



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale

Dottorato di Ricerca in Biotecnologie e Bioscienze

XXXV Ciclo

***Caratterizzazione funzionale del sistema tossina-antitossina
di tipo II DinJ-YafQ in *Lacticaseibacillus paracasei*:
la regolazione della crescita batterica
come risposta adattativa allo stress***

Coordinatore: Prof. Marco Ventura

Tutore: Prof. Claudio Rivetti

Co-tutore: Prof.ssa Claudia Folli

Dottoranda:

Aleksandra Anna Bonini

Anni Accademici 2019/2020 – 2021/2022

1. Introduzione

1.1. I sistemi tossina-antitossina batterici	1
1.2. Classificazione dei sistemi TA	3
1.3. La problematica della persistenza	12
1.4. I batteri lattici	15
1.5. Identificazione del sistema tossina-antitossina più rappresentato nei batteri del gruppo <i>Lacticaseibacillus casei</i> : DinJ-YafQ	18
1.6. Tipi di stress a cui i batteri del gruppo <i>Lacticaseibacillus casei</i> sono sottoposti	25
1.7. Espressione di DinJ-YafQ in risposta a stress di varia natura nei batteri del gruppo <i>Lacticaseibacillus casei</i>	27
1.8. Saggi della tossicità di YafQ di <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> in vivo	31

2. Scopo del lavoro	35
----------------------------------	-----------

3. Materiali e metodi

3.1. Clonaggio genico e mutagenesi per la sovraespressione di proteine ricombinanti <i>wild type</i> e mutanti	38
3.2. Clonaggio, amplificazione e mutagenesi dei frammenti di DNA per gli EMSA	39
3.3. Espressione e purificazione di proteine ricombinanti	40
3.4. Saggi in vitro dell'attività RNAsica	42
3.5. EMSA	42
3.6. EMSA di competizione	44
3.7. Microscopia a forza atomica	44
3.8. <i>Crosslinking</i>	48
3.9. Saggi in vivo della repressione trascrizionale	48
3.10. Strumenti bioinformatici	49

4. Risultati e discussione

4.1. Attività ribonucleasica di YafQ	51
4.2. Analisi degli stati oligomerici di DinJ, YafQ e del complesso DinJ-YafQ mediante <i>crosslinking</i> con glutaraldeide e cromatografia ad esclusione dimensionale	55
4.2.1. Stati oligomerici del complesso DinJ-YafQ	56
4.2.2. Stati oligomerici di DinJ	59
4.2.3. Stati oligomerici di YafQ	61
4.3. Studio del legame di DinJ al proprio operone	
4.3.1. DinJ e il complesso DinJ-YafQ legano una sequenza palindromica sul promotore del proprio operone in modo cooperativo	62
4.3.2. L'amminoacido conservato R13 localizzato sul dominio RHH di DinJ è essenziale per il legame al DNA	68
4.3.3. DinJ reprime in maniera specifica la trascrizione dell'operone <i>dinJ-yafQ</i> impedendo all'RNA polimerasi di accedere al promotore	71
4.3.4. La presenza delle due ripetizioni invertite sul promotore è importante per il legame cooperativo di DinJ e DinJ-YafQ al DNA	72
4.3.5. Un modello strutturale di due eterotetrameri DinJ-YafQ legati al promotore è compatibile con la cooperatività del legame in <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	74
4.4. Microscopia a forza atomica	76
4.5. DinJ reprime la trascrizione dell'operone <i>dinJ-yafQ</i> in vivo	82

5. Conclusioni	88
-----------------------------	----

6. Materiale supplementare	91
---	----

1. Introduzione

1.1. I sistemi tossina-antitossina batterici

I sistemi tossina-antitossina (TA) sono loci genici abbondantemente distribuiti nei genomi dei batteri e degli archaea, possono essere localizzati sul DNA cromosomico o su quello plasmidico, e regolano la crescita e la morte cellulare in risposta alle condizioni ambientali. I sistemi TA sono costituiti da una tossina che svolge un'azione tossica sulla stessa cellula che l'ha sintetizzata, interferendo con processi cellulari essenziali quali la replicazione del DNA, la sintesi proteica, l'integrità della membrana cellulare, la sintesi della parete cellulare e la formazione del citoscheletro ¹, e da un'antitossina che contrasta l'azione della tossina fino a quando le condizioni sono favorevoli alla crescita cellulare. La tossina ha una struttura stabile, a differenza dell'antitossina, la cui struttura tridimensionale presenta un *folding* parziale ² che ne compromette la stabilità e la rende suscettibile alla degradazione da parte delle proteasi, per quanto riguarda i sistemi aventi un'antitossina di natura proteica: ciò implica che l'antitossina debba essere continuamente sintetizzata per poter neutralizzare la tossina, infatti, finché l'antitossina interviene contrastando la tossicità della tossina, la cellula è esente dagli effetti tossici del sistema e la crescita cellulare procede normalmente, ma, non appena si instaurano delle condizioni di stress, l'antitossina viene degradata con il conseguente sopravvento degli effetti tossici della tossina. La degradazione dell'antitossina coinvolge l'intervento di proteasi ATP-dipendenti quali Lon, ClpAP e ClpXP ³. Ne consegue che la cellula entra in uno stato dormiente, dovuto ad un rallentamento metabolico che ne riduce la sensibilità alle condizioni avverse e, in questo modo, ne promuove la sopravvivenza.

I sistemi tossina-antitossina sono organizzati in operoni, in cui spesso il gene dell'antitossina è localizzato a monte di quello della tossina, questa disposizione conferisce il vantaggio di poter sintetizzare prima l'antitossina, che potrà quindi neutralizzare prontamente la tossina non appena quest'ultima verrà prodotta ⁴, tuttavia in alcuni casi, come *higBA*, *rnlAB*, *hicAB* e *mqsRA*, l'ordine è invertito, con il gene dell'antitossina a valle di quello della tossina ⁵.

Le tossine costituenti i sistemi tossina-antitossina differiscono dalle tossine batteriche ^{6,7}, queste ultime sono fattori di virulenza rappresentati dalle esotossine (proteine tossiche solubili secrete nell'ambiente esterno sia da batteri Gram-positivi che Gram-negativi, promuovono l'invasione

dell'organismo ospite e catalizzano modifiche covalenti a carico delle cellule dell'ospite alterandone la fisiologia)⁸ e dalle endotossine (rappresentate dal lipide A, che è il dominio idrofobico del lipopolisaccaride costituente la membrana esterna dei batteri Gram-negativi, viene liberato nell'ambiente esterno solo in seguito alla morte e lisi del batterio, stimolano la risposta immunitaria e possono innescare lo shock settico nell'animale ospite)⁹.

Le tossine dei sistemi tossina-antitossina svolgono la loro attività solo all'interno della stessa cellula che le ha sintetizzate, non sono secrete nell'ambiente esterno, tuttavia ci sono casi eccezionali in cui certe tossine vengono secrete nell'ambiente esterno e possono interagire con l'organismo ospite^{10,11}. L'azione delle tossine dei sistemi tossina-antitossina è finalizzata a promuovere la sopravvivenza della cellula batterica in risposta alle condizioni ostili, instaurando uno stato dormiente, caratterizzato da un rallentamento metabolico che si protrae finché lo stress persiste e rappresentano, quindi, una risposta adattativa allo stress. La sopravvivenza promossa da questi sistemi può anche svolgersi attraverso il suicidio altruistico che favorisce la sopravvivenza di una popolazione batterica che si viene a trovare in condizioni ostili, in quanto la morte di un numero limitato di cellule libera delle componenti che alleviano lo stress, apportando un beneficio al resto della popolazione batterica¹². I sistemi tossina-antitossina possono promuovere la sopravvivenza di una popolazione batterica nel contesto dell'infezione abortiva, infatti l'infezione di un batteriofago può innescare l'attivazione della tossina con la conseguente morte cellulare che blocca la propagazione dell'infezione fagica a livello della popolazione^{13,14}. I sistemi tossina-antitossina localizzati sul DNA plasmidico sono un elemento chiave nel mantenimento del plasmide contenente il relativo operone mediante l'uccisione post-segregazionale per effetto della peculiare differenza nella stabilità della tossina rispetto all'antitossina: la cellula figlia che non ha ereditato il plasmide ha comunque ereditato le proteine precedentemente sintetizzate dalla cellula madre e l'antitossina, essendo meno stabile della tossina, andrà incontro alla degradazione per prima, non potranno essere sintetizzate altre antitossine de novo, quindi la cellula subirà l'azione tossica della tossina e solo le cellule che hanno ereditato il plasmide saranno in grado di neutralizzarla, in quanto potranno sintetizzare la corrispondente antitossina.

1. 2. Classificazione dei sistemi TA

Sono state identificate 8 classi di sistemi TA, distinte in base alla natura delle componenti (proteine o RNA) e alla modalità con cui l'antitossina contrasta l'azione della tossina. Nei tipi da I a VII la tossina è una proteina, nel tipo VIII è un RNA^{15,16}; nei moduli di tipo I, III e VIII le antitossine sono piccoli RNA non codificanti, mentre nei tipi II, IV, V, VI e VII sono piccole proteine¹⁶. Le funzioni delle tossine non sono distribuite in maniera omogenea tra i vari tipi, bensì alcune funzioni sono prevalentemente rappresentate da tossine facenti parte di un determinato tipo: ad esempio, le tossine che formano pori transmembrana che interrompono l'integrità della membrana prevalgono nei sistemi di tipo I (es. *tisB-istR*), le tossine ad attività ribonucleasica prevalgono nel tipo II (es. *dinJ-yafQ*).

Tipo I

Nei sistemi TA di tipo I, l'antitossina è un RNA antisenso complementare a quello della tossina, di cui inibisce l'espressione mediante due meccanismi: l'appaiamento dell'antitossina all'mRNA della tossina porta alla formazione di un doppio filamento che impedisce il legame del ribosoma e la traduzione (vedi figura 1.1), inoltre, l'RNA duplex costituito dall'mRNA della tossina e dall'antitossina rappresenta un bersaglio delle RNAsi, per cui viene rapidamente degradato.

Il gene dell'antitossina può essere sovrapposto, in direzione convergente, a quello della tossina, oppure può essere separato con direzionalità divergente.

In questo tipo di sistema, le tossine sono piccole proteine idrofobiche con domini ad α -elica in grado di inserirsi nella membrana cellulare e formare dei pori che interrompono l'integrità della membrana. Il primo sistema tossina-antitossina di questo tipo ad essere stato scoperto è *hok-sok*, identificato nel plasmide R1 di *E. coli* e denominato inizialmente "*par*" (*plasmid partitioning*), poiché aveva mostrato di stabilizzare i plasmidi¹⁷, permettendo il partizionamento dei plasmidi tra le cellule figlie; successivamente si è scoperto che questo sistema è costituito da un gene codificante per una proteina in grado di uccidere la cellula, denominata "*host killing*" (*hok*) e da un gene in grado di contrastarne l'azione, denominato "*suppression of host killing*" (*sok*)¹⁸, per questo il sistema è identificato come *hok-sok*.

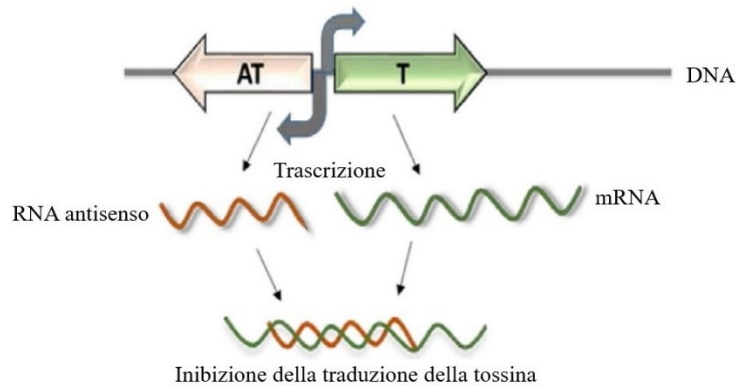


Figura 1.1. Illustrazione schematica del sistema tossina-antitossina di tipo I: i geni e i promotori sono indicati con le frecce colorate e grigie, rispettivamente. Il gene dell'antitossina (AT) e il relativo trascritto (linea curva) sono colorati in arancione, il gene della tossina (T) e il corrispondente mRNA sono colorati in verde (adattato da Rif. 3).

Tipo II

Nei sistemi di tipo II, illustrati schematicamente nella figura 1.2, che sono quelli più abbondanti e meglio caratterizzati, sia l'antitossina che la tossina sono proteine codificate da geni appartenenti allo stesso operone e, di solito, quello dell'antitossina è posto a monte di quello codificante per la tossina. L'antitossina inibisce l'attività della tossina formando un complesso stabile mediante l'interazione diretta con il sito attivo che occlude l'ingresso del substrato (ad esempio, nel sistema *yefM-yoeB* di *E. coli*, l'antitossina YefM avvolge la tossina YoeB, ostruendone il sito catalitico¹⁹), oppure mediante l'induzione di una variazione conformazionale della tossina che ne determina l'inattivazione (ad esempio, nel sistema *relB-relE* di *E. coli* il legame dell'antitossina RelB causa la dislocazione di una α -elica nella tossina RelE contenente il residuo catalitico Tyr87, essenziale per la tossicità²⁰). In condizioni di stress, l'antitossina viene degradata ad opera di proteasi quali Lon^{21, 22, 23, 24, 25} o quelle della famiglia Clp^{26, 27, 28}, con la conseguente liberazione della tossina^{29, 30, 31, 32}.

Il sistema di tipo II *ccdAB* è il primo sistema tossina-antitossina ad essere stato identificato, è localizzato sul plasmide F di *E. coli* ed è coinvolto nel mantenimento plasmidico³³.

Le tossine di questo tipo più abbondanti sono endoribonucleasi che interferiscono con la traduzione mediante l'attività endoribonucleasica: alcune tagliano l'mRNA libero in modo sequenza-specifico (ad esempio MazF)³⁴, altre tagliano solo l'mRNA associato al ribosoma (ad esempio RelE)³⁵; alcune

tossine di tipo II tagliano il tRNA iniziatore (ad esempio VapC)³⁶, altre eseguono catalisi diverse dal taglio di acidi nucleici, alcune catalizzano modificazioni covalenti delle molecole bersaglio, come nel caso della fosforilazione del fattore di allungamento EF-Tu (ad esempio HipA)³⁷, bloccano la sintesi della parete cellulare mediante la fosforilazione dei precursori del peptidoglicano (come PezT)³⁸, alcune tossine sono acetiltransferasi che bloccano la traduzione attraverso l'acetilazione dei tRNA (ad esempio, TacT e AtaT acetilano il gruppo α -amminico di alcuni amminoacil-tRNA, tra i substrati di AtaT vi è anche l'iniziatore Met-tRNA^{fMet}^{39,40}), altre interferiscono con la replicazione del DNA inibendo la DNA girasi (come CcdB e ParE)^{41,42,43}.

L'antitossina, oltre ad inibire la corrispondente tossina, agisce da repressore trascrizionale del proprio operone, legandosi ad una sequenza palindromica sul promotore. Gli operoni dei sistemi TA possono essere soggetti alla regolazione mediante cooperatività condizionale, in cui la regolazione trascrizionale dipende dal rapporto stechiometrico tra la tossina e l'antitossina. Nel sistema *ccdAB*, l'antitossina CcdA dimerizza e lega una sequenza palindromica sul promotore del proprio operone con una scarsa affinità, tuttavia l'associazione della tossina aumenta l'affinità di legame del complesso al promotore, portando ad una forte inibizione trascrizionale⁴⁴; in alcuni sistemi di questo tipo, ulteriori incrementi nella concentrazione della tossina che comportino uno sbilanciamento del rapporto stechiometrico tra tossina e antitossina, con un eccesso della tossina, possono destabilizzare il legame dell'antitossina al DNA, con la conseguente rapida derepressione del sistema.

Sebbene, di solito, specifiche famiglie di antitossine siano associate a specifiche famiglie di tossine, sono stati identificati dei sistemi ibridi in cui l'antitossina è associata ad una tossina di una famiglia diversa¹.

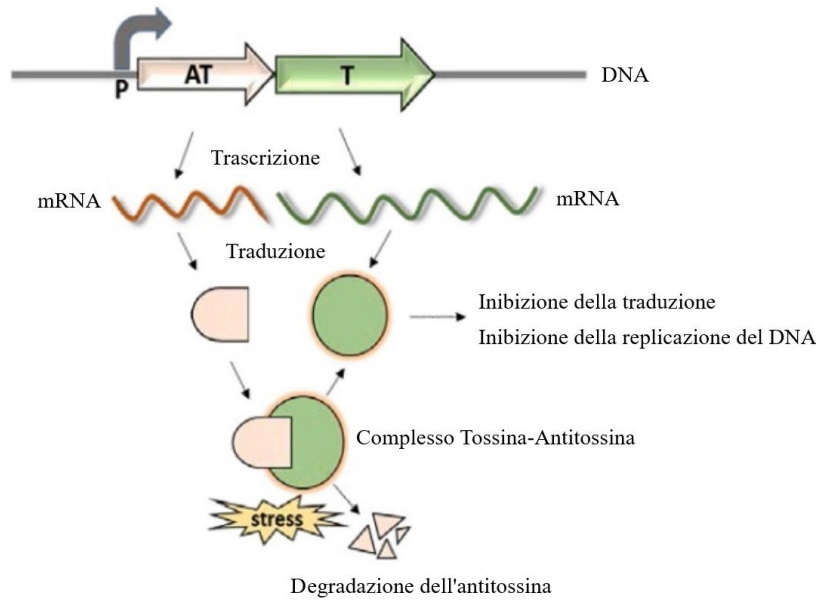


Figura 1.2. Illustrazione schematica del sistema tossina-antitossina di tipo II: i geni (AT: antitossina; T: tossina) e il promotore (P) dell'operone sono rappresentati dalle frecce colorate e dalla freccia grigia, rispettivamente; le linee curve rappresentano gli mRNA; gli elementi dell'antitossina sono colorati in arancione e quelli della tossina in verde (adattato da Rif. 3).

Tipo III

I sistemi di tipo III sono costituiti da un'antitossina a RNA che interagisce direttamente con la tossina proteica, inattivandola (vedi figura 1.3).

Sono note 3 superfamiglie di questo tipo: *toxIN*, *tenpIN* e *cptIN*⁴⁵.

La caratteristica principale di questi sistemi è la presenza di ripetizioni dirette nella sequenza dell'antitossina (ad esempio, l'antitossina ToxI è costituita dalla ripetizione di 36 nucleotidi)⁴⁶. Il sistema *toxIN* è stato identificato per la prima volta nella protezione contro le infezioni fagiche tramite l'infezione abortiva, in quanto promuove il suicidio altruistico delle cellule infette e impedisce la diffusione del batteriofago nella popolazione batterica⁴⁷.

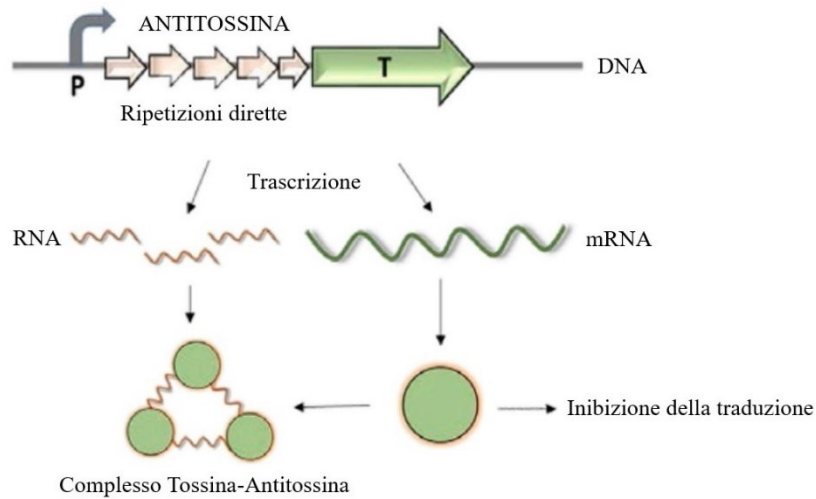


Figura 1.3. Illustrazione schematica del sistema tossina-antitossina di tipo III: la freccia grigia indica il promotore (P), quella verde il gene della tossina (T), mentre la sequenza dell'antitossina, caratterizzata da ripetizioni dirette, è rappresentata dalle frecce multiple arancioni; dei trascritti (linee curve) solo la tossina viene tradotta, l'antitossina a RNA interagisce direttamente con la tossina per inattivarla (adattato da Rif. 3).

Tipo IV

Nel tipo IV, sia l'antitossina che la tossina sono proteine che non interagiscono direttamente: l'antitossina contrasta l'azione della tossina mediante il legame competitivo al target della tossina (vedi figura 1.4). Il primo operone di questo tipo ad essere scoperto è stato *cbeA-cbtA*: la tossina CbtA riduce la polimerizzazione delle proteine del citoscheletro MreB e FtsZ, modificando così la morfologia della cellula⁴⁸, mentre l'antitossina CbeA inibisce il legame della tossina legandosi agli stessi target e stabilizzandone i polimeri.

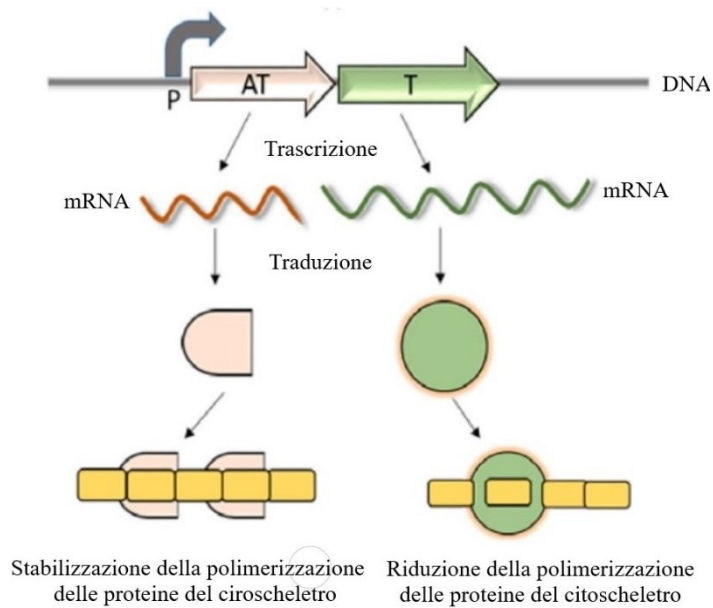


Figura 1.4. Illustrazione schematica del sistema tossina-antitossina di tipo IV *cbeA-cbtA*: la freccia grigia rappresenta il promotore (P) e le frecce colorate i geni dell'antitossina (AT, arancione), che nell'esempio illustrato è CbeA, e della tossina (T, verde), che nel caso specifico è CbtA. L'esempio illustrato è rappresentativo della mancanza dell'interazione diretta tra antitossina e tossina tipica dei sistemi di tipo IV, in quanto la tossicità di quest'ultima viene contrastata mediante competizione con l'antitossina per il legame del bersaglio (adattato da Rif. 3).

Tipo V

Nel sistema di tipo V, l'antitossina è un enzima che taglia l'mRNA della relativa tossina, impedendone così la traduzione (meccanismo illustrato nella figura 1.5). Il primo sistema di questo tipo ad essere stato identificato è *ghoST*, in cui l'antitossina GhoS è un'endoribonucleasi che taglia in modo sequenza-specifico l'mRNA della tossina corrispondente, GhoT, che danneggia la membrana cellulare⁴⁹.

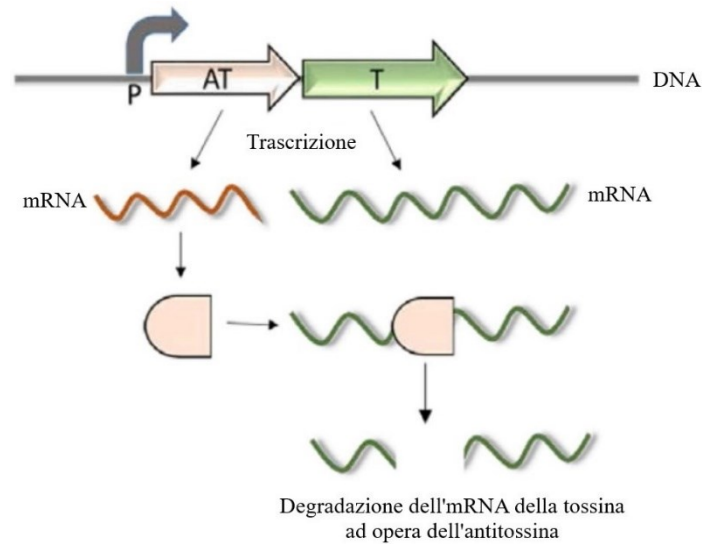


Figura 1.5. Illustrazione schematica del sistema tossina-antitossina di tipo V: le frecce colorate rappresentano le sequenze codificanti per l'antitossina (AT, arancione) e la tossina (T, verde), la freccia grigia definisce il promotore dell'operone (P) (adattato da Rif. 3).

Tipo VI

L'operone *socAB* è stato identificato come sistema TA di tipo VI: la tossina SocB lega la β -sliding clamp e inibisce così la fase di allungamento della replicazione del DNA; l'antitossina SocA è una proteina che funge da adattatore proteolitico, si lega alla tossina e ne determina la degradazione mediata dalle proteasi (vedi figura 1.6)^{50, 51}.

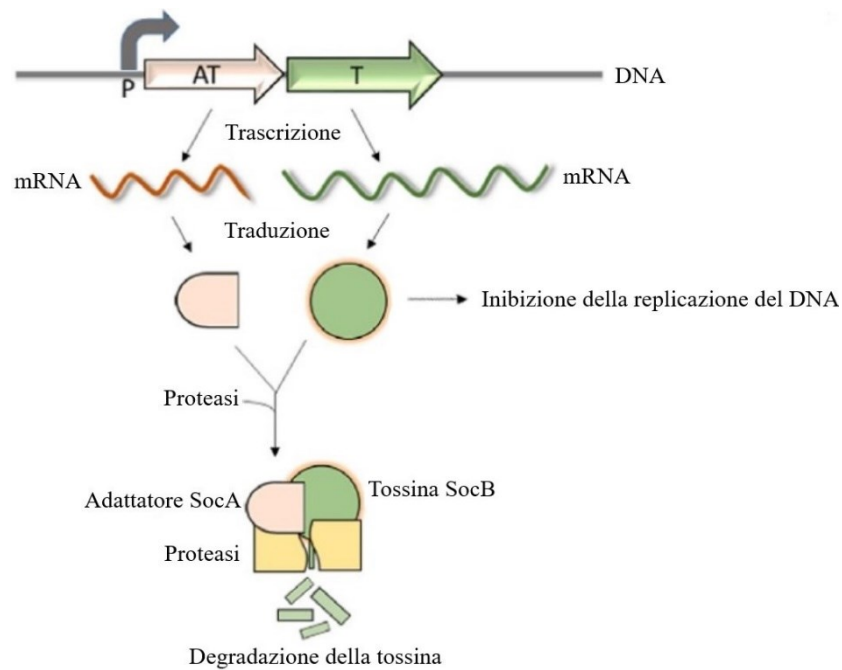


Figura 1.6. Illustrazione schematica del sistema tossina-antitossina di tipo VI *socAB*: le sequenze del promotore (P) e quelle codificanti per le proteine sono rappresentate dalle frecce in grigio e a colori, rispettivamente; i trascritti (linee curve) e i prodotti genici sono rappresentati con le medesime colorazioni applicate alle sequenze codificanti (AT: antitossina, in arancione; T: tossina, in verde), la proteasi è rappresentata in giallo (adattato da Rif. 3).

Tipo VII

Nei sistemi di tipo VII, l'antitossina è un enzima che modifica la tossina⁵².

Il primo sistema di questo tipo ad essere stato identificato è *hha-tomB* in *Yersinia enterocolitica*⁵³ e in *E. coli*⁵⁴, è un sensore della presenza di ossigeno e determina la riduzione della crescita cellulare in carenza di ossigeno: la tossina Hha, di natura proteica, modula l'espressione dell'emolisina e comporta la riduzione della formazione di biofilm e la lisi cellulare in condizioni di anossia, mentre in presenza di ossigeno l'antitossina TomB inattiva Hha catalizzandone l'ossidazione su un residuo conservato di Cys, che ne destabilizza la struttura e ne annulla la tossicità (vedi figura 1.7).

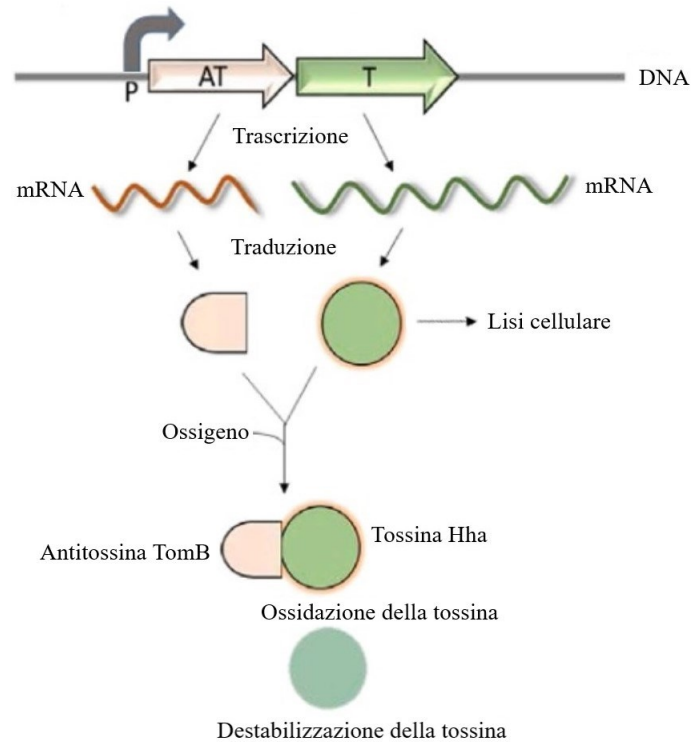


Figura 1.7. Illustrazione schematica del sistema tossina-antitossina di tipo VII *hha-tomB*: le sequenze codificanti sono rappresentate dalle frecce colorate (AT: antitossina *tomB*, arancione; T: tossina *hha*, verde), il promotore dalla freccia grigia (P) (adattato da Rif. 3).

Tipo VIII

Sia la tossina che l'antitossina sono RNA: l'antitossina è un RNA antisense che si appaia alla tossina e ne maschera l'attività (meccanismo illustrato in figura 1.8). Il primo sistema identificato di questo tipo è *sdsR-ryeA*¹⁵, i cui geni codificanti sono posizionati sullo stesso locus su filamenti opposti. La tossina SdsR è un piccolo RNA che reprime l'espressione di TolC appaiandosi al relativo mRNA: TolC è una proteina della membrana esterna, costituente un sistema di efflusso dato dall'interazione con altre due componenti, di cui una proteina della membrana interna e una proteina periplasmica che connette le due proteine di membrana per formare un canale di espulsione di molecole tossiche e di antibiotici⁵⁵; l'azione di SdsR è inibita dall'appaiamento all'antitossina RyeA, quest'ultima è sensibile alla degradazione da parte dell'RNasi BN⁵⁶, presente in grandi quantità durante la fase esponenziale della crescita batterica, che innesca l'intervento della tossina SdsR, con il conseguente

aumento della sensibilità agli antibiotici e ad altre molecole tossiche mediante la riduzione della loro espulsione nell'ambiente esterno.

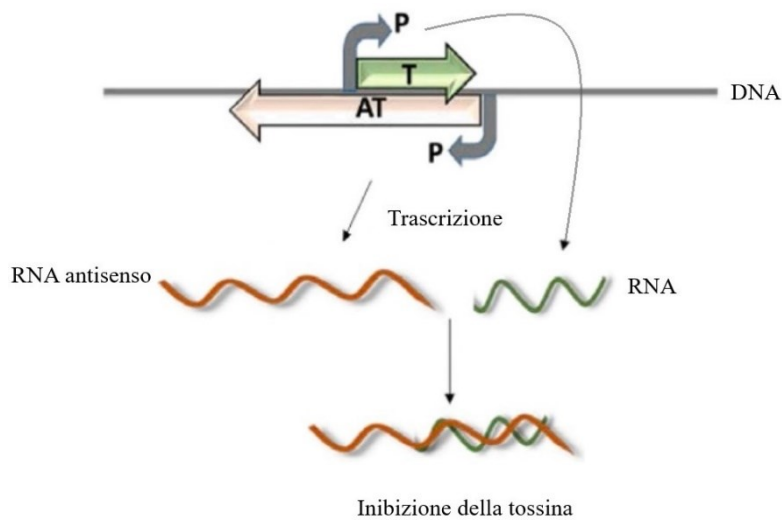


Figura 1.8. Illustrazione schematica del sistema tossina-antitossina di tipo VIII: la sequenza codificante per la tossina (T) è rappresentata in verde, quella dell'antitossina (AT) in arancione e quelle dei promotori (P) in grigio. Entrambe le componenti di questo sistema sono RNA che non vengono tradotti (linee curve con la medesima colorazione delle rispettive sequenze codificanti) (adattato da Rif. 3).

1. 3. *La problematica della persistenza*

L'attivazione della tossina nei sistemi tossina-antitossina batterici in risposta allo stress ha come risultato finale l'insorgenza di uno stato dormiente dato da un rallentamento metabolico che rende la cellula meno sensibile ai fattori nocivi e permette di convergere le risorse cellulari verso processi vitali essenziali, eventualmente in combinazione con la formazione di biofilm che contribuisce positivamente alla capacità delle cellule di fronteggiare le condizioni ostili.

I biofilm sono costituiti da cellule batteriche immerse in una matrice extracellulare protettiva da esse prodotta, alla quale aderiscono, formata da proteine, polisaccaridi, lipidi e DNA, con la formazione di canali che favoriscono lo scambio di nutrienti e lo scambio orizzontale di materiale genetico, come ad esempio i geni per la resistenza agli antibiotici. Vi è una maggiore incidenza di cellule persistenti all'interno dei biofilm grazie all'attivazione dei sistemi tossina-antitossina, i quali sono direttamente

coinvolti nella persistenza attraverso la determinazione di uno stato dormiente e alcuni di questi sistemi prevedono meccanismi determinanti nella formazione di biofilm, come i sistemi HipA-HipB e MqsR-MqsA⁵⁷. La matrice extracellulare costituente il biofilm protegge la popolazione batterica in essa contenuta agendo sia come barriera fisica, sia come una barriera che si oppone alla diffusione di molecole tossiche, quali ad esempio gli antibiotici, protegge dall'essiccazione, dalla radiazione UV e dal sistema immunitario dell'organismo ospite⁵⁸. La maggiore incidenza di cellule persistenti in combinazione con l'azione protettiva della matrice extracellulare incrementano notevolmente la capacità di sopravvivenza delle cellule che fanno parte dei biofilm.

I benefici appena trattati a carico dei batteri comportano una serie di problematiche in ambito sanitario nel contesto dei patogeni persistenti, poiché conferiscono al batterio l'abilità di sopravvivere in presenza di antibiotici, oltre che fornire al batterio la protezione dal sistema immunitario dell'organismo ospite.

La resistenza, o tolleranza, agli antibiotici è la capacità ereditabile dei batteri di crescere in presenza di elevate concentrazioni di antibiotici, viene misurata quantificando la minima concentrazione di un antibiotico in grado di inibire la crescita di una popolazione batterica, risultando letale, alla quale invece un ceppo resistente della stessa specie risulta in grado di crescere e replicarsi⁵⁹. Ci sono tre possibili meccanismi sottesi alla resistenza, rappresentati da:

- riduzione intracellulare della concentrazione dell'antibiotico mediante la riduzione della permeabilità della membrana cellulare allo specifico antibiotico oppure mediante una maggiore efficienza di espulsione della molecola;
- modificazioni a carico del bersaglio dell'antibiotico mediante mutazioni oppure modifiche post-traduzionali;
- inattivazione diretta dell'antibiotico mediante modifiche covalenti oppure mediante idrolisi⁶⁰.

La persistenza è un fenomeno differente dalla resistenza, in quanto è la capacità non ereditabile del batterio di sopravvivere in presenza di concentrazioni di antimicrobici che sarebbero letali per la stessa specie batterica e comprende l'intervento di sistemi tossina-antitossina; le cellule persistenti furono identificate per la prima volta all'inizio degli anni '80 in una popolazione di *E. coli* e furono denominate hip (*high-persister*)⁶¹. HipA-HipB di *E. coli* è un sistema tossina-antitossina di tipo II coinvolto nella persistenza e rappresenta un'interconnessione tra la persistenza e la risposta stringente, la quale viene innescata in condizioni di carenza di amminoacidi: HipA è una tossina con

la funzione di serina/treonina chinasi, fosforila la glutammil-tRNA sintetasi GltX su un residuo di Ser nel sito di legame dell'ATP, ne consegue l'accumulo di RNA^{Glu} scarico, che innesca la risposta stringente⁶², che porta la cellula ad uno stato di quiescenza.

La risposta stringente, che è coinvolta nella formazione di cellule persistenti, è innescata dalla carenza di aminoacidi, di ferro, di carbonio, o da danni alla membrana e comporta l'attivazione di SpoT o della sintasi RelA, che causa l'aumento della concentrazione delle molecole di segnalazione guanosina tetrafosfato (ppGpp) e guanosina pentafosfato (pppGpp), definite alarmoni (p)ppGpp. L'alarmoni (p)ppGpp deriva da tRNA scarichi modificati per azione di fattori della risposta stringente, è un importante regolatore dell'espressione genica nella risposta stringente, lega, insieme a DksA, le subunità β and β' dell'RNA polimerasi e ne modifica l'affinità di legame per i promotori, introducendo specifiche alterazioni dell'espressione genica:

- la riduzione della sintesi di rRNA e, quindi, dei ribosomi, e l'aumento della trascrizione di geni coinvolti nella biosintesi degli aminoacidi⁶³;
- può alterare l'utilizzazione dei fattori σ per promuovere la trascrizione di specifici geni che altrimenti non verrebbero trascritti e che sono importanti per affrontare le condizioni stressanti⁶⁴;
- può interferire negativamente con la traduzione legando i fattori di traduzione IF-2, EF-Tu e EF-G⁶⁵.

La connessione tra le condizioni di stress e l'attivazione dei sistemi tossina-antitossina mediata dalla risposta stringente, attraverso il (p)ppGpp, è illustrata nella figura 1.9: l'aumento della concentrazione di pp(p)Gpp durante la risposta stringente comporta l'inibizione dell'esopolifosfatasi, che è l'enzima che degrada i polifosfati, infine l'associazione dei polifosfati con la proteasi ATP-dipendente Lon ne promuove l'attività⁶⁶, innescando la degradazione dei substrati, di cui fanno parte le antitossine, con il sopravvento della tossicità delle tossine dei rispettivi sistemi.

Un'altra via di connessione tra le condizioni di stress e l'attivazione dei sistemi TA è rappresentata dalla risposta SOS, la quale è innescata da danni al DNA, rilevati come DNA a singolo filamento da parte di RecA che, in presenza di dATP, promuove il taglio proteolitico del repressore LexA, con la conseguente derepressione dei geni coinvolti nella risposta SOS, che normalmente sono repressi da LexA: un esempio di sistema TA attivato dalla risposta SOS è *tisB-istR*⁶⁷.

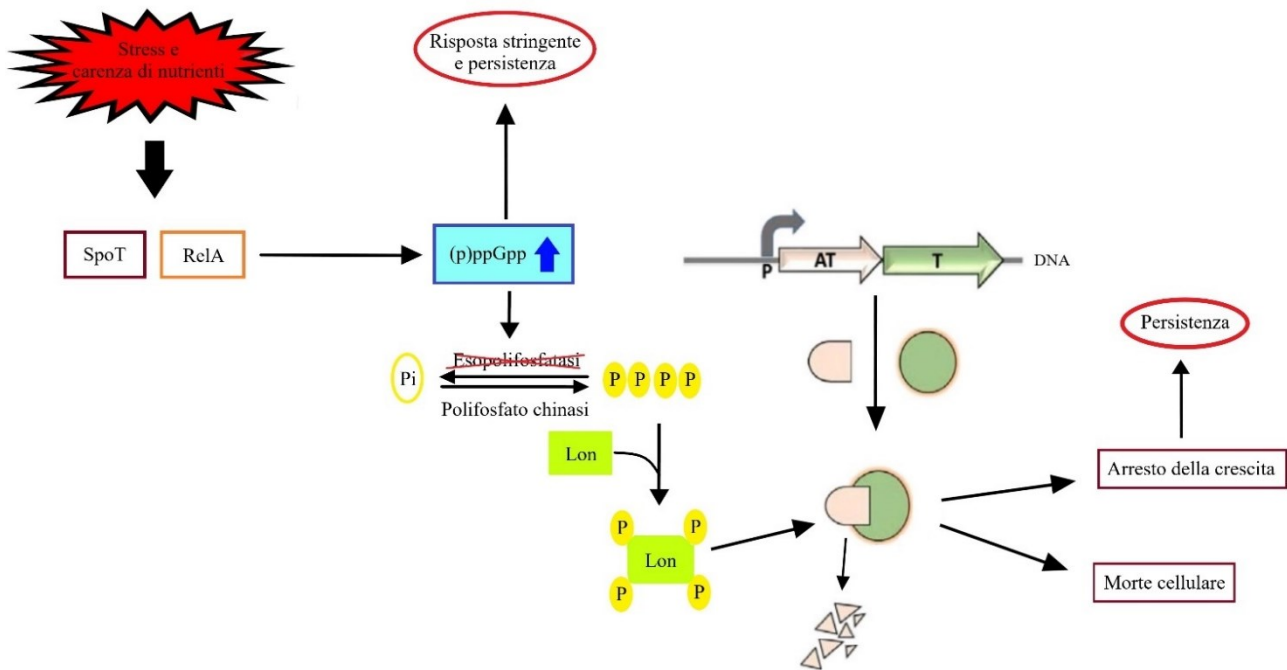


Figura 1.9. Il duplice ruolo del (p)ppGpp nell'insorgenza della persistenza, sia in modo diretto, agendo sulla regolazione dell'espressione genica, sia in modo indiretto, attraverso l'attivazione dei sistemi TA mediata dall'attivazione della proteasi Lon.

1. 4. I batteri lattici

Un ampio gruppo eterogeneo di batteri che rivestono una grande importanza sia in ambito biotecnologico e industriale che sanitario e farmaceutico sono i batteri lattici, ossia batteri Gram-positivi, non sporigeni, anaerobi aerotolleranti (microaerofili), catalasi-negativi e privi di citocromi, sono stati addomesticati da alcuni millenni per la produzione di cibo e bevande, sfruttandone l'abilità di eseguire la fermentazione lattica nei processi di biotrasformazione, ad esempio sono utilizzati nella produzione di derivati del latte, come formaggi e yogurt, e nella produzione del vino.

I principali batteri lattici di interesse industriale nel settore alimentare sono rappresentati dai generi *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* e *Carnobacterium*: fanno parte dell'ordine *Lactobacillales*, della classe dei *Bacilli*, nel phylum *Firmicutes*.

Alcuni batteri lattici sono patogeni (ad esempio *Enterococcus* e *Streptococcus*) oppure commensali, altri invece svolgono un ruolo positivo nella salute umana, ad esempio sono utilizzati come probiotici (diverse specie di *Lactobacillus* e *Lacticaseibacillus*) e alcuni sono impiegati nella produzione industriale, sfruttandone l'abilità di eseguire la fermentazione degli zuccheri per la biotrasformazione degli alimenti, in concomitanza alla produzione di aromi (ad esempio, mediante la fermentazione malolattica ad opera di *Oenococcus oeni* vengono generati dei sottoprodotti che conferiscono particolari aromi al vino, tra i quali gli esteri, i tioli e i monoterpeni ⁶⁸), inoltre alcuni ceppi hanno proprietà antimicrobiche secernendo batteriocine che inibiscono la proliferazione di altre specie batteriche che contaminerebbero gli alimenti con effetti deleteri, con il conseguente deterioramento (ad esempio, alcuni ceppi di *L. lactis* producono la nisina in ambiente acido, che inibisce la crescita dei clostridi, preservando la qualità dei latticini ⁶⁹).

L'impiego dei batteri lattici come probiotici ha mostrato effetti benefici sulla salute:

- prevenzione di malattie cardiovascolari: transitando attraverso il tratto gastrointestinale, i batteri lattici probiotici esprimono come meccanismo di difesa l'idrolasi dei sali biliari, che degrada la bile promuovendo la sopravvivenza dei batteri; l'idrolasi viene secreta dal batterio nell'intestino e, oltre a proteggere il batterio, svolge effetti benefici a carico dell'organismo ospite in quanto abbassa i livelli sierici del colesterolo e riduce il rischio di obesità e di aterosclerosi ⁷⁰;
- effetti sul sistema nervoso centrale: uno studio ha individuato un'azione neuromodulatoria mediata da *Lacticaseibacillus rhamnosus* attraverso la regolazione dell'espressione dei recettori dell'acido γ -amminobutirrico (GABA), un importante neurotrasmettitore inibitorio che inibisce la trasmissione nervosa riducendo l'eccitabilità neuronale; la riduzione della concentrazione del GABA è associata a depressione, ansia, schizofrenia, disturbi nello spettro dell'autismo ed epilessia ⁷¹. La somministrazione di *L. rhamnosus*, ceppo JB1, ha determinato specifiche alterazioni nella quantità di mRNA dei recettori GABA in particolari aree: un incremento dell'mRNA di GABA_{B1b} nelle regioni corticali e una riduzione dello stesso nell'amigdala e nell'ippocampo, la riduzione dell'espressione di GABA_{Aa2} nell'amigdala e nella corteccia prefrontale e l'incremento dello stesso nell'ippocampo, effetti che hanno portato alla riduzione dei sintomi correlati con ansia e depressione ⁷²;
- partecipano alla riduzione della massa tumorale: è stata osservata un'azione immunomodulatoria mediata da *L. rhamnosus* GG promuovendo l'espansione e l'attività delle cellule T CD8 e CD4 a livello intestinale, promuovendo la risposta antitumorale in un modello murino di cancro al colon ⁷³.

Il genere *Lactocaseibacillus* appartiene alla famiglia Lactobacillaceae, costituita da oltre 300 specie caratterizzate da una notevole eterogeneità filogenetica e metabolica, alcune sono autoctone, occupando specifici habitat per lunghi periodi, svolgendo ruoli ecologici ben definiti ⁷⁴, altre sono alloctone, rilevabili in habitat con cui non hanno una relazione evolutiva: ad esempio, i lattobacilli presenti nel tratto gastrointestinale umano provengono da alimenti fermentati ^{75, 76}, i lattobacilli presenti nelle acque reflue o sulla superficie dei vegetali rappresentano dei contaminanti fecali provenienti da animali o da insetti ⁷⁷.

Usando come criteri la fonte da cui i batteri sono stati isolati e la frequenza, le capacità metaboliche, la temperatura ottimale di crescita e la capacità di far fronte a determinati fattori di stress caratteristici di certi habitat, le specie costituenti la famiglia *Lactobacillaceae* possono essere assegnate a tre categorie di stile di vita: libero, nomadico e adattato all'ospite; dal confronto del raggruppamento delle specie secondo il criterio filogenetico con l'assegnazione ad uno stile di vita risulta evidente una correlazione tra la filogenesi e lo stile di vita ⁷⁷.

Le specie di *Lactobacillaceae* che si sono adattate a colonizzare altri organismi ospiti hanno mostrato di possedere i tratti genomici peculiari dei simbionti:

- la riduzione delle dimensioni del genoma, poiché la disponibilità di funzioni fornite dall'ambiente esterno ha portato alla perdita delle medesime funzioni nel batterio;
- la riduzione del contenuto in GC, in quanto è stata osservata una correlazione tra la riduzione delle dimensioni del genoma e l'aumento del contenuto in AT e si suppone che ciò sia dovuto alla perdita o alla riduzione della funzionalità di geni codificanti per proteine coinvolte nel riparo dei danni al DNA, con il conseguente incorporamento dell'uracile nel DNA a causa della mancata correzione di un errore di replicazione o della deamminazione della citosina senza una successiva correzione, che ne determina la fissazione ⁷⁸ (vedi figura 1.10).

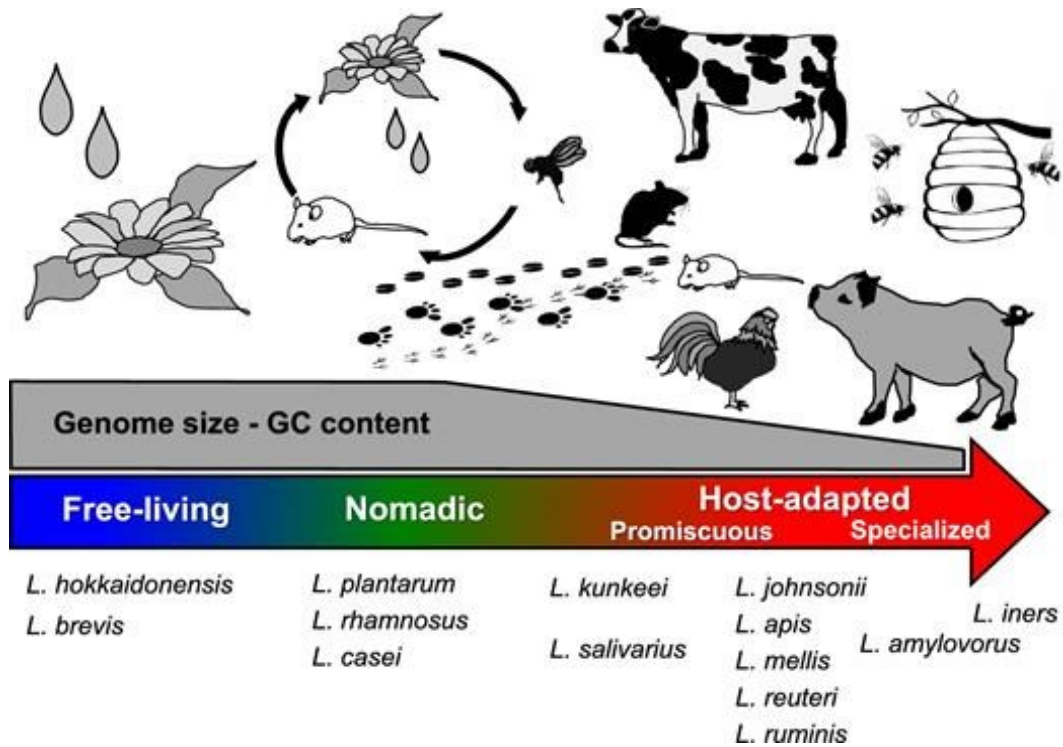


Figura 1.10. L'evoluzione degli stili di vita dei lattobacilli da uno stato di libertà ad uno stile nomadico fino all'adattamento ad un organismo ospite è correlata con la riduzione delle dimensioni del genoma e del suo contenuto in GC (adattato da Rif. 77).

Molte specie della famiglia Lactobacillaceae trovano largo impiego nell'industria alimentare e sono utilizzate come probiotici, vengono somministrate nel trattamento di patologie che compromettono il microbiota del tratto gastrointestinale.

1. 5. Identificazione del sistema tossina-antitossina più rappresentato nei batteri del genere Lactocaseibacillus: DinJ-YafQ

I sistemi tossina-antitossina di tipo II aventi una tossina ad attività ribonucleasica, che può essere ribosoma-dipendente (taglia l'mRNA associato al ribosoma) o ribosoma-indipendente, sono i più abbondanti e tra questi i più diffusi sono DinJ-YafQ, YefM-YoeB, RelB-RelE, YafN-YafO e HigB-HigA ⁷⁹: un'analisi bioinformatica preliminare mediante Blastp, usando come *query* le sequenze omologhe delle tossine di *E. coli* K-12, della loro distribuzione in diverse specie di *Lactobacillaceae* ha rilevato che i più abbondanti sono YafQ e YoeB ⁸⁰.

Un'ulteriore indagine mediante PSI-BLAST nelle specie di *Lacticaseibacillus* di largo impiego tecnologico, ossia *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, usando le sequenze di YafQ e YoeB di *E. coli* K-12 come *query*, ha rivelato che YafQ è la tossina maggiormente diffusa, ne sono stati identificati 19 omologhi, mentre nelle stesse specie sono stati identificati solo 7 omologhi di YoeB⁸⁰ (vedi tabella 1).

	YafQ	YoeB
L. casei	7	3
L. paracasei	6	2
L. rhamnosus	6	2

Tabella 1. Distribuzione di YafQ e YoeB nelle tre specie di *Lacticaseibacillus* di interesse biotecnologico risultata della ricerca mediante PSI-BLAST: YafQ è la tossina maggiormente rappresentata.

Per quanto riguarda la tossina maggiormente diffusa nelle specie di interesse, YafQ, componente del sistema TA oggetto dello studio di questa tesi, la corrispondente antitossina DinJ è stata identificata mediante la ricerca di una ORF a monte della sequenza codificante per la tossina e 4 delle 19 tossine sono risultate orfane, in quanto la corrispondente antitossina risulta assente⁸⁰.

Le sequenze amminoacidiche di YafQ delle specie studiate, restituite da PSI-BLAST, sono state allineate con la sequenza omologa di *E. coli* (vedi figura 1.11) e i residui catalitici sono risultati essere conservati nella maggioranza dei casi, sono state trovate due sequenze con una delezione N-terminale (YafQ_rh4 e YafQ_rh_6-T, quest'ultima rappresenta la versione trunca all'N-terminale di YafQ_rh6, vedi l'allineamento in figura 1.11)⁸⁰. La conservazione dei residui catalitici suggerisce che YafQ nelle specie considerate potrebbe avere un'attività catalitica analoga a quella della proteina omologa di *E. coli*.

```

*          20          40          60          80          100          120          *
YafQ_rh1  MPTS-LPFIQSRSKHLQQLQAGRFKADFOQVAVYQT--STPDP-EKIDHVVKKR---KPRALFVKG-----DILLIRVE--PDAQLLDVGRGET-----
YafQ_ca1  MFH--YQITQOSRKHHLQQLQAGRFQNDFEQVTNYKT--GDFP-EKIDHVVKSR---KPRALFVKG-----SWLLIRVE--DTRRLLDVGRGD-----
YafQ_ca2  MPT--ROITQOSRKHHLQQLQAGRFQNDFOQVLDYRA--GQFP-EKIDHVVKKR---KTRALFVKG-----DILLIRVE--DDTRRLLDVGRGE-----
YafQ_rh2  MPQ--YQITQOSRKHHLQQLQAGRFQNDFEQVTNYKT--GDFP-EKIDHVVKSR---KPRALFVKG-----SWLLIRVE--DLKRLLDVGRGD-----
YafQ_pa2  MNNFIYKPAFERQKHRYTTLKGGRYKKEDFEAVYHKLQ--DEPDP-PHINDHADVNR---KPERDLHFKP-----DILLIKYD--GEFRFDTGSHSDFN-----
YafQ_ca3  MNNFIYKPAFERQKHRYTTLKGGRYKKEDFEAVYHKLQ--DEPDP-PHINDHADVNR---KPERDLHFKP-----DILLIKYD--GEFRFDTGSHSDFN-----
YafQ_rh3  ---MYKKEPEPCKDYQCKRVHPELINDLMALEQOI--NGIQA--QEPHVKNRGGNYNGHYEFHLDG-----KVDLVI--MPHKTNPVRLRISGHOEFHGSLN-----
YafQ_ca6  ---MYKKEPEPCKDYQCKRVHPELINDLMALEQOI--NGIQA--QEPHVKNRGGNYNGHYEFHLDG-----KVDLVI--MPHKTNPVRLRISGHOEFHGSLN-----
YafQ_pa6  ---MYKKEPEPCKDYQCKRVHPELINDLMALEQOI--NGIQA--QEPHVKNRGGNYNGHYEFHLDG-----KVDLVI--MPHKTNPVRLRISGHOEFHGSLN-----
YafQ_ca4  ---MYSLVPTPTKDLRRLSKK--HWPMDELKTAVNLAAGTNAELSS--KKVADHASSSS--EWKGYRELHVDGPRG-----DILLIKKIQQDLTLVRTGSHHNLGK-----
YafQ_pa3  ---MYSLVPTPTKDLRRLSKK--HWPMDELKTAVNLAAGTNAELSS--KKVADHASSSS--EWKGYRELHVDGPRG-----DILLIKKIQQDLTLVRTGSHHNLGK-----
YafQ_ca5  ---MQLKQTKSEELKQVKK--HFPITVLPCLKAVE--QDVI--VLKQIKHAKGN---WRGYREFHPARYGNYGKN--YDMLVITVQLDHDDELLELDATGSH--E--LNQ-----
YafQ_pa4  ---MQLKQTKSEELKQVKK--HFPITVLPCLKAVE--QDVI--VLKQIKHAKGN---WRGYREFHPARYGNYGKN--YDMLVITVQLDHDDELLELDATGSH--E--LNQ-----
YafQ_ca7  ---MKKLRFKPRATNADLRSLASLDKSIIDEVRAADLLE--QQCP-P-PEEHE--NRRMSGYN---EFH--RDTPKMKTPSETNVLVYVYTIIDKDELVIG--RV--SHDR--FPGQNRKRYRKNDEYKKSFL-----
YafQ_pa5  ---MKKLRFKPRATNADLRSLASLDKSIIDEVRAADLLE--QQCP-P-PEEHE--NRRMSGYN---EFH--RDTPKMKTPSETNVLVYVYTIIDKDELVIG--RV--SHDR--FPGQNRKRYRKNDEYKKSFL-----
YafQ_rh4  ---MSLLKRYTHSAKQLKKNLS--SEDKDCKEKCIDS--CV--GKEP-P-KRHHS--SGN---WINHREFH--RP-----NLLVYVSIIDGEEITVAVGRRHNLGI-----
YafQ_rh5  ---MMLTINRTRTKKQFHLHLQ--GKDMTKLATAIDTQR--QDRK--KLASLH--RGA---HSGERALH--AP-----DILLVYKVDAAELIMLDATGTHRDTLNIE-----
YafQ_rh 6-T  ---MMLTINRTRTKKQFHLHLQ--GKDMTKLATAIDTQR--QDRK--KLASLH--RGA---HSGERALH--AP-----DILLVYKVDAAELIMLDATGTHRDTLNIE-----
YafQ_E.coli --MIQRDIFYSGQKSLDVI--LAQR--HKDMNKLKYLITL--IN--NLPDP--AV--H--V--L--G--S--W--K--G--Y--D--A--L--E--P-----DILLIKKLT--DKLRFERTGTHAA--FG-----

```

Figura 1.11. Allineamento delle sequenze di YafQ restituite da PSI-BLAST con YafQ di *E. coli* (UniProt Q47149) (adattato da Rif. 80).

YafQ di *E. coli* è una endoribonucleasi che lega il ribosoma interagendo con la subunità 50S e blocca l'allungamento della traduzione mediante il taglio specifico sulle sequenze 5'-AAA-G/A-3'⁸¹. Il meccanismo catalitico proposto per la tossina YafQ di *E. coli* consiste nel taglio del ponte fosfodiesterico dell'mRNA legato al ribosoma mediante una sostituzione nucleofila bimolecolare (SN2)⁸², illustrata nella figura 1.12.

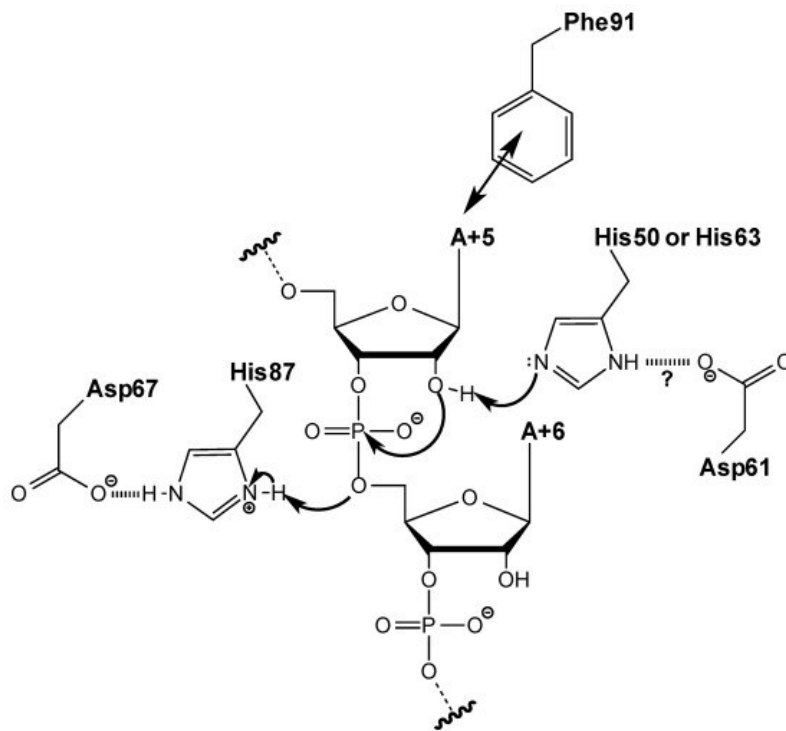


Figura 1.12. Meccanismo proposto per la catalisi del taglio ribonucleolitico catalizzato da YafQ di *E. coli* (adattato da Rif. 82).

YafQ appartiene alla famiglia di tossine RelE: la tossina RelE è una endoribonucleasi ribosoma-dipendente, in quanto è in grado di tagliare l'mRNA solo se questo è associato al ribosoma, per cui non è possibile osservare l'attività di taglio di RelE in vitro in assenza di ribosomi. Al contrario di RelE, alcune tossine di questa famiglia, quali YafQ, HigB e YoeB, possono effettuare il taglio ribonucleolitico anche in assenza di ribosomi, grazie ai residui catalitici His e Glu, conservati in varie endoribonucleasi ribosoma-indipendenti come la RNasi T1^{19, 82, 83}, invece RelE è andata incontro a mutazioni con la perdita dei residui catalitici conservati His e Glu e presenta un'abbondante accumulo di residui basici sulle tre α -eliche mediante le quali interagisce con il ribosoma a livello dell'rRNA 16S⁸⁴. Affinché RelE possa tagliare l'mRNA, è necessario che si instaurino le interazioni tra la Tyr 87 di RelE e la seconda base azotata nel codone del substrato mRNA, posizionato nel sito A del ribosoma, e tra la base azotata del terzo nucleotide del codone del substrato nel sito A e la C1054 dell'rRNA 16S⁸⁵.

Un'altra differenza tra le RNasi ribosoma-dipendenti e ribosoma-indipendenti è che, a differenza di RelE, che lascia un 2'-3'-fosfato ciclico all'estremità 3' del prodotto di taglio⁸⁶, le RNasi che non necessitano del ribosoma idrolizzano il fosfato ciclico a 3'-fosfato^{82, 83, 87}, come avviene nelle reazioni catalizzate dall'RNasi T1⁸⁸.

Una ricerca mediante Blastn di DinJ-YafQ in tutti i ceppi di *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* la cui sequenza completa del genoma è stata depositata nella banca dati NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) ne ha rilevato un'abbondante distribuzione nel DNA cromosomico, mentre sono pressochè assenti nel DNA plasmidico ⁸⁰: il sistema DinJ-YafQ è coinvolto prevalentemente nella sopravvivenza in condizioni di stress alla base della persistenza, piuttosto che nell'uccisione post-segregazionale alla base del mantenimento plasmidico.

È stato eseguito uno screening mediante PCR dell'operone *dinJ-yafQ* in 17 ceppi del genere *Lacticaseibacillus* isolati da prodotti lattiero caseari, dati dalle specie *L. casei* (7 ceppi), *L. paracasei* (7 ceppi) e *L. rhamnosus* (3 ceppi), con coppie di primers specifici progettati sulla base delle sequenze dell'operone *dinJ-yafQ* maggiormente diffuse in ciascuna specie come risultato dalla ricerca con PSI-BLAST: sono stati identificati 10 moduli (ceppi 2306, 2203, 4340 di *L. casei*; ceppi 4341, 4366, 2333, 4186 di *L. paracasei*; ceppi 1019, 1473, 2360 di *L. rhamnosus*), i quali sono stati successivamente sequenziati e le corrispondenti sequenze amminoacidiche sono state allineate con quelle omologhe di *E. coli* (gli allineamenti sono mostrati nelle figure 1.13 a per YafQ, 1.13 b per DinJ), che sono già state caratterizzate: le sequenze amminoacidiche sono prevalentemente conservate nella maggior parte dei casi, suggerendo che il sistema nei lattobacilli di interesse possa avere una funzione analoga a quella in *E. coli*.

a

```

                                     H50           D61H63   D67           H87
YafQ_coli   : MIQRDIEYSGQYSKDVKLAQKRHKDMNKLKYLMTLLIN--NTLPLPAVYKDHPLQGS--WKGYRDAHVEP---DWLLIYKLT--DKLLRFERTGTHAALFG-- : 92
YafQ_pa4366 : --MYSLVPTPTFFKRDRLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSSKKYADHALSSSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIKQQDLILTLVRTGSHHNLGK- : 100
YafQ_pa2333 : --MYSLVPTPTFFKRDRLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSSKKYADHALSSSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIKQQDLILTLVRTGSHHNLGK- : 100
YafQ_pa4186 : --MYSLVPTPTFFKRDRLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSSKKYADHALSSSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIEQQDLILTLVRTGSHHNLGK- : 100
YafQ_pa4341 : --MYSLVPTPTFFKRDRLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSSKKYADHALSSSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIEQQDLILTLVRTGSHHNLGK- : 100
YafQ_ca2306 : --MYSLVPTPTFFKRDRLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSSKKYADHALSSSSSEWKGYRELYVDGPRGDWLLIYKIEQQDLILTLVRTGSHHNLGK- : 100
YafQ_ca4340 : --MYSLVPTPTFFKRDRLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSSKKYADHALSSSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIKQQDLILTLVRTGSHHNLGK- : 100
YafQ_ca2203 : --MYSLVPTPTFFKRDRLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSSKKYADHALSSSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIEQQDLILTLVRTGSHHNLGK- : 100
YafQ_rh2360 : --MLTINRTRTFKRFKHLRQKDMTKLATAIDTLQR--QDRVKLASLHDHALKGA--HSGERALHVAP---DWLLVYKVDAAELILMLLATGTHRDTLNIE : 94
YafQ_rh1019 : -----MQR--QGHVKLASLHDHALKGA--HSGERALHVAP---DWLLVYKVDAAELILMLLATGTHRDTLNIE : 61
YafQ_rh1473 : -----MQR--QAHVKLASLHDHALKGA--HSGERALHIAP---DWLLVYKVDAAELILMLLATGTHRDTLNIE : 61

```

b

```

                                     *           20           *           40           *           60           *           80           *
DinJ_E.coli : ---MAANAFVRRARIDEDLKNQAADVLAGMGLTISDLVRIITLTKVAREKALPFDLREPQLTIQSIKNSSEAGIDVHKAKDADDLFDKLG I---- : 86
DinJ_L.pa4366 : MAATKKETRLNIRVDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFMTKMKVDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPPELLKKYSTPDDMWRDLNV---- : 89
DinJ_L.pa2333 : MAATKKETRLNIRVDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFMTKMKVDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPPELLKKYSTPDDMWRDLNV---- : 89
DinJ_L.pa4186 : MAATKKETRLNIRVDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFMTKMKVDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPPELLKKYSTPDDMWRDLNV---- : 89
DinJ_L.pa4341 : MAATKKETRLNIRVDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFMTKMKVDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPPELLKKYSTPDDMWRDLNV---- : 89
DinJ_L.ca2306 : MAATKKETRLNIRVDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFMTKMKVDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPPELLKKYSTPDDMWRDLNV---- : 89
DinJ_L.ca4340 : MAATKKETRLNIRVDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFMTKMKVDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPPELLKKYSTPDDMWRDLNV---- : 89
DinJ_L.ca2203 : MAATKKETRLNIRVDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFMTKMKVDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPPELLKKYSTPDDMWRDLNV---- : 89
DinJ_L.rh2360 : ---METKSRI SVRIDTKTKERALHVLNSMGLDMSAINMYLKRIGDTGELPFTPEMSFADQLQAAEADV KAGRTKSFKTVDALMKDLYSDVDD : 90
DinJ_L.rh1019 : ---MTKKSRI SVRIDTKTKERALHVLNSMGLDISAINMYLKRIGDTGALPFTPEMSFVDQLQVAEADV KAGRIKSFKTVDALMKDLYSDVDD : 90
DinJ_L.rh1473 : ---MAKESHIRNWIINTITKKRALHVLNRLGLERFSAINMYSKRIGDTGALPFTPEMSFADQLRFAEADV KAGRIKSFKTVGALMKDLYSDVDD : 90

```

Figura 1.13. (a) Allineamento delle sequenze di YafQ dei diversi ceppi del genere *Lacticaseibacillus* analizzati con la proteina omologa di *E. coli* (UniProt Q47149): i residui catalitici di *E. coli* (H50 - D61 - H63 - D67 - H87, indicati sopra all'allineamento) sono altamente conservati (evidenziati in azzurro), i residui non conservati sono evidenziati in rosso. **(b)** Allineamento delle sequenze di DinJ degli stessi ceppi di *Lacticaseibacillus* riportati in a con la proteina omologa di *E. coli* (UniProt Q47150).

Usando le coordinate strutturali di YafQ di *E. coli* (PDB ID 4ML2) come templatò, è stato creato il modello strutturale di YafQ di *L. paracasei* 4366 (YafQ_pa4366) (vedi figura 1.14): le posizioni dei tre residui catalitici della tossina di *E. coli* sono conservate.

È stato creato il modello strutturale di YafQ di *L. rhamnosus* 2360 (YafQ_rh2360) (vedi figura 1.14), che presenta la sostituzione del residuo catalitico D67 di *E. coli* con una A (D59A); la regione N-terminale mancante nella variante tronca di YafQ_rh2360, presente in *L. rhamnosus* 1473 (YafQ_rh1473), corrisponde alle α -eliche 1 e 2 che interagiscono con l'antitossina DinJ e con l'rRNA 16S ed è evidenziata in rosso nella figura 1.15; la sostituzione D59A potrebbe essere associata ad una riduzione dell'attività catalitica, che potrebbe aver reso possibile la fissazione della delezione N-terminale nel ceppo *L. rhamnosus* 1473, con la compromissione dell'azione neutralizzante esercitata da DinJ senza però compromettere la capacità di crescita della cellula, nel caso in cui la delezione delle α -eliche 1 e 2 non avesse compromesso la funzionalità della tossina.

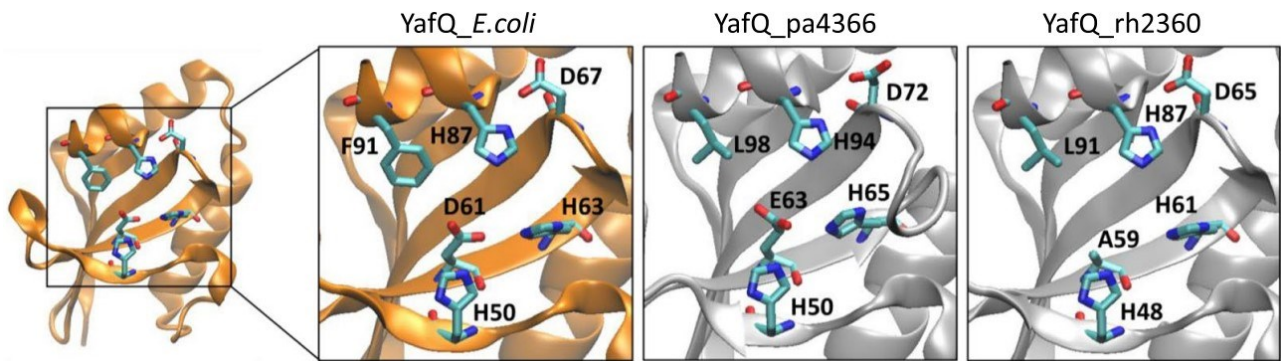


Figura 1.14. Rappresentazione del sito attivo di YafQ di *E. coli* e confronto con i modelli strutturali di YafQ di *L. paracasei* 4366 e *L. rhamnosus* 2360 (adattato da Rif. 80).

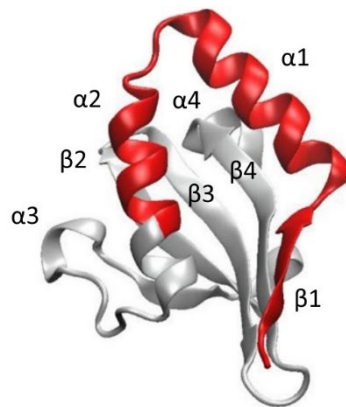


Figura 1.15. Modello strutturale di YafQ di *L. rhamnosus* 2360, dove la regione N-terminale deleta nella variante omologa di *L. rhamnosus* 1473 è evidenziata in rosso (adattato da Rif. 80)

1. 6. Tipi di stress a cui i batteri del genere *Lacticaseibacillus* sono sottoposti

Numerosi ceppi di batteri del genere *Lacticaseibacillus* sono utilizzati come probiotici, come colture starter impiegate nell'industria lattiero-casearia per la fermentazione del latte e come colture addizionali per l'accelerazione della produzione e intensificazione degli aromi dei latticini⁸⁹: questi batteri devono fare fronte a diversi tipi di stress nel corso del processo produttivo e durante il percorso per raggiungere il tratto gastrointestinale: ad esempio il pH acido, lo stress osmotico, lo stress termico sotto forma di alte temperature, le basse temperature associate alla conservazione dei prodotti, lo stress ossidativo e i sali biliari. La capacità di far fronte a determinati stress e la varietà di stress tollerati sono variabili per ogni ceppo.

Stress acido

I batteri del genere *Lacticaseibacillus* sono acido-tolleranti, in quanto si sono evoluti in presenza di condizioni ricorrenti di basso pH da essi stessi generato mediante la fermentazione lattica; essi sono eterofermentanti facoltativi, in quanto possono fare la fermentazione omolattica, producendo solo acido lattico come prodotto principale della fermentazione degli zuccheri esosi, principalmente del glucosio, mediante la via glicolitica, o di Embden-Meyerhof, oppure possono fare la fermentazione eterolattica, producendo acido lattico, etanolo o acido acetico e CO₂ mediante la via dei pentoso fosfati, o di Warburg-Dickens, ad opera di una pentoso fosfochetolasi inducibile. Le strategie messe in atto da questi microrganismi per contrastare il pH acido dell'ambiente, come nel tratto gastrointestinale, oppure durante i processi industriali, includono:

- la deaminazione degli amminoacidi e l'espulsione nell'ambiente extracellulare dei gruppi amminici, che neutralizzano gli acidi^{90, 91} (ad esempio il *pathway* dell'arginina deiminasi, che prevede la degradazione dell'arginina a ornitina, NH₃ e CO₂, generando ATP da ADP e fosfato⁹²);
- la pompa protonica F₀F₁ (ATP-sintasi): un enzima che produce ATP utilizzando i protoni, oppure pompa i protoni all'esterno consumando ATP⁹³;
- l'alterazione della membrana cellulare mediante una maggiore sintesi di peptidoglicano, aumentando l'espressione delle proteine MurA e MurG⁹⁴;
- la riparazione del DNA e delle proteine: in presenza di danni al DNA si verifica una sovraregolazione delle proteine di riparo dei danni al DNA (riparazione per escissione dei nucleotidi, riparazione per escissione delle basi, riparo dei mismatch e ricombinazione omologa, mentre la destabilizzazione della struttura delle proteine comporta una sovraregolazione di proteine della

risposta generale allo stress e proteine chaperone per ripristinare il corretto *folding* proteico e prevenirne le alterazioni strutturali ^{94, 95, 96}.

Stress termico da basse temperature

I batteri del genere *Lacticaseibacillus* possono subire la refrigerazione per la conservazione dei prodotti di cui fanno parte: la riduzione della temperatura modifica la fluidità della membrana cellulare, la diffusione delle molecole, l'interazione delle proteine e degli acidi nucleici, aumenta il superavvolgimento negativo del DNA interferendo con la trascrizione; i batteri contrastano queste alterazioni aumentando l'espressione e l'attività delle proteine indotte dal freddo (tra cui CspA), che promuovono l'aumento della fluidità della membrana, con la modificazione della composizione dei lipidi transmembrana (aumenta la quantità di lipidi insaturi e a catena corta) e riducono il superavvolgimento negativo del DNA ⁹⁷.

Stress termico da alte temperature

Significativi incrementi della temperatura danneggiano le cellule innescando la denaturazione delle proteine e degli acidi nucleici: i batteri del genere *Lacticaseibacillus* aumentano l'espressione delle HSP (*Heat Shock Proteins*), che sono dei *chaperone* molecolari che promuovono il corretto *folding* delle proteine. La tolleranza alle alte temperature è risultata essere favorita dalla sovraespressione di DnaK, GroEL, ClpB, and GrpE ⁹⁸.

Stress ossidativo

In condizioni aerobiche, i batteri del genere *Lacticaseibacillus* utilizzano l'O₂ per produrre energia, con l'intervento di enzimi quali la piruvato ossidasi, NADH ossidasi e NADH perossidasi, che contribuiscono alla formazione delle specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) ^{99, 100}, rappresentate dall'anione superossido (O₂⁻), dal perossido di idrogeno (H₂O₂) e dal radicale idrossile (HO^{*}), determinanti lo stress ossidativo, e danneggiano le proteine, i lipidi e gli acidi nucleici. La catalasi interviene nella degradazione di H₂O₂, è assente la superossido dismutasi, tuttavia questi batteri lattici accumulano elevate concentrazioni intracellulari di Mn, coinvolto nella detossificazione non enzimatica dai radicali superossido ⁹³.

Stress osmotico

I batteri del genere *Lacticaseibacillus* si trovano spesso a dover affrontare la presenza di elevate concentrazioni saline nei cibi fermentati, infatti questi batteri tollerano meglio la presenza di NaCl rispetto ai batteri patogeni e a quelli responsabili del deterioramento degli alimenti, per cui vengono aggiunte elevate concentrazioni di NaCl nella coltura starter per promuovere la crescita selettiva dei ceppi voluti ⁹¹. Elevate concentrazioni saline determinano alterazioni nella parete cellulare e promuovono la formazione di biofilm ¹⁰¹.

Stress da acidi biliari

I batteri del genere *Lacticaseibacillus* che transitano nell'intestino vengono a contatto con gli acidi biliari, secreti dall'ospite per promuovere la digestione, i quali hanno anche un'azione antimicrobica in quanto danneggiano la membrana, il DNA, l'RNA e destabilizzano la struttura delle proteine ^{97, 90}. La tolleranza di questi batteri alla bile coinvolge l'intervento di proteine che comprendono RmlC, coinvolta nella modificazione della membrana, delle proteine della sintesi della parete cellulare NagA e NagB, della proteina chaperone ClpP e dell'idrolasi dei sali biliari (*Bile Salt Hydrolase*, BSH) ¹⁰².

1.7. Espressione di DinJ-YafQ in risposta a stress di varia natura nelle specie L. casei, L. paracasei e L. rhamnosus

È stata studiata l'espressione di DinJ-YafQ e i suoi effetti sulla colturabilità in tre specie di *Lacticaseibacillus* (*L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*) in risposta ai diversi stress caratteristici dei processi industriali a cui i batteri lattici di interesse vengono sottoposti, in particolare nel contesto dell'industria lattiero-casearia (carenza di nutrienti, pH basso, alta concentrazione salina, stress ossidativo e alte temperature) ¹⁰³: i risultati dello studio sono rappresentati nelle figure 1.17 a e b. L'unico stress che attiva efficientemente il sistema DinJ-YafQ nelle specie studiate, sotto forma di una significativa sovraregolazione dell'operone tale da ridurre la colturabilità delle cellule, è risultato essere lo stress termico da alte temperature, osservabile attraverso la degradazione dell'rRNA 16S, come mostrato nella figura 1.16, *lanes* 8, 9 e 10; questo risultato è in contrasto con il sistema omologo di *E. coli*, dove la riduzione termica risulta essere lo stress che attiva più significativamente il sistema DinJ-YafQ ¹⁰⁴.

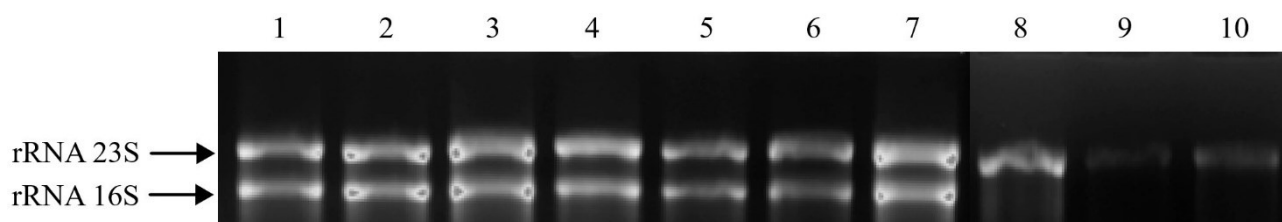
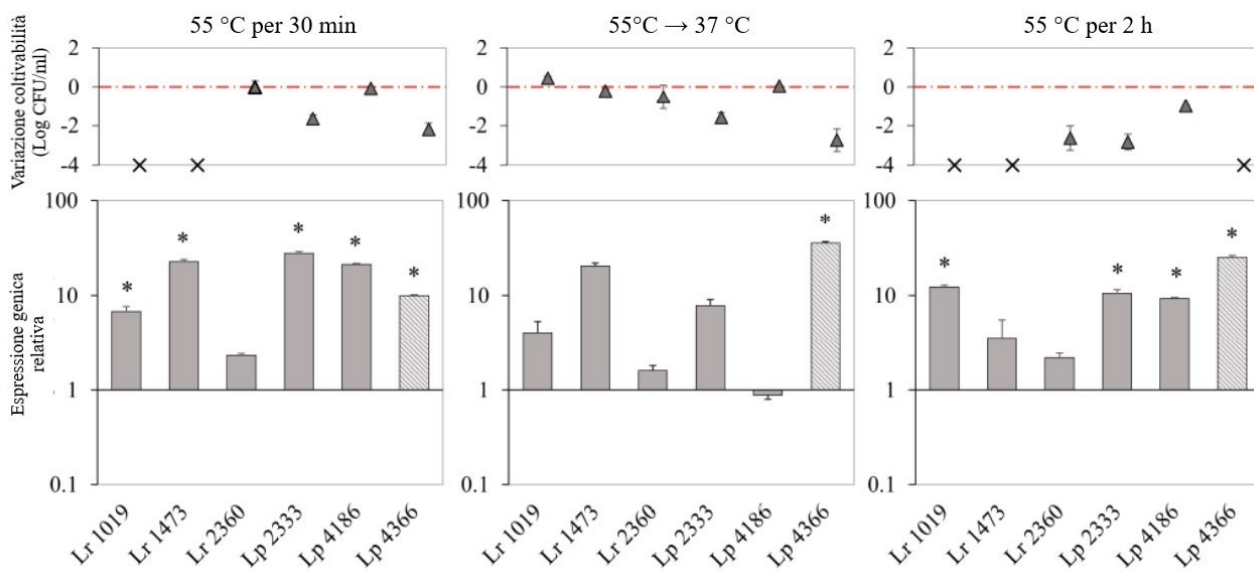


Figura 1.16. Elettroforesi su gel di agarosio in condizioni denaturanti dell'RNA totale estratto da *L. paracasei* 4366 in seguito a specifici stress: 1) controllo negativo; 2) carenza di nutrienti; 3) pH acido; 4) stress osmotico; 5) stress ossidativo; 6) ampicillina; 7) kanamicina; 8) stress termico 30 min; 9) alleviamento dello stress termico; 10) stress termico 2 h. Le frecce indicano l'rRNA 23S e l'rRNA 16S. Gli RNA estratti nelle diverse condizioni di stress si presentano integri, ad eccezione dell'RNA estratto da cellule sottoposte a stress termico (*lanes* 8, 9 e 10) (adattato da Rif. 103).

Effetti dello stress termico sulla coltivabilità delle cellule e sull'espressione di DinJ-YafQ (vedi figura 1.17.a):

- incubazione a 55 °C per 30 minuti: in tutti i ceppi è stata osservata una sovraregolazione del sistema, soprattutto in *L. paracasei* 2333; la coltivabilità è stata notevolmente ridotta in *L. rhamnosus* 1019 e 1473, mentre si è osservata una lieve riduzione in *L. paracasei* 2333 e 4366;
- sollievo dallo stress termico mediante trasferimento a 37 °C per 90 minuti: si è osservata una riduzione dell'espressione di DinJ-YafQ in tutti i ceppi ad eccezione di *L. paracasei* 4366, nel quale l'espressione è aumentata ulteriormente; la coltivabilità è rimasta inalterata rispetto allo stress precedente (55 °C per 30 minuti), ad eccezione dei ceppi di *L. rhamnosus* 1019 e 1473, che hanno ripristinato la normale coltivabilità;
- incubazione a 55 °C per 2 ore: l'espressione del sistema non ha mostrato variazioni rispetto a quanto osservato nel caso dell'incubazione a 55 °C per 30 minuti; in tutti i ceppi si è osservata una riduzione della coltivabilità.

a



b

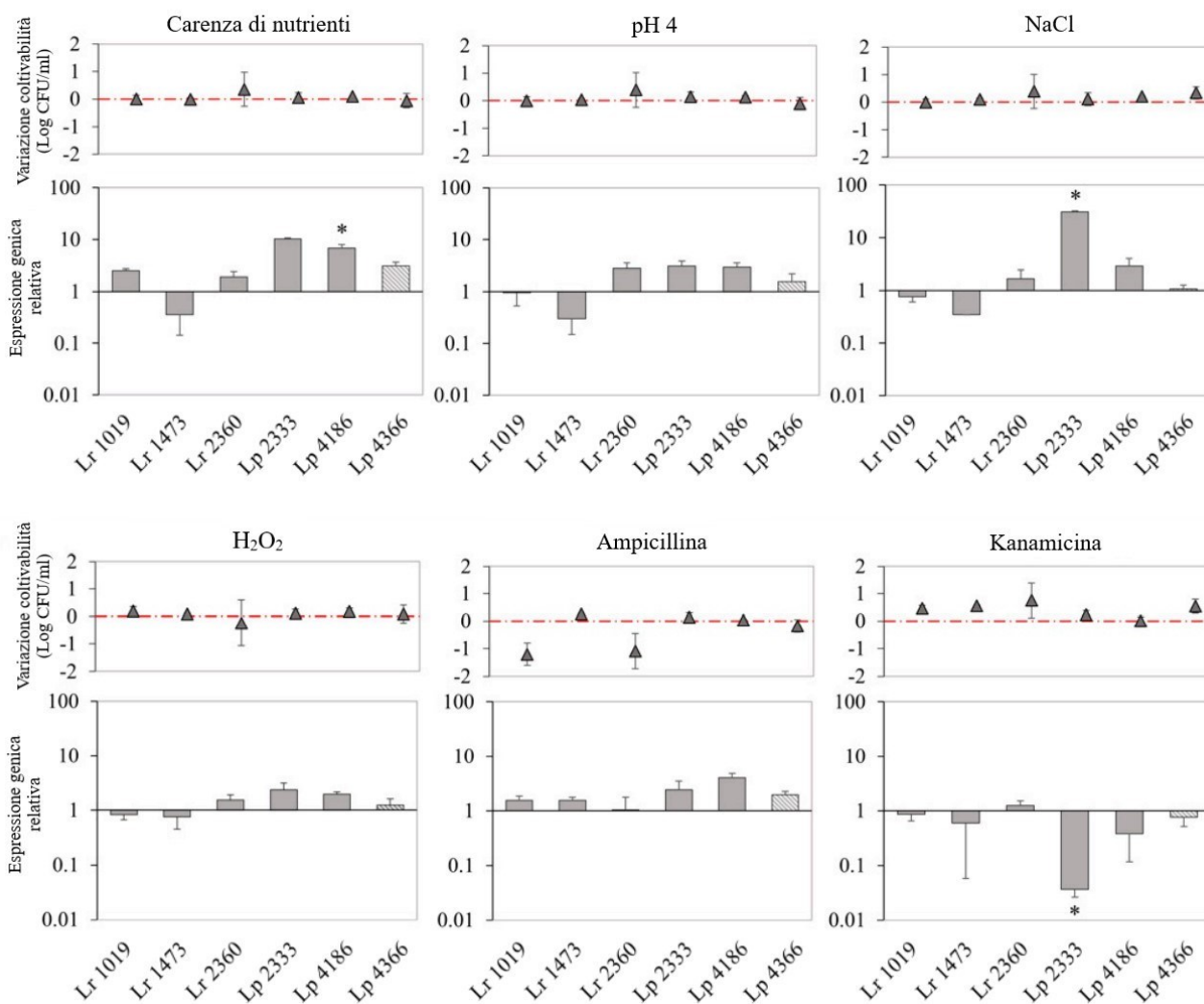


Figura 1.17. Espressione relativa di DinJ-YafQ (riquadri in basso) e variazione della coltivabilità cellulare (riquadri in alto) nei diversi ceppi di *L. paracasei* (4366, 2333, 4186) e di *L. rhamnosus* (2360, 1019, 1473) in seguito all'esposizione agli specifici stress a cui i ceppi analizzati sono solitamente sottoposti: l'espressione relativa è indicata come multiplo del valore misurato nelle stesse condizioni per il gene di riferimento codificante per l'rRNA 16S, ad eccezione di *L. paracasei* per cui è stato scelto come gene di riferimento quello codificante per GyrB a causa dell'estesa degradazione dell'rRNA in risposta allo stress termico per questo ceppo. La variazione della coltivabilità è riportata come differenza rispetto al controllo negativo (linea tratteggiata rossa). **a)** Effetti dello stress termico da elevate temperature (55 °C) per 30 minuti (a sinistra), sollievo dallo stress termico mediante trasferimento delle colture batteriche da 55 °C a 37 °C (in centro) e mantenimento delle cellule ad elevate temperature per un intervallo di tempo prolungato di 2 ore (a destra): è evidente che l'innalzamento termico aumenti l'espressione di *dinJ-yafQ* e riduca la crescita cellulare. **b)** Effetti degli stress di natura diversa dallo stress termico (carenza di nutrienti, ambiente acido, elevate concentrazioni saline, stress ossidativo e presenza di antibiotici, in particolare kanamicina e ampicillina): non si osservano variazioni nella crescita cellulare correlate a variazioni dell'espressione di *dinJ-yafQ* (adattato da Rif. 80).

Il medesimo studio ha individuato che nel ceppo 2360 di *L. rhamnosus*, avente una sequenza amminoacidica di YafQ conservata ad eccezione dell'Asp 61 di *E. coli*, che in *L. paracasei* 4366 è sostituito da Glu, un amminoacido con proprietà simili, è sostituito da un residuo di Ala: lo stress termico determina una blanda sovraregolazione del sistema, tuttavia la coltivabilità delle cellule è rimasta inalterata, contribuendo a sostenere l'ipotesi della riduzione dell'attività catalitica di YafQ_{rh2360}, che rappresenta un dato a sostegno di un meccanismo catalitico di YafQ di *Lacticaseibacillus paracasei* 4366 analogo a quello della tossina omologa di *E. coli*.

In *L. paracasei* 4366 è stata osservata un'efficace sovraregolazione del sistema *dinJ-yafQ* associata a una riduzione della crescita in presenza di un rialzo termico (figura 1.17.a), la correlazione tra la tossicità di YafQ in questo ceppo e la riduzione della crescita è supportata dalla conservazione dei residui che in *E. coli* hanno un ruolo catalitico (figura 1.13.a). È interessante notare la sovraregolazione di *dinJ-yafQ* anche in risposta ad uno stress diverso da quello termico, ossia lo stress osmotico, nel ceppo 2333 di *L. paracasei* (figura 1.17.b, NaCl come fonte di stress), anche se in questo caso non si osservano alterazioni nella crescita cellulare, ma ciò può essere correlato con la sostituzione D72G: questo dato racchiude il fatto che la tipologia di stress che attiva un determinato sistema TA è ceppo-specifica.

La variabilità della tipologia di stress attivanti uno stesso sistema TA tra ceppi diversi e ancora più tra specie diverse è evidente anche considerando che in *E. coli* il sistema *dinJ-yafQ* viene attivato in risposta allo stress termico sotto forma di basse temperature¹⁰⁴.

L'allineamento delle sequenze amminoacidiche di DinJ e YafQ dei ceppi di *Lactocaseibacillus* studiati ha rivelato la presenza di una tossina mutata con possibile perdita della funzione (proteina tronca all'N-terminale YafQ_rh1019 con sostituzione di due putativi residui catalitici, D61A e H63A, vedi figura 1.13.a) in concomitanza ad un'antitossina avente una sequenza amminoacidica conservata e, quindi, funzionante: questa osservazione suggerisce la possibilità del coinvolgimento di DinJ nella regolazione trascrizionale di altri geni oppure nell'interazione con proteine diverse da YafQ, infatti sono stati dimostrati casi di *crossstalk* tra tossine e antitossine appartenenti a famiglie diverse e casi di antitossine del sistema di tipo II che reprimono la trascrizione di altri geni oltre al proprio operone.

1.8. Saggi della tossicità di YafQ di L. paracasei in vivo

Sono stati fatti saggi della tossicità in vivo delle due varianti di YafQ di *L. paracasei* 4366 e 2333, che differiscono per l'amminoacido in posizione 72, ossia Asp e Gly rispettivamente, corrispondenti nell'omologo di *E. coli* ad un residuo di Asp catalitico (D67), mediante l'analisi della crescita di cellule di *E. coli* C41 (DE3) pLysS trasformate con il plasmide inducibile da lattosio pET11 in cui è stata clonata la sequenza di YafQ.

In seguito all'induzione con IPTG 1 mM, YafQ_pa4366 ha determinato una significativa inibizione della crescita cellulare (vedi figura 1.18.a), mentre le cellule trasformate con YafQ_pa2333 non hanno mostrato alcuna significativa riduzione della crescita (vedi figura 1.18.b).

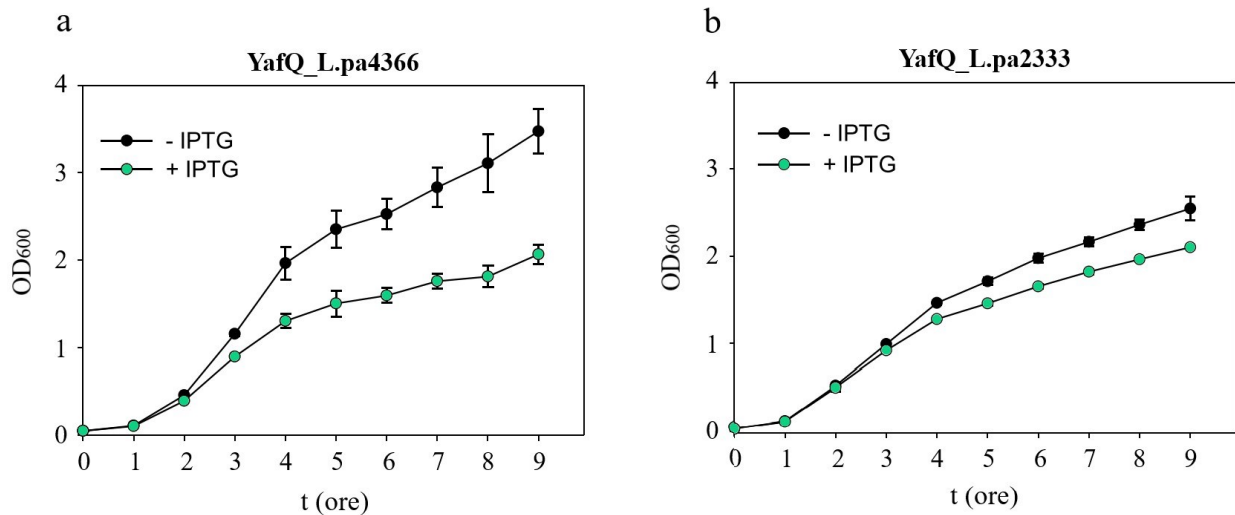


Figura 1.18. Saggi in vivo della tossicità di YafQ di *L. paracasei* 4366 **(a)** e di *L. paracasei* 2333 **(b)**. L'induzione dell'espressione di YafQ_{pa4366} è associata all'inibizione della crescita cellulare, mentre l'espressione di YafQ_{pa2333} non ha effetti significativi sulla crescita (adattato da Rif. 80).

Saggi in vivo dell'attività ribonucleasica mediante la colorazione con la tioflavina T, un colorante fluorescente che colora l'RNA totale cellulare, hanno dimostrato che YafQ_{pa4366} ha attività RNAsica (vedi figura 1.19.a), mentre YafQ_{pa2333} ha mostrato una attività RNAsica trascurabile (vedi figura 1.19.b).

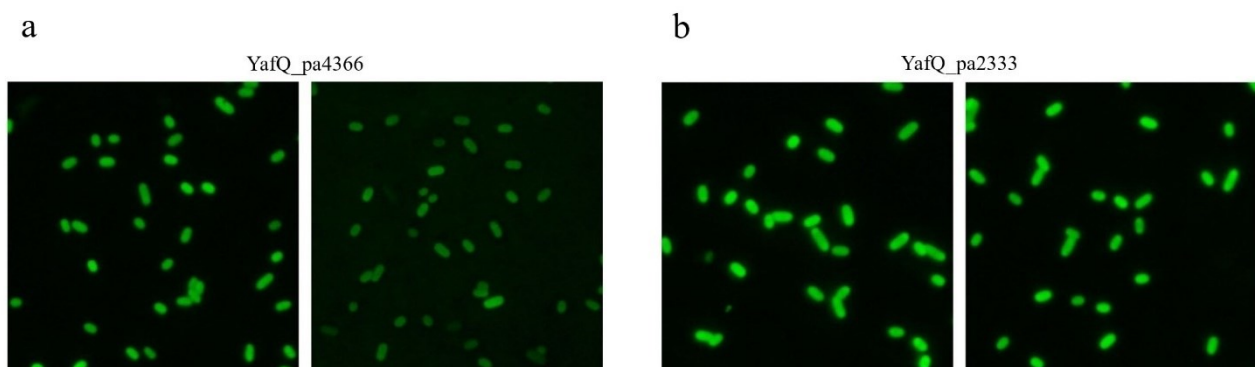


Figura 1.19. Immagini di microscopia a fluorescenza di cellule di *E. coli* C41 (DE3) pLysS in cui è stata indotta l'espressione di YafQ_{pa4366} **(a)** e di YafQ_{pa2333} **(b)**, colorate con la tioflavina T prima (sinistra) e dopo (destra) l'incubazione di 20 ore (adattato da Rif. 80).

È stato verificato mediante microscopia a fluorescenza se la tossicità di YafQ non comportasse alterazioni dell'integrità della membrana di cellule di *E. coli* C41 (DE3) pLysS, in cui è stata indotta l'espressione di YafQ_{pa4366} con IPTG, mediante colorazione con i coloranti fluorescenti 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI), permeabile alla membrana e conferisce una colorazione blu a tutte le cellule, e bromuro di etidio (EtBr), impermeabile alla membrana e conferisce una colorazione rossa solo alle cellule che hanno riportato danni alla membrana. Le immagini delle cellule sono state acquisite dopo 3, 6 e 9 ore di incubazione con IPTG + DAPI + EtBr e hanno mostrato in tutti i casi solo ed esclusivamente la fluorescenza blu di DAPI, dimostrando che la tossicità di YafQ non comporta danni alla membrana cellulare (vedi figura 1.20).

Induzione dell'espressione di YafQ_{pa4366} con IPTG

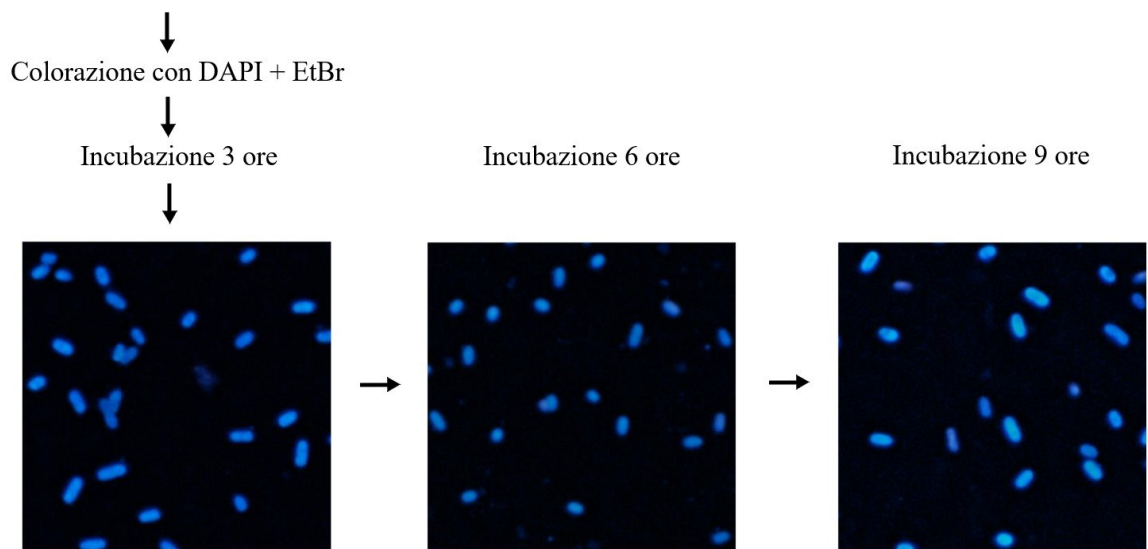


Figura 1.20. Microscopia a fluorescenza di cellule di *E. coli* C41 (DE3) pLysS in cui è stata indotta l'espressione di YafQ_{pa4366}, incubate con IPTG e i coloranti fluorescenti DAPI e EtBr per 3, 6 e 9 ore. Le cellule presentano solo la colorazione con DAPI, è assente il segnale della fluorescenza di EtBr, dimostrando che YafQ non provoca danni alla membrana cellulare (adattato da Rif. 80).

Questi risultati supportano l'ipotesi che YafQ di *L. paracasei* 4366 abbia una tossicità mediata dall'attività ribonucleasica, in assenza di compromissione dell'integrità della membrana, e che questa attività sia correlata con un rallentamento della crescita.

La variante del ceppo 2333 di *L. paracasei* presenta una riduzione dell'attività RNAsica, che conferma quanto suggerito dall'evidenza della sostituzione D72G visibile nell'allineamento delle sequenze amminoacidiche e suggerisce un meccanismo catalitico analogo a YafQ di *E. coli*.

Per verificare il ruolo di DinJ rispetto a YafQ, sono stati condotti saggi di crescita e dell'attività ribonucleasica in vivo in cellule di *E. coli* C41 (DE3) pLysS cotrasformate con plasmidi inducibili da lattosio in cui sono stati clonati i geni codificanti per YafQ_{pa4366} e DinJ di *L. paracasei* 4366. La sequenza amminoacidica di DinJ è identica nei ceppi di *L. paracasei* 4366 e 2333.

I saggi di crescita e i saggi in vivo dell'attività ribonucleasica di cellule in cui è stata indotta la coespressione di DinJ e YafQ_{pa4366} hanno mostrato che DinJ è in grado di neutralizzare la tossicità di YafQ: la coespressione di DinJ e YafQ risulta nel ripristino della crescita cellulare (figura 1.21.a) e nell'assenza di degradazione dell'RNA (figura 1.21.b)

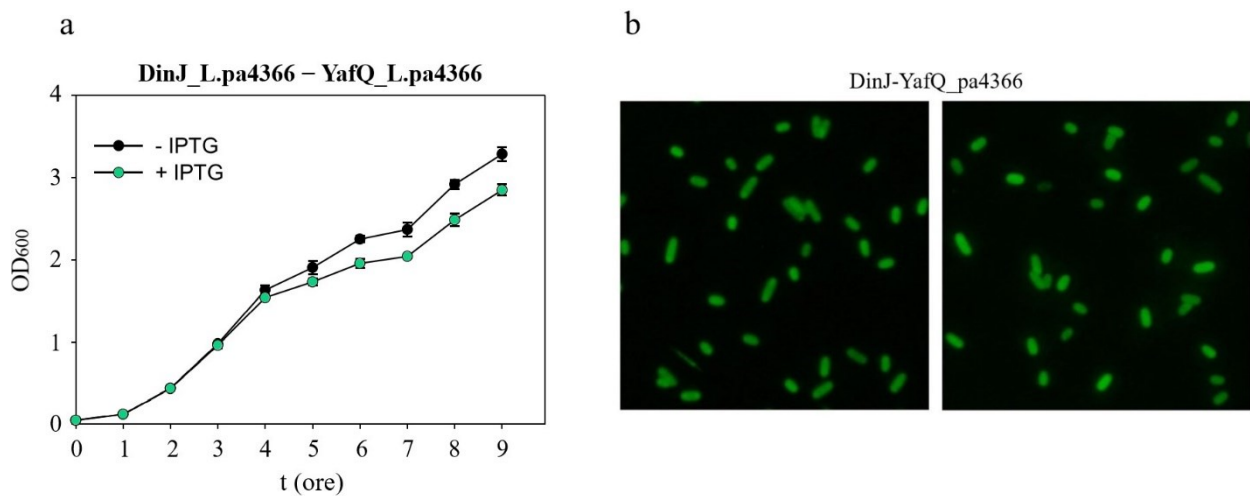


Figura 1.21. a) Saggi in vivo della tossicità di YafQ di *L. paracasei* 4366 in presenza di DinJ. **b)** Immagini di microscopia a fluorescenza di cellule di *E. coli* C41 (DE3) pLysS in cui è stata indotta la coespressione di DinJ e YafQ_{pa4366}, colorate con la tioflavina T prima (sinistra) e dopo (destra) l'incubazione di 20 ore (adattato da Rif. 80). DinJ annulla l'inibizione della crescita cellulare e la degradazione dell'RNA associate a YafQ.

2. Scopo del lavoro

Dai grafici nelle figure 1.17.a e 1.17.b è possibile apprezzare la significatività delle conseguenze dell'innalzamento termico sulla riduzione della crescita cellulare, la correlazione di questo effetto con la sovraespressione di DinJ-YafQ e, confrontando questi risultati con la degradazione dell'rRNA 16S nella figura 1.16, lanes 8, 9 e 10, la tossicità del sistema *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* 4366 sotto forma di degradazione dell'RNA. Le analisi preliminari sui sistemi TA nel genere *Lacticaseibacillus*^{80, 103} suggeriscono un ruolo di YafQ come ribonucleasi, la cui attività è osservabile soprattutto in *Lacticaseibacillus paracasei* in un contesto di stress termico da alte temperature e questa osservazione è compatibile con l'instabilità di DinJ, che si suppone che abbia un'azione di neutralizzazione su YafQ, come emerge dalle informazioni ricavate dall'analisi di omologia.

Si è deciso di estendere la comprensione del sistema *dinJ-yafQ* nel genere *Lacticaseibacillus* mediante ulteriori caratterizzazioni, prendendo come modello di studio il sistema di *L. paracasei* 4366, la cui sequenza amminoacidica relativa alla tossina presenta la conservazione degli amminoacidi catalitici, come evidenziato dall'allineamento con la proteina omologa di *E. coli* nella figura 1.13.a, e risulta essere coinvolta nel rallentamento della crescita cellulare nel caso in cui la temperatura subisca un sensibile rialzo. La caratterizzazione di *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* 4366 verrà arricchita dall'integrazione con le informazioni fornite dallo studio del sistema omologo del ceppo 2333 di *L. paracasei*, caratterizzato da una sostituzione di un residuo predetto di avere un ruolo catalitico in YafQ di questa specie (D72G), l'ipotesi di tale ruolo è rinforzata dai saggi dell'attività ribonucleasica in vivo, riportati nella figura 1.19, che rivelano una riduzione dell'attività catalitica di YafQ in presenza di una Gly al posto dell'Asp in posizione 72.

Considerando le seguenti informazioni disponibili per il sistema *dinJ-yafQ* di *L. paracasei*:

- la conservazione dei residui catalitici dell'omologo di YafQ di *E. coli*, già caratterizzato, visibili dall'allineamento delle sequenze amminoacidiche (figura 1.13.a);
- la disposizione dei putativi residui catalitici nel modello strutturale di YafQ di *L. paracasei* 4366 analoga a quella presente nel sito catalitico della tossina omologa di *E. coli* (figura 1.14);
- l'assenza di danni alla membrana cellulare (figura 1.20), a differenza di quanto accade tipicamente in un sistema TA di tipo I;
- la tossicità di YafQ rilevabile dalla degradazione dell'RNA (figura 1.19.a) e dalla riduzione della crescita cellulare (figura 1.18.a), con riduzione di questi effetti nel caso della sostituzione dell'Asp 72 con la Gly (figure 1.19.b e 1.18.b);

- la presenza della corrispondente antitossina *dinJ* a monte della ORF di YafQ, avente una sequenza amminoacidica conservata nell'allineamento con l'antitossina omologa caratterizzata di *E. coli* (figura 1.13 b) e la neutralizzazione della tossicità di YafQ associata alla coespressione con DinJ (figura 1.21 a e b);

si ipotizza che sistema *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* sia un sistema tossina-antitossina di tipo II che interviene nella risposta adattativa allo stress, promuovendo la sopravvivenza del batterio in seguito all'innalzamento della temperatura.

Per confermare le ipotesi ricavate dagli studi sopra riportati e completare la caratterizzazione di DinJ-YafQ come sistema importante nella sopravvivenza dei batteri lattici di interesse industriale, sono stati messi a punto studi sia in vitro che in vivo.

Per testare in vitro la capacità di YafQ di tagliare l'RNA, si faranno i saggi dell'attività ribonucleasica sull'RNA totale estratto da *L. paracasei*: per poter purificare la tossina sarà necessario purificare innanzitutto il complesso tossina-antitossina, in quanto la coespressione dell'antitossina è essenziale per la crescita delle cellule in cui è indotta l'espressione della tossina, dopodichè sarà possibile ottenere la tossina dalla dissociazione del complesso mediante denaturazione e, infine, dopo aver eseguito il *refolding* della tossina mediante rimozione dell'agente denaturante, si disporrà della tossina purificata; verranno confrontati i comportamenti delle due varianti di YafQ, ossia quella del ceppo 4366, i cui predetti residui catalitici sono conservati nell'allineamento con la tossina omologa di *E. coli*, la cui attività RNAsica è ben nota, e quella del ceppo 2333 di *L. paracasei*, in cui una Gly sostituisce un Asp con un predetto ruolo catalitico nel ceppo 4366 (D72G).

Per verificare in vitro l'azione neutralizzante che l'antitossina DinJ esercita su YafQ, si faranno i saggi dell'attività ribonucleasica in presenza del complesso DinJ-YafQ sia del ceppo 4366 che 2333 di *L. paracasei*.

Si procederà con l'analisi degli stati oligomerici di DinJ, di YafQ e del complesso DinJ-YafQ, per comprendere la stechiometria con cui queste proteine interagiscono, mediante *crosslinking* con glutaraldeide, integrando le informazioni con le osservazioni ricavate dalla cromatografia ad esclusione dimensionale, che fornisce indicazioni sul peso molecolare con cui le specie si presentano

in soluzione, da cui si può ricavare il numero di monomeri coinvolti nell'interazione conoscendo il peso molecolare delle singole proteine.

Per indagare il ruolo di DinJ come repressore trascrizionale del proprio operone:

- si verificherà in vitro la sua capacità di legare una sequenza palindromica posta sul promotore che si suppone essere il sito di legame dell'antitossina, mediante il saggio del ritardo della mobilità elettroforetica (EMSA), sia con DinJ che con il complesso DinJ-YafQ e, dal confronto della capacità di DinJ di legare il DNA in presenza e in assenza di YafQ, si potrà capire se il legame di YafQ alteri l'affinità di DinJ al DNA;
- se venisse confermata la capacità di DinJ di legare il proprio promotore allora si potrà procedere con l'analisi in vitro della competizione con la RNA polimerasi per il legame al promotore mediante l'EMSA di competizione, per verificare la correlazione tra il legame di DinJ al promotore e la repressione trascrizionale;
- si potranno eseguire studi di mutagenesi volti all'identificazione dei residui di DinJ essenziali per il legame al DNA;
- si potrà verificare la repressione trascrizionale in vivo utilizzando un sistema reporter costituito dalla ORF della GFP posta sotto il controllo del promotore dell'operone *dinJ-yafQ*, in un sistema ricombinante inducibile composto da DinJ, in presenza e in assenza di YafQ per verificare se l'interazione con la tossina alteri la regolazione trascrizionale mediata da DinJ in vivo;
- si potrà verificare il legame di DinJ al proprio promotore mediante microscopia a forza atomica, con la possibilità di ricavare ulteriori informazioni relative agli stati oligomerici del complesso DinJ-YafQ ed eventuali variazioni nella capacità di formare oligomeri in seguito all'interazione con il DNA.

3. Materiali e Metodi

3.1. Clonaggio genico e mutagenesi per la sovraespressione di proteine ricombinanti wild type e mutanti

Le sequenze codificanti per YafQ di *L. paracasei* 4366 e 2333 sono state amplificate dal DNA totale estratto dai rispettivi ceppi batterici ¹⁰³, i quali sono stati isolati da prodotti lattiero-caseari e appartengono alla collezione microbica di Ateneo dell'università di Parma (UPCC, University of Parma Culture Collection). DinJ ha la medesima sequenza amminoacidica nei ceppi 4366 e 2333 e la sequenza codificante è stata amplificata dal DNA totale estratto da *L. paracasei* 4366.

Le sequenze amplificate sono state clonate nel vettore pGEM-T easy vector (Promega), successivamente sono state clonate nei siti di restrizione NdeI/BamHI nei vettori di espressione inducibili da lattosio pET28b o pET11b, per ottenere le proteine ricombinanti rispettivamente con o senza His-tag associato al sito di taglio della trombina all'N-terminale.

La sequenza mutata di dinJ R13A è stata ottenuta mediante mutagenesi sito-specifica usando come template il plasmide pET28b-*dinJ*, la DNA polimerasi ad alta fedeltà Pfu Ultra II Fusion HS (Stratagene) e i primers mutagenici, dopodiché il DNA amplificato è stato digerito con l'enzima DpnI (New England Biolabs) per eliminare il DNA template parentale e infine è stato usato per trasformare il ceppo XL1-Blue di *E. coli*.

Le sequenze clonate sono state verificate mediante sequenziamento.

Per produrre DinJ, *wild type* o mutante R13A, le cellule di *E. coli* BL21 (DE3) sono state trasformate con il plasmide pET28b-*dinJ* o pET28b-*dinJ* R13A, rispettivamente.

La coespressione con l'antitossina DinJ è necessaria per la produzione della tossina YafQ, in quanto bisogna neutralizzarne la tossicità per permettere la crescita batterica con buone rese nella produzione della proteina di interesse: le cellule di *E. coli* BL21 (DE3) sono state trasformate con pET11b-*dinJ* e pET28b-*yafQ*_pa4366 o pET28b-*yafQ*_pa2333.

Per ottenere il complesso DinJ-YafQ, le cellule di *E. coli* BL21 (DE3) sono state cotrasformate con pET28b-*dinJ* o pET28b-*dinJ* R13A e pET11b-*yafQ*_pa4366 o pET11b-*yafQ*_pa2333.

3.2. Clonaggio, amplificazione e mutagenesi dei frammenti di DNA per gli EMSA

La sequenza contenente il promotore di *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* 4366 è stata ottenuta mediante PCR dal genoma del medesimo ceppo utilizzando gli specifici primers che hanno amplificato una regione di 1051 bp contenente l'operone *dinJ-yafQ* utilizzando i primers Prom_pa4366_Fw e Prom_pa4366_Rev, dopodichè la sequenza amplificata è stata clonata nel vettore pNEB193 in modo non direzionato usando l'enzima di restrizione SmaI.

Il frammento di DNA di 194 bp utilizzato negli EMSA, contenente la regione del promotore dell'operone *dinJ-yafQ*, è stato ottenuto per amplificazione mediante PCR in condizioni standard di un templatato costituito dal locus *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* 4366 clonato nel vettore pNEB193, usando i primers marcati al 5' con il fluoroforo DY682 (Alexa680) Pr-plus_DY682 e Pr-minus_DY682 . L'amplicone marcato ad entrambe le estremità è stato purificato con un kit di clean-up per prodotti della PCR. La qualità e la concentrazione dell'amplicone sono state verificate mediante elettroforesi su gel di agarosio 1%.

Sequenza di 194 bp contenente il promotore, marcata con il fluoroforo Alexa680 alle estremità 5':

```
AACGTCCTGATGGCAGTTACGCTTCCATTTGTGCGAAGAAAAAGCCAGAAATCCGGTTGAATTCATCTCACATG  
ATGTTATCCCCTGTGTTTACATTGGGATAATTCGTGATATAATTAGTTGTTAGATAGGAAGGAGTGGTTAG  
CAATGGCAGCCACAAAGAAAGAAACTCGCTTGAATATTCGTGTTGATC
```

Le regioni di appaiamento dei primers marcati con il fluoroforo sono evidenziate in verde.

La rimozione della seconda ripetizione invertita (IR2) sul promotore di *dinJ-yafQ* è stata fatta mediante mutagenesi sito diretta, utilizzando primers mutagenici che hanno sostituito la IR2 con una sequenza casuale diversa (Primer 2 For -IR2 e Primer 1 Rev -IR2) e come templatato il plasmide pNEB193 in cui è stato clonato il locus *dinJ-yafQ*.

Mutazione che viene eseguita a carico della IR2:

5' -TTACATTGGGATAA-3' → 5' -TTCGTAGATCGAAG-3'

Sono state eseguite due PCR separatamente, utilizzando come templatato il promotore di *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* 4366 clonato in pNEB193, una con i primers Prom_Pa4366_Fw e primer 1

Rev_IR2 (PCR 1) e l'altra con i primers Primer For_IR2 e Prom_Pa4366_Rv (PCR 2); dopodichè, è stata eseguita un'ulteriore PCR (PCR 3) utilizzando gli ampliconi delle PCR 1 e 2 come templatato, che presentano una regione in comune attraverso cui si appaiano, e i primers Prom_Pa4366_Fw e Prom_Pa4366_Rv. Le sequenze dei primers sono riportate nella tabella 2.

Clonaggio in pGEM-T easy vector della sequenza contenente il promotore privo della IR2.

La sequenza del promotore mutato è stata poi amplificata mediante PCR con gli stessi primers marcati al 5' con Alexa Fluor 680 usati per amplificare il promotore *wild type* (Pr-plus_DY682 e Pr-minus_DY682). Il promotore mutato, marcato ad entrambe le estremità 5', è stato purificato con un kit di clean-up per prodotti della PCR e la qualità e la concentrazione dell'amplicone sono state verificate mediante elettroforesi su gel di agarosio 1%.

La sequenza di 196 bp contenente il promotore PR del fago λ è stata amplificata mediante PCR in condizioni standard utilizzando come templatato il vettore in cui è stato clonato il promotore in questione, pDSU- λ PRPromoter, e specifici primers marcati al 5' con il fluoroforo DY682, λ Pr-plus_DY682 e λ Pr-minus_DY682. L'amplicone è stato successivamente purificato con un kit di clean-up per prodotti della PCR e la qualità e la concentrazione dell'amplicone sono state verificate mediante elettroforesi su gel di agarosio 1%.

3.3. Espressione e purificazione di proteine ricombinanti

Le cellule ricombinanti di *E. coli* BL21 sono state fatte crescere nel terreno di Luria-Bertani (triptone: 10 g/L; estratto di lievito: 5 g/L; NaCl: 10 g/L) supplementato con 50 μ g/mL di kanamicina per selezionare le cellule trasformate con pET28b, con 100 μ g/mL di ampicillina per selezionare le cellule trasformate con pET11b e con entrambi gli antibiotici per selezionare le cellule cotrasformate con pET28b e pET11b. Le cellule sono state incubate a 37 °C fino al raggiungimento di una densità ottica a 600 nm di 0.5 – 0.8, quindi l'espressione delle proteine è stata indotta con isopropil- β -D-tiogalattopiranoside (IPTG) 1 mM e le cellule sono state incubate a 20 °C per 16 h. Le cellule sono state centrifugate a 4500 \times g per 15 min a 4 °C. L'espressione delle proteine è stata verificata mediante SDS-PAGE e colorazione con il blu di Coomassie dei campioni non indotti e indotti. Il pellet cellulare ottenuto da 1 L di coltura è stato risospeso in 40 mL di tampone di lisi (Tris-HCl 50 mM, KCl 250 mM, MgCl₂ 5 mM, imidazolo 15 mM, pH 7.5) e sonicato in ghiaccio. La progressione della sonicazione è stata monitorata misurando la percentuale di cellule lisate su aliquote campionate in

fase di sonicazione, la sonicazione è stata terminata quando completa al 90%. La percentuale del completamento della sonicazione è stata misurata con la seguente formula:

$$\left[1 - \left(\frac{OD_{590} \text{ post}}{OD_{590} \text{ pre}}\right)\right] \times 100$$

dove $OD_{590} \text{ pre}$ è la densità ottica a 590 nm del campione non sonicato e $OD_{590} \text{ post}$ è la densità ottica a 590 nm del campione sonicato.

La coltura cellulare sonicata è stata centrifugata a $13300 \times g$ per 30 min a 4 °C. Le proteine ricombinanti sono state purificate dal surnatante del lisato.

DinJ e il complesso DinJ-YafQ, entrambi con una coda poli-istidina all'N-terminale di DinJ ($(6 \times \text{His})\text{DinJ}$ e $(6 \times \text{His})\text{DinJ-YafQ}$) sono stati purificati mediante cromatografia di affinità con una colonna HisTrap FF crude connessa ad un sistema FPLC ÄKTA Pure (GE Healthcare). In seguito al caricamento del surnatante, la colonna è stata lavata con elevate concentrazioni saline (NaCl 2 M) per rimuovere gli acidi nucleici contaminanti. Le proteine sono state eluite con il tampone di eluizione (Tris-HCl 50 mM, KCl 250 mM, MgCl₂ 5 mM, imidazolo 500 mM, pH 7.5) e raccolte in frazioni, infine l'imidazolo è stato rimosso mediante lo scambio con il medesimo tampone privo di imidazolo usando colonne di desalting Hi-trap (GE Healthcare). La concentrazione delle proteine è stata ricavata misurando l'assorbimento a 280 nm con il coefficiente di estinzione molare ricavato mediante ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) ($\text{DinJ } \epsilon_{280} = 6990 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $\text{DinJ-YafQ } \epsilon_{280} = 29450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

YafQ è stata ottenuta dalla denaturazione del complesso DinJ-YafQ, avente una coda di poli-istidina all'N-terminale di YafQ ($\text{DinJ-}(6 \times \text{His})\text{YafQ}$): il surnatante del lisato cellulare che ha espresso il complesso è stato caricato sulla colonna HisTrap FF crude connessa ad un sistema FPLC ÄKTA Pure (GE Healthcare), la dissociazione e rimozione di DinJ è stata eseguita mediante il lavaggio con il tampone denaturante (Tris-HCl 50 mM, KCl 250 mM, MgCl₂ 5 mM, guanidinio cloruro 6 M, pH 7.5), YafQ è stata successivamente eluita con il tampone di eluizione in condizioni denaturanti (Tris-HCl 50 mM, KCl 250 mM, MgCl₂ 5 mM, guanidinio cloruro 6 M, imidazolo 500 mM, pH 7.5), infine l'imidazolo e il guanidinio cloruro sono stati rimossi mediante scambio con un tampone avente la stessa composizione ma privo di imidazolo e guanidinio cloruro, con la conseguente rinaturazione di YafQ. La concentrazione di YafQ è stata misurata mediante l'assorbimento a 280 nm con il coefficiente di estinzione molare fornito da ProtParam ($\text{YafQ } \epsilon_{280} = 22460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

La qualità delle proteine purificate è stata verificata mediante SDS-PAGE.

Le proteine purificate sono state divise in aliquote, congelate rapidamente in azoto liquido e conservate a -80 °C.

3.4. *Saggi in vitro dell'attività RNAsica*

I saggi dell'attività RNAsica sono stati preparati a temperatura ambiente (RT) assemblando 170 ng di RNA di *L. paracasei* e concentrazioni crescenti di YafQ, o del complesso DinJ-YafQ, in Tris-HCl 10 mM pH 7.5 in un volume di 10 μ L. Le reazioni sono state incubate a 37 °C per 15 minuti, dopodichè è stato aggiunto il loading dye 10 \times (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 60 mM pH 8.0, glicerolo 60%, blu di bromofenolo 0.3%) ad un volume di 2 μ L e le reazioni sono state fatte correre su gel di agarosio all'1% a 7 V/cm per 40 min. L'immagine del gel è stata acquisita con il sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad).

L'attività ribonucleasica è stata rilevata sottoforma di degradazione dell'rRNA.

3.5. *EMSA*

La tecnica con cui è stata studiata l'affinità di legame di DinJ e DinJ-YafQ al DNA è il saggio di ritardo della mobilità elettroforetica (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA), una procedura elettroforetica che rileva il legame di una proteina al DNA in base al rallentamento della corsa del DNA sul gel, dovuto al maggiore peso molecolare del complesso DNA-proteina rispetto al DNA dissociato.

Il frammento di DNA utilizzato è stato marcato con il fluoroforo Alexa 680, che presenta un picco di eccitazione alla lunghezza d'onda di 679 nm e un picco di emissione a 702 nm. L'associazione del fluoroforo ad entrambe le estremità del frammento di DNA ne rende possibile la rilevazione con un'elevata sensibilità, permettendo l'utilizzo di ridotte concentrazioni di DNA nelle reazioni di legame, con la proteina in forte eccesso, un requisito importante per la misurazione della costante di dissociazione della proteina dal DNA.

Le reazioni di legame sono state preparate in un volume totale di 10 μ L, incubando il DNA 2 nM con concentrazioni crescenti di DinJ o DinJ-YafQ a temperatura ambiente per 10 min, nel tampone di legame composto da Tris-HCl 50 mM pH 7.5, KCl 50 mM e glicerolo al 5%, in presenza di 128 ng di DNA estratto dallo sperma di salmone (*salmon sperm DNA*, ssDNA) come competitore su cui avere legami aspecifici, affinché si osservino solo legami specifici a livello del promotore che permettono di avere risultati puliti e la misurazione corretta della K_D .

Le reazioni di legame sono state fatte correre mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 6% in condizioni native nel tampone TBE (Tris 45 mM, acido borico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8.3) a 9

V/cm per 70 min a temperatura ambiente, usando l'apparato Mini-Protean (Bio-Rad). Le condizioni native del gel hanno permesso di mantenere associati durante la corsa i complessi che si sono formati. L'immagine del gel è stata acquisita con il sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad) e le intensità delle bande di DNA non legato sono state quantificate mediante analisi densitometrica con il software Image Lab (Bio-Rad). Per ogni reazione, la frazione di DNA non legato è stata calcolata come intensità della banda corrispondente rispetto all'intensità della banda del controllo negativo (ctrl-), dove la proteina è assente:

$$\text{Frazione DNA non legato} = \frac{\text{Intensità banda DNA}}{\text{Intensità banda DNA ctrl} -}$$

La frazione di DNA legato è stata ricavata come valore complementare della frazione di DNA non legato:

$$\text{Frazione DNA legato} = 1 - \text{Frazione DNA non legato}$$

La frazione di DNA legato è stata plottata su un grafico in funzione della concentrazione della proteina, restituendo una curva di saturazione sigmoideale che risulta fittata in modo ottimale con l'equazione di Hill-Langmuir:

$$\text{Frazione di DNA legato} = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_{Dapp}}{[P]}\right)^n}$$

dove K_{Dapp} è la costante di dissociazione apparente, che indica l'affinità con cui la proteina lega il DNA, $[P]$ è la concentrazione della proteina DinJ o DinJ-YafQ, n è il coefficiente di Hill, che definisce se ci sia cooperatività e permette di quantificarla

3.6. EMSA di competizione

Gli EMSA di competizione di DinJ e DinJ-YafQ con la RNA polimerasi per il legame al DNA sono stati condotti utilizzando lo stesso frammento di DNA di 194 bp contenente il promotore di *dinJ-yafQ* marcato con Alexa Fluor 680 utilizzato per gli EMSA. Le reazioni sono state preparate a temperatura ambiente incubando per 10 minuti il DNA 2 nM con concentrazioni crescenti di proteina (DinJ o DinJ-YafQ) in un volume totale di 10 μ L in presenza di 128 ng di DNA estratto dallo sperma di salmone per i legami aspecifici, in un tampone di legame composto da Tris-HCl 20 mM pH 7.9, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM e glicerolo al 5%. Successivamente, è stata aggiunta l'RNA polimerasi oloenzima di *E. coli* (New England BioLabs) 200 nM e le reazioni sono state incubate per 30 minuti a 37 °C. Le reazioni sono state fatte correre su gel di agarosio al 2% a 20 V/cm per 50 minuti a temperatura ambiente nel tampone TB (Tris 45 mM, acido bórico 45 mM, pH 8.3).

È stato condotto un esperimento di controllo negativo utilizzando un frammento di DNA di 196 bp marcato alle estremità 5' con il fluoroforo Alexa Fuor 680 contenente il promotore PR del fago λ invece del frammento contenente il promotore di *dinJ-yafQ*.

Le immagini del gel sono state acquisite con il sistema ChemiDoc MP.

3.7. Microscopia a forza atomica

Il legame di DinJ-YafQ al proprio promotore è stato confermato dalla visualizzazione mediante microscopia a forza atomica (AFM), che permette di ottenere una rappresentazione tridimensionale ad alta risoluzione di un campione. L'immagine è ottenuta da una scansione del campione mediante una punta sottile, con un raggio di curvatura apicale dalle dimensioni nell'ordine di 10^{-9} m, collocata all'estremità di una leva flessibile (*cantilever*) che, durante la scansione del campione, subisce delle deflessioni conseguenti all'adattamento della posizione della punta sulla superficie dell'oggetto scansionato, il quale è depositato su un tubo piezoelettrico che consente i movimenti lungo le coordinate x, y, z¹¹⁷. Le oscillazioni della leva, a cui la punta è associata, vengono misurate da un sistema composto da un laser riflesso sul cantilever e un fotodiodo che ne rileva il movimento indotto dalla flessione innescata dall'adattamento della punta della leva alla superficie del campione (vedi figura 3.1).

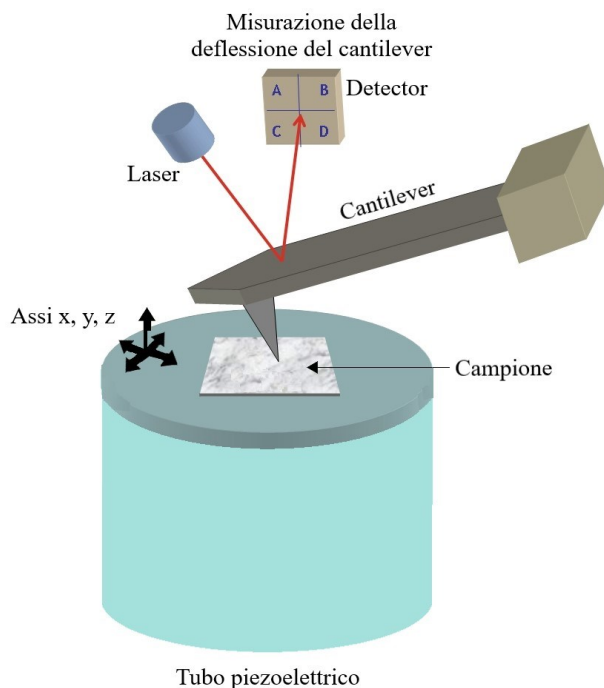


Figura 3.1. Rappresentazione del funzionamento del microscopio a forza atomica (adattato da Rif. 118).

La scansione eseguita mantenendo la punta del cantilever sempre a contatto con la superficie è denominata modalità a contatto (*contact*), l'immagine viene acquisita tramite il rilevamento delle deflessioni del *cantilever* (vedi figura 3.2, sinistra), tuttavia questa procedura può causare la deformazione in campioni delicati come le macromolecole biologiche, con la conseguente acquisizione di immagini che non corrispondono alla reale conformazione tridimensionale dell'oggetto studiato e, in questo caso, è preferibile la modalità a contatto intermittente (*tapping*), in cui la punta del *cantilever*, mentre esegue la scansione, oscilla ad alte frequenze, dell'ordine di 10^5 Hz, e l'immagine del campione viene acquisita mediante la quantificazione della variazione dell'ampiezza delle oscillazioni del *cantilever* (vedi figura 3.2, destra).

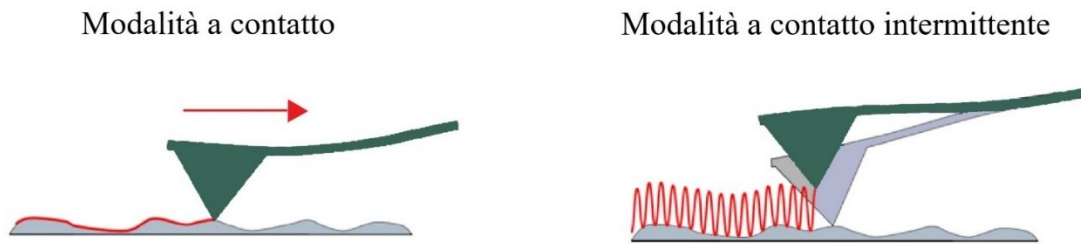


Figura 3.2. Rappresentazione schematica di due modalità con cui la punta del cantilever può scansionare la superficie del campione: modalità a contatto (a sinistra) e a contatto intermittente (a destra) (adattato da Rif. 119).

La componente proteica che è stata utilizzata per la formazione dei complessi nucleoproteici analizzati mediante AFM è costituita dai complessi DinJ-YafQ, in quanto il legame di DinJ, nella forma dimerica, al DNA genera un complesso avente dimensioni troppo ridotte per poter essere correttamente rilevato mediante AFM (ciò è dovuto ad un effetto di allargamento dell'immagine ottenuta che non corrisponde alla reale conformazione del campione e il meccanismo che genera questa imprecisione è illustrato in figura 3.3), per cui l'utilizzo del complesso DinJ-YafQ fornisce il vantaggio di generare complessi nucleoproteici dal peso molecolare maggiore: infatti, un dimero $(6 \times \text{His})\text{DinJ}_2$ ha un peso molecolare di 24.5 kDa, che è un valore limite minimo per la capacità risolutiva dell'AFM, ma se a ciascun monomero di DinJ è legato un monomero di YafQ allora il peso molecolare del complesso diventa circa 48 kDa, che rientra in un range di dimensioni correttamente rilevabili con questa tecnica.

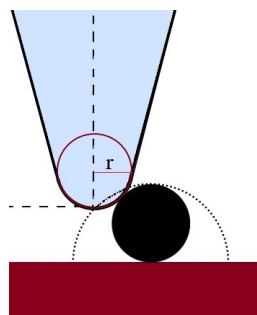


Figura 3.3. Illustrazione del meccanismo alla base della limitazione della capacità risolutiva generata da strutture del campione con dimensioni inferiori alla soglia minima della capacità di rilevamento della punta associata al cantilever: minore è il raggio della curvatura apicale (r), tanto maggiore sarà la risoluzione delle immagini (adattato da Rif. 120).

I campioni costituiti dai complessi proteici associati al DNA, da sottoporre a scansione mediante AFM, vengono preparati incubando le due componenti, ossia proteine e DNA, affinché si formino i complessi nucleoproteici, dopodichè si esegue il *crosslinking* del campione con glutaraldeide, per prevenire la dissociazione dei complessi dopo la loro deposizione sullo strato di mica appena sfogliato, come descritto in “materiali e metodi”.

Le immagini sono state acquisite nella modalità tapping, con una punta dal raggio apicale di 5 nm. I complessi nucleoproteici sono stati preparati assemblando il frammento di DNA contenente il promotore di *dinJ-yafQ* alla concentrazione 20 nM con il complesso DinJ-YafQ 100 nM in un tampone composto da HEPES 4 mM pH 7.4, KCl 50 mM e MgCl₂ 2 mM. Le reazioni sono state incubate a 25 °C per 30 minuti, dopodichè è stata aggiunta la glutaraldeide allo 0.1% e l’incubazione è proseguita per altri 10 minuti, infine è stato fatto il quenching aggiungendo Tris-HCl a pH 8 alla concentrazione finale 2 mM. Le reazioni sono state diluite 1:10 nel buffer di deposizione (HEPES 4 mM pH 7.4, NaCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM) e 20 µL sono stati depositati sulla mica per 2 minuti e, infine, la superficie è stata risciacquata con H₂O Milli-Q e asciugata con azoto. Le immagini di 512 × 512 pixel con una dimensione della scansione di 2 µm sono state acquisite con un microscopio Nanoscope IIIA (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) dotato di scanner E, con modalità tapping. È stato usato un cantilever in silicone (MikroMasch, Tallinn, Estonia) con un raggio della punta di 5 nm.

La posizione del complesso DinJ-YafQ sul DNA è stata stimata quantificando la lunghezza dei filamenti alle due estremità del complesso (metodo descritto in Rif. 105).

Il volume dei complessi nucleoproteici è stato misurato tramite una procedura scritta in Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA): i valori dei pixel sono stati convertiti in altezza in nm e l’immagine è stata portata a zero sottraendo il valore minimo. Ogni complesso è stato delineato con un’ellisse, quindi il volume del complesso è stato ricavato dall’area e dall’altezza dei pixel all’interno della selezione e il volume della proteina è stato ricavato sottraendo il volume del DNA in prossimità del complesso. Il valore del *background* è stato determinato in un’area di 6 × 6 pixel adiacente al complesso (figura 4.31).

Per ricavare il rapporto stechiometrico dei complessi DinJ-YafQ e il DNA è stata ottenuta una curva di calibrazione del rapporto volume/peso molecolare usando quattro proteine globulari a peso molecolare noto (figura 4.30). I campioni proteici sono stati diluiti ad una concentrazione finale di 20 nM nel tampone di deposizione composto da HEPES 4 mM pH 7.4, NaCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM, sono stati depositati sulla mica, sciacquati e asciugati; le immagini mediante AFM sono state acquisite con scansioni aventi la dimensione di 2 µm. Il volume delle proteine è stato misurato usando l’algoritmo “Zero basis” del software Gwyddion v2.60¹⁰⁶.

3.8. *Crosslinking*

Gli esperimenti di *crosslinking* sono stati condotti incubando le proteine con la glutaraldeide 0.1% per 30 minuti a temperatura ambiente in un tampone composto da HEPES 4 mM e KCl 10 mM, pH 7.4. Le reazioni sono state spente con Tris-HCl 100 mM pH 8.0.

I campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE. Le immagini sono state acquisite con il sistema ChemiDoc MP.

Gli esperimenti di *crosslinking* sono stati eseguiti apportando successive variazioni alla concentrazione di glutaraldeide, con incrementi a 0.2% e poi a 0.5%, in quanto in presenza di glutaraldeide 0.1% si osservavano, oltre agli oligomeri, le bande dei singoli monomeri che permanevano anche aumentando la concentrazione della proteina, indicando che la porzione di proteina non crosslinkata non fosse una conseguenza della minore concentrazione di proteina, si è voluto quindi verificare se incrementando la concentrazione di glutaraldeide si sarebbe ottenuta una riduzione dell'intensità delle bande dei monomeri rispetto agli oligomeri. L'incremento della concentrazione di glutaraldeide non ha fornito risultati diversi da quelli ottenuti alla concentrazione 0.1% per quanto riguarda gli stati di oligomerizzazione delle proteine.

3.9. *Saggi in vivo della repressione trascrizionale*

Per testare la repressione trascrizionale mediata da DinJ e da DinJ-YafQ è stata usata la *Green Fluorescent Protein* (GFP) come sistema reporter.

Il promotore dell'operone *dinJ-yafQ* è stato amplificato mediante PCR dal DNA totale estratto da *L. paracasei* 4366 e la ORF della *gfp* è stata amplificata mediante PCR da pET28CpoI-*gfpmut2*¹⁰⁷ utilizzando primers per l'introduzione di una regione comune e con una successiva PCR, sfruttando l'appaiamento parziale tra i due ampliconi, le due sequenze sono state fuse introducendo al 5' e al 3' i siti di taglio per BglII e HindIII, rispettivamente. Il prodotto di fusione è stato clonato nei siti di restrizione BglII/HindIII del vettore pET28b, pET28b-*dinJ* e pET28b-*dinJ* R13A (vedi tabella 2 per i primers). Con le sequenze clonate, che sono state verificate mediante il sequenziamento, è stata fatta la trasformazione mediante elettroporazione di *E. coli* C41(DE3) pLysS, con o senza la cotrasformazione con pET11b-*yafQ* 2333.

Singole colonie di cellule trasformate prelevate dalle piastre di terreno solido (LB-agar) addizionato con gli opportuni antibiotici (ampicillina per pET11b e kanamicina per pET28b) sono state

ridistribuite su piastre con terreno solido fresco in presenza dei medesimi antibiotici, con o senza IPTG 0.5 mM e sono state incubate a 37 °C overnight. Le piastre sono state infine scannerizzate con il sistema Chemidoc MP per monitorare la fluorescenza e, quindi, l'attività di regolazione trascrizionale che il sistema DinJ-YafQ attua a livello per proprio operone.

Le stesse colonie che sono state ridistribuite su terreno solido sono state fatte anche crescere in terreno LB liquido, addizionato con gli opportuni antibiotici per il mantenimento dei plasmidi ricombinanti, a 37 °C overnight. Le colture sono state diluite in terreno liquido fresco fino a OD₆₀₀ 0.1 con o senza IPTG 0.5 mM e sono state fatte crescere a 37 °C. Campioni delle colture in fase esponenziale, dal volume di 1 mL, sono stati prelevati dopo 2 ore di crescita, sono stati centrifugati, lavati due volte e risospesi in PBS fino a OD₆₀₀ 0.5. L'intensità della fluorescenza della GFP a 507 nm è stata misurata con uno spettrofluorofotometro (PerkinElmer LS-55) con una luce di eccitazione avente una lunghezza d'onda di 488 nm.

3.10. Strumenti bioinformatici

Gli omologhi di DinJ-YafQ che presentano la sequenza del promotore conservata sono stati identificati mediante la ricerca con BlastX usando come query MK544944.1. Le sequenze nucleotidiche a monte delle regioni codificanti sono state allineate con ClustalO, usando le impostazioni di default sul portale web EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)¹⁰⁸ e perfezionate mediante editing manuale.

L'allineamento delle sequenze è stato eseguito con ESPript 3.0 (<https://escript.ibcp.fr/>)¹⁰⁹.

I modelli strutturali di DinJ e YafQ sono stati ottenuti mediante modelling per omologia usando SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)¹¹⁰. Come template sono stati usati DinJ di *E. coli* (PDB ID: 4Q2U)¹¹⁵ e YafQ di *E. coli* (PDB ID: 4ML2)¹¹¹. Per creare il complesso eterotetrameric (DinJ)₂-YafQ₂, i modelli strutturali di DinJ e YafQ sono stati allineati con la struttura cristallizzata del complesso DinJ-YafQ di *E. coli* (PDB ID: 4Q2U). La struttura secondaria della sequenza di DNA a doppia elica contenente la regione del promotore di *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* 4366 (TTATCCCCTGTGTTTACATTGGGATAA) è stata generata con lo strumento SCIFBio (<http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/bdna.jsp>)¹¹².

Per costruire il modello strutturale del legame di due complessi eterotetrameric (DinJ)₂-(YafQ)₂ alle ripetizioni invertite sul promotore è stata usata come template la struttura cristallizzata del complesso Arc-DNA (PDB ID: 1PAR)¹¹³. I due emisiti di legame sul DNA sono separati da 16 bp, corrispondenti

a 1,5 giri della doppia elica, per cui sono localizzati su lati opposti del DNA e ciò rende possibile il legame simultaneo di due complessi $(DinJ)_2-(YafQ)_2$ al promotore. Un complesso DinJ-YafQ è stato allineato con un dimero Arc legato al centro di un emisito, l'altro complesso DinJ-YafQ è stato posizionato al centro dell'altro emisito. L'allineamento e l'aggiustamento manuale dei modelli strutturali sono stati eseguiti mediante PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LCC*).

Primer	Sequenza	Ceppo	Descrizione
yafQ_pa plus	CATATGTATAGTCTGGTTCCGACG	4366, 2333	Clonaggio di yafQ
yafQ_pa minus	GGATCCTATTTACCCAGAAGGTTATGA	4366, 2333	Clonaggio di yafQ
dinJ_pa4366 plus	CATATGGCAGCCACAAAGAAAGAA	4366	Clonaggio di dinJ
dinJ_pa4366 minus	GGATCCCTATACATTCAAGTCTCTCCAC	4366	Clonaggio di dinJ
dinJR13A plus	GAAACTCGCTTGAATATTGCTGTTGATCCGGAATTA AAAAGTGC	4366	Mutagenesi
dinJR13A minus	GCACTTTTTAATTCGGATCAACAGCAATATTCAAGCGAGTTTC	4366	Mutagenesi
Pr-plus_DY682	DY682-AACGTCTGATGGCAGTTACG	4366	EMSA
Pr-minus_DY682	DY682-GATCAACACGAATATTCAAGCG	4366	EMSA
λ Pr-plus_DY682	DY682-CGTCCTCAAGCTGCTCTTG	-	EMSA
λ Pr-minus_DY682	DY682-GTTTGCCAAAGCGCATTGC	-	EMSA
Prom_pa4366_Fw	ATACTATGTCGGAAGGTCAG		Mutagenesi
Prom_pa4366_Rev	CCTTTTTGGACGGCCTTTCG		Mutagenesi
Primer 2 For -IR2	CACTGTGTTTCGTAGATCGAAGTTCGTGATATAATTAGGTTGTTAG		Mutagenesi
Primer 1 Rev -IR2	CTTCGATCTACGAAACACAGTGGGATAACATCATG		Mutagenesi
Pr_pa4366 plus	GTGATCGATCTTTGAGGACCG	4366	Clonaggio pr-gfp
Pr_pa4366 minus	CTCCTTTACTCATTGCTAACCAC	4366	Clonaggio pr-gfp
gfp plus	GTGGTTAGCAATGAGTAAAGGAG	-	Clonaggio pr-gfp
gfp minus	TTATTTGTATAGTTCATCCATGCC	-	Clonaggio pr-gfp
Pr-gfp-BglIII plus	TATAGATCTGTGATCGATCTTTGAGGAC	-	Clonaggio pr-gfp
Pr-gfp-HindIII minus	TATAAGCTTTTATTTGTATAGTTCATCCATGC	-	Clonaggio pr-gfp

Tabella 2. Sequenze dei primers utilizzati.

4. Risultati e discussione

4.1. Attività ribonucleasica di YafQ

Per verificare in vitro l'attività ribonucleasica di YafQ, sono stati condotti saggi dell'attività RNAsica a concentrazioni costanti dell'RNA substrato in presenza di un gradiente crescente della concentrazione di YafQ.

Ai fini della purificazione di abbondanti quantità di YafQ, trattandosi di una proteina tossica, è necessaria la coespressione con la corrispondente antitossina DinJ per permettere la crescita delle cellule ricombinanti, che devono quindi essere state cotrasformate con i due plasmidi inducibili, in cui sono state clonate le sequenze codificanti per YafQ e DinJ. La tossina, quindi, viene inizialmente co-purificata insieme a DinJ sotto forma di complesso DinJ-YafQ, dal quale infine la tossina è ottenuta mediante dissociazione del complesso in condizioni denaturanti. Il medesimo protocollo di purificazione di YafQ mediante dissociazione del complesso DinJ-YafQ è stato applicato anche per la variante meno tossica rilevata nel ceppo 2333 di *L. paracasei* (YafQ_pa2333), che presenta la sostituzione del residuo catalitico D72 con una G: seppure i saggi in vivo abbiano dimostrato la riduzione dell'attività ribonucleasica nella variante della tossina del ceppo 2333, è preferibile purificarla partendo dalla coespressione con la rispettiva antitossina per prevenire l'insorgenza e la selezione di forme mutate di YafQ.

I saggi in vitro dell'attività ribonucleasica di YafQ, condotti come descritto nella sezione dedicata in "Materiali e metodi", ne hanno confermato l'attività ribonucleasica: alla concentrazione della proteina 270 nM (figura 4.1, lane 5) si ha la quasi completa degradazione dell'RNA.

YafQ è classificata come mRNA interferasi ribosoma-dipendente, in *E. coli* catalizza l'idrolisi mediante catalisi acido-basica dell'mRNA in fase di traduzione; tuttavia, in vitro YafQ taglia l'RNA anche in assenza del ribosoma. È noto che YafQ di *E. coli* interagisce con il ribosoma a livello dell'rRNA 16S e questo potrebbe essere correlato con il tipo di attività di taglio osservata in vivo, ossia un'efficiente degradazione dell'rRNA 16S, come si può osservare nella figura 1.16, lanes 8, 9, 10.

Attività RNAsica di YafQ di *L. paracasei* 4366

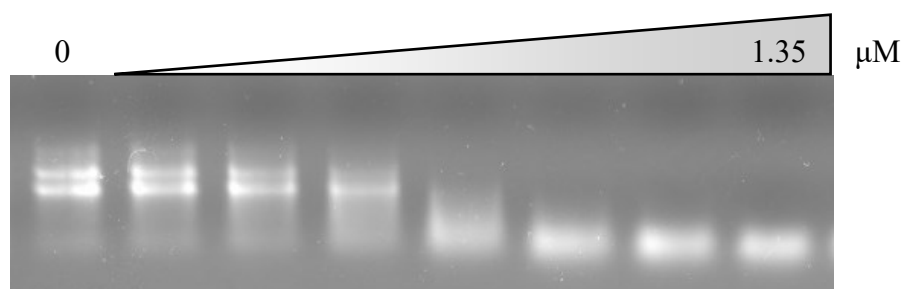


Figura 4.1. Saggio dell'attività ribonucleasica di YafQ_{pa4366}.

170 ng di RNA per ogni reazione.

Concentrazione della proteina:

0 nM – 14 nM – 68 nM – 135 nM – 270 nM – 540 nM – 800 nM – 1.350 μM

La variante di YafQ identificata nel ceppo di *L. paracasei* 2333 presenta la sostituzione di un residuo conservato di Asp (D72), con un residuo di Gly (vedi figura 4.2: la Gly 72 è evidenziata in rosso). Poiché l'Asp 72 è predetto di avere un ruolo catalitico sulla base dell'analisi dell'allineamento della sequenza amminoacidica con quella omologa di *E. coli*, che è stata caratterizzata, è stata analizzata l'attività di questa variante. YafQ di *L. paracasei* 2333 risultata avere un'attività catalitica ridotta in confronto a YafQ di *L. paracasei* 4366, come si può osservare in figura 4.3: il taglio dell'RNA alla concentrazione di YafQ 680 nM, corrispondente alla *lane* 6, non è completo, a differenza di YafQ_{pa4366} che, nelle stesse condizioni sperimentali, è associata al taglio quasi completo dell'RNA già alla concentrazione 270 nM (vedi *lane* 5 in figura 4.1). Questi risultati supportano quanto suggerito dalla conservazione dei residui noti per avere un ruolo catalitico in *E. coli* e suggeriscono che il meccanismo d'azione della tossina in *L. paracasei* possa essere il medesimo di quello della proteina omologa di *E. coli* (vedi il meccanismo illustrato nella figura 1.12). Un'altra evidenza a supporto della riduzione dell'attività catalitica della variante di YafQ di *L. paracasei* 2333 è la crescita delle cellule ricombinanti BL21 trasformate solo con pET28b-*yafQ* 2333 anche in seguito all'induzione con IPTG 1 mM, una condizione che invece determina il blocco della proliferazione cellulare quando il plasmide con cui le cellule sono trasformate è pET28b-*yafQ* 4366. Un'ulteriore evidenza della riduzione della catalisi in seguito alla sostituzione D72G in YafQ di *L. paracasei* è fornita dai saggi di crescita rappresentati in figura 1.18.b, dove la riduzione della crescita cellulare associata all'espressione di YafQ_{pa2333} non è significativa, e dalla riduzione dell'attività ribonucleasica in vivo osservabile in figura 1.19.b.

```

                                     YafQ_pa4366 D72
                                     YafQ_pa2333 G72
                                     *      20      *      40      *      60      *      80      *      100
YafQ_E.coli : MIQRDIEYSQGYSKDVKLAQKRHKDMNKLYLMTLLIN--NTLPLPAVYKDHPLQGS--WKGYRDAHVEP--DWLLIYKLT--DKLLRFERTGTHAALFG-- : 92
YafQ_L.pa4366 : --MYSLVPTPTFKRDLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSKKYADHALSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIKQDDLILTLVRTGSHHNLGK-- : 100
YafQ_L.pa2333 : --MYSLVPTPTFKRDLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSKKYADHALSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIKQDDLILTLVRTGSHHNLGK-- : 100
YafQ_L.pa4186 : --MYSLVPTPTFKRDLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSKKYADHALSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIEQDDLILTLVRTGSHHNLGK-- : 100
YafQ_L.pa4341 : --MYSLVPTPTFKRDLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSKKYADHALSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIEQDDLILTLVRTGSHHNLGK-- : 100
YafQ_L.pa4186 : --MYSLVPTPTFKRDLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSKKYADHALSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIEQDDLILTLVRTGSHHNLGK-- : 100
YafQ_L.ca2306 : --MYSLVPTPTFKRDLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSKKYADHALSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIEQDDLILTLVRTGSHHNLGK-- : 100
YafQ_L.ca4340 : --MYSLVPTPTFKRDLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSKKYADHALSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIKQDDLILTLVRTGSHHNLGK-- : 100
YafQ_L.ca2203 : --MYSLVPTPTFKRDLKRLSKKHWPMDLKTAVNLLAAGTNAELLSKKYADHALSSSEWKGYRELHVDGPRGDWLLIYKIEQDDLILTLVRTGSHHNLGK-- : 100
YafQ_L.rh2360 : --MLTINRTRTFKRFKHLRQGGKDMTKLATAIDTLQR--QDRVKLASLHDHALKGA--HSGERALHVAP--DWLLVYKVDAAEALILMLLATGTHRDNLNIE : 94
YafQ_L.rh1019 : -----MQR--QGHVKLASLHDHALKGA--HSGERALRVAP--DWLLVYKVDAAEALILMLLATGTHRDNLNIE : 61
YafQ_L.rh1473 : -----MQR--CAHVKLASLHDHALKGA--HSGERALHIAP--DWLLVYKVDAAEALILMLLATGTHRDNLNIE : 61

```

Figura 4.2. Allineamento delle sequenze amminoacidiche di YafQ di alcuni ceppi del genere *Lacticaseibacillus* con la sequenza omologa di *E. coli*. La Gly 72 che in YafQ_pa2333 sostituisce Asp 72 è evidenziata in rosso, il residuo corrispondente in YafQ_pa4366, conservato in *E. coli*, è evidenziato in verde.

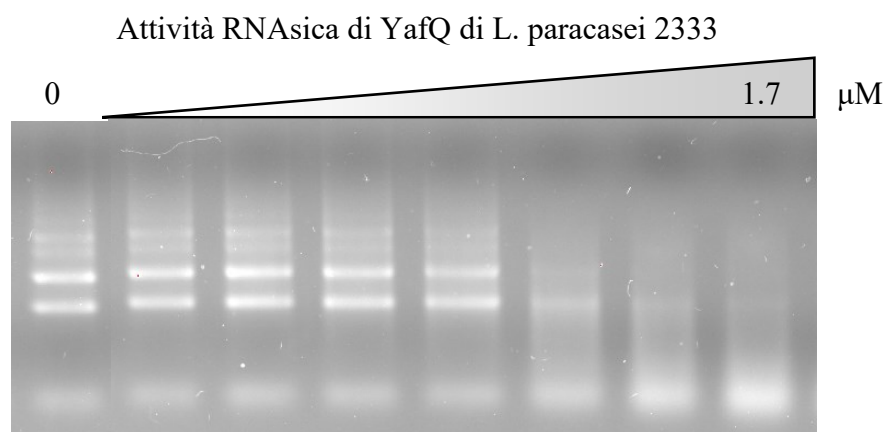


Figura 4.3. Saggio dell'attività ribonucleasica di YafQ_pa2333.

170 ng di RNA per ogni reazione.

Concentrazione della proteina:

0 nM – 17 nM – 85 nM – 170 nM – 340 nM – 680 nM – 1 μM – 1.7 μM

I saggi dell'attività ribonucleasica del complesso DinJ-YafQ confermano la neutralizzazione che DinJ esercita sulla tossicità di YafQ, sia nel ceppo 4366 (vedi figura 4.4) che 2333 (vedi figura 4.5) di *L. paracasei*: l'assenza dell'attività di taglio dell'RNA nel saggio con il complesso DinJ-YafQ conferma le osservazioni date dagli esperimenti in vivo, da cui emerge che la coespressione di DinJ con YafQ ripristina la crescita cellulare (figura 1.21.a) e inibisce l'attività di taglio a carico dell'RNA (figura 1.21.b).

Attività RNAsica di DinJ-YafQ di *L. paracasei* 4366

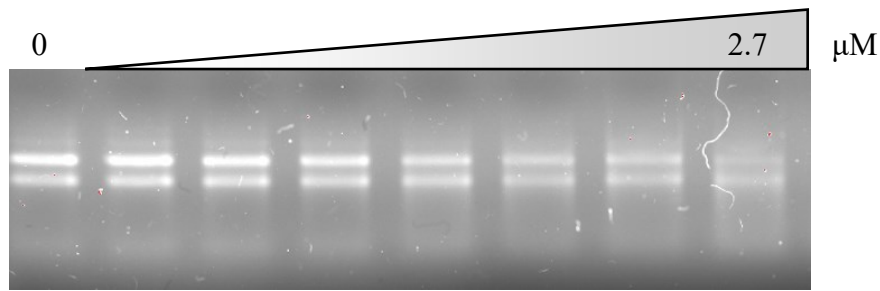


Figura 4.4. Saggio dell'attività ribonucleasica del complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 4366.

120 ng di RNA per ogni reazione.

Concentrazione della proteina:

0 nM – 27 nM – 135 nM – 270 nM – 540 nM – 1.1 μM – 1.6 μM – 2.7 μM

I saggi dell'attività RNAsica del complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 2333 (con YafQ G72) dimostrano che la sostituzione D72G su YafQ non ne compromette la capacità di instaurare le interazioni con DinJ, che ne neutralizzano l'attività ribonucleasica. Il saggio con DinJ-YafQ di *L. paracasei* 2333, mostrato in figura 4.5, rivela la totale assenza di attività di taglio anche alle maggiori concentrazioni di proteina (*lanes* 6 e 7, in cui la concentrazione di proteina è 1.1 μM e 1.6 μM, rispettivamente), mentre nel saggio con la sola tossina YafQ_{pa2333}, mostrato in figura 4.3, l'attività RNAsica è già evidente alla concentrazione di YafQ_{pa2333} 680 nM (vedi *lanes* 6 – 7 – 8, corrispondenti alle concentrazioni di YafQ_{pa2333} rispettivamente di 680 nM – 1 μM – 1.7 μM).

Attività RNAsica di DinJ-YafQ 2333

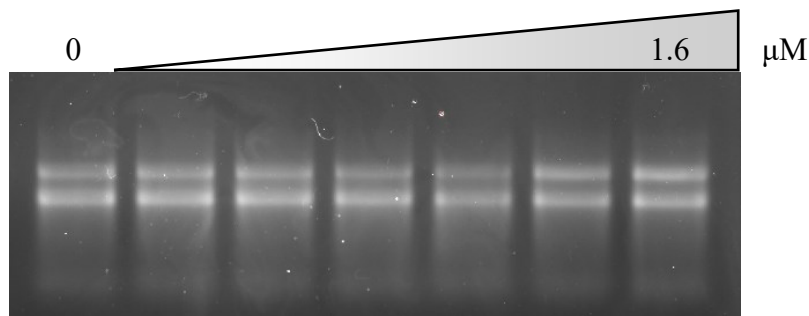


Figura 4.5. Saggio dell'attività ribonucleasica del complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 2333.

120 ng di RNA per ogni reazione.

Concentrazione della proteina:

0 nM – 27 nM – 135 nM – 270 nM – 540 nM – 1.1 μM – 1.6 μM

4.2. Analisi degli stati oligomerici di DinJ, YafQ e del complesso DinJ-YafQ mediante crosslinking con glutaraldeide e cromatografia ad esclusione dimensionale

Sono stati eseguiti esperimenti di *crosslinking* con glutaraldeide per analizzare gli stati oligomerici con cui si presentano in soluzione DinJ e YafQ e per comprenderne la stechiometria nel complesso DinJ-YafQ, integrando i risultati con i dati forniti dalla cromatografia ad esclusione dimensionale.

La glutaraldeide è un agente crosslinkante per le proteine: genera legami crociati reagendo con i gruppi amminici degli amminoacidi, con la formazione di una base di Schiff tra il terminale carbonilico della glutaraldeide e i gruppi amminici carichi positivamente sulla superficie delle proteine (in particolare le Lys).

Sono state testate diverse condizioni di *crosslinking* apportando modifiche ad alcuni parametri, ossia la concentrazione di glutaraldeide (0.1%, 0.2%, 0.5%), il tempo di incubazione con la glutaraldeide (10 min, 20 min, 30 min) e la concentrazione delle proteine (da 2 μ M a 20 μ M) per verificare le condizioni ottimali per l'analisi degli stati oligomerici: il pattern di formazione delle bande corrispondenti ai diversi oligomeri è risultato invariato nelle diverse condizioni.

4.2.1. Stati oligomerici del complesso DinJ-YafQ

Il *crosslinking* con glutaraldeide dei complessi DinJ-YafQ dei ceppi di *L. paracasei* 2333 (vedi figure 4.6 e 4.7) e 4366 (vedi figura 4.8) evidenzia la formazione di dimeri, trimeri e tetrameri, identificabili in base alla posizione delle bande delle specie crosslinkate rispetto al marcatore del peso molecolare. Il peso molecolare di un omodimero di DinJ con His-tag al terminale amminico, $(6\times\text{His})\text{DinJ}_2$, è 24.6 kDa, di un trimero $(6\times\text{His})\text{DinJ}_2\text{-YafQ}$ è 36 kDa, di un tetramero $(6\times\text{His})\text{DinJ}_2\text{-YafQ}_2$ è 47.4 kDa: i pesi molecolari di queste tre forme oligomeriche sono compatibili con le bande sul gel elettroforetico ottenute dal *crosslinking* del complesso DinJ-YafQ.

La natura etero-oligomerica delle specie crosslinkate è supportata dall'evidenza della riduzione dell'intensità di entrambe le bande corrispondenti alle forme monomeriche di DinJ e YafQ quando il complesso è incubato con glutaraldeide, come si può osservare dal confronto delle intensità delle bande inferiori, costituite dalle forme monomeriche delle componenti del complesso, nelle *lanes* 3 e 5 in figura 4.6, dove le concentrazioni della proteina sono le medesime (20 μM), in assenza e in presenza di glutaraldeide, rispettivamente; la stessa osservazione può essere fatta confrontando le *lanes* 2 e 4 nella medesima figura 4.6.

Gli stati oligomerici del complesso DinJ-YafQ dei due ceppi di *L. paracasei*, 2333 e 4366, non presentano differenze, indicando che la sostituzione D72G in YafQ, che ne riduce l'attività catalitica (figura 4.3), non ne altera la capacità di formare oligomeri.

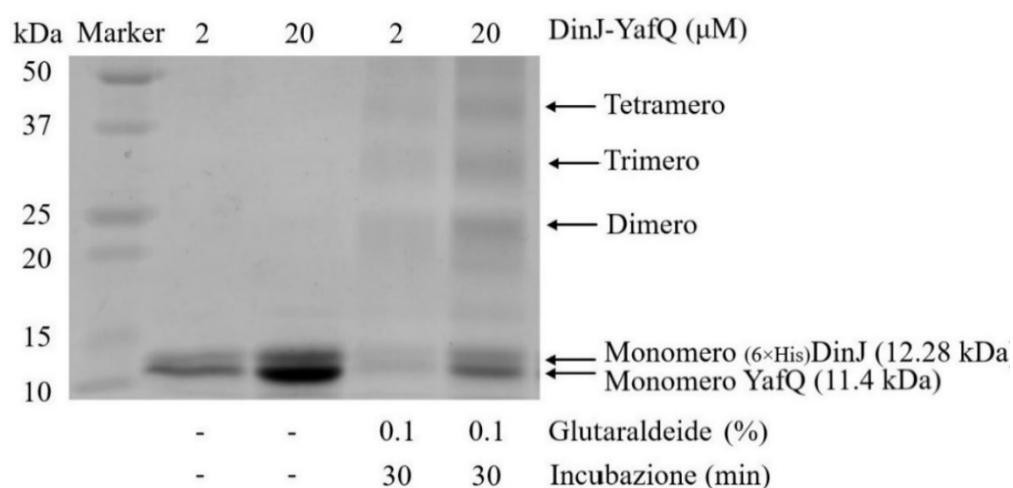


Figura 4.6. SDS-PAGE del complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 2333 alle concentrazioni 2 e 20 μM , prima (*lanes* 2-3) e dopo l'incubazione con glutaraldeide 0.1% per 30 minuti (*lanes* 4-5). Gli stati oligomerici delle specie crosslinkate sono indicati dalle frecce sulla base delle dimensioni del marcatore del peso molecolare (Marker, *lane* 1).

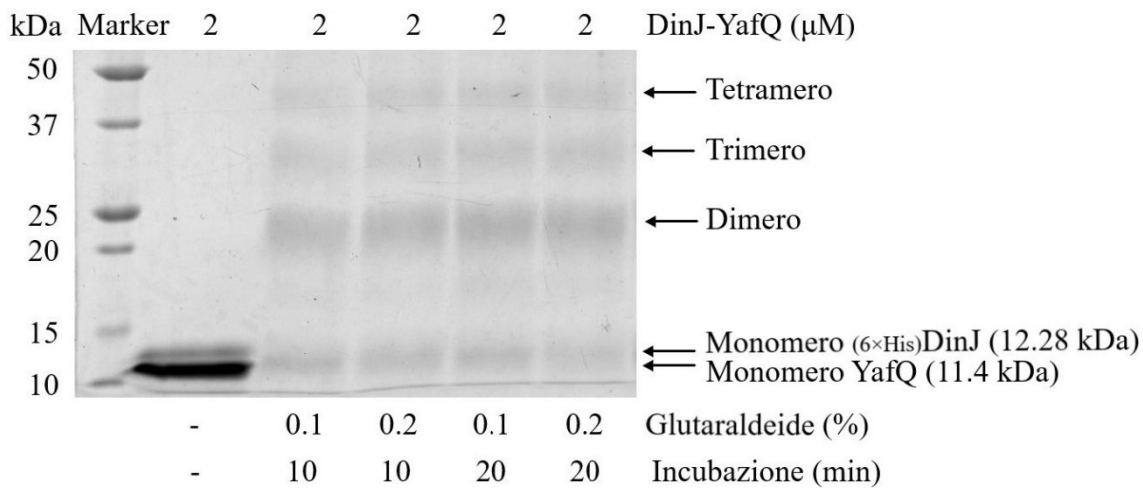


Figura 4.7. SDS-PAGE del complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 2333 alla concentrazione 2 μM , prima (lane 2) e dopo l'incubazione con glutaraldeide 0.1% e 0.2% per 10 minuti (lanes 3 e 4) e 20 minuti (lanes 5 e 6). Gli stati oligomerici delle specie crosslinkate sono indicati dalle frecce sulla base delle dimensioni del marcatore del peso molecolare (Marker, lane 1).

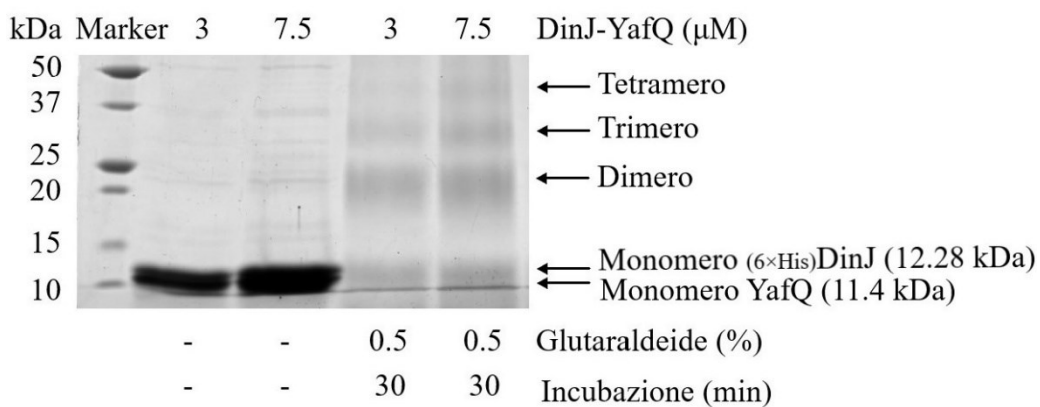


Figura 4.8. SDS-PAGE del complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 4366 alla concentrazione 3 e 7.5 μM , prima (lanes 2 e 3) e dopo l'incubazione con glutaraldeide 0.5% per 30 minuti (lanes 4 e 5). Gli stati oligomerici delle specie crosslinkate sono indicati dalle frecce sulla base delle dimensioni del marcatore del peso molecolare (Marker, lane 1).

La cromatografia ad esclusione dimensionale del complesso DinJ-YafQ, mostrata in figura 4.9, presenta un picco principale corrispondente ad un peso molecolare apparente di 57 kDa, che è compatibile con un complesso eterotetramerico $(\text{DinJ})_2-(\text{YafQ})_2$, il cui peso molecolare è 47.4 kDa.

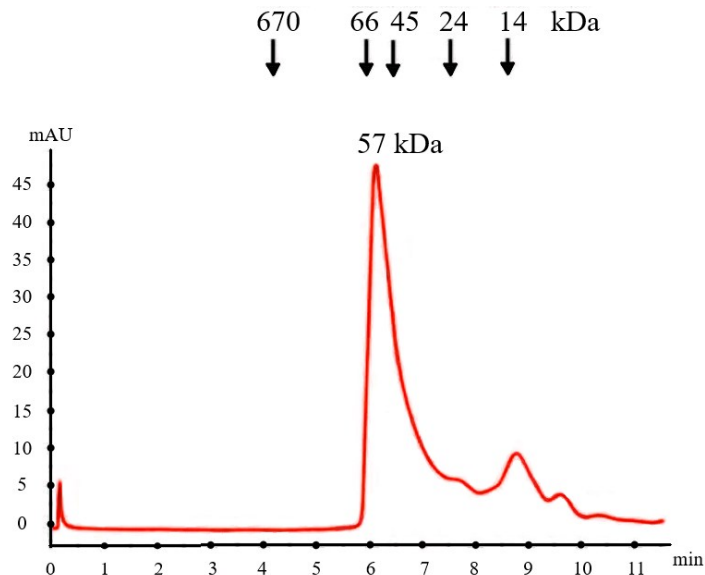


Figura 4.9. Cromatografia ad esclusione dimensionale su colonna Superdex 200 Increase 5/150 GL del complesso DinJ-YafQ. Il picco principale ha un tempo di eluizione di 6.16 minuti e corrisponde ad un peso molecolare apparente di 57 kDa, che potrebbe rappresentare la forma eterotetramericica $(\text{DinJ})_2-(\text{YafQ})_2$.

La cromatografia ad esclusione dimensionale del complesso DinJ-YafQ, mostrata in figura 4.10, ha rivelato una dissociazione del complesso eterotetramerico DinJ-YafQ dipendente dalla concentrazione: a concentrazioni maggiori (linea arancione, proteina 50 μM) la proteina eluisce sotto forma di tetramero, mentre a concentrazioni minori (linea verde, proteina 30 μM) eluisce come omodimero DinJ-DinJ e i monomeri di YafQ, corrispondenti rispettivamente al picco di sinistra e di destra sulla linea verde.

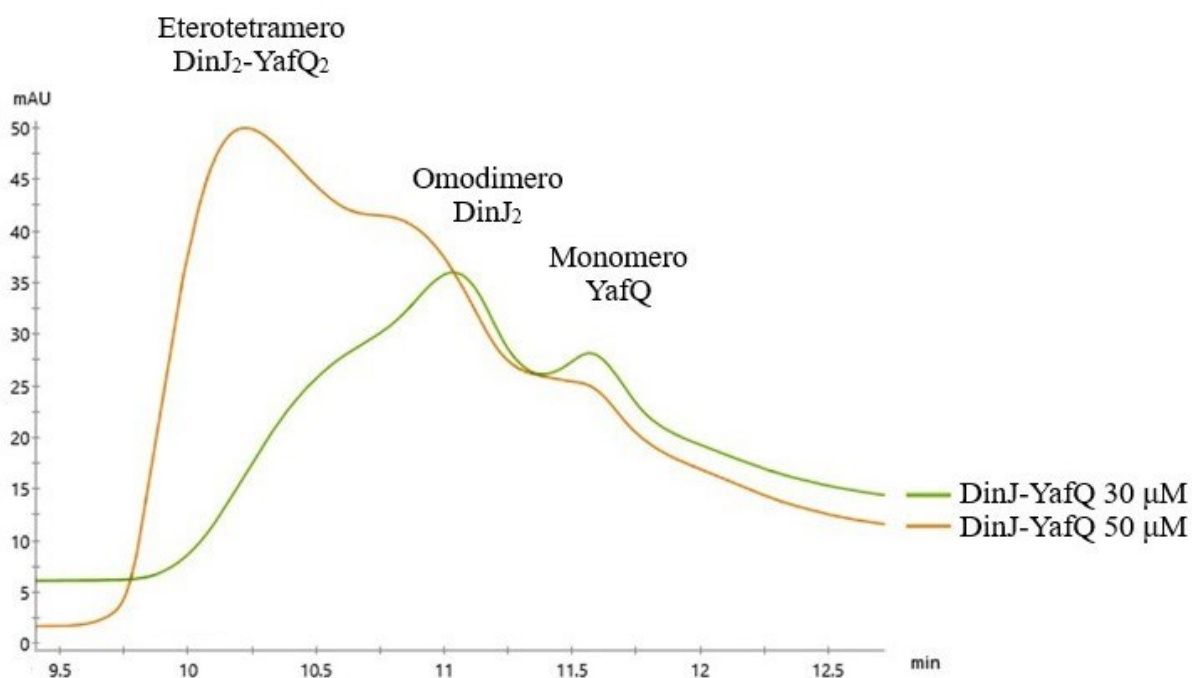


Figura 4.10. La cromatografia ad esclusione dimensionale su colonna Superose 6 dei complessi DinJ-YafQ a concentrazioni diverse rivela stati di oligomerizzazione diversi in funzione della concentrazione del complesso: alla concentrazione 50 μM (linea arancione) il picco principale potrebbe essere dato dal complesso eterotetramerico, invece alla concentrazione minore del complesso, pari a 30 μM (linea verde), si ottengono due picchi di eluizione principali corrispondenti a specie dal peso molecolare minore, che potrebbero essere dati dall'omodimero DinJ₂ (picco a sinistra, linea verde) e dal monomero YafQ (picco a destra, linea verde).

4.2.2. Stati oligomerici di DinJ

Il *crosslinking* con glutaraldeide di DinJ, mostrato in figura 4.11, rivela che l'unico stato oligomerico con cui la proteina si presenta è un dimero, sulla base delle dimensioni della banda rilevata mediante SDS-PAGE nei campioni incubati con l'agente crosslinkante (*lanes* 3 e 4, corrispondenti alle concentrazioni di DinJ 7.5 e 20 μM , rispettivamente) rispetto alle bande del marcatore del peso molecolare.

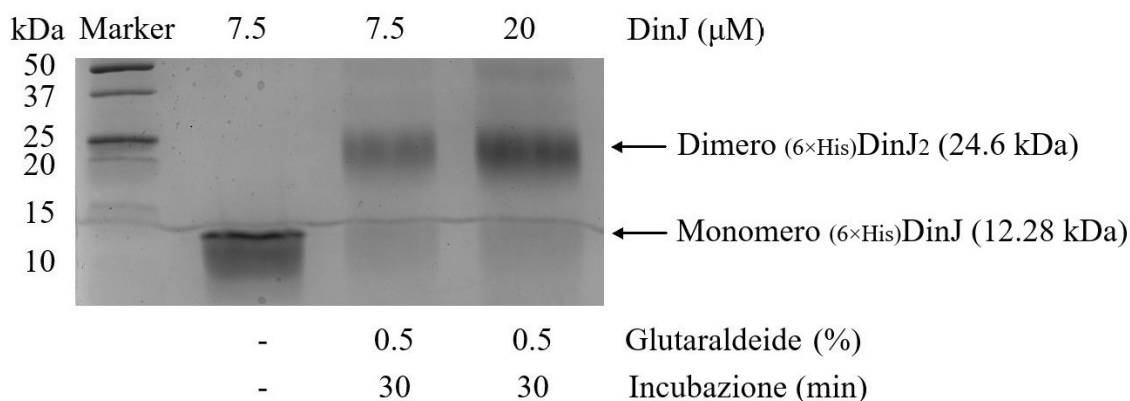


Figura 4.11. SDS-PAGE di DinJ alle concentrazioni 7.5 e 20 μ M dopo l'incubazione con glutaraldeide 0.5% per 30 minuti (*lanes* 3 e 4); nel controllo negativo, in assenza di glutaraldeide, la concentrazione della proteina è 7.5 μ M (*lane* 2). Gli stati oligomerici delle specie crosslinkate sono indicati dalle frecce sulla base delle dimensioni del marcatore del peso molecolare (*lane* 1).

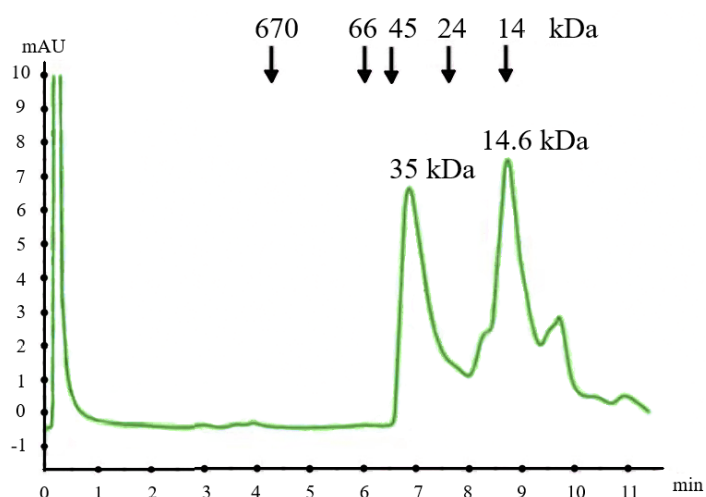


Figura 4.12. Cromatografia ad esclusione dimensionale su colonna Superdex 200 Increase 5/150 GL di DinJ. I due picchi principali hanno un tempo di eluizione di 6.87 e 8.77 minuti e corrispondono a pesi molecolari apparenti di 35 e 14.6 kDa, rispettivamente.

DinJ in soluzione è presente sia come monomero che come omodimero. Il monomero DinJ genera un picco corrispondente ad un peso molecolare apparente di 14.6 kDa, osservabile in figura 4.12, picco di destra, nel profilo di eluizione mediante cromatografia ad esclusione dimensionale (il peso molecolare della forma monomerica di DinJ è 12.28 kDa). L'omodimero DinJ-DinJ è attribuibile al picco relativo al peso molecolare apparente di 35 kDa, in figura 4.12, picco di sinistra (il peso molecolare del dimero DinJ₂ è 24.6 kDa). Questi risultati sono supportati dall'evidenza emersa dal

crosslinking della medesima proteina, la cui analisi mediante SDS-PAGE mostra la presenza di due specie aventi dimensioni compatibili con il monomero di 12.28 kDa e il dimero di 24.6 kDa, e il maggiore peso molecolare osservato mediante cromatografia ad esclusione dimensionale rispetto al valore atteso, che sarebbe 24.6 kDa per DinJ_(6×His) nella forma dimerica, anzichè 35 kDa, potrebbe essere dovuto alla conformazione allungata del dimero DinJ-DinJ.

4.2.3. Stati oligomerici di YafQ

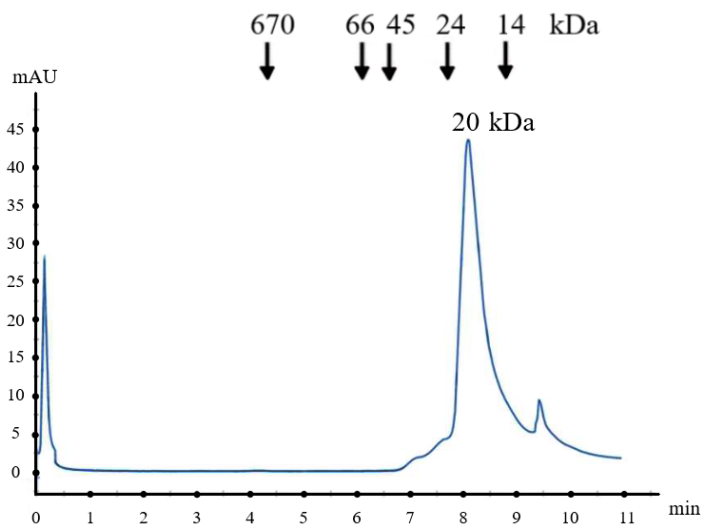


Figura 4.13. Cromatografia ad esclusione dimensionale su colonna Superdex 200 Increase 5/150 GL di $(6\times\text{His})\text{YafQ}$ di *L. paracasei* 4366 (13.6 kDa). Il picco principale ha un tempo di eluizione di 8.09 minuti e corrisponde ad un peso molecolare apparente di 20 kDa, attribuibile alla forma monomerica della tossina.

I risultati ottenuti mediante gli esperimenti di *crosslinking*, integrati con le informazioni ricavate dalla cromatografia ad esclusione dimensionale, supportano l'ipotesi che DinJ in soluzione si presenti come omodimero (figura 4.11, *lanes* 3 e 4), che YafQ si associ al dimero DinJ-DinJ senza formare omodimeri di YafQ (vedi il profilo di eluizione di YafQ nella cromatografia ad esclusione dimensionale riportata in figura 4.13: vi è un unico picco principale corrispondente ad un peso molecolare apparente di 20 kDa, attribuibile alla forma monomerica), per cui il trimero osservato potrebbe essere dato da un monomero di YafQ associato al dimero DinJ₂, un comportamento

compatibile con quello che è stato osservato nel sistema omologo in *E. coli*, la cui struttura tridimensionale è stata risolta e da cui emerge che il complesso si forma dalla dimerizzazione di due monomeri DinJ mediante l'interazione a livello dell'N-terminale, mentre YafQ si associa al C-terminale di DinJ per formare l'eterotetramero YafQ-(DinJ)₂-YafQ.

4.3. Studio del legame di DinJ al promotore del proprio operone

4.3.1. DinJ e il complesso DinJ-YafQ legano una sequenza palindromica sul promotore del proprio operone in modo cooperativo

Dalle informazioni disponibili per l'antitossina omologa di *E. coli* e dalle analisi di omologia, è stato predetto che DinJ del genere *Lactocaseibacillus* possa legare una sequenza palindromica posta sul promotore del proprio operone, sovrapposta all'elemento -35, mediante un dominio RHH al terminale amminico, sia in forma omodimerica che eterotetramerica in associazione a YafQ. In *E. coli*, DinJ assume un *folding* ordinato solo in seguito all'omodimerizzazione e la sua stabilità è ulteriormente incrementata dalla formazione del complesso eterotetramericco con YafQ.

La capacità di DinJ di legarsi al proprio promotore è stata analizzata sia in vitro, mediante l'EMSA, sia in vivo utilizzando la ORF della *gfp* come gene reporter, posta sotto il controllo del promotore dell'operone *dinJ-yafQ* di *Lactocaseibacillus paracasei*. Questi esperimenti hanno dimostrato l'attività di repressore trascrizionale di DinJ sia sottoforma di omodimero, sia nel complesso eterotetramericco con YafQ.

La capacità di DinJ di legare il promotore del proprio operone è stata analizzata in vitro mediante il saggio del ritardo della mobilità elettroforetica (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA), che sfrutta il rallentamento della corsa di un frammento di DNA su un gel elettroforetico in seguito al legame della proteina al DNA, dovuto al maggiore peso molecolare del complesso DNA-proteina rispetto al DNA dissociato dalla proteina.

È stata usata una sequenza del promotore di *dinJ-yafQ* di 194 bp marcata al 5' di entrambe le estremità con il fluoroforo Alexa Fluor 680, che conferisce un'elevata sensibilità di rilevamento della molecola,

per cui sono sufficienti piccole quantità di DNA per poterlo visualizzare e questo è un requisito essenziale per la misurazione della costante di dissociazione del complesso proteina–DNA, in quanto è importante che la concentrazione della proteina sia in forte eccesso rispetto al ligando.

Dopo aver assemblato le reazioni di legame della proteina al DNA e analizzato la frazione di DNA legato, come descritto in “Materiali e metodi”, è stato possibile ricavare i parametri che descrivono il comportamento della proteina studiata nel contesto del legame al proprio promotore, ossia la costante di dissociazione (K_D) e il coefficiente di Hill. La costante di dissociazione del complesso proteina–DNA è la concentrazione della proteina alla quale il 50% del DNA in soluzione è legato a formare il complesso nucleoproteico, è il reciproco dell’affinità, quanto minore è il valore della K_D tanto maggiore sarà l’affinità della proteina per una determinata sequenza di DNA. Per poter misurare la K_D mediante l’EMSA è importante che la concentrazione del DNA sia inferiore alla K_D ¹¹⁴.

Il legame cooperativo descrive la facilitazione di una molecola a legare un ligando se in soluzione si sono già formati dei complessi tra le due specie interagenti; la cooperatività è possibile solo se una delle due componenti coinvolte nell’interazione presenta più di un sito di legame per il ligando e il coefficiente di Hill (n) è il parametro che definisce quanto sia cooperativo il legame:

- se $n = 1$ allora la formazione del legame tra le due componenti non dipende dalla presenza di altri complessi già formati;
- $n > 1$ indica cooperatività positiva;
- $n < 1$ indica cooperatività negativa, per cui l’interazione tra le componenti sfavorisce la formazione di altri complessi.

EMSA con DinJ

L'EMSA con DinJ (figura 4.14.a) e la relativa curva di saturazione (figura 4.14.b) rivelano che DinJ lega con alta affinità e in modo cooperativo il promotore del proprio operone, con una $K_D \approx 60$ nM e un coefficiente di Hill ≈ 3.2 : i valori sono stati ricavati dall'analisi densitometrica della corsa elettroforetica delle reazioni di legame (figura 4.14.a) e dal *fitting* dei dati ottenuti sperimentalmente (figura 4.14.b), come descritto in "materiali e metodi".

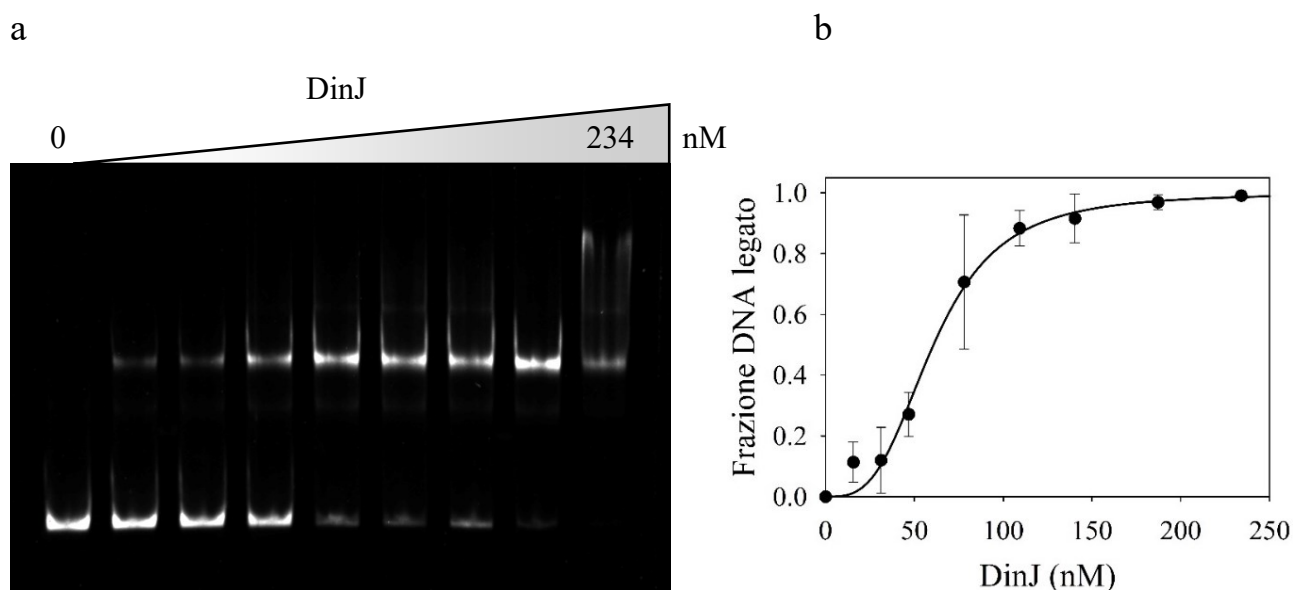


Figura 4.14. a) EMSA con DinJ di *L. paracasei* 4366.

Concentrazioni della proteina:

0 nM – 16 nM – 32 nM – 48 nM – 78 nM – 109 nM – 140 nM – 187 nM – 234 nM

b) Curva di legame di DinJ al DNA. Ciascun punto riportato è il valore medio ottenuto da tre esperimenti indipendenti \pm deviazione standard. $K_{Dapp} = 61 \pm 4$ nM. Coefficiente di Hill = 3.2 ± 0.5 .

EMSA con il complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 4366

L'EMSA con DinJ-YafQ di *L. paracasei* 4366 (figura 4.15.a) mostra che il complesso lega il promotore del proprio operone in modo cooperativo con affinità superiore rispetto a DinJ, con una $K_D \approx 44$ nM e un coefficiente di Hill ≈ 2.4 (il *fitting* dei dati sperimentali è riportato in figura 4.15.b).

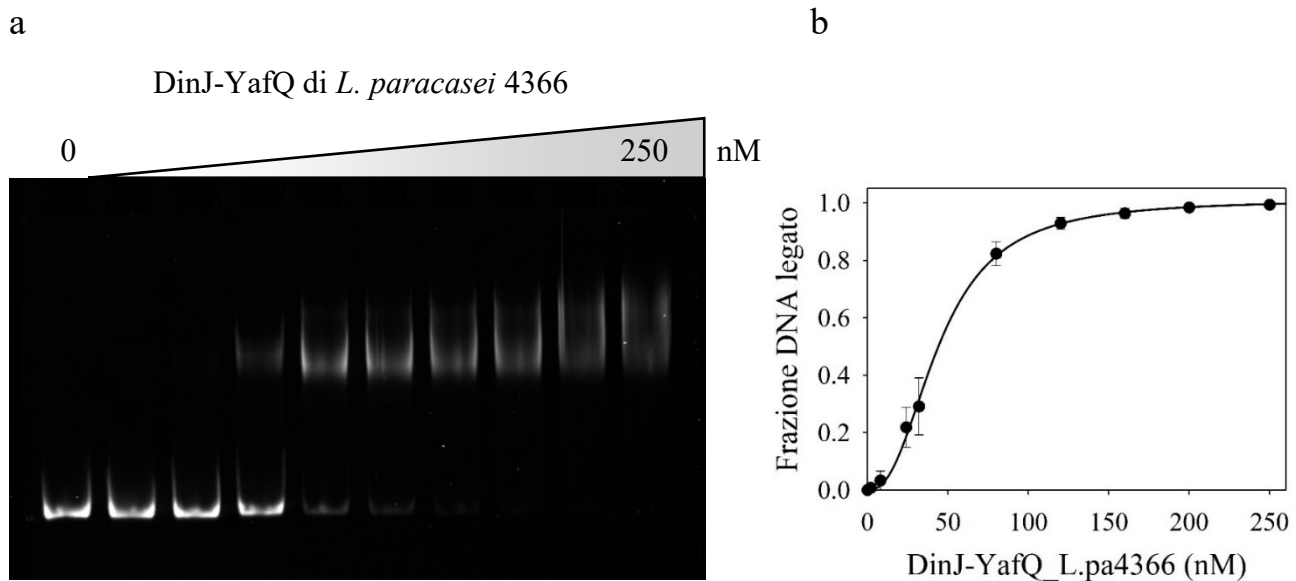


Figura 4.15. a) EMSA con il complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 4366.

Concentrazioni della proteina:

0 nM – 2 nM – 8 nM – 24 nM – 32 nM – 80 nM – 120 nM – 160 nM – 200 nM – 250 nM

b) Curva di legame del complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 4366 al DNA. Ciascun punto riportato è il valore medio ottenuto da tre esperimenti indipendenti \pm deviazione standard. $K_{Dapp} = 44 \pm 1.7$ nM. Coefficiente di Hill = 2.4 ± 0.2 .

EMSA con YafQ di *L. paracasei* 4366

Per verificare se YafQ nel complesso DinJ-YafQ interagisca direttamente con il DNA, è stato fatto un EMSA con YafQ di *L. paracasei* 4366 e il promotore di *dinJ-yafQ*, da cui è risultato che YafQ non lega il DNA (vedi figura 4.16): la banda di DNA non subisce il ritardo della corsa nemmeno alla massima concentrazione di proteina, corrispondente a 468 nM (*lane* 5), mentre il legame di DinJ al promotore si può osservare già alla concentrazione 16 nM (figura 4.14.a, *lane* 2) e il legame del complesso DinJ-YafQ alla concentrazione 24 nM (figura 4.15.a, *lane* 4).

Il legame del complesso DinJ-YafQ al promotore è mediato esclusivamente da DinJ, infatti YafQ non partecipa direttamente al legame del complesso al DNA.

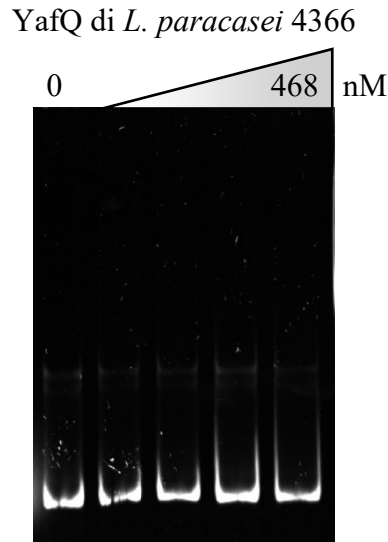


Figura 4.16. EMSA con YafQ di *L. paracasei* 4366. La tossina non lega il DNA.

Concentrazioni della proteina:

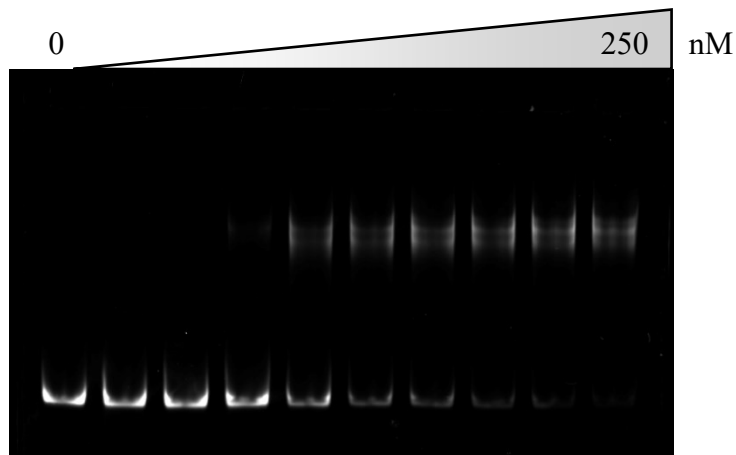
0 nM – 40 nM – 117 nM – 234 nM – 468 nM

EMSA con il complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 2333

L'EMSA con DinJ-YafQ di *L. paracasei* 2333 (figura 4.17.a) mostra che il complesso lega il promotore del proprio operone in modo cooperativo con un'affinità che non si discosta significativamente da quella di DinJ-YafQ di *L. paracasei* 4366: il *fitting* dei dati sperimentali, riportato in figura 4.17.b, ha rivelato una $K_D \approx 78$ nM e un coefficiente di Hill ≈ 2.4 .

L'affinità di legame del complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 2333 al DNA non presenta differenze significative rispetto al complesso del ceppo 4366: si può concludere che la sostituzione dell'Asp 72 di YafQ con la Gly non ne compromette la capacità di interazione con DinJ (vedi esperimenti di *crosslinking* con DinJ-YafQ di *L. paracasei* 2333 nelle figure 4.6 e 4.7) e non interferisce con la capacità di DinJ di legare il DNA.

a

DinJ-YafQ di *L. paracasei* 2333

b

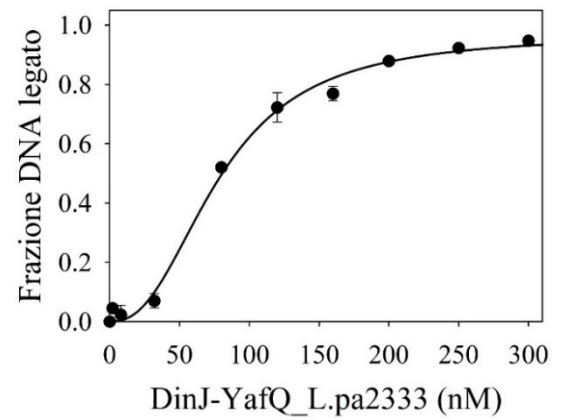


Figura 4.17. a) EMSA con il complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 2333.

Concentrazioni della proteina:

0 nM – 2 nM – 8 nM – 32 nM – 80 nM – 120 nM – 160 nM – 200 nM – 250 nM – 300 nM

b) Curva di legame del complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 2333 al DNA. Ciascun punto riportato è il valore medio ottenuto da tre esperimenti indipendenti \pm deviazione standard. $K_{Dapp} = 78 \pm 3.3$ nM. Coefficiente di Hill = 2.4 ± 0.24 .

4.3.2. L'amminoacido conservato R13 localizzato sul dominio RHH di DinJ è essenziale per il legame al DNA

L'allineamento di DinJ di *L. paracasei* con la proteina omologa in *E. coli* mostra la conservazione di un residuo di Arg, localizzato all'N-terminale, noto per essere coinvolto nel legame al DNA (R13 per *Lacticaseibacillus paracasei*, R10 per *Escherichia coli*), come mostrato nella figura 4.18. Il residuo R13 di DinJ è evidenziato in rosso nella figura 4.19, che rappresenta il modello strutturale di DinJ di *L. paracasei* 4366 e 2333 (la sequenza amminoacidica dell'antitossina nei due ceppi è identica, come si può osservare in figura 4.18, righe 2 e 3).

È stata fatta la mutagenesi sito-specifica sostituendo Arg 13 con Ala, come descritto in "Materiali e metodi", e la capacità del mutante DinJ R13A di legare il DNA è stata testata mediante l'EMSA.

	DinJ_pa4366									
	* R13	20	*	40	*	60	*	80	*	
DinJ_E.coli	---	MAANAFVRR	RI	DEDLKNQAADVLAGMGLTISDLVRLITLTKVAREKALPFDLREP	QLTIQSIK	NSEAGIDVHKAKDADDLFDK	LG	----		86
DinJ_L.pa4366	MAATKKETRLNIR	VDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFM	TKMVKDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPELLKKY	STPDDMWRDLN	----					89
DinJ_L.pa2333	MAATKKETRLNIR	VDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFM	TKMVKDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPELLKKY	STPDDMWRDLN	----					89
DinJ_L.pa4186	MAATKKETRLNIR	VDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFM	TKMVKDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPELLKKY	STPDDMWRDLN	----					89
DinJ_L.pa4341	MAATKKETRLNIR	VDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFM	TKMVKDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPELLKKY	STPDDMWRDLN	----					89
DinJ_L.ca2306	MAATKKETRLNIR	VDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFM	TKMVKDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPELLKKY	STPDDMWRDLN	----					89
DinJ_L.ca4340	MAATKKETRLNIR	VDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFM	TKMVKDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPELLKKY	STPDDMWRDLN	----					89
DinJ_L.ca2203	MAATKKETRLNIR	VDPELKSAAQIVANDMGIDLTAAVTMFM	TKMVKDHALPFTPTSLPVETLQALKEAKHPELLKKY	STPDDMWRDLN	----					89
DinJ_L.rh2360	---	METKSRISVR	IDTKTKERALHVLNSMGLDSSAINMYLKRIGDTGELPFTPEMSFADQLQAAEADV	KAGRTKSFKTVDALMKDLYNDVDD	----					90
DinJ_L.rh1019	---	MTKSRISVR	IDTKTKERALHVLNSMGLDISSAINMYLKRIGDTGALPFTPPMSFVDQLQVAEADV	KAGRIKSFKTVDALMKDLYSDVDD	----					90
DinJ_L.rh1473	---	MAKESHIRN	WINTITKKRALHVLNRLGLERFSAINMYSKRIGDTGALPFTLEMSFADQLRFAEADV	KAGRIKSFKTVGLMKDLYNDVDD	----					90

Figura 4.18. Allineamento delle sequenze amminoacidiche di DinJ di alcuni ceppi del genere *Lacticaseibacillus* con la sequenza omologa di *E. coli*: la Arg 10 in *E. coli* è conservata corrisponde alla Arg 13 di DinJ di *L. paracasei* 4366, suggerendo che quel residuo potrebbe essere coinvolto nel legame al DNA.

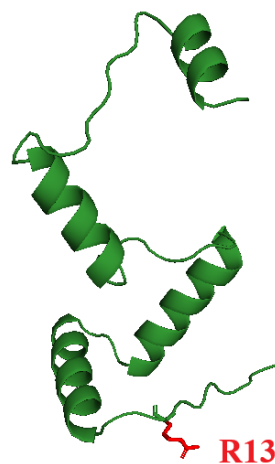


Figura 4.19. Modello strutturale di DinJ di *L. paracasei* 4366: la R13 è evidenziata in rosso.

EMSA con DinJ R13A

Come si può osservare in figura 4.20, il mutante DinJ R13A ha perso la capacità di legare il DNA: non vi è ritardo nella corsa del DNA nemmeno alla concentrazione della proteina 200 nM (*lane 5*). Il residuo Arg 13 di DinJ di *L. paracasei* media il legame al DNA.

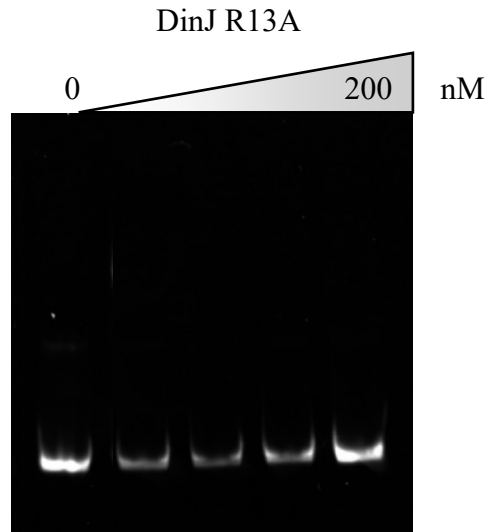


Figura 4.20. EMSA con DinJ R13A.

Concentrazioni della proteina:

0 nM – 50 nM – 100 nM – 150 nM – 200 nM

EMSA con il complesso DinJ R13A–YafQ_{pa4366}

L'EMSA con il complesso con la forma mutata di DinJ, DinJ R13A-YafQ, risulta nell'assenza di legame al DNA (figura 4.21), tuttavia compare un *supershift* ad alte concentrazioni di proteina (*lanes 7 - 8 - 9 - 10*, a cui corrispondono le concentrazioni di proteina 800 nM - 1 μ M - 1.2 μ M - 1.5 μ M): ciò suggerisce la possibilità che il legame di YafQ a DinJ possa aumentare l'affinità di DinJ al DNA e che lo *supershift* osservato corrisponda ai complessi DinJ R13A-YafQ legati al promotore. Infatti, dagli studi in vivo con la GFP come sistema reporter, è emerso che in terreno liquido in presenza di YafQ l'antitossina mutata è stata in grado di eseguire una repressione trascrizionale (vedi la differenza tra la figura 4.35.b, che illustra la misurazione della fluorescenza della GFP in colture cellulari in terreno liquido in presenza della forma mutata di DinJ R13A senza YafQ, e la figura 4.37.b B, che mostra la riduzione della fluorescenza della GFP quando il mutante DinJ R13A è coespresso con YafQ, rispetto alle misurazioni riportate in figura 4.35.b).

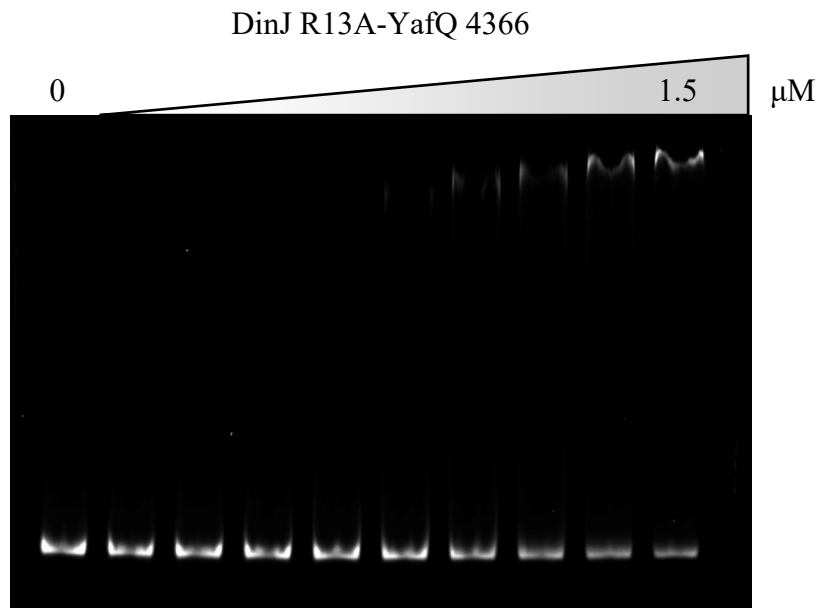


Figura 4.21. EMSA con il complesso DinJ R13A-YafQ_{pa4366}.

Concentrazioni della proteina:

0 nM – 50 nM – 100 nM – 200 nM – 400 nM – 600 nM – 800 nM – 1 µM – 1.2 µM – 1.5 µM

È stato condotto un saggio dell'attività ribonucleasica di YafQ di *L. paracasei* 4366 nel complesso con la forma mutata di DinJ R13A, riportato nella figura 4.22, per verificare gli effetti della mutazione nel dominio dell'antitossina che è predetto di legare il DNA sulla capacità di neutralizzare la tossina: la mutazione R13A di DinJ non ne compromette la capacità di neutralizzare YafQ, come si può osservare dal saggio dell'attività ribonucleasica del complesso DinJ R13A-YafQ in figura 4.22. Questo risultato supporta l'ipotesi che la regione di DinJ che media il legame al DNA non sia coinvolta nell'interazione con YafQ, come si può osservare dal modello strutturale del complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 4366 (vedi figura 4.26).

Attività RNAsica di DinJ R13A-YafQ 4366

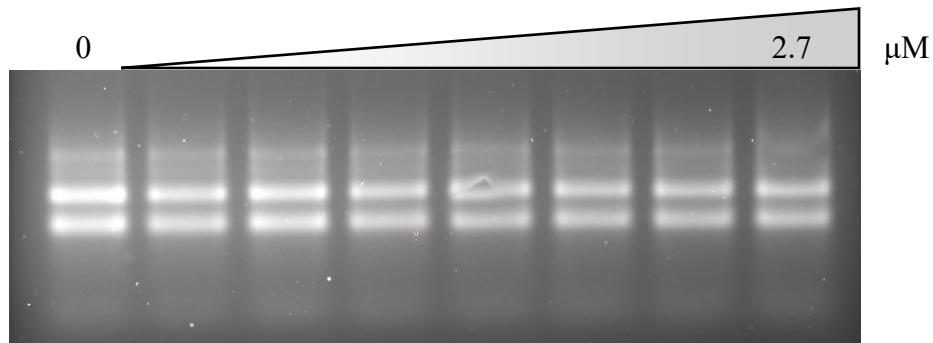


Figura 4.22. Saggio dell'attività ribonucleasica del complesso DinJ R13A-YafQ_{pa4366}.

120 ng di RNA per ogni reazione.

Concentrazione della proteina:

0 nM – 27 nM – 135 nM – 270 nM – 540 nM – 1.1 μM – 1.6 μM - 2.7 μM

4.3.3. DinJ reprime in maniera specifica la trascrizione dell'operone *dinJ-yafQ* impedendo all'RNA polimerasi di accedere al promotore

Dagli EMSA di competizione con DinJ-YafQ e la RNA pol, utilizzando come promotori quello di *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* 4366 in un caso (figura 4.23.a) e il promotore PR del fago λ nell'altro (figura 4.23.b), è risultato che:

- la repressione trascrizionale mediata da DinJ avviene bloccando l'accesso dell'RNA pol al promotore;
- la repressione è specifica, infatti DinJ-YafQ non è in grado di legarsi al promotore PR del fago λ (vedi *lane* 2 in figura 4.23.b) e ciò lo rende accessibile all'RNA pol (in figura 4.23.b il legame della RNA pol al promotore, *lanes* 3-4-5-6, non presenta variazioni in presenza di un gradiente crescente del complesso DinJ-YafQ, perché quest'ultimo non lega il promotore PR del fago λ).

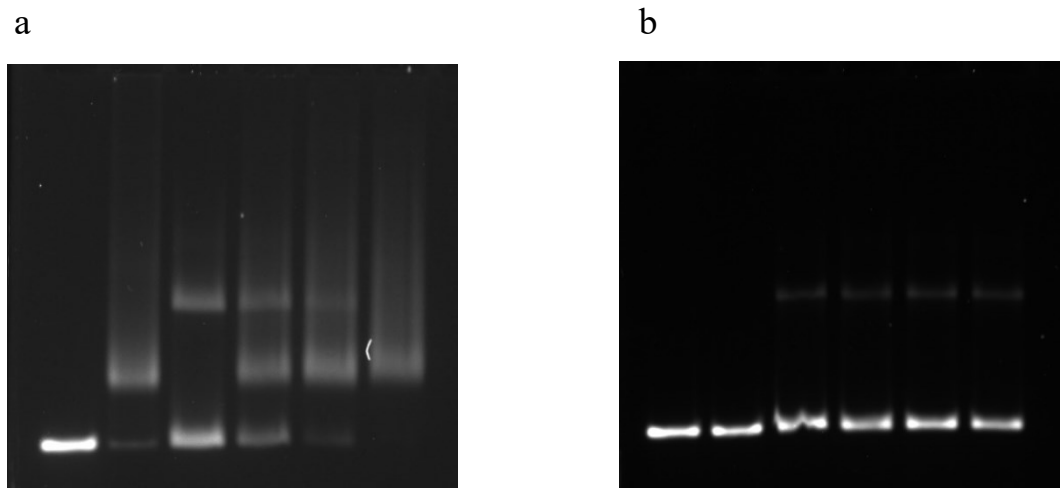


Figura 4.23. EMSA di competizione con il promotore di *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* 4366 (a) e del promotore PR del fago λ (b).

Componenti delle *lanes*:

DNA (ctrl⁻) – DY 200 nM – RNA pol – RNA pol + [(DY 50 nM) – (DY 100 nM) – (DY 200 nM)]

(dove la concentrazione della RNA pol è costante, pari a 200 nM).

4.3.4. La presenza delle due ripetizioni invertite sul promotore è importante per il legame cooperativo di DinJ e DinJ-YafQ al DNA

Per verificare il ruolo dei due emisiti della sequenza palindromica sul promotore di *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* nella capacità di DinJ di legare il DNA, sono stati condotti studi di mutagenesi a carico della sequenza del promotore, volti a verificare il legame di DinJ al promotore in presenza di uno solo dei due emisiti in seguito alla rimozione di uno di essi. La mutagenesi della sequenza del promotore di *dinJ-yafQ* è stata eseguita come descritto in “Materiali e metodi”.

È stato studiato l’effetto sul legame di DinJ al DNA dell’assenza di uno dei due emisiti della sequenza palindromica: mediante mutagenesi sito diretta è stato rimosso il secondo emisito (IR2) e la sequenza mutata del promotore è stata utilizzata per eseguire l’EMSA con il complesso DinJ-YafQ.

L’affinità di legame risulta ridotta, non vi è lo *shift* totale del DNA nemmeno ad elevate concentrazioni di proteina: infatti, come si può osservare in figura 4.15.a, in cui è riportato un EMSA con il complesso DinJ-YafQ di *L. paracasei* 4366, alla concentrazione del complesso 160 nM (*lane* 8) tutto il DNA risulta essere legato, mentre nel caso del promotore contenente un solo emisito (vedi

figura 4.24) una frazione di DNA non legato è ancora presente alla massima concentrazione di proteina testata, ossia 500 nM (*lane* 10).

EMSA con il complesso DinJ-YafQ e il promotore mutato (rimozione di un emisito)

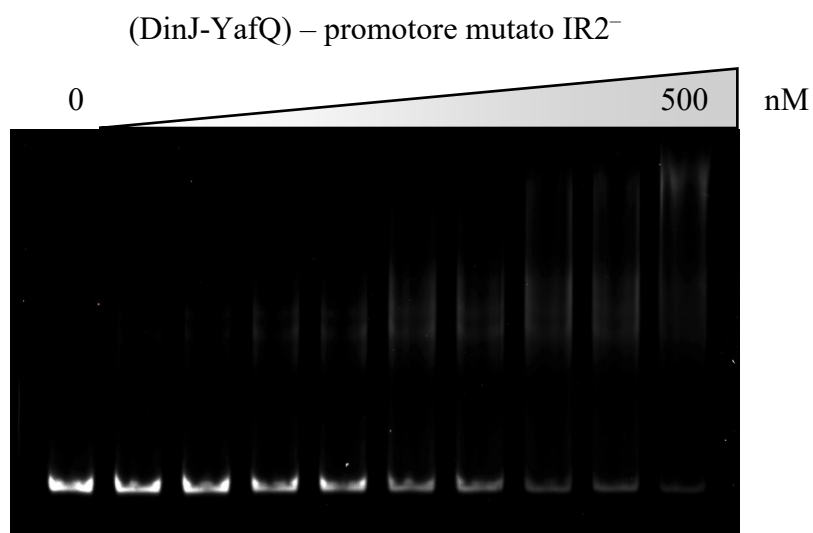


Figura 4.24. EMSA con DinJ-YafQ e il promotore privo di un emisito.

Concentrazioni del complesso:

0 nM – 20 nM – 40 nM – 80 nM – 120 nM – 160 nM – 200 nM – 300 nM – 400 nM – 500 nM

4.3.5. Un modello strutturale di due eterotetrameri DinJ-YafQ legati al promotore è compatibile con la cooperatività del legame in *Lacticaseibacillus paracasei*

È stato costruito un modello strutturale di due complessi tetramericici DinJ-YafQ di *L. paracasei*, associati ciascuno ad un emisito della ripetizione invertita sul proprio promotore (la sequenza palindromica è rappresentata in figura 4.25, mentre il modello strutturale del legame di due complessi tetramericici DinJ-YafQ al promotore è riportata in figura 4.26). Da questo modello è emerso che il simultaneo legame di due complessi DinJ-YafQ al promotore è possibile grazie alla distanza tra i due emisiti di legame, che ne determina il posizionamento ai lati opposti della doppia elica, senza scontro sterico tra i due complessi. Nel sistema omologo di *E. coli*, rappresentato in figura 4.27, invece, la distanza tra i due emisiti della sequenza palindromica ne determina l'esposizione sullo stesso lato della doppia elica, ad una distanza troppo ridotta, che risulta incompatibile con il simultaneo legame di due complessi al promotore, a causa dell'ingombro sterico delle proteine ¹¹⁵.

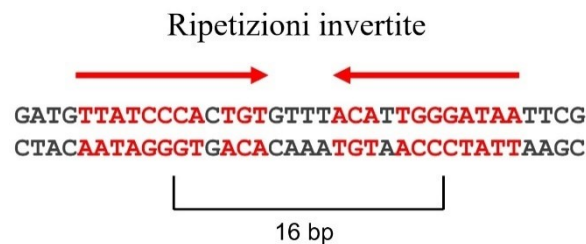


Figura 4.25. Sequenza palindromica del promotore di *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* 4366, predetta di essere il sito di legame di DinJ e DinJ-YafQ. La distanza tra i due emisiti rende ciascun sito di legame esposto sul versante opposto della doppia elica, in quanto corrisponde a 1.5 giri (adattato da Rif. 116).

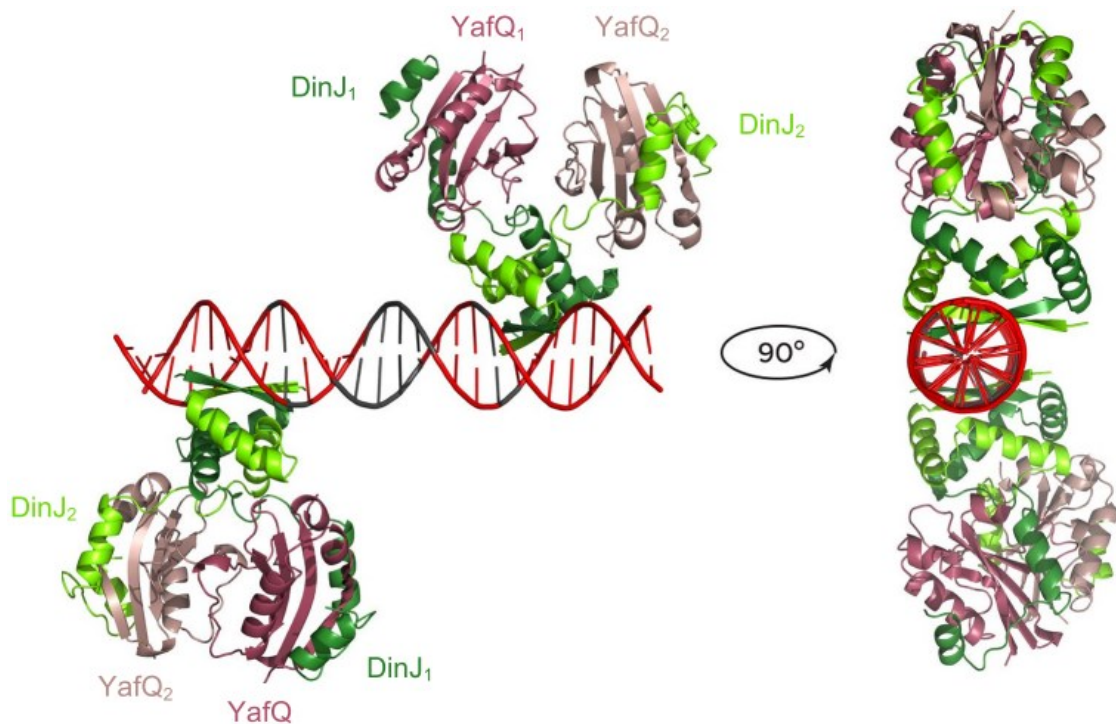


Figura 4.26. Modello strutturale del legame di due tetrameri DinJ-YafQ di *L. paracasei* 4366 legati al promotore: ciascun tetramero lega un singolo emisito della sequenza palindromica e, grazie alla distanza tra i due emisiti, è possibile il legame simultaneo di due eterotetrameri al promotore, in quanto non c'è scontro (adattato da Rif. 116).

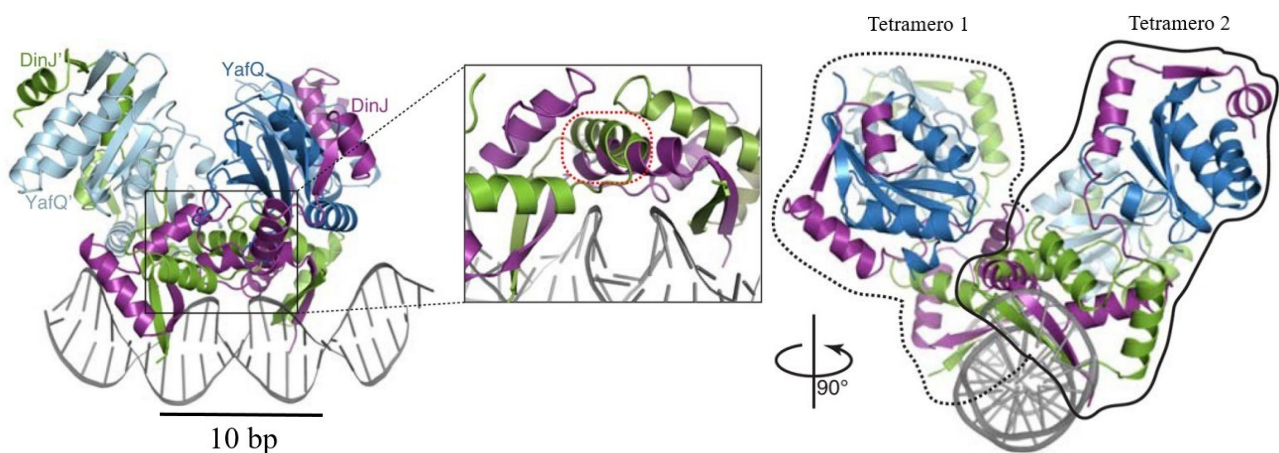


Figura 4.27. Modello strutturale del legame di due tetrameri DinJ-YafQ di *E. coli* al promotore: la distanza tra i due emisiti non è compatibile con il simultaneo legame dei due tetrameri a causa dello scontro sterico (adattato da Rif. 115).

4.4. *Microscopia a forza atomica*

Il legame di DinJ-YafQ al proprio promotore è stato analizzato mediante microscopia a forza atomica (*Atomic Force Microscopy*, AFM) per verificarne la specificità del legame e per analizzare gli stati oligomerici del complesso in presenza del relativo sito di legame.

Il frammento di DNA usato in questo studio all'AFM, costituito da 1051 bp, presenta la sequenza del promotore di *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* 4366 ad una distanza di 404 bp da un'estremità del frammento: misurando la distanza del complesso nucleoproteico dalle estremità del DNA nell'immagine acquisita è possibile rilevare la posizione sul DNA a cui il complesso proteico si è legato e ciò permette di verificare se sia stata legata la sequenza palindromica sovrapposta all'elemento -35 del promotore (procedura descritta in "Materiali e metodi").

Dalla misurazione della posizione sul DNA di numerosi complessi nucleoproteici è risultato che DinJ-YafQ lega preferenzialmente la regione del proprio promotore prevista: la posizione del legame e la relativa frequenza osservata sono riportate sul grafico in figura 4.28 e un esempio delle immagini acquisite mediante AFM, da cui sono stati ricavati i dati riportati in figura 4.28, è riportata in figura 4.29.

Lo studio dell'interazione di DinJ con il promotore del proprio operone mediante microscopia a forza atomica ha fornito un'evidenza della specificità con cui l'antitossina interagisce con il DNA e ha confermato la localizzazione del sito di legame di DinJ in corrispondenza della sequenza palindromica parzialmente sovrapposta all'elemento -35 del promotore di *dinJ-yafQ*.

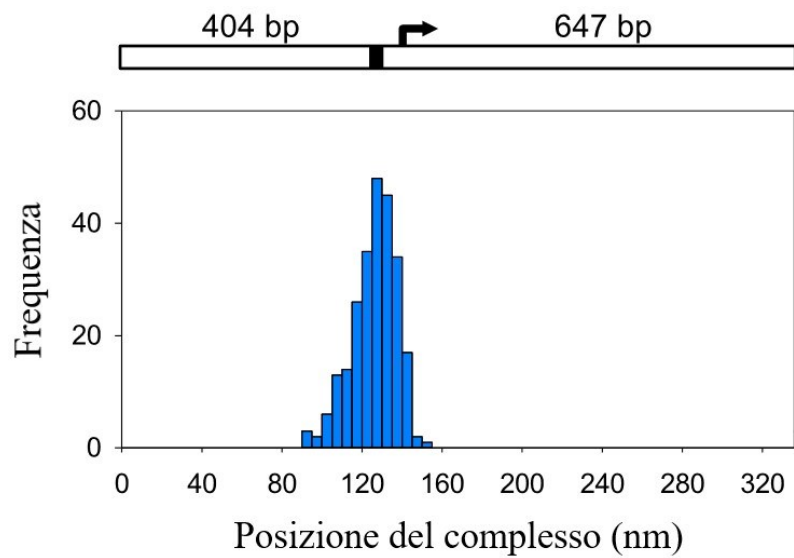


Figura 4.28. Grafico in cui sono rappresentate le posizioni dei complessi nucleoproteici sul frammento di DNA e la relativa frequenza di rilevamento posta sotto forma di quantificazione numerica; il pannello superiore rappresenta la posizione della sequenza palindromica predetta essere il sito di legame di DinJ-YafQ, evidenziata in nero, che dista 404 bp da un'estremità del frammento e 647 bp dall'altra estremità, mentre la freccia evidenzia la posizione +1 (sito di inizio della trascrizione).

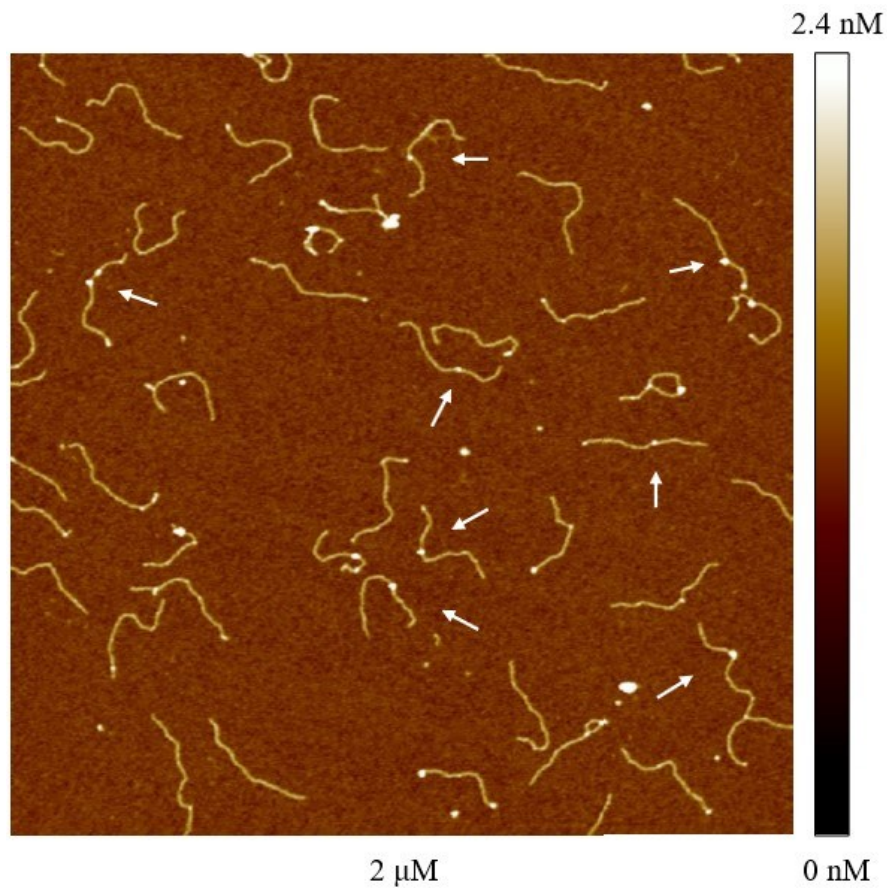


Figura 4.29. Immagine acquisita mediante AFM dei complessi DinJ-YafQ legati al DNA: numerosi complessi risultano localizzati in corrispondenza della sequenza palindromica predetta essere il sito di legame di DinJ-YafQ e sono indicati mediante le frecce bianche.

La misurazione del volume dei complessi nucleoproteici, eseguita come descritto in “Materiali e metodi”, permette di studiarne la stechiometria e, quindi, di analizzarne gli stati oligomerici, facendo riferimento alla relazione tra il volume misurato e il peso molecolare corrispondente, che viene ricavata mediante una retta di taratura (riportata in figura 4.30) eseguita misurando il volume di proteine dal peso molecolare noto.

Il metodo che è stato usato per misurare il volume dei complessi DinJ-YafQ è illustrato in figura 4.31.

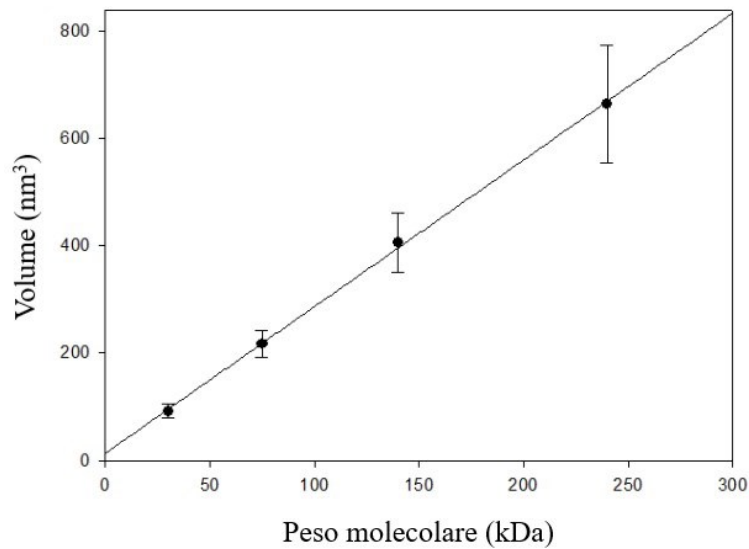


Figura 4.30. Retta di taratura che riporta il volume misurato di proteine a peso molecolare noto, nelle immagini acquisite mediante AFM, in funzione del peso molecolare corrispondente. La retta così ottenuta è stata utilizzata per ricavare il peso molecolare dei complessi nucleoproteici costituiti da oligomeri di DinJ-YafQ, usando come riferimento il valore del volume misurato del complesso.

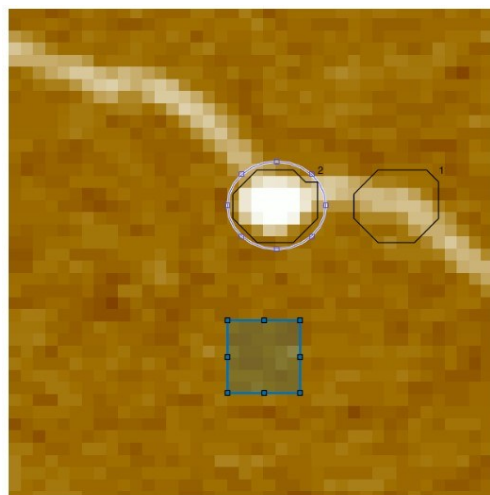


Figura 4.31. Illustrazione della procedura utilizzata per misurare il volume dei complessi DinJ-YafQ, legati in modo specifico al proprio promotore, da cui è possibile ricavare il relativo stato oligomerico: la selezione ellittica bianca, eseguita manualmente, definisce l'oggetto della misurazione, ossia il complesso proteico, le selezioni mediante la linea nera delimitano i pixel usati come parametro di misurazione del volume del complesso proteico (numero 2) e del DNA (numero 1); i pixel contenuti nella selezione del riquadro blu sono utilizzati per definire lo sfondo da sottrarre alle misurazioni dei complessi.

I volumi dei complessi proteici misurati ricoprono un ampio intervallo compreso tra 20 e 1200 nm³ che, sulla base della retta di calibrazione riportata in figura 4.30, corrispondono a pesi molecolari che vanno da 50 a oltre 300 kDa e, come mostrato in figura 4.32, il volume riscontrato più frequentemente è circa 250 nm³, corrispondente a circa 100 kDa. I pesi molecolari maggiormente distribuiti rientrano in un range compreso tra 50 e 150 kDa, corrispondente a 1 e 3 eterotetrameri DinJ-YafQ, rispettivamente. Tuttavia, con minore frequenza, sono state rilevate forme oligomeriche di dimensioni minori, compatibili con un omodimero DinJ-DinJ, e stati oligomeriche superiori, corrispondenti a 4 eterotetrameri e, con frequenza progressivamente minore, forme oligomeriche che arrivano fino a 8 eterotetrameri.

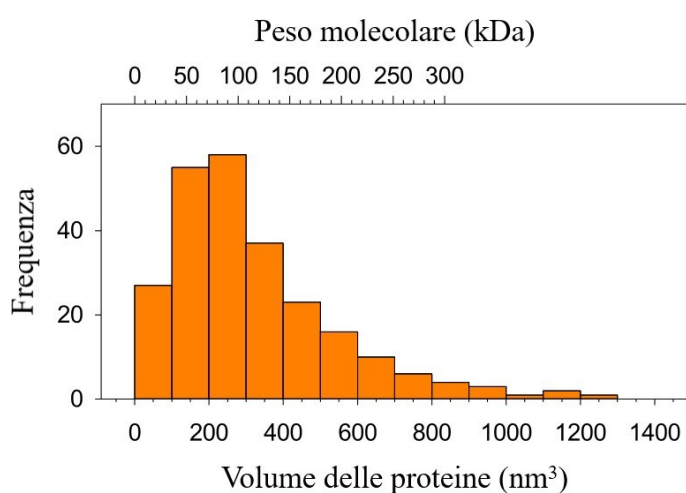


Figura 4.32. Rappresentazione grafica dei differenti volumi dei complessi proteici misurati, con il corrispondente peso molecolare indicato superiormente, e la relativa quantità, che rivela che le forme oligomeriche maggiormente rappresentate consistono in 1, 2 e 3 eterotetrameri associati al DNA.

Le osservazioni fatte mediante AFM del complesso DinJ-YafQ legato al DNA hanno rivelato la formazione degli stati oligomeriche osservati anche negli esperimenti di *crosslinking* (vedi figure 4.6 - 4.7 - 4.8), nei quali la forma oligomerica di dimensioni maggiori corrisponde ad un singolo eterotetramero, e i complessi aventi dimensioni compatibili con forme tetrameriche sono riportati nella prima riga della figura 4.33. Inoltre sono stati rilevati stati oligomeriche di ordine superiore, dei quali il più rappresentato corrisponde a due eterotetrameri (vedi figura 4.32, valori intorno a 100 kDa), riportati nella terza riga della figura 4.33, non osservabili in assenza del DNA contenente il sito di legame sul promotore, supportando la cooperatività del legame al DNA di DinJ-YafQ di *L. paracasei*.

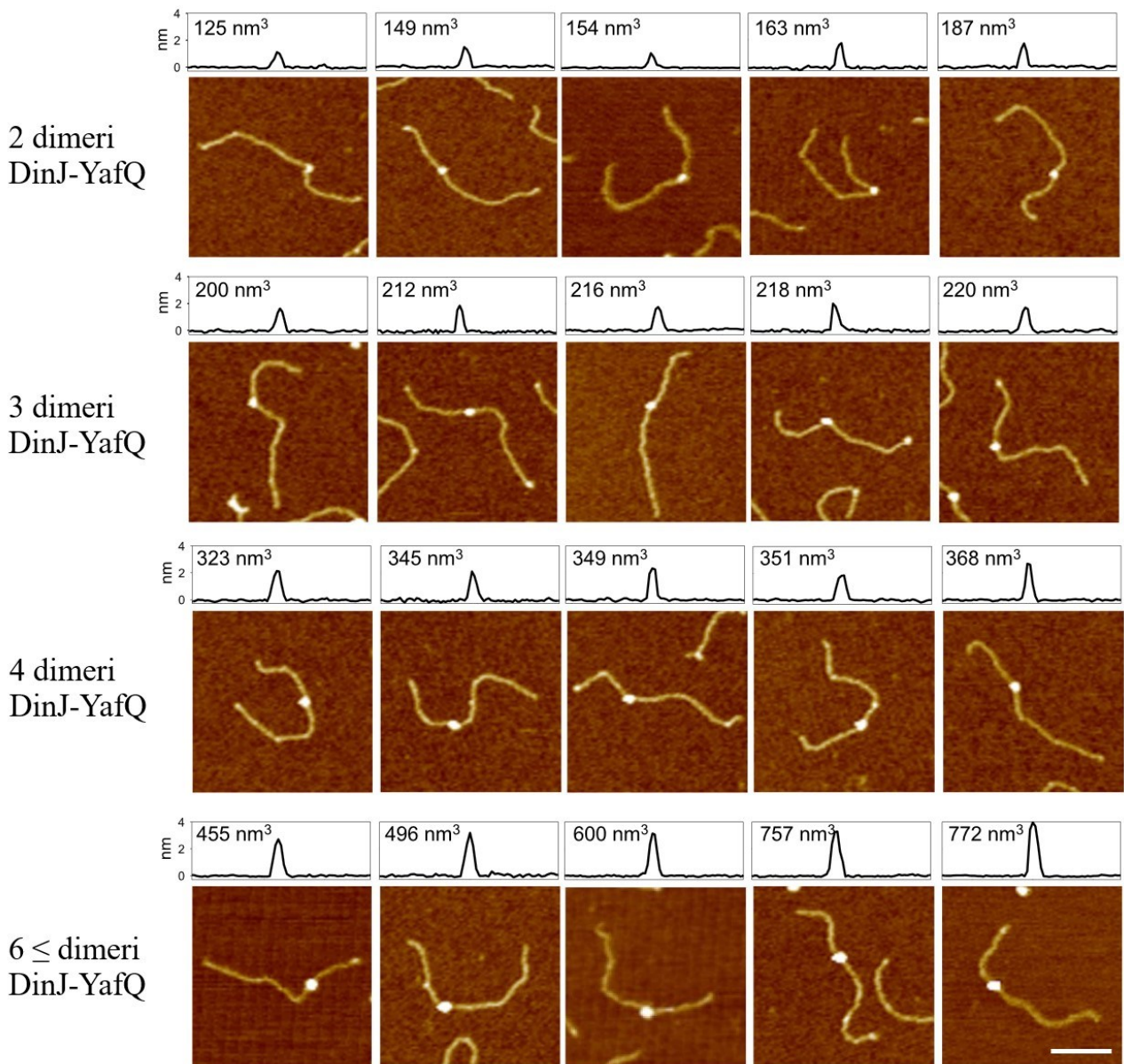


Figura 4.33. Una selezione di immagini acquisite mediante AFM dei complessi DinJ-YafQ legati in modo specifico al proprio promotore, ordinate secondo un volume crescente e, quindi, secondo stati di oligomerizzazione progressivamente maggiori: nella prima riga i complessi corrispondono a 2 dimeri DinJ-YafQ, ossia un eterotetramero, nella seconda riga sono riportati complessi aventi un volume corrispondente a 3 dimeri DinJ-YafQ, che potrebbero essere costituiti da un eterotetramero DinJ-YafQ legato ad un emisito e un dimero DinJ-DinJ legato al secondo emisito, nella terza riga i volumi dei complessi corrispondono a 2 eterotetrameri, mentre nella quarta riga sono riportati i complessi più rari, corrispondenti a 6 o più dimeri DinJ-YafQ (adattato da Rif. 116).

4.5. *DinJ reprime la trascrizione dell'operone dinJ-yafQ in vivo*

La regolazione dell'operone *dinJ-yafQ* mediata da DinJ, sia da sola che nel complesso con YafQ, è stata studiata in vivo usando la GFP (*Green Fluorescent Protein*) come sistema reporter: la preparazione di un costrutto in cui il gene codificante per la GFP è posto sotto il controllo del promotore di DinJ-YafQ permette di analizzare la repressione trascrizionale a carico del promotore studiato misurando l'intensità della fluorescenza della proteina e la sua riduzione in presenza della proteina repressore.

La GFP è una proteina che è stata isolata dalla medusa *Aequorea victoria*, ha una struttura a barile β particolarmente sottile, definita lattina β , che internamente contiene una α -elica composta da una sequenza amminoacidica in cui è incluso il tripeptide Ser 65 – Tyr 66 – Gly 67, che è responsabile della formazione del fluoroforo durante il *fold*ing.

Per verificare in vivo la repressione trascrizionale esercitata da DinJ sul proprio operone e poter apprezzare il ruolo del residuo R13 nell'attività regolatoria, il promotore di *dinJ-yafQ* a monte della sequenza codificante per la GFP è stato clonato in un plasmide pET28b in cui, sotto il controllo del promotore T7, è stato clonato *dinJ* (figura 4.34.c) oppure il mutante *dinJ* R13A (figura 4.35.c) e, con tali costrutti, sono state trasformate le cellule di *E. coli* C41 (DE3) pLysS. L'intensità della fluorescenza è stata misurata prima e dopo l'induzione con IPTG 0.5 M, sia in terreno liquido (figura 4.34.b per *dinJ wild type*, figura 4.35.b per il mutante *dinJ* R13A) sia in terreno solido (figura 4.34.a per *dinJ wild type*, figura 4.35.a per il mutante *dinJ* R13A).

In seguito all'induzione con IPTG su terreno solido, le cellule con il gene *dinJ wild type* hanno mostrato un'evidente riduzione dell'intensità della fluorescenza (figura 4.34.a), mentre le cellule con la sequenza mutata *dinJ* R13A hanno mantenuto inalterata l'intensità della fluorescenza (figura 4.35.a). Questi risultati confermano la funzione di repressore trascrizionale che DinJ esercita sul proprio operone e il ruolo cruciale del residuo R13 nel legame di DinJ al DNA, infatti la sostituzione R13A determina una significativa riduzione della capacità dell'antitossina di legare il promotore (vedi figura 4.20).

La maggiore intensità della fluorescenza delle colture non indotte e indotte in terreno liquido con la variante mutata rispetto alla proteina *wild type* mostrano che l'espressione basale di *DinJ wild type*, in assenza quindi di IPTG, sia sufficiente per avere della repressione trascrizionale (si confrontino le intensità della fluorescenza riportate in figura 4.34.b, in presenza di *DinJ wild type*, con quelle in figura 4.35.b, in presenza di *DinJ* R13A).

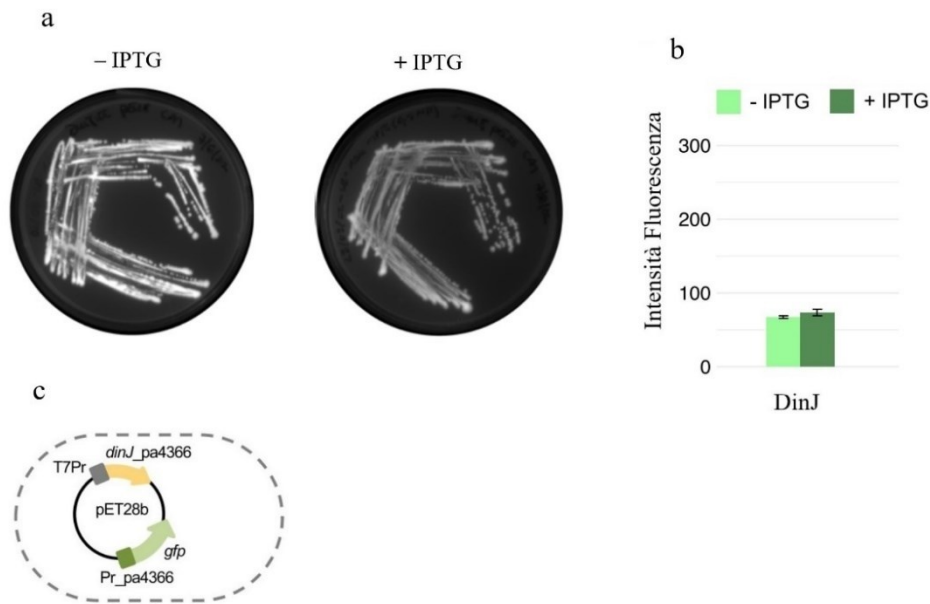


Figura 4.34. a) In seguito all'induzione dell'espressione di DinJ *wild type*, si osserva la riduzione della fluorescenza su terreno solido. La repressione trascrizionale della GFP è evidente. **b)** Non si osservano variazioni nell'intensità della fluorescenza in seguito all'induzione con IPTG in terreno liquido. **c)** Costrutto con cui sono state trasformate le cellule. I valori dell'intensità della fluorescenza misurata sono riportati nella tabella supplementare S1.a.

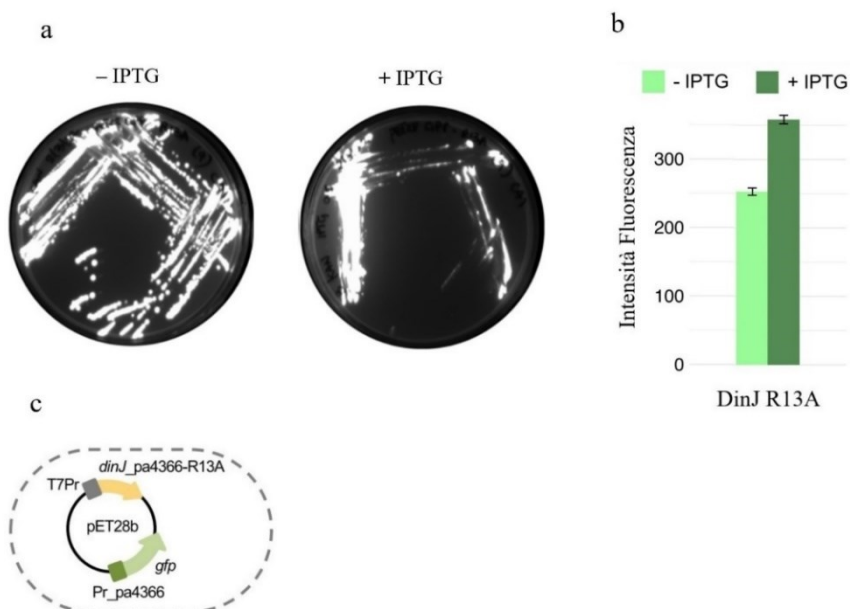


Figura 4.35. a) In seguito all'induzione dell'espressione del mutante DinJ R13A, non si osserva la repressione trascrizionale della GFP su terreno solido, l'intensità della fluorescenza resta inalterata in presenza dell'antitossina mutata. **b)** L'intensità della fluorescenza in terreno liquido presenta un incremento in seguito all'induzione con IPTG. **c)** Costrutto con cui sono state trasformate le cellule analizzate in a e b. I valori dell'intensità della fluorescenza misurata sono riportati nella tabella supplementare S1.b.

È stato fatto un controllo negativo trasformando lo stesso tipo di cellule con lo stesso costrutto privo del gene dell'antitossina, per avere un confronto della mancanza della repressione data da DinJ in assenza di induzione con IPTG e della mancanza della repressione data dalla mutazione di *dinJ*R13A, con e senza IPTG, con la mancata repressione data dall'assenza del gene dell'antitossina: la coltura su terreno solido di cellule prive del gene dell'antitossina ha restituito uno scarso numero di cellule fluorescenti (vedi figura 4.36 in alto, notare la differenza con la parte in basso che rappresenta la coltura che esprime DinJ R13A), che indica un'elevata espressione della GFP con effetti tossici sulla cellula ¹²¹. Da questi risultati si può dedurre che il promotore di *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* sia riconosciuto e trascritto efficientemente dalla RNA polimerasi di *E. coli*, supportando quanto osservato negli EMSA di competizione, dove si è osservata la capacità dell'RNA pol di *E. coli* di legare il promotore di *dinJ-yafQ* di *L. paracasei* (vedi figura 4.23.a, lane 3, e figura 4.23.b, lanes 3-4-5-6).

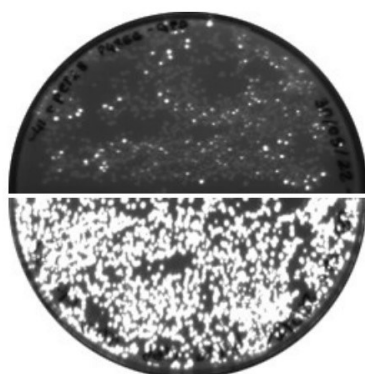


Figura 4.36. Confronto tra la coltura su terreno solido di cellule trasformate con il costrutto in cui è clonata solo la ORF della GFP fusa al promotore di DinJ-YafQ (in alto) e la coltura di cellule trasformate con un costrutto in cui sono clonati la ORF della GFP fusa al promotore di DinJ-YafQ e il gene codificante per il mutante DinJ R13A (in basso).

Per verificare se la coespressione di DinJ, *wild type* o mutante, con YafQ comporti un'alterazione nella repressione del loro operone dovuta ad una variazione dell'affinità di DinJ per il DNA in seguito all'interazione con YafQ, le cellule sono state cotrasformate con i seguenti costrutti:

- pET11b, in cui è stata clonata la sequenza codificante per YafQ di *L. paracasei* 2333, posta sotto il controllo del promotore T7;

- pET28b, in cui sono state clonate la ORF della GFP a valle del promotore di *dinJ-yafQ* e la ORF di DinJ (figura 4.37.c A) o DinJ R13A (figura 4.37.c B), sotto il controllo del promotore T7.

La scelta dell'utilizzo della variante di YafQ di *L. paracasei* 2333 è dovuta alla sua minore tossicità, gli esperimenti di legame del complesso DinJ-YafQ in vitro (EMSA) avevano mostrato che le due varianti di YafQ, dei ceppi 4366 e 2333 di *L. paracasei*, associate a DinJ non mostrano differenze significative a livello della capacità del complesso di legare il DNA (vedi figura 4.17 per il complesso di *L. paracasei* 2333 e figura 4.15 per il complesso del ceppo 4366), per cui le due varianti di YafQ sono equivalenti dal punto di vista degli effetti sull'attività di repressione trascrizionale di DinJ nel complesso DinJ-YafQ.

In presenza di YafQ, non si osservano alterazioni nell'entità della repressione del proprio operone data da DinJ *wild type*, sia su terreno liquido (figura 4.37.b A) che solido (figura 4.37.a A); invece, l'espressione di YafQ in presenza del mutante DinJ R13A non mostra variazioni su terreno solido (figura 4.37.a B), tuttavia determina una riduzione della fluorescenza in terreno liquido, sia con sia senza IPTG (figura 4.37.b B), rispetto alla condizione in cui YafQ è assente (figura 4.35.b), come mostrato nel confronto in figura 4.38: questo risultato suggerisce che YafQ sia in grado di aumentare l'affinità di DinJ al proprio promotore, e questa osservazione potrebbe fornire la spiegazione dello *supershift* osservato nell'EMSA con il complesso mutato DinJ R13A-YafQ (vedi figura 4.21, lanes 7–8–9–10), dove il legame al DNA è osservabile solo ad alte concentrazioni della proteina e lo *shift* del DNA potrebbe essere attribuito unicamente al legame del complesso, eventualmente sotto forma di stati oligomerici superiori (compatibilmente con le osservazioni condotte mediante AFM, riportate in figura 4.33).

L'induzione dell'espressione di YafQ_{pa2333} in assenza di DinJ, sia su terreno solido (figura 4.37.a C) che liquido (figura 4.37.b C) è associata ad una riduzione della fluorescenza attribuibile alla sua attività ribonucleasica.

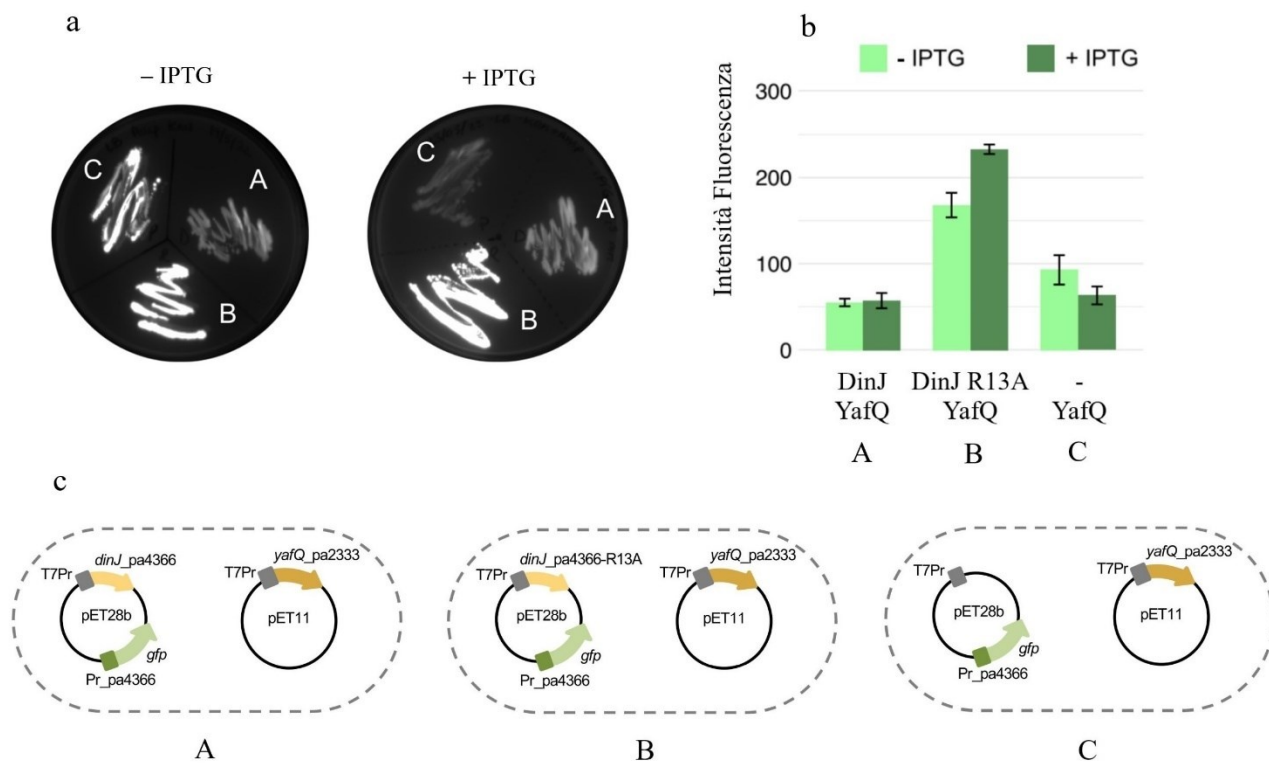


Fig. 4.37. Controllo dell'espressione della GFP in presenza di YafQ. **a)** Colture di cellule C41 (DE3) pLysS trasformate coi plasmidi illustrati in c, prima (sinistra) e dopo (destra) l'induzione con IPTG 0.5 mM. A: induzione di DinJ-YafQ; B: induzione di DinJ R13A-YafQ; C: induzione di YafQ. **b)** Intensità della fluorescenza delle colture ricombinanti in terreno liquido, prima (verde chiaro) e dopo (verde scuro) l'induzione con IPTG: la repressione rilevata in B (espressione di DinJ R13A-YafQ), sia prima che dopo l'induzione, è maggiore che in assenza di YafQ (vedi figura 4.35.b), indicando un'incremento dell'affinità di DinJ al DNA quando è associata alla tossina. In a (C) e b (C) si osserva una riduzione della fluorescenza associata all'induzione dell'espressione di YafQ che si suppone essere dovuta alla sua attività ribonucleasica. **c)** Costrutti con cui sono state trasformate le cellule analizzate in a e b per vedere l'effetto dell'espressione di YafQ sulla regolazione trascrizionale mediata da DinJ (A) o DinJ R13A (B), e per verificare la regolazione trascrizionale in presenza esclusivamente di YafQ, senza DinJ (C). I valori dell'intensità della fluorescenza misurata sono riportati nella tabella supplementare S1.c.

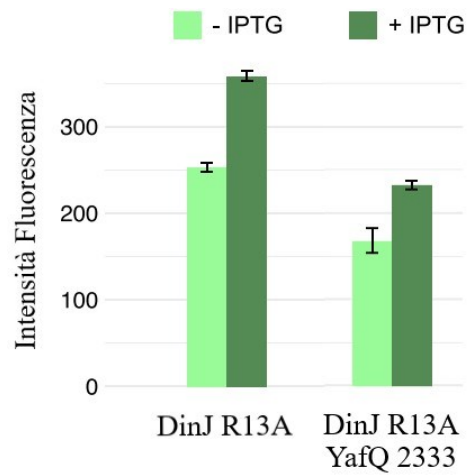


Figura 4.38. Confronto tra le intensità della fluorescenza delle cellule trasformate con il costrutto illustrato in figura 4.35.c (espressione inducibile di DinJ R13A; sinistra) e i costrutti in figura 4.37.c B (coespressione inducibile di DinJ R13A e YafQ; destra), prima (verde chiaro) e dopo (verde scuro) l'induzione con IPTG: è evidente una riduzione della fluorescenza in terreno liquido quando YafQ viene coespressa con DinJ R13A.

5. Conclusioni

La caratterizzazione funzionale del predetto sistema tossina-antitossina DinJ-YafQ di *Lacticaseibacillus paracasei*, rilevato da uno studio bioinformatico, ha confermato i dati ricavati dall'analisi di omologia e dal confronto con il sistema omologo caratterizzato di *Escherichia coli* e ha fornito una comprensione approfondita di questo sistema in *L. paracasei*.

Saggi in vitro hanno dimostrato l'attività ribonucleasica di YafQ e, data l'associazione tra l'attività ribonucleasica e il rallentamento della crescita osservato in uno studio precedente (vedi Fig. 1.18 a), si può concludere che l'inibizione della crescita mediata da YafQ di *L. paracasei* 4366 sia data dal rallentamento metabolico conseguente alla riduzione della disponibilità del materiale per la sintesi delle proteine, in quanto vengono degradati i relativi mRNA, come è noto che avvenga nel caso del sistema omologo di *E. coli*, senza che venga compromessa l'integrità della membrana cellulare (vedi Fig. 1.20). La riduzione della sintesi proteica potrebbe essere ulteriormente accentuata dalla possibile degradazione degli rRNA, che implicherebbe una riduzione della disponibilità di ribosomi, infatti i saggi dell'attività ribonucleasica in vitro hanno rivelato un'efficiente attività di taglio da parte di YafQ a carico dell'rRNA 16S. L'innescò di una maggiore attività ribonucleasica nel contesto di un innalzamento termico è una strategia di sopravvivenza che comporta molteplici vantaggi. Sintetizzando una minore quantità di proteine, la cellula risparmia energie e risorse. Il rallentamento metabolico conseguente alla degradazione dell'RNA conferisce alla cellula una minore suscettibilità ad essere danneggiata dalle condizioni di stress. Si tenga presente che l'innalzamento termico promuove la destabilizzazione della struttura e della funzione delle proteine, può portare alla formazione di aggregati proteici, che si accentua progressivamente all'aumentare della temperatura ed è un processo deleterio, infatti è stata osservata una correlazione tra la formazione di aggregati proteici e la riduzione della vitalità della popolazione batterica¹²²: minore è la quantità di proteine, minore sarà l'impatto negativo dell'innalzamento termico sulla vitalità della popolazione batterica.

DinJ è una proteina instabile, presenta alcune regioni prive di un ripiegamento ben definito e l'omodimerizzazione ne aumenta la stabilità, infatti in soluzione si presenta come omodimero (vedi Fig. 4.10), e, in presenza di YafQ, forma uno stabile eterotetramero in cui a ciascun monomero di DinJ è associato un singolo monomero di YafQ; l'associazione di YafQ a DinJ ne compromette l'attività ribonucleasica. Il saggio dell'attività ribonucleasica del complesso DinJ-YafQ ha dimostrato la capacità di DinJ di neutralizzare YafQ, confermando l'osservazione in vivo dell'integrità dell'RNA quando DinJ è coespressa con YafQ. L'instabilità della struttura dell'antitossina ha un importante

significato biologico, poiché rende il sistema attivabile dallo stress mediante una rapida attivazione della tossina quando alla cellula conviene entrare in uno stato dormiente, che la rende meno suscettibile ai danni che lo stress potrebbe provocare.

DinJ, oltre alla neutralizzazione di YafQ, media la repressione trascrizionale del proprio operone: finché le condizioni sono favorevoli alla crescita, l'antitossina sintetizzata si lega al promotore e l'ingombro sterico che ne consegue rende il promotore inaccessibile all'RNA polimerasi, per cui vengono sintetizzate scarse quantità di DinJ e YafQ. Grazie alla localizzazione del gene dell'antitossina a monte di quello della tossina, la sintesi di DinJ precede quella di YafQ, la quale viene prontamente neutralizzata dopo la sintesi. Non appena si instaurano le condizioni sfavorevoli che determinano la degradazione di DinJ, non solo si ha l'attivazione di YafQ, ma avviene anche la derepressione del sistema, che porta all'incremento della concentrazione della tossina. Il legame di DinJ al DNA è specifico: lega selettivamente il promotore del proprio operone, anche se non è da escludere che possa avere un'attività di repressione di geni posti sotto il controllo di promotori diversi. Uno studio di mutagenesi ha dimostrato che il sito di legame di DinJ di *L. paracasei* è localizzato su una sequenza palindromica sul proprio promotore, sovrapposta all'elemento -35: l'eliminazione di un emisito in questa regione determina la riduzione dell'affinità di DinJ. Il residuo principale che media il legame specifico di DinJ al DNA è l'Arg 13, come evidenziato dall'incapacità del mutante DinJ R13A di legare il proprio promotore in vitro, tuttavia da uno studio in vivo è risultata una residua attività di repressione trascrizionale, indicando che anche altre regioni della proteina potrebbero partecipare alla specificità di legame al DNA. In alcuni sistemi tossina-antitossina è stato riscontrato il fenomeno della cooperatività condizionale, in cui l'affinità di legame dell'antitossina al DNA è modulata dal rapporto stechiometrico tra tossina e antitossina: il legame della tossina all'antitossina ne aumenta l'affinità di legame al DNA, per cui un iniziale aumento della quantità di tossina si riflette in una maggiore efficienza di repressione trascrizionale, ma ulteriori incrementi della concentrazione della tossina, che portano all'incremento del rapporto stechiometrico tossina:antitossina oltre un certo valore, comportano una riduzione dell'affinità di legame dell'antitossina al DNA. La cooperatività condizionale rappresenta un meccanismo efficiente della regolazione del sistema in risposta alle condizioni ambientali, in quanto lievi incrementi della quantità della tossina senza un significato fisiologico, quindi accidentali e non necessari, vengono bilanciati da una maggiore repressione che mantiene spento il sistema, invece significativi aumenti nella concentrazione della tossina, dati dalle condizioni che portano alla degradazione dell'antitossina, causano una rapida derepressione del sistema data dalla combinazione della riduzione della concentrazione dell'antitossina e dalla riduzione della sua affinità per il promotore: è possibile che questo meccanismo possa caratterizzare anche DinJ-YafQ di *L. paracasei*. Lo studio in vivo condotto usando la GFP come sistema reporter

suggerisce che il legame di YafQ a DinJ possa aumentarne l'affinità al DNA: la variazione dell'intensità di repressione trascrizionale può essere apprezzata considerando che mutante DinJ R13A mostra una piccola attività residua di repressore in vivo, che viene incrementata se è coespressa con YafQ (in terreno liquido, la coespressione di YafQ con DinJ R13A è associata alla riduzione della fluorescenza, vedi Fig. 4.38). La maggiore repressione esercitata dall'antitossina quando è legata alla relativa tossina rappresenta un sistema tamponante per le fluttuazioni casuali della concentrazione di YafQ.

Il sistema tossina-antitossina *dinJ-yafQ* è un elemento chiave nella risposta adattativa allo stress termico in *Lactocaseibacillus paracasei*, che è uno stress tipico per la specie in questione, in quanto è caratteristico del processo produttivo nell'industria lattiero-casearia che prevede l'utilizzo della specie batterica su cui questo studio è focalizzato.

Il ruolo cruciale dei sistemi tossina-antitossina nella regolazione della vita e della morte delle cellule batteriche solleva l'importanza dello studio di questi sistemi sia nell'ambito della medicina, per la possibilità di sviluppare e implementare nuovi trattamenti antimicrobici che abbiano come target i sistemi tossina-antitossina, permettendo di debellare definitivamente le infezioni batteriche resistenti ai trattamenti antimicrobici, sia in ambito industriale, con la possibilità di apportare miglioramenti alle rese produttive e modifiche nella qualità dei prodotti ottenuti da processi che prevedono l'utilizzo di colture microbiche, introducendo ceppi batterici ingegnerizzati nella coltura starter con l'implemento della resistenza agli stress previsti da una determinata procedura produttiva.

6. Materiale supplementare

a

	Intensità fluorescenza	DV	Trattamento
DinJ	67	1.6	-IPTG
	73	4.3	+IPTG

b

	Intensità fluorescenza	DV	Trattamento
DinJ R13A	253	5.4	-IPTG
	358	5.9	+IPTG

c

	Intensità fluorescenza	DV	Trattamento
DinJ-YafQ	55	4.5	-IPTG
	58	8.8	+IPTG
DinJ R13A-YafQ	168	14.3	-IPTG
	233	5.2	+IPTG
YafQ	93	17	-IPTG
	63	10.1	+IPTG

Tabella S1. Valori dell'intensità della fluorescenza della GFP misurata con lo spettrofluorimetro per analizzare la repressione trascrizionale ad opera di DinJ (a), di DinJ R13A (b) e gli effetti di YafQ sulla repressione trascrizionale mediata da DinJ (c). Ciascun valore dell'intensità della fluorescenza è il risultato della media di 3 esperimenti indipendenti \pm DV (deviazione standard), in assenza e in presenza di IPTG.

Bibliografia

- 1 – Unterholzner, S. J., Poppenberger, B., & Rozhon, W. (2013). Toxin–antitoxin systems. *Mobile Genetic Elements*, 3(5), e26219. <https://doi.org/10.4161/mge.26219>
- 2 – Cherny, I., Rockah, L., & Gazit, E. (2005). The YoeB toxin is a folded protein that forms a physical complex with the unfolded YefM antitoxin: Implications for a structural-based differential stability of toxin-antitoxin systems. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30063–30072. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506220200>
- 3 – Singh, G., Yadav, M., Ghosh, C., & Rathore, J. S. (2021). Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence. In *Current Research in Microbial Sciences* (Vol. 2). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100047>
- 4 – Yang, Q. E., & Walsh, T. R. (2017). Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 41, Issue 3, pp. 343–353). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux006>
- 5 – Tian, Q. B., Ohnishi, M., Murata, T., Nakayama, K., Terawaki, Y., & Hayashi, T. (2001). Specific Protein–DNA and Protein–Protein Interaction in the hig Gene System, a Plasmid-Borne Proteic Killer Gene System of Plasmid Rts1. *Plasmid*, 45(2), 63–74. <https://doi.org/10.1006/PLAS.2000.1506>
- 6 – Hayes F., Van Melder L. Toxins-antitoxins: Diversity, evolution and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2011;46(5):386–408. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.600437>
- 7 – Kedzierska, B., & Hayes, F. (2016). Emerging roles of toxin-antitoxin modules in bacterial pathogenesis. In *Molecules* (Vol. 21, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules21060790>
- 8 – Barbieri, J. T. (2009). Exotoxins. *Encyclopedia of Microbiology*, 355–364. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00225-X>
- 9 – Sampath, V. P. (2018). Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates. *Agriculture and Natural Resources*, 52(2), 115–120. <https://doi.org/10.1016/J.ANRES.2018.08.002>
- 10 – Santiago, A. da S., Mendes, J. S., dos Santos, C. A., de Toledo, M. A. S., Beloti, L. L., Crucello, A., Horta, M. A. C., Favaro, M. T. de P., Munar, D. M. M., de Souza, A. A., Cotta, M. A., & de Souza, A. P. (2016). The antitoxin protein of a toxin-antitoxin system from *Xylella fastidiosa* is secreted via outer membrane vesicles. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02030>
- 11 – Triplett, L. R., Shidore, T., Long, J., Miao, J., Wu, S., Han, Q., Zhou, C., Ishihara, H., Li, J., Zhao, B., & Leach, J. E. (2016). AvrXo1 Is a Bifunctional type III Secreted effector and toxin-antitoxin system component with homologs in diverse environmental contexts. *PLoS ONE*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158856>

- 12 – Carmona-Fontaine, C., & Xavier, J. B. (2012). Altruistic cell death and collective drug resistance. In *Molecular Systems Biology* (Vol. 8). <https://doi.org/10.1038/msb.2012.60>
- 13 – Dy, R. L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2014). A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism. *Nucleic Acids Research*, *42*(7), 4590–4605. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1419>
- 14 – Dy, R. L., Richter, C., Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2014). Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. *Annual Review of Virology*, *1*(1), 307–331. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085500>
- 15 – Choi, J. S., Kim, W., Suk, S., Park, H., Bak, G., Yoon, J., & Lee, Y. (2018). The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli*. *RNA Biology*, *15*(10), 1319–1335. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1532252>
- 16 – Song, Sooyeon, and Thomas K. Wood. "Toxin/antitoxin system paradigms: toxins bound to antitoxins are not likely activated by preferential antitoxin degradation." *Advanced biosystems* 4.3 (2020): 1900290. <https://doi.org/10.1002/adbi.201900290>
- 17 – Gerdes, K., Erik, J. L., Larsen, V., & MOLINT, R. (1985). Stable Inheritance of Plasmid Ri Requires Two Different Loci. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 161, Issue 1).
- 18 – Gerdes, K., Rasmussen, P. B., & Molin, S. (1986). Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(10), 3116. <https://doi.org/10.1073/PNAS.83.10.3116>
- 19 – Kamada, K., & Hanaoka, F. (2005). Conformational Change in the Catalytic Site of the Ribonuclease YoeB Toxin by YefM Antitoxin. *Molecular Cell*, *19*(4), 497–509. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.07.004>
- 20 – Li, G. Y., Zhang, Y., Inouye, M., & Ikuma, M. (2009). Inhibitory mechanism of *Escherichia coli* RelE-RelB toxin-antitoxin module involves a helix displacement near an mRNA interferase active site. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(21), 14628–14636. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809656200>
- 21 – van Melderen, L., Bernard, P., & Couturier, M. (1994). Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Molecular Microbiology*, *11*(6), 1151–1157. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1994.TB00391.X>
- 22 – van Melderen, L., Thi, M. H. D., Lecchi, P., Gottesman, S., Couturier, M., & Maurizi, M. R. (1996). ATP-dependent Degradation of CcdA by Lon Protease. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(44), 27730–27738. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27730>
- 23 – Smith, A. S. G., & Rawlings, D. E. (1998). Efficiency of the pTF-FC2 pas Poison-antidote stability system in *Escherichia coli* is affected by the host strain, and antidote degradation requires the Lon protease. *Journal of Bacteriology*, *180*(20), 5458–5462. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JB.180.20.5458-5462.1998>

- 24 – Christensen, S. K., Mikkelsen, M., Pedersen, K., & Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25), 14328–14333. <https://doi.org/10.1073/PNAS.251327898>
- 25 – Hansen, S., Vulić, M., Min, J., Yen, T. J., Schumacher, M. A., Brennan, R. G., & Lewis, K. (2012). Regulation of the Escherichia coli HipBA Toxin-Antitoxin System by Proteolysis. *PLOS ONE*, 7(6), e39185. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0039185>
- 26 – Lehnerr, H., & Yarmolinsky, M. B. (1995). Addiction protein Phd of plasmid prophage P1 is a substrate of the ClpXP serine protease of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(8), 3274–3277. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.8.3274>
- 27 – Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., & Glaser, G. (1996). An Escherichia coli chromosomal “addiction module” regulated by guanosine [corrected] 3’,5’-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(12), 6059–6063. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.12.6059>
- 28 – Donegan, N. P., Thompson, E. T., Fu, Z., & Cheung, A. L. (2010). Proteolytic regulation of toxin-antitoxin systems by ClpPc in Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*, 192(5), 1416–1422. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JB.00233-09>
- 29 – Chukwudi, C. U., & Good, L. (2015). The role of the hok/sok locus in bacterial response to stressful growth conditions. *Microbial Pathogenesis*, 79, 70–79. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2015.01.009>
- 30 – Coussens, N. P., & Daines, D. A. (2016). Wake me when it’s over – Bacterial toxin-antitoxin proteins and induced dormancy. *https://Doi.Org/10.1177/1535370216651938*, 241(12), 1332–1342. <https://doi.org/10.1177/1535370216651938>
- 31 – Wang, X., Kim, Y., Hong, S. H., Ma, Q., Brown, B. L., Pu, M., Tarone, A. M., Benedik, M. J., Peti, W., Page, R., & Wood, T. K. (2011). Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nature Chemical Biology* 2011 7:6, 7(6), 359–366. <https://doi.org/10.1038/nchembio.560>
- 32 – Wang, X., & Wood, T. K. (2011). Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(16), 5577–5583. <https://doi.org/10.1128/AEM.05068-11/ASSET/D89840CB-E8FF-4D93-B019-499936D1544D/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991023540003.JPEG>
- 33 – Ogura, T., & Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(15), 4784–4788. <https://doi.org/10.1073/PNAS.80.15.4784>
- 34 – Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K. P., Ikura, M., Qing, G., & Inouye, M. (2003). MazF Cleaves Cellular mRNAs Specifically at ACA to Block Protein Synthesis in Escherichia coli. *Molecular Cell*, 12(4), 913–923. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00402-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00402-7)
- 35 – Pedersen, K., Zavialov, A. v., Pavlov, M. Y., Elf, J., Gerdes, K., & Ehrenberg, M. (2003). The Bacterial Toxin RelE Displays Codon-Specific Cleavage of mRNAs in the Ribosomal A Site. *Cell*, 112(1), 131–140. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01248-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01248-5)

- 36 – Winther, K. S., & Gerdes, K. (2011). *Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019587108>
- 37 – Schumacher, M. A., Piro, K. M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K., & Brennan, R. G. (2009). *Molecular Mechanisms of HipA Mediated Multidrug Tolerance and its Neutralization by HipB*. <https://doi.org/10.1126/science.1163806>
- 38 - Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R. L., & Meinhart, A. (2011). A Novel Mechanism of Programmed Cell Death in Bacteria by Toxin-Antitoxin Systems Corrupts Peptidoglycan Synthesis. *PLoS Biol*, 9(3), 1001033. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001033>
- 39 – Yashiro, Y., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., & Tomita, K. (2020). Mechanism of aminoacyl-tRNA acetylation by an aminoacyl-tRNA acetyltransferase AtaT from enterohemorrhagic E. coli. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19281-z>
- 40 – Jurėnas, D., Garcia-Pino, A., & van Melderen, L. (2017). Novel toxins from type II toxin-antitoxin systems with acetyltransferase activity. *Plasmid*, 93, 30–35. <https://doi.org/10.1016/J.PLASMID.2017.08.005>
- 41 – Maki, S., Takiguchi, S., Miki, T., & Horiuchi, T. (1992). Modulation of DNA supercoiling activity of Escherichia coli DNA gyrase by F plasmid proteins. Antagonistic actions of LetA (CcdA) and LetD (CcdB) proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 267(17), 12244–12251. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)49831-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)49831-1)
- 42 – Jiang, Y., Pogliano, J., Helinski, D. R., & Konieczny, I. (2002). ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of Escherichia coli gyrase. *Molecular Microbiology*, 44(4), 971–979. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2002.02921.X>
- 43 – Yuan, J., Sterckx, Y., Mitchenall, L. A., Maxwell, A., Loris, R., & Waldor, M. K. (2010). Vibrio cholerae ParE2 poisons DNA gyrase via a mechanism distinct from other gyrase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 40397–40408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.138776>
- 44 – Vandervelde, A., Drobnak, I., Hadži, S., Sterckx, Y. G. J., Welte, T., de Greve, H., Charlier, D., Efremov, R., Loris, R., & Lah, J. (2017). Molecular mechanism governing ratio-dependent transcription regulation in the ccdAB operon. *Nucleic Acids Research*, 45(6), 2937–2950. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX108>
- 45 - Blower, T. R., Short, F. L., Rao, F., Mizuguchi, K., Pei, X. Y., Fineran, P. C., Luisi, B. F., & Salmond, G. P. C. (2012). Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Research*, 40(13), 6158–6173. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS231>
- 46 – Goeders, N., Chai, R., Chen, B., Day, A., & Salmond, G. P. C. (2016). Structure, Evolution, and Functions of Bacterial Type III Toxin-Antitoxin Systems. *Toxins* 2016, Vol. 8, Page 282, 8(10), 282. <https://doi.org/10.3390/TOXINS8100282>
- 47 – Blower, T. R., Fineran, P. C., Johnson, M. J., Toth, I. K., Humphreys, D. P., & Salmond, G. P. C. (2009). Mutagenesis and functional characterization of the RNA and protein components of the

toxIN abortive infection and toxin-antitoxin locus of *Erwinia*. *Journal of Bacteriology*, 191(19), 6029–6039. <https://doi.org/10.1128/JB.00720-09>

48 – Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K. P., & Inouye, M. (2012). YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 84(5), 979–989. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2012.08068.X>

49 – Wang, X., Lord, D. M., Cheng, H. Y., Osbourne, D. O., Hong, S. H., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., Peti, W., Benedik, M. J., Page, R., & Wood, T. K. (2012). A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature Chemical Biology* 2012 8:10, 8(10), 855–861. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1062>

50 – Aakre, C. D., Phung, T. N., Huang, D., & Laub, M. T. (2013). A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp. *Molecular Cell*, 52(5), 617–628. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.014>

51 – Markovski, M., & Wickner, S. (2013). Preventing bacterial suicide: A novel toxin-antitoxin strategy. *Molecular Cell*, 52(5), 611–612. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.018>

52 – Wang, X., Yao, J., Sun, Y. C., & Wood, T. K. (2021). Type VII Toxin/Antitoxin Classification System for Antitoxins that Enzymatically Neutralize Toxins. *Trends in Microbiology*, 29(5), 388–393. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.12.001>

53 – Marimon, O., Teixeira, J. M. C., Cordeiro, T. N., Soo, V. W. C., Wood, T. L., Mayzel, M., Amata, I., García, J., Morera, A., Gay, M., Vilaseca, M., Orekhov, V. Y., Wood, T. K., & Pons, M. (2016). An oxygen-sensitive toxin–antitoxin system. *Nature Communications* 2016 7:1, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms13634>

54 - García-Contreras, R., Zhang, X.-S., Kim, Y., & Wood, T. K. (2008). Protein Translation and Cell Death: The Role of Rare tRNAs in Biofilm Formation and in Activating Dormant Phage Killer Genes. *PLoS ONE*, 3(6), 2394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002394>

55 – Parker, A., & Gottesman, S. (2016). Small RNA regulation of TolC, the outer membrane component of bacterial multidrug transporters. *Journal of Bacteriology*, 198(7), 1101–1113. https://doi.org/10.1128/JB.00971-15/SUPPL_FILE/ZJB999093981SO1.PDF

56 – Gupta, A. K., Siddiqui, N., Yadav, D., Arora, L., & Dutta, T. (2019). Regulation of RyeA/SraC expression in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 516(3), 661–665. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2019.06.110>

57 – Karimi, S., Ghafourian, S., Kalani, M. T., Jalilian, F. A., Hemati, S., & Sadeghifard, N. (2015). Association Between Toxin-Antitoxin Systems and Biofilm Formation. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(1), 14540. <https://doi.org/10.5812/JJM.14540>

58 - Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2004 2:2, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>

- 59 – Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, 21(12). <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
- 60 – Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO3380>
- 61 – Jayaraman, R. (2008). Bacterial persistence: Some new insights into an old phenomenon. *Journal of Biosciences*, 33(5), 795–805. <https://doi.org/10.1007/S12038-008-0099-3/METRICS>
- 62 – Kaspy, I., Rotem, E., Weiss, N., Ronin, I., Balaban, N. Q., & Glaser, G. (2013). HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nature Communications* 2013 4:1, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms4001>
- 63 – Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., & Nyström, T. (2002). Regulation of ζ factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes & Development*, 16(10), 1260–1270. <https://doi.org/10.1101/GAD.227902>
- 64 – Srivatsan, A., & Wang, J. D. (2008). Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), 100–105. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2008.02.001>
- 65 – Bai, K., Yan, H., Chen, X., Lyu, Q., Jiang, N., Li, J., & Luo, L. (2021). The Role of RelA and SpoT on ppGpp Production, Stress Response, Growth Regulation, and Pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Microbiology Spectrum*, 9(3). https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.02057-21/SUPPL_FILE/SPECTRUM02057-21_SUPP_1_SEQ9.PDF
- 66 - Downey, M. (2019). A Stringent Analysis of Polyphosphate Dynamics in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 201(9). <https://doi.org/10.1128/JB.00070-19>
- 67 – Gerhart, E., Wagner, H., & Unoson, C. (2012). RNA Biology The toxin-antitoxin system tisB-istR1 Expression, regulation, and biological role in persister phenotypes Special Focus Review Special Focus Review. *RNA Biology* 1513 *RNA Biology*, 9, 1513–1519. <https://doi.org/10.4161/rna.22578>
- 68 – Capozzi, V., Tufariello, M., de Simone, N., Fragasso, M., & Grieco, F. (2021). Biodiversity of Oenological Lactic Acid Bacteria: Species- and Strain-Dependent Plus/Minus Effects on Wine Quality and Safety. *Fermentation* 2021, Vol. 7, Page 24, 7(1), 24. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION7010024>
- 69 – Ávila, M., Gómez-Torres, N., Gaya, P., & Garde, S. (2020). Effect of a nisin-producing lactococcal starter on the late blowing defect of cheese caused by *Clostridium tyrobutyricum*. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(10), 3343–3349. <https://doi.org/10.1111/IJFS.14598>
- 70 - Wang, G., Yin, S., An, H., Chen, S., & Hao, Y. (2011). Coexpression of bile salt hydrolase gene and catalase gene remarkably improves oxidative stress and bile salt resistance in *Lactobacillus casei*.

Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 38(8), 985–990.
<https://doi.org/10.1007/S10295-010-0871-X>

71 – Allen, M. J., Sabir, S., & Sharma, S. (2022). GABA Receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2(C), 62–64. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(81\)90264-9](https://doi.org/10.1016/0165-6147(81)90264-9)

72 – Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. v., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Bienenstock, J., & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), 16050–16055. https://doi.org/10.1073/PNAS.1102999108/SUPPL_FILE/PNAS.201102999SI.PDF

73 – Owens, J. A., Saeedi, B. J., Naudin, C. R., Hunter-Chang, S., Barbian, M. E., Eboka, R. U., Askew, L., Darby, T. M., Robinson, B. S., & Jones, R. M. (2021). Lactobacillus rhamnosus GG Orchestrates an Antitumor Immune Response. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 12(4), 1311–1327. <https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2021.06.001>

74 – Tannock, G. W. (2004). A special fondness for lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3189–3194. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3189-3194.2004>

75 – Tannock, G. W. (1992). The Lactic Microflora of Pigs, Mice and Rats. *The Lactic Acid Bacteria Volume 1*, 21–48. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3522-5_2

76 – Walter, J. (2008). Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: Implications for fundamental and biomedical research. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 74, Issue 16, pp. 4985–4996). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.00753-08>

77 – Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., Leulier, F., Gänzle, M., & Walter, J. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus Lactobacillus. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp_1), S27–S48. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX030>

78 – Moran, N. A. (2002). Microbial Minimalism: Genome Reduction in Bacterial Pathogens. *Cell*, 108(5), 583–586. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00665-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00665-7)

79 – Yamaguchi, Y., & Inouye, M. (2011). Regulation of growth and death in Escherichia coli by toxin-antitoxin systems. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 9, Issue 11, pp. 779–790). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2651>

80 – Ferrari, A., Maggi, S., Montanini, B., Levante, A., Lazzi, C., Yamaguchi, Y., Rivetti, C., & Folli, C. (2019). Identification and first characterization of DinJ-YafQ toxin-antitoxin systems in Lactobacillus species of biotechnological interest. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44094-6>

81 – Prysak, M. H., Mozdierz, C. J., Cook, A. M., Zhu, L., Zhang, Y., Inouye, M., & Woychik, N. A. (2009). Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage. *Molecular Microbiology*, 71(5), 1071–1087. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06572.x>

- 82 – Maehigashi, T., Ruangprasert, A., Miles, S. J., & Dunham, C. M. (2015). Molecular basis of ribosome recognition and mRNA hydrolysis by the *E. coli* YafQ toxin. *Nucleic Acids Research*, *43*(16), 8002–8012. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv791>
- 83 – Schureck, M. A., Repack, A., Miles, S. J., Marquez, J., & Dunham, C. M. (2016). Mechanism of endonuclease cleavage by the HigB toxin. *Nucleic Acids Research*, *44*(16), 7944–7953. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW598>
- 84 – Jurėnas, D., & van Melderren, L. (2020). The Variety in the Common Theme of Translation Inhibition by Type II Toxin–Antitoxin Systems. *Frontiers in Genetics*, *11*, 262. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.00262/BIBTEX>
- 85 – Han, Y., & Lee, E. J. (2020). Invited Mini Review Substrate specificity of bacterial endoribonuclease toxins. *BMB Reports*, *53*(12), 611–621. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.12.203>
- 86 – Neubauer, C., Gao, Y. G., Andersen, K. R., Dunham, C. M., Kelley, A. C., Hentschel, J., Gerdes, K., Ramakrishnan, V., & Brodersen, D. E. (2009). The Structural Basis for mRNA Recognition and Cleavage by the Ribosome-Dependent Endonuclease RelE. *Cell*, *139*(6), 1084. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.11.015>
- 87 – Feng, S., Chen, Y., Kamada, K., Wang, H., Tang, K., Wang, M., & Gao, Y. G. (2013). YoeB–ribosome structure: a canonical RNase that requires the ribosome for its specific activity. *Nucleic Acids Research*, *41*(20), 9549–9556. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT742>
- 88 – Heinemann, U., & Saenger, W. (2012). Crystallographic Study of Mechanism of Ribonuclease Ti-Catalysed Specific RNA Hydrolysis. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/07391102.1983.10507459*, *1*(2), 523–538. <https://doi.org/10.1080/07391102.1983.10507459>
- 89 – Ortigosa, M., Arizcun, C., Irigoyen, A., Oneca, M., & Torre, P. (2006). Effect of lactobacillus adjunct cultures on the microbiological and physicochemical characteristics of Roncal-type ewes' milk cheese. *Food Microbiology*, *23*(6), 591–598. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2005.09.005>
- 90 – Corcoran, B., Stanton, C., Fitzgerald, G., & Ross, R. (2008). Life Under Stress: The Probiotic Stress Response and How it may be Manipulated. *Current Pharmaceutical Design*, *14*(14), 1382–1399. <https://doi.org/10.2174/138161208784480225>
- 91 – Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J. A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Turrone, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., & Kok, J. (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *80*(3), 837–890. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>
- 92 – Novák, L., Zubáčová, Z., Karnkowska, A., Kolisko, M., Hroudová, M., Stairs, C. W., Simpson, A. G. B., Keeling, P. J., Roger, A. J., Čepička, I., & Hampl, V. (2016). Arginine deiminase pathway enzymes: evolutionary history in metamonads and other eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology*, *16*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12862-016-0771-4>

- 93 – van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. In *Antonie van Leeuwenhoek* (Vol. 82).
- 94 – Wu, C., Zhang, J., Chen, W., Wang, M., Du, G., & Chen, J. (2012). A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acid-induced alterations in *Lactobacillus casei* Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2), 707–722. <https://doi.org/10.1007/S00253-011-3757-6/FIGURES/9>
- 95 – Wu, R., Zhang, W., Sun, T., Wu, J., Yue, X., Meng, H., & Zhang, H. (2011). Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 181–187. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2011.04.003>
- 96 – Wu, C., He, G., & Zhang, J. (2014). Physiological and proteomic analysis of *Lactobacillus casei* in response to acid adaptation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(10), 1533–1540. <https://doi.org/10.1007/S10295-014-1487-3>
- 97 – Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107>
- 98 – Broadbent, J. R., Oberg, C. J., Wang, H., & Wei, L. (1997). Attributes of the Heat Shock Response in Three Species of Dairy *Lactobacillus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 20(1), 12–19. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80043-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80043-4)
- 99 – de Angelis, M., & Gobbetti, M. (2004). Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *PROTEOMICS*, 4(1), 106–122. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200300497>
- 100 – Ianniello, R. G., Zotta, T., Matera, A., Genovese, F., Parente, E., & Ricciardi, A. (2016). Investigation of Factors Affecting Aerobic and Respiratory Growth in the Oxygen-Tolerant Strain *Lactobacillus casei* N87. *PLOS ONE*, 11(11), e0164065. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0164065>
- 101 – Palomino, M. M., Allievi, M. C., Gründling, A., Sanchez-Rivas, C., & Ruzal, S. M. (2013). Osmotic stress adaptation in *Lactobacillus casei* BL23 leads to structural changes in the cell wall polymer lipoteichoic acid. *Microbiology (United Kingdom)*, 159(PART11), 2416–2426. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.070607-0/CITE/REFWORKS>
- 102 – Hamon, E., Horvatovich, P., Bisch, M., Bringel, F., Marchioni, E., Aoudé-Werner, D., & Ennahar, S. (2012). Investigation of biomarkers of bile tolerance in *Lactobacillus casei* using comparative proteomics. *Journal of Proteome Research*, 11(1), 109–118. https://doi.org/10.1021/PR200828T/SUPPL_FILE/PR200828T_SI_002.XLS
- 103 – Levante, A., Folli, C., Montanini, B., Ferrari, A., Neviani, E., & Lazzi, C. (2019). Expression of DINJ-YAFQ system of *Lactobacillus casei* group strains in response to food processing stresses. *Microorganisms*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100438>
- 104 – Zhao, Y., McAnulty, M. J., & Wood, T. K. (2016). Toxin YafQ reduces *Escherichia coli* growth at low temperatures. *PLoS ONE*, 11(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161577>

- 105 – Doniselli, N., Rodriguez-Aliaga, P., Amidani, D., Bardales, J. A., Bustamante, C., Guerra, D. G., & Rivetti, C. (2015). New insights into the regulatory mechanisms of ppGpp and DksA on Escherichia coli RNA polymerase-promoter complex. *Nucleic Acids Research*, 43(10), 5249–5262. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv391>
- 106 - Nečas, D., & Klapetek, P. (2012). Gwyddion: An open-source software for SPM data analysis. *Central European Journal of Physics*, 10(1), 181–188. <https://doi.org/10.2478/S11534-011-0096-2/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- 107 – Abbruzzetti, S., Grandi, E., Viappiani, C., Bologna, S., Campanini, B., Raboni, S., Bettati, S., & Mozzarelli, A. (2005). Kinetics of acid-induced spectral changes in the GFPmut2 chromophore. *Journal of the American Chemical Society*, 127(2), 626–635. <https://doi.org/10.1021/JA045400R/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JA045400RN00001.GIF>
- 108 – Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ268>
- 109 – Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W320–W324. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU316>
- 110 – Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., & Schwede, T. (2008). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols* 2009 4:1, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.197>
- 111 – Liang, Y., Gao, Z., Wang, F., Zhang, Y., Dong, Y., & Liu, Q. (2014). Structural and functional characterization of Escherichia coli toxin-antitoxin complex dinJ-yafQ. *Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 21191–21202. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.559773>
- 112 – Arnott S, Campbell-Smith PJ, Chandrasekaran R (1976) In: Fasman GP (ed) Handbook of biochemistry and molecular biology, 3rd ed. Nucleic Acids--Volume II. CRC Press, Cleveland, pp. 411-422, 1976th edn.
- 113 – Raumann, B. E., Rould, M. A., Pabo, C. O., & Sauer, R. T. (1994). DNA recognition by β -sheets in the Arc repressor-operator crystal structure. *Nature* 1994 367:6465, 367(6465), 754–757. <https://doi.org/10.1038/367754a0>
- 114 – Heffler, M. A., Walters, R. D., & Kugel, J. F. (2012). Using electrophoretic mobility shift assays to measure equilibrium dissociation constants: GAL4-p53 binding DNA as a model system. *Biochemistry and Molecular Biology Education : A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 40(6), 383–387. <https://doi.org/10.1002/BMB.20649>
- 115 – Ruangprasert, A., Maehigashi, T., Miles, S. J., Giridharan, N., Liu, J. X., & Dunham, C. M. (2014). Mechanisms of toxin inhibition and transcriptional repression by Escherichia coli DinJ-YafQ. *Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 20559–20569. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.573006>

- 116 – Bonini, A. A., Maggi, S., Mori, G., Carnuccio, D., Delfino, D., Cavazzini, D., Ferrari, A., Levante, A., Yamaguchi, Y., Rivetti, C., & Folli, C. (2022). Functional characterization and transcriptional repression by *Lacticaseibacillus paracasei* DinJ-YafQ. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(21), 7113–7128. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12195-4>
- 117 – Tamer, N., & Dahleh, M. (1994). Feedback control of piezoelectric tube scanners. *Proceedings of the IEEE Conference on Decision and Control*, 2, 1826–1831. <https://doi.org/10.1109/CDC.1994.411117>
- 118 – *Nanotechnology/AFM - Wikibooks, open books for an open world.* <https://en.wikibooks.org/wiki/Nanotechnology/AFM>
- 119 – Ohmann, R. (2022). *Atomic Force Microscopy.* www.nanosurf.com
- 120 – Hoogenboom, B. W. (2021). Stretching the resolution limit of atomic force microscopy. In *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 28, Issue 8, pp. 629–630). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00638-x>
- 121 – Kain, S. R. (2005). Methods and protocols. In: *Green fluorescent protein.* John Wiley & Sons, Ltd, pp 407–421.
- 122 - Maisonneuve, E., Ezraty, B., & Dukan, S. (2008). Protein aggregates: An aging factor involved in cell death. *Journal of Bacteriology*, 190(18), 6070–6075. <https://doi.org/10.1128/JB.00736-08>