



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI CICLO XX

MECCANISMO DEL TRASFERIMENTO PLASMIDICO FEROMONE-DIPENDENTE NEGLI ENTEROCOCCHI: RUOLO DELLE PROTEINE TraA E TraC OTTENUTE DA UN CEPPPO DI *ENTEROCOCCUS FAECALIS* DI ORIGINE ALIMENTARE

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Giuliano Sansebastiano
Tutor:
Chiar.mo Prof. Rodolfo Berni
Co-Tutor:
Prof.ssa Claudia Folli

Dottoranda:
Dott.ssa Beatrice Alfieri

Ai miei amici

Nei sentieri già tracciati io mi perdo.

Tagore

RIASSUNTO

Gli enterococchi sono molto diffusi in natura e sono presenti in prodotti caseari e in altri alimenti fermentati. Essi possiedono meccanismi di trasferimento genico altamente evoluti, come quello del trasferimento plasmidico coniugativo feromone-dipendente. I plasmidi coniugativi feromone-dipendenti sono caratterizzati da un'alta trasmissibilità; sono quindi responsabili della diffusione dei geni da essi trasportati, tra i quali spesso vi sono quelli che codificano per fattori di virulenza e antibiotico-resistenza. Si è dapprima eseguito uno screening di ceppi di *E. faecalis* isolati da prodotti caseari allo scopo di valutare la diffusione in questi ceppi dei plasmidi feromone-dipendenti più noti (pAD1, pCF10 e pPD1). I plasmidi pPD1 e pCF10 sono risultati ampiamente diffusi.

Abbiamo quindi rivolto il nostro interesse al plasmide pPD1, considerata la sua ampia diffusione in ceppi di enterococchi di origine alimentare e la sua limitata caratterizzazione riguardo ai meccanismi implicati nel trasferimento plasmidico. Il trasferimento del plasmide pPD1 di *E. faecalis* è indotto in risposta al feromone cPD1, secreto da cellule riceventi prive di plasmide. cPD1 viene internalizzato dalle cellule donatrici contenenti pPD1 grazie al riconoscimento da parte del recettore di membrana TraC e del recettore intracellulare TraA. L'autoinduzione conseguente alla produzione di feromone endogeno è presumibilmente inibita grazie al ruolo svolto dalla proteina TraB e dal peptide inibitore iPD1. Successivamente allo screening dei ceppi di *E. faecalis*, da un ceppo in cui era presente il plasmide pPD1 (*E. faecalis* 7C5) si è estratto il DNA plasmidico e si sono amplificati mediante PCR i geni codificanti per TraA e TraC. Dopo clonaggio molecolare, abbiamo prodotto TraC e TraA in forma ricombinante utilizzando *E. coli* come organismo d'espressione. Le proteine ricombinanti si sono dimostrate solubili e sono state purificate mediante tecniche cromatografiche convenzionali. TraA e TraC sono state quindi impiegate per studi di interazione *in vitro* con i peptidi cPD1 e iPD1. Questi studi hanno permesso di dimostrare che il legame di cPD1 a TraA è molto più forte di quello a TraC; invece l'inibitore iPD1 ha mostrato un'affinità molto elevata sia per TraA che per TraC. Per entrambe le proteine è stato determinato lo stato di aggregazione: TraC è risultata essere monomerica sia in presenza che in assenza del feromone cPD1, mentre TraA è risultata essere un oligomero sia in presenza che in assenza di cPD1.

Si sono infine investigati i meccanismi molecolari alla base della regolazione trascrizionale mediata da TraA dei geni coinvolti nel processo di coniugazione. TraA lega il DNA a monte di *ipd* (gene che codifica per iPD1) nei tre siti Tab1, Tab2 e Tab3. I risultati ottenuti hanno mostrato che in assenza di peptidi o in presenza del peptide inibitore iPD1, TraA lega preferenzialmente il

sito di legame sul DNA Tab1 e reprime la trascrizione di *ipd*. Dopo l'aggiunta del peptide feromone cPD1, si è osservata una redistribuzione del legame preferenziale di TraA alle Tab: è risultato preferenziale il legame per Tab3 rispetto a Tab1 con conseguente derepressione del promotore di *ipd*. Sono stati inoltre identificati due nuovi siti di legame per TraA in prossimità dei terminatori di *ipd* TT1 e TT2, suggerendo un possibile meccanismo regolativo addizionale controllato da TraA sulla terminazione di *ipd*. Il legame di TraA al sito in prossimità di TT2, essendo sovrapposto al promotore del gene *traE*, può essere coinvolto anche nella regolazione dell'espressione della proteina TraE, che a sua volta è considerata in grado di attivare l'espressione delle proteine direttamente coinvolte nel processo coniugativo. Analisi condotte mediante Northern Blot hanno inoltre indicato che cPD1 induce la trascrizione del gene *traE* mediante un *read-through* dei siti di terminazione di *ipd*. Accurate misure AFM hanno infine consentito di identificare il corretto inizio della trascrizione del gene *traA*, localizzato circa 100 nucleotidi più a monte rispetto a quello precedentemente proposto. Si può ritenere che la trascrizione di *traA* origini quindi un mRNA con una lunga sequenza non tradotta all'estremità 5', con un probabile ruolo regolativo. Inoltre, la trascrizione del gene *traA* potrebbe essere anch'essa regolata dal legame della proteina TraA ad un terzo sito, da noi identificato in prossimità del suo promotore.

INDICE

INDICE	1
PARTE I. INTRODUZIONE	5
1. Il genere <i>Enterococcus</i>	5
2. Proprietà funzionali degli enterococchi.....	5
2.1 Batteriocine prodotte dagli enterococchi.....	6
2.2 Metabolismo del citrato.....	7
2.3 Proteolisi e lipolisi svolte dagli enterococchi.....	7
2.3.1 Proteolisi.....	7
2.3.2 Lipolisi	8
2.4 Enterococchi come probiotici.....	8
3. Gli enterococchi negli alimenti	9
3.1 Formaggi	10
3.2 Prodotti carnei	12
3.3 Verdure e olive	12
4. Gli enterococchi come patogeni.....	13
4.1 Antibiotico-resistenza degli enterococchi	13
4.2 Fattori di virulenza degli enterococchi.....	14
4.2.1 Citolisina	14
4.2.2 Sostanza aggregante	15
4.2.3 Gelatinasi.....	15
4.2.4 Proteina extracellulare di superficie.....	15
4.3 Meccanismi di trasferimento genico	16
5. Trasferimento plasmidico feromone-dipendente	17
5.1 Sintesi dei feromoni	19
5.2 Legame ed internalizzazione del feromone nella cellula	20
5.3 Controllo dell'attività del feromone endogeno	21
5.3.1 Il peptide inibitore	21
5.3.2 La famiglia delle proteine TraB	23
5.4 Fase intracellulare dell'induzione	24
5.4.1 Regolazione della coniugazione in pAD1	24

5.4.2 Regolazione della coniugazione in pCF10	28
5.4.3 Ruolo di TraA nella regolazione della coniugazione di pPD1	32
PARTE II. SCREENING DI CEPPI DI ENTEROCOCCHI (<i>E. FAECALIS</i>) DI ORIGINE ALIMENTARE PER LA PRESENZA DI PLASMIDI FEROMONE-DIPENDENTI.....	35
Scopo della ricerca	35
Risultati	36
1. Progettazione di primer specifici per pPD1, pAD1 e pCF10.....	36
2. Screening dei ceppi	37
3. PCR multiplex.....	40
Discussione.....	41
Materiali e metodi	43
1. Ceppi analizzati	43
2. Reazioni di PCR.....	43
2.1 PCR <i>touchdown</i>	43
2.2. Estrazione di DNA plasmidico.....	44
2.3 PCR multiplex.....	44
PARTE III. CLONAGGIO, ESPRESSIONE, PURIFICAZIONE E PROPRIETA' DI LEGAME DELLE PROTEINE TraA E TraC.....	47
Scopo della ricerca	47
Risultati e discussione	48
1. Espressione e purificazione di TraA e TraC in forma ricombinante.....	48
2. Stato di aggregazione di TraA e TraC.....	50
3. Legame del feromone e dell'inibitore a TraA e TraC.....	51
4. Legame di TraA al DNA.....	53
Materiali e metodi	54
1. Ceppi e plasmidi.....	54
2. Clonaggio genico ed espressione eterologa di TraA e TraC.....	54
3. Purificazione delle proteine ricombinanti TraA e TraC.....	55
4. Misure di spettrometria di massa	55
5. Analisi di sequenza dei geni <i>ipd</i> e <i>cpd</i> di <i>E. faecalis</i> 7C5	56
6. Sintesi dei peptidi.....	57
7. Saggi di legame proteina-peptide.....	57
8. Saggio di legame TraA-DNA.....	58

PARTE IV. INTERAZIONI DI TraA CON REGIONI DI DNA DEL PLASMIDE pPD1 ESSENZIALI PER IL TRASFERIMENTO PLASMIDICO CONIUGATIVO FEROMONE- DIPENDENTE	59
Scopo della ricerca	59
Risultati	60
1. Legame differenziale di TraA ai siti Tab1, Tab2 e Tab3	60
2. Riposizionamento del promotore del gene <i>traA</i>	66
3. Identificazione di nuovi siti di legame di TraA nella regione intergenica <i>traA-traE</i>	69
4. Regolazione della trascrizione del gene <i>ipd</i>	73
Discussione.....	76
Materiali e metodi	79
1. DNA templati per AFM	79
2. DNA templati per i saggi di migrazione ritardata su gel.....	80
3. DNA templati per i saggi di trascrizione <i>in vitro</i>	80
4. Proteine e peptidi.....	81
5. Microscopia a forza atomica	81
6. Saggi di migrazione ritardata su gel.....	85
7. Saggi di trascrizione <i>in vitro</i>	85
8. Ibridazioni di RNA.....	86
PARTE V. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	89
PARTE VI. BIBLIOGRAFIA.....	93

PARTE I. INTRODUZIONE

1. Il genere *Enterococcus*

I batteri del genere *Enterococcus* appartengono al vasto gruppo dei microrganismi conosciuti come batteri lattici (LAB), così chiamati per la loro capacità di promuovere la fermentazione lattica.

Gli enterococchi sono cocchi Gram-positivi, non sporigeni, catalasi e ossidasi negativi, anaerobi facoltativi che si presentano singolarmente, in coppie o in corte catene. Sono acidofili o acidotolleranti, la maggior parte cresce a un pH di 4-4.5, alcune specie tollerano pH molto bassi, fino a 3.6, altre sono attive a pH più alti, fino a pH 6. Crescono a un optimum di temperatura di 35°C; la maggior parte delle specie può crescere a temperature che vanno da 10 a 45°C e sopravvivere a riscaldamento a 60°C per 30 minuti. Sono debolmente proteolitici e lipolitici.

Dal punto di vista tassonomico il genere *Enterococcus* è stato aggiornato diverse volte ^{1; 2; 3; 4} dagli anni 80, quando studi d'ibridazione DNA-DNA e sequenziamento della subunità 16S dell'RNA ribosomiale hanno permesso di stabilire che le specie *Streptococcus faecium* e *S. faecalis* fossero sufficientemente distanti dalle altre specie di streptococchi da essere trasferite nel genere *Enterococcus* ⁵. Ad oggi appartengono agli enterococchi 28 specie: *E. asini*, *E. avium*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharominimus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus* e *E. villorum*.

Gli enterococchi sono largamente diffusi nell'ambiente grazie alla loro capacità di crescere e sopravvivere in condizioni avverse. Si possono trovare nel terreno, negli alimenti e nell'acqua ma il loro habitat naturale è rappresentato dal tratto gastrointestinale di uomini e animali.

2. Proprietà funzionali degli enterococchi

Studi effettuati sulla microflora di formaggi stagionati dell'area mediterranea hanno indicato che gli enterococchi giocano un ruolo importante nella maturazione, probabilmente grazie alla proteolisi, lipolisi e al metabolismo del citrato, contribuendo così al loro aroma ^{6; 7; 8; 9; 10}. Essi sono rinvenibili anche in altri prodotti alimentari fermentati, come salsicce ^{11; 12; 13; 14} e olive ^{11; 15; 16; 17; 18}. Gli enterococchi hanno la capacità di produrre batteriocine, chiamate enterocine, che sono

piccoli peptidi con attività antimicrobica nei confronti di batteri Gram-positivi, come ad esempio *Listeria*¹⁹. In alcuni paesi inoltre gli enterococchi sono usati come probiotici^{11; 12}.

2.1 Batteriocine prodotte dagli enterococchi

Le batteriocine prodotte dai LAB appartengono ad un largo gruppo di piccoli peptidi antimicrobici sintetizzati naturalmente dai microrganismi a livello ribosomiale. Questi peptidi sono cationici, anfifilici e differiscono per spettro e modalità d'azione, struttura e massa molecolare, termostabilità, range di pH in cui sono attivi, determinanti genetici^{19; 20; 21; 22; 23; 24; 25}.

Le batteriocine prodotte dai LAB possono essere suddivise in tre classi principali a seconda delle proprietà strutturali, fisico-chimiche e molecolari. Tuttavia, questa classificazione viene continuamente aggiornata ed evolve con l'aumentare delle informazioni che si acquisiscono e con la scoperta di nuove batteriocine^{23; 25; 26}. Le batteriocine di classe I sono i lantibiotici, piccoli peptidi cationici, idrofobici, stabili al calore, che contengono amminoacidi modificati post-traduzionalmente, come la lantionina o la 3-metil-lantionina. Le batteriocine di classe II sono piccoli peptidi idrofobici, cationici, stabili al calore, che non sono modificati post-traduzionalmente, ad eccezione della rimozione del peptide segnale. In questa classe possono essere identificate tre sottoclassi: la sottoclasse IIa o batteriocine pediocina-simili, con un forte effetto anti-*Listeria* e con la sequenza consenso YGNGV all'N-terminale; la sottoclasse IIb o batteriocine che richiedono due catene polipeptidiche per la piena attività; la sottoclasse IIc o batteriocine che non appartengono ai due sottogruppi precedenti. Le batteriocine di classe III sono un gruppo di proteine idrofiliche e labili al calore.

Ad oggi sono state identificate numerose enterocine; Krämer e Brandis²⁷ hanno riportato l'attività anti-*Listeria* della batteriocina E1A prodotta da *E. faecium* E1. Attualmente la capacità degli enterococchi di inibire la *Listeria* spp. è ben conosciuta e può essere spiegata dalla vicinanza filogenetica tra enterococchi e *Listeria*^{2; 3}. La prima batteriocina purificata è stata l'enterocina AS-48 prodotta da *E. faecalis* S-48^{28; 29}, che è stata definita un peptide antibiotico ciclico. Da allora il numero di batteriocine caratterizzate sta crescendo, anche se molte di queste non sono state purificate. Questo è il caso della batteriocina prodotta da *E. faecalis* K 4³⁰, da *E. faecalis* 226 NWC³¹, da *E. faecium* L1³² e da molti altri ceppi.

Le enterocine, come molte altre batteriocine, hanno come target primario la membrana citoplasmatica. Esse formano pori nelle membrane cellulari dissipando così il potenziale transmembrana e/o il gradiente di pH e causando la perdita di indispensabili molecole intracellulari²³.

2.2 Metabolismo del citrato

Il citrato è presente in molte materie prime usate nelle fermentazioni degli alimenti, come frutta, vegetali e latte, ed è anche usato come additivo per la produzione di salsicce fermentate. Non tutti i LAB sono in grado di metabolizzare il citrato; questa proprietà è invariabilmente legata ai plasmidi endogeni che contengono il gene codificante per il trasportatore responsabile dell'*uptake* del citrato dal mezzo. Durante la degradazione del citrato si formano prodotti metabolici come diacetile, acetaldeide, acetoino e 2,3-butandiolo, composti che hanno proprietà aromatiche molto distinte e influenzano in modo significativo la qualità degli alimenti fermentati³³. Ad esempio il diacetile determina le proprietà di aroma dei formaggi freschi, del latte fermentato, della panna e del burro. Dalla degradazione del citrato si ottiene anche anidride carbonica che contribuisce alla *texture* di alcuni prodotti caseari.

Il metabolismo dell'acido citrico è stato studiato in modo approfondito ed è stato documentato in ceppi di *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*^{34; 35; 36; 37; 38; 39}. Limitate sono invece le informazioni disponibili riguardo al metabolismo del citrato da parte degli enterococchi^{40; 41; 42}. Solo negli ultimi anni l'attenzione si è focalizzata su questi microrganismi, probabilmente perché diversi ceppi di enterococchi sono stati rinvenuti in molti formaggi, soprattutto dell'area mediterranea. Il catabolismo del citrato del latte da parte degli enterococchi può spiegare, insieme ad altri meccanismi, il ruolo di questi batteri nello sviluppo di proprietà organolettiche nei formaggi^{43; 44; 45; 46; 47}.

2.3 Proteolisi e lipolisi svolte dagli enterococchi

2.3.1 Proteolisi

La degradazione della caseina gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo della *texture* nel formaggio. Inoltre, alcuni peptidi possono contribuire alla formazione di aromi desiderati e non. Anche la degradazione secondaria degli amminoacidi è considerata avere un impatto importante sullo sviluppo di aromi nei formaggi. Oltre agli enzimi proteolitici del latte e alla chimosina usata per la coagulazione delle proteine, si ritiene abbiano un ruolo importante nell'idrolisi della caseina durante la preparazione del formaggio anche le proteasi associate alla parete cellulare dei LAB e le peptidasi intracellulari rilasciate dopo la lisi nel latte cagliato⁴⁸.

Studi riguardanti la proteolisi svolta dai batteri lattici sono principalmente confinati al genere *Lactococcus* e *Lactobacillus*^{49; 50}. Benchè in letteratura non ci siano molte informazioni concernenti la proteolisi svolta dagli enterococchi, si può affermare che questa attività è generalmente bassa per i ceppi di *Enterococcus*, ad eccezione di ceppi della specie *E. faecalis*^{51; 52; 53}.

2.3.2 Lipolisi

I lipidi hanno un grande effetto sull'aroma e sulla *texture* del formaggio. Essi contribuiscono all'aroma del formaggio in diversi modi, ad esempio sono fonte di acidi grassi, soprattutto a corta catena, che possono essere convertiti in altri composti aromatici come metil chetoni e lattoni; in seguito all'ossidazione degli acidi grassi, inoltre, portano alla formazione di varie aldeidi insature molto saporite. L'idrolisi dei grassi del latte durante la preparazione e la maturazione dei formaggi è dovuta alle lipasi endogene del latte, agli enzimi lipolitici di batteri starter e non-starter e, a seconda del tipo di formaggio, da preparazioni di enzimi esogeni ⁵⁴. I LAB sono considerati debolmente lipolitici rispetto ad altri gruppi di microrganismi. Nonostante ciò si ritiene che l'attività lipolitica svolta dai LAB abbia un ruolo importante nella determinazione di aromi particolari di molti formaggi. Si ritiene che alcuni LAB usati come starter (*Lactococcus* e *Lactobacillus*) e altri batteri (*Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Micrococcus*), che possono sopravvivere alla pastorizzazione e/o contaminare il formaggio durante la maturazione, contribuiscano in modo significativo all'idrolisi dei grassi ⁵⁴. Riguardo all'attività lipolitica degli enterococchi in letteratura esistono dati scarsi e contraddittori. Gli studi più recenti hanno concluso che l'attività lipolitica degli enterococchi sul latte è ceppo-dipendente. Molti dei ceppi analizzati hanno esibito una bassa attività e solo alcuni ceppi appartenenti alla specie *E. faecalis* sono stati classificati come lipolitici ⁵⁵. Uno studio ancora più recente svolto su 129 enterococchi ha mostrato che la maggior parte (90%) ha idrolizzato tutti i substrati dalla tributirina (C4) alla tristearina (C18) in misura decrescente. Inoltre, per quanto riguarda l'attività esterasica, tutti i ceppi erano attivi sui substrati sintetici usati, dal 4-nitrofenilacetato (C2) allo stearato (C18), con attività decrescente. Generalmente, i ceppi di *E. faecalis* sono i più lipolitici e con maggior attività esterasica, seguiti *E. faecium* e *E. durans* ⁴³.

2.4 Enterococchi come probiotici

Un probiotico può essere definito una preparazione o un prodotto contenente microrganismi vitali in numero sufficiente a modificare la microflora dell'ospite apportando benefici per la salute ¹⁹. Sono applicati in alimenti come yogurt, lattici fermentati e non, formulazioni per l'infanzia e preparazioni farmaceutiche. Ai probiotici vengono attribuiti numerosi effetti positivi: rinforzano le difese immunitarie, bilanciano la flora microbica, riducono gli enzimi fecali implicati nello sviluppo del cancro, vengono impiegati in trattamenti di diarrea associata a viaggi e terapie antibiotiche, nel controllo del rotavirus e delle coliti causate da *Clostridium difficile* e nella prevenzione di ulcere collegate a *Helicobacter pylori*. I probiotici sono anche stati implicati nella riduzione del colesterolo nel sangue, inibiscono i microrganismi patogeni di origine alimentare e gli organismi che causano carie dentali, migliorano i sintomi del malassorbimento del lattosio

come pure delle infezioni da candida e del tratto urinario ⁵⁶. I microrganismi per essere definiti probiotici devono avere alcuni requisiti ⁵⁷. Tra questi ricordiamo la capacità di aderire alle cellule, di escludere o ridurre l'aderenza dei patogeni, di sopravvivere a lungo e moltiplicarsi, di produrre acidi, perossido di idrogeno e batteriocine; devono essere sicuri, non invasivi, non cancerogeni e non patogeni e aggregarsi per formare una flora bilanciata. I ceppi usati come probiotici per l'uomo vengono isolati dal tratto gastro-intestinale umano e spesso appartengono al genere *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Ceppi appartenenti anche ad altre specie però sono state usate come probiotici come ad esempio *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. thermophilus*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteriodes*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Pediococcus acidilactici*, *Sporolactobacillus inulinus*, *E. coli*, *Bacillus cereus* ed il lievito *Saccharomyces cerevisiae* ^{58; 59}; ⁶⁰. Ceppi di *E. faecalis* vengono anche usati come integratori nell'alimentazione animale. Dal febbraio 2004 sono state autorizzate dall'unione europea 10 preparazioni (9 differenti ceppi di *E. faecium*) come additivi per mangimi (European Commission, 2004). Un ceppo studiato molto approfonditamente di *Enterococcus* usato come probiotico è l'*E. faecium* SF 68, prodotto in Svizzera (Cylactin® LBC SF68 ME10, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland). Si utilizza per la prevenzione di diarrea associata a cure antibiotiche ⁶¹ e per il trattamento della diarrea nei bambini ⁶². In Danimarca un latte fermentato contenente *E. faecium* SF 68 è stato venduto per diversi anni per il suo effetto ipocolesterolemico ⁶³. Un altro prodotto probiotico disponibile sul mercato che contiene un ceppo di *E. faecium* è Walthers ECOFLOR (Walthers Health Care, Den Haag, The Netherlands).

L'uso di enterococchi come probiotici rimane una questione controversa. Benché siano comprovati gli effetti benefici di alcuni ceppi, la crescente associazione degli enterococchi a malattie umane e ad antibiotico resistenze multiple ha sollevato numerosi dubbi riguardo al loro impiego. Il timore che geni che codificano per antibiotico resistenze e fattori di virulenza possano essere trasferiti ad altri batteri del tratto gastrointestinale ha contribuito ad alimentare questa controversia ¹².

3. Gli enterococchi negli alimenti

Gli enterococchi sono ampiamente diffusi nell'ambiente e il loro habitat principale è rappresentato dal tratto gastrointestinale di uomini e animali. *E. faecalis* è spesso la specie predominante nell'intestino umano, anche se in alcuni individui e in alcuni paesi la specie *E. faecium* risulta prevalente ³. Mundt ⁶⁴ ha dimostrato che la presenza di *E. faecalis* negli alimenti non è sempre direttamente collegata alla contaminazione fecale. Nel 1992, l'UE ha stabilito un livello massimo per la presenza di coliformi e *Escherichia coli*, entrambi considerati come indicatori di igiene, mentre non è stato posto nessun limite per gli enterococchi. Inoltre, è stato

dimostrato che gli enterococchi hanno un basso valore come indicatori di igiene nei processi delle industrie alimentari ⁶⁵. Oltre a ciò, benché *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans* siano spesso isolati dalle feci umane, essi sono molto meno diffusi in animali che sono fonti di alimenti, come maiali, bovini e pecore ¹¹. Gli enterococchi non sono solo associati ad animali vertebrati, ma si possono anche trovare nel terreno, nelle acque di superficie, nei vegetali e negli insetti ^{64, 66}. La resistenza degli enterococchi alla temperatura di pastorizzazione e la loro adattabilità a diversi substrati e condizioni di crescita (temperature basse e alte, pH e concentrazione di sale estremi) fanno sì che essi si possano ritrovare sia in alimenti prodotti con materie prime crude (latte o carne), sia in prodotti alimentari trattati con il calore. Questo significa che questi batteri possono sostenere le normali condizioni di produzione degli alimenti oltre ad avere la capacità di contaminare i prodotti finiti durante il *food processing*. Pertanto, gli enterococchi possono diventare una parte importante della microflora di alimenti fermentati, specialmente formaggi e carni. Il contributo degli enterococchi alle proprietà organolettiche di alimenti fermentati e la loro capacità di produrre batteriocine (enterocine) sono importanti caratteristiche per la loro applicabilità nella tecnologia alimentare. Negli ultimi anni sono cresciuti considerevolmente i lavori riguardanti l'utilizzo degli enterococchi sottoforma di colture o co-colture starter. La maggior parte di questo tipo di ricerche si è focalizzata sull'applicabilità dei ceppi di enterococchi con interessanti proprietà biochimiche e tecnologiche in formaggi e, in minima parte, in prodotti carnei. La selezione di enterococchi da poter usare nei processi alimentari è un compito difficile a causa del potenziale rischio che possono rappresentare per la salute umana ^{67, 68}.

3.1 Formaggi

Gli enterococchi sono associati a formaggi tradizionali europei prodotti con latte crudo o pastorizzato di capra, pecora, bufala e mucca in paesi mediterranei come Grecia, Italia, Spagna e Portogallo ^{10; 69; 70; 71}. La presenza degli enterococchi nel latte e nei formaggi è stata a lungo considerata il risultato di condizioni non igieniche durante i processi di lavorazione. La contaminazione può avere origine fecale diretta, o essere indiretta, quindi associata a sorgenti d'acqua, alle parti esterne degli animali, alle attrezzature e i recipienti di stoccaggio del latte ^{13; 72}. I livelli di enterococchi nelle cagliate dei diversi formaggi rientrano in un range che va da 10^4 a 10^6 CFU g⁻¹ e nei formaggi completamente maturi da 10^5 a 10^7 CFU g⁻¹ ^{10; 11; 12; 13}, con *E. faecalis* e *E. faecium* come specie predominanti. In tabella 1 sono mostrati tutti i formaggi europei nei quali gli enterococchi sono stati studiati. Sebbene alcuni autori in passato abbiano sostenuto che alti livelli di contaminazione da enterococchi possano causare un deterioramento delle proprietà sensoriali di alcuni formaggi ^{73; 74}, ci sono numerosi dati in letteratura che provano che questi microrganismi nel formaggio hanno un ruolo favorevole. Gli enterococchi contribuiscono alla

maturazione e allo sviluppo dell'aroma di questi alimenti grazie alla loro attività proteolitica ed esterasica, così come alla produzione di diacetile ed altri importanti composti volatili ^{11; 12; 44}.

Origini	Formaggio	Tipo di latte	Riferimenti
Francese	Comté	Mucca	Bouton et al., 1998
Francese	Roquefort	Mucca	Devoyod, 1969
Francese	Venaco	Pecora/capra	Casalta and Zennaro, 1997
Greco	farmhouse cheese	Pecora	Gomez et al., 2000
Greco	Feta	Pecora	Litopolou-Tzanetaki et al., 1993
Greco	Feta and Teleme	Pecora	Tzanetakis and Litopoulou-Tzanetaki, 1992
Greco	Kefalotyri	Pecora	Litopolou-Tzanetaki, 1990
Greco	Orinotyri	Pecora	Prodromou et al., 2001
Greco	Pichtogalo Chanion	Pecora/capra	Papageorgiou et al., 1998
Irlandese	Cheddar	Mucca	Gelsomino et al., 2001
Italiano	Buffalo Mozzarella	Bufala	Parente et al., 1989
Italiano	Fiore Sardo	Pecora	Ledda et al., 1994
Italiano	Fontina	Mucca	Battistotti et al., 1977
Italiano	Montasio	Mucca	Basso et al., 1994
Italiano	Monte Veronese	Mucca	Torriani et al., 1998
Italiano	Mozzarella	Mucca	Morea et al., 1999
Italiano	Pecorino Sardo	Pecora	Mannu et al., 1999; Mannu and Paba, 2002
Italiano	Semicotto Caprino	Capra	Suzzi et al., 2000
Portoghese	Serra da Estrela	Pecora	Macedo et al., 1995
Portoghese	Serra da Estrela	Pecora	Tavaria and Malcata, 1998
Spagnolo	Armada	Capra	Tornadijo et al., 1995
Spagnolo	Arzúar	Mucca	Centeno et al., 1995
Spagnolo	Cebreiro	Mucca	Centeno et al., 1996, 1999
Spagnolo	Cebreiro	Mucca	Menéndez et al., 1998
Spagnolo	Majorero	Capra	Fontecha et al., 1990
Spagnolo	La Serena	Pecora	Fernandez del Pozo et al., 1988
Spagnolo	Manchego	Pecora	Ramos et al., 1981
Spagnolo	Roncal-Idiazabal	Pecora	Arizcun et al., 1997
Spagnolo	San Simón	Mucca	García et al., 2002
Spagnolo	Tenerife	Capra	Zárate et al., 1997
Spagnolo	Tetilla	Mucca	Menéndez et al., 2001

Tabella 1. Formaggi europei in cui sono state identificate specie di enterococchi.

3.2 Prodotti carnei

La presenza degli enterococchi nel tratto gastrointestinale degli animali potrebbe portare alla contaminazione della carne durante la macellazione. In studi effettuati su prodotti a carne cruda, *E. faecalis* è risultata essere la specie predominante in tagli di manzo e maiale⁷⁵ e in campioni di polli raccolti in macelli per pollame. Oltre che alla carne cruda, gli enterococchi possono anche essere associati alla carne processata. Il riscaldamento delle carni processate durante la produzione può conferire un vantaggio selettivo agli enterococchi, in quanto questi microrganismi sono tra i più termotolleranti tra i batteri non sporigeni. Ceppi di *E. faecalis* e *E. faecium* possono sopravvivere a trattamenti termici^{76; 77}. La resistenza al calore degli enterococchi in questi prodotti è influenzata da componenti come il sale, i nitriti e i tessuti della carne^{11; 76; 77}. Per evitare la contaminazione di queste carni processate è consigliato di mantenere la contaminazione iniziale al minimo ed effettuare trattamenti termici adeguati in base alla resistenza termica degli enterococchi isolati dal materiale crudo⁷⁶.

Gli enterococchi sono stati anche isolati da alcuni tipi di salsicce fermentate. I salami e i Landjäger contengono enterococchi in un numero variabile da 100 a 2.6×10^5 CFU g⁻¹⁷⁸. Gli enterococchi sono stati anche isolati da salsicce fermentate sottoposte a disidratazione, come il Chorizo^{79; 80} e l'Espetec⁸¹, entrambi prodotti in Spagna. Inoltre, è stato riportato che la concentrazione di enterococchi alla fine del processo di maturazione in salsicce fermentate tedesche ed italiane, prodotte sia con l'aggiunta di culture starter che senza, va da 10^3 a 10^5 CFU g⁻¹⁸².

Le attività biochimiche degli enterococchi nelle salsicce non sono state studiate come nel caso dei prodotti caseari. Essi possono contribuire all'aromatizzazione delle salsicce grazie alla loro attività glicolitica, proteolitica e lipolitica. Inoltre, è stata descritta la capacità degli enterococchi di ridurre la formazione di metamioglobina¹⁴.

3.3 Verdure e olive

Gli enterococchi sono comunemente presenti in numero elevato in verdure e olive^{11; 13; 18; 83}. I dati in letteratura riguardanti l'isolamento e la caratterizzazione di enterococchi da questi alimenti è scarsa. Gli enterococchi sono stati isolati da olive verdi fermentate Spanish-style¹⁷, spesso contaminate da *E. faecium* e *E. faecalis*. In uno studio recente Ben Omar e collaboratori¹⁸ hanno studiato le proprietà funzionali, le caratteristiche di virulenza e di antibiotico-resistenza di cinquanta "isolati" di enterococchi da differenti campioni alimentari spagnoli. Tre di questi sono stati isolati dalle olive e appartengono alla specie *E. faecium*. In un altro studio recente, Randazzo e collaboratori⁸⁴ hanno isolato 52 LAB da olive verdi fermentate naturalmente raccolte in diverse

zone della Sicilia. Anche se la maggior parte di questi ceppi è risultata appartenere al genere *Lactobacillus*, quattro sono stati identificati come *Enterococcus* spp. sulla base di tratti fenotipici e biochimici. La caratterizzazione dell'rDNA 16S effettuata mediante l'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) ha rivelato che questi ceppi appartenevano alle specie *E. faecium*, *E. caselliflavus* e *E. hirae*. La diversificazione dei prodotti vegetali nei negozi europei sta aumentando e i vegetali pronti, minimamente processati, sono molto popolari tra i consumatori. LAB produttori di batteriocine o batteriocine purificate potrebbero venire impiegate per migliorare la loro sicurezza. Tuttavia, l'uso di batteriocine, prodotte da ceppi di enterococchi, come biopreservanti in verdure e olive è stato studiato molto superficialmente^{16; 17; 31; 85}.

4. Gli enterococchi come patogeni

Gli enterococchi sono tra i più comuni patogeni nosocomiali in soggetti defedati e immunodepressi e spesso sono implicati come causa di endocarditi, batteriemie ed infezioni del tratto urinario, del sistema nervoso centrale, intraddominali e pelviche¹¹. Numerosi sono i fattori di virulenza associati a questi organismi che sono stati descritti⁸⁶ e il numero dei ceppi di enterococchi antibiotico-resistenti (ARE), specialmente quelli vancomicina-resistenti (VRE), è in crescita⁸⁷.

4.1 Antibiotico-resistenza degli enterococchi

L'antibiotico resistenza può essere naturale (intrinseca) e acquisita (trasferibile). Gli enterococchi hanno resistenze sia naturali che acquisite⁸⁸. Esempi di resistenza intrinseca sono la vancomicina resistenza (tipo *VanC*) in *E. gallinarum*, e la resistenza nei confronti di streptogramina in *E. faecalis*, così come alle isoxazolilpenicilline, alle cefalosporine, ai monobactami, agli aminoglicosidi (a bassi livelli) e ai lincosamidi. È invece acquisita la resistenza all'ampicillina (specialmente in *E. faecium*), alle tetracicline, ai macrolidi, agli aminoglicosidi (ad alti livelli), al cloramfenicolo, ai chinoloni e alle streptogramine (in *E. faecium* e nelle specie vicine) e ai glicopeptidi (vancomicina). L'ampicillina, la vancomicina e la gentamicina sono gli antibiotici di uso clinico più rilevanti per la cura di infezioni causate da ceppi di enterococchi con antibiotico-resistenze multiple. E' da notare che nelle due decadi passate l'uso eccessivo di vancomicina ha fatto crescere sensibilmente il numero di VRE e quindi la percentuale di enterococchi nosocomiali invasivi che possiedono alti livelli di vancomicina-resistenza⁸⁷. Sfortunatamente i VRE sono anche molto resistenti a tutte le cure anti-enterococchi⁸⁹ e quindi i VRE sono batteri molto temibili. Dutka-Malen e collaboratori⁹⁰ hanno messo a punto un saggio PCR per identificare i genotipi associati alla resistenza ai glicopeptidi. Gli enterococchi resistenti ai

glicopeptidi sono infatti fenotipicamente e genotipicamente eterogenei. La resistenza ai glicopeptidi negli enterococchi si manifesta grazie alla presenza, nel genoma batterico, di sei distinti geni indicati con le sigle *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, codificanti per i rispettivi pattern fenotipici ⁹¹. Tra questi i fenotipi *vanA* e *vanB* sono quelli con maggior rilevanza clinica e sono osservati più frequentemente in due specie di enterococchi: *E. faecalis* e *E. faecium*. ^{92; 93; 94}. Benché *E. faecalis* sia probabilmente ancora la causa della maggior parte delle infezioni, quelle provocate da *E. faecium* sono in aumento ⁹⁵; inoltre *E. faecium* tenderebbe ad acquisire ampicillina e vancomicina resistenza più frequentemente di *E. faecalis* ⁹⁶. Gli ARE sono largamente diffusi negli alimenti. Sono stati trovati in prodotti a base di carne, caseari, in cibi pronti e perfino tra ceppi di enterococchi impiegati come probiotici ^{13; 97}. Franz e collaboratori ⁹⁷ hanno trovato in enterococchi isolati da alimenti in Europa numerosi tratti di resistenza acquisita; i ceppi coinvolti però non mostravano in generale resistenza nei confronti degli antibiotici clinicamente più rilevanti. Giraffa ¹³ ha enfatizzato il ruolo giocato dagli alimenti come possibile “serbatoio” di ARE, in particolare di VRE, che potrebbero causare la diffusione dei tratti di antibiotico-resistenza nell’ambiente. Studi recenti hanno investigato la diffusione di VRE in campioni alimentari ^{98; 99}, confermando che svariati ceppi trasportano vancomicina-resistenza. Diventa quindi fondamentale che i ceppi che vengono usati negli alimenti (come starter e/o probiotici) siano privi di geni codificanti per antibiotico resistenza ^{67; 68; 97}.

4.2 Fattori di virulenza degli enterococchi

I fattori di virulenza consistono in molecole che aumentano la capacità dei microrganismi di causare malattie ¹⁰⁰. Tipici esempi sono la citolisina, la sostanza aggregante, la gelatinasi, il superossido extracellulare e la proteina extracellulare di superficie.

4.2.1 Citolisina

La citolisina è una citotossina ad attività emolitica. L’analisi amminoacidica di una citolisina purificata da *E. faecalis* ha rivelato che appartiene ai lantibiotici (batteriocine di classe I) ¹⁰¹. La citolisina è l’unico tra i lantibiotici in grado di lisare cellule eucariotiche oltre ad avere effetto battericida. Come tutti i lantibiotici, la citolisina forma dei pori nelle membrane citoplasmatiche di cellule batteriche target. Per la produzione di citolisina è necessario un cluster genico contenente sei geni ^{101; 102}. I due geni che codificano per le subunità di citolisina sono chiamati *cyiL_L* (codificante per un peptide di 68 amminoacidi) e *cyiL_S* (codificante per un peptide di 63 amminoacidi). Solo i ceppi che sono in grado di esprimere e secernere entrambe le subunità sono emolitici ¹⁰³. I geni codificanti per la citolisina sono localizzati sul plasmide coniugativo

feromone-dipendente ad alta trasmissibilità pAD1¹⁰⁴. È stata riscontrata la sua presenza nel 60% dei ceppi di *E. faecalis* isolati da campioni clinici e ne è stata ampiamente confermata l'attività tossica e di batteriocina. Nell'uomo la citolisina sembra contribuire alla patogenesi; in particolare il rischio di morte in caso di batteriemie causate da ceppi citolitici risulta essere cinque volte superiore rispetto ad una stessa infezione causata da ceppi non citolitici¹⁰⁵.

4.2.2 Sostanza aggregante

La sostanza aggregante (AS) è una proteina di superficie feromone inducibile di *E. faecalis*, che promuove la formazione di aggregati durante la coniugazione batterica; in particolare, l'AS media il contatto tra le cellule enterococciche donatrici e riceventi per facilitare il trasferimento plasmidico¹⁰⁶. Questo tratto può contribuire alla patogenesi delle infezioni causate da enterococchi attraverso diversi meccanismi. Le cellule che esprimono questo tratto formano degli aggregati *in vivo*, ma non è noto come questo possa influenzare la fagocitosi ed il conseguente danneggiamento delle funzioni vitali dell'organismo. Infine, l'AS aumenta l'idrofobicità della superficie degli enterococchi; questo può indurre la localizzazione del colesterolo nei pagosomi e quindi prevenire o ritardare la fusione con le vescicole lisosomiali¹⁰⁰. Studi riguardanti le endocarditi hanno mostrato sinergia tra citolisina e AS. Fino ad ora l'AS è stata rinvenuta solo in ceppi di *E. faecalis*; tuttavia la sua incidenza tra gli "isolati" alimentari sembra essere alta^{97; 107}.

4.2.3 Gelatinasi

La gelatinasi (Gel) è una metallo endopeptidasi extracellulare coinvolta nella degradazione della gelatina, del collagene, dell'emoglobina e di altri peptidi bioattivi¹⁰⁸. Su e collaboratori¹⁰⁸ hanno sequenziato il gene della proteasi (*gelE*) in *E. faecalis*. E' stato dimostrato che la Gel, che è comunemente prodotta da "isolati" enterococcici clinici, fecali, nosocomiali, è un fattore di virulenza, almeno per le peritoniti indotte nei topi¹⁰⁹. La produzione di Gel da parte di ceppi di *E. faecalis* di origine alimentare è alta^{97; 107}. Tuttavia Eaton e Gasson¹⁰⁷ hanno dimostrato che anche quando il gene *gel* è presente si può trovare un fenotipo negativo. Nessun ceppo di *E. faecium* è stato trovato coinvolto nella produzione di Gel.

4.2.4 Proteina extracellulare di superficie

La proteina extracellulare di superficie (Esp) è stata descritta la prima volta in un "isolato" clinico di *E. faecalis* MMH594 da Shankar e collaboratori¹¹⁰. Il gene *esp* è costituito da 5622 nucleotidi ed è in grado di codificare un primo prodotto di trascrizione di 1873 amminoacidi. Studi sulla distribuzione di questa proteina di superficie rivelano un significativo arricchimento nelle infezioni derivate da "isolati" di *E. faecalis*^{110; 111}. Si ritiene che Esp abbia un ruolo nell'adesione

e nella capacità del batterio di sottrarsi alle difese immunitarie dell'ospite. La presenza della Esp in "isolati" alimentari è diversa per *E. faecium* e *E. faecalis*: mentre si trova piuttosto raramente in *E. faecium*, è trovata molto più frequentemente in *E. faecalis*^{97; 107}.

4.3 Meccanismi di trasferimento genico

Gli enterococchi sono in grado di trasferire materiale genetico, tra cui i geni che codificano per fattori di virulenza e per l'antibiotico resistenza, attraverso meccanismi di trasferimento genetico che coinvolgono plasmidi e trasposoni, ovvero piccole porzioni di DNA capaci, nel primo caso di replicarsi autonomamente, nel secondo di trasferirsi in punti diversi del genoma dello stesso organismo. Negli enterococchi esistono due tipi di plasmidi coniugativi¹¹². Il primo tipo, con grandezza di circa 30 kb, non produce aggregati e non viene trasferito da cellule donatrici a cellule riceventi in liquido di coltura, ma viene trasferito tra cellule su superfici solide (ad esempio membrane filtranti), con una frequenza di trasferimento relativamente bassa. Questi plasmidi hanno solitamente un ampio range di ospite e possono essere trasferiti anche a batteri appartenenti a genere diverso. Rappresentativi di questo tipo di plasmidi coniugativi sono pIP501 e pAM β 1, che sono trasferibili dagli enterococchi a lattococchi, lattobacilli, listeria, *S. aureus* e *Bacillus* spp., e per i quali sono noti i meccanismi molecolari di trasferimento^{11; 113; 114}. I plasmidi del secondo tipo sono feromone-dipendenti e si trovano essenzialmente in *E. faecalis*. Sono caratterizzati da un'elevata trasmissibilità a batteri della stessa specie, da una dimensione di circa 45 kb e dal fatto che la capacità di essere trasferiti dalla cellula donatrice a quella ricevente viene conferita da un piccolo feromone secreto dalla cellula ricevente. I plasmidi feromone-dipendenti più studiati sono il plasmide pAD1, che codifica per la citolisina, il plasmide pCF10, che codifica per la resistenza alla tetraciclina, e il plasmide pPD1, che codifica per la batteriocina 21. Gli enterococchi trasportano anche trasposoni coniugativi. Tra questi troviamo il trasposone Tn916, associato alla resistenza alla tetraciclina, identificato inizialmente in *E. faecalis* DS16¹¹⁵.

Lo scambio di materiale genetico tra enterococchi, tra cui plasmidi che codificano per antibiotico resistenza e determinanti di virulenza, è stato studiato sia *in vivo* che *in vitro*. E' stato dimostrato che anche in assenza della pressione selettiva della tetraciclina il plasmide pCF10 viene trasferito nel tratto gastrointestinale di suini da cellule di *E. faecalis* ingerite a cellule di *E. faecalis* già presenti nell'ambiente intestinale, permettendo la persistenza del plasmide nell'intestino^{116; 117}. Recentemente è stato riportato che la frequenza del trasferimento è fortemente influenzata dalle condizioni ambientali e che il trasferimento plasmidico in *E. faecalis* è attivato in presenza di plasma umano¹¹⁸.

La catena alimentare è stata indicata come possibile fonte di antibiotico-resistenza; recentemente ceppi di enterococchi che veicolano la resistenza ai glicopeptidi sono stati isolati in diversi

alimenti in Europa ^{119; 120; 121; 122; 123}. Un rischio che si sta valutando è il possibile trasferimento della resistenza alla vancomicina dagli enterococchi a *S. aureus*. Il trasferimento dei geni che codificano per l'antibiotico resistenza dagli enterococchi a *S. aureus* è stato descritto per la prima volta in ¹²⁴. Alcuni ceppi di *E. faecalis* trasportano plasmidi feromone-dipendenti che possono trasportare altre parti mobili di DNA, tra cui i trasposoni che codificano per l'antibiotico-resistenza. Questi plasmidi rispondono a peptidi prodotti da *S. aureus*, che inducono la coniugazione. Il trasposone entra nel cromosoma di *S. aureus*, mentre il plasmide non essendo in grado di riprodursi nello *S. aureus* viene perso. E' stato possibile ottenere in laboratorio il trasferimento della resistenza alla vancomicina da enterococchi a *S. aureus* ¹²⁵. Anche se il processo di trasferimento non è stato caratterizzato nei dettagli, è stato mostrato che *vanA* può essere trasferito ed espresso in *S. aureus*. Un esempio di trasferimento di antibiotico-resistenza a *S. aureus* è rappresentato dalla trasmissione di un trasposone vancomicina-resistente da un VRE ad un ceppo di *S. aureus* meticillina-resistente, che ha originato un ceppo di *S. aureus* vancomicina-meticillina-resistente in un paziente ospedalizzato ¹²⁶.

In passato è stato suggerito l'impiego degli enterococchi in ambito alimentare solo dopo che i ceppi patogeni e non patogeni fossero stati caratterizzati in base ad attente selezioni e a studi dei singoli casi. Era anche stata enfatizzata la presenza di ceppi sicuri ^{9; 127}. Oggi è chiaro che i meccanismi di trasferimento genico tra gli enterococchi rendono ogni ceppo potenzialmente patogeno ¹³.

5. Trasferimento plasmidico feromone-dipendente

Un sistema particolarmente interessante e unico tra i batteri è quello che controlla il trasferimento dipendente da feromoni di plasmidi in processi di coniugazione in *E. faecalis*.

Benché i meccanismi molecolari alla base del processo di coniugazione non siano completamente noti, i plasmidi feromone-dipendenti più studiati pPD1, pAD1 e pCF10, appaiono regolati da un medesimo meccanismo di trasferimento. La coniugazione ha inizio in risposta alla secrezione di un feromone (cPD1 per pPD1, cAD1 per pAD1 e cF10 per pCF10) altamente specifico da parte di una cellula ricevente priva di plasmidio. Il feromone induce nella cellula donatrice la trascrizione dei geni che codificano per le proteine coinvolte nel processo coniugativo, tra cui la sostanza aggregante. Una volta espressa sulla superficie della cellula donatrice, la sostanza aggregante permette il legame alla cellula ricevente inducendo la formazione di un "canale coniugativo", che consente il trasferimento del plasmide dalla cellula donatrice a quella ricevente. Dopo il trasferimento, la produzione della sostanza aggregante cessa, portando alla scomparsa di aggregazione cellulare. Il feromone viene internalizzato dalla cellula donatrice per mezzo di una "surface binding protein" (TraC per pPD1 e pAD1 e PrgZ per pCF10) e riconosciuto dal

recettore intracellulare TraA per pPD1 e pAD1 e PrgX per pCF10. TraA e PrgX sono “DNA-binding protein” che in assenza di feromone svolgono il ruolo di regolatori negativi del processo di coniugazione^{128; 129; 130; 131}.

L'autoinduzione della coniugazione dovuta alla produzione di feromone endogeno da parte delle cellule donatrici è prevenuta grazie a due specifici meccanismi: la produzione di un inibitore (iPD1 per pPD1, iAD1 per pAD1 e iCF10 per pCF10) codificato a livello plasmidico, e la sintesi della proteina plasmide-specifica, TraB per pPD1 e pAD1 e PrgY per pCF10 (Fig. 1). Grazie a questi meccanismi la coniugazione si verifica solo in presenza di feromone esogeno¹³². Un ceppo di *E. faecalis* che possiede un tipo di plasmide feromone-dipendente rimane sensibile all'acquisizione di altri tipi di plasmidi feromone-dipendenti; questa caratteristica può portare frequentemente alla coesistenza di diversi tipi di plasmidi feromone-dipendenti all'interno di una stessa cellula¹³³.

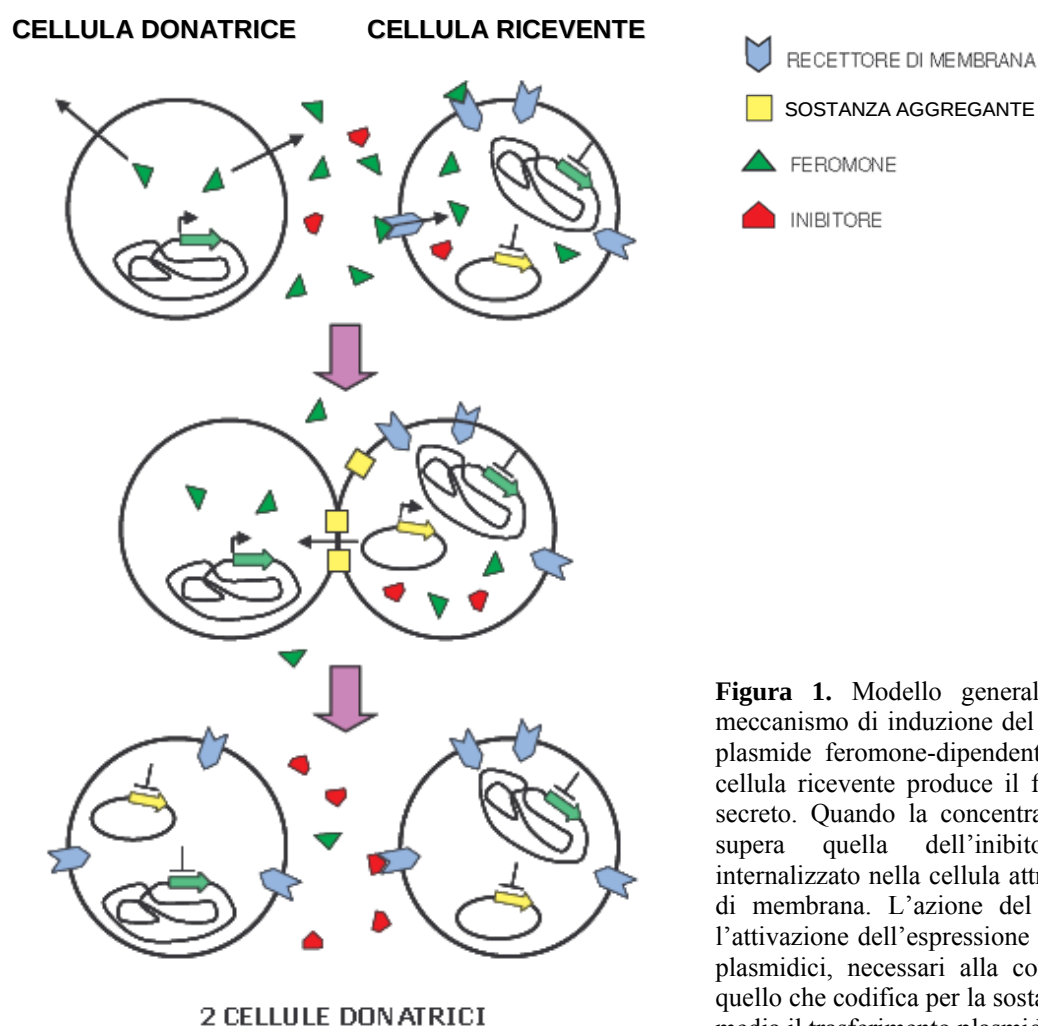


Figura 1. Modello generale che descrive il meccanismo di induzione del trasferimento di un plasmide feromone-dipendente. Il genoma della cellula ricevente produce il feromone che viene secreto. Quando la concentrazione di feromone supera quella dell'inibitore, esso viene internalizzato nella cellula attraverso un recettore di membrana. L'azione del feromone prevede l'attivazione dell'espressione di una serie di geni plasmidici, necessari alla coniugazione, tra cui quello che codifica per la sostanza aggregante che media il trasferimento plasmidico.

5.1 Sintesi dei feromoni

Tutti i feromoni sono peptidi di 7-8 amminoacidi che derivano dal taglio proteolitico del peptide segnale di lipoproteine secrete codificate a livello cromosomico dai ceppi di enterococchi ¹³⁴. Nel caso di pCF10 il feromone è secreto alla concentrazione di circa 10^{-11} M ed è in grado di indurre la risposta nella cellula donatrice a concentrazioni più basse di 2×10^{-12} M, che corrispondono a meno di 5 molecole di feromone per cellula donatrice ¹³⁵. La maggior parte dei ceppi di *E. faecalis* sintetizza molteplici feromoni, ciascuno con uno specifico spettro di attività. Nonostante la varietà di feromoni prodotti da una singola cellula e la loro similarità di sequenza, ogni plasmide risponde in modo altamente selettivo al rispettivo feromone, ignorando la presenza di feromoni specifici per altri plasmidi feromone-dipendenti ^{136; 137}.

Il processamento proteolitico del precursore di cCF10, così come quello per i precursori di cAD1 e cPD1, è necessario per il rilascio del peptide maturo nel surnatante di coltura. Tutti i precursori hanno un residuo di cisteina a valle della sequenza relativa al feromone maturo, che viene riconosciuta come sito di taglio da una peptidasi segnale II. Il taglio a livello di questo residuo coincide con il distacco del feromone maturo dalla lipoproteina ¹³⁸. Alcuni feromoni necessitano di un ulteriore processamento a monte della sequenza segnale, ad opera di un'altra proteasi, denominata Eep (*enhanced expression of pheromone*) ¹³⁹, simile ad alcune proteasi Zn-dipendenti appartenenti alla famiglia delle Rip (*regulated intermembrane proteolysis*), che a loro volta svolgono una ampia varietà di attività proteolitiche cellulari ¹⁴⁰. Eep opera il taglio dei precursori di cPD1, cAD1 e cCF10 (ma non di cAM373) all'estremità N-terminale della sequenza del feromone immaturo. Poiché Eep sembra essere una proteina di membrana, è stato ipotizzato che il taglio proteolitico del precursore del feromone possa essere accoppiato con il suo trasporto attivo attraverso la membrana verso l'esterno della cellula, come avviene per le batteriocine ed altri peptidi correlati. Considerando infatti l'elevata idrofobicità del peptide, il trasporto attivo attraverso la membrana può rappresentare l'unico modo in grado di assicurare il rilascio selettivo di feromone e per garantire che questo non interagisca in modo aspecifico con la membrana cellulare. Studi effettuati su cAD1 hanno mostrato che l'intera lunghezza del peptide è importante per la sua attività biologica. Una delezione sull'estremità N-terminale ne elimina completamente l'attività, mentre una delezione sull'estremità C-terminale non ne riduce apprezzabilmente l'attività. E' stata valutata l'attività di strutture ibride cAD1-cPD1. L'ibrido cAD1-cPD1 (quattro residui N-terminali di cAD1 e quattro residui carbossiterminali di cPD1: LFSLFLSG) mostra lo 0.01% dell'attività di cAD1 e nessuna attività di cPD1. L'ibrido cPD1-cAD1 (FLVMVLAG) ha lo 0.1% di attività di cPD1 e nessuna attività di cAD1 ¹⁴¹. Questi dati mostrano l'importanza

dell'estremità N-terminale del peptide per la specificità. L'aggiunta di un'alanina all'estremità N-terminale di cAD1 ne riduce di notevolmente l'attività ^{142; 143}.

Per quanto riguarda le lipoproteine precursori dei feromoni, poco è conosciuto. I loro geni sono variamente localizzati all'interno del genoma batterico e presentano come unica caratteristica comune il fatto di possedere la sequenza del feromone posta all'interno della sequenza segnale ¹³².

5.2 Legame ed internalizzazione del feromone nella cellula

Le cellule donatrici presentano sulla loro superficie un recettore specifico: una proteina codificata a livello plasmidico (TraC per pPD1 e pAD1 e PrgZ per pCF10) che può riconoscere e legare lo specifico feromone prodotto dalla cellula ricevente. TraC di pPD1 e pAD1 e PrgZ presentano un'elevata identità di sequenza amminoacidica e sono omologhi delle OppA (*"oligopeptide-binding proteins"*), proteine codificate a livello cromosomico e associate a sistemi di trasporto in *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* ^{136; 144}. Le porzioni N-terminali di queste proteine enterococciche contengono una sequenza segnale caratteristica delle lipoproteine secrete che permette il legame covalente alla superficie esterna della membrana plasmatica, a cui partecipa un residuo di cisteina N-terminale ¹³⁶. Studi condotti sul plasmide pCF10 hanno mostrato che l'ingresso nella cellula donatrice del feromone avviene grazie ad un meccanismo che coinvolge sia PrgZ che il sistema Opp ¹⁴⁵. Una proteina OppA è presente infatti anche nel cromosoma di *E. faecalis* ¹⁴⁵. OppA importa i peptidi attraverso il reclutamento di un sistema ben caratterizzato, denominato Opp, costituito da un traslocatore legato alla membrana cellulare, composto a sua volta da due subunità che formano un canale transmembrana e da due ATPasi citoplasmatiche ¹⁴⁶. In assenza di PrgZ, il complesso OppA è in grado di importare il feromone all'interno della cellula solo se presente ad elevate concentrazioni, mentre nelle condizioni fisiologiche solo PrgZ ha un'affinità tale da mediare l'internalizzazione di cCF10 ¹⁴⁵. Si può concludere che le proteine TraC e PrgZ hanno la funzione di aumentare la sensibilità della cellula alla risposta al feromone ¹⁴⁷.

Mediante esperimenti con ceppi batterici geneticamente modificati è stato mostrato che le proteine di superficie TraC e PrgX sono coinvolte nell'attivazione e nell'inattivazione del processo di coniugazione attraverso il legame con il feromone e l'inibitore, rispettivamente ^{144; 147; 148; 149}. Tuttavia non sono mai stati presentati dati che provino l'interazione tra le proteine purificate TraC e PrgZ con i peptidi feromone e inibitore.

5.3 Controllo dell'attività del feromone endogeno

Le cellule donatrici contenenti il plasmide possono potenzialmente continuare a secernere feromone anche dopo l'acquisizione del plasmide. Nei plasmidi feromone-dipendenti si è quindi dovuto evolvere un meccanismo per prevenire la coniugazione autoindotta e per fare in modo che la coniugazione fosse indotta solo dalla presenza di cellule riceventi. Questo meccanismo coinvolge l'espressione di due prodotti genici che agiscono in modo indipendente, entrambi codificati a livello del plasmide che risponde all'induzione: un peptide inibitore, che agisce come competitore del feromone, e una proteina di membrana altamente conservata, denominata TraB o PrgY a seconda del sistema considerato, che sembra essere coinvolta nell'inibizione della produzione di feromone endogeno.

5.3.1 Il peptide inibitore

I peptidi inibitori sono costituiti da 7-8 aminoacidi idrofobici e mostrano una certa somiglianza di sequenza tra loro e con quella dei feromoni; la coppia cAD1/iAD1 presenta quattro aminoacidi identici su otto, mentre per la coppia cPD1/iPD1, il rapporto è di due su otto (Tabella 2).

I peptidi inibitori vengono sintetizzati tramite processamento post-traduzionale a partire da precursori lunghi 22-23 aminoacidi, probabilmente tramite un meccanismo simile a quello utilizzato per il precursore del feromone¹⁵⁰. Così come il feromone, l'inibitore deve quindi uscire dalla cellula e venire reimportato per partecipare alla regolazione. Per quanto riguarda pAD1, è stato dimostrato il coinvolgimento della proteina Eep durante il processamento che porta alla formazione di feromone ed inibitore¹⁴².

I peptidi inibitori sono stati proposti come competitori del feromone per il legame alle *surface binding protein* TraC e PrgZ^{151; 152}. Il bilancio tra la quantità di feromone e inibitore nel surnatante è altamente controllato, il che assicura il blocco dell'autoinduzione e, nello stesso tempo, consente una pronta risposta all'incremento della concentrazione di feromone, rilasciato da cellule riceventi poste nelle vicinanze. Analizzando con HPLC i surnatanti di culture di ceppi di *E. faecalis* che trasportano il plasmide pCF10 è risultato evidente che queste cellule secernono una miscela di iCF10 e cCF10 in un rapporto molare di 50-100/1^{118; 152}; questo rapporto è sufficiente per permettere a iCF10 di neutralizzare l'attività biologica di cCF10 e nello stesso tempo consente alle cellule donatrici di rimanere sensibili ad un livello estremamente basso (circa 10^{-11} M) di cCF10 esogeno eventualmente prodotto da cellule riceventi¹³⁵. Quindi lo stato indotto delle cellule donatrici non dipende dalla concentrazione assoluta di cCF10 ma piuttosto dalla concentrazione relativa di cCF10 e iCF10¹⁵³. Nonostante l'apparente omologia tra gli inibitori e i rispettivi feromoni, le loro funzioni effettive sembrano essere altamente specifiche. Il feromone cCF10 mostra una certa somiglianza a iAD1 e iPD1 (Tabella 2); nonostante ciò è stato dimostrato

che cCF10 non ha nessuna attività inibitoria nei confronti di cellule che trasportano pAD1 e pPD1¹³⁶. Sorprendentemente, è stato osservato che sia cCF10 che iCF10 inibiscono in modo competitivo il legame di cPD1 alla proteina TraC di pPD1 nella stessa misura di iPD1¹⁴⁷. Questo risultato implica che il ruolo dell'inibitore non è solo quello di inibire il legame del feromone alle proteine TraC e PrgZ ma coinvolge altri meccanismi molecolari nei quali la risposta al feromone e all'inibitore è ancora più specifica^{132; 136; 137}.

Plasmide: pPD1 (60 Kb) Feromone: cPD1 Precursore: cPD1p Inibitore: iPD1 Precursore: iPD1p	Tipo di virulenza: codifica per la batteriocina bac21 FLVMFLSG MRKLNRLWLYGSGLLFLVMFLSGCVKTGA... (234 amminoacidi) ALILTLVS MKQQKKHIAALLFALILTLVS
Plasmide: pAD1 (56 Kb) Feromone: cAD1 Precursore: cAD1p Inibitore: iAD1 Precursore: iAD1p	Tipo di virulenza: codifica per la citolisina e per la resistenza agli UV LFSVLVLAG MKVNFVKGFAAIALFSLVLGCGADKK... (143 amminoacidi) LFVVTLVG MSKRAMKKIPLITLFVVTLVG
Plasmide: pCF10 (36 Kb) Feromone: cCF10 Precursore: cCF10p Inibitore: iCF10 Precursore: iCF10p	Tipo di virulenza: resistenza alla tetraciclina LVTLVFV VKKYKRLLLMAGLVTLVFVLSACGTAPVS... (275 amminoacidi) AITLIFI MKTTLKKLSRYIAVVIAITLIFI

Tabella 2. Sequenze dei feromoni, degli inibitori e dei loro rispettivi precursori per alcuni plasmidi feromone-dipendenti.

Seppure non si sia ancora dimostrato che l'inibitore venga introdotto all'interno della cellula, alcuni studi condotti su pPD1 hanno dimostrato la capacità di TraA, il recettore intracellulare del feromone, di legare l'inibitore; è noto, infatti, che iPD1 funziona come antagonista di cPD1 per il legame alla proteina TraA¹⁴⁷. L'interazione tra iPD1 e TraA è ancora più specifica di quella tra il feromone e TraC, infatti nessuno degli inibitori o dei feromoni prodotti dagli altri plasmidi è in grado di competere con cPD1 per il legame a TraA¹⁴⁷. Sembra quindi che sia TraA a determinare la specificità tra feromone, inibitore e plasmidi¹⁵⁴.

Anche per iCF10 si è dimostrato il legame al recettore intracellulare PrgX¹⁵⁵.

Per quanto riguarda iAD1, esperimenti di legame *in vitro*, hanno evidenziato l'esistenza di una debole interazione dell'inibitore con TraA, in grado di competere con il legame del feromone; tuttavia, è stato riportato che questa interazione provoca l'attivazione della trascrizione dei geni preposti al trasferimento, in modo analogo a quanto avviene in presenza del feromone¹⁵⁶. È stato

quindi proposto da alcuni autori che l'inibitore iAD1 competa con cAD1 solo per il legame alla proteina TraC^{143; 157}.

5.3.2 La famiglia delle proteine TraB

Il secondo determinante plasmidico possibilmente coinvolto nell'inibizione dell'autoinduzione in pCF10 è *prgY* (*traB* in pPD1 e pAD1), che codifica per una proteina di membrana la cui funzione presumibile è quella di ridurre il livello del feromone rilasciato dalla membrana cellulare. Infatti, cellule contenenti il plasmide mutato in questo gene producono una elevata quantità di feromone, paragonabile a quello rilasciato dalle cellule riceventi, e mostrano un fenotipo costitutivo di aggregazione cellulare^{130; 158}. Per quanto riguarda i plasmidi pPD1 e pAD1, l'azione di TraB è direttamente associata ad una diminuzione della quantità di feromone rilasciato nel terreno dalle cellule donatrici rispetto a quella rilasciata dalle cellule riceventi. Questi risultati suggeriscono un coinvolgimento di TraB come inibitore della produzione di feromone secreto che, tramite un meccanismo ancora sconosciuto, blocca l'espressione del feromone o degrada il feromone attivo una volta che la cellula ha acquisito il plasmide^{144; 159}.

Invece, nel caso del plasmide pCF10 vi è la stessa quantità di cCF10 nel surnatante colturale delle cellule donatrici contenenti il plasmide e in quello delle cellule riceventi senza plasmide¹⁵². Questo ha fatto inizialmente pensare che PrgY dovesse essere in grado di bloccare l'autoinduzione delle cellule donatrici mediante un meccanismo differente da quello delle proteine TraB¹⁶⁰. La porzione principale di PrgY sembra trovarsi fuori dalla membrana ed esservi legata per mezzo di segmenti trans-membrana C-terminali^{153; 161}. E' interessante notare che PrgY appartiene ad una superfamiglia di proteine correlate ampiamente distribuite negli organismi viventi, benchè non in tutte le specie¹⁶¹. Nell'ambito della superfamiglia, PrgY e il suo analogo TraB sono tra i membri più studiati^{144; 162}. Poiché la risposta delle cellule donatrici a cCF10 necessita dell'ingresso del feromone nella cellula per mezzo dell'attività concertata di PrgZ e del sistema Opp¹⁴⁵, un possibile meccanismo di funzionamento di PrgY potrebbe coinvolgere questo processo di ingresso nella cellula. Tuttavia, numerosi dati suggeriscono un modello diverso nel quale il dominio extracellulare di PrgY interagisce con cCF10 nascente non appena viene rilasciato dalla membrana; questa interazione dovrebbe sequestrare, modificare o degradare il peptide; in accordo, è riportato che PrgY non ha nessun effetto su cCF10 esogeno¹⁶¹. Il controllo di PrgY per il feromone endogeno è altamente specifico per cCF10 e i determinanti specifici per il riconoscimento da parte di PrgY sembrano risiedere nella sequenza di cCF10 matura e non nel peptide segnale precursore (J. Chandler & G. Dunny 2006, dati non pubblicati)

¹⁵³.

5.4 Fase intracellulare dell'induzione

Una volta all'interno della cellula, il feromone è in grado di interagire con un recettore intracellulare, una proteina che lega il DNA, chiamata TraA o PrgX a seconda del sistema plasmidico. Mutazioni all'interno di questo gene determinano l'espressione costitutiva dei prodotti genici preposti alla coniugazione e determinano l'aggregazione cellulare permanente; questo suggerisce che TraA e PrgX si comportino come regolatori negativi dell'espressione dei geni per la coniugazione, quando la cellula si trova nella condizione di non-induzione^{128; 129; 130; 131}. Il legame con il feromone abolisce la funzione di controllo negativo, cosicché i geni per la coniugazione possano essere espressi^{163; 164; 165}.

PrgX è stata studiata approfonditamente. Questa proteina, la cui sequenza presenta somiglianza molto bassa con quella degli analoghi funzionali TraA di pAD1 e TraA di pPD1, è in grado di formare oligomeri *in vivo*, mentre lo stato monomerico è favorito in presenza di cCF10^{166; 167}. Recentemente, la determinazione delle strutture cristallografiche di PrgX e di PrgX complessata con cCF10 ha mostrato una conformazione tetramERICA che viene destabilizzata in presenza di cPD1¹⁶⁸.

Nella maggior parte dei plasmidi feromone-dipendenti, il promotore di TraA è localizzato qualche centinaia di basi a monte del gene per l'inibitore ed ha orientazione opposta^{144; 169}. In tutti i sistemi finora caratterizzati, TraA (o PrgX) riconosce dei siti di legame sul DNA in una regione a monte del promotore del gene per l'inibitore^{147; 163; 170}. L'interazione della proteina con questi siti specifici regola la trascrizione del gene per l'inibitore e, data l'organizzazione genica policistronica del plasmide, controlla, attraverso meccanismi di antiterminazione^{163; 164; 171; 172}, anche la trascrizione dei geni posti a valle dell'inibitore, deputati alla coniugazione. In assenza di induzione, TraA deve far fronte a due problemi: da una parte deve garantire l'espressione basale dell'inibitore, richiesta per evitare l'autoinduzione; dall'altra, deve impedire l'espressione di quei fattori di coniugazione, i cui geni sono posti a valle dell'inibitore e la cui espressione deve essere attivata solo quando cellule riceventi si trovano nelle vicinanze.

Le modalità con cui TraA interagisce con il DNA e il numero di siti di legame che riconosce varia a seconda del plasmide che si prende in esame, ma nella maggior parte dei sistemi le conseguenze di tale interazione producono effetti paragonabili. Nei paragrafi seguenti verrà brevemente descritto il meccanismo d'azione attuato dal recettore intracellulare del feromone nei tre sistemi plasmidici feromone-dipendenti meglio studiati.

5.4.1 Regolazione della coniugazione in pAD1

La figura 2 mostra la regione di pAD1 associata alla regolazione della risposta al feromone ed illustra i punti chiave di questo meccanismo. Il plasmide codifica due proteine regolatrici: TraE1,

che regola positivamente i geni strutturali associati alla coniugazione, e TraA, che regola negativamente l'espressione di *traE1*. Mutazioni in *traA* (gene che codifica per TraA) danno luogo all'espressione costitutiva delle funzioni coniugative^{130; 173}, mentre mutazioni in *traE1* rendono il sistema non reattivo nei confronti del feromone^{164; 174}. In assenza di feromone, la proteina TraA mantiene il sistema nel suo stato inattivo grazie alla sua associazione con P₀, un promotore che controlla la trascrizione che parte da *iad*, il gene che codifica per iAD1^{156; 164}. E' importante notare che un livello basale di trascrizione a partire da P₀ è mantenuto anche in assenza di cAD1 al fine di sintetizzare e secernere iAD1 nello stato non-indotto. Alcuni trascritti vanno oltre *iad* ma non più lontano del terminatore t1¹⁷⁵; inoltre, la presenza di due sequenze promotrici sovrapposte nella regione di P₀¹⁷³ suggerisce un grado di complessità ancora maggiore per il meccanismo di controllo della trascrizione. Studi *in vitro* hanno mostrato che cAD1 si lega direttamente a TraA causandone la dissociazione da P₀¹⁵⁶; vi sono inoltre prove che in seguito all'induzione si abbia una attivazione della trascrizione dal promotore P₀ che procede oltre il terminatore t1 ed un secondo terminatore t2, localizzato 125 nucleotidi più a valle¹⁶³. L'estensione della trascrizione da P₀ permette la sintesi di TraE1, che a sua volta regola positivamente i geni strutturali posti a valle. Inoltre TraE1 è in grado di autoregolare se stesso attivando la trascrizione a partire dal suo promotore, P_E, localizzato all'interno del terminatore t2^{163; 176}. *orfY* e *orf1* sono altri geni posti a valle di *traE1* che sembra giochino un ruolo positivo nel processo di coniugazione; in particolare vi sono prove che l'estensione della trascrizione da P₀ fino ad oltre *orfY* sia necessaria almeno per avviare l'attivazione della trascrizione di questi determinanti^{157; 163; 165; 176}. E' evidente che la terminazione della trascrizione associata a t1 e t2 debba essere molto forte; quindi basta una piccola quantità di trascritto che proceda fino a *traE1* per dare origine ad un maggiore aumento della sintesi di TraE1 dovuta alla capacità di quest'ultima proteina di autoregolarsi a livello del suo stesso promotore P_E. Un altro importante regolatore negativo è una piccola molecola di RNA (~200 nucleotidi), denominata mD, che viene espressa dal promotore P_A, con un trascritto che converge con quello dal promotore P₀^{175; 177}. L'RNA mD è espresso ad un livello relativamente alto nello stato non-indotto: la sua trascrizione è molto ridotta dopo 5 minuti di induzione e non è quasi più rilevabile dopo 10 minuti. Questo RNA è un potenziatore della terminazione della trascrizione a t1, probabilmente grazie ad una sequenza di 11 nucleotidi presente in mD, complementare al trascritto divergente nella regione che comprende il loop del t1¹⁷⁵. Il suo ruolo sembra essere quello di favorire il processo di terminazione al terminatore t1 nello stato non indotto come risultato di un "annealing" RNA-RNA simile a quello riportato da Yarnell e Roberts¹⁷⁸. Una frazione del trascritto dal promotore P_A si crede si estenda a valle attraverso *traA* al fine di trascrivere una quantità di TraA sufficiente per poter svolgere il suo ruolo di regolatore negativo¹⁷⁹. L'interazione tra le porzioni sovrapposte

dei trascritti di *mD* e *iad* sembra poter partecipare alla regolazione globale della risposta al feromone ¹⁸⁰. Mentre un aumento di trascrizione da P_0 durante l'induzione è associata ad un'espressione ridotta da P_A , nello stato non indotto la trascrizione da P_A può interferire negativamente con la trascrizione da P_0 . In accordo con la presenza di trascritti divergenti, è possibile che si formino strutture secondarie tra ogni trascritto e che avvenga un appaiamento tra i trascritti; uno di questi eventi o entrambi possono influenzare la traduzione di iAD1. A questo proposito, è interessante notare che, durante l'induzione, l'espressione di iAD1 aumenta di solo due volte; anche nei mutanti di *traA* che possiedono una trascrizione significativamente più elevata dal promotore P_0 , l'attività di iAD1 rilevabile aumenta sempre di solo due volte ¹⁷⁴. Plausibilmente, questo livello di iAD1 minore di quello atteso può essere correlato con un'inibizione dovuta alla presenza di trascritti divergenti ¹⁴³.

L'induzione da parte di feromone esogeno dà come risultato finale l'attivazione della trascrizione dei geni strutturali a valle di *traE1* ^{164; 172; 174; 181}. I primi geni strutturali a valle di *traE1* sono *sea1* (che codifica per una "surface exclusion protein") e *asa1* (che codifica per la sostanza aggregante AS) (Fig. 2) ^{181; 182}.

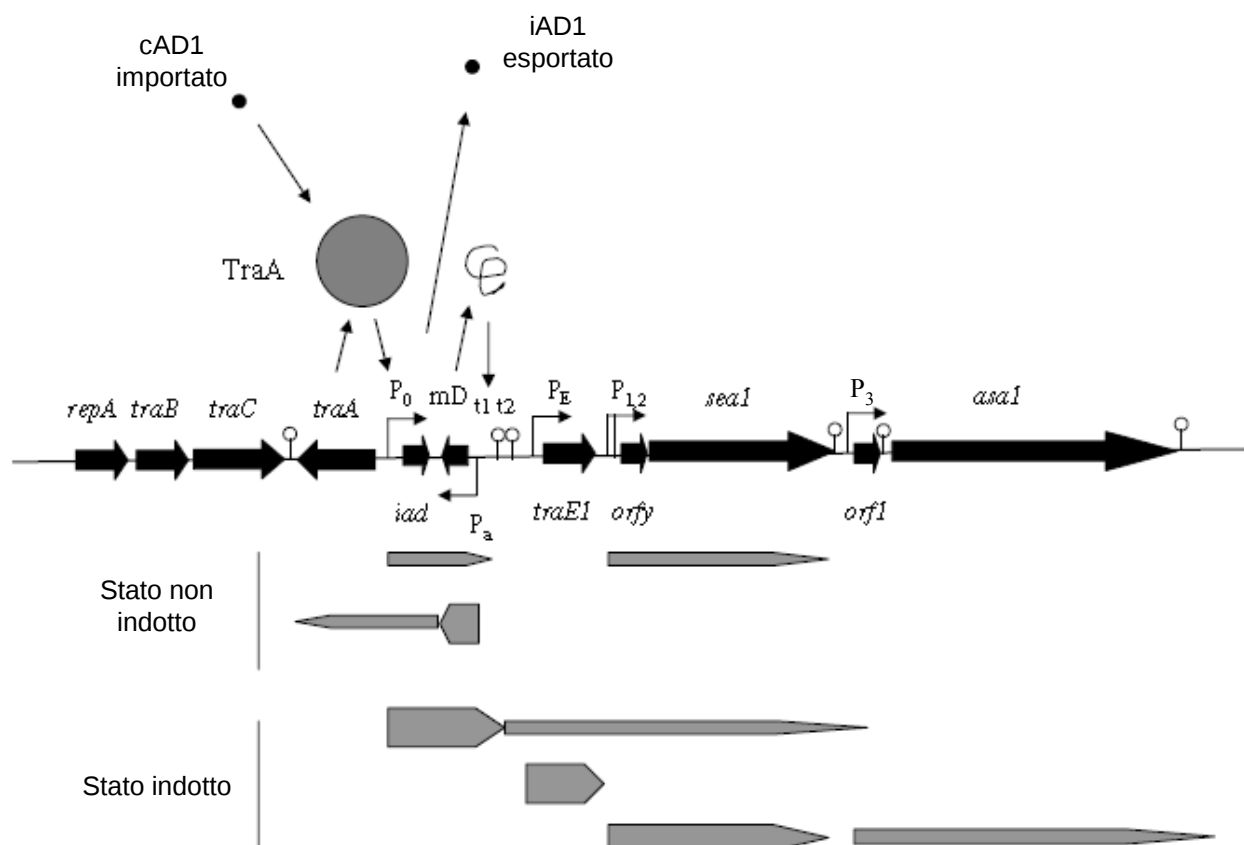


Figura 2. Modello che illustra la visione corrente degli aspetti regolativi alla base della risposta al feromone pAD1. I geni sono indicati con frecce nere mentre i trascritti sono riportati sotto in grigio. I promotori sono indicati come P e i terminatori come stem loop.

Un'analisi trascrizionale indica che *sea1* viene co-trascritta con una piccola *orfy* che si trova a monte, a partire da due promotori vicini detti P₁ e P₂. E' stato suggerito che P₁ è utilizzato durante un livello basso ma rilevabile di espressione di *sea1* che si ha nello stato non-indotto, mentre P₂ è utilizzato durante l'induzione¹⁷². L'attivazione della trascrizione di *sea1* durante l'induzione, sembra richiedere l'estensione della trascrizione oltre *traE1* a partire dal promotore P₀^{163; 172}. L'induzione di *sea1* viene bloccata da una mutazione mediata dall'inserzione di un trasposone in *traE1* in grado di bloccare la trascrizione, mentre non viene influenzata da una delezione *in-frame* di *traE1*. Questo suggerisce che un'estensione della trascrizione oltre *traE1* a partire da P₀ (ad esempio in *orfy*) sia necessaria perchè *sea1* venga trascritta. In contrasto con il caso di *sea1*, una delezione *in-frame* di *traE1* blocca la trascrizione di *asa1*¹⁸³, indicazione del fatto che è necessario TraE1 per l'espressione di AS. Poiché l'inserzione di un trasposone in *sea1* non previene l'induzione di AS^{174; 181; 184}, si può ipotizzare che la trascrizione da P₀ necessaria per l'espressione di AS, non vada oltre *orfy*. E' stato inoltre riportato che il gene *asa1* è co-trascritto con l'*orf1* (vedi figura 2) a partire dal promotore P₃, che è attivo solo nello stato indotto¹⁷². Il trascritto primario di P₃ termina alla fine di *asa1*, ma trascritti di intensità minore sembrano estendersi oltre.

Come discusso in una review precedente¹⁸⁵ probabilmente è significativa la presenza di una sequenza TTAAAAATA localizzata nella regione del promotore di *traE1* (P_E), che è anche presente in un'altra regione che si trova 21 nucleotidi a monte dell'inizio della trascrizione di *asa1*, suggerendo che possono essere entrambi siti di legame per TraE1. C'è anche una sequenza TTATTTTATTT all'interno di P₀, presente anche in P_E, che si sovrappone con due nucleotidi alla sequenza prima menzionata (TTATTTTATTTAAAAATA). Questo fa pensare alla possibilità che questi siano entrambi siti di legame per TraA. Nel caso di P_E a causa della sovrapposizione tra queste due sequenze potrebbe esserci una competizione tra TraA e TraE1 per il legame ai rispettivi siti regolatori. Tuttavia, mentre TraA è in grado di legare P₀ *in vitro*, non c'è nessuna evidenza del legame con P_E^{156; 163}.

In tutti i plasmidi feromone-dipendenti che sono stati caratterizzati, vi è una regione organizzata in modo equivalente che inizia da P₀ e termina al terminatore t1¹⁷⁹. Un'analisi di DNA hybridization¹⁸⁶ ha mostrato che, mentre i differenti plasmidi feromone-dipendenti esibiscono omologia significativa tra alcuni geni correlati alla coniugazione che si trovano a valle di t2 (compresi *orfy*, *sea1* e *asa1*), sia *traE1* che *orf1* non hanno omologia con nessuna regione di pPD1 o pCF10 (Fig. 3).

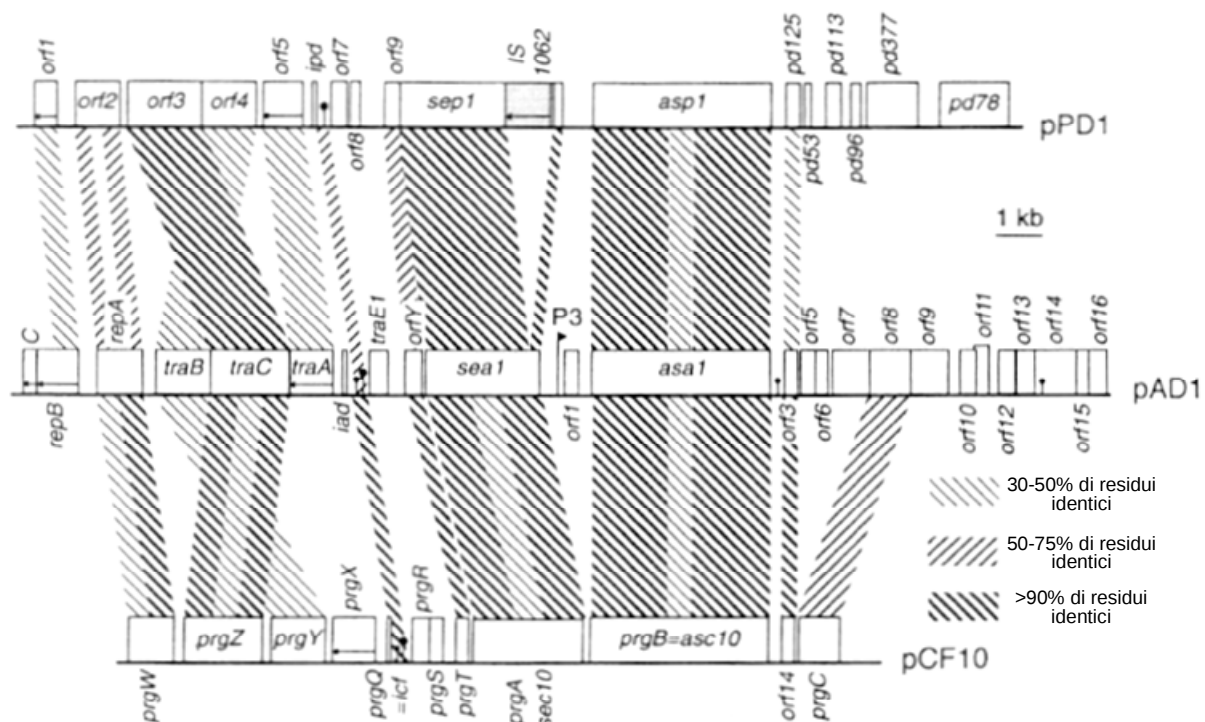


Figura 3. Confronto tra le regioni dei plasmidi pPD1, pAD1 e pCF10 che contengono i geni implicati nella coniugazione. La diversa densità dei tratteggi si riferisce a differenti percentuali di somiglianza a livello nucleotidico.

5.4.2 Regolazione della coniugazione in pCF10

La trascrizione della regione che comprende i geni che codificano per PrgX (*prgX*) e per iCF10 (*prgQ*) nel plasmide pCF10 è stata studiata approfonditamente^{187; 188; 189; 190; 191}. Il promotore di *prgQ* è attivo nelle cellule non indotte, ma il trascritto risultante (chiamato Qs) è lungo solo 400 nucleotidi con l'estremità 3' in prossimità della struttura invertita ripetuta IRS1 che può funzionare come terminatore della trascrizione e nel processamento dell'mRNA^{171; 188; 190}. L'induzione del feromone ha come risultato un modesto incremento (2-5 volte) dell'attività del promotore di *prgQ*, e un'analisi condotta mediante Northern Blot ha rivelato la presenza di forme estese di mRNA, tra cui la più abbondante è QL, che è più lunga di Qs di circa 130 nucleotidi. Studi condotti con RT-PCR hanno mostrato che in tutte le condizioni c'è un esteso processamento all'estremità 3' dei trascritti ottenuti dal promotore di *prgQ*, ma nelle cellule indotte questi trascritti si possono estendere fino a *prgB* (gene che codifica per la sostanza aggregante) e oltre^{171; 188; 189; 192}. Quindi, il risultato più significativo dell'induzione del feromone è l'estensione della trascrizione dal promotore di *prgQ* oltre la regione IRS1. Il gene *prgX* è adiacente a *prgQ* ma con orientazione opposta. Contrariamente alle attese iniziali la trascrizione di *prgX* non inizia dalla regione tra *prgX* e *prgQ* ma da un promotore che si trova all'interno del locus di *prgQ*¹⁹¹. Quindi, l'mRNA *prgX* non processato contiene una sequenza di diverse centinaia di nucleotidi non codificante alla sua estremità 5'. Come nel caso dei trascritti *prgQ*, anche il trascritto *prgX* è

soggetto a esteso processamento all'estremità 5'. La forma più abbondante e stabile di questo trascritto è Qa (Q antisense), che consiste in un frammento di RNA di 102 nucleotidi ¹⁹⁰. Qa, che è complementare ad un segmento di Qs, gioca anch'esso un ruolo critico nella regolazione della trascrizione. Evidenze genetiche mostrano che Qa ha la funzione di bloccare la produzione dei trascritti *prgQ* che si estendono oltre IRS1; questa attività di Qa non viene influenzata dal feromone. Sia Qa che Qs hanno il potenziale di formare strutture secondarie diverse; è stato dimostrato che l'accoppiamento di questi due RNA permette la formazione di un terminatore funzionale partendo dall'estremità 3' di Qs, mentre quando Qs non è appaiato si avvolge in una struttura alternativa che non ha la funzione di terminatore ¹⁹⁰. Nelle cellule non indotte, la sintesi di Qa e Qs è bilanciata in modo che nessun trascritto Qs si estenda oltre IRS1. Quando si verifica l'aumento della trascrizione di *prgQ*, dovuto alla presenza del feromone in grado di abolire la repressione svolta da PrgX, la quantità del trascritto Qa non è sufficiente per determinare la terminazione di tutti i trascritti Qs e quelli che si estendono oltre IRS1 risultano responsabili dell'espressione delle proteine coinvolte nella coniugazione (Fig. 4). Questo modello si sta ancora verificando sperimentalmente.

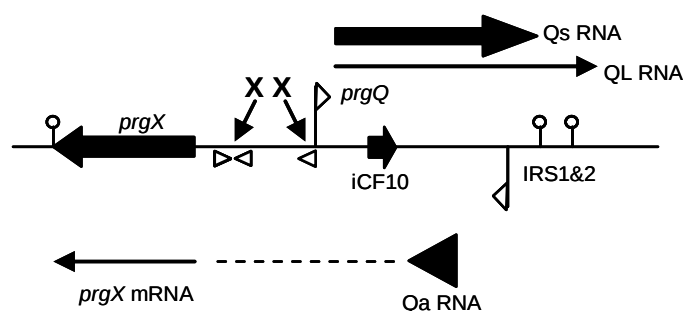


Figura 4. Schematizzazione dei geni regolativi e deputati al trasferimento di pCF10 (regione *prgX-prgQ*, 9 Kb). I promotori di *prgQ* e *prgX* sono indicati da bandierine rivolte nel verso dei rispettivi trascritti. Gli RNA sono rappresentati con delle frecce il cui spessore è indicazione della loro abbondanza relativa. La linea tratteggiata rappresenta l'RNA che viene processato per rilasciare sia Qa che *prgX*. I piccoli triangoli vuoti indicano i siti di legame di PrgX sul DNA e gli *stem loop* i terminatori. Le X rappresentano PrgX dalle quali partono le frecce che indicano il legame al DNA. Infine è riportata la piccola ORF (*open reading frame*) localizzata all'interno del locus di *prgQ* codifica per il peptide inibitore iCF10.

L'altro elemento funzionale prodotto dal promotore Qa è PrgX. L'analisi genetica della funzione di PrgX mostra che questa proteina reprime (benché modestamente) l'inizio della trascrizione dal promotore *prgQ* e questa repressione è sensibile alla presenza del feromone ¹⁹⁰; è interessante notare anche che la proteina PrgX regola positivamente la sua stessa espressione e quella di Qa ^{155; 191}.

L'insieme di questi risultati permette di affermare che il prodotto della trascrizione dal promotore Qa interferisce con la trascrizione di *prgQ* con due meccanismi indipendenti; una volta prodotti,

ognuno di questi prodotti genici può funzionare in modo indipendente rispetto all'altro, ma il modo con cui vengono sintetizzati li rende interdipendenti nelle cellule donatrici *wild-type*.

Approfondite analisi genetiche e molecolari di PrgX indicano che è una proteina multifunzionale. Oltre alle funzioni descritte finora, PrgX lega il DNA di pCF10 in due siti (O1 e O2) nella regione tra *prgX* e *prgQ*; questa proteina nelle cellule di *E. faecalis* esiste in uno stato oligomerico; in presenza di feromone PrgX perde il suo stato oligomerico ¹⁶⁶. Uno schema riassuntivo delle principali caratteristiche di PrgX e Qa è presentato in tabella 3.

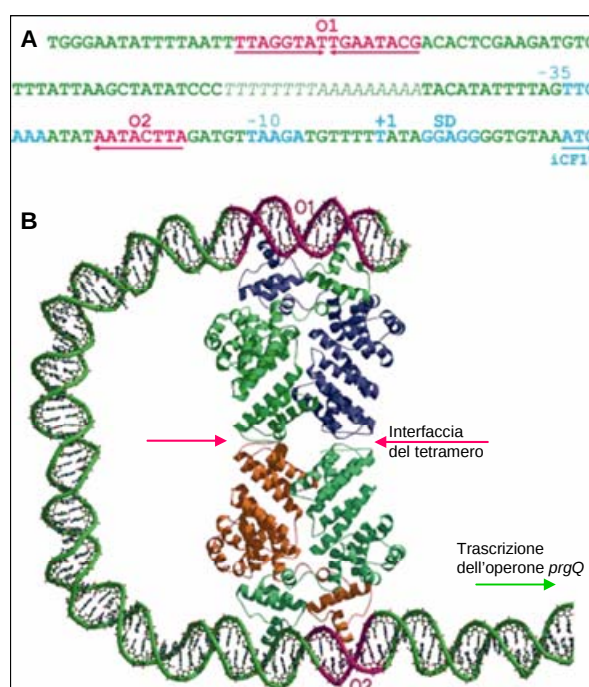
Proprietà	PrgX	Qa
Composizione molecolare	Proteina di 317 amminoacidi	RNA di 102 nucleotidi
Fonte	Tradotta dall'estremità 3' del trascritto che parte dal promotore P _{Qa}	Processato dall'estremità 5' del trascritto che parte dal promotore P _{Qa}
Target molecolare	Due siti di legame sul DNA di pCF10	RNA Qs (ipotizzato)
Funzioni	Riduce l'attività del promotore di <i>prgQ</i> ; regola positivamente la sintesi dell'mRNA Qa	Inibisce l'allungamento della trascrizione di <i>prgQ</i>
Sensibilità al feromone	+ +	- -

Tabella 3. Proprietà importanti di PrgX e Qa.

E' stato proposto un modello di DNA looping che con un singolo meccanismo permette il funzionamento di entrambe le funzioni regolative di PrgX. Analisi biochimiche hanno mostrato che l'affinità di legame di PrgX per il DNA di pCF10 non è particolarmente alta, in particolare il secondo sito di legame (quello che coincide con il promotore *prgQ* ed è quindi il più importante per la repressione) è molto debole ¹⁷⁰. Si è concluso quindi che le interazioni proteina-proteina tra le molecole di PrgX legate ai due siti possano formare un DNA loop che stabilizzi il complesso. Dati strutturali hanno permesso di osservare che la proteina si presenta nei cristalli come tetrametro, formato a sua volta da due dimeri che interagiscono ciascuno con un sito di legame sul DNA. L'operatore O1 presenta una sequenza pseudopalindromica di 16 bp, che giustifica la maggior affinità del dimero di PrgX per questo sito di legame rispetto a O2, che ne contiene solo una metà ¹⁷⁰; quest'ultimo si trova in prossimità del sito di inizio della trascrizione di *prgQ* (Fig. 5). Il legame a O1 e la formazione del tetrametro determinano un aumento dell'affinità per O2, con conseguente ripiegamento del DNA e inibizione della trascrizione del gene codificante per l'inibitore. Il livello di repressione attuato su *prgQ* è lieve, poiché il sistema deve garantire la produzione di una quantità di inibitore necessaria ad impedire l'autoinduzione. La struttura del complesso PrgX/cCF10 fornisce una chiara indicazione di come il legame del feromone porti ad una perdita di affinità della proteina per i suoi siti di legame. L'interazione tra i domini C-

terminali del dimero PrgX porta alla formazione di una tasca in grado di legare il feromone. Questo legame induce la dissociazione dei due dimeri e una forte riduzione di affinità di PrgX per O₂; con il distacco di PrgX dal DNA viene meno l'inibizione della trascrizione dell'operone a partire da *prgQ*. Il debole livello di espressione dell'inibitore mantenuto in assenza del feromone, rende il sistema altamente sensibile a minimi cambiamenti nella concentrazione del feromone. Il legame di cCF10 a PrgX determina un aumento dell'espressione di iCF10 e, di conseguenza dei geni posti a valle, deputati alla coniugazione. L'aumento della produzione dell'inibitore è inoltre necessario a ristabilire il sistema non indotto. Mentre è facile da immaginare come la formazione del complesso possa reprimere il promotore *prgQ*, agendo come *roadblock* per le molecole di RNA polimerasi, il meccanismo di auto-regolazione positiva è meno ovvio. Recenti dati genetici, biochimici e strutturali ^{167; 168} hanno suggerito che l'inibitore iCF10 lega PrgX nella stessa tasca di cCF10, ma il peptide legato interagisce con un diverso gruppo di residui amminioacidici vicini all'estremità C-terminale di PrgX e non causa la destabilizzazione del tetramero.

Figura 5. Il recettore del feromone PrgX. A) O1 è un sito pseudopalindromico con elevata affinità per la proteina, mentre O2 contiene solo un emisito. Quest'ultimo si trova posizionato all'interno del promotore di *prgQ*. B) PrgX controlla l'espressione dell'intero operone che inizia con *prgQ* promuovendo la formazione di un loop nel DNA.



Riassumendo, lo stato indotto delle cellule donatrici dipende dalle concentrazioni relative dei due peptidi feromone e inibitore più che dalla concentrazione assoluta di cCF10. La produzione di iCF10 da parte delle cellule donatrici auto-reprime il promotore *prgQ* interagendo con PrgX ¹⁵⁵, mentre il primo risultato diretto dell'induzione del feromone endogeno sembra essere un aumento della sintesi di iCF10. Questo probabilmente ha lo scopo di “spegnere” il sistema dopo un periodo transitorio di espressione. Relativamente a questo modello, è stato recentemente scoperto che una distruzione del gene *prgY* causa un aumento della trascrizione di *prgQ* e quindi presumibilmente un incremento della produzione di iCF10 per compensare l'elevata sintesi di cCF10 da parte dei mutanti *prgY* ¹⁹³. A prima vista, il coinvolgimento di due diversi peptidi extracellulari per il controllo della coniugazione sembra essere inutile e complicato. Tuttavia, recentemente è stato scoperto che questo sistema è anche usato dalle cellule contenenti pCF10 per attivare

l'espressione di Asc10, la sostanza aggregante di pCF10, quando crescono nel plasma di mammiferi ^{118; 193}. Componenti del plasma, probabilmente un complesso albumina/lipide, sequestrano selettivamente o degradano iCF10, portando all'induzione (indotta da cCF10 endogeno) delle proteine coinvolte nella coniugazione, compresa Asc10. L'espressione di quest'ultima proteina incrementa la virulenza di *E. faecalis* in diversi sistemi modello ¹⁹⁴; mutazioni a carico del gene codificante per cCF10 nelle cellule riceventi o in grado di inattivare la regolazione feromone-dipendente di pCF10 delle cellule donatrici, aboliscono la coniugazione plasmidica *in vivo*.

5.4.3 Ruolo di TraA nella regolazione della coniugazione di pPD1

Il plasmide pPD1 codifica per la risposta all'induzione da parte del feromone cPD1. Alcuni esperimenti condotti utilizzando il feromone marcato con trizio, dimostrano che cPD1 entra nelle cellule con l'aiuto di TraC o indipendentemente se presente ad alte concentrazioni e, una volta all'interno, lega il recettore intracellulare TraA in un rapporto di 1:1 ($K_d \sim 0.5$ nM); inoltre, studi di inibizione competitiva del legame di [³H]cPD1 a TraA, hanno consentito di constatare che iPD1 funziona come antagonista di cPD1 per il legame a TraA e che è capace di inibire l'attività del feromone quando il rapporto di concentrazione cPD1/ iPD1 è pari a circa 1:1 ¹⁴⁷.

Il gene per TraA si trova immediatamente a monte del gene *ipd* ^{144; 169}, all'interno di una regione considerata essenziale per la risposta all'induzione mediata dal feromone. Esperimenti di DNase I footprinting, hanno permesso di identificare tre siti di legame (Tab1, Tab2, Tab3) con un motivo di sequenza conservato (5'-TXXTXAXAATACA-3', dove X rappresenta qualunque nucleotide) (Fig. 6) ¹⁹⁵; da questi esperimenti è emerso inoltre che TraA possiede una maggiore affinità per Tab1 rispetto a Tab2 e Tab3.

Il legame di TraA con il DNA è stato ulteriormente investigato tramite esperimenti di migrazione ritardata su gel, in cui è risultata evidente un'elevata affinità della proteina per Tab1, che sia sola o in associazione con cPD1 o iPD1. L'angolo di legame tra proteina e DNA corrisponde a 57° per quanto riguarda TraA da sola e si riduce a 53° e 43° in presenza di cPD1 e iPD1, rispettivamente. Esperimenti di Northern Blotting hanno dimostrato che il livello di trascrizione di *ipd* aumenta notevolmente dopo l'esposizione delle cellule a cPD1, a fronte di un aumento di sole due volte della quantità di inibitore che viene secreto nel terreno. Questo elemento sembra suggerire che l'RNA codificante per iPD1, svolga un ruolo funzionale che va oltre alla produzione dell'inibitore, ad esempio garantire l'espressione dei geni per la coniugazione posti a valle di *ipd*, come nel caso di *prgQ* prodotto da pCF10 ¹⁹⁶.

Al contrario di quanto avviene per *ipd*, la trascrizione di *traA* viene inibita dall'azione di cPD1; essendo TraA un regolatore negativo della via di risposta a cPD1, l'inibizione della sua trascrizione può provocare una derepressione del sistema da parte di TraA stesso.

In contrasto con il comportamento di TraA in pAD1¹⁷⁶, gli esperimenti di migrazione ritardata su gel hanno evidenziato che, in pPD1, l'affinità di legame di TraA per il DNA rimane invariata in presenza o in assenza del feromone. L'unico cambiamento coinvolge il ripiegamento del DNA indotto dalla proteina nelle diverse condizioni di legame.

Il modello proposto sulla base di queste osservazioni¹⁹⁵ prevede che, in assenza di cellule recipienti, TraA interagisca con iPD1 e si leghi alla regione riportata in figura 6B (denominata regione *ipd-traA*) che comprende le Tab, inibendo la trascrizione del gene *ipd*, probabilmente tramite un'alterazione della conformazione del DNA; in questo stato sia *ipd* che *traA* sono espressi ad un livello basso. Una volta che il feromone, rilasciato nel terreno dalle cellule recipienti, entra nella cellula, compete con iPD1 per il legame a TraA. Il complesso TraA-cPD1 induce un diverso ripiegamento del DNA in questa regione che porta alla diminuzione dell'espressione di *traA* e all'attivazione di *ipd*. Con il passare del tempo, le molecole di TraA diminuiscono, si ha la piena espressione di *ipd* e l'attivazione della trascrizione dei geni preposti alla coniugazione, posti a valle.

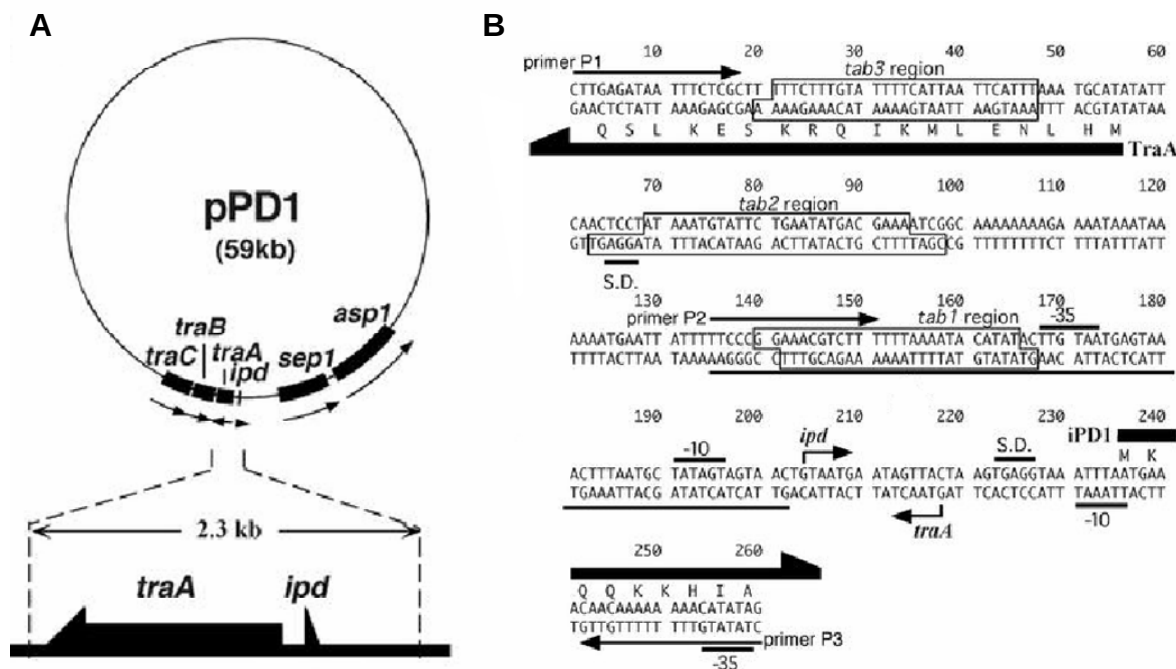


Figura 6. A) Mappa del plasmide pPD1 dove è indicata la regione che include i geni *traA* e *ipd*. B) Sequenza della regione *ipd-traA* di 260pb, dove sono indicate le posizioni dei siti di legame di TraA Tab1, Tab2 e Tab3, delle regioni ipotetiche -10 e -35 dei promotori di *ipd* e *traA* e delle sequenze Shine-Dalgarno.

PARTE II. SCREENING DI CEPPI DI ENTEROCOCCHI (*E. FAECALIS*) DI ORIGINE ALIMENTARE PER LA PRESENZA DI PLASMIDI FEROMONE-DIPENDENTI

Scopo della ricerca

Gli enterococchi possiedono meccanismi di trasferimento genico molto efficienti; tra questi vi è il trasferimento plasmidico feromone-dipendente. I plasmidi feromone-dipendenti sono caratterizzati da un'alta trasmissibilità; sono quindi responsabili della diffusione dei geni che trasportano. Questi plasmidi spesso possiedono geni che codificano per fattori di virulenza e antibiotico-resistenza; ricordiamo che, in particolare, pAD1 trasporta il gene che codifica per la citolisina e pCF10 quello per la resistenza alla tetraciclina; tutti questi plasmidi inoltre codificano per la sostanza aggregante che, non solo costituisce un fattore di virulenza, ma facilita anche la coniugazione. L'eventuale presenza di plasmidi feromone-dipendenti in ceppi di origine alimentare contribuirebbe quindi a rafforzare l'idea che gli enterococchi non siano microrganismi sicuri da impiegare deliberatamente nelle tecnologie alimentari.

Al fine di valutare la diffusione dei principali plasmidi feromone-dipendenti pAD1, pCF10 e pPD1 in ceppi di enterococchi di origine alimentare è stato effettuato uno screening di svariati ceppi isolati da prodotti lattiero caseari. Lo screening è stato eseguito mettendo a punto protocolli PCR mirati all'amplificazione di regioni di DNA specifiche per i diversi plasmidi.

Risultati

1. Progettazione di primer specifici per pPD1, pAD1 e pCF10

I tre plasmidi, pPD1, pAD1 e pCF10, per i quali si è voluta valutare la presenza in ceppi di enterococchi di origine alimentare, trasportano i geni codificanti per i loro peptidi inibitori. Essendo questi peptidi altamente specifici e caratterizzanti ogni singolo plasmide feromone-dipendente, si è scelto di analizzare le sequenze di DNA dei loro geni al fine di identificare regioni utili alla progettazione di primer, in grado di amplificare specificatamente regioni dei singoli plasmidi. Si è inoltre tenuto conto della possibilità di impiegare i primer in reazioni PCR multiplex, selezionando quindi per ogni plasmidio sequenze con temperature di appaiamento compatibili e in grado di originare amplificati di dimensioni facilmente distinguibili mediante separazione elettroforetica. Per scegliere i primer più adatti si è eseguito un allineamento dei geni codificanti per gli inibitori iPD1, iAD1 e iCF10 (Fig. 7) e si sono identificate le regioni con bassa somiglianza evidenziate nei rettangoli colorati. In tabella 4 sono indicate le sequenze dei primer così progettati che originano amplificati di dimensioni differenti: 242 pb, 172 pb o 287 pb per i plasmidi pPD1, pAD1 o pCF10, rispettivamente.

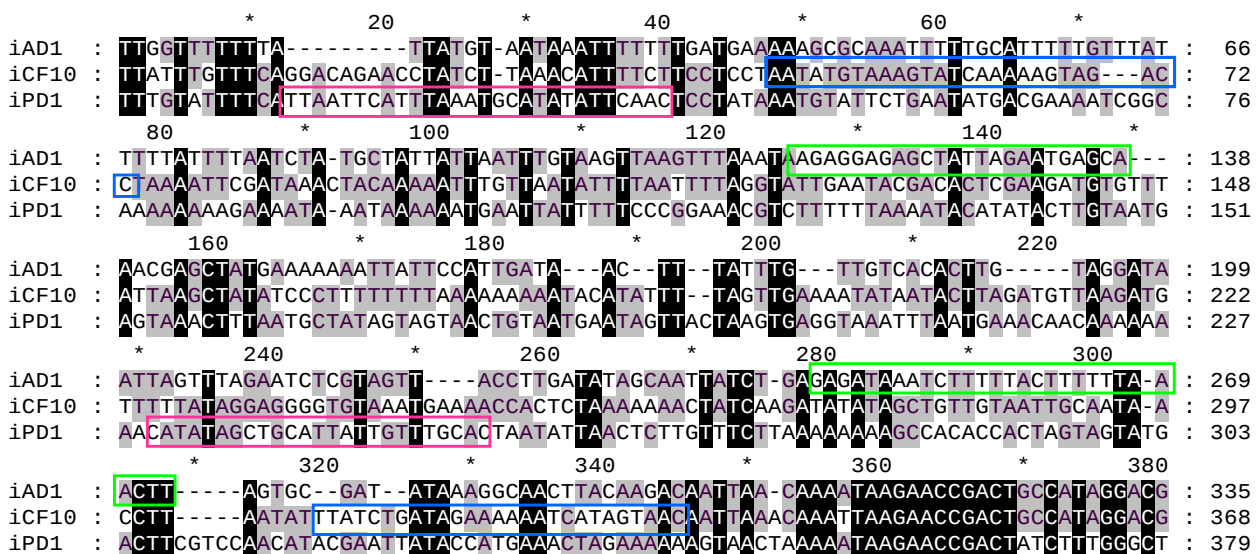
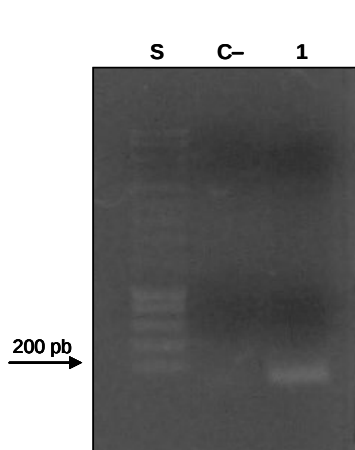


Figura 7. Allineamento delle regioni dei plasmidi pAD1, pCF10 e pPD1 per le quali sono stati progettati i primer. Coi rettangoli colorati sono indicate le specifiche sequenze scelte per la progettazione dei primer. In nero o in grigio sono evidenziati i nucleotidi uguali in tre o due delle tre sequenze allineate, rispettivamente. L'allineamento è stato costruito con CLUSTALX.

Plasmide	Primer	Sequenza	Dimensione amplificato
pPD1	iPD1f	5'-TTAATTCATTTAAATGCATATATTCAAC-3'	242 pb
	iPD1r	5'-GTGCAAACAATAATGCAACTATATG-3'	
pAD1	iAD1f	5'-AGAGGAGAGCTATTAGAATGAGCA-3'	172 pb
	iAD1r	5'-AAGTTTAAAAAAGTAAAAAGATTTATCTC-3'	
pCF10	iCF10f	5'-AATATGTAAAGTATCAAAAAGTAGACC-3'	287 pb
	iCF10r	5'-GTTACTATGATTTTTTCTATCAGATAA-3'	

Tabella 4. Sequenze dei primer impiegati per l'individuazione dei plasmidi pPD1, pAD1 e pCF10.

La coppia di primer iPD1f/iPD1r si è dimostrata in grado di amplificare un frammento di circa 250 pb in una reazione di PCR che sfrutta come template il DNA plasmidico estratto da *E. faecalis* 7C5 (Fig. 9), in accordo con la presenza in questo ceppo del plasmide pPD1, come precedentemente documentato¹⁹⁷. E' stata inoltre verificata la presenza del plasmide pAD1 nel ceppo OG1X impiegando i primer iAD1f/iAD1r (Fig. 8). Come controllo positivo del plasmide pCF10 si è scelto il DNA plasmidico estratto dal ceppo 33 che dà un amplificato di circa 300 pb



impiegando i primer iCF10f/iCF10r (Fig. 10). I tre amplificati così ottenuti, purificati dal gel di agarosio e sottoposti a sequenziamento, hanno evidenziato sequenze identiche a quelle attese per i tre plasmidi in esame.

Figura 8. Analisi elettroforetica su gel di agarosio della reazione di PCR per il ceppo OG1X. S: marker di grandezza molecolare del DNA (SmartLadder, Eurogentec). C-: controllo negativo (differisce dal campione in quanto non contiene DNA plasmidico). Lane 1: campione amplificato con i primer iAD1f/iAD1r.

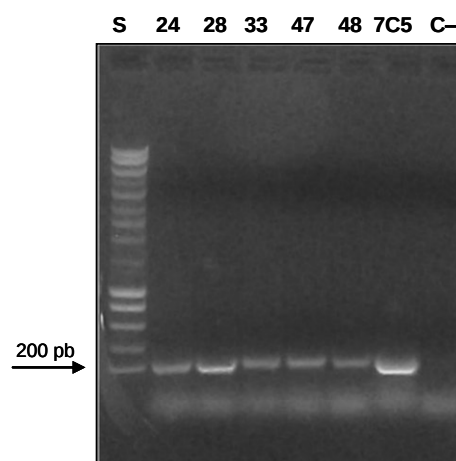
2. Screening dei ceppi

Il DNA plasmidico estratto da numerosi ceppi di enterococco è stato analizzato per la presenza dei plasmidi pPD1, pAD1 e pCF10.

Ceppi 24, 28, 33, 47, 48 e 7C5

Come appare evidente in figura 9 il plasmide pPD1 è presente in tutti i ceppi in esame. Tale risultato è confermato dal sequenziamento degli amplificati. Il plasmide pAD1 non è presente in nessun ceppo analizzato (Fig. 10), mentre il plasmide pCF10 è evidenziabile nei ceppi 33 e 7C5 (Fig. 11).

Figura 9. Analisi elettroforetica su gel di agarosio delle reazioni di PCR per i ceppi 24, 28, 33, 47, 48, 7C5 con la coppia di primer iPD1f/iPD1r.



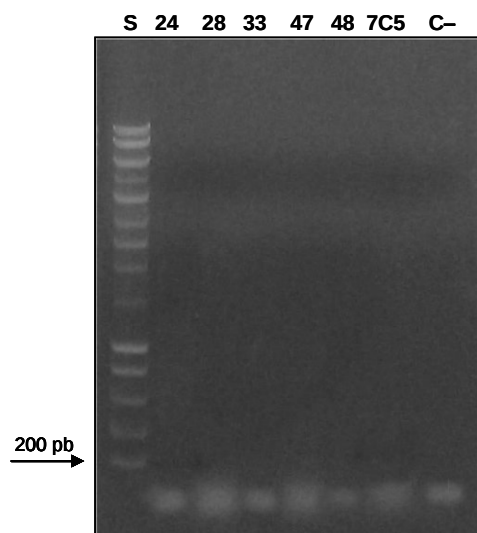


Figura 10. Analisi elettroforetica su gel di agarosio delle reazioni di PCR per i ceppi 24, 28, 33, 47, 48, 7C5 con la coppia di primer iAD1f/iAD1r.

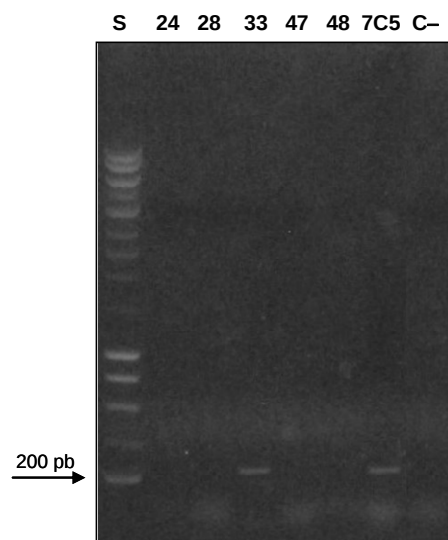


Figura 11. Analisi elettroforetica su gel di agarosio delle reazioni di PCR per i ceppi 24, 28, 33, 47, 48, 7C5 con la coppia di primer iCF10f/iCF10r.

Ceppi 21, 23, 26, 29 e 30

I plasmidi pPD1 e pCF10 sono presenti in tutti i ceppi in esame, mentre il plasmide pAD1 è presente solo nel ceppo 21 (Fig. 12). Il ceppo 26 con i primer iAD1f/iAD1r origina un amplificato aspecifico delle dimensioni di circa 300 pb (Fig. 12).

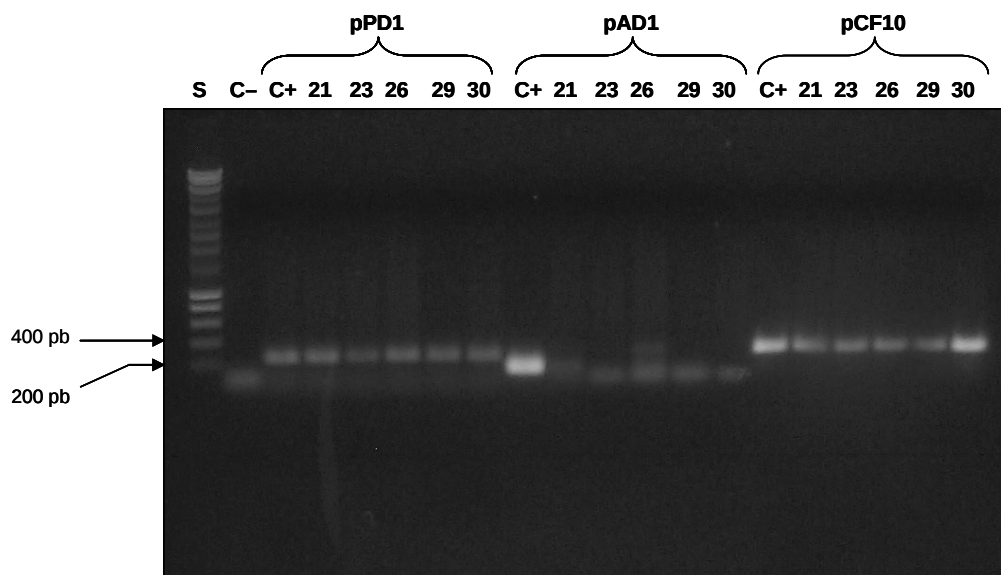


Figura 12. Analisi elettroforetica su gel di agarosio delle reazioni di PCR per i ceppi 21, 23, 26, 29, 30.

Ceppi 34, 36, 46, 49 e 52

Tutti i ceppi in esame possiedono i plasmidi pPD1 e pCF10, mentre nessuno possiede il plasmide pAD1 (Fig.13). Impiegando i primer iCF10f/iCF10r il ceppo 52 origina anche un amplificato aspecifico di circa 600 pb (Fig. 13).

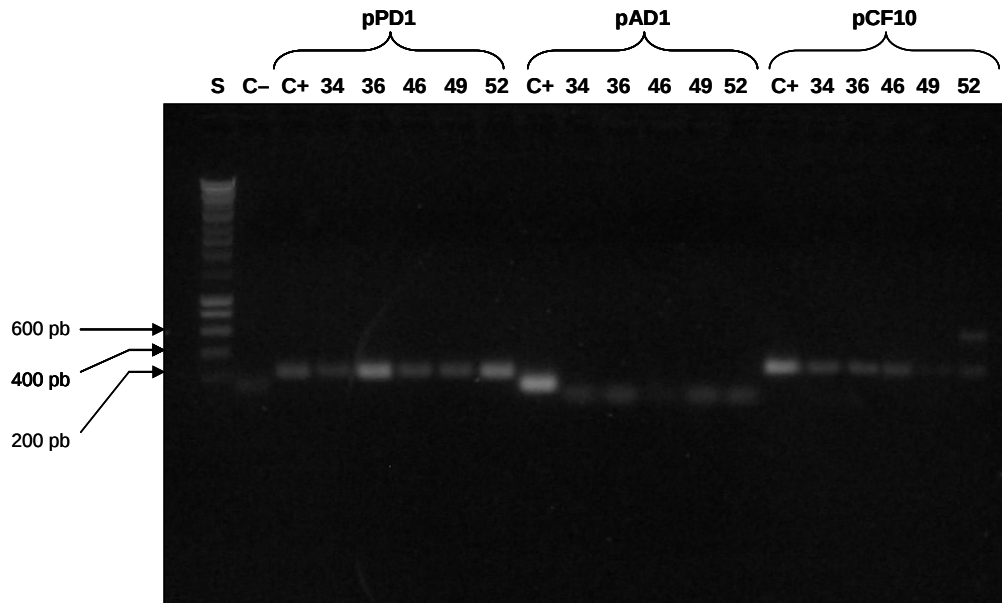


Figura 13. Analisi elettroforetica su gel di agarosio delle reazioni di PCR per i ceppi 34, 36, 46, 49, 52.

Ceppi 53, 56, 57, 58 e 59

Il plasmide pPD1 è presente in tutti i ceppi; il plasmide pAD1 si trova nei ceppi 56 e 59; mentre il plasmide pCF10 si evidenzia nei ceppi 56, 58 e 59 (Fig. 14). Il ceppo 59 origina diversi amplificati aspecifici: con i primer iPAD1f/iPAD1r origina un amplificato di circa 400 pb e con i primer iCF10f/iCF10r origina un amplificato a circa 600 pb e uno a circa 1000 pb (Fig. 14).

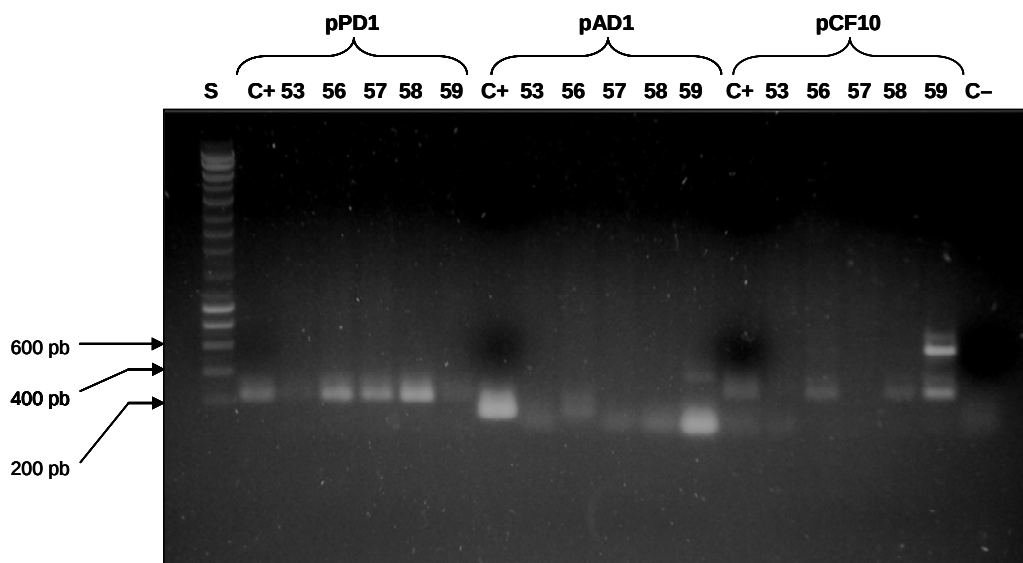


Figura 14. Analisi elettroforetica su gel di agarosio delle reazioni di PCR per i ceppi 53, 56, 57, 58, 59.

3. PCR multiplex

Ci si è quindi proposti di mettere a punto un metodo rapido per l'identificazione contemporanea dei tre principali plasmidi feromone-dipendenti.

Per ottenere l'amplificazione dei tre frammenti marker dei plasmidi pAD1, pPD1 e pCF10, presenti nel ceppo 21, con un'unica reazione, inizialmente si sono applicate le stesse condizioni delle PCR precedenti inserendo le tre coppie di primer. Si è però ottenuto solo l'amplificato corrispondente al plasmide pCF10. Si è quindi effettuata una prova inserendo nella reazione solo le coppie di primer iAD1f/iAD1r e iPD1f/iPD1r. In questo caso si sono ottenuti entrambi gli amplificati desiderati.

Si è dedotto che il plasmide pCF10 è presente in un numero di copie superiore rispetto agli altri due e la competizione che ne deriva determina l'amplificazione prevalente del frammento corrispondente a pCF10.

Si sono quindi saggiate diverse concentrazioni per i primer iCF10f/iCF10r e, applicando le condizioni descritte nei Materiali e metodi (PCR multiplex), è stato possibile ottenere con una sola reazione di PCR i tre amplificati d'interesse, verificando così contemporaneamente la presenza dei tre plasmidi nel ceppo 21. La separazione elettroforetica degli amplificati è stata effettuata impiegando un gel ad un'alta percentuale di agarosio (1.4%) per consentire la distinzione degli amplificati sulla base della dimensione (Fig.15).

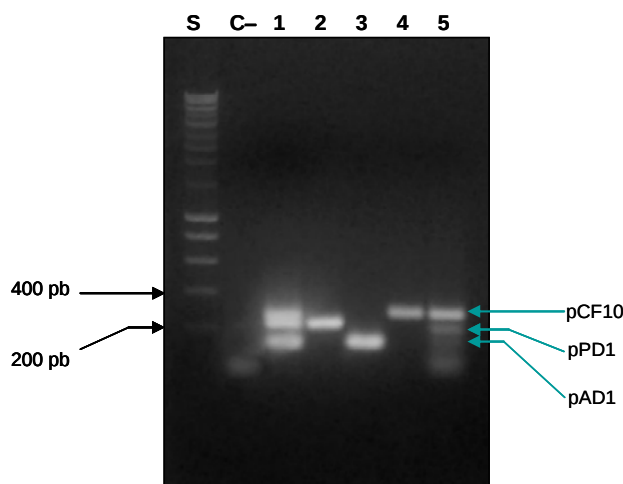


Figura 15. Analisi elettroforetica su gel di agarosio della reazione di PCR multiplex del ceppo 21. Lane 1: tre controlli positivi (miscela di tre reazioni di PCR per ottenere gli amplificati dei controlli positivi); lane 2: controllo positivo pPD1; lane 3: controllo positivo pAD1; lane 4: controllo positivo pCF10; lane 5: PCR multiplex del ceppo 21.

Discussione

Dall'esame dei risultati complessivi dello screening riportati in tabella 5 emerge un'ampia diffusione dei plasmidi feromone-dipendenti pPD1 e pCF10 in ceppi di *E. faecalis* di origine alimentare. Il plasmide pAD1 invece è risultato presente in soli tre dei 20 ceppi analizzati.

	Ceppi di enterococchi																				
	7C5	21	23	24	26	28	29	30	33	34	36	46	47	48	49	52	53	56	57	58	59
pPD1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pAD1	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	+
pCF10	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	−	+	−	+	+

Tabella 5. Presenza (+) o assenza (-) dei plasmidi pPD1, pAD1 e pCF10 nei ceppi in esame.

Lo screening è stato effettuato per ceppi di *E. faecalis* in quanto il trasferimento plasmidico feromone-dipendente è specifico per gli enterococchi di questa specie. La presenza di un simile sistema di trasferimento plasmidico è stato descritto anche per *E. faecium*, ma solo in un caso¹⁹⁸. L'incidenza di fattori di virulenza negli enterococchi isolati da campioni alimentari sembra essere dipendente dal ceppo^{97; 107}. Idealmente i ceppi da impiegare come starter o probiotici dovrebbero essere totalmente privi di fattori di virulenza ed essere sensibili agli antibiotici clinicamente rilevanti. In generale, la presenza negli alimenti di *E. faecium* sembra essere associata ad un rischio minore, in quanto generalmente questa specie presenta meno fattori di virulenza rispetto ad *E. faecalis*. Dal momento che gli enterococchi possiedono diversi sistemi di trasferimento genico (ad esempio plasmidi coniugativi e non coniugativi e trasposoni), tutti i ceppi del genere *Enterococcus* possono acquisire determinanti di virulenza ed antibiotico-resistenza. Tale rischio risulta sicuramente maggiore per ceppi di *E. faecalis*, a causa della presenza in questa specie di meccanismi di trasferimento feromone-dipendente^{12; 106}. La conoscenza del grado di trasferimento plasmidico ai ceppi di possibile utilizzo come starter o probiotici sarebbe di grande interesse. Nel caso in cui tale trasferimento fosse presente, sarebbe importante conoscere l'impatto del trasferimento di uno o più determinanti di virulenza sulla patogenicità del ceppo ricevente. Quanto detto finora rivela che l'utilizzo degli enterococchi come starter o probiotici rappresenta un potenziale pericolo per la salute umana. Tuttavia non si deve dimenticare che gli enterococchi sono coinvolti nei processi fermentativi di numerosi prodotti tradizionali nei quali svolgono un ruolo positivo. Inoltre in commercio vi sono ceppi probiotici che possiedono una lunga storia di sicurezza d'utilizzo (vedi Introduzione). Infine è da considerare che sebbene i ceppi di enterococchi isolati dagli alimenti spesso possiedano uno o più fattori di virulenza, le

conseguenze delle infezioni enterococciche in soggetti sani risultano molto lievi ¹². Rimane comunque il rischio del trasferimento di fattori di virulenza e di antibiotico-resistenze dagli enterococchi ad altri microrganismi più patogeni. Ad esempio è risaputo che enterococchi e stafilococchi sono in grado di scambiarsi materiale genetico; in particolare *S. aureus* è in grado di secernere un peptide con attività simile a quella del feromone di *E. faecalis* cAM373. E' stato recentemente scoperto che il plasmide pAM368 di *E. faecalis*, che trasporta geni per la vancomicina-resistenza, viene trasferito tramite coniugazione in risposta al feromone cAM373 ¹⁹⁹. Questo fa crescere la preoccupazione per una possibile acquisizione della vancomicina-resistenza da parte di *S. aureus*.

In questo lavoro di tesi è stato messo a punto un protocollo di "PCR multiplex" in grado di identificare mediante una singola analisi la presenza dei tre principali plasmidi feromone-dipendenti caratterizzati da un elevato grado di trasferibilità, che potrà risultare vantaggioso nell'analisi di routine di ceppi di *E. faecalis* rivolta all'identificazione dei plasmidi da essi trasportati.

Materiali e metodi

1. Ceppi analizzati

I ceppi analizzati, tutti appartenenti alla specie *E. faecalis* secondo il metodo API 20 Strep (Bartocci, E., dati non pubblicati), sono stati ottenuti da latte e prodotti caseari. Tutti i ceppi sono stati forniti dal Dipartimento di Scienze Biopatologiche e Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, a meno del ceppo *E. faecalis* 7C5, anch'esso isolato da un prodotto caseario, che è stato utilizzato anche come controllo positivo per la presenza del plasmide pPD1¹⁹⁷. Come controllo positivo del plasmide pAD1 è stato acquistato un ceppo di *E. faecalis* OG1X contenente il plasmide d'interesse. Per pCF10 il controllo positivo è stato rappresentato da un ceppo tra quelli esaminati che risultava positivo solo per la presenza di quel plasmide (ceppo 33).

2. Reazioni di PCR

2.1 PCR *touchdown*

Per l'amplificazione si è applicata una metodica di PCR detta *touchdown*, che consiste nel diminuire la temperatura di annealing di un grado centigrado ad ogni ciclo di polimerizzazione fino ad una temperatura inferiore di almeno 10 gradi rispetto alla temperatura iniziale. Una volta raggiunta la temperatura finale si effettuano 30 cicli aggiuntivi di polimerizzazione. Iniziando la reazione di appaiamento a temperature maggiori si evita l'amplificazione di frammenti di DNA non specifici causata dall'interazione dei primer con siti a bassa complementarità. La progressiva riduzione della temperatura di appaiamento fa sì che la prima sequenza ad essere amplificata sia quella che presenta il maggior numero di nucleotidi complementari alla sequenza dei primer; questa sequenza, a causa della crescita esponenziale degli amplificati, sarà anche quella favorita nell'amplificazione finale rispetto agli amplificati meno specifici.

Ogni reazione di PCR conteneva una delle coppia di primer (iCF10f/iCF10r o iAD1f/iAD1r o iPD1f/iPD1r) (1 µl ciascuno, 25 µM), 5 µl di DNA plasmidico estratto dai singoli ceppi di enterococchi, 0.2 µl GoTaq DNA polimerasi (Promega, 5 unità/µl), 4 µl di dNTPs (2.5 mM), 10 µl di tampone di reazione (5x) e acqua fino a volume finale di 50 µl.

Ciclo di temperature applicato:

94°C	3'	
94°C	45''	} 11 cicli
T _A dei primer / T _A dei primer – 10°C	45''	
72°C	45''	
94°C	45''	} 30 cicli
T _A dei primer – 10°C	45''	
72°C	45''	
72°C	10'	
6°C	∞	

La temperatura di appaiamento (T_A) dei primer è stata calcolata mediante la seguente equazione²⁰⁰.

$$T_A = [4 (C+G) + 2 (A+T)] - 5$$

Per la visualizzazione dei prodotti di PCR si è impiegata separazione elettroforetica su gel di agarosio all'1%.

Per purificare gli amplificati dal gel si è utilizzato il metodo *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) e si è applicato il protocollo della ditta produttrice.

2.2. Estrazione di DNA plasmidico

Per l'estrazione del DNA plasmidico di enterococchi da singole colonie batteriche è stato utilizzato il kit *Perfectprep plasmid Mini* (Eppendorf) usando il protocollo della ditta produttrice. Prima dell'estrazione si è effettuata la rivitalizzazione dei ceppi a partire da skim milk di singole colonie: ad 1 ml di skim milk sono stati aggiunti 5 ml di terreno M17 addizionato di lattosio allo 0.5% e si è incubato a 37°C per 24 ore in condizioni di microaerofilia. In due giorni successivi è stato trasferito 1 ml di coltura in 5 ml di terreno e si è effettuata un'ulteriore crescita a 37°C per 24 ore. Il DNA plasmidico è stato estratto a partire da 3 ml dell'ultima crescita.

2.3 PCR multiplex

L'impiego di PCR multiplex consente di amplificare simultaneamente diverse regioni di DNA (nella stessa provetta) usando più di coppie di primer. La messa a punto di questa metodica è particolarmente problematica in quanto nella stessa reazione si vengono a trovare diverse coppie

di primer che possono formare dimeri di primer, o avere temperature di annealing molto diverse. Anche la quantità di DNA template è un parametro critico per questo tipo di metodica.

Una PCR multiplex renderebbe possibile verificare la presenza dei tre plasmidi in un ceppo di enterococco con una sola reazione di PCR.

E' stata messa a punto una reazione di PCR multiplex per l'individuazione simultanea dei plasmidi pAD1, pPD1 e pCF10 nel ceppo 21, uno dei ceppi si era dimostrato possedere tutti e tre i plasmidi. La miscela di reazione conteneva i seguenti componenti:

- 5 µl di DNA plasmidico estratto dal ceppo 21,
- 10 µl di tampone di reazione (5x),
- 1 µl di primer iPD1f (forward) (25 µM),
- 1 µl di primer iPD1r (reverse) (25 µM),
- 1 µl di primer iAD1f (25 µM),
- 1 µl di primer iAD1r (25 µM),
- 0.25 µl di primer iCF10f (25 µM),
- 0.25 µl di primer iCF10r (25 µM),
- 4 µl di dNTPs (2.5 mM),
- 0.2 µl di GoTaq DNA polimerasi (Promega, 5 unità/µl)
- acqua fino a volume finale di 50 µl.

Ciclo di temperature applicato:

94°C	3'	
94°C	45''	} 11 cicli
61-51°C	45''	
72°C	45''	
94°C	45''	} 30 cicli
51°C	45''	
72°C	45''	
72°C	10'	
6°C	∞	

Per la visualizzazione dei prodotti di PCR si è impiegata separazione elettroforetica su gel di agarosio all'1.4%.

PARTE III. CLONAGGIO, ESPRESSIONE, PURIFICAZIONE E PROPRIETA' DI LEGAME DELLE PROTEINE TraA E TraC.

Scopo della ricerca

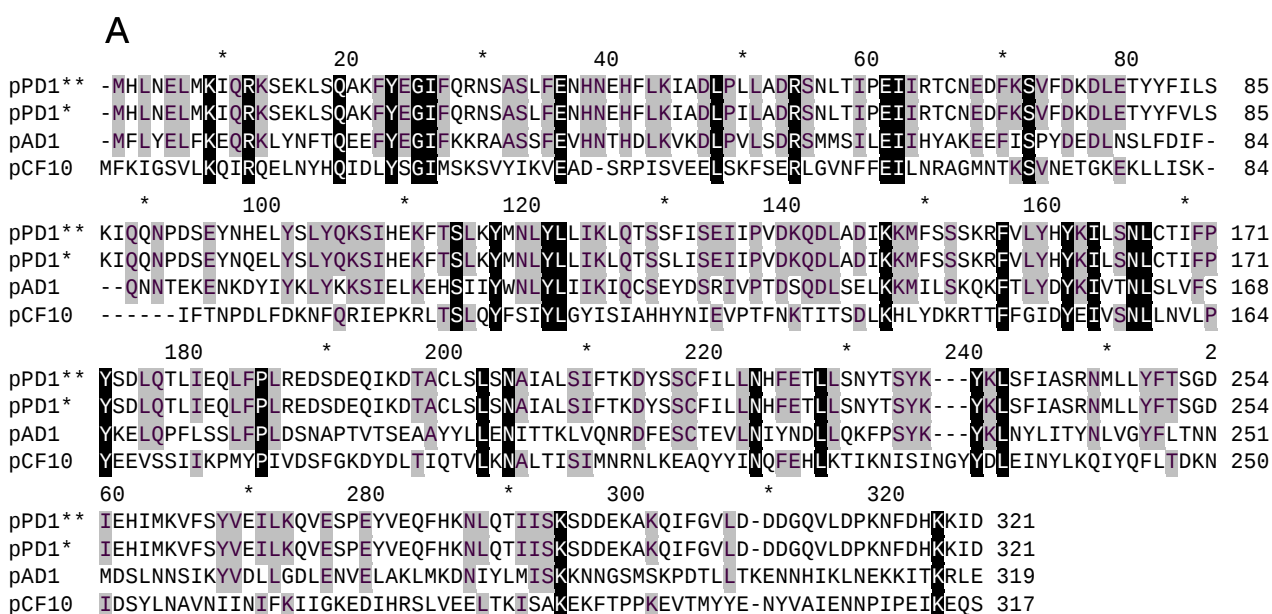
Una delle ricerche da noi condotte ha avuto come scopo l'espressione in forma ricombinante e la purificazione di TraC e TraA codificate dal plasmide pPD1, due proteine coinvolte nel trasferimento plasmidico feromone-dipendente negli enterococchi. TraC, che si trova sulla superficie delle cellule donatrici, ha presumibilmente la funzione di aumentare la sensibilità della cellula al feromone prodotto dalla cellula ricevente ¹⁴⁷ e, in associazione con le proteine del sistema Opp, permette l'internalizzazione del feromone. Una volta all'interno della cellula, il feromone viene riconosciuto e legato dal recettore intracellulare TraA, una "*DNA-binding protein*" che in assenza di feromone svolge un ruolo di regolatore negativo del processo di coniugazione. In presenza del feromone, TraA induce la trascrizione del gene *traE* il cui prodotto di espressione (TraE), regola, a sua volta, l'espressione delle proteine coinvolte nel processo di coniugazione come la sostanza aggregante. Sono state studiate le interazioni di TraA e TraC con i peptidi feromone (cPD1) e inibitore (iPD1) e, nel caso di TraA, con il DNA.

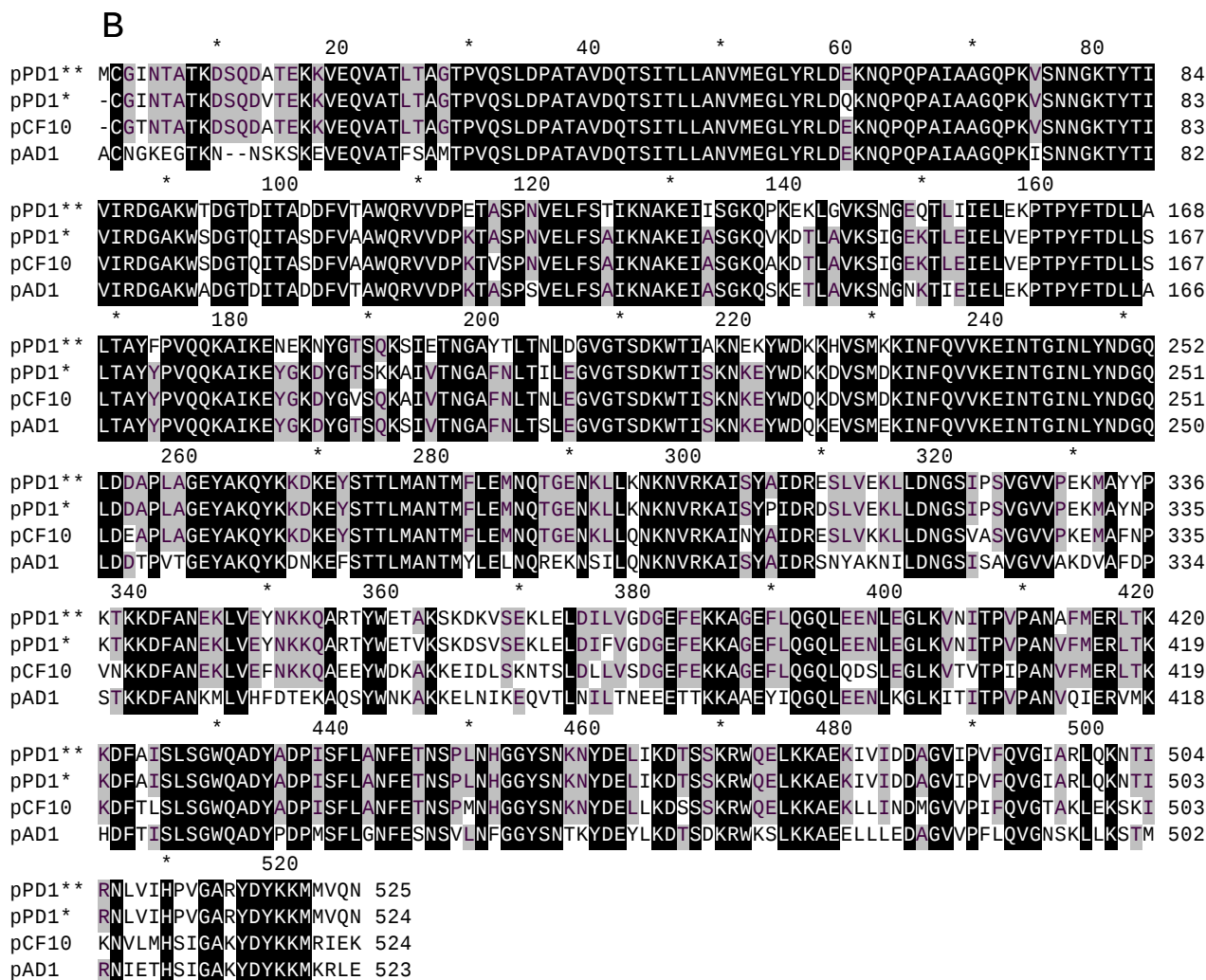
Risultati e discussione

1. Espressione e purificazione di TraA e TraC in forma ricombinante

Le proteine TraC e TraA codificate dal plasmidio pPD1 del ceppo *E. faecalis* 7C5 di origine alimentare sono state ottenute in forma ricombinante. In uno studio precedente è stato infatti verificato che il ceppo *E. faecalis* 7C5 trasporta il plasmide feromone-dipendente pPD1, che codifica per la batteriocina AS48¹⁹⁷.

Come dedotto dalle sequenze nucleotidiche, le sequenze amminoacidiche di TraA e TraC codificate dal plasmide pPD1 di *E. faecalis* 7C5 presentano una somiglianza del 99% e del 92%, rispettivamente, con le sequenze delle stesse proteine codificate dal plasmide pPD1 di *E. faecalis* 39S depositate in GenBank (accession no. D78016) (Fig. 16A e B). L'allineamento multiplo di queste sequenze amminoacidiche con quelle dei loro omologhi funzionali presenti in altri plasmidi rivela un'identità del 36% con TraA di pAD1 e del 17% con PrgX di pCF10, mentre TraC presenta un'alta identità di sequenza (70%) con TraC di pAD1 e con PrgZ di pCF10 (81%) (Fig. 16A e B). Nel caso di TraC e dei suoi omologhi i primi 300 amminoacidi della catena polipeptidica sono altamente conservati, mentre una maggiore variabilità di sequenza caratterizza gli ultimi 220 amminoacidi (Fig. 16B).





***E. faecalis* 7C5 **E. faecalis* 39S

Figura 16. Allineamenti di sequenza multipli tra TraA (A) e TraC (B) del plasmide pPD1 di *E. faecalis* 7C5 e 39S e le proteine omologhe codificate dai plasmidi pAD1 e pCF10. I residui identici in tutte le sequenze o in almeno 3 delle 4 sequenze sono evidenziati in nero o in grigio, rispettivamente. I codici di accesso a GenBank sono: D78016 per TraA e TraC di pPD1 di *E. faecalis* 39S; AY855841 per PrgX e PrgZ di pCF10; AAA72024 e M84374 per TraC e TraA di pAD1, rispettivamente. L'allineamento è stato costruito con CLUSTALX.

Le proteine TraC e TraA ricombinanti si sono ottenute usando *E. coli* come organismo d'espressione e il vettore pET come sistema inducibile d'espressione. Una volta ottimizzate le condizioni d'induzione al fine di ottenere una elevata resa in proteina (induzione a 30°C overnight per TraC e a 28°C per 3 ore per TraA), si è proceduto alla loro espressione su larga scala. Entrambe le proteine sono state espresse con una buona resa e in forma solubile, come è possibile vedere negli SDS-PAGE mostrati nelle figura 17A e C.

Durante la purificazione TraA ha iniziato ad eluire dalla colonna Q Sepharose High Performance ad una concentrazione di NaCl pari a 0.12 M, mentre TraC ad concentrazione di NaCl pari a 0.25 M. TraC era eluita dalla colonna Phenyl Sepharose nel tampone di equilibrio iniziale, contenente Ammonio Solfato 1 M. Una purezza finale superiore del 95% per entrambe le proteine

è stata valutata mediante SDS-PAGE (Fig. 17B e D). La resa finale di TraA e TraC è stata stimata in circa 10 mg/l di coltura e 2 mg/l di coltura, rispettivamente.

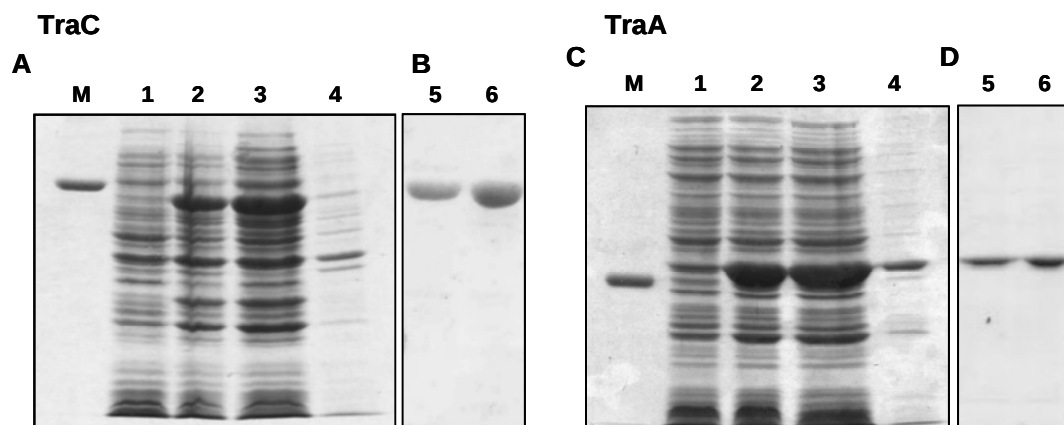


Figura 17. Elettroforesi mediante SDS-PAGE che mostrano l'induzione e la solubilità dopo lisi cellulare (A e C) e la purificazione (B e D) di TraC e TraA, rispettivamente. M: marker di peso molecolare (siero albumina bovina, 67 kDa, per TraC e rodanesi bovina, 33 kDa, per TraA); lane 1: colture cellulari non indotte; lane 2: colture cellulari indotte con IPTG; lane 3: surnatanti dopo lisi cellulare delle colture indotte; lane 4: precipitati dopo lisi cellulare della coltura indotta; lane 5-6: frazioni delle proteine pure ottenute dopo applicazione di protocolli specifici di purificazione (per dettagli vedere Materiali e metodi).

Le masse molecolari delle proteine ricombinanti purificate TraA e TraC sono state determinate mediante spettrometria di massa elettrospray (ESI) in condizioni denaturanti. Nel caso di TraA è stata stimata una massa di 37757 Da, che è identica a quella stimata per la proteina completa comprendente anche il residuo di metionina N-terminale. Invece, nel caso di TraC è stata determinata una massa di 57721 Da, significativamente più piccola di quella calcolata sulla base della sequenza amminoacidica (58737). Per stabilire quale porzione di proteina mancasse, è stata effettuata un'analisi di spettrometria di massa MALDI-TOF dei frammenti ottenuti dalla digestione della proteina con tripsina. Il *mass fingerprint* dei peptidi ottenuti ha permesso di ottenere una sequenza che copre il 78% della proteina, compresa l'estremità C-terminale. Questo suggerisce che la porzione di proteina mancante sia quella N-terminale. In particolare, il peso stimato di 57721 Da è abbastanza compatibile con la mancanza di 10 amminoacidi N-terminali.

2. Stato di aggregazione di TraA e TraC

Il comportamento cromatografico su colonna Ultrogel AcA54, precedentemente calibrata con proteine di peso molecolare noto, ha permesso di stimare per TraC una massa apparente di circa 60 kDa, corrispondente a quella della proteina monomerica (57721 Da); invece per TraA la massa apparente è risultata maggiore di 67 kDa, in accordo con uno stato oligomerico della proteina, il cui monomero ha una massa di 37757 Da (Fig. 18). Lo stesso comportamento cromatografico è stato osservato per entrambe le proteine preincubate con quantità saturanti di cPD1 (non

mostrato); si può quindi concludere che lo stato di aggregazione di TraC non viene influenzato dal legame del feromone e che TraA è un oligomero anche in presenza di cPD1. Lo stato di aggregazione delle proteine ricombinanti è stato ulteriormente analizzato mediante spettrometria di massa ESI in condizioni non denaturanti. Il peso molecolare di TraC da sola o preincubata con quantità saturanti di cPD1 risulta essere 57721 e 58600, rispettivamente; il segnale di massa corrispondente a TraA da sola o preincubata con quantità saturanti di cPD1 non è invece rilevabile nelle stesse condizioni sperimentali applicate per TraC, in accordo con lo stato oligomerico della proteina sia in assenza che in presenza del feromone, corrispondente ad una massa al di fuori del range di determinazione strumentale.

I risultati ottenuti per TraA non sembrano in accordo con il comportamento di PrgX, l'analogo funzionale di TraA codificato dal plasmide pCF10, descritto in precedenza; infatti studi *in vivo* hanno suggerito che questa proteina si trovi in forma oligomerica in assenza di ligandi o in presenza di iCF10, e che sia monomerica in presenza di cPD1 ¹⁶⁷.

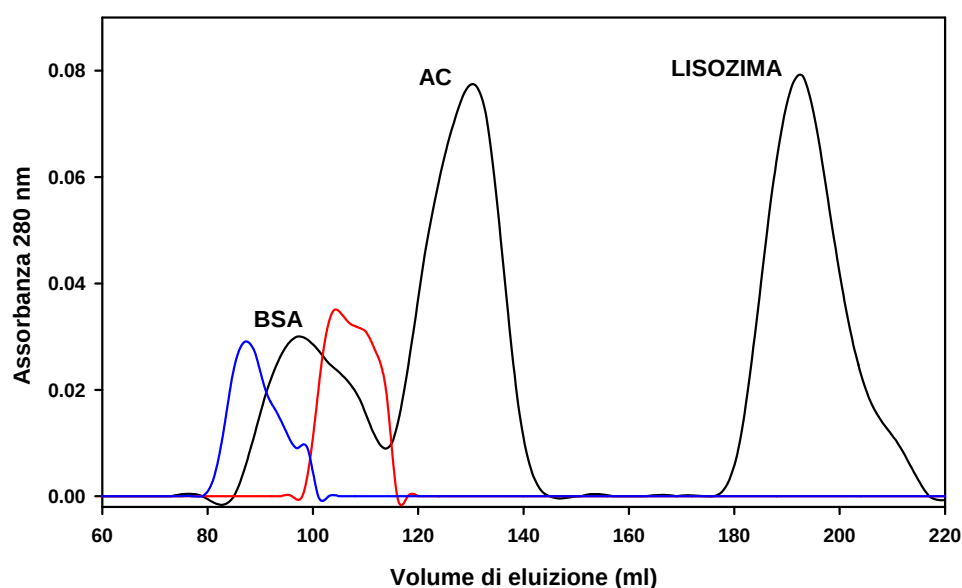


Figura 18. Cromatografia ad esclusione dimensionale per le proteine TraA e TraC. Dopo calibrazione della colonna Ultrogel ACA54 con siero albumina bovina (BSA, 67 kDa), anidrasi carbonica (AC, 29 kDa) e lisozima (14 kDa), si è analizzato il comportamento cromatografico di TraA (linea blu) e di TraC (linea rossa).

3. Legame del feromone e dell'inibitore a TraA e TraC

Le sequenze codificanti per cPD1 e iPD1 di *E. faecalis* 7C5 da noi identificate presentano un'identità del 100% con quelle depositate in GenBank; sono stati quindi sintetizzati i peptidi corrispondenti.

Titolazioni per il legame dei peptidi feromone e inibitore a TraA e TraC, mostrate nelle figure 19 e 20, rispettivamente, si sono ottenute mediante analisi con spettrometria di massa. E' possibile

notare che il legame di cPD1 a TraA è molto più forte di quello a TraC (Fig. 19). Invece l'inibitore iPD1 mostra un'affinità molto forte sia per TraA che per TraC (Fig. 20). Poichè le concentrazioni relativamente alte di peptidi in soluzione, necessarie per avere un segnale misurabile con la spettrometria di massa, inducono un legame pressoché stechiometrico, non si possono determinare parametri quantitativi per il legame di cPD1 e iPD1 a TraA e di iPD1 a TraC. Nel caso dell'interazione relativamente debole tra TraC e cPD1 si può invece stimare una K_D di 1.1 μM . Questi risultati sono in accordo con i risultati di studi precedenti che indicavano un'alta affinità di legame di TraA espressa in forma ricombinante come proteina di fusione per cPD1 e iPD1¹⁴⁷.

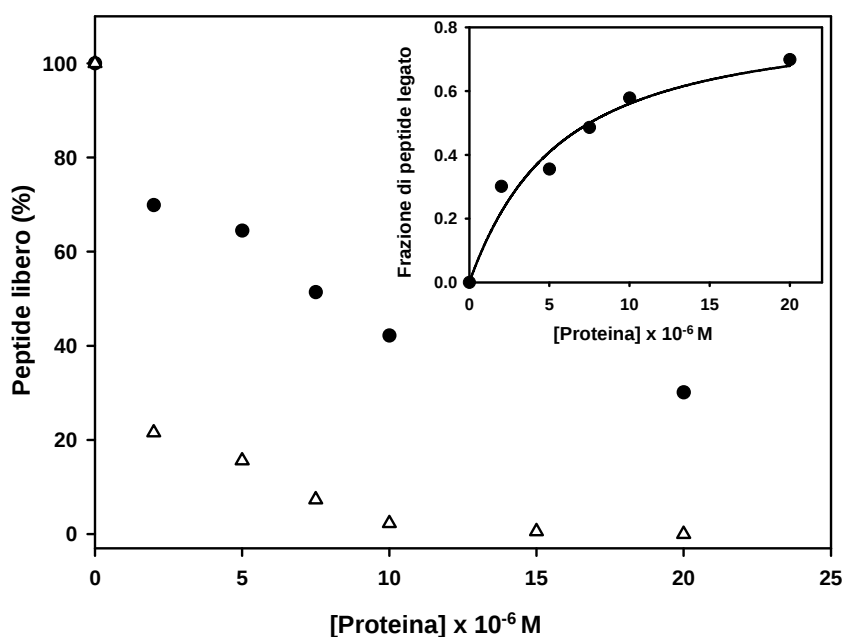


Figura 19. Legame del feromone cPD1 a TraA e TraC. Per ogni titolazione, sono stati analizzati mediante spettrometria di massa ESI campioni differenti contenenti una concentrazione di cPD1 pari a circa 2 μM e concentrazioni crescenti di TraC o TraA fino a 20 μM . La percentuale dei peptidi liberi rimasti in soluzione per ogni campione dopo l'aggiunta delle proteine è stata riportata in grafico in funzione della concentrazione di TraA (triangoli vuoti) e di TraC (pallini pieni). *Inset*, "fitting" delle saturazioni frazionarie determinate sperimentalmente per il legame di cPD1 a TraC in una curva teorica corrispondente ad un valore di K_d di 1.1 μM .

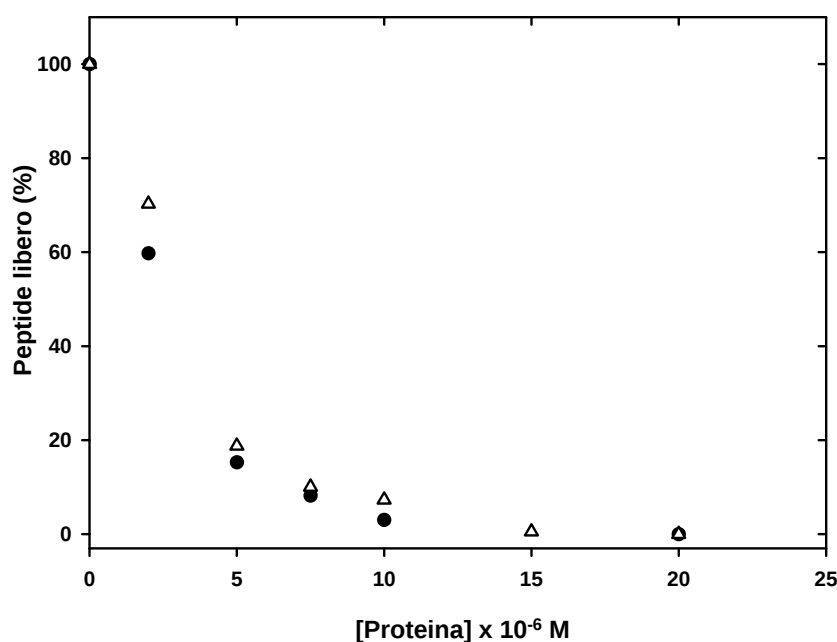


Figura 20. Legame dell'inibitore iPD1 a TraA e TraC. Per ogni titolazione, sono stati analizzati mediante spettrometria di massa ESI campioni differenti contenenti una concentrazione di iPD1 pari a circa 2 μM e concentrazioni crescenti di TraC o TraA fino a 20 μM . La percentuale dei peptidi liberi rimasti in soluzione in ogni campione dopo l'aggiunta delle proteine è stata riportata in grafico in funzione della concentrazione di TraA (triangoli vuoti) e di TraC (pallini pieni).

4. Legame di TraA al DNA

E' stato riportato che sul plasmide pPD1, a monte del gene *ipd*, sono presenti tre siti di legame per TraA, uno forte (Tab1) e due deboli (Tab2 e Tab3) ¹⁹⁵. L'interazione di TraA con Tab1 ha un ruolo di primaria importanza nella regolazione della trascrizione del gene *ipd* e di conseguenza nel controllo dell'espressione di tutte le proteine coinvolte nella coniugazione ¹⁹⁵. La capacità della proteina ricombinante TraA di legare Tab1 è stata verificata mediante saggio di migrazione ritardata su gel (EMSA); i risultati ottenuti hanno evidenziato un legame pressoché saturato di TraA a Tab1 a partire da concentrazioni pari a 290 nM della proteina (Fig. 21).



Figura 21. Legame di TraA al DNA. Il saggio di migrazione ritardata su gel è stato eseguito usando una concentrazione pari a 32 nM di un frammento di DNA marcato della lunghezza di 28 pb corrispondente a Tab1 e concentrazioni crescenti di TraA ricombinante (0, 96, 160, 225, 290, 354 e 480 nM; lane 1-7). E' mostrata la percentuale di DNA legato riferita a diverse concentrazioni di proteina, stimata confrontando l'intensità della banda corrispondente al complesso proteina-DNA con l'intensità totale stimata per ciascuna lane.

Materiali e metodi

1. Ceppi e plasmidi

Il ceppo di *E. faecalis* 7C5, isolato da un prodotto caseario²⁰¹, ci è stato fornito dall'Istituto Lattiero Caseario di Lodi. Nonostante questo ceppo fosse stato inizialmente classificato come appartenente alla specie *E. faecium*²⁰¹, sequenziando l'rRNA 16S si è verificato che in realtà appartiene alla specie *E. faecalis* (dati non mostrati). I ceppi di *E. coli* XL1B-Blue e BL21 (DE3) sono stati acquistati da Stratagene. Il vettore pGEM-T Easy (Promega) e pET11b (Novagen) sono stati impiegati per il subclonaggio e per l'espressione delle proteine, rispettivamente.

2. Clonaggio genico ed espressione eterologa di TraA e TraC

Le sequenze codificanti per TraA e TraC sono state amplificate applicando un protocollo *touchdown* PCR con una temperatura di appaiamento decrescente da 61°C a 51°C nel caso di TraA e da 56°C a 46°C nel caso di TraC; si è impiegata una Deep Vent DNA polimerasi (New England, *BioLabs*) e come templatato il DNA plasmidico totale estratto da *E. faecalis* 7C5 in accordo con¹⁷⁴. Le sequenze dei primer (TraAplus, TraAminus, TraCplus, TraCminus, mostrati in tabella 6), in grado di inserire un sito di restrizione *NdeI* e uno *BamHI* rispettivamente alle estremità 5' e 3' delle sequenze codificanti, sono stati progettati sulla base della sequenza parziale di pPD1 di *E. faecalis* 39-5Sa depositata in GenBank (accession no. D28859). Dopo l'aggiunta di un residuo di adenosina all'estremità 3' mediante incubazione per 30 minuti a 72°C in presenza di MasterTaq DNA polimerasi (Eppendorf), i prodotti di amplificazione sono stati inseriti nel vettore pGEM T-easy (Promega) per generare i plasmidi ricombinanti intermedi pGEM-*traA* e pGEM-*traC*. I frammenti di restrizione ottenuti dalla digestione dei plasmidi ricombinanti pGEM-*traA* e pGEM-*traC* con le endonucleasi *NdeI* e *BamHI* sono stati clonati nel vettore d'espressione pET11b (Novagen), a sua volta sottoposto a digestione con *NdeI* e *BamHI*. Le sequenze di DNA dei plasmidi ottenuti (pET-*traA* e pET-*traC*) sono stati verificate per entrambi i filamenti. L'espressione di TraA e TraC nelle cellule di *E. coli* BL21 (DE3) è stata indotta in presenza di isopropil-1-tio-β-D-galattopiranoside 1 mM; dopo incubazione per 3 ore a 28°C per TraA e *overnight* a 30°C per TraC, le cellule sono state sottoposte a 20 cicli di sonicazione da 30 secondi ciascuno per ottenere la lisi.

Primer	Sequenza
TraAplus	5'-GGATCCTTAATCTATTTTTTGTGG-3'
TraAminus	5'-CATATGCATTTAAATGAATTAATGAAAA-3'
TraCplus	5'-CATATGTGTGGTATAAATACTGCC-3'
TraCminus	5'-GGATCCCTAATTTTGTACCATCATT-3'

Tabella 6. Sequenze dei primer impiegati per l'amplificazione del DNA codificante per TraA e TraC e l'inserimento dei siti di restrizione *NdeI* e *BamHI*.

3. Purificazione delle proteine ricombinanti TraA e TraC

TraA è stata purificata applicando due passaggi cromatografici. Il lisato batterico è stato inizialmente sottoposto ad una cromatografia ad esclusione dimensionale impiegando una colonna Sephadex G100 (Pharmacia) equilibrata con Tris-HCl 30 mM, Ammonio Solfato 0.1 M, pH 7.5. La proteina TraA ottenuta da questa colonna è stata applicata su una colonna Q Sepharose High Performance (Pharmacia) equilibrata con Tris-HCl 30 mM, pH 7.5, e l'eluizione delle frazioni contenenti la proteina è stata ottenuta applicando un gradiente lineare di NaCl (da 0 a 0.5 M). La proteina TraC è stata purificata nei passaggi iniziali nello stesso modo di TraA, con l'impiego di una ulteriore cromatografia ad interazione idrofobica (Phenyl Sepharose, Pharmacia) come step finale. La concentrazione delle proteine è stata determinata usando coefficienti di estinzione (A 1 mg/ml, 1 cm) a 280 nm di 0.61 per TraA e 1.19 per TraC, calcolati in accordo con ²⁰². La correttezza della massa molecolare delle proteine ricombinanti TraA e TraC è stata verificata mediante spettrometria di massa ESI in condizioni denaturanti (0.1% di acido formico). Lo stato di aggregazione di TraA e TraC è stato analizzato mediante cromatografia ad esclusione dimensionale su colonna Ultrogel AcA54 (Bio Septra) equilibrata con Tris-HCl 30 mM, Ammonio Solfato 0.1 M, pH 7.5, e calibrata con proteine a peso molecolare noto (sieroalbumina bovina, anidra carbonica e lisozima). Per stabilire una possibile influenza dell'interazione con cPD1 sullo stato oligomerico delle 2 proteine, sono stati analizzati due ulteriori campioni: TraC o TraA preincubate con 5 equivalenti di cPD1 per proteina monomerica. Prima di essere sottoposti a cromatografia per filtrazione molecolare proteine e ligandi sono stati incubati a temperatura ambiente per un'ora nel tampone di equilibramento della colonna. Lo stato di aggregazione di TraA e TraC è stato analizzato anche mediante spettrometria di massa ESI in condizioni non denaturanti.

4. Misure di spettrometria di massa

Per le misure di spettrometria di massa ESI è stato usato uno spettrometro di massa Quattro LC (Micromass, Manchester, UK) a triplo quadrupolo equipaggiato con un'interfaccia electrospray

assistita pneumaticamente. Per l'acquisizione e il processamento dei dati si è usato il software MassLynx v3.4. Negli esperimenti ES, il gas di nebulizzazione e di desolvatazione (azoto) sono stati utilizzati ad un flusso di 55 e 500 L/ora, rispettivamente. L'iniezione diretta effettuata con una pompa a siringa Harvard ad un flusso di 4 µl/min è stata impiegata per l'analisi delle soluzioni proteiche. Gli esperimenti MS sono stati eseguiti acquisendo il segnale degli ioni positivi (PI). Le condizioni dell'interfaccia sono le seguenti: voltaggio del cono 20 V; voltaggio electrospray 3 kV; temperatura di sorgente 100°C; temperatura di desolvatazione 100°C. Gli spettri di massa sono stati acquisiti in un intervallo di m/z 250-2500 usando uno "step size" di 0.1 Th e un tempo di scansione di 3 secondi.

Gli spettri di massa MALDI-TOF dei peptidi, ottenuti mediante digestione della proteina TraC con tripsina, sono stati acquisiti con uno spettrometro di massa MALDI LR reflectron (Micromass) equipaggiato con un laser N₂ a 337nm. Gli spettri sono stati ottenuti nella modalità ioni positivi. Le condizioni dello strumento sono state impostate come descritto qui di seguito: voltaggio "pulse" 2.2 kV, voltaggio "reflectron" 2 kV, potenziale di accelerazione 15 kV. La calibrazione dello strumento viene eseguita impiegando una miscela standard di calibrazione per peptidi. Come matrice è stato usato l'acido α -ciano-idrossicinnamico (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) disciolto in metanolo: acetonitrile (50:50, v:v). Aliquote di 0.5 µl dei campioni di peptidi (2 µM) sono state mescolate con la soluzione matrice (0.5 µl). Le analisi MALDI-TOF sono state eseguite subito dopo l'evaporazione del solvente.

5. Analisi di sequenza dei geni *ipd* e *cpd* di *E. faecalis* 7C5

Il gene *ipd* è stato amplificato mediante PCR essenzialmente nello stesso modo descritto per i geni *traA* e *traC*, usando i primer specifici P1plus (CTTGAGATAATTTCTCGCTTTTTC) e iPminus (AGTCATACTACTAGTGGTGTGG). Il gene della lipoproteina contenente la sequenza codificante per cPD1 è stato amplificato mediante PCR in condizioni standard impiegando MasterTaq DNA polimerasi (Eppendorf) e come template il DNA genomico di *E. faecalis* 7C5, purificato in accordo con ²⁰³. Le sequenze specifiche dei primer cPplus (ATTTTTTAGAAAAGGACCGAATTAC) e cPminus (TTGAATACATGTGAAAATACCACC) sono state progettate sulla base della sequenza del DNA genomico di *E. faecalis* V583 (GenBank accession no. NC_004668). Le sequenze dei prodotti di amplificazione sono state verificate in entrambi i filamenti.

6. Sintesi dei peptidi

I peptidi cPD1 (FLVMFLSG) e iPD1 (ALILTLVS) sono stati preparati con il sintetizzatore multiplo di peptidi Advanced Chemtec 478Ω, a partire da 0.06 mmol di resina Wang già modificata con l'amminoacido C-terminale. La strategia di sintesi adottata è basata sull'uso del gruppo *N*-9-fluorenilmetilossicarbonilico (Fmoc) come protettore della funzione α -amminica e del gruppo *tert*-butilico per le catene laterali degli amminoacidi serina e treonina. La reazione di condensazione dei diversi Fmoc-ammino acidi sulla catena peptidica in crescita è stata condotta in presenza di esafluorofosfato di O-benzotriazolil-N,N,N',N'-tetrametiluronio e N,N'-diisopropiletilammina. La rimozione del gruppo protettore Fmoc è stata ottenuta con piperidina al 20% in N,N-dimetilformammide. Al termine della sintesi i peptidi sono stati simultaneamente deprotetti e rimossi dalla resina per trattamento, in atmosfera inerte, con una miscela di acido trifluoroacetico (TFA)-acqua-1,2-etanditiolo-triisopropilsilano (94 : 2.5 : 2.5 : 1 in volume). Le miscele acide sono state concentrate a piccolo volume e i peptidi si sono precipitati per aggiunta di etere etilico freddo. I prodotti sono stati purificati mediante HPLC, utilizzando una colonna Vydac (eluente A: TFA 0.1% in acetonitrile acquoso 90%; eluente B: TFA acquoso 0.1%; gradiente lineare: A 25-50% in 20 min) e caratterizzati mediante spettrometria di massa ESI, trovando un valore sperimentale di massa in ottimo accordo con quello calcolato: per cPD1 [M+H] trovato 913.49, calcolato 913.48 e per iPD1 [M+H] trovato 829.50 calcolato 929.53.

7. Saggi di legame proteina-peptide

La capacità di TraA e TraC di legare il feromone e l'inibitore è stata analizzata mediante spettrometria di massa. In particolare, per ogni titolazione sono stati preparati differenti campioni contenenti cPD1 2 μ M o iPD1 5 μ M e concentrazioni crescenti di TraA e TraC in un range da 0 a 20 μ M in acqua milliQ. Per ogni misura è stata stimata la percentuale di peptide che rimaneva in soluzione dopo l'aggiunta delle proteine. Le curve di titolazione si sono ottenute riportando in grafico il segnale di massa dei peptidi liberi in funzione delle concentrazioni di TraA e TraC. Gli esperimenti di legame sono stati eseguiti in duplicato a 20°C.

Nel caso del complesso cPD1-TraC, caratterizzato da un legame peptide-proteina relativamente debole, è stato possibile determinare il valore della costante di dissociazione (K_D). La frazione di peptide legata alla proteina (α) è stata stimata per ogni punto della curva di titolazione in accordo con l'equazione:

$$\alpha = (\text{segnale di massa per il peptide libero totale} - \text{segnale di massa misurato}) / \text{segnale di massa per il peptide libero totale}.$$

L'analisi di regressione non lineare dei dati di legame è stata eseguita impiegando Sigma Plot (Jandel Corte Madera, Ca).

8. Saggio di legame TraA-DNA

La capacità della proteina ricombinante TraA di legare il DNA è stata analizzata mediante il saggio di migrazione ritardata su gel (EMSA). Per questi esperimenti è stato utilizzato un frammento di DNA corrispondente al sito di legame per TraA Tab1¹⁹⁵. L'oligonucleotide Tab1_5' (GGAAACGTCTTTTAAATACATATAC) è stato marcato enzimaticamente con [γ^{32} P]ATP utilizzando T4 polinucleotide chinasi (Fisher Molecular Biology). Per generare un probe a doppio filamento, l'oligonucleotide Tab1_5' marcato (0.2 μ M) e un oligonucleotide complementare Tab1_minus (GTATATGTATTTTAAAAAGACGTTTCC) (0.2 μ M) si sono incubati in Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM per 5 minuti a 100°C, lasciando poi raffreddare lentamente fino a 25°C. L'avvenuto *annealing* del DNA è stato verificato mediante elettroforesi su gel non denaturante di poliacrilamide all'8%. Per l'esecuzione dell'EMSA, ogni campione di reazione di legame conteneva 32 nM di DNA, BSA ultrapura (Amersham Pharmacia Biotech) 0.125 mg/ml e concentrazioni crescenti di TraA ricombinante (da 0 a 480 nM). Dopo 15 minuti di incubazione a 25°C, è stato aggiunto ad ogni campione glicerolo ad una concentrazione finale di 9% (v/v) e i campioni di reazione sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilamide non denaturante all'8%, contenente glicerolo al 2.5%. Il saggio elettroforetico è stato condotto a 20°C usando un tampone di corsa contenente Tris-Borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8. Le immagini sono state raccolte mediante Phosfoimager (Personal Molecular Imager FX, Bio-Rad). La percentuale di DNA legato per ogni concentrazione di proteina è stata stimata confrontando l'intensità della banda corrispondente al complesso proteina-DNA con il segnale totale misurato per ogni lane, usando il software Multi-Analyst/PC (Bio-Rad).

PARTE IV. INTERAZIONI DI TraA CON REGIONI DI DNA DEL PLASMIDE pPD1 ESSENZIALI PER IL TRASFERIMENTO PLASMIDICO CONIUGATIVO FEROMONE-DIPENDENTE

Scopo della ricerca

TraA, la proteina regolatrice negativa della coniugazione, è una *DNA binding protein*. Studi precedenti condotti sul plasmide pAD1 hanno proposto un meccanismo di regolazione che coinvolge la dissociazione del complesso TraA-DNA in presenza dello specifico feromone cAD1 con la conseguente derepressione della coniugazione ¹⁵⁶. Per quanto riguarda il plasmide pPD1, più recentemente è stato dimostrato che TraA riconosce specificatamente tre distinti siti sul DNA chiamati Tab1, Tab2 e Tab3, localizzati a monte del gene *ipd*. Saggi di migrazione ritardata su gel condotti con Tab1 e TraA hanno suggerito che la presenza del feromone cPD1 o dell'inibitore iPD1 inducono un cambiamento dell'angolo di ripiegamento del DNA nel complesso TraA-Tab1 che è coinvolto nel controllo della trascrizione dei geni *traA* e *ipd* ¹⁹⁵. Analisi condotte mediante Northern Blot hanno anche mostrato che la trascrizione è sovra-regolata per il gene *ipd* e repressa per il gene *traA* dal feromone esogeno cPD1 ¹⁹⁵. Al fine di investigare più approfonditamente le proprietà di legame di TraA e più in generale il meccanismo di regolazione della coniugazione negli enterococchi, si è utilizzata la microscopia a forza atomica (AFM) in associazione con saggi di migrazione ritardata su gel (EMSA) e trascrizione *in vitro* per analizzare le interazioni di TraA con specifiche regioni del plasmide pPD1 sia in presenza che in assenza dei peptidi regolatori cPD1 e iPD1.

Risultati

1. Legame differenziale di TraA ai siti Tab1, Tab2 e Tab3

E' stato dimostrato che la regione compresa tra le sequenze codificanti di TraA e *iPD1* è essenziale per la regolazione della coniugazione mediata dal feromone cPD1¹²⁸. Più recentemente, un saggio *DNase footprinting* ha permesso di identificare in questa regione tre siti di legame per TraA, uno forte (Tab1) e due deboli (Tab2 e Tab3) (Fig. 22A)¹⁹⁵. Per meglio investigare le proprietà di legame di TraA a questi tre siti e il meccanismo di regolazione della trascrizione del gene *ipd*, si sono preparati dei complessi DNA-TraA in differenti condizioni e si sono visualizzati mediante AFM. Le immagini raccolte sono state analizzate per misurare accuratamente la lunghezza del DNA e la posizione di TraA lungo il frammento di DNA impiegato negli esperimenti. I risultati delle misure AFM sono stati confermati da quelli di saggi di migrazione ritardata su gel condotti in condizioni molto simili.

I complessi TraA-DNA sono stati preparati usando la proteina TraA ricombinante (vedi Parte II) e un frammento di DNA della lunghezza di 947 pb contenente i siti Tab1, Tab2 e Tab3 localizzati vicino al centro del DNA template (Fig. 22B). I complessi sono stati assemblati sia in assenza che in presenza dei peptidi regolatori cPD1 o iPD1 (vedi Materiali e metodi), depositati sopra un cristallo esfoliato di mica e visualizzati mediante AFM in modalità *tapping*.

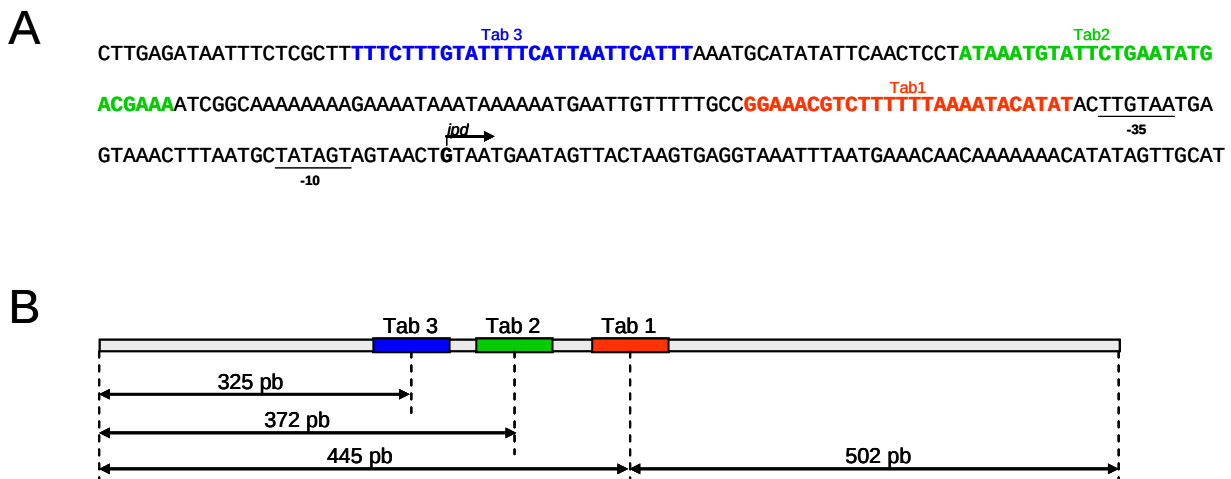


Figura 22. A) Sequenza di DNA a monte del gene *ipd* con indicati l'inizio della trascrizione di *ipd*, le regioni -10 e -35 sottolineate e i siti Tab1, Tab2 e Tab3 in rosso, verde e blu, rispettivamente. B) Rappresentazione schematica del frammento di DNA utilizzato per gli esperimenti AFM. E' riportata la distanza in pb dal centro di ogni Tab ad un'estremità del DNA.

La figura 23A mostra alcune immagini di complessi selezionati in cui TraA è visualizzato come una sferetta bianca lungo il DNA templato.

Per determinare la posizione in cui TraA lega il DNA, per prima cosa è stata misurata la lunghezza del complesso tracciando il percorso del DNA da un'estremità all'altra come descritto precedentemente²⁰⁴ e nei Materiali e metodi. Poi la proteina legata è stata visualizzata ed è stata misurata la sua distanza da entrambe le estremità del DNA. La posizione è espressa come RATIO, ovvero rapporto tra la lunghezza del braccio corto del frammento di DNA templato e la lunghezza dell'intera molecola. Il braccio corto del frammento di DNA rappresenta la distanza (nm) più breve da percorrere, partendo da un'estremità del frammento e seguendo il profilo della molecola di DNA, per raggiungere il punto in cui la proteina è legata. Quindi la posizione della proteina varia da 0 a 0.5, con quest'ultimo valore che corrisponde alla proteina legata al centro del frammento di DNA.

Questo tipo di analisi, tuttavia, pone un problema per la determinazione della reale localizzazione della proteina, poiché, data l'impossibilità per l'operatore di distinguere le due estremità di un frammento di DNA, un determinato valore di rapporto identifica due potenziali siti sul DNA, ciascuno localizzato alla stessa distanza da una delle due estremità. Questo inconveniente viene solitamente risolto progettando i templati per l'analisi AFM con la regione d'interesse posizionata interamente in una metà del frammento. In questo modo, un valore ricorrente di RATIO può essere imputato ad un legame specifico della proteina in un sito localizzato nella metà del frammento contenente la regione d'interesse, poiché l'altra metà, essendo costituita dal DNA proveniente dal vettore di clonaggio, non presenta sicuramente siti specifici di legame per TraA. La presenza della proteina in questa seconda metà del frammento può essere imputata ad una interazione di tipo casuale e, di conseguenza, poco frequente.

Il calcolo della RATIO è stato eseguito singolarmente per tutti i complessi osservati, relativi a ciascuna serie di esperimenti. I valori relativi ai rapporti calcolati per ciascun complesso sono stati analizzati statisticamente e rappresentati in grafico in funzione della frequenza con cui ciascun valore compariva: la presenza di uno o più siti specifici di legame della proteina si traduce nella comparsa di picchi centrati sul corrispondente valore di rapporto. Questa procedura consente di determinare la presenza di siti di legame riconosciuti da una particolare proteina e di analizzare le variazioni nell'affinità del legame al DNA in diverse condizioni sperimentali.

L'analisi AFM consente inoltre di calcolare in modo accurato la lunghezza delle molecole di DNA coinvolto nella formazione dei complessi; questo parametro, paragonato alla lunghezza media del DNA libero, permette di dedurre la presenza di eventuali alterazioni della struttura della doppia elica causati dall'interazione con la proteina, come superavvolgimenti e formazione di loop.

L'estensione dell'interazione tra proteina e DNA viene calcolata sulla base della presenza o meno di un accorciamento medio della lunghezza del DNA nei complessi rispetto al DNA libero, poiché la risoluzione dello strumento non consente di osservare in modo diretto la regione di contatto con la proteina e gli eventuali ripiegamenti del DNA. La presenza di una estesa interazione DNA-proteina si renderà manifesta al momento della misurazione delle molecole di DNA, in cui i valori relativi ai complessi risulteranno in media significativamente minori dei valori relativi al DNA libero; l'accorciamento osservato corrisponderà alla lunghezza della regione di contatto della doppia elica con la proteina. Nel caso invece di proteine che stabiliscono un minor numero di contatti, interagendo in maniera meno estesa con il DNA, le distribuzioni delle lunghezze di DNA libero e complessi saranno pressoché sovrapponibili. Questa metodologia di indagine strutturale è già stata utilizzata con successo in differenti studi sulle interazioni DNA-proteina²⁰⁵.

Per l'analisi dei complessi TraA-DNA per prima cosa si è determinata la lunghezza di un elevato numero di molecole di DNA in complesso e di un equivalente numero di molecole di DNA libero. Ponendo i valori in grafico in funzione della frequenza con cui ciascuna misura compare, si nota una piccola differenza tra il massimo delle distribuzioni delle lunghezze del DNA libero e quello delle distribuzioni delle lunghezze del DNA nei complessi (Fig. 23B), indicazione del fatto che non c'è una compattazione significativa del DNA in seguito al legame di TraA alle Tab nemmeno in presenza o assenza dei peptidi cPD1 o iPD1.

L'assenza di compattazione del DNA rende più facile stabilire la localizzazione della proteina lungo il template, ossia correlare la posizione di TraA lungo il DNA determinata mediante AFM con la posizione delle Tab dedotta sulla base della sequenza di DNA.

La figura 23C mostra la distribuzione della posizione di TraA lungo il frammento di DNA sia in assenza che in presenza di cPD1 e iPD1. E' da notare che in tutti i casi l'AFM identifica tre distinti siti di legame per TraA che corrispondono alle tre posizioni attese per Tab1, Tab2 e Tab3. Tuttavia, la frequenza del legame ad una specifica Tab cambia a seconda delle diverse condizioni. In particolare, TraA sola o in presenza di iPD1 lega preferenzialmente Tab1, mentre in presenza di cPD1, TraA lega preferenzialmente Tab3.

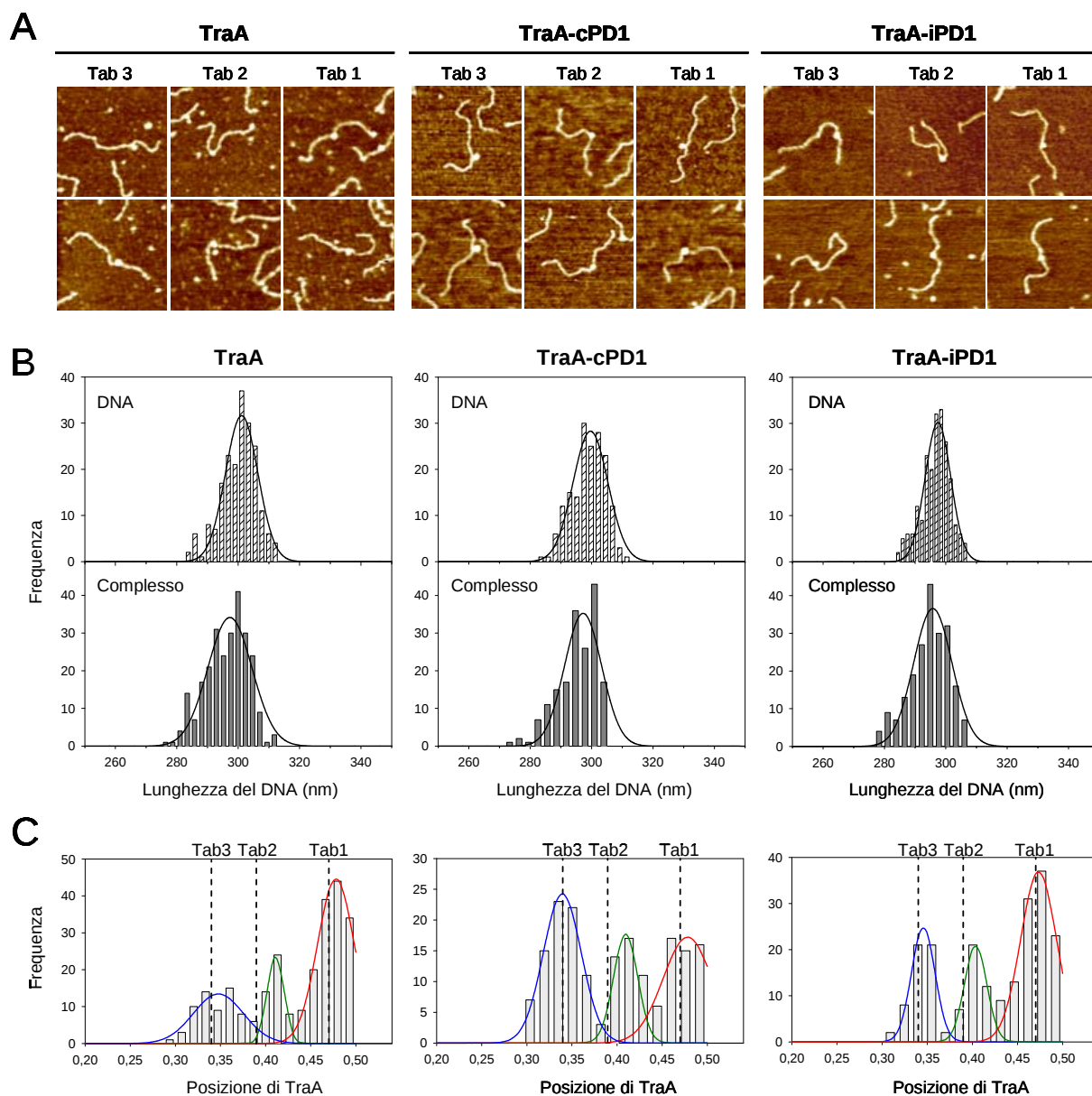


Figura 23. A) Immagini AFM di complessi TraA-DNA selezionati che mostrano TraA (sferetta bianca) legata alle Tab nelle condizioni indicate sopra ogni set costituito da sei immagini. B) Istogrammi delle misure delle lunghezze del DNA libero (barre a strisce) e del DNA nel complesso con TraA (barre grigie) in differenti condizioni sperimentali indicate sopra ogni grafico. I valori sono stati sottoposti a *fitting* con una gaussiana. C) Istogrammi della posizione di TraA lungo il DNA template espressa come rapporto tra la lunghezza del braccio più corto (la distanza (nm) più breve da percorrere, partendo da un'estremità del frammento e seguendo il profilo della molecola di DNA, per raggiungere il punto in cui la proteina è legata) e l'intera lunghezza del DNA. Da sinistra a destra, i complessi proteina-DNA sono stati assemblati con TraA, TraA complessata a cPD1 e TraA complessata a iPD1. La posizione attesa del centro di ogni Tab è indicata con linee tratteggiate.

La visualizzazione dei complessi ha inoltre evidenziato la presenza di un ridotto numero di complessi doppi, identificabili in base alla presenza di due molecole di TraA legate ad un medesimo frammento in corrispondenza di una diversa Tab (Fig. 24A e B).

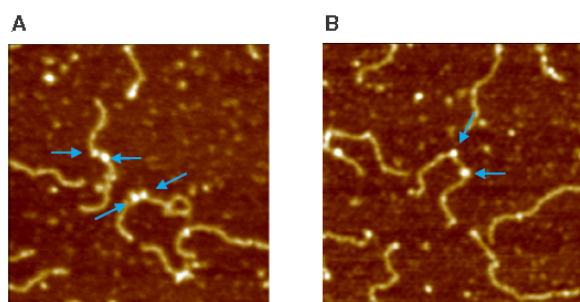
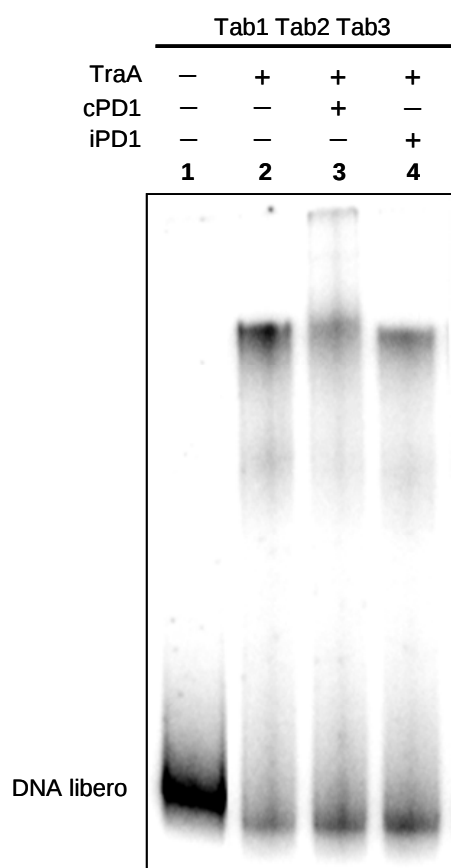


Figura 24. Esempi di complessi doppi di TraA sul frammento di DNA *ipd-traA* (freccie azzurre). A) Si osservano due complessi doppi in cui TraA è legata alla Tab1 e alla Tab2. B) Si osserva un complesso doppio dove TraA è legata alla Tra1 e alla Tab3.

Il numero di questi complessi non variava rispetto ai siti occupati, né tanto meno a seconda che la proteina fosse legata al feromone o all'inibitore. Inoltre non è stata mai riscontrata la presenza di complessi in cui tutti e tre i siti di legame fossero simultaneamente occupati. Questi risultati suggeriscono che l'interazione che TraA stabilisce con i diversi siti specifici non è di tipo cooperativo, poiché, in questo caso, il legame della proteina ad un sito promuoverrebbe l'interazione di TraA con uno dei siti adiacenti, portando alla visualizzazione di un elevato numero di complessi doppi o tripli.

I risultati AFM sono stati confermati da esperimenti EMSA utilizzando un frammento di DNA di 266 pb contenente Tab1, Tab2 e Tab3. Come mostrato in figura 25, la migrazione elettroforetica dei complessi TraA-DNA (lane 2) e TraA-iPD1-DNA (lane 4) dà luogo a bande definite; la migrazione del complesso con iPD1, in particolare, risulta leggermente più veloce della



precedente. La maggiore mobilità del complesso TraA-iPD1-DNA può indicare un cambiamento conformazionale del complesso nucleo-proteico che può consistere in un cambiamento dell'angolo di ripiegamento del DNA come suggerito in precedenza ¹⁹⁵. Viceversa, preincubando TraA con il feromone cPD1 si ottiene come risultato una banda più diffusa (Fig. 25, lane 3); questo suggerisce un legame meno focalizzato della proteina lungo il frammento di DNA.

Figura 25. Saggio di migrazione ritardata su gel del frammento di DNA marcato radioattivamente della lunghezza di 266 pb contenente i siti Tab1, Tab2 e Tab3 nelle condizioni indicate sopra al gel.

Comportamenti simili si sono osservati con un frammento di DNA contenente solo il sito Tab1. La figura 26B mostra la posizione di TraA determinata mediante AFM lungo un frammento di 808 pb con il sito Tab1 inserito circa al centro del template (schema in alto). TraA da sola o in presenza di iPD1 lega specificatamente Tab1 come indicato dalla corrispondenza tra il picco delle distribuzioni e la posizione della Tab1, indicata dalla linea tratteggiata, e dalla forma ristretta delle distribuzioni. Viceversa, in presenza di cPD1 la forma della distribuzione è decisamente più larga, indicazione di una maggiore affinità di TraA per altri siti diversi da Tab1. Questo risultato è stato confermato da un esperimento EMSA condotto con un frammento di DNA di 28 pb contenente il sito Tab1 (Fig. 26A). In accordo con i dati AFM, TraA da sola (lane 2) o in presenza di iPD1 (lane 4) fa migrare il DNA in bande distinte mentre in presenza di cPD1 (lane 3) si osserva una banda diffusa.

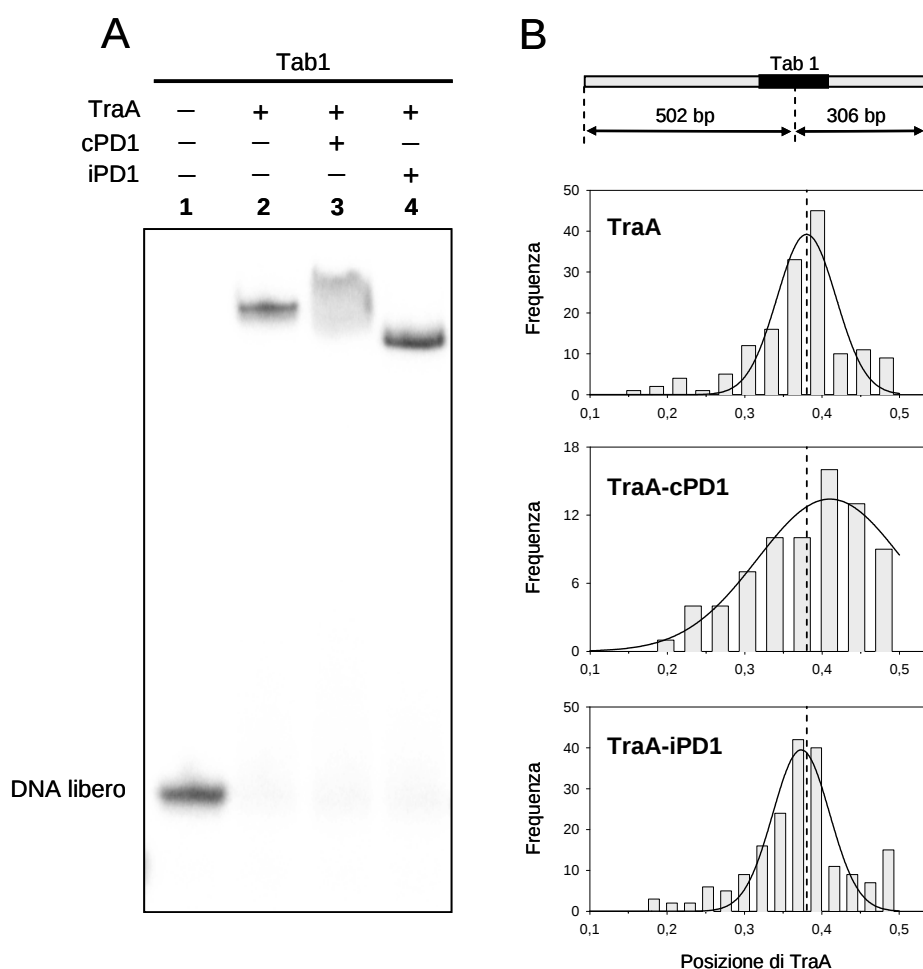


Figura 26. Legame differenziale di TraA alla Tab1. A) Saggio di migrazione ritardata su gel del frammento marcato radioattivamente di 28 pb corrispondente al sito Tab1. I componenti di reazione sono indicati sopra al gel. B) Istogrammi della posizione di TraA determinata mediante immagini AFM dei complessi TraA-DNA assemblati con un frammento di DNA di 808 pb contenente solo la Tab1 (schema in alto) nelle condizioni indicate in ogni grafico. La posizione attesa al centro del sito Tab1 è indicata con una linea tratteggiata. Le distribuzioni sono state sottoposte a *fitting* con una funzione Gaussiana.

2. Riposizionamento del promotore del gene *traA*

Per investigare un possibile ruolo di TraA nella regolazione dei geni *ipd* e *traA*, sono stati eseguiti dei saggi di trascrizione *in vitro* utilizzando RNA polimerasi di *E. coli* e frammenti di DNA contenenti i promotori di questi geni precedentemente identificati ¹⁹⁵, sia nella loro forma *wild-type* che con mutazioni nella regione -10, al fine di inattivare alternativamente entrambi i promotori (vedi Materiali e metodi). Lo “spegnimento” dei promotori rende possibile osservare l’attività dei singoli geni in assenza dell’eventuale interferenza prodotta dalla loro vicinanza.

Non essendo presenti sequenze di terminazione nei DNA templati, la trascrizione che inizia dai due promotori si fermerà una volta raggiunta l’estremità del frammento, dando origine a trascritti *run-off*. La posizione dei due promotori rispetto all’estremità dei frammenti di DNA è tale che i trascritti *ipd* o *traA* che partono dagli specifici promotori risulteranno di lunghezza diversa e saranno quindi facilmente riconoscibili in seguito ad elettroforesi su gel di acrilammide denaturante.

Come mostrato nella figura 27 la trascrizione *run-off* del DNA *wild-type* template (lane 2) dà come risultato due bande di RNA corrispondenti alla dimensione attesa (182 nucleotidi (nt)), considerando la posizione del promotore di *ipd* (P_0) nel frammento di DNA impiegato. Tuttavia, non si è evidenziata un’altra banda attesa corrispondente ad un RNA di 270 nt, associabile al trascritto di *traA* dal promotore precedentemente identificato.

Si identifica invece una banda corrispondente ad un trascritto della lunghezza di circa 300 nt. Inattivando alternativamente i promotori *ipd* e *traA*, è possibile confermare che le due bande di RNA di circa 182 nt corrispondono al trascritto dal promotore di *ipd* (Fig. 27, lane 4), mentre dal promotore di *traA* non si origina nessun trascritto nemmeno in assenza di una possibile

interferenza data dalla trascrizione del gene *ipd* (Fig. 27, lane 3 e 4).

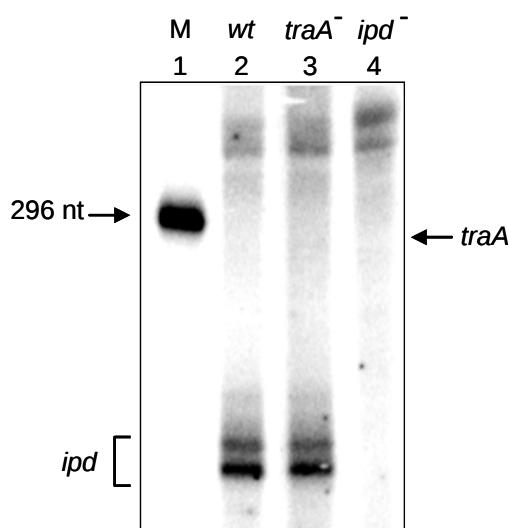
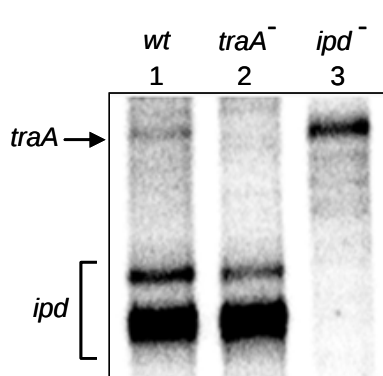


Figura 27. Gel denaturante che mostra i prodotti dell’esperimento di trascrizione *in vitro* effettuato utilizzando un DNA template che contiene i promotori di *traA* e *ipd* sia *wild-type* (lane 2) che mutati nella regione -10, al fine di inattivare alternativamente entrambi i promotori (lane 3 e 4). Nella lane 1 è mostrato un marker di RNA della lunghezza di 296 nt. La posizione attesa per il prodotto *run-off* dal promotore di *ipd* è indicata sulla sinistra, mentre la posizione attesa per il trascritto *run-off* dal promotore di *traA* precedentemente identificato è indicata sulla destra, ma in nessuna lane è presente una banda che può corrispondere a questo trascritto. In tutte le lane è invece presente una banda corrispondente ad un RNA più lungo (circa 300 nt).

È interessante notare che immagini AFM dei complessi ottenuti con RNA polimerasi di *E. coli* e con un frammento di DNA di 907 nt contenente il promotore di *ipd* e quello di *traA* identificati precedentemente (Fig. 29A), rivelano la presenza di due distinti siti di legami sul DNA per la RNA polimerasi di *E. coli*: uno corrispondente al promotore di *ipd* e l'altro corrispondente ad una sequenza di DNA localizzata circa 100 nt a monte del promotore di *traA* identificato in precedenza. L'analisi di sequenza di questa regione rivela la presenza di un esamero consenso –10 (TAATAT) e di un esamero –35 caratteristici dei promotori batterici. Inoltre la posizione del promotore appena identificato è compatibile con il trascritto di circa 300 nt osservato negli esperimenti di trascrizione *in vitro* (Fig. 27).

Per confermare che il promotore identificato sia quello del gene *traA*, si sono eseguiti saggi di trascrizione usando frammenti di DNA contenenti il promotore di *ipd* e il promotore di *traA* di nuova identificazione (P_A), sia nella loro forma *wild-type*, che alternativamente inattivati mediante mutazioni puntiformi. Come mostrato in figura 28 la trascrizione con i promotori *wild-type* dà origine a due trascritti *run-off* le cui lunghezze sono compatibili con la trascrizione a partire dal promotore *ipd* e dal promotore *traA* da noi identificato (lane 1). Ogni banda scompare quando viene inattivato il promotore corrispondente (lane 2 e 3). Come risulta evidente dall'intensità delle bande, è interessante notare che il promotore di *traA* è più debole di quello di



ipd; tuttavia l'attività di *traA* aumenta dopo l'inattivazione di *ipd* suggerendo un'interferenza nella trascrizione tra questi due geni convergenti.

Figura 28. Trascrizione in vitro del DNA templato contenente il promotore di *ipd* e il promotore di *traA* da noi identificato nelle forme *wild-type* (lane 1) e nelle rispettive forme mutate inattive *traA*⁻ (lane 2) e *ipd*⁻ (lane 3). La posizione attesa dei trascritti *run-off* è indicata nel lato sinistro del gel.

Le immagini AFM dei complessi formati da RNA polimerasi di *E. coli* con un frammento di DNA di 907 pb, confermano che l'inattivazione di ogni promotore dà luogo alla perdita del complesso col promotore corrispondente (Fig. 29B e C). In accordo con i dati fino ad ora raccolti, è stato identificato il sito di inizio della trascrizione di *traA* mediante Primer Extension (dati non mostrati) ed è stato riportato in figura 30, che include anche le altre sequenze che possono avere un ruolo importante nel meccanismo di regolazione della coniugazione degli enterococchi come verrà discusso in seguito.

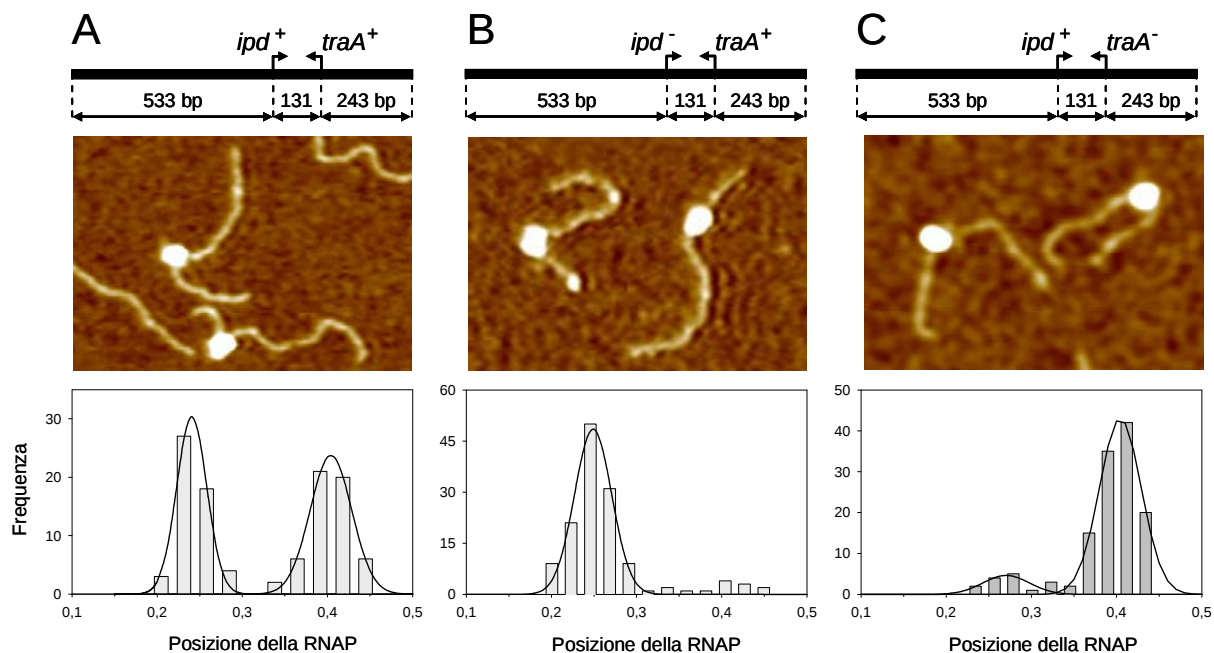


Figura 29. A) Posizione della RNA polimerasi di *E. coli* lungo un frammento di DNA contenente il promotore di *ipd* e il promotore di *traA* nella forma *wild-type* come determinato mediante AFM. B) Posizione determinata mediante AFM della RNA polimerasi di *E. coli* lungo un frammento di DNA contenente il promotore di *traA* da noi identificato *wild-type* e il promotore di *ipd* mutato. C) Posizione determinata mediante AFM della RNA polimerasi di *E. coli* lungo un frammento di DNA contenente il promotore di *traA* da noi identificato mutato e il promotore di *ipd* *wild-type*.

CTTGAGATAATTTCTCGCTTTTCTTTGTATTTTCATTAAATTCATTTAAATGCATATATTCAACTCCTATAAATGTATTCTGAATATGACGAAATCGGC AAA
 AAAAAAGAAAAATAAAAAATGAATTGTTTTTGCCGGAACGCTCTTTTAAAAATACATATCTTGTAAATGAGTAACTTTAATGCTATAGTAGTAACGTGA
 ATGAATAGTTACTAAGTGAGGTAATTTAATGAAACAACAAAAAACATATAGTTGCATTATTGTTGCACTAATATTAACCTCTGTTCTTAAAAAAGC
 CACACCACTAGTAGTAGTACTTCGTCACATACGAATTATACCATGAACTAGAAAAAGTAACATAAAATAAGAACCGACTATCTTTGGGCTACCAACCCA
 AGAGGATAGTTAAATAATTCATGCTGATCCCATGAACATATCTCGGTTCTCGAACACTGCAACATAAGTTACAACATATAGTATAACAATTTTTTAAGAGAAT
 TTCCAGACCTTTTAACTCCTTTATTGGTCTAGGAAAAAGATTACTTTAAATAAATTTGTTTGTATGGTGGAAATGATGGTTGCAGTACACGGGGAACGTATA
 CAGTTTCATGTATATGTTCCCGTTTTTGGTTTTATCGCTAAATTTTGAAGGGCTGGTGTTCAGAATGAAACAAAAAGTGACGGGTACAATGATTTTAC
 AAAAGGTCTATCGGATTCATACAAAGACAGGAAATTGTTATGTATTAGAAAACGAGCGATTTATCTAGCAGTTCAAGTTTTAGAATGGAATGATCTG
 GAAAAATATAGAGAAATCCTCAAATGGGTGTTACCAAAACATTGCTTCGTCAAATCATTTCTGTTATGACAAAGATGGAATAAAATCATTGAACGAAAG
 AAAGGGTCCACCAAGTTAACCCTTGTCTGTGAAAAAGTAAATAAAAAAGTCAACTAGTTTCCGCTAGCTGACAAGCATCATTGAAAGAAAAAATTA
 ATGAATAAAATGTTAAAAATAGTATACCAACAGGAAGTGAACGAGTAAATAGAACAGGAGGGCTCTATGGAAGAAACGAATTGCCTATGCAGAAGAACT
 AAATCACGGAGACGTGATACGAGTATTTTCTATGACCAAAATTTGGAATGGATGAAACAACTTTTACAGCTCTTGTGTTGACTGCTCGGACAAGAAAAA
 TTAGTCATTCCGCAAGACTTCCAAGGCCATCTGTATCGAGCTGCGCAAAAAGGTGCAGATTGGGAGATAACAGTGGATTGGTTACTAGAAAATGATGTTGACG
 TATTCATTGTCGAACGATTTGACCAAGTTACTCGCTACCATTTGGAATTTTAAACGAAGAAGAAGTGAACAAAAGTATTCAGGAAACACCTATTGTTGCT
 GGTTCAGCAAAATGCAACAAAAAAGAACATTCTATCTTCTGATAACGAGAAGAAGACGCTTTCTTTTACAACGAATAGTCAGCGAGAAAGTCCG
 CTGCCTTGCTTATCAGCGTAGCTATGAAAGGCAAGGATACAGAA

Tab 3
 Tab 2
 Tab 1
ipd⁺
traA⁺
traE⁺
traF⁺
 TT1
 TT2
 TT3

Figura 30. Sequenza di DNA del plasmide pPD1 dalla regione regolatrice del gene *ipd* fino al gene *traF*. I siti di inizio trascrizione dei geni *ipd*, *traA*, *traE* e *traF* sono indicati in grassetto, le regioni -10 e -35 sono sottolineate, i siti Tab1, Tab2 e Tab3 sono indicati in rosso, verde e blu rispettivamente e i terminatori TT1, TT2 e TT3 sono indicati in rosa.

3. Identificazione di nuovi siti di legame di TraA nella regione intergenica *traA-traE*

E' stato proposto che nel sistema coniugativo del plasmide pAD1 TraA possa regolare anche la terminazione di *ipd* a livello dei terminatori TT1 e TT2 e l'attività del gene *traE*^{153; 163}. Poiché le regioni intergeniche *traA-traE* dei plasmidi pPD1 e pAD1 presentano un'alta somiglianza (Fig. 31), si può ipotizzare che anche nel plasmide pPD1 TraA svolga un ruolo regolativo a livello di questa regione che include i terminatori TT1 e TT2 di *ipd* e i promotori di *traA* e *traE*. Per questo motivo, si sono eseguiti esperimenti AFM con lo scopo di trovare dei possibili siti di legame di TraA nella regione intergenica *traA-traE* di pPD1. Il metodo utilizzato è analogo a quello impiegato per l'analisi del legame di TraA con le tre Tab, mediante il calcolo delle RATIO, con l'unica differenza che, in questa regione, non è nota l'esistenza di siti di legame per TraA. L'interazione preferenziale di TraA per un eventuale sito di legame si tradurrà nella presenza di un picco definito nella distribuzione delle RATIO, come nel caso del legame specifico di TraA per le tre Tab, mentre, in assenza di una marcata preferenza, la distribuzione si presenterà ampia e allargata, indice di un legame casuale della proteina lungo la molecola di DNA.

Sequence	Position	Sequence	Position
pPD1	1	CATA--CGAATTATACCATGAAAC-TAGAA-AAAAGTAACTAAAAATAA	45
pPAD1	1	cttagtgcgga--tata-aaggcaacttacaagacaattaac--aaaataa	45
pPD1	46	GAACCGACTATCTTTGGGCTAC--CAACCCAAGAGGATAGTTAAATAATT	93
pPAD1	46	gaaccgactgccatagg--acgggaatcctagaggacaggttaacaatt	92
pPD1	94	CATGCTGAT-CCCATGAACTATACTCGTTTCTCGAACACTGCAACATAAG	142
pPAD1	93	catgct-atacccatgaactatactcggttctcgtttgttgcaacattag	141
pPD1	143	TTACAACATATAGTATAACAATTTTTTAAAGAGAATTTCCAGACCTTTTTTA	192
pPAD1	142	ttacaacgtatagatataacaattttttatgtaaaattctagactttttta	191
pPD1	193	AACTCCTTTATTGGTCTAGGAAAAAGATTACTTTA-AATAAATTGTT---	238
pPAD1	192	aactcctttatttgtctaggaaaa--gtt--tttacagtgaattgtttta	237
pPD1	239	-----TTGTATGGTGAATGATGGTTGCAGTACACGGGGAACGTATACAG	283
pPAD1	238	attagttgtat---aaatgttgg-agcag---cggggaatgtatacag	278
pPD1	284	TTCATGTATATGTTCCCGT	303
pPAD1	279	ttcatgtatatattccccgc	298

Figura 31. Allineamento delle sequenze della regione intergenica *traA-traE* dei plasmidi pPD1 e pAD1. L'allineamento è stato costruito con EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms.

A tal fine, sono stati preparati due DNA templati, uno contenente il terminatore TT1 e l'altro il terminatore TT2. A causa della vicinanza delle sequenze, il frammento di DNA contenente il sito TT1 comprende anche il promotore di *traA* (Fig. 30 e 32A), mentre il frammento di DNA TT2 comprende anche il promotore di *traE* (Fig. 30 e 32B). Per quanto riguarda il primo frammento, TT1 e il promotore di *traA* distano circa 100 pb e quindi sono due siti distinguibili mediante AFM, mentre il secondo frammento contiene TT2 e il promotore di *traE* praticamente sovrapposti.

Le immagini AFM dei complessi assemblati con il frammento di DNA contenente TT1 e il promotore di *traA* rivelano la presenza di due specifici siti di legame di TraA al DNA la cui posizione si correla bene con le posizioni attese per il promotore di *traA* e per il terminatore TT1 di *ipd* (Fig. 32A, schema in alto). Quando i complessi vengono assemblati in presenza di cPD1, la distribuzione della posizione di legame di TraA diventa molto allargata (Fig. 32A, grafico centrale) indicazione di un legame non specifico del complesso TraA-cPD1 al DNA. Al contrario quando i complessi vengono assemblati in presenza di iPD1 la situazione è molto simile a quella osservata per TraA sola (Fig. 32A, grafico in fondo), con il complesso TraA-iPD1 legato in modo specifico al terminatore TT1 e al promotore di *traA*.

Analogamente, esperimenti AFM condotti con il DNA template contenente il terminatore TT2 e il promotore di *traE* mostrano un legame preferenziale di TraA e del complesso TraA-iPD1 ad una precisa posizione interna al DNA template, che corrisponde alla regione di DNA che comprende il terminatore TT2 e il promotore di *traE* (Fig. 32B, grafico in alto e in fondo). Ancora una volta, il legame dei complessi TraA-cPD1 è diffuso lungo il frammento di DNA, indicazione del fatto che questa interazione non è specifica (Fig. 32B, grafico centrale).

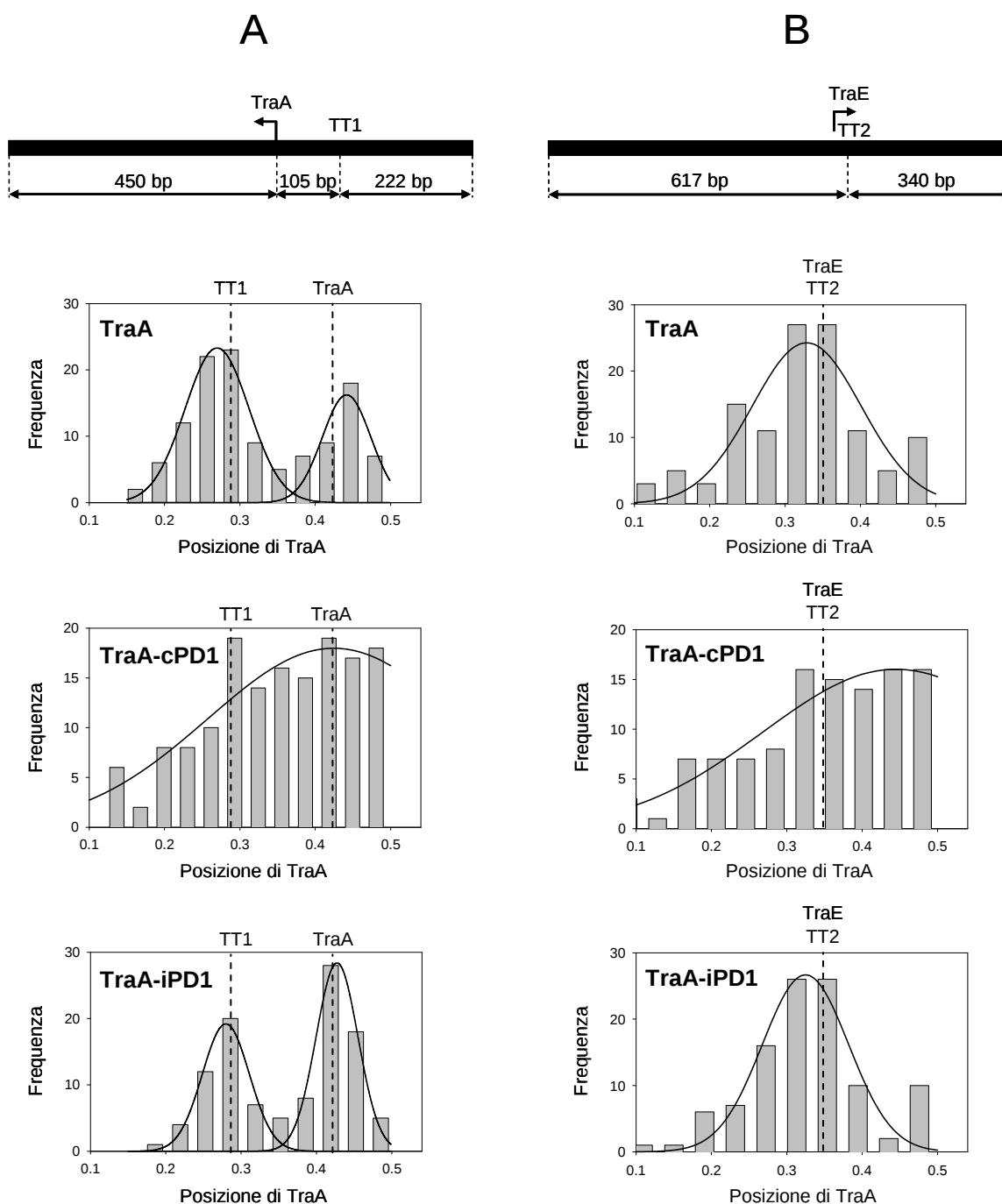


Figura 32. Identificazione di nuovi siti di legame nella regione intergenica *traA-traE*. A) Posizione di TraA, determinata mediante AFM, lungo un frammento di DNA che contiene il promotore di *traA* e il terminatore TT1 (schema in alto), sia in presenza che in assenza dei peptidi cPD1 o iPD1 come indicato in ogni grafico. La posizione attesa del promotore di *traA* e del centro del terminatore TT1 sono indicate con linee tratteggiate. Il *fitting* delle distribuzioni è stato effettuato con una Gaussiana doppia per i dati nei grafici in alto e in basso, e con una Gaussiana singola per i dati nel grafico centrale. B) Posizione di TraA, determinata mediante AFM, lungo un frammento che contiene il promotore di *traE* e il terminatore TT2 (schema in alto), in assenza o in presenza dei peptidi cPD1 o iPD1 come indicato in ogni grafico. La posizione attesa del promotore di *traE* e del centro del terminatore TT2 sono sovrapposte e indicate con linee tratteggiate. Il *fitting* delle distribuzioni è stato effettuato con una Gaussiana singola.

La capacità di TraA di legare la regione intergenica *traA-traE* è stata investigata anche mediante saggi di migrazione ritardata su gel utilizzando due frammenti di DNA, uno contenente TT1 e il promotore di *traA*, l'altro contenente TT2 e il promotore di *traE*. La presenza di un legame non

trascurabile di TraA ad entrambi i frammenti è confermato dal ritardo elettroforetico delle bande relative ai complessi con la proteina, rispetto al DNA libero, anche se i complessi nucleo-proteici si sono ottenuti con concentrazioni di TraA maggiori di quelle impiegate per studiare il legame alle Tab.

Negli esperimenti EMSA condotti con il frammento di DNA contenente il terminatore TT1 (Fig. 33A) il complesso TraA-iPD1-DNA dà luogo ad una banda che migra più velocemente di quella del complesso TraA-DNA (Fig. 33A, lane 4) come osservato già nel caso del legame di TraA-iPD1 alle Tab. Preincubando TraA con il feromone cPD1 si ottiene una banda che rimane nei pozzetti del gel, a causa probabilmente della formazione di aggregati proteina-DNA (Fig. 33A, lane 3).

Gli esperimenti EMSA eseguiti con il frammento di DNA contenente il terminatore TT2 (Fig. 33B) hanno mostrato un legame più debole di TraA e una diversa migrazione dei complessi. Preincubando TraA con cPD1 si ottengono aggregati che rimangono nei pozzetti e una banda che corre più lentamente di quella del complesso TraA-DNA (Fig. 33B, lane 3). Il complesso TraA-iPD1-DNA migra più lentamente del complesso TraA-DNA ma più velocemente di quello TraA-cPD1-DNA (Fig. 33B, lane 4).

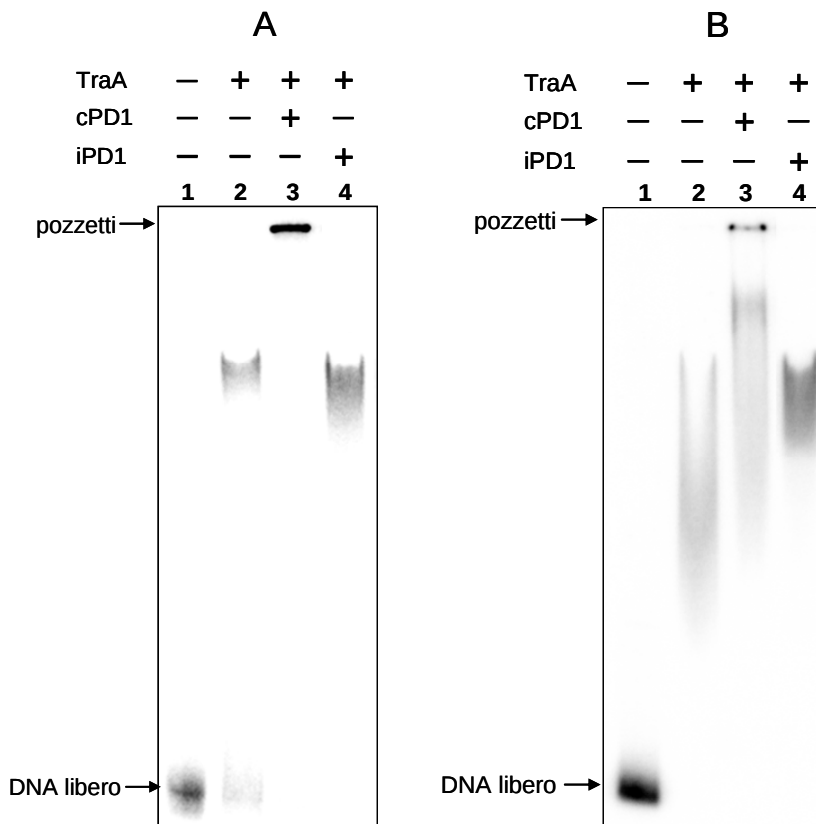


Figura 33. Saggi di migrazione ritardata su gel dei frammenti marcati radioattivamente contenenti il terminatore TT1 (A) e il terminatore TT2 (B). I componenti di reazione sono indicati sopra ai gel.

Tutti questi dati indicano che all'interno della regione intergenica *traA-traE* vi sono almeno tre distinti siti di legame per TraA: uno in prossimità del terminatore TT1, un altro vicino al

promotore di *traA* e un terzo nella regione di DNA che contiene sia il terminatore TT2 che il promotore di *traE*. Come osservato anche per i siti Tab1, Tab2 e Tab3, il legame di TraA a questa regione di DNA è modulato dalla presenza dei peptidi feromone cPD1 e inibitore iPD1.

4. Regolazione della trascrizione del gene *ipd*

Con lo scopo di chiarire il ruolo di TraA nella regolazione della trascrizione di *ipd* e per trovare una possibile relazione tra il legame differenziale di TraA alle Tab e l’attività del promotore *ipd*, si sono eseguiti degli esperimenti di trascrizione *in vitro* usando come template un DNA contenente il promotore di *ipd*, la regione a monte che comprende le Tab e la forma inattivata del promotore di *traA* da noi identificato per evitare interferenze. Poiché nel DNA template non sono inclusi i terminatori, sono stati analizzati i prodotti *run-off*.

La figura 34 mostra i risultati delle reazioni di trascrizione effettuate in assenza di qualsiasi componente regolatore (lane 1), con TraA da sola (lane 2), o legata al peptide feromone (lane 3) o inibitore (lane 4). L’intensità delle bande, espressa come percentuale rispetto all’intensità della banda ottenuta in assenza di TraA (lane 1) che è presa come riferimento, è riportata sotto ogni lane. In presenza della sola TraA (lane 2), la trascrizione dal promotore di *ipd* è ridotta di più della metà. L’attività del promotore di *ipd* è ulteriormente ridotta quando TraA viene incubata con quantità saturanti dell’inibitore iPD1 (lane 4). Viceversa, TraA non svolge più un’attività di repressione sul promotore di *ipd* in presenza di quantità saturanti di feromone cPD1 (lane 3). Queste osservazioni si correlano bene con l’ipotesi che TraA agisca come repressore del gene *ipd* legando la Tab1, legame che noi abbiamo mostrato essere modulato dalla presenza o assenza dei peptidi regolatori iPD1 o cPD1.

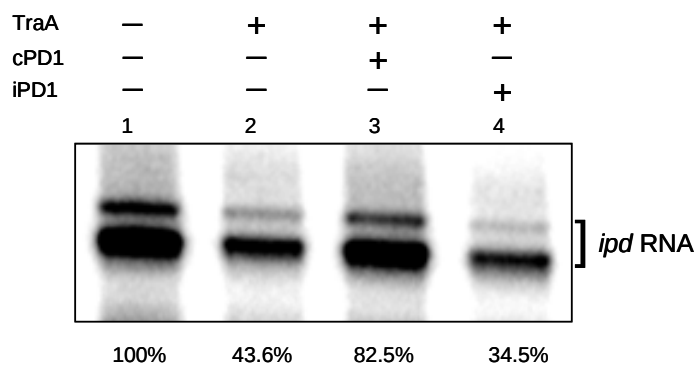


Figura 34. Regolazione della trascrizione di *ipd*. Gel denaturante che mostra gli RNA trascritti prodotti dagli esperimenti di trascrizione *in vitro* effettuati con RNA polimerasi di *E. coli* e con un DNA template contenente il promotore di *ipd* nelle condizioni sperimentali indicate sopra il gel. L’intensità relativa delle bande è riportata sotto ogni lane.

La sovra-regolazione della trascrizione di *ipd* in presenza di feromone (stato indotto) è stata anche osservata *in vivo* con un'analisi Northern Blot condotta con RNA estratti da cellule batteriche cresciute in assenza di cPD1 o indotte con cPD1 per 15, 30, 45 e 60 minuti (Fig. 35A e 14B).

Impiegando una sonda di DNA specifica per la sequenza codificante di *ipd* (Fig. 35A), nessun RNA è stato rilevato (lane 1) nelle cellule non indotte. Dopo 15 minuti dall'induzione con cPD1 compaiono tre distinte bande corrispondenti a RNA della dimensione di circa 1300, 450 e 200 nucleotidi e una banda molto debole della dimensione di circa 250 nucleotidi. Gli RNA di 250 e 450 nucleotidi hanno una dimensione corrispondente a quella degli RNA trascritti dal promotore di *ipd* che terminano al terminatore TT1 e TT2, rispettivamente (vedi le sequenze nella figura 30); mentre l'RNA di 200 nucleotidi può corrispondere ad un trascritto che parte dal promotore di *ipd*, termina al terminatore TT1 e viene successivamente processato. E' interessante notare che la banda che migra più lentamente (lane 1), della dimensione di circa 1300 nucleotidi, potrebbe corrispondere ad un trascritto che inizia dal promotore di *ipd* e trascrive oltre i terminatori TT1 e TT2, *traE* e *traF*, a valle del quale, analizzando la sequenza di DNA mediante il software *einverted* (EMBOSS), si è identificata una possibile sequenza di terminazione della trascrizione TT3 (Fig. 30). Questo mRNA policistronico scompare dopo i primi 30 minuti di induzione. L'intensità del trascritto che termina al TT1 decresce durante l'induzione, mentre l'intensità del trascritto che termina al TT2 aumenta nei primi 30 minuti d'induzione (Fig. 35A lane 2 e 3) e poi inizia a decrescere.

Ibridando le stesse preparazioni di RNA con una sonda di DNA specifica per la sequenza codificante per *traE* (Fig. 35B), si rilevano due bande di circa 1300 e 900 nucleotidi dopo 15 minuti dall'induzione con cPD1. Il trascritto di circa 900 nt è compatibile con la trascrizione che parte dal promotore di *traE* (P_E) e si estende fino a *traF* dove è stato identificato il possibile terminatore TT3 (Fig. 30). Poiché questo trascritto non viene ibridato dalla sonda specifica per il codificante di *ipd*, l'assenza di questa banda nel filtro mostrato in figura 14A supporta fortemente questa ipotesi. Il trascritto di circa 1300 nt, invece, che si pensa parta dal promotore *ipd* e arrivi fino al terminatore a valle di *traF*, viene ibridato sia dalla sonda specifica per il codificante di *ipd* che da quella specifica per il codificante di *traE*, come si deduce dal fatto che la banda corrispondente a questo trascritto è visibile in entrambi i filtri. Questi RNA sono visibili dopo 15 minuti dall'induzione con cPD1, poi vengono rapidamente metabolizzati e dopo 60 minuti la loro presenza è pressoché trascurabile.

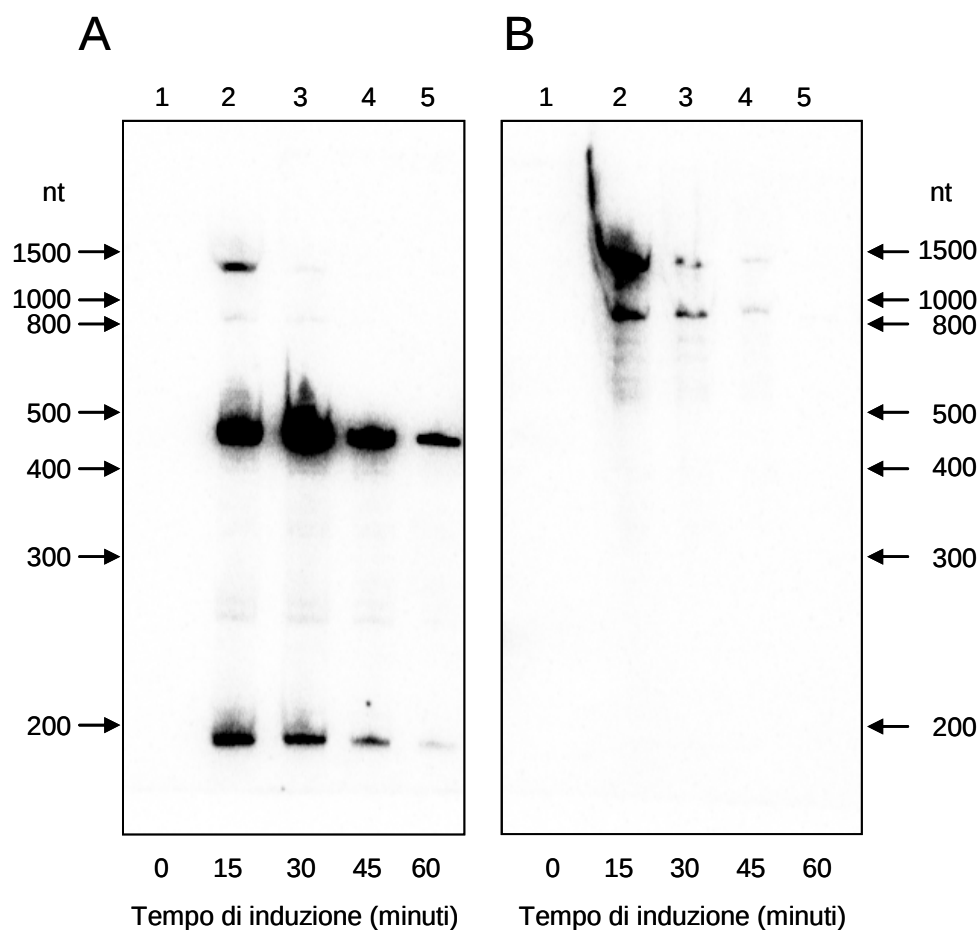


Figura 35. A) Northern Blot dell'RNA totale estratto dal cellule indotte con il feromone cPD1 per i tempi indicati sotto ogni lane. Per l'ibridazione si è impiegata una sonda di DNA marcata specifica per la sequenza codificante di *ipd*. B) Northern blot dell'RNA totale estratto dal cellule indotte con il feromone cPD1 per i tempi indicati sotto ogni lane. Per l'ibridazione si è impiegata una sonda di DNA marcata specifica per la sequenza codificante di *traE*. Le posizioni marker di RNA sono state tracciate sulla base delle bande visualizzate mediante colorazione all'etidio bromuro.

Discussione

Dati precedentemente riportati avevano identificato tre siti di legame specifici (Tab1, Tab2 e Tab3) di TraA localizzati a monte del promotore di *ipd* nel plasmide coniugativo pPD1¹⁹⁵. Le analisi AFM e EMSA effettuate in questo studio confermano le osservazioni precedenti e forniscono ulteriori chiarimenti sul meccanismo di regolazione del gene *ipd* in risposta agli specifici peptidi feromone (cPD1) e inibitore (iPD1). In particolare è stato mostrato che TraA da sola o in presenza di quantità saturanti di cPD1 o iPD1 è in grado di legare tutti i tre siti denominati Tab1 Tab2 e Tab3. Tuttavia, l'occupazione relativa dei tre siti cambia a seconda delle differenti condizioni: TraA e il complesso TraA-iPD1 legano preferenzialmente la Tab1, mentre il complesso TraA-cPD1 lega preferenzialmente la Tab3. Questo scenario suggerisce che il legame di TraA o del complesso TraA-iPD1 alla Tab1, che si trova appena a monte del -35 di *ipd*, possa effettivamente inibire il legame della RNA polimerasi al promotore o la formazione del complesso di inizio trascrizione. Questa osservazione è stata confermata dai risultati dei saggi di trascrizione *in vitro* che hanno mostrato un alto livello di repressione della trascrizione di *ipd* in presenza di TraA da sola o del complesso TraA-iPD1. Rimane non completamente chiaro il ruolo svolto da Tab2 e Tab3 nella regolazione di *ipd*. Alcune ipotesi possono essere fatte a questo riguardo: a) la presenza di tre siti di legame per il DNA aumentano la repressione di *ipd* nelle condizioni non indotte. b) la Tab2 e la Tab3 possono servire a mantenere una alta concentrazione di TraA in prossimità del promotore di *ipd*. c) la presenza di tre siti di legame sul DNA per TraA, la cui affinità è regolata dai peptidi feromone e inibitore, può aumentare notevolmente il range di modulazione dell'espressione di *ipd* nelle diverse condizioni. L'evidenza da noi mostrata circa la localizzazione del promotore di *traA* (a circa 200 pb a valle di Tab1) rende difficile credere che il legame di TraA alle Tab possa avere un ruolo nella regolazione dell'espressione di *traA* come precedentemente suggerito¹⁹⁵. Tuttavia, le analisi AFM condotte sul promotore di *traA* di nuova identificazione hanno anche permesso di individuare un sito di legame per TraA in prossimità di questa regione promotrice (Fig. 32A). Il legame specifico di TraA a questo sito è modulato dai peptidi cPD1 e iPD1 e potrebbe regolare la trascrizione di *traA*. Inoltre, l'estremità 5' del trascritto non processato del gene *traA* contiene una sequenza non codificante molto lunga che potrebbe essere coinvolta nella regolazione dell'espressione di *ipd* come precedentemente osservato per il plasmidio pAD1¹⁴³.

L'identificazione di due nuovi siti di legame per TraA vicino ai terminatori della trascrizione di *ipd* TT1 e TT2 apre nuovi scenari sulla regolazione dell'espressione di *ipd*. E' plausibile che il legame di TraA nelle vicinanze dei terminatori TT1 e TT2 possa favorire la terminazione della

trascrizione di *ipd* per mezzo di un meccanismo *roadblock*, simile a quello già descritto per la regolazione di geni batterici e mitocondriali^{206; 207; 208} e proposto anche per il sistema feromone-dipendente del plasmide pAD1¹⁶³. E' interessante notare che le nostre analisi AFM hanno mostrato che il legame di TraA ai terminatori è modulato dai peptidi cPD1 e iPD1 in un modo simile a quello già descritto per il sito Tab1; infatti iPD1 favorisce il legame di TraA ai terminatori mentre cPD1 ne favorisce il loro rilascio.

Sulla base dei dati presentati in questo e in lavori precedenti, si può ipotizzare che i differenti elementi coinvolti nella regolazione dei geni preposti alla coniugazione interagiscano come illustrato in figura 36. Nello stato non indotto TraA reprime la trascrizione del gene *ipd* legando la Tab1 ed eventualmente favorendo la terminazione in corrispondenza di TT1 e TT2 legandosi a specifici siti localizzati in prossimità di quei terminatori. Influenzando la terminazione a TT1 e TT2, TraA impedisce o consente la trascrizione di *traE* localizzato a valle del gene *ipd* attraverso un meccanismo di terminazione o di *read-through*. Inoltre poiché l'inizio di trascrizione di *traE* è localizzato vicino al terminatore TT2 è verosimile che il legame di TraA a questa regione sia in grado di reprimere la trascrizione del gene *traE*. Questo scenario è supportato da esperimenti di Northern Blotting presentati in questo lavoro che impiegano sonde di DNA specifiche per le sequenze codificanti di *ipd* o *traE* e che mostrano assenza di RNA (vedi lane 1 nella figura 35A e B) nelle cellule non indotte^{163; 165; 195}. Dopo l'aggiunta di cPD1, il legame di TraA a Tab1 e ai due terminatori TT1 e TT2 perde specificità permettendo che inizi la trascrizione dal promotore di *ipd* e proceda oltre ai terminatori TT1 e TT2 fino ai geni *traE* e *traF* originando un lungo RNA policistronico di circa 1500 nucleotidi. Si può ipotizzare che la terminazione della trascrizione avvenga in corrispondenza di un sito di terminazione da noi definito TT3 (vedi figura 30) che è stato possibile identificare analizzando la sequenza mediante il software *einverted* (EMBOSS). La sintesi di questo lungo RNA è tuttavia transitoria infatti dopo 30 minuti dall'induzione con cPD1 la banda corrispondente non è quasi più rivelabile sia con la sonda *ipd* che *traE* (Fig. 35A e B, lane 3, 4 e 5). Questo implica che la repressione mediata da TraA si ristabilisca rapidamente, in parte in seguito all'espressione di iPD1 che compete con cPD1 per il legame a TraA, in parte per un aumento della sintesi di TraA dovuto ad una derepressione del gene *traA* (cPD1 favorisce il rilascio di TraA anche dal sito di legame identificato vicino al promotore del gene *traA* (Fig. 32A)). A questo punto, tuttavia, una quantità di TraE sufficiente è trascritta per regolare positivamente la sua stessa espressione e quella dei geni posti a valle. Il meccanismo di regolazione da noi proposto ha molti punti in comune con quello precedentemente descritto per il plasmidio coniugativo di *E. faecalis* pAD1¹⁴³ e, benché in questi sistemi siano coinvolti peptidi

feromone e inibitore diversi, essi mantengono una strategia comune di regolazione della coniugazione.

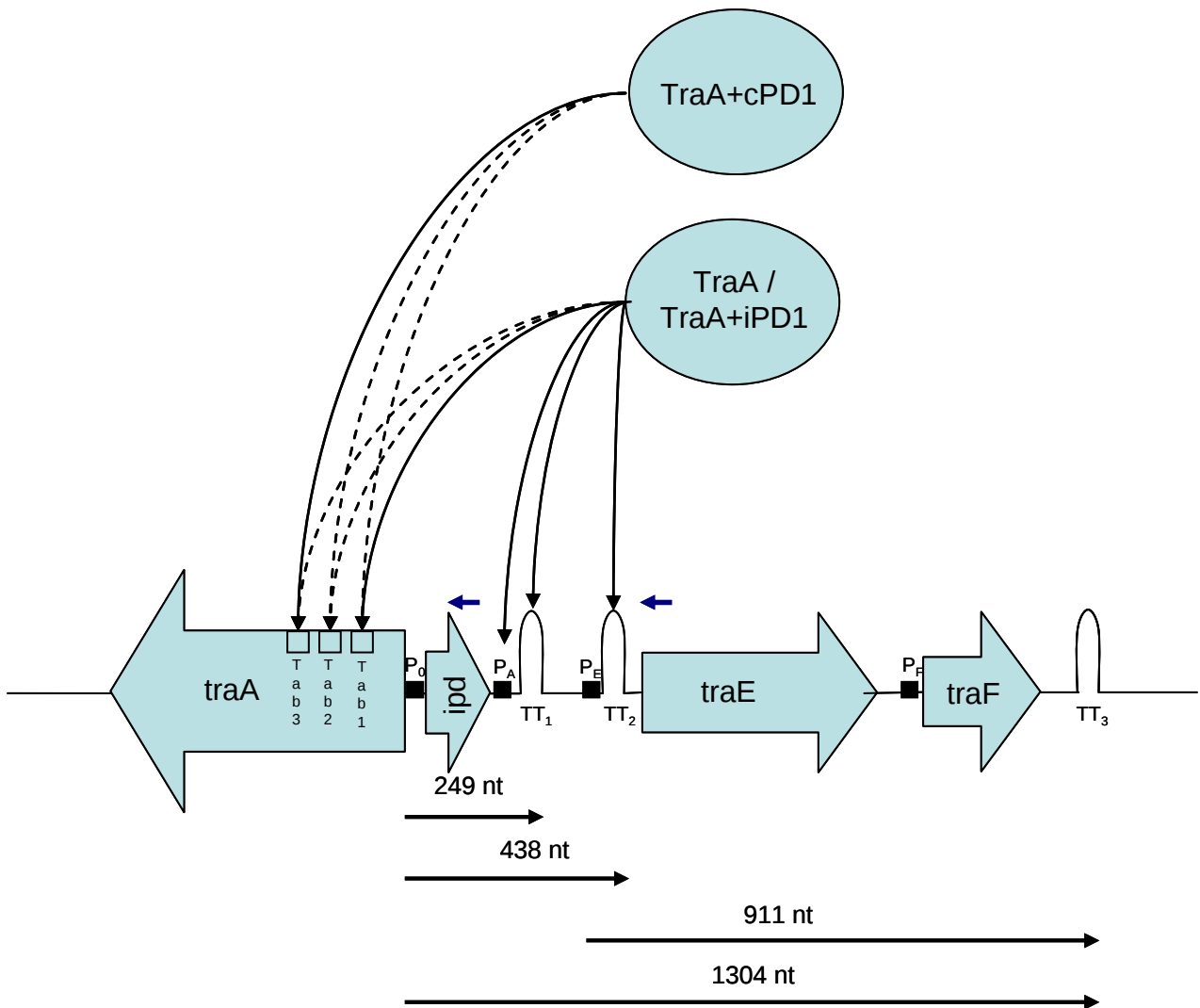


Figura 36. Modello della regolazione della risposta al feromone nel plasmide pPD1. Nello stato non indotto TraA reprime la trascrizione di *ipd* legandosi preferenzialmente alla Tab1 e favorendo la terminazione della trascrizione a TT1 e TT2 legandosi in prossimità di questi terminatori. Il legame di TraA in prossimità di P_A probabilmente regola la trascrizione di *traA*. L'induzione del feromone causa il rilascio di TraA da Tab1, dai terminatori TT1 e TT2 e da P_A , consentendo un aumento della trascrizione di *ipd* e la trascrizione dei geni a valle *traE* e *traF* fino al terminatore TT3. La repressione di TraA si ristabilisce rapidamente, in parte in seguito all'espressione di iPD1 che compete con cPD1 per il legame a TraA, in parte per un aumento della sintesi di TraA dovuto ad una derepressione del gene *traA*. Le frecce curve indicano il legame di TraA (le linee tratteggiate sono indicazione di un legame di TraA non preferenziale ad un sito sul DNA). Sotto all'illustrazione sono indicate le dimensioni dei trascritti che si sono evidenziati mediante esperimenti Northern Blot con sonde specifiche per *ipd* e *traE*. Queste ultime sono indicate con frecce blu.

Materiali e metodi

1. DNA templati per AFM

Il frammento di DNA della lunghezza di 947 pb che contiene i siti Tab1, Tab2 e Tab3 è stato amplificato dal plasmide pNEBP1-P3 mediante PCR usando i primer pNEBfor e pNEBrev (Tabella 7) in condizioni standard. Il plasmide pNEBP1-P3 è stato ottenuto clonando la sequenza compresa tra gli oligonucleotidi P1plus e P3minus (Tabella 7) del plasmide pPD1 estratto da *E. faecalis* 7C5 nel sito di restrizione *Sma*I di pNEB193.

Il DNA template della lunghezza di 808 pb contenente il sito Tab1 è stato ottenuto per PCR usando come template il plasmide pNEBTab1 e come primer pNEBfor e pNEBrev (Tabella 7). Il plasmide pNEBTab1 si è ottenuto clonando la sequenza di DNA compresa tra gli oligonucleotidi Tab1_5' e P3minus (Tabella 7) di pPD1 nel sito di restrizione *Sma*I di pNEB193.

I frammenti di 907 pb utilizzati negli esperimenti AFM per verificare la localizzazione dei promotori di *ipd* e di *traA* sono stati ottenuti amplificando mediante PCR i plasmidi pNEBipd-*traA*, pNEBipd⁻-*traA*, pNEBipd-*traA*⁻ e pNEBipd-new*traA*⁻ con i primer uni_fw e pNEBrev (Tabella 7). Il plasmide pNEBipd-*traA* è stato ottenuto clonando la sequenza di DNA compresa tra gli oligonucleotidi P1plus e P1TraA3' (Tabella 7) di pPD1 nel sito di restrizione *Sma*I di pNEB193. I plasmidi pNEBipd⁻-*traA*, pNEBipd-*traA*⁻ e pNEBipd-new*traA*⁻ si sono ottenuti da pNEBipd-*traA* introducendo tre mutazioni puntiformi nell'esamero -10 di *ipd* (TATAGT → TGTCGC), nell'esamero -10 di *traA* precedentemente identificato (AATTTA → TGTCAC) e nell'esamero -10 di *traA* da noi identificato (TATAAT → TGTCAC), rispettivamente. I mutanti si sono ottenuti per PCR usando una DNA polimerasi termostabile ad alta fedeltà (PfuUltra II Fusion HS DNA polimerasi, Stratagene) e primer mutagenici complementari a filamenti opposti (-10ipdmutplus e -10ipdmutminus per il promotore -10 di *ipd*, -10traAmutplus e -10traAmutminus per il promotore -10 di *traA* precedentemente identificato e -10TraA2plus e -10TraA2minus per il promotore -10 di *traA* da noi identificato) (Tabella 7). I prodotti di PCR sono stati sottoposti a digestione con l'enzima *Dpn*I (Stratagene) per degradare il DNA template non mutato. I singoli cloni sono stati sequenziati per confermare la presenza della mutazione desiderata.

Il frammento di DNA della lunghezza di 777 pb contenente il promotore di *traA* e il terminatore di *ipd* TT1 è stato amplificato mediante PCR usando pNEBipdTT1 come DNA template e i primer pNEBfor e uni_rev (Tabella 7). Il plasmide pNEBipdTT1 è stato ottenuto clonando la sequenza di pPD1 compresa tra gli oligonucleotidi ipd_traEplus e ipdterminus (Tabella 7) nel sito di restrizione *Sma*I di pNEB193.

Il frammento di DNA della lunghezza di 957 pb contenente il promotore di *traE* e il terminatore di *ipd* TT2 è stato ottenuto per PCR da pNEBipdTT2 usando i primer pNEB_for2 e pNEBrev (Tabella 7). Il plasmide pNEBipdTT2 è stato ottenuto clonando la sequenza di pPD1 compresa tra gli oligonucleotidi traEplus e ipd_traEminus (Tabella 7) nel sito di restrizione *Sma*I di pNEB193. Tutti i DNA usati per gli esperimenti AFM sono stati purificati da gel, elettro-eluiti per mezzo di un apparato Elutrap (Schleicher & Schuell, Keene NH), estratti con fenolo/cloroformio e precipitati con etanolo.

2. DNA templati per i saggi di migrazione ritardata su gel

Il frammento di DNA della lunghezza di 266 pb contenente i siti di legame Tab1, Tab2 e Tab3 (P1-P3) è stato ottenuto con una PCR *touchdown* utilizzando la DNA polimerasi GoTaq (Promega), il DNA plasmidico totale purificato da *E. faecalis* 7C5 in accordo con ¹⁷⁴ come template e i primer P1plus e P3minus (Tabella 7). Il DNA amplificato è stato purificato mediante QIAquick® Gel Extraction kit (QUIAGEN) e marcato all'estremità 5' con [γ^{32} P]ATP e T4 polinucleotide chinasi (Fisher Scientific).

Il frammento di DNA corrispondente al sito Tab1 è stato ottenuto nel seguente modo: l'oligonucleotide Tab1_5' (Tabella 7) è stato marcato enzimaticamente con [γ^{32} P]ATP e T4 polinucleotide chinasi e è stato purificato con colonna cromatografica Micro Bio-Spin™ (Bio-Rad). Nella reazione di *annealing* del DNA, 9 pmoli dell'oligonucleotide Tab1_5' marcate con ³²P sono stati mescolati con 9 pmoli dell'oligonucleotide complementare Tab1minus (Tabella 7) in Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), NaCl 100 mM e EDTA 1 mM. I 45 μ l di reazione si sono incubati a 100°C per 5 minuti e si sono lasciati raffreddare lentamente fino a temperatura ambiente in un periodo di tre ore circa. Il DNA ibridato è stato analizzato mediante gel non denaturante all'8%.

Il frammento di DNA di 269 pb contenente il promotore di *traA* e il terminatore TT1 è stato ottenuto per PCR utilizzando come template il plasmide pNEBipdTT1 e i primer ipd_traEplus e ipdterminus (Tabella 7). Il frammento di DNA di 159 pb contenente il promotore di *traE* e il terminatore TT2 è stato amplificato mediante PCR utilizzando come template il plasmide pNEBipdTT2 e i primer traEplus e ipd_traEminus (Tabella 7). Questi ultimi due frammenti sono stati purificati e marcati come già descritto per il frammento P1-P3.

3. DNA templati per i saggi di trascrizione *in vitro*

I frammenti di DNA usati come templati negli esperimenti di trascrizione *in vitro* riportati nelle figure 27 e 28 sono stati ottenuti per PCR dai plasmidi pNEBipd-traA, pNEBipd⁻-traA, pNEBipd-traA⁻ e pNEBipd-newtraA⁻ usando i primer P1plus e P1minus (Tabella 7) in condizioni standard di reazione.

Il frammento di DNA usato nell'esperimento di trascrizione *in vitro* riportato in figura 34 è stato ottenuto per PCR dal plasmide pNEBipd-newtraA⁻ usando i primer P1plus e P1minus (Tabella 7). Tutti i DNA sono stati purificati dal gel, elettro-eluiti per mezzo di un apparato Elutrap, sottoposti ad estrazione con Fenolo/Cloroformio e precipitati con Etanolo.

4. Proteine e peptidi

La proteina TraA codificata dal plasmide pPD1 del ceppo di *E. faecalis* 7C5 è stata espressa in forma ricombinante e purificata come descritto nella Parte II di questa tesi, così come la sintesi dei peptidi cPD1 e iPD1.

La RNA polimerasi di *E. coli* è stata acquistata da Epicentre Biotechnologies.

5. Microscopia a forza atomica

La microscopia a forza atomica (AFM) è una tecnica innovativa, la cui applicazione in campo biologico ha offerto la possibilità, negli ultimi anni, di compiere studi strutturali ad elevata risoluzione, portando alla caratterizzazione di un crescente numero di complessi DNA-proteina.

Le dimensioni e l'organizzazione molecolare dei complessi nucleo-proteici rendono difficile altri approcci di analisi strutturale come per esempio NMR e cristallografia. Basata su un semplice principio, l'AFM consente di analizzare strutture con dimensioni nell'intervallo di 10-200 nm, utilizzando un campione essiccato o immerso in soluzione acquosa, condizione, quest'ultima, che maggiormente si avvicina a quella fisiologica.

Nel microscopio a forza atomica, l'immagine viene ottenuta mediante la scansione della superficie del campione con una sonda. La sonda è costituita da una sottilissima punta, posta all'estremità di una leva molto flessibile (cantilever). Durante la scansione, la leva subisce delle oscillazioni che seguono il profilo del campione e la cui lettura da parte di un sistema ottico permette di ricostruire la topografia della superficie su cui è stato depositato. Il sistema di rivelazione è costituito da un raggio laser che riflesso dalla leva su un fotomoltiplicatore viene convertito in segnale elettrico (Fig. 37). Il campione viene posto sopra un sistema di scansione rappresentato da un tubo piezoelettrico, in grado di compiere movimenti di pochi Å nelle direzioni x y z.

L'applicazione in campo biologico della microscopia a forza atomica consente l'impiego di due modalità operative: il “*contact mode*” e il “*tapping mode*” (Fig. 38). Nel “*contact mode*” la punta aderisce costantemente alla superficie del campione; questo metodo ha il vantaggio di fornire immagini stabili, ma il contatto continuo tra punta e campione genera forze di taglio che possono causare il danneggiamento del campione.

Nel “*tapping mode*”, la modalità applicata nell’analisi condotta in questo lavoro di tesi, la leva oscilla ad una frequenza di alcune centinaia di KHz. Quando la punta incontra il campione, l’ampiezza dell’oscillazione subisce una variazione che viene rilevata dal fotodiodo, il quale elabora un segnale elettrico. In risposta a questo segnale, un sistema di controllo a feedback aziona il tubo piezoelettrico al fine di imprimere al campione un movimento lungo l’asse z, in modo da ristabilire l’ampiezza dell’oscillazione originaria. Il voltaggio necessario a ripristinare l’ampiezza di partenza, rappresenta il segnale in uscita che, una volta elaborato, porta alla creazione di un’immagine a falsi colori. Il contatto transiente che la punta stabilisce con la superficie del campione ne limita il danneggiamento e rende questa modalità particolarmente indicata allo studio dei materiali biologici.

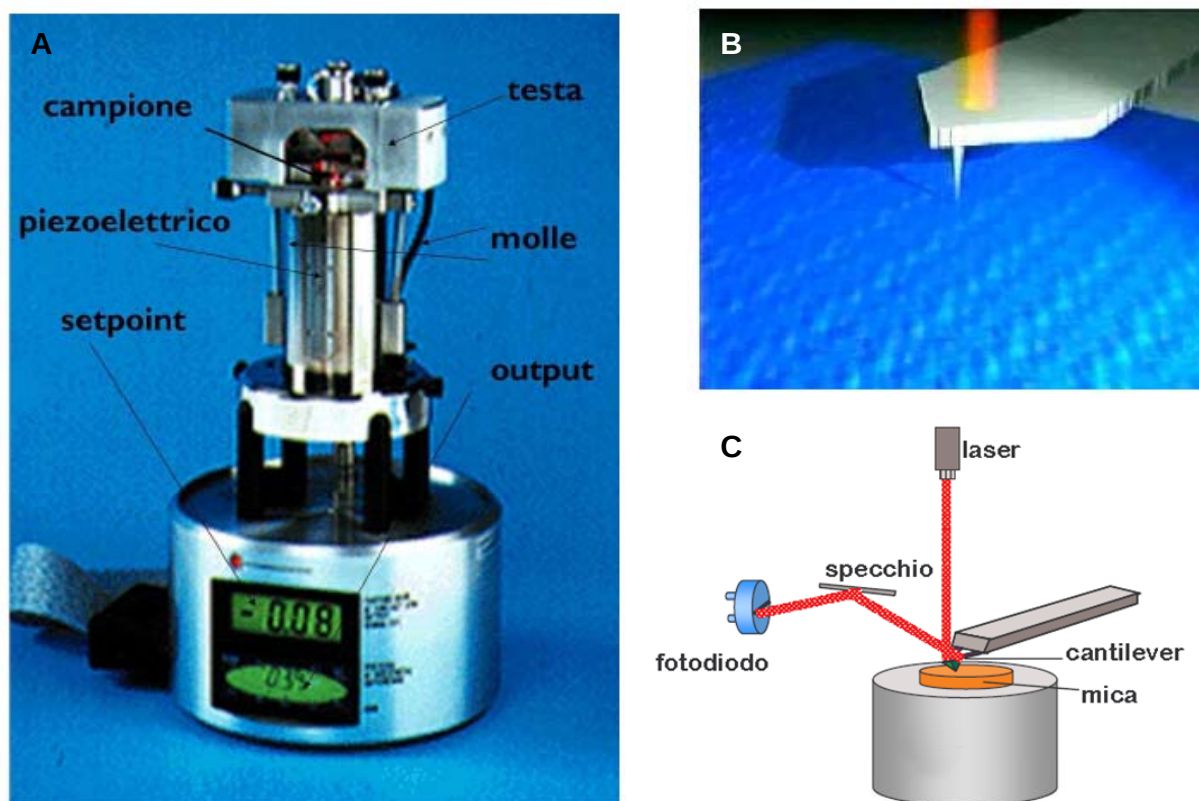


Figura 37. A) Immagine del microscopio a forza atomica in cui sono indicati i componenti principali dello strumento. B) Immagine del laser puntato sul retro del cantilever. C) Schema che descrive il principio di funzionamento dell’AFM: la punta scansiona la superficie del campione posto sopra il tubo piezoelettrico; la variazione dell’oscillazione subita dalla punta è rivelata da un sistema ottico costituito da un laser, un insieme di lenti e un fotodiodo.

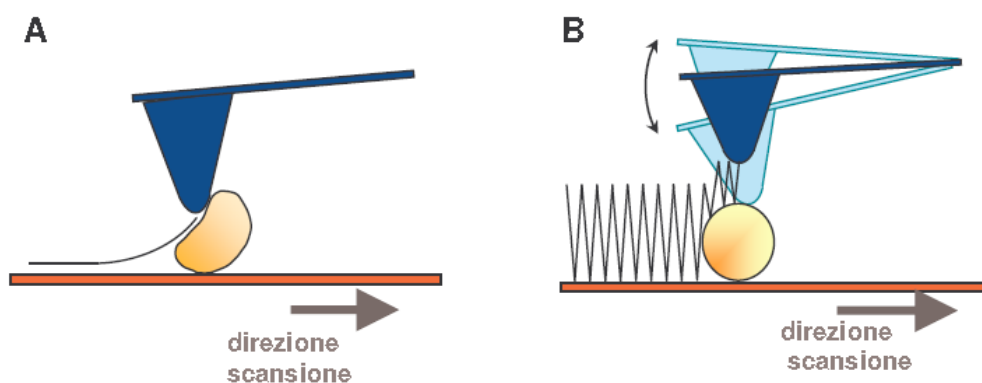


Figura 38. Rappresentazione delle modalità operative nella microscopia a forza atomica. A) “contact mode” la punta aderisce costantemente alla superficie del campione. B) “tapping mode” la punta oscilla con una determinata ampiezza che varia quando incontra il campione.

I complessi TraA-DNA per gli esperimenti AFM sono stati assemblati in tampone Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, mescolando 100 fmoli di DNA con 10 equivalenti molarli di TraA, TraA preincubata con cPD1 o TraA preincubata con iPD1, rispettivamente. I complessi TraA-cPD1 e TraA-iPD1 si sono costituiti con un rapporto molare TraA:peptide di 1:5. Dopo un’incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente, i campioni sono stati diluiti 10 volte nel tampone di deposizione (Hepes 4 mM pH 7.4, NaCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM) e immediatamente depositati su uno strato esfoliato di mica (un alluminio silicato di struttura lamellare) (Mica New York, NY). Una volta depositati i campioni, si lasciano trascorrere circa due minuti necessari perché le molecole interagiscano col substrato, poi si risciacqua con acqua milli-Q (Millipure) e quindi si asciuga con un flusso di azoto.

I complessi del DNA con la RNA polimerasi di *E. coli* sono stati preparati mescolando 200 fmoli di DNA template con 200 fmoli di RNA polimerasi in 10 µl di tampone di trascrizione (Tris-HCl 20 mM pH 7.9, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM). Dopo un’incubazione di 30 minuti a 37°C la reazione viene diluita 10 volte in tampone di deposizione, depositata su uno strato esfoliato di mica e asciugata come descritto sopra. Le immagini AFM sono state ottenute utilizzando un microscopio a Forza Atomica Nanoscope III (Veeco Instruments Inc). La modalità operativa prescelta è quella *tapping* ed il campione viene analizzato essiccato. Lo strumento è equipaggiato con uno scanner di tipo E (12 mm x 12mm), sonde e cantilever commerciali (Nanoscope o Olympus le sonde, Nanosensor il cantilever). Le immagini di 512x512 pixels sono state raccolte con “scan size” di 2 µm ad una velocità di scansione compresa tra 2-3 lines per secondo. Le immagini sono state processate con Matlab e la lunghezza delle molecole di DNA è stata misurata come descritto di seguito. Le immagini derivanti dalla scansione della superficie del campione sono descritte da un insieme di pixel in una griglia bidimensionale. La lunghezza

delle molecole di DNA così rappresentate non può essere misurata in modo esatto, ma deriva da una stima approssimata (il cui calcolo è consentito dall'utilizzo del software predisposto); infatti, a causa delle dimensioni della punta, il profilo ottenuto è un'approssimazione di quello originale. Sull'accuratezza della misurazione incidono altri fattori: la risoluzione delle immagini (dipendente dalle proprietà intrinseche dello strumento e dalle caratteristiche del campione), il metodo impiegato per determinare l'insieme di pixel che meglio descrivono la molecola e la scelta dell'algoritmo in grado di fornire la stima più accurata della lunghezza del frammento di DNA.

La selezione dell'insieme di pixel che descrivono la molecola è stata condotta attraverso un metodo di digitazione manuale. La procedura manuale prevede l'individuazione, da parte di un operatore, del “percorso” che segua più fedelmente il contorno originale della molecola; partendo da un'estremità si esegue una selezione di una serie di punti lungo il DNA, fino a raggiungere l'altra estremità. Il profilo della molecola è ottenuto dall'interpolazione dei punti selezionati e dal successivo allineamento del punto al pixel di maggiore intensità all'interno di una finestra di cinque pixel. Infine la molecola è ridotta ad un insieme di pixel che ne seguono il profilo (Fig. 39).

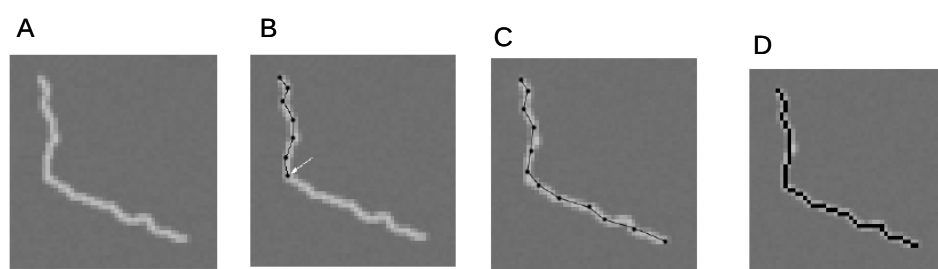


Figura 39. Procedura con cui viene ricavato il profilo della molecola di DNA. A) Molecola di DNA da misurare. B) e C) Selezione da parte dell'operatore di alcuni punti seguendo il contorno della molecola. D) Interpolazione dei punti selezionati e allineamento con i pixel di maggiore intensità all'interno di una determinata finestra.

La scelta dell'algoritmo per il calcolo della lunghezza del DNA incide in modo rilevante sull'accuratezza della stima. L'algoritmo che si è rivelato più adatto a questo scopo (chiamato *the n-point polynomial fitting*) aggiusta le coordinate di ciascun pixel operando il *fitting* di una polinomiale di un determinato grado su una finestra di n punti. La lunghezza della molecola è infine dedotta calcolando la distanza euclidea tra due punti successivi del profilo ottenuto ²⁰⁴.

$$L_{PF} = \sum_{i=1}^{n-1} \sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2}$$

La localizzazione della proteina lungo la molecola di DNA viene effettuata cliccando con il mouse al centro della struttura proteica globulare.

Le misure ottenute vengono sottoposte ad un'analisi statistica che prevede il *fitting* dei risultati ottenuti attraverso una funzione gaussiana. Per tale operazione è stato utilizzato il software Sigma Plot (Systat Software Inc).

6. Saggi di migrazione ritardata su gel

I complessi TraA-DNA sono stati assemblati mescolando la sonda di DNA marcata all'estremità 5' (0.08 pmoli di P1-P3 o 0.23 pmoli di Tab1), 9 equivalenti molar di TraA o TraA preincubata con cPD1 o iPD1 (5 equivalenti molar rispetto alla concentrazione della proteina) in 8 µl di tampone Tris-HCl 25 mM pH 8 contenente KCl 50 mM e BSA ultrapura 0.125 mg/ml (Amersham Pharmacia Biotech). I complessi TraA-DNA preparati per identificare nuovi siti di legame per TraA nelle regioni adiacenti ai terminatori TT1 e TT2 sono stati assemblati come i precedenti unendo 0.105 pmoli di frammento di DNA contenente TT1 o 0.105 pmoli di frammento contenente TT2 e 50 equivalenti molar di TraA o TraA preincubata con cPD1 o iPD1 (5 equivalenti molar rispetto alla concentrazione della proteina).

Dopo un'incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente, alle reazioni si è aggiunto glicerolo ad una concentrazione finale del 9% e i campioni sono stati caricati su un gel non denaturante all'8% contenente glicerolo al 2.5%. La corsa elettroforetica è avvenuta a 20 mA in Tris-borato 90 mM pH 8, EDTA 2 mM a 20°C. Al termine della corsa il gel è stato esposto alla lastra del Phosphor Imager. La scansione della lastra impressionata è stata eseguita mediante Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad).

7. Saggi di trascrizione *in vitro*

In 10 µl di reazione, 200 fmoli di DNA si sono lasciate in incubazione con 500 fmoli di RNA polimerasi di *E. coli* (Epicentre) nel tampone di trascrizione (Tris-HCl 20 mM pH 7.9, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, inibitore di RNasi 20 U (SUPERase-Ambion Inc.)) per 45 minuti a 37°C per permettere la formazione dei complessi. Si sono poi aggiunti eparina ad una concentrazione finale di 100 µg/ml, α³²P[UTP] marcato (2.8×10^{-3} mCi) e NTPs alla concentrazione finale di 20 µM ognuno. La reazione viene poi ulteriormente incubata per 15 minuti a 37°C. La trascrizione è stata bloccata mettendo i tubi contenenti le reazioni in ghiaccio secco e aggiungendo 30 µl di formammide all'80%. I trascritti sono stati analizzati in gel denaturante contenente urea al 6%. Al termine della corsa il gel è stato esposto alla lastra del Phosphor Imager. La scansione della lastra impressionata è stata eseguita mediante Phosphor

Imager. La quantificazione delle bande relative ai trascritti è stata eseguita utilizzando il software “Quantity One” (Bio-Rad).

8. Ibridazioni di RNA

E. faecalis 7C5 si è fatto crescere a 37°C fino ad un OD a 660 nm pari a 0.5 prima dell’aggiunta di cPD1 ad una concentrazione finale di 50 nM. L’RNA totale è stato estratto da 10 ml di coltura cellulare a 0, 15, 30, 45 e 60 minuti dopo l’induzione con cPD1. Le cellule sono state raccolte per centrifugazione, lavate con 1 ml di tampone TE (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM) e risospese in 200 µl di tampone TES (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM, saccarosio 6.7%) contenente lisozima 20 mg/ml. Dopo un’incubazione di 30 minuti a 37°C, 800 µl di TRIzol (Invitrogen Inc.) e 1 g di biglie di vetro (150-212 µm, SIGMA) sono stati aggiunti ad ogni campione. Le cellule si sono distrutte vortexando per 4 cicli di 3 minuti con intervalli di 2 minuti in ghiaccio tra i diversi cicli. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, i campioni sono stati trattati con 160 µl di cloroformio e gli acidi nucleici recuperati nella fase acquosa sono stati precipitati aggiungendo 400 µl di isopropanolo e risospesi in acqua. La concentrazione dell’RNA è stata stimata misurando l’assorbanza a 260 nm.

Nell’analisi Northern Blotting, 10 µg di RNA totale sono stati sottoposti a elettroforesi su gel al 6% denaturante (urea 8 M) e trasferiti su una membrana GeneScreen Plus (PerkinElmer). I filtri sono stati ibridati con una sonda marcata radioattivamente di 30 nucleotidi (ipdcdsminus (Tabella 7)) o con una sonda marcata radioattivamente di 27 nucleotidi (traEcdsminus (Tabella 7)) complementari a regioni interne alla sequenza codificante per iPD1 (*ipd*) e TraE (*traE*), rispettivamente. La marcatura delle sonde si è effettuata come descritto precedentemente per i frammenti di DNA impiegati negli esperimenti EMSA.

Le preibridazioni sono state effettuate a 28°C per 90 minuti in SSC 5x (Sodio Citrato 75 mM, NaCl 0.75 M, pH 7), contenente 0.1 mg/ml di DNA denaturato di sperma di salmone, 5% di soluzione di Denhardt’s e 0.5% di Sodio Dodecil Solfato (SDS). Le ibridazioni sono state eseguite *overnight* a 28°C in presenza di circa 8×10^5 colpi per minuto/ml di sonda marcata. I filtri sono stati poi lavati una volta con SSC 2x, SDS 0.1% a 28°C per 10 minuti, una volta con SSC 1x, SDS 0.1% a 28°C per 7 minuti e un’ultima volta in SSC 0.2%, SDS 0.1% a 37°C per 15 minuti. Le immagini sono state raccolte per mezzo di Personal Molecular Imager FX.

Primer	Sequenza
P1plus	5'-CTTGAGATAATTTCTCGCTTTTTC-3'
P3minus	5'-ATGCAGCTATATGTTTTTTTTGTTG-3'
P1minus	5'-TTTAGTTACTTTTTTCTAGTTTCATG-3'
P1traA3'	5'-GAGTATAGTTCATGGGATCAGC-3'
Tab1_5'	5'-GGAAACGTCTTTTTTAAAATACATATAC-3'
Tab1minus	5'-GTATATGTATTTTAAAAAAGACGTTTCC-3'
-10ipdmutplus	5'-GAGTAAACTTTAATGCT GTGGC AGTAACTGTAATGAATAG-3'
-10ipdmutminus	5'-CTATTCATTACAGTTACT GCCAC AGCATTAAAGTTTACTC-3'
-10traAmutplus	5'-GTTACTAAGTGAGGTAA GTCTC ATGAAACAACAAAAAAC-3'
-10traAmutminus	5'-GTTTTTTTGTGTTTCAT GAGACT TACCTCACTTAGTAAC-3'
-10TraA2plus	5'-GACTTCGTCCAACATACGAG GTGAC ACCATGAACTAGAAAAAG-3'
-10TraA2minus	5'-CTTTTTTCTAGTTTCATGGT GTCACT CGTATGTTGGACGAAGTC-3'
ipdcdsminus	5'-TATTAGTGCAAACAATAATGCAACTATATG-3'
ipd_traEplus	5'-GCACTAATATTAACCTTGTTTC-3'
ipdterminus	5'-CAATAAAGGAGTTTAAAAAGGTC-3'
ipd_traEminus	5'-ACCAGCCCTTTCTAAAATTTAG-3'
traEcdsminus	5'-GTTTCATTCTTGAACACCAGCCCTTTC-3'
traEplus	5'-GACCTTTTTAACTCCTTTATTG-3'
pNEBfor	5'-AAAACCTCTGACACATGCAGC-3'
pNEBrev	5'-AATACGCAAACCGCCTCTCC-3'
pNEB_for2	5'-CACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC-3'
uni_fw	5'-GTTTTCCAGTCACGACGTTGT-3'
uni_rev	5'-TTGTGAGCGGATAACAATTTAC-3'

Tabella 7. Sequenze dei primer impiegati per l'analisi delle interazioni della proteina TraA con regioni geniche essenziali per la risposta feromone-dipendente nel plasmide pPD1.

PARTE V. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Gli enterococchi sono molto diffusi in natura e sono presenti in prodotti caseari e in altri alimenti fermentati, come salsicce e olive. Sono stati proposti come colture starter per formaggio in quanto sono in grado di crescere in questo alimento e contribuiscono allo sviluppo di aromi tipici. Da tempo gli enterococchi sono utilizzati come probiotici e la loro capacità di produrre batteriocine attive anche contro batteri patogeni, in particolare la *Listeria*, può rappresentare un'ulteriore caratteristica con potenzialità applicative nelle tecnologie alimentari.

Il genere batterico *Enterococcus* possiede meccanismi di trasferimento genetico orizzontale altamente evoluti. Lo scambio di materiale genetico contribuisce ad aggravare significativamente i problemi di ambito medico associati a questi microrganismi. Essi sono infatti patogeni nosocomiali che contengono geni che codificano per antibiotico-resistenza e fattori di virulenza in grado di trasferirsi dagli enterococchi ad altre specie batteriche con cui sono associati (ad esempio batteri del tratto gastrointestinale). Il sequenziamento completo del genoma di un ceppo virulento di *E. faecalis* ha rivelato che un quarto del suo materiale genetico è composto da elementi mobili²⁰⁹ ed è stato trovato che “isolati” clinici trasportano da tre a cinque plasmidi contemporaneamente. I diversi tratti di virulenza si possono accumulare su un singolo plasmide e si possono quindi facilmente trasferire ad altri microrganismi. I plasmidi che mostrano più alta frequenza di trasferimento tra gli enterococchi sono quelli feromone-dipendenti. Il trasferimento di questi plasmidi è indotto dalla produzione da parte della cellula ricevente di un feromone altamente specifico. Lo screening di ceppi di *E. faecalis* isolati da prodotti caseari da noi eseguito ha avuto lo scopo di valutare la diffusione dei plasmidi feromone-dipendenti più noti (pAD1, pCF10 e pPD1) in ceppi di origine alimentare. Il metodo PCR da noi impiegato si è rivelato molto efficace e ha permesso di osservare un'ampia diffusione dei plasmidi feromone-dipendenti pPD1 e pCF10; il plasmide pAD1 invece è risultato presente in soli tre dei 20 ceppi analizzati. L'analisi da noi svolta si inserisce nell'ambito delle ricerche volte ad investigare la diffusione dei tratti di virulenza e antibiotico-resistenza in ceppi di enterococchi isolati da alimenti; i geni che codificano per queste caratteristiche infatti sono spesso trasportati da plasmidi feromone-dipendenti. In particolare pAD1 trasporta il gene che codifica per la citolisina e pCF10 quello per la resistenza alla tetraciclina; tutti questi plasmidi inoltre codificano per la sostanza aggregante che, non solo costituisce un fattore di virulenza, ma facilita anche la coniugazione. Ci sono anche evidenze del fatto che i plasmidi feromone-dipendenti facilitino la mobilitazione di altri

plasmidi non coniugativi, così come il trasferimento di altri elementi provvisti di mobilità propria come i trasposoni^{112; 115; 185; 210}.

Poiché il trasferimento di questi plasmidi è indotto dalla produzione da parte della cellula ricevente di un feromone altamente specifico e la capacità di produrre feromoni sembra appartenere solo a *E. faecalis* nell'ambito degli enterococchi, la diffusione dei plasmidi feromone-dipendenti dovrebbe essere limitata a questa specie. Sarebbe comunque interessante applicare la tecnica da noi messa a punto a ceppi di altre specie al fine di identificare l'eventuale presenza di plasmidi feromone-dipendenti in specie di enterococchi diverse da *E. faecalis*, in grado quindi di indurre il trasferimento plasmidico grazie alla produzione di peptidi con attività omologa agli specifici feromoni.

Il meccanismo che controlla il trasferimento plasmidico dipendente da feromoni in processi di coniugazione in *E. faecalis* è unico tra i batteri. Al fine di chiarire alcuni aspetti relativi al trasferimento del plasmide feromone-dipendente pPD1 si sono espresse in forma ricombinante TraA e TraC, due proteine codificate da questo plasmide, che svolgono un importante ruolo nel processo di coniugazione. Per entrambe le proteine è stato determinato lo stato di aggregazione: TraC è risultata essere monomerica sia in presenza che in assenza del feromone cPD1, mentre TraA è risultata essere un oligomero sia in presenza che in assenza di cPD1. Relativamente a questi risultati sarebbe interessante approfondire meglio lo stato oligomerico di TraA; studi *in vivo* hanno infatti suggerito che PrgX, l'analogo funzionale di TraA codificata dal plasmide pCF10, si trovi in forma oligomerica in assenza di ligandi o in presenza dell'inibitore iCF10, e che questa sua struttura sia destabilizzata in presenza di cPD1¹⁶⁷. E' stato inoltre evidenziato che il diverso stato di aggregazione di PrgX ha una funzione fondamentale nella regolazione della trascrizione dei geni coinvolti nella coniugazione (vedi Introduzione).

Si è analizzata inoltre la capacità di TraA e TraC di legare i peptidi feromone e inibitore; il legame di cPD1 a TraA è risultato essere molto più forte di quello a TraC, invece l'inibitore iPD1 mostra un'affinità molto elevata sia per TraA che per TraC.

Per la *DNA binding protein* TraA si è studiato approfonditamente il suo ruolo come regolatore della trascrizione dei geni coinvolti nel trasferimento del plasmide pPD1. I risultati ottenuti hanno mostrato che in assenza di peptidi o in presenza del peptide inibitore iPD1, TraA lega preferenzialmente il sito di legame sul DNA Tab1 e reprime la trascrizione di *ipd*. Dopo l'aggiunta del peptide feromone cPD1, si osserva una redistribuzione del legame di TraA: diventa preferenziale il legame per Tab3 rispetto a Tab1, e si ha una conseguente derepressione del promotore di *ipd*. Sono stati inoltre identificati due nuovi siti di legame per TraA in prossimità dei terminatori di *ipd* TT1 e TT2, suggerendo un possibile meccanismo regolativo addizionale controllato da TraA sulla terminazione di *ipd*. Il legame di TraA al sito in prossimità di TT2,

essendo sovrapposto al promotore di *traE*, può essere coinvolto anche nella regolazione dell'espressione della proteina TraE, che, a sua volta, è considerata in grado di attivare l'espressione delle proteine direttamente coinvolte nel processo coniugativo. Esperimenti futuri potranno meglio chiarire il ruolo di questi legami. Analisi condotte mediante Northern Blot hanno inoltre indicato che cPD1 induce la trascrizione del gene *traE* mediante un *read-through* dei siti di terminazione di *ipd*. Accurate misure AFM hanno infine consentito di identificare il corretto inizio della trascrizione del gene *traA*, rispetto a quello precedentemente proposto ¹⁹⁵. La localizzazione dell'inizio del trascritto di *traA* da noi identificata origina una molecola di mRNA con un'estremità 5' non tradotta molto lunga che potrebbe, dopo processamento, essere coinvolta in meccanismi di regolazione dell'espressione, come già osservato nel caso del plasmide pAD1. Inoltre, la trascrizione del gene *traA* potrebbe essere anch'essa regolata dal legame della proteina TraA ad un terzo sito, da noi identificato in prossimità del suo promotore.

Sono tuttora in corso studi mirati ad identificare mediante cristallizzazione e diffrazione dei raggi X le caratteristiche strutturali di TraA e dei complessi TraA-cPD1 e TraA-iPD1 al fine di chiarire quali sono i cambiamenti conformazionali alla base dell'attività di regolatore trascrizionale di questa proteina.

Sarebbe inoltre molto interessante poter applicare le metodiche messe a punto in questo lavoro di tesi per studiare l'attività di regolazione della trascrizione svolta dalla proteina TraE.

PARTE VI. BIBLIOGRAFIA

1. Schleifer, K. H. & Kilpper-Bälz, R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* **10**, 1-19.
2. Stackebrandt, E. & Teuber, M. (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 317-24.
3. Devriese, L. A. & Pot, B. (1995). The genus *Enterococcus*. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria* (Wood, B. J. B. & Holzapfel, W. H., eds.), Vol. 2, pp. 327–367. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom.
4. Hardie, J. M. & Whiley, R. A. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **26**, 1S-11S.
5. Schleifer, K. & Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **34**, 31-34.
6. Coppola, S., Villani, F., Coppola, R. & Parente, E. (1990). Comparison of different starter systems for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Lait* **70**, 411-423.
7. Litopoulou-Tzanetaki, E. & Tzanetakis, N. (1992). Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food microbiology* **9**, 13-19.
8. Ledda, A., Scintu, M. F., Pirisi, A., Sanna, S. & Mannu, L. (1994). Technological characterization of lactococci and enterococci for the manufacture of fiore sardo sheep cheese. *Scienza e tecnica lattiero-casearia* **45**, 443-456.
9. Giraffa, G., Carminati, D. & Neviani, E. (1997). Enterococci Isolated from Dairy Products: A Review of Risks and Potential Technological Use. *Journal of Food Protection* **60**, 732-737.
10. Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I. G. & Anifantakis, E. M. (2003). Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *Int J Food Microbiol* **82**, 153-61.
11. Franz, C., Holzapfel, W. & Stiles, M. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol* **47**, 1-24.
12. Franz CM, S. M., Schleifer KH, Holzapfel WH. (2003). Enterococci in foods--a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* **88**, 105-122.
13. Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 163-71.
14. Hugas, M., Garriga, M. & Aymerich, M. T. (2003). Functionality of enterococci in meat products. *Int J Food Microbiol* **88**, 223-33.
15. Fernandez-Diaz, M. (1983). Olives. In *Biotechnology* (Rehm, H. & Reed, G., eds.), Vol. 5, pp. 379-397. Verlag Chemie, Weinheim.

16. Franz, C. M., Schillinger, U. & Holzapfel, W. H. (1996). Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int J Food Microbiol* **29**, 255-70.
17. Floriano, B., Ruiz-Barba, J. L. & Jimenez-Diaz, R. (1998). Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4883-90.
18. Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N. M., Franz, C. M., Holzapfel, W. H., Perez-Pulido, R., Martinez-Canamero, M. & Galvez, A. (2004). Functional and safety aspects of *Enterococci* isolated from different Spanish foods. *Syst Appl Microbiol* **27**, 118-30.
19. De Vuyst, L. & Vandamme, E. J. (1994.). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. (De Vuyst, L. & Vandamme, E. J., eds.), pp. 91–142. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom.
20. Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**, 39-85.
21. Nissen-Meyer, J. & Nes, I. F. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol* **167**, 67-77.
22. Ennahar, S. & Deschamps, N. (2000). Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* **88**, 449-57.
23. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* **71**, 1-20.
24. McAuliffe, O., Ross, R. P. & Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 285-308.
25. Riley, M. A. & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* **84**, 357-64.
26. Rodriguez, J. M., Martinez, M. I., Horn, N. & Dodd, H. M. (2003). Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* **80**, 101-16.
27. Krämer, J. & Brandis, H. (1975). Purification and Characterization of two bacteriocins from *Streptococcus faecium*. *J Gen Microbiol.* **88**, 93-100.
28. Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Maqueda, M. & Valdivia, E. (1989). Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus* (*Enterococcus*) *faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. *Antimicrob Agents Chemother.* **33**, 437-441.
29. Martinez-Bueno, M., Maqueda, M., Galvez, A., Samyn, B., Van Beeumen, J., Coyette, J. & Valdivia, E. (1994). Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J Bacteriol* **176**, 6334-9.
30. Kuhnen, E., Sahl, H. G. & Brandis, H. (1985). Purification and properties of LIQ 4, an antibacterial substance produced by *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* K4. *J Gen Microbiol* **131**, 1925-32.

31. Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P. & Coppola, S. (1993). Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol* **74**, 380-7.
32. Lyon, W. J., Olson, D. G. & Murano, E. A. (1995). Isolation and Purification of Enterocin EL1, a Bacteriocin Produced by a Strain of *Enterococcus faecium*. *Journal of Food Protection* **58**, 890-898.
33. Hugenholtz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**, 165-178.
34. Drinan, D. F., Robin, S. & Cogan, T. M. (1976). Citric acid metabolism in hetero- and homofermentative lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* **31**, 481-6.
35. Kennes, C., Dubourguier, H. C., Albagnac, G. & Nyns, E.-J. (1991). Citrate metabolism by *Lactobacillus plantarum* isolated from orange juice. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 380-384.
36. Palles, T., Beresford, T., Condon, S. & Cogan, T. M. (1998). Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 147-154.
37. Kimoto, H., Nomura, M. & Suzuki, I. (1999). Growth energetics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in cometabolism of citrate and glucose. *International Dairy Journal* **9**, 857-863.
38. Goupry, S., Croguennec, T., Gentil, E. & Robins, R. J. (2000). Metabolic flux in glucose/citrate co-fermentation by lactic acid bacteria as measured by isotopic ratio analysis. *FEMS Microbiol Lett* **182**, 207-11.
39. Cogan, T. M. (1987). Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp.: effects on growth, substrates and products. *J. Appl. Bacteriol* **63**, 551-558.
40. Hagrass, A., Fayed, E., Aly, A. & el-Samragy, Y. (1991). Growth characteristics of enterococci isolated from Laban Rayeb. *Nahrung* **35**, 209-13.
41. Urdaneta, D., Raffae, D., Ferrer, A., de Ferrer, B. S., Cabrera, L. & Perez, M. (1995). Short-chain organic acids produced on glucose, lactose, and citrate media by *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, and *Enterobacter aerogenes* strains. *Bioresource Technology* **54**, 99-103.
42. Freitas, A. C., Pais, C., lia, M., Malcata, F. X. & Hogg, T. A. (1996). Microbiological Characterization of Picante da Beira Baixa Cheese. *Journal of Food Protection* **59**, 155-160.
43. Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G. & Tsakalidou, E. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal* **11**, 621-647.
44. Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G. & Tsakalidou, E. (2001). Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5482-7.
45. Sarantinopoulos, P., Makras, L., Vaningelgem, F., Kalantzopoulos, G., De Vuyst, L. & Tsakalidou, E. (2003). Growth and energy generation by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 during citrate metabolism. *International Journal of Food Microbiology* **84**, 197-206.
46. Rea, M. C. & Cogan, T. M. (2003). Glucose prevents citrate metabolism by enterococci. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 201-206.

47. Rea, M. C. & Cogan, T. M. (2003). Catabolite Repression in *Enterococcus faecalis*. *Systematic and Applied Microbiology* **26**, 159-164.
48. Wilkinson, M. G., Guinee, T. P., O'Callaghan, D. M. & Fox, P. F. (1994). Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. *Journal of Dairy Research* **61**, 249-262.
49. Pritchard, G. G. & Coolbear, T. (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**, 179-206.
50. Sousa, M. J., Ardo, Y. & McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* **11**, 327-345.
51. Arizcun, C., Barcina, Y. & Torre, P. (1997). Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *International Journal of Food Microbiology* **38**, 17-24.
52. Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M. E., Andrighetto, C. & Lanorte, M. T. (2000). A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology* **89**, 267-274.
53. Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J. & Dellaglio, F. (2001). Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J Dairy Res* **68**, 303-16.
54. El Soda, M., Law, J., Tsakalidou, E. & Kalantzopoulos, G. (1995). Lypolytic activity of cheese related microorganisms and its impact on cheese flavour. In *Food flavour: Generation, Analysis and Process Influence*. (Charalambous, G., ed.), pp. 1823-1847. Elsevier Science, London, United Kingdom.
55. Carrasco de Mendoza, M. S., Scarinci, M. S., Huerto-Garat, H. E. & Simonetta, A. C. (1992). Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 289-293.
56. Saavedra, J. M. (2001). Clinical applications of probiotic agents. *American Journal of Clinical Nutrition* **73**, 1147S-1151.
57. Salminen, S., Isolauri, E. & Salminen, E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 347-58.
58. Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* **66**, 365-78.
59. O'Sullivan, M., Thornton, G., O'Sullivan, G. & Collins, J. (1992). Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends Food Sci Technol* **3**, 309-14.
60. Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. & Huis in't Veld, J. H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* **41**, 85-101.
61. Wunderlich, P., Braun, L., Fumagalli, I., D'Apuzzo, V., Heim, F., Karly, M., Lodi, R., Politta, G., Vonbank, F. & Zeltner, L. (1989). Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *J Int Med Res* **17**, 333-338.
62. Bellomo G, Mangiagli A, Nicastro L & G., F. (1980). A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in paediatrics. *Current Therapeutic Research* **27**, 927-936.

63. Agerbaek, M., Gerdes, L. U. & Richelsen, B. (1995). Hypocholesterolaemic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. *Eur J Clin Nutr* **49**, 346-52.
64. Mundt, L. (1986). Enterococci. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Sneath, P., Mair, N., Sharpe, M. & Holt, J., eds.), Vol. 2, pp. 1063-1065.
65. Birollo, G. A., Reinheimer, J. A. & Vinderola, C. G. (2001). Enterococci vs non-lactic acid microflora as hygiene indicators for sweetened yoghurt. *Food Microbiology* **18**, 597-604.
66. Deibel, R. H. & Silliker, J. H. (1963). Food-Poisoning Potential of the Enterococci. *J Bacteriol* **85**, 827-32.
67. Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Bjorkroth, K. J., Franz, C. M., Foulquie Moreno, M. R., Revets, H., De Vuyst, L., Swings, J., Kersters, K., Dellaglio, F. & Holzapfel, W. H. (2002). Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1381-91.
68. De Vuyst, L., Foulquie Moreno, M. R. & Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int J Food Microbiol* **84**, 299-318.
69. Xanthopoulos, V., Polychroniadou, A., Litopoulou-Tzanetaki, E. & Tzanetakis, N. (2000). Characteristics of Anevato Cheese made from Raw or Heat-treated Goat Milk Inoculated with a Lactic Starter. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **33**, 483-488.
70. Pérez Elortondo, F. J., Albisu, M. & Barcina, Y. (1999). Physicochemical properties and secondary microflora variability in the manufacture and ripening of Idiazabal cheese. *Lait* **79**, 281- 290.
71. Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G. & Tsakalidou, E. (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* **76**, 93-105.
72. Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Condon, S., Swings, J. & Cogan, T. M. (2001). Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int J Food Microbiol* **71**, 177-88.
73. Thompson, T. L. & Marth, E. H. (1986). Changes in Parmesan cheese during ripening: microflora-coliforms, enterococci, anaerobs, propionibacteria and staphylococci. *Milchwissenschaft* **41**, 201-204.
74. López-Díaz, T. M., Santos, J. A., Gonzalez, C. J., Moreno, B. & Garcia, M. L. (1995). Bacteriological quality of traditional Spanish blue cheese. *Milchwissenschaft* **50**, 503-505.
75. Stiles, M. E., Ramji, N. W., Ng, L. K. & Paradis, D. C. (1978). Incidence and relationship of group D streptococci with other indicator organisms in meats. *Can J Microbiol* **24**, 1502-8.
76. Magnus, C., Ingledew, W.M., & McCurdy, AR. (1986). Thermal resistance of streptococci isolated from pasteurized ham. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* **19**, 62-67.
77. Magnus, C., McCurdy, AR., & Ingledew W.M. (1988). Further studies on the thermal resistance of *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis* in pasteurized ham. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* **21**, 209-212.

78. Teuber, M., Perreten, V. & Wirsching, F. (1996). Antibiotikumresistente Bakterien: Eine neue Dimension in der Lebensmittelmikrobiologie. *Lebensmitteltechnologie* **29**, 182–199.
79. Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L. M., Nes, I. F., Hernandez, P. E. & Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* **143**, 2287-94.
80. Cintas, L. M., Casaus, P., Havarstein, L. S., Hernandez, P. E. & Nes, I. F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4321-30.
81. Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L. S., Hugas, M., Garriga, M. & Nes, I. F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1676-82.
82. Marchesini, B., Bruttin, A., Romailier, N., Moreton, R. S., Stucchi, C. & Sozzi, T. (1992). Microbiological events during commercial meat fermentations. *Journal of Applied Bacteriology* **73**, 203-209.
83. Mundt, J. O. (1963). Occurrence of enterococci on plants in a wild environment. *Appl Microbiol* **11**, 141-4.
84. Randazzo, C. L., Restuccia, C., Romano, A. D. & Caggia, C. (2004). *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology* **90**, 9-14.
85. Bennik, M. H., Vanloo, B., Brasseur, R., Gorris, L. G. & Smid, E. J. (1998). A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim Biophys Acta* **1373**, 47-58.
86. Jett, B., Huycke, M. & Gilmore, M. (1994). Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* **7**, 462-478.
87. Endtz, H. P., van den Braak, N., Verbrugh, H. A. & van Belkum, A. (1999). Vancomycin resistance: status quo and quo vadis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**, 683-90.
88. Klare, I., Werner, G. & Witte, W. (2001). Enterococci. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. *Contrib Microbiol* **8**, 108-22.
89. Landman, D. & Quale, J. M. (1997). Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options. *J Antimicrob Chemother* **40**, 161-70.
90. Dutka-Malen, S., Evers, S. & Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 24-27.
91. McKessar, S. J., Berry, A. M., Bell, J. M., Turnidge, J. D. & Paton, J. C. (2000). Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3224-8.
92. Murray, B. E. (1997). Vancomycin-resistant enterococci. *Am J Med* **102**, 284-93.
93. Murray, B. E. (1998). Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* **4**, 37-47.

94. Cetinkaya, Y., Falk, P. & Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* **13**, 686-707.
95. Treitman, A. N., Yarnold, P. R., Warren, J. & Noskin, G. A. (2005). Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). *J Clin Microbiol* **43**, 462-3.
96. Tenover, F. C. & McDonald, L. C. (2005). Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Curr Opin Infect Dis* **18**, 300-5.
97. Franz CM, M.-S. A., Yousif NM, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel & WH. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among *Enterococci* isolated from food. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4385-4389.
98. Messi, P., Guerrieri, E., de Niederhausern, S., Sabia, C. & Bondi, M. (2006). Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. *International Journal of Food Microbiology* **107**, 218-222.
99. Sabia, C., de Niederhausern, S., Guerrieri, E., Messi, P., Anacarso, I., Manicardi, G. & Bondi, M. (2007). Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources. *J Appl Microbiol*.
100. Mundy, L. M., Sahm, D. F. & Gilmore, M. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* **13**, 513-22.
101. Gilmore, M. S., Segarra, R. A., Booth, M. C., Bogie, C. P., Hall, L. R. & Clewell, D. B. (1994). Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol* **176**, 7335-44.
102. Saris, P. E., Immonen, T., Reis, M. & Sahl, H. G. (1996). Immunity to lantibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**, 151-9.
103. Booth, M. C., Bogie, C. P., Sahl, H. G., Siezen, R. J., Hatter, K. L. & Gilmore, M. S. (1996). Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol Microbiol* **21**, 1175-84.
104. Ike, Y., Clewell, D. B., Segarra, R. A. & Gilmore, M. S. (1990). Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. *J Bacteriol* **172**, 155-63.
105. Huycke, M. M., Spiegel, C. A. & Gilmore, M. S. (1991). Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 1626-34.
106. Clewell, D. B. (1993). Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* **73**, 9-12.
107. Eaton, T. J. & Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1628-35.
108. Su, Y. A., Sulavik, M. C., He, P., Makinen, K. K., Makinen, P. L., Fiedler, S., Wirth, R. & Clewell, D. B. (1991). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun* **59**, 415-20.
109. Singh, K. V., Qin, X., Weinstock, G. M. & Murray, B. E. (1998). Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J Infect Dis* **178**, 1416-20.

110. Shankar, V., Baghdayan, A. S., Huycke, M. M., Lindahl, G. & Gilmore, M. S. (1999). Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* **67**, 193-200.
111. Waar, K., Muscholl-Silberhorn, A. B., Willems, R. J., Slooff, M. J., Harmsen, H. J. & Degener, J. E. (2002). Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates. *J Infect Dis* **185**, 1121-7.
112. Clewell, D. B. (1990). Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**, 90-102.
113. Krah, E. R., 3rd & Macrina, F. L. (1989). Genetic analysis of the conjugal transfer determinants encoded by the streptococcal broad-host-range plasmid pIP501. *J Bacteriol* **171**, 6005-12.
114. Leblanc, D. J. & Lee, L. N. (1984). Physical and genetic analyses of streptococcal plasmid pAM beta 1 and cloning of its replication region. *J Bacteriol* **157**, 445-53.
115. Franke, A. E. & Clewell, D. B. (1981). Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J Bacteriol*. **145**, 494-502.
116. Licht, T. R., Laugesen, D., Jensen, L. B. & Jacobsen, B. L. (2002). Transfer of the pheromone-inducible plasmid pCF10 among *Enterococcus faecalis* microorganisms colonizing the intestine of mini-pigs. *Appl Environ Microbiol* **68**, 187-93.
117. Licht, T. R., Hammerum, A. M., Jensen, L. B. & Jacobsen, B. L. (2001). Effect of pheromone induction on transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10 in intestinal mucus ex vivo. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 305-9.
118. Hirt, H., Schlievert, P. M. & Dunny, G. M. (2002). In vivo induction of virulence and antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* mediated by the sex pheromone-sensing system of pCF10. *Infect Immun* **70**, 716-23.
119. Borgen, K., Wasteson, Y., Kruse, H. & Willems, R. J. (2002). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) from Norwegian poultry cluster with VREF from poultry from the United Kingdom and The Netherlands in an amplified fragment length polymorphism genogroup. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3133-7.
120. Borgen, K., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A., Wasteson, Y., Olsvik, O. & Kruse, H. (2000). Continuing high prevalence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned. *J Appl Microbiol* **89**, 478-85.
121. Hammerum, A. M., Fussing, V., Aarestrup, F. M. & Wegener, H. C. (2000). Characterization of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* isolates from humans, chickens and pigs by RiboPrinting and pulsed-field gel electrophoresis. *J Antimicrob Chemother* **45**, 677-80.
122. Del Grosso, M., Caprioli, A., Chinzari, P., Fontana, M. C., Pezzotti, G., Manfrin, A., Giannatale, E. D., Goffredo, E. & Pantosti, A. (2000). Detection and characterization of vancomycin-resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy. *Microb Drug Resist* **6**, 313-8.
123. Gambarotto, K., Ploy, M. C., Dupron, F., Giangiobbe, M. & Denis, F. (2001). Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in pork and poultry products from a cattle-rearing area of France. *J Clin Microbiol* **39**, 2354-5.

124. Clewell, D. B., An, F. Y., White, B. A. & Gawron-Burke, C. (1985). Streptococcus faecalis sex pheromone (cAM373) also produced by Staphylococcus aureus and identification of a conjugative transposon (Tn918). *J Bacteriol* **162**, 1212-20.
125. Noble, W. C., Virani, Z. & Cree, R. G. (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiol Lett* **72**, 195-8.
126. Weigel, L. M., Clewell, D. B., Gill, S. R., Clark, N. C., McDougal, L. K., Flannagan, S. E., Kolonay, J. F., Shetty, J., Killgore, G. E. & Tenover, F. C. (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of Staphylococcus aureus. *Science* **302**, 1569-71.
127. Giraffa, G. & Sisto, F. (1997). Susceptibility to vancomycin of enterococci isolated from dairy products. *Lett Appl Microbiol* **25**, 335-8.
128. Nakayama, J. & Suzuki, A. (1997). Genetic analysis of plasmid-specific pheromone signaling encoded by pPD1 in Enterococcus faecalis. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**, 1796-9.
129. Tanimoto, K., Tomita, H. & Ike, Y. (1996). The traA gene of the Enterococcus faecalis conjugative plasmid pPD1 encodes a negative regulator for the pheromone response. *Plasmid* **36**, 55-61.
130. Ike, Y. & Clewell, D. B. (1984). Genetic analysis of the pAD1 pheromone response in Streptococcus faecalis, using transposon Tn917 as an insertional mutagen. *J Bacteriol* **158**, 777-83.
131. Hedberg, P. J., Leonard, B. A. B., Ruhfel, R. E. & Dunny, G. M. (1996). Identification and Characterization of the Genes of Enterococcus faecalis Plasmid pCF10 Involved in Replication and in Negative Control of Pheromone-Inducible Conjugation. *Plasmid* **35**, 46-57.
132. Chandler, J. R. & Dunny, G. M. (2004). Enterococcal peptide sex pheromones: synthesis and control of biological activity. *Peptides* **25**, 1377-88.
133. Wirth, R. (1994). The sex pheromone system of Enterococcus faecalis. More than just a plasmid-collection mechanism? *Eur J Biochem* **222**, 235-46.
134. Clewell, D. B., An, F. Y., Flannagan, S. E., Antiporta, M. & Dunny, G. M. (2000). Enterococcal sex pheromone precursors are part of signal sequences for surface lipoproteins. *Mol Microbiol* **35**, 246-7.
135. Mori, M., Sakagami, Y., Ishii, Y., Isogai, A., Kitada, C., Fujino, M., Adsit, J. C., Dunny, G. M. & Suzuki, A. (1988). Structure of cCF10, a peptide sex pheromone which induces conjugative transfer of the Streptococcus faecalis tetracycline resistance plasmid, pCF10. *J. Biol. Chem.* **263**, 14574-14578.
136. Dunny, G. M., Antiporta, M. H. & Hirt, H. (2001). Peptide pheromone-induced transfer of plasmid pCF10 in Enterococcus faecalis: probing the genetic and molecular basis for specificity of the pheromone response. *Peptides* **22**, 1529-39.
137. Ehrenfeld, E. E., Kessler, R. E. & Clewell, D. B. (1986). Identification of pheromone-induced surface proteins in Streptococcus faecalis and evidence of a role for lipoteichoic acid in formation of mating aggregates. *J Bacteriol* **168**, 6-12.
138. Dev, I. K. & Ray, P. H. (1990). Signal peptidases and signal peptide hydrolases. *J Bioenerg Biomembr* **22**, 271-90.

139. An, F. Y., Sulavik, M. C. & Clewell, D. B. (1999). Identification and characterization of a determinant (eep) on the *Enterococcus faecalis* chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1. *J Bacteriol* **181**, 5915-21.
140. Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B. & Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**, 391-8.
141. Kitada, C., Fujino, M., Mori, M., Sakagami, Y., Isogai, A., Suzuki, A., Clewell, D. & Craig, R. . (1985). Synthesis and structure-activity relationships of *Streptococcus faecalis* sex pheromones, cPD1 and cAD1. In *Peptide Chemistry 1984* (Izumiya, N., ed.), pp. 43-48. Protein Research Foundation, Osaka, Japan.
142. An, F. Y. & Clewell, D. B. (2002). Identification of the cAD1 sex pheromone precursor in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **184**, 1880-7.
143. Clewell, D. B. (2007). Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. *Plasmid* **58**, 205-27.
144. Nakayama, J., Yoshida, K., Kobayashi, H., Isogai, A., Clewell, D. B. & Suzuki, A. (1995). Cloning and characterization of a region of *Enterococcus faecalis* plasmid pPD1 encoding pheromone inhibitor (ipd), pheromone sensitivity (traC), and pheromone shutdown (traB) genes. *J Bacteriol* **177**, 5567-73.
145. Leonard, B. A., Podbielski, A., Hedberg, P. J. & Dunny, G. M. (1996). *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 260-4.
146. Detmers, F. J., Lanfermeijer, F. C. & Poolman, B. (2001). Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. *Res Microbiol* **152**, 245-58.
147. Nakayama, J., Takanami, Y., Horii, T., Sakuda, S. & Suzuki, A. (1998). Molecular mechanism of peptide-specific pheromone signaling in *Enterococcus faecalis*: functions of pheromone receptor TraA and pheromone-binding protein TraC encoded by plasmid pPD1. *J Bacteriol* **180**, 449-56.
148. Fixen, K. R., Chandler, J. R., Le, T., Kozlowski, B. K., Manias, D. A. & Dunny, G. M. (2007). Analysis of the amino acid sequence specificity determinants of the enterococcal cCF10 sex pheromone in interactions with the pheromone-sensing machinery. *J Bacteriol* **189**, 1399-406.
149. Tanimoto, K., An, F. Y. & Clewell, D. B. (1993). Characterization of the traC determinant of the *Enterococcus faecalis* hemolysin-bacteriocin plasmid pAD1: binding of sex pheromone. *J Bacteriol* **175**, 5260-4.
150. Clewell, D. B., Francia, M. V., Flannagan, S. E. & An, F. Y. (2002). Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. *Plasmid* **48**, 193-201.
151. Nakayama, J., Ono, Y. & Suzuki, A. (1995). Isolation and structure of the sex pheromone inhibitor, iAM373, of *Enterococcus faecalis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **59**, 1358-1359.
152. Nakayama, J., Ruhfel, R. E., Dunny, G. M., Isogai, A. & Suzuki, A. (1994). The prgQ gene of the *Enterococcus faecalis* tetracycline resistance plasmid pCF10 encodes a peptide inhibitor, iCF10. *J Bacteriol* **176**, 7405-8.

153. Dunny, G. M. (2007). The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**, 1185-93.
154. Nakayama, J., Horii, T. & Suzuki, A. (1999). Bacterial peptide pheromone is improved where it directly binds to an intracellular receptor. In *Peptide science-present and future. Proceedings of the 1st International Peptide Symposium, 1997* (Shimonishi, Y., ed.), pp. 215-217. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
155. Kozlowicz, B. K., Bae, T. & Dunny, G. M. (2004). *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive protein PrgX: genetic separation of positive autoregulatory functions from those involved in negative regulation of conjugative plasmid transfer. *Mol Microbiol* **54**, 520-32.
156. Fujimoto, S. & Clewell, D. B. (1998). Regulation of the pAD1 sex pheromone response of *Enterococcus faecalis* by direct interaction between the cAD1 peptide mating signal and the negatively regulating, DNA-binding TraA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6430-6435.
157. Muscholl-Silberhorn, A. B. (2000). Pheromone-Regulated Expression of Sex Pheromone Plasmid pAD1-Encoded Aggregation Substance Depends on at Least Six Upstream Genes and a cis-Acting, Orientation-Dependent Factor. *J Bacteriol.* **182**, 3816-3825.
158. Christie, P. J. & Dunny, G. M. (1986). Identification of regions of the *Streptococcus faecalis* plasmid pCF-10 that encode antibiotic resistance and pheromone response functions. *Plasmid* **15**, 230-41.
159. An, F. Y. & Clewell, D. B. (1994). Characterization of the determinant (traB) encoding sex pheromone shutdown by the hemolysin/bacteriocin plasmid pAD1 in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* **31**, 215-21.
160. Buttaro, B. A., Antiporta, M. H. & Dunny, G. M. (2000). Cell-associated pheromone peptide (cCF10) production and pheromone inhibition in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **182**, 4926-33.
161. Chandler, J. R., Flynn, A. R., Bryan, E. M. & Dunny, G. M. (2005). Specific control of endogenous cCF10 pheromone by a conserved domain of the pCF10-encoded regulatory protein PrgY in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **187**, 4830-43.
162. Weaver, K. E. & Clewell, D. B. (1990). Regulation of the pAD1 sex pheromone response in *Enterococcus faecalis*: effects of host strain and traA, traB, and C region mutants on expression of an E region pheromone-inducible lacZ fusion. *J Bacteriol* **172**, 2633-41.
163. Tanimoto, K. & Clewell, D. B. (1993). Regulation of the pAD1-encoded sex pheromone response in *Enterococcus faecalis*: expression of the positive regulator TraE1. *J Bacteriol* **175**, 1008-18.
164. Pontius, L. T. & Clewell, D. B. (1992). Conjugative transfer of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1: nucleotide sequence and transcriptional fusion analysis of a region involved in positive regulation. *J Bacteriol* **174**, 3152-60.
165. Muscholl, A., Galli, D., Wanner, G. & Wirth, R. (1993). Sex pheromone plasmid pAD1-encoded aggregation substance of *Enterococcus faecalis* is positively regulated in trans by traE1. *Eur J Biochem* **214**, 333-8.
166. Bae, T. & Dunny, G. M. (2001). Dominant-negative mutants of prgX: evidence for a role for PrgX dimerization in negative regulation of pheromone-inducible conjugation. *Mol Microbiol* **39**, 1307-20.

167. Kozłowicz, B. K., Shi, K., Gu, Z. Y., Ohlendorf, D. H., Earhart, C. A. & Dunny, G. M. (2006). Molecular basis for control of conjugation by bacterial pheromone and inhibitor peptides. *Mol Microbiol* **62**, 958-69.
168. Shi, K., Brown, C. K., Gu, Z. Y., Kozłowicz, B. K., Dunny, G. M., Ohlendorf, D. H. & Earhart, C. A. (2005). Structure of peptide sex pheromone receptor PrgX and PrgX/pheromone complexes and regulation of conjugation in *Enterococcus faecalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18596-601.
169. Fujimoto, S., Tomita, H., Wakamatsu, E., Tanimoto, K. & Ike, Y. (1995). Physical mapping of the conjugative bacteriocin plasmid pPD1 of *Enterococcus faecalis* and identification of the determinant related to the pheromone response. *J Bacteriol* **177**, 5574-81.
170. Bae, T., Kozłowicz, B. & Dunny, G. M. (2002). Two targets in pCF10 DNA for PrgX binding: their role in production of Qa and prgX mRNA and in regulation of pheromone-inducible conjugation. *J Mol Biol* **315**, 995-1007.
171. Chung, J. W. & Dunny, G. M. (1995). Transcriptional analysis of a region of the *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10 involved in positive regulation of conjugative transfer functions. *J Bacteriol* **177**, 2118-24.
172. Galli, D., Friesenegger, A. & Wirth, R. (1992). Transcriptional control of sex-pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis* and sequence analysis of a third structural gene for (pPD1-encoded) aggregation substance. *Mol Microbiol* **6**, 1297-308.
173. Pontius, L. T. & Clewell, D. B. (1992). Regulation of the pAD1-encoded sex pheromone response in *Enterococcus faecalis*: nucleotide sequence analysis of traA. *J Bacteriol* **174**, 1821-7.
174. Ehrenfeld, E. E. & Clewell, D. B. (1987). Transfer functions of the *Streptococcus faecalis* plasmid pAD1: organization of plasmid DNA encoding response to sex pheromone. *J Bacteriol* **169**, 3473-81.
175. Tomita, H. & Clewell, D. B. (2000). A pAD1-encoded small RNA molecule, mD, negatively regulates *Enterococcus faecalis* pheromone response by enhancing transcription termination. *J Bacteriol* **182**, 1062-73.
176. do Carmo de Freire Bastos, M., Tomita, H., Tanimoto, K. & Clewell, D. B. (1998). Regulation of the *Enterococcus faecalis* pAD1-related sex pheromone response: analyses of traD expression and its role in controlling conjugation functions. *Mol Microbiol* **30**, 381-92.
177. de Freire Bastos, M. C., Tanimoto, K. & Clewell, D. B. (1997). Regulation of transfer of the *Enterococcus faecalis* pheromone-responding plasmid pAD1: temperature-sensitive transfer mutants and identification of a new regulatory determinant, traD. *J Bacteriol* **179**, 3250-9.
178. Yarnell, W. S. & Roberts, J. W. (1999). Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination. *Science* **284**, 611-5.
179. Clewell, D. B. & Dunny, G. M. (2002). Conjugation and genetic exchange in enterococci. In *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance* (Gilmore, M. S., ed.), pp. 265-300. ASM Press, Washington, DC.
180. Callen, B. P., Shearwin, K. E. & Egan, J. B. (2004). Transcriptional Interference between Convergent Promoters Caused by Elongation over the Promoter. *Molecular Cell* **14**, 647-656.
181. Weidlich, G., Wirth, R. & Galli, D. (1992). Sex pheromone plasmid pAD1-encoded surface exclusion protein of *Enterococcus faecalis*. *Mol Gen Genet* **233**, 161-8.

182. Galli, D., Lottspeich, F. & Wirth, R. (1990). Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol Microbiol* **4**, 895-904.
183. Francia, M. V., Weaver, K. E., Goicoechea, P., Tille, P. & Clewell, D. B. (2007). Characterization of an active partition system for the *Enterococcus faecalis* pheromone-responding plasmid pAD1. *J Bacteriol* **189**, 8546-55.
184. Wu, K., An, F. Y. & Clewell, D. B. (1999). *Enterococcus faecalis* Pheromone-Responding Plasmid pAD1 Gives Rise to an Aggregation (Clumping) Response When Cells Are Exposed to Subinhibitory Concentrations of Chloramphenicol, Erythromycin, or Tetracycline. *Plasmid* **41**, 82-88.
185. Clewell, D. B. (1999). Sex pheromone systems in enterococci. In *Cell-Cell Signaling in Bacteria*. (Dunny, G. M. & Winans, S. C., eds.), pp. 47-65. ASM Press, Washington, DC.
186. Hirt, H., Wirth, R. & Muscholl, A. (1996). Comparative analysis of 18 sex pheromone plasmids from *Enterococcus faecalis*: detection of a new insertion element on pPD1 and implications for the evolution of this plasmid family. *Mol Gen Genet* **252**, 640-7.
187. Chung, J. W., Bensing, B. A. & Dunny, G. M. (1995). Genetic analysis of a region of the *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10 involved in positive regulation of conjugative transfer functions. *J Bacteriol* **177**, 2107-17.
188. Bensing, B. A. & Dunny, G. M. (1997). Pheromone-inducible expression of an aggregation protein in *Enterococcus faecalis* requires interaction of a plasmid-encoded RNA with components of the ribosome. *Mol Microbiol* **24**, 295-308.
189. Bensing, B. A., Meyer, B. J. & Dunny, G. M. (1996). Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7794-9.
190. Bae, T., Kozłowicz, B. K. & Dunny, G. M. (2004). Characterization of cis-acting prgQ mutants: evidence for two distinct repression mechanisms by Qa RNA and PrgX protein in pheromone-inducible enterococcal plasmid pCF10. *Mol Microbiol* **51**, 271-81.
191. Bae, T., Clerc-Bardin, S. & Dunny, G. M. (2000). Analysis of expression of prgX, a key negative regulator of the transfer of the *Enterococcus faecalis* pheromone-inducible plasmid pCF10. *J Mol Biol* **297**, 861-75.
192. Dunny, G. M. & Chung, J. W. (1992). Cis-Acting, Orientation-Dependent, Positive Control System Activates Pheromone-Inducible Conjugation Functions at Distances Greater than 10 Kilobases Upstream from Its Target in *Enterococcus faecalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9020-9024.
193. Chandler, J. R., Hirt, H. & Dunny, G. M. (2005). A paracrine peptide sex pheromone also acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15617-22.
194. McCormick, J. K., Hirt, H., Dunny, G. M. & Schlievert, P. M. (2000). Pathogenic Mechanisms of Enterococcal Endocarditis. *Curr Infect Dis Rep* **2**, 315-321.
195. Horii, T., Nagasawa, H. & Nakayama, J. (2002). Functional analysis of TraA, the sex pheromone receptor encoded by pPD1, in a promoter region essential for the mating response in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **184**, 6343-50.

196. Leonard, B. A., Bensing, B. A., Hedberg, P. J., Ruhfel, R. E., Chung, J. W. & Dunny, G. M. (1995). Pheromone-inducible gene regulation and signalling for the control of aggregation substance expression in the conjugative plasmid pCF10. *Dev Biol Stand* **85**, 27-34.
197. Folli, C., Ramazzina, I., Arcidiaco, P., Stoppini, M. & Berni, R. (2003). Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiology Letters* **221**, 143-149.
198. Heaton, M. P., Discotto, L. F., Pucci, M. J. & Handwerger, S. (1996). Mobilization of vancomycin resistance by transposon-mediated fusion of a VanA plasmid with an *Enterococcus faecium* sex pheromone-response plasmid. *Gene* **171**, 9-17.
199. Showsh, S. A., De Boever, E. H. & Clewell, D. B. (2001). Vancomycin resistance plasmid in *Enterococcus faecalis* that encodes sensitivity to a sex pheromone also produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2177-8.
200. Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., Hirose, T. & Itakura, K. (1979). Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to {Phi}X 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucl. Acids Res.* **6**, 3543-3558.
201. Torri Tarelli, G., Carminati, D. & Giraffa, G. (1994). Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. *Food microbiology* **11**, 243-252.
202. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
203. Kalia, A., Rattan, A. & Chopra, P. (1999). A method for extraction of high-quality and high-quantity genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. *Anal Biochem* **275**, 1-5.
204. Rivetti, C. & Codeluppi, S. (2001). Accurate length determination of DNA molecules visualized by atomic force microscopy: evidence for a partial B- to A-form transition on mica. *Ultramicroscopy* **87**, 55-66.
205. Rivetti, C., Guthold, M. & Bustamante, C. (1999). Wrapping of DNA around the E.coli RNA polymerase open promoter complex. *Embo J* **18**, 4464-75.
206. Choi, S.-K. & Saier, M. H., Jr. (2005). Regulation of sigL Expression by the Catabolite Control Protein CcpA Involves a Roadblock Mechanism in *Bacillus subtilis*: Potential Connection between Carbon and Nitrogen Metabolism. *J Bacteriol.* **187**, 6856-6861.
207. Kruse, B., Narasimhan, N. & Attardi, G. (1989). Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell* **58**, 391-7.
208. Gilmour, D. S. & Fan, R. (2008). Derailing the locomotive: transcription termination. *J Biol Chem* **283**, 661-4.
209. Paulsen, I. T., Banerjee, L., Myers, G. S., Nelson, K. E., Seshadri, R., Read, T. D., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Gill, S. R., Heidelberg, J. F., Tettelin, H., Dodson, R. J., Umayam, L., Brinkac, L., Beanan, M., Daugherty, S., DeBoy, R. T., Durkin, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., Vamathevan, J., Tran, B., Upton, J., Hansen, T., Shetty, J., Khouri, H., Utterback, T., Radune, D., Ketchum, K. A., Dougherty, B. A. & Fraser, C. M. (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **299**, 2071-4.

210. Francia, M. V. & Clewell, D. B. (2002). Transfer origins in the conjugative *Enterococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAM373: identification of the pAD1 *nic* site, a specific relaxase and a possible TraG-like protein. *Mol Microbiol* **45**, 375-95.

PUBBLICAZIONI

Molti degli esperimenti descritti in questa tesi di dottorato sono inclusi in due manoscritti in preparazione:

1) Molecular cloning, E. coli overexpression, purification and binding properties of TraA and TraC, two proteins involved in the pheromone-dependent conjugation process in Enterococci.

2) TraA transcription regulation activity in pheromone-dependent plasmid pPD1.

Durante il periodo del dottorato mi sono inoltre occupata anche degli argomenti relativi alle seguenti pubblicazioni:

1) Pasquato, N., Berni, R., Folli, C., Alfieri, B., Cendron, L. & Zanotti, G. (2007). Acidic pH-induced conformational changes in amyloidogenic mutant transthyretin. *J Mol Biol* 366, 711-9.

Un numeroso gruppo di malattie, le amiloidosi, sono caratterizzate dal deposito nei tessuti di aggregati proteici omogenei sotto forma di fibrille. Tali fibrille si formano a seguito della insolubilizzazione e polimerizzazione di diverse proteine, in un processo noto come fibrillogenesi. La formazione di depositi extracellulari altera la normale struttura dei tessuti e causa profonde alterazioni delle funzioni cellulari. Le patologie amiloidotiche si distinguono in forme ereditarie e non ereditarie. Nelle amiloidosi sistemiche ereditarie le proteine che formano le fibrille amiloidotiche sono forme mutanti di diverse proteine, tra le quali la transtiretina, trasportatore plasmatico della tiroxina e co-trasportatore insieme alla “retinol-binding protein” del retinolo, è più frequentemente implicata. In questo lavoro abbiamo studiato le alterazioni strutturali di uno dei più importanti mutanti amiloidogenici della transtiretina.

Abstract

Several proteins, including transthyretin (TTR), can generate in tissues extracellular insoluble aggregates, in the form of fibrils, that are associated with pathological states known as amyloidoses. To date, more than 80 different TTR point mutations have been associated with hereditary amyloidosis in humans. In vitro, the formation of amyloid fibrils by human TTR is known to be triggered by acidic pH. We show here that, in vitro, the natural amyloidogenic I84S and the non-natural I84A TTR mutant forms exhibit a propensity to produce fibrils in an acidic

medium significantly higher than that of wild-type TTR. The two mutant forms have been crystallized at both neutral and acidic pH. Their neutral pH crystal structures are very similar to that of wild-type TTR, consistent with previous evidence indicating that only minor structural changes are induced by amyloidogenic mutations. On the contrary, their crystal structures at moderately low pH (4.6) show significant conformational differences as compared to their neutral pH structures. Remarkably, such changes are not induced in wild-type TTR crystallized at low pH. The most relevant consist of the unwinding of the TTR short alpha-helix and of the change in conformation of the loop connecting the alpha-helix to beta-strand F. Only one monomer of the crystallographic dimer is affected, causing a disruption of the tetrameric symmetry. This asymmetry and a possible destabilization of the tetrameric quaternary structure of TTR may be responsible for the amyloidogenic potential of the two TTR mutant forms at low pH.

2) Asero, R., Amato, S., Alfieri, B., Folloni, S. & Mistrello, G. (2007). Rice: another potential cause of food allergy in patients sensitized to lipid transfer protein. *Int Arch Allergy Immunol* 143, 69-74.

Le non specific lipid transfer protein (nsLTP) sono allergeni largamente diffusi tra gli alimenti di origine vegetale. In diversi casi è stata evidenziata cross-reattività tra nsLTP da specie botaniche distanti; questo avviene particolarmente per soggetti che presentano alti livelli di IgE verso la nsLTP di pesca. Per queste ragioni le nsLTP sono attualmente definite panallergeni delle piante. Ad oggi sono state riportate reazioni allergiche sistemiche, tra cui anafilassi e asma, in pazienti allergici a nsLTP in seguito all'ingestione di frutta da *Rosacee*, noci e nocciole, mais, birra, uva, more, senape e arachidi. In seguito alla scoperta di tre casi di reazioni sistemiche dovute all'ingestione di riso da parte di soggetti allergici a nsLTP da diverse fonti alimentari, ci siamo proposti di ottenere nsLTP di riso in forma pura per poterne evidenziare le proprietà di immunoreattività.

Abstract

Recent studies show that the lipid transfer protein (LTP), the major *Rosaceae* allergen in patients not sensitized to birch pollen, is a largely cross-reacting allergen. Moreover, it is a potentially hazardous allergen due to its stability upon thermal treatment and pepsin digestion. The present study reports 3 cases of rice-induced anaphylaxis in LTP-allergic patients. In vitro inhibition studies, carried out using LTP purified from both rice and apple as well as whole peach extract, show that LTP was the relevant allergen in these patients and demonstrate the cross-reactivity between rice LTP and peach/apple LTP.

RINGRAZIAMENTI

Se chiudo gli occhi, vedo tutte le persone che mi sono state vicino in questi tre anni, e la cosa più bella è che se li riapro la maggior parte è ancora qui.

Vorrei ringraziare innanzitutto chi ha lavorato insieme a me. Senza badare a gerarchie ringrazio Silvia, Claudia, Ileana e il Professor Berni, punti di riferimento preziosissimi, per tutto quello che mi hanno insegnato e per il tempo che mi hanno dedicato. Grazie anche a Laura, Riccardo, Enrico, Roberto e a tutte le altre persone del Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare sempre disponibili e pronte a trovare soluzioni quando sembra non ce ne siano.

Grazie a Lisa Elviri per le misure di spettrometria di massa e al Professor Rivetti per l'AFM.

Grazie a tutti gli studenti che in questi tre anni sono passati dal laboratorio 48 per l'aiuto pratico e soprattutto per l'entusiasmo che mi hanno trasmesso. Gli ultimi arrivati sono quelli che si ricordano di più: il mio zainetto Fiammetta, Betta, Davide, Lorenzo, Giuseppe, Fabio, Mariella, Valentina... ma anche Ilaria ed Elena.

Un immenso grazie va alla mia famiglia: mia sorella, Paolo, i ragazzi e mio padre, per il sostegno, la pazienza e la comprensione. Grazie a mia madre per quello che sono.

Ringrazio gli amici ai quali questa tesi è dedicata perché ne ho di meravigliosi! Un grande grandissimo grazie a Marianne per essere qui a condividere con me momenti belli e brutti, per tutto quello che mi sta insegnando, per le tante risate e le parole di conforto. Grazie a Silvia la mia insostituibile complice di lavoro e amica meravigliosa, per tutte le volte che il suo ottimismo è bastato per entrambe. Grazie ad Ileana per la disponibilità infinita... spesso basta uno sguardo per capirci. Grazie a Barbara, Giulia, Valeria, le amiche di sempre, per la pazienza nel sopportare le mie infinite assenze. Grazie a Ezio, Fulvio, Thomas, Nadia, Trava, Cristian per le serate in compagnia.

Infine grazie a Simone perché con lui tutto sembra possibile... non c'è bisogno di sognare quando i sogni possono diventare realtà...