

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



**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA APPLICATA
XXII CICLO**

**Risposta adattativa allo stress in *Streptococcus*
*thermophilus***

**Coordinatore:
Ch.mo Prof.
Ricca Ezio**

**Candidata:
dott.ssa Asterinou Kleopatra**

**Tutor:
Ch.mo Prof. Varcamonti Mario**

INDICE

1. Introduzione	pag. 5
1.1. Batteri lattici	pag. 6
1.2. <i>Streptococcus thermophilus</i>	pag. 8
1.3. Importanza biotecnologia dei batteri lattici	pag. 10
1.4. Fenomeno del <i>cold shock</i> batterico	pag. 13
1.5. Fenomeno dell'<i>heat shock</i> batterico	pag. 17
1.6. I repressori CtsR, HrcA Rr01 e la risposta allo stress	pag. 20
1.7. tmRNA	pag. 22
1.8. Scopo della tesi	pag. 28
2. Materiali e metodi	pag. 29
2.1 Ceppi batterici	pag. 30
2.2 Terreni di coltura	pag. 30
2.3. Vettori	pag. 31
2.4. Geni sottoposti a mutagenesi	pag. 32
2.5. Estrazione del DNA cromosomale	pag. 34
2.6. Reazione a catena della polimerasi (PCR)	pag. 34
2.7. Gene <i>soe</i>ing	pag. 35
2.8. Elettroforesi sul gel di agarosio	pag. 37

2.9. Reazione di ligasi	pag. 38
2.10. Preparazione di cellule di <i>Escherichia coli</i> (DH5α ed EC101) competenti con CaCl₂	pag. 38
2.11. Trasformazione di <i>E. coli</i> DH5α	pag. 39
2.12. Isolamento del DNA plasmidico da cellule di <i>E. coli</i> (metodo della lisi alcalina)	pag. 39
2.13. Clonaggio in <i>E. coli</i> EC101	pag. 40
2.14. Preparazione di cellule competenti di <i>S. thermophilus</i>	pag. 41
2.15. Trasformazione di cellule di <i>S. thermophilus</i> per elettroporazione	pag. 41
2.16. Integrazione di pGhost9 nel cromosoma di <i>S. thermophilus</i> per ricombinazione omologa	pag. 42
2.17. Controllo dell'integrazione di pGhost9 nel cromosoma di <i>S. thermophilus</i> con la colony PCR	pag. 42
2.18. Estrazione di proteine da <i>S. thermophilus</i>	pag. 44
2.19. Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS	pag. 45
2.20. Colorazione con Coomassie	pag. 46
2.21. Precipitazione degli estratti proteici	pag. 47
2.22. Estrazione dell'RNA totale da <i>S. thermophilus</i>.	pag. 47
2.23. RT-PCR semiquantitativa	pag. 48
2.24. Cromatografia per affinità	pag. 50
2.25. Co-immunoprecipitazione	pag. 50

2.26. Western blot	pag. 51
2.27. Congelamento-scongelamento	pag. 53
2.28. Condizioni di stress	pag. 54
2.29. Crescita ed acidificazione del mezzo	pag. 55
3. Risultati	pag. 56
3.1. Costruzione dei ceppi mutanti	pag. 57
3.2. Cinetica della crescita ed acidificazione del mezzo.	pag. 60
3.3. Risposta agli stress ed influenza della fase di crescita e dell'adattamento	pag. 62
3.4. Analisi dell'estratto proteico totale tramite SDS-PAGE	pag. 65
3.5. Analisi bidimensionale dell'estratto proteico totale	pag. 70
3.6. Discussione	pag. 75
3.7. Resistenza al congelamento di <i>S. thermophilus</i>	pag. 81
3.8. Effetto della mutazione <i>ssrA</i> sulla crescita	pag. 85
3.9. Risposta allo stress ed effetto della fase di crescita e del preadattamento sul mutante Tm4	pag. 86
3.10. Resistenza del mutante Tm4 al congelamento	pag. 88
3.11. Analisi semiquantitativa tramite RT-PCR dell'espressione di <i>ssrA</i>	pag. 91
3.12. Analisi del pattern proteico del mutante <i>ssrA</i>	pag. 92
3.13. Costruzione del mutante tmH6	pag. 96

3.14. Rivelazione di peptidi marcati dalla molecola tmH6	pag. 97
3.15. Discussione	pag.100
4.Riassunto e conclusioni	pag.104
5. Bibliografia	pag.112

1.Introduzione

1.1. Batteri lattici

I batteri lattici costituiscono un gruppo di eubatteri gram-positivi molto diffuso nell'ambiente dove occupano nicchie ecologiche molto diverse che vanno dalla superficie delle piante al tratto gastrointestinale di molti animali.

Si tratta di batteri sferici o a bastoncino, isolati o raggruppati in corte catene, immobili, catalasi negativi e non sporigeni; essi sono anaerobi aerotolleranti poiché sopravvivono in presenza di ridotte concentrazioni d'ossigeno, ma non possedendo citocromi o altri enzimi contenenti il gruppo eme, sono incapaci di sintetizzare ATP attraverso un metabolismo respiratorio.

La denominazione di batteri lattici deriva dalla loro capacità di produrre acido lattico quale principale, talvolta unico, risultato finale della fermentazione dei carboidrati, caratteristica che conferisce loro un'elevata acido-tolleranza. La loro crescita, infatti, è possibile anche quando il pH del mezzo raggiunge valori inferiori a 5.0. Questa peculiarità ha un gran valore selettivo poiché riduce fortemente la competizione con molti altri batteri ed organismi presenti nella stessa nicchia ecologica.

La classificazione riportata nel *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt, 1989), colloca i batteri lattici sferici nella famiglia delle *Streptococcaceae* e quelli a bastoncino nella famiglia delle *Lactobacillaceae*. Inoltre, sono distinti in mesofili e termofili a seconda che l'intervallo di temperatura ottimale di crescita è compreso tra i 25 e 37 °C oppure tra i 38 e 44 °C.

I batteri lattici sono molto esigenti dal punto di vista nutrizionale. Non vi è crescita in presenza di ammonio come unica fonte di azoto e mostrano auxotrofia per diversi aminoacidi, vitamine, basi puriniche e pirimidiniche. Tale caratteristica potrebbe essere il risultato di un adattamento a nicchie ecologiche nutrizionalmente ricche, come il latte, pertanto, questi microrganismi avrebbero perso alcune funzioni acquisendone altre (Godo et al., 1993). Esempi di tale capacità adattativa sono l'utilizzo del lattosio attraverso il sistema fosfotransferasico (De Vos e Gasson, 1989), lo sviluppo di un efficiente sistema proteolitico che permette loro di ricavare peptidi ed aminoacidi dalla degradazione della caseina (Pritchard e Coolbear, 1993) e la perdita della funzionalità dei geni per la biosintesi di alcuni aminoacidi.

Per quanto attiene al sistema proteolitico, essi possiedono un sistema di proteasi molto sofisticato, che permette loro di crescere in ambienti ricchi di proteine e poveri di aminoacidi liberi. I batteri lattici che vivono nel latte, ad esempio, soddisfano la richiesta di aminoacidi con la proteolisi delle proteine, soprattutto della caseina, che è quella più abbondante e caratterizzata da un elevato contenuto in prolina. In questo processo rivestono maggiore importanza, in quanto responsabili del primo *step* di degradazione della caseina, le proteinasi di parete cellulare che appartengono alla medesima famiglia delle *proteinasi multi-domain* (Courtin et al., 2002). L'ulteriore degradazione degli oligopeptidi prodotti, è dovuta all'intervento di una serie di endopeptidasi e di di- e tri-peptidasi.

1.2. *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus è uno dei batteri lattici maggiormente utilizzati nell'industria lattiero-casearia, esso forma catene di cellule sferiche prive di motilità (fig. 1).

E' un batterio termofilo, anaerobio aerotollerante, effettua un metabolismo di tipo omofermentativo, producendo acido lattico L (+) a seguito della fermentazione del lattosio, saccarosio, trealosio e glucosio. Esso cresce in maniera ottimale a 42°C (Salminen e Von Wright, 1993), ma può vivere a temperature comprese tra i 20 ed i 50°C (De Roissart e Luquet, 1994).

L'impiego di *S. thermophilus* in campo alimentare riguarda soprattutto la produzione dello yogurt e dei formaggi le cui fasi di lavorazione richiedono temperature anche di 50°C. Combinazioni di *S. thermophilus* con diversi ceppi di *L. Bulgaricus* sono utilizzate anche nella preparazione della mozzarella, ed uno studio ha dimostrato come la diversa specificità proteolitica dei ceppi combinati possano influire sulle proprietà della mozzarella, quali la digeribilità e la compattezza (Oommen et al., 2002).

Negli ultimi anni si stanno evidenziando le proprietà benefiche fornite all'organismo dal consumo di cibi fermentati dai batteri lattici, in qualità di adiuvanti nella stimolazione della risposta immunitaria negli animali e nell'uomo (Faure et al., 2001). Numerose evidenze sperimentali mostrano l'attività antimutagenica dei

prodotti fermentati con *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, dovuta al rilascio durante la fermentazione, di componenti specifici (Bodana e Rao, 1990). Tale attività, unita alle condizioni fisico-chimiche create da questi batteri nel colon, all'attività immunostimolante, al controllo della microflora intestinale coinvolta nella produzione di carcinogeni, ed al legame e degradazione dei medesimi, potrebbe avere un ruolo nella prevenzione del cancro del colon (Hirayama e Rafter, 1999). Inoltre, è noto da tempo, che cellule di *S. thermophilus*, inattivate al calore, mostrano attività antitumorale contro il fibrosarcoma nei ratti (Kaklij et al., 1996).

Quando coltivato in latte, *S. thermophilus*, avendo una ridotta attività proteolitica nei confronti della caseina, manifesta una scarsa capacità di proliferazione e per tale motivo, nei processi di fermentazione del latte è spesso utilizzato in simbiosi con altri batteri lattici i quali, pur richiedendo anch'essi la presenza nel mezzo d'alcuni aminoacidi e vitamine, sono tuttavia capaci di degradare più efficientemente le proteine e rendere così disponibili gli aminoacidi richiesti. Per la produzione dello yogurt, ad esempio, *S. thermophilus* viene coltivato nel latte pastorizzato, in associazione con *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*.

Lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante ha avuto grande importanza per lo studio di *S. thermophilus*. Sono state infatti messe a punto una serie di tecniche di trasformazione al fine di manipolare geneticamente questo microrganismo che non possiede una competenza naturale (Mercenier, 1990). Analisi effettuate tramite *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) hanno permesso di definire la lunghezza del

genoma di *S. thermophilus* che, come per gli altri batteri lattici, risulta piuttosto limitata (Roussel et al., 1994). Lo studio effettuato su diversi ceppi ha rivelato che la maggior parte è priva di plasmidi. Un ristretto numero ne presenta uno solo di piccole dimensioni, e solo in rari casi è stato possibile trovarne due o tre nella stessa cellula batterica. Date le piccole dimensioni, la maggior parte dei plasmidi di *S. thermophilus* rimangono criptici (Turgeon e Moineau, 2001).

Figura 1: Immagine al microscopio elettronico a scansione di *S. thermophilus*



1.3. Importanza biotecnologia dei batteri lattici

I batteri lattici sono utilizzati da circa quattromila anni nella produzione di cibi fermentati quali *yogurt*, formaggi e altri derivati del latte, nella lavorazione di prodotti

lattiero-caseari e nella conservazione degli alimenti, in quanto producono proteine ad azione antimicrobica, le batteriocine. Le proprietà dei batteri lattici si sono rivelate di grande utilità anche per la salute dell'uomo. La loro presenza nel latte, ad esempio permette la riduzione del contenuto di lattosio, difficilmente digeribile per circa il 90% della popolazione adulta mondiale (Chassy e Murphy, 1993). Con la nascita dell'industria alimentare essi hanno acquisito un'importanza sempre maggiore, fino a diventare l'elemento centrale di alcuni processi del settore. L'acidificazione prodotta nel mezzo di crescita, inibisce i batteri che contaminano i cibi, favorendo sia la conservazione delle sostanze alimentari che il rilascio di sostanze aromatiche, le quali conferiscono ai prodotti finiti proprietà nutrizionali ed aromi differenti rispetto al prodotto alimentare di partenza. Molte fermentazioni industriali vengono avviate utilizzando ceppi *starter* congelati o liofilizzati, ed è noto che entrambi questi processi rappresentano una condizione di forte *stress* per la cellula che può essere danneggiata dalla formazione di cristalli di ghiaccio e dalle variazioni di osmolarità, fenomeni che determinano l'alterazione dell'integrità della membrana e della funzionalità metabolica. Per questo motivo è fondamentale comprendere i meccanismi adattativi al freddo ed i fattori che possono influenzare la sopravvivenza al congelamento. E' inoltre noto che molte fermentazioni si bloccano quando il prodotto, come ad esempio lo *yogurt*, viene conservato a bassa temperatura (4°C). In questa condizione però, continua, anche se lentamente, la produzione di acido lattico,

determinando una progressiva acidificazione del prodotto che può diventare inadatto al consumo.

Durante i processi di produzione, i microrganismi utilizzati sono sottoposti a condizioni di stress notevoli e di diversa natura, come ad esempio, variazioni di temperatura, livelli di pH e salinità, che possono determinare condizioni fisiologiche molto lontane da quelle ottimali per la crescita. Alcuni batteri sono in grado di resistere meglio di altri a condizioni di *stress*, grazie all'evoluzione di complessi sistemi che regolano le risposte adattative. Per queste ragioni, è molto importante comprendere le modalità di adattamento dei batteri lattici agli stress in generale. Infatti, una migliore e più dettagliata compressione dei meccanismi adattativi, a livello sia molecolare che fisiologico, porterebbe a conoscenze di grande interesse e valore applicativo e potrebbe essere un punto di partenza per ottimizzare i processi fermentativi a bassa temperatura, limitare e controllare lo sviluppo di patogeni nei prodotti alimentari e quindi, migliorare le prestazioni industriali dei batteri lattici e le modalità di conservazione degli alimenti. Ad esempio, l'isolamento di ceppi batterici mutati nel meccanismo di risposta allo *stress* da freddo e la successiva caratterizzazione dei geni coinvolti, è un passaggio indispensabile per ottenere microrganismi più resistenti e che siano allo stesso tempo finemente regolabili nella loro attività fermentativa alle diverse temperature. Anche per questo l'utilizzo di ceppi selezionati con particolari caratteristiche di resistenza agli *stress*, determinerà sicuramente un aumento della qualità e della conservazione dei prodotti.

1.4. Fenomeno del *cold shock* batterico

In seguito ad un abbassamento di temperatura, le cellule batteriche devono far fronte a diversi problemi: (1) le strutture secondarie del DNA e dell'RNA si stabilizzano e ciò può influire sulla ricombinazione, sull'efficienza della traduzione dei messaggeri e della replicazione del DNA; (2) la formazione della bolla di trascrizione, formata dal complesso DNA-RNA polimerasi, necessaria per iniziare tale processo, può essere impedita, soprattutto nei batteri mesofili, bloccandone l'inizio; (3) la fluidità della membrana citoplasmatica diminuisce e ciò influenza le funzioni associate alla stessa, come il trasporto attivo e la secrezione (Cossins, 1994).

Per fronteggiare i problemi causati dallo *shock* da freddo i batteri hanno evoluto una risposta adattativa denominata *cold shock response*, grazie alla quale rispondono allo *stress* da freddo alterando la sintesi proteica e alcune strutture cellulari come la membrana citoplasmatica, nel tentativo di adattarsi alle nuove condizioni ambientali (Gounot, 1991).

A seguito dello *shock* termico, per un certo periodo di tempo, variabile da specie a specie, le cellule arrestano la crescita e tutte le funzioni ad essa associate. Questa fase è denominata acclimatazione: le cellule percepiscono l'abbassamento di temperatura ed azionano il sistema di risposta *cold shock*, costituito da una serie di proteine deputate allo svolgimento di diverse funzioni. I geni frequentemente coinvolti in questa risposta adattativa, codificano per proteine che contribuiscono al corretto

svolgimento di funzioni essenziali come la trascrizione (*nusA*), la traduzione (*infB*), la degradazione di mRNA (*pnp*) (Bae et al., 2000) e la ricombinazione (*recA*). Sono inoltre coinvolti altri geni la cui funzione a bassa temperatura non è stata ancora completamente compresa (Varcamonti et al., 2003). In aggiunta a dette proteine, vengono sintetizzate delle de-saturasi che consentono di aumentare la fluidità della membrana per effetto dell'incremento della produzione di acidi grassi insaturi (Cossins, 1994), nonché una famiglia di proteine denominate *cold shock proteins* (CSP). Si tratta di una famiglia di proteine di circa 7 KDa ad induzione transiente, che si ritiene siano coinvolte in una serie di funzioni cellulari come la trascrizione, la traduzione e la ricombinazione del DNA (Schumann, 2000). Esse potrebbero anche funzionare come RNA-*chaperon*, dato che possiedono siti di legame per acidi nucleici a singolo filamento (motivi RNP di legame all'RNA), per tali caratteristiche esse potrebbero quindi ridurre al minimo le strutture secondarie dell'mRNA, facilitando perciò il processo di traduzione (Graumann et al., 1997). CspA (7.5 KDa) è la proteina maggiormente espressa in molte specie batteriche (Goldstein et al., 1990), essa è la principale CSP di *E. coli* ed è in grado di svolgere contemporaneamente funzione di RNA-*chaperon*, di attivatore trascrizionale e regolatore del suo gene (Jiang et al., 1997).

Le CSPs svolgono un ruolo fondamentale nella risposta *cold shock* e nella ripresa della crescita a bassa temperatura, promuovendo l'inizio della traduzione nelle cellule metabolicamente inattive. Benché non osservate in tutti i batteri, le si ritrovano in un

ampio numero di Gram-positivi e Gram-negativi come *B. subtilis* (Graumann et al., 1997), *E. coli* (Yamanaka et al., 1998) e *L. lactis* (Wouters et al., 1998).

La specie batterica *E. coli* è quella meglio analizzata in rapporto alla risposta *cold shock* (Thieringer et al., 1998). Quando cellule di *E. coli* vengono trasferite da 37 °C a 10 °C, si arresta la crescita cellulare per circa 4 ore; durante questa fase di acclimatazione, avvengono numerosi cambiamenti fisiologici: aumenta la quantità di acidi grassi insaturi di membrana e la sintesi di DNA, RNA e di gran parte delle proteine viene bloccata. L'arresto della crescita sembra essere causato principalmente dall'inibizione della traduzione. Infatti, la presenza di strutture secondarie, all'estremità 5' dei messaggeri indotte dall'abbassamento di temperatura, impedisce l'attacco dei ribosomi alle sequenze Shine-Dalgarno e di fatto, l'inizio della traduzione. Anche in *B. subtilis* si conoscono diversi dettagli di tale sistema adattativi (Graumann et al., 1997) : CspB è coinvolta nella tolleranza al congelamento, come dimostrato dall' utilizzo di un ceppo delecto per il gene *cspB* che mostra una diminuita sopravvivenza al congelamento; è così stato ipotizzato che le CSPs abbiano una funzione anticongelamento che riduce il danno cellulare provocato da tale *stress* (Willimsky et al., 1992). Per comprendere la funzione svolta dalle CSPs, sono stati effettuati esperimenti di congelamento-scongelo di cellule batteriche, ad esempio si è osservato che cellule di *L. lactis* pre-incubate a 10 °C per 4 ore, prima del congelamento, aumentano il grado di sopravvivenza di un fattore 100. Poiché tale fenomeno non si osserva se le cellule sono trattate con cloramfenicolo durante il *cold*

shock, è evidente che la sintesi proteica è necessaria affinché si verifichi l'adattamento (Wouters et al., 2001). Si ritiene che le CSPs in *L. Lactis* migliorino la sopravvivenza al freddo o direttamente attraverso la stabilizzazione degli acidi nucleici, o indirettamente attraverso l'induzione di altri fattori e proteine (CIP), specifiche della risposta al freddo, agendo complessivamente come proteine con funzione di regolazione.

Solo da pochi anni si è cominciato a studiare in *S. thermophilus* il fenomeno del *cold shock*, l'adattamento a basse temperature e la crioprotezione. Considerata la sua temperatura minima di crescita, gli esperimenti di *cold shock* vengono generalmente effettuati a 20 °C. Il ceppo CNRZ 302 di *S. thermophilus* è stato analizzato per la capacità di sopravvivere al congelamento. Dopo pre-incubazione a 20 °C per 2 e 4 ore e successivo congelamento, si osservano significativi aumenti nella sopravvivenza rispetto alle colture di controllo (direttamente congelate senza pretrattamento), dopo 4 ripetuti cicli di congelamento-scongelo. Per l'adattamento al congelamento ottenuto mediante pre-esposizione a bassa temperatura, è richiesta la sintesi proteica, come già osservato in *L. lactis* (Wouters et al., 1999).

Nonostante quanto detto sulle proteine CSPs, molto resta ancora da approfondire per stabilire l'esatta funzione di esse e di altre proteine indotte dal *cold shock* nel fenomeno della crioprotezione in *S. thermophilus*.

1.5. Fenomeno dell'*heat shock* batterico

Quando le cellule vengono esposte ad una temperatura più alta di quella ottimale di crescita, viene alterata la loro fisiologia interna. L'esposizione ad alte temperature interferisce principalmente con la struttura delle proteine, le quali non mantengono la conformazione nativa, e quindi non solo non riescono più ad esplicare la propria funzione, ma possono formare degli aggregati molecolari dannosi per la cellula. Per far fronte a questo problema la cellula è in grado di effettuare una risposta denominata *heat shock*. Le cellule riconoscono le proteine non native (denaturate, assemblate in maniera scorretta, danneggiate o aggregate), le riparano, laddove possibile, o le distruggono, se irreversibilmente alterate. La risposta *heat shock* consiste nell'induzione rapida di un *set* di geni che codificano per le *heat shock proteins* (HSP). Diversi dati sperimentali hanno evidenziato che questi geni sono regolati non solo da stress da caldo, ma anche da altri tipi di stress classificabili in tre gruppi: (1) Fattori chimico-fisici: aumento di temperatura, variazione del pH o dell'osmolarità, irradiazione con luce UV; (2) Sostanze metabolicamente dannose: etanolo, antibiotici, metalli pesanti, agenti che danneggiano il DNA; (3) Processi metabolici complessi: carenza di carbonio ed aminoacidi, infezioni virali, *stress* ossidativi.

Ulteriori dati sperimentali hanno dimostrato che mutazioni nei geni codificanti per alcune HSPs influenzano diversi processi biologici come la replicazione del DNA, la

sintesi dell'RNA e la divisione cellulare ed inoltre che alcune HSPs sono presenti a bassi livelli anche durante la crescita cellulare a temperature normali. Per questo motivo si ritiene che le HSPs svolgono un ruolo nella cellula non specificamente limitato alla risposta allo stress termico. Tale ruolo consisterebbe nel monitorare lo stato fisiologico della cellula, tenendo sotto controllo la struttura secondaria e terziaria delle proteine cellulari (Hendrich e Hartl, 1993).

In base al ruolo che svolgono nella risposta heat shock le HSPs vengono divise in: (1) proteasi ATP-dipendenti quali ClpP, ClpQ, Lon, FtsH, DegP; (2) chaperon molecolari Clp/Hsp100 (ClpA, ClpB, ClpX, ClpY), DnaK e il complesso GroEL/GroES.

Le proteasi ATP-dipendenti hanno il ruolo di degradare i polipeptidi irrimediabilmente danneggiati durante il periodo di stress (Gottesman e Maurizi, 1992). Gli chaperon molecolari solubilizzano gli aggregati proteici legandoli in modo transiente, hanno il compito di prevenire un folding prematuro delle proteine e di promuovere, in vivo, il raggiungimento di uno "stato conformazionale corretto" (Hendrich e Hartl, 1993). Ad esempio, DnaK e GroEL, insieme con i loro co-chaperon, GroES per GroEL, DnaJ e GrpE per DnaK, interagiscono in modo transiente con substrati proteici denaturati, per impedirne l'aggregazione e favorirne il ripristino della conformazione nativa (Bukau e Horwich, 1998).

I geni di resistenza agli *stress* giocano un ruolo importante nella virulenza di diversi patogeni. Ad esempio, in *Staphylococcus aureus*, durante l'infezione di cellule

epiteliali umane, è stata evidenziata l'induzione della sintesi di DnaK e GroESL (Qoronfleh et al., 1998).

Gli *chaperon* GroEL e GroES, che in *E. coli* sono richiesti per la crescita a tutte le temperature (Fayet et al., 1989), vengono fortemente indotti da diverse forme di stress, responsabili della denaturazione proteica (Hightower, 1991). Gli operoni *groESL* e *dnaK* sono sottoposti ad una regolazione sia positiva, dovuta all'intervento di fattori σ alternativi (Yura et al., 1993) che negativa, dovuta all'azione di un repressore, HrcA, che interagisce con una sequenza *inverted repeat* (IR), denominata CIRCE (*Controlling Inverted Repeat of Chaperon Expression*), posizionata a monte degli operoni (Zuber e Shumann, 1994). In *Lactobacillus johnsonii* l'operone *groES/groEL* è indotto da *heat shock* e la sua massima attività trascrizionale si osserva in seguito ad un *heat shock* a 55 °C e l'esposizione da 15' a 30' di cellule in fase logaritmica a questa temperatura, incrementa il grado di sopravvivenza al congelamento. Questo risultato suggerisce che l'induzione *heat shock* dell'operone in *L. johnsonii*, fornisce una certa protezione al congelamento e che un breve pre-trattamento *heat shock* può essere usato per provocare l'incremento della concentrazione di *chaperon*, cosa che, oltre ad offrire una protezione aggiuntiva contro la denaturazione proteica, può migliorare la *fitness* e la generale tolleranza dei lactobacilli agli *stress* incontrati durante la produzione e conservazione di colture fermentative o probiotiche (Walzer et al., 1999).

1.6. I repressori CtsR, HrcA Rr01 e la risposta allo stress.

S. thermophilus come detto in precedenza è uno dei microrganismi usati come starter per la produzione di molti prodotti fermentate. La sua capacità di resistere agli stress ambientali durante la produzione o la conservazione come ceppo starter congelato o/e essiccato è di importanza fondamentale. Riesce a sopravvivere a variazioni di pH, di temperatura, alla carenza di nutrienti, al congelamento, a stress di tipo ossidativo ed osmotico. E' stato osservato che sia la carenza di nutrienti che l'esposizioni a condizioni di stress sub-letali, portano ad un cambiamento sostanziale dell'espressione proteica (Arena et al., 2006; Salzano et al., 2007; Zotta et al., 2008) e molti geni e prodotti genici sono stati associati all'adattamento agli stress (termico, acido ed ossidativo) (Wouters et al., 1999; Thibessard, Fernandez, Gintz, Leblond-Bourget e Decaris, 2001; Thibessard et al., 2002; Giliberti et al., 2002; Thibessard et al., 2004; Varcamonti et al., 2003, 2006).

Nei batteri LAB sia HrcA (repressore dei geni di classe I in *B. subtilis*), che si lega ad elementi CIRCE (Controlling Inverted Repeats of Chaperon Expression) (Naberhaus, 1999) e CtsR (repressore dei geni di classe II coinvolti nella risposta allo stress in *B. subtilis*), che riconosce una sequenza eptanucleotidica (Derrè et al., 1999), sono implicati nella regolazione dell'espressione degli chaperon molecolari (GrpE/DnaK/DnaJ, GroEL/GroES) e delle proteasi Clp e le ATPasi (ClpP, ClpX, ClpC, ClpE, ClpL etc) (van de Cucite et al. 2002) rispettivamente. Anche se la

regolazione può essere significativamente differente da quella dei batteri Gram positivi come *B. subtilis*, è stata comunque osservata una doppia regolazione da parte di CtsR ed HrcA per alcuni operoni di alcuni batteri LAB (Chastanet et al., 2001; Chastanet and Msadek, 2003; Crandvalet et al., 2005). Inoltre, la proteina CcpA coinvolta nel controllo dei cataboliti, regola l'espressione di alcuni geni coinvolti nella risposta allo stress (Castaldo et al., 2006; Zomer et al., 2007) e degli streptococchi del gruppo A; il sistema covR/covS ha un ruolo nella regolazione di molti geni tra cui geni essenziali per la virulenza e la risposta allo stress (Federle et al., 1999; Dalton and Scott, 2004; Churchward 2007). In *S. thermophilus* la regolazione della risposta allo stress è simile a quella di *S. salivarius*. La proteina HrcA di *S. thermophilus* è stata caratterizzata da Martirani et al. (2001) ed è stato trovato che controlla l'espressione di DnaK e l'operone GroESL tramite un legame con la sequenza CIRCE conservata nei promotori di questi operoni. HrcA funziona come un dimero e la sua attività di legame al DNA (DNA-binding) dipende dalla presenza di GroEL. Chastanet et al. (2001) hanno provato che ci sono siti di legame per HrcA e CtsR nei promotori degli operoni groESL di molti streptococchi (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. agalactiae* e *Lactococcus lactis*). Però in *S. thermophilus* sembra che groESL sia regolato soltanto da HrcA (Arena et al., 2006). Chastanet e Msadek (2003) hanno dimostrato che in *S. salivarius* ClpP, che appartiene ai geni di classe III in *B. subtilis*, è doppiamente regolato sia da CtsR che da HrcA e che possono essere identificati sia siti di legame per CtsR che elementi

CIRCE nel promotore ClpL di *S. thermophilus*. Inoltre, nei genomi di *S. thermophilus* CNRZ1066 (TIGR Locus: NT85ST0369) ed LMG18311 (TIGR Locus: NT09ST0373) vi sono geni omologhi di covR, noti come rr01.

La regolazione di operoni di stress ha un ruolo importante nella sopravvivenza dei batteri in condizioni normali di crescita ed in condizioni di stress, tale regolazione può essere influenzata dallo stato generale della cellula batterica come è stato dimostrato in numerose specie tra cui *L. lactis* (Varmanen et al., 2000), *S. pyogenes* (Woodbury e Haldenwang, 2003; Chastanet et al., 2001), *S. mutans* (Kajfasz et al., 2009) e *Lb. sakei* (Hüfner et al., 2007).

E' stato dimostrato inoltre che esiste un'elevata variabilità nella risposta allo stress tra i diversi ceppi di *S. thermophilus* isolati da diverse fonti (Zotta et al., 2008) e anche se un pre-adattamento allo stato acido o caldo di cellule in fase esponenziale aumenta la tolleranza allo stress acido e caldo, questo non vale per tutti i ceppi. Tra i diversi ceppi di *S. thermophilus*, Sfi39 mostra una relativamente bassa tolleranza allo stress.

1.7. tmRNA

Il tmRNA, codificato dal gene *ssrA*, è stato identificato per la prima volta in *E. coli* come un piccolo RNA, lungo 363 basi, avente una mobilità elettroforetica di 10S (Lee et al., 1978; Chauhan e Apirion, 1998; Oh et al., 1990). Il suo nome deriva dalla

presenza di due domini separati, uno funziona come tRNA e l'altro come mRNA (fig. 2). Il tmRNA è generalmente conservato tra gli eubatteri (Williams, 2002); l'inattivazione del gene *ssrA* può essere letale o meno a seconda della specie considerata. L'assenza del tmRNA influenza la fisiologia di alcuni batteri: in *E. coli* il tmRNA è essenziale ad alte temperature (Oh e Apirion, 1991); in *B. subtilis* il ceppo selvatico può crescere normalmente anche a 52 °C, mentre quello deletato non è in grado di crescere ad una temperatura superiore a 45 °C (Muto et al., 2000).

Questi dati evidenziano che il tmRNA contribuisce all'adattamento cellulare a temperature superiori a quella ottimale di crescita.

In alcuni batteri esso è richiesto per lo sviluppo della virulenza (Novick et al., 1993); in un mutante del gene *ssrA* di *Salmonella enterica*, ad esempio, viene persa la patogenicità (Julio et al., 2000).

Il tmRNA dirige la trans-traduzione, un complesso sistema che permette, mediante successiva proteolisi, di eliminare le proteine tronche originatesi a causa di *shock* termici o di altri *stress* che alterano la funzionalità dei sistemi trascrizionale e traduzionale, consentendo il riciclo degli aminoacidi (Keiler et al., 1996) e soprattutto, il rilascio dei ribosomi 70S, fermi su molecole di mRNA incomplete.

Il tmRNA è carico alla sua estremità 3' con l'aminoacido alanina (Stepanov e Nyborg, 2003); in *B. subtilis* è stato dimostrato che il tmRNA interagisce con i ribosomi 70S e non con le subunità 50S e 30S, né con i polisomi (Ushida et al., 1994); in *E. coli*, è stato accertato che il caricamento del tmRNA con l'alanina è

necessario sia per l'interazione di esso con i ribosomi che per la marcatura terminale della proteina (Tadaki et al., 1996).

A seguito di tali osservazioni, per spiegare la funzione ed il meccanismo d'azione del tmRNA, fu proposto il modello della trans-traduzione (fig. 3) (Atkins e Gesteland, 1996).

Tale modello si compone di quattro fasi: (1) il tmRNA agisce come un tRNA aminoacilato con alanina all'estremità 3'CCA (tmRNA^{ala}), entra nel sito A del ribosoma traduce fermo sull' mRNA (Rudinger et al., 1999); (2) l' alanina viene trasferita al peptide tronco, ed il tmRNA trasloca dal sito A al sito P del ribosoma; (3) l'mRNA dunque, non continua su di esso, ma sulla breve ORF interna del tmRNA, quest'ultima, in *E. coli* codifica per la sequenza decapeptidica AANDENYALA, che viene aggiunta al C-terminale della catena polipeptidica tronca (Tu et al., 1995); (4) in corrispondenza del codone di *stop* del tmRNA, il complesso di traduzione si dissocia, rilasciando il peptide "marcato" che sarà quindi degradato mediante proteolisi.

Le proteasi coinvolte nella degradazione del peptide "marcato" sono sia citoplasmatiche ATP-dipendenti quali, ClpXP, la principale, e ClpAP (Gottesman et al., 1998), sia periplasmatiche ATP-indipendenti, quali Tsp e HtrA (Spiers et al., 2002), che legate alla membrana, come FtsH (Herman et al., 1998).

La degradazione mediata da ClpXP è incrementata dall'attività di una proteina associata al ribosoma, SspB, la quale si lega specificamente alla sequenza (AAND)

N-terminale del decapeptide (Levchencko et al., 2000), mentre ClpXP riconosce la sequenza (ALAA) C-terminale del decapeptide (Flynn et al., 2001).

La trans-traduzione può avvenire in tre casi : (1) i ribosomi sono fermi all'estremità 3' di mRNA tronchi; (2) i ribosomi rallentano a causa della presenza di codoni rari su messaggeri intatti (Hayes et al., 2002); (3) i ribosomi sono bloccati in siti di *stop* interni di messaggi completi (Sunohara et al., 2002).

In *E. coli* (Withey J. et al., 1999) ed in *B. subtilis* (Muto A. et al., 2000) la molecola del tmRNA non è essenziale, ma una delezione del gene *ssrA* che codifica per il tmRNA provoca un rallentamento della crescita ed una crescita influenzata dalla temperatura. Nel cianobatterio *Synechocystis* (de la Cruz et al., 2001) ed in *E. coli* (Luidalepp et al., 2005), la delezione della molecola di tmRNA causa un aumento di sensibilità verso l'inibizione della traduzione. In *Neisseria gonorrhoeae*, *ssrA* è essenziale (Huang et al., 2000). In quest'organismo, il fenotipo viene restaurato con l'espressione di un tmRNA che al C-terminale della sequenza target presenta 2 residui di Asp al posto delle Ala. Dal momento che questa sostituzione cambia residui critici nel riconoscimento dei peptidi marcati dal tmRNA da parte delle proteasi Clp si è ipotizzato che è il riciclo dei ribosomi il meccanismo di funzionamento del tmRNA in *N. gonorrhoeae* insieme ad una efficiente degradazione dei peptidi marcati.

Figura 2: Modello schematico della struttura del tmRNA di *E. coli*

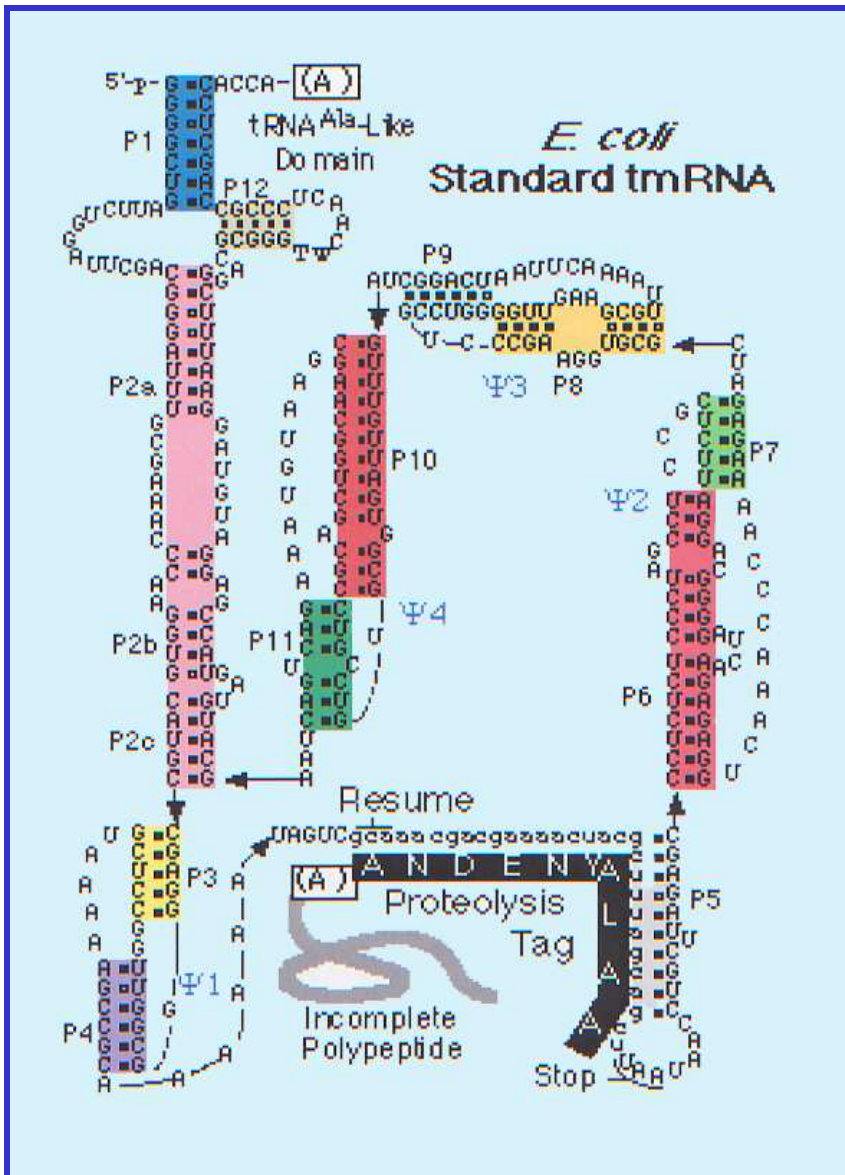
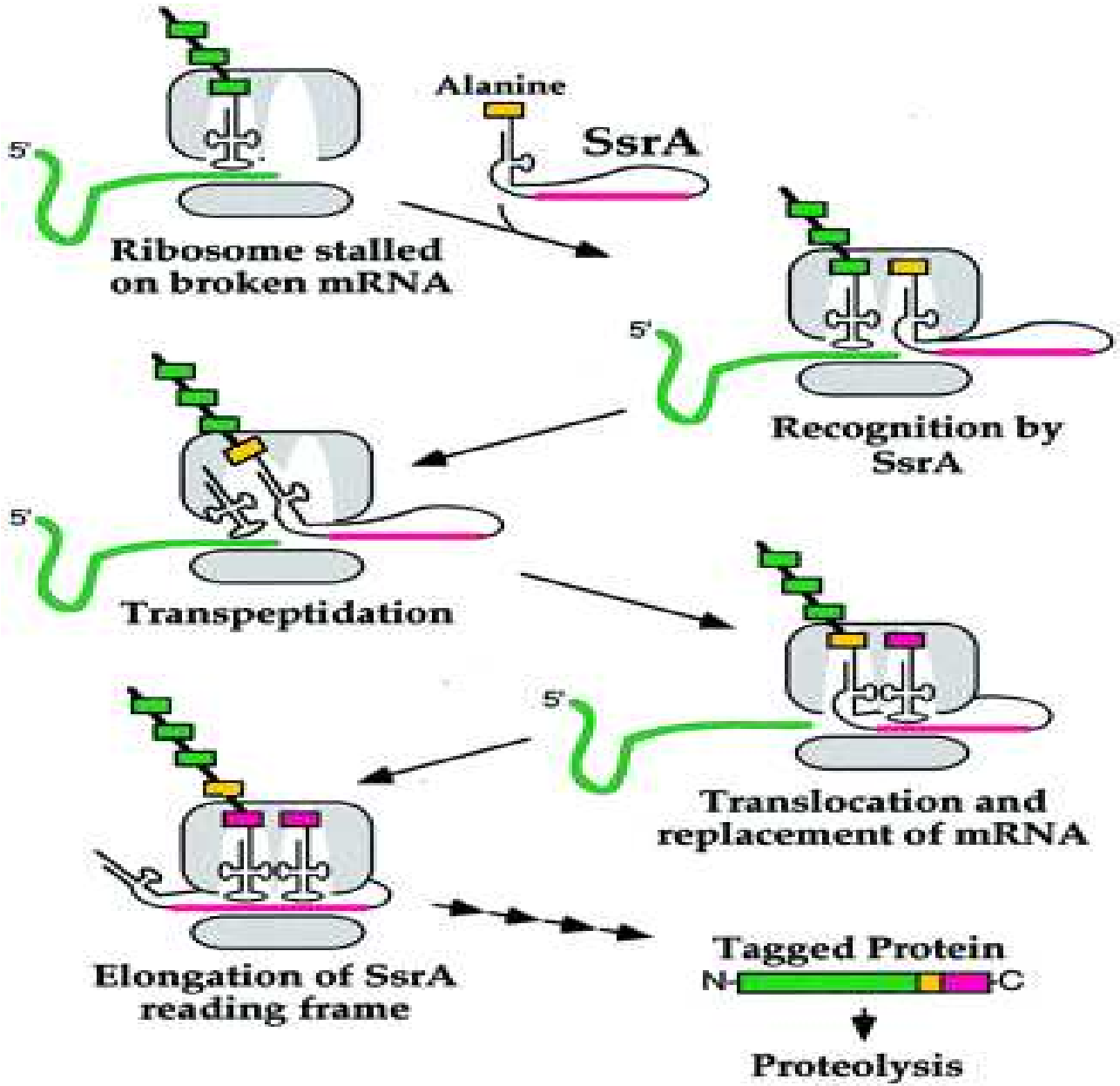


Figura 3: Modello della trans-traduzione



1.8. Scopo della tesi

La risposta adattativa dei batteri agli stress in genere e in particolare a quelli termici, è oggetto di numerosi studi. Notevole studio è stato dedicato alla conoscenza dei fenomeni adattativi in *S. thermophilus*, uno dei batteri lattici più utilizzati dall'industria lattiero-casearia. Molti processi fermentativi, in cui vengono utilizzati tali batteri, avvengono in condizioni ambientali molto diverse da quelle fisiologiche. Le variazioni di temperatura che le cellule subiscono durante i processi di produzione e di conservazione degli alimenti, costituiscono uno stress al quale esse rispondono attivando complessi meccanismi metabolici. La comprensione dei meccanismi coinvolti nella risposta agli stress, rappresenta un punto di partenza per migliorare l'adattamento in condizioni non fisiologiche per la crescita, ed ottimizzare i processi industriali, permettendo di ottenere prodotti qualitativamente migliori.

Nel presente lavoro abbiamo creato dei mutanti di *S. thermophilus* di alcuni geni noti dalla letteratura per essere indotti in condizioni di stress di natura acida, termica ed osmotica, e di geni che codificano per prodotti implicati nel processo della trans-traduzione, visto che uno dei network più soggetti ad alterazioni in condizioni di stress è l'equilibrio della sintesi proteica e del riciclo degli aminoacidi e dei ribosomi. Questo studio ci permetterà di capire meglio il modo in cui questo organismo riesce ad adattarsi e sopravvivere in condizioni ambientali non ottimali.

2. Materiali e metodi

2.1. Ceppi batterici

SFi39 (Lemoine et al., 1997) di *S. thermophilus* è stato utilizzato in tutti gli esperimenti riportati ed i mutanti sono stati ottenuti partendo da questo ceppo.

DH5 α (Sambrook et al., 1989) ed EC101 (derivato da JM101 repA⁺, Km^r) (Leenhouts et al., 1993) di *E. coli*, sono stati utilizzati come ospiti negli esperimenti di clonaggio.

2.2. Terreni di coltura

Terreni utilizzati per la crescita di *E. coli*:

TY: 8g NaCl; 10g triptone; 5g estratto di lievito; per litro di acqua bidistillata.

Piastre TY-agar: stessi ingredienti del terreno TY con l'aggiunta di 15 g di agar batteriologico per litro.

Antibiotici: quando richiesto, l'antibiotico ampicillina, è stato usato ad una concentrazione finale di 100 $\mu\text{g/ml}$; l'antibiotico eritromicina, ad una concentrazione finale di 100 $\mu\text{g/ml}$; l'antibiotico kanamicina, ad una concentrazione finale di 10 $\mu\text{g/ml}$.

Terreni utilizzati per la crescita di *S. thermophilus*:

M17: 5g triptone; 5g peptone di soia; 5g estratto di carne; 2.5g estratto di lievito; 0.5g acido ascorbico; 1g MgSO₄; 19g β -Na₂-glicerofosfato; per litro di acqua bidistillata; lattosio alla concentrazione finale del 1%, aggiunto dopo sterilizzazione in autoclave.

Piastre M17-agar: stessi ingredienti del terreno M17 con l'aggiunta di agar batteriologico alla concentrazione finale dell'1%.

Antibiotici: quando richiesto, l'antibiotico eritromicina, è stato aggiunto ad una concentrazione finale di 4 µg/ml.

Terreno utilizzato per la preparazione di cellule di *S. thermophilus* competenti:

Belliker: 20g triptone; 5g estratto di lievito; 2.5g gelatina; 5g saccarosio; 5g destrosio; 5g lattosio; 4g NaCl; 1.5g NaAc; 0.5g acido ascorbico; 10g estratto di carne; pH 6.8; per litro di acqua bidistillata.

Piastre Belliker Agar: stessi ingredienti del terreno Belliker con l'aggiunta di agar batteriologico alla concentrazione finale dell'1%.

Terreno utilizzato per l'integrazione del plasmide pGhost9 trasformato nel cromosoma di *S. thermophilus*:

HJL: 3% tryptone, 1% yeast extract, 0,2% beef extract, 0,5% KH₂PO₄ e lattosio all'1%.

2.3. Vettori

pGEM-TEasy (Promega): vettore plasmidico linearizzato (~ 3 kb), ideale per il clonaggio dei prodotti di PCR, grazie alla presenza di una base T non appaiata a ciascuna estremità, che si appaia con la A aggiunta dalla Taq polimerasi alle estremità 3' dei frammenti amplificati. Esso presenta un gene per la resistenza

all'ampicillina e un *polylinker* all'interno della sequenza codificante per la β -galattosidasi, cosicché l'eventuale inserzione di un frammento di DNA può essere verificata con un semplice saggio colorimetrico.

pGhost9: vettore plasmidico *shuttle* (3.7 kb) capace di replicazione autonoma (grazie ad un'origine di replicazione derivata da pBR322) solo a temperatura permissiva (30°C). Tale plasmide può replicarsi in *E. coli* EC101 anche a 37°C, ma non in *S. thermophilus*; esso contiene un gene per la resistenza all'eritromicina ed uno per la proteina RepA^{ts}, richiesta per la replicazione del plasmide e contenente 4 mutazioni che rendono attiva la proteina a 30°C ed inattiva a 37°C.

2.4. Geni sottoposti a mutagenesi

I geni selezionati per la mutagenesi e i corrispondenti primer usati per l'amplificazione di regioni interni sono elencati nella tabella 1. Le sequenze sono state disegnate sulla base del genoma di *S. thermophilus* CNRZ1066.

Tabella 1: Geni sottoposti a mutagenesi e primer usati.

Gene	Funzione	Primer per l'amplificazione del frammento interno al gene
Tsf	Translation elongation factor Ts	F: 5' GGCAGAAATTACAGCTAAAC 3' R: 5' AGTGCGGTCCATTTTACCTGGG 3'
clpL	ATP dependent proteinase ATP binding subunit	F: 5' CCGAATTGCCGTTTCAGAAAGGCG 3' R: 5' CCTCTAGATTATTAGCCTTGCAAACGGTTACCC 3'
clpX	ATP-dependent protease	F: 5' CGTGGGGCAAGATCGTGTC 3'

	ATP-binding subunit	R: 5' GGTCAAACTCAACAAGTTCAAGGG 3'
clpP	ATP dependent Clp protease	F: 5' CCGGTAGTTATTGAACAAAC 3' R: 5' AGTGCACTCATCCAATTATCACG 3'
grpE	Heat shock protein chaperonin	F: 5' GCCTTGACTGAAGATATTAA 3' R: 5' AGTCAGGCATGGTTTGAATAGCC 3'
ctsR	Class III stress gene repressos HSP	F: 5' CAAGAAATACATCAGATAG 3' R: 5' GATAGCCGCATCTTCGCCTAAAAC 3'
hrcA	Heat inducible transcriptional repressor	F: 5' CGCAAAGGCAAAACGCTATT 3' R: 5' TCACCGTGACATTTTCAAGAGC 3'
smpB	ssrA binding protein	F: 5' GCCAAAAGGTGAAGGCAATG 3' R: 5' CGCGACGTTTGATTGACTCAC 3'
pfkA	6-Phosphofructokinase	F: 5' CGGTTTGCGCATCTTTTGTA 3' R: 5' AGTCTTGCCAATTCGAGACGTTT 3'
tufA	Elongation factor Tu	F: 5' CCACACGTTAACATTGGTAC 3' R: 5' AGTCCAGGCGCAGCCAATACTT 3'
Dpr	Peroxide resistance protein non heme iron-containing ferritin	F: 5' ACTAGTGACAGATTCAATTAAAG 3' R: 5' AGTCATCTGTGATATCCAAGCC 3'
gpmA	Phosphoglucerasomutase	F: 5' GGAACGCGAACTTCGGAGAC 3' R:5' AGTGGCTCCATTATAAGTCTTTG 3'
ureC	Urea amidohudrolase (urease) alpha subunit	F: 5' GGGGATAGCGTACGTCTTGG 3' R: 5' TCAGCCAGCATCACCCATAACAC 3'
divIVA	Cell division initiation protein	F: 5' CAGCGCTTGATATTAAGAG 3' R: 5' AGTGGAGTTGAAGTAATATCATTTG 3'
rr01	Response regulator (omologo covR)	F: 5' CGCATTTTGATTGTTGAAGATG 3' R: 5' AGTGAAGCAAGAGTTCCTCACGGG 3'
ssrA	Transfer-messenger RNA (tmRNA)	F: 5' CTCGTGTGGCGACGTTAACG 3' R: 5' CATATTCGTCTACGACC 3'

2.5. Estrazione del DNA cromosomale

Il DNA cromosomale di *S. thermophilus* veniva estratto partendo da una coltura (13 ml) cresciuta a 42°C o. n., veniva centrifugata a 4000 rpm per 5', il *pellet* ottenuto, risospeso in 1 ml di SuTE, contenente lisozima (10mg/ml), ed incubato per 30' a 37°C, con agitazione. Veniva effettuata, quindi, una centrifugazione a 7000 rpm per 10', ed il *pellet* risospeso in 1 ml di TE 10/10 (10mM Tris-HCl, pH 8; 10mM EDTA), veniva aggiunto 1/10 Vol di SDS 10% e 5µl di Rnasi A (10mg/ml), ed incubato, quindi, a 37°C, per 30'. Venivano aggiunti poi, 20µl di proteinasi K (10mg/ml) ed ancora incubato a 55°C per 60', al termine dei quali, veniva aggiunto 1/10 Vol di Tris-HCl 1M, pH 8. Veniva effettuata quindi, un'estrazione con fenolo-cloroformio (1:1), cui seguiva centrifugazione a 13000 rpm per 5'. Recuperato il sopranatante, il DNA veniva precipitato con 2½ Vol di etanolo al 95% e 1/10 Vol di NaAcetato 3M a -80°C. Infine, dopo lavaggio con etanolo al 70%, il DNA cromosomale estratto veniva risospeso in H₂O.

2.6. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

L'amplificazione dei frammenti interni ai geni selezionati veniva effettuata con una reazione di PCR utilizzando come stampo, il DNA cromosomale di *S. thermophilus* e, come *primers*, due oligonucleotidi: Forward all'estremità 3'-terminale, e il Reverse

all'estremità 5'-terminale, disegnati sulla sequenza interna dei geni di *S. thermophilus*.

Questi *primers* forniscono l'innesco per la Taq polimerasi, un enzima termostabile capace di catalizzare la reazione di polimerizzazione ad alta temperatura. La miscela di reazione era composta da: DNA cromosomale (50ng); *primers* F e R (5 μ M ciascuno); dNTP (0.2mM); PCR buffer (Invitrogen); MgCl₂ (1.5mM); Taq DNA polimerasi 5U (Invitrogen); Il programma di PCR eseguito, prevedeva 2' a 94°C e 30 cicli con i seguenti parametri: 30'' a 94°C e 40'' a 52°C, necessari, rispettivamente, per la denaturazione del DNA e l'ibridazione degli oligonucleotidi col filamento complementare, quindi, 1' e 30'' a 72°C, durante i quali avveniva la reazione di polimerizzazione. Il prodotto della reazione veniva visualizzato su gel di agarosio, eluito e clonato nel vettore pGEM-TEasy.

2.7. Gene soeing

Il metodo del gene soeing permette la produzione di prodotti di PCR sovrapposti per una sequenza di 20-30 bp. Consiste in una serie di PCR in cui la prima, porta alla sintesi di due prodotti di PCR, uno con la modifica desiderata al 3' e l'altro con la modifica desiderata al 5'. Dopo la purificazione dei prodotti, si continua con una seconda PCR di pochi cicli ± 7 , in cui si usa soltanto un primer, in un caso quello che permette l'amplificazione del filamento che va dal 5' al 3' e nell'altro caso quello che

permette l'amplificazione del filamento complementare. Dopo di che si lascia in ghiaccio per 30'', si uniscono le due frazioni e si rimette in ghiaccio per 30'' ed infine si conclude con un'ultima PCR hot start che permette l'ulteriore amplificazione del prodotto con la sequenza sovrapposta interna al frammento (fig. 4). Questo metodo è stato usato per introdurre una modifica all'interno della sequenza target della molecola del tmRNA. Abbiamo sostituito 6 codoni con altri che codificano per 6 istidine. I primer usati sono elencati nella tabella 2. I programmi di PCR usati sono identici a quelli usati per l'amplificazione degli altri geni, l'unica cosa che cambia è il numero di cicli come detto precedentemente ed il passaggio nel ghiaccio prima e dopo aver unito le due frazioni contenenti i singoli filamenti amplificati.

Figura 4: Schema rappresentativo del metodo gene soeing

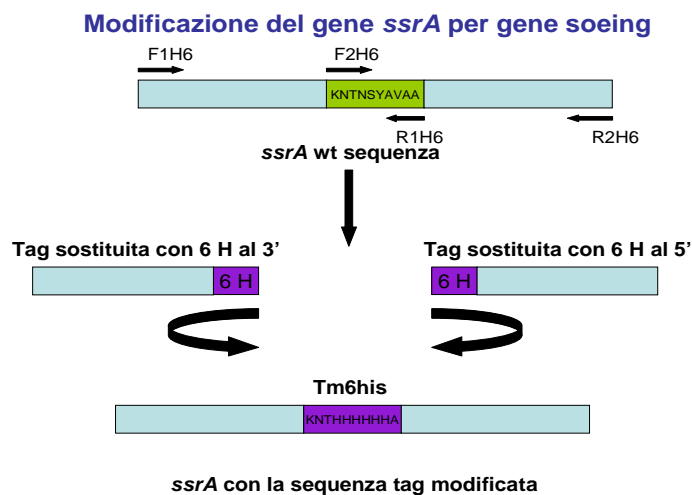


Tabella 2: Primer usati nel gene soeing

Nome	Sequenza
F1H6	5' CCCTTAGGGTGCAAAGTGGAAACG 3'
R1H6	5' TTAATGAGTGGTGATGGTGATGATTAGTATTTTTTGCAGTTATATTTAACTGAGCG 3'
F2H6	5' AATCATCACCATCACCATCATTAAAACACCTGCTCGCGTCGACTTCTAGCAGATTGC 3'
R2H6	5' GTGAGACACCTAAAACGGTC 3'

2.8. Elettroforesi sul gel di agarosio

Il gel d'agarosio veniva preparato sciogliendo 1 g di agarosio (BIO-RAD) in 100 ml di TAE 1X, a cui veniva aggiunto bromuro di etidio 1µg/ml.

I campioni di DNA venivano caricati nei pozzetti del gel e fatti migrare a 100 Volt insieme ad uno *standard* di peso molecolare (1 Kb ladder); ai campioni, prima della corsa, veniva aggiunto 1/10 Vol di una soluzione di loading buffer (0.5% blu di bromofenolo; 30% glicerolo). Dopo la migrazione le bande venivano visualizzate illuminando il gel con luce U. V.

2.9. Reazione di ligasi

Per il clonaggio veniva utilizzato il plasmide pGEM-TEasy. La miscela di reazione era composta da: vettore ed inserto in rapporto molare 1:3; 5U dell'enzima T4 DNA ligasi (Promega); buffer di reazione specifico (Promega). La reazione procedeva o. n. alla temperatura di 16°C, dopo di che veniva effettuata la trasformazione aggiungendo, alla reazione di ligasi, 200 µl di cellule di *E. coli DH5α* competenti.

2.10. Preparazione di cellule di *Escherichia coli* (*DH5α* ed *EC101*) competenti con CaCl₂

Cellule di *E. coli*, cresciute o.n. a 37°C in terreno TY, venivano diluite 1:100 in terreno TY (40ml) preriscaldato a 37°C e incubate alla stessa temperatura, con agitazione fino a O.D.₆₀₀=0.5. Dopo una permanenza di 15' in ghiaccio, venivano centrifugate a 4000 rpm per 7-10' a 4°C, ed il *pellet* risospeso in un volume (20 ml) di CaCl₂ (50mM) preraffreddato, pari alla metà di quello iniziale. Dopo incubazione in ghiaccio per 30-60', veniva centrifugato come descritto in precedenza, quindi, il *pellet* risospeso in CaCl₂ 50mM (1/10 del volume iniziale). Dopo aver lasciato la sospensione in ghiaccio per un'ora, veniva aggiunto glicerolo ad una concentrazione finale del 20 % . Aliquote delle cellule venivano congelate a -80°C.

2.11. Trasformazione di *E. coli* DH5 α

La trasformazione veniva effettuata aggiungendo 10 μ l della miscela di ligasi a 100 μ l di cellule di *E. coli* (DH5 α) competenti. I tubi riposti in ghiaccio per 20-30' e poi, per 1' a 42°C. Quindi, di nuovo in ghiaccio per 2', con successiva aggiunta di terreno TY (500 μ l). Infine, il tutto veniva incubato a 37°C per 50-60', piastrato su TY agar contenente l'antibiotico ampicillina ad una concentrazione di 100 μ g/ml, X-Gal ed IPTG per il saggio colorimetrico della β -galattosidasi e, quindi, incubate a 37°C o.n.

2.12. Isolamento del DNA plasmidico da cellule di *E. coli* (metodo della lisi alcalina)

Per l'estrazione del DNA plasmidico, veniva usata una coltura cresciuta o. n. a 37°C con agitazione (50ml). Il *pellet* ottenuto dopo centrifugazione per 5', veniva risospeso in 1 ml di tampone di lisi (Tris 25 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM, pH 8.0; glucosio 50 mM). Dopo un'incubazione a RT per 5', veniva aggiunta una soluzione (2ml) 0.2 N NaOH; 1% SDS. Seguiva una permanenza in ghiaccio per 5', al termine dei quali veniva aggiunta una soluzione (1.5 ml) di K-Acetato 3M. Seguiva una permanenza in ghiaccio per 5', al termine dei quali, le cellule venivano centrifugate a 6000 rpm per 5', veniva raccolto il sopranatante, aggiunto un volume di fenolo-cloroformio (1:1) e centrifugato a 6000 rpm per 10'. Recuperato il sopranatante, il DNA veniva precipitato con 2.5 Vol di etanolo 100%. Il *pellet* veniva lavato in etanolo 70%,

centrifugato a 13000 rpm per 5', ed infine risospeso in 50 µl di H₂O. Per eliminare l'RNA presente, veniva aggiunta Rnasi A ad una concentrazione di 0.02 mg/ml.

2.13. Clonaggio in *E. coli* EC101

Il vettore pGEM-TEasy, nel quale era stato clonato il frammento interno al gene da interrompere, veniva sottoposto ad una digestione enzimatica con *EcoRI*. Tale reazione consentiva il rilascio del frammento di interesse che, purificato mediante *gel-extraction* (QIAquick Gel Extraction kit -QUIAGEN), veniva clonato nel vettore pGhost9, precedentemente linearizzato con *EcoRI* e trattato con la fosfatasi alcalina per limitare la percentuale di plasmide che può ricircularizzarsi. La reazione della ligasi veniva fatta ad un rapporto 1:5 tra vettore ed inserto alla stesse condizioni descritte precedentemente.

Il prodotto della ligasi, veniva utilizzato per trasformare cellule di *E. coli* (*EC101*) allo stesso modo della trasformazione con le cellule DH5α. Il prodotto veniva piastrato su terreno TY Agar contenente l'antibiotico eritromicina ad una concentrazione di 100µg/ml per selezionare le cloni positivi. Una volta ottenuto il clone positivo, veniva effettuata una crescita o/n a 37°C con agitazione per effettuare l'isolamento del DNA plasmidico con il metodo della lisi alcalina descritto precedentemente. Il plasmide ottenuto in seguito veniva utilizzato per la trasformazione di *S. thermophilus*.

2.14. Preparazione di cellule competenti di *S. thermophilus*

Una coltura di *S. thermophilus* cresciuta o. n. in terreno Belliker a 42°C, veniva diluita 1:1000 nello stesso mezzo, al quale veniva aggiunta DL-treonina (20mM), quindi, veniva reincubata a 42°C, fino a $OD_{600}=0.2-0.4$. Raggiunto tale valore, veniva centrifugata e sottoposta a lavaggio due volte con tampone di elettroporazione (272 mM saccarosio; 1 mM EDTA; 7 mM HEPES, pH 6.5; 15% glicerolo). Infine, le cellule della coltura venivano risospese in 1 ml di buffer, aliquotate (50 μ l) e congelate a -80°C.

2.15. Trasformazione di cellule di *S. thermophilus* per elettroporazione

Per la trasformazione, in una cuvetta per elettroporazione pre-raffreddata, veniva aggiunto DNA plasmidico (500 ng) a 50 μ l di cellule. La cuvetta veniva quindi, collocata in un elettroporatore programmato con i parametri: 25 μ F; 2.1 kV/cm; 400 Ohm. Veniva applicata una scarica elettrica, utilizzando il Biorad Gene Pulser. A questo punto, alle cellule veniva aggiunto 1ml di HJL, incubate a 42°C per tre ore e poi a 30°C per altre tre ore ed infine, piastrate su Belliker Agar in presenza dell'antibiotico eritromicina ad una concentrazione di 4 μ g/ml per la selezione delle

cellule trasformate, ed incubate a 30°C per 48 ore in anaerobiosi (AnaeroJar, Oxoid; AnaeroGen bags, Oxoid).

2.16. Integrazione di pGhost9 nel cromosoma di *S. thermophilus* per ricombinazione omologa

Una colonia di *S. thermophilus* trasformata con pGhost9 contenente l'inserto veniva fatta crescere o. n. a 30°C (temperatura di replicazione del plasmide) in HJL in presenza di eritromicina alla concentrazione finale di 4µg/ml. La coltura veniva poi diluita 1:30 in HJL ed incubata a 30°C per tre ore fino a $OD_{600} = 0.2-0.3$, e poi, a 42°C per due ore fino a $OD_{600} = 1.2-1.5$. A questo punto, le cellule venivano diluite e piastrate su M17L agar a cui veniva addizionata eritromicina 4µg/ml, ed incubate o/n a 42°C in anaerobiosi (AnaeroJar, Oxoid; AnaeroGen bags, Oxoid).

2.17. Controllo dell'integrazione di pGhost9 nel cromosoma di *S. thermophilus* con la colony PCR

L'avvenuta integrazione sul cromosoma di *S. thermophilus* veniva controllata tramite una colony PCR partendo da una colonia singola ottenuta dopo il protocollo d'integrazione, usando degli oligonucleotidi disegnati a monte ed a valle di ogni

gene. Gli oligonucleotidi primers sono stati disegnati sulla base del genoma di *S. thermophilus* CNRZ1066 (tabella 3)

Tabella 3: Primer usati per controllare l'avvenuta integrazione sul cromosoma di *S. thermophilus*.

Gene	Funzione	Primer per il controllo dell'integrazione sul cromosoma di <i>S. thermophilus</i>
Tsf	Translation elongation factor Ts	F: 5' GGGGCGGGGCTCAGCCC 3' R: 5' GCTCAGATGTTTTCTAATTAC 3'
clpL	ATP dependent proteinase ATP binding subunit	F: 5' CACAGTATGAGGTGATTATATG 3' R: 5' GCTTCATTAATCGGATTAAGAG 3'
clpP	ATP dependent Clp protease	F: 5' GACAATATTTAAAAGGAG 3' R: 5' CCGATTAGCATCTGAC 3'
clpX	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	F: 5' GGGTTAGCAGTTTTTCTC 3' R: 5' CTCTTATTTGCCGCACTGAG 3'
grpE	Heat shock protein chaperonin	F: 5' CGAAGTTTTCTTAAGCCG 3' R: 5' GTCGTTTCGGACAAGG 3'
ctsR	Class III stress gene repressos HSP	F: 5' GTCAAATTATTAGACTGGAGG 3' R: 5' GGCCTGCATTTTTCTG 3'
hrcA	Heat inducible transcriptional repressor	F: 5' GTCGTTGTACGAGAGTGC 3' R: 5' GTCTCGGTAGCTTCCTC 3'
smpB	ssrA binding protein	F: 5' GTGGTTACAAAGGCTCTTATG 3' R: 5' CGCTAGGTACTATTCAAGACAGC 3'
pfkA	6-Phosphofructokinase	F: 5' CCGATAAACTTTTCAAATT 3' R: 5' GTCGCTTTTGCGACGGATTA 3'
tufA	Elongation factor Tu	F: 5' GACTGTATTGCCTACTGTC 3' R: 5' CTAATAATTGTATTGGGAAC 3'
Dpr	Peroxide resistance protein non heme iron-containing	F: 5' GTTCTAATAAGGAGAAAG 3' R: 5' CGCCGCCTTTCTTCTTG 3'

	ferritin	
gpmA	Phosphoglucerasomutase	F: 5'CCCGAAATAAAAAGGAGAC 3' R: 5' GCTGACCAAAGTCAACTTTTC 3'
ureC	Urea amidohidrolase (urease) alpha subunit	F: 5'GACTAGAAAGAGGAC 3' R: 5' GGAAAAAATCCAGCCTC 3'
divIVA	Cell division initiation protein	F: 5' GGTAAAAAATAAAGGAGGCCTG 3' R: 5' CCATCTCCCCTCGCTG 3'
rr01	Response regulator (omologo covR)	F: 5'GAGGAAATGAAAGCC 3' R: 5' CTAATGGTTACTTTACC 3'
ssrA	Transfer-messenger RNA (tmRNA)	F: 5' CTCGTGTGGCGACGTTAACG 3' R: 5' CATATTCGTCTACGACC 3'

2.18. Estrazione di proteine da *S. thermophilus*

Le colture cresciute a 42°C o. n. in M17L, venivano diluite a $OD_{600}=0.1$ ed incubate alla stessa temperatura, fino a $OD_{600}=0.5$. A tale valore, le colture venivano suddivise, ciascuna in quattro aliquote: ad una veniva aggiunto l'antibiotico cloramfenicolo, ad una concentrazione finale di 1mg/ml, centrifugata a 5000 rpm per 5' a 4°C, ed il *pellet* veniva risospeso in PBS 1X preraffreddato in ghiaccio. Si procedeva poi, all'estrazione delle proteine. Le altre tre aliquote di ciascuno dei due ceppi, venivano centrifugate per 10' a 4000 rpm a RT. I *pellet* ottenuti, venivano risospesi in terreno M17L opportunamente preraffreddato a 20°C o preriscaldato a 48°C; le sospensioni venivano quindi, sottoposte rispettivamente, ad un *cold shock* a

20°C per due ore e ad un *heat shock* a 48°C per 30'. Dopo aggiunta di cloramfenicolo (1mg/ml), le colture venivano centrifugate e risospese come già fatto per le prime due aliquote. Si procedeva poi, all'estrazione delle proteine, osservando il seguente protocollo: le sospensioni venivano trasferite in tubi FastPROTEIN-BLUE (Bio-101), contenenti una matrice di lisi e si omogenizzava utilizzando il FastPrep (Resnova) per un tempo di 30 secondi, a velocità 6 (3 cicli). Quindi, i tubi venivano centrifugati per 1' a 10.000 rpm, il sopranatante prelevato e conservato a -20°C.

In altri casi l'estrazione delle proteine totali veniva effettuata tramite sonicazione a 14000 Htz con cicli di 1' on e 1' off. Il campione prima della sonicazione veniva risospeso nel tampone adatto ad ogni esigenza.

2.19. Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS

I campioni proteici (10µg) venivano separati su gel di poliacrilammide in SDS, adoperando l'apparecchio Protein II (BIO-RAD).

Lower gel al 10%: 13.8 ml di 30% acrilammide-bisacrilammide mix (37.5:1); 10.4 ml di 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8; 0.4 ml di 10% sodio dodecilsolfato (SDS); 0.4 ml di 10% ammonio per solfato (APS) ; 0.016 ml di TEMED; acqua fino a 40 ml.

Upper gel al 5%: 2.5 ml di 30% acrilammide-bisacrilammide mix (37.5:1); 1.19 ml di 1.5 M Tris/HCl, pH 6.8; 0.15 ml di 10% SDS; 0.15 ml di 10% APS; 0.015 ml di TEMED; acqua fino a 15 ml.

Preparazione dei campioni per la corsa: ai campioni veniva aggiunto 1/3 del volume di una soluzione addensante e denaturante, contenente: 10% glicerolo; 50 mM Tris/HCl, pH 6.8; 0.1% blu di bromofenolo; 2% SDS; 4% β -mercaptoetanololo in acqua. I campioni venivano poi bolliti per 5' prima di essere caricati per favorire la denaturazione. Per comparare i pesi molecolari veniva utilizzato il *marker* "Precision Protein Standards" (BIO-RAD).

La separazione delle proteine veniva effettuata a 80 Volt per circa due ore.

2.20. Colorazione con Coomassie

Il gel veniva fissato e colorato mediante immersione nella soluzione colorante (625mM Coomassie Brilliant Blue; 50% metanolo; 10% acido acetico) per circa 40'. Il gel veniva poi decolorato con una soluzione di metanolo al 50% e acido acetico al 10% e seccato a 80°C sotto vuoto per due ore.

2.21. Precipitazione degli estratti proteici

La precipitazione veniva effettuata secondo il metodo Wessel-Flueggel utilizzando metanolo e cloroformio. All'estratto proteico venivano aggiunti 4 Vol di metanolo e 1.5 Vol di cloroformio, dopo agitazione, venivano aggiunti 3 Vol d'acqua bidistillata e, dopo miscelazione, si centrifuga a RT per 1' a 7000 rpm: si forma un *pellet* proteico all'interfaccia tra la fase inferiore e quella superiore. Aspirata la fase superiore, al *pellet* venivano aggiunti 3 Vol di metanolo e, dopo miscelazione, veniva centrifugato nuovamente a RT per 2' a 7000 rpm. Veniva eliminata nuovamente la fase superiore, ed il *pellet* si lasciava seccare sotto vuoto. Tale precipitazione permetteva di eliminare i sali e gli eventuali residui di membrana presenti nell'estratto proteico al fine di ottenere una risoluzione migliore nella successiva elettroforesi su gel bidimensionale.

2.22. Estrazione dell'RNA totale da *S. thermophilus*.

Una coltura del ceppo *wild-type*, cresciuta a 42°C o. n. in M17L veniva diluita a $OD_{600}=0.1$ e incubata alla stessa temperatura fino a $OD_{600}=0.5$. A tale valore, la

coltura veniva suddivisa in quattro aliquote: ad una, veniva aggiunto l'antibiotico rifampicina ad una concentrazione finale di 200 µg/ml per bloccare la trascrizione, ed incubata a 42°C per 5', trascorsi i quali, si procedeva all'estrazione dell'RNA; le altre tre aliquote venivano centrifugate per 10' a 4000 rpm a temperatura ambiente (RT). I *pellet* ottenuti, venivano risospesi in terreno M17L opportunamente preraffreddato a 20°C o preriscaldato a 48°C, quindi, sottoposti, rispettivamente, ad un *cold shock* a 20°C per due e ad un *heat shock* a 48°C per 30'. Scaduti i tempi di *shock*, alle colture veniva aggiunta rifampicina (200 µg/ml), incubate per 5' alle rispettive temperature di *shock*, per bloccare la trascrizione, e, quindi, si procedeva all'estrazione dell'RNA. Per l'estrazione, veniva utilizzato l'*RNeasy Mini kit* (QUIAGEN), osservando le relative istruzioni. L' RNA così ottenuto, veniva sottoposto a trattamento con DNasi, per eliminare la frazione di DNA, contaminante residua. Per valutare la bontà dell'RNA estratto, veniva eseguita una corsa elettroforetica su di un gel d'agarosio All'1.8%.

2.23. RT-PCR semiquantitativa

Dopo l'estrazione degli RNA totali, 5µg sono stati usati per la sintesi del cDNA con il kit StrataScript Reverse Transcriptase, seguendo le istruzioni. I *primer* usati sono elencati nella tabella 4 (16S-R e tmRNA-R). Il cDNA ottenuto è stato amplificato

con i *primer* specifici per il 16S usato come controllo interno (16S-F/ 16S-R) ed i *primer* specifici per il gene *ssrA* (tmRNA-F/ tmRNA-R) (tabella 4), usando il kit della Taq polymerase (Invitrogen). Il programma usato consiste ad uno *step* iniziale di 3' a 94 °C seguito da 30 cicli composti da uno *step* a 94°C per 45'', uno a 52 °C per 60'' ed uno a 72 °C per 1' ed uno *step* finale di 10' a 72 °C. 10 µl del prodotto di amplificazione sono stati caricati su di un gel d'agarosio al 2% ed analizzati con il programma Multi Analyst per avere un confronto semiquantitativo della quantità di trascritto nelle condizioni esaminate.

La tecnica della RT-PCR è stata usata anche per verificare la presenza del trascritto modificato contenente le 6 istidine al posto della normale sequenza target nel ceppo mutante tmH6 (F1H6/R3H6cont ed F1H6/R3wtcont) . I *primer* usati sono elencati nella tabella 4.

Tabella 4: *Primer* usati nel RT-PCR

Primer	Sequenza
tmRNA-F	5' ATTTATAAGCTACGTTTCGATCATTGC 3'
tmRNA-R	5' GACGACACATAACTCAAGCCTTCTAT 3'
16S-F	5' GGTAATGGCTCACCTAGG 3'
16S-R	5' CTATGGTTGAGCCACAGCC 3'
F1H6	5' CCCTTAGGGTGCAAAGTGGAACG 3'
R3H6cont	5' ATGATGGTGATGGTGATG 3'
R3wtcont	5' GGCTGGCTACAGCGTAAGA 3'

2.24. Cromatografia per affinità

La cromatografia per affinità è stata utilizzata per la purificazione di proteine marcate con sei istidine del ceppo mutante tmH6. La tecnica è stata applicata anche agli estratti proteici totali del ceppo wt e del ceppo mutante tm4, per confrontarli.

E' stato usato il kit His Trap FF crude da 2 ml (GE Healthcare). Ogni colonna è stata lavata con 5 ml di H₂O bidistillata e poi con 5 ml di buffer di eluizione (Buffer phosphato contenente 500 mM di Imidazolo). In seguito la colonna veniva equilibrata con 10 ml di binding buffer (buffer phosphato con 20 mM di Imidazolo) e poi veniva applicato l'estratto proteico totale ottenuto dalla sonicazione del campione disciolto in binding buffer, per favorire l'adesione nella matrice della colonna. La colonna veniva lavata con 10 ml di binding buffer raccogliendo l'eluato in frazioni da 2 ml. Infine l'eluizione delle proteine marcate con le sei istidine avveniva con 5 ml di buffer di eluizione, raccogliendo frazioni da 1 ml.

Le frazioni raccolte venivano preparate per un *western-blotting* con l'anticorpo anti-his.

2.25. Co-immunoprecipitazione

Le colture cellulari dopo essere state sottoposte agli stress termici, venivano centrifugate a 7000 rpm ed il *pellet* veniva lavato con il buffer di lisi freddo (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0,5% Triton X-100; 10% glicerolo). Il *pellet* veniva

risospeso in un volume adeguato di buffer di lisi (1/10-1/50 del volume iniziale) e sottoposto a sonicazione. Dopo la sonicazione, il campione veniva centrifugato a 13000 rpm a 4°C per 10' e veniva raccolto il surnatante. 200 µl di estratto venivano trasferiti in un' *ependorf* pulita e si portava a volume a 1 ml con *buffer* di lisi freddo. A questo punto veniva aggiunto l'anticorpo (1-5 µg di anticorpo per ml di estratto) e si lasciava per almeno 2 ore in incubazione a RT in agitazione lenta su ruota. Dopodiché 40 µl di resina coniugata a proteina A venivano aggiunti e si lasciava in incubazione o/n a 4°C sempre in agitazione su ruota.

In seguito campione veniva centrifugato a 5000 rpm per 2' e il surnatante veniva aspirato delicatamente. Il *pellet* veniva risospeso in 1 ml di buffer di lisi freddo e lasciato in agitazione per 5'. Questo passaggio veniva ripetuto 3 volte, e dopo l'ultimo lavaggio, la resina veniva risospesa in 30-35 µl di *SDS-loading buffer* ed il campione veniva sottoposto ad un *SDS-PAGE* e dopo la corsa elettroforetica ad un *western-blot* con l'anticorpo anti-His.

2.26. Western blot

Per effettuare un *western- blot*, il gel subito dopo la corsa elettroforetica veniva trasferito su un filtro di nitrocellulosa (PVDF). Il gel veniva posto nel Tampone di trasferimento (Tris-Glicina 1X; Metanolo 20%) preraffreddato ad equilibrare per

almeno 5'. La membrana PVDF veniva tagliata in base alle dimensioni del gel e veniva attivata immergendola per 10'' in metanolo per farle perdere le proprietà idrofobiche, poi 2' in H₂O e poi in tampone di trasferimento per 10'. A questo punto veniva allestito il "sandwich" facendo attenzione ad evitare le bolle d'aria usando spugnette e carta *watman* precedentemente imbevute di tampone di trasferimento (Polo negativo; spugnetta; 2 fogli di carta *watman*; gel ; filtro PVDF; 2 fogli di carta *watman*; spugnetta; polo positivo). Il "sandwich" veniva posizionato nella cameretta rispettando la polarità degli elettrodi e si avviava il trasferimento nella vaschetta refrigerante per 2 ore a 100V costanti a 4°C.

Dopo il trasferimento, veniva fatta la saturazione dei siti di legame sul filtro usando una *blocking solution* composta da 3-5% latte in polvere o BSA in PBS 1X e si lasciava il filtro in *blocking solution* per 2 ore in agitazione a RT.

In seguito veniva fatta l'incubazione con l'anticorpo diluito 1:500 in *blocking solution* per 2 ore a RT.

Prima di effettuare la rivelazione per chemiluminescenza (ECL) il filtro veniva lavato almeno 3 volte per 15' in PBS 1X ed asciugato delicatamente. Per la rivelazione mediante ECL le due soluzioni A e B (Amersham farmacia) venivano mescolate ad un rapporto 40:1 e poi la soluzione veniva distribuita uniformemente sul filtro con l'aiuto di un lucido e lasciata 5' a RT. Dopodiché veniva asciugato delicatamente e si proseguiva con lo sviluppo su di una lastra fin quando non si otteneva il segnale desiderato.

2.27. Congelamento-scongelamento

Le colture batteriche cresciute a 42°C o.n. in M17L venivano diluite a $OD_{600}=0.1$ e lasciate crescere fino a $OD_{600}=0.5$. A tale valore, le colture venivano centrifugate per 10' a 4000 rpm, a 30°C, ed i *pellet* ottenuti venivano risospesi in terreno M17L preriscaldato a 42°C. Ciascuna delle due sospensioni ottenute, veniva suddivisa in 5 tubi, 4 venivano congelati a -20°C, un quinto (per ciascuna sospensione) veniva utilizzato per piastrare un'opportuna diluizione (10^{-5}) di riferimento dell'esperimento. Il giorno successivo, mediante *colony counter*, veniva eseguito il conteggio delle colonie. Il conteggio al giorno 0 rappresentava il riferimento dell'esperimento a cui veniva attribuito il valore 100%. Le aliquote congelate di ciascuna delle due sospensioni, venivano scongelate rispettivamente, dopo uno, due, tre giorni ed un mese di congelamento, piastrate, incubate e contate, per valutare la percentuale di sopravvivenza al congelamento, rispetto al riferimento non sottoposto a congelamento. Allo stesso modo appena descritto, venivano trattate le cellule batteriche sottoposte ad un pretrattamento di *cold shock* a 20°C per due e quattro ore o di *heat shock* a 48°C per 30'.

2.28. Condizioni di stress

Il ceppo Sfi39 di *S. thermophilus* ed i mutanti *ctsR*, *hrcA*, *rr01* e Tm4 sono stati sottoposti a diversi trattamenti di stress per valutare la diversità della risposta sia in fase esponenziale (crescita in M17L1%, pH 6.8, O.D₆₀₀ = 0.6) che stazionaria (crescita per 16 ore in M17L1%, pH 6.8) in seguito ad un preadattamento acido o termico, o senza nessun tipo di preadattamento. Il grado di sopravvivenza è stato valutato attraverso conta su piastra M17L1% agar dopo 48h di incubazione in condizioni di anaerobiosi di diluizioni di ogni campione dopo essere stato sottoposto allo stress.

Preadattamento acido: crescita in M17L1% pH 5.0 a 42°C per 60'.

Preadattamento termico: crescita in M17L1% pH 6.8 a 50°C per 60'.

Stress acido: rissospendendo le cellule in tampone sodio-lattato pH 3.5 ed incubando a 42°C per 30'.

Stress termico: rissospendendo le cellule in tampone fosfato 10mM pH 7.0 ed incubando a 60°C per 30'.

Stress osmotico: rissospendendo le cellule in NaCl 2 mol/L ed incubando a 42°C per 30'.

Stress ossidativo: rissospendendo le cellule in H₂O₂ ed incubando a 42°C per 30'

2.29. Crescita ed acidificazione del mezzo

E' stata valutata la cinetica della crescita del wt e dei mutanti durante la fermentazione in M17L o M17IE partendo da pre-inoculi negli stessi mezzi. E' stata usata un'agitazione di 100 rpm ed ogni 30' 1 mL di coltura veniva prelevato per effettuare la lettura a 600 nm. Alla fine della fase esponenziale, diverse aliquote venivano piastrate su M17L o M17LE agar per calcolare il numero di cellule. Ogni fermentazione è stata ripetuta 2 volte ed i parametri delle curve di crescita sono stati valutati con il modello descritto da Baranti e Roberts (1994) usando il DMFit v 2.0 (Baranti and Roberts, 2004).

Per valutare l'effetto dell'inattivazione dei geni nell'acidificazione del latte, sono state fatte delle colture contenenti Skim Milk (Oxoid; RSM) all'11% (w/v) partendo da pre-inoculi all'1% (v/v) ed incubando o.n a 42°C. Questi sono stati usati per fare una coltura al 5% (v/v) in MRS pre-riscaldato a 42°C. Il pH è stato misurato in intervalli di 30' ed è stato calcolato il dpH. L'acidificazione del mezzo è stata valutata anche incubando al 5% (v/v) in M17L o M17Le ed in YLB modificato (10g peptone; 10g Lab Lemco; 3g estratto di lievito; 1% w/v lattosio) o YLBE.

3. Risultati

3.1. Costruzione dei ceppi mutanti

Streptococcus thermophilus è uno dei batteri lattici più utilizzati nelle industrie alimentari per la produzione di cibi fermentati (yogurt, formaggi, latticini). Si tratta di un batterio lattico, gram positivo, anaerobio aerotollerante. Durante i processi di produzione, i microrganismi utilizzati sono sottoposti a condizioni di stress notevoli e di diversa natura, come ad esempio, variazioni di temperatura, livelli di pH e salinità, che possono determinare condizioni fisiologiche molto lontane da quelle ottimali per la crescita. Alcuni batteri sono in grado di resistere meglio di altri a condizioni di stress, grazie all'evoluzione di complessi sistemi che regolano le risposte adattative. Basati sui dati esistenti in letteratura e dati sperimentali, abbiamo selezionato alcuni geni noti per essere coinvolti nella risposta adattativa allo stress da caldo, freddo ed acido da sottoporre a mutagenesi con lo scopo di studiare il fenotipo dei mutanti in diverse condizioni di crescita e capire l'effetto della mutazione. I geni selezionati sono elencati nella tabella 1.

Sulla base della sequenza genomica del ceppo CNRZ1066 sono stata disegnati gli oligonucleotidi corrispondenti ai geni d'interesse (tabella 1). I primer sono stati utilizzati per una reazione di PCR in cui il DNA cromosomale di *S. thermophilus* Sfi39 fungeva da stampo. Il prodotto di amplificazione ottenuto è stato clonato nel vettore pGemT-Easy ed usato per trasformare il ceppo DH5 α di *E. coli*. I cloni positivi sono stati selezionati sia con il saggio colorimetrico della β -galattosidasi che

per una singola digestione enzimatica con l'enzima di restrizione EcoR1 che forniva come prodotti il gene clonato ed il plasmide pGemT-Easy (nel caso del gene *dpr* ho usato l'enzima di restrizione SpeI, perché il frammento del gene amplificato conteneva al suo interno la sequenza per il sito di taglio di EcoR1). Il frammento ottenuto, veniva clonato nel vettore pGhost9 precedentemente linearizzato con l'enzima EcoR1 (SpeI nel caso del gene *dpr*) ed usato per trasformare il ceppo EC101 di *E. coli*. I cloni positivi sono stati selezionati tramite una digestione enzimatica con l'enzima EcoR1 (SpeI per *dpr*). I plasmidi purificati, venivano usati per trasformare le cellule elettrocompetenti del ceppo Sfi39 di *S. thermophilus* per elettroporazione. Alcuni dei cloni trasformanti, selezionati per la loro resistenza all'eritromicina, venivano sottoposti al protocollo d'integrazione del plasmide. I cloni trasformanti, venivano cresciuti a 30°C in M17LE per 3 ore e poi incubati a 42°C. A tale temperatura il plasmide non è in grado di replicarsi dal momento che il gene *repA^{ts}* in esso contenuto presenta 4 mutazioni che rendono la proteina RepA, necessaria per la replicazione del plasmidi, attiva a 30°C ed inattiva già a 37°C. Pertanto alla temperatura di 42°C ed in presenza di selezione antibiotica, vengono selezionati i cloni in cui è avvenuta l'integrazione nel cromosoma batterico.

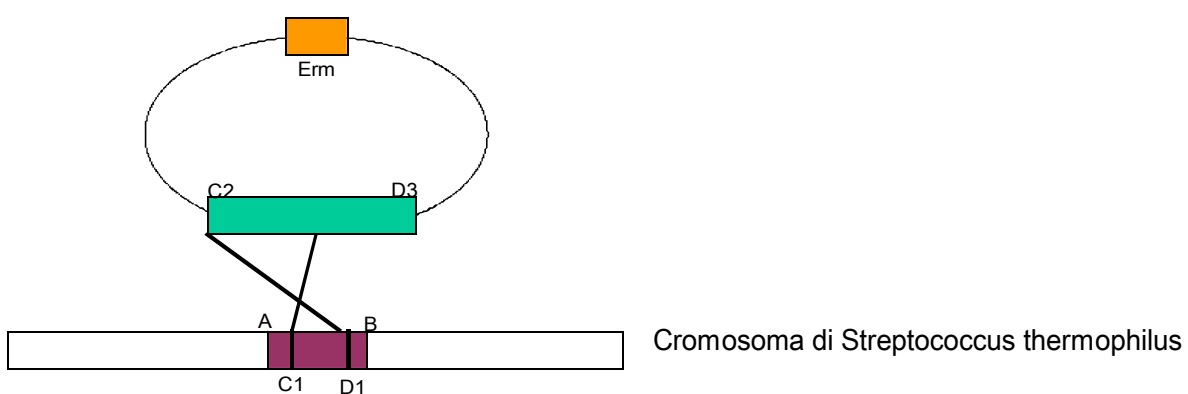
Grazie ad un singolo evento di ricombinazione omologa tra il frammento interno al gene clonato in pGhost9 ed il corrispondente sul DNA cromosomale di *S. thermophilus* Sfi39, il plasmide ricombinante si integra nel gene d'interesse interrompendolo (fig. 5).

Per confermare l'avvenuta integrazione, abbiamo effettuato una colony-PCR usando gli oligonucleotidi elencati nella tabella 2 che sono stati disegnati esternamente ad ogni gene d'interesse e quindi il prodotto di amplificazione nel caso dei mutanti interrotti è un frammento lungo 3700 bp che corrispondono al plasmide pGhost9 più x che è la parte corrispondente al gene d'interesse.

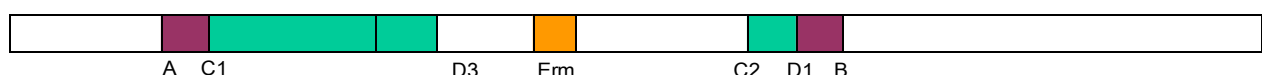
Applicando questo protocollo ho ottenuto i mutanti dei seguenti geni: *ureC*, *hrcA*, *divIVA*, *ctsR*, *dpr*, *rr01*, *clpL* e *smpB*, un mutante del gene *clpL* duplicato in tandem denominato MVK3, tmRNA ed un mutante del gene tmRNA con la sequenza codificante per il decapeptide sostituita da 6 istidine, denominato tmH6. Per ottenere quest'ultimo mutante ho usato la tecnica del gene soeing descritta nel paragrafo 2.7.

Figura 5: Rappresentazione schematica dell'evento d'integrazione sito specifica.

Trasformazione di *Streptococcus thermophilus* con pGhost9 contenente l'inserto



Integrazione del plasmide nel cromosoma di *Streptococcus thermophilus* ricombinazione omologa



3.2. Cinetica della crescita ed acidificazione del mezzo.

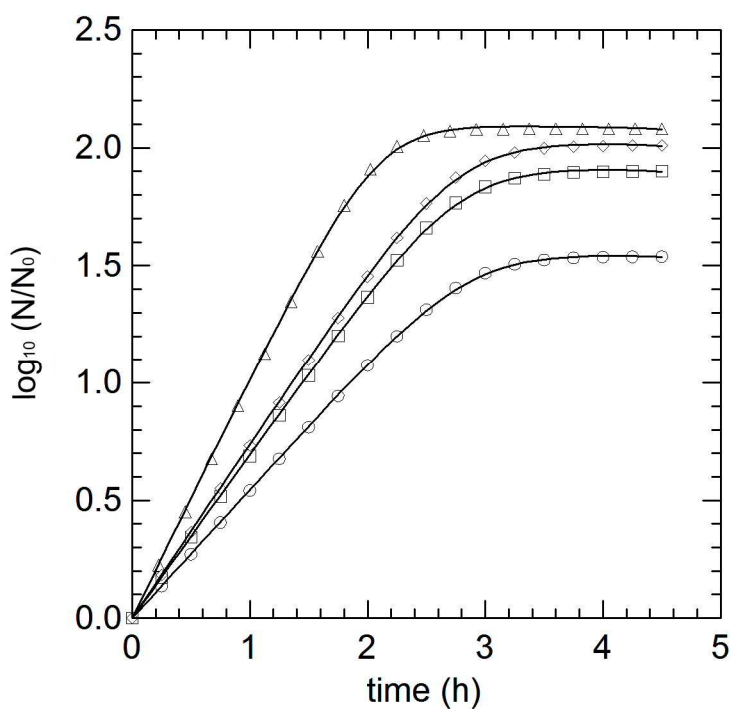
La cinetica della crescita di *S. thermophilus* Sfi39 e dei suoi mutanti *ctsR*, *hrcA* e *rr01* è mostrata nella figura 6. E' stato usato il D-model per tutte le fermentazioni (R^2 da 0.987 a 0.999). Il valore più basso di μ_{max} è stato trovato in Sfi39 ($1.25 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$; stimato \pm errore standard), mentre il valore più alto di μ_{max} è stato trovato per il mutante *ctsR* ($2.31 \pm 0.2 \text{ h}^{-1}$). *hrcA* e *rr01* presentano valori di $1.58 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ e di $1.69 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ rispettivamente. *S. thermophilus* Sfi39 ed i suoi mutanti crescono poco in M17L raggiungendo una densità finale di 2.9×10^8 , 5.2×10^8 , 2.1×10^8 e 5.6×10^8 cfu/ml per Sfi39, *ctsR*, *hrcA* e *rr01* rispettivamente. Non è stata osservata nessuna fase lag in nessuno dei ceppi.

E' stata valutata la capacità dei ceppi di ridurre il pH del mezzo (MRS) durante la fermentazione in *batch*; essa è diversa nei vari ceppi (Tukeys HSD, $p < 0.005$). Dopo 7.5 ore di fermentazione, il ceppo wt aveva un dpH = 1.63 con una popolazione finale di 1.25×10^9 cfu/ml, un valore molto diverso da quello ottenuto per *ctsR* (dpH= 1.57) che però aveva una popolazione finale molto più elevata (6.31×10^9 cfu/ml), mentre il dpH più basso è stato quello del mutante *hrcA* (dpH = 1,46 con una popolazione finale di 1.58×10^{10} cfu/ml). Nel mutante *rr01* il dpH era di 1.52 unità con una popolazione finale di 1.26×10^9 cfu/ml.

Dopo un'incubazione prolungata (24 ore), i valori di pH finali e di dpH erano rispettivamente 4.15 , 4.12 ,4.32 ,4.20 e 2.13 , 2.15 , 1.97 e 2.08 per Sfi39, *ctsR*, *hrcA* e *rr01*, rispettivamente.

Dopo 16 ore d'incubazione in un mezzo con pH prestabilito (M17 o M17LE con pH iniziale 6.85), il massimo dell'abbassamento di pH misurato alla fine della crescita era di 1.59 misurato per il wt, invece per *hrcA*, *ctsR* e *rr01* era di 1.49 ,1.53 e di 1.51 rispettivamente. Invece in YLB medium (pH iniziale di 6.5) il ceppo *ctsR* presentava l'abbassamento maggiore (1.92) ed il wt quello minore (1.32). Per i ceppi *hrcA* e *rr01* l'abbassamento era 1.82 e 1.71 rispettivamente.

Figura 6: Cinetica della crescita di *S. thermophilus* Sfi39(\circ) e dei suoi mutanti *ctsR*(\triangle), *hrcA*(\square) e *rr01*(\diamond)



3.3. Risposta agli stress ed influenza della fase di crescita e dell'adattamento

La risposta agli stress di cellule non preadattate in fase esponenziale di crescita o preadattate allo stress acido o caldo di Sfi39 e dei suoi mutanti *ctsR*, *hrcA* e *rr01* è mostrato in figura 7. I risultati erano altamente riproducibili ed il coefficiente di variazione (cv) era sempre più basso del 5%, con l'eccezione di esperimenti in cui la conta della percentuale di sopravvivenza era molto bassa. Tranne che per le cellule in fase stazionaria del mutante *rr01*, in tutti gli altri casi lo stress da acido riduceva la percentuale di cellule sopravvissute di 5 unità della scala logaritmica sia in fase esponenziale che stazionaria di crescita. Invece la risposta allo stress da caldo, osmotico ed ossidativi era molto variabile. Le cellule in fase stazionaria del ceppo Sfi39, *ctsR* ed *hrcA* erano molto più sensibili allo stress da acido rispetto a quelle trattate in fase esponenziale di crescita. I preadattamenti caldo e acido incrementavano la tolleranza allo stress da acido per tutti i ceppi da 3 a 9 volte.

La percentuale di cellule sopravvissute dopo lo stress da caldo per i ceppi *ctsR* ed *hrcA* era significativamente superiore alla percentuale del ceppo Sfi39 in ambedue le fasi di crescita. Le cellule preadattate al caldo in fase esponenziale di crescita del ceppo *ctsR* ed *hrcA* erano solo marginalmente più resistenti rispetto a quelle non preadattate in fase esponenziale. Il preadattamento acido ha fatto aumentare di poco la tolleranza allo stress da caldo per il ceppo *hrcA*, ma non per il ceppo *ctsR* del

quale le cellule preadattate allo stress acido erano lo stesso tolleranti allo stress da caldo come le cellule preadattate all'acido di Sfi39.

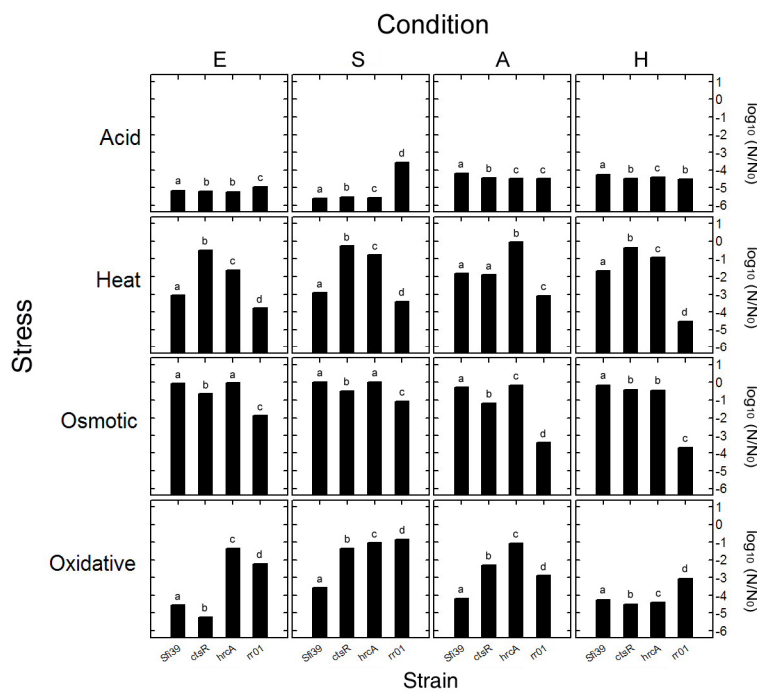
L'inattivazione di *rr01* ha causato una significativa diminuzione della tolleranza allo stress da caldo rispetto a Sfi39, sia in fase esponenziale che in fase stazionaria. Il preadattamento di *rr01* in fase esponenziale allo stress acido o caldo, risultava in un lieve incremento ed un significativo decremento della tolleranza allo stress da caldo rispetto alle cellule non preadattate in fase esponenziale.

L'inattivazione di *ctsR*, diminuisce leggermente la tolleranza delle cellule trattate in fase esponenziale, stazionaria e preadattate allo stress acido e osmotico rispetto a Sfi39 e *hrcA*. Cellule in fase esponenziale del mutante *rr01* erano 72 volte più sensibili rispetto a Sfi39. Inoltre il preadattamento acido e termico riducono drammaticamente la tolleranza allo stress osmotico.

L'inattivazione di *hrcA* e di *rr01*, aumenta la tolleranza allo stress ossidativo delle cellule in fase esponenziale non preadattate rispetto a Sfi39 e *ctsR*. Il preadattamento acido aumenta significativamente la tolleranza allo stress ossidativo per *ctsR* ma non per gli altri mutanti. Mentre il preadattamento termico diminuisce significativamente la tolleranza di *hrcA* e di *rr01*, risulta marginalmente aumentata la sopravvivenza di Sfi39 e di *ctsR*.

Figura 7: Risposta agli stress di cellule non preadattate in fase esponenziale di crescita o preadattate allo stress acido o caldo di Sfi39 e dei suoi mutanti *ctsR*, *hrcA* e *rr01*

I risultati sono espressi come $\log_{10} (N/N_0)$ dove N_0 e N sono relativamente il numero di cellule prima e dopo l'esposizione allo stress.



3.4. Analisi dell'estratto proteico totale tramite SDS-PAGE

I cambiamenti nel pattern proteico di cellule preadattate e non preadattate di Sfi39, *ctsR*, *hrcA* e *rr01* sono stati analizzati tramite SDS-PAGE (fig. 8). È stata considerata la presenza di bande di intensità standardizzata per tutti i pattern. La deviazione standard ed il coefficiente di variazione dell'intensità sono stati calcolati e la distribuzione di un coefficiente di variazione (cv) è stato usato per scartare delle bande che mostravano un cv più basso del 20% della distribuzione e sono state scartate dall'analisi perché sono state considerate non influenzate dalla fase di crescita o dal preadattamento. Allo stesso modo, bande con un cv più alto del 80% sono stati esclusi dall'analisi. Il coefficiente di variazione (cv) dell'intensità delle bande di 4 replicati di un estratto proteico di cellule prese in fase esponenziale di crescita e senza nessun preadattamento del ceppo Sfi39, era diverso nei diversi gel effettuati con un cv dal 6 al 22% ed erano più evidenti rispetto ai replicati caricati sullo stesso gel (cv da 0 al 10%). Questo confronto di cv nello stesso gel facilita il paragone tra le diverse bande dello stesso gel. Dall'altro lato, la stima dei pesi molecolari di bande che coincidono, ha mostrato un cv basso $< 0.5\%$. L'adattamento e la crescita in fase stazionaria ha influenzato l'espressione proteica soprattutto nel *range* tra 70-40 KDa (fig 8). È stata valutata l'intensità delle bande proteiche di cellule adattate allo stress acido e/o termico in fase esponenziale di crescita, di cellule non adattate in fase esponenziale di crescita e di cellule non adattate in fase

stazionaria di crescita per valutare l'effetto della fase di crescita, dell'adattamento e soprattutto dell'inattivazione dei geni *ctsR*, *hrcA* e *rr01*. Sia la percentuale di variazione dell'intensità delle bande proteiche relativa alle stesse bande di cellule non preadattate in fase esponenziale e la percentuale di variazione dell'intensità delle bande proteiche del wt sono mostrati in tabella 5. Dal momento che l'intensità delle bande nel gel monodimensionale SDS-PAGE può essere difficile da stimare, sono stati presi in considerazione soltanto differenze $\geq \pm 3$ unità della deviazione standard (la deviazione standard tra i gel in replicato degli estratti in fase esponenziale dello Sfi39).

La fase di crescita e il preadattamento, come anche l'inattivazione di geni codificanti per regolatori di stress, influisce molto sul profilo proteico di tutti i geni. E' stata osservata un'induzione significativa di alcune bande proteiche (bande b1 a b5, b7, b10 a b12) negli estratti del ceppo Sfi39 di cellule preadattate allo stress da caldo e lo stress da acido.

Il pattern proteico dell'estratto *ctsR* in fase stazionaria, è caratterizzato da un'over-espressione di un gruppo di proteine, la b7 (60.7 KDa) e la b6 (70.9 KDa), che sono anche più abbondanti negli estratti delle cellule preadattate allo stress acido ed allo stress da caldo. Rispetto all'estratto in fase esponenziale, le bande b6, b7, b8, b10 e b11 sono significativamente meno abbondanti in fase stazionaria, mentre la loro intensità aumenta nelle cellule preadattate (con l'eccezione di b10 e b11 nelle cellule preadattate allo stesso acido).

Il pattern proteico delle cellule in fase esponenziale del mutante *hrcA*, mostra una forte riduzione delle bande b4 ed una totale assenza della b10 paragonato al pattern del ceppo Sfi39 in fase esponenziale, ma nello stesso estratto si nota un notevole incremento di altre bande (b5, b8, b9, b12). La fase di crescita ed il preadattamento causano un gran cambiamento nella maggioranza delle bande rispetto all'estratto in fase esponenziale.

L'inattivazione di *rr01* almeno nel gel monodimensionale non mostra molte differenze dal ceppo parentale Sfi39.

E' stata calcolata la correlazione di Pearson tra l'intensità delle bande e la tolleranza allo stress, ma anche se il cambiamento nell'intensità delle bande è stato associato ai cambiamenti nella risposta allo stress, in alcuni casi, non c'è una correlazione statistica significativa tra la sopravvivenza e l'espressione proteica usando il test di Bonferroni

Figura 8: SDS-PAGE di cellule preadattate e non preadattate di *Sfi39*, *ctsR*, *hrcA* e *rr01*

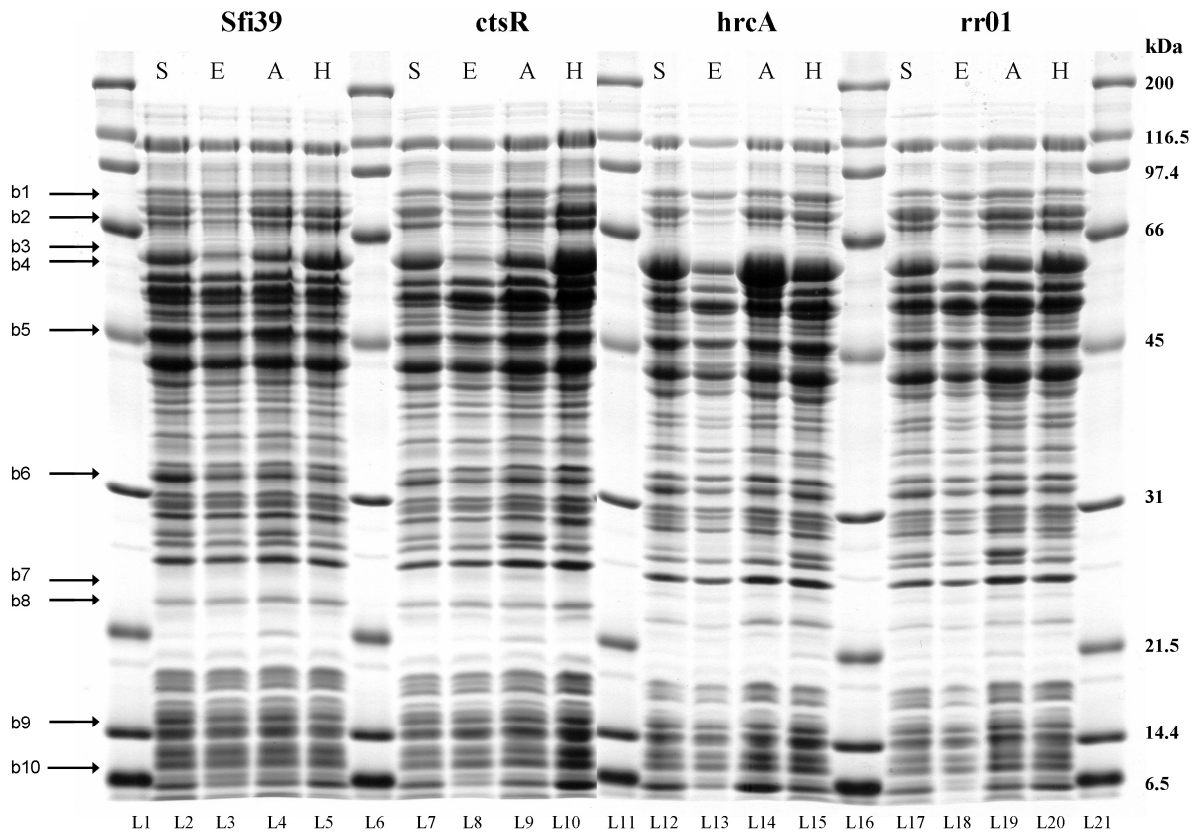


Tabella 5: Cambiamenti nell'intensità delle bande proteiche riscontrate sui gel SDS-PAGE di *S. thermophilus* e dei mutanti *ctsR*, *hrcA* e *rr01* presi in fase esponenziale di crescita (E), stazionaria (S) e dopo preadattamento termico (H) e acido (A).

(a) intensità della banda standardizzata; (b) cambiamento dell'intensità della banda relativa alla stessa banda di cellule prese in fase esponenziale senza nessun preadattamento. I risultati sono espressi in percentuale $100 * [(PCintst_X - PCintst_E) / PCintst_E]$ dove $PCintst_X$ è l'intensità della banda standardizzata e $PCintst_E$ è l'intensità della stessa banda standardizzata delle cellule prese in fase esponenziale senza nessun preadattamento dello stesso ceppo; (c) è il cambiamento nell'intensità della banda di cellule in fase esponenziale senza nessun preadattamento di *Sfi39*. Le intensità sono espresse in percentuale $100 * [(PCintst_X - PCintst_{ESFI}) / PCintst_{ESFI}]$ dove $PCintst_X$ è l'intensità della banda standardizzata e $PCintst_{ESFI}$ è l'intensità della stessa

banda di cellule prese in fase esponenziale senza nessun preadattamento di Sfi39.(d)
 identificazione di bande proteiche putative.

* differenza $>\pm 3$ unita di deviazione standard dell'intensità delle bande in replicati
 del gel di cellule prese in fase esponenziale di Sf39 sono considerate come veri
 cambiamenti dell'espressione proteica.

Band (kDa) ^d	<i>S. thermophilus</i>				<i>ctsR</i> mutant				<i>hrcA</i> mutant				<i>rrO1</i> mutant				
	E	S	A	H	E	S	A	H	E	S	A	H	E	S	A	H	
b1 (90.7) (ClpC)	(a)	0.17	0.24	0.25	0.22	0.20	0.22	0.29	0.25	0.15	0.17	0.16	0.22	0.21	0.13	0.20	0.17
	(b)	0	40 *	47 *	31 *	0	5	42 *	20 *	0	16	3	47 *	0	-39 *	-6	-21 *
	(c)	0	40 *	47 *	31 *	20 *	26 *	70 *	44 *	-12	0	-10	27 *	28 *	22 *	19 *	0
b2 (75.9) (ClpL)		0.49	0.76	0.84	0.80	0.52	0.65	0.85	0.91	0.35	0.68	0.79	0.76	0.50	0.77	0.81	0.78
		0	54 *	71 *	63 *	0	25 *	64 *	75 *	0	90 *	123 *	113 *	0	53 *	62 *	56 *
		0	54 *	71 *	63 *	6	32 *	73 *	85 *	-28 *	37 *	61 *	54 *	2	56 *	65 *	58 *
b3 (70.9) (hsp70)		0.45	0.71	0.77	0.82	0.47	0.69	0.78	0.92	0.28	0.56	0.57	0.62	0.50	0.76	0.73	0.83
		0	58 *	72 *	83 *	0	48 *	66 *	95 *	0	99 *	105 *	120 *	0	52 *	47 *	66 *
		0	58 *	72 *	83 *	5	55 *	74 *	104 *	-37 *	25	28	38 *	11	69 *	63 *	85 *
b4 (64.8) (DnaK)		0.20	0.32	0.34	0.29	0.24	0.24	0.34	0.35	0.16	0.26	0.31	0.25	0.22	0.28	0.25	0.24
		0	51 *	64 *	39 *	0	0	43 *	47 *	0	64 *	96 *	56 *	0	31 *	15	11
		0	51 *	64 *	39 *	16 *	14 *	66 *	70 *	-24 *	24 *	48 *	18 *	3	35 *	19 *	15
b5 (60.7) (hsp60)		0.54	0.91	0.89	0.97	0.59	0.93	0.94	1.00	0.88	1.02	1.03	0.99	0.64	0.95	0.89	0.98
		0	67 *	64 *	79 *	0	56 *	59 *	69 *	0	16	18	13	0	49 *	40	53 *
		0	67 *	64 *	79 *	9	70 *	74 *	85 *	62 *	88 *	90 *	83 *	18	75 *	65 *	80 *
b6 (49.0) (Gor)		0.79	0.84	0.90	0.85	0.67	0.63	0.85	0.88	0.57	0.69	0.75	0.80	0.62	0.65	0.74	0.69
		0	6	14	7	0	-6	27 *	31 *	0	20	32 *	41 *	0	5	20	12
		0	6	14	7	-15	-20	8	12	-27 *	-13	-4	2	-17	-21	-6	-12
b7 (44.7) (ClpX)		0.65	0.83	0.87	0.75	0.60	0.54	0.80	0.95	0.50	0.66	0.74	0.80	0.55	0.57	0.70	0.72
		0	28 *	34 *	16	0	-9	34 *	59 *	0	31 *	48 *	60 *	0	4	28	31 *
		0	28 *	34 *	16	-8	-16 *	24 *	46 *	-23	1	14	23 *	-16	-12	8	10
b8 (33.0) (DivIV A)		0.58	0.56	0.63	0.68	0.65	0.55	0.71	0.89	0.70	0.72	0.84	0.80	0.66	0.61	0.73	0.78
		0	-2	9 *	17 *	0	-15 *	10 *	36 *	0	4	21 *	15 *	0	-8	10	19
		0	-2	9 *	17 *	12 *	-4	23 *	53 *	20	25 *	45 *	39 *	14	5	26 *	35 *
b9 (25.1) (ProW X)		absent	absent	absent	absent	absent	absent	0.27	absent	0.18	0.20	0.20	0.28	0.16	0.16	0.24	0.20
		0	0	0	0	0	0	27	0	0	16	16	61	0	0	47	16
		0	0	0	0	0	0	27	0	18	20	20	28	16	16	24	19
b10 (23.0) (GrpE)		0.14	0.19	0.20	0.20	0.15	0.15	0.14	0.29	absent	absent	absent	absent	absent	absent	absent	absent
		0	34 *	41 *	47 *	0	0	-7 *	90 *	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	34 *	41 *	47 *	8	6	0	106 *	-100 *	-100 *	-100 *	-100 *	-100 *	-100 *	-100 *	-100 *
b11 (20.1) (Prot24)		0.05	0.07	0.07	0.08	0.16	0.14	0.15	0.25	absent	absent	absent	absent	0.13	0.14	absent	absent
		0	41	41	65	0	-11	-4	58 *	0	0	0	0	0	5	-100 *	-100 *
		0	41	41	65	201 *	167 *	189 *	374 *	-100 *	-100 *	-100 *	-100 *	159 *	173 *	-100 *	-100 *
b12 (16.5) (Asp)		0.19	0.38	0.31	0.26	0.22	0.30	0.38	0.50	0.21	0.31	0.33	0.41	0.19	0.30	0.38	0.32
		0	103 *	70 *	41 *	0	38	71 *	129 *	0	48 *	61 *	96 *	0	54 *	94 *	65 *
		0	103 *	70 *	41 *	17	63 *	103 *	171 *	11	64 *	78 *	116 *	3	59 *	101 *	70 *
b13 (10.7) (GroES)		0.65	0.67	0.66	0.63	0.61	0.58	0.67	0.95	0.64	0.72	0.89	0.85	0.54	0.54	0.71	0.75
		0	3	0	-4	0	-6	9	54 *	0	13	39 *	34 *	0	0	30 *	37 *
		0	3	0	4	-6	-12	2	45 *	-3	10	36 *	30 *	-17	-17	8	14

3.5. Analisi bidimensionale dell'estratto proteico totale.

I risultati del SDS-PAGE sono stati confermati da un'analisi preliminare in gel 2D di estratti in fase esponenziale, stazionaria e di estratti di cellule preadattate allo stress da acido e lo stress da caldo di Sfi39 e dei suoi mutanti nei geni regolatori *ctsR*, *hrcA* e *rr01*. Visto che i repressori HrcA e CtsR sono implicati nella regolazione degli chaperon molecolari Clp ATPases, e che in altre specie di streptococchi (*S. mutans* e *S. salivarius*) l'espressione delle proteine GroESL e ClpP è doppiamente regolata da CtsR ed HrcA, ho focalizzato la mia attenzione sulle variazioni degli chaperon molecolari DnaK, GroEL e le ClpATPases (fig. 9). L'identificazione di queste proteine è stata confermata dalla spettrometria di massa MALDI-ToF. Alcuni esempi sono mostrati nella figura 9.

Il volume di ogni spot è stato prima espresso in percentuale del volume totale dello spot nel gel. Per calcolare il coefficiente di variazione è stata paragonata l'intensità di proteine conservate (glutammato deidrogenasi, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, fosfoglicerato mutasi e la subunita ribosomale L1) presenti in tutti i gel (16 2-DE gels) ed è stato osservato che quello della fosfoglicerato mutasi (valori sperimentali pI , pI_E di 6.02; MM_E di 24.7 KDa) aveva il minor coefficiente di variazione ($cv= 27.6$ %) calcolato sulla base del volume dello spot di tutti i campioni.

Per questo motivo, il volume degli spot di DnaK, GroEL e ClpL di ogni gel sono stati standardizzati in confronto con il volume dello spot della fosfoglicerato mutasi presente nello stesso gel. Per valutare l'effetto della fase di crescita, del

preadattamento e dell'inattivazione dei geni regolatori *CtsR*, *HrcA* e *Rr01* nell'espressione proteica, sono stati confrontati i volumi degli spot di *DnaK*, *GroEL* e *ClpL* di estratti di cellule prese in fase esponenziale, stazionaria, preadattate allo stress da caldo e allo stress da acido dei mutanti con quello degli estratti in fase esponenziale del ceppo *Sfi39* (tab. 6). In più è stato valutato il rapporto tra il volume degli spot di *GroEL* e *DnaK* di tutti i campioni. Sono stati considerati come effettivi cambiamenti nell'espressione proteica differenze \geq di 2 unità (cv).

A causa del grande coefficiente di variazione del volume degli spot di *DnaK*, *GroEL* e *ClpL* osservata nel 2-DE di *Sfi39*, questi non sono stati considerati significativi. L'inattivazione dei regolatori di stress in alcuni casi ha prodotto una grande variazione nella sintesi degli chaperon molecolari e di *ClpL* (tab. 6).

Le cellule in fase esponenziale del mutante *ctsR* non mostrano una variazione significativa di *DnaK*, *GroEL* e *ClpL* rispetto allo stesso estratto del ceppo wt *Sfi39*. Nel caso delle cellule preadattate al caldo del mutante *ctsR*, i livelli di *DnaK* aumentano di 2 e 3 volte rispetto alle cellule non preadattate e quelle del wt, mentre l'espressione di *ClpL* aumenta nelle cellule preadattate allo stress acido.

L'inattivazione di *HrcA* induce un'over-espressione di *GroEL* soprattutto nelle cellule preadattate al caldo (10 volte) rispetto al pattern del wt. Le cellule in fase esponenziale del mutante *hrcA*, mostrano un incremento di *GroEL* ma non di *DnaK* rispetto agli estratti in fase esponenziale del wt. E' stata osservata una diminuzione di *DnaK* in tutte le condizioni.

Inoltre è stata osservata una forte up-regolazione di GroEL nel mutante *rr01* dopo l'esposizione allo stress acido e caldo (11 e 15 volte rispettivamente), mentre aumenta leggermente il livello di DnaK dopo il preadattamento acido e caldo (2 e 3 volte rispettivamente) rispetto all'estratto delle cellule non preadattate. Al contrario di quello che succede nel mutante *ctsR*, *hrcA* ed il wt, il mutante *rr01* dopo il preadattamento allo stress acido e caldo aumenta l'espressione solo di DnaK o di DnaK e GroEL rispetto all'estratto in fase esponenziale.

Con l'eccezione dell'estratto in fase esponenziale di *rr01*, il rapporto tra il volume degli spot di GroEL e DnaK ha mostrato una maggior espressione di GroEL rispetto a DnaK (tab. 6). Il rapporto tra GroEL/DnaK nel wt e nei ceppi *ctsR* e *rr01* va da 1.2 a 2.0 volte. Al contrario GroEL era sempre over-espresso rispetto a DnaK nel mutante *hrcA*. In particolare il rapporto GroEL/DnaK aumenta in fase stazionaria (11.2 volte) e dopo il preadattamento acido e caldo (15.4 e 26.5 volte) rispetto a quelle misurate in fase esponenziale (9.6 volte) dovuta alla contemporanea down-regolazione di DnaK ed alla forte over-espressione di GroEL quando il repressore HrcA era inattivato.

Figura 9: Esempi di gel 2D

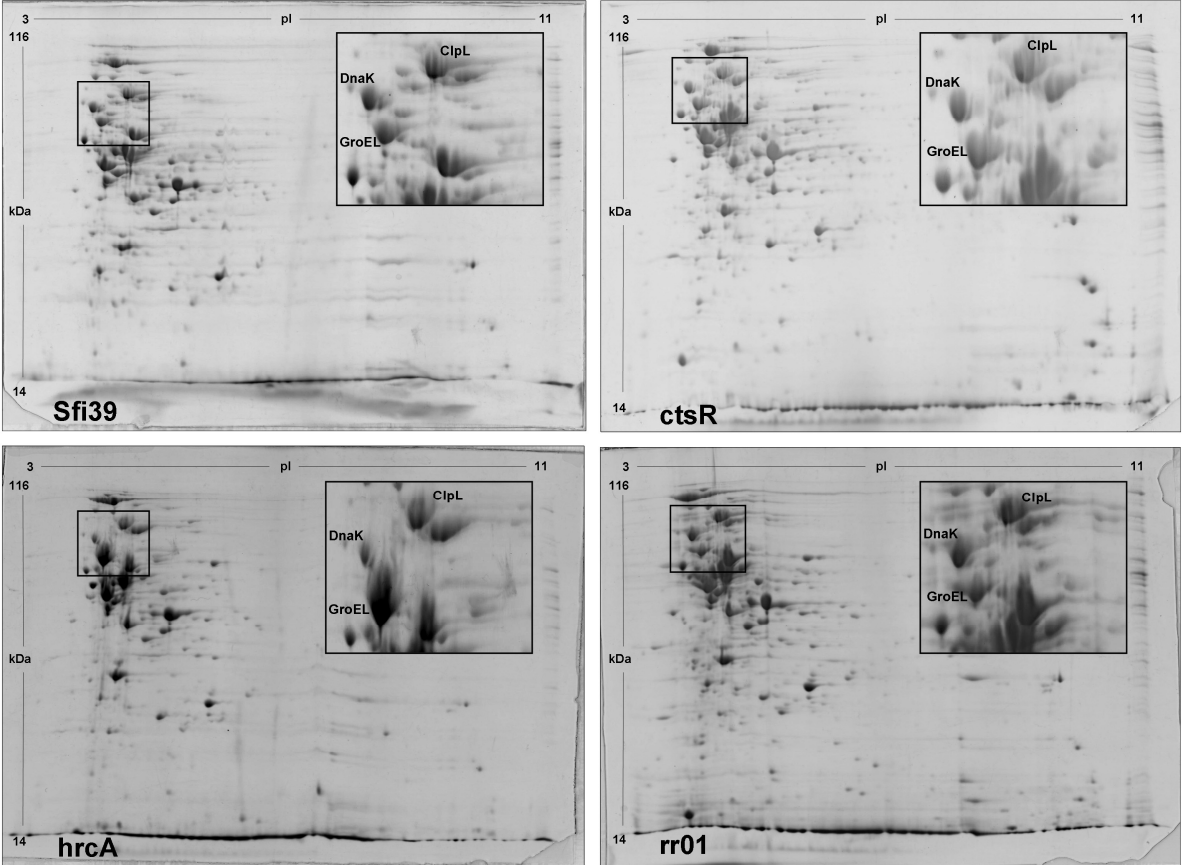


Tabella 6: Variazione del volume degli spot identificati sui gel 2D di *S. thermophilus* Sfi39 e dei mutanti nei geni regolatori *ctsR*, *hrcA* e *rr01*, in relazione alla fase di crescita (E, esponenziale, S, stazionaria) ed il preadattamento (A, acido, H, caldo).

Ceppo	Fase	Variazione del volume degli spot									GroEL / DnaK
		DnaK			GroEL			ClpL			
		SV	E1	E2	SV	E1	E2	SA	E1	E2	
Sfi39 wild-type	E	0.68	0	0	0.83	0	0	1.12	0	0	1.2
	S	1.18	72	72	2.40	188*	188*	0.29	-61	-61	2.0
	A	1.97	189	189	2.79	234*	234*	1.31	126	126	1.4
	H	0.14	-79	-79	0.23	-78	-78	0.44	-34	-34	1.6
<i>ctsR</i>	E	1.07	0	57	1.52	0	82	1.41	0	94	1.4
	S	0.76	-29	12	1.44	-5	73	2.01	16	126	1.9
	A	2.12	98	211	3.79	149*	354*	6.02	594*	1245*	1.8
	H	3.55	231	420*	4.17	175*	400*	3.00	115	318	1.2
<i>hrcA</i> mutant	E	0.28	0	-78	2.76	0	231*	1.70	0	131	9.6
	S	0.28	0	-78	3.21	16	284*	0.35	-75	-42	11.2
	A	0.17	-42	-75	2.58	-6	209*	2.24	14	164	15.4
	H	0.40	41	-40	10.82	291*	1186*	2.05	90	340	26.5
<i>rr01</i>	E	0.84	0	22	0.31	0	-62	1.52	0	34	0.4
	S	0.66	-21	-3	0.77	145*	-8	0.44	-57	-43	1.2
	A	3.37	303*	394*	4.40	1034*	426*	0.72	-18	9	1.3
	H	1.92	130	182	2.30	631*	174*	0.97	31	75	1.2

SV, volume dello spot standardizzato ; E1 cambiamenti nel volume dello spot in relazione allo stesso spot in cellule non preadattate prese in fase esponenziale di crescita. I risultati sono espressi come percentuale di $[(SV_X - SV_E) / SV_E]$ dove SV_X è il volume standardizzato dello spot e SV_E è il volume standardizzato dello stesso spot in cellule non preadattate prese in fase esponenziale di crescita dello stesso ceppo; E2, cambiamenti nel volume dello spot relative allo stesso spot in cellule non preadattate prese in fase esponenziale di crescita di *S. thermophilus*. I risultati sono espressi come percentuale di $[(SV_X - SV_{ESF}) / SV_{ESF}]$ dove SV_X è il volume dello

pot standardizzato e SV_{ESF} è il volume dello stesso spot standardizzato di cellule non preadattate prese in fase esponenziale di *S. thermophilus* Sfi39.

* differenze $> \pm 3$ unità di deviazione standard del volume dello spot in tutti i campioni sono considerate come reali cambiamenti di espressione proteica.

3.6. Discussione

L'effetto dell'inattivazione di geni coinvolti nella risposta allo stress di numerosi batteri d'importanza industriale e/o clinica è oggetto di studio di numerosi autori (Varmanen et al., 2000; Chastanet et al., 2001; Lemos et al., 2001; Woodbury and Haldenway, 2003; Dalton and Scott, 2004; Hüfner et al., 2007). In questo studio sono riportati gli effetti sul fenotipo e sull'espressione proteica di *S. thermophilus* e dei suoi mutanti *ctsR*, *hrcA* ed *rr01*.

Sono stati inattivati i geni *ctsR* (regolatore negativo dei geni di classe III), *hrcA* (regolatore negativo dei geni di classe I) ed *rr01* che codifica per un omologo di CovR, il quale ha un ruolo importante nella regolazione del metabolismo, nella risposta allo stress e nello sviluppo della virulenza nei streptococchi del gruppo A (GAS, Churchward, 2007). Un omologo di CovR è stato identificato anche negli streptococchi del gruppo B (GBS, Jiang et al., 2005) ed in *S. mutans* (Biswas and Biswas, 2006).

L'inattivazione dei geni *ctsR*, *hrcA* ed *rr01*, influenza molto la capacità di *S. thermophilus* Sfi39 di crescere nei terreni da laboratorio e nel latte. Anche se c'è un'espressione differenziale di numerosi geni in seguito all'esposizione ad uno stress,

in tutti i batteri lattici (van de Guchte et al., 2002) e in *S. thermophilus* (Arena et al., 2006) molti geni codificanti per diverse funzioni metaboliche sono influenzati dall'esposizione allo stress. Si conosce poco sui geni controllati da *rr01* (omologo di *covR*) in *S. thermophilus*, ma è ben noto che nei batteri GAS e nei GBS questo gene controlla l'espressione del 6-15% dei geni, tra cui molti geni con funzioni metaboliche importanti (Dal ton et al., 2006; Jiang et al., 2005) e partecipa in un network di regolazione molto complesso (Churchward, 2007). Arena et al. (2006) hanno trovato nel loro studio putative sequenze consenso di Rr01 in 4 geni di *S. thermophilus* tra cui geni che codificano per proteine importanti nella sintesi proteica (*fus*, *tufA*), nel metabolismo energetico (*gpmA*) e nella divisione cellulare (*divIVA*). Sia CtsR che HrcA controllano geni importanti per la tolleranza allo stress acido ed alla carenza di nutrienti (Arena et al., 2006). Il gene *fus*, codificante per il fattore di elongazione G, presenta nel suo promotore sequenze consenso sia per Rr01 che per CtsR in *S. thermophilus*, mentre *clpP*, un gene importante per gli stessi due stress è controllato da HrcA e da CtsR. Per queste ragioni, non è sorprendente che l'inattivazione di questi geni regolatori influenza molto la crescita nei diversi mezzi e nelle diverse condizioni. In altri streptococchi, l'inattivazione di *hrcA* ha come effetto una crescita più lenta rispetto al *wt* (Kim et al., 2008; Lemos et al., 2001). È stato riportato che l'inattivazione di *hrcA* tramite una mutazione non polare in *S. pyogenes* (Woodbury and Haldenwang, 2003) e in *S. mutans* (Lemos et al., 2001; Lemos et al., 2007) ha un effetto letale attribuito all'essenzialità di DnaK, il cui gene è localizzato

a valle di *hrcA* e di *grpE* in *S. pyogenes* ed in *S. thermophilus*. Anche se l'inserzione del vettore pGhost9 dovrebbe essere polare, c'è una minima produzione di DnaK nel mutante *hrcA*. Questo può essere dovuto ad un promotore alternativo σ^B localizzato a monte di *grpE* o alla trascrizione da un promotore di pGhost9. Una banda con un PM simile a ClpC (b1) è stata trovata in tutti gli SDS-PAGE del mutante *ctsR*, anche se *clpC* è localizzato immediatamente a valle di *ctsR* e non dovrebbe essere espresso. Non ci sono lavori in cui è dimostrato l'effetto dell'inattivazione di *ctsR* sulla crescita di batteri del gruppo dei streptococchi. In *Lb. sakei*, un mutante Δ *ctsR* cresce allo stesso modo del *wt* in MRS mentre la crescita in un sistema sperimentale era migliorata (Hüfner et al., 2007) mentre in *Lactococcus lactis*, una delezione in *ctsR*, riduce la crescita a 30 e a 37°C (Varmanen et al., 2000).

La crescita nella fase stazionaria ed il preadattamento per esposizione a condizioni lievi di stress, sono usati per incrementare la resistenza allo stress in molti batteri, inclusi molti LAB (van de Guchte et al., 2002) ed in *S. thermophilus*. I cambiamenti nell'espressione genica durante la fase stazionaria spesso risultano in una risposta allo stress generalizzata che porta ad un aumento alla tolleranza di molti o di tutti gli stress. Mentre il preadattamento determina un aumento della resistenza ad un determinato stress, dovuta alla produzione di proteine che migliorano la tolleranza ad un determinato stress ed in alcuni casi una cross-protezione dovuta all'espressione di proteine coinvolte nella risposta allo stress aspecificamente, come le chaperonine ed i complessi proteici Clp (van de Guchte et al., 2002).

Le cellule del ceppo *wt* Sfi39 prese in fase esponenziale erano molto sensibili sia allo stress da acido che allo stress ossidativo, ma erano più tolleranti allo stress termico ed osmotico. Il preadattamento acido o termico ha aiutato a migliorare la tolleranza allo stress termico ed acido, mentre allo stress ossidativo non è migliorata di molto. Per quanto riguarda i mutanti, il preadattamento in alcuni casi peggiora la tolleranza invece che migliorarla. L'inattivazione di *rr01* aumenta la tolleranza allo stress ossidativo ma riduce quella allo stress osmotico e termico. Zotta et al. (2008) hanno dimostrato lo stesso comportamento anche in 4 ceppi di *S. thermophilus* isolati da diverse fonti. Inoltre il preadattamento termico nel caso del mutante *rr01* non migliora la tolleranza, anzi, la tolleranza è minore rispetto alle cellule in fase esponenziale e stazionaria. Nel caso del mutante *hrcA* sembra esserci una sensibilità maggiore allo stress acido. La stessa cosa è stata osservata nel mutante Δ *hrcA* di *S. mutans* (Lemos et al., 2001). In questo caso l'aumento di sensibilità è stato associato ai livelli ridotti di espressione di DnaK ed alla più bassa attività delle ATPases. Nel caso di *S. mutans* questa sensibilità si osserva anche allo stress ossidativo e termico, cosa che non si verifica in *S. thermophilus*.

Arena et al. (2006) hanno effettuato uno studio dettagliato di proteomica sugli effetti dei cambiamenti di temperatura (50°C e 20°C), lo stress acido e la carenza di nutrienti in *S. thermophilus* ed hanno osservato un significativo cambiamento nell'espressione proteica. In tutti i casi, hanno osservato un aumento dell'espressione

di GroEL, GroES e ClpL/ClpP, mentre DnaK, GrpE, Dpr ed alcuni altri aumentano in base agli specifici stress.

In questo studio dall'analisi degli SDS-PAGE e di 2DE sono stati confermati molti dei dati messi in evidenza dall'analisi di Arena et al. (2006). Molte bande dei gel SDS-PAGE mostrano una variazione dipendente dalla fase di crescita, il preadattamento o la mutazione. Tra queste c'erano la ClpC (b1) (Clp-ATPase) la ClpL (b2), la ClpX (b7), le chaperonine DnaK (b4), la GrpE (b10) e GroES (b13), proteine della risposta generale allo stress come la Prot 24 (b11), proteine per l'inizio della divisione cellulare come la DivIVA (b8), la glutadione riduttasi Gor (b7), il trasportatore ABC di prolina/glicina betaina ProWX (b9) ed una proteina putativa dello shock acido (b12). Inoltre è stato osservato un cambiamento dell'intensità delle bande con PM di 60,7 (b5) e 70,9 KDa (b3) che sono compatibili con Hsp60 e Hsp70 rispettivamente. Sono state trovate anche proteine coinvolte nella risposta allo stress, ma sono state scartate dall'analisi perché avevano un coefficiente di variazione basso. Nei gel 2DE molti spot sono stati identificati tramite MALDI-Tof ed i risultati ottenuti sono in buona parte in accordo con i dati di altri autori per quanto riguarda il ruolo soprattutto di HrcA e CtsR.

E' noto che la trascrizione dei geni dell' operone *hrcA* (*hrcA-grpE-dnaK-dnaJ*) e dell'operone *groEL* (*groEL* e *groES*), entrambi repressi da HrcA, mostrano un pattern temporale diverso. Laport et al. (2004) hanno dimostrato che il trascritto di *groES-groEL* in *E. faecalis* aumenta nei primi 30' dello shock termico e poi diminuisce.

Woodbury e Haldenwang (2003) usando un'analisi tramite Northern blot, hanno dimostrato che il trascritto di *dnaK* in *S. pyogenes* ha i livelli massimi dopo 15' di esposizione ad elevate temperature e poi diminuisce, mentre l'espressione di GroEL rimane costante. In Sfi39 abbiamo notato che c'è un aumento significativo di DnaK, GroEL e ClpL anche in seguito ad uno stress acido.

Nel mutante *ctsR* c'è un aumento significativo di ClpL rispetto al ceppo *wt* in tutte le condizioni sperimentali, dovuta all'inattivazione di *ctsR* che codifica per un repressore dei geni *clp*. Sia lo stress acido che caldo aumentano ulteriormente i livelli di ClpL dimostrando che la repressione da *ctsR* non è l'unico fattore che influenza l'espressione di *clpL*. Si osserva anche un aumento di DnaK e di GroEL.

I pattern proteici del mutante *hrcA* sono coerenti con il ruolo di HrcA come repressore di operoni *hrcA* e *groES*. L'inattivazione di *hrcA* riduce notevolmente ma non abolisce l'espressione di *dnaK* ed aumenta l'espressione di *groEL* portando ad un incremento del rapporto GroEL/DnaK. La crescita in fase stazionaria ed i preadattamenti aumentano ulteriormente la quantità di GroEL, indicando che la repressione da HrcA può non essere l'unico fattore che controlla l'espressione di *groEL- groES*.

In molti streptococchi il sistema *covR/covS* controlla l'espressione di un gran numero di geni (Federle et al., 1999; Dalton and Scott, 2004; Jiang et al., 2005; Biswas and Biswas, 2006; Churchward, 2007). Gli SDS-PAGE del mutante *rr01* erano molto simili a quelli del *wt* in tutte le condizioni, con l'eccezione della banda b10 (GrpE) la

quale era sempre assente nel mutante e poche altre differenze. Dall'altro lato, i risultati dei gel 2DE erano in contrasto con quelli degli SDS-PAGE. Il mutante *rr01* era l'unico in cui le cellule in fase esponenziale erano più tolleranti allo stress termico, osmotico ed ossidativo ma solo marginalmente meno tolleranti allo stress acido rispetto alle cellule preadattate al caldo o all'acido. I cambiamenti dovuti al preadattamento erano evidenti nei gel SDS-PAGE e 2DE. L'incremento nella sintesi delle chaperonine evidente nei gel 2DE dopo un preadattamento non è accompagnato da una maggior tolleranza allo stress, indicando che altri fattori possono essere coinvolti. Un'analisi più dettagliata di proteomica e trascrittomica potrebbe chiarire il ruolo di questi regolatori in *S. thermophilus*.

3.7. Resistenza al congelamento di *S. thermophilus*.

Molte fermentazioni industriali sono avviate utilizzando ceppi starter congelati o liofilizzati, ed è noto che entrambi questi processi rappresentano una condizione di forte stress per la cellula batterica che può essere danneggiata dalla formazione di cristalli di ghiaccio e dalle variazioni d'osmolarità, fenomeni che determinano l'alterazione dell'integrità della membrana e della funzionalità metabolica. Per questo motivo è fondamentale comprendere i meccanismi adattativi al freddo ed i fattori che possono influenzare la sopravvivenza al congelamento.

Le risposte adattative dei batteri agli stress in genere, ed in particolare a quelli termici, negli ultimi anni sono state oggetto di numerosi studi. Notevole attenzione è stata dedicata alla conoscenza dei fenomeni adattativi in *S. thermophilus*, uno dei batteri lattici più utilizzati dall'industria lattiero casearia. Esso cresce in maniera ottimale a 42°C (Salminen e Von Wright, 1993), ma può vivere a temperature comprese tra 20 e 50°C (De Roissart e Luquet, 1994).

Allo scopo di esaminare il comportamento del ceppo Sfi39 di *S. thermophilus*, in relazione al congelamento, e valutare se pre-trattamenti *cold* e *heat shock* conferissero crio-protezione, cioè consentissero al batterio di adattarsi al congelamento, eseguiamo un esperimento di congelamento-scongelo, come indicato nei *Materiali e metodi*, su cellule cresciute a 42°C, su cellule sottoposte ad un trattamento di *cold shock* alla temperatura di 20° C, per 2 e 4 ore, nonché su cellule sottoposte ad un trattamento di *heat shock* alla temperatura di 48° C, per 30'.

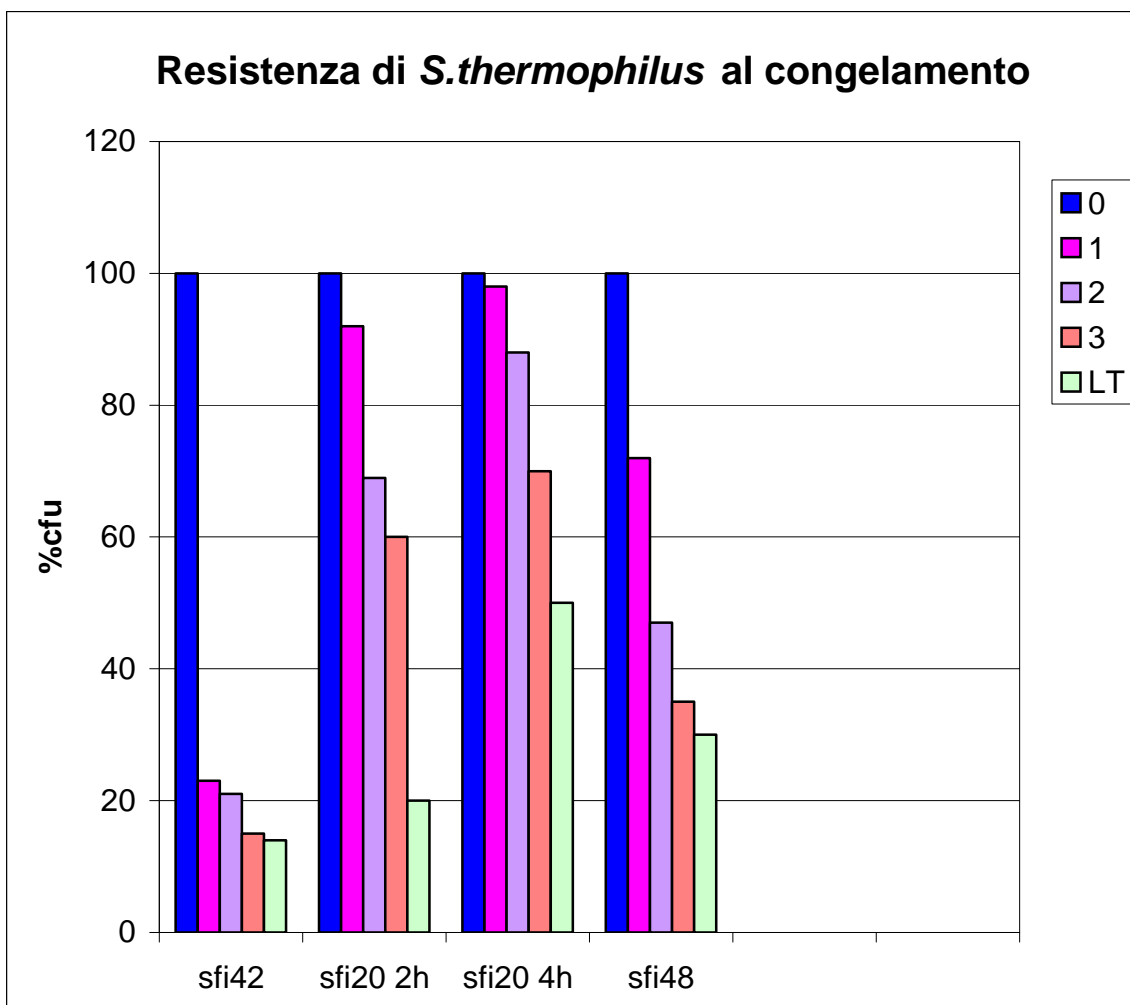
(fig. 10). Da tale studio risultava che entrambi i pre-adattamenti termici avevano un effetto favorevole sulla sopravvivenza delle cellule batteriche dopo il congelamento.

Per quanto osservato, dunque, si può ipotizzare l'esistenza di uno o più fattori attivati sia dalla risposta adattativa all'*heat* che al *cold shock* che favoriscono la sopravvivenza delle cellule batteriche sottoposte al congelamento. Uno di tali fattori, codificato dal gene *clpL*, è già stato caratterizzato presso il laboratorio in cui ho svolto il mio dottorato per essere indotto in ambedue gli stress termici, il mutante del gene *clpL* non presentava un fenotipo diverso dal selvatico nei confronti della

resistenza al congelamento dopo heat e cold shock, e non si dimostrava quindi responsabile del fenotipo osservato nella figura 10 .

Appartenendo la proteina ClpL alla famiglia delle Clp-ATPasi aventi funzione di *chaperon* molecolari e di co-proteasi coinvolte nella degradazione delle proteine marcate con il decapeptide codificato dal t/mRNA (vedi introduzione), decidevo quindi di costruire un mutante nel gene *ssrA*, codificante per il t/mRNA, la cui sequenza era stata già identificata e caratterizzata presso il laboratorio in cui ho svolto la mia tesi.

Figura 10: Resistenza al congelamento del ceppo SFi39 di *S. thermophilus* dopo crescita a 42°C (sfi42), dopo cold shock per due ore (sfi20 2h), dopo cold shock per 4 ore (sfi20 4h) e dopo heat shock (sfi48). I dati di sopravvivenza venivano misurati prima del congelamento (0), dopo un giorno (1), dopo 2 giorni (2), dopo 3 giorni (3) e dopo un mese (LT).

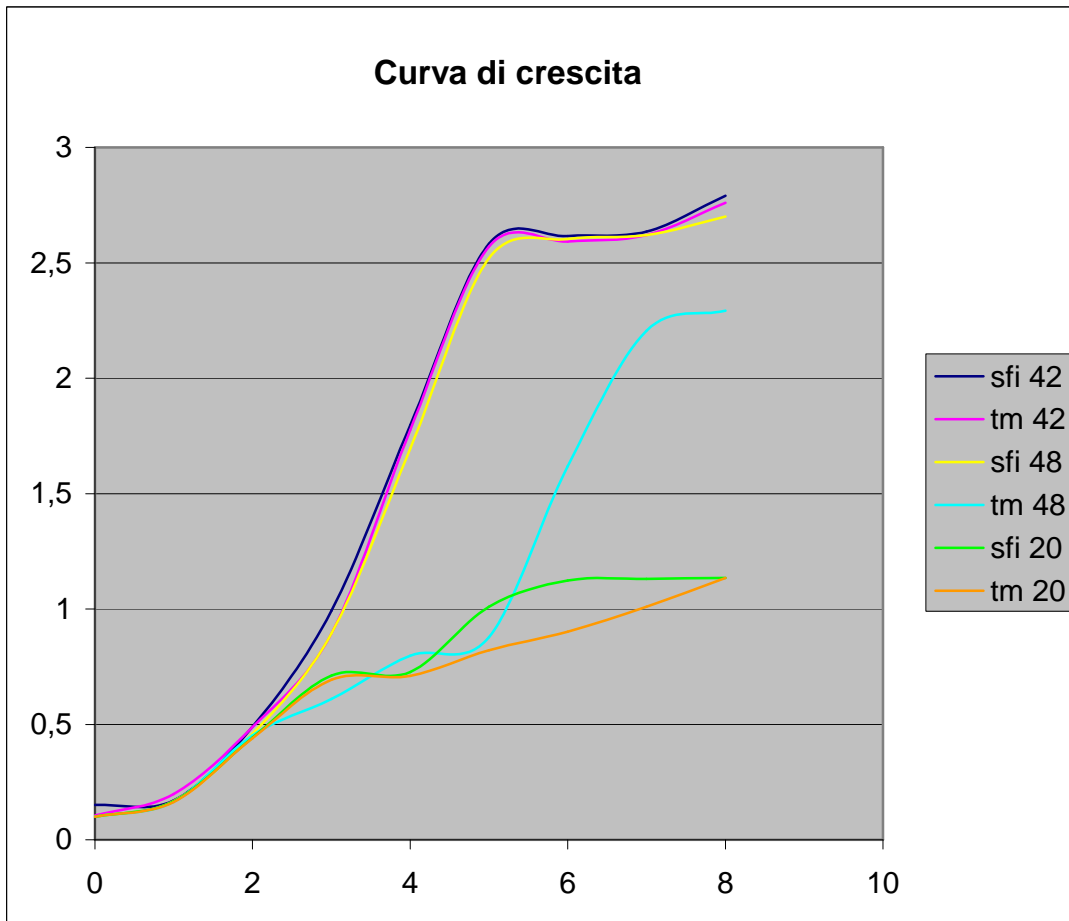


3.8. Effetto della mutazione *ssrA* sulla crescita

Allo scopo di verificare se l'assenza del t/mRNA, codificato da *ssrA*, potesse avere un effetto sulla crescita di *S. thermophilus*, effettuavo curve di crescita alle temperature di 42, 48 e 20°C. Una coltura del ceppo selvatico ed una del ceppo mutato, entrambe cresciute o.n. a 42°C, venivano diluite a $OD_{600}=0.1$, in terreno M17L, preriscaldato a 42°C, quindi, incubate alla stessa temperatura e lasciate crescere fino a $OD_{600}=0.4$. Raggiunto tale valore, ciascuna coltura veniva suddivisa in tre aliquote che venivano centrifugate a 4000 rpm per 10'. I pellet raccolti, venivano risospesi in terreno M17L, preincubato alle temperature di 42, 48 e 20°C, e incubati alle stesse temperature dei terreni di coltura. Le curve di crescita venivano tracciate misurando la densità ottica ogni 30 minuti (fig. 11). Alla temperatura di 42°C non riscontravo nessuna differenza nella velocità di crescita del ceppo *wild-type* e del ceppo mutato; entrambe infatti presentano un tempo di generazione di 30'. Anche a 20°C non riscontravo significative differenze, a 48°C invece, osservavo che il ceppo selvatico continuava la sua normale crescita, mentre quello mutante mostrava una significativa fase di rallentamento della crescita per poi riprendere con la stessa velocità del selvatico.

Queste osservazioni evidenziano che l'assenza del gene *ssrA* influisce negativamente sulla crescita a 48°C.

Figura 11: curva di crescita a 42°C, 48°C e 20°C per il ceppo selvatico (Sfi39) e per il mutante *ssrA* (tm).



3.9. Risposta allo stress ed effetto della fase di crescita e del preadattamento sul mutante Tm4.

La risposta allo stress acido ed osmotico è simile nei due ceppi Sfi39 e Tm4. I due ceppi mostrano una buona tolleranza allo stress osmotico sia in fase esponenziale che stazionaria. In seguito allo stress da acido, si nota una alta mortalità > di 5 unità della

scala logaritmica in tutti due i ceppi. Il preadattamento acido e caldo aumenta la tolleranza allo stress acido solo di 1 unita della scala logaritmica (fig. 12).

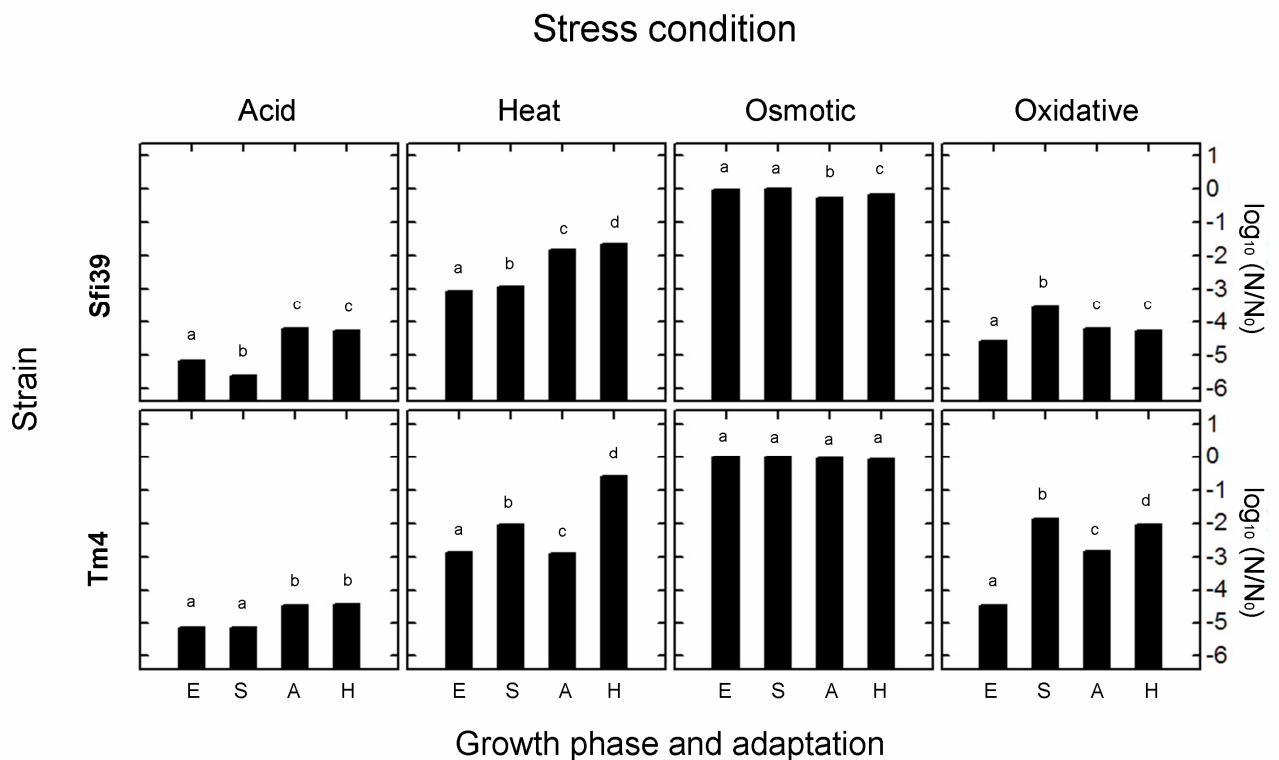
Il numero di cellule sopravvissute della fase stazionaria era generalmente più elevato rispetto a quello delle corrispondenti della fase esponenziale in tutti due i ceppi. Soltanto le cellule in fase stazionaria del ceppo wt erano lievemente più sensibili allo stress acido rispetto alle cellule prese in fase esponenziale.

La risposta allo stress acido e allo stress da caldo era abbastanza variabile. Le cellule del mutante Tm4 erano leggermente più resistenti allo stress da caldo rispetto alle cellule del ceppo wt. I preadattamenti aumentano la sopravvivenza del ceppo wt allo stress da caldo. Il preadattamento però acido (pH 5.0) del ceppo Tm4 non ha influenzato molto la tolleranza allo stress da caldo.

Le cellule della fase stazionaria del mutante Tm4 erano significativamente più tolleranti allo stress ossidativi rispetto at wt ed il numero delle cellule sopravvissute era di 3 unita della scala logaritmica più elevato rispetto alle cellule in fase esponenziale. Allo stesso modo, anche il preadattamento acido e caldo aumentano la tolleranza allo stress ossidativi, ma non quanto la crescita in fase stazionaria.

Figura 12: Risposta agli stress del ceppo wt Sfi39 e del mutante Tm4 in relazione alla fase di crescita (E, esponenziale, S, stazionaria) ed il preadattamento (A, acido, H, caldo).

I risultati sono espressi come $\log_{10} (N/N_0)$ dove N_0 e N sono relativamente il numero di cellule prima e dopo l'esposizione allo stress.



3.10. Resistenza del mutante Tm4 al congelamento.

Accertato che l'assenza del gene *ssrA* influiva negativamente sulla crescita a 48°C, allo scopo di verificarne il coinvolgimento nella resistenza al congelamento dopo *heat* e *cold shock*, eseguiamo un esperimento di congelamento-scongelo, come indicato nei *Materiali e metodi*; cioè cercavo di comprendere se il t/mRNA fosse

coinvolto nel fenomeno della crioprotezione dopo *heat* e *cold shock*. L'esperimento veniva condotto su cellule cresciute a 42°C, su cellule sottoposte ad un *cold shock* alla temperatura di 20° C, per 2 e 4 ore, nonché su cellule sottoposte ad un *heat shock* alla temperatura di 48° C, per 30'.

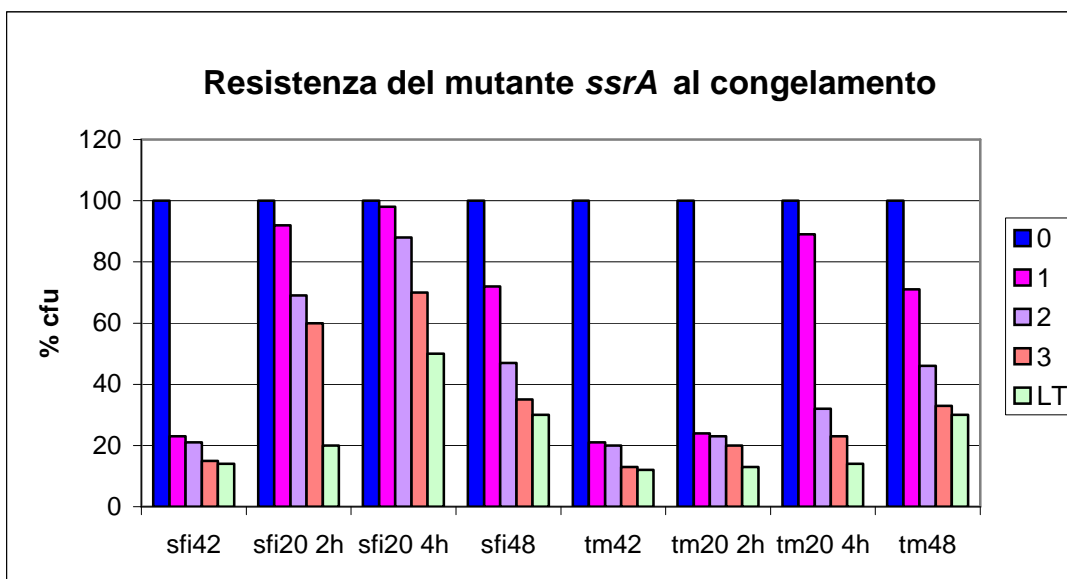
Come mostrato in figura 9, per cellule cresciute a 42° C e non sottoposte ad alcun pretrattamento, osservavo che, rispetto a quelle di controllo, la sopravvivenza al congelamento (espressa in cfu), era piuttosto bassa e decresceva, dopo il 1° giorno, al 21%, dopo il 2° al 20% e dopo il 3° al 13%.

Per cellule sottoposte a *cold shock* alla temperatura di 20° C per due ore, osservavo, per il mutante *ssrA*, che l'incremento della sopravvivenza rispetto a quelle non pretrattate, era quasi nullo (fig. 13) contrariamente a quanto avveniva per il ceppo *wild-type*. Quando il *cold shock* veniva protratto per 4 ore, osservavo, nel mutante, una elevata sopravvivenza dopo il 1° giorno di congelamento (fig. 9), che diminuiva significativamente nei giorni successivi e dopo un mese; tale effetto risultava nettamente inferiore a quello riscontrato nel ceppo *wild-type*, nelle medesime condizioni (fig. 13). Nel mutante *ssrA*, quindi, l'effetto crioprotettivo determinato da un pretrattamento a 20°C, necessita di un maggior tempo di incubazione a tale temperatura per potersi esprimere a livello fenotipico, e soltanto se il congelamento è di breve durata.

Infine, per cellule sottoposte a *heat shock* ad una temperatura di 48°C per 30', osservavo, nel ceppo mutante, una sopravvivenza equivalente a quella del ceppo selvatico (fig. 13).

Queste osservazioni evidenziano che il gene *ssrA* ed il suo prodotto t/mRNA, sono coinvolti nel meccanismo di crioprotezione dipendente da *cold shock*, e che l'effetto registrato sull'efficienza di crescita a 48°C non è correlabile al fenomeno della crioprotezione dipendente da *heat shock*.

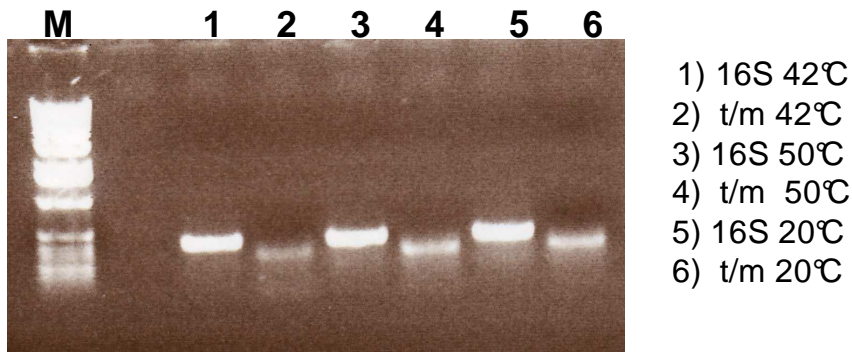
Figura 13: Resistenza al congelamento del ceppo SFi39 di *S. thermophilus* e del mutante *ssrA* dopo crescita a 42°C (sfi42 e tm42), dopo cold shock per due ore (sfi20 2h e tm20 2h), dopo cold shock per 4 ore (sfi20 4h e tm20 4h) e dopo heat shock (sfi48 e tm48). I dati di sopravvivenza venivano misurati prima del congelamento (0), dopo un giorno (1), dopo 2 giorni (2), dopo 3 giorni (3) e dopo un mese (LT).



3.11. Analisi semiquantitativa tramite RT-PCR dell'espressione di *ssrA*

E' già noto dalla letteratura che la quantità relativa di tmRNA aumenta con le elevate temperature in *B. subtilis* (Muto et al., 2000; Shin and Price, 2007), e che in *Streptomyces coelicolor* è importante per la sopravvivenza delle cellule ad elevate temperature (Yang and Glover, 2009). Visto che il mutante Tm4 ha dimostrato di avere delle difficoltà nella crescita ad elevate temperature, abbiamo deciso di verificare se ci sono delle differenze nella quantità relativa di tmRNA presente nella cellule nelle diverse condizioni di stress termico. E' stato estratto l'RNA totale dal ceppo Sfi39 cresciuto a 42°C, 48°C e 20°C ed è stato sintetizzato il cDNA usando i primer specifici per la molecola del tmRNA e del DNA ribosomale 16S considerato gene *house-keeping*. Il programma Multi-Analyst, ci ha permesso di calcolare la quantità relativa di trascritto in base alla fluorescenza relativa di ogni banda presente sul gel d'agarosio (fig 14). La quantità relativa del trascritto 16S è sempre costante per tutte e tre le temperature, invece la quantità relativa del trascritto della molecola di tmRNA aumenta non solo ad elevate temperature (48°C) ma anche a basse temperature (20°C). La quantità relativa di tmRNA è quasi due volte più elevata in condizioni di stress, suggerendo che il sistema del tmRNA è probabilmente richiesto per l'adattamento sia ad elevate che a basse temperature.

Figura 14: RT-PCR semiquantitativa sul ceppo wt Sfi39



	Area mm ²	Mean count	Volume count	Std dev.	Adj.volume count
16S 42°C	7,44	129,24	1660,56	44,06	961,02
16S 50°C	7,25	136,58	1672,24	38,30	990,18
16S 20°C	8,57	529,07	1911,95	44,70	1105,88
t/m 42°C	7,81	23,22	915,84	9,30	181,33
t/m 50°C	7,50	43,84	1034,87	16,06	328,97
t/m 20°C	7,50	45,43	1046,79	16,04	340,88

16S42/t/m42= 961,02/ 181,33= 5,3
 16S50/t/m50= 990,18/328,97 = 3,0
 16S20/t/m20= 1105/340,88 =3,2

t/m20/ t/m42 =340,88/181,33 = 1,88
t/m50/t/m42 =328,97/181,33 = 1,81

La quantità di tmRNA in condizioni di stress termico aumenta di quasi 2 volte

3.12. Analisi del pattern proteico del mutante ssrA.

Dall'analisi degli estratti proteici totali in SDS-PAGE mono-dimensionali, non abbiamo osservato differenze significative in tutte le condizioni sperimentali esaminate. Però visto che abbiamo osservato delle differenze nel fenotipo del mutante TM4 rispetto al ceppo wt Sfi39 ed in più ci sono nelle differenze a livello trascrizionale della molecola del tmRNA a diverse temperature, abbiamo deciso di

effettuare una corsa elettroforetica bidimensionale per vedere se le differenze a livello fenotipico che abbiamo osservato, sono correlate a differenze a livello di espressione proteica del mutante Tm4. Sono state estratte le proteine totali da cellule cresciute a 42°C, 48°C e 20°C come descritto nel paragrafo 2.14, e caricati su di un gel 2D (fig. 15). Nei gel 2D abbiamo osservato alcune differenze tra i due ceppi, soprattutto negli estratti sottoposti ad un cold shock. Gli spot che mostravano le differenze più significative, sono stati identificati tramite il MALDI-TOP-MS (tabella 7).

Nella prima parte della tabella sono indicati spot che erano presenti nell'estratto del ceppo wt a 20°C ed assenti nella stessa area del mutante Tm4 a 20°C. Lo spot n° è una proteina d'interfaccia tra le subunita ribosomali (gene codificante yfiA). Questa proteina è associata alla subunita 30S e 70S ma non alla 50S, ed è stato provato che è localizzata nell'interfaccia e potrebbe influenzare l'associazione delle subunita ribosomali (Agafonov et al., 1999). L'abbondanza di questa proteina nell'estratto del wt a 20°C può essere spiegata dal fatto che alle basse temperature il metabolismo è un po' rallentato e meno subunita ribosomali sono associate.

Gli spot n° 12, 13 e 14 sono tutti rappresentati dalla gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi. E' stato osservato in diversi casi che gli enzimi glicolitici sono indotti in condizioni di stress e in diverse condizioni di crescita. Alcuni esempi sono *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (Prasad et al., 2003) e *Lactobacillus helveticus* (Di Cagno et al., 2006). Un elevato numero di proteine coinvolto nel metabolismo glicolitico è importante per la sopravvivenza in condizioni di stress o incrementando i

livelli di ATP sintetasi (Wilkins et al., 2002) o compensando la bassa capacità glicolitica (Wouters et al, 2000).

Gli spot n° 5 e 6 sono rappresentati dal fattore di elongazione P il quale è noto per stimolare l'attività della peptidiltransferasi ribosomale (Aoki et al., 1997). Anche in questo caso l'abbondanza di questa proteina può essere spiegata dal generale rallentamento del metabolismo a basse temperature. Per lo stesso motivo possiamo giustificare l'abbondanza del fattore di elongazione Tu (spot E) . Il fattore EF-Tu è noto per interagire con proteine denaturate o che non hanno la loro conformazione nativa come fanno i chaperon molecolari che sono coinvolti nel ripiegamento proteico per il *foldings* corretto e la rinaturazione delle proteine in seguito ad uno stress, suggerendo che oltre la sua funzione nella traduzione e l'elongazione può essere implicato anche nella protezione delle proteine da danni causati dallo stress e nel *foldings* corretto (Caldas et al., 1998).

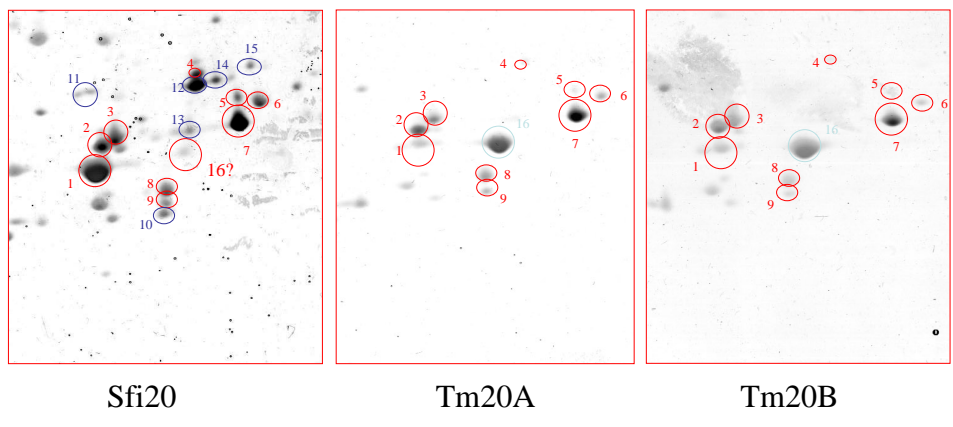
Lo spot A è la proteina putativa enoyl-CoA idratasi implicata nel metabolismo degli acidi grassi. Lo spot L è la proteina GroEL che è uno chaperon molecolare richiesto per il corretto *foldings* di molte proteine. E' stato già studiato per essere indotto in risposta al *cold shock* (Arena et al., 2006; Wouters et al., 1999; Vorderwülbecke et al., 2005).

Lo spot n° 16 invece è abbondante sia nell'estratto del wt che in quello del mutante Tm4. L'unica differenza è che migra in modo diverso nei due gel, infatti nel caso del mutante Tm4 migra in una zona a pH più basso quindi ha un punto isoelettrico

diverso. Si tratta della proteina glicolitica 2,3 bifosfatoglicerato mutasi fosfoglicerato dipendente.

Figura 15: Zoom di zone del gel 2D che mostrano più differenze di estratti sottoposti a cold shock.

Zoom A



- Spots present only on Sfi20
- Spots present on the Sfi 20 and the Tm20 A/B
- Spots present only on the Tm20 A/B

Tabella 7: Spot identificati tramite MALDI-TOP-MS. Nella prima parte sono indicati gli spot più abbondanti nel ceppo wt sottoposto a cold shock e assenti nel mutante tm. Nella seconda parte è indicata la 2,3 bifosfatoglicerato mutasi fosfoglicerato dipendente che migra diversamente nei due ceppi.

Spot	Protein name	Swiss-prot entry
10	Ribosomal subunit interface protein	Q8E1L6
12	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q8VVB9
13	GlnQ	Q9AGR8
14	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q8VVB9
65	Elongation factor P	Q97SE8
A	Putative enoyl-CoA hydratase	Q8DSN0
L	GroEL [Fragment]	Q8KJ08
E	Elongation factor Tu [Fragment]	Q9EZW2

Sfi-Tm (Zoom A)

Spot	Protein name	Swiss-prot entry
Dx	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	Q8VVB5
Sx	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	Q8VVB5

[1] La quantità di materiale è stato il fattore limitante per l'identificazione degli altri spot. I gel non erano altamente riproducibili per cui, in alcuni casi è stato possibile prelevare il campione da un singolo gel. Ad esempio il campione 15 ed alcuni spot presenti nello zoom C erano presenti solo nel master gel in cui erano indicati.

[2] Theoretical Molecular weight: **36026 Da**

[3] Theoretical Molecular weight: **56381 Da**

[4] Shift

3.13. Costruzione del mutante tmH6.

Avendo osservato che la molecola di tmRNA è importante per l'adattamento alle alte e basse temperature anche in *S. thermophilus*, abbiamo deciso di costruire un altro mutante del gene *ssrA* che ci permettesse di identificare quali sono i target di proteolisi della molecola del tmRNA. A tale scopo abbiamo costruito un mutante

della molecola del tmRNA che porta una modificazione in corrispondenza della sequenza segnale. Abbiamo sostituito sei aminoacidi con sei istidine, in questo modo i peptidi marcati non vengono degradati dal sistema proteolitico. Quindi la sequenza target nel mutante con le sei istidine, chiamato tmH6 è AKTHHHHHHA invece di essere AKTNSYAVAA.

Il modo in cui è stato costruito il mutante è descritto nel paragrafo 2.7. In questo mutante sono presenti sia una molecola funzionante di tmRNA che permette così al ceppo una crescita simile a quella del ceppo wt in tutte le condizioni sperimentali, e una molecola portante le sei istidine. In questo modo una parte dei peptidi tronchi o danneggiati è sottoposta alla degradazione normalmente, ma nel caso di stress termico che come abbiamo visto c'è un'induzione di quasi due volte della molecola del tmRNA, una parte dei peptidi tronchi sarà marcata dalla molecola modificata e quindi non verrà degradata permettendoci di rilevarla tramite un western-blotting con un anticorpo diretto contro le sei istidine.

3.14. Rivelazione di peptidi marcati dalla molecola tmH6.

E' noto che il sistema di trans-traduzione viene indotto in condizioni di stress, come alte e basse temperature e mancanza di nutrienti. Però non si sa molto sui peptidi soggetti maggiormente al controllo della molecola di tmRNA tramite la marcatura. Per questo motivo abbiamo deciso di confrontare gli estratti proteici totali del ceppo

wt, del mutante Tm4 nel quale la molecola del tmRNA non è funzionante e del mutante tmH6 che ha una molecola di tmRNA funzionante ed una con la sequenza decapeptidica target modificata in modo tale da marcare i peptidi nascenti danneggiati o tronchi con sei istidine. Le sei istidine ci permettono in un secondo momento tramite un western-blot con un anticorpo diretto contro le 6 istidine di rivelare i peptidi in questione e in seguito identificarli.

Abbiamo confrontato gli estratti sia di cellule cresciute in condizioni normali (42°C) che in condizioni di stress termico (20°C e 50°C) come descritto nel paragrafo 2.18. Dopo l'estrazione proteica, abbiamo proseguito con la purificazione tramite cromatografia d'affinità (paragrafo 2.24) e/o co-immunoprecipitazione (paragrafo 2.25) per aumentare la quantità dei peptidi marcati dalle sei istidine. I risultati mostrati sono riferiti agli estratti purificati per cromatografia, anche se abbiamo ottenuto gli stessi risultati anche con la co-immunoprecipitazione.

Dai gel SDS-PAGE non si notano delle differenze significative nel pattern proteico tra i tre ceppi (dati non mostrati). Effettuando un western-blot con un anticorpo anti-his (anticorpo monoclonale anti-polistidine coniugato alla perossidasi; clone His1; Sigma A7058) soltanto gli estratti del ceppo tmH6 danno dei segnali positivi, mentre non c'è nessun segnale negli estratti del wt e del mutante Tm4 (figura 16).

La banda più alta (± 55KDa) che dà un segnale forte in tutti e gli estratti tmH6, ma più intensi nell'estratto dei 20°C e dei 50°C, per le sue dimensioni ci ha fatto pensare ad un frammento della proteina GroEL, la qual è normalmente presente negli estratti

proteici di *S. thermophilus* in quella altezza. Per questo motivo abbiamo effettuato un western-blot di questi estratti con un anticorpo anti-GroEL (Rabbit anti-GroEL; frazione Igg; Sigma GmbH G6532). Questo esperimento ha confermato la nostra ipotesi. Infatti in corrispondenza dei 55 KDa tutti gli estratti danno un segnale positivo con l'anticorpo anti-GroEL e come ci aspettavamo, la quantità di GroEL in condizioni di stress termico aumenta (fig. 17).

Figura 16: Western-blot sugli estratti proteici purificati per cromatografia d'affinità, con l'anticorpo anti-His

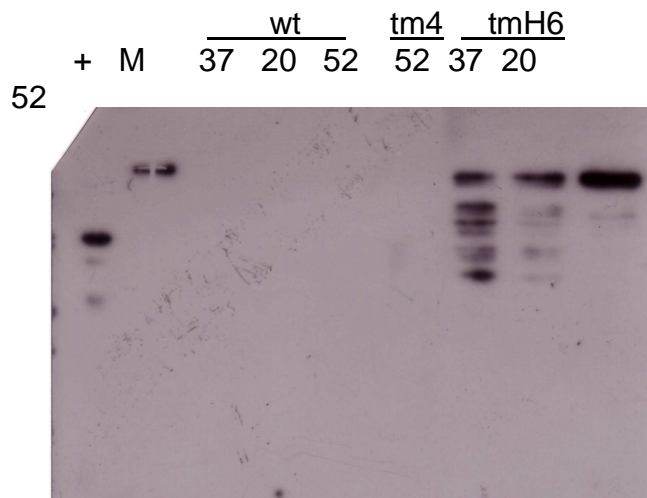
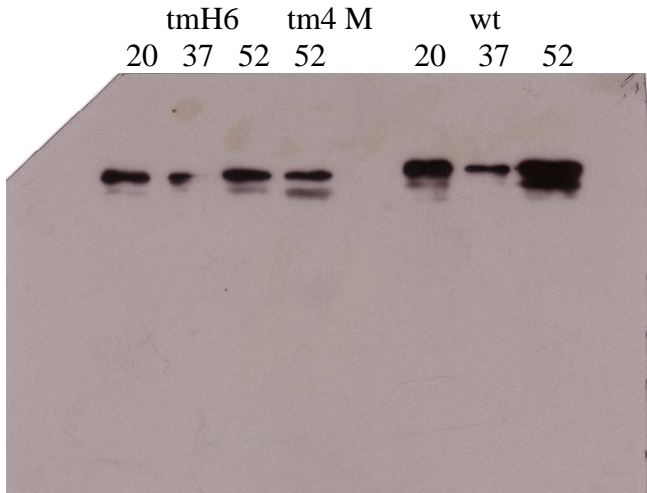


Figura 17: Western-blot sugli estratti proteici purificati per cromatografia d'affinità con l'anticorpo anti-GroEL.



3.15. Discussione.

Il tmRNA fa parte di un importante sistema di controllo qualità che elimina mRNA tronchi e/o danneggiati e ricicla i ribosomi bloccati al 3' terminale di mRNA tronchi. Non è solo universalmente conservato (Gueneau de Novoa , Williams, 2004), ma è anche uno degli RNA più abbondanti nella cellula batterica (Moore, Sauer, 2005; Lee et al., 1978; Keiler et al., 2000) ed è importante per la fisiologia di molte specie.

Nel presente studio, ci siamo concentrati sugli effetti della mutazione del gene *ssrA* in *S. thermophilus* Sfi39. Abbiamo costruito un ceppo mutante nel quale il gene *ssrA* è interrotto quindi non viene sintetizzata la molecola del tmRNA. La molecola del tmRNA è essenziale soltanto in pochi organismi come ad esempio *Neisseria*

gonorrhoeae (Huang et al., 2000; Keiler, 2008). In tutte le altre specie la mutazione causa difetti nella crescita quando il profilo d'espressione cambia, come durante la risposta allo stress, l'espressione della virulenza e lo sviluppo (Keiler, 2008). Le cellule mostrano anche una più lenta ripresa dalla fase stazionaria, sono più sensibili alla carenza di aminoacidi, allo stress da caldo, agli antibiotici che promuovono un *read-through frameshift* e lo stallo (Keiler, 2008). Nel caso di *S. thermophilus* abbiamo osservato che il mutante mostrava un fase lag più prolungata ad elevate temperature e per questo motivo pensiamo che l'assenza del tmRNA influenza in modo negativo la crescita ad elevate temperature. Lo stesso fenomeno si osserva anche in *B. subtilis* (Muto et al., 2000;Shin et al., 2007) ed in *E. coli* (Withey et al., 1999; Moore et al., 2005). Questo dato è stato anche confermato dall'analisi tramite RT-PCR che ci ha permesso di osservare un'induzione dell'espressione di *ssrA* (di quasi 2 volte) in condizioni di stress da caldo e da freddo. Lo stesso abbiamo osservato con un mutante *smpB*. Inoltre il mutante *smpB* aveva le stessi difficoltà nella crescita del mutante *ssrA* ed i livelli di espressione di *smpB* erano maggiori in seguito ad uno stress termico, fenomeno che è stato osservato anche in *B. subtilis* ed *E. coli*. Per quanto riguarda gli altri stress (acido, osmotico, ossidativo) non c'erano differenze significative. I due ceppi *wt* e Tm4 hanno una relativamente bassa tolleranza allo stress acido e mostrano un lieve miglioramento in seguito ad un preadattamento (acido o caldo). I due ceppi hanno una risposta simile anche allo stress osmotico.

Era già noto che un lieve preadattamento al freddo conferisce una certa protezione al congelamento a *S. thermophilus* ed anche un preadattamento al caldo ma in minor misura (Varcamonti et al., 2006). Nel caso del mutante *ssrA* abbiamo osservato che la mutazione aveva un effetto negativo sulla resistenza al congelamento. Il mutante *ssrA* presenta una maggiore resistenza al congelamento solo in seguito ad un preadattamento al freddo di 4 ore a 20°C, mentre il preadattamento al caldo non aveva nessun effetto sulla resistenza al congelamento. Questo comportamento fa pensare che la molecola del tmRNA sia coinvolta nel fenomeno della crioprotezione dipendente dallo shock da freddo e non solo all'adattamento termico.

Dall'analisi dei gel 2DE su estratti proteici del ceppo selvatico e del mutante *ssrA*, abbiamo identificato alcuni spot interessanti che erano over espressi nel ceppo wt (a 20°C) ed uno abbondante in entrambi i ceppi ma che migra in una zona più acida nel ceppo mutante. Due spot sono stati caratterizzati come proteine implicate nel metabolismo energetico (glyceraldeide-3-fosfato deidrogenasi e 2,3 bifosfoglicerato dipendente fosfoglicerato mutasi) ed è noto che in condizioni di stress c'è un cambiamento generale nell'espressione proteica che coinvolge tra l'altro proteine del metabolismo energetico per assicurare la sopravvivenza in condizioni ambientali avverse. Allo stesso modo possiamo spiegare l'abbondanza delle proteine identificate che fanno parte del macchinario della sintesi proteica come fattore di elongazione P, il fattore di elongazione TU e la proteina dell'interfaccia ribosomale. L'over-espressione dell'enoil-CoA idratasi che è implicata nel metabolismo degli acidi

grassi è probabilmente dovuta al fatto che gli acidi grassi sono importanti per l'omeostasi delle membrane cellulari, importanti nel caso del cold shock, perché l'abbassamento della temperatura causa una fluidità minore della membrana plasmatica. Per quanto riguarda l'incremento di GroEL, nel mutante Tm4 e nel mutante tmH6, è una conferma di studi precedenti (Munavar et al., 2005; Vorderwülbecke et al., 2005) nei quali si era osservata un'induzione delle HSP nei mutanti *ssrA*.

4. Riassunto e conclusioni

Streptococcus thermophilus è uno dei batteri lattici più utilizzati nelle industrie alimentari per la produzione di cibi fermentati (yogurt, formaggi, latticini). Si tratta di un batterio lattico, Gram positivo, anaerobio aerotollerante. Ha un metabolismo omofermentativo e produce acido lattico a seguito della fermentazione del lattosio, saccarosio, trealosio e glucosio. Esso cresce in maniera ottimale a 42°C (Salminen e Von Wright, 1993), ma può vivere tra i 20°C e i 50°C (De Roissart e Luquet, 1994). Durante i processi di produzione, i microrganismi utilizzati sono sottoposti a condizioni di stress notevoli e di diversa natura, come ad esempio variazioni di temperatura, livelli di pH e salinità, che possono determinare condizioni fisiologiche molto lontane da quelle ottimali per la crescita. Alcuni batteri sono in grado di resistere meglio di altri a condizioni di stress, grazie all'evoluzione di complessi sistemi che regolano le risposte adattative.

Obiettivi di questo lavoro sono stati l'isolamento di mutanti di *S. thermophilus* in alcuni geni noti dalla letteratura per essere indotti in condizioni di stress di natura acida, termica ed osmotica, e di geni che codificano per prodotti implicati nel processo della trans-traduzione poiché uno dei network più soggetti ad alterazioni in condizioni di stress è l'equilibrio della sintesi proteica e del riciclo degli aminoacidi e dei ribosomi. Sulla base dei risultati del lavoro di Arena et al. (2006), abbiamo selezionato come oggetto di mutagenesi i geni codificanti per: *tsf* (Translation elongation factor Ts), *clpL* (ATP dependent proteinase ATP binding subunit), *clpP* (ATP dependent Clp protease), *clpX* (ATP dependent protease ATP binding subunit),

grpE (Heat shock protein chaperonin), *ctsR* (Class III stress gene repressor HSP), *hrcA* (Heat inducible transcription repressor), *smpB* (ssrA binding protein), *pfkA* (6-Phosphofruktokinase), *tufA* (Elongation factor Tu), *dpr* (Peroxide resistance protein non heme iron-containing ferritin), *gpmA* (Phosphoglucosomutase), *ureC* (Urea amidohidrolase alpha subunit), *divIVA* (cell division initiation protein), *rr01* (Response regulator, omologo di *covR*).

Sulla base della sequenza genomica del ceppo di *S. thermophilus* CNRZ1066, sono state disegnate delle coppie di primers che hanno permesso l'amplificazione di frammenti interni ai geni selezionati. Tali frammenti sono stati clonati all'interno del vettore pGhost9 e trasformati nel ceppo *Sfi39* di *S. thermophilus* mediante elettroporazione. I trasformanti ottenuti sono stati sottoposti al protocollo d'integrazione cromosomica per interrompere i geni bersaglio. In questo modo sono stati ottenuti 8 ceppi mutanti, ed un ceppo mutante del gene *clpL* duplicato in tandem. I ceppi ottenuti sono: *ureC*, *divIVA*, *ctsR*, *rr01*, *hrcA*, *dpr*, *clpL*, *smpB* e *clpL-tandem*. L'integrazione sito specifica è stata verificata tramite PCR, usando degli oligonucleotidi complementari a monte ed a valle del gene d'interesse. In questo modo si amplifica tutta la regione implicata nel crossing-over. I mutanti degli altri geni non sono stati ottenuti, perché tali mutazioni erano probabilmente letali.

Sono stati condotti diversi esperimenti sui mutanti ottenuti per studiarne il fenotipo in diverse condizioni ambientali ed i cambiamenti nel profilo proteico usando cellule della fase esponenziale, stazionaria e cellule preadattate allo stress termico o allo

stress acido. I dati più significativi riguardano i ceppi mutanti *hrcA*, *ctsR* ed *rr01*. Abbiamo notato che l'inattivazione dei geni *ctsR*, *hrcA* ed *rr01*, influenza molto la capacità di *S. thermophilus* Sfi39 di crescere nei terreni da laboratorio e nel latte. Le cellule del ceppo *wt* Sfi39 prese in fase esponenziale erano molto sensibili sia allo stress da acido che allo stress ossidativo, ma erano più tolleranti allo stress termico ed osmotico. Il preadattamento acido o termico migliora la tolleranza allo stress termico ed acido, mentre allo stress ossidativo non migliora di molto. Per quanto riguarda i mutanti, il preadattamento in alcuni casi peggiora la tolleranza invece che migliorarla. L'inattivazione di *rr01* aumenta la tolleranza allo stress ossidativo ma riduce quella allo stress osmotico e termico, tale comportamento è stato osservato anche in altri ceppi di *S. thermophilus*. Nel caso del mutante *hrcA* sembra esserci una sensibilità maggiore allo stress acido, cosa che è stata osservata anche nel mutante $\Delta hrcA$ di *S. mutans* (Lemos et al., 2001). In quel caso hanno attribuito questa sensibilità ai livelli ridotti d'espressione di DnaK ed alla più bassa attività delle ATPases. Nel caso di *S. mutans* questa sensibilità si osserva anche allo stress ossidativo e termico, cosa che non si verifica in *S. thermophilus*.

Dall'analisi degli SDS-PAGE e di 2DE sono stati confermati molti dei dati messi in evidenza dall'analisi di Arena et al. (2006). Molte bande dei gel SDS-PAGE mostrano una variazione dipendente alla fase di crescita, il preadattamento o la mutazione. Tra queste ci sono la ClpC (b1) (Clp-ATPase) la ClpL (b2), la ClpX (b7), le chaperonine DnaK (b4), la GrpE (b10) e GroES (b13), proteine della risposta

generale allo stress come la Prot 24 (b11), proteine per l'inizio della divisione cellulare come la DivIVA (b8), la glutadione riduttasi Gor (b7), il trasportatore ABC di prolina/glicina betaina ProWX (b9) ed una proteina putativa dello shock acido (b12). Inoltre è stato osservato un cambiamento dell' intensità delle bande con PM di 60,7 (b5) e 70,9 KDa (b3) che sono compatibili con Hsp60 e Hsp70 rispettivamente. Sono state trovate anche proteine coinvolte nella risposta allo stress, ma sono state scartate dall'analisi perché avevano un coefficiente di variazione basso. Questa sono GroEL, DnaJ ed HslO. In Sfi39 abbiamo notato che c'è un aumento significativo di DnaK, GroEL e ClpL anche in seguito ad uno stress acido. Nel mutante *ctsR* c'è un aumento significativo di ClpL rispetto al ceppo *wt* in tutte le condizioni sperimentali, dovuta all'inattivazione di *ctsR* che codifica per un repressore dei geni *clp*. Sia lo stress acido che caldo aumentano ulteriormente i livelli di ClpL dimostrando che la repressione da *ctsR* non è l'unico fattore che influenza l'espressione di *clpL*. Si osserva anche un aumento di DnaK e di GroEL. I pattern proteici del mutante *hrcA* sono coerenti con il ruolo di HrcA come repressore di operoni *hrcA* e *groES*. L'inattivazione di *hrcA* riduce notevolmente ma non abolisce l'espressione di *dnaK* ed aumenta l'espressione di *groEL* portando ad un incremento del rapporto GroEL/DnaK. La crescita in fase stazionaria ed i preadattamenti aumentano ulteriormente la quantità di GroEL, indicando che la repressione da HrcA può non essere l'unico fattore che controlla l'espressione di *groEL- groES*. Gli SDS-PAGE del mutante *rrO1* erano molto simili a quelli del *wt* in tutte le condizioni, con

l'eccezione della banda b10 (GrpE) la quale era sempre assente nel mutante. L'incremento nella sintesi delle chaperonine evidente nei gel 2DE dopo un preadattamento non è accompagnato da una maggior tolleranza allo stress, indicando che altri fattori possono essere coinvolti. Un'analisi più dettagliata di proteomica e trascrittomica potrebbe chiarire il ruolo di questi regolatori in *S. thermophilus*.

Un'altra molecola che svolge un ruolo importante per la risposta adattativa agli stress è il tmRNA che grazie al processo della trans-traduzione assicura la degradazione dei peptidi tronchi o danneggiati ed il riciclo degli aminoacidi, processi fondamentali per la sopravvivenza cellulare. Conoscendo da studi precedenti che il preadattamento al freddo ed al caldo conferiscono una maggiore crioprotezione a *S. thermophilus* e che la molecola del tmRNA è importante per la crescita in condizioni di stress termico (Muto et al., 2000) abbiamo deciso di studiare il fenotipo ed il profilo proteico del mutante *ssrA* e costruire un mutante con la sequenza codificante per il nucleotide target modificata per riuscire ad identificare i peptidi marcati dal tmRNA.

Dalle curve di crescita, si osserva che il mutante mostrava un fase lag più prolungata ad elevate temperature e per questo motivo pensiamo che l'assenza del tmRNA influenza in modo negativo la crescita ad elevate temperature. Per quanto riguarda gli stress (acido, osmotico, ossidativo) non c'erano differenze significative. Tutte e due i ceppi *wt* e Tm4 hanno una relativamente bassa tolleranza allo stress acido e mostrano un lieve miglioramento in seguito ad un preadattamento (acido o caldo). I due ceppi hanno una risposta simile anche allo stress osmotico. Nel caso del

congelamento, la mutazione aveva un effetto negativo sulla resistenza al congelamento. Il mutante *ssrA* aveva una maggiore resistenza al congelamento solo in seguito ad un preadattamento al freddo di 4 ore a 20°C, mentre il preadattamento al caldo non aveva nessun effetto sulla resistenza al congelamento. Questo comportamento fa pensare che la molecola del tmRNA è coinvolta nel fenomeno della crioprotezione dipendente dallo shock da freddo e non solo all'adattamento termico. Per quanto riguarda il pattern proteico, nel caso degli SDS-PAGE i pattern sono molto simili. Nei gel 2DE, a causa di una piccola quantità di estratto l'analisi è un po' limitata. Sono stati identificati alcuni spot significativi, i quali erano over espressi nel ceppo wt (a 20°C) ed uno abbondante in tutte e due i ceppi ma che migra in una zona più acida nel ceppo mutante. Due degli spot sono proteine implicate nel metabolismo energetico (glyceraldeide-3-phosphato deidrogenasi e 2,3 biphosphoglicerato dipendente phosphoglicerato mutasi). La loro abbondanza può essere spiegata dal fatto che in condizioni di stress c'è un cambiamento generale nell'espressione proteica che coinvolge tra l'altro proteine del metabolismo energetico per assicurare la sopravvivenza in condizioni ambientali avverse. Allo stesso modo possiamo spiegare l'abbondanza delle proteine identificate che fanno parte del macchinario della sintesi proteica come fattore di elongazione P, il fattore di elongazione TU e la proteina dell'interfaccia ribosomale. L'over-espressione dell'enoil-CoA idratasi che è implicata nel metabolismo degli acidi grassi è probabilmente dovuta al fatto che gli acidi grassi sono importanti per l'omeostasi

delle membrane cellulari, importanti nel caso del cold shock, perché l'abbassamento della temperatura causa una fluidità minore della membrana plasmatica. Per quanto riguarda l'abbondanza di GroEL nel mutante Tm4 e nel mutante tmH6, è una conferma di altri studi (Munavar et al., 2005; Vorderwülbecke et al., 2005) nei quali è stata osservata un'induzione delle HSP nei mutanti *ssrA*.

I risultati ottenuti e presentati in questa tesi rappresentano uno studio ampio e dettagliato sull'effetto di mutazioni in geni importanti per la resistenza e l'adattamento a condizioni ambientali sfavorevoli per il batterio lattico *S. thermophilus*. La comprensione del fenomeno dell'adattamento agli stress ambientali e l'identificazione di molecole coinvolte in tale adattamento potranno essere applicate al miglioramento genetico di ceppi di *S. thermophilus* utilizzati nel campo delle fermentazioni alimentari.

5.Bibliografia

Agafonov DE, Kolb VA, Nazimov IV, Spirin AS. (1999). A protein residing at the subunit interface of the bacterial ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 26;96(22):12345-9.

Aoki H, Dekany K, Adams SL, Ganoza MC.(1997). The gene encoding the elongation factor P protein is essential for viability and is required for protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 272(51):32254-9.

Arena S, D'Ambrosio C, Renzone G, Rullo R, Ledda L, Vitale F, Maglione G, Varcamonti M, Ferrara L, Scaloni A. (2006). A study of *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *Proteomics.* 6(1):181-92.

Atkins JF, Gesteland RF. (1996). A case for trans translation. *Nature.* 379(6568):769-71

Bae W, Xia B, Inouye M, Severinov K. (2000). *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(14):7784-9.

Biswas S, Biswas I. (2006). Regulation of glucosyltransferase (gtfBC) operon by CovR in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 188(3):988-98.

Bodana AR, Rao DR.(1990). Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J Dairy Sci.*73(12):3379-84.

Bukau B. and Horwich A.L. (1998). The Hsp60 and Hsp70 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366

Caldas TD, El Yaagoubi A, Richarme G.(1998). Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *J. Biol. Chem.* 273(19):11478-82.

Castaldo C, Siciliano RA, Muscariello L, Marasco R, Sacco M.(2006). CcpA affects expression of the *groESL* and *dnaK* operons in *Lactobacillus plantarum*. *Microb Cell Fact.* 27;5:35.

Chassy, B.M. and C.M. Murpy. (1993). P. 65-82. *Lactococcus* and *Lactobacillus*, p. 65-82. In A.L. Sonenshein, J.A. Hoch and R. Losick (Eds.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society of Microbiology, Washington D.C.

Chastanet A., Prudhomme M., Claverys J.P., Msadek T. (2001). Regulation of *Streptococcus pneumoniae clp* gene and their role in competence development and stress survival. *J. Bacteriol.* 183:7295-307.

Chastanet A. and Msadek T. (2003). ClpP of *Streptococcus salivarius* is a Novel Member of the Dually Regulated Class of Stress Response Genes in Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* 185(2): 683-7.

Chauhan A.K. and Apirion D. (1989). The gene for a small stable RNA (10Sa RNA) of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 3:1481-5.

Churchward G. The two faces of Janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A streptococci. *Mol Microbiol.* 2007 Apr;64(1):34-41. Review.

Cossin, A.R. (1994). In Cossin AR (ed) Temperature adaptation of biological membranes. Portland, London, 63

Courtin P., Monnet V., Rul F. (2002). Cell-wall proteinases PstS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus* /*Lactobacillus Bulgaricus* mixed cultures in milk. Microbiol. 148 (Pt 11):3413-21.

Dalton TL, Collins JT, Barnett TC, Scott JR.(2006). RscA, a member of MDR1 family of transporters, is repressed by CovR and required for growth of *Streptococcus pyogenes* under heat stress. J Bacteriol.188(1):77-85.

Dalton TL, Scott JR. (2004). CovS inactivates CovR and is required for growth under condition of general stress in *Streptococcus pyogenes*. J Bacteriol.186(12):3928-37.

de la Cruz J, Vioque A. (2001). Increase sensitivity to protein synthesis inhibitors in cells lacking tmRNA. RNA.7(12):1708-16.

Derré I, Rapoport G, Devine K, Rose M, Msadek T.(1999). ClpE, a novel type of HSP100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis*.Mol Microbiol.32(3):581-93.

Derré I, Rapoport G, Msadek T.(1999). CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria.Mol Microbiol.31(1):117-31.

De Roissard H., and Luquet F.M. (1994). Bacterias Lactiques. Lorica : Uriage

- De Vos W. M., and Gasson M.J.** (1989) Structure and expression of the *Lactococcus lactis* gene for phospho-beta-galactosidase (lacG) in *Escherichia coli* and *L. lactis*. J. Gen. Microbiol. 135(Pt7): 1833-46
- Di Cagno R, De Angelis M, Limitone A, Fox PF, Gobbetti M.** (2006). Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures. Appl Environ Microbiol. 72(7):4503-14.
- Faure G.C., Morisset M., Gobert B., Guerin C., Pedone C :, Bouley C., Bene M.C.** (2001). Specific IgA to lactic acid bacteria in feces of children consuming milk fermented by yogurt symbiosis and *Lactobacillus Casei*. (Danone strain DN 114001) Adv.Exp.Med.Biol. 501:385-9.
- Fayet O., Ziegelhoffer T., Georgopoulos C.** (1989). The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *E. coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. J. Bacteriol. 171(3):1379-85.
- Federle MJ, McIver KS, Scott JR.** (1999). A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A streptococcus. J Bacteriol. 181(12):3649-57.
- Flynn J.M., Levchenko I., Seidel M., Wickner S.H., Sauer R.T. Baker T.A.** (2001). Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis. Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 98(19):10584-9.

- Giliberti G, Naclerio G, Martirani L, Ricca E, De Felice M.**(2002). Alteration of cell morphology and viability in a *recA* mutant of *Streptococcus thermophilus* upon induction of heat shock and nutrient starvation. *Gene*. Jul 295(1):1-6.
- Godon J. J., Delorme C., Bardowski J. Chopin M., Ehrlich S.D., Renault P.** (1993). Gene inactivation in *Lactococcus lactis*: Branched-chain amino acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175: 4383-90.
- Goldstein J., Murano S., Shmookler Reis R.J.** (1990). Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87(1):283-7.
- Gottesman S. and Maurizi M.R.** (1992). Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.* 56:592-621.
- Gottesman S. Roche E., Zhou Y., Sauer H.T.** (1998). The ClpXP and ClpAP protease degrade protein with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* 12:1338-47.
- Gounot A.M.** (1991). Bacterial life at low temperatures: physiological aspects and biotechnological implications, *J. Apple Bacteriol.* 71(5): 386-97.
- Grandvalet C, Coucheney F, Beltramo C, Guzzo J.**(2005). CtsR is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. *J. Bacteriol.* 187(16):5614-23.
- Graumann P., Wendrich T.M., Weber M.H., Schroder K., Marahiel M.A.** (1997). A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular

growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol. Microbio.* 25(4):741-56.

Gueneau de Novoa P., Williams KP. (2004). The tmRNA website : reductive evolution of tmRNA in plastids and other endosymbionts. *Nucleic Acid Res.* 1;32 (Database issue): D104-8

Hayes C.S., Bose B., Sauer R.T. (2002). Proline residues at the C terminus of nascent chains induce SsrA tagging during translation termination. *J. Biol. Chem.* 277: 33825-32.

Hendrich J.P. and Hartl F.U. (1993). Molecular chaperones function of heat shock proteins *Ann.Rev.Biochem.* 62:349-84.

Herman C., Thevenet D., Bouloc P., Walker GC. D'Ari R. (1998). Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes Dev:* 12(9):1348-55.

Hightower LE. (1991). Heat shock, stress proteins chaperones and proteotoxicity. *Cell.* 66(2):191-7.

Hirayama K: and Rafter J. (1999). The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention: mechanistic consideration. *A. Van Leeuwenhoek.* 76(1-4): 391-4.

Holt J.G. (1986). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, vol. I e II, Buchanan and Gibbons (Eds.), William and Wiking Pubbl., Baltimore.

- Hüfner E, Markieton T, Chaillou S, Crutz-Le Coq AM, Zagorec M, Hertel C.(2007).** Identification of *Lactobacillus sakei* genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(8):2522-31
- Jiang W., Hou Y., Inouye M. (1997).** CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli* is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* 272: 196-202.
- Jiang WZ, Kitamura Y, Li B.(2005).** Improving acidogenic performance in anaerobic degradation of solid organic waste using a rotational drum fermentation system *Bioresour Technol.*96(14):1537-43.
- Julio S., Heithoff D.M., Mahan M.J. (2000).** *ssrA* (tmRNA) plays a role in *Salmonella enterica serovar Typhimurium* pathogenesis. *J. Bacteriol.* 182(6):15558-63.
- Kajfasz JK, Martinez AR, Rivera-Ramos I, Abranches J, Koo H, Quivey RG Jr, Lemos JA. (2009).** Role of Clp proteins in expression of virulence properties of *Streptococcus mutans* *J Bacteriol.*191(7):2060-8.
- Kaklij G.S. and Kelkar S.M. (1996).** Tumor-specific translocation resistance in mice after treatment of initial tumor with *Streptococcus thermophilus*. *Microbiol. Immunol.* 40(1): 55-8.
- Keiler KC. (2008).** Biology of trans-translation.*Annu Rev Microbiol.* 62:133-51. Review.

Keiler K.C., Waller P.R., Sauer R.T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesis from damaged messenger RNA. *Science* 271(5251):955-6.

Laport MS, Lemos JA, Bastos Md Mdo C, Burne RA, Giambiagi-De Marval M.(2004). Transcriptional analysis of the groE and dnaK operones of *Enterococcus faecalis*. *Res. Microbiol.* 155(4):252-8.

Lee S:Y., Bailey S.C., Apirion D. (1978). Small stable RNAs from *Escherichia coli*: evidence for the existence of new molecules and for a new ribonucleoprotein particle containing 6S RNA. *J. Bacteriol.* 133(2):1015-23.

Leenhouts K.J.F. and Venema G. Lactococcal plasmid vector. In *Plasmids. A practical approach 2/e*, edited by K. G. Hardy 1993, Oxford University Press, New York, p 65-94.

Lemoine J., Chirat F., Wieruszeski J.M., Streecker G., Favre N., Neeser J.R. (1997). Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Sfi39 and Sfi12. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(9):3512-18.

Lemos JA, Chen YY, Burne RA. (2001). Genetic and physiologic analysis of the groE operon and role of the HrcA repressor in stress gene regulation and acid tolerance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.*183(20):6074-84.

Levchenko I., Seidel M., Sauer R.T., Baker T.A. (2000). A specific-enhancing factor for the ClpXP degradation machine. *Science* 289(5488):2354-6.

- Luidalepp H, Hallier M, Felden B, Tenson T.**(2005). tmRNA decreases the bactericidal activity of aminoglycosides and the susceptibility to inhibitors of cell wall synthesis. *RNA Biol.*2(2):70-4.
- Martirani L., Raniello R., Naclerio G., Ricca E., De Felice M.** (2001). Identification of the DNA-binding protein, HrcA, of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 198(2):177-82.
- Mercenier A.** (1990). Molecular genetics of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 87:61-78.
- Moore SD, Sauer RT.**(2005). Ribosome rescue: tmRNA tagging activity and capacity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*58(2):456-66.
- Munavar H., Zhou Y., Gottesman S.** (2005). Analysis of the *Escherichia coli* Alp phenotype: heat shock induction in *ssrA* mutants. *J. Bacteriol.* 187(14):4739-51.
- Muto A., Fujihara A., Ito K.I., Matsuno J., Ushida C., Himeno H.** (2000). Requirement of transmessenger RNA for the growth of *Bacillus subtilis* under stresses. *Genes Cells* 5(8):627-35.
- Narberhaus F.**(1999). Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol Microbiol.*31(1):1-8. Review.
- Novick R.P., Ross H.F., Projan S.J., Kornblum J., Kreiswirth B., Moghazeh S.** (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factor is controlled by a regulatory RNA molecule *EMBO J.* 12: 3967-75.

- Oh B.K., and Apirion D.** (1991). 10S RNA, a small stable RNA of *Escherichia coli*, is functional. *Mol. Gen. Genet.* 229(1):52-6.
- Oh B.K., Chauhan A.K.m Isolo K., Apirion D.** (1990). Location of a gene (*ssrA*) for a small, stable RNA of *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* 172(8):4708-9.
- Oommen B.S., McMahon D.J., Oberg C.J., Broadbent J.R., Strickland M.** (2002). Proteolytic specificity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* influences functional properties of mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 85(11):2750-8.
- Prasad J, McJarrow P, Gopal P.**(2003). Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl Environ Microbiol.*69(2):917-25.
- Pritchard G. and Coolbear T.** (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12(1-3):179-206.
- Qoronleh M. W., Bortner C.A., Schwatzberg P., Wilkinson B.J.** (1998). Enhanced levels of *Staphylococcus aureus* stress protein GroEL and DnaK homologs early in infection of human epithelial cells. *Infect Immun.* 66(6): 3024-7.
- Roussel Y., Pebay M., Guedon G., Simonet J.M., Decaris B.** (1994). Physical and genetic map of *Streptococcus thermophilus* A054. *J. Bacteriol.* 176(24):7413-22.
- Rudinger-Thirion J., Giege J.R. Felden B.** (1999). Aminoacylated tmRNA from *Escherichia coli* interacts with prokaryotic elongation factor Tu. *Rna* 5(8):989-92.
- Salminen S., and Von Wright A.** (1993). Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker. 1-95.

Salzano AM, Arena S, Renzone G, D'Ambrosio C, Rullo R, Bruschi M, Ledda L, Maglione G, Candiano G, Ferrara L, Scaloni A.(2007).A widespread picture of the *Streptococcus thermophilus* proteome by cell lysate fractionation and gel-based/gel-free approaches.*Proteomics*.7(9):1420-33.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schumann W. (2000). Function and regulation of temperature-inducible bacterial proteins on the cellular metabolism. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Vol. 67:1-33.

Shin JH., Price CW. (2007). The SsrA-SmpB system is important for growth of *Bacillus subtilis* at low and high temperatures. *J. Bacteriol.* 189(10):3729-37.

Spiers A., Lamb H.K., Coklin S., Weelers K.A., Budworth J., Dodds A.L., Pallen M.J., Maskell D.J., Charles I.G., Hawkins A.R. (2002). PDZ domains facilitate binding of high temperature requirement protease A (HtrA) and tail-specific protease (Tps) to heterologous substrates through recognition of the small stable RNA A (*ssrA*) encoded peptide. *J. Biol. Chem.* 277(42):39443-9.

Stepanov V.G. and Nyborg J. (2003). tmRNA from *Thermus thermophilus*. Interaction with alanyl-tRNA synthetase and elongation factor Tu. *Eur. J. Biochem.* 270(3): 463-75.

Sunohara T., Abo T., Inada T., Aiba H. (2002). The C-terminal amino acid sequence of nascent peptides is a major determinant of SsrA tagging at all three stop codons. *Rna*. 8(11):1416-27.

Tadaki T., Fukushima M., Ushida C., Himero H., Muto A. (1996). Interaction of 10Sa RNA with ribosomes in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 399(3):223-6.

Thibessard A, Fernandez A, Gintz B, Leblond-Bourget N, Decaris B.(2001). Hydrogen peroxide effects on *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 cell viability. *Res Microbiol*.152(6):593-6.

Thibessard A, Fernandez A, Gintz B, Leblond-Bourget N, Decaris B.(2002). Effects of rodA and pbp2b disruption on cell morphology and oxidative stress response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *J Bacteriol*. 2002 May;184(10):2821-6.

Thibessard A, Borges F, Fernandez A, Gintz B, Decaris B, Leblond-Bourget N.(2004). Identification of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 genes involved in defense against superoxide stress. *Appl Environ Microbiol*.70(4):2220-9.

Thieringer H.A., Jones P.G., Inouye M. (1998). Cold shock and adaptation. *Bioessays*. 20(1):49-57.

Tu G.F., Reid G.E., Zhang J.G., Moritz R.L., Simpson R.J. (1995). C-terminal extension of truncated recombinant proteins in *Escherichia coli* with a 10Sa RNA decapeptide. *J. Biol. Chem*. 270:9322-6.

Turgeon N. and Moineau S. (2001). Isolation and characterization of a *Streptococcus thermophilus* plasmid closely related to the pMV158 family. *Plasmid*. 45(3):171-83.

Ushida C., Himero H., Watanabe T., Muto A. (1994). tRNA-like structures in 10Sa RNAs of *Mycolpasma capricolum* and *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acid Res.* 22(16):3392-6.

Varcamonti M., Graziano M.R., Pezzopane R., Naclerio G., Arsenijevic S. and De Felice M. (2003). Impaired temperature stress response of a *Streptococcus thermophilus deoD* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1287-89.

Varcamonti M, Arsenijevic S, Martirani L, Fusco D, Naclerio G, De Felice M.(2006). Expression of the heat shock gene *clpL* of *Streptococcus thermophilus* is induced by both heat and cold shock. *Microb Cell Fact.* 15;5:6.

Varmanen P, Ingmer H, Vogensen FK.(2000). *ctsR* of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of *clp* gene expression. *Microbiology*.146 (Pt 6):1447-55.

Van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich SD., Maguin E., Atonie Van Leeuwenhoek. (2002). Stress in lactis acid bacteria. 82(1-4):187-216. Review.

Vorderwülbecke S, Kramer G, Merz F, Kurz TA, Rauch T, Zachmann-Brand B, Bukau B, Deuerling E. (2005). Low temperature of GroEL/ES overproduction permits growth of *Escherichia coli* cells lacking trigger factor DnaK.

*FEBS Lett.*579(15):181-7.

Walker D.C., Girgis H.S., Klaenhammer T.R. (1999). The *groESL* chaperone operon of *Lactobacillus johnsonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: (7): 3033-41.

Wilkins JC, Homer KA, Beighton D.(2002). Analysis of Streptococcus mutans proteins modulated by culture under acidic conditions. *Appl Environ Microbiol.*68(5):2382-90.

Williams K.P. (2002). The tmRNA website: invasion by an intron. *Nucleic Acids Res.* 30(1):179-82.

Willmsky G., Bang H., Fischer G., Marahiel M.A. (1992). Characterization of *cspB*, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *J. Bacteriol.* 174(20):6326-35.

Withey J., Friedman D. (1999). Analysis of the role of trans-translation in the requirement of tmRNA for lambdaimm P22 growth in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 181(7):2148-57.

Woodbury R., Haldenwang WG. (2003). HrcA is a negative regulator of dnaK and groESL operons of Streptococcus pyogenes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21;302(4):722-7.

Wouters J.A., Sanders J.W., Kok J., de Vos W.M., Kuipers O.P., Abee T. (1998). Clustered organization and transcriptional analysis of a family of five *csp* genes of *Lactococcus Lactis* MG1363. *Microbiology.* 144(Pt10):2885-93.

Wouters J.A., Rombouts F.M., de Vos W.M., Kuipers O.P., Abee T. (1999). Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10): 4436-42.

Wouters J.A., Frenkiel H., de Vos W.M., Kuipers O.P., Abee T. (2001). Cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 are involved in cryoprotection and in the production of cold-induced proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(11):5171-8.

Yamanaka K., Fang L., Inouye M. (1998). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Microbiol.* 27: 247-55.

Yang C, Glover JR.(2009). The SmpB-tmRNA tagging system plays important roles in *Streptomyces coelicolor* growth and development. *PLoS One.*4(2):e4459.

Yura T., Nagai H., Mori H. (1993). Regulation of the heat shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:321-50.

Zomer AL, Buist G, Larsen R, Kok J, Kuipers OP.(2007). Time-resolved determination of the CcpA regulon of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol.*189(4):1366-81.

Zotta T, Ricciardi A, Ciocia F, Rossano R, Parente E.(2008). Diversity of stress responses in dairy thermophilic streptococci. *Int J Food Microbiol.* 2008 May 10;124(1):34-42.

Zotta T, Asterinou K, Rossano R, Ricciardi A, Varcamonti M, Parente E.(2009). Effect of inactivation of stress response regulators on the growth and survival of *Streptococcus thermophilus* Sfi39. *Int J Food Microbiol.*28;129(3):211-20.

Zuber U. and Schumann W. (1994). CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon Dank of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 176(5):1359-63.