

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA CELLULARE,  
MOLECOLARE E INDUSTRIALE  
XXII CICLO  
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche  
Settore scientifico disciplinare di afferenza: CHIM/11**

**CROSS-TALK TRA *BIFIDOBACTERIUM* E INTESTINO  
UMANO: IMPATTO SULLE ATTIVITA' HEALTH  
PROMOTING**

**Presentata da:  
Dott. Samuele Ciro Federico Dipalo**

**Coordinatore:  
Chiar.mo Prof.  
Alejandro Hochkoeppler**

**Relatore:  
Chiar.mo Prof.  
Patrizia Brigidi**

**Esame finale anno 2010**



## *INDICE*

ABSTRACT	pag ....A
1. INTRODUZIONE	
1.1. Microbiota intestinale	pag ....2
1.1.1. Composizione: Batteri, archea, eucarioti, virus	
1.1.2. Localizzazioni	pag ....6
1.1.3. Ageing	pag ....8
1.1.4. Forze ecologiche ed evolutive che modellano la diversità microbica	pag ...10
1.1.5. Principali contributi funzionali	pag ...12
1.1.5.1. Attività metaboliche	
1.1.5.2. Funzioni trofiche	
1.1.5.3. Funzione protettiva	
1.2. Phylum Actinobacteria	pag ...17
1.2.1. Caratteristiche generali	
1.2.2. Tassonomia	
1.3. Il genere <i>Bifidobacterium</i>	pag ...19
1.3.1. Storia e tassonomia	
1.3.2. Caratteristiche generali	pag ...21
1.3.3. Morfologia	pag ...22
1.3.4. Fisiologia	pag ...23
1.3.5. Habitat	
1.3.6. Nutrizione, metabolismo e capacità biosintetiche	pag ...24
1.3.7. Strutture extracellulari ed interazione con l'ospite	pag ...28
1.3.8. Produzione batteriocine	pag ...29
1.3.9. Risposta a stress	
1.4. I probiotici	pag ...31
1.4.1. Definizione e caratteristiche generali	
1.4.2. Prerequisiti e criteri di selezione	pag ...33
1.4.2.1. Sicurezza	
1.4.2.2. Tolleranza a pH, osmolarità e Sali biliari	
1.4.2.3. Adesione alla mucosa intestinale	
1.4.2.4. Attività antimicrobica	
1.4.2.5. Interazione con il sistema immune dell'ospite	
1.4.2.6. Attività anti-infiammatoria	
1.5. Effetti nutritivi e terapeutici	pag ...42
1.5.2. Miglioramento della tolleranza al lattosio	
1.5.3. Riduzione del contenuto plasmatico di colesterolo	
1.5.4. Sintesi di vitamine	
1.5.5. Sintesi di amminoacidi	
1.5.6. Inibizione della riduzione del nitrato	
1.5.7. Effetti su assorbimento minerale, contenuto minerale osseo e struttura ossea	
2. SCOPO DELLA TESI	
2.1. Scopo	pag ...46
3. CAPITOLO I	
3.1. Introduzione	pag ...48
3.1.1. Il ruolo biologico dell'ossalato	
3.1.2. L'ossalato nell'organismo umano	
3.1.2.1. Fisiologia	
3.1.2.2. Patologia	

3.1.3. L'ossalato nell'ambiente	pag ...50
3.1.4. L'ossalato ed i microrganismi	
3.1.5. Microrganismi aerobi che degradano l'ossalato	pag ...51
3.1.6. Microrganismi anaerobi che degradano l'ossalato	pag ...52
3.1.7. Il ruolo di <i>Oxalobacter formigenes</i>	pag ...53
3.1.8. Il metabolismo dell'ossalato	pag ...54
3.1.9. Probiotici e metabolismo dell'ossalato	pag ...56
3.2. Materiali e metodi	pag ...58
3.2.1. Ceppi batterici e terreno colturale	
3.2.2. Analisi di ossalato e saccarosio con elettroforesi capillare	
3.2.3. Analisi del gene <i>oxc</i> in <i>Bifidobacterium</i>	pag ...59
3.2.4. Costruzione e screening di una libreria genomica di <i>B. lactis</i> B107 per il gene <i>oxc</i>	
3.2.5. Sequenziamento e analisi dei frammenti di DNA genomico contenenti il gene <i>oxc</i>	
3.2.6. Esperimenti di fermentazioni	pag ...60
3.2.7. Estrazione di RNA e sintesi di cDNA	pag ...61
3.2.8. PCR Real-Time	pag ...62
3.2.9. Analisi dei livelli trascrizionali relativi dei geni <i>oxc</i> , <i>orf-1</i> e <i>orf-4</i>	
3.3. Risultati	pag ...64
3.3.1. Attività ossalato-degradativa e individuazione del gene <i>oxc</i> in ceppi di <i>Bifidobacterium</i>	
3.3.2. Analisi cinetica del consumo di ossalato e saccarosio in <i>B. lactis</i> B107	pag ...65
3.3.3. Banca genica di <i>B. lactis</i> B107 e isolamento del gene <i>oxc</i>	pag ...67
3.3.4. Analisi dell'inserito da 10.2 Kb del clone F	
3.3.5. Caratterizzazione dell'espressione di <i>oxc</i>	pag ...69
3.3.6. Esperimenti di fermentazione	pag ...70
3.3.7. Livelli di espressione dei geni <i>oxc</i> , <i>ORF-1</i> e <i>ORF-4</i> in risposta allo shift di pH e l'aggiunta di ossalato	pag ...71
3.4. Discussione	pag ...72
4. CAPITOLO II	
4.1. Introduzione	pag ...78
4.1.1. Il sistema Plasminogeno-Plasmina	
4.1.2. Il Plasminogeno nell'intestino	pag ...80
4.1.3. Interazione dei batteri patogeni con il sistema del plasminogeno	pag ...81
4.1.4. Attivatori batterici del plasminogeno	pag ...82
4.1.5. Recettori batterici del Plasminogeno e "moonlighting proteins"	pag ...83
4.2. Materiali e metodi	pag ...85
4.2.1. Ceppi batterici, terreni e condizioni colturali	
4.2.2. Frazionamento delle proteine di parete	
4.2.3. Elettroforesi bidimensionale delle proteine di parete di <i>Bifidobacterium</i>	
4.2.4. Plg overlay assay	
4.2.5. Identificazione di proteine con MALDI-TOF MS	pag ...86
4.2.6. Dot Blot	
4.2.7. Legame al Plasminogeno misurato con MALDI-TOF MS	pag ...87
4.3. Risultati	pag ...88
4.3.1. Localizzazione delle proteine putative che legano il Plg	
4.3.2. Identificazione delle Plasminogen binding protein putative isolate	pag ...89

4.3.3. Studio del binding al plasminogeno in <i>B. lactis</i> BI07 in diverse fasi di crescita	
4.3.4. Analisi MALDI-TOF MS	pag ...90
4.4. Discussione	pag ...93
5. CONCLUSIONI	
5.1. Conclusioni	pag ...96
6. BIBLIOGRAFIA	pag ...99
APPENDICE 1	pag .123
APPENDICE 2	pag .170
APPENDICE 3	pag .175

## ***ABSTRACT***

## Abstract

Bifidobacteria constitute up to 3% of the total microbiota and represent one of the most important health-promoting bacterial groups of the human intestinal microflora. The presence of *Bifidobacterium* in the human gastrointestinal tract has been directly related to several health-promoting activities; however, to date, no information about the specific mechanisms of interaction with the host is available.

The first health-promoting activities studied in these job was the oxalate-degrading activity.

Oxalic acid occurs extensively in nature and plays diverse roles, especially in pathological processes. Due to its highly oxidizing effects, hyper absorption or abnormal synthesis of oxalate can cause serious acute disorders in mammals and be lethal in extreme cases. Intestinal oxalate-degrading bacteria could therefore be pivotal in maintaining oxalate homeostasis, reducing the risk of kidney stone development. In this study, the oxalate-degrading activity of 14 bifidobacterial strains was measured by a capillary electrophoresis technique. The *oxc* gene, encoding oxalyl-CoA decarboxylase, a key enzyme in oxalate catabolism, was isolated by probing a genomic library of *B. animalis* subsp. *lactis* BI07, which was one of the most active strains in the preliminary screening. The genetic and transcriptional organization of *oxc* flanking regions was determined, unravelling the presence of other two independently transcribed open reading frames, potentially responsible for *B. animalis* subsp. *lactis* ability to degrade oxalate. Transcriptional analysis, using real-time quantitative reverse transcription PCR, revealed that these genes were highly induced in cells first adapted to subinhibitory concentrations of oxalate and then exposed to pH 4.5. Acidic conditions were also a prerequisite for a significant oxalate degradation rate, which dramatically increased in oxalate pre-adapted cells, as demonstrated in fermentation experiments with different pH-controlled batch cultures. These findings provide new insights in the characterization of oxalate-degrading probiotic bacteria and may support the use of *B. animalis* subsp. *lactis* as a promising adjunct for the prophylaxis and management of oxalate-related kidney disease.

In order to provide some insight into the molecular mechanisms involved in the interaction with the host, in the second part of the job, we investigated whether *Bifidobacterium* was able to capture human plasminogen on the cell surface. The binding of human plasminogen to *Bifidobacterium* was dependent on lysine residues of surface protein receptors. By using a proteomic approach, we identified six putative plasminogen-binding proteins in the cell wall fraction of three strain of *Bifidobacterium*. The data suggest that plasminogen binding to *Bifidobacterium* is due to the concerted action of a number of proteins located on the bacterial cell surface, some of which are highly conserved cytoplasmic proteins which have other essential cellular functions. Our findings represent a step forward in understanding the mechanisms involved in the *Bifidobacterium*-host interaction.

In these job w studied a new approach based on to MALDI-TOF MS to measure the interaction between entire bacterial cells and host molecular target.

MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight)—mass spectrometry has been applied, for the first time, in the investigation of whole *Bifidobacterium* cells-host target proteins interaction. In particular, by means of this technique, a dose dependent human plasminogen-binding activity has been shown for

*Bifidobacterium*. The involvement of lysine binding sites on the bacterial cell surface has been proved. The obtained result was found to be consistent with that from well-established standard methodologies, thus the proposed MALDI-TOF approach has the potential to enter as a fast alternative method in the field of biorecognition studies involving in bacterial cells and proteins of human origin.

## ***INTRODUZIONE***

## ***Microbiota intestinale***

Il microbiota intestinale rappresenta il più complesso ecosistema presente in natura ed è costituito da  $10^{13} - 10^{14}$  cellule per contenuto intestinale e come numero supera di 10 volte le cellule germinali e somatiche dell'organismo umano (Savege 1977). La maggiore concentrazione riscontrata è a livello del colon, dove i batteri arrivano fino a  $10^{11}$  cell/mL di contenuto luminale. (Ley *et al.*, 2008) (Turnbaugh *et al.*, 2006) (Xu *et al.*, 2007). Il numero di geni riferiti al microbiota umano risulta essere 100 volte superiore rispetto ai geni presenti nell'uomo, che è stato calcolato essere 31897 (<http://eugen.es.org/>). Alla luce di queste considerazioni, l'uomo può essere considerato un super organismo costituito da cellule microbiche e cellule umane, il cui corredo genetico è rappresentato dall'insieme dei geni presenti nel genoma umano e nel genoma del microbiota intestinale (microbioma) (Gill *et al.*, 2006).

Il microbiota intestinale umano si sviluppa subito dopo la nascita, dipende dal numero e dal tipo di microrganismi con cui viene a contatto nei primi anni di vita e dal patrimonio genetico individuale. La complessità delle interazioni che si vengono a creare all'interno dell'intestino e la molteplicità delle specie microbiche presenti in natura, rendono unico il microbiota di ogni singolo individuo. Questa popolazione, unica e specifica, è caratterizzata da un core che si mantiene relativamente stabile nel tempo. La composizione del microbiota può mutare nel corso degli anni a seguito di diarrea acuta, trattamento antibiotico e modificazioni della dieta; nella popolazione microbica possono inoltre essere riconosciuti membri microbici autoctoni o "residenti", ed altri alloctoni, derivanti cioè dal cibo e dall'acqua ingeriti o da altre componenti esterne, rendendo questo ecosistema estremamente dinamico.

La relazione che si instaura tra ospite e microbiota è stata spesso definita come commensale (solo uno dei due partner trae beneficio da questa interazione), mentre è più veritiero definire questo rapporto di tipo simbiotico o mutualistico (entrambi i partner traggono beneficio dal rapporto instaurato). In questo rapporto mutualistico, l'ospite acquisisce energia, mediante assorbimento dei prodotti finali delle fermentazioni batteriche [short chain fatty acid (SCFA)], mentre il microbiota si trova in un ambiente anossico protetto con un ricco buffet di nutrienti e a temperatura relativamente costante.

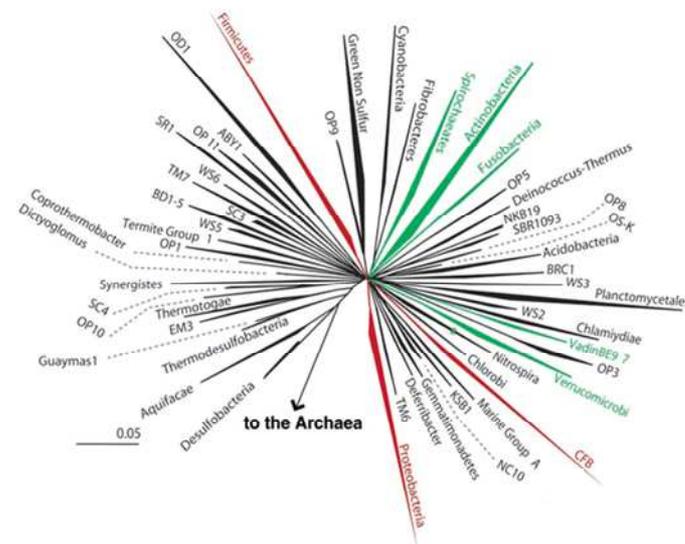
### ***Composizione: Batteri, Archea, Eucarioti, Virus***

Il microbiota intestinale contiene tutti e tre i domini della vita, batteri, archeobatteri ed eucarioti. Nonostante l'altissima densità cellulare dei batteri, la diversità a livello di divisioni è tra le più basse di qualsiasi ecosistema. Le stime disponibili, basate sulle sequenze del gene 16S rRNA, indicano infatti che più del 90% dei tipi filogenetici (filotipi) dei batteri del colon appartengono solo a 2 divisioni (phyla) delle 70 note nel dominio dei batteri, *Bacteroides* e *Firmicutes* (rispettivamente 60 e 80% della comunità fecale totale, ed entrambi a basso contenuto in G+C e rispettivamente Gram negativi e positivi), con i rimanenti filotipi distribuiti tra altre 8 divisioni. All'interno del phylum *Firmicutes*, la maggior parte delle sequenze fino ad ora disponibili appartiene alla famiglia *Lachnospiraceas*, che include i gruppi clostridiali XIV e IV. Con un numero di specie batteriche pari ad un valore compreso tra 500 e 1000 (il 99% dei batteri appartengono, tuttavia, a sole 30 o 40 specie principali) e con più di 7000 ceppi, l'albero evolutivo del microbiota intestinale umano può essere visualizzato con 9 rami corrispondenti alle

divisioni identificate sino ad ora (*Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*, *VadinBE97*), ciascuno sovrastato da fronde rappresentanti le stirpi discendenti, e ciascuna fronda composta da innumerevoli foglie che rappresentano i batteri strettamente correlati fra loro (Fig. 1) (Bäckhed *et al.*, 2005).

Nonostante siano 13 le divisioni di archeobatteri descritte fino ad ora, la comunità archea dell'intestino umano risulta molto semplice e consiste di soli 3 isolati, dei quali *Methanospaera stadtmannae* è raro (Miller e Wolin, 1985), e *Methanospaera ruminantium* è stato riportato in un singolo studio datato 1968 (Nottingham e Hungate 1968). La presenza di un solo archeobatterio appartenente agli *Euryarchaea*, l'abbondante *Methanobrevibacter smithii* (fino al 10% del microbiota intestinale), è stata confermata da studi molecolari (Miller e Wolin, 1986) (Eckburg *et al.*, 2005). *M. smithii* accoppia l'ossidazione di H<sub>2</sub> alla riduzione di CO<sub>2</sub> per produrre metano (CH<sub>4</sub>). Nelle feci di produttori di metano, gli archeobatteri metanogeni sono stati rilevati in concentrazioni maggiori di 10<sup>8</sup> cell/mL, mentre i non produttori sono compresi tra 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup> cell/mL (Doré *et al.*, 1995).

Fornendo lo step finale nel processo di estrazione di energia mediante degradazione di composti organici, gli archea possono alterare la termodinamica dell'intero sistema, con profonde conseguenze per l'ospite. Nonostante un possibile coinvolgimento del genotipo dell'ospite, fattori ambientali e della dieta sembrano essere i principali responsabili nel determinare numero e attività dei metanogeni a livello intestinale (Florin *et al.*, 2000). Ulteriori studi restano necessari per verificare la bassa diversità degli archeobatteri (Rieu-Lesme *et al.*, 2005).



**Fig. 1.** Diversità batterica nell'intestino umano. L'albero filogenetico relativo al dominio Bacteria è stato costruito da Bäckhed *et al.* (2005) sulla base di 8903 sequenze rappresentative del gene 16S rRNA. Le divisioni (superkingdom) numericamente abbondanti sono mostrate in rosso, quelle rare in verde, mentre il colore nero indica divisioni "undetected". I proteobacteria sono comuni ma solitamente non dominanti (Seksik *et al.*, 2003). La lunghezza delle linee è una misura della distanza evolutiva dal progenitore comune. La scale bar indica il grado di diversità (distanza evolutiva) all'interno di una divisione, in termini di frazione di nucleotidi del gene 16S rRNA che differiscono tra i diversi membri. CFB, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*.

In tabella 1 è riportata la distribuzione filogenetica, basata sulle sequenze geniche SSU (Small Subunit, 16S e 18S) rRNA, dei filotipi procariotici del tratto gastrointestinale

umano. In figura 2 sono riportate, rispettivamente, la distribuzione filogenetica delle classi di phylum fino ad ora identificate, e l'abbondanza relativa dei phylum di appartenenza (Eckburg *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2007).

**Tabella 1:** Distribuzione filogenetica delle sequenze geniche di SSU rRNA (1998-2006) dei filotipi procariotici del tratto gastrointestinale umano, riportate da Rajilić *et al.* (2007).

Phylum	Class	Order	Family/Cluster
Actinobacteria 57	Actinobacteria 57	Actinomycetales 22	Actinomycetaceae 6
			Corynebacteriaceae 6
			Micrococcaceae 4
			Propionibacteriaceae 6
		Bifidobacteriales 20	Bifidobacterium 20
		Coriobacteriales 15	Coriobacteriaceae 15
Bacteroidetes 136	Bacteroidetes 136	Bacteroidales 136	Rikenellaceae 15
			Bacteroidaceae 45
			Prevotellaceae 36
			Porphyromonadaceae 21
			Unclassified 19
Cyanobacteria 1	Cyanobacteria 1	Chroococcales 1	Unclassified 1
Firmicutes 818	Asteroleplasma 1 Bacilli 92	Anaeroplasmatales 1	Anaeroplasmataceae 1
		Bacillales 18	Bacillaceae 14
			Staphylococcaceae 4
		Lactobacillales 74	Aerococcaceae 1
			Carnobacteriaceae 1
			Lactobacillaceae 36
			Leuconostocaceae 2
			Lactococcaceae 2
			Streptococcaceae 32
	Clostridia 669	Clostridiales 669	Cl. cluster I 27
			Cl. cluster III 7
			Cl. cluster IV 212
			Cl. cluster IX 40
			Cl. cluster XI 31
			Cl. cluster XIII 8
			Cl. cluster XIVa 276
			Cl. cluster XV 5
			Unclassified 63
	Mollicutes 42	Unclassified 42	Cl. cluster XVI 14
			Cl. cluster XVII 5
			Cl. cluster XVIII 9
	Unclassified 14	Unclassified 14	Unclassified 14
Fusobacteria 12	Fusobacteria 12	Fusobacteriales 12	Fusobacteriaceae 11
			Incertae sedis 11 1
Proteobacteria 124	Alphaproteobacteria 6	Rhizobiales 1	Unclassified 1
		Sphingomonadales 1	Unclassified 1
		Unclassified 4	Unclassified 4
	Betaproteobacteria 19	Burkholderiales 18	Alcaligenaceae 8
			Oxalobacteriaceae 3
			Burkholderiaceae 1
			Incertae sedis 5 1
			Unclassified 5
		Neisseriales 1	Neisseriaceae 1
	Gammaproteobacteria 74	Aeromonadales 4	Aeromonadaceae 2
			Succinivibrionaceae 2
		Enterobacteriales 51	Enterobacteraceae 51
		Pasteurellales 2	Pasteurellaceae 2
		Pseudomonadales 11	Moraxellaceae 6
			Pseudomonadaceae 5
		Vibrionales 4	Vibrionaceae 4
		Xanthomonadales 2	Xanthomonadaceae 2
	Deltaproteobacteria 7	Desulfovibrionales 7	Desulfovibrionaceae 7
	Epsilonproteobacteria 18	Campylobacteriales 18	Campylobacteraceae 12
			Helicobacteraceae 6
Verrucomicrobia 3	Verrucomicrobia 3	Verrucomicrobiales 3	Verrucomicrobiaceae 3
Euryarchaeota 3	Methanobacteria 3	Methanobacteriales 3	Methanobacteriaceae 3

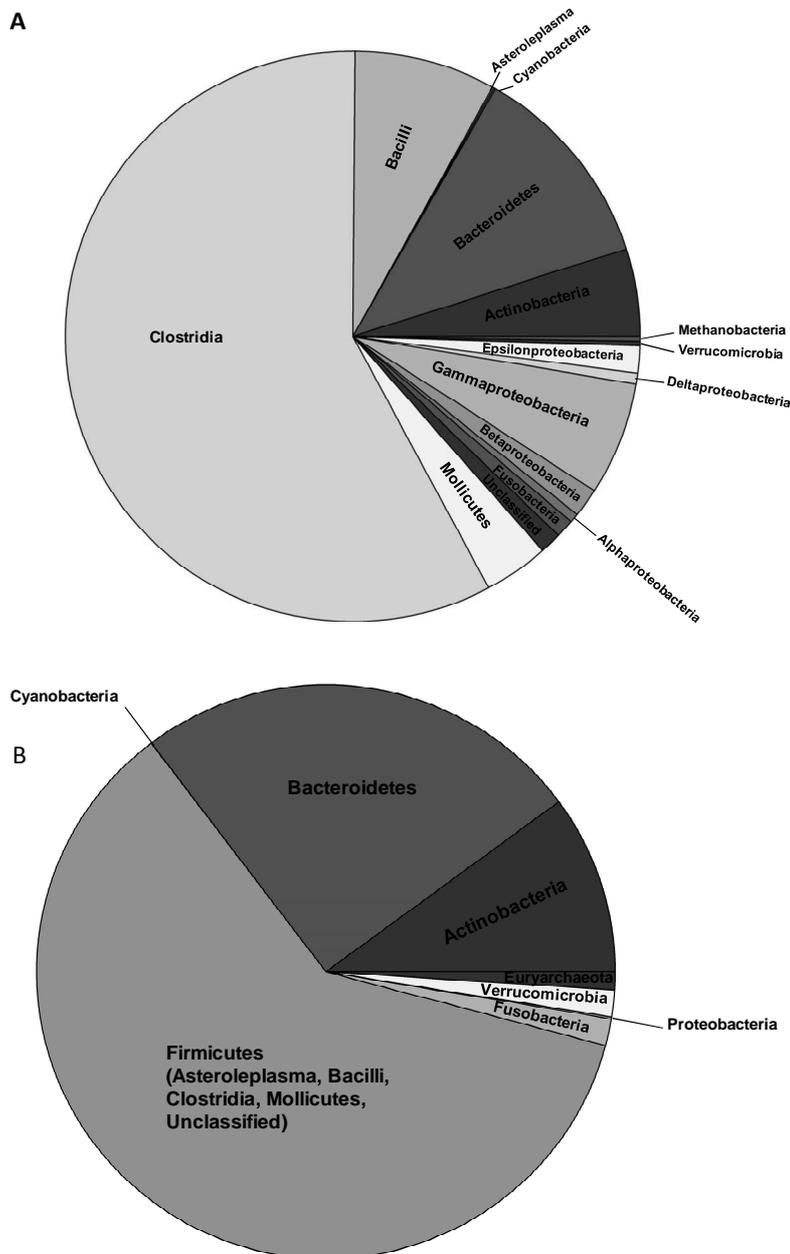


Fig. 2. Diversità procariotica del tratto gastrointestinale umano.

- (A) Distribuzione filogenetica, basata sulle sequenze geniche SSU rRNA, delle classi di phyla identificate dal 1998 fino agli inizi del 2006.
- (B) Abbondanza relativa dei phyla nel tratto gastrointestinale umano, calcolata sulla base degli studi effettuati da Eckburg *et al.* (2005), Wang *et al.* (2005), Bik *et al.* (2006), Gill *et al.* (2006), Ley *et al.* (2006), e Palmer *et al.* (2007).

La diversità degli eucarioti presenti nel microbiota intestinale umano è stata determinata esclusivamente mediante approcci coltura-dipendenti. Da campioni intestinali umani sono state isolate 17 specie appartenenti al genere *Candida*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Anderson, 1917; Finegold *et al.*, 1974; Finegold *et al.*, 1977) (Taylor *et al.*, 1985; Biasoli *et al.*, 2002). Fatta eccezione per *Candida albicans* e *C. rugosa*, gli eucarioti non sono risultati né ampiamente distribuiti né tantomeno abbondanti nell'intestino

umano [si stima che rappresentino circa lo 0.05% del microbiota fecale (Simon e Gorbach 1984)].

È stata descritta la composizione dei geni rRNA fungini dei tessuti e del contenuto luminale murino. Mediante l'utilizzo di un metodo coltura-indipendente, denominato fingerprinting oligonucleotidico dei geni rRNA (OFRG), Scupham et al. (2006) hanno identificato i generi *Acremonium*, *Monilia*, *Fusarium*, *Cryptococcus/Filobasidium*, *Scleroderma*, *Catenamycota*, *Spizellomyces*, *Neocallimastix*, *Pawellomyces*, *Entophlyctis*, *Mortierella*, *Smittium* e l'ordine *Mucorales*, appartenenti ai 4 maggiori phyla fungini *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* e *Zygomycota*.

I virus rappresentano un ulteriore ed importante costituente del microbiota intestinale umano come indicato da studi che riportano l'identificazione, nelle feci umane, più di 1200 genotipi virali con densità fino a  $10^9$  virioni/g di materiale secco, e di batteriofagi nella mucosa di soggetti sani e affetti da malattie infiammatorie intestinali (IBD). I batteriofagi esercitano una forte influenza sulla diversità batterica e sulla struttura della popolazione, e probabilmente sono coinvolti in fenomeni di disbiosi, destabilizzando le comunità batteriche. Recentemente hanno misurato la comunità virale totale associata alla mucosa intestinale in individui sani ed in pazienti affetti da morbo di Crohn. Mediante microscopia ad epifluorescenza, sono state osservate particelle virus-simili (VLP) con una media di  $1.2 \cdot 10^9$  VLP per campione bioptico ( $4 \cdot 10^7 - 1.7 \cdot 10^{10}$ ,  $10^{10}/\text{mm}^3$  di tessuto). Particelle virali corrispondenti a batteriofagi con morfologia di *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae* sono risultate dominanti, ed ogni individuo è apparso colonizzato da un'unica famiglia prevalente (Breitbart et al., 2008).

## Localizzazione

Il microbiota intestinale umano differisce a livello qualitativo lungo tutto il tratto gastrointestinale (Fig. 3) (Savege 1977; Berg 1996). A queste differenze si aggiunge una stratificazione orizzontale, con la presenza di diverse comunità microbiche nel lumen intestinale, nello strato di muco, nelle cripte e direttamente aderenti alle cellule epiteliali (Roze et al., 1982; Lee 1984).

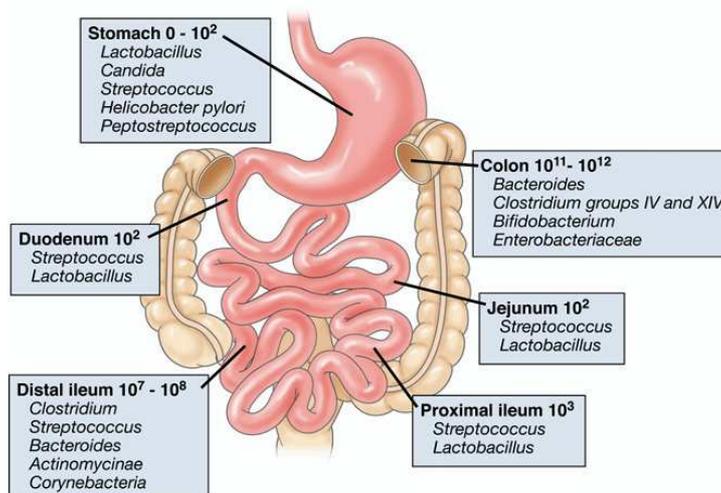


Fig. 3. Composizione e concentrazioni luminali delle specie microbiche dominanti nelle differenti regioni del tratto gastrointestinale umano.

In termini quantitativi, esofago e stomaco portano il minore carico batterico. Il normale microbiota esofageo è relativamente semplice in termini di composizione in

specie, ed i predominanti batteri coltivabili sono anaerobi facoltativi che derivano dalla cavità orale, quali streptococchi e lattobacilli ( $10^2$ - $10^3$ /cm<sup>2</sup> di superficie mucosale o/mL di aspirato luminale).

Fatta eccezione per le poche ore immediatamente successive ad un pasto, lo stomaco umano contiene bassi livelli di lattobacilli e di altri microrganismi acido resistenti ( $10^1$ - $10^2$ /mL di contenuto), generalmente provenienti dalla cavità orale. Nella mucosa gastrica è stata evidenziata anche la presenza di *Helicobacter pylori*, presente nel 30-80% di individui sani, agente eziologico di gastrite, ulcera gastrica e duodenale, implicato nel cancro allo stomaco. Lo stomaco costituisce una barriera contro il continuo accesso di batteri dall'ambiente esterno verso le parti distali del tratto gastrointestinale grazie a fattori come l'acidità, la presenza di ossido nitrico, che deriva dalla riduzione batterica del nitrato salivario, e di enzimi proteolitici. Tuttavia, l'analisi effettuata da Bik *et al.* (2006) su sequenze del gene 16S rRNA recuperate dalla mucosa gastrica di 23 soggetti, ha permesso di scoprire una diversità maggiore di quanto considerato fino ad ora, con la caratterizzazione di membri dei phyla *Deiococcus/Thermus*. Nelle biopsie gastriche, similmente alla composizione del microbiota intestinale, sono risultati predominanti membri dei phyla *Proteobacteria* (per la maggior parte *H. pylori*), *Firmicutes* e *Bacteroides*, mentre una minor percentuale è stata riportata per *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, TM7, *Deferribacteres* e *Deinococcus/Thermus* (Bik *et al.*, 2006).

Il rapido flusso di materiale attraverso l'intestino tenue (tempo di transito del digerito compreso tra 2-4 h) previene una permanente colonizzazione microbica di questo tratto. Tuttavia, il numero di batteri aumenta progressivamente lungo il tratto intestinale man mano che il potenziale ossido riduttivo cala. Il microbiota del digiuno appare dominato da specie appartenenti al genere *Streptococcus* (Wang *et al.*, 2005) ma, solo a livello ileo-cecale, è presente una significativa popolazione di batteri [ $10^8$ - $10^9$ /g di contenuto intestinale (Macfarlane *et al.*, 1995)]. L'analisi dei geni SSU rRNA, effettuata da Frank *et al.* (2007) su campioni del tratto gastrointestinale umano, ha confermato l'arricchimento, a livello di intestino tenue, di sequenze appartenenti al sottogruppo *Bacillus* del phylum *Firmicutes* (principalmente *Streptococcaceae*, corrispondenti al 23% delle sequenze ottenute contro il 5% a livello del colon). È stato, inoltre, riscontrato un 8% corrispondente a sequenze di membri del phylum *Actinobacteria* e, in particolare, dei sottogruppi *Actinomycinaeae* e *Corynebacteriaceae*. Da campioni del piccolo intestino sono state ottenute poche sequenze di *Bacteroidetes* e *Lachnospiraceae*, contrariamente a quanto osservato a livello del colon.

L'intestino crasso rappresenta il sito del tratto gastrointestinale con il più alto numero di batteri e la maggiore diversità microbica [ $10^{11}$ - $10^{12}$ /mL di contenuto luminale, pari a circa il 60% della massa fecale (Guarner e Malagelada 2003)]. Si tratta per la maggior parte di anaerobi stretti, spesso non sporigeni, il 54-75% dei quali Gram-positivi (Zoetendal *et al.*, 2006). La motilità stagnante con contrazioni retropulsive, che permette di trattenere il contenuto per lunghi periodi, ed il pH tamponato da secrezioni di bicarbonato, rendono l'ambiente del crasso più favorevole alla colonizzazione da parte di batteri. A livello del colon, il microbiota viene solito considerato un'entità omogenea; in realtà i batteri esistono in una molteplicità di differenti microhabitat e nicchie metaboliche associate alla mucosa, allo strato di muco che riveste l'intestino, e alla superficie di residui digestivi particolati, presenti nel lumen intestinale. Questi biofilm microbici sono spesso caratterizzati da un comportamento multicellulare coordinato e da un potenziale metabolico differente, in natura ed efficienza, rispetto alle loro controparti

non aderenti. Molte specie all'interno dei biofilm, mostrano anche una maggiore resistenza ad antibiotici ed altri fattori ambientali, quali pH acido e misure difensive dell'ospite, deleteri per microrganismi free-living (Macfarlane e Dillon 2007).

## Ageing

Il primo insediamento batterico nell'uomo avviene alla nascita, quando l'intestino del neonato, ancora sterile, viene colonizzato da microrganismi di origine materna o ambientale. Recenti studi hanno dimostrato che il microbiota intestinale umano varia in funzione dell'età (Mariat *et al.*, 2009). In particolare è possibile notare come il rapporto tra *Firmicutes* e *Bacteroides* varia da 0.4, 10.9 e 0.6 passando dall'età neonatale, adulta ed anziani.

A differenza del microbiota intestinale adulto, la microflora neonatale risulta più variabile in composizione e meno stabile nel tempo. La composizione e lo sviluppo del microbiota intestinale del neonato dipendono da molti fattori, quali tipologia del parto, allattamento (al seno o artificiale), eventuali trattamenti terapeutici, livello di igiene, e background genetico, come evidenziato da studi condotti su gemelli monozigoti (Zoetendal *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2002; Favier *et al.*, 2002; Vaughan *et al.*, 2002; Fanaro *et al.*, 2003). Tuttavia, in letteratura, sono spesso riportate informazioni contrastanti. In alcuni studi, ad esempio, è riportato il dominio quasi esclusivo di *Bifidobacterium* nel microbiota di neonati allattati al seno [il che appare giustificato dalla presenza, nel latte materno, sia di oligosaccaridi naturali (GOS) (Aggett *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2006) e peptidi bifidogenici (Liepke *et al.*, 2002) che di ceppi appartenenti ai gruppi *B. longum* e *B. animalis* (Gueimonde *et al.*, 2007)] (Stark *et al.*, 1982; Benno *et al.*, 1984; Favier *et al.*, 2002; Penders *et al.*, 2006), mentre in altri casi i bifidobatteri vengono ritrovati solo in una piccola frazione di neonati e, comunque, non risultano numericamente dominanti (Hall *et al.*, 1990; Hopkins *et al.*, 2005). Anche l'effetto della dieta sulla composizione del microbiota appare controverso, benché la maggior parte degli studi riporti una minor abbondanza di *Bifidobacterium* ed una maggior presenza di aerobi in caso di neonati nutriti con latte artificiale (Favier *et al.*, 2002; Hopkins *et al.*, 2005; Penders *et al.*, 2005). La modalità del parto e l'età gestazionale sono stati indicati come ulteriori fattori chiave capaci di modellare il microbiota neonatale. Differenze sia nel timing della colonizzazione che nella composizione sono state riportate tra bambini nati con taglio cesareo e bambini venuti alla luce con parto naturale, così come tra bambini nati prematuri e non (Hallstrom *et al.*, 2004; Penders *et al.*, 2006). Palmer *et al.* (2007), mediante impiego di un microarray SSU rDNA, hanno esaminato lo sviluppo del microbiota intestinale di 14 neonati sani, inclusi due gemelli dizigoti. Benché estremamente diverse nei primi mesi di vita, le comunità microbiche dei neonati sono diventate progressivamente più simili le une alle altre, fino al raggiungimento di un profilo caratteristico del tratto gastrointestinale adulto. Al termine del primo anno di vita, infatti, il microbiota intestinale dei neonati è apparso in genere caratterizzato da una prevalenza di *Bacteroides* e *Firmicutes*, dalla presenza di *Verrucomicrobia*, e da una scarsità di *Proteobacteria* e batteri aerobi Gram-negativi. L'ipotesi più accreditata è che i primissimi eventi di colonizzazione siano determinati da batteri opportunisti a cui il neonato viene esposto, generalmente provenienti dal microbiota vaginale, fecale o associato alla pelle della madre. Palmer *et al.* (2007), infatti, hanno riscontrato una significativa somiglianza tra la microflora del neonato e quella della madre, in linea con le precedenti evidenze di una trasmissione verticale dei microrganismi (Mandar e

Mikelsaar, 1996; Caufield *et al.*, 2007; Linz *et al.*, 2007). Nel corso del tempo, tuttavia, il “fitness advantage” dei gruppi che tipicamente dominano il microbiota del colon adulto, prevale sul vantaggio iniziale dei primi colonizzatori [solitamente aerobi appartenenti ai generi *Staphylococcus* e *Streptococcus* o alla famiglia Enterobacteriaceae (Cooperstock e Zedd, 1983)], che probabilmente risultano meno adatti all’ambiente intestinale. La colonizzazione delle prime specie permette, inoltre, una riduzione del potenziale ossidoriduttivo a livello intestinale, ed il conseguente establishment di anaerobi stretti quali *Bacteroides* e *Clostridium* (Bezirtzoglou, 1997; Teitelbaum e Walker, 2002; Thompson-Chagoyàn *et al.*, 2007). In aggiunta a questo, i progressivi cambiamenti all’interno dell’intestino, dovuti allo sviluppo intrinseco della mucosa intestinale, alla transizione ad una dieta adulta e agli effetti del microbiota stesso (Mackie *et al.*, 1999; Belenguer *et al.*, 2006; Samuel e Gordon, 2006; Sonnenburg *et al.*, 2006), potrebbero imporre una selezione ancora più stringente a favore dei batteri maggiormente adattati. Per quanto riguarda gemelli dizigoti, la significativa similarità osservata da Palmer *et al.* (2007) tra i profili temporali delle loro comunità microbiche suggerisce come il fattore ambiente rivesta un ruolo principale nel determinare le caratteristiche distintive del microbiota intestinale. A conferma e supporto di questa evidenza, uno studio precedente ha mostrato come il microbiota di famiglie di topi geneticamente equivalenti sia più simile tra membri della stessa gabbia (madre e prole condividono la medesima gabbia) che non tra differenti gabbie (Ley *et al.*, 2005).

Benché il microbiota intestinale umano sia relativamente stabile nel corso della vita adulta, cambiamenti correlati all’età nel tratto gastrointestinale, così come modifiche nella dieta e nella reattività del sistema immunitario dell’ospite, comportano variazioni a livello della composizione della microflora (Tiihonen K. *et al.* 2009). La conoscenza di queste modifiche correlate all’ageing risulta estremamente importante per il trattamento o la profilassi di malattie, e per il mantenimento di uno stato di salute nella popolazione anziana. L’incremento dei livelli soglia relativi al senso del gusto e dell’olfatto (Weiffenbach *et al.*, 1982; Doty *et al.*, 1984), il conseguente disinteresse per il cibo, la disfunzione dell’apparato masticatorio causata dalla perdita di denti e massa muscolare (Karlsson *et al.*, 1991; Newton *et al.*, 1993), e le difficoltà nel deglutire (Castell, 1988), possono portare, nella popolazione anziana, al consumo di una dieta ristretta e nutrizionalmente sbilanciata. Alle modifiche nella dieta si associano cambiamenti fisiologici a livello del tratto gastrointestinale, quali riduzione del peso fecale che si verifica con l’avanzare dell’età (Woodmansey *et al.*, 2004). Questo calo nel peso delle feci è stato correlato ad un più lento transito intestinale e ad una ridotta escrezione di materiale batterico (Stephen *et al.*, 1987). I maggiori tempi di ritenzione sono stati, a loro volta, correlati ad un incremento nella fermentazione batterica di proteine e, conseguentemente, ad un aumento nei livelli di ammonio e fenoli generati nei processi putrefattivi (Macfarlane *et al.*, 1989). Nella popolazione anziana, il conteggio medio degli anaerobi totali del microbiota intestinale rimane relativamente stabile (Woodmansey *et al.*, 2004); tuttavia, sono state riportate variazioni nella composizione dei diversi generi, accompagnate da una riduzione generale nella diversità delle specie (Fig. 4). Numerosi studi mostrano, infatti, un declino nella conta vitale e nella diversità delle specie appartenenti al genere *Bacteroides*, ed un incremento nel numero di batteri proteolitici, quali *Fusobacteria*, *Propionibacteria* e *Clostridia* (Hopkins e Macfarlane, 2002; Bartosch *et al.*, 2004; Woodmansey *et al.*, 2004). Un incremento nella conta vitale è stato riportato anche per il genere *Eubacterium* (Woodmansey *et al.*, 2004), il che potrebbe

determinare una maggiore trasformazione di acidi biliari con l'ottenimento di metaboliti potenzialmente dannosi per l'ospite. Questi batteri potrebbero anche contribuire all'insorgenza dell'artrite nella popolazione anziana, come già dimostrato in ratti inoculati per via intraperitoneale con materiale cellulare proveniente da *Eubacterium aerofaciens* (Severijnen *et al.*, 1989). La forte riduzione nella diversità delle specie di bifidobatteri [uno o due microrganismi dominanti, quali *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum* o *Bifidobacterium longum* (Hopkins e Macfarlane, 2002)] potrebbe essere determinata da una ridotta adesione alla mucosa intestinale, con il risultato di una compromessa funzionalità e responsività del sistema immunitario ed un'incrementata suscettibilità ad infezioni gastrointestinali.

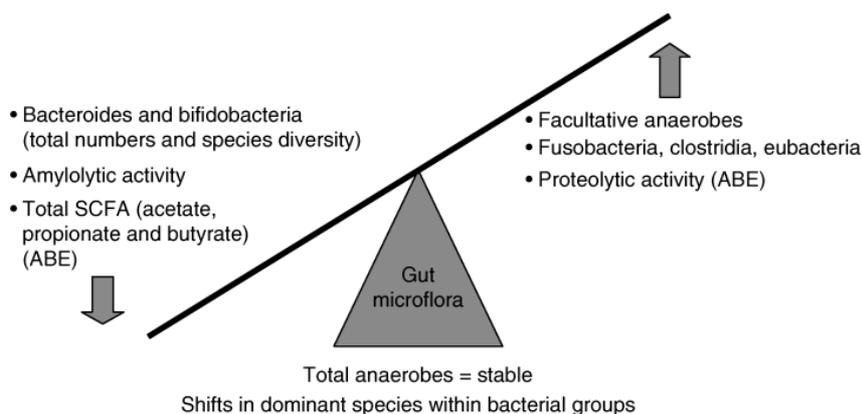


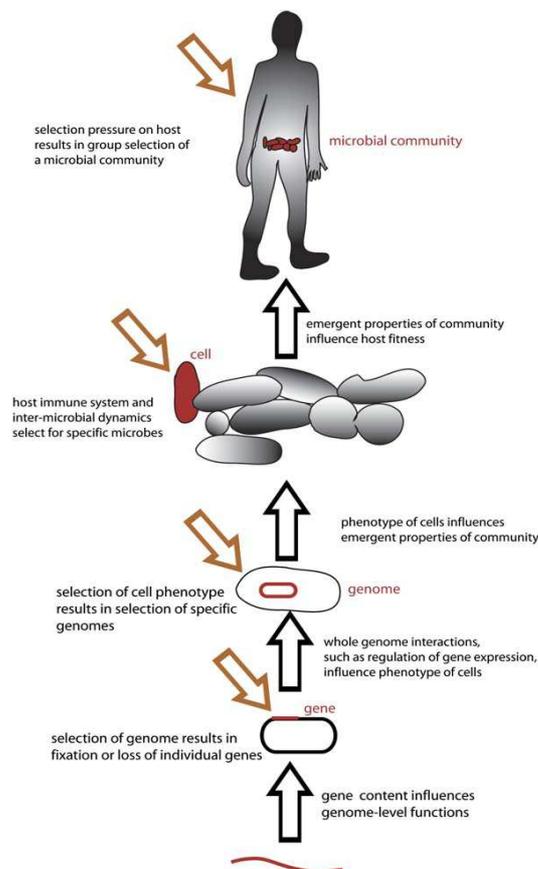
Fig. 4. Variazioni nella microflora intestinale della popolazione anziana. ABE, antibiotic-treated elderly.

Simili alterazioni nella composizione del microbiota fecale sono state studiate da van Tongeren *et al.* (2005) in anziani con alto Groningen Frailty Indicator (GFI). La frailty può essere generalmente definita come condizione in cui si assiste ad un progressivo calo delle risorse necessarie ad una persona per il mantenimento di un livello accettabile di funzionamento. La compromissione di fattori quali mobilità, fitness fisico, peso corporeo, vista, udito, cognizione, e risorse psicosociali, è stata associata ad una significativa riduzione nel numero di lattobacilli, *Bacteroides/Prevotella* e *Faecalibacterium prausnitzii*, ed al parallelo incremento di batteri appartenenti alla famiglia *Enterobacteriaceae*.

### ***Forze ecologiche ed evolutive che modellano la diversità microbica***

La diversità microbica esistente a livello dell'intestino umano è il risultato della coevoluzione di comunità microbiche e dei loro ospiti. La struttura peculiare di questa diversità deriva da un processo di selezione naturale operante a due livelli, "top-down" e "bottom-up" (Fig. 5). Secondo i principi ecologici, la selezione che opera a livello dell'ospite (top-down) favorisce l'instaurarsi di comunità stabili con un alto grado di ridondanza funzionale ["insurance hypothesis" (Yachi e Loreau, 1999)]. Il risultato è l'ottenimento di una comunità composta da divisioni microbiche anche ampiamente divergenti ma nei cui genomi sono presenti geni che codificano per proteine con funzioni omologhe. La ridondanza funzionale permette di evitare l'instaurarsi di "keystone species", ovvero specie con un ruolo centrale nell'ecosistema, la cui perdita determinerebbe un drammatico cambiamento a livello di processi e diversità. La forza

che si contrappone a questa, denominata bottom-up, costituisce, invece, una pressione selettiva che nasce dalla competizione tra membri del microbiota e favorisce una loro specializzazione funzionale (Ley *et al.*, 2006).



**Fig. 5.** Processi di selezione naturale che modellano la diversità microbica (Ley *et al.*, 2006).

Le frecce di color marrone indicano pressioni selettive e sono dirette verso l'unità sottoposta a selezione (mostrata in rosso). Le frecce nere indicano proprietà emergenti ad un livello che influenzano i livelli superiori nella gerarchia. In base alla "hierarchy theory", i livelli più alti determinano costrizioni sulle possibilità organizzative dei livelli inferiori. I principi ecologici predicono una selezione "top-down" guidata dall'ospite, che risulta in una comunità composta da divisioni microbiche ampiamente divergenti ma i cui genomi contengono suite di geni altamente simili (ridondanza funzionale). Un'ulteriore predizione è rappresentata dall'alta frequenza e dai numerosi meccanismi di lateral gene transfer. Al contrario, la competizione tra membri del microbiota esercita una pressione selettiva "bottom-up" con il risultato di genomi specializzati, caratterizzati da suite di geni funzionalmente differenti (tratti metabolici). Una volta instaurati, i tratti specifici possono essere conservati mediante opposizione alla ricombinazione omologa (Majewski *et al.*, 2000).

Tra i fattori che influenzano la diversità microbica all'interno dell'intestino umano, l'ambiente chimico svolge sicuramente un ruolo importante. I microrganismi intestinali possono ottenere energia mediante trasferimento di elettroni da carbonio organico a (i) carbonio organico (fermentazione); (ii) carbonio inorganico (metanogenesi); (iii) solfato (riduzione del solfato). A questo si aggiunge la peristalsi intestinale che limita ulteriormente il numero di nicchie microbiche disponibili. Solo gli archeobatteri sono in grado di produrre metano; la riduzione del solfato viene operata, invece, da *Desulfovibrio* spp. ( $\delta$ -Proteobacteria) e *Desulfotomata* spp. (Firmicutes).

La fermentazione rappresenta il principale pathway energetico per *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, e di conseguenza il pathway energetico dominante all'interno del microbiota intestinale. La codominanza di questi phyla sembra trarre origine dai ruoli metabolici distinti ma complementari all'interno della comunità (Ley *et al.*, 2006).

La cooperazione e la suddivisione delle risorse rappresenta una strategia alternativa che consente di evitare una competizione testa a testa per risorse limitanti. In base agli insegnamenti della teoria ecologica, la competizione testa a testa, comporterebbe l'esclusione del perdente (Putman, 1994). All'interno dell'intestino umano, invece, si vengono ad instaurare network in cui i prodotti di un microrganismo diventano substrati per la crescita di un altro, e la rimozione dei prodotti di scarto del secondo incrementano la resa termodinamica del primo (Thauer *et al.*, 1977). Questi network chimici hanno il

potenziale di essere incredibilmente complessi ma soprattutto variabili in base alle disponibilità di substrato e ai gradienti termodinamici.

Per quanto riguarda le forze evolutive che modellano forma e struttura dei genomi batterici, duplicazione genica, perdita di geni ed eventuali riarrangiamenti cromosomici rappresentano i principali eventi genetici responsabili dell'evoluzione e delle dinamiche dei genomi. Inizialmente l'ipotesi più accreditata era che i genomi batterici si fossero evoluti a partire da un genoma ancestrale di dimensioni decisamente inferiori, attraverso numerosi eventi di duplicazione genica con la conseguente generazione di paraloghi (Kunisawa, 1995). Successivamente, un'analisi basata sulle sequenze genomiche attualmente disponibili, ha mostrato come la duplicazione genica contribuisca solo in minima parte all'evoluzione genomica (Coenye et al., 2005). Comunque, è stato osservato come geni coinvolti in una specifica situazione di adattamento siano stati preservati dopo la duplicazione, suggerendo quindi il ruolo evolutivo di questo evento genetico.

## ***Principali contributi funzionali***

### **Attività metaboliche**

La principale funzione metabolica svolta dal microbiota intestinale è costituita dalla fermentazione di residui della dieta non digeribili e di muco endogeno prodotto dall'epitelio. Il muco dell'ospite, infatti, oltre a fornire protezione contro l'adesione e l'invasione di microrganismi patogeni, costituisce una riserva consistente di glicani, mucina, glicosfingolipidi, acido ialuronico ed eparina (Hooper et al., 2002), e permette, quindi, di mitigare gli effetti relativi a drastici cambiamenti nella disponibilità di polisaccaridi della dieta (Bäckhed et al., 2005).

La diversità genica esistente nella comunità microbica garantisce la presenza di numerosi enzimi e pathway biochimici diversi da quelli costitutivi dell'ospite. Nell'uomo e nel topo, l'analisi metagenomica del microbioma intestinale, ed il confronto tra diversi ecosistemi microbici, ha evidenziato, infatti, l'arricchimento in geni appartenenti alle categorie e pathway KEGG [Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kanehisa et al., 2004)] relativi a metabolismo di carboidrati e glicani (Tringe et al., 2005; Turnbaugh et al., 2007). *B. longum* e *Bacteroides thetaiotaomicron* dedicano circa l'8% del loro genoma a funzioni di trasporto e metabolismo di carboidrati (Schell et al., 2002; Xu et al., 2003).

Il risultato finale delle attività metaboliche del microbiota è il recupero di energia e di substrati assorbibili per l'ospite, ed il rifornimento di energia e prodotti nutritivi per la crescita e la proliferazione dei batteri. A livello di colon, la maggior fonte di energia è la fermentazione di carboidrati non digeribili, quali polisaccaridi (amido, cellulosa, emicellulosa, inulina, pectine e gomme), oligosaccaridi, ed alcoli (Cummings et al., 1987, 1996), con la conseguente produzione di acidi grassi a corta catena (SCFA), e gas, quali H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. L'accumulo di H<sub>2</sub> riduce l'efficienza del processing di polisaccaridi, ma la generazione di metano ad opera di archeobatteri metanogeni rimuove l'idrogeno prodotto e permette di incrementare le rese di fermentazione (Stams, 1994). Anche il metabolismo anaerobico di peptidi e proteine (putrefazione) ad opera della microflora intestinale, determina la produzione di SCFA ma, allo stesso tempo, comporta la

generazione di una serie di substrati potenzialmente tossici, quali ammonio, ammine, fenoli, tioli e indoli (Macfarlane *et al.*, 1986; Smith e Macfarlane, 1996). Le fonti proteiche disponibili sono elastina e collagene provenienti da fonti alimentari, enzimi pancreatici, cellule epiteliali morte e batteri lisati (Salminen *et al.*, 1998). A livello di cieco e colon ascendente, una fermentazione saccarolitica intensa determina una produzione consistente di SCFA e si accompagna a valori acidi di pH (5-6) e ad una rapida crescita batterica (Cummings *et al.*, 1987; Macfarlane *et al.*, 1992; Fallingborg, 1999). Al contrario, la disponibilità di substrato diminuisce nel colon discendente, il pH si avvicina alla neutralità, i processi putrefattivi diventano quantitativamente più importanti e le popolazioni batteriche appaiono statiche.

Gli SCFA svolgono un'importante funzione a livello della fisiologia dell'ospite. In particolare, il butirrato rappresenta la principale sorgente energetica delle cellule epiteliali del colon (circa il 70% dell'intake energetico), che lo consumano quasi interamente (Cummings *et al.*, 1987). Acetato e propionato, invece, sono in grado di modulare il metabolismo del glucosio; il loro assorbimento determina una minore risposta glicemica dopo ingestione di glucosio orale o di un pasto standard (Venter *et al.*, 1990; Brighenti *et al.*, 1995). Un basso indice glicemico è stato, infatti, riportato per numerosi cibi caratterizzati da alte percentuali di carboidrati non digeribili (Thorburn *et al.*, 1993; Englyst *et al.*, 1999). Acido valerico ed acidi grassi a catena ramificata, quali isobutirrico e isovalerico, si formano in quantità minore durante il catabolismo degli amminoacidi ramificati valina, leucina e isoleucina (Macfarlane e Macfarlane, 2003). Gli SCFA vengono assorbiti a livello dell'intestino umano principalmente mediante diffusione passiva dell'acido protonato, ma è attivo anche un meccanismo di uptake cellulare mediante co-trasporto di ioni  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  (Fleming *et al.*, 1991).

I microrganismi del colon esercitano un ruolo fondamentale anche nella sintesi di vitamine, quali B12 e K (Conly *et al.*, 1994; Hill, 1997), e nell'assorbimento di ioni calcio, magnesio e ferro (Roberfroid *et al.*, 1995; Miyazawa *et al.*, 1996; Younes *et al.*, 2001).

Al microbiota intestinale sono state, inoltre, attribuite (i) funzioni bioremediation-like, quale la detossificazione di carcinogeni, il che potrebbe modulare la suscettibilità dell'ospite a differenti tipi di neoplasma, sia all'interno che all'esterno dell'intestino (Reiners *et al.*, 1999); (ii) la degradazione dell'ossalato, i cui livelli sono stati correlati alla predisposizione allo sviluppo di calcoli renali (Sidhu *et al.*, 2001); (iii) la modificazione degli acidi biliari con conseguenti alterazioni del metabolismo lipidico dell'ospite (Martin *et al.*, 2007a).

Sulla base delle funzioni metaboliche esercitate dalla microflora intestinale, appare evidente come il valore nutritivo del cibo non sia, quindi, un valore assoluto ma largamente influenzato dalle capacità digestive del microbiota del singolo individuo (Bäckhed *et al.*, 2004, 2007; Gill *et al.*, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2007a). Evidenti sono le implicazioni che porteranno all'identificazione di soggetti a rischio malnutrizione od obesità, ed al trattamento di tali individui sulla base di una dieta personalizzata che tenga in considerazione l'ecologia microbica dell'intestino. Studi condotti su animali germ-free hanno, infatti, mostrato come il microbiota intestinale sia in grado di incrementare l'assorbimento di monosaccaridi con conseguente induzione di lipogenesi epatica (Bäckhed *et al.*, 2004). Inoltre, il deposito stesso di lipidi a livello di adipociti risulta favorito dalla soppressione, mediata dal microbiota, del fasting-induced adipocyte factor (Fiaf), inibitore di una lipasi lipoproteica coinvolta, come fattore limitante, nei processi di import e conservazione negli adipociti di acidi grassi derivati da

trigliceridi. In individui obesi, il microbiota intestinale ha, quindi, un'incrementata e trasmissibile capacità di promuovere il deposito di grassi ed estrarre una maggiore quantità di energia dalla dieta. L'analisi delle sequenze del gene 16S rRNA ottenute da campioni di feci umane e dell'intestino crasso di topi obesi e non, ha mostrato una significativa alterazione nella composizione del microbiota, con una riduzione del 50% nel numero di *Bacteroidetes* ed un corrispondente incremento nel phylum *Firmicutes* in condizioni di obesità (Ley *et al.*, 2005, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2006). Questa profonda modulazione della microflora intestinale è stata associata ad un aumento significativo nei livelli di polisaccaridi sierici con conseguente secrezione di citochine proinfiammatorie, ad un incremento del peso corporeo e della massa grassa, all'accumulo di trigliceridi epatici, e all'insorgenza del diabete di tipo 2 (Dumas *et al.*, 2006; Cani *et al.*, 2007). In particolare, in uno studio recente, Martin *et al.* (2007a) hanno evidenziato come il microbiota intestinale sia in grado di modulare il metabolismo lipidico dell'ospite mediante (i) modificazione del pattern metabolico degli acidi biliari; (ii) effetto diretto sull'emulsificazione ed assorbimento lipidico, ed effetto indiretto (iii) sulla conservazione degli acidi grassi nel fegato, e (iv) sui processi di lipoperossidazione.

La modulazione dei livelli sierici di lipidi ad opera del microbiota intestinale, ha suscitato un notevole interesse in relazione alla possibile eziologia di malattie cardiovascolari (Pereira e Gibson, 2002). A ceppi appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sono stati attribuiti effetti di diminuzione dei livelli di colesterolo e di protezione contro l'ossidazione di VLDL e LDL (Terahara *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2003).

## Funzioni trofiche

L'effetto trofico esercitato sull'epitelio intestinale dai SCFA ha un ruolo fondamentale nella fisiologia del colon. Tutti e 3 i maggiori SCFA (acetato, propionato e butirato) stimolano in vivo la proliferazione e la differenziazione delle cellule epiteliali a livello di intestino tenue e crasso (Frankel *et al.*, 1994). In particolare, in vitro, il butirato è in grado di inibire la proliferazione cellulare e di stimolare la differenziazione di linee cellulari epiteliali di origine neoplastica (Siavoshian *et al.*, 2000), e promuovere la reversione di cellule neoplastiche ad un fenotipo non tumorale (Gibson *et al.*, 1992). Tan *et al.* (2002) hanno evidenziato, mediante functional proteomics, come il trattamento di HT-29 con butirato sia associato ad inibizione della crescita ed apoptosi, con alterazioni nei pattern proteomici, quali riduzione nell'espressione di componenti del sistema ubiquitina-proteasoma, ed upregolazione di proteine sia pro- (caspasi 4 e catepsina D) che anti-apoptotiche (hsp27, proteina antiossidante 2 e piruvato deidrogenasi E1).

Il microbiota esercita un ruolo importante anche sullo sviluppo del sistema immunitario mucosale, sia in termini di componenti fisiche che di funzione. La mucosa intestinale rappresenta la principale superficie di contatto tra il sistema immunitario e l'ambiente esterno; a questo livello, l'interazione tra ospite e batteri promuove lo sviluppo di un sistema immunitario competente (Guarner e Malagelada, 2003). Infatti, immediatamente dopo l'esposizione a batteri luminali, si osserva un drastico aumento nel numero di linfociti intraepiteliali (Umesaki *et al.*, 1993; Helgeland *et al.*, 1996), lo sviluppo a livello di follicoli e lamina propria, dei centri germinali contenenti le cellule produttrici di immunoglobuline (Cebra *et al.*, 1998), ed un significativo incremento nella concentrazione di immunoglobuline sieriche (Butler *et al.*, 2000).

Nelle prime settimane di vita, l'interazione tra tessuto linfoide associato all'intestino e microbiota sembra essere cruciale nel determinare un appropriato sviluppo dei

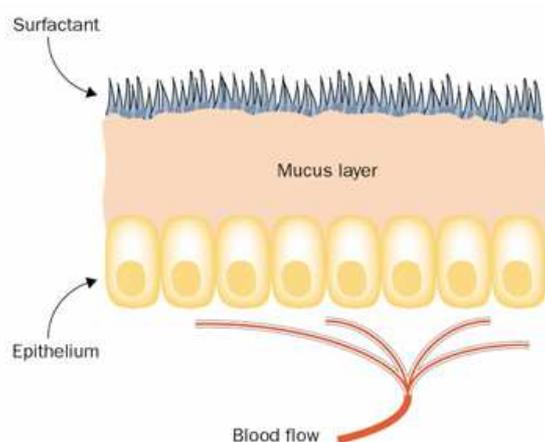
complessi circuiti immunoregolatori sia a livello mucosale che sistemico. Negli adulti, l'immunità viene costantemente rimodellata dalla interazione persistente tra ospite e batteri intestinali. La diversificazione degli antigeni di superficie sembra consentire ai microrganismi di eludere l'immunosorveglianza al fine di conservare la propria nicchia ecologica nel tratto intestinale. Ad esempio, *B. fragilis*, specie predominante a livello del colon umano, è in grado di modificare la sua antigenicità di superficie mediante produzione di differenti polisaccaridi capsulari (Krinos *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2007). D'altro canto, le difese dell'ospite si adattano a tali modifiche per riuscire a mantenere un controllo attivo sulla crescita batterica (Guarner e Malagelada, 2003).

L'interazione tra microbiota intestinale e cellule del sistema immunitario è in grado di modificare i processi di rinnovo delle cellule epiteliali. Gli effetti possono variare dalla capacità di riparare una barriera mucosale danneggiata (Pull *et al.*, 2005) ad una maggiore suscettibilità a trasformazioni neoplastiche (Chu *et al.*, 2004).

Mediante interazione con le cellule epiteliali dell'intestino umano, la colonizzazione microbica di superfici mucosali è anche in grado di regolare la sottostante microvascolarizzazione (Stappenbeck *et al.*, 2002).

## Funzioni protettive

Oltre alla funzione protettiva svolta dalla barriera mucosale, separando il milieu interno dall'ambiente luminale (Fig. 6), una cruciale linea di resistenza alla colonizzazione da parte di microrganismi esogeni è rappresentata dal microbiota intestinale. Animali germ-free, infatti, risultano più sensibili alle infezioni (Baba *et al.*, 1991; Taguchi *et al.*, 2002). Diversi sono i meccanismi implicati nell'effetto barriera. In vitro, i batteri competono per siti d'attacco a livello dell'orlo a spazzola delle cellule dell'epitelio intestinale. Batteri aderenti non patogeni possono, quindi, prevenire l'attacco ed impedire la successiva penetrazione di microrganismi enteroinvasivi (Bernet *et al.*, 1994). Un ulteriore fattore di competizione è costituito dalla disponibilità di nutrienti nelle nicchie ecologiche e dall'affinità per i nutrimenti stessi, il che può favorire una maggiore velocità di sviluppo. Infine, i batteri possono inibire la crescita di eventuali competitori mediante produzione di sostanze antimicrobiche, le batteriocine (Brook, 1999; Lievin *et al.*, 2000). L'ospite può controllare la produzione di tali sostanze, poiché la maggior parte di esse sono proteine, degradabili da proteasi digestive.



**Fig. 6. Barriera mucosale.** La barriera mucosale separa il milieu interno dall'ambiente luminale. La funzione barriera dipende dall'integrità della mucosa e dalla reattività di fattori dinamici di difesa, quali flusso sanguigno mucosale, secrezioni epiteliali, e cellule immunocompetenti. Il layer di muco è formato dall'interazione tra varie secrezioni mucosali, comprese glicoproteine della mucina, peptidi trefoil, e fosfolipidi surfattanti

Il microbiota intestinale è paragonabile, quindi, ad un efficiente e stabile bioreattore naturale (Sonnenburg *et al.*, 2004), che oppone resistenza all'insorgenza di subpopolazioni patogene che potrebbero danneggiare l'ospite (Bäckhed *et al.*, 2005). Piuttosto che competere con le specie mutualistiche, il patogeno si avvale di strategie in grado di procurargli habitat che non siano occupati da membri del microbiota intestinale. Per fare questo si avvale di un'alta dose infettiva, di organelli specializzati per l'attacco e l'invasione e di enterotossine per indurre secrezione d'acqua (Nataro e Kaper, 1998).

In uno studio, Ley *et al.* (2006) hanno evidenziato come l'intera comunità microbica possa risultare patogena, e rappresentare un fattore di rischio ambientale che può contribuire all'insorgenza di disordini. Questo tipo di rischio, tuttavia, è dipendente dalla concomitanza di fattori di rischio quali genotipo dell'ospite, dieta e comportamento di una comunità microbica.

## ***Phylum Actinobacteria***

### ***Caratteristiche generali***

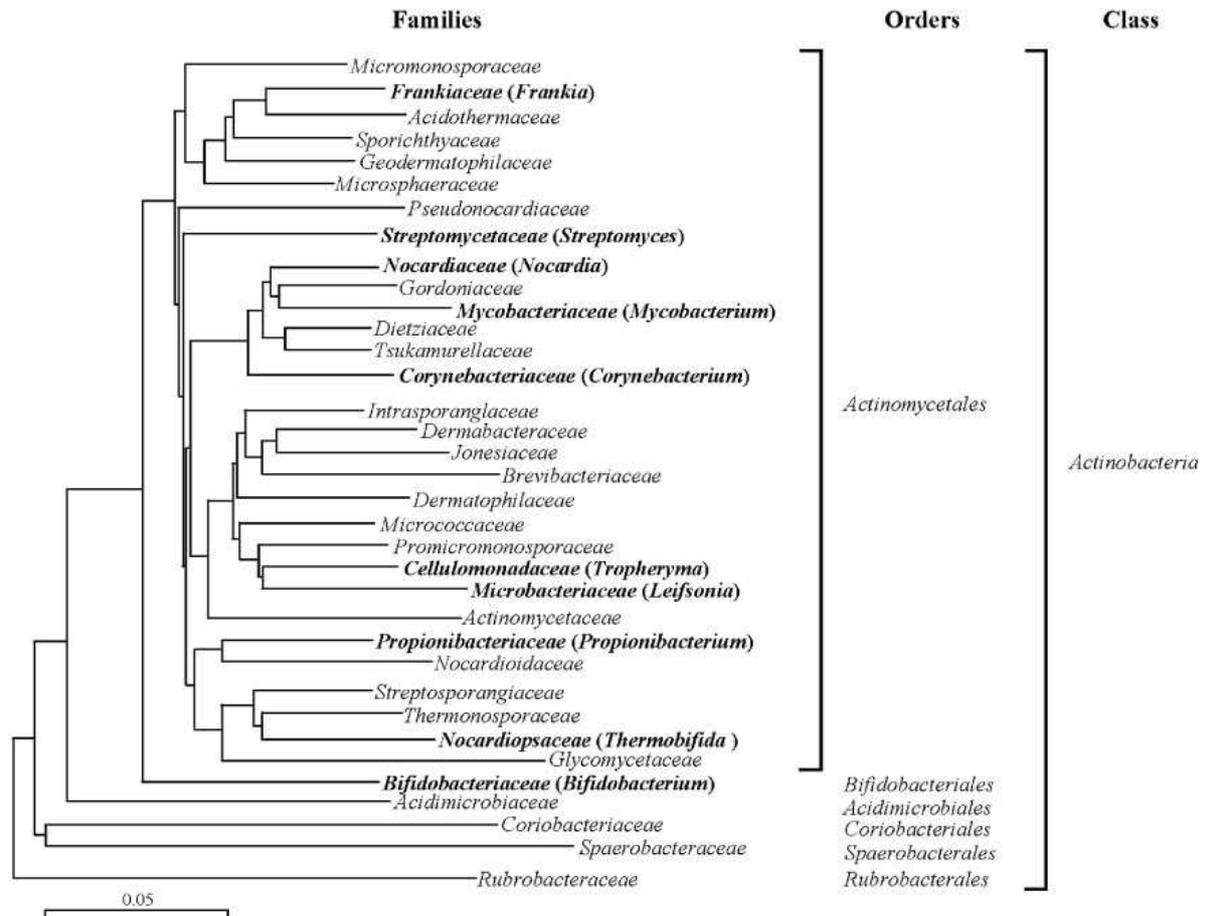
In termini di numero e diversità delle specie identificate, il phylum *Actinobacteria* rappresenta una delle maggiori unità tassonomiche tra i 18 principali lineage attualmente riconosciuti all'interno del dominio *Bacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997). Le 5 sottoclassi ed i 14 subordini (Stackebrandt, 2000) di *Actinobacteria* comprendono batteri Gram-positivi caratterizzati da un alto contenuto G+C, variabile dal 51% in alcuni corynebacteria fino al 70% in *Streptomyces* e *Frankia*. Un'eccezione è rappresentata dal patogeno obbligato *Tropheryma whipplei*, il cui genoma possiede un contenuto G+C inferiore al 50%.

Una morfologia estremamente varia [coccoide (*Micrococcus*), sia coccoide che a bastoncello (ad es. *Arthrobacter*), a forma di ife frammentate (ad es. *Nocardia* spp.), o micelio permanente altamente differenziato (ad es. *Streptomyces* spp.)] caratterizza il phylum *Actinobacteria* (Atlas, 1997). Differenti sono anche le proprietà fisiologiche e metaboliche di questi microrganismi, quali produzione di un ampio range di enzimi extracellulari e soprattutto formazione di una varietà di metaboliti secondari (Schrempf, 2001), la maggior parte dei quali potenti antibiotici (Lechevalier e Lechevalier, 1967), una caratteristica che ha reso la specie *Streptomyces* la primaria produttrice di antibiotici impiegata nelle industrie farmaceutiche (Berdy, 2005). Relativamente agli stili di vita, il phylum *Actinobacteria* comprende patogeni (ad es. *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp., e *Propionibacterium* spp.), microrganismi del suolo (*Streptomyces* spp.), commensali delle piante (*Leifsonia* spp.), simbionti azoto fissatori (*Frankia*), e abitanti del tratto gastrointestinale (*Bifidobacterium* spp.). Gli *Actinobacteria* risultano ampiamente distribuiti in ecosistemi sia terrestri che acquatici, ma soprattutto nel suolo, dove svolgono un ruolo fondamentale nel riciclo di biomateriale refrattario mediante decomposizione e formazione di humus (Goodfellow e Williams, 1983; Stach e Bull, 2005). In particolare, ceppi appartenenti al genere *Bifidobacterium* sono impiegati come ingredienti attivi in una varietà di functional food. Le loro proprietà health-promoting o probiotiche includono protezione contro patogeni mediata da processi di esclusione competitiva, attività bile salt hydrolase, modulazione del sistema immune, e capacità di aderire al muco o all'epitelio intestinale (Lievin *et al.*, 2000; Ouwehand *et al.*, 2002; Stanton *et al.*, 2005).

### ***Tassonomia***

L'analisi delle sequenze del gene 16S rRNA ha consentito l'identificazione di 39 famiglie e 130 generi nel phylum *Actinobacteria*, inclusi batteri Gram-positivi ad alto contenuto G+C caratterizzati da semplici morfologie, quali bifidobatteri e micrococchi (Fig. 7) (Embley e Stackebrandt, 1994). Nell'albero filogenetico degli *Actinobacteria*, una distinta ramificazione separa i bifidobatteri da tutte le altre famiglie note.

Il phylum *Actinobacteria* appare caratterizzato da una sinapomorfia molecolare unica: un'inserzione omologa di circa 100 nucleotidi tra le eliche 54 e 55 del gene 23S rRNA (Roller *et al.*, 1992).



**Fig. 7.** Albero filogenetico del phylum *Actinobacteria*.

L'albero è stato costruito da Ventura *et al.* (2007a), sulla base delle sequenze del gene 16S rRNA. La scale bar indica 5 nucleotidi. Le famiglie contenenti membri di cui è stato sequenziato l'intero genoma, sono riportate in grassetto.

## ***Genere Bifidobacterium***

### ***Storia e tassonomia***

I bifidobatteri sono stati isolati per la prima volta nel 1899 ad opera di Tissier, dalle feci di neonati allattati con latte materno. Questi microrganismi Gram-positivi, anaerobi, non produttori alcun tipo di gas, furono denominati per la loro morfologia bifida *Bacillus bifidus*. In seguito Orla-Jensen, studiando i batteri produttori di acido lattico, osservò come anche *B. bifidus* fosse in grado di produrre tale acido e lo classificò nella famiglia delle *Lactobacteriaceae*, con la denominazione di *Lactobacillus bifidus*. Nonostante già nel 1924 Orla-Jensen avesse proposto il genere *Bifidobacterium* come taxon separato (Orla-Jensen, 1924), la denominazione *L. bifidus*, basata esclusivamente su elementi morfologici e sull'analisi dei prodotti di fermentazione, permase fino agli anni '70. L'attribuzione di una collocazione tassonomica certa per *B. bifidus* era resa complicata soprattutto dall'elevato polimorfismo.

Nel 1957 si conclude quello che Poupard *et al.* (1973) chiamano "primo periodo", durante il quale non vi fu nessuna rilevante novità nella conoscenza dei bifidobatteri, per via delle difficoltà incontrate nel definire un mezzo di coltura adatto all'isolamento ed al mantenimento dei microrganismi.

Nel "secondo periodo" viene individuato un terreno complesso in grado di consentire la crescita selettiva di *B. bifidus*, permettendo così di basare la classificazione su prove biochimiche oltre che su elementi morfologici. Dehnert per primo propose di suddividere i bifidobatteri in cinque gruppi in base alle loro capacità di fermentare 24 zuccheri (Dehnert, 1957). Questo studio fu approfondito e ampliato da Reuter (1963) che, sulla base delle caratteristiche fermentative e sierologiche, identificò e classificò 7 nuove specie di origine umana: *B. bifidus* var. a e b, *B. infantis*, *B. parvulorum* var. a e b, *B. breve* var. a e b, *B. liberorum*, *B. lactensis*, *B. adolescentis* var. a e b e *B. longum* var. a e b. Nel 1969 Mitsuoka, estendendo gli studi dall'uomo agli animali, definì due sottospecie di *B. longum* (*animalis* a e b) e due nuove specie isolate da feci di maiale, pollo, vitello e ratto: *B. thermophilum* e *B. pseudolongum*. Dal ruminale di buoi e cavalli furono isolate le specie *B. ruminale* e *B. globosum* (Scardovi *et al.*, 1969), mentre nell'intestino di ape furono scoperte tre nuove specie dalla morfologia del tutto peculiare: *B. asteroides*, *B. indicum* e *B. coryneforme* (Scardovi e Trovatelli, 1969). Questi ultimi studi si avvalsero dell'individuazione di una via fermentativa caratteristica dei bifidobatteri (Scardovi e Trovatelli, 1965; De Vries *et al.*, 1967), il cui enzima chiave è rappresentato dalla fruttosio-6-P fosfochetolasi. Tale attività enzimatica, presente negli estratti cellulari, dimostra l'appartenenza delle cellule esaminate al genere *Bifidobacterium*. La presenza di questo pathway metabolico permette di differenziare inoltre il genere *Bifidobacterium* dai lactic acid bacteria (LAB), tra cui è stato, invece, tradizionalmente classificato [sulla base dell'analisi della struttura della mureina (Kandler e Lauer, 1974)], nonostante la scarsa correlazione filogenetica. I LAB comprendono specie batteriche Gram-positive e catalasi-negative, in grado di produrre acido lattico come principale prodotto finale della fermentazione di carboidrati.

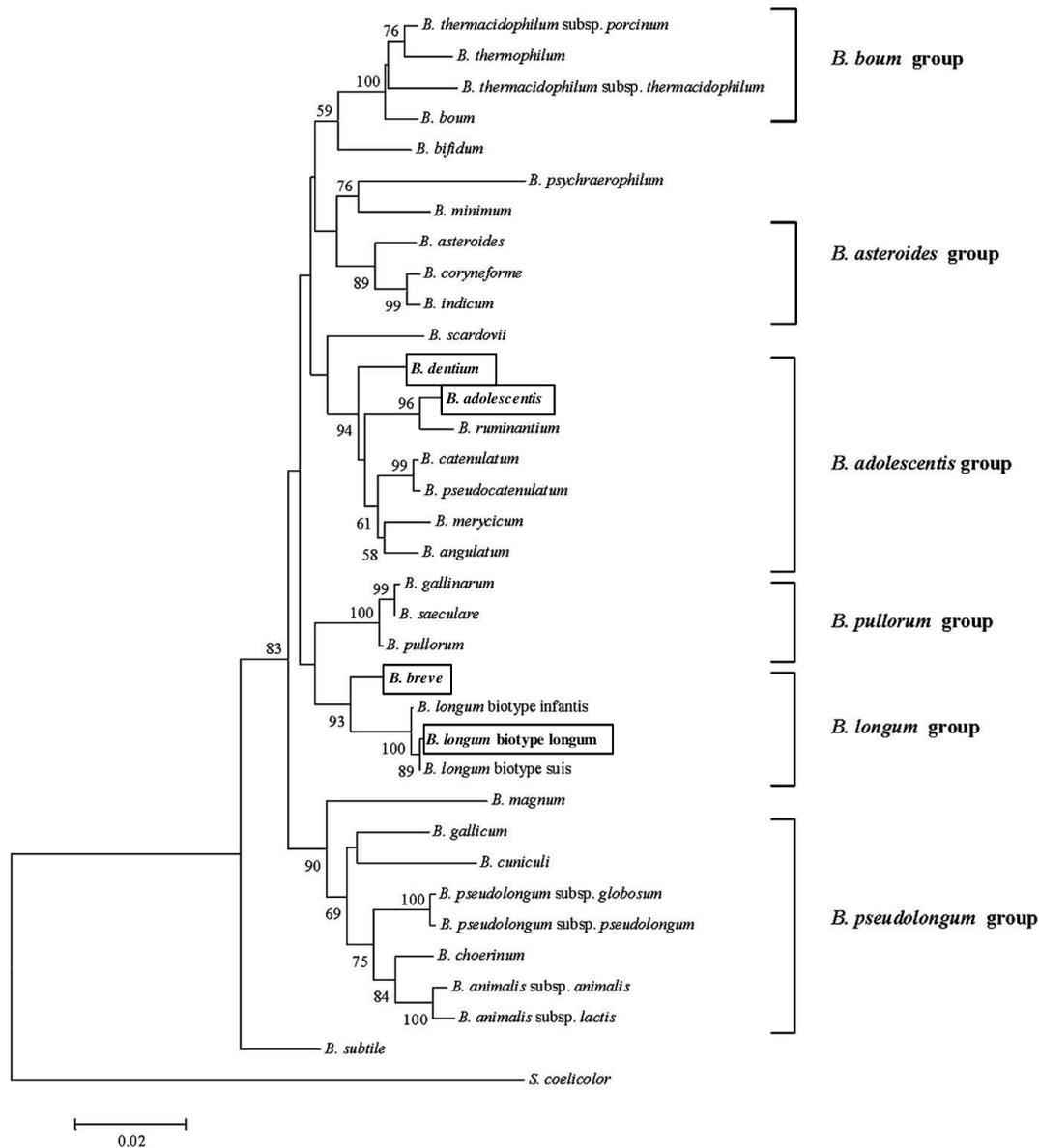
Una svolta decisiva si ebbe con i dati riguardanti l'ibridazione DNA-DNA (Scardovi *et al.*, 1970; Scardovi *et al.*, 1971) che stabilirono quantitativamente il grado di omologia tra due specie, fornendo un criterio tassonomico molto più significativo ed indipendente dall'habitat del microrganismo. Isolati caratterizzati da un valore di ibridazione DNA-DNA

maggiore del 70% e con una differenza inferiore al 5% nelle temperature di melting, sono considerati appartenenti alla stessa specie. Tali dati furono messi in relazione con i pattern elettroforetici di proteine solubili, anch'essi usati a scopo sistematico (Biavati *et al.*, 1982).

Recentemente, nella tassonomia dei bifidobatteri, è diventata pratica comune l'analisi della sequenza del gene 16S rRNA (Matsuki *et al.*, 1998, 1999; Ventura *et al.*, 2001a, 2001b, 2003a; Ventura e Zink, 2002), o di geni housekeeping, quali *recA* (Kullen *et al.*, 1997; Ventura e Zink, 2003c), *tufA* (Ventura *et al.*, 2003b), *atpD* (Ventura *et al.*, 2004a), *groEL* (Jian *et al.*, 2001; Ventura *et al.*, 2004b), *dnaK* (Ventura *et al.*, 2005a), *grpE* (Ventura *et al.*, 2005a), *clpP* (Ventura *et al.*, 2005d), e *hrcA* (Ventura *et al.*, 2005c). Questo tipo di identificazione si basa sull'amplificazione specifica di frammenti di DNA, successiva reazione di sequenziamento e confronto con i database pubblici, procedure che, al contrario dei test di ibridazione a DNA, sono rapide, riproducibili ed economiche (Gevers *et al.*, 2005). Tuttavia, alberi costruiti sulla base di un singolo gene non riflettono in maniera adeguata le relazioni filogenetiche, a causa di possibili eventi di HGT, ricombinazione genica, e frequenze di mutazione incongruenti. Solo la costruzione di un albero filogenetico basato su un set di allineamenti combinati di proteine ortologhe conservate [supertree (Bininda-Emonds, 2004)] è in grado di rappresentare in maniera affidabile le relazioni evolutive tra batteri (Brown *et al.*, 2001). Una recente analisi filogenetica del genere *Bifidobacterium*, effettuata mediante un approccio di concatenazione multigenico, ha mostrato un incremento nella capacità discriminatoria e nella solidità dell'albero filogenetico così ottenuto (Ventura *et al.*, 2006b). Inoltre, tale analisi ha evidenziato come il progenitore di tutti i gruppi di *Bifidobacterium* fino ad ora noti sia strettamente correlato all'attuale specie *B. asteroides*.

La presenza di inserzioni e delezioni conservate all'interno di sequenze codificanti per subunità I della citocromo c ossidasi, CTP sintetasi e glutamil-tRNA sintetasi, e nel gene 23S rRNA, costituisce una caratteristica molecolare condivisa da bifidobatteri e altri *Actinobacteria* (Gao e Gupta, 2005). Recenti evidenze suggeriscono, in particolare, una forte correlazione tra specie appartenenti all'ordine *Bifidobacteriales* e membri dell'ordine *Micrococccineae* (*Arthrobacter*, *Tropheryma*, *Leifsonia*, *Kinenococcus*, etc.), entrambi "deep-branching lineage" all'interno del phylum *Actinobacteria* (Gao e Gupta, 2006).

In base al Taxonomic Outline of the Prokaryotes (Garrity *et al.*, 2004), la famiglia *Bifidobacteriaceae*, unica all'interno dell'ordine *Bifidobacteriales*, è costituita da 6 generi, *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Scardovia*, *Parascardovia*, *Aeriscardovia* e *Falcivibrio* (Stackebrandt, 2000; Felis e Dellaglio, 2007), di cui solo *Bifidobacterium* contiene più di una specie. Gli altri generi comprendono *Aeriscardovia aeriphila*, *Gardnerella vaginalis*, *Parascardovia denticolens* (inizialmente classificata come *B. denticolens*) e *Scardovia inopinata* (inizialmente classificata come *B. inopinatum*). Le specie appartenenti al genere *Falcivibrio*, *F. grandis* e *F. vaginalis*, sono state trasferite al genere *Mobiluncus* e, rispettivamente, alle specie *M. mulieris* e *M. curtisii* (Hoyles *et al.*, 2004), che appartengono all'ordine *Actinomycetales*, subordine *Actinomycineae*, famiglia *Actinomycetaceae* (Garrity *et al.*, 2004). Il genere *Bifidobacterium* contiene 6 cluster filogenetici, denominati *B. boum*, *B. asteroides*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. pullorum* e *B. pseudolongum* (Fig. 8) (Ventura *et al.*, 2006b).



**Fig. 8.** Albero filogenetico del genere *Bifidobacterium*.

L'albero è stato costruito da Ventura *et al.* (2007b), sulla base delle sequenze del gene 16S rRNA, utilizzando come radice *S. coelicolor*. La scale bar rappresenta le distanze calcolate. I rettangoli indicano specie di *Bifidobacterium* di cui è disponibile la sequenza genomica intera o parziale.

## Caratteristiche generali

I bifidobatteri sono bastoncelli dalle estremità bifide (a forma di Y), dalle dimensioni comprese tra i 2 ed i 5  $\mu\text{m}$ , visibili come entità singole, ma anche in forma di catene o aggregati. Si tratta di microrganismi saccarolitici, anaerobi, immobili, asporigeni, non filamentosi e non produttori di gas. Sono catalasi-negativi, tranne alcune eccezioni (*B. indicum* e *B. asteroides* quando crescono in presenza di aria). Il contenuto G+C del loro genoma varia dal 42 al 67 mol% (Biavati e Mattarelli, 2001).

Delle 29 specie di *Bifidobacterium* attualmente riconosciute, fino ad ora è stato sequenziato il genoma di soli 8 ceppi e ci sono altri 10 ceppi che sono in fase di lavorazione e che a breve potrebbero risultare completati. Tali genomi, di dimensioni comprese tra 1.9 e 2.9 Mb, mostrano caratteristiche strutturali tipiche di un cromosoma batterico, quali (i) co-orientamento di trascrizione genica e replicazione del DNA (McLean *et al.*, 1998); (ii) maggiore preponderanza di G e ridotto numero di C nella composizione

nucleotidica del leading strand di DNA (Frank e Lobry, 1999); (iii) presunta origine di replicazione (Qin *et al.*, 1999), caratterizzata da una costellazione di geni attorno all'origine stessa (ad es. *rpmH*, *dnaA*, *dnaN*, e *recF*), da una particolare asimmetria dei nucleotidi GC ([G-C]/[G+C]), e dalla presenza, immediatamente a monte del gene *dnaA*, di box multipli DnaA e sequenze ricche in AT (Christensen *et al.*, 1999).

Tab. 2. Caratteristiche generali di alcuni dei genomi di *Bifidobacterium*.

General features	<i>B. longum</i> biotype longum NCC2705	<i>B. breve</i> UCC2003	<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	<i>B. dentium</i> Bd1
Status	F	F	F	F
Genome size (bp)	2,256,646	2,422,668	2,089,645	2,636,367
No. of ORFs	1732	1868	1,701	2197
% G+C content	60	58.73	59	58
No. of rRNA operons	4	2	5	3
No. of tRNAs	57	54	70	55
Intact insertion sequence elements	16	26	-	-
Prophage-like sequences	1 (Bl-1)	1 (Bbr-1)	-	2
Reference	Schell <i>et al.</i> , 2002	UCC Unpublished	Gifu University, GenBank AP009256	UniPR&UCC, NC_013714

F, finished;

UCC, National University of Ireland, Cork, Ireland; UniPr, University of Parma, Italy.

-, not available.

In *Bifidobacterium*, il numero di operoni rRNA può variare da 1 a 5 (Candela *et al.*, 2004), il che probabilmente riflette le differenti strategie ecologiche (Klappenbach *et al.*, 2000). Anche il numero di geni tRNA, nei genomi di *Bifidobacterium* sequenziati fino ad ora, è variabile (54 in *B. breve* UCC2003, 56 in *B. longum* biotype longum NCC2705, 70 in *B. adolescentis*). I tRNA sono risultati rappresentativi di tutti e 20 gli amminoacidi e ridondanti per tutti, tranne che per cisteina, istidina, isoleucina, fenilalanina e triptofano.

## Morfologia

La forma a bastoncino che caratterizza il genere *Bifidobacterium* viene mantenuta solamente in condizioni nutrizionali ottimali, quali quelle che caratterizzano l'habitat naturale, mentre in colture di laboratorio vengono osservate forme irregolari con rigonfiamenti, protuberanze e ramificazioni. Tale pleomorfismo è stato attribuito a particolari richieste nutrizionali probabilmente determinate da una composizione della parete cellulare più complessa rispetto ad altri generi. L'ipotesi è avvalorata dall'osservazione che lo sviluppo in mezzi di coltura privi di N-acetil-ammino-zuccheri, precursori nella sintesi della parete cellulare, induce la comparsa di forme irregolari (Glick *et al.*, 1960). Lo stesso effetto è stato riscontrato in presenza di NaCl, mentre un'azione contraria sembra essere associata agli ioni  $Ca^{2+}$  (Kojima *et al.*, 1970a, 1970b). Una reversione dalla forma irregolare alla forma bastoncellare è stata osservata in bifidobatteri cresciuti in terreno minimo, in seguito all'aggiunta nel terreno colturale degli amminoacidi alanina, acido aspartico, acido glutammico e serina (Husain *et al.*, 1972). Oltre alle condizioni colturali (Biavati e Mattarelli, 2001), il morfotipo del genere *Bifidobacterium* può variare in relazione a specie e fase di crescita (Fig. 9) (Klijn *et al.*, 2005).

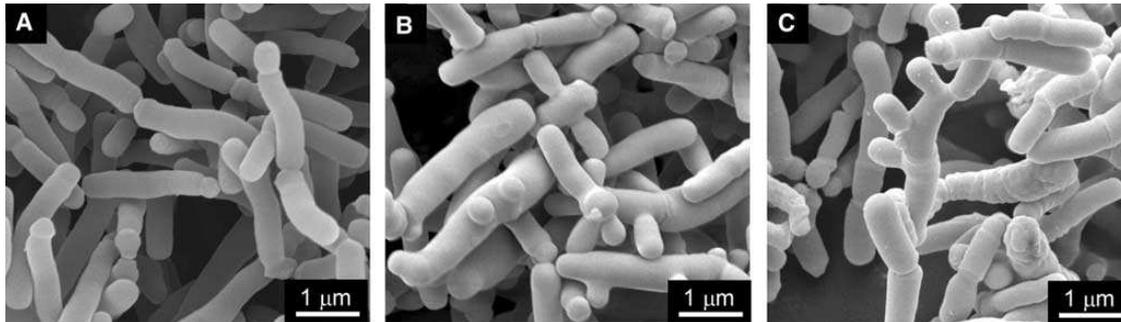


Fig. 9. *B. longum* NCC2705 al microscopio elettronico.

Le cellule sono state cresciute in MRS in anaerobiosi. In fase esponenziale (A) si può osservare la tipica forma bastoncellare, mentre in fase di transizione (B) e stazionaria (C) prevale la forma ramificata.

## Fisiologia

Le condizioni ottimali per la crescita di *Bifidobacterium* sono rappresentate da una temperatura compresa tra 36° e 38°C, e da un valore di pH tra 6 e 7 e un basso potenziale redox. Benché sia richiesta anaerobiosi stretta, i diversi ceppi possono presentare variabilità nella tolleranza all'O<sub>2</sub> sia in termini quantitativi che per i meccanismi biochimici alla base di tale sensibilità (De Vries e Stouthamer, 1968). Molto importante per questo aspetto è la presenza o meno della catalasi, enzima responsabile della rimozione dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'assenza di questo enzima provoca un accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che inibisce la fruttosio-6-P fosfochetolasi, enzima chiave dei processi fermentativi in *Bifidobacterium*, con conseguente inibizione della crescita. Tuttavia, in alcuni ceppi anaerobi stretti è presente una debole attività catalasica e l'assenza di sviluppo si giustifica con l'accumulo di O<sub>2</sub> nel mezzo di coltura, che porta ad un aumento del potenziale redox.

## Habitat

I bifidobatteri sono stati isolati da nicchie ecologiche differenti ma connesse tra di loro: intestino di mammiferi [nel microbiota umano di neonati predominano *B. breve* e *B. longum* biotype infantis; in quello adulto *B. adolescentis*, *B. longum* biotype longum e *B. catenulatum* (Satokari *et al.*, 2001)], cavità orale umana (*B. dentium*), cibo (*B. animalis* subsp. *lactis*), intestino di insetti (*B. asteroides*, *B. indicum*, e *B. coryneforme*), acque di scolo e liquami di fogna (*B. minimum* e *B. subtile*) (Tab. 4).

Tab. 3. Specie appartenenti al genere *Bifidobacterium* ed origine ecologica.

Species	Origin
<i>B. breve</i>	Infant feces
<i>B. bifidum</i>	Infant feces
<i>B. subtile</i>	Sewage
<i>B. asteroides</i>	Hindgut of honeybee
<i>B. magnum</i>	Rabbit feces
<i>B. adolescentis</i>	Intestine of adult
<i>B. catenulatum</i>	Intestine of adult
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Infant feces
<i>B. indicum</i>	Hindgut of honeybee
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>Pseudolongum</i>	Swine feces
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>Globosum</i>	Bovine rumen
<i>B. gallicum</i>	Human feces
<i>B. cuniculi</i>	Rabbit feces
<i>B. psychraerophilum</i>	Porcine feces
<i>B. angulatum</i>	Human feces
<i>B. animalis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Yoghurt
<i>B. animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	Animal feces
<i>B. dentium</i>	Dental caries

<i>B. thermophilum</i>	Swine feces
<i>B. longum</i> biotype longum	Intestine of adult
<i>B. longum</i> biotype infantis	Intestine of infant
<i>B. longum</i> biotype suis	Swine feces
<i>B. choerinum</i>	Swine feces
<i>B. merycicum</i>	Bovine rumen
<i>B. minimum</i>	Sewage
<i>B. saeculare</i>	Rabbit feces
<i>B. gallina rum</i>	Chicken cecum
<i>B. pullorum</i>	Chicken feces
<i>B. thermoacidophilum</i> subsp. thermoacidophilum	Waste water
<i>B. ruminantium</i>	Bovine rumen
<i>B. thermoacidophilum</i> subsp. Porcinum	Piglet feces
<i>B. boum</i>	Rumen cattle
<i>B. coryneforme</i>	Hindgut of honeybee
<i>B. scardavi</i>	Human blood

L'intestino dei mammiferi rappresenta, sicuramente, l'habitat più naturale per la sopravvivenza e la moltiplicazione di *Bifidobacterium*; costituiscono circa il 3-5% dell'intero microbiota intestinale, anche se il loro reale contributo può variare tra individui e in relazione all'età e alla dieta (Favier *et al.*, 2002; Lay *et al.*, 2005; Vaughan *et al.*, 2005; Zoetendal *et al.*, 2006). A livello del tratto gastrointestinale, possono essere presenti sia come autoctoni che alloctoni (Tannock, 1999). I bifidobatteri alloctoni derivano da quegli alimenti nel quale vengono aggiunti intenzionalmente per via dei potenziali effetti benefici sulla salute dell'ospite. Dopo ingestione di tali preparazioni, i bifidobatteri alloctoni persistono nel tratto gastrointestinale ma solo per brevi periodi di tempo (Ouwehand *et al.*, 2004; Bartosch *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2005). I ceppi appartenenti alle specie *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* biotype infantis e *B. longum* biotype longum, sono i bifido batteri che fino ad ora hanno mostrato proprietà probiotiche. All'interno dell'intestino umano, questi microrganismi sono in grado di fermentare una grande varietà di oligosaccaridi, alcuni dei quali sono impiegati commercialmente al fine di incrementare *in situ* il numero di bifidobatteri e di altri batteri probiotici [prebiotic concept (Gibson e Roberfroid, 1995)].

Altre nicchie colonizzate dai bifidobatteri sono costituite dalla cavità orale, che ospita *B. adolescentis* e *B. dentium*, probabilmente coinvolto nella formazione della carie (Scardovi e Crociani, 1974), e dalla vagina, in cui sono presenti *B. breve*, *B. longum* e *B. adolescentis*.

I bifidobatteri sono stati ampiamente studiati e caratterizzati negli animali, soprattutto erbivori ruminanti. Alcune specie sembrano avere specificità d'ospite: *B. magnum* e *B. cuniculi* (Scardovi *et al.*, 1979) sono presenti solo nelle feci di coniglio; *B. pullorum* (Trovatelli *et al.*, 1974) e *B. gallinarum* (Watabe *et al.*, 1983) solo in feci di pollo; *B. suis* (Matteuzzi *et al.*, 1971) nelle feci di suino.

### ***Nutrizione, metabolismo e capacità biosintetiche***

Il genere *Bifidobacterium* è caratterizzato da una richiesta di nutriliti molto eterogenea. Molte specie utilizzano come unica fonte azotata i sali di ammonio (Hassinen *et al.*, 1951), mentre altre richiedono l'aggiunta nel mezzo di coltura di composti azotati organici (Matteuzzi *et al.*, 1978). L'azoto assunto dal terreno viene utilizzato per la biosintesi di amminoacidi, soprattutto alanina, valina e acido aspartico. Per quanto riguarda la richiesta di vitamine, anche in questo caso c'è molta variabilità all'interno del genere (Trovatelli e Biavati, 1978). Diverse vitamine idrosolubili come tiamina, acido folico, acido nicotinico, piridossina e vitamina B12 (Deguchi *et al.*, 1985),

possono essere sintetizzate, mentre la riboflavina deve essere aggiunta al terreno di coltura per consentire la crescita dei bifidobatteri. Studi riguardanti la richiesta di elementi metallici sono stati condotti su *B. bifidum* da Bezkorovainy e Toupuzian (Bezkorovainy e Topouzian, 1983; Topouzian *et al.*, 1984). In particolare, sono stati chiariti gli aspetti riguardanti il metabolismo ed i meccanismi di uptake di  $Fe^{2+}$ ; i risultati indicano come pompe elettrogeniche dipendenti da gradienti protonici possano essere coinvolte nella cattura di questo ione.

Le informazioni relative alle capacità biosintetiche di *Bifidobacterium* sono piuttosto limitate e, fino ad ora, basate sull'analisi della sequenza genomica solo di *B. longum* biotype longum NCC2705 (Schell *et al.*, 2002). Nel suo genoma, sono presenti i geni responsabili della sintesi di almeno 19 amminoacidi a partire da ammonio o da altri precursori biosintetici quali fosfoenolpiruvato, oxaloacetato, oxoglutarato e fumarato (quest'ultimo fornito da un parziale ciclo di Krebs, in cui mancano gli enzimi fumarasi, oxoglutarato deidrogenasi e malato deidrogenasi). L'assenza, invece, dei geni coinvolti nel pathway di assimilazione solfato/solfito non ha ancora permesso di chiarire se *Bifidobacterium* sia in grado o meno di biosintetizzare la cisteina. Probabilmente, il pathway biosintetico è integro ma richiede una fonte di zolfo ridotto (Grundy e Henkin, 1998), che potrebbe essere fornito, come idrogeno solfuro, da batteri del colon solfato-riduttori, suggerendo una relazione sinergica tra questi gruppi all'interno del microbiota intestinale. *B. longum* biotype longum NCC2705 possiede tutti gli enzimi necessari per la biosintesi di pirimidine e purine a partire da glutammina, così come quelli richiesti per la sintesi di acido folico, tiamina, e acido nicotinico. Al contrario, i pathway per la biosintesi *de novo* di riboflavina, biotina, cobalammina, pantotenato, lipoato e piridossina, appaiono parziali se non completamente assenti. Nel complesso, le capacità biosintetiche di *B. longum* biotype longum NCC2705 sembrano indicare l'adattamento di *Bifidobacterium* ad un ambiente in cui non sono disponibili fonti esterne di amminoacidi, nucleotidi e determinate vitamine. Studi preliminari di analisi genomica comparativa, supportati dallo sviluppo di medium sintetici a composizione definita, hanno confermato la maggior parte di queste caratteristiche prototrofiche e auxotrofiche (O'Connell-Motherway, Forde, Fitzgerald and van Sinderen, unpublished results).

In *Bifidobacterium* risultano sovraespressi COG implicati nel controllo del ciclo e della divisione cellulare (Fic, FtsE, FtsK, FtsX, FtsZ, ParA e Smc). Inoltre, quasi il 7% del genoma di *B. longum* biotype longum NCC2705 è dedicato alla sintesi di regolatori trascrizionali, per la maggior parte molecole repressore (Tab. 4). I repressori garantiscono una risposta più rapida e stringente a modifiche ambientali, quali variabile disponibilità di substrato a livello dell'intestino umano.

**Tab. 4.** COG in *Bifidobacterium* ed altri batteri dell'intestino umano.

COG description	% in Bifidobacterium	% in Bacteroides	% in Actinobacteria	% in Bacteria
Translation	6.61	3.35	4.13	3.65
RNA processing and modification	0.05	0.00	0.02	0.01
Transcription	6.81	3.31	7.06	4.94
Replication, recombination and repair	5.58	4.09	4.63	4.42
Chromatin structure and dynamics	0.00	0.00	0.01	0.01
Cell cycle control, mitosis and meiosis	1.32	0.72	0.83	0.69
Defense mechanisms	2.30	1.70	1.40	1.15
Signal transduction mechanisms	3.62	3.27	3.48	3.44
Cell wall/membrane biogenesis	3.62	6.35	3.13	4.10
Cell motility	0.78	0.28	0.43	1.37
Cytoskeleton	0.05	0.00	0.01	0.01
Extracellular structures	0.19	0.00	0.02	0.02

Intracellular trafficking and secretion	1.37	1.48	0.93	1.72
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2.94	2.14	2.48	2.61
Energy production and conversion	2.64	3.99	4.53	4.37
Carbohydrate transport and metabolism	9.79	5.65	4.23	3.48
Amino acid transport and metabolism	9.79	4.39	7.14	5.90
Nucleotide transport and metabolism	3.28	1.63	1.89	1.63
Coenzyme transport and metabolism	2.59	3.04	3.13	2.65
Lipid transport and metabolism	2.01	1.69	4.07	2.66
Inorganic ion transport and metabolism	4.85	4.06	4.74	3.62
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	0.54	0.89	3.64	1.79
General function prediction only	11.56	7.58	11.13	8.19
Function unknown	4.80	3.60	5.06	4.81
Not in COGs	12.88	38.61	20.41	32.68

I dati sono stati recuperati da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La categoria "Not in COGs" include molte proteine ipotetiche.

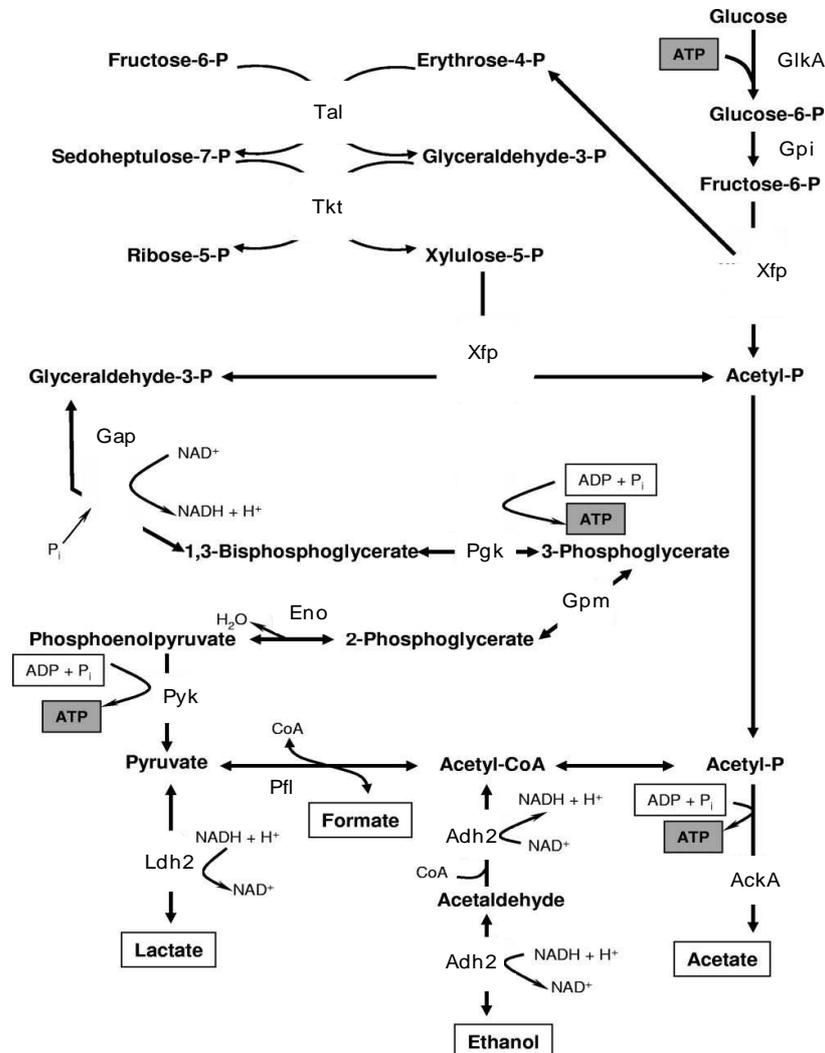
Relativamente alle capacità fermentative, *B. longum* biotype longum NCC2705 possiede tutti gli enzimi richiesti per il metabolismo, tramite lo shunt del fruttosio-6-P, di glucosio, gluconato, fruttosio, galattosio, N-acetil-glucosammina, N-acetil-galattosammina, arabinosio, xilosio, ribosio, saccarosio, lattosio, raffiniosio, cellobiosio, melibiosio, gentobiosio, maltosio, isomaltosio e mannosio. Alcune di queste sostanze, quali glucosio, lattosio, saccarosio e fruttosio, sono fermentate universalmente, mentre altri carboidrati ed alcuni alcoli come mannitolo e sorbitolo, possono essere utilizzati come substrato per processi fermentativi solo da alcune specie. E' stato calcolato che circa il 10% del suo genoma sia coinvolto nel metabolismo e nel trasporto di carboidrati (Tab. 5), una percentuale di gran lunga maggiore se confrontata con quella di altri microrganismi del tratto gastrointestinale umano, quali *E. coli*, *Enterococcus faecium* e *Lactococcus lactis*. Un adattamento genico di simile portata risulta, invece, condiviso da batteri intestinali appartenenti al phylum *Bacteroidetes*, e probabilmente, rappresenta una specifica risposta di adattamento alla nicchia ecologica del tratto gastrointestinale, conferendo a *Bifidobacterium* un vantaggio competitivo e consentendo di minimizzare il cross-feeding. Il genoma di *B. longum* biotype longum NCC2705 contiene più di 40 glicosil idrolasi, molte delle quali esercitano la loro attività come enzimi secreti. I geni codificanti per questi enzimi, sono per lo più associati tra loro in unità genetiche caratterizzate da un'organizzazione modulare, che prevede la presenza di uno specifico repressore LacI-type, un trasportatore oligosaccaridico MalEFG-type, e da 1 a 6 geni codificanti differenti classi di glicosil idrolasi.

I bifidobatteri sono in grado di degradare anche un ampio range di glicoconjugati dell'ospite, compresi complessi carboidrati contenenti acido sialico presenti nella mucina, glicosfolipidi e latte umano, il che sottolinea la relazione sinergica instauratasi tra l'ospite e questo gruppo microbico intestinale (Hoskins *et al.*, 1985; Corfield *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2001).

Limitate sono le informazioni relative alla degradazione dell'amido da parte di *Bifidobacterium*. Da un isolato umano di *B. adolescentis*, è stata purificata un' $\alpha$ -amilasi extracellulare, capace di idrolizzare l'amido a maltosio e maltotriosio (Lee *et al.*, 1997). In uno studio più recente, finalizzato a valutare l'utilizzo di amido, amilopectina e pullulano da parte di specie differenti di *Bifidobacterium*, è stato mostrato come tutti i ceppi di *B. breve* testati abbiano attività amilopullulanasi (Ryan *et al.*, 2006). Poiché *B. breve* rappresenta una delle specie batteriche dominanti a livello del microbiota neonatale (Scardovi *et al.*, 1971; Ventura *et al.*, 2004c), la presenza di questa attività enzimatica potrebbe svolgere un ruolo fondamentale durante lo svezzamento infantile, momento in

cui il bambino si trova esposto, per la prima volta, a carboidrati complessi di natura diversa rispetto a quelli presenti nel latte materno.

Lo shunt del fruttosio-6-P (Fig. 10) inizia con la conversione di glucosio-6-P in fruttosio-6-P tramite esochinasi e glucosio-6-P isomerasi.



**Fig. 10.** Shunt del fruttosio-6-P. AckA, acetato chinasi; Adh2, aldeide-alcol deidrogenasi 2; Eno, enolasi; Gap, gliceraldeide-3-P deidrogenasi C; GlkA, glucochinasi; Gpi, glucosio-6-P isomerasi; Gpm, fosfoglicerato mutasi; Ldh2, lattato deidrogenasi; Pfk, fosfoglicerato chinasi; Pfl, formiato acetiltrasferasi; Pyk, piruvato chinasi; Tal, transaldolasi; Tkt, transchetolasi; Xfp, fruttosio-6-P fosfochetolasi.

Il fruttosio-6-P è scisso in acetil-P ed eritrosio-4-P ad opera della fruttosio-6-P fosfochetolasi (EC 4.1.2.2), enzima principale di questo processo fermentativo. Dall'acetil-P si ottiene acetato grazie all'enzima acetato chinasi. L'eritrosio-4-P e il fruttosio-6-P sono convertiti in pentosi-P attraverso l'azione successiva di transaldolasi e transchetolasi. In seguito alla scissione fosforolitica di xilulosio-5-P si formano gliceraldeide-3-P ed acetil-P. Dalla gliceraldeide-3-P si ottiene acido piruvico che è poi ridotto ad acido L(+)-lattico.

La fermentazione del glucosio produce principalmente acido acetico ed acido L(+)-lattico, nel rapporto teorico 1.5:1.0. Sono state riportate deviazioni da questo rapporto fermentativo dovute alla scissione fosforoclastica di parte dell'acido piruvico in acido formico ed acido acetico, ed alla riduzione di quest'ultimo in etanolo (De Vries e

Stouthamer, 1968). I differenti rapporti molarli osservati sembrano variare in relazione anche a substrato e condizioni di crescita (Rasic e Kurman, 1983; Palframan *et al.*, 2003; González *et al.*, 2004). Generalmente, i bifidobatteri non producono CO<sub>2</sub>, acido propionico, butirrico ed indolo; è possibile, invece, osservare la formazione di piccole quantità di acido formico, etanolo ed acido succinico (Rasic e Kurman, 1983). Alcuni ceppi mostrano alti livelli d'attività ureasica costitutiva (Crociani e Matteuzzi, 1982), mentre altri possiedono una debole attività proteolitica (Borisova e Slivko, 1973). Nei bifidobatteri, non sembrano essere presenti i pathway della via glicolitica e dell'esoso monofosfato. In *B. longum* biotype longum, è presente, invece, un parziale pathway di Embden-Meyerhoff ed un parziale ciclo di Krebs, in cui sono assenti i geni codificanti per fumarasi, oxoglutarato deidrogenasi e malato deidrogenasi.

Trasportatori ABC, permeasi, simporti protonici [uno specifico per il lattosio è stato identificato in *B. bifidum* (Krzewinski *et al.*, 1996)], simporti cationici [quello specifico per il glucosio in *B. bifidum* DSM20082 è dipendente da ioni K<sup>+</sup> (Krzewinski *et al.*, 1997)] e sistemi fosfoenolpiruvato-fosfotrasferasi (PEP-PTS, Schell *et al.*, 2002) garantiscono il trasporto di carboidrati e sono codificati da circa il 10% del contenuto genico totale di *Bifidobacterium*. In particolare, i sistemi PEP-PTS, responsabili del trasporto di glucosio e arabinosio in *B. breve* (Degnan e Macfarlane, 1993), comportano la concomitante internalizzazione e fosforilazione del carboidrato. Il trasferimento del fosfato dal PEP allo zucchero è mediato da una catena enzimatica composta da EI (Enzyme I), HPr (proteina contenente istidina), e EII (Enzyme II). Nel genoma di *B. longum* biotype longum NCC2705, è stato identificato un solo gene omologo codificante per EII, a differenza di *B. breve* UCC2003, che contiene 4 loci EII (Maze *et al.*, 2006). Benché il preciso significato biologico di questa differenza nel sistema PEP-PTS non sia ancora noto, è ipotizzabile che le diverse capacità di trasporto riflettano le differenti origini ecologiche dei microrganismi.

### ***Strutture extracellulari ed interazione con l'ospite***

Nell'interazione tra bifidobatteri e cellule epiteliali dell'ospite, un fattore chiave è rappresentato dalle proteine extracellulari. MacConaill *et al.* (2003) hanno mostrato come i sistemi di export delle proteine in *B. breve* siano comparabili a quelli già noti ed attivi in altri batteri Gram-positivi, in cui è la presenza di un peptide segnale o di regioni transmembrana che guida le proteine alla superficie cellulare. Nei genomi di *B. longum* biotype longum NCC2705 e *B. longum* biotype longum DJO10A, sono stati identificati geni putativi codificanti per strutture simili a fimbrie capaci di legare glicoproteine e, presumibilmente, coinvolte nell'interazione diretta con le strutture dell'ospite (rispettivamente BL0675 e gi|23335911). Queste proteine putative, probabilmente ancorate alla parete cellulare, sono infatti caratterizzate da un'alta percentuale di identità nei confronti di FimA e FimP, che rappresentano le 2 maggiori subunità fimbriali di *Actinomyces* (Li *et al.*, 1999). Inoltre, in entrambi i microrganismi, così come in *B. breve*, è stato caratterizzato un inibitore di proteasi simile alla serpina (Ivanov *et al.*, 2006). La serpina è un efficiente inibitore dell'elastasi umana neutrofila e pancreatica, il cui rilascio nei siti di infiammazione intestinale ad opera di neutrofili, costituisce un interessante meccanismo di immunità innata. La presenza di tale inibitore potrebbe fornire protezione nei confronti di proteolisi esogena e svolgere un ruolo essenziale nell'interazione diretta di *Bifidobacterium* con l'ospite.

Un'ulteriore possibilità di interazione è rappresentata dalla capacità di *Bifidobacterium* di produrre esopolisaccaridi (EPS) o polisaccaridi capsulari (Ruas-Madiedo *et al.*, 2006). In batteri patogeni, queste strutture extracellulari potrebbero contribuire ad aggirare il sistema immunitario dell'ospite e svolgere, quindi, un ruolo in infezioni batteriche croniche (Vuong *et al.*, 2004) mentre, in microrganismi non patogeni, potrebbero facilitare l'adesione batterica alle cellule epiteliali dell'ospite e contribuire alla resistenza nei confronti di acidi gastrici e sali biliari (Perez *et al.*, 1998). Nagaoka *et al.* (1994) hanno riportato la produzione di EPS ricco in ramnosio legato alla parete cellulare in *B. breve* e *B. bifidum*, mentre la produzione di un polisaccaride costituito da glucosio, ribosio, galattosio, ramnosio e chiroinositolo, associato alla cellula, è stata dimostrata da You *et al.* (2004) in ceppi di *B. bifidum*. L'analisi della sequenza genomica di *B. longum* biotype longum NCC2705 ha rivelato la presenza di 2 regioni correlate alla biosintesi di polisaccaridi, caratterizzate dalla vicinanza di elementi IS e da una forte divergenza nel contenuto G+C, indice di come tali loci siano stati presumibilmente acquisiti mediante HGT. Analogamente, regioni geniche codificanti per EPS e ceppo specifiche sono state individuate anche nei genomi di *B. breve* UCC2003 e *B. adolescentis* ATCC 15703.

Il cross-talk molecolare tra *Bifidobacterium* ed ospite rappresenta uno step essenziale, da cui dipendono le attività health-promoting attribuite a questo genere batterico, quali modulazione del sistema immune intestinale, mantenimento dell'integrità della barriera mucosale, ed incremento nella secrezione di mucina (Otte e Podolsky, 2004; Ismail e Hooper, 2005).

### ***Produzione di batteriocine***

Le batteriocine sono state inizialmente definite come composti proteici prodotti sia da batteri Gram-positivi che negativi, capaci di esercitare attività battericida o batteriostatica contro specie strettamente correlate tra loro (Tagg *et al.*, 1976). Esistono, comunque, esempi di batteriocine ad ampio spettro (Klaenhammer, 1993), e con attività sia antimicrobica che di signalling (Kleerebezem *et al.*, 1997). I bifidobatteri sono in grado di produrre batteriocine (Bevilacqua *et al.*, 2003; Toure *et al.*, 2003; Servin, 2004), come bifidocin B, batteriocina ad ampio spettro di classe IIa, prodotta da *B. bifidum* (Yildirim *et al.*, 1999). In *B. longum* biotype longum DJO10A, sono state identificate 2 coding sequence correlate a lantibiotici, ovvero batteriocine di piccole dimensioni che tipicamente contengono lantionina e residui di  $\beta$ -metil lantionina derivanti dalla deidratazione di serina e treonina (Jack *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 1999).

### ***Risposta a stress***

I geni codificanti per proteine coinvolte nella risposta a stress costituiscono un ulteriore esempio di come il contenuto genomico di *Bifidobacterium* rifletta l'adattamento al tratto gastrointestinale (Ventura *et al.*, 2006a). In particolare, geni codificanti per i principali chaperoni molecolari e famiglie proteasiche, quali *groEL-groES*, *dnaK*, *grpE*, *dnaJ*, *clpB*, *clpC*, e *clpP*, sono stati isolati da quasi tutti i taxa di *Bifidobacterium*. Comunque, diversamente dagli altri batteri appartenenti al phylum *Actinobacteria*, i bifidobatteri non possiedono copie multiple o paraloghi dei suddetti geni, fatta eccezione per *dnaJ* e *clpP* (Ventura *et al.*, 2006a). In *Bifidobacterium* è stato, inoltre, osservato il set più piccolo di geni codificanti per heat shock protein (Hsp), rispetto ad altri batteri Gram-positivi ad alto contenuto G+C. La nicchia pressoché isoterma fornita da ospiti mammiferi rende, infatti, obsoleto lo sviluppo di un elaborato

sistema di risposta a fluttuazioni della temperatura (Ventura *et al.*, 2006a). Le significative variazioni nelle condizioni osmotiche hanno, invece, reso necessario, in *Bifidobacterium*, lo sviluppo di un adeguato sistema di protezione contro sali biliari e/o stress osmotici (Sánchez *et al.*, 2005, 2007b; Ventura *et al.*, 2005a, 2006a; Ruiz *et al.*, 2007).

Recentemente, mediante approccio proteomico, mirato all'identificazione e caratterizzazione delle proteine espresse da *B. longum* biotype longum NCC2705, è stata evidenziata la presenza degli enzimi alchil idroperossido reductasi, presumibilmente coinvolti nel riparo del danno ossidativo a proteine e lipidi, e coloilglicin idrolasi, che probabilmente conferisce resistenza ai sali biliari in quanto catalizza l'idrolisi di glicina- e taurina-coniugati in residui amminoacidici e acidi biliari (Yuan *et al.*, 2006). Nel medesimo studio, sono state identificate come abbondantemente espresse anche heat shock protein corrispondenti a DnaK, GroEL e GroES.

L'analisi della sequenza genomica di *B. longum* biotype longum NCC2705, ha rivelato l'esistenza di differenti meccanismi regolatori che consentono la protezione cellulare di fronte a stress di varia natura: (i) risposta stringente, evocata da qualsiasi stress di sufficiente impatto fisiologico tale da impedire il caricamento di tRNA con amminoacidi (la coding sequence *BL1439* è omologa a *relA*, codificante per una proteina responsabile della repressione della trascrizione); (ii) sigma factor, capaci di determinare la selettività del promotore e di attivare geni altrimenti silenti (CDS *BL1357* e *BL1358*); (iii) regolatori negativi HspR e HrcA (Klijn *et al.*, 2005).

## ***Probiotici***

### ***Definizione e caratteristiche generali***

Il termine “probiotico” fu coniato nel 1965 da Lilly e Stillwell per indicare l’effetto stimolante sulla crescita batterica da parte di sostanze rilasciate da microrganismi (“living organisms, which upon ingestion in certain numbers, exert health benefits beyond inherent basic nutrition”). Nel tempo esso ha assunto valenze diverse: (i) “live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance” (Fuller, 1989); (ii) “live microbial food ingredient that is beneficial to health” (Salminen, 1998); (iii) “live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization, 2002); (iv) “live microbial food supplements that change either the composition or metabolic activities of the microbiota, or modulate immune system reactivity in a way that benefits health” (Macfarlane e Cummings, 2002).

Fino ad ora, attività probiotica è stata associata a lattobacilli, bifidobatteri, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *E. coli* Nissle 1917, ceppo non patogeno, al lievito *Saccharomyces boulardii* e *Clostridium butyricum* (Shanahan, 2001a, 2001b). Il primo batterio utilizzato come probiotico è stato *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, impiegato dalla popolazione bulgara per la produzione di yogurt. Altri lattobacilli attualmente usati nella produzione di preparati probiotici includono *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. reuteri*, *L. brevis*, e *L. cellobiosus*. Tra i bifidobatteri vengono impiegati come probiotici *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, e *B. longum*. Le specie *B. thermophilum* e *B. pseudolongum*, che tipicamente fanno parte del microbiota animale, sono largamente utilizzate come probiotici veterinari. A queste si aggiungono altre specie microbiche appartenenti ai generi batterici *Streptococcus* (*S. salivarius*, *S. lactis* riclassificato come *L. lactis*) (Roberfroid e Gibson, 1994), *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*), *Propionibacterium* e *Bacillus*, ma il loro utilizzo è limitato dalla presenza di molte specie patogene appartenenti a questi generi, il che mette in dubbio la reale sicurezza della loro somministrazione (FAO/WHO, 2002). Inoltre, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, e specie appartenenti ai generi *Leuconostoc* e *Lactococcus*, impiegati come starter nei processi di produzione di latti fermentati, non sono normalmente isolati dal tratto gastrointestinale, per cui presumibilmente incapaci di colonizzare ed influenzare l’omeostasi del microbiota intestinale (Alm, 1991). Il ceppo *E. coli* Nissle 1917 è stato isolato da feci umane e, nonostante il sierotipo (O6:K5:H1) caratteristico di batteri associati ad infezioni del tratto urinario, si è rivelato, fino ad ora, completamente non patogeno, consentendo quindi il suo impiego come probiotico (Gunzer *et al.*, 2002; Grozdanov *et al.*, 2004; Westendorf *et al.*, 2005). La biosicurezza è confermata dall’utilizzo in Europa centrale di Mutaflor® come rimedio microbico dal 1917, nella prevenzione di diarrea, indotta dai patogeni *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli*, e nel trattamento di disordini funzionali dell’intestino (Möllenbrink e Bruckschen, 1994) e IBD (Isolauri *et al.*, 2002; Podolsky, 2002; Kruis *et al.*, 2004; Grabig *et al.*, 2006). *E. coli* Nissle 1917 è stato anche impiegato per la colonizzazione intestinale di neonati al fine di sopprimere l’acquisizione di microrganismi patogeni e multiresistenti (Westendorf *et al.*, 2005). Lata *et al.* (2007) hanno riportato come la somministrazione di Mutaflor® in

pazienti affetti da cirrosi epatica, sia efficace nel ripristino di una normale colonizzazione microbica e determini un decremento nei livelli di endotossine.

Esistono probiotici destinati ad impiego veterinario ed altri ad impiego umano. Nell'alimentazione animale, l'uso di probiotici ha scopi essenzialmente produttivi, in quanto la loro assunzione determina un incremento nella velocità di crescita dell'animale, una riduzione dell'incidenza di infezioni subcliniche, un miglioramento della capacità di utilizzo del cibo a causa della presenza di nuovi enzimi digestivi rilasciati dai probiotici (Kumprekt *et al.*, 1984), ed un incremento nei quantitativi di uova e latte prodotti (Williams e Newbold, 1990). I probiotici destinati all'impiego umano possono essere suddivisi in probiotici alimentari e farmaceutici. I primi, oltre all'effetto positivo esercitato direttamente sulla microflora intestinale dell'ospite, contribuiscono alle proprietà organolettiche, reologiche e nutrizionali dei cibi. I prodotti fermentati contengono, infatti, vitamine e sali minerali in maggiore quantità (MacDonought *et al.*, 1983), ed i carboidrati e le proteine si trovano in forma più digeribile rispetto alle controparti non fermentate. I probiotici farmaceutici trovano, invece, impiego nel trattamento di diarrea, stipsi, flatulenza, acidità gastrica, colonizzazione da patogeni, gastroenterite e ipercolesterolemia. Recenti trial clinici hanno dimostrato la loro efficacia anche nel trattamento di malattie infiammatorie intestinali quali colite ulcerosa, morbo di Crohn, paucite (Gionchetti *et al.*, 2000, 2003a, 2003b; Sartor, 2004a, 2004b) e sindrome del colon irritabile (Limdi *et al.*, 2006). La loro azione terapeutica può essere correlata ad alcune attività accertate per i suddetti batteri, quali competizione con microrganismi patogeni, neutralizzazione di cataboliti "tossici" mediante produzione di enzimi detossificanti, e modulazione del sistema immune dell'ospite (Tannock, 1999; Madsen *et al.*, 2001; Ulisse *et al.*, 2001; Lammers *et al.*, 2003).

I prodotti fermentati arricchiti con batteri probiotici rappresentano una categoria di functional food di estremo successo. Le piccole bottiglie contenenti bevande ad uso giornaliero, producono un mercato annuale di 1000 milioni di kg e 1.2 miliardi di euro nella sola Europa (Buss, 2004). In Finlandia, ad esempio, si è assistito ad un significativo incremento nell'utilizzo del probiotico *L. rhamnosus* GG a partire dalla sua introduzione negli anni novanta (isolato nel 1985 da Gorbach e Goldin). Nel 1992, 3\*10<sup>6</sup> Kg di prodotto contenente LGG sono stati venduti in questa nazione (Saxelin *et al.*, 1996). Nonostante proprietà probiotiche siano state attribuite a numerosi ceppi microbici spesso correlati tra loro, solo poche specie batteriche dominano il mercato o sono state impiegate in trial clinici (Tab. 5).

**Tab. 5. Specie probiotiche comunemente utilizzate, designazione dei ceppi e prodotti commerciali.**

Species	Strain	Commercial brand name(s)
<i>L. casei</i>	DN114001	Actimel <sup>®</sup>
<i>L. casei</i>	Shirota	Yakult <sup>®</sup>
<i>L. plantarum</i>	299v	ProViva <sup>®</sup>
<i>L. rhamnosus</i>	GG	Actifit <sup>plus</sup> <sup>®</sup> , GEFILUS <sup>®</sup> , LGG <sup>®</sup> , Onaka He GG! <sup>®</sup> , Vifit <sup>®</sup> etc.
<i>L. johnsonii</i>	La1	LC1 <sup>®</sup>
<i>B. lactis</i>	Bb-12	Various brand names

Il maggiore impiego dei probiotici come supplementi alimentari più che come prodotti farmaceutici non ha reso strettamente necessario dimostrare la loro sicurezza, purezza e potenza prima dell'immissione sul mercato. Tuttavia, in Europa, i supplementi alimentari destinati a bambini e ragazzi devono possedere specifici requisiti da un punto di vista legislativo (commission of the european communities, 1996). Negli Stati Uniti, i prodotti probiotici per il trattamento o la prevenzione di disordini, sono classificati come

prodotti biologici e necessitano della revisione e approvazione da parte della Food and Drug Administration. La revisione da parte della Therapeutic Goods Administration e del ministero della salute è richiesta, rispettivamente in Australia ed in Giappone, prima dell'immissione sul mercato di prodotti probiotici con specifici effetti benefici sulla salute dell'ospite (FAO/WHO, 2001).

### ***Prerequisiti e criteri di selezione***

I prerequisiti necessari per l'impiego di probiotici sono efficacia e sicurezza.

Fondamentale è che i probiotici siano GRAS [generally recognized as safe (Salminen *et al.*, 1998a)] e, dunque, non patogeni né associabili a potenziali rischi per la salute dell'ospite. Per quanto concerne, invece, la loro efficacia a livello intestinale, le caratteristiche ottimali includono tolleranza alle condizioni presenti nel tratto gastrointestinale (resistenza ai succhi gastrici, alla bile, e alla digestione ad opera di enzimi enterici o pancreatici), capacità di adesione alle superfici intestinali, antagonismo nei confronti di batteri patogeni, produzione di sostanze antimicrobiche e capacità di modulare la risposta immune dell'ospite (Dunne *et al.*, 2001).

### **Sicurezza**

L'impiego su larga scala di prodotti probiotici ha reso necessario definire i potenziali rischi associati al loro consumo. Nonostante siano microrganismi generalmente non patogeni, la somministrazione dovrebbe essere effettuata con prudenza e cautela soprattutto in determinati gruppi di pazienti, quali bambini nati prematuramente o con problemi di immunodeficienza.

Casi di sepsi batterica e fungina, la cui insorgenza costituisce il rischio principale, sono stati, infatti, già riportati e correlati all'ingestione di supplementi probiotici in pazienti debilitati, con sistema immunitario compromesso o affetti da malattie croniche (Tab. 6 e 7). Nella maggior parte dei casi, una terapia antimicrobica adeguata è stata sufficiente a risolvere batteriemia e fungemia, mentre in alcuni pazienti si è sviluppato shock settico, e in altri casi l'esito è stato addirittura fatale.

**Tab. 6.** Casi di sepsi batterica nell'uomo correlata alla somministrazione di probiotici.

Study	Age	Risk factors	Probiotic	Method of identification	Form of sepsis
Rautio <i>et al.</i> (1999)	74 y	Diabetes mellitus	LGG	API 50 CH, PFGE of DNA restriction fragments	Liver abscess
Mackay <i>et al.</i> (1999)	67 y	Mitral regurgitation, dental extraction	Lactobacillus rhamnosus, 3 x10 <sup>9</sup> CFU/d	API 50 CH, pyrolysis mass spectrometry	Endocarditis
Kunz <i>et al.</i> (2004)	3 mo	Prematurity, short-gut syndrome	LGG	No confirmatory typing	Bacteremia
	10 wk	Prematurity, inflamed intestine, short-gut syndrome	LGG	PFGE of DNA restriction fragments	Bacteremia
De Groote <i>et al.</i> (2005)	11 mo	Prematurity, gastrostomy, short-gut syndrome, CVC, parenteral nutrition, rotavirus diarrhea	LGG, 1/4 capsule/d	rRNA sequencing	Bacteremia
Land <i>et al.</i> (2005)	4 mo	Cardiac	LGG, 10 <sup>10</sup> CFU/d	Repetitive element sequence-based PCR DNA fingerprinting	Endocarditis
	6 y	Cerebral palsy, jejunostomy feeding, CVC, antibiotic-associated diarrhea	LGG, 10 <sup>10</sup> CFU/d	Repetitive element sequence-based PCR DNA fingerprinting	Bacteremia
Richard <i>et al.</i> (1988)	47 y	Not stated	Bacillus subtilis, 8 x10 <sup>9</sup> spores/d	Antibiotic susceptibility	Bacteremia
	25 y	Not stated	Bacillus subtilis, 8 x10 <sup>9</sup> spores/d	Antibiotic susceptibility	Bacteremia

	63 y	Neoplastic disease	Bacillus subtilis, 8 x10 <sup>9</sup> spores/d	Antibiotic susceptibility	Bacteremia
	79 y	Not stated	Bacillus subtilis, 8 x10 <sup>9</sup> spores/d	Antibiotic susceptibility	Bacteremia
Oggioni <i>et al.</i> (1998); Spinosa <i>et al.</i> (2000) <sup>*</sup>	73 y	Chronic lymphocytic leukemia	<i>B. subtilis</i> , 10 <sup>9</sup> spores/d	16S rRNA sequencing	Bacteremia

\*Outcome fatale non chiaramente correlato a sepsi probiotica.

**Tab. 7. Casi di sepsi fungina nell'uomo correlata alla somministrazione di probiotici.**

Study	Age	Risk factors	Probiotic	Method of identification	Form of sepsis
Hennequin <i>et al.</i> (2000)	30 mo	Cystic fibrosis, CVC, poor nutritional state, intestinal surgery	<i>Saccharomyces boulardii</i> , 750 mg/d	PFGE of mitochondrial DNA restriction fragments	Fungemia
	36 y	HIV infection, CVC, diarrhea	<i>S. boulardii</i> , 1.5 g/d	PFGE of mitochondrial DNA restriction fragments	Fungemia
	47 y	Antibiotic-associated diarrhea, upper GI surgery for malignancy	<i>S. boulardii</i> , 2 g/d	PFGE of mitochondrial DNA restriction fragments	Septic shock
	78 y	Peptic ulcer, chronic renal failure, pneumonia, COPD	<i>S. boulardii</i> , 1.5 g/d	PFGE of mitochondrial DNA restriction fragments	Fungemia
Cassone <i>et al.</i> (2003)	34 y	CVC, intensive care unit	No direct treatment	PFGE of undigested chromosomal DNA	Fungemia
	48 y	CVC, intensive care unit	No direct treatment	PFGE of undigested chromosomal DNA	Fungemia
	75 y	CVC, intensive care unit	No direct treatment	PFGE of undigested chromosomal DNA	CVC colonization
	35 y	Intensive care unit	Unclear	PFGE of undigested chromosomal DNA	Fungemia
Perapoch <i>et al.</i> (2000)	3 mo	CVC, diarrhea, parenteral nutrition	<i>S. boulardii</i> , 100 mg/d	PFGE of mitochondrial DNA restriction fragments	Fungemia
	Infant	Short-bowel syndrome, CVC, parenteral nutrition	Not received directly (no direct treatment)	PFGE of mitochondrial DNA restriction fragments; PFGE of undigested chromosomal DNA	Fungemia
Lherm <i>et al.</i> (2002)	50–82 y	Acutely unwell on intensive care unit with respiratory failure, CVC	<i>S. boulardii</i> , 1.5–3.0 g/d	PFGE of nuclear and mitochondrial DNA restriction fragments	Fungemia
Bassetti <i>et al.</i> (1998)	51 y	Immunosuppression, <i>Clostridium difficile</i> -associated diarrhea, CVC	<i>S. boulardii</i> , 1 g/d	PFGE of DNA restriction fragments	Fungemia
Riquelme <i>et al.</i> (2003)	42 y	Kidney and pancreas transplant, immunosuppression, <i>C. difficile</i> -associated diarrhea	<i>S. boulardii</i> , 1 g/d	PFGE of DNA restriction fragments	Fungemia
Fredenucci <i>et al.</i> (1998)	49 y	Antibiotic-associated diarrhea, immunosuppression	<i>S. boulardii</i> , 200 mg/d	PFGE of undigested chromosomal DNA API 32C	Fungemia
Cesaro <i>et al.</i> (2000)	8 mo	Acute myeloid leukemia, CVC, neutropenia	<i>S. boulardii</i>	API 32C	Fungemia
Cherifi <i>et al.</i> (2004)	89 y	<i>C. difficile</i> -associated, colitis, gastrostomy	<i>S. boulardii</i> , 300 mg/d	No formal identification described	Fungemia
Henry <i>et al.</i> (2004)	65 y	Malignancy, immunocompromise, mucositis, diarrhea, parenteral nutrition	<i>S. boulardii</i>	No formal identification described	Fungemia
Niault <i>et al.</i> (1999)	78 y	Antibiotic-associated diarrhea, intensive care unit, intragastric feeding	<i>S. boulardii</i> , 1.5 g/d	No formal identification described	Fungemia
Viggiano <i>et al.</i> (1995)	14 mo	Burns, diarrhea, gastrostomy	<i>S. boulardii</i> , 200 mg/d	No formal identification described	Fungemic shock
Zunic <i>et al.</i> (1991)	33 y	Inflammatory bowel disease, intensive care unit, parenteral nutrition	<i>S. boulardii</i> , 1.5 g/d	No formal identification described	Fungemia
Pletincx <i>et al.</i> (1995)	1 y	Parenteral nutrition, antibiotic-associated diarrhea, CVC	<i>S. boulardii</i> , 600 mg/d	No formal identification described	Septicemia
Rijnders <i>et al.</i> (2000) <sup>*</sup>	74 y	Colitis, nasogastric feeding	<i>S. boulardii</i> , 600 mg/d	No formal identification described	Fungemia
Lestin <i>et al.</i> (2003) <sup>#</sup>	48 y	Diabetes, <i>C. difficile</i> -associated diarrhea	<i>S. boulardii</i> , 150 mg/d	API 32C	Fatal fungemia

CVC, central venous catheter; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; GI, gastrointestinal.

250 mg *S. boulardii* = 5.425 x 10<sup>13</sup> cellule vitali.

\*Outcome fatale (n = 3) non chiaramente correlato a sepsi probiotica.

#Fungemia fatale associata a megacolon tossico; morte correlata a sepsi probiotica.

Boyle *et al.* (2006), proprio sulla base dei casi di sepsi riportati fino ad ora, hanno proposto una lista di fattori di rischio associati all'impiego di prodotti probiotici (Tab. 8). La presenza di un singolo fattore di rischio "maggiore" o di più fattori di rischio di minore entità, dovrebbe comportare una certa cautela nel loro utilizzo. Benché non esistano chiare evidenze, la capacità dei probiotici di modulare le risposte immuni dell'ospite fa sì che anche la gravidanza costituisca un ulteriore fattore di rischio. Specie probiotiche appartenenti al genere *Lactobacillus* si sono rivelate, infatti, in grado di inibire il fenotipo Th2 e determinare un incremento nella concentrazione di IFN- $\gamma$  [citochina pro-infiammatoria, secreta da cellule T attivate e natural killer (NK), capace di sostenere reazioni citotossiche], effetti che potrebbero mettere in serio pericolo la vitalità del feto (Wegmann *et al.*, 1993; Pochard *et al.*, 2002; Pohjavuori *et al.*, 2004).

**Tab. 8.** Fattori di rischio proposti da Boyle *et al.* (2006) per lo sviluppo di sepsi probiotica.

Major risk factors
1) Immune compromise, including a debilitated state or malignancy
2) Premature infants
Minor risk factors
1) CVC
2) Impaired intestinal epithelial barrier, eg, diarrheal illness, intestinal inflammation
3) Administration of probiotic by jejunostomy
4) Concomitant administration of broad spectrum antibiotics to which probiotic is resistant
5) Probiotics with properties of high mucosal adhesion or known pathogenicity
6) Cardiac valvular disease ( <i>Lactobacillus</i> probiotics only)

Alcuni ceppi appartenenti al genere *Bifidobacterium*, e membri comuni del microbiota intestinale umano, sono stati correlati a casi di infezioni dentali, polmonari, a batteriemia, ascessi ed infezioni sanguigne (Green, 1978; Gasser, 1994; Saarela *et al.*, 2002; Borriello *et al.*, 2003). Nella maggior parte dei casi, è stato dimostrato il coinvolgimento specifico di *B. dentium* (originariamente denominato *B. eriksonii*), l'unica specie di *Bifidobacterium* classificata nel gruppo di rischio 2 e ritenuta un patogeno dentale. La presenza di *B. adolescentis* è stata riportata, invece, solo in un numero limitato di casi di otite (Brook, 1996).

Benché LAB e bifidobatteri siano in grado di invadere l'ospite mediante meccanismi di traslocazione batterica con conseguente batteriemia (Berg, 1992; Dietch *et al.*, 1992), probabilmente sono necessari altri fattori, sia batterici che dell'ospite, perché tali microrganismi possano determinare l'insorgenza di infezioni sistemiche (Ishibashi e Yamazaki, 2001). La traslocazione batterica è un fenomeno determinato da una compromessa barriera intestinale che consente il passaggio di batteri (o di componenti e prodotti batterici) attraverso la membrana mucosale e l'epitelio intestinale. Successivamente, i batteri traslocati sono trasportati, attraverso la tunica propria, ai linfonodi mesenterici ed altri organi con conseguente batteriemia che può aggravarsi fino all'insorgenza di setticemia (Berg, 1985, 1992; Van Leeuwen *et al.*, 1994). Yamazaki *et al.* (1991) hanno riportato un caso di traslocazione batterica in topi gnotobiotici monoassociati con *B. longum* BB536, ma la traslocazione non ha, comunque, prodotto infezioni o effetti dannosi sulla salute dell'ospite; al contrario, la monoassociazione con *B. longum* ha portato ad un'incremento generale nelle risposte immunitarie.

Al fine di selezionare batteri probiotici "safe", un fattore di rilievo è costituito dall'incapacità di produrre sostanze pericolose per l'ospite. I bifidobatteri possiedono, ad esempio, bassa attività deaminasica, responsabile della produzione di ammonio (Ishibashi e Yamazaki, 2001), e mancano dell'attività 7 $\alpha$ -deidrossilasica correlata alla

produzione di acidi biliari secondari che agiscono come promotori nei processi di carcinogenesi (Takahashi e Morotomi, 1994).

Ulteriori test necessari per la valutazione della sicurezza di probiotici sono la determinazione dell'attività di aggregazione piastrinica, che sembra contribuire alla progressione di endocardite infettiva (Douglas *et al.*, 1990), e la valutazione di attività enzimatiche responsabili della degradazione del muco intestinale e della conseguente compromissione della barriera mucosale (Zhou *et al.*, 2001). Non è ancora ben chiaro se proteine di superficie, glicoproteine e lectine presenti sulla parete cellulare dei probiotici possano essere realmente correlate all'infettività, e se glicosidasi e proteasi (arilamidasi), responsabili del breakdown delle glicoproteine umane, giochino un ruolo fondamentale nei processi di infezione. La dimostrazione del reale coinvolgimento dei probiotici nei processi di traslocazione e infezione batterica, metterebbe subito in discussione uno dei principali criteri di selezione, ovvero la capacità di aderire alle cellule epiteliali dell'intestino umano. Recentemente, Ruas-Madiedo *et al.* (2008) hanno dimostrato, mediante studi *in vitro*, la degradazione della mucina intestinale ad opera di ceppi appartenenti al genere *Bifidobacterium*, riaprendo così il dibattito sui criteri relativi alla sicurezza dei probiotici. La capacità degradativa sembra essere correlata alla presenza di 2 geni, *afcA* e *engBF*, codificanti per glicosidasi extracellulari.

Il possibile trasferimento di geni conferenti resistenza ad agenti antimicrobici costituisce un ulteriore fattore di rischio associato al trattamento probiotico. Molti ceppi appartenenti al genere *Lactobacillus*, ad esempio, sono naturalmente resistenti all'antibiotico vancomicina (per la presenza di D-Ala-D-Lattato anziché D-Ala-D-Ala a livello di peptidoglicano), ma i geni conferenti la resistenza sono cromosomici e, quindi, non facilmente trasferibili ad altre specie (Tynkkynen *et al.*, 1998). Tuttavia, Mater *et al.* (2008) hanno dimostrato per la prima volta il trasferimento della resistenza a vancomicina (cluster *vanA*) da enterococchi ad un ceppo commerciale di *L. acidophilus*, suggerendo una certa cautela nell'impiego di probiotici in pazienti immunocompromessi o durante terapia antibiotica. Il trasferimento è avvenuto, in assenza di pressione selettiva, sia *in vitro* che *in vivo* nell'intestino murino, e sono state misurate alte frequenze di transconiuganti, capaci di persistere a livello del tratto gastrointestinale. Studi *in vitro* hanno dimostrato l'alto potenziale di trasferimento di geni antibiotico-resistenti anche da enterococchi probiotici a batteri patogeni (Lund e Edlund, 2001). Nel 2003, lo SCAN, EU's Scientific Committee on Animal Nutrition, ha introdotto linee guida che potrebbero essere estese anche agli alimenti destinati all'uso umano ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out108\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out108_en.pdf)).

Sono stati riportati i pattern fenotipici di suscettibilità antimicrobica per diversi bifidobatteri (Delgado *et al.*, 2005; Moubareck *et al.*, 2005), ed è stata evidenziata la presenza del gene *tet(W)* conferente resistenza all'antibiotico tetraciclina, e ampiamente distribuito in diversi batteri intestinali (Salyers *et al.*, 2004; Roberts, 2005). Mediante impiego di un approccio microchip-hybridization, è stata dimostrata la presenza di una copia cromosomica del gene *tet(W)* nel genoma di *B. lactis* DSM10140, il che suggerisce la necessità di rimuovere questo microrganismo come probiotico oppure inattivare irreversibilmente il gene che conferisce resistenza antimicrobica (Kastner *et al.*, 2005).

Ceppi probiotici differenti possono, inoltre, determinare effetti molto specifici e variabili tra loro persino all'interno della stessa specie. In diversi studi sono state, infatti, riscontrate significative differenze nell'efficacia e negli outcome microbiologici e clinici correlati all'impiego di diversi probiotici (Wagner *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 2002;

Young *et al.*, 2004). I loro effetti possono inoltre subire variazioni in condizioni di salute o malattia, e in relazione all'età dei pazienti. L'ampio range di effetti sembra essere correlato alle capacità dei probiotici di esprimere uniche e particolari molecole di superficie (glicolipidi e *microbe-associated molecular patterns*), e di secernere prodotti in grado di interagire con vari componenti delle cellule epiteliali (Marco *et al.*, 2006). In assenza di ulteriori e precise conferme in studi separati, non è quindi possibile trarre conclusioni generalizzate sugli effetti mostrati da un singolo ceppo né sui rischi associati al suo consumo.

Molte evidenze supportano l'importanza della vitalità di ceppi probiotici. In studi condotti sull'uomo, batteri vitali hanno determinato effetti immunologici maggiori rispetto alle loro controparti non vitali, e batteri inattivati sono stati persino associati ad effetti negativi sulla salute dell'ospite (Kaila *et al.*, 1995; Kirjavainen *et al.*, 2003).

Attualmente, non esistono informazioni chiare sugli appropriati regimi di dosaggio dei probiotici. In studi condotti con metodi coltura-dipendenti, una dose giornaliera  $\geq 10^{10}$  CFU si è rivelata necessaria per ottenere un recupero fecale affidabile di LGG (Saxelin *et al.*, 1991). Tuttavia, la detection a livello di feci potrebbe non riflettere in alcun modo l'outcome clinico. Inoltre, il numero di batteri che raggiungono vitali l'intestino dipende da altri fattori in aggiunta alla dose, quali formulazione probiotica, somministrazione contemporanea di cibo o latte (che potrebbe fornire protezione contro i succhi gastrici), pH gastrico dell'ospite, motilità intestinale e composizione del microbiota. Le formulazioni probiotiche commercialmente disponibili contengono generalmente  $\geq 10^6$  CFU/g di microrganismi vitali, ma le dosi richieste per l'ottenimento di specifici effetti clinici non sono ancora state determinate.

### **Tolleranza a pH, osmolarità e sali biliari**

Al fine di raggiungere il tratto gastrointestinale dell'ospite con un numero di cellule batteriche sufficienti per l'ottenimento di effetti terapeutici, i probiotici devono essere in grado di resistere ai bassi valori di pH presenti a livello gastrico (pH 2), alla ridotta attività dell'acqua ( $a_w$  equivalente a 0.3 M NaCl) e alla presenza di sali biliari nell'intestino tenue (5 mM). Gli acidi biliari inibiscono la crescita di diversi organismi probiotici Gram-positivi, quali ceppi appartenenti ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, mentre hanno un effetto decisamente inferiore se non addirittura nullo su organismi Gram-negativi come *E. coli*. La resistenza a pH acidi risulta critica anche in campo alimentare, in quanto uno dei principali fattori responsabili della mortalità di bifidobatteri in cibi fermentati, è proprio l'acidità (Moreno *et al.*, 2006).

Il clonaggio del sistema di uptake della betaina, BetL, di *L. monocytogenes* in *L. salivarius* UCC118 (Sheehan *et al.*, 2006) e *B. breve* UCC2003 (Sheehan *et al.*, 2007), ha determinato un significativo miglioramento nella tolleranza dei probiotici a succhi gastrici e a condizioni di elevata osmolarità, che mimano l'ambiente intestinale. Tuttavia, la naturale selezione di probiotici caratterizzati da un'espressione elevata di omologhi BetL appare necessaria per poter ottenere effetti protettivi simili ma senza impiego delle tecnologie del DNA ricombinante.

L'induzione di acido-resistenza in ceppi di *B. longum* e *B. catenulatum* ha determinato un incremento nella tolleranza anche ad altre condizioni di stress (sali, bile ed alte temperature), suggerendo lo sviluppo di meccanismi di protezione crociata (Collado e Sanz, 2007). Inoltre, i ceppi acido-resistenti hanno mostrato una maggiore capacità fermentativa ed un aumento in attività enzimatiche presumibilmente coinvolte

nell'utilizzo di glicoproteine umane e di prebiotici, il che incrementa ulteriormente le loro possibilità di sopravvivenza e colonizzazione transiente dell'epitelio intestinale. L'esposizione a condizioni di stress acido può indurre variazioni anche a livello di componenti strutturali, quali acidi grassi della membrana cellulare, con conseguenti modifiche nella permeabilità di membrana e nei pattern di resistenza/sensibilità ad antibiotici (Fozo *et al.*, 2004).

Tecniche di microincapsulazione sono state sviluppate al fine di migliorare la stabilità di organismi probiotici in functional food (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Ding e Shah, 2007). Come materiale incapsulante è stato largamente impiegato l'alginato, additivo alimentare non tossico (Prevost e Divies, 1992). Un ulteriore vantaggio è rappresentato dalla solubilità di questo materiale che garantisce la reversibilità della microincapsulazione ed il rilascio delle cellule intrappolate.

Recentemente, Sánchez *et al.* (2007a) hanno analizzato i meccanismi di risposta e adattamento a stress acido in *B. longum*. Mediante analisi dei profili proteomici, quantificazione di prodotti metabolici, e determinazione dello stato redox cellulare, è stato evidenziato il coinvolgimento di variazioni nel flusso glicolitico e nella capacità di regolare il pH interno, come dimostrato dalla sovrapproduzione di due subunità intracellulari di F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasi. L'adattamento e la risposta a pH acidi in *B. longum* si accompagnano, inoltre, ad un incremento nella concentrazione di ammonio citoplasmatico, probabilmente derivante dalla deaminazione amminoacidica, e ad una ridotta attività dell'enzima bile salt hydrolase (BSH), che catalizza il rilascio di glicina e taurina dai sali biliari coniugati. La maggiore tossicità dei sali biliari deconiugati rispetto alle loro controparti coniugate (Grill *et al.*, 2000; Noriega *et al.*, 2006), suggerisce come il calo dell'attività BSH possa rappresentare un meccanismo di difesa di *Bifidobacterium* nei confronti della bile.

I sali biliari sono detergenti naturali, sintetizzati nel fegato a partire da colesterolo e conservati come coniugati amminoacidici a livello della vescica biliare, che facilitano digestione e assorbimento di componenti della dieta idrofobici. La natura anfipatica è responsabile della forte attività antimicrobica, che determina danno alle membrane e stress ossidativo (Bernstein *et al.*, 1999).

La superficie cellulare dei microrganismi rappresenta il primo target fisico d'azione della bile. I sali biliari sono in grado di modulare l'espressione di proteine di membrana in batteri enterici (Bron *et al.*, 2004b; Sánchez *et al.*, 2006), di influenzare la composizione lipidica in *Bifidobacterium* (Gómez-Zavaglia *et al.*, 2002) e di compromettere la funzionalità della membrana cellulare in *Lactobacillus* (Taranto *et al.*, 2003, 2006). I meccanismi di inibizione della crescita sono probabilmente correlati alla dissipazione del potenziale di membrana (Kurdi *et al.*, 2006). Ai fini di contrastare la tossicità della bile, in *Bifidobacterium* è stato riportato il coinvolgimento di diversi meccanismi cellulari, quali espulsione dei sali biliari attraverso proteine multidrug resistance (Price *et al.*, 2006) e incrementata attività BSH (Begley *et al.*, 2006; Noriega *et al.*, 2006). In particolare, l'adattamento alla bile in *B. animalis* subsp. *lactis* ha determinato un calo della fluidità di membrana, una riduzione del rapporto proteine:fosfolipidi, ed uno shift nella composizione in acidi grassi della membrana cellulare (Ruiz *et al.*, 2007).

Sánchez *et al.* (2005) hanno mostrato come i sali biliari, a cui i bifidobatteri sono naturalmente esposti, inducano una complessa risposta fisiologica in *B. longum*, che coinvolge chaperone molecolari, diversi enzimi della glicolisi e del catabolismo del

piruvato, proteine coinvolte nei processi di trascrizione e traduzione, e nel metabolismo di amminoacidi e nucleotidi.

Successivamente, mediante approccio proteomico e fisiologico, sono stati determinati in *B. animalis* subsp. *lactis* i meccanismi coinvolti nella risposta e resistenza ai sali biliari (Sánchez *et al.*, 2007b). Analogamente a quanto già verificato in *B. longum*, in presenza della bile sono risultati incrementati i livelli d'espressione di proteine del metabolismo dei carboidrati, chaperone molecolari, fattori trascrizionali e traduzionali. E' stato inoltre confermato il link tra resistenza ai sali biliari ed incremento dell'attività BSH, che permette di contrastare la tossicità dei sali biliari coniugati (De Smet *et al.*, 1995; Grill *et al.*, 2000).

Whitehead *et al.* (2008) hanno determinato, mediante microarray, le variazioni nell'espressione genica associate all'esposizione di *L. reuteri* ATCC 55730 a concentrazioni fisiologiche di bile (0.2-2% nel piccolo intestino). In particolare, sono stati identificati geni coinvolti nello stress a livello di membrana e/o parete cellulare, stress ossidativo, danno al DNA e denaturazione di proteine. Mutazioni in una molecola chaperone, in una putativa esterasi ed in un trasportatore multidrug resistance hanno ridotto la capacità del microrganismo di rispondere ed adattarsi allo shock determinato dall'esposizione ad acidi biliari.

I microrganismi probiotici vengono, però, sottoposti ad una serie di stress non solo a livello del tratto gastrointestinale dell'ospite, ma anche durante il processing industriale. Ad esempio, le alte temperature raggiunte durante lo spray drying (Simpson *et al.*, 2005), così come durante la conservazione del prodotto possono limitare la produzione su larga scala e la stabilità del prodotto finale. Mediante approccio proteomico, sono state identificate in *B. longum* differenti proteine indotte da alte temperature, quali chaperone molecolari, proteine coinvolte nei processi di trascrizione e traduzione, ed enzimi di diversi pathway metabolici (Savijoki *et al.*, 2005). Recentemente, Rezzonico *et al.* (2007) hanno impiegato un whole-genome DNA microarray per l'analisi delle variazioni nei livelli di espressione genica in seguito a heat shock subletale. L'incubazione a 50°C anche solo per pochi minuti è risultata nella down-regolazione di complessi macchinari cellulari coinvolti nei processi di traduzione, divisione cellulare e partizione cromosomica, e nell'induzione dell'espressione di geni con funzione sconosciuta ma ampiamente conservati in altre specie batteriche e presumibilmente coinvolti nella risposta a stress termici. Più recentemente, Suokko *et al.* (2008) hanno valutato come la proteasi ClpL sia essenziale per l'induzione di termotolleranza in *L. gasseri* e faccia parte del regulone HrcA.

### **Adesione alla mucosa intestinale**

La capacità di aderire alla mucosa intestinale è considerata uno dei principali criteri di selezione nell'individuazione di potenziali probiotici (Ouwehand *et al.*, 1999), in quanto consente ai ceppi di persistere a livello intestinale (Morelli *et al.*, 1997) ed esercitare effetti benefici sulla salute dell'ospite più a lungo, e permette all'ospite di ridurre il quantitativo di cellule da assumere quotidianamente. Tuttavia, l'adesione gioca un ruolo chiave anche nei meccanismi di traslocazione batterica e virulenza (Finlay e Falkow, 1997). La maggiore capacità di adesione al muco intestinale mostrata, ad esempio, da ceppi di *Lactobacillus* spp. isolati da sangue rispetto ad isolati da feci o da prodotti giornalieri, suggerisce l'esistenza di una stretta relazione tra adesione mucosale e patogenicità di *Lactobacillus* in ospiti compromessi a livello immunitario o affetti da gravi

disordini (Apostolou *et al.*, 2001). La presenza, tra gli isolati clinici, anche di ceppi caratterizzati da una bassa capacità adesiva, sottolinea, comunque, come altri fattori, quali adesione alle proteine della matrice extracellulare, attività emolitica, aggregazione piastrinica e resistenza al siero, siano coinvolti nei processi di traslocazione dei lattobacilli dall'intestino al circolo sanguigno (Apostolou *et al.*, 2001).

Al fine di quantificare l'adesione di *Bifidobacterium* alle cellule dell'epitelio intestinale, Candela *et al.* (2005) hanno sviluppato un approccio analitico basato sulla tecnica della real-time PCR, che consente, in modo rapido, accurato e con elevata sensibilità, di rivelare e quantificare simultaneamente differenti generi e specie batteriche aderenti ad un monolayer epiteliale. Mediante tale analisi, è stato dimostrato come l'adesione a Caco-2 cell sia un fenotipo variabile all'interno del genere *Bifidobacterium*. Sono stati, infatti, identificati 3 diversi caratteri adesivi: alta adesività (> 40 cellule batteriche/Caco-2 cell), adesività (5–40 cellule batteriche/Caco-2 cell), e nessuna capacità adesiva (< 5 cellule batteriche/Caco-2 cell). La metodologia molecolare sviluppata è stata impiegata anche in studi di competizione con enteropatogeni; tutti i ceppi di *Bifidobacterium* esaminati hanno mostrato attività di spiazzamento nei confronti di *S. enterica* serovar. *typhimurium*, *Y. enterocolitica* and *E. coli* EPEC.

In assenza di adesione alla mucosa intestinale, la concentrazione dei probiotici viene diluita fino a raggiungere un livello insignificante dopo il consumo di un pasto o di una bevanda. Benché non sia ancora stato chiarito se tutti i probiotici normalmente impiegati possano crescere nell'ambiente intestinale, nessun probiotico commerciale è in grado di stabilirsi in maniera permanente nell'intestino umano, il che suggerisce come, anche in presenza di divisione cellulare, le specifiche velocità di crescita non siano sufficienti a rimpiazzare i microrganismi che continuamente si distaccano dalla superficie intestinale (Salminen *et al.*, 1998b; Rastall, 2004; Klingberg e Budde, 2006). Questa colonizzazione transiente sembra garantire, comunque, la protezione della mucosa intestinale da microrganismi patogeni, la stimolazione delle risposte immuni locali e sistemiche, e l'integrità della funzione della barriera mucosale. Resta ancora da definire se la colonizzazione intestinale sia necessaria perché i probiotici possano esercitare specifici effetti.

Va comunque sottolineato che le conoscenze relative all'adesione di probiotici derivano per lo più da studi *in vitro*, che mimano in maniera parziale la complessità dell'ecosistema intestinale. Il fissaggio convenzionale dei tessuti intestinali, che comporta distacco e perdita di muco superficiale, e l'impiego di linee cellulari incapaci di produrre muco, costituiscono un grosso limite sperimentale e pongono notevoli dubbi sull'importanza e sul significato fisiologico dell'adesione epiteliale (Corthésy *et al.*, 2007).

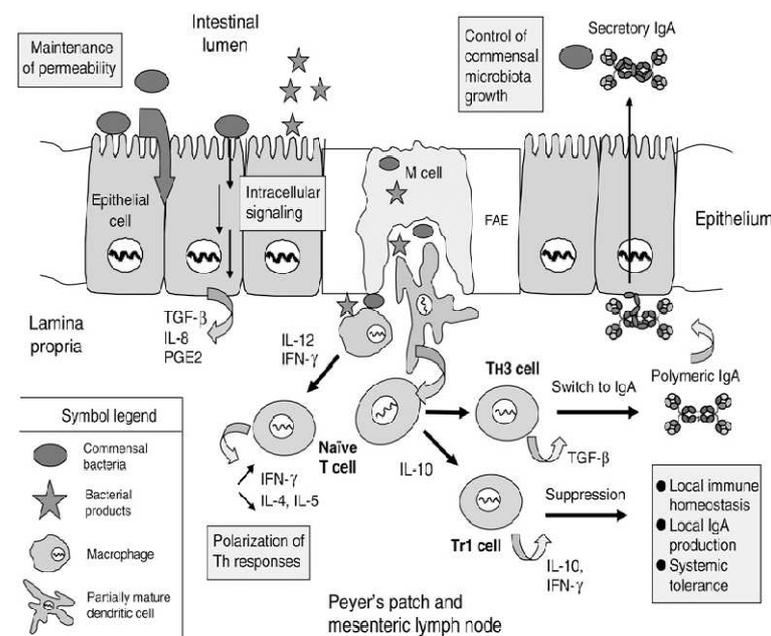
### **Attività antimicrobica**

La produzione di agenti antibatterici, quali batteriocine e composti simili (Vincent *et al.*, 1959), consente ai probiotici di controllare la crescita di membri del microbiota intestinale e di modulare, quindi, microflora e metabolismo. A questi meccanismi si aggiunge la produzione, durante il metabolismo degli zuccheri, di acidi organici (acido lattico, acetico e formico), che determinano una riduzione del pH intestinale, con conseguente inibizione della crescita di specie batteriche acido-sensibili (Rasic, 1989), e stimolano la peristalsi intestinale favorendo l'eliminazione di microrganismi patogeni eventualmente presenti (Savage, 1977). La sopravvivenza nel tratto gastrointestinale e l'inibizione competitiva dell'adesione all'epitelio intestinale di batteri patogeni è

garantita anche dalla produzione di perossido d'idrogeno, ammonio e biosurfattanti (Boyle *et al.*, 2006). *Salmonella*, *C. albicans*, *Shigella*, *Clostridium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, e *Campylobacter jejuni* sono tra i patogeni maggiormente sensibili all'azione inibitoria di *Bifidobacterium* (Berirtzoglou e Romond, 1990; Ibrahim e Bezkorovainy, 1993). All'attività antimicrobica concorre anche l'incremento, indotto da molte specie probiotiche, nella produzione di mucina e defensina- $\beta$ 2 da parte delle cellule dell'epitelio intestinale (Mack *et al.*, 2003).

## Interazione con il sistema immune dell'ospite

Per poter modulare l'immunità dell'ospite, fondamentale è il cross-talk tra probiotici e cellule del sistema immunitario. La capacità dei probiotici di persistere e moltiplicarsi a livello intestinale non sembra costituire un prerequisito necessario per l'interazione con le cellule immunitarie, in quanto la semplice associazione con cellule epiteliali e il rilascio di prodotti, quali metaboliti, componenti della parete cellulare e DNA, sembrano sufficienti per scatenare cascate di signaling capaci di attivare le sottostanti cellule immuni della lamina propria (Fig. 11).



**Fig. 11.** Cross-talk tra batteri probiotici e mucosa intestinale. A livello di epitelio intestinale, gli effetti benefici dei probiotici potrebbero essere mediati da processi di colonizzazione transiente e/o rilascio di composti bioattivi, con rinforzo della barriera intestinale e modulazione diretta delle funzioni delle cellule epiteliali quali rilascio di citochine e chemochine. Benché rappresenti un evento limitato, la traslocazione di batteri verso la lamina propria influenza immunità innata e adattativa mediante attivazione della produzione di citochine da parte di monociti e macrofagi. Il campionamento operato dalle cellule M delle placche del Peyer ed il successivo coinvolgimento delle cellule dendritiche contribuisce alla presentazione di antigeni microbici a cellule T naïve a livello di placche del Peyer e linfonodi mesenterici. Questo consente una risposta mucosale mediata da IgA al fine di prevenire overgrowth e diffusione batterica.

L'impatto di un'eventuale adesione batterica sui processi di traslocazione attraverso l'epitelio continua a rappresentare una questione aperta. Diversi studi hanno già riportato eventi di traslocazione di batteri commensali verso i linfonodi mesenterici, il che probabilmente svolge un ruolo centrale nello sviluppo e nell'attivazione del sistema immune intestinale (Gautreaux *et al.*, 1994; Berg, 1999). Pathway alternativi per l'attraversamento dell'epitelio sono rappresentati da cellule dendritiche, che con le loro protusioni possono attraversare le giunzioni e catturare batteri luminali (Rescigno *et al.*, 2001; Niess *et al.*, 2005), e da cellule M specializzate delle placche del Peyer (Macpherson e Uhr, 2004). Il binding al lato luminale delle cellule M consente un trasporto antigenico capace di stimolare il tessuto linfoide sottostante.

Gli effetti dei batteri probiotici sul sistema immunitario dell'ospite possono essere mediati anche da fattori solubili, rilasciati da tali microrganismi, capaci di alterare la permeabilità epiteliale (Madsen *et al.*, 2001), inibire la cascata infiammatoria (Ménard *et*

*al.*, 2004), e mediare attivazione/maturazione/sopravvivenza di cellule dendritiche (Hoarau *et al.*, 2006). Ad esempio, il DNA isolato dalla miscela probiotica VSL#3 è stato capace di generare una risposta non infiammatoria a livello di cellule epiteliali ed immuni, e determinare inibizione della secrezione di IL-8 da parte delle cellule epiteliali, attenuazione dell'IFN- $\gamma$  indotto da *B. vulgatus*, inibizione della produzione di TNF- $\alpha$ , e miglioramento nello score istologico dell'infiammazione in topi knockout per IL-10 (Jijon *et al.*, 2004; Rachmilewitz *et al.*, 2004).

Diversi studi hanno esplorato il potenziale ruolo dei probiotici nell'induzione, o ripristino, di risposte immuni di tipo regolatorio a livello intestinale. Studi *in vitro* hanno evidenziato come componenti non definiti di lattobacilli possano avere effetti anti-proliferativi su cellule T ed effetti soppressivi sulla secrezione di citochine (Pessi *et al.*, 1999). Mediante l'impiego di modelli animali, è stato dimostrato un incremento nella porzione di cellule T CD25<sup>+</sup> (subset delle cellule CD4<sup>+</sup> con un ruolo fondamentale nell'omeostasi intestinale), ed una riduzione nella reattività delle cellule T in seguito a somministrazione di diversi ceppi di *Lactobacillus* (Herias *et al.*, 1999; Kirjavainen *et al.*, 1999; Mike *et al.*, 1999). In trial clinici, l'ingestione di *L. rhamnosus* GG è stata associata ad elevate concentrazioni sieriche di IL-10 (Pessi *et al.*, 2000), ma a nessun effetto protettivo in pazienti affetti da IBD (Prantera *et al.*, 2002).

Microrganismi probiotici e commensali non patogeni sono capaci di indurre risposte anticorpali di IgA secretorie e scatenare, quindi, fenomeni di esclusione immune e successiva eliminazione intestinale (Fang *et al.*, 2000; Cukrowska *et al.*, 2002).

### **Attività anti-infiammatoria**

Il trattamento probiotico è in grado di contrastare processi di infiammazione. Gli effetti sono presumibilmente esercitati mediante stabilizzazione del microbiota, rinforzo della barriera intestinale, degradazione di antigeni enterici ed alterazione della loro immunogenicità. Il controllo della produzione di citochine pro- e anti-infiammatorie contribuisce a giustificare l'attività anti-infiammatoria (Salminen *et al.*, 1998b; Hemmi *et al.*, 2000).

Recentemente, in uno studio condotto su animali, è stata osservata un significativo incremento nelle capacità anti-infiammatorie di un ceppo di *L. plantarum*, che produce acido lipoteicoico modificato in seguito a semplice inattivazione genica (Mercenier A, personal communication).

### ***Effetti nutritivi e terapeutici***

#### **Miglioramento della tolleranza al lattosio**

Una insufficiente produzione di  $\beta$ -galattosidasi è all'origine di una intolleranza alimentare verso sostanze contenenti lattosio. L'assunzione di lattici fermentati o yogurt comporta un'attenuazione dei disturbi in soggetti carenti di tale enzima, rispetto all'ingestione di un equivalente quantitativo di latte (De Wit *et al.*, 1988). Questo risultato si deve alla fermentazione del lattosio da parte di batteri lattici e bifidobatteri presenti in tali alimenti e al contemporaneo rilascio delle lattasi da essi prodotte. Il rilascio di  $\beta$ -galattosidasi a livello intestinale migliora la digestione e la soglia di intolleranza nei soggetti lattasi-deficienti, supplendo alla carenza dell'ospite (Kilara e Shahani, 1976). I bifidobatteri sono ancora più efficaci dei lattobacilli in quanto più

resistenti alla bile e, quindi, in grado di raggiungere più facilmente l'intestino dove liberano il proprio enzima (Rao *et al.*, 1989).

### **Riduzione del contenuto plasmatico di colesterolo**

Sebbene non siano chiare le modalità con cui i bifidobatteri agiscono sul colesterolo ematico, la loro somministrazione mediante yogurt arricchiti è stata correlata ad una riduzione della colesterolemia e ad un possibile effetto in disordini cardiaci (Homma, 1988; Rasic *et al.*, 1992).

I presunti effetti ipocolesterolemici esercitati dai LAB potrebbero essere mediati da un'incrementata escrezione fecale di colesterolo assimilato con la dieta (Bottazzi *et al.*, 1986), o di acidi biliari, in seguito a deconiugazione (De Smet *et al.*, 1998) o assimilazione (Gilliland *et al.*, 1985). La maggiore escrezione di acidi biliari comporterebbe una ridotta quantità di acidi che ritornano al fegato, una ridotta inibizione feedback della loro sintesi e, in ultima analisi, un'incrementata conversione del colesterolo. D'altro canto, l'assimilazione di colesterolo ridurrebbe il colesterolo assorbibile, influenzando direttamente i livelli ematici (Park *et al.*, 2008).

### **Sintesi di vitamine**

Diverse sono le vitamine sintetizzate dai bifidobatteri e tra queste vi sono tiamina, riboflavina, vitamina B6, e vitamina K. Il loro assorbimento risulta, comunque, lento e scarso, così che è difficile stabilire il reale contributo all'alimentazione dell'ospite (Rasic e Kurmann, 1983).

### **Sintesi di amminoacidi**

Alcuni ceppi appartenenti al genere *Bifidobacterium*, se cresciuti in carenza di azoto organico, producono alanina, valina, acido aspartico e treonina (Matteuzzi *et al.*, 1978).

### **Inibizione della riduzione del nitrato**

Gli acidi organici prodotti da bifidobatteri e lattobacilli inibiscono la crescita di microrganismi nitrato-riduttori presenti nel tratto gastrointestinale. Tale effetto è positivo soprattutto nei neonati, nei quali l'assunzione di acqua ricca di nitrati e la loro successiva riduzione a nitriti potrebbe provocare fenomeni di ipossia (Dolezalec, 1979). Gli ioni nitrito sono, infatti, specie chimiche fortemente ossidanti in grado di determinare l'ossidazione dell'emoglobina.

### **Effetti su assorbimento minerale, contenuto minerale osseo e struttura ossea**

La produzione di metaboliti ed enzimi microbici, ma soprattutto di vitamine sembra offrire un razionale agli effetti health-supporting dei probiotici (Scholz-Ahrens *et al.*, 2007). Vitamine quali D, C, K (Weber, 1999) ed acido folico (Villa *et al.*, 1995) sono, infatti, coinvolte nel metabolismo del calcio e richieste per la formazione della matrice ossea. Ulteriori meccanismi includono: (i) rilascio dei minerali complessati all'acido fitico ad opera di batteri produttori dell'enzima fitasi (Lan *et al.*, 2002); (ii) stimolazione dell'uptake di calcio da parte degli enterociti (Gilman e Cashman, 2006); (iii) effetto antiartritico (presumibilmente attribuibile agli effetti anti-infiammatori dei probiotici) (Rovensky *et al.*, 2004). Gli effetti positivi osservati a livello della struttura ossea

potrebbero essere mediati anche da peptidi bioattivi rilasciati dalle proteine del latte durante i processi fermentativi (Narva *et al.*, 2004).

## ***SCOPO DELLA TESI***

## Scopo della tesi

Il microbiota intestinale umano è un complesso ecosistema composto da un numero di batteri che supera di 10 volte il numero di cellule germinali e somatiche dell'organismo umano e che presenta un pool di geni (micro bioma) 100 volte superiore a quello umano. Nel corso dell'evoluzione, il microbiota e l'uomo hanno instaurato un rapporto di tipo mutualistico, dove entrambi i partner traggono beneficio dalla simbiosi. Questa interazione consente ai microrganismi di vivere in un ambiente favorevole con un continuo apporto di sostanze nutritive, mentre l'uomo riceve molteplici benefici derivanti dalla presenza del microbiota, quali la protezione contro batteri patogeni, detossificazione di molecole organiche e attività pro-proliferativa dell'epitelio intestinale.

Prodotti fermentati arricchiti con batteri probiotici, rappresentano una categoria di functional food di estremo successo. I probiotici destinati a questo impiego possono essere divisi in alimentare e farmaceutico. I primi, oltre ad avere un effetto positivo diretto sul microbiota dell'ospite, concorrono nella modificazione delle condizioni organolettiche e nutrizionali del prodotto stesso; mentre i probiotici farmaceutici vengono impiegati nel trattamento di patologie quali diarrea, stipsi, flatulenza, acidità gastrica, colonizzazione da patogeni, gastroenteriti e ipercolesterolemia. Un microrganismo, per essere definito probiotico, deve presentare determinate caratteristiche, essere GRAS, tollerare l'attività gastrica dell'ospite, aderire alle pareti intestinali, essere antagonista nei confronti di batteri patogeni, produrre sostanze antimicrobiche, neutralizzare cataboliti tossici e modulare l'attività infiammatoria del sistema immunitario dell'ospite (Tannock, 1999; Dunne *et al.* 2001; Madsen *et al.* 2001; Ulisse *et al.* 2001; Lammers *et al.* 2003).

In questa tesi di dottorato, sono stati indagati i meccanismi alla base degli effetti health promoting di *Bifidobacterium* uno dei generi più utilizzati nei preparati probiotici. In particolare, sono state studiate l'attività ossalato degradativa e la capacità di aderire alle pareti dell'intestino.

L'ossalato è un composto ampiamente distribuito in natura ed è presente nell'uomo sia come prodotto endogeno che introdotto con la dieta. L'eccesso, affiancato da un malfunzionamento metabolico di origine genetica, porta all'insorgenza di iperossaluria, comportando danni a livello renale e cardiaco. Turroni *et al.* (2007), hanno studiato l'attività ossalato degradativa in microrganismi probiotici, principalmente *Lactobacillus*. Alla luce di questi risultati, in questo lavoro si è studiato l'attività ossalato degradativa nel genere *Bifidobacterium* al fine di individuare i geni coinvolti nel processo di degradazione e verificarne l'espressione in diverse condizioni di crescita.

Nella seconda parte del presente lavoro si è studiata la capacità di *Bifidobacterium* di legare la superficie intestinale. Questa funzione è stata studiata in passato sui batteri patogeni e studi recenti hanno dimostrato come probiotici e patogeni condividano gli stessi meccanismi di interazione, tra cui la capacità di interagire con il plasminogeno umano. Il sistema plasminogeno – plasmina è coinvolto nei processi di proteolisi extracellulare presente nei mammiferi, ed è impiegato in tutti i meccanismi di migrazione cellulare coinvolti nel rimodellamento dei tessuti e nei processi infiammatori. La proteina chiave di questo sistema è il plasminogeno, zimogeno della serina proteasi plasmina. L'obiettivo di questo studio è di indagare quali sono i meccanismi molecolari coinvolti nei processi di interazione col plasminogeno e studiare nuove applicazioni per lo studio di interazione batteri-proteine.

## ***CAPITOLO 1***

Attività ossalato degradativa in *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*: impatto delle condizioni acide sui livelli trascrizionali dei geni codificanti per oxalyl-CoA decarbossilasi e formyl-CoA transferasi.

## **Introduzione**

### **Il ruolo biologico dell'ossalato**

L'ossalato è un acido dicarbossilico molto diffuso in natura, soprattutto nel regno vegetale. Nell'uomo questa molecola si trova sia come prodotto del catabolismo epatico di glicina, gliossilato, acido ascorbico e di triptofano, che come componente della dieta (è presente in alimenti quali frutta, verdura, grano e noccioline). Si pensa che la quantità totale di ossalato presente nell'uomo derivi per lo più dalla sintesi endogena, in quanto l'apporto nutrizionale di questo composto sembra contribuire solo con un modesto 10-20% (Hodkinson, 1977). In realtà, la quantità di ossalato che viene ingerita e la frazione assorbita rimangono ancora da stimare con accuratezza.

Poiché l'uomo non possiede enzimi in grado di degradarlo, la maggior parte dell'ossalato ingerito è degradata dal microbiota intestinale, oppure escreta attraverso le feci o le urine (Holmes *et al.*, 1995).

L'acido ossalico è uno dei composti maggiormente ossidati in natura e per questo motivo ha la capacità di formare radicali dell'ossigeno in seguito all'interazione con il perossido d'idrogeno. Legandosi a ioni di calcio, sodio, magnesio, potassio o ferro forma sali insolubili che rendono difficile il suo catabolismo (Sidhu *et al.*, 1997b). Fortunatamente solo una parte della frazione ingerita con la dieta viene assorbita a livello intestinale. Ma in alcuni individui, geneticamente predisposti o con un'alterazione del microbiota intestinale, si può avere un rapido accumulo di ossalato sotto forma di cristalli di calcio (Holmes *et al.*, 1995), creando disturbi a carico dell'apparato urinario o gastrointestinale, l'iperossaluria.

### **L'ossalato nell'organismo umano**

#### **Fisiologia**

In individui sani i processi biosintetici giustificano circa il 90% dell'ossalato presente nelle urine. La sintesi endogena è regolata geneticamente da due alleli codominanti che presentano un gene regolatore della sintesi di questo composto. Esistono quindi individui con un più alto rischio di andare incontro agli effetti tossici dell'ossalato (Erickson *et al.*, 1984).

La proporzione di ossalato nelle urine, derivante dalle quantità introdotte con la dieta, è altamente variabile, ed è stato dimostrato che può essere compresa in un range dal 2 al 50% del valore totale introdotto (Lindsjö *et al.*, 1989). Il contenuto di acido ossalico assunto con la dieta può essere stimato e controllato, mentre risulta difficile quantificare e controllare l'ossalato presente nel lumen a causa dell'assorbimento variabile lungo l'intero tratto gastrointestinale.

La membrana epiteliale del tratto gastrointestinale e renale rappresenta la principale interfaccia di scambio dell'ossalato tra l'organismo e l'ambiente e gioca un ruolo prioritario nel mantenimento e nel bilancio di massa dell'ossalato. Benché i tessuti umani presentino una scarsa attività degradativa dell'acido ossalico, il suo assorbimento dipende da diversi fattori quali flussi paracellulari all'interno dell'apparato digerente, concentrazione di ossalato solubilizzato, tempo di transito, proprietà di assorbimento delle cellule epiteliali del lume intestinale (Binder *et al.*, 1974), e concentrazioni di calcio, magnesio e fibre. Calcio e magnesio impediscono l'assorbimento perché legano l'ossalato, diminuendone la frazione libera disponibile (Berg *et al.*, 1986), mentre le fibre

abbassano l'assorbimento perché diminuiscono il tempo di transito lungo il tratto gastrointestinale (Holmes *et al.*, 1995). In diversi studi è stato individuato un picco di assorbimento dell'ossalato dopo 2-5 ore dalla somministrazione (Erickson *et al.*, 1984; Prenen *et al.*, 1984), ed il colon è stato evidenziato come sito principale di assorbimento (Hatch *et al.*, 1995). In questa sede è stato evidenziato l'accoppiamento del flusso di ossalato con scambiatori di  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Sia nel segmento prossimale che in quello distale del colon, la direzione del flusso netto può essere regolata da neurormoni, che condizionano il trattamento enterico dei maggiori elettroliti plasmatici.

Il primo sistema di trasporto ad essere caratterizzato è stato lo scambiatore ossalato  $(\text{SO}_4)^{2-}/\text{OH}^-$  nel piccolo intestino, identificato grazie all'osservazione che il gradiente di ioni  $\text{OH}^-$  stimola l'uptake di ossalato e solfato, e che entrambi gli anioni divalenti erano cis-inibiti e trans-stimolati l'un l'altro. L'uptake non è risultato condizionato dalla presenza di un gradiente elettrico. Un altro sistema di trasporto caratterizzato a livello dell'orletto a spazzola delle cellule dell'ileo è uno scambiatore ossalato/ $\text{Cl}^-$ ; sia l'ossalato che il cloruro sono cis-inibiti e trans-stimolati e inducono il controflusso l'uno dell'altro. Il processo di scambio è elettroneutrale. Nel largo intestino, invece, il trasporto dell'ossalato è sempre stato considerato una diffusione passiva anche se recentemente sono state riportate evidenze su un suo trasporto attivo. Una minore attenzione è stata riservata allo studio dell'assorbimento dell'ossalato attraverso la mucosa dello stomaco, in quanto questo assorbimento sembra essere non troppo significativo e molto probabilmente avviene attraverso una diffusione non ionica dell'acido libero secondo un gradiente di concentrazione.

## Patologia

L'ossalato, quando è presente in concentrazione molto elevata, può risultare estremamente tossico per l'organismo umano (Sidhu *et al.*, 1997a). L'acido ossalico è in grado di legare due ioni calcio per formare ossalato di calcio, sale insolubile che si deposita a livello renale sotto forma di cristalli.

Studi genetici hanno identificato un gruppo di individui con disordini metabolici ereditari nei quali insorgono con ricorrenza calcoli di ossalato di calcio anche in giovane età. Questa malattia genetica prende il nome di iperossaluria primaria. È caratterizzata da una sintesi difettiva dell'ossalato epatico, infatti l'enzima alanin-gliossilato amminotransferasi (AGT), che catalizza la reazione di transaminazione del gliossilato a glicina usando come cofattore il piridossal-5-fosfato, non viene espresso. In assenza di AGT, il gliossilato viene ossidato a ossalato nei perossisomi dalla gliossilato ossidasi, o rilasciato attraverso la membrana dei perossisomi nel citosol e ossidato ad ossalato dalla lattato deidrogenasi. Le caratteristiche fisiopatologiche dell'iperossaluria primaria sembrano essere dovute ad un aumento della sintesi di ossalato e ad una bassa solubilità dell'ossalato di calcio. Dal punto di vista clinico è una malattia molto eterogenea. In molti casi, infatti, si ha il non corretto indirizzamento della proteina ai mitocondri anziché ai perossisomi, in altri si riscontra una distribuzione equa tra i due compartimenti subcellulari, ma la proteina dei perossisomi viene aggregata in strutture corpuscolari (Danpure *et al.*, 1994). L'iperossaluria primaria è dapprima causa di un'eccessiva escrezione di ossalato nelle urine e poi del successivo sviluppo di calcoli nel tratto urinario (urolitiasi) e di deposizione di ossalato di calcio nel parenchima renale (nefrocalcosi). Il trattamento clinico prevede il ritardo dell'inizio del danno renale regolando la quantità di ossalato introdotto con la dieta, mantenendo alto il flusso

urinario così da minimizzare la saturazione di ossalato di calcio, e somministrando inibitori della cristallizzazione del calcio urinario. In caso di stadi avanzati in cui si ha una notevole deposizione di ossalato di calcio, si effettua emodialisi con successivo trapianto renale.

Uno studio condotto su pazienti predisposti alla formazione di cristalli di ossalato di calcio, ha evidenziato come l'iperossaluria possa anche essere causata da un aumento dei livelli di ossalato introdotto con la dieta (Holmes *et al.*, 1995). L'elevata quantità di acido ossalico assorbita a livello enterico, riconducibile spesso a malattie gastrointestinali o ad alterazioni del microbiota, porta all'iperossaluria enterica (Allison *et al.*, 1989; Argenzio *et al.*, 1988). Questa è conseguenza di un malassorbimento intestinale: gli acidi grassi si legano al calcio rendendo l'ossalato più disponibile all'assorbimento, e insieme ai sali biliari aumentano la permeabilità del colon. Pazienti affetti da fibrosi cistica sono, infatti, ad alto rischio di sviluppo di nefrocalcolosi e litiasi urinaria (Chidekel e Dolan, 1996). Tutti i pazienti affetti da iperossaluria enterica mostrano basse attività di degradazione dell'ossalato (Sidhu *et al.*, 1998), così come basse sono risultate anche le attività riscontrate in pazienti affetti da morbo di Crohn (Balcke, 1983), steatorrea (Goldkin *et al.*, 1986) e sindrome del colon irritabile (Goldkin *et al.*, 1985). Kleinschmidt e i suoi collaboratori hanno evidenziato come la concentrazione dei batteri degradanti l'ossalato in pazienti affetti da calcio-ossalato urolitiasi sia di tre ordini di grandezza inferiore rispetto ad individui sani (Kleinschmidt *et al.*, 1992).

Recentemente è stato dimostrato che la somministrazione orale di ceppi batterici appartenenti ai generi probiotici *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* riduce l'escrezione urinaria di ossalato in pazienti con urolitiasi e leggera iperossaluria (Campieri *et al.*, 2001); ciò permette di supporre che questi ceppi probiotici svolgano un ruolo nella degradazione dell'ossalato. In uno studio più recente condotto su pazienti affetti da malassorbimento di grassi, nefrolitiasi e presunta iperossaluria enterica, si è osservato che la somministrazione del preparato probiotico Oxadrop® influenza l'assorbimento di ossalato e riduce i livelli di supersaturazione nelle urine (Lieske *et al.*, 2005).

### ***L'ossalato nell'ambiente***

L'ossalato si trova comunemente nel suolo e deriva principalmente dagli essudati delle radici, dai prodotti di decomposizione dei tessuti vegetali e animali e dai prodotti metabolici di batteri e funghi. La concentrazione di ossalato nel suolo varia tra  $10^{-3}$  e  $10^{-6}$  M, con i valori più alti in prossimità della rizosfera rispetto al resto del suolo. Grazie alla capacità di legare metalli, l'ossalato è importante per la solubilizzazione e il trasporto dei metalli nel suolo, e nel fenomeno di corrosione delle rocce. Attraverso l'interazione con alluminio e ferro, l'ossalato è importante anche per la nutrizione delle piante in quanto aumenta la biodisponibilità di fosfato, potassio, magnesio e calcio.

I processi microbici aerobi e anaerobi, che influenzano l'interazione ossalato-metallo o la disponibilità dell'ossalato, possono modulare lo stato nutrizionale-tossicologico dell'ecosistema terrestre.

### ***L'ossalato ed i microrganismi***

Poiché l'ossalato è il prodotto di reazioni metaboliche in una grande varietà di piante, animali e microrganismi, non deve sorprendere che i microrganismi stessi siano in grado di attaccare questo composto largamente distribuito nell'ecosistema naturale. Le proprietà chimico-fisiche dell'ossalato (forte acido, bassa solubilità dei suoi sali, inibitore

di diversi enzimi, ecc.) suggeriscono che, se non fosse per il catabolismo dei microrganismi, il suo accumulo in elevate quantità non sarebbe compatibile con la vita.

Dal punto di vista dei batteri, l'ossalato non sembra essere "nutrilita di prima scelta" in quanto la natura chimica dell'ossalato ne limita l'utilità. Inoltre, il suo alto stato di ossidazione implica che solo una piccola quantità di energia può essere resa disponibile attraverso un'ulteriore ossidazione della molecola di ossalato. Nonostante tutto, una grande varietà di microrganismi hanno colonizzato quelle nicchie dove l'ossalato viene prodotto e reso disponibile come substrato. Le nicchie possono essere sia aerobiche (per esempio il suolo), in cui l'ossigeno presente è utilizzato come accettore terminale di elettroni, che anaerobiche (per esempio l'intestino dei mammiferi), dove l'ossigeno è virtualmente assente ed altre molecole vengono utilizzate come accettori finali di elettroni. I microrganismi che degradano l'ossalato possono essere "generalisti", se sono in grado di fermentare molti altri substrati tra cui l'ossalato, o "specialisti" se la loro crescita dipende esclusivamente dal metabolismo di questo composto.

### ***Microrganismi aerobi che degradano l'ossalato***

Circa un terzo dei microrganismi aerobi in grado di degradare l'ossalato appartiene al genere *Streptomyces*, il quale è stato considerato il più attivo nel turnover dell'ossalato di calcio nel suolo.

Le concentrazioni più elevate di batteri che degradano l'ossalato (fino a  $2.8 \cdot 10^9$  colonie per grammo di suolo) sono state stimate nella rizosfera di alcune piante e sono molto probabilmente associate alla presenza di funghi micorrizici produttori di ossalato. Un recente studio ha mostrato che, 21 giorni dopo l'aggiunta di ossalato nel terreno in esame, la velocità di degradazione dell'ossalato incrementava, con un relativo aumento della anidride carbonica prodotta (da 0.018 a 0.26  $\mu\text{mol}$  per grammo di terreno), e il numero di microrganismi degradanti l'ossalato aumentava da  $0.1 \cdot 10^7$  a  $1.57 \cdot 10^7$  cellule per g di terreno.

La capacità di usare l'ossalato sembra essere un tratto comune a diversi generi batterici nel suolo, ad es. *Streptomyces* e *Xanthobacter*. Dato l'elevato numero di microrganismi classificati fino ad oggi solo alcuni saranno discussi qui di seguito.

*Alcaligenes eutrophus* è un microrganismo Gram-negativo, strettamente aerobio, di forma bastoncellare, che cresce utilizzando un vasto assortimento di composti organici, tra cui l'ossalato.

*Bacillus oxalophilus* è un batterio mesofilo che degrada l'ossalato, recentemente isolato dalla rizosfera di *Rumex acetosa* (Zaitsev *et al.*, 1993). Si tratta di organismi mobili, Gram-positivi, sporigeni, a forma bastoncellare, che utilizzano l'ossalato come unica fonte di carbonio ed energia ("specialisti").

*Methylobacterium extorquens* è stato il primo batterio che degrada l'ossalato ad essere descritto in letteratura (Bassalik, 1913). Sebbene sia classificato tra i batteri metilotrofi facoltativi, la sua collocazione è incerta. *M. extorquens* e altri ceppi ad esso correlati sono in grado di utilizzare per la crescita i composti C1 (metanolo e metilamina) così come composti multicarbonio come l'ossalato.

*Thiobacillus novellus* è un batterio strettamente aerobio, chemiolitotrofo facoltativo; deriva l'energia per la crescita dall'ossidazione e riduzione di solfuri (tiosolfato e solfito) e dall'ossidazione dell'ossalato e di composti C1 (formiato, metanolo, formammide). Interessante è che se *T. novellus* utilizza l'ossalato per crescere, non è in grado di ossidare

i tiosolfati, mentre l'utilizzo di formiato, metanolo e formamide rende la cellula capace di ossidare i tiosolfati.

I batteri appartenenti al genere *Xanthobacter* sono aerobi obbligati, chemiolitotrofi, idrogeno-ossidanti e in grado di fissare l'azoto. *X. autotrophicum* e *X. flavum* sono le uniche due specie in grado di utilizzare un gran numero di composti organici come ossalato, alcoli a corta catena, zuccheri e amminoacidi.

I batteri aerobi degradanti l'ossalato isolati dal suolo, sono piuttosto importanti perché utilizzati in diverse applicazioni biotecnologiche. Alcuni di questi ceppi, infatti, sono stati già impiegati per proteggere *Arabidopsis thaliana* dalle infezioni di *Sclerotinia sclerotium*, un fungo patogeno produttore di ossalato. L'acido ossalico prodotto dal fungo sembra essere coinvolto nel processo di infezione, e le colture di batteri degradanti l'ossalato aggiunte alle foglie di *A. thaliana* sembrano prevenire questa infezione. Le applicazioni future prevedono l'introduzione di geni batterici che codificano per gli enzimi responsabili della degradazione dell'ossalato, direttamente in piante transgeniche.

Altre specie di microrganismi aerobi degradanti l'ossalato sono state isolate dall'intestino di lombrico. Una di queste è *Pseudomonas oxalaticus*, isolato nel 1935 e la cui classificazione è stata discussa a lungo (Hodgkinson, 1977; Quayle, 1963). *P. oxalaticus* è un microrganismo aerobio, Gram-negativo che cresce metabolizzando vari substrati (ossalato, formiato, lattato, succinato, gliossilato, malonato, acetato e glicerolo), pur essendo il formiato l'unico substrato in grado di supportarne la crescita attraverso la via metabolica di Calvin-Benson (Quayle, 1963).

### ***Microrganismi anaerobi che degradano l'ossalato***

Tutte le informazioni sui microrganismi anaerobi degradanti l'ossalato sono state ottenute da studi su rumine e intestino di mammiferi, ma gli organismi responsabili della scomparsa dell'ossalato in questi ecosistemi, sono stati solo recentemente isolati e studiati più nel dettaglio.

La prima evidenza della presenza di microrganismi degradanti l'ossalato è risultata dall'osservazione che alcuni animali svilupparono tolleranza a diete con alto contenuto di ossalato. Fu così ipotizzato che ci fosse un aumento della degradazione di ossalato ad opera di microrganismi intestinali. La capacità dei microrganismi del rumine di degradare l'ossalato è stata verificata utilizzando il contenuto del rumine di pecore e bovini. Successivamente sono stati condotti numerosi studi su diverse specie animali (conigli, porcellini d'india, cavalli) in cui sono stati constatati un incremento della popolazione microbica intestinale e un aumento delle velocità di degradazione in seguito a diete con elevati livelli di ossalato (Allison *et al.*, 1981).

I tentativi iniziali di isolare microrganismi in grado di degradare l'ossalato fallirono, per lo più per la mancanza di un substrato idoneo e di condizioni sperimentali strettamente anaerobiche necessarie per l'isolamento. Dawson fu comunque il primo ad isolare uno di questi microrganismi, *Oxalobacter formigenes*, a partire da rumine di pecora (Dawson *et al.*, 1980). Oggi, grazie allo sviluppo di un metodo di selezione basato sulla comparsa di aloni trasparenti intorno a colonie cresciute su piastre di ossalato di calcio (Daniel *et al.*, 1989; Allison *et al.*, 1985), l'isolamento e il conteggio di batteri in grado di degradare l'ossalato sono stati di gran lunga facilitati.

Nel 1940 fu dimostrato per la prima volta, in un'incubazione in vitro, che anche i batteri delle feci umane erano in grado di degradare l'ossalato (Barber e Gallimore,

1940). I tempi di incubazioni, tuttavia, erano lunghi e non si avevano comunque dati riguardanti le velocità di degradazione. Hodgkinson ha stimato che i batteri intestinali umani sono in grado di degradare da 70 a 100 mg di ossalato al giorno, ma l'attendibilità di questi dati è ancora da verificare (Hodgkinson *et al.*, 1977). Sebbene le informazioni disponibili suggeriscono che i microrganismi appartenenti al genere *Oxalobacter* sono i più importanti batteri degradanti l'ossalato presenti a livello intestinale, non si può escludere tale capacità metabolica anche in altre specie microbiche intestinali. Sono stati, infatti, isolati da feci umane ceppi di *Eubacterium lentum* (Ito *et al.*, 1996), *Enterococcus faecalis* (Hokama *et al.*, 2000) e *Providencia rettgeri* (Hokama *et al.*, 2005) in grado di degradare l'ossalato. Tali microrganismi, al contrario di tutte le specie di *Oxalobacter*, non dipendono per la crescita dall'ossalato per cui non sono considerati "specialisti" ma "generalisti".

Recenti studi hanno, inoltre, dimostrato che la somministrazione orale di preparazioni probiotiche contenenti *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* riduce l'escrezione urinaria di ossalato in pazienti affetti da urolitiasi e leggera iperossaluria e ipossaluria enterica (Lieske *et al.*, 2005; Campieri *et al.*, 2001). Le specie maggiormente caratterizzate che hanno dimostrato un'elevata capacità di degradare l'acido ossalico, sono *B. lactis* DSM 10140 (Federici *et al.*, 2004) e *L. acidophilus* NCFM (Azcarate-Peril *et al.*, 2006).

Sono stati identificati anche altri microrganismi degradanti l'ossalato, isolati da ecosistemi terrestri quali gli ambienti acquatici (Smith *et al.*, 1983). La maggior parte di essi è riferibile al genere *Oxalobacter*, fatta eccezione per un batterio Gram-positivo, mobile e sporigeno, classificato come *Oxalophagus oxalicus* [*Clostridium oxalicum* (Collins *et al.*, 1994; Dehning *et al.*, 1989)]. Tutti i gruppi microbici isolati dall'ambiente acquatico sembrano comunque essere fisiologicamente affini a *Oxalobacter*; sono, infatti, tutti "specialisti" e necessitano di ossalato per la crescita (Dehning *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1985).

Sono stati, inoltre, isolati due microrganismi termofili, *Clostridium thermoaceticum* e *Clostridium thermoautotrophicum*, in ambienti quali sorgenti calde, con attività degradativa nei confronti dell'ossalato (Daniel *et al.*, 1993), ma tali microrganismi sono in grado anche di utilizzare altri substrati come fonti carbonate ed energetiche.

### ***Il ruolo di Oxalobacter formigenes***

La maggior parte delle informazioni relative a *O. formigenes* riguardano il ceppo OxB (Dawson *et al.*, 1980).

Tale microrganismo è Gram-negativo, strettamente anaerobio, di forma bastoncellare (0.4-0.6 x 1.2-2.5 µm) con cellule spesso ricurve che possono essere singole o associate in coppie o corte catene. Le cellule asporigene non presentano flagelli ed il loro DNA ha un contenuto in G+C pari circa al 48-51%.

La richiesta di ossalato per la crescita di *O. formigenes* è fondamentale: è necessaria infatti circa 1 mole di ossalato per grammo di cellule. L'acetato è l'unico altro substrato organico richiesto per lo sviluppo, formiato e biossido di carbonio sono i maggiori prodotti del metabolismo dell'ossalato e vengono rilasciati in un rapporto di circa 1:1 (Allison *et al.*, 1985).

Un vasto numero di disordini gastrointestinali è stato associato ad un incremento dell'assorbimento dell'ossalato introdotto con la dieta, che può comportare anche un elevato rischio di urolitiasi. Diversi studi hanno identificato il colon come il sito principale

di assorbimento ed hanno evidenziato una molteplicità di fattori implicati nell'insorgenza dell'iperossaluria enterica (Balcke, 1983). Fino a qualche anno fa, la perdita o la diminuzione dell'attività dei batteri che degradano l'ossalato nel colon, non sembrava costituire un fattore di rischio per l'insorgenza della patologia. Recentemente, sono stati invece condotti studi su pazienti che soffrivano o erano a rischio elevato di iperossaluria enterica, tutti focalizzati sul ruolo del più importante microrganismo intestinale degradante l'ossalato, *O. formigenes* (Sidhu *et al.*, 1999). Basse o addirittura nulle attività di degradazione dell'ossalato sono state misurate nei campioni fecali di pazienti sottoposti a intervento di bypass digiuno-ileale, in pazienti affetti da morbo di Crohn o steatorrea e in pazienti con sindrome del colon irritabile (Sidhu *et al.*, 1997a). Per valutare l'importanza della degradazione microbica intestinale dell'ossalato, sono stati condotti esperimenti su ratti nutriti con alte concentrazioni di ossalato, sia colonizzati che non da *O. formigenes*; tutti hanno dimostrato il ruolo chiave di questo microrganismo nel regolare l'assorbimento di acido ossalico a livello intestinale e nel mantenerne così l'omeostasi nel plasma e nelle urine (Sidhu *et al.*, 2001). Più recentemente, Hatch e collaboratori (2006) hanno evidenziato come, oltre all'elevata attività di degradazione dell'ossalato, *O. formigenes* sia in grado anche di interagire fisiologicamente con la mucosa del colon promuovendo la secrezione enterica dell'acido ossalico.

Ad una concentrazione 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> cfu di *O. formigenes* per g di peso umido di contenuto del colon in individui sani, questo microrganismo è in grado di rimuovere l'ossalato ingerito e creare un gradiente transepiteliale favorevole per la secrezione dell'ossalato attraverso il colon.

### ***Il metabolismo dell'ossalato***

I principali meccanismi di degradazione dell'ossalato sono:

- decarbossilazione, con produzione di acido formico e anidride carbonica [(COOH)<sub>2</sub> → HCOOH + CO<sub>2</sub>];
- ossidazione, con produzione di perossido di idrogeno e anidride carbonica [(COOH)<sub>2</sub> → 2CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>].

Molti batteri metabolizzano l'acido ossalico attraverso una via decarbossilativa a 3 stadi:

- attivazione dell'ossalato ad oxalyl-CoA;
- decarbossilazione dell'oxalyl-CoA a formyl-CoA;
- ossidazione del formiato ad anidride carbonica.

Gli enzimi chiave di queste reazioni sono rispettivamente: oxalyl-CoA decarbossilasi (oxc), formyl-CoA transferasi (frc) e formiato deidrogenasi (FDH). Sia oxalyl-CoA decarbossilasi che formyl-CoA transferasi sono enzimi citoplasmatici, mentre esistono formiato deidrogenasi sia di membrana che solubili (Chandra *et al.*, 1977; Blackmore e Quayle, 1970).

L'ossidazione del formiato, processo tipico dei microrganismi aerobi, è utilizzata per la crescita batterica, insieme alla riduzione del NAD(P) e di altri trasportatori elettronici. I batteri anaerobi, a differenza di quelli aerobi, si limitano invece ad utilizzare una via decarbossilativa a 2 stadi, con formiato come prodotto finale.

Studi condotti su un ceppo di *Pseudomonas* capace di ossidare direttamente l'ossalato a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hanno permesso di comprendere il ruolo centrale dell'enzima ossalato-ossidasi, alla base di tale processo catabolico. Questo enzima è una metallo proteina

contenente manganese e zinco (Koyama *et al.*, 1988), a differenza dell'analoga ossalato-ossidasi di piante e funghi, la quale è una flavoproteina (Hodkingson *et al.*, 1977).

Tra i batteri che utilizzano l'ossalato come fonte carbonata, sicuramente *O. formigenes* è stato quello più studiato e da esso deriva il modello di decarbossilazione dell'acido ossalico.

L'acido ossalico è trasportato all'interno della cellula e attivato a oxalyl-CoA attraverso il trasferimento di un coenzimaA (CoA) dal formyl-CoA; l'oxalyl-CoA viene così decarbossilato rilasciando formyl-CoA e CO<sub>2</sub> che diffonde fuori dalla cellula. Il trasferimento del CoA dal formyl-CoA ad una nuova molecola di ossalato produce una molecola di formiato che esce dalla cellula attraverso l'antiporto formiato/ossalato. Quest'ultimo meccanismo è stato scoperto osservando che i proteoliposomi di *O. formigenes* scambiavano formiato con ossalato (Anantharam *et al.*, 1989). È stato così identificato un antiporto di membrana che effettua lo scambio elettrogenico tra il formiato, che presenta una carica negativa, e l'ossalato, che invece ne possiede due.

Per ogni molecola di oxalyl-CoA decarbossilata è consumato un protone; si crea così un gradiente protonico usato per la sintesi di ATP. La variazione di energia libera associata alla decarbossilazione dell'ossalato ( $\Delta G = -26,7$  kJ/mole) è minore dell'energia richiesta per la sintesi di una mole di ATP attraverso la fosforilazione a livello del substrato, per questo motivo il batterio utilizza il ciclo elettrogenico di efflusso/influsso di prodotto/substrato. Il ciclo di influsso, decarbossilazione ed efflusso dei prodotti di tale metabolismo, costituisce di per sé un'indiretta pompa protonica. Misure dei potenziali di membrana e dei gradienti di pH attraverso la membrana cellulare di *O. formigenes* sono, infatti, in accordo con il modello proposto (Kuhner *et al.*, 1987).

I tre enzimi chiave di questo ciclo sono stati purificati da *O. formigenes* (Baetz *et al.*, 1990; Baetz *et al.*, 1989). L'oxalyl-CoA decarbossilasi rappresenta circa il 10% di tutte le proteine solubili di questo microrganismo (Baetz *et al.*, 1992), richiede tiamina pirofosfato (TPP) come cofattore e la sua attività è stimolata da ioni Mg<sup>2+</sup>. L'antiporto OxIT è una singola proteina di membrana (Ruan *et al.*, 1992) che regola lo scambio delle due molecole senza alcuna richiesta energetica addizionale. Questo enzima ha un alto turnover in quanto riesce a scambiare 1000 molecole al secondo, e costituisce circa il 5-10% di tutte le proteine di membrana. La formyl-CoA transferasi è una proteina omodimerica che trasferisce il coenzimaA da formyl-CoA all'ossalato. Recentemente sono state ottenute le strutture cristalline sia dell'oxalyl-CoA decarbossilasi (Berthold *et al.*, 2006) che della formyl-CoA transferasi (Jonsson *et al.*, 2004). Le conoscenze genetiche relative al controllo della degradazione dell'ossalato sono invece limitate. I geni *oxc* e *frc* di *O. formigenes*, clonati ed espressi in *E. coli*, sono risultati monocistronici e regolati da singoli promotori e terminatori Rho-dipendenti (Sidhu *et al.*, 1997c; Lung *et al.*, 1994).

Un diverso meccanismo di decarbossilazione è stato proposto per *Clostridium thermoaceticum*, il quale converte l'ossalato ad acetato ed anidride carbonica:



L'utilizzo acetogenico dell'ossalato rappresenta un ulteriore meccanismo catabolico in microrganismi anaerobi obbligati. Gli studi enzimologici hanno indicato che *C. thermoaceticum* è dipendente dalla presenza di un accettore di elettroni (ad es. benzilviologeno) e che l'aggiunta di CoA alla miscela di reazione non influenza l'attività ossalato-degradativa. Queste informazioni suggeriscono che il meccanismo con cui *C. thermoaceticum* ossida l'ossalato è diverso da quello descritto per gli altri organismi

anaerobi. In questa prospettiva, è interessante notare che gli studi per chiarire la via metabolica dell'acetil-CoA hanno preso in considerazione la possibilità di avere l'ossalato come potenziale intermedio nella formazione dell'acetato a partire dall'anidride carbonica (Seravalli e Ragsdale, 2000; Seravalli *et al.*, 1995). L'energia derivante dalla decarbossilazione dell'ossalato sembra essere conservata con un meccanismo alternativo rispetto a quello di *O. formigenes*. Le reazioni di decarbossilazione possono, infatti, essere accoppiate a gradienti di ioni  $\text{Na}^+$  generati da decarbossilasi che fungono da pompe di  $\text{Na}^+$ . Resta ancora da chiarire se la decarbossilazione in *C. thermoaceticum* sia accoppiata ad un sistema di conservazione dell'energia transmembrana.

### **Probiotici e metabolismo dell'ossalato**

Campieri *et al.* (2001) hanno dimostrato che la somministrazione orale di ceppi batterici appartenenti ai generi probiotici *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* riduceva l'escrezione urinaria di ossalato in pazienti con urolitiasi e leggera iperossaluria. Ciò permette di supporre che questi ceppi probiotici svolgano un ruolo significativo nella degradazione dell'ossalato. In uno studio condotto su pazienti affetti da malassorbimento di grassi, nefrolitiasi e presunta iperossaluria enterica, si è osservato che la somministrazione del preparato probiotico Oxadrop® influenzava l'assorbimento di ossalato e riduceva i livelli di supersaturazione nelle urine (Lieske *et al.*, 2005).

Nel 2004 Federici *et al.* hanno condotto uno screening preliminare su 12 ceppi di *Bifidobacterium*, rivelando, con metodi enzimatici, un'elevata variabilità nella loro capacità ossalato-degradativa (Federici *et al.*, 2004). *B. lactis* DSM 10140 è risultato il più attivo, capace di degradare il 60% dell'ossalato aggiunto al terreno di coltura dopo 5 giorni di incubazione. Successivamente, è stato identificato e caratterizzato nel suo genoma un elemento genico che presentava un'elevata omologia (56%) con il gene codificante per *oxc* di *O. formigenes*. L'attività ossalato-degradativa dell'enzima *oxc* di *B. lactis* DSM 10140 è stata valutata mediante elettroforesi capillare, un metodo rapido e sensibile che consente la determinazione del consumo di oxalyl-CoA. I risultati ottenuti hanno suggerito il potenziale coinvolgimento di *Bifidobacterium* nella degradazione dell'ossalato presente a livello intestinale. A differenza dello "specialista" *O. formigenes*, la cui crescita dipende completamente dalla presenza di ossalato, *B. lactis* DSM 10140 può essere considerato un microrganismo "generalista" dal momento che la sua fonte energetica primaria sono i carboidrati.

Recentemente, l'analisi della sequenza genomica del ceppo probiotico *Lactobacillus acidophilus* NCFM ha rivelato la presenza di un operone, coinvolto nel catabolismo dell'ossalato, che contiene geni omologhi a *frc* e *oxc* di *O. formigenes* (Altermann *et al.*, 2005). L'analisi fisiologica di un mutante con il gene *frc* deletato, incapace di degradare l'ossalato, ha dimostrato che l'espressione di *frc* aumenta specificamente la sopravvivenza in presenza di ossalato e a valori acidi di pH (Azcarate-Peril *et al.*, 2006). In uno studio più recente, è stata determinata l'attività di degradazione dell'ossalato di 60 ceppi di *Lactobacillus* appartenenti a 12 diverse specie (Turroni *et al.*, 2007). La capacità ossalato-degradativa è risultata altamente variabile nei vari ceppi considerati e le maggiori percentuali di degradazione sono state ottenute con *L. acidophilus* e *L. gasseri*. Successivamente è stata eseguita una caratterizzazione funzionale di *oxc* e *frc* di *L. acidophilus* LA 14 mediante elettroforesi capillare. Nonostante le attività degli enzimi ricombinanti siano risultate decisamente inferiori rispetto a quelle dei corrispondenti enzimi di *O. formigenes*, è stata dimostrata la funzione e l'importante ruolo di *oxc* e *frc* di

*L. acidophilus* LA 14 nel catabolismo dell'ossalato. È interessante osservare che *L. acidophilus* LA 14 era tra i componenti dei preparati probiotici utilizzati nei trial clinici condotti da Campieri e Lieske (Lieske et al., 2005; Campieri et al., 2001). Nel 2007 uno studio condotto su *L. gasseri* ATCC 33323 ha evidenziato la capacità di questo microrganismo di degradare l'ossalato in condizioni di crescita che simulano l'habitat del colon umano. Gli stessi autori hanno, inoltre, dimostrato che, in condizioni acide (pH 5.5) e in presenza di ossalato 37.3 mM, si ha un aumento dei livelli trascrizionali del gene *oxc* (Lewanika et al., 2007).

L'identificazione di ceppi probiotici con attività ossalato-degradativa offre la possibilità di fornire questa capacità ad individui affetti da disordini correlati ad un eccessivo accumulo di ossalato.

## ***Materiali e metodi***

### ***Ceppi batterici e terreno colturale***

Per questo lavoro sono stati selezionati quattordici ceppi di *Bifidobacterium* appartenenti alle seguenti specie, *B. animalis* subsp. *lactis* (denominato *B. lactis*), *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. longum* biotype *longum* e *B. longum* biotype *suis* (denominati rispettivamente *B. longum* e *B. suis*). *B. bifidum* S16, *B. catenulatum* B665 e *B. longum* S123 sono stati isolati da feci umane, mentre *B. breve* BBSF, *B. longum* W11 e tutti i ceppi appartenenti a *B. lactis*, ad eccezione di *B. lactis* DSM 10140, sono stati isolati da preparati probiotici.

Tutti i ceppi di bifidobatteri sono stati cresciuti a 37°C in terreno complesso (NCM) riportato da Mlobeli et al. (1998), contenente (g/L): tryptone (Oxoid, Hampshire, UK), 10.0; acqua peptonata, 5.0; estratto di lievito (Oxoid), 5.0; Tween 80, 0.5; NaCl, 4.5; KCl, 0.5; MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 0.15; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4; NH<sub>4</sub>Cl, 1.0; cysteina-HCl, 1.2. L'acqua peptonata è stata preparata come segue (g/L): bacteriological peptone (Oxoid), 10.0; NaCl, 5.0; Tween 80, 1.0. Prima di autoclavare a 121°C per 20 minuti, il terreno è stato portato a pH 6.5. Il terreno solido, per le colture in piastra, è stato preparato aggiungendo 1.5% (w/v) di agar (Oxoid) al terreno liquido NCM prima del passaggio di sterilizzazione. Dopo sterilizzazione, al terreno NCM, è stata aggiunta sterilmente una soluzione di saccarosio in modo da ottenere una concentrazione finale di 20 g/L.

Le condizioni di anaerobiosi sono state raggiunte utilizzando giare contenenti Anaerocult A (Merk, Milano, Italia).

### ***Analisi di ossalato e saccarosio con elettroforesi capillare***

I ceppi di *Bifidobacterium* sono stati coltivati per 5 giorni in presenza di sodio-ossalato 5 mM. Come controllo positivo e negativo sono stati usati rispettivamente *B. lactis* DSM 10140 e *E. coli* ATCC 11105. Al termine del periodo di incubazione, il brodo esausto delle colture batteriche e il terreno colturale non inoculato sono stati analizzati in elettroforesi capillare (CE), utilizzando come metodo di rilevamento una tecnica di assorbimento UV indiretto (Holmes, 1995).

Le analisi in CE sono state eseguite utilizzando lo strumento Biofocus 2000 (BioRad, Hercules, CA), dotato di un rilevatore UV, con capillare rivestito permanentemente con polietilenimmina (PEI) (50 µm diametro interno; 31 cm lunghezza effettiva). Il rivestimento del capillare è stato eseguito seguendo il metodo proposto da Erim et al (1995). Il voltaggio, applicato in polarità invertita, è stato mantenuto costante a 20 kV (detector all'anodo) ad una temperatura controllata di 25°C. I campioni, diluiti 1:10 e poi filtrati con filtro 0.45 µm, sono stati iniettati idrodinamicamente con una pressione di 2 psi al sec. Come soluzione elettrolitica è stata utilizzata una soluzione 10 mM di sodio cromato a pH 7.7, come standard interno è stata utilizzata una soluzione di sodio solfato alla concentrazione di 0.2 g/L. La lunghezza d'onda del detector è stata impostata a 254 nm.

Campioni della coltura di *B. lactis* BI07 sono stati analizzati in elettroforesi capillare per la determinazione del saccarosio. La separazione elettroforetica è stata condotta ad un voltaggio costante di 7 kV (detector all'anodo) ed ad una temperatura controllata di 25°C in un capillare di 50 µm di diametro interno e una lunghezza effettiva di 31 cm (Composite Metal Service). La soluzione elettrolitica sviluppata da Jager et al. (2007) è

una soluzione a base acquosa composta da 15 mM di potassio sorbato, 0.3 mM di esadeciltrimetil ammonio bromuro (CTAB) e 50 mM di NaOH a pH 12; come standard interno è stata utilizzata una soluzione di lattosio alla concentrazione di 1.0 g/L.

L'identificazione dei composti, è avvenuta tramite comparazione dei tempi di migrazione di soluzioni standard. La quantificazione di ossalato e saccarosio è stata eseguita tramite determinazione dell'area del picco, definita come il rapporto tra l'area del picco del composto con il tempo di migrazione e successivamente comparato col valore ottenuto dallo standard interno.

### ***Analisi del gene *oxc* in *Bifidobacterium****

Il DNA genomico di *Bifidobacterium* è stato estratto utilizzando il kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Germania) in accordo con le istruzioni del manuale.

Utilizzando termociclatori Biometra Thermal Cycler T Gradient (Biometra, Gottingen, Germania) e AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) come DNA polimerasi, sono state eseguite PCR per amplificare i DNA genomici. I primer utilizzati, *oxc*-L/*oxc*-R, sono stati disegnati sulla sequenza genica del gene *oxc* di *O. formigenes* (NCBI acc. No.: M77128), e di batteri probiotici con completo o parziale sequenziamento del genoma: *L. acidophilus* NCFM, *L. gasseri* ATCC 33323 e *B. lactis* 10140.

### ***Costruzione e screening di una libreria genomica di *B. lactis* BI07 per il gene *oxc****

Il DNA cromosomico di *B. lactis* BI07 è stato parzialmente digerito con enzima di restrizione *Mbo*I. I frammenti di DNA compresi tra 9 e 23 kb sono stati isolati tramite gradiente continuo di saccarosio (10-40%) e successivamente legati in un vettore Lambda EMBL3 digerito con l'enzima di restrizione *Bam*HI usando il Kit EMBL3/*Bam*HI Vector (Stratagene, La Jolla, CA). Il DNA circolare è stato quindi impaccato in vitro usando il kit Gigapac III Gold-11 contenente gli estratti di packaging, la libreria così ottenuta è stata piastrata su XL1-Blue MRA (P2).

Lo screening della libreria genomica di *B. lactis* BI07 è stato eseguito con l'amplicone di 1001-bp, ottenuto amplificando il genoma di *B. lactis* BI07 con i primer *oxc*-L e *oxc*-R, marcato con digoxigenina-dUTP (Roche, Mannheim, Germany). Le placche ibridizzate sono state trattate in accordo con le procedure standard.

### ***Sequenziamento e analisi dei frammenti di DNA genomico contenenti il gene *oxc****

I cloni dei frammenti di DNA genomico di *B. lactis* BI07 che avevano risposto positivamente all'ibridazione, sono stati amplificati usando i primer EMBL3-F e EMBL3-R (tabella 9), disegnati sulle regioni fiancheggianti il sito di clonaggio *Bam*HI del vettore Lambda EMBL3. Per determinare la sequenza nucleotidica del gene *oxc* e le sue regioni superiori e inferiori, è stata impiegata una strategia di gene walking. Il sequenziamento è stato eseguito con la tecnica del nucleotide dideoossi terminale usando il terminatore BigDye e un sequenziatore automatico ABI 3730 (Applied Biosystem). I dati della sequenza sono stati processati utilizzando il software GCG versione 10 (Wisconsin package; Genetics Computer Group, Madison, WI).

L'analisi della sequenza di DNA e la ricerca di sequenze nucleotidiche od amminoacidi che simili sono state eseguite in database utilizzando il network BLAST (BlastN, BlastX e BlastP) (Altschul, et al. 1997) nel sito della NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

L'analisi delle probabili proteine codificate dalle open reading frames (ORFs) di interesse, sono state eseguite utilizzando Protein Families Database of Alignments e HMMs (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) come anche Clusters of Orthologous Group of Proteins (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>). Utilizzando il software TMpred ([http://www.chembnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.chembnet.org/software/TMPRED_form.html)) sono state ipotizzate le regioni trans membrana delle proteine tradotte dalla sequenza nucleotidica di interesse.

Le sequenze proteiche ottenute dal tool informatico Entrez Protein Database del sito internet NCBI sono state allineate ed utilizzate per generare un albero filogenetico dove le sequenze sono state appaiate in base alla loro similarità (software ClustalX per allineamento di sequenze multiple e calcolo dell'albero filogenetico, e software NJplot per la visualizzazione dell'albero) (Perrière, et al. 1996; Thompson, et al. 1997).

**Tab 9.** Oligonucleotides used in this study

Primers	Nucleotide sequence (5'-3')	Purpose
<i>oxc-L</i>	GCTACCACGAAGTCTTCCC	PCR
<i>oxc-R</i>	CCATAACGCCCAAGTACC	PCR
<i>EMBL3-F</i>	TTATGCCCGAGAAGATGTTGA	Sequencing
<i>EMBL3-R</i>	TATACATGGTTCTCTCCAGAG	Sequencing
<i>A</i>	TCGCTTTCGCGCACCTGTATT	Primer walking
<i>B</i>	TCGCGAACTGCGCATTCCGT	Primer walking
<i>C</i>	TCATGCGCGCAATCACCATT	Primer walking
<i>D</i>	TGGGTGGTTGTCGGTGGTCT	Primer walking
<i>E</i>	ATGAGCGTCTCGGCGAGGTA	Primer walking
<i>F</i>	GGTCACTGATTTTCGCACGTAT	Primer walking and RT-qPCR
<i>G</i>	TCGGTCTTCTCGACGAATTCA	Primer walking and RT-qPCR
<i>H</i>	ACCGCGAACCCTACCTCAA	Primer walking
<i>I</i>	AAGCGGCCGTATGCGCGTTGAT	Primer walking and RT-qPCR
<i>J</i>	GAGATGATGATGCCGAGAATGC	Primer walking and RT-qPCR
<i>K</i>	CGCTGCGTAATTTGGGACA	Primer walking
<i>L</i>	TACGACGACAGGCACCAT	Primer walking
<i>M</i>	ACCAGCTCGATCGGGGATAT	Primer walking
<i>N</i>	CGACTTGCACTCGTTGACGAT	Primer walking
<i>O</i>	CGACGATCATGAGCTACACCAA	Primer walking
<i>P</i>	GAAGCTCGGCGAGAACAA	Primer walking
<i>Q</i>	ATCGGTCTCCAGCCCTT	Primer walking and RT-qPCR
<i>R</i>	CGTGTACCAGTCCATGCAGAA	Primer walking and RT-qPCR
<i>S</i>	GGCCAACAAGATACGGGAAA	Primer walking
<i>T</i>	GTGTGGACGGTGACGTAGATT	Primer walking
<i>Bif164<sup>a</sup></i>	GGGTGGTAATGCCGGATG	RT-qPCR
<i>Bif662<sup>a</sup></i>	CCACCGTTACACCGGAA	RT-qPCR
<i>GAPDH-L</i>	CTCGAGTGCACCGGCTTCTA	RT-qPCR
<i>GAPDH-R</i>	TGAAGCCGTACTCGTTGTCGTA	RT-qPCR
<i>gmk-L</i>	TGGGTTTCGGTCTCCGCCAC	RT-qPCR
<i>gmk-R</i>	AGTCCACCTTCGCGGTCTC	RT-qPCR
<i>recA-L</i>	ACGGCCATCTTCATCAACCAG	RT-qPCR
<i>recA-R</i>	GGTGAACCAAGAACCGGACTT	RT-qPCR
<i>rpoB-L<sup>b</sup></i>	CCAGGTCGGCGAGCTGAT	RT-qPCR
<i>rpoB-R<sup>b</sup></i>	TACGGGTTCTCGATGAAGC	RT-qPCR

RT-qPCR, real-time quantitative reverse transcription PCR.

<sup>a</sup>, Langengijk *et al.* (32).

<sup>b</sup>, Vitali *et al.* (57).

## Esperimenti di fermentazioni

Fermentazioni batch sono state eseguite in bioreattori da 1-L (ADI 1025 Bio Consolle e ADI 1010 Bio Controller; Applikon Biotechnology, Schiedam, Olanda) usando 500 mL di terreno NCM arricchito con 20 g/L di saccarosio. L'inoculo al 5% (v/v) per i fermentatori è

stato preparato nel modo seguente. Una vial di Working Cell Bank (WCB) di *B. lactis* BI07 è stata inoculata al 2% (v/v) in 50 mL di terreno NCM con 20 g/L saccarosio. L'incubazione è stata condotta in anaerobiosi a 37 °C per 18 h. L'anaerobiosi è stata ottenuta insufflando N<sub>2</sub> sterile nel terreno ad un flusso costante di 0.1 L/min. La temperatura e l'agitazione sono state mantenute costanti, rispettivamente a 37°C e 300 rpm. Il pH iniziale è stato aggiustato a 6.5 e mantenuto costante automaticamente con l'aggiunta di NaOH 4 M. Impiegando sei diversi fermentatori, è stato possibile studiare in parallelo diverse condizioni colturali, dopo le prime 24 ore di processo, che sono state mantenute costanti per tutti i bioreattori. Le condizioni colturali sono state cambiate nel seguente modo:

- i) Abbassamento del pH a 5.5 aggiungendo o meno sodio ossalato (5 mM);
- ii) Abbassamento del pH a 4.5 aggiungendo o meno sodio ossalato (5 mM);
- iii) Aggiunta di sodio ossalato (5 mM);
- iv) Nessuna variazione.

Ogni nuova condizione colturale è stata propagata per altre 24 ore.

Per verificare come la fase di adattamento all'ossalato influenzi la capacità ossalato degradativa, un altro esperimento di fermentazione è stato eseguito nelle seguenti condizioni: crescita per 24 ore a pH 6.5 in presenza di sodio ossalato (5 mM) e successivamente è stato abbassato il pH a 4.5 ed è stato mantenuto costante per altre 24 h. Tutti i parametri fermentativi sono stati controllati on-line utilizzando il software BioXpert Lite (Applikon Biotechnology). A intervalli appropriati sono stati eseguiti prelievi dai bioreattori in modo da ottenere i campioni per le analisi successive.

La crescita cellulare è stata seguita leggendo la densità ottica a 600 nm (OD<sub>600</sub>), effettuando il conteggio in piastra su terreno NCM agar e valutando il peso secco. La determinazione del peso secco è stata effettuata dopo aver centrifugato 5 mL di brodo colturale, lavato il pellet e risospeso in acqua e in fine seccato a 80°C fino a raggiungimento di un peso stabile.

La concentrazione residua di ossalato è stata misurata nel terreno esausto tramite EC come precedentemente riportato.

### ***Estrazione di RNA e sintesi di cDNA***

L'RNA è stato estratto partendo da 1.5 mL di brodo colturale, le cellule ottenute sono state incubate per 3 h a 37°C in 100 µL di tampone TE contenente 0.1% di diethyl pyrocarbonato (DEPC) e 15 mg/mL di lisozima, in modo da digerire la parete cellulare. Usando il kit Illustra RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare, Uppsala, Svezia), è stato purificato l'RNA, successivamente trattato con DNasi I su RNAspin Mini Columns (GE Healthcare), e eluito in 60 µL di acqua senza RNase. L'integrità dell'RNA è stata confermata con una corsa elettroforetica su gel di agarosio con formaldeide in accordo con le procedure standard (Sambrook, *et al.* 1989). La quantificazione dell'RNA (A<sub>260</sub>) e la qualità (A<sub>260/280</sub>) sono state misurate tramite analisi con spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware).

Il primo filamento di cDNA è stato sintetizzato in un volume totale di 20 µL usando esameri random e Transcriptor Reverse Transcriptase in accordo con le istruzioni del produttore (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit; Roche). Per controllare il DNA residuo, ogni campione di RNA è stato saggiato per la sintesi di cDNA senza l'utilizzo dell'enzima trascrittasi inversa (NoRT). La soluzione di reazione è stata incubata in

Biometra Thermal Cycler T Gradient (Biometra) sotto il seguente ciclo di reazione: 65°C per 10 min, 25°C per 10 min, 55°C per 30 min e 85°C per 5 min per inattivare l'enzima.

### ***PCR Real-Time***

La reazione di quantificazione di PCR è stata eseguita in LightCycler System (Roche). L'amplificazione è stata eseguita in un volume di 20 µl contenente 50 ng di RNA iniziale, come template di cDNA, 4 µl di SYBR Green PCR master mix e i specifici primer alla concentrazione di 500 nM (tabella). È stato applicato il seguente termociclo: un ciclo a 95°C per 10 min, 40 cicli a 95°C per 15 sec, 58°C o 60°C (solo per il set Q/R primer) per 25 sec, 72°C per 30 sec e un'ulteriore step di incubazione a 89°C per 5 sec per l'acquisizione della fluorescenza.

Il ciclo limite (CT) è stato definito come il primo ciclo di PCR dove la fluorescenza misurata ha una differenza significativa rispetto al rumore di fondo. Tutti i campioni e le combinazioni di primer sono stati analizzati in triplicato. Per verificare la contaminazione di sottofondo o data dal DNA cromosomico, ogni corsa includeva un controllo negativo e un campione della reazione NoRT cDNA. Quando il  $\Delta CT$  tra il campione e quello ottenuto con NoRT era maggiore di 4 volte, la contaminazione data dal DNA era considerata trascurabile. L'analisi dei prodotti e la specificità del processo di PCR è stato verificato dopo amplificazione mediante l'analisi delle curve della temperatura di melting dei prodotti di PCR.

I prodotti di cDNA sono stati successivamente amplificati con PCR convenzionale usando primer interni al gene di interesse e successivamente corsi su gel di agarosio.

### ***Analisi dei livelli trascrizionali relativi dei geni *oxc*, *orf-1* e *orf-4****

Per la quantificazione dei livelli di espressione dei geni di interesse, è stata utilizzata una curva standard che metteva in relazione quantità relative di RNA e i risultati di quantificazione ottenuti dalla qPCR. Per ogni gene di interesse è stata creata una curva di calibrazione adibita alla quantificazione relativa del livello di espressione. L'efficienza di amplificazione (E) è stata calcolata per ogni coppia di primer usando l'equazione:

$$E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] * 100$$

Un gruppo di 5 geni Housekeeping, un rRNA (gene 16S rRNA) e 4 gene codificanti mRNA (GAPDH, gmk, recA and rpoB), sono stati utilizzati per valutare la stabilità dei geni espressi. I valori di CT ottenuti dal Light Cycler system (Roche) sono stati convertiti in quantità relative e importati in un'applicazione Visual Basic per Microsoft Excell denominata geNorm v. 3.5 (Vandesompele, *et al.* 2002). Per ogni gene housekeeping è stato misurato il valore di stabilità M, definito come la variazione media a coppie di un particolare gene di riferimento con quelli di controllo. Idealmente, M deve essere minore o uguale a 1.5, e un alto valore di M riflette la stabilità di espressione del gene. Il fattore di normalizzazione (NF), basato sulla media geometrica dei migliori valori ottenuti dai geni housekeeping, è stato calcolato con geNorm e applicato per il processamento dei dati. Per determinare il numero ottimale di geni (n) da includere in NF, la variazione media accoppiata  $V_n/n+1$  è stata calcolata tra due NF sequenziali ( $NF_n$  e  $NF_{n+1}$ ). In accordo con Vandesompele *et al.* (2002), non sono stati considerati geni con valori inferiori a 1.5. I livelli di espressione dei geni *oxc*, ORF-1 e ORF-4 sono stati riportati come quantità relativa del gene di interesse contro il valore NF.

Differenze tra le diverse condizioni sperimentali sono state saggiate utilizzando il T-student test statistico, usando SigmaStat v. 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA), che risulta significativo per valori di P inferiori a 0.05.

## Risultati

### Attività ossalato-degradativa e individuazione del gene *oxc* in ceppi di *Bifidobacterium*

L'attività ossalato degradativa dei ceppi di *Bifidobacterium* è stata valutata mediante analisi in elettroforesi capillare (CE). Tra i 14 ceppi utilizzati, uno appartiene a specie suina, *B. suis*; *B. lactis* è ampiamente utilizzato in preparati alimentari e farmaceutici di tipo probiotico; mentre gli altri ceppi sono stati isolati dalle feci umane, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum* e *B. longum*. Questo approccio analitico ha consentito di misurare la concentrazione residua di ossalato tramite misura indiretta agli UV. La sensibilità del metodo a 254 nm, stimato come LOD (S/N=3) e LOQ (S/N=10), è stato trovato rispettivamente di 0.05 e 0.15 mM. La ripetibilità del sistema di separazione è stato valutato per analisi successive di una soluzione 0.25 mM di ossalato; la deviazione standard percentuale (RSD%) del tempo di migrazione è stata 1.24% (n=5, analisi effettuate lo stesso giorno) e 2.14% (n=5, analisi corse in giorni diversi). La RSD% del rapporto corretto dell'area dei picchi (analita/standard interno) è stata 2.06% (n=, analisi effettuate lo stesso giorno) ed è stata trovata inferiore del 4% dopo 2 due giorni consecutivi di analisi (n=10).

Tab 10. Attività ossalato degradativa dei ceppi di *Bifidobacterium* testati in questo lavoro.

Species/strains	Oxalate degradation %
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	0
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 10140, BA30, Bb12, BI07, L15	100
<i>B. bifidum</i> S16	0
<i>B. breve</i> ATCC 15700, BBSF	0
<i>B. catenulatum</i> B665	0
<i>B. longum</i> biotype <i>longum</i> S123, ATCC 15707, W11	0
<i>B. longum</i> biotype <i>suis</i> ATCC 27533	0
<i>E. coli</i> ATCC 11105	0

ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, MD); DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany); B, L, S and W, our collection

Come riportato in tabella 10, solo 5 ceppi di *B. lactis* mostravano attività ossalato degradativa dopo 5 giorni di incubazione, mentre nessun tipo di attività degradativa è stata riscontrata nei restanti bifidobatteri.

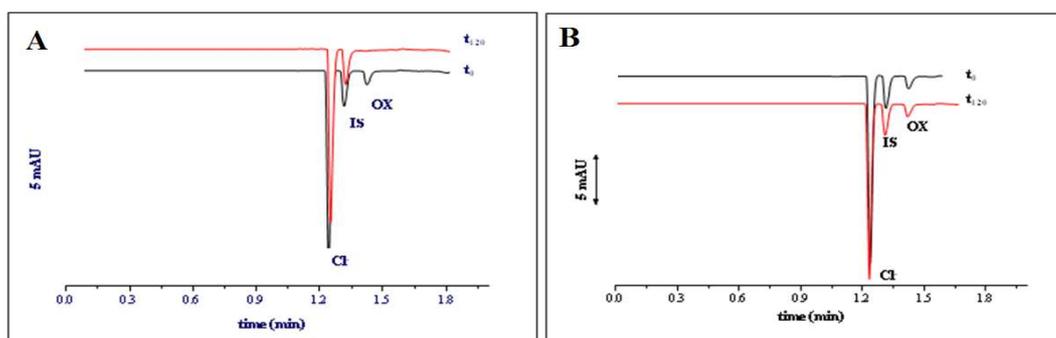
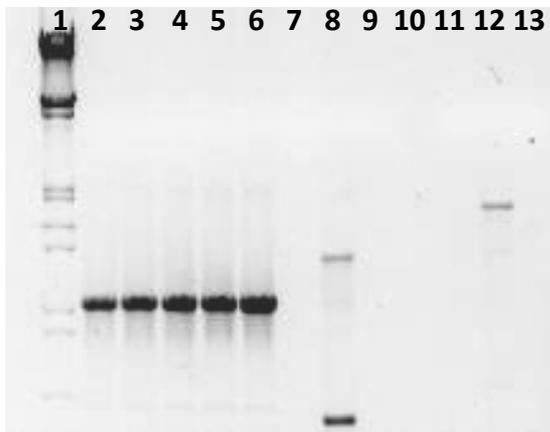


Fig 12. Elettroferogramma a  $t_0$  (nero) e a  $t_{120h}$  (rosso) di *B. lactis* BI07 (A) e *B. catenulatum* B665 (B). Cl<sup>-</sup> = cloruro, IS= standard interno (solfato), OX= ossalato; V= 20kV, T= 25°C; rivelazione a 254 nm.

In figura 12 è riportato l'elettroferogramma dell'analisi con CE del brodo esausto di *B. lactis* BI07 e di *B. catenulatum* B665 al tempo t0 e dopo 120 h di crescita in presenza di sodio ossalato alla concentrazione di 5 mM, confermando la completa scomparsa del picco corrispondente all'ossalato al t120 solo in *B. lactis*. Come previsto, i due controlli, positivo (*B. lactis* DSM 10140) e negativo (*E. coli* ATCC 11105), hanno dato rispettivamente il 100% e lo 0% di degradazione dell'ossalato.

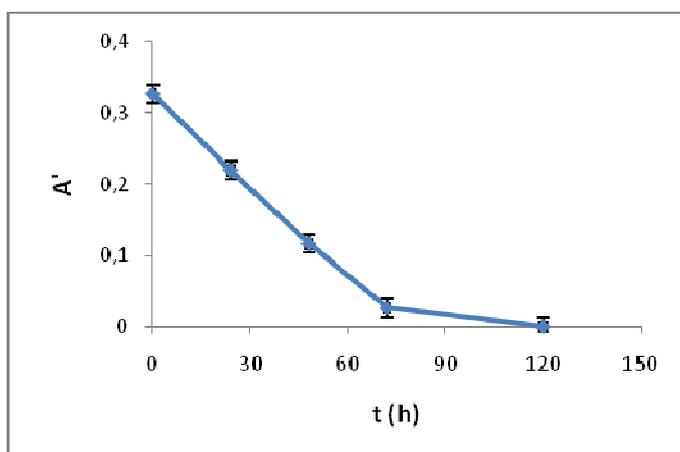
Per verificare se l'attività ossalato degradativa fosse correlata alla presenza del gene *oxc*, tutti i 14 ceppi di *Bifidobacterium* sono stati analizzati in PCR. Per fare questo, è stata impiegata una coppia di primer, *oxc*-L/*oxc*-R, disegnata sulla sequenza nucleotidica del gene *oxc* di *O. formigenes* e di ceppi probiotici che sono stati caratterizzati e aventi attività ossalato degradativa. Anche in questo caso, solo i 5 ceppi di *B. lactis* presentavano l'amplicone specifico di 1001 bp caratteristico del gene *oxc* (Fig 13).



Il gel di agarosio all'1% di elettroforesi a campo pulsato (PFGE) delle amplificazioni ottenute con la coppia di primer *oxc*-L/*oxc*-R (lane 2), *B. lactis* DSM 10140 (lane 2), *B. lactis* BB12 (lane 4), *B. lactis* L15 (lane 6), *B. lactis* BB12 (lane 7), *B. breve* ATCC 25919 (lane 10), *B. adolescentis* ATCC 25919 (lane 3), *B. suis* ATCC 27533 (lane 3).

### ***Analisi cinetica del consumo di ossalato e saccarosio in B. lactis BI07***

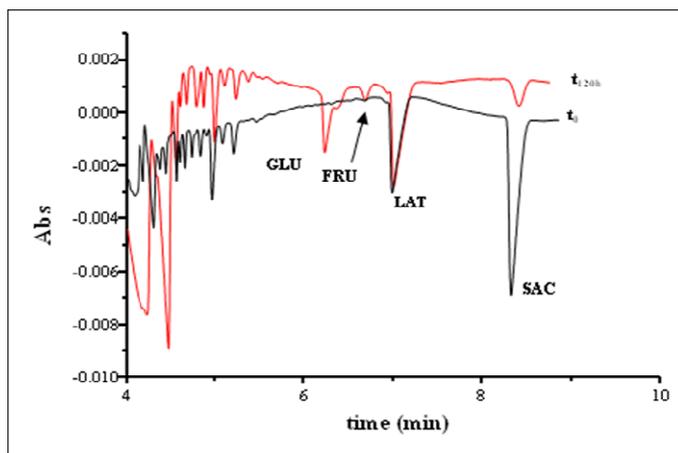
L'attività ossalato degradativa di *B. lactis* BI07 è stata valutata nel corso di tutto il periodo di incubazione di 5 giorni. Come riportato in figura 14, la degradazione di ossalato risulta essere lineare per le prime 72 h di incubazione, passando da 5 mM a 0.4 mM, con una degradazione del 92%.



Analisi cinetica di degradazione di ossalato in *B. lactis* BI07. Il grafico riportato esprime il consumo di ossalato nel corso di incubazione. Come si può osservare, il consumo è lineare fino a 72 h di incubazione, dopo di che si completa la scomparsa di ossalato già a partire dal terzo giorno di incubazione.

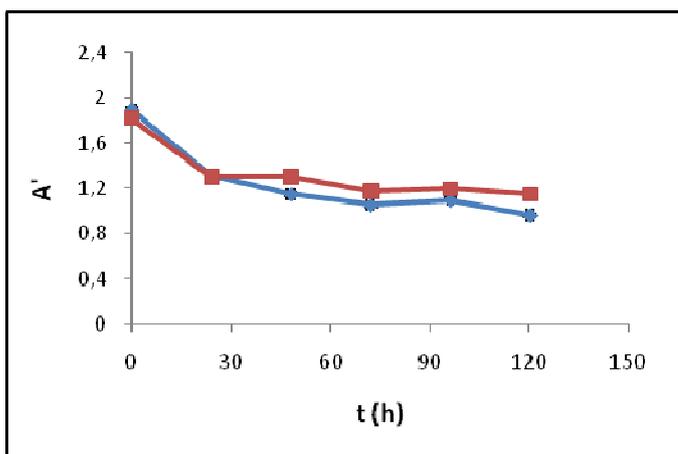
Lo stesso esperimento di degradazione è stato eseguito facendo crescere *B. lactis* BI07 in presenza di ossalato senza aggiungere la fonte carbonata, saccarosio, al terreno di crescita. In queste condizioni *B. lactis* BI07 non è in grado di crescere e la degradazione di ossalato risulta essere molto più bassa rispetto agli esperimenti precedenti.

Per quanto concerne il consumo di saccarosio da parte di *B. lactis* BI07, come è possibile vedere dagli elettroferogrammi riportati in figura 15, la scomparsa di saccarosio dal terreno colturale è accompagnata dalla comparsa di due segnali corrispondenti al glucosio e fruttosio, prodotti di degradazione del saccarosio.



rogramma a  $t_0$  (nero) e  
a  $t_{24h}$  di *B. lactis* BI07. GLU=  
glucosio, LAT= lattosio  
SAC= saccarosio.

L'andamento cinetico, viene invece riportato in figura 16, dove è possibile vedere come ci sia un calo repentino nelle prime 24 ore, con un consumo del 30%; nei rimanenti giorni di incubazione si ha una degradazione più lenta fino a raggiungere il 50% di degradazione.



di degradazione del  
saccarosio da parte di  
*B. lactis* BI07 in presenza  
di ossalato (rosso).

In figura 16 è riportato anche la cinetica di degradazione di saccarosio in *B. lactis* BI07 in assenza di ossalato. L'andamento cinetico risulta essere simile a quello ottenuto con l'ossalato a 5 mM di concentrazione.

### ***Banca genica di B. lactis BI07 e isolamento del gene oxc***

Per identificare i geni potenzialmente coinvolti nel processo di degradazione di ossalato, è stata creata in Lambda EMBL3 e screenata su *E. coli* XL1-Blue MRA (P2), una libreria genica del genoma di *B. lactis* BI07 digerita con *Mbol*. Due cloni positivi sono stati individuati da placche di ibridazione con sonda del gene *oxc* marcata con digossigenina-dUTP, e denominati F e S. attraverso un'analisi preliminare con enzimi di restrizione, si è visto che il clone F conteneva un frammento di 10.2 kb e il clone S un frammento di 9.5 kb.

### ***Analisi dell'inserito da 10.2 Kb del clone F***

Utilizzando la tecnica del primer walking, l'intero frammento del clone F è stato sequenziato e sono state individuate 5 complete e 2 incomplete ORF intorno al gene putativo per OXC (figura 17). A parte le ORF-2 e -4, tutte le altre ORF sono orientate nella stessa direzione di *oxc*. Attraverso un'analisi bioinformatica della sequenza di 1782 bp del gene *oxc*, codificante per una proteina di 593 aa (MW 36.71 kDa), è stato possibile riscontrare una totale omologia al gene *oxc* di *B. lactis* DSM 10140, dove è già stato dimostrato il suo impiego nel catabolismo di ossalato (Federici *et al.*, 2004). Da un'analisi BlastX del gene *oxc* di *B. lactis* BI07, è stato possibile verificare l'alta similarità con l'oxalyl-CoA decarbossilasi putativa di *B. gallicum*, *B. dentium* e *B. pseudocatenulatum* (79%, 78% e 74% di similarità, rispettivamente) (acc. no.: ZP\_04006707, YP\_001271099, ZP\_04012429), con *E. coli* (51%) (acc. no.: NP\_416874) e *O. formigenes* (48%) (acc. no.: ZP\_04579522). La proteina codificata da *oxc* ha un dominio conservato che è presente in enzimi che richiedono tiamina pirofosfato (TPP) [acetolactate synthase, pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboligase, phosphonopyruvate decarboxylase] (COG0028). Nel prodotto di *oxc*, la porzione N-terminale del dominio TPP-binding (pfam02776) inizia al residuo amminoacidico 23 e si estende per 165 aa, la porzione centrale (pfam00205) inizia al residuo 212 e si estende per 130 aa e la porzione C-terminale del dominio TPP-binding (pfam02775) inizia al residuo 418 e si estende per 135 aa.

ORF-1 inizia sullo stesso filamento, 104 nucleotidi a valle del gene *oxc*. La proteina dedotta dalla sequenza nucleotidica ha un peso molecolare di 39.25 kDa e un *pI* di 8.99. Effettuando una blast analisi dei 367 aa codificati dalla ORF-1 si evidenzia una similarità con diverse permeasi, avendo i domini COG0679 e pfam03547 conservati. Oltre alla permeasi di *B. lactis* DSM 10140, identica al 100%, le somiglianze più forti si riscontrano per i recettori putativi di *B. dentium*, *B. pseudocatenulatum* e *B. gallicum* (79-81% di identità e 88-9% di similarità) (acc. no.: ZP\_02917881, ZP\_03743614, ZP\_05965189). Livelli di similarità superiori al 72% sono stati individuati per *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* e *L. ultunensis* (acc. no.: YP\_193290, YP\_814096, ZP\_04006706, ZP\_04012395), mentre il 49% di identità è stato trovato per il trasportatore putativo YfdV di *E. coli* (acc. no.: NP\_416873). L'analisi delle zone di idrofobicità della proteina ipotetica codificata per la ORF-1 ha rivelato la presenza di 10 segmenti transmembrana, composti da diversi residui idrofobici. L'analisi topologica ha predetto che la porzione N-terminale può essere espressa nello spazio extracellulare.

ORF-2 è stata identificata 7 nucleotidi a valle di ORF-1 orientata in direzione opposta a *oxc*. Il gene è stato previsto codificare per una proteina contenete 43 aa e con un peso molecolare di 4740 Da. La comparazione della proteina ha mostrato una similarità

significativa solo con una non-pfam proteina ipotetica di *B. lactis* DSM 10140 (acc. no.: gblA CS48365).

ORF-3, localizzata 863 nucleotidi a valle di ORF-1 sullo stesso filamento, è di 1137 bp di lunghezza e codifica per una proteina di 378 aa con peso molecolare di 40.03 kDa. A livello proteico, il prodotto della ORF-3 ha mostrato un'alta omologia con la beta-mannosidasi secreta di *B. lactis* (100% di identità; acc. no.: YP\_002970426), *Streptomyces coelicolor* e *Streptomyces lividans* (50% di identità; acc. no.: embICAA20610, gblAAA26710). Nella porzione C-terminale della proteina è presente un dominio di legame per la cellulosa o per proteine (pfam02013).

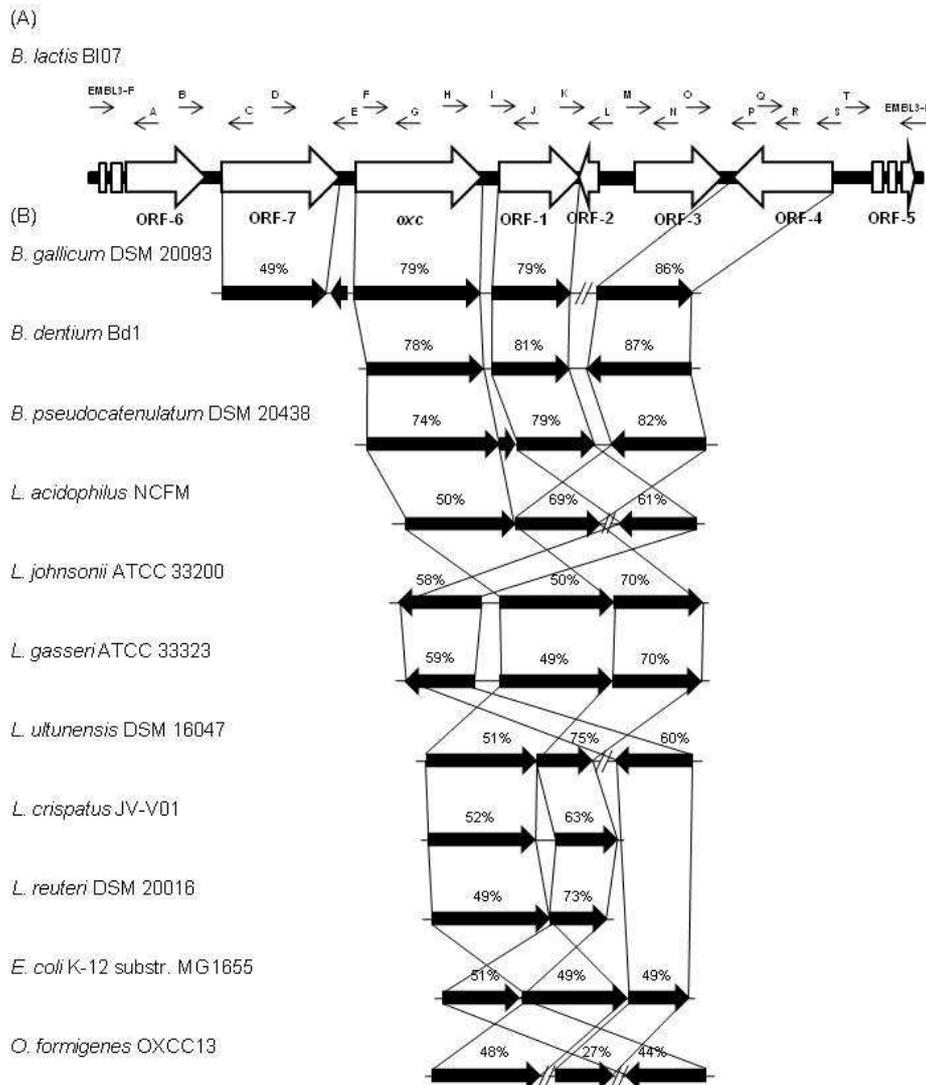
ORF-4, orientata in direzione opposta del gene *oxc*, è composta da 1332 bp codificando per una proteina di 443 aa, con un peso molecolare previsto di 48.90 kDa e un *pI* di 5.03. Comparando la sequenza amminoacidica all'interno del database, è stato possibile mostrare un'alta similarità con la formyl-CoA transferasi putativa di *B. lactis* (100% di omologia; acc. no.: YP\_002970425), *B. dentium*, *B. gallicum* e *B. pseudocatenulatum* (82-87% di omologia, 92-95% di similarità) (acc. no.: ZP\_02917882, ZP\_05965202, ZP\_03743615). Livelli di omologia maggiori di 63% sono stati osservati con l'enzima Frc di diversi lattobacilli (*L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. ultunensis*, *L. crispatus*) (acc. no.: ZP\_04006708, YP\_001271100, YP\_814094, YP\_193317, ZP\_04012428, ZP\_03995674). Inoltre, il prodotto della ORF-4 presenta il 44 e 49% di omologia (62 e 67% di similarità) con le proteine codificate dai geni *frc* di *O. formigenes* (acc. no.: ZP\_04579035) e *yfdW* di *E. coli* (acc. no.: NP\_416875). L'analisi della sequenza proteica con pfam marche, ha rivelato la presenza di un dominio conservato pfam02515, appartenente alla terza famiglia delle CoA- transferasi, che parte dal residuo 74 e si estende per 207 aa. Come per *Oxc*, non sono state riscontrate porzioni proteiche transmembranalari o di ancoraggio alla parete, suggerendo che questa proteina sia di tipo citoplasmatico.

L'ultima ORF completa, localizzata a monte di *oxc* e denominata ORF-7, contiene 552 codoni. La sequenza amminoacidica conferisce un peso molecolare di 60.26 kDa ed un *pI* di 8.98, dimostrando il 100% di omologia con la famiglia di proteine del canale del cloro voltaggio dipendente di *B. lactis* DSM 10140 (acc. no.: YP\_002970430), e una significativa similarità con le proteine del cloro putative EriC di *B. gallicum* (49% omologia; acc. no.: ZP\_05965186) e *Eggerthella lenta* (44% omologia; acc. no.: ZP\_03895186). Nella sequenza proteica proposta è presente un dominio conservato di EriC, coinvolto nel trasporto e nel metabolismo di ioni inorganici (COG0038). Il profilo idrofobico del prodotto di ORF-7 rivela la presenza di 11 regioni trans membrana con orientamento interno ed esterno.

Sono state identificate due ORF incomplete, entrambe sullo stesso filamento di *oxc*. La prima, ORF-5, contiene 8 codoni per la regione N-terminale della proteina, che mostra un'alta similarità con la proteina integrasi putativa di *B. lactis* DSM (83% di omologia; acc. no.: YP\_002970424). La seconda, ORF-6, localizzata a monte di ORF-7, contiene 345 aa, che hanno un'omologia al 100% con una proteina della membrana esterna di *B. lactis* DSM 10140, coinvolta nel processo di adesione al collagene (acc. no.: YP\_002970431).

Comparando l'organizzazione genica intorno a *oxc* con quella degli altri bifidobatteri risulta essere simile (fig 17). Sicuramente, *oxc*, ORF-1 e ORF-4 sono presenti nello stesso ordine in *B. gallicum*, *B. dentium* e *B. pseudocatenulatum*. È molto interessante notare come nel genoma di *B. gallicum*, il gene codificante per la proteina Frc putativa, è localizzata 14 ORF a valle del gene *oxc* sullo stesso filamento. Il repertorio genico

presente nei livelli tassonomici indipendenti (per esempio *Lactobacillus*, *Escherichia* e *Oxalobacter*) è risultato molto differente in termini di disposizione e orientamento trascrizionale, che risulta essere in accordo con la loro distanza filogenetica. L'unica eccezione è rappresentata da *O. formigenes*, dove sono inserite oltre 500 kbp tra *oxc* e ORF-4 (fig 17).



**Fig 17.** Organizzazione genica intorno al gene *oxc* in *B. lactis* BI07 (A) e comparazione con i geni corrispondenti in bifidobatteri, lattobacilli, *E. coli* and *O. formigenes* (B). Ogni freccia indica le ORF, e la lunghezza è proporzionale alla lunghezza della ORF predetta. Sulle frecce sono indicati i livelli di omologia amminoacidica espressi in percentuale.

### **Caratterizzazione dell'espressione di *oxc***

Per verificare se il gene *oxc* sia un trascritto policistronico, è stato sintetizzato cDNA di *B. lactis* BI07 partendo da RNA totale, utilizzando diverse coppie di primer. Primer B e G sono stati utilizzati per individuare il trascritto tra ORF-7 e *oxc*, primer F e J per individuare il trascritto tra *oxc* e ORF-1, primer I e N per individuare il trascritto tra ORF-1

e ORF-3, e i primer O e R per determinare se ORF-3 e ORF-4 sono espressi insieme nello stesso RNA trascritto. Solo con i primer B e G si è ottenuto un prodotto di PCR con le dimensioni previste, indice del fatto che l'intera regione tra *oxc* e ORF-1, e ORF-1 e ORF-3 non produce nessun tipo di amplicone. Nessun prodotto di PCR è stato ottenuto utilizzando primer O/R, come previsto sulla base della direzione trascrizionale di ORF-3 e ORF-4. Questi risultati indicano che ORF-7 e il gene *oxc* sono presenti sullo stesso mRNA, ma il trascritto non si estende a valle di *oxc*. Differentemente, ORF-1, ORF-3 e ORF-4 sono trascritti in modo indipendente.

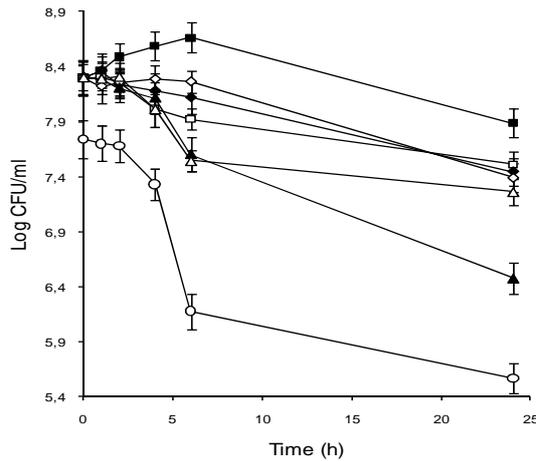
### ***Esperimenti di fermentazione***

Per valutare l'impatto delle condizioni acide sull'attività ossalato degradativa di *B. lactis* B107, sono state allestite fermentazioni batch a pH controllato, esperimenti già realizzati per *L. acidophilus* NCFM da Azcarate-Peril et al. (2006). *B. lactis* B107 è stato cresciuto a pH 6.5 e dopo 24 h di crescita la coltura si trovava in fase esponenziale, con una velocità specifica di crescita di  $0.23 \text{ h}^{-1}$  e una biomassa in peso secco di  $1.5 \text{ g/L}$  ( $9 \cdot 10^8 \text{ CFU/mL}$ ,  $\text{OD}_{600} = 4$ ). Dopo 24 ore di crescita sono state modificate le condizioni di coltura aggiungendo prima sodio ossalato (concentrazione finale 5 mM) e successivamente il pH è stato impostato a 4.5, 5.5 o 6.5 e mantenuto costante per tutto il processo. Per valutare l'effetto del pH, altre tre fermentazioni sono state eseguite senza aggiungere sodio ossalato. Campioni di brodocolturale sono stati prelevati a tempi prefissati in modo da poter analizzare la crescita cellulare e la degradazione di ossalato.

In figura 18 sono riportate le ultime 24 ore di crescita di *B. lactis* B107 nei vari processi di fermentazione. Prima della variazione del pH (0-24 ore) l'andamento della crescita risultava essere uguale in tutti i processi fermentativi, ad eccezione della fermentazione di adattamento con ossalato, dove le cellule di *B. lactis* B107 sono state cresciute in presenza di ossalato a pH 6.5, in questo caso la cinetica di crescita presenta una velocità di crescita di  $0.15 \text{ h}^{-1}$ , valore inferiore a quello ottenuto senza la presenza di ossalato.

Confrontando le cinetiche di crescita delle fermentazioni, si può notare come le colture che hanno subito la diminuzione del pH raggiungano un minor valore di biomassa, in particolare, dopo lo shift del pH a 5.5, la velocità di crescita di *Bifidobacterium* cala in modo continuo per tutto il periodo della fermentazione, fino a raggiungere valori inferiori di un'ordine di grandezza. A pH 4.5 si ha un'iniziale fase stazionaria, seguita da una perdita lineare della concentrazione più accentuata rispetto alle condizioni di pH 5.5. Questi risultati suggeriscono che la perdita di vitalità sia proporzionale all'abbassamento del pH.

Per quanto riguarda l'ossalato, altro fattore di stress, la sua aggiunta causa effetti contrastanti con quelli ottenuti dalla variazione del pH. Aggiungendo ossalato l'effetto atteso è un aumento della morte cellulare causato dalla presenza delle due condizioni di stress. Questo effetto si può vedere per la fermentazione a pH 6.5, dove dopo 6 ore di processo si ha il dimezzamento della biomassa; al contrario, durante le fermentazioni a pH 5.5, l'effetto dell'ossalato è inverso rispetto a quello ottenuto a pH 6.5. Infatti, durante le prime 6 ore di processo (dopo la variazione del pH) si ha un incremento della vitalità cellulare, circa del 20%, rispetto alla fermentazione a pH 5.5 senza ossalato. Questo risultato è stato confermato anche alla condizione di pH 4.5, dove l'aggiunta di ossalato consente di ottenere una biomassa maggiore di 1 ordine di grandezza rispetto alla fermentazione a pH 4.5.

Attività ossalato degradativa in *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*

**Fig 18.** Vitalità di *B. lactis* BI07 a differenti pH. Dopo 24 ore di crescita a pH 6.5, il pH è stato mantenuto a 6.5 (quadrato), diminuito a pH 5.5 (diamante) o 4.5 (triangolo). Nelle stesse condizioni sono state eseguite fermentazioni con l'aggiunta di ossalato (simboli vuoti). È stata eseguita anche una fermentazione in cui *B. lactis* BI07 è stato preadattato con ossalato 5 mM e dopo 24 h di crescita il pH è stato modificato a 4.5 e aggiunto ossalato per arrivare a 50 mM (cerchio bianco).

Per quanto concerne l'attività ossalato degradativa di *B. lactis* BI07, dopo la variazione del pH, si possono evidenziare 2 fasi nel processo di degradazione, la prima va dalle 24 alle 30 ore, mentre la seconda dalle 30 alle 48 ore di processo.

Come riportato in tabella 11, il pH influenza in modo netto il consumo di ossalato, andando dal 6% per il pH 6.5 fino ad arrivare al 43% a pH 4.5, valore confermato dalla fermentazione con 50 mM di ossalato. Le velocità di degradazione confermano l'aumento della capacità in relazione alla diminuzione del pH, passando da 0.09 a 3.21 mmol/h. Le cellule di *B. lactis* BI07 adattate all'ossalato, incrementano notevolmente la velocità di degradazione, passando da 0.74 mmol/h a 339.33 mmol/h nella prima fase di degradazione, mentre nella seconda si ha un incremento di 3 ordini di grandezza, passando da 3.21 a 1210.72 mmol/h.

**Tab 11.** Attività ossalato degradativa di *B. lactis* BI07 in diverse fermentazioni batch a pH controllato

Condizioni sperimentali	Degradazione di ossalato (%)	Velocità di degradazione di ossalato (mmol/h)	
		Fase 1	Fase 2
pH 6.5 + 5 mM oxa	6	0.19	0.09
pH 5.5 + 5 mM oxa	12	0.17	0.12
pH 4.5 + 5 mM oxa	43	0.74	3.21
pH 4.5 + 50 mM oxa	43	339.33	1210.72

### ***Livelli di espressione dei geni oxc, ORF-1 e ORF-4 in risposta allo shift di pH e l'aggiunta di ossalato***

Sono stati valutati gli effetti delle differenti condizioni fermentative sui livelli trascrizionali di *B. lactis* BI07 dei geni *oxc*, ORF-1 e ORF-4, potenzialmente coinvolti nel metabolismo dell'ossalato; per tale scopo, è stata calcolata l'abbondanza relativa del trascritto genico normalizzato sui livelli trascrizionali di alcuni geni Housekeeping, procedura già utilizzata da Vandesompele *et al.* (2002).

In ogni corsa di qPCR, è stata calcolata una curva di calibrazione in modo da calcolare l'efficienza di amplificazione (E), questo per tutti i geni analizzati (*oxc*, ORF-1, ORF-4, 16S rRNA, GAPDH, *gmk*, *recA* e *rpoB*). Il valore E è stato maggiore dell'85% per i geni di riferimento GAPDH, *gmk* e *recA*, dove la pendenza della curva standard risultava minore di 4.1, mentre per i geni 16S rRNA, *rpoB* e i geni target hanno presentato un valore E

minore di 75% (il coefficiente di correlazione ottenuto è stato maggiore di 0.99). La riproducibilità e l'affidabilità del metodo è stato saggiato ripetendo la sintesi del cDNA e l'analisi qPCR per tre volte nelle stesse condizioni sperimentali.

Utilizzando geNorm, è stato possibile misurare la stabilità dell'espressione genica dei geni housekeeping. Il gene 16S rRNA è risultato avere il peggior punteggio come gene housekeeping, venendo così eliminato dal calcolo dell'adeguato fattore di normalizzazione NF. Partendo dal calcolo della variazione pair-wise tra due NF sequenziali, contenente un incremento del numero di geni, è stato considerato un valore soglia di 0.15 come proposto da Vandesompele et al. (2002), i rimanenti quattro geni sono necessari come controlli interni per la media geometrica.

In figura 19 sono riportati i livelli di mRNA normalizzati dei geni *oxc*, ORF-1 e ORF-4 al tempo t0 e dopo 1, 2, 4, 6 e 24 ore dopo aver cambiato le condizioni sperimentali delle fermentazioni batch. Il dividendo esponenziale (24h) cellulare a pH 6.5 rappresenta le condizioni di controllo utilizzate per comparare le variazioni di pH. I geni sono stati considerati up- o down- regolati se la variazione dei livelli relativi di espressione sono di un valore superiore alle 2 volte se comparati al livello delle condizioni di controllo. Quando i 5 mM di ossalato sono stati aggiunti mantenendo il pH 6.5, in tutti e tre i geni considerati non sono state riscontrate variazioni significative, supportando l'assenza di un effetto specifico di ossalato senza l'abbassamento del pH. Differentemente, dopo l'abbassamento del pH a 4.5, per *oxc* e ORF-4 si ha un incremento immediato dei livelli di espressione relativi in modo indipendente dall'aggiunta dell'ossalato. I più alti valori dei livelli trascrizionali, 5.5 volte maggiore rispetto ai livelli basali, sono stati riscontrati dopo 1 h per ORF-4 e 2 h per *oxc*, in assenza di ossalato. A pH 4.5, i livelli trascrizionali di ORF-1 non presentano variazioni significative rispetto ai livelli basali delle cellule di *B. lactis* BI07 di controllo. Modeste variazioni di induzione della permeasi putativa è stata visualizzata dopo lo shift del pH a 5.5 e aggiunta di ossalato, con un valore di 2.7 al tempo t1. Nella coltura di controllo a pH 5.5, è stato osservato un aumento significativo dei livelli trascrizionali di *oxc* (3.2 volte maggiore). In quasi tutti i pH controllati, i livelli trascrizionali dei geni tende a calare dopo il tempo limite.

Quando *Bifidobacterium* è stato preadattato a 5 mM di ossalato durante le prime 24 h di crescita, tutti i geni esaminati sono risultati indotti. I livelli di espressione mostrano i valori massimi (6.5 *oxc*, 3.5 per ORF-1 e 12 per ORF-4) immediatamente dopo la variazione delle condizioni sperimentali e iniziano a calare dopo la prima ora di trattamento. Comunque, il quantitativo del trascritto rimane considerevolmente elevato rispetto ai livelli basali. Significative differenze sono state osservate a t0 per tutti i geni tra il pre-adattamento e la coltura a pH 4.5 senza adattamento. In tutti gli altri campioni analizzati non sono state riscontrate significative induzioni o repressioni dei geni *oxc*, ORF-1 e ORF-4.

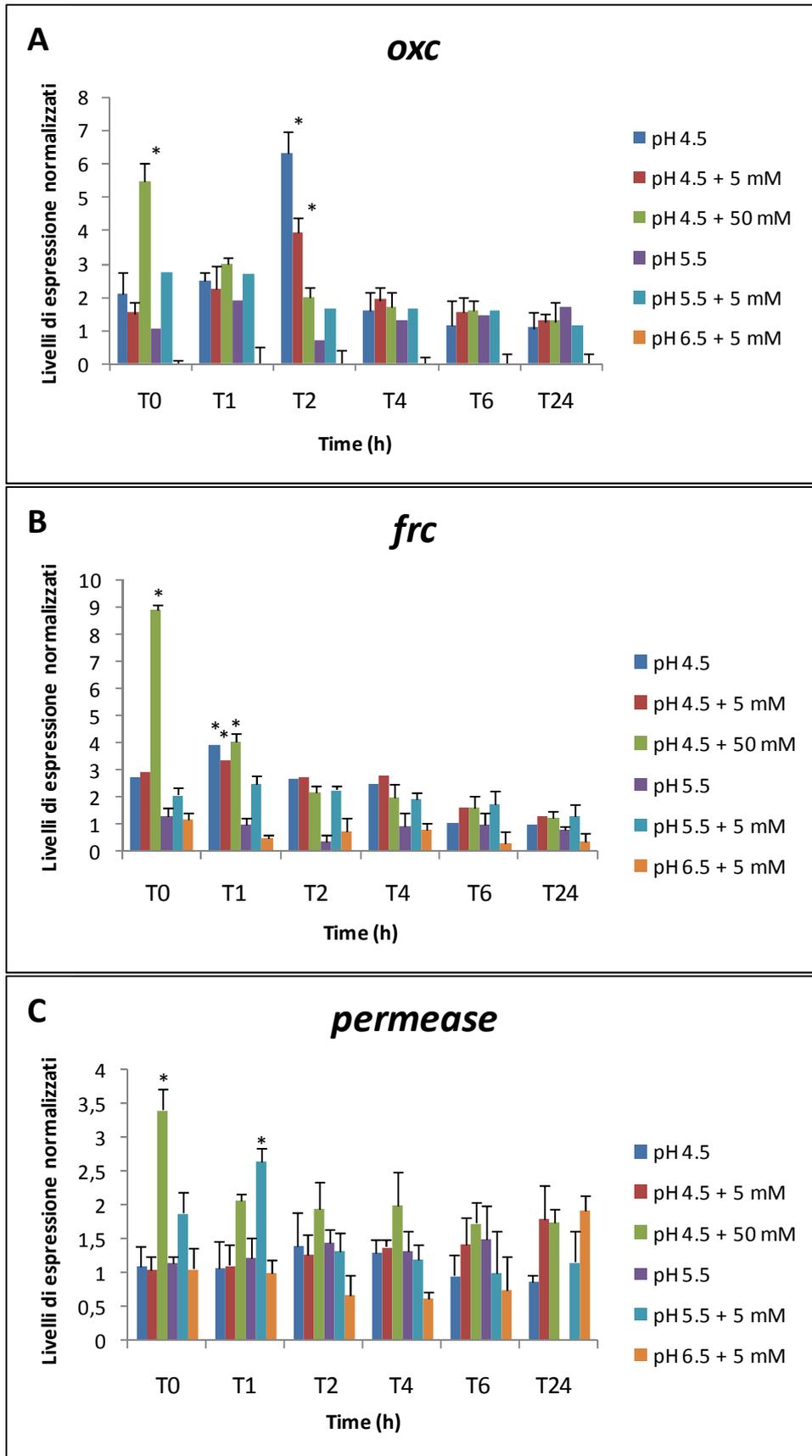


Fig 19. Livelli di espressione normalizzati dei geni *oxc* (A), ORF 3 (B) e ORF 5 (C) di *B. lactis* B107 in diverse condizioni colturali. \*,  $P < 0.05$ .

## Discussione

In questo lavoro è stato eseguito uno screening preliminare con CE per valutare l'attività ossalato degradativa in 14 ceppi di *Bifidobacterium* presi tra 7 differenti specie. Differentemente da quanto riportato da Federici *et al.* (2004), nessuna attività ossalato degradativa è stata osservata in *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. longum* e *B. suis*, mentre tutti i ceppi di *B. lactis* utilizzati presentavano un'attività del 100%. Le differenze dei risultati ottenuti rispetto a Federici *et al.* (2004), è data molto probabilmente dal metodo analitico scelto per misurare la concentrazione residua di ossalato, Federici *et al.* (2004) utilizzano un metodo enzimatico commerciale. In questo caso, l'uso della CE come metodo analitico, consente di migliorare il metodo di analisi in quanto è necessaria una piccola concentrazione di campione, tempi di analisi ridotti e alta efficienza di separazione, rispetto ai tradizionali metodi spettrofotometrici. A conferma dell'analisi con CE, in tutti i ceppi che presentavano attività ossalato degradativa è stata riscontrata la presenza del gene *oxc* mediante PCR.

Dopo l'attività ossalato degradativa e il suo uso in prodotti farmaceutici ed alimentari, *B. lactis* BI07 è stato scelto come modello per studiare a livello genico l'attività ossalato degradativa in *Bifidobacterium*. Utilizzando una strategia di primer walking, è stato possibile sequenziare un frammento della banca genomica di *B. lactis* BI07 delle dimensioni di 10.2 kb. Le sequenze nucleotidiche ottenute corrispondevano al 100% al genoma di *B. lactis* DSM 10140. 5 complete e 2 ORF parziali sono state individuate nell'intorno del gene *oxc* di *B. lactis* BI07. In particolare, circa 3.4 kbp a valle del gene *oxc*, l'analisi bioinformatica identifica la presenza di formyl-CoA transferasi (*fcc*) ortologo (ORF-4), rafforzando l'ipotesi che *B. lactis* possiede un meccanismo ossalato degradativo simile agli altri microrganismi anaerobi presenti nell'intestino, come *O. formigenes*, *Eubacterium lentum* e *Providencia* sp. (Sahin, 2003). Come dimostrato per *O. formigenes* (Sidhu *et al.*, 1997), l'analisi genetica ha mostrato che i geni *oxc* e *fcc* in *B. lactis* BI07 non sono parte di un operone policistronico. Ricerche simili sui genomi completi o parziali di *Bifidobacterium* hanno mostrato che geni putativi *oxc* e *fcc* sono presenti in *B. gallicum*, *B. dentium* e *B. pseudocatenulatum*. Come riportato per tutte le sequenze genomiche di *Bifidobacterium*, la ORF che codifica per una permeasi putativa (ORF-1) è stata identificata affiancata al gene *oxc* sullo stesso filamento, come in *B. lactis* BI07. Sebbene questo prodotto non sia identico alla proteina antiporto ossalato:formiato OxIT di *O. formigenes*, né a trasportatore ABC di *L. acidophilus* NCFM associato a *oxc*, la sua presenza vicino a *oxc* suggerisce il suo ruolo potenziale come proteina trasportatrice di ossalato. Tuttavia, la collocazione di *oxc*, *fcc* e il gene codificante per il trasportatore dell'ossalato putativo nel genoma di *B. gallicum*, *B. dentium* e *B. pseudocatenulatum* è risultato differente da *B. lactis* sia per quanto riguarda l'ordine che per l'orientamento dei geni. In particolare, le ORF-2 e -3 di *B. lactis* BI07, localizzate tra *oxc* e *fcc* ortologi, non mostrano nessuna somiglianza con i geni conosciuti di *Bifidobacterium*, indicando una specificità di *B. lactis* o che ancora non sono stati determinati in genomi incompleti. Diversamente, la completa ORF-7 identificata a monte di *oxc*, mostra un'omologia al 49% nella sequenza amminoacidica predetta con la proteina canale del cloro di *B. gallicum* codificata dal gene *EriC*, situato vicino a *oxc* come in *B. lactis*. È stato proposto che questa proteina canale per il cloro funzioni come uno shunt elettrico legato alla decarbossilazione di amminoacidi, permettendo così ai batteri enterici di sopravvivere in un ambiente fortemente acido dello stomaco. In questo modo, il flusso di protoni verso

l'interno, dovuto alla forte acidità esterna, è continuamente contrastato nel citoplasma dall'uso di protoni da parte di oxalyl-CoA decarbossilasi.

Per valutare se il metabolismo dell'ossalato potesse essere utilizzato come primaria fonte di energia, *B. lactis* BI07 è stato fatto crescere in assenza di fonte carbonata. In queste condizioni non si riscontrava né la crescita di *B. lactis* BI07 né il consumo di ossalato, dimostrando che l'ossalato non può essere utilizzato come unica fonte energetica e che il suo metabolismo è dipendente dallo stato fisiologico di crescita del microrganismo; conseguentemente, l'ossalato non ha nessun tipo di impatto sul metabolismo della fonte carbonata.

Il ruolo dell'ambiente acido sull'attività ossalato degradativa di *B. lactis* BI07 è stata valutata in fermentazioni batch a pH controllato. Gli esperimenti di fermentazione hanno indicato che solo il pH a 4.5 mostra un significativo consumo di ossalato e che la velocità di degradazione aumenta notevolmente nelle cellule che sono state preadattate. Inoltre è stato dimostrato che *B. lactis* può sopravvivere a pH acido meglio di altri ceppi di *Bifidobacterium*, tuttavia il pH influisce notevolmente la biomassa, come dimostrato dal calo della vitalità delle cellule diminuendo il pH a 5.5 e ancora più evidente a pH 4.5. Si è osservato che l'aggiunta di ossalato migliora la capacità di *B. lactis* BI07 di resistere ai pH acidi, cosa molto evidente per il pH 4.5.

Per la prima volta è stata provata la regolazione dei geni *oxc*, *frc* ed il gene che codifica per la permeasi tramite un'analisi in real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). Per consentire un'accurata quantificazione dei livelli di cDNA e per identificare la reale variazione sono stati normalizzati i valori con un appropriato controllo genico interno. Il fattore di normalizzazione comprende diversi geni housekeeping stabilmente espressi. Sono stati utilizzati cinque diversi geni appartenenti a diverse classi funzionali, GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), *gmk* (guanylate kinase), *recA* (recombinase A), *rpoB* (subunità beta di DNA-directed RNA polymerase) e 16S rRNA (SSU ribosome, quattro copie). Anche se il gene 16S rRNA è quello che normalmente viene utilizzato come prodotto cellulare per la normalizzazione (Bustin *et al.*, 2000), nei nostri studi abbiamo deciso di utilizzare geni housekeeping metabolici. Questo perché il rRNA costituisce il 90% del RNA totale batterico e non è sempre rappresentativo della frazione mRNA (Dennis *et al.*, 2004). Inoltre, diversi studi hanno mostrato come i livelli di ITS fluttuino nelle cellule procariote, rendendo il gene 16S rRNA non utilizzabile per la normalizzazione (Vandecasteele *et al.*, 2002).

Dopo la normalizzazione dei dati di espressione, la ORF-4 di *B. lactis* BI07, codificante per l'enzima putativo *frc*, è risultato il gene più indotto, esibendo un aumento di espressione da 2.5 a 12 volte durante le fermentazioni batch a pH 4.5. Inoltre, le condizioni acide sono un prerequisito per la trascrizione di *oxc*, che risulta molto attivo dopo 2 h lo shift del pH da 6.5 a 4.5. Come per *L. acidophilus* NCFM (Azcarate-Peril *et al.*, 2006) e *L. gasseri* ATCC 33323 (Lewanika *et al.*, 2007), quando le cellule dei bifidobatteri sono fatte crescere in presenza di ossalato, preadattamento, e successivamente portate ad un pH di 4.5 e ad un incremento della concentrazione di ossalato, i livelli di mRNA dei geni *oxc* e *frc* subiscono un notevole incremento. In queste condizioni è stato registrato anche un leggero incremento dei livelli trascrizionali di ORF-1. Per tutti e tre i geni, non sono state osservate variazioni date dall'aggiunta di ossalato senza l'abbassamento del pH. Mentre una diminuzione dei livelli trascrizionali sono stati riscontrati alla fine della fermentazione, sia per *oxc* che per *frc*, suggerendo una progressiva riduzione dell'attività trascrizionale e metabolica.

In conclusione, i risultati indicano che in *B. lactis* BI07 il pattern degradativo dell'ossalato e l'attività trascrizionale dei geni potenzialmente coinvolti sono pH dipendenti. La scoperta di geni che sono regolati dalla variazione del pH è molto importante. Il pH del lumen nel colon prossimale è riportato essere tra 5.5 e 6.5, mentre quello del colon distale è 6.5-7, entrambi sono il risultato degli alti processi fermentativi realizzati dai microrganismi saccharolitici presenti nelle zone distali (Cummings, et al. 1991). Il pH di entrambe le zone è molto variabile e può essere localmente ridotto tramite l'ingestione di carboidrati non digeribili (Bird, et al. 2008, Bown, et al. 1974, Chung, et al. 2007). Questo suggerisce che il pH del colon può variare in accordo con l'attività fermentativa microbica che risulta essere dipendente dall'apporto di carboidrati che arrivano attraverso la dieta. In questo modo si possono creare delle nicchie in cui il pH risulta particolarmente acido con il relativo accumulo di microrganismi acido resistenti. In questa prospettiva, l'abilità di degradare ossalato può conferire un vantaggio evolutivo a *B. lactis* rendendolo capace di consumare l'eccesso di protoni e mantenere il pH citoplasmatico costante. Inoltre, alle condizioni di pH acido, *B. lactis* può giocare un ruolo importante per il mantenimento dell'omeostasi dell'ossalato attraverso la detossificazione dell'ossalato. L'attività ossalato degradativa che caratterizza la specie *B. lactis* rispetto alle altre specie di bifidobatteri maggiormente utilizzate in preparati probiotici, può giustificare l'uso di questa specie per il trattamento di disordini associati all'ossalato.

## ***Capitolo 2***

Interazioni tra *Bifidobacterium* e plasminogeno umano

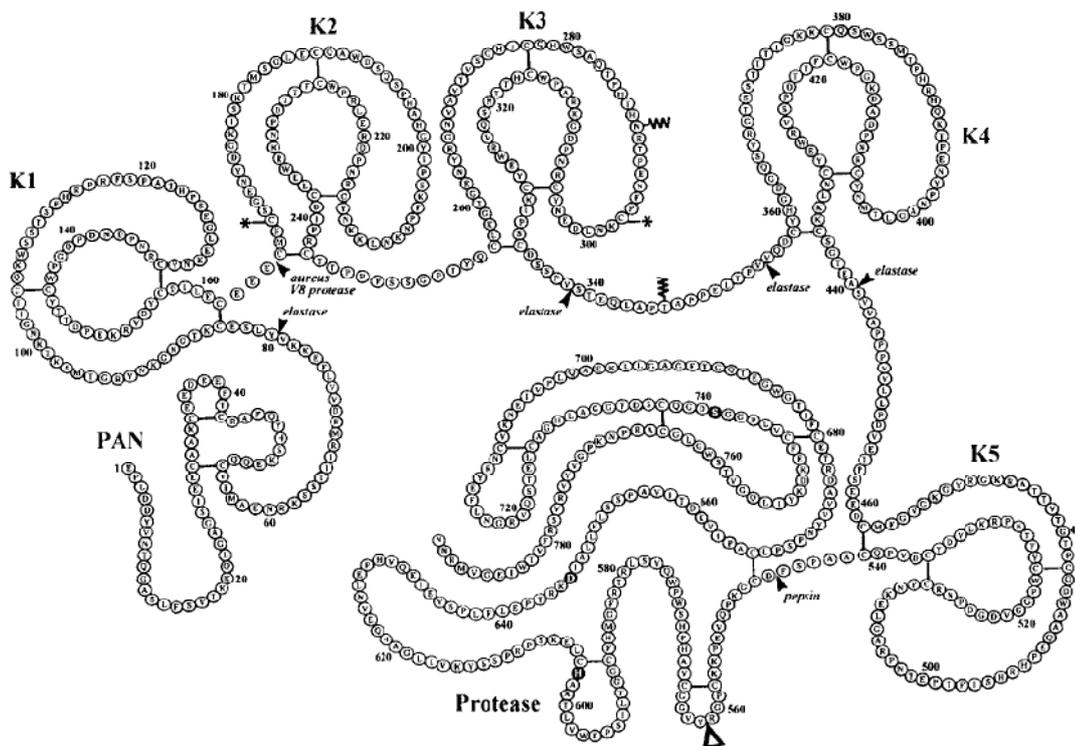
## Introduzione

I meccanismi molecolari coinvolti nel cross-talk tra *Bifidobacterium* e intestino dell'ospite sono per la maggior parte sconosciuti, ma numerosi dati mostrano una possibile interazione tra questi microrganismi e il plasminogeno umano.

### Il sistema plasminogeno-plasmina

Il sistema plasminogeno-plasmina è coinvolto nei processi di proteolisi extracellulare presenti nei mammiferi. Svolge un ruolo fondamentale nella fibrinolisi, nella migrazione cellulare, nel rimodellamento dei tessuti e nei processi infiammatori (Marsh, 1981; Dano et al., 1985; Saksela e Rijken, 1988).

La proteina chiave di questo sistema è il plasminogeno (Plg), zimogeno della serin-proteasi plasmina. Il Plg è una glicoproteina a singola catena con una massa molecolare di circa 92 kDa; è presente nel plasma a concentrazioni di 180-200 µg/ml (circa 2 µM), ma si ritrova anche in diversi fluidi interstiziali (Myohanen e Vaheri, 2004). Questa proteina è sintetizzata soprattutto nel fegato, ma sono state identificate anche altre sorgenti tissutali, tra cui l'intestino (Zhang et al., 2002). Il Plg è sintetizzato come proteina di 810 aminoacidi (aa); il taglio del peptide segnale (19 aa) porta alla proteina matura (791 aa), che presenta un residuo di acido glutammico all'N terminale (Glu-Plg) (figura 20).



**Fig 20.** Struttura del plasminogeno umano. Il triangolo indica il sito di taglio degli attivatori del plasminogeno (uPA e tPA) (Soff, 2000).

Il Glu-Plg contiene un sito di fosforilazione [Ser578 (Wang et al., 1997)] e due siti di glicosilazione [Thr346, Asn289 (Hayes e Castellino, 1979a, 1979b, 1979c)], ma si possono distinguere due glicoforme di Plg: il tipo 1, che ha entrambi i siti glicosilati, e il tipo 2, che

presenta solo l' O-glicosilazione. Oltre al Glu-Plg, sono presenti altre forme di questa proteina, Lys-Plg [84 kDa, 713-714 aa (Mori et al., 1995)] e Val-Plg o mini-Plg [38 kDa, 344 aa (Folkman, 1995)], originate dall'idrolisi enzimatica di specifici legami peptidici. La formazione della plasmina a partire da queste forme troncate è più rapida rispetto al Glu-Plg.

La plasmina, ottenuta dal taglio proteolitico operato dagli attivatori del Plg a livello del legame peptidico Arg561-Val562, è una molecola costituita da una catena N terminale pesante e una catena C terminale leggera, unite da due legami disolfuro (Cys548-Cys666; Cys558-Cys566).

La catena pesante presenta il peptide di attivazione N terminale (residui 1-77, circa 8 kDa) seguito da 5 domini kringle (K1-K5) consecutivi; la catena leggera presenta invece il dominio serin-proteasico (25 kDa) contenente la triade catalitica His603-Asp646-Ser741 (Vassalli et al., 1991; Ponting et al., 1992).

I domini kringle sono strutture di circa 80 residui aminoacidici (65 kDa) organizzati in un triplo loop, stabilizzato da 3 ponti disolfuro (Sottrup-Jensen et al., 1978). Questi domini mediano interazioni di legame intermolecolari, regolando così l'attività delle proteine che li possiedono. Numerose molecole presentano al loro interno strutture omologhe ai kringle: oltre al Plg/plasmina, si hanno la protrombina, gli attivatori del plasminogeno tPA e uPA, l'angiostatina [(costituita dai primi quattro kringle del Plg (O'Reilly et al., 1994)), l'apolipoproteina A (che presenta più di 40 kringle), il fattore di crescita degli epatociti (HGF) e le proteine HGF-like, le defensine, il fattore di coagulazione XII (Ponting et al., 1992; Bork et al., 1996). Diversi studi hanno mostrato che i kringle interagiscono con i ligandi attraverso siti di legame per la lisina [LBS, Lysine-Binding Site (Ponting et al., 1992)]. Per quanto riguarda il Plg/plasmina, i kringle 1, 4 e 5 mostrano la maggiore affinità per ligandi contenenti lisina, mentre il kringle 2 risulta il meno affine (Marti et al., 1997).

Il target principale dell'attività proteolitica della plasmina è la fibrina, proteina derivante dal fibrinogeno che costituisce la struttura del coagulo. Oltre a questa molecola, si conoscono molti altri substrati della plasmina, tra cui vitronectina, fibronectina e laminina, componenti principali della membrana basale e della matrice extracellulare (Plow et al., 1995). Inoltre, la plasmina può attivare altri enzimi proteolitici, come le metalloproteasi della matrice e le elastasi latenti dei macrofagi, responsabili della degradazione del collagene, dell'elastina e dei proteoglicani (Murphy et al., 1999).

A causa dell'abbondanza del plasminogeno che circola nell'organismo e dell'ampia varietà dei substrati della plasmina, questo sistema proteolitico deve essere strettamente regolato.

L'attivazione della plasmina è controllata da attivatori del plasminogeno (Plasminogen Activator, PA). I PA fisiologici dei mammiferi sono l'attivatore tissutale del plasminogeno (tissue-type PA, tPA) e l'urochinasi (urokinase-type PA, uPA) (Castellino e Powell, 1981); entrambi appartengono al gruppo delle serin-proteasi secrete attivate da taglio proteolitico. Il tPA, sintetizzato soprattutto dalle cellule dell'endotelio vascolare, presenta un dominio finger che lega la fibrina (omologo a quello presente nella fibronectina tipo-1), un dominio Growth Factor-like (GFD), due domini kringle e il dominio catalitico; questo attivatore presenta un'alta affinità per il Plg solo in presenza di fibrina, permettendo così la produzione di plasmina soltanto a livello del coagulo. Per quanto riguarda l'uPA, la sua struttura è simile a quella del tPA: presenta un dominio GFD, un kringle e il dominio proteasico. L'urochinasi, però, agisce in situazioni e localizzazioni

cellulari differenti: lega infatti uno specifico recettore presente sulla membrana cellulare (uPA receptor, uPAR) e il legame permette l'incremento dell'attività dell'uPA, oltre a proteggerlo dagli inibitori dei PA e dalla plasmina. Grazie alle diverse proprietà di legame, questi due attivatori agiscono in processi diversi: l'uPA sembra essere l'attivatore del Plg più importante nei processi di migrazione delle cellule eucariotiche, mentre il tPA risulta fondamentale nella fibrinolisi (Lijnen e Collen, 1995; Plow et al., 1999).

A fianco degli attivatori esistono anche inibitori, appartenenti al gruppo delle serpine, che agiscono sull'attività catalitica delle serin-proteasi formando un complesso stabile a livello del sito attivo dell'enzima. L'inibitore principale della plasmina è la serpina  $\alpha$ 2-antiplasmina ( $\alpha$ 2-AP), che inibisce efficientemente la plasmina solubile legandosi ai kringle e bloccando il sito attivo. Un altro inibitore abbondante nel plasma è l' $\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 2-M), che risulta però meno attiva rispetto all' $\alpha$ 2-AP (Miyashita et al., 1988). Sono presenti poi gli inibitori dei PA (PAI1-3), che regolano negativamente la plasmina in modo indiretto.

Al sistema di regolazione appartengono anche recettori a bassa affinità presenti sulla superficie di molte cellule di mammiferi, che riconoscono i domini kringle del Plg (Hajjar, 1991; Miles et al., 1991; Redlitz e Plow, 1995); tra questi recettori si hanno proteine con lisine C terminali ( $\alpha$ -enolasi) o ricche in lisine (anfoterina), ma anche recettori non proteici (gangliosidi e glicosaminoglicani) (Plow et al., 1995). Il legame del Plg al recettore altera la sua conformazione in modo da facilitarne l'attivazione da parte dei PA e proteggere la plasmina dall'inibitore  $\alpha$ 2-AP (Wiman et al., 1979; Mangel et al., 1990).

### ***Il plasminogeno nell'intestino***

L'epitelio intestinale costituisce un'efficiente barriera selettiva tra lume e tessuti sottostanti. Le cellule epiteliali formano un singolo strato compatto grazie alla presenza di complessi giunzionali che permettono l'adesione tra cellula e cellula e tra cellula e membrana basale. Gli enterociti sono però soggetti ad un rapido e continuo turnover a partire da cellule staminali pluripotenti localizzate alla base delle cripte; i siti di adesione devono quindi essere disgregati e riformati in maniera controllata e proprio in questo processo è coinvolto il sistema Plg/plasmina (Gibson et al., 1998). Questo sistema sembra avere un ruolo importante anche nel turnover di cellule epiteliali presenti in altri distretti, come la pelle e la cornea (Lazarus e Jensen, 1991; Morimoto et al., 1993).

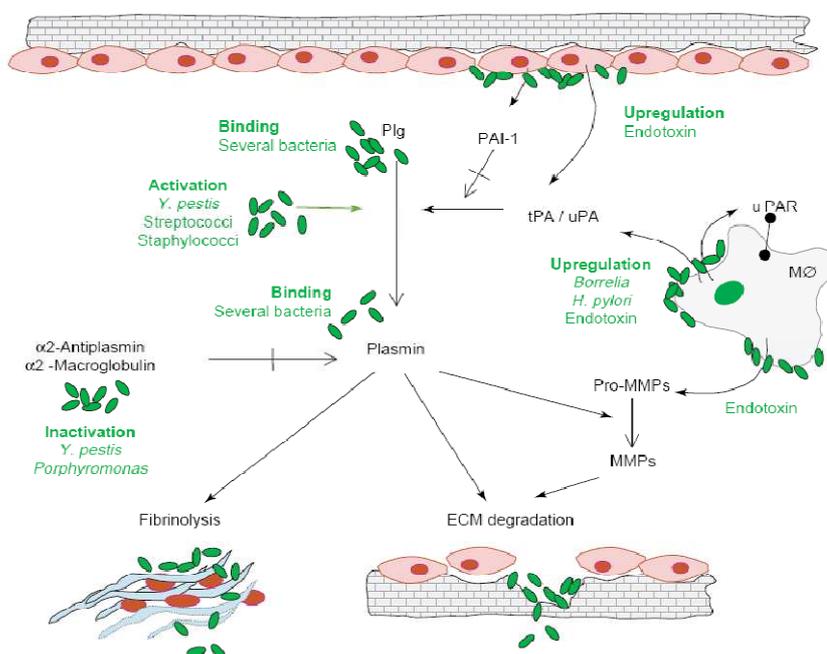
Componenti del sistema Plg/plasmina sono stati individuati in differenti compartimenti a livello intestinale. Zhang et al. (2002) hanno mostrato che il gene del Plg è espresso nell'intestino, anche se a bassi livelli, così come l'attivatore tPA. Le cellule epiteliali del colon, inoltre, secernono uPA ed esprimono il suo recettore uPAR (Gibson et al., 1991). I compartimenti epiteliali dove l'uPA è maggiormente espresso (la superficie epiteliale del colon, la parte superiore dei villi nell'intestino tenue) sono costituiti da cellule differenziate mature coinvolte nell'assorbimento. Queste cellule risultano legate alla membrana basale in modo relativamente debole e sono soggette ad un continuo turnover, per cui dopo apoptosi vengono disperse nel lume intestinale o fagocitate da macrofagi subepiteliali. La localizzazione dell'attività proteasica della plasmina sulla superficie cellulare, grazie al sistema uPA-uPAR, permette la disgregazione delle giunzioni intercellulari, riducendo così l'adesione tra cellula e cellula e tra cellula e membrana basale e favorendo il processo di turnover.

Accanto a questa funzione fisiologica, la proteolisi extracellulare dipendente da Plg gioca un ruolo cruciale nell'invasività delle cellule tumorali. Perché un tumore diventi

invasivo e generi metastasi le cellule trasformate devono degradare i componenti della membrana basale e della matrice extracellulare (ECM) al fine di diffondere nei tessuti sottostanti. Questo processo sfrutta il sistema di citochine e fattori di crescita presenti in situ e richiede la sovraespressione di componenti dei sistemi proteolitici, tra cui quello del Plg/plasmina (Berger, 2002). Le cellule tumorali focalizzano l'attività proteolitica sulla superficie attraverso l'espressione di recettori per la plasmina e l'uPA; inoltre, esse producono PAI-1 e PAI-2 in modo da impedire un'eccessiva degradazione dell'ECM a cui devono aderire e attraverso cui devono migrare.

### ***Interazione dei batteri patogeni con il sistema del plasminogeno***

Numerosi batteri patogeni hanno sviluppato diverse strategie per sfruttare l'alta concentrazione di Plg nei fluidi corporei e l'ampio spettro di substrati della plasmina durante il processo di colonizzazione dell'ospite (Sun et al., 2004; Bergmann et al., 2005; Lähteenmäki et al., 2005; Bergmann e Hammerschmidt, 2007) (figura 21). Alcune specie attivano direttamente il Plg grazie alla produzione di PA batterici, ma la maggior parte dei patogeni immobilizza il Plg mediante recettori di superficie, favorendone la conversione a plasmina da parte dei PA dell'ospite. I microrganismi acquisiscono in questo modo un'attività proteolitica ad ampio spettro associata alla superficie: questo favorisce la migrazione attraverso le barriere fisiche tissutali e risponde alle richieste nutrizionali del microrganismo durante il processo di invasione e colonizzazione. Studi in vitro hanno infatti mostrato che la plasmina immobilizzata su diversi patogeni (*Yersinia pestis*, *Borrelia burgdorferi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Salmonella typhimurium*) degrada l'ECM dei mammiferi, a cui questi batteri devono aderire, e permette loro di attraversare la membrana basale e i monostrati di cellule epiteliali, in un processo definito "metastasi batterica" (Lähteenmäki et al., 2005). Tuttavia, solo per alcuni di essi [*Yersinia pestis*, *Borrelia burgdorferi* e le specie di *Streptococcus* appartenenti al gruppo A (Group A *Streptococcus*, GAS)] è stato dimostrato il coinvolgimento dell'attivazione del Plg a plasmina nella patogenesi in vivo (Lähteenmäki et al., 2005; Bergmann e Hammerschmidt, 2007).



**Fig 21.** Overview del sistema del plasminogeno (Plg) nei mammiferi e delle modalità di interazione dei batteri patogeni. (tPA: attivatore tissutale del plasminogeno; uPA: urochinasasi; PAI-1: inibitore 1 degli attivatori del plasminogeno; uPAR: recettore dell'uPA; ECM: matrice extracellulare; Pro-MMPs: precursori delle metalloproteasi di matrice; MMP: metalloproteasi di matrice; MΦ: macrofagi) (Lähteenmäki et al., 2005).

### ***Attivatori batterici del plasminogeno***

Differenti proteine batteriche agiscono come attivatori del Plg; le più conosciute e studiate sono Pla in *Yersinia pestis*, PgtE in *Salmonella enterica*, streptochinasi (SK) in *Streptococcus* (gruppi A, C e G), stafilochinasi (SAK) in *Staphylococcus aureus* (Lähteenmäki et al., 2001). La proteasi di superficie Pla di *Yersinia pestis* (agente eziologico della peste) è un attivatore del Plg molto efficiente. Pla converte il Plg a plasmina per idrolisi dello stesso legame peptidico tagliato dagli attivatori fisiologici tPA e uPA; inoltre, agisce come adesina, affine alla laminina presente nell'ECM e nella membrana basale. Studi su topi infettati con ceppi di *Yersinia pestis* Pla-knock out hanno mostrato l'importanza di questa proteina nella migrazione del patogeno dal sito d'infezione primario intradermico alla circolazione sanguigna. Pla appartiene alla famiglia delle omptine, adesine/proteasi della membrana esterna degli enterobatteri con struttura a  $\beta$ -barrel (Sodeinde et al., 1992; Lathem et al., 2007). Per quanto riguarda l'omptina PgtE di *Salmonella enterica*, è stata dimostrata la sua capacità di attivare il Plg in vitro, ma il suo ruolo nella patogenesi della salmonellosi resta da chiarire (Kukkonen e Korhonen, 2004).

Le proteine SK e SAK sono PA batterici secreti che formano un complesso con il Plg causandone un cambiamento conformazionale e inducendone l'attivazione a plasmina. SK è stata studiata ampiamente in diverse specie di GAS. Studi condotti da Sun et al. (2004) hanno evidenziato l'importanza della plasmina nella patogenesi delle infezioni da *Streptococcus*. In assenza di attività plasminica, infatti, l'occlusione microvascolare locale, dovuta alla formazione di coaguli di fibrina, rappresenta un meccanismo di difesa dell'ospite contro i GAS. La degradazione di fibrina mediata da plasmina, attivata da SK, permette invece di superare questa barriera, facilitando la diffusione dei batteri invasivi.

### ***Recettori batterici del plasminogeno e “moonlighting proteins”***

I recettori batterici del Plg (plasminogen receptor, PlgR) sono molecole di superficie sfruttate dai batteri per immobilizzare il Plg e favorire la sua conversione a plasmina da parte dei PA. Questo sistema permette ai batteri di acquisire un'attività proteolitica a livello della parete. Nei batteri Gram negativi, i principali PlgR sono costituiti da fimbrie e flagelli, appendici filamentose presenti sulla superficie di questi microrganismi. Sui batteri Gram positivi, invece, sono state identificate proteine di parete che legano il Plg. Molti patogeni presentano PlgR, la maggior parte dei quali possiede anche altre funzioni, come adesione, movimento, attività enzimatica, assunzione di nutrienti, interazione con il sistema immunitario. Una singola specie batterica può inoltre esprimere differenti tipi di PlgR (Lähteenmäki et al., 2001).

In *Borrelia burgdorferi*, l'agente eziologico della malattia di Lyme o borreliosi, sono state identificate due Plg binding protein: la proteina A di superficie esterna (outer surface protein A, OspA) e una proteina di superficie da 70 kDa che presenta omologia con le proteine del trasportatore periplasmico ABC di altri batteri patogeni (Fuchs et al., 1994; Hu et al., 1997).

Non sono presenti PA batterici, ma il Plg legato al batterio viene attivato a plasmina dall'uPA umano e promuove la degradazione dei componenti dell'ECM e la migrazione batterica attraverso i monostrati endoteliali (Coleman e Benach, 1999). È stato dimostrato che cellule di *B. burgdorferi* e OspA purificata stimolano la produzione di pro-uPA nei monociti umani, oltre ad aumentare l'espressione e il rilascio di uPAR dai monociti (Coleman et al., 2001; Coleman e Benach, 2003).

I GAS esprimono diverse Plg binding protein di superficie; una delle più affini è PAM (plasminogen-binding group A streptococcal M-protein), appartenente alla famiglia delle proteine M, molecole fibrillari antifagocitarie caratterizzate da numerose regioni ripetute (Berge e Sjobring, 1993). L'interazione con il Plg è mediata da due sequenze ripetute di 13 aa ( $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ ) contenenti un residuo centrale di lisina, localizzate sulla superficie esposta all'N-terminale di PAM. La sostituzione nella sequenza  $\alpha 1$  del residuo di lisina centrale con un residuo di alanina riduce dell'80% il legame al Plg (Ringdahl e Sjobring, 2000). In *Streptococcus* sono state identificate anche altre proteine di superficie che legano ad alta affinità il Plg: la proteina Prp (PAM-related protein), appartenente alla famiglia delle proteine M (Sanderson-Smith et al., 2007), e la proteina E legante colina (choline-binding protein E, CBPE), membro della famiglia di proteine leganti colina esposte sulla superficie (Attali et al., 2008).

Tra i PlgR batterici destano particolare interesse alcune proteine citoplasmatiche che, pur essendo prive di segnali di esportazione e di ancoraggio alla parete, sono esposte sulla superficie. Il meccanismo di secrezione o ancoraggio di queste "moonlighting protein" è ancora da chiarire. Spesso le "moonlighting protein" sono enzimi (come  $\alpha$ -enolasi) o heat shock protein (Hsp) molto conservati che, quando si trovano sulla parete, acquisiscono una "moonlighting function" aggiuntiva, differente da quella svolta nel citoplasma (Jeffery, 1999; Schaumburg et al., 2004).

In vari microrganismi sono stati identificati diversi enzimi glicolitici che interagiscono in modo specifico con il Plg; tra questi, i più studiati sono gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e  $\alpha$ -enolasi.

GAPDH è stato il primo PlgR identificato sui GAS in grado di legare il Glu-Plg. Studi di mutagenesi sito-specifica hanno dimostrato l'importanza della lisina C-terminale nell'interazione di GAPDH con il Plg: la sostituzione di questo residuo con una leucina porta infatti ad una riduzione del legame. D'altra parte, cellule mutanti per questa proteina presentano un Plg binding paragonabile a quello dei non mutanti, il che indica l'esistenza di altri PlgR sulla superficie di questi microrganismi (Winram e Lottenberg, 1998). Anche in *Listeria monocytogenes* GAPDH è stato individuato nella frazione proteica della parete cellulare e potrebbe rappresentare un altro fattore di virulenza di questo patogeno (Schaumburg et al., 2004).

L' $\alpha$ -enolasi è un enzima fondamentale della glicolisi: catalizza la conversione del 2-fosfo-Dglicerato (2-PGE) a fosfoenolpiruvato (PEP). Negli eucarioti l'enzima attivo forma un dimero, mentre nei batteri si trova come ottamero (Brown et al., 1998; Ehinger et al., 2004). La localizzazione dell' $\alpha$ -enolasi sulla superficie cellulare è comune a molti organismi procarioti ed eucarioti (Pancholi, 2001). Questo enzima è il principale PlgR presente sulla superficie di varie specie di *Streptococcus*. Due residui di lisina posizionati al C-terminale dell' $\alpha$ -enolasi di *Streptococcus pneumoniae* (sito BS1) sono importanti nell'interazione con il Plg/plasmina (Bergmann et al., 2001), ma la rimozione di questi due aminoacidi per trattamento con carbossipeptidasi B, o la loro sostituzione con residui di leucina, riduce solo in parte il legame al Plg. Un ulteriore sito di legame al Plg (sito BS2) è stato quindi identificato nell' $\alpha$ -enolasi di *S. pneumoniae* (sequenza aminoacidica: 248FYDKERKVVY256) (Bergmann et al., 2003) e la risoluzione della struttura cristallografica di questa proteina ha mostrato la sua localizzazione su un loop esposto sulla superficie (Ehinger et al., 2004). L'esposizione di  $\alpha$ -enolasi e la sua attività di Plg binding è stata dimostrata per numerosi organismi eucarioti e procarioti, sia commensali [*Lactobacillus crispatus* ST1 (Antikainen et al., 2007a; Hurmalainen et al., 2007)] che

patogeni [*Bacillus anthracis* Sterne 34F2 (Agarwal et al., 2008), *Candida albicans* (ceppi: ATCC 10261, SGY243, CAI4, CAF2, CHK21, CAJ4) (Jong et al., 2003), *Fasciola hepatica* (Bernal et al., 2004), *Leishmania mexicana* AZV (Vanegas et al., 2007), *Listeria monocytogenes* EGDe (Schaumburg et al., 2004), *Mycobacterium fermentans* PG-18 (Yavlovich et al., 2007), *Neisseria meningitidis* (ceppi: MC58, H44/76, Z2491, 2120, 171, 172, a14) (Knaust et al., 2007), *Onchocerca volvulus* (Jolodar et al., 2003), *Pneumocystis carinii* (Fox e Smulian, 2001), *Schistosoma bovis* (Ramajo-Hernández et al., 2007), *Staphylococcus aureus* (Mölkänen et al., 2002), *Streptococcus mutans* (Ge et al., 2004; Jones e Holt, 2007), *Trichomonas vaginalis* (Mundodi et al., 2008)]. Tra i procarioti, solo nei Gram positivi l' $\alpha$ -enolasi lega il Plg, mentre i Gram negativi, come *Bacteroides fragilis*, presentano sulla membrana esterna altre proteine in grado di interagire con il Plg, ad esempio Pbp (Plg binding protein) (Sijbrandi et al., 2005; Sijbrandi et al., 2008).

Il legame al Plg e l'adesione alle proteine della matrice extracellulare sono solitamente considerati fattori di virulenza, coinvolti nei processi di invasione e colonizzazione batterica.

Un recente studio di Antikainen et al. (2007b) ha però mostrato che le molecole di  $\alpha$ -enolasi presenti sia sulla parete di diverse specie commensali di *Lactobacillus* (*L. crispatus* ST1, *L. johnsonii* F133) sia sulla superficie dei patogeni *Streptococcus pneumoniae* TIGR4, *Streptococcus pyogenes* IH32030 e *Staphylococcus aureus* 8325-4 possiedono la stessa attività di legame al Plg e di adesione alle proteine dell'ECM. *Streptococcus* e *Staphylococcus* esprimono però propri attivatori del Plg, mentre *Lactobacillus* non possiede PA: è dunque probabile che l'interazione con il sistema del Plg sia una strategia ecologica comune a batteri presenti nello stesso ecosistema ma che occupano nicchie differenti, portando ad un diverso esito dell'interazione (commensalismo o patogenesi). Una importante "moonlighting protein" appartenente al gruppo delle Hsp è la chaperone molecolare DnaK, della famiglia delle Hsp70. Le chaperone molecolari costituiscono complessi proteici i cui componenti, altamente conservati e presenti sia in eucarioti che in procarioti, sono coinvolti in processi di folding proteico: ripiegamento e assemblaggio di proteine di nuova sintesi, refolding di proteine unfolded o aggregate, trasporto di proteine nella cellula. Sono stati identificati diversi complessi di chaperone molecolari; uno dei principali è il complesso Hsp70, omologo al complesso DnaK presente nei batteri. Questo sistema di chaperone permette il folding delle proteine attraverso cicli di legame e rilascio, dipendenti da ATP, di segmenti idrofobici di una catena polipeptidica unfolded. DnaK è uno dei componenti di questo complesso e presenta una struttura molto conservata, costituita da un dominio ATPasico all'N-terminale e da un dominio di legame al substrato al C-terminale (Hartl, 1996; Bukau e Horwich, 1998; Mayer e Bukau, 2005). DnaK è stata ritrovata sulla parete cellulare di tre specie patogene (*Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis* e *Mycobacterium tuberculosis*) ed è stata dimostrata la sua interazione con il Plg/plasmina (Schaumburg et al., 2004; Knaust et al., 2007; Xolalpa et al., 2007).

## ***Materiali e metodi***

### ***Ceppi batterici, terreni e condizioni colturali***

Per questo studio sono stati utilizzati 4 ceppi di bifidobatteri. *Bifidobacterium bifidum* S16 e *Bifidobacterium longum* S123 sono stati isolati da feci umane, mentre *B. lactis* DSM 10140 e *B. lactis* BI07 sono stati isolati da prodotti alimentari. I bifidobatteri sono stati coltivati in terreno MRS (Difco) addizionato con L-cisteina al 0.05% (wt/vol) a 37°C in condizioni di anaerobiosi, ottenute utilizzando Anaerocult A (Merck) in giare. Le cellule di bifidobatteri sono state fatte crescere per 18 h fino a raggiungimento della fase stazionaria.

### ***Frazionamento delle proteine di parete***

Le proteine della parete cellulare di bifidobatteri sono state estratte a partire da 50 mL di coltura batterica in fase stazionaria di crescita come riportato da Hardie e Williams (1998). Le cellule di *Bifidobacterium* sono state separate dal brodo esausto tramite centrifugazione per 10 min a 5000 rpm a 4°C e successivamente lavate con tampone Tris-HCl 50 mM pH 7.6. A questo punto, i batteri sono stati risospesi in 2 mL di protoplast buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, saccarosio 1 M, phenylmethylsulfonyl fluoride 1.4 mM, lysozime 15 mg/mL) e incubati per 90 minuti a 37°C. Dopo l'incubazione, la sospensione cellulare è stata centrifugata per 3 minuti a 4000 rpm a 4°C e il sovrantante, contenente le proteine della parete cellulare, è stato conservato a -20°C.

### ***Elettroforesi bidimensionale delle proteine di parete di Bifidobacterium***

Per la corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide 2-DE, la frazione proteica della parete cellulare di *Bifidobacterium* è stata solubilizzata in tampone IEF contenente urea 7M, thiourea 2M, CHAPS 4% e 2-mercaptoethanolo 0.005% (vol/vol). La concentrazione delle proteine totali è stata calcolata usando PlusOne 2D Quant kit (GE Healthcare).

L'isoelettrofocalizzazione è stata eseguita in Immobiline DryStrip con un gradiente di pH tra 4 e 7 (7 cm di corsa) in un sistema IPGphor (GE Healthcare). 40 µg di proteine sono state reidratate per 12 h in 125 µL di buffer A (urea 8M, CHAPS 2% (vol/vol), Ampholine da pH 4.0 a 6.5 (GE Healthcare), dithiothreitol 10 mM, bromophenol blu 0.8%) e focalizzate per 10kV\*h. Le proteine focalizzate sulla strip sono poi state ridotte e alchilate (Görg, et al. 1988) prima del trasferimento su un gel di acrilammide al 12% (larghezza 8 cm; spessore 1 mm). L'elettroforesi è stata eseguita in un sistema verticale mini SE250 (GE Healthcare). Le proteine sono state separate in SDS-page a 160 V per 2.5 h. Gli spot sono stati visualizzati colorando con blue di comassie R350 (PhastGel Blue R; Ge Healthcare).

### ***Plg overlay assay***

Le proteine della parete cellulare di *Bifidobacterium* (40 µg) sono state trattate per eseguire una 2-DE e immobilizzate su membrana di nitrocellulosa (Pure nitrocellulose membrane; Bio-Rad) usando il trans-Blot electrophoretic cell (Bio-Rad). Dopo trasferimento, la membrana è stata trattata con skim milk 10% in PBS per saturare tutti i siti di legame aspecifico, e successivamente incubato con Plg umano 4 mg/mL (Sigma-

Aldrich) in PBS per 1 h a 25°C. Dopo diversi lavaggi in PBS, il Plg legato è stato evidenziato incubando la membrana con un anticorpo di capra IgG anti-Plg (Kordia). La membrana è stata lavata per 3 volte in TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.6, NaCl 0.5 M, Tween 20 0.05%) e incubata con anticorpo IgG anti Plg coniugato con perossidasi (Sigma-Aldrich). Dopo tre lavaggi con TBS-T, la membrana è stata incubata con ECL Plus (GE Healthcare) e il segnale di chemiluminescenza è stato determinato usando PhosphorImage Strom (GE Healthcare). Per determinare il legame del Plg ai siti di binding alla lisina (LBS), l'esperimento è stato ripetuto in presenza di EACA. Il primo e il secondo anticorpo non hanno legami specifici con la membrana.

### ***Identificazione di proteine con MALDI-TOF MS***

Le proteine selezionate sono state excise dal gel di acrilammide e sottoposte a digestione con tripsina e estrazione peptidica (Shevchenko, et al. 1996). I peptidi estratti sono stati purificati con ZipTip (Millipore). I peptidi sono stati analizzati utilizzando un MALDI-TOF MS con una postazione di lavoro Voyager-DE Pro Biospectrometry (Applied Biosystem). Il voltaggio di accelerazione di 20 kV con un tempo di ritardo di estrazione di 40 ns. Per la calibrazione dello strumento si utilizza una soluzione di auto digerito di tripsina. I database Aldente (<http://www.expasy.org/tools/aldente>) e ProFound (<http://129.85.19.192/index.html>) sono stati impiegati per identificare le proteine analizzate.

### ***Dot Blot***

Fermentazioni batch sono state eseguite in bireattori da 1-L (ADI 1025 Bio Consolle e ADI 1010 Bio Controller; Applikon Biotechnology, Schiedam, Olanda) usando 500 mL di terreno MRS. L'inoculo al 10% (vol/vol) per i fermentatori è stato preparato nel modo seguente, una vial di WCB di *B. lactis* BI07 è stata inoculata al 2% (vol/vol) in 50 mL di terreno MRS, incubato anaerobicamente a 37 °C per 18 h. Tutte le fermentazioni sono state eseguite in condizioni di anaerobiosi insufflando N<sub>2</sub> sterile nel terreno ad un flusso costante di 0.1 L/min. La temperatura e l'agitazione sono state mantenute costanti, rispettivamente a 37°C e 300 rpm. Ad ogni ora è stato effettuato un prelievo al fine di misurare la concentrazione cellulare, tramite la valutazione della densità ottica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) e tramite conteggio in piastra (CFU/mL). Le cellule ai tempi 1, 4 e 12 ore, corrispondenti alle 3 fasi di crescita cellulare, latenza, esponenziale, stazionaria, sono state lavate con soluzione tris-HCl 50 mM pH 7.4 e portate alla concentrazione di 1\*10<sup>9</sup> CFU/mL e 20 µL di questa sospensione sono stati depositati su una membrana di nitrocellulosa (Pure nitrocellulose membrane; Bio-Rad). Dopo trasferimento, la membrana è stata trattata con skim milk 10% in PBS per saturare tutti i siti di legame specifico, e successivamente incubato con Plg umano 4 mg/mL (Sigma-Aldrich) in PBS per 1 h a 25°C. Dopo diversi lavaggi in PBS, il Plg legato è stato evidenziato incubando la membrana con un anticorpo di capra IgG anti-Plg (Kordia). La membrana è stata lavata per 3 volte in TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.6, NaCl 0.5 M, Tween 20 0.05%) e incubata con anticorpo IgG anti Plg coniugato con perossidasi (Sigma-Aldrich). Dopo tre lavaggi con TBS-T, la membrana è stata incubata con ECL Plus (GE Healthcare) e il segnale di chemiluminescenza è stato determinato usando PhosphorImage Strom (GE Healthcare).

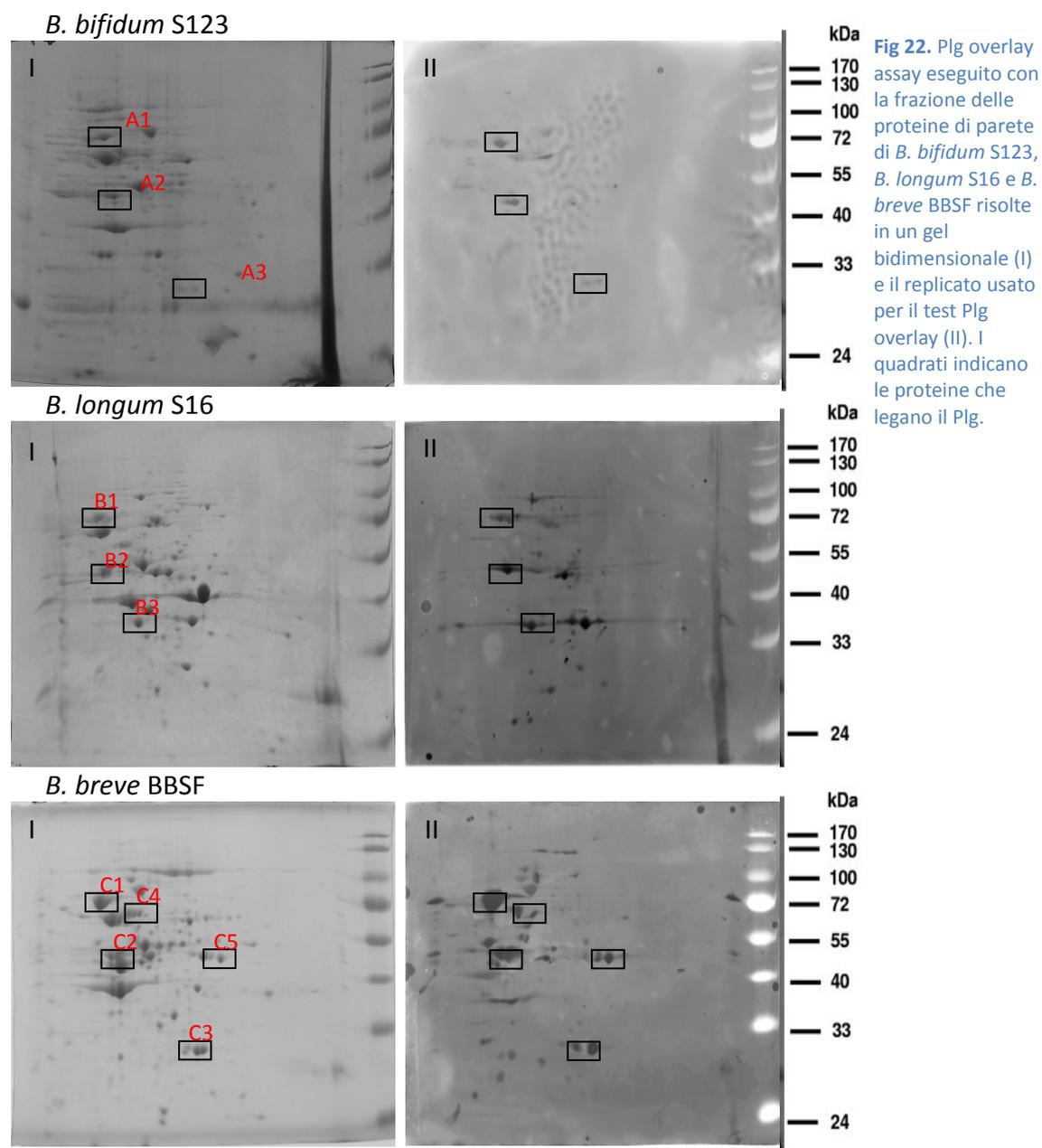
### ***Legame al plasminogeno misurato con MALDI-TOF MS***

Tre diversi ceppi di *Bifidobacterium*, *B. lactis* BI07, *B. longum* S123 e *B. bifidum* S16, sono stati fatti crescere in terreno MRS per 18 h fino al raggiungimento della fase stazionaria. Dopo lavaggio con PBS,  $1 \cdot 10^9$  CFU/mL di ogni ceppo sono stati incubati con 0, 10, 20, 50, 100  $\mu$ g di Plg umano (Sigma Aldrich), come è riportato in Candela et al. 2007. Successivamente, le cellule di bifidobatteri, sono state lavate tre volte con PBS per rimuovere il Plg non legato. Dopo i lavaggi le cellule sono state risospese in 20  $\mu$ L di NH<sub>4</sub>Cl al 2% per l'analisi al MALDI-TOF. Ogni soluzione batterica è stata spottata, asciugata e ricoperta con 1.0  $\mu$ L di soluzione matrice (12.5 mg/mL di acido ferulico in una miscela di acido formico/aceto nitrile/acqua 17:33:50). La goccia risultante è stata quindi asciugata all'aria ed analizzata in Voyager-DE Pro Biospectrometry, con un voltaggio di accelerazione di 25 kV e un tempo di ritardo di estrazione di 750 ns. I dati sono stati calibrati utilizzando BSA e per il tempo di volo standard del Plg è stata utilizzata una soluzione stock.

## Risultati

### Localizzazione delle proteine putative che legano il Plg

La capacità di legare il plasminogeno da parte di ceppi di *Bifidobacterium*, è stata valutata mediante plasminogen overlay assay. I ceppi di *B. bifidum* S123 e *B. longum* S16 utilizzati nello studio sono stati isolati da campioni fecali umani, mentre *B. breve* BBSF viene utilizzato nella formulazione di preparati probiotici farmaceutici. Questo approccio ha consentito di evidenziare le proteine di *Bifidobacterium* che sono in grado di legare il plasminogeno in modo specifico. La frazione proteica della parete cellulare dei bifidobatteri in fase stazionaria è stata purificata e successivamente è stato eseguito un Plg overlay assay. Le proteine della parete cellulare sono state risolte in un gel di poliacrilammide bidimensionale, immobilizzate su una membrana di nitrocellulosa, incubata con Plg umano e visualizzato con anticorpi anti-Plg per identificare il Plg legato.



In figura 22 sono riportati per ciascuno dei ceppi analizzati i Plg overlay assay e l'alettroforesi bidimensionale delle proteine di parete. Le immagini dei gel che compongono la figura, sono 2 gel identici colorati, uno con blu di comassie (I), mentre l'altro rappresenta il risultato del Plg overlay assay (II). Il Plg overlay assay ha consentito di individuare quali sono le proteine di parete in grado di legare il Plg in modo specifico, mentre dal gel bidimensionale è stato possibile estrarre la proteina relativa allo spot che lega il Plg e da cui si è proceduto con l'analisi MALDI-TOF per l'identificazione.

Per ogni ceppo di bifidobatterio studiato è stato possibile evidenziare diverse proteine di parete in grado di legare il plasminogeno, ma solo per alcune è stato possibile l'identificazione in spettrometria di massa (rettangoli neri fig. 22).

### ***Identificazione delle plasminogen binding protein putative isolate***

L'identificazione delle plasminogen binding protein putative è stata ottenuta mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. A tal fine gli spot proteici delle plasminogen binding protein putative sono stati estratti dai gel, digeriti con trispsina e analizzati mediante MALDI-TOF. Il fingerprinting ottenuto da ciascuno spot è stato processato col software ProFound per la sua identificazione.

**Tab 12.** Identificazione delle plasminogen binding protein putative di *Bifidobacterium*

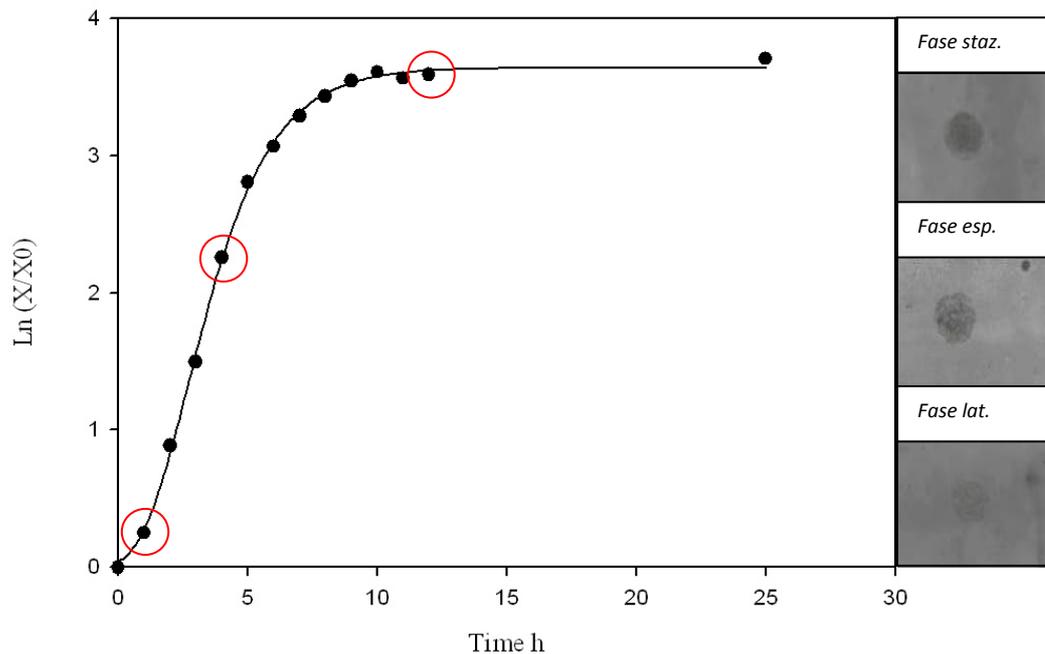
<b>Proteina</b>	<b>Batterio</b>	<b>Spot</b>
DnaK	<i>B. longum</i> S123, <i>B. bifidum</i> S16 e <i>B. breve</i> BBSF	A1, B1, C1
enolase	<i>B. longum</i> S123, <i>B. bifidum</i> S16 e <i>B. breve</i> BBSF	A2, B2, C2
phosphoglycerate mutase	<i>B. longum</i> S123, <i>B. breve</i> BBSF	A3,C3
bile salt hydrolase	<i>B. bifidum</i> S16	B3
$\alpha$ -galactosidase	<i>B. breve</i> BBSF	C4
acetato chinase	<i>B. breve</i> BBSF	C5

In tabella 12 sono riportati i risultati dell'analisi MALDI-TOF. Tra tutti gli spot analizzati è stato possibile identificare 6 diverse proteine capaci di legare il plasminogeno umano. È possibile notare come tutti e tre i ceppi studiati abbiano espresso sulla parete cellulare le proteine DnaK e enolasi, rispettivamente di 67 KDa e 46.6 KDa, *B. longum* S123 e *B. breve* BBSF presentano phosphoglycerate mutase di 28 KDa, mentre *B. bifidum* S16 espone sulla superficie l'enzima bile salt hydrolase di 35 KDa. Tutte queste proteine erano già state individuate in un lavoro precedente da Candela et al. 2007 in *B. lactis* BI07. È importante notare come in *B. breve* BBSF siano state individuate due nuove proteine, l' $\alpha$ -galactosidasi e l'acetato chinasi, rispettivamente di 60 KDa e 50 KDa. Tutte le proteine identificate, ad eccezione di  $\alpha$ -galactosidasi, presentano un residuo di lisina al C terminale, aminoacido che viene riconosciuto dal plasminogeno umano come sito di legame.

### ***Studio del binding al plasminogeno in B. lactis BI07 in diverse fasi di crescita.***

Esperimenti di binding sulla porzione proteica di parete dei batteri fornisce informazioni su quali proteine possono legare la molecola target, in questo caso il Plg. Tuttavia, è molto importante conoscere come il microrganismo interagisce col Plg nelle diverse condizioni di crescita e soprattutto nel suo habitat. Prendendo come

microrganismo modello *B. lactis* BI07, abbiamo eseguito una fermentazione batch al fine di valutare la capacità di legare il plasminogeno nelle diverse fasi di crescita. Ai tempi 1, 4, 12 ore, corrispondenti rispettivamente alle fasi di latenza, esponenziale e stazionaria di crescita (fig. 2a), sono state prelevate le cellule e ne è stata valutata la capacità di legare il plasminogeno in esperimenti di dot blot. A tal fine, per ciascuno dei tre prelievi, le cellule microbiche sono state lavate e risospese in tampone Tris-HCl pH 7.4 alla concentrazione di  $1 \times 10^9$  CFU/ml. 20  $\mu$ l di ciascuna sospensione cellulare sono stati depositati su membrana di nitrocellulosa. La membrana è stata poi incubata con plasminogeno 4  $\mu$ g/ml, lavata, e il plasminogeno complessato alle cellule batteriche è stato rilevato mediante incubazione con anticorpo anti-plasminogeno (fig. 2b).



**Fig 23.** (a) Curva di crescita di *B. lactis* BI07, i cerchi rossi rappresentano i prelievi alle 1, 4, 12 ore per lo studio dell'attività di legame al plasminogeno mediante dot blot; (b) esperimento di dot blot per la misura dell'attività di binding al plasminogeno di *B. lactis* BI07 alle fasi di latenza, esponenziale e stazionaria di crescita.

I risultati ottenuti negli esperimenti di dot blot, dimostrano che la capacità di legare il plasminogeno da parte di *B. lactis* BI07 dipende dalla fase di crescita del microrganismo, in particolare l'attività di binding aumenta passando dalla fase di latenza alla fase stazionaria. Utilizzando questa tecnica è possibile valutare l'aumento della capacità di legare il plg nelle diverse fasi di crescita, ma non è possibile dare una misura dell'incremento.

### ***Analisi MALDI-TOF MS***

Gli studi che fino ad ora sono stati utilizzati per studiare le interazioni batteri e target molecolari sono molto costosi sia in termini di soldi che in termini di tempo. Tutti questi approcci richiedono l'uso di anticorpi in grado di riconoscere la molecola target e sono di tipo qualitativo e non quantitativo. Lo scopo di questo lavoro è anche quello di studiare nuovi approcci per misurare l'interazione tra batteri e proteine e poter quantificare l'interazione che si viene a creare.

Recentemente, l'analisi diretta della parete cellulare tramite MALDI-TOF MS è stata applicata come metodo di identificazione veloce di microrganismi (Mandrell et al. 2005).

Basandoci su questo approccio, siamo andati a studiare l'interazione tra parete cellulare batterica e Plasminogeno umano mediante analisi MALDI-TOF.

In questi esperimenti abbiamo utilizzato *B. lactis* BI07, *B. bifidum* S16 e *B. longum* S123 cresciuti per 18 h in MRS in modo da raggiungere la fase stazionaria. Dopo la crescita, le cellule sono state lavate e risospese in PBS ad una concentrazione di  $10^9$  CFU/mL. La sospensione cellulare è stata incubata in presenza di Plg umano alla concentrazione di 0, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ . L'eccesso del Plg è stato eliminato lavando con soluzione PBS e la sospensione batterica è stata analizzata in MALDI-TOF MS. In figura 24 è riportato lo spettro di risposta dell'analisi di *B. lactis* BI07 incubato con le diverse concentrazioni di Plg.

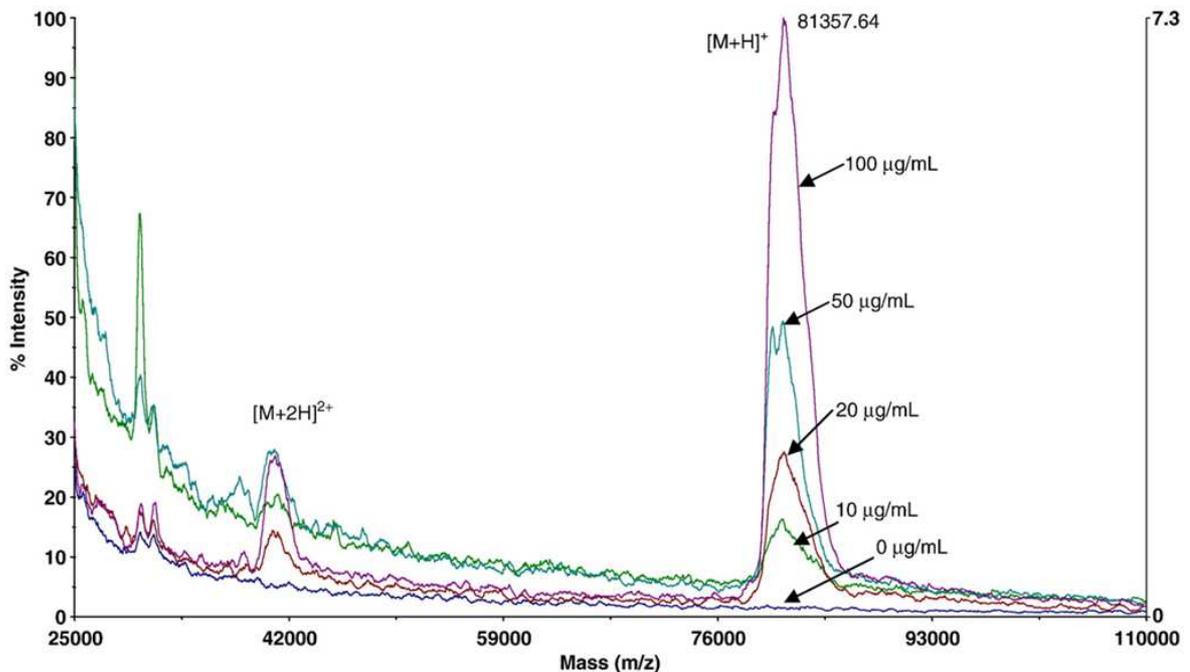
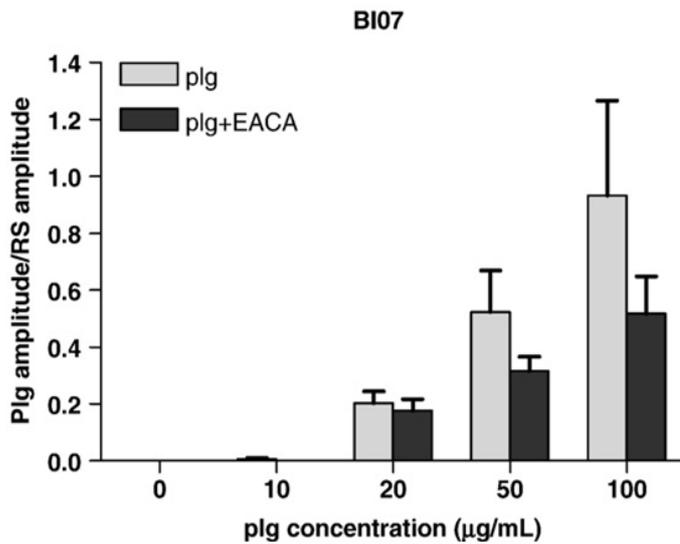


Fig 24. Sovrapposizione degli spettri di analisi MALDI-TOF ottenuti dopo incubazione di *B. lactis* BI07 con Plg (0, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ).

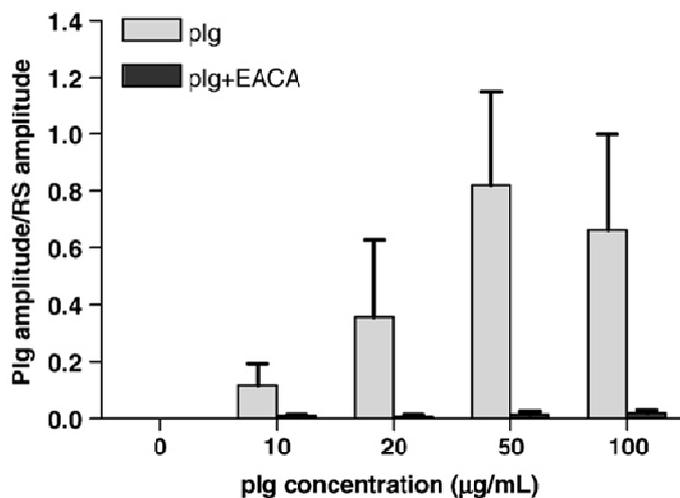
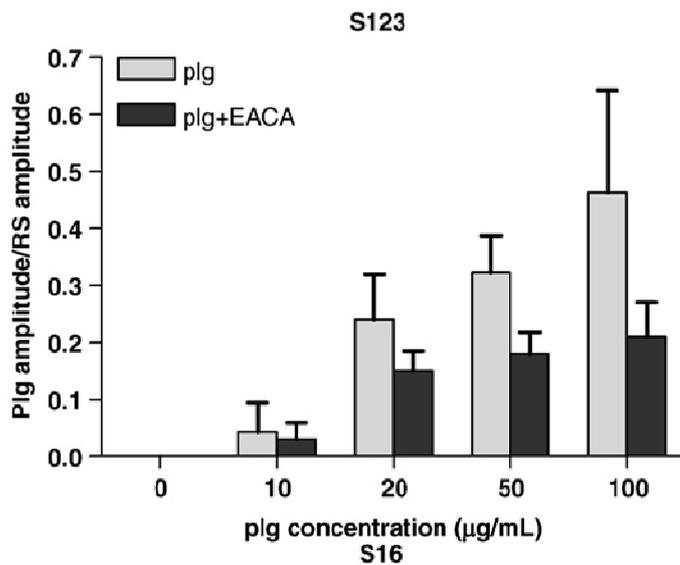
Il segnale a 81400 Da è dato dal Plg  $[M+H]^+$  perso dalla superficie batterica dopo che il laser del MALDI ha colpito lo spot. Per tutti i ceppi il segnale a  $m/z$  81400 Da risulta alto quando è alta la concentrazione di plasminogeno incubato. Il legame del plasminogeno umano alla superficie batterica è mediato da siti di legame alla lisina (LBS) dove il Plg ha alta affinità per amminoacidi lisina (Sun, 2005). Per dimostrare il ruolo dei LBS nel reclutamento del Plg sulla superficie di *Bifidobacterium*, è stato utilizzato un analogo strutturale della lisina,  $\epsilon$ -amino caproic acid (EACA) 0.5 M (Sigma – Aldrich), in questo caso il legame al plasminogeno da parte di bifidobatteri risulta inibito. Per verificare la specificità di interazione col plasminogeno, lo stesso approccio MALDI-TOF MS è stato utilizzato per misurare il legame di *Bifidobacterium* con BSA (Sigma-Aldrich). A tal fine,  $10^9$  CFU/mL di *Bifidobacterium* in fase stazionaria sono state incubate con 50  $\mu\text{g}$  di BSA e trattate come descritte per il Plg. Nessun tipo di risposta alla BSA è stata riscontrata.

In figura 25 sono riportati i rapporti tra le concentrazioni di Plg e di standard interno ottenute durante le analisi MALDI-TOF negli esperimenti senza (barre grige) e con EACA 0.5 M (barre nere). In tutti e tre i ceppi, si può vedere come il legame tra Plg e cellule

amenti con l'aumentare della concentrazione di incubazione, ma che la presenza di EACA causa una diminuzione del segnale.



udio del legame al  
*Bifidobacterium*  
MALDI-TOF. Le  
appresentano la  
espressa come  
tra standard  
: P1g, di *B. lactis*  
*bifidum* S16 e *B.*  
S123 incubati con  
concentrazioni di  
10, 20, 50, 100  
i assenza (grigio) o  
(nero) di EACA.



## Discussione

Studi precedenti di Candela et al. (2007), hanno dimostrato la capacità di legare il Plg da parte di *B. lactis* BI07 grazie alla presenza di moonlight protein sulla parete cellulare. In questo lavoro sono stati considerati altri 3 ceppi di *Bifidobacterium*, *B. longum* S123, *B. bifidum* S16 e *B. breve* BBSF, in modo da verificare la presenza di meccanismi condivisi per il legame con il plasminogeno. Tramite esperimenti di plasminogen overlay assay e identificazione proteica con MALDI-TOF MS, è stato possibile identificare 6 proteine capaci di legare il Plasminogeno. Tra queste, DnaK e enolasi, rispettivamente di 67 KDa e 46.6 KDa, sono proteine espresse in tutti e tre i ceppi analizzati. Enolasi è uno dei recettori del plasminogeno meglio caratterizzati sia in eucarioti che in procarioti, mentre la DnaK è stata già identificata come plasminogen binding protein in diversi batteri gram +. *B. longum* S123 e *B. breve* BBSF presentano phosphoglycerate mutase di 28 KDa, mentre *B. bifidum* S16 espone sulla superficie l'enzima bile salt hydrolase di 35 KDa. Queste quattro proteine erano già state individuate da Candela et al. (2007) in *B. lactis* BI07, mentre è importante segnalare che in *B. breve* BBSF sono state individuate due nuove proteine, l' $\alpha$ -galattosidasi e l'acetato chinasi, rispettivamente di 60 KDa e 50 KDa. L'identificazione di alcune plasminogen binding protein putative della frazione delle proteine di parete di *B. longum* S123, *B. bifidum* S16 e *B. breve* BBSF confermano l'ipotesi secondo cui il binding al plasminogeno a batteri gram + sia dovuto all'azione concertata di differenti proteine appartenenti alla categoria delle "moonlighting" protein. Queste sono proteine citoplasmatiche altamente conservate che, espresse sulla parete cellulare, acquisiscono una funzione differente da quella che svolgono nel citoplasma. Nessuna di queste proteine possiede alcun segnale di secrezione e di ancoraggio alla parete cellulare, e quindi, il meccanismo di secrezione e collocamento sulla parete cellulare è a tutt'oggi sconosciuto.

Nella seconda fase del lavoro sperimentale, cellule di *B. lactis* BI07 cresciute in una fermentazione batch sono state prelevate a diverse fasi di crescita (latenza, esponenziale e stazionaria) e sottoposte ad esperimenti di dot blot. I risultati ottenuti hanno dimostrato come la capacità di legare il plasminogeno da parte di *B. lactis* BI07 sia dipendente dalla fase di crescita, aumentando in maniera progressiva dalla fase di latenza alla fase stazionaria. Questo tipo di approccio, inoltre, ha evidenziato quali sono le problematiche nel quantificare il binding tra cellule intere e target molecolari, costi elevati degli esperimenti, lunghi tempi di attesa e risultati qualitativi. Alla luce di questi dati, è nata la necessità di trovare un metodo analitico in grado di studiare il legame cellule-target in modo veloce, economico, ma soprattutto in grado di calcolare le costanti di dissociazione del legame.

Prendendo come sistema di riferimento il binding al plasminogeno di *B. lactis* BI07 [sistema già studiato in precedenza utilizzando diverse tecniche analitiche quali citometria a flusso, (Candela et al. 2007)], è stato sviluppato un nuovo approccio per poter studiare le interazioni cellula – target molecolare. Recentemente è stata impiegata la tecnologia MALDI-TOF MS per l'identificazione di microrganismi, ogni batterio analizzato produce uno spettro di massa specifico, dipendente dalle proteine espresse sulla parete cellulare. Utilizzando questa tecnica, è possibile misurare target molecolari noti presenti sulla superficie del batterio. Per questi esperimenti, una concentrazione di cellule di *B. lactis* BI07 pari a  $10^9$  CFU/mL, è stata incubata con concentrazioni crescenti di Plasminogeno, i campioni così ottenuti sono stati analizzati al MALDI-TOF MS. In risposta alle analisi con MALDI-TOF MS, nello spettro di massa, il plasminogeno

staccatosi dalla superficie cellulare produce un picco a 81400 Da, inoltre, in completo accordo coi dati ottenuti con la citometria a flusso, l'analisi rivela un'attività Plasminogen binding dose dipendente per tutti i ceppi utilizzati. Per tutti i ceppi di *Bifidobacterium* testati si vede come il segnale del Plg sia alto quando i batteri sono incubati con alte concentrazioni di plasminogeno.

In conclusione si può quindi affermare che il genere *Bifidobacterium* possiede una significativa attività di legame al plasminogeno e una certa capacità nell'intervenire nel sistema plasmina/plasminogeno umano. Studi recenti, hanno dimostrato come *Lactobacillus crispatus*, un membro commensale del microbiota umano, sia in grado di interagire col plasminogeno, aprendo la strada alla comparazione del sistema Plasminogeno/plasmina tra batteri commensali e patogeni. Inoltre, l'abilità di *Bifidobacterium* di intervenire nel sistema del plasminogeno umano, può avere un ruolo fondamentale nel processo di colonizzazione del tratto gastro-intestinale, attraverso la degradazione della matrice extracellulare e aumentando la probabilità di interagire con le cellule dell'ospite. Tuttavia, il reclutamento della plasmina per favorire la colonizzazione è ancora in fase di studio.

Un approccio analitico nuovo utilizzabile nello studio dell'interazione tra batteri e matrice extracellulare, è rappresentato dal MALDI-TOF MS. Rispetto alle metodologie classiche generalmente impiegate per questi studi, come per esempio metodi immunologici e proteine radioattive, l'analisi MALDI-TOF MS rappresenta un approccio più veloce ed economico. Lo studio dell'interazione tra batteri e proteine umane con MALDI-TOF MS può rappresentare una metodologia nuova in grado di investigare i meccanismi di simbiosi e di patogenicità tra batteri e uomo.

***CONCLUSIONI***

## Conclusioni

In questa tesi di dottorato è riportato lo studio dei meccanismi che sono alla base di alcuni degli effetti health promoting di *Bifidobacterium*, uno dei generi più utilizzati nei preparati probiotici. In particolare, sono state studiate l'attività ossalato degradativa e la capacità di aderire alle pareti dell'intestino. Sono stati determinati per la prima volta in *Bifidobacterium* i geni coinvolti nel metabolismo dell'ossalato ed è stata studiata la loro regolazione a livello trascrizionale. Sono state inoltre identificate diverse proteine coinvolte nel processo di binding al plasminogeno da parte di *Bifidobacterium*, confermando i meccanismi di interazione già studiati da Candela *et al.* (2007), e per la prima volta è stato impiegato un nuovo approccio veloce ed economico in grado di studiare l'interazione batteri – target molecolari, basato sulla tecnologia MALDI-TOF MS.

I risultati ottenuti mostrano come solo in *Bifidobacterium lactis* sia stata rilevata la presenza dell'attività ossalato degradativa, la dimostrazione è avvenuta attraverso l'impiego di Elettroforesi Capillare, utilizzata per determinare la concentrazione residua di ossalato, ma anche utilizzando l'analisi genetica del genoma di *Bifidobacterium* andando a ricercare il gene *oxc* coinvolto nel suo metabolismo. Grazie a questo studio è stato possibile individuare il gene di interesse *oxc* all'interno del genoma di *B. lactis* BI07 e ne è stato studiato l'intorno. Utilizzando una strategia di primer walking è stato possibile sequenziare un frammento di 10.2 Kb dove sono state individuate 5 ORF complete e 2 ORF parziali. Tra queste è stato individuato il gene *frc*, codificante per la proteina formyl CoA transferasi, coinvolta anch'essa nel metabolismo dell'ossalato, ed è stato inoltre possibile identificare nella ORF-1, presente sullo stesso filamento di *oxc*, una permeasi adibita al trasporto dell'ossalato. Le ORF-2 e ORF-3 non presentavano nessun tipo di omologia con i geni conosciuti in *Bifidobacterium*, indicando una specificità di *B. lactis*, mentre la ORF-7, situata a monte di *oxc*, è stata associata a una proteina canale per il cloro di *B. gallicum* codificata dal gene *EriC* situato vicino a *oxc*, proprio come in *B. lactis*. Utilizzando sempre come modello *B. lactis* BI07, è stata misurata la capacità ossalato degradativa in diverse condizioni colturali, dimostrando che a pH acido c'è un aumento dei livelli trascrizionali dei geni *oxc*, *frc* e ORF-1, tutti coinvolti nel metabolismo dell'ossalato. Questo risultato ci spinge a pensare che l'attività ossalato degradativa in *B. lactis* sia un vantaggio dal punto di vista evolutivo e che favorisce il microrganismo nella sopravvivenza in nicchie in cui il pH risulta particolarmente acido.

Nella seconda parte della tesi, è stata confermata la presenza di meccanismi condivisi per il legame al plasminogeno in 3 ceppi di *Bifidobacterium*. Le plasminogen binding protein putative coinvolte nel legame al Plasminogeno individuate sono: DnaK,  $\alpha$ -enolasi, fosfoglicerato mutase, bile salt hydrolase, proteine già note da letteratura, mentre per la prima volta sono state identificate l'acetato chinasi e l' $\alpha$ -galactosidase. Le proteine individuate appartengono alla categoria delle "moonlighting" protein, proteine citoplasmatiche che, espresse sulla parete cellulare acquisiscono una funzione differente da quella che svolgevano nel citoplasma. Partendo da questi risultati, è stata poi dimostrata la dipendenza del binding al plasminogeno alla fase di crescita del microrganismo. Attraverso esperimenti di Dot Blot, è stato possibile dimostrare che, passando dalla fase di latenza alla fase stazionaria, si ha un aumento del binding al Plasminogeno. I risultati di questo esperimento hanno spinto gli studi verso l'utilizzo di nuove tecniche per lo studio dell'interazione cellule/target molecolari, in quanto quelle fin'ora utilizzate non consentono di ottenere informazioni di tipo quantitativo. Per la prima volta, è stato impiegata la tecnologia MALDI-TOF MS per studiare l'interazione *B.*

*lactis* B107 e Plasminogeno. Grazie a questa nuova tecnica è stato possibile quantificare l'interazione tra *Bifidobacterium* e Plasminogeno, aprendo nuove strade per la misura dell'interazione tra batteri e target molecolari.

In conclusione si può affermare che questo studio ha consentito di approfondire le informazioni che ci sono sui bifidobatteri, aiutando a far luce sui meccanismi che consentono a *Bifidobacterium* di colonizzare e sopravvivere nell'intestino umano. È stato inoltre fornito un nuovo approccio analitico che consente di studiare in modo quantitativo l'interazione batterio-proteine in modo più veloce ed economico e potrebbe rappresentare una nuova metodologia per indagare sui meccanismi che sono alla base dei processi di simbiosi tra uomo e batteri.

## ***BIBLIOGRAFIA***

- Abe, K., Z. S. Ruan, and P. C. Maloney. 1996. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of OxIT, the oxalate:formate exchange protein of *Oxalobacter formigenes*. *J. Biol. Chem.* 271:6789-6793.
- Aggett PJ, Agostoni C, Axelsson I, Edwards CA, Goulet O *et al.* (2003) Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol* 36, 329-337.
- Allison, M. J., K. A. Dawson, W. R. Mayberry, and J. G. Foss. 1985. *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. *Arch. Microbiol.* 141:1-7.
- Altermann, E., W. M. Russell, M. A. Azcarate-Peril, R. Barrangou, B. L. Buck, O. McAuliffe, N. Souther, A. Dobson, T. Duong, M. Callanan, S. Lick, A. Hamrick, R. Cano, and T. R. Klaenhammer. 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:3906-3912.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Anderson HW (1917) Yeast-like fungi of the human intestinal tract. *J Infect Dis* 21, 341-386.
- Apostolou E, Kirjavainen PV, Saxelin M, Rautelin H, Valtonen V *et al.* (2001) Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia? *FEMS Immunol Med Microbiol* 31, 35-39.
- Araya M, Morelli L, Reid G, Sanders ME, Stanton C (2006) Guidelines for the evaluation of probiotics in foods. FAO/WHO Report. [On line] (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>)
- Atlas R (1997) Principles of microbiology. WCB McGrill-Hill, New York, NY.
- Azcarate-Peril, M. A., J. M. Bruno-Bárcena, H. M. Hassan, and T. R. Klaenhammer. 2006. Transcriptional and functional analysis of oxalyl-coenzyme A (CoA) decarboxylase and formyl-CoA transferase genes from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1891-1899.
- Baba E, Nagaishi S, Fukata T, Arakawa A (1991) The role of intestinal microflora on the prevention of *Salmonella* colonization in gnotobiotic chickens. *Poultry Sci* 70, 1902-1907.
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY *et al.* (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 15718-15723.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915-1920.
- Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 979-984.
- Baetz, A. L., and M. J. Allison. 1990. Purification and characterization of formyl-coenzyme A transferase from *Oxalobacter formigenes*. *J. Bacteriol.* 172:3537-3540.
- Baetz, A. L., and M. J. Allison. 1989. Purification and characterization of oxalyl-coenzyme A decarboxylase from *Oxalobacter formigenes*. *J. Bacteriol.* 171:2605-2608.
- Barrangou, R., E. P. Briczinski, L. L. Traeger, J. R. Loquasto, M. Richards, P. Horvath, A. C. Coute-Monvoisin, G. Leyer, S. Rendulic, J. L. Steele, J. R. Broadbent, T. Oberg, E. G. Dudley, S. Schuster, D. A. Romero, and R. F. Roberts. 2009. Comparison of the complete genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and BI-04. *J. Bacteriol.* 191:4144-4151.
- Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME (2004) Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 70, 3575-3581.
- Bartosch S, Woodmansey EJ, Paterson JC, McMurdo ME, Macfarlane GT (2005) Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clin Infect Dis* 40, 28-37.

- Begley M, Hill C, Gahan CGM (2006) Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol* 72, 1729-1738.
- Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P *et al.* (2006) Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 72, 3593-3599.
- Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T (1984) The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol* 28, 975-986.
- Berdy J (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* (Tokyo) 58, 1-26.
- Berg RD (1985) Bacterial translocation from the intestines. *Exp Anim* 34, 1-16.
- Berg RD (1992) Translocation and the indigenous gut flora. In: Fuller R, ed. *Probiotics, the scientific basis*. London: Chapman & Hall, pp. 55-85.
- Berg RD (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 4, 430-435.
- Berg RD (1999) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 473, 11-30.
- Berirtzoglou E, Romond C (1990) Effect of the feeding practices on the establishment of bacterial interactions in the intestine of the newborn delivered by caesarean section. *J Perinat Med* 18, 139-143.
- Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL (1994) *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 35, 483-489.
- Bernstein H, Payne CM, Bernstein C, Schneider J, Beard SE *et al.* (1999) Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein misfolding by the bile salt, deoxycholate. *Toxicol Lett* 108, 37-46.
- Bevilacqua L, Ovidi M, Di Mattia E, Trovatelli LD, Canganella F (2003) Screening of *Bifidobacterium* strains isolated from human faeces for antagonistic activities against potentially bacterial pathogens. *Microbiol Res* 158, 179-185.
- Bezirtzoglou E (1997) The intestinal microbiota during the first weeks of life. *Anaerobe* 3, 173-177.
- Bezkorovainy A, Topouzian N (1983) Aspects of iron metabolism in *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*. *Int J Biochem* 15, 316-366.
- Biasoli SM, Tosello EM, Magarò MH (2002) Adherence of *Candida* stains isolated from the human gastrointestinal tract. *Mycoses* 45, 465-469.
- Biavati B, Scardovi V, Moore WEC (1982) Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *Int J Syst Bacteriol* 32, 358-373.
- Biavati B, Mattarelli P (2001) The family *Bifidobacteriaceae*. In: *The Prokaryotes* (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, eds.), Release 3.7, pp.1-70. Springer, New York.
- Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA *et al.* (2006) Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 732-737.
- Bininda-Emonds ORP (2004) The evolution of supertrees. *Trends Ecol Evol* 19, 315-322.
- Bird, A. R., M. S. Vuaran, R. A. King, M. Noakes, J. Keogh, M. K. Morell, and D. L. Topping. 2008. Wholegrain foods made from a novel high-amylose barley variety (Himalaya 292) improve indices of bowel health in human subjects. *Br. J. Nutr.* 99:1032-1040.
- Bown, R. L., J. A. Gibson, G. E. Sladen, B. Hicks, and A. M. Dawson. 1974. Effects of lactulose and other laxatives on ileal and colonic pH as measured by a radiotelemetry device. *Gut* 15:999-1004.
- Borisova GV, Slivko VV (1973) Biochemical activity of bifidobacteria in milk. *Molochnaya Promyshlennost* 12, 13-15.

- Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J *et al.* (2003) Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin Infect Dis* 36, 775-780.
- Bottazzi V, Zacconi C, Gonzaga E, Paladino M (1986) Absorption of cholesterol by intestinal lactic acid bacteria. *Ann Microbiol* 36, 1-5.
- Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang MLK (2006) Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* 83, 1256-1264.
- Brighenti F, Castellani G, Benini L, Casiraghi MC, Leopardi E *et al.* (1995) Effect of neutralized and native vinegar on blood glucose and acetate responses to a mixed meal in healthy subjects. *Eur J Clin Nutr* 49, 242-247.
- Bron PA, Grangette C, Mercenier A, de Vos WM, Kleerebezem M (2004a) Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. *J Bacteriol* 186, 5721-5729.
- Bron PA, Marco M, Hoffer SM, Van Mullekom E, de Vos WM *et al.* (2004b) Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters *in vitro* and *in situ* in the gastrointestinal tract. *J Bacteriol* 186, 7829-7835.
- Brook I (1996) Isolation of non-sporing anaerobic rods from infections in children. *J Med Microbiol* 45, 21-26.
- Brook I (1999) Bacterial interference. *Crit Rev Microbiol* 25, 155-172.
- Brown JR, Douady CJ, Italia MJ, Marshall WE, Stanhope MJ (2001) Universal trees based on large combined protein sequence data sets. *Nat Genet* 28, 281-285.
- Buss D (2004) Danone's top functional brand has America in its sights. *New Nutrition Business* 9, 3-5.
- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25:169-193.
- Butler JE, Sun J, Weber P, Navarro P, Francis D (2000) Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology* 100, 119-130.
- Campieri, C., M. Campieri, V. Bertuzzi, E. Swennen, D. Matteuzzi, S. Stefoni, F. Pirovano, C. Centi, S. Ulisse, G. Famularo, and C. De Simone. 2001. Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration. *Kidney Int.* 60:1097-1105.
- Candela M, Vitali B, Matteuzzi D, Brigidi P (2004) Evaluation of the *rrn* operon copy number in *Bifidobacterium* using real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 38, 229-232.
- Candela M, Seibold G, Vitali B, Lachenmaier S, Eikmanns BJ *et al.* (2005) Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: Competition between bifidobacteria and enteropathogens. *Res Microbiol* 156, 887-895.
- Candela M, Bergmann S, Vici M, Vitali B, Turrioni S *et al.* (2007) Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. *J Bacteriol* 189, 5929-5936.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C *et al.* (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761-1772.
- Cani PD, Delzenne NM (2007) Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10, 729-734.
- Castell DO (1988) Eating and swallowing disorders in the elderly. *Pract Gastroenterol* 12, 32-43.
- Casula G, Cutting SM (2002) *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 68, 2344-2352.
- Caufield PW, Saxena D, Fitch D, Li Y (2007) Population structure of plasmid-containing strains of *Streptococcus mutans*, a member of the human indigenous biota. *J Bacteriol* 189, 1238-1243.
- Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F, Shroff KE (1998) Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol* 6, 13-18.

- Chung, Y.-C., C.-K. Hsu, C.-Y. Ko, and Y.-C. Chan. 2007. Dietary intake of xylooligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal moisture, and pH value in the elderly. *Nutr. Res.* 27:756-761.
- Christensen BB, Atlung T, Hansen FG (1999) DnaA boxes are important elements in setting the initiation mass of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181, 2683–2688.
- Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ (2002) Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 168, 171-178.
- Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM *et al.* (2004) Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted *Gpx1* and *Gpx2* genes. *Cancer Res* 64, 962-968.
- Coenye T, Gevers D, Van de Peer Y, Vandamme P, Swings J (2005) Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol Rev* 29, 147-167.
- Collado MC, Sanz Y (2007) Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. *J Appl Microbiol* 103, 1147-1157.
- Conly JM, Stein K, Worobetz L, Rutledge-Harding S (1994) The contribution of vitamin K2 (menaquinones) produced by the intestinal microflora to human nutritional requirements for vitamin K. *Am J Gastroenterol* 89, 915-923.
- Cooperstock MS, Zedd AJ (1983) Intestinal flora of infants. In *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. Hentges DJ, ed. New York, Academic Press, pp. 79-100.
- Corfield MS, Wagner SA, Clamp JR, Kriaris MS, Hoskins LC (1992) Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylsulfatase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infect Immunol* 60, 3971-3978.
- Corthésy B, Gaskins HR, Mercenier A (2007) Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr* 137, 781S-790S.
- Crociani F, Matteuzzi D (1982) Urease activity in the genus *Bifidobacterium*. *Ann Microbiol* 133, 417-423.
- Cukrowska B, Lodinová-Zádníková R, Enders C, Sonnenborn U, Schulze J *et al.* (2002) Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand J Immunol* 55, 204-209.
- Cummings JH, Englyst HN (1987) Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr* 45, 1243-1255.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT (1987a) Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221-1227.
- Cummings JH, Hill MJ, Bone ES, Branch WJ, Jenkins DJA (1987b) The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. Part II. Bacterial metabolites in feces and urine. *Am J Clin Nutr* 32, 2094-2101.
- Cummings, J. H., and G. T. Macfarlane. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* 70:443-459.
- Cummings JH, Beatty ER, Kingman SM, Bingham SA, Englyst HN (1996) Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *Br J Nutr* 75, 733-747.
- De Smet I, van Hoorde L, Vande Woestyne M, Christiaens H *et al.* (1995) Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 79, 292-301.
- De Smet L, De Boever P, Verstraete W (1998) Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. *Br J Nutr* 79, 185-194.
- De Vries W, Gerbrandy SJ, Stouthamer AH (1967) Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochim Biophys Acta* 136, 415-425.
- De Vries W, Stouthamer AH (1968) Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xilose by bifidobacteria. *J Bacteriol* 96, 472-478.
- De Wit O, Pochart P, Desjeux JF (1988) Breath hydrogen concentration and plasma glucose, insulin and free fatty acid levels after lactose, milk, fresh or heated yogurt ingestion by healthy young adults with or without lactose malabsorption. *Nutrition* 4, 131-135.

- Degnan BA, MacFarlane GT (1993) Transport and metabolism of glucose and arabinose in *Bifidobacterium breve*. *Arch Microbiol* 260, 144-151.
- Deguchi Y, Morishita T, Mutai M (1985) Comparative studies of synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agric Biol Chem* 49, 13-19.
- Dehnert J (1957) Untersuchungen ueber die Gram-positive Stuhlflora des Brustmilchkinder. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig A* 169, 66-69.
- Delgado S, Floréz AB, Mayo B (2005) Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr Microbiol* 50, 202-207.
- Dietch EA, Hempa AC, Specian RD, Bery RD (1992) A study of the relationships among survival gut origin, sepsis and bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *J Trauma* 32, 141-147.
- Ding WK, Shah NP (2007) Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *J Food Sci* 72, M446-M450.
- Dolezalec J (1979) Use of the bifidogenic microflora in the manufacture of dried milks for feeding infants and children. *Prumysl Potravin* 30, 684-685.
- Doré J, Pochart P, Bernalier A, Goderel I, Morvan B *et al.* (1995) Enumeration of H<sub>2</sub>-utilizing methanogenic archaea, acetogenic and sulphate-reducing bacteria from human feces. *FEMS Microbiol Ecol* 17, 279-284.
- Doty RL, Sharman P, Applebaum SL, Giberson R, Siksorski L *et al.* (1984) Smell identification ability: changes with age. *Science* 22, 1441-1443.
- Douglas CW, Brown PR, Preston FE (1990) Platelet aggregation by oral streptococci. *FEMS Microbiol Lett* 72, 63-68.
- Dumas ME, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C *et al.* (2006) Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 12511-12516.
- Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D *et al.* (2001) *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr* 73, 386s-392s.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L *et al.* (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635-1638.
- Edwards CA, Parrett AM (2002) Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr* 88, S11-S18.
- Embley TM, Stackebrandt E (1994) The molecular phylogeny and systematics of the *actinomyces*. *Annu Rev Microbiol* 48, 257-289.
- Englyst KN, Englyst HN, Hudson GJ, Cole TJ, Cummings JH (1999) Rapidly available glucose in foods: an *in vitro* measurement that reflects the glycemic response. *Am J Clin Nutr* 69, 448-454.
- Erim, F. B., A. Cifuentes, H. Poppe, and J. C. Kraak. 1995. Performance of a physically adsorbed high-molecular-mass polyethyleneimine layer as coating for the separation of basic proteins and peptides by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 708:356-361.
- Federici, F., B. Vitali, R. Gotti, M. R. Pasca, S. Gobbi, A. B. Peck, and P. Brigidi. 2004. Characterization and heterologous expression of the oxalyl coenzyme A decarboxylase gene from *Bifidobacterium lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5066-5073.
- Fallingborg J (1999) Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan Med Bull* 46, 183-196.
- Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V (2003) Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr* 92, 48-55.
- Fang H, Elina T, Heikki A, Seppo S (2000) Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29, 47-52.
- FAO/WHO (2001) Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics. Cordoba, Argentina, 2001.

- FAO/WHO (2002) Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Available at: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf).
- Favier CS, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL (2002) Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 68, 219-226.
- Federici F, Vitali B, Gotti R, Pasca MR, Gobbi S *et al.* (2004) Characterisation and heterologous expression of the oxalyl coenzyme A decarboxylase gene from *Bifidobacterium lactis*. *Appl Environ Microbiol* 70, 5066-5073.
- Felis GE, Dellaglio F (2007) Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Intestinal Microbiol* 8, 44-61.
- Finegold SM, Vera LS, Paul TS, Harvey AE, Shirley ML *et al.* (1977) Fecal microbial flora in Seventh Day Adventist populations and control subjects. *Am J Clin Nutr* 30, 1781-1792.
- Finlay BB, Falkow S (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 6, 136-169.
- Fleming SE, Choi SY, Fitch MD (1991) Absorption of short-chain fatty acids from the rat cecum *in vivo*. *J Nutr* 121, 1787-1797.
- Florin THF, Zhu G, Kirk KM, Martin NG (2000) Shared and unique environmental factors determine the ecology of methanogens in humans and rats. *Am J Gastroenterol* 95, 2872-2879.
- Fozo EM, Kajfasz JK, Quivey RG Jr (2004) Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 238, 291-295.
- Frank AC, Lobry JR (1999) Asymmetric substitution patterns: a review of possible underlying mutational or selective mechanisms. *Gene* 238, 65-77.
- Frank DN, Amand AL St, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N *et al.* (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 13780-13785.
- Frankel WL, Zhang W, Singh A, Klurfeld DM, Don S *et al.* (1994) Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology* 106, 375-380.
- Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. A review. *J Appl Bacteriol* 66, 365-378.
- Garrity GM, Bell JA, Liburn TG (2004) Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, Release 5.0, Springer-Verlag, New York. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>.
- Gasser F (1994) Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bulletin de l'Institut Pasteur* 92, 45-67.
- Gautreaux MD, Deitch EA, Berg RD (1994) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract to various segments of the complex. *Infect Immun* 62, 2132-2134.
- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T *et al.* (2005) Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* 3, 733-739.
- Gibson PR, Moeller I, Kagelari O, Folino M, Young GP (1992) Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells *in vitro*. *J Gastroenterol Hepatol* 7, 165-172.
- Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401-1412.
- Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ *et al.* (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355-1359.
- Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C (1985) Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 49, 377-381.
- Gilman J, Cashman KD (2006) The effect of probiotic bacteria on trans-epithelial calcium transport and calcium uptake in human intestinal-like Caco-2 cells. *Curr Issues Intest Microbiol* 7, 1-5.

- Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D *et al.* (2000) Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patient with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 119, 305-309.
- Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM *et al.* (2003a) Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 124, 1202-1209.
- Gionchetti P, Amadini C, Rizzello F, Venturi A, Poggioli G *et al.* (2003b) Diagnosis and treatment of pouchitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 75-87.
- Glick M, Sall T, Zilliken F, Mudd S (1960) Morphological changes of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus* produced by a cell wall precursor. *Biochim Biophys Acta* 37, 361-363.
- Goldfarb, D. S., F. Modersitzki, and J. R. Asplin. 2007. A randomized, controlled trial of lactic acid bacteria for idiopathic hyperoxaluria. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2:745-749.
- Gómez-Zavaglia A, Kociubinski G, Pérez P, Disalvo E, De Antoni G (2002) Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *J Appl Microbiol* 93, 794-799.
- González R, Blancas A, Santillana R, Azaola A, Wachter C (2004) Growth and final product formation by *Bifidobacterium infantis* in aerated fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 606-610.
- Goodfellow M, Williams ST (1983) Ecology of *actinomycetes*. *Annu Rev Microbiol* 37, 189-216.
- Gorbach SL, Goldin BR (1989) *Lactobacillus* strains and methods of isolation. United States, US patent 4, 839, 281.
- Grabig A, Paclik D, Guzy C, Dankof A, Baumgart DC *et al.* (2006) *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via Toll-like receptor 2-and Toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infect Immun* 74, 4075-4082.
- Green SL (1978) Case report: fatal anaerobic pulmonary infection due to *Bifidobacterium eriksonii*. *Postgrad Med* 63, 187-188.
- Grill JP, Perrin S, Schneider F (2000) Bile salt toxicity to some bifidobacteria strains: role of conjugated bile salt hydrolase and pH. *Can J Microbiol* 46, 878-884.
- Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G *et al.* (2004) Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol* 186, 5432-5441.
- Grundy FJ, Henkin TM (1998) The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 30, 737-749.
- Guarner F, Malagelada JR (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* 361, 512-519.
- Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E (2007) Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology* 92, 64-66.
- Gunzer F, Hennig-Pauka I, Waldmann KH, Sandhoff R, Grone HJ *et al.* (2002) Gnotobiotic piglets develop thrombotic microangiopathy after oral infection with enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Am J Clin Pathol* 118, 364-375.
- Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ (1990) Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child* 65, 185-188.
- Hallstrom M, Eerola E, Vueno R, Janas M, Tammela O (2004) Effects of mode of delivery and necrotising enterocolitis on the intestinal microflora in preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23, 463-470.
- Hassinen JB, Durbin GT, Tomarelli RM, Bernhart FW (1951) The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. *J Bacteriol* 62, 771-777.
- Hatch, M., J. Cornelius, M. Allison, H. Sidhu, A. Peck, and R. W. Freel. 2006. Oxalobacter sp. reduces urinary oxalate excretion by promoting enteric oxalate secretion. *Kidney Int.* 69:691-698.

- Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, Midtvedt T, Brandtzaeg P (1996) Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology* 89, 494-501.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S *et al.* (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- Herias MV, Hesse C, Telemo E, Midtvedt T, Hanson LA *et al.* (1999) Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. *Clin Exp Immunol* 116, 283-290.
- Hill MJ (1997) Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev* 6, S43-S45.
- Hoarau C, Lagaraine C, Martin L, Velge-Roussel F, Lebranchu Y (2006) Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J Allergy Clin Immunol* 117, 696-702.
- Holmes, R. P. 2000. Oxalate synthesis in humans: assumptions, problems, and unresolved issues. *Mol. Urol.* 4:329-332.
- Holmes, R. P., and M. Kennedy. 2000. Estimation of oxalate content of foods and daily oxalate intake. *Kidney Int.* 57:1662-1667.
- Holmes, R. P. 1995. Measurement of urinary oxalate and citrate by capillary electrophoresis and indirect ultraviolet absorbance. *Clin. Chem.* 41:1297-1301.
- Hoppe, B., B. Beck, N. Gatter, G. von Unruh, A. Tischer, A. Hesse, N. Laube, P. Kaul, and H. Sidhu. 2006. Oxalobacter formigenes: a potential tool for the treatment of primary hyperoxaluria type 1. *Kidney Int.* 70:1305-1311.
- Hoppe, B., G. von Unruh, N. Laube, A. Hesse, and H. Sidhu. 2005. Oxalate degrading bacteria: new treatment option for patients with primary and secondary hyperoxaluria? *Urol. Res.* 33:372-375.
- Homma N (1988) Bifidobacteria as a resistance factor in human beings. *Bifidobacteria Microflora* 7, 35-39.
- Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 22, 283-307.
- Hopkins MJ, Macfarlane GT (2002) Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol* 51, 448-454.
- Hopkins MJ, Macfarlane GT, Furrer E, Fite A, Macfarlane S (2005) Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses. *FEMS Microbiol Ecol* 54, 77-85.
- Hoskins LC, Agustines M, McKee WB, Boulding ET, Kriaris M *et al.* (1985) Mucin degradation in the human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J Clin Invest* 75, 944-953.
- Hoyles L, Collins MD, Falsen E, Nikolaitchouk N, McCartney AL (2004) Transfer of members of the genus *Falciivibrio* to the genus *Mobiluncus*, and emended description of the genus *Mobiluncus* system. *Appl Microbiol* 27, 72-83.
- Husain I, Poupard JA, Norris RF (1972) Influence of nutrition on the morphology of a strain of *Bifidobacterium bifidum*. *J Bacteriol* 111, 841-844.
- Ibrahim SA, Bezkorovainy A (1993) Inhibition of *Escherichia coli* by bifidobacteria. *J Food Prot* 56, 713-715.
- Ishibashi N, Yamazaki S (2001) Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr* 73, 465s-470s.
- Ismail AS, Hooper LV (2005) Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, 779-784.
- Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S (2002) Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* 50, 54-59.

- Ivanov D, Emonet C, Foata F, Affolter M, Delley M *et al.* (2006) A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. *J Biol Chem* 281, 17246-17252.
- Iyer, R., T. M. Iverson, A. Accardi, and C. Miller. 2002. A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. *Nature* 419:715-718.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59, 171-200.
- Jager A. V., F. G. Tonin, and M. F. Tavares. 2007. Comparative evaluation of extraction procedures and method validation for determination of carbohydrates in cereals and dairy products by capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.* 30:586-594.
- James, L. F. 1972. Oxalate toxicosis. *Clin. Toxicol.* 5:231-243.
- Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D *et al.* (2004) DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 126, 1358-1373.
- Kaila M, Isolauri E, Saxelin M, Arvilommi H, Vesikari T (1995) Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Arch Dis Child* 72, 51-53.
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M (2004) The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res* 32, D277-D280.
- Kandler O, Lauer E (1974) Neuere Vorstellungen zur Taxonomie der Bifidobakterien. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1, Orig Reihe A228*, pp. 29-45.
- Karlsson S, Persson M, Carlsson GE (1991) Mandibular movement and velocity in relation to state of dentition and age. *J Oral Rehabil* 18, 1-8.
- Kastner S, Perreten V, Bleuler H, Hugenschmidt G, Lacroix C *et al.* (2005) Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Syst Appl Microbiol* 29, 145-155.
- Kaufman, D. W., J. P. Kelly, G. C. Curhan, T. E. Anderson, S. P. Dretler, G. M. Preminger, and D. R. Cave. 2008. Oxalobacter formigenes may reduce the risk of calcium oxalate kidney stones. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19:1197-1203.
- Kwak, C., B. C. Jeong, J. H. Ku, H. H. Kim, J. J. Lee, C. S. Huh, Y. J. Baek, and S. E. Lee. 2006. Prevention of nephrolithiasis by *Lactobacillus* in stone-forming rats: a preliminary study. *Urol. Res.* 34:265-270.
- Kilara A, Shahani KM (1976) Lactose activity of cultured and acidified dairy products. *J Dairy Sci* 61, 2031-2035.
- Kirjavainen PV, El Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT, Wright PF (1999) The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 26, 131-135.
- Kirjavainen PV, Salminen SJ, Isolauri E (2003) Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 36, 223-227.
- Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12, 39-85.
- Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66, 1328-1333.
- Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, de Vos WM (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24, 895-904.
- Klijn A, Mercenier A, Arigoni F (2005) Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 29, 491-509.
- Klingberg TD, Budde BB (2006) The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *Int J Food Microbiol* 109, 157-159.

- Kojima M, Suda S, Hotta S, Hamada K (1970a) Induction of pleomorphism and calcium ion deficiency in *Lactobacillus bifidus*. *J Bacteriol* 102, 217-220.
- Kojima M, Suda S, Hotta S, Hamada K (1970b) Necessity of calcium ion for cell division. *J Bacteriol* 104, 1010-1013.
- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H (2003) Review: evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt. *Int Dairy J* 13, 3-13.
- Krinos CM, Coyne MJ, Weinacht KG, Tzianabos AO, Kasper DL *et al.* (2001) Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions. *Nature* 414, 555-558.
- Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B *et al.* (2004) Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617-1623.
- Krzewinski F, Brassart C, Gavini F, Bouquelet F (1996) Characterisation of the lactose transport system in the strain *Bifidobacterium bifidum* DSM20082. Université des Sciences et Technologies de Lille, France 32, 301-307.
- Krzewinski F, Brassart C, Gavini F, Bouquelet F (1997) Glucose and galactose transport in *Bifidobacterium bifidum* DSM20082. Université des Sciences et Technologies de Lille, France 35, 175-179.
- Kullen MJ, Brady LJ, O'Sullivan DJ (1997) Evaluation of using a short region of the *recA* gene for rapid and sensitive speciation of dominant bifidobacteria in the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 154, 377-383.
- Kumprekt I, Gasnarek Z, Zobak P (1984) The effect of a single and continuous administration of *Streptococcus faecium* M-74 germs on the growth of broilers and on metabolic processes in broiler. *Zivoc Vyr* 29, 949-955.
- Kunisawa T (1995) Identification and chromosomal distribution of DNA sequence segments conserved since divergence of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Mol Evol* 40, 585-593.
- Kurdi P, Kawanishi K, Mizutani K, Yokota A (2006) Mechanism of growth inhibition by free bile acids in Lactobacilli and Bifidobacteria. *J Bacteriol* 188, 1979-1986.
- Lamendella, R., J. W. Santo Domingo, C. Kelty, and D. B. Oerther. 2008. Bifidobacteria in feces and environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:575-584.
- Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Gionchetti P, Rizzello F *et al.* (2003) Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38, 165-172.
- Lan GQ, Abdullah N, Jalaludin S, Ho YW (2002) Efficacy of supplementation a phytase-producing bacterial culture on the performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets. *Poult Sci* 81, 1522-1532.
- Langendijk, P. S., F. Schut, G. J. Jansen, G. C. Raangs, G. R. Kamphuis, M. H. Wilkinson, and G. W. Welling. 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3069-3075.
- Lata J, Novotný I, Přibramská V, Juránková J, Frič P *et al.* (2007) The effect of probiotics on gut flora, level of endotoxin and Child-Pugh score in cirrhotic patients: results of a double-blind randomized study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19, 1111-1113.
- Lay C, Rigottier-Gois L, Holmstrøm K, Rajilic M, Vaughan EE *et al.* (2005) Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol* 71, 4153-4155.
- Lay C, Sutren M, Rochet V, Saunier K, Doré J *et al.* (2005) Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. *Environ Microbiol* 7, 933-946.
- Lechevalier HA, Lechevalier MP (1967) Biology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 21, 71-100.

- Lee A (1984) Neglected niches: the microbial ecology of the gastrointestinal tract. In: *Advances in Microbial Ecology*, Marshal KC, ed. New York, Plenum Press, pp. 115-162.
- Lee SK, Kim YB, Ji GE (1997) Note: purification of amylase secreted from *Bifidobacterium adolescentis*. *J Appl Microbiol* 83, 267-272.
- Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD *et al.* (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 11070-11075.
- Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. (2008) Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Oct;6(10):776-88.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837-848.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006) Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023.
- Lewanika, T. R., S. J. Reid, V. R. Abratt, G. T. Macfarlane, and S. Macfarlane. 2007. *Lactobacillus gasser* Gasser AM63(T) degrades oxalate in a multistage continuous culture simulator of the human colonic microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61:110-120.
- Li T, Johansson I, Hay DI, Stromberg N (1999) Strains of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces viscosus* exhibit structurally variant fimbrial subunit proteins and bind to different peptide motifs in salivary proteins. *Infect Immunol* 67, 2053-2059.
- Liepke C, Adermann K, Raida M, Magert HJ, Frossmann WG *et al.* (2002) Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *Eur J Biochem* 269, 712-718.
- Lieske, J. C., D. S. Goldfarb, C. De Simone, and C. Regnier. 2005. Use of a probiotic to decrease enteric hyperoxaluria. *Kidney Int.* 68:1244-1249.
- Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D *et al.* (2000) *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47, 646-652.
- Lilly DM, Stillwell RH (1965) Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 47, 747-748.
- Limdi JK, O'Neill C, McLaughlin J (2006) Do probiotics have a therapeutic role in gastroenterology? *World J Gastroenterol* 12, 5447-5457.
- Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H *et al.* (2007) An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445, 915-918.
- Lund B, Edlund C (2001) Probiotic *Enterococcus faecium* strain is possible recipient of the vanA gene cluster. *Clin Infect Dis* 32, 1-11.
- MacConaill LE, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2003) Investigation of protein export in *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol* 69, 6994-7001.
- MacDonought FE, Wells P, Wong NP (1983) Mechanism of lactose utilisation by lactic acid streptococci: enzymatic and genetic analysis. *J Bacteriol* 102, 804-809.
- Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C (1986) Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol* 132, 1647-1656.
- Macfarlane GT, Englyst HN (1986) Starch utilization by the human large intestinal microflora. *J Appl Bacteriol* 60, 195-201.
- Macfarlane GT, Cummings JH, Macfarlane S, Gibson GR (1989) Influence of retention time on degradation of pancreatic enzymes by human colonic bacteria grown in a 3-stage continuous culture system. *J Appl Bacteriol* 67, 520-527.
- Macfarlane GT, Gibson GR, Cummings JH (1992) Comparison of fermentations reactions in different regions of the human colon. *Appl Bacteriol* 72, 57-64.
- Macfarlane GT, Gibson GR, Drasar BS, Cummings JH (1995) Metabolic significance of the colonic microflora. In: *Gastrointestinal and Oesophageal Physiology*, Whitehead R, ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, pp. 249-274.
- Macfarlane S, Macfarlane GT (2003) Regulation of short-chain fatty acid production. *P Nutr Soc* 62, 67-72.

- Macfarlane S, Dillon JF (2007) Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 102, 1187-1196.
- Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA (2003) Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52, 827-833.
- Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69, 1035S-1045S.
- Macpherson AJ, Harris NL (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 4, 478-485.
- Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H *et al.* (2001) Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121, 580-591.
- Majewski J, Zawadzki P, Pickerill P, Cohan FM, Dowson CG (2000) Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation. *J Bacteriol* 182, 1016-1023.
- Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavolv, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Huang, D. M. Goldstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y. Goh, A. Benson, K. Baldwin, J.-H. Lee, I. Diaz-Muniz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu, M. Saier, T. Klaenhammer, P. Richardson, S. Kozyavkin, B. Weimer, and D. Mills. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:15611-15616.
- Mandar R, Mikelsaar M (1996) Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biol Neonate* 69, 30-35.
- Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M (2006) Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol* 17, 204-210.
- Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarões V, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP. (2009) The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* Jun 9;9:123.
- Martin FJ, Dumas M, Wang Y, Legido-Quigley C, Yap IKS *et al.* (2007a) A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Mol Syst Biol* 3: Article number 112; doi:10.1038/msb4100153.
- Martin F-PJ, Wang Y, Sprenger N, Yap IKS, Lundstedt T *et al.* (2007b) Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Mol Syst Biol* 4: Article number 157; doi:10.1038/msb4100190.
- Mater DD, Langella P, Corthier G, Flores MJ (2008) A probiotic *Lactobacillus* strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. *J Mol Microbiol Biotechnol* 14, 123-127.
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Oyaizu H (1998) Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers. *FEMS Microbiol Lett* 167, 113-121.
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H (1999) Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl Environ Microbiol* 65, 4506-4512.
- Matteuzzi D, Crociani F, Zani G, Trovatelli LD (1971) *Bifidobacterium suis* sp. nov.: a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig faeces. *Zeitschrift Allgemeine Mikrobiol* 11, 387-395.
- Matteuzzi D, Crociani F, Emaldi O (1978) Amino acids produced by bifidobacteria and some clostridia. *Ann Microbiol Inst Pasteur* 129, 175-181.
- Maus, J. E., and S. C. Ingham. 2003. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 95:146-154.

- Maze A, O'Connell-Motherway M, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2006) Identification and characterization of a fructose phosphotransferase system in *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol* 73, 545-553.
- McLean MJ, Wolfe KH, Devine KM (1998) Base composition skews, replication orientation, and gene orientation in 12 prokaryote genomes. *J Mol Evol* 47, 691-696.
- Ménard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N *et al.* (2004) Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* 53, 821-828.
- Ménard O, Butel MJ, Gaboriau-Routhiau V, Waligora-Dupriet AJ (2008) Gnotobiotic mouse immune response induced by *Bifidobacterium* sp. strains isolated from infants. *Appl Environ Microbiol* 74, 660-666.
- Mike A, Nagaoka N, Tagami Y, Miyashita M, Shimada S *et al.* (1999) Prevention of B220+ T cell expansion and prolongation of lifespan induced by *Lactobacillus casei* in MLR/lpr mice. *Clin Exp Immunol* 117, 368-375.
- Miller TL, Wolin MJ (1985) *Methanosphaera stadtmaniae* gen nov., sp. nov. a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Arch Microbiol* 141, 116-122.
- Miller TL, Wolin MJ (1986) Methanogens in human and animal tracts. *Syst Appl Microbiol* 7, 223-229.
- Miyazawa E, Iwabuchi A, Yoshida T (1996) Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorous, calcium and magnesium in germfree and conventional rats. *Nutr Res* 16, 603-613.
- Mlobeli, N. T., N. A. Gutierrez, and I. S. Maddox. 1998. Physiology and kinetics of *Bifidobacterium bifidum* during growth on different sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:125-128.
- Murphy, C., S. Murphy, F. O'Brien, M. O'Donoghue, T. Boileau, G. Sunvold, G. Reinhart, B. Kieley, F. Shanahan, and L. O'Mahony. 2009. Metabolic activity of probiotics-Oxalate degradation. *Vet. Microbiol.* 136:100-107.
- Möllenbrink M, Bruckschen E (1994) Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *E. coli* Nissle 1917 strain (Mutaflor). *Med Klin (Munich)* 89, 587-593.
- Morelli L, Cesena C, Lucchini F, Callegari ML (1997) Role of cell aggregation protein in adhesion *in vitro* and *in vivo*. In: *Novel Methods for Probiotic Research*, 2nd Workshop FAIR CT96-1028, PROBDEMO, p. 63. Technical Research Centre of Finland, Espoo.
- Moreno Y, Collado MC, Ferrús MA, Cobo JM, Hernández E *et al.* (2006) Viability assessment of lactic acid bacteria in commercial dairy products stored at 4°C using LIVE/DEAD® BacLight™ staining and conventional plate counts. *Int J Food Sci Technol* 41, 275-280.
- Moubareck C, Gavini F, Vaugien L, Butel MJ, Doucet-Populaire F (2005) Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J Antimicrob Chemother* 55, 38-44.
- Nagaoka M, Hashimoto S, Watanabe T, Yokokura T, Mori Y (1994) Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biol Pharm Bull* 17, 1012-1017.
- Narva M, Hallee J, Vaananen K, Korpela R (2004) Effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on bone cells *in vitro*. *Life Sci* 75, 1727-1734.
- Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11, 142-201.
- Newton JP, Yemm R, Abel RW, Menhinick S (1993) Changes in human jaw muscles with age and dental state. *Gerodontology* 10, 16-22.
- Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S *et al.* (2005) CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254-258.
- Noriega L, Cuevas I, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG (2006) Deconjugation and bile salts hydrolase activity by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile. *Int Dairy J* 16, 850-855.
- Nottingham PM, Hungate RE (1968) Isolation of methanogenic bacteria from feces of man. *J Bacteriol* 96, 2178-179.

- Orla-Jensen S (1924) La classification des bacteries lactiques. *Lait* 4, 468-474.
- Otte JM, Podolsky DK (2004) Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, 613-626.
- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S (1999) Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J* 9, 43-52.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279-289.
- Ouwehand AC, Kurvinen T, Rissanen P (2004) Use of a probiotic *Bifidobacterium* in a dry food matrix, an *in vivo* study. *Int J Food Microbiol* 95, 103-106.
- Palframan RJ, Gibson GR, Rastall RA (2003) Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Curr Issues Intest Microbiol* 4, 71-75.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5, 1556-1573.
- Park YH, Kim JG, Shin YW, Kim HS, Kim Y-J *et al.* (2008) Effects of *Lactobacillus acidophilus* 43121 and a mixture of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* on the serum cholesterol level and fecal sterol excretion in hypercholesterolemia-induced pigs. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 70581-70586.
- Penders J, Vink C, Driessen C, London N, Thijs C *et al.* (2005) Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 243, 141-147.
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B *et al.* (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118, 511-521.
- Pereira DI, Gibson GR (2002) Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in human. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37, 259-281.
- Perez PF, Minnaard Y, Disalvo EA, De Antoni GL (1998) Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl Environ Microbiol* 64, 21-26.
- Pessi T, Sutas Y, Saxelin M, Kallioinen H, Isolauri E (1999) Antiproliferative effects of homogenates derived from five strains of candidate probiotic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65, 4725-4728.
- Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E (2000) Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* 30, 1804-1808.
- Pochard P, Gosset P, Granette C, Andre C, Tonnel AB *et al.* (2002) Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 110, 617-623.
- Podolsky DK (2002) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347, 417-429.
- Pohjavuori E, Viljanen M, Korpela R, Kuitunen M, Tiittanen M *et al.* (2004) *Lactobacillus* GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 114, 131-136.
- Poupard JA, Husain I, Norris RF (1973) Biology of the bifidobacteria. *Bacteriol Rev* 37, 136-165.
- Prantera C, Scribano ML, Falasco G, Andreoli A, Luzzi C (2002) Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus* GG. *Gut* 51, 405-409.
- Prevost H, Divies C (1992) Cream fermentation by mixed culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel beads. *Biotechnol Lett* 14, 583-588.
- Price CE, Reid SJ, Driessen AJ, Abratt VR (2006) The *Bifidobacterium longum* NCIMB 702259T *ctr* gen codes for a novel cholate transporter. *Appl Environ Microbiol* 72, 923-926.
- Pull SL, Doherty JM, Millis JC, Gordon JI, Stappenbeck TS (2005) Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 99-104.

- Putman R (1994) Community Ecology. New York, Chapman and Hall.
- Qin MH, Madiraju MV, Rajagopalan M (1999) Characterization of the functional replication origin of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene* 233, 121-130.
- Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C *et al.* (2004) Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126, 520-528.
- Rajilić-Stojanović M (2007) Diversity of the human gastrointestinal microbiota: novel perspectives from highthroughput analyses. PhD Thesis. Wageningen, The Netherlands, Wageningen University.
- Rao AV, Shiwain N, Maharaj I (1989) Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Canc Inst Food Sci Technol* 22, 365-369.
- Rasic LJ, Kurman JA (1983) Bifidobacteria and their role. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart.
- Rasic J (1989) The role of dairy foods containing bifidobacteria and acidophilus bacteria in nutrition and health. *Ferm. Milks Curr Res Ass Int Fabric Yog*, Paris, France.
- Rasic J, Vujicic IF, Skrinjar M, Vulic M (1992) Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotech Lett* 14, 39-44.
- Rastall RA (2004) Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *J Nutr* 134, 2022S-2026S.
- Reiners JJ, Clift R, Mathieu P (1999) Suppression of cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor. *Carcinogenesis* 20, 1561-1566.
- Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P (2001) Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204, 572-581.
- Reuter G (1963) Vergleichende untersuchungen ueber die bifidus-flora im sauglings und erwachsenstuhl. *Zbl Bakteriol Par Infek* 191, 486-507.
- Rezzonico E, Lariani S, Barretto C, Cuanoud G, Giliberti G *et al.* (2007) Global transcriptome analysis of the heat shock response of *Bifidobacterium longum*. *FEMS Microbiol Lett* 271, 136-45.
- Rieu-Lesme F, Delbes C, Sollelis L (2005) Recovery of partial 16S rDNA sequences suggests the presence of Crenarchaeota in the human digestive ecosystem. *Curr Microbiol* 51, 317-321.
- Roberfroid MB, Gibson GR (1994) Probiotic and prebiotic. In: *Ilsi Europe, Workshop of colony microflora: nutrition and health*. Barcelona, Spain, 14-16 sept 1994.
- Roberfroid MB, Bornet F, Bouley C, Cummings JH (1995) Colonic microflora: nutrition and health: summary and conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI) (Europe) workshop held in Barcelona, Spain. *Nutr Rev* 53, 127-130.
- Roberts M (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 245, 195-203.
- Rodby, R. A., T. S. Tyazka, and J. W. Williams. 1991. Reversal of cardiac dysfunction secondary to type I primary hyperoxaluria after combined liver-kidney transplantation. *Am. J. Med.* 90:498-504.
- Roller C, Ludwig W, Schleifer KH (1992) Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes. *J Gen Microbiol* 138, 1167-1175.
- Rovinsky J, Svik K, Matha V, Istok R, Ebringer L *et al.* (2004) The effects of *Enterococcus faecium* and selenium on methotrexate treatment in rat adjuvant-induced arthritis. *Clin Dev Immunol* 11, 267-273.
- Rozee KR, Cooper D, Lam K, Costerton JW (1982) Microbial flora of the mouse ileum mucous layer and epithelial surface. *Appl Environ Microbiol* 43, 1451-1463.
- Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilan CG, Salminen S (2006) Short communication: effect of exopolysaccharide isolated from "villi" on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. *J Dairy Sci* 89, 2355-2358.

- Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Fernández-García M, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A (2008) Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 74, 1936-1940.
- Ruiz L, Sánchez B, Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A (2007) Cell envelope changes in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* as a response to bile. *FEMS Microbiol Lett* 274, 316-322.
- Ryan MP, Jack RW, Josten M, Sahl HG, Jung G *et al.* (1999) Extensive post-translational modification, including serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lactacin 3147. *J Biol Chem* 274, 37544-37550.
- Ryan SM, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2006) Screening and identification of starch, amylopectin and pullulan-degrading activities in bifidobacterial strains. *Appl Environ Microbiol* 72, 5289-5296.
- Saarela M, Mättö J, Mattila-Sandholm T (2002) Safety aspects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species originating from human oro-gastrointestinal tract or from probiotic products. *Microbial Ecol in Health & Disease* 14, 234-241.
- Sahin, N. 2003. Oxalotrophic bacteria. *Res. Microbiol.* 154:399-407.
- Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D *et al.* (1998a) Demonstration of safety of probiotics – a review. *Int J Food Microbiol* 44, 93-106.
- Salminen S, Bouley C, Bouton-Ruault MC, Cummings J, Franck A *et al.* (1998b) Functional food science in gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80, S147-S171.
- Salyers AA, Gupta A, Wang Y (2004) Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* 12, 412-416.
- Sambrook, J. E., F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Samuel BS, Gordon JI (2006) A humanized gnotobiotic mouse model of host-archeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10011-10016.
- Sánchez B, Champomier-Vergès MC, Anglade P, Baraige F, de los Reyes-Gavilán CG *et al.* (2005) Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *J Bacteriol* 187, 5799-5808.
- Sánchez B, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A (2006) The F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase of *Bifidobacterium animalis* is involved in bile tolerance. *Environ Microbiol* 8, 1825-1833.
- Sánchez B, Champomier-Vergès MC, Collado MC, Anglade P, Baraige F *et al.* (2007a) Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype longum. *Appl Environ Microbiol* 73, 6450-6459.
- Sánchez B, Champomier-Vergès MC, Stuer-Lauridsen B, Ruas-Madiedo P, Anglade P *et al.* (2007b) Adaptation and response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to bile: a proteomic and physiological approach. *Appl Environ Microbiol* 73, 6757-6767.
- Sartor RB (2004a) Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr Opin Gastroenterol* 21, 44-50.
- Sartor RB (2004b) Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 126, 1620-1633.
- Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM (2001) Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 67, 504-513.
- Savage DC (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 31, 107-133.
- Savijoki K, Suokko A, Palva A, Valmu L, Kalkkinen N *et al.* (2005) Effect of heat-shock and bile salts on protein synthesis of *Bifidobacterium longum* revealed by [<sup>35</sup>S]methionine labelling and two-dimensional gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 248, 207-215.

- Saxelin M, Chuang NH, Chassy B, Rautelin H, Mäkelä PH *et al.* (1996) Lactobacilli and bacteraemia in southern Finland, 1989-1992. *Clin Infect Dis* 22, 564-566.
- Scardovi V, Trovatelli LD (1965) The fructose-6-phosphate shunt as a peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann Microbiol Enzymol* 15, 19-29.
- Scardovi V, Trovatelli LD (1969) New species of bifidobacteria from *Apis mellifera* L and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. *Zbl Bakteriologie Par Infek Hyg Abt 2* 123, 64-88.
- Scardovi V, Trovatelli LD, Crociani F, Sgorbati B (1969) Bifidobacteria in bovine rumen. New species of the genus *Bifidobacterium*, *B. globosum* sp. nov. and *B. ruminale* sp. nov. *Arch Microbiol* 68, 278-294.
- Scardovi V, Zani G, Trovatelli LD (1970) Deoxyribonucleic acid homology among the species of the genus *Bifidobacterium* isolated from animals. *Arch Microbiol* 72, 318-325.
- Scardovi V, Trovatelli LD, Zani G, Crociani F, Matteuzzi D (1971) Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* 21, 276-294.
- Scardovi V, Crociani F (1974) *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int J Syst Bacteriol* 24, 6-20.
- Scardovi V, Casalicchio S, Vincenzi N (1979) Multiple electrophoretic forms of transaldolase and their relationships to the taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 29, 312-327.
- Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B *et al.* (2002) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 14422-14427.
- Scholz-Ahrens KE, Ade P, Marten B, Weber P, Timm W *et al.* (2007) Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *J Nutr* 137, 838S-846S.
- Schrempf H (2001) Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 285-289.
- Scupham AJ, Presley LL, Wei B, Bent E, Griffith N *et al.* (2006) Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine. *Appl Environ Microbiol* 72, 793-801.
- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P *et al.* (2003) Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52, 237-242.
- Servin AL (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28, 405-440.
- Severijnen AJ, van Kleef R, Hazenburg MP, van de Merwe J (1989) Cell wall fragments from major residents of the human intestinal flora induce chronic arthritis in rats. *J Rheumatol* 16, 1061-1068.
- Shanahan F (2001a) Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapies. *Gastroenterology* 120, 622-635.
- Shanahan F (2001b) Turbo probiotics for IBD. *Gastroenterology* 120, 1297-1298.
- Sheehan VM, Sleator RD, Fitzgerald GF, Hill C (2006) Heterologous expression of BetL, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl Environ Microbiol* 72, 2170-2177.
- Sheehan VM, Sleator RD, Hill C, Fitzgerald GF (2007) Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbiology* 153, 3563-3571.
- Sidhu, H., M. J. Allison, J. M. Chow, A. Clark, and A. B. Peck. 2001. Rapid reversal of hyperoxaluria in a rat model after probiotic administration of *Oxalobacter formigenes*. *J. Urol.* 166:1487-1491.

- Sidhu, H., M. E. Schmidt, J. G. Cornelius, S. Thamilselvan, S. R. Khan, A. Hesse, and A. B. Peck. 1999. Direct correlation between hyperoxaluria/oxalate stone disease and the absence of the gastrointestinal tract-dwelling bacterium *Oxalobacter formigenes*: possible prevention by gut recolonization or enzyme replacement therapy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10:S334-S340.
- Sidhu, H., S. D. Ogden, H. Y. Lung, B. G. Luttge, A. L. Baetz, and A. B. Peck. 1997. DNA sequencing and expression of the formyl coenzyme A transferase gene, *frc*, from *Oxalobacter formigenes*. *J. Bacteriol.* 179:3378-3381.
- Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, Bonnet C, Cherbut C *et al.* (2000) Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* 46, 507-514.
- Sidhu H, Allison MJ, Chow JM, Clark A, Peck AB (2001) Rapid reversal of hyperoxaluria in a rat model after probiotic administration of *Oxalobacter formigenes*. *J Urol* 166, 1487-1492.
- Simon GL, Gorbach SL (1984) Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 86, 174-193.
- Simpson PJ, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP (2005) Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *J Appl Microbiol* 99, 493-501.
- Siva, S., E. R. Barrack, G. P. Reddy, V. Thamilselvan, S. Thamilselvan, M. Menon, and M. Bhandari. 2009. A critical analysis of the role of gut *Oxalobacter formigenes* in oxalate stone disease. *BJU Int.* 103:18-21.
- Smith EA, Macfarlane GT (1996) Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effect of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J Appl Bacteriol* 81, 288-302.
- Sonnenburg JL, Angenent LT, Gordon JI (2004) Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat Immunol* 5, 569-573.
- Sonnenburg JL, Chen CT, Gordon JI (2006) Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS Biol* 4, e413.
- Stach JE, Bull AT (2005) Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 3-9.
- Stackebrandt E, Sproer C, Rainey FA, Burghardt J, Pauker O *et al.* (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47, 1134-1139.
- Stackebrandt SP (2000) The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community. Springer-Verlag, New York, NY.
- Stallmach A, Schäfer F, Hoffmann S, Weber S, Müller-Molaian I *et al.* (1998) Increased state of activation of CD4 positive T cells and elevated interferon  $\gamma$  production in pouchitis. *Gut* 43, 499-505.
- Stams AJ (1994) Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 271-294.
- Stanton, C., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and D. van Sinderen. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:198-203.
- Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI (2002) Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 15451-15455.
- Stark PL, Lee A (1982) The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J Med Microbiol* 15, 189-203.
- Stephen AM, Wiggings HS, Cummings JH (1987) Effect of changing transit time on colonic microbial metabolism in man. *Gut* 28, 601-609.

- Su P, Henriksson A, Tandianus JE, Park JH, Foong F *et al.* (2005) Detection and quantification of *Bifidobacterium lactis* LAFTIB94 in human faecal samples from a consumption trial. *FEMS Microbiol Lett* 244, 99-103.
- Suokko A, Poutanen M, Savijoki K, Kalkkinen N, Varmanen P (2008) ClpL is essential for induction of thermotolerance and is potentially part of the HrcA regulon in *Lactobacillus gasserii*. *Proteomics* 8, 1029-1041.
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40, 722-756.
- Taguchi H, Takahashi M, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A *et al.* (2002) Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, strain 6. *J Med Microbiol* 51, 336-343.
- Takahashi T, Morotomi M (1994) Absence of cholic acid 7-dehydroxylase activity in the strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *J Dairy Sci* 77, 3275-3286.
- Tan S, Seow TK, Liang RCMY, Koh S, Lee CPC *et al.* (2002) Proteome analysis of butyrate-treated human colon cancer cells (HT-29). *Int J Cancer* 98, 523-531.
- Tannock GW (1999) A fresh look at the intestinal microflora. In: Probiotics, A Critical Review, Tannock GW, ed., Horizon Scientific Press, University of Otago, Dundin, New Zealand, pp. 5-17.
- Taranto MP, Fernández-Murga ML, Lorca G, de Valdez GF (2003) Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *J Appl Microbiol* 95, 86-91.
- Taranto MP, Pérez-Martínez G, Font de Valdez G (2006) Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Res Microbiol* 157, 720-725.
- Taylor GR, Kropp KD, Molina TC (1985) Nine-year microflora study of an isolator-maintained immunodeficient child. *Appl Environ Microbiol* 50, 1349-1356.
- Teitelbaum JE, Walker WA (2002) Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr* 22, 107-38.
- Terahara M, Nishide S, Kaneko T (2000) Preventive effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the oxidation of LDL. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 1868-1873.
- Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* 41, 100-180.
- Thompson-Chagoyàn OC, Maldonado J, Gil A (2007) Colonization and impact of disease and other factors on intestinal microbiota. *Dig Dis Sci* 52, 2069-2077.
- Thorburn A, Muir J, Proietto J (1993) Carbohydrate fermentation decreases hepatic glucose output in healthy subjects. *Metabolism* 42, 780-785.
- Tiitonen K, Ouwehand AC, Rautonen N. (2009) Effect of overweight on gastrointestinal microbiology and immunology: correlation with blood biomarkers. *Br J Nutr.* Nov 24:1-9.
- Topouzian N, Joseph BJ, Bezkorovainy A (1984) Effects of various metals and calcium metabolism inhibitors on the growth of *Bifidobacterium var. pennsylvanicus*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 3, 137-142.
- Toure R, Kheadr E, Lacroix C, Moroni O, Fliss I (2003) Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* 95, 1058-1069.
- Tracy, C. R., and M. S. Pearle. 2009. Update on the medical management of stone disease. *Curr Opin. Urol.* 19:200-204.
- Tringe SG, von Mering C, Kobayashi A, Salamov AA, Chen K *et al.* (2005) Comparative metagenomics of microbial communities. *Science* 308, 554-557.
- Trovatelli LD, Crociani F, Pedinotti M, Scardovi V (1974) *Bifidobacterium pullorum* sp. nov.. A new species isolated from chicken feces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit feces. *Arch Microbiol* 98, 187-198.
- Trovatelli LD, Biavati B (1978) Esigenze nutrizionali di alcune specie del genere *Bifidobacterium*. In: Atti XVIII Cong Naz Soc It Microb Fiuggi, Giugno 1978, Lombardo ed., Roma, pp. 330-333.

- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER *et al.* (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R *et al.* (2007) The human microbiome project. *Nature* 449, 804-810.
- Turrioni, F., E. Foroni, P. Pizzetti, V. Giubellini, A. Ribbera, P. Merusi, P. Cagnasso, B. Bizzarri, G. L. de' Angelis, F. Shanahan, D. van Sinderen, and M. Ventura. 2009. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1534-1545.
- Turrioni S, Vitali B, Bendazzoli C, Candela M, Gotti R *et al.* (2007) Oxalate consumption by lactobacilli: evaluation of oxalyl-CoA decarboxylase and formyl-CoA transferase activity in *Lactobacillus acidophilus*. *J Appl Microbiol* 103, 1600-1609.
- Tynkkyinen S, Singh KV, Varmanen P (1998) Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (*van*) genes. *Int J Food Microbiol* 41, 195-204.
- Ulisse S, Gionchetti P, D'Alo S, Russo FP, Pesce I *et al.* (2001) Expression of cytokines, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinases in pouchitis: effects of probiotic treatment. *Am J Gastroenterol* 96, 2691-2699.
- Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Okada Y (1993) Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology* 79, 32-37.
- Van Leeuwen PAM, Boermeester MA, Houdijk APJ, Ferwerda ChC, Cuesta MA *et al.* (1994) Clinical significance of translocation. *Gut* 35, S28-S34.
- Van Tongeren SP, Slaets JPJ, Harmsen HJM, Welling GW (2005) Fecal microbiota composition and frailty. *Appl Environ Microbiol* 71, 6438-6442.
- Vandecasteele, S. J., W. E. Peetermans, R. Merckx, and J. Van Eldere. 2001. Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions. *J. Bacteriol.* 183:7094-7101.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3:research0034.1-0034.11.
- Vaughan EE, de Vries MC, Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans AD *et al.* (2002) The intestinal LABs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 341-352.
- Vaughan EE, Heilig HG, Ben-Amor K, de Vos WM (2005) Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol Rev* 29, 477-490.
- Venter CS, Vorster HH, Cummings JH (1990) Effects of dietary propionate on carbohydrate and lipid metabolism in healthy volunteers. *Am J Gastroenterol* 85, 549-553.
- Ventura M, Elli M, Reniero R, Zink R (2001a) Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Ecol* 36, 113-121.
- Ventura M, Reniero R, Zink R (2001b) Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach. *Appl Environ Microbiol* 67, 2760-2765.
- Ventura M, Zink R (2002) Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. *Appl Environ Microbiol* 68, 6429-6434.
- Ventura M, Meylan V, Zink R (2003a) Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences. *Appl Environ Microbiol* 69, 4296-4301.

- Ventura M, Canchaya C, Meylan V, Klaenhammer TR, Zink R (2003b) Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. *Appl Environ Microbiol* 69, 6908-6922.
- Ventura M, Zink R (2003c) Comparative sequence analysis of the *tuf* and *recA* genes and restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region sequences supply additional tools for discriminating *Bifidobacterium lactis* from *Bifidobacterium animalis*. *Appl Environ Microbiol* 69, 7517-7522.
- Ventura M, Canchaya C, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R (2004a) *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: identification of the *atp* (atpBEFHAGDC) operon and analysis of its genetic structure, characteristics, and phylogeny. *Appl Environ Microbiol* 70, 3110-3121.
- Ventura M, Canchaya C, Zink R, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2004b) Characterization of the *groEL* and *groES* loci in *Bifidobacterium breve* UCC 2003: genetic, transcriptional, and phylogenetic analyses. *Appl Environ Microbiol* 70, 6197-6209.
- Ventura M, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R (2004c) Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86, 205-223.
- Ventura M, Zink R, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2005a) Gene structure and transcriptional organization of the *dnaK* operon of *Bifidobacterium breve* UCC 2003 and application of the operon in bifidobacterial tracing. *Appl Environ Microbiol* 71, 487-500.
- Ventura M, Lee JH, Canchaya C, Zink R, Leahy S *et al.* (2005b) Prophage-like elements in bifidobacteria: insights from genomics, transcription, integration, distribution, and phylogenetic analysis. *Appl Environ Microbiol* 71, 8692-8705.
- Ventura M, Canchaya C, Bernini V, Del Casale A, Dellaglio F *et al.* (2005c) Genetic characterization of the *Bifidobacterium breve* UCC2003 *hrcA* locus. *Appl Environ Microbiol* 71, 8998-9007.
- Ventura M, Zhang Z, Cronin M, Canchaya C, Kenny JG *et al.* (2005d) The ClgR protein regulates transcription of the *clpP* operon in *Bifidobacterium breve* UCC 2003. *J Bacteriol* 187, 8411-8426.
- Ventura M, Canchaya C, Zhang Z, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2006a) How high G + C Gram-positive bacteria and in particular bifidobacteria cope with heat stress: protein players and regulators. *FEMS Microbiol Rev* 30, 734-759.
- Ventura M, Canchaya C, Del Casale A, Dellaglio F, Neviani E *et al.* (2006b) Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2783-2792.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF *et al.* (2007a) Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 495-548.
- Ventura M, O'Connell-Motherway M, Leahy S, Moreno-Munoz JA, Fitzgerald GF *et al.* (2007b) From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. *Int J Food Microbiol* 120, 2-12.
- Villa ML, Marcus R, Ramirez Delay R, Kelsey JL (1995) Factors contributing to skeletal health of postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 10, 1233-1242.
- Vincent J, Veomett R, Riley F (1959) Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *J Bacteriol* 78, 477-484.
- Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER *et al.* (2004) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* 279, 54881-54886.
- Wagner RD, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Farmer J *et al.* (1997) Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect Immun* 65, 4165-4172.
- Wang X, McCullough KD, Franke TF, Holbrook NJ (2000) Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem* 275, 14624-14631.
- Wang B, Brand-Miller J, McVeagh P, Petocz P (2001) Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *Am J Clin Nutr* 74, 510-515.

- Wang M, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G (2005) Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol* 54, 219-231.
- Ward RE, Ninonuevo M, Mills DA, Lebrilla CB, German JB (2006) In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl Environ Microbiol* 72, 4497-4499.
- Watabe J, Benno Y, Mitsuoka T (1983) *Bifidobacterium gallinarum* sp. nov.: a new species isolated from the caeca of chickens. *Int J Syst Bacteriol* 33, 127-132.
- Weber P (1999) The role of vitamins in the prevention of osteoporosis-a brief status report. *Int J Vitam Nutr Res* 69, 194-197.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14, 353-356.
- Weese, J. S., H. E. Weese, L. Yuricek, and J. Rousseau. 2004. Oxalate degradation by intestinal lactic acid bacteria in dogs and cats. *Vet. Microbiol.* 101:161-166.
- Weiffenbach JM, Baum BJ, Burghauer R (1982) Taste thresholds: quality specific variation with human aging. *J Gerontol* 37, 372-377.
- Westendorf AM, Gunzer F, Deppenmeier S, Hunger JK, Schmidt MA *et al.* (2005) Intestinal immunity of *E. coli* Nissle 1917: a safe carrier for therapeutic molecules. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43, 373-384.
- Whitehead K, Versalovic J, Roos S, Britton RA (2008) Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Appl Environ Microbiol* 74, 1812-1819.
- Williams, H. E., and L. H. Smith. 1968. Disorders of oxalate metabolism. *Am. J. Med.* 45:715-735.
- Williams PEW, Newbold CJ (1990) Rumen probiosis: the effect of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity in recent advances in animal nutrition. In: Rumen Microflora, Haresign W, Cole DJA, eds., Butterworth, London, pp. 211-227.
- Woodmansey EJ, McMurdo ME, Macfarlane GT, Macfarlane S (2004) Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiota in young adults and in non-antibiotic-treated elderly subjects. *Appl Environ Microbiol* 70, 6113-6122.
- Xiao JZ, Kondo S, Takahashi N, Miyaji K, Oshida K *et al.* (2003) Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *J Dairy Sci* 86, 2452-2461.
- Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK *et al.* (2003) A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science* 299, 2074-2076.
- Xu J, Mahowald MA, Ley RE, Lozupone CA, Hamady M *et al.* (2007) Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol* 5, 1574-1586.
- Yachi S, Loreau M (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1463-1468.
- Yamazaki S, Tsuyuki S, Akashiba H *et al.* (1991) Immune response of *Bifidobacterium*-monoassociated mice. *Bifidobacter Microflora* 10, 19-31.
- Yildirim Z, Winters DK, Johnson MG (1999) Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J Appl Microbiol* 86, 45-54.
- You HJ, Oh DK, Ji GE (2004) Anticancerogenic effect of a novel chiroinositol-containing polysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* BGN4. *FEMS Microbiol Lett* 240, 131-136.
- Younes H, Coudray C, Bellanger J, Demigne C, Rayssiguier Y *et al.* (2001) Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br J Nutr* 86, 479-485.

- Young SL, Simon MA, Baird MA, Tannock GW, Bibiloni R *et al.* (2004) Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 686-690.
- Yuan J, Zhu L, Liu X, Li T, Zhang Y *et al.* (2006) A proteome reference map and proteomic analysis of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Mol Cell Proteomics* 5, 1105-1118.
- Zhou JS, Gopal PK, Gill HS (2001) Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. *Int J Food Microbiol* 63, 81-90.
- Zoetendal EG, Akkermans AD, Akkermans-van Vliet WM, de Visser AGM, de Vos WM (2001) The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecol in Health & Disease* 13, 129-134.
- Zoetendal EG, Vaughan EE, de Vos WM (2006) A microbial world within us. *Mol Microbiol* 59, 1639-1650.

## ***APPENDICE 1***

1 **Oxalate-degrading activity in *Bifidobacterium lactis*: impact of acidic conditions on the**  
2 **transcriptional levels of oxalyl-CoA decarboxylase and formyl-CoA transferase genes**

3

4 Silvia Turrone, Claudia Bendazzoli, Samuele C. F. Dipalo, Marco Candela, Beatrice Vitali, Roberto  
5 Gotti and Patrizia Brigidi\*

6

7 Department of Pharmaceutical Sciences, University of Bologna, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna,  
8 Italy

9

10 **Running title:** Oxalate consumption in *Bifidobacterium*

11

12 **\*Corresponding author.** Mailing address: Department of Pharmaceutical Sciences, University of  
13 Bologna, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna, Italy. Phone: +39 051 2099743. Fax: +39 051 2099734.

14 E-mail: [patrizia.brigidi@unibo.it](mailto:patrizia.brigidi@unibo.it)

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

## 1 **Abstract**

2 Oxalic acid occurs extensively in nature and plays diverse roles, especially in pathological  
3 processes. Due to its highly oxidizing effects, hyper absorption or abnormal synthesis of oxalate can  
4 cause serious acute disorders in mammals and be lethal in extreme cases. Intestinal oxalate-  
5 degrading bacteria could therefore be pivotal in maintaining oxalate homeostasis, reducing the risk  
6 of kidney stone development. In particular, the potential role of probiotic *Bifidobacterium* and  
7 *Lactobacillus* strains in oxalate-related diseases has been recently evaluated. In this study, the  
8 oxalate-degrading activity of 14 bifidobacterial strains was measured by a capillary electrophoresis  
9 technique. The *oxc* gene, encoding oxalyl-CoA decarboxylase, a key enzyme in oxalate catabolism,  
10 was isolated by probing a genomic library of *B. lactis* BI07, which resulted one of the most active  
11 strains in the preliminary screening. The genetic and transcriptional organization of *oxc* flanking  
12 regions was determined, unravelling the presence of other two independently transcribed open  
13 reading frames, potentially responsible for *B. lactis* ability to degrade oxalate. Amino acid sequence  
14 analysis of the first one (ORF-1) showed a significant similarity with predicted permeases, whereas  
15 in the opposite orientation to *oxc*, a formyl-CoA transferase ortholog (ORF-4) was identified.  
16 Kinetics of oxalate consumption in different pH-controlled batch cultures and transcriptional  
17 analysis using real-time quantitative reverse transcription PCR, revealed that the *B. lactis* pre-  
18 adaptation to subinhibitory concentrations of oxalate and the subsequent exposure to an acidic  
19 environment were a prerequisite for a significant *oxc*, ORF-1 and ORF-4 gene expression induction  
20 as well as high oxalate degradation rates.

21

22

23

24

25

## 1 **Introduction**

2 Oxalate is a normal end-product of amino acid metabolism and must be excreted,  
3 predominantly via the kidney, to maintain homeostasis (21). Oxalate is also present in a wide range  
4 of foods and drinks, and the normal dietary intake is variable, ranging from 70 to 920 mg per day  
5 (22). Because of its highly oxidizing effects and the capability to combine with cations to form  
6 insoluble salts, this organic dicarboxylate is extremely toxic for most forms of life. In humans,  
7 oxalate can cause a variety of pathological disorders, including hyperoxaluria, urolithiasis,  
8 cardiomyopathy and renal failure (28, 41, 59). Hyperoxaluria is the single strongest promoter of  
9 kidney stone formation, whose medical management represents a burden to the individual patient as  
10 well as the healthcare system (50). The lack of new medications and the continued poor compliance  
11 with drug therapy have led to a growing interest in dietary manipulation and novel therapies aimed  
12 at preventing recurrent stone formation. Unfortunately, an oxalate-free diet is difficult to achieve  
13 and would probably be deficient in essential nutrients. Hence, other approaches to reduce urinary  
14 oxalate for managing stone disease have been explored.

15 The discovery of oxalate-degrading bacteria within the human gastrointestinal tract has opened  
16 the way to a flurry of research regarding their potential role in reducing urinary excretion of oxalic  
17 acid (12, 19, 20, 24, 25, 29, 30, 34, 44, 45). The first oxalate-degrading bacterium to be described  
18 was *Oxalobacter formigenes*, an obligate anaerobe which relies exclusively on oxalate metabolism  
19 for energy (2). In *O. formigenes*, oxalate is decarboxylated to give CO<sub>2</sub> and formate in a two-step  
20 pathway that is mediated by the coupled action of the enzymes formyl-CoA transferase (Frc) (6)  
21 and oxalyl-CoA decarboxylase (Oxc) (7). Frc catalyses the transfer of CoA from formate to oxalate,  
22 thus activating the oxalyl moiety for the thiamine-dependent decarboxylation mediated by Oxc.  
23 Several studies have established a direct correlation between the disappearance of *O. formigenes*  
24 from the intestinal microbiota and the appearance of hyperoxaluria symptoms, confirming its major  
25 role in maintaining oxalate homeostasis, and making it the leading probiotic candidate for the

1 management of kidney stone disease (20, 24, 25, 29, 44, 45, 50). However, the complicated growth  
2 requirements of *O. formigenes* with the need to determine the optimal dietary oxalate level required  
3 to maintain its colonization severely limited its administration (47).

4 Probiotic use of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains that metabolize oxalate might provide  
5 a valid alternative to *O. formigenes*. Bifidobacteria and lactobacilli are common inhabitants of  
6 mammalian guts including humans (55). Some strains of these genera are known to have health-  
7 promoting effects and have been added for decades as functional ingredients in food products (48).  
8 In particular, strains of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* are widely used in dairy products in  
9 North America and Europe (8), due to the several benefits associated to their administration, such as  
10 improvement of various physiological conditions, modulation of the host immune response, and  
11 reduction of certain risks that impact health (36).

12 Increasing reports documented a significant reduction in urinary oxalate levels associated with  
13 probiotic administration in both animals and humans (12, 30, 34, 39, 58), and suggested the  
14 existence of oxalate-degrading activity in *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species. Azcarate-Peril  
15 *et al.* (5) identified a cluster of genes encoding the Oxc and Frc proteins in *Lactobacillus*  
16 *acidophilus* NCFM and showed that mildly acidic conditions were a prerequisite for their  
17 transcription. Similarly, an oxalate-dependent induction of the *oxc* gene in cells first adapted to  
18 subinhibitory concentrations of oxalate and then exposed to pH 5.5 was also observed in  
19 *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 (33). Moreover, Turrone *et al.* (52) screened the oxalate-  
20 degrading ability of several lactobacilli strains isolated from functional foods and pharmaceutical  
21 preparations, and demonstrated the functionality of *L. acidophilus* LA14 Oxc and Frc in oxalate  
22 catabolism.

23 Differently, to the best of our knowledge only one study has so far investigated the potential role  
24 of *Bifidobacterium* in the human intestinal degradation of oxalate (18). In that study, the oxalate-  
25 degrading capacity of 12 bifidobacterial strains was evaluated and it was provided the first in-depth  
26 genetic and functional characterization of Oxc from *B. lactis* DSM 10140. However, until now no

1 information exists about other bifidobacterial genes potentially involved in oxalate degradation as  
2 well as their regulation at the transcriptional level under different growth conditions.

3 In the present work, a sensitive and selective capillary electrophoretic method has been applied  
4 to determine the oxalate-degrading activity in several *Bifidobacterium* strains. Among the most  
5 active strains, *B. animalis* subsp. *lactis* BI07 has been selected for further analysis. Putative genes  
6 encoding Oxc and Frc have been identified and characterized. The impact of acidic conditions on  
7 the oxalate degradation and the expression levels of these predicted genes has been evaluated.

8

## 9 **Materials and Methods**

### 10 **Bacterial strains and media**

11 Fourteen bifidobacterial strains belonging to *B. adolescentis*, *B. animalis* subsp. *lactis* (referred  
12 as *B. lactis* throughout the paper), *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. longum* biotype *longum*  
13 and *B. longum* biotype *suis* (designated *B. longum* and *B. suis* in this work, respectively) species  
14 were selected for this study (Table 1). Apart from *B. suis* ATCC 27533, all the other strains cover  
15 the range of bifidobacteria most commonly encountered in the human gut (56). *B. bifidum* S16, *B.*  
16 *catenulatum* B665 and *B. longum* S123 were isolated from human faeces, whereas *B. breve* BBSF,  
17 *B. longum* W11 and all the strains belonging to the *B. lactis* species with the exception of *B. lactis*  
18 DSM 10140, were isolated from commercial probiotic products.

19 Bifidobacteria were grown anaerobically at 37°C in the nutritionally complex medium (NCM)  
20 reported by Mlobeli *et al.* (38), containing (in grams per liter): tryptone (Oxoid, Hampshire, UK),  
21 10.0; peptone water, 5.0; yeast extract (Oxoid), 5.0; Tween 80, 0.5; NaCl, 4.5; KCl, 0.5; MgCl<sub>2</sub> ·  
22 6H<sub>2</sub>O, 0.15; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4; NH<sub>4</sub>Cl, 1.0; cysteine-HCl, 1.2. Peptone water was prepared as follows  
23 (g/l): bacteriological peptone (Oxoid), 10.0; NaCl, 5.0; Tween 80, 1.0; pH 7.2. The pH of the  
24 medium was adjusted to 6.5 before autoclaving. Solid medium was prepared by the addition of  
25 1.5% (wt/vol) agar (Oxoid) to NCM. Sucrose 20 g/l was used as energy source, sterilized

1 separately, and aseptically added to the culture medium. Anaerobic conditions were achieved in  
2 anaerobic jars supplemented with a pad of Anaerocult A (Merck, Milan, Italy).

3 *Escherichia coli* ATCC 11105 was grown at 37°C in Luria-Bertani medium with shaking.

#### 4 **Capillary electrophoresis analysis of oxalate-degrading activity and sucrose consumption in** 5 ***Bifidobacterium* strains**

6 *Bifidobacterium* strains were cultured for 5 days with 5 mM sodium oxalate. *B. lactis* DSM  
7 10140 and *E. coli* ATCC 11105 were used as positive and negative control, respectively.  
8 Uninoculated broth medium was utilized as the experimental control. Residual oxalate in bacterial  
9 culture supernatants and control broth was measured at the end of the incubation period using the  
10 capillary electrophoresis (CE) method with indirect UV absorbance detection reported by Holmes  
11 (23), slightly modified as described below.

12 Electrophoretic experiments were performed on a Biofocus 2000 apparatus (BioRad, Hercules,  
13 CA) in a polyethylenimine-coated capillary (50 µm internal diameter; 31 cm effective length). The  
14 capillary was provided by Composite Metal Service (Ilkley, UK). The coating procedure followed  
15 the method proposed by Erim *et al.* (17). The applied voltage was maintained at 20 kV (anodic  
16 detection) at a controlled temperature of 25°C. The samples, diluted 1:10 and filtered (0.45 µm  
17 filters), were injected hydrodynamically using a pressure of 2 psi × s. Ten mM sodium chromate,  
18 pH 7.7, was used as the background electrolyte; 0.2 g/l sodium sulphate was chosen as the internal  
19 standard. Detection wavelength was 254 nm.

20 Culture broth samples of *B. lactis* BI07 were taken over time and further analyzed by CE for  
21 sucrose determination. Electrophoretic separations were carried out at a constant voltage of 7 kV  
22 (anodic detection) at a controlled temperature of 25°C on a capillary of 50 µm internal diameter  
23 with an effective length of 31 cm (Composite Metal Service). The electrolyte solution developed by  
24 Jager *et al.* (27) for carbohydrate determinations in dairy products, comprising 15 mM potassium  
25 sorbate, 0.3 mM cetyl trimethyl ammonium bromide and 50 mM NaOH, pH 12, was chosen as the  
26 background electrolyte; 1.0 g/l lactose was used as the internal standard.

1 Identification of the analytes was performed by comparison of the migration times obtained in  
2 actual samples with those of standard solutions. Spiking experiments (standard addition method)  
3 confirmed the peak identity. The quantification of oxalate and sucrose was carried out by  
4 determining the corrected peak area  $A'$ , defined as the ratio between the analyte peak area and the  
5 correspondent migration time, and by comparing this ratio to that of the internal standard (sodium  
6 sulphate for oxalate and lactose for sucrose).

#### 7 **Detection of *oxc* gene in *Bifidobacterium* strains**

8 Genomic DNA of *Bifidobacterium* strains was isolated using DNeasy Blood & Tissue Kit  
9 (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

10 PCR was carried out in a Biometra Thermal Cycler T Gradient (Biometra, Göttingen, Germany)  
11 with AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) as DNA polymerase. The primer set  
12 *oxc-L/oxc-R* (Table 2), used to amplify the chromosomal DNAs, was designed by aligning the *oxc*  
13 genes from *O. formigenes* (NCBI acc. no.: M77128), and probiotic bacteria whose complete or  
14 partial genome sequences were available at the beginning of this study: *L. acidophilus* NCFM (3),  
15 *L. gasseri* ATCC 33323 (35) and *B. lactis* DSM 10140 (8).

#### 16 **Construction and screening of *B. lactis* BI07 genomic library for *oxc* gene**

17 The isolated chromosomal DNA from *B. lactis* BI07 was partially digested with the restriction  
18 enzyme *Mbo*I. DNA fragments ranging from 9 to 23 kb were isolated using a continuous sucrose  
19 gradient (10-40%) and then ligated to the Lambda EMBL3 vector *Bam*HI arms using the Lambda  
20 EMBL3/*Bam*HI Vector Kit (Stratagene, La Jolla, CA) as per manufacturer's instructions. Ligated  
21 DNA was packed *in vitro* using Gigapack III Gold-11 packaging extract provided with the kit and  
22 the library was plated on XL1-Blue MRA (P2) host strain.

23 The screening of the *B. lactis* BI07 genome library was performed by using the 1001-bp  
24 amplicon, obtained amplifying the *B. lactis* BI07 genome with the *oxc-L* and *oxc-R* primers,  
25 digoxigenin-dUTP labelled (Roche, Mannheim, Germany) following the supplier's instructions.  
26 The plaque hybridization was carried out according to standard procedures (43).

## 1 **Sequencing and analysis of the genomic DNA fragment from *oxc*-positive clones**

2 The *B. lactis* BI07 genome fragments from positive clones were amplified by using the primers  
3 EMBL3-F and EMBL3-R (Table 2), based on the cloning site flanking regions on the Lambda  
4 EMBL3 vector *Bam*HI arms. To determine the nucleotide sequence of *oxc* gene and its up- and  
5 downstream regions, a primer walking sequencing strategy was employed (Fig. 4A and Table 2).  
6 Nucleotide sequencing was performed by the dideoxy chain termination method using BigDye  
7 terminators and the ABI 3730 automated DNA sequencer (Applied Biosystems) for analysis. The  
8 primary DNA sequence data were assembled using GCG version 10 (Wisconsin package; Genetics  
9 Computer Group, Madison, WI).

10 DNA sequence analysis and similarity searches of nucleotide and protein databases were carried  
11 out using the BLAST network service (BlastN, BlastX and BlastP) (4) at the NCBI website  
12 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

13 Conserved domains in the potential proteins encoded by the open reading frames (ORFs) of  
14 interest were inferred from the amino acid sequences by using the Protein Families Database of  
15 Alignments and HMMs (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) as well as Clusters of  
16 Orthologous Groups of Proteins (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>). Membrane-spanning regions  
17 of the translated gene products were predicted by the TMPred program  
18 ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)).

19 Protein sequences obtained from the Entrez Protein Database at NCBI website were aligned and  
20 utilized to generate an unrooted phylogram tree using the neighbor-joining method (ClustalX  
21 software for multiple sequence alignments and tree calculation, and NJplot program for tree  
22 visualization) (40, 49).

## 23 **Nucleotide sequence accession numbers**

24 The sequence of the DNA fragment containing the *oxc* gene from *B. lactis* BI07 was deposited in  
25 the GenBank database under the following accession numbers: AB488699, AB488700, AB488701,  
26 AB488702 and AB488703.

## 1 **Fermentation experiments**

2 Batch fermentations were performed in 1-l stirred tank bioreactors (ADI 1025 Bio Console and  
3 ADI 1010 Bio Controller; Applikon Biotechnology, Schiedam, Netherlands) using 500 ml NCM  
4 supplemented with 20 g/l sucrose. For inoculum buildup, *B. lactis* BI07 was incubated  
5 anaerobically at 37°C for 18 h in the same culture medium and propagated twice using 2% (vol/vol)  
6 inoculum. All the fermentations were carried out anaerobically by sparging the medium with filter-  
7 sterilized nitrogen at a rate of 0.1 l/min. Temperature was kept at 37°C and constant stirring (300  
8 rpm) was applied. The initial pH value was adjusted to 6.5 and controlled through automatic  
9 addition of 4 M NaOH. Six parallel fermentation processes were performed in which, 24 h after the  
10 inoculum, the medium composition and the culture pH were modified as follows: (i) lowering of pH  
11 to 5.5 with or without addition of 5 mM sodium oxalate; (ii) lowering of pH to 4.5 with or without  
12 addition of 5 mM sodium oxalate; (iii) addition of 5 mM sodium oxalate; (iv) no variation. Each  
13 treatment was applied for 24 h. Finally, a further fermentation experiment was carried out under the  
14 following conditions: 24-h growth at pH 6.5 in presence of 5 mM sodium oxalate then addition of  
15 50 mM sodium oxalate, and lowering and maintenance of pH 4.5 for 24 h. All the fermentative  
16 parameters were controlled on-line (BioXpert Lite software; Applikon Biotechnology). Samples for  
17 further analysis were withdrawn at appropriate intervals. Each fermentation was carried out in  
18 triplicate.

19 Cellular growth was followed by optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>), plate counting on NCM agar  
20 and dry cell weight. The biomass dry weight was determined by centrifugation of 5-ml aliquots of  
21 fermentation broth. The pellets were washed twice with deionised water and dried at 80°C until  
22 constant weight.

23 Residual concentrations of oxalate were measured on the cultural supernatants by CE as reported  
24 above.

## 25 **RNA extraction and cDNA synthesis**

1 Total RNA was extracted from 1.5 ml of bacterial culture using the Illustra RNAspin Mini RNA  
2 Isolation Kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), starting with digestion of bacterial cell wall in 100  
3  $\mu$ l of 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated TE buffer containing 15 mg/ml lysozyme for 3 h  
4 at 37°C. The purified RNA was treated with DNase I on RNAspin Mini columns (GE Healthcare),  
5 and eluted in 60  $\mu$ l of RNase-free water. RNA integrity was confirmed by formaldehyde agarose gel  
6 electrophoresis according to standard procedures (43). RNA quantity ( $A_{260}$ ) and quality ( $A_{260/280}$ )  
7 were assessed by analysis with the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop  
8 Technologies, Wilmington, DE).

9 First-strand cDNA was synthesized in a total volume of 20  $\mu$ l using random hexamers and the  
10 Transcriptor Reverse Transcriptase according to the manufacturer's instructions (Transcriptor First  
11 Strand cDNA Synthesis Kit; Roche). To check for residual DNA, each RNA sample was also  
12 subjected to a cDNA synthesis reaction without addition of reverse transcriptase enzyme (NoRT).  
13 The reaction mixtures were incubated in a Biometra Thermal Cycler T Gradient (Biometra) under  
14 the following cycling conditions: 65°C for 10 min, 25°C for 10 min, 55°C for 30 min, and 85°C for  
15 5 min to inactivate the enzyme.

#### 16 **Real-time quantitative PCR**

17 Real-time quantitative PCR (qPCR) was carried out with a LightCycler system (Roche).  
18 Amplifications were performed in a 20- $\mu$ l reaction volume containing 1  $\mu$ l of cDNA template,  
19 equivalent to 50 ng RNA starting material, 4  $\mu$ l of SYBR Green PCR master mix and 500 nM  
20 concentration of the appropriate gene-specific primers (Table 2). The following cycle profile was  
21 used: one cycle at 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 s, 58°C or 60°C (only for Q/R primer  
22 set) for 25 s, 72°C for 30 s and an additional incubation step at 89°C for 5 s for fluorescence  
23 acquisition. Cycle threshold ( $C_T$ ) was defined as the first PCR cycle in which the generated  
24 fluorescence is recorded as statistically significant above background. All sample and primer  
25 combinations were assessed in triplicate. To check for background contamination or residual  
26 chromosomal DNA, each run included a negative control and a NoRT cDNA reaction. When a  $\Delta C_T$

1 > 4 between the sample and its respective NoRT was obtained, the DNA contamination level was  
2 considered negligible. Product detection and PCR specificity were checked post-amplification by  
3 examining the temperature-dependent melting curves of the PCR products.

4 cDNA products were subsequently amplified by conventional PCR using primers internal to the  
5 genes of interest. PCR products were analysed by agarose gel electrophoresis.

#### 6 **Analysis of the relative expression levels of the *oxc*, ORF-1 and ORF-4 genes**

7 To quantify the gene expression, relative quantification by means of a standard curve was used.  
8 Standard curves of the same RNA sample were registered in each qPCR run for each gene, by  
9 analysing two-fold serial dilutions of the cDNA. The amplification efficiency ( $E$ ) was calculated for  
10 each primer pair using the equation  $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$ .

11 A panel of five housekeeping genes, one gene encoding rRNA (the 16S rRNA gene) and four  
12 genes encoding mRNA (*GAPDH*, *gmk*, *recA* and *rpoB*), was evaluated for gene expression stability.  
13  $C_T$  values from the LightCycler System (Roche) were converted into relative quantities and  
14 imported into geNorm v. 3.5, a Visual Basic Application (VBA) for Microsoft Excel (54). For each  
15 housekeeping gene, the gene stability  $M$ , defined as the average pair-wise variation for a particular  
16 reference gene with all the other tested control genes, was measured. Ideally,  $M$  should be lower  
17 than or equal to 1.5, and the highest  $M$  value reflects the least stable expression level. A  
18 normalization factor (NF), based on the geometric mean of the best-performing housekeeping  
19 genes, was calculated by geNorm and applied for data processing. To determine the optimal number  
20 of genes ( $n$ ) to include in NF, the pair-wise variation  $V_{n/n+1}$  was calculated between two sequential  
21 NFs ( $NF_n$  and  $NF_{n+1}$ ). According to Vandesompele *et al.* (54), a cut-off value of 0.15, below which  
22 the inclusion of an additional control gene is not required, was considered. The relative *oxc*, ORF-1  
23 and ORF-4 expression levels were reported as relative quantity of the target gene against NF.

24 Differences between experimental conditions were assessed by the Student's  $t$ -test, using  
25 SigmaStat v. 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA), with  $P$ -values < 0.05 considered to be  
26 significant.

1

## 2 **Results**

### 3 **Oxalate-degrading activity and *oxc* gene detection in *Bifidobacterium* strains**

4 A CE technique was used for the determination of the oxalate-degrading activity in 14  
5 *Bifidobacterium* strains belonging to the human species *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B.*  
6 *catenulatum* and *B. longum*, the *B. lactis* species, widely used in dairy and pharmaceutical products,  
7 and the swine species *B. suis*. This analytical approach allowed measuring residual oxalate in the  
8 bacterial culture supernatants by means of indirect UV detection. The sensitivity data at the  
9 detection wavelength of 254 nm, estimated as LOD (S/N = 3) and LOQ (S/N = 10), were found to  
10 be 0.05 and 0.15 mM, respectively. The repeatability of the separation system was evaluated by  
11 replicated analysis of 0.25 mM oxalate; the relative standard deviation percentage (RSD%) of  
12 migration time were 1.24% (n = 5, intra-day) and 2.14% (n = 10, inter-day). The RSD% of the  
13 corrected peak area ratio (analyte to internal standard) was 2.06% (n = 5, intra-day) and it was  
14 found to be less than 4% over a two consecutive days experiment (n = 10).

15 As reported in Table 1, only the five *B. lactis* strains showed oxalate-degrading activity with  
16 100% of oxalate consumption after 5 days of incubation, whereas no degrading activity was  
17 exhibited by all the other bifidobacterial strains tested. Figure 1, showing representative  
18 electropherograms of *B. lactis* BI07 (Fig. 1A) and *B. catenulatum* B665 (Fig. 1B) culture  
19 supernatants at  $t_0$  and after 120-h growth in presence of 5 mM sodium oxalate, confirms the  
20 complete disappearance of the peak corresponding to oxalate at  $t_{120}$  only for *B. lactis*. As expected,  
21 0 and 100% oxalate degradation values were obtained for the negative (*E. coli* ATCC 11105) and  
22 positive (*B. lactis* DSM 10140) controls, respectively. The 14 *Bifidobacterium* strains were  
23 subsequently analysed in PCR for the detection of the *oxc* gene by using the *oxc-L/oxc-R* primer  
24 set, based on the *oxc* gene sequences from *O. formigenes* and probiotic bacteria with a well-

1 characterized oxalate-degrading activity. Again, only the five *B. lactis* strains gave the specific  
2 amplicon of 1001 bp (data not shown).

### 3 **Kinetic analysis of oxalate and sucrose consumption by *B. lactis* BI07**

4 The time course of oxalate degradation by *B. lactis* BI07 was determined. As shown in Figure 2,  
5 the degradation profile resulted characterized by a linear disappearance of 5 mM oxalate from the  
6 culture supernatants, reaching a residual oxalate concentration of 0.4 mM, corresponding to a 92%  
7 degradation value, after 72-h growth. *B. lactis* BI07 oxalate-degrading activity was also evaluated in  
8 the same experimental conditions except for the absence of sucrose in the culture medium  
9 composition. In this case, bifidobacteria resulted unable to grow (data not shown) as well as to  
10 utilize oxalate, as demonstrated by the recovery of almost all the oxalate added to the cultural broth  
11 at the fifth day of incubation (Fig. 2).

12 Consumption kinetics of sucrose was also analysed. The sensitivity data at the detection  
13 wavelength of 254 nm, estimated as LOD (S/N = 3) and LOQ (S/N = 10), were found to be 0.03  
14 and 0.10 mg/ml, respectively. Reproducibility of the electrophoretic system was determined on  
15 replicated injections of 0.15 mg/ml sucrose. RSD% of migration time were 1.15% (n = 5, intra-day)  
16 and 2.49% (n = 10, inter-day). The intra- and inter-day (2 days) RSD% of the corrected peak area  
17 ratio were found to be 1.49% (n = 5) and 3.37% (n = 10), respectively. The electropherograms  
18 obtained by analysing *B. lactis* BI07 culture supernatants at  $t_0$  and after incubation for 120 h with 5  
19 mM sodium oxalate, are shown in Figure 3 together with the time course of sucrose consumption. A  
20 30% degradation value of the carbon source was measured in the first 24 h of growth. From 24 to  
21 120 h of incubation, the remaining sucrose was further degraded to half the initial concentration  
22 (Fig. 3B). At the same time, the appearance of two peaks in the electropherograms, corresponding  
23 to glucose and fructose as result of sucrose breakdown, was observed (Fig. 3A). When oxalate was  
24 not added to the culture medium, a similar consumption profile for sucrose was obtained (Fig. 3B).

### 25 **Construction of a gene bank for *B. lactis* BI07 and isolation of the *oxc* gene**

1 To identify the genes potentially involved in oxalate consumption, a *Mbo*I-digested genomic  
2 library for *B. lactis* BI07 was created in Lambda EMBL3 and screened in *E. coli* XL1-Blue MRA  
3 (P2) cells. Two positive clones were identified by plaque hybridization with the digoxigenin-dUTP  
4 labelled *oxc* gene probe, and were designated F and S. Preliminary restriction enzyme analysis  
5 revealed that F contained a 10.2-kb insert and S, a 9.5-kb insert (data not shown).

#### 6 **Analysis of the 10.2-kb insert of the clone F**

7 A total of 10208 bp was sequenced from clone F by a primer walking strategy, unravelling the  
8 presence of five complete and two partial ORFs around the putative *oxc* gene (Fig. 4A). Apart from  
9 ORF-2 and -4, all the other ORFs resulted oriented in the same direction of *oxc*. Bioinformatic  
10 analysis of the 1782-bp *oxc* gene, encoding a 593-amino-acid (aa) protein ( $M_r$  63.71 kDa), revealed  
11 100% homology with the corresponding gene from *B. lactis* DSM 10140, whose complete genome  
12 has been recently sequenced (8). The function and significance of *B. lactis* DSM 10140 Oxc in  
13 oxalate catabolism have already been demonstrated (18). BlastX analysis of *B. lactis oxc* gene  
14 revealed the highest similarities to the putative oxalyl-CoA decarboxylases of *B. gallicum*, *B.*  
15 *dentium* and *B. pseudocatenulatum* (79%, 78% and 74% identity, respectively) (acc. no.:  
16 ZP\_05965188, ZP\_02917880, ZP\_03743612). High similarity scores were also found to the Oxc  
17 enzymes of several *Lactobacillus* strains (*L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L.*  
18 *reuteri* and *L. ultunensis*) (49-52% identity) (acc. no.: YP\_193318, ZP\_03995673, YP\_814095,  
19 ZP\_04006707, YP\_001271099, ZP\_04012429), as well as *E. coli* (51%) (acc. no.: NP\_416874) and  
20 *O. formigenes* (48%) (acc. no.: ZP\_04579522). The protein encoded by *oxc* has a conserved domain  
21 that is present in thiamine pyrophosphate (TPP)-requiring enzymes [acetolactate synthase, pyruvate  
22 dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboligase, phosphonopyruvate decarboxylase]  
23 (COG0028). In the *oxc* product, the N-terminal TPP-binding domain (pfam02776) starts at residue  
24 23 and spans 165 aa, the central domain (pfam00205) starts at residue 212 and spans 130 aa and the  
25 C-terminal TPP-binding domain (pfam02775) starts at residue 418 and spans 135 aa.

1 ORF-1 begins on the same strand, 104 nucleotides downstream of the *oxc* gene. The deduced  
2 protein has a theoretical  $M_r$  of 39.35 kDa and a *pI* of 8.99. Blast analysis of the 367 aa encoded by  
3 ORF-1 revealed similarities to a number of permeases, having the conserved COG0679 and  
4 pfam03547 domains. Apart from the predicted permease of *B. lactis* DSM 10140 (100% identity),  
5 the strongest of these similarities were to the putative receptors of *B. dentium*, *B.*  
6 *pseudocatenulatum* and *B. gallicum* (79-81% identity and 88-89% similarity) (acc. no.:  
7 ZP\_02917881, ZP\_03743614, ZP\_05965189). Similarity levels over 72% were detected for *L.*  
8 *acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* and *L. ultunensis* (acc. no.: YP\_193290, YP\_814096,  
9 ZP\_04006706, ZP\_04012395), whereas 49% identity was found for the putative transporter YfdV  
10 from *E. coli* (acc. no.: NP\_416873). The hydrophobicity plot of the predicted protein encoded by  
11 ORF-1 revealed the presence of ten transmembrane segments, composed of several hydrophobic  
12 residues. The transmembrane topology was predicted as N-terminus outside, with the N-terminal  
13 portion of the protein likely to be located in the extracellular space.

14 ORF-2 was identified 7 nucleotides downstream of the ORF-1 in the opposite orientation to *oxc*.  
15 The gene was predicted to encode a protein containing 43 aa and having a calculated  $M_r$  of 4740  
16 Da. Protein comparison showed a significant similarity only to a non-pfam hypothetical protein of  
17 *B. lactis* DSM 10140 (acc. no.: gblACS48365).

18 The third complete ORF, located 863 nucleotides downstream of the ORF-1 on the same strand,  
19 is 1137 bp in length encoding 378 aa ( $M_r$  40.03 kDa). At the protein level, the ORF-3 product  
20 showed the highest overall identities to the secreted beta-mannosidases of *B. lactis* (100% identity;  
21 acc. no.: YP\_002970426), *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* (50% identity; acc.  
22 no.: embICAA20610, gblAAA26710). A conserved cellulose or protein binding domain  
23 (pfam02013) is present in the C-terminal end of these proteins.

24 ORF-4, which reads divergently from the *oxc* gene, consists of 1332 bp encoding a protein of  
25 443 aa, with a deduced  $M_r$  of 48.90 kDa and a calculated *pI* of 5.03. Comparison of the predicted aa  
26 sequence to the database revealed the highest similarities to the putative formyl-CoA transferases of

1 *B. lactis* (100% identity; acc. no.: YP\_002970425), *B. dentium*, *B. gallicum* and *B.*  
2 *pseudocatenulatum* (82-87% identity, 92-95% similarity) (acc. no.: ZP\_02917882, ZP\_05965202,  
3 ZP\_03743615). Levels of identity > 63% were observed with the Frc enzymes of several  
4 lactobacilli (*L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. ultunensis*, *L. crispatus*) (acc. no.:  
5 ZP\_04006708, YP\_001271100, YP\_814094, YP\_193317, ZP\_04012428, ZP\_03995674).  
6 Additionally, the ORF-4 product exhibited 44 and 49% identity (62 and 67% similarity) with the  
7 proteins encoded by *O. formigenes frc* (acc. no.: ZP\_04579035) and *E. coli yfdW* (acc. no.:  
8 NP\_416875) genes, respectively. Analysis of the predicted protein sequence for pfam matches  
9 revealed the presence of the conserved pfam02515 domain, belonging to the third family of CoA  
10 transferases, which starts at residue 74 and spans 207 aa. As for Oxc, no regions involved in  
11 membrane sorting or anchoring were detected in the ORF-4 aa chain, suggesting its cytoplasmic  
12 localization.

13 The last complete ORF, identified upstream of *oxc* and designated ORF-7, contains 552 codons.  
14 The deduced aa sequence, with theoretical M<sub>r</sub> and pI values of 60.26 kDa and 8.98, displayed 100%  
15 identity with the voltage gated chloride channel family protein from *B. lactis* DSM 10140 (acc. no.:  
16 YP\_002970430), and significant similarities to the putative chloride channel proteins EriC from *B.*  
17 *gallicum* (49% identity; acc. no.: ZP\_05965186) and *Eggerthella lenta* (44% identity; acc. no.:  
18 ZP\_03895186). In the predicted protein sequence, a conserved domain, present in EriC proteins and  
19 involved in inorganic ion transport and metabolism, was detected (COG0038). The hydropathy plot  
20 of the ORF-7 product revealed the presence of 11 membrane-spanning regions with an inside-  
21 outside orientation.

22 Two incomplete ORFs were also identified, both on the same strand of the *oxc* gene. The first,  
23 ORF-5, contains 8 codons for the N-terminal end of a protein, which showed the highest similarity  
24 to a putative integrase of *B. lactis* DSM 10140 (83% identity; acc. no.: YP\_002970424). The  
25 second, ORF-6, located upstream of ORF-7, contains 345 aa, which exhibited 100% identity to a

1 predicted outer membrane protein involved in collagen adhesion of *B. lactis* DSM 10140 (acc. no.:  
2 YP\_002970431).

3 The comparison with other bifidobacteria revealed that the genetic organizations around the *oxc*  
4 gene are similar (Fig. 4B). Indeed, *oxc*, ORF-1 and ORF-4 are present in the same gene order in *B.*  
5 *gallicum*, *B. dentium* and *B. pseudocatenulatum*. Interestingly, in *B. gallicum* genome, the gene  
6 encoding the putative Frc is located 14 ORFs downstream on the same strand of *oxc*. The gene  
7 inventory in unrelated taxa (e.g. *Lactobacillus*, *Escherichia* and *Oxalobacter*) was shown to be  
8 different in terms of gene order and transcriptional orientation, which is in accordance with their  
9 distant phylogenetic positions. The only exception is represented by *O. formigenes* where, however,  
10 more than 500 kbp are inserted between *oxc* and ORF-4 (Fig. 4B).

11 Figure 5 shows the phylogenetic relationships of putative Oxc (Fig. 5A) and Frc (Fig. 5B) from  
12 several organisms whose protein sequences were available. As expected, the enzymes from  
13 bifidobacteria clustered together and closer to those from lactobacilli. Both trees showed that there  
14 was a division between *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains and all the other bacteria and  
15 eukaryotes taken into account, which was particularly evident for Frc.

#### 16 **Characterization of the *oxc* transcript**

17 To examine if the *oxc* gene is transcribed polycistronically, cDNA synthesized from *B. lactis*  
18 BI07 total RNA was amplified by PCR with several primer pairs that probed four different regions  
19 (Fig. 4A). Primers B and G were used to detect transcripts running from ORF-7 to *oxc*, primers F  
20 and J for transcripts running from *oxc* to ORF-1, primers I and N for transcripts running from ORF-  
21 1 to ORF-3, and the primer set O/R to determine if ORF-3 and ORF-4 were coordinately expressed  
22 on the same RNA transcript. A clear signal with the predicted product size was obtained only with  
23 primers B and G, whereas the PCR reactions amplifying the intergenic regions between *oxc* and  
24 ORF-1, and ORF-1 and ORF-3 did not yield amplicons (Fig. 6). No PCR product was obtained  
25 even with the primer pair O/R, as expected on the basis of the opposite transcriptional directions of  
26 ORF-3 and ORF-4. These results indicated that ORF-7 and *oxc* genes were present on the same

1 mRNA transcript, but the transcript did not extend downstream of *oxc*. Differently, ORF-1, ORF-3  
2 and ORF-4 were most likely transcribed independently.

### 3 **Fermentation experiments**

4 To evaluate the impact of acidic conditions on the oxalate-degrading activity of *B. lactis* BI07,  
5 pH-controlled batch cultures were carried out as previously performed by Azcarate-Peril *et al.* (5)  
6 for *L. acidophilus* NCFM. *B. lactis* BI07 was grown at pH 6.5 and after 24 h, when the culture was  
7 in exponential phase with an average specific growth rate of  $0.23 \text{ h}^{-1}$  and a biomass concentration of  
8 approximately  $9 \times 10^8$  CFU/ml ( $\text{OD}_{600} = 4$ ; dry weight = 1.5 g/l), the experimental conditions were  
9 modified. Five mM sodium oxalate was provided and the bacterial cells were exposed to pH 5.5 or  
10 4.5 or maintained at pH 6.5. As a control, fermentation experiments were repeated in absence of  
11 oxalate. Samples were collected before ( $t_0$ ) and after changing the experimental conditions, and  
12 analysed for bacterial growth and oxalate degradation.

13 As shown in Fig. 7, all the pH-controlled cultures showed a loss in viability ranging from < 1-log  
14 unit to approximately 2-log units over the 24 h following the variation of the experimental  
15 conditions. In particular, after pH shift to 5.5, the *Bifidobacterium* viable cell concentration started  
16 declining slowly. At pH 4.5, the loss in viability was preceded by an initial lag phase followed by a  
17 log-linear decline of biomass concentration. As expected, in the pH 6.5 control culture, *B. lactis*  
18 BI07 continued to grow for further 6 h with a specific growth rate of  $0.14 \text{ h}^{-1}$  before reaching the  
19 stationary phase.

20 For what concerns *B. lactis* BI07 oxalate-degrading activity, the different pH-controlled batch  
21 cultures consumed oxalate to a different extent. As reported in Table 3, a significant consumption  
22 (43%) was measured when *B. lactis* was challenged with pH 4.5, whereas negligible values of  
23 oxalate degradation were exhibited by the pH 6.5- and 5.5-controlled cultures. In terms of oxalate  
24 consumption rates, the highest value was registered during the last 18 h of fermentation at pH 4.5,  
25 with 0.1 mmol/l of oxalate degraded per h. Interestingly, when 5 mM sodium oxalate was provided,  
26 the growth kinetics of *B. lactis* BI07 resulted impaired in a different way depending on the

1 fermentation pH (Fig. 7). At pH 6.5, oxalate addition adversely affected cell viability, with a  
2 significant decline in the growth rate, whereas the exposure to increasingly acidic conditions  
3 resulted in a reduction of the viable cell number lower than that detected in absence of oxalate. The  
4 improvement in viability by oxalate provision was particularly evident in the pH 4.5-controlled  
5 batch cultures, where a cell concentration value 1-log unit higher than that found in absence of  
6 oxalate was reached at the end of the fermentation process.

7 Based on these results, a further fermentation experiment was performed by pre-adapting  
8 *Bifidobacterium* to a noninhibiting concentration of oxalate (5 mM) prior to the acid challenge. The  
9 pH shift was combined with the addition of a higher concentration of oxalate (50 mM). The  
10 protocol used was analogous to the one reported by Azcarate-Peril *et al.* (5), except for the pH value  
11 chosen (4.5 instead of 5.5). As shown in Figure 7 and Table 3, both viable cell number and oxalate-  
12 degrading activity drastically changed. Indeed, during the first 6 h after the variation of the  
13 experimental conditions a shift of the biomass concentration from  $5.5 \times 10^7$  to  $1.5 \times 10^6$  CFU/ml  
14 was registered (Fig. 7). Although the oxalate consumption percentage was equal to that determined  
15 at pH 4.5 with 5 mM oxalate, *B. lactis* BI07 pre-adapted cells degraded oxalic acid with a  
16 significantly higher rate, approaching 20-fold the corresponding value measured in absence of pre-  
17 adaptation during the first 6 h of fermentation after the pH shift (Table 3).

#### 18 **Relative expression of the *oxc*, ORF-1 and ORF-4 genes in response to pH shift and oxalate** 19 **addition**

20 The effect of the different experimental conditions on the transcriptional levels of the *B. lactis*  
21 BI07 *oxc*, ORF-1 and ORF-4 genes, potentially involved in oxalate catabolism, was investigated.  
22 To this aim, the relative abundances of gene transcripts were determined in response to pH shift and  
23 oxalate addition, following the normalization strategy based on multiple housekeeping genes,  
24 outlined by Vandesompele *et al.* (54).

25 In each qPCR run, a standard curve was used to calculate the amplification efficiency (E) for all  
26 the genes analyzed (*oxc*, ORF-1, ORF-4, 16S rRNA, *GAPDH*, *gmk*, *recA* and *rpoB*). E was > 85%

1 for the reference genes *GAPDH*, *gmk* and *recA*, whereas a slope of the standard curve of less than -  
2 4.1, indicative of  $E < 75\%$ , was obtained for 16S rRNA, *rpoB* and the target genes. The correlation  
3 coefficients were  $> 0.99$ . The reproducibility and reliability of the assay were assessed by repeating  
4 the cDNA synthesis and qPCR three times under identical conditions. The intra-assay coefficients  
5 of variation (CV) for cDNA synthesis and qPCR were about 5% and 3%, respectively. The inter-  
6 assay CVs ranged between 10% and 5%.

7 The gene expression stability measure  $M$  calculated by geNorm was 0.739 for *GAPDH*, 0.773 for  
8 *gmk*, 0.828 for *recA* and 0.841 for *rpoB*. The 16S rRNA gene resulted the worst-scoring  
9 housekeeping gene with a  $M$  value of 1.717, thus it was eliminated from the calculation of a suitable  
10 normalization factor (NF). Since the pair-wise variation between two sequential NFs containing an  
11 increasing number of genes was above the cut-off value of 0.15 proposed by Vandesompele *et al.*  
12 (54), the remaining four genes were needed as internal controls for geometric averaging.

13 In Figure 8, the normalized mRNA expression levels of the *oxc* (Fig. 8A), ORF-1 (Fig. 8B) and  
14 ORF-4 (Fig. 8C) genes at  $t_0$  and 1, 2, 4, 6 and 24 h after changing the experimental conditions in the  
15 different batch cultures are illustrated. Exponentially dividing (24 h) cells at pH 6.5 represented the  
16 control condition used for comparing the other pH-controlled batch cultures. Genes were considered  
17 to be up- or down-regulated if their relative expression levels were at least two-fold higher or lower,  
18 respectively, compared to the control sample. When 5 mM sodium oxalate was provided  
19 maintaining pH 6.5, all the three genes evaluated were expressed without considerable differences,  
20 supporting the absence of a specific effect of oxalate without lowering pH. Differently, after  
21 exposure to pH 4.5, for *oxc* (Fig. 8A) and ORF-4 (Fig. 8C), the relative expression immediately and  
22 consistently increased independently of oxalate addition. The highest expression levels, with a  
23 statistically significant average increase of 5.5-fold respect to the basal expression, were observed  
24 after 1 and 2 h in absence of oxalate, respectively for ORF-4 and *oxc*. At pH 4.5, ORF-1 transcripts  
25 were detected but their amounts were not significantly higher than those found in *B. lactis* BI07  
26 control cells (Fig. 8B). Modest levels of induction of the gene encoding the putative permease were

1 exhibited after the pH shift to 5.5 and addition of oxalate, with a mean of 2.7 at  $t_1$ . In pH 5.5-  
2 controlled batch cultures, statistically significant higher amounts of the *oxc* gene transcript were  
3 also observed (3.2 as maximal fold change). In almost all the pH-controlled batch cultures, the gene  
4 transcript levels tended to decrease over time.

5 When *Bifidobacterium* was pre-adapted to 5 mM oxalate during the first 24 h of growth, all the  
6 loci examined were highly induced. Their expression showed a maximum level (6.5 for *oxc*, 3.5 for  
7 ORF-1 and 12 for ORF-4) immediately after the variation of the experimental conditions and started  
8 to decrease already after 1 h of treatment. However, the relative amounts of all transcripts remained  
9 consistently higher than the basal expression at all time points. Statistically significant differences  
10 were observed at  $t_0$  for all genes between pre-adapted cultures and pH 4.5-controlled cultures  
11 without pre-adaptation. In all the other samples analyzed, no significant induction or repression of  
12 the *oxc*, ORF-1 and ORF-4 genes was observed.

13

## 14 **Discussion**

15 In this work, a preliminary screening concerning oxalate-degrading activity in 14  
16 *Bifidobacterium* strains belonging to seven different species was carried out by capillary  
17 electrophoresis (CE). Differently from what reported by Federici *et al.* (18), no oxalate consumption  
18 was observed for *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. longum* and *B. suis*,  
19 whereas all the *B. lactis* strains tested proved to be equally active, with 100% oxalate degradation. It  
20 is noteworthy that Federici *et al.* (18) measured the oxalate concentration using a commercial  
21 enzymatic kit with low sensitivity and specificity of analysis due to the complexity of the reaction  
22 mixture. Therefore, the differences registered in the *Bifidobacterium* oxalate degradation values can  
23 be easily explained by considering the high separation efficiency and sensitivity which characterize  
24 CE. Furthermore, only small amounts of sample and short time of analysis are required, making CE  
25 a much more suitable and reliable analytical approach respect to the conventional

1 spectrophotometric methods. Confirming our findings and in accordance with the *in silico* screening  
2 for oxalyl-CoA decarboxylase (*oxc*)-related genes in members of *Bifidobacterium* whose complete  
3 or partial genome sequences are available, among all the bifidobacteria tested the *oxc* gene was  
4 detected by PCR only in the *B. lactis* strains.

5 Owing to the high level of oxalate-degrading activity and the wide use in dairy and  
6 pharmaceutical products, *B. lactis* BI07 was selected as a model strain for further investigation. By  
7 a primer walking strategy, the 10.2-kb insert from one of the two *oxc*-positive clones of the *Mbo*I-  
8 digested genomic library, was sequenced, unravelling 100% identity with the corresponding  
9 nucleotide sequences from *B. lactis* DSM 10140 complete genome (8). Five complete and two  
10 partial ORFs around the *B. lactis* BI07 *oxc* gene were identified and functionally annotated. In  
11 particular, about 3.4 kbp downstream of the *B. lactis* *oxc* gene, the bioinformatic analysis identified  
12 the presence of a formyl-CoA transferase (*frc*) ortholog (ORF-4), strengthening the hypothesis that  
13 *B. lactis* has a mechanism of oxalate degradation similar to that of other intestinal anaerobic  
14 bacteria, such as the “specialist” *O. Formigenes*, *Eubacterium lentum* and *Providencia* sp. (42). As  
15 demonstrated for *O. formigenes* (46), the genetic analysis showed that *oxc* and *frc* in *B. lactis* BI07  
16 are not part of a polycistronic operon. Similarity searches of the *oxc* and *frc* gene sequences from *B.*  
17 *lactis* BI07 against the available partial or complete *Bifidobacterium* genomes showed that, besides  
18 *B. lactis*, only *B. gallicum*, *B. dentium* and *B. pseudocatenulatum* harbour putative *oxc* and *frc*  
19 genes. Interestingly, apart from *B. gallicum*, which appears to be exclusively associated with animal  
20 faeces (31), the other *Bifidobacterium* species with a potential oxalate-degrading activity seem to  
21 prefer a cosmopolitan lifestyle without a clear ecological specialization (31, 51). As reported for all  
22 these bifidobacterial genome sequences, an ORF encoding a putative permease (ORF-1) was  
23 identified flanking the *oxc* gene on the same strand also in *B. lactis* BI07. Although this gene  
24 product has no similarity to the *O. formigenes* oxalate:fomate antiporter protein OxIT (1), nor to the  
25 ABC transporter of *L. acidophilus* NCFM which is associated with *oxc* (5), its presence in the *oxc*  
26 surrounding regions suggests its potential role as oxalate transporter protein. However, the

1 arrangement of *oxc*, *frc* and the gene encoding the putative oxalate transporter in the *B. gallicum*, *B.*  
2 *dentium* and *B. pseudocatenulatum* genomes is resulted somewhat different from *B. lactis* with  
3 regard to gene order and orientation. In particular, *B. lactis* BI07 ORF-2 and ORF-3, located  
4 between *oxc* and *frc* orthologs, did not display a significant sequence similarity to any known genes  
5 of *Bifidobacterium*, indicating that they are either specific to *B. lactis* or yet to be determined in the  
6 other incomplete genomes. Diversely, the complete *B. lactis* ORF (ORF-7) identified upstream of  
7 *oxc*, showed 49% predicted amino acid identity to the *B. gallicum* putative chloride channel protein  
8 EriC gene, located close to *oxc* in a gene organization similar to *B. lactis*. It has been proposed that  
9 these channel proteins may function as an electrical shunt for an outwardly directed virtual proton  
10 pump that is linked to amino acid decarboxylation, allowing enteric bacteria to survive in the  
11 strongly acidic environment of the stomach (26). In this way, the persistent proton influx that arises  
12 from a high extracellular acidity could be continually counteracted in the cytoplasm by the  
13 decarboxylation-linked proton utilization. Since oxalate, after intracellular uptake and activation to  
14 oxalyl-CoA, is decarboxylated to formyl-CoA in a reaction that consumes a proton, the concerted  
15 action of permease, Oxc, Frc and EriC could allow *Bifidobacterium* to withstand acid challenges.

16 To investigate whether *B. lactis* BI07 could rely on oxalate metabolism as major energy source,  
17 its oxalate-degrading activity was determined in absence of the sugar source. In these conditions,  
18 neither *B. lactis* growth nor oxalate consumption was observed, providing evidence that oxalate  
19 cannot be used as the sole carbon source and that its metabolism is strictly dependent on the cell  
20 physiological state. Conversely, according to our data, no impact of oxalate on *B. lactis* sugar  
21 metabolism was determined.

22 The role of an acidic environment in the *B. lactis* BI07 oxalate degradation pattern was evaluated  
23 in pH-controlled batch cultures analogously to what already reported for *L. acidophilus* (5) and *L.*  
24 *gasseri* (33). Fermentation experiments indicated that only at pH 4.5 there is a significant oxalate  
25 consumption and that the degradation rate dramatically increases in oxalate pre-adapted  
26 bifidobacterial cells. Although it has been proven that *B. lactis* can survive acidic pH better than

1 other *Bifidobacterium* species (37), a key effect of fermentation pH was also observed on biomass  
2 production, as demonstrated by the marked drop in the percentage of viable cells when pH was  
3 decreased down to 5.5 and, even more, to 4.5. Interestingly, the provision of oxalate appeared to  
4 improve the *B. lactis* BI07 ability to resist the detrimental effects of acidic pH, which was  
5 particularly evident at pH 4.5.

6 For the first time, using real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR), the  
7 regulation of *B. lactis* *oxc*, *frc* and the gene encoding the putative permease was proven. To allow  
8 accurate quantification of cDNA levels and to identify real gene-specific variations, an appropriate  
9 normalization strategy using proper internal control genes is imperative. According to  
10 Vandesompele *et al.* (54), a normalization factor comprised of the most stably expressed  
11 housekeeping genes, which best accounted for the expected activity levels, was chosen. Since there  
12 is no consensus for prokaryotic endogenous control (53), five presumed housekeeping genes  
13 belonging to different functional classes, *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase),  
14 *gmk* (guanylate kinase), *recA* (recombinase A), *rpoB* (subunit beta of DNA-directed RNA  
15 polymerase) and 16S rRNA (SSU ribosome, four copies), were tested. Although 16S rRNA is  
16 among the most commonly used cellular products for transcript normalization (11), in our study the  
17 metabolic housekeeping gene transcripts were found to work best for RT-qPCR data normalization.  
18 It is well established that rRNA may constitute up to 90% of the total bacterial RNA and is not  
19 always representative of mRNA fraction (15). Further, a number of reports have shown that *rrs*  
20 transcript levels fluctuate in bacterial cells, making 16S rRNA not a suitable normalizer in all cases  
21 (53).

22 After normalization of the expression data, the *B. lactis* BI07 ORF-4, encoding the putative Frc  
23 enzyme, is resulted the most highly induced gene, exhibiting between 2.5- and 12-fold higher levels  
24 of expression in the pH 4.5-controlled batch cultures. Acidic conditions were also a prerequisite for  
25 *oxc* transcription, which was most active within 2 h after the pH shift from 6.5 to 4.5. As for *L.*  
26 *acidophilus* NCFM (5) and *L. gasseri* ATCC 33323 (33), when bifidobacterial cells were pre-

1 adapted to subinhibitory concentrations of oxalate and subsequently exposed to lower pH values  
2 plus a higher concentration of oxalic acid, the relative *oxc* and *frc* mRNA abundances were  
3 significantly increased. However, respect to lactobacilli, in *B. lactis* BI07 higher transcriptional  
4 levels have been observed and, more important, a pH value of 4.5 instead of 5.5 is resulted  
5 fundamental for gene expression as well as oxalate-degrading activity. After oxalate pre-adaptation,  
6 a lower but significant magnitude of up-regulation was also detected for ORF-1. For all the three  
7 genes, no specific effect of oxalate without lowering pH was observed. Further, decreased transcript  
8 levels were detected over time, mainly for *oxc* and *frc*, suggesting a progressive reduction of the  
9 transcriptional and metabolic activities of *B. lactis* BI07.

10 In conclusion, our results indicate that in *B. lactis* BI07 the pattern of oxalate degradation and the  
11 transcriptional activities of the genes potentially involved in oxalate catabolism, are pH dependent.  
12 The discovery of genes whose expression responds to changes in pH is particularly important. The  
13 pH of the lumen of the proximal colon is reported to be somewhat lower (5.5-6.5) than that of the  
14 distal colon (6.5-7.0), mainly as a result of the higher fermentation rate of saccharolytic microbial  
15 groups within the proximal region (14). The pH of both regions may be transiently and locally  
16 reduced following ingestion of non-digestible, but fermentable, carbohydrates (9, 10, 13). It is  
17 expected therefore that colonic pH will fluctuate according to the active fermentation of dietary  
18 substrates by the intestinal microbiota, reflecting local gradients of short chain fatty acid production  
19 and transport, and creating niches that can be exploited by more low pH-tolerant microorganisms  
20 (16). In this respect, the ability to degrade oxalate could confer a selective advantage, allowing *B.*  
21 *lactis* to endure such acid challenges, by consuming the excess of protons and maintaining the  
22 cytoplasmic pH. On the other hand, in conditions of low pH *B. lactis* could play a pivotal role in the  
23 maintenance of a safe oxalate balance through oxalate detoxification. The oxalate-degrading  
24 activity which uniquely characterizes the *B. lactis* species over the other bifidobacteria most  
25 commonly encountered in probiotic products, may justify the use of this probiotic species as a  
26 promising adjunct for the prevention and treatment of oxalate-associated disorders.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

## Acknowledgements

This work was financed by the project “Mechanisms of interaction and cell-cell communication in lactic acid bacteria from food ecosystems: transcriptomics, proteomics and metabolomics”, PRIN 2007 funds from Ministry of University and Scientific Research of Italy.

## References

1. Abe, K., Z. S. Ruan, and P. C. Maloney. 1996. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of OxIT, the oxalate:formate exchange protein of *Oxalobacter formigenes*. *J. Biol. Chem.* **271**:6789-6793.
2. Allison, M. J., K. A. Dawson, W. R. Mayberry, and J. G. Foss. 1985. *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. *Arch. Microbiol.* **141**:1-7.
3. Altermann, E., W. M. Russell, M. A. Azcarate-Peril, R. Barrangou, B. L. Buck, O. McAuliffe, N. Souther, A. Dobson, T. Duong, M. Callanan, S. Lick, A. Hamrick, R. Cano, and T. R. Klaenhammer. 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:3906-3912.
4. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
5. Azcarate-Peril, M. A., J. M. Bruno-Bárcena, H. M. Hassan, and T. R. Klaenhammer. 2006. Transcriptional and functional analysis of oxalyl-coenzyme A (CoA) decarboxylase and formyl-CoA transferase genes from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:1891-1899.
6. Baetz, A. L., and M. J. Allison. 1990. Purification and characterization of formyl-coenzyme A transferase from *Oxalobacter formigenes*. *J. Bacteriol.* **172**:3537-3540.

- 1 7. **Baetz, A. L., and M. J. Allison.** 1989. Purification and characterization of oxalyl-coenzyme A  
2 decarboxylase from *Oxalobacter formigenes*. J. Bacteriol. **171**:2605-2608.
- 3 8. **Barrangou, R., E. P. Briczinski, L. L. Traeger, J. R. Loquasto, M. Richards, P. Horvath, A.**  
4 **C. Coute-Monvoisin, G. Leyer, S. Rendulic, J. L. Steele, J. R. Broadbent, T. Oberg, E. G.**  
5 **Dudley, S. Schuster, D. A. Romero, and R. F. Roberts.** 2009. Comparison of the complete  
6 genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and B1-04. J. Bacteriol.  
7 **191**:4144-4151.
- 8 9. **Bird, A. R., M. S. Vuaran, R. A. King, M. Noakes, J. Keogh, M. K. Morell, and D. L.**  
9 **Topping.** 2008. Wholegrain foods made from a novel high-amylose barley variety (Himalaya  
10 292) improve indices of bowel health in human subjects. Br. J. Nutr. **99**:1032-1040.
- 11 10. **Bown, R. L., J. A. Gibson, G. E. Sladen, B. Hicks, and A. M. Dawson.** 1974. Effects of  
12 lactulose and other laxatives on ileal and colonic pH as measured by a radiotelemetry device.  
13 Gut **15**:999-1004.
- 14 11. **Bustin, S. A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription  
15 polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinol. **25**:169-193.
- 16 12. **Campieri, C., M. Campieri, V. Bertuzzi, E. Swennen, D. Matteuzzi, S. Stefoni, F. Pirovano,**  
17 **C. Centi, S. Ulisse, G. Famularo, and C. De Simone.** 2001. Reduction of oxaluria after an oral  
18 course of lactic acid bacteria at high concentration. Kidney Int. **60**:1097-1105.
- 19 13. **Chung, Y.-C., C.-K. Hsu, C.-Y. Ko, and Y.-C. Chan.** 2007. Dietary intake of  
20 xylooligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal moisture, and pH value in the  
21 elderly. Nutr. Res. **27**:756-761.
- 22 14. **Cummings, J. H., and G. T. Macfarlane.** 1991. The control and consequences of bacterial  
23 fermentation in the human colon. J. Appl. Bacteriol. **70**:443-459.
- 24 15. **Dennis, P. P., M. Ehrenberg, and H. Bremer.** 2004. Control of rRNA synthesis in *Escherichia*  
25 *coli*: a systems biology approach. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **68**:639-668.

- 1 16. **Duncan, S. H., P. Louis, J. M. Thomson, and H. J. Flint.** 2009. The role of pH in determining  
2 the species composition of the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* **11**:2112-2122.
- 3 17. **Erim, F. B., A. Cifuentes, H. Poppe, and J. C. Kraak.** 1995. Performance of a physically  
4 adsorbed high-molecular-mass polyethyleneimine layer as coating for the separation of basic  
5 proteins and peptides by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **708**:356-361.
- 6 18. **Federici, F., B. Vitali, R. Gotti, M. R. Pasca, S. Gobbi, A. B. Peck, and P. Brigidi.** 2004.  
7 Characterization and heterologous expression of the oxalyl coenzyme A decarboxylase gene  
8 from *Bifidobacterium lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5066-5073.
- 9 19. **Goldfarb, D. S., F. Modersitzki, and J. R. Asplin.** 2007. A randomized, controlled trial of  
10 lactic acid bacteria for idiopathic hyperoxaluria. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2**:745-749.
- 11 20. **Hatch, M., J. Cornelius, M. Allison, H. Sidhu, A. Peck, and R. W. Freel.** 2006. *Oxalobacter*  
12 sp. reduces urinary oxalate excretion by promoting enteric oxalate secretion. *Kidney Int.* **69**:691-  
13 698.
- 14 21. **Holmes, R. P.** 2000. Oxalate synthesis in humans: assumptions, problems, and unresolved  
15 issues. *Mol. Urol.* **4**:329-332.
- 16 22. **Holmes, R. P., and M. Kennedy.** 2000. Estimation of oxalate content of foods and daily oxalate  
17 intake. *Kidney Int.* **57**:1662-1667.
- 18 23. **Holmes, R. P.** 1995. Measurement of urinary oxalate and citrate by capillary electrophoresis and  
19 indirect ultraviolet absorbance. *Clin. Chem.* **41**:1297-1301.
- 20 24. **Hoppe, B., B. Beck, N. Gatter, G. von Unruh, A. Tischer, A. Hesse, N. Laube, P. Kaul, and**  
21 **H. Sidhu.** 2006. *Oxalobacter formigenes*: a potential tool for the treatment of primary  
22 hyperoxaluria type 1. *Kidney Int.* **70**:1305-1311.
- 23 25. **Hoppe, B., G. von Unruh, N. Laube, A. Hesse, and H. Sidhu.** 2005. Oxalate degrading  
24 bacteria: new treatment option for patients with primary and secondary hyperoxaluria? *Urol.*  
25 *Res.* **33**:372-375.

- 1 26. **Iyer, R., T. M. Iverson, A. Accardi, and C. Miller.** 2002. A biological role for prokaryotic ClC  
2 chloride channels. *Nature* **419**:715-718.
- 3 27. **Jager A. V., F. G. Tonin, and M. F. Tavares.** 2007. Comparative evaluation of extraction  
4 procedures and method validation for determination of carbohydrates in cereals and dairy  
5 products by capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.* **30**:586-594.
- 6 28. **James, L. F.** 1972. Oxalate toxicosis. *Clin. Toxicol.* **5**:231-243.
- 7 29. **Kaufman, D. W., J. P. Kelly, G. C. Curhan, T. E. Anderson, S. P. Dretler, G. M.**  
8 **Preminger, and D. R. Cave.** 2008. *Oxalobacter formigenes* may reduce the risk of calcium  
9 oxalate kidney stones. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**:1197-1203.
- 10 30. **Kwak, C., B. C. Jeong, J. H. Ku, H. H. Kim, J. J. Lee, C. S. Huh, Y. J. Baek, and S. E. Lee.**  
11 2006. Prevention of nephrolithiasis by *Lactobacillus* in stone-forming rats: a preliminary study.  
12 *Urol. Res.* **34**:265-270.
- 13 31. **Lamendella, R., J. W. Santo Domingo, C. Kelty, and D. B. Oerther.** 2008. Bifidobacteria in  
14 feces and environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:575-584.
- 15 32. **Langendijk, P. S., F. Schut, G. J. Jansen, G. C. Raangs, G. R. Kamphuis, M. H. Wilkinson,**  
16 **and G. W. Welling.** 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium*  
17 spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl.*  
18 *Environ. Microbiol.* **61**:3069-3075.
- 19 33. **Lewanika, T. R., S. J. Reid, V. R. Abratt, G. T. Macfarlane, and S. Macfarlane.** 2007.  
20 *Lactobacillus gasseri* Gasser AM63(T) degrades oxalate in a multistage continuous culture  
21 simulator of the human colonic microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* **61**:110-120.
- 22 34. **Lieske, J. C., D. S. Goldfarb, C. De Simone, and C. Regnier.** 2005. Use of a probiotic to  
23 decrease enteric hyperoxaluria. *Kidney Int.* **68**:1244-1249.
- 24 35. **Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavolv, N.**  
25 **Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S.**  
26 **Lucas, K. Huang, D. M. Goldstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y.**

- 1     **Goh, A. Benson, K. Baldwin, J.-H. Lee, I. Diaz-Muniz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter,**  
2     **R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne,**  
3     **D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu,**  
4     **M. Saier, T. Klaenhammer, P. Richardson, S. Kozyavkin, B. Weimer, and D. Mills.** 2006.  
5     Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:15611-15616.
- 6   36. **Marco, M. L., S. Pavan, and M. Kleerebezem.** 2006. Towards understanding molecular modes  
7     of probiotic action. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**:204-210.
- 8   37. **Maus, J. E., and S. C. Ingham.** 2003. Employment of stressful conditions during culture  
9     production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.*  
10    **95**:146-154.
- 11 38. **Mlobeli, N. T., N. A. Gutierrez, and I. S. Maddox.** 1998. Physiology and kinetics of  
12     *Bifidobacterium bifidum* during growth on different sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*  
13     **50**:125-128.
- 14 39. **Murphy, C., S. Murphy, F. O'Brien, M. O'Donoghue, T. Boileau, G. Sunvold, G. Reinhart,**  
15     **B. Kiely, F. Shanahan, and L. O'Mahony.** 2009. Metabolic activity of probiotics-Oxalate  
16     degradation. *Vet. Microbiol.* **136**:100-107.
- 17 40. **Perrière, G., and M. Gouy.** 1996. WWW-Query: An on-line retrieval system for biological  
18     sequence banks. *Biochimie* **78**:364-369.
- 19 41. **Rodby, R. A., T. S. Tyazka, and J. W. Williams.** 1991. Reversal of cardiac dysfunction  
20     secondary to type I primary hyperoxaluria after combined liver-kidney transplantation. *Am. J.*  
21     *Med.* **90**:498-504.
- 22 42. **Sahin, N.** 2003. Oxalotrophic bacteria. *Res. Microbiol.* **154**:399-407.
- 23 43. **Sambrook, J. E., F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,*  
24     2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- 1 44. **Sidhu, H., M. J. Allison, J. M. Chow, A. Clark, and A. B. Peck.** 2001. Rapid reversal of  
2 hyperoxaluria in a rat model after probiotic administration of *Oxalobacter formigenes*. *J. Urol.*  
3 **166**:1487-1491.
- 4 45. **Sidhu, H., M. E. Schmidt, J. G. Cornelius, S. Thamilselvan, S. R. Khan, A. Hesse, and A. B.**  
5 **Peck.** 1999. Direct correlation between hyperoxaluria/oxalate stone disease and the absence of  
6 the gastrointestinal tract-dwelling bacterium *Oxalobacter formigenes*: possible prevention by gut  
7 recolonization or enzyme replacement therapy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**:S334-S340.
- 8 46. **Sidhu, H., S. D. Ogden, H. Y. Lung, B. G. Luttge, A. L. Baetz, and A. B. Peck.** 1997. DNA  
9 sequencing and expression of the formyl coenzyme A transferase gene, *frc*, from *Oxalobacter*  
10 *formigenes*. *J. Bacteriol.* **179**:3378-3381.
- 11 47. **Siva, S., E. R. Barrack, G. P. Reddy, V. Thamilselvan, S. Thamilselvan, M. Menon, and M.**  
12 **Bhandari.** 2009. A critical analysis of the role of gut *Oxalobacter formigenes* in oxalate stone  
13 disease. *BJU Int.* **103**:18-21.
- 14 48. **Stanton, C., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and D. van Sinderen.** 2005. Fermented functional  
15 foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**:198-203.
- 16 49. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins.** 1997. The  
17 CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by  
18 quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**:4876-4882.
- 19 50. **Tracy, C. R., and M. S. Pearle.** 2009. Update on the medical management of stone disease.  
20 *Curr. Opin. Urol.* **19**:200-204.
- 21 51. **Turroni, F., E. Foroni, P. Pizzetti, V. Giubellini, A. Ribbera, P. Merusi, P. Cagnasso, B.**  
22 **Bizzarri, G. L. de'Angelis, F. Shanahan, D. van Sinderen, and M. Ventura.** 2009. Exploring  
23 the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl. Environ.*  
24 *Microbiol.* **75**:1534-1545.
- 25 52. **Turroni, S., B. Vitali, C. Bendazzoli, M. Candela, R. Gotti, F. Federici, F. Pirovano, and P.**  
26 **Brigidi.** 2007. Oxalate consumption by lactobacilli: evaluation of oxalyl-CoA decarboxylase and

- 1 formyl-CoA transferase activity in *Lactobacillus acidophilus*. J. Appl. Microbiol. **103**:1600-  
2 1609.
- 3 53. **Vandecasteele, S. J., W. E. Peetermans, R. Merckx, and J. Van Eldere.** 2001. Quantification  
4 of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR  
5 during in vitro growth and under different conditions. J. Bacteriol. **183**:7094-7101.
- 6 54. **Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F.**  
7 **Speleman.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric  
8 averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. **3**:research0034.1-0034.11.
- 9 55. **Ventura, M., S. O'Flaherty, M. J. Claesson, F. Turrone, T. R. Klaenhammer, D. van**  
10 **Sinderen, and P. W. O'Toole.** 2009. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria:  
11 probiogenomics. Nat. Rev. Microbiol. **7**:61-71.
- 12 56. **Ventura, M., M. O'Connell-Motherway, S. Leahy, J. A. Moreno-Munoz, G. F. Fitzgerald,**  
13 **and D. van Sinderen.** 2007. From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. Int. J.  
14 Food Microbiol. **120**:2-12.
- 15 57. **Vitali B., S. Turrone, F. Dal Piaz, M. Candela, V. Wasinger, and P. Brigidi.** 2007. Genetic  
16 and proteomic characterization of rifaximin resistance in *Bifidobacterium infantis* BI07. Res.  
17 Microbiol. **158**:355-362.
- 18 58. **Weese, J. S., H. E. Weese, L. Yuricek, and J. Rousseau.** 2004. Oxalate degradation by  
19 intestinal lactic acid bacteria in dogs and cats. Vet. Microbiol. **101**:161-166.
- 20 59. **Williams, H. E., and L. H. Smith.** 1968. Disorders of oxalate metabolism. Am. J. Med. **45**:715-  
21 735.
- 22
- 23
- 24
- 25

## 1 **Figure legends**

2

3 **Figure 1.** Electropherograms of *B. lactis* BI07 (A) and *B. catenulatum* B665 (B) culture  
4 supernatants at  $t_0$  and after 120-h incubation ( $t_{120}$ ) with 5 mM sodium oxalate. (1), (2) and (IS)  
5 indicate the negative peaks of chloride ions, oxalate and internal standard, respectively.

6

7 **Figure 2.** Degradation kinetics of oxalate by *B. lactis* BI07 in presence (▲) and in absence (■) of  
8 20 g/l sucrose in the culture medium. The negative peak areas of oxalate detected by capillary  
9 electrophoresis are plotted over 5 days of incubation with 5 mM sodium oxalate. Each point  
10 represents the mean of three independent experiments. The error bars indicate standard deviations.

11

12 **Figure 3.** Sucrose consumption by *B. lactis* BI07. (A) Electropherograms of culture supernatants at  
13  $t_0$  and after 120-h incubation ( $t_{120}$ ) with 20 g/l sucrose. (1), (2), (3) and (IS) indicate the negative  
14 peaks of glucose, fructose, sucrose and internal standard, respectively. (B) Time course of carbon  
15 source consumption in presence (▲) and in absence (■) of 5 mM sodium oxalate. The negative  
16 peak areas of sucrose detected by capillary electrophoresis are plotted over 5 days of incubation  
17 with 20 g/l sucrose. Each point represents the mean of three independent experiments. The error  
18 bars indicate standard deviations.

19

20 **Figure 4.** Genetic organization around the *oxc* gene in *B. lactis* BI07 (A) and comparison with the  
21 corresponding loci in bifidobacteria, lactobacilli, *E. coli* and *O. formigenes* (B). A through T,  
22 primers A through T used for primer walking (Table 2). Each arrow indicates an ORF, and the  
23 length of the arrow is proportional to the length of the predicted ORF. Levels of amino acid  
24 identity, expressed as percentage, are shown.

25

1 **Figure 5.** Unrooted phylogram tree of oxalyl-CoA decarboxylase (A) and formyl-CoA transferase  
2 (B) sequences from diverse organisms. Multiple sequence alignments and phylogenetic tree  
3 calculations were performed by ClustalX. NJplot program was used to display the trees. The scale  
4 bars indicate phylogenetic distances. The organisms used were: *B. lactis* BI07, *B. gallicum* DSM  
5 20093, *B. dentium* ATCC 27678, *B. pseudocatenulatum* DSM 20438, *L. gasseri* ATCC 33323, *L.*  
6 *johnsonii* ATCC 33200, *L. reuteri* DSM 20016, *L. acidophilus* NCFM, *L. ultunensis* DSM 16047,  
7 *L. crispatus* JV-V01, *O. formigenes* OXCC13, *E. coli* K-12, *Acetobacter aceti* 1023, *Streptomyces*  
8 *sviceus* ATCC 29083, *Mycobacterium smegmatis* MC2 155, *Providencia rettgeri* DSM 1131,  
9 *Polynucleobacter necessarius* QLW-P1DMWA-1, *Burkholderia xenovorans* LB400, *Polaromonas*  
10 sp. JS666, *Ralstonia eutropha* JMP134, *Xanthobacter autotrophicus* Py2, *Oligotropha*  
11 *carboxidovorans* OM5, *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831, *Bradyrhizobium japonicum*  
12 USDA 110, *Alpha proteobacterium* BAL199, *Roseovarius* sp. 217, *Vitis vinifera*, *Arabidopsis*  
13 *thaliana* and *Xenopus tropicalis*.

14

15 **Figure 6.** RT-PCR analysis of the transcriptional organization around the *oxc* gene in *B. lactis*  
16 BI07. G, positive genomic DNA control; +, first-strand cDNA generated by RT reaction; -, negative  
17 control reaction lacking RT enzyme. For cDNA synthesis, total RNA extracted from *B. lactis* BI07  
18 cells grown in a batch fermentor at pH 6.5 for 24 h was used as a template. B, F, G, I, J, N, O, R,  
19 primers used for RT-PCR (Table 2). M, molecular weight marker (M1: Lambda  
20 DNA/*EcoRI*+*HindIII*; M2: Lambda DNA/*HindIII*; M-Medical Fermentas, Milan, Italy). Expected  
21 size of amplicons is indicated each side in bp.

22

23 **Figure 7.** *B. lactis* BI07 viability in different pH-controlled batch fermentations after changing the  
24 experimental conditions. After 24-h growth at pH 6.5, the fermentation pH was lowered to 5.5 or  
25 4.5 or maintained at 6.5 with or without simultaneous addition of 5 mM sodium oxalate. In the last  
26 batch fermentation, *Bifidobacterium* was pre-adapted to 5 mM sodium oxalate during the first 24 h

1 and then exposed to pH 4.5 and a 10-time higher concentration of oxalic acid. Each treatment was  
2 applied for 24 h.

3

4 **Figure 8.** Relative expression levels of the *oxc* (A), ORF-1 (B) and ORF-4 (C) genes of *B. lactis*  
5 BI07 in different pH-controlled batch cultures at 0, 1, 2, 4, 6 and 24 h after the variation of the  
6 experimental conditions. The gene transcript amounts were normalized against four housekeeping  
7 genes (*GAPDH*, *gmk*, *recA* and *rpoB*), and compared to the control culture represented by  
8 exponentially dividing cells at pH 6.5. Along the Y axis, the variations in terms of culture pH and  
9 oxalate concentration applied after 24-h growth at pH 6.5 are indicated. In the last batch  
10 fermentation, *Bifidobacterium* was pre-adapted to 5 mM sodium oxalate during the first 24 h and  
11 then exposed to pH 4.5 and a 10-time higher concentration of oxalic acid. \*,  $P < 0.05$ .

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **TABLE 1.** *Bifidobacterium* spp. included in the present study and  
 2 their oxalate-degrading activity

Species/strains	Oxalate degradation %
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	0
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 10140, BA30, Bb12, BI07, L15	100
<i>B. bifidum</i> S16	0
<i>B. breve</i> ATCC 15700, BBSF	0
<i>B. catenulatum</i> B665	0
<i>B. longum</i> biotype <i>longum</i> S123, ATCC 15707, W11	0
<i>B. longum</i> biotype <i>suis</i> ATCC 27533	0
<i>E. coli</i> ATCC 11105	0

3 ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, MD); DSM,  
 4 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH  
 5 (Braunschweig, Germany); B, L, S and W, our collection.

6  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19

**TABLE 2.** Oligonucleotides used in this study

Primers	Nucleotide sequence (5'-3')	Purpose
oxc-L	GCTACCACGAACTGCTTCCC	PCR
oxc-R	CCCATAACGCCCAAGTACC	PCR
EMBL3-F	TTATGCCCCGAGAAGATGTTGA	Sequencing
EMBL3-R	TATACATGGTTCTCTCCAGAG	Sequencing
A	TCGCTTTCGCGCACCTGTATT	Primer walking
B	TCGCGAACTGCGCATTCCGT	Primer walking
C	TCATGCGCGCAATCACCGATT	Primer walking
D	TGGGTGGTTGTTCGGTGGTCT	Primer walking
E	ATGAGCGTCTCGGCGAGGTA	Primer walking
F	GGTCACTGATTTTCGCACGTAT	Primer walking and RT-qPCR
G	TCGGTCTTCTCGACGAATTCA	Primer walking and RT-qPCR
H	ACCGCGAACCCCTACCTCAA	Primer walking
I	AAGCGGCCGTATGCGCGTTGAT	Primer walking and RT-qPCR
J	GAGATGATGATGCCGGAGAATGC	Primer walking and RT-qPCR
K	CGCCTGCGTAATTTGGGACA	Primer walking
L	TACGCAGCGACAGGCACCAT	Primer walking
M	ACCAGCTCGATCGGGGATAT	Primer walking
N	CGACTTGCCTCGTTGACGAT	Primer walking
O	CGACGATCATGAGCTACACCAA	Primer walking
P	GAAGCTCGGCGAGAACAA	Primer walking
Q	ATCGGTCTCCCAGCCCTT	Primer walking and RT-qPCR
R	CGTGTACCAGTCCATGCAGAA	Primer walking and RT-qPCR
S	GGCCAACAAGATACGGGAAA	Primer walking
T	GTGTGGACGGTGACGTAGATT	Primer walking
Bif164 <sup>a</sup>	GGGTGGTAATGCCGGATG	RT-qPCR
Bif662 <sup>a</sup>	CCACCGTTACACCGGGAA	RT-qPCR
GAPDH-L	CTCGAGTGCACCGGCTTCTA	RT-qPCR
GAPDH-R	TGAAGCCGTA CTCTCGTTGTCGTA	RT-qPCR
gmk-L	TGGGTTTCGGTCTCCGCCAC	RT-qPCR
gmk-R	AGCTCCACCTTCGCGGTCTC	RT-qPCR
recA-L	ACGGCCATCTTCATCAACCAG	RT-qPCR
recA-R	GGTGAACCAAGAACCGGACTT	RT-qPCR
rpoB-L <sup>b</sup>	CCAGGTCGGCGAGCTGAT	RT-qPCR
rpoB-R <sup>b</sup>	TACGGGGTCTCGATGAAGC	RT-qPCR

2 RT-qPCR, real-time quantitative reverse transcription PCR.

3 <sup>a</sup>, Langengijk *et al.* (32).

4 <sup>b</sup>, Vitali *et al.* (57).

5

6

1 **TABLE 3.** *B. lactis* BI07 oxalate-degrading activity in  
 2 different pH-controlled batch fermentations

Experimental conditions <sup>a</sup>	Oxalate degradation (%)	Oxalate degradation rate (mmol/l/h) <sup>b</sup>	
		1	2
		pH 6.5 + 5 mM oxa	6
pH 5.5 + 5 mM oxa	12	0.05	0.01
pH 4.5 + 5 mM oxa	43	0.04	0.10
pH 4.5 + 50 mM oxa	43	0.85	0.74

3 <sup>a</sup>, variations in terms of culture pH and oxalate  
 4 concentration applied after 24-h growth at pH 6.5. In the  
 5 last batch fermentation, *B. lactis* BI07 was pre-adapted to  
 6 5 mM sodium oxalate during the first 24 h and then  
 7 exposed to pH 4.5 and a 10-time higher concentration of  
 8 oxalic acid.

9 <sup>b</sup>, oxalate consumption rate calculated during the first 6 h  
 10 (1) and in the last 18 h of fermentation (2) after changing  
 11 the experimental conditions.

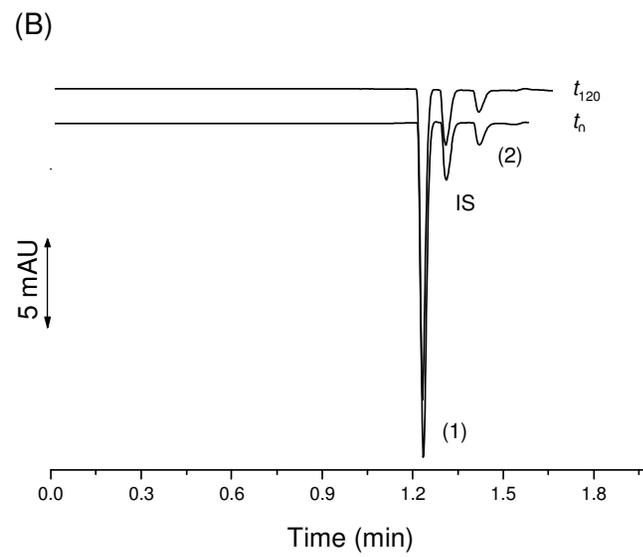
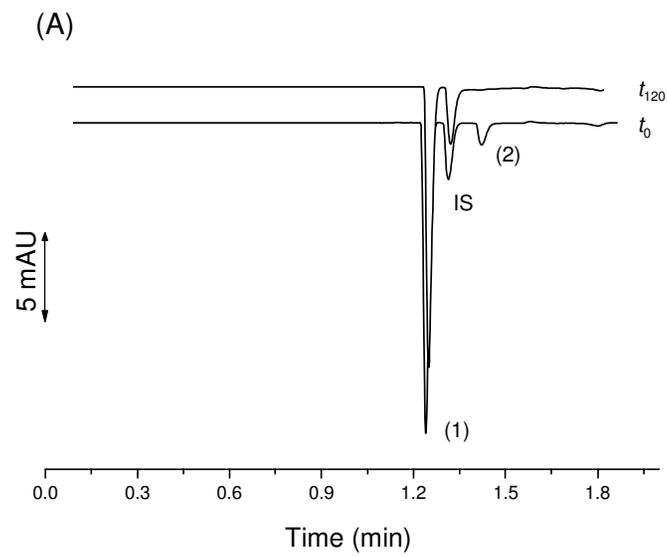


Figure 1

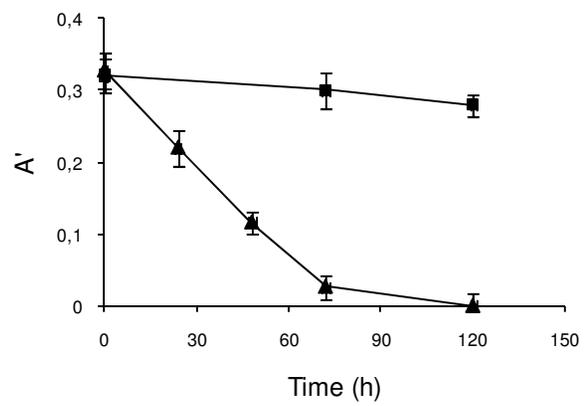


Figure 2

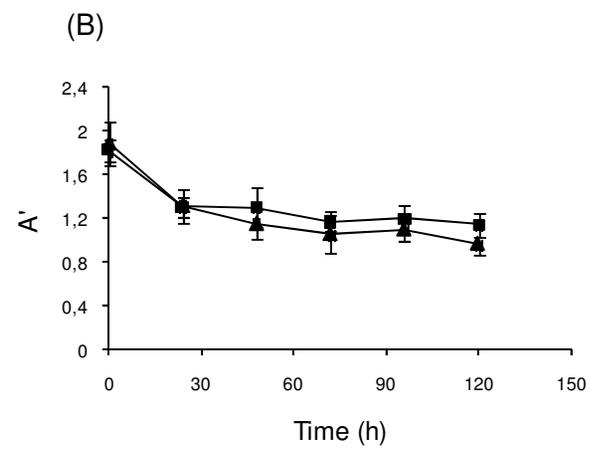
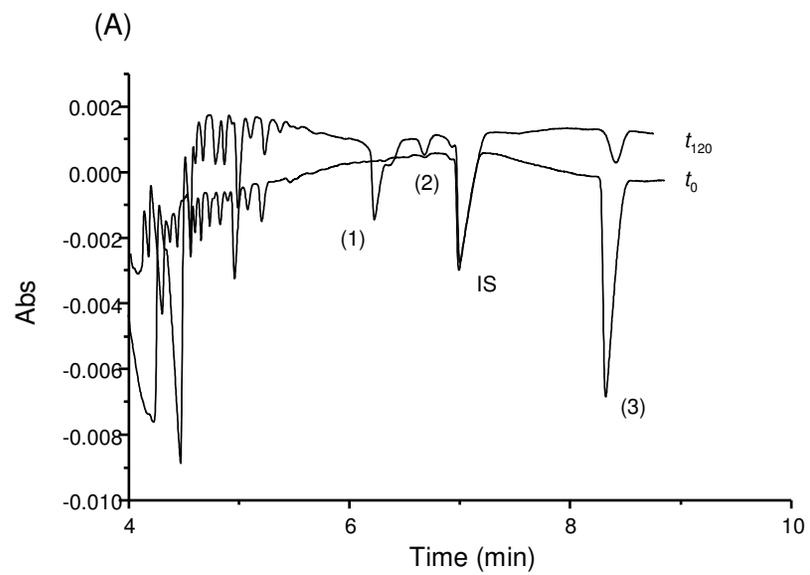


Figure 3

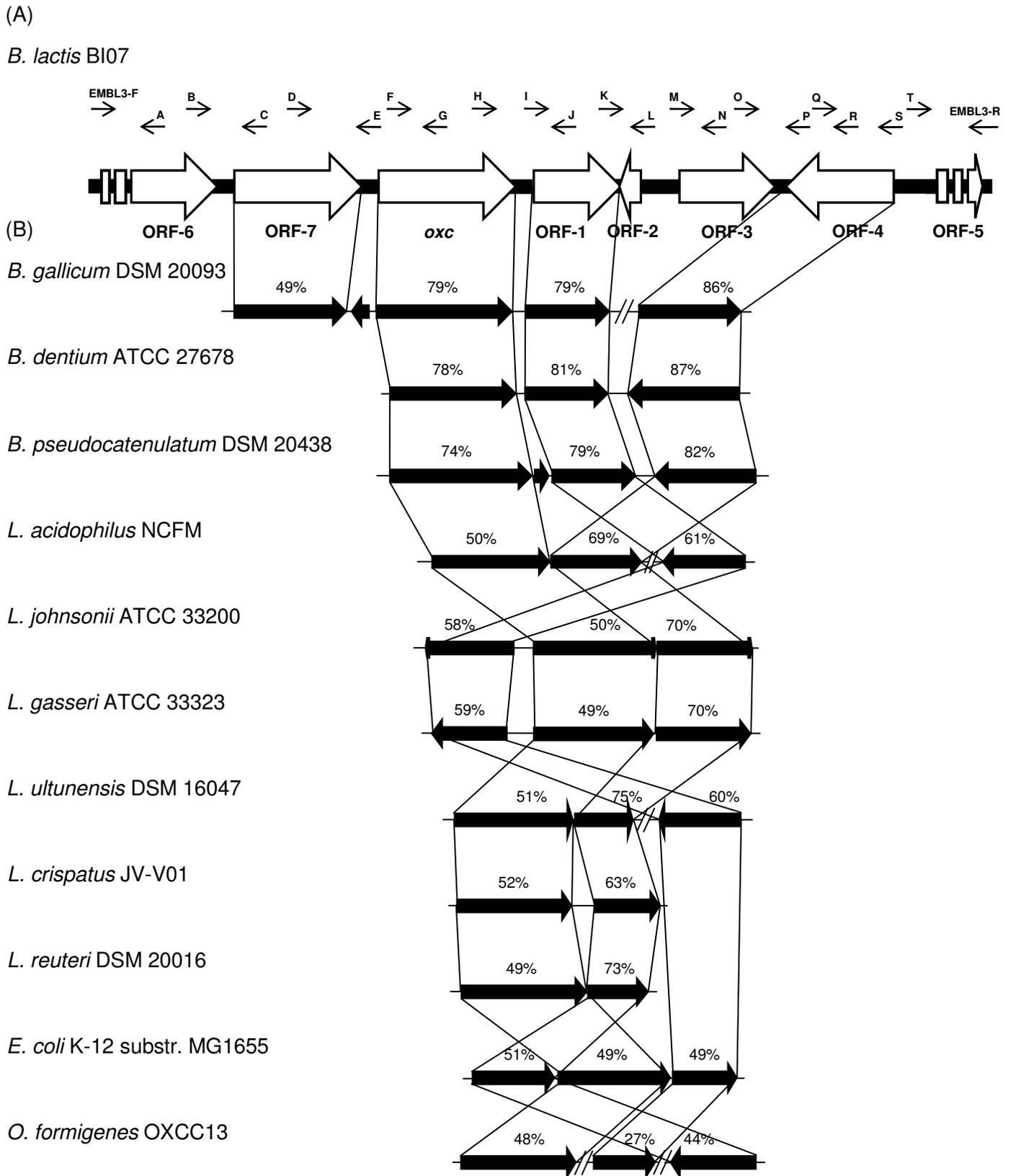


Figure 4



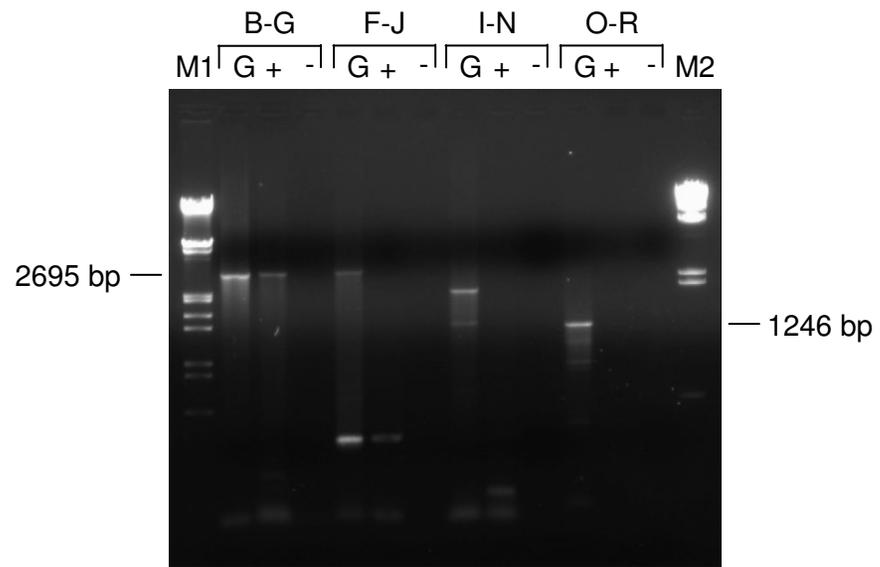


Figure 6

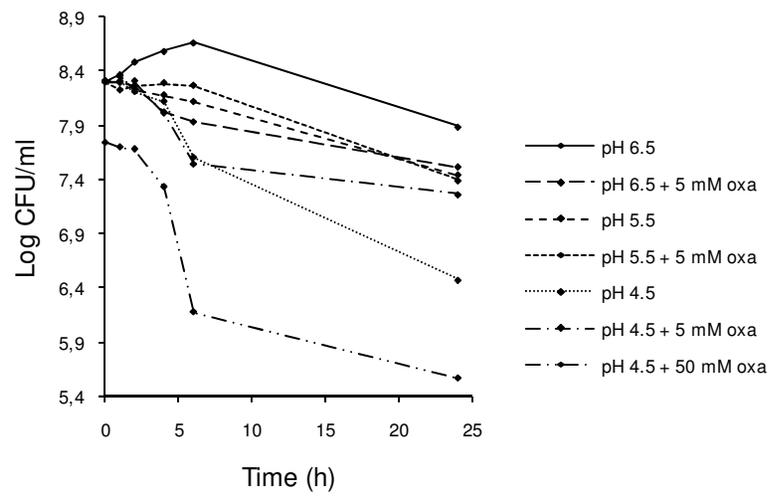


Figure 7

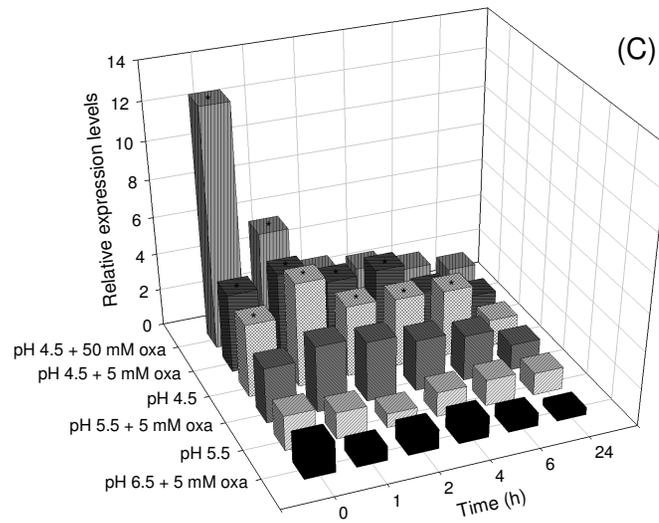
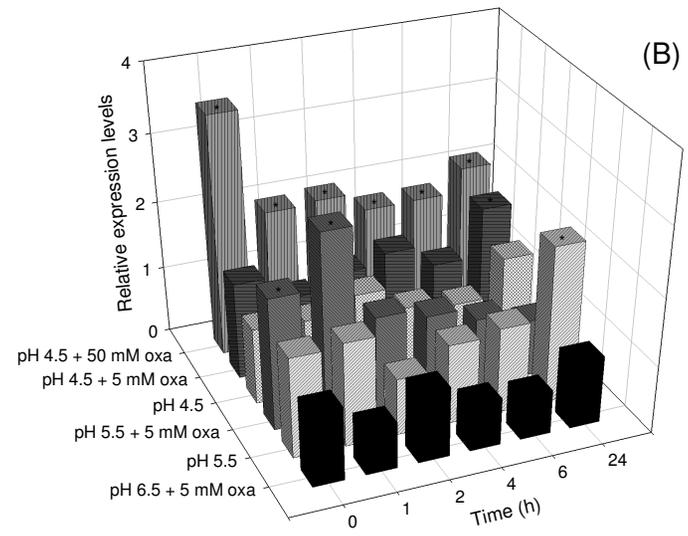
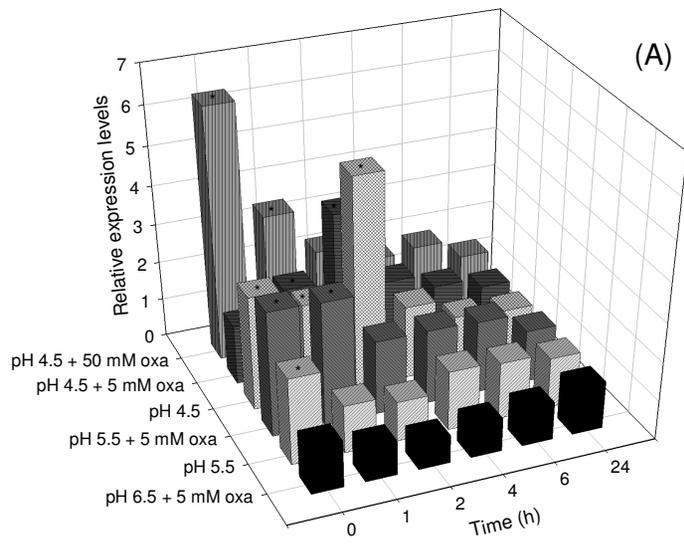


Figure 8

## ***APPENDICE 2***

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Microbiological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jmicmeth](http://www.elsevier.com/locate/jmicmeth)

## Note

Rapid MALDI-TOF-MS analysis in the study of interaction between whole bacterial cells and human target molecules: Binding of *Bifidobacterium* to human plasminogen

Marco Candela, Jessica Fiori, Samuele Dipalo, Marina Naldi, Roberto Gotti, Patrizia Brigidi\*

Department of Pharmaceutical Sciences, University of Bologna, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna, Italy  
 CIRB-CRBA Proteomic Facility Services, University of Bologna, Bologna, Italy

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 November 2007  
 Received in revised form 20 February 2008  
 Accepted 25 February 2008  
 Available online 6 March 2008

## Keywords:

Bacteria–host interaction  
 Molecular cross-talk  
 MALDI-TOF  
 Plasminogen-binding  
*Bifidobacterium*

## ABSTRACT

MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight)—mass spectrometry has been applied, for the first time, in the investigation of whole *Bifidobacterium* cells–host target proteins interaction. In particular, by means of this technique, a dose dependent human plasminogen-binding activity has been shown for *Bifidobacterium*. The involvement of lysine binding sites on the bacterial cell surface has been proved. The obtained result was found to be consistent with that from well-established standard methodologies, thus the proposed MALDI-TOF approach has the potential to enter as a fast alternative method in the field of biorecognition studies involving in bacterial cells and proteins of human origin.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Bacteria can live in intimate association with humans (Ochman and Moran, 2001) and, regardless of the symbiotic or pathogenic nature of the relation, the interactions with microorganisms affect human biology in a deep way and exert important influences on human health (Backhed et al., 2005; Collier-Hyams and Neish, 2005; Sasakawa and Hacker, 2006). One of the primary aims of cellular microbiology is the study of the interaction between bacteria and host proteins (Neish, 2002; Roux et al., 2004). For pathogens, as well as for symbionts, the binding to protein receptors on the host cell surface, or the interaction with proteins of the extracellular matrix, triggers the attachment to host target cells and represents a crucial step in the early stages of the colonization establishment (Hentschel et al., 2000; Hammerschmidt, 2006; Pizarro-Cerda and Cossart, 2006). Until now the interaction between bacteria and host protein targets has been commonly studied by using radiolabelled compounds or by immunological methods such as: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and blot overlay assay (Candela et al., 2007; Giomarelli et al., 2006; Bergmann et al., 2001; Lahteenmaki et al., 1995). Even if absolutely reliable, such methodologies are laborious, time consuming and expensive. Recently, the direct analysis of whole bacterial cells by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) has been applied to a rapid identification of microorganisms (Mandrell et al., 2005; Meetani et al., 2005; Donohue et al., 2006). In this study we developed a new rapid MALDI-TOF based approach to investigate the interaction between whole bacterial cells and host molecular targets.

In a previous paper (Candela et al., 2007) we studied the interaction between *Bifidobacterium*, an important health-promoting genus of the human intestinal microbiota (Klijn et al., 2005), and human plasminogen (Plg), the monomeric proenzyme of the serine protease plasmin (Collen and Verstraete, 1975), by flow cytometry. Here we investigate the interaction between three bifidobacterial strains and human Plg by using a new rapid MALDI-TOF based approach. *B. lactis* B107, *B. bifidum* S16, and *B. longum* S123 were grown until stationary phase (18 h) in MRS medium (Difco) supplemented with 0.05% (wt/vol) L-cysteine at 37 °C in anaerobic conditions. After washing in phosphate-buffered saline (PBS),  $1 \times 10^9$  CFU of each strain were incubated with 0, 10, 20, 50, 100 µg of human Plg (Sigma–Aldrich), respectively, as reported by Candela et al., 2007. Subsequently, bifidobacteria strains were washed three times with PBS to remove unbound Plg. After washing, bacterial cells were resuspended in 20 µL NH<sub>4</sub>Cl 2% for MALDI-TOF analysis. In order to detect Plg recruited on the bacterial cell surface, 1.0 µL of each bacterial suspension was spotted, airdried, and then overlaid with 1.0 µL of matrix solution (12.5 mg/mL ferulic acid in a mixture of formic acid/ acetonitrile/water 17:33:50). The resulting droplet was left to crystallize by airdrying and analyzed in a Voyager DE Pro (Applied Biosystem, Foster City, CA) MALDI-TOF mass spectrometer operating in linear positive ion mode in the range of 20000–100000 Da and equipped with a pulsed N<sub>2</sub> laser at 337 nm. Default operating conditions were as follows: accelerating voltage 25,000 V, grid voltage 22,500 V, extraction delay time 750 ns. All acquisitions were generated automatically on the instrument software (Voyager™, Biospectrometry Workstation) using a random search pattern mode and based on overaging 1600 shots from 20 non-overlapping positions (80 shots/position). Data were externally calibrated with the standard bovine serum albumine (BSA) solution

\* Corresponding author. Department of Pharmaceutical Sciences, University of Bologna, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna, Italy. Tel.: +390512099743; fax: +390512099734.  
 E-mail address: [patrizia.brigidi@unibo.it](mailto:patrizia.brigidi@unibo.it) (P. Brigidi).

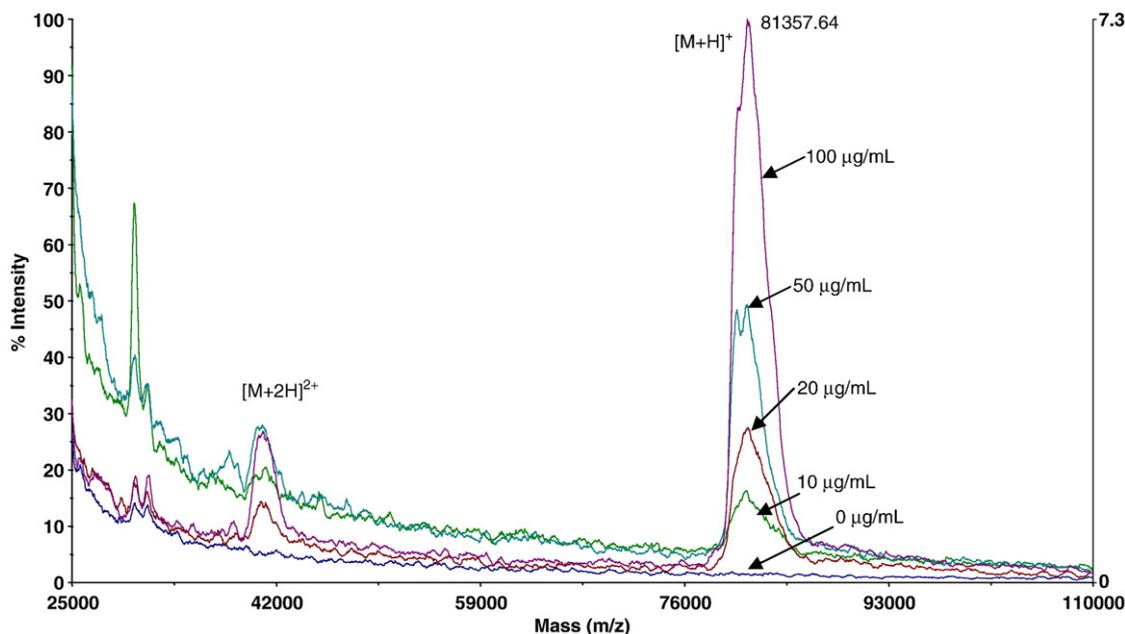


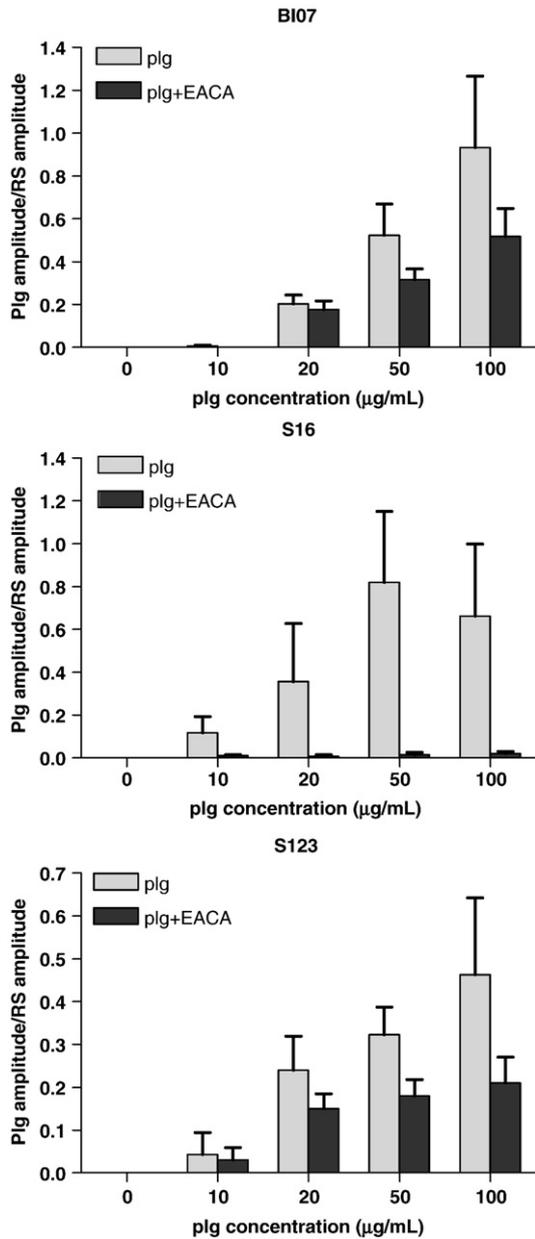
Fig. 1. Overall MALDI-TOF mass spectra of *B. lactis* B107 incubated with different concentrations of Plg (0, 10, 20, 50, 100 µg/mL). Plg  $[M+H]^+$  signal at 81 kDa,  $[M+2H]^{2+}$  at 40 kDa.

(67 kDa). As analytical standard 400 ng of human Plg were spotted. In complete accordance with the data obtained by the flow cytometric approach (Candela et al., 2007), the MALDI-TOF analysis revealed a dose dependent Plg binding activity for all bifidobacterial strains tested. Fig. 1 shows a representative MALDI-TOF-MS overall spectra of Plg response. The signal at  $m/z$  81,400 Da was due to the Plg  $[M+H]^+$  lost from the bacterial surface by the laser of MALDI applied on the sample spot. For all the bifidobacterial strains tested, the amplitude of the signal at  $m/z$  81,400 Da resulted higher when the bacteria were incubated with higher amount of Plg. These results were presented as the ratio between the amplitude of the signal at  $m/z$  81,400 Da (Plg) and the amplitude of a specific bacterial reference peak (Fig. 2). The binding of human Plg to the bacteria cell surface is mediated by the lysine binding sites (LBS) of Plg which have affinity for the amino acid lysine (Sun, 2005). Proving the role of LBS for Plg recruitment on the bifidobacterial cell surface, in the presence of the lysine analog  $\epsilon$ -amino caproic acid (EACA) 0.5 M (Sigma-Aldrich) the Plg binding to the bifidobacterial cell surface results inhibited. Fig. 2 shows the decrease in signal, expressed as Plg amplitude/Reference Signal amplitude (RS amplitude), in the presence of EACA 0.5 M. In order to determine the specificity of Plg interaction, the same MALDI-TOF based methodology was used to assess the binding of bifidobacteria to BSA (Sigma-Aldrich). To this aim, stationary phase cells of *B. lactis* B107, *B. bifidum* S16, and *B. longum* S123 were incubated with 50 µg of BSA and treated as described for Plg. Binding to BSA was detected by MALDI-TOF analysis as reported above. As expected, for all bifidobacteria strains tested no  $m/z$  67 kDa response signal was detected (data not shown).

The results of Plg binding to *Bifidobacterium* obtained by MALDI-TOF are in accordance with those previously obtained by flow cytometry (Candela et al., 2007), proving the potential of this new rapid MALDI-TOF approach to study the interaction between bacteria and human target proteins. Respect to the standard methodologies generally employed for these studies, such as immunological methods or the use of radiolabeled proteins, the MALDI-TOF analysis represents a faster and cheaper approach. The study of the interaction between bacteria and human proteins by MALDI-TOF-MS could represent an innovative methodology to investigate the mechanisms of bacterial symbiosis and pathogenesis in the human host.

## References

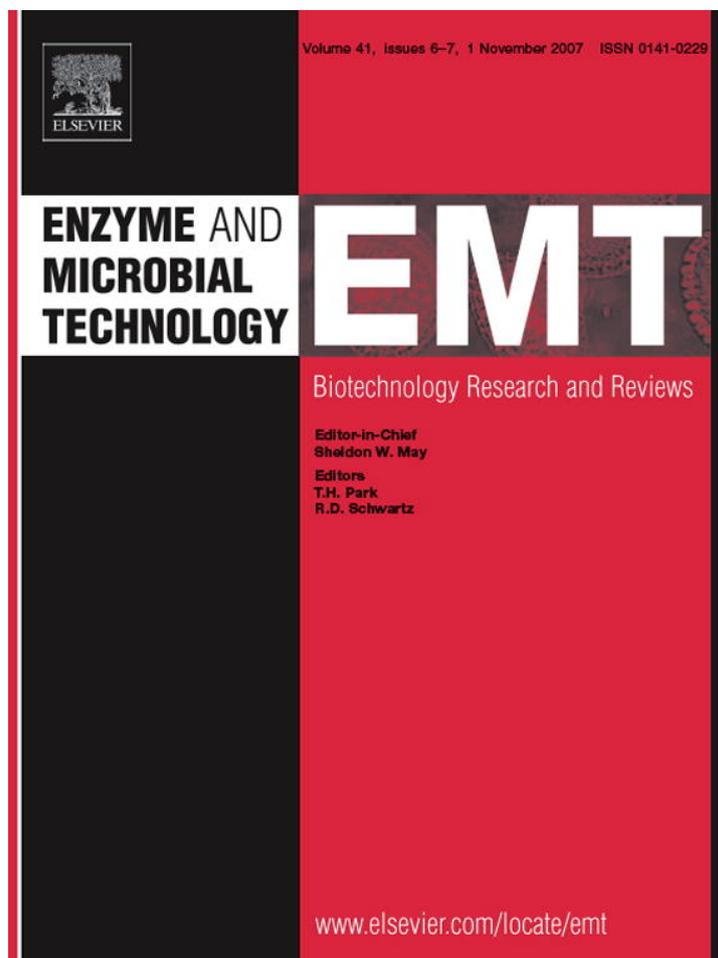
- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human-intestine. *Science* 307, 1915–1920.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S., Hammerschmidt, S., 2001. a-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol. Microbiol.* 40, 1273–1287.
- Candela, M., Bergmann, S., Vici, M., Vitali, B., Turroni, S., Eikmanns, B.J., Hammerschmidt, S., Brigidi, P., 2007. Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. *J. Bacteriol.* 189, 5929–5936.
- Collen, D., Verstraete, M., 1975. Molecular biology of human plasminogen. II. Metabolism in physiological and some pathological conditions in man. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 34, 403–408.
- Collier-Hyams, L.S., Neish, A.S., 2005. Innate immune relationship between commensal flora and the mammalian intestinal epithelium. *Cell. Mol. Life. Sci.* 62, 1339–1348.
- Donohue, M.J., Samllwood, A.W., Pfaller, S., Rodgers, M., Shoemaker, J.A., 2006. The development of a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of *Aeromonas* species using whole cells. *J. Microbiol. Meth.* 65, 380–389.
- Giomarelli, B., Visai, L., Hijazi, K., Rindi, S., Ponzio, M., Iannelli, F., Speziale, P., Pozzi, G., 2006. Binding of *Streptococcus gordonii* to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 265, 172–177.
- Hammerschmidt, S., 2006. Adherence molecules of pathogenic pneumococci. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 12–20.
- Hentschel, U., Steinert, M., Hacker, J., 2000. Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends Microbiol.* 8, 226–231.
- Klijn, A., Mercenier, A., Arigoni, F., 2005. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 491–509.
- Lahteenmaki, K., Virkola, R., Pouttu, R., Kuusela, P., Kukkonen, M., Korhonen, T.K., 1995. Bacterial plasminogen receptors: in vitro evidence for a role in degradation of the mammalian extracellular matrix. *Infect. Immun.* 63, 3659–3664.
- Mandrell, R.E., Harden, L.A., Bates, A.B., Miller, W.G., Haddon, W.F., Fagerquist, C.K., 2005. Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6292–6307.
- Meetani, M.A., Voorhees, K.J., 2005. MALDI mass spectrometry analysis of high molecular weight proteins from whole bacterial cells: pretreatment of samples with Surfactants. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 1422–1426.
- Neish, A.S., 2002. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microb. Infect.* 4, 309–317.
- Ochman, H., Moran, N.A., 2001. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* 292, 1096–1098.
- Pizarro-Cerda, J., Cossart, P., 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124, 715–727.
- Roux, P., Munter, S., Frischknecht, F., Herbomel, P., Shorte, S.L., 2004. Focusing light on infection in four dimensions. *Cell. Microbiol.* 6, 333–343.
- Sasakawa, C., Hacker, J., 2006. Host-microbe interaction: bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 1–4.
- Sun, H., 2005. The interaction between pathogens and host coagulation system. *Physiology* 21, 281–288.



**Fig. 2.** Study of Plg binding to *Bifidobacterium* by MALDI-TOF. The bars represent the response, expressed as Plg amplitude/Reference Signal amplitude (RS amplitude), with the standard deviation (SD), of *B. lactis* BI07, *B. bifidum* S16 and *B. longum* S123 incubated with different concentrations of Plg (0, 10, 20, 50, 100 µg/mL) in the absence (grey bars) or in the presence (black bars) of EACA. Reference signals: 23,000 Da (BI07), 30,300 Da (S16), 30,000 Da (S123).

## ***APPENDICE 3***

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



## A new bacterial mannosidase for the selective modification of ramoplanin and its derivatives

Samuele Di Palo<sup>a</sup>, Raffaella Gandolfi<sup>a</sup>, Srdjan Jovetic<sup>b</sup>, Flavia Marinelli<sup>c</sup>,  
Diego Romano<sup>d</sup>, Francesco Molinari<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> *Istituto di Chimica Organica, Università di Milano, Via Venezian 21, 20133 Milano, Italy*

<sup>b</sup> *ACTYGEA, Via R. Lepetit 34, 21040 Gerenzano (VA), Italy*

<sup>c</sup> *Dipartimento di Biotecnologie e Scienze Molecolari, Università degli Studi dell'Insubria, Via J.H. Dunant 3, 21100 Varese, Italy*

<sup>d</sup> *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Università di Milano, Via Celoria 2, 20133 Milano, Italy*

Received 8 May 2007; received in revised form 3 July 2007; accepted 4 July 2007

### Abstract

Ramoplanin is a lipoglycopeptide produced by *Actinoplanes* sp. ATCC 33076 and active on bacterial cell wall biosynthesis by binding to Lipid II. A screening of an actinomycetes collection was performed to select enzymatic activities able to introduce specific modifications in the ramoplanin molecule. An extracellular mannosidase from *Streptomyces* GE 91081 was found to selectively remove one mannose unit from ramoplanin and tetrahydroramoplanin to give the corresponding mannosyl aglycones. These molecules show an improved microbiological activity versus some resistant staphylococci and streptococci, and are useful intermediates in the synthesis of novel ramoplanin-like antibiotics. The biotransformation of ramoplanin has been optimised to improve molar conversion and the transformation reaction rate.  
© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Antibiotic; *Streptomyces*; Ramoplanin; Biotransformation; Lipoglycopeptide

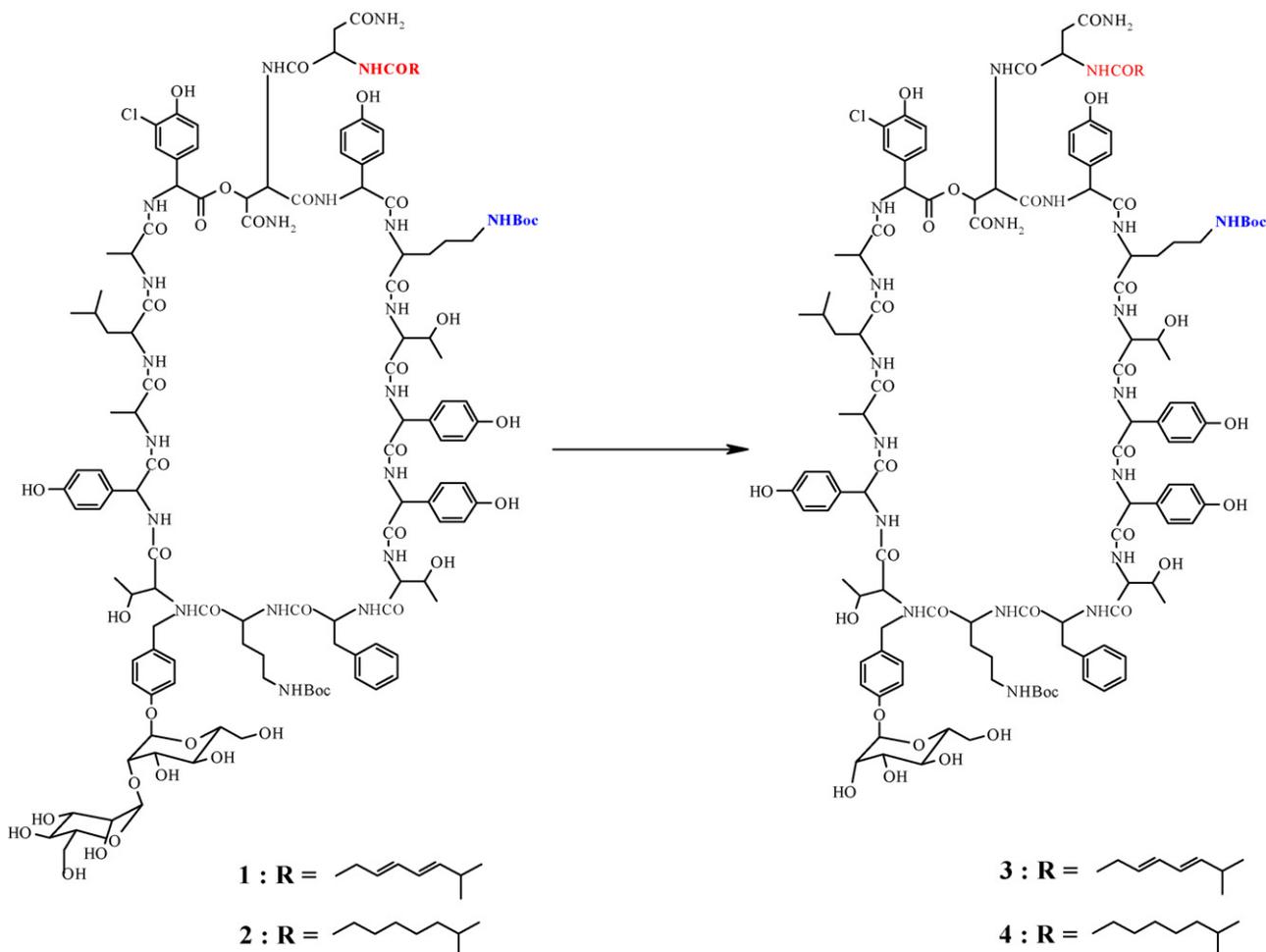
### 1. Introduction

Ramoplanin is a lipoglycopeptide antibiotic produced by fermentation of an *Actinoplanes* strain deposited in the American Type Culture Collection as ATCC 33076 [1]. It is active on bacterial cell wall biosynthesis by binding to Lipid II and inhibiting peptidoglycan transglycosylases, and it does not show cross-resistance with  $\beta$ -lactams or glycopeptides [2]. Its structure consists in a cyclic peptide formed from sixteen amino acids and one side branch amino acid, which is acylated by a di-unsaturated fatty acid. A disaccharide residue (D-mannosyl-D-mannose) is attached to the cyclic peptide [3] (Scheme 1). The antibiotic was first isolated as a complex of three closely related components A1, A2 and A3, of which A2 is the most abundant. These factors differ in the length and branching of the di-unsaturated fatty acid residue. Ramoplanin component A2 is highly active against numerous Gram-positive bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

[4], vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE) and those Gram-positive bacteria resistant to ampicillin and erythromycin [5]. Later three other minor factors, namely A'1, A'2 and A'3, were detected in traces in the fermentation broths and were shown to differ from the parental components of the original complex by lacking one mannose unit [6]. Traces of tetrahydroramoplanin, which differs from ramoplanin in the saturated fatty acid residue, were also found. Ramoplanin component A2 (so far indicated as ramoplanin) is presently in Phase III clinical trials for eradication of VRE and MRSA, and in Phase II for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea [7].

Extensive chemical modification to generate novel derivatives with improved pharmacological activity has been hampered due to the molecule instability at acidic or alkaline pH and its structural complexity. Thus, microbial modifications have been explored searching for selective transformations of ramoplanin, tetrahydroramoplanin and their chemically modified derivatives. Deglycosylated derivatives of other glycopeptides were previously obtained mainly by chemical treatment or by biotransformation or by direct production using blocked mutants [8–10]. Ramoplanin, A40926 and teicoplanin aglycones and pseudoaglycones were found to have an improved microbi-

\* Corresponding author. Tel.: +39 0250319148; fax: +39 0250319191.  
E-mail address: [francesco.molinari@unimi.it](mailto:francesco.molinari@unimi.it) (F. Molinari).

Scheme 1. Demannosylation of di-Boc-ramoplanin **1** and di-Boc-tetrahydroramoplanin **2**.

ological activity against some classes of staphylococci and streptococci and were used as the starting material for the synthesis of several semisynthetic derivatives [6,11].

In this paper we have studied the enzymatic demannosylation of di-*tert*-BOC ramoplanin (**1**) and of di-*tert*-BOC-tetrahydroramoplanin (**2**) (Scheme 1) for producing intermediates needed for the synthesis of novel ramoplanin-like molecules. To this purpose, two free amino groups (C<sub>4</sub> and C<sub>10</sub>) in ramoplanin and tetrahydroramoplanin were protected as Boc-derivatives prior to biotransformation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Reagents and solvents were purchased from Sigma–Aldrich (Milano, Italy); di-Boc-ramoplanin **1** and di-Boc-tetrahydroramoplanin **2** were kindly provided by Vicuron Pharmaceuticals srl.

### 2.2. Strains and culture conditions

The following strains from commercial collections (ATCC, LGC Pro-mochem, Sesto San Giovanni, Milano; NRRL, USDA, Peoria, Illinois, USA) or from proprietary Vicuron collection (GE, Gerenzano-Varese, Italy) were used: *Actinomadura parvosata* ATCC 53463, *Actinoplanes* sp. ATCC 33076,

*Actinoplanes* sp. ATCC 53533, *Actinoplanes* sp. NRRL 3884, *Actinoplanes missouriensis* NRRL 15646, *Actinoplanes teichomyeticus* ATCC 31121, *Kibdelosporangium oridum* ATCC 39922, *Nocardia orientalis* NRRL 2450, *Streptomyces* sp. GE 91081, *Streptomyces* sp. GE 105105, *Streptomyces* sp. GE 107613, *Streptomyces* sp. GE 107678, *Streptomyces* sp. NRRL 15009, *Streptomyces candidus* NRRL 3218, *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 31613, *Streptomyces roseosporum* NRRL 11379, *Streptomyces virginiae* NRRL 12525, *Streptosporangium roseum* NRRL 12064. The microorganisms were maintained in Nutrient Glycerol (nutrient broth Difco 8 g l<sup>-1</sup>; glycerol 150 ml l<sup>-1</sup>) with 0.01% Tween 60 in 96-well microtiter plates at -20 °C. An aliquot of 20 μl of spores maintained in Nutrient Glycerol was plated on oatmeal agar medium and incubated at 28 °C for 5 days. A loop of a mature plate was used as inoculum in a liquid medium (20 ml) containing glucose 20 g, yeast extract 2 g, soybean meal 8 g, NaCl 4 g and CaCO<sub>3</sub> 1 g in 1 l tap water at pH 7 in 100 ml Erlenmeyer baffled flasks. After incubation for 72 h at 28 °C, the mycelial suspension (2%) was transferred into a liquid AUR/M medium (composed with maltose 20 g, dextrin 10 g, soybean meal 15 g, meat extract 4 g, yeast extract 2 g, peptone 4 g, and CaCO<sub>3</sub> 2 g in 1 l tap water at pH 7); growth was carried out in Erlenmeyer flasks for 96 h on a rotary shaker (200 rpm) at 28 °C.

*Streptomyces* GE 91081 was also grown in liquid media containing yeast extract (15 g l<sup>-1</sup>) at pH 7.0 with different carbon sources (glucose, maltose, sucrose, lactose and starch) at different concentrations (10–50 g l<sup>-1</sup>).

Samples were collected from fermentation flasks at different times for determining the dry weight, pH and residual glucose. For dry weight determination, the mycelium after centrifugation, was washed with distilled water and dried at 110 °C for 24 h. The growth curves were determined by applying the mathematic model of Gompertz [12] using dry weight data. Total protein content was determined according a standard Bradford assay [13].

### 2.3. Enzyme extract preparation and biotransformations

The initial screening was performed with the actinomycetes above described and with a commercial enzyme ( $\alpha$ -mannosidase from *Canavalia ensiformis*, Sigma–Aldrich, Milano, Italy). Biotransformations with microbial cells was carried out by directly adding neat substrate ( $0.4 \text{ g l}^{-1}$ ) to whole cultures after 96 h growth. The biotransformation with the commercial enzyme was carried out in 10 ml screw capped test tubes by using the enzyme preparation (36 mg) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 (3 ml) with  $0.4 \text{ g l}^{-1}$  of the substrate. After incubation on a rotary shaker (200 rpm) at  $28^\circ\text{C}$ . Samples ( $200 \mu\text{l}$ ) were withdrawn, filtered, diluted with an equal amount of  $\text{CH}_3\text{CN}$  and analysed by HPLC.

In the case of biotransformation with *Streptomyces* sp. GE 91081 the mycelium after centrifugation at 12,000 rpm for 20 min was washed with physiological solution and resuspended (50 mg dry weight) in 10 ml of 0.1 M phosphate buffer. The liquid fraction (10 ml) was transferred in 50 ml baffled flasks and the substrate was added. Alternatively, it was ultra-filtered using a stirred ultra-filtration cell (Model 8050, capacity 50 ml) with a membrane having a 10,000 Da cut-off. The ultra-filtrate fraction containing  $0.04 \text{ g l}^{-1}$  of total protein was used for bioconversion optimization. The conditions of the sequential experimental trials were selected employing the Multisimplex<sup>®</sup> 2.0 software [14]. The control variables were temperature, pH, type of buffer and ions and two response variables were chosen for the optimization, namely the initial reaction rate and the molar conversion after 24 h.

### 2.4. Analytical methods

Analysis was performed on HPLC Merck Hitachi 655 A, with UV detector Merck Hitachi L-4000 and a  $5 \mu\text{m}$  particle size Supelco Hypersil ODS column ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ). Di-Boc-ramoplanin **1** and its demannosylated products were eluted with a solvent system consisting of a mixture of an aqueous solution of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (20 mM) and  $\text{CH}_3\text{CN}$  (9/1, v/v) (solvent A) and an aqueous solution of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (20 mM) and  $\text{CH}_3\text{CN}$  (3/7, v/v) (solvent B). A linear gradient from a ratio of solvent A/solvent B of 45/55 (v/v) to a ratio of 25/75 (v/v) was applied over a period of 25 min. The flow-rate was  $1.5 \text{ ml min}^{-1}$ ; injection volume was  $20 \mu\text{l}$  and UV detector at 254 nm. The analysis of di-Boc-tetrahydorramoplanin **2** and its demannosylated products were performed with a solvent system consisting of an aqueous solution of  $\text{HCOONH}_4$  (50 mM) (solvent A) and acetonitrile (solvent B). A linear gradient from a ratio of solvent A/solvent B of 90/10 (v/v) to a ratio of 30/70 (v/v) was applied over a period of 35 min. The flow-rate was  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$ ; injection volume was  $20 \mu\text{l}$  and UV detector (268 nm).

## 3. Results

### 3.1. Screening for the modification of di-Boc-tetrahydorramoplanin

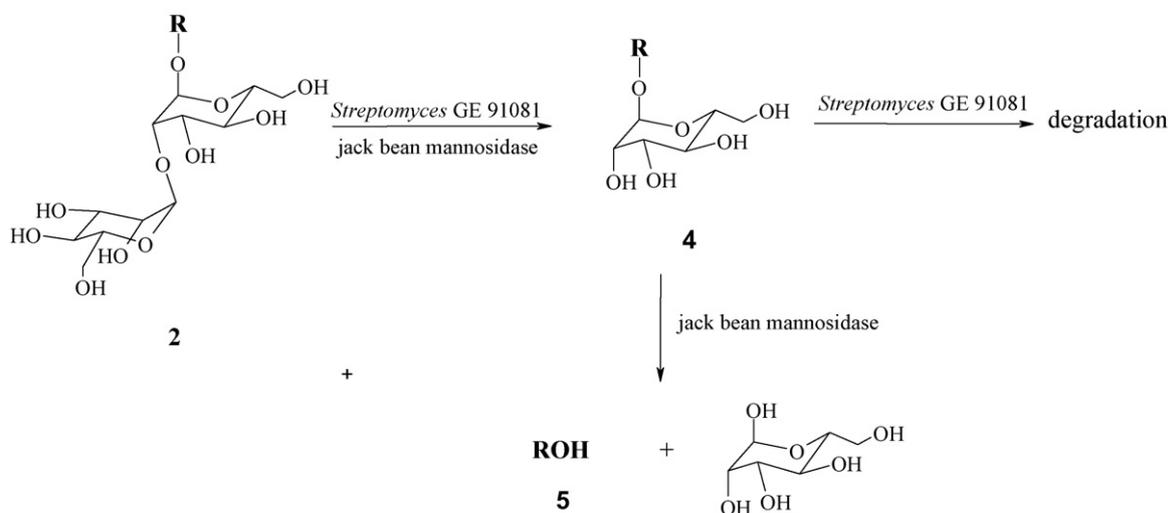
A screening for the modification of di-Boc-tetrahydorramoplanin **2** ( $0.4 \text{ g l}^{-1}$ ) was firstly carried out using the commercial jack bean  $\alpha$ -mannosidase (from *Canavalia ensiformis*) in parallel to the whole cultures of 18 actinomycetes from Vicuron collection. Scheme 2 summarizes the observed biotransformations.

The commercial  $\alpha$ -mannosidase hydrolysed **2** to the corresponding mannosyl aglycone **4** and to the aglycone **5** (Fig. 1A). Some of the screened actinomycetes (9 out of 18) did not show any activity, whereas 7 strains degraded the substrate; *Nocardia orientalis* NRRL 2450 produced traces of **5** and *Streptomyces* GE 91081 transformed **2** into **4** with maximum accumulation of  $0.15 \text{ mg ml}^{-1}$  before further degradation (Fig. 1B).

On the basis of these results, the commercial  $\alpha$ -mannosidase has been used to prepare **5** and this work will be described elsewhere. Hereby, our attention was focused on the mannosidase activity from *Streptomyces* GE 91081 due to its specificity with the aim to obtain the mannosyl aglycone **4** as the only product.

### 3.2. Biotransformation with *Streptomyces* GE 91081

*Streptomyces* GE 91081 was grown in liquid media containing different carbon sources (glucose, maltose, sucrose, lactose and starch) from 10 to  $50 \text{ g l}^{-1}$ ; biotransformation ( $0.4 \text{ g l}^{-1}$  of substrate) was performed using whole cultures grown for different times. The mannosidase activity was induced by starch and by disaccharide sugars, but these conditions increased product degradation rate as well. A medium composed with yeast extract and  $30 \text{ g l}^{-1}$  of glucose gave the best results by limiting by-product formation. Fig. 2 shows the dependence of mannosidase activity upon growth of *Streptomyces* GE 91081 in this medium.



Scheme 2. Enzymatic modification of di-Boc-tetrahydorramoplanin **2**.

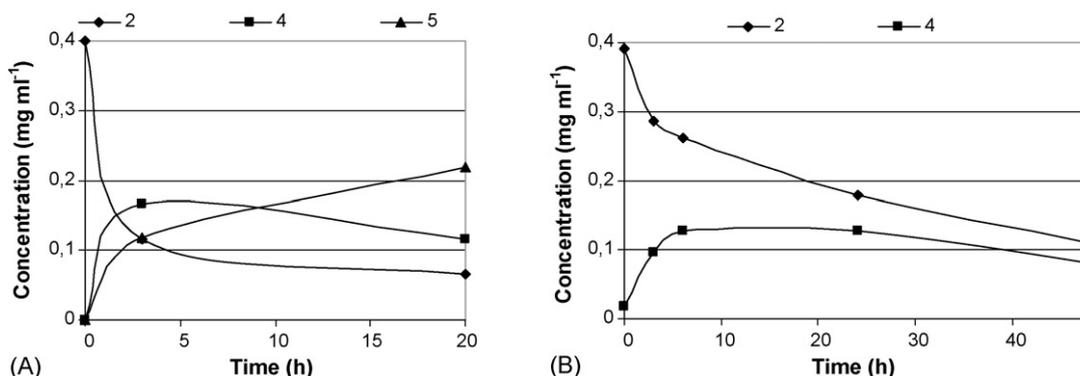


Fig. 1. Biotransformation with jack bean  $\alpha$ -mannosidase of 2 into the mannosyl aglycone 4 and into the aglycone 5 (A) and with *Streptomyces* GE 91081 of 2 into the mannosyl aglycone 4 (B).

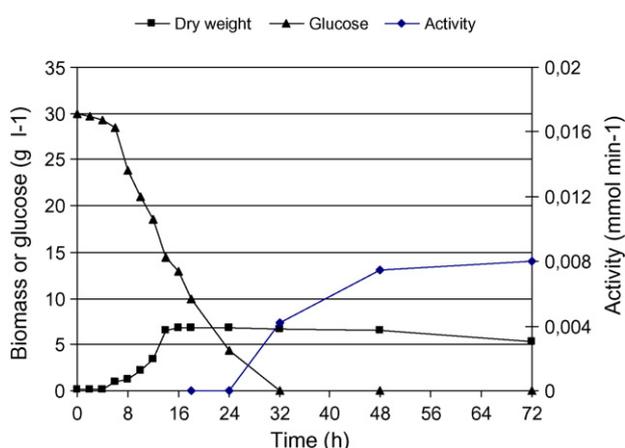


Fig. 2. Growth, glucose consumption and activity towards 2 of the whole cultures of *Streptomyces* GE 91081. Activity was defined as the  $\mu$ mol of product formed in 1 min.

*Streptomyces* GE 91081 showed a good growth rate with  $\mu_{\max} = 0.51 \text{ h}^{-1}$ . The hydrolytic activity became detectable only when glucose was almost completely consumed, with cells entered into stationary phase. Cultures grown for 72 h gave the best mannosidase activity and were used for the following experiments. Cell-free broth fraction and washed mycelium suspended in physiological solution were independently assayed to localize mannosidase activity (Fig. 3).

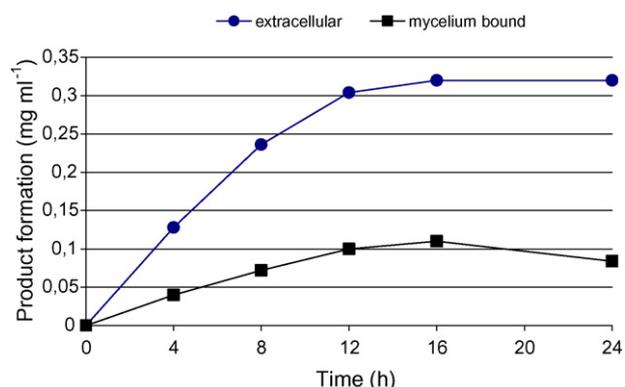


Fig. 3. Production of 4 by biotransformation of 2 (initial concentration 0.4 g/L) with extracellular or mycelium-bound enzymes from *Streptomyces* GE 91081.

The activity was mostly found as extracellular, with high molar conversion and no further modification of the mannosyl aglycone 4, while mycelium-bound enzymes gave lower yields and further degradation of 4. Similar behaviour was obtained when di-Boc-ramoplanin 1 was used as substrate.

The extracellular fraction, containing approximately  $4 \text{ g l}^{-1}$  of total proteins, was ultra-filtered (cut-off 10,000 Da). The enzymatic fraction retained by UF was diluted to  $0.040 \text{ mg ml}^{-1}$  protein concentration and used for further experiments.

### 3.3. Optimization of the enzymatic bioconversion

One of the main drawbacks in biotransformation of lipophilic molecules such as ramoplanin, is the low solubility of the substrates in water, which diminishes reaction rates and overall productivity. Different co-solvents were investigated for improving the solubility of the substrate: acetone, acetonitrile, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, ethanol and mixtures of these solvents. The use of acetonitrile (2.5%, v/v) allowed the highest conversion rate, as shown in Fig. 4.

The further optimization was carried out by simultaneously evaluating different parameters of the biotransformation (temperature, pH, type of buffer and ions) using the Multisimplex experimental design [13]; citrate, phosphate and Tris-HCl buffers were used for achieving different pH values. The best

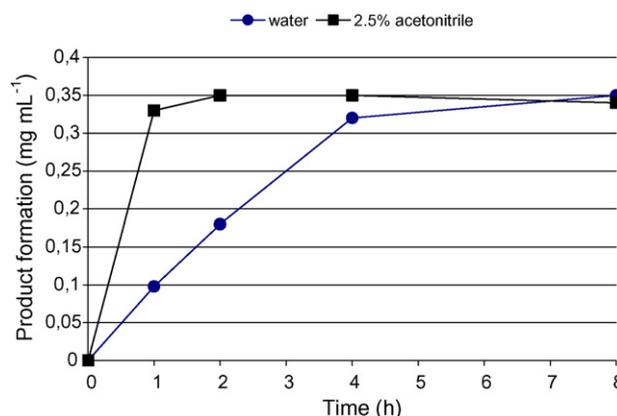


Fig. 4. Biotransformation of 2 (0.4 g/L) into 4 catalysed by the mannosidase from *Streptomyces* GE 91081 in water and water/acetonitrile.

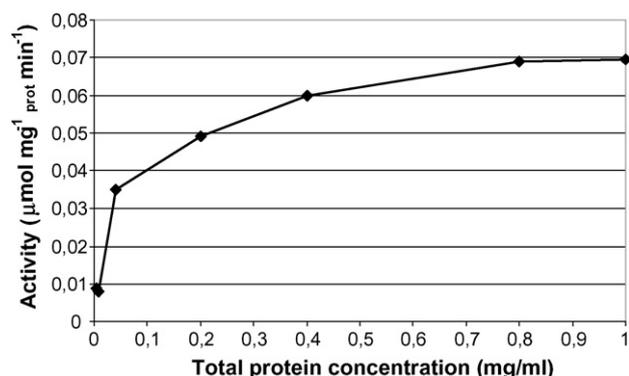


Fig. 5. Effect of total protein concentration on the biotransformation of **2** ( $0.4 \text{ g l}^{-1}$ ) into **4**.

conditions for the biotransformation of **2** were 20 mM phosphate buffer at pH 6.2,  $30^\circ\text{C}$ ; enzymatic activity was inhibited by EDTA (5 mM) and bivalent ions ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ). The effect of the total protein concentration on the biotransformation is reported in Fig. 5.

The reaction with  $0.8 \text{ g l}^{-1}$  of total protein was completed in 1 min. The best conditions found for the hydrolysis of di-Boc-tetrahydroramoplanin **2** were also employed for the transformation of di-Boc-ramoplanin **1**. The transformation of  $0.4 \text{ g l}^{-1}$  of **1** with the enzymatic extract containing  $0.8 \text{ g l}^{-1}$  of total protein was completed in 3 min. The effect of the substrate concentration was studied under optimised conditions with initial concentrations of di-Boc-ramoplanin **1** and di-Boc-tetrahydroramoplanin **2** ranging from 0.4 to  $10 \text{ g l}^{-1}$ . The highest yields were observed in both the cases using  $5 \text{ g l}^{-1}$  of substrate. Thus, preparative biotransformations of **1** and **2** were independently carried out on 1 l scale with an enzymatic extract containing 0.8 g of total protein starting from 5 g of substrate: 4.15 g of **3** and 4.50 g of **4** were obtained, respectively, after 24 h.

#### 4. Discussion

Previous studies have shown that demannosyl ramoplanin, isolated in traces as minor component in the fermentation broth, was endowed of an improved microbiological activity towards resistant pathogens [6]. Moreover, demannosylated ramoplanin and demannosylated tetrahydroramoplanin (and particularly their *tert* BOC protected derivatives) are required as starting material for chemical modifications. Recently ramoplanin and its aglycone have been prepared by a complex multi-step chemical synthesis [15,16], but the overall yield was very low and this route is not competitive with the biological production. Ramoplanin and tetrahydroramoplanin aglycones were quantitatively produced by employing the commercially available jack bean  $\alpha$ -mannosidase. Indeed a novel extracellular mannosidase from *Streptomyces* GE 91081 selectively converted the substrates into the corresponding mannosyl aglycones. It is noteworthy that this new  $\alpha$ -mannosidase was very active with ramoplanin-like substrates, whereas it did not show any activity when assayed on *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, that is the standard substrate for the  $\alpha$ -mannosidase activity identification [17].

The role of  $\alpha$ -mannosidases in eukaryotic cells is mostly related with glycoprotein processing [18], while on bacterial  $\alpha$ -mannosidases limited information is available. An extracellular enzyme from *Bacillus* has been described [19] and cell-bound  $\alpha$ -mannosidases have been found in *Mycobacterium tuberculosis* [20] and *Thermotoga maritime* [21]. An archaeal  $\alpha$ -mannosidase has been recently characterised, but its physiological role is unclear [22].

The *Streptomyces* mannosidase described in this work showed good kinetic properties and its activity was not inhibited by high concentrations either of the substrate or of the product. The enzyme had a good stability and its production as a crude preparation to be used in biotransformations was simple. These features made feasible the scaling up of the preparative biotransformations, allowing for the production of multi-gram of the desired products with molar conversions above 85%.

The rapid and convenient process for the demannosylation of ramoplanin/tetrahydroramoplanin by the crude enzyme from *Streptomyces* sp. GE 91081 may be efficiently coupled with the recently optimized process for the selective production of A2 component by *Actinoplanes* sp. ATCC 33076 [23].

#### Acknowledgments

We would like to thank Dr. Romeo Ciabatti and Dr. Sonia Maffioli for providing us the substrates and for their precious help about the analytical section.

#### References

- [1] Cavalleri B, Pagani H, Volpe G, Selva E, Parenti F. A-16686, a new antibiotic from *Actinoplanes* I. Fermentation, isolation and preliminary physico-chemical characteristics. *J Antibiotics* 1984;3:309–17.
- [2] Hu Y, Helm JS, Chen XY, Walker S. Ramoplanin inhibits bacterial transglycosylases by binding as a dimer to lipid II. *J Am Chem Soc* 2003;125:8736–7.
- [3] Ciabatti R, Kettenring, Winters G, Tuan G, Zerilli LF, Cavalleri B. Ramoplanin (A-16686), a new glycolipodepsipeptide antibiotic III. Structure elucidation. *J Antibiotics* 1989;42:254–67.
- [4] Maple PA, Hamilton JM, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W. Comparative *in vitro* activity of vancomycin, teicoplanin, ramoplanin (formely A16686), paldimycin, DuP 721 and DuP 105 against methicillin and gentamicin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antibiotics Chemother* 1989;23: 517–25.
- [5] Collins LA, Eliopoulos GM, Wennersten CB, Ferraro MJ, Moellering RC. *In vitro* activity of ramoplanin against vancomycin-resistant gram-positive organisms. *Antimicrobial Agents Chemother* 1993;37:1364–6.
- [6] Gastaldo L, Ciabatti R, Assi F, Restelli E, Kettenring JK, Romano G, et al. Isolation, structure, determination and biological activity of A-16686 factors A'1, A'2 and A'3 glycolipodepsipeptide antibiotics. *J Ind Microbiol* 1992;11:13–8.
- [7] <http://biotechnologyhealthcare.com>, Genome Therapeutics, June 2004.
- [8] Lanici GC, Cavalleri B. Glycopeptide antibiotics (Dalbaheptides). In: Rehm HJ, Rehm G, editors. *Biotechnology*, vol. 7, second ed. Weinheim: VCH; 1997. p. 369–95.
- [9] Beltrametti E, Lazzarini A, Brunati M, Selva E, Marinelli F. Production of demannosyl-A40926 by a *Nonomuria* sp. ATCC 39727 mutant strain. *J Antibiotics* 2003;56:310–3.
- [10] Borghi A, Ferrari AP, Gallo GG, Zanol M, Zerilli LF, Lancini GC. Microbial de-mannosylation and mannosylation of teicoplanin derivatives. *J Antibiotics* 1991;44:1444–51.

- [11] Selva E, Goldstein BP, Ferrari P, Pallanza R, Riva E, Berti M, et al. A40926 aglycone and pseudoaglycones: preparation and biological activity. *J Antibiotics* 1988;41:1243–52.
- [12] Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM. Modelling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:1875–81.
- [13] Bradford MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [14] Walters FH, Parker LR, Morgan SL, Deming SN. *Sequential Simplex Optimization*. Boca Raton: CRC Press; 1991.
- [15] Jiang W, Wanner J, Lee RJ, Bounaud PY, Boger DL. Total synthesis of the ramoplanin A2 and ramoplanose aglycon. *J Am Chem Soc* 2002;124:5288–90.
- [16] Shin D, Rew Y, Boger DL. Total synthesis and structure of the ramoplanin A1 and A3 aglycons: two minor components of the ramoplanin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:11977–9.
- [17] Manchenko GP. *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*. Boca Raton: CRC Press; 1994.
- [18] Daniel PF, Winchester B, Warren CD. Mammalian alpha-mannosidases—multiple forms but a common purpose? *Glycobiology* 1994;4:551–66.
- [19] Maruyama Y, Nakajima T, Ichishima E. A 1,2-alpha-D-mannosidase from a *Bacillus* sp., and mode of action. *Carbohydr Res* 2003;415:87–93.
- [20] Rivera-Marrero CA, Ritzenthaler JD, Roman J, Moremen KW. Molecular cloning and expression of an alpha-mannosidase gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Pathog* 2001;30:9–18.
- [21] Nakajima M, Imamura H, Shoun H, Wakagi T. Unique metal dependency of cytosolic alpha-mannosidase from *Thermotoga maritima*, hyperthermophilic bacterium. *Arch Biochem Biophys* 2003;415:87–93.
- [22] Angelov A, Putyrski M, Liebl W. Molecular and biochemical characterization of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -mannosidase and their clustered genes from the thermoacidophilic archaeon *Picrophilus torridus*. *J Bacteriol* 2006;188:7123–31.
- [23] Brunati M, Bava A, Marinelli F, Lancini GC. Influence of leucine and valine on ramoplanin production by *Actinoplanes* sp. ATCC 33076. *J Antibiotics* 2005;58:473–8.