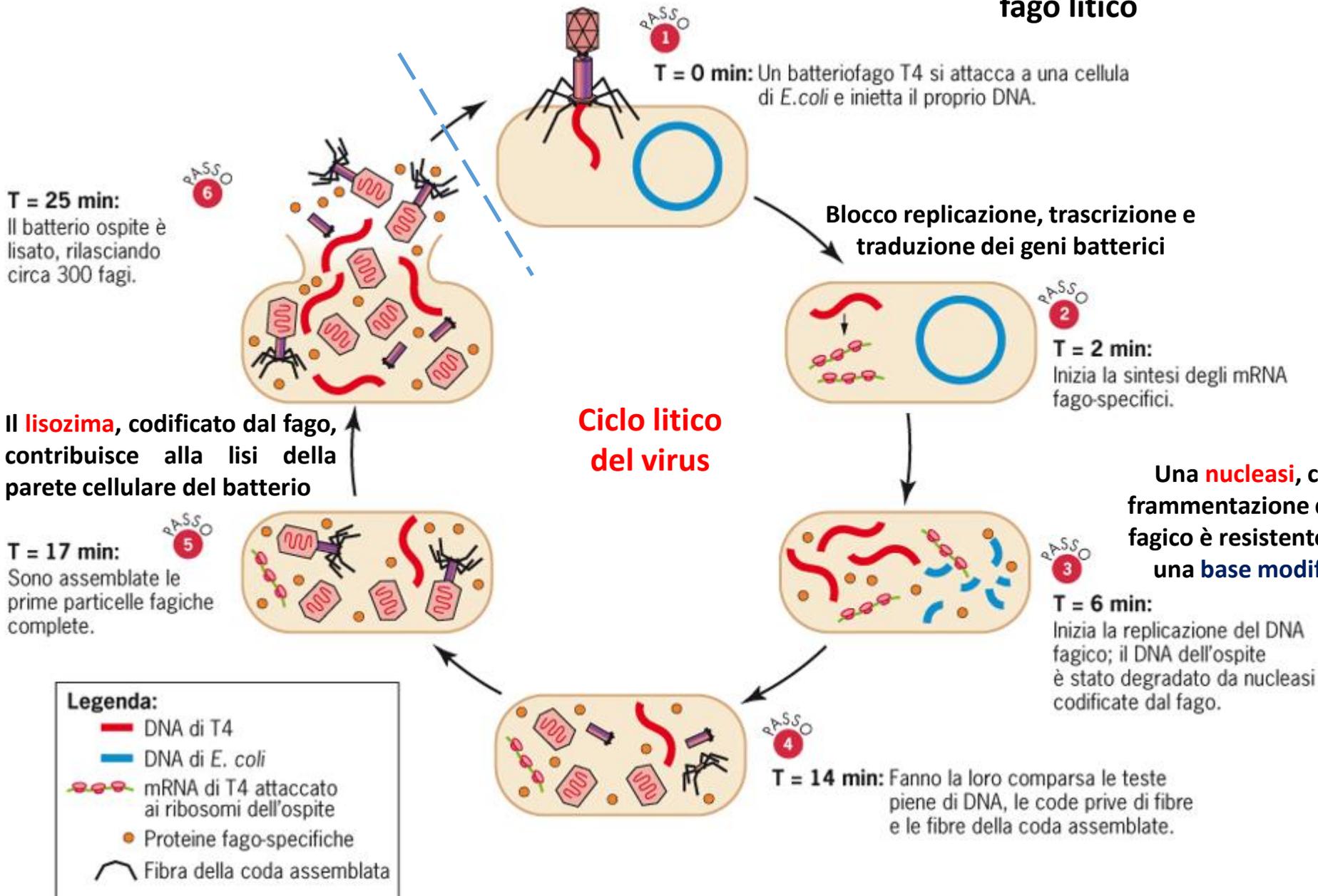
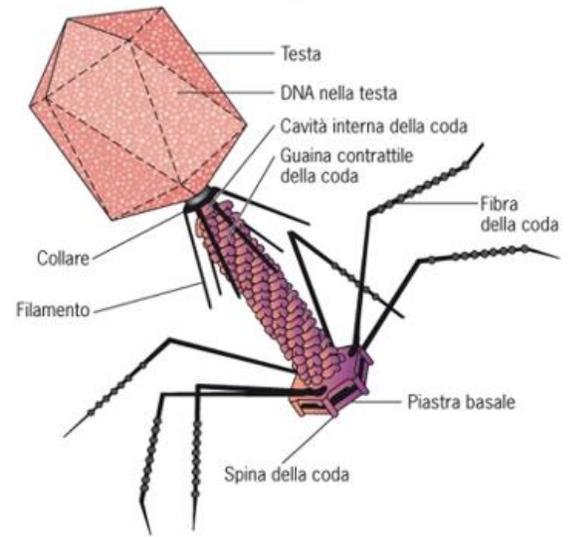


GENETICA VIRALE E BATTERICA

Fago t4 fago litico



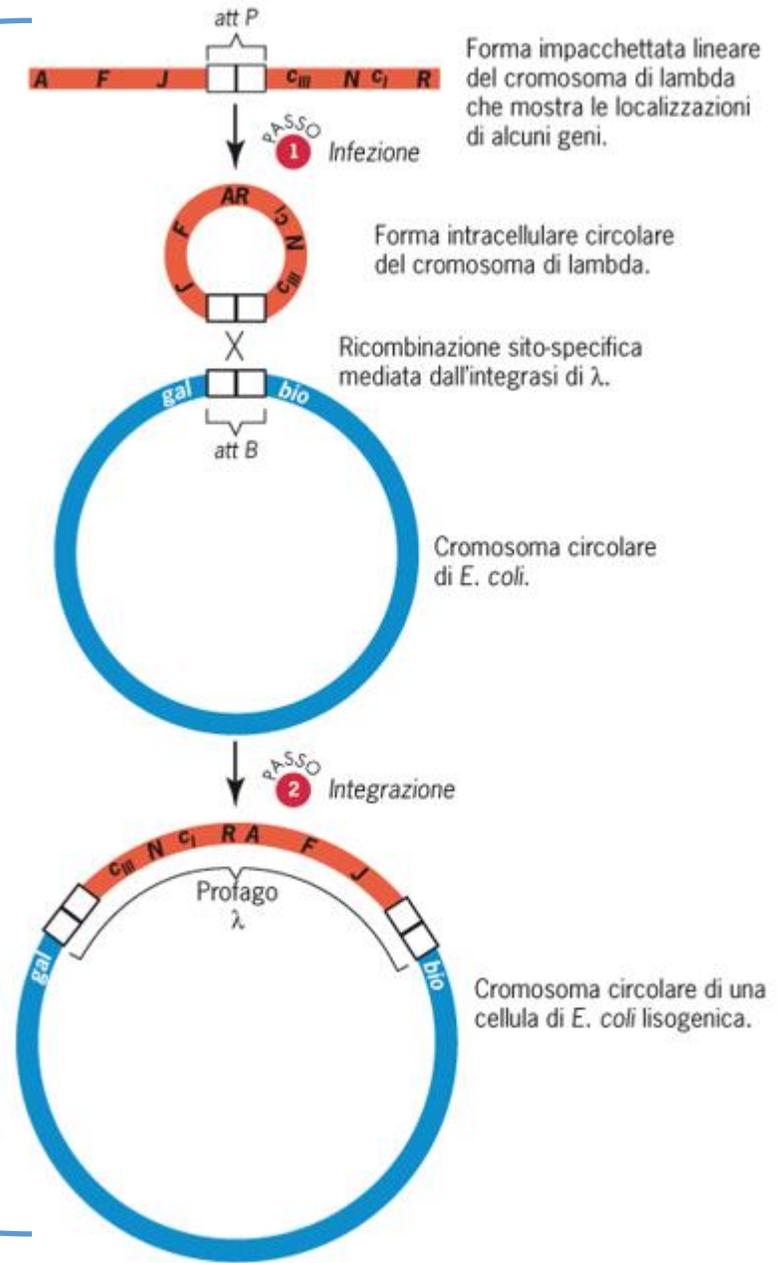
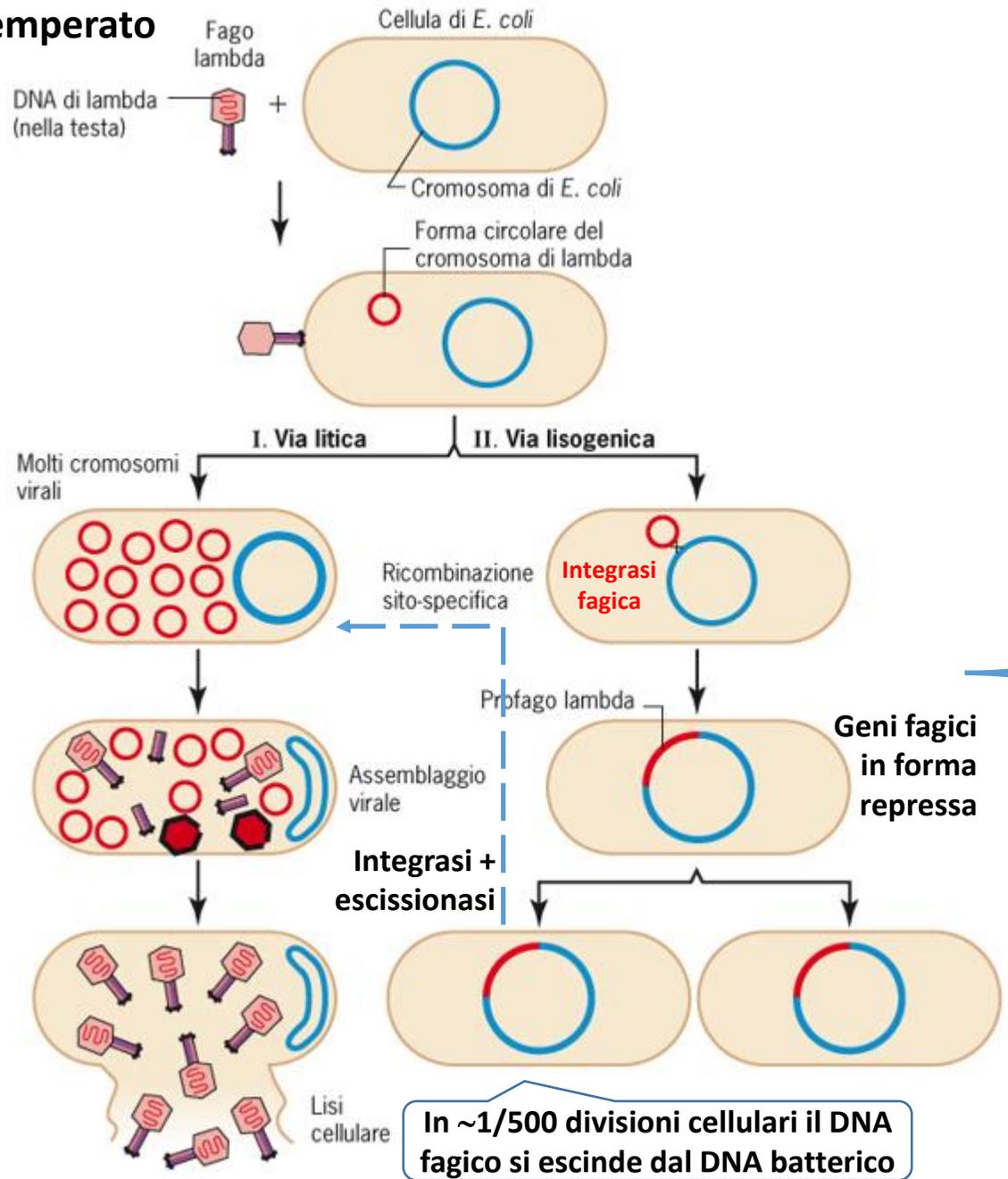
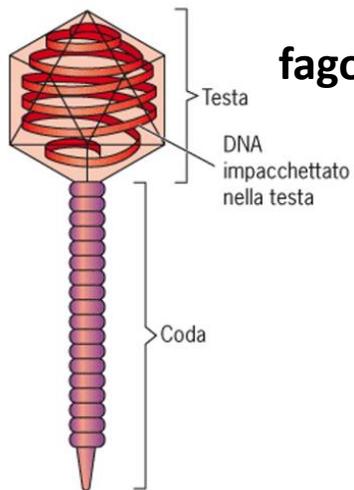
Legenda:

- DNA di T4
- DNA di *E. coli*
- mRNA di T4 attaccato ai ribosomi dell'ospite
- Proteine fago-specifiche
- Fibra della coda assemblata

Una **nucleasi**, codificata dal fago, induce una frammentazione del cromosoma cellulare. Il DNA fagico è resistente alla nucleasi per la presenza di una **base modificata (5-metil-idrossicitosina)**

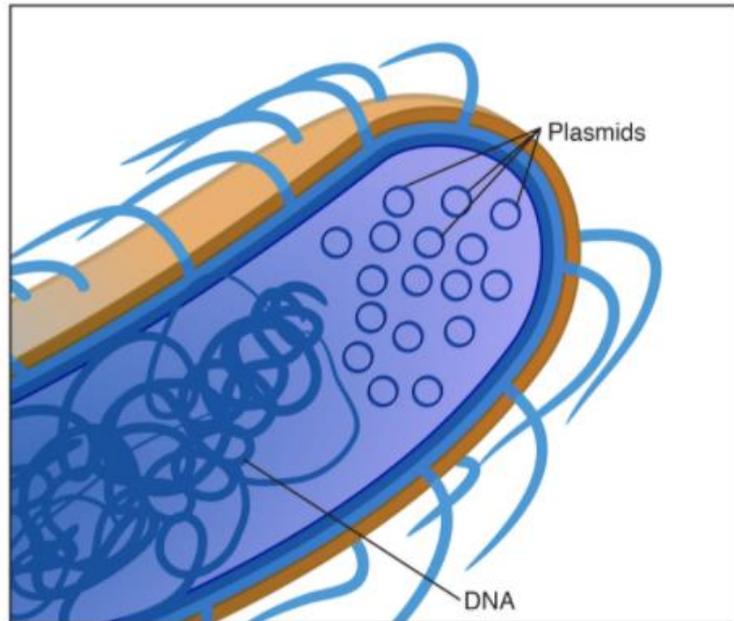
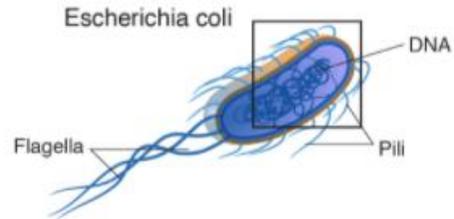
Fago λ

fago temperato



Batteri

- Monoploidi
- Possiedono, di solito, un solo **cromosoma**
- Possiedono uno o più **plasmidi**
- Si riproducono per **scissione binaria**
- **Non si riproducono sessualmente**
- Non presentano fenomeni di condensazione mitotica o meiotica
- Presentano **processi parasessuali** basati su eventi di **ricombinazione**
- ...



Escherichia coli

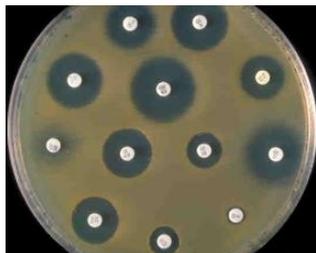
Mutazioni
possono indurre cambiamenti



Morfologia del batterio
Morfologia colonia
Velocità di crescita
Attività enzimatiche
Capacità di utilizzare carboidrati
...

$lac^+ \rightarrow Lac^+$ (fenotipo)
 $lac^- \rightarrow Lac^-$ (fenotipo)
...

Mutanti auxotrofi → ceppi incapaci di sintetizzare un enzima necessario per la produzione di una sostanza necessaria alla crescita ($trp^- \rightarrow Trp^-$).



Mutanti resistenti agli antibiotici → ceppi capaci di crescere in presenza di antibiotici ($amp^+ \rightarrow Amp^+$). I geni per la resistenza agli antibiotici possono essere utilizzati come **marcatori dominanti selezionabili**.

Eucarioti



Scambio genico reciproco (bidirezionale) tra cromosomi completi.

Eventi di **ricombinazione** nei batteri

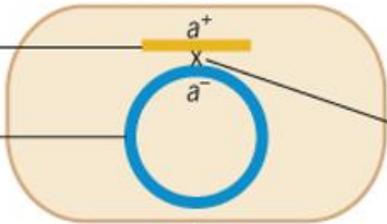


Trasferimento di geni, unidirezionale, da una cellula batterica ad un'altra.

Un evento di ricombinazione

Frammento del cromosoma della cellula donatrice

Cromosoma circolare integro della cellula ricevente



PASSO

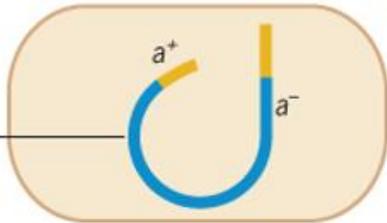
1 Il trasferimento genico produce un batterio parzialmente diploide.

Singolo evento di ricombinazione

PASSO

2 Un singolo evento di ricombinazione tra il frammento lineare del donatore e il cromosoma circolare integro del ricevente produce un cromosoma lineare instabile.

Cromosoma ricombinante lineare instabile

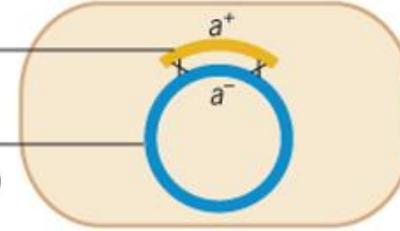


(b)

Due eventi di ricombinazione

Frammento del cromosoma della cellula donatrice

Cromosoma circolare integro della cellula ricevente

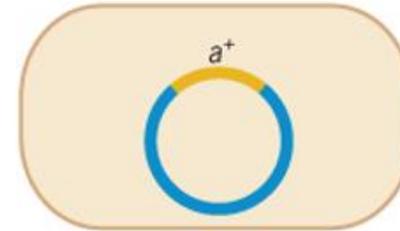


PASSO

1 Il trasferimento genico nei batteri produce una cellula ricevente parzialmente diploide che contiene un frammento del cromosoma della cellula donatrice.

PASSO

2 2 eventi di ricombinazione inseriscono un segmento del cromosoma della cellula donatrice nel cromosoma circolare integro della cellula ricevente. Il frammento del DNA ricevente che è stato sostituito viene degradato.

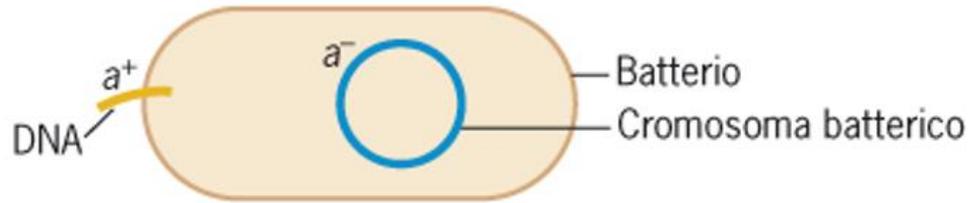


(a)

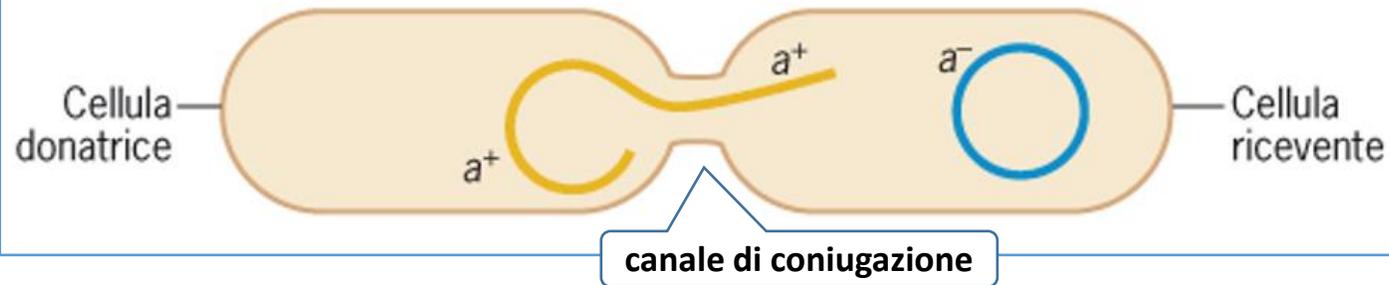
Eventi di ricombinazione in numero dispari generano **cromosomi ricombinanti instabili**, incompatibili con la sopravvivenza della cellula batterica.

TRASFERIMENTO GENICO NEI PROCARIOTI (TGO) (processi parasessuali)

Trasformazione: assorbimento di DNA libero.



Coniugazione: trasferimento diretto di DNA da un batterio a un altro.



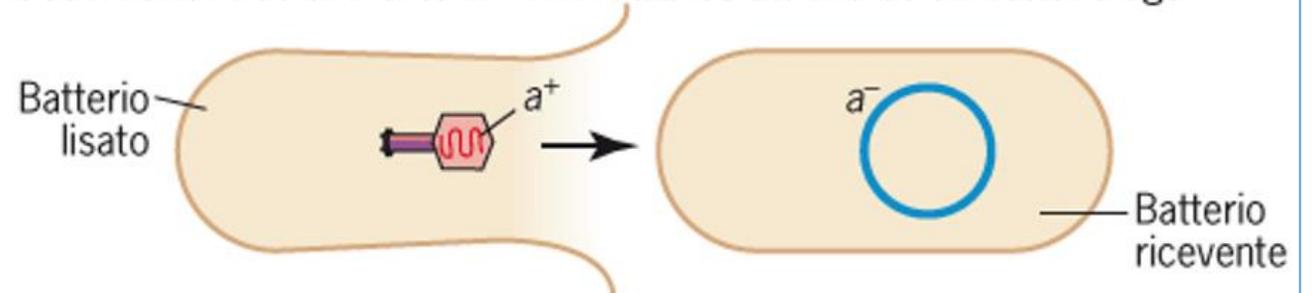
I **procarioti non hanno riproduzione sessuale**, ma partecipano ad un diffuso trasferimento genico orizzontale (HGT → *horizontal gene transfer*), acquisendo DNA da microrganismi diversi. Il TGO è una forza fondamentale che, contribuendo alla diversificazione ed all'adattamento, è alla base dell'**evoluzione batterica!**

Distinzione tra i tre processi parasessuali nei batteri

| Processo di ricombinazione | Criteri | |
|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| | Contatto cellulare richiesto? | Sensibile alla DNasi? |
| Trasformazione | no | sì |
| Coniugazione | sì | no |
| Trasduzione | no | no |

Tra i diversi meccanismi di trasferimento genico, la trasduzione è quello che, forse, avviene in tutte le specie batteriche.

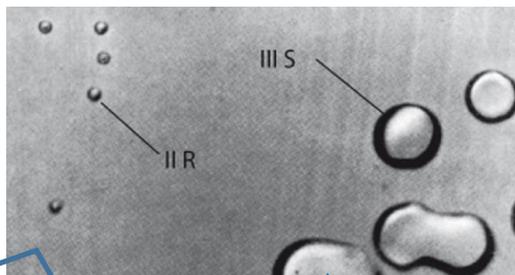
Trasduzione: trasferimento di DNA batterico attraverso un batteriofago.



TRASFORMAZIONE

Streptococcus pneumoniae (cocco Gram positivo)

Può produrre una **capsula polisaccaridica** che protegge la cellula batterica dal riconoscimento da parte dei globuli bianchi dell'ospite.

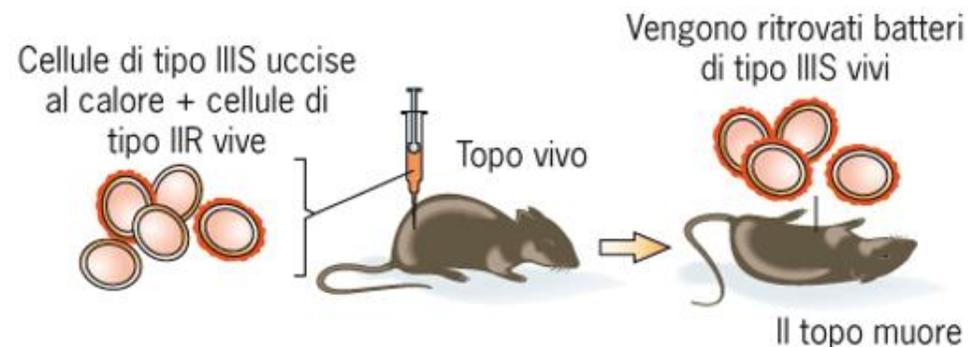
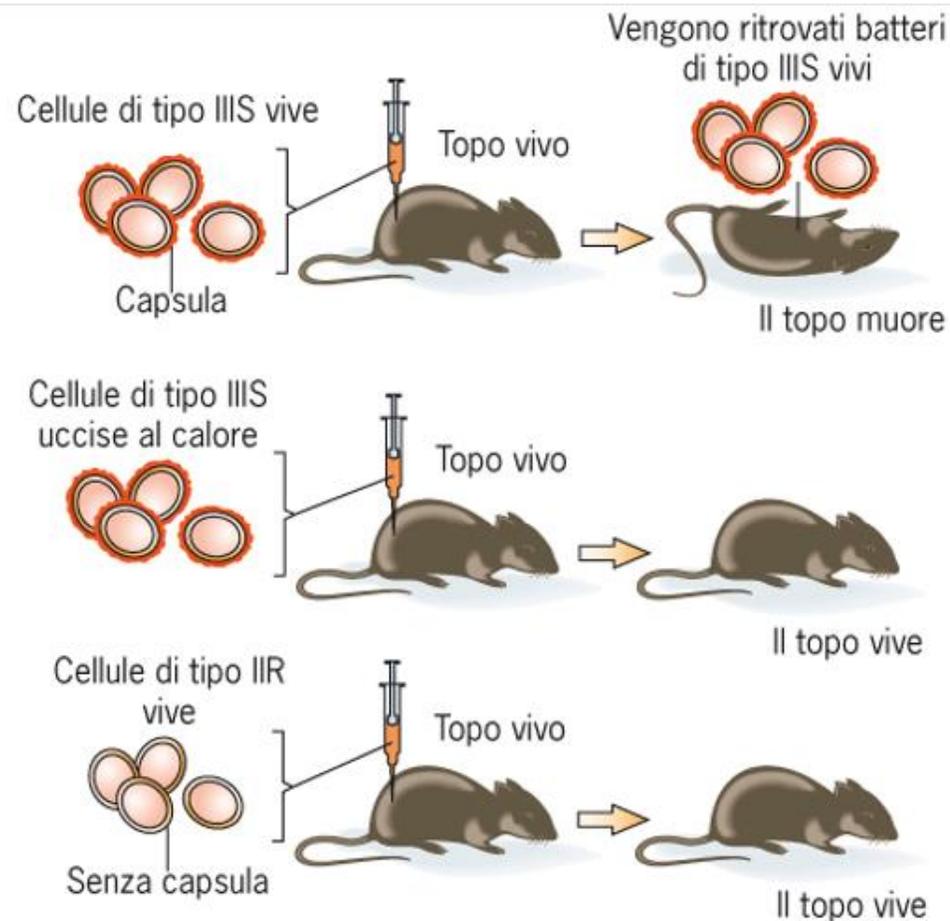


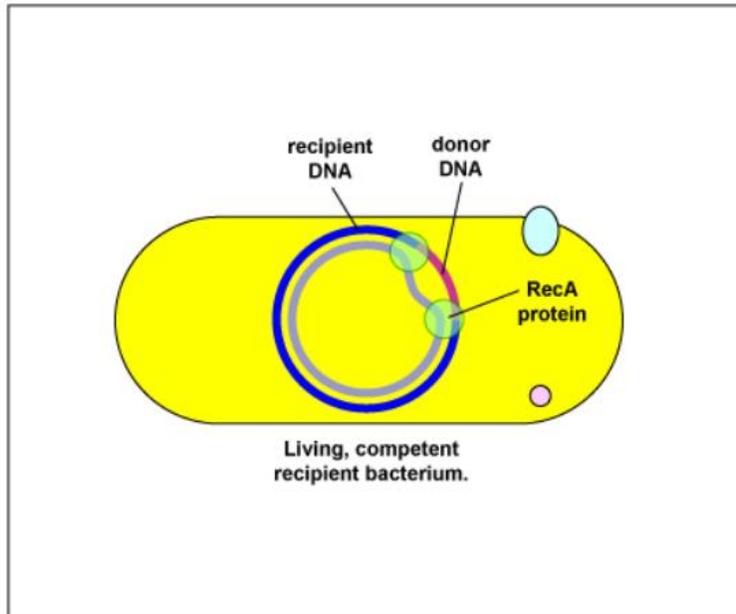
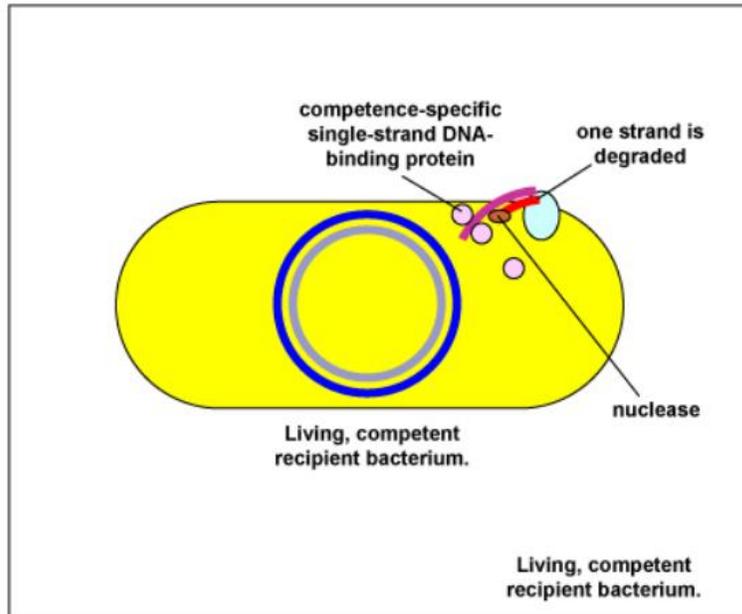
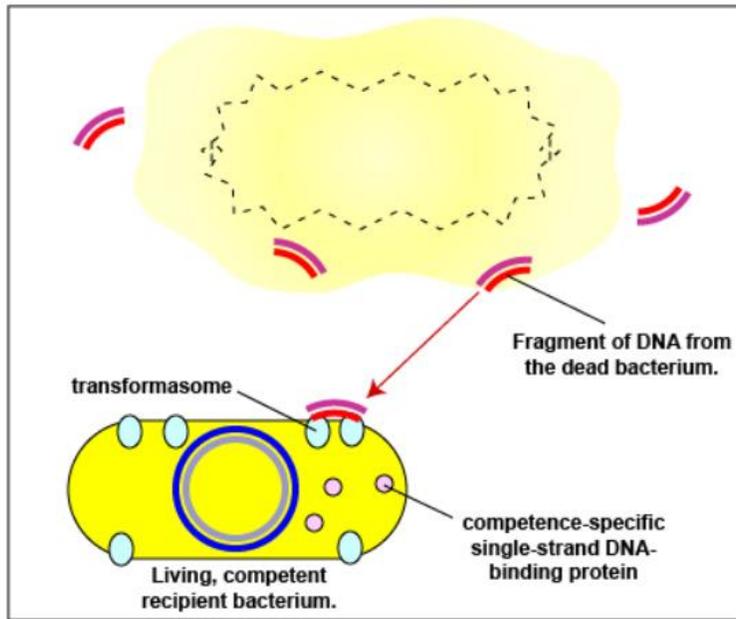
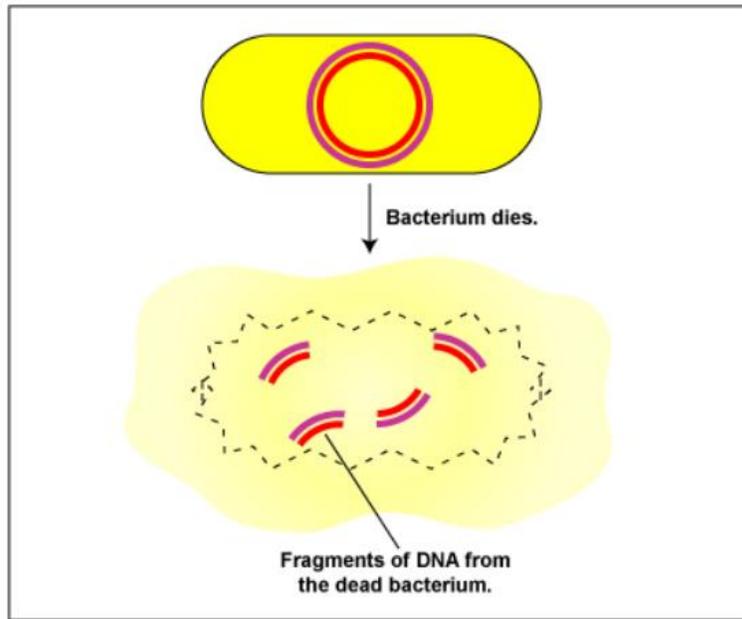
Colonie con cellule di **tipo R** non capsulate
 ↑
 blocco dei geni responsabili della sintesi della capsula.

Colonie lisce, con capsula

Gli pneumococchi possono presentare capsule antigenicamente diverse (tipo I, II, III, ...).

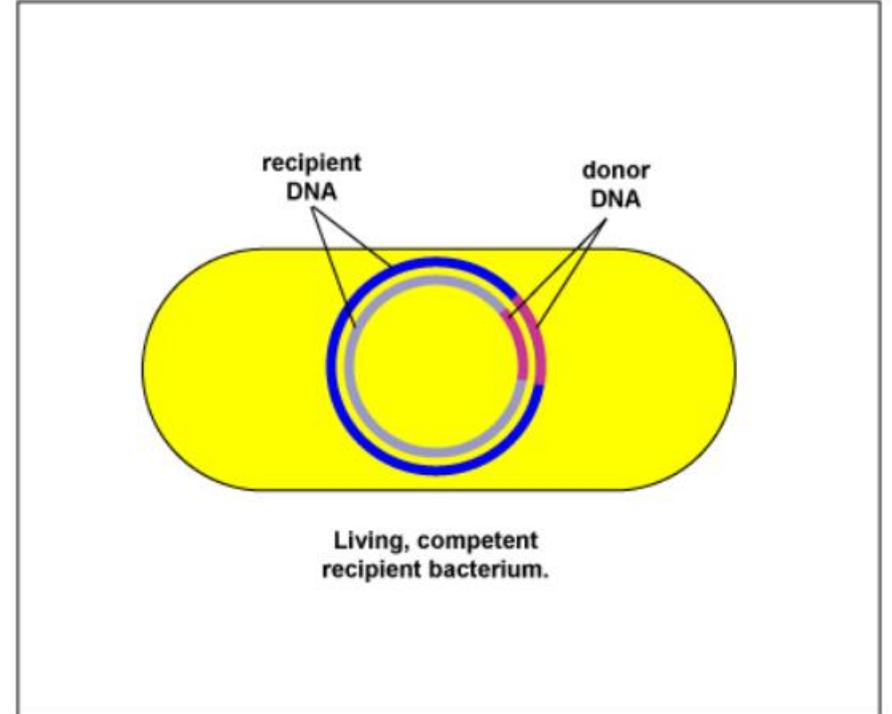
| Sierotipo | morfologia colonia | capsula | virulenza |
|-----------|--------------------------|----------|------------|
| IIR | rugosa (<i>rough</i>) | assente | avirulento |
| IIS | liscia (<i>smooth</i>) | presente | virulento |
| IIIR | rugosa (<i>rough</i>) | assente | avirulento |
| IIIS | liscia (<i>smooth</i>) | presente | virulento |





La trasformazione è una forma di **ricombinazione genetica** in cui un frammento di DNA di un batterio morto e degradato entra in un **batterio ricevente competente** e sostituisce un pezzo di DNA del ricevente. La trasformazione, di solito, consiste in una ricombinazione tra regioni omologhe del DNA (aventi quasi le stesse sequenze nucleotidiche). In genere, si tratta di ceppi batterici simili o di ceppi della stessa specie batterica.

I batteri competenti sono in grado di legare il DNA con maggiore efficienza rispetto ai non competenti. Alcuni batteri possono andare incontro ad autolisi, fornendo DNA per la ricombinazione omologa. Inoltre, alcuni batteri competenti sono in grado di uccidere le cellule non competenti per indurre il rilascio di DNA per la trasformazione.



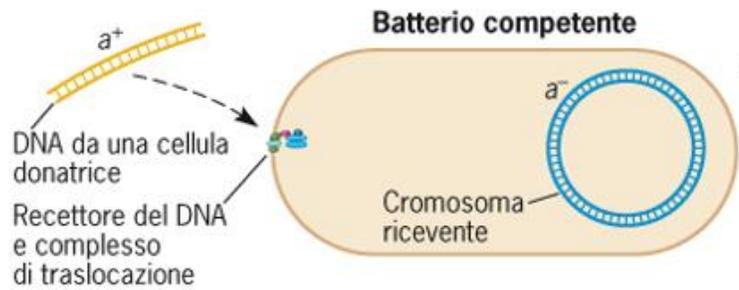
Molte specie batteriche legano DNA esogeno libero di qualsiasi origine →
 Specie batteriche che legano il *DNA della stessa specie o specie correlate* →

S. pneumoniae, B. subtilis, ...

H. influenzae, N. gonorrhoeae, ...

Lega DNA con una particolare
sequenza di 11 coppie di basi

Lega DNA con una particolare
sequenza di 10 coppie di basi

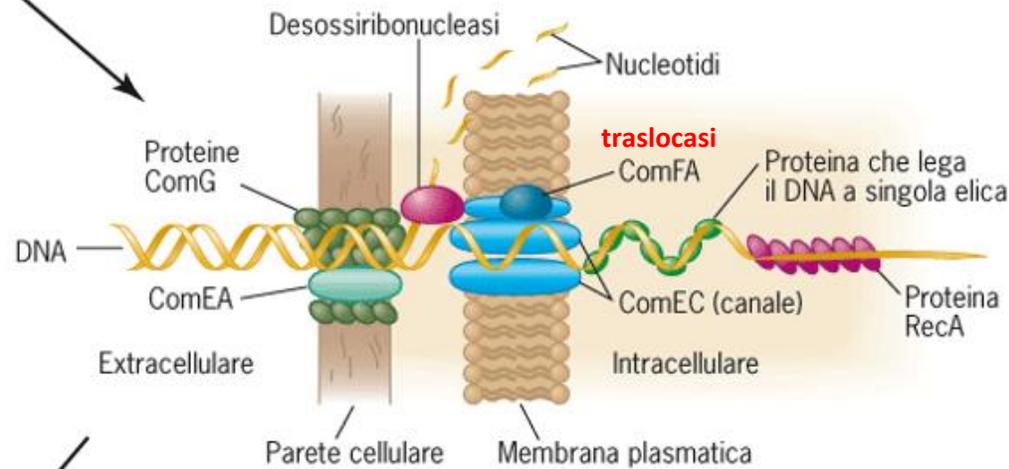


B. subtilis

1 Un batterio competente può legare il DNA esogeno e trasportarlo all'interno della cellula.

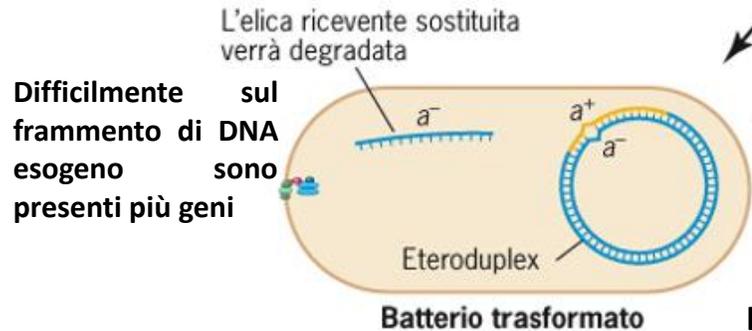
Per poter captare frammenti di DNA esogeno la cellula deve essere nello stato «**competente**».

2 Il DNA esogeno è legato al complesso recettore dalle proteine della competenza ComEA e ComG. Mentre il DNA viene spinto attraverso il canale composto dalla proteina ComEC nella membrana dalla traslocasi ComFA, un'elica del DNA è degradata da una desossiribonucleasi. L'altra elica viene stabilizzata da una proteina che lega il DNA a singolo filamento e dalla proteina RecA.



La competenza è legata all'espressione di **geni** che codificano proteine necessarie a legare il DNA esogeno (**proteine della competenza: Com**).

I geni della competenza sono espressi in seguito alla produzione di piccoli peptidi (**feromoni**).



Batterio trasformato

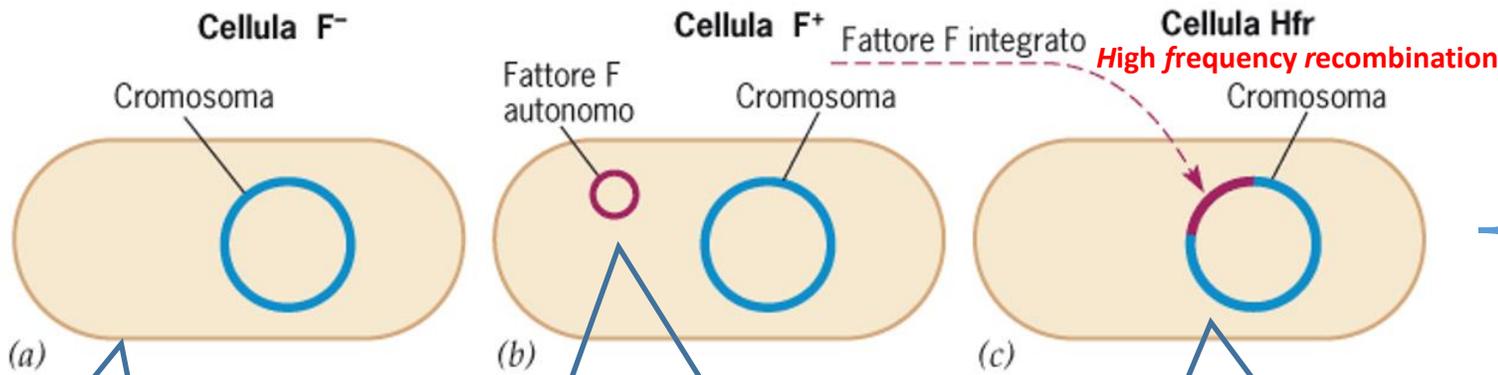
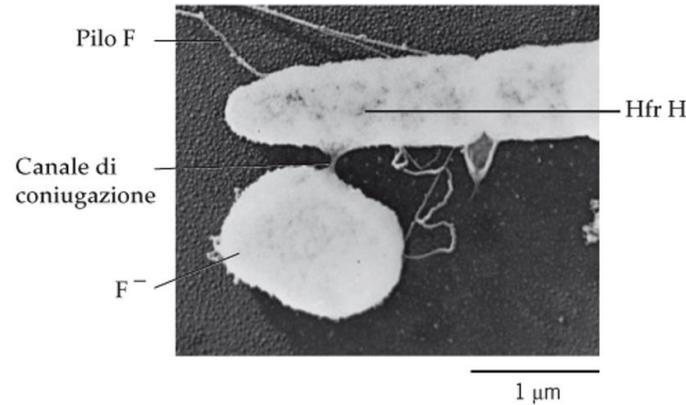
3 Il singolo filamento del DNA donatore viene integrato nel cromosoma della cellula ricevente, producendo un DNA eteroduplex con alleli differenti sui due filamenti.

I geni della competenza sono organizzati in diversi **cluster** (cluster A, B, C, D, ...). Il primo gene di ogni cluster viene indicato con A, il secondo con B, ...

In seguito a divisione del batterio trasformato si formano due cellule con **DNA omoduplex**.

CONIUGAZIONE

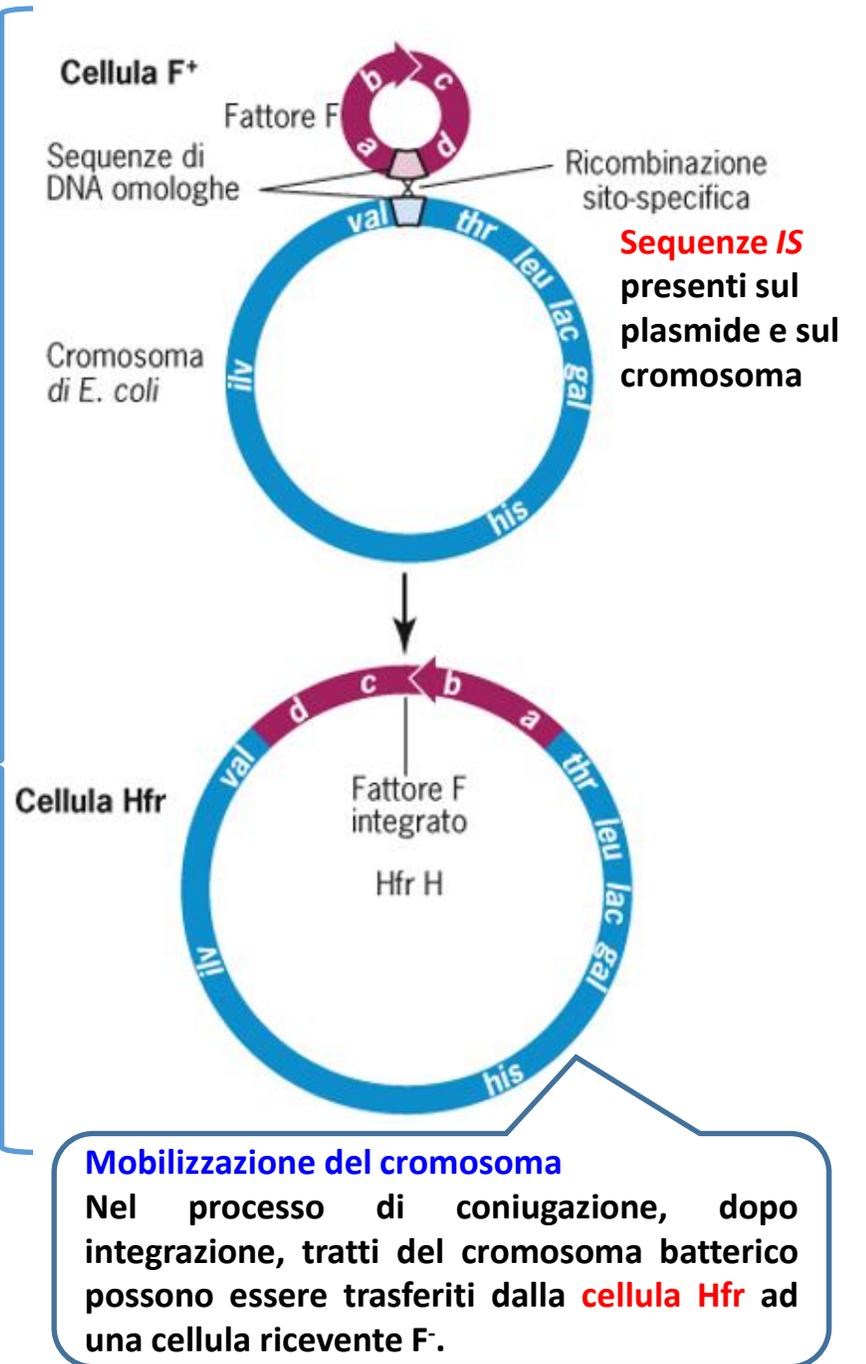
Il **pilo F**, la cui sintesi è sotto il controllo del **fattore F** (fertilità), ha la sola funzione di stabilire un **contatto cellula-cellula** e non interviene nel trasferimento del DNA. Il DNA viene trasferito, da una cellula all'altra, attraverso un **canale di coniugazione**.



Cellula priva di fattore F

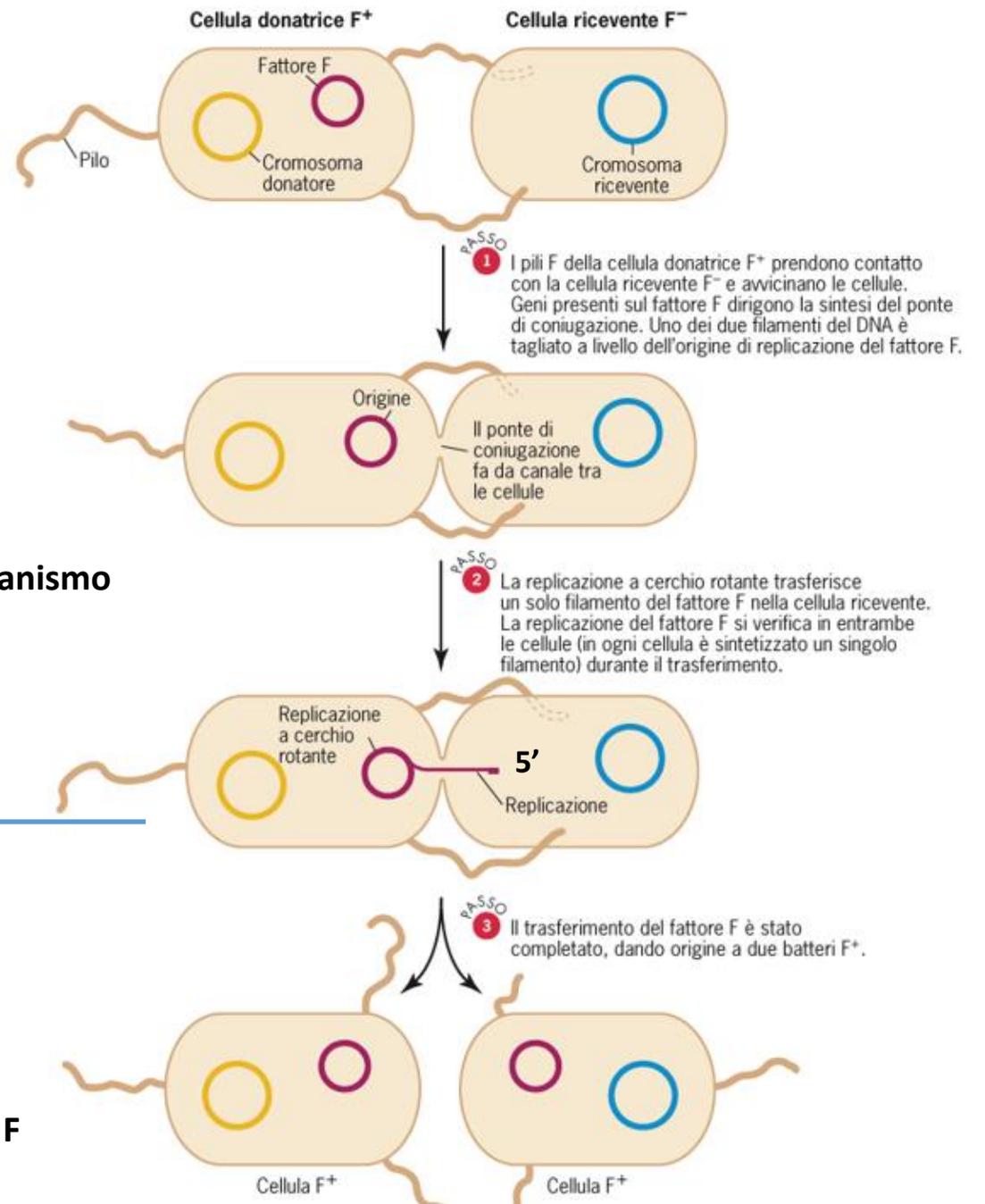
Il **fattore F** si replica **autonomamente**.
In seguito a coniugazione, viene trasferita solo una copia del fattore F; entrambe le cellule (donatrice e ricevente) avranno una copia del fattore F.

Cellula con il fattore F integrato nel cromosoma del batterio (**cellula Hfr**)

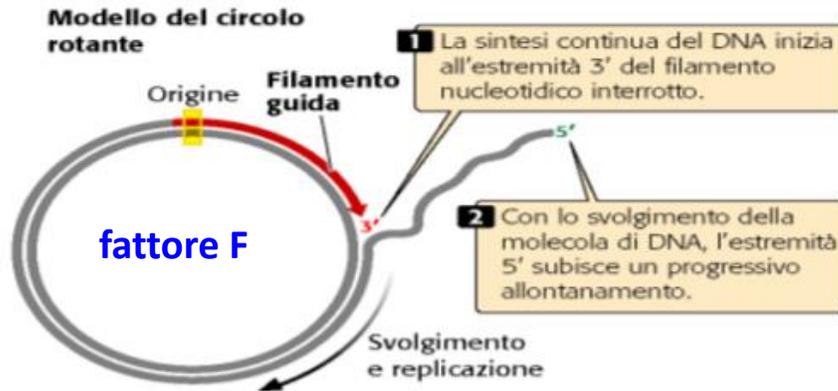


Mobilizzazione del cromosoma
Nel processo di coniugazione, dopo integrazione, tratti del cromosoma batterico possono essere trasferiti dalla **cellula Hfr** ad una cellula ricevente F⁻.

Coniugazione tra cellula F^+ (con fattore F autonomo) e cellula F^-

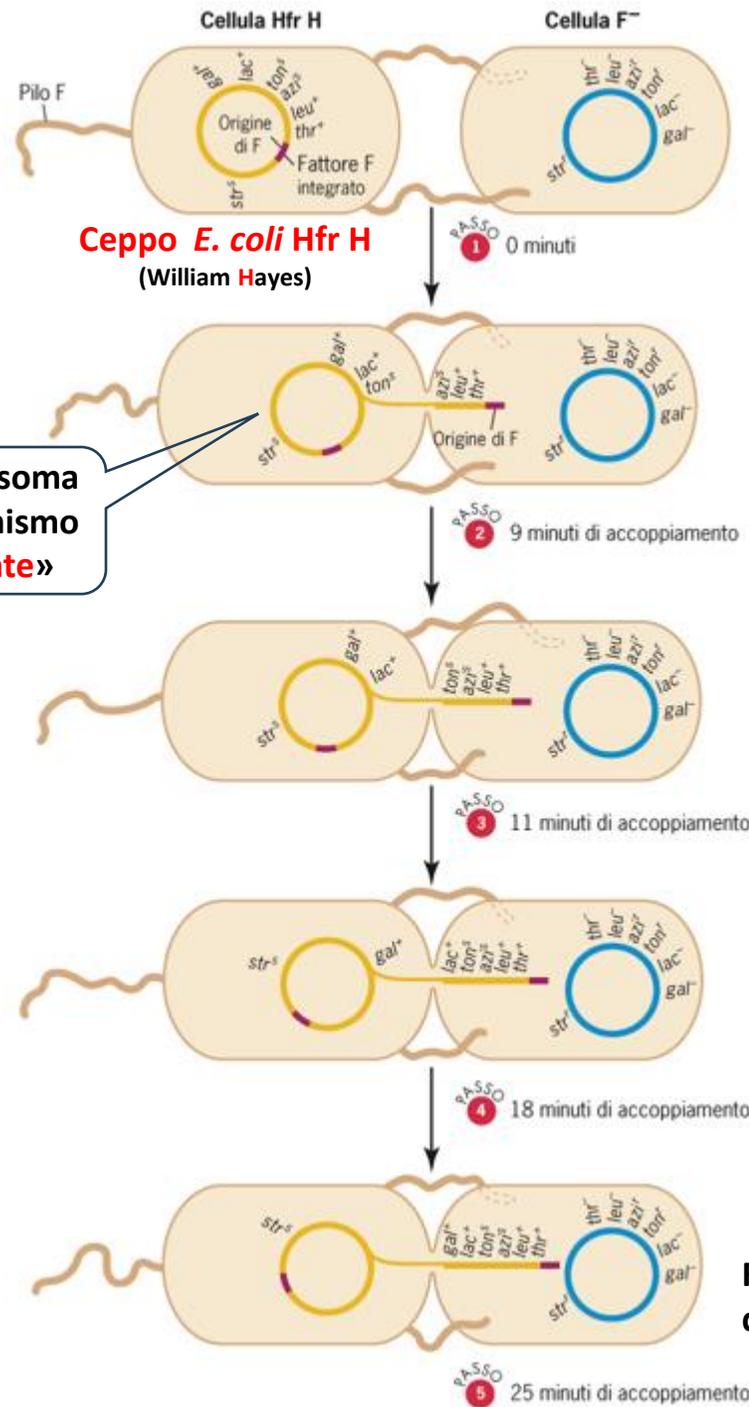


Trasferimento fattore F mediante meccanismo «**replicazione a cerchio rotante**»



Entrambe le cellule porteranno il fattore F

Coniugazione tra cellula con fattore F integrato nel cromosoma (Hfr) e cellula F⁻.



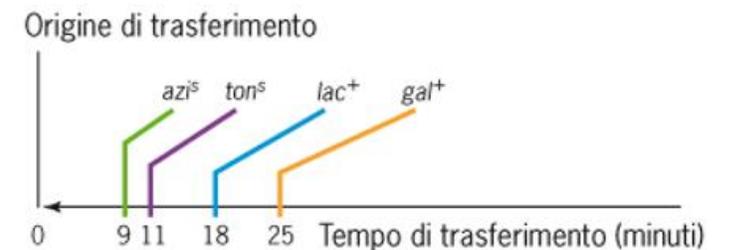
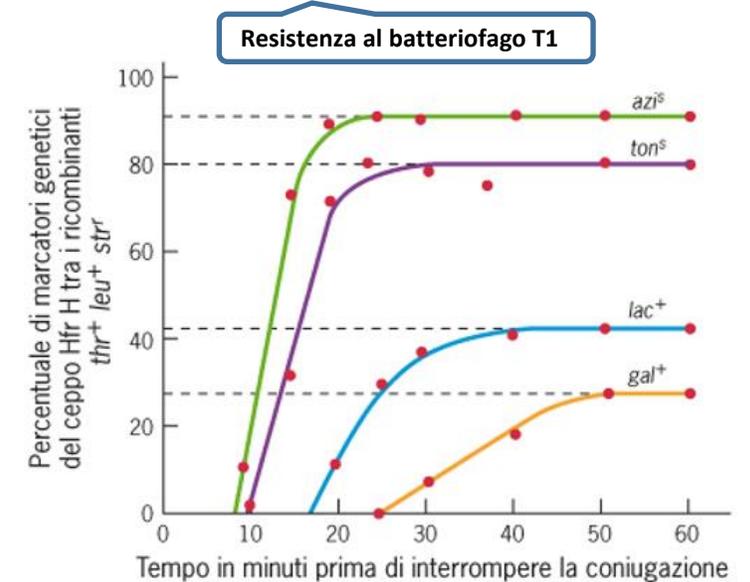
Esperimento coniugazione interrotta

(E. Wollam e F. Jacob 1957)

Interrompendo il processo di trasferimento a tempi diversi e valutando la comparsa dei ricombinanti è possibile risalire all'ordine dei geni sul cromosoma.

Ceppo Hfr H → *thr⁺ leu⁺ azi^s ton^s lac⁺ gal⁺ str^s*

Ceppo F⁻ → *thr⁻ leu⁻ azi^r ton^r lac⁻ gal⁻ str^r*



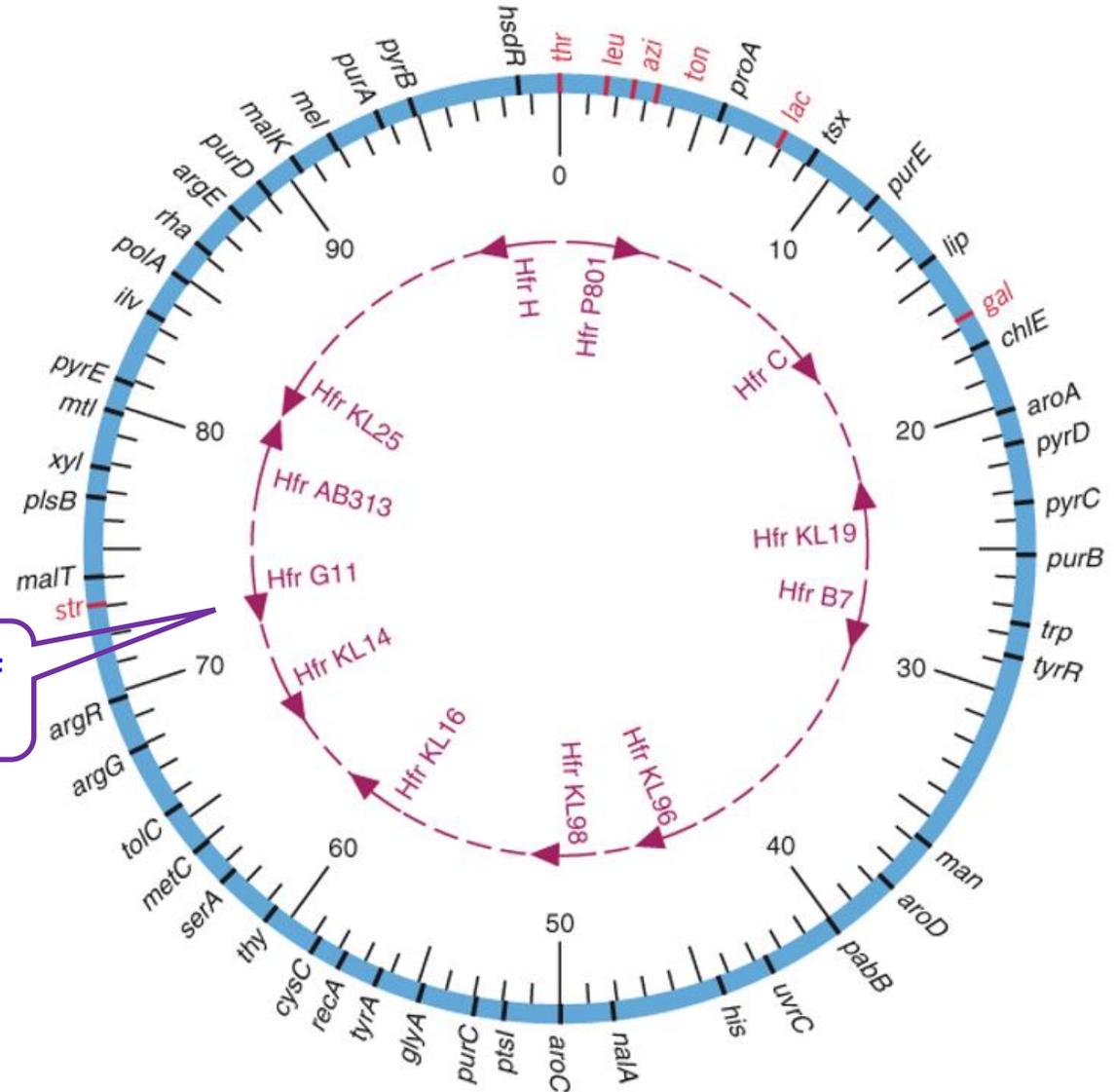
Raramente la cellula ricevente diventerà cellula F⁺.

A seconda di dove si inserisce il fattore F, il trasferimento genico può iniziare in punti diversi del cromosoma.

Anche l'orientamento (orario/antiorario) nel corso dell'inserzione sul cromosoma stabilisce lo schema di trasferimento dei geni durante la coniugazione.

Diversi punti di inserzione del fattore F nel cromosoma dei ceppi Hfr di *E. coli*.

Mappa di associazione circolare di *E. coli*



In *E. coli* sono stati identificati diversi tipi di **PLASMIDI**

- Fattori F (fertilità)
- Plasmidi R (resistenza agli antibiotici)
- Plasmidi Col (colicinogenici → produzione colicine)

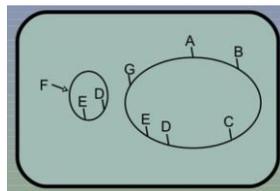
I fattori F, molti plasmidi R ed alcuni plasmidi Col conferiscono alle cellule la capacità di coniugare.

Plasmidi coniugativi

Rapida diffusione tra i batteri, anche di specie diverse, di geni presenti sui plasmidi

L'integrazione è possibile grazie alla presenza di brevi **sequenze di inserzione (IS)** presenti sia sul plasmide che sul cromosoma.

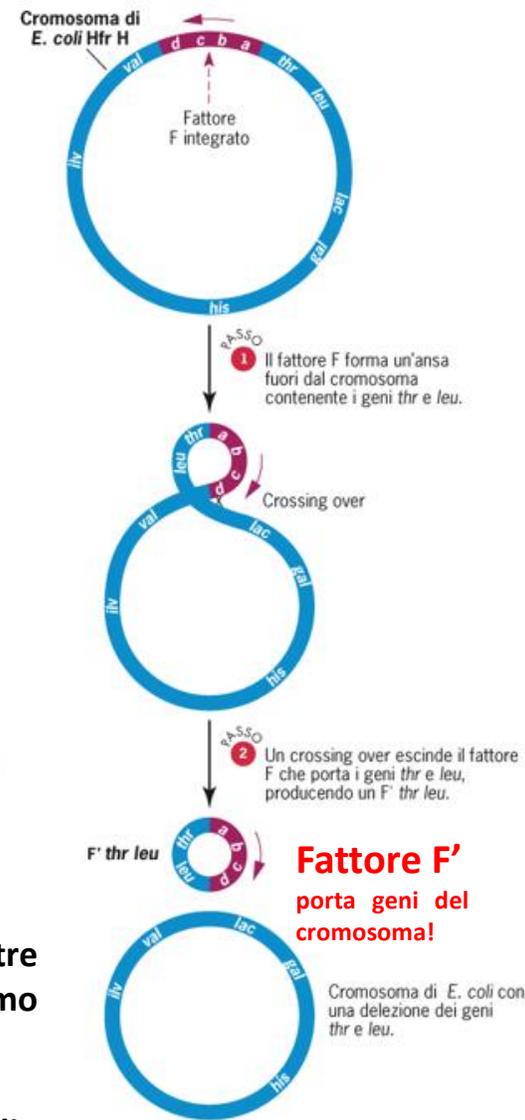
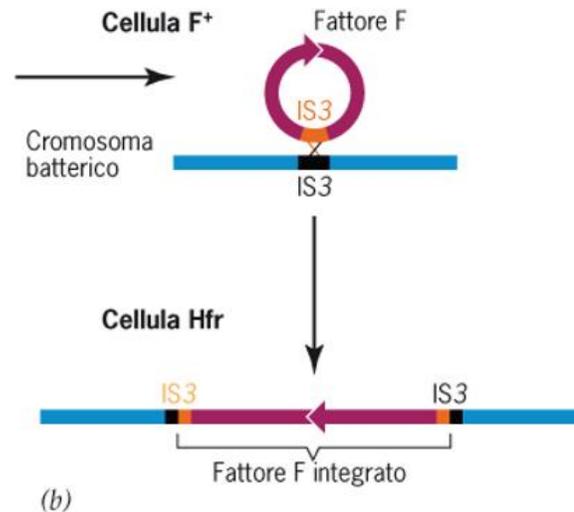
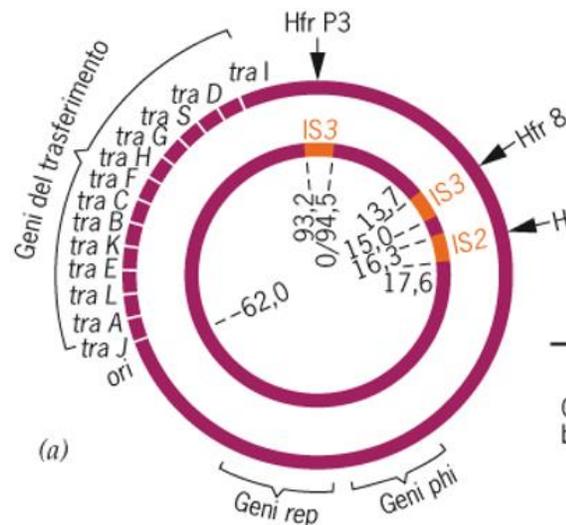
- Le IS sono trasponibili: possono spostarsi da un cromosoma ad un altro.
- Consentono la ricombinazione.
- Consentono la formazione dei ceppi Hfr.



Plasmidi che possono esistere sia in forma autonoma che in **forma integrata** in un cromosoma sono detti **EPISOMI**.

↓
Cellule Hfr

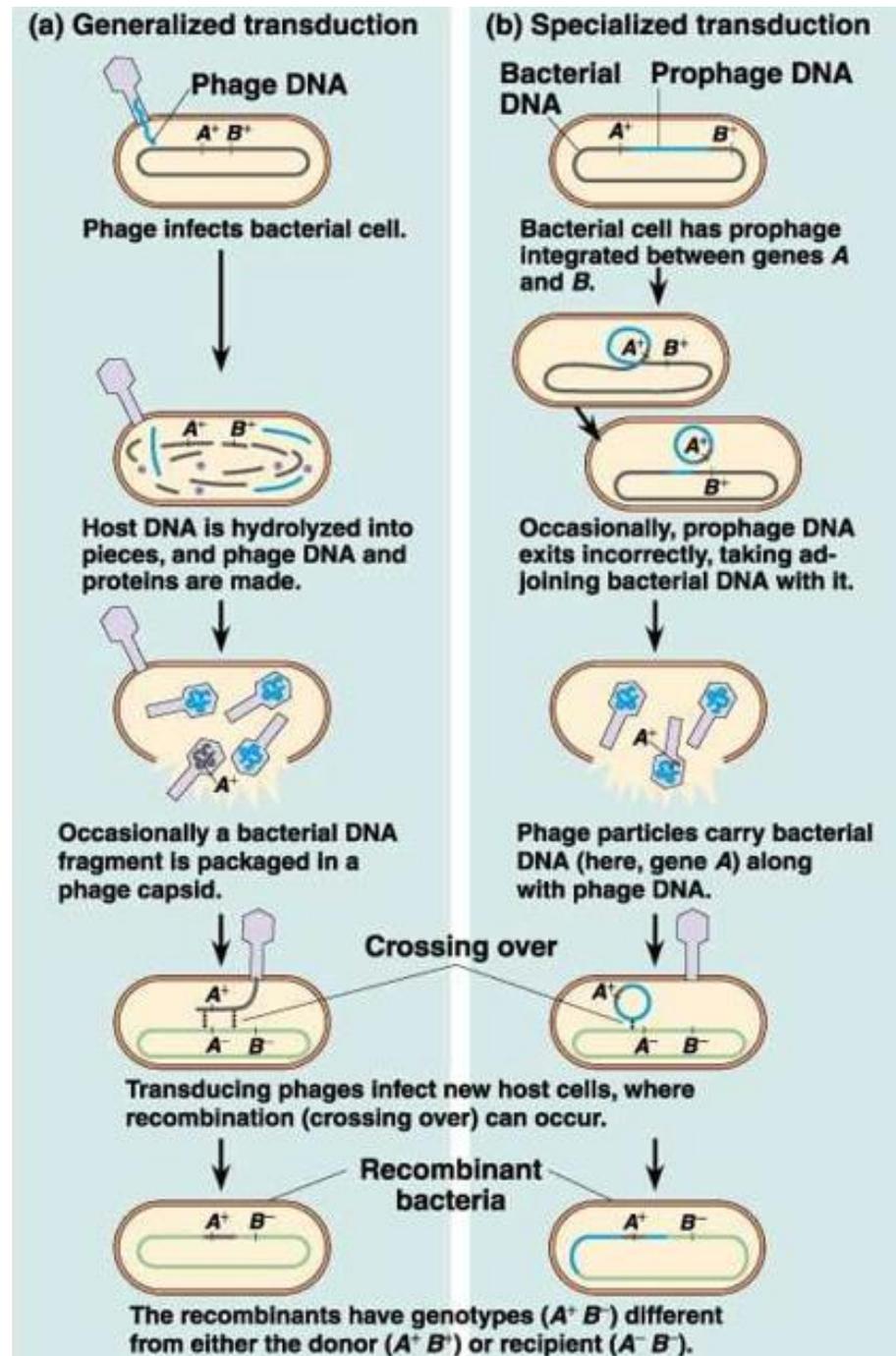
Diversi ceppi Hfr di *E. coli* K12



Il **fattore F'** può essere trasferito ad altre cellule mediante un meccanismo definito **seduzione**.

↓
Possono dare origine a diploidi parziali.

TRASDUZIONE



Nella **trasduzione generalizzata** le particelle fagiche contengono solo frammenti di DNA batterico.

Qualsiasi gene batterico può essere trasportato dal fago.

La trasduzione generalizzata è un processo poco efficiente



Un determinato **gene batterico** può essere trasdotto con una frequenza pari a $\sim 1/10^6$ particelle fagiche.

Nella **trasduzione specializzata** le particelle fagiche contengono **parte del DNA virale** e **parte del DNA batterico**.

A seconda del tipo di fago e del punto di inserzione, vengono trasferiti solo alcuni tipi di geni del cromosoma batterico.



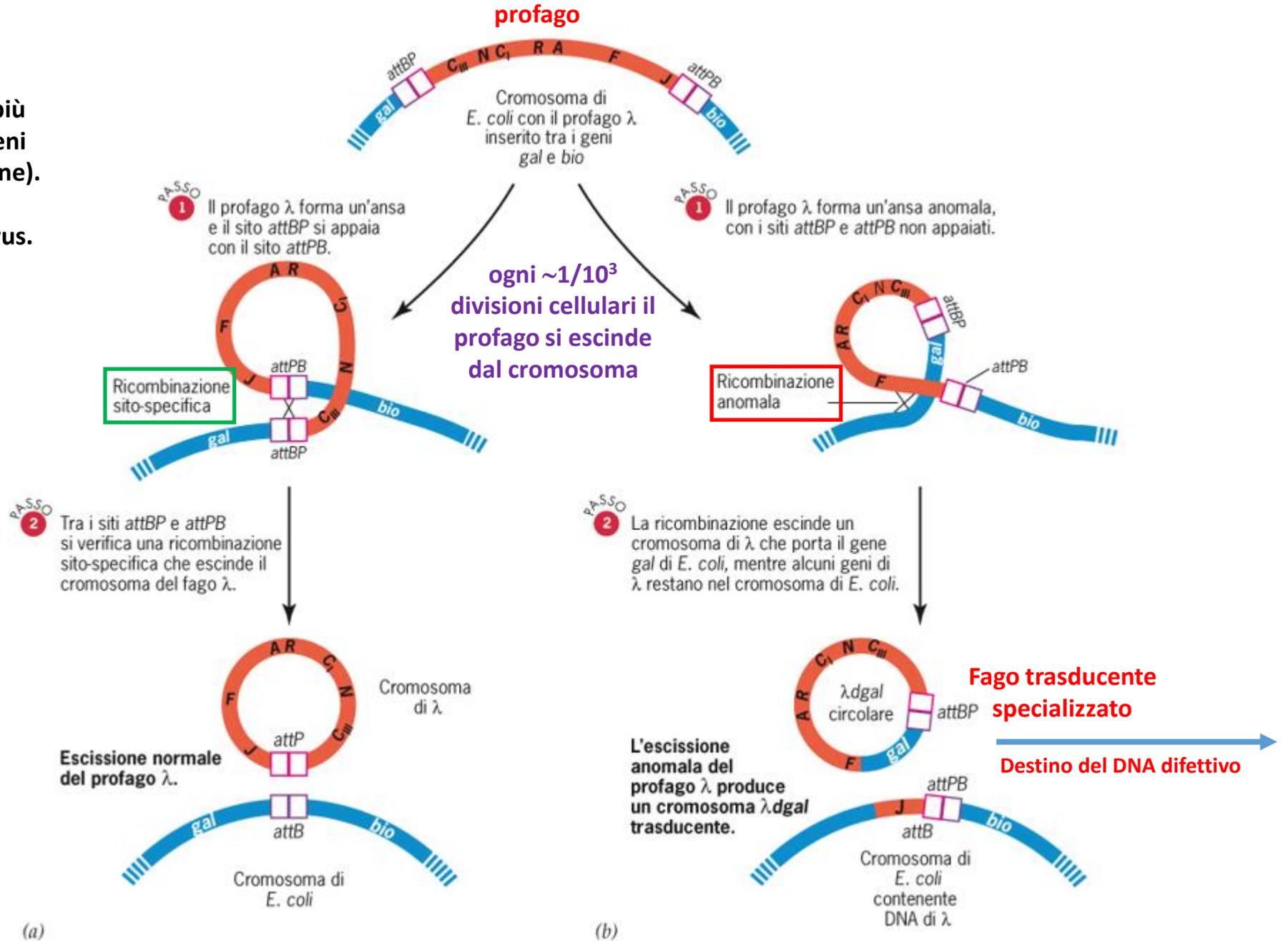
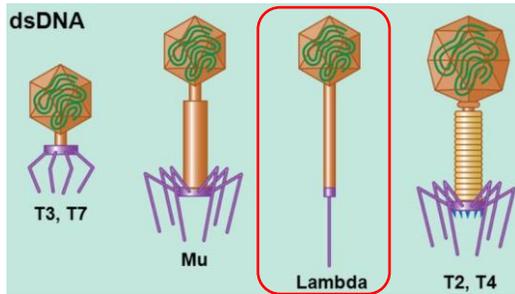
Integrazione sito-specifica del virus.

Il destino del DNA difettivo dipende dalla parte mancante del cromosoma virale.

TRASDUZIONE

Con il fago λ vengono trasferiti più frequentemente alcuni tipi di geni (quelli più vicini al sito di inserzione).

Integrazione sito-specifica del virus.

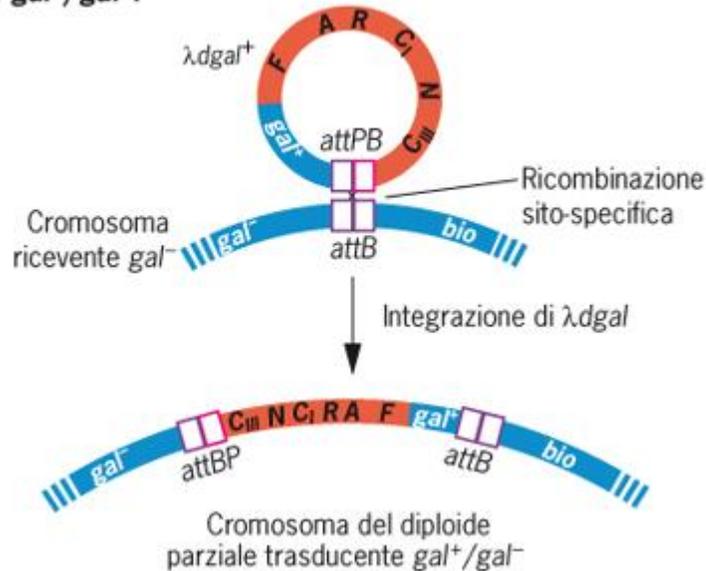


Destino del DNA difettivo

Se la **particella trasducente** difetta dei geni per il ciclo litico, ma porta i geni per l'**integrasi** ed il **sito att**, il DNA si può integrare nel cromosoma batterico ma non può replicarsi. La replicazione di questo fago può avvenire solo se è presente un altro fago selvatico (*helper*).

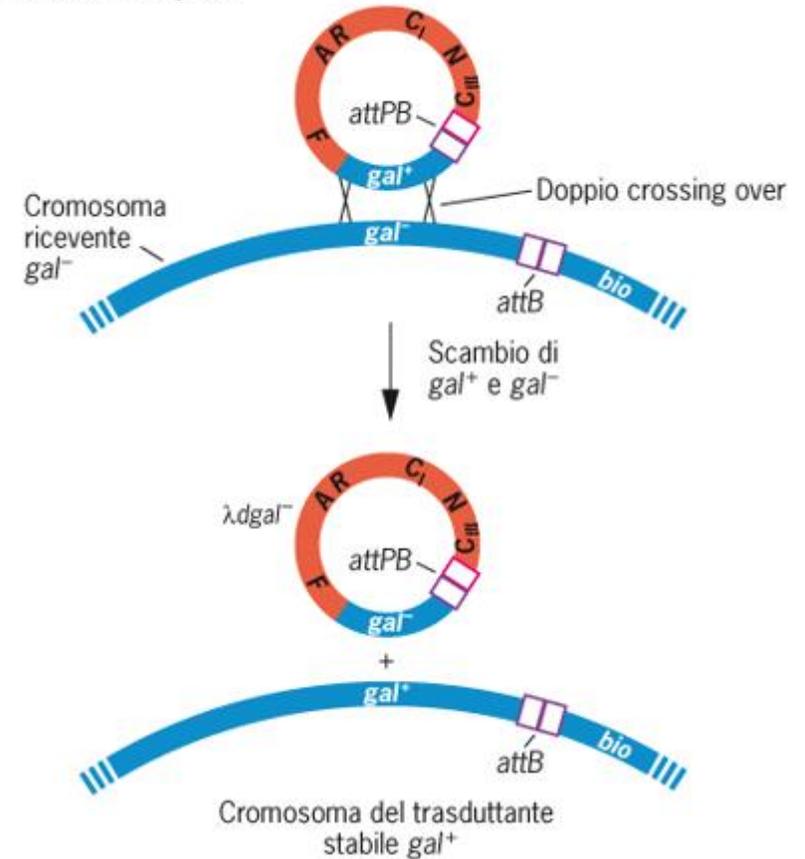
Integrazione del DNA difettivo nel cromosoma batterico

L'integrazione di $\lambda.dgal^+$ nel sito *attB* produce un diploide parziale gal^+/gal^- .



Formazione di un diploide parziale instabile!

Un doppio crossing over inserisce l'allele gal^+ di $\lambda.dgal^+$ nel cromosoma ospite.



Un doppio crossing over porta alla formazione di un trasducente stabile