promotori studiati.

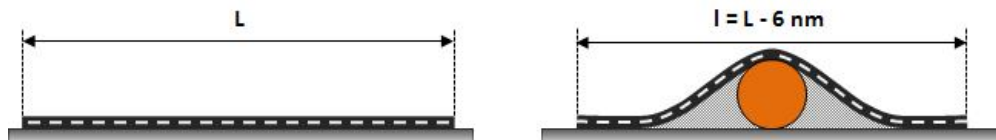


**Figura 3.3.** Immagine AFM ottenuta depositando una soluzione equimolare di RNAP e frammenti di DNA contenenti uno specifico promotore (sinistra). Sono mostrati nel dettaglio: una molecola di DNA libera, un complesso specifico al promotore ed un complesso non specifico.

Oltre alla lunghezza dei frammenti di DNA ed alla posizione dell'enzima, ogni esperimento ha previsto anche il conteggio di tutte le molecole presenti nelle immagini raccolte: il numero totale di molecole di DNA legate e non legate dall'RNAP è stato infatti confrontato con il numero di complessi specifici al promotore allo scopo di ottenere il valore di occupanza dello stesso, in questo lavoro definita come *promoter occupancy*. Essa risulta rappresentativa della reale situazione di occupanza dei promotori che si ottiene in soluzione durante la reazione di formazione dei complessi aperti, grazie al fatto che le molecole raggiungono la mica per semplice diffusione ed il legame al supporto è un processo irreversibile.

Rispetto alla misura del DNA libero, la cui principale difficoltà risiede nella corretta determinazione del primo e dell'ultimo pixel corrispondenti alle estremità della molecola, nel caso dei complessi nucleoproteici è necessario anche considerare che la porzione di DNA che si trova a contatto con la proteina, o nelle sue strette vicinanze, risulta nascosta dall'effetto di allargamento della punta; per la stima della lunghezza del DNA associato all'RNAP si è quindi deciso di tracciarne il profilo passando per il punto centrale dello *spot* corrispondente all'enzima (Figura 3.2, in basso a sinistra). Inoltre, nel caso in cui questo venisse a trovarsi al di sotto della molecola di DNA in seguito alla deposizione su mica, ne

provocherebbe un accorciamento intrinseco stimabile attorno ai 6 nm (Mangiarotti *et al*, 2009), come mostrato nella Figura 3.4.



**Figura 3.4.** Schematizzazione dell'effetto di accorciamento del DNA provocato dalla presenza di un oggetto di dimensioni paragonabili a quelle dell'RNAP- $\sigma^{70}$  al di sotto del frammento. L'effetto è stimato intorno ai 6 nm (dato estrapolato da Mangiarotti *et al*, 2009).

In una situazione paragonabile a quella reale è però lecito aspettarsi che solo una parte dei complessi possano disporsi ponendo la polimerasi tra il DNA e la mica; per tale motivo è stato possibile stimare un accorciamento medio del DNA dovuto a questo “effetto-deposizione” inferiore ai 4 nm. Di conseguenza, nell'analisi dei risultati ottenuti in questo lavoro, soltanto accorciamenti del DNA di entità superiore ai 4 nm sono considerati indicativi di un ripiegamento della sequenza del promotore attorno all'RNAP.

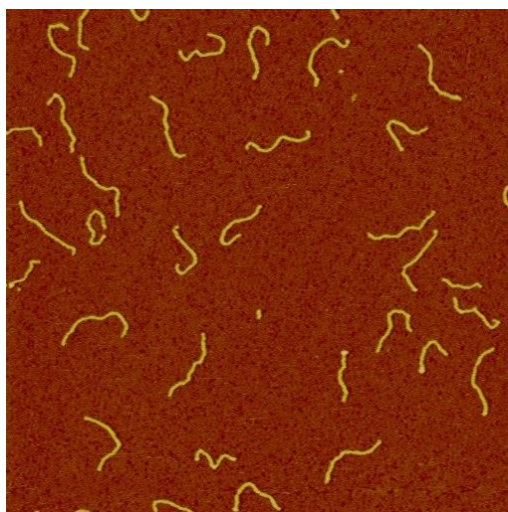
Un'ultima importante osservazione relativa alla misura della lunghezza del DNA depositato su mica nelle condizioni descritte riguarda il fatto che essa risulta più corta rispetto a quella calcolata considerando lo spazio occupato, secondo dati cristallografici, da ogni coppia di basi: sulla mica essa infatti non occupa 0,338 nm come indicato dalla struttura cristallografica del DNA, ma circa 0,33 nm; ciò può essere dovuto a diversi fattori, tra cui una parziale transizione del DNA dalla forma A alla forma B, indotta dalle particolari condizioni e modalità di deposizione delle molecole sulla superficie (Rivetti and Codeluppi, 2001). Tuttavia, dal momento che questo effetto coinvolge sia le molecole di DNA libere che quelle legate dall'RNAP, il valore assoluto riguardante l'eventuale accorciamento indotto dall'interazione con l'enzima non viene alterato.

### 3.1.2. Requisiti strutturali dei frammenti di DNA per l'analisi AFM

I frammenti di DNA contenenti i promotori studiati in questo lavoro sono stati costruiti rispettando precisi requisiti sperimentali: le loro dimensioni devono essere vicine a 1000 bp, in modo tale da risultare facilmente identificabili e misurabili in immagini di dimensioni pari a  $2 \times 2 \mu\text{m}$ , ma da ridurre allo stesso tempo il rischio di sovrapposizioni intra- ed intermolecolari durante la deposizione, che potrebbero interferire con la corretta stima

della lunghezza. I frammenti devono inoltre contenere solo il promotore di interesse, che deve essere circondato da sequenze eterologhe appartenenti al plasmide in cui esso è stato preventivamente clonato e prive di elementi riconoscibili dall'RNAP, così da evitare che la stessa possa legarsi in siti differenti dal promotore in studio. Le amplificazioni mediante PCR, necessarie per ottenere frammenti aventi le caratteristiche descritte, sono state progettate in modo tale che i promotori venissero a trovarsi in una posizione non perfettamente centrale dell'amplicone: tale organizzazione permette, oltre che di distinguere i complessi specifici al promotore da quelli in cui l'RNAP è legata al DNA in maniera aspecifica, anche di identificare il DNA *upstream* e quello *downstream* rispetto al sito di inizio della trascrizione.

Per ottenere un'elevata qualità delle preparazioni di DNA, necessaria per la loro visualizzazione mediante AFM e per la successiva analisi, i prodotti derivanti dall'amplificazione devono essere sottoposti ad una procedura di purificazione piuttosto lunga e selettiva che si avvale della tecnica dell'elettroeluzione, descritta in Materiali e Metodi. L'immagine 3.5 mostra il grado di purezza del DNA che deve essere raggiunto per una corretta analisi AFM.

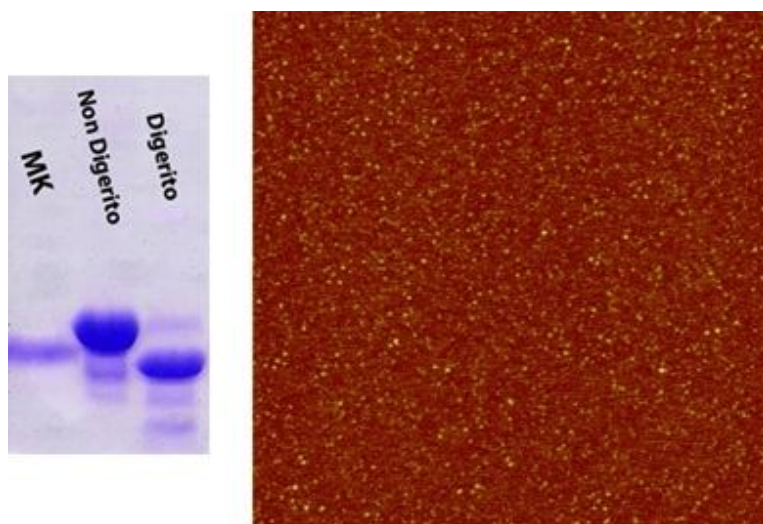


**Figura 3.5.** Immagine AFM ottenuta in seguito a deposizione di un frammento di DNA lungo 1004 bp.

### **3.1.3. Clonaggio, espressione e purificazione della proteina DksA di *E. coli***

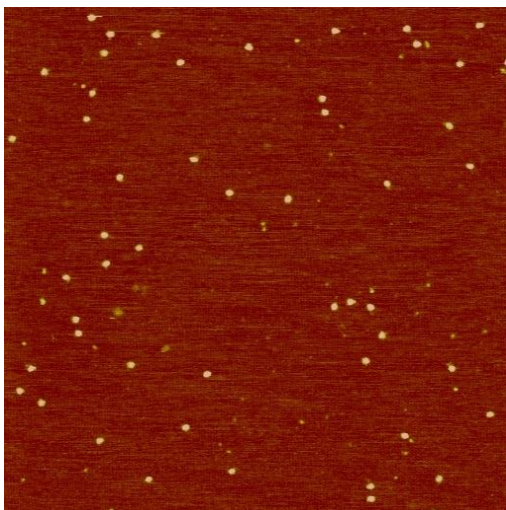
Il gene codificante per il fattore trascrizionale batterico DksA (~17,5 kDa) è stato isolato dal genoma di *E. coli* ceppo *XL1B* mediante PCR e clonato nel vettore di espressione pET28b in

modo tale che risultasse fuso alla sequenza codificante per il *tag* di istidine a livello dell'estremità N-terminale della proteina; *his-tag* e proteina sono separate da un *linker* contenente una sequenza aminoacidica riconosciuta dalla proteasi trombina, che permette la successiva rimozione della porzione eterologa. Le prove di induzione e di solubilità hanno mostrato che la proteina risultava presente nel surnatante, dal quale è stata purificata mediante due passaggi cromatografici successivi: una cromatografia per affinità al  $\text{Ni}^{2+}$ , cui è seguito il taglio dell'*his-tag* mediante digestione con trombina, ed una successiva purificazione attraverso cromatografia a scambio ionico. L'eliminazione dell'*his-tag* è servita ad evitare che una sequenza aminoacidica eterologa lunga 23 a.a. (*His*<sub>6</sub> + *linker*) potesse ridurre la capacità della DksA di agire modificando l'attività dell'RNAP, visto che ciò presuppone l'inserimento di una porzione del modulatore all'interno del canale secondario dell'enzima, piuttosto stretto e selettivo. Dopo l'eluizione dalla seconda colonna cromatografica la proteina è stata sottoposta a dialisi per l'eliminazione dell'eccesso di sali ed il successivo stoccaggio. Questo protocollo sperimentale ha dato una resa soddisfacente, pari a oltre 20 mg di proteina per litro di coltura cellulare; il grado di purezza è adatto ai nostri scopi, come si evince dall' SDS-PAGE e dall'immagine AFM riportata nella Figura 3.6.



**Figura 3.6.** Sinistra: SDS-PAGE che mostra la DksA prima (Non Digerito) e dopo (Digerito) la digestione con trombina. Destra: immagine AFM che mostra la preparazione di DksA ottenuta in seguito al secondo passaggio cromatografico: le dimensioni della proteina risultano omogenee e corrispondenti a quelle attese sulla base del suo peso molecolare (~17,5 kDa).

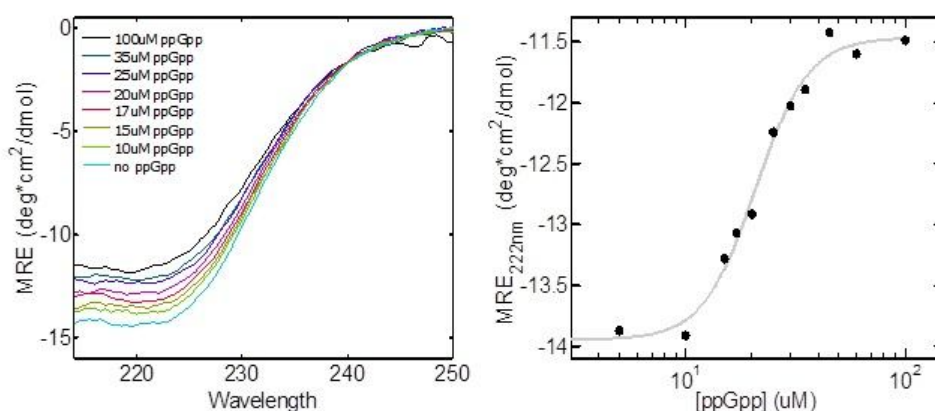
RNAP- $\sigma^{70}$  e ppGpp sono disponibili in commercio e sono stati quindi acquistati, anche al fine di avere preparazioni pure ed affidabili, capaci di garantire risultati riproducibili. La Figura 3.7 mostra un'immagine AFM della sola RNAP; il ppGpp non risulta invece visibile nelle condizioni riportate per DNA, DksA e RNAP a causa delle sue ridotte dimensioni.



**Figura 3.7.** Immagine AFM che mostra la deposizione delle preparazione commerciale di RNAP- $\sigma^{70}$ .

#### 3.1.4. Determinazione della costante di dissociazione ( $K_D$ ) del legame del ppGpp alla RNAP

In letteratura sono riportati valori non univoci della  $K_D$  del legame tra ppGpp e RNAP; allo scopo di ottenere un dato affidabile sono stati condotti esperimenti di dicroismo circolare su soluzioni di enzima incubato con concentrazioni crescenti di alarmonone, da 0 a 100  $\mu\text{M}$ . Come precedentemente riportato (Woody *et al*, 1987), analizzando gli spettri relativi a lunghezze d'onda comprese tra 210 e 250 nm, si osserva una riduzione della MRE (*Mean Residue Ellipticity*) all'aumentare della concentrazione del ppGpp, fino ad ottenerne un calo del 19,7% a 100  $\mu\text{M}$  di alarmonone. Dal *fitting* dei valori ottenuti alle diverse concentrazioni di modulatore a 222 nm con l'equazione di Hill si ottiene una  $K_D$  pari a  $20,8 \pm 2,3 \mu\text{M}$ . Oltre a fornire la costante di dissociazione del composto, la sensibile variazione dello spettro nel lontano UV causata dal ppGpp sottolinea che esso provoca una modificazione conformazionale significativa dell'RNAP. I risultati ottenuti mediante dicroismo circolare non sono però sufficienti a spiegare in dettaglio tale modificazione.



**Figura 3.8.** *Mean Residue Ellipticity* (MRE) dell’rNAP in presenza di concentrazioni crescenti di ppGpp (0 – 100  $\mu\text{M}$ ); come mostrato nella legenda, ad ogni colore corrisponde lo spettro ottenuto ad una determinata concentrazione di alarmona (sinistra); *Mean Residue Ellipticity* (MRE) dell’rNAP a 222 nm in presenza di concentrazioni crescenti di ppGpp (0 – 100  $\mu\text{M}$ ); il *fitting* dei dati con l’equazione di Hill fornisce un valore di  $K_D$  pari a  $20,8 \pm 2,3 \mu\text{M}$ .

Il valore della  $K_D$  del legame della DksA all’rNAP è stato ottenuto con diversi metodi da differenti gruppi di ricerca: in tutti i casi esso risulta prossimo a 100 nM (Lennon *et al*, 2009). Per i nostri esperimenti è stato preso in considerazione il dato medio riportato in lavori indipendenti, pari a 105 nM.

### 3.2. I promotori *rrn* di *E. coli*

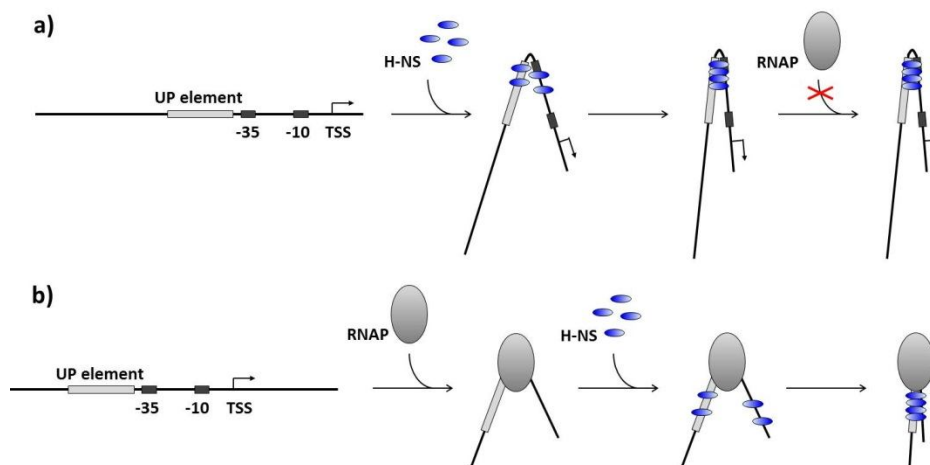
#### 3.2.1. Struttura e regolazione dei promotori *rrn*

La sintesi proteica rappresenta per la cellula il processo a più alto consumo energetico; poter ridurre rapidamente la produzione delle proteine in condizioni di carenza nutrizionale è quindi di vitale importanza per la sopravvivenza di ogni microrganismo. I batteri rispondono a stress ambientali di diverso tipo innanzitutto inibendo la produzione degli RNA stabili (rRNA e tRNA): ciò si traduce in una riduzione della biogenesi del ribosoma con conseguente risparmio di energia, che può quindi essere utilizzata per la risposta allo stimolo stressogeno (Zhang *et al*, 2002). Oltre 40 anni fa è stato dimostrato che la sintesi degli rRNA e dei tRNA in ceppi batterici *wild-type* è strettamente dipendente dalla presenza dei 20 aminoacidi all’interno della cellula; la mancanza anche di un solo aminoacido determina quella che è stata successivamente definita risposta stringente (Stent and Brenner, 1961). Essa inizia con l’occupazione del sito A dei ribosomi da parte di tRNA privi

del corrispondente aminoacido, situazione che induce lo stallo del ribosoma e la conseguente attivazione della proteina RelA, che a sua volta sintetizza grandi quantità dell'ormone ppGpp. Il legame del ppGpp all'RNAP porta all'inibizione della trascrizione dei geni per gli RNA stabili attraverso un meccanismo allosterico che prevede l'intervento sinergico della proteina DksA e che risulta strettamente dipendente dalla concentrazione del ribonucleotide iniziatore (iNTP) (Paul *et al*, 2004).

In *E. coli* i geni per gli rRNA (16S, 23S e 5S rRNA) sono organizzati in sette diverse unità trascrizionali costituite dagli operoni *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* e *rrnH* (Kolmsee *et al*, 2011). Ogni operone è controllato da due differenti promotori, posti in tandem e separati da circa 120 bp, P1 e P2. P1 è il promotore principale e risulta il più finemente regolato nelle diverse fasi di crescita del batterio, mentre P2 sembra svolgere un ruolo secondario ed è attivo soprattutto in fase di crescita stazionaria, quando la richiesta di RNA stabili è limitata (Murray *et al*, 2003).

L'attivazione dei promotori P1 dipende da fattori trascrizionali che agiscono secondo i classici meccanismi di regolazione dell'espressione genica: l'attivatore trascrizionale Fis recluta e stabilizza l'RNAP sul DNA (Hirvonen *et al*, 2001; Zhi *et al*, 2003), mentre il repressore H-NS impedisce il legame dell'RNAP al DNA, ma è anche in grado di bloccare l'enzima sulla sequenza promotrice mediante un interessante meccanismo di *trapping* (Dame *et al*, 2002).



**Figura 3.9.** Rappresentazione schematica dei meccanismi di repressione della trascrizione operati da H-NS sui promotori *rrn*: a) repressione per ingombro sterico *looping*-mediato; b) repressione mediata da un fenomeno di *trapping* dell'RNAP, che viene bloccata sul promotore (adattata da Dame *et al*, 2002).



attività sinergica e stimolatoria, come quelli che codificano per le proteine coinvolte nella sintesi e nel trasporto degli aminoacidi, ha consentito di chiarire i meccanismi alla base dei diversi effetti dei due modulatori su promotori differenti. La sequenza promotrice dei geni *up*-regolati possiede infatti un discriminatore ricco in A+T ed uno *spacer* di 18 bp che insieme rendono il complesso aperto molto stabile: la destabilizzazione operata dagli effettori della risposta stringente sembra contribuire, in questo contesto, ad un più rapido *promoter escape*, garantendo così un più facile ingresso nella fase di allungamento (Paul *et al*, 2005).

Questi studi sottolineano come i promotori che mostrano complessi aperti con emivita breve abbiano sacrificato la stabilità dello stesso allo scopo di poter rispondere efficientemente e rapidamente a variazioni dei livelli intracellulari dei modulatori trascrizionali che agiscono legando direttamente l'RNAP (Haugen *et al*, 2006).

### **3.2.2. Analisi AFM dei complessi di inizio della trascrizione e degli effetti di ppGpp e DksA sui promotori *rrnB* P1 e *rrnA* P1**

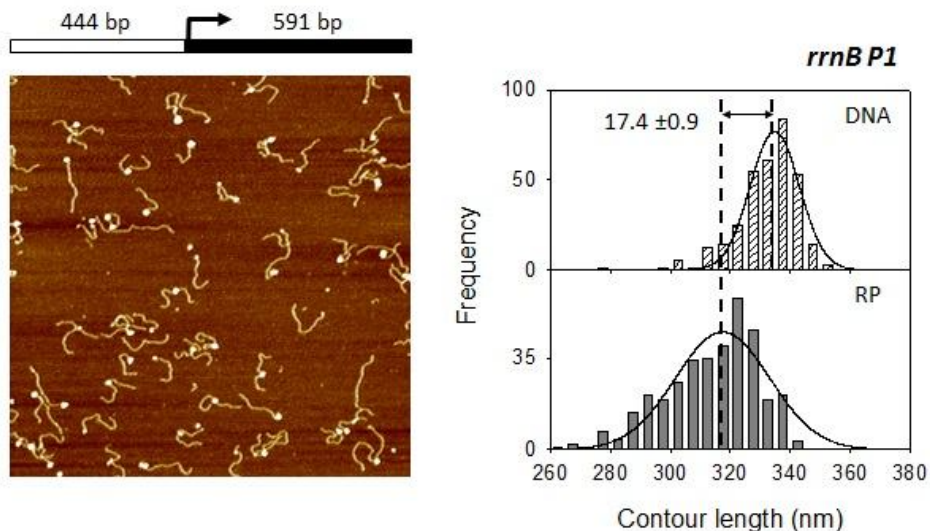
Di seguito verranno illustrati e poi discussi i dati ottenuti analizzando i complessi di inizio della trascrizione su *rrnB* P1 e gli effetti dei modulatori della risposta stringente su di essi. Verrà inoltre mostrato come l'analisi di un promotore avente la medesima sequenza nucleotidica, *rrnA* P1, abbia portato a risultati del tutto analoghi. Nel paragrafo successivo è proposto un modello del meccanismo d'azione di ppGpp e DksA su questi promotori, elaborato unendo le osservazioni ottenute con la microscopia a forza atomica alle informazioni presenti nella letteratura più recente.

#### **Durante la formazione di $RP_0$ su *rrnB* P1 e *rrnA* P1 l'RNAP induce una compattazione del DNA differente da quella osservata su altri promotori**

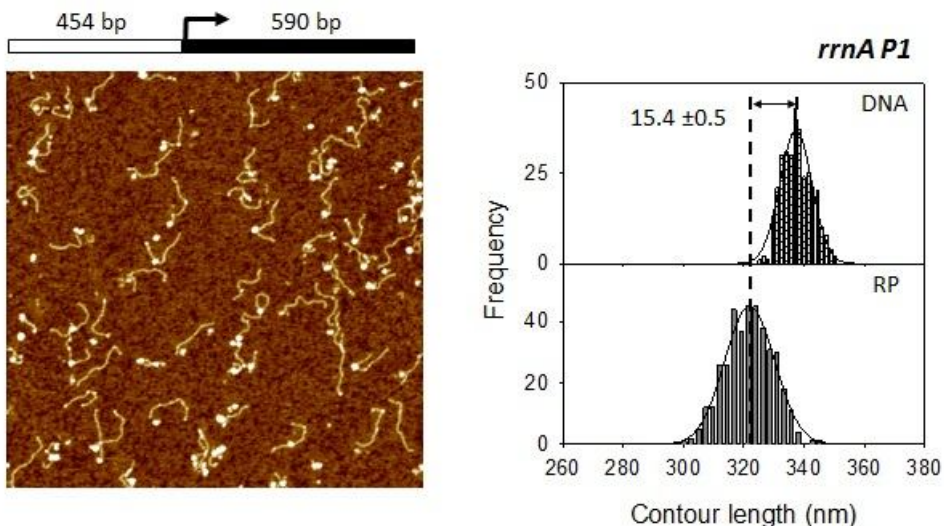
Allo scopo di studiare la struttura del complesso aperto sui promotori per gli rRNA si è proceduto all'incubazione per 30' a 37°C di una concentrazione equimolare, pari a 20 nM, di RNAP e di frammenti di DNA di 1035 bp, contenenti il promotore *rrnB* P1, in un buffer di trascrizione ed in presenza dei primi due ribonucleotidi dell'rRNA (1 mM ATP e 0,1 mM CTP), necessari per la formazione di un complesso aperto stabile (Paul *et al*, 2004). Il primo dato ottenuto dall'analisi delle 103 immagini raccolte riguarda la stima della *promoter occupancy*: il rapporto tra il numero di complessi specifici ed il numero totale di molecole di DNA, libere o legate in modo specifico e non specifico dall'RNAP, fornisce la percentuale di

promotori legati dall'enzima e, con buona approssimazione, può essere considerato una stima della loro affinità reciproca. Per *rrnB* P1 è stata ottenuta un'occupazione del promotore pari al 6,7%, confermata successivamente dal dato ottenuto sull'altro promotore per gli rRNA, *rrnA* P1, pari al 6,4%.

La successiva analisi della lunghezza di 329 molecole di DNA libere e di 627 complessi totali, dei quali 352 sono risultati essere specifici al promotore, avendo un rapporto  $Bc/Bl$  compreso nel *range* stabilito di  $\pm 0,12$  rispetto al valore atteso (0,75 in questo caso), ha evidenziato un accorciamento pari a  $17,4 \pm 0,9$  nm. In letteratura è riportato che il legame dell'RNAP al promotore *rrnB* P1 induce un accorciamento del DNA pari a circa 30 nm (Dame *et al*, 2002), del tutto simile a quello precedentemente osservato per i complessi aperti formati sul promotore  $P_R$  (Rivetti *et al*, 1999); tuttavia, il numero di complessi analizzati in tale lavoro (32) risulta piuttosto limitato. Il nostro risultato, che si discosta significativamente da quello pubblicato, è stato ottenuto analizzando un numero di complessi 10 volte superiore (352) ed è stato inoltre confermato in seguito dall'analisi degli  $RP_0$  formati sul promotore *rrnA* P1: su di esso l'accorciamento è risultato pari a  $15,4 \pm 0,5$  nm, valore del tutto simile a quello ottenuto su *rrnB* P1. Questi dati sono in accordo con osservazioni precedenti secondo le quali l'entità dell'accorciamento sarebbe strettamente dipendente dalle sequenze promotrici, con particolare riferimento a quelle presenti nella regione *upstream* (Cellai *et al*, 2007): la presenza di un solo elemento UP, situato tra la posizione -40 e la posizione -60 rispetto al sito di inizio della trascrizione dei promotori *rrnB* P1 e *rrnA* P1, determina un accorciamento del DNA maggiore di quello osservato per un promotore privo di tale elemento, come lacUV5 (4 nm), ma minore di quello misurato sul promotore fagico  $P_R$  (30 nm) per il quale, a monte della posizione -80, è stata identificata una sequenza ricca in A+T che può essere contattata dall'RNAP (Mangiarotti *et al*, 2009). Analizzando il valore del rapporto  $Bc/Bl$  ottenuto sia su *rrnB* P1 che su *rrnA* P1 è stato inoltre possibile osservare che esso risulta leggermente inferiore al valore atteso, a dimostrazione del fatto che la maggior parte dell'interazione tra enzima e DNA responsabile dell'accorciamento coinvolge la regione a monte rispetto al TSS.



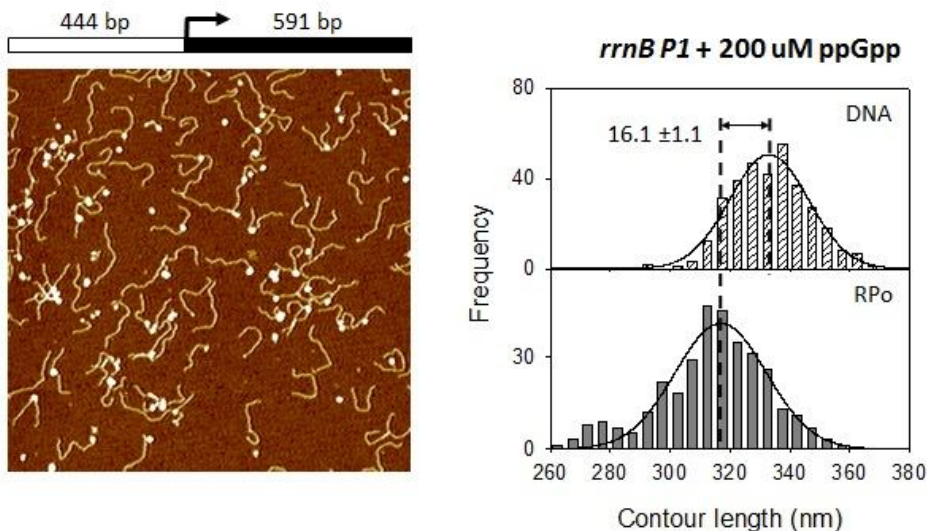
**Figura 3.11.** Rappresentazione schematica del frammento di DNA lungo 1035 bp, contenente il promotore *rrnB* P1 (del quale è mostrata la posizione del TSS) e immagine AFM rappresentativa dell'esperimento condotto con lo stesso, in presenza dell'RNAP, degli iNTPs ed in assenza di modulatori (sinistra). Distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP); è indicato il valore dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima al promotore completo di errore standard fra le due medie, pari a  $17,4 \pm 0,9$  nm (destra).



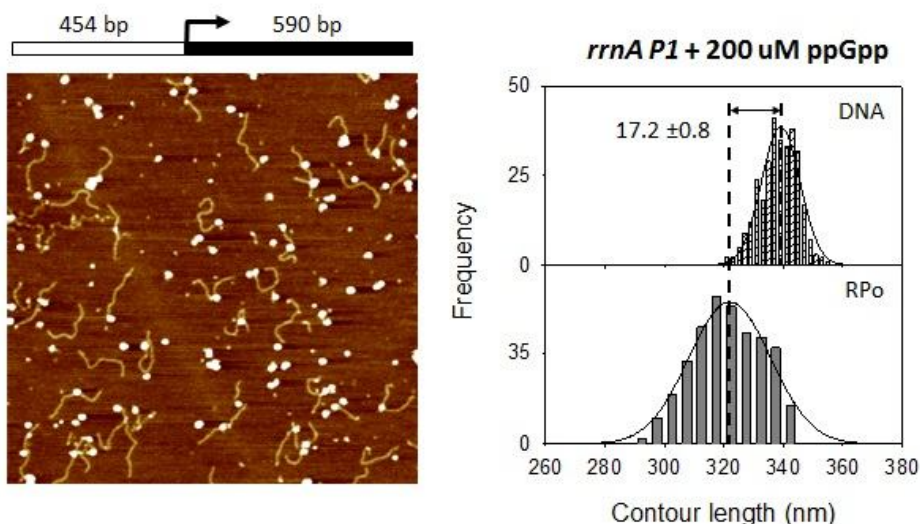
**Figura 3.12.** Rappresentazione schematica del frammento di DNA lungo 1044 bp, contenente il promotore *rrnA* P1 (del quale è mostrata la posizione del TSS) e immagine AFM rappresentativa dell'esperimento condotto con lo stesso, in presenza dell'RNAP, degli iNTPs ed in assenza di modulatori (sinistra). Distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP); è indicato il valore dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima al promotore completo di errore standard fra le due medie, pari a  $15,4 \pm 0,5$  nm (destra).

### Il ppGpp non modifica l'estensione dell'interazione tra RNAP e promotori per gli rRNA e riduce solo marginalmente la *promoter occupancy*

*In vivo*, l'aumento della concentrazione di ppGpp da  $\mu\text{M}$  a  $\text{mM}$  che si verifica in seguito all'attivazione della risposta stringente provoca una drastica riduzione della sintesi degli rRNA, mentre *in vitro*, in assenza di cofattori, l'alarmone non è in grado di ridurre sensibilmente l'attività trascrizionale dell'RNAP a partire dai promotori *rrn* (Perederina *et al.*, 2004). Per verificare gli effetti del ppGpp nei confronti dell'interazione tra enzima e promotori per gli rRNA si è proceduto ad una preincubazione dell'RNAP con concentrazioni saturanti di ppGpp, pari a  $200 \mu\text{M}$  ( $\sim 10$  volte la  $K_D$ ), aggiungendo in seguito il frammento contenente *rrnB* P1 (oppure quello contenente *rrnA* P1) insieme agli iNTPs. Dall'analisi delle 105 immagini AFM raccolte per il promotore *rrnB* P1 è stato possibile osservare che l'alarmone provoca una lieve riduzione della *promoter occupancy*, che scende al 6,1%; un dato simile è stato ottenuto calcolando la *promoter occupancy* su *rrnA* P1, che in queste condizioni è scesa al 5,1%. Il valore di accorciamento misurato su *rrnB* P1, pari a  $16,1 \pm 1,1$  nm, dimostra però che il ppGpp non determina alcun effetto nei confronti del *wrapping* del DNA. Questo risultato è stato confermato dai dati ottenuti su *rrnA* P1, sul quale l'entità dell'accorciamento indotto dall'enzima in presenza di ppGpp è risultato pari a  $17,2 \pm 0,8$  nm. I valori di accorciamento riscontrati in presenza dell'alarmone sono quindi del tutto paragonabili a quelli calcolati in sua assenza.



**Figura 3.13.** Rappresentazione schematica del frammento di DNA lungo 1035 bp, contenente il promotore *rrnB* P1 (del quale è mostrata la posizione del TSS) e immagine AFM rappresentativa dell'esperimento condotto con lo stesso, in presenza dell'RNAP, degli iNTPs e di ppGpp 200  $\mu$ M (sinistra). Distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP); è indicato il valore dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima al promotore completo di errore standard fra le due medie, pari a  $16,1 \pm 1,1$  nm (destra).

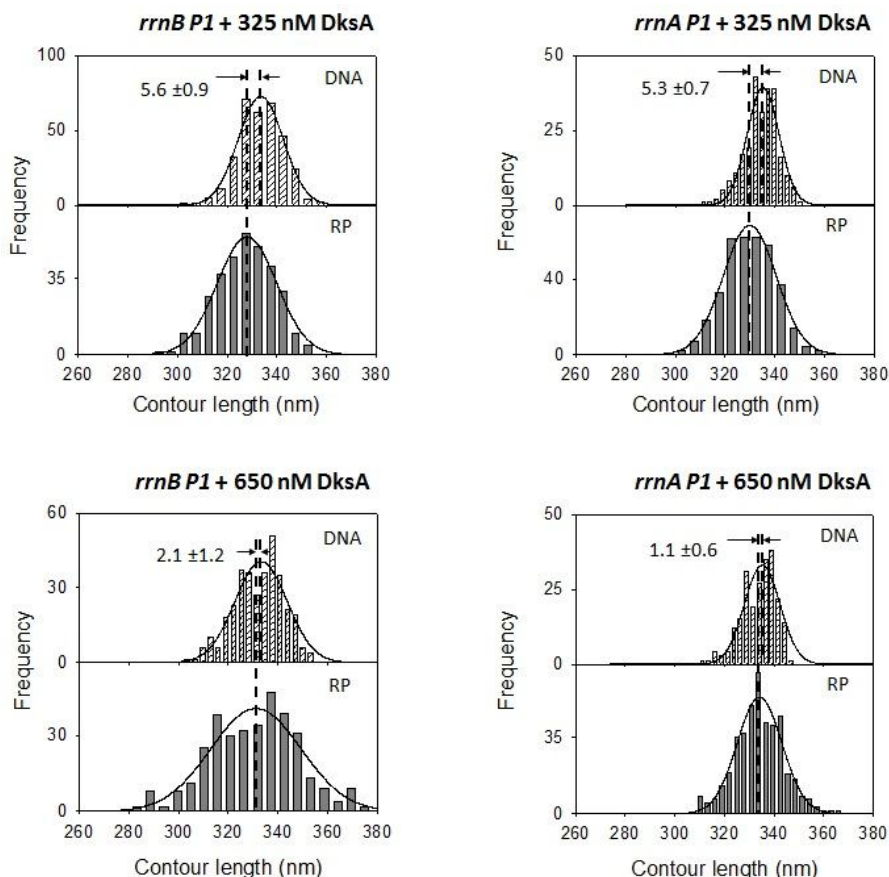


**Figura 3.14.** Rappresentazione schematica del frammento di DNA lungo 1044 bp, contenente il promotore *rrnA* P1 (del quale è mostrata la posizione del TSS) e immagine AFM rappresentativa dell'esperimento condotto con lo stesso, in presenza dell'RNAP, degli iNTPs e di ppGpp 200  $\mu$ M (sinistra). Distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP); è indicato il valore dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima al promotore completo di errore standard fra le due medie, pari a  $17,2 \pm 0,8$  nm (destra).

### La DksA riduce la *promoter occupancy* e interferisce con l'interazione tra RNAP e promotori *rrn*

Per investigare gli effetti della DksA sui complessi di inizio della trascrizione, concentrazioni crescenti di proteina, pari a 325 e 650 nM ( $\sim 3$  e 6 volte la sua  $K_D$ ), sono state preincubate con l'RNAP, procedendo in seguito all'aggiunta del DNA e degli iNTPs. In queste condizioni è stata osservata una riduzione dell'occupanza dei promotori da parte dell'enzima, che è risulta pari al 4,6% su *rrnB* P1 ed al 4,2% su *rrnA* P1; ciò dimostra che la DksA esercita un effetto negativo sulla capacità dell'RNAP di riconoscere e legare stabilmente i promotori per gli rRNA. Il dato più rilevante riguarda tuttavia il *wrapping*: in presenza di 325 nM DksA l'accorciamento del DNA a seguito della formazione dei complessi specifici su *rrnB* P1 scende a  $5,6 \pm 0,9$  nm e viene ulteriormente ridotto a  $2,1 \pm 1,2$  nm se la concentrazione di

DksA viene portata a 650 nM. Risultati molto simili sono stati ottenuti anche su *rrnA* P1. *In vitro* quindi la DksA, legando l'RNAP, provoca un significativo calo del *wrapping* sui promotori per gli rRNA, riducendo l'affinità dell'enzima nei confronti della loro sequenza.

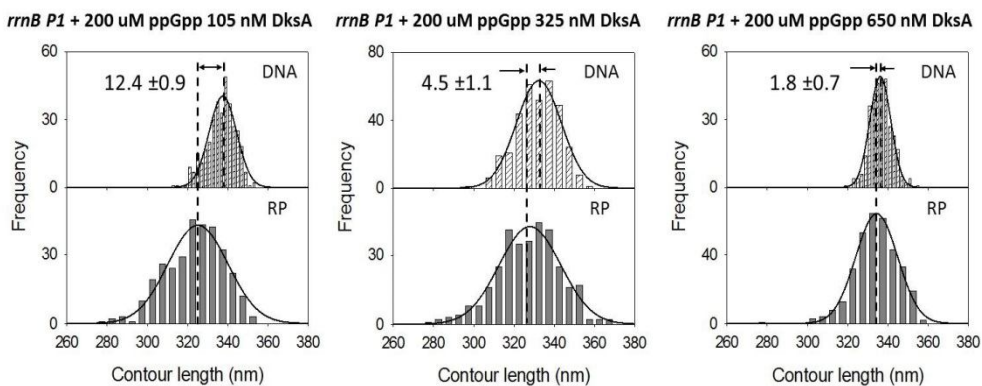


**Figura 3.15.** Sinistra: istogrammi della distribuzione delle lunghezze delle molecole di DNA libere (DNA) e legate dall'RNAP specificamente al promotore *rrnB* P1 (RP) ottenuti in presenza di DksA 325 nM (in alto) e 650 nM (in basso); sono riportati i valori di accorciamento indotti dal legame dell'enzima al promotore completi di errore standard fra le due medie, pari rispettivamente a  $5,6 \pm 0,9$  nm e  $2,1 \pm 1,2$  nm. Destra: istogrammi della distribuzione delle lunghezze delle molecole di DNA libere (DNA) e legate dall'RNAP specificamente al promotore *rrnA* P1 (RP) ottenuti in presenza di DksA 325 nM (in alto) e 650 nM (in basso); sono riportati i valori di accorciamento indotti dal legame dell'enzima al promotore completi di errore standard fra le due medie, pari rispettivamente a  $5,3 \pm 0,7$  nm e  $1,1 \pm 0,6$  nm.

### **Il ppGpp aumenta gli effetti negativi della DksA sulla *promoter occupancy*, ma non influenza ulteriormente il *wrapping* del DNA**

Numerose evidenze indicano che ppGpp e DksA agiscono sinergicamente come attivatori o repressori della trascrizione a seconda delle caratteristiche cinetiche del promotore

considerato (Paul *et al*, 2005; Lemke *et al*, 2011; Chandrangsu *et al*, 2011). In particolare, sui promotori *rrn* questi effettori riducono la stabilità del complesso aperto, inibendo fortemente l'espressione degli rRNA in risposta a diverse condizioni di stress (Paul *et al*, 2004). Per capire se l'alarmone, di concerto con la DksA, è in grado di ridurre l'affinità tra RNAP e promotore e l'estensione della loro interazione, l'enzima è stato preincubato con concentrazioni crescenti di modulatore proteico (325 e 650 nM) in presenza di una concentrazione saturante di ppGpp (200  $\mu$ M); in seguito all'interazione tra modulatori trascrizionali e RNAP si è proceduto all'aggiunta del frammento di DNA contenente il promotore *rrnB* P1 e degli iNTPs. Dai dati raccolti è emerso che la *promoter occupancy* risente della presenza di entrambi gli effettori, scendendo dal valore di 4,6% osservato in presenza della sola DksA, al 3,5% calcolato con l'aggiunta del ppGpp. Al contrario il *wrapping* non si mostra sensibile alla presenza dell'alarmone, neanche in presenza di una concentrazione di DksA non saturante, pari alla sua  $K_D$  (105 nM); in questa situazione infatti l'accorciamento indotto dall'RNAP ha fornito un valore intermedio rispetto a quelli osservati senza proteina e con 325 nM della stessa, mentre l'accorciamento in presenza di 325 nM e 650 nM DksA insieme al ppGpp è molto simile a quello ottenuto con le stesse concentrazioni di proteina, ma in assenza dell'alarmone.

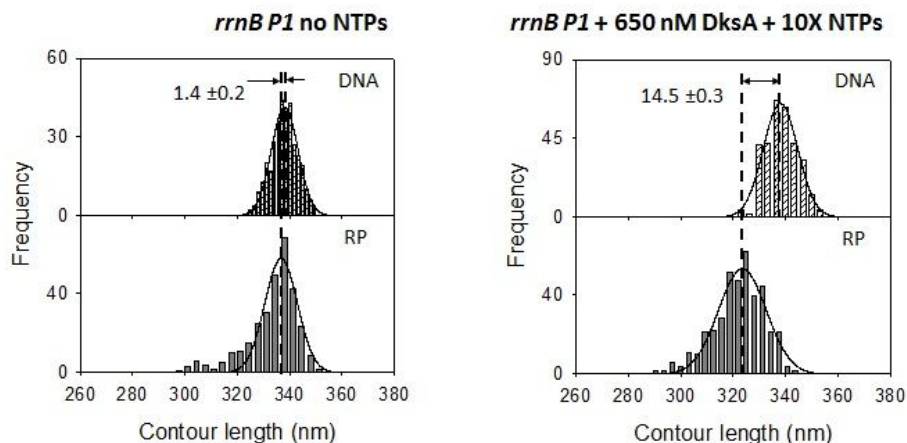


**Figura 3.16.** Istogrammi della distribuzione delle lunghezze delle molecole di DNA libere (DNA) e legate dall'RNAP specificamente al promotore *rrnB* P1 (RP) ottenuti in presenza di ppGpp 200  $\mu$ M e DksA 105 nM (sinistra), 325 nM (centro) e 650 nM (destra); sono riportati i valori di accorciamento indotti dal legame dell'enzima al promotore completi di errore standard fra le due medie, pari rispettivamente a 12,4  $\pm$  0,9 nm, 4,5  $\pm$  1,1 nm e 1,8  $\pm$  0,7.

### **Il *wrapping* dipende dalla presenza dei nucleotidi e gli stessi attenuano gli effetti negativi della DksA**

Partendo dalle numerose indicazioni circa la necessità dell'introduzione degli iNTPs nel sito attivo dell'RNAP per la stabilizzazione di  $RP_O$  sui promotori *rrn* (Gaal *et al*, 1997), è stato allestito un esperimento in cui RNAP e DNA sono stati incubati per 30' a 37°C in assenza di ATP e CTP. L'analisi delle immagini AFM ha evidenziato una drastica riduzione sia della *promoter occupancy*, che in queste condizioni raggiunge il 2,8%, che del *wrapping*, sceso a  $1,4 \pm 0,2$  nm. Questi risultati sottolineano l'importanza dei nucleotidi nella formazione del complesso aperto e nella estesa interazione tra RNAP e sequenze del promotore, due aspetti tra loro correlati: l'avvolgimento della regione *upstream* del promotore attorno all'enzima può favorire la denaturazione a livello del sito di inizio della trascrizione, permettendo l'isomerizzazione da  $RP_C$  a  $RP_O$ . L'occupanza del promotore risulta diminuita probabilmente a causa dello spostamento dell'equilibrio da  $RP_O$  a  $RP_C$  e della conseguente dissociazione dell'enzima dal DNA provocata dall'assenza dei nucleotidi.

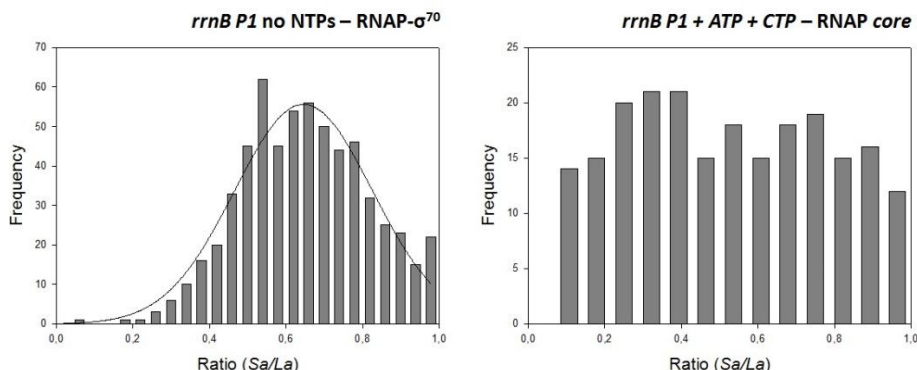
I risultati ottenuti in assenza di iNTPs sono molto simili a quelli riscontrati preincubando l'RNAP con concentrazioni saturanti di DksA, pari a 650 nM; alla luce di ciò e considerando che la DksA lega l'RNAP inserendo il suo dominio *coiled-coil* nel canale secondario ed interagendo con il  $Mg^{2+}$  catalitico, abbiamo formulato un'ipotesi circa un possibile effetto negativo della proteina nei confronti della capacità dei nucleotidi di stabilizzare il complesso aperto. Per investigare questa ipotesi l'RNAP è stata preincubata con 650 nM DksA prima dell'aggiunta del frammento contenente *rrnB* P1 e di una concentrazione di ATP e CTP dieci volte superiore a quella utilizzata negli esperimenti precedenti, pari rispettivamente a 10 ed 1 mM. In questa situazione gli effetti negativi della DksA vengono annullati: la *promoter occupancy* torna ai livelli simili ai più elevati riscontrati su questi promotori, vicini al 6,5%. Allo stesso modo il *wrapping* mostra un valore pari a  $14,5 \pm 0,3$  nm, del tutto analogo a quello ottenuto in assenza di modulatori e con la concentrazione di iNTPs utilizzata in tutti gli altri esperimenti condotti sui promotori per gli rRNA (1 mM ATP e 0,1 mM CTP). Questi dati sembrano quindi confermare il nostro modello circa il possibile meccanismo d'azione della DksA.



**Figura 3.17.** Istogrammi della distribuzione delle lunghezze delle molecole di DNA libere (DNA) e legate dall'RNAP specificamente al promotore *rrnB P1* (RP) ottenuti in assenza di modulatori e iNTPs (sinistra) ed in presenza di DksA 650 nM e di ATP 10 mM e CTP 1 mM (10X rispetto agli esperimenti fin qui descritti) (destra); sono riportati i valori di accorciamento indotti dal legame dell'enzima al promotore completi di errore standard fra le due medie, pari rispettivamente a  $1,4 \pm 0,2$  nm e  $14,5 \pm 0,3$ .

Un dato interessante emerso dall'esperimento condotto in assenza di nucleotidi e di modulatori riguarda il valore del rapporto  $B_c/B_l$ : contrariamente a quanto osservato in tutte le altre situazioni, esso è risultato sensibilmente inferiore all'atteso (0,65 anziché 0,75), indicando che l'enzima è legato preferibilmente all'elemento UP piuttosto che agli elementi centrali del promotore. Un risultato di questo tipo potrebbe indicare una minore affinità della subunità  $\sigma$  per gli elementi -10 e -35 in assenza di NTPs ed una conseguente maggiore influenza dell'interazione tra  $\alpha$ -CTDs ed elemento UP sulla formazione del complesso tra RNAP e DNA. Ulteriori indagini risultano necessarie per l'approfondimento di questa inattesa osservazione. In ogni caso, per valutare se essa potesse essere dovuta alla dissociazione della subunità  $\sigma$  dal core dell'RNAP, abbiamo incubato l'apoenzima con il frammento DNA contenente lo specifico promotore: in queste condizioni l'RNAP core lega il DNA in modo sequenza aspecifico (come mostrato dall'istogramma della distribuzione dei rapporti in Figura 3.18) e non si osserva nessun effetto di accorciamento del DNA indotto dal legame dell'enzima, a conferma della necessità della subunità  $\sigma$  per il riconoscimento del promotore. Questa osservazione sembra indicare che l'assenza di nucleotidi non provoca la dissociazione di questa subunità dall'RNAP, almeno nelle condizioni da noi utilizzate; è però importante sottolineare che la soluzione di enzima utilizzata nei nostri esperimenti presenta una concentrazione di subunità  $\sigma$  saturante: è evidente che questo

aspetto può impedire l'osservazione di un'eventuale riduzione dell'affinità tra questa ed il core dell'RNAP.

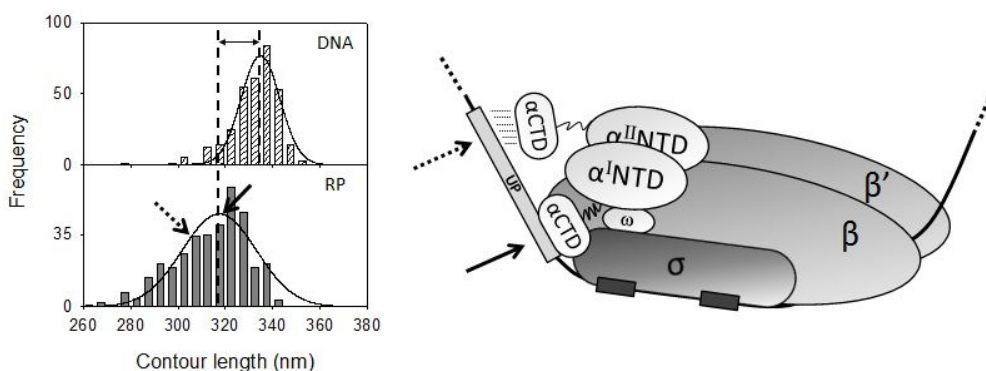


**Figura 3.18.** Istogrammi della distribuzione dei valori ottenuti calcolando il rapporto tra braccio corto e braccio lungo (indicati negli istogrammi come *Short arm* e *Long arm*, *Sa/La*) su frammenti di DNA contenenti il promotore *rrnB* P1 incubati con l'RNAP- $\sigma^{70}$  in assenza di NTPs (sinistra) e l'RNAP-core in presenza di ATP e CTP (destra). Il valore atteso sulla base della posizione del TSS è pari a 0,75.

### 3.2.3. Le analisi AFM evidenziano nuovi dettagli circa il meccanismo d'azione di ppGpp e DksA sui promotori per gli rRNA di *E. coli*

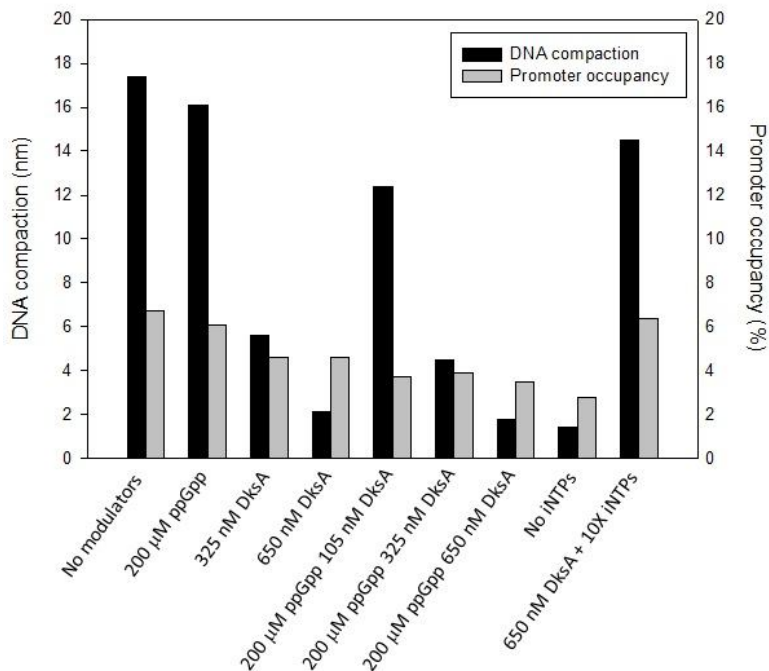
Il primo importante risultato ottenuto dall'analisi dei complessi di inizio della trascrizione sui promotori per gli rRNA è relativo alla determinazione dell'estensione della regione di DNA interagente con l'RNAP; nelle condizioni utilizzate, ovvero a 37°C ed in presenza dei primi due nucleotidi dell'RNA che deve essere sintetizzato, i complessi si trovano nella conformazione aperta con il DNA denaturato attorno al sito di inizio della trascrizione (Gourse, 1988). L'accorciamento delle molecole di DNA legate dall'RNAP rispetto a quelle libere, pari ad oltre 15 nm sia per *rrnB* P1 che per *rrnA* P1, è in parziale disaccordo con quanto precedentemente riportato (Dame *et al*, 2002), ma è stato osservato misurando la lunghezza di un numero statisticamente più significativo di complessi ed è coerente con la struttura di questi promotori: la presenza di un elemento UP tra le posizioni -40 e -60 (Ross *et al*, 2001) e l'interazione tra le subunità  $\beta$  e  $\beta'$  dell'RNAP ed il DNA a valle del TSS, fino alla posizione +12/+15 (Rutherford *et al*, 2009), possono giustificare un *wrapping* di questa estensione. Considerando l'elemento UP infatti, solo la sequenza prossimale (dalla posizione -40 alla -46) viene generalmente legata con maggiore affinità dal dominio C-terminale di una delle due subunità  $\alpha$  dell'RNAP grazie alla minore tensione conformazionale che questa interazione richiede rispetto al legame con la sequenza distale

(Estrem *et al*, 1999). Inoltre, la rigidità intrinseca di una porzione di DNA ricca in sequenze poli-T e poli-A, come quella presente nell'elemento UP dei promotori *rrn*, potrebbe sfavorirne il ripiegamento (Crothers *et al*, 1990) contrastando il conseguente avvicinamento della porzione distale dell'elemento UP ad uno degli  $\alpha$ -CTD, a seguito del legame dell'altro con la porzione prossimale. L'interazione dell'RNAP con la porzione distale risulta quindi sfavorita rispetto a quella con la porzione prossimale ed è dunque plausibile che l'adsorbimento sulla mica possa in qualche modo interferire con il suo mantenimento. I valori di accorciamento leggermente differenti riscontrati su *rrnB* P1 e *rrnA* P1 (rispettivamente  $17,4 \pm 0,9$  e  $15,4 \pm 0,5$  nm) potrebbero essere dovuti alla natura transiente dell'interazione tra il secondo  $\alpha$ -CTD e la sequenza distale dell'elemento UP: è possibile ipotizzare che durante la deposizione sulla mica alcuni complessi vengano fissati in una situazione di più estesa interazione rispetto ad altri e che la distribuzione di tali complessi sulla superficie possa essere del tutto casuale; il maggior numero di dati presenti nella regione di sinistra della distribuzione delle lunghezze misurate per i complessi su *rrnB* P1 (Figura 3.19, sinistra) potrebbe confermare questa ipotesi, mettendo in evidenza una sottopopolazione di molecole legate all'RNAP anche a livello della porzione distale dell'elemento UP e presentanti quindi un valore di accorciamento maggiore rispetto a quello medio.



**Figura 3.19.** Istogrammi della distribuzione delle lunghezze del DNA libero (DNA) e legato dall'RNAP specificamente al promotore *rrnB* P1 (RP) ottenuti in assenza di modulatori (sinistra). Rappresentazione dell'RNAP- $\sigma^{70}$  legata al promotore *rrnB* P1 nel complesso aperto (destra). La figura spiega l'ipotesi secondo cui l'accorciamento di circa 16 nm indotto dall'RNAP è dovuto alla forte interazione tra uno degli  $\alpha$ -CTDs dell'enzima e la porzione prossimale dell'elemento UP del promotore (freccia a riga continua), mentre la più debole e transiente interazione tra l'altro  $\alpha$ -CTDs e la porzione distale dell'elemento UP, dovuta alla rigidità intrinseca di questo, potrebbe giustificare una sottopopolazione di complessi mostranti un maggiore accorciamento (freccia a riga tratteggiata).

Dopo aver stabilito l'entità dell'interazione tra RNAP e DNA, abbiamo analizzato la *promoter occupancy* ed il *wrapping* relativi ai complessi di inizio della trascrizione sul promotore *rrnB* P1 in presenza di ppGpp e DksA (mostrati nell'istogramma in Figura 3.20), confermando poi i risultati attraverso l'analisi di *rrnA* P1. Partendo dalle nostre osservazioni abbiamo quindi cercato di elaborare un modello relativo al meccanismo d'azione dei modulatori della risposta stringente che fosse in grado di spiegare il loro effetto inibitorio sull'inizio del processo trascrizionale, già osservato in numerosi studi sia *in vivo* che *in vitro*, ma ancora non del tutto caratterizzato, soprattutto per quanto riguarda gli aspetti strutturali.

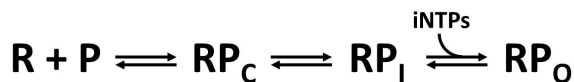


**Figura 3.20.** Iistogramma riassuntivo dei risultati ottenuti nei diversi esperimenti condotti sul promotore *rrnB* P1 relativamente alla compattazione del DNA (barre nere) e alla *promoter occupancy* (barre grigie). Gli stessi risultati sono raccolti nella Tabella 1 dell'Allegato.

Il *rate-limiting step* dell'inizio della trascrizione degli rRNA in *E. coli* è rappresentato dall'isomerizzazione attraverso la quale l'RNAP, legata al promotore, denatura una porzione di DNA attorno al TSS permettendo l'appaiamento dei nucleotidi complementari alle prime posizioni del DNA stampo; la formazione della bolla di trascrizione può essere favorita dall'avvolgimento sinistrorso del DNA attorno all'enzima, e ciò pone quindi in evidenza

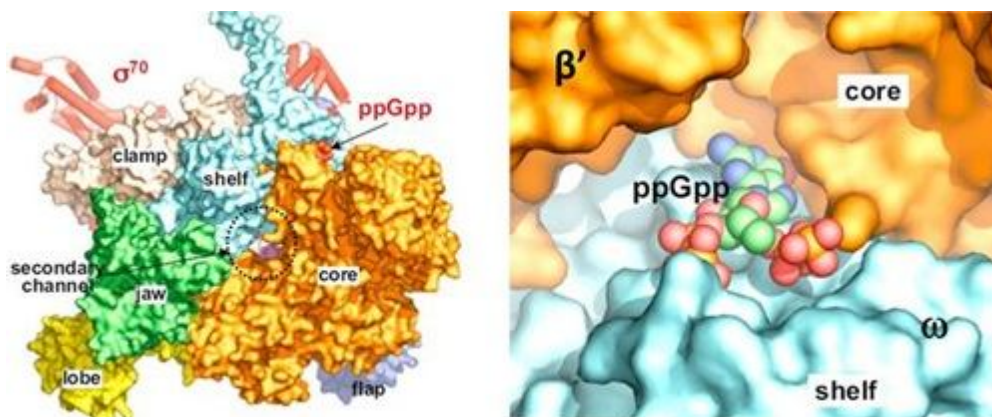
l'importanza del *wrapping* nel processo di inizio della trascrizione. Una volta formatosi, l' $RP_0$  può rapidamente evolvere verso il complesso di allungamento che catalizza la sintesi dell'intero trascritto. Il discriminatore ricco in G+C dei promotori *rrn* e l'interazione non ottimale dello stesso con la porzione 1.2 di  $\sigma$ , uniti ad uno *spacer* di sole 16 bp, fanno sì che il complesso aperto che si forma su di essi sia instabile (Haugen *et al*, 2006). In condizioni favorevoli alla crescita ed alla proliferazione, l'elevata disponibilità di nucleotidi ha però un effetto stabilizzante tale da permettere un efficiente *promoter escape*, grazie anche al fatto che sui promotori per gli rRNA questa fase risulta molto rapida e non richiede la sintesi di corti trascritti abortivi (Gries *et al*, 2010). La presenza di un elemento UP contribuisce inoltre al legame dell'RNAP al promotore, favorendo gli elevati livelli di trascrizione riscontrabili durante la fase di crescita esponenziale (Ross *et al*, 2001). In questa situazione i livelli intracellulari di ppGpp sono bassi e la DksA, seppure presente nella cellula in concentrazioni costanti, non sembra determinare effetti inibitori; anche questo aspetto è probabilmente dovuto all'elevata disponibilità di NTPs capaci di diffondere verso il sito attivo dell'RNAP.

In condizioni ambientali sfavorevoli viene attivata la risposta stringente che si manifesta con un rapido aumento della concentrazione di ppGpp ed un generale cambiamento del profilo di espressione genica: si osserva l'inibizione della trascrizione dei geni coinvolti nella proliferazione cellulare, in particolare i geni associati alla sintesi proteica come quelli codificanti per gli RNA stabili, mentre viene attivata la trascrizione dei geni i cui prodotti risultano necessari per rispondere allo stimolo stressogeno, come i geni per la biosintesi ed il trasporto degli aminoacidi (Durfee *et al*, 2008). L'effetto principale di questa riorganizzazione trascrizionale è la riduzione della biogenesi dei ribosomi, causata dal blocco della sintesi degli rRNA. Per comprendere i meccanismi molecolari alla base di una così drastica inibizione dell'espressione dei geni controllati dai promotori *rrn*, che si esplica negli stadi iniziali del processo trascrizionale, è necessario considerare gli step chiave della formazione del complesso aperto. Come schematizzato nella Figura 3.21, è possibile distinguere almeno un intermedio nel processo di formazione di  $RP_0$  a partire da RNAP (R) e promotore (P), chiamato  $RP_i$ ; numerosi gruppi di ricerca hanno concentrato i loro sforzi nell'individuazione degli step di questo processo maggiormente influenzati dai modulatori della risposta stringente.



**Figura 3.21.** Step cinetici della formazione del complesso aperto sui promotori *rrn*.

La recente determinazione della struttura cristallografica dell'RNAP- $\sigma^{70}$  di *E. coli* legata al ppGpp ha fornito un importante contributo, mostrando che esso si posiziona, contrariamente a quanto ipotizzato in precedenza sulla base delle informazioni derivanti dal co-cristallo con l'RNAP di *T. thermophilus* (Artsimovitch *et al*, 2004), lontano dal sito attivo di circa 28 Å, in una tasca idrofila situata sulla superficie esterna dell'enzima, all'interfaccia tra *core module* e *shelf module* (Zuo *et al*, 2013); la base azotata del modulatore interagisce principalmente con la subunità  $\beta'$  (modulo *core*) mentre i due gruppi pirofosfato interagiscono con la subunità  $\omega$  (modulo *shelf*).



**Figura 3.22.** Sinistra: struttura cristallografica dell'RNAP- $\sigma^{70}$  nella quale è indicato il sito di legame del ppGpp. Destra: ppGpp alloggiato nella tasca idrofila posta sulla superficie esterna dell'enzima, all'interfaccia tra *core module* e *shelf module* (adattata da Zuo *et al*, 2013).

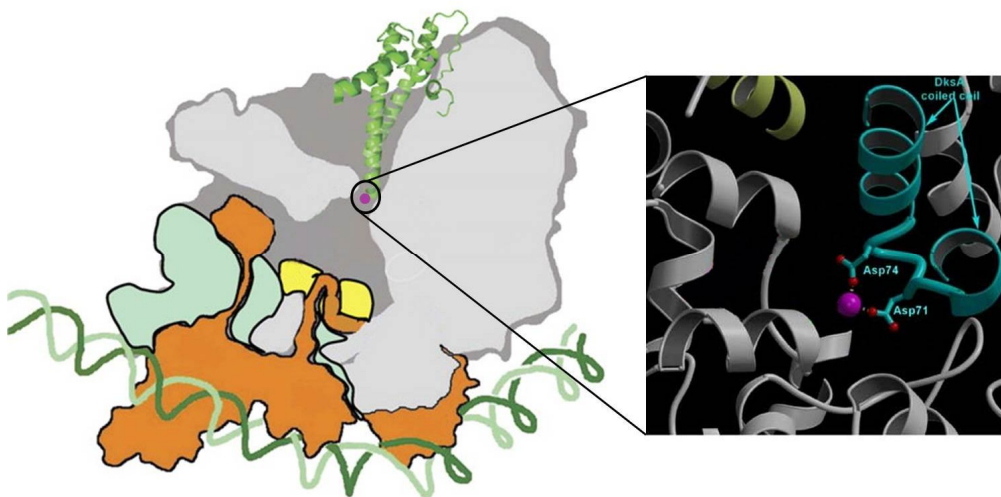
Questa caratteristica modalità di legame dell'alarmone all'RNAP può spiegarne l'attività destabilizzante sul complesso aperto solo considerando un meccanismo di tipo allosterico che agisca influenzando i cambiamenti conformazionali che avvengono durante l'isomerizzazione: la struttura a chela di granchio dell'RNAP permette dei movimenti, definiti di *ratchening*, che portano al progressivo avvicinamento delle subunità  $\beta$  e  $\beta'$  durante la formazione del complesso aperto; questo movimento è associato a modificazioni

conformazionali che coinvolgono la cosiddetta *switch region* alla base della chela, costituita da *core* e *shelf modules*; in questo modo l'enzima può stringere parte della sua struttura attorno alle porzioni di DNA a valle rispetto al sito di inizio della trascrizione, stabilizzando il complesso nel quale il DNA, attorno al TSS, risulta denaturato a formare la bolla di trascrizione (Chakraborty *et al*, 2012). Il ppGpp, inserendosi in una cavità alla base della chela, potrebbe impedire il libero movimento relativo tra il modulo *core* ed il modulo *shelf*, sfavorendo pertanto la chiusura della chela e la conseguente denaturazione della doppia elica e riducendo in questo modo la stabilità del complesso aperto; un analogo meccanismo d'azione è alla base dell'attività di alcune molecole inibitorie utilizzate come antimicrobici (Mukhopadhyay *et al*, 2008). La presenza dei nucleotidi, capaci di stabilizzare  $RP_o$ , riduce l'effetto del modulatore fino ad annullarlo se questo viene aggiunto in un sistema *in vitro* altamente purificato, in assenza di cofattori (Zuo *et al*, 2013; Ross *et al*, 2013). In linea con quest'ultima osservazione, l'analisi AFM dei complessi di inizio della trascrizione su *rrnB* P1 e *rrnA* P1 indica che il ppGpp, in presenza di ATP e CTP, non è in grado di ridurre significativamente l'affinità tra RNAP e promotore e di modificare il *wrapping* del DNA attorno all'enzima; è lecito quindi affermare che in presenza di concentrazioni saturanti di ppGpp e iNTPs i complessi aperti non vengono alterati dall'allarme.

Concentrazioni saturanti della sola DksA provocano, anche in presenza dei nucleotidi iniziatori, una drastica riduzione dell'estensione dell'interazione tra RNAP e DNA; inoltre essa riduce la capacità dell'enzima di legare il promotore, come evidenziato dalla contestuale riduzione della *promoter occupancy*. Questi due effetti possono essere l'uno causa dell'altro, visto che una ridotta superficie di contatto può determinare la formazione di un minor numero di complessi come conseguenza di una minore affinità tra enzima e sequenze del promotore. E' plausibile ipotizzare inoltre che la perdita del *wrapping* indotta dal legame della DksA all'RNAP, determinando l'annullamento del superavvolgimento che questa conformazione normalmente comporta, possa ridurre il suo contributo energetico alla denaturazione del DNA attorno al TSS, già intrinsecamente sfavorita dal lungo discriminatore ricco in G+C. Anche se non disponiamo di ulteriori evidenze sperimentali, possiamo supporre che la DksA, in queste condizioni, impedisca l'isomerizzazione verso il complesso aperto e che quindi i complessi al promotore osservati nelle immagini AFM si trovino nella conformazione chiusa.

L'aggiunta del ppGpp all'RNAP già legata dalla DksA influisce negativamente sull'affinità tra enzima e DNA, portando la percentuale di promotori occupati a valori attorno al 3,5%; al contrario l'accorciamento del DNA indotto dal legame all'enzima non sembra subire modificazioni ulteriori rispetto quello provocato dal solo regolatore proteico, confermando quanto riportato in letteratura secondo cui l'alarmone non determina evidenti effetti negativi in sistemi già saturati dalla DksA (Paul *et al*, 2004).

Partendo da questi dati abbiamo formulato un modello secondo il quale la DksA, inserendo il suo dominio *coiled-coil* nel canale secondario dell'RNAP ed interagendo direttamente con il  $Mg^{2+}$  catalitico dell'enzima (Figura 3.23), potrebbe interferire con l'effetto stabilizzante dei nucleotidi nei confronti del complesso aperto. Questo può essere spiegato considerando due possibili meccanismi d'azione, tra loro non mutualmente esclusivi: l'occlusione per ingombro sterico del canale secondario, attraverso il quale hanno accesso gli NTPs che devono raggiungere il sito catalitico, e l'interazione diretta di due residui di acido aspartico della DksA con il  $Mg^{2+}$  che risulta coinvolto nel corretto posizionamento del nucleotide da aggiungere alla catena di RNA in fase di crescita.



**Figura 3.23.** Rappresentazione schematica della struttura cristallografica dell'RNAP- $\sigma^{70}$  nella quale è indicato il sito di legame della DksA (adattata da Rutherford *et al*, 2009). Nel dettaglio: porzione del dominio *coiled-coil* della DksA inserito nel canale secondario dell'enzima fino a raggiungerne il sito attivo, dove interagisce con uno dei  $Mg^{2+}$  catalitici (adattata da Perederina *et al*, 2004).

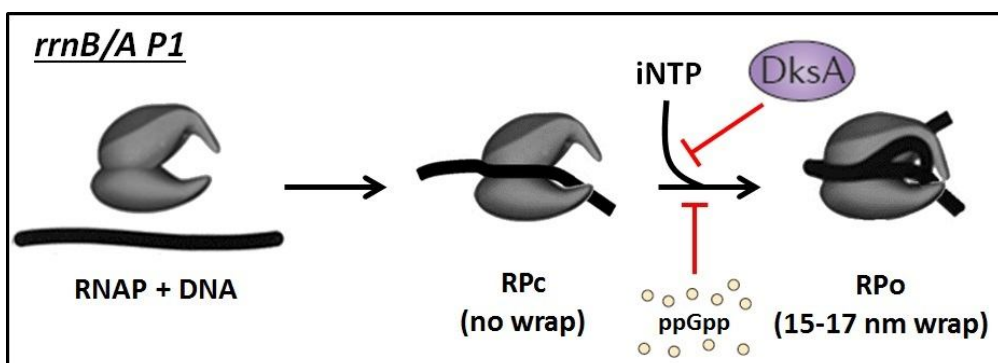
Per confermare questa ipotesi abbiamo analizzato i complessi di inizio della trascrizione formati dall'RNAP su *rnmB* P1 in assenza di iNTPs. In queste condizioni la *promoter*

*occupancy* è inferiore a quella osservata in presenza della DksA e dei nucleotidi ed il *wrapping* del DNA viene perso. In un esperimento successivo è stato osservato che gli effetti negativi provocati da concentrazioni saturanti di DksA sia sull'affinità tra enzima e DNA sia sull'estensione dell'interazione vengono annullati da elevate concentrazioni di iNTPs. Questi risultati dimostrano che la DksA agisce destabilizzando il complesso aperto grazie all'interferenza con il corretto posizionamento degli NTPs nel sito attivo. In effetti, precedenti esperimenti condotti sia *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato che elevate concentrazioni di DksA determinano una maggiore richiesta di NTPs per raggiungere livelli trascrizionali paragonabili a quelli che si osservano in assenza della proteina (Paul *et al*, 2004). Questa ipotesi non esclude che la modificazione dell'interazione tra enzima e DNA possa essere dovuta anche ad un effetto strutturale di tipo allosterico mediato dalla DksA, né che il suo legame possa indurre alterazioni allosteriche della capacità dell'RNAP di modificare la propria conformazione durante l'isomerizzazione da  $RP_C$  a  $RP_O$  (Rutherford *et al*, 2009), ma porta nuove evidenze circa un suo ulteriore meccanismo d'azione.

Da quanto emerso la DksA sembra dunque rappresentare il principale effettore responsabile dell'inibizione della sintesi degli rRNA durante la risposta stringente: in condizioni di crescita favorevoli, gli effetti provocati dai suoi livelli intracellulari costanti vengono annullati da elevate concentrazioni di nucleotidi, mentre il ppGpp, non venendo sintetizzato, non può contribuire alla regolazione dei promotori *rrn*. In condizioni di stress nutrizionale o ambientale, oppure durante il passaggio dalla fase di crescita esponenziale a quella stazionaria, la diminuzione dei livelli cellulari di nucleotidi riduce il loro effetto stabilizzante nei confronti dei complessi aperti: in queste condizioni quindi essi non risultano più in grado di contrastare il meccanismo inibitorio messo in atto dalla DksA. Nello stesso tempo, l'aumento dei livelli di ppGpp fa sì che esso possa legarsi all'interfaccia tra subunità  $\beta'$  e  $\omega$  nella *switch region* dell'RNAP, alla base della struttura a chela di granchio: lontano dal sito attivo, l'alarmone può ridurre allostericamente la capacità dell'enzima di allontanare tra loro le subunità  $\beta$  e  $\beta'$  per accogliere il dsDNA nel canale principale, ma può anche inibire il loro successivo avvicinamento per l'interazione con la porzione a valle rispetto al TSS che normalmente stabilizza il complesso, sfavorendo in questo modo l'apertura della bolla di trascrizione durante l'isomerizzazione da  $RP_C$  a  $RP_O$ . I risultati ottenuti analizzando migliaia di molecole di DNA e di complessi nucleoproteici suggeriscono che l'inibizione della sintesi degli rRNA causata dall'alarmone sia dovuta soprattutto a

meccanismi di tipo indiretto, quali l'inibizione della trascrizione del gene per l'attivatore Fis e la sostituzione delle subunità  $\sigma^{70}$  legate al *core* dell'RNAP con subunità coinvolte nella risposta a situazioni di stress, come  $\sigma^S$ ; nelle nostre condizioni sperimentali quest'ultimo effetto non è stato osservato, visto che anche in presenza dell'alarmone l'RNAP lega specificamente la sequenza del promotore ad indicare che essa è nella forma di oloenzima, ma ciò può essere dovuto alla presenza in soluzione di una concentrazione saturante di subunità  $\sigma^{70}$  ed alla assenza di fattori  $\sigma$  alternativi. Non possiamo comunque escludere il coinvolgimento diretto del modulatore nella regolazione dell'inizio della trascrizione, attraverso modificazioni conformazionali di tipo allosterico a carico dell'RNAP capaci di promuovere l'interazione della DksA con il suo canale secondario; questo aumento dell'affinità, unito al calo dei livelli di NTPs, renderebbe le 3000-10000 molecole di modulatore proteico costantemente presenti in ogni fase della crescita cellulare sufficienti a legare l'RNAP, assicurando un adeguato controllo dell'espressione genica.

I nostri risultati ed il modello proposto confermano l'effetto destabilizzante dei modulatori della risposta stringente sui complessi di inizio della trascrizione: la DksA, il ppGpp e l'assenza di nucleotidi sono in grado di ridurre l'emivita del complesso aperto, nel quale l'avvolgimento del DNA attorno all'RNAP è risultato pari ad oltre 15 nm. Su promotori la cui sequenza determina la formazione di  $RP_o$  instabili, come i promotori per gli rRNA, questo sposta l'equilibrio verso il complesso chiuso (in cui il *wrapping* è risultato nullo) e, di conseguenza, riduce l'occupanza dei promotori da parte dell'enzima.



**Figura 3.24.** Rappresentazione grafica degli step cinetici della formazione del complesso aperto sui promotori *rrn* correlati al *wrapping* del DNA attorno all'RNAP; sono mostrati i passaggi su cui agiscono gli effettori della risposta stringente (adattato da Coulombe and Burton, 1999).

Su promotori ad emivita lunga (come quelli che dirigono l'espressione di geni i cui prodotti sono coinvolti nella biosintesi degli aminoacidi) la destabilizzazione può invece favorire il *promoter escape*, giustificando l'effetto positivo che ppGpp e DksA hanno sull'espressione dei geni da essi controllati.

### 3.3. Il promotore $P_R$ del batteriofago $\lambda$

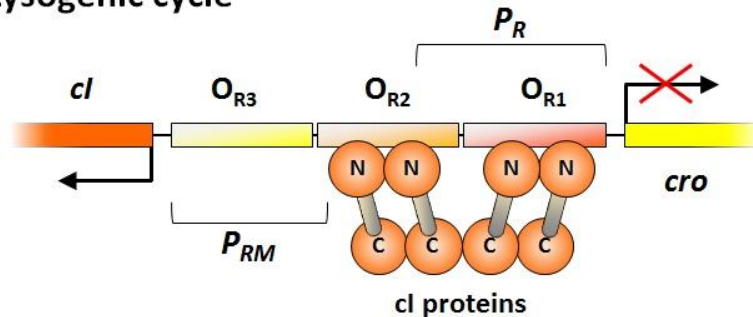
#### 3.3.1. Struttura e regolazione del promotore $P_R$

Il batteriofago  $\lambda$  rappresenta un interessante modello per lo studio della regolazione dell'espressione genica. In seguito all'infezione di una cellula ospite, il genoma fagico, iniettato dal capsido al citoplasma, può essere integrato nel cromosoma batterico; dopo l'integrazione, il fago può rimanere silente per numerose divisioni cellulari nella forma di profago, operando così il ciclo lisogeno. In alternativa può sfruttare i macchinari trascrizionali e biosintetici della cellula per produrre un elevato numero di particelle fagiche infettanti che vengono rilasciate mediante lisi cellulare, attraverso quello che è definito ciclo litico. Il mantenimento del ciclo lisogeno o l'attivazione del ciclo litico dipendono da due differenti *pathway* di espressione genica.

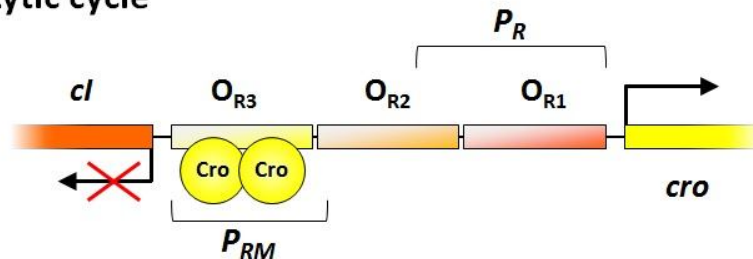
Il repressore  $cl$  è l'unico prodotto fagico sintetizzato durante lo stato di lisogenia; legando il DNA esso determina una forte repressione dell'espressione di tutti gli altri geni del fago. Contestualmente a tale effetto inibitorio,  $cl$  è in grado di promuovere la sua stessa sintesi, reclutando l'RNAP batterica sul promotore  $P_{RM}$ . Come mostrato nella Figura 3.25,  $cl$  agisce come omodimero legando con affinità decrescente le sequenze  $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$  e  $O_{R3}$ ;  $O_{R3}$  viene legata dal repressore solo quando lo stesso è presente a concentrazioni molto elevate, determinando in tal modo un controllo a *feedback* basato su un'auto-inibizione della trascrizione del gene  $cl$ . Sfruttando questo gradiente di affinità il repressore impedisce il legame dell'RNAP al promotore  $P_R$ , dal momento che questo risulta sovrapposto alle sequenze  $O_{R1}$  e  $O_{R2}$ . In seguito ad eventi quali il riconoscimento di danni al DNA batterico indotti da raggi UV,  $cl$  si dissocia e libera il promotore  $P_R$  che può così essere riconosciuto dalla RNAP: ciò porta alla sintesi della proteina Cro, coinvolta nell'attivazione dei geni necessari al ciclo litico e nella repressione del gene per il repressore  $cl$ , grazie alla sua capacità di legarsi con alta affinità alla sequenza  $O_{R3}$  sovrapposta al promotore  $P_{RM}$ . Il

legame di Cro all'operatore  $O_{R3}$ , oltre ad impedire l'attivazione della trascrizione a partire da  $P_{RM}$ , recluta l'RNAP sul promotore del suo stesso gene,  $P_R$ , promuovendo un meccanismo di auto-attivazione (Dodd *et al*, 2005).

### Lysogenic cycle



### Lytic cycle

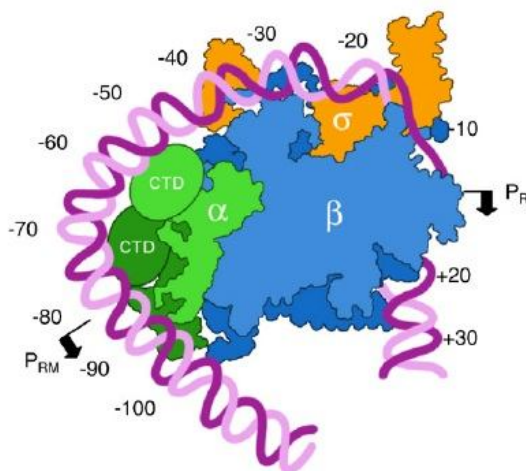


**Figura 3.25.** Durante il ciclo lisogeno del batteriofago  $\lambda$  l'unico prodotto fagico presente nella cellula ospite è il repressore  $cl$ , che agisce come omodimero legando le sequenze dei tre siti operatori  $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$  e  $O_{R3}$  con affinità decrescente; in questo modo esso inibisce la trascrizione a partire dal promotore  $P_R$ , mentre la promuove dal promotore  $P_{RM}$ . Eventi quali il riconoscimento di danni a carico del DNA dell'ospite determinano il distacco di  $cl$  dal DNA con conseguente legame dell'RNAP al promotore  $P_R$  per il quale l'enzima mostra elevata affinità; ciò porta alla sintesi di Cro che, legandosi con affinità decrescente ai tre siti operatori  $O_{R3}$ ,  $O_{R2}$  e  $O_{R1}$ , porta all'inibizione di  $P_{RM}$  e all'ulteriore attivazione di  $P_R$  per il mantenimento del ciclo litico.

*In vitro*, in assenza di Cro e  $cl$ , l'RNAP lega il promotore  $P_R$  con un'affinità significativamente superiore a  $P_{RM}$ , tanto che in presenza di entrambi i promotori, disposti secondo l'architettura mostrata nella Figura 3.25, la trascrizione si verifica esclusivamente a partire da  $P_R$  (Mangiarotti *et al*, 2009).

L'estensione dell'interazione tra RNAP e  $P_R$  è stata studiata utilizzando diversi approcci biochimici, in particolare mediante saggi di *footprinting* del DNA con DNasi I o radicali idrossilici (Craig *et al*, 1995). Accurate analisi dei complessi di inizio della trascrizione

effettuate in precedenza nel nostro laboratorio utilizzando la microscopia a forza atomica hanno mostrato un accorciamento del DNA legato dall'enzima rispetto al DNA libero di circa 30 nm. Esperimenti eseguiti eliminando progressivamente porzioni sempre più estese della regione a monte dell'elemento -35 hanno evidenziato il ruolo nell'interazione con l'RNAP di due sequenze ricche in A+T, situate rispettivamente tra -45 e -58 e tra -88 e -100 bp rispetto al TSS; è importante sottolineare che queste sequenze risultano sovrapposte al promotore  $P_{RM}$ . Inoltre, esperimenti condotti utilizzando varianti dell'RNAP mutate nei domini C-terminali delle subunità  $\alpha$  o nei *linker* flessibili che uniscono tra loro i domini C- ed N-terminali hanno messo in evidenza il ruolo fondamentale che queste porzioni dell'enzima svolgono nella compattazione del DNA. Alla luce di queste osservazioni è stato proposto un modello che giustifica l'accorciamento del DNA contenente il promotore  $P_R$  con un avvolgimento o *wrapping* dello stesso attorno all'enzima, grazie all'interazione degli  $\alpha$ -CTDs con regioni ricche in A+T poste a monte degli elementi centrali del promotore. Un'interazione di questo tipo potrebbe spiegare la forte inibizione della trascrizione a partire da  $P_{RM}$  osservata anche in assenza di Cro: la sequenza di questo promotore risulta infatti occupata da porzioni dell'RNAP impegnate nel legame con il promotore  $P_R$ . (Rivetti *et al*, 1999; Cellai *et al*, 2007; Mangiarotti *et al*, 2009).



**Figura 3.26.** Un *wrapping* della sequenza nucleotidica del promotore fagico  $P_R$  attorno all'RNAP di circa 30 nm determina l'interazione dei domini C-terminali delle subunità  $\alpha$  dell'enzima con la sequenza del promotore  $P_{RM}$ ; l'ingombro sterico che ne deriva impedisce l'attivazione della trascrizione a partire da questo promotore, anche in assenza di fattori proteici, permettendo il mantenimento del ciclo litico (adattata da Mangiarotti *et al*, 2009).

Come altri promotori batterici, anche il promotore fagico  $P_R$  è regolato direttamente dagli effettori della risposta stringente. A livello di questo promotore ppGpp e DksA non sembrano però avere un effetto di tipo sinergico, quanto piuttosto antagonista: il ppGpp ne riduce fortemente l'attivazione (Potrykus *et al*, 2002), mentre la DksA risulta essenziale per la trascrizione a partire da  $P_R$ , sia *in vivo* che *in vitro*; è stato infatti osservato che in ceppi  $\Delta dksA$  il batteriofago  $\lambda$  non è in grado di promuovere il ciclo litico. I meccanismi molecolari alla base di questi opposti effetti regolatori non risultano ancora sufficientemente chiari; alcune evidenze sperimentali suggeriscono che l'alarmone possa impedire la formazione del primo legame fosfodiesterico, inibendo l'inizio del processo trascrizionale; la DksA al contrario sembrerebbe in grado di favorire, con un meccanismo di tipo allosterico, il legame dell'RNAP alla sequenza del promotore (Łyżeń *et al*, 2009).

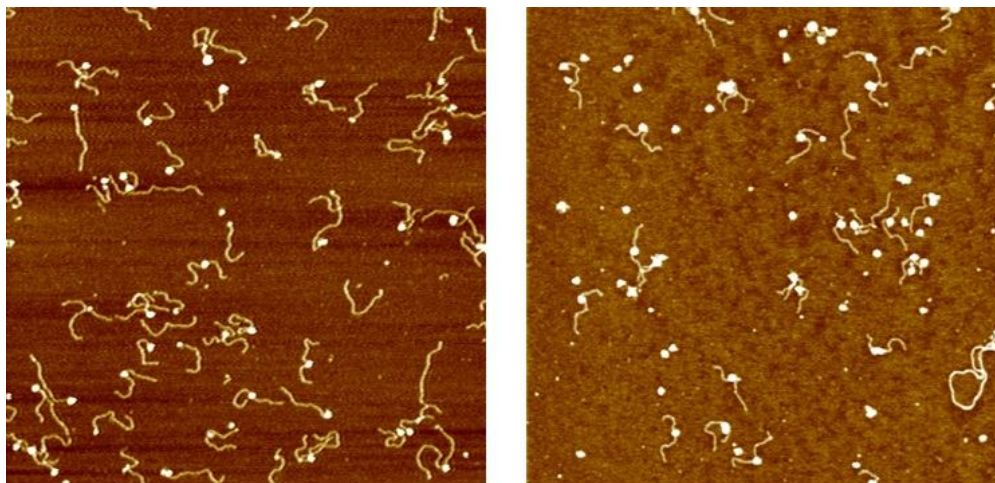
### **3.3.2. Analisi AFM dei complessi di inizio della trascrizione e degli effetti di ppGpp e DksA sul promotore $P_R$**

Nei prossimi paragrafi verranno illustrati e discussi i dati ottenuti analizzando migliaia di complessi di inizio della trascrizione sul promotore fagico  $P_R$ , dapprima in assenza dei modulatori della risposta stringente, poi preincubando l'RNAP con diverse combinazioni e concentrazioni degli stessi. I risultati emersi in questo lavoro sono alla base del modello proposto per spiegare i meccanismi d'azione responsabili degli effetti antagonisti di ppGpp e DksA sulla trascrizione a partire dal promotore  $P_R$ .

#### **La diversa sequenza *upstream* di $P_R$ e la maggiore affinità per l'RNAP inducono un avvolgimento del DNA attorno all'enzima di entità diversa ed una *promoter occupancy* maggiore rispetto a quanto osservato sui promotori *rrn***

In accordo con quanto precedentemente osservato (Rivetti *et al*, 1999) il legame dell'RNAP- $\sigma^{70}$  di *E. coli* al promotore  $P_R$  del batteriofago  $\lambda$  determina un accorciamento del DNA pari a  $29,3 \pm 1,1$  nm. Su questo promotore la formazione di complessi aperti non richiede l'aggiunta di iNTPs in quanto l'emivita di  $RP_0$  è estremamente lunga e permette di ottenerne un elevato numero semplicemente incubando l'RNAP con il DNA, per 30' a 37°C in un buffer di trascrizione; la *promoter occupancy* in queste condizioni è infatti risultata pari al 23,9%, un valore quasi 4 volte superiore rispetto a quello osservato su *rrnB* P1 e *rrnA* P1 in presenza di ATP e CTP. Il confronto delle immagini AFM riportate nella Figura 3.27

dimostra come, nel caso di  $P_R$  e contrariamente a quanto osservabile per  $rrnB$  P1, un elevato numero di molecole di DNA risulta legato dall'RNAP a livello del sito promotore.



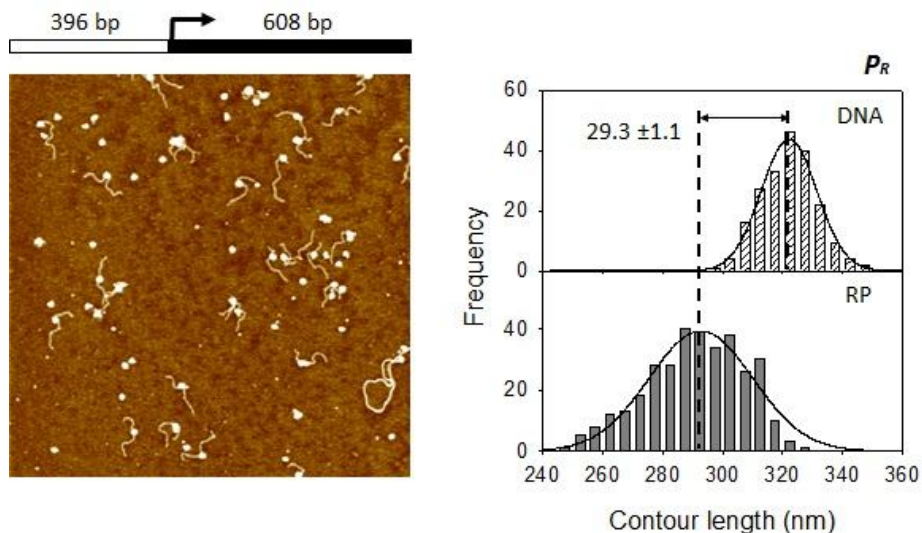
**Figura 3.27.** Immagini AFM rappresentative degli esperimenti condotti in assenza di modulatori, incubando l'RNAP con il frammento di DNA contenente il promotore  $rrnB$  P1 in presenza degli iNTPs (sinistra); e con il frammento di DNA contenente il promotore  $P_R$  (destra). Il confronto mostra la maggior affinità dell'RNAP per il promotore fagico, evidenziata da una maggiore percentuale di molecole di DNA legate dall'enzima specificamente al promotore.

### **Il ppGpp riduce la *promoter occupancy* ed il *wrapping* su $P_R$**

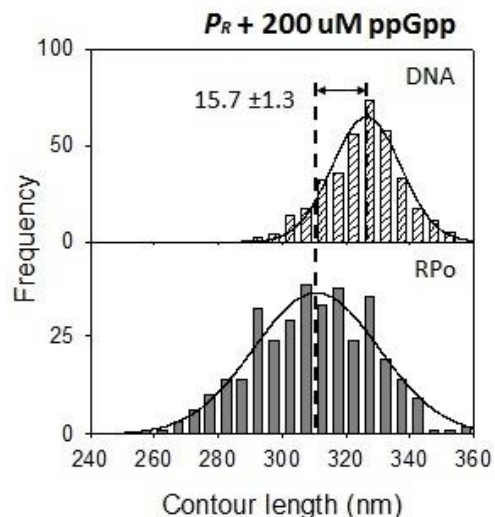
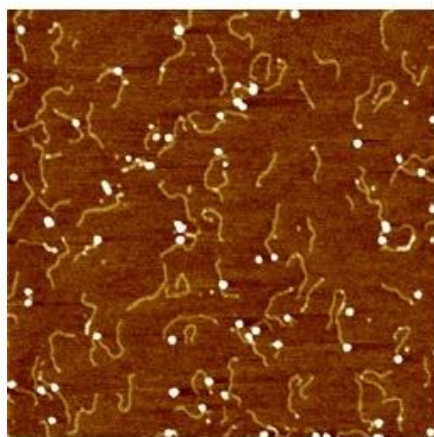
Preincubando l'RNAP con una concentrazione saturante di ppGpp (200  $\mu$ M) si ottiene una drastica riduzione della *promoter occupancy*, che scende dal 23,9% osservato in assenza di alarmonone al 4,6%, effetto che si evince chiaramente anche dal semplice confronto delle immagini AFM mostrate nelle figure 3.28 e 3.29. Inoltre l'entità dell'interazione tra DNA ed enzima in presenza del modulatore risulta fortemente ridotta, passando da  $29,3 \pm 1,1$  a  $15,7 \pm 1,3$  nm, come mostrato dagli istogrammi delle distribuzioni delle lunghezze (Figura 3.28 e 3.29). In letteratura è riportato che il ppGpp inibisce la trascrizione a partire dai promotori che formano complessi aperti a breve emivita, favorendola al contrario a partire da promotori formanti  $RP_0$  stabili (Haugen *et al*, 2008). Tuttavia, ciò non si verifica per il promotore fagico  $P_R$ : nonostante la lunga emivita del complesso aperto formato dall'RNAP su questo promotore (McKane *et al*, 2000), l'alarmonone mostra un forte effetto inibitorio sul ciclo litico del fago  $\lambda$ , sia mediante meccanismi indiretti, basati sulla regolazione dell'espressione di diversi geni coinvolti nella fisiologia del fago (Stomińska *et al*, 1999), che attraverso l'inibizione diretta della trascrizione dei geni controllati da  $P_R$  (Potrykus *et al*,

2002). I dati ottenuti dall'analisi delle immagini AFM raccolte in presenza di ppGpp sono coerenti con queste osservazioni.

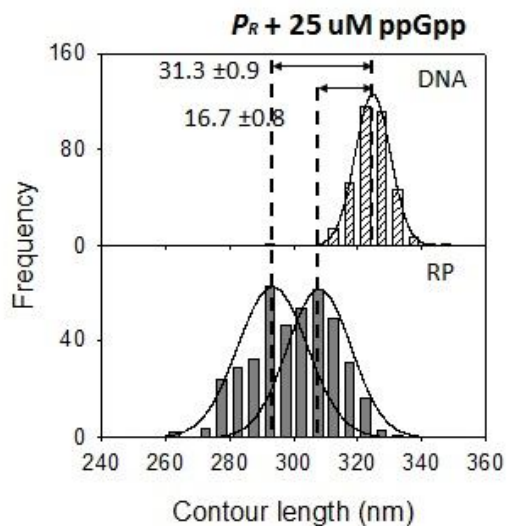
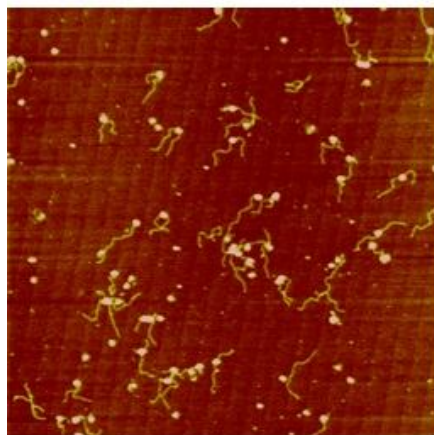
Particolarmente interessante è il risultato emerso dall'analisi dei complessi di inizio della trascrizione ottenuti aggiungendo il frammento di DNA contenente il promotore  $P_R$  all'RNAP preincubata con 25  $\mu\text{M}$  ppGpp, una concentrazione di poco superiore alla sua  $K_D$ . Il grafico della distribuzione delle lunghezze relativo a questo esperimento (Figura 3.30) mostra un peculiare andamento bimodale: il picco di sinistra corrisponde a complessi aperti con un *wrapping* del DNA attorno all'RNAP pari a  $31,3 \pm 0,9$  nm, probabilmente formati dal DNA legato alle unità di enzima non associate al ppGpp; il picco di destra rappresenta invece la sottopopolazione di complessi in cui l'accorciamento risulta ridotto ( $16,7 \pm 0,8$  nm) dall'effetto del legame del ppGpp all'enzima. Questo risultato conferma il valore di  $K_D$  ottenuto mediante dicroismo circolare e dimostra che l'effetto sul *wrapping* è direttamente dovuto al legame dell'alarmone all'RNAP.



**Figura 3.28.** Rappresentazione schematica del frammento di DNA lungo 1004 bp, contenente il promotore  $P_R$  (del quale è mostrata la posizione del TSS) e immagine AFM rappresentativa dell'esperimento condotto con lo stesso, in presenza dell'RNAP ed in assenza di modulatori (sinistra). Distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP); è indicato il valore dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima al promotore completo di errore standard fra le due medie, pari a  $29,3 \pm 1,1$  nm (destra).



**Figura 3.29.** Immagine AFM rappresentativa dell'esperimento condotto incubando il frammento di DNA lungo 1004 bp contenente il promotore  $P_R$  con l'RNAP, in presenza di ppGpp 200  $\mu\text{M}$  (sinistra). Distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP); è indicato il valore dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima al promotore completo di errore standard fra le due medie, pari a 15,7  $\pm$  1,3 nm (destra).

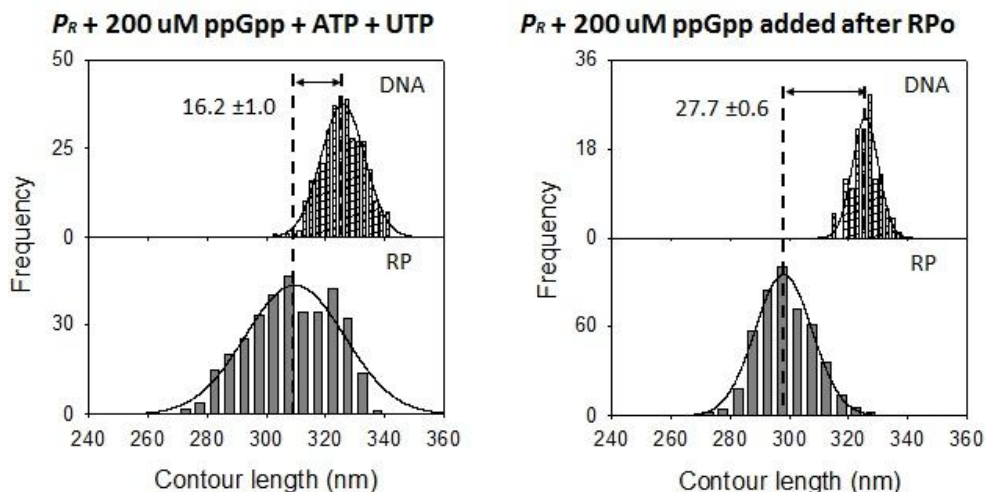


**Figura 3.30.** Immagine AFM rappresentativa dell'esperimento condotto incubando il frammento di DNA lungo 1004 bp contenente il promotore  $P_R$  con l'RNAP, in presenza di ppGpp 25  $\mu\text{M}$  (sinistra). Distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP); sono indicati i valori dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima associato all'alarmone al promotore, completo di errore standard fra le due medie, pari a 16,7  $\pm$  0,8 nm, e dell'enzima non associato all'alarmone anch'esso completo di errore standard fra le due medie, pari a 31,3  $\pm$  0,9 nm (destra).

**Gli effetti del ppGpp non dipendono dalla presenza degli iNTPs e l'alarmone non modifica il *wrapping* di complessi aperti già formati su  $P_R$**

Contrariamente a quanto osservato su  $P_R$ , sui promotori per gli rRNA il ppGpp da solo non ha mostrato alcun effetto negativo sul *wrapping* e ha indotto solo una piccola diminuzione della *promoter occupancy*. Per valutare se queste differenze potessero essere imputabili alla presenza nella soluzione di reazione degli iNTPs (ATP e CTP) necessari a stabilizzare gli  $RP_O$  sui promotori *rrn*, si è proceduto all'analisi della lunghezza di molecole di DNA legate dall'RNAP preincubata con 200  $\mu$ M ppGpp in presenza di 1 mM ATP e 0,1 mM UTP, confrontandola poi con la lunghezza delle molecole non legate dall'enzima presenti nelle stesse immagini. Come emerge dal confronto delle lunghezze medie ottenute dalle distribuzioni mostrate nella Figura 3.31, in queste condizioni l'alarmone mantiene la sua capacità di provocare una riduzione dell'accorciamento del DNA associato all'RNAP, che è risultato pari a  $16,2 \pm 1,0$ , dimostrando che il suo effetto negativo sul *wrapping* non è influenzato dalla presenza degli iNTPs. E' interessante notare come la percentuale di promotori occupati dall'RNAP sia risultata pari all'11,5%, un valore significativamente superiore a quello ottenuto con l'aggiunta del solo ppGpp (4,8%), anche se comunque inferiore a quello osservabile in assenza di modulatori e nucleotidi (23,9%). Ciò significa che, seppur non intervenendo nell'interazione tra porzioni dell'RNAP (probabilmente gli  $\alpha$ -CTDs) e sequenze a monte del promotore  $P_R$ , come dimostrato dall'entità del *wrapping*, i nucleotidi favoriscono l'associazione tra enzima e DNA.

E' stato inoltre osservato che se anziché incubare preventivamente l'RNAP con l'alarmone si aggiunge una concentrazione saturante di ppGpp (200  $\mu$ M) solo in seguito alla formazione degli  $RP_O$ , non si osservano modificazioni significative del *wrapping* ( $27,7 \pm 0,6$  nm) e della *promoter occupancy* (21,3%); questo risultato ribadisce l'estrema stabilità dei complessi aperti sul promotore fagico che, una volta formati, risultano insensibili agli effetti del ppGpp.

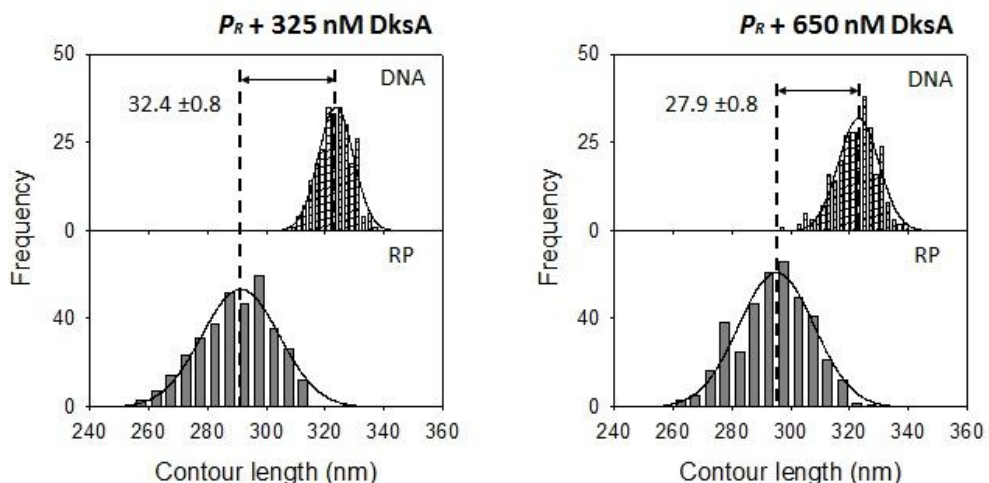


**Figura 3.31.** Sinistra: distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP) in presenza di ppGpp 200  $\mu$ M e ATP/CTP 1/0,1 mM; è indicato il valore dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima al promotore, completo di errore standard fra le due medie, pari a  $16,2 \pm 1,0$  nm. Destra: distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP) in presenza di ppGpp 200  $\mu$ M aggiunto però dopo la formazione dei complessi aperti; è indicato il valore dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima al promotore, completo di errore standard fra le due medie, pari a  $27,7 \pm 0,6$  nm.

### La DksA non modifica l'estensione dell'interazione tra RNAP e promotore $P_R$ , ma aumenta la promoter occupancy

L'identificazione della DksA come cofattore del ppGpp e la possibilità che ne è derivata di spiegare la discrepanza tra i forti effetti regolativi che l'alarmone provoca *in vivo* rispetto a quelli che esso determina in sistemi *in vitro* altamente purificati (Paul *et al*, 2004; Perederina *et al*, 2004), hanno indotto numerosi gruppi di ricerca a concentrarsi sulla comprensione del ruolo del modulatore proteico nella regolazione dell'espressione genica ppGpp-mediata. Mentre inizialmente numerosi lavori sembravano indicare che i due effettori della risposta stringente agissero sinergicamente, inibendo alcuni promotori (Paul *et al*, 2004; Lemke *et al*, 2011; Chandrangsu *et al*, 2011) ed attivandone altri (Paul *et al*, 2005), col tempo sono emerse alcune evidenze di come essi potessero avere anche effetti diretti indipendenti (Åberg *et al*, 2008) o addirittura antagonisti (Łyżeń *et al*, 2009), a seconda del promotore considerato. La trascrizione dei geni controllati da  $P_R$  per esempio è inibita dal ppGpp, mentre risulta attivata dalla DksA.

Per studiare l'eventuale influenza della DksA sul numero e sulla conformazione dei complessi di inizio della trascrizione al promotore  $P_R$ , l'RNAP è stata preincubata con concentrazioni crescenti del modulatore proteico, pari a 325 e 650 nM (rispettivamente 3 e 6 volte la sua  $K_D$ ), prima dell'aggiunta del DNA. Come mostrato nella Figura 3.32, in queste condizioni non sono emerse variazioni significative del *wrapping*, che rimane attorno al valore di 30 nm (rispettivamente  $32,4 \pm 0,8$  e  $27,9 \pm 0,8$ ) osservato in assenza di modulatori, mentre la percentuale di promotori occupati dall'RNAP risulta lievemente incrementata, superando il 25%. Questi risultati sono coerenti con quanto riportato in letteratura secondo cui l'estensione dell'interazione tra RNAP e  $P_R$  non viene alterata dalla presenza della DksA, che sembra invece in grado di aumentare allostericamente l'affinità tra RNAP e promotore  $P_R$  (Łyżeń *et al*, 2009).

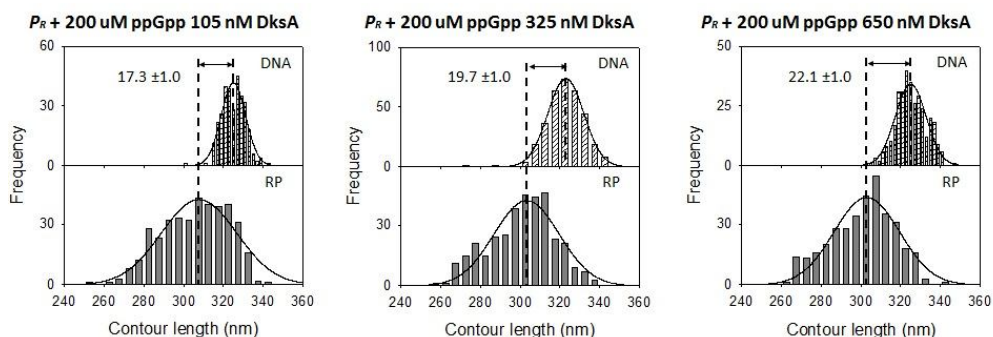


**Figura 3.32.** Sinistra: distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP) in presenza di DksA 325 nM; è indicato il valore dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima al promotore, completo di errore standard fra le due medie, pari a  $32,4 \pm 0,8$  nm. Destra: distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP) in presenza di DksA 650 nM; è indicato il valore dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima al promotore, completo di errore standard fra le due medie, pari a  $27,9 \pm 0,8$  nm.

### La DksA mitiga gli effetti negativi del ppGpp sul promotore $P_R$

Un interessante risultato è emerso dall'analisi dei complessi ottenuti su  $P_R$  preincubando l'RNAP con 200  $\mu$ M ppGpp e, contemporaneamente, con concentrazioni crescenti di DksA. In queste condizioni la proteina mitiga gli effetti negativi indotti dall'alarmone: il *wrapping*

aumenta dai  $15,7 \pm 1,3$  nm osservati in presenza del solo ppGpp, ai  $17,3 \pm 1,0$ ,  $19,7 \pm 1,0$  e  $22,1 \pm 1,0$  nm misurati in seguito all'aggiunta di concentrazioni di DksA rispettivamente pari a 105, 325 e 650 nM. Le analisi condotte dimostrano che l'incremento della concentrazione del modulatore proteico comporta anche un aumento della *promoter occupancy*; è quindi possibile ipotizzare che la maggiore estensione dell'interazione tra enzima e DNA favorita dalla presenza della proteina (e messa in luce dai valori relativi al *wrapping*) ne determini un'affinità più elevata, giustificando la percentuale di promotori occupati dall'RNAP in presenza di entrambi i modulatori, pari a circa l'11%, contro il 4,5% osservato in presenza del solo alarmona.



**Figura 3.33.** Sinistra: distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP) in presenza di ppGpp 200  $\mu$ M e DksA 105 nM; è indicato il valore dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima al promotore, completo di errore standard fra le due medie, pari a  $17,3 \pm 1,0$  nm. Centro: distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP) in presenza di ppGpp 200  $\mu$ M e DksA 325 nM; è indicato il valore dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima al promotore, completo di errore standard fra le due medie, pari a  $19,7 \pm 1,0$  nm. Destra: distribuzione delle lunghezze ottenute analizzando oltre 300 molecole di DNA libere (DNA) ed oltre 300 molecole legate dall'RNAP specificamente al promotore (RP) in presenza di ppGpp 200  $\mu$ M e DksA 650 nM; è indicato il valore dell'accorciamento indotto dal legame dell'enzima al promotore, completo di errore standard fra le due medie, pari a  $22,1 \pm 1,0$  nm.

I dati emersi in questi tre esperimenti sono in pieno accordo con quanto riportato in letteratura relativamente all'azione antagonista degli effettori della risposta stringente sul promotore fagico  $P_R$ : mentre il ppGpp comporta la riduzione della *promoter occupancy* e la parziale perdita del *wrapping*, in linea con il suo effetto inibitorio sull'espressione dei geni controllati dal promotore fagico, la DksA aumenta il numero di promotori legati dall'RNAP grazie ad un aumento dell'estensione dell'interazione tra enzima e DNA, che rende maggiore la loro affinità reciproca, riducendo così l'azione inibitoria dell'alarmona.

### 3.3.3. Le analisi AFM contribuiscono a comprendere il meccanismo d'azione alla base degli effetti antagonisti di ppGpp e DksA sul promotore fagico $P_R$

È noto che la formazione del complesso aperto sul promotore fagico  $P_R$  risulta energeticamente favorita e non richiede l'aggiunta degli iNTPs (McKane and Gussin, 2000): una volta formato,  $RP_0$  mostra un'emivita di alcune ore anche in loro assenza. A conferma di ciò, le immagini AFM hanno permesso di dimostrare che la semplice incubazione di una concentrazione equimolare di RNAP e di un frammento di DNA contenente tale promotore garantisce la formazione di un elevato numero di complessi. Dall'analisi delle immagini AFM raccolte è emerso che il DNA associato all'RNAP subisce un accorciamento di circa 30 nm rispetto al DNA libero e che tale accorciamento interessa per 2/3 la sequenza a monte del sito di inizio della trascrizione e per 1/3 quella a valle, come si evince dal rapporto  $Bc/Bl$ , che risulta sempre leggermente inferiore al rapporto atteso sulla base della posizione del TSS nel template utilizzato per gli esperimenti. In letteratura sono riportati esperimenti di *footprinting* del DNA con i quali è stato possibile evidenziare una protezione dal taglio della DNasi I da parte dell'RNAP su  $P_R$  pari a circa 60 bp, cioè circa 20 nm, in assenza di nucleotidi e modulatori (Łyżeń *et al*, 2009); tuttavia, il frammento di DNA utilizzato in questo lavoro si estende solamente fino alla posizione -87 rispetto al sito di inizio della trascrizione di  $P_R$ , ma precedenti esperimenti AFM hanno dimostrato che la presenza della sequenza ricca in A+T posizionata tra -80 e -100 è fondamentale per avere un accorciamento di 30 nm: è stato possibile osservare come la sua rimozione provochi una riduzione del *wrapping* fino a circa 20 nm (Mangiarotti *et al*, 2009), valore sostanzialmente identico a quello ottenuto mediante *footprinting*.

Contrariamente alla maggior parte degli altri promotori regolati direttamente da ppGpp e DksA,  $P_R$  risulta inibito da alti livelli del primo ed attivato dal secondo: in ceppi  $\Delta dksA$  non si ha l'attivazione del fago. Diversamente da quanto inizialmente ipotizzato, il ppGpp è quindi in grado di inibire l'attivazione della trascrizione anche a partire da promotori che formano un  $RP_0$  stabile, come  $P_R$ . Tuttavia, in letteratura è riportato che su  $P_R$  l'alarmone sembra avere effetto non tanto sulla stabilità del complesso aperto, quanto piuttosto sulla fase di *clearance* del promotore, soprattutto mediante l'inibizione della formazione del primo legame fosfodiesterico (Potrykus *et al*, 2002). Da queste osservazioni emerge un meccanismo d'azione del ppGpp alternativo alla già proposta riduzione dell'emivita del complesso aperto, mediata da un effetto allosterico dovuto al suo legame alla base della

struttura a chela di granchio dell'RNAP, il quale induce una riduzione della capacità dell'enzima di passare dalla conformazione a "pinze aperte" a quella a "pinze chiuse" durante la formazione dell' $RP_0$  (Ross *et al*, 2013). I nostri dati evidenziano che l'alarmone determina una drastica riduzione della *promoter occupancy* ed una riduzione dell'estensione dell'interazione tra l'RNAP e le sequenze *upstream* di  $P_R$ . Partendo da queste osservazioni abbiamo elaborato un modello secondo il quale la riduzione del *wrapping* emersa nei nostri esperimenti in presenza del ppGpp (da  $29,3 \pm 1,1$  nm a  $15,7 \pm 1,3$  nm) potrebbe spiegare la riduzione della velocità del *promoter escape* riportata in letteratura come conseguenza di un minor superavvolgimento negativo del DNA attorno all'RNAP; a conferma di questa ipotesi è stato dimostrato che la topologia locale del DNA è un fattore determinante per l'espressione dei geni regolati dal promotore  $P_R$  (Łyżek *et al*, 2008): la formazione della bolla di trascrizione sembra dipendere fortemente dall'avvolgimento sinistrorso del DNA attorno all'enzima. Il drastico calo della *promoter occupancy* provocato dal ppGpp (da 23,9% a 4,8%) può essere in parte spiegato con la riduzione dell'estensione della regione di DNA interagente con l'RNAP che, causando una minor stabilizzazione del complesso aperto, favorirebbe la cinetica di dissociazione dell'enzima dal promotore. Inoltre l'effetto allosterico del ppGpp, inibendo i movimenti conformazionali dell'RNAP (Zuo *et al*, 2013), potrebbe ridurre la capacità dell'enzima legato dall'alarmone di accogliere il dsDNA nel sito attivo, influenzando negativamente la velocità di formazione dei complessi. In presenza degli iNTPs il numero di promotori occupati dall'RNAP legata dall'alarmone aumenta sensibilmente (da 4,8% a 11,5%), ma il *wrapping* rimane ridotto rispetto a quello che si osserva in assenza del modulatore; questo può essere spiegato ipotizzando che un avvolgimento di circa 16 nm del DNA attorno all'RNAP (peraltro osservato anche sui promotori *rrn*) sarebbe sufficiente a permettere l'apertura della bolla di trascrizione, anche se in maniera meno efficiente rispetto ad un *wrapping* di 30 nm: nel breve periodo temporale durante il quale il DNA rimane denaturato attorno al sito di inizio della trascrizione, l'appaiamento dei nucleotidi alle posizioni +1 e +2 del filamento stampo potrebbe determinare la stabilizzazione del complesso aperto, senza però provocare alcuna conseguenza sul grado di avvolgimento del DNA. A partire da una simile ipotesi si potrebbe speculare che l'interazione degli  $\alpha$ -CTDs con regioni a monte del promotore  $P_R$  potrebbe essere causa e non conseguenza della maggiore stabilità dell' $RP_0$  rispetto a quella vista per i promotori per gli rRNA: in questo scenario, una volta associatasi

agli elementi centrali del promotore, l'RNAP potrebbe interagire anche con le porzioni distali aumentando il superavvolgimento negativo del DNA e favorendo la formazione ed il mantenimento della bolla di trascrizione; tale fenomeno sembra però inibito dal legame del ppGpp all'RNAP.

A conferma della stabilità del complesso aperto formato sul promotore  $P_R$ , l'aggiunta di concentrazioni saturanti di ppGpp ad una soluzione contenente l'RNAP già associata al DNA non determina significativi cambiamenti del *wrapping* e porta solo ad una leggera diminuzione della *promoter occupancy* (dal 23,9 al 21,3%); questo dimostra come uno degli effetti principali del ppGpp sull'associazione tra RNAP e promotore  $P_R$  possa essere imputato alla ridotta capacità dell'enzima legato dall'alarmone di accogliere il DNA nel sito attivo durante le primissime fasi del processo trascrizionale; una volta formatosi il complesso ed avvenuta l'isomerizzazione verso la forma aperta, il ppGpp non è in grado di portare ad una sua destabilizzazione: per tale motivo né la *promoter occupancy*, né il *wrapping* risultano alterati. L'analisi delle immagini AFM non permette di dimostrare se questo effetto sia dovuto all'incapacità del ppGpp di legare l'RNAP dopo che questa ha subito il cambiamento conformazionale che accompagna l'isomerizzazione  $RP_C \rightarrow RP_O$ , oppure all'inefficacia dell'alarmone nei confronti di un  $RP_O$  già formatosi. Ritenendo vero il modello secondo cui il ppGpp sarebbe in grado di inibire i movimenti dell'RNAP necessari all'allontanamento ed all'avvicinamento delle subunità  $\beta$  e  $\beta'$ , risulterebbe più probabile l'ipotesi che prevede l'incapacità dell'alarmone, legatosi all'RNAP già coinvolta nella formazione di un complesso aperto, di provocarne il ritorno verso il complesso chiuso.

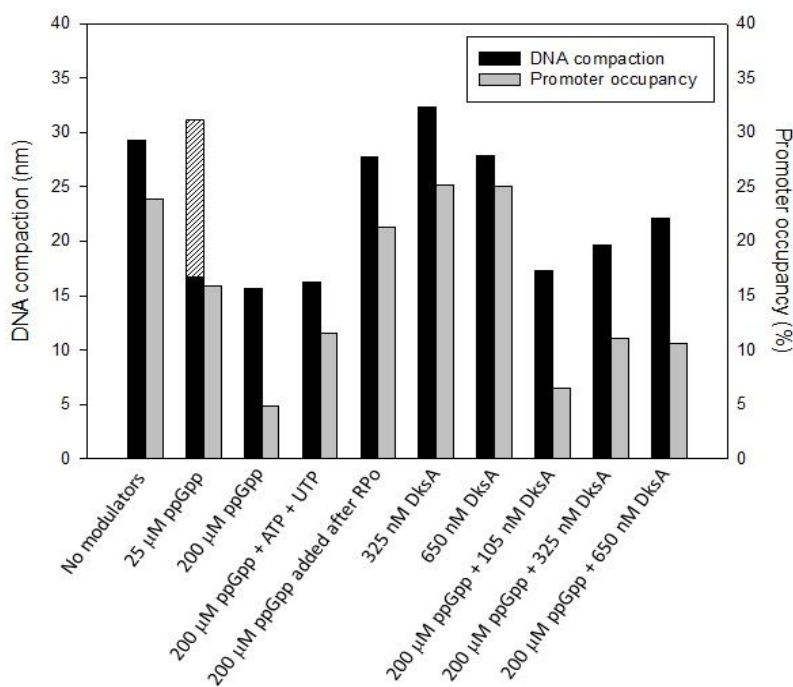
In linea con la sua capacità di promuovere la trascrizione a partire da promotori sui quali si ha la formazione di complessi aperti stabili, la DksA sembra necessaria, *in vivo*, per la corretta attivazione del promotore  $P_R$  (Łyżeń *et al*, 2009). I risultati ottenuti mediante microscopia a forza atomica dimostrano che il legame della DksA all'RNAP determina un aumento, anche se di lieve entità, della percentuale di complessi specifici al promotore (da 23,9 a 25,1%) e non modifica il *wrapping* del DNA attorno all'enzima. Ciò risulta coerente con quanto riportato in letteratura secondo cui, contrariamente a quanto osservato su altri promotori regolati positivamente dal modulatore proteico, su  $P_R$  esso sembra agire favorendo l'associazione della polimerasi al DNA, probabilmente mediante una modificazione conformazionale di tipo allosterico indotta dal suo legame al canale secondario dell'enzima. Saggi di *band shift* e *footprinting* del DNA hanno dimostrato in

effetti che il modulatore proteico aumenta l'associazione dell'RNAP a  $P_R$  e non altera l'estensione della regione interagente (Łyżeń *et al*, 2009). Gli effetti negativi osservati sui promotori *rrn*, che secondo il modello proposto in questa tesi sarebbero dovuti alla capacità del modulatore proteico di interferire col corretto posizionamento dei nucleotidi nel sito attivo, non si osservano durante la formazione del complesso aperto su  $P_R$  in quanto essa non richiede la presenza degli iNTPs (McKane and Gussin, 2000). Alla luce di quanto emerso dai nostri risultati possiamo confermare la capacità della DksA di attivare la trascrizione a partire da  $P_R$  mediante l'induzione di una modificazione conformazionale dell'RNAP sufficiente a favorirne l'associazione con una estesa porzione di DNA.

Gli effetti più evidenti della proteina si osservano tuttavia quando essa è presente contemporaneamente al ppGpp: concentrazioni crescenti di DksA sono in grado di mitigare gli effetti negativi dell'alarmone, sia sulla *promoter occupancy* (che sale dal 4,8% in presenza del solo nucleotide tetrafosfato a circa l'11% quando presenti entrambi i modulatori) che sul *wrapping*, che dai  $15,7 \pm 1,3$  nm osservati quando l'RNAP è preincubata con il ppGpp sale a  $17,3 \pm 1,0$ ,  $19,7 \pm 1,0$ , e  $22,1 \pm 1,0$  nm con l'aggiunta rispettivamente di 105, 325 e 650 nM di DksA. E' possibile supporre che la DksA, modificando allostericamente la conformazione dell'RNAP in modo da facilitarne l'interazione con le porzioni *upstream* del promotore, possa ridurre l'effetto negativo dell'alarmone sul *wrapping* del DNA; in questo modo promuoverebbe il superavvolgimento negativo, favorendo la formazione di RP<sub>O</sub>: avendo un discriminatore ricco in G+C, anche se in misura minore di quello dei promotori *rrn*,  $P_R$  sembra infatti richiedere l'avvolgimento sinistrorso del DNA per un'efficace denaturazione locale della doppia elica, necessaria per l'apertura della bolla di trascrizione; l'importanza della topologia locale del DNA per l'espressione a partire da  $P_R$  è stata riportata anche in altri lavori (Łyżeń *et al*, 2008). Secondo questo modello dunque il ppGpp ridurrebbe la trascrizione attraverso una riduzione del *wrapping*, mentre la DksA sarebbe in grado di mitigarne efficacemente l'effetto promuovendo un'estesa interazione tra enzima e DNA. *In vivo* l'aumento della concentrazione intracellulare dell'alarmone durante la risposta stringente risulta perciò determinante: quando esso è presente a livelli basali (nell'ordine del  $\mu\text{M}$ ) i suoi effetti sono efficacemente annullati dalla proteina (presente nella cellula a concentrazioni costanti, pari a circa 20  $\mu\text{M}$ ); l'aumento della concentrazione del ppGpp fino a livelli nell'ordine del mM rende invece trascurabile l'azione

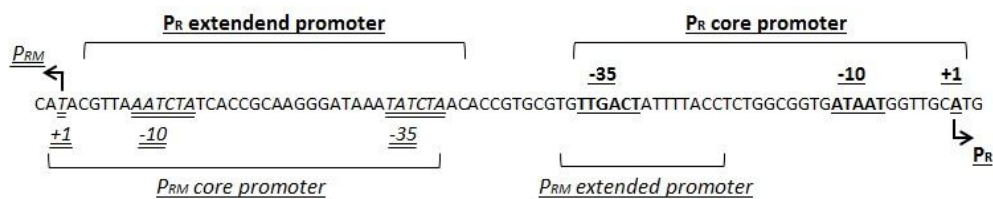
della DksA e può inibire la trascrizione dei geni controllati da  $P_R$ , inibendo di conseguenza il ciclo litico.

In letteratura è riportato che la completa assenza del ppGpp, osservata in ceppi  $\Delta relA/\Delta spoT$ , impedisce l'attivazione del ciclo litico; anche se ciò può essere ricondotto ad effetti indiretti dovuti all'inibizione trascrizionale, normalmente mediata dall'alarmone, di geni codificanti per specifiche proteasi cellulari coinvolte nella scelta tra i due diversi destini del fago (Słomińska *et al*, 1999), è possibile ipotizzare che livelli basali di ppGpp possano risultare necessari per ridurre la forte associazione dell'RNAP al DNA dovuta all'interazione con un'estesa regione a monte degli elementi centrali del promotore; in assenza dell'alarmone l'enzima, la cui interazione con il DNA è favorita da modificazioni conformazionali indotte allostericamente dalla DksA, potrebbe risultare "bloccato" nel complesso aperto al promotore, impedendo così l'attivazione del ciclo litico.



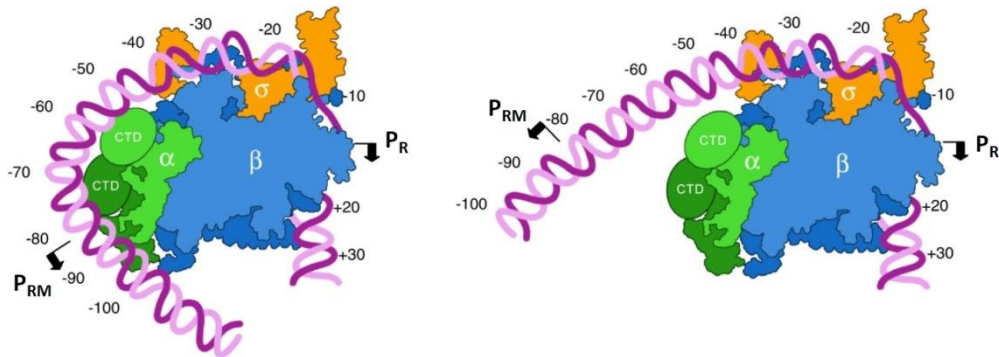
**Figura 3.34.** Istogramma riassuntivo dei risultati ottenuti nei diversi esperimenti condotti sul promotore  $P_R$  relativamente alla compattazione del DNA (barre nere) e alla *promoter occupancy* (barre grigie). Per l'esperimento condotto in presenza di ppGpp 25  $\mu$ M sono indicati i valori di compattazione del DNA relativi alle due sottopopolazioni osservate (barra nera e barra a righe). Gli stessi risultati sono raccolti nella Tabella 2 dell'Allegato.

Un importante contributo alla scelta tra lisogenia e ciclo litico da parte dei modulatori della risposta stringente va senza dubbio ricercato nella loro capacità di modificare il *wrapping* del DNA attorno all'RNAP: il promotore  $P_{RM}$ , essenziale per il mantenimento del ciclo lisogeno in quanto responsabile del controllo dell'espressione del repressore  $\text{cI}$ , ha orientamento opposto rispetto al promotore  $P_R$  e i due TSS distano 82 bp l'uno dall'altro (come mostrato nella Figura 3.35)



**Figura 3.35.** Sequenza nucleotidica della porzione del genoma del batteriofago  $\lambda$  contenente i promotori divergenti  $P_{RM}$  (da destra a sinistra) e  $P_R$  (da sinistra a destra). In grassetto e con sottolineatura singola sono indicati gli elementi del promotore  $P_R$ ; in corsivo e con sottolineatura doppia sono indicati gli elementi del promotore  $P_{RM}$ . La distanza tra i due TSS è pari a 82 bp.

Questa disposizione fa sì che il promotore  $P_{RM}$  risulti sovrapposto alle regioni ricche in A+T del promotore  $P_R$  e dal momento che quest'ultimo, in assenza di regolatori proteici, è quello maggiormente legato dall'RNAP, l'estesa regione di interazione tra enzima e DNA che si osserva nel complesso aperto determina un impedimento sterico al legame dell'enzima al promotore  $P_{RM}$ ; in queste condizioni si può verificare l'attivazione trascrizionale solo a partire da  $P_R$ , con conseguente sintesi di Cro ed attivazione del ciclo litico. In presenza di livelli basali di ppGpp e di concentrazioni costanti di DksA prevalgono nettamente gli effetti stabilizzanti della proteina che, favorendo allostericamente il legame dell'RNAP alle regioni a monte degli elementi centrali del promotore  $P_R$ , può impedire l'attivazione trascrizionale a partire da  $P_{RM}$ . L'aumento dei livelli dell'alarmone in seguito all'attivazione della risposta stringente determina una riduzione del *wrapping* da 30 a 16 nm: è possibile ipotizzare che questo comporti la liberazione del TSS e degli elementi -10 e -35 di  $P_{RM}$ , permettendo così l'interazione dell'RNAP con questo promotore e consentendo di conseguenza l'espressione del gene che codifica per il repressore  $\text{cI}$ . Questo modello potrebbe spiegare l'attivazione ppGpp-mediata del ciclo lisogeno.

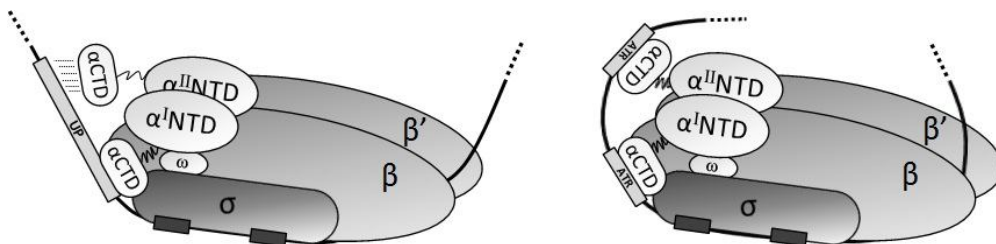


**Figura 3.36.** In assenza di modulatori, l'entità del *wrapping* del DNA attorno all'RNAP (30 nm) fa sì che un'estesa porzione di DNA a monte del TSS del promotore  $P_R$ , sovrapposta al promotore  $P_{RM}$ , risulti occupata dall'enzima: in questo modo viene represso il ciclo lisogeno e attivato quello litico (sinistra). Il ppGpp riduce il *wrapping* a circa 16 nm, liberando parte del promotore  $P_{RM}$  (destra) (adattata da Mangiarotti *et al*, 2009).

### 3.4. Risvolti fisiologici del *wrapping* e degli effetti di ppGpp e DksA su *wrapping* e *promoter occupancy* dei promotori $rrn$ e $P_R$

I risultati ottenuti dall'analisi di migliaia di complessi di inizio della trascrizione hanno evidenziato che l'estensione dell'interazione tra RNAP e DNA sui promotori per gli rRNA di *E. coli* è significativamente inferiore rispetto a quella già osservata sul promotore  $P_R$  del batteriofago  $\lambda$ . Misurando accuratamente l'accorciamento dovuto al legame dell'RNAP sui diversi promotori e correlando questo dato con le caratteristiche delle sequenze a monte del loro sito di inizio della trascrizione è stato possibile ipotizzare che il minor avvolgimento delle sequenze *upstream* di  $rrnB$  P1 e  $rrnA$  P1 attorno all'enzima sia dovuto alla maggiore rigidità intrinseca dei tratti poli-A e poli-T presenti nel loro elemento UP, che renderebbero energeticamente sfavorito il forte ripiegamento richiesto al DNA durante l'interazione con l'enzima; al contrario, la minore presenza di tratti a sequenza omogenea a monte dell'elemento  $-35$  di  $P_R$  permette il ripiegamento di una estesa regione, rendendo possibile un accorciamento del DNA maggiore di quello misurato sui promotori  $rrn$ . Inoltre è riportato che dopo la formazione del complesso aperto le porzioni distali delle subunità  $\beta$  e  $\beta'$  dell'RNAP interagiscono con la sequenza *downstream* fino alla posizione  $+12/+15$  sui promotori per gli rRNA e fino alla posizione  $+20/+25$  su  $P_R$  (Gries *et al*, 2010), fornendo così un ulteriore contributo alla maggior compattazione del DNA indotta dall'enzima su quest'ultimo. Un accorciamento di circa 16 bp sui promotori  $rrn$  può spiegare

un'interazione che si estende da poche coppie di basi a valle del TSS fino alla porzione prossimale dell'elemento UP; i circa 30 nm di compattazione del DNA misurati su  $P_R$  possono invece giustificare un'interazione che si estende dalla posizione +20 fino alle regioni ricche in A+T presenti a monte degli elementi centrali del promotore ed identificate mediante mutagenesi per delezione progressiva di tratti di sequenza sempre più estesi (Mangiarotti *et al*, 2009).



**Figura 3.37.** Rappresentazione schematica del modello proposto per spiegare la differente entità del *wrapping* del DNA attorno all'RNAP osservata mediante AFM sui promotori *rrn* (sinistra) e  $P_R$  (destra).

La più elevata percentuale di promotori legati dall'RNAP osservata su  $P_R$  può essere spiegata considerando la maggiore affinità dell'enzima per la sua sequenza, garantita da una regione di interazione che coinvolge circa 90-100 bp (30 nm) contro le circa 50-60 bp (16 nm) contattate sui promotori *rrn*. Inoltre, le sequenze del discriminatore, degli elementi -10 e -35 e la lunghezza dello *spacer* del promotore  $P_R$  risultano ottimali per la formazione di  $RP_O$  stabili, mentre quelli dei promotori *rrnB* P1 e *rrnA* P1 sono sfavorevoli alla stabilità degli  $RP_O$ . È importante sottolineare come una maggiore affinità tra enzima e DNA ed una più lunga emivita del complesso aperto non determinino necessariamente un maggior tasso trascrizionale; al contrario, il forte legame dell'RNAP con un'estesa sequenza nucleotidica a monte del promotore  $P_R$  può sfavorire il *promoter escape*, riducendo la velocità con cui ha inizio la fase di allungamento: sul promotore fagico il complesso aperto è molto stabile, ha un'emivita di alcune ore e mantiene l'RNAP saldamente ancorata al promotore; *in vivo*, in presenza degli NTPs, questo fenomeno viene però efficacemente controbilanciato dal conseguente superavvolgimento negativo, in grado di favorire la formazione del complesso aperto e l'avvio della fase di inizio abortivo; nei nostri esperimenti l'assenza dei nucleotidi, necessari per l'ingresso in questa fase, comporta il blocco dell'RNAP nel complesso aperto al promotore. Sui promotori per gli rRNA l'emivita del complesso aperto è invece molto breve, rientrando nell'ordine di pochi minuti: in presenza di elevate concentrazioni di RNAP

e di nucleotidi, situazione che si riscontra in fase di crescita esponenziale, il complesso aperto può passare rapidamente alla fase di allungamento, determinando di conseguenza uno spostamento dell'equilibrio che favorisce l'associazione tra enzima e promotore; ciò ne giustifica l'elevato tasso trascrizionale che si osserva durante la fase di crescita esponenziale. Nei nostri esperimenti, in assenza di due dei quattro nucleotidi, essenziali per la *clearance* del promotore, l'equilibrio è necessariamente spostato verso la dissociazione e ciò si traduce in una *promoter occupancy* circa 4 volte inferiore a quella che si osserva su  $P_R$ . In questo contesto si inserisce la regolazione dell'inizio della trascrizione mediata dagli effettori della risposta stringente, ppGpp e DksA. Gli rRNA rappresentano il prodotto genico più abbondante nelle cellule batteriche: la loro sintesi a partire dai sette diversi operoni ridondanti nel genoma di *E. coli* è necessaria per la biogenesi del ribosoma ed è responsabile del più alto dispendio metabolico cellulare. In condizioni ambientali favorevoli, l'assemblaggio di un elevato numero di ribosomi si traduce in un'efficiente produzione delle proteine necessarie alla crescita ed alla proliferazione; quando le condizioni esterne cambiano, diventando sfavorevoli alla sopravvivenza, una serie di meccanismi molecolari permettono al batterio di mettere in atto efficaci sistemi di adattamento. L'aumento della concentrazione di ppGpp che si verifica in risposta a stimoli stressogeni rappresenta uno dei più accurati meccanismi di regolazione del metabolismo batterico correlati alle condizioni ambientali: la capacità dell'alarmone di agire legando direttamente l'RNAP permette una rapida inibizione della trascrizione dei geni necessari alla crescita cellulare ed una concomitante espressione di quelli utili alla sopravvivenza in situazioni di stress. I geni per gli rRNA sono quelli maggiormente inibiti da alti livelli di ppGpp: il suo legame all'interfaccia tra le subunità  $\beta'$  ed  $\omega$  dell'RNAP determina una destabilizzazione allosterica del complesso aperto, già caratterizzato da un'emivita intrinsecamente molto breve, spostando l'equilibrio verso la dissociazione dell'enzima dal DNA. Tuttavia, è solo grazie alla contemporanea riduzione della concentrazione intracellulare di nucleotidi (necessari alla stabilizzazione di  $RP_0$ ) ed al legame del modulatore proteico DksA al canale secondario della polimerasi, che si può verificare il blocco della sintesi degli rRNA, con un sensibile risparmio energetico garantito dalla drastica diminuzione del numero di ribosomi prodotti. La riduzione del *wrapping* misurata in presenza della DksA e l'osservazione secondo cui lo stesso effetto è provocato dall'assenza degli iNTPs dimostrano che in queste condizioni non si verifica l'avvolgimento del DNA attorno all'RNAP: il venir meno del contributo energetico

normalmente fornito dall'andamento sinistrorso della doppia elica al processo di formazione della bolla di trascrizione potrebbe impedire l'isomerizzazione da  $RP_C$  a  $RP_O$  sui promotori aventi un discriminatore ricco in G+C, spostando l'equilibrio verso la dissociazione dell'enzima dal DNA, evidenziata nei nostri esperimenti dal netto calo della *promoter occupancy*. L'assenza di evidenti effetti negativi riscontrata in presenza del solo alarmonone può essere spiegata considerando la capacità degli iNTPs di annullarne gli effetti destabilizzanti su  $RP_O$ . E' inoltre possibile supporre che il ppGpp agisca come mediatore allosterico del legame della DksA al canale secondario dell'RNAP, promuovendone l'affinità reciproca: in presenza di entrambi i modulatori la *promoter occupancy* risulta minore di quella riscontrata preincubando l'RNAP con il solo ppGpp o con la sola DksA. Questa considerazione potrebbe contribuire alla spiegazione dell'effetto sinergico degli effettori della risposta stringente sull'inizio della trascrizione degli rRNA.

Diverso è il significato fisiologico della regolazione della trascrizione a partire dal promotore fagico  $P_R$ : il batteriofago  $\lambda$ , dopo l'infezione, può integrare il suo materiale genetico nel cromosoma batterico, rimanendo silente per numerosi cicli cellulari grazie al mantenimento del ciclo lisogeno; in alternativa può sfruttare il macchinario biosintetico dell'ospite per produrre un elevato numero di particelle fagiche che vengono rilasciate nell'ambiente in seguito alla lisi del batterio, operando così il ciclo litico. La scelta tra lisi e lisogenia è regolata da meccanismi molecolari basati sull'azione di attivatori e repressori trascrizionali e dipende dalle condizioni di crescita in cui si trova l'ospite: in situazioni ottimali per la proliferazione cellulare, necessarie per un'efficace propagazione del fago, l'attivazione dei promotori che promuovono il ciclo litico, come il promotore  $P_R$ , è garantita dalla loro elevata capacità di reclutare l'RNAP batterica e di portare così ad un elevato tasso di trascrizione dei geni da essi regolati. L'osservazione secondo cui la DksA risulta fondamentale per l'attivazione del ciclo litico (Łyżek *et al*, 2009) fa supporre che la sequenza di  $P_R$  possa essersi evoluta in modo da sfruttare la presenza di una concentrazione costante di modulatore proteico nella cellula ospite; esso infatti, legando l'RNAP, promuoverebbe la trascrizione non solo mediante l'aumento dell'affinità tra enzima e promotore, garantito da un meccanismo di tipo allosterico confermato dalle nostre analisi AFM e che solo negli ultimi anni sta trovando una spiegazione a livello strutturale (Rutherford *et al*, 2009), ma anche attraverso la destabilizzazione del complesso aperto che, su un promotore le cui caratteristiche cinetiche permettono la formazione di un  $RP_O$  così

stabile, risulterebbe necessaria per il *promoter escape*. È stato inoltre osservato che il ciclo litico può essere attivato solo in cellule in cui sono presenti livelli basali di ppGpp; in sua assenza (come in ceppi  $\Delta relA/\Delta spoT$ ) o in presenza di elevati livelli di alarmonone (in seguito all'attivazione della risposta stringente) la trascrizione dei geni controllati dal promotore  $P_R$  risulta inibita e viene quindi mantenuto lo stato di lisogenia (Słomińska *et al*, 1999). I nostri risultati possono contribuire a spiegare tale osservazione: il ppGpp, in concentrazioni saturanti, riduce il *wrapping* da 30 a 16 nm, riducendo di conseguenza le forti interazioni che l'RNAP instaura con le sequenze *upstream* di  $P_R$ . Su un promotore che mostra un'emivita del complesso aperto di alcune ore, questo effetto destabilizzante potrebbe tradursi in un più rapido *promoter escape*, che risulterebbe invece rallentato in ceppi ppGpp<sup>0</sup>. Tuttavia, in presenza di elevati livelli di alarmonone, il suo effetto inibitorio nei confronti della formazione del primo legame fosfodiesterico (Łyżeń *et al*, 2009) può impedire la sintesi dei prodotti necessari al ciclo litico. Inoltre, mentre nel complesso aperto caratterizzato da un *wrapping* di 30 nm gli elementi centrali del promotore  $P_{RM}$  sono occupati dall'RNAP legata a  $P_R$ , nel complesso caratterizzato da un accorciamento del DNA ridotto a 16 nm che si osserva in presenza di ppGpp, l'impedimento sterico potrebbe venir meno e l'enzima, legando  $P_{RM}$ , potrebbe promuovere l'espressione dei geni necessari per il mantenimento del ciclo lisogeno (vedi Figura 3.36). Il batteriofago  $\lambda$  sembra quindi aver evoluto un sistema che gli permette di percepire il livello intracellulare di ppGpp e di sfruttare la sua variazione come segnale molecolare che, essendo indicativo della capacità dell'ospite di dar vita o meno ad un sufficiente numero di particelle fagiche infettanti, può indirizzare la scelta tra il mantenimento dello stato profagico e la promozione del ciclo litico. In modo analogo, la capacità di trarre vantaggio dal legame della DksA all'RNAP permetterebbe un'efficace promozione del ciclo litico, dal momento che la proteina è sempre presente nel citoplasma della cellula infettata.



## **4. CONCLUSIONI**



La caratterizzazione strutturale dei complessi di inizio della trascrizione batterica, eseguita attraverso un'approfondita analisi dei dati raccolti mediante microscopia a forza atomica, ha permesso di studiare gli effetti indotti dall'interazione dell'RNAP con la sequenza di diversi promotori. E' stato possibile confermare i risultati precedentemente emersi nel nostro laboratorio relativi al promotore  $P_R$  del batteriofago  $\lambda$  e fornire nuove indicazioni relative ai promotori *rrnB* P1 e *rrnA* P1 di *E. coli*. La diversa natura delle sequenze *upstream* che caratterizzano i promotori considerati determina una differente interazione tra RNAP e DNA, inducendo una compattazione del DNA pari a 30 nm su  $P_R$  e pari a 16 nm sui promotori *rrn*; questi valori sono in accordo con la capacità dell'enzima di contattare le diverse sequenze nucleotidiche poste a monte dell'elemento -35.

L'analisi AFM ha reso inoltre possibile ottenere dati statisticamente significativi relativi agli effetti provocati dai modulatori della risposta stringente, ppGpp e DksA, sui diversi complessi di inizio della trascrizione. Abbiamo osservato che sui promotori *rrn* il ppGpp, in presenza degli iNTPs, non provoca una modificazione significativa della *promoter occupancy* e del *wrapping* del DNA attorno all'RNAP; è possibile ipotizzare che nelle condizioni in cui sono stati condotti gli esperimenti i complessi che si osservano siano aperti, dal momento che valori di accorciamento del tutto analoghi sono stati ottenuti anche in assenza di modulatori, situazione che dovrebbe garantire la formazione di  $RP_0$ . La DksA, al contrario, determina una forte riduzione della *promoter occupancy* e del *wrapping*. Inoltre, la presenza contemporanea di entrambi i modulatori provoca un'ulteriore riduzione della percentuale di complessi specifici al promotore, confermando l'effetto sinergico che i modulatori della risposta stringente hanno sulla sintesi degli rRNA. Le successive osservazioni secondo cui l'assenza degli iNTPs provoca effetti del tutto simili a quelli causati dalla DksA e che una concentrazione di nucleotidi dieci volte superiore a quella normalmente utilizzata nei nostri esperimenti annulla gli effetti indotti da concentrazioni saturanti di modulatore proteico (pari a sei volte la sua  $K_D$ ) hanno permesso di formulare un modello secondo il quale la DksA rappresenta l'effettore principale della risposta stringente, responsabile della riduzione della sintesi degli rRNA che si osserva in cellule sottoposte a stress. Secondo questo modello essa agisce interferendo con il corretto posizionamento dei nucleotidi nel sito attivo dell'RNAP grazie all'inserimento del suo dominio *coiled-coil* nel canale secondario dell'enzima ed alla sua interazione con il  $Mg^{2+}$  catalitico. In tale situazione, l'aumento dei livelli di ppGpp ed il contestuale calo della concentrazione di NTPs

rappresenterebbero i segnali molecolari necessari a promuovere l'attività della DksA: l'alarmone, legando l'interfaccia tra *core* e *shelf modules* dell'RNAP, ne riduce la mobilità, inibendo la sua capacità di accogliere il dsDNA nel sito attivo dell'enzima e di promuovere l'isomerizzazione da complesso chiuso a complesso aperto, ma ne aumenta anche allostericamente l'affinità per la DksA. Nello stesso tempo, la presenza di una inferiore concentrazione di nucleotidi riduce la loro capacità di competere con il modulatore proteico per il corretto alloggiamento nel sito attivo. La destabilizzazione del complesso aperto che deriva dalle alterazioni conformazionali dell'RNAP, su promotori che risultano già intrinsecamente incapaci di formare complessi aperti stabili a causa di uno *spacer* di lunghezza non ottimale e di lungo discriminatore ricco in G+C energeticamente difficile da denaturare, porta così al crollo dei livelli trascrizionali. Questo effetto si traduce nella diminuzione del numero di ribosomi prodotti con un notevole risparmio energetico, necessario all'adattamento alle nuove condizioni ambientali.

Diverso è il significato fisiologico degli effetti di ppGpp e DksA sui complessi di inizio della trascrizione al promotore fagico  $P_{R_i}$ : la capacità di sfruttare i segnali molecolari associati alle condizioni di crescita della cellula ospite garantisce al fago la possibilità di operare una opportuna scelta tra lisi e lisogenia. In condizioni ottimali per la proliferazione cellulare, la presenza di bassi livelli di ppGpp e di concentrazioni costanti di DksA, assicurano un'efficace espressione dei geni controllati dal promotore  $P_{R_i}$ , necessari per l'attivazione del ciclo litico. In linea con questa ipotesi, abbiamo potuto osservare che la presenza della sola DksA non modifica l'estensione della regione di interazione tra RNAP e DNA ed aumenta, seppur di poco, l'occupanza del promotore. Al contrario il ppGpp riduce fortemente il *wrapping* e determina un drastico calo della *promoter occupancy*, confermando la propria capacità di inibire l'espressione dei geni controllati da  $P_{R_i}$  in seguito all'attivazione della risposta stringente. È importante sottolineare come la riduzione del *wrapping* potrebbe favorire la trascrizione dei geni controllati dal promotore  $P_{R_{M_i}}$ , necessaria per il mantenimento del ciclo lisogeno e la cui sequenza, con orientamento divergente rispetto a quella di  $P_{R_i}$ , è sovrapposta alle regioni coinvolte nel *wrapping* di  $P_{R_i}$  osservato in assenza di modulatori. È noto che la completa assenza di alarmone, esattamente come la sua presenza ad alti livelli, inibisce la trascrizione a partire da  $P_{R_i}$ ; ciò può essere spiegato ipotizzando che una bassa concentrazione di ppGpp potrebbe essere necessaria per una piccola destabilizzazione del complesso aperto, altrimenti troppo stabile per permettere un'efficace *promoter escape*.

Un effetto simile potrebbe essere indotto anche dalla DksA che, agendo allostericamente, può portare sia ad un aumento dell'affinità tra enzima e sequenze promotrici, che ad una destabilizzazione del complesso aperto necessaria al *promotor escape*. Inoltre, è stato possibile constatare come la presenza contemporanea di ppGpp e di concentrazioni crescenti di DksA evidenzia che quest'ultima è in grado di contrastare gli effetti negativi dell'alarmone sia sulla *promoter occupancy* che sul *wrapping*. Ciò risulta in linea con alcune osservazioni recentemente riportate in letteratura, secondo le quali concentrazioni crescenti di modulatore proteico sembrerebbero in grado, *in vitro*, di annullare gli effetti inibitori del ppGpp. L'elevata stabilità intrinseca del complesso aperto al promotore  $P_R$ , garantita da un discriminatore più corto di quello dei promotori *rrn* e da uno *spacer* di lunghezza ottimale rende inutile la presenza degli iNTPs ed impedisce al ppGpp di avere effetto se aggiunto dopo la formazione degli RP<sub>o</sub>. I dati ottenuti sul promotore fagico confermano l'effetto antagonista dei due modulatori, difficile da interpretare alla luce del modello cinetico proposto per descriverne gli effetti sinergici riscontrati sulla maggior parte dei promotori batterici. Dal punto di vista evolutivo sembra quindi che il batteriofago  $\lambda$  abbia sviluppato meccanismi utili a sfruttare la presenza della DksA nel citoplasma della cellula ospite e a percepire le variazioni della concentrazione di ppGpp associate allo stato metabolico di quest'ultima per dirigere il proprio destino.



## **5. MATERIALI E METODI**



## 5.1. Preparazione dei templati plasmidici e dei frammenti di DNA per l'AFM

### 5.1.1. *rrnB* P1

Il promotore batterico *rrnB* P1 è stato isolato dal genoma di *E. coli* ceppo *XL1B* mediante PCR classica con Taq polimerasi (prodotta nel nostro laboratorio), amplificando la regione compresa tra la posizione -375 e la posizione +80 rispetto al sito di inizio della trascrizione. L'amplicone è stato quindi clonato nel plasmide pGEM T-easy (Promega Corporation) e successivamente trasferito nel plasmide pNEB 193 sfruttando i siti di restrizione per *EcoRI* e *HindIII* presenti nel suo *polylinker*, ottenendo in questo modo un plasmide ricombinante chiamato pNEB\_*rrnB* P1. La corretta sequenza del costrutto è stata verificata mediante sequenziamento (BMR Genomics). Il frammento di DNA per l'analisi AFM è stato amplificato a partire dal plasmide pNEB\_*rrnB* P1 mediante PCR classica utilizzando il primer *forward* pNEB\_For (5'GAGACGGTCACAGCTTGTCTG) ed il primer *reverse* pNEB\_Rev (5'GGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGG) in modo da produrre un amplicone lungo 1035 bp, contenente il sito di inizio della trascrizione in una posizione tale da formare un braccio corto di 454 bp ed un braccio lungo di 591 bp, determinando un rapporto *Bc/Bl* atteso pari a 0,75.

### 5.1.2. *rrnA* P1

Il promotore batterico *rrnA* P1 è stato isolato dal genoma di *E. coli* ceppo *XL1B* mediante PCR classica con Taq polimerasi (prodotta nel nostro laboratorio), amplificando la regione compresa tra la posizione -383 e la posizione +80 rispetto al sito di inizio della trascrizione. L'amplicone è stato quindi clonato nel plasmide pGEM T-easy (Promega Corporation) e successivamente trasferito nel plasmide pNEB 193 sfruttando i siti di restrizione per *EcoRI* e *HindIII* presenti nel suo *polylinker*, ottenendo un plasmide ricombinante chiamato pNEB\_*rrnA* P1. La corretta sequenza del costrutto è stata verificata mediante sequenziamento (BMR Genomics). Il frammento di DNA per l'analisi AFM è stato amplificato a partire dal plasmide pNEB\_*rrnA* P1 mediante PCR classica utilizzando il primer *forward* pNEB\_For (5'GAGACGGTCACAGCTTGTCTG) ed il primer *reverse* pNEB\_Rev (5'GGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGG) in modo da produrre un amplicone lungo 1044 bp, contenente il sito di inizio della trascrizione in una posizione tale da formare un braccio

corto di 444 bp ed un braccio lungo di 590 bp, determinando un rapporto  $Bc/Bl$  atteso pari a 0,77.

### 5.1.3. $P_R$

Il promotore fagico  $P_R$ , precedentemente clonato all'interno nel plasmide pSAP (Rivetti *et al*, 1999), è stato trasferito nel plasmide pDE13 sfruttando due siti di restrizione per *HindIII* presenti nel suo *polylinker*. La corretta sequenza del costrutto è stata verificata mediante sequenziamento (BMR Genomics). Il frammento di DNA per l'analisi AFM è stato amplificato a partire dal plasmide pDE13 mediante PCR classica utilizzando il primer *forward* LPR-Gless\_FOR (5'CAGTCACGACGTTGTAAAACG) ed il primer *reverse* pDE1200-US (5'GGGTACTCATACTCACTTC) in modo da produrre un amplicone lungo 1004 bp, contenente il sito di inizio della trascrizione in una posizione tale da formare un braccio corto di 396 bp ed un braccio lungo di 608 bp, determinando un rapporto  $Bc/Bl$  atteso pari a 0,65.

### 5.1.4. Purificazione dei frammenti di DNA per l'analisi AFM

Allo scopo di ottenere frammenti di DNA integri e puri, necessari per le successive analisi AFM, il prodotto di ogni amplificazione è stato separato mediante gel d'agarosio all'1% e la banda corrispondente è stata excisa ed elettroeluita utilizzando un apposito apparato per elettroeluzione (Schleicher & Schuell). La soluzione di DNA è stata quindi sottoposta ad estrazione con fenolo-cloroformio, precipitazione con etanolo e sodio acetato ed in seguito risospesa in buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA). La determinazione della concentrazione di tutte le preparazioni di DNA è stata eseguita mediante misura spettrofotometrica a 260 nm.

## 5.2. Clonaggio, espressione e purificazione del fattore trascrizionale DksA di *E. coli*

Il gene codificante per il fattore trascrizionale DksA è stato isolato dal genoma di *E. coli* ceppo *XL1B* mediante PCR classica con Taq polimerasi (prodotta nel nostro laboratorio) utilizzando il primer *forward* Dksa\_NheI (5'ATATAAAGCTAGCATGCAAGAAGGGCAAACCG) ed il primer *reverse* Dksa\_HindIII (5'ATTTTAAAGCTTTTAGCCAGCCATCTGTTTTTC) contenenti all'estremità 5' sequenze riconosciute e tagliate rispettivamente da *NheI* e *HindIII* e code

poli(AT) necessarie per promuoverne l'attività endonucleasica. Dopo doppia digestione enzimatica l'amplicone, purificato mediante corsa elettroforetica in gel d'agarosio all'1,2% e successiva procedura di *gel extraction* utilizzando un kit per gel-eluzione (Qiagen), è stato clonato nel vettore di espressione pET28(b), precedentemente sottoposto allo stesso trattamento e defosforilato. La corretta sequenza del costrutto è stata in seguito verificata mediante sequenziamento (BMR Genomics). Nel vettore utilizzato il gene per il fattore trascrizionale DksA è posto sotto il controllo del promotore inducibile *T7* ed è fuso alla sequenza codificante per un *tag* esaistidinico all'estremità N-terminale, che nel corrispondente prodotto proteico risulta separato rispetto alla sequenza della proteina di interesse da un sito riconosciuto dalla proteasi trombina. Cellule di *E. coli* ceppo *BL21* sono state trasformate con il plasmide pET28(b) contenente il gene *dksA*. Dopo aver determinato l'inducibilità e la solubilità della proteina (risultata pari a circa il 95%), questa è stata over-espressa incubando 1 litro di coltura cellulare in terreno LB addizionato di kanamicina e cloramfenicolo, in agitazione a 37°C, fino al raggiungimento di una densità ottica a 600 nm compresa tra 0,6 e 0,8, corrispondente alla fase di crescita esponenziale; si è proceduto quindi all'induzione mediante aggiunta di IPTG (Sigma-Aldrich) alla concentrazione finale di 1 mM. Dopo quattro ore in agitazione a 30°C le cellule sono state recuperate e sottoposte a lisi per sonicazione in *lysis buffer* (50 mM sodio fosfato pH 8.5, 300 mM NaCl, 10% glicerolo, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanolo, 0.5 mM pepstatina, 1 mM leupeptina, 1 mM PMSF, 0.1% Tween-20 e 0.2 mg/ml lisozima). Il surnatante del lisato cellulare è stato caricato su colonna His-trap FF pre-equilibrata con *buffer 1* (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 20 mM imidazolo) alla velocità di 2 ml/min utilizzando un sistema FPLC Akta Prime. La colonna è stata quindi lavata con cinque volumi di *buffer 1* mentre l'eluizione ha previsto l'utilizzo di 200 ml di gradiente di imidazolo da 20 a 500 mM; la proteina è stata eluita a circa 300 mM imidazolo. Dopo l'eluizione le frazioni contenenti la DksA (individuate mediante saggio con reattivo di Bradford) sono state unite ed il tampone scambiato con *buffer 2* (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl) mediante dialisi. L'incubazione *over night* a 25°C con 10 U/ml di trombina (Sigma-Aldrich) ha permesso la rimozione dell'*his-tag*, verificata su SDS-PAGE. La proteina è stata sottoposta ad un ulteriore step di purificazione mediante scambio ionico utilizzando una colonnina cromatografia caricata con 5 ml di resina (Sigma-Aldrich) pre-equilibrata con *buffer 2*. La colonna è stata lavata con dieci volumi di *buffer 3* (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl) mentre l'eluizione è stata ottenuta caricando la colonna con tre

volumi di *buffer 4* (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl). Le frazioni contenenti la proteina (individuate mediante saggio con reattivo di Bradford) sono state caricate separatamente su SDS-PAGE e quelle risultate sufficientemente pure sono state unite, sottoposte a scambio del tampone con *storage buffer* (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM NaCl) e concentrate fino a circa 2 mg/ml utilizzando un apparato Amicon. La quantificazione è stata eseguita mediante misura spettrofotometrica a 280 nm che ha mostrato una resa finale soddisfacente, pari a circa 20 mg totali di DksA.

### 5.3. Determinazione della $K_D$ del legame del ppGpp alla RNAP

Le analisi CD (CD Spectrometer Model 410, AVIV Biomedical Inc.) sono state condotte utilizzando come tampone il *deposition buffer* (4 mM Hepes pH 7,4, 10 mM NaCl, 2 mM  $MgCl_2$ ), lo stesso utilizzato negli esperimenti AFM (vedi sotto), con il quale si è proceduto alla preliminare definizione della *baseline*, sottratta alle misure eseguite con concentrazioni crescenti di ppGpp (0, 10, 15, 17, 20, 25, 35, 100  $\mu$ M) man mano aggiunte ad una concentrazione costante di RNAP (15  $\mu$ g/ml). Dopo l'aggiunta del modulatore all'enzima si è proceduto all'incubazione per 15 minuti prima di effettuare la misura, eseguita utilizzando una cuvetta di quarzo con un cammino ottico di 1 cm. E' stato quindi ricavato il valore di MRE (*Molar Ratio Ellipticity*) a 222 nm per concentrazioni pari a 5, 10, 15, 17, 20, 25, 30, 35, 45, 60, 100  $\mu$ M di ppGpp e la curva di saturazione così ottenuta è stata utilizzata per ricavare il valore della  $K_D$  attraverso il *fitting* con l'equazione di Hill per il legame di un ligando ad una proteina:

$$MRE = [ppGpp]^n / (K_D + [ppGpp]^n)$$

### 5.4. Procedura sperimentale di analisi AFM

La procedura sperimentale che è stata seguita in ciascuna seduta di analisi dei complessi di inizio della trascrizione mediante AFM ha previsto quattro passaggi fondamentali: formazione dei complessi tra RNAP e DNA, condotta in assenza o presenza di iNTPs, ppGpp e DksA in differenti combinazioni e concentrazioni (descritte nel capitolo Risultati e Discussioni e riassunte nelle Tabelle 1 e 2 in Allegato); deposizione su mica e raccolta delle

immagini; valutazione del numero totale di molecole di DNA presenti in ogni immagine e determinazione della lunghezza delle molecole di DNA libere e legate dall'RNAP; analisi statistica ed interpretazione dei dati ottenuti.

#### 5.4.1. Formazione dei complessi di inizio della trascrizione

I complessi di inizio della trascrizione sono stati assemblati in *transcription buffer* (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) in un volume finale di 10 µl. Dove non diversamente specificato, i complessi formati sui promotori *rrnB* P1 e *rrnA* P1 sono stati allestiti in presenza di 1 mM ATP e 0,1 mM CTP (necessari per la stabilizzazione del complesso aperto, Paul *et al*, 2004), mentre quelli allestiti su *P<sub>R</sub>* non hanno richiesto l'aggiunta di iNTPs (nell'unico caso in cui sono stati utilizzati sul promotore fagico, una soluzione contenente 10 mM ATP e 0,1 mM UTP è stata diluita dieci volte nella reazione di formazione dei complessi al promotore). Negli esperimenti condotti senza modulatori, una concentrazione pari a 20 nM di RNAP (fornita dalla Epicentre Biotechnologies ad una concentrazione iniziale di 0,5 µg/µl) è stata incubata con una concentrazione pari a 20 nM di DNA in *transcription buffer* per 30 minuti a 37°C. Quando richiesti, ppGpp (TriLink Biotechnologies) e DksA sono stati preincubati con l'RNAP in *transcription buffer* 30 minuti a 37°C in diverse concentrazioni e combinazioni prima dell'aggiunta del DNA, incubato in seguito con l'enzima associato a uno o ad entrambi i modulatori per 30 ulteriori minuti a 37°C.

#### 5.4.2. Deposizione sulla mica e raccolta delle immagini

Le reazioni di formazione dei complessi di inizio della trascrizione sono state diluite 1:10 in *deposition buffer* (4 mM Hepes pH 7,4, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) così da ottenere una concentrazione di RNAP e DNA ottimale per le analisi AFM, pari a circa 2 nM; dopo la diluizione si è proceduto rapidamente alla deposizione di 20 µl di campione su uno strato di mica appena sfogliato; trascorsi due minuti la superficie di mica è stata risciacquata con acqua milliQ ed asciugata con un flusso d'azoto, prima del posizionamento sul tubo piezoelettrico dell'AFM. Se non diversamente specificato, negli esperimenti condotti su *rrnB* P1 e *rrnA* P1, ma non in quelli condotti su *P<sub>R</sub>*, il *deposition buffer* è stato addizionato con la concentrazione di iNTPs sopra specificata. Le condizioni di deposizione utilizzate permettono al DNA di raggiungere la superficie per semplice diffusione e garantiscono che il

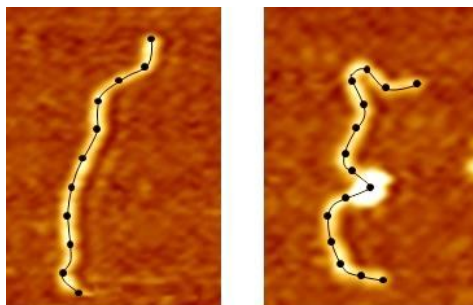
legame avvenga in modo da non modificare le caratteristiche fisiche e strutturali che le macromolecole hanno in soluzione (Rivetti *et al*, 1996). Lo strumento utilizzato per tutte le misure descritte in questo lavoro di tesi è il Nanoscope III (Digital Instruments Inc.); le immagini, di dimensione pari a  $2 \times 2 \mu\text{m}$  e formate da  $512 \times 512$  pixel, sono state raccolte in modalità *tapping* con lo scanner E ( $12 \mu\text{m} \times 12 \mu\text{m}$ ) e con sonde commerciali (MikroMasch), ad una velocità compresa tra 2 e 3 linee al secondo. Durante la scansione lo strumento è stato mantenuto sospeso utilizzando cavi elastici così da evitare alterazioni del segnale dovute alle vibrazioni del suolo. Ogni esperimento ha previsto la raccolta di 100-150 immagini, allo scopo di poter misurare da queste un numero sufficiente di molecole di DNA libere (circa 300) e di complessi specifici al promotore (circa 300).

#### **5.4.3. Analisi della lunghezza delle molecole di DNA libere e legate dall'RNAP, determinazione della *promoter occupancy*, analisi statistica dei dati.**

Nelle immagini digitali che si ottengono con il microscopio a forza atomica una molecola di DNA è rappresentata da una stringa di pixel contenuta in una griglia bidimensionale; in questo contesto non è possibile determinare in maniera diretta la misura delle molecole depositate, ma solo ottenere una stima della loro lunghezza, la cui accuratezza dipende da due fattori principali: la qualità e la risoluzione delle immagini ed il metodo scelto per determinare la lunghezza di ogni molecola analizzata. Mentre la risoluzione è una proprietà strettamente connessa allo strumento ed al campione, si possono distinguere due fasi fondamentali durante il processamento delle immagini che influiscono sulla possibilità di ottenere una stima attendibile della lunghezza del DNA: innanzitutto risulta di fondamentale importanza identificare correttamente l'insieme di pixel che meglio descrivono il profilo della molecola; in secondo luogo è necessario applicare un metodo che sia in grado di stimare nel modo più preciso possibile la lunghezza del polimero a partire dai pixel che lo rappresentano.

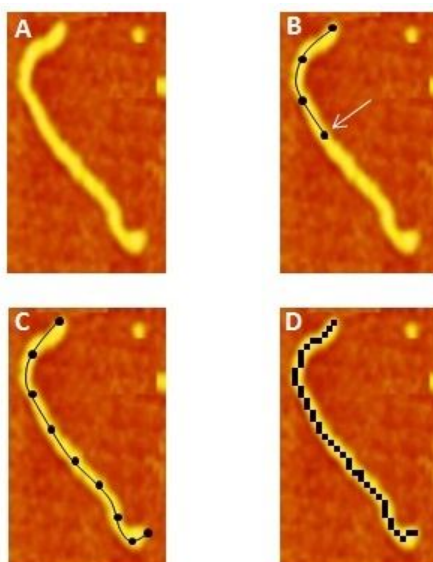
La definizione del profilo delle molecole che si vogliono analizzare viene eseguita manualmente. Per ottenere analisi accurate e riproducibili tutte le molecole analizzate sono state da me misurate, utilizzando un software dedicato, sviluppato in ambiente Matlab (MathWorks) e già applicato con successo in numerosi altri lavori. La misura prevede la selezione manuale del primo e dell'ultimo pixel di ogni molecola che si decide di analizzare e di una serie di pixel intermedi lungo il suo sviluppo; quando l'analisi riguarda un

complesso nucleoproteico, la definizione manuale del profilo prevede il passaggio per il centro dell'RNAP (Figura 5.1).



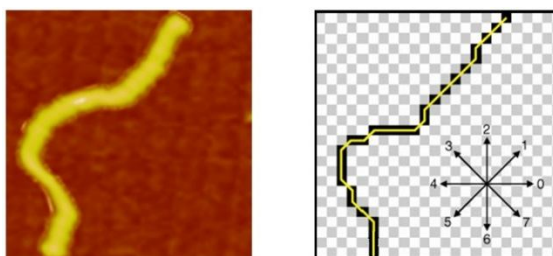
**Figura 5.1.** Procedura adottata per la digitazione di una molecola di DNA libera (sinistra) e di una molecola di DNA legata dall'RNAP (sinistra).

Il software è in grado di migliorare la selezione facendo coincidere ogni punto individuato manualmente con il pixel di maggiore intensità in un intervallo di cinque pixel dal punto in cui è avvenuta la selezione manuale (Figura 5.2). Successivamente la molecola viene ridotta ad una stringa di pixel secondo lo schema definito "8-adiacenti" (Figura 5.3, destra).



**Figura 5.2.** Procedura per l'estrazione delle coordinate del DNA necessarie alla stima della lunghezza della molecola. A) molecola da misurare; B) selezione di alcuni punti lungo la molecola da parte dell'operatore; C) molecola completamente tracciata dall'operatore; D) un software dedicato interpola i punti selezionati dall'operatore determinando quali sono i pixel a più alta intensità all'interno di un intervallo predefinito.

L'algoritmo utilizzato per la determinazione della lunghezza del DNA si basa sulla caratterizzazione  $n_e-n_o$ , normalmente utilizzata per la determinazione della lunghezza di polimeri visualizzati a partire dalla loro immagine digitale. Questa caratterizzazione considera ogni stringa di pixel come un insieme di segmenti (*chain code*) definiti "pari" o "dispari" a seconda che siano disposti seguendo la griglia di pixel rispettivamente in orizzontale o verticale (pari,  $e$ ), oppure in diagonale (dispari,  $o$ ). Ogni molecola è quindi rappresentata da un insieme di pixel  $n_e+n_o$ .

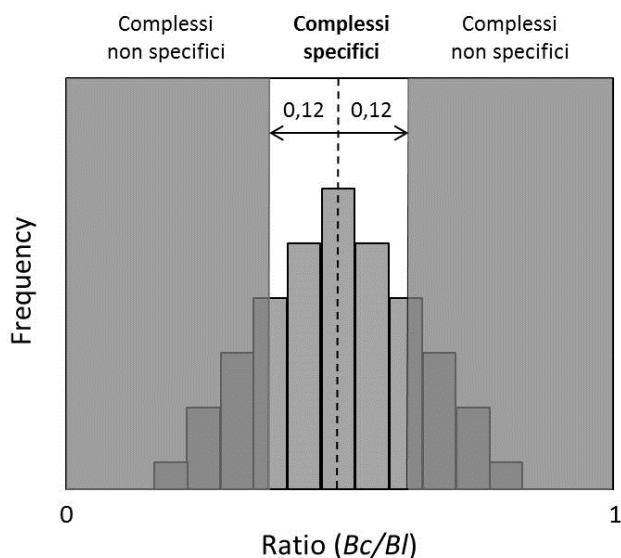


**Figura 5.3.** La molecola di DNA visualizzata mediante scansione AFM (sinistra) è rappresentata da una stringa di pixel (destra) utilizzata da un algoritmo per ricavarne la lunghezza in nm. Nella caratterizzazione ( $n_e-n_o$ ) ogni pixel è connesso a quello precedente e a quello successivo da un segmento che può essere "pari" ( $e$ ) oppure "dispari" ( $o$ ) a seconda che esso segua la griglia di pixel orizzontalmente o verticalmente, oppure che la segua in diagonale.

Una semplice relazione che può essere utilizzata per questo tipo di caratterizzazione è l'equazione proposta da Freeman, nella quale si applica un coefficiente  $a=1$  agli elementi pari ed un coefficiente  $b=\sqrt{2}$  agli elementi dispari (Freeman, 1970). Questa equazione determina però una sovrastima della reale lunghezza del DNA e di tutti i polimeri aventi un'elevata flessibilità (Rivetti, 2009). Mediante simulazioni al computer è stato possibile ottenere coefficienti in grado di fornire un dato più preciso relativo alla lunghezza effettiva di polimeri aventi diverse caratteristiche di flessibilità, con particolare riferimento al DNA. Per una molecola di DNA depositata su mica in *deposition buffer* e visualizzata mediante AFM in immagini di  $2 \times 2 \mu\text{m}$  composte da  $512 \times 512$  pixel (in cui quindi ogni pixel ha un lato di 3,91 nm), i coefficienti capaci di fornire la stima più vicina alle reali dimensioni del DNA analizzato sono risultati essere  $a=0,964$  e  $b=1,363$  (Rivetti, 2009). L'equazione applicata dall'algoritmo utilizzato in questo lavoro per misurare il DNA e i complessi nucleoproteici risulta quindi essere la seguente:

$$L_{DNA} = 0,964n_e + 1,363n_o$$

Per ogni esperimento sono state ricavate due serie di misure: una relativa alla lunghezza in nm delle molecole di DNA libere, l'altra relativa a quella delle molecole di DNA legate dall'RNAP; in questa seconda serie di misure viene inclusa anche la determinazione della posizione dell'RNAP lungo il DNA, dalla quale il software permette di ricavare il rapporto  $Bc/Bl$  così da poter estrapolare un sottoinsieme di dati relativo solo ai complessi nei quali l'enzima risulta legato specificamente al promotore: i complessi specifici sono quelli che forniscono un rapporto  $Bc/Bl$  compreso in un intervallo di  $\pm 0,12$  rispetto al valore atteso.



**Figura 5.4.** Esempio di istogramma della distribuzione dei rapporti  $Bc/Bl$  grazie al quale è possibile discriminare i complessi specifici al promotore da quelli non specifici.

Le due serie di dati relativi alla lunghezza delle molecole di DNA libere e di quelle interessate dalla formazione del complesso specifico vengono sottoposte ad analisi statistica (utilizzando il software SigmaPlot), che prevede la creazione di un istogramma della distribuzione delle lunghezze ed il *fitting* dei risultati ottenuti attraverso una funzione gaussiana.

In ogni esperimento viene stabilito il numero totale di molecole presenti nelle immagini (legate e non legate dall'RNAP); il confronto di questo con il numero di complessi specifici al promotore permette di ottenere la *promoter occupancy*.



## **6. BIBLIOGRAFIA**



- Abbondanzieri E. A.**, Greenleaf W. J., Shaevitz J. W., Landick R. and Block S. M. (2005) Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature*, **438**, 460-465.
- Åberg A.**, Shingler V. and Balsalobre C. (2008) Regulation of the *fimB* promoter: a case of differential regulation by ppGpp and DksA *in vivo*. *Molecular Microbiology*, **67**, 1223-1241.
- Aboud M.** and Pastan I. (1975) Activation of transcription by guanosine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate, transfer ribonucleic acid, and novel protein from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **250**, 2189-2195.
- Appleman J. A.**, Ross W., Salomon J. and Gourse R. L. (1998) Activation of *Escherichia coli* rRNA transcription by FIS during a growth cycle. *Journal of Bacteriology*, **180**, 1525-1532.
- Artsimovitch I.**, Patlan V., Sekine S., Vassilyeva M. N., T. Hosaka, Ochi K., Yokoyama S. and Vassilyev D. G. (2004) Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell*, **117**, 299-310.
- Atkinson G. C.**, Tenson T. and Hauryliuk V. (2011) The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS ONE*, **6**, 1-21.
- Baikalov I.**, Schöder I., Kaczor-Grzeskowiak M., Grzeskowiak K., Gunsalus R. P. and Dickerson R. E. (1996) Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry*, **35**, 11053-11061.
- Barker M. M.**, Gaal T., Josaitis C. A. and Gourse R. L. (2001) Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Molecular Biology*, **305**, 673-688.
- Battesti A.** and Bouveret E. (2006) Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Molecular Microbiology*, **62**, 1048-1063.
- Binnig G.**, Quate C. F. and Gerber C. (1986) Atomic Force Microscope. *Physical Review Letter*, **56**, 930-933.
- Borukhov S.** and Nudle E. (2008) RNA polymerase: the vehicle of transcription. *Trends in Microbiology*, **16**, 126-134.
- Braeken K.**, Moris M., Daniels R., Vanderleyden J. and Michiels J. (2006) New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. *Trends in Microbiology*, **14**, 45-54.
- Bremer H.**, Dennis P., and Ehrenberg M. (2003) Free RNA polymerase and modeling global transcription in *Escherichia coli*. *Biochimie*, **85**, 597-609.
- Brown N. L.**, Stoyanov J. V., Kidd S. P. and Hobman J. L. (2003) The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology reviews*, **27**, 145-163.
- Browning D. F.** and Busby S. J. W. (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 1-9.
- Browning D. F.**, Grainger D. C. and Busby S. J. W. (2010) Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Current Opinion in Microbiology*, **13**, 773-780.

- Burgess R. R.** and Anthony L. (2003) How sigma docks to RNA polymerase and what sigma does. *Current Opinion in Microbiology*, **4**, 126-131.
- Bustamante C.** and Rivetti C. (1996) Visualizing protein-nucleic acid interactions on a large scale with the scanning force microscope. *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure*, **25**, 395-429.
- Campbell E. A.**, Westblade L. F. and Darst S. A. (2008) Regulation of bacterial RNA polymerase  $\sigma$  factor activity: a structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, **11**, 121-127.
- Cashel M.** and Gallant J. (1969) Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature*, **221**, 838-841.
- Cashel M.** (1969) The Control of Ribonucleic Acid Synthesis in *Escherichia coli*: IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid-starved stringent strains. *Journal of Biological Chemistry*, **244**, 3133-3141.
- Cellai S.**, Mangiarotti L., Vannini N., Naryshkin N., Kortkhonjia E., Ebright R. H. and Rivetti C. (2007) Upstream promoter sequences and  $\alpha$ CTD mediate stable DNA wrapping within the RNA polymerase-promoter open complex. *EMBO Reports*, **8**, 271-278.
- Chakraborty A.**, Wang D., Ebright Y. W., Korlann Y., Kortkhonjia E., Kim T., Chowdhury S., Wigneshweraraj S., Irschik H., Jansen R., Nixon B. T., Knight J., Weiss S. and Ebright R. H. (2012) Opening and closing of the bacterial RNA polymerase clamp. *Science*, **337**, 591-595.
- Chandrangsu P.**, Lemke J. J. and Gourse R. L. (2011) The *dksA* promoter is negatively feedback regulated by DksA and ppGpp. *Molecular Microbiology*, **80**, 1337-1348.
- Chatterji D.** and Kumar Ojha A. (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Current Opinion in Microbiology*, **4**, 160-165.
- Coulombe B.** and Burton Z. F. (1999) DNA bending and wrapping around RNA polymerase: a "revolutionary" model describing transcriptional mechanisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**, 457-478.
- Craig M. L.**, Suh W. C. and Record M. T. Jr. (1995) HO $\cdot$  and DNase I probing of E sigma 70 RNA polymerase-lambda PR promoter open complexes: Mg<sup>2+</sup> binding and its structural consequences at the transcription start site. *Biochemistry*, **34**, 15624-15632.
- Craig M. L.**, Tsodikov O. V., McQuade K. L., Schlax P. E. Jr., Capp M. W., Saecker R. M. and Record M. T. Jr. (1998) DNA footprints of the two kinetically significant intermediates in formation of an RNA polymerase-promoter open complex: evidence that interactions with start site and downstream DNA induce sequential conformational changes in polymerase and DNA. *Journal of Molecular Biology*, **283**, 741-756.
- Crothers D. M.**, Haran T. E. and Nadeau J. G. (1990) Intrinsically bent DNA. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 7093-7096.
- Dalebroux Z. D.**, Svensson S. L., Gaynor E. C. and Swanson M. S. (2010) ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **74**, 171-199.
- Dalebroux Z. D.** and Swanson M. S. (2012) ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nature Reviews Microbiology*, **10**, 203-212.

- Dame R. T.**, Wyman C. and Goosen N. (2000) H-NS mediated compaction of DNA visualized by atomic force microscopy. *Nucleic Acid Research*, **28**, 3504-3510.
- Dame R. T.**, Wyman C., Wurm R., Wagner R. and Goosen N. (2002) Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 2146–2150.
- Dame R. T.** (2005) The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Molecular Microbiology*, **56**, 858–870.
- Davis C. A.**, Capp M. W., Record M. T. Jr. and Saecker R. M. (2005) The effects of upstream DNA on open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**, 285-290.
- Dodd I. B.**, Shearwin K. E. and Egan J. B. (2005) Revisited gene regulation in bacteriophage  $\lambda$ . *Current Opinion in Genetics & Development*, **15**, 145–152.
- Durfee T.**, Hansen A., Zhi H., Blattner F. R. and Jin D. J. (2008) Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **190**, 1084-1096.
- Ebright R. H.** (1993) Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters. *Molecular Microbiology*, **8**, 797-802.
- Estrem S. T.**, Ross W., Gaal T., Chen Z. W. S., Niu W., Ebright R. H. and Gourse R. L. (1999) Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase  $\alpha$  subunit. *Genes & Development*, **13**, 2134–2147.
- Faith J. J.**, Hayete B., Thaden J. T., Mogno I., Wierzbowski J., Cottarel G., Kasif S., Collins J. J. and Gardner T. S. (2007) Large-scale mapping and validation of *Escherichia coli* transcriptional regulation from a compendium of expression profiles. *PLoS Biology*, **5**, 54-66.
- Freeman H.** (1970) Boundary encoding and processing. In: *Lipkin BS, Rosenfeld A, editors. Picture Processing and Psychopictorics. New York: Academic Press*, 241–266.
- Furman R.**, Sevostyanova A. and Artsimovitch I. (2012) Transcription initiation factor DksA has diverse effects on RNA chain elongation. *Nucleic Acids Research*, **40**, 3392–3402.
- Gaal T.**, Bartlett M. S., Ross W., Turnbough C. L. Jr., Gourse R. L. (1997) Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science*, **278**, 2092-2097.
- Gatewood M. L.** and Jones G. H. (2010) (p)ppGpp inhibits polynucleotide phosphorylase from *Streptomyces* but not from *Escherichia coli* and increases the stability of bulk mRNA in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, **192**, 4275-4280.
- Ghosh T.**, Bose D. and Zhang X. (2010) Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. *FEMS Microbiology Reviews*, **34**, 611-627.
- Goldman S. R.**, Ebright R. H and Nickels B. E. (2009) Direct detection of abortive RNA transcripts *in vivo*. *Science*, **324**, 927-928.
- Gourse R. L.** (1988) Visualization and quantitative analysis of complex formation between *E. coli* RNA polymerase and an rRNA promoter *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, **16**, 9789-9809.

- Gourse R. L.**, Ross W and Gaal T. (2000) UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Molecular Microbiology*, **37**, 687-695.
- Gries T. J.**, Konturb W. S., Cappa M. W., Saecker R. M. and Record M. T. Jr. (2010) One-step DNA melting in the RNA polymerase cleft opens the initiation bubble to form an unstable open complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 10418-10423.
- Gummesson B.**, Lovmar M. and Nyström T. (2013) A proximal promoter element required for positive transcriptional control by ppGpp and DksA during the stringent response. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 21055-21064.
- Haugen S. P.**, Berkmen M. B., Ross W., Gaal T., Ward C. and Gourse R. L. (2006) rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of  $\sigma$  region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell*, **125**, 1069-1082.
- Haugen S. P.**, Ross W. Manrique M. and Gourse R. L. (2008) Fine structure of the promoter- $\sigma$  region 1.2 interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 3293-3297.
- Haugen S. P.**, Ross W. and Gourse R. L. (2008) Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nature Reviews Microbiology*, **6**, 507-519.
- Hirvonen C. A.**, Ross W., Wozniak C. E., Marasco E., Anthony J. R., Aiyar S. E., Newburn V. H. and Gourse R. L. (2001) Contributions of UP elements and the transcription factor FIS to expression from the seven *rrn* P1 promoters in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **183**, 6305-6314.
- Hook-Barnard I. G.** and Hinton D. M. (2009) The promoter spacer influences transcription initiation via  $\sigma^{70}$  region 1.1 of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 737-742.
- Hsu L. M.**, Vo N. V., Kane C. M. and Chamberlin M. J. (2003) *In vitro* studies of transcript initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase. 1. RNA chain initiation, abortive initiation, and promoter escape at three bacteriophage promoters. *Biochemistry*, **42**, 3777-3786.
- Jishage M.** and Ishihama A. (1999) Transcriptional organization and *in vivo* role of the *Escherichia coli* *rsd* gene, encoding the regulator of RNA polymerase Sigma D. *Journal of Bacteriology*, **181**, 3768-3776.
- Jishage M.**, Kvint K., Shingler V. and Nyström T. (2002) Regulation of  $\sigma$  factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes & Development*, **16**, 1260-1270.
- Kang P. J.** and Craig E. A. (1990) Identification and characterization of a new *Escherichia coli* gene that is a dosage-dependent suppressor of a *dnaK* deletion mutation. *Journal of Bacteriology*, **172**, 2055-2064.
- Kanjee U.**, Gutsche I., Alexopoulos E., Zhao B., El Bakkouri M., Thibault G., Liu K., Ramachandran S., Snider J., Paiand E. F. and Houry W. A. (2011) Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase. *The EMBO Journal*, **30**, 931-944.
- Kolmsee T.**, Delic D., Agyenim T., Calles C. and Wagner R. (2011) Differential stringent control of *Escherichia coli* rRNA promoters: effects of ppGpp, DksA and the initiating nucleotides. *Microbiology*, **157**, 2871-2879.

- Kontur W. S.**, Saecker R. M., Davis C. A., Capp M. W. and Record M. T. Jr. (2006) Solute probes of conformational changes in open complex formation by *E. coli* RNA polymerase at the  $\lambda P_R$  promoter: evidence for unmasking of the active site in the isomerization step and for large-scale coupled folding in the subsequent conversion to  $RP_{\sigma}$ . *Biochemistry*, **45**, 2161-2177.
- Landick R.** (2005) NTP-entry routes in multi-subunit RNA polymerases. *TRENDS in Biochemical Sciences*, **30**, 651-654.
- Lane W. J.** and Darst S. A. (2010) Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: sequence analysis. *Journal of Molecular Biology*, **395**, 671-685.
- Lee D. J.**, Minchin S. D. and Busby S. J.W. (2012) Activating transcription in bacteria. *Annual Reviews of Microbiology*, **66**, 125-152.
- Lee J. H.**, Lennon C. W., Ross W. and R. L. Gourse (2012) Role of the coiled-coil tip of *Escherichia coli* DksA in promoter control. *Journal of Molecular Biology*, **416**, 503-517.
- Leibman M.** and Hochschild A. (2007) A  $\sigma$ -core interaction of the RNA polymerase holoenzyme that enhances promoter escape. *The EMBO Journal*, **26**, 1579-1590.
- Lemke J. J.**, Sanchez-Vazquez P., Burgos H. L., Hedberg G., Ross W. and Gourse R. L. (2011) Direct regulation of *Escherichia coli* ribosomal protein promoters by the transcription factors ppGpp and DksA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 5712-5717.
- Lennon C. W.**, Gaal T., Ross W. and Gourse R. L. (2009) *Escherichia coli* DksA binds to free RNA polymerase with higher affinity than to RNA polymerase in an open complex. *Journal of Bacteriology*, **191**, 5854-5858.
- Lennon C. W.**, Ross W., Martin-Tumasz S., Touloukhonov I., Vrentas C. E., Rutherford S. T., Lee J., Butcher S. E. and Gourse R. L. (2012) Direct interactions between the coiled-coil tip of DksA and the trigger loop of RNA polymerase mediate transcriptional regulation. *Genes & Development*, **26**, 2634-2646.
- Levine A.**, Vannier F., Dehbi M., Henckes G., Séror S. J. (1991) The stringent response blocks DNA replication outside the *ori* region in *Bacillus subtilis* and at the origin in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, **219**, 605-613.
- Lewis M.** (2005) The *lac* repressor. *Comptes Rendus Biologies*, **328**, 521-548.
- Lyubchenko Y. L.**, Shiyakhtenkol L. S., Aki T. and Adhya S. (1997) Atomic force microscopic demonstration of DNA looping by GalR and HU. *Nucleic Acids Research*, **25**, 873-876.
- Łyżeń R.**, Kochanowska M., Węgrzyn G. and Szalewska-Pałasz A. (2008) IHF- and SeqA-binding sites, present in plasmid cloning vectors, may significantly influence activities of promoters. *Plasmid*, **60**, 125-130.
- Łyżeń R.**, Kochanowska M., Węgrzyn G. and Szalewska-Pałasz A. (2009) Transcription from bacteriophage  $\lambda$  pR promoter is regulated independently and antagonistically by DksA and ppGpp. *Nucleic Acids Research*, **37**, 6655-6664.
- Maeda H.**, Fujita N. and Ishihama A. (2000) Competition among seven *Escherichia coli*  $\sigma$  subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, **28**, 3497-3503.

- Magnusson L. U.**, Farewell A. and Nyström T. (2005) ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *TRENDS in Microbiology*, **13**, 236-242.
- Magnusson L. U.**, Gummerson B., Joksimović P., Farewell A. and Nyström T. (2007) Identical, independent, and opposing roles of ppGpp and DksA in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **189**, 5193-5202.
- Mangiarotti L.**, Cellai S., Ross W., Bustamante C. and Rivetti C. (2009) Sequence-dependent upstream DNA–RNA polymerase interactions in the open complex with  $\lambda P_R$  and  $\lambda P_{RM}$  promoters and implications for the mechanism of promoter interference. *Journal of Molecular Biology*, **385**, 748-760.
- Maurer S.**, Fritz J., Muskhelishvili G. and Travers A. (2006) RNA polymerase and an activator form discrete subcomplexes in a transcription initiation complex. *The EMBO Journal*, **25**, 3784–3790.
- McKane M.** and Gussin G. N. (2000) Changes in the 17 bp spacer in the  $P_R$  promoter of bacteriophage  $\lambda$  affect steps in open complex formation that precede DNA strand separation. *Journal of Molecular Biology*, **299**, 337-349.
- Mechold U.**, Potrykus K., Murphy H., Murakami K. S. and M. Cashel (2013) Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acid Research*, **41**, 6175-6189.
- Milon P.**, Tischenko E., Tomšić J., Caserta E., Folkers G., La Teana A., Rodnina M. V., Pon C. L., Boelens R. and Gualerzi C. O. (2006) The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 139625-13967.
- Mooney R. A.**, Darst S. A. and Landick R. (2005) Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Molecular Cell*, **20**, 335–345.
- Mukhopadhyay J.**, Das K., Ismail S., Koppstein D., Jang M., Hudson B., Sarafianos S., Tuske S., Patel J., Jansen R., Irschik H., Arnold E. and Ebright R. H. (2008) The RNA polymerase “switch region” is a target for inhibitors. *Cell*, **135**, 295–307.
- Murakami K. S.** (2013) X-ray Crystal Structure of *Escherichia coli* RNA Polymerase  $\sigma^{70}$  holoenzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 9126-9134.
- Murray K. D.** and Bremer H. (1996) Control of spoT-dependent ppGpp Synthesis and degradation in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, **259**, 41-57.
- Murray H. D.**, Appleman J. A. and Gourse R. L. (2003) Regulation of the *Escherichia coli* *rrnB* P2 promoter. *Journal of Bacteriology*, **185**, 28-34.
- Nickels B. E.**, Dove S. L., Murakami K. S., Darst S. A. and Hochschild A. (2002) Protein–protein and protein–DNA interactions of  $\sigma^{70}$  region 4 involved in transcription activation by  $\lambda$ cl. *Journal of Molecular Biology*, **324**, 17-34.
- Nickels B. E.** and Hochschild A. (2004) Regulation of RNA polymerase through the secondary channel. *Cell*, **118**, 281-284.
- Nudler E.**, Mustaev A., Lukhtanov E. and Goldfarb A. (1997) The RNA–DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell*, **89**, 33–41.

- Österberg S.**, del Peso-Santos T. and Shingler V. (2011) Regulation of alternative sigma factor use. *Annual Review of Microbiology*, **65**, 37–55.
- Paul B. J.**, Barker M. M., Ross W., Schneider D. A., Webb C., Foster J. W. and Gourse R. L. (2004) DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*, **118**, 311-322.
- Paul B. J.**, Ross W., Gaal T. and Gourse R. L. (2004) rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics*, **38**, 749–770.
- Paul B. J.**, Berkmen M. B. and Gourse R. L. (2005) DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**, 7823-7828.
- Perederina A.**, Svetlov V., Vassilyeva M. N., Tahirov T. H., Yokoyama S., Artsimovitch I. and Vassilyev D. G. (2004) Regulation through the secondary channel-structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell*, **118**, 297-309.
- Pérez-Rueda E.** and Collado-Vides J. (2000) The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acid Research*, **28**, 1838-1847.
- Peters J. M.**, Vangeloff A. D. and Landick R. (2011) Bacterial transcription terminators: the RNA 3'-end chronicles. *Journal of Molecular Biology*, **412**, 793-813.
- Potrykus K.**, Wegrzyn G. and Hernandez V. J. (2002) Multiple mechanisms of transcription inhibition by ppGpp at the  $\lambda_{pR}$  promoter. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 43785–43791.
- Potrykus K.** and Cashel M. (2008) (p)ppGpp: still magical? *Annual Review of Microbiology*, **62**, 35-51.
- Rao N. N.**, Gómez-García M. R. and Kornberg A. (2009) Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annual Review of Biochemistry*, **78**, 605-647.
- Reppas N. B.**, Wade J. T., Church G. M. and Struhl K. (2006) The transition between transcriptional initiation and elongation in *E. coli* is highly variable and often rate limiting. *Molecular Cell*, **24**, 747-757.
- Revyakin A.**, Liu C., Ebright R. H. and Strick T. R. (2006) Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching. *Science*, **314**, 1139-1143.
- Rivetti C.**, Guthold M. and Bustamante C. (1996) Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *Journal of Molecular Biology*, **264**, 919-932.
- Rivetti C.**, Guthold M. and Bustamante C. (1999) Wrapping of DNA around the *E. coli* RNA polymerase open promoter complex. *The EMBO Journal*, **18**, 4464-4475.
- Rivetti C.** and Codeluppi S. (2001) Accurate length determination of DNA molecules visualized by atomic force microscopy: evidence for a partial B- to A-form transition on mica. *Ultramicroscopy*, **87**, 55-66.
- Rivetti C.** (2009) A simple and optimized length estimator for digitized DNA contours. *Cytometry Part A*, **75A**, 854-861.

- Roberts J. W.** (2009) Promoter-specific control of *E. coli* RNA polymerase by ppGpp and a general transcription factor. *Genes & Development*, **23**, 143-146.
- Ross W.**, Gosink K. K., Salomon J., Igarashi K., Zou C., Ishihama A., Severinov K. and Gourse R. L. (1993) A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the  $\alpha$  subunit of RNA polymerase. *Science*, **262**, 1407-1413.
- Ross W.**, Ernst A. and Gourse R. L. (2001) Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interaction:  $\alpha$  subunit binding to the UP element minor groove. *Genes & Development*, **15**, 491-506.
- Ross W.**, Vrentas C. E., Sanchez-Vazquez P., Gaal T. and Gourse R. L. (2013) The Magic Spot: a ppGpp binding site on *E. coli* RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Molecular Cell*, **50**, 420-429.
- Rugar D.** and Hansma P. (1990) Atomic Force Microscopy. *Physics Today*, **43**, 23-30.
- Rutherford S. T.**, Lemke J. J., Vrentas C. E., Gaal T., Ross W. and Gourse R. L. (2007) Effects of DksA, GreA, and GreB on transcription initiation: insights into the mechanisms of factors that bind in the secondary channel of RNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, **366**, 1243-1257.
- Rutherford S. T.**, Villers C. L., Lee J., Ross W. and Gourse R. L. (2009) Allosteric control of *Escherichia coli* rRNA promoter complexes by DksA. *Genes & Development*, **23**, 236-248.
- Saeker R. M.**, Record M. T. Jr. and deHaseth P. L. (2011) Mechanism of Bacterial Transcription Initiation: RNA polymerase - promoter binding, isomerization to initiation-competent open complexes, and Initiation of RNA Synthesis. *Journal of Molecular Biology*, **412**, 754-771.
- Sakata-Sogawa K.** and Shimamoto N. (2004) RNA polymerase can track a DNA groove during promoter search. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 14731-14735.
- Schröder I.**, Darie S. and Gunsalus R. P. (1993) Activation of the *Escherichia coli* Nitrate Reductase (*narGHI*) Operon by NarL and Fnr requires Integration Host Factor. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 771-774.
- Schwartz E. C.**, Shekhtman A., Dutta K., Pratt M. R., Cowburn D., Darst S. and Muir T. W. (2008) A full-length group 1 bacterial Sigma factor adopts a compact structure incompatible with DNA binding. *Chemistry & Biology*, **15**, 1091-1103.
- Shin M.**, Kang S., Hyun S., Fujita N., Ishihama A., Velentin-Hansen P. and Choy H. E. (2001) Repression of *deoP2* in *Escherichia coli* by CytR: conversion of a transcription activator into a repressor. *The EMBO Journal*, **20**, 5392-5399.
- Shlyakhtenko L. S.**, Gall A. A., Weimer J. J., Hawn D. D. and Lyubchenko Y. L. (1999) Atomic Force Microscopy imaging of DNA covalently immobilized on a functionalized mica substrate. *Biophysical Journal*, **77**, 568-576.
- Słomińska M.**, Neubauer P. and Węgrzyn G. (1999) Regulation of bacteriophage  $\lambda$  development by guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate. *Virology*, **262**, 431-441.
- Srivatsan A.** and Wang J. D. (2008) Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Current Opinion in Microbiology*, **11**, 100-105.

- Stent G. S.** and Brenner S. (1961) A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **47**, 2005-2014.
- Tamer N.** and Dahleh M. (1994) Feedback control of piezoelectric scanners. *Proceedings of 33<sup>rd</sup>*, 1826-1831.
- Tehranchi A. K.**, Blankschien M. D., Zhang Y., Halliday J., Srivatsan A., Herman C. and Wang J. D. (2010) The transcription factor DksA prevents disruption of DNA replication upon nutritional stress. *Cell*, **141**, 595-605.
- Trautinger B. W.**, Jaktaji R. P., Rusakova E. and Lloyd R. G. (2005) RNA Polymerase modulators and DNA repair activities resolve conflicts between DNA replication and transcription. *Molecular Cell*, **19**, 247-258.
- Travers A.** and Muskhelishvili G. (2005) DNA supercoiling – a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nature Reviews*, **3**, 158-169.
- Vassilyeva M. N.**, Perederina A. A., Svetlov V., Yokoyama S., Artsimovitch I. and Vassilyev D. G. (2004) Cloning, expression, purification, crystallization and initial crystallographic analysis of transcription factor DksA from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica*, **60**, 1611-1613.
- Vrentas C E.**, Gaal T., Ross W., Ebricht R. H. and Gourse R. L. (2005) Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes & Development*, **19**, 2378-2387.
- Vrentas C E.**, Gaal T., Berkmen M. B., Rutherford S. T., Haugen S. P., Ross W. and Gourse R. L. (2008) Still looking for the Magic Spot: The crystallographically defined binding site for ppGpp on RNA Polymerase is unlikely to be responsible for rRNA transcription regulation. *Journal of Molecular Biology*, **377**, 551-564.
- Wagner R.** (2002) Regulation of ribosomal RNA synthesis in *E. coli*: effects of the global regulator guanosine tetraphosphate (ppGpp). *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology*, **4**, 331-340.
- Weinzierl R. O. J.** (2011) The Bridge Helix of RNA Polymerase acts as a central nanomechanical switchboard for coordinating catalysis and substrate movement. *Archaea*, **2011**, 1-8.
- Wendrich T. M.**, Blaha G., Wilson D. N., Marahiel M. A. and Nierhaus K. H. (2002) Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Molecular Cell*, **10**, 779-788.
- Werner F.** and Grohmann D. (2011) Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nature*, **9**, 85-98.
- Woody A. Y.**, Woody R. W. and Malcolm A. D. (1987) Effects of ppGpp on transcription by DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli*: circular dichroism, absorption and specific transcription studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, **909**, 115-125.
- Zhang G.**, Campbell E. A., Minakhin L., Ritchter C., Severinov K. and Darst S. A. (1999) Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA Polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, **98**, 811-824.
- Zhang X.**, Dennis P., Ehrenberg M. and Bremer H. (2002) Kinetic properties of *rrn* promoters in *Escherichia coli*. *Biochimie*, **84**, 981-996.

**Zhi H.**, Wang X., Cabrera J. E., Johnson R. C. and Jin D. J. (2003) Fis stabilizes the interaction between RNA Polymerase and the ribosomal promoter *rrnB* P1, leading to transcriptional activation. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 47340-47349.

**Zuo Y.**, Wang Y. and Steitz T. A. (2013) The mechanism of *E. coli* RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Molecular Cell*, **50**, 430-436.

## ALLEGATO

Promotori	Modulatori	Nucleotidi	% RP	Taglia DNA (bp)	Lunghezza DNA libero (nm)	Lunghezza DNA nei complessi (nm)	Accorciamento del DNA (nm)	Figura
<i>rrnB</i> P1	--	ATP + CTP	6,7	1035	334,8 ± 0,5 (329)	317,4 ± 0,8 (351)	17,4 ± 0,9	3.11
<i>rrnB</i> P1	200 µM ppGpp	ATP + CTP	6,1	1035	333,0 ± 0,7 (330)	316,9 ± 0,8 (333)	16,1 ± 1,1	3.13
<i>rrnA</i> P1	--	ATP + CTP	6,4	1044	337,3 ± 0,3 (324)	321,9 ± 0,4 (390)	15,4 ± 0,5	3.12
<i>rrnA</i> P1	200 µM ppGpp	ATP + CTP	5,1	1044	339,1 ± 0,4 (310)	321,9 ± 0,7 (354)	17,2 ± 0,8	3.14
<i>rrnB</i> P1	325 nM DksA	ATP + CTP	4,6	1035	333,5 ± 0,5 (327)	327,9 ± 0,7 (321)	5,6 ± 0,9	3.15
<i>rrnB</i> P1	650 nM DksA	ATP + CTP	4,6	1035	333,2 ± 0,6 (339)	331,1 ± 1,0 (345)	2,1 ± 1,2	3.15
<i>rrnA</i> P1	325 nM DksA	ATP + CTP	4,2	1044	335,2 ± 0,4 (249)	329,9 ± 0,6 (360)	5,3 ± 0,7	3.15
<i>rrnA</i> P1	650 nM DksA	ATP + CTP	4,4	1044	335,2 ± 0,5 (227)	334,1 ± 0,4 (422)	1,1 ± 0,6	3.15
<i>rrnB</i> P1	200 µM ppGpp 105 nM DksA	ATP + CTP	3,7	1035	337,7 ± 0,4 (351)	325,3 ± 0,8 (314)	12,4 ± 0,9	3.16
<i>rrnB</i> P1	200 µM ppGpp 325 nM DksA	ATP + CTP	3,9	1035	332,6 ± 0,6 (349)	328,1 ± 0,9 (328)	4,5 ± 1,1	3.16
<i>rrnB</i> P1	200 µM ppGpp 650 nM DksA	ATP + CTP	3,5	1035	336,4 ± 0,3 (324)	334,6 ± 0,6 (336)	1,8 ± 0,7	3.16
<i>rrnB</i> P1	--	--	2,8	1035	338,1 ± 0,3 (347)	336,7 ± 0,4 (306)	1,4 ± 0,2	3.17
<i>rrnB</i> P1	650 nM DksA	10x ATP + CTP	6,4	1035	338,0 ± 0,4 (313)	323,5 ± 0,5 (399)	14,5 ± 0,3	3.17

**Tabella 1.** Riassunto dei risultati ottenuti sui promotori *rrn*. Tra parentesi è riportato il numero di molecole analizzate.

Promotori	Modulatori	Nucleotidi	% RP	Taglia DNA (bp)	Lunghezza DNA libero (nm)	Lunghezza DNA nei complessi (nm)	Accorciamento del DNA (nm)	Figura
$P_R$	--	--	23,9	1004	322,1 ± 0,7 (204)	292,8 ± 0,9 (336)	29,3 ± 1,1	3.28
$P_R$	200 µM ppGpp	--	4,8	1004	326,4 ± 0,6 (359)	310,7 ± 1,1 (347)	15,7 ± 1,3	3.29
$P_R$	25 µM ppGpp	--	15,9	1004	324,7 ± 0,3 (351)	293,4 ± 0,8 (186) 308,0 ± 0,7 (227)	31,3 ± 0,9 16,7 ± 0,8	3.30
$P_R$	200 µM ppGpp	ATP + UTP	11,5	1004	325,8 ± 0,4 (341)	309,6 ± 0,9 (342)	16,2 ± 1,0	3.31
$P_R$	200 µM ppGpp added after RP <sub>0</sub>	--	21,3	1004	325,6 ± 0,4 (136)	297,9 ± 0,5 (456)	27,7 ± 0,6	3.31
$P_R$	325 nM DksA	--	25,2	1004	323,6 ± 0,4 (256)	291,2 ± 0,7 (345)	32,4 ± 0,8	3.32
$P_R$	650 nM DksA	--	25,1	1004	323,0 ± 0,4 (277)	295,1 ± 0,7 (385)	27,9 ± 0,8	3.32
$P_R$	200 µM ppGpp 105 nM DksA	--	6,5	1004	325,0 ± 0,3 (311)	307,7 ± 1,0 (385)	17,3 ± 1,0	3.33
$P_R$	200 µM ppGpp 325 nM DksA	--	11,1	1004	322,9 ± 0,5 (333)	303,2 ± 0,9 (349)	19,7 ± 1,0	3.33
$P_R$	200 µM ppGpp 650 nM DksA	--	10,6	1004	325,0 ± 0,4 (330)	302,9 ± 0,9 (356)	22,1 ± 1,0	3.33

**Tabella 2.** Riassunto dei risultati ottenuti sul promotore  $P_R$ . Tra parentesi è riportato il numero di molecole analizzate.

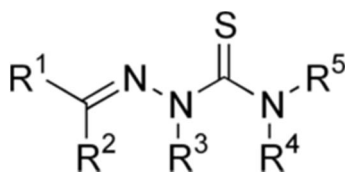
## APPENDICE I

### Studio del meccanismo d'azione del *bis (S-citronellaltiosemicarbazonato) nickel(II)*, un tiosemicarbazone ad attività antiproliferativa

#### 1. INTRODUZIONE

Il cancro, con oltre 12 milioni di casi diagnosticati ogni anno, è la malattia a più alta incidenza nell'uomo. Nonostante il continuo sviluppo di terapie sempre più efficaci abbia permesso di ridurre fortemente il tasso di mortalità ad esso associato, rimane impellente la necessità di mettere a punto nuove strategie anti-tumorali altamente selettive, in grado di evitare i gravi effetti collaterali che spesso determinano una drastica riduzione della reale efficacia dei farmaci disponibili. La chemioterapia, nata negli anni '40 con l'impiego delle prime "mostarde azotate" e dei folato-antagonisti, è tuttora la strategia d'elezione per il trattamento dei tumori; tuttavia, le forti limitazioni d'impiego dovute alla tossicità dei composti utilizzati spinge la ricerca verso l'identificazione di molecole che, pur mantenendo la loro efficacia antiproliferativa, siano in grado di agire con maggiore selettività così da danneggiare i tessuti patologici, preservando allo stesso tempo l'integrità di quelli sani (Chamber and Roberts, 2005).

Lo sviluppo di nuovi farmaci chemioterapici prende spesso avvio da molecole già note per la loro attività biologica, cercando di ottimizzarne l'azione terapeutica attraverso la parziale modificazione della loro struttura. Una classe di composti noti da tempo per le importanti proprietà antiproliferative, inizialmente su batteri e virus, successivamente anche su cellule tumorali, è rappresentata dai tiosemicarbazoni (TSCs), che si ottengono per condensazione di aldeidi e chetoni alifatici, aromatici o eterociclici con tiosemicarbazidi (Figura 1.1).



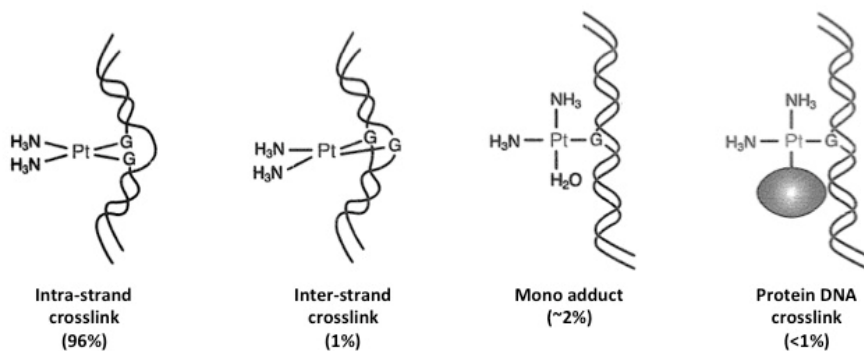
**Figura 1.1.** Formula di struttura generale dei tiosemicarbazoni;  $\text{R}^{1,2,3,4,5} = \text{H}$  o altri sostituenti organici.

Negli ultimi anni grande attenzione è stata posta ai complessi metallici dei tiosemicarbazoni, nei quali essi si comportano come ligandi chelanti lo ione (in genere  $\text{Fe}^{2+}$ ,

$\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Ni}^{2+}$ ); la coordinazione del metallo tende a disporre le molecole in modo da formare una superficie idrofobica che ne aumenta la capacità di attraversamento delle membrane biologiche per semplice diffusione passiva (Casas *et al*, 2000; Pelosi, 2010). In alcuni casi i ligandi hanno attività biologica intrinseca; tuttavia è stato dimostrato come essa possa essere associata proprio alla presenza del metallo coordinato, dal momento la sua rimozione può provocare l'inattivazione del composto (Kizilcikli *et al*, 2007).

Numerosi lavori hanno cercato di definire i bersagli molecolari ed il meccanismo d'azione di molti tiosemicarbazoni coordinanti diversi ioni metallici; da questi studi sono emerse svariate ipotesi circa le modalità secondo cui agiscono queste molecole a spiccata attività antiproliferativa: uno dei primi *target* identificati è stata la ribonucleotide reductasi, enzima in grado di ridurre i ribonucleotidi a deossiribonucleotidi, fondamentale quindi per la sintesi del DNA; molecole capaci di inibire tale enzima si sono rivelate efficaci nel bloccare la crescita di cellule altamente proliferanti (Sartorelli *et al*, 1976; Thelander *et al*, 1983); molti tiosemicarbazoni sono risultati attivi nei confronti di questo enzima solo quando complessati a ioni metallici (Trossini *et al*, 2009). Un altro meccanismo d'azione, sfruttato da alcuni TSCs, risulta essere la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS): il centro metallico dei complessi tiosemicarbazonici può infatti attivare l'ossigeno generando radicali che possono interagire con diverse macromolecole biologiche, principalmente DNA (Gómez-Saiz *et al*, 2008). Alcuni complessi metallici dei tiosemicarbazoni hanno mostrato attività inibitoria nei confronti della P-Glicoproteina 1, anche nota come MDR1 (*Multidrug Resistance Type 1*), un membro delle proteine ABC (*ATP Binding Cassette*) coinvolte nella resistenza ai farmaci tipicamente associata ad alcuni tipi di tumori. I derivati dell'istatin- $\beta$ -tiosemicarbazone, per esempio, agiscono da inibitori di MDR1, limitando la sua capacità di espellere molecole tossiche dalle cellule tumorali, favorendo in questo modo l'attivazione della cascata apoptotica (Hall *et al*, 2009). Anche la topoisomerasi II risulta essere un bersaglio molecolare di molti complessi metallici dei TSCs: la sua attività è necessaria per ridurre i superavvolgimenti provocati dal processo di replicazione del DNA ed essa è quindi essenziale soprattutto in cellule altamente proliferanti, come le cellule tumorali; alcuni composti inibiscono l'attività di questo enzima, spesso bloccandolo nel complesso legato al DNA, dopo che questo è stato tagliato e prima che possa avvenire la chiusura del conseguente *gap*. L'effetto di un'inibizione di questo tipo è un evidente danno alla doppia elica che, quando riconosciuto dai sistemi di riparo del DNA, può indurre l'apoptosi (Chen *et*

*al*, 2004). Dal momento che molti complessi metallici dei tiosemicarbazoni sono caratterizzati da una struttura planare, è stato ipotizzato che essi possano legare direttamente il DNA mediante un fenomeno di intercalazione; risulta tuttavia evidente che la presenza di un catione metallico bivalente può permettere, oltre a quella appena citata, modalità alternative di interazione con la doppia elica; un esempio in tal senso è fornito dal cisplatino (cis-diclorodiamminoplatino, cDDP), il chemioterapico attualmente più utilizzato, la cui struttura ed attività si basano sulla coordinazione di un atomo di Pt(II). Esso è impiegato come principale terapia per il trattamento di vari tipi di tumori solidi, quali quelli ai testicoli, alle ovaie, all'utero o ai polmoni, e può anche essere utilizzato come adiuvante terapeutico a seguito di radioterapia o asportazione chirurgica della massa tumorale (Alderden *et al*, 2006). La penetrazione del cisplatino nelle cellule avviene sia per diffusione passiva che attraverso diversi trasportatori di membrana (Hall *et al*, 2008); nel citoplasma il composto viene idrolizzato grazie alla ridotta concentrazione di ioni cloruro (4 mM) rispetto a quella plasmatica (103 mM) e tale idrolisi risulta fondamentale in quanto la forma solvatata del cisplatino è quella biologicamente attiva: essa costituisce un potente elettrofilo capace di reagire con una grande varietà di nucleofili, compresi gli acidi nucleici e i gruppi sulfidrilici delle proteine. Il suo target principale è comunque rappresentato dal DNA: l'atomo di platino del composto è infatti in grado di legare covalentemente l'azoto 7 delle purine, provocando la formazione di monoaddotti al DNA, il *crosslink* intra- ed interfilamento ed il *crosslink* fra DNA e proteine (Figura 1.2). I legami crociati fra due guanine di uno stesso filamento sono le lesioni più frequentemente causate dal cisplatino e, per questo, maggiormente responsabili della sua citotossicità.



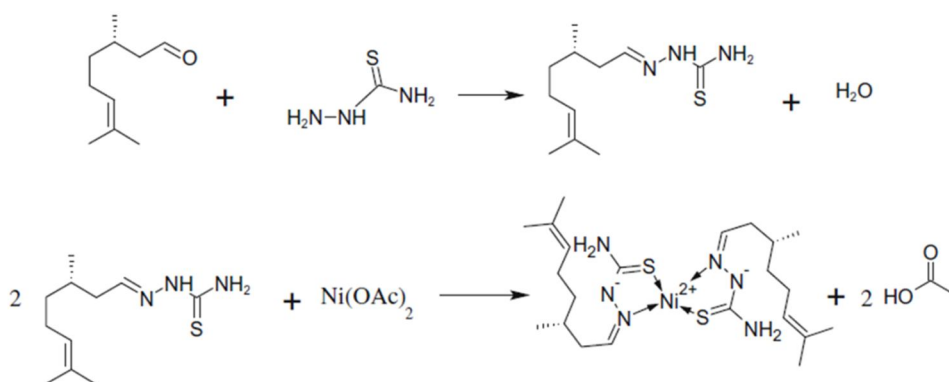
**Figura 1.2.** Rappresentazione schematica dei meccanismi d'azione del cisplatino.

L'efficacia di un chemioterapico dipende, oltre che dal suo meccanismo d'azione, anche dalla sua capacità di eludere i sistemi detossificanti e riparativi delle cellule bersaglio. Le alterazioni nella struttura del DNA provocate dal cisplatino, per esempio, possono essere riconosciute da proteine cellulari deputate alla riparazione degli stessi. Il sistema NER (*Nucleotide Excision Repair*) è il principale sistema di riparo del danno rappresentato da *crosslink* intrafilamento; risultano inoltre coinvolti i sistemi di riparo accoppiati alla trascrizione (TCR, *Transcription Coupled Repair*), e quelli per ricombinazione omologa (HR, *Homolog Recombination*) e per sintesi translesione, che rappresentano l'ultima possibilità per la cellula di superare il blocco della replicazione indotto dal *crosslink* intrafilamento del DNA. Il meccanismo d'azione del cisplatino bypassa la resistenza mediata da questi sistemi di riparo perché promuove l'attivazione di p53 e c-Abl, proteine coinvolte nell'attivazione di differenti cascate apoptotiche (Basu and Krishnamurthy, 2010).

Una forte limitazione imputabile alle attuali strategie chemioterapiche, oltre alla tossicità sistemica che queste generalmente determinano alle dosi efficaci per una corretta terapia, va ricercata nello sviluppo di meccanismi di resistenza da parte delle cellule tumorali. Per esempio, diversi tipi di resistenza possono essere sviluppati da una cellula per sopravvivere al trattamento con cisplatino: essa può derivare da un maggior tasso di riparazione o tolleranza del danno indotto dallo xenobiotico al DNA o ad altri bersagli cellulari, dall'aumentata capacità delle cellule tumorali di evadere l'apoptosi e da una riduzione dell'accumulo cellulare del farmaco, che può essere dovuto sia ad un minor *uptake* che ad un maggiore efflusso dello stesso, oppure ad un più efficace detossificazione mediata da tioli cellulari quali glutatione e metallotioneine. Per queste ragioni, numerosi studi si sono concentrati sull'approfondimento del meccanismo d'azione del cisplatino per identificare possibili strategie utili a limitarne gli effetti collaterali, oltre che sullo sviluppo di molecole analoghe che potessero avere i medesimi effetti terapeutici, associati però ad una riduzione della tossicità e della resistenza cellulare. Alcune sostanze come il carboplatino o l'oxaliplatino sono già impiegate in diversi protocolli terapeutici. Purtroppo, tumori resistenti al cisplatino mostrano spesso anche cross-resistenza ai suoi analoghi; questo genera l'esigenza di sintetizzare molecole altrettanto efficaci, ma di natura diversa e non soggette a meccanismi molecolari che permettano alla cellula di limitarne l'attività farmacologica (Siddik, 2003). Visto il ruolo del Pt(II) nell'attività biologica del cisplatino, grande interesse è attualmente rivolto nei confronti di molecole a base metallica. Numerosi composti

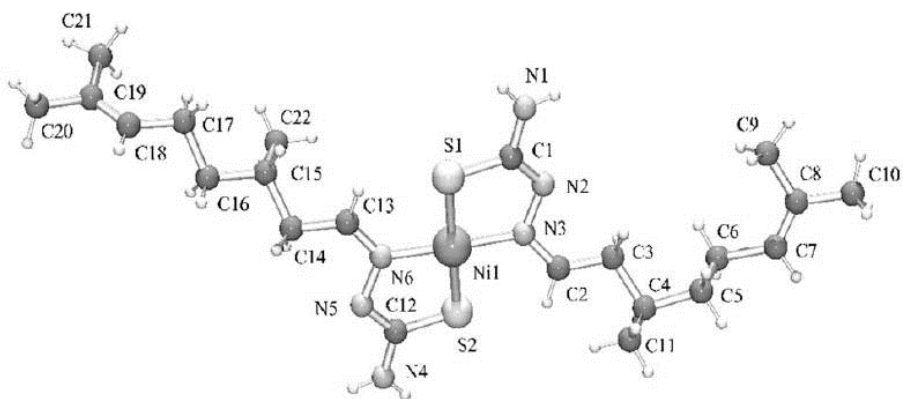
complessati con l'oro, il rutenio, il gallio oppure con metalli naturalmente presenti nell'organismo come il ferro, il nichel o il rame sono ad oggi in fase di sperimentazione clinica. Si ritiene che l'utilizzo di elementi endogeni (soprattutto Ni(II) e Cu(II)) possa portare ad importanti sviluppi nel campo della chemioterapia dal momento che essi sono altamente tollerabili dall'organismo e sono in grado di indurre morte cellulare attraverso meccanismi alternativi all'apoptosi (paraptosi, autofagia, ecc.), risultando efficaci anche contro i tumori resistenti ai farmaci proapoptotici (Clarke *et al*, 1999).

Fra i più promettenti composti complessati con ferro, nichel o rame ad attività antineoplastica si annoverano quelli i cui ligandi sono rappresentati dai tiosemicarbazoni. Un importante sottoinsieme di questi è costituito dai TSCs derivati da aldeidi naturali, come citronellale, retinale o citrale, in genere complessati ad atomi di rame o nichel. E' in questo contesto che si inserisce il presente lavoro di ricerca, svolto in collaborazione con il gruppo del Prof. Giorgio Pelosi del Dipartimento di Chimica dell'Università degli Studi di Parma e la Prof.ssa Buschini del Dipartimento di Bioscienze. In un lavoro precedentemente pubblicato da questi due gruppi di ricerca è stata descritta la sintesi di un nuovo composto a potenziale attività antiproliferativa, il bis(S-citronellaltiosemicarbazonato)nichel(II) ( $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ ), e ne è stata determinata preliminarmente l'attività biologica. Il  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  è sintetizzato attraverso due reazioni successive: la prima avviene tra citronellale e tiosemicarbazide e genera il solo ligando; la seconda ha come reagenti il ligando stesso ( $[\text{Htcitr}]$ ) e l'acetato di nichel(II) e consente la sintesi del complesso metallico attivo (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Sintesi del ligando [Htcitr] (sopra) e del complesso con il Ni(II), chiamato  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  (sotto) (adattata da Buschini *et al*, 2009).

Il complesso con il metallo ha una costante di ripartizione, indicativa del livello di idrofilia o idrofobia, pari a  $\log P_{OW} = 2.94 \pm 0.05$ , maggiore rispetto a quella del solo ligando ( $1.66 \pm 0.01$ ); i valori logaritmici di questa costante sono tipicamente negativi per sostanze ad alto carattere idrofilo, mentre risultano positivi e crescenti all'aumentare del carattere idrofobico del composto; in particolare, valori compresi tra 2 e 4 sono indicativi di un'eccellente capacità penetrante attraverso le membrane fosfolipidiche. Il valore osservato può essere giustificato dal fatto che nel  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  la porzione polare del ligando risulta mascherata dalla coordinazione col metallo, enfatizzando in questo modo il ruolo apolare delle lunghe catene alifatiche. È stato quindi ipotizzato che in acqua la loro flessibilità possa facilitarne l'impacchettamento attorno al catione metallico, favorendo l'attraversamento del doppio strato fosfolipidico durante l'ingresso nelle cellule bersaglio. Un'altra importante caratteristica strutturale del composto è la presenza di legami a idrogeno che coinvolgono i gruppi amminici terminali e l'azoto deprotonato dell'idrazina; questi atomi, insieme alle posizioni apicali del metallo, costituiscono i punti potenzialmente più adatti all'interazione del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  con enzimi, acidi nucleici o altre macromolecole biologiche e sono quindi le posizioni critiche per la sua attività biologica (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Struttura cristallografica del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  (adattata da Buschini *et al*, 2009).

Per gli studi preliminari riguardanti gli effetti ed il meccanismo d'azione del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  sono stati utilizzati diversi approcci sperimentali basati sull'impiego di cellule linfocitiche non proliferanti (in fase  $G_0$ ), cellule indotte alla proliferazione, e cellule p-53 difettive (U937) derivanti da linfoma istiocitico umano. È emerso che il trattamento di cellule della linea

U937 con il  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  induce l'arresto del ciclo cellulare in fase  $G_2/M$  e determina l'attivazione dell'apoptosi mediata da un aumento della permeabilità della membrana mitocondriale, da una down-regolazione di Bcl-2 (proteina ad attività antiapoptotica) e dall'attivazione della caspasi 3. Confrontando gli effetti del complesso metallico osservati sulla linea cellulare U937 con quelli riscontrabili su cellule quiescenti (in fase  $G_0$ ) è stato dimostrato che l'induzione dell'apoptosi osservata sulle cellule proliferanti non si verifica in cellule non in attiva proliferazione. Inoltre, il trattamento delle stesse cellule con uguali concentrazioni di Ni(II) libero non determina gli stessi effetti: l' $IC_{50}$  del complesso è infatti risultata pari a  $14,4 \mu\text{M}$  mentre il Ni(II) non complessato dai ligandi determina effetti simili a concentrazioni superiori a  $320 \mu\text{M}$ . Esperimenti basati sul *Comet assay* in ambiente alcalino (che a differenza di quello condotto in ambiente neutro è utilizzato per visualizzare specificamente le rotture a singolo filamento) hanno indicato un evidente danno al DNA indotto dal  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ , ma lo stesso saggio condotto in presenza di una specifica endonucleasi capace di riconoscere le basi ossidate (ENDOIII), ha rivelato che solo una parte di tale danno è giustificabile considerando lo stress ossidativo. Alla luce di queste evidenze sperimentali gli autori hanno ipotizzato che la morte cellulare programmata dovesse essere provocata da un insulto di tipo genotossico o da un'eccessiva o alterata attivazione dei meccanismi di riparo del DNA (Buschini *et al*, 2009). Ulteriori studi sono perciò risultati necessari per comprendere a fondo il meccanismo d'azione di questo nuovo tiosemicarbazone complessato con il Ni(II) e per individuare il suo bersaglio molecolare all'interno della cellula.

## 2. SCOPO DELLA RICERCA

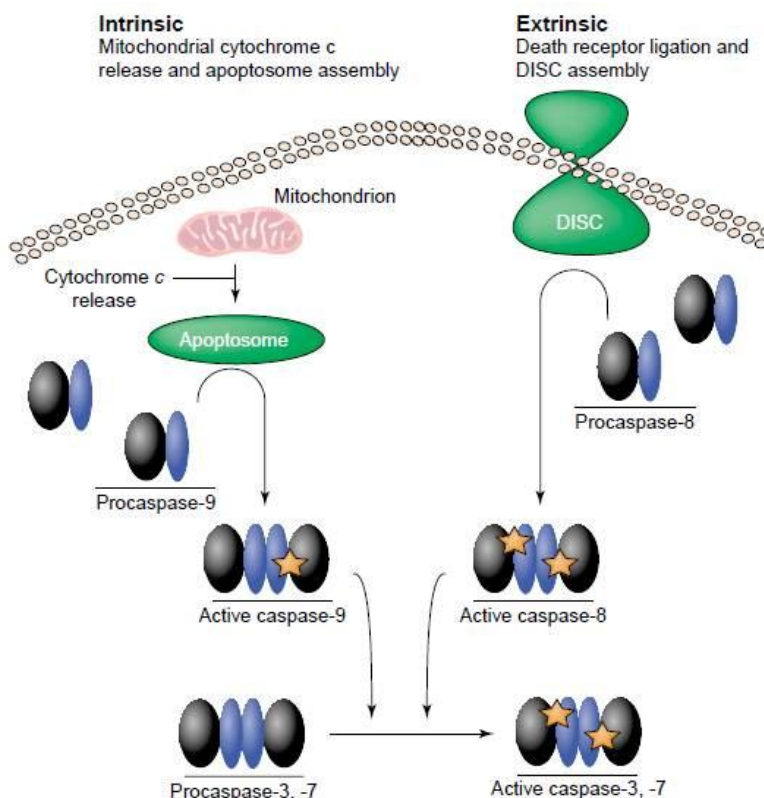
I risultati preliminari emersi dal lavoro descritto nel precedente capitolo hanno dimostrato le proprietà antiproliferative del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ , ma non sono stati sufficienti a chiarirne il meccanismo d'azione e soprattutto non hanno permesso di individuarne il reale bersaglio molecolare (Buschini *et al*, 2009). Il presente studio si è quindi posto come obiettivo quello di approfondire gli aspetti non ancora definiti circa l'attività del complesso metallico, sia dal punto di vista del meccanismo d'azione a livello molecolare che per quanto riguarda gli effetti che esso provoca su diversi aspetti della fisiologia cellulare. A tale scopo sono stati allestiti numerosi saggi, sia *in vivo* che *in vitro*. Il nostro ruolo nella collaborazione con i gruppi di ricerca del Prof. Pelosi (Dipartimento di Chimica), della Prof.ssa Buschini

(Dipartimento di Bioscienze) e con le Dott.sse Pinelli e Alinovi (Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale) dell'Università degli Studi di Parma ha riguardato dapprima l'individuazione del bersaglio molecolare del complesso metallico attraverso *band shift assay* su gel d'agarosio e saggi fluorimetrici e, successivamente, la caratterizzazione mediante microscopia a forza atomica e *laser optical tweezers* degli effetti che questo provoca a livello strutturale legandosi direttamente al DNA.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONI

#### 3.1. Riposta cellulare al trattamento con $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ : induzione dell'apoptosi

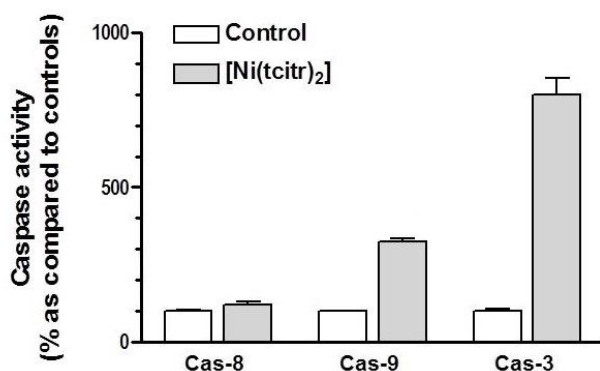
Nel lavoro di caratterizzazione preliminare dell'attività del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  è stata messa in evidenza la sua capacità di arrestare il ciclo cellulare e di portare all'attivazione dell'apoptosi mediata dalla caspasi 3, una delle tre caspasi "effetttrici" responsabili dei processi che conducono alla morte cellulare programmata (Buschini *et al*, 2009).



**Figura 3.1.** Schema riassuntivo dell'attivazione caspasi-mediated dell'apoptosi intrinseca ed estrinseca (adattata da Boatright and Salvesen, 2003).

Per approfondire il ruolo dell'apoptosi caspasi-mediata nella risposta cellulare al trattamento con il complesso metallico è stata valutata l'induzione della caspasi 8 e della caspasi 9 in seguito all'esposizione allo stesso; queste caspasi sono dette "iniziatrici" in quanto attivano quelle effettrici attraverso proteolisi sito-specifica; la caspasi 8 viene attivata a sua volta da segnali extracellulari e l'apoptosi da essa indotta è quindi di tipo estrinseco; al contrario la caspasi 9 è attivata da segnali di danno intracellulare ed essa determina quindi un'apoptosi di tipo intrinseco (Fulda and Debatin, 2006) (Figura 3.1).

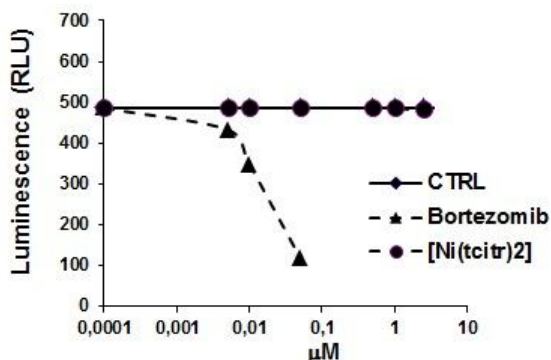
Per investigare l'attivazione delle diverse caspasi, cellule della linea U937 sono state sottoposte a trattamento con 14,4  $\mu\text{M}$  di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  (pari alla sua  $\text{IC}_{50}$ ). Dopo 12 ore di esposizione si è proceduto alla lisi cellulare ed all'aggiunta di substrati specifici per le tre diverse caspasi, rappresentati da tre diversi oligopeptidi (vedi Materiali e Metodi); ognuno di essi, se proteolizzato, dà vita ad un prodotto colorimetrico differente e facilmente quantificabile. Questo saggio ha permesso di osservare una significativa attivazione della caspasi 3 e della caspasi 9, mentre la caspasi 8 non è risultata attivata dal trattamento. Nell'esperimento di controllo, in cui le cellule sono state trattate con il solo solvente (DMSO), non si è verificata alcuna attivazione (Figura 3.2). Questi risultati confermano che l'apoptosi indotta dal trattamento è di tipo intrinseco, in accordo con la depolarizzazione della membrana mitocondriale riscontrata nel precedente lavoro (Buschini *et al*, 2009).



**Figura 3.2.** Attività delle caspasi 8, 9 e 3 misurata dopo 12 ore di trattamento con  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$

Dal momento che l'attività del proteasoma risulta strettamente correlata alla regolazione della crescita cellulare e ai processi apoptotici (Tu *et al*, 2012) e che studi recenti hanno riportato una forte inibizione della sua attività da parte di alcuni complessi metallici (Verani,

2012), è stato messo a punto un saggio atto a definire l'eventuale capacità del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  di agire in tal senso. Si è potuto osservare che il trattamento di cellule proliferanti con concentrazioni comprese tra 0 e 50  $\mu\text{M}$  di complesso metallico non riduce la proteolisi proteasoma-mediata rispetto a quanto osservato utilizzando il solo solvente (DMSO); al contrario l'impiego del Bortezomib (un inibitore del proteasoma approvato dalla FDA) provoca un drastico calo di tale attività. Il saggio utilizzato risulta altamente sensibile in quanto si basa sulla luminescenza emessa dalla luciferasi attivata ad aminoluciferasi in seguito al taglio proteolitico mediato dal proteasoma: l'inibizione dello stesso da parte del Bortezomib impedisce l'attivazione proteolitica dell'aminoluciferasi, riducendo fortemente la luminescenza misurabile; effetti analoghi non sono stati osservati in seguito a trattamento col solo DMSO (come atteso), né con concentrazioni crescenti di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  (Figura 3.3) ad indicare che esso non agisce inibendo il proteasoma.

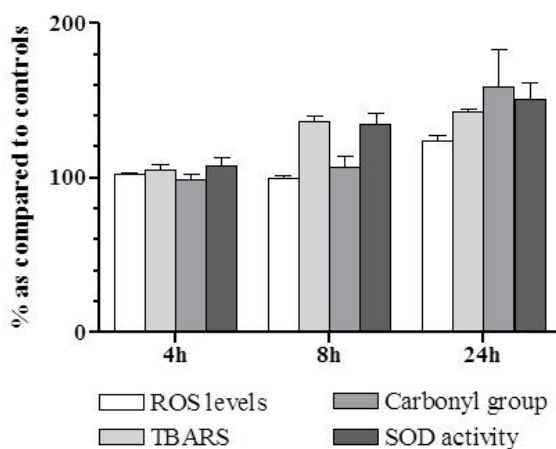


**Figura 3.3.** Effetto di concentrazioni crescenti di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  sull'attività del proteasoma di cellule U937. Il Bortezomib è stato utilizzato come controllo positivo, mentre il DMSO come controllo negativo.

### 3.2. Stress ossidativo indotto dal $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$

I complessi metallici spesso inducono un significativo aumento della concentrazione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) causando numerosi danni a diverse componenti cellulari, come le membrane fosfolipidiche, le proteine e gli acidi nucleici (Jomovaa and Valko, 2011). Nel precedente lavoro è stato osservato che il  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  può causare danno ossidativo al DNA, ma solo a concentrazioni molto elevate (Buschini *et al*, 2009); in questo studio si è proceduto alla valutazione dello stress ossidativo indotto dal composto su diversi aspetti del metabolismo cellulare. La

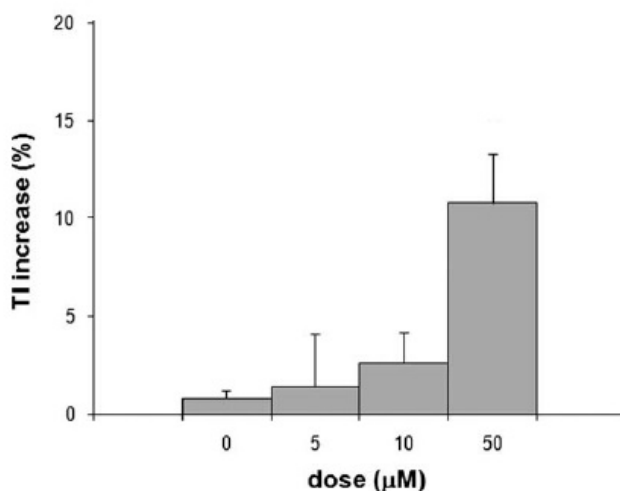
generazione di specie reattive dell'ossigeno in seguito a esposizione di cellule U937 a concentrazioni pari all'IC<sub>50</sub> di [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] (14,4μM) è stata monitorata misurando la fluorescenza emessa dalla DCF (2',7'-diclorofluoresceina), un composto polare e fluorescente, in seguito alla rimozione del gruppo acetato da parte di esterasi intracellulari ed alla successiva ossidazione del DCFH-DA (2',7'-diclorodididrofluoresceina-diacetato), composto apolare e non fluorescente, da parte delle ROS eventualmente presenti nelle cellule analizzate. Come mostra l'istogramma nella Figura 3.4 (barre bianche) solo dopo 24 ore di trattamento si ha un aumento intracellulare di ROS significativo se confrontato con quello che si osserva in cellule trattate con DMSO (controllo negativo). E' stato inoltre possibile osservare, già dopo 8 ore di trattamento, un importante incremento dell'attività della Superossido Dismutasi (SOD) in risposta all'aumento delle ROS (barre grigio scuro), necessaria per la conversione dei radicali in un composto meno reattivo come l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Monitorando la concentrazione delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS), sottoprodotti della perossidazione dei lipidi, si è potuto anche constatare un importante aumento delle stesse in seguito a trattamento con [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] già dopo 8 ore, ma il prolungamento fino a 24 ore non ha determinato un ulteriore incremento della perossidazione lipidica (barre grigio chiaro). Il sensibile aumento dei gruppi carbonilici misurato mediante un metodo rapido e sensibile, già impiegato con successo in altri studi (Vettori *et al*, 2005), ha inoltre evidenziato che tra le 8 e le 24 ore si assiste ad una forte ossidazione anche a carico delle componenti proteiche della cellula (barre grigie).



**Figura 3.4.** Indicatori di danno ossidativo presi in considerazione nel presente lavoro sperimentale.

Dato il suo importante ruolo nella riduzione del danno associato allo stress ossidativo, si è proceduto alla quantificazione dei livelli di glutatione intracellulare (GSH): utilizzando un kit commerciale basato su un metodo colorimetrico non si è riscontrata alcuna variazione nei suoi livelli in seguito al trattamento ad indicare che il  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  non riduce la concentrazione intracellulare di questo importante tripeptide ad azione antiossidante, pur provocando un consistente aumento dei livelli di specie radicaliche.

Il danno ossidativo a carico del DNA dimostrato da precedenti analisi attraverso la tecnica del *Comet assay* in ambiente alcalino in presenza dell'enzima ENDOIII (Figura 3.5, Buschini *et al*, 2009), associato all'aumento delle ROS, al danno ossidativo a carico dei lipidi e delle proteine ed al concomitante incremento dell'attività della SOD, sebbene non accompagnato da un consumo evidente di glutatione, confermano la capacità del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  di indurre un significativo aumento dei radicali all'interno della cellula; ciò potrebbe in parte spiegare l'induzione dell'apoptosi mediata dall'attivazione della caspasi 9. Tuttavia, l'intensità degli effetti a carico del DNA nucleare non è giustificabile considerando il solo contributo dei radicali dell'ossigeno e ulteriori indagini sono risultate necessarie per comprendere il reale meccanismo d'azione del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ .



**Figura 3.5.** Danno ossidativo al DNA evidenziato mediante *Comet assay* in ambiente alcalino in presenza dell'enzima batterico ENDOIII; il dato è riportato come aumento % dell'intensità della coda (TI %) confrontata con quella osservata in assenza di enzima (adattata da Buschini *et al*, 2009).

### 3.3. Attività genotossica e mutagenica del [Ni(tcitr)<sub>2</sub>]

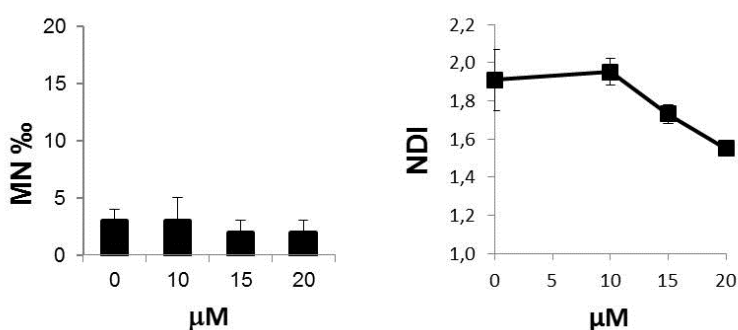
Molti degli effetti collaterali di diversi composti chemioterapici sono imputabili alla loro attività mutagenica. Dal momento che il [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] è in grado di provocare un aumento della migrazione del DNA visualizzabile mediante *Comet assay* in ambiente alcalino anche a dosi subletali (Buschini *et al*, 2009) si è deciso di valutare la sua capacità di indurre mutazioni geniche o cromosomiche; tale capacità può essere saggiata utilizzando rispettivamente il *Salmonella reversion test* ed il test dei micronuclei. Il *Salmonella reversion test* (o test di Ames) è diffusamente impiegato per la valutazione del potere mutagenico degli xenobiotici e permette di identificare diversi tipi di mutazioni geniche attraverso l'utilizzo di diversi ceppi batterici di *Salmonella typhimurium*. Il test si basa sulla valutazione della capacità di un sospetto mutageno di provocare la reversione del carattere auxotrofo *his<sup>-</sup>* in un ceppo mutato, rendendolo capace di sopravvivere in un terreno privo di istidina; l'utilizzo di ceppi in cui l'auxotrofia è causata da mutazioni di diverso tipo (puntiformi, *frameshift*, ecc.) permette di individuare lo specifico effetto mutageno eventualmente indotto dallo xenobiotico in studio. Per superare il limite provocato dall'utilizzo di cellule batteriche in coltura, ovvero l'incapacità di mettere in luce la mutagenicità di eventuali metaboliti del composto in studio, il test viene condotto anche in presenza di un estratto di epatociti di ratto (chiamato S9) contenente gli enzimi coinvolti nel metabolismo delle sostanze esogene (Maron and Ames, 1983). L'impiego di questo saggio ha permesso di dimostrare che il [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] non causa un aumento significativo del numero di revertenti se confrontato con quello provocato dai due composti utilizzati come controlli positivi (icantone e 2-aminofluorene) né nel ceppo TA98 (adatto per l'individuazione di mutazioni *frameshift*), né nel ceppo TA100 (specifico per l'individuazione di mutazioni puntiformi). Il risultato osservato non cambia significativamente se alle piastre di coltura viene aggiunto l'estratto S9, ad indicare che né il [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] né suoi metaboliti inducono mutazioni genetiche, neanche alle più alte concentrazioni testate, pari a 100 µg/piastra (Tabella 1).

	TA98 (-S9)	TA98 (+S9)	TA100 (-S9)	TA100 (+S9)
[Ni(tcitr) <sub>2</sub> ] 0 µg/plate	18±4	24±3	193± 8	166±1
[Ni(tcitr) <sub>2</sub> ] 2,5 µg/plate	17±5	34±3	197±15	201±13
[Ni(tcitr) <sub>2</sub> ] 5 µg/plate	17±1	20±1	184±22	194±24
[Ni(tcitr) <sub>2</sub> ] 10 µg/plate	16±5	19±2	188± 3	182±20
[Ni(tcitr) <sub>2</sub> ] 50 µg/plate	13±2	21±4	187±31	200±27
[Ni(tcitr) <sub>2</sub> ] 100 µg/plate	17±3	18±3	178±11	174±9
Hycanthone 50 µg/plate	<u>1083±247</u>	--	<u>1154±182</u>	--
2-aminofluorene 50 µg/plate	--	<u>706±59</u>	--	<u>515± 7</u>

**Tabella 1.** Revertenti indotti dal trattamento con diverse concentrazioni di [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] in due ceppi di *Salmonella typhimurium*, in presenza (+) o assenza (-) dell'estratto S9. E' indicato il numero medio ± la deviazione standard, ottenuto da tre diverse piastre per ogni trattamento. L'icantone (50 µg/piastra) ed il 2-aminofluorene (50 µg/piastra) sono stati utilizzati come controlli positivi. Un aumento significativo di revertenti rispetto al controllo negativo è indicato mediante sottolineatura del numero osservato.

Per valutare gli eventuali danni cromosomici provocati dal [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] è stato impiegato il test dei micronuclei o *Cytokinesis-Block Micronucleus assay* (CBMN) su linfociti umani freschi, prelevati da soggetti giovani e sani, non fumatori e non esposti in precedenza a sostanze mutagene o a radiazioni di diverso tipo. Questo test si basa sul principio secondo il quale consistenti danni al DNA possono provocare, durante la divisione nucleare, la formazione di organelli aberranti simili al nucleo, ma di dimensioni notevolmente inferiori e contenenti frammenti genomici, la cui presenza è quindi indice di mutazioni cromosomiche; il numero di questi micronuclei osservati in seguito al trattamento di cellule linfocitiche sane con uno xenobiotico può quindi essere utilizzato per caratterizzarne la mutagenicità (Fenech, 2000). L'esposizione delle cellule a 10, 15 e 20 µM di [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] non ha provocato un aumento del numero di micronuclei (Figura 3.6, sinistra) se confrontato con il controllo negativo (DMSO) e con i controlli positivi (Bleomicina 6 µg/ml e Colcemide 0.02 µg/ml). Un ulteriore dato che può essere ottenuto da questo tipo di saggio cellulare è rappresentato dall'indice di divisione nucleare (*Nuclear Division Index*, NDI); esso permette di valutare il numero di cellule in attiva divisione all'interno di una coltura cellulare sottoposta a trattamento con uno xenobiotico attraverso la conta del numero di nuclei in fase di duplicazione: un valore di NDI pari a 2,0 indica che tutte le cellule sono andate incontro a duplicazione del nucleo, completando quindi il processo mitotico; al contrario, un valore

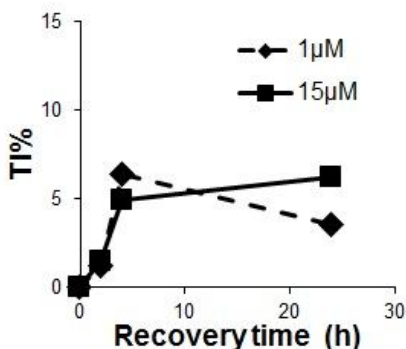
pari a 1,0 indica che nessuna delle cellule osservate è riuscita ad entrare in mitosi a causa di un blocco in una fase precedente del ciclo cellulare, generalmente provocato da importanti danni al genoma indotti dalla sostanza testata. Trattando linfociti umani freschi con concentrazioni crescenti di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  si è potuta osservare una riduzione significativa dell'NDI a concentrazioni superiori a 10  $\mu\text{M}$ ; questo risultato conferma le precedenti evidenze sperimentali, che indicavano il blocco delle cellule in fase  $G_2/M$ , prima quindi dell'inizio del processo mitotico (Figura 3.6, destra).



**Figura 3.6.** Frequenza di micronuclei (MN‰) osservati in seguito all'esposizione a concentrazioni crescenti di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  (sinistra); indice di divisione nucleare (NDI) osservato in seguito allo stesso tipo di trattamento (destra).

I dati ottenuti dal *Salmonella reversion test*, dal test dei micronuclei e dall'indice di divisione nucleare suggeriscono dunque che il  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  non ha attività mutagena; ciò non significa che esso non sia in grado di provocare errori o danni al DNA, ma indica che questi, se prodotti, non vengono fissati in quanto inducono il blocco del ciclo cellulare e stimolano l'attivazione dell'apoptosi che, come visto, è di tipo intrinseco essendo mediata dalla caspasi 9 ed associata all'aumento della permeabilità della membrana mitocondriale. Per confermare l'incapacità delle cellule U937 di riparare l'insulto genotossico provocato dal  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  si è proceduto incubandole per un'ora a 37°C con 1 e 15  $\mu\text{M}$  di complesso metallico, sostituendo poi il terreno contenente lo xenobiotico con terreno fresco. Il danno genomico indotto dal trattamento ad entrambe le concentrazioni testate, valutato misurando la quantità di DNA presente nella coda (TI%) con la versione alcalina del *Comet assay*, non viene ridotto dalla rimozione del composto, se non in misura limitata e solo in seguito al trattamento con la concentrazione più bassa di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ , pari ad 1 $\mu\text{M}$ , ad

indicare che i sistemi di riparo del danno al DNA non sono in grado, in queste condizioni, di evitare il blocco del ciclo cellulare e l'attivazione del processo apoptotico (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** *Comet assay* in ambiente alcalino utilizzato per valutare la capacità delle cellule di riparare i danni cromosomici indotti dal  $[\text{Ni}(\text{tctr})_2]$  in seguito alla sostituzione del terreno contenente il composto con terreno fresco. L'effetto è indicato come "intensità percentuale della coda" TI (%) confrontato con il valore ottenuto eseguendo il saggio dopo un'ora di trattamento ed è misurato dopo 2, 4 e 24 ore dalla rimozione del complesso metallico.

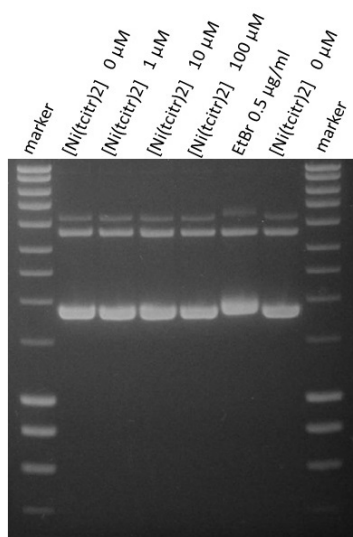
### 3.4. Individuazione del bersaglio molecolare del $[\text{Ni}(\text{tctr})_2]$

Il DNA è spesso il bersaglio molecolare di composti la cui struttura è basata sulla coordinazione di cationi metallici bivalenti; questi possono interagire con la doppia elica mediante coordinazione metallica nel solco minore o in quello maggiore, oppure attraverso legami non covalenti di tipo elettrostatico che si instaurano con le cariche negative dello scheletro fosfodiesterico. Un importante esempio è fornito dal cisplatino che, come visto, interagisce con il DNA determinando la formazione di monoaddotti, *crosslink* intra- ed interfilamento e *crosslink* tra DNA e proteine (Jamieson and Lippard, 1999). Allo scopo di valutare l'eventuale capacità del  $[\text{Ni}(\text{tctr})_2]$  di legarsi direttamente al DNA e di provocare una modificazione conformazionale dello stesso, in questo studio sono stati impiegati diversi approcci sperimentali basati sull'elettroforesi su gel d'agarosio, sulla fluorimetria, sul dicroismo circolare, sulla microscopia a forza atomica e sul *laser optical tweezers*. E' in questa fase che si inserisce il lavoro svolto dal nostro gruppo di ricerca.

#### **Shift assay su gel d'agarosio**

Precedenti analisi condotte dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Buschini hanno mostrato che il trattamento del plasmide pBR322 superavvolto con concentrazioni crescenti  $[\text{Ni}(\text{tctr})_2]$  non induce frammentazione, né una modificazione del grado di superavvolgimento,

permettendo di ipotizzare che le rotture a singolo filamento del DNA evidenziate dal *Comet assay* in ambiente alcalino dovessero essere indotte da meccanismi indiretti piuttosto che direttamente provocate dall'interazione del composto con gli acidi nucleici. In totale accordo con questa osservazione, incubando per un'ora a temperatura ambiente una quantità costante di plasmide pNEB193 superavvolto con concentrazioni crescenti di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  (0, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) non sono state riscontrate modificazioni evidenti della velocità di migrazione elettroforetica in confronto a quella del plasmide non trattato ed a quella osservata per il plasmide incubato con l'intercalante etidio bromuro (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), che invece ne riduce la velocità di migrazione (Figura 3.8).



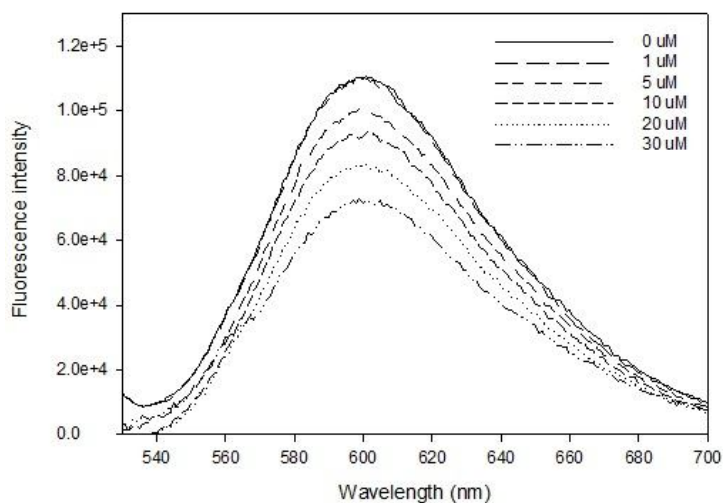
**Figura 3.8.** Elettroforesi su gel d'agarosio all'1,6% di aliquote di 350 ng del plasmide pNEB193 trattate con diverse concentrazioni di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  e con etidio bromuro 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Il gel è stato colorato mediante *staining* in EtBr al termine della corsa elettroforetica per non alterare la migrazione dei plasmidi.

La mancata osservazione di modificazioni nella velocità di migrazione dei plasmidi potrebbe essere dovuta alla bassa sensibilità del metodo elettroforetico, che impedisce di individuare piccole alterazioni della conformazione del DNA; oppure ad una scissione del complesso metallico sottoposto al campo elettrico, provocata dall'allontanamento del Ni(II) dai ligandi.

### Saggi fluorimetrici

Allo scopo di valutare con un metodo più adatto e sensibile il legame del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  al DNA e gli eventuali effetti che questo può indurre sulla conformazione della doppia elica, sono

stati condotti saggi fluorimetrici utilizzando come *probe* l'etidio bromuro (EtBr): quando è intercalato alle basi azotate nella doppia elica, se eccitato ad una lunghezza d'onda di 525 nm, esso emette a 600 nm con un'intensità circa 20 volte maggiore rispetto a quando si trova libero in soluzione. Alla luce di queste considerazioni è stato messo a punto un esperimento in cui al DNA plasmidico superavvolto negativamente ed incubato 30 minuti a temperatura ambiente con una concentrazione di EtBr tale da avere 3 molecole di intercalante per ogni plasmide, sono state aggiunte concentrazioni crescenti di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  (0, 1, 5, 10, 20, 30). I risultati ottenuti, del tutto analoghi a quelli riportati in lavori basati su esperimenti simili in cui sono stati analizzati altri composti coordinanti metalli (Liu *et al*, 1998), hanno mostrato una significativa diminuzione della fluorescenza, il cui andamento concentrazione-dipendente segue la cinetica attesa per il legame di una molecola ad un ligando (Figura 3.9), dimostrando quindi la capacità del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  di legare DNA.



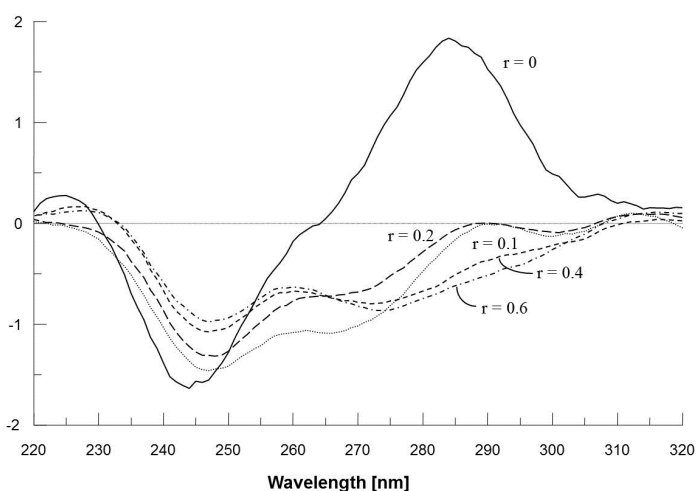
**Figura 3.9.** Spettri di emissione ottenuti incubando concentrazioni crescenti di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  (0-30  $\mu\text{M}$ ) con plasmidi intercalati dall'EtBr (rapporto molare DNA:EtBr = 1:3);  $\lambda_{\text{ex}}$  = 525 nm.

L'effetto di *quenching* del segnale emesso dall'EtBr, osservato in seguito all'aggiunta del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ , potrebbe essere causato dalla riduzione dell'affinità dell'intercalante per il DNA dovuta ad una distorsione conformazionale indotta dal complesso metallico sulla doppia elica: ciò determinerebbe il distacco della *probe* con conseguente riduzione dell'intensità della fluorescenza emessa. In alternativa, il *quenching* osservato potrebbe essere dovuto ad un fenomeno di *electron transfer* dall'EtBr al Ni(II), che in questo caso agirebbe come

accettore. Entrambe queste ipotesi presuppongono l'interazione diretta del complesso metallico con il DNA.

### Dicroismo circolare (CD)

Per stabilire se il legame del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  al DNA evidenziato dai saggi fluorimetrici potesse determinare una modificazione conformazionale della doppia elica sono stati raccolti spettri CD di soluzioni di *calf thymus* DNA (CT-DNA) incubate con concentrazioni crescenti di complesso metallico in modo da ottenere rapporti  $[\text{complesso metallico}]/[\text{DNA}]$  pari a 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6. Lo spettro CD caratteristico di una soluzione di DNA in forma B è rappresentato da una banda positiva attorno a 285 nm di lunghezza d'onda, dovuta alle interazioni di *stacking* tra le basi, e da una banda negativa attorno a 245 nm, generata dall'andamento elicoidale destrorso della doppia elica; l'intersezione si osserva a livello della lunghezza d'onda corrispondente al massimo assorbimento da parte del DNA (260 nm) (Kypr *et al*, 2009). Lo spettro mostrato nella Figura 3.10 relativo al rapporto  $[\text{complesso metallico}]/[\text{DNA}]$  pari a 0 (linea continua) mostra esattamente questo tipo di andamento. L'aumento della concentrazione di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  provoca una diminuzione della banda attorno 245 nm, con un contemporaneo spostamento verso il rosso di circa 3 nm; l'effetto più evidente è stato tuttavia osservato a livello della banda attorno a 285 nm che, in seguito al trattamento, subisce un drastico cambiamento, assumendo un valore sempre più negativo all'aumentare della concentrazione dello xenobiotico.



**Figura 3.10.** Spettri CD ottenuti incubando concentrazioni crescenti di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  con CT-DNA.  $r$  indica il rapporto  $[\text{complesso metallico}]/[\text{DNA}]$ .

Dal momento che il legame di piccole molecole ad uno o ad entrambi i solchi del DNA, così come interazioni di tipo elettrostatico tra i gruppi fosfato dello scheletro e composti polari a basso peso molecolare, non alterano in maniera significativa lo spettro CD del B-DNA che si ottiene tra i 220 ed i 320 nm di lunghezza d'onda (Nordén and Tjernel, 1982) l'analisi degli spettri dei campioni trattati ha permesso di ipotizzare che l'interazione del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  con la doppia elica determina una significativa modificazione della sua struttura. Gli spettri CD ottenuti in seguito al trattamento con il  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  sono infatti compatibili con quelli già osservati per forme condensate di  $\Psi$ -DNA (Zuidam *et al*, 1999). L'assenza di punti isodicroici suggerisce inoltre che in soluzione possano essere presenti conformazioni differenti di DNA interagente con il complesso metallico.

E' noto che il Ni(II) si lega specificamente e con alta affinità all'azoto 7 della guanina a livello del solco maggiore, inducendo una modificazione conformazionale che determina la transizione del DNA dalla forma B a quella Z, in cui l'N7 risulta maggiormente accessibile. Questa transizione avviene a concentrazioni submillimolari di Ni(II), come confermato da misure spettrofotometriche di assorbimento e di dicroismo circolare, oltre che da indagini AFM (Sitko *et al*, 2003). Gli spettri da noi ottenuti non sono però compatibili con una transizione B – Z; questo ci permette di affermare che l'effetto conformazionale osservato non è indotto dal metallo non complessato, quanto piuttosto dall'intero complesso in studio. L'andamento dello spettro, unito alle evidenze derivanti dallo *shift assay* su gel d'agarosio, rende inoltre possibile escludere un'interazione di tipo intercalante tra  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  e DNA.

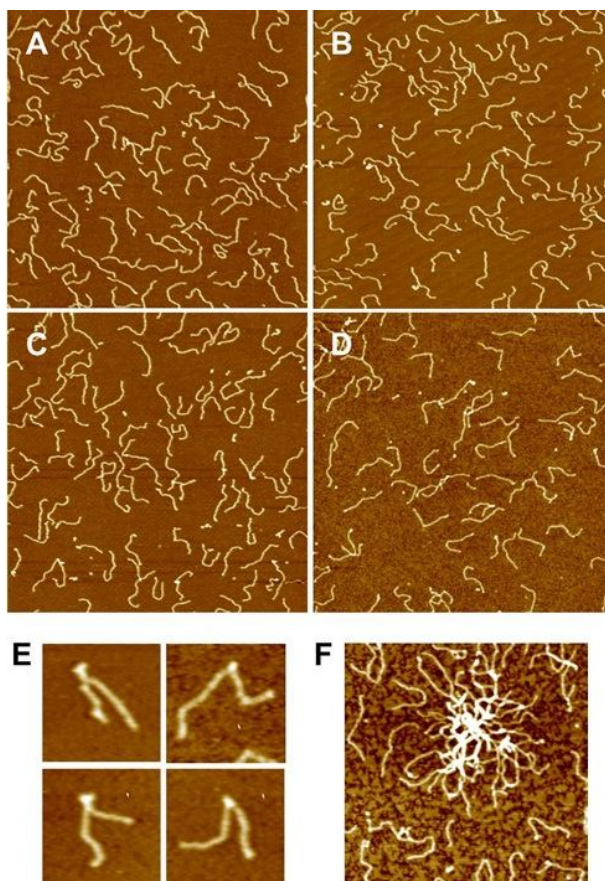
### **Microscopia a forza atomica (AFM)**

La fluorimetria ed il dicroismo circolare hanno fornito importanti informazioni circa la capacità del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  di legare il DNA e di modificarne la struttura. Tuttavia, non è stato possibile chiarire la modalità di legame e l'entità dell'alterazione conformazionale indotta dal complesso metallico. Al fine di approfondire questi aspetti, fondamentali per la comprensione del suo reale meccanismo d'azione, sono stati condotti esperimenti basati sulla microscopia a forza atomica; con essa è infatti possibile ottenere informazioni riguardanti un elevato numero di molecole, che possono nello stesso tempo essere visualizzate ed analizzate singolarmente. Questo approccio sperimentale ha permesso in passato di approfondire gli effetti del legame al DNA del cisplatino e di alcuni suoi derivati (Onoa *et al*, 1998; Hou *et al*, 2009).

Il substrato scelto per le analisi AFM è rappresentato da un frammento di DNA di sequenza casuale, lungo 1004 bp, ottenuto mediante PCR classica e purificato attraverso un sistema di elettroeluzione, necessario per ottenere una preparazione estremamente pura. Tali caratteristiche rispecchiano la necessità di poterne misurare parametri strutturali, in particolare la lunghezza (*contour length*), e di poter osservare eventuali modificazioni conformazionali indotte dal trattamento con il complesso metallico, in immagini di dimensioni pari a  $2 \times 2 \mu\text{m}$ . La deposizione delle molecole su un supporto di mica, un fillosilicato che può essere facilmente sfogliato lungo piani cristallini garantendo una superficie estremamente liscia che espone gli atomi di ossigeno, richiede la presenza di  $\text{Mg}^{2+}$ , necessario per il legame del polianione ad una superficie carica negativamente. Questa strategia di deposizione (i cui dettagli sono riportati in Materiali e Metodi) non altera le caratteristiche fisiche delle molecole di DNA legate al supporto rispetto a quelle che esse mostrano in soluzione, nonostante il cambiamento di dimensionalità (Rivetti *et al*, 1996); i frammenti di DNA possono infatti distendersi sulla superficie bidimensionale raggiungendo una situazione di equilibrio termodinamico e mostrando pochissime sovrapposizioni intra- o intermolecolari, come risulta evidente osservando la Figura 3.11(A). Le immagini AFM riportate nella Figura 3.11(A-D) sono rappresentative di deposizioni di DNA preventivamente sottoposto a trattamento per un'ora a temperatura ambiente con il solo DMSO (A) e con 1 (B), 10 (C), 100 (D)  $\mu\text{M}$  di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ . In tutte le immagini le molecole appaiono perfettamente integre, ad indicare che la frammentazione evidenziata mediante *Comet assay* in ambiente alcalino non è dovuta ad un'azione nucleasica diretta del composto. Questo risultato è in accordo con le evidenze sperimentali ottenute trattando plasmidi superavvolti con concentrazioni crescenti di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  e valutando gli effetti del trattamento mediante migrazione su gel d'agarosio.

Un'analisi più dettagliata dei frammenti di DNA esposti al complesso metallico ha però permesso di mettere in evidenza la presenza di strutture simili a nodi o forcine, che spesso inducono angoli di ripiegamento del DNA molto stretti, mai osservati su molecole non trattate (Figura 3.11(E)). Il numero di queste strutture lungo i frammenti di DNA aumenta all'aumentare della concentrazione del composto (Tabella 2), ma non cambia variando il tempo di incubazione: non sono state infatti osservate differenze significative trattando il DNA con  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  100  $\mu\text{M}$  per 1, 2, 4 o 8 ore. L'analisi del profilo delle strutture descritte ha rivelato che esse hanno un'altezza compresa tra 1 e 2 nm, corrispondente a circa il

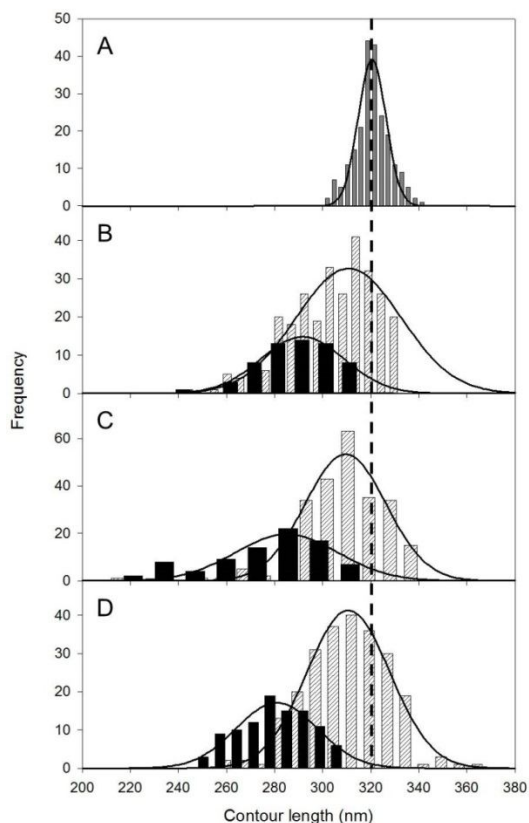
doppio di quella che normalmente assume il DNA non trattato ed osservato mediante AFM nelle condizioni da noi utilizzate (generalmente compreso tra 0,4 e 0,8 nm). Questo dato suggerisce che le deformazioni indotte dal trattamento corrispondano ad una sovrapposizione di segmenti di DNA, forse legati tra loro da una o più molecole di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ . A conferma di questa ipotesi, soprattutto alle più alte concentrazioni di xenobiotico, sono stati identificati grossi aggregati sopramolecolari formati da numerose molecole di DNA, mai osservati in altre condizioni (Figura 3.11(F)).



**Figura 3.11.** Immagini AFM ottenute depositando per 2 minuti una soluzione di DNA 2 nM trattato con DMSO (A) ed 1 (B), 10 (C), 100 (D)  $\mu\text{M}$  di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  per un'ora a T.A. in *deposition buffer* (4 mM Hepes pH 7,4, 10 mM NaCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ). E: dettaglio di molecole presentanti strutture simili a nodi o forcine indotte dal trattamento; F: dettaglio di uno degli aggregati sopramolecolari osservati in seguito al trattamento con alte concentrazioni di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ .

Per caratterizzare nel dettaglio gli effetti del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  sulla struttura generale della doppia elica abbiamo analizzato la lunghezza delle molecole di DNA presenti nelle immagini

raccolte, utilizzando un software dedicato e seguendo la procedura descritta in Rivetti, 2009. In questa fase le molecole presentanti strutture simili a nodi o forcine sono state misurate separatamente rispetto a quelle che invece ne risultavano prive. Come mostrato negli istogrammi della distribuzione delle lunghezze (Figura 3.12) e riassunto in Tabella 2, la lunghezza media dei frammenti di DNA apparentemente non distorti dal  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  è risultata sistematicamente più corta di circa 10 nm se confrontata con quella ottenuta misurando molecole non esposte al complesso metallico, senza alcuna correlazione rispetto alla concentrazione dello xenobiotico. Come atteso, il cambiamento della lunghezza è più marcato per le molecole con nodi o forcine: l'accorciamento medio infatti è risultato rispettivamente pari a  $29,9 \pm 17,4$ ,  $35,5 \pm 21,4$  e  $39,6 \pm 16,9$  nm in seguito al trattamento con 1, 10, 100  $\mu\text{M}$  di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ . La forte riduzione della lunghezza osservata su questi frammenti può essere spiegata considerando che le deformazioni visibili nelle immagini AFM consistono in porzioni condensate di DNA; di conseguenza esse influenzano la stima della lunghezza perché mantengono nascosta alla misurazione parte della molecola.



**Figura 3.12.** Istogrammi della distribuzione delle lunghezze ottenute misurando molecole di DNA trattate col solo DMSO (A), oppure trattate con 1 (B), 10 (C) e 100 (D)  $\mu\text{M}$  di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  per un'ora a T.A.; la linea tratteggiata indica la lunghezza media delle molecole misurate nel controllo negativo. Le barre a righe sono state ottenute misurando le molecole apparentemente prive di distorsioni, mentre quelle nere sono state ottenute misurando le molecole presentanti nodi o forcine.

Per valutare se gli effetti conformazionali osservati fossero effettivamente provocati dal complesso metallico sono stati eseguiti due esperimenti di controllo in cui il frammento di DNA lungo 1004 bp è stato incubato per un'ora a temperatura ambiente con 100  $\mu\text{M}$  di  $\text{NiSO}_4$  oppure con 100  $\mu\text{M}$  di  $[\text{Htcitr}]$  (il solo ligando); l'analisi delle immagini AFM e la determinazione della lunghezza delle molecole di DNA hanno permesso di dimostrare che sia il  $\text{Ni}(\text{II})$  che i ligandi, se utilizzati separatamente, non sono in grado di provocare gli effetti osservati in seguito al trattamento con il  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  (Tabella 2).

EXPERIMENT	Length without knots (nm)	Length with knots (nm)	Molecules with knots (%)
DNA	$320.6 \pm 5.8$ (220)	--	--
DNA + $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ 1 $\mu\text{M}$	$310.9 \pm 21.9$ (283)	$291.7 \pm 17.4$ (61)	17.7%
DNA + $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ 10 $\mu\text{M}$	$309.6 \pm 16.9$ (255)	$285.1 \pm 21.4$ (84)	24.8%
DNA + $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ 100 $\mu\text{M}$	$310.7 \pm 17.3$ (238)	$281.0 \pm 16.9$ (102)	30.0%
DNA + $\text{NiSO}_4$ 100 $\mu\text{M}$	$322.6 \pm 9.4$ (135)	--	--
DNA + $[\text{Htcitr}]$ 100 $\mu\text{M}$	$319.0 \pm 12.1$ (170)	--	--

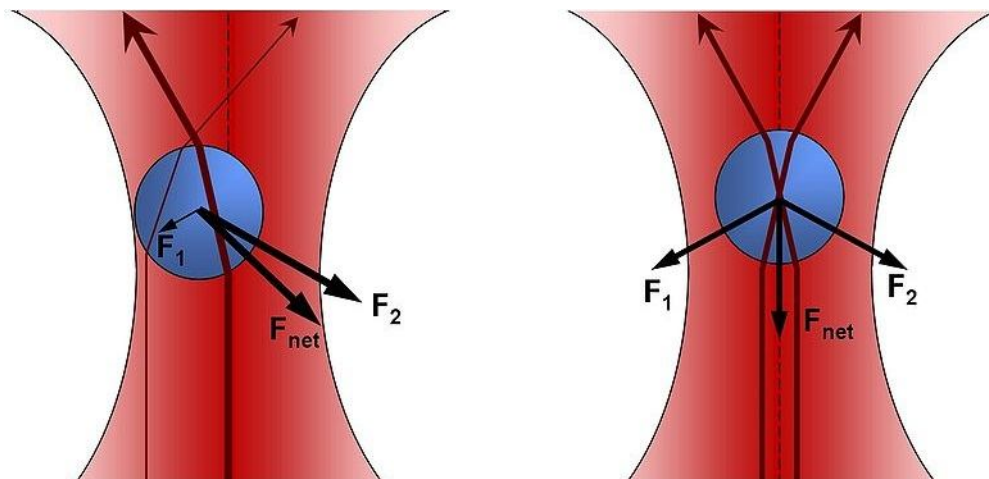
**Tabella 2.** Riassunto dei risultati ottenuti misurando la lunghezza di molecole non trattate e trattate con concentrazioni crescenti di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ . Sono riportati i valori medi  $\pm$  la deviazione standard delle lunghezze misurate considerando separatamente le molecole con e senza nodi e forcine (tra parentesi è riportato il numero di molecole analizzate per ciascuna misura riportata). Nell'ultima colonna è indicata la percentuale di molecole presentanti nodi o forcine sul totale di molecole presenti nelle immagini raccolte per ciascun esperimento.

La riduzione della lunghezza del DNA, osservata anche sulle molecole apparentemente prive di strutture simili a nodi o forcine, ha permesso di confermare quanto osservato mediante dicroismo circolare, apportando però nuovi importanti dettagli strutturali: il  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  non lega il DNA intercalandosi allo stesso (in questo caso provocherebbe infatti un allungamento apparente delle molecole), quanto piuttosto provocandone una modificazione strutturale che porta ad una sua compattazione con conseguente accorciamento; in questo senso l'analisi AFM supporta l'ipotesi di una transizione

molecolare significativa indotta dal  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ . E' infatti interessante notare come due tra le più note forme alternative di DNA, la forma A e la forma C, siano rappresentate da strutture più compatte, dunque più corte, rispetto al B-DNA: ogni coppia di basi nel B-DNA occupa 0,338 nm, contro i 0,332 del C-DNA ed i 0,282 dell'A-DNA. L'accorciamento di 10 nm da noi osservato (pari circa al 3,5% della lunghezza originaria) è quindi in parte compatibile con una transizione B – C del DNA, che potrebbe anche confermare l'ipotesi circa l'allontanamento dell'EtBr dalla doppia elica, formulata in seguito all'osservazione relativa al calo della fluorescenza emessa dopo l'aggiunta del composto: la compattazione del DNA potrebbe essere responsabile dello spiazzamento dell'intercalate che normalmente si posiziona tra le coppie di basi, a causa di una riduzione dello spazio disponibile tra queste ultime. Tuttavia, lo spettro CD ottenuto sul CT-DNA trattato non corrisponde esattamente a quello riportato in letteratura per il C-DNA, osservabile peraltro solo ad elevate concentrazioni saline (es. 6 M  $\text{LiCl}_2$ ) (Baase and Johnson, 1979). Questo aspetto può essere spiegato considerando che in soluzione sono probabilmente presenti specie molecolari tra loro conformazionalmente differenti: ciò è confermato sia dagli spettri CD, che come visto non mostrano punti isodicroici, sia dalle immagini AFM, nelle quali si osservano molecole apparentemente non distorte, ma più corte rispetto al B-DNA, e molecole presentanti evidenti strutture a nodo o forcina, oltre che grossi aggregati sopramolecolari.

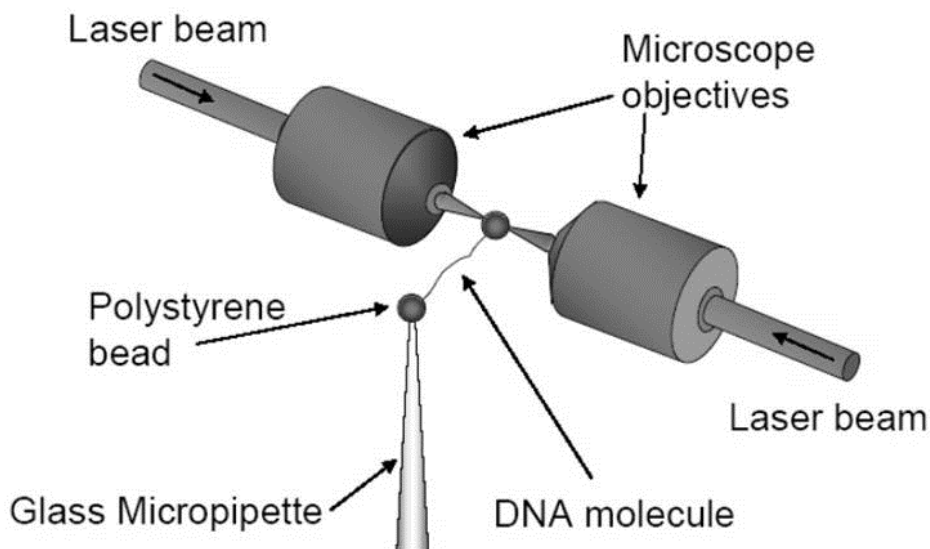
### ***Laser Optical Tweezers***

Il *laser optical tweezers* rappresenta una tecnologia innovativa che negli ultimi due decenni è stata applicata con successo allo studio delle proprietà meccaniche ed elastiche di diverse tipologie di biopolimeri, in particolare DNA e proteine. Essa si basa sulla possibilità di manipolare oggetti di dimensioni micrometriche grazie alle proprietà intrappolanti della luce: quando microsferi di materiale dielettrico sono colpite da un raggio laser altamente focalizzato vengono stabilmente mantenute a livello del fuoco grazie alla risultante netta derivante dalla somma delle forze che compongono la radiazione luminosa: la forza di *scattering* e quella di gradiente (Ashkin *et al*, 1986) (Figura 3.13).



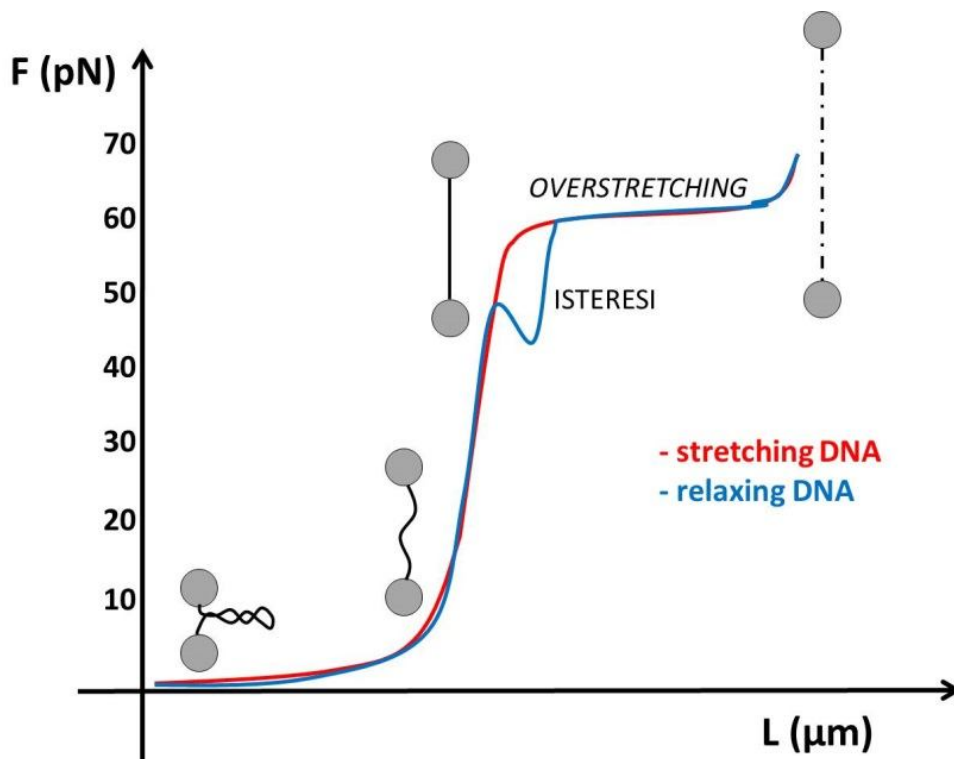
**Figura 3.13.** Quando una microsfera di materiale dielettrico si trova all'interno del gradiente di intensità luminosa di un raggio laser è sottoposta a due forze principali: le forze di *scattering* tendono a spingerla nella stessa direzione del laser; quelle di gradiente la attirano verso la regione a più alta intensità luminosa, corrispondente al fuoco del raggio laser. La loro componente netta ( $F_{net}$ ) permette di mantenere la microsfera saldamente intrappolata nel punto definito dalla posizione del fuoco.

Agendo sulla posizione del fuoco del laser è possibile spostare l'oggetto intrappolato; si parla perciò di "trappola ottica". Se l'oggetto è rappresentato da una microsfera alla quale è stata preventivamente ancorata una macromolecola biologica, il suo spostamento permette la manipolazione della stessa (Moffit *et al*, 2008). Lo strumento a nostra disposizione, il MiniTweezers, ha una configurazione a doppio raggio laser: essendo questi direzionati l'uno verso l'altro, l'annullamento delle forze di *scattering* e l'aumento di quelle di gradiente determinano la formazione di una trappola ottica estremamente stabile con la quale è possibile manipolare una delle microsferi utilizzate come *probe* negli esperimenti, alla quale viene preventivamente agganciata un'estremità della molecola che si vuole analizzare; l'altra microsfera viene invece mantenuta ferma per suzione attraverso l'utilizzo di una micropipetta ed è utilizzata per vincolare la macromolecola in studio. Tutti gli esperimenti avvengono all'interno di un ambiente controllato, rappresentato da una celletta autoprodotta, e l'andamento dell'esperimento può essere seguito visivamente grazie ad un sistema video collegato ad un microscopio ad immersione. Il MiniTweezers permette l'applicazione di forze nell'ordine del pN e con esso è possibile monitorare spostamenti di pochi Å (Figura 3.14).



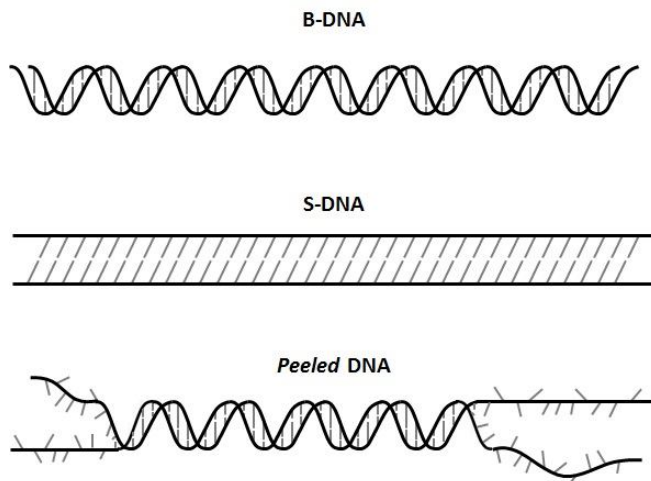
**Figura 3.14.** Rappresentazione schematica della conduzione di un esperimento di trazione di una molecola di DNA utilizzando il *laser optical tweezers* MiniTweezers.

Lo stiramento di una molecola di DNA, ottenuto allontanando la microsfera posizionata nella trappola ottica rispetto a quella vincolata alla micropipetta, permette di studiare le caratteristiche meccaniche ed elastiche del biopolimero: per forze inferiori ai 15 pN la forza che il DNA oppone alla trazione è di tipo puramente entropico e corrisponde alla tendenza della doppia elica a rimanere in una conformazione aggrovigliata piuttosto che distesa; tra i 15 ed i 60 pN il DNA si comporta come un normale polimero inestensibile mentre, superati i 55-65 pN (a seconda della concentrazione salina della soluzione), si assiste ad una modificazione conformazionale che determina l'*overstretching* della molecola, la quale assume una lunghezza pari a circa 1,7 volte quella originaria. Dopo l'estensione, la riduzione della forza applicata attraverso il semplice riavvicinamento delle microsferi permette il ritorno alla situazione iniziale; in questa fase si può notare, analizzando la curva ottenuta dalla correlazione tra forza applicata ed estensione osservata, un'isteresi probabilmente dovuta al tempo necessario per la riorganizzazione della doppia elica (Smith *et al*, 1996) (Figura 3.15).



**Figura 3.15.** Esempio di curva forza/estensione ottenuta da un esperimento di trazione e rilassamento di una molecola di DNA.

Per dare una spiegazione strutturale all'*overstretching* è stata proposta l'ipotesi secondo cui il DNA sottoposto a trazione può andare incontro ad una transizione molecolare che converte il B-DNA in S-DNA; in tale conformazione i legami a idrogeno tra le coppie di basi vengono mantenuti, mentre lo scheletro generale della doppia elica subisce una distorsione dovuta al parzialmente svolgimento attorno all'asse longitudinale. Questa transizione genera quindi una struttura più simile ad una scala a pioli che ad un'elica (Bustamante *et al*, 2000). Ipotesi alternative propongono invece un parziale *peeling* del DNA, dovuto ad una denaturazione che si origina dalle porzioni vicine alle microsferi a cui esso è agganciato o a partire da eventuali *nick* presenti lungo i filamenti (van Mameren *et al*, 2009). In realtà è probabile che i due modelli proposti coesistano, con regioni della molecola denaturate ed altre sottoposte invece alla transizione B – S (Zhanga *et al*, 2013) (Figura 3.16).

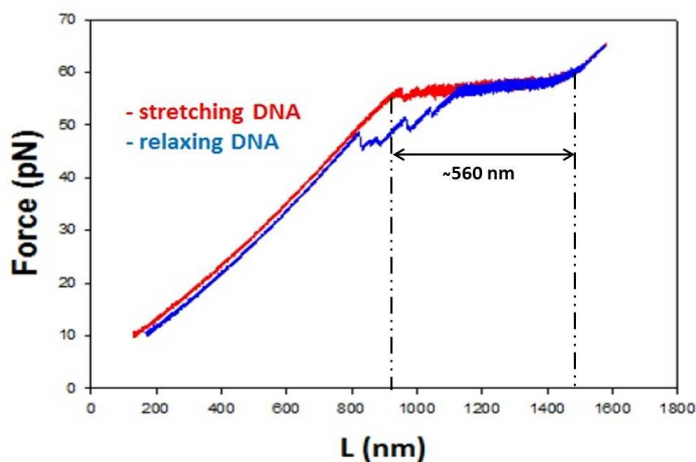


**Figura 3.16.** Struttura del B-DNA (sopra) e possibili strutture proposte per spiegarne l'*overstretching*: S-DNA (in centro); *peeling* del DNA (sotto).

Alcuni lavori hanno mostrato come le curve forza/estensione del DNA possano essere analizzate allo scopo di ottenere maggiori informazioni circa il meccanismo d'azione e le modalità di legame ad esso da parte di alcune proteine o xenobiotici (McCauley and Williams, 2006). Alterazioni strutturali e meccaniche sono state rilevate da variazioni della curva di forza/estensione ottenuta stirando il genoma del fago  $\lambda$  (lungo circa 50 kb) preventivamente trattato con composti quali daunomicina, YO-1 e bromuro di etidio (intercalanti), YOYO-1 (un bisintercalante), distamicina-A (un legante del solco minore dell'elica del DNA) ed un peptide  $\alpha$ -elica (legante il solco maggiore). In questo lavoro sono state osservate numerose differenze rispetto al DNA libero, sia nella parte iniziale della curva, ovvero durante le prime fasi della trazione, sia a carico della fase di *overstretching*: in particolare, le molecole leganti i solchi dell'elica hanno causato un accorciamento dell'*overstretching* ed un aumento delle forze richieste per ottenerlo, mentre gli intercalanti hanno provocato l'eliminazione completa della transizione dalla forma B a quella S del DNA oltre che un atteso allungamento della lunghezza apparente della molecola (Sischka *et al*, 2005).

In questo lavoro abbiamo sfruttato la tecnologia del *laser optical tweezers* allo scopo di approfondire le informazioni riguardanti l'interazione tra  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  e DNA ottenute con la fluorimetria, il dicroismo circolare e la microscopia a forza atomica. Il template utilizzato per questi esperimenti, rappresentato da un frammento di DNA lungo 2359 bp modificato

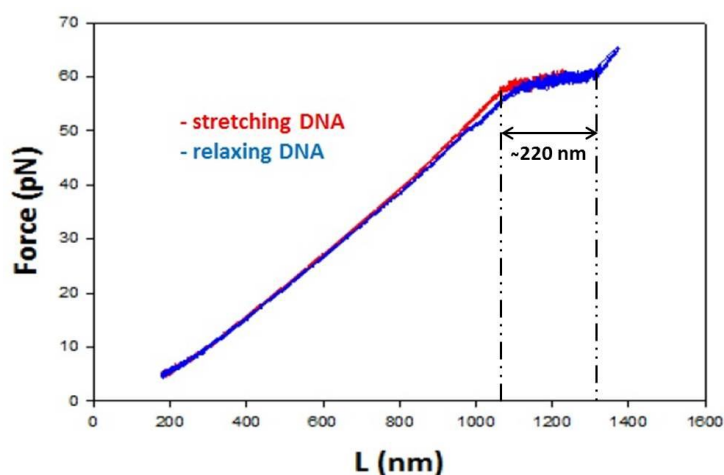
alle estremità 5' con un gruppo -SH da un lato e con una biotina dall'altro, è stato sintetizzato mediante PCR e purificato per elettroeluizione (vedi Materiali e Metodi). Le modificazioni risultano necessarie per il legame alle due microsfere: una di queste porta infatti sulla sua superficie gruppi -NH<sub>2</sub> attivati utilizzando il cross-linkante *sulfo-SMCC* che può generare un legame covalente con i gruppi -SH; l'altra è invece funzionalizzata con streptavidina. La lunghezza scelta per le molecole (circa 800 nm) risulta ottimale per poterle analizzare senza che le microsfere debbano venire a contatto tra loro, garantendo una sensibile riduzione del rischio di interazioni aspecifiche tra le stesse. Le curve di forza/estensione ottenute analizzando il DNA in presenza del solo DMSO (controllo negativo) confermano quanto riportato in letteratura: applicando una forza di trazione di poco inferiore ai 60 pN si osserva un repentino aumento della lunghezza della molecola pari a circa il 70% (560 nm) della sua lunghezza originaria, mentre riavvicinando le sue estremità si ottiene il ritorno alla situazione iniziale, passando attraverso un'evidente fase di isteresi tra i 55 ed i 45 pN (Figura 3.17).



**Figura 3.17.** Esempio di curva di forza/estensione ottenuta ponendo in trazione e successivamente rilassando una molecola di DNA lunga 2359 bp in un tampone privo di [Ni(tcitr)<sub>2</sub>].

Per evitare che le distorsioni conformazionali indotte dal [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] ed osservate con gli altri approcci sperimentali utilizzati in questo lavoro potessero impedire il legame del DNA alle microsfere, gli esperimenti al *laser optical tweezers* per valutarne gli effetti sono stati condotti aggiungendo il complesso metallico alla soluzione presente nella celletta in cui vengono condotti gli esperimenti solo successivamente alla fase di interazione del DNA con

i gruppi chimici funzionalizzanti le microsfere. In presenza di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$   $100 \mu\text{M}$  si è potuta osservare una significativa riduzione dell'estensione dell'*overstretching*, che è passata da un valore medio pari a circa il 70% della lunghezza totale della molecola analizzata in assenza di trattamento (Figura 3.17) ad una media di circa il 30% in presenza del composto. Oltre a questo dato, anche la minore entità del segnale riconducibile all'isteresi permette di ipotizzare una compattazione del DNA che impedisce la normale transizione B – S di tutta la molecola o di alcune sue parti, consentendo una più rapida riorganizzazione durante la fase di riduzione della forza applicata (Figura 3.18).



**Figura 3.17.** Esempio di curva di forza/estensione ottenuta ponendo in trazione e successivamente rilassando una molecola di DNA lunga 2359 bp in presenza di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$   $100 \mu\text{M}$ .

Le evidenze ottenute in questi esperimenti sono in accordo con quanto osservato mediante dicroismo circolare e microscopia a forza atomica: il DNA risulta apparentemente più corto e compatto; ciò permette di escludere la possibilità di un'interazione di tipo intercalante e di ipotizzare che le strutture a nodi e forcine osservate nelle immagini AFM possano in qualche modo impedire a parte della molecola di subire la transizione normalmente indotta dall'applicazione di forze di trazione pari a circa 60 pN.

#### 4. CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati emersi nel lavoro preliminare di caratterizzazione strutturale e funzionale del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  gli autori avevano ipotizzato che esso potesse avere effetti genotossici, diretti o provocati dai sistemi di riparo del DNA, tali da indurre una forte

alterazione del ciclo cellulare, con conseguente blocco nella fase G<sub>2</sub>/M ed attivazione della cascata apoptotica (Buschini *et al*, 2009). Nello studio qui proposto sono stati impiegati numerosi e diversificati approcci sperimentali di tipo sia cellulare che molecolare, allo scopo di fare luce su molti degli aspetti ancora non chiari riguardanti il meccanismo d'azione ed il bersaglio molecolare del complesso metallico e gli effetti da esso indotti sulla fisiologia globale della cellula.

L'osservazione secondo cui l'apoptosi è indotta dal [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] attraverso l'attivazione della caspasi 9 in seguito all'aumento della permeabilità della membrana mitocondriale, ed è quindi di tipo intrinseco, ha rinforzato l'ipotesi secondo cui uno dei principali effetti destabilizzanti sul ciclo cellulare fosse imputabile alla formazione di specie reattive dell'ossigeno ed alla loro azione nei confronti di diverse componenti cellulari, tra cui in particolare il DNA, come precedentemente evidenziato dal *Comet assay* in ambiente alcalino nella versione modificata con l'enzima ENDOIII, utile per individuare basi ossidate. Nel presente lavoro è stato messo in luce un significativo aumento della concentrazione intracellulare di ROS, accompagnato da un forte danno ossidativo a livello lipidico e proteico; il contemporaneo incremento dell'attività della SOD conferma l'ipotesi secondo cui parte del danno a carico del DNA precedentemente osservato è causato dalla formazione di radicali dell'ossigeno; tuttavia questi, da soli, non sono sufficienti a spiegare l'importante insulto genotossico e una così forte alterazione del ciclo cellulare. Per chiarire le reali cause di tali effetti e partendo da recenti osservazioni secondo cui il proteasoma sarebbe deputato alla degradazione degli istoni modificati in seguito a danno ossidativo (Catalgol *et al*, 2010), ma verrebbe inibito da alcuni composti metallici (Verani, 2012), è stata testata la capacità del [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] di agire in tal senso. E' emerso che l'attività proteolitica del proteasoma, con particolare riferimento a quella chimotripsina-simile coinvolta nel riparo del danno ossidativo a carico degli istoni, non risulta alterata dalla molecola in studio, che dunque non agisce interferendo con questo meccanismo.

Dal momento che il principale effetto osservato in seguito al trattamento con il [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] è risultato essere un consistente danno a carico della componente cromatinica del nucleo e considerato che molti degli effetti collaterali delle chemioterapie scaturiscono dal potere mutageno dei farmaci utilizzati, si è proceduto valutando il potenziale mutagenico del complesso metallico, sfruttando il *Salmonella reversion test* ed il *Cytokinesis-Block Micronucleus assay*; l'applicazione di questi saggi ha permesso di dimostrare che il

[Ni(tcitr)<sub>2</sub>] non induce mutazioni genetiche né aberrazioni cromosomiche o più probabilmente che eventuali mutazioni, una volta indotte, non possono essere fissate a causa del blocco del ciclo cellulare in fase G<sub>2</sub>/M e della conseguente attivazione dell'apoptosi. Inoltre, rimuovendo il composto dopo un'ora di trattamento non si è osservata alcuna riduzione dell'intensità della coda nel *Comet assay*, ad indicare che il danno indotto al genoma non può essere riparato dai sistemi di riparo cellulari, aspetto importante considerando che uno dei meccanismi che permettono alle cellule tumorali di risultare resistenti ad alcune sostanze chemioterapiche riguarda proprio tale capacità.

Per comprendere quale fosse il reale bersaglio molecolare del [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] e per capire se il danno indotto al DNA fosse diretto o indirettamente causato dalla formazione di ROS e da eccessivi o errati meccanismi di riparo, sono stati condotti diversi saggi *in vitro*. L'elettroforesi su gel d'agarosio di plasmidi superavvolti sottoposti a trattamento con il complesso metallico non ha evidenziato rotture o modificazioni della loro topologia. Tuttavia, i successivi saggi fluorimetrici hanno indicato il legame diretto del composto al DNA; La riduzione della fluorescenza emessa dall'etidio bromuro in seguito all'aggiunta di concentrazioni crescenti di [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] ha permesso di ipotizzare che l'interazione tra xenobiotico e doppia elica può indurre una modificazione conformazionale tale da spiazzare l'intercalante; oppure che la fluorescenza emessa da quest'ultimo può essere ridotta da un fenomeno di *electron transfer* nel quale il Ni(II) risulta agire da accettore.

Gli spettri CD di CT-DNA incubato con concentrazioni crescenti di composto hanno evidenziato importanti modificazioni conformazionali a carico della doppia elica, non riconducibili a meccanismi intercalanti o alla transizione dalla forma B alla forma Z del DNA normalmente indotta dall'interazione di Ni(II) con l'N7 della guanina; l'andamento degli spettri registrati tra i 220 ed i 320 nm di lunghezza d'onda ha invece permesso di ipotizzare una forte compattazione del DNA, riconducibile alla forma Ψ-DNA. Queste compattazione è stata confermata dalla microscopia a forza atomica, che ha fornito anche maggiori dettagli di tipo strutturale. Nelle immagini non si è notato alcun fenomeno di frammentazione delle molecole di DNA, a conferma di quanto osservato mediante elettroforesi su gel d'agarosio, mentre sono state messe in evidenza strutture a nodo o forcina inducenti forti angoli di piegamento nelle molecole trattate con il [Ni(tcitr)<sub>2</sub>], mai osservati in campioni non trattati. Oltre alla presenza di queste strutture, alte circa il doppio rispetto alla doppia elica di DNA depositata su mica ed osservata mediante AFM, sono stati individuati anche grossi

complessi sopramolecolari, soprattutto alle concentrazioni di complesso metallico più elevate: sulla base di queste osservazioni è stato possibile ipotizzare che il composto possa indurre la formazione di *crosslink* intra- ed interfilamento, responsabili del danno al DNA che induce il blocco del ciclo cellulare. L'analisi della lunghezza dei frammenti di DNA non alterati in modo evidente ha fornito un valore di circa il 3,5% inferiore rispetto alla lunghezza del DNA non trattato; ciò supporta fortemente le osservazioni ottenute mediante dicroismo circolare, secondo cui il  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  non agisce mediante meccanismo intercalante quanto piuttosto provocando una compattazione del DNA. Inoltre è stato possibile dimostrare che il solo  $\text{NiSO}_4$  o le sole catene alifatiche ( $[\text{Htcitr}]$ ) non determinano alcun tipo di alterazione, confermando che è il complesso metallico, e non il metallo o il ligando, a determinare gli effetti osservati a carico del DNA.

Un'ulteriore strategia impiegata per la comprensione delle alterazioni conformazionali provocate dal legame del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  al DNA ha riguardato la manipolazione diretta di singole molecole attraverso il *laser optical tweezers*: quando queste vengono trattate con il complesso metallico, la curva forza/estensione prodotta dal loro stiramento e successivo rilassamento a forze comprese tra 0 e 65 pN ha mostrato sensibili cambiamenti rispetto al controllo negativo; in particolare, la riduzione dell'estensione dovuta al fenomeno dell'*overstretching*, passata dal 70% al 30% della lunghezza originale della molecola, e la meno evidente isteresi necessaria a permettere il ritorno alla forma B del DNA dopo la transizione alla forma S, suggeriscono che la doppia elica risulta fortemente distorta dal complesso metallico: è ipotizzabile che le strutture a nodo o forcina visualizzate nelle immagini AFM possano rendere porzioni della molecola inestensibili, anche se questa viene sottoposta a forze superiori ai 60 pN.

L'elevato numero di approcci sperimentali utilizzati in questo lavoro ha permesso di chiarire numerosi aspetti riguardanti la modalità d'azione e gli effetti del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ , sia a livello cellulare che molecolare. Esso si è rivelato un interessante composto ad attività antiproliferativa, con un elevato grado di selettività nei confronti di cellule in attiva proliferazione, soprattutto se p53-difettive (come la maggior parte delle cellule tumorali). Il suo meccanismo d'azione è ancora in parte da chiarire, ma sembra rappresentare un esempio nuovo nel campo farmacologico e tossicologico, suggerendo che questo complesso con il Ni(II) può rappresentare un efficace agente chemioterapico e/o un importante punto di partenza dal quale sviluppare nuovi tiosemicarbazoni biologicamente attivi.

## 5. MATERIALI E METODI

### Apoptosi

L'attività enzimatica delle caspasi 3, 8 e 9 è stata testata in piastre da 96 pozzetti sfruttando un saggio fluorimetrico.  $3 \times 10^6$  cellule sono state trattate per 8 e 24 ore con una concentrazione pari all'IC<sub>50</sub> di [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] (14,4 μM), raccolte per centrifugazione e risospese in buffer di lisi (0,1 M Tris/HCl, 0,5% Triton X-100, 5 mM β-mercaptoetanol e 0,1 mg/ml PMSF). Il lisato è stato quindi incubato con il *reaction buffer* e lo specifico substrato: Ile-Glu-Thr-Asp(IETD)-AFC (7-amino-4-trifluorimetilcumarina) per la caspasi 8 (Biovision); Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-AFC per la caspasi 9 (Biovision); rodamina 110 bis-(N-CBZ-L-aspartil-L-glutamil-L-valil-L-aspartato amide) (Z-DEVD-R110) per la caspasi 3 (Molecular Probes), seguendo i protocolli forniti dai produttori. Il taglio enzimatico serve a convertire il substrato in un prodotto fluorescente, che è stato quantificato utilizzando un fluorimetro Cary Eclipse (Varian). Per il saggio dell'attività della caspasi 3 è stata preparata una curva standard di emissione dell'R110 (0-25 μM); i risultati ottenuti dal saggio dell'attività della caspasi 8 e 9 sono espressi in unità arbitrarie.

### Attività del proteasoma

L'attività del proteasoma è stata valutata utilizzando il *Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Cell-Based assays* (Promega Corporation). Cellule U937 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ( $2 \times 10^4$  cellule/pozzetto) ed equilibrate a 37°C in 5% CO<sub>2</sub> per 2 ore prima del trattamento con [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] (14,4 μM). Sono state quindi incubate con i reagenti forniti dal produttore, contenenti un substrato specifico per l'attività chimotripsina-simile (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC), secondo le indicazioni riportate nel protocollo. La luminescenza emessa è stata misurata utilizzando un lettore di micropiastre (TECAN). Il cambiamento della luminescenza è stato calcolato mediante confronto con un campione non-trattato; come controllo positivo è stato usato il Bortezomib.

### Stress ossidativo

I livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono stati determinati analizzando l'aumento della fluorescenza emessa in seguito alla rimozione del gruppo acetato da parte di esterasi cellulari dal DCFH-DA (Molecular Probes), un composto non fluorescente e non polare, ed alla ossidazione del DCFH da parte delle ROS a dare il DCF, un composto polare e fluorescente. Cellule U937 sono state incubate a 37°C per 30 minuti al buio in PBS preriscaldato contenente 10 μM DCFH-DA. L'eccesso di reagente è stato eliminato con PBS

prima dell'aggiunta del complesso metallico. Le cellule sono state quindi raccolte e lavate con PBS, poi lisate utilizzando la *Cell Dissociation Solution* (Sigma-Aldrich) e centrifugate per rimuovere i detriti cellulari. Il surnatante è stato trasferito in piastre da 96 pozzetti e la fluorescenza è stata misurata per 30 minuti utilizzando un fluorimetro Cary Eclipse (Varian) ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ ).

I livelli intracellulari di GSH sono stati determinati utilizzando un kit colorimetrico commerciale (Oxis International). Il lisato cellulare è stato preparato in accordo con il protocollo fornito dal produttore. Dopo l'esposizione al complesso metallico,  $3 \times 10^6$  cellule U937 sono state raccolte e risospese in 500  $\mu\text{l}$  di acido metafosforico 5% (p/v) a 4°C; la sospensione è stata omogenizzata e centrifugata a 3000g per 10 minuti a 4°C. Il contenuto di GSH nel surnatante è stato misurato rapidamente e la concentrazione è stata stimata utilizzando una curva di calibrazione (0-100  $\mu\text{M}$ ) e normalizzata sul contenuto proteico.

L'attività dell'enzima SOD è stata stimata utilizzando il kit commerciale *Superoxide Dismutase Activity Assay* (BioVision) basato sulla produzione del colorante idrosolubile formazan dopo la riduzione da parte di un anione superossido, reazione inibita dalla superossido dismutasi; nel saggio viene quindi misurata l'attività inibente dell'enzima.  $3 \times 10^6$  cellule U937 sono state lisate con un buffer di lisi (0,1 M Tris/HCl, 0,5% Triton X-100, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanololo e 0,1 mg/ml PMSF); dopo centrifugazione, l'attività inibente delle SOD citosoliche e mitocondriali che si trovano nel surnatante è stata misurata in accordo con il protocollo fornito dal produttore.

L'utilizzo dei gruppi carbonilici delle proteine come biomarcatori di stress ossidativo presenta alcuni vantaggi rispetto agli altri metodi generalmente impiegati: essi si formano rapidamente in seguito alla formazione di ROS e le proteine carbonilate risultano piuttosto stabili. La quantificazione dei gruppi carbonilici si basa sulla loro derivatizzazione con 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH), in accordo con il metodo utilizzato con successo in Vettori *et al*, 2005. Dopo 24 ore di trattamento con dosi pari all'IC<sub>50</sub> di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  o con DMSO (controllo negativo),  $2 \times 10^6$  cellule sono state centrifugate ed il pellet è stato risospeso in H<sub>2</sub>O; dopo tre cicli di congelamento (-80°C) e scongelamento (37°C) si è proceduto alla precipitazione del DNA con 0,1 volumi di una soluzione di streptomina solfato al 10% (p/v) in PBS. Dopo 10 minuti a T.A. il precipitato è stato rimosso per centrifugazione a 3000g per 5 minuti. A 250  $\mu\text{l}$  di surnatante sono stati aggiunti 350  $\mu\text{l}$  di una soluzione contenente 15 mM di DNPH e 2,5 M HCl. La soluzione è stata incubata al buio per 60 minuti, vortexando ogni 15 minuti.

Successivamente l'aggiunta di 600  $\mu\text{l}$  di una soluzione al 20% (p/v) di tricloroacetato ha permesso la precipitazione delle proteine; dopo 10 minuti il campione è stato centrifugato per 5 minuti a 5000g eliminando il surnatante. Il pellet è stato invece lavato tre volte con una soluzione 1:1 di etanolo:etilacetato per rimuovere i residui di DNPH libera ed i contaminanti lipidici. Il precipitato è stato quindi risospeso in 1 ml di una soluzione 8 M di guanidinio-HCl, incubando 10 minuti a 37°C. Il contenuto in gruppi carbonilici è stato misurato dal picco di assorbanza a 365 nm, applicando un coefficiente di estinzione molare pari a 22000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

I prodotti intracellulari della perossidazione dei lipidi sono stati identificati utilizzando il metodo delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) descritto in Vettori *et al*, 2005: la decomposizione dei perossidi instabili derivanti dagli acidi grassi polinsaturi genera la formazione di malondialdeide (MDA) che condensando con due equivalenti di acido tiobarbiturico dà vita ad un prodotto fluorescente facilmente quantificabile.  $10^6$  cellule U937 sono state piastrate in fiasche da 25  $\text{cm}^2$  e, una volta raggiunta la fase di crescita esponenziale, sono state trattate con  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  14,4  $\mu\text{M}$  per 24 ore. Dopo l'incubazione le cellule sono state recuperate, sottoposte a tre cicli di congelamento e scongelamento e centrifugate a 3000g. Un'aliquota di surnatante è stata addizionata di un egual volume di acido ortofosforico 0,2 M e di 1/16 di volume di acido tiobarbiturico in 0,1 M NaOH ed incubato per 45 minuti a 95°C. Le TBARS sono state estratte aggiungendo butanolo/NaCl e centrifugando per 10 minuti a 3000g. La quantificazione è stata ottenuta mediante misura della fluorescenza con un fluorimetro Cary Eclipse (Varian) ( $\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$ ). La curva di calibrazione (0-10  $\mu\text{M}$ ) è stata realizzata utilizzando soluzioni di malondialdeide a concentrazioni note. La concentrazione di TBARS è stata espressa come rapporto percentuale rispetto al controllo.

Tutte le misure sono state riportate in relazione al contenuto proteico totale dei lisati cellulari, calcolato mediante il *Bicinchoninic Acid Protein assay* (Thermo Scientific), seguendo le indicazioni del produttore.

Tutti i dati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard ottenute da almeno tre esperimenti indipendenti e la significatività delle differenze rispetto ai controlli è stata valutata mediante il test t di Student o l'ANOVA, seguiti dal test di Dunnett o di Turkey utilizzando il software SPSS 17.0 (SPSS Inc.) e considerando significativo un *p-value* di 0,05.

### **Attività mutagenica**

Il *Salmonella reversion test* (Maron and Ames, 1983) è stato impiegato per valutare l'attività mutagenica del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$ . Il saggio ha sfruttato i ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* ed è stato condotto sia in assenza che in presenza dell'estratto di fegato di ratto S9. Sono state testate sei diverse dosi di complesso metallico (0, 2,5, 5, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{piastra}$ ) su entrambi i ceppi. Come controlli positivi sono stati utilizzati l'licantone (50  $\mu\text{g}/\text{piastra}$ ) ed il 2-aminofluorene (5  $\mu\text{g}/\text{piastra}$ ); come controllo negativo si è proceduto al trattamento col solo solvente DMSO. I dati sono stati riportati come media  $\pm$  deviazione standard del numero di revertenti ottenuti in tre esperimenti ripetuti. I risultati del test sono stati valutati considerando le linee guida maggiormente seguite: sono da ritenersi mutagene le sostanze che generano un numero di revertenti pari almeno al doppio di quelli generati dal controllo negativo ed ottenuti con almeno due concentrazioni consecutive di composto; il numero di revertenti deve inoltre essere dose-dipendente (IARC, 1987).

Per saggiare la capacità del  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  di causare alterazioni cromosomiche è stato impiegato il *Cytokinesis-Block Micronucleus assay* (CBMN) su linfociti umani freschi prelevati da soggetti sani, non fumatori e precedentemente non esposti a composti genotossici o radiazioni. I linfociti sono stati cresciuti alla concentrazione di  $5 \times 10^5/\text{ml}$  in RPMI 1640 contenente 15% FCS (Sigma), 1% fitoemoagglutinina, 1 mM L-glutamina, 100 IU penicillina and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomina in atmosfera contenente il 5% di  $\text{CO}_2$  per 72 ore totali; a 44 ore di incubazione è stata aggiunta citocalasina-B 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e dopo 48 ore è stato aggiunto il  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  (10, 15, 20  $\mu\text{M}$ ). Come controllo negativo è stato utilizzato il DMSO, mentre come controlli positivi sono stati utilizzati la bleomicina (6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ed il colcemide (0,02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Raggiunte le 72 ore i linfociti sono stati raccolti e trattati con 1:2 RPMI 1640 medium:H<sub>2</sub>O, addizionato di 2% FCS per 2 minuti e fissate con 1:1 acido acetico:metanolo preraffreddato in ghiaccio. I vetrini sono stati preparati utilizzando una citocentrifuga, asciugando all'aria e colorando con il metodo May-Grunwald-Giemsa. La conta dei micronuclei è stata eseguita utilizzando un microscopio ottico ad immersione Axioplan (Zeiss) ad un ingrandimento 1000X, seguendo il metodo riportato in Fenech, 2000. Per ogni trattamento (in duplicato) sono stati esaminati almeno 2000 linfociti binucleati, calcolando la frequenza dei micronuclei.

Il *Nuclear Division Index* (NDI) è stato calcolato utilizzando la formula  $\text{NDI} = (\text{M1} + 2\text{M2} + 3\text{M3} + 4\text{M4}) / \text{N}$ , dove M1-M4 indicano il numero di cellule con 1-4 nuclei e N indica il

numero totale di cellule contate (Eastmond and Tucker, 1989). Sono state contate oltre 1000 cellule mono-, di-, tri- o tetranucleate e ne è stata calcolata la percentuale relativa.

Per valutare la capacità delle cellule U937 trattate con  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  di riparare il danno al DNA è stata impiegata la versione alcalina del *Comet assay*. Le cellule sono state seminate per 24 ore ( $2,5 \times 10^5$  cellule/ml) prima del trattamento con 1 e 15  $\mu\text{M}$  di complesso metallico; dopo 1 ora a 37°C il terreno di trattamento è stato eliminato e sostituito con terreno fresco e le cellule sono state incubate a 37°C per altre 0, 2, 4, 24 ore; le cellule sono state quindi recuperate ed utilizzate per il saggio, condotto come riportato in Buschini *et al*, 2009. Il DNA è stato marcato con 75  $\mu\text{l}$  di etidio bromuro (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) prima dell'osservazione a 400X di ingrandimento utilizzando un microscopio a fluorescenza Leica DMLS ed un sistema automatico di analisi delle immagini (Comet Assay III– Perceptive Instruments Ltd). Sono state analizzate 100 cellule per ogni campione ed il danno al DNA è stato calcolato come percentuale di intensità del segnale nella coda (TI%). La significatività statistica dei dati è stata calcolata utilizzando il software SPSS 11 (SPSS Inc.).

#### **Individuazione del bersaglio molecolare del $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$**

**Spettro di emissione.** Gli spettri di emissione sono stati misurati a 25°C utilizzando un fluorimetro Fluoromax 3 (Horiba Scientific) e cuvette di plastica con un cammino ottico di 1 cm. La misura del bianco è stata eseguita su un tampone 20 mM Tris-HCl pH 8. La misura dell'effetto di *quenching* è stata invece ottenuta aumentando progressivamente la concentrazione del complesso metallico (0, 1, 5, 10, 20 and 30  $\mu\text{M}$ ) in una soluzione contenete 30 nM etidio bromuro ed il plasmide pNEB193 54  $\mu\text{M}$  in un tampone 20 mM Tris-HCl pH 8 ( $\lambda_{\text{ex}} = 525 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$ ).

**Dicroismo circolare.** Gli spettri di dicroismo circolare sono stati registrati a 25°C utilizzando uno spettropolarimetro Jasco J-715 e cuvette di quarzo con un cammino ottico di 1 cm. Il CT-DNA (Sigma) è stato risospeso in 10 mM PBS pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl e conservato a 4°C. Le misure sono state condotte incrementando la concentrazione di  $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]$  in modo da ottenere rapporti [complesso metallico]/[CT-DNA] pari a 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6. Il coefficiente di estinzione molare applicato ( $\epsilon_{260}$ ) è pari a  $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

**Microscopia a forza atomica.** Il frammento lungo 1004 bp utilizzato per l'analisi AFM è stato ottenuto mediante PCR classica dal plasmide pDE13 utilizzando una Taq polimerasi prodotta nel nostro laboratorio, il primer *forward* (5'GGGTACTCATACTCACCTC) ed il primer *reverse* (5'CAGTCACGACGTTGTAAAACG). L'amplicone è stato purificato mediante

separazione elettroforetica su gel d'agarosio 1% e successiva elettroeluizione in apparato Elutrap (Schleicher & Schuell). Successivamente si è proceduto alla separazione mediante fenolo-cloroformio ed alla precipitazione con etanolo. Il pellet è stato risospeso in 10 mM Tris-HCl pH = 8, 1 mM EDTA e conservato a 4°C. La sua concentrazione è stata determinata mediante misura spettrofotometrica a 260 nm.

I trattamenti con il [Ni(tcitr)<sub>2</sub>] sono stati condotti per 1 ora a T.A. in 5 µl di tampone 10 mM Tris-HCl con una concentrazione di DNA pari a 40 nM e di complesso metallico pari a 1, 10, 100 µM. Come controlli sono stati eseguiti trattamenti con 100 µM NiSO<sub>4</sub> e con 100 µM [Htcitr]. Dopo il trattamento i campioni ed i controlli sono stati diluiti in 20µl di *deposition buffer* (4 mM Hepes pH 7,4, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) e depositati su mica appena sfogliata (Ted Pella Inc.); dopo due minuti la mica è stata risciacquata con H<sub>2</sub>O milliQ ed asciugata con un flusso d'azoto.

Le immagini di 2X2 µm (512X512 pixel) sono state raccolte in aria utilizzando il microscopio a forza atomica Nanoscope IIIa (Digital Instruments), operando in modalità *tapping* ed utilizzando *cantilever* commerciali (MikroMasch). L'analisi è stata condotta utilizzando un programma MatLab (Mathworks) scritto nel nostro laboratorio. La lunghezza delle molecole è stata misurata utilizzando il metodo descritto in Rivetti, 2009, mentre la posizione delle strutture a nodi o forcine lungo le molecole è stata determinata manualmente.

**Laser optical tweezers.** Il frammento di DNA utilizzato per gli esperimenti al MiniTweezers, lungo 2359 bp, è stato ottenuto mediante PCR classica sul plasmide pNEB193 utilizzando una Taq polimerasi prodotta nel nostro laboratorio, il primer *forward* BIOT-200-FOR (5'-BIOT-CCTCTTCGCTATTACGCCAG-3') modificato con una biotina all'estremità 5' ed il primer *reverse* Oligo-SH-Rev (5'-SH-CGTGAGGTGGCACTTTTCGG-3') modificato con un gruppo -SH al 5'. L'amplicone è stato purificato mediante separazione elettroforetica su gel d'agarosio 1% e successiva elettroeluizione in apparato Elutrap (Schleicher & Schuell). Successivamente si è proceduto alla separazione mediante fenolo-cloroformio ed alla precipitazione con etanolo. Il pellet è stato risospeso in 10 mM Tris-HCl pH = 8, 1 mM EDTA e conservato a 4°C. La sua concentrazione è stata determinata mediante misura spettrofotometrica a 260 nm. Prima del legame alle sfere, il DNA è sottoposto a riduzione mediante incubazione per 15 minuti a T.A. con DTT 10 mM; l'agente riducente è stato poi rimosso mediante ripetute diluizioni utilizzando il sistema Vivaspin (Sartorius). Le microsfele funzionalizzate con gruppi -NH<sub>2</sub> (~4 µm di diametro; Kisker Biotech GmbH & Co.) sono state attivate utilizzando il

cross-linkante sulfo-SMCC (Pierce Biotechnology Inc.), incubandole con una concentrazione pari a 1 mM dello stesso per 16 ore a 4°C. L'eccesso di cross-linkante è stato eliminato con ripetute diluizioni mediante centrifugazione delle sfere a 11000 rpm a 16°C, anche allo scopo di conservarle in un tampone adeguato per il successivo legame del DNA (20 mM Hepes pH 6,9). Le microsfele funzionalizzate con streptavidina (~2 µm di diametro; Kisker Biotech GmbH & Co.) sono state preparate mediante lavaggi successivi in 20 mM Hepes pH 7,6 attraverso centrifugazione a 11000 rpm a 16°C. Per legare il DNA alle microsfele attivate con sulfo-SMCC si è proceduto incubando un rapporto microsfele:DNA pari a 1:10000 per 2 ore a T.A.. Terminata la reazione di legame del DNA alle sfere, queste e quelle modificate con streptavidina sono state diluite in 1 ml di 20 mM Hepes pH 7,6 ed iniettate nella cassetta in cui sono stati condotti gli esperimenti.

## 6. BIBLIOGRAFIA

**Alderen R. A.**, Hall M. D. and Hambley T. W. (2006) The discovery and development of Cisplatin. *Journal of Chemical Education*, **83**, 728-734.

**Ashkin A.**, Dziedzic J. M., Bjorkholm J. E. and Chu S. (1985) Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters*, **11**, 288-290.

**Baase W. A.** and Johnson W. C. Jr (1979) Circular dichroism and DNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*, **6**, 798-814.

**Basu A.** and Krishnamurthy S. (2010) Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *Journal of Nucleic Acids*, **2010**, 1-16.

**Boatright K. M.** and Salvesen G. S. (2003) Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, **15**, 725-731.

**Buschini A.**, Pinelli S., Pellacani C., Giordani F., Belicchi Ferrari M., Bisceglie F., Giannetto M., Pelosi G. and Tarasconi P. (2009) Synthesis, characterization and deepening in the comprehension of the biological action mechanisms of a new nickel complex with antiproliferative activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **103**, 666-677.

**Bustamante C.**, Smith S. B., Liphard J. and Smith D. (2000) Single-molecule studies of DNA mechanics. *Current Opinion in Structural Biology*, **10**, 279-285.

**Casas J. S.**, García-Tasende M. S. and Sordo J. (2000) Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. *Coordination Chemistry Reviews*, **109**, 197-261.

**Catalgol B.**, Wendt B., Grimm S., Breusing N., Özer N. K. and Grune T. (2010) Chromatin repair after oxidative stress: Role of PARP-mediated proteasome activation. *Free Radical Biology & Medicine*, **48**, 673-680.

**Chamber B. A.** and Roberts T. G. Jr. (2005) Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews*, **5**, 65-72.

- Chen J.**, Huang Y., Liu G., Afrasiabi Z., Sinn E., Padhye S. and Ma Y. (2004) The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **197**, 40-48.
- Clarke M. J.**, Zhu F. and Frasca D. R. (1999) Non-Platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chemical Review*, **99**, 2511-2533.
- Eastmond D. A.** and Tucker J. D. (1989) Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental Molecular Mutagenesis*, **13**, 34-43.
- Fenech M.**, The *in vitro* micronucleus technique. *Mutatio Research*, **455**, 81-95.
- Fulda S.** and Debatin K. (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, **25**, 4798-4811.
- Gómez-Saiz P.**, Gil-García R., Maestro M. A., Pizarro J. L., Arriortua M. I., Lezama L., Rojo T., González-Álvarez M., Borrás J. and García-Tojal J. (2008) Structure, magnetic properties and nuclease activity of pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazonecopper(II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **102**, 1910-1920.
- Hall M. D.**, Okabe M., Shen D., Liang X. and Gottesman M. M. (2008) The role of cellular accumulation in determining sensitivity to Platinum-based chemotherapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **48**, 495-535.
- Hall M. D.**, Salam N. K., Hellawell J. L., Fales H. M., Kensler C. B., Ludwig J. A., Szakács G., Hibbs D. E. and Gottesman M. M. (2009) Synthesis, activity, and pharmacophore development for Isatin- $\beta$ -thiosemicarbazones with selective activity toward multidrug-resistant cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, **52**, 3191-3204.
- Hou X.**, Zhang X., Wei K., Ji C., Dou S., Wang W., Li M. and Wang P. (2009) Cisplatin induces loop structures and condensation of single DNA molecules. *Nucleic Acids Research*, **37**, 1400-1410.
- IARC** (1987) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans overall evaluation of carcinogenicity, **7**, da p. 170.
- Jamieson E. R.** and Lippard S. (1999) Structure, recognition and processing of Cisplatin-DNA adducts. *Chemical Reviews*, **99**, 2467-2498.
- Jomova K.** and Valko M. (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, **283**, 65-87.
- Kizilcikli I.**, Kurt Y. D., Akkurt B., Genel A. Y., Birteksöz S., Ötük G. and Ülküseven B. (2007) Antimicrobial activity of a series of thiosemicarbazones and their ZnII and PdII complexes. *Folia Microbiology*, **52**, 15-25.
- Kypr J.**, Kejnovská I., Renčiuk D. and Vorlíčková M. (2009) Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Research*, **37**, 1713-1725.
- Liu C.**, Zhou J. and Xu H. (1998) Interaction of the copper(II) macrocyclic complexes with DNA studied by fluorescence quenching of ethidium. *Journal of Inorganic Chemistry*, **71**, 1-6.

- Maron D. M.** and Ames B. N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**, 173-215.
- McCauley M. J.** and Williams M. C. (2006) Mechanisms of DNA binding determined in Optical Tweezers experiments. *Biopolymers*, **85**, 154-168.
- Moffit J. R.**, Chemla Y. R., Smith S. B. and Bustamante C. (2008) Recent advances in Optical Tweezers. *Annual Review of Biochemistry*, **77**, 205-228.
- Nordén B.** and Tjerneld F. (1982) Structure of methylene blue-DNA complexes studied by linear and circular dichroism spectroscopy. *Biopolymers*, **21**, 1713-1734.
- Onoa G. B.**, Cervantes G., Moreno V. and Prieto M. J. (1998) Study of the interaction of DNA with cisplatin and other Pd(II) and Pt(II) complexes by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research*, **26**, 1473-1480.
- Pelosi G.** (2010) Thiosemicarbazone metal complexes: from structure to activity. *The Open Crystallography Journal*, **3**, 16-28.
- Rivetti C.**, Guthold M. and Bustamante C. (1996) Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *Journal of Molecular Biology*, **264**, 919-932.
- Rivetti C.** (2009) A simple and optimized length estimator for digitized DNA contours. *Cytometry Part A*, **75A**, 854-861.
- Sartorelli A. C.**, Agrawal K. C., Tsiftoglou A. S. and Moore R. C. (1976) Characterization of the biochemical mechanism of action of alpha-(N)-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. *Advances in Enzyme Regulation*, **15**, 117-139.
- Siddik Z. H.** (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, **22**, 7265-7279.
- Sischka A.**, Toensing K., Eckel R., Wilink S. D., Sewald N., Ros R. and Anselmetti D. (2005) Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA binding ligands. *Biophysical Journal*, **88**, 404-411.
- Sitko J. C.**, Mateescu E. M. and Hansma H. G. (2003) Sequence-dependent DNA condensation and the electrostatic zipper. *Biophysical Journal*; **84**, 419-431.
- Smith S. B.**, Cui Yujia and Bustamante C. (1996) Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, **271**, 795-799.
- Thelander L.** and Gräslund A. (1983) Mechanism of inhibition of mammalian ribonucleotide reductase by the iron chelate of 1-formylisoquinoline thiosemicarbazone. Destruction of the tyrosine free radical of the enzyme in an oxygen-requiring reaction. *Journal of Biological Chemistry*, **258**, 4063-4066.
- Trossini G. H. G.**, Guido R. V. C., Oliva G., Ferreira E. I. and Andricopulo A. D. (2009) Quantitative structure-activity relationships for a series of inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*: Molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **28**, 3-11.

**Tu Y.**, Chen C., Pan J., Xu J., Zhou Z. and Wang C. (2012) The Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **5**, 726-738.

**Van Mameren J.**, Gross P., Farge G., Hooijman P., Modesti M., Falkenberg M., Wuite G. J. L. and Peterman E. J. G. (2009) Unraveling the structure of DNA during overstretching by using multicolor, single-molecule fluorescence imaging. *Proceedings of the National Academy of Science*, **106**, 18231–18236.

**Verani C. N.** (2012) Metal complexes as inhibitors of the 26S proteasome in tumor cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **106**, 59-67.

**Vettori M.V.**, Caglieri A., Goldoni M., Castoldi A.F., Dar E., Alinovi R., Ceccatelli S. and Mutti A. (2005) Analysis of oxidative stress in SK-N-MC neurons exposed to styrene-7,8-oxide. *Toxicology in Vitro*, **19**, 11–20.

**Zhanga X.**, Chenb H., Leb S., Rouzinac I., Doylea P. S. and Yana J. (2013) Revealing the competition between peeled ssDNA, melting bubbles, and S-DNA during DNA overstretching by single-molecule calorimetry. *Proceedings of the National Academy of Science*, **110**, 3865-3870.

**Zuidam N. J.**, Barenholz Y. and Minsky A. (1999) Chiral DNA packaging in DNA-cationic liposome assemblies. *FEBS Letters*, **457**, 419-422.

## APPENDICE II

### PUBBLICAZIONI

**Buschini A.**, Pinelli S., Alinovi R., Mussi F., Rivetti C., Doniselli N., Pelosi G. (2014) Unraveling mechanisms behind the biological activity of bis(S-citronellalthiosemicarbazonato)nickel(II). *Metalomics*, accepted manuscript, DOI: [10.1039/C3MT00345K](https://doi.org/10.1039/C3MT00345K)

**In preparazione:** Synergic and opposite effects of two stringent response modulators on bacterial transcriptional initiation complexes.



## **Un grazie a...**

Arrivato al termine di questo percorso, scritta anche questa terza tesi (l'ultima, lo giuro), non posso far altro che rivolgere un pensiero a chi ha contribuito al raggiungimento di un traguardo così importante, che segna il mio ingresso nel vero mondo della Ricerca (in quello dei grandi per intenderci).

E allora dico grazie, anzi grazie mille, a Claudio (per questa volta, credo mi sia concesso di omettere il cognome), perché è merito suo se ora posso lanciarmi con fiducia nel futuro, ed è per merito suo se in questo futuro non posso far altro che vederci un bancone da laboratorio e quattro pipette. Un esempio da seguire, non ho dubbi!

E poi grazie alla mia famiglia: a mamma e papà, che con la loro presenza, fisica e morale, mi hanno spinto ogni giorno verso traguardi sempre più alti, permettendomi di raggiungerli con determinazione e senza distrazioni. E ad Elisa, che prima sopportando la mia voce nelle lunghe giornate di studio e poi sostenendomi con week end passati insieme e dolci leccornie, ha reso le giornate serene e felici.

Ma soprattutto grazie infinite a Bea, la persona che più di tutte sa cosa rappresenta per me questo dottorato: 3 anni di fatiche (molte) e soddisfazioni (poche), ma durante i quali ci siamo conosciuti ed ho capito che forse non è poi così sbagliato innamorarsi della "vicina di scrivania" e "dirimpettaia di bancone". Lunghe sere a parlare di esperimenti, protocolli, dati che non tornano, articoli che dovrebbero essere scritti, futuro da condividere, ovunque nel Mondo, ma con intorno sempre cellule, provette, libri...! Abbiamo un obiettivo, che suona molto come un sogno: credo davvero che insieme, un giorno, potremo dire di averlo raggiunto!

Un ringraziamento a tutti quelli che, in un modo o nell'altro, mi hanno fatto sentire il loro appoggio: ai colleghi e ai Prof del (ex)Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, e soprattutto agli amici di sempre, che hanno la fortuna di vivere ogni giorno sul "mio" splendido lago (che merita, ovviamente, un ringraziamento tutto suo...)!





