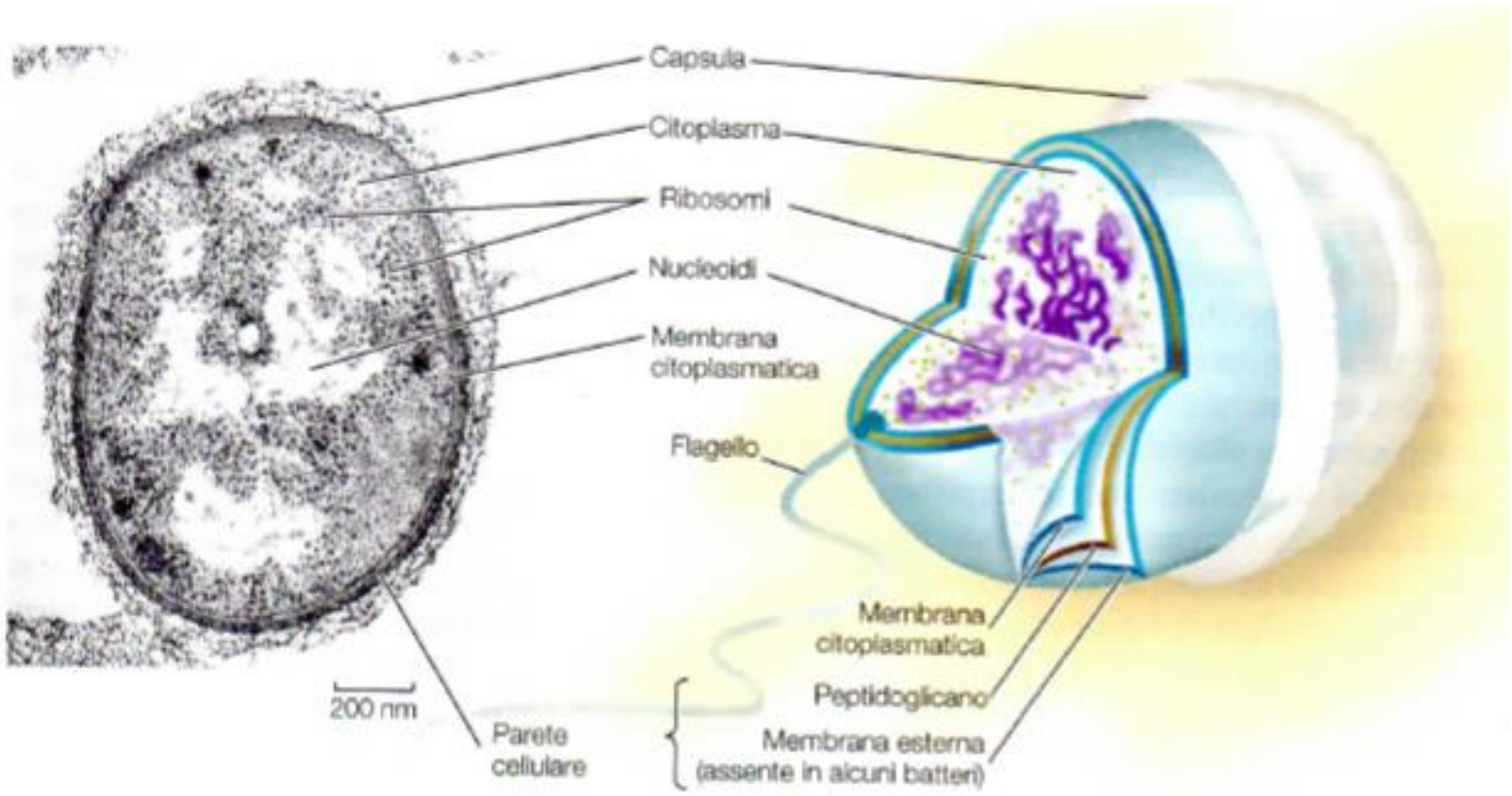
12. Ricombinazione e genetica dei batteri

Domande

- In che modo si è dimostrato che nei procarioti avviene ricombinazione?
- In che modo i procarioti possono scambiarsi materiale genetico?
- Com’è fatta una mappa genetica in un procariote?
- Cosa determina la polarità sessuale nei batteri?
- Come intervengono i fagi nella ricombinazione batterica?

Cellula procariotica

- **dimensioni: 1-1,5 u**
- **assenza mem. nucleare**
-- **unico cromosoma circolare**
-- **no mitosi e meiosi**
- **moltiplicazione: scissione semplice ca. 20-30 min**



- Batterio *Pseudomonas aeruginosa illustra la tipica struttura propria di tutte le cellule procariotiche.*
- *Questo* batterio è anche dotato di una **struttura protettiva costituita da una membrana esterna** posseduta da alcuni procarioti (ma non da tutti).
- Anche il flagello e la capsula sono attributi che si trovano solo in alcune cellule procariotiche.

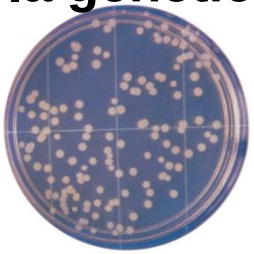
Procarioti vs. Eucarioti

- **Procarioti: aploidi,** contengono un singolo cromosoma circolare.
- Spesso contengono **piccole molecole di DNA extracromosomali chiamate "plasmidi".**
- questi conferiscono proprietà vantaggiose come la resistenza ad alcune molecole (farmaci e antibiotici).
- Nei procarioti **solo molecole di DNA circolare possono essere replicate.**
- Al contrario gli eucarioti sono spesso diploidi ed hanno cromosomi lineari normalmente in numero maggiore di uno.
- Negli eucarioti la trascrizione dei geni avviene nel nucleo e la traduzione degli RNA avviene nel citoplasma. I due processi sono separati fisicamente.
- Nei **procarioti** la **traduzione è accoppiata alla trascrizione.**
  - La traduzione delle molecole di RNA inizia prima che la trascrizione venga completata.

Variabilità intraspecifica



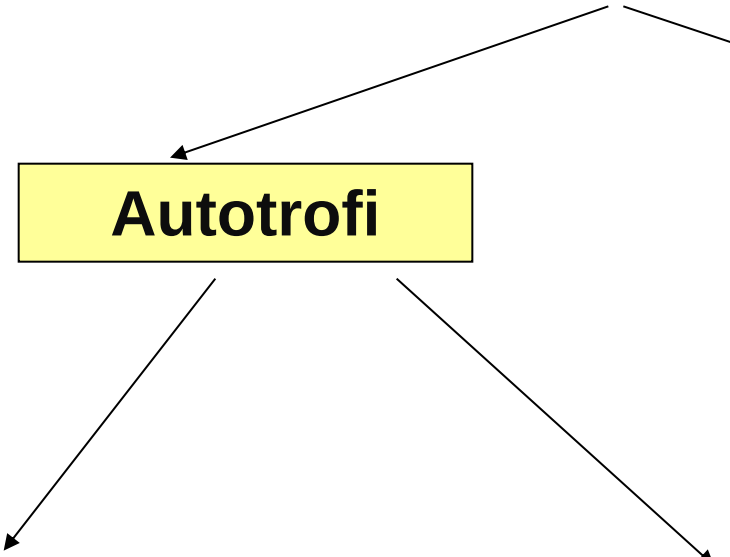
➢ **Dove sta la variabilità intraspecifica necessaria per studiare la genetica dei batteri?**



- **caratteristiche ereditabili**: diverse da quelle degli organismi superiori: caratteristiche non morfologiche, ma **biochimiche**.

- ***mutanti nutrizionali:*** capacità di crescere su un terreno minimo *(prototrofi),* o incapacità *(auxotrofi);*
- ***mutanti di fermentazione:*** capacità o incapacità di fermentare uno zucchero, ad esempio il lattosio;
- ***mutanti per resistenza:*** ad antibiotici, ad infezione con specifici batteriofagi, ecc.;
- ***mutanti per termo-sensibilità:,*** capacità di crescere solo in un ristretto range di temperatura *(temperatura permissiva),* rispetto al genotipo *wild type.*

Come si nutrono?



Autotrofi

Eterotrofi

- Non sono in grado di trasformare sostanze inorganiche in sostanze organiche

Fotosintetici

- Producono sostanze organiche a partire da CO_2 e acqua, usando **energia luminosa**

Chemio-sintetici

- Si procurano l'energia trasformando molecole inorganiche.

Es. solfobatteri

Metabolismo

Aerobi

- Vivono solo in presenza di ossigeno

Anaerobi

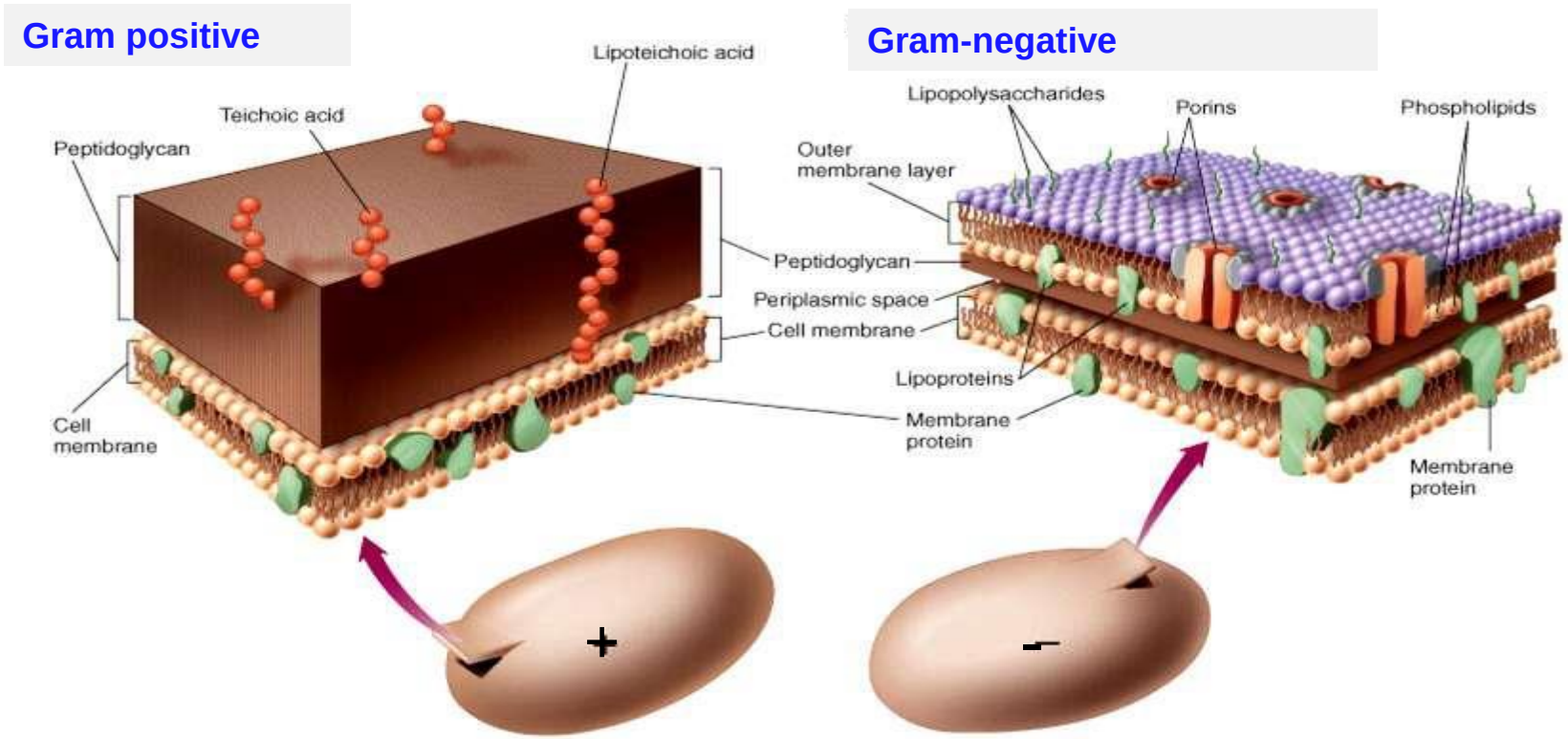
Obbligati

- Vivono solo in assenza di ossigeno

Facoltativi

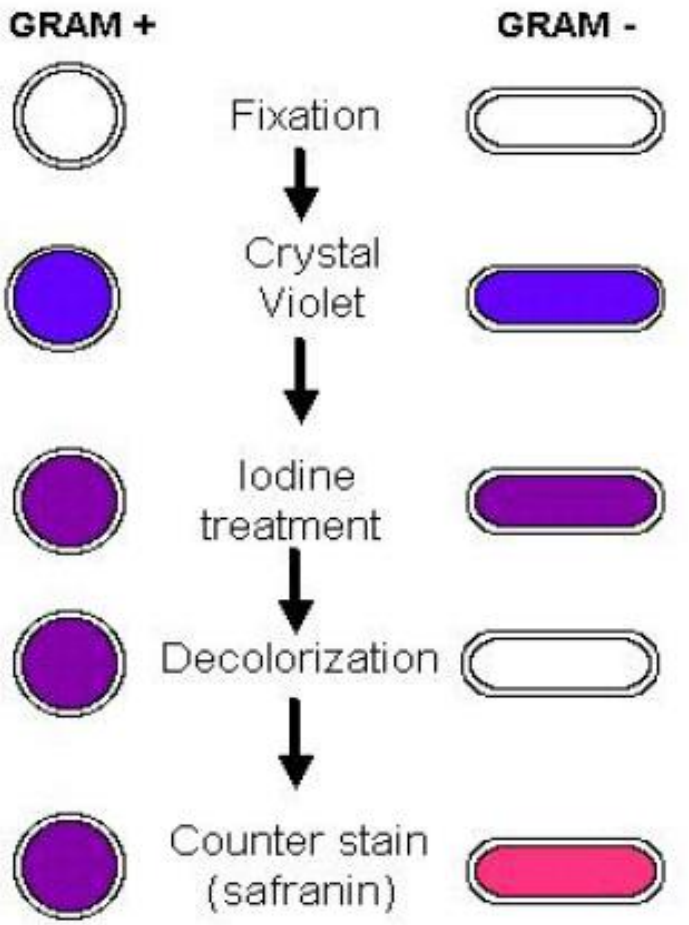
- Possono vivere sia in presenza che in assenza di ossigeno

Parete batterica



COLORAZIONE GRAM

- Si basa sulla **capacita' di trattenere un colorante basico**
  - **ciò** grazie alla presenza ed alla quantita' di "peptidoglicano" nella parete cellulare.
- **Batteri Gram negativi** parete sottile ricca di lipopolisaccaridi e lipoproteine.
- **Batteri Gram positivi**: presentano amino-zuccheri.
  N-acetilglucosamina (NAG) e acido N-acetilmuramico (NAM) nella parete.



Lo strato più **spesso di peptido-glicano** nei batteri Gram + trattiene il colorante violetto.

Nei batteri Gram – questo viene invece decolorato dall'acetone

è visibile la seconda colorazione con safranina (o fucsina)

Coltivazione dei microrganismi

- Lo studio dei microrganismi generalmente richiede la loro coltivazione in laboratorio
- Si cerca di **riprodurre artificialmente** un ambiente in grado di soddisfare le esigenze metaboliche del microrganismo che si desidera coltivare
- Per la crescita in laboratorio è necessario conoscere:
  - **metabolismo**
  - **esigenze nutrizionali**
  - **temperatura ottimale**
  - **pH ottimale**

I TERRENI DI COLTURA

- I terreni di coltura contengono tutte quelle **sostanze organiche ed inorganiche necessarie** per la crescita del microrganismo.
- La composizione chimica dei diversi terreni di coltura è naturalmente differente in relazione alle necessità nutrizionali del batterio che si desidera coltivare.

- In generale essi sono composti da:
  - **CARBONIO**
  - **IDROGENO**
  - **OSSIGENO**
  - **AZOTO**
  - **FOSFORO**
  - **ZOLFO**
  - **OLIGOELEMENTI (Fe, Ca, Co, Cu, Mn, etc.)**

Terreni di coltura:
Classificazione per costituzione chimica

- In base alla **costituzione chimica:**

- **Terreni MINIMI**: per la crescita dei soli batteri autotrofi. Gli elementi essenziali (N, C, S, P) sono presenti come sali inorganici in **composizione e quantità note.**
- **Terreni SINTETICI (o definiti):** è **nota** la formulazione **chimica di ogni ingrediente**; le singole sostanze di cui il batterio necessita sono presenti in quantità note.
- **Terreni COMPLESSI**: ignota l'esatta composizione chimica delle sostanze nutritive (estratto di carne di bue, cuore, cervello, ecc.

- Comprendono la maggior parte dei terreni usati in laboratorio.

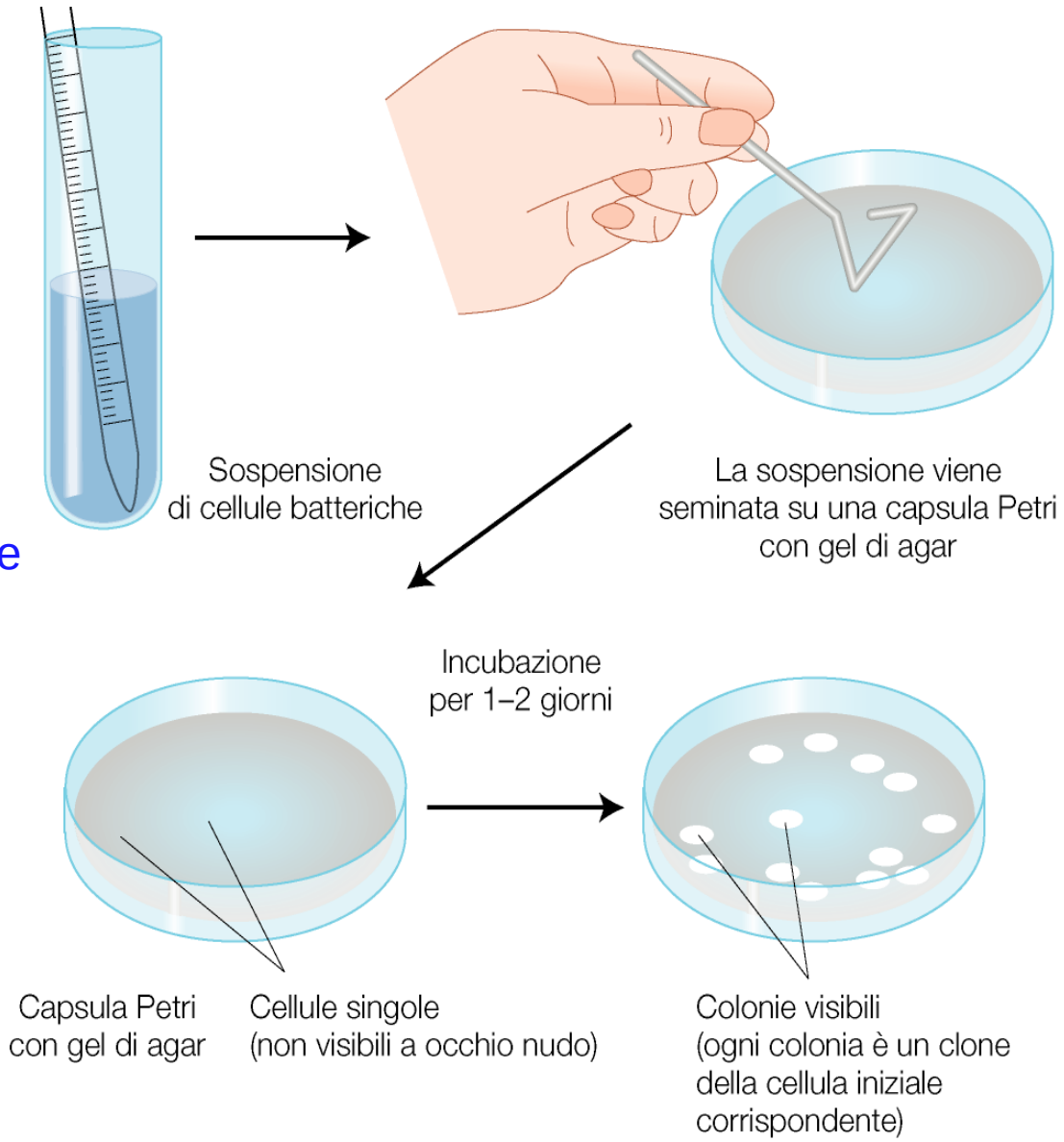
Terreni di coltura: Classificazione per funzione

- In base alla **funzione:**
  - **Terreni di ARRICCHIMENTO (o ELETTIVI):** la specie microbica di interesse vi cresce in un tempo assai più breve rispetto ad altre specie microbiche.
  - **Terreni SELETTIVI**: **contengono sostanze batteriostatiche** (sali biliari, tellurito di K, NaCl, azide sodica, cetrimide, cristal-violetto) a concentrazione nota
    - queste inibiscono o rallentano lo sviluppo di molte specie microbiche, ma non di altre. Utilizzati per l'isolamento di specifici microrganismi da campioni altamente contaminati.
  - **Terreni DIFFERENZIALI: contengono sostanze indicatrici di particolari reazioni biochimiche** che avvengono nel terreno stesso.
  - Usati per la ID di specifici microrganismi.

Metodi di coltura di batteri.

❑ Colonie batteriche, ciascuna derivante da una singola cellula

- ✓ I fenotipi batterici possono essere saggiati in base alle caratteristiche delle loro colonie.
- ✓ Un ceppo batterico viene fatto crescere in un terreno liquido contenente nutrienti,
- ✓ poi un piccolo numero di cellule viene prelevato dalla sospensione liquida e disseminato su un mezzo solido.
- ✓ **Da ogni cellula si originerà una colonia.**



Tutte le cellule di una colonia hanno lo stesso genotipo e lo stesso fenotipo

Principali terreni microbiologici per colture aerobiche

Luria Bertani Brodo (LB)



Usi: Coltura di specie batteriche aerobiche

LB-Agar



Usi: Coltura di specie batteriche aerobiche su terreni solidi

MacConkey Agar



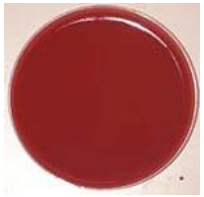
Usi: terreni selettivi per batteri Gram-negativi, enterici (tolleranti alla bile). Valutare la fermentazione del lattosio

Sheep's Blood Agar



Usi: Terreni non selettivi, ottimi per la coltura di molte specie batteriche incluse specie Gram - e Gram + inclusi Stafilococchi e Streptococchi

Chocolate Agar



Usi: terreni molto arricchiti con globuli rossi lisati, per rilasciare molti nutrienti necessari *organismi esigenti*.

Hektoen Enteric Agar



Usi: terreni selettivi per batteri enterici Gram-(concent. di sali biliari più elevate rispetto a MacConkey). Utilizzato per valutare la fermentazione del lattosio e la capacità di produrre idrogeno solforato (H2S). Permette di distinguere tra *E. coli, Salmonella* e altri patogeni dello stomaco incluse specie di Shigella

Alcuni terreni di crescita per batteri chemiotrofi

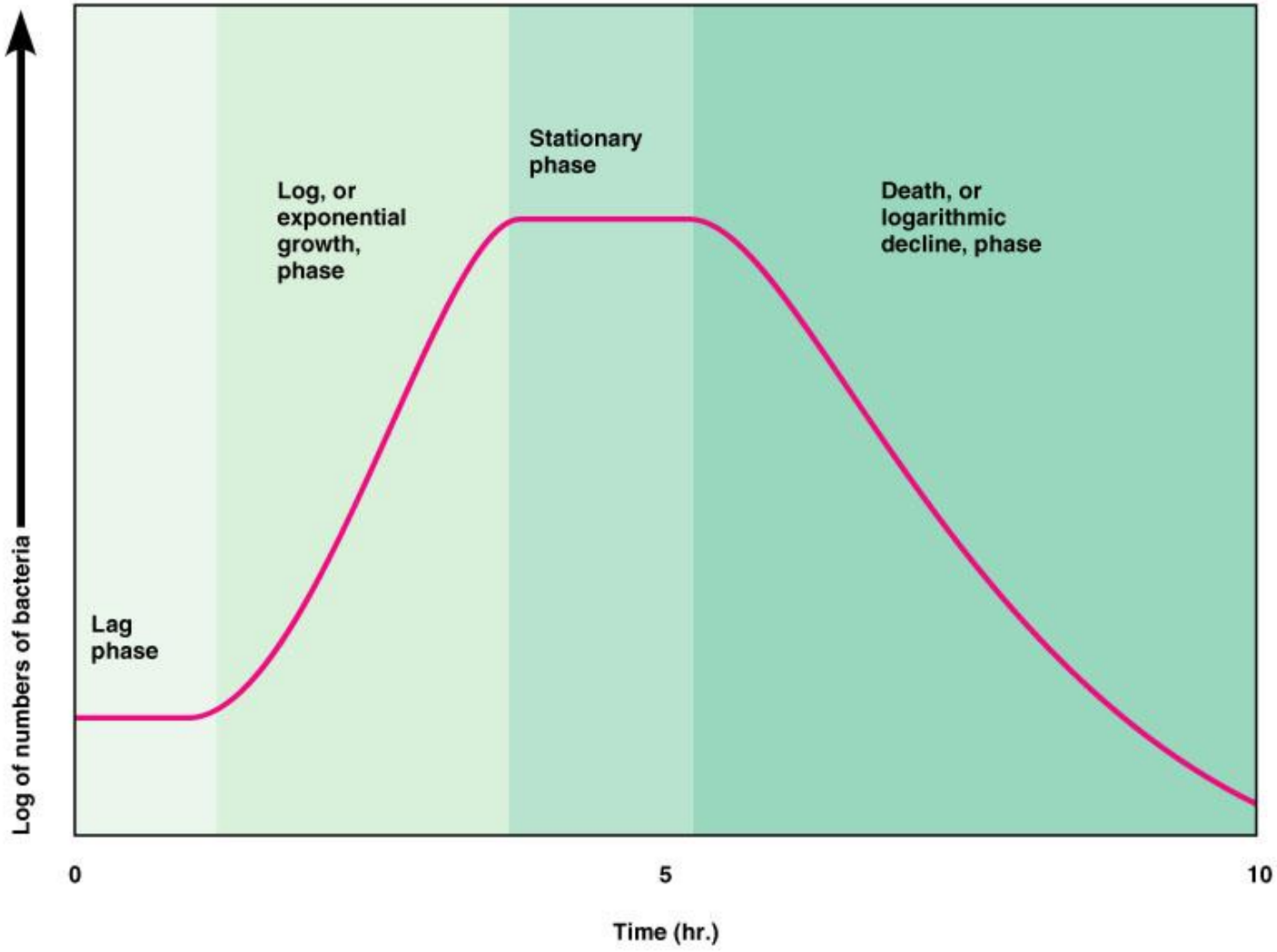
Terreno minimo	Terreno per un batterio auxotrofo	Terreno completo
Acqua, 1 litro Fonte di carbonio ed energia (p.e. glucosio, 5 g) NH_4Cl 1 g $KHPO_4$ $7H_2O$ 1 g $MgSO_4$ $7H_2O$ 200 mg $FeSO_4$ $7H_2O$ 10 mg $CaCl_2$ 10 mg Tracce di elementi (Mn,Mo,Cu,Co,Zn) come sali inorganici: 0,02-0,05 mg di ciascuno	Terreno minimo + uno o più fattori di crescita necessari per la crescita dell'auxotrofo (aminoacidi, vitamine, basi azotate)	Terreno minimo + estratto di lievito (5 gr): fornisce tutti i possibili fattori di crescita, quindi permette la crescita di tutti i batteri auxotrofi

Crescita batteri in coltura in coltura

- **4 fasi :**

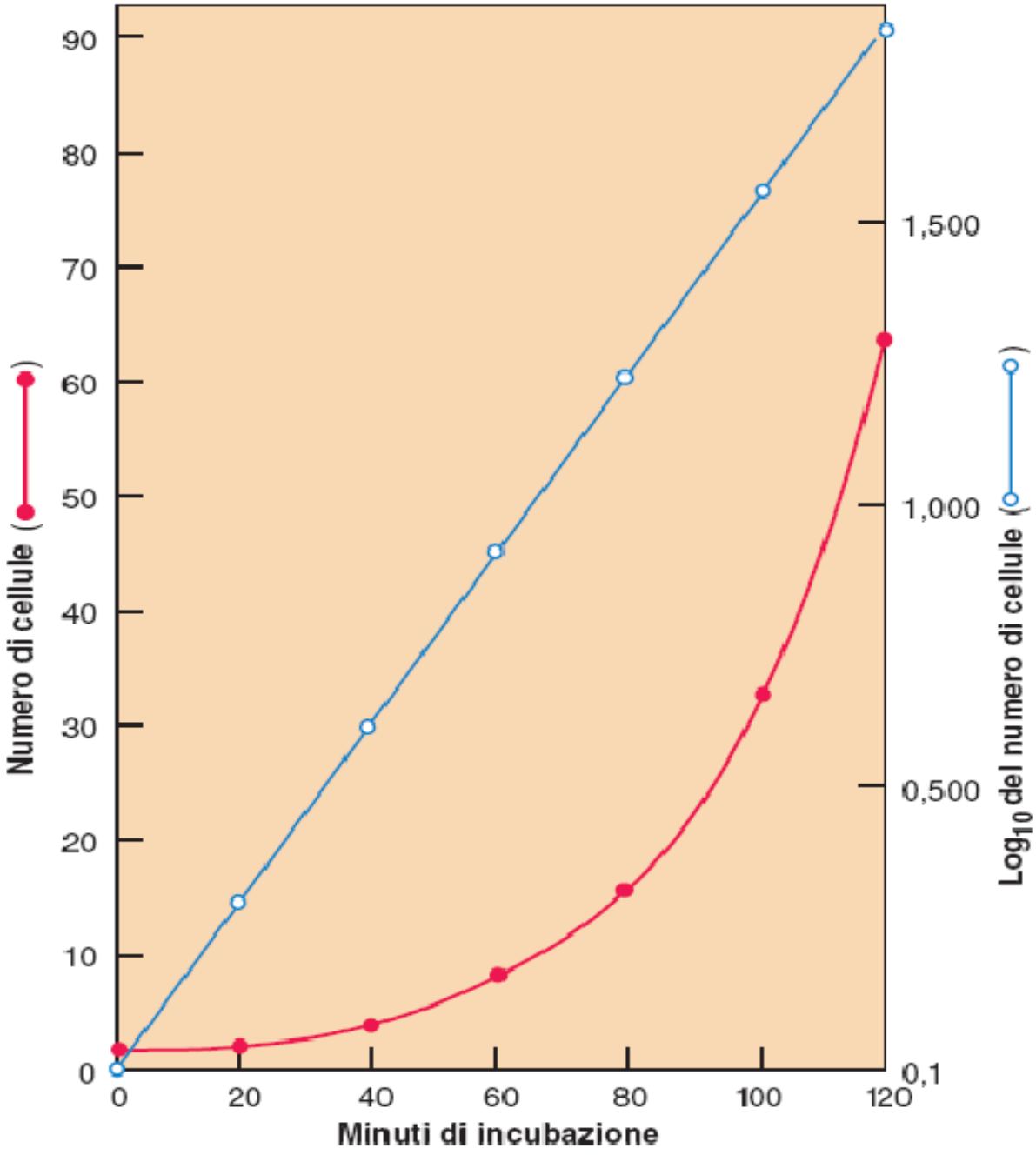
  - fase latenza
  - fase log
(crescita esponenziale)

  - fase stazionaria
  - fase di morte



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Grafico su
- scala aritmetica
(scala delle ordinate a sinistra)
e logaritmica
(scala delle ordinate a destra)
di una popolazione batterica che si duplica ogni 20 minuti.



Numero di generazioni e tempo di generazione

- L'aumento del numero di cellule durante la crescita esponenziale di una coltura batterica non è altro che una **progressione geometrica in base 2** (2^0 --> 2^1),
- Per cui esiste una relazione diretta tra il numero di cellule inizialmente in una coltura ed il numero presente dopo un certo periodo di crescita esponenziale

$N = N_0 2^n$

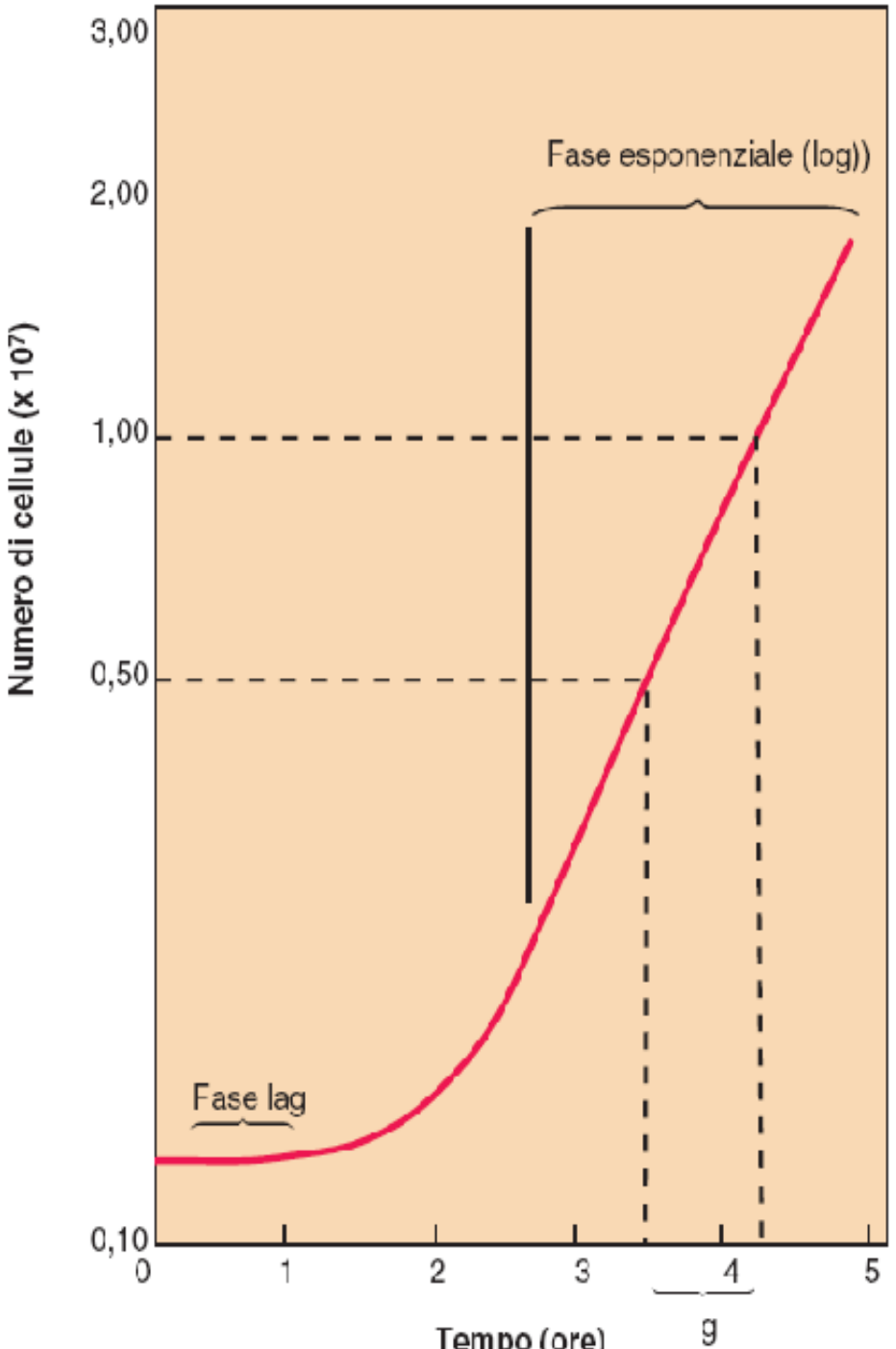
N = numero finale di cellule
N_0 = numero iniziale di cellule
n = numero di generazioni avvenute nel periodo di crescita esponenziale
g = tempo di generazione
t = tempo in ore o minuti di crescita esponenziale

$n = \log N - \log N_0 / \log 2 = 3{,}3 (\log N - \log N_0)$

$g = t/n$

Il tempo di Generazione (g)

- può essere determinato mediante grafico su carta semi-logaritmica dei dati di crescita



Tempi di generazione di alcuni microrganismi

Microrganismo	Temperatura (°C)	Tempo di generazione (ore)
Batteri		
Beneckea natriegens	37	0,16
Escherichia coli	40	0,35
Bacillus subtilis	40	0,43
Staphylococcus aureus	37	0,47
Pseudomonas aeruginosa	37	0,58
Clostridium botulinum	37	0,58
Rhodospirillum rubrum	25	4,6–5,3
Anabaena cylindrica	25	10,6
Mycobacterium tuberculosis	37	≈12
Treponema pallidum	37	33
Alghe		
Scenedesmus quadricauda	25	5,9
Chlorella pyrenoidosa	25	7,75
Asterionella formosa	20	9,6
Euglena gracilis	25	10,9
Ceratium tripos	20	82,8
Protozoi		
Tetrahymena geleii	24	2,2–4,2
Leishmania donovani	26	10–12
Paramecium candatum	26	10,4
Acanthamoeba castellanii	30	11–12
Giardia lamblia	37	18
Funghi		
Saccharomyces cerevisiae	30	2
Monilinia fructicola	25	30

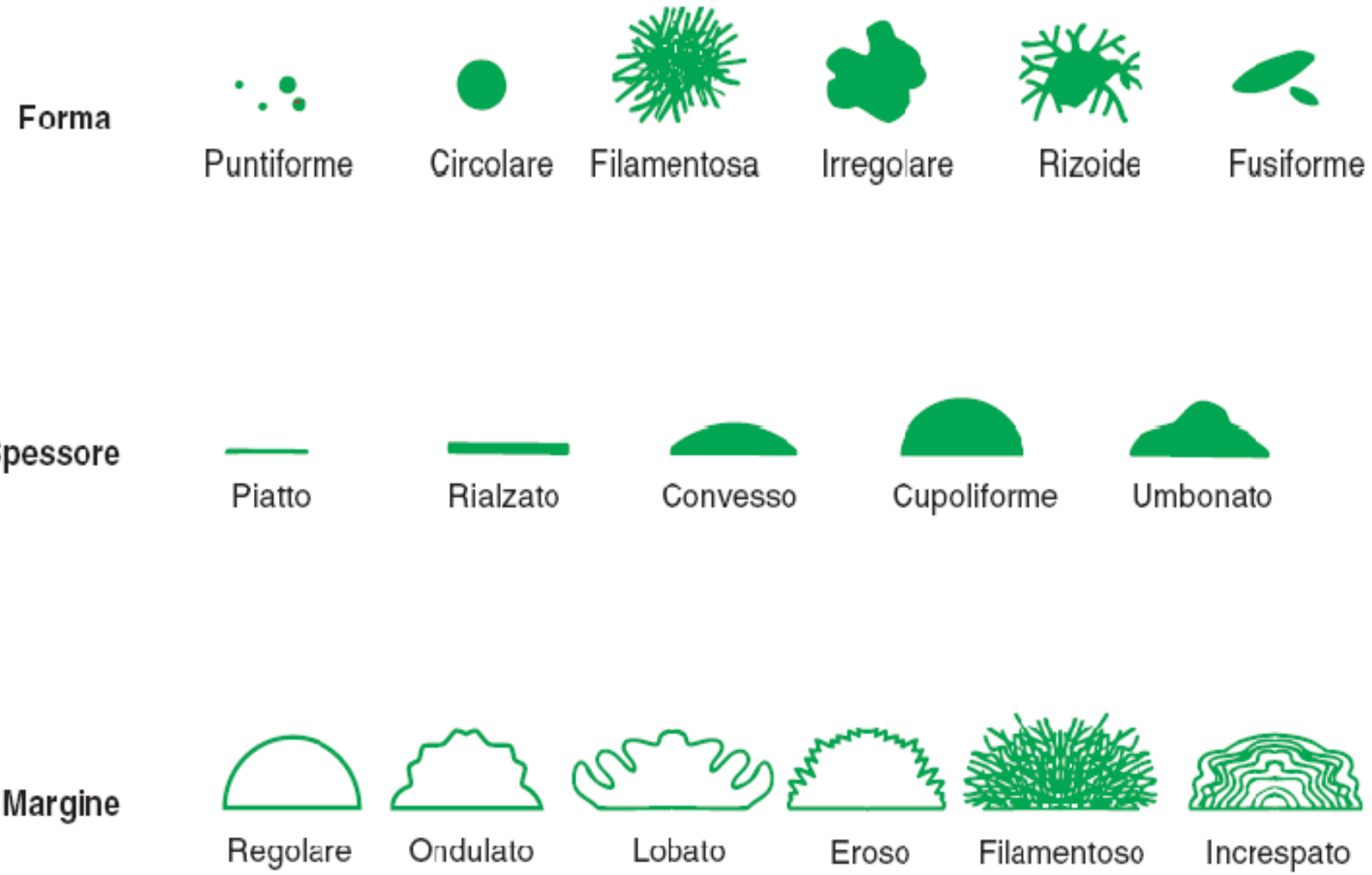
Identificazione delle colonie

- è eseguita **ricorrendo a colture pure derivate da ciascun tipo di colonia precedentemente** isolata
- si basa sullo studio di alcuni caratteri:

  - **ASPETTO COLONIE**
  - **CARATTERI MICROSCOPICI** (morfologia e caratteristiche tintoriali)
  - **CARATTERI BIOCHIMICI (**Produzione di prodotti metabolici peculiari; presenza/assenza di enzimi particolari)
  - **CARATTERI ANTIGENICI**

Esame colturale

- I caratteri colturali forniscono indizi utili per l'identificazione

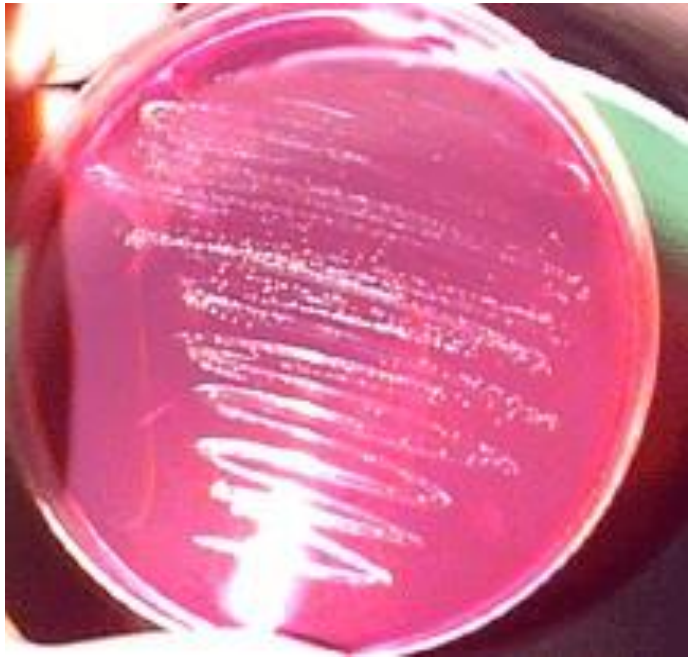


QUANTI BATTERI CI SONO IN UNA COLTURA?

- Necessità di conoscere il **titolo esatto di una** coltura:

- **Studi genetici**: si considerano le colonie come individui singoli.

- *Necessità pratiche*: colture confluenti su piastra non sono di grande utilità



Metodi di conteggio dei microrganismi

- **Conta al microscopio con camera di Petroff- Hausser**
- **Metodi turbidimetrici (torbidità, assorbanza)**
- **Misura del peso secco**
- **Conteggio vitale in piastra (CFU)**

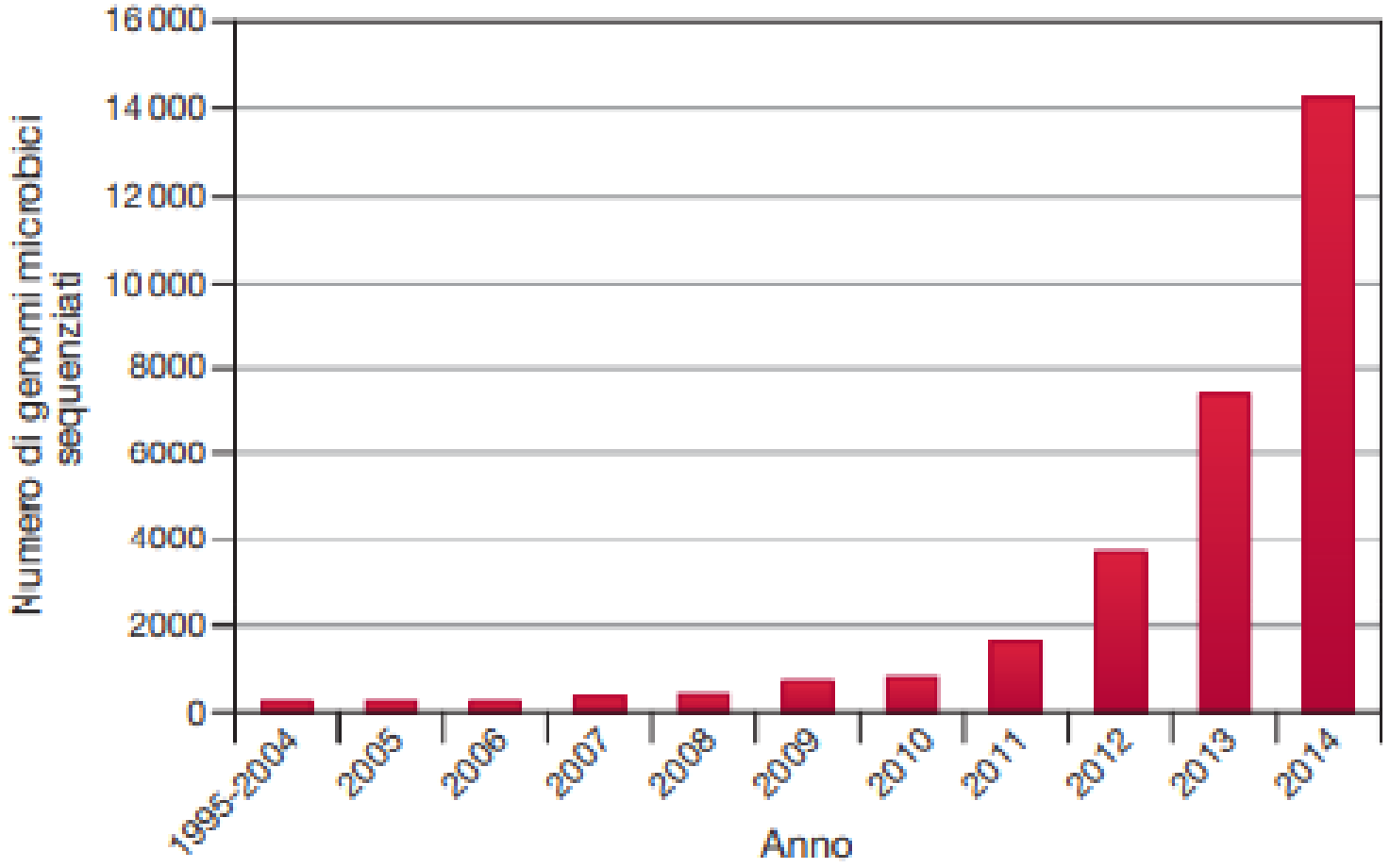
CROMOSOMA BATTERICO (nucleoide)

- Il DNA di un microrganismo è **concentrato in un'unica molecola**, il **cromosoma** batterico.
- Alcuni batteri possono avere più di un cromosoma
  - dimensioni tipiche: 3 - 5.000.000 bp, (1.7 mm)
  - **Il cromosoma è circolare**
    alcuni importanti gruppi hanno cromosomi lineari
  - Il DNA è sempre associato a proteine, ma non così altamente organizzato come negli eucarioti

Alcuni esempi dell'organizzazione del genoma nei batteri

	Cromosomi	Plasmidi
Eschericia coli K-12	Uno circolare (4,6 Mb)	
Pseudomonas aeruginosa	Uno circolare (6,3 Mb)	
Ureaplasma urealyticum	Uno circolare (0,75 Mb)	
Agrobacterium tumefaciens	Uno circolare (3,0 Mb) + uno lineare (2,1 Mb)	Due circolari (450 + 200 Kb)
Borrelia	Uno lineare (0,91 Mb)	Multipli, sia lineari che circolari (5-200 Kb)
Brucella suis biovar. 1,2,4	Due circolari (1,0 + 2,0 Mb)	
Brucella suis biovar. 3	Uno circolare (3,1 Mb)	
Paracoccus denitrificans	Tre circolari (2,0 + 1,1 + 0,64 Mb)	
Bacillus thuringiensis	Uno circolare (5,7 Mb)	Sei (ciascuno >50 Kb)
Rhizobacterium meliloti	Due circolari (1,7 + 3,4 Mb)	Un megaplasmide circolare (1,4 Mb)

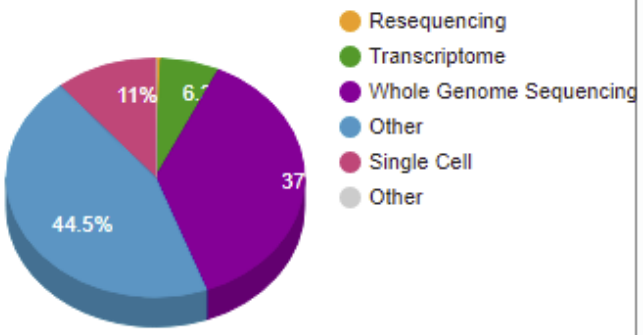
INCREMENTO DEL NUMERO DI SEQUENZE DI GENOMI MICROBICI DEPOSITATE PRESSO LA BANCA DATI GENBANK DAL 1995 AL 2014.



I genomi sequenziati sono in generale di pubblico dominio
sono accessibili tramite Internet in siti web che raccolgono tutte le sequenze conosciute (DNA database) come ad esempio **GOLD Database** (https://gold.jgi.doe.gov/) oppure il National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome)

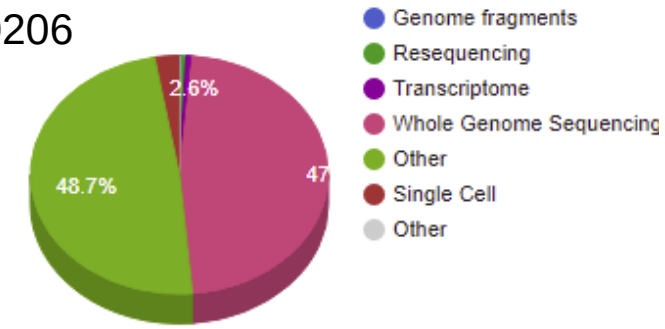
Archaeal Distribution

4568

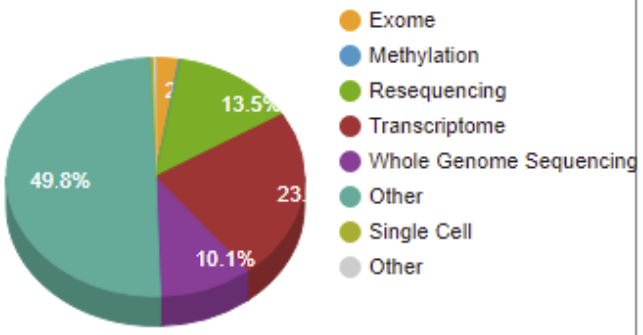


Bacterial Distribution

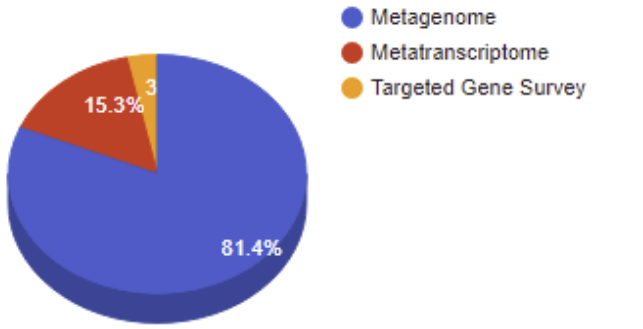
400206



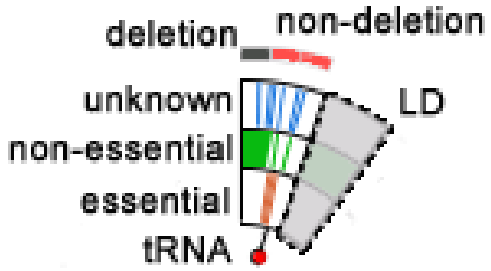
Eukarya Distribution



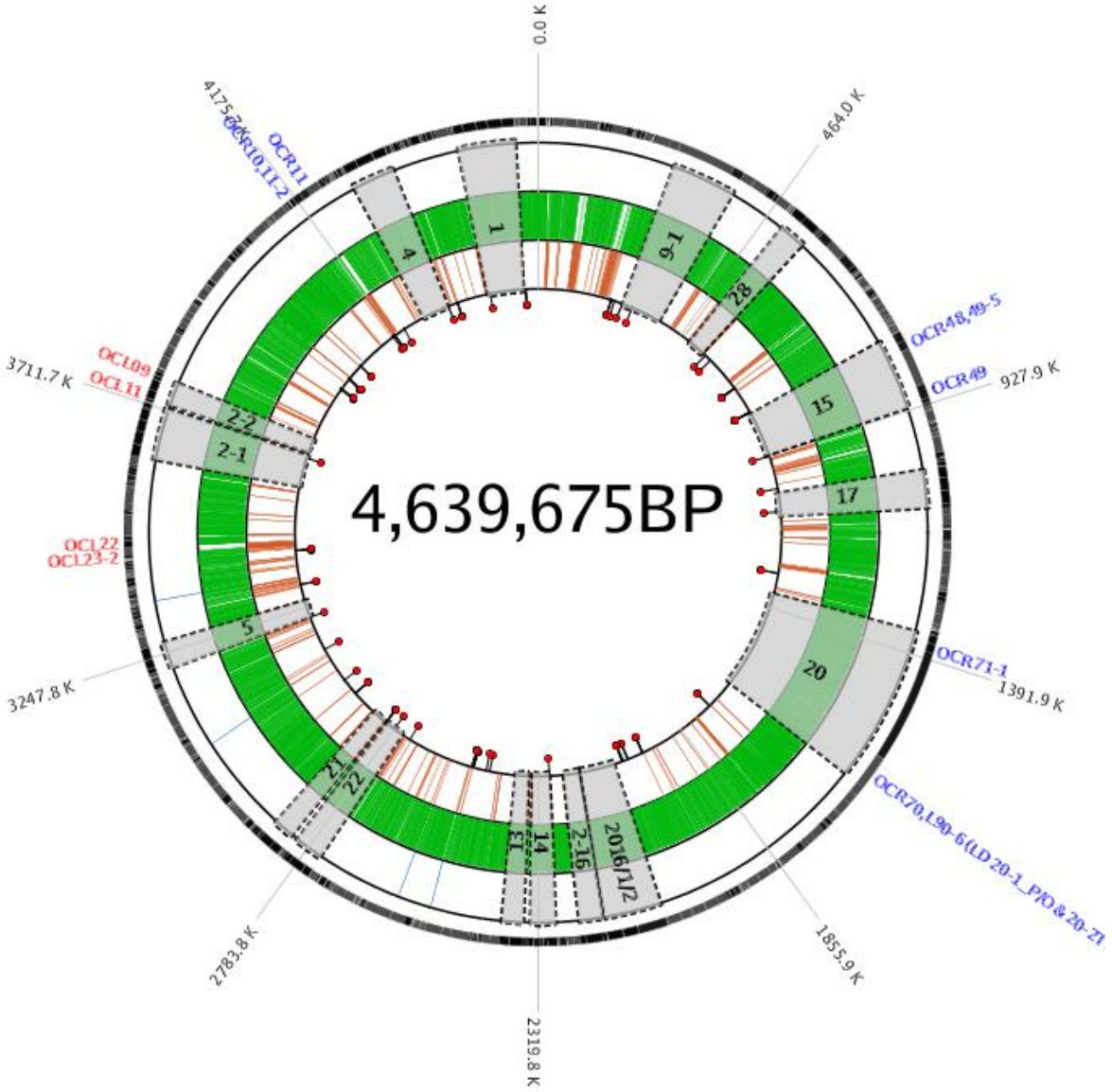
Metagenomic Distribution



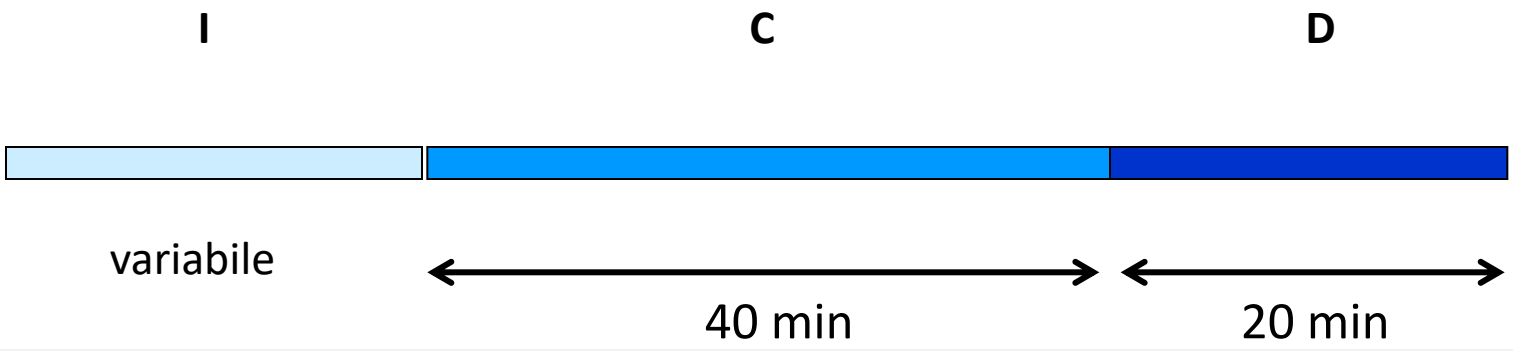
Genoma di *E. coli*



- 4760 genes
- 302 essential
- 4455 nonessential
- 3 unknown



Il ciclo cellulare di *Escherichia coli*



- **Fase I:** **periodo di inter-inizio. Osservabile in cellule che si dividono lentamente (T>60'); la cellula si prepara alla replicazione del DNA**

- **Fase C:** **periodo necessario alla replicazione del DNA. Il limite è dovuto alla velocità di sintesi del DNA da parte della DNA pol.**

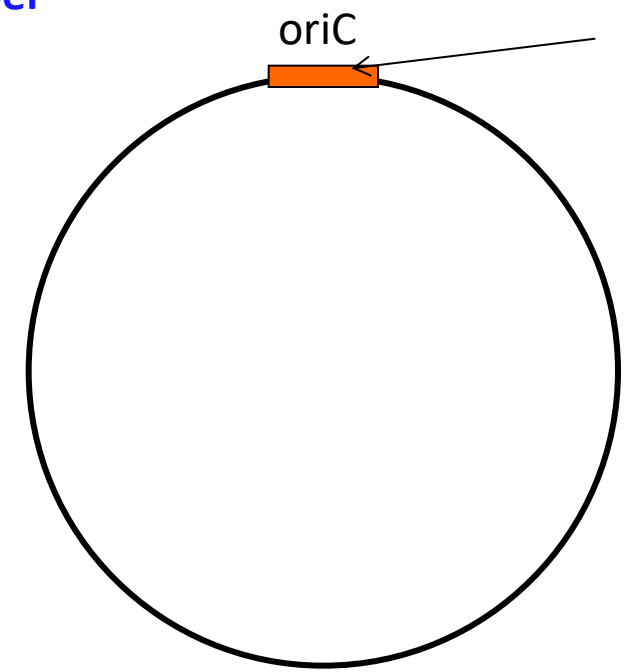
- **Fase D:** **periodo della divisione. E' il tempo che intercorre tra il completamento della replicazione del cromosoma e la divisione cellulare.**

La replicazione del cromosoma di *E. coli*

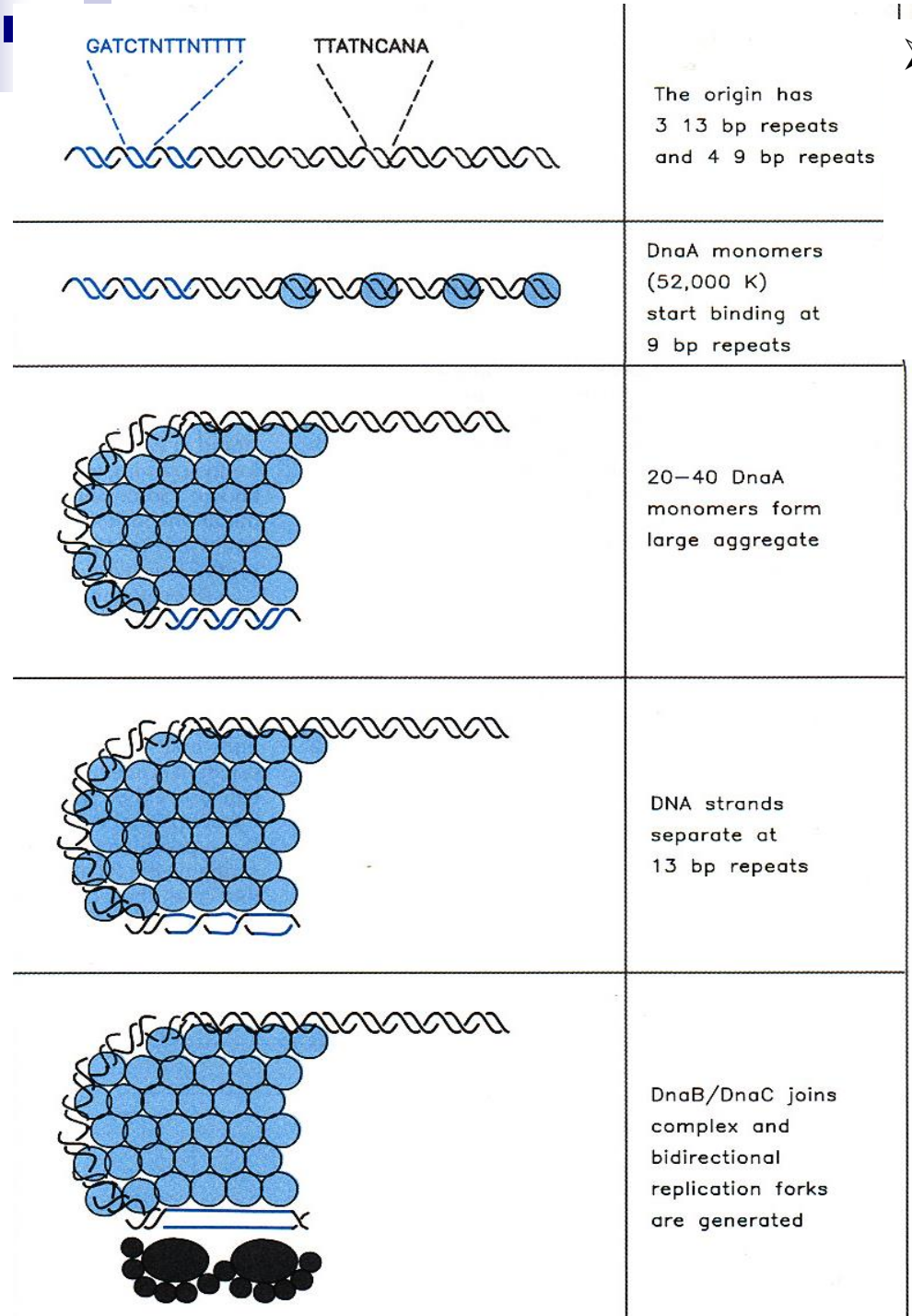
- Un **unico replicone circolare** di 4,6 milioni di bp
- **L'inizio della replicazione** è un **evento separato dalla replicazione** del DNA e richiede uno specifico set di proteine.
- Essenzialmente si verifica la separazione dei filamenti complementari di DNA a un sito specifico, **chiamato *oriC*,** che **permette l'ingresso e l'assemblaggio degli enzimi della replicazione**.

Le proteine richieste per l'inizio

DnaA
DnaB
DnaC
HU
Girasi
SSB



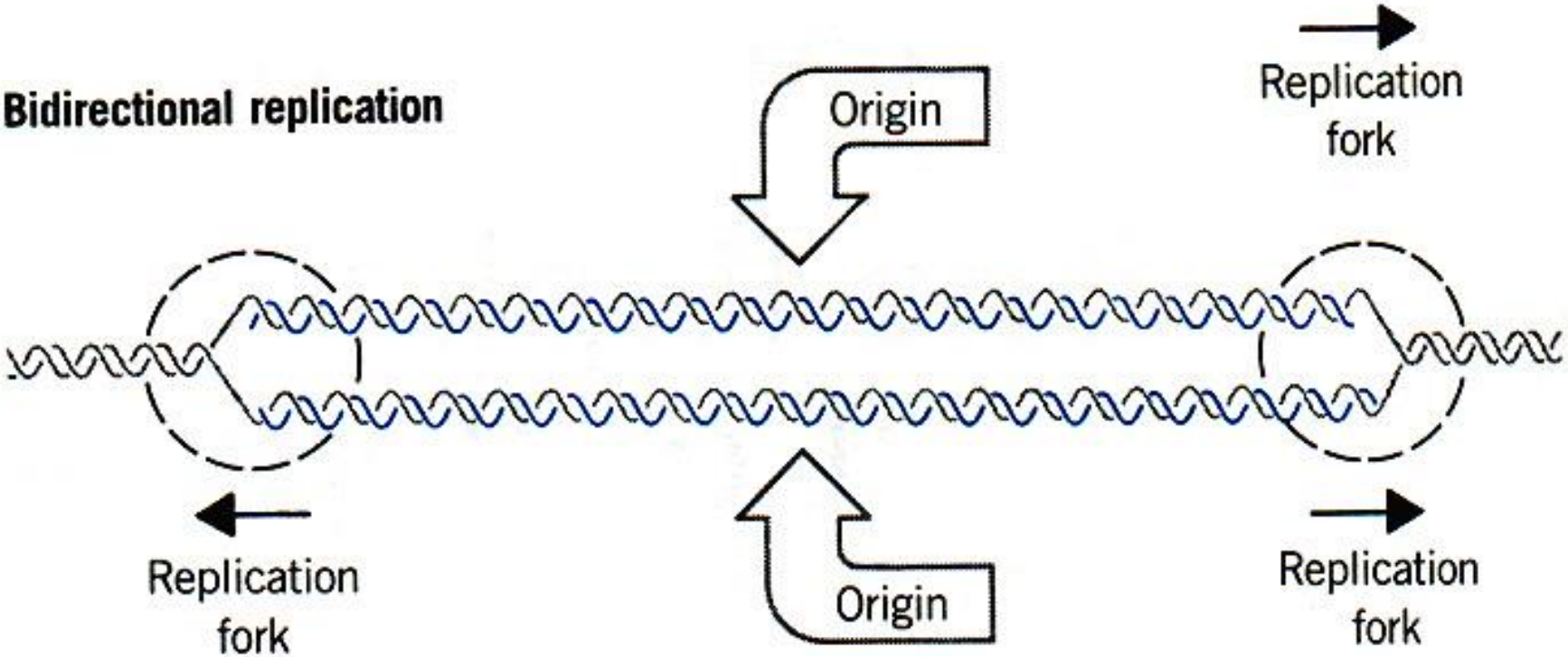
La prima tappa nella formazione del complesso di inizio è il legame al sito oriC della proteina DnaA



- Il sito **oriC** presenta sequenze ripetute di **9** e **13** basi all'interno di una regione di **245 bp che costituisce la sequenza minima necessaria** per l'inizio della replicazione. Le due sequenze sono diverse ma comunque ricche in AT.
- Si ritiene che DnaA riconosca inizialmente **le sequenze di 9 bp** e vi si leghi in maniera cooperativa fino a che 20-40 monomeri formino un nucleo centrale attorno al quale si avvolge il DNA di oriC
- Il risultato è l'apertura delle sequenze ripetute di 13 bp ricche in AT. A questo punto entrano **DnaB, C** ed altre proteine che formano un complesso di 480.000 daltons.
- **DnaB è l'elicasi** necessaria per separare la doppia elica. Altre proteine sono necessarie per l'inizio come pure per il prosieguo della replicazione e sono la **DNA girasi che** rimuove super-avvolgimenti positivi e **SSB** che stabilizza il DNA a singola elica.

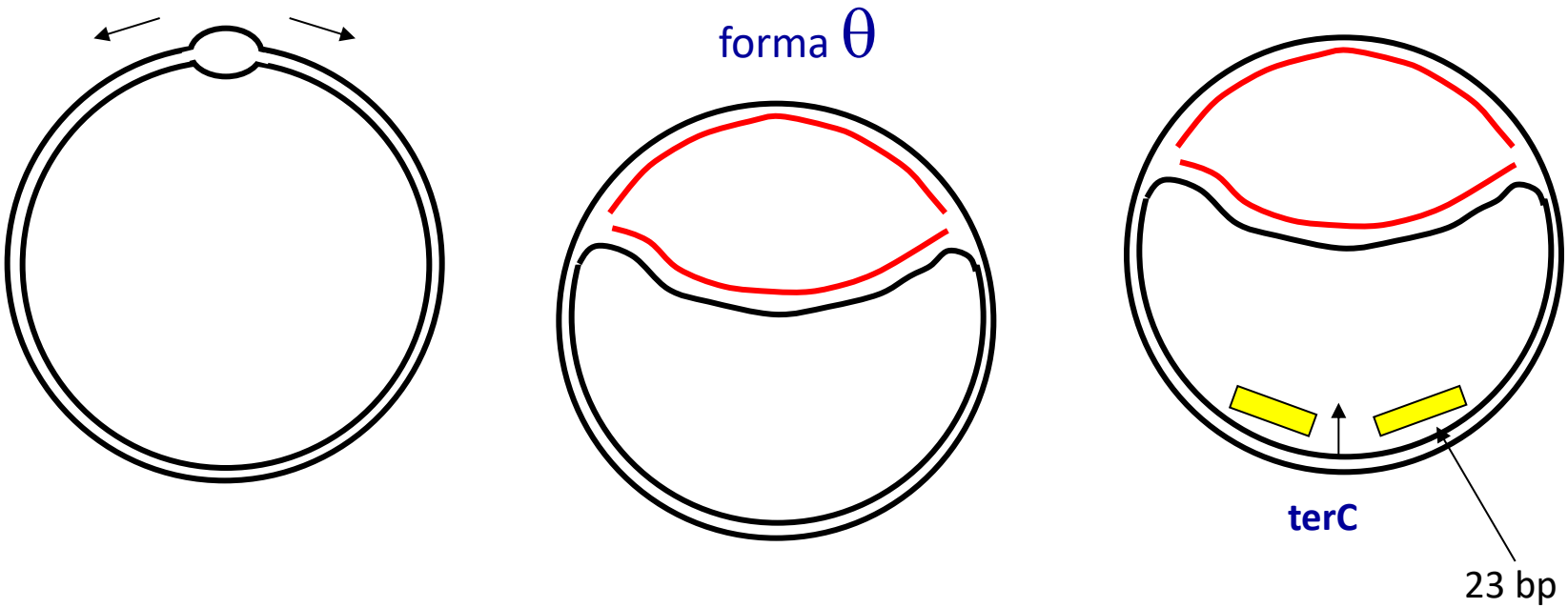
La replicazione del cromosoma di *E. coli*

- Si **forma una forca replicativa e**
- **la sintesi** di DNA procede **bidirezionalmente**
- non senza che sia **prima stato sintetizzato un innesco di RNA che** funge da primer per la DNA polimerasi III



Le varie fasi della replicazione possono essere seguite al ME.

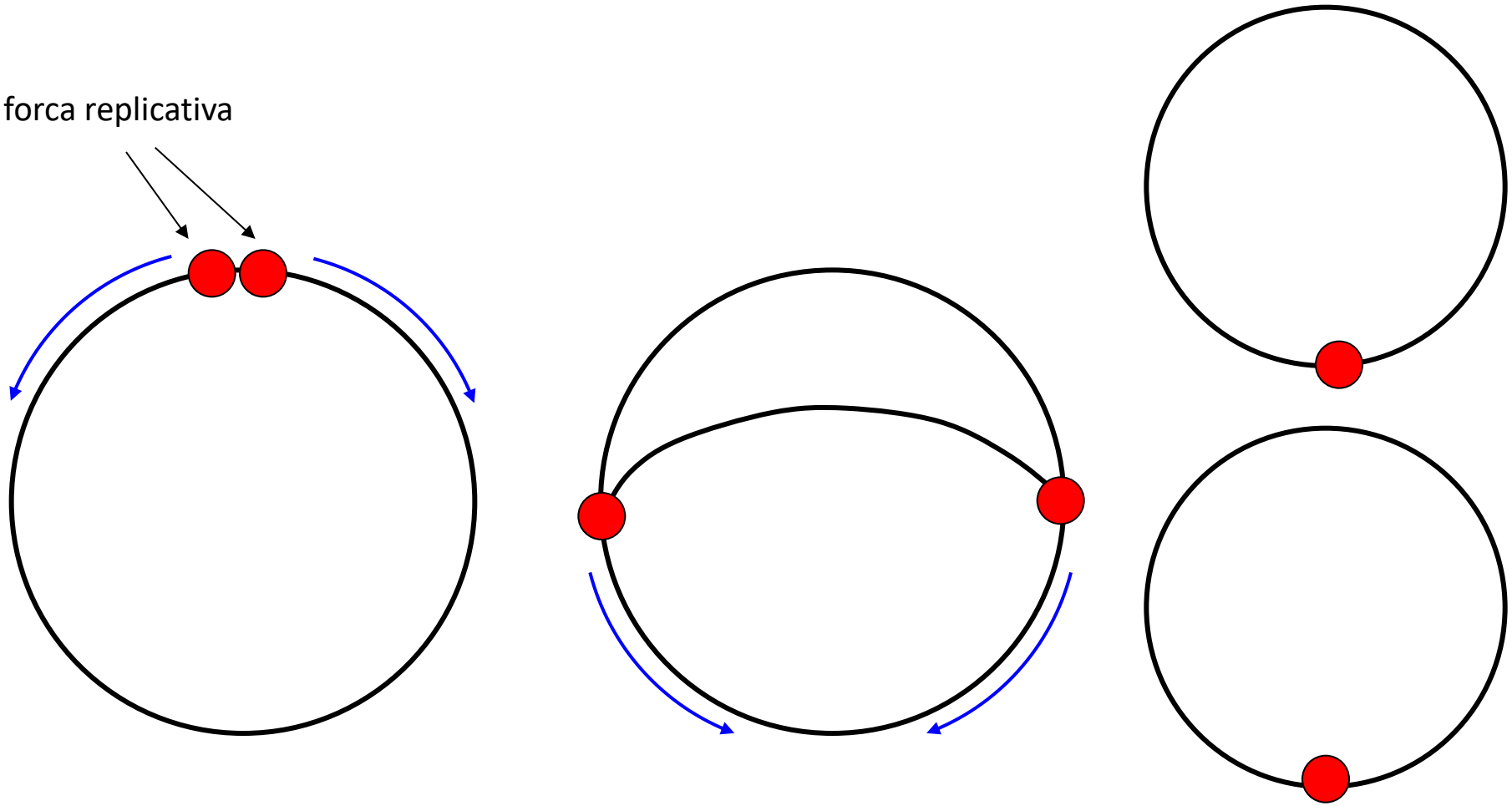
- **All'inizio si ha la struttura a "occhio" che si trasforma nella struttura intermedia a "teta" con l'avanzamento delle forche replicative**



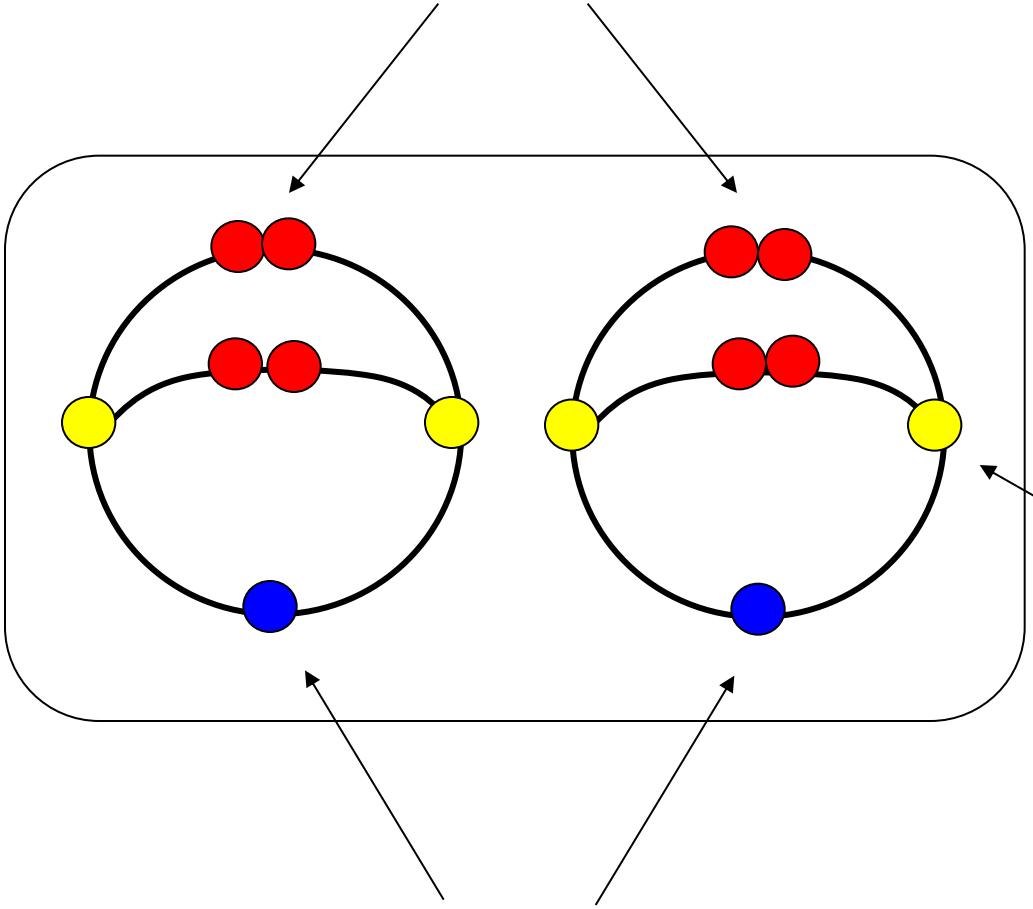
- La replicazione termina al **sito di terminazione** indicato come **terC** dove si incontrano le due forche replicative.
- La regione terC contiene due sequenze di **23** bp che delimitano il punto di incontro.
- La completa replicazione del cromosoma richiede circa **40 minuti**

Il paradosso della divisione in *E. coli*

- **Come può un batterio dividersi ogni 20 minuti se il DNA impiega 40 minuti per duplicarsi?**



replicazione che inizia



replicazione iniziata 20’ prima

replicazione iniziata 40’ prima

Problemi posti dalla replicazione

➢ Quale è il segnale che dà inizio alla replicazione?

- **raggiungimento di una massa critica**, quindi la frequenza di inizio è legata alla massa cellulare.
- **Più un batterio cresce velocemente**, cioè più velocemente può aumentare la sua massa, **più frequentemente inizierà la replicazione.**
- Deve pertanto esistere un **meccanismo di controllo che correli la massa all'inizio della replicazione**

➢ Quale meccanismo mette in relazione la fine della replicazione con la successiva divisione?

- Un modello per spiegare il fenomeno:
  - **esiste un iniziatore che viene sintetizzato costitutivamente**
  - **questo si accumula proporzionalmente** all'aumento della massa cellulare
  - fino a raggiungere una concentrazione critica che avvii l'inizio della replicazione.

Il modello non è stato ancora provato

La segregazione del nucleoide

➢ La **replicazione del cromosoma** è **seguita dalla segregazione: processo dove i cromosomi duplicati vengono disposti ai lati opposti della cellula in divisione.**

- I batteri quali *E. coli* riescono a portare a termine questo processo in modo efficiente nonostante l'assenza di un apparato mitotico

➢ **I geni responsabili di questo processo non sono ancora del tutto noti**

- ma sicuramente implicato **è l'operone *mukFEB***

➢ **Il gene B codifica** per una proteina di 177 kDa

- questa è la più grande proteina conosciuta in ***E. Coli*** e
- ha una struttura **simile alla miosina eucariotica.**
- Ha una attività **ATPasica e GTPasica**
- la parte globulare ha affinità per il DNA.

✓ Mutanti in *mukB* portano alla formazione di cellule anucleate

La proteina MukB una proteina SMC like

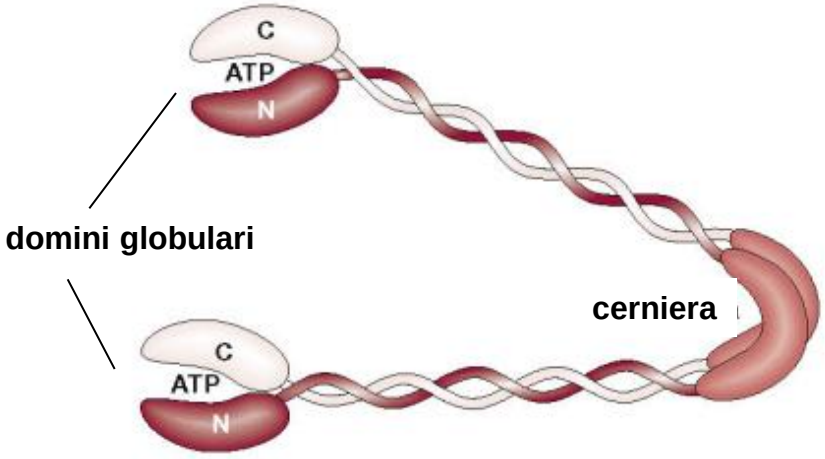
- La proteina MukB è **una proteina SMC like (** Structural Maintanance of Chromosome) presente in molti batteri.

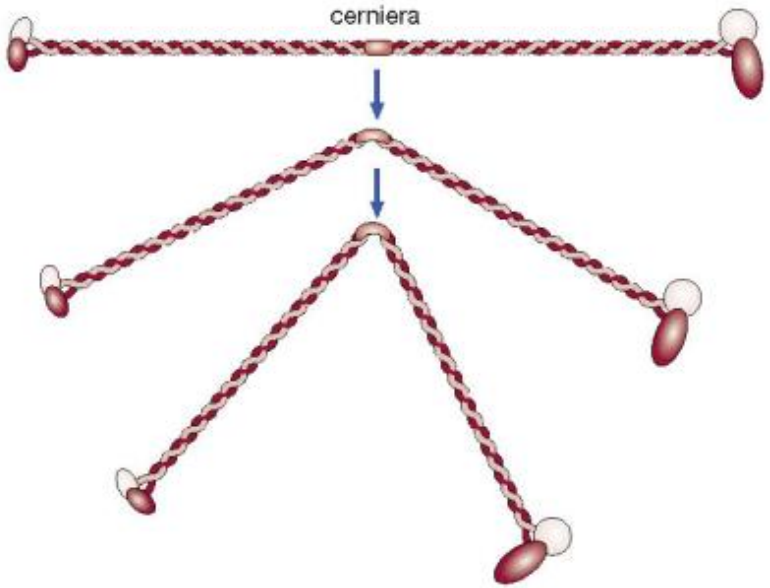
- In **assenza della proteina MukB** i batteri **diventano termosensibili** e a temperatura permissiva hanno una crescita ridottissima:
  - si osserva una decondensazione del DNA ed una perdita del nucleoide ad alta frequenza.
- La proteina MukB svolge un **ruolo importante anche nella segregazione dei cromosomi in seguito a divisione cellulare.**

- La perdita di **MukB** e della proteina del nucleoide HU è letale per la cellula.

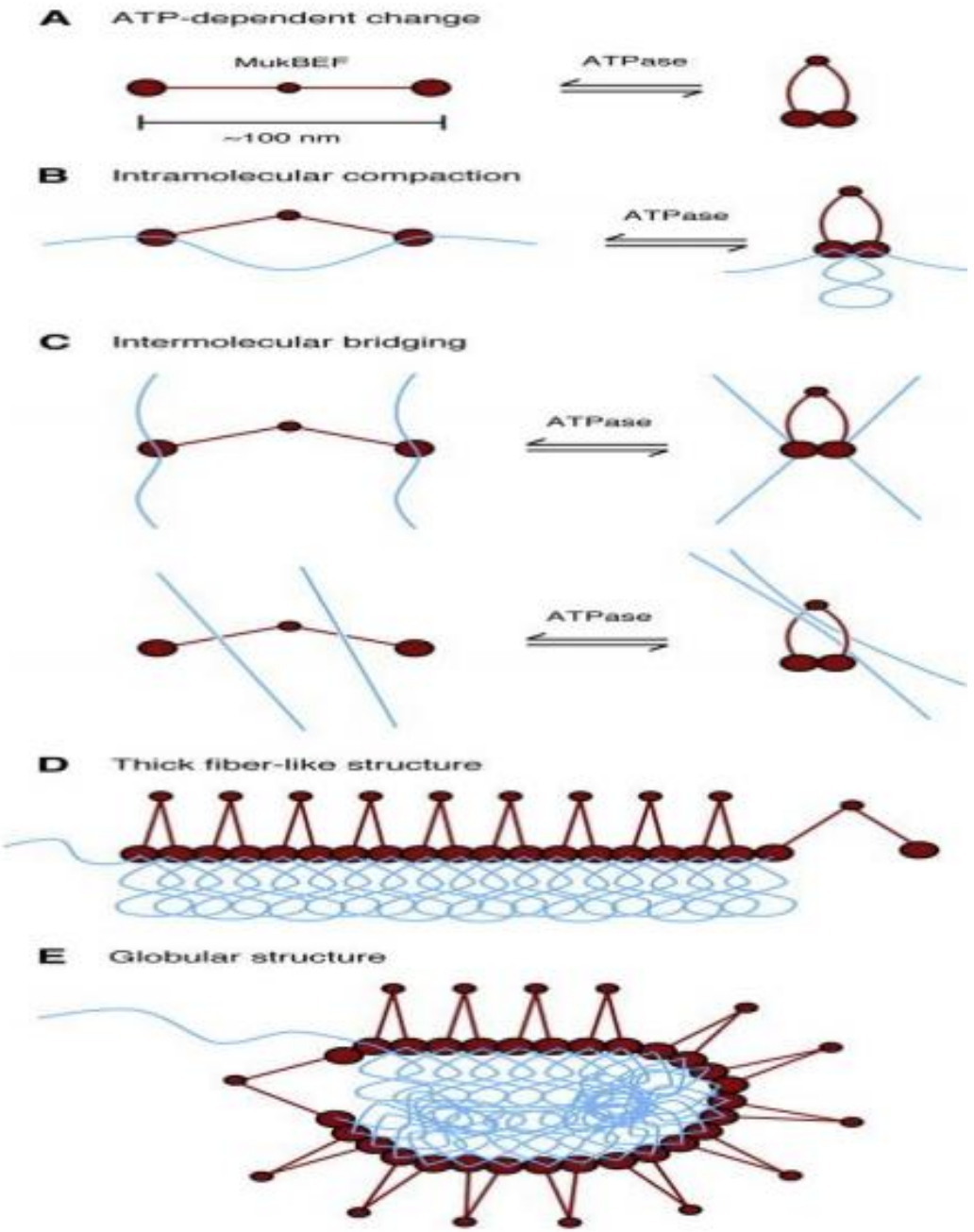
La proteina Muk B

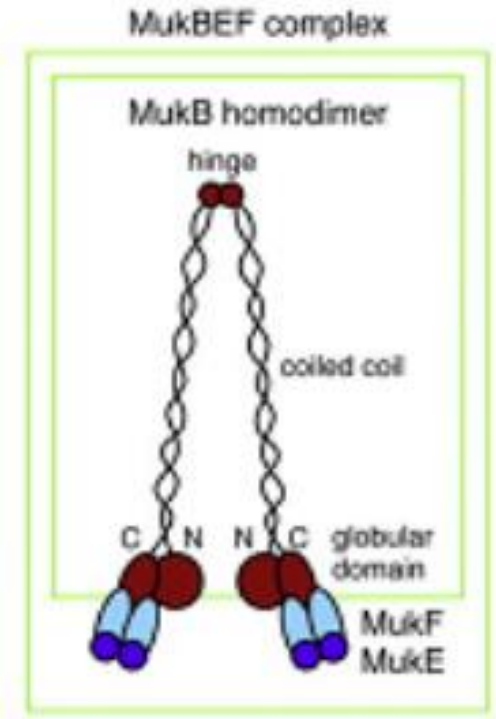
- La proteina Muk B come molte proteine della famiglia SMC ,è
  - costituita da due domini globulari N- e C- terminali (teste)
  - separati da 2 regione coiled-coil
  - intervallate da una terza regione globulare che costituisce una cerniera flessibile.
- Le proteine MuKB sono **omodimeri** ed hanno nelle regioni C e N terminali dei **domini ATPasici conservat**i.



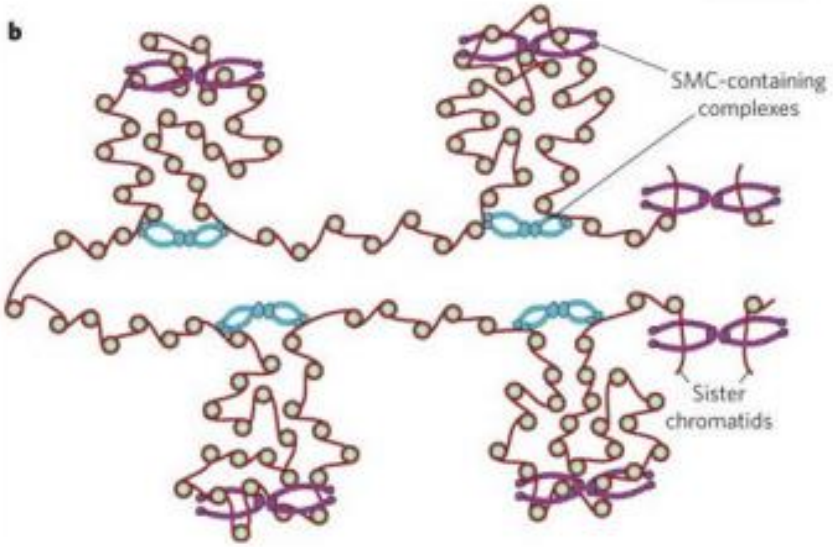


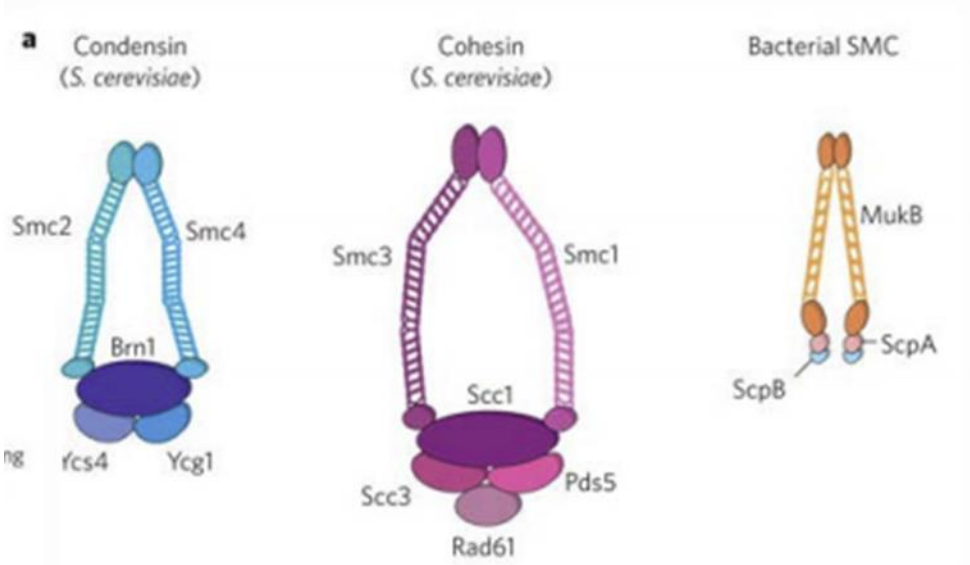
- Nella forma chiusa la proteina scorre sul DNA
- ed è in grado di **indurne il ripiegamento.**
- La proteina MukB potrebbe legare il DNA in due punti
- interagendo con i domini testa
- poi grazie alla flessibilità della regione cerniera provo-carne il ripiegamento e la
- condensazione





- **La condensina batterica** costituita dalla proteina **MukB** appartiene alla famiglia delle
  - SMC proteins (Structural Maintance of Chromosome)
  - proteine MukFE
- è in **grado di compattare il DNA in presenza di ATP con un meccanismo simile a quello osservato negli eucarioti**





Le proteine associate al nucleoide (NAP proteins)

- Anche nei batteri **esistono proteine implicate nell'organizzazione strutturale del DNA.**
- L'isolamento e la caratterizzazione delle proteine del nucleoide (definite precedentemente **istone simili**) è risultato complesso
  - perchè in molti casi mostrano una stretta associazione con altre proteine prevalentemente quelle ribosomiali
  - perché il loro legame è meno sensibile all'aumento della forza ionica

Principali Proteine Associate al Nucleoide

- **FIS,** Factor for inversion stimulation, regola l'espressione genica
- **N-HS**, Histone-like Nucleoid Structuring Protein, ha un ruolo nella formazione della "struttura" del nucleoide e influenza l'espressione genica in determinate condizioni.
- **HU,** Histone-like Proteine, inserisce avvolgimenti negativi in molecole di DNA circolare, con l'aiuto della topoisomerasi.
- **Dps,** DNA-binding protein form starved cells, proteine che proteggono il DNA da danni ossidativi.
- **IHF,** integration Host Factor, proteine che favoriscono l'integrazione di elementi trasponibili (spesso importanti per la sopravvivenza della cellula)
- **LRP,** Leucine Responsive Protein
- **CbpA**, Curved DNA binding-protein

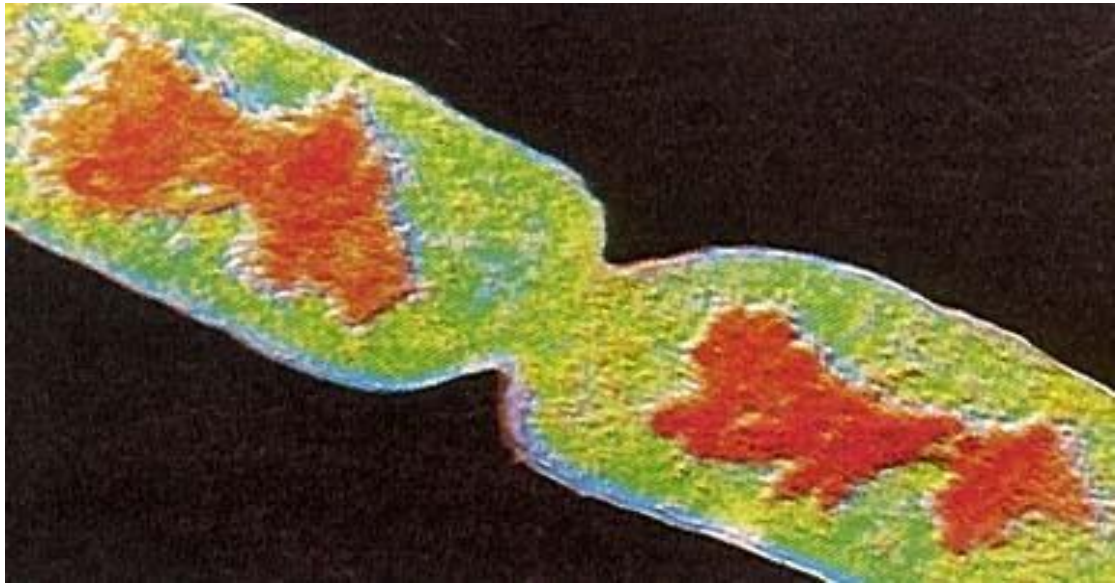
La scissione binaria

- La riproduzione dei batteri: asessuata
  - avviene mediante la divisione di un individuo in due cellule figlie uguali tra loro e identiche alla progenitrice
  - viene definito **scissione binaria,**
  - processo molto simile, ma molto più semplice della mitosi cellulare.

- **La scissione binaria**, o in due parti,
  - comune negli organismi unicellulari,
  - rara nei pluricellulari perché richiederebbe la rigenerazione di parti specializzate in ciascuno degli organismi figli.

Scissione binaria di *Escherichia coli*:

in rosso il nucleoide e in verde il citoplasma



- Il tempo richiesto da un batterio per svolgere un ciclo di crescita completo è variabile e dipende da diversi fattori nutrizionali e genetici. In condizioni nutrizionali ottimali, *E. coli* completa un intero ciclo in circa 20 minuti.

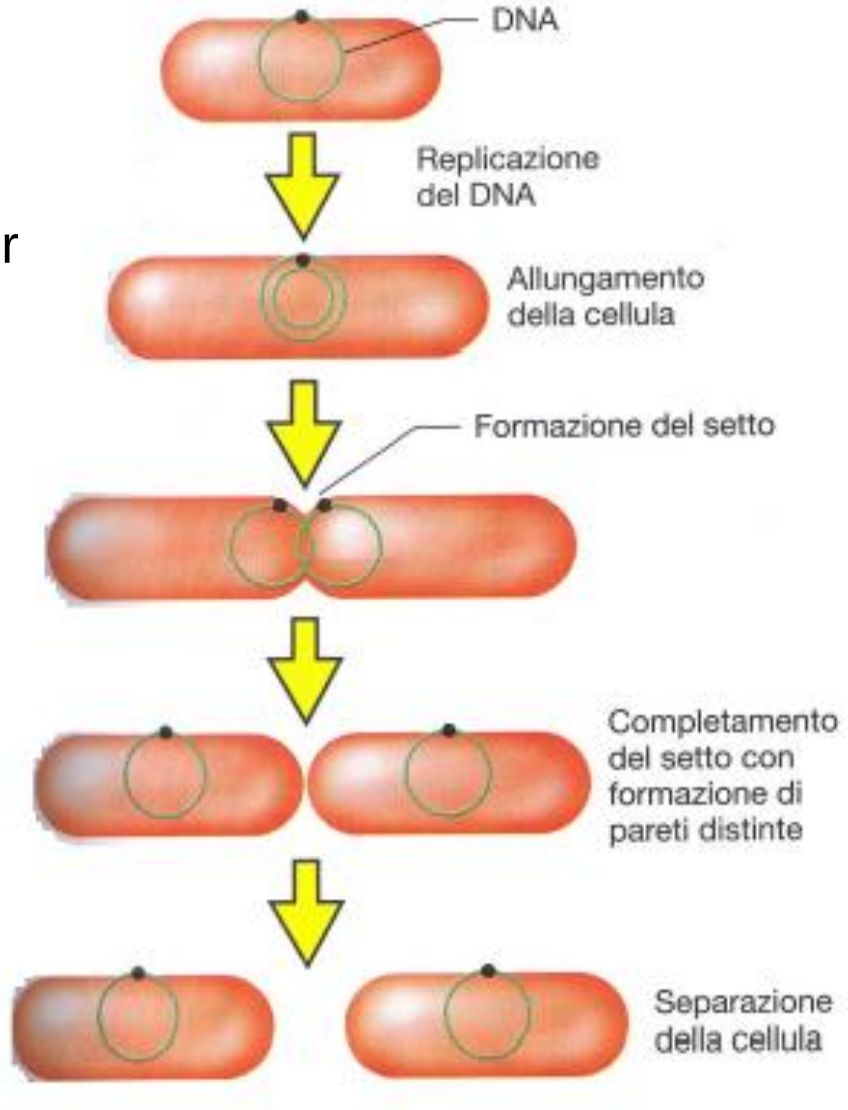
Processo generale di riproduzione per scissione binaria di un batterio bastoncellare.

Il nucleoide è rappresentato dal cerchio verde

- Dopo la duplicazione del DNA (genoforo) le due molecole si fissano in punti diversi del plasmalemma che poi si discostano per accrescimento dell'area interposta.

- Il plasmalemma quindi si introflette e separa le due molecole di DNA in due cellule figlie

- Nella scissione linaria a cellula si divide in seguito alla formazione di un **setto divisorio** formato dalla introflessione della membrana citoplasmatica e dalla parete cellulare



La divisione in *E. coli*

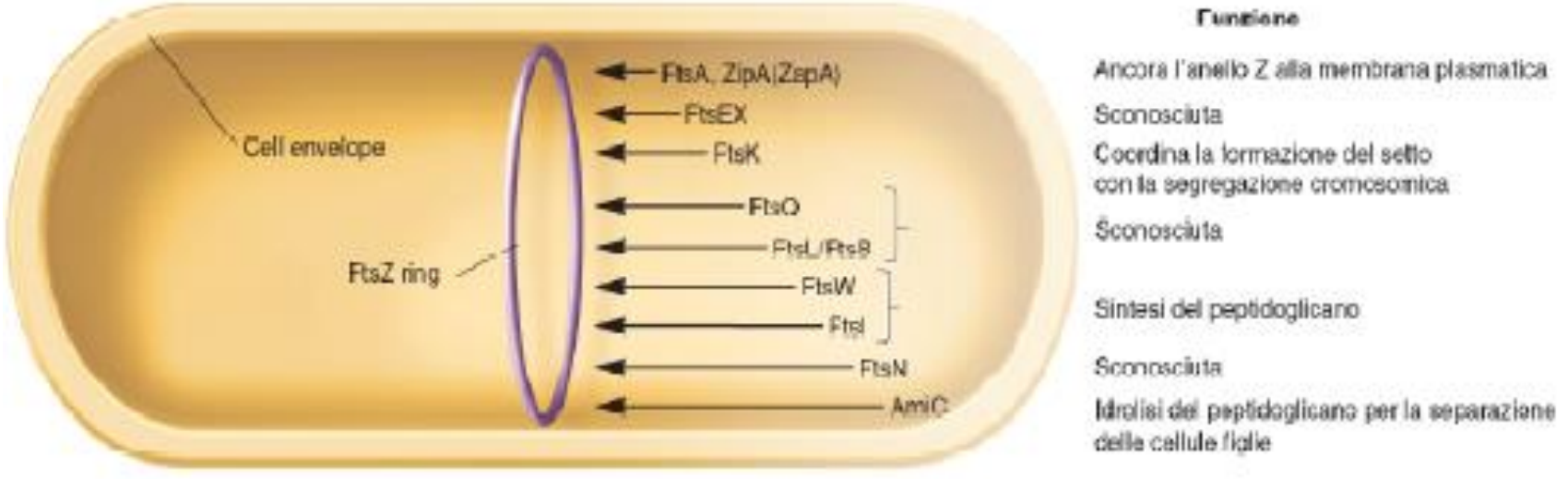
- La divisione nei batteri gram-negativi comporta la crescita interna e coordinata dei tre strati che delimitano il citoplasma sotto forma di un setto
- La formazione del setto richiede una regolazione:
  1) TEMPORALE
  2) SPAZIALE

- La regolazione temporale fa in modo che la divisione avverrà sempre dopo la duplicazione del DNA (un blocco nella sintesi del DNA non sarà seguito dalla divisione).
- Un ruolo importante è svolto dalla **proteina SulA** (sistema sos) che inibisce in modo selettivo la principale proteina responsabile della **formazione del setto (FtsZ).**
- Altri fattori che attivano la formazione del setto devono ancora essere individuati.

Il divisoma

- L'interazione delle proteine FtsZ porta alla formazione di un apparato di divisione chiamato **Divisoma**

- **Il divisoma,** probabilmente dirige la sintesi di nuova membrana e materiale parietale in entrambe le direzioni, finché la cellula non raggiunge il doppio della sua lunghezza iniziale, evento seguito dalla formazione di un restringimento con separazione delle due cellule figlie.



- Le **autolisine** sono enzimi che hanno una funzione simile al lisozima;
- durante la formazione del divisoma provocano piccole fessure nella parete a partire dall'anello di proteine FtsZ
- ciò permette attraverso queste l'aggiunta di materiale di nuova sintesi

Proteine del divisoma.

FtsZ	Proteina pilota, polimerizza per formare lo *Z-ring*. Assieme a FtsA e ZipA forma il *proto-ring*.
FtsA	Appartiene alla famiglia dell'actina. Localizza al sito di divisione formando una struttura ad anello. Ruolo poco noto.
ZipA	Proteina integrale di membrana che lega a FtsZ e àncora lo *Z-ring* alla membrana.
ZapA	Promuove l'assemblaggio e la formazione dello *Z-ring*.
FtsW	Proteina politopica integrale di membrana che stabilizza lo *Z-ring*. Ipotetico ruolo di trasduttore di segnale; sembrerebbe coinvolta nel trasporto dei lipidi legati al peptidoglicano.
FtsK	Proteina politopica di membrana. Il dominio N-terminale è posizionato a livello del macchinario di divisione; il C-terminale è coinvolto nella segregazione del cromosoma. Ipotetico ruolo nel check-point della divisione.
FtsI (PBP3)	Il dominio C-terminale con attività transpeptidasica lega alle β-lattamasi l'N-terminale ancorata alla membrana; è necessario per la crescita del peptidoglicano settale. Mutanti di FtsI sono responsabili della resistenza non plasmidica alle penicilline.
FtsQ, FtsB, FtsL	Proteine bitopiche che formano una struttura trimerica. Il ruolo del complesso è quello di connettore periplasmatico tra il *proto-ring* e le altre proteine del divisoma.
FtsN	Controlla, in una fase tardiva, l'assemblaggio del divisoma.

Formazione del setto e divisione in *E. coli*

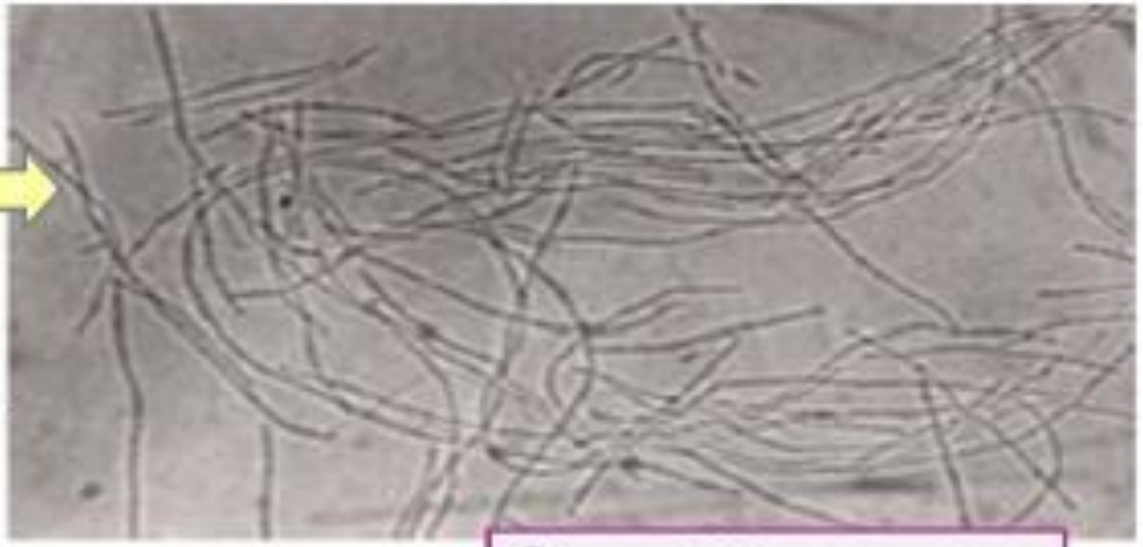
Una fase precoce della divisione nei batteri è la formazione dello *Z ring* a livello del sito di divisione.



Mutante termosensibile per una proteina del divisoma (FtsQ).

Ceppo *fts* ad alta T (42° C)

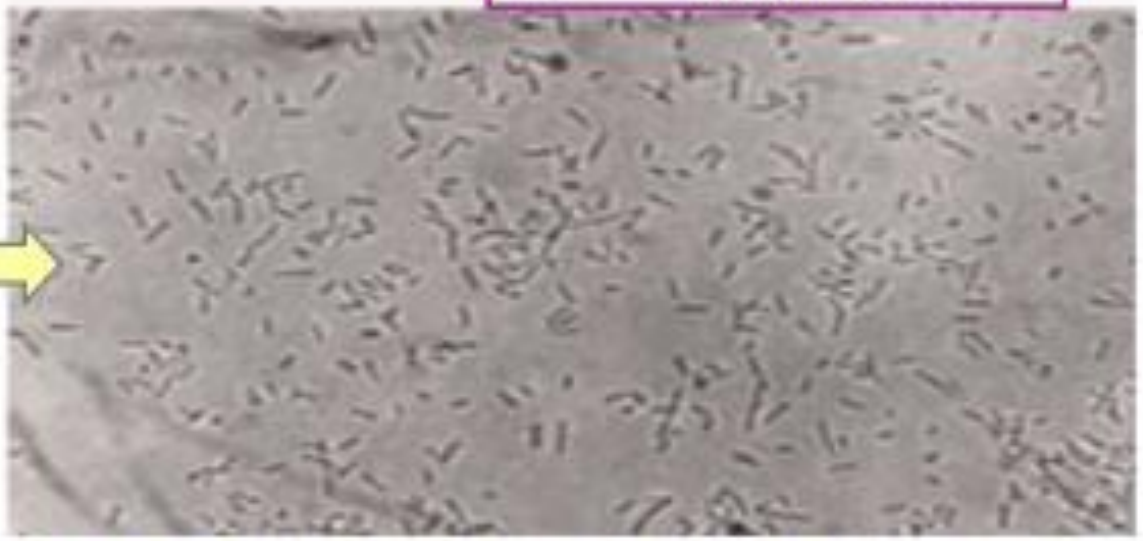
A T non permissiva le cellule crescono normalmente in dimensioni ma non potendo dividersi formano cellule lunghe e filamentose con più copie del cromosoma (non visibile nella figura) che poi muoiono.



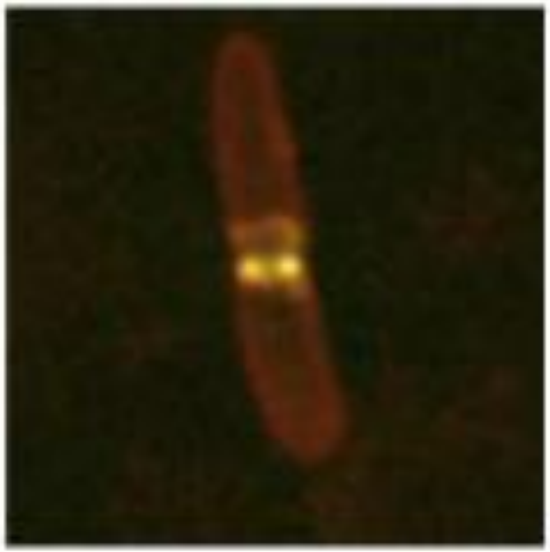
***fts* = Filaments**

Ceppo *fts* a bassa T (30° C)

A T permissiva le cellule si dividono correttamente.



Un fenotipo analogo è osservabile in mutanti termosensibili per altri geni della divisione.



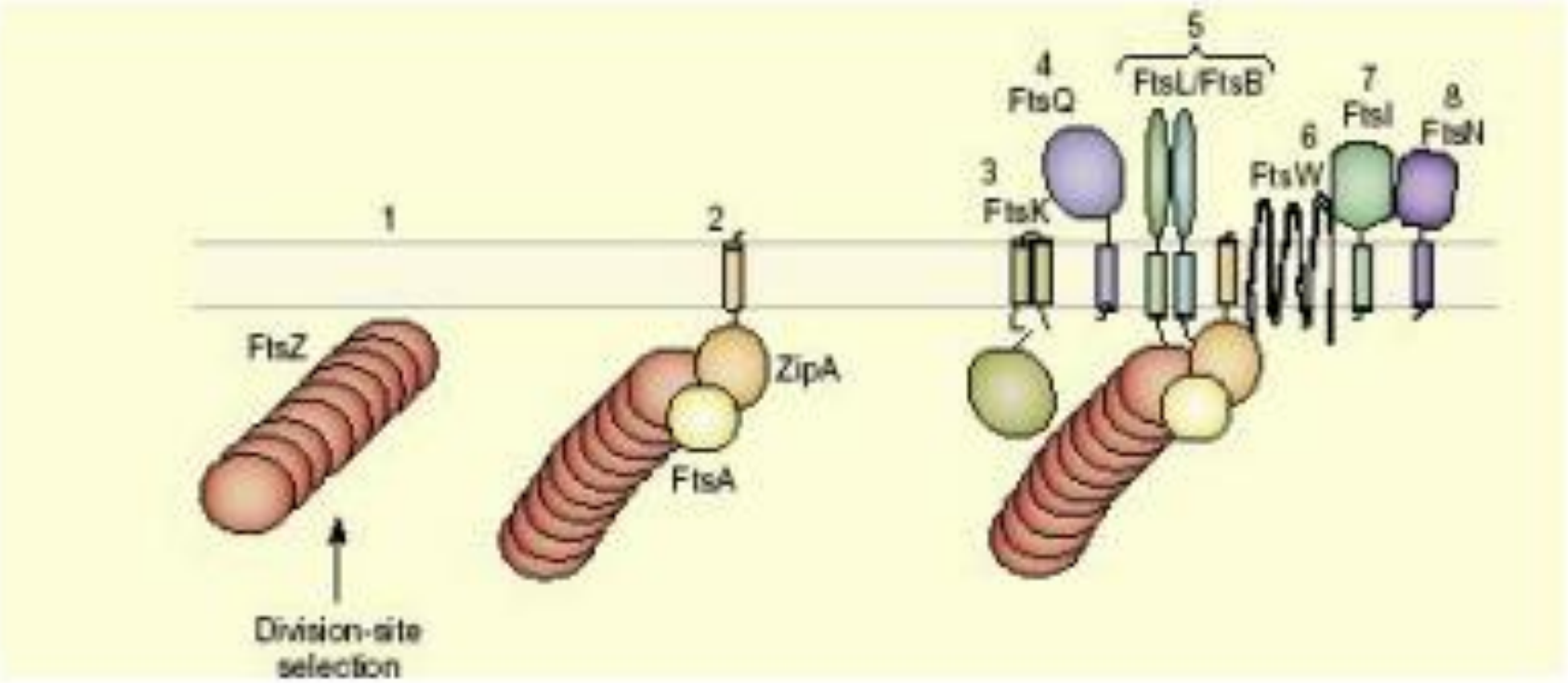
FtsZ

Filamenting **t**emperature-**s**ensitive mutant **Z**

FtsZ è virtualmente presente in tutti i batteri, nella maggioranza degli Archaea e nei cloroplasti e mitocondri degli eucarioti.

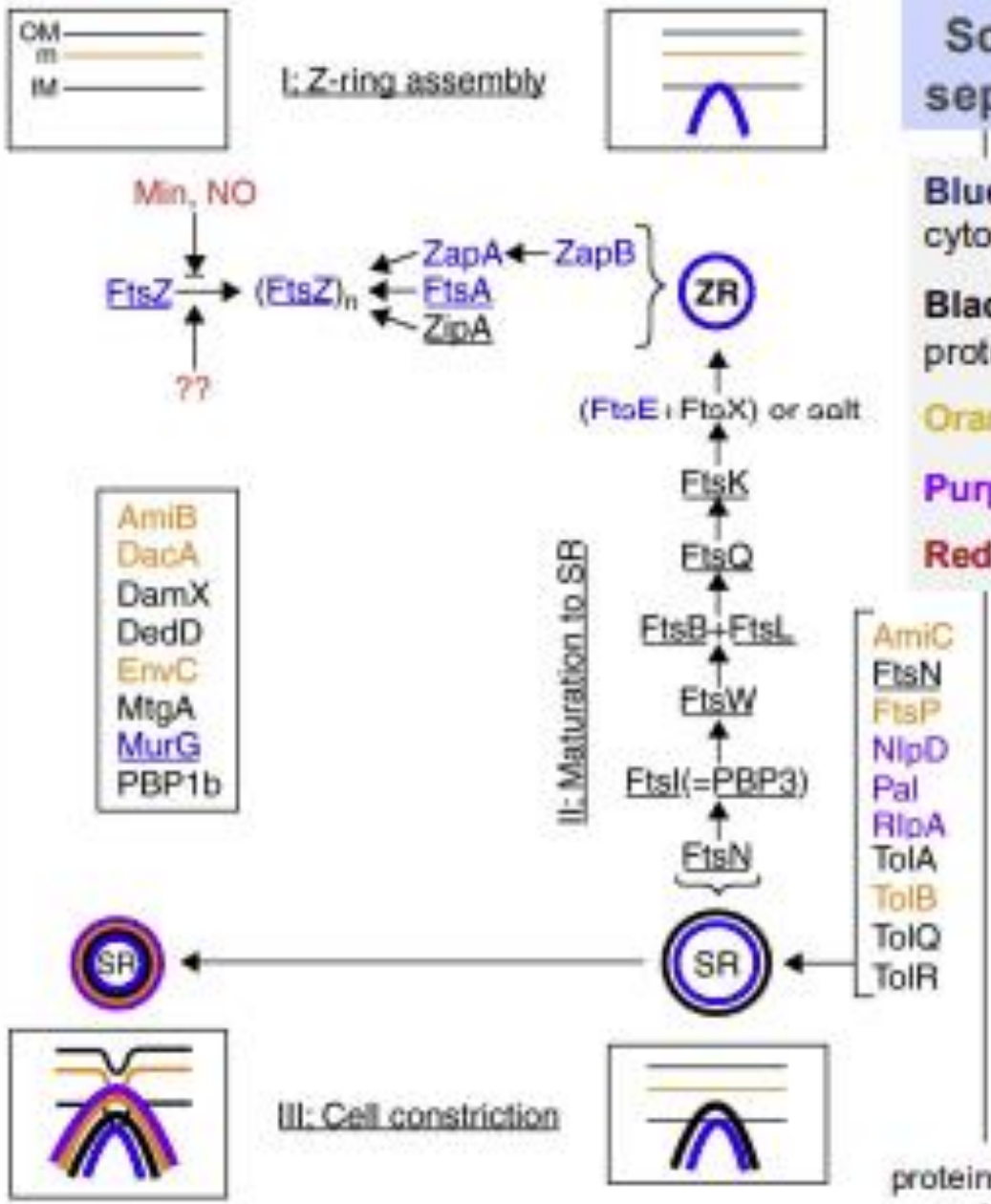
Tra le proteine batteriche coinvolte nella divisione è quella più conservata

La formazione dello *Z ring* è dovuta alla capacità della proteina FtsZ di polimerizzare



queste proteine possono legare ed idrolizzare nucleosidi trifosfati (GTP) che forniscono l'energia necessaria al rimodellamento della forma cellulare, possibilmente contrastando le forze dovute al turgore e alla architettura parietale presente.

Schematic representation of septal ring assembly in *E. coli*



Blue: proteins assembling at the cytoplasmic face of the IM

Black: trans-membrane inner-membrane proteins

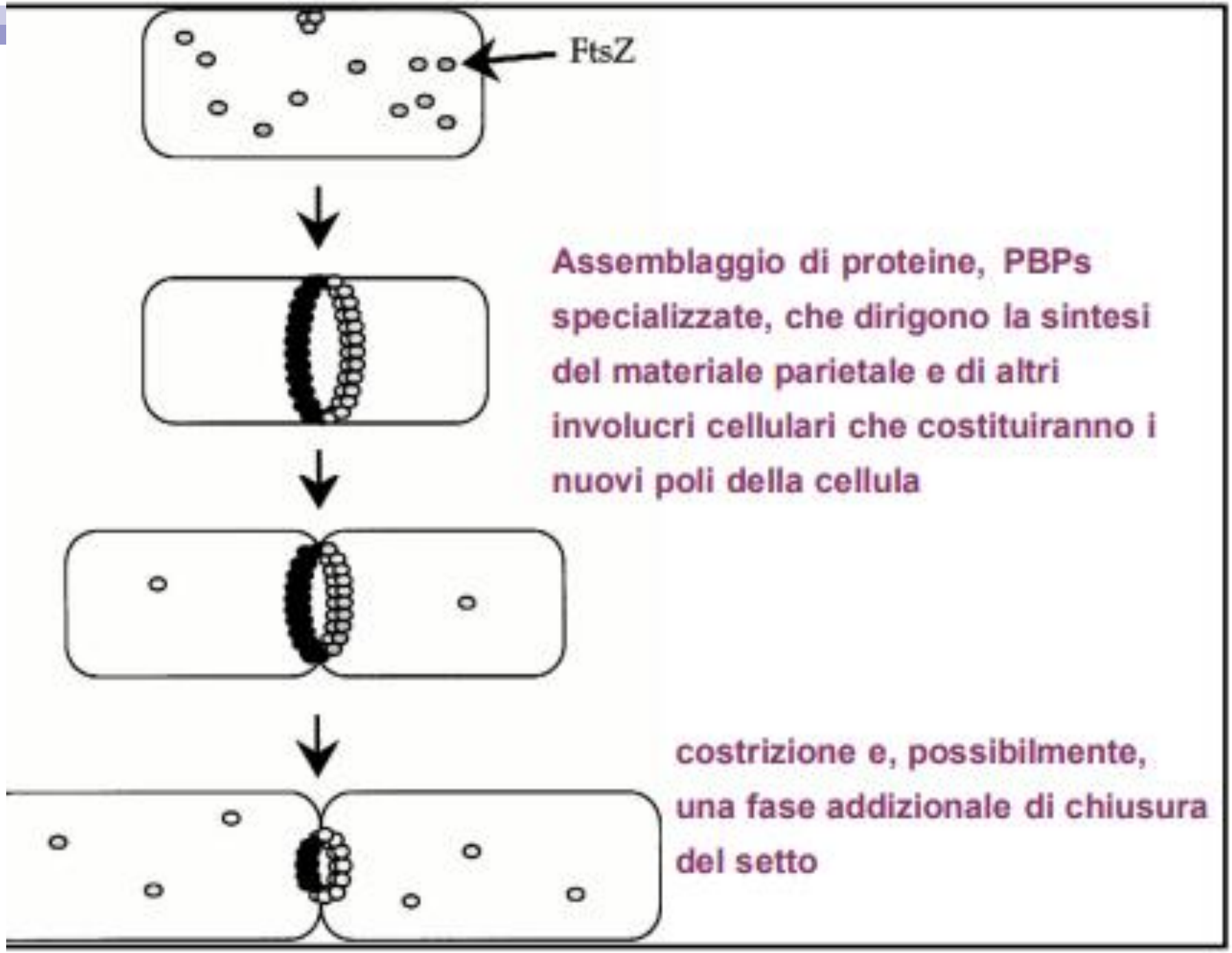
Orange: periplasmic proteins

Purple: outer-membrane (lipo-)proteins

Red: regulators of Z-ring positioning

proteins that are essential for viability are underlined

Current Opinion in Microbiology

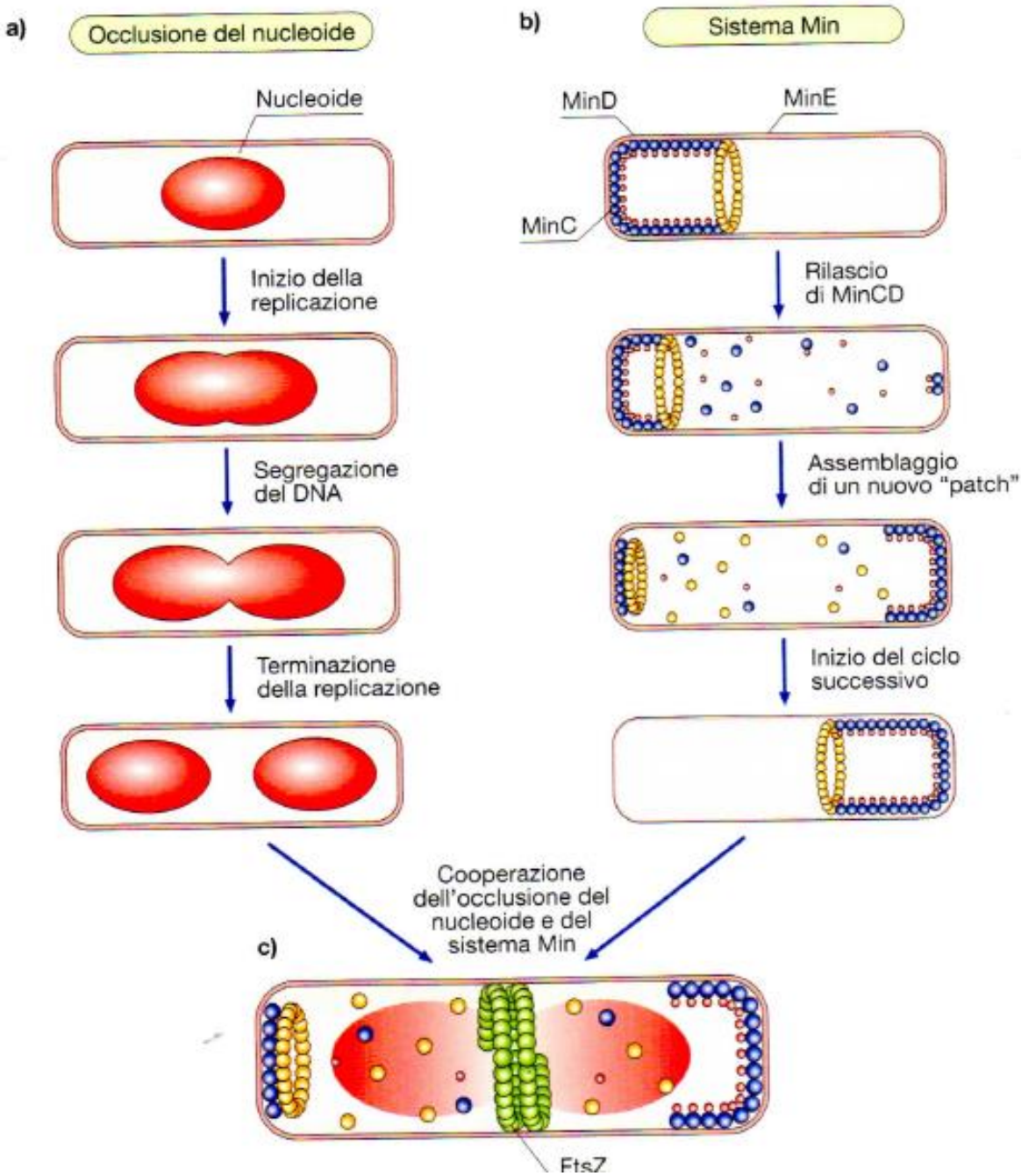

FtsZ
Assemblaggio di proteine, PBPs specializzate, che dirigono la sintesi del materiale parietale e di altri involucri cellulari che costituiranno i nuovi poli della cellula
costrizione e, possibilmente, una fase addizionale di chiusura del setto

FtsZ

- è la proteina principale del setto e quella che interviene per prima
- proteina citoplasmatica di 40.000 D, circa 20.000 copie per cellula
- è una GTPasi con attività polimerizzante che richiede GTP
- La polimerizzazione è inibita da **SulA** (controllo della replicazione) e da **MinC** (controllo spaziale della localizzazione del setto)
- Tra le proteine **Fts** è quella più conservata tra i procarioti: è assente solo nelle clamidie.
  E' presente in alcuni mitocondri e cloroplasti

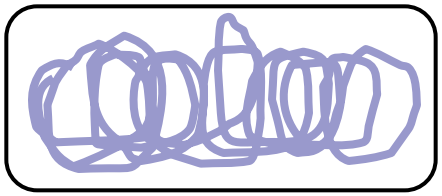
CONTROLLO TOPOLOGICO DEL DIFFERENZIAMENTO DEL SETTO DI DIVISIONE.

- La scelta del sito per l'assemblaggio del divisoma e della sintesi del setto è sottoposta ad un duplice sistema di controllo,
- **l'occlusione del nucleoide e**
- **il sistema Min.**
- La cooperazione tra i due sistemi permette il differenziamento del
- setto solo nella zona mediana
- della cellula madre

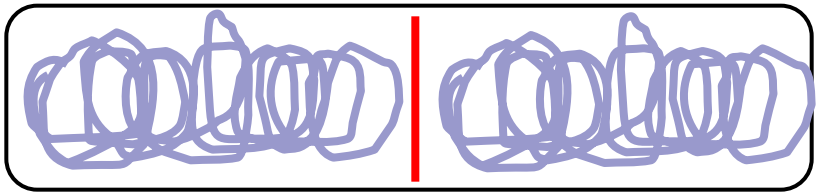


Occlusione del nucleoide

- **Il nucleoide esercita un effetto negativo sul posizionamento del setto**: in una regione occupata dal nucleoide non si formerà mai il setto.



- Il volume cellulare è occupato dal nucleoide. Non ci sono siti liberi per la formazione del setto



- In seguito alla segregazione del DNA, la regione mediana rimane **libera dal nucleoide. Il setto può formarsi**

- Non è richiesta la completa separazione dei nucleoidi ma è sufficiente una diminuzione della concentrazione del DNA

Il sistema Min

- Il sistema Min di *E. coli* consiste di 3 proteine: **MinC**
  MinD
  MinE

- **MinC è un inibitore della divisione e**d è attivato da MinD. (complesso MinCD)
- **L'azione inibitrice di MinC è esercitata direttamente sulla proteina FtsZ**

- **MinD** è una proteina associata alla membrana
- **MinE** agisce su MinD ed è responsabile della localizzazione spaziale del complesso MinCD:
  la sua funzione è quella di far localizzare MinCD ai poli della cellula e lontano dal piano di divisione mediano.

✓ **Ma come agisce MinE?**

- **MinE provoca una rapida oscillazione di MinD tra un polo e l'altro della cellula nel giro di pochi secondi.**
- **In questo movimento è coinvolto anche MinC in quanto associato a MinD.**

Note sulle colture batteriche

- Quando le **cellule raggiungono il numero di 10^7 la loro massa è** visibile a occhio nudo sotto forma di colonia.
  - I membri di una colonia aventi in comune un unico progenitore genetico sono detti **clone.**

- I batteri di tipo selvatico sono **prototrofici, cioè crescono e si** dividono su un **terreno di coltura minimo (acqua, sali inorganici** e **una fonte di C** per la produzione di energia).
- Da una coltura prototrofica si possono ottenere
  - **mutanti auxotrofici :**
    - non sono capaci di crescere su terreno minimo
    - crescono solo su terreno contenente uno o più nutrienti specifici (adenina, treonina o biotina).

Genetica dei batteri: sistema biologico

- **Vantaggi:**

- **grande dimensione delle popolazioni:** breve tempo e poco spazio
- ciò consente il rilevamento e lo **studio di eventi rari**.
- **condizione aploide:** manifestazione di tutti i geni, senza i problemi legati alla dominanza
- **mancanza di processi di differenziamento:** facilita l'identificazione dei singoli prodotti genici.
- **la brevità del ciclo vitale:** permette di analizzare molte generazioni in breve tempo.

Perché l'analisi genetica?

- capire le regole e i meccanismi della trasmissione dei caratteri ereditari
- analizzare specifici fenomeni e processi biologici

- **analisi genetica richiede:**
  - **mutanti**
  - **fenomeni di rimescolamento di geni e alleli**

- **Analisi genetica "classica":** è stata fatta su poche specie batteriche**:**
  - **Gram negativi**: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*
  - **Gram positivi:** *Bacillus subtilis*, *Streptomyces coelicolor*

.

Mutanti nutrizionali

- **Terreno minimo**: una fonte di C organico, sali minerali
- **Terreno completo**: terreno minimo + vitamine, tutti i nucleotidi e tutti gli amminoacidi

- **Prototrofo**: ceppo capace di cre-scere su terreno minimo
- **Auxotrofo**: ceppo che per crescere richiede uno o più amminoacidi e proteine, in aggiunta al terreno minimo

Es. di genotipo: *gly*$^+$ *gua*$^+$ *ile*$^-$ *ade*$^-$

Non ha bisogno di glicina e guanina, ma cresce solo in presenza di isoleucina e adenina

Figura 14.1
Colonie batteriche cresciute su un terreno di coltura una piastra di Petri.



Sistemi di selezione per mutazioni batteriche

1. Identificazione di mutanti batterici

Occorrono sistemi di selezione

2. Quali sono i caratteri che si seguono?

- biosintesi di aminoacidi
- utilizzo di zuccheri
- resistenza ad antibiotici

Nomenclatura genetica batterica

- Normalmente 2-3 lettere seguite dai simboli + o –
- Prototrofi/auxotrofi

–met^{+}: può sintetizzare metionina, un wild-type **prototrofo**

–met^{-}: richiede metionina, un mutante **auxotrofo**

- Fonti di energia

–gal^{+}: può utilizzare il galattosio, wild-type

–gal^{-}: non può utilizzare il galattosio, mutante

- Resistenze

–str^{r}:resistente alla streptonicina aggiunta al terreno di coltura

–str^{s}: sensibile alla streptomicina nel terreno di coltura

Nomenclatura genetica batterica

FENOTIPO		GENOTIPO	
selvatico	mutante	selvatico	mutante
Str^{R}	Str^{S}	str^{+}	$str\text{-}^{1}$
Trp^{+}	Trp^{-}	trp^{+} $leuB^{+}$ $lacZ^{+}$	trp-12 leuB42 lacZ27
Leu^{+}	Leu^{-}		
Lac^{+}	Lac^{-}		

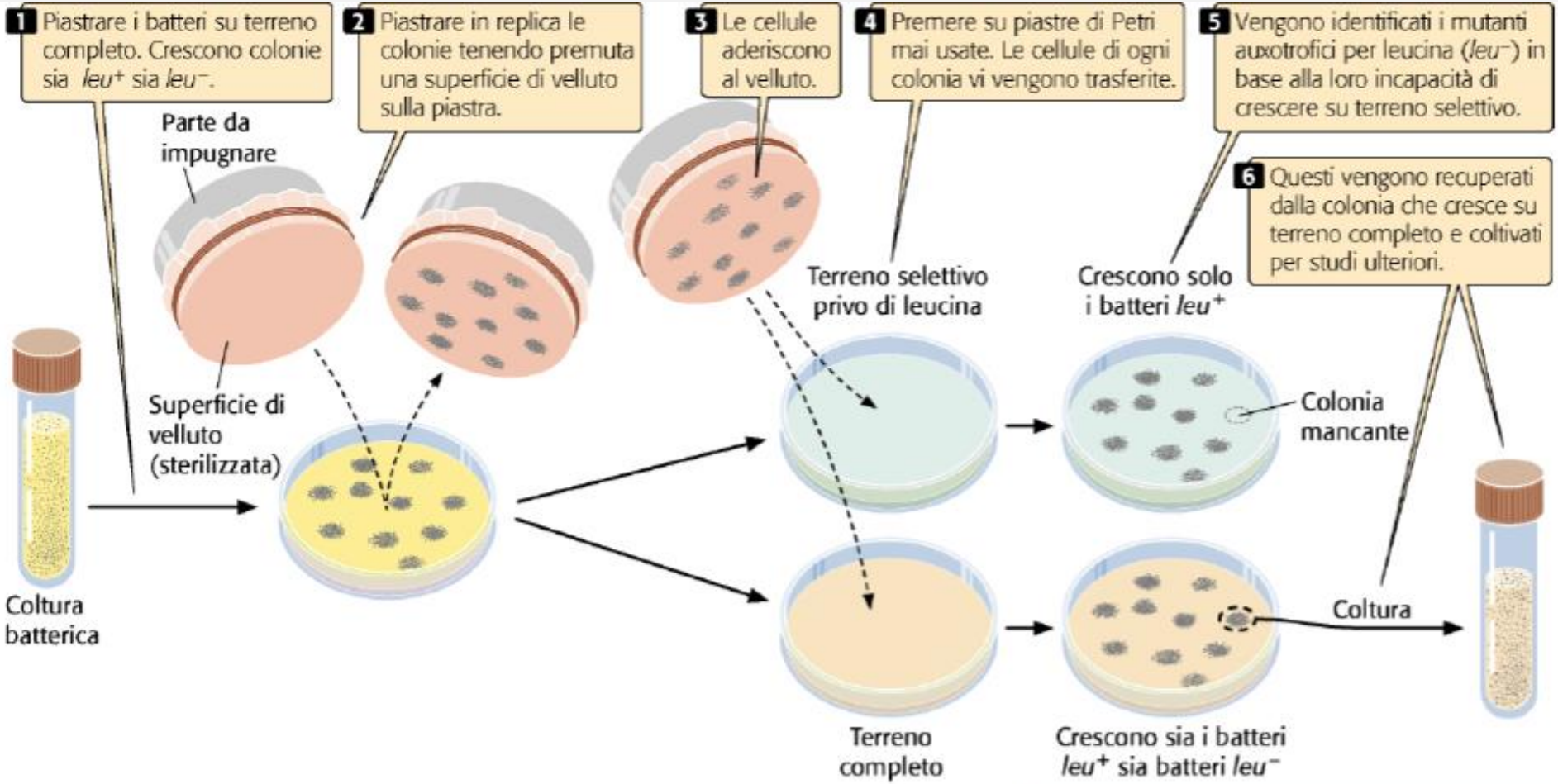
Str: strptomicina (antibiotico)

Trp: triptofano (amminoacido) Leu: leucina (amminoacido); Lac: lattosio (zucchero)

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

Test per richieste nutrizionali



Replica plating

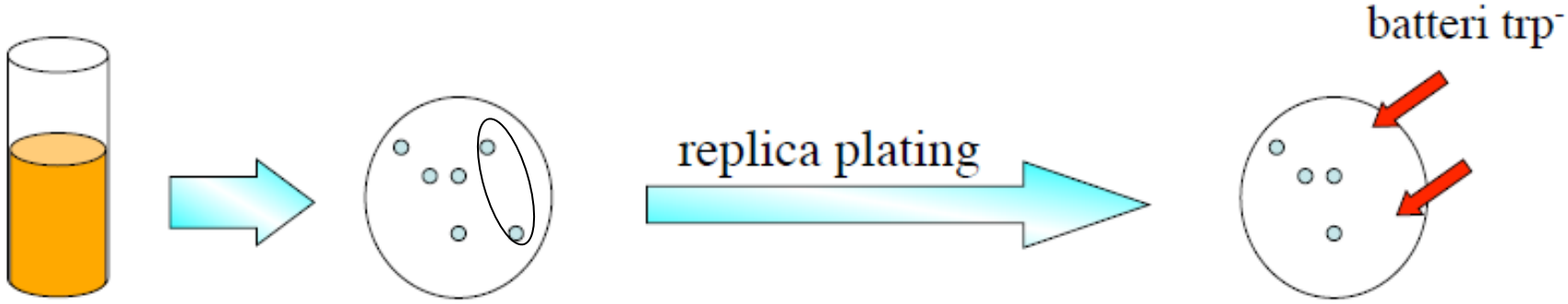
Trasferisce il pattern delle colonie batteriche per saggio delle piaste

Conclusione: Una colonia che cresce su terreno completo ma non su uno selettivo presenta una mutazione in un gene che codifica per la sintesi di un nutriente essenziale.

Selezione per mutanti della biosintesi di aa

Si cercano i mutanti aa^- (es. trp-)

Trp+ sintetizza triptofano -> cresce sia in assenza che in presenza di trp
Trp- non sintetizza triptofano -> cresce solo in presenza di trp



coltura (10^9 batteri) **contiene trp+ e trp-**

terreno con trp
crescono $trp^{+/-}$

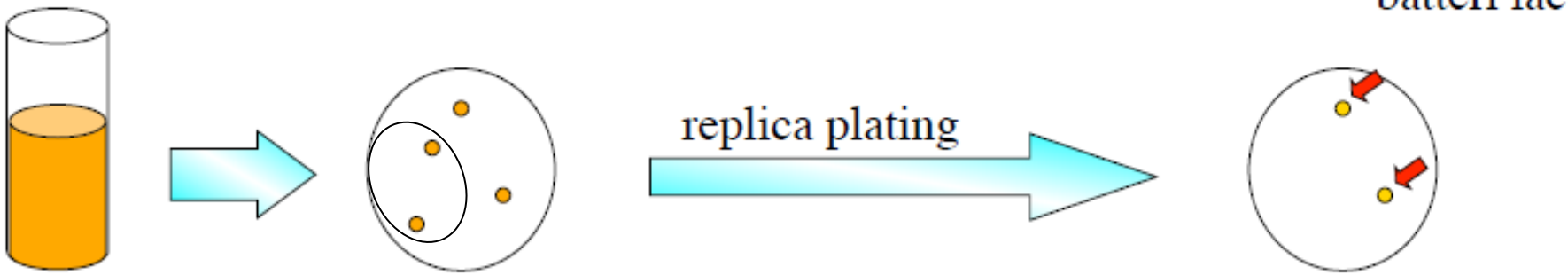
terreno minimo
crescono trp^+

In questo modo dalla coltura di partenza e' possibile **isolare** cloni mutanti per il trp

Selezione per mutanti dell'uso di zuccheri

- **Si cercano i mutanti incapaci di utilizzare uno zucchero (Es. *lac-* , *lattosio-)***

Lac+ utilizza il lattosio per crescere -> cresce se e' presente lattosio come **unica** fonte di carbonio
Lac- non puo' usare lattosio per crescere -> non cresce se e' presente **solo** lattosio nel mezzo



coltura (10^9 batteri) **contiene lac+ e lac-**

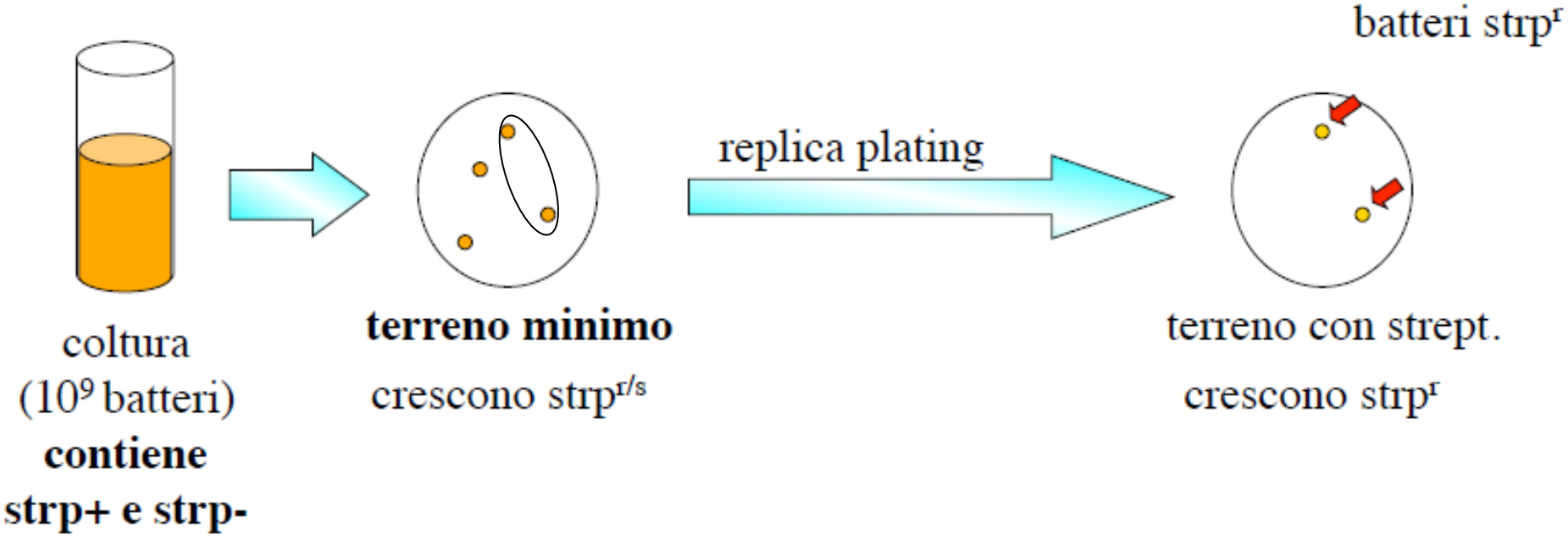
terreno minimo (glucosio) crescono $lac^{+/-}$

terreno con lattosio crescono lac^+

In questo modo dalla coltura di partenza e' possibile **isolare** cloni mutanti per il lattosio

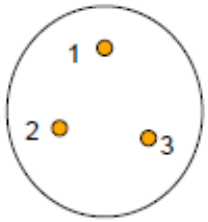
Selezione per mutanti della resistenza ad antibiotici

Si cercano mutanti antibiotico^r) es *strp*^{r}, streptomicina resistente

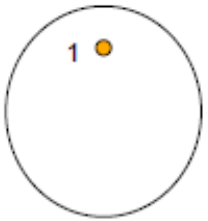


In questo modo dalla coltura di partenza
e' possibile **isolare** cloni resistenti alla streptomicina

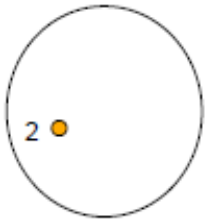
Esercizio



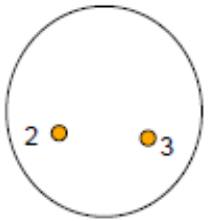
terreno minimo
+ metionina
+ arginina



terreno minimo
+ arginina



terreno minimo
+ metionina
+ arginina
+ streptomicina



terreno minimo
+ metionina

Genotipo colonie

Colonia 1: $met^{+}\ arg^{-}\ strp^{s}$

Colonia 2: $met^{-}\ arg^{+}\ strp^{r}$

Colonia 3: $met^{-}\ arg^{+}\ strp^{s}$

Mappe genetiche in batteri

- strategie condivise con gli eucarioti:

1. **incroci fra ceppi** che **differiscono per marcatori diversi**
2. **identificazione e conteggio dei ricombinanti**

Esiste sempre la relazione tra
distanza genetica e frequenza dei ricombinanti

Ricombinazione non meiotica

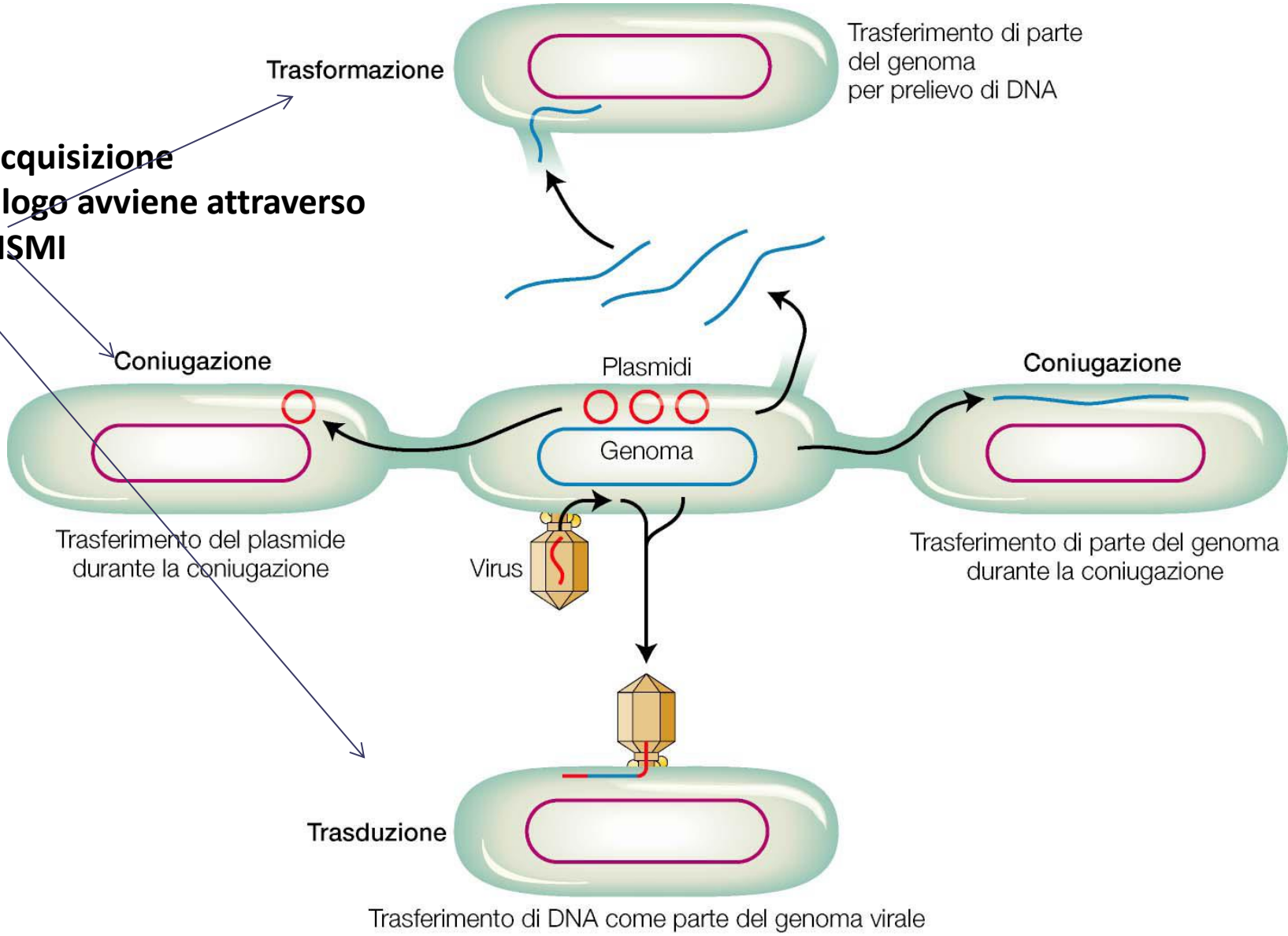
- I **processi di ricombinazione si associano** frequentemente all'**acquisizione** da parte del microrganismo di **DNA ETEROLOGO.**
  - Questo evento è normale negli organismi eucarioti e avviene attraverso la riproduzione sessuata.

- **Nei batteri l'acquisizione di DNA eterologo avviene attraverso TRE MECCANISMI distinti:**

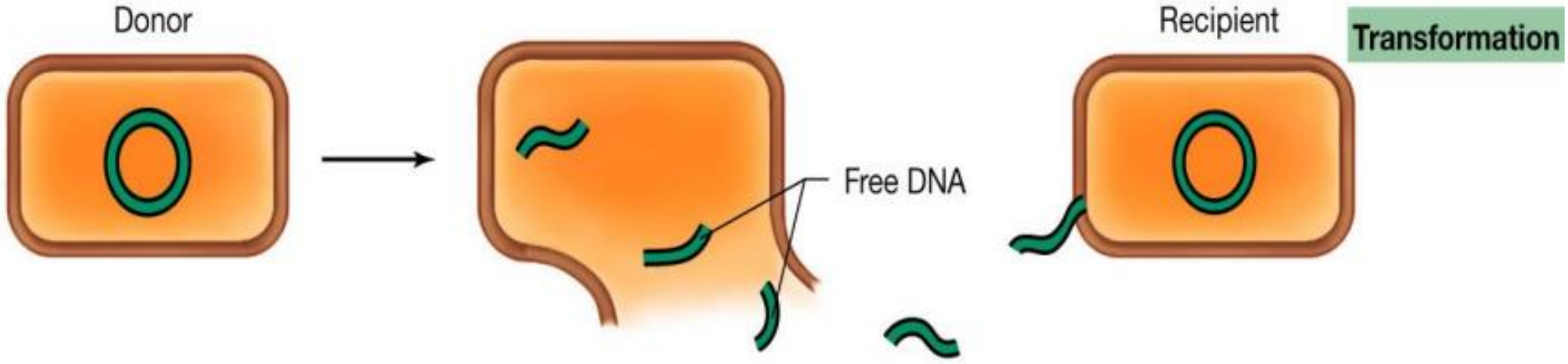
- **Trasformazione**: acquisizione attiva di DNA libero dall'ambiente.
- **Coniugazione:** processo di trasferimento di DNA da un ceppo (donatore) all'altro mediato da plasmidi
- **Trasduzione** : processo di trasferimento di DNA da una cellula all'altra mediato da batteriofagi

Il trasferimento genico

Nei **batteri l'acquisizione di DNA eterologo avviene attraverso TRE MECCANISMI distinti:**

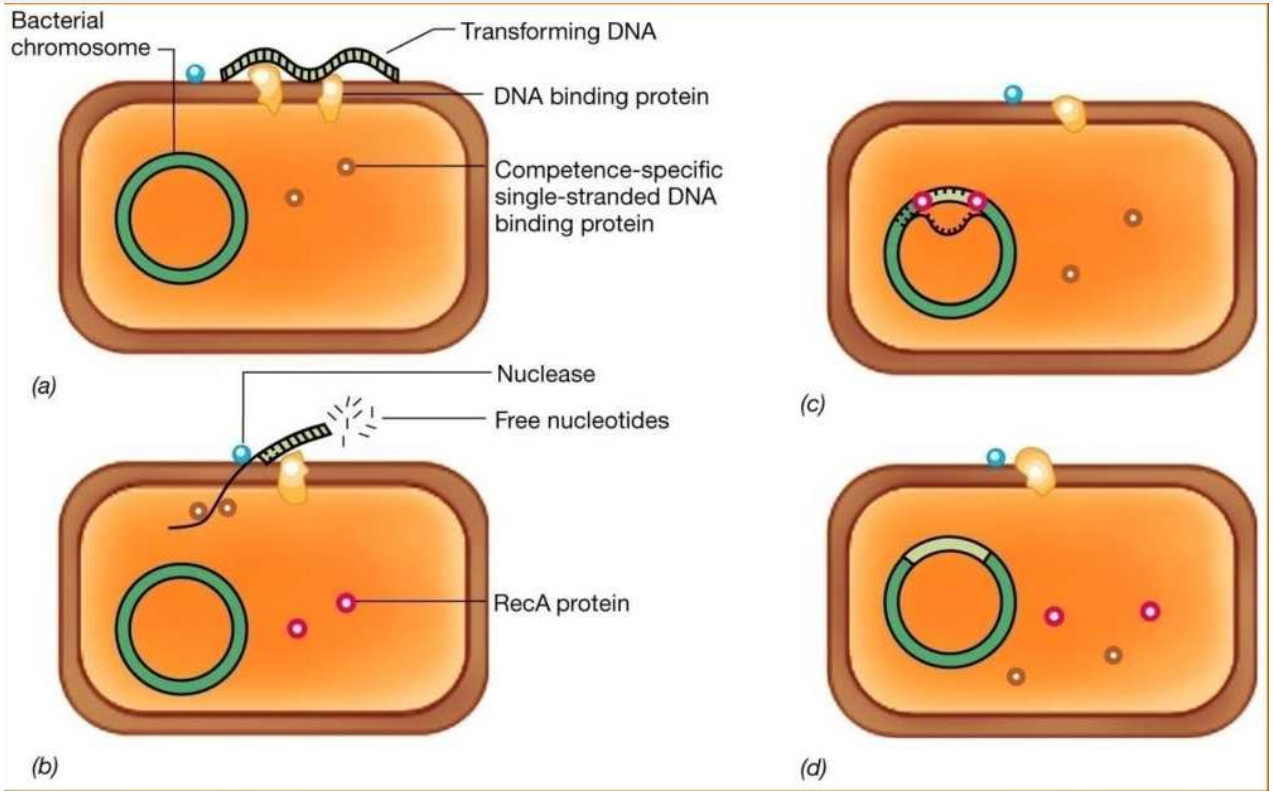


1. La trasformazione



- 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,
- quindi il DNA esogeno si replica con il resto del genoma e manifesta la sua potenzialità genetica nel fenotipo della cellula trasformata

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 d**el DNA donatore nel cromosoma della cellula ricevente;
  - **espressione fenotipic**a del nuovo carattere.

TRASFORMAZIONE: caratteristiche

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

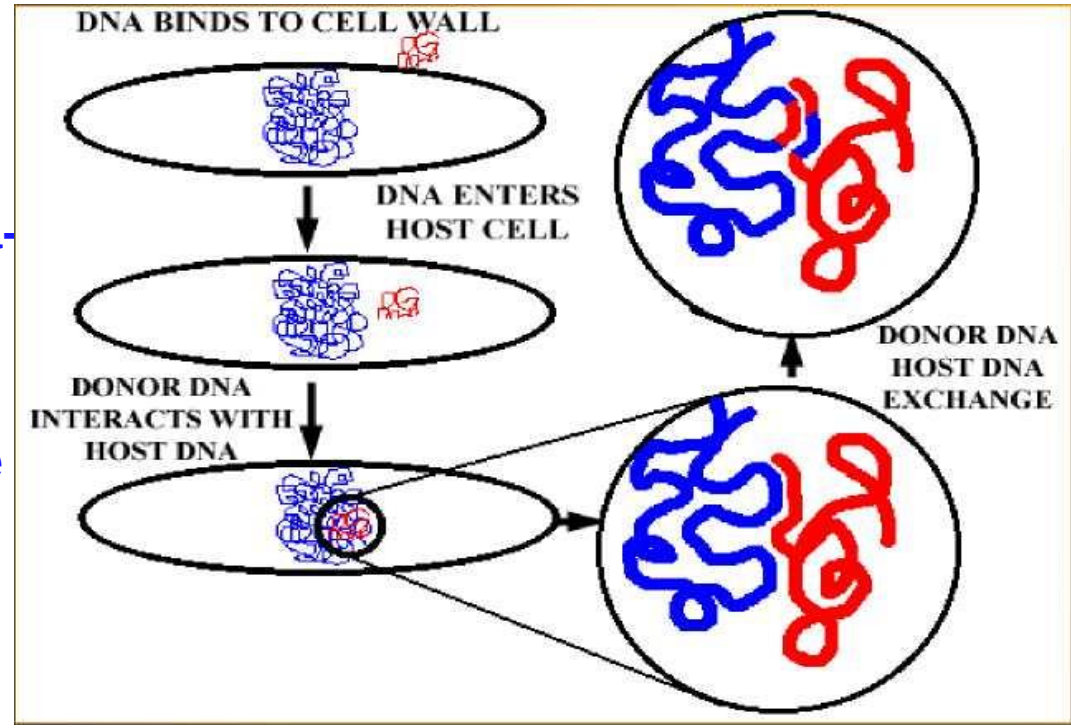
5. Processo di ricombinazione

6. L'incorporazione di DNA esogeno può essere vista come

- una fonte di nutrienti
- un modo per generare diversità genetica o per riparare danni al DNA.

La trasformazione naturale

- **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.

Meccanismo della trasformazione

(avviene naturalmente in *Bacillus subtilis*)

Formazione di un tratto di DNA eteroduplex

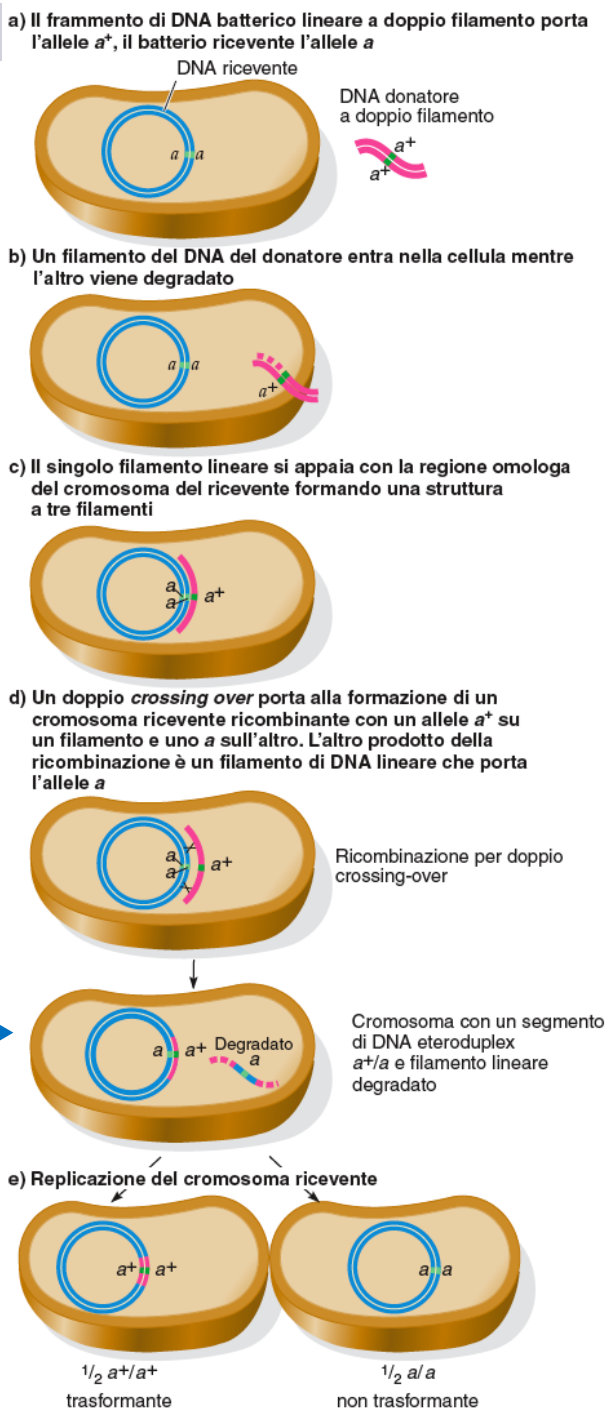
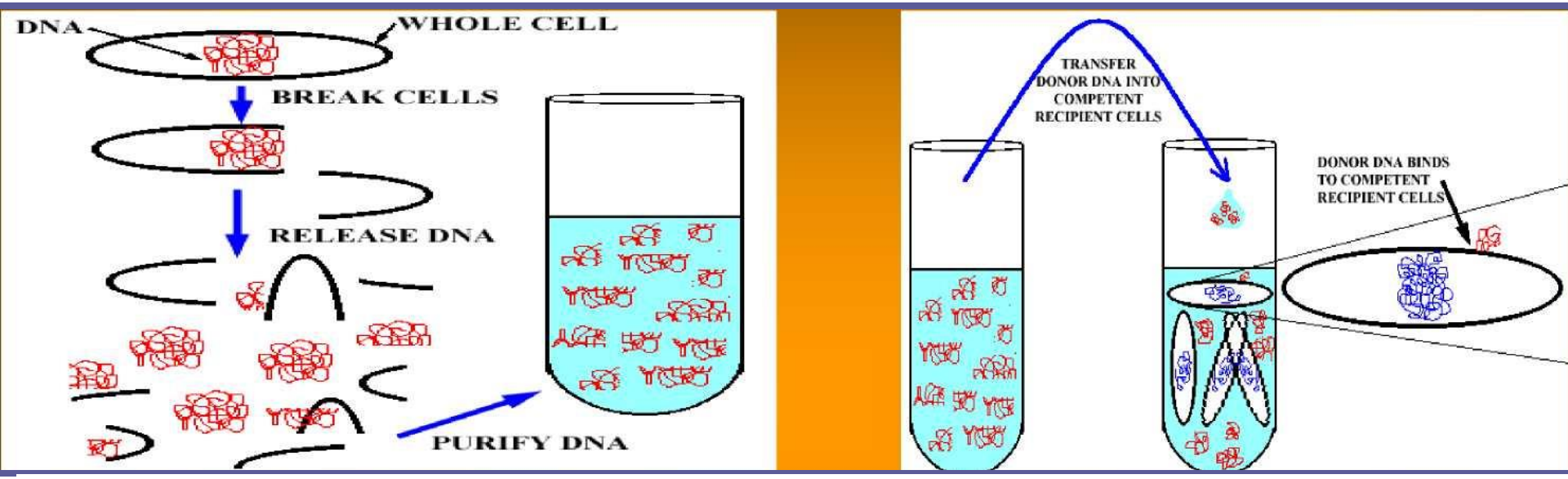


Figura 15.9

LA TRASFORMAZIONE ARTIFICIALE

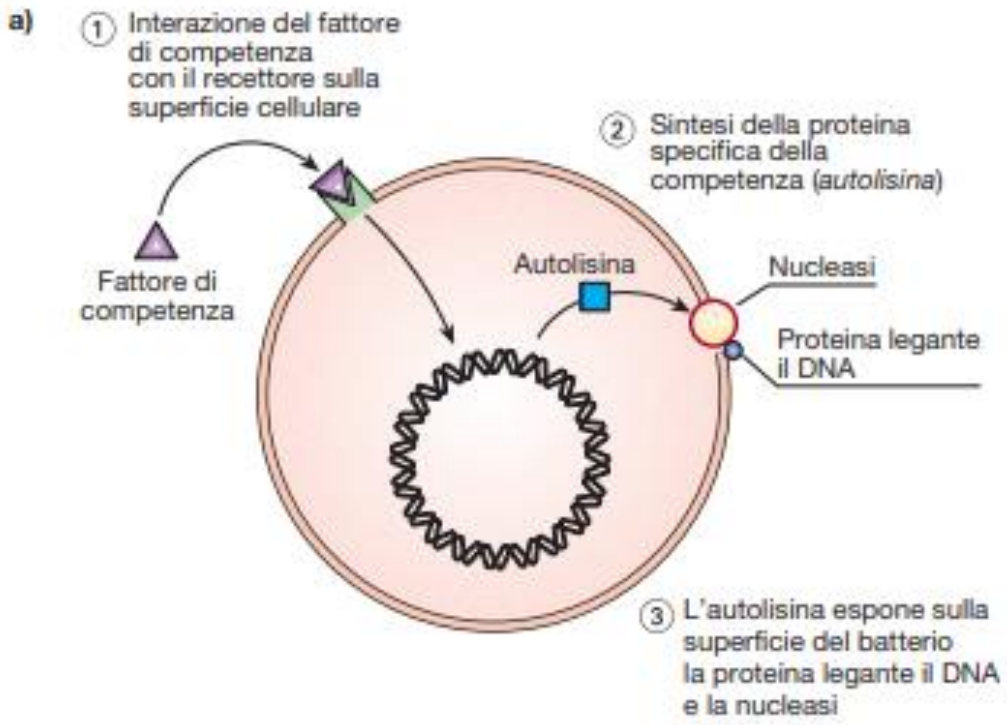


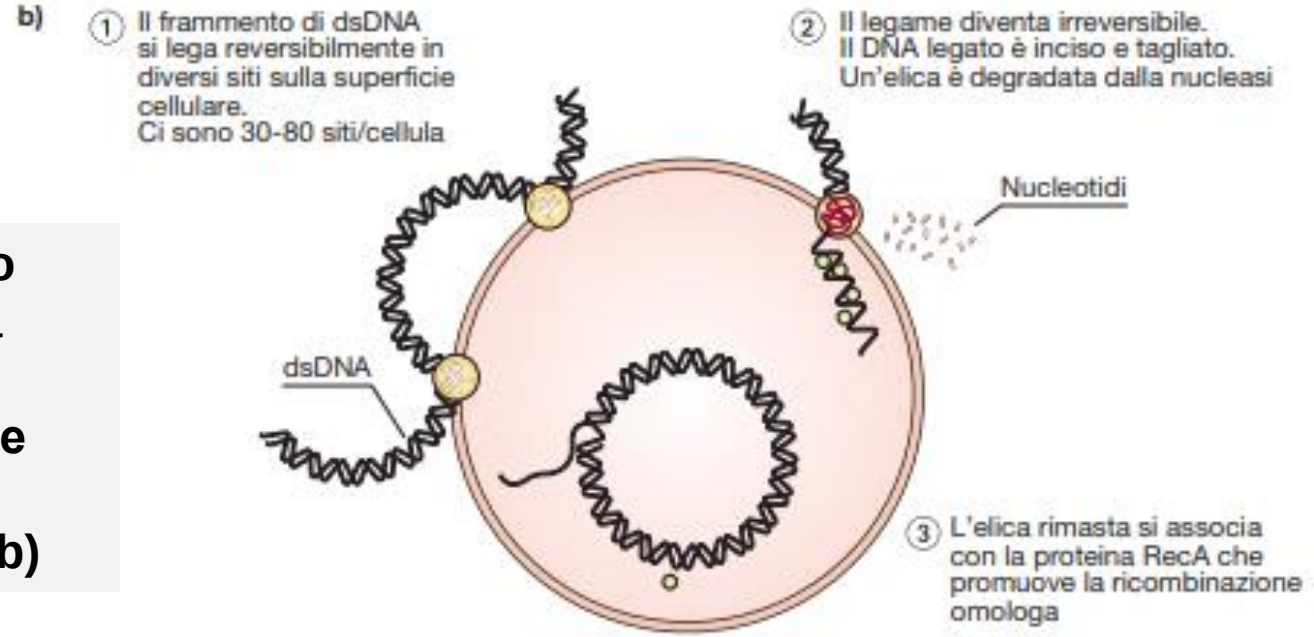
- **Altri batteri, invece, come *E. coli*,**
- **- non presentano durante la loro crescita una fase fisiologica in cui siano competenti per la trasformazione.**
- Colture di *E. coli* possono essere rese **artificialmente competenti** se vengono esposte ad alte concentrazioni di ioni metallici (calcio, ad esempio) e se si opera a temperature opportune, rendendole capaci di incorporare DNA esogeno

Le proteine necessarie nella trasformazione (proteine di competenza)

- sono **omologhe in parte con quelle per l'assemblaggio dei pili** che sono utilizzati nella coniugazione.
- Queste proteine sono simili, salvo rare eccezioni, nei batteri Gram- e Gram +
- tali proteine fanno parte di una vasta famiglia i cui membri si ritrovano nei sistemi di secrezione di tipo IV (T4SS) o nei **trasloconi** (o canale di traslocazione),
- questi sono un complesso di proteine associate con la traslocazione attraverso le membrane dei polipeptidi in fase di sintesi

SVILUPPO DELLA COMPETENZA E TRASFOR-MAZIONE DEI BATTERI GRAM +.





varie fasi che vanno dallo sviluppo della competenza (a) fino all'assunzione e ricombinazione del DNA trasformante (b)

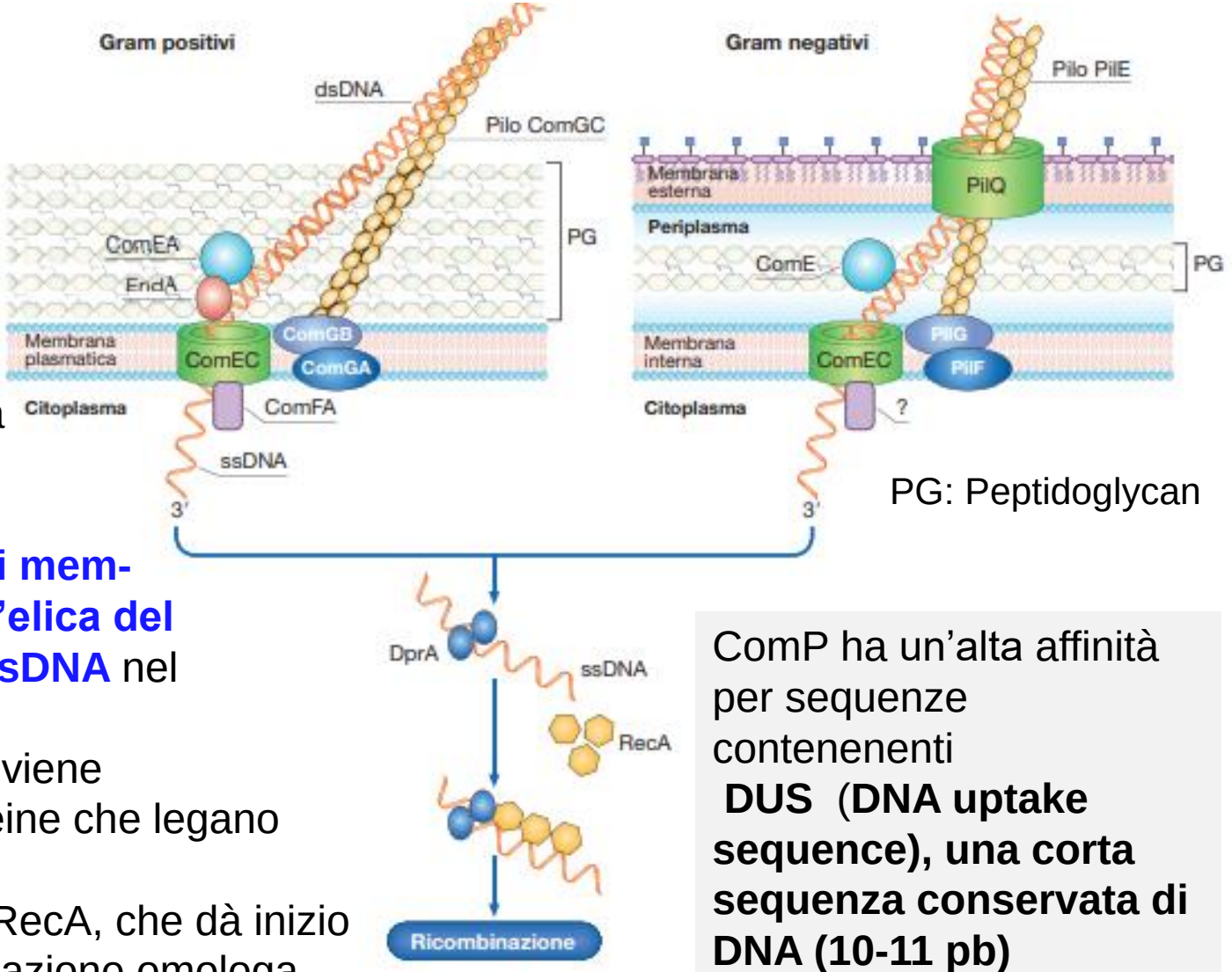
APPARATO DI TRASFORMAZIONE NEI BATTERI GRAM POSITIVI E NEI BATTERI GRAM NEGATIVI

- è sostanzialmente conservato nei batteri Gram+ e Gram –
- è costituito:

(1) da un **pilo di trasformazione, per la cattura del** dsDNA, ancorato alla membrana plasmatica:

nei batteri Gram - esso attraversa la membrana esterna tramite un canale;

(2) da un **complesso di membrana che degrada un'elica del dsDNA e trasporta il ssDNA** nel citoplasma.



PG: Peptidoglycan

- Il DNA internalizzato viene
  - prima legato da proteine che legano ssDNA (DprA)
  - successivamente da RecA, che dà inizio al processo di ricombinazione omologa.

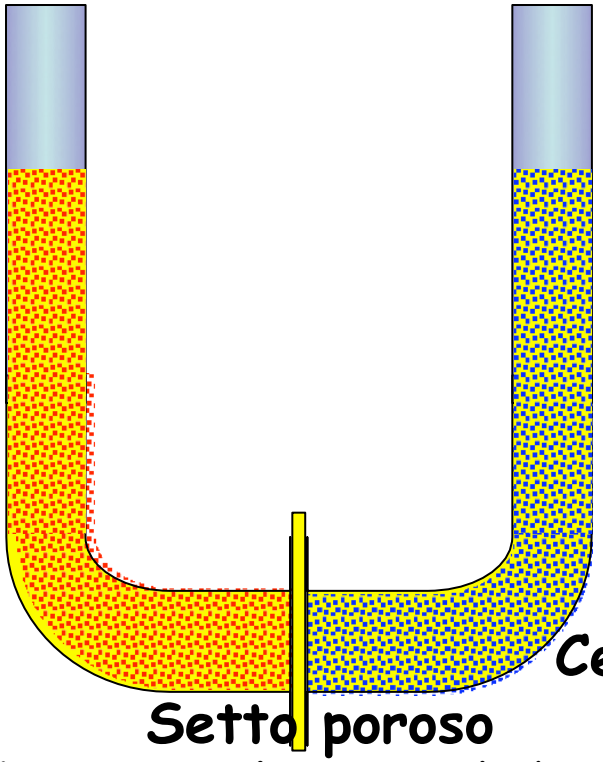
ComP ha un'alta affinità per sequenze contenenenti **DUS (DNA uptake sequence), una corta sequenza conservata di DNA (10-11 pb)**

2. Coniugazione nei batteri

Tubo di Davis

Saggiato su piastre per la ricerca di prototrofi

ASSENZA DI PROTOTROFI

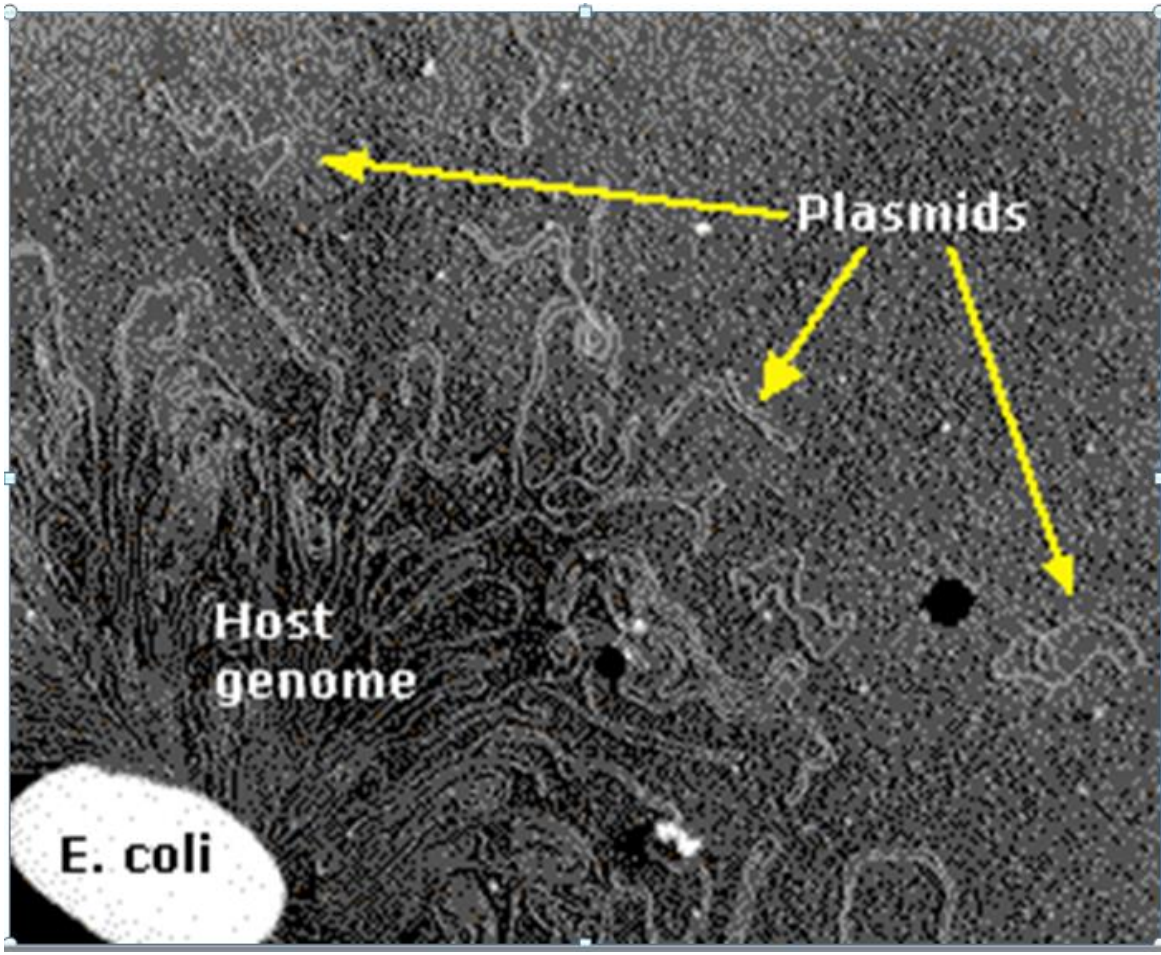


- La coniugazione **richiede un contatto cellula-cellula**:
- quando le colture sono separate da un filtro poroso permeabile alle macromolecole ma non ai batteri, la ricombinazione non avviene!

- Il **contatto tra donatore e ricevente** è quindi e**ssenziale** affinché avvenga il **trasferimento genico**.

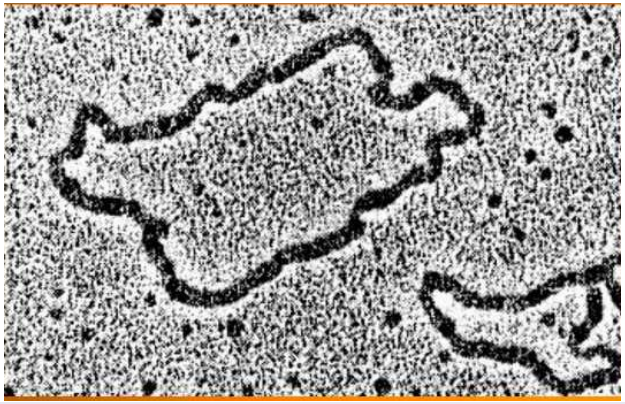
Molte sequenze di DNA nei batteri sono mobili e possono essere trasferite tra individui e tra specie

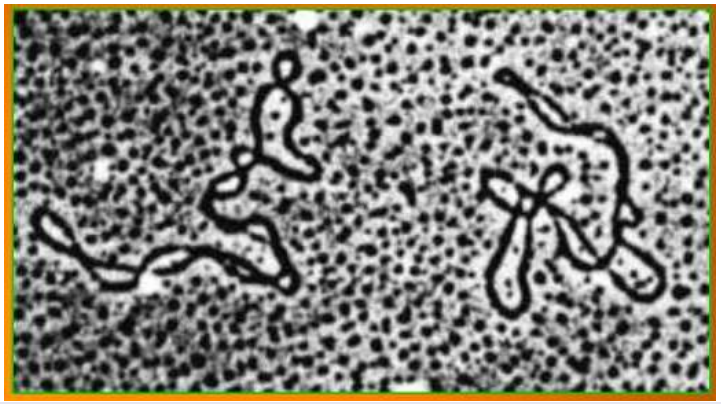
- Il materiale genetico dei batteri è organizzato in una **semplice struttura circolare,**
- In questo organismo esisto-no due diversi 'mating types '
- L'appartenenza all'uno o l'altro dipende dalla presen-za di un fattore genetico (F)



Micrografia E.di una cellula disgregata di *E. coli* cell, che mostra DNA cromosomico rilassato e diversi molecole di plasmidi

PLASMIDI





- in numerose specie batteriche sono presenti
- molecole di DNA circolare tra 1.000 e 100.000 bp
- piu' piccole del genoma, 1-5x10^6 bp
- dotate di capacita' replicativa autonoma (**repliconi)**
- talora in grado di **integrarsi nel genom**a (episomi)
- questi possono conferire fenotipi rilevanti ai batteri (virulen-za- resistenza)

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

FUNZIONI (FENOTIPI) CONFERITE AI MICRORGANISMI DAI PLASMIDI

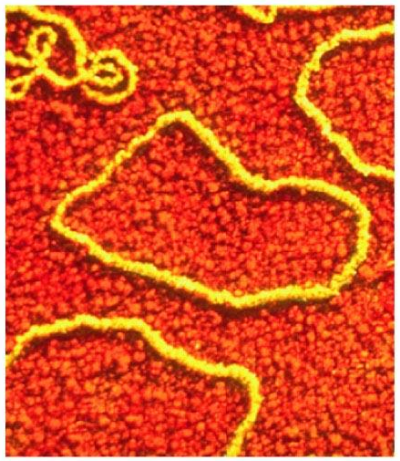
1. Resistenza (antibiotici, metalli, batteriofagi, batteriocine)
2. **Trasferimento di geni** (coniugazione)
3. **Metabolismo** (utilizzazione di lattosio, saccarosio, ac.citrico, degradazione di erbicidi, etc.)
4. **Antagonismo** (produzione di antibiotici e di batteriocine)
5. **Interazioni tra organismi**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

Sono detti "criptici" i plasmidi a fenotipo sconosciuto

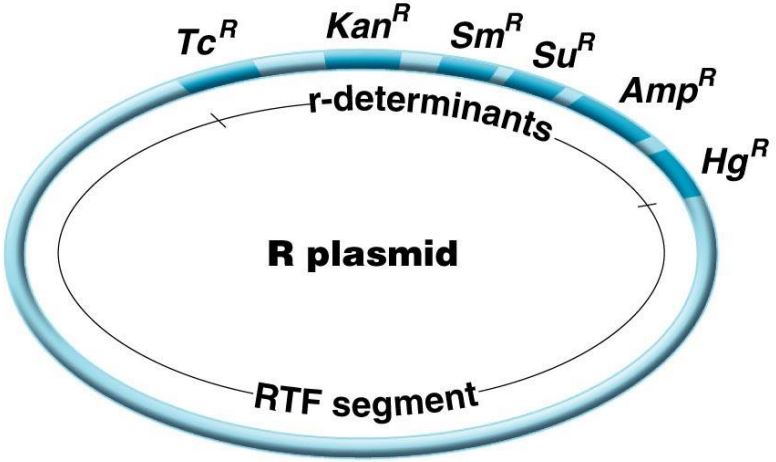
Un plasmide è una molecola di DNA accessoria, frequentemente circolare

- Plasmidi contengono uno o più geni
- replicano independentemente dal cromosoma batterico.

(a)



(b)



- **fattore F:** conferisce fertilità.
- **plasmidi R:** conferiscono resistenza a antibiotici, metalli pesanti.
- **plasmidi Col:** specificano colicine che possono uccidere batteri vicini.

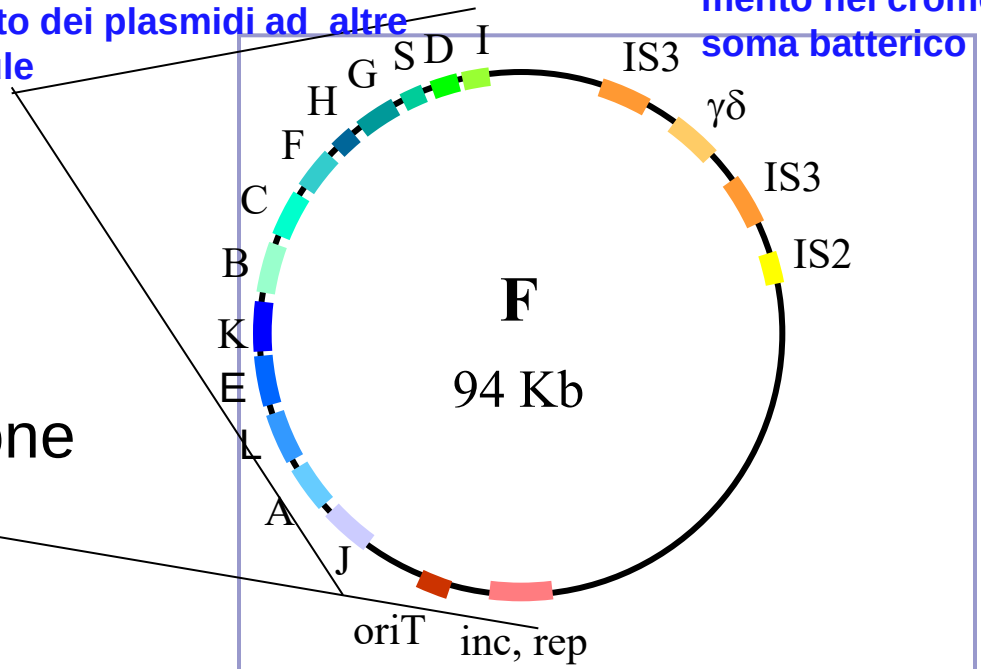
- Metabolismo della canfora
- Induzione di tumori nelle piante

Plasmide/Fattore F

- Basso n°di copie (1-2/ cell.)
- Il DNA può essere diviso in 4 regioni:
  1. Regione ***tra*** (35 Kb)
  2. Regione della replicazione (***inc***, ***rep***)
  3. Elementi trasponibili
  4. Regione silente

➢ **Geni che regolano il trasferimento dei plasmidi ad altre cellule**

➢ **Sequenze che regolano l'inserimento nel cromosoma batterico**

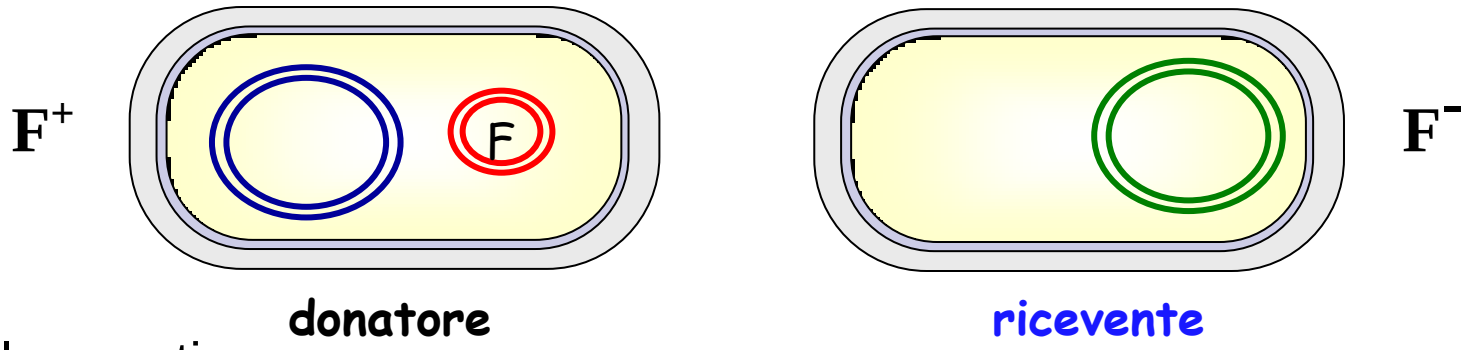


➢ **Geni che controllano la replicazione dei plasmidi**

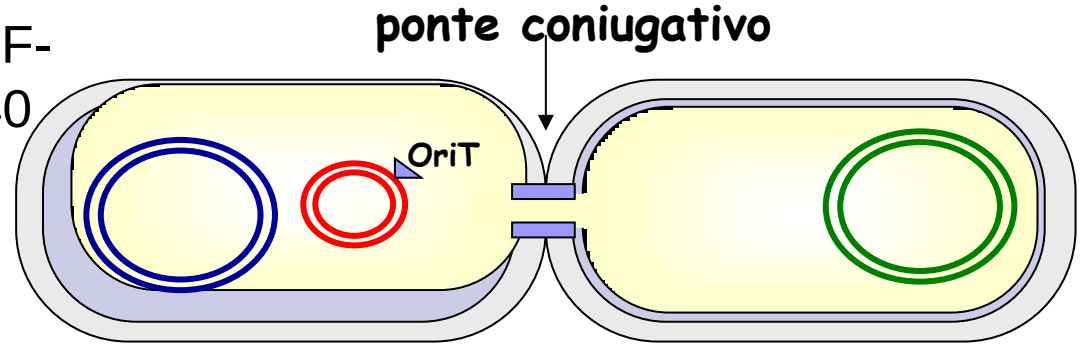
Regione *tra*:

- Sintesi ed assemblaggio dell'F pilus (13 geni)
- Mating-pair stabilization (2 geni)
- Metabolismo del DNA coniugativo (5 geni)
- Regolazione del trasferimento (3 geni)
- Esclusione di superficie (2 geni)

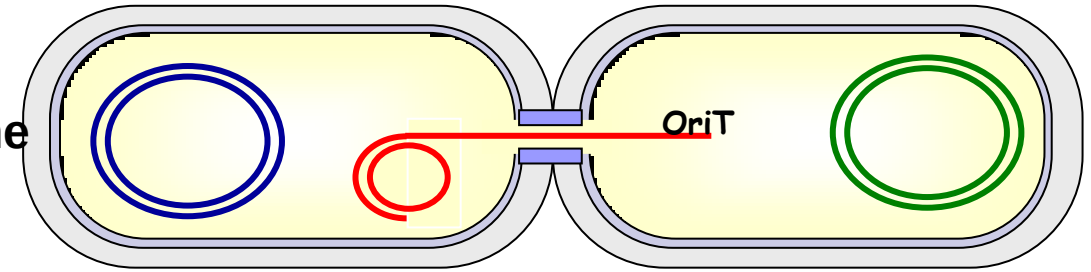
Coniugazione semplice



- Il materiale genetico trasferito da F+ --> F- è il fattore F (~ 1/40 del DNA totale



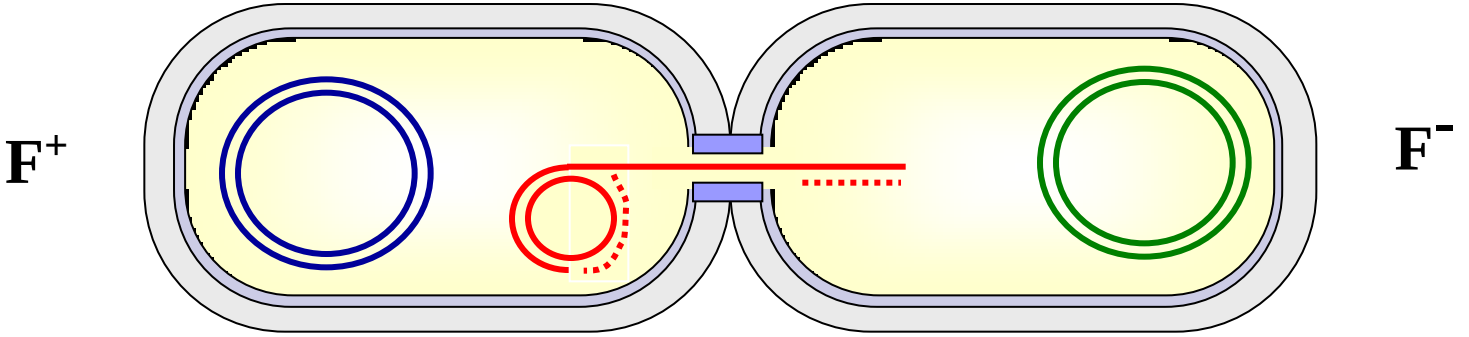
- Il **passaggio avviene dopo che F si è replicato**



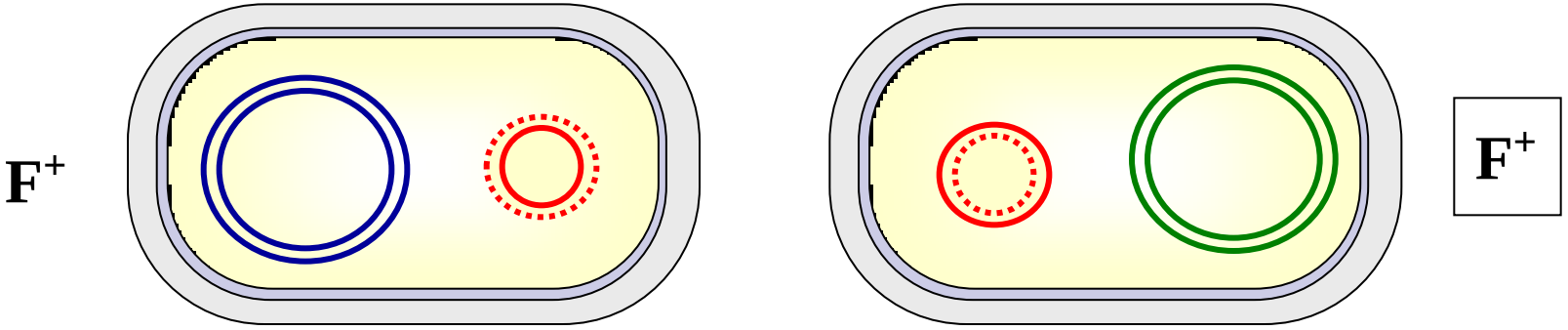
fattore F:

trasferito a cellula ricevente

→diventa F+



- **Viene trasferito un filamento singolo di F.**
- **Nel ricevente viene sintetizzato il filamento complementare**

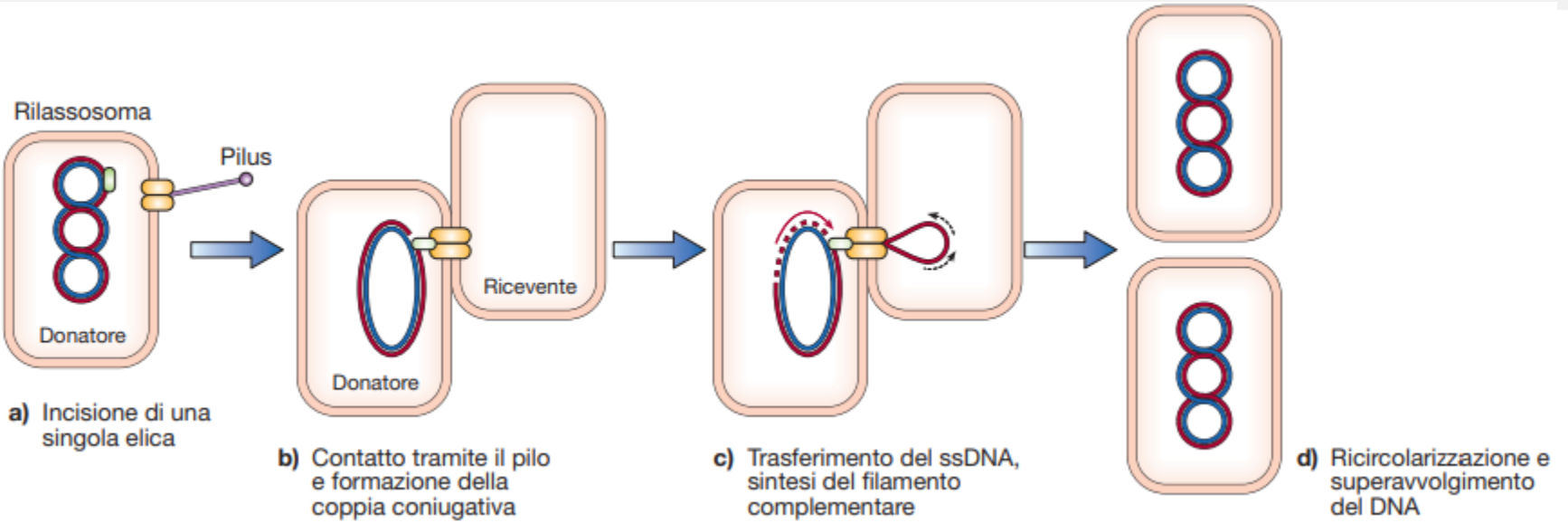


- Una copia del cromosoma con F rimane nella cellula donatrice dopo la replicazione della singola elica restante

fattore F: trasferito a cellula ricevente →diventa F+

- **Nell'incrocio tra un F+ ed un F- alla fine avremo 2 cellule F+.**
- **Tutte le cellule recipienti riceveranno il plasmide F**

TRASFERIMENTO CONIUGATIVO DEL DNA.



- .La cellula donatrice schematizzata in (a) entra in contatto con una cellula ricevente mediante il suo pilo.

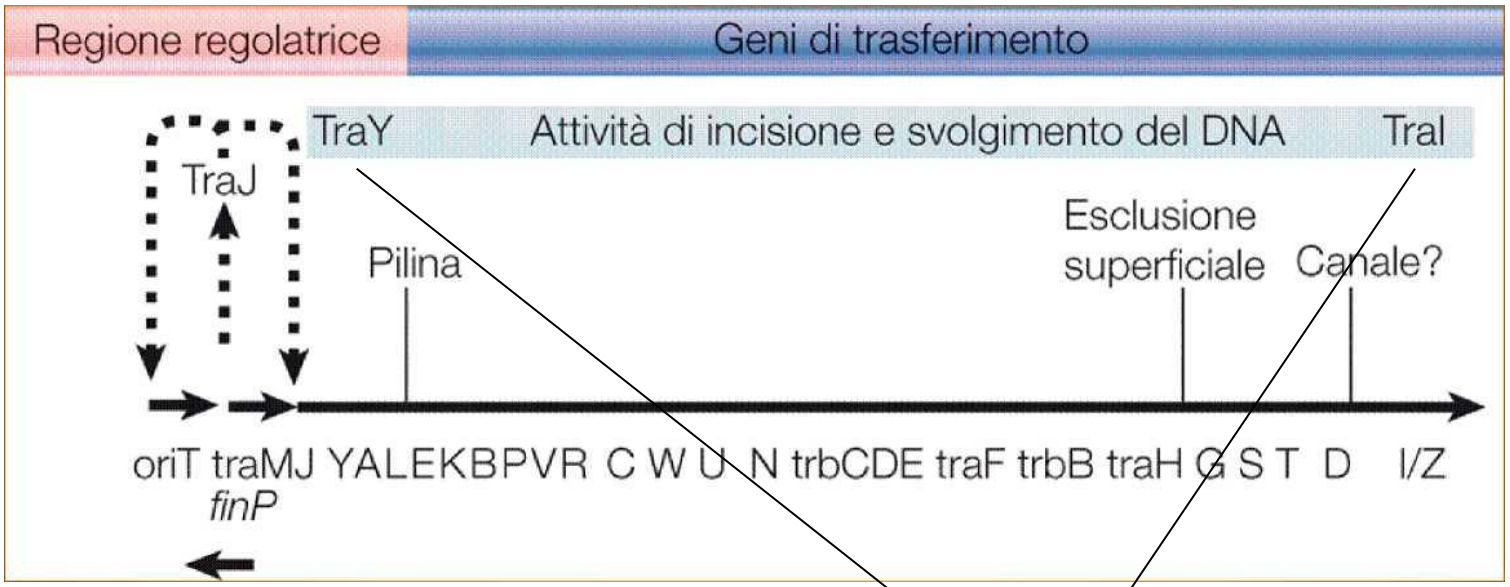
(b) Dopo il contatto, **il pilo si ritrae per depolimerizzazione**, portando le due cellule a stretto contatto. Le proteine **Tra** formano un poro fra le due membrane del donatore e del ricevente.

(c) Il DNA del donatore "preparato" per il trasferimento **è spinto nella cellula ricevente sotto forma di singolo filamento**. Questo filamento di DNA si comporta nella cellula ricevente come stampo per la DNA pol., che sintetizzerà il filamento complementare. Man mano che l'estremità oriT a singolo filamento del plasmide viene spinta nella cellula ricevente, il filamento complementare chiuso covalentemente si comporta come stampo e viene replicato a sua volta secondo il modello del rolling-circle,

(d) Al termine del processo le due cellule (cellula donatrice e cellula ricevente) avranno una **copia completa di DNA plasmidico.**

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 *fnP* è un regolatore codificante un piccolo RNA antisenso che spegne *traJ.*
- Solo **4 dei geni *tra* (*traD, trai, traMe 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).**

GENI E SEQUENZE DEL FATTORE F DI *E. coli*.

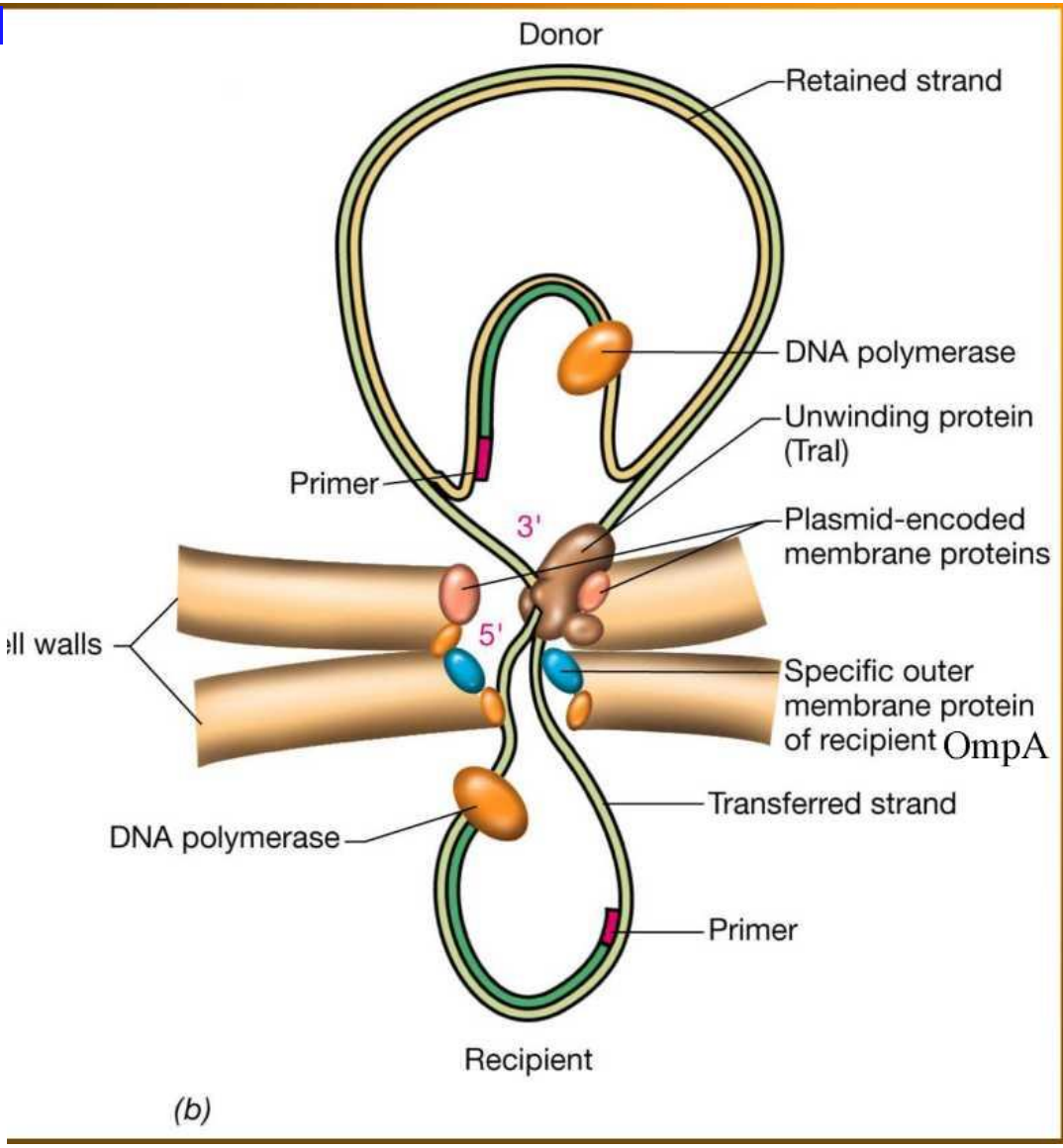
Simbolo	Funzione
ccdAB	Inibizione della divisione della cellula ospite
incBCE	Incompatibilità
oriT	Sito d'inizio del trasferimento del DNA
oriV	Origine della replicazione bidirezionale
parABCL	Partizione
traABCEFGHKLQUVW	Biosintesi e assemblaggio del pilo
traGN	Stabilizzazione dell'accoppiamento
traL	"Nickasi" *oriT*-specifica; DNA elicasi
traMDZ	Complesso per il trasferimento del DNA
traY	Esonucleasi, coadiuva la "nickasi"
traJ, finOP	Regolazione del trasferimento
traST	Esclusione di superficie

Il relaxosoma TraI e TraY: facilita il trasferimento del plasmide durante la coniugazione batterica

- **L'enzima TraI, fa parte del relaxosoma,**
  - è una **relaxasi,** una nucleasi codificata dall'operone ***tra*** del plasmide F,
  - essa taglia un filamento del DNA circolare ed in corrispondenza dell'**oriT** e inizia il processo di trasferimento
  - Tale proteina ha a**nche attività elicasica 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**

- ciò a partire da un innesco di RNA, in modo che alla fine del processo ciascuna cellula possieda un plasmide intero



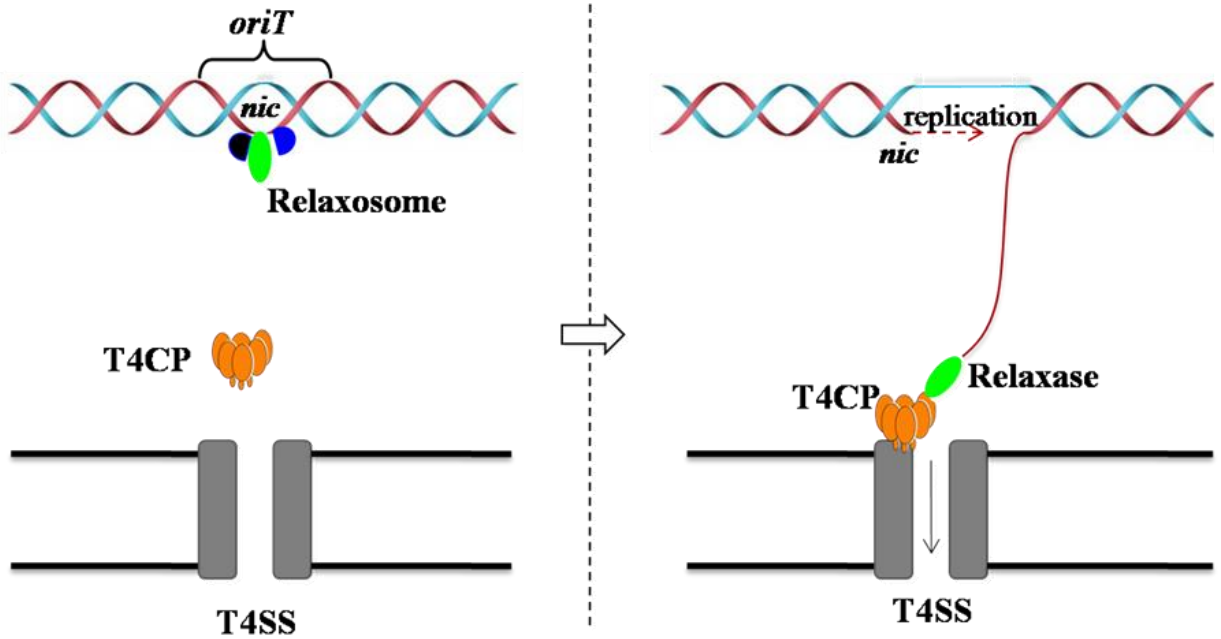
Trasferimento coniugativo di DNA a filament singolo (ssDNA)

1) L'origine del trasferimento (oriT) è un tratto di DNA di solito di diverse centinaia di bp di lunghezza.

- All'interno dell'oriT c'è il **sito nic** in cui la **relaxasi**, una fosfodiesterasi, scinde in modo specifico per sito e filamento, con conseguente trasferimento di un ssDNA in direzione 5'-3' alla cellula ricevente.
- Il sito nic subisce scissione e rilegatura durante la crescita vegetativa, ma questo viene convertito in una reazione di scissione e svolgimento quando si è formata una coppia di accoppiamento competente

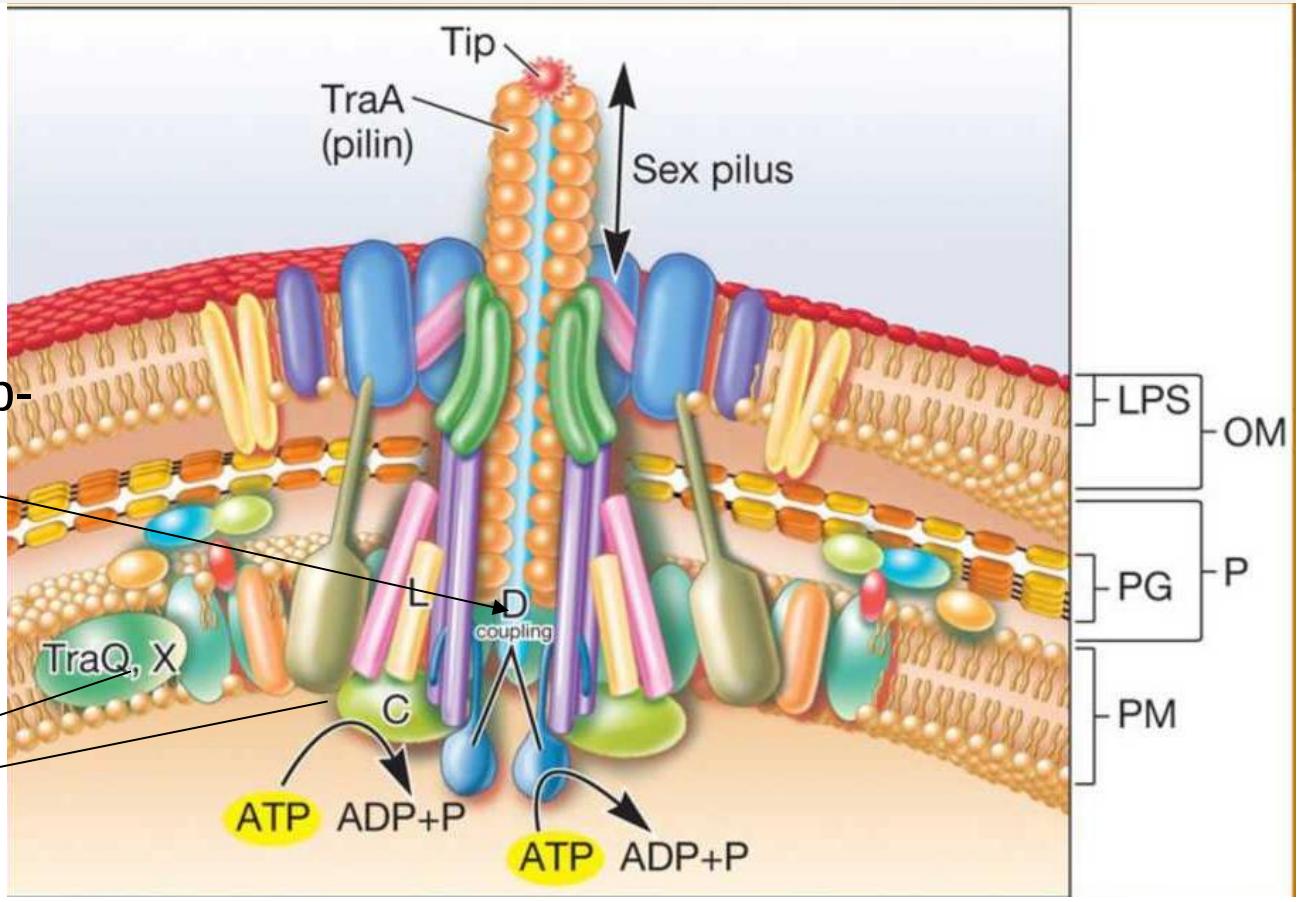
2). Il r**elaxosoma**, un complesso multiproteina-DNA formato all'origine del trasferimento (oriT), è costituito da una **relaxasi,** diretta al sito nic da proteine ausiliarie leganti il DNA

3) La **proteina di accoppiamento (T4CP)** guida questo complesso proteina-DNA (relaxosoma-oriT) al T4SS sulla membrana, dove il filamento trasferito esce dai batteri



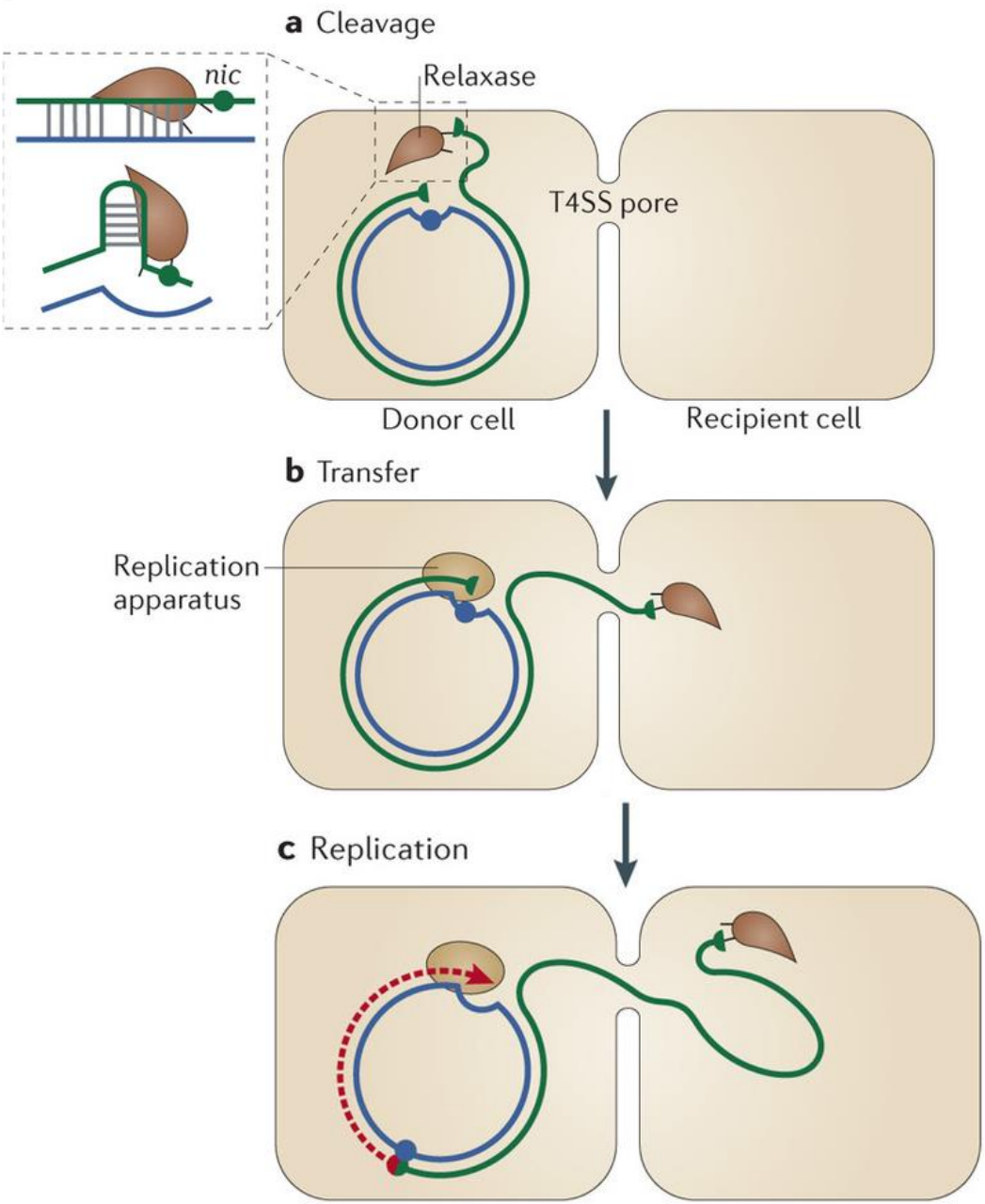
Sistema di trasporto di tipo IV codificato dal Plasmide F

- 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 ATPasi
- **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

Ruolo della relaxasi

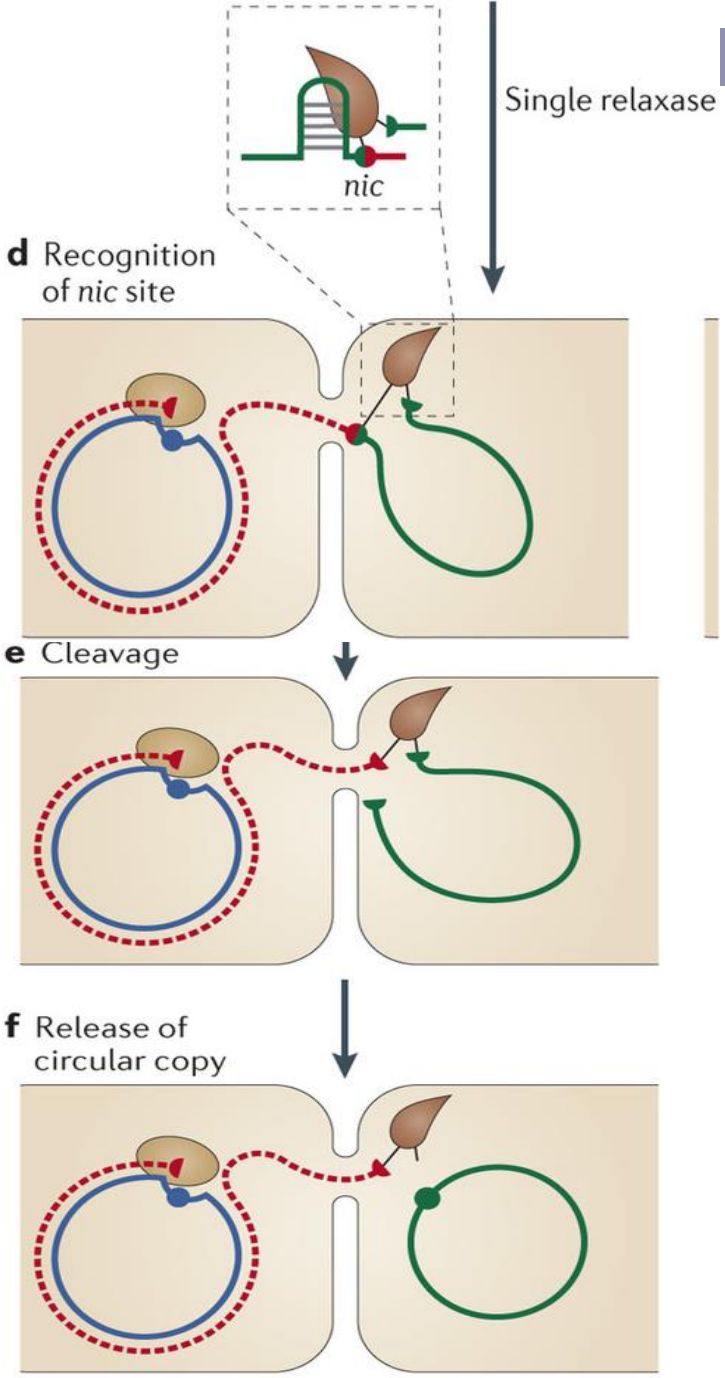


- **La coniugazione avviene attraverso un poro che mette in comunicazione donatore e recipiente generato dal T4SS** (proteina di accoppiamento)

a) La coniugazione è iniziata dalla relaxasi che riconosce un sito localizzato al **3' del sito nic.** La relaxasi poi lega a se, tramite un residuo di Tyr, il DNA ss tagliato a nic

- b) Il DNAss legato alla relaxasi viene trasferito nella cellula recipiente

- c) Inizia la replicazione nella **cellula donatrice che rigenera il sito nic**

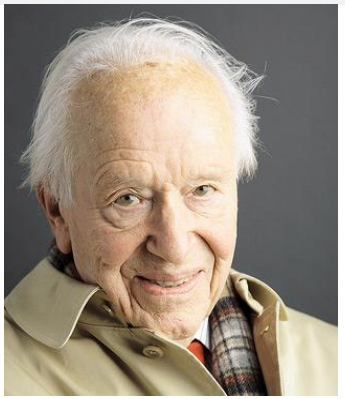


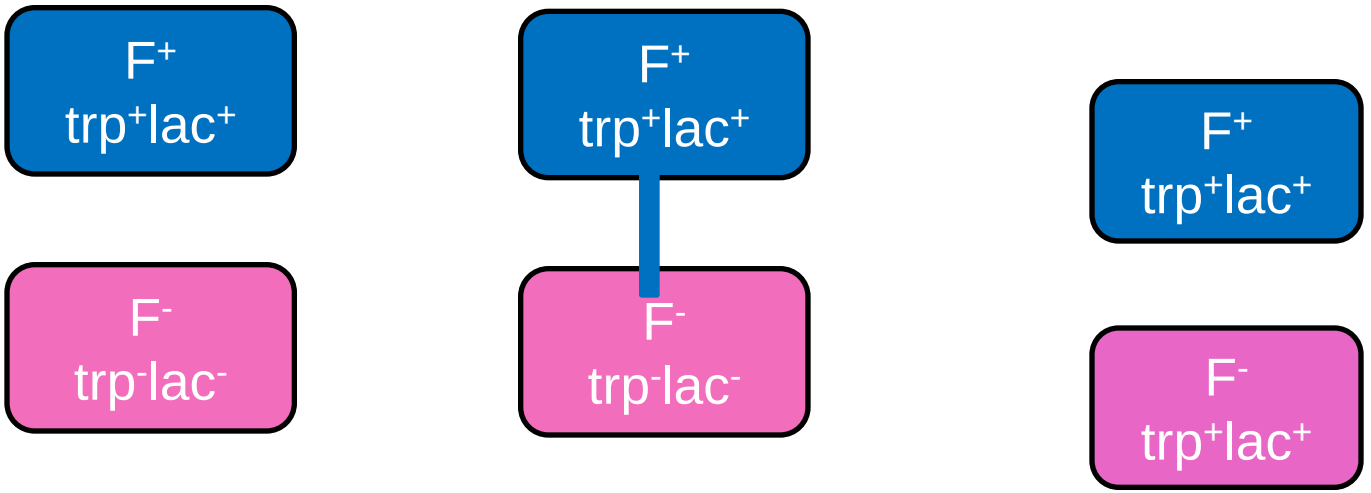
- **d**–**f** | La replicazione procede fintanto che l'intera molecola di DNA circolare non viene replicata completamente.
- Il sito *nic* che era stato ricostituito viene poi tagliato dalla relaxasi per generare una copia di DNA circolare SS nella cellula recipiente.

- Il taglio è mediato dalla relaxasi legata al sito *nic* originale nella cellula recipiente.

- La replicazione nella cellula donatrice é generalmente accoppiata al trasferimento.
- La replicazione del DNAss nella cellula recipiente è portata avanti dall'apparato di replicazione della cellula recipiente.

Altri ceppi F^+ trasferiscono molti geni che danno luogo a ricombinazione, generalmente senza che venga trasferito il fattore di sessualità





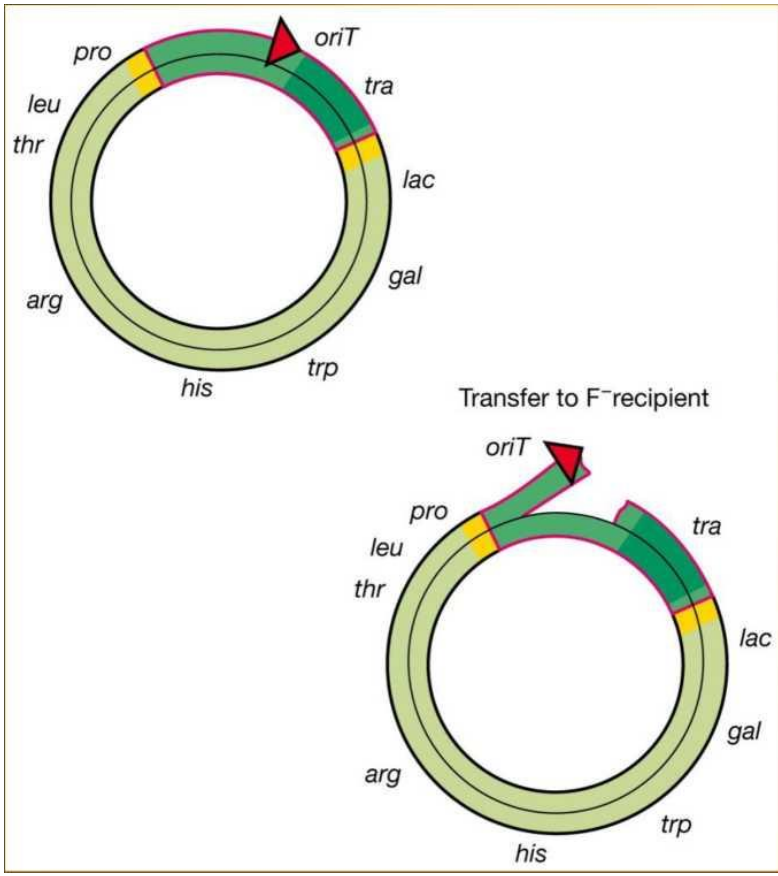
Ceppi *Hfr*: High Frequency of Recombination

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.

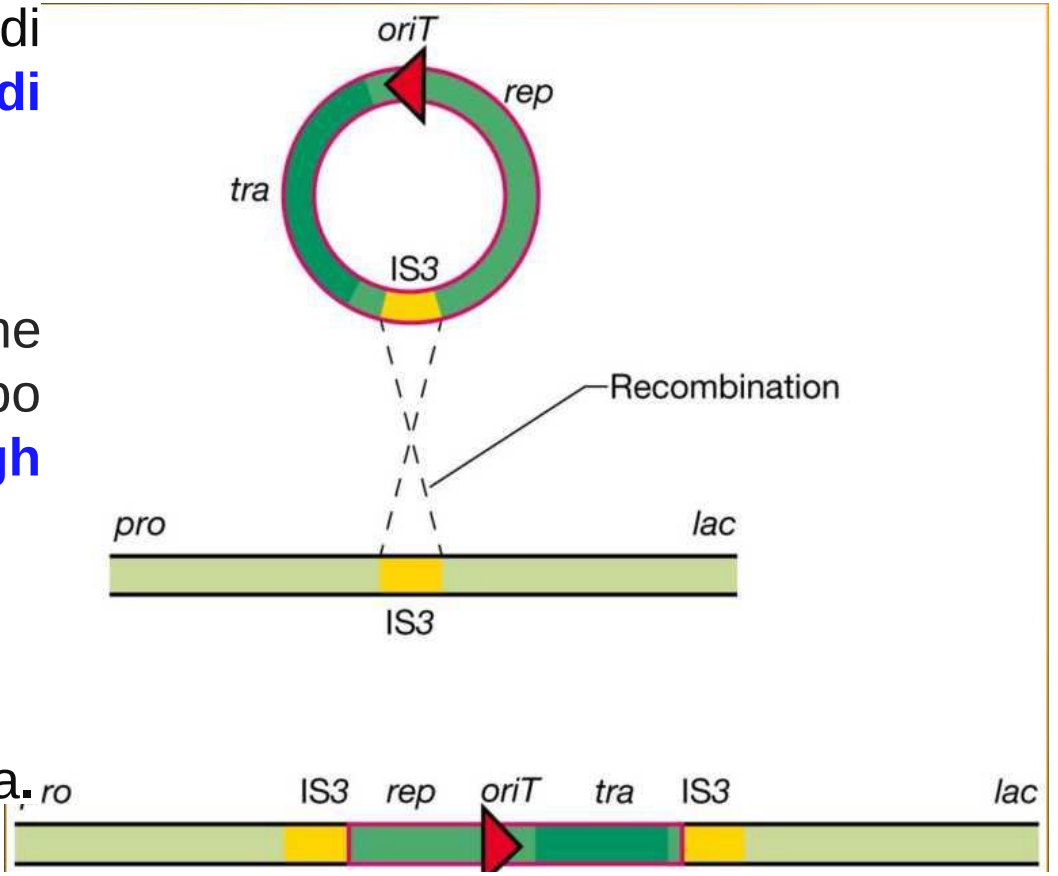
- Le cellule F+ convertono in modo efficiente F- in F+, proprio perché viene trasferito l'intero plasmide F.



I ceppi Hfr (High frequency recombination)

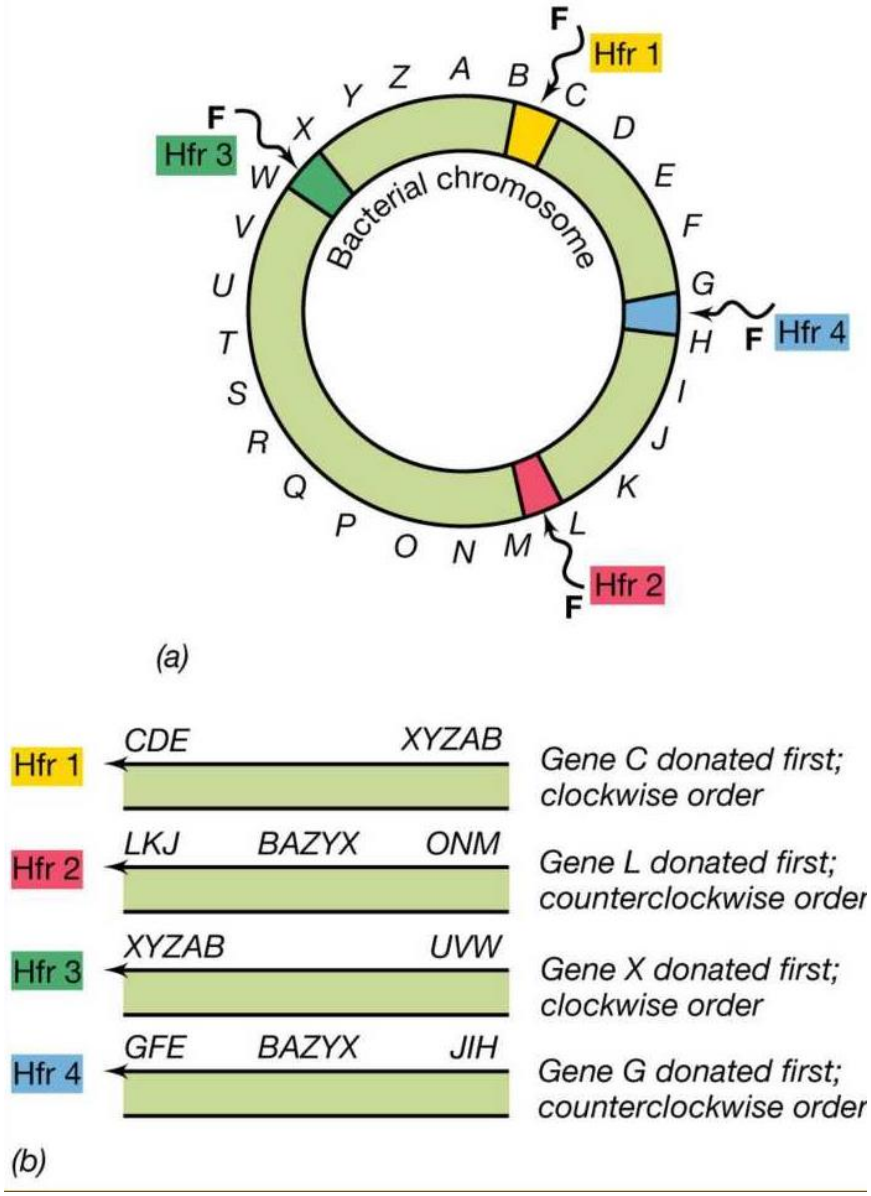
- Il plasmide F può essere trasferito senza che vi sia scambio di materiale cromosomico e quindi senza la **formazione di ricombinanti.**

- 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.



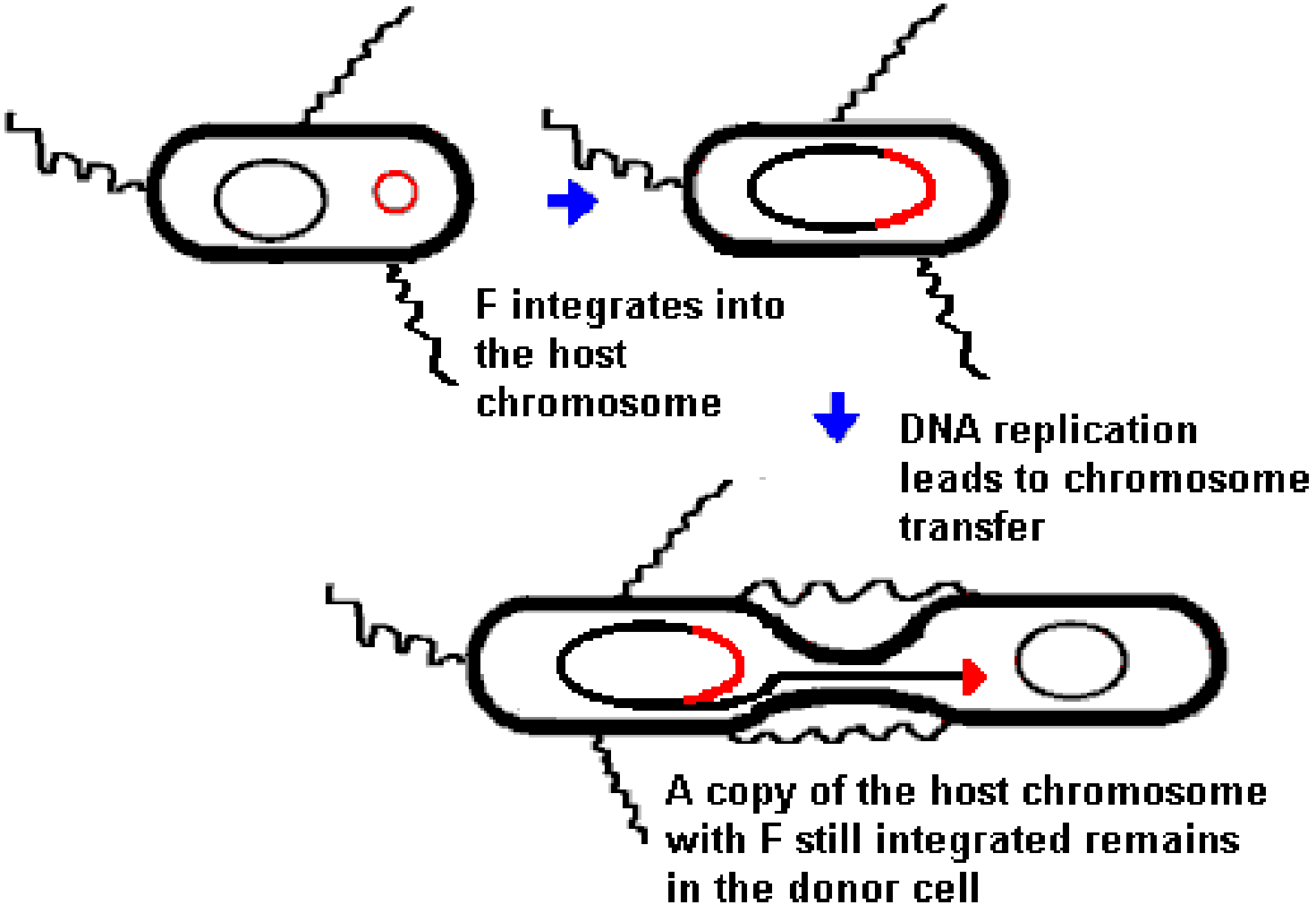
- **Il fattore F può esistere in due stati alternativi,**
  - **come elemento citoplasmatico capace di replicazione autonoma ,**
  - **oppure integrato nel cromosoma batterico insieme al quale si replica, chiamato episoma.**

Formazione di differenti ceppi Hfr



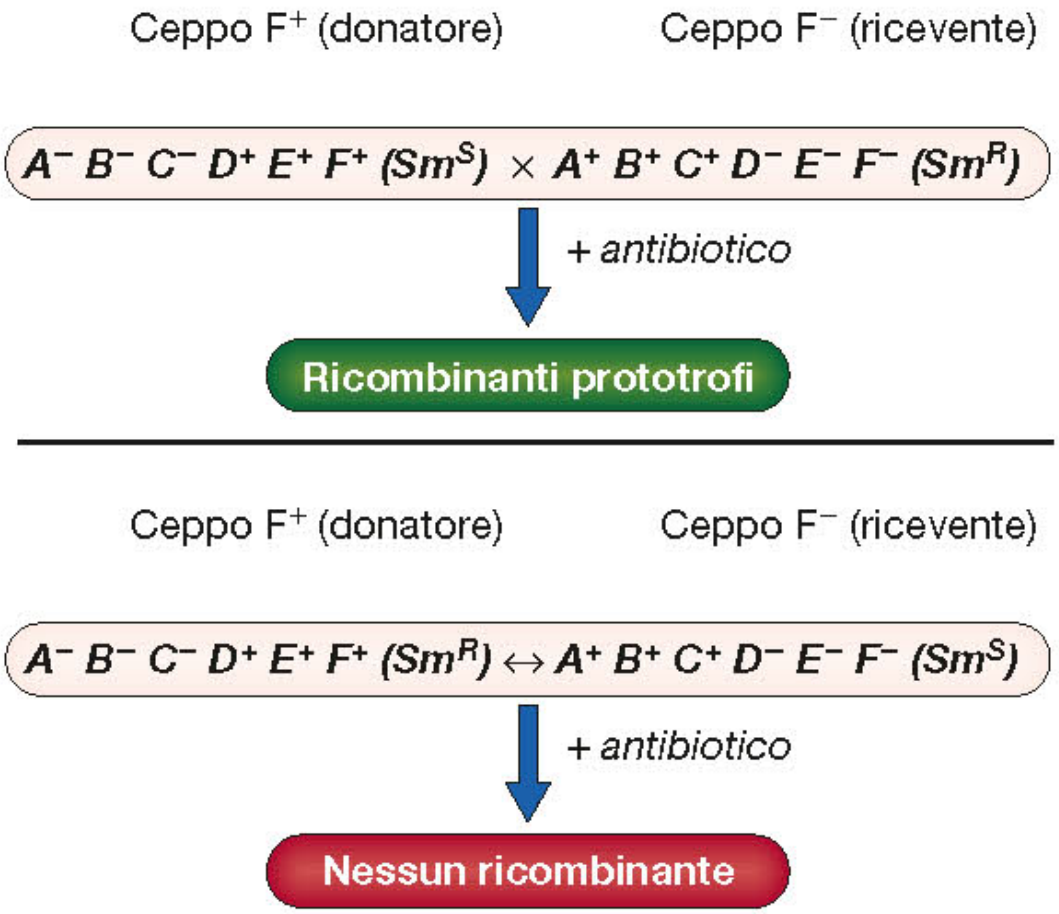
- **L'integrazione di F** nel cromosoma batterico avviene **mediante un singolo crossing-over tra le sequenze IS**
- Ciò da origine a diversi ceppi "Hfr,
- Questi trasferiscono geni in ordine diverso a partire da origini differenti

Nella coniugazione fra Hfr ed F^-, il fattore F è trasferito per ultimo



Si può utilizzare questa particolarità per la mappatura genetica

Il trasferimento durante la coniugazione è polarizzato



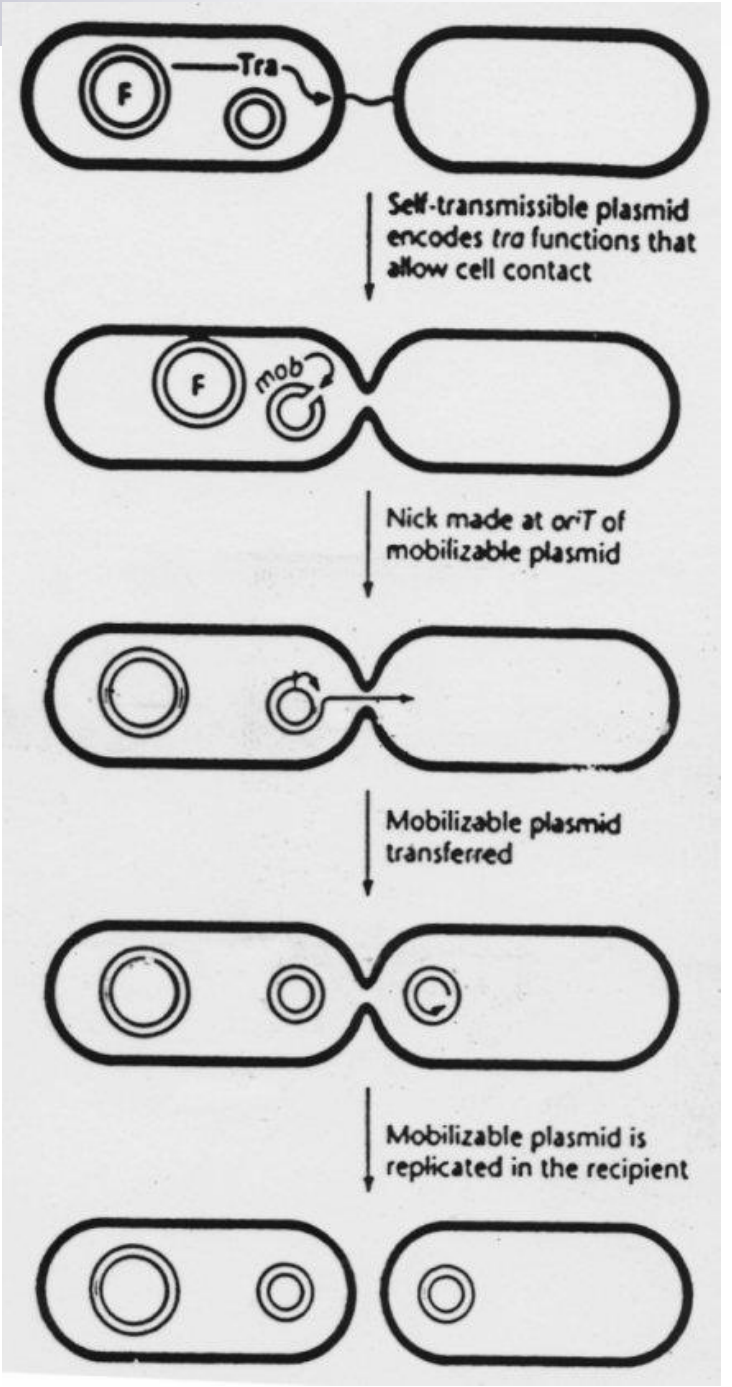
- Il trasferimento procede **dal ceppo don**atore (cellula F+ o Hfr) verso la cellula recipiente F-.
- Il recipiente deve essere vitale.

LA MOBILIZZAZIONE

- I **plasmidi mobilizzabili sono plasmidi non coniugativi**
- Questi **sono in grado di sfruttare il sistema di coniugazione di un plasmide compa**tibile presente nella cellula ospite.

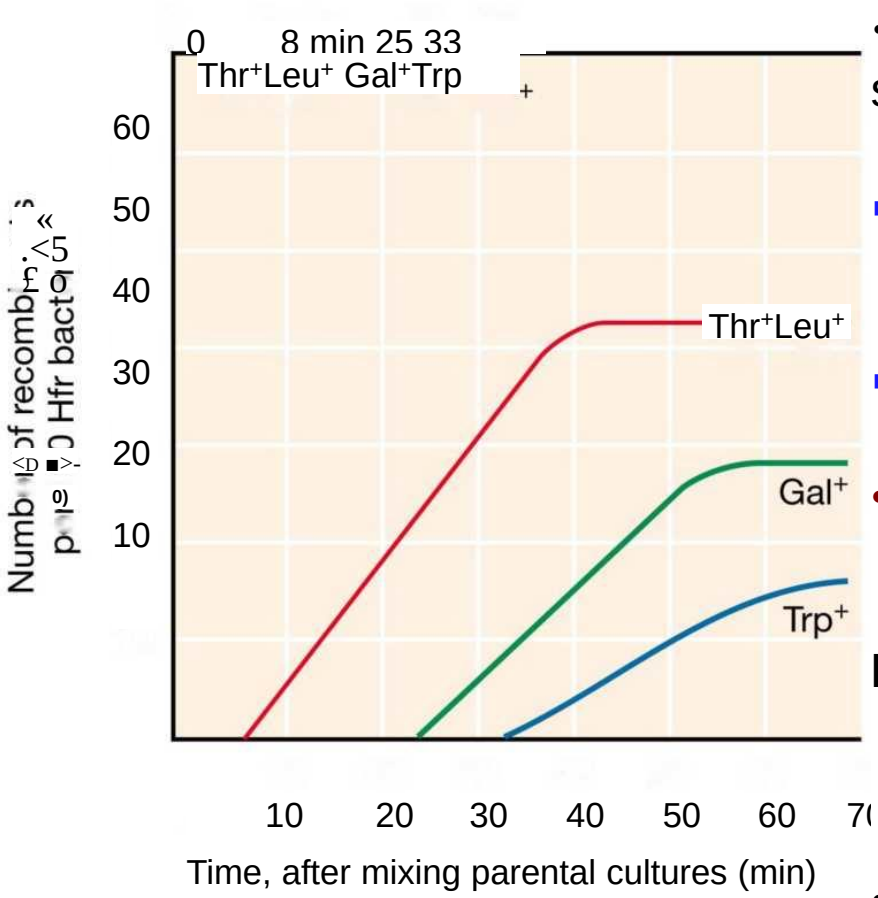
- Alcuni posseggono una **propria nucleasi in grado di tagliare il DNA nel sito di oriT** per dare l'avvio al processo di coniugazione.

- Altri plasmidi invece posseggono semplicemente un sito oriT riconoscibile da varie nucleasi codificate dai plasmidi coniugativi.



Esperimento di coniugazione interrotta

- 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,***
  - **questo 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-.**

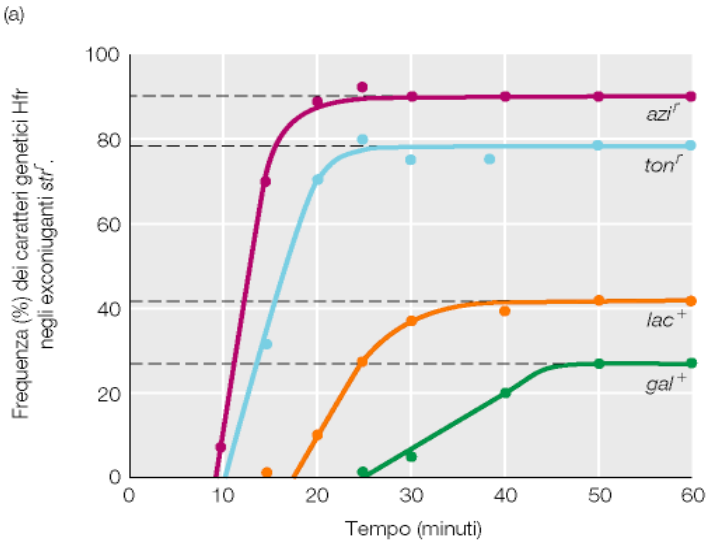
Il trasferimento per ogni particolare ceppo inizia in un punto preciso del cromosoma e sempre nello stesso punto con una velocità costante.

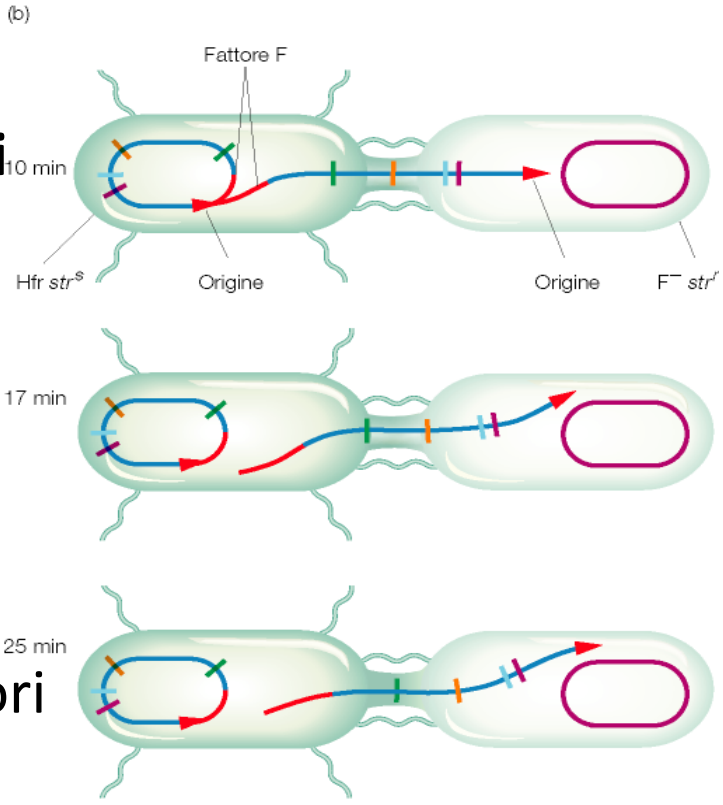
- **Il tempo richiesto per il trasferimento dell'intero cromosoma è di 100 minuti a 37°C.**

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

Esperimenti di coniugazione interrotta

- **Cellule F- resistenti alla streptomicina e con mutazioni dei geni *azi, ton, lac* e *gal* sono incubate per periodi diversi con cellule sensibili alla streptomicina e di tipo selvatico per i suddetti geni.**



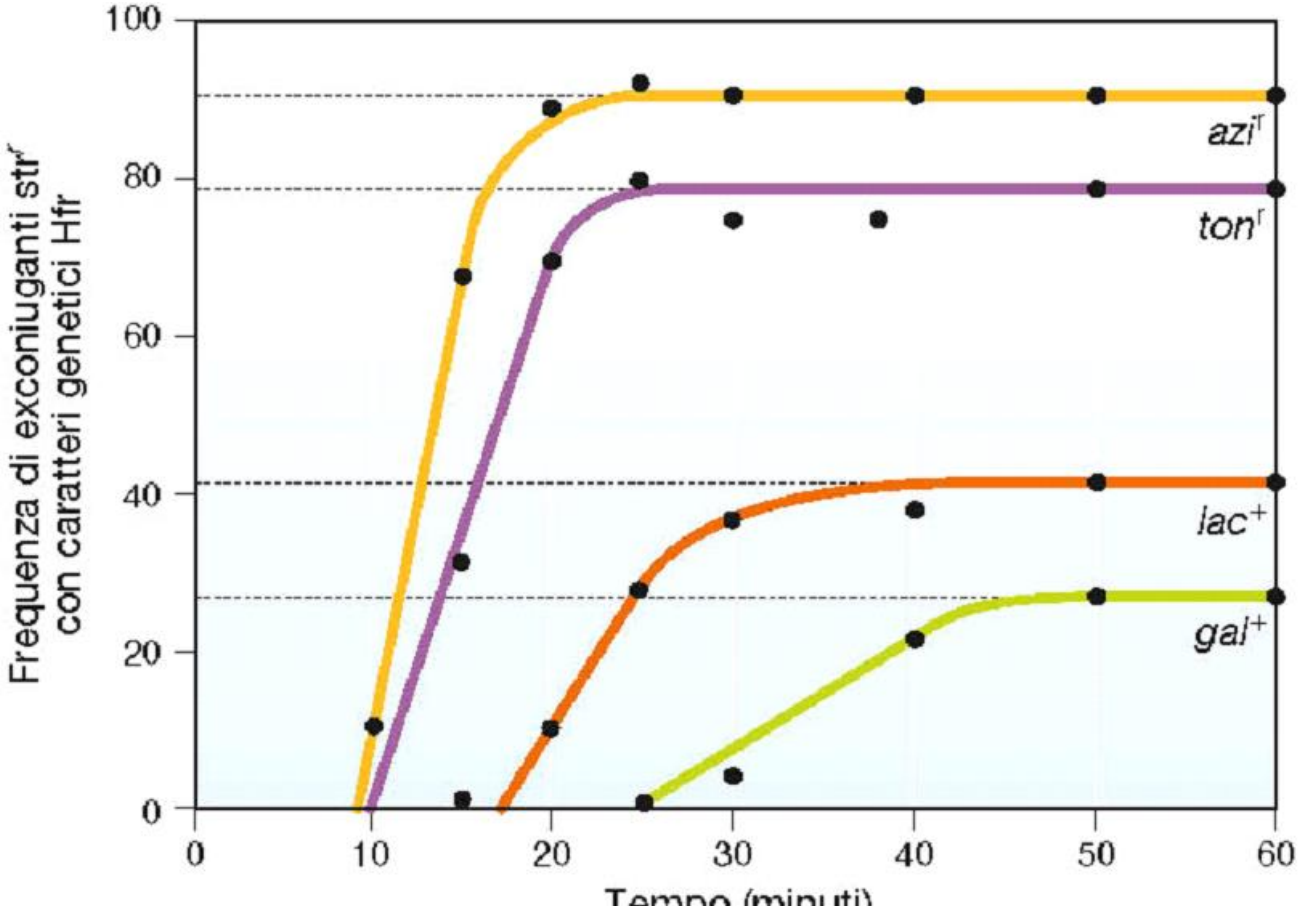


a) grafico della frequenza degli alleli del donatore negli exconiuganti in funzione del tempo trascorso dopo la coniugazione.

b) schema del trasferimento dei marcatori (con colori diversi)

Come si riuscì a stabilire l'ordine dei geni osservando le frequenze di ricombinanti?

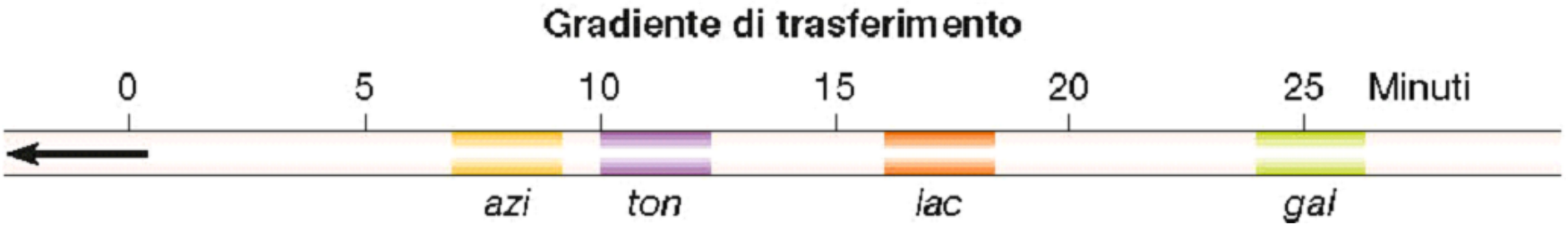
- Il ceppo recipiente è
  sensibile a sodio azide (azi $^{-}$), al fago T1 (ton^{s})
  incapace di fermentare lattosio (lac^{-}) e galattosio (gal^{-})
  ma resistente alla streptomicina

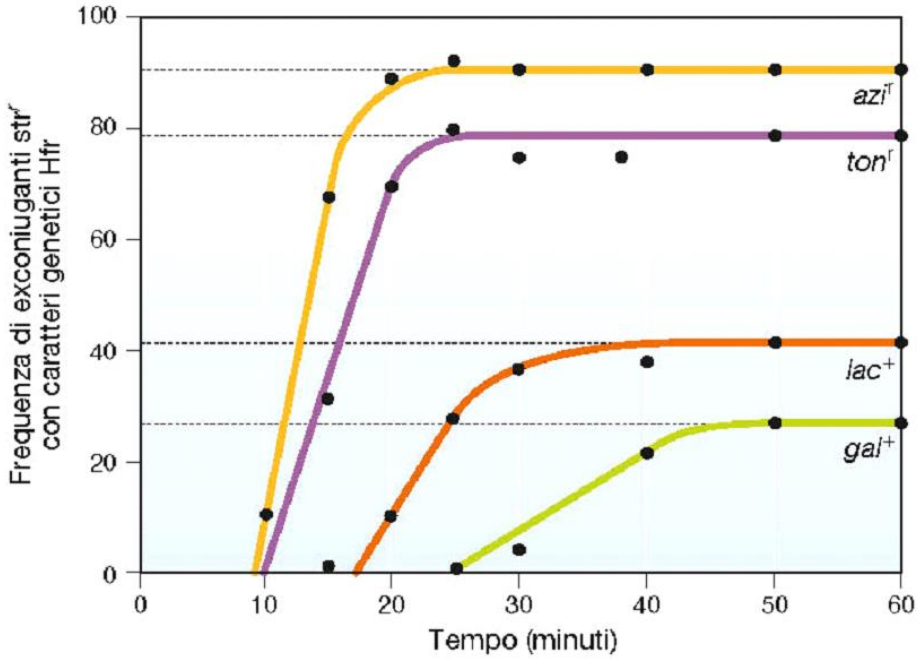


- Il grafico riporta le frequenze
- in **funzione del tempo dei batteri "recipienti"**
- che hanno ricevuto i caratteri del donatore azi^{r},ton^{r}, lac^{+} gal^{+}

TonA proteine funzionano
come un recettori alla spperfcie della cellula

- Sulla base dei dati ottenuti è possibile
  - costruire una mappa genetica nella quale
  - i **geni sono distanziati a seconda di quanti minuti siano necessari perché entrino**





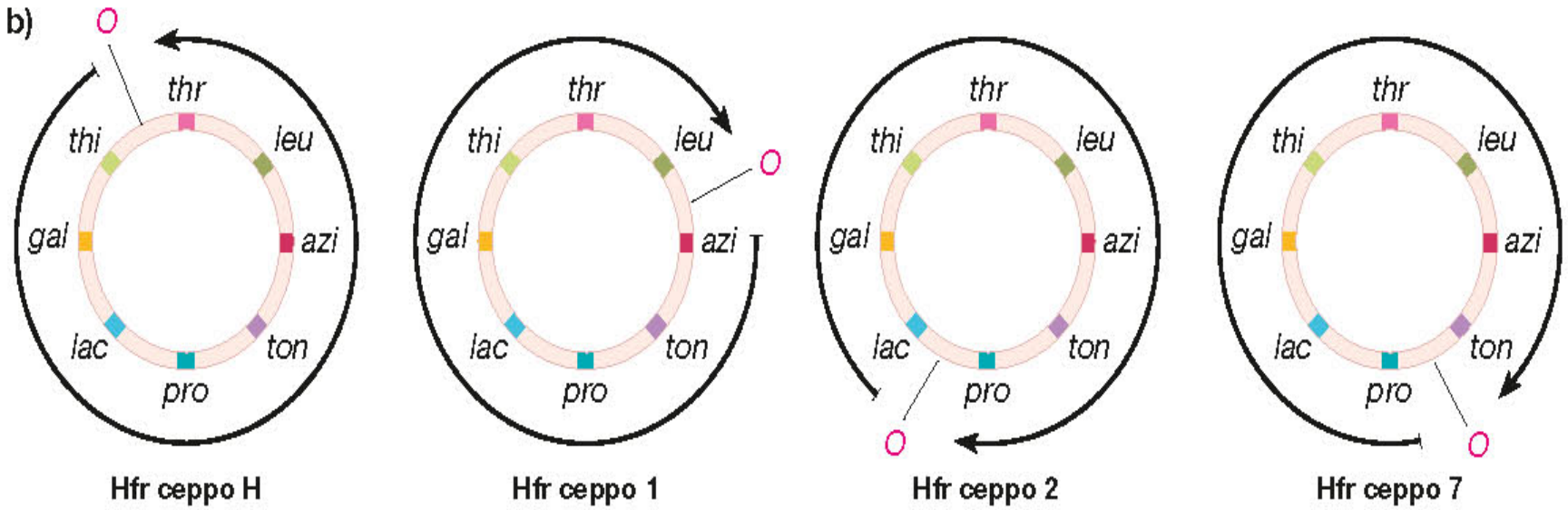
- Le frequenze di ricombinazione dei geni più lontani diminuiscono in funzione della distanza dall'origine
- ciò a **causa di rotture dell'apparato di coniugazione**

Hfr diversi producono ricombinanti diversi

a)

Ceppo Hfr	Ordine di trasferimento (primi → ultimi)
H	*thr* – *leu* – *azi* – *ton* – *pro* – *lac* – *gal* – *thi*
1	*leu* – *thr* – *thi* – *gal* – *lac* – *pro* – *ton* – *azi*
2	*pro* – *ton* – *azi* – *leu* – *thr* – *thi* – *gal* – *lac*
7	*ton* – *azi* – *leu* – *thr* – *thi* – *gal* – *lac* – *pro*

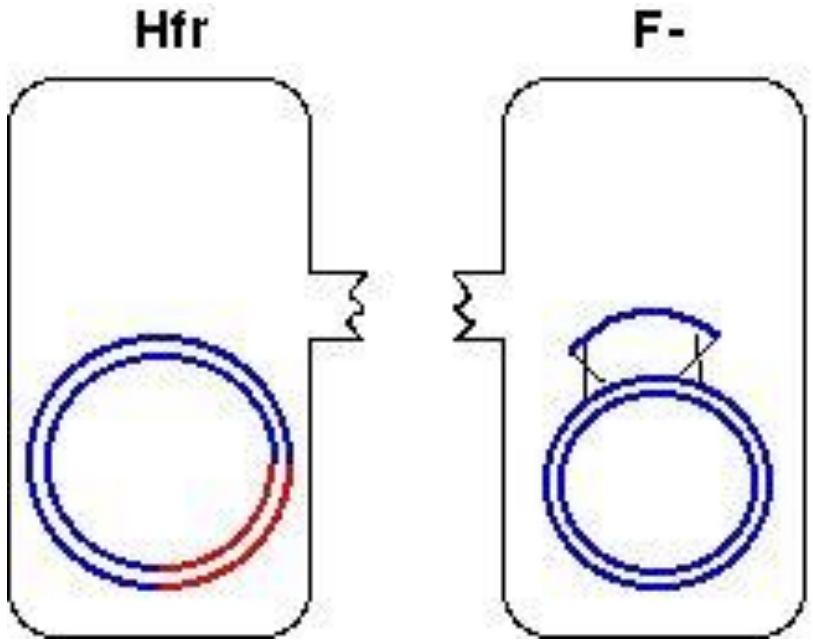
b)



Risultato di un incrocio Hfr x F-

- In un **incrocio Hfr x F-**
- otterremo alla fine
  - una cellula Hfr
  - ed una F-

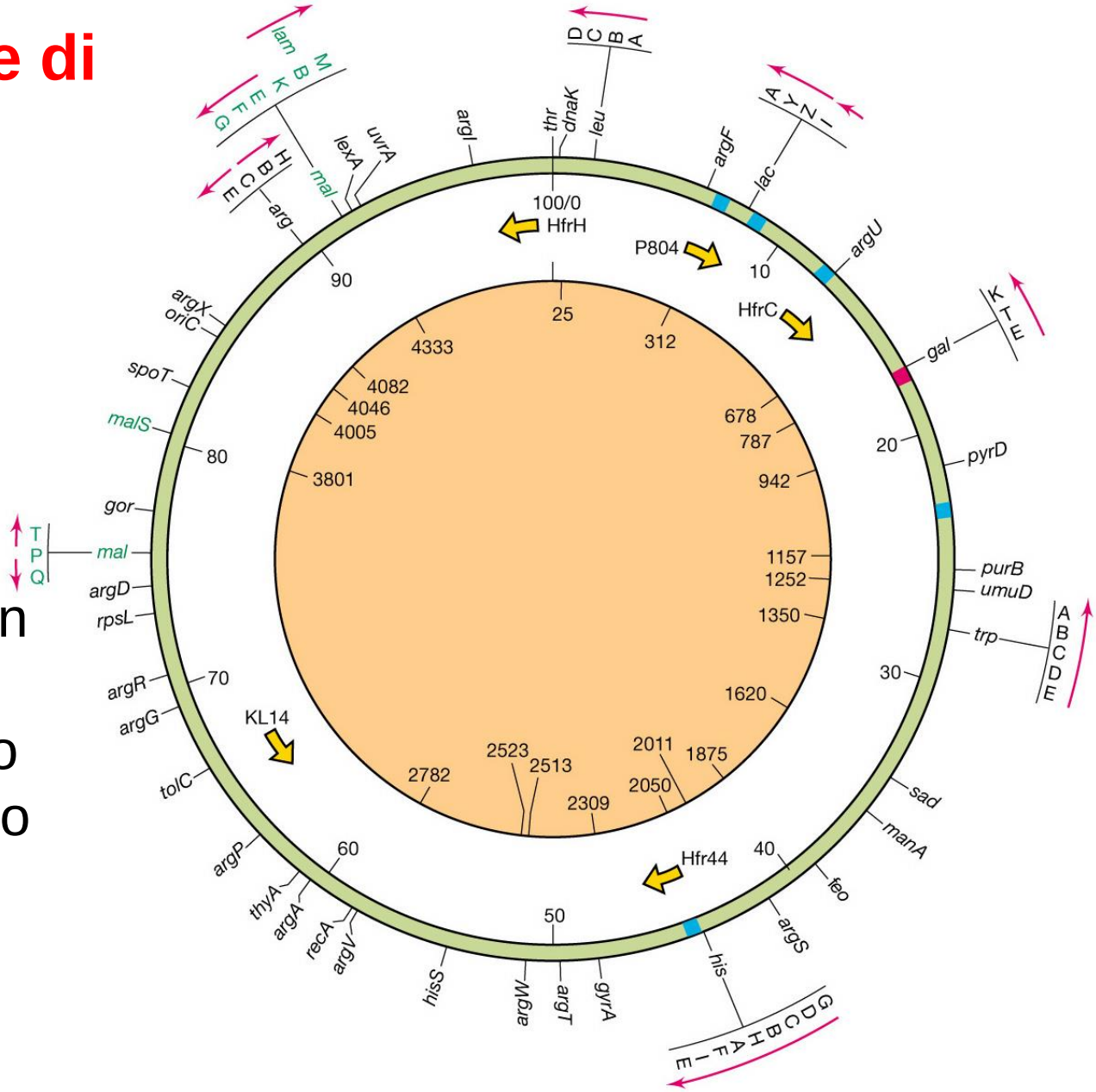
nella quale potrà aver luogo la ricombinazione del frammento di DNA cromosomico del donatore ereditato per trasferimento.



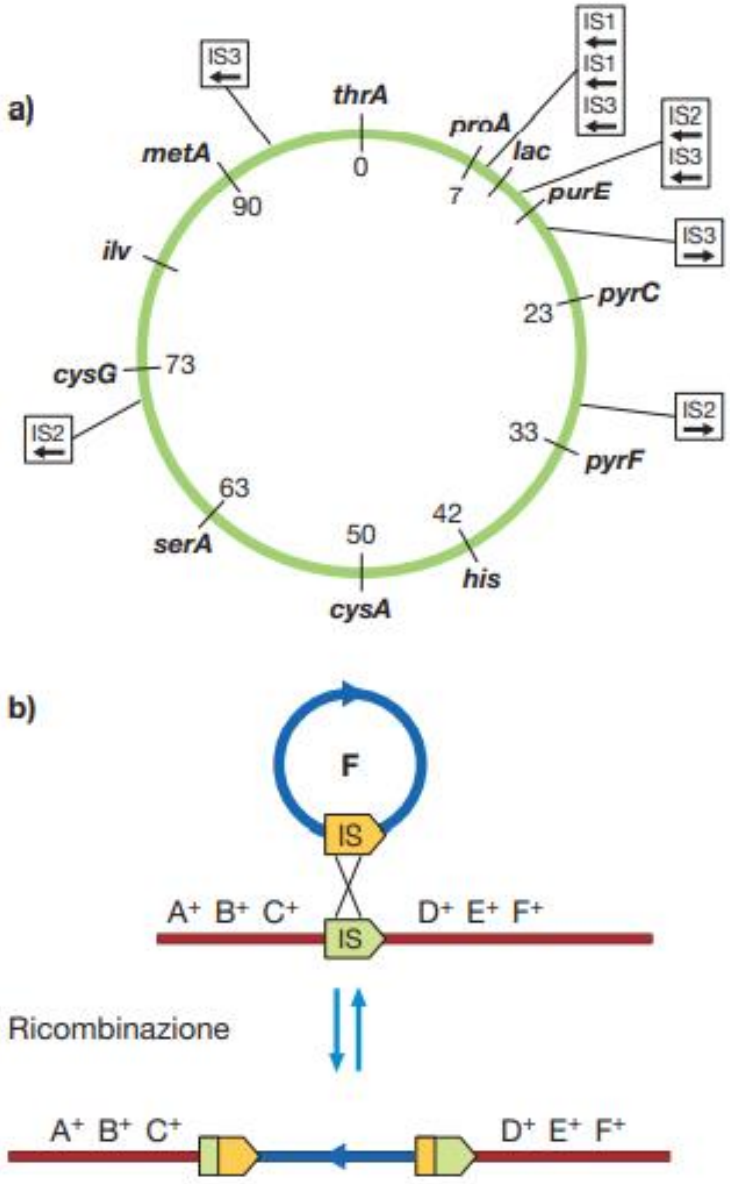
- I ricombinanti nel ceppo recipiente si vengono a formare
- perchè il frammento cromosomico trasferito se **troverà sequenze omologhe sul** cromosoma del recipiente ricombinerà .
- Altrimenti verrà degradato.

Mappa circolare di E.coli

- La mappa utilizza come **unità di misura i minuti**
- in riferimento a quanti minuti ci vogliono perché un gene sia trasferito rispetto ad un altro durante un incrocio Hfr-x F-.



INTEGRAZIONE DEL FATTORE F NEL CROMOSOMA E FORMAZIONE DI CEPPI Hfr E F'



Il fattore F' e la F-duzione

- **Si ottiene in seguito a un errato processo di escissione di F**

- La formazione di un F' produce una delezione nel cromosoma

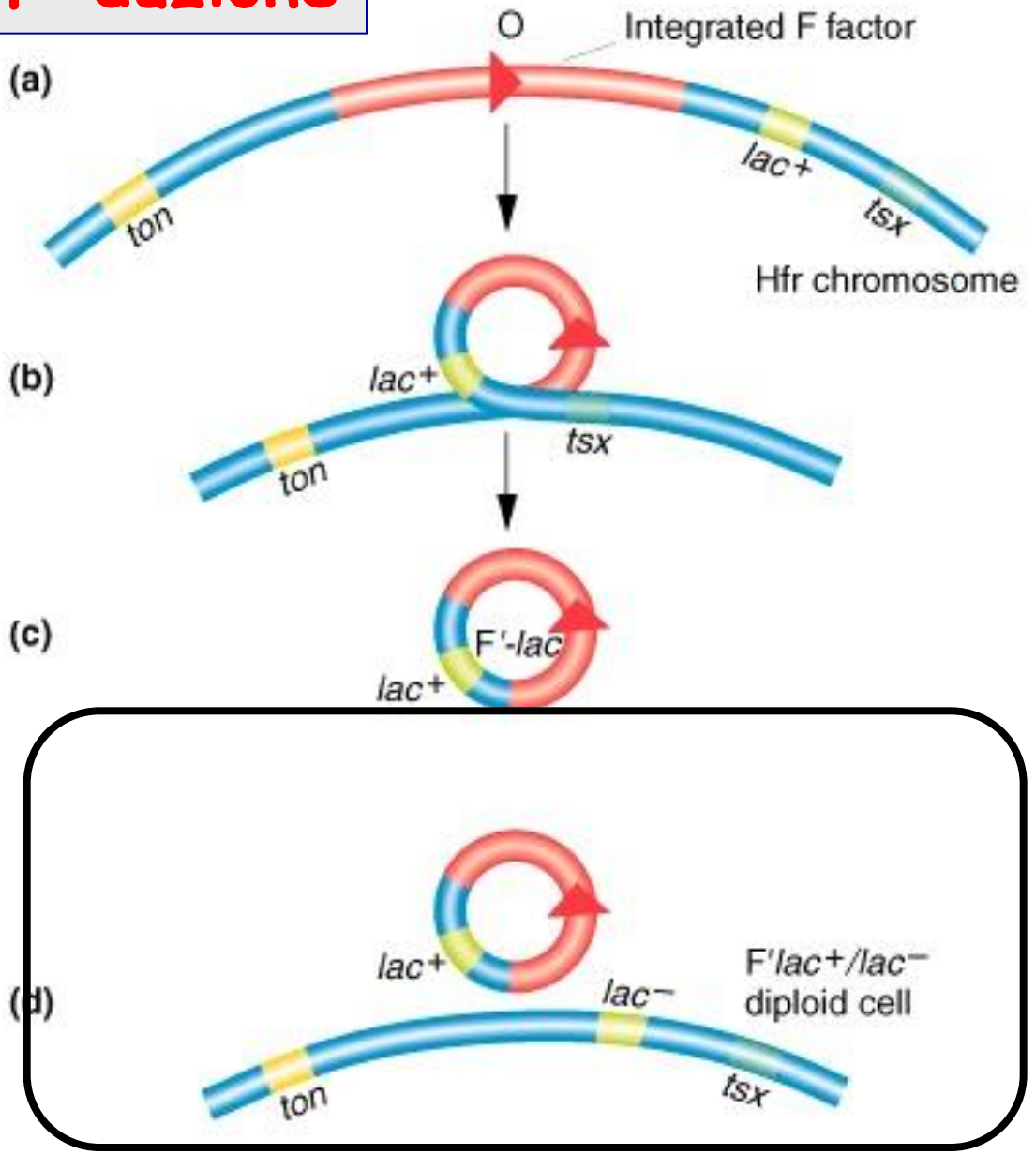
- In seguito ad incrocio:

F' x F⁻

si produce un diploide parziale

o

merizigote



Ricapitolando……

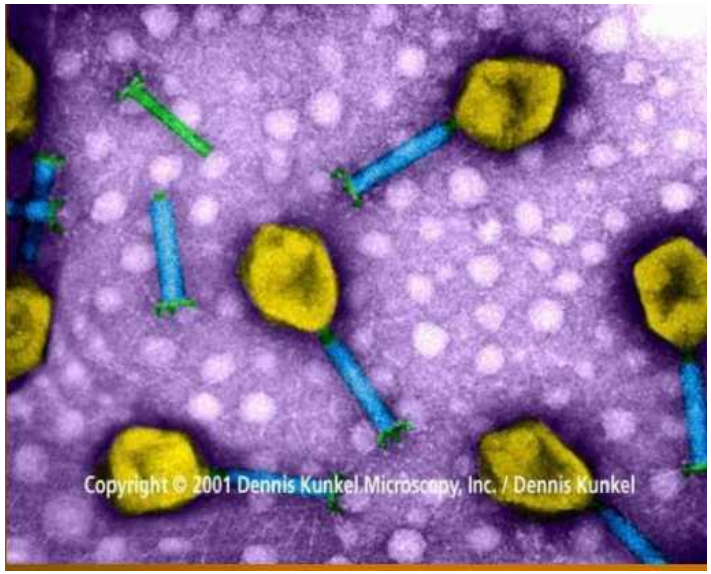
> Il fattore F può trovarsi nella cellula come:

1. **F^+**
2. **Hfr**
3. **F'**

da un incrocio……	**i riceventi……**
$F^+ \times F^-$	diventano **F^+**
Hfr x F^-	rimangono **F^-** ma possono acquisire nuovi caratteri
$F' \times F^-$	diventano **F'** e diploidi parziali per uno o più geni

3. La trasduzione

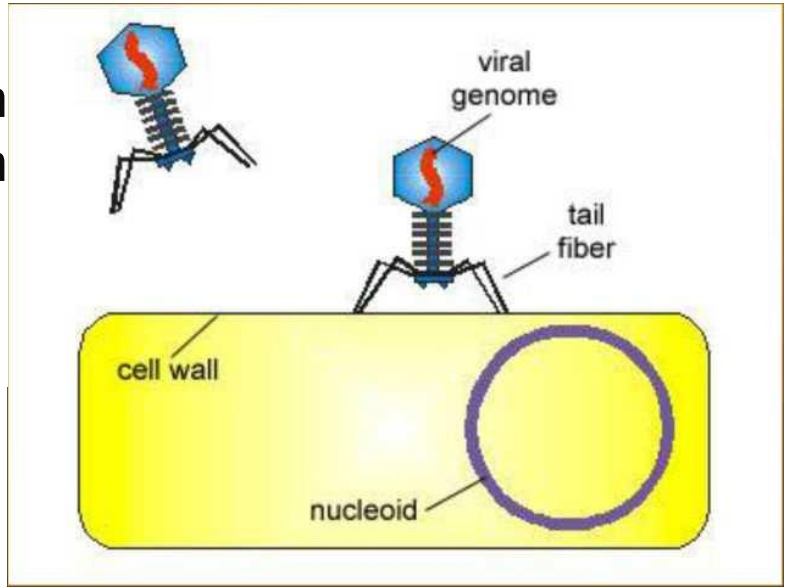
- Alcuni **batteriofagi possono agire come vettori di informazione genetica per i loro ospiti**, trasportando geni batterici da una cellula all'altra.



- Questo fenomeno è stato denominato t**rasduzione**
- **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 puo' essere potenzialmente trasferito

2. **Specializzata (associata al ciclo lisogeno)** trasduzione nella quale specifici geni batterici sono trasferiti

a. La trasduzione generalizzata

- Le principali caratteristiche della trasduzione generalizzata sono:

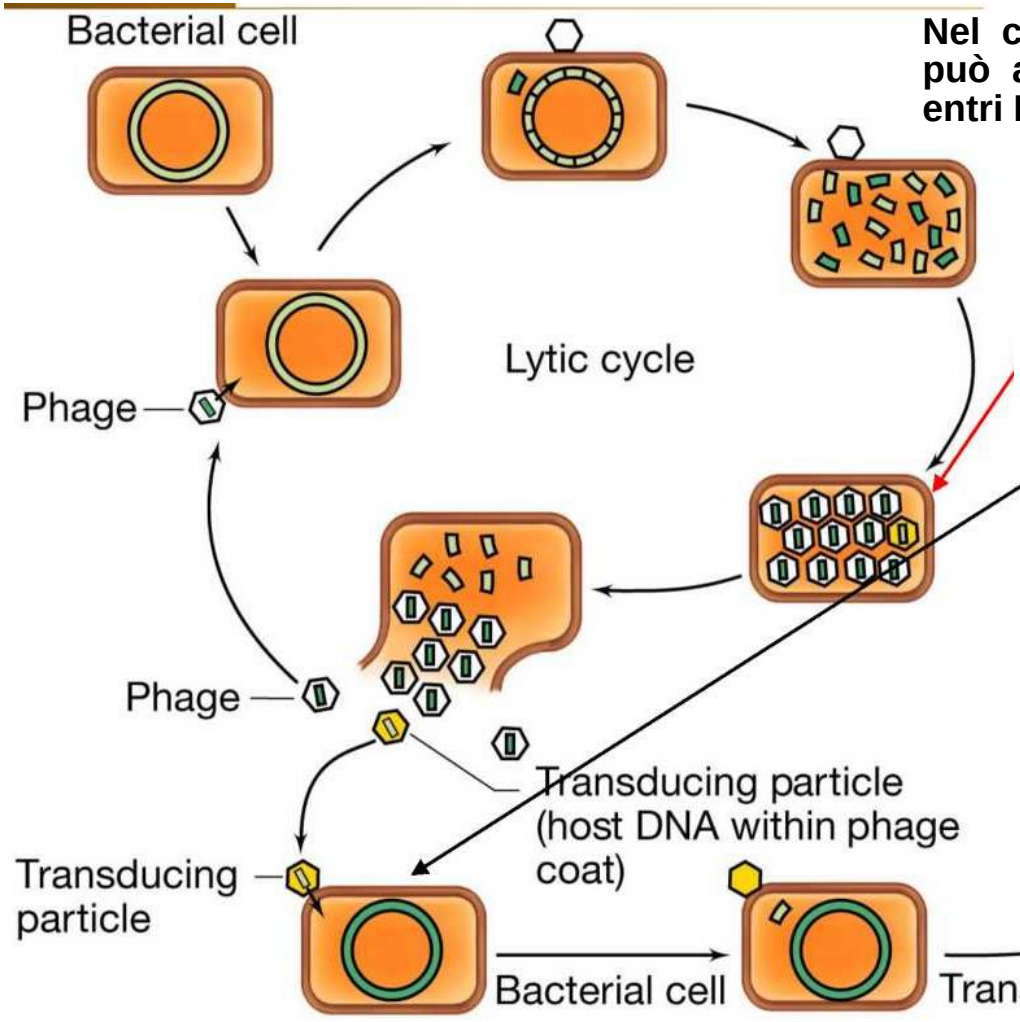
1) tutti i marcatori genetici hanno la possibilità di essere trasdotti, anche se spesso vengono trasdotti con frequenze diverse;

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 <u>non sono lisogeni</u> e non portano parte del genoma fagico;

4) I fagi che danno trasduzione generalizzata possono trasdurre anche plasmidi.

a. La trasduzione generalizzata



Nel corso del montaggio delle particelle virali può accadere che, per errore, in alcune teste entri DNA batterico anziché virale.

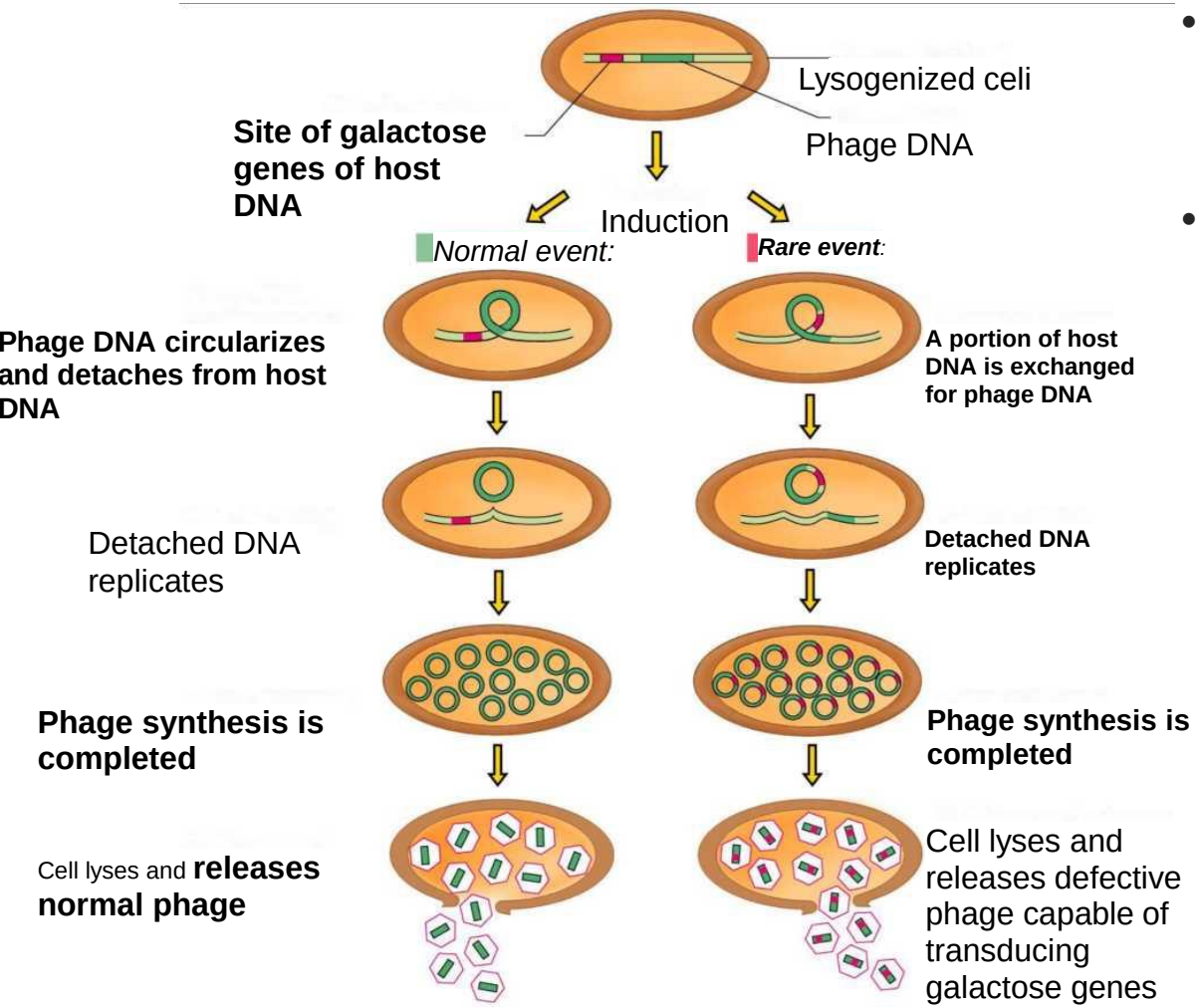
Tali particelle all'atto dell'infezione iniettano nel batterio ricevente il DNA ricevuto per errore

Il **frammento di DNA trasdotto , una volta entrato nel batterio ricevente, può essere incorporato nel cromosoma mediante due o più crossing-over, sostituendosi così ad una parte del batterio ricevente.**

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

b. La trasduzione specializzata

- **La trasduzione specializzata viene operata solo da fagi temperati, e solo inseguito 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 *λdgal*, 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.

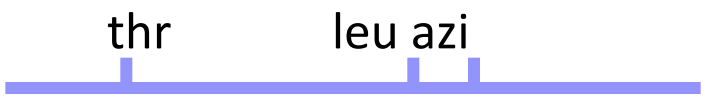
Mappatura di geni in E. coli sulla base della frequenza di cotrasduzione

- **Due loci vengono trasdotti insieme solo se sono molto vicini**

leu^+ thr^+ azi^R → leu thr azi^S

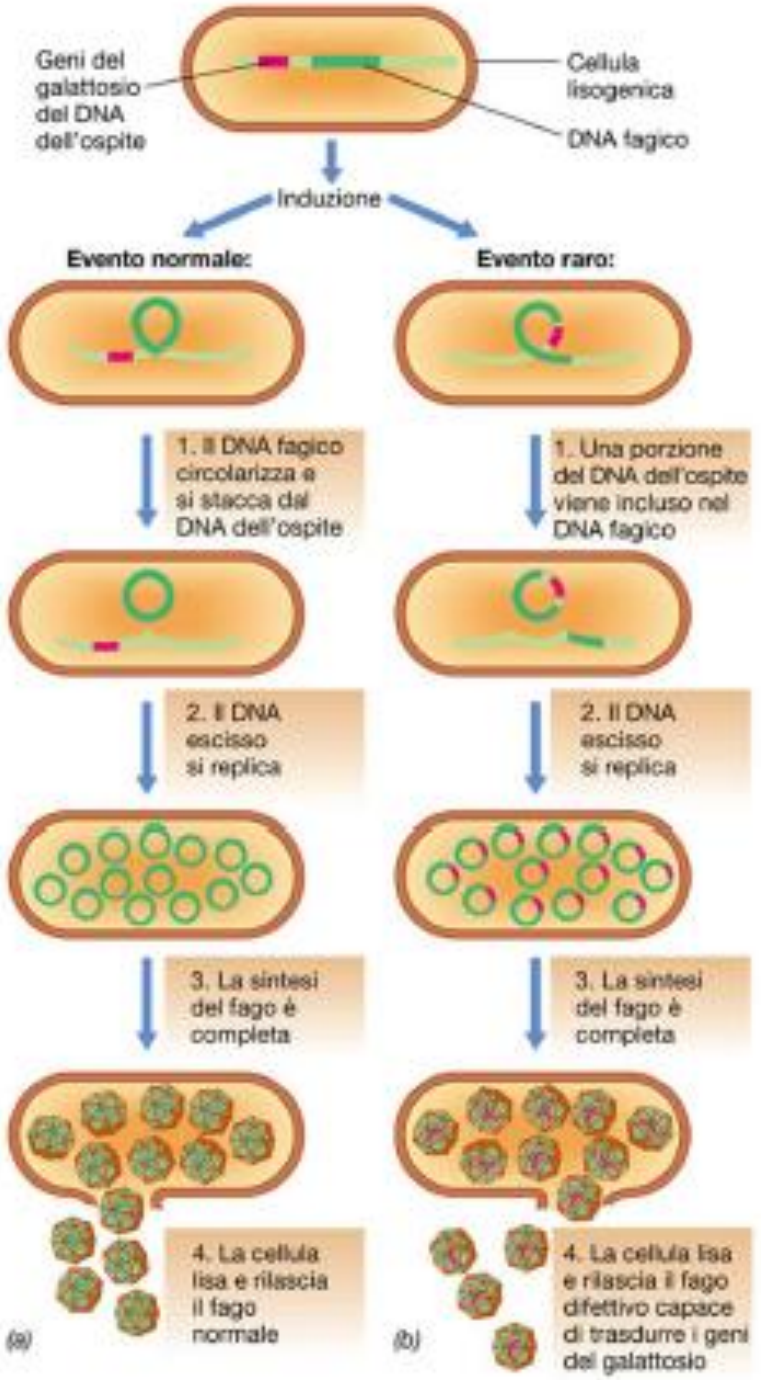
azi^R, azi^S = resistente o sensibile a sodio azide

Selezione per	Frequenza di cotrasduzione	
leu^+	thr^+ 0.02	azi^R 0.50
thr^+	leu^+ 0.03	azi^R 0.00
azi^R	leu^+ 0.48	thr^+ 0.00



3 TRASDUZIONE

Riassumendo:



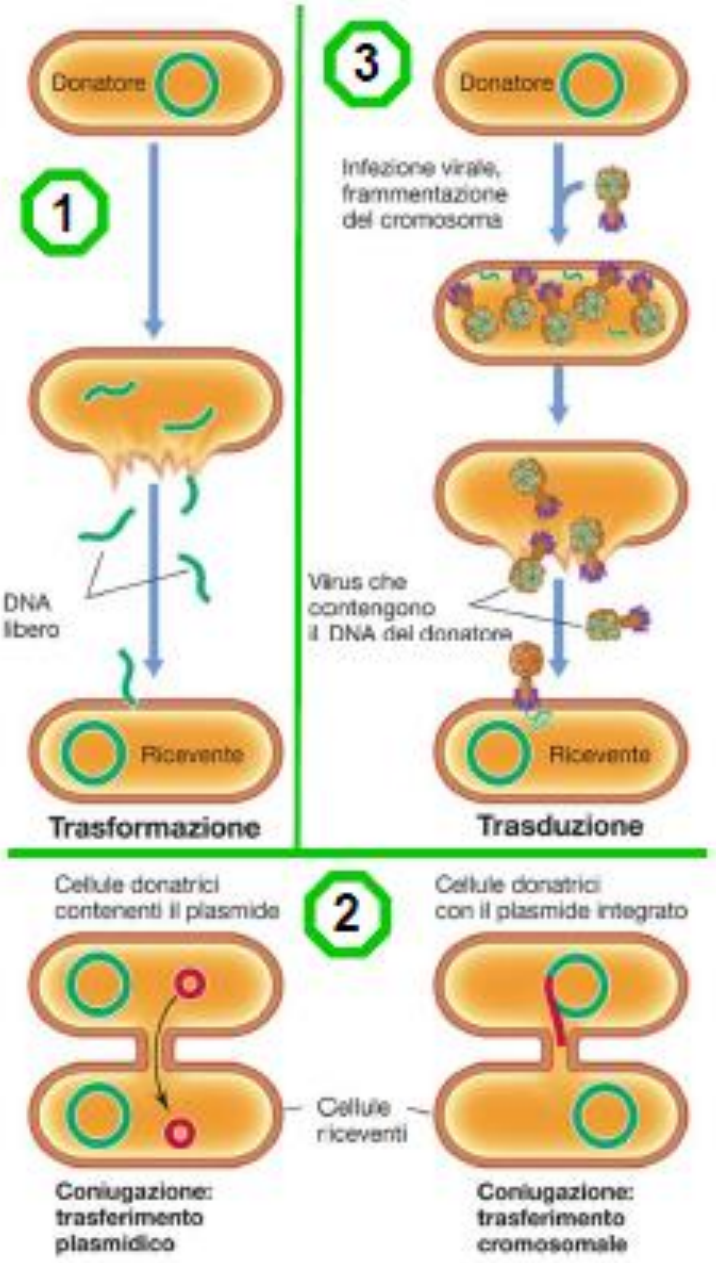
➢ Riassumendo:

I processi di ricombinazione genetica nei batteri sono dunque tre:

1. **Trasformazione:** acquisizione di DNA libero dall'ambiente.

2. **Coniugazione**: processo di trasferimento di DNA da un cellula ad un'altra mediato da plasmidi.

3. **Trasduzione**: processo di trasferimento di DNA da una cellula all'altra mediato da batteriofagi.



Riassunto

- I batteri possono scambiarsi tratti di DNA tramite trasformazione, coniugazione e trasduzione
- Trasformazione e trasduzione non richiedono un contatto fra ceppi batterici vivi, la coniugazione sì
- La sessualità nella coniugazione è determinata dalla presenza e dalla localizzazione di un fattore F
- Esperimenti di interruzione della coniugazione permettono di mappare genomi batterici
- La ricombinazione batterica può anche essere mediata da batteriofagi: trasduzione generalizzata e specializzata