



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata –
Curriculum Biomedico

Metionina-aminopeptidasi di *Mycobacterium tuberculosis*:
screening di potenziali inibitori per lo sviluppo di nuove
molecole con attività antitubercolare

Relatore:

Prof. Laurent Robert Chiarelli

Correlatore:

Dr. Mario Cocorullo

Tesi di

Aurora Antinoro

Anno Accademico 2024\2025

SOMMARIO

INTRODUZIONE.....	4
1. Epidemiologia	4
1.1 <i>Variazioni geografiche e gruppi a rischio.....</i>	<i>5</i>
1.2 <i>Impatto socioeconomico e fattori di rischio.....</i>	<i>6</i>
2. Agente eziologico della tubercolosi	7
2.1 <i>Classificazione e caratteristiche generali.....</i>	<i>7</i>
2.2 <i>Struttura e organizzazione dell'involucro cellulare:</i>	<i>8</i>
3. Terapia farmacologica della tubercolosi	13
3.1 <i>Farmaci di prima linea</i>	<i>13</i>
3.2 <i>Farmaci di seconda linea e nuovi farmaci.....</i>	<i>14</i>
4. Resistenza ai farmaci in <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
4.1 <i>Definizione di tubercolosi multiresistente (MDR-TB) ed estensivamente resistente (XDR-TB)</i>	<i>15</i>
4.2 <i>Meccanismi molecolari della resistenza in Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>16</i>
5. Limiti delle terapie attuali.....	20
6. Nuovi bersagli farmacologici.....	21
6.1 <i>Identificazione dei nuovi target terapeutici</i>	<i>21</i>
6.2 <i>Approcci di drug discovery e validazione dei target in Mycobacterium tuberculosis.....</i>	<i>22</i>
7. Metionina-aminopeptidasi (MapB) di <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
7.1 <i>Caratteristiche generali e classificazione di MapB</i>	<i>25</i>
7.2 <i>Struttura e caratteristiche biochimiche di MtMetAP1c (MapB).....</i>	<i>26</i>
7.3 <i>Ruolo funzionale di MapB e confronto con MapA.....</i>	<i>28</i>
SCOPO DELLA RICERCA	30
MATERIALI E METODI	31
8. Materiali	31
8.1 <i>Attrezzatura tecnica</i>	<i>31</i>
8.2 <i>Reagenti</i>	<i>31</i>
8.3 <i>Substrati e inibitori</i>	<i>32</i>
8.4 <i>Cellule utilizzate per esprimere MetAP1c</i>	<i>32</i>
8.5 <i>Terreno di coltura e antibiotico</i>	<i>34</i>
8.6 <i>Tamponi utilizzati durante la purificazione delle proteine mediante cromatografia di affinità</i>	<i>34</i>

9. Metodi	35
9.1 Coltivazione ed espressione proteica	35
9.2 Preparazione dell'estratto cellulare grezzo	36
9.3 Purificazione di MetAP1c mediante cromatografia di affinità su metallo chelato (IMAC)	36
9.4 Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)	38
9.5 Valutazione dell'attività enzimatica di MetAP1c in presenza di cofattori metallici e inibitori	40
9.6 Effetto dei cofattori metallici	42
9.7 Screening di inibitori	42
9.8 Determinazione dell'IC50	43
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	44
10. Premessa.....	44
10.1 Espressione e purificazione di MetAP1c (MapB)	44
10.2 Effetto dei cofattori metallici sull'attività enzimatica di MetAP1c.....	47
10.3 Analisi cinetica di MetAP1c nei confronti del substrato MG-12.....	49
10.4 Saggi di inibizione di MetAP1c	50
10.5 Determinazione della IC50 dei composti selezionati	55
CONCLUSIONI.....	60
BIBLIOGRAFIA	61

INTRODUZIONE

1. Epidemiologia

La tubercolosi (TB) è una malattia infettiva trasmissibile causata dal batterio *Mycobacterium tuberculosis* e rappresenta ancora oggi una delle principali cause di mortalità a livello globale. La trasmissione avviene principalmente per via aerea, attraverso particelle rilasciate nell'aria quando una persona affetta da TB tossisce o parla. Nonostante sia una malattia prevenibile e generalmente curabile, ogni anno oltre 10 milioni di persone sviluppano la malattia e più di 1 milione muore a causa della TB, rendendola una delle principali cause di morte per malattia infettiva nel mondo (1).

Negli ultimi decenni si è osservata una riduzione graduale dell'incidenza globale, interrotta dalla pandemia di COVID-19, che ha causato ritardi nell'identificazione dei casi e compromesso gli sforzi di controllo della malattia (2,3). I dati raccolti nel 2024 mostrano che l'incidenza di TB è in continua diminuzione in regioni come il Mediterraneo orientale, il Sud-Est asiatico, l'Europa e l'Africa; mentre nelle Americhe si registra un aumento dell'incidenza per il quarto anno consecutivo, legato a ritardi nella diagnosi e alla lenta ripresa dei servizi sanitari.

I tre principali focolai di TB sono il Sud-Est asiatico (34% dei casi), il Pacifico occidentale (27%) e l'Africa (25%). A livello globale, trenta Paesi rappresentano l'87% dei casi di TB; in particolare, otto Paesi, India, Indonesia, Filippine, Cina, Pakistan, Nigeria, Repubblica Democratica del Congo e Bangladesh, da soli concentrano circa i due terzi dei casi mondiali (1).

Estimated number of incident TB cases for countries with at least 100 000 incident cases, 2024^a

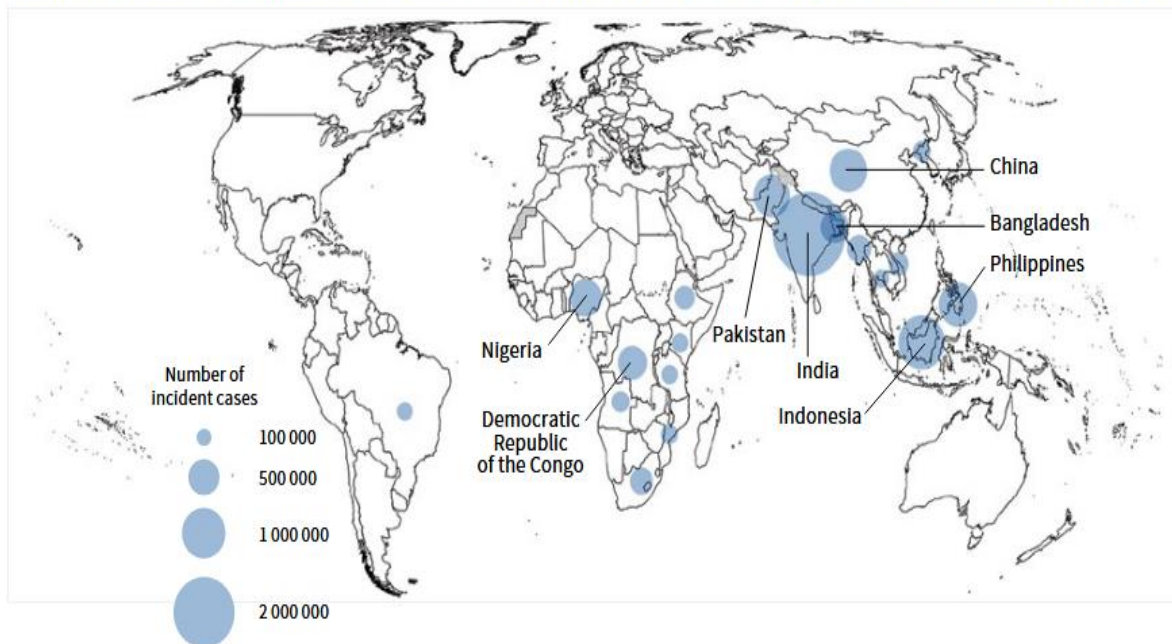


Figura. 1: I paesi indicati rappresentano gli otto che hanno cumulato due terzi del numero globale stimato di persone che hanno sviluppato la tubercolosi nel 2024 (1).

1.1 Variazioni geografiche e gruppi a rischio

La distribuzione della tubercolosi non è uniforme e tende a concentrarsi soprattutto in popolazioni socialmente ed economicamente svantaggiate, che spesso incontrano barriere nell'accesso a servizi sanitari e cure tempestive.

Tra i gruppi più a rischio rientrano persone senza fissa dimora, detenuti, rifugiati e richiedenti asilo, minatori, nomadi, persone che usano droghe e individui con HIV. In questi gruppi, la prevalenza della malattia può superare di oltre 25 volte quella della popolazione generale.

I dati disponibili mostrano differenze significative nella distribuzione della TB sia a livello geografico sia all'interno dei gruppi vulnerabili citati. Ad esempio, la prevalenza

stimata tra le persone senza fissa dimora varia da 1.100 a oltre 6.000 casi ogni 100.000 negli USA; tra i detenuti supera spesso i 2.500 casi ogni 100.000; nei rifugiati la media è di circa 1.331 casi ogni 100.000; in contesti di estrema povertà la prevalenza arriva fino a 13.512 casi ogni 100.000.

Questi dati evidenziano come la tubercolosi non sia distribuita uniformemente, ma sia strettamente influenzata da determinanti sociali, economici e comportamentali. L'accesso limitato a servizi sanitari, le condizioni di vita precarie, le disuguaglianze economiche e le abitudini di vita contribuiscono a modulare il rischio di malattia e la gravità del suo impatto nelle diverse popolazioni. Comprendere questi fattori è fondamentale per analizzare l'impatto globale della tubercolosi e per progettare interventi mirati, aprendo la strada a una valutazione più dettagliata dei fattori di rischio socioeconomici, comportamentali e metabolici che ne influenzano la diffusione e la mortalità (2).

1.2 Impatto socioeconomico e fattori di rischio

La tubercolosi colpisce più frequentemente gli uomini rispetto alle donne, con tassi di incidenza, prevalenza e mortalità più elevati. Queste differenze possono essere attribuite a fattori occupazionali e comportamentali, come l'esposizione professionale a settori a rischio (edilizia, miniere), e abitudini di vita quali fumo e consumo di alcol, più diffuse negli uomini. Inoltre, fattori culturali e sociali possono indurre gli uomini a ritardare diagnosi e trattamento, aumentando il rischio di trasmissione e di esiti avversi.

Il peso maggiore della malattia si osserva in Asia meridionale e nell'Africa subsahariana, mentre regioni come Europa occidentale e del Pacifico ad alto reddito mostrano valori significativamente inferiori (2).

Il Socio-Demographic Index (SDI), che misura il livello di sviluppo socio-economico sulla base di reddito pro capite, livello di istruzione e tasso di fertilità, dimostra essere negativamente con l'impatto della tubercolosi, indicando che paesi con livelli più elevati

di sviluppo socio-economico presentano generalmente tassi più bassi di incidenza, mortalità e anni di vita persi per disabilità (DALYs).

L'analisi per età evidenzia che la TB colpisce principalmente la popolazione in età lavorativa (15–69 anni), con un picco di prevalenza tra i 30 e i 34 anni, mentre i tassi di mortalità aumentano progressivamente con l'età.

Diversi fattori di rischio comportamentali e metabolici contribuiscono significativamente all'incidenza globale della malattia: tra i principali determinanti figurano consumo di tabacco, uso di alcol, iperglicemia, obesità e scarsa attività fisica. A livello globale, tabacco e alcol rappresentano i fattori di rischio più rilevanti, soprattutto nei Paesi a medio e medio-alto SDI. Inoltre, si osservano differenze di genere nei fattori di rischio predominanti: negli uomini il consumo di tabacco rappresenta il principale fattore associato ai DALYs correlati alla TB, mentre nelle donne assume maggiore rilevanza l'iperglicemia (3).

L'andamento globale della tubercolosi, modellato da disparità socio-economiche, differenze geografiche e comportamenti di rischio, riflette non solo le condizioni di vita delle popolazioni, ma anche le caratteristiche biologiche dell'agente eziologico, *Mycobacterium tuberculosis*, la cui capacità di persistere latentemente e di diffondersi efficacemente costituisce un fattore cruciale nella distribuzione e nel controllo della malattia.

2. Agente eziologico della tubercolosi

2.1 Classificazione e caratteristiche generali

Mycobacterium tuberculosis è un bacillo appartenente al genere *Mycobacterium* ed è l'agente eziologico della tubercolosi nell'uomo. Questo microrganismo fa parte del *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC), un gruppo di specie strettamente correlate tra loro che comprende, tra le altre, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium bovis*, anch'esse in grado di causare tubercolosi nell'uomo (1). Tra

queste, *M. tuberculosis* rappresenta il principale patogeno responsabile della maggior parte dei casi di tubercolosi a livello globale (4).

Dal punto di vista microbiologico, *M. tuberculosis* è un bacillo acido-resistente (acid-fast) e viene tradizionalmente descritto come Gram-positivo, sebbene la particolare composizione della sua parete cellulare ricca di lipidi renda la colorazione di Gram poco affidabile (1). Il batterio è, inoltre, un aerobio obbligato (4) e presenta una crescita estremamente lenta, con tempi di duplicazione significativamente più lunghi rispetto alla maggior parte dei batteri patogeni.

M. tuberculosis è un batterio intracellulare facoltativo capace di sopravvivere e replicarsi all'interno delle cellule dell'ospite, in particolare nei macrofagi (1).

Questa capacità di adattamento all'ambiente intracellulare, insieme alla sua flessibilità metabolica e alla particolare struttura del suo involucro cellulare, contribuisce alla sua notevole capacità di persistere nell'organismo umano. L'infezione da *M. tuberculosis*, infatti, può rimanere asintomatica per lunghi periodi nella maggior parte degli individui infetti e ciò riflette la complessa interazione tra il patogeno e il sistema immunitario dell'ospite.

Grazie a queste caratteristiche biologiche e alla sua capacità di adattarsi all'ospite umano, *M. tuberculosis* è considerato uno dei patogeni batterici di maggiore successo nella storia dell'umanità e continua a rappresentare una delle principali cause di mortalità per malattie infettive a livello globale (4).

2.2 Struttura e organizzazione dell'involucro cellulare:

L'involucro cellulare (cell envelope) di *M. tuberculosis* rappresenta una struttura complessa e altamente specializzata che svolge un ruolo fondamentale nella sopravvivenza del batterio e nella sua interazione con l'ospite. A differenza di molti altri batteri, l'envelope micobatterica è costituita da una struttura multilaminare che combina

caratteristiche tipiche dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi, formando una barriera altamente idrofobica e impermeabile (4).

Alla base della parete cellulare è presente uno strato di peptidoglicano (PG) che conferisce stabilità strutturale e resistenza osmotica e presenta una caratteristica modificazione strutturale in cui una parte dei residui di N-acetilmuramico sono sostituiti da N-glicolilmuramico (MurNGlyc). Questa modificazione, tipica dei micobatteri, aumenta la resistenza del peptidoglicano all'azione del lisozima, un enzima del sistema immunitario innato che idrolizza i legami glicosidici del peptidoglicano batterico. (5). Questo strato è covalentemente legato all'arabinogalattano (AG), un polisaccaride ramificato che a sua volta è esterificato con acidi micolici (MA), lunghi acidi grassi caratteristici dei micobatteri. L'insieme di queste tre componenti costituisce il complesso mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan (mAGP), che rappresenta il nucleo strutturale della parete micobatterica (6). Al di sopra del mAGP si trova la mycomembrane, una membrana esterna composta principalmente da acidi micolici legati all'arabinogalattano, che agisce come barriera di diffusione per molte molecole e contribuisce alla naturale resistenza del batterio a numerosi antibiotici e stress ambientali (6,7). La mycomembrane contiene anche lipidi polari e glicolipidi come trealosio monomicolato (TMM) e trealosio dimicolato (TDM), e proteine di trasporto e porine che permettono l'importazione di nutrienti essenziali e regolano la permeabilità della cellula (7).

Al di sopra della mycomembrane può essere presente una capsula polisaccaridica, particolarmente evidente nei micobatteri patogeni come *M. tuberculosis* (7). La capsula è costituita principalmente da glucani e D-arabino-D-mannano, con una piccola quantità di lipidi specifici della specie. Questa struttura superficiale contribuisce all'adesione alla cellula ospite, alla modulazione della risposta immunitaria e alla protezione dai danni ambientali (7).

La membrana plasmatica (PM) sottostante il peptidoglicano non è una semplice barriera: contiene fosfolipidi e proteine, tra cui glicoconjugati come fosfatidilinositoli mannosilati (PIM), lipoarabinomannani (LAM) e lipomannani (LM), e ospita sistemi di secrezione Type VII (ESX/ESAT-6) essenziali per la virulenza e la sopravvivenza intracellulare del

batterio (7). L'involucro cellulare non è una struttura statica: la sua composizione e organizzazione può variare in risposta alle condizioni ambientali e alle diverse fasi di crescita batterica. Questa dinamicità consente a *M. tuberculosis* di adattarsi ai differenti microambientanti presenti all'interno dell'ospite, facilitando la sopravvivenza intracellulare e la persistenza dell'infezione (4).

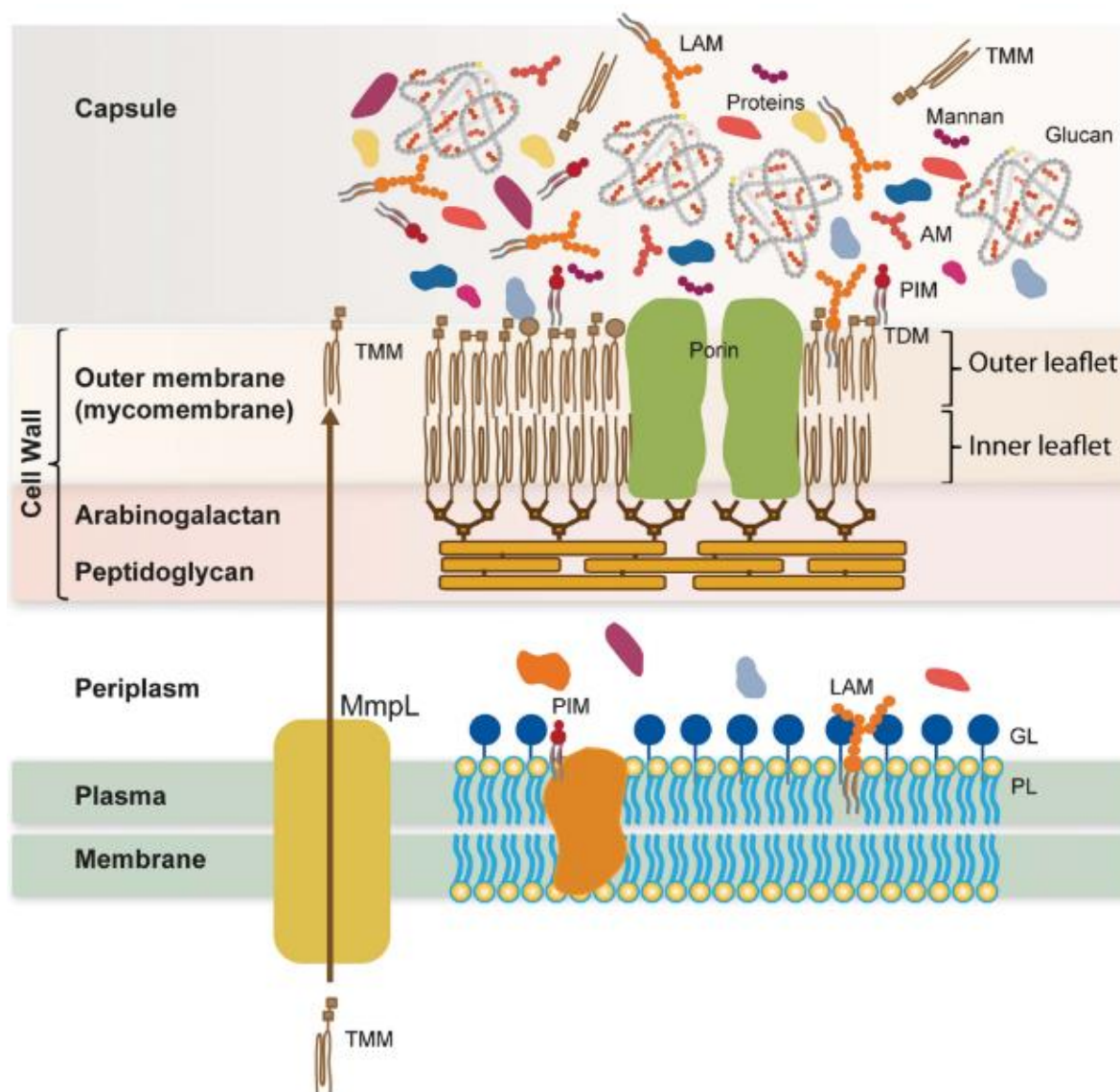


Figura. 2: Struttura schematica della cell envelope di *Mycobacterium tuberculosis*. La figura mostra i principali componenti dell'involucro cellulare micobatterico, inclusi capsula, mycomembrane ricca di acidi micolici, complesso arabinogalattano-peptidoglicano (mAGP) e membrana plasmatica (7).

2.3 Componenti di superficie e fattori di virulenza

I lipidi di superficie della parete di *M. tuberculosis* rappresentano fattori chiave di virulenza, essenziali per la sopravvivenza intracellulare, l'adesione alla cellula ospite e la modulazione della risposta immunitaria. Tra questi, il phthiocerol dimycocerosate (PDIM) è localizzato principalmente nello strato esterno della membrana e può essere secreto o rilasciato dalle cellule batteriche. Il PDIM contribuisce a mascherare i pattern molecolari associati al patogeno (PAMPs), ritardando il riconoscimento da parte dei Toll-like receptor e facilitando l'infezione attraverso il reclutamento di macrofagi non microbicidi. Inoltre, PDIM può favorire la rottura del fagosoma e l'induzione della risposta di interferone di tipo I, modulando l'immunità innata e ritardando la risposta adattativa (8,9).

I disaccaridi esterificati con acidi micolici (TDM e TMM) costituiscono componenti cruciali della membrana esterna. Il TDM, legandosi a recettori come MINCLE presenti sulle cellule immunitarie, induce la produzione di TNF- α , IL-6 e MCP-1 e promuove il reclutamento di neutrofili e macrofagi, contribuendo sia all'infiammazione sia alla persistenza intracellulare (1). TMM e TDM, insieme agli acidi micolici liberi, contribuiscono, inoltre, all'impermeabilità della membrana e supportano la sopravvivenza intracellulare nei macrofagi. La produzione di TDM è particolarmente elevata durante la fase di crescita attiva, mentre in stasi aumenta la proporzione di acidi micolici liberi, favorendo l'adattamento a infezioni croniche o subcliniche (8).

Oltre ai lipidi strutturali come TDM e TMM, la membrana citoplasmatica di *M. tuberculosis* contiene fosfatidilinositoli mannosilati (PIM), lipomannani (LM) e lipoarabinomannani (LAM), che derivano dai PIM. Questi lipidi svolgono un ruolo cruciale sia nell'integrità della parete cellulare sia nella modulazione della risposta immunitaria dell'ospite. I PIM, presenti esclusivamente negli actinomiceti, contribuiscono alla bassa permeabilità della membrana e alla tolleranza intrinseca agli

antibiotici, e rappresentano precursori dei LM e dei LAM. I LM sono polimannosilati e costituiscono la base strutturale dei LAM; la loro funzione dipende dal grado di acilazione, con forme tetra-acilate capaci di attivare i macrofagi tramite TLR2 e TLR4, mentre le forme diacilate inibiscono la produzione di ossido nitrico e di citochine nei macrofagi attivati (8).

I LAM sono glicolipidi formati dall'aggiunta di unità di arabinosio ai LM; quando contengono residui di mannosio si definiscono ManLAM.

PIM, LM e LAM si legano a recettori sulle cellule presentanti l'antigene, come MR, DC-SIGN e DCAR, influenzando la capacità del micobatterio di sfuggire alla risposta immunitaria. In particolare, ManLAM protegge i bacilli dalla distruzione fagolisosomiale nei macrofagi inibendo la maturazione e l'acidificazione del fagosoma mediante l'inibizione della PI3K e il ritardo della fusione fagosoma-lisosoma. Grazie a queste proprietà, PIM, LM e LAM contribuiscono significativamente alla virulenza di *M. tuberculosis*, facilitando l'instaurarsi dell'infezione e la sopravvivenza intracellulare (1).

Oltre ai lipidi di membrana, la virulenza di *M. tuberculosis* è strettamente legata a proteine di superficie che modulano la risposta immunitaria dell'ospite. Proteine come PE, PPE e lipoproteine interferiscono con processi cellulari chiave, tra cui la maturazione del fagosoma, l'autofagia e la morte cellulare. Il sistema di secrezione di tipo VII (ESX) è fondamentale per la patogenicità, consentendo il trasferimento di proteine dalla membrana citoplasmatica alla parete cellulare. Tra i principali effettori vi sono ESAT-6, CFP-10, EspA, EspB e EspC, oltre alle proteine della famiglia PE-PPE. In particolare, il sistema ESX-1 contribuisce al danneggiamento della membrana fagosomiale, facilitando la sopravvivenza intracellulare dei bacilli e attivando meccanismi di riparazione dell'ospite, come il reclutamento di ESCRT-III e proteine del reticolo endoplasmatico, per limitare il danno e contenere l'infezione (1,4).

In sintesi, la combinazione di lipidi di superficie, lipoglicani, sistemi di secrezione e proteine PE/PPE rende la superficie di *M. tuberculosis* estremamente adattativa,

permettendo al batterio di evadere la risposta immunitaria e sopravvivere all'interno dell'ospite, e costituisce la base per la sua virulenza e capacità di persistenza.

3. Terapia farmacologica della tubercolosi

3.1 Farmaci di prima linea

Il regime terapeutico standard per la tubercolosi farmaco-sensibile (DS-TB) prevede una fase intensiva iniziale, seguita da una fase di continuazione, per una durata complessiva di almeno sei mesi. Il trattamento si basa su una terapia farmacologica combinata che impiega più antibiotici con differenti meccanismi d'azione (10).

I farmaci di prima linea comprendono Isoniazide (INH), Rifampicina (RIF), Etambutolo (EMB) e Pirazinamide (PZA), che agiscono su bersagli distinti ma complementari (11). In particolare, l'isoniazide è un profarmaco che, una volta attivato all'interno della cellula batterica, inibisce la sintesi degli acidi micolici, componenti essenziali della mycomembrane micobatterica, compromettendo l'integrità della parete cellulare. La rifampicina agisce inibendo la RNA polimerasi DNA-dipendente, bloccando la trascrizione e quindi la sintesi di RNA. L'etambutolo interferisce con la biosintesi dell'arabinogalattano, un polisaccaride fondamentale del complesso mycolyl–arabinogalactan–peptidoglycan (mAGP), alterando ulteriormente la struttura dell'involucro cellulare (11). Infine, la pirazinamide, attiva in ambiente acido, esercita la sua azione principalmente sulle popolazioni batteriche persistenti, inibendo più processi cellulari essenziali in *M. tuberculosis*, tra cui la produzione di energia e vie metaboliche come la sintesi di pantotenato/coenzima A (12).

L'efficacia di questo regime combinato risiede nella capacità di colpire simultaneamente diversi processi essenziali per la sopravvivenza di *Mycobacterium tuberculosis*, in particolare quelli legati alla sintesi e al mantenimento dell'involucro cellulare, già descritto come uno dei principali determinanti di virulenza e resistenza intrinseca del

patogeno. Tuttavia, la necessità di trattamenti prolungati e la complessità della terapia rappresentano ancora oggi importanti criticità nella gestione della malattia, influenzando l'aderenza terapeutica e contribuendo alla comparsa di resistenze (1,10).

Nonostante l'efficacia del regime standard, in alcuni casi la terapia di prima linea non è sufficiente, soprattutto nei pazienti con ceppi resistenti alla isoniazide e alla rifampicina (MDR-TB) o a più farmaci di prima linea (XDR-TB), rendendo necessario l'impiego di farmaci di seconda linea e di nuovi farmaci (11).

3.2 Farmaci di seconda linea e nuovi farmaci

I farmaci di seconda linea e i nuovi farmaci agiscono su bersagli differenti rispetto ai farmaci di prima linea. Tra i principali vi sono i fluorochinoloni, che inibiscono la DNA girasi, enzima essenziale per la replicazione del DNA, la bedaquilina, che blocca l'ATP sintasi dei micobatteri, interferendo con il metabolismo energetico del batterio, e il delamanid, un derivato nitro-imidazolico, che interferisce con la sintesi degli acidi micolici e la respirazione cellulare (11,13,14).

Questi farmaci sono impiegati principalmente nei casi di tubercolosi resistente (MDR/XDR) e hanno permesso di migliorare l'efficacia della terapia, aumentando le possibilità di guarigione anche in pazienti con ceppi multiresistenti. Studi clinici e revisioni recenti hanno riportato che l'impiego di questi farmaci può ridurre il tempo necessario per ottenere la negativizzazione dell'eventuale carica batterica e offre opzioni terapeutiche nei casi in cui i regimi di prima linea risultano inefficaci (10,13,14). Tuttavia, la crescente diffusione di ceppi resistenti rappresenta una delle principali sfide nel trattamento della tubercolosi, rendendo necessario comprendere i meccanismi molecolari alla base della resistenza.

4. Resistenza ai farmaci in *Mycobacterium tuberculosis*

4.1 Definizione di tubercolosi multiresistente (MDR-TB) ed estensivamente resistente (XDR-TB)

La tubercolosi resistente costituisce una sfida significativa nella lotta contro *M. tuberculosis*, poiché i regimi di prima linea non risultano efficaci contro ceppi multiresistenti. La resistenza può emergere spontaneamente attraverso mutazioni genetiche nei geni bersaglio dei farmaci o essere selezionata da trattamenti incompleti o non corretti (15).

Secondo le linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, la tubercolosi multiresistente (MDR-TB) è definita come l'infezione da ceppi di *M. tuberculosis* resistenti almeno a isoniazide (INH) e rifampicina (RIF), i due farmaci più efficaci di prima linea. La tubercolosi estensivamente resistente (XDR-TB) rappresenta una forma più grave di resistenza, caratterizzata da resistenza a INH, RIF, ad almeno un fluorochinolone e a un farmaco iniettabile di seconda linea (15,16).

L'impatto della MDR/XDR-TB è significativo sia a livello clinico sia epidemiologico. Studi recenti indicano che i casi di MDR-TB costituiscono una quota consistente dei nuovi casi di tubercolosi in alcune regioni ad alta incidenza, con un aumento della mortalità e della durata dei trattamenti necessari rispetto alla tubercolosi farmaco-sensibile. La gestione clinica di questi pazienti richiede l'uso di regimi complessi di farmaci di seconda linea e nuovi farmaci, che possono ridurre la carica batterica ma sono spesso più tossici e costosi, aumentando le difficoltà di aderenza al trattamento (15).

In sintesi, la MDR/XDR-TB è definita da resistenze specifiche ai principali farmaci antitubercolari e rappresenta un problema crescente a livello globale, rendendo necessario comprendere sia la diffusione sia i meccanismi molecolari alla base della resistenza, per migliorare l'efficacia delle terapie (15,17).

4.2 Meccanismi molecolari della resistenza in Mycobacterium tuberculosis

La resistenza ai farmaci in *M. tuberculosis* è principalmente il risultato di mutazioni cromosomiche che alterano i bersagli dei farmaci o i processi necessari alla loro attivazione, piuttosto che dell'acquisizione di geni di resistenza tramite trasferimento orizzontale (18). Questa caratteristica distingue *M. tuberculosis* da molti altri patogeni batterici e riflette la sua evoluzione come microrganismo intracellulare altamente adattato all'ospite umano.

Inoltre, la bassa permeabilità dell'involucro cellulare, descritta nella sezione 2.2, insieme alla presenza di sistemi di efflusso, contribuisce a un ridotto accumulo intracellulare dei farmaci, rappresentando un importante meccanismo di resistenza intrinseca. In questo contesto, esposizioni a basse concentrazioni di antibiotico, inferiori alla concentrazione inibente minima, non sono sufficienti a eliminare il batterio, ma inducono uno stato di stress che favorisce processi adattativi. In particolare, tali condizioni possono aumentare il tasso di mutazione in diversi geni associati alla resistenza e promuovere l'attivazione di pompe di efflusso, determinando la comparsa di una resistenza fenotipica inizialmente reversibile nell'arco di pochi giorni (18,19).

Tuttavia, in presenza di una pressione farmacologica prolungata, questo stato transitorio può evolvere verso una resistenza stabile, attraverso la selezione e l'accumulo di mutazioni cromosomiche che conferiscono un vantaggio adattativo al batterio. Le basi molecolari di questo processo non sono ancora completamente chiarite, ma si ritiene che coinvolgano diversi fattori, tra cui l'aumento della mutagenesi indotta da specie reattive dell'ossigeno, la pressione selettiva esercitata dai farmaci e possibili vantaggi fisiologici associati alle mutazioni stesse, come suggerito dalla loro comparsa anche in assenza di antibiotici (18).

A livello molecolare, i principali meccanismi di resistenza agli antibiotici includono: la modificazione del bersaglio del farmaco, l'inattivazione enzimatica del farmaco e alterazioni nei sistemi di trasporto, come l'aumento dell'efflusso o la ridotta permeabilità, che limitano l'accumulo intracellulare (20,21).

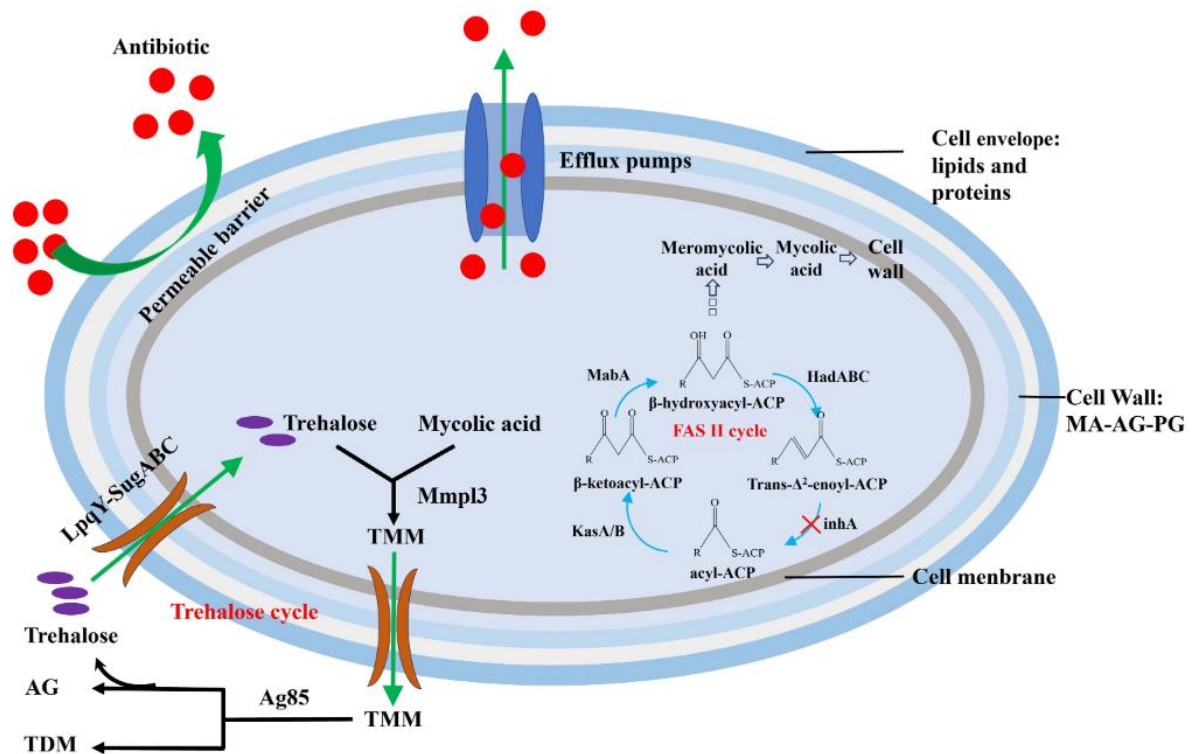


Figura. 3: Rappresentazione schematica dei principali meccanismi di resistenza in *Mycobacterium tuberculosis* (20).

- Isoniazide

La resistenza all'isoniazide è principalmente associata a mutazioni nel gene *katG*, che codifica per una catalasi-perossidasi necessaria per l'attivazione del profarmaco. In particolare, la mutazione S315T riduce l'attività enzimatica di *KatG*, impedendo la conversione dell'isoniazide nella sua forma attiva (19,22).

Un secondo meccanismo coinvolge mutazioni nel promotore o nella regione codificante del gene *inhA*, che determinano una sovraespressione o una ridotta affinità dell'enzima bersaglio, una enoil-ACP reductasi coinvolta nella sintesi degli acidi micolici (19,22).

Questi meccanismi risultano particolarmente rilevanti in relazione alla struttura dell'envelope micobatterico, poiché interferiscono direttamente con la biosintesi degli

acidi micolici, componenti fondamentali della mycomembrane descritta nella sezione 2.2.

- Rifampicina

La resistenza alla rifampicina è prevalentemente dovuta a mutazioni nel gene *rpoB*, che codifica per la subunità β della RNA polimerasi DNA-dipendente. Tali mutazioni si concentrano in una regione altamente conservata nota come rifampicin resistance determining region (RRDR) e determinano una ridotta affinità del farmaco per il suo bersaglio (23).

Poiché la rifampicina rappresenta uno dei farmaci più efficaci nella terapia antitubercolare, la resistenza alla rifampicina porta a un numero maggiore di fallimenti terapeutici e decessi rispetto alla resistenza a qualsiasi altro farmaco. La comparsa di mutazioni in *rpoB* è considerata un marker chiave di tubercolosi multiresistente (19).

- Pirazinamide

La resistenza alla pirazinamide è associata principalmente a mutazioni nel gene *pncA*, che codifica per una pirazinamidasi responsabile della conversione del profarmaco nella sua forma attiva, l'acido pirazinoico (24).

Mutazioni in *pncA* determinano una perdita o riduzione dell'attività enzimatica, impedendo l'attivazione del farmaco. Questo meccanismo è particolarmente rilevante considerando che la pirazinamide agisce su popolazioni batteriche persistenti, contribuendo alla durata prolungata della terapia (18,19).

- Etambutolo

La resistenza all'etambutolo è principalmente correlata a mutazioni nel gene *embB*, coinvolto nella biosintesi dell'arabinogalattano. Tali mutazioni alterano l'attività dell'arabinosil transferasi, impedendo la formazione del complesso micolil-

arabinogalattano-peptidoglicano, che contribuisce ad aumentare la permeabilità della parete cellulare, riducendo l'efficacia del farmaco (19,25).

Anche in questo caso, il meccanismo di resistenza è strettamente connesso alla struttura del complesso mAGP, evidenziando come l'involucro cellulare rappresenti un bersaglio centrale sia per l'azione farmacologica sia per l'insorgenza di resistenza.

- Fluorochinoloni

La resistenza ai fluorochinoloni è associata più comunemente a mutazioni nei geni *gyrA* e *gyrB*, che codificano per le subunità della DNA girasi. Queste mutazioni riducono il legame del farmaco con l'enzima, compromettendo la sua capacità di inibire la replicazione del DNA (18,26).

- Nuovi farmaci

Per quanto riguarda i nuovi farmaci, la resistenza alla bedaquilina è stata associata principalmente a mutazioni nel gene *atpE*, che codifica per la subunità c dell'ATP sintasi micobatterica, localizzata nella regione di membrana FO e coinvolta nella traslocazione protonica e nella rotazione del complesso enzimatico. Un altro meccanismo di resistenza è dato da mutazioni nel gene regolatore *Rv0678*, che codifica per il repressore *MmpR*, influenzando la trascrizione delle proteine *MmpL5* e *MmpS5*, che insieme costituiscono la pompa di efflusso *MmpL5-MmpS5* (21,27).

Il delamanid è un profarmaco che richiede attivazione bioreducente da parte della nitroreduktasi Ddn dipendente dal cofattore F420. La resistenza al farmaco è associata a mutazioni nei geni coinvolti in questo processo, tra cui *ddn*, *fgd1* e i geni della biosintesi del cofattore F420 (*fbiA-D*), che compromettono l'attività enzimatica necessaria per l'attivazione del farmaco. (28).

Farmaco	Gene/i coinvolto/i	Meccanismo di resistenza
Isoniazide	<i>katG, inhA</i>	Ridotta attivazione del profarmaco / modifiche del target
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Mutazioni nella RNA polimerasi β , ridotto legame del farmaco
Pirazinamide	<i>pncA</i>	Mancata attivazione del profarmaco
Etambutolo	<i>embB</i>	Alterazione della parete cellulare (arabinosil transferasi)
Fluorochinoloni	<i>gyrA, gyrB</i>	Mutazioni nella DNA girasi, ridotto legame del farmaco
Bedaquilina	<i>atpE, Rv0678</i>	Mutazioni ATP sintasi / regolatore MmpR e pompe di efflusso
Delamanid	<i>ddn, fgd1, fbiA-D</i>	Ridotta attivazione bioreducente del profarmaco

Figura. 4: Farmaci antitubercolari di prima, seconda linea e nuovi farmaci, con indicazione dei geni coinvolti nella loro attivazione e nei meccanismi di resistenza.

5. Limiti delle terapie attuali

Il trattamento della tubercolosi presenta numerose limitazioni. In primo luogo, la durata prolungata della terapia rappresenta un ostacolo significativo: mentre la tubercolosi farmaco-sensibile richiede almeno 6 mesi con farmaci di prima linea, le forme resistenti possono necessitare regimi estesi fino a 18–24 mesi, spesso con l'impiego di farmaci aggiuntivi (14,29).

A questa criticità si aggiunge la tossicità dei farmaci, in particolare quelli di seconda linea, associata a effetti avversi rilevanti quali epatotossicità, nefrotossicità e ototossicità, che possono compromettere la continuità del trattamento (30).

La combinazione di lunga durata e tossicità contribuisce a una scarsa aderenza. L'aderenza non si limita alla percentuale di dosi assunte, ma comprende: (a) l'inizio della terapia, ossia l'assunzione della prima dose; (b) l'implementazione corretta del regime terapeutico nel tempo; (c) la persistenza, ovvero la continuità della terapia senza interruzioni. L'aderenza è riconosciuta come uno dei principali fattori di fallimento terapeutico e di sviluppo di resistenza ai farmaci (29).

Un ulteriore elemento critico è rappresentato dalla cosiddetta “forgiveness” del farmaco, cioè la capacità di mantenere efficacia anche in presenza di irregolarità nell'assunzione. Studi recenti hanno dimostrato che i regimi attuali per la tubercolosi sono molto meno “forgiving” di quanto si ritenesse in precedenza (29).

Inoltre, i regimi per la tubercolosi resistente risultano significativamente più complessi e costosi rispetto a quelli standard, fino a 25 volte più elevati. Nonostante l'impiego di terapie avanzate, i tassi di successo rimangono limitati, con ~56% nei casi di MDR-TB, valori più bassi in alcune aree ad alta incidenza (India, Indonesia, Mozambico, Ucraina) e ancora inferiori nelle forme XDR (30).

Nel complesso, questi limiti evidenziano la necessità di identificare nuovi bersagli farmacologici e sviluppare strategie terapeutiche più efficaci e sostenibili (30).

6. Nuovi bersagli farmacologici

6.1 Identificazione dei nuovi target terapeutici

Negli ultimi anni, la crescente diffusione di ceppi resistenti ha evidenziato i limiti dei bersagli farmacologici tradizionali, principalmente associati alla sintesi della parete cellulare e ai processi di replicazione e trascrizione. Di conseguenza, la ricerca si è orientata verso l'identificazione di nuovi bersagli molecolari essenziali per la sopravvivenza del batterio, sfruttando approcci basati sul sequenziamento del genoma e sullo screening di proteine indispensabili tramite strategie target-based e chemogenomiche (31).

I nuovi target terapeutici includono proteine coinvolte nella sintesi e nel mantenimento della parete cellulare (ad es. InhA, DprE1, MmpL3), enzimi chiave del metabolismo energetico (ATP sintasi, NDH-2, complesso bc1), trasportatori lipidici e fattori essenziali per la crescita e la divisione batterica (ad es. FtsZ, Clp proteasi). Questi bersagli offrono opportunità per lo sviluppo di farmaci contro ceppi MDR/XDR di *M. tuberculosis* (32). L'identificazione di nuovi bersagli farmacologici richiede approcci sistematici in grado di determinare quali geni siano realmente essenziali per la sopravvivenza di *M. tuberculosis* nelle diverse condizioni dell'infezione (33).

6.2 Approcci di drug discovery e validazione dei target in Mycobacterium tuberculosis

La scoperta di nuovi farmaci contro *M. tuberculosis* rappresenta una sfida cruciale, a causa della capacità del patogeno di adattarsi a diversi microambienti durante l'infezione. Questo adattamento comporta profondi cambiamenti metabolici, rendendo complessa l'identificazione di bersagli farmacologici realmente efficaci (33).

I primi approcci volti a identificare geni essenziali si basavano sull'uso di microarray o sul sequenziamento convenzionale per mappare i siti di inserzione dei trasposoni in librerie di mutanti casuali, al fine di individuare regioni del genoma incapaci di tollerare mutazioni. Tuttavia, tali metodiche presentano importanti limitazioni: i microarray non consentono una mappatura precisa dei siti di inserzione, mentre il sequenziamento convenzionale, pur essendo più accurato, risulta complesso e costoso quando applicato a librerie di grandi dimensioni, necessarie per un'identificazione affidabile dei geni essenziali. Inoltre, nessuno di questi approcci permette un confronto quantitativo accurato della composizione dei pool di mutanti su un ampio intervallo dinamico (33).

Recentemente, l'introduzione di tecniche di genomica funzionale basate su mutagenesi con trasposoni combinata al sequenziamento ad alta profondità ha permesso di identificare in modo diretto e sistematico i geni essenziali per i processi vitali del batterio (33). Questi approcci consentono anche la validazione funzionale dei target, confrontando la crescita dei mutanti in vitro e in modelli animali per distinguere i geni

realmente indispensabili durante l'infezione. L'analisi temporale rivela inoltre che la necessità di alcuni geni può cambiare nelle diverse fasi dell'infezione, riflettendo le diverse condizioni metaboliche e gli stress cui il batterio è sottoposto nell'ospite (34).

Un ulteriore vantaggio di queste tecniche è l'identificazione di geni specifici dei micobatteri, potenzialmente selettivi per nuovi farmaci in quanto non presenti nell'ospite umano (34).

L'identificazione di geni essenziali mediante questi approcci rappresenta il punto di partenza per lo sviluppo di strategie di drug discovery target-based. I progressi nelle tecniche genomiche, inclusi studi di whole genome sequencing (WGS), hanno migliorato la comprensione della biologia e della patogenicità di *M. tuberculosis*, facilitando l'individuazione di nuovi bersagli farmacologici. Nonostante ciò, meno dello 0,5% delle proteine del batterio è attualmente sfruttato a fini terapeutici, evidenziando l'ampio potenziale di target ancora inesplorati (35).

La scoperta di nuovi farmaci può seguire due principali strategie: l'approccio target-to-drug e l'approccio drug-to-target. Nel primo caso, i composti vengono sviluppati o selezionati per inibire uno specifico bersaglio molecolare precedentemente identificato, generalmente scelto sulla base della sua essenzialità per la sopravvivenza batterica e dell'assenza di omologhi nell'ospite umano. Questo approccio consente una caratterizzazione dettagliata del meccanismo d'azione e una progettazione razionale dei composti. Tuttavia, uno dei principali limiti risiede nel fatto che l'attività osservata in saggi biochimici in vitro non si traduce necessariamente in efficacia su cellule intere, principalmente a causa della scarsa permeabilità dell'involucro micobatterico e della presenza di sistemi di efflusso, contribuendo all'elevato tasso di fallimento di questa strategia (35).

Al contrario, l'approccio drug-to-target si basa sull'identificazione di composti attivi direttamente su cellule batteriche, garantendo fin dalle fasi iniziali la loro efficacia in un contesto biologico rilevante. Tuttavia, in questo caso il bersaglio molecolare deve essere identificato successivamente, un processo spesso complesso che può portare alla

frequente individuazione di inibitori diretti verso un numero limitato di bersagli “promiscui” (35).

Alla luce dei limiti intrinseci di entrambi gli approcci, negli ultimi anni si è affermata la tendenza a integrare strategie target-to-drug e drug-to-target, combinando l’identificazione razionale dei bersagli con lo screening fenotipico, al fine di aumentare l’efficienza del processo di drug discovery e accelerare lo sviluppo di nuovi agenti antitubercolari (35). L’integrazione tra approcci genomici per l’identificazione dei target e strategie di screening farmacologico rappresenta un passaggio fondamentale per lo sviluppo di nuovi farmaci. (34,35). In questo contesto, la caratterizzazione strutturale e funzionale di enzimi essenziali, insieme all’identificazione di inibitori selettivi, costituisce un passo cruciale per valutarne il reale potenziale come target farmacologico, anticipando lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate.

7. Metionina-aminopeptidasi (MapB) di *Mycobacterium tuberculosis*

Alla luce della necessità di identificare nuovi bersagli farmacologici per *M. tuberculosis*, l’attenzione si è recentemente rivolta verso enzimi coinvolti in processi cellulari essenziali, come la maturazione proteica. In questo contesto, le metionina-aminopeptidasi (MetAP) rappresentano un sistema di particolare interesse, in quanto responsabili della rimozione co-traduzionale della metionina N-terminale, un processo fondamentale per la corretta funzione di numerose proteine cellulari (36,37).

Tra queste, la metionina-aminopeptidasi MapB di *M. tuberculosis* ha suscitato crescente interesse come potenziale bersaglio terapeutico. Studi genetici indicano che MapB è essenziale per la sopravvivenza batterica; tuttavia, il suo ruolo funzionale non è ancora completamente definito, anche a causa della parziale ridondanza con l’isoenzima MapA (37).

Questa incertezza, insieme alla centralità del processo di maturazione proteica, rende necessario un approfondimento delle caratteristiche strutturali e funzionali di MapB, nonché una valutazione più accurata del suo potenziale come target farmacologico (37).

7.1 Caratteristiche generali e classificazione di MapB

La proteina MapB (Methionine Aminopeptidase B) appartiene alla famiglia delle metionina-aminopeptidasi (MetAP), una classe di metalloproteasi coinvolte nella rimozione della metionina N-terminale dalle proteine neo-sintetizzate. Questo processo co-traduzionale, altamente conservato, è essenziale per la corretta maturazione, localizzazione e funzione di numerose proteine cellulari (36,37).

Le MetAP sono ubiquitariamente presenti nei tre domini della vita (batteri, archea ed eucarioti) e si suddividono in due principali classi evolutive, MetAP1 e MetAP2. Queste differiscono sia per la presenza di un inserto nel dominio catalitico sia per la loro distribuzione filogenetica. Entrambe le classi appartengono alla famiglia delle metallo-idrolasi dinucleari e richiedono ioni metallici bivalenti come cofattori per la loro attività enzimatica (37,38).

Nella maggior parte dei procarioti è presente un unico isoenzima MetAP: gli eubatteri possiedono generalmente MetAP di tipo 1, mentre gli archea presentano prevalentemente MetAP di tipo 2. La presenza di più isoforme nello stesso organismo è relativamente rara; tuttavia, *M. tuberculosis* rappresenta un'eccezione, in quanto possiede due geni che codificano per metionina-aminopeptidasi di tipo 1, *mapA* e *mapB*. Questi codificano rispettivamente per le isoforme MtMetAP1a e MtMetAP1c, entrambe omologhe alla MetAP di *E. coli* (37).

MapB, corrispondente all'isoforma MtMetAP1c, è una metallo-proteasi essenziale coinvolta nei processi di maturazione proteica del batterio. Sebbene condivida la stessa funzione biochimica generale con l'isoenzima MapA, evidenze genetiche e funzionali

indicano che le due proteine non sono completamente equivalenti, suggerendo una specializzazione funzionale all'interno della cellula micobatterica (36,37).

Nel complesso, la presenza di due isoforme di MetAP in *M. tuberculosis* rappresenta una peculiarità rispetto alla maggior parte dei procarioti e suggerisce un ruolo particolarmente rilevante di questi enzimi nei processi di crescita e sopravvivenza del patogeno. In particolare, MapB emerge come un elemento chiave nella maturazione proteica e come potenziale bersaglio farmacologico, alla luce della sua importanza funzionale e della sua specificità rispetto alle controparti dell'ospite (36,37).

7.2 Struttura e caratteristiche biochimiche di MtMetAP1c (MapB)

MtMetAP1c (MapB) è una metionina aminopeptidasi metallo-dipendente la cui attività catalitica richiede la presenza di ioni metallici bivalenti. L'enzima, purificato come apoenzima privo di metallo, può essere attivato in vitro da diversi cationi, tra cui Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} e Fe^{2+} . Tra questi, Co^{2+} e Fe^{2+} mostrano la maggiore affinità di legame, mentre Ni^{2+} è associato al più elevato rendimento catalitico in condizioni sperimentali. Tuttavia, studi condotti in un sistema cellulare eterologo (*E. coli*) indicano che MtMetAP1c utilizza preferenzialmente Fe^{2+} come cofattore funzionale, suggerendo che l'enzima seleziona il metallo più disponibile nel contesto cellulare (37).

Dal punto di vista strutturale, MtMetAP1c presenta il caratteristico fold "pita-bread", tipico delle metionina-aminopeptidasi, che definisce l'architettura del dominio catalitico. Il sito attivo è localizzato in una tasca superficiale e contiene un centro dinucleare costituito da due ioni metallici, coordinati da residui amminoacidici altamente conservati nelle metionina-aminopeptidasi, coinvolti nella coordinazione dei metalli nel sito attivo (37,39).

Questa organizzazione è essenziale per l'attività catalitica e per il corretto posizionamento del substrato, in particolare della metionina N-terminale e del residuo penultimo, che determinano la specificità enzimatica (37,39).

La tasca del sito attivo è prevalentemente idrofobica e mostra una notevole plasticità conformazionale. Studi strutturali hanno evidenziato che il legame di diversi inibitori induce riarrangiamenti locali dei residui del sito attivo, permettendo l'adattamento a ligandi di dimensioni e caratteristiche chimiche differenti. Questa flessibilità contribuisce alla capacità dell'enzima di interagire con una varietà di molecole, ma rappresenta al contempo una sfida per lo sviluppo di inibitori altamente selettivi (37).

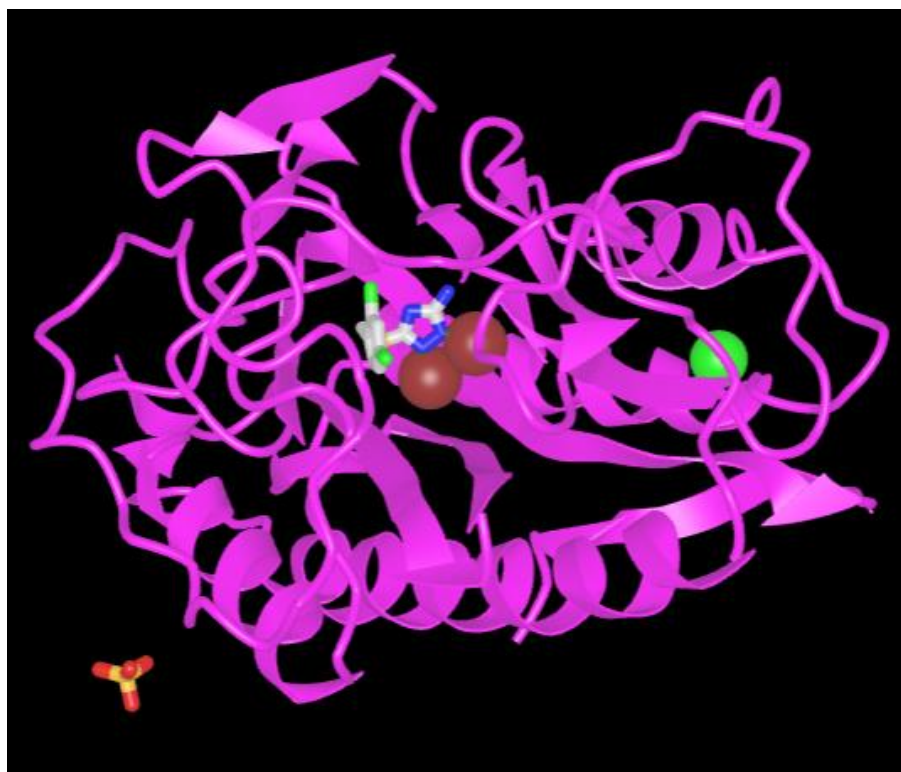


Figura. 5: Struttura tridimensionale di MtMetAP1c (MapB) di *Mycobacterium tuberculosis*: rappresentata in modalità cartoon (viola). Il sito attivo contiene due ioni Ni^{2+} (sfere marroni) che costituiscono il centro catalitico dinucleare. Un inibitore (T07, in grigio, blu e verde) è localizzato in prossimità del sito attivo e rappresenta un esempio di legame ligando-enzima (PDB: 3IU9 <https://www.rcsb.org/3d-view/3IU9>).

Nonostante l'elevata conservazione del dominio catalitico tra le MetAP, inclusi gli enzimi umani MetAP1 e MetAP2, esistono differenze strutturali nelle regioni circostanti il sito attivo che possono essere sfruttate per la progettazione di inibitori selettivi. In particolare, variazioni nella conformazione della tasca superficiale e nella coordinazione dei metalli offrono opportunità per discriminare tra enzimi micobatterici e umani, riducendo il rischio di effetti off-target (39).

Nel complesso, le caratteristiche strutturali e biochimiche di MtMetAP1c evidenziano come questo enzima rappresenti un bersaglio farmacologico promettente. La combinazione di essenzialità per la sopravvivenza batterica, metallo-dipendenza e plasticità del sito attivo fornisce una base razionale per lo sviluppo di nuovi inibitori mirati contro *M. tuberculosis* (36,37,39).

7.3 Ruolo funzionale di MapB e confronto con MapA

Studi genetici mirati hanno chiarito le differenze funzionali tra mapA e mapB in *M. tuberculosis*. In particolare, la delezione completa del gene mapA risulta compatibile con la sopravvivenza batterica, determinando solo un lieve difetto di crescita durante la fase esponenziale, indicando che mapA è dispensabile per la vitalità cellulare. Al contrario, tentativi di eliminare mapB hanno dimostrato che questo gene è essenziale: la sua delezione è possibile solo in presenza di una copia complementare, mentre la sua completa rimozione determina l'assenza di crescita batterica (36).

Ulteriori evidenze indicano che, sebbene esista una certa ridondanza funzionale tra i due isoenzimi, questa è solo parziale. Studi su mutanti doppi e su varianti di mapB con attività enzimatica ridotta hanno mostrato che livelli molto bassi di attività di MapB sono sufficienti a sostenere la crescita solo in presenza di mapA. In assenza di quest'ultimo, tali livelli risultano insufficienti a garantire la sopravvivenza batterica, evidenziando il ruolo predominante di MapB (36).

Dal punto di vista strutturale, una differenza rilevante tra le due proteine è rappresentata dalla presenza, in MapB, di un'estensione N-terminale di circa 40 amminoacidi, assente in MapA, che è stata proposta come elemento coinvolto nell'interazione con il ribosoma. Questa caratteristica suggerisce un ruolo più diretto di MapB nei processi co-traduzionali, contribuendo a spiegare la sua essenzialità rispetto all'isoenzima MapA (36,37).

Nel complesso, questi dati indicano che, pur condividendo la stessa funzione biochimica di rimozione della metionina N-terminale, le due isoforme non sono funzionalmente equivalenti. MapB rappresenta la principale attività MetAP necessaria per la vitalità di *M. tuberculosis*, mentre MapA svolge un ruolo accessorio e solo parzialmente compensatorio (36).

SCOPO DELLA RICERCA

L'obiettivo generale della ricerca in cui si inserisce questa tesi è l'identificazione di nuovi farmaci antitubercolari efficaci contro ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* multi-resistenti, per i quali la maggior parte dei trattamenti attualmente disponibili risulta inefficace.

In particolare, il presente lavoro si concentra sullo studio della proteina MapB, una metionina-aminopeptidasi essenziale per la sopravvivenza del batterio, con l'obiettivo di valutarne il potenziale come bersaglio farmacologico per lo sviluppo di nuovi agenti antimicrobici.

A tal fine, l'enzima ricombinante è stato prodotto in *Escherichia coli* e purificato mediante cromatografia di affinità. Successivamente, sono stati valutati alcuni parametri dell'enzima, utili per la messa a punto di un saggio di attività ottimale per lo studio di potenziali inibitori.

In particolare, è stato utilizzato un substrato artificiale fluorescente (MG-12), per il quale è stata determinata la Km. Inoltre sono stati eseguiti saggi di attività enzimatica in presenza di diversi cofattori metallici, per verificare quale fosse quello preferito dall'enzima.

Messe a punto le condizioni ideali per il saggio, è stata testata una piccola libreria di derivati dell'acido picolinico, per verificare il potenziale di questo scaffold come inibitore dell'enzima.

Le molecole sono state testate inizialmente ad una concentrazione fissa, quindi per quelle risultate più efficaci è stata determinata la concentrazione necessaria a ridurre del 50% l'attività dell'enzima (IC50), al fine di valutare la sua efficacia come possibile composto farmacologico.

Questo approccio sperimentale permette di individuare sia i metalli più adatti a sostenere l'attività enzimatica di MapB, sia eventuali molecole in grado di inibirla, fornendo informazioni fondamentali per lo sviluppo di nuovi inibitori antitubercolari.

MATERIALI E METODI

8. Materiali

8.1 *Attrezzatura tecnica*

- Centrifuga da banco B4 (Jouan);
- Collettore di frazioni modello 2110 (Bio-Rad);
- Colonna cromatografica di affinità HisTrap da 1 mL (GE Healthcare);
- Concentratori Amicon® Ultra-10 mL; (Millipore);
- Incubatrice agitatrice Innova 43 (New Brunswick Scientific);
- Pompa peristaltica miniplus 2 (Gilson);
- Sonicatore Soniprep 150 (MSE);
- Spettrofotometro DS-C (Denovix);
- Spettrofluorimetro QFX (Denovix);
- Ultracentrifuga Avanti JXN-26 (Beckman Coulter);
- Tubi per dialisi (Sigma-Aldrich)
- Bilancia analitica
- pHmetro

8.2 *Reagenti*

Tamponi fosfato (K_2HPO_4 , KH_2PO_4), Cloruro di sodio (NaCl), Cloruro di potassio (KCl), Tris-HCl, Glicina, Sodio dodecil solfato (SDS), Metanolo, Acido acetico della PanReac,

Isopropil β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG), Ampicillina, Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), Imidazolo, Terreno di coltura LB (Luria-Bertani), Acrilammide/bis-acrilammide, Ammonio persolfato (APS), TEMED, Blu di bromofenolo, β -mercaptoetanolo, Coomassie Brilliant Blue R250. Cloruro di calcio (CaCl_2), Cloruro di magnesio (MgCl_2), Cloruro di ferro (FeCl_3), Solfato di ferro (FeSO_4), Cloruro di cobalto (CoCl_2), Solfato di rame (CuSO_4), Cloruro di manganese (MnCl_2), Solfato di nichel (NiSO_4), della Sigma-Aldrich

La proteasi TEV è stata preparata precedentemente in laboratorio.

8.3 Substrati e inibitori

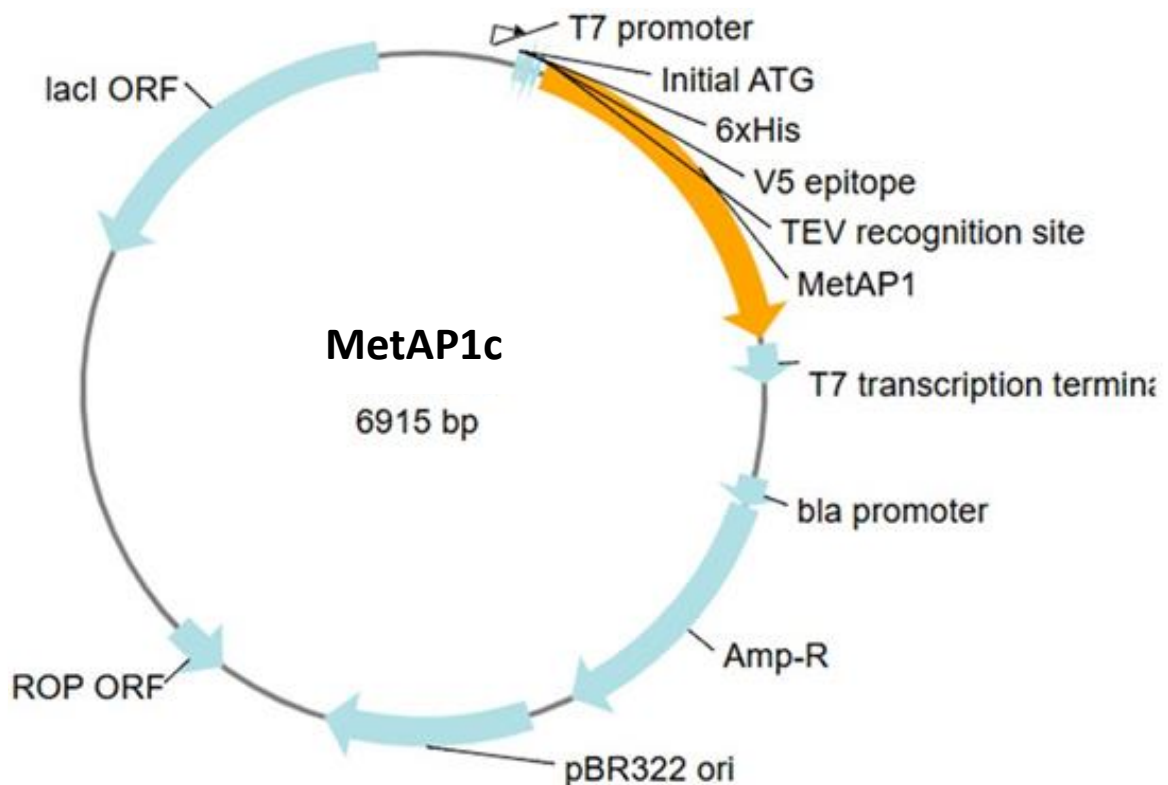
Gli inibitori (3S50, 3S55, 3S60, 3S61, EP4, EP5, EP5F, MB2, MB3, MB4, MB5, MAT2, MAT4, MAT5, MAT6, MAT7, CQ) e il substrato sintetico di MetAP1c MG-12 sono stati sintetizzati presso il MedChemLab della Prof.ssa Villa (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli studi di Milano).

8.4 Cellule utilizzate per esprimere MetAP1c

Per l'espressione della proteina MetAP1c sono state utilizzate cellule di *Escherichia coli* BL21 (DE3), trasformate con il plasmide pET151_D_Tar contenente il gene mapB, precedentemente prodotto in laboratorio.

Questo plasmide utilizza un sistema di espressione a due stadi, basato sull'impiego della RNA polimerasi del fago T7, regolata da un promotore Lac inducibile con lattosio /IPTG. Infatti, solo in presenza di questi induttori, la RNA polimerasi virale verrà sintetizzata e potrà legarsi al promotore T7 presente nel plasmide, avviando la trascrizione del gene target.

Il cDNA della proteina è stato inserito nel plasmide a valle del promotore specifico per la RNA polimerasi T7. Inoltre, il vettore presenta due sequenze posizionate a monte del sito di clonaggio, al fine di produrre MetAP1c in forma di proteina di fusione per facilitarne la purificazione. A monte del sito di clonaggio, all'estremità N-terminale, è presente un dominio di sei istidine (6xHis tag) per la purificazione tramite colonne di affinità, e una sequenza di riconoscimento per la proteasi TEV, la quale serve per l'eventuale rimozione del tag. Infine, essendo un vettore d'espressione, deve essere presente un gene che codifica per una resistenza, in questo caso all'ampicillina (gene Amp), il quale consente la selezione delle cellule trasformate attraverso l'uso dell'antibiotico.



Vettore d'espressione pET151-MetAP1c

8.5 Terreno di coltura e antibiotico

Il terreno utilizzato per la crescita delle cellule trasformate di *E. coli* è il brodo Luria-Bertani (LB). È un terreno ricco di nutrienti, comunemente impiegato per la coltivazione di Enterobacteriaceae, costituito da triptone ed estratto di lievito. Il terreno LB può inoltre contenere concentrazioni variabili di NaCl, a seconda dell'applicazione specifica e della tipologia di LB utilizzata. La composizione del terreno LB impiegato nel presente lavoro è la seguente:

- Triptone (Becton-Dickinson) 10 g/L
- Estratto di lievito (Becton-Dickinson) 5 g/L
- NaCl 10 g/L
- Acqua Milli-Q 1 L

Il brodo LB è stato preparato in beute da 5 L con un volume finale di 1 L per beuta e sterilizzato in autoclave a 118 °C per circa 20 minuti.

Per selezionare le cellule trasformate, nel terreno LB liquido è stata aggiunta ampicillina. La soluzione madre di ampicillina, a concentrazione 100 mg/mL, è stata conservata a -20 °C e aggiunta al brodo LB in rapporto 1:1000, ottenendo una concentrazione finale di 100 µg/mL. L'aggiunta dell'antibiotico è stata effettuata alla fiamma, in modo da garantire la sterilità ed evitare contaminazioni.

8.6 Tamponi utilizzati durante la purificazione delle proteine mediante cromatografia di affinità

Per la purificazione della proteina tramite cromatografia di affinità, sono stati utilizzati diversi buffer, le cui composizioni chimiche sono riportate di seguito:

- Buffer A: 50 mM potassio fosfato (KPi) pH 8.0, 500 mM KCl;

- Buffer B: 50 mM KPi pH 8.0, 500 mM KCl, 20 mM imidazolo (ImOH);
- Buffer B1: 50 mM KPi pH 8.0, 500 mM KCl, 500 mM ImOH;
- Buffer C: 50 mM KPi pH 8.0, 150 mM KCl.

Il tampone fosfato di potassio (KPi) è comunemente utilizzato per mantenere stabile il pH durante la purificazione proteica. L'imidazolo è impiegato per eluire proteine legate alle colonne cromatografiche contenenti resina che lega specificamente l'His-tag delle proteine, mentre la concentrazione di KCl regola la forza ionica dei buffer.

9. Metodi

9.1 Coltivazione ed espressione proteica

Le cellule di *Escherichia coli* BL21 (DE3), precedentemente trasformate con il plasmide pET151_D_Tar contenente il gene mapB, sono state coltivate in beute da 5 L riempite con 1 L di terreno liquido LB. Il terreno è stato sterilizzato in autoclave e, dopo il raffreddamento, è stato aggiunto l'antibiotico ampicillina alla concentrazione finale di 100 µg/mL, sufficiente a selezionare le cellule trasformate e prevenire la crescita di contaminanti.

Le cellule sono state inoculate nelle beute principali in proporzione 1:50 e incubate a 37°C con agitazione a 160 rpm fino al raggiungimento di una densità ottica (OD600) compresa tra 0,6 e 0,8, corrispondente alla fase logaritmica di crescita, in cui le cellule presentano un'elevata attività metabolica e una maggiore capacità di sintesi proteica. A questo punto, l'espressione della proteina è stata indotta mediante aggiunta di IPTG, direttamente nelle beute in incubatore, alla concentrazione finale di 0,5 mM.

Dopo l'induzione, la temperatura è stata impostata a 25 °C e le colture sono state incubate overnight per consentire la produzione della proteina ricombinante. Al termine dell'espressione, le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 4.000 x g per

20 minuti a 4°C e il pellet cellulare è stato suddiviso in aliquote da circa 10 g e conservato a -20°C fino al momento della purificazione.

9.2 Preparazione dell'estratto cellulare grezzo

Il pellet cellulare raccolto al termine dell'espressione di MetAP1c è stato risospeso in Buffer A (50 mM di KPi pH 8.0, 500 mM KCl) contenente PMSF 1 mM, un inibitore delle proteasi. Il PMSF è stato aggiunto immediatamente prima della sospensione delle cellule per proteggere MetAP1c dalle proteasi rilasciate durante la lisi cellulare.

Le cellule risospese sono state lisate mediante sonicazione, eseguendo 6 cicli di 30 secondi ciascuno, alternati a pause di 1 minuto e 30 secondi, al fine di evitare il surriscaldamento che potrebbe denaturare la proteina.

Il lisato cellulare è stato sottoposto a centrifugazione a 50.000 x g per 20 minuti a 4°C, al fine di rimuovere i detriti cellulari. Il surnatante ottenuto, contenente la proteina solubile, è stato raccolto e avviato alla successiva purificazione mediante cromatografia di affinità.

9.3 Purificazione di MetAP1c mediante cromatografia di affinità su metallo chelato (IMAC)

Le proteine dotate di His-tag possono essere purificate mediante cromatografia di affinità su metallo immobilizzato (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC). Questa tecnica utilizza come fase stazionaria una resina a cui sono coordinati ioni bivalenti di metalli di transizione. La sequenza di istidine (His-tag) presenta un'elevata affinità per tali ioni, poiché l'anello imidazolico della catena laterale dell'istidina è in grado di formare legami di coordinazione con essi; tra i metalli, il nichel (Ni²⁺) è quello più comunemente impiegato.

Le proteine legate alla resina vengono successivamente eluite mediante l'aggiunta di imidazolo ad alta concentrazione nella fase mobile, il quale compete con le istidine per il legame con gli ioni metallici della fase stazionaria, determinando il distacco della proteina.

Il pellet cellulare contenente MetAP1c solubile, ottenuto dalla preparazione dell'estratto grezzo, è stato caricato su una colonna HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare), precedentemente equilibrata con Buffer A (50 mM KPi pH 8.0, 500 mM KCl). La proteina con His-tag si lega agli ioni nichel immobilizzati sulla resina di affinità della colonna.

Successivamente, la colonna è stata lavata con Buffer B, contenente una bassa concentrazione di imidazolo (20 mM), al fine di rimuovere proteine legate in modo aspecifico con bassa affinità alla resina e che non possiedono il tag di His. L'eluizione della proteina di interesse è stata effettuata con Buffer B1, contenente imidazolo ad alta concentrazione (500 mM) per staccare quelle proteine che mostrano elevata affinità per la resina, tra cui MapB. Il flusso della pompa peristaltica utilizzata è mantenuto costante (a 1,5 mL/min).

Durante l'eluizione, le frazioni sono state raccolte e mantenute in ghiaccio. Le frazioni sono state analizzate mediante spettrofotometro UV-Vis, misurando l'assorbanza a 280 nm, lunghezza d'onda alla quale assorbono gli amminoacidi aromatici delle proteine. Le frazioni con maggiore assorbanza sono state selezionate per la fase successiva.

Per rimuovere l'His-tag, le frazioni selezionate sono state trasferite in tubo da dialisi (MWCO 12 kDa) immersi in 2 L di Buffer C (50 mM KPi pH 8.0, 150 mM KCl) contenente la proteasi TEV.

La dialisi è stata condotta a 4 °C sotto agitazione magnetica per tutta la notte, permettendo alla proteasi di riconoscere la sequenza specifica tra l'His-tag e MetAP1c e rimuovere il tag senza danneggiare la proteina.

Dopo la digestione, la proteina è stata sottoposta a una seconda cromatografia IMAC per separare MetAP1c priva di His-tag dal tag rimosso e dalla proteasi TEV, che rimangono legati alla colonna.

In queste condizioni, MetAP1c, privata dell'His-tag, non si lega alla matrice della colonna e viene recuperata, mentre la proteasi TEV, l'His-tag rimosso e l'eventuale proteina non digerita restano legati alla colonna.

Le frazioni raccolte durante l'eluizione contenenti MetAP1c pura sono state nuovamente monitorate mediante spettrofotometria a 280 nm e conservate aggiungendo glicerolo al 20% prima del congelamento a -80 °C, fino all'utilizzo nei saggi enzimatici.

9.4 Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)

Al termine della purificazione, la proteina MetAP1c è stata analizzata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), secondo il metodo di Laemmli, al fine di valutarne il grado di purezza.

Questa tecnica consente la separazione delle proteine esclusivamente in base al peso molecolare. In condizioni denaturanti, infatti, le proteine vengono trattate con sodio dodecil solfato (SDS), un detergente anionico che si lega alla catena polipeptidica in maniera proporzionale alla sua lunghezza, conferendo a tutte le proteine una carica negativa uniforme.

In questo modo, durante la migrazione elettroforetica, la separazione dipende unicamente dalla dimensione delle proteine.

Il gel di poliacrilammide è costituito da due strati con diversa concentrazione di acrilammide: uno strato superiore, detto stacking gel (5% di acrilammide), contenente i pozzetti per il caricamento dei campioni, e uno strato inferiore, detto running gel (12% di acrilammide), nel quale avviene la separazione delle proteine.

Per la preparazione del gel di corsa (10 mL) sono stati miscelati:

- H₂O 3.3 mL
- Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 2.5 mL
- SDS 10% 0.1 mL
- Acrilammide 30% 4.0 mL
- Ammonio persolfato 10% 0.1 mL
- TEMED 0.004 mL

Per la preparazione del gel di caricamento sono stati miscelati:

- H₂O 2.7 mL
- Tris-HCl 1 M, pH 6.8 0.5 mL
- SDS 10% 0.04 mL
- Acrilammide 30% 0.67 mL
- Ammonio persolfato 10% 0.04 mL
- TEMED 0.004 mL

Prima del caricamento, i campioni sono stati trattati con una soluzione contenente blu di bromofenolo (1%), glicerolo (10%), β -mercaptoetanol (2 mM) e SDS (10%), e incubati a 95 °C per 5 minuti, al fine di denaturare completamente le proteine e ridurre eventuali

ponti disolfuro. Questo trattamento consente la linearizzazione delle proteine e l'uniformazione della loro carica.

I campioni sono stati quindi caricati nei pozzetti del gel insieme a un marcatore di peso molecolare, utile per stimare la dimensione delle proteine analizzate. La corsa elettroforetica è stata effettuata in tampone Tris-Glicina 1X, applicando inizialmente una tensione di 90 V per favorire l'allineamento dei campioni nello stacking gel, successivamente aumentata a 120 V fino al raggiungimento dell'estremità dell'anodo del gel.

Al termine della separazione, il gel è stato colorato mediante immersione in una soluzione contenente 0.25 g di Coomassie Brilliant Blue R250 disciolti in 90 mL di metanolo/acqua e 10 mL di acido acetico. Il colorante si lega alle proteine in maniera proporzionale alla loro quantità, rendendo visibili le bande proteiche.

Infine, il gel è stato sottoposto a decolorazione in una soluzione contenente acido acetico 10% e metanolo 20%, al fine di rimuovere il colorante in eccesso e migliorare il contrasto delle bande.

9.5 Valutazione dell'attività enzimatica di MetAP1c in presenza di cofattori metallici e inibitori

L'attività enzimatica di MetAP1c è stata valutata mediante spettrofluorimetria, utilizzando il substrato sintetico MG-12. Questo substrato, una volta idrolizzato dall'enzima, rilascia un prodotto fluorescente, consentendo di monitorare l'andamento della reazione nel tempo (Figura 6).

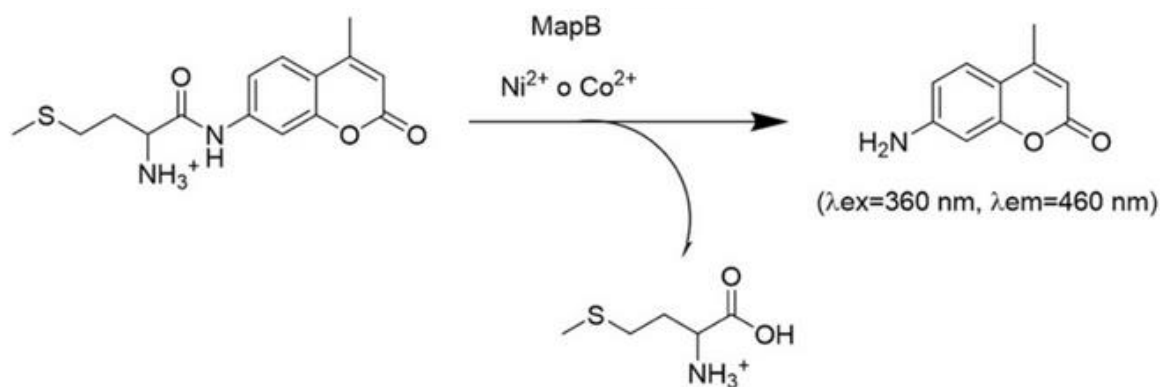


Figura. 6: Schema della reazione catalizzata da MetAP1c sul substrato MG-12, con formazione del prodotto fluorescente rilevato mediante spettrofluorimetria.

La fluorescenza è stata misurata con eccitazione a 360 nm ed emissione a 460 nm. I saggi enzimatici sono stati eseguiti in un volume finale di 100 µL, contenente la proteina purificata, il substrato e diversi cofattori metallici e/o inibitori alle concentrazioni indicate.

L'attività enzimatica è stata espressa come percentuale di attività residua rispetto al controllo privo di inibitore, calcolata secondo la formula:

$$Attività\ residua\ \% = \frac{A_i}{A_0} \times 100$$

Sulla base dei risultati preliminari, i saggi successivi sono stati condotti utilizzando Ni^{2+} alla concentrazione di 5 µM e MG-12 alla concentrazione di 70 µM.

9.6 Effetto dei cofattori metallici

Per valutare l'influenza dei cofattori metallici sull'attività di MetAP1c, sono stati testati diversi ioni metallici a concentrazioni differenti, al fine di analizzare la dipendenza dell'attività enzimatica dalla concentrazione del metallo.

I metalli analizzati comprendevano Ca^{2+} (CaCl_2), Mg^{2+} (MgCl_2), Fe^{3+} (FeCl_3), Fe^{2+} (FeSO_4), Co^{2+} (CoCl_2), Cu^{2+} (CuSO_4), Mn^{2+} (MnCl_2), Ni^{2+} (NiSO_4).

Per consentire un confronto diretto tra i diversi metalli, l'attività enzimatica è stata valutata alla concentrazione standard di 50 μM per ciascun cofattore.

In ciascun saggio, il volume di proteina era generalmente 96 μL , a cui venivano aggiunti 2 μL di substrato MG-12 e 2 μL della soluzione di metallo a concentrazione desiderata.

Per i sali in presenza dei quali l'enzima ha mostrato la migliore attività, il saggio è stato ripetuto a diverse concentrazioni (1-100 μM), per verificare la concentrazione ottimale

9.7 Screening di inibitori

Gli inibitori testati comprendevano una serie di composti appartenenti prevalentemente alla classe dei derivati dell'acido picolinico, selezionati sulla base di studi precedenti che hanno evidenziato questo scaffold come efficace e selettivo nei confronti della MetAP di *M. tuberculosis*. Il composto CQ, noto inibitore delle MetAP, è stato incluso come controllo.

Sulla base di queste osservazioni, è stato effettuato uno screening di diversi analoghi strutturali al fine di identificare molecole con attività inibitoria ottimale nei confronti di MetAP1c.

I composti analizzati comprendevano 3S50, 3S55, 3S60, 3S61, EP4, EP5, EP5F, MB2, MB3, MB4, MB5, MAT2, MAT4, MAT5, MAT6, MAT7, CQ, le cui strutture chimiche sono riportate in tabella 1.

Per la valutazione dell'attività inibitoria, i saggi sono stati allestiti in volume finale di 100 μL , utilizzando il substrato MG-12 alla concentrazione di 70 μM e Ni^{2+} alla concentrazione di 5 μM , condizioni identificate come ottimali nei saggi preliminari.

In una prima fase, l'attività enzimatica è stata valutata in presenza dei diversi composti a concentrazione fissa (100 μM), al fine di confrontare la capacità inibitoria relativa e identificare i composti più attivi da sottoporre a ulteriori analisi.

9.8 Determinazione dell'IC50

La determinazione dell'IC50 è stata effettuata per i composti selezionati a seguito dello screening preliminare.

I saggi sono stati condotti valutando l'attività enzimatica in presenza di concentrazioni crescenti degli inibitori, utilizzando MG-12 alla concentrazione di 70 μM e Ni^{2+} alla concentrazione di 5 μM , mantenute costanti durante l'esperimento.

Le concentrazioni degli inibitori sono state variate mediante diluizioni seriali, e l'attività enzimatica è stata espressa come percentuale rispetto al controllo privo di inibitore.

I dati sperimentali ottenuti sono stati analizzati mediante regressione non lineare utilizzando il software GraphPad Prism 8.0, al fine di determinare la concentrazione di inibitore necessaria a ridurre del 50% l'attività enzimatica (IC50), utilizzando la seguente equazione:

$$A_i = A_0 \times \left(1 - \frac{[I]}{[I] + IC_{50}} \right)$$

RISULTATI E DISCUSSIONE

10. Premessa

L'identificazione di nuovi bersagli farmacologici rappresenta una strategia fondamentale per lo sviluppo di nuovi agenti antitubercolari, soprattutto alla luce della crescente diffusione di ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* resistenti ai farmaci attualmente disponibili.

In questo contesto, le metionina-aminopeptidasi (MetAP) rivestono un ruolo di particolare interesse, in quanto coinvolte nella maturazione proteica e quindi essenziali per la sopravvivenza cellulare. Tra queste, l'isoforma MapB (MtMetAP1c) di *M. tuberculosis* è stata recentemente proposta come potenziale target farmacologico.

Il presente lavoro sperimentale si è focalizzato sulla caratterizzazione biochimica di MetAP1c, prodotta come proteina ricombinante in *Escherichia coli* e successivamente purificata. In particolare, sono stati condotti saggi enzimatici al fine di valutare l'attività dell'enzima in presenza di diversi cofattori metallici e di identificare potenziali inibitori.

L'attività enzimatica è stata analizzata mediante saggi fluorimetrici utilizzando un substrato sintetico, mentre l'effetto di diverse molecole inibitorie è stato valutato attraverso studi di inibizione enzimatica e determinazione della concentrazione inibente al 50% (IC50) per i composti più promettenti.

10.1 Espressione e purificazione di MetAP1c (MapB)

La proteina ricombinante MetAP1c è stata espressa in cellule di *Escherichia coli* BL21 (DE3) trasformate con il plasmide pET151_D_Tar contenente il gene mapB. Le cellule sono state coltivate in beute da 5 L contenenti ciascuna 1 L di LB contenente ampicillina e incubate a 37°C. Una volta raggiunta la fase esponenziale, l'espressione proteica è stata indotta mediante aggiunta di IPTG.

Dopo l'induzione, la temperatura è stata impostata a 25 °C e l'incubazione è stata proseguita overnight (O/N). Il giorno seguente, le cellule sono state raccolte tramite centrifugazione e il pellet cellulare è stato risospeso in Buffer A contenente PMSF. La lisi cellulare è stata effettuata mediante sonicazione, seguita da centrifugazione per ottenere l'estratto cellulare chiarificato.

La purificazione di MetAP1c è stata eseguita mediante cromatografia di affinità su metallo immobilizzato (IMAC), sfruttando la presenza dell'His-tag all'estremità N-terminale della proteina.

L'estratto cellulare è stato caricato su una colonna precedentemente equilibrata con Buffer A. Dopo il caricamento, la colonna è stata lavata con Buffer A per eliminare le proteine non legate, e successivamente con Buffer B, contenente una bassa concentrazione di imidazolo, per rimuovere le proteine legate aspecificamente. Infine, le proteine specificamente legate sono state eluite con Buffer B1 ad alta concentrazione di imidazolo.

Le frazioni contenenti MetAP1c sono state raccolte e sottoposte a digestione con proteasi TEV per la rimozione dell'His-tag. Il campione è stato quindi ulteriormente purificato mediante una seconda cromatografia IMAC, che ha permesso di separare la proteina priva di tag dalle impurità residue, tra cui la proteasi TEV e il tag rimosso.

Le diverse fasi della purificazione sono state analizzate mediante SDS-PAGE (Figura 7), al fine di valutare il grado di purezza della proteina nelle varie frazioni raccolte.

Come mostrato in Figura 7, nel campione relativo alla prima cromatografia (1° crom) si osservano numerose bande proteiche, indicative della complessità dell'estratto, sebbene sia già visibile una banda predominante corrispondente alla proteina di interesse. Dopo la digestione con proteasi TEV (post dialisi), si osserva una variazione della migrazione della banda principale, compatibile con la rimozione dell'His-tag, mentre sono ancora presenti alcune impurità proteiche.

Infine, dopo la seconda cromatografia (2° crom), la proteina appare come una banda singola e predominante, indicando un elevato grado di purezza del campione.

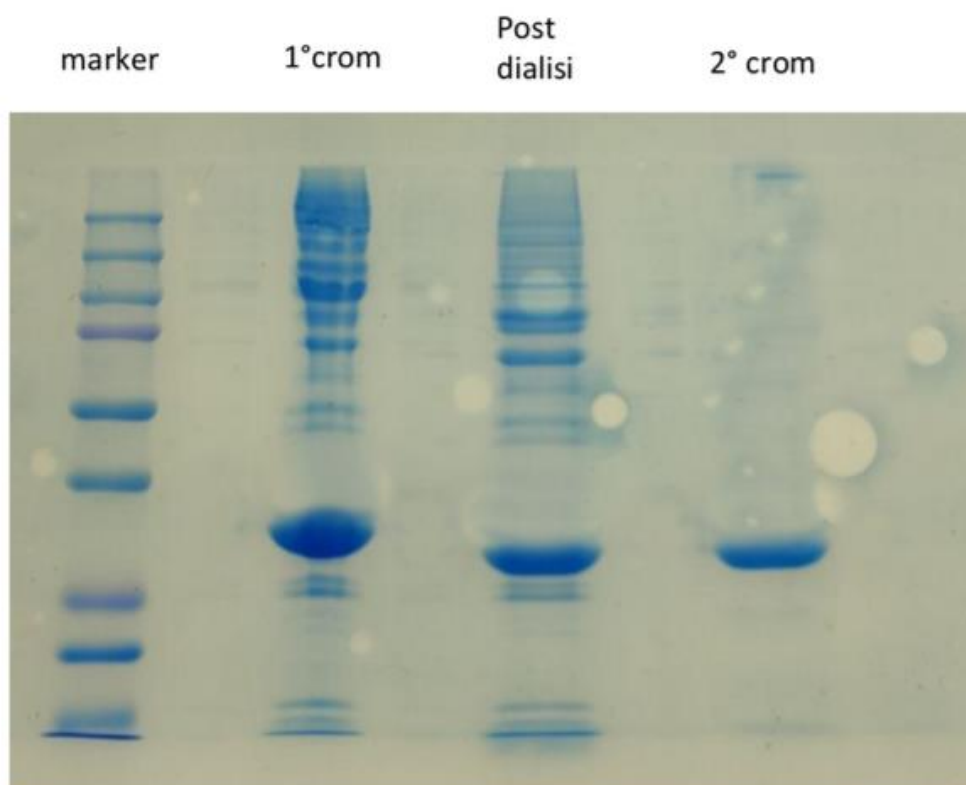


Figura. 7: Analisi SDS-PAGE delle diverse fasi di purificazione di MetAP1c: frazioni della prima cromatografia IMAC (1° crom), campione dopo digestione con proteasi TEV (post dialisi) e frazioni della seconda cromatografia IMAC (2° crom).

Nel complesso, l'analisi SDS-PAGE conferma che il protocollo di purificazione adottato ha permesso di ottenere MetAP1c con un elevato grado di purezza, rendendo la proteina idonea per i successivi saggi di caratterizzazione enzimatica.

10.2 Effetto dei cofattori metallici sull'attività enzimatica di MetAP1c

L'attività enzimatica di MetAP1c è stata valutata mediante saggio fluorimetrico utilizzando il substrato sintetico MG-12, al fine di identificare le condizioni ottimali per la caratterizzazione biochimica dell'enzima. In particolare, è stata analizzata l'influenza di diversi ioni metallici sull'attività catalitica, in quanto le metionina-aminopeptidasi sono metallo-enzimi la cui attività dipende dalla presenza di cofattori metallici nel sito attivo.

In una prima fase, è stato effettuato un confronto dell'attività enzimatica in presenza di diversi ioni metallici (Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Ni^{2+}).

Per consentire un confronto diretto tra i cofattori, è stata considerata l'attività enzimatica misurata alla concentrazione standard di 50 μM per ciascun metallo.

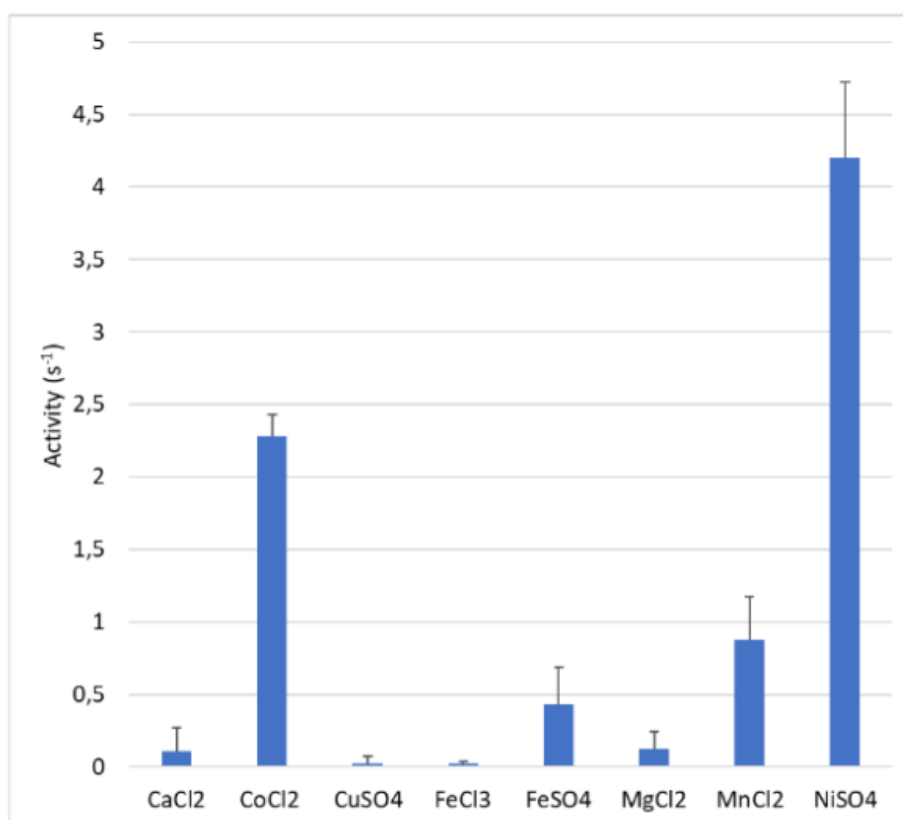


Figura. 8: Attività enzimatica di MetAP1c in presenza di diversi ioni metallici (50 μM), determinata mediante dosaggio fluorimetrico utilizzando MG-12 come substrato.

Come mostrato in Figura 8, si osserva una marcata dipendenza dell'attività enzimatica dalla natura dello ione metallico. In particolare, gli ioni Ni^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} risultano sostenere i livelli più elevati di attività enzimatica; al contrario, Ca^{2+} e Mg^{2+} mostrano un'attività molto ridotta, mentre Cu^{2+} e Fe^{3+} risultano praticamente incapaci di supportare la catalisi. Lo ione Fe^{2+} determina invece un'attività bassa ma rilevabile.

Questi risultati sono in linea con il comportamento tipico delle metionina-aminopeptidasi, la cui attività dipende dalla presenza di ioni metallici nel sito attivo. Le differenze osservate tra i metalli testati possono essere ricondotte alla loro diversa capacità di coordinarsi all'enzima e di supportare il corretto funzionamento del centro catalitico. Sulla base di questi risultati preliminari, è stata successivamente analizzata la dipendenza dell'attività enzimatica dalla concentrazione dei metalli più efficaci (Ni^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+}).

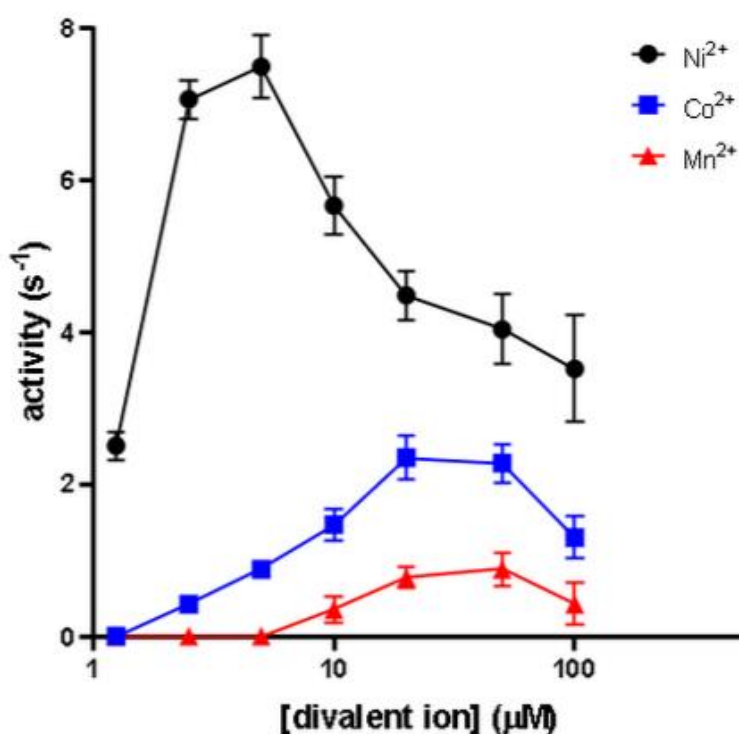


Figura. 9: Effetto della concentrazione degli ioni metallici Ni^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+} sull'attività enzimatica di MetAP1c. L'attività è stata determinata utilizzando MG-12 come substrato.

Come mostrato in Figura 9, l'attività enzimatica aumenta in funzione della concentrazione del metallo fino a raggiungere un plateau.

Tra i metalli analizzati, il nichel (Ni^{2+}) risulta quello in grado di sostenere la maggiore attività enzimatica, con un massimo osservato nell'intervallo di concentrazione compreso tra circa 5 e 10 μM . A concentrazioni superiori non si osserva un ulteriore incremento significativo dell'attività, suggerendo una saturazione del sito attivo.

Alla luce di questi risultati, il nichel alla concentrazione di 5 μM è stato selezionato come cofattore ottimale per i successivi studi cinetici e per i saggi di inibizione enzimatica.

10.3 Analisi cinetica di MetAP1c nei confronti del substrato MG-12

L'attività enzimatica di MetAP1c è stata ulteriormente caratterizzata mediante analisi cinetica allo stato stazionario, analizzando la variazione della velocità di reazione in funzione della concentrazione del substrato sintetico MG-12.

I saggi sono stati condotti utilizzando il nichel (Ni^{2+}) alla concentrazione di 5 μM , identificata come ottimale sulla base dei risultati precedentemente ottenuti (paragrafo 10.2). La velocità di reazione è stata quindi misurata al variare della concentrazione di MG-12.

Come mostrato in Figura 10, la velocità di reazione aumenta all'aumentare della concentrazione di substrato fino al raggiungimento di un plateau, mostrando un andamento tipico della cinetica di Michaelis-Menten. Dall'analisi della curva cinetica è stato possibile determinare un valore di K_m apparente pari a circa 70 μM , indicativo dell'affinità dell'enzima per il substrato MG-12.

Sulla base di questo valore, la concentrazione di 70 μM di MG-12 è stata selezionata per i successivi saggi di inibizione, in quanto rappresentativa di condizioni prossime alla

K_m , ideali per evidenziare eventuali effetti inibitori dei composti testati, anche per quanto riguarda possibili inibitori competitivi.

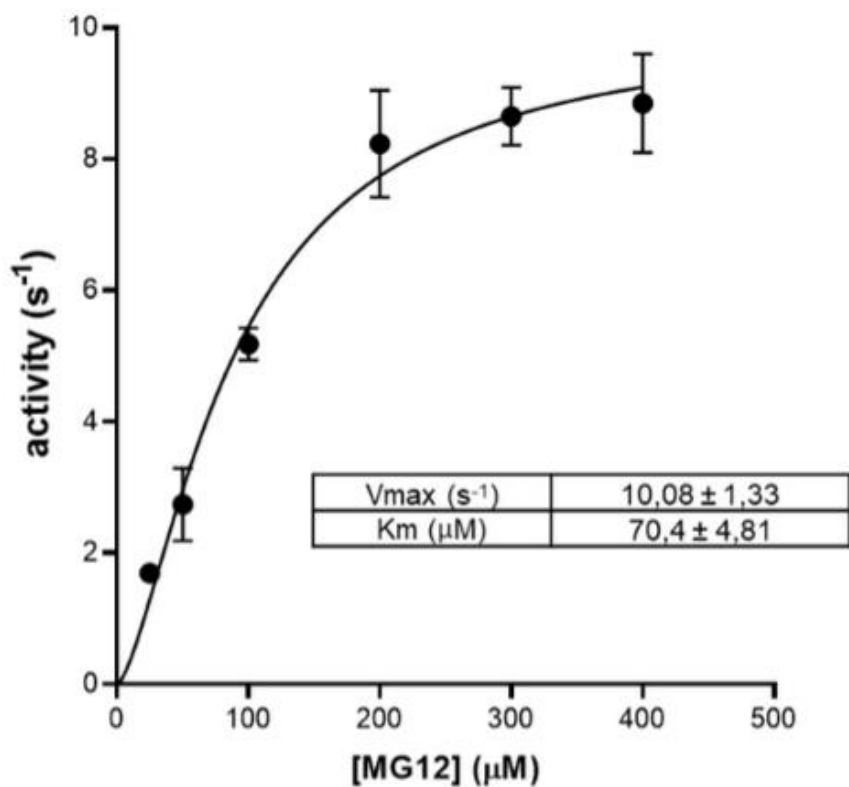


Figura. 10: Curva cinetica di MetAP1c in funzione della concentrazione del substrato MG-12, determinata in presenza di Ni^{2+} ($5 \mu M$).

10.4 Saggi di inibizione di MetAP1c

Sulla base di studi precedenti che hanno identificato l'acido picolinico come uno scaffold in grado di inibire in modo efficiente e selettivo le metionina-aminopeptidasi di *M. tuberculosis*, è stato effettuato uno screening di una serie di analoghi strutturali, con l'obiettivo di individuare composti con attività inibitoria ottimale nei confronti di

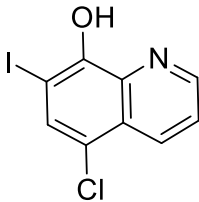
MetAP1c. Il composto CQ, noto inibitore delle MetAP, è stato incluso come controllo positivo.

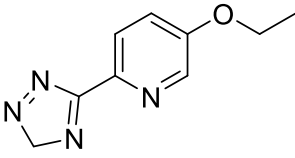
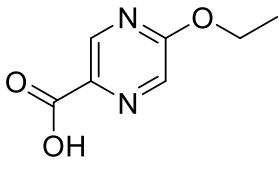
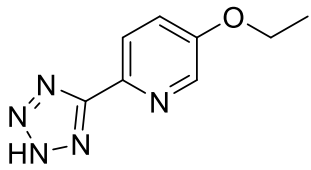
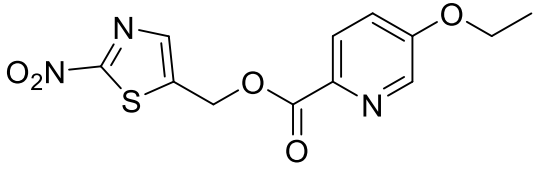
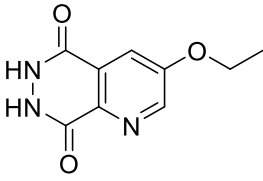
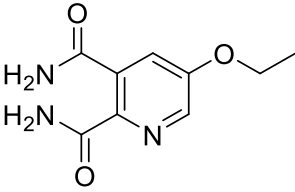
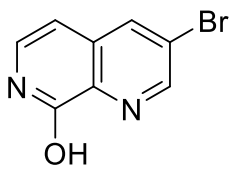
La proteina MetAP1c purificata è stata utilizzata per valutare l'attività di una serie di composti potenzialmente inibitori dell'enzima. I composti testati, identificati tramite screening preliminari e appartenenti a diverse classi chimiche, sono stati analizzati al fine di individuare molecole in grado di ridurre l'attività enzimatica. I saggi sono stati condotti utilizzando MG-12 alla concentrazione di 70 μM , corrispondente alla K_m determinata sperimentalmente (paragrafo 10.3), e Ni^{2+} 5 μM come cofattore ottimale, sulla base dei risultati precedentemente ottenuti (paragrafo 10.2). In una prima fase, è stato effettuato uno screening preliminare valutando l'attività enzimatica residua in presenza dei diversi composti a concentrazione fissa.

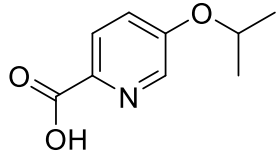
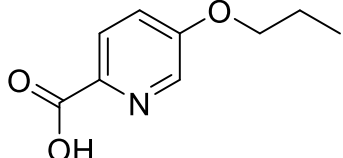
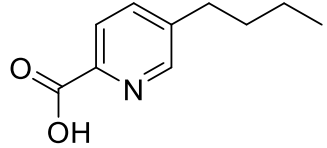
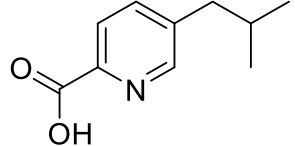
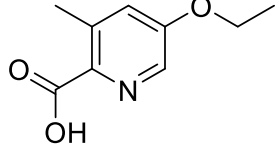
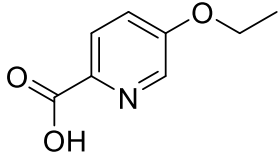
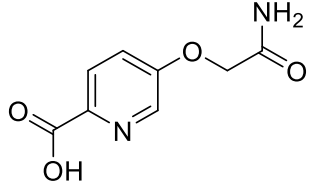
Questo approccio consente di confrontare direttamente l'effetto dei diversi composti sull'attività enzimatica, evidenziando le differenze nella loro capacità inibitoria. Inoltre, la valutazione dell'attività residua rappresenta un parametro utile per identificare rapidamente i composti più promettenti da sottoporre a ulteriori analisi.

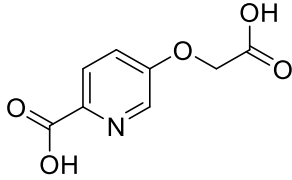
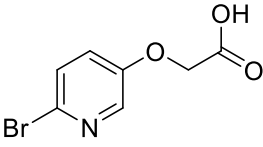
Nella tabella 1 sono riportate le strutture dei diversi inibitori testati, e l'attività residua di MetAP1c, in presenza del composto stesso alla concentrazione finale di 100 μM .

Tabella 1. Attività enzimatica residua (%) di MetAP1c in presenza dei diversi composti inibitori, determinata mediante saggio fluorimetrico utilizzando MG-12 (70 μM) e Ni^{2+} (5 μM).

Nome	Struttura	Attività residua %
CQ	 5-chloro-7-iodoquinolin-8-ol	17,7 \pm 8,37

3S50	 <p>5-ethoxy-2-(3H-1,2,4-triazol-5-yl)pyridine</p>	16,57 ± 4,05
3S55	 <p>5-ethoxypyrazine-2-carboxylic acid</p>	20,1 ± 2,86
3S60	 <p>5-ethoxy-2-(2H-tetrazol-5-yl)pyridine</p>	22,10 ± 4,01
3S61	 <p>(2-nitrothiazol-5-yl)methyl 5-ethoxypicolinate</p>	83,98 ± 4,55
EP4	 <p>3-ethoxy-6,7-dihydropyrido[2,3-d]pyridazine-5,8-dione</p>	19,1 ± 2,11
EP5	 <p>5-ethoxypyridine-2,3-dicarboxamide</p>	46,41 ± 3,25
EP5F	 <p>3-bromo-1,7-naphthyridin-8-ol</p>	61,8 ± 5,41

MAT2	 <p>5-isopropoxypicolinic acid</p>	$15,8 \pm 2,32$
MAT4	 <p>5-propoxypicolinic acid</p>	$0,58 \pm 0,32$
MAT5	 <p>5-butylpicolinic acid</p>	$1,66 \pm 1,05$
MAT6	 <p>5-isobutylpicolinic acid</p>	$2,21 \pm 0,32$
MAT7	 <p>5-ethoxy-3-methylpicolinic acid</p>	$2,76 \pm 1,15$
MB2	 <p>5-ethoxypicolinic acid</p>	$0,23 \pm 0,35$
MB3	 <p>5-(2-amino-2-oxoethoxy)picolinic acid</p>	$4,38 \pm 0,24$

MB4	 5-(carboxymethoxy)picolinic acid	46,54 ± 0,75
MB5	 2-((6-bromopyridin-3-yl)oxy)acetic acid	45,62 ± 1,21

Come mostrato in Tabella 1, i composti testati presentano un effetto differente sull'attività enzimatica di MetAP1c, con alcuni composti particolarmente efficaci, e anche più potenti del composto CQ, noto inibitore delle MetAP, utilizzato qui come controllo positivo.

In particolare, alcuni composti, come MB2 e MAT4, determinano una marcata riduzione dell'attività enzimatica, suggerendo un'elevata capacità inibitoria, mentre altri mostrano un effetto più moderato o trascurabile.

In particolare si nota come il gruppo carbossilico sia importante per avere una elevata attività, in quanto composti che ne sono privi (3S50, EP4, MB5 fra gli altri), portano a dei livelli di inibizione molto più bassi.

Inoltre è fondamentale che lo scaffold sia un acido picolinico, infatti il composto 3S55, che ha come core una pirazina risulta molto meno efficace (attività residua superiore al 20 %), rispetto a MB2 (attività residua 0.23 %).

La natura della catena laterale in 5 deve essere relativamente apolare, ad esempio il composto MB4 con un gruppo carbossilico sulla catena è praticamente inattivo, rispetto ai composti che presentano principalmente catene laterali idrofobiche (MAT5, MAT6).

Infine, ulteriori sostituenti in altre posizioni sull'eterociclo portano un peggioramento dell'attività: ad es. MAT7 con un semplice gruppo metilico in 3 risulta molto meno attivo di MB2.

Le differenze osservate tra i composti possono essere quindi attribuite, almeno in parte, alle diverse caratteristiche strutturali delle molecole testate, che possono influenzare la loro capacità di interagire con il sito attivo dell'enzima.

Sulla base dei risultati ottenuti, i composti che hanno mostrato una maggiore attività sono stati selezionati come i più promettenti e sottoposti a ulteriori analisi per la determinazione della IC50.

10.5 Determinazione della IC50 dei composti selezionati

I composti selezionati nello screening preliminare sono stati ulteriormente caratterizzati mediante determinazione della IC50, al fine di valutarne la potenza inibitoria nei confronti di MetAP1c. Oltre ai composti identificati come più rappresentativi (MB2, MB3, MAT4 e CQ), sono stati inclusi ulteriori composti (MAT5, MAT6, MAT7 e 3S50) per ottenere una valutazione più completa dell'attività inibitoria delle diverse molecole testate.

L'IC50 rappresenta la concentrazione di inibitore necessaria a ridurre del 50% l'attività enzimatica ed è stata determinata analizzando l'attività enzimatica in funzione della concentrazione dell'inibitore, mantenendo costanti le condizioni sperimentali (MG-12 70 μM e Ni^{2+} 5 μM).

In figura 11 è riportato il grafico della IC50 del composto di controllo CQ.

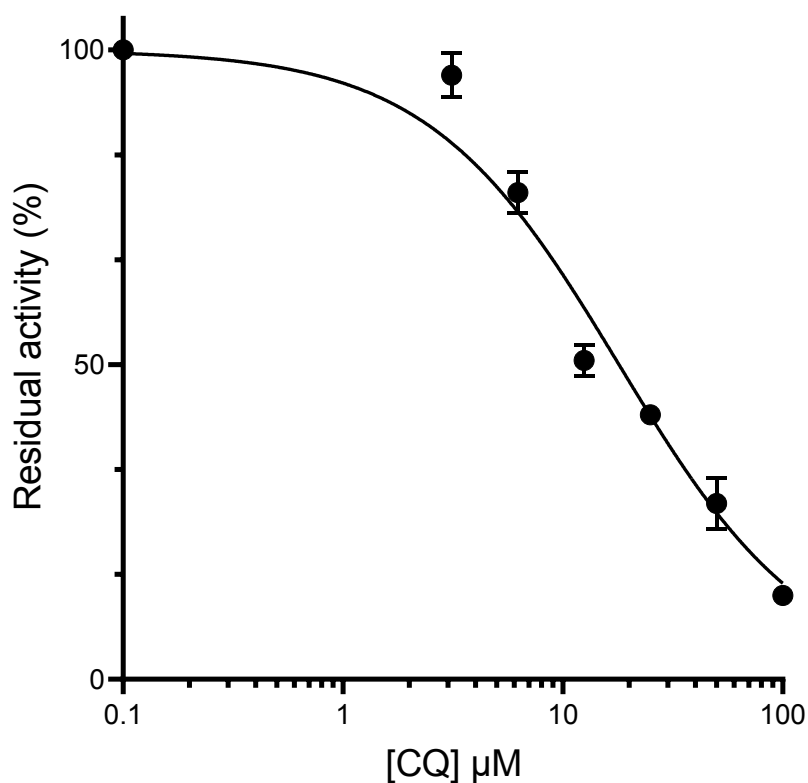


Figura. 11: Curva dose-risposta del composto CQ testato come inibitori di MetAP1c. L'attività enzimatica residua (%) è stata determinata in funzione della concentrazione dell'inibitore utilizzando MG-12 (70 μM) e Ni²⁺ (5 μM).

Come si può vedere in Figura il composto analizzato determinano una riduzione dell'attività enzimatica dipendente dalla concentrazione, evidenziando un andamento tipico delle curve dose-risposta, con una IC₅₀ di 11.4 ± 1.21 μM.

In modo analogo sono stati testati anche i derivati picolinici, che sono risultati generalmente molto più attivi. Si osservano differenze significative nella potenza inibitoria tra i diversi composti. In particolare, alcuni composti mostrano curve spostate verso basse concentrazioni di inibitore, indicando una maggiore efficacia e quindi valori di IC₅₀ più bassi.

Tra questi, MB2 e MAT5 e MAT6 risultano tra i composti più attivi, mostrando valori di IC₅₀ sub-micromolari, (rispettivamente $0.29 \pm 0.07 \mu\text{M}$, $0.92 \pm 0.10 \mu\text{M}$ e $0.77 \pm 0.10 \mu\text{M}$) (Figura 12) in accordo con i risultati dello screening preliminare (paragrafo 10.4).

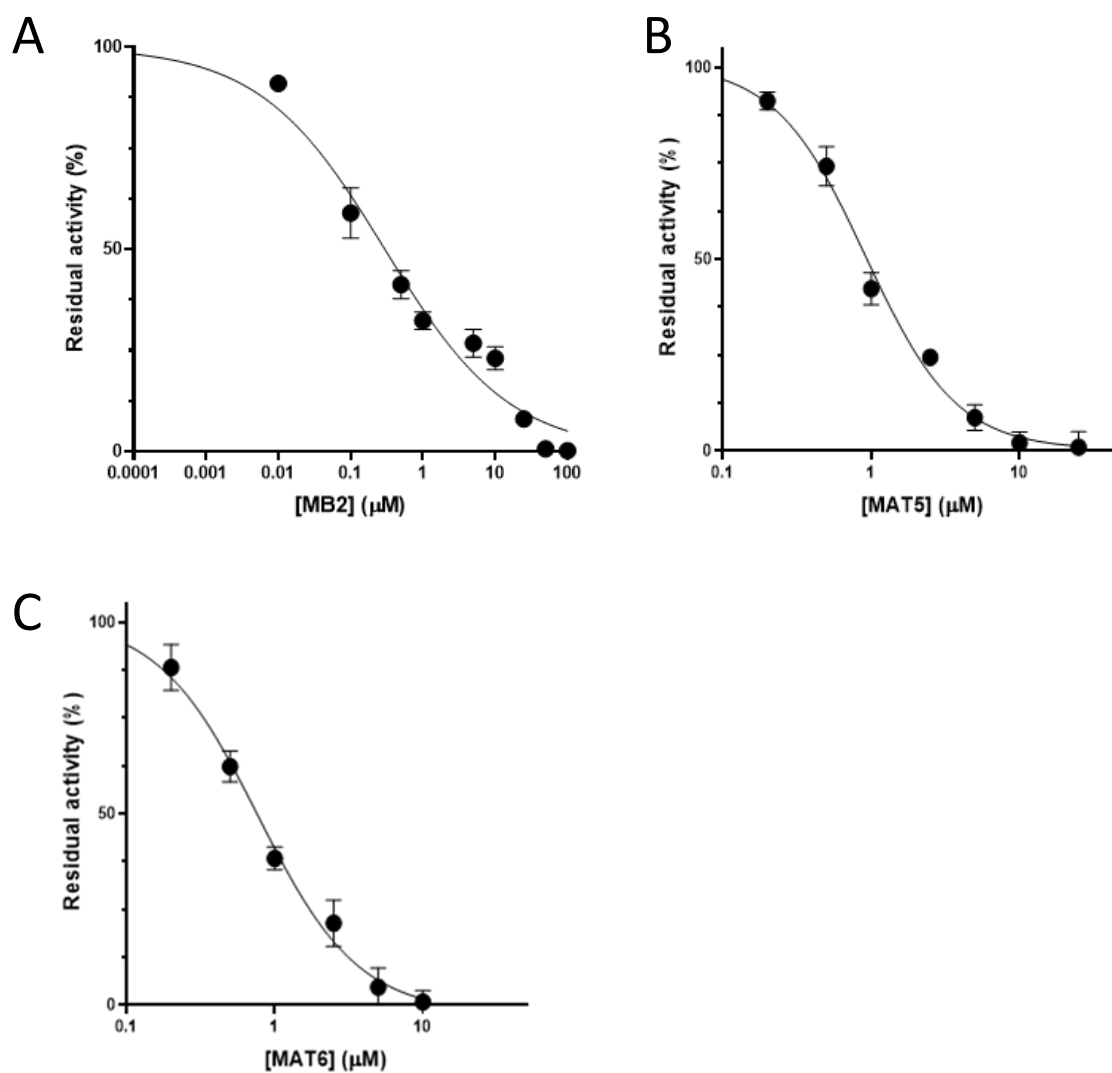


Figura. 12: Curve dose-risposta dei composti MB2 (A), MAT5 (B) e MAT6 (C) testati come inibitori di MetAP1c nelle stesse condizioni sperimentali descritte in Figura 11.

Altri composti, come MAT4, e MAT7, mostrano un'attività intermedia, mentre composti come CQ e 3S50 presentano curve spostate verso concentrazioni più elevate, suggerendo una minore potenza inibitoria (Figura 13).

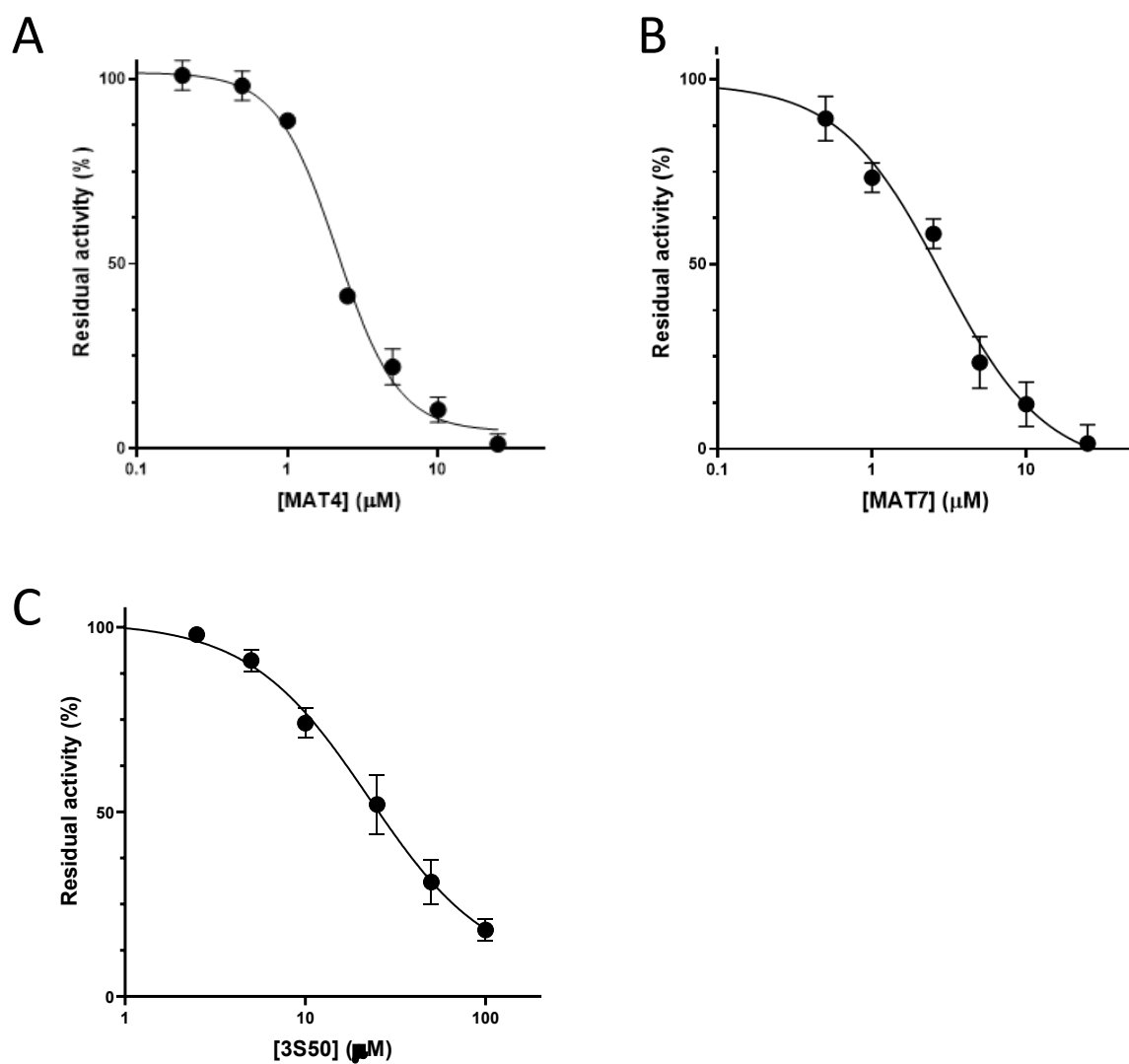


Figura. 13: Curve dose-risposta dei composti MAT4 (A), MAT7 (B) e 3S50 (C) testati come inibitori di MetAP1c nelle stesse condizioni sperimentali descritte in Figura 11.

Nel complesso, questi risultati evidenziano una significativa variabilità nell'attività inibitoria dei composti testati, ma confermano il potenziale dello scaffold dell'acido picolinico per ottenere ottimi inibitori di MetAP1c.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha permesso di caratterizzare dal punto di vista biochimico la metionina-aminopeptidasi MapB (MtMetAP1c) di *Mycobacterium tuberculosis*, confermandone la natura metallo-dipendente e definendo condizioni sperimentali adeguate per lo studio della sua attività enzimatica e della sua inibizione.

Attraverso i saggi sperimentali è stato possibile definire le condizioni ottimali per lo studio dell'enzima. In particolare, i risultati ottenuti hanno evidenziato che il nichel rappresenta il cofattore più efficace tra quelli analizzati e hanno consentito di determinare, mediante il substrato sintetico MG-12, un valore di Km apparente utile per l'impostazione dei saggi di inibizione.

L'aspetto più rilevante emerso da questo studio riguarda lo studio degli inibitori. I risultati ottenuti confermano che l'acido picolinico rappresenta un ottimo scaffold per l'identificazione di molecole in grado di inibire MapB.

Alcuni dei composti testati hanno mostrato un'elevata attività inibitoria, con valori di IC50 nell'ordine del sub-micromolare, indicando una buona potenza nei confronti dell'enzima.

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che MapB possa essere un bersaglio interessante per lo sviluppo di nuovi farmaci antitubercolari e che i derivati dell'acido picolinico rappresentino una buona base di partenza per l'identificazione di nuovi inibitori.

I composti più promettenti identificati nel corso di questo lavoro saranno oggetto di studi successivi, finalizzati a verificarne l'effettiva attività antibatterica. Saranno inoltre necessari test su cellule umane, per valutarne l'eventuale tossicità e approfondirne il potenziale come candidati per lo sviluppo di nuovi agenti antitubercolari.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization, Global tuberculosis report 2025.
2. Litvinjenko S et al. Burden of tuberculosis among vulnerable populations worldwide: an overview of systematic reviews. *Lancet Infect Dis.* 2023; 23: 1395–407. doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00372-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00372-9).
3. Yang H et al. Global, regional, and national burden of tuberculosis and attributable risk factors for 204 countries and territories, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Diseases 2021 study. *BMC Public Health.* 2024; 24:3111. doi: <https://doi.org/10.1186/s12889-024-20664-w>.
4. Warner D et al. Mycobacterium tuberculosis biology, pathogenicity, and interaction with the host. *Nat Rev Microbiol.* 2025; 23(12): 788–804. doi: [10.1038/s41579-025-01201-x](https://doi.org/10.1038/s41579-025-01201-x).
5. Jankute M et al. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annu. Rev. Microbiol.* 2015; 69:405–23. doi: [10.1146/annurev-micro-091014-104121](https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104121).
6. Meyer FM, Bramkamp M. Cell wall synthesizing complexes in Mycobacteriales. *Current Opinion in Microbiology.* 2024; 79:102478. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2024.102478>.
7. Daffé M, Marrakchi H. Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope. *Microbiol Spectrum.* 2018; 7(4):GPP3-0027. doi: [10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018).

8. Dulberger CL et al. The mycobacterial cell envelope — a moving target. *Nature reviews Microbiology*. 2020; 18, pages47–59. doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0273-7>.
9. Forrellad AM et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Landes Bioscience*. 2013; virulence 4:1, 3–66. doi: 10.4161/viru.22329.
10. Imazu P et al. Efficacy and safety of daily treatments for drug-susceptible pulmonary tuberculosis: a systematic review and network meta-analysis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2022; 74, 905–917. doi: <https://doi.org/10.1093/jpp/rgac004>.
11. Zade A. Investigating the Efficacy and Mechanisms of Action of Tuberculosis Drugs. *Sys Rev Pharm*. 2024; 15(6): 210-214. doi: 10.31858/0975-8453.15.6.210-214.
12. Zhang Y et al. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr*. 2013; 2(4): 1–12. doi:10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013.
13. Diaz JMA et al. New and Repurposed Drugs for the Treatment of Active Tuberculosis: An Update for Clinicians. *Respiration*. 2023;102:83–100. doi: 10.1159/000528274.
14. Borisov SE et al. Effectiveness and safety of bedaquiline containing regimens in the treatment of MDR- and XDR-TB: a multicentre study. *Eur Respir J*. 2017; 49: 1700387. doi: <https://doi.org/10.1183/13993003.00387-2017>.
15. Lange C et al. Drug-resistant tuberculosis: An update on disease burden, diagnosis and treatment. *Respirology*. 2018; 23, 656–673. doi: 10.1111/resp.13304.

16. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment and care, 2025.
17. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 2020.
18. Miotto P et al. Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Molecular Mechanisms Challenging Fluoroquinolones and Pyrazinamide Effectiveness. CHEST. 2015; 147(4): 1135 – 1143. doi: 10.1378/chest.14-1286.
19. Laurenzo D, Mousa SA. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis and current status of rapid molecular diagnostic testing. Acta Tropica. 2011; 119 5–10. doi:10.1016/j.actatropica.2011.04.008.
20. Xiong X et al. Identification of Mycobacterium tuberculosis Resistance to Common Antibiotics: An Overview of Current Methods and Techniques. Infection and Drug Resistance. 2024; 17 1491–1506. doi: <https://doi.org/10.2147/IDR.S457308>.
21. Ismail N et al. In Vitro Study of Stepwise Acquisition of rv0678 and atpE Mutations Conferring Bedaquiline Resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2019; 63:e00292-19. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00292-19>.
22. Bollela VR et al. Detection of katG and inhA mutations to guide isoniazid and ethionamide use for drug-resistant tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2016; 20(8): 1099–1104. doi: 10.5588/ijtld.15.0864.
23. Li M et al. rpoB Mutations and Effects on Rifampin Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Infection and Drug Resistance. 2021; 14 4119–4128. doi: <https://doi.org/10.2147/IDR.S333433>.

24. Cheng SJ et al. pncA Mutations as a Major Mechanism of Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Spread of a Mono-resistant Strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; p. 528-532. doi: 10.1128/AAC.44.3.528-532.2000.
25. BakuBa Z. et al. Mutations in the embB Gene and Their Association with Ethambutol Resistance in Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates from Poland. *BioMed Research International.* 2013; 5 pages. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/167954>.
26. Chien J et al. Mutations in gyrA and gyrB among Fluoroquinolone- and Multidrug Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60:2090–2096. doi:10.1128/AAC.01049-15.
27. Guo H et al. Structure of mycobacterial ATP synthase bound to the tuberculosis drug bedaquiline. *Nature.* 2020. doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3004-3>.
28. Liu Y et al. Spontaneous Mutational Patterns and Novel Mutations for Delamanid Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022;30;66(12):e00531-22. doi: 10.1128/aac.00531-22.
29. Cremades MG et al. Emerging Therapeutics, Technologies, and Drug Development Strategies to Address Patient Nonadherence and Improve Tuberculosis Treatment. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2022; 62:197–210. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-041921-074800>.
30. Lopes SR et al. Update in tuberculosis treatment: a scoping review of current practices. *Breathe* 2025; 21:240232. doi: <https://doi.org/10.1183/20734735.0232-2024>.

31. Capela R et al. Target Identification in Anti-Tuberculosis Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24, 10482. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms241310482>.
32. Mi J et al. Advances in Key Drug Target Identification and New Drug Development for Tuberculosis. *BioMed Research International*. 2022; 23 pages. doi: <https://doi.org/10.1155/2022/5099312>.
33. Griffin JE et al. High-Resolution Phenotypic Profiling Defines Genes Essential for Mycobacterial Growth and Cholesterol Catabolism. *PLoS Pathog.* 2011; 7(9):e1002251. doi:10.1371/journal.ppat.1002251.
34. Sassetti CM, Rubin EJ. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Microbiology*. 2003; 100 (22) 12989-12994. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.2134250100>.
35. Abrahams AK, Besra GS. Mycobacterial drug discovery. *RSC Med. Chem.*,2020,11, 1354. doi: 10.1039/d0md00261e.
36. Vanunu M et al. MapB Protein is the Essential Methionine Aminopeptidase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cells*. 2019; 8, 393; doi:10.3390/cells8050393.
37. Lu J et al. Catalysis and inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidase. *J Med Chem.* 2010; 53(3): 1329. doi: 10.1021/jm901624n.
38. Helgren TR et al. Advances in Bacterial Methionine Aminopeptidase Inhibition. *Curr Top Med Chem.* 2016 ; 16(4): 397–414. doi: 10.2174/1568026615666150813145410.

39. Lu J et al. Structural analysis of inhibition of Mycobacterium tuberculosis methionine aminopeptidase by bengamide derivatives. *Eur J Med Chem.* 2012; 47(1): 479–484. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.11.017.
40. <https://www.rcsb.org/3d-view/3IU9>