

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
"BIOLOGIA APPLICATA"
XIX CICLO**

TESI

**La proteina Lrp di *Citrobacter rodentium* e suo
ruolo nella regolazione dei fattori di virulenza**

Coordinatore
Ch.ma Prof.ssa
Amalia Virzo De Santo

Candidata
Dr. Angelina Cordone

Tutor
Ch.mo Prof. Ezio Ricca

Indice

1	Indotuzione	4
1.1	Adesione a-finbriali	6
1.2	Il pilus come modello di adesione dei batteri Gram-negativi	7
1.2.1	Il pilus di tipo P	8
1.2.2	Il pilus di tipo I	9
1.2.3	Il pilus di tipo IV	12
1.3	<i>Escherichia coli</i> enteropatogeno (EPEC)	13
1.4	L'Isola di Patogenicità	18
1.4.1	Sistema di secrezione di tipo III e proteine di secrezione	19
1.4.2	Intima adesione e formazione del piedistallo	22
1.5	Regolazione dei fattori di virulenza in EPEC	25
1.6	<i>Citrobacter rodentium</i> come sistema modello per lo studio dell' infezione indotta da EPEC	28
1.7	La proteina regolativa Lrp	29
1.7.1	Lrp regola l'espressione dei geni della virulenza	32
1.8	Scopo della tesi	35
2	The <i>lrp</i> gene and its role in type I fimbriation in <i>Citrobacter rodentium</i>	38
2.1	Risultati	41
2.1.1	Il gene <i>lrp</i> di <i>Citrobacter rodentium</i>	41

2.1.2	Il gene <i>lrp</i> di <i>C. rodentium</i> è in grado di complementare l'assenza di Lrp in un mutante di <i>Escherichia coli</i>	43
2.1.3	Il promotore del gene <i>lrp</i> di <i>C. rodentium</i>	44
2.1.4	Lrp regola negativamente l'espressione del suo gene strutturale	46
2.1.5	Identificazione e caratterizzazione della regione <i>fim</i> sul cromosoma di <i>C. rodentium</i>	50
2.1.6	L'espressione dell'operone <i>fimAICDFGH</i> dipende dalle condizioni di crescita	52
2.1.7	Lrp regola positivamente l'espressione dell'operone <i>fimAICDFGH</i>.	54
2.1.8	Lrp controlla l'inversione del promotore <i>fimS</i>	58
2.2	Discussione	62
2.3	Materiali e metodi	65
2.3.1	Ceppi batterici e condizioni di crescita	65
2.3.2	Manipolazioni genetiche	65
2.3.3	Costruzione dei mutanti <i>lrp</i> e <i>fimE</i> di <i>C. rodentium</i>	69
2.3.4	Saggio in liquido per misurare l'attività β-galattosidasi e β-glucuronidasi	70
2.3.5	Estrazione degli RNA totali ed RT-PCR	71
2.3.6	Real-Time PCR	73
2.3.7	Saggio di agglutinazione	74
3	Lrp negatively regulates the expression of LEE genes in <i>Citrobacter rodentium</i>	75
3.1	Risultati	78

3.1.1	Il Regulone Lrp di <i>C. rodentium</i>	78
3.1.2	Lrp regola l'espressione dei geni presenti nel locus LEE	81
3.1.3	Lrp regola direttamente l'espressione dell'operone LEE1	83
3.1.4	Ruolo della proteina Lrp durante l'infezione	89
3.2	Discussione	91
3.3	Materiali e Metodi	94
3.3.1	Ceppi batterici e condizioni di crescita	94
3.3.2	Manipolazioni genetiche	94
3.3.3	Estrazione degli RNA	98
3.3.4	DNA Microarray	98
3.3.5	Real-Time PCR	101
3.3.6	Espressione e purificazione della proteina ricombinante 6His-Lrp	101
3.3.7	Saggio EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay)	102
3.3.8	Esperimenti <i>in vivo</i>	103
4	Bibliografia	105

Capitolo 1

Introduzione

Molti microrganismi patogeni hanno sviluppato nel tempo un gran numero di meccanismi per poter penetrare ed invadere le cellule ed i tessuti eucariotici e per sfuggire ai sofisticati sistemi di difesa degli organismi superiori.

Un requisito fondamentale per il processo infettivo è rappresentato dalla capacità del patogeno di aderire alla membrana della cellula ospite in maniera specifica. I batteri che non vi aderiscono, infatti, sono rapidamente eliminati dai meccanismi di difesa aspecifici della cellula ospite, come la peristalsi ed i movimenti ciliari, oppure dal normale ricambio delle cellule epiteliali e dello strato mucoso.

Una volta avvenuta l'adesione specifica, il patogeno può produrre una serie di sostanze tossiche, classificate in esotossine ed endotossine, in grado di penetrare nelle cellule epiteliali danneggiandole, oppure invadere le cellule epiteliali e proliferare negli strati cellulari sottostanti. Affinchè avvenga l'adesione specifica è necessario che i batteri espongano sulla propria superficie delle molecole di adesione, definite generalmente *adesine* che si legano a recettori di superficie o a molecole della matrice extracellulare come collagene, fibronectina e integrine (Krogh *et al.*,1992).

Non tutte le *adesine* batteriche rappresentano fattori di virulenza e definire il loro ruolo specifico nell'infezione ha presentato notevoli

difficoltà, sia perché molte di esse sono state ritrovate in ceppi batterici patogeni e non patogen, sia perché un singolo patogeno è in grado di esprimere sulla propria superficie differenti fattori di adesione.

L'identificazione di molte adesine batteriche ha tuttavia permesso di chiarire che queste sono generalmente proteine associate alla membrana batterica (adesine a-fimbriali) (2); o localizzate all'apice di un pilus (Hultgren *et al.*,1993).

1.1 Adesine a-fimbriali

Diversi batteri hanno sulla loro superficie esterna una serie di proteine di membrana che svolgono un ruolo importante nel processo di adesione ed invasione delle cellule ospiti. Un esempio è rappresentato da *Bordetella pertussis*, agente eziologico della pertosse che presenta molti potenziali fattori di adesione che gli permettono di aderire con maggiore efficienza al bersaglio (Sandros *et al.*, 1993). *B. pertussis* colonizza l'orletto a spazzola dell'epitelio bronchiale ed invade i macrofagi del sistema respiratorio. Le condizioni presenti nel tratto respiratorio superiore inducono tale patogeno a produrre in sequenza numerosi fattori di virulenza di cui l'emoagglutinina filamentosa (FHA) e la tossina della pertosse sono i due esempi più conosciuti. L'FHA si lega ai carboidrati presenti sulla superficie delle cellule epiteliali respiratorie e, presentando una particolare sequenza amminoacidica Arg-Gly-Asp (RGD), che è

riconosciuta dalle integrine CR3 dei macrofagi, induce l'adesione alla membrana cellulare eucariotica (Ishibashi *et al.*, 1994). I batteri vengono quindi inglobati nel macrofago ma senza attivazione del *burst* ossidativo necessario alla loro uccisione.

Alternativamente l'adesività è mediata dalla tossina della pertosse, un'esotossina costituita da cinque diverse subunità peptidiche di cui due, S2 ed S3 presentano molte caratteristiche tipiche delle selectine eucariotiche.

Simulando le molecole dell'ospite, le *adesine* batteriche sono in grado di mediare l'interazione con le cellule eucariotiche.

1.2 Il pilus come modello di adesione dei batteri Gram-negativi

Il meccanismo di adesione meglio conosciuto è quello mediato da proteine strutturali che nel loro insieme formano il pilus o fimbria; tali proteine sono formate dall'assemblaggio di singole subunità di circa 20 kDa ognuna definite piline.

Il pilus è una struttura abbastanza lunga e flessibile che si estende dalla membrana esterna del batterio e serve a stabilire un contatto tra quest'ultima e la membrana della cellula ospite (Kuehn *et al.*, 1994). Si tratta di una struttura molto fragile che va incontro ad un continuo *turnover*; ciò è importante perché permette al batterio di eludere la risposta immunitaria dell'ospite. Infatti, alcuni batteri, come ad esempio

Neisseria gonorrhoeae, agente eziologico della gonorrea, sono in grado di cambiare il tipo di pilina utilizzata nella formazione del pilus. Tale fenomeno, noto come variazione di fase, avviene con frequenza e rende impossibile per l'organismo infettato una risposta anticorpale che possa prevenire la colonizzazione (Stern *et al.*, 1987).

I meccanismi molecolari necessari alla biogenesi e al successivo assemblaggio del pilus sulla membrana batterica sono altamente conservati tra i batteri, così come le proteine che costituiscono la base del pilus che ancora i *pili* alla parete cellulare batterica.

Una notevole variabilità si osserva invece per quel che riguarda l'apice dei *pili* che presentano le componenti proteiche essenziali per la specificità d'adesione. Tale variabilità ci permette di distinguere vari tipi di pilus.

1.2.1 Il pilus di tipo P

Di particolare interesse è stato lo studio del pilus di tipo P, codificato dai geni *pap* (Hultgren *et al.*, 1993). I ceppi di *Escherichia coli* che esprimono tale pilus sono la causa principale di una nota patologia, la pielonefrite, dovuta alla colonizzazione iniziale del tratto urinario e successiva infezione dei reni. Tale pilus ha la forma di un'asta alla cui estremità distale è legata una adesina, la proteina PapG, che media il contatto con la membrana eucariotica cui il batterio aderisce.

La sintesi del pilus di tipo P ed il successivo assemblaggio sulla superficie batterica è guidata da due proteine: PapD e PapC. PapD è un *chaperone* periplasmatico altamente conservato con una struttura immunoglobulino-simile (Holmgren *et al.*, 1992) necessario al trasporto delle diverse copie di pilina PapA, che costituiscono il pilus, dalla membrana citoplasmatica alla membrana esterna; PapC riceve le subunità traslocate da PapD sulla membrana esterna consentendone l'assemblaggio in modo apicale. La traslocazione ed il successivo assemblaggio della proteina PapH segna la fine del processo di estrusione e stabilizza il pilus ancorandolo alla parete cellulare. I geni *pap*, responsabili della formazione del pilus, sono altamente conservati in molti batteri gram-negativi, ma nonostante ciò, i meccanismi molecolari alla base della biogenesi e dell'assemblaggio del pilus sono in molti casi sostanzialmente diversi.

1.2.2 Il Pilus di tipo I

Il pilus di tipo I è una struttura proteica molto conservata tra gli enterobatteri (Abraham *et al.*, 1999). I geni responsabili della formazione di questo tipo di pilus sono organizzati in tre unità trascrizionali. L'operone *fimAICDFGH*, responsabile della produzione delle proteine strutturali del pilus e i geni *fimB* e *fimE* che codificano rispettivamente per le ricombinasi FimB e FimE. Tali ricombinasi sono responsabili

dell'inversione di un frammento di DNA di 314 paia di basi contenente il promotore dell'operone *fimAICDFGH*, definito *fimS* (Olsen et al.;1994). Il promotore *fimS* può presentarsi in due orientamenti: l'orientamento 'ON' che permette la trascrizione dell'operone e l'orientamento 'OFF', che non permette la trascrizione dell'operone. In particolare la ricombinasi FimB catalizza l'inversione del promotore *fimS* in entrambe le direzioni (ON \leftrightarrow OFF); la ricombinasi FimE, invece, catalizza l'inversione del promotore soltanto da ON ad OFF (Gally et al.; 1996). Da un punto di vista strutturale il pilus di tipo I si presenta come una spessa bacchetta elicoidale dello spessore di 7 nm composta da più subunità FimA associate ad una struttura fibrillare apicale costituita dalla subunità FimH, e da due proteine adattatrici, FimF e FimG (Fig .1A e 1B). La proteina FimH è una proteina d'adesione che lega il mannosio e le proteine mannosilate presenti sulla membrana di molte cellule eucariotiche. Tale attività fornisce al batterio la capacità di aderire a svariati tipi cellulari, come ad esempio le cellule della mucosa buccale, le cellule del tubulo prossimale del glomerulo renale, l'epitelio della vescica urinaria e dell'intestino. Nonostante tale ampia capacità adesiva, FimH presenta un'elevata specificità per i recettori glicoproteici espressi dalle cellule uroepiteliali e di conseguenza

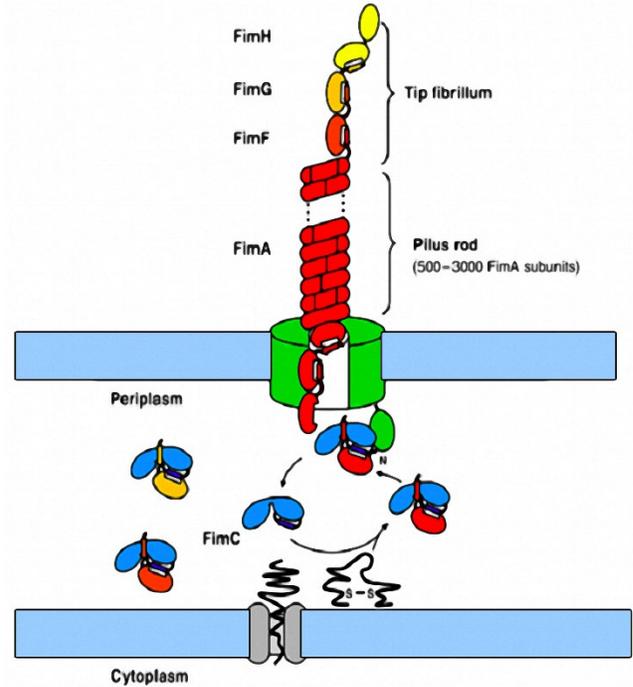
A**B**

Fig1 (A) Fotografia a microscopio elettronico ad alta risoluzione del pilus di tipo I. La freccia indica l'apice del pilus costituito dall'adesina FimH. (B) Rappresentazione schematica dell'assemblaggio del pilus di tipo I. Lo *chaperone* molecolare FimC forma dei complessi con le subunità del pilus (FimA, FimF, FimG e FimH) appena traslocate nel periplasma. I complessi FimC-subunità giungono in prossimità della proteina FimD che costituisce il poro di traslocazione. La proteina FimC viene rilasciata nel periplasma e le subunità del pilus vengono traslocate all'esterno. L'asta del pilus è costituita da più subunità della proteina FimA assemblate a formare una struttura elicoidale. L'apice del pilus è costituito da due proteine adattatrici, FimF e FimG, e dalla proteina FimH .

i patogeni che presentano tale tipo di pilus provocano, in generale, infezioni del tratto urinario (Abraham *et al.*, 2001).

1.2.3 Il Pilus di tipo IV

Di particolare rilevanza è il pilus di tipo IV, caratteristico di alcuni microrganismi patogeni tra cui *Pseudomonas aeruginosa*, varie specie del genere *Neisseria*, e di *Escherichia coli* enteropatogeno (EPEC) (Stern *et al.*, 1987). La pilina che costituisce il pilus di tipo IV presenta alcune caratteristiche specifiche tra cui una sequenza ammino-terminale molto conservata ed inusuale, in quanto il residuo amminoacidico N-terminale è metilato e manca della classica sequenza *leader* per la traslocazione attraverso la membrana. Inoltre, l'estremità C-terminale presenta coppie di cisteina coinvolte nella formazione sia di legami intracatena che di ponti disolfuro tra molecole diverse. I geni codificanti per le proteine coinvolte nell'assemblaggio di tale tipo di pilus appartengono al sistema di secrezione di tipo II, un sistema di secrezione generale utilizzato per trasportare le molecole da una parte all'altra della parete dei batteri Gram-negativi.

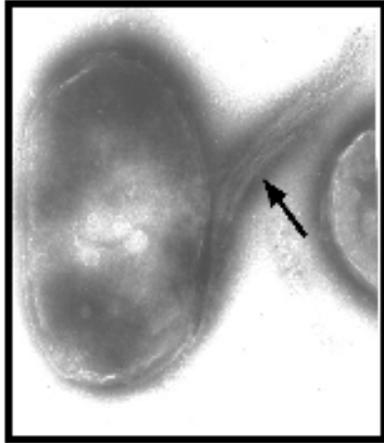
Il pilus di tipo IV ha attirato, negli ultimi anni, l'attenzione di molti ricercatori, per la sua importanza nella prima fase d'infezione indotta da *E. coli* enteropatogeno nell'uomo. La presenza di tale tipo di pilus permette, infatti, l'iniziale adesione del patogeno all'epitelio intestinale e

l'aggregazione delle cellule batteriche in microcolonie localizzate nel sito d'infezione.

1.3 *Escherichia coli* enteropatogeno (EPEC)

Escherichia coli enteropatogeno (EPEC) è la causa principale della diarrea neonatale nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo (Nataro *et al.*, 1998). Similmente ad altri patogeni, EPEC entra nell'organismo animale per via orale e inizia a colonizzare l'epitelio intestinale, ma, a differenza di altri patogeni, non invade l'ambiente intracellulare e forma colonie che aderiscono strettamente alla membrana delle cellule epiteliali. L'adesione iniziale di EPEC all'epitelio intestinale è dovuta alla presenza di un plasmide di 95 kb, definito EAF (EPEC Adherence Factor), recante i geni responsabili della formazione di appendici cellulari appartenenti alla famiglia del pilus di tipo IV. Queste appendici cellulari, denominate 'bounble forming pili', sono la risultante di un numero variabile di fimbrie dello spessore di circa 7 nm intrecciate tra loro a formare una struttura elicoidale di circa 50 nm di diametro (Fig. 2A e 2B).

A



B

Type IV bundle-forming pilus:

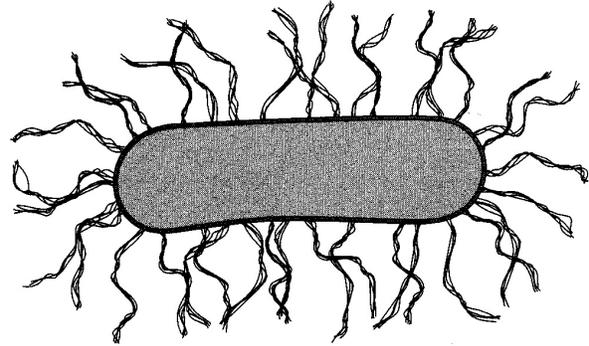


Fig. 2 (A) Fotografia a microscopio elettronico a trasmissione d una cellula di EPEC. La freccia indica il Boundle forming pilus. (B) Distribuzione del Boundle forming pilus sulla superficie dei batteri.

Esperimenti condotti *in vitro* ed *in vivo* hanno permesso di dimostrare che il BFP è responsabile del raggruppamento di microcolonie batteriche al sito di adesione in seguito alla colonizzazione dell'epitelio intestinale da parte di EPEC (Fig.3). Tale fenomeno, noto come adesione localizzata (Nataro *et al.*, 1998), rappresenta il primo stadio dell'infezione indotta da EPEC. In seguito all'adesione del patogeno, l'epitelio intestinale subisce una serie di cambiamenti morfologici e strutturali che terminano con la retrazione dei microvilli e con la formazione di una struttura proteica ricca in actina, il piedistallo (fig. 4A), a cui il patogeno rimane adeso durante tutta l'infezione. Le alterazioni morfologiche e istologiche che si osservano sulla superficie degli enterociti in seguito all'interazione patogeno-cellula ospite sono definite 'attaching and effacing lesions' (Fig.4B) e sono dovute alla presenza sul cromosoma di tale patogeno di un' isola di patogenicità definita Locus of Enterocyte Effacement o locus LEE.

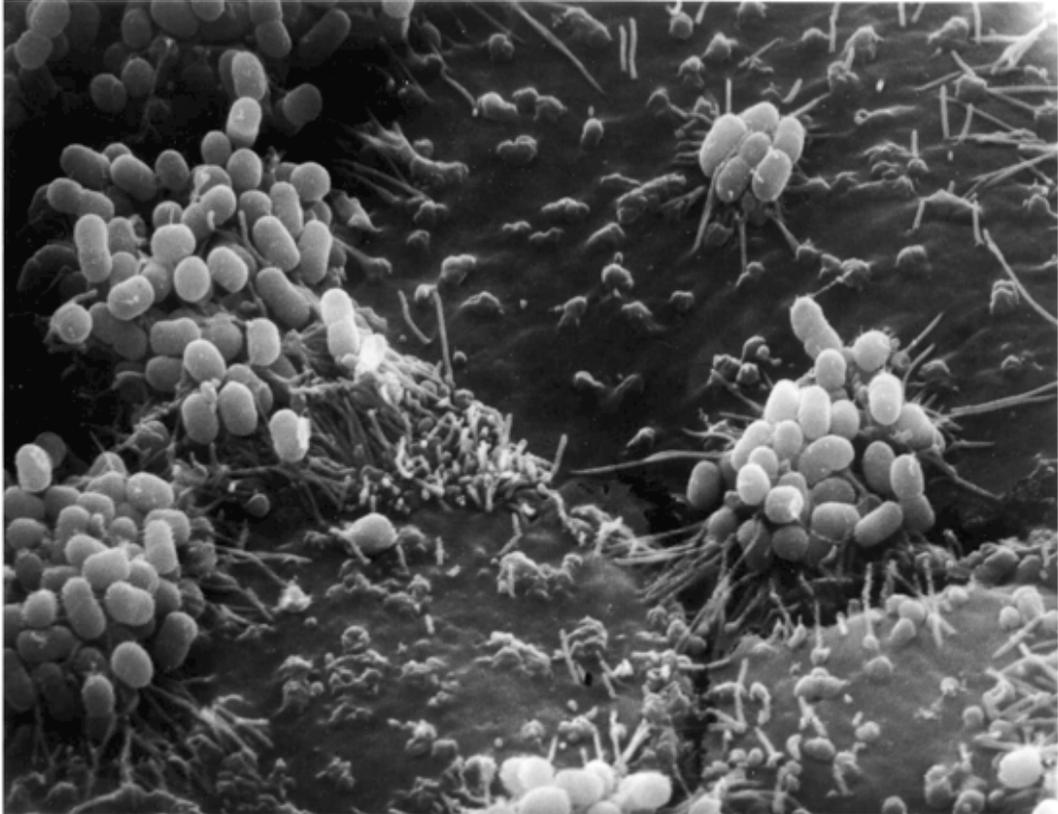


Fig. 3. Fotografia a microscopio elettronico che mostra la formazione di microcolonie batteriche (Adesione Localizzata) di EPEC a cellule HEp-2

A



B



Fig.4. (A) EPEC (color porpora) induce la formazione del piedistallo (color arancione) sulla membrana delle cellule bersaglio. (B) Fotografia a microscopio elettronico a scansione che mostra le lesioni di tipo 'attacing and effacing' sulla membrana di enterociti

1.4 L'Isola di Patogenicità

I cambiamenti che si osservano nell'organizzazione del citoscheletro e la successiva formazione del “pedistallo”, in seguito all'adesione di EPEC all'epitelio cellulare, sono mediati dai geni della virulenza localizzati in un locus del cromosoma definito isola della patogenicità (o locus) LEE (Jerse *et al.*, 1990).

Oltre a EPEC, tale locus genico è presente in diversi enterobatteri patogeni, quali *E. coli* enteroemorragico (EHEC), *Hafnia alvei* (Albert *et al.*, 1992) e *Citrobacter rodentium*, l'agente eziologico dell'iperplasia nei topi (Frankel *et al.*, 1994; Shauer *et al.*, 1993).

I geni presenti nel locus LEE sono organizzati in cinque grandi unità trascrizionali, LEE1, LEE2, LEE3, LEE4, LEE5 funzionalmente suddivise in 3 domini. Il dominio più grande, costituito dagli operoni LEE1, LEE2 e LEE3, è responsabile della formazione del sistema di secrezione di tipo III (*Type Three Secretion System*, TTSS); il dominio centrale, costituito dall'operone LEE5 è responsabile dell'intima adesione del patogeno all'epitelio intestinale dell'ospite; il dominio terminale, costituito dall'operone LEE4, è responsabile della produzione di proteine di secrezione che vengono traslocate attraverso il TTSS dal patogeno alla cellula ospite (Hueck *et al.*, 1998) (Fig.5 A).

1.4.1 Sistema di secrezione di tipo III e proteine di secrezione

Il Sistema di Secrezione di Tipo III (TTSS) è un complesso multiproteico utilizzato da molti patogeni Gram-negativi per traslocare fattori di virulenza all'interno del citoplasma della cellula ospite.

Il TTSS, da un punto di vista strutturale, presenta elevate omologie con l'apparato biosintetico flagellare e può essere suddiviso in tre porzioni principali: il corpo basale, un canale proteico ed il filamento apicale. Il corpo basale rappresenta la porzione più complessa del TTSS ed è costituito da due anelli proteici denominati 'inner ring' (IR) ed 'outer ring' (OR), inseriti rispettivamente nella membrana interna ed esterna del batterio e collegati tra loro da una struttura bastoncellare. L'anello interno è costituito dall'assemblaggio di cinque proteine strutturali, EscR, EscS, EscT, EscU ed EscV; l'anello esterno, invece, è costituito da un'unica proteina di 54 kDa appartenente alla famiglia delle 'secretine' denominata EscC. I due anelli proteici sono connessi tra loro da una lipoproteina definita EscJ. La struttura di tale proteina è stata recentemente determinata mediante Risonanza Magnetica Nucleare. Da tale analisi è emerso che la proteina EscJ è costituita da due domini strutturali connessi tra loro da un legame covalente a formare una struttura cilindrica che può estendersi fino a 10 nm di lunghezza (Crepin *et al.*, 2005). La traslocazione di proteine effettrici dal patogeno alla cellula ospite è resa possibile dalla presenza di una proteina di canale, la

proteina EspF, collegata direttamente alla proteina EscC. Le proteine assemblate a costituire questo macchinario di traslocazione sono tutte codificate dai geni del locus LEE presenti negli operoni LEE1, LEE2 ed LEE3. In seguito all'assemblaggio del TTSS sulla superficie del patogeno, ha inizio la traslocazione e la polimerizzazione di varie subunità della proteina EspA, codificata dal locus LEE4, che termina con la formazione di un lungo filamento che si estende fino alla membrana della cellula eucariotica. Recentemente è stata determinata la struttura tridimensionale del filamento EspA (Daniell *et al.*, 2003) che si presenta come una struttura tubulare con un canale centrale del diametro di circa 2.5 nm. Questo canale centrale rappresenta la via di traslocazione di due proteine, EspB ed EspD, che si inseriscono nella membrana plasmatica della cellula ospite formando un canale di traslocazione (Fig. 5 B). In seguito alla formazione di questo poro, il patogeno inietta nel citoplasma ospite una serie di proteine effettrici, tra cui EspF e Tir. Analisi in vitro hanno dimostrato che EspF è responsabile della riduzione della resistenza transepiteliale (TER) e dell'alterazione delle giunzioni strette (Tight Junction) dell'epitelio intestinale (McNamara *et al.*; 2001; Elliott *et al.*; 2002; Viswanathan *et al.*; 2004). Tir, invece è responsabile principalmente dei cambiamenti citoscheletrici nel citoplasma cellulare che provocano la formazione del piedistallo.

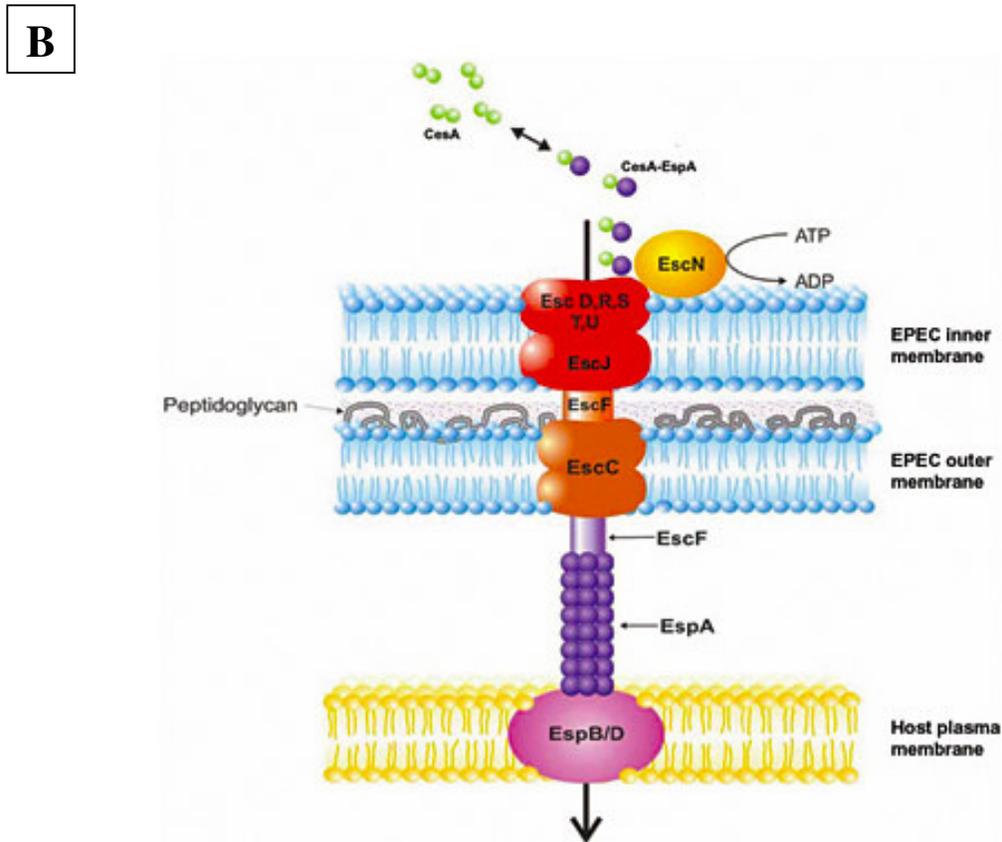
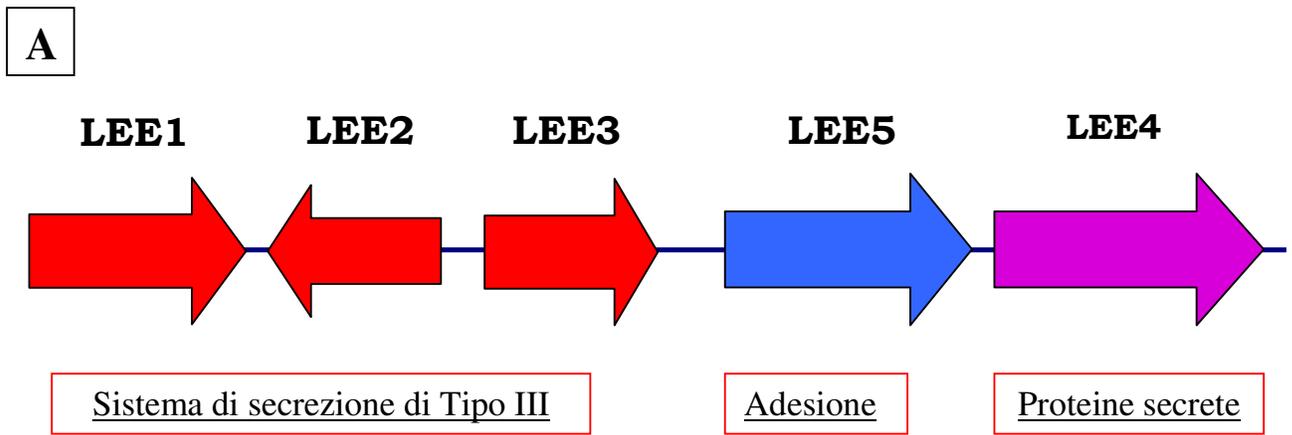


Fig.5. (A) Rappresentazione schematica dell'organizzazione strutturale e funzionale del locus LEE. Gli operoni LEE1, LEE2 ed LEE3 (indicati in rosso) sono responsabili della formazione del TTSS; L'operone LEE5 (indicato in blu) è responsabile dell'adesione patogeno-cellula ospite; l'operone LEE4 (indicato in porpora) è responsabile della formazione si proteine di secrezione. (B) Rappresentazione schematica del sistema di secrezione di tipo III

1.4.2 Intima adesione e formazione del piedistallo

La peculiarità del meccanismo di infezione utilizzato da EPEC risiede nella capacità di tale patogeno di aderire in maniera ‘intima’ all’epitelio della cellula intestinale.

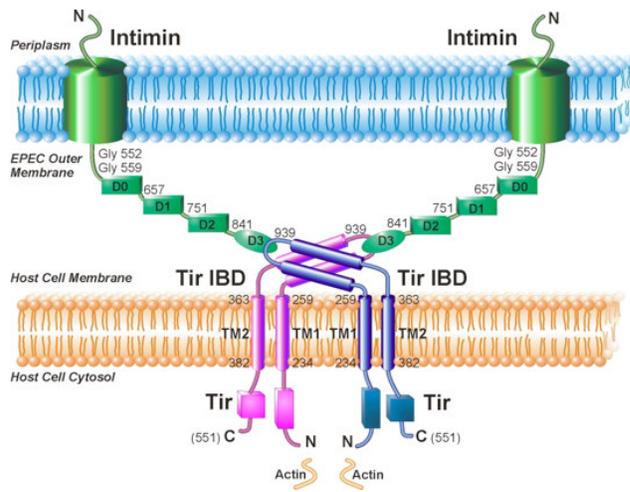
Questa capacità è dovuta alla presenza, sulla membrana esterna del batterio, di una proteina di adesione denominata intimina. Tale proteina, codificata dal gene *eae* presente nell’operone LEE5 del locus LEE (Jerse *et al.*, 1991), ha un peso molecolare di 94kDa e presenta due domini funzionali:

- il dominio N-terminale, molto conservato tra gli enteropatogeni, è inserito nella membrana esterna del batterio a formare una struttura a β -foglietto ed è responsabile della dimerizzazione della proteina (Touze *et al.*, 2004).
- Il dominio C-terminale è costituito da una sequenza di 280 amminoacidi (Int280), molto variabile tra i diversi enteropatogeni, che si estende dalla membrana del patogeno e interagisce con i recettori presenti sulla membrana plasmatica dell’ospite.

Il meccanismo di adesione utilizzato da EPEC è alquanto insolito poiché il recettore per l’intimina, la proteina Tir (*Transmembrane intimin receptor*), viene prodotto dal batterio stesso sotto forma di una proteina di circa 78 kDa, e traslocato, mediante il TTSS, nel citoplasma della

cellula epiteliale. All'interno della cellula ospite, Tir interagisce con chaperones molecolari e viene esposto sulla superficie della membrana volgendo entrambe le estremità, N-terminale e C-terminale, sul versante citoplasmatico e formando un loop extracellulare responsabile dell'interazione con l'intimina (Kenny *et al.*, 1997) (Fig.6A). In seguito al legame con l'intimina la proteina Tir viene fosforilata su due residui di serina (S434ed S463) e su un residuo di tirosina (Y474) da chinasi proprie dell'ospite. L'attivazione di Tir provoca, attraverso una serie di reazioni a cascata, l'attivazione del complesso Arp2/3 responsabile di un riarrangiamento citoscheletrico all'interno del citosol cellulare che termina con la polimerizzazione locale dei filamenti di actina e con la formazione del piedistallo (Fig. 6B).

A



B

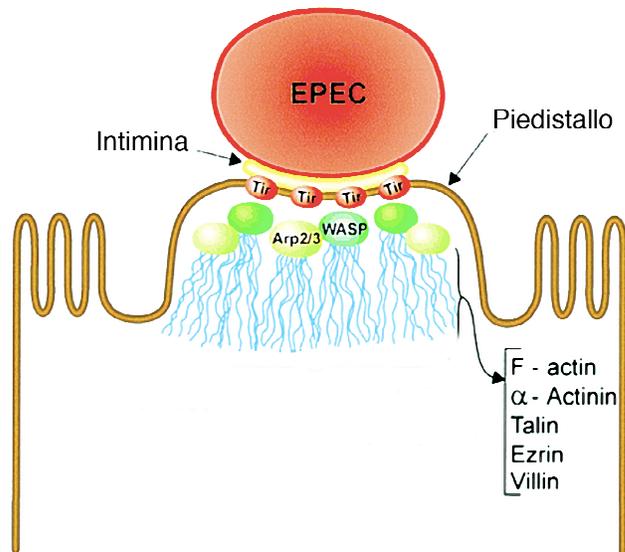


Fig.6. (A) Interazione tra l'intimina ed il suo recettore di membrana, la proteina Tir. L'estremità C-terminale dell'intimina interagisce con il loop extracellulare della proteina Tir. (B) In seguito al legame con l'intimina, la proteina Tir viene attivata provocando una serie di reazioni a cascata che terminano con l'attivazione del complesso Arp2/3, responsabile della polimerizzazione di molecole di astina

1.5 Regolazione dei fattori di virulenza in EPEC

L'espressione dei geni presenti nel locus LEE è finemente regolata dall'azione combinata di diversi fattori trascrizionali.

Il primo elemento regolatorio identificato e caratterizzato è il locus *per* presente sul plasmide EAF (EPEC-Adherence factor). Tale locus comprende i geni *perA*, *perB* e *perC*. Il gene *perA* codifica per la proteina PerA, appartenente alla famiglia dei regolatori trascrizionali AraC, che regola positivamente l'espressione del Bfp (Sohel *et al.*, 1996; Tobe *et al.*, 1996) e dei geni presenti nel locus LEE (Gomez-Duarte *et al.*; 1999). I geni *perB* e *perC* codificano per due proteine che agiscono da coregolatori aumentando l'effetto positivo di PerA attraverso un meccanismo ancora sconosciuto. La regolazione del locus *per* dipende dalla regolazione positiva di PerA sul suo gene strutturale e dalla repressione della proteina GadX (Shin *et al.*, 2001). Quest'ultima è responsabile dell'attivazione del gene *gadA* codificante per l'enzima glutammato-decarbossilasi, una proteina responsabile dell'adattamento alle condizioni acide che EPEC incontra passando nello stomaco (Shin *et al.*, 2001).

Il locus *per* è coinvolto anche nella regolazione dei geni presenti nel locus *LEE*. Tale regolazione avviene mediante l'attivazione della proteina Ler (LEE-encoded regulator), codificata dal primo gene dell'operone LEE1.

Studi relativamente recenti hanno dimostrato che la proteina Ler è il principale attivatore trascrizionale dei geni presenti negli operoni LEE2, LEE3, LEE4 ed LEE5 (Bustamante *et al.*, 2001) e dei geni situati all'esterno del locus LEE (Elliott *et al.*; 2000). La regolazione di *ler* oltre ad essere PerA-dipendente è mediata dall'azione combinata di numerosi attivatori e repressori trascrizionali.

I principali attivatori trascrizionali identificati come regolatori del gene *ler* sono IHF (integration-host factor) (Friedberg *et al.*; 1999), Fis (factor for inversion stimulation) (Goldberg *et al.*; 2001) e QseA (qorum sensing-*E. coli* regulator) (Sperandio *et al.*; 2002).

La regolazione negativa svolta dalla proteina Ler è, invece mediata dal regolatore globale H-NS (histone-like nucleoid structuring protein) che antagonizza l'azione svolta da Ler sull'espressione degli operoni LEE legandosi direttamente al promotore di tali operoni e inibendone l'espressione (Bustamante *et al.*, 2001) (Fig.7). La regolazione del locus LEE appare molto complessa per l'esistenza di numerosi vie di regolazione. La chiarificazione di come tali vie siano connesse tra loro rappresenta un requisito fondamentale per la comprensione della patogenesi indotta da EPEC.

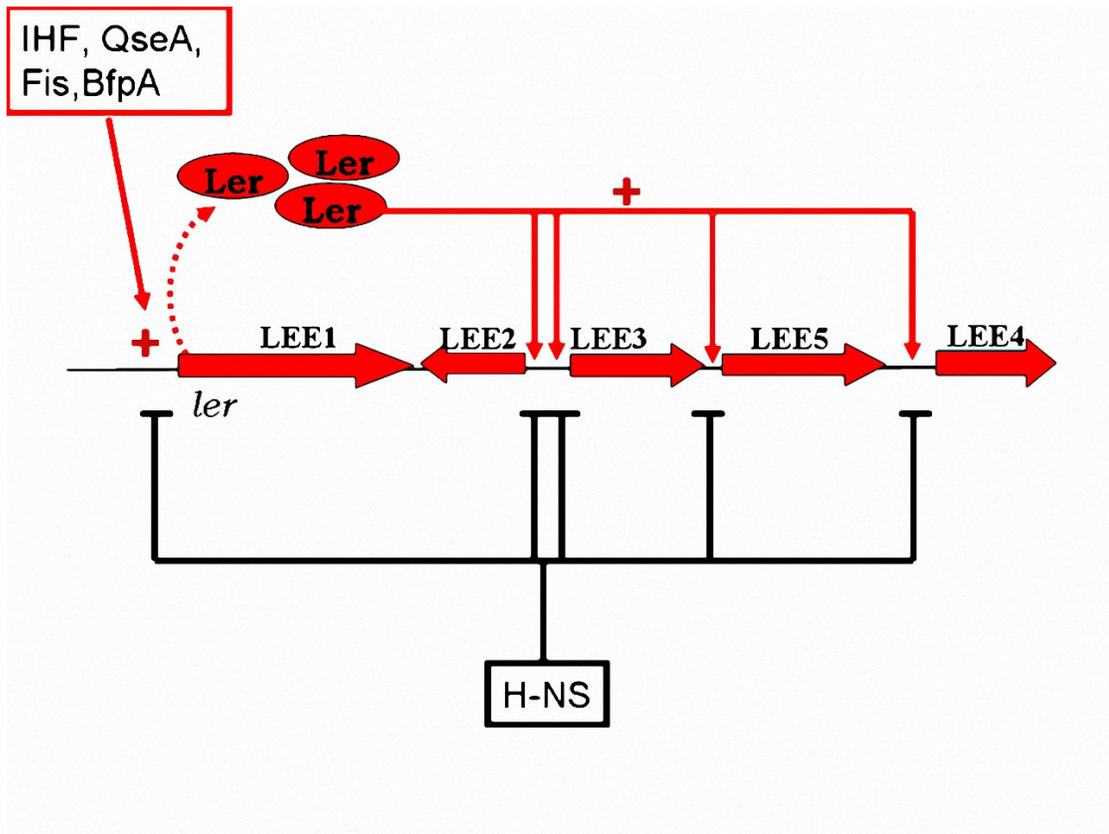


Fig.7 Modello di regolazione del locus LEE. In figura sono riportati alcuni attivatori trascrizionali (IHF, BfpA, QseA, Ler, Fis) ed il principale repressore trascrizionale H-NS

1.6 *Citrobacter rodentium* come sistema modello per lo studio dell'infezione indotta da EPEC

Negli ultimi anni numerose ricerche hanno permesso di stabilire le basi molecolari dell'interazione EPEC-cellula ospite ma a tutt'oggi le conoscenze relative al danno provocato da EPEC non sono ancora chiare. Le riserve di natura etica che precludono la possibilità di effettuare esami su campioni biotici durante l'infezione indotta da EPEC e l'impossibilità di utilizzare tale patogeno in esperimenti *in vivo* con animali da laboratorio, data la sua specificità per l'uomo, hanno reso necessaria la ricerca di sistemi modello. A tal fine sono stati identificati ed isolati un gran numero di enteropatogeni animali specie-specifici. In questa classe rientra *Citrobacter rodentium*, un enterobatterio Gram-negativo, non capsulato, anaerobio facoltativo, mobile per la presenza di un flagello, in grado di utilizzare l'acido citrico come sola fonte di carbonio.

C. rodentium è l'agente eziologico dell'iperplasia nei topi (Bartold *et al.*, 1976), caratterizzata da una proliferazione incontrollata delle cellule della mucosa intestinale e da cambiamenti istopatologici simili a quelli provocati da EPEC nell'uomo (Bartold *et al.*, 1978). In alcuni casi i topi infettati da *C. rodentium* vanno incontro al prolasso rettale seguito dalla morte del topo stesso (Luperchio *et al.*, 2000). Le lesioni provocate da tale patogeno sono dovute alla presenza nel suo DNA genomico del locus

LEE codificante i geni della virulenza omologo al locus LEE di EPEC ed EHEC (vedi 1.4).

C. rodentium è un microrganismo poco caratterizzato dal punto di vista molecolare con l'eccezione dei geni codificati dal locus LEE (Shauer *et al.*, 1993), responsabili della sua virulenza che sono stati sequenziati e si trovano in banca dati. Sebbene *C. rodentium* ed i ceppi patogeni di *E. coli* differiscano tra loro nella specificità tissutale, le lesioni provocate nell'organismo ospite sono identiche dal punto di vista ultrastrutturale. Attraverso la costruzione di un mutante di *C. rodentium* delecto del gene *eaeA* è stata dimostrata l'importanza di tale gene e della proteina da esso codificata, l'intimina, nel processo d'infezione. Inoltre, è stato osservato che l'intimina di EPEC può complementare l'assenza dell'intimina endogena di *C. rodentium* (Frankel *et al.*, 1996).

Tali risultati dimostrano quindi che l'infezione murina da *C. rodentium* rappresenta un modello pertinente per indagare il ruolo e le proprietà molecolari ed immunologiche delle proteine coinvolte nella patogenesi indotta da EPEC e EHEC nell'uomo.

1.7 La proteina regolativa Lrp

Relativamente recente è il concetto che una singola proteina regolativa, sia in grado di controllare l'espressione di diversi geni ed operoni, distanti tra loro sul cromosoma batterico. Da questa osservazione si è

giunti all'individuazione della "risposta globale", in cui diverse funzioni sono controllate coordinatamente in risposta ad un segnale quale ad esempio una variazione di temperatura, di pH o di concentrazione dei nutrienti.

Uno dei sistemi maggiormente studiati è quello della proteina regolativa Crp (cAMP receptor protein); tale proteina risponde a variazioni di concentrazione della fonte di carbonio disponibile per la crescita che si manifestano attraverso una variazione di concentrazione di una molecola effettore, cAMP. Il complesso cAMP-Crp è in grado di legarsi a siti specifici sul DNA provocando l'attivazione coordinata di numerosi geni.

Lo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione dei processi metabolici in *E.coli*, ha permesso di individuare un'importante proteina regolativa, denominata Lrp (leucine-responsive regulatory protein), la cui azione può essere modulata dall'effettore leucina (Ricca *et al.*, 1989; Platko *et al.*, 1990; Newman *et al.* 1995).

In *E. coli* questa proteina controlla l'espressione di numerosi geni ed operoni tra cui *ilvIH* (Ricca *et al.*, 1989; Platko *et al.*, 1990), *sdaA* (Lin *et al.*, 1990), *serA* e *tdh* (Lin *et al.*, 1990; Rex *et al.*, 1991), *livJ* e *livKHMGF* (Haney *et al.*, 1992), *oppABCDF* (Austin *et al.*, 1989), *fanABC* e *papBA* (Braaten *et al.*, 1992), *lysU* (Lin *et al.*, 1992).

Un'analisi mediante esperimenti di DNA microarray ha recentemente mostrato che, in *E. coli*, Lrp regola almeno il 10 % dei geni e che la

leucina può sia contrastarne l'azione che fungere da cofattore (Tani et al.; 2002). In molti casi comunque, la regolazione genica da parte di Lrp è leucina-indipendente (Calvo and Matthews, 1994)

Il gene codificante per Lrp è stato clonato e sequenziato, ed esperimenti di analisi mutazionale hanno permesso di evidenziare che la proteina Lrp presenta tre domini funzionali:

- un dominio ammino-terminale, contenente il sito di legame della proteina al DNA;
- un dominio centrale responsabile dell'attivazione trascrizionale;
- un dominio carbossi-terminale, importante per la risposta alla leucina.

Studi condotti sulla proteina purificata hanno evidenziato l'esistenza, in soluzione, di una forma dimerica costituita da due subunità identiche di 18.8 kDa; inoltre è stata stimata la presenza di circa 3000 molecole di dimero per cellula in cellule di *E. coli* cresciute in terreno minimo contenente glucosio.

Uno degli operoni regolati positivamente dalla proteina Lrp, ed ampiamente studiato è l'operone *ilvIH*, codificante uno dei due isoenzimi aceto-ossiacido sintasi (AHAS), che catalizzano la prima reazione nella biosintesi degli amminoacidi a catena ramificata isoleucina, leucina e valina (De Felice *et al.*, 1977; De Felice *et al.*, 1979; La Cara e De Felice,

1979). L'attivazione trascrizionale dell'operone *ilvIH* da parte della proteina Lrp è eliminata dalla presenza della leucina esogena (Ricca *et al.*, 1989).

1.7.1 Lrp regola l'espressione dei geni della virulenza

Lrp gioca un ruolo importante nella patogenicità di alcuni enterobatteri poiché in diversi ceppi patogeni di *E. coli* regola l'espressione di geni coinvolti nella formazione di *fimbriae* e *pili* tra cui gli operoni *pap* e *fim* (Braaten *et al.*, 1992).

I geni *pap* vanno incontro alla variazione di fase in cui si osserva il passaggio da una fase trascrizionalmente attiva, durante la quale viene espresso il pilus (fase ON) ad una fase trascrizionalmente inattiva, durante la quale il pilus non viene prodotto (fase OFF).

L'espressione dei geni *pap* è regolata in parte dal legame di Lrp a due regioni del DNA che fungono una da attivatore e l'altra da repressore della trascrizione situate tra il promotore di un gene divergente, *papI*, codificante per un gene regolatore, ed il promotore di *papBA* che codifica per i geni strutturali del pilus. In tal modo Lrp a seconda del sito di DNA a cui si lega è in grado di agire sia da attivatore che da repressore della trascrizione dei geni coinvolti nella formazione del pilus. Tale meccanismo è regolato anche dalla presenza di due importanti GATC-box, la cui metilazione dovuta ad una deossadenosina-metilasi (Dam),

riduce l'affinità di legame di Lrp ai siti attivatori e blocca la cellula in uno stato OFF.

Un altro meccanismo di regolazione molto studiato riguarda l'espressione dei geni *fim* responsabili della formazione del pilus di tipo I in *E. coli*. Lrp è un'attivatore trascrizionale di tali geni e la leucina esogena modula positivamente questa regolazione (Roesch and Bloomfield, 1998). La regolazione mediata da Lrp è dovuta alla presenza nel promotore *fimS* (par. 1.2.2), di tre siti di legame per Lrp, definiti rispettivamente sito 1, sito 2 e sito 3. In assenza di leucina esogena, Lrp è in grado di legarsi ai tre siti di legame anche a bassa concentrazione. Analisi mutazionali hanno evidenziato che il legame di Lrp al sito 3 non è necessario per la stabilizzazione del complesso DNA-proteina (Roesch and Bloomfield, 1998), e che il legame di Lrp a questo sito, quando gli altri due sono già occupati dalla proteina è cooperativo. Blomfield et al., (1997) hanno proposto un modello secondo cui l'inversione del promotore *fimS* è stimolata da Lrp che, insieme al regolatore trascrizionale IHF, promuove una curvatura del DNA. Questo cambiamento conformazionale si verifica solo quando Lrp è legata ai siti 1 e 2 ma non al sito 3. Questo modello assume, inoltre, che la leucina esogena stimola l'inversione di *fimS* promuovendo la dissociazione di Lrp dal terzo sito di legame. (Blomfield et al.; 1997).

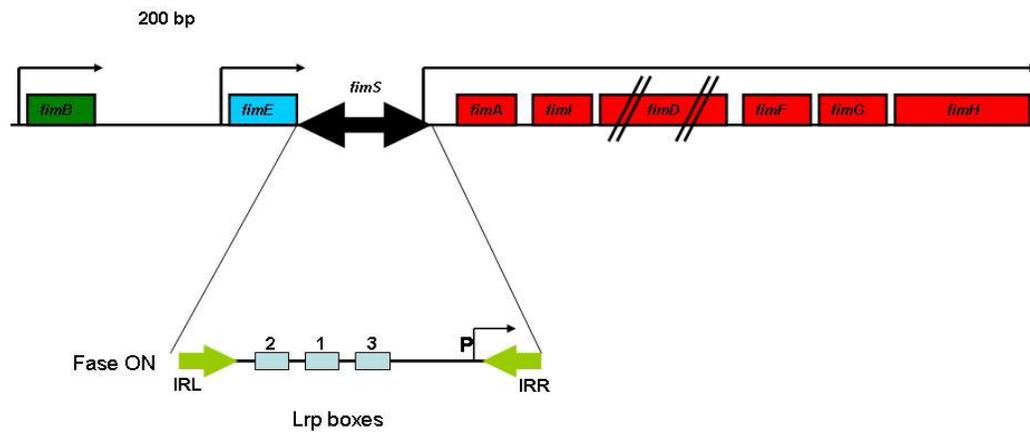


Fig. 8. Rappresentazione schematica delle tre unità trascrizionali presenti nella regione *fim* di *E. coli*. L'operone *fimAICDFGH*, responsabile della formazione delle proteine strutturali del pilus di tipo I è indicato in rosso; il gene *fimB*, codificante per la ricombinasi FimB è indicato in verde; il gene *fimE*, codificante per la ricombinasi FimE è indicato in azzurro. È riportato anche il promotore *fimS* orientato in fase ON fiancheggiato dalle le due sequenze ripetute Invertite (IRL ed IRR). Nel promotore *fimS* sono situate le tre box di legame per la proteina Lrp

1.8 Scopo della tesi

C. rodentium è un batterio gram-negativo responsabile di una infezione della mucosa intestinale murina molto simile a quella causata nell'uomo da *E. coli* enteropatogeno (EPEC). Esistono numerose similitudini tra *C. rodentium* ed *E. coli* anche per quanto riguarda i geni localizzati nell'isola di patogenicità LEE, i cui prodotti sono responsabili delle varie fasi del processo infettivo.

Nonostante la limitata conoscenza che finora si ha della fisiologia e genetica di *C. rodentium*, le elevate omologie con un importante patogeno umano e la possibilità di utilizzarlo in esperimenti *in vivo* con un sistema murino, hanno recentemente reso *C. rodentium* un importante modello per lo studio dei meccanismi di infezione dei ceppi enteropatogenici.

In questo contesto si inserisce il lavoro della mia tesi di dottorato che ha l'obiettivo di studiare *C. rodentium* per approfondirne la conoscenza di base e per individuare eventuali altri fattori, oltre ai prodotti del locus LEE, coinvolti nella patogenicità di tale organismo.

A tale scopo ho analizzato se *C. rodentium* esprimesse un omologo della proteina Lrp, un regolatore trascrizionale con effetto globale sul metabolismo di vari enterobatteri.

La proteina Lrp, identificata in *E. coli* circa 15 anni fa (Ricca *et al.*, 1989), è stata poi oggetto di numerosi ed approfonditi studi che hanno

portato sia a chiarire le modalità di legame di Lrp al DNA (Cui *et al.*, 1995) ed all'effettore leucina (Platko *et al.*, 1993), sia ad individuare un gran numero di geni ed operoni controllati trascrizionalmente da Lrp che, infine, ad osservare che omologhi di Lrp sono presenti in molti batteri, in particolare enterobatteri (Friedberg *et al.*, 1995).

Particolarmente interessante per l'obiettivo della mia tesi era l'osservazione che al gruppo di geni regolati da Lrp appartengono anche geni codificanti per fattori di virulenza, quali i geni *pap* e i geni *fim* di patogeni di *E. coli* che codificano rispettivamente per il pilus di tipo P (Braaten *et al.*, 1992) e per il pilus di tipo I.

Con il mio lavoro di tesi ho messo in evidenza che anche *C. rodentium*, come altri enterobatteri, possiede un omologo di Lrp e che tale proteina oltre a regolare negativamente l'espressione del suo gene strutturale, controlla positivamente la formazione del pilus di tipo I. Esperimenti di DNA microarray, da me effettuati durante una permanenza di tre mesi presso il laboratorio del Dr. Jay Hinton (Norwich, UK), mi hanno inoltre permesso di analizzare il regulone Lrp di *C. rodentium*. Da tale analisi è emerso che oltre ai geni coinvolti nella regolazione del metabolismo primario, anche i geni presenti nel locus LEE di *C. rodentium* sono sotto il controllo di Lrp.

Esperimenti di Real-Time PCR e saggi EMSA mi hanno permesso di validare i risultati ottenuti con la tecnica dei microarray e di individuare

in Lrp un nuovo regolatore trascrizionale del locus LEE. L'evidenza di un ruolo diretto di Lrp nella regolazione del Locus LEE pone le basi per uno studio più approfondito dei fattori che partecipano alla patogenicità di *C. rodentium* e del loro ruolo infettivo *in vivo*.

Capitolo 2

**“The *lrp* gene and its role in type I fimbriation
in *Citrobacter rodentium*”**

Cordone A. *et al*, 2005. J. Bacteriol.,187:7009-7017

Gli esperimenti descritti in questo capitolo sono stati pubblicati sulla rivista *Journal of Bacteriology* (**187**:7009-7017; 2005). Questo lavoro è stato poi premiato come miglior lavoro nel campo della patogenesi fatto da un giovane ricercatore italiano in occasione dell' VIII Covegno della Federazione Italiana Scienze della Vita (FISV) (Riva del Garda, TN, 30 settembre 2006).

In questo lavoro, il gene *lrp* di *C. rodentium*, caratterizzato mediante clonaggio e sequenza nucleotidica, veniva espresso in un ceppo di *E. coli* che non esprime il gene *lrp* omologo. L'analisi del ceppo ricombinante mostrava che il gene di *C. rodentium* era in grado di complementare la mancata espressione del gene *lrp* omologo. Poichè tale espressione veniva fatta utilizzando i segnali di trascrizione e traduzione di *C. rodentium* ciò dimostrava che questi erano funzionanti anche in *E. coli*. Grazie alla costruzione di un ceppo di *C. rodentium* delecto del gene *lrp*, era poi possibile dimostrare che tale gene è autoregolato negativamente dal suo stesso prodotto e che la leucina esogena non ha effetto su tale regolazione.

Sempre nello stesso lavoro venivano effettuati una serie di esperimenti di Real-Time PCR con RNA estratto da *C. rodentium* selvatico e dal ceppo isogenico che non esprime *lrp*. Con tali esperimenti veniva valutato il ruolo di Lrp sull'espressione dei geni *fim* di *C. rodentium*. Questi

esperimenti permettevano di chiarire che Lrp regola positivamente l'operone *fimAICDFGH* e che tale regolazione viene esercitata mediante un'azione di Lrp sul meccanismo di variazione di fase che regola l'operone *fimAICDFGH*. La mancata espressione di *lrp* determina quindi una maggiore frequenza di cellule con il promotore di *fimAICDFGH* in fase OFF e quindi di cellule prive del pilus di tipo I.

2.1 Risultati

2.1.1 Il gene *lrp* di *Citrobacter rodentium*

L'analisi delle sequenze presenti in banca dati della regione genica comprendente il gene *lrp* di vari enterobatteri mi permetteva di evidenziare che l'organizzazione genica è conservata tra *C. rodentium*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *S. flexneri*. Sul cromosoma di tali enterobatteri, infatti, il gene *lrp* è compreso tra il gene *trdX*, divergente rispetto ad esso ed il gene *ftsK* orientato nella stessa direzione (Fig 9A). Inoltre, confrontando la sequenza amminoacidica del putativo prodotto del gene *lrp* di *C. rodentium* con quella di diversi enterobatteri, si evidenziava una elevata omologia. In particolare la proteina Lrp di *C. rodentium* risultava essere identica alla proteina Lrp di *Salmonella typhimurium* LT2 (CB025049) e molto simile alla proteina Lrp di *E. coli* K-12 (CB035580), *Shigella flexneri* (CB015933), *Proteus mirabilis* (GL086888) and *Yersinia enterocolitica* (GL082961) con 99.4%, 99.4%, 97.6% and 93.9% di identità amminoacidica, rispettivamente.

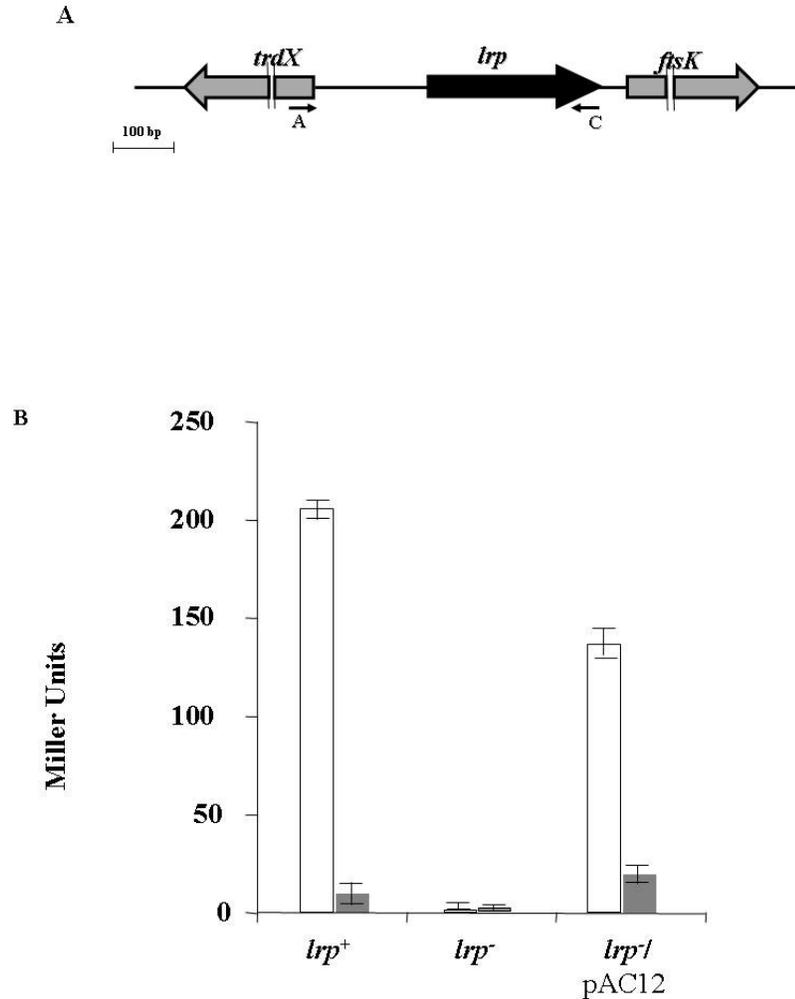


Fig.9. (A) Rappresentazione schematica della regione genica *trdX-lrp-ftsK* presente sul cromosoma di *C. rodentium*. In figura è indicata la posizione degli oligonucleotidi sintetici A e C (B) Saggio di attività β-galattosidasi condotto sui ceppi di *E. coli*: CV975 (*ilvIH::lacZ*), CV1008 (*ilvIH::lacZ lrp::Tn10*) e AC13 (CV1008 recante il plasmide pAC12), indicati rispettivamente come *lrp*⁺, *lrp*⁻ ed *lrp*⁻/pAC12. Le cellule sono state cresciute in terreno minimo (barre bianche) ed in terreno minimo supplementato con 100μg/ml di leucina (barre grigie).

2.1.2 Il gene *lrp* di *C. rodentium* è in grado di complementare l'assenza di Lrp in un mutante di *Escherichia coli*

Al fine di verificare la funzionalità del gene *lrp* di *C. rodentium* decidevo di effettuare un esperimento di complementazione. A tale scopo utilizzavo gli oligonucleotidi A e C (Tab. 4, Materiali e metodi; Fig.9A) per amplificare da DNA cromosomale di *C. rodentium* un frammento di 1228 coppie di basi contenente la regione regolativa ed il coding di *lrp*. Il frammento amplificato veniva purificato e clonato nel plasmide commerciale pGemT-easy. Il plasmide ricombinante così ottenuto, nominato pAC12, veniva utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo di *E. coli* CV1008 (Platko *et al.*, 1990), mutato nel gene endogeno *lrp* e recante sul suo cromosoma una fusione traduzionale tra il promotore del gene *ilvIH*, bersaglio regolativo di Lrp, ed il gene reporter *lacZ*. Il ceppo ricombinate così ottenuto, nominato AC13, veniva utilizzato per misurare l'attività dell'enzima β -galattosidasi, codificato dal gene reporter *lacZ*, mediante saggi di attività enzimatica in liquido. Come controllo positivo dell'esperimento utilizzavo il ceppo di *E. coli* CV975 (Platko *et al.*, 1990), recante anch'esso sul cromosoma la fusione genica *ilvIH::lacZ* e contenente la copia selvatica del gene *lrp*. Decidevo di effettuare l'esperimento sia in assenza che in presenza di leucina esogena, per verificare se anche la funzione della proteina Lrp di *C. rodentium*, come noto in letteratura per *E. coli*, fosse regolata da tale effettore. I

risultati da me ottenuti mettono in evidenza che il gene *lrp* di *C. rodentium* è in grado di complementare l'assenza di espressione di *lrp* in *E. coli* CV1008 ripristinando pienamente l'espressione della fusione genica *ilvIH-lacZ*. Inoltre, analogamente a quanto accade per la proteina Lrp di *E. coli* (Ernsting *et al.*, 1992), la leucina esogena è in grado di contrastare la funzione di Lrp di *C. rodentium*, riportando a valori basali l'attività β -galattosidasi nel ceppo complementato (Fig. 9B).

2.1.3 Il promotore del gene *lrp* di *C. rodentium*

Al fine di caratterizzare il promotore del gene *lrp* decidevo di effettuare esperimenti di RT-PCR. Il cDNA veniva sintetizzato mediante reazione di retrotrascrizione utilizzando come stampo gli RNA totali estratti dal ceppo selvatico di *C. rodentium* e come primer l'oligonucleotide A (Fig. 10A). Il cDNA così ottenuto veniva amplificato mediante diverse reazioni di PCR utilizzando le coppie di oligonucleotidi indicati in figura 10A. Ottenevo prodotti di amplificazione della grandezza attesa utilizzando le coppie di oligonucleotidi E-A, F-A e G-A ma non con le coppie B-A, C-A e D-A (Fig 10B). Questo risultato mi permetteva di concludere che un frammento di DNA di almeno 250 paia di basi a monte del codone d'inizio della traduzione sono trascritte e che il punto d'inizio della trascrizione è compreso tra gli oligonucleotidi D ed E (Fig. 10A).

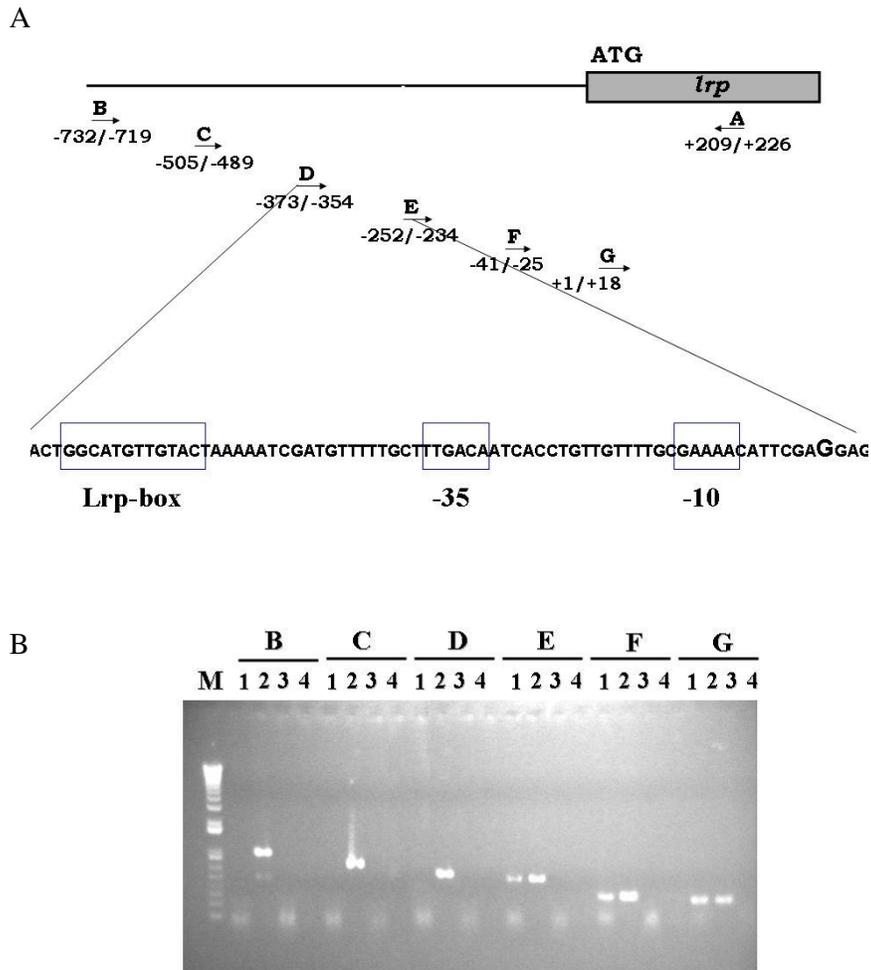


Fig. 10 (A) Rappresentazione schematica del gene *lrp* di *C. rodentium*. In figura sono indicate le putative regioni regolative come un sito di legame per Lrp e le sequenze -10 e -35 del promotore. Le frecce indicano la posizione degli oligonucleotidi. (B) Eperimenti di RT-PCR. Per ogni coppia di oligonucleotidi, le reazioni sono state condotte utilizzando come stampo: il cDNA (pozzetto 1); il DNA cromosomale (pozzetto 2); RNA non retrotrascritto (pozzetto 3) e H₂O (pozzetto 4). M indica il marker

Inoltre un'analisi comparativa di tale regione genica con quella riportata in banca dati per *E. coli* K 12 mi permetteva di evidenziare un putativo sito di legame per Lrp, e le putative box -10 e -35 (Fig. 10A).

2.1.4 Lrp regola negativamente l'espressione del suo gene strutturale

Per studiare l'espressione del gene *lrp* decidevo di costruire un ceppo di *C. rodentium* nullo per tale gene mediante il λ -Red System (Datsenko and Wanner., 2004). A tal fine trasformavo cellule competenti del ceppo selvatico di *C. rodentium* con il plasmide pKD46 (Materiali e Metodi).

Il ceppo così ottenuto, nominato EM1, veniva trasformato per elettroporazione con un frammento di DNA di 1091 coppie di basi contenente la cassetta genica per il cloramfenicolo e 40 paia di basi di omologia con le regioni adiacenti al gene *lrp*. Il ceppo EM1, contenente il frammento di PCR, veniva cresciuto in presenza di arabinosio, al fine di indurre l'espressione delle ricombinasi del fago λ . In seguito ad un doppio evento di ricombinazione, mediato dalle ricombinasi del fago λ , si otteneva la sostituzione del gene *lrp* con la cassetta per il cloramfenicolo. La verifica dell'avvenuta sostituzione genica veniva effettuata mediante PCR utilizzando gli oligonucleotidi sintetici c1 ed O (Tab.4) ed esperimenti di *Southern blot* ed un clone positivo, nominato EM2, veniva selezionato per le analisi successive.

Per analizzare l'espressione del gene *lrp* decidevo di costruire la fusione traduzionale *lrp::gusA*. Un frammento di DNA di 734 paia di basi contenente il promotore del gene *lrp* e sei codoni della regione N-terminale del gene veniva amplificato mediante PCR utilizzando il DNA cromosomale di *C. rodentium* come stampo, e gli oligonucleotidi E ed N come primers (Tab.4).

Il frammento amplificato veniva inserito, nel corretto quadro di lettura, a monte del gene reporter *gusA*, portato dal plasmide pGusA, ottenendo il plasmide ricombinante pAC47. Il plasmide così ottenuto veniva utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo selvatico di *C. rodentium* e del ceppo EM2, ottenendo rispettivamente i ceppi AC49 e AC52.

Su entrambi i ceppi veniva effettuato un saggio di attività in liquido per misurare l'espressione Lrp-dipendente dell'enzima β -glucuronidasi. Il saggio veniva condotto in presenza ed in assenza di leucina esogena per verificare l'effetto di questo amminoacido sull'espressione genica.

Il risultato di questo esperimento, mostrato in fig.11, indica che l'espressione dell'enzima β -glucuronidasi è più alta ($P < 0.05$) nel ceppo mutato nel gene *lrp* (AC52) rispetto al ceppo selvatico (AC49), suggerendo che Lrp regola l'espressione del suo gene strutturale in maniera negativa. Inoltre, in seguito all'aggiunta di leucina esogena non si osserva alcuna variazione significativa dei livelli di espressione genica, indicando che questa regolazione è leucina-indipendente (Fig.11).

Per verificare se il effetto regolativo di Lrp sul suo gene strutturale fosse modesto perchè limitato da una titolazione provocata dalla presenza di siti di legame per Lrp sul plasmide multicopie pAC47, decidevo di clonare in questo plasmide l'intera copia del gene *lrp* utilizzata nell'esperimento di complementazione (Materiali e Metodi). A tal fine l'intera copia del gene *lrp* veniva escissa dal plasmide pAC12 e clonata nel plasmide pAC47, dando origine al plasmide ricombinante pAC61. L'introduzione di questo plasmide nel ceppo selvatico di *C. rodentium* mi permetteva di ottenere un nuovo ceppo, nominato AC62, che mostrava un'attività β -glucuronidasica tre volte più bassa ($P < 0.05$) di quella osservata con il ceppo AC49 recante il plasmide pAC47 (Fig. 11).

Il risultato di questo esperimento, mostrato in fig.11, oltre a confermare il ruolo negativo di Lrp sull'espressione del suo gene strutturale, indicava che la presenza del plasmide pAC47 in cellule del ceppo selvatico di *C. rodentium* provoca un effetto di titolazione per la presenza di almeno un sito di legame per Lrp.

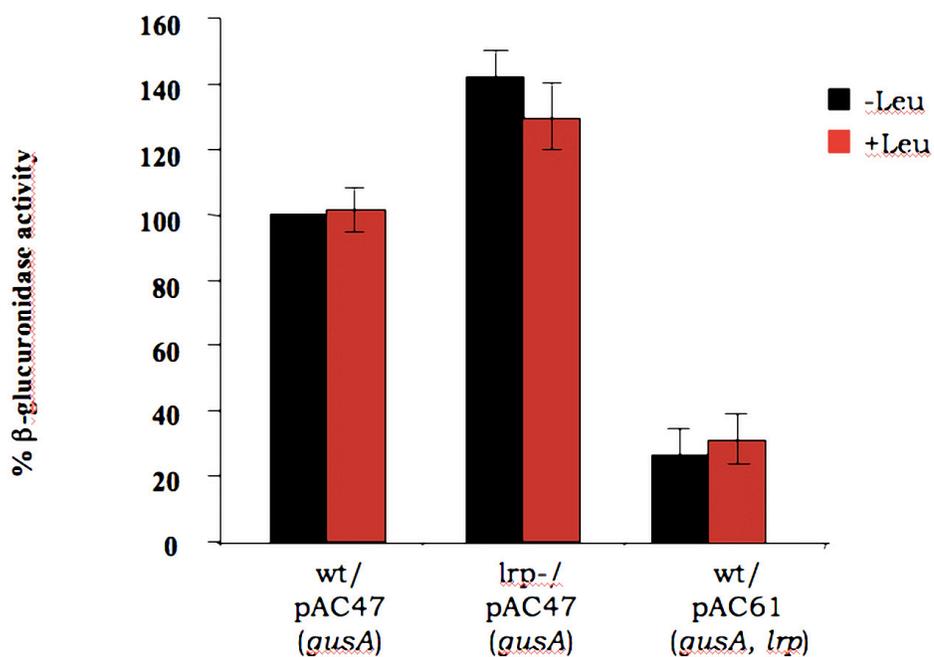


Fig. 11. Saggio di attività b-glucuronidasica condotto sui ceppi di *C. rodentium* AC49 (ATCC51459 - wild type – recante il plasmide pAC47), AC52 (EM2 – *lrp*⁻ - recante il plasmide pAC47), AC62 (ATCC51459 - selvatico – recante il plasmide pAC61), indicati rispettivamente come wt/pAC47(*gusA*), *lrp*⁻/pAC47(*gusA*) e wt/pAC61(*gusA*, *lrp*). Le cellule sono cresciute in terreno minimo (barre nere) ed in terreno supplementato con 100 µg/ml di leucina (barre rosse). Il valore di attività β-glucuronidasica ottenuto per il ceppo AC49, cresciuto in assenza di leucina, è considerato il 100% di attività. I dati riportati sono il risultato di almeno tre esperimenti indipendenti.

2.1.5 Identificazione e caratterizzazione della regione *fim* sul cromosoma di *C. rodentium*

L'analisi delle sequenze presenti in banca dati mi permetteva di verificare che sul cromosoma di *C. rodentium* è presente una regione genica altamente omologa alla regione cromosomica di *Escherichia coli* K12 contenente l'operone *fimAICDFGH* e i geni adiacenti *fimB* e *fimE*. Tale ricerca mi permetteva di individuare sul cromosoma di *C. rodentium* identificare anche la presenza di una regione di DNA di 314 paia di basi contenente il promotore dell'operone *fimAICDFGH*, denominata *fimS*, compresa tra l'operone *fimAICDFGH* e il gene *fimE*. L'elevata omologia di sequenza con la regione *fimS* di *E. coli* ci permetteva di assumere che anche in *C. rodentium* tale regione è coinvolta nel meccanismo di variazione di fase che regola l'espressione del pilus di tipo I. Esperimenti preliminari di RT-PCR, riassunti in Tab. 1, condotti utilizzando come stampo gli RNA totali estratti dal ceppo selvatico di *C. rodentium* e come primer le coppie di oligonucleotidi indicati in fig.12, mi permettevano di verificare che i geni *fimB*, *fimE* e l'operone *fimAICDFGH* di *C. rodentium* sono trascrizionalmente attivi e che tali geni sono organizzati in tre unità trascrizionali distinte di 606 (*fimB*), 597 (*fimE*) e 6596 (*fimAICDFGH*) coppie di basi rispettivamente.

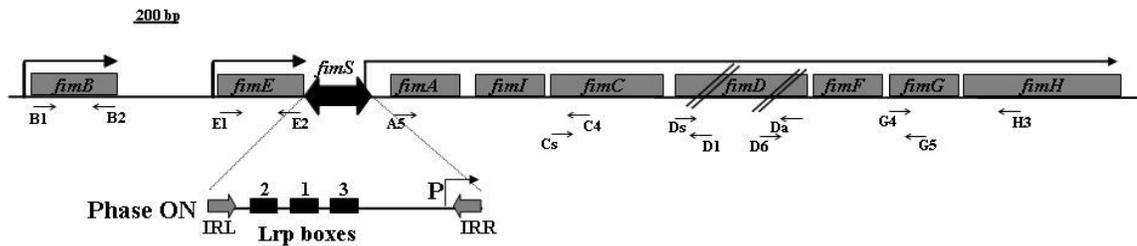


Fig. 12. Rappresentazione schematica della regione *fim* presente sul cromosoma di *C. rodentium*. Le frecce indicano la posizione degli oligonucleotidi sintetici. È inoltre riportato l'elemento *fimS* in orientazione ON in cui sono indicati i tre siti di legame per Lrp e due sequenze ripetute ed invertite (IRL and IRR). I tre siti di legame per Lrp sono indicati nell'ordine 2-1-3 per omologia con il modello di *E. coli* (Roesch and Blomfield, 1998).

Oligonucleotidi	Prodotti di amplificazione specifici
B1-B2	+
E1-E2	+
B1-E2	-
E1-C4	-
A5-C4	+
Cs-D1	+
Ds-Da	+
D6-G5	+
G4-H3	+

Tab. 1. Esperimenti di RT-PCR

Il cDNA sintetizzato dagli RNA totali estratti dal ceppo selvatico di *C. rodentium* è stato amplificato con le coppie di oligonucleotidi indicati.

2.1.6 L'espressione dell'operone *fimAICDFGH* dipende dalle condizioni di crescita

Per analizzare l'espressione dell'operone *fimAICDFGH*, codificante per componenti strutturali del pilus di tipo I, decidevo di effettuare un'analisi mediante Real-Time PCR utilizzando il cDNA ottenuto dagli RNA totali estratti dal ceppo selvatico di *C. rodentium* in diverse fasi (esponenziale, stazionaria precoce e stazionaria tardiva) e condizioni di crescita (terreno ricco crescita statica, terreno ricco crescita in agitazione, terreno minimo). In accordo con i dati riportati in letteratura per altri enterobatteri (Swang *et al*, 1992), questa analisi mediante Real-Time PCR mostrava che, crescendo le cellule sia in terreno ricco che in terreno minimo, l'espressione dell'operone *fimAICDFGH* aumentava con l'ingresso delle cellule in fase stazionaria di crescita ($P < 0.05$). Inoltre, crescendo le cellule in terreno ricco, i livelli di espressione di quest'operone erano più alti in condizioni di crescita statica ($P < 0.05$). In questa condizione di crescita, infine, l'espressione dell'operone si riduceva con l'ingresso delle cellule in fase stazionaria per aumentare nuovamente in fase stazionaria tardiva ($P < 0.05$) (Fig.13).

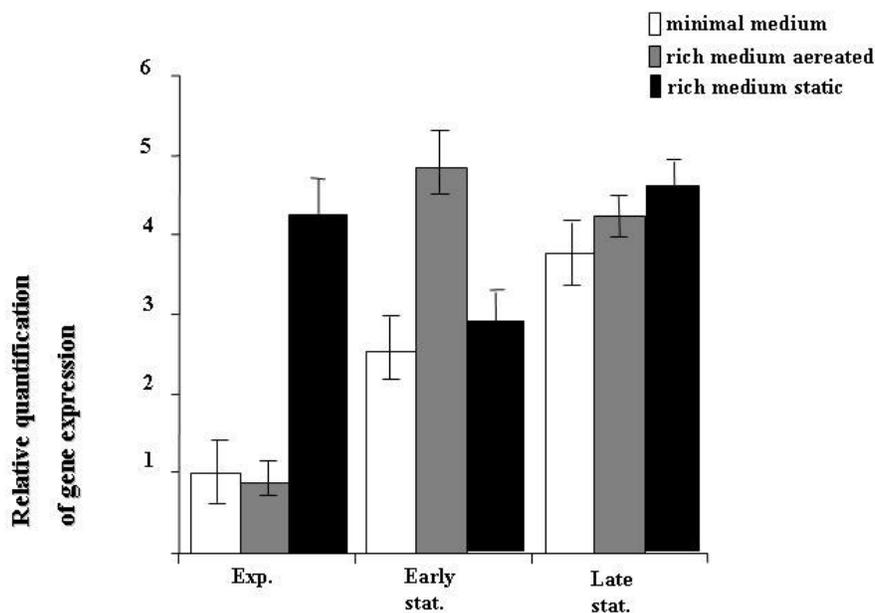


Fig. 13. Analisi mediante Real-Time PCR per monitorare l'espressione dell'operone *fimAICDFGH* in diverse condizioni di crescita. Cellule del ceppo selvatico di *C. rodentium* venivano cresciute in terreno minimo (barre bianche), terreno ricco in agitazione (barre grigie) e terreno ricco in condizioni statiche (barre nere), e raccolte in fase esponenziale, all'ingresso della fase stazionaria (fase stazionaria precoce) e tre ore dopo l'inizio della fase stazionaria di crescita (fase stazionaria tardiva). L'RNA totale veniva estratto ed il cDNA veniva sintetizzato utilizzando l'enzima trascrittasi inversa e oligo esamerici random (Invitrogen). Il cDNA sintetizzato, veniva amplificato in reazioni contenenti oligonucleotidi specifici per la regione codificante del gene *fimA* e l'agente intercalante SYBR Green. Il segnale di fluorescenza, dovuto al SYBR Green, veniva monitorato per quantizzare i prodotti di amplificazione specifici in ogni ciclo di PCR mediante il sistema ABI PRISM 7500 (PE Applied Biosystems). Il metodo del $\Delta\Delta C_t$ veniva utilizzato per calcolare la quantità relativa di RNA specifici per ogni campione e i livelli di espressione relativi a *fimA* per ogni campione venivano normalizzati rispetto ai livelli di espressione di tale gene nel ceppo selvatico cresciuto in terreno minimo in fase esponenziale di crescita.

2.1.7 Lrp regola positivamente l'espressione dell'operone *fimAICDFGH*.

Per analizzare l'effetto di Lrp sull'espressione dei geni *fimB*, *fimE* e *fimAICDFGH* decidevo di effettuare analisi mediante Real-Time PCR. Il cDNA veniva sintetizzato dall'RNA totale (Materiali e Metodi) estratto da cellule del ceppo selvatico e da cellule del ceppo EM2 (*lrp*-) di *C. rodentium* cresciute in terreno minimo e raccolte in fase stazionaria precoce. Il cDNA ottenuto veniva amplificato utilizzando oligonucleotidi specifici per i geni *fimB*, *fimE* e *fimA* (Tab. 4). I risultati di questi esperimenti, riportati in tabella 2, mostrano che il livello di espressione dell'operone *fimAICDFGH* è significativamente più alto ($P < 0.05$) nel ceppo selvatico rispetto al ceppo EM2 (*lrp*), mentre i livelli di espressione dei geni *fimB* e *fimE* sono sostanzialmente simili ($P < 0.05$) in entrambi i ceppi. Inoltre, in seguito all'aggiunta di leucina esogena al terreno di crescita del ceppo selvatico, si osserva un aumento significativo nei livelli di espressione dell'operone *fimAICDFGH* e del gene *fimE*. Questi risultati suggeriscono che Lrp svolge un ruolo di regolatore positivo sull'espressione dell'operone *fimAICDFGH* e che il suo ligando, la leucina, potenzia questo effetto positivo.

L'effetto positivo del complesso Lrp-leucina sull'espressione del gene *fimE* ma non sul gene *fimB* può essere spiegata come un aumento della stabilità dell'mRNA di *fimE*, dovuto ad un effetto della leucina sul

meccanismo di variazione di fase, come precedentemente riportato per *E. coli* (Sohanpal *et al.*, 2001).

Per confermare i risultati ottenuti mediante Real-Time PCR e verificare il ruolo di Lrp sulla formazione del pilus di tipo I, decidevo di effettuare un saggio di agglutinazione (Materiali e Metodi). Come indicato in fig.14, utilizzando cellule del ceppo EM2, rispetto a cellule del ceppo selvatico di *C. rodentium*, si osservava una ridotta capacità dei batteri di agglutinare cellule di *Saccaromyces cerevisiae*. Questo risultato è in accordo con i dati trascrizionali riassunti in Tab. 2 e conferma che Lrp ha un ruolo positivo sulla formazione del pilus di tipo I in *C. rodentium*.

	Selvatico	EM2
<i>fimAICDFGH</i>	min	1.00 ± 0.17
	min + leu	2.20 ± 0.20
<i>fimB</i>	min	1.00 ± 0.20
	min + leu	1.20 ± 0.10
<i>fimE</i>	min	1.00 ± 0.15
	min + leu	1.60 ± 0.22

Table 2. Analisi mediante Real-Time PCR dell'espressione dei geni *fimB*, *fimE* e *fimA* nel ceppo selvatico e nel ceppo EM2 di *C. rodentium*^{a,b,c}

^a Le cellule sono cresciute in terreno minimo e raccolte in fase stazionaria di crescita; ^b I dati sono presentati come una media aritmetica ± deviazione standard; ^c Per ciascuna unità trascrizionale i dati sono normalizzati rispetto ai livelli trascrizionali del ceppo selvatico; ^dN.D.: Non Determinata.

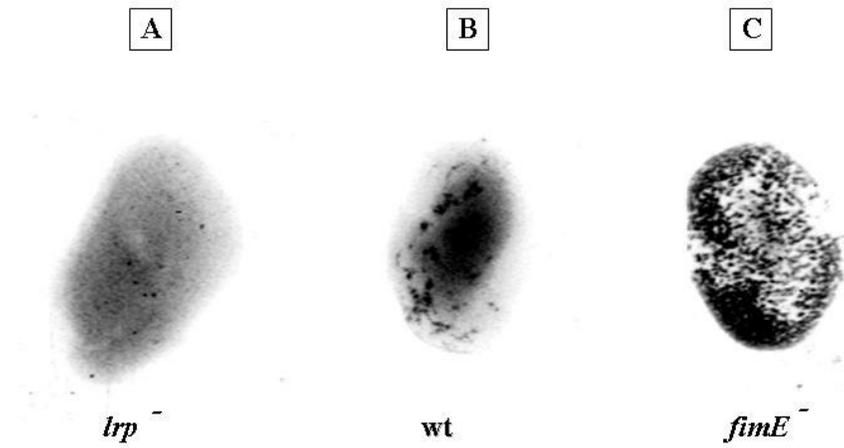


Fig. 14. Saggio di agglutinazione. 10 μ l di cellule di lievito, *Saccharomyces cerevisiae* al 3%(V/W), sono miscelati con 10 μ l di culture batteriche (OD₅₉₅ =3) dei ceppi di *Citrobacter rodentium* EM2 (A), wt (B), EM3 (C)

2.1.8 Lrp controlla l'inversione del promotore fimS

In *E. coli* Lrp controlla il meccanismo di variazione di fase di fimS legandosi a tre siti di legame presenti nel promotore fimS (Roesch *and* Blomfield, 1998). È possibile che anche in *C. rodentium* il ruolo di Lrp sull'espressione dell'operone *fimAICDFGH* sia dovuto ad un controllo sull'inversione del promotore fimS. Per verificare questa ipotesi decidevo di comparare, mediante Real-Time PCR, l'espressione dell'operone *fimAICDFGH* e l'orientazione del promotore fimS. Gli esperimenti di Real-Time PCR sono stati condotti su cDNA sintetizzati dall'RNA totale e sul DNA cromosomale estratti da cellule del ceppo selvatico e del ceppo EM2 (*lrp*). Per monitorare l'espressione dell'operone *fimAICDFGH* venivano utilizzati gli oligonucleotidi FimA ct1-FimA ct2, specifici per la regione codificante del gene *fimA*, invece, per monitorare il numero di molecole con il promotore in fase ON venivano utilizzati gli oligonucleotidi ONs e ONa (Tab.4) specifici per fimS. Come riportato in Tab. 3, il numero di molecole con il promotore in fase ON era 37 volte più alto ($P < 0.05$) in cellule del ceppo selvatico rispetto alle cellule del ceppo EM2 (*lrp*), suggerendo che Lrp controlla la variazione di fase favorendo l'orientazione ON. L'azione svolta da Lrp sul meccanismo di variazione di fase è, molto probabilmente, dovuta alla sua capacità di curvare il DNA (Wang *et al.*, 1994), provocando un cambiamento

conformazionale nel promotore *fimS* che porta ad una interazione tra le due estremità del promotore (Roesch *and* Blomfield, 1998).

Nelle stesse condizioni, il numero di molecole di mRNA dell'operone *fimAICDFGH* risultava essere solo 16 volte più alto ($P < 0.05$) nel ceppo selvatico rispetto al mutante *lrp* (Tab.3). La differenza tra il numero di promotori potenzialmente attivi (*fimS* in fase ON) e il numero di molecole di RNA messaggero sintetizzate, in presenza di Lrp, suggeriva che l'espressione dell'operone *fimAICDFGH* non è costitutiva ma probabilmente regolata negativamente.

Per confermare questa ipotesi ho deciso di verificare se la cellula fosse in grado di trascrivere l'operone *fimAICDFGH* oltre i livelli mostrati in questo esperimento. A tal fine ho costruito un ceppo di *C. rodentium* mutato nel gene *fimE* (Materiali e Metodi), nominato EM3. Su tale ceppo veniva effettuato un saggio di agglutinazione ed il risultato di tale saggio (Fig.14) mostra che cellule del ceppo EM3 hanno un'attività di agglutinazione molto più forte di cellule del ceppo selvatico, come conseguenza di un aumento del numero di pili di tipo I sulla superficie del batterio. Tale risultato conferma che anche in *C. rodentium*, come già riportato in letteratura per *E. coli*, la ricombinasi FimE catalizza specificamente l'inversione di fase da ON ad OFF.

	<i>fimS</i> -ON	<i>fimAICDFGH</i>
ATCC51459 (wild type)	1.00 ± 0.25	1.0 ± 0.17
EM2 (<i>lrp</i>)	0.027 ± 0,016	0.06 ± 0,014
EM3 (<i>fimE</i>)	86.3 ± 14.3	50.3 ± 6.6

Tab. 3 Esperimenti di Real-Time PCR per analizzare il numero di molecole con il promotore in fase ON e I livelli di espressione dell'operone *fimAICDFGH*^{a,b}
^a le cellule sono cresciute in terreno minimo e raccolte in fase stazionaria di crescita; ^b I risultati sono presentati come media aritmetica ± deviazione standard

Un'analisi mediante Real-time PCR è stata condotta sul ceppo EM3 per misurare i livelli di espressione dell'operone *fimAICDFGH* ed il numero di molecole con il promotore *fimS* in fase ON. I risultati ottenuti, mostrati in Tab. 3, indicano che il numero di molecole di *fimS* in fase ON è 86 volte più alto ($P < 0,05$) nel ceppo EM3 rispetto al ceppo selvatico, mentre il livello di espressione dell'operone *fimAICDFGH* è soltanto 50 volte più alto ($P < 0,05$). Il risultato di questo esperimento, in accordo con il risultato ottenuto precedentemente con il ceppo mutato in *lrp* (Tab.2), ci permette di concludere che sebbene la cellula sia in grado di trascrivere l'operone *fimAICDFGH* oltre i livelli osservati nel ceppo selvatico (EM3 vs wild type), tale aumento è però limitato da qualche altro fattore, suggerendo quindi che l'espressione di tale operone non è costitutiva ma è sottoposta a regolazione negativa.

2.2 Discussione

Negli enterobatteri la proteina Lrp appartiene ad una famiglia di regolatori trascrizionali responsabili della regolazione di geni coinvolti nel trasporto e nella sintesi degli amminoacidi e di vari tipi di appendici cellulari. In questo lavoro abbiamo dimostrato che il patogeno murino *C. rodentium* presenta un omologo strutturale e funzionale della proteina Lrp, in grado di complementare la funzione svolta dalla proteina Lrp di *E. coli*. La costruzione di un mutante di *C. rodentium* nullo per *lrp*, ci ha permesso di dimostrare che Lrp regola negativamente l'espressione del suo gene strutturale e di analizzare il suo ruolo sulla formazione del pilus di tipo I in tale batterio.

Il pilus di tipo I, codificato dal cluster genico *fim*, è considerato il principale fattore di virulenza dei batteri uropatogeni e permette l'adesione del batterio a recettori mannosilati presenti sulla superficie delle cellule uroepiteliali (Schwan *et al.*, 1992). Le proprietà adesive del pilus di tipo I sono dovute alla proteina FimH, una proteina d'adesione situata all'apice del pilus e codificata dall'ultimo gene dell'operone *fimAICDFGH*. Il pilus di tipo I è stato recentemente identificato come fattore di virulenza del patogeno invasivo *Citrobacter freundii* (Hess *et al.*, 2004). Sebbene *C. freundii* e *C. rodentium* appartengano allo stesso genere, tali batteri presentano una bassa omologia di sequenza ed una differente organizzazione cromosomale nel sistema dei geni *fim*. I geni

fim di *C. freundii*, infatti, sono simili a quelli presenti in *Salmonella enterica* spp. Typhimurium, mentre quelli di *C. rodentium* presentano elevate omologie con i geni *fim* di *E. coli*.

Un saggio di agglutinazione ci indicava che cellule del ceppo isogenico di *C. rodentium* mutato nel gene *lrp* non sono in grado di agglutinare cellule di lievito, suggerendo un effetto positivo di Lrp sulla formazione del pilus. Esperimenti di Real-Time PCR, inoltre ci permettevano di verificare che in presenza della proteina Lrp, l'espressione dell'operone *fimAICDFGH*, ma non dei geni *fimB* e *fimE*, aumenta significativamente e che la presenza del suo ligando, la leucina, potenzia l'effetto di Lrp. Tali esperimenti ci suggerivano che l'effetto di Lrp sulla formazione del pilus è esercitato attraverso il controllo dell'espressione dell'operone *fimAICDFGH*. Per chiarire se la modulazione operata da Lrp sull'espressione dell'operone *fimAICDFGH* fosse di tipo trascrizionale o se Lrp agisse favorendo inversione del promotore FimS verso la fase ON abbiamo condotto ulteriori analisi mediante Real-Time PCR. I risultati di tali analisi indicano che l'aumento di molecole con il promotore FimS orientato in fase ON non corrisponde ad un identico aumento del numero di molecole di mRNA specifico per l'operone *fimAICDFGH*. Questo risultato ci ha permesso di concludere che non tutte le molecole con il promotore in fase ON sono trascritte e di

ipotizzare che il promotore dell'operone *fimAICDFGH* è regolato negativamente.

Questo risultato era confermato da un'analisi mediante Real-Time PCR condotta su un ceppo di *C. rodentium* mutato nel gene *fimE* e quindi incapace di esprimere la ricombinasi specifica responsabile dello *switch* da ON ad OFF. In questo mutante, il numero di molecole di FimS in fase ON è circa 86 volte più alto rispetto al ceppo selvatico, mentre il numero di molecole di mRNA specifiche per l'operone *fimAICDFGH* è solo 50 volte più volte. Tale risultato, insieme a quelli precedentemente descritti, ci ha permesso di concludere che l'espressione dell'operone *fimAICDFGH* oltre ad essere controllata da Lrp attraverso la variazione di fase, è regolata negativamente a livello trascrizionale.

2.3 Materiali e Metodi

2.3.1 Ceppi batterici e condizioni di crescita

Citrobacter rodentium ATCC51459 è il ceppo parentale di tutti i ceppi ricombinanti descritti in questo lavoro. *Escherichia coli* DH5 λ (*supE44* Δ *lacU169* [ϕ 80 Δ *lacZM15*] *hsdR17 recA1*) (Sambrook *et al.*, 1998) è stato utilizzato per tutti gli esperimenti di clonaggio, mentre i ceppi di *E. coli* CV975 (*ilvIH::lacZ*) e CV1008 (*ilvIH::lacZ lrp-35::Tn10*) (Platko *et al.*, 1990) sono stati utilizzati per gli esperimenti di complementazione. I batteri venivano cresciuti a 37°C in terreno ricco (LB) ed in terreno minimo supplementato con tiamina (5 μ g/ml), glucosio (0.4%) e, laddove indicato, con leucina (100 μ g/ml). Gli antibiotici utilizzati sono: ampicillina 100 μ g/ml e cloramfenicolo 35 μ g/ml. Per i saggi di attività β -galattosidasica e β -glucuronidasica, le colture batteriche in fase stazionaria di crescita venivano diluite 100 volte nell'appropriato terreno di coltura fino ad OD₆₀₀ nm= 0.1, e cresciute a 37°C in agitazione fino alla fase esponenziale (OD₆₀₀ nm=0.8), raccolte mediante centrifugazione e conservate a -80°C fino all'utilizzo.

2.3.2 Manipolazioni genetiche

La preparazione del DNA plasmidico e cromosomale, reazioni di ligasi, digestioni enzimatiche, elettroforesi su gel d'agarosio e la

trasformazione dei batteri venivano effettuati come precedentemente descritto (Sambrook *et al.*, 1989). Il sequenziamento del DNA veniva effettuato utilizzando il T7 Sequencing kit (Usb corporation) con [α -³⁵S]-thio-dATP (>1,000 Ci mmol⁻¹; MP Biomedicals). Gli esperimenti di Southern blot venivano condotti in accordo con i protocolli standard, utilizzando il Kit Ready-ToGo DNA Labelling Beads (-dCTP) (Amersham) con [γ -³²P]- dCTP (MP Biomedicals).

Il plasmide pAC12 veniva ottenuto clonando un frammento 1228 paia di basi nel plasmide commerciale pGemT-easy (Promega). Tale frammento era il risultato di un'amplificazione mediante PCR effettuata utilizzando il DNA cromosomale di *C. rodentium* come stampo e gli oligonucleotidi sintetici A e C (Tab. 4) come primer specifici. Il plasmide ricombinante così ottenuto era utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo AC1008. I cloni, ampicillina resistenti, venivano testati su terreno agarizzato contenente 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) ed un clone positivo, nominato AC13, veniva selezionato per le analisi successive.

Nome	Sequenza (5' - 3') ^a	posizione ^b
<i>lr</i>		
A	GGGCCGGTCAGGTC	-732/-719
B	CGACACACGGACCTACG	+427/+443
C	TTAGCGCGTCTTAATAACC	+477/+495
D	AGCTGGGATCCGAGG	+773/+787
E	ACCAGAAAGTGACGCATCC	+210/+227
F	GTAGGGAATTTACCGGC	-505/-489
G	GGTGAGAAAATGACGATTTG	-373/-354
H	GTGTTATCTGTGTGTCGC	-252/-234
I	GTCAGGCAGGAATAGGG	-41/-25
L	ATGGTAGATAGCAAGAAGCG	+1/+20
N	<u>GCATGCCTTCTTGCTATCTACCAT</u>	+1/+18
O	TGGATTGTAGGGAATTTACCGGC	-512/-489
P	CCGTTGCCGTCACGGC	-148/-133
Q	GTGAGTAAACGTCGTTATCTTACC	+1/+24
X	GAAAATGACGATTTGACGCTGTTGGCAATGAATAACTGGgtgtaggctggagctgcttc	+368/-329
Y	TTGCTCTGTTGACTTCTTCCATAACGACGTAGGTCCGeatatgaatatcctcctta	+432/+469
Z	CCGGTAAAGAAGTACAGGCTATGATGCTGGCCGCCCGCATGGCgtgtaggctggagctgcttc	+23/+66
W	CGAATATTACGGTGGCCGAGATAATCCTGGATAAGCCCGTcatatgaatatcctcctta	+457/+497
c1	TTATACGCAAGGCGACAAGG (4)	
<i>fim</i>		
FimA-rt1	CGCTGACGCCACCTTCA	+516/+532
FimA-rt2	GCCCTGAGTCACTCCCTGTCT	+556/+576
FimB-rt1	CGGGCTACCGCTGGAGAT	+396/+413
FimB-rt2	GTTTGCCAAGCGAAACCA	+441/+459
FimE-rt1	CGCCGCTGAAAAATGG	+187/+203
FimE-rt2	AACCGCTTCCCGCTCATC	+232/+249
ONs	AATAAAGAGGAAATATAAATCTGAACAAGTCA	-419/-400
ONa	AACCCCTCACAGGAAGCCAT	-480/-449
Sig70s	TCCAGCGTAGAGTCCGAAATC	+259/+279
Sig70a	TGCCCATTTGCGGCATAT	+308/+325
A5	GCTGACGCCACCTTCAAAGT	+517/+536
Cs	CAGGAAATGACGGTG	-12/+3
C4	GGTGATTGCCCGTGTITTTTT	+25/+45
Ds	GCCGCCGGGAACCTATCGCG	+219/+238
D1	CATTGAGGTAGATATCCACGCG	+245/+267
D6	GGTGCAGCTCAGCGTCACCC	+1583/+1602
Da	GGCTGCCGCTCAGATAGA	+1626/+1634
G5	TTGTCCTGAAGTTCGAGTGG	-1/+21
G4	GATGAAATGGTTCAATCCGG	+318/+338
H3	CGACGTTCACTTGGCGTGTA	+151/+170

Table 4. Oligonucleotidi sintetici

^a La parte sottolineata degli oligonucleotidi indica un sito di riconoscimento per enzimi di restrizione. ^b la posizione degli oligonucleotidi è indicata considerando la prima base del codone di traduzione della sequenza di *lrp* o *fim* come +1

La fusione traduzionale *lrp::gusA* veniva costruita nel modo seguente: un frammento di DNA di 734 paia di basi contenente il promotore del gene *lrp* e 18 paia di basi a valle dell'ATG del gene, veniva amplificato mediante PCR utilizzando il DNA cromosomale di *C. rodentium* come stampo e gli oligonucleotidi E ed N come primers (Tab.4).

Il frammento amplificato veniva inizialmente clonato nel plasmide commerciale pGemT-easy. Il plasmide ricombinante ottenuto veniva sottoposto a digestione enzimatica con l'enzima di restrizione *SphI* e, in seguito a tale digestione, il frammento veniva escisso e trasferito nel plasmide pGusA, precedentemente digerito con lo stesso enzima. Il plasmide pGusA è un plasmide derivante da pGemT-easy recante la regione codificante per il gene reporter *gusA*. Il frammento veniva inserito, nel corretto quadro di lettura, a monte del gene reporter *gusA* ottenendo il plasmide ricombinante pAC47. Il plasmide così ottenuto veniva utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo selvatico di *C. rodentium* e del ceppo mutano nel gene *lrp* (vedi paragrafo successivo), ottenendo rispettivamente i ceppi AC49 e AC52.

l'intera copia del gene *lrp* veniva escissa dal plasmide pAC12 mediante digestione enzimatica con l'enzima *NotI* e clonata nel plasmide pAC47, precedentemente linearizzato con l'enzima di restrizione *SallI*. Le estremità non coesive del frammento venivano riempite mediante reazione di 'fill in' utilizzando la DNA polimerasi di Klenow. Il

plasmide ricombinante così ottenuto veniva nominato pAC61, e utilizzato per trasformare cellule del ceppo selvatico di *C. rodentium*, dando origine al ceppo AC62.

2.3.3 Costruzione dei mutanti *lrp* e *fimE* di *C. rodentium*

Mutanti nulli di *C. rodentium* per i geni *lrp* e *fimE* sono stati ottenuti utilizzando il metodo descritto da Datsenko e Warner ((Datsenko *and* Wanner, 2000). In breve, la cassetta genica che conferisce resistenza all'antibiotico cloramfenicolo (*cat*) veniva amplificata mediante PCR utilizzando gli oligonucleotidi X e Y per *lrp* e W e Z per *fimE* (Tab.4). Questi oligonucleotidi erano disegnati in modo da presentare all'estremità 3', 18 (per X e Y) e 17 (per W e Z) paia di basi di omologia con la cassetta genica per il cloramfenicolo, seguite da e 40 paia di basi complementari alle regioni adiacenti ai geni *lrp* e *fimE* (-368/-329 per X, +432/+469 per Y, +23/+66 per Z e +457/+497 per W, considerando come +1 il primo nucleotide tradotto). I prodotti di amplificazione, rispettivamente di 1091 (*lrp*) e 1099 (*fimE*) coppie di basi, venivano utilizzati per trasformare mediante elettroporazione cellule competenti del ceppo di *C. rodentium* EM1, ottenuto trasformando il ceppo selvatico ATCC51459 con il plasmide a basso numero di copie pKD46. Tale plasmide presenta la cassetta genica l'ampicillina e i geni codificanti per le ricombinasi del fago λ sotto un promotore inducibile dall'arabinosio. Il

ceppo EM1, contenente il frammento di PCR, veniva cresciuto ad una temperatura di 30°C fino ad una fase esponenziale di crescita (OD_{600nm} 0.6), in LB in presenza di 100µg/ml di ampicillina e di 1 mM di arabinosio, al fine di indurre l'espressione delle ricombinasi del fago λ . I ceppi cloramfenicolo-resistenti venivano in seguito cresciuti a 37°C in LB in assenza di Ampicillina per allontanare il plasmide pKD46. La verifica della presenza della cassetta genica *cat* all'interno dei geni *lrp* o *fimE* veniva effettuata mediante PCR utilizzando gli oligonucleotidi sintetici c1 ed O (*lrp*) o Q (*fimE*) e mediante esperimenti di *Southern blot*. Un clone positivo per ogni trasformazione, nominati rispettivamente EM2(*lrp*) e EM3 (*fimE*) veniva selezionato per analisi successive.

2.3.4 Saggio in liquido per misurare l'attività β -galattosidasica e β -glucuronidasica

Il saggio in liquido per misurare l'attività β -galattosidasica veniva condotto come riportato in letteratura (Platko *et al.*, 1990). Per ogni ceppo da analizzare l'attività relativa veniva espressa in unità Miller come nanomoli di *o*-nitrophenyl galactoside idrolizzate al minuto, calcolate secondo la formula $A_{420}/V_e \times T$. V_e è il volume di cellule permeabilizzate espresso in ml e T è il tempo di reazione in minuti.

Il saggio in liquido per misurare l'attività β -glucuronidasi veniva condotto come riportato in letteratura (Wilson *et al.*, 1992). Per ogni campione da analizzare veniva costruito un grafico riportando sull'asse delle ordinate il valore di assorbanza A_{405} e sull'asse delle ascisse il tempo di reazione espresso in minuti; una volta ottenuto il grafico, veniva calcolata la pendenza (S) e l'attività relativa, espressa come nanomoli di *p*-nitrophenyl glucuronide idrolizzate al minuto, veniva calcolata secondo la formula $S/V_e \times 0.02$. V_e è il volume di cellule permeabilizzate espresso in ml e 0.02 rappresenta il valore di A_{405} dato da 1 nmol di prodotto ottenuto. I valori riportati in questo lavoro sono la media di tre esperimenti indipendenti e sono statisticamente significativi ($P < 0.05$)

2.3.5 Estrazione degli RNA totali ed RT-PCR

Gli RNA totali venivano estratti utilizzando il Qiagen Mini Kit (Qiagen, Milano, Italia) seguendo le istruzioni del kit. Gli RNA totali venivano eluiti in 50 μ l di H₂O RNasi-free contenente RNasina (inibitore delle RNasi) (1U/ μ g RNA totale; Amersham Pharmacia Biotech) e conservati a -80°C prima di essere utilizzati per le analisi di retrotrascrizione. La concentrazione e la qualità degli RNA veniva verificata allo spettrofotometro e mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

Gli RNA venivano trattati con l'enzima DNasi RNasi-free (1U/ μ g of total RNA; Turbo DNA-free Ambion) per 30 minuti a 37°C e la reazione veniva fermata dall'aggiunta di un reagente capace di bloccare la DNasi. 4 μ g di RNA totali venivano incubati con 2 mM di oligonucleotide E per 10 minuti a 70°C, in un volume finale di 15.5 μ l. In seguito veniva aggiunta la seguente miscela di reazione: 1X tampone di reazione, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM di ogni deossinucleoside trifosfato (dNTP), 1u/ μ l Rnasina (1U/ μ g RNA totale; Amersham Pharmacia Biotech), 1 μ l trascrittasi inversa (Promega). La reazione veniva incubata per 5 minuti a temperatura ambiente e successivamente per 60 minuti a 42°C. La reazione di retrotrascrizione veniva bloccata incubando la reazione per 10 minuti a 70°C. Il cDNA così ottenuto veniva amplificato mediante PCR con le coppie di oligonucleotidi indicati in Fig. 1A e 3 A. per ogni coppia di oligonucleotidi utilizzata, venivano effettuati un controllo positivo (DNA cromosomale come stampo) e due controlli negativi (RNA non retrotrascritto e H₂O come stampo). Le reazioni di PCR sono state condotte nelle seguenti condizioni: 5 min a 94 °C, seguiti da 30 cicli di 95 °C per 30 s, 52 °C per 40 s, e 72 °C per 1 min. Al termine dei 30 cicli seguivano 5 minuti a 72°C per la terminazione delle catene. I prodotti delle reazioni venivano visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

2.3.6 Real-Time PCR

Esperimenti di Real-Time PCR venivano effettuati utilizzando come stampo il DNA cromosomale o il cDNA sintetizzato dall'RNA totale estratto da cellule di *C. rodentium* cresciute in differenti condizioni e fasi di crescita utilizzando la trascrittasi inversa SuperScript III (Invitrogen) e oligonucleotidi random esamerici. I campioni di cDNA venivano diluiti 200 volte. Tutti gli oligonucleotidi, inclusi quelli utilizzati per amplificare il gene 'houseskipling' rpoD (Tab.4), sono stati disegnati con il software ABI PRISM Primer Express (PE Applied Biosystems). Gli esperimenti di Real-Time PCR sono stati condotti utilizzando il kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG(Invitrogen), contenente l'agente intercalante SYBR Green. Il cDNA o il DNA cromosomale venivano aggiunti, insieme ad ogni coppia di primer specifici, alla miscela di reazione contenute nel kit. Il segnale di fluorescenza ,dovuto al SYBR Green, veniva monitorato per quantizzare i prodotti di amplificazione specifici in ogni ciclo di PCR mediante il sistema ABI PRISM 7500 (PE Applied Biosystems). Il metodo del $\Delta\Delta C_t$ veniva utilizzato per calcolare la quantità relativa di RNA specifici per ogni campione e i livelli relativi di espressione genica per ogni campione venivano normalizzati rispetto ai livelli di espressione genica osservata nel ceppo selvatico cresciuto in terreno minimo in fase esponenziale di crescita.

I dati riportati sono una media di almeno tre esperimenti indipendenti e sono statisticamente significativi ($P < 0.05$).

L'efficienza dei primer è stata verificata come suggerito dal libretto di istruzioni (PE Applied System).

2.3.7 Saggio di agglutinazione

La capacità dei batteri di esprimere strutture λ -D-mannosilate veniva saggiata sulla base della loro capacità di agglutinare cellule del lievito *Saccharomyces cerevisiae* su supporti di vetro, come riportato in letteratura. 10 μ l di una coltura liquida di batteri ad una $OD_{595} = 3$ e 10 μ l di cellule di lievito al 3% (w/v), risospesi in Buffer Fosfato, venivano gentilmente miscelati tra loro e tale sospensione veniva lasciata a temperatura ambiente per due minuti.

Capitolo 3

**“Lrp negatively regulates the expression of LEE
genes in *Citrobacter rodentium*”**

I risultati descritti in questo capitolo sono oggetto di un manoscritto in fase di preparazione. Parte degli esperimenti sono stati da me effettuati nel laboratorio del Prof. J. Hinton (Institute of Food Research, Norwich, UK) durante una mia permanenza lì di tre mesi.

In questo lavoro ho inizialmente utilizzato la metodologia dei *DNA microarrays* (esperimenti svolti in UK) per analizzare il regulone Lrp. Come precedentemente osservato in altri enterobatteri, anche in *C. rodentium* Lrp controlla circa il 10% dei geni, tra i quali quelli i cui prodotti sono coinvolti nel metabolismo primario, biosintesi, trasporto e catabolismo degli amminoacidi. Il risultato più interessante venuto fuori dalla mia analisi di *DNA microarrays* è stato l'effetto regolativo di Lrp sui geni portati dall'isola di patogenicità LEE. Tale effetto non era mai stato riportato in precedenza e rende lo studio di Lrp e del suo meccanismo d'azione particolarmente interessante.

Rientrata in Italia decidevo di confermare i risultati ottenuti per *DNA microarrays* mediante esperimenti di Real-Time PCR. Tali esperimenti mi confermavano un effetto regolativo di Lrp sugli operoni LEE.

Poiché tali operoni sono noti per essere regolati da un intricato network di fattori trascrizionali, decidevo di verificare se l'effetto da me osservato fosse diretto (cioè mediato da un'interazione di Lrp con le regioni promotrici dei vari operoni) oppure indiretto. A tale scopo purificavo la proteina Lrp di *C. rodentium*, fusa a sei residui di istidina (6xHis tag),

mediante *over*-espressione in *E. coli*, Quindi utilizzavo la proteina purificata in esperimenti di legame al DNA, utilizzando frammenti di DNA contenenti i promotori dei vari operoni LEE. Tali esperimenti evidenziavano un effetto diretto di Lrp solo sul promotore LEE1.

Poichè il primo gene dell'operone LEE è un fattore trascrizionale, Ler, che controlla l'espressione degli altri operoni LEE, ipotizzavo che Lrp controlla direttamente LEE1 ed indirettamente tramite Ler, gli altri operoni LEE.

Infine effettuavo degli esperimenti *in vivo*, per vedere se la mancata espressione di Lrp o la sua *over*-produzione avessero effetto sulla virulenza dell'organismo. I risultati di tali esperimenti indicavano che mentre la mancanza di Lrp non causava una aumentata virulenza del batterio la sua *over*-produzione causava, invece una forte riduzione della virulenza.

3.1 Risultati

3.1.1 Il Regulone Lrp di *C. rodentium*

Un'analisi di microarray condotta in *E. coli* (Tani *et. al.*, 2002) aveva precedentemente evidenziato un ruolo importante di Lrp che regolando circa il 10% dei geni era indicato come un *regolatore globale* del metabolismo. Decidevo quindi di verificare il ruolo svolto da tale proteina anche in *C. rodentium* mediante *DNA microarray*.

Poichè non sono disponibili 'array' specifici per *C. rodentium*, per i miei esperimenti ho utilizzato array contenenti il genoma di microrganismi diversi (*E. coli*, EPEC) a cui venivano aggiunte 23 *open reading frame* specifiche per *C. rodentium* (Materiali e Metodi). Per verificare che tali arrays erano rappresentativi del genoma di *C. rodentium* effettuavo un'esperimento preliminare di ibridizzazione tra il cromosoma di *C. rodentium* e gli array eterologhi. Il risultato di tale esperimento mi permetteva di concludere che il 96 % dei geni presenti sugli array era in grado di ibridizzare al genoma di *C. rodentium* e che quindi tali arrays erano utilizzabili per analizzare il regulone Lrp di *C. rodentium*.

Cellule del ceppo selvatico e cellule del ceppo EM2 (*lrp* null) di *C. rodentium* venivano cresciute in terreno minimo fino ad una fase stazionaria di crescita in presenza ed in assenza di leucina esogena, quindi gli RNA totali venivano estratti, retrotrascritti e marcati mediante l'incorporazione di un nucleotide coniugato con una molecola

fluorescente che emette nel verde. I campioni di cDNA così marcati, venivano separatamente uniti al DNA cromosomale di *C. rodentium* marcato precedentemente con un nucleotide legato al fluorocromo Cy3 che emette nel rosso (Materiali e Metodi). La miscela contenente DNA cromosomale e cDNA marcati con due fluorocromi differenti veniva ibridizzata tutta la notte agli 'array' ed il giorno dopo i segnali di fluorescenza emessi dai due fluorocromi, Cy3- e Cy5-, venivano quantizzati utilizzando il sistema GenePiX. I risultati di tale analisi (Tab 5). mostrano che, analogamente a quanto accade in *E. coli*, la proteina Lrp di *C. rodentium* è principalmente coinvolta nella regolazione del metabolismo amminoacidico. In particolare i geni coinvolti nella degradazione, nella biosintesi e nel trasporto degli amminoacidi e di piccole molecole risultavano essere sotto il controllo di Lrp anche in tale batterio e anche la modulazione da parte della leucina risultava essere simile a quella osservata in *E. coli* (Tani *et al.*,2002).

L'analisi dei risultati ottenuti metteva in evidenza che in *C. rodentium* oltre a geni coinvolti nel metabolismo primario erano regolati da Lrp anche i geni portati dall'isola di patogenicità LEE. In particolare i geni presenti nel locus LEE presentavano livelli di espressione significativamente più alti (>2) in assenza della proteina Lrp e la regolazione di tali geni risultava essere leucina-indipende. Questo

Funzione dei geni	Attivati da Lrp	Effetto leucina	Repressi da Lrp	Effetto leucina
--------------------------	------------------------	----------------------------	------------------------	----------------------------

Biosintesi amminoacidi	<i>ilvIH</i>	Antagonizza	<i>metABCDE</i>	Antagonizza
	<i>leuLABD</i>	Antagonizza	<i>lys</i>	Nessun effetto
	<i>gltBDF</i>	Antagonizza	<i>ilvGEMDA</i>	Potenzia
Biosintesi cofattori			<i>thi</i>	Nessun effetto
			<i>pdxAB</i>	Nessun effetto
Degradazione amminoacidi			<i>tdh</i>	Antagonizza
			<i>xyLAB</i>	Nessun effetto
Stress osmotico			<i>mdoABCDEG</i>	Nessun effetto
Trasporto	<i>nikAB,</i>	Nessun effetto	<i>livJ</i>	Potenzia
	<i>manXYZ</i>	Nessun effetto	<i>livKHMGF</i>	Potenzia
			<i>oppABCDF</i>	Nessun effetto

Tab.5 Schema riassuntivo dei geni metabolici di *C. rodentium*. La regolazione di questi geni da parte di Lrp e dell'effettore leucina è simile a quella osservata in *Escherichia coli*. Sono considerati solo quei geni la cui espressione è almeno 2 volte maggiore (geni attivati) o almeno 2 volte minore (geni Repressi). in presenza di Lrp I risultati sono la media di 3 esperimenti per ogni ceppo.

risultato mi suggeriva che Lrp agisce da regolatore negativo sull'espressione di tali fattori di virulenza.

3.1.2 Lrp regola l'espressione dei geni presenti nel locus LEE

Per confermare i risultati ottenuti mediante *DNA Microarray*, decidevo di effettuare un esperimento di Real-Time PCR che mi permettesse di misurare i livelli di espressione dei geni presenti nei cinque operoni del Locus LEE di *C. rodentium* in presenza ed in assenza della proteina Lrp. A tal fine gli RNA totali estratti da cellule del ceppo selvatico e del ceppo EM2 (*lrp*), venivano estratti e retrotrascritti come descritto in Materiali e Metodi. Il cDNA veniva amplificato utilizzando coppie di oligonucleotidi, specifiche per un gene presente in ognuno dei cinque operoni. In particolare utilizzavo coppie di oligonucleotidi che mi permettevano di amplificare i seguenti geni: *escR*, per l'operone LEE1; *sepZ*, per l'operone LEE2; *escV*, per l'operone LEE3; *sepL*, per l'operone LEE4 e *tir* per l'operone LEE5 (Tab. 7).

Il risultato di tale esperimento (Fig. 15) mostra che l'espressione degli operoni LEE1, LEE2, LEE3 ed LEE4 è significativamente più alta nel ceppo EM2 rispetto al ceppo selvatico di *C. rodentium*, confermando il risultato ottenuto mediante esperimenti di *Microarray* e indicando che Lrp è un regolatore negativo dell'espressione di tali geni. Nessuna differenza significativa si osservava nei livelli di espressione

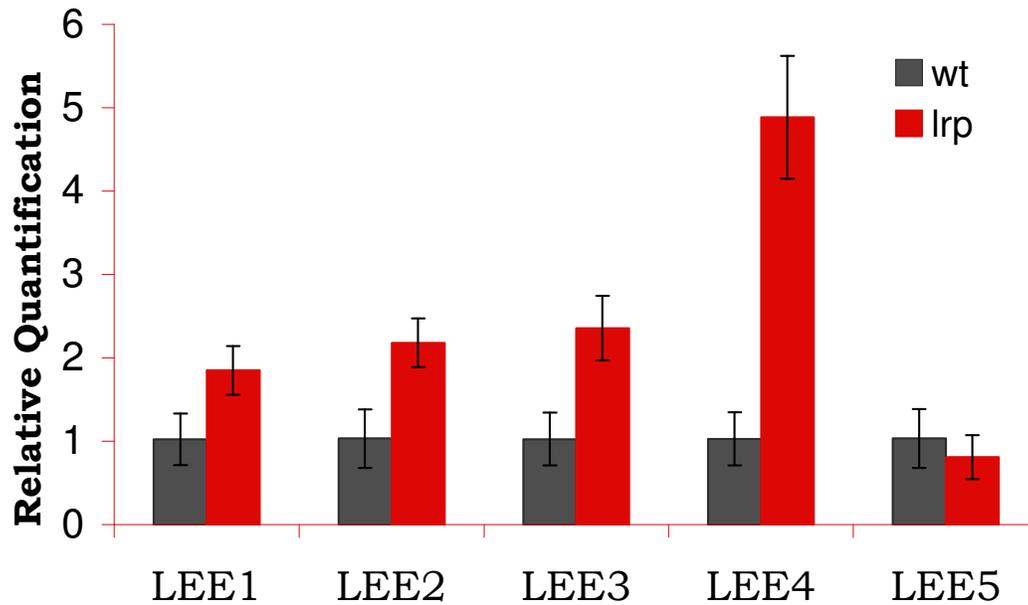


Fig. 15 Esperimenti di Real-Time PCR. I livelli di espressione dei cinque operoni del locus LEE di *C. rodentium* sono stati analizzati in presenza (ceppo selvatico, barre grigie) ed in assenza (ceppo mutato in *lrp*, barre rosse) della proteina Lrp. L'asterisco indica un aumento significativo ($p < 0.05$) nei livelli di espressione nel ceppo mutato in *lrp*

dell'operone LEE5, probabilmente perché altri fattori sono coinvolti nella sua regolazione.

3.1.3 Lrp regola direttamente l'espressione dell'operone LEE1

Al fine di verificare se l'effetto inibitorio di Lrp sull'espressione dei geni presenti nel locus LEE fosse diretto, decidevo effettuare un'analisi mediante saggi EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay). Tale analisi veniva condotta utilizzando la proteina Lrp, contenente una coda di sei istidine all'estremità amminotermine, da me purificata (Materiali e Metodi) e 400 paia di basi a monte dell'ATG della prima *orf* (*open reading frame*) di ciascuno dei cinque operoni del locus LEE. Come controllo positivo per queste analisi decidevo di effettuare un saggio EMSA tra la proteina 6His-Lrp ed il promotore del gene *lrp* portato da plasmide pAC45 (Materiali e Metodi), perché come noto in letteratura (Cordone *et al.*, 2005), il gene *lrp* è regolato dal suo stesso prodotto. Il risultato di questo esperimento preliminare, riportato in fig. 16 A, mostra che la proteina Lrp fusa a 6 residui di istidina all'estremità N-Terminale è funzionante ed in grado di legare in maniera specifica il promotore del suo gene strutturale. Sulla base di tale risultato decidevo di verificare l'esistenza di un'interazione tra la suddetta proteina ed i promotori dei cinque operoni del locus LEE di *C. rodentium*. A tal fine i plasmidi pAC101, pAC102, pAC103, pAC104 e pAC105 venivano digeriti con

l'enzima di restrizione *NotI* e, i frammenti escissi, venivano marcati con $\alpha^{32}\text{P}$ -dGTP (Materiali e Metodi).

L'interazione tra la proteina Lrp ed i singoli frammenti di DNA radioattivi veniva valutata mediante saggio EMSA e la specificità di un eventuale legame veniva verificata effettuando l'esperimento in assenza ed in presenza di frammento non marcato (competitore specifico) 1000 volte più concentrato della sonda utilizzata. I risultati di questa analisi, mostrati in fig. 16 B e 16 C, evidenziano l'esistenza di un legame specifico tra Lrp ed il promotore dell'operone LEE1, mentre nessun legame si osserva tra la proteina ed il promotore degli operoni LEE2, LEE3, LEE4, LEE5. Allo scopo di delineare meglio la regione di DNA responsabile dell'interazione con la proteina, decidevo di effettuare ulteriori analisi EMSA utilizzando la proteina Lrp e due delezioni del frammento di 400 coppie di basi del promotore dell'operone LEE1.

Mediante amplificazioni per PCR effettuate utilizzando come stampo il DNA cromosomale di *C. rodentium* e come primers le coppie di oligonucleotidi pLEE1A Fw-pLEE1 Rv e pLEE1B Fw-pLEE1B Rv, (Tab. 7), ottenevo due frammenti di DNA, nominati LEE1 A, e LEE1 B, rispettivamente di 300 e 100 coppie di basi a monte dell'ATG del primo gene dell'operone LEE1. I frammenti venivano clonati in pGemT-easy, originando rispettivamente i plasmidi pMA1 e pMA2, escissi, mediante digestione con l'enzima di restrizione *NotI*, purificati e marcati

terminalmente con $\alpha^{32}\text{Pd-GTP}$ (Materiali e Metodi). Come riportato in fig. 17 A, si evidenziava un'interazione specifica tra la proteina Lrp ed il frammento di 300 paia di basi. Nessuna interazione, invece, veniva osservata tra la proteina ed il frammento di 100 coppie di basi (fig. 17 B), suggerendo che il sito di legame tra la proteina Lrp ed il promotore dell'operone LEE1 è situato in una regione cromosomica compresa tra 300 e 100 coppie di basi a monte dell'ATG del primo gene di quest'operone. Tali risultati erano in accordo con un'analisi effettuata in banca dati mediante il software blast. Comparando, infatti, tale sequenza con la regione di legame per la proteina Lrp presente nel promotore del suo gene strutturale era possibile evidenziare la presenza di due putativi siti di legame per la proteina Lrp localizzati rispettivamente, 133 e 25 paia di basi a monte dell'ATG del primo gene dell'operone LEE1 (Fig.18). Poichè Lrp non è in grado di interagire con il frammento di 100 coppie di basi, che contiene solo un putativo sito di legame, ma è capace di interagire con il frammento di 300 coppie di basi, che li contiene entrambi, è possibile ipotizzare che il legame di Lrp al DNA sia di tipo cooperativo. Tale caratteristica del legame Lrp-DNA è stata precedentemente ipotizzata per la proteina di *E. coli* (Chen *et al.*, 2005).

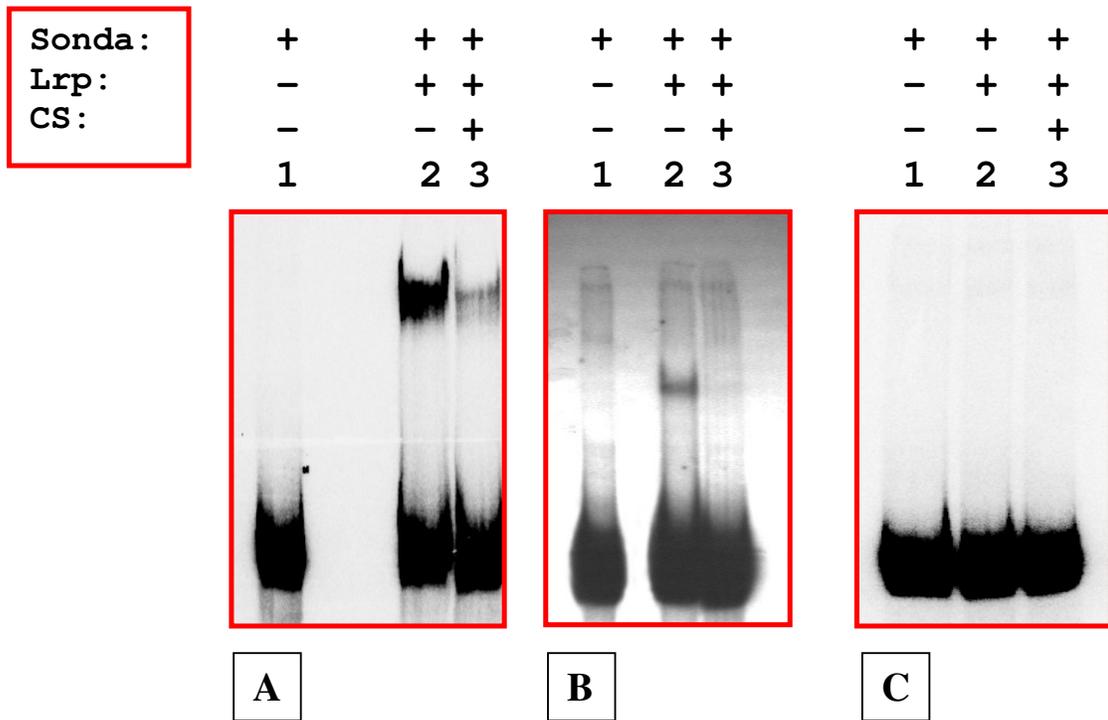


Fig. 16 Saggi EMSA effettuati con i promotori dei geni: *lrp* (A), LEE1 (B) e LEE2 (C).CS: Competitore Specifico aggiunto 1000 volte in eccesso rispetto alla sonda. Per ogni esperimento è riportato: (1) Sonda; (2) sonda + proteina; (3) sonda + proteina + competitore specifico .Il risultato relativo agli operoni LEE3, LEE4 ed LEE5 (non mostrato) è identico a quello osservato per l'operone LEE2

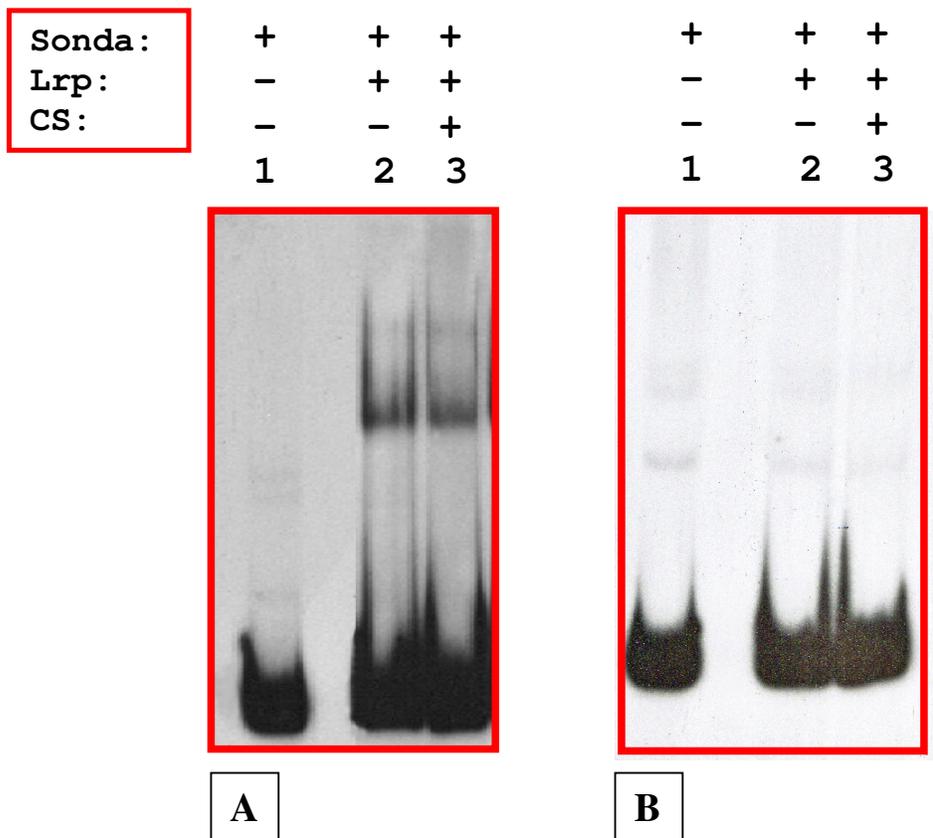
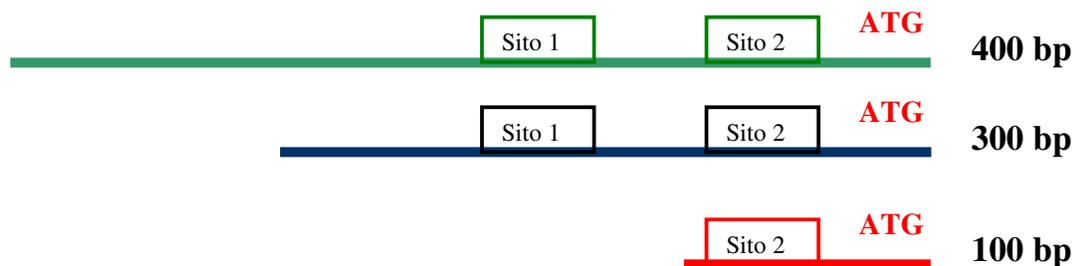


Fig. 17 Saggi EMSA effettuati con i frammenti LEE1A (A) e LEE1B (B), rispettivamente di 300 e 100 coppie di basi a monte dell'ATG della prima *orf* dell'operone LEE1. CS: Competitore Specifico aggiunto 1000 volte in eccesso rispetto alla sonda. Per ogni esperimento è riportato: (1) Sonda; (2) sonda + proteina; (3) sonda + proteina + competitore specifico.



CACTAGCTAAATCTTTATAATTTATTGATTTTTTAATGATTTTTTAATTG 300
GTATAATTTTTTTGTTGACATTTAAGGATAATATATTTTACACATTATGT 250
 ATCAGGGGTTAATAGCTTTTATAGGGGTTTTGTATGATGAAGTAGATTTT 200
TCTAATGTGATAGATAAGACGTTATCTTACATAATTTATAACATTCTATT 150
AATTGTTGACCCATCCATGTAAGGATGAGCTTGTTAATATCTTAAATATAT 100
 AAAAGT**ATG**AGGAGATTATTTATTATGAATATGGAAACTAATTGCCCCAC 50
AAAAGT**ATG**AGGAGATTATTTATTATGAATATGGAAACTAATTGCCCCAC

Fig. 17. Rappresentazione schematica dei tre frammenti di DNA, rispettivamente di 400 (verde), 300 (blu) e 100 (rosso) coppie di basi a monte dell'ATG della prima *orf* dell'operone LEE1 utilizzati per i saggi EMSA. Nel frammento di 400 coppie di basi sono riportate le due putative regioni di legame per la proteina Lrp (sito1 e sito 2). Tali sequenze sono entrambe presenti nel frammento di 300 coppie di basi ma solo una delle due (sito2) è presente nel frammento di 100 coppie di basi. In basso è riportata la sequenza nucleotidica dei frammenti di 300 (sottolineata in blu) e 100 (sottolineato in blu e rosso) coppie di basi. Le due putative box di legame sono indicate in grassetto.

3.1.4 Ruolo della proteina Lrp durante l'infezione

Per verificare se la mancata espressione di Lrp o la sua *over*-produzione avessero effetto sulla virulenza di *C. rodentium* decidevo di effettuare esperimenti *in vivo*. A tal fine gruppi di topi venivano infettati, mediante somministrazione orale, con 1×10^3 cellule di *C. rodentium* selvatico (wild type), EM2 (*lrp*) e AC108 (*lrp/pAC12*) perché è noto in letteratura che queste quantità di *C. rodentium* sono in grado di provocare la morte di topi lattanti (D'arienzo *et al.*, 2006). Dopo 28 giorni dalla somministrazione orale ne veniva valutato il tasso di mortalità (Materiali e Metodi). Come mostrato in tab. 6, infettando i topi con il ceppo selvatico (wild type) o il ceppo mutato in *lrp* di *C. rodentium* (EM2), non si osserva una variazione significativa nel tasso di mortalità dei topi, mentre utilizzando il ceppo AC108, recante il plasmide multicopie pAC12 che porta la copia intera del gene *lrp* e che quindi *over*-esprime la proteina Lrp, si osserva una drastica riduzione nel tasso di mortalità. Il risultato di questo esperimento mi permette di concludere che la proteina Lrp ha un ruolo durante l'infezione indotta da *C. rodentium* perché, quando la proteina è assente (EM2) la virulenza del batterio non aumenta, probabilmente perché sono necessari altri fattori di virulenza, mentre la sua *over*-produzione (AC108) determina una netta riduzione della virulenza del batterio. Le analisi relative alla colonizzazione degli organi interni e alla produzione delle citochine sono ancora in corso.

<i>C. rodentium</i> 1x10 ³ CFU	N° topi utilizzati	N°topi morti	Tasso di mortalità
wild type	13	9	69.2%
EM2 (<i>lrp</i>)	14	9	64%
AC108 (<i>lrp/plrp</i>)	14	2	14.2%

Tab. 6. Esperimenti *in vivo*. In tabella sono riportati i tre ceppi isogenici di *C. rodentium* utilizzati per infettare i topi (selvatico, EM2 e AC108), il numero totale dei topi utilizzati, il numero dei topi morti in seguito all'infezione ed il tasso di mortalità, indicato come rapporto percentuale tra il numero di topi morti ed il numero di topi utilizzati. I topi sono stati infettati mediante somministrazione orale.

3.2 Discussione

Citrobacter rodentium è un enterobatterio patogeno responsabile di un' infezione alla mucosa gastrointestinale dei topi simile a quella indotta da ceppi enteropatogeni ed enteroemorragici di *Escherichia coli* (EPEC ed EHEC) nell'uomo. La somiglianza con patogeni umani ha reso *C. rodentium* un adeguato sistema modello per studiare e analizzare questo tipo di infezione.

Allo scopo di approfondire le conoscenze relative alla patogenesi indotta da tale batterio, abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione sul ruolo svolto dalla proteina Lrp in questo patogeno.

Lrp è una delle proteine regolative più importanti in *E. coli* per lo svariato numero di operoni da essa controllato, tra questi vi sono anche alcuni geni che codificano per fattori di virulenza.

Per analizzare il regulone Lrp in *C. rodentium* ho effettuato esperimenti di *Microarray* su un ceppo selvatico e su un ceppo mutato nel gene *lrp* di questo batterio. I risultati ottenuti con i *Microarray* mostrano che, analogamente a quanto accade in altri enterobatteri, Lrp di *C. rodentium* è principalmente responsabile della regolazione del metabolismo e che anche la modulazione da parte della leucina esogena è simile. Un risultato nuovo e decisamente interessante è emerso analizzando l'espressione dei geni presenti nell'isola di patogenicità o locus LEE (Locus for Enterocyte Effacement). In assenza della proteina Lrp,

l'espressione dei geni presenti nei cinque operoni di tale locus, era significativamente aumentata. Per confermare i dati dei *Microarray* e verificare l'effetto di Lrp sull'espressione degli operoni LEE ho effettuato un esperimento di Real-Time PCR che mi ha permesso di misurare e comparare tra loro i livelli di espressione dei 5 operoni in presenza ed in assenza della proteina Lrp.

In accordo con i dati dei *Microarray*, i risultati della Real-Time PCR indicavano che Lrp regola negativamente l'espressione dei geni del locus LEE.

Per verificare, inoltre, se l'effetto inibitorio di Lrp sull'espressione dei geni di virulenza fosse diretto oppure mediato da altri fattori ho effettuato esperimenti di Band Shift tra la proteina Lrp purificata e il promotore dei 5 operoni del locus LEE.

Da questa analisi è emerso che Lrp si lega specificamente al promotore dell'operone LEE1. Poiché il primo gene di quest'operone codifica per Ler, il principale attivatore trascrizionale dei geni del locus LEE, tali esperimenti mi permettono di concludere che Lrp regola negativamente l'espressione dei geni di virulenza in *C. rodentium* agendo direttamente sull'operone LEE1 e indirettamente, tramite Ler, sugli altri operoni del Locus. Infine, decidevo di effettuare esperimenti *in vivo* per indagare sul ruolo di Lrp durante l'infezione indotta da *C. rodentium*. Da tale analisi è emerso che in seguito ad una *over*-produzione della proteina Lrp si

osserva una riduzione della virulenza del batterio. I risultati degli esperimenti *in vitro* ed *in vivo* condotti durante la mia Tesi di dottorato mi permettono di concludere che Lrp ha un ruolo nel modulare l'infezione indotta da *C. rodentium* perché quando tale proteina è assente si osserva un aumento di espressione degli operoni del Locus LEE, ma tale aumento trascrizionale, non corrisponde *in vivo* ad un aumento nella virulenza del batterio, probabilmente perché sono necessari altri fattori di virulenza non dipendenti da Lrp. In presenza, invece, di elevate concentrazioni di Lrp si ha una forte repressione dei vari operoni del locus e questo determina una netta riduzione della virulenza di *C. rodentium*.

3.3 Materiali e Metodi

3.3.1 Ceppi batterici e condizioni di crescita

Citrobacter rodentium ATCC51459 è il ceppo parentale di tutti i ceppi ricombinanti descritti in questo lavoro. *Escherichia coli* DH5 λ (*supE44* Δ *lacU169* [ϕ 80 Δ *lacZM15*] *hsdR17 recA1*) (Sambrook et al., 1998) è stato utilizzato per tutti gli esperimenti di clonaggio, mentre *E. coli* BL21 (DE3) (Moffatt and Studier, 1986). I batteri venivano cresciuti a 37°C in terreno ricco (LB) ed in terreno minimo (MOPS) supplementato con glucosio (0.4%) e, laddove indicato, con leucina (100 μ g/ml). Gli antibiotici utilizzati sono: ampicillina 100 μ g/ml e cloramfenicolo 35 μ g/ml. Per gli esperimenti di Microarray e Real-Time PCR le colture batteriche venivano diluite ad OD_{600nm}=0.1 nell'appropriato terreno, cresciute in agitazione a 37°C fino ad una fase stazionaria di crescita (OD_{600 nm}=2), raccolte mediante centrifugazione e conservate a -80°C fino all'estrazione degli RNA totali.

3.3.2 Manipolazioni genetiche

La preparazione del DNA plasmidico e cromosomale, reazioni di ligasi, digestioni enzimatiche, elettroforesi su gel d'agarosio e su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e la trasformazione dei batteri venivano effettuati come descritto in letteratura (Sambrook et al., 1989).

Il plasmide pAC1 veniva costruito clonando un frammento di 495 paia di basi, contenente la regione codificante del gene *lrp* di *C. rodentium* nel plasmide commerciale pGemT-easy (Promega). Tale frammento era il risultato di un'amplificazione mediante PCR effettuata utilizzando il DNA cromosomale di *C. rodentium* come stampo e gli oligonucleotidi sintetici Lrp-s e Lrp-a come primer specifici (Tab.7). Il plasmide ricombinante così ottenuto veniva sottoposto a digestione enzimatica con l'enzima di restrizione *EcoRI* ed, in seguito a tale digestione, il frammento veniva escisso e trasferito nel plasmide di espressione pRset-B (Invitrogen), precedentemente linearizzato con lo stesso enzima, a valle ed *in frame* con una sequenza di sei residui di istidina. Il plasmide ricombinante ottenuto, nominato pAC100 è stato utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo di *E. coli* BL21 (DE3), dando origine al ceppo AC101.

Il plasmide pAC12 (par. 2.3.2) veniva utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo EM2 (par. 2.3.3) di *C. rodentium* dando origine al ceppo ricombinante AC108.

Il plasmide pAC45 è stato ottenuto clonando un frammento di 530 paia di basi, contenente la regione promotrice del gene *lrp* di *C. rodentium*, nel plasmide commerciale pGemT-easy. Il frammento veniva amplificato dal DNA cromosomale di *C. rodentium* mediante PCR, utilizzando gli oligonucleotidi sintetici Lrp2 ed Lrp7 (Tab.7).

I plasmidi pAC101, pAC102, pAC103, pAC104, pAC105 sono stati ottenuti clonando nel plasmide commerciale pGemT-easy frammenti di 390, 392, 400, 390, 398 coppie di basi, rispettivamente,

Tali frammenti, contenenti le putative regioni regolative degli operoni LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 ed LEE5 del Locus LEE di *C. rodentium*, sono stati ottenuti mediante reazioni di PCR amplificando il DNA cromosomale di *C.rodentium* con gli oligonucleotidi sintetici (pLEE1Fw-pLEERv, per LEE1; pLEE2Fw-pLEE2Rv, per LEE2; pLEE3Fw-pLEE3Rv, per LEE3; pLEE4Fw-pLEE4Rv, per LEE4; pLEE5Fw-pLEE5Rv, per LEE5) (Tab.7). I plasmidi pMA1 e pMA2 sono stati ottenuti clonando rispettivamente frammenti di 300 e 100 paia di basi nel plasmide commerciale pGem-t-easy. Tali frammenti venivano amplificati mediante PCR utilizzando come stampo il DNA cromosomale di *C. rodentium* e come primers specifici le coppie di oligonucleotidi pLEE1A-fw-pLEE1Rv e pLEE1B-Fw-pLEE1Rv indicati in Tab.7

Nome	Sequenza (5' - 3') ^a
<i>lrp</i>	
Lrp-s	ATGGTAGATAGCAAGAAGCG
Lrp-a	ATTAGCGCGCGTTTAATAACC
Lrp-2	GTAGGGAATTTACCGGC
Lrp-7	<u>GCATGCCTTCTTGCTATCTACCAT</u>
Operone LEE1	
pLEE1-FW	TGAGCTCTCAGTAAATATCAATACGG
pLEE1-RV	GTGGGCGAATTAGTTTCCAT
pLEE1A-Fw	ATTAATGCCGCTTTGCCAC
pLEE1B-Fw	AATTGTTGACCCATCCATGT
LEE1-s	TTACCGGCTTTCACTATGGGA
LEE1-a	AAATCCTATCTTAAATGCGGCTTC
Operone LEE2	
pLEE2-Fw	GCAAGGGCACTGAAGAAAAGA
pLEE2-Rv	GGTTCCATTGATTTTCTCCTT
LEE2-s	GTGGTATTACCGCTGGCGAC
LEE2-a	CTCATCCACGGGACCATTTC
Operone LEE3	
pLEE3-Fw	GTGAAGAGTTGTCGATACAC
pLEE3-Rv	CGGCAGACTCTTGAAG
LEE3-s	TTGATGGTGATATGCGTGCA
LEE3-a	GAACTTTTGCCTCAAGCGGAT
Operone LEE4	
pLEE4-Fw	CCTTTCCGGTTGGTAATGG
pLEE4-Rv	AGGAATCTCACGTCAC
LEE4-s	TTCATCACTTGCGGAAACGA
LEE4-a	CCTTTGCGATATCCCAGGC
Operone LEE5	
pLEE5-Fw	GGAGGGTATTTTGGGCTTAAT
pLEE5-Rv	GCAGGCGGAATTAATTGTT
LEE5-s	AAATGCTGCAGAAGCTGCG
LEE5-a	TGGAACGCCTCCTTCGTTAA
Sig70s	TCCAGCGTAGAGTCCGAAATC
Sig70a	TGCCATTTGCGCATAT

Tab.7 Oligonucleotidi sintetici utilizzati. La parte sottolineata indica un sito di riconoscimento per enzimi di restrizione

3.3.3 Estrazione degli RNA

Colture batteriche venivano cresciute in terreno minimo, in agitazione a 37°C, fino all'ingresso delle cellule in fase stazionaria di crescita ($OD_{600nm}=2$). La crescita veniva bloccata e gli RNA stabilizzati aggiungendo alla coltura batterica 1/5 del volume finale di una soluzione costituita da Etanolo 10%-fenolo 90%. La coltura batterica veniva incubata immediatamente in ghiaccio per 30 minuti (Kelly *et al.*, 2004; Hinton *et al.*, 2004), centrifugata a 4°C per 30 minuti e conservata a -80°C fino all'utilizzo.

Gli RNA totali venivano estratti mediante il kit SV total RNA extraction (Promega) come riportato in letteratura (Kelly *et al.*, 2004).

La concentrazione e la qualità degli RNA veniva verificata allo spettrofotometro e mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

3.3.4 DNA Microarray

Gli esperimenti di DNA Microarray sono stati condotti seguendo il protocollo proposto da De Risi *et al.*, (1996). Brevemente, 16 µg di RNA totali e 5 µg di random primer esamerici venivano incubati insieme per 10 min a 70°C e retrotrascritti in presenza del nucleotide fluorescente Cy5-dCTP a 37°C per 12 ore. Il DNA genomico veniva marcato con il nucleotide fluorescente Cy3-dCTP e utilizzato come controllo interno per ogni esperimento. Il DNA genomico ed il cDNA così marcati, venivano

miscelati insieme in un rapporto di 1 a 5, denaturati e ibridizzati agli 'array' contenuti su dei supporti di vetro. Gli 'array' utilizzati per questi esperimenti contenevano 6402 geni costituiti dal genoma intero di *Escherichia coli* K12 e *Shigella flexneri* e da diversi geni di virulenza dei ceppi EPEC ed EHEC. Inoltre, a tali array venivano aggiunti 23 geni specifici di *C. rodentium* (Tab 8). L'ibridazione veniva condotta a 63 °C per tutta la notte ed il giorno dopo, i vetrini (array) venivano sottoposti a diversi lavaggi con SSC (0.15 M Cloruro di Sodio- 0.015 M Citrato di Sodio) a diverse concentrazioni. I vetrini venivano scannerizzati mediante il GenePix 4000A scanner ed i segnali di fluorescenza emessi dai due fluorocromi Cy3- e CY5 venivano quantizzati utilizzando il sistema GenePiX. Le ibridazioni sono state condotte in triplicato e i dati ottenuti da ogni esperimento sono stati comparati l'un l'altro e poi normalizzati rispetto al profilo di espressione genica del ceppo selvatico di *C. rodentium*. Sono stati considerati significativi ($P < 0.05$) soltanto i risultati relativi ai geni la cui espressione risultava essere di almeno due volte superiore o inferiore al controllo (ceppo selvatico)

<i>ShE. coli</i> microarray	Numero totale di geni: 6402
Geni specifici di <i>E. coli</i> K12	4265
Geni specifici di <i>E. coli</i> O157 EDL933	1128
Geni specifici di <i>S. flexneri</i>	555
Geni di virulenza di <i>E. coli</i> □	431
Geni specifici di <i>C. rodentium</i>	23

Tab. 8. ‘*ShEcoli* Microarray’ utilizzato per gli esperimenti di ibridizzazione.

3.3.5 Real-Time PCR

Esperimenti di Real-Time PCR venivano effettuati utilizzando come stampo il cDNA sintetizzato dall'RNA totale estratto da cellule di *C. rodentium* cresciute in differenti condizioni e fasi di crescita utilizzando la trascrittasi inversa SuperScript III (Invitrogen) e oligonucleotidi random esamerici. I campioni di cDNA venivano diluiti 200 volte. Tutti gli oligonucleotidi, inclusi quelli utilizzati per amplificare il gene 'houseskipling' rpoD (Tab.7), sono stati disegnati con il software ABI PRISM Primer Express (PE Applied Biosystems). Gli esperimenti di Real-Time PCR sono stati condotti come descritto precedentemente (Cordone *et al.*, 2005)

3.3.6 Espressione e purificazione della proteina ricombinante 6His-Lrp

Una colonia singola del ceppo ricombinante AC101 veniva inoculata in 5 ml di Terreno ricco (LB) in presenza di 100 mg/ml dell'antibiotico ampicillina per circa 12 ore. La coltura veniva diluita 100 volte in terreno fresco e lasciata a crescere a 37°C fino ad una fase esponenziale di crescita $OD_{600\text{ nm}}=0.8$. L'espressione dell'aproteina ricombinante 6His-Lrp veniva indotta aggiungendo 1 mM di Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside. I batteri venivano incubati a 37° in agitazione per altre 2 ore, raccolti mediante centrifugazione, risospesi in 10 ml di Tris-

HCl e sottoposti a lisi cellulare mediante sonicazione. L'omogenato veniva centrifugato 10 minuti a 4000 rpm ed il surnatante, contenente le proteine totali, veniva filtrato mediante membrane con pori dello spessore di 0.22 μ m (Millipore) e applicato alla colonnina His-Bind (Amersham) preequilibrata con 10 ml di tampone (20 mM Buffer fosfato, 0.5M NaCl, 10 mM Imidazolo, pH 7.5). Dopo il passaggio dell'estratto proteico, la colonna veniva lavata con 10 ml di tampone (20 mM Buffer fosfato, 0.5M NaCl, 20 mM Imidazolo, pH 7.5) e la proteina veniva eluita con 5 ml di tampone di eluizione (20 mM Buffer fosfato, 0.5 M NaCl, 500 mM Imidazole, pH 7.5) e raccolta in frazioni da 500 μ l. Le frazioni proteiche venivano analizzate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizione denaturanti (SDS-PAGE) e quelle contenenti la proteina ricombinante, venivano dializzate contro tampone fosfato contenente 30 % di glicerolo .

3.3.7 Saggio EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay)

Il legame tra la proteina purificata ed il promotore degli operoni LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 ed LEE5 veniva verificato mediante il saggio EMSA descritto da Ricca et al.(1989), con delle piccole modifiche. I plasmidi pAC101, pAC102, pAC103, pAC104 e pAC105 (vedi par.3.2) venivano digeriti con l'enzima di restrizione *NotI*. In seguito a tale digestione , i frammenti venivano escissi, purificati, quantizzati su gel d'agarosio e

marcati con α -³²PdGTP utilizzando la DNA polimerasi di Klenow. La reazione di marcatura dei frammenti veniva condotta a temperatura ambiente per 2 ore. I nucleotidi non incorporati durante tale reazione, venivano rimossi mediante purificazione con colonnina cromatografia (Qiagen).

Una miscela di reazione contenente 600ng di 6His-Lrp, 1 μ g di competitore aspecifico (DNA Salmon Sperm, Biolabs), tampone di legame 10X (1 mM EDTA, 1 mM DTT, 40 mM Magnesio acetato, 50 mM NaCl e 12.5% glicerolo, pH 7.9) veniva preincubata 10 minuti a temperatura ambiente e dopo l'aggiunta di 0.5 ng di frammento marcato veniva lasciata per altri 10 minuti a temperatura ambiente.

I complessi DNA-Proteina venivano verificati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 4% in tampone TAE 0.5 X (Tris Acetato EDTA). La corsa del gel veniva effettuata per circa 3 ore a 250 Volts e 30 mA. Alla fine della corsa il gel veniva seccato in Gel-Dryer per 1 ora a 80 °C ed esposto in presenza di una lastra autoradiografica a -80°C per 12 ore.

3.3.8 Esperimenti *in vivo*

Topi NIH Swiss di una settimana di età venivano infettati mediante somministrazione orale con 20 μ l di buffer fosfato (PBS) contenete 1×10^3 CFU (Unità Formanti Colonia) dei ceppi isogenici di *C. rodentium* (wild

type, EM2 e AC108.). I topi sono stati monitorati per 28 giorni al fine di valutarne il tasso di mortalità (% topi morti / numero totale di topi infettati). Il 28° giorno dopo l'infezione i topi sono stati sacrificati e sono state condotte analisi sulla colonizzazione degli organi interni (colon distale, fegato e linfonodi mesenterici) e sulla produzione di citochine.

Capitolo 4

Bibliografia

- Abraham, S., J. Shin, and R. Malaviya. 2001.** Type I fimbriated *Escherichia coli*-mast cells interactions in cystitis. *J. Infect. Dis.* 183: S51-S55
- Abraham, S., N. Sharon, and I. Cohen. 1999.** Adhesion of bacteria to mucosal surface. In: Ogra P. L., M.J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, J.R. McGhee, eds. *Mucosal immunology*. San Diego: Academic Press.
- Albert, M. J., S. M. Faruque, M. Ansaruzzaman, M. M. Islam, K. Haider, K. Alam, I. Kabir, and R. Robins-Browne. 1992.** Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between *enteropathogenic Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. *J. Med. Microbiol.* 37: 310-314
- Barthold, S. W., G. L. Coleman, P. N. Bhatt, G. W. Osbaldiston, and A. M. Jonad. 1976.** The etiology of transmissible murine colonic hyperplasia. *Lab. Anim. Sci.* 26: 889-894
- Barthold, S. W., G. L. Coleman, R. O. Jacoby, E. M. Livestone, and A. M. Jonad. 1978.** Transmissible murine colonic hyperplasia. *Vet. Pathos.* 15: 223-236
- Blomfield, I. C. 2001.** The regulation of pap and type I fimbriation in *Escherichia coli*. *Adv. Microb. Physiol. (Review)* 45: 1-49
- Blomfield, I. C., D. H. Kulasekara, and B. I. Einstein. 1997.** Integration host factor stimulates both FimB- and FimE-mediated site-specific DNA inversion that controls phase variation of type 1 fimbriae expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 23: 705-17.
- Blomfield, I. C., M. G. McClain, J. A. Princ, P. J, Calie, and B. I. Einstein. 1991.** Type 1 fimbriation and *fimE* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 173:5298-5307.
- Braaten, B. A., J. V. Platko, M. W. van der Woude, B. H. Simons, F. K. de Draaf, J. M. Calvo, and D. A Low. 1992.** Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the pap and fan pili operons in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 15: 4250-4254
- Bustamante, V. H., F. J. Santana, E. Calva, and J. L. Puente. 2001.** Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol. Microbiol.* 39: 664-678
- Calvo, J. M., and R. G. Matthews. 1994.** The Leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev. (Review)*. 58: 466-490
- Chen S., M. Iannolo, and J. M. Calvo. 2005.** Cooperative binding of the Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) to DNA. *J. Mol. Biol.* 345:241-264

Cordone, A., E. M. F. Mauriello, D. J. Pickard, G. Dougan, M. De Felice, and E. Ricca. 2005. The *lrp* gene and its role in type I fimbriation in *Citrobacter rodentium*. J. Bacteriol. 187: 7009-7017

Crepin, V. F., S. Presannan, R. K. Shaw, R. K. Wilson, E. Creasey, C. M. Abe, S. Knutton, G. Frankel, and S. Matthews. 2005. Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ. Mol. Microbiol. 55: 1658-1670

Cui, Y., Q. Wang, G. D. Stormo, J. M. Calvo. 1995. A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. J. Bacteriol. 177: 4872-4880

D'Arienzo, R., F. Maurano, G. Mazzarella, D. Luongo, R. Stefanile, E. Ricca, and M. Rossi. 2006. *Bacillus subtilis* spores reduce susceptibility to *Citrobacter rodentium*-mediated enteropathy in a mouse model. Res. Microbiol. 157: 891-897

Daniell, S. J., E. Kocsis, E. Morris. S. Knutton, F. P. Booy, and G. Frankel. 2003. 3D structure of EspA filament from enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 49: 301-308

Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 6640-6645.

De Felice, M., and M. Levinthal. 1977. The acetohydroxyacid syntase III isoenzyme of *Escherichia coli* K-12: regulation of synthesis by leucine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 79: 82-87

De Felice, M., M. Levinthal, M. Iaccarino, and J. Guardiola. 1979. Growth inhibition as a consequence of antagonism between related aminoacido: effect of valine in *Escherichia coli* K-12. Microbiol. Rev. 43: 42-58

De Risi, J., L. Penland, O. P. Brown, M. L. Bittner, P. S. Meltzer, M. Raay, Y. Chen, Y. A. Sy, and J. M. Trent. 1996. Use of cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. Nat. Genet. 14:367-379

Elliott, S. J., C. B. O'Connell, A. Koutsouris, C. Brinkley, M. S. Donnenberg, G. Hecht, and J. B. Kaper. 2002. A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for enteropathogenic *Escherichia coli* to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF. Infect. Immun. 70: 2271-2277

Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Giron, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel, and J. B. Kaper. 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 68: 6115-6126

- Ernsting, B. R., M. R. Atkinson, A. J. Ninfa, and R. G. Matthews. 1992.** Characterization of the regulon controlled by the leucine-responsive regulatory protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174: 1109-1118.
- Frankel, G., A. D. Phillips, M. Novakova, H. Field, D. C. A. Candy, D. B. Schauer, G. Douce, and G. Dougan. 1996.** Intimin of enteropathogenic *Escherichia coli* restores murine virulence to a *Citrobacter rodentium eaeA* mutant: induction of an immunoglobulin A response to intimin and EspB. *Infect. Immun.* 64: 5315-5325
- Frankel, G., D. C. Candy, P. Everest, and G. Dougan. 1994.** Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect. Immun.* 1835-1842
- Friedberg, D., J. V. Platko, B. Tylwer, and J. M. Calvo. 1995.** The amino acid sequence of Lrp is highly conserved in four enteric microorganism. *J. Bacteriol.* 177: 1624-1626
- Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang, and I. Rosenshine. 1999.** Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 34: 951-952
- Gally, D. L., T. J. Rucker, and I. C. Blomfield. 1994.** The Leucine-responsive regulatory protein binds to the *fim* switch to control phase variation of type 1 fimbrial expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 176:5665-72.
- Goldberg, M. D., M. Johnson, J. C. Hinton, and P. H. Williams. 2001.** Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 41: 549-559
- Gomez-Duarte, O. G., A. Ruiz-Tagle, D. C. Gomez, G. I. Viboud, K.G. Jarvis, and J. B. Kaper. 1999.** Identification of IngA, the structural gene of longus type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiology.* 145: 1809-1816
- Haney, S. A., J.V. Platko, D.L. Oxender, and J. M. Calvo. 1992.** Lrp, a leucine-responsive protein, regulates branched-chain amino acid transport genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174: 108-115
- Hess, P., A. Altenhofer, S. A. Khan, N. Daryab, K. S. Kim, J. Hacker, and T. A. Oelschlaeger. 2004.** A *Salmonella fim* homologue in *Citrobacter freundii* mediates invasion in vitro and crossing of the blood-barrier in the rat pup model. *Infect. Immun.* 72: 5298-5307.
- Holmgren, A., M.J. Kuehn, C.I. Branden, and S.J. Hultgren. 1992.** Conserved immunoglobulin-like features in a family of periplasmic pilus chaperones in bacteria. *EMBO J.* 11: 1617-1622.

- Hueck, C. J. 1998.** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animal and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (Review). 62: 379-433
- Hultgren, S. J., F. Jacob-Dubuisson, C. H. Jones, and C. I. Branden. 1993.** PapD and superfamily of periplasmic immunoglobulin-like pilus chaperones. *Adv: Protein Chem.* 44: 99-123.
- Hultgren, S. J., S. Abraham, M. Caparon, P. Falk, J. St Geme, and S. Normak. 1993.** Pilus and non pilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* 73: 887-991
- Jerse, A. E., K. G. Gicquelais, and J. B. Kaper. 1991.** Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 59: 3869-3875
- Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper. 1990.** A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7839-7843
- Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, and B. B. Finlay. 1997.** Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell.* 91: 511-520
- Kroghelt, K. A., 1992.** Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis.* 13: 721-735
- Kuehn, M.J., F. Jacob-Dubuisson, K. Dodson, L. Slonim, R. Striker, and S. J. Hultgren. 1994.** Genetic, biochemical, and structural studies of biogenesis of adhesive pili in bacteria. *Methods Enzymol.* 236: 282-306.
- La Cara, F., and M. De Felice. 1979.** Chromatographic detection of the acetohydroxy acid synthase isoenzymes of *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 14: 319-326
- Lin, R., B. Ernsting, I. N. Hirshfield, R.G. Matthews, F.C. Neidhardt, R.L. Clark, and E. B. Newman. 1992.** The *lrp* gene product regulates expression of *lysU* in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 174:2779-2784.
- Luperchio, S. A., J. V. Newman, C. A. Dangler, M. D. Schrenzel, D. J. Brenner, A. G. Steigerwalt, and D. B. Schauer. 2000.** *Citrobacter rodentium*, the causative agent of transmissible murine colonic hyperplasia, exhibits clonality: synonymy of *C. rodentium* and mouse-pathogenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4343-4350
- Mc Namara, B. P., A. Koutsouris, C. B. O'Connell, J. P. Nougayrede, M. S. Sonnenberg, and G. Hecht. 2001.** Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupt host intestinal barrier function. *J. Clin. Invest.* 107: 621-629
- Moffatt, B. A., and F. W. Studier. 1987.** T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell.* 49: 221-227

- Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998.** Diarreagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11: 142-211
- Newman, E. B., and R. Lin. 1995.** Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. Annu Rev Microbiol. 49: 747-775
- Olsen, P. B., and P. Klemm. 1994.** Localization of promoters in the *fim* gene cluster and the effect of H-NS on the transcription of *fimB* and *fimE*. FEMS Microbiol. Lett. 116: 95-100
- Platko, J. V., and J. M. Calvo. 1993.** Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. J Bacteriol. 175: 1110-1117
- Platko, J. V., D. A. Willins, and J. M. Calvo. 1990.** The *ilvIH* operon of *Escherichia coli* is positively regulated. J. Bacteriol. 172:4563-4570.
- Rex, J. H., B. D. Aronson, and R. L. Somerville . 1991.** The *tdh* and *serA* operons of *Escherichia coli*: mutational analysis of the regulatory elements of leucine-responsive genes. J Bacteriol. 173: 5944-5953
- Ricca, E., D. A. Aker, and J. M. Calvo. 1989.** A protein that binds to the regulatory region of the *Escherichia coli ilvIH* operon. J Bacteriol. 171: 1658-1664
- Roesch, P. L., and I. C. Blomfield. 1998.** Leucine alters the interaction of the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) with the *fim* switch to stimulate site-specific recombination in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 27: 751-761
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, US.
- Sandros, J., and E. Tomanem. 1993.** Attachment factors of *Bordetella pertussis*: mimicry of eukaryotic cell recognition molecules. Trends Micriobiol. 1 :192-196
- Schauer, D. B., and S. Falkow. 1993.** Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. Infect. Immun. 61: 2486-2492
- Schwan, W. R., H. S. Seifert, and J. L. Duncan. 1992.** Growth conditions mediate differential transcription of *fim* genes involved in phase variation of type I pili. J. Bacteriol. 174: 2367-2375.
- Shinm, S., M. P. Castanie-Cornet, J. W. Foster, A. J. Crawford, C. Brinkley, and J. B. Kaper. 2001.** An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. Mol. Microbiol. 1133-1150

Sohanpal, B. K., H. D. Kulasekara, A. Bonnen, and I. C. Blomfield. 2001. Orientational control of *fimE* expression in *Escherichia coli* Mol. Microbiol. 42: 483-494.

Sohel, I., J. L. Puente, S. W. Ramer, D. Bieber, C. Y. Wu, and G. K. Schoolnik. 1996. Enteopathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster for bundle-forming pilus morphogenesis. J. Bacteriol. 178: 2613-2628

Sperandio, V., C. C. Li, and J. B. Kaper. 2002. Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. Infect. Immun. 70: 3085-3093

Stern, A., and T. F. Meyer. 1987. Common mechanism controlling phase and antigenic variation in pathogenic neissariae. Mol. Microbiol. 1: 5-12

Tani, T. H., A. Khodursky, R. M. Blumenthal, P. O. Brown, and R. G. Matthews. 2002. Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99: 13471-13476.

Tedin, K., and U. Blasi. 1996. The RNA chain elongation rate of the lambda late mRNA is unaffected by high levels of ppGpp in the absence of amino acid starvation. J. Biol. Chem. 271: 17675-17686.

Tobe, T., G. K. Schoolnik, I. Sohel, V. H. Bustamante, and J. L. Puente. 1996. Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 21: 963-975

Touze T., R. D. Hayward, J. Eswaran, J. M. Leong, and V. Koronakis. 2004. Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor. Mol. Microbiol. 51: 73-87

Viswanathan V. K., S. Lukic, A. Koutsouris, R. Miao, M. M. Muza, and G. Hecht. 2004. Cytokeratin 18 interacts with the enteropathogenic *Escherichia coli* secreted protein F (EspF) and is redistributed after infection. Cell. Microbiol. 6: 987-997

Wang, Q., J. Wu, D. Friedberg, J. Plakto, and J. M. Calvo. 1994. Regulation of the *Escherichia coli lrp* gene. J Bacteriol. 176: 1831-1839

Wilson, K. J., R. A. Jefferson, and S. G. Hughes. 1992. The *Escherichia coli gus* operon: induction and expression of the *gus* operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. In S.R. Gallagher (Ed.), GUS Protocols. Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, Inc. San Diego, US. pp. 7-23.