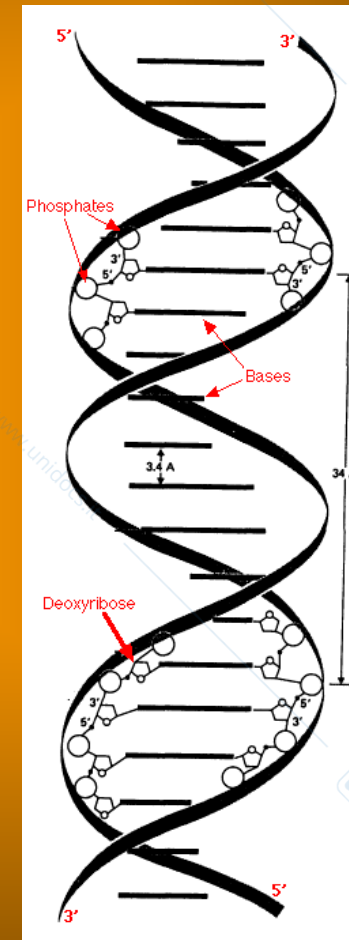
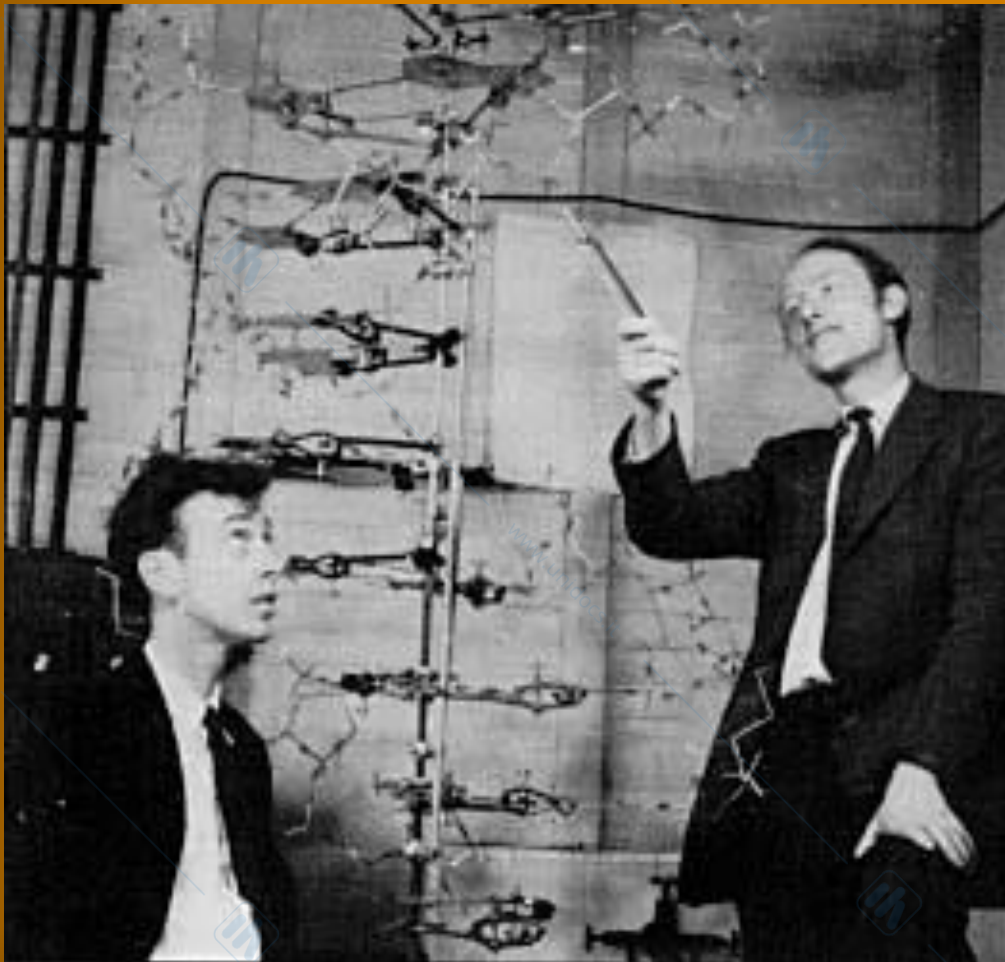


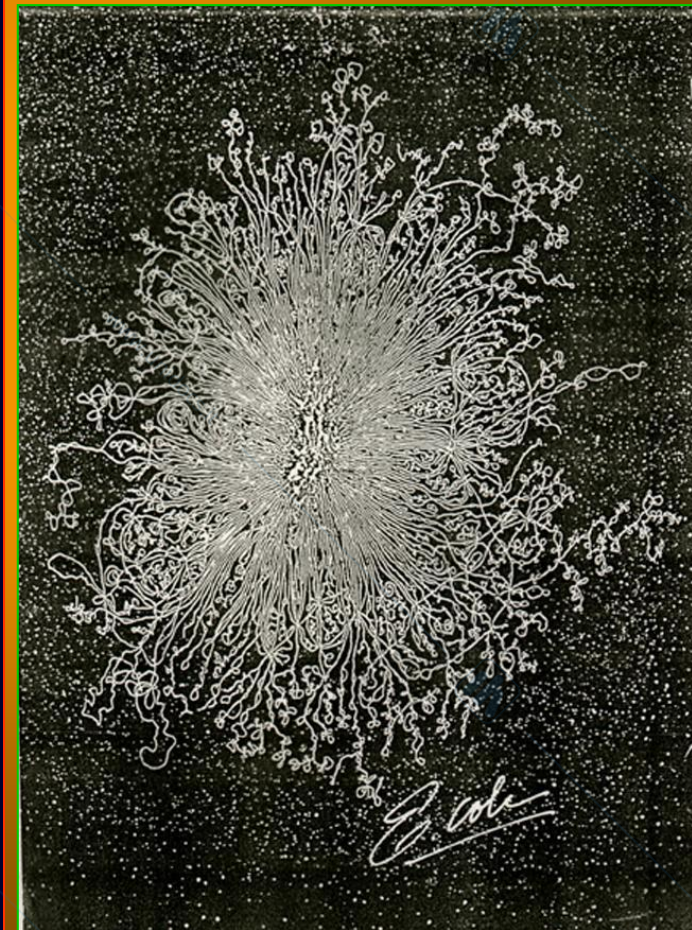
Genetica batterica



1953: James Watson e Francis Crick scoprono la struttura del DNA

IL PATRIMONIO GENETICO DEI PROCARIOTI

- **GENERALMENTE 1 MOLECOLA CIRCOLARE DI DNA** (eccezioni *V. cholerae* 2 cromosomi circolari; *Burkholderia* spp 3 cromosomi circolari; *Agrobacterium tumefaciens* 1 circolare e 1 lineare e *Streptomyces lividans* 1 cromosoma lineare)
- **MEDIAMENTE $3-6 \times 10^6$ bp** (range: 0,5-12 Mb)
- **PESO MOLECOLARE $\pm 2-4 \times 10^9$ Da**
- **MOLECOLA SUPERAVVOLTA**
- **LUNGHEZZA 1,1 mm**



Bacterial genomes

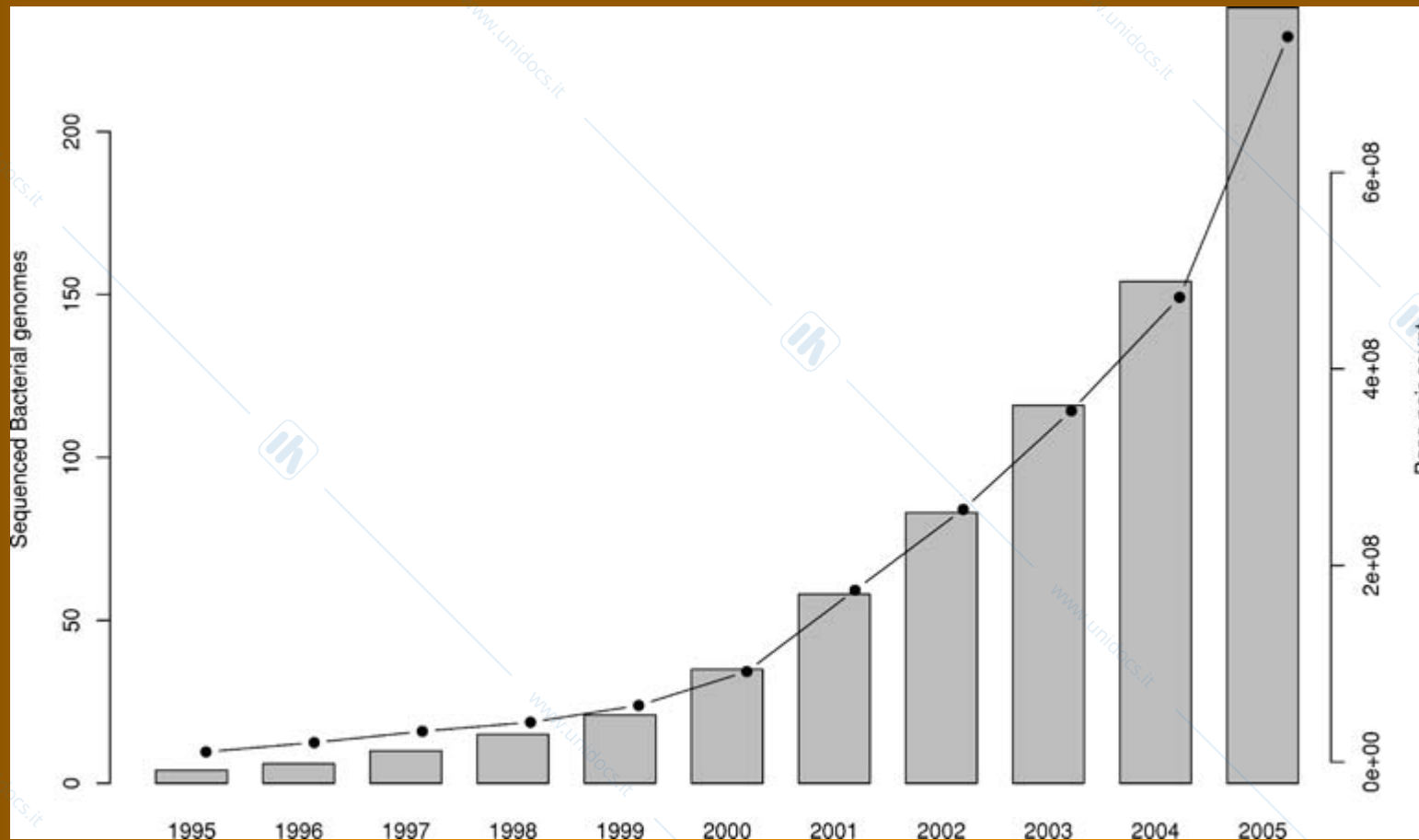


Fig. 1 Cumulative number of complete published sequenced bacterial genomes (bars) and total number of basepairs (line) over the past decade (1995–2005)

It has been more than 10 years since the first bacterial genome sequence was published. Hundreds of bacterial genome sequences are now available for comparative genomics.

Research Article

Comparative Analyses of Base Compositions, DNA Sizes, and Dinucleotide Frequency Profiles in Archaeal and Bacterial Chromosomes and Plasmids

Hiromi Nishida

Agricultural Bioinformatics Research Unit, Graduate School of Agricultural Sciences, University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

Correspondence should be addressed to Hiromi Nishida, hnishida@iu.a.u-tokyo.ac.jp

Received 25 November 2011; Revised 11 January 2012; Accepted 19 January 2012

Academic Editor: Hideaki Nojiri

Copyright © 2012 Hiromi Nishida. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In the present paper, I compared guanine-cytosine (GC) contents, DNA sizes, and dinucleotide frequency profiles in 109 archaeal chromosomes, 59 archaeal plasmids, 1379 bacterial chromosomes, and 854 bacterial plasmids. In more than 80% of archaeal and bacterial plasmids, the GC content was lower than that of the host chromosome. Furthermore, most of the differences in GC content found between a plasmid and its host chromosome were less than 10%, and the GC content in plasmids and host chromosomes was highly correlated (Pearson's correlation coefficient $r = 0.965$ in bacteria and 0.917 in archaea). These results support the hypothesis that horizontal gene transfers have occurred frequently via plasmid distribution during evolution. GC content and chromosome size were more highly correlated in bacteria ($r = 0.460$) than in archaea ($r = 0.195$). Interestingly, there was a tendency for archaea with plasmids to have higher GC content in the chromosome and plasmid than those without plasmids. Thus, the dinucleotide frequency profile of the archaeal plasmids has a bias toward high GC content.

Genomes of prokaryotes cover a broad compositional range, GC levels being comprised between approximately 25% and 75%.

DNA base composition, specifically guanine-cytosine (GC) content, is a bacterial taxonomic marker. For example, actinobacteria have high, whereas clostridia have low GC-containing genomes .

Mutazioni e origine delle variazioni genetiche nei procarioti

Mutazione: cambiamento ereditabile nella sequenza di basi dell'acido nucleico genomico di un organismo.

E' il motore che guida la variazione biologica e di conseguenza l'evoluzione

Mutante: ceppo che porta tale cambiamento genetico cromosomale.

Gli esperimenti condotti usando ceppi mutanti probabilmente rappresentano i metodi migliori per analizzare le funzioni cellulari.

La tecnologia dei mutanti si fonda sul confronto fra i ceppi mutanti (portatori di specifiche mutazioni) e ceppi selvatici dai quali derivano.

Definizione di genotipo e fenotipo

Le mutazioni possono essere classificate in due modi:

Cambiamento del Genotipo: precisa composizione genetica di un organismo

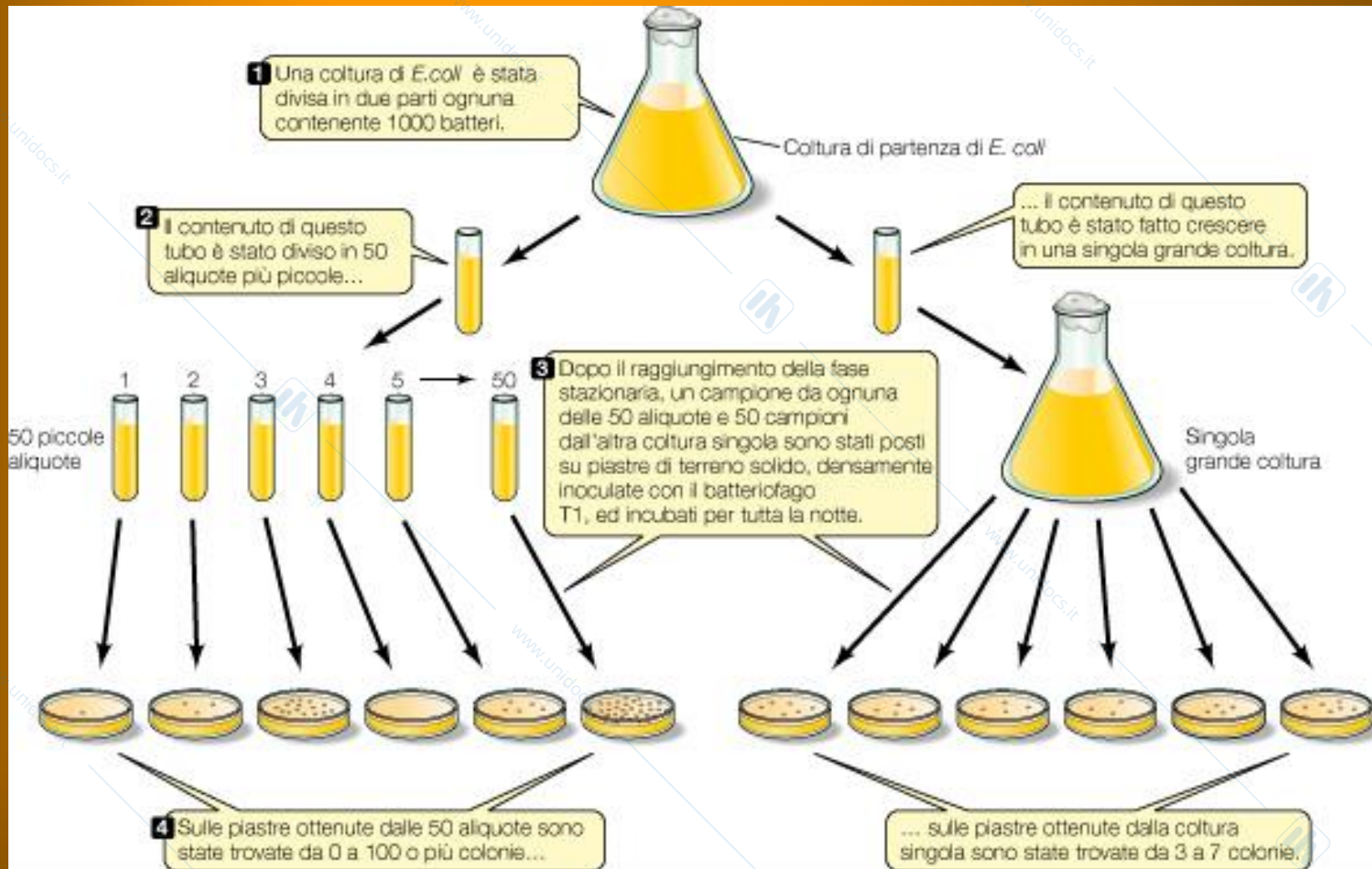
(es. $hisC \rightarrow HisC$)

Mutazioni del gene *hisC*: *hisC1*, *hisC2*, *hisC3*, etc.

Cambiamento del Fenotipo: caratteristiche osservabili di un organismo (aspetto esteriore, funzioni)

(es: un ceppo His^+ è in grado di produrre istidina
un ceppo His^- non è in grado di produrre istidina)

Test di fluttuazione

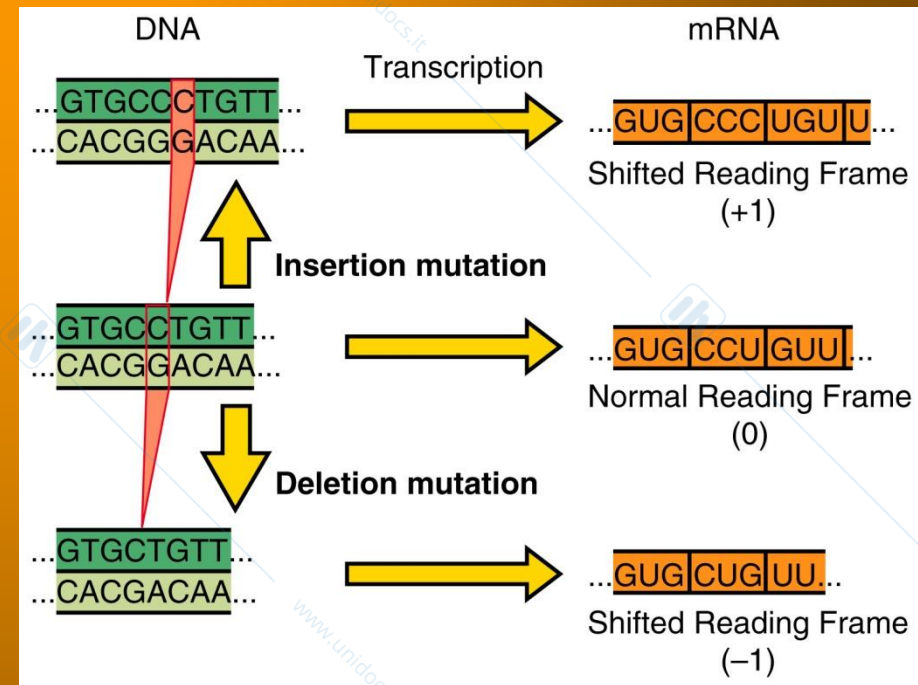
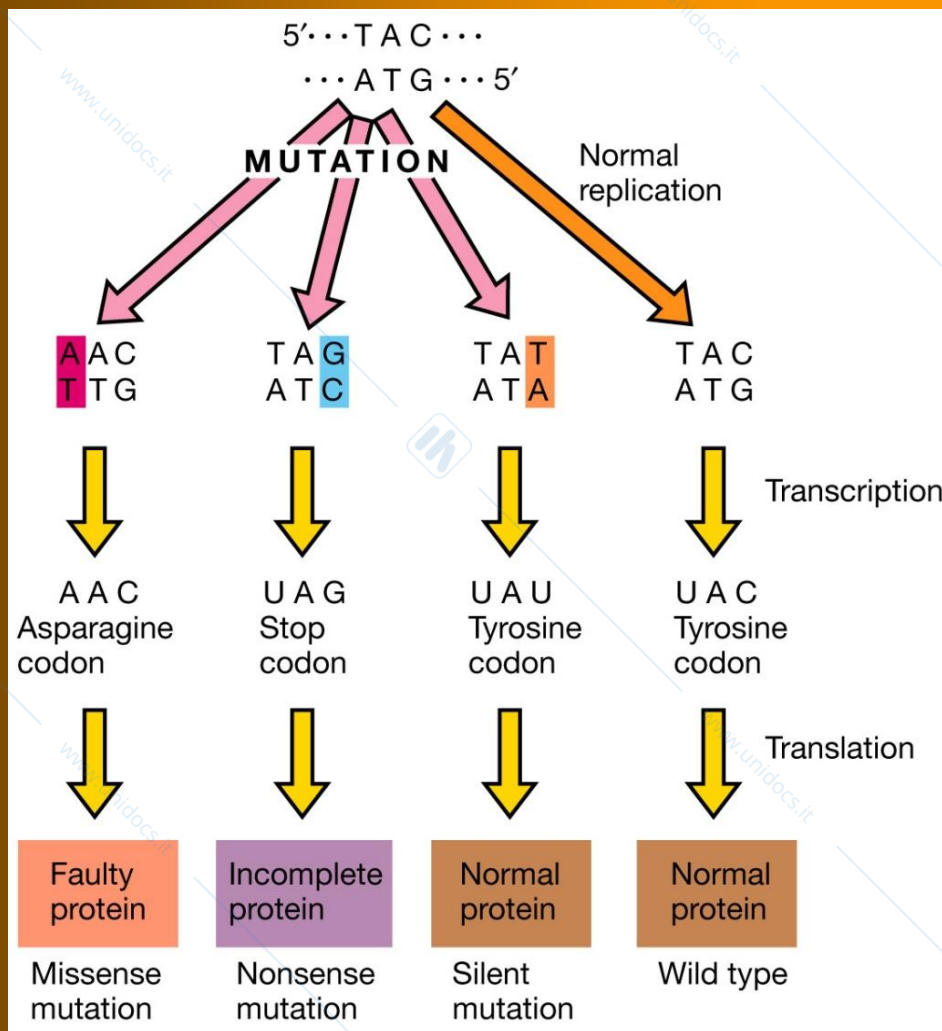


Il test di fluttuazione stabilì in modo conclusivo che **le mutazioni possono avvenire spontaneamente** nei batteri e che la presenza di agente selettivo ha solo la funzione di evidenziare ogni singolo mutante. In questo esperimento furono ottenuti, in seguito a mutazione, batteri resistenti all'infezione del fago T1.

Tipi di ceppi mutanti

DESIGNAZIONE	FENOTIPO
Auxotrofi	Richiedono un fattore di crescita esogeno, tipo amminoacido o vitamina
Temperatura sensibili	Perdono particolari funzioni ad alte o basse temperature
Osmotici sensibili	Perdono particolari funzioni ad alta o bassa osmolarità
Letali condizionati	Incapaci di crescere in particolari condizioni (tipo alte temperature) in qualsiasi terreno
Fonte carbonio	Incapaci di usare particolari composti come fonte di C
Fonte azoto	Incapaci di usare particolari composti come fonte di N
Fonte fosforo	Incapaci di usare particolari composti come fonte di P
Fonte zolfo	Incapaci di usare particolari composti come fonte di S

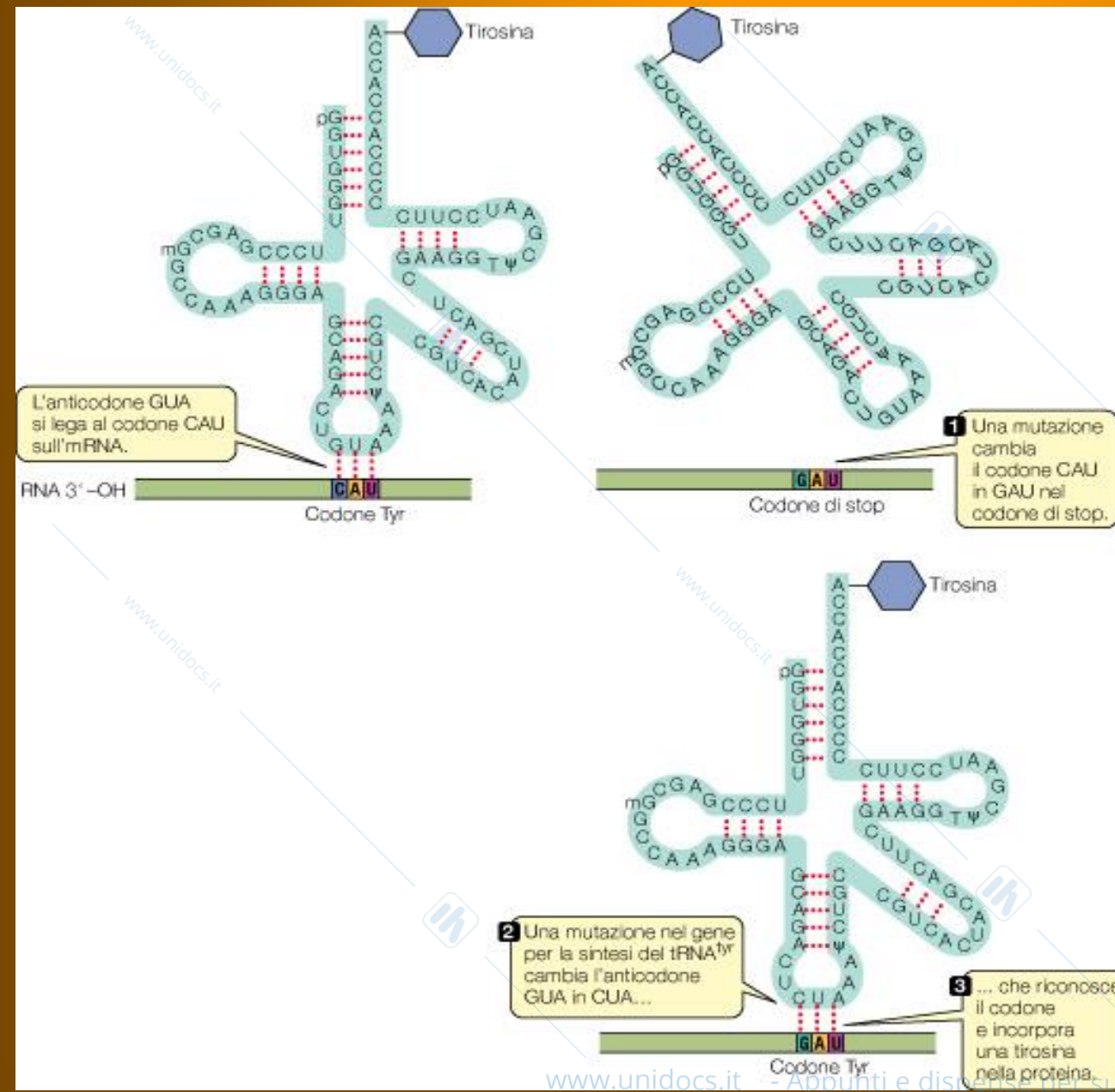
Possibili effetti delle mutazioni



Le **mutazioni puntiformi** possono risultare per sostituzione di un paio di basi (missenso, nonsenso, silenti) oppure per inserzione o delezione di un paio di basi (frameshift)

Anche la conseguenza di **riarrangiamenti e macrolesioni** (duplicazioni, delezioni, inserzioni, traslocazioni, inversioni) può variare da nessun effetto fino alla perdita di funzione

Mutazione soppressiva

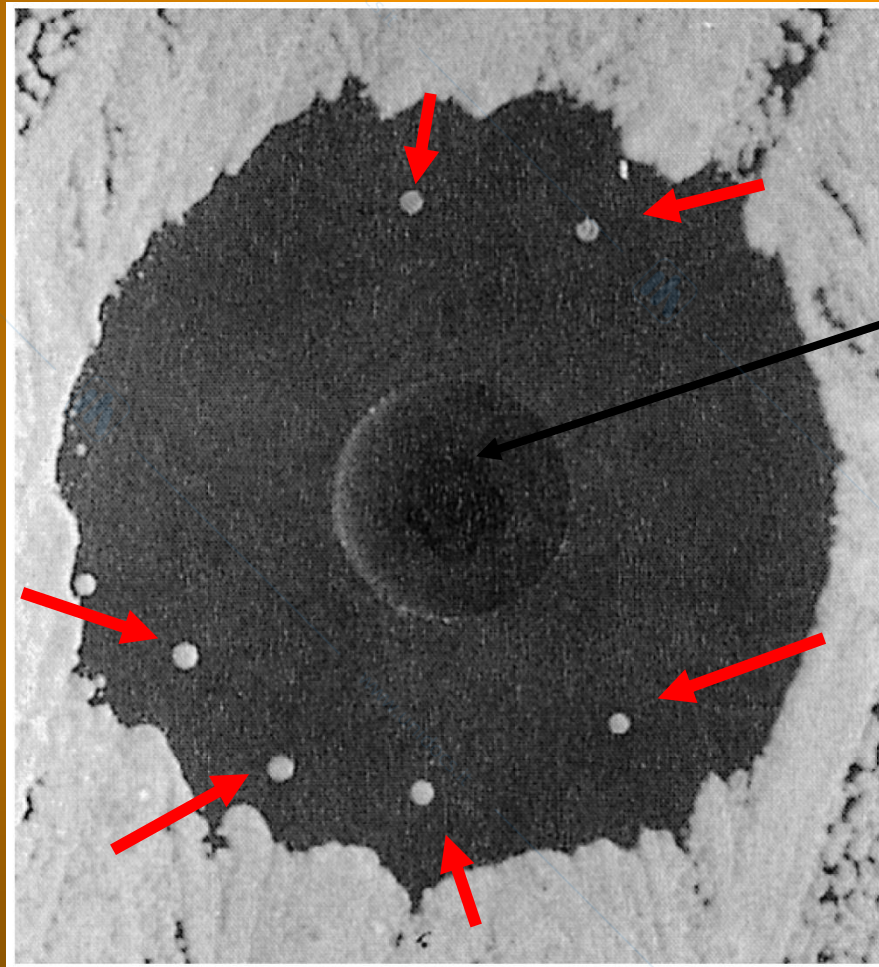


Poiché le mutazioni causano spesso un'alterazione del metabolismo cellulare e non permettono il funzionamento ottimale delle strutture della cellula, vi è una pressione selettiva verso la comparsa di nuove mutazioni che compensino il difetto causato dalle precedenti. Questo tipo di compensazione, mediante mutazioni soppressive, che riparano agli errori causati da altre mutazioni, viene definito **soppressione.**

L'isolamento dei mutanti: "screening" vs selezione

- **Mutazioni selezionabili:** conferiscono alcuni vantaggi agli organismi che le possiedono
- **Mutazioni non selezionabili:** anche se portano ad un profondo cambiamento del fenotipo di un organismo

Mutanti antibiotico resistenti



Dischetto imbevuto
di antibiotico

Sviluppo di mutanti antibiotico resistenti all'interno dell'alone di inibizione determinato da un disco per il saggio degli antibiotici.
La resistenza ai farmaci è un esempio di mutazione selezionabile

Mutazione non selezionabile



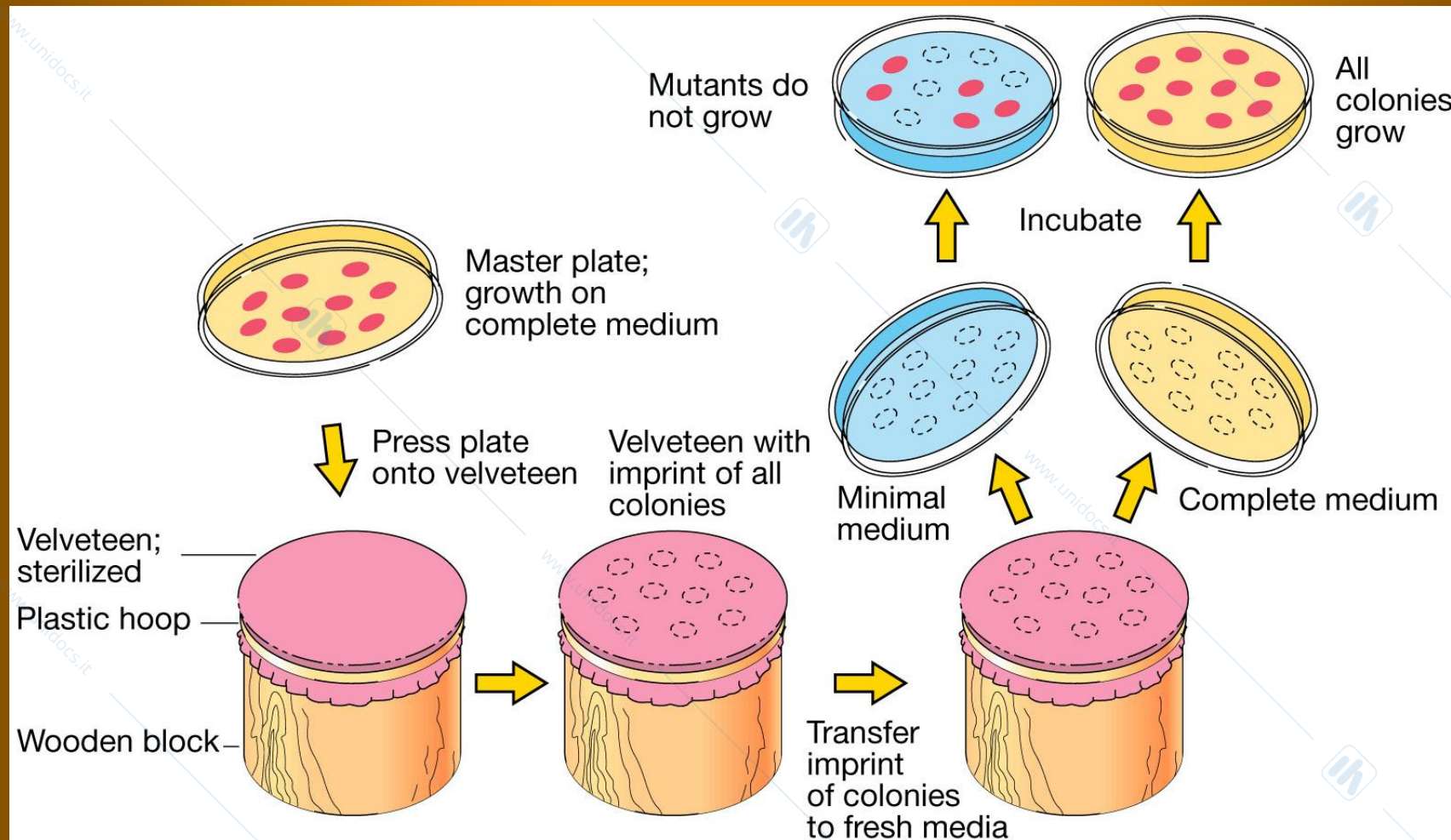
Mutanti spontanei pigmentati e non pigmentati di *Aspergillus nidulans*.

Il ceppo selvatico presenta una pigmentazione verde. I mutanti bianchi o incolori non presentano pigmentazione, mentre i mutanti gialli non sono in grado di convertire il pigmento al colore normale (verde).

Le cellule non pigmentate non presentano né un vantaggio né uno svantaggio rispetto alle colonie parentali pigmentate quando crescono in piastre di agar, ma in natura può esserci un vantaggio selettivo per gli organismi pigmentati.

Possiamo identificare queste mutazioni solo esaminando un gran numero di colonie e cercare quelle differenti attraverso il processo di screening.

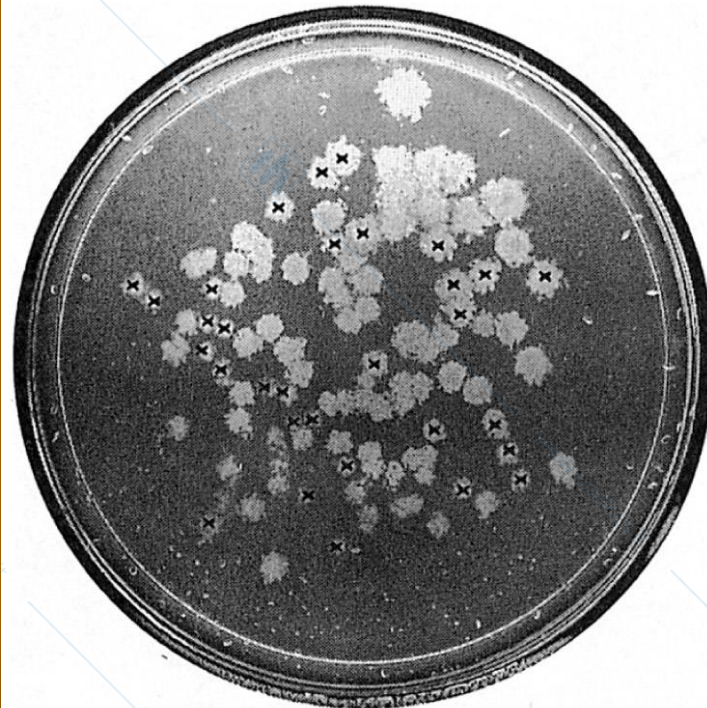
Tecnica del piastramento per replica (*replica plating*) per l'individuazione di mutanti nutrizionali



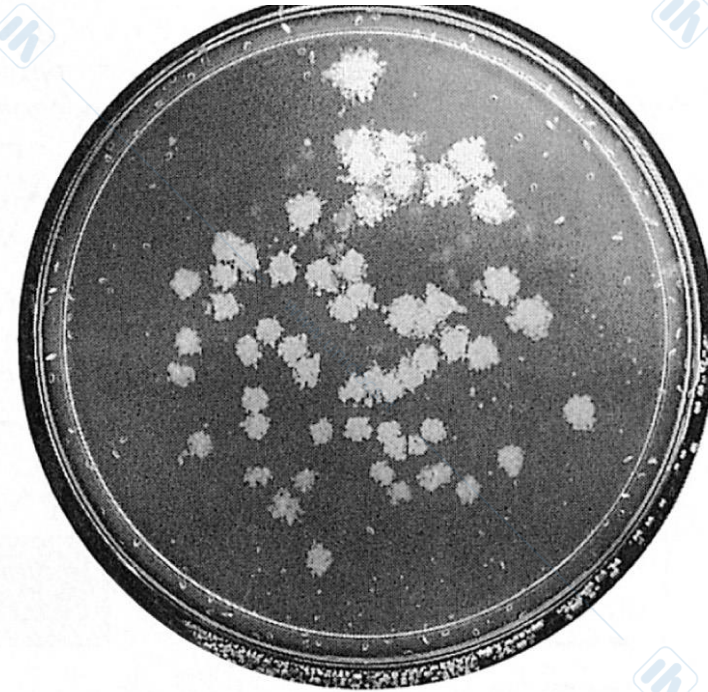
I mutanti non selezionabili possono essere trovati mediante lo "screening" di una larga popolazione di organismi

Tecnica del piastramento per replica (*replica plating*) per l'individuazione di mutanti nutrizionali

Piastra madre
con terreno completo



Piastra replicata
con terreno minimo
privo di leucina



Le colonie che non crescono sulla piastra replicata sono indicate con una X. La piastra replicata manca di un nutriente (leucina) presente sulla piastra madre. Le colonie indicate con la X si dicono **auxotrofe** per leucina (incapaci di crescere in un terreno di coltura minimo, privo del nutriente). Il ceppo selvatico da cui il mutante auxotrofo deriva è detto **prototrofo**.

La frequenza di mutazione

Il tasso di mutazione è generalmente calcolato in termini di **numero di mutanti formati per divisione cellulare**.

Diversi meccanismi di sorveglianza (*proofreading*, riparo del DNA) riducono la frequenza di errore.

- La **frequenza di mutazioni spontanee** è bassa:
 10^{-8} - 10^{-11} per coppia di basi durante un singolo ciclo replicativo
- In un gene (circa 1000 bp) la frequenza di errori è 10^{-4} - 10^{-8} per generazione

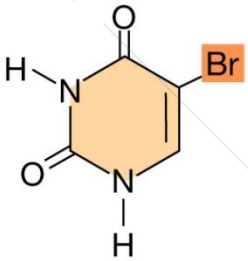
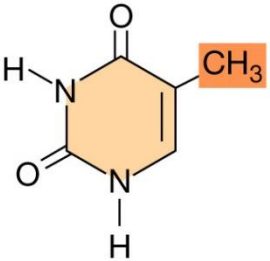
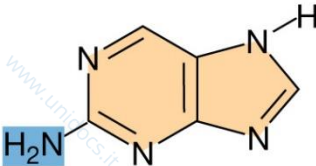
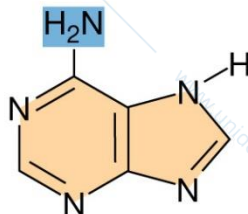
In una coltura normale, di organismi in piena crescita, avente circa 10^8 cellule/ml, esiste la probabilità che in ciascun ml di coltura ci sia un certo numero di mutanti differenti

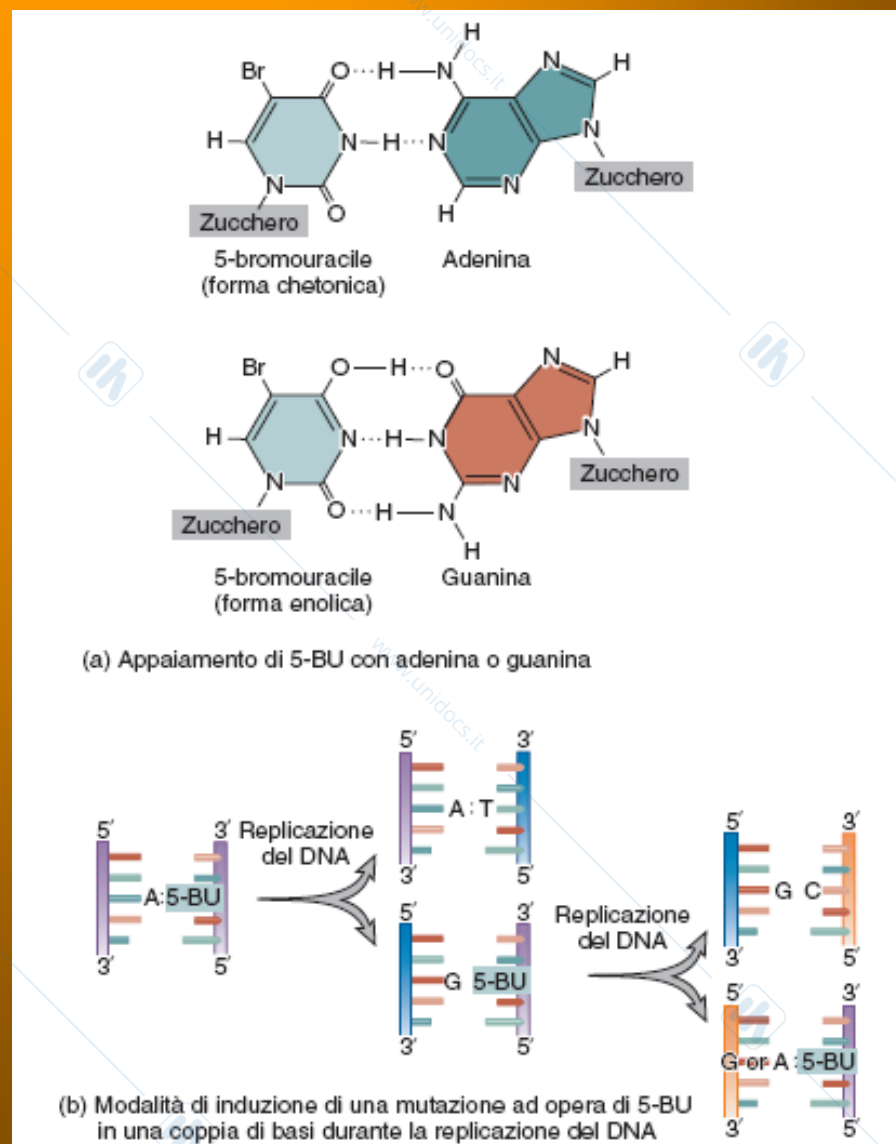
La mutagenesi

Gli agenti mutageni inducono mutazioni aumentando la frequenza di mutazione.

- **Chimici:** analoghi delle basi, agenti alchilanti, agenti intercalanti, specie reattive dell'ossigeno, etc.
- **Fisici:** radiazioni
- **Biologici:** trasposoni, fagi

Analoghi delle basi

Analog	Substitutes for
 <p>5-Bromouracil</p>	 <p>Thymine</p>
 <p>2-Aminopurine</p>	 <p>Adenine</p>



Hanno una struttura simile alla purine (2-aminopurina) e alle pirimidine (5-BU), ma si dimostrano difettosi nell'appaiamento

Agenti mutageni chimici che alterano il DNA

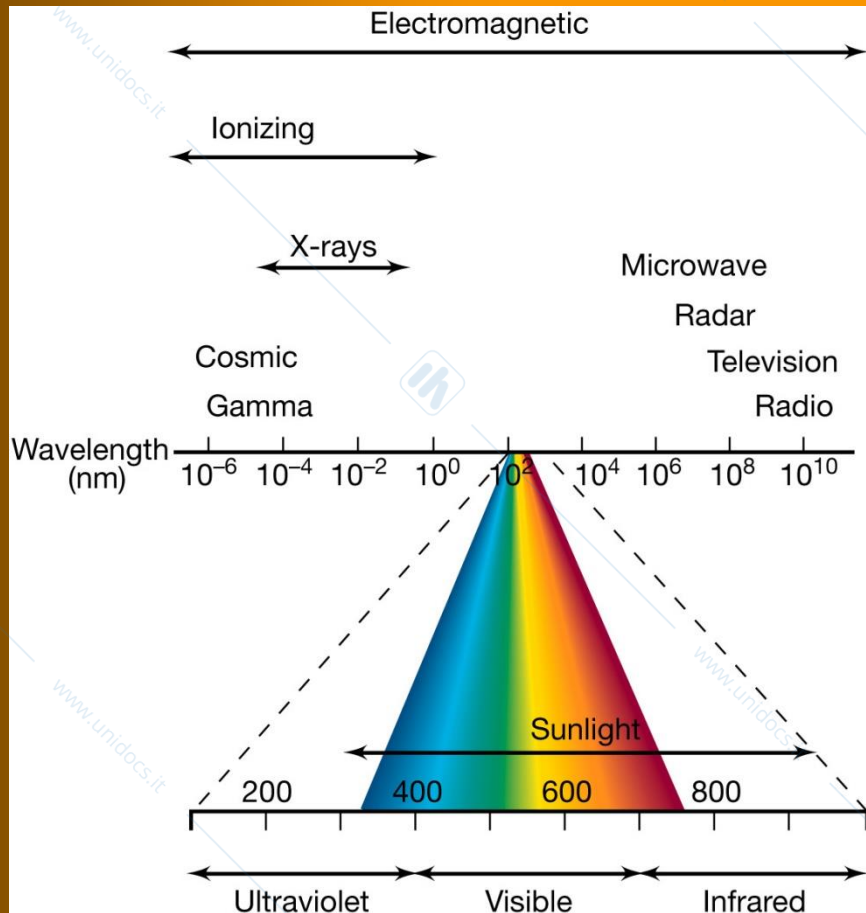
- **Acido nitroso (HNO_2):** provoca deaminazione di A e C, causando la transizione da AT a GC oppure da GC a AT
- **Agenti alchilanti** (es. nitrosoguanidina, sulfonato di etilmetano): determinano la formazione di legami crociati tra le eliche del DNA, causando diversi tipi di mutazioni (puntiformi, delezioni, etc.)
- **Coloranti intercalanti** (acridine, bromuro di etidio): si inseriscono tra due paia di basi del DNA, provocando microinserzioni e microdelezioni con salto di lettura.

Tabella 11.1

Esempi di agenti mutageni

Mutageno del DNA	Effetto(i) sulla struttura
Chimico	
5-bromouracile	Analogo di base
2-amminopurina	Analogo di base
Etile metansulfonato	Agente alchilante
Idrossilamina	Induce l'idrossilazione della citosina
Mostarda azotata	Agente alchilante
Ossido nitroso	Provoca la deaminazione di basi
Proflavina	Agente intercalante
Arancio di acridina	Agente intercalante

Le radiazioni



Gli acidi nucleici (DNA, RNA) assorbono efficientemente le radiazioni UV: max assorbimento a 269 nm.

Le radiazioni mutagene:

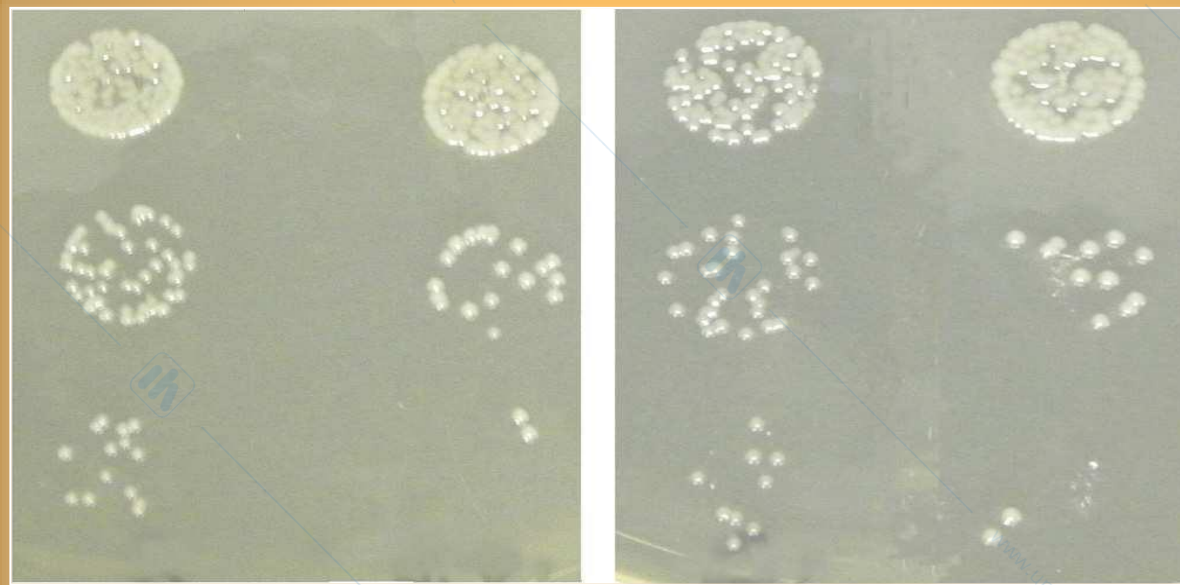
1. **Ionizzanti** (raggi X, raggi gamma e raggi cosmici)
2. **Non ionizzanti** (radiazioni UV)

Le radiazioni UV inducono nel DNA la formazione di dimeri di pirimidine: la formazione di legami covalenti tra due pirimidine adiacenti (C o T) durante la replicazione.



DIMERO DI TIMINA

Saggio UV-mutagenesi



Le radiazioni UV vengono usate per l'isolamento di mutanti nelle colture microbiologiche.

Per la **mutagenesi** è utilizzata la lampada germicida che emette radiazioni UV nella regione a 260 nm. Viene utilizzata una dose di UV che porta alla morte il 90-95% della popolazione cellulare, cercando i mutanti tra le cellule sopravvissute

Il test di Ames

Saggio usato per valutare la mutagenicità di una sostanza chimica, basato sull'analisi dell'insorgenza di mutazioni in ceppi batterici.

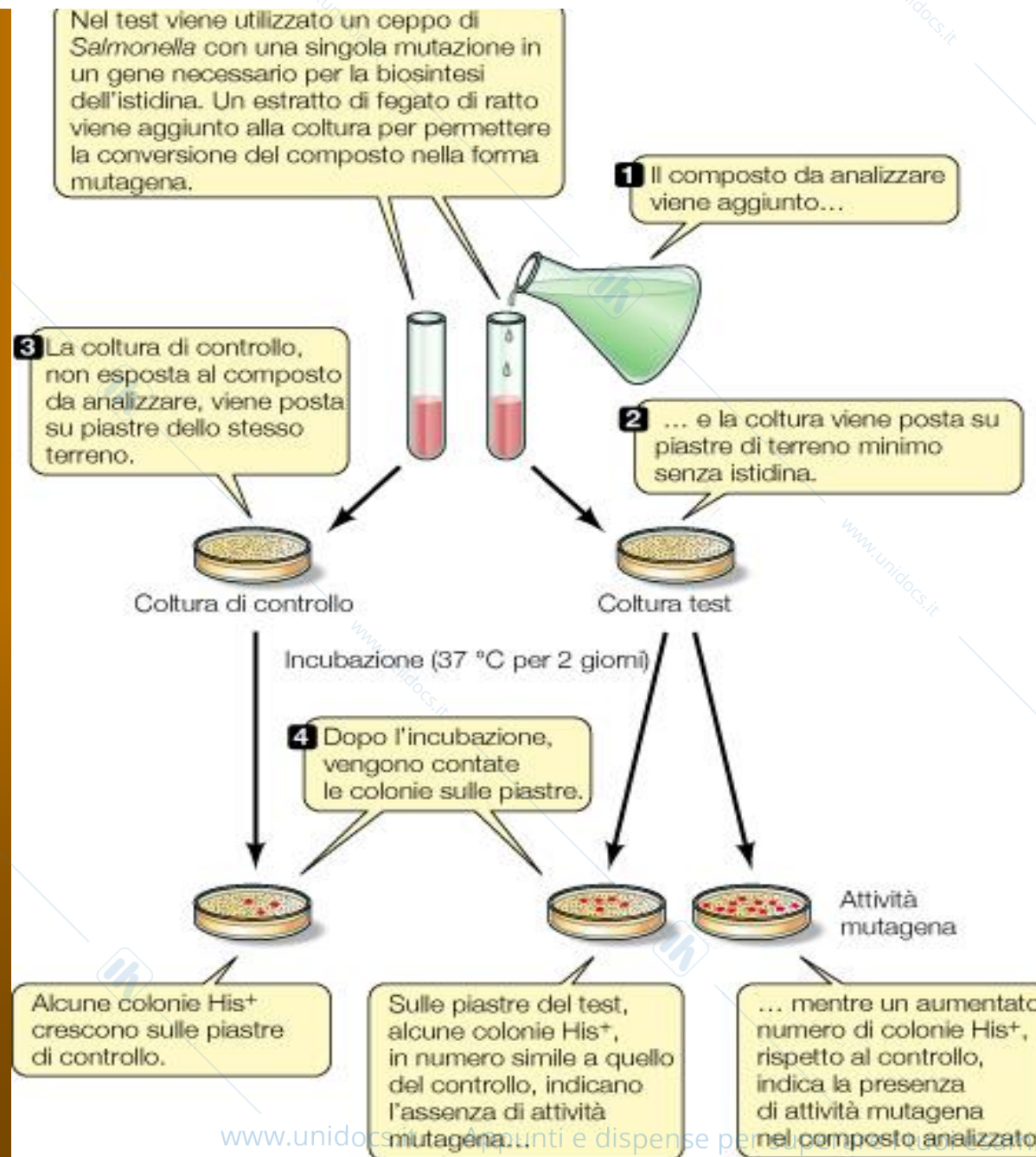
Il metodo standard consiste nel determinare se la **frequenza di retromutazione (reversione)** in ceppi batterici auxotrofi per alcuni nutrienti risulti **aumentata** dopo il contatto con il sospetto mutageno

Revertante: ceppo in cui il fenotipo selvatico perso nel mutante viene ripristinato

E' uno dei pre-test più utili per determinare la cancerogenesi potenziale di un composto

Il test di Ames... in liquido

mutante di *Salmonella enterica* che richiede istidina (auxotrofo His⁻)



Il test di Ames...in solido



Entrambe le piastre sono state inoculate con una coltura di un mutante di *Salmonella enterica* che richiede istidina (auxotrofo His⁻).

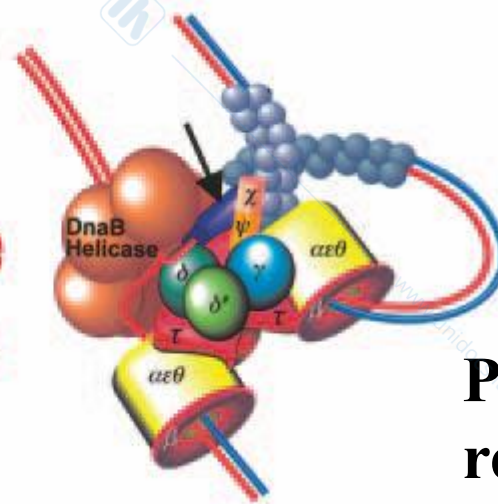
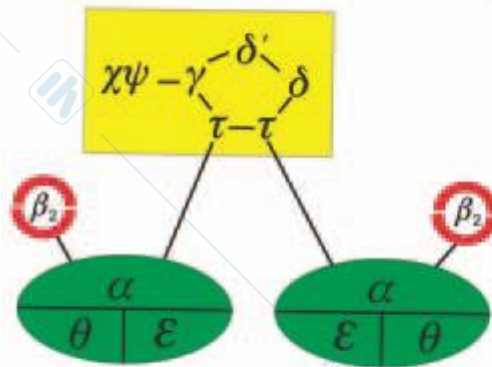
Il terreno non contiene istidina per cui solamente le cellule che retromutano a selvatiche possono crescere.

I retromutanti spontanei appaiono su ambedue le piastre, ma la sostanza chimica nel disco di carta della piastra in basso, ha determinato un aumento della frequenza di mutazione, come dimostrato dal gran numero di colonie che circondano il disco.

Non si osservano revertanti in stretta vicinanza del disco perché la concentrazione del mutageno è così alta da risultare letale.

I sistemi di riparo

Le cellule posseggono diversi sistemi per correggere gli errori e riparare i danni del DNA



PolIII:
replicasi batterica

Alcuni processi sono però *errore-prone*, per cui è lo stesso processo di riparo che introduce mutazioni.

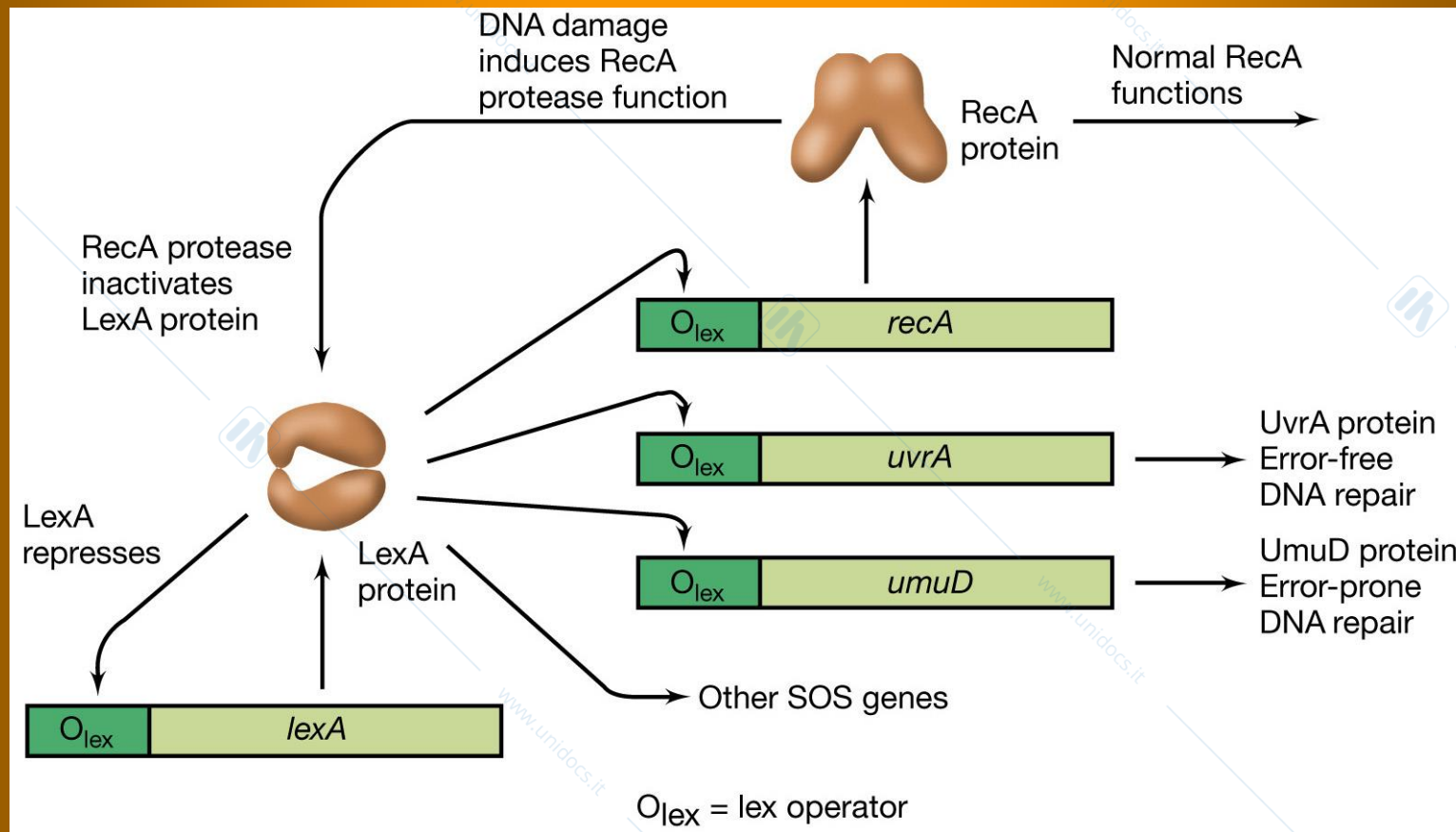
(DNA mutasi: polimerasi II, IV e V)

Il fenotipo mutatore

Un ceppo con una frequenza di mutazione aumentata, viene definito "ceppo mutatore".

- Spesso il fenotipo mutatore è conseguenza di difetti nei sistemi di riparo, che risulta selezionato in ambienti complessi e molto variabili
- In alcuni casi questo fenomeno rappresenta un vantaggio selettivo per il microrganismo che può generare mutazioni adattative, che portano ad un fenotipo che può sopravvivere a particolari stress.

Il meccanismo della risposta SOS



Il danno al DNA serve come segnale di allarme per la cellula determinando l'induzione coordinata di diverse funzioni cellulari coinvolte nel riparo.

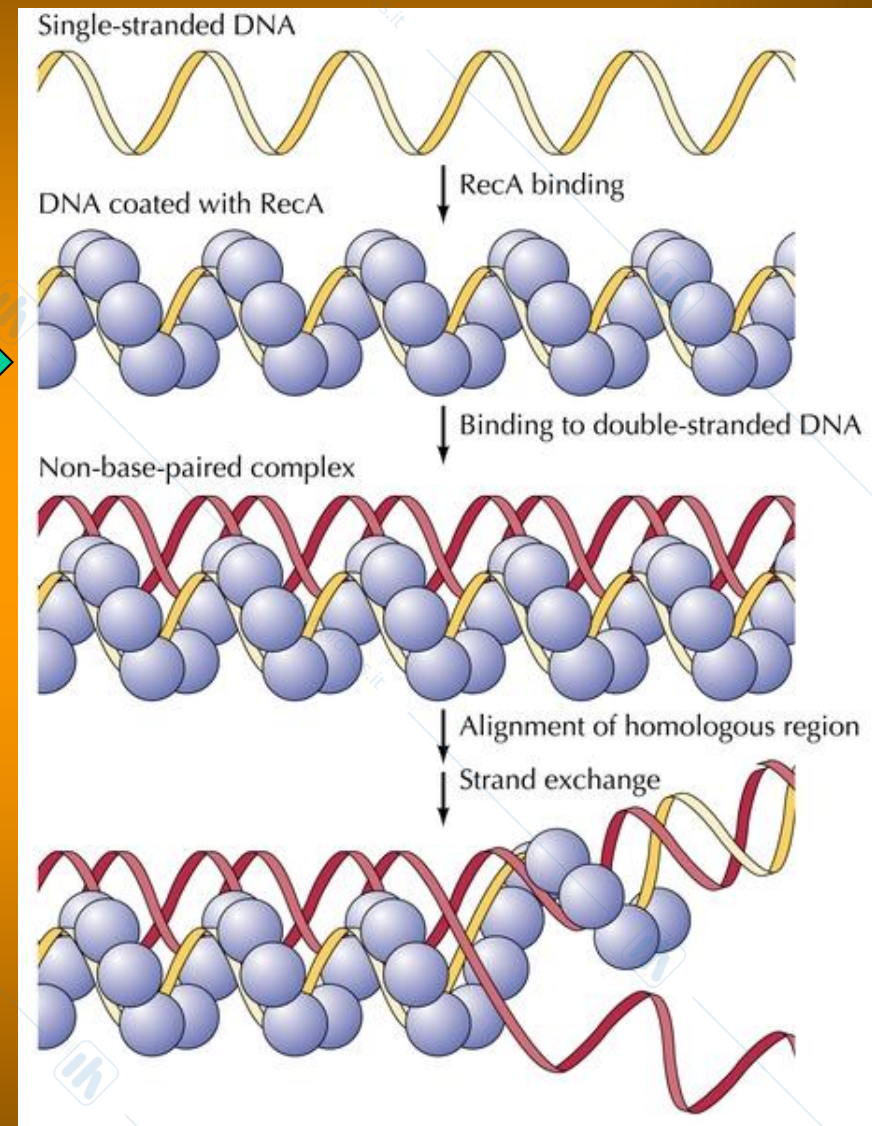
RecA, una proteasi del sistema SOS, taglia LexA (repressore dei geni del sistema SOS) inattivandola.

L'inattivazione di LexA determina l'espressione dei geni *recA*, *uvrA*, *umuD* e quindi la sintesi di proteine coinvolte nel riparo

RecA è coinvolta nella ricombinazione omologa e nel riparo per ricombinazione

RecA promuove lo scambio di filamenti tra DNA omologo e la formazione di eteroduplex.
(modello di rottura del doppio filamento)

RecA è fondamentale per l'attività dei pathway RecBCD e RecFOR che intervengono nel riparo postreplicativo dei danni al DNA.



La ricombinazione omologa

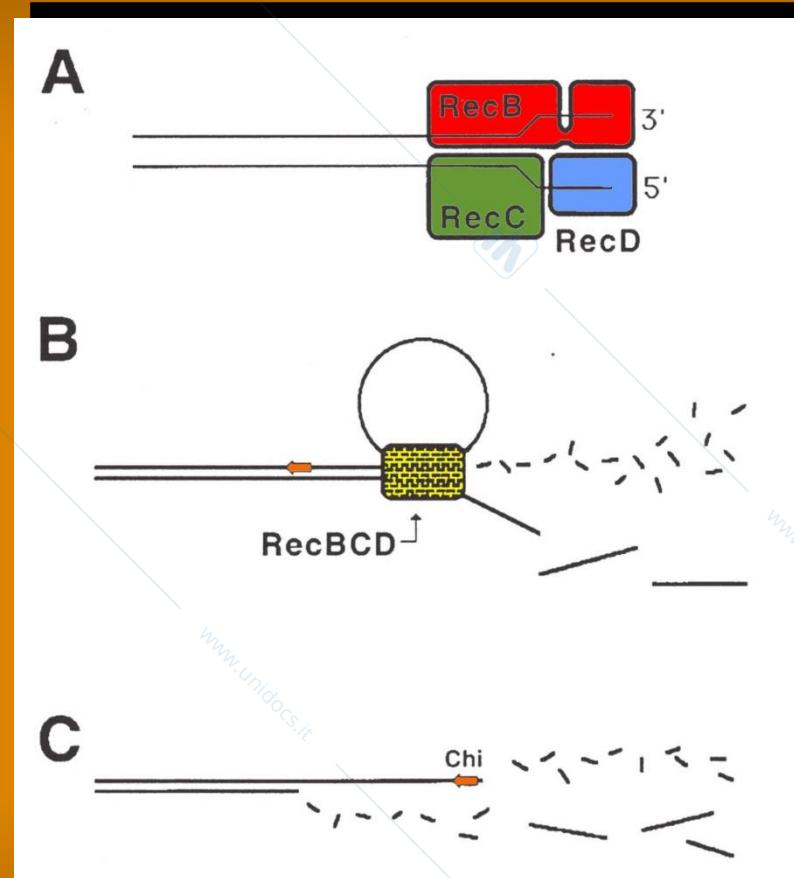
Tabella 11.3

Proteine implicate nella ricombinazione omologa in *E. coli*

Proteina	Descrizione
Rec BCD	Riconosce le rotture a doppio filamento e genera, quindi, regioni a singolo filamento in corrispondenza del sito di rottura, coinvolte nell'invasione del filamento
Proteina di legame a singolo filamento	Impedisce l'eccessiva degradazione del filamento a opera di RecBCD
RecA	Promuove l'invasione del filamento e lo spostamento del filamento complementare per generare un'ansa D
RecG	Contribuisce alla formazione di giunzioni Holliday e promuove la branch migration
RuvABC	Endonucleasi che lega le giunzioni Holliday, promuove la branch migration e taglia i filamenti in corrispondenza della giunzione Holliday per separare i cromosomi

La ricombinazione omologa è svolta dai prodotti dei geni *rec*

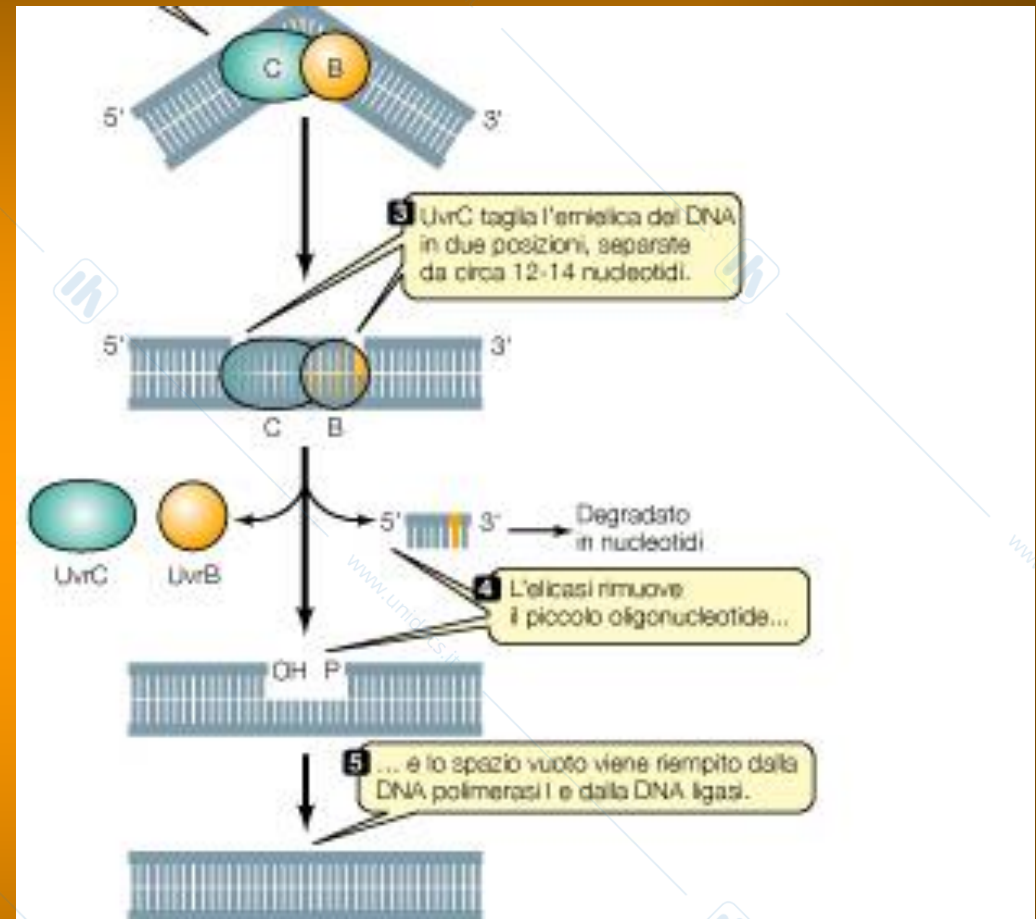
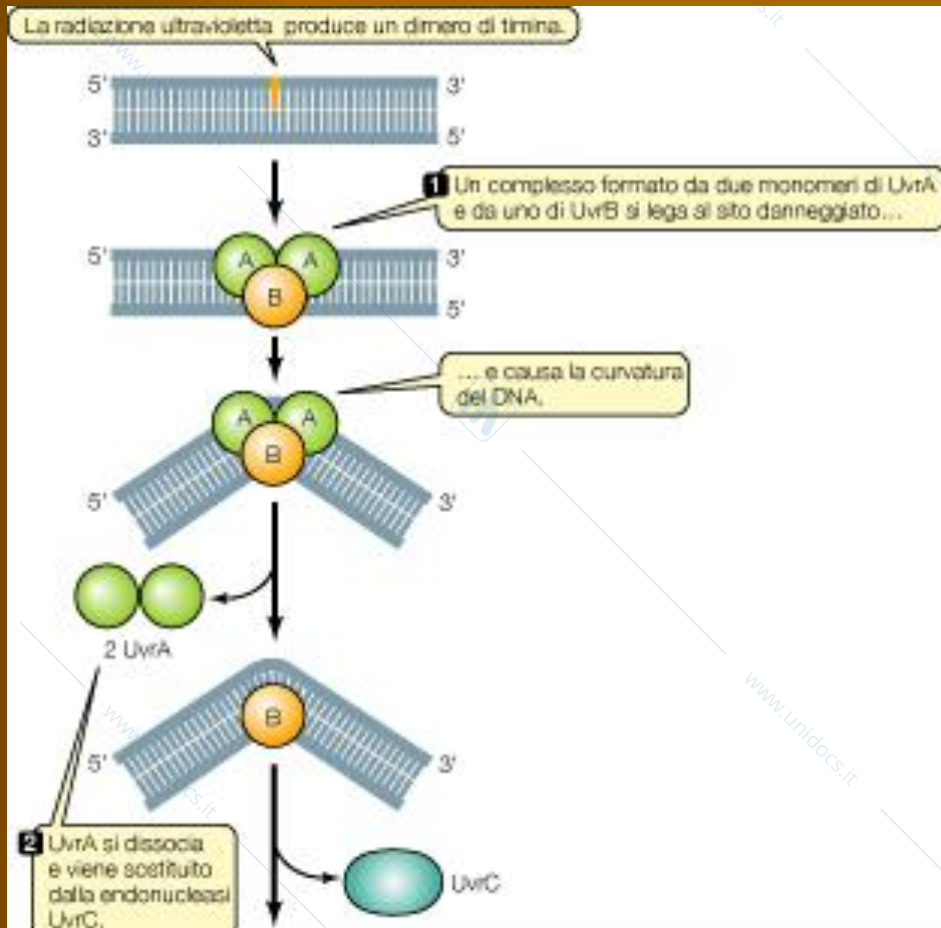
Meccanismo d'azione del complesso RecBCD una esonucleasi responsabile dei meccanismi di ricombinazione e riparazione del DNA



- A:** Legame del complesso RecBCD alla doppia elica del DNA.
B: Azione del complesso enzimatico prima del sito Chi.
C: Azione del complesso enzimatico dopo il sito Chi.

sito Chi converte il complesso RecBCD degradante nel complesso RecBCD ricombinante. Dopo il sito Chi, RecBCD continua a degradare il DNA ma con velocità ridotta e solo il filamento 5' terminale, generando un filamento 3' terminale sporgente

UvrABC: endonucleasi coinvolta nel riparo per escissione



Il MMR system in *E. coli*

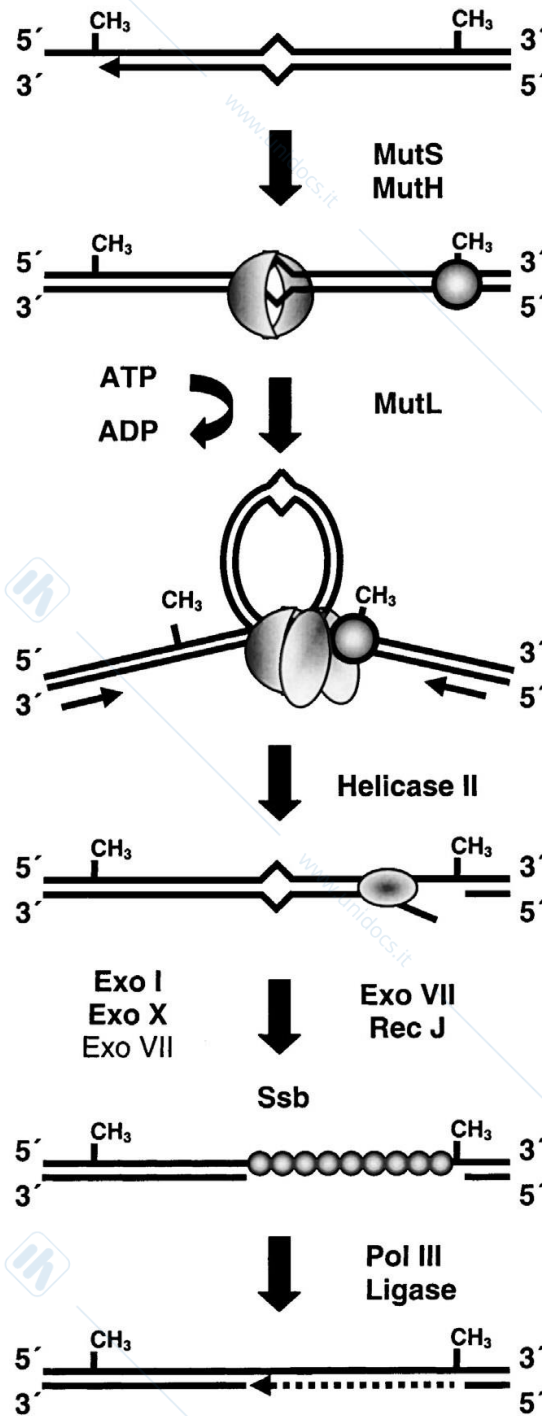
MutS: omodimero che riconosce il mismatch

MutH: endonucleasi monomeriche che lega e incide i siti GATC emimetilati

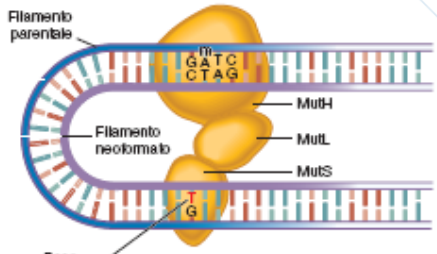
MutL: ATPasi che in forma di dimero interagisce con elicasasi di tipo II (tipo UvrD)

Le **esonucleasi** rimuovono il tratto di filamento che comprende il mismatch

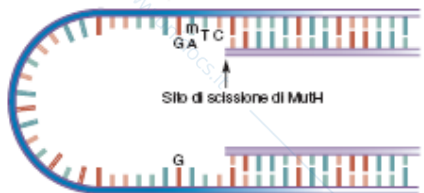
La **DNA polimerasi III**, le **proteine Ssb** e la **ligasi** completano il riparo



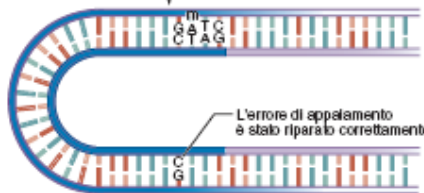
La proteina MutS trova l'errore di appaiamento. Il complesso MutS/MutL si lega a MutH, a sua volta già congiunto a una sequenza emimetilata.



MutH crea un taglio lungo il filamento non metilato. Una esonucleasi comincia ad agire in corrispondenza del sito di scissione e digerisce il filamento non metilato appena al di là dell'errore di appaiamento di basi.



La DNA polimerasi riempie la lacuna. La DNA ligasi sigilla le estremità.



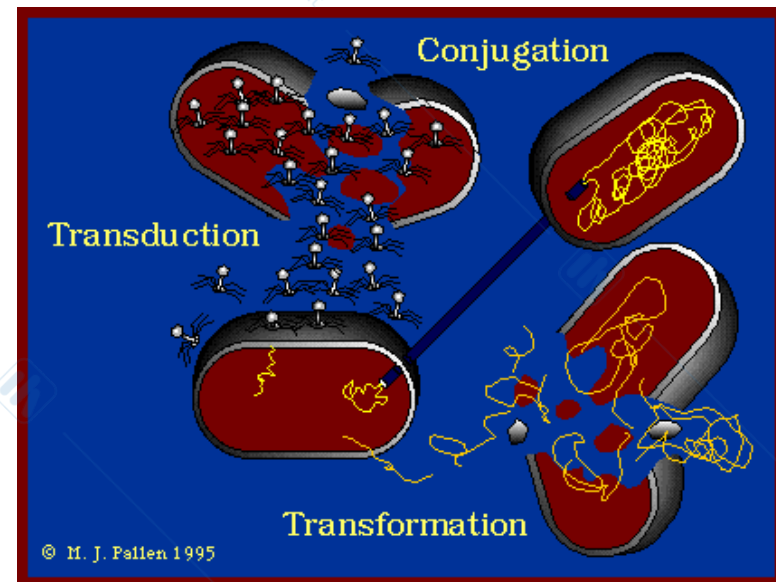
L'errore di appaiamento è stato riparato correttamente.

Le tecniche di genetica batterica: in vivo

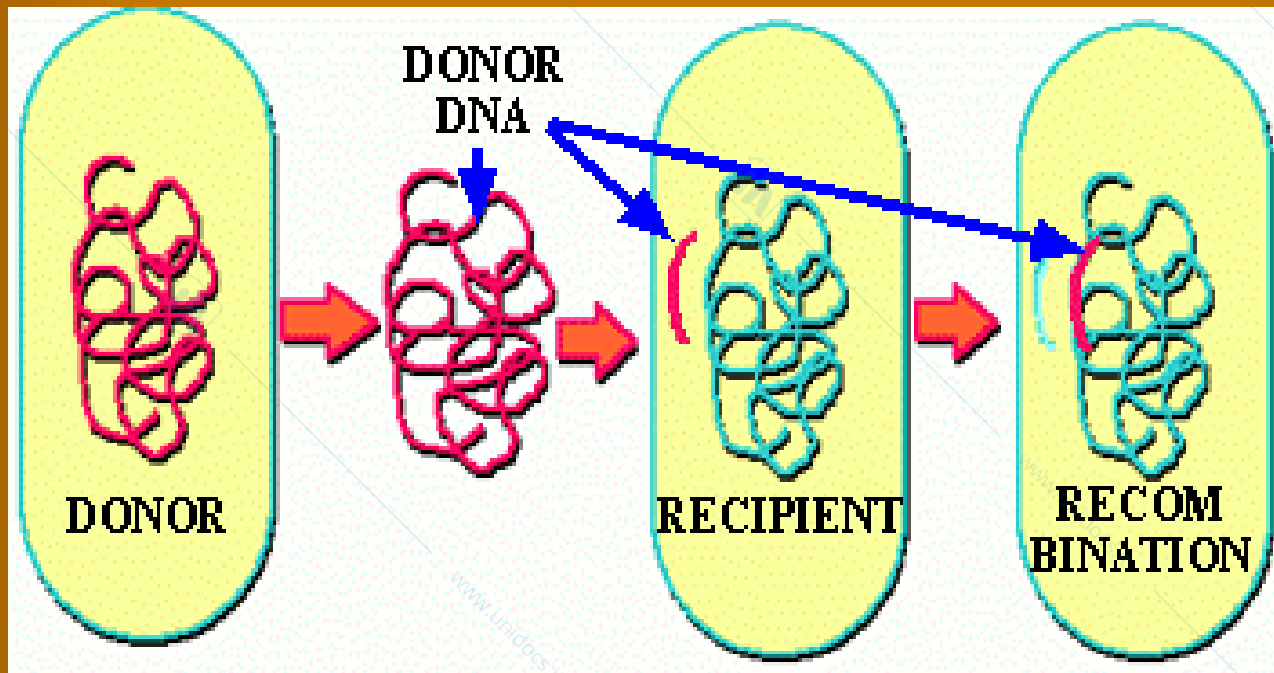
Per poter studiare l'organizzazione e la funzione del genoma batterico si possono sfruttare i processi attraverso cui i batteri si scambiano materiale genetico in vivo.

Questi processi comprendono:

- **Trasformazione**
- **Coniugazione**
- **Trasduzione**

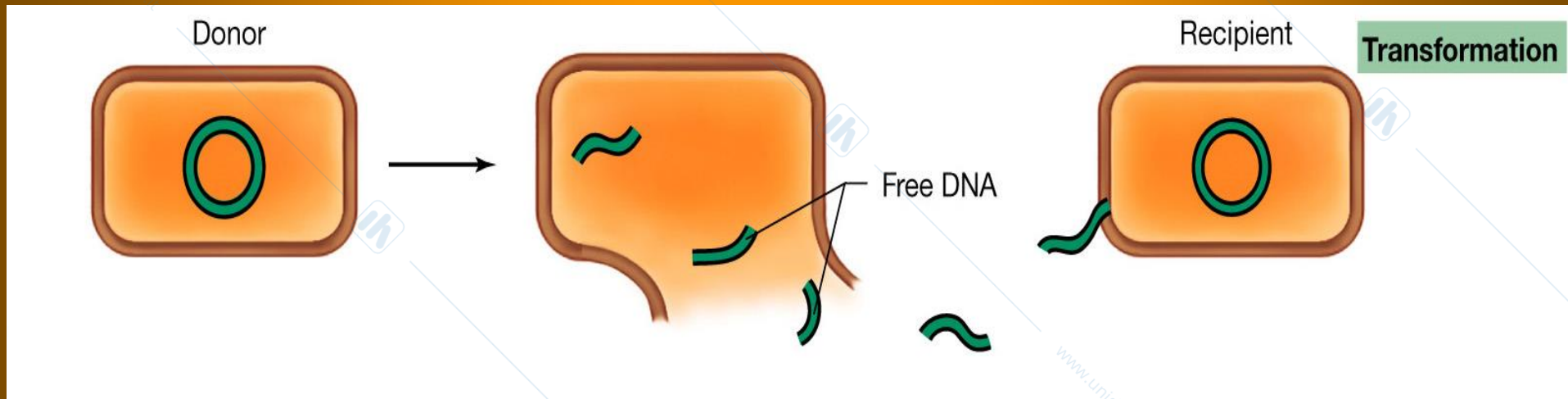


TRASFERIMENTO GENETICO ORIZZONTALE



Durante questi processi, si ha il trasferimento di parte del materiale genetico di un batterio ad un altro batterio, con formazione di un diploide parziale ed instabile.

La trasformazione



La trasformazione è il processo attraverso il quale molecole libere di DNA vengono incorporate e integrate nel genoma di cellule di un organismo ricevente.

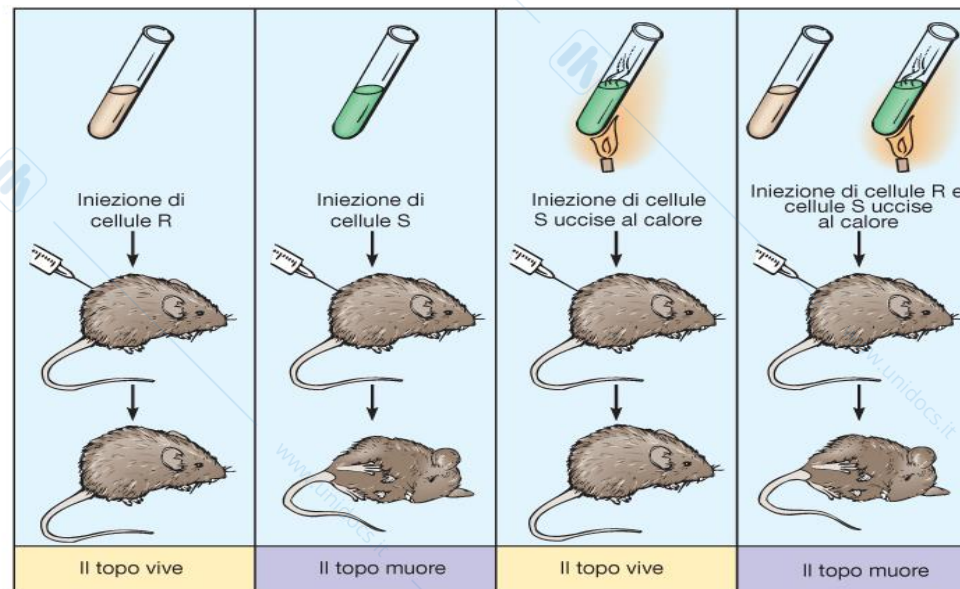
Per integrazione s'intende un'associazione stabile tra il DNA della cellula donatrice e quello della cellula ricevente, per cui il DNA esogeno si replica con il resto del genoma e manifesta la sua potenzialità genetica nel fenotipo della cellula trasformata.

TRASFORMAZIONE

1. Non richiede uno stretto contatto cellula-cellula
2. Utilizza DNA libero
3. Tipica dei batteri del suolo
4. Le cellule in grado di captare il DNA libero vengono definite competenti
5. Processo di ricombinazione

La trasformazione: l' esperimento di Griffith

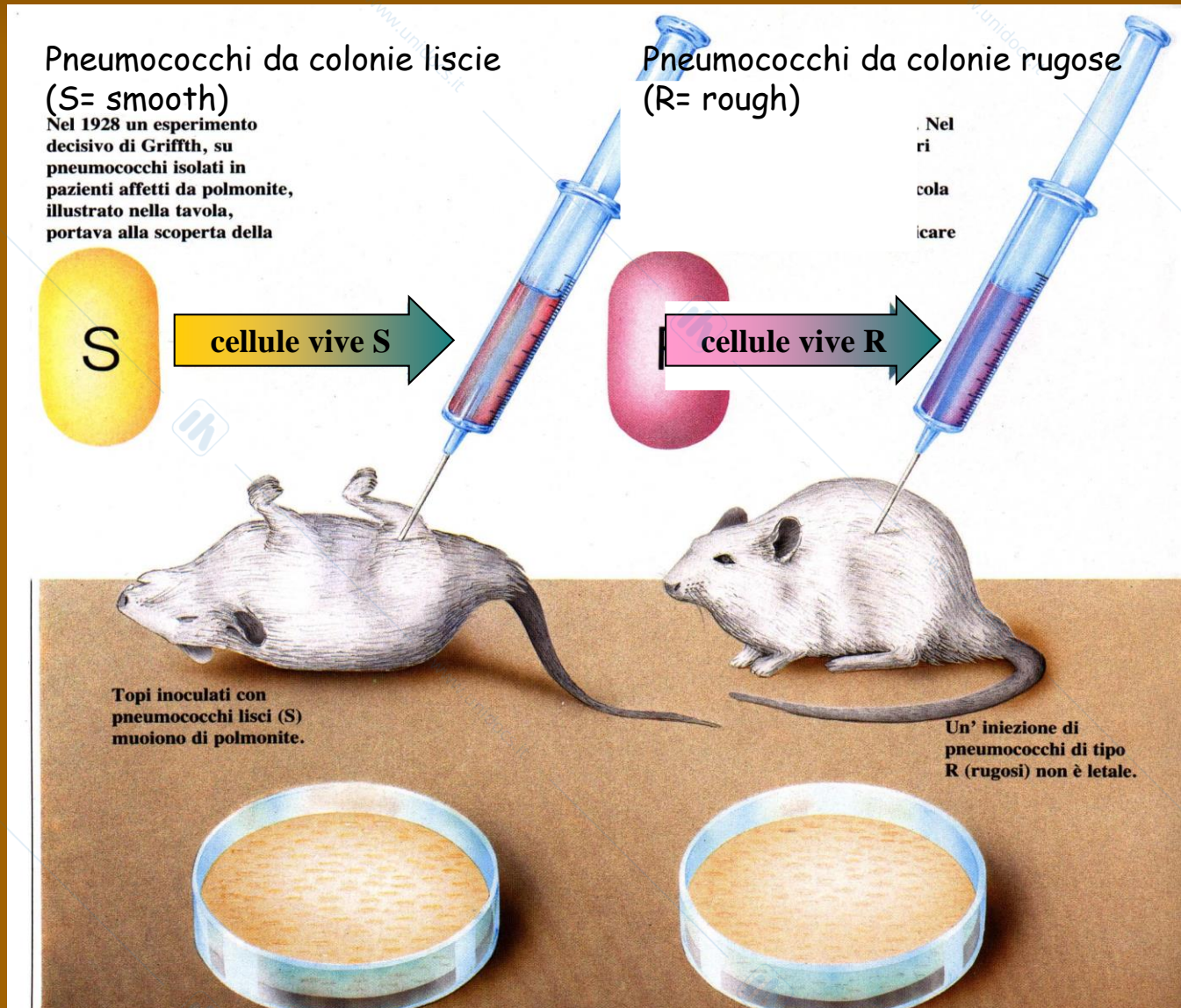
Il fenomeno fu scoperto nel 1928 da Griffith durante uno studio sulla virulenza dello pneumococco.



La virulenza di questo batterio dipende dalla presenza di una capsula polisaccaridica che conferisce alle colonie un aspetto liscio (Smooth, S).

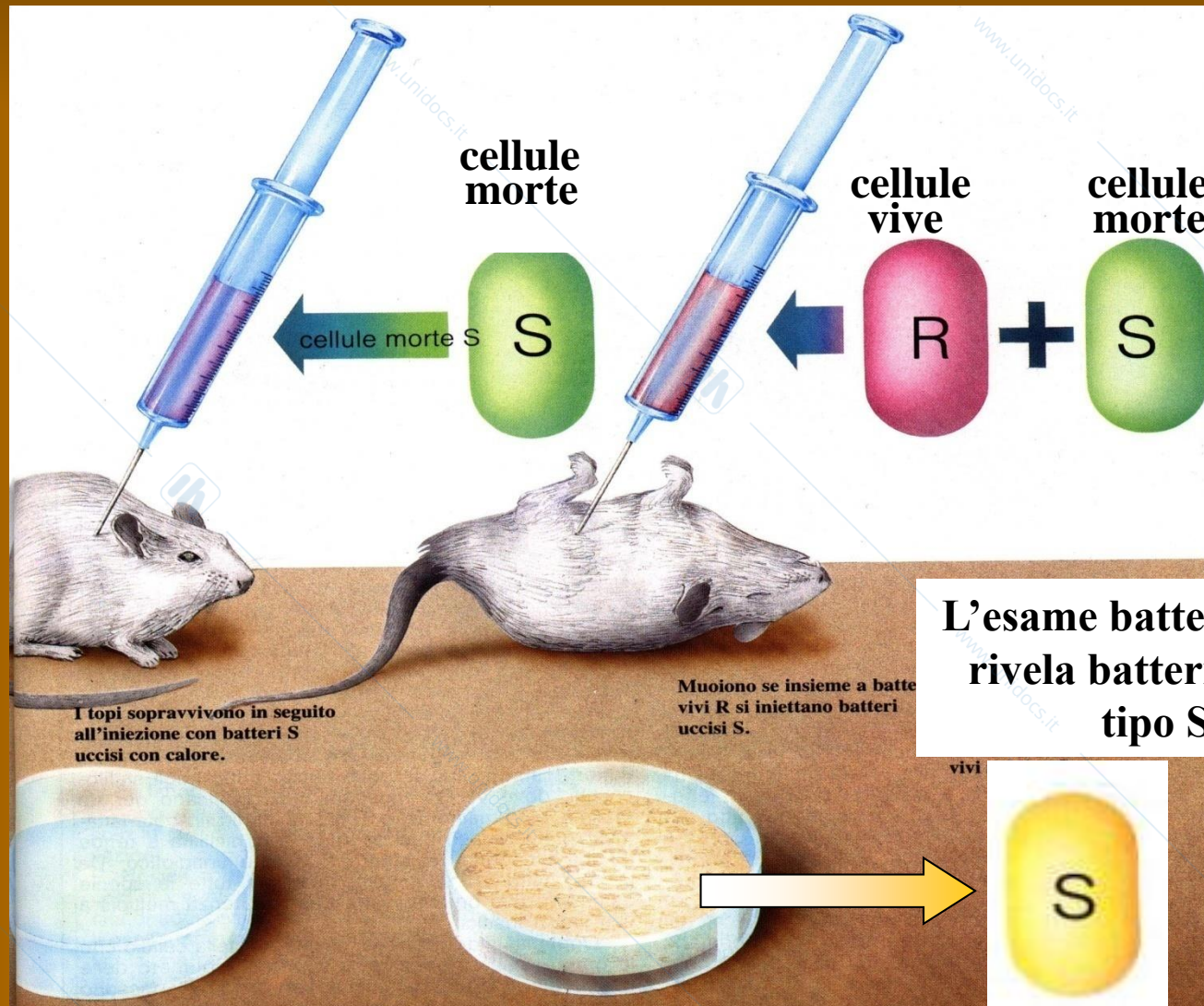
Ceppi che hanno perso la capacità di sintetizzare la capsula non sono più virulenti, e sono facilmente riconoscibili perché formano colonie di tipo rugoso (Rough, R); questi ultimi derivano per mutazione da ceppi S.

L'esperimento di Griffith



Con il suo esperimento Griffith dimostrò che se i topi erano inoculati con batteri vivi di tipo S, morivano. Invece, iniettando una sospensione di pneumococchi vivi di tipo R non si osservava alcun effetto patogeno sull'animale.

L'esperimento di Griffith



Iniettando una miscela di batteri R vivi e di batteri S uccisi con il calore, si provocava invece la morte dei topi, da cui era possibile isolare pneumococchi vivi con le stesse caratteristiche antigeniche dei batteri S utilizzati per l'infezione mista.

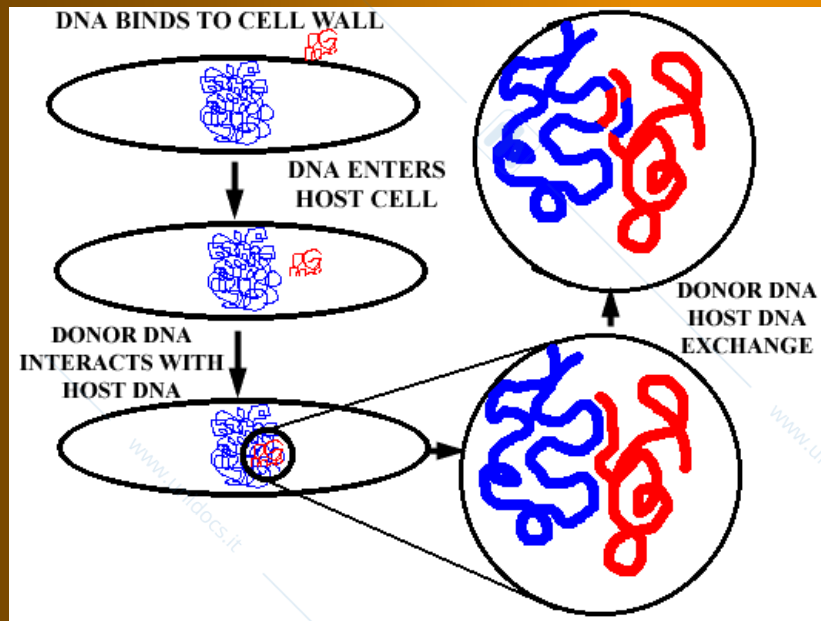
La trasformazione: l' esperimento di Griffith

- Griffith ipotizzò che i batteri morti di tipo S contenevano una qualche sostanza, che egli chiamò **principio trasformante**, capace di trasformare i batteri R in batteri virulenti di tipo S.

- Successivamente nel 1944 Avery insieme ad altri ricercatori, mediante esperimenti in vitro dimostrarono che il **"principio trasformante"** era DNA.

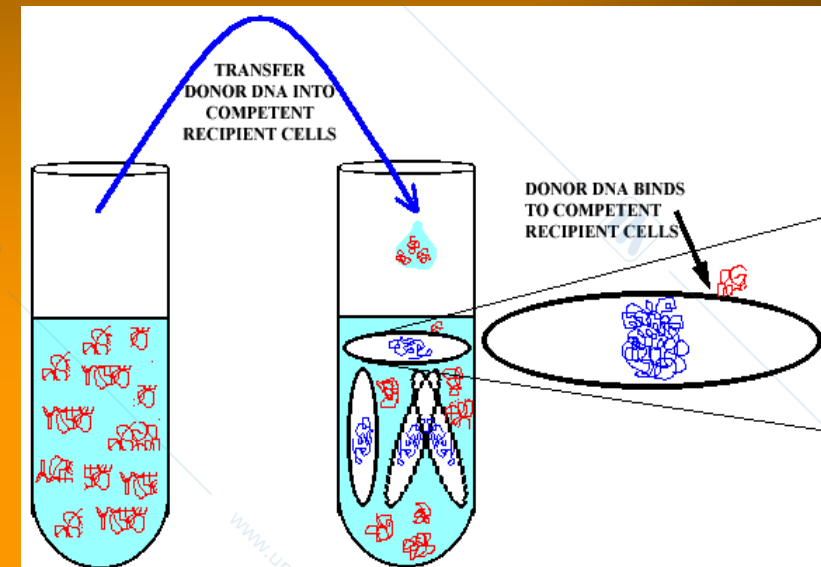
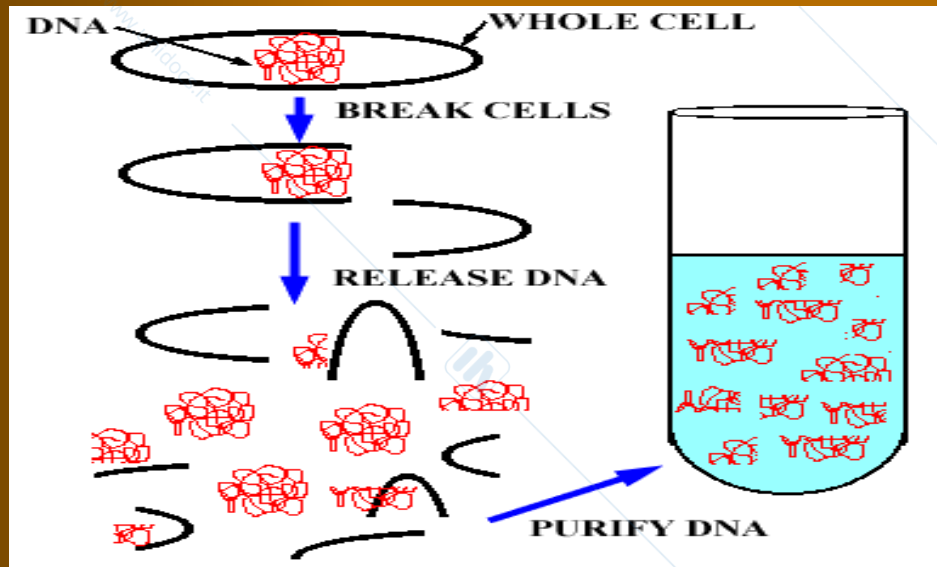
Il DNA contenuto nell'estratto, una volta integrato nella cellula batterica, conferiva la capacità di sintetizzare la capsula polisaccaridica e quindi la virulenza.

La trasformazione naturale



- La trasformazione è un processo che avviene naturalmente in numerosi batteri, dei quali i più studiati appartengono ai generi *Bacillus*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Neisseria* e *Mycobacterium*.
- I batteri non sono sempre trasformabili: vi è uno stato fisiologico, detto competenza, in cui possono essere trasformati. In *B. subtilis* la fase di competenza è transitoria e corrisponde alla fine della crescita esponenziale.
- **In un esperimento di trasformazione**, i batteri vengono esposti al DNA e dopo una breve incubazione vengono seminati su opportuno terreno selettivo che permette la crescita soltanto degli eventuali batteri trasformanti, cioè dei ricombinanti che hanno sostituito parte del proprio genoma con il DNA derivato dal ceppo donatore. Molto utili sono pertanto i mutanti auxotrofi e i mutanti resistenti ad antibiotici; ma è possibile trasformare per qualunque marcatore genetico.

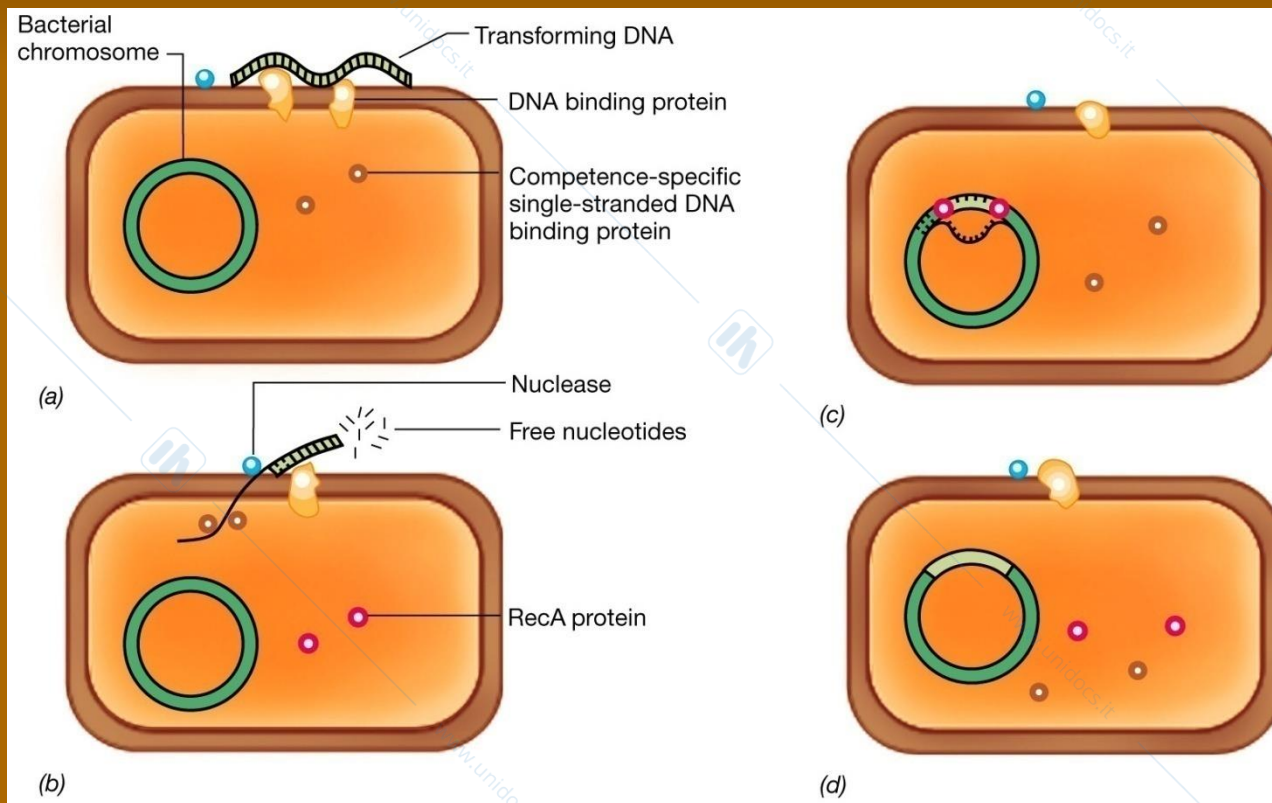
LA TRASFORMAZIONE ARTIFICIALE



Altri batteri, invece, come *E. coli*, non presentano durante la loro crescita una fase fisiologica in cui siano competenti per la trasformazione.

Colture di *E. coli* possono essere rese artificialmente competenti se vengono esposte ad alte concentrazioni di ioni metallici (calcio, ad esempio) e se si opera a temperature opportune, rendendole capaci di incorporare DNA esogeno

La trasformazione



Il processo di trasformazione può essere diviso nelle seguenti fasi:

- **adsorbimento del DNA su recettori specifici** presenti sulla cellula competente;
- **incorporazione del DNA nella cellula;**
- **eclisse**, periodo che intercorre fra l'incorporazione e il ritorno della capacità di trasformare;
- **integrazione del DNA donatore** nel cromosoma della cellula ricevente;
- **espressione fenotipica del nuovo carattere.**

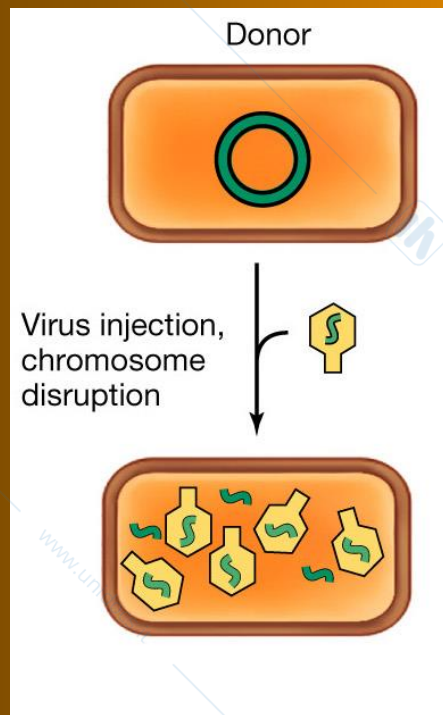
La trasformazione: differenze tra Gram+ e Gram-

Una delle differenze più importanti tra Gram+ e Gram- riguarda l'incorporazione del DNA.

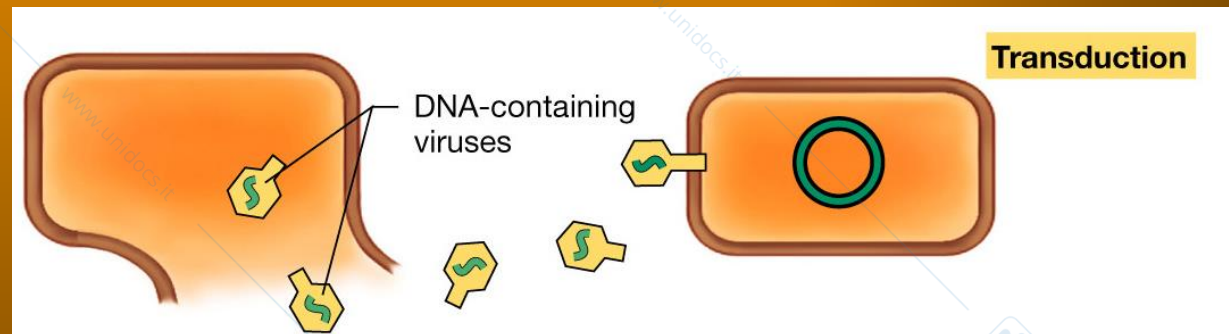
In *Haemophilus*, batterio Gram negativo, ad esempio è **più selettiva**.

In questo batterio, infatti, viene incorporato solo DNA di *Haemophilus*; e solo molecole che portano una particolare sequenza di poche paia di basi, ripetuta numerose volte nel genoma, vengono integrate nel cromosoma della cellula ricevente.

La trasduzione

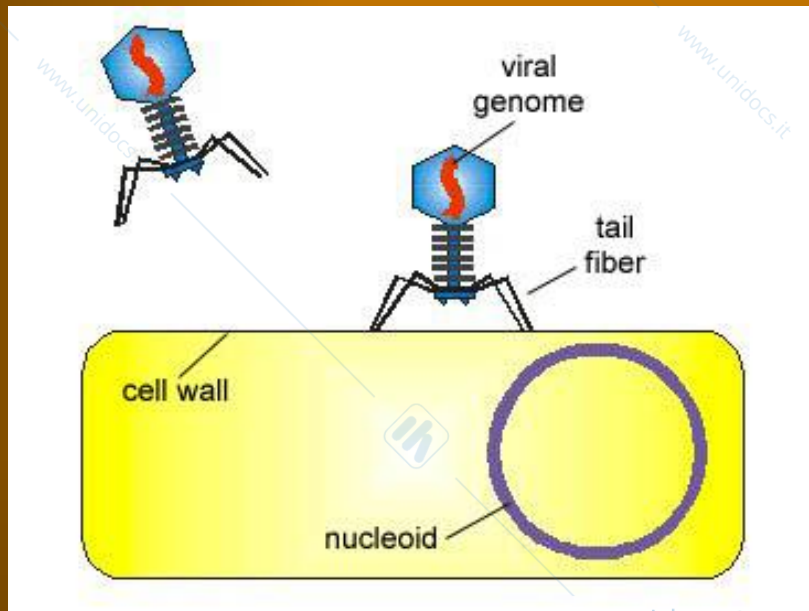
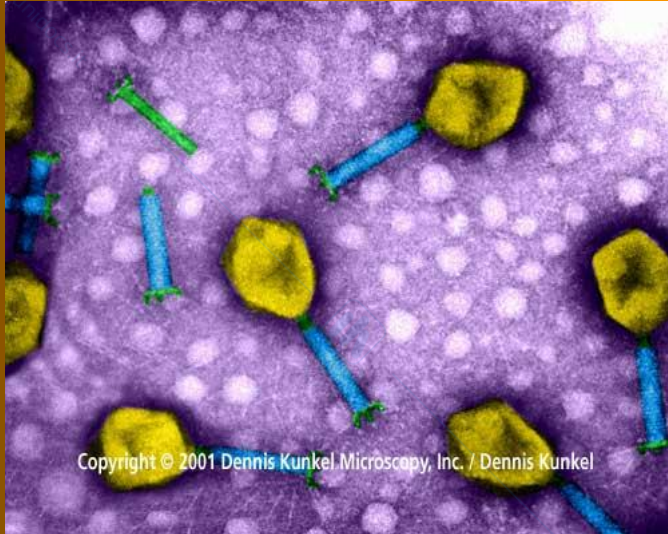


BATTERIOFAGO:
virus batterico



La trasduzione è un processo di trasferimento di materiale genetico in cui il DNA del donatore si trasferisce grazie alla mediazione di un virus.

La trasduzione



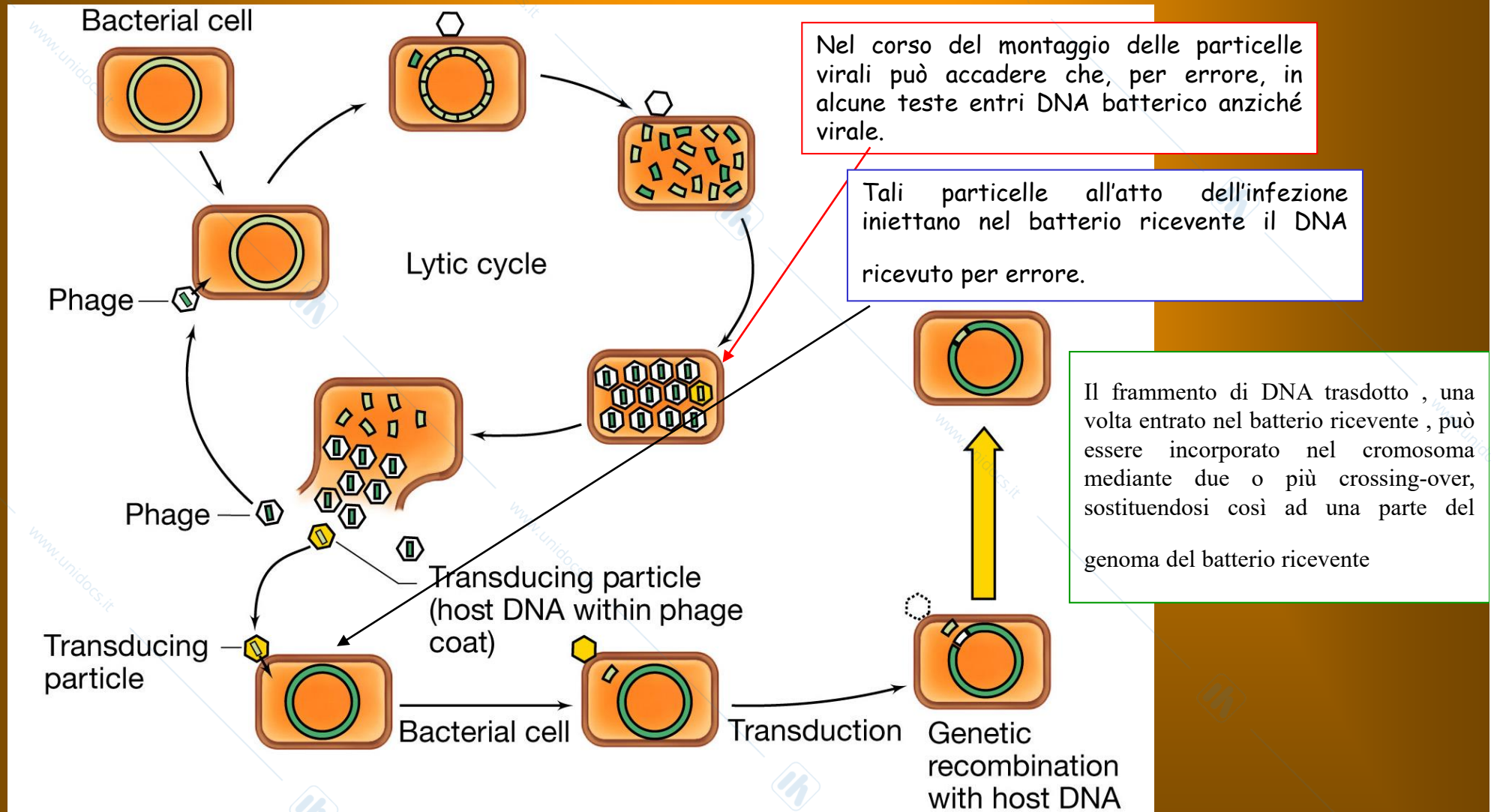
- Alcuni batteriofagi possono agire come vettori di informazione genetica per i loro ospiti, trasportando geni batterici da una cellula all'altra.
- Questo fenomeno è stato denominato trasduzione e trasducente si dice la particella fagica (quasi sempre un fago temperato) che trasferisce il materiale genetico.
- Dopo la scoperta del fenomeno in *Salmonella*, la trasduzione è stata trovata in diversi batteri tra cui *E.coli*, *B.subtilis*, *Shigella*, *Proteus*, e *Staphylococcus*.

La trasduzione

Si conoscono due principali tipi di trasduzione:

1. **Generalizzata (associata al ciclo litico)**
trasduzione nella quale ogni gene batterico può essere potenzialmente trasferito
2. **Specializzata (associata al ciclo lisogeno)**
trasduzione nella quale specifici geni batterici sono trasferiti

La trasduzione generalizzata



Nella trasduzione generalizzata il batteriofago è capace di trasdurre un qualsiasi gene dal ceppo donatore al ceppo ricevente.

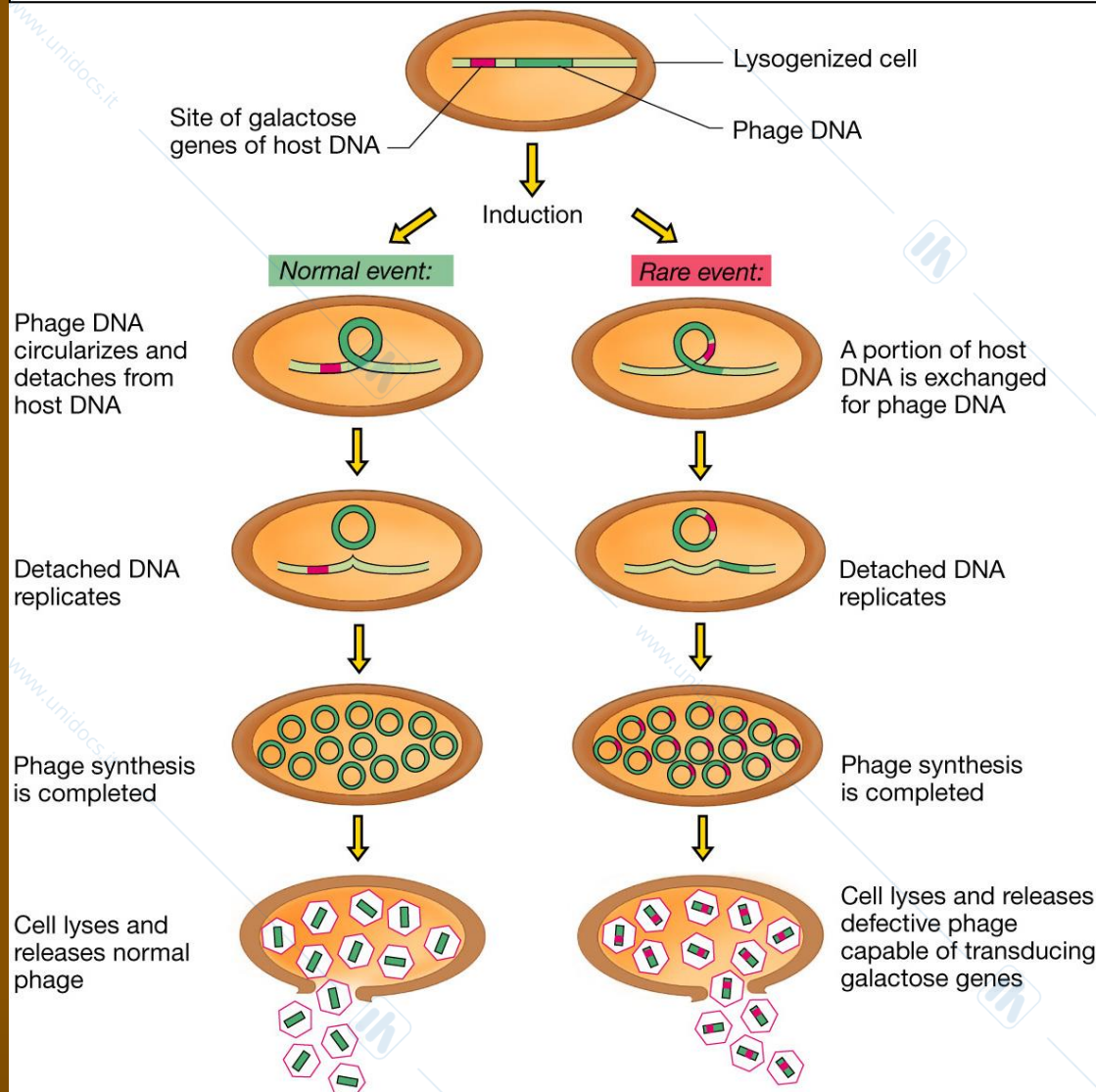
La trasduzione generalizzata

Le principali caratteristiche della trasduzione generalizzata sono:

- 1) tutti i marcatori genetici hanno la possibilità di essere trasdotti, anche se spesso vengono trasdotti con frequenze diverse;
- 2) il frammento di DNA trasdotto viene integrato nell'ospite e si sostituisce alla regione omologa del DNA della cellula ricevente ;
- 3) i batteri trasdotti non sono lisogeni e non portano parte del genoma fagico;
- 4) i fagi che danno trasduzione generalizzata possono trasdurre anche plasmidi.

La trasduzione specializzata

La trasduzione specializzata viene operata solo da fagi temperati, e solo in seguito a induzione di un batterio lisogeno.



Alcuni geni del cromosoma batterico adiacenti al fago λ integrato sono erroneamente escissi insieme al DNA fagico. Allo stesso tempo rimangono nel cromosoma batterico alcuni geni fagici. Per cui **le particelle fagiche che si formano sono difettive.**

In questo esempio la particella fagica alterata, detta λ_{dgal} , è difettiva poiché i geni fagici si sono persi e non può generare fagi maturi. Le particelle, per riprodursi, hanno bisogno della presenza di un fago normale (λ^+), che supplisce alle funzioni mancanti.

A sinistra: Eventi litici normali

A destra: Produzione di particelle che trasducono geni del galattosio in una cellula di E. coli contenete un profago lambda

La trasduzione specializzata: caratteristiche

- *Permette un trasferimento, di DNA da un batterio all'altro, estremamente efficiente, garantendo ad una piccola regione del cromosoma batterico di venire replicata indipendentemente dal resto.*
- *Il lisato trasducente può essere ottenuto solo per induzione di un batterio lisogeno per λ , e non per infezione litica.*
 - *I batteri trasdotti mostrano immunità verso il fago.*

IMMUNITA' FAGICA:

durante lo stato lisogeno la cellula batterica e' immune da infezioni di altri fagi dello stesso tipo del fago integrato

La lisogenia ha grande valore selettivo per la cellula batterica ospite, conferendo resistenza all'infezione da virus dello stesso tipo.

CONVERSIONE FAGICA

Insieme dei cambiamenti fenotipici (nuovi caratteri fenotipici) che si verificano nelle cellule batteriche quando lisogenizzate da fagi temperati normali (contenti geni di origine batterica), convertiti allo stato di profago.

ESEMPI DI CONVERSIONE FAGICA:

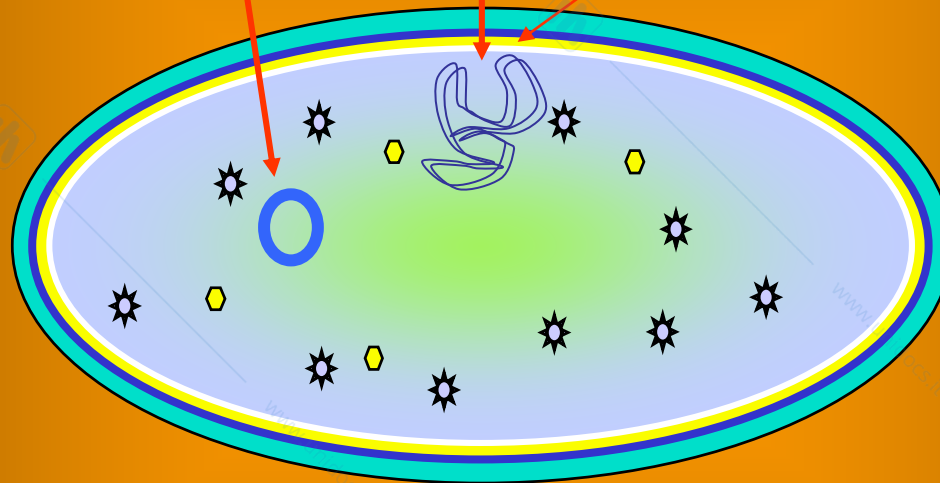
- La trasformazione di batteri avirulenti in batteri produttori di tossine, es. *Corynebacterium diphtheriae* (ceppi che esprimono il gene *tox*, presente nel profago β , acquisito per conversione lisogena, e producono la proteina Tox)
- Amplia il corredo di tossine batteriche, es. *Clostridium botulinum* (almeno due delle sette tossine botuliniche, C e D sono codificate da geni profagici), *Streptococcus pyogenes* (alcune tossine pirogene)

IL PATRIMONIO GENETICO DEI PROCARIOTI

DNA extracromosomiale

Nucleoide

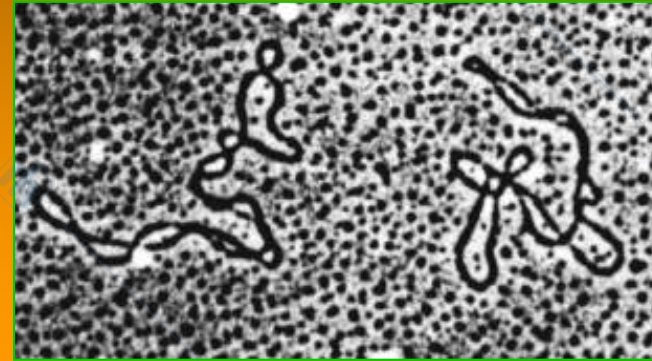
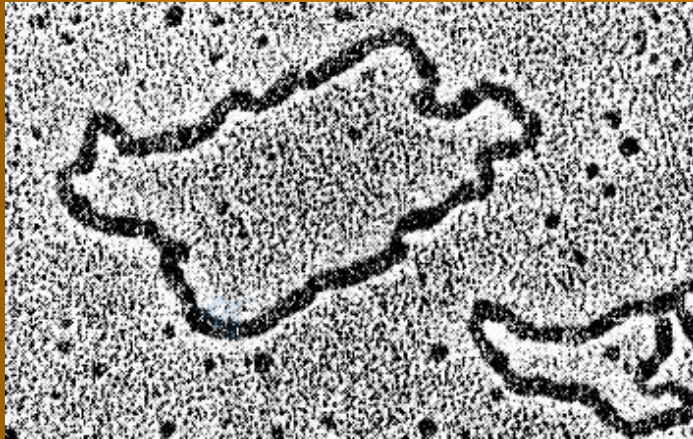
SITO DI ANCORAGGIO
DEL CROMOSOMA
ALLA MEMBRANA



Dimensioni dei Plasmidi: tra 1.000 e 100.000 bp

Dimensioni DNA genomico: $1-5 \times 10^6$ bp

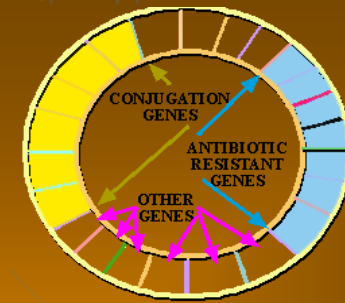
I PLASMIDI



IN NUMEROSE SPECIE BATTERICHE SONO PRESENTI MOLECOLE DI DNA CIRCOLARE, PIU' PICCOLE DEL GENOMA, DOTATE DI **CAPACITA' REPLICATIVA AUTONOMA (REPLICONI)** TALORA IN GRADO DI INTEGRARSI NEL GENOMA (**EPISOMI**) CHE **POSSONO CONFERIRE FENOTIPI RILEVANTI** AI BATTERI (**VIRULENZA-RESISTENZA**)

Come il cromosoma, essi possono assumere una configurazione circolare aperta ("released" o "open circular"), oppure superavvolta ("supercoiled").

I PLASMIDI



CIRCULAR PLASMID DNA

- Elementi genetici accessori
- DNA a doppia elica, generalmente di forma circolare
- Dimensioni: da meno di 1 kb a centinaia di Kb
- Possono essere presenti da 1 a centinaia di copie
- Capaci di replicazione indipendente
- Alcuni plasmidi sono coniugativi, altri non coniugativi
- La presenza di certi plasmidi in una cellula impedisce l'acquisizione stabile di altri ("plasmidi incompatibili"). Da questo punto di vista, tutti i plasmidi possono essere inclusi in specifici gruppi di incompatibilità.
- Non sono indispensabili, ma conferiscono alla cellula batterica ospite importanti vantaggi selettivi

FUNZIONI (FENOTIPI) CONFERITE AI MICRORGANISMI DAI PLASMIDI

1. **Resistenza** (antibiotici, metalli, batteriofagi, batteriocine)
2. **Trasferimento di geni** (coniugazione)
3. **Metabolismo** (utilizzo di lattosio, saccarosio, ac. citrico, degradazione di erbicidi, etc.)
4. **Antagonismo** (produzione di antibiotici e di batteriocine)
5. **Interazioni tra organismi** (fissazione simbiotica dell'azoto)
6. **Virulenza** (fattori di adesione e colonizzazione, coagulasi, emolisina, enterotossine)

Sono detti "criptici" i plasmidi a fenotipo sconosciuto.

FUNZIONI ASSOCIATE A GENI PLASMIDICI

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

E. coli, Salmonella, Shigella

RESISTENZA AI METALLI PESANTI

E. coli, Staph. aureus, Pseudomonas

UTILIZZAZIONE DI LATTOSIO, SACCAROSIO ED ALTRI COMPOSTI

Batteri lattici, Enterobatteri

PRODUZIONE DI BATTERIOCINE

E. coli, Batteri lattici ed altri

FATTORI DI VIRULENZA

Staphylococcus aureus

PRODUZIONE DI ANTIBIOTICI

Streptomyces

FISSAZIONE DELL'AZOTO

Rhizobium

PRODUZIONE DI ENTEROTOSSINE

E. coli enterotossici

SINTESI DI DESTRANO

Streptococcus mutans

INDUZIONE DI TUMORI NELLE PIANTE

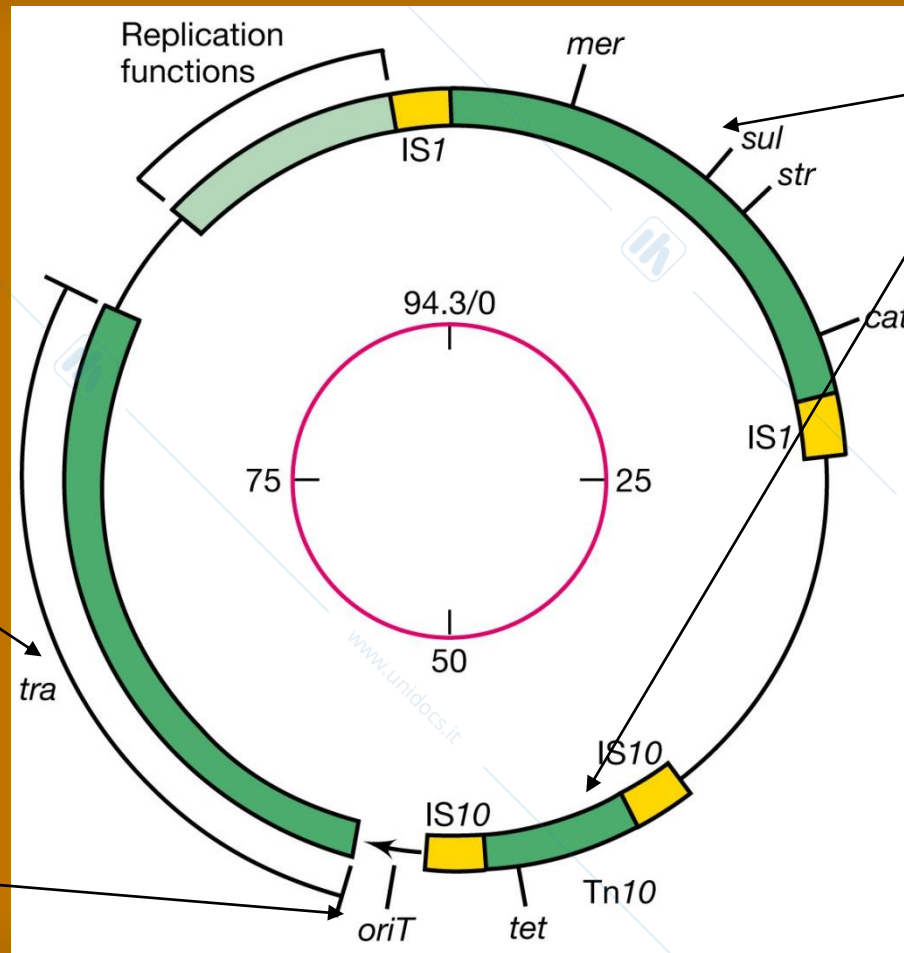
Agrobacterium tumefaciens

DEGRADAZIONE DI IDROCARBURI

Pseudomonas

INSTABILITA' FENOTIPICA

Plasmide R



GENI PER LA RESISTENZA BATTERICA AGLI ANTIBIOTICI:

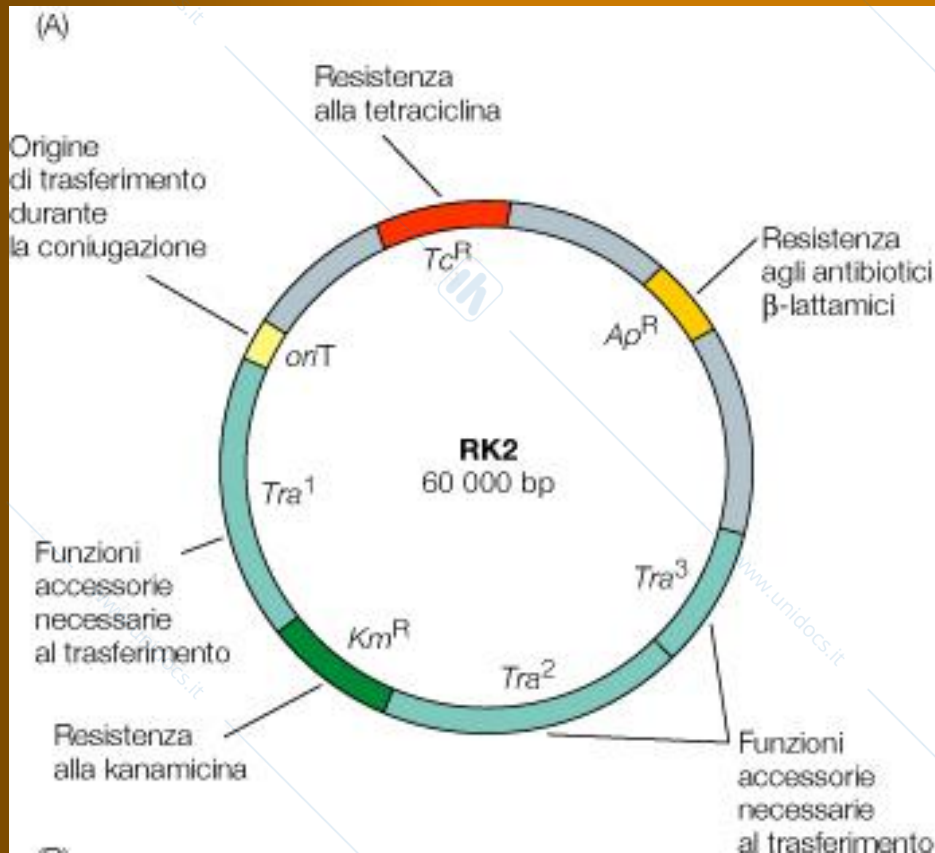
- cat (cloramfenicolo)
- sul (sulfonamide)
- str (streptomicina)
- tet (tetraciclina)

Geni per il trasferimento

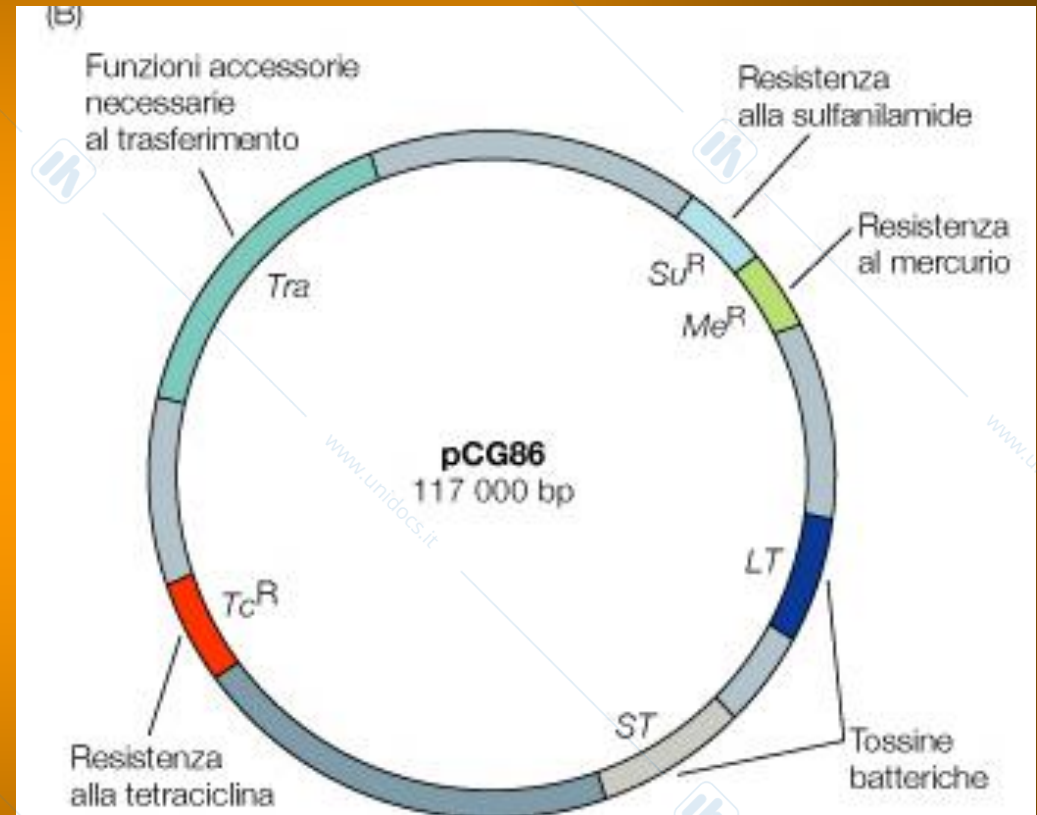
Origine del trasferimento coniugativo

Mappa genica del plasmide di resistenza R100 (oltre 94.000 bp)

Plasmidi di batteri patogeni

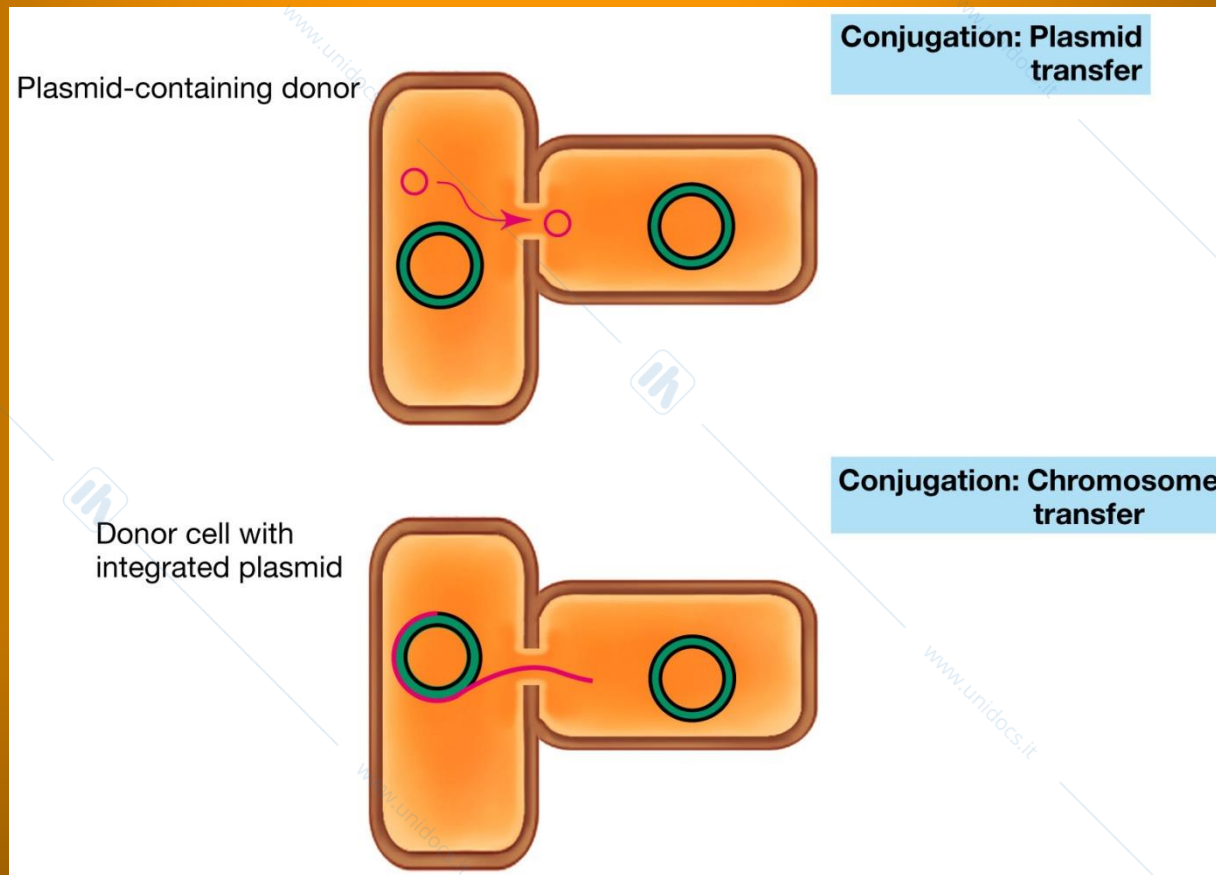


Plasmide R ampiamente diffuso



Plasmide di un ceppo patogeno di *E. coli*

La coniugazione



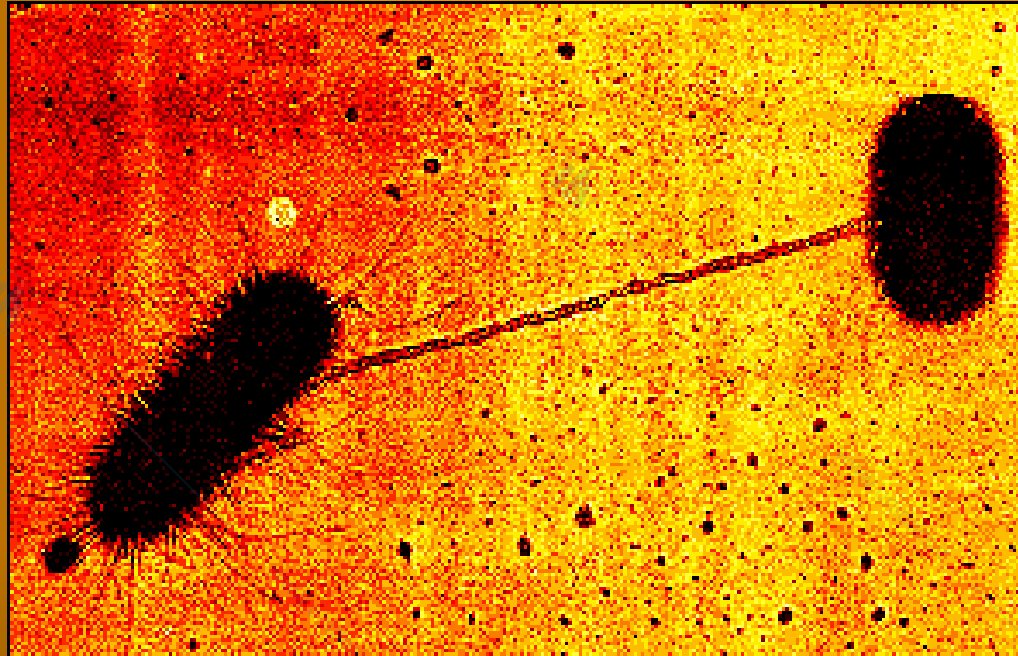
La coniugazione è un processo di trasferimento unidirezionale di materiale genetico da un batterio donatore a un batterio ricevente.

Oltre a DNA plasmidico può essere trasferito anche DNA cromosomale

Sono noti molti casi di trasmissione fra ceppi della stessa specie e di trasmissione inter-specifica. Questo fenomeno di "horizontal genes transfer" è sicuramente alla base della **formazione naturale di nuovi ceppi microbici.**

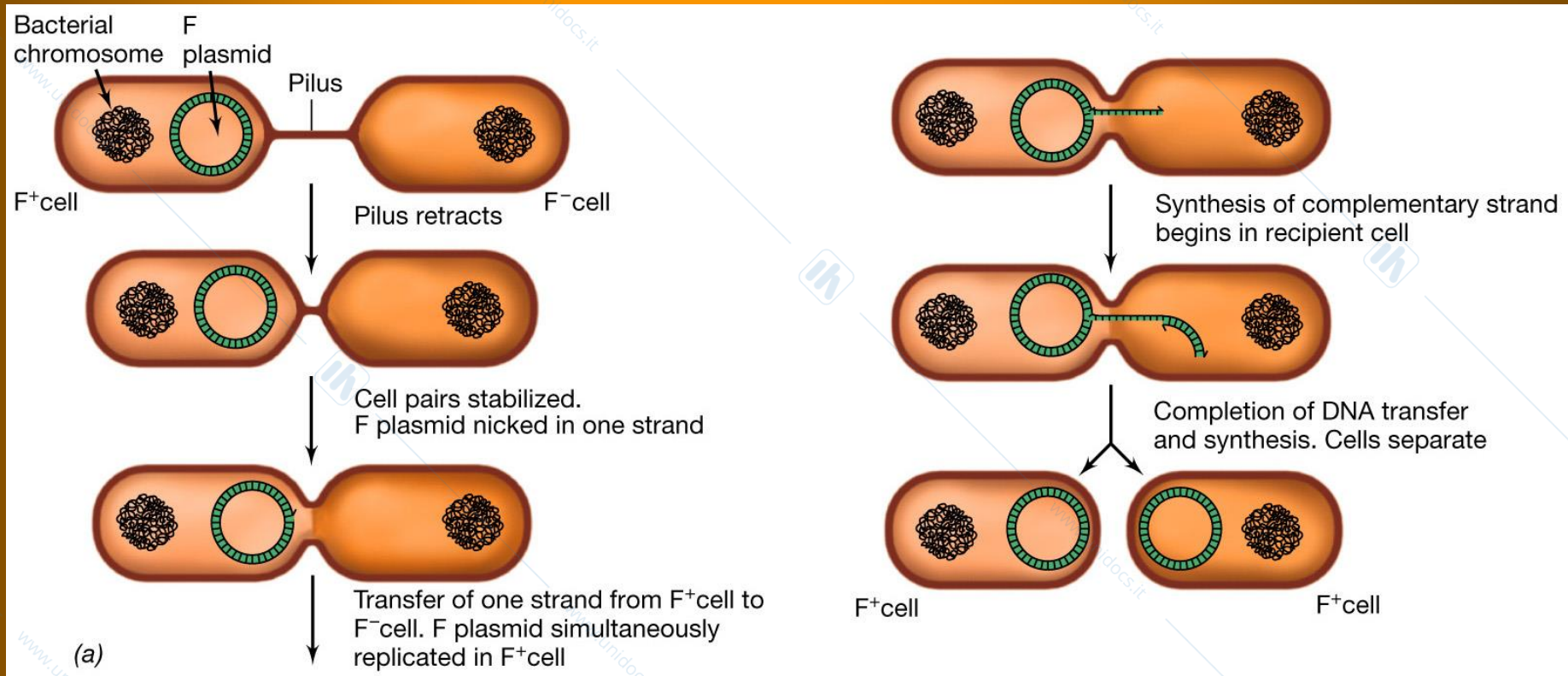
Nella coniugazione il trasferimento coinvolge il contatto cellula-cellula e un plasmide coniugativo della cellula donatrice.

Coniugazione:



Fotografia al m. e. che mostra lo scambio di materiale genetico da un batterio donatore ad un batterio ricevente attraverso il pilus F, che serve a stabilire il primo contatto tra i batteri, necessario per la formazione di un ponte coniugativo.

La coniugazione



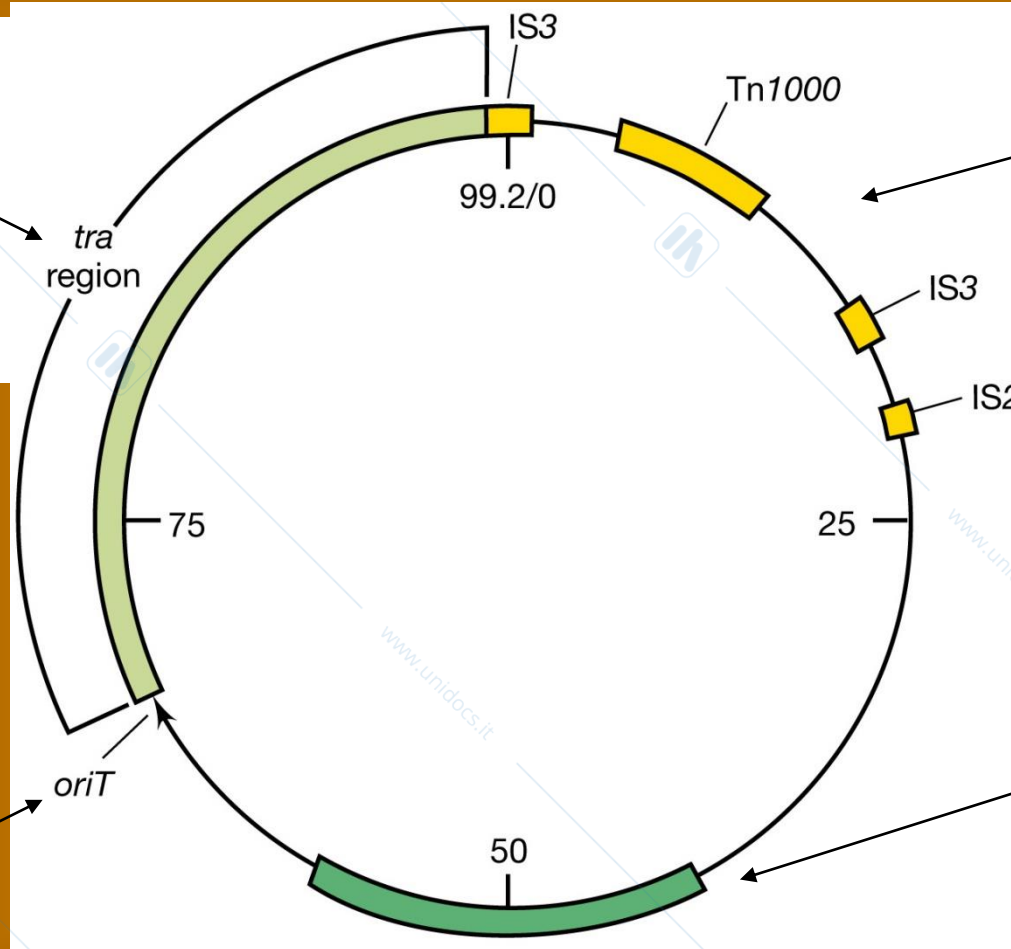
In *E. coli* esistono due tipi di batteri, i quali durante la coniugazione si comportano uno da donatore di materiale genetico (batteri F⁺ o maschi) e l'altro da ricevente (F⁻ o femmine).

Se si mescolano batteri F⁺ ed F⁻ in opportune condizioni, quasi tutti gli F⁻ diventano F⁺ grazie alla presenza nel citoplasma del batterio F⁺ di un fattore di fertilità, F, che passa nell'F⁻ quando i due batteri vengono a contatto.

Durante il trasferimento il DNA viene replicato mediante il meccanismo di replicazione a cerchio rotante.

Plasmide F

Regione tra, contiene i geni coinvolti nel trasferimento durante la coniugazione



Elementi trasponibili che possono ricombinare con elementi simili presenti sul cromosoma batterico, determinando l'integrazione del plasmide e la formazione di ceppi Hfr

Punto di origine del trasferimento

Regione coinvolta nella replicazione e segregazione del plasmide nelle cellule che crescono normalmente

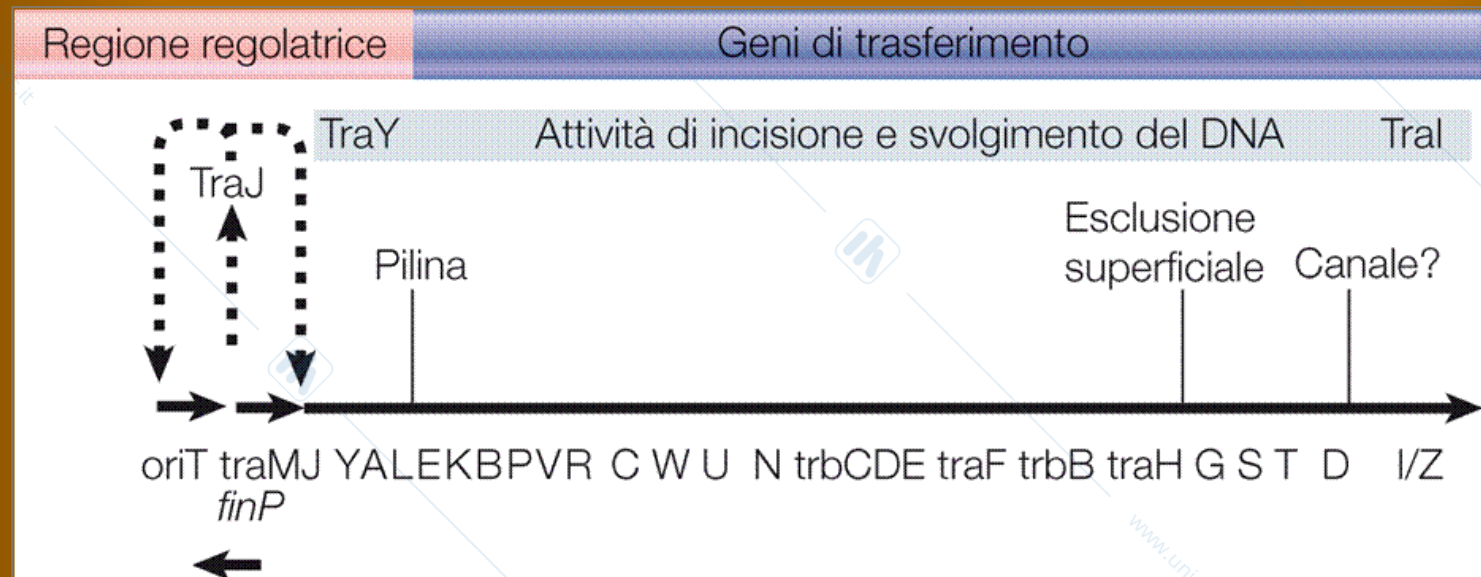
Mapa genica del plasmide F (Fertilità) di *E. coli*

Il plasmide di oltre 99.000 bp è costituito da diverse decine di geni.

Una funzione importante per la coniugazione, riguarda la produzione di un appendice, il pilus F che è sotto il controllo di 12 geni

Regione di trasferimento del plasmide F

contiene circa 40 geni necessari per il trasferimento del DNA, arrangiati nei loci *tra* e *trb*.

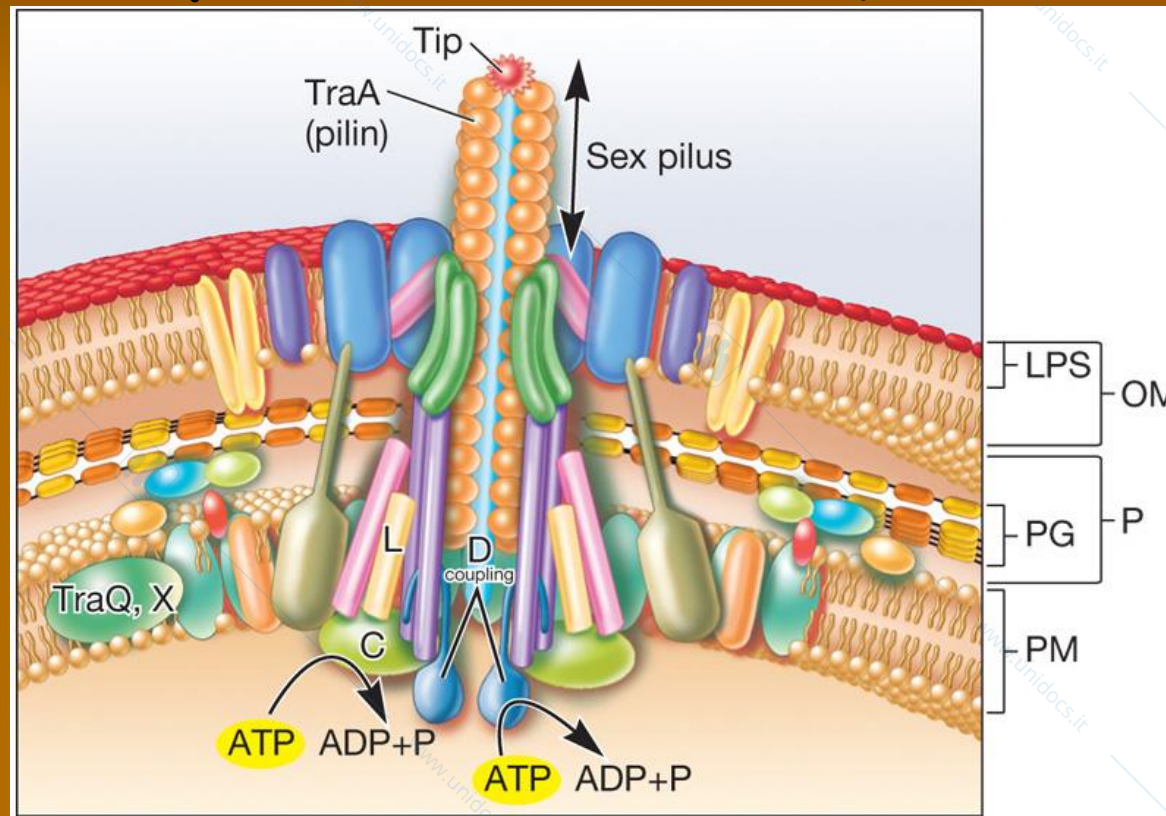


Quasi tutti sono espressi come parte di **un'unica unità trascrizionale** di 32kb (l'unità *traY-I*). *traM* e *traJ* sono espressi separatamente, con *traJ* che è il regolatore che attiva sia *traM* che l'unità *traY-I*.

Nell'elica opposta *finP* è un regolatore codificante un piccolo RNA antisense che spegne *traJ*.

Solo 4 dei geni *tra* (*traD*, *traI*, *traM* e *traY*) sono coinvolti direttamente nel trasferimento del DNA: la maggior parte codifica proteine che formano un grande complesso proteico che attraversa la membrana, chiamato **sistema di secrezione di tipo 4** (T4SS).

Sistema di trasporto di tipo IV codificato dal Plasmide F



Le proteine TraA formano il pilus coniugativo

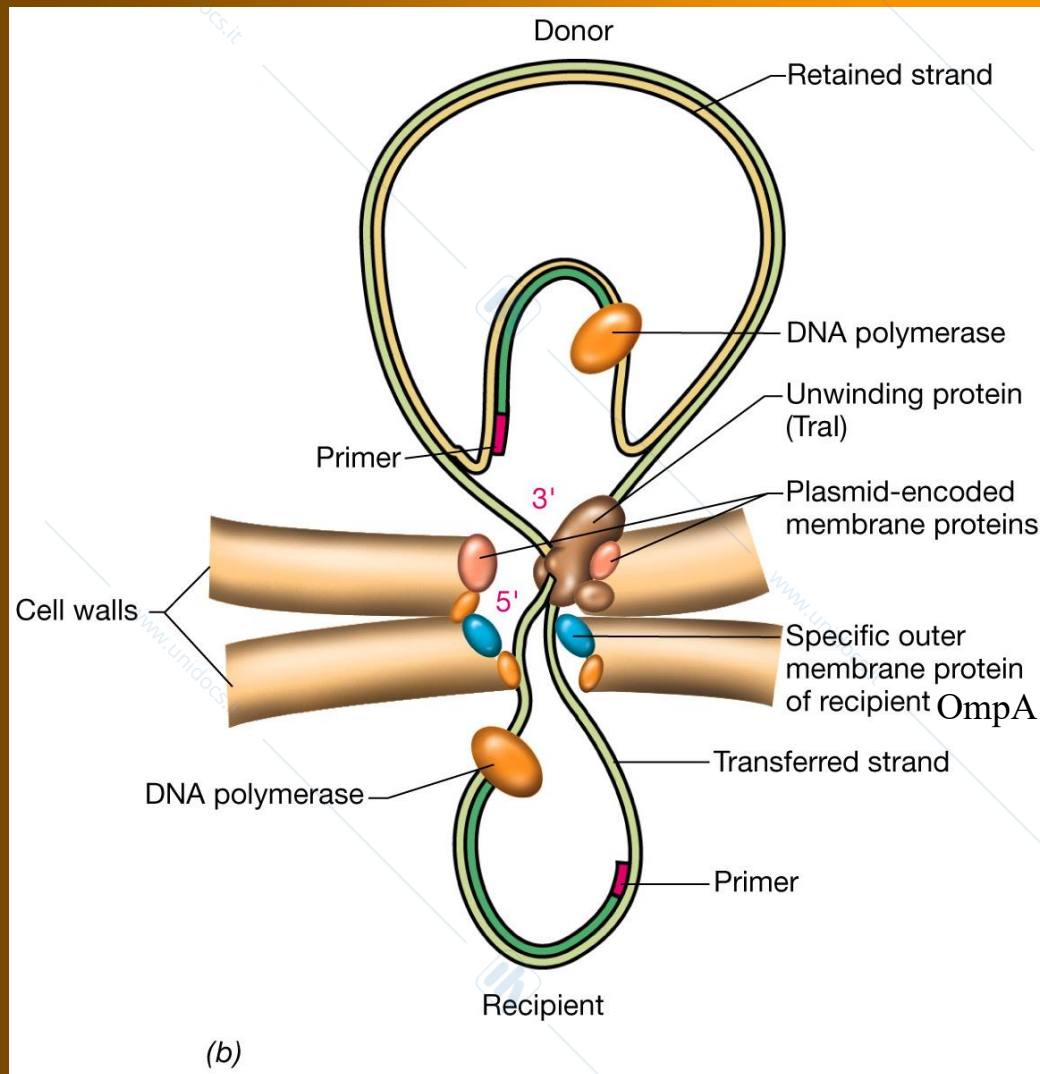
Tra D: fattore di accoppiamento che permette la formazione del ponte citoplasmatico.
e guida il DNA verso il sistema di secrezione

TraC è una NTPasi

TraQ e TraX sono proteine coinvolte nella maturazione e nell'acetilazione della pilina.

Le proteine codificate dai geni traG e traN, invece, sono responsabili del mantenimento del contatto tra le cellule in fase di coniugazione

Il relaxosoma TraI e TraY

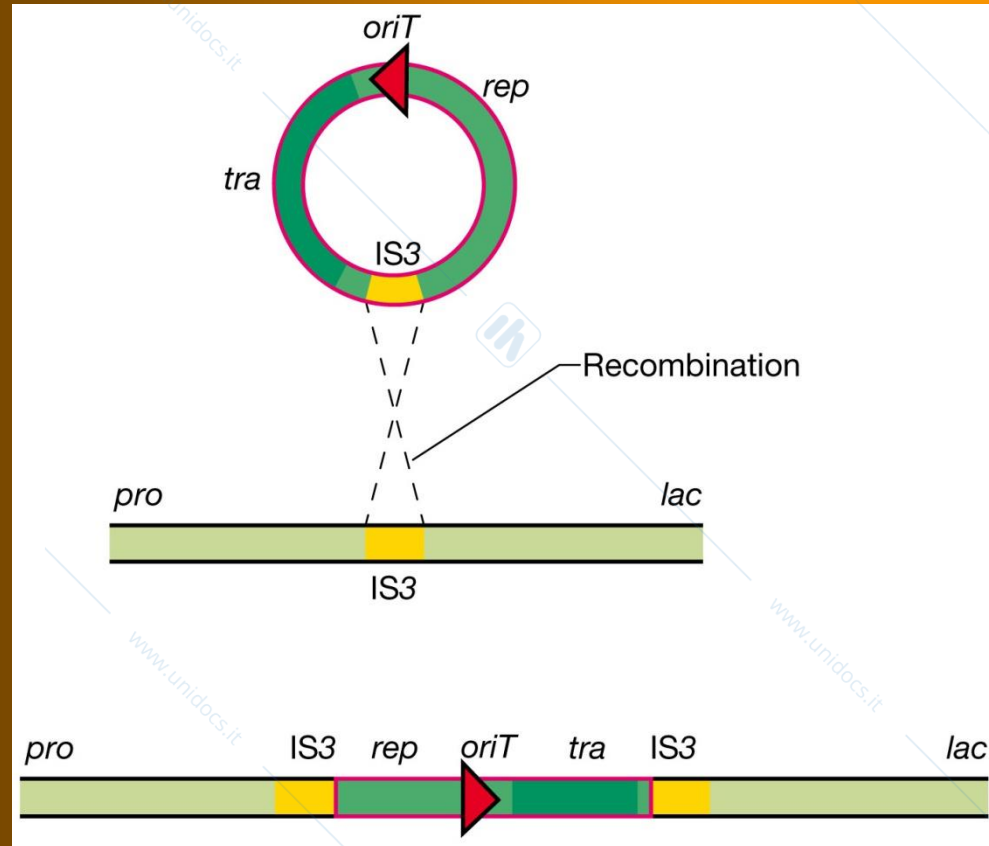


L'enzima TraI, che fa parte del relaxosoma, è una relaxasi, una nucleasi codificata dall'operone tra del plasmide F, che taglia un filamento del DNA circolare ed in corrispondenza dell'oriT e inizia il processo di trasferimento

Questa proteina ha anche attività elicasi ed è perciò coinvolta nello srotolamento del filamento da trasferire.

Non appena inizia il trasferimento, sia nel donatore che nel ricevente viene sintetizzato un filamento di DNA complementare a partire da un innesco di RNA, in modo che alla fine del processo ciascuna cellula possiede un plasmide intero

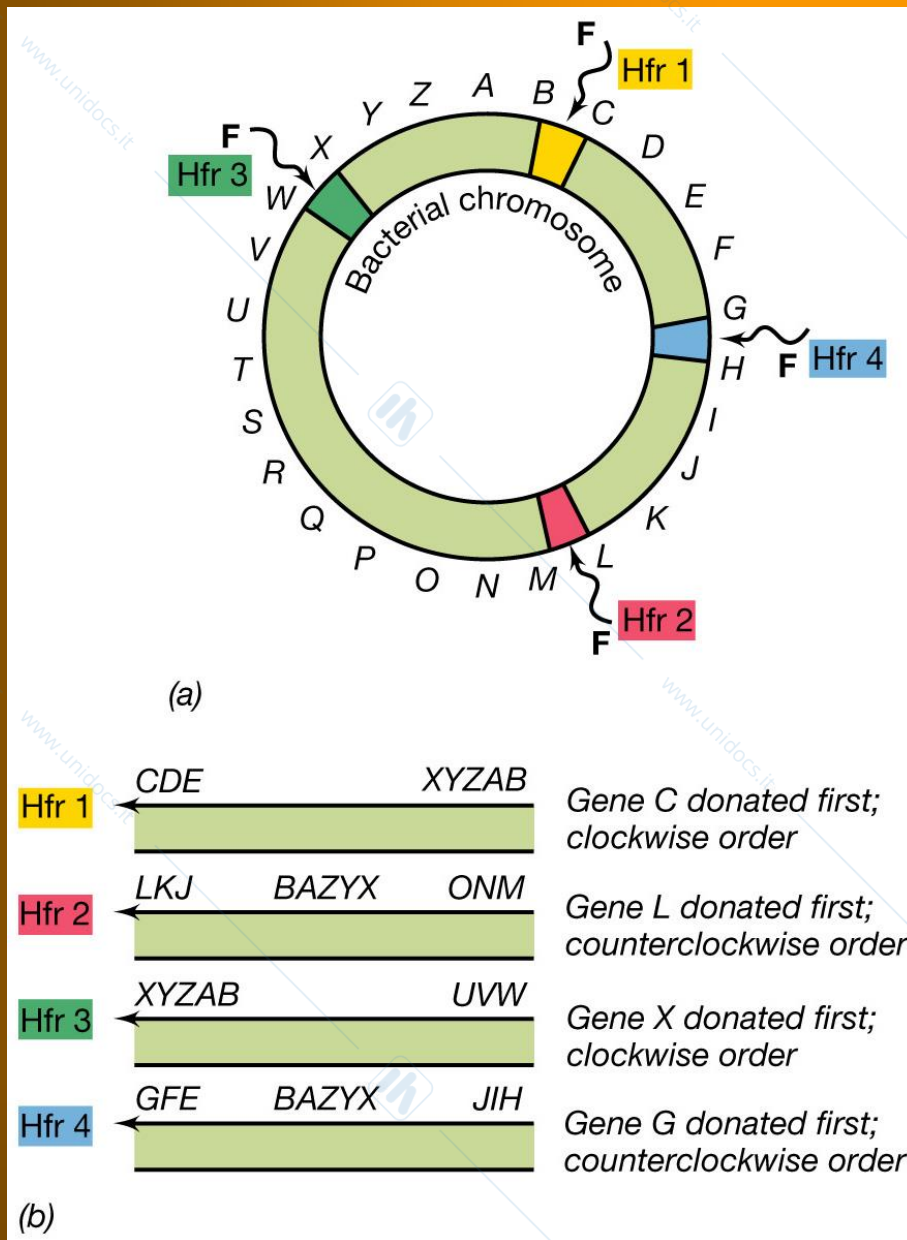
I ceppi Hfr (High frequency recombination)



- Il plasmide F può essere trasferito senza che vi sia scambio di materiale cromosomico e quindi senza la formazione di ricombinanti.
- E' possibile però l'integrazione nel cromosoma del plasmide F che determina la formazione di un ceppo donatore ultrafertile, detto Hfr (High frequency recombination).
- Il plasmide si può inserire in diversi siti che corrispondono a sequenze di inserzione (IS) presenti sia in F che nel cromosoma.

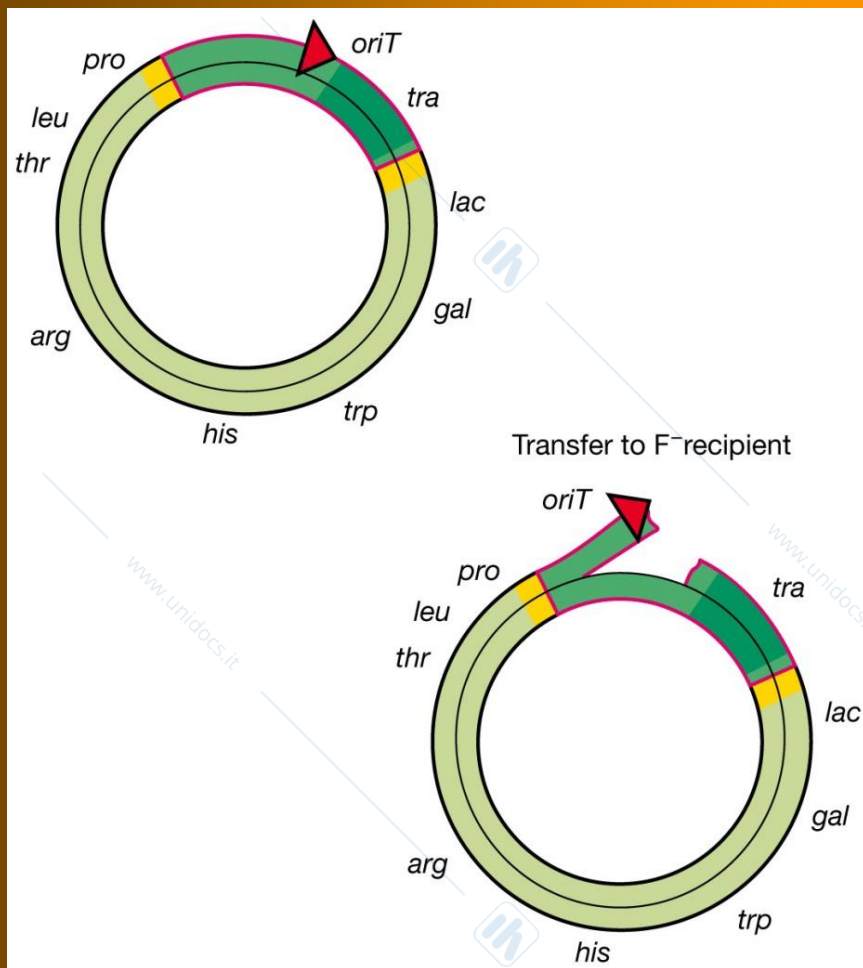
Il fattore F, può esistere in due stati alternativi, come elemento citoplasmatico capace di replicazione autonoma, oppure integrato nel cromosoma batterico insieme al quale si replica, chiamato episoma.

Formazione di differenti ceppi Hfr



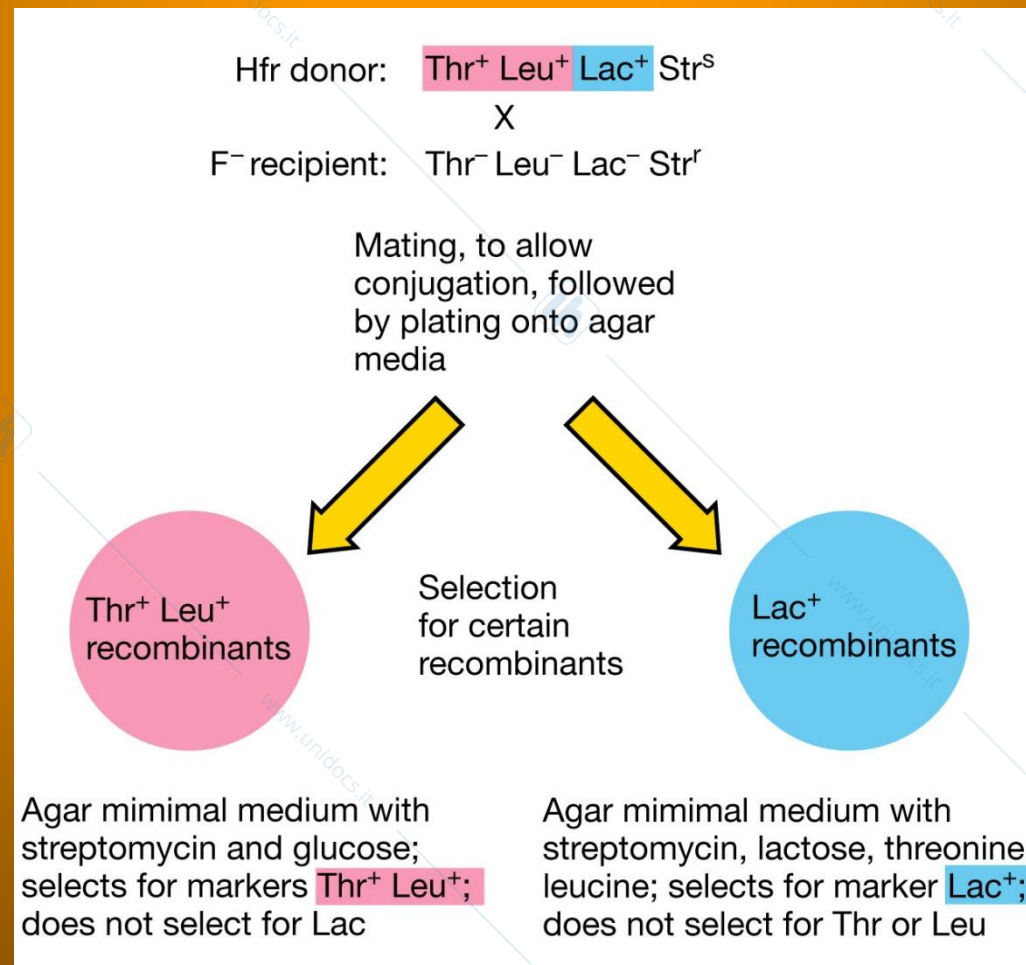
L'integrazione di F nel cromosoma batterico avviene mediante un singolo crossing-over tra le sequenze IS dando origine a diversi ceppi Hfr, che trasferiscono geni in ordine diverso a partire da origini differenti

I ceppi Hfr (High frequency recombination)



- I ceppi Hfr negli incroci con F⁻ danno ricombinanti con una frequenza circa 1000 volte maggiore di quella che si può trovare in un incrocio tra F⁺ ed F⁻.
- Ogni Hfr dà però alta frequenza di ricombinazione solo per alcuni caratteri, non per tutti.
- Sebbene i ceppi Hfr trasmettano geni cromosomali ad alta frequenza, essi non convertono le cellule F⁻ in cellule F⁺, in quanto solo raramente viene trasferito l'intero plasmide.
- Le cellule F⁺ convertono in modo efficiente F⁻ in F⁺, proprio perché viene trasferito l'intero plasmide F.

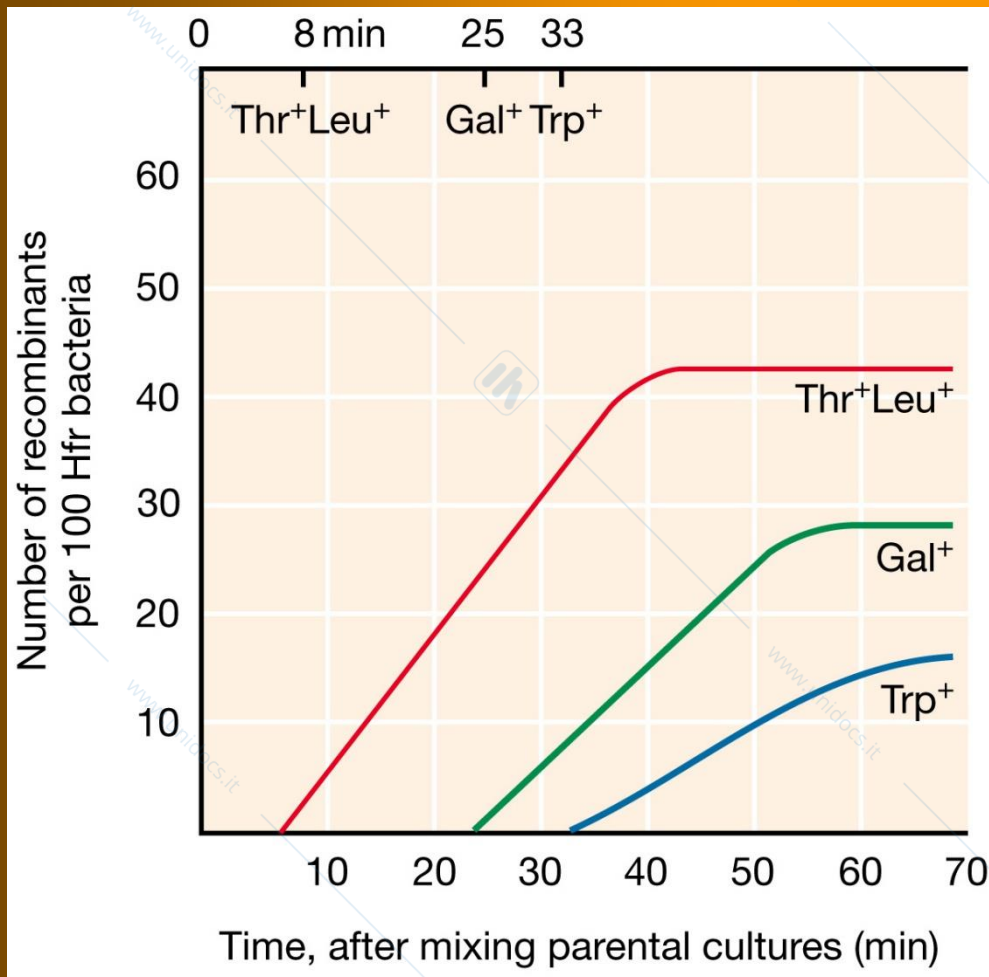
La coniugazione



Procedimento di laboratorio per riconoscere la coniugazione genetica.

Il terreno selettivo è un terreno minimo che contiene streptomina, in modo che solo le cellule ricombinanti possano crescere. In ogni terreno variando la composizione si può selezionare una specifica classe di ricombinanti

Esperimento di coniugazione interrotta



Il ceppo donatore Hfr è Str^s
Il ceppo ricevente F⁻ è Str^r ma
auxotrofo per i marcatori scelti

- Per l'incrocio si mescolano batteri Hfr ed F⁻, generalmente nel rapporto 10/1; a vari tempi si preleva un campione della coltura, che viene agitato violentemente per provocare la rottura delle coppie formatesi nella miscela.
- I campioni vengono poi seminati su terreni selettivi per osservare la comparsa dei diversi ricombinanti.
- **I marcatori dell'Hfr compaiono nei ricombinanti secondo un ordine temporale ben preciso, che corrisponde all'ordine in cui i geni sono localizzati nel cromosoma.**
- **Questi dati dimostrano che esiste una polarità nel trasferimento del cromosoma dall'Hfr all'F⁻. Il trasferimento per ogni particolare ceppo inizia in un punto preciso del cromosoma e sempre nello stesso punto con una velocità costante.**
- **Il tempo richiesto per il trasferimento dell'intero cromosoma è di 100 minuti a 37°C.**

La trasposizione

Processo per cui un gene si muove da una posizione ad un'altra nel genoma

- Fondamentale nell'evoluzione del genoma batterico e negli studi di genetica batterica
- E' un evento raro: 10^{-5} - 10^{-7} per generazione

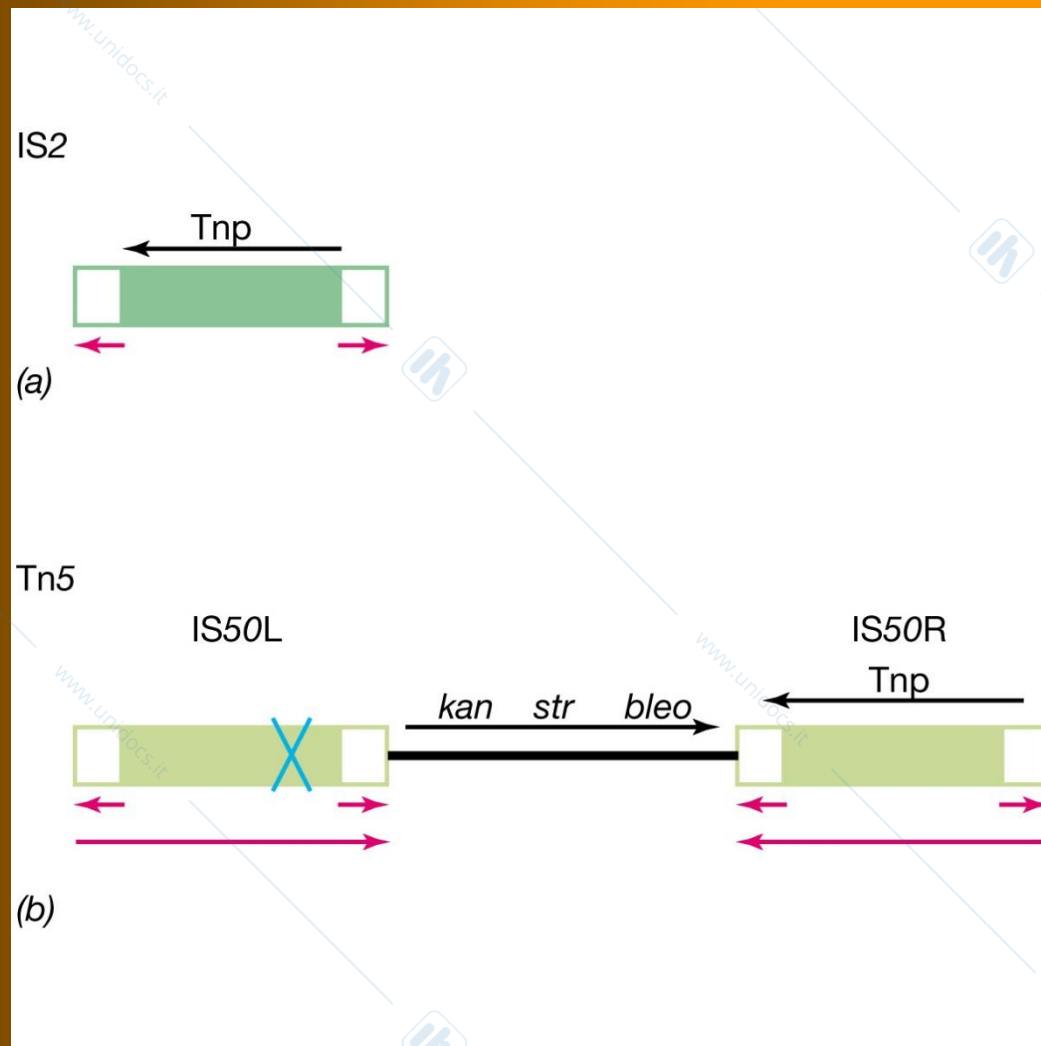
Elementi trasponibili

La trasposizione dei geni è legata alla presenza di elementi genetici detti elementi trasponibili.

Nei Batteri vi sono tre tipi di elementi trasponibili:

- 1. Le sequenze d' inserzione**
- 2. I trasposoni**
- 3. Alcuni virus (es. Mu)**

Elementi trasponibili



Mappe degli elementi trasponibili
IS2 e Tn5

- **IS2** è una **sequenza d'inserzione** di 1327 bp con ripetizioni invertite di 41 bp alle sue estremità
- **Tn5** è un **trasposone composto** di 5,7 kb che presenta un gruppo di geni di resistenza tra le sequenze d'inserzione IS50L e IS50R alle sue estremità
- IS50L non è capace di trasposizione indipendente, per la presenza di una mutazione nonsense nel gene della sua trasposasi
- Le frecce nere indicano la direzione di trascrizione dei geni sugli elementi

Tabella 11.4**Proprietà di alcune sequenze di inserzione selezionate**

Sequenza di inserzione	Lunghezza (bp)	Ripetizione invertita (lunghezza in bp)	Sito bersaglio (lunghezza in bp)	Numero di copie sul cromosoma di <i>E. coli</i>
IS1	768	23	9 o 8	6-10
IS2	1,327	41	5	4-13 (1) ^a
IS3	1,400	38	3-4	5-6 (2)
IS4	1,428	18	11 o 12	1-2
IS5	1,195	16	4	10-11

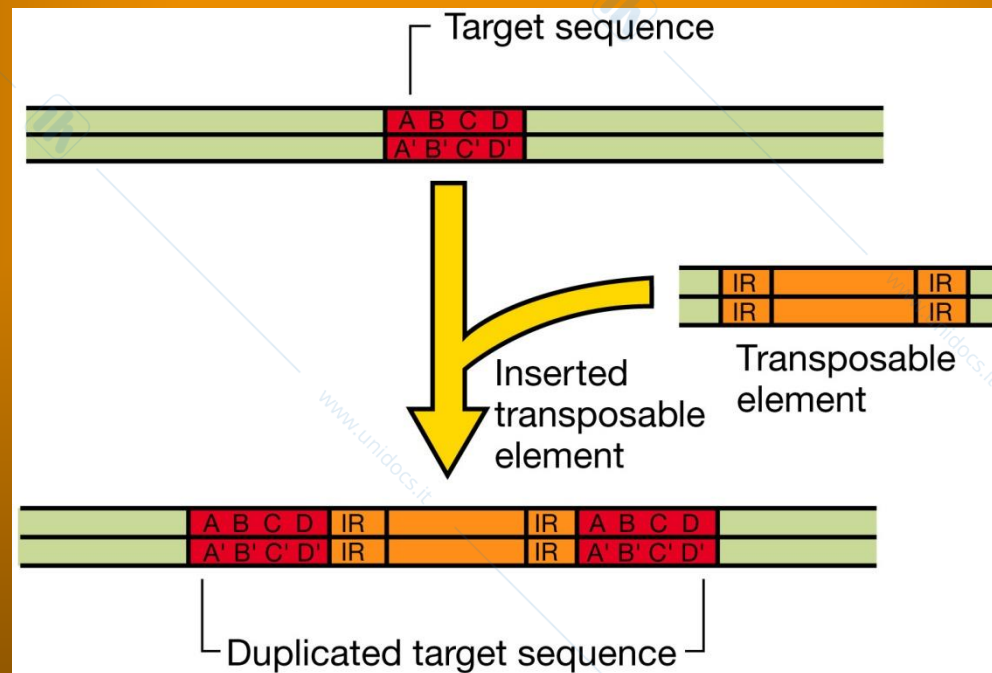
^aIl valore in parentesi indica il numero di elementi IS sul plasmide fattore F.

Tabella 11.5**Proprietà di alcuni trasposoni composti selezionati**

Trasposone	Lunghezza (bp)	Lunghezza della ripetizione terminale	Modulo terminale	Marcatori genetici
Tn3	4,957	38		Resistenza all'ampicillina
Tn501	8,200	38		Resistenza al mercurio
Tn951	16,500	Sconosciuta		Utilizzo del lattosio
Tn5	5,700		IS50	Resistenza alla kanamicina
Tn9	2,500		IS1	Resistenza al cloramfenicolo
Tn10	9,300		IS10	Resistenza alla tetraciclina
Tn903	3,100		IS903	Resistenza alla kanamicina
Tn1681	2,061		IS1	Enterotossina termo-stabile
Tn2901	11,000		IS1	Biosintesi di arginina

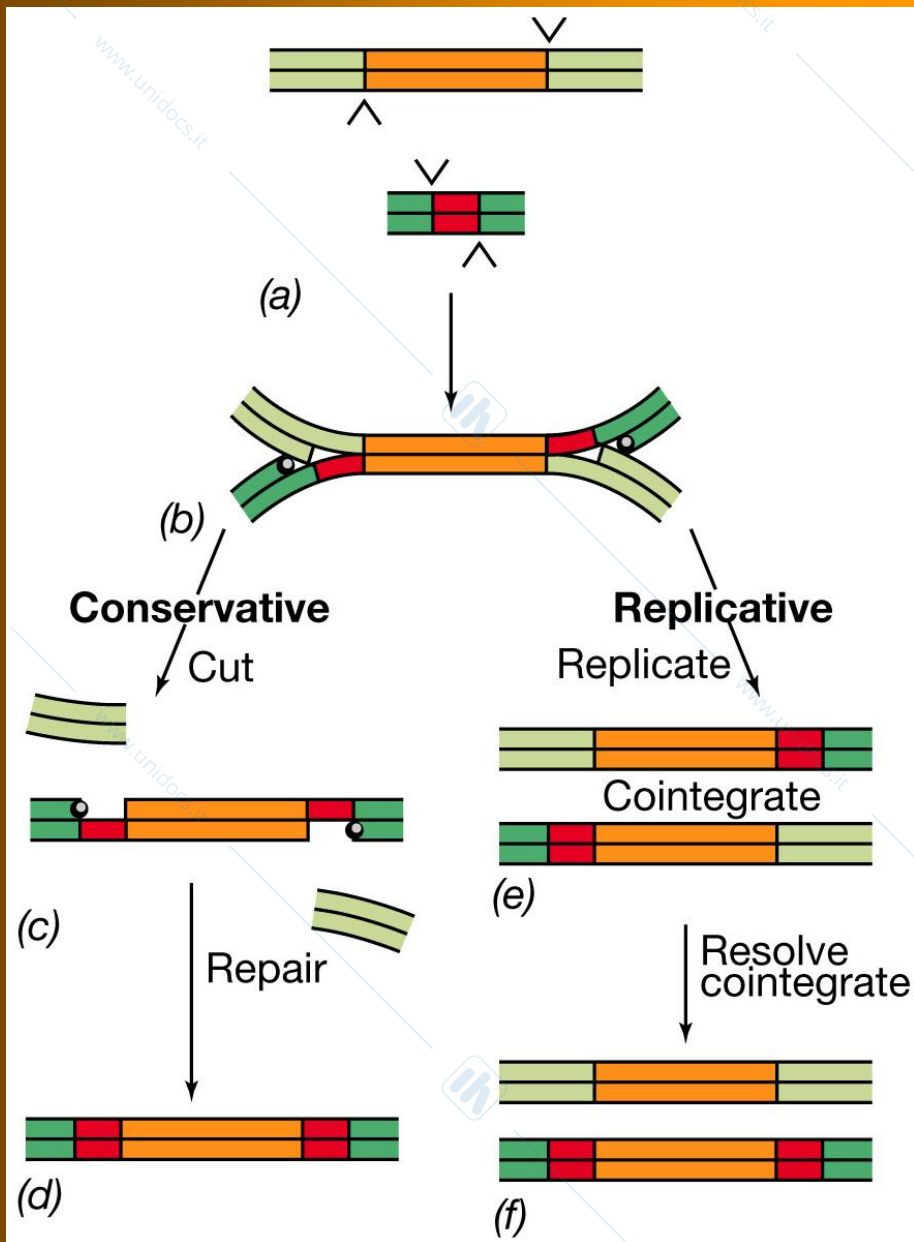
Componenti essenziali per la trasposizione

- **Ripetizioni invertite** presenti alle estremità degli elementi trasponibili
- **Trasposasi:** enzima, generalmente codificato dall'elemento trasponibile, che riconosce queste ripetizioni; taglia ed eventualmente lega il DNA durante la trasposizione



L'inserzione di un elemento trasponibile genera la duplicazione di una corta sequenza del DNA bersaglio nel sito d'integrazione, conseguenza del riparo delle sequenze a singolo filamento create dai tagli sfalsati durante la trasposizione.

Meccanismi di trasposizione

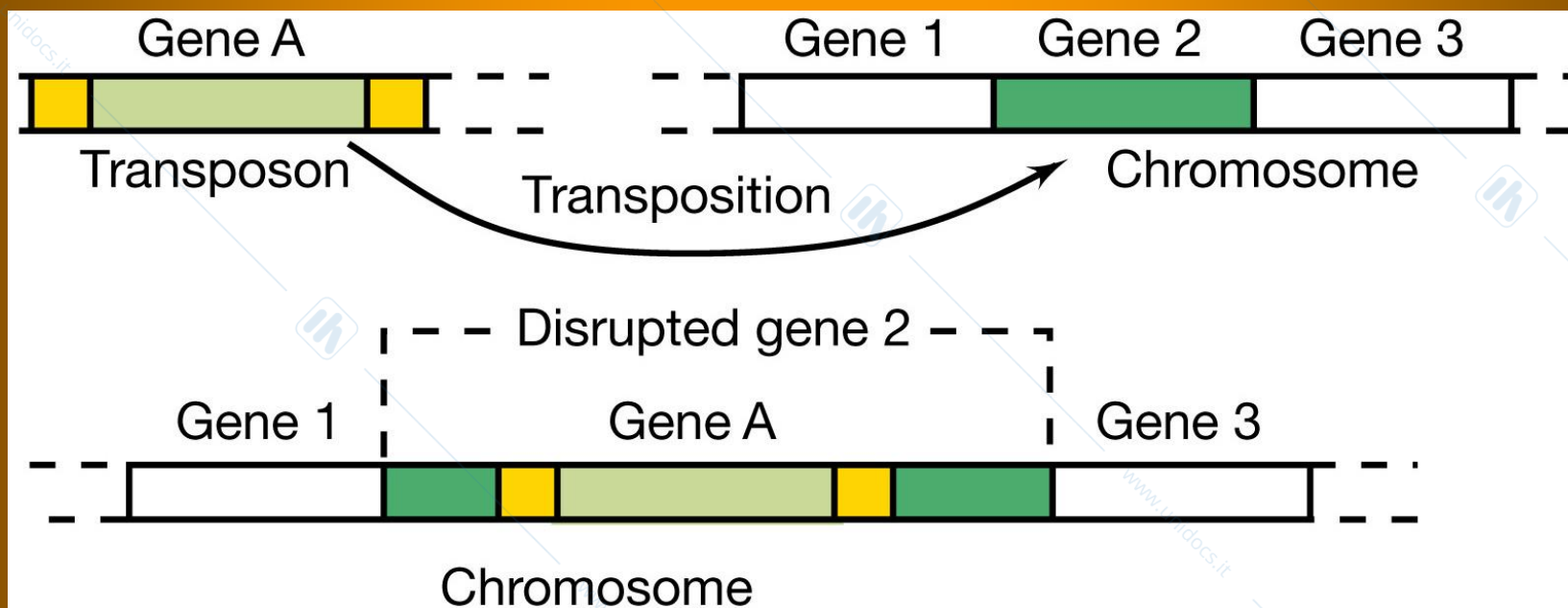


In entrambi i meccanismi la trasposasi taglia il DNA alla fine dell'elemento trasponibile e nel sito bersaglio. Il sito bersaglio viene legato all'elemento trasponibile

Nella trasposizione conservativa l'elemento trasponibile (es. Tn5) viene escisso da un sito del cromosoma e reinserto in un secondo sito. Il numero di copie di un trasposone conservativo rimane perciò invariato.

Nella trasposizione replicativa gli elementi (es. batteriofago Mu) sono invece duplicati durante la trasposizione per cui una copia dell'elemento trasponibile rimane nel sito originale e un'altra copia viene inserita in un altro sito

Mutagenesi per trasposizione



Se il sito d'inserzione di un elemento trasponibile è all'interno di un gene, l'inserzione del trasposone causerà la perdita della continuità lineare del gene con conseguente **inattivazione funzionale del gene stesso.**

L'elemento più adatto per la mutagenesi per trasposizione è quello contenente un gene per la resistenza ad un antibiotico

Ruolo dei trasposoni nell'evoluzione dei plasmidi

