

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dottorato di Ricerca in

**“Microbiologia Medica ed Immunologia”
XX ciclo**

Titolo della tesi

**Clonaggio, espressione e caratterizzazione della porzione solubile di
Anaerobic induced protein A (sAniA)
di *Neisseria meningitidis***

**Candidato
Dott.ssa Arianna Neri**

**Anno Accademico
2007-2008**

Tutor : Dott.ssa Paola Stefanelli

Coordinatore: Prof. Carlo F. Perno

ABSTRACT

Neisseria meningitidis is likely to be exposed to nitrosative stress during natural colonization in the human host and disease in general. Furthermore, *N. meningitidis* can live in the absence of oxygen replacing the aerobic pathway with nitrite (NO₂⁻) based metabolism involving as a first step the activity of nitrite reductase (encoded by *aniA* gene). During the life cycles inside the host, for instance during mucosal invasion or during sepsis, *N. meningitidis* may continue to survive by the denitrificant pathway. Expression of the these genes by *N. meningitidis* during colonization and different phases of disease plays a crucial role in bacterial survival and thus in infection.

On the basis of this knowledge, the present study evaluates sequence conservation in the gene coding for nitrite reductase (*aniA*) and AniA expression from a panel of *Neisseria meningitidis* isolates. Sequence analysis of the coding region in 19 disease-associated and 4 carrier strains notwithstanding a high degree of sequence similarity showed a number of nucleotide changes, some of which possibly resulted in premature translation termination or function loss. In particular, in one disease-associated strain a 9-residues insertion was found to be located close to the type I Cu-site and a catalytic histidine at position 280 was mutated into a leucine. In two strains from carriers, a sequence corresponding to a portion of a transposase gene within the *aniA* was also found. The AniA protein was always expressed, except for these two carriers strains and for other two strains in which the presence of the premature stop codons was recognized.

The biochemical properties of the cloned soluble domain of the enzyme (sAniA) from *N. meningitidis* reference MC58 strain and from a clinical invasive isolate, were studied. In particular, biochemical analysis of sAniA from MC58 demonstrated a clear dependence of its catalytic activity upon acidification.

The results suggest that the presence of a conserved and functional *aniA* gene is not essential for meningococcal survival.

RIASSUNTO

Neisseria meningitidis è facilmente esposto allo stress nitrosoattivo durante la colonizzazione e/o durante la malattia, ma può continuare a sopravvivere in ambienti poveri di ossigeno attraverso la via di denitrificazione. E', inoltre, in grado di contrastare l'effetto tossico dell'ossido nitrico per la presenza della nitrito reductasi (codificata dal gene *aniA*) primo anello del processo di denitrificazione.

Questo studio ha, come scopo, quello di valutare la conservazione della sequenza nucleotidica e aminoacidica del gene *aniA*; l'espressione della proteina AniA di un gruppo di ceppi di *N. meningitidis* isolati da casi di infezione meningococcica (invasivi) e da portatori (non invasivi). L'analisi della sequenza di 19 ceppi invasivi e in 4 ceppi non invasivi, ha mostrato un alto grado di somiglianza nonostante siano state trovate un certo numero di cambiamenti nucleotidici alcuni dei quali definiti codoni di stop ed altri responsabili di una perdita di attività dell'enzima. In particolare, in un ceppo invasivo (1332) è stata trovata una inserzione di 9 aminoacidi vicino al sito legante il rame di tipo I ed un cambiamento dell'istidina a leucina nel sito catalitico, in posizione 280. In due ceppi non invasivi è stata identificata una parte del gene codificante una trasposasi.

Tutti i ceppi di meningococco rappresentanti le diverse alterazioni riconosciute nel gene *aniA*, esprimono, tuttavia, la proteina, eccetto in quei ceppi con una proteina incompleta.

La crescita in vitro di ciascun ceppo di *N. meningitidis* è risultata essere paragonabile sia in presenza che in assenza di nitrito, ed il mancato consumo di nitrito, suggerisce che, nonostante la proteina venga espressa in tutti i ceppi, esiste probabilmente un difetto nel consumo di questo substrato da parte dell'enzima AniA.

Sono state studiate le proprietà biochimiche del dominio solubile dell'enzima AniA (sAniA) del ceppo di riferimento MC58, ottenuto clonando la sequenza del gene corrispondente nel vettore di espressione batterica pET28. In particolare, l'analisi biochimica di base di sAniA ha dimostrato una chiara dipendenza dell'attività catalitica in un ambiente acido.

I risultati ci suggeriscono che la presenza del gene *aniA* conservato e funzionale non è indispensabile per la sopravvivenza del meningococco, nonostante questo enzima sia incluso in una via metabolica importante nel ciclo di vita di questo patogeno.

INDICE

1	Introduzione	1
1.1	Infezione da <i>N. meningitidis</i>	1
1.2	<i>Neisseria meningitidis</i>	5
1.3	Fattori di virulenza	6
1.4	Metabolismo dell'ossido nitrico in <i>N. meningitidis</i>	16
1.5	Classi di nitrito reductasi	26
1.6	Struttura del dominio solubile e meccanismo catalitico di AniA	29
1.7	Ruolo di AniA nella patogenesi di <i>N. meningitidis</i>	38
1.8	Scopo della tesi	41
2.	Materiali e Metodi	43
2.1	Ceppi batterici e procedure colturali	43
2.2	Estrazione del DNA di <i>N. meningitidis</i> e analisi della sequenza del gene <i>aniA</i>	43
2.3	Clonaggio ed espressione della porzione solubile di AniA dai ceppi MC58 e 1332	45
2.4	Lisi dei batteri e purificazione di sAniA	48
2.5	Preparazione del siero policlonale di coniglio e Western blotting	50
2.6	Caratterizzazione biochimica di AniA	51
2.6.1	Dosaggi di attività enzimatica a diversi pH	52
2.6.2	Cinetica enzimatica di AniA	54

2.7 Crescita in brodo e consumo del nitrito di ceppi di <i>N. meningitidis</i> di isolamento clinico	55
3. <i>Risultati</i>	57
3.1 Analisi della sequenza nucleotidica e aminoacidica del gene <i>aniA</i>	57
3.2 Clonaggio ed espressione della porzione solubile di AniA	64
3.3 Espressione di AniA in ceppi di isolamento clinico	67
3.4 Attività enzimatica di sAniA di MC58 in funzione del pH.....	69
3.5 Caratterizzazione di sAniA di MC58 valutando l'ossidazione del ditionito	71
3.4 Consumo di nitrito in ceppi di <i>N. meningitidis</i> di isolamento clinico	74
4. <i>Discussione</i>	78
4. <i>Bibliografia</i>	84

1. INTRODUZIONE

1.1 Infezione da *Neisseria meningitidis*

Considerando l'attualità e la gravità della malattia causata da *Neisseria meningitidis* nel mondo, risulta ancora necessaria un'attenta sorveglianza al fine di individuare le misure di profilassi più appropriate, sia attraverso le informazioni epidemiologiche sia attraverso la conoscenza delle caratteristiche dei ceppi di *N. meningitidis* circolanti.

L'incidenza media della malattia da *N. meningitidis* in Italia negli ultimi tre anni è pari allo 0.4 casi ogni 100.000 abitanti, con circa 180 casi segnalati ogni anno (www.simi.iss.it).

In genere, tra la popolazione sana, esiste una consistente proporzione di soggetti che sono colonizzati dal batterio nel rino-faringe, i cosiddetti portatori sani. La prevalenza di portatori sani è assai variabile in rapporto a fattori diversi, quali le aree geografiche, l'età dei soggetti, le condizioni socio-economiche e di densità di popolazione. La percentuale di portatori sani può oscillare entro limiti ampi, da un minimo dell'1-2% fino ad un massimo del 15-20%, che può essere raggiunta in comunità chiuse e circostanze particolari, quali ad esempio quelle che si realizzano con le reclute militari.

L'uomo rappresenta l'unico ospite naturale per *N. meningitidis* e il nasofaringe è il sito da cui i meningococchi sono trasmessi attraverso aerosol (Chin J. 2000). La manifestazione morbosa classica dell'infezione da *N. meningitidis* è rappresentata da un'inflammatione purulenta delle meningi, accompagnata in vario grado da lesioni infiammatorie a carico dell'encefalo e del midollo spinale. La meningite meningococcica si manifesta quando i batteri passando attraverso la mucosa, in particolare la superficie micro villosa di cellule del nasofaringe (figura 1), invadono il sangue, attraversano le meningi e raggiungono il fluido cerebrospinale.

La malattia si manifesta tra i 2 e i 10 giorni, più comunemente entro 3-4 giorni, di incubazione, anche se i problemi della diagnosi sono dovuti alla somiglianza con più comuni e meno gravi malattie. Clinicamente la malattia è caratterizzata da rigidità nucale, cefalea, febbre, irritabilità, disturbi mentali, nausea e vomito. *N. meningitidis* può essere isolato contemporaneamente da liquor e da sangue in circa $\frac{3}{4}$ dei pazienti, ma la sola sepsi meningococcica, nota come Sindrome di Waterhouse-Friderichsen, è riscontrabile in una percentuale che va dal 5 al 20% dei pazienti. La Sindrome è caratterizzata da sintomi quali febbre, esantema e un'acuta emorragia (Peltola H 1983).

La modalità più comune di trasmissione interumana della meningite epidemica è quella aerea o il contatto con secrezioni del tratto respiratorio di individui carrier. Lo stato di portatore conduce alla sintesi di anticorpi protettivi mentre ci sono evidenze che indicano come la malattia insorga in persone che hanno acquisito da poco l'infezione.

Esistono due forme cliniche della patologia meningococcica. La meningite meningococcica è la più comune specialmente durante i focolai epidemici, l'esito può essere favorevole se l'infezione viene trattata tempestivamente. Al contrario, la setticemia meningococcica, in cui i batteri si ritrovano nel sangue, è meno frequente e presenta un alto tasso di mortalità nonostante l'immediato intervento terapeutico.

La rapidità di diffusione e di manifestazione patologica della meningite meningococcica richiede misure di terapia e di profilassi che devono essere immediatamente attuate. Nel trattamento dei pazienti affetti da meningite meningococcica si tende a preferire come primo trattamento cefalosporine di terza generazione, quali cefotaxime e ceftriaxone. Questi antibiotici hanno il vantaggio di un'alta efficacia unita ad una eccellente capacità di penetrazione nel fluido cerebrospinale.

Attualmente gli antibiotici che efficacemente eliminano il portatore nasofaringeo di *N. meningitidis* sono: rifampicina, ceftriaxone e ciprofloxacina. La chemioprolifassi con rifampicina, farmaco di prima scelta, va limitata ai soli casi considerati ad alto rischio;

poiché il suo uso è stato associato a comparsa di ceppi resistenti, questo farmaco non è raccomandato per una profilassi di massa. Il ceftriaxone può essere utilizzato nei bambini al di sotto dei 12 anni e in stato di gravidanza, a differenza della ciprofloxacina che non è consigliata sotto i 18 anni e nelle donne gravide.

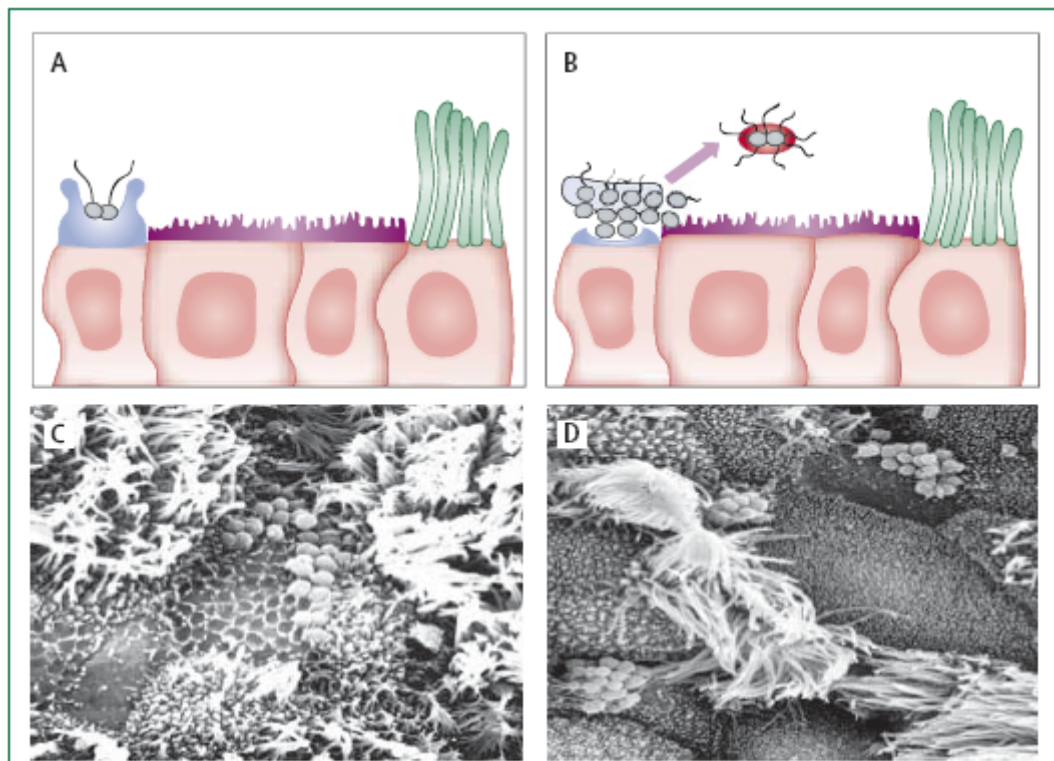


Figura 1. Infezione di *N. meningitidis* (A), adesione del batterio (B), formazione di microcolonie (C), colonizzazione della mucosa nasofaringea (D) (Lancet 2007,369:2196-210).

1.2 *Neisseria meningitidis*

La famiglia *Neisseriaceae* comprende i generi *Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Branhamella*. Al genere *Neisseria*, appartengono due specie patogene per l'uomo: *N. meningitidis* (anche detto meningococco) e *N. gonorrhoeae* (anche detto gonococco).

N. meningitidis è stato isolato per la prima volta nel 1887 da Anton Weichselbaun a Vienna dal liquor di un paziente affetto da una forma purulenta di meningite. Una descrizione del batterio era già stata fatta tre anni prima, in un essudato meningeo da due italiani, Marchiafava e Celli. *N. meningitidis* è un batterio gram negativo che si presenta sotto forma di diplococco, con una morfologia detta a «a chicco di caffè» (figura 2).

Il rivestimento, proprio di tutti i batteri Gram-negativi, è costituito da due membrane tra le quali si interpone uno strato di peptidoglicano. Molte ricerche sono state fatte sulla membrana esterna, importante perché sito di interazione con l'ospite. Lo studio è stato facilitato dall'analisi di numerose vescicole prodotte per esocitosi dalla membrana stessa, contenente i costituenti caratteristici della membrana (Poolman J. T., 1995). Inoltre, la membrana esterna del meningococco, contenente il polisaccaride capsulare, le proteine della membrana esterna, il lipooligosaccaride e il pilo, è il maggior contributo alla virulenza di *N. meningitidis* (Tzeng Y.-L., 2000).

1.3 Fattori di virulenza

Capsula

La membrana esterna è circondata da una capsula polisaccaridica (figura 3) ancorata alla membrana esterna, particolarmente importante perchè rappresenta uno dei maggiori fattori di virulenza del batterio utilizzato per classificare i diversi sierogruppi dei ceppi circolanti.

Sono stati identificati 13 sierogruppi di *N. meningitidis* basati sulle diverse strutture della capsula polisaccaridica, ma solamente sei sierogruppi (A, B, C, W135, X, e Y) sono più spesso associati ad infezioni invasive.

I polisaccaridi capsulari presentano diverse caratteristiche chimiche e immunologiche nei diversi sierogruppi.

Si possono identificare due tipi principali di capsula, una contenente acido sialico ed una priva di quest'ultimo.

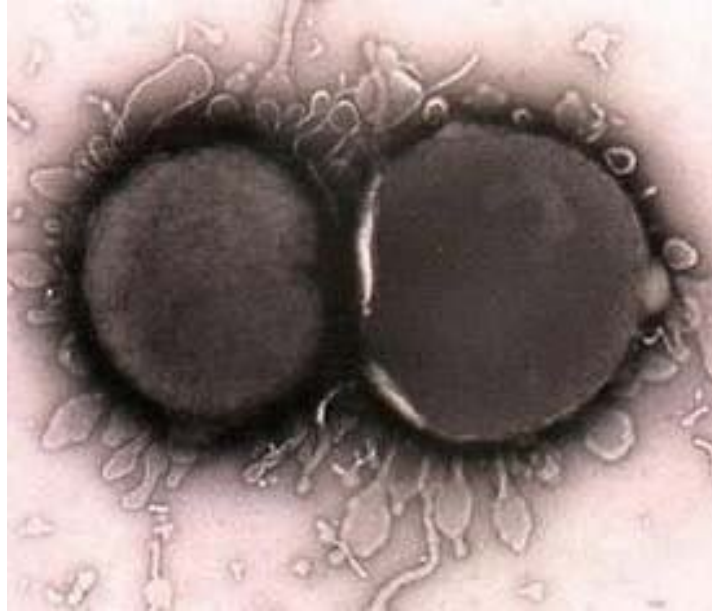


Figura 2. Foto al microscopio elettronico di *N. meningitidis* (www.meningitisuk.org).

Questo secondo tipo di capsula è caratteristico del sierogruppo A. I polisaccaridi di gruppo A sono costituiti da unità ripetute di N-acetil-D-mannosamina-1-fosfato, con legami $\alpha(1-6)$.

L'altro tipo di capsula, contenente acido sialico, è caratteristico dei sierogruppi B, C, W-135 e Y (8). Essi posseggono un complesso genico, *cps*, contenente i geni codificanti gli enzimi biosintetici per il polisaccaride capsulare e le proteine responsabili per il suo trasporto. I geni degli enzimi impegnati nella biosintesi, *siaA*, *siaB*, *siaC*, *siaD*, costituiscono l'unità trascrizionale *sia*, contenuta nella regione del complesso *cps*.

L'omopolimero presente nella capsula del sierogruppo B, è di particolare interesse, in quanto mima parte della struttura delle molecole di adesione delle cellule neurali eucariotiche, sfuggendo così alla risposta anticorpale. Il mimetismo viene spesso utilizzato dai batteri per non suscitare risposte specifiche del sistema immunitario dell'ospite. L'acido sialico è un componente essenziale della capsula del meningococco, presente sotto forma di polimero oppure attaccato alla porzione terminale del lipooligosaccaride di membrana. Conferisce al batterio resistenza al sistema alternativo del complemento, impedendo l'attacco del fattore C3b al batterio.

La capsula è il principale fattore che contribuisce alla sopravvivenza batterica nelle particelle di aerosol nell'ambiente esterno, durante la diffusione nel flusso sanguigno e nel liquido cerebrospinale.

Ceppi sottoposti a variazione di fase negativa, che li rende acapsulati, dopo aver colonizzato un individuo, possono attraversare la mucosa nasofaringea; tuttavia, una volta raggiunto lo strato sottomucosale o il sangue, non sono in grado di sopravvivere. La loro breve permanenza all'interno dell'ospite riesce comunque a stimolare in parte il sistema immunitario e di conseguenza, un portatore risulta protetto (12).

In *N. meningitidis* parte della regione contenente l'unità trascrizionale *sia*, può essere coinvolta in trasferimenti orizzontali di materiale genetico, frequenti in questa specie

batterica. Uno scambio che coinvolga il gene della polisialiltrasferasi può portare ad una variazione del sierogruppo capsulare di un ceppo. Il cambiamento della capsula costituisce un'importante meccanismo di virulenza per il meningococco, consentendo al batterio l'evasione dall'immunità naturale o acquisita.

LPS

Il lipopolisaccaride (LPS), contenuto nella membrana esterna del batterio (figura 3), è composto da due porzioni, una saccaridica ed una lipidica.

Diversamente dall'LPS degli enterobatteri, che contiene molteplici unità saccaridiche ripetute, l'LPS di meningococco è costituito da brevi catene di zuccheri e perciò viene definito lipooligosaccaride (LOS). Esso è composto da glucosio, galattosio, acido 3-cheto-2-desossioctanoico, glucosamina, galattosamina ed etanolamina, in proporzioni diverse in base all'immunotipo. Le catene oligosaccaridiche sono soggette a variazione antigenica, sulla cui base viene definito l'immunotipo cui appartiene un dato ceppo (13).

Il lipooligosaccaride subisce un processo di sializzazione, con la sostituzione del galattosio terminale con acido sialico. Si tratta di una modifica importante, che permette al lipooligosaccaride di svolgere una funzione chiave nella protezione del batterio dai sistemi di difesa dell'ospite. (14).

OMPs

Sulla base della funzione svolta e delle caratteristiche fisiche, le proteine della membrana esterna (outer membrane proteins, OMPs) (figura 3) sono suddivise in diverse classi (16).

Le OMPs di classe 1, 2 e 3 sono di particolare importanza perché responsabili della differenziazione sierologica dei ceppi di *N.meningitidis*. Queste proteine sono porine che si riuniscono in trimeri nella membrana a formare pori per il passaggio di soluti idrofilici.

Le OMPs di classe 1, prodotte dal gene *porA* (18, 19), si differenziano da quelle di classe 2 e 3 per il fatto di avere anse molto più esposte in superficie, una caratteristica che spiega perché gli anticorpi diretti contro la classe 1 mostrino una più alta attività battericida. Un'altra peculiarità delle OMP di classe 1 è la presenza di regioni altamente variabili, VR1, VR2 e VR3. La variabilità di queste sequenze, in particolar modo la VR2, che permette di definire diversi e numerosi epitopi, che sono uno dei meccanismi di evasione del riconoscimento da parte del sistema immunitario dell'ospite (21). La conseguente variabilità degli epitopi permette al batterio di sfuggire al sistema immunitario dell'ospite. Riarrangiamenti quali inserzioni, delezioni o sostituzioni di amminoacidi in VR1 e VR2 possono portare a variazioni delle proprietà antigeniche della proteina e al fallimento dell'attività battericida degli anticorpi.

E' importante lo studio dei meccanismi che regolano l'espressione dei geni, per ricombinazione intragenica o per trasferimento orizzontale. Una variazione o un riassortimento delle parti dei geni codificanti regioni immunologicamente rilevanti generano varianti antigeniche, che, non riconosciute dal sistema immunitario, diffondono facilmente. Spesso l'origine di epidemie sono, infatti, la comparsa e diffusione di varianti antigeniche che sfuggono il riconoscimento da parte dell'ospite.

Le proteine di classe 2 e 3 sono codificate dal gene *porB*; possono essere considerate due alleli, due forme diverse dello stesso gene (22). Ogni batterio possiede una sola delle due forme alleliche. Sono le proteine quantitativamente più espresse nella membrana. Mostrano anch'esse, come quelle di classe 1, un certo grado di variabilità.

La classe 4 comprende proteine «modificabili per riduzione», (Rmp), stabili antigenicamente e in grado di ridurre l'effetto battericida di anticorpi diretti contro gli altri antigeni di superficie. Esse, infatti, stimolano la produzione di anticorpi IgG fissanti il complemento, capaci di bloccare i meccanismi di batteriolisi.

La classe 5 è costituita da due proteine, Opa e Opc, coinvolte nei processi di adesione e invasione delle cellule dell'ospite. Opa media l'entrata nelle cellule epiteliali; Opc interviene nell'attacco e entrata nelle cellule epiteliali e endoteliali.

Un'ulteriore classe di OMPs comprende proteine sintetizzate dal meningococco in caso di carenza di ferro.

Neisseria meningitidis ha elaborato un meccanismo alternativo di cattura del ferro. Essa produce OMPs in grado di catturare il complesso ferro-proteina (lactoferrina e transferrina nell'uomo) e di rilasciare il ferro all'interno del batterio (23, 24).

Pili

Tra le proteine della membrana esterna che contribuiscono alla virulenza ci sono i pili (figura 3), che facilitano l'adesione iniziale dei meningococchi alle cellule e permettono il movimento sopra la superficie epiteliale e il passaggio attraverso lo strato mucosale del faringe.

I pili sono degli aggregati elicoidali costituiti principalmente da una subunità proteica detta pilina. Si estendono, a partire dalla doppia membrana, attraverso la capsula del batterio fino alla superficie esterna.

I ceppi di *N. meningitidis* possono esprimere uno solo di due antigenicamente, fisicamente e funzionalmente distinti tipi di pili, detti Classe I e Classe II.

La Classe I comprende pili in grado di legare anticorpi specifici (SM1) e con una peculiare struttura con regioni conservate, semivariabili e ipervariabili. I pili della Classe II non reagiscono con gli anticorpi SM1 e hanno un peso molecolare inferiore rispetto alla Classe I.

Le modalità di incontro batterio-cellula ospite sono ancora da chiarire. Non è noto se l'interazione pilo-cellula sia diretta, mediata da una regione conservata del pilo, o se richieda la presenza di un'adesina, una proteina che medi l'adesione.

La variabilità dei pili, oltre a consentire l'evasione dal sistema immunitario permette la modulazione del grado di capacità adesiva, e quindi di virulenza, del batterio nelle diverse fasi dell'infezione.

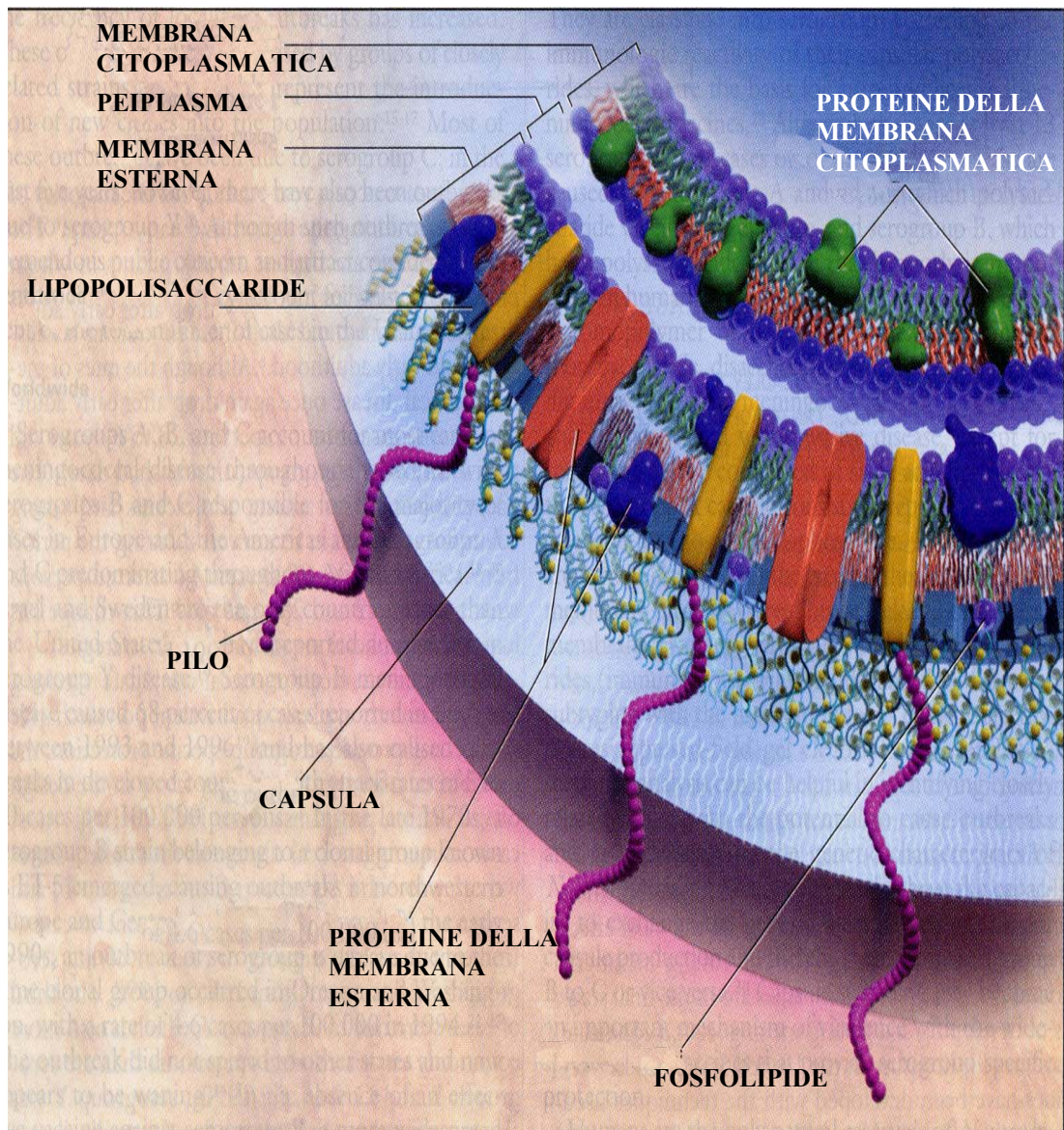


Figura 3. Sezione della membrana cellulare di *Neisseria meningitidis* (N Engl J Med, vol.344, n.18, 2001).

IgA-proteasi

Le IgA-proteasi, codificate nel meningococco dal gene *iga*, sono delle endopeptidasi capaci di scindere nella regione cerniera la catena pesante delle immunoglobuline IgA umane. Vengono prodotte soprattutto da batteri che interagiscono con le mucose, in cui le immunoglobuline di classe A svolgono un ruolo chiave nella prima linea di difesa dell'ospite.

Nei tratti respiratori superiori, via di accesso del meningococco, la sottoclasse di immunoglobuline IgA1, contro cui agiscono le proteasi di *N. meningitidis*, serina-proteasi IgA1 specifiche, è la predominante. Si distinguono due tipi di proteasi, in base al legame peptidico che tagliano: il tipo 1 scinde il legame prolina-serina, il tipo 2 agisce sul legame prolina-treonina (27).

Un'ulteriore funzione svolta dalle IgA1 proteasi consiste nel taglio di LAMP1, la maggiore glicoproteina di membrana dei lisosomi e degli endosomi, deputata al mantenimento della stabilità dei due compartimenti (28).

Proteine leganti il ferro

Il meningococco ha evoluto sistemi efficienti per l'acquisizione del ferro, che è presente negli ambienti durante l'infezione. La maggior parte del ferro dell'ospite è contenuto intracellularmente come emoglobina, e extracellularmente come transferrina e lattoferrina umana.

Una proteina della membrana esterna legante l'emoglobina, HmbR, si crede che estragga l'eme dall'emoglobina e in seguito lo trasporti nel periplasma.

Due sistemi di trasporto a due componenti sono coinvolti nell'acquisizione della transferrina (TbpA e TbpB) e della lattoferrina (LbpA e LbpB) umana. TbpA e TbpB formano un complesso nella membrana esterna, e ciascuna di queste proteine può legare la lattoferrina indipendentemente. LbpA e LbpB sembrano funzionare come TbpA e

TbpB, ma rispetto a quest'ultime sono considerate più importanti perché la lattoferrina nel primo step di infezione è la maggior sorgente di ferro nella superficie mucosale. LbpA e LbpB sono codificate come un operone che è represso dalla proteina Fur e dallo ione ferrico (Tzeng Y.L. 2000).

1.4 Metabolismo dell'ossido nitrico in *N. meningitidis*

N. meningitidis, nonostante sia considerato uno batterio strettamente aerobio, in vitro viene coltivato in microaerofilia con una percentuale di CO₂ pari al 5%.

Risulta interessante considerare il ruolo dell'ossigeno e di altri possibili accettori di elettroni nella catena respiratoria di *N. meningitidis*, durante i diversi stadi del suo ciclo patogenetico.

I batteri invasivi devono evitare di essere uccisi nel nasofaringe da fagociti mononucleati e macrofagi residenti in questo tessuto. Queste cellule eliminano i batteri mediante diversi meccanismi, come il “burst ossidativo”, un meccanismo associato al rilascio di specie reattive dell'ossigeno. *N. meningitidis* per neutralizzare lo stress ossidativo esprime prodotti genici quali: la glutatione perossidasi (Moore T.D. 1996), la superossido dismutasi e la catalasi (Archibald F. S. 1986). Inoltre, i macrofagi umani rilasciano ossido nitrico (NO) come molecola segnale e in risposta a diversi prodotti batterici, tra i quali il lipopolisaccaride di *N. meningitidis* (Blondiau C. 1994). Poiché l'NO è una molecola facilmente diffusibile all'interno delle cellule, questa può causare la morte o l'inibizione dei batteri intra ed extracellulari (Webb J. L. 2001).

E' stato dimostrato come *N. gonorrhoeae* sia in grado di crescere in assenza di ossigeno tramite un processo di respirazione anaerobia del nitrito, definito denitrificazione (Joan S, Knapp 1982).

Questo processo è parte integrante dell'apparato bioenergetico nei batteri denitrificanti, dove gli ossianioni dell'azoto sono utilizzati nella catena respiratoria di trasporto degli elettroni, in modo che il nitrato o il nitrito possono agire come accettori finali di elettroni in carenza di ossigeno molecolare per generare un gradiente elettrochimico ai due lati della membrana citoplasmatica, fondamentale per la sintesi di ATP.

La denitrificazione è definita, a livello fenomenologico, una trasformazione dissimilatoria del nitrato (o nitrito) a specie gassose con conservazione di energia, e rientra in un complesso di reazioni che sono il ciclo biogeochimica dell'azoto batterico (Zumft W. G.1997): l'azoto viene introdotto nella biosfera attraverso fissazione chimica e biologica dell'azoto molecolare (N_2) e viene rimosso dalla denitrificazione.

La denitrificazione completa è la riduzione del nitrato attraverso il nitrito, NO e l'ossido nitroso a azoto gassoso ed è caratterizzata da quattro diversi enzimi (Berks B. C. *et al.*, 1995) (figura 4):

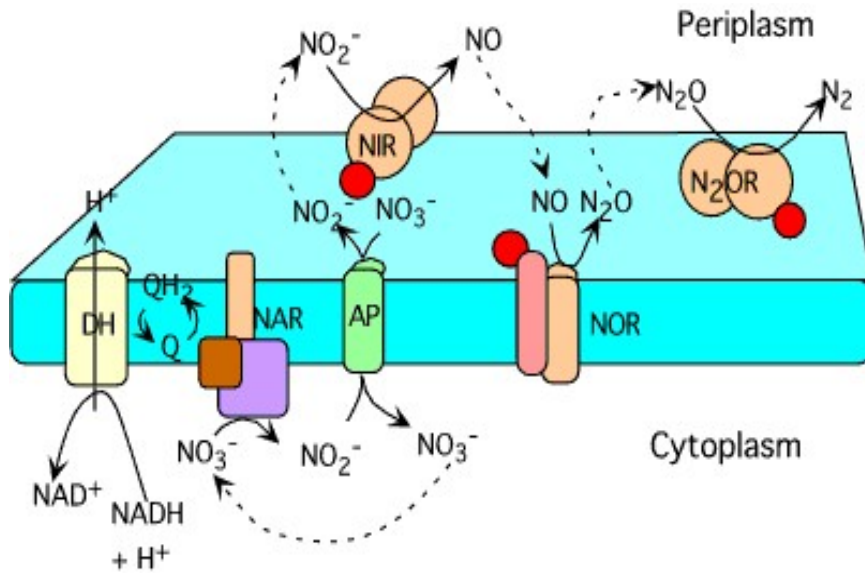
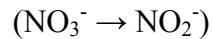


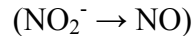
Figura 4. Organizzazione della catena di trasferimento elettronico in batteri gram negativi. Componenti della catena di respirazione aerobia: complesso della deidrogenasi NADH (DH), ciclo del chinone (Q, QH₂). Il sistema di denitrificazione comprende: nitrato reductasi (NAR), nitrito reductasi (NIR), NO reductasi (NOR), N₂O reductasi (N₂OR). (Microbiol. Mol. Biol. Rev., Vol. 61, No. 4, p. 533-616, 1997).

- la nitrato-reduttasi, che catalizza la riduzione del nitrato a nitrito



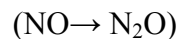
esistono due diversi enzimi di nitrato-reduttasi distinti geneticamente: NAR, un enzima legato alla membrana, e NAP, un enzima periplasmatico;

- la nitrito reduttasi, che catalizza la riduzione del nitrito a ossido nitrico



ci sono due tipi di nitrito reduttasi coinvolti nella denitrificazione: un enzima contenente rame (Cu-Nir) e un enzima contenente eme (cd₁-Nir);

- la NO-reduttasi, che catalizza la riduzione dell'ossido nitrico ad ossido nitroso



- la ossido nitroso-reduttasi, che catalizza la riduzione dell'ossido nitroso ad azoto gassoso $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$).

Altre proteine associate alla denitrificazione sono le cupredossine azzurrina e pseudoazzurina, codificate rispettivamente dai geni *azu* e *paz*.

N. meningitidis rappresenta un denitrificatore “parziale” in quanto può svolgere solo le due reazioni centrali della via di denitrificazione:

- la riduzione del nitrito ad NO;
- la riduzione dell'NO ad ossido nitroso;

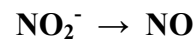
e questi processi permettono al meningococco di crescere in condizioni povere di ossigeno.

Mentre i denitrificanti obbligati, come *Paracoccus denitrificans*, contengono più di 40 geni coinvolti nella sintesi dell'apparato necessario alla denitrificazione, il meningococco possiede solo pochi geni, che vengono distinti in due classi: geni strutturali per la catena di trasporto degli elettroni e geni regolatori.

I geni strutturali sono:

- il gene *aniA* codifica per una **nitrito reduttasi** contenente rame, **AniA** (**A**naerobic induced protein **A**) necessaria per la riduzione del nitrito (NO_2^-) ad ossido nitrico (NO).

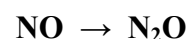
AniA



Tale enzima è una lipoproteina di 39KDa che risulta legata alla membrana esterna nel versante periplasmatico, tramite una acilazione N-terminale della cisteina con acido palmitico (Martin J. Boulanger et al. 2002) (figura 5). Nel gonococco l'espressione del gene *aniA* viene indotta dall'anaerobiosi e la sua induzione è aumentata dal nitrito. Il controllo dell'espressione del gene avviene mediante FNR e NarP/Q (S. Lissenden 2000);

- il gene *norB*, adiacente ad *aniA* ma trascritto in direzione opposta, che codifica per una **ossido nitrico (NO) reduttasi**, NorB (Nitric oxide reductase) responsabile della riduzione dell'ossido nitrico ad ossido nitroso.

NorB



L'NO-reduttasi è molto simile a quella di *N. gonorrhoeae* e di *Ralstonia eutropha*, e a differenza di quella di altri microrganismi come *Paracoccus denitrificans*, manca di una subunità contenente "l'eme c", che dona elettroni alla subunità contenente il sito attivo, ma possiede una estensione N-terminale che agisce come una chinolo ossidasi fornendo due elettroni al sito attivo per la formazione del chinolo ossidato. L'NO-reduttasi è una proteina integrale della membrana citoplasmatica, infatti presenta numerosi domini transmembrana (figura 5). È stato visto che l'induzione dell'espressione di *norB* avviene in anaerobiosi in presenza

di nitrito, ma non avviene in anaerobiosi o in aerobiosi in assenza di nitrito. Quando AniA è prodotta costitutivamente, l'espressione di *norB* può essere indotta sia in anaerobiosi che in aerobiosi, quindi questo ci suggerisce che è l'ossido nitrico, prodotto dalla reazione enzimatica di AniA, ad essere l'agente induttore indispensabile all'espressione di *norB* (Tracey C. Householder 2000).

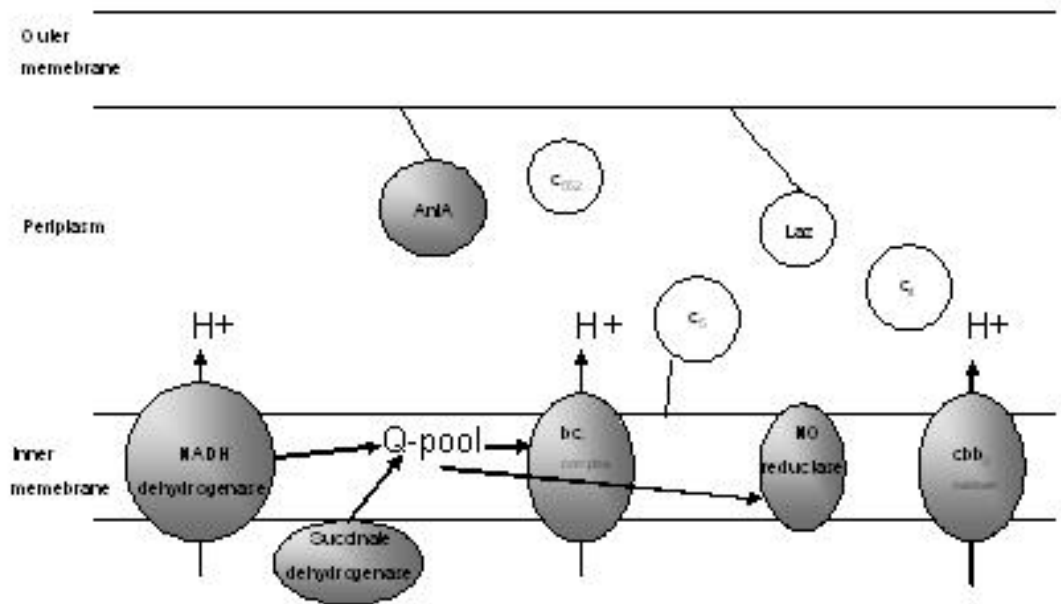


Figura 5. Ipotetica struttura della catena respiratoria di *N. meningitidis*. Sono mostrati i componenti della catena respiratoria le frecce rappresentano la via di trasferimento degli elettroni. (Biochim. Soc. Trans. Vol.33, part1, p.134-136, 2005)

I geni regolatori del processo di denitrificazione codificano per regolatori di trascrizione, che vengono attivati in risposta a determinati cambiamenti ambientali e sono:

- *fnr* che codifica la proteina **FNR** (Fumarate and Nitrate reduction regulator) in grado di attivare in assenza di ossigeno la trascrizione di geni coinvolti nella respirazione anaerobica del nitrito (S. Lissenden 2000). FNR si lega come omodimero a specifiche sequenze palindromiche del DNA, dove ogni monomero si lega ad una metà del sito. Esso è distinto funzionalmente in due domini: un dominio si lega al DNA di tipo “elix turn elix” e una regione N-terminale a foglietti β antiparalleli che costituisce il dominio sensoriale. La regione sensoriale di FNR presenta quattro residui di cisteine conservate che legano il cluster ferro-zolfo sensibile all’ossigeno. Vari studi hanno dimostrato che la forma attiva della proteina presenta un cluster ferro-zolfo $[4Fe-4S]^{2+}$ per monomero che è convertito a $[2Fe-2S]^{2+}$ in seguito all’esposizione dell’ossigeno. Ciò determina un cambiamento conformazionale nella regione N-terminale di FNR che ne impedisce il legame alla sequenza specifica di DNA, e quindi , l’interazione con il macchinario trascrizionale (Jason Crack 2003). E’ probabile che il fattore FNR funga da attivatore trascrizionale di due geni: *aniA* e *ccp*, che codifica per una citocroma c perossidasi;
- *narP/narQ* che codifica per un sistema sensoriale-regolatorio a due componenti coinvolto nella risposta del batterio alla presenza di nitrito.

Inoltre, è stato dimostrato che l’espressione della nitrito reductasi e dell’NO reductasi in *N. meningitidis* può essere controllata dal repressore Fur in risposta alla presenza del

ferro (Delany I. 2004), sebbene non sia ancora chiara se la sua attività di regolatore sia NO-dipendente.

Infine è stato definito recentemente un nuovo regolatore della denitrificazione in *N. meningitidis*: il gene *nsrR*, che codifica per una proteina repressore NsrR, identificato per la prima volta in *Nitrosomonas europaea* come repressore della nitrito reductasi (Rock D. J 2007). E' stato mostrato come nel meningococco il regolatore NsrR sia sensibile al NO piuttosto che al nitrito, e quindi sembra che possa agire sia come regolatore NO-dipendente (con il gene *norB*) sia come regolatore NO-indipendente (con il gene *aniA*).

Un ulteriore locus genetico coinvolto nel metabolismo dell'NO nel meningococco è il gene *cycP*, che codifica per il citocromo c'. Una caratteristica distintiva di questo citocromo rispetto a quello di altri microrganismi, è la presenza di una sequenza segnale che dirige la proteina alla membrana esterna dove lega covalentemente la componente lipidica, invece di essere diretta nel periplasma. La funzione del citocromo c' in *Rhodobacter capsulatus* è di legare e rimuovere l'NO, abbassando così la tossicità di questo radicale libero. Nel meningococco, questo citocromo può avere un ruolo simile, e probabilmente può avere un ruolo nell'evasione della risposta immunitaria dell'ospite durante l'infezione (Anjum M. F. 2002).

Il genoma di *N. meningitidis* ha inoltre rivelato la presenza di un centro numero di componenti della catena di trasportatori di elettroni: geni codificanti il complesso del citocromo *bc₁* (complesso III), un numero di citocromi putativi tipo-c, una cupredossina Laz associata alla membrana esterna (azzurrina lipide modificata) (M. Deedom 2005).

La capacità del meningococco di crescere mediante la denitrificazione è fisiologicamente importante sia, durante l'invasione delle mucose in cui il microrganismo può incontrare facilmente microambienti a bassa concentrazione di

ossigeno, sia durante la sepsi, in cui i tessuti gravemente danneggiati possono non essere perfusi in maniera sufficiente con sangue ossigenato.

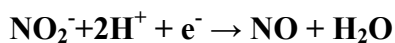
Inoltre, in risposta alla variazione di disponibilità del nitrito (ad esempio dopo un pasto) il meningococco può causare la produzione di un *burst* di NO che: (i) è tossico per i microrganismi competenti per la colonizzazione del tessuto nasofaringeo, (ii) influenza i sistemi segnale dell'ospite che sono dipendenti dall'NO, (iii) inibisce l'attività ossidativa del meningococco così favorendo la denitrificazione del batterio (Rock J. D.2005).

Questa protezione dall'NO fisiologicamente importante, poiché i macrofagi dell'ospite umano producono NO al fine di uccidere microrganismi invasori.

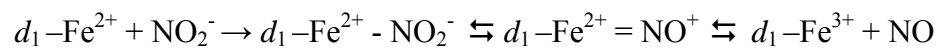
Così come proteggono l'organismo dagli effetti tossici dell'NO, i sistemi di rimozione dell'NO possono avere ulteriori implicazioni per la normale fisiologia dell'ospite umano infettato, in quanto l'NO è un potente agente vasodilatatore. Se il metabolismo del meningococco svuota i tessuti periferici dell'ospite dall'NO, si ha una deregolazione del tono vascolare che causa una diminuzione del flusso sanguigno e quindi ipossia.

1.5 Classi di nitrito reduttasi

Le nitrito reduttasi impiegate nel processo di denitrificazione appartengono a due diverse classi enzimatiche che si differenziano in termini di struttura e di gruppi prostetici metallici. Esse sono: il **citocromo cd₁** e la **nitrito reduttasi contenente rame**. Entrambe riducono il nitrito ad ossido nitrico secondo la seguente reazione:



I. Il **citocromo cd₁**, posseduta in circa il 75% dei batteri denitrificanti, è un omodimero di circa 60kD che presenta in entrambe le subunità un eme di tipo C legato covalentemente ad un eme di tipo D₁ non legato covalentemente, rendendo l'enzima una proteina tetraemica. La struttura cristallografica (Nicholas J. 1998) del citocromo cd₁ isolato dal batterio *Paracoccus denitrificans* conferma la natura dimerica dell'enzima e mostra due dimeri per ogni monomero. Il dominio più piccolo N-terminale che contiene l'eme c ha una struttura prevalentemente ad α eliche, mentre il dominio C-terminale contenente l'eme d₁ ha una struttura a β -propulsore. Dal punto di vista funzionale è stato dimostrato che l'eme d₁ è il sito di riduzione del nitrito e l'eme di tipo c implicato nel trasferimento elettronico da una proteina donatrice di elettroni all'eme d₁. Il meccanismo catalitico (figura 6) proposto prevede che nel primo step il nitrito legato all'eme ridotto d₁ (E- NO₂⁻) è protonato e deidratato per dare un enzima nitrosilato (E- NO⁺). Nel secondo step l'eme d₁ è ossidato e l'NO⁺ legato è ridotto a NO, si ha quindi il rilascio dell'ossido nitrico.



↓↑

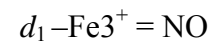


Figura 6. Meccanismo catalitico del citocromo cd₁

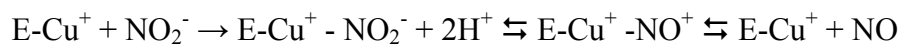


Figura 7. Meccanismo catalitico della nitrito reduttasi contenente rame.

II. La **nitrito reduttasi contenente rame** è un omotrimerico di circa 36kDa di peso per monomero, in cui ogni subunità lega come gruppi prostetici un rame tipo I (CuI) e un rame tipo II (CuII). Il Cu II è coinvolto nella catalisi enzimatica al sito attivo ed è coordinato da tre residui di Istidine e da una molecola di acqua che viene spiazzata dal legame del substrato. Il Cu I è caratterizzato da un alto potenziale di riduzione ed è coordinato da due Istidine, una Metionina ed una Cisteina. Tale centro è coinvolto nel trasferimento elettronico da parte di proteine donatrici (cupredoxine e citocromi) al Cu II. Da un punto di vista strutturale ogni monomero dell'enzima è costituito da due domini a β -barile collegati da una regione ad α -elica. Il meccanismo catalitico per questa classe di enzima prevede il legame del nitrito al Cu II ossidato. Questo centro è ridotto in seguito al trasferimento di un elettrone ad opera del centro di tipo I. Il nitrito viene così ridotto e protonato originando un intermedio transiente che ha legato NO e lo ione idrossido. Il ciclo catalitico è completato quando l'NO è rilasciato (figura 7).

1.6 Struttura del dominio solubile e meccanismo catalitico di AniA

AniA è stata identificata solo in due classi di batteri patogeni, quali *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*, e i dati strutturali e funzionali della proteina riportati in letteratura sono noti solo per l'AniA del gonococco. Data la stretta omologia di sequenza per l'AniA tra *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* (figura 8), è possibile supporre che le due proteine abbiano comportamenti simili da un punto di vista strutturale e funzionale.

AniA, una nitrito reduttasi contenente rame, è la maggiore proteina della membrana esterna indotta in anaerobiosi nel gonococco. Tale enzima è una lipoproteina, la cui sequenza aminoacidica ha rivelato una sequenza consenso lipoproteica: ALAAC (Hoehn G. T. 1992), simile a quella trovata in altre due proteine della membrana esterna del gonococco (Lip e Laz). Questa sequenza viene tagliata da una peptidasi II seguita da una acilazione N-terminale della cisteina con un acido palmitico (Mizushima S. 1984). La lipoproteina AniA così processata ha una predetta massa molecolare di circa 39KDa.

L'iniziale caratterizzazione del gene *aniA* e il suo prodotto proteico non ha rivelato la funzione fisiologica della proteina. La sequenza del dominio centrale di AniA mostra una bassa somiglianza (circa il 30%) alla sequenza di nitrito reductasi a rame di batteri del suolo. E' stato dimostrato tramite una mutazione all'interno del gene *aniA* che la proteina è una nitrito reductasi inducibile, essenziale per la crescita anaerobia di *N. gonorrhoeae* (Mellies J. 1997). Infatti, l'espressione di *aniA* è in modo significativo superiore in condizioni anaerobiche in presenza di nitrito, rispetto alle condizioni aerobiche in assenza di nitrito (Clark V. L. 1988), suggerendo quindi che sia l'assenza di ossigeno che la presenza di nitrito inducano la sintesi di AniA.

Dalla struttura cristallografica di AniA, recentemente risolta in *N. gonorrhoeae* (Martin J. Boulanger 2002), è stato visto che l'enzima è un omotrimerico ed ogni monomero (figura 9B) è composto da un dominio N-terminale e da un dominio C-terminale ripiegati a β -barile e connessi da una piccola regione di legame. Il dominio N-terminale di ogni monomero è localizzato alla periferia del trimero, mentre il dominio C-terminale circonda l'asse tri-giro della proteina (figura 9A). Ampie interazioni monomero-monomero evidenziano una stretta interazione tra i tre monomeri. Un prolungamento della catena polipeptidica all'estremità C-terminale si estende oltre l'interfaccia monomero-monomero e si impacchetta con il dominio N-terminale dell'adiacente monomero.

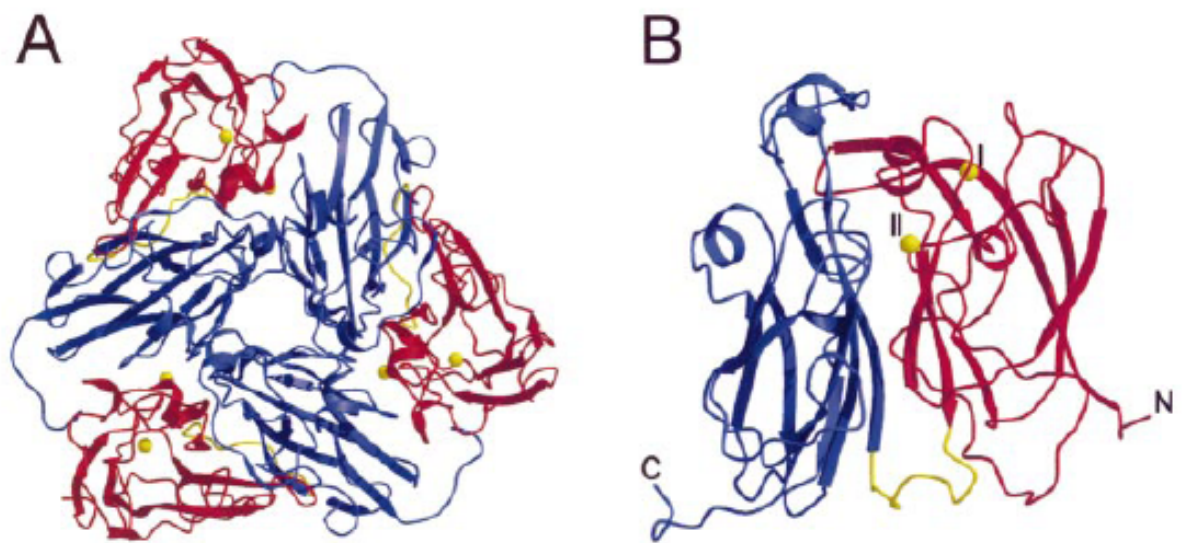


Figura 9. Struttura secondaria del omotrimerico (A) e del monomero (B) di sAniA. Il dominio N-terminale di ogni monomero è mostrato in rosso, la regione di legame è mostrata in giallo e il dominio C-terminale di ogni monomero è mostrato in blu. Le sfere gialle indicano gli atomi di rame di tipo I e di tipo II. (J.Mol. Biol., 315, 1111-1127).

Gli atomi di rame di tipo I sono disposti nel dominio N-terminale del monomero e sono posizionati approssimativamente 6Å sotto la superficie della proteina. Due atomi di azoto dell'Istidina (His94 e His 143), e due atomi di zolfo, uno della Cisteina 135 e l'altro della Metionina 148, coordinano il rame di tipo I (figura 10). I ligandi cisteina e istidina sono posizionati, approssimativamente, in piano con l'atomo di rame, mentre la metionina adotta una coordinazione assiale.

Il rame di tipo II è localizzato all'estremità di una tasca di 16 Å, formata dal dominio N-terminale di un monomero e dal dominio C-terminale del monomero adiacente. Il rame è legato da atomi N^{ε2} di tre residui di Istidina, due forniti dal dominio N-terminale di un monomero e il terzo fornito dal dominio C-terminale del monomero adiacente, formando una geometria trigonale. Una molecola di acqua, Wat503, legata alla posizione apicale, completa la coordinazione tetraedrica del rame di tipo II.

I due atomi di rame sono connessi tramite i residui His134, ligando del rame di tipo II, e Cys135, ligando del rame di tipo I.

La cavità del sito attivo è affiancata da alcuni residui idrofobici che formano una zona ugualmente idrofobica circondante il rame di tipo II.

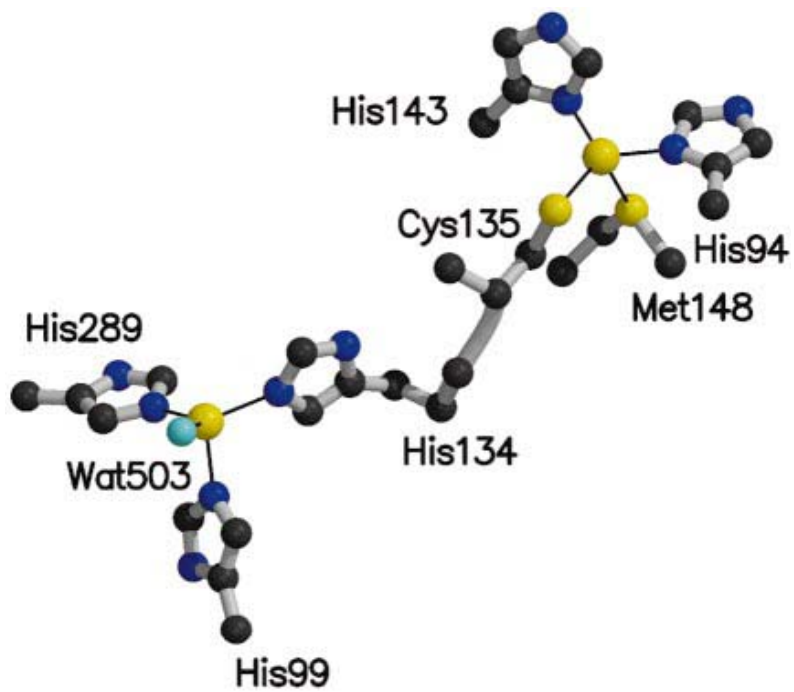


Figura 10. Coordinazione dei centri a Cu di tipo I e di tipo II. (J.Mol. Biol., 315, 1111-1127).

Per quanto riguarda il meccanismo catalitico di AniA, è stato visto che le nitrito reduttasi contenente rame presentano due centri a rame per monomero: il rame di tipo I (Cu I) detto “rame blu” ed il rame di tipo II (Cu II) detto “rame non blu”. Il Cu I accetta un elettrone da un trasportatore esterno e nella forma ossidata presenta una colorazione blu o verde. In base a queste differenze negli spettri di assorbimento le NIRs vengono classificate in “NIRs” blu e “NIRs verdi”. Il Cu II acquista un elettrone dal Cu I ridotto e rappresenta il centro catalitico di riduzione del nitrito.

Paragonando strutturalmente i centri a rame fra le “NIRs blu” e “NIRs verdi” si deduce che CuI ha una coordinazione tetraedrica nelle NIRs verdi ed una coordinazione trigonale planare distorta (Dodd F. E. 1997) o tetraedrica distorta nelle NIRs blu (Inoue T. 1998). Mentre il dominio Cu II legato a tre residui di istidine e da una molecola di acqua con una geometria tetraedrica, è identica in tutte le NIRs.

Analisi di strutture cristallografiche e cinetiche (Zelda H. Abraham 1997) suggeriscono che due residui amminoacidici, Asp98 e His255, localizzate nelle vicinanze del Cu II partecipano alla catalisi enzimatica.

Il meccanismo catalitico proposto (Kunishige K. 1999) prevede come step iniziale il legame del nitrito al sito catalitico ossidato. Il substrato NO_2^- spiazza una molecola di acqua legata al Cu II che cede un protone all'Asp98 ed è rilasciata come OH⁻ (figura 11). Il gruppo β -carbossilico protonato dall' Asp98 forma un legame idrogeno con un atomo di ossigeno del nitrito legato al Cu II. Il Cu I cede un elettrone al Cu II che viene così ridotto, e il protone dell'Asp98 è trasferito a NO_2^- per formare l'intermedio NOOH (step 2). Il movimento dell'His255 protonata, verso NOOH e il trasferimento elettronico dal Cu II a NOOH può facilitare il taglio del legame N-O (step 3). Un altro protone viene donato dal gruppo imidazolico

dell'His255 per formare una molecola di acqua coordinata al Cu II, e contemporaneamente viene prodotto l'NO (step 4). I due residui amminoacidici coinvolti nella catalisi sono altamente conservati nelle NIRs e mutazioni a questi livelli riducono enormemente l'attività catalitica.

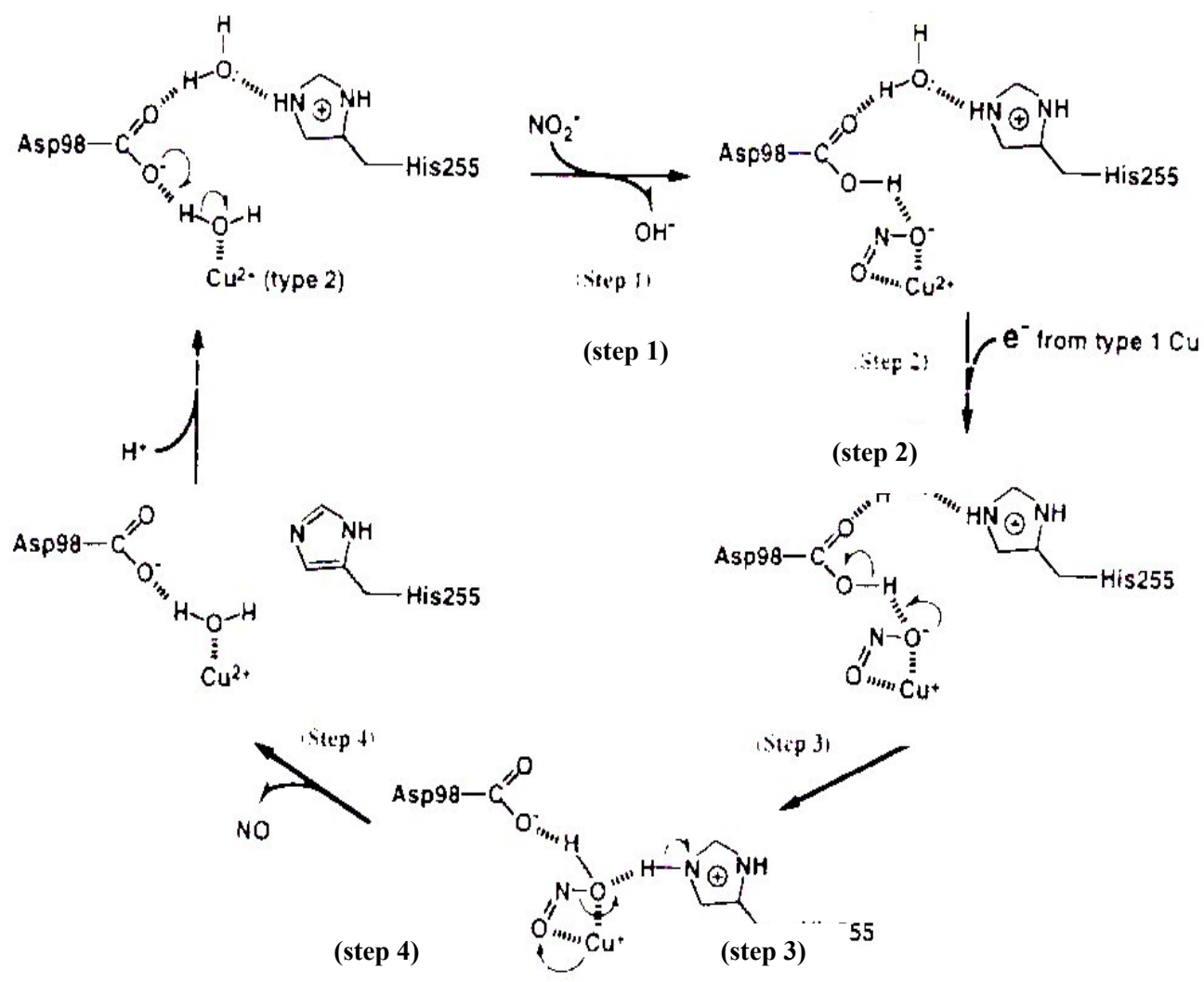


Figura 11. Meccanismo catalitico di AniA.

1.7 Ruolo di AniA nella patogenesi di *N. meningitidis*

Per descrivere il ruolo di AniA nella patogenesi di *N. meningitidis*, esistono ad oggi due modelli che prendono in riferimento due distinte localizzazioni della proteina il cui ruolo è descritto per *N. gonorrhoeae*.

Il primo di questi ha la sua base nell'ipotesi che la proteina AniA, ancorata alla membrana esterna e probabilmente diretta verso il periplasma, abbia un ruolo nella catena respiratoria bioenergetica, durante la crescita anaerobia di *Neisseria*.

E' noto che *N. meningitidis* possiede una catena di respirazione omologa al complesso respiratorio III, ciò fa supporre che gli elettroni entrano nella catena respiratoria tramite una deidrogenasi NADH o una succinato deidrogenasi, che, a loro volta, trasferiscono questi elettroni al citocromo bc_1 attraverso l'ubichinone. Sembra che, *N. meningitidis* sia in grado di sintetizzare solamente una delle reduttasi terminali che utilizzano l'ossigeno: un citocromo cbb_3 ossidasi. Questo citocromo, in altri organismi, è associato ad una crescita in condizioni limitanti di ossigeno. Quindi questo implica che *N. meningitidis* si è adattato a crescere in condizioni microaerobie. Infatti esistono in *N. meningitidis* due reduttasi terminali di elettroni alternative: la nitrito redattasi (AniA) e l'NO reduttasi (NorB). Si ipotizza che l'AniA, identificata in origine come una proteina della membrana esterna indotta maggiormente in anaerobiosi, sia ancorata covalentemente alla membrana esterna e che la regione N-terminale della proteina, probabilmente, è tagliata da una peptidasi segnale 2 e la risultante cisteina N-terminale legni covalentemente un lipide della membrana esterna. Questo sito di legame è seguito da una regione altamente ripetuta, la quale potrebbe formare un legame che permetterebbe all'enzima di avere una mobilità dentro il periplasma. *N. meningitidis* possiede, inoltre, la cupredossina Laz, che come l'Ania, si pensa che sia legata alla membrana

esterna tramite un dominio di legame. Il centro contenente il rame di questa cupredossina è coinvolto nel trasferimento elettronico dal complesso bc_1 all'AniA. In alternativa ci sono una serie di citocromi tipo-*c* (i due citocromi periplasmatici c_{552} e c_4 , il citocromo associato alla membrana c_5) che svolgono il ruolo di trasferire gli elettroni all'AniA (Rock J. D. 2005).

Il secondo modello dimostra, invece, un'importante ruolo della proteina AniA che, diretta verso l'esterno della cellula, adempie alle richieste immunoregatorie. Infatti, anticorpi anti-AniA sono stati isolati dal siero di pazienti affetti da gonorrea, indicando che la proteina è espressa in vivo e che questa espressione permetterebbe al gonococco di aumentare la propria resistenza nel siero (Cardinale J. A., 2000). La risultante protezione nel siero in seguito all'espressione di AniA è o il risultato diretto della presenza della proteina nella membrana esterna, oppure il risultato della presenza di una proteina secondaria indotta in risposta all'espressione di AniA.

Secondo quest'ultimo modello, l'effetto immunoregolatorio della proteina è indipendente dall'attività nitrito reduttasica di AniA. Ma, una risposta nel spiegare la protezione AniA-dipendente, può stare nella presenza di una regione ripetuta e ricca in prolina, essendo noto che questa regione sia coinvolta in diversi tipi di interazione proteina-proteina. E' possibile che la regione ricca in prolina legghi direttamente il fattore regolatorio H del complemento, oppure che questa regione legghi una proteina sierica come ad esempio l'eparina, che possa agire da ponte per legare il fattore H (Cardinale J. A. 2000).

Dato che, prove sperimentali hanno dimostrato la validità dei due modelli, la localizzazione cellulare di AniA rimane fondamentalmente ancora non definita. Quindi, la più semplice conclusione è quella secondo la quale esistono due localizzazioni di AniA: una è quella che la proteina diretta nel periplasma è coinvolta nella denitrificazione e quindi partecipa alla respirazione bioenergetica,

mentre gli effetti immunoregolatori sono realizzati dalla proteina solamente quando questa è diretta all'esterno della cellula.

Le nitrito reduttasi contenente il rame sono in grado di detossificare chimicamente specie reattive quali il nitrito e il superossido, che sono rilasciati dal sistema immunitario cellulare. Analisi strutturali e spettroscopiche hanno rivelato una somiglianza topologica tra il sito attivo della nitrito reduttasi contenente il rame e il sito attivo della superossido reduttasi (SOD), nota per rimuovere specie reattive dell'ossigeno. Quindi il ruolo proposto per l'AniA di rimuovere radicali ossidativi costituisce un efficiente mezzo per evadere la risposta immunitaria durante l'infezione (Martin J. Bounlanger 2002).

E' stato dimostrato come l'AniA non sia direttamente coinvolta alla virulenza del batterio in quanto mutanti *aniA*⁻ di gonococco non modificano la propria capacità di legare o invadere le cellule epiteliali. Ma l'adattamento all'ambiente povero di ossigeno è sicuramente un aspetto importante della patogenesi dell'infezione durante la quale la sopravvivenza del batterio è collegata alla sua capacità denitrificante, in cui l'AniA gioca un ruolo importante (Mellies J. 1997).

1.8 SCOPO DELLA TESI

N. meningitidis utilizza il nitrito come una importante sorgente di substrato nella catena respiratoria, in quanto negli ambienti in cui vive la disponibilità di ossigeno è limitata e variabile.

Infatti, *N. meningitidis* è in grado di crescere in condizioni di carenza di ossigeno utilizzando un meccanismo biochimico alternativo alla respirazione che è la denitrificazione, durante la quale il nitrito è utilizzato, al posto dell'ossigeno, come accettore finale di elettroni (Anjum M. F. 2002).

Questo processo permette al microrganismo di sopravvivere in ambienti poco ossigenati come durante le prime fasi asintomatiche della malattia o nello stato di sepsi. Lo studio di questa via metabolica denitrificante ha destato interesse nel campo medico soprattutto per comprendere meglio uno degli aspetti della patogenesi di *N. meningitidis*.

Tra gli enzimi principalmente coinvolti nel metabolismo del nitrito, è stata scelta per questo studio il prodotto del gene *aniA*, nitrito reduttasi contenente rame, perché grazie alla sua attività *N. meningitidis* è in grado di contrastare l'effetto tossico dell'NO.

Al fine di caratterizzare AniA dal punto di vista biochimico e funzionale nei ceppi di *N. meningitidis*, lo scopo del seguente lavoro è:

- clonare, esprimere e purificare la porzione del gene *aniA* che codifica la parte solubile della nitrito reduttasi contenente rame (sAniA) del ceppo di riferimento di sierogruppo B *N. meningitidis* MC58
- caratterizzare a livello biochimico l'sAniA andando a studiare l'attività enzimatica in funzione del pH e la cinetica enzimatica
- analizzare la conservazione della sequenza del gene *aniA* in un gruppo di ceppi invasivi e non invasivi di *N. meningitidis* isolati in Italia

- valutare la curva di crescita, in condizioni di microaerofilia in presenza e in assenza di nitrito, di ceppi di *N. meningitidis*, rappresentanti le classi di mutazioni contenute all'interno del gene *aniA* e appartenenti a diversi gruppi clonali già caratterizzati geneticamente.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi batterici e procedure colturali

Sono stati selezionati 23 ceppi di *N. meningitidis*, di cui 19 invasivi e 4 non invasivi, isolati in Italia tra il 1999 e il 2006. Inoltre, è stato aggiunto allo studio un ceppo di *N. lactamica* (gentilmente fornito dal Dott. M. Comanducci, Novartis, Siena, Italia) come ceppo commensale.

Tutti i ceppi sono stati seminati su piastre di Thayer Martin (TM). Questo terreno è costituito da GC Agar Base arricchito con emoglobina in polvere solubile e con Vitox (OXOID; Vitamina B12, L-glutamina, Adenina solfato, Guanina cloridrato, Acido p-aminobenzoico, L-cistina, NAD-coenzima1, Cocarbossilasi, Ferrico nitrato, Tiamina cloridrato, Cisteina cloridrato, Destrosio).

Le piastre sono state incubate per 24 ore in termostato a 37°C in condizioni di microaerofilia, concentrazione di CO₂ pari al 5%.

La crescita in terreno liquido è stata eseguita utilizzando Mueller-Hinton broth (MHB; Oxoid) supplementato con 10mM NaHCO₃, in presenza e in assenza di 2mM di NaNO₂, in condizioni di microaerofilia e in agitazione tramite magnete.

2.2 Estrazione del DNA di *N. meningitidis* e analisi della sequenza del gene *aniA*.

Il DNA cromosomico di ciascun ceppo è stato estratto utilizzando il kit QIAamp DNA minikit (QIAGEN, Hilden, Germania).

La regione codificante per l'intero gene *aniA* di tutti i ceppi esaminati è stata amplificata tramite PCR, utilizzando i primers disegnati sulla sequenza nucleotidica del gene *aniA* del ceppo di riferimento *N. meningitidis* MC58 (numero di accesso AE002098).

I primers utilizzati per la PCR sono: diretto, *AniNde* contenente il sito di restrizione *NdeI* (5'-CAA AAG GAA ATC ATA TGA AAC GCC AAG CC, con posizione nucleotidica da 8501 a 8530), inverso, *AniBam* contenente il sito di restrizione *BamHI* (5'-GGC AGT GGA TCC CCC GCT AAT G, con posizione nucleotidica da 9724 a 9702) disegnati entrambi sulla sequenza del gene *aniA* con numero di accesso AE002098.

La miscela di reazione per la PCR consiste di: 100ng di DNA cromosomico estratto, 5µl di tampone di amplificazione 10x, 1.5µl di MgCl₂ (concentrazione finale 1.5mM), 0.01mM di dNTP (Finnzymes, Finlandia), 2.5 U di EuroTaq (Euroclone, Devon, UK), 20pmol di ciascun primer e acqua sterile in un volume totale di 50µl di reazione. L'amplificazione è stata eseguita in uno strumento Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germania) per 32 cicli con i seguenti parametri: denaturazione a 95°C per 1 minuto, allineamento dei primers a 58°C per 1 minuto, allungamento a 72°C per 1 minuto, con una reazione finale di allungamento a 72°C per 5 minuti. Tutti i prodotti di amplificazione sono stati analizzati tramite elettroforesi e purificati con il kit "QIAquick purification columns" (Qiagen) per la successiva analisi di sequenza. Le sequenze sono state analizzate con il programma BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

I dendrogrammi ottenuti dall'analisi della sequenza nucleotidica e amminoacidica del gene *aniA*, sono stati ottenuti attraverso il metodo "Neighbor-Joining tree" nel programma DNAMAN (versione n.5.2.10).

2.3 Clonaggio ed espressione della porzione solubile di AniA (sAniA) dai ceppi MC58 E 1332.

La porzione del gene NMB1623 relativa a sAniA, è stata amplificata dal DNA genomico del ceppo MC58 e dal ceppo invasivo 1332, mediante PCR; i primers sono stati disegnati sulla base della sequenza nucleotidica presente nel sito web ([http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBLCDS:AAF41975\]](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBLCDS:AAF41975])) e in funzione dei siti di restrizione singoli della regione “polylinker” del plasmide pET28b (Novagen, Madison, WI, USA). I primers senso e antisenso sono:

- 5'-CCG AAG CCG CAC **ATA** TGG CCG CAC AAA CCG CC-3' (senso) con un sito di restrizione per *NdeI*;
- 5'-GGC AGT **GGA** TCC TCC CGC TAA TG-3' (antisenso) con un sito di restrizione per *BamHI*.

L'amplificazione del frammento in PCR è stata condotta con 30 cicli di denaturazione a 94°C per 30 secondi, allineamento a 58°C per 30 secondi, ed un estensione a 72°C per 70 secondi, utilizzando lo strumento “Mastercycler personal (Eppendorf). Per la miscela di reazione sono stati utilizzati: 100ng di DNA cromosomico estratto, 5µl di tampone di amplificazione 10x, 20mM di MgCl₂, 0.01mM di dNTP (Finnzymes), 2.5 U di *Pfu* DNA polymerase (Fermentas), 20pmol di ciascun primer e acqua sterile in un volume totale di 50µl di reazione. Il prodotto di amplificazione di circa 1000bp è stato purificato mediante un kit di estrazione da gel (Qiagen), digerito con *NdeI* e *BamHI*, di nuovo purificato da gel e quindi sottoposto a reazione di ligazione con il plasmide pET28b, il quale era stato parallelamente digerito con gli stessi enzimi di restrizione. Il plasmide così prodotto dalla reazione è stato usato per trasformare cellule di *E. coli* DH5α rese competenti tramite il metodo chimico CaCl₂/MgCl₂. I batteri trasformati sono stati selezionati mediante screening delle colonie cresciute su terreni supplementari con kanamicina, quindi è stata verificata la presenza dell'inserito nel sito di clonaggio

multiplo del vettore, mediante PCR condotta usando come primers gli oligonucleotidi T7 promoter: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TA- (senso), e T7 termination: 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G- (antisenso). Infine la regione del plasmide contenente il gene clonato è stata sottoposta a sequenziamento con il metodo di dideoossi per terminazione di catena, usando i precedenti primers standard T7, allo scopo di verificare la corrispondenza tra la sequenza clonata e quella dello stesso gene dal ceppo di riferimento MC58, e quella del ceppo invasivo 1332. Con questa strategia di clonaggio la proteina contiene, all'estremità N-terminale, la sequenza di sei istidine, più la sequenza target per l'enzima proteolitico trombina.

Ceppi di *E. coli* BL21DE3 competenti per l'espressione di proteine clonate in vettori della serie pET (figura 12) sono stati successivamente trasformati con il vettore ricombinante.

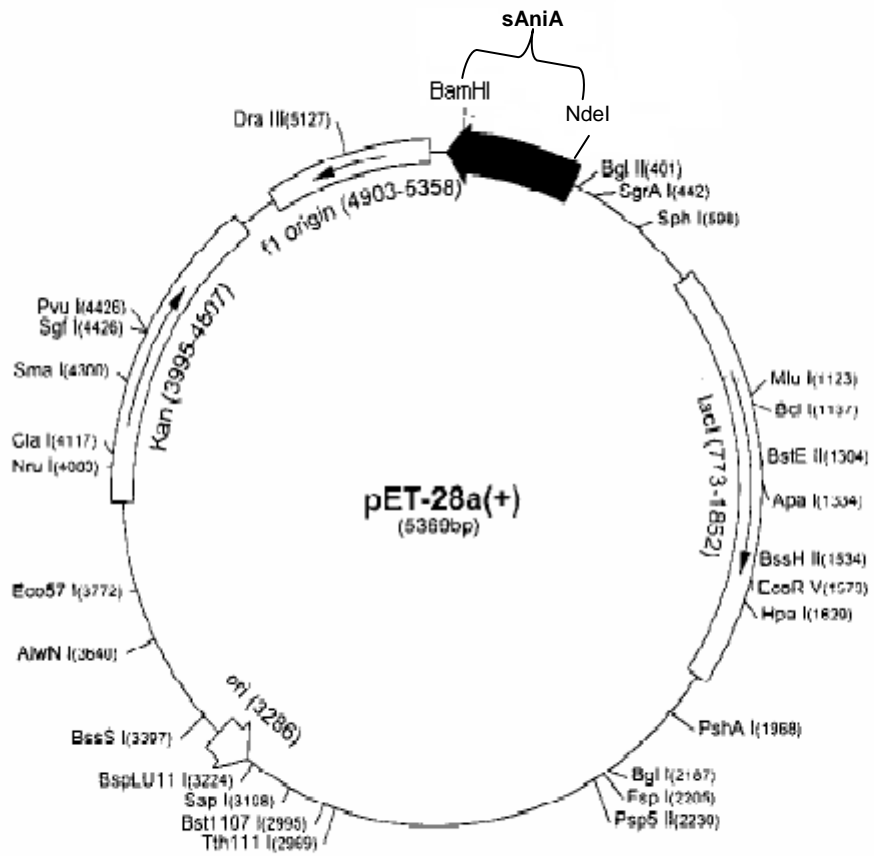


Figura 12. Struttura del pET-28a ricombinante contenente sAniA e il gene “kan” che codifica per la resistenza alla kanamicina.

Dopo aver trasformato le cellule batteriche di *E. coli* BL21DE3 per Ani-his tag tramite elettroporazione, e coltivate in piastre di Luria-Bertani (LB) agar contenente kanamicina, è stato effettuato un test per verificare l'espressione della proteina. Vengono prelevate 3 colonie di cellule trasformate e vengono fatte crescere a 37°C in 5ml di LB-brodo contenente kanamicina 30µg/ml fino a una OD_{600nm}=0.5-0.6. Ognuno dei campioni da 5ml viene diviso in due aliquote da 2.5ml, di cui una viene indotta con Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) a concentrazione 1mM finale e l'altra viene lasciata come controllo non indotto. Test e controlli vengono lasciati a 37°C in agitazione overnight. Il giorno seguente i campioni vengono raccolti e centrifugati a 7000rpm a 4°C per 15 minuti, e i rispettivi pellet vengono risospesi nel tampone "buffer sample" (Tris/HCl 0.25M pH=6.8, 0.5% blu di bromofenolo, 0.01% SDS, 5% β-mercaptoetanol) riducente e denaturante, bolliti per 5 minuti, centrifugati per eliminare le membrane e il supernatante viene caricato in un gel di sodio dodecilsolfato-poliacrilamide (SDS-PAGE).

2.4 Lisi dei batteri e purificazione di sAniA

Una volta verificata l'espressione di AniA nei test, si procede alla coltura batterica. 300µl di batteri positivi per l'over espressione di AniA sono stati inoculati in 5ml di LB-brodo con kanamicina 40µg/ml (concentrazione operativa che viene conservata anche nelle successive diluizioni) fino ad una OD_{600nm}=0.4-0.7. La sospensione batterica viene diluita 1:4, viene aggiunto l'antibiotico 1000x e viene fatta crescere fino ad una OD_{600nm}=0.4-0.7; in seguito è lasciata a 4°C tutta la notte. Il giorno successivo la coltura batterica viene posta in agitazione a 37°C fino ad una OD_{600nm}=0.7-1; diluita la coltura 1:10 e aggiunto la kanamicina 1000x, si lascia il tutto in agitazione fino ad una OD_{600nm}=0.6-0.7. A questo punto la coltura è diluita ulteriormente 1:10, si aggiunge

la kanamicina 1000x, per un volume totale di 2l di terreno e viene posta in agitazione a 37°C. Quando $OD_{600nm}=0.6-0.7$ si procede all'induzione con IPTG 1mM finale. Dopo l'induzione la coltura viene lasciata in agitazione tutta la notte fino ad una $OD_{600nm}=1.2-1.4$, che corrisponde ad un ciclo replicativo completo. A questo punto i batteri vengono raccolti mediante centrifugazione a 7000rpm a 4°C per 15minuti, e i pellet risospesi in tampone A di lisi (tampone fosfato 20mM pH=7.4, NaCl 0.5M e imidazolo 5mM). I batteri sono lisati con 5 cicli da 60'' di sonicazione. L'estratto è centrifugato a 1000rpm per 30' e il supernatante contenente le proteine solubili viene aliquotato per essere processato.

La purificazione del lisato batterico contenente sAniA è stata eseguita in HPLC utilizzando una colonna Hi trap chelating HP (GE-Healthcare, Italia) da 1ml. Tale colonna viene preparata a mano poco prima della corsa cromatografia, seguendo le istruzioni della casa produttrice. Dopo aver equilibrato la colonna di affinità in tampone A, sono stati caricati 5ml di lisato batterico ad un flusso di 0.6ml/min in modo da permettere alla proteina AniA di legarsi tramite un legame di coordinazione fra la coda di istidine e il nichel della matrice della colonna.

Le frazioni cromatografiche contenenti la nostra proteina vengono riunite e dializzate tutta la notte in tampone Tris/HCl 20mM pH=8.4 con NaCl 150mM in modo da equilibrare il campione per il successivo step di purificazione. Il giorno successivo concentriamo il dializzato in centrikon 1000 di cut-off (Millipore, Italia), a 4000rpm per 30min ed effettuiamo un dosaggio del campione tramite il metodo Bradford, incubando con trombina 0.5U/mg di AniA a 30°C per 2 ore. Terminata l'incubazione lasciamo il campione in ghiaccio ed effettuiamo una corsa cromatografia di affinità isocratica utilizzando sempre una colonna Hi trap chelating da 1ml, equilibrata con tampone Tris/HCl 20mM pH=8.4 con NaCl 150mM, al fine di separare la coda di istidine dall'AniA. L'ultimo step di purificazione consiste in una cromatografia a scambio

anionico in gradiente continuo di NaCl utilizzando una colonna resource Q (GE-Healthcare, Italia) da 1ml, in modo da separare l'AniA dalla trombina. La colonna viene equilibrata in tampone Tris/HCl 20mM pH=8.4, e il campione caricato a 0.6ml/min lasciando risciacquare la colonna in quest'ultimo tampone, fino a che l'assorbanza a 280nm non risce a zero. L'eluizione delle proteine legate è stata seguita a 280nm in gradiente di NaCl 0-0.3M.

Le frazioni della cromatografia a scambio anionico sono state analizzate in SDS-PAGE riunendo quelle pure contenenti AniA. Tali frazioni sono state dializzate in tampone fosfato 20mM con CuSO₄ 5mM pH=7, per ricostituire i siti catalitici al rame, concentrate in centrikon 1000 (Millipore, Italia) e dosate con il metodo Bradford per valutarne la concentrazione.

Una frazione di AniA è stata utilizzata per immunizzare i conigli e ottenere anticorpi policlonali anti-AniA, al fine di valutare l'espressione della proteina su un gruppo di ceppi di *N. meningitidis* tramite immuno-blotting.

2.5 Preparazione del siero policlonale di coniglio e Western Blotting

Sono stati immunizzati due conigli (New Zeland rabbits, Charles River) con 1.5mg di proteina AniA purificata. La prima dose è stata effettuata sottocute e costituita dalla proteina ricombinante miscelata con ugual volume di adiuvante di Freud completo, mentre le successive dosi sono state preparate con l'adiuvante di Freud incompleto, e sono state iniettate il 14° e 28° giorno. I campioni di sangue sono stati prelevati 2 settimane dopo l'ultima dose.

Per l'espressione di AniA nei ceppi di *N. meningitidis* presi in esame, 20µl di sospensione batterica bollita diluita con Laemmli buffer al 5%, è stata separata in elettroforesi al 12% in SDS-PAGE. L'analisi del Western blot è stata eseguita secondo

le procedure standard (Laemmli UK 1970), e in particolare: le proteine separate dal gel di elettroforesi vengono trasferite mediante campo elettrico su una membrana di nitrocellulosa. Dopo il trasferimento la membrana viene prima incubata con il siero policlonale di coniglio immunizzato con l'AniA ricombinante con e senza coda di istidine diluito 1:5000, poi viene sottoposta all'azione di un anticorpo secondario IgG anti-IgG di coniglio coniugato con una fosfatasi e diluito 1:30000. La proteina è stata visualizzata tramite il substrato fosfatasi-alkalino BCIP/NBT (Sigma).

2.6 Caratterizzazione biochimica di AniA

Il sistema dei reagenti di Griess è una tecnica colorimetrica che permette di dosare i nitriti presenti in soluzione tramite la formazione, in ambiente acido, di un composto diazidico che assorbe a 540nm (Kohei Su ruga 2004). La retta standard di riferimento per i nitriti è stata tracciata utilizzando, in un volume finale di reazione 2.2ml, concentrazioni progressivamente dimezzate di nitrito da 50 fino a 1.56 μ M. In cuvette di plastica da 3ml vengono immessi 200 μ l di nitrito, la cui concentrazione viene man mano dimezzata, mediante diluizioni sariali 1:2, partendo da un valore iniziale di 550 μ M sino al valore finale di 17.16 μ M. A questo volume vanno aggiunti, in maniera sequenziale, i seguenti reagenti di Griess:

- 1ml di sulfanilamide 1% in acido fosforico 5% e si lascia per 5 min in incubazione a temperatura ambiente e al buio, in modo da far reagire tale composto con NO_2^-
- 1ml di NED 0.1% in acqua e si lascia in incubazione, a temperatura ambiente e al buio, per 20min al fine di assestare lo sviluppo del colore dovuto alla formazione di un composto diazidico

A questo punto leggiamo i campioni a 540nm, sottratti del bianco (campioni senza nitrito) e il software traccia la retta che meglio approssima i punti, dove in ordinate abbiamo i valori di assorbanza di ogni concentrazione standard di nitriti ed in ascisse i corrispettivi valori di concentrazione di nitriti.

2.6.1 Dosaggi di attività enzimatica a diversi pH

Le cinetiche enzimatiche sono state condotte a diversi valori di pH, compresi in un range che va da 4.5 a 7, mediante l'utilizzo di opportuni tamponi. La miscela di reazione è costituita dalle seguenti concentrazioni:

- 33.6mM di tampone al pH cui viene condotto l'esperimento
- 2mM di nitrito
- 0.7mM di metil viologeno
- 14mM ditionito
- 11nM AniA

Le provette contenenti le miscele di reazione sono state incubate in bagnetto a 37°C a diversi tempi prefissati: 1, 2, 5, 10 min; scaduti i quali vengono vortexate finchè la soluzione non diventa chiara, per eliminare il potere riducente extra e bloccare così la reazione enzimatica. A questo punto aggiungiamo in sequenza nelle cuvette da 3ml:

- 50µl dei mix di reazione ai diversi tempi di incubazione
- 150µl di H₂O
- 1ml di acido sulfanilico 1% in acido fosforico 5% e si lascia per 5 min in incubazione a temperatura ambiente e al buio
- 1ml di NED 0.1% in acqua e si lascia in incubazione al buio a temperatura ambiente per 20min per lo sviluppo del colore

La quantificazione dei nitriti in soluzione viene determinata misurando l'assorbanza a 540nm, mediante estrapolazione della concentrazione della retta di taratura .

Ai valori di velocità enzimatica calcolati ai vari pH vanno sottratti i valori di velocità di autoriduzione del nitrito dipendenti dal pH. Per il calcolo delle velocità cinetiche ad ogni tempo di incubazione, ai vari valori di pH, abbiamo proceduto nel seguente modo. Abbiamo mediato i vari dati di concentrazione dei nitriti espressi in $\mu\text{mol/l}$ ai diversi tempi prefissati e li abbiamo moltiplicati per il fattore di diluizione in cuvetta, in modo da ottenere la concentrazione effettiva nella miscela. I valori di concentrazione espressi in mM ai diversi tempi, sono stati fittati tramite una regressione lineare utilizzando il programma Grafit, ed il relativo coefficiente angolare ci fornisce il valore di velocità di scomparsa del nitrito espresso in mM/min. Poiché il valore di velocità calcolato è relativo ad un litro di soluzione, lo apportiamo ai 500 μl della miscela di reazione, esprimendolo in $\mu\text{mol/min}$. A tale valore di riduzione enzimatica sottraiamo il relativo valore di autoriduzione per ottenere la velocità enzimatica reale. A questo punto calcoliamo l'attività specifica definita come:

$$\mathbf{A.S. = U/mg_{proteina}}$$

Dove A.S.: attività specifica; U:unità enzimatica; $\text{mg}_{proteina}$: mg di enzima nella miscela di reazione

Le unità enzimatiche rappresentanti le μmol di nitrito ridotte al minuto sono date dai valori di velocità enzimatica reale, mentre la quantità di enzima presente nel mix espresso in mg è 0.0002mg.

2.6.2 Cinetica enzimatica di AniA

Le costanti enzimatiche apparenti di AniA, come K_m e K_{cat} sono state definite a diversi valori di pH, mediante un metodo spettrofotometrico che valuta l'ossidazione del ditionito a 315nm (Zelda L. Abraham, 1997).

Le cinetiche enzimatiche sono state condotte variando le concentrazioni di nitrito (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M) ad ogni punto di pH, mentre la concentrazione di ditionito è stata mantenuta in largo eccesso rispetto alla concentrazione di nitrito, in modo da mantenere il sistema in condizioni di pseudo-primo ordine. Nella cuvetta tonometrica vengono messi 5ml di miscela di reazione formata da: tampone 100mM al pH prefissato, nitrito di sodio alla concentrazione prestabilita, ditionito di sodio 10.3mM. Una volta create le condizioni di microaerobiosi tramite una pompa da vuoto, il ditionito viene disciolto nella miscela. A questo punto si preleva 1ml di mix di reazione e si mette in una cuvetta da 0.2cm di cammino ottico preventivamente degassata. Si azzerava contro il campione, valutando l'ossidazione del ditionito a 315nm per 10min dopo aver iniettato nella cuvetta AniA 110nM.

Di ogni singolo punto di ossidazione enzimatica del ditionito abbiamo calcolato la velocità espressa in $\Delta A/\text{min}$ dal coefficiente angolare della retta della porzione pendente della curva. A questi valori sono stati sottratti punto per punto le velocità di autoossidazione del ditionito per ottenere le velocità enzimatiche reali. Data la legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C$$

dove A: assorbanza, ϵ_{λ} : coefficiente di estinzione molare, l: cammino ottico della radiazione nella soluzione, C: concentrazione della soluzione che assorbe la luce.

Trasformiamo i valori di velocità da $\Delta A/\text{min}$ a $\Delta C/\text{min}$ sapendo che $\epsilon_{\lambda} = 8\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ed $l = 0.2 \text{cm}$. Essendo la reazione enzimatica catalizzata da AniA, per ogni micromole di ditionito ossidato si forma una micromole di ossido nitrico; quindi il valore positivo

delle velocità di ossidazione del ditionito indirettamente rappresenta la velocità di formazione dell'NO. Fittando i dati di velocità alle varie concentrazioni di nitrito con l'equazione di Michaelis Menten tramite il programma Grafit, si ottengono le costanti cinetiche apparenti: V_{max} e K_m . La costante catalitica K_{cat} è data dalla seguente formula:

$$K_{cat} = V_{max} / [E_{tot}]$$

dove K_{cat} = costante catalitica, V_{max} = velocità massima, $[E_{tot}]$ = concentrazione totale di enzima in cuvetta. Si calcolano le costanti catalitiche ai vari pH conoscendo i relativi valori di V_{max} e sapendo che $[E_{tot}] = 0.1 \mu M$.

2.7 Crescita in brodo e consumo del nitrito di ceppi di isolamento clinico

Per valutare la crescita di *N. meningitidis* in MHB in presenza e in assenza di 2mM $NaNO_2$, in condizioni di microaerofilia, sono stati selezionati i ceppi di meningococco rappresentanti le varianti del gene *aniA*. I ceppi di *N. meningitidis* congelati sono stati seminati su piastre di TM. Il giorno successivo, ciascun brodo è stato inoculato in MHB ad una $OD_{600nm} = 0.08$ e fatto crescere per circa 18-19 ore, in agitazione. La mattina seguente, per ogni ceppo sono state eseguite due subcolture in MHB ad una $OD_{600nm} = 0.08$, sempre in agitazione, una coltura senza e una coltura con 2mM di $NaNO_2$. A questo punto ogni brodo è stato incubato in microaerofilia e la curva di crescita è stata monitorata dal tempo zero (T0) al tempo di 24 ore (T24), valutando la crescita di ogni batterio dalla misura dell' OD_{600nm} . Parallelamente alla crescita, è stato misurato il consumo di nitrito nel tempo, tramite la reazione colorimetrica di Griess, in tutti i ceppi di *N. meningitidis* cresciuti in presenza di nitrito. La prima misura del nitrito è stata eseguita a T0, e le successive, ogni 2ore e 30min fino ad arrivare fase stazionaria. In particolare, da ogni coltura in brodo è stata prelevata un'aliquota e centrifugata, il sovrantante ottenuto è stato aggiunto alla miscela di reazione costituita dai reagenti di

Griess, seguendo gli stessi tempi e condizioni di incubazione già descritti nel paragrafo 2.6. La lettura dell'assorbanza è stata eseguita a 540nm e l'OD, così ottenuta, è riportata sul grafico della retta standard di riferimento per i nitriti, dove per una data OD si ricava la concentrazione di nitrito corrispondente, e quindi la quantità di nitrito consumata per ogni ceppo esaminato.

3. RISULTATI

3.1 Analisi della sequenza nucleotidica e aminoacidica del gene *aniA*

L'intero gene *aniA* è stato amplificato in tutti i ceppi di *N. meningitidis* esaminati (tabella 1). 2 ceppi, non invasivi, per la presenza del gene codificante la trasposasi NMB1251 non hanno dato nessuna amplificazione. In particolare, l'analisi è stata eseguita su 19 ceppi di isolamento clinico invasivi di *N. meningitidis* e su 2 ceppi non invasivi, isolati in Italia. La sequenza è stata analizzata paragonandola verso il ceppo di riferimento *N. meningitidis* MC58 di sierogruppo B e verso il ceppo commensale *N. lactamica*.

La figura 12 mostra l'allineamento della sequenza aminoacidica di AniA. I residui corrispondenti al sito catalitico (D137 e H280) sono evidenziati in verde e la sequenza del peptide segnale (MKRQALAAMIASLFALAAC) è sottolineata. La maggior parte delle mutazioni trovate sono nella regione ammino-terminale della proteina: tra il residuo 1 e il residuo 100 (facendo riferimento alla sequenza del gene *aniA* di MC58: AE002098/AAF41975).

In due ceppi invasivi, 1661 e 1759, sono state trovate molte mutazioni “*frame-shift*” creando codoni di stop e quindi una struttura tronca della proteina. Il sito di palmitoilazione, cisteina in posizione 19, è mutato in un residuo di glicina in due ceppi, nel ceppo non invasivo 100 e nel ceppo invasivo 1857. Nei ceppi 1012 e 1159 sono state trovate quattro e due mutazioni, rispettivamente, all'interno della sequenza segnale che potrebbero interferire con il trasporto della proteina nel periplasma così da indurre, probabilmente, un fallimento della localizzazione. La sequenza dei ceppi 1332, 1284, 1661, 1759, 1892, 1447, 1682 e 1798 ha mostrato una delezione di quattro aminoacidi nella stessa posizione: dal residuo 28 al residuo 31. Tre ceppi: 1012, 1765 e 1891,

hanno mostrato gli stessi tre aminoacidi inseriti in posizione 35, 36 e 41, e un aminoacido deleto in posizione 27. Questi stessi ceppi hanno altre mutazioni in posizione 60, 61, 70, 71 e 75.

Una inserzione di 9 aminoacidi in posizione 143 vicino al sito di legame del rame di tipo I è stata trovata nel ceppo 1332, che insieme al ceppo 1892, hanno il sito catalitico mutato: H₂₈₀→L, e solo il ceppo 1892 ha V₂₈₁→R.

Infine, i ceppi 1159, 1239, 1332, 1284, 1447 e 1682 hanno mostrato due identiche mutazioni in posizione 35 e 51.

Nonostante la presenza di numerose mutazioni puntiformi nella sequenza nucleotidica, i dendrogrammi ottenuti dall'allineamento sia della sequenza nucleotidica sia della sequenza aminoacidica hanno rivelato un alto grado di somiglianza tra 85% e 95%, come mostrato in figura 13A, e B.

TABELLA 1. Ceppi di *N. meningitidis* esaminati per il gene *aniA*

CODICE CEPPO	SIEROGRUPPO CAPSULARE	ANNO DI ISOLAMENTO	QUADRO CLINICO
1012	B	1999	SEPSI
1043	B	2000	MENINGITE
100	C	2000	NON INVASIVO
1159	B	2001	MENINGITE
297	B	2001	NON INVASIVO
1200	B	2002	SEPSI
1239	C	2002	SEPSI
1284	C	2002	MENINGITE
1332	C	2003	MENINGITE+SEPSI
1447	W135	2004	MENINGITE+SEPSI
1661	C	2005	MENINGITE
1682	Y	2005	MENINGITE
1759	C	2005	-
1765	B	2005	SEPSI
1774	W135	2005	-
1798	C	2006	SEPSI
1849	B	2006	-
1851	B	2006	MENINGITE
1857	B	2006	MENINGITE
1891	B	2006	SEPSI
1892	Y	2006	MENINGITE

- : non noto

	10	19	29	38	48
MC58	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GGEPAAQAPA	ETPAA--AAEA	-ASSAAQTAAE
N. I.	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GGEPAAQAPA	ETPAA--SAEA	-ASSAAQTAAE
100	MKRQALAAMI	ASLFALAA G	GGEPAAQAPA	ETPAA--AAEA	-ASSAAQTAAE
1043	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GGEPAAQAPA	ETPAA--AAEA	-ASSAAQTAAE
1200	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GGEPAAQAPA	ETPAA--AAEA	-ASSAAQTAAE
1159	MKRQAL SE TI	AS M FALAAC	GG EQ AAQAPA	ETPAA--SAEA	- SS AAQTAAE
1332	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GGEPAAQA ---	--- PAA--SAEA	-ASSAAQTAAE
1239	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GG EQ AAQAPA	ETPAA--SAEA	-ASSAA QA AAE
1284	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GGEPAAQA ---	--- PAA--SAEA	-ASSAAQTAAE
297	MKRQ TLAALI	AS V FALAAC	GEQ AAK-PA	ETPA ATA SAEA	PAASNSQA AAE
1012	MKRQ TLAALI	AS V FALAAC	GEQ AAK P -PA	ETPA ATA SAEA	PAASNSQA AAE
1857	MKRQALAAMI	ASLFALAA G	GGEPAAQAPA	ETPAA--AAEA	-ASSAAQTAAE
1849	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GGEPAAQAPA	ETPAA--AAEA	-ASSAAQTAAE
1851	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GGEPAAQAPA	ETPAA--AAEA	-ASSAAQTAAE
1661	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GGEPAAQA ---	--- PAA--SAEA	-ASSAAQTAAE
1759	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GGEPAAQA ---	--- PAA--SAEA	-ASSAAQTAAE
1774	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GG EQ AAQAPA	ETPAA--SAEA	-ASSAAQTAAE
1798	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GGEPAAQA ---	--- PAA--AAEA	-ASSAAQTAAE
1892	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GGEPAAQA ---	--- PAA--SAEA	-ASSAAQTAAE
1447	MKRQALAAMI	ASLFALAAC	GGEPAAQA ---	--- PAA--SAEA	-ASSAAQA AAE
1682	MKRQALAA TI	AS M FALAAC	GGEPAAQ T ---	--- PAA--SAEA	-ASSAAQTAAE
1765	MKRQ TLAALI	AS V FALAAC	GEQ AAK-PA	ETPA ATA SAEA	PAASNSQA AAE
1891	MKRQ TLAALI	AS V FALAAC	GEQ AAK-PA	ETPA ATA SAEA	PAASNSQA AAE

	58	68	78	88	98
MC58	TPSGELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TMTMEDGVEY
N. I.	TPSGELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TM KMD DGVEY
100	TPSGELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TMTMEDGVEY
1043	TPSGELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TMTMEDGVEY
1200	TPSGELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TMTMEDGVEY
1159	TP A GELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TM KMD DGVEY
1332	TP A GELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TMTMEDGVEY
1239	TP A GELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TMTMEDGVEY
1284	TP A GELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TMTMEDGVEY
297	TP S SELPVID	AIV THAPEVP	PPTDRDHP AK	VRVKMETVEK	TM KMD DGVEY
1012	TP S SELPVID	AIV THAPEVP	PPTDRDHP AK	VRVKMETVEK	TM KMD DGVEY
1857	TPSGELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TMTMEDGVEY
1849	TPSGELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TMTMEDGVEY
1851	TPSGELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TMTMEDGVEY
1661	TP T GELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	P*-----WKT
1759	TP T GELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	P*-----WKT
1774	TPSGELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TM KMD DGVEY
1798	TPSGELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TMTMEDGVEY
1892	TP T GELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TMTMEDGVEY
1447	TP A GELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TM KMD DGVEY
1682	TP A GELPVID	AVTTHAPEVP	PAIDRDYPAK	VRVKMETVEK	TM KMD DGVEY
1765	TP S SELPVID	AIV THAPEVP	PPTDRDHP AK	VRVKMETVEK	TM KMD DGVEY
1891	TP S SELPVID	AIV THAPEVP	PPTDRDHP AK	VRVKMETVEK	TM KMD DGVEY

	108	118	128	138	143
MC58	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
N. I.	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
100	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1043	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1200	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HA VTG -----
1159	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1332	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG QGGGA
1239	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1284	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	S FTVPHNVDF	HAATG-----
297	HYW TFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1012	HYW TFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1857	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1849	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1851	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1661	VWNTAT CHLT	ATFRVA *SAY	AKAIRLKW NF	PTTRLLPFPI	TSSTSP----
1759	VWNTAT CHLT	ATFRVA *SAY	AKAIRLKW NF	PTTRLLPFPI	TSSTSP----
1774	HYW TFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1798	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1892	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1447	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1682	RYWTFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1765	HYW TFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----
1891	HYW TFDGDVP	GRMIRVREGD	TVEVEFSNNP	SSTV PHNVDF	HAATG-----

	149	159	169	179	187
MC58	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
N. I.	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	PDIYHCAVAP	--VGMHIANG
100	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1043	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1200	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1159	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1332	AATG QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQ AG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1239	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1284	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQ AG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
297	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQ AG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1012	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQ AG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1857	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1849	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1851	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1661	---- QPVRAA	VQPQLPPRA	ALPHSASKPC	NRVCTSTAP	SRRSVCTSPT
1759	---- QPVRAA	VQPQLPPRA	ALPHSASKPC	NRVCTSTAP	SRRSVCTSPT
1774	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1798	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQ AG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1892	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1447	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1682	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQPG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1765	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQ AG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG
1891	----QGGGAA	ATFTAPGRTS	TFSFKALQ AG	LYIYHCAVAP	--VGMHIANG

	197	207	217	227	237
MC58	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKAVAEQ
N. I.	MYGLILVEPK	EGLPKVNKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLHP	FDMDKAVAEQ
100	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKAVAEQ
1043	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKAVAEQ
1200	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKAVAEQ
1159	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEL	YIVQGDLYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKAVAEQ
1332	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKA IAEQ
1239	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKAVAEQ
1284	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKA IAEQ
297	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKA IAEQ
1012	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKA IAEQ
1857	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKAVAEQ
1849	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKAVAEQ
1851	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKAVAEQ
1661	VCTVFWSSLK	KVCRKWIKSS	TSSKATSTPK	AKKARKACN-	----RSIWTK
1759	VCTVFWSSLK	KVCRKWIKSS	TSSKATSTPK	AKKARKACN-	----RSIWTK
1774	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKA IAEQ
1798	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKA IAEQ
1892	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKAVAEQ
1447	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKAVAEQ
1682	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKA IAEQ
1765	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKA IAEQ
1891	MYGLILVEPK	EGLPKVDKEF	YIVQGDFYTK	GKKGAAQGLQP	FDMDKA IAEQ

	247	257	267	277	284
MC58	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
N. I.	PEYVVFNGHV	GSIAAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
100	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1043	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1200	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1159	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1332	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F L V IG---E
1239	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1284	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
297	PEYVVFNGHV	GSIAAGDNALK	AKAGET I RMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1012	PEYVVFNGHV	GSIAAGDNALK	AKAGET I RMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1857	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1849	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1851	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1661	PLPNSLNTSY	STVMVLSPAI	TRKPKQAKPC	VCTSVTAVRT	*CLPSTSSAK
1759	PLPNSLNTSY	STVMVLSPAI	TRKPKQAKPC	VCTSVTAVRT	*CLPSTSSAK
1774	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1798	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1892	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F PR IG---E
1447	PEYVVFNGHV	GSIAAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1682	PEYVVFNGHV	GAIAGDNALK	AKAGETVRMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1765	PEYVVFNGHV	GSIAAGDNALK	AKAGET I RMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E
1891	PEYVVFNGHV	GSIAAGDNALK	AKAGET I RMY	VGNGGPNLVS	S F HVIG---E

	294	304	314	324	334
MC58	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
N. l.	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
100	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1043	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1200	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1159	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1332	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1239	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1284	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
297	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	K-----		
1012	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIQGSY	TLVDHSIFRA
1857	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1849	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1851	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1661	SSTKFMWAAA	SLTKTYKAPS	FLPAVP-PSS	NSKSTSTRAAT	LWSTTPSSAH
1759	SSTKFMWAAA	SLTKTYKAPS	FLPAVP-PSS	NSKSTSTRAAT	LWSTTPSSAH
1774	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1798	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1892	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1447	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1682	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1765	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA
1891	IFDKVYVEGG	KLINENVQST	IVPAGGSAIV	EFKVDIPGSY	TLVDHSIFRA

	344	354	364	374	384
MC58	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
N. l.	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAASAASA	PAASAPAASA
100	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1043	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1200	FNKGALGQFK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1159	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1332	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1239	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1284	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAASAASA	PAASAPAASA
297A	-----	-----	-----	-----	-----
1012	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1857	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1849	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1851	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1661	STKARWANKR	VRKTLKSLKN	VIPLTPVTVQ	LLLLPLPQLL	PRQPLHPKKA
1759	STKARWANKR	VRKTLKSLKN	VIPLTPVTVQ	LLLLPLPQLL	PRQPLHPKKA
1774	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1798	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKMSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1892	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1447	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAAPAASA	PAASAPAASA
1682	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAARAASA	PAASAHAASA
1765	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAASAASA	PAASAPAASA
1891	FNKGALGQLK	VEGAENPEIM	TQKLSDTAYA	GNGAASAASA	PAASAPAASA

	390
MC58	SEKSVY
N. l.	SEKSVY
100	SEKSVY
1043	SEKSVY
1200	SEKSVY
1159	SEKSVY
1332	SEKSVY
1239	SEKSVY
1284	SEKSVY
297	-----
1012	SEKSVY
1857	SEKSVY
1849	SEKSVY
1851	SEKSVY
1661	LSSG-
1759	LTVR-
1774	SEKSVY
1798	SEKSVY
1892	PAKSDY
1447	AKSDY
1682	LAKSDY
1765	SEKSVY
1891	SEKSVY

Figura 12. Allineamento della sequenza aminoacidica della proteina AniA dei ceppi di *N. meningitidis* di isolamento clinico, paragonandola alla sequenza di AniA del ceppo MC58. I colori indicano : le mutazioni (giallo), le inserzioni (rosso), le delezioni (verde), il peptide segnale per il trasporto della proteina nel periplasma (sottolineato nel ceppo MC58), il sito di palmitolazione (grassetto), e i residui aminoacidici presenti nel sito di legame il rame di tipo I (blu) e di tipo II (rosa). Il sito catalitico istidina è colorato in verde. I ceppi non invasivi sono evidenziati in rosso. *N. l.*: *Neisseria lactamica*.

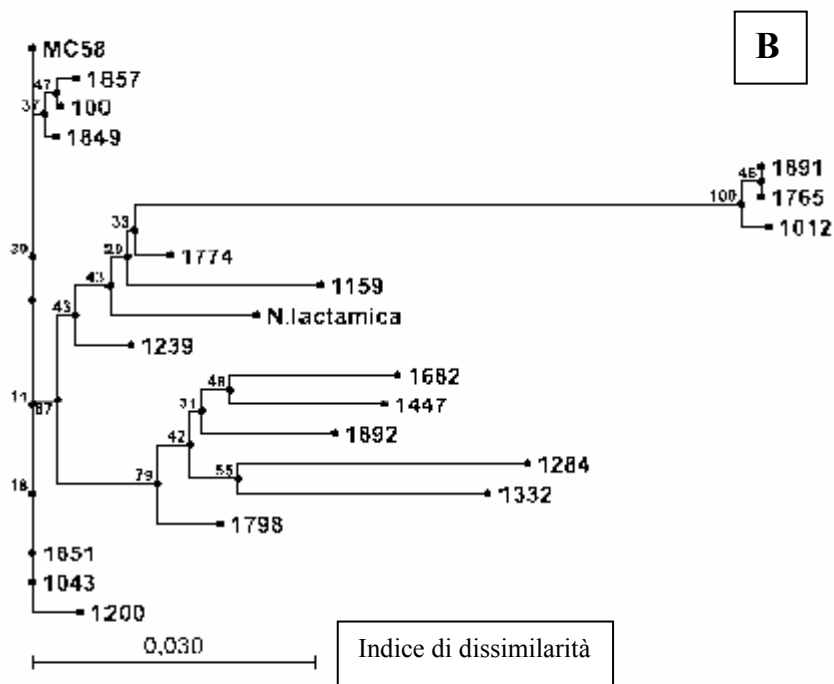
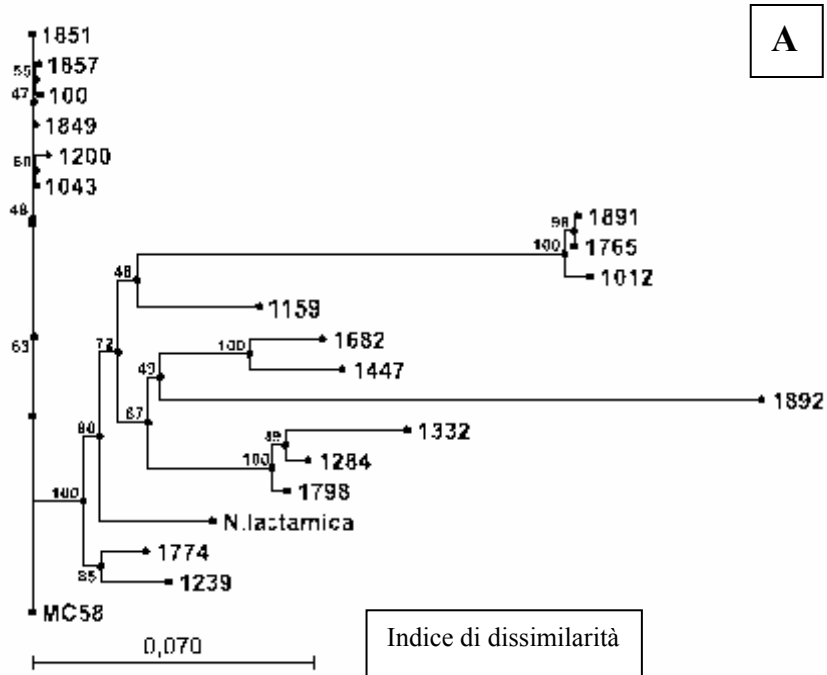


Figura 13. Dendrogrammi rappresentativi della sequenza nucleotidica (A) e aminoacidica (B) di AniA, ottenuti con il programma “Neighbor Joining tree”. I codici identificativi corrispondenti ai ceppi di *N. meningitidis* sono indicati sulla destra; MC58 è il ceppo di riferimento; *N. lactamica* è il ceppo commensale.

3.2 Clonaggio del dominio solubile di AniA

Il dominio solubile di AniA (sAniA) del ceppo di riferimento MC58 è stato ottenuto clonando la sequenza del gene corrispondente nel vettore di espressione batterica il plasmide pET28.

Inizialmente, sono stati selezionati i cloni di *E. coli* BL21 DE3 che esprimono maggiormente la sAniA, poi si è proceduto alla purificazione della proteina ricombinante, verificando la presenza di residui sequenziali di istidine. La proteina ricombinante, presentando la sequenza di sei istidine all'estremità C-terminale, si lega alla matrice della colonna di affinità tramite un legame di coordinazione tra la coda di istidine e il nichel della colonna. L'eluizione avviene in gradiente di imidazolo separando le proteine legate del lisato batterico, con un gradiente di concentrazione di imidazolo a seconda della forza del legame di coordinazione. Dall'analisi elettroforetica delle varie frazioni proteiche raccolte della cromatografia di affinità, la sAniA-His tag non eluisce in un unico picco del cromatogramma e ad una specifica concentrazione di imidazolo, ma viene staccata a partire da un tempo di ritenzione di circa 20 minuti corrispondente a circa 130mM di imidazolo, lungo tutto il gradiente. Dopo taglio dalla proteina ricombinante la coda di istidine che presenta all'estremità N-terminale il sito di riconoscimento per la trombina. In seguito, come ultimo step di purificazione è stata separata la trombina dall'AniA mediante cromatografia a scambio anionico in gradiente di NaCl e dall'analisi elettroforetica delle varie frazioni raccolte relative ai picchi del cromatogramma si deduce che l'AniA fluisce intorno ai 20min e la trombina, che si lega più fortemente alla resina fluisce intorno ai 63min.

Una volta purificata l'AniA, è stata effettuata una scansione spettroscopica nel visibile di sAniA con valori massimi di assorbimento a 458 e 585nm (figura 14).

Una frazione di sAniA è stata utilizzata per caratterizzare la proteina a livello biochimico e una frazione per immunizzare i conigli ed ottenere anticorpi policlonali anti-AniA.

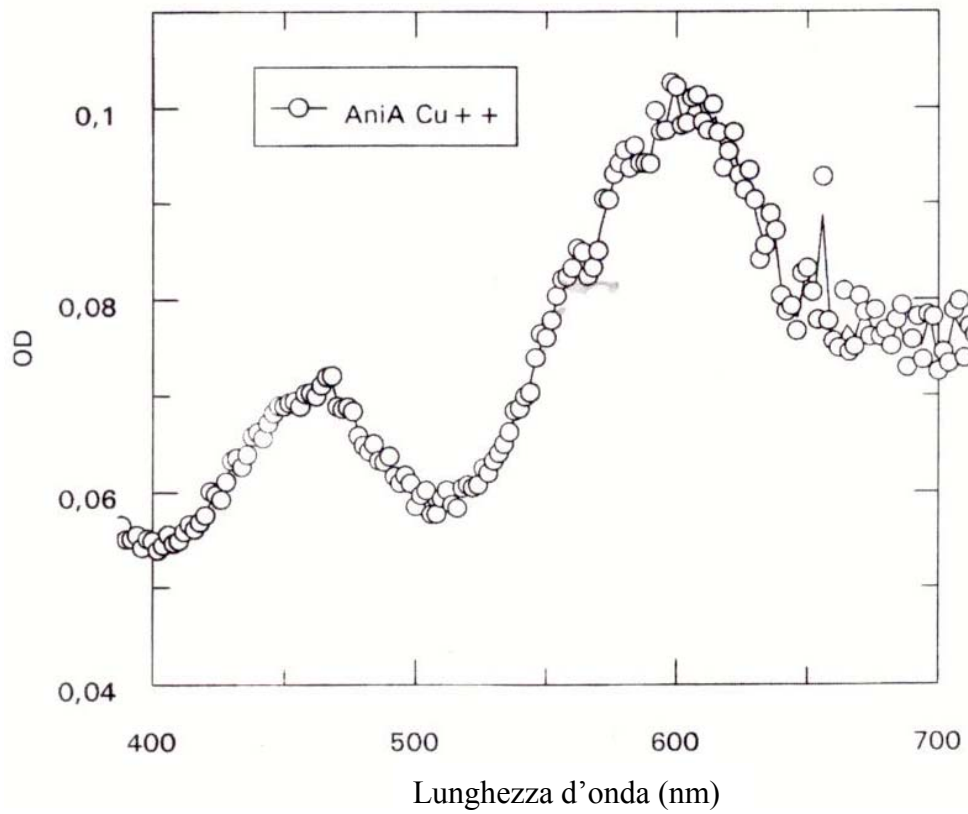


Figura 14. Analisi dello spettro nel visibile di sAniA in tampone fosfato 20mM, pH=7.

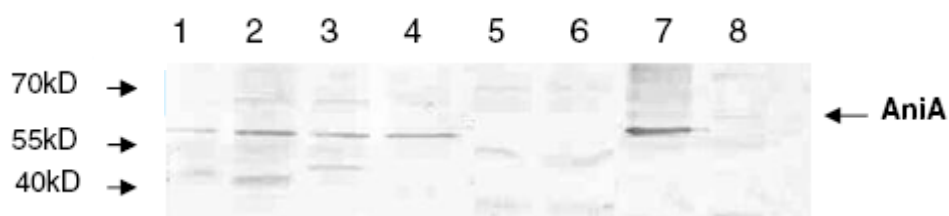
3.3 Espressione di AniA in ceppi di isolamento clinico

L'espressione della proteina AniA in tutti i ceppi di meningococco esaminati è stata valutata dall'analisi del western-blotting, utilizzando il siero policlonale di coniglio ottenuto dopo immunizzazione con la sAniA clonata ed espressa in *E. coli*.

Tutti i ceppi di *N. meningitidis* contenenti le diverse alterazioni, delezioni e/o inserzioni, o il peptide segnale difettivo, esprimono la proteina, eccetto che due ceppi (1661 e 1759) per la presenza di un codone di stop all'interno del gene *aniA* (figura 15A). Nessuna proteina AniA è stata identificata come AniA in due ceppi di meningococco non invasivi in cui è stata trovata al posto del gene *aniA* una sequenza codificante una trasposasi parziale.

Per tutti gli altri ceppi, il livello di espressione della proteina mostrata è equiparabile a quello ottenuto per il ceppo di riferimento MC58 (figura 15B).

A



B

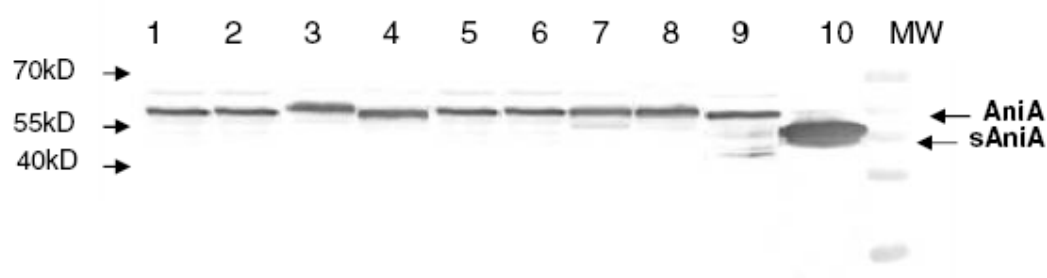


Figura 15. Western blotting della proteina AniA in ceppi di meningococco cresciuti in condizioni di microaerofilia.

MC58: ceppo di riferimento.

A) Linea 1) e 2) 100 e il 1857, (ceppi con sito di palmitolazione difettivo); Linea 3) 1332 (ceppo con mutazione H280L nel sito catalitico, inserzione di 9 aminoacidi vicino il sito del legame per il rame di tipo I); Linea 4) 1892 (ceppo con mutazioni H280P e V281R nel sito catalitico); Linea 5) 1661 (ceppo con codone di stop); Linea 6) 1759 (ceppo con codone di stop); Linea 7) 1159 (ceppo con possibile fallimento di localizzazione); Linea 8) 297 (ceppo con sequenza non completa della proteina); la posizione del dominio solubile dell'AniA purificata è indicata dalla freccia.

B) Linea 1) MC58; Linea 2) 1043; Linea 3) 1447; Linea 4) 1284; Linea 5) 1200;

Linea 6) 1891; Linea 7) 1239; Linea 8) 1159; Linea 9) 1012; Linea 10) sAniA: dominio solubile di AniA, clonata in *E. coli*.

MW: marker "Prestained Protein Ladder" (Fermentas).

3.4 Attività enzimatica di sAniA di MC58 in funzione del pH

La riduzione del nitrito di sAniA di MC58 a differenti pH è stata misurata con il metodo di Griess. Ai valori di velocità enzimatica calcolati ai vari pH sono stati sottratti i valori di velocità di autoriduzione del nitrito dipendente dal pH. L'autoriduzione del nitrito in funzione del pH particolarmente preponderante sotto al valore di pH=6.

In seguito è stata calcolata l'attività specifica di sAniA e il valore risultante a pH=7 è 75 U/mg, che risulta essere inferiore al valore di 160U/mg riportato per AniA di *N. gonorrhoeae*. Come è mostrato in figura 16 la dipendenza dal pH dell'attività specifica mostra un complesso andamento a due campane, con i punti di massimo a pH=5.5 e a pH=6.5. Il valore massimo di attività specifica che è pari a 280U/mg si raggiunge a pH=5.5, e il decremento dell'attività ai valori di pH inferiori a quello ottimale non è dovuto all'instabilità o al denaturazione di sAniA, poiché tutte le reazioni di riduzione sono lineari nei saggi. Questo comportamento è simile a quello riportato per la nitrito reductasi di *Alcaligenes xilosoxidans* suggerendo, probabilmente, il coinvolgimento di diversi residui aminoacidici coinvolti nel processo di trasferimento dei protoni contribuendo all'andamento dell'attività enzimatica in funzione del pH.

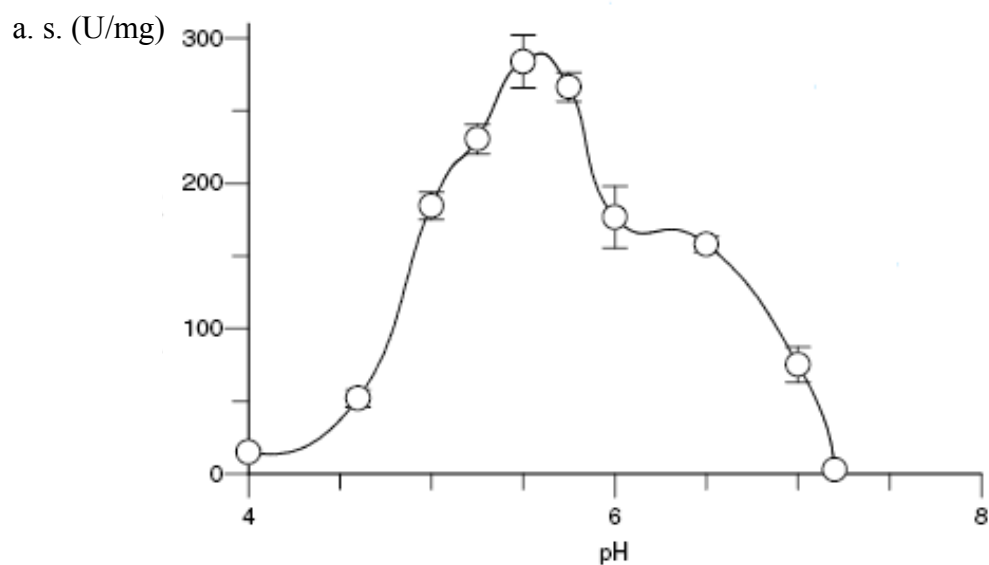
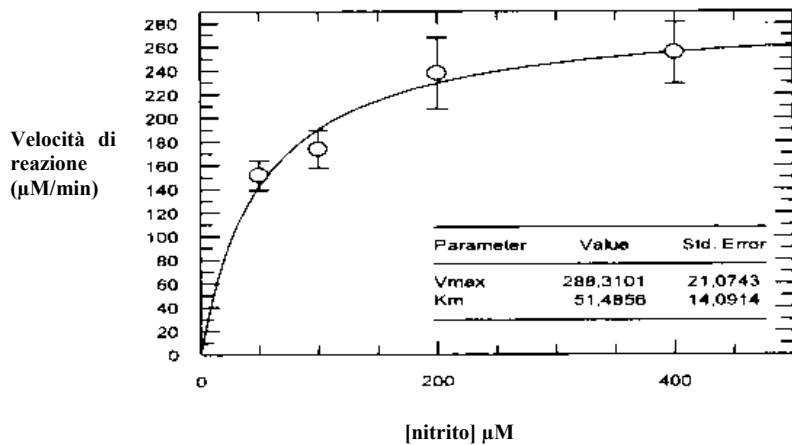


Figura 16. Andamento dell'attività specifica di sAniA di MC58 in funzione del pH (a. s.= attività specifica; U= quantità di enzima necessario per ridurre 1 μ mol di substrato /min).

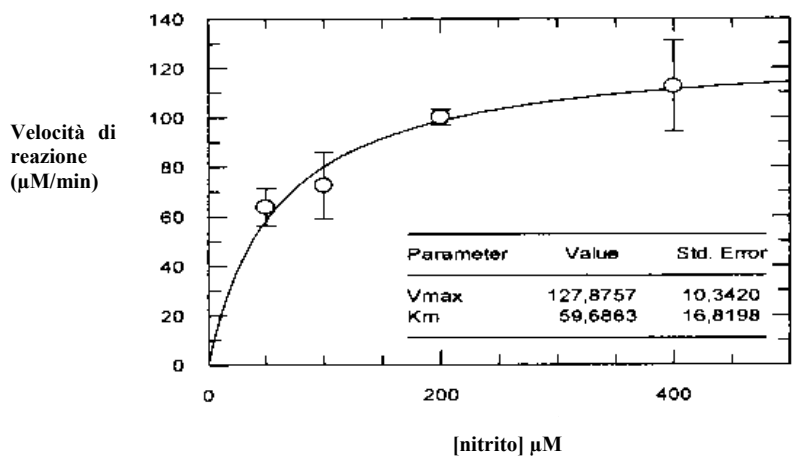
3.5 Caratterizzazione di sAniA di MC58 valutando l'ossidazione del ditionito

L'analisi della cinetica enzimatica è stata eseguita tramite la determinazione dei parametri cinetici, V_{MAX} , K_M e K_{CAT} , ottenuti a diversi valori di pH, seguendo l'ossidazione del ditionito a 315nm come descritto in letteratura per altre nitrito reductasi. Le reazioni che seguono lo schema di

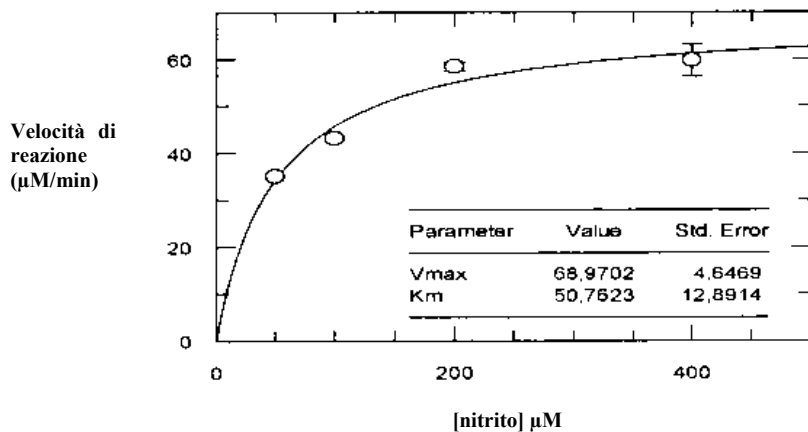
Michaelis-Menten sono rappresentate in figura 17, in cui sono state determinate per ciascun valore di pH le costanti cinetiche apparenti: K_m e V_{max} . Dai dati sperimentali ottenuti, descritti in figura 18, si evince che la K_{CAT} apparente aumenta di circa 5 volte andando da valori di pH=7 a valori di pH=5. Il range di valori della K_{CAT} che va da 12 a $49s^{-1}$ chiaramente dimostra che, alla variazione di pH da 7 a 5, la protonazione di uno o più residui aminoacidici è fondamentale per la catalisi. Come è stato già riportato la dipendenza della K_{CAT} dal pH per la nitrito reductasi di *Alcaligenes xilosoxidans*. Inoltre, risulta che la K_M apparente non cambia in seguito ad acidificazione e risulta essere, ai vari valori di pH, di circa $60\mu M$. Questo valore rientra nel range dei valori della K_M apparenti riportati per le altre nitrito reductasi a pH=7 di diversi microrganismi denitrificanti che va da 35 a $74\mu M$. Il fatto che la costante di affinità ai vari pH rimane nel suo valore inalterata, probabilmente è dovuto alla presenza di residui aminoacidici il cui legame al nitrito non viene influenzato dal pH.



A



B



C

Figura 17. Cinetiche enzimatiche di sAniA di MC58 valutando l'ossidazione del ditionito a 315nm, a vari pH: A) pH=5, B) pH=6, C) pH=7.

pH	$K_{cat} (s^{-1})$	$K_M \text{ app. } (\mu M)$
5	49.9±3.6	62±14
6	21.9±1.6	67.9±15
7	12±0.98	63.2±16

Figura 18. Costanti cinetiche ottenute ai vari pH.

3.6 Consumo di nitrito in ceppi di *N. meningitidis* di isolamento clinico

Le culture, in brodo, sono state eseguite in condizioni di microaerofilia sia in presenza che in assenza di 2mM di nitrito. I risultati della crescita di ciascun ceppo di *N. meningitidis*, rappresentanti le diverse alterazioni riconosciute nel gene *aniA*, come ad esempio la delezione di 4 aminoacidi, l'inserzione di 9 aminoacidi, il sito di palmitolazione difettivo, le mutazioni presenti nel sito catalitico, sono rappresentati in figura 18A e B. Sia le curve di crescita che il consumo del nitrito sono, per tutti i ceppi, paragonabili eccetto che per il ceppo di riferimento MC58, in cui è stato possibile osservare il consumo del nitrito caratterizzato da una cinetica lenta (figura 19). Mentre per tutti gli altri ceppi, sebbene l'espressione della proteina sia stata confermata, non è stato riportato alcun consumo di nitrito. Questo fenomeno può dipendere dalla mancanza della proteina AniA in questi ceppi di isolamento clinico, oppure per la presenza di un difettivo flusso di elettroni all'AniA.

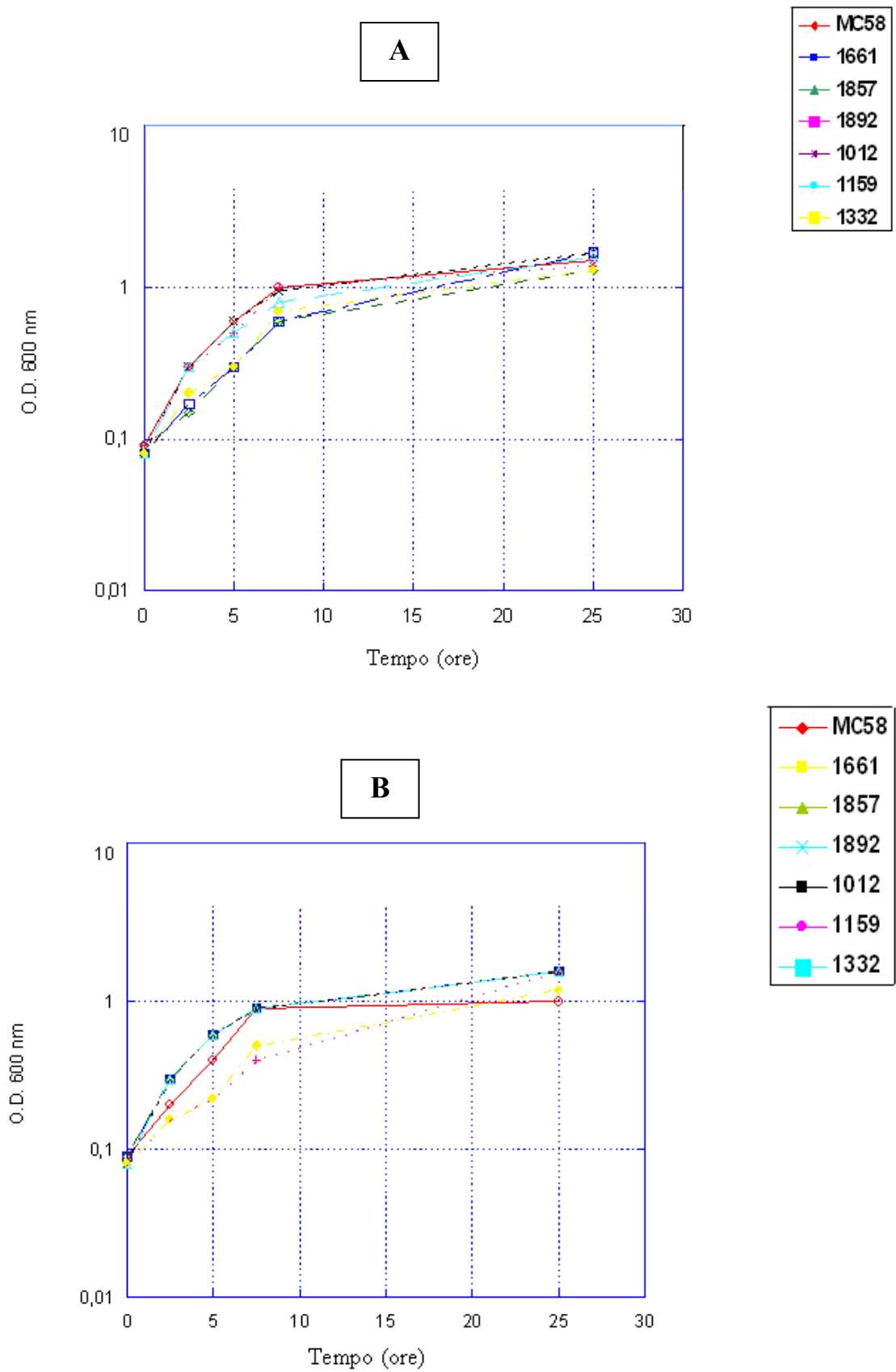


Figura 18. Curve di crescita dei ceppi di *N. meningitidis* cresciuti in condizioni di microaerofilia in assenza (A) e in presenza (B) di 2mM di nitrito.

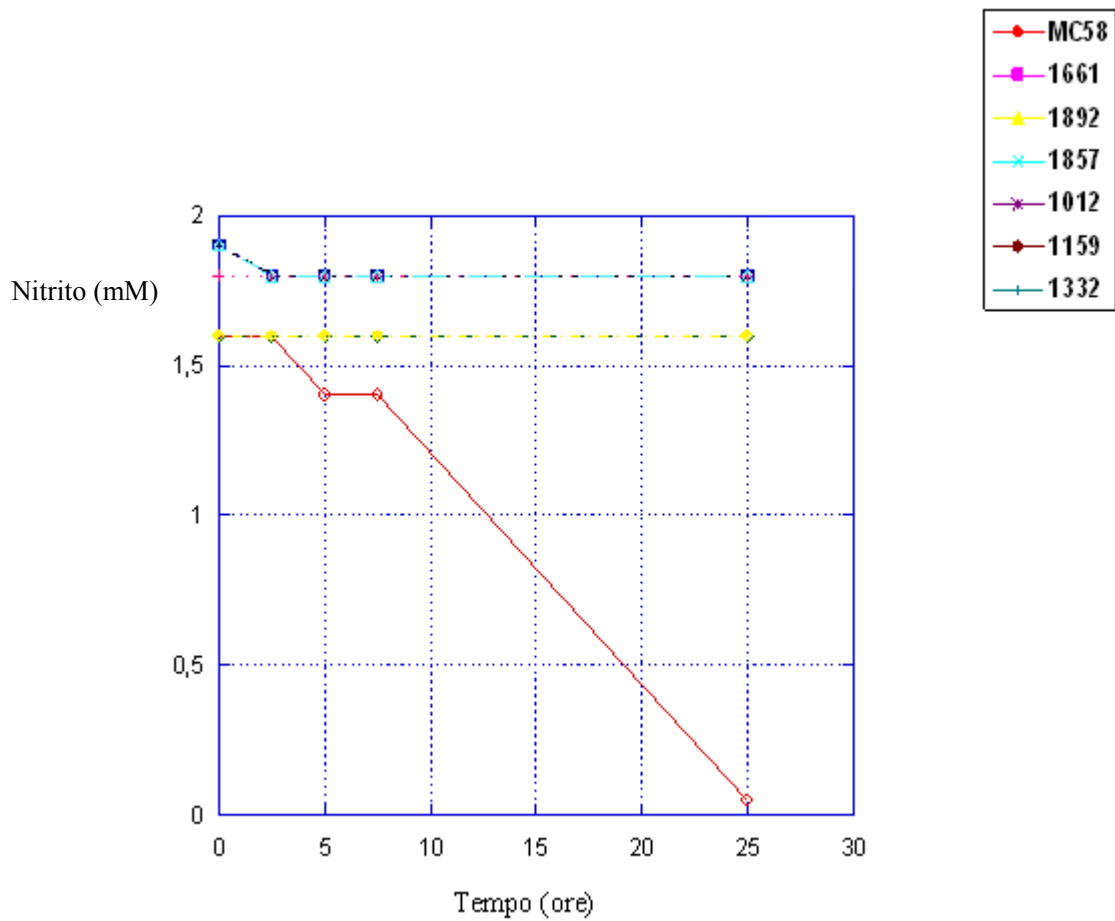


Figura 19. Consumo di nitrito misurato lungo il periodo di crescita dei ceppi di *N. meningitidis*.

4. DISCUSSIONE

La capacità di *N. meningitidis* di colonizzare e di provocare la malattia possono essere in parte addotte alla sua capacità di sopravvivere nella mucosa del nasofaringe umano e negli ambienti scarsamente ossigenati che incontra durante il processo infettivo. Quest'ultima caratteristica è riconducibile alla capacità di sostituire il "pathway" aerobico con quello che utilizza il nitrito, coinvolgendo nella prima fase del processo l'attività della nitrito reduttasi (codificata dal gene *aniA*). Durante i primi stadi di infezione il lipopolisaccaride batterico induce una produzione da parte dei macrofagi di ossido nitrico, che, come noto, ha effetti tossici su molti batteri.

Inoltre, è stato dimostrato che l'esposizione delle cellule dell'endotelio cerebro-vascolare a *N. meningitidis* può indurre una sovrapproduzione di ossido nitrico, portando alla morte cellulare e favorendo probabilmente l'entrata del meningococco nel sistema nervoso centrale (Constantin D., 2002).

Durante i cicli di vita del batterio dentro l'ospite, ad esempio durante l'invasione della mucosa o durante la sepsi, *N. meningitidis* è facilmente esposto allo stress nitrosoattivo e può continuare a sopravvivere attraverso la via di denitrificazione (Anjum M. F. 2002).

In questo processo metabolico *N. meningitidis*, al posto dell'ossigeno, utilizza il nitrito come accettore terminale di elettroni grazie alla presenza di geni che codificano per una nitrito reduttasi (*AniA*), un'ossido nitrico reduttasi (*NorB*) e una serie di trasportatori di elettroni, quali il complesso *bc1* e la cupedrossina *Laz*, che svolgono il ruolo di trasferire gli elettroni alla nitrito reduttasi nella catena di trasporto di elettroni (Rock J.D. 2005).

Sebbene la denitrificazione sia generalmente considerata un processo anaerobio, è stato dimostrato che l'attività della nitrito reduttasi e dell'ossido nitrico reduttasi in *N. meningitidis* non viene influenzata dalla presenza di ossigeno, ma piuttosto viene attivata quando l'ossido nitrico raggiunge concentrazioni tali da inattivare la catena respiratoria dipendente dall'ossigeno stesso.

Infatti, *N. meningitidis* non è in grado di crescere in condizioni strettamente anaerobiche, ma la presenza del nitrito permette al batterio di crescere in condizioni microaerofile, accelerando la fase di crescita seguendo un andamento esponenziale (Rock J.D. 2005).

Sulla base di queste conoscenze, lo studio di questa tesi è stato focalizzato sulle caratteristiche molecolari e fisiologiche del gene *aniA* e del prodotto genico coinvolto nella via di denitrificazione. E' stata analizzata la sequenza nucleotidica e aminoacidica del gene *aniA* di ceppi di *N. meningitidis* isolati da casi di infezione meningococcica (invasivi) e da portatori (non invasivi), con lo scopo di valutare se differenze nella sequenza genica potessero influenzare l'espressione dell'enzima AniA.

I risultati ottenuti suggeriscono un alto grado di somiglianza tra le sequenze del gene *aniA*, sebbene siano stati trovati un significativo numero di cambiamenti nucleotidici, alcuni dei quali coinvolti nella funzione e nella struttura del prodotto genico.

In particolare, in quattro ceppi due invasivi non esprimono l'AniA per la presenza di un codone di stop nella prima metà della sequenza genica, due non invasivi per la presenza di una sequenza parziale che codifica per una transposasi all'interno del gene *aniA*.

Altri due isolati, uno invasivo ed uno non, presentano una mutazione che altera il segnale di palmitolazione, che media il legame della proteina matura alla membrana. Questo risultato permette di ipotizzare che in questi due ceppi la proteina AniA non venga legata alla membrana nello spazio periplasmatico, così come definito da diversi autori (Boulangier M. J. 2002).

Due ceppi invasivi hanno mutazioni all'interno della sequenza segnale coinvolta nel trasporto della proteina nello spazio periplasmatico, così da ipotizzare nei ceppi stessi una mancata localizzazione della proteina.

Ed infine due ceppi invasivi hanno mutazioni significative all'interno del sito catalitico, suggerendo un'assenza di attività della proteina, così come è stato dimostrato per il citocromo cd_1 nitrito reductasi di *Pseudomonas aeruginosa*, in cui mutazioni dei residui

del sito catalitico annullano l'attività nitrito reductasica riducendo l'affinità di legame dell'enzima con substrati anionici (come il nitrito) (Centola F. 2006).

La maggior parte delle altre differenze presenti nella sequenza aminoacidica sono mutazioni presenti nei siti non coinvolti nell'attività dell'enzima o, probabilmente, coinvolti nei riarrangiamenti strutturali della proteina (Boulanger M.J. 2002).

Sebbene siano state trovate diverse alterazioni nella sequenza del gene *aniA* studiato, alcune delle quali sono singole mutazioni mentre le altre possono recare un cambiamento nella localizzazione, nella struttura o nell'attività catalitica della proteina, possiamo affermare che la presenza di un'efficiente nitrito reductasi non riveste un ruolo importante nella sopravvivenza del meningococco.

Questa affermazione trova sostegno nella crescita in vitro, che risulta essere paragonabile sia in presenza sia in assenza di nitrito, e il mancato consumo di nitrito misurato lungo il periodo di crescita stesso, suggerisce che, nonostante la proteina venga espressa in tutti i ceppi, eccetto per due ceppi invasivi in cui hanno all'interno del gene un codone di stop, esiste probabilmente un difetto nel consumo di questo substrato. Possiamo ipotizzare che questo fenomeno possa dipendere da una perdita di attività della proteina AniA in questi ceppi di isolamento clinico, oppure dalla presenza di un flusso difettivo di elettroni verso l'AniA.

Le proprietà spettroscopiche della porzione solubile di AniA (sAniA) sono risultate identiche a quelle già descritte per *N. gonorrhoeae*. Per un ceppo invasivo, che è stato isolato da un caso di meningite e sepsi, non è stata osservata alcuna attività catalitica e si può ipotizzare che questa mancata attività possa dipendere o dalla presenza di una inserzione di 9 aminoacidi vicina al sito di legame per il rame di tipo I, o dalla presenza di una mutazione da istidina a leucina, in posizione 280 nel sito di legame il rame di tipo II.

L'attività catalitica di sAniA è ottimale intorno a pH 5.5 e la dipendenza dal pH della K_{cat} apparente di sAniA del ceppo MC58 fa riferimento a quanto già descritto per la nitrito reductasi di *Alcaligenes xylosoxidans*, suggerendo che la protonazione di più residui aminoacidici è fondamentale per la

catalisi. Come dimostrato da studi cristallografici del nitrito legato alla nitrito reduttasi di *A. cycloclastes*, i residui aminoacidici Asp98 e His255 sembra che siano la sorgente dei due protoni utilizzati nella reazione di riduzione da nitrito ad ossido nitrico.

L'attività specifica relativa della nitrito reduttasi di *N. meningitidis* è inferiore al valore pubblicato per l'enzima corrispondente di *N. gonorrhoeae* (75 U/mg verso 160 U/mg a pH 7), che riflette una ridotta attività di queste nitrito reduttasi paragonate a enzimi simili provenienti da altri batteri particolarmente attivi nel processo di denitrificazione (300-800 U/mg) (Abraham ZH, 1997). Inoltre, dall'esperimento di ossidazione del ditionito, sono stati ottenuti i parametri cinetici per l'attività enzimatica. I valori della K_{cat} variano tra 12 e 50 sec^{-1} andando da un pH 7 ad un pH 5, mentre i valori della K_M non sono variati in modo significativo in seguito ad acidificazione e risulta essere di circa 60 μM . Questi dati sembrano confermare la dipendenza della catalisi dal pH, ma non l'alta affinità dell'enzima per il nitrito, come del resto già dimostrato per la nitrito reduttasi di *A. xylooxidans* (Abraham ZH, 1997).

L'incremento di acidità metabolica è stata riportata come una conseguenza della sepsi (Desai VS, 1995) e la sopravvivenza di *N. meningitidis* nel fluido cerebrospinale è stato inversamente correlato all'alcalinizzazione misurata in campioni di pazienti (Cunniffe JG, 1996). Questi dati possono far ipotizzare che l'ambiente acido-neutro non ostacoli la diffusione di *N. meningitidis* durante le ultime fasi del processo infettivo.

Gli alti livelli di NO possono essere coinvolti nelle fasi più drammatiche dell'infezione meningococcica, come l'invasione dei tessuti cerebrali dopo aver danneggiato la barriera emato-encefalica. Infatti, aumentati livelli di nitrito nel fluido cerebrospinale, dovuti all'aumento di NO, sono stati osservati durante l'infezione (Faraci FM, 1998).

Questa tesi ha descritto per la prima volta un'analisi della sequenza genica ed espressione proteica della nitrito reduttasi di ceppi di *N. meningitidis* di isolamento clinico, invasivi e non invasivi. È stato dimostrato come le alterazioni trovate all'interno del gene *aniA* non influenzino l'espressione del gene e che queste mutazioni permettano al ceppo di crescere, in vitro, in maniera paragonabile a

ceppi che esprimono l'enzima non mutato. L'enzima AniA, quindi, sembrerebbe essere coinvolto nella via di denitrificazione, che sappiamo essere fisiologicamente importante nella vita di questo patogeno anche in vivo. Tuttavia non gioca un ruolo chiave nella sua sopravvivenza.

Infine, sono state descritte le proprietà biochimiche del dominio solubile della nitrito reduttasi di *N. meningitidis* MC58 rivelando il possibile adattamento di AniA in un ambiente acido ed è stato constatato che, a differenza delle nitrito reduttasi di altre specie batteriche, l'AniA mantiene un valore di K_M apparente costante a diversi pH. Il significato di questo risultato potrebbe essere ricondotto all'affinità dei residui coinvolti nel legame con il nitrito indipendente da variazioni di pH, al contrario di quanto riportato in altri batteri.

5. BIBLOGRAFIA

Abraham Z. H., Lowe D.J. and Smith B. E. **Purification and characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (N. C. I. M. B. 11015): evidence for the presence of both type 1 and type 2 copper centres.** J. Biochem. 295: 587-593, 1993.

Anjum M. A., Stevanin T. M., Read C. R., and Moir J. W. B. **Nitric oxide metabolism in *Neisseria meningitides*.** J. Bacteriol., 184: 2987-2993, 2002.

Archibald F. S., and M. N. Duong **Superoxide dismutase and oxygen toxicity defenses in the genus *Neisseria*.** Infect. Immun., 51: 631-41, 1986.

Berks B. C., S. J. Ferguson, J. W. Moir, and D. J. Richardson **Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions.** Biochim. Biophys. Acta 1232: 97-173, 1995.

Boulanger M. J. and Murphy M. E. P. **Crystal Structure of the Soluble Domain of the Major Anaerobically Induced Outer Membrane Protein (AniA) from Pathogenic *Neisseria*: A New Class of Copper-containing Nitrite Reductases.** J. Mol. Biol. 315: 1111-1127, 2002.

Bloundiau C., P. Lagadec, P. Lejeune, N. Onier, J. M. Cavillon and J. F. Jeannin **Correlation between the capacity to activate macrophages *in vitro* and the antitumor activity *in vivo* of lipopolysaccharides from different bacterial species.** Immunobiology 190: 243-254, 1994.

Cardinale J. A. and Clark V.L. **Expression of AniA, the Major Anaerobically Induced Outer Membrane Protein of *Neisseria gonorrhoeae*, Provides Protection against Killing by Normal Human Sera.** Infect. Immun. 68: 4368-4369, 2000.

Centola F., Rinaldo S., Brunori M., Cutruzzolà F. **Critical role of His369 in the reactivity of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome cd1 nitrite reductase with oxygen.** FEBS J. 273: 4495-503, 2006.

Chin J. (ed.) **Control of communicable diseasea**, manual, 17th edition. American Public Health Association, Washington, DC, pp. 340-347, 2000.

Cornelissen C.N. and P.F. Sparling **Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens.** Molecular microbiology, 14(5), pp.843-850,1994.

Crack J., Green J., and Thomson A. J. J. Biol. Chem. 279: 9278-86, 2003.

Cuniffe J. G., Whitby-Stevens S., Wilcox M. H. **Effect of pH changes in cerebrospinal fluid specimens on bacterial survival and antigen test results.** J. Clin. Pathol. 49: 249-53, 1996.

Deeudom M., Rock J. and Moir J. **Organization of the respiratory chain of *Neisseria meningitidis*.** Bioch. Soc. Trans. 34: 139-142, 2006.

Desai V. S., Weil M. H., Tang W., Gazmuri R., Bisera J. **Hepatic, renal, and cerebral tissue hypercarbia during sepsis and shock in rats.** J. Lab. Clin. Med. 125: 456-61, 1995.

Dodd F. E., Van Beeumen J., Eady R. R. and Hasnain S. S. **X-ray structure of a blue-copper nitrite reductase in two crystal forms. The nature of the copper sites, mode of substrate binding and recognition by redox partner.** J. Mol. Biol. 282: 369-382, 1997.

Gotschlich E. C. *Neisserie* In Microbiology, R.Dulbecco and E.C. Gotschlich, pp.567-570, 1980.

Hammerschmidt S., A. Muller, H. Siffmann, M. Muhlenhoff, R. Borrow, A. Fox; J.van Putten, D. Zollinger, R. Schahn and M. Frosch **Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease.** Molecular microbiology, 20 (6), pp.1211-1220, 1996.

Hammerschmidt S., C. Birkholz, U. Zahringer, B.D. Robertson, J. van Putten, O. Ebeling and M. Frosch **Contribution of the capsule gene complex (*cps*) to lipooligosaccharide biosynthesis and serum resistance in *Neisseria meningitidis***. *Molecular microbiology*, 11(5), pp.885-896, 1994.

Householder T. C., Fozo E. M., Cardinale J. A., and Clark V. L. **Gonococcal nitric oxide reductase is encoded by a single gene, *norB*, which is required for anaerobic growth and is induced by nitric oxide**. *Infect. Immun.* 68: 5241-5246, 2000.

Inoue T., Gotowda M., Delingeer, Kataoka K., Yamaguchi K., Suzuki S. et al. **Type I Cu structure of blue nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 at 2.05 Å resolution: comparison of blue and green nitrite reductase**. *J. Biochem.* 124: 876-9, 1998.

Kataoka K., Furusawa H., Takagi K., Yamaguchi K., Suzuki S. **Functional analysis of conserved aspartate and histidine residues located around the type 2 copper site of copper-containing nitrite reductase**. *J. Biochem.* 127: 345-350, 2000.

Knapp J. S. and V. L. Clark **Anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae* coupled to nitrite reduction**. *Infect. Immun.*, 46: 176-181, 1984.

Lissenden S., S. Mohan, T. Overton, T. Regan, H. Crooke, J. A. Cardinale, T. C. Householder, P. Adams, C. D. Conner, V. L. Clark, H. Smith and J. A. Cole **Identification of transcription activators that regulate gonococcal adaptation from aerobic anaerobic or oxygen-limited growth**. *Mol. Microbiol.* 37:839-855, 2000.

Lomolt H. **Molecular biology and vaccine aspects of bacterial immunoglobulin A1 proteases**. *APIMIS Suppl*62, 104, pp.5-28, 1996.

Maiden J., J. Sucker and M. Feavers **Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight *Neisseria meningitidis***. *Molecular microbiology*, 5(3), pp.727-736, 1991.

Martel N. and B.C. Lee **Acquisition of heme iron by *Neisseria meningitidis* does not involve meningococcal transferrin-binding proteins**. *Infection and immunity*, 62(2), pp.700-703, 1994.

- McGuinness B. and J. Heckels **Class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*: epitope analysis of the antigenic diversity between strains, implication for subtype definition and molecular epidemiology.** *Molecular microbiology*, 7(4), pp.505-514, 1993.
- Mellies J., J. Jose, T. F. Meyer **The *Neisseria gonorrhoeae* gene *aniA* encodes an inducible nitrite reductase.** *Mol. Gen. Genet.* 256: 525-532, 1997.
- Moore T. D., and P. F. Sparling **Interruption of the *gpxA* gene increases the sensitivity of *Neisseria meningitidis* to paraquat.** *J. Bacteriol.* 178: 4301-05,1996.
- Nicholas J. W., Butland G., Cheesman M. R., Moir J. W. B.,Richardos D. J. and Spiro S. *Bioch. Biophys. Acta* 1411:456-474,1999.
- Peltola H. **Meningococcal disease: still with us.** *Rev. Infect. Dis.* 5, pp. 71-91, 1983.
- Poolman J. T., Van der Ley P. A. and Tommassen J. **Surface structures and secreted products of meningococci.** In K. Cartwright (ed.), *Meningococcal Disease*, John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp.21-24, 1995.
- Pon R. A., M. Lussier, Q.L. Yang and H.J.Jennings **N-propionylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique bactericidal capsular epitope in group B *Neisseria meningitidis*.** *Journal of Experimental Medicine*, 185(11), pp.1929-1938, 1997.
- Rokbi B., M. Mignon, G. Wilmotte, D.A. Caugant and M.J. Quentin-Millet **Evaluation of recombinant transferrin-binding protein B variants from *Neisseria meningitidis* for their ability to induce cross-reactive and bactericidal antibodies against a genetically diverse collection of serogroup B strains.** *Infection and immunity*, 65(1), pp.55-63, 1997.
- Rock J. D., Mahnane M. R., Anjum M. F., Shaw J. G., Read R. C., Moir J. W. B. **The pathogen *Neisseria meningitidis* requires oxygen, but supplements growth by denitrification. Nitrite, nitric oxide and oxygen control respiratory flux at genetic and metabolite levels.** *Mol. Microbiol.* 58: 800-809, 2005.

Rock J. D. and W. B. Moir **Microaerobic denitrification in *Neisseria meningitidis***. Bioch. Soc. Trans. 33: 134-136, 2005.

Rock J. D., Thomson M. J., Read R. C. and Moir W. B. **Regulation of denitrification genes in *Neisseria meningitidis* by nitric oxide and repressor NsrR**. J. Bacteriol., 189: 1138-1144, 2007.

Struelens M.J. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clinical microbiology and infection., 2 (1), pp.2-11, 1996.

Tzeng Y.-L., Stephens D. S. **Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis***. Micr. and Infec., 2, pp.687-700, 2000.

Zumft W. G. **Cell biology and molecular basis of denitrification**. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 533-616, 1997.

Wedge E., R. Dalseg, D.A. Caugant, J.T. Poolmann and L.O. Froholm **Expression of an inaccessible P1.7 subtype epitope of meningococcal class 1 proteins**. Journal of Medical Microbiology, 38, pp.23-28, 1993.

Webb J. L., M. W. Harvey, D. W. Holden, and T. J. Evans **Macrophage nitric oxide synthase associates with cortical actin but is not recruited to phagosomes**. Infect. Immun., 69: 6391-6400, 2001.

Woods J. P. and J. Cannon **Variation in expression of class 1 and class 5 outer membrane proteins during nasopharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis***. Infection and immunity, 58(2), pp.569-572, 1990