

Come avvengono i cambiamenti genici?

Come avviene il trasferimento di geni tra i microrganismi?

Cambiamenti genici

Mutazione

Variazione ereditabile nella sequenza dei diversi nucleotidi del genoma, derivante, di solito, da cambiamenti genici di piccola entità.

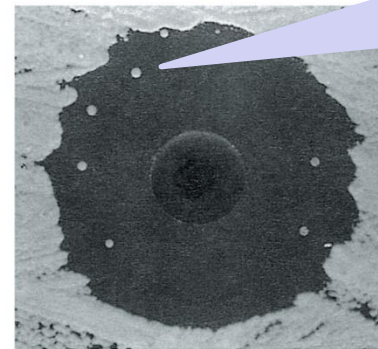
Ricombinazione genetica

Segmenti genetici (DNA) appartenenti a due diversi genomi che, in seguito a riarrangiamento, generano nuove combinazioni di geni.

Effetti positivi ↔ effetti neutrali ↔ effetti negativi

Mutazione e ricombinazione, generando variabilità genetica, sono alla base dei processi evolutivi dei microrganismi.

I ceppi portatori di cambiamenti genici sono detti **MUTANTI**



I **mutanti** differiscono dai ceppi parentali nel genotipo

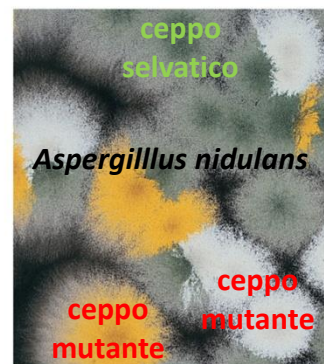


i cambiamenti possono manifestarsi sotto forma di **fenotipo mutante**

Procarioti → assenza di riproduzione sessuale



Il trasferimento genico orizzontale o laterale (TGO) è alla base dello scambio di geni e degli eventi di ricombinazione



(b)



(c)

Ceppo mutante (assenza vescicole gassose)

Halobacterium (Archaea)

Ceppo selvatico (c. bianche)

Tipi di mutante

Fenotipo	Natura del cambiamento	Identificazione del mutante
Auxotrofo	Perdita di un enzima nella via biosintetica	Incapacità di crescere in un terreno privo del nutriente
Sensibile al freddo	Alterazione di una proteina essenziale che viene inattivata a bassa temperatura	Incapacità di crescere a una temperatura bassa (per esempio 20 °C), che normalmente ne permetterebbe la crescita
Resistente a un farmaco	Alterazione della permeabilità al farmaco o del suo bersaglio o disattivazione del farmaco	Coltura in un terreno contenente una concentrazione del farmaco inibente la crescita
Non capsulato	Perdita o modifica della capsula esterna	Colonie piccole e ruvide invece di grandi e lisce
Non mobile	Perdita di flagelli o flagelli non funzionali	Colonie compatte invece di piatte e diffuse
Non pigmentato	Perdita di un enzima della via biosintetica, che porta alla perdita di uno o più pigmenti	Presenza di colore differente o perdita di colore
Colonia ruvida	Perdita o modifica dei lipopolisaccaridi della membrana esterna	Colonie granulari e irregolari invece di lisce e lucide
Fermentazione dello zucchero	Perdita di un enzima nella via degradativa	Mancanza di cambiamento di colore su agar contenente zucchero e un indicatore di pH
Sensibile alla temperatura	Alterazione di una proteina essenziale, per cui è più sensibile al calore	Incapacità di crescere a una temperatura che normalmente permetterebbe la crescita (per esempio 40 °C) ma in grado di crescere a una temperatura più bassa (per esempio a 30 °C)
Resistente ai virus	Perdita del recettore per il virus	Crescita in presenza di batteriofagi anche se presenti ad alto titolo

Madigan, Martiniko - Brook – Biologia dei microrganismi – 2007, CEA

Una **mutazione** è **selezionabile** quando il ceppo mutante evidenzia un certo vantaggio in particolari condizioni ambientali (es. resistenza ad un farmaco).

Resistenza ad un farmaco



Come procedere all'isolamento di un mutante resistente?

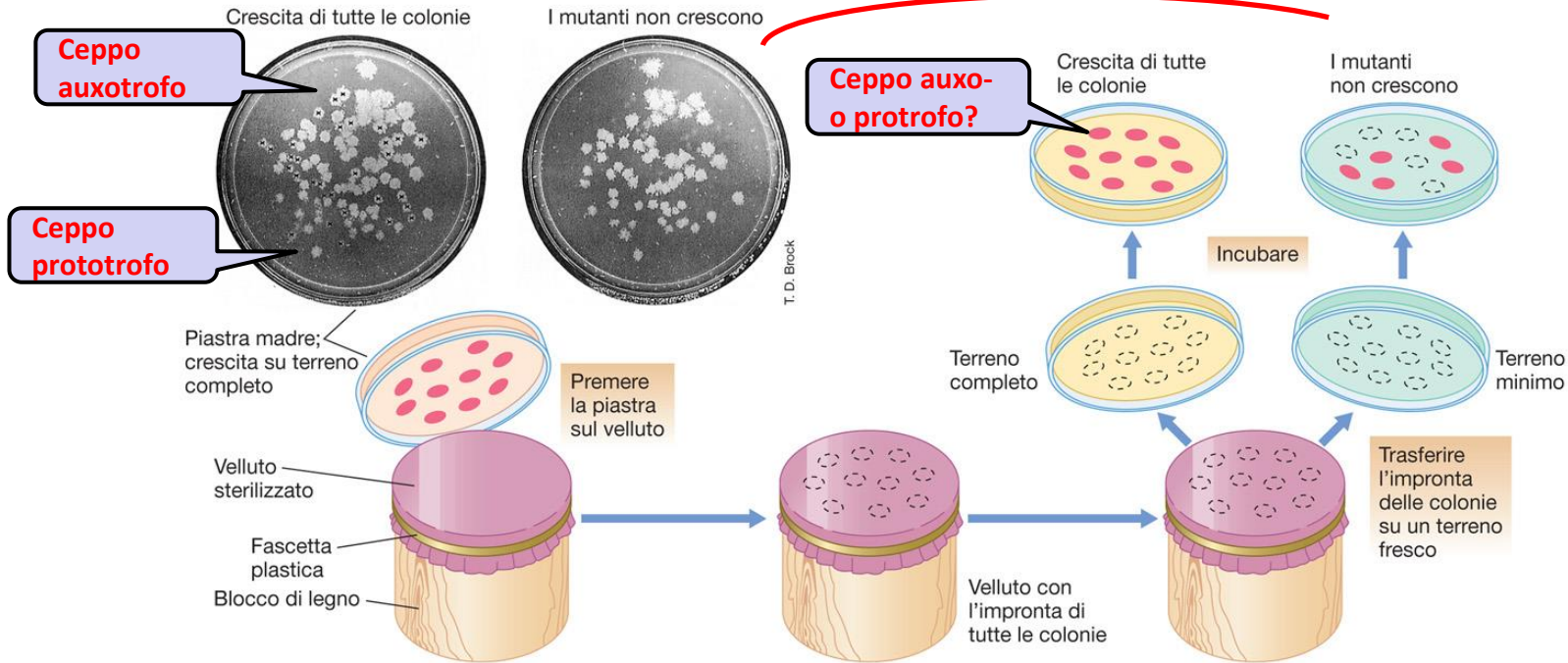
Mutanti per richieste nutrizionali

Auxotrofi
ceppi mutanti caratterizzati da particolari richieste nutrizionali

Prototrofi
ceppi selvatici parentali da cui hanno origine gli auxotrofi

Screening auxotrofi nutrizionali

Tecnica "replica plating"



Per facilitare l'isolamento di mutanti auxotrofi → Tecnica "**selezione con penicillina**"

Si esegue la coltura batterica in terreno privo di uno specifico fattore di crescita e con aggiunta di penicillina

La penicillina uccide solo i batteri in fase di crescita (prototrofi)

I batteri che non erano in crescita (mutanti) quando trasferiti in terreni con il fattore di crescita e senza antibiotico possono moltiplicarsi.

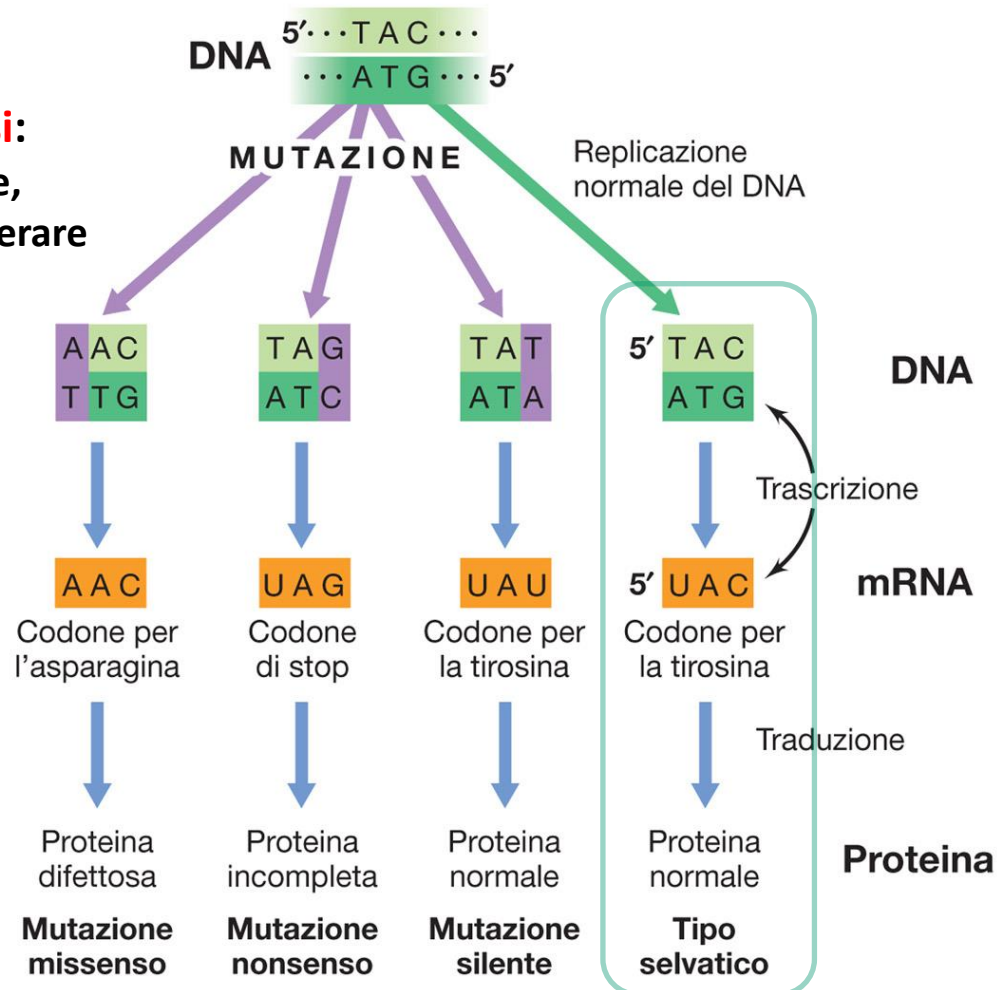
Mutazioni (spontanee o indotte)

- Sostituzione di basi (mutazioni puntiformi)
- Scivolamento dello schema di lettura (frameshift)
- Inserzione di elementi trasponibili (trasposoni)
- Delezione
- Inversione

Effetto della **sostituzione di basi**:
la sostituzione di una singola base,
all'interno di un codone, può generare
3 diversi prodotti proteici.

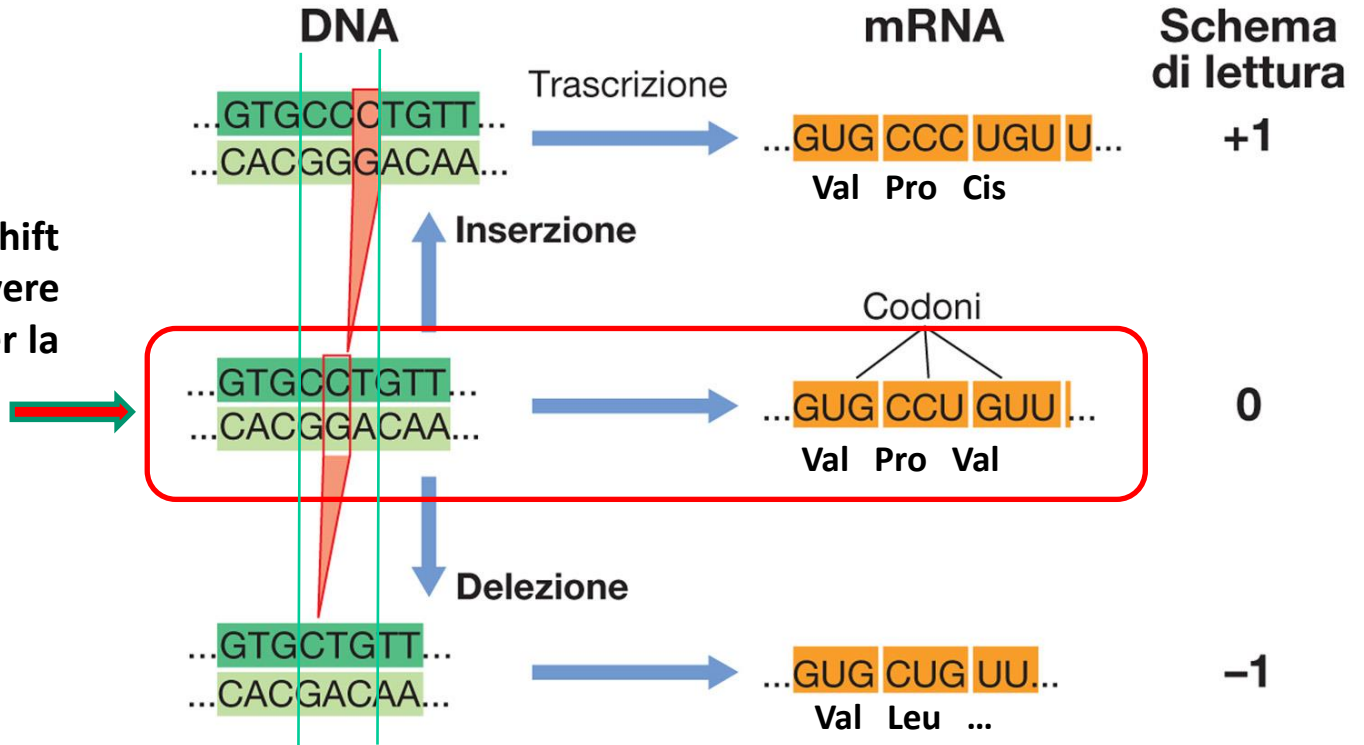
Le mutazioni che inducono la
sostituzione in una coppia di
basi vengono definite
“**mutazioni puntiformi**”.

La sostituzione, a seconda
della posizione in cui avviene
all'interno del codone, può
avere **effetti diversi**.



Mutazione per scivolamento dello schema di lettura (frameshift)

Le mutazioni frameshift possono avere conseguenze gravi per la vitalità della cellula?



Ogni inserzione o delezione di una o due coppie di basi causa uno scivolamento dello schema di lettura (→ **conseguenze gravi**).

Mutazione per inserzioni (**sequenze di inserzione**) o delezioni

Le **INSERZIONI** consistono nell'acquisizione di un tratto di DNA più o meno esteso (fino a migliaia di basi o più geni).

Anche le **sequenze di inserzione** (700-1400 pb), elementi trasponibili coinvolti in eventi di ricombinazione omologa, possono indurre mutazioni.

Le **DELEZIONI** consistono nella perdita di un tratto di DNA (fino a migliaia di basi o più geni).

Si generano, di solito, in seguito ad errori intervenuti durante eventi di ricombinazione

Se il gene deleto è essenziale per la sopravvivenza batterica, la mutazione sarà letale!

Anche le **TRASLOCAZIONI** possono essere causa di mutazioni.

Le **traslocazioni** consistono nello spostamento di un tratto di DNA in un'altra regione.

I **trasposoni**, elementi genetici mobili che oltre ai geni per la trasposizione portano altri geni. Inserendosi all'interno di un gene ne causano, in genere, la perdita della funzione. Essi possono inserirsi in punti diversi del cromosoma ed essere causa di mutazioni.

Le **INVERSIONI** sono dovute ad un cambio nell'orientamento di un tratto di DNA.

Retromutazione e reversione

Una **seconda mutazione** può annullare l'effetto di una precedente mutazione.

In seguito a **mutazioni puntiformi**, le **REVERSIONI** consentono di ripristinare il **fenotipo selvatico** mutato.

revertenti dello stesso sito

Quando una seconda mutazione nello stesso sito ripristina la **funzionalità** del gene.

Si parla di **revertente vero** se viene ristabilita la **sequenza tipo** del ceppo selvatico.

revertenti di un secondo sito

Quando una seconda mutazione (**soppressiva**) avviene in un sito diverso del DNA, ma ripristina la **funzionalità** del gene (**fenotipo selvatico**).

A differenza delle mutazioni puntiformi e delle inserzioni di grandi frammenti, **estese mutazioni per delezione** non sono reversibili!

È molto difficile ripristinare il **fenotipo selvatico** in seguito a **mutazioni frameshift** (mutazioni geneticamente stabili)

Nel corso di un ciclo di replicazione del DNA intervengono errori (**mutazioni spontanee**) con una frequenza pari a $\sim 10^{-6} \div 10^{-7}$ per kilobase (\sim gene).



Un gene con 1000 paia di basi \rightarrow frequenza di errori $10^{-6} \div 10^{-7}$ per generazione
 Una coltura batterica 10^8 cellule/ml \rightarrow presenza di mutanti per ogni gene

In natura le cellule, per sopravvivere a **condizioni di elevato stress**, possono aumentare la frequenza di mutazione di alcuni geni (**MUTAZIONI ADATTATIVE**).

La frequenza di mutazione nei genomi ad RNA è 1000 volte più alta rispetto ai genomi a DNA

La frequenza di mutazione spontanea è relativamente bassa rispetto a quella indotta da alcuni **agenti chimici, fisici e biologici**.

Mutageni chimici

- analoghi delle basi
- agenti alchilanti,
- agenti intercalanti
- ...

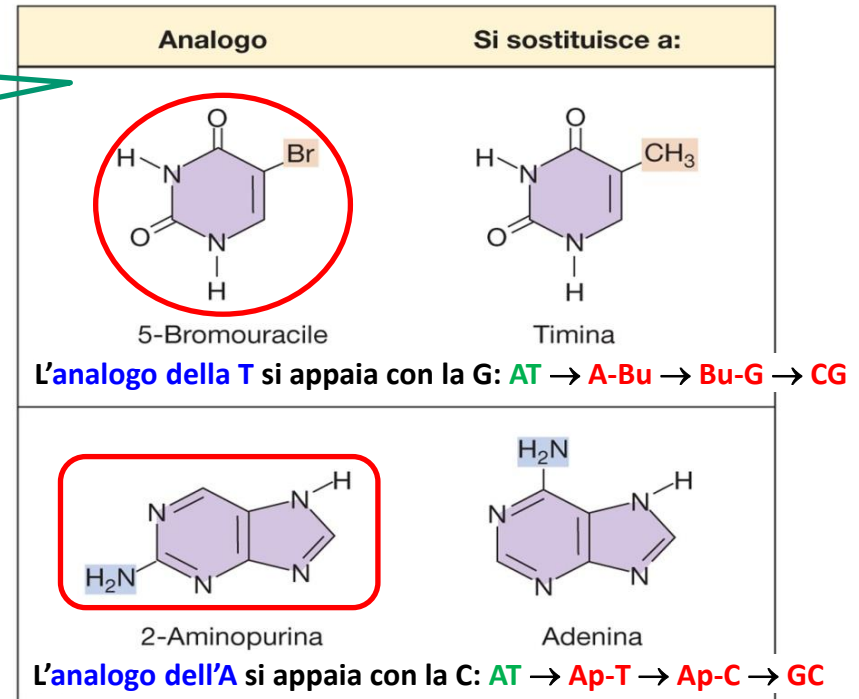
Analoghi delle basi determinano appaiamenti difettosi

Agenti alchilanti

Inducono mutazioni (**introduzione di gruppi metilici**) anche in assenza di replicazione del DNA.

Agenti intercalanti

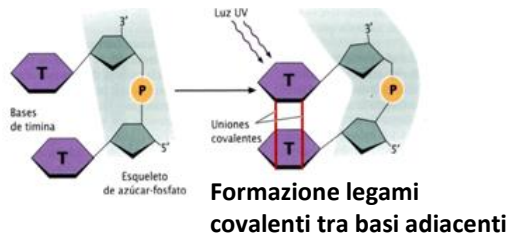
Molecole planari (acridine) che inserendosi nella catena di DNA ne alterano la conformazione; inserendosi tra coppie di basi adiacenti le separano ed inducono mutazioni frameshift (delezione o inserzione di singole basi).



Radiazioni

(ionizzanti e non ionizzanti)

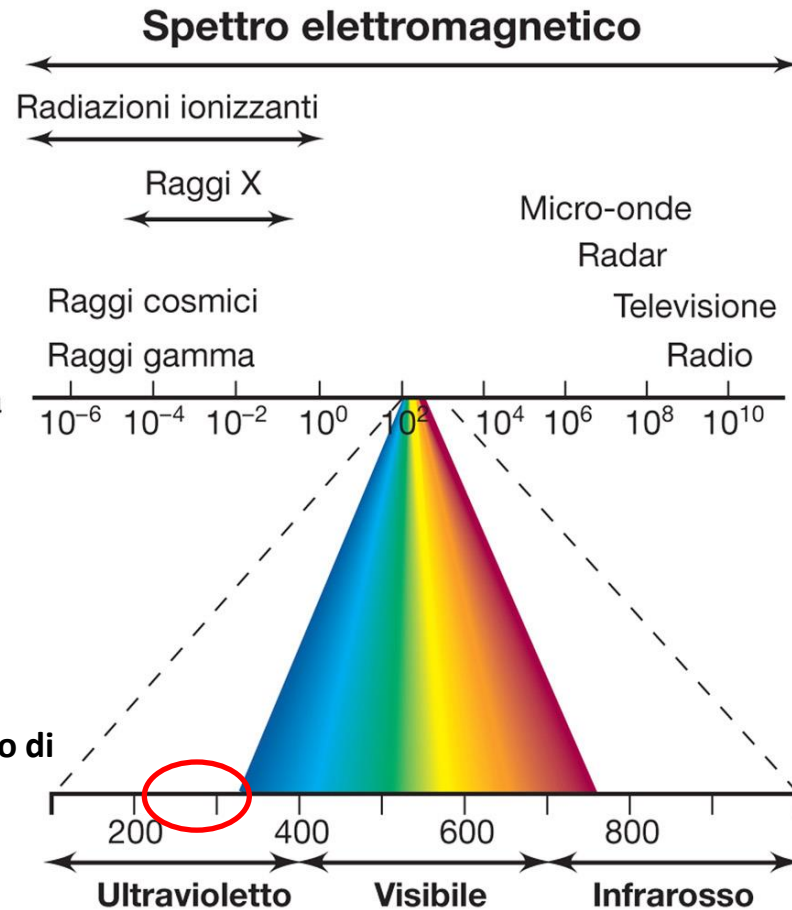
Le **radiazioni UV**, letali per le cellule, agiscono a livello del DNA. La formazione di **dimeri di pirimidine** (citosina o timina) induce lo stallo della polimerasi o aumenta la probabilità che la polimerasi inserisca nucleotidi sbagliati in questa posizione.



DNA ed RNA hanno un massimo di assorbimento nello spettro elettromagnetico a 260 nm.

M.T. Madigan, J.M. Martinko

Le **radiazioni ionizzanti** (raggi X, raggi cosmici e raggi gamma) possono indurre mutazioni in seguito alla **ionizzazione** dell'acqua o di altre sostanze. Il più noto tra i prodotti della ionizzazione è il **radicale idrossile (OH·)**. I radicali liberi inducono rotture nel DNA (frammentazione).



Brock, Biologia dei Microrganismi

Copyright © 2007 Casa Editrice Ambrosiana



Le radiazioni ionizzanti, a differenza degli UV, hanno un più alto potere di penetrazione

Sistemi di riparazione

- Reversione diretta
- Riparazione del singolo filamento
- Riparazione del doppio filamento

Sistema giunzione imprecisa delle rotture a doppio filamento (MMEJ, microhomology-mediated end-joining)

In caso di rotture a doppio filamento, non corrette dai normali sistemi di riparazione, interviene il sistema della **giunzione delle estremità mediato da micro-omologia**.

Enzimi specifici effettuano tagli (**resezioni**) ad entrambi i lati della rottura del DNA. La resezione genera piccoli tratti a singolo filamento di DNA complementare ai lati della rottura che consentono la giunzione delle estremità.



Il meccanismo della giunzione delle estremità mediato da micro-omologia genera **delezioni** di decine/centinaia di basi.

Una frequenza di mutazione relativamente bassa non è un evento negativo in quanto contribuisce all'evoluzione dei microrganismi

equilibrio

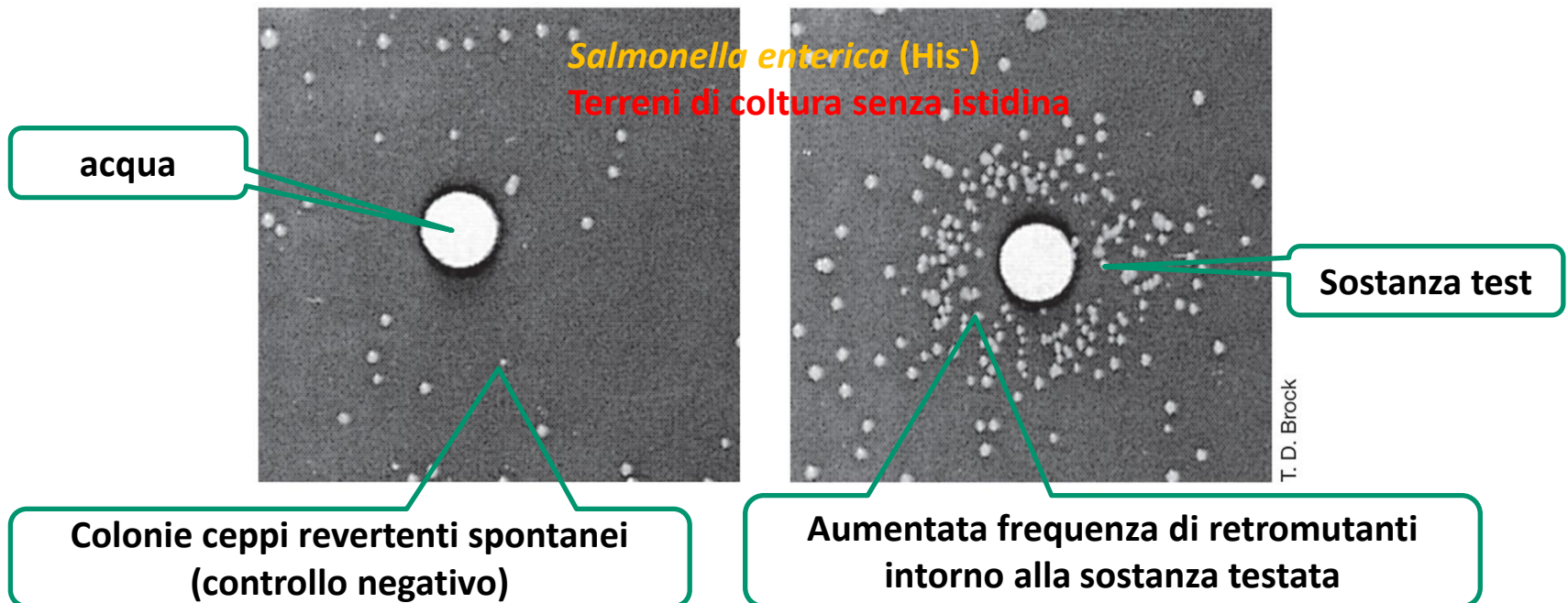
stabilità genetica ↔ miglioramento evolutivo

VALUTAZIONE DELLA MUTAGENESI E DEL POTENZIALE CANCEROGENO di prodotti chimici → Test di Ames

Basato sulla valutazione della frequenza di retromutazione in ceppi auxotrofi (mutazione puntiforme) per alcuni nutrienti, in seguito all'esposizione alla sospetta sostanza mutagena.

Ceppi

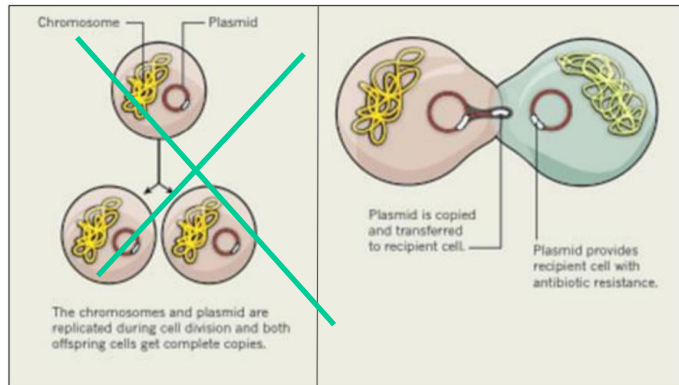
- *Salmonella enterica* (His⁻)
- *E. coli* (Trp⁻)



VARIABILITA' GENETICA

TRASFERIMENTO GENICO ORIZZONTALE (TGO)

scambio genetico nei procarioti



Trasferimento di geni tra cellule che non sono discendenti dirette.

•TRASFORMAZIONE

•TRASDUZIONE

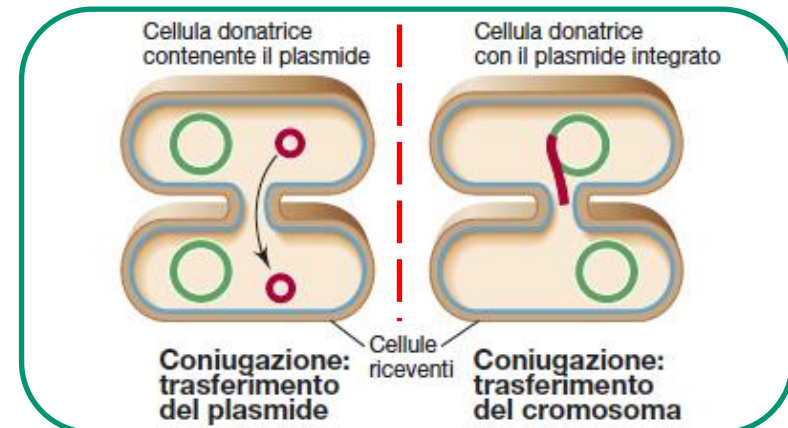
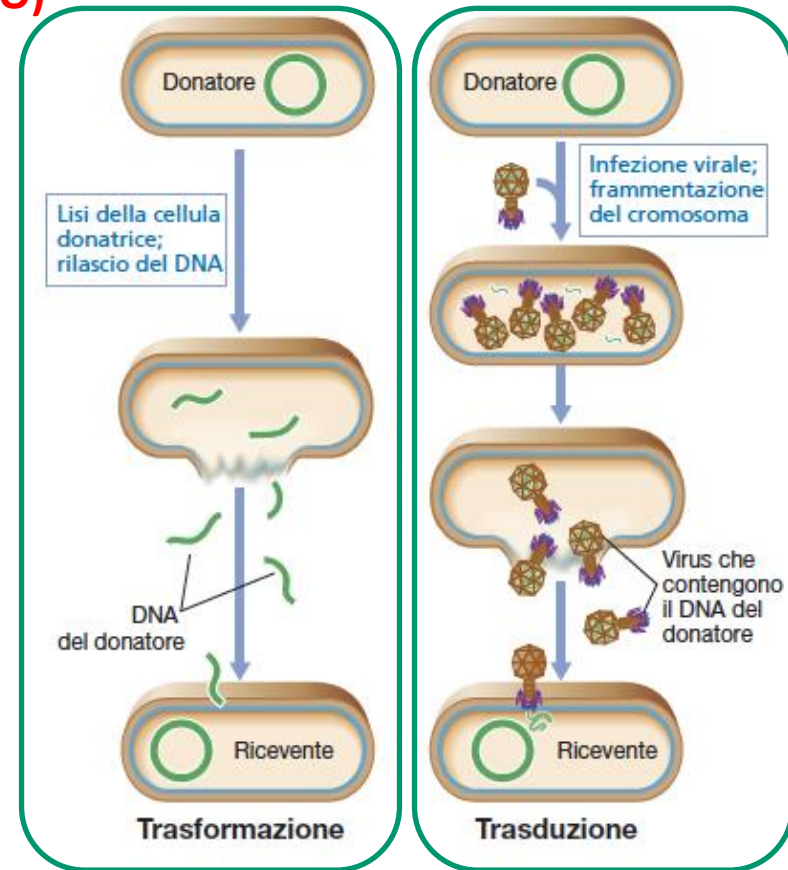
- generalizzata
- specializzata

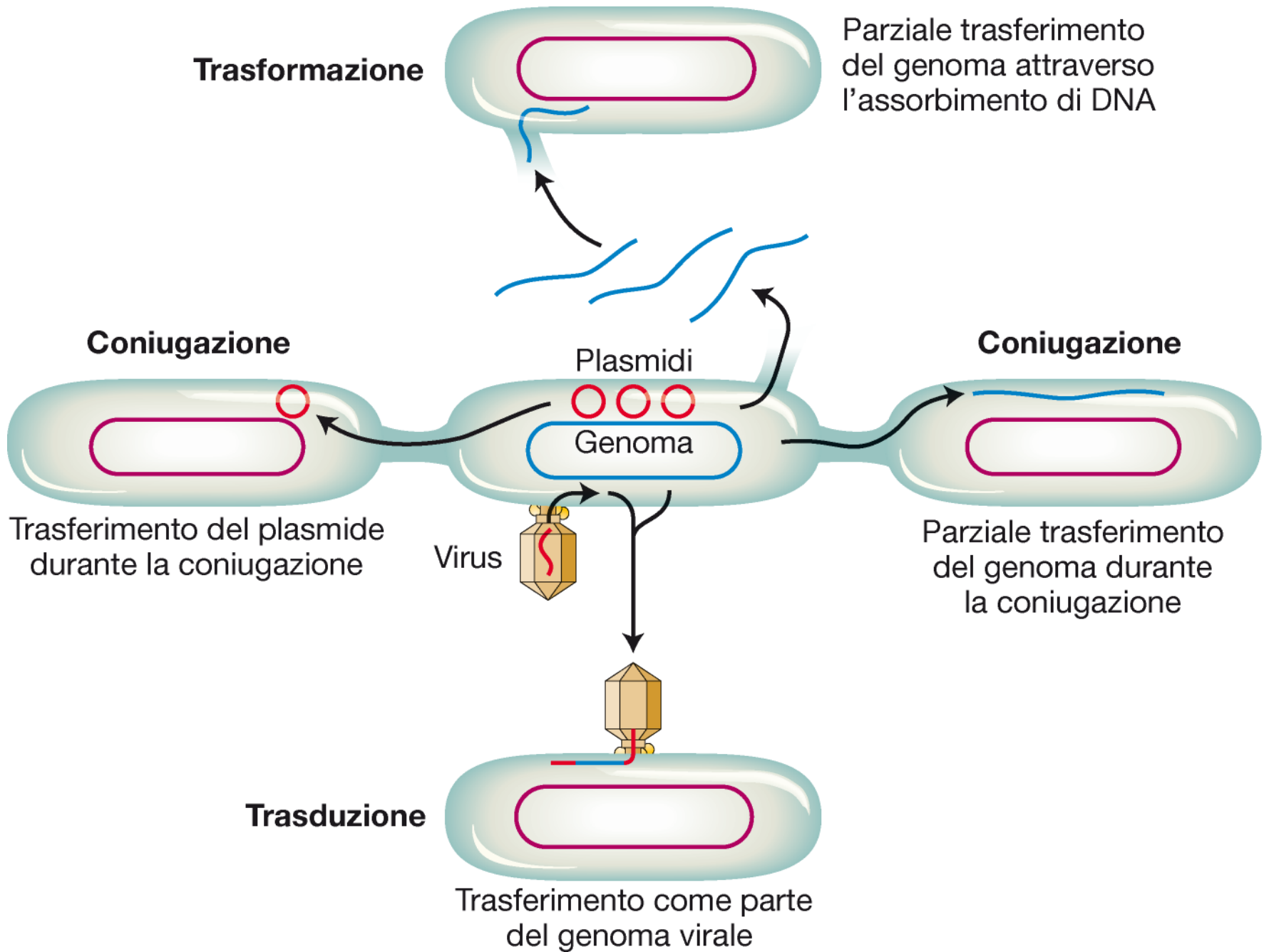
•CONIUGAZIONE

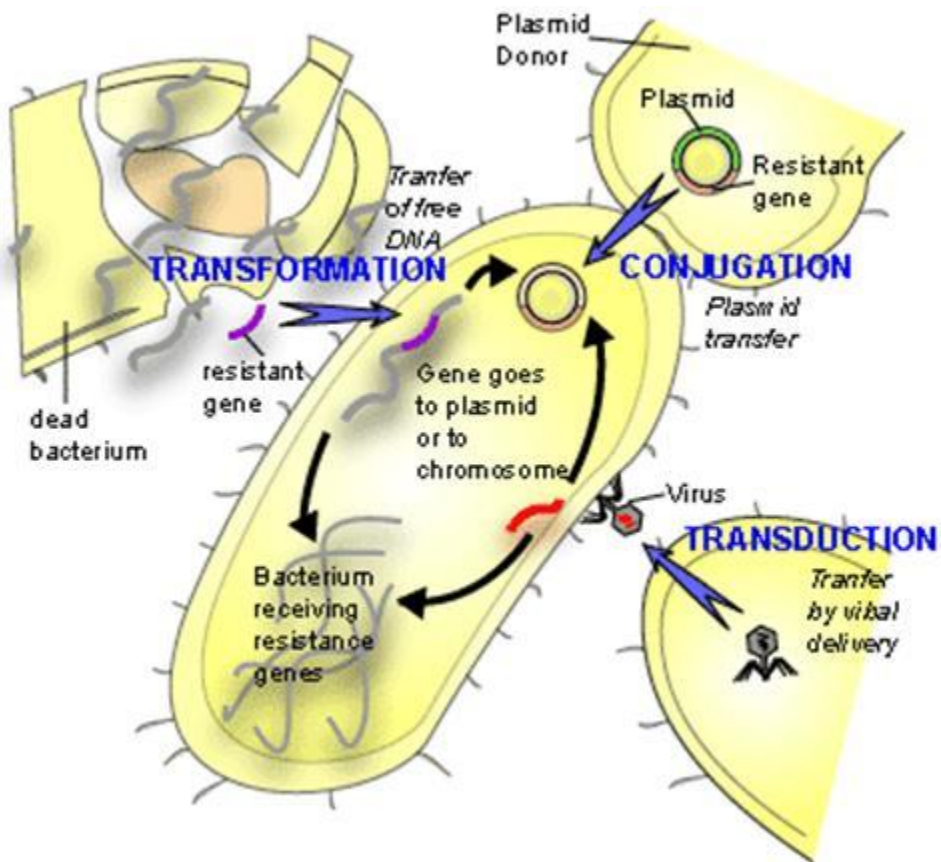
- trasferimento plasmidi
- mobilizzazione cromosoma (ceppi HFR)

Destino del DNA trasferito

- **Degradazione** da parte degli enzimi di restrizione della cellula ricevente;
- **Replicazione autonoma** nella cellula ricevente se il DNA possiede un'origine della replicazione (plasmidi, DNA fagico);
- **Ricombinazione** con il cromosoma della cellula ricevente.







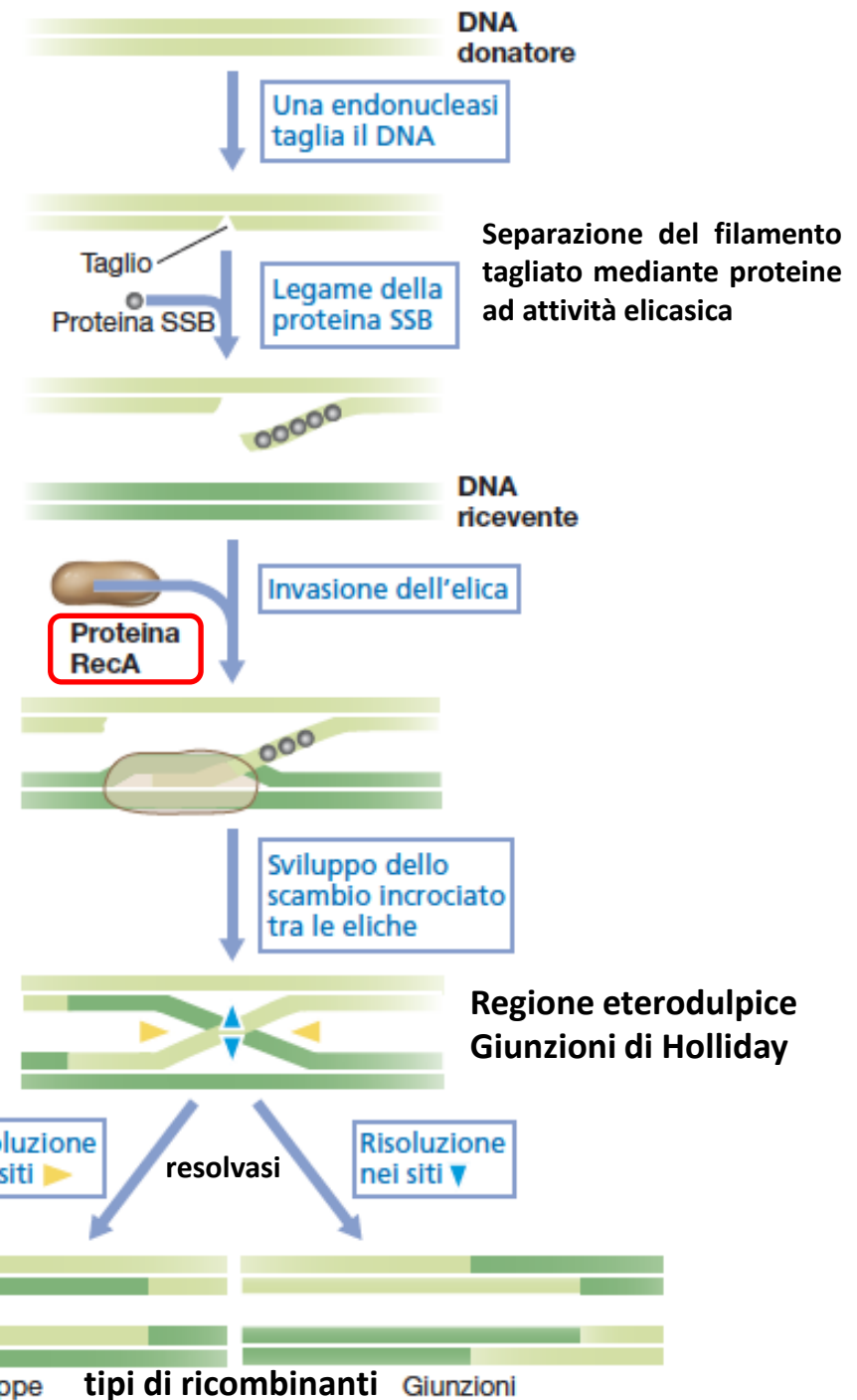
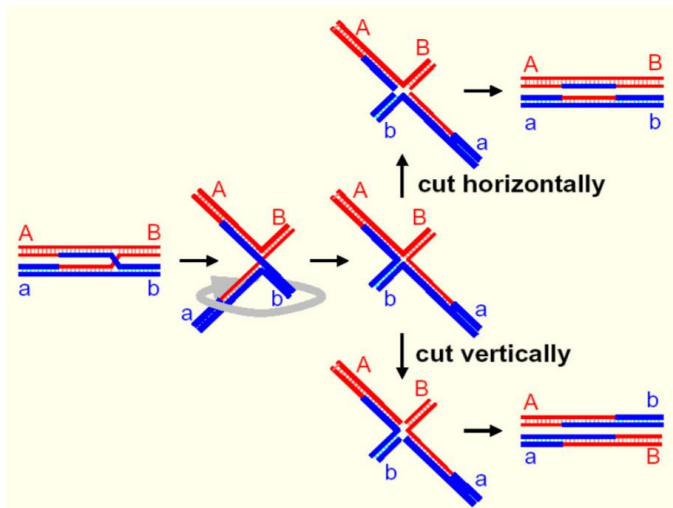
Trasferimento tra cellule di geni per la resistenza agli antibiotici

RICOMBINAZIONE GENICA (meccanismo generale)

La ricombinazione genica consiste in uno scambio fisico di tratti di sequenze omologhe tra DNA di origini diverse (ricombinazione omologa).

In seguito ad eventi di rottura e saldatura di segmenti di DNA appaiati avviene lo scambio tra sequenze omologhe (**CROSSING-OVER**).

In tutti i procarioti e molti *Eukarya*, negli eventi di ricombinazione omologa è fondamentale il ruolo di RecA o proteine molto simili.

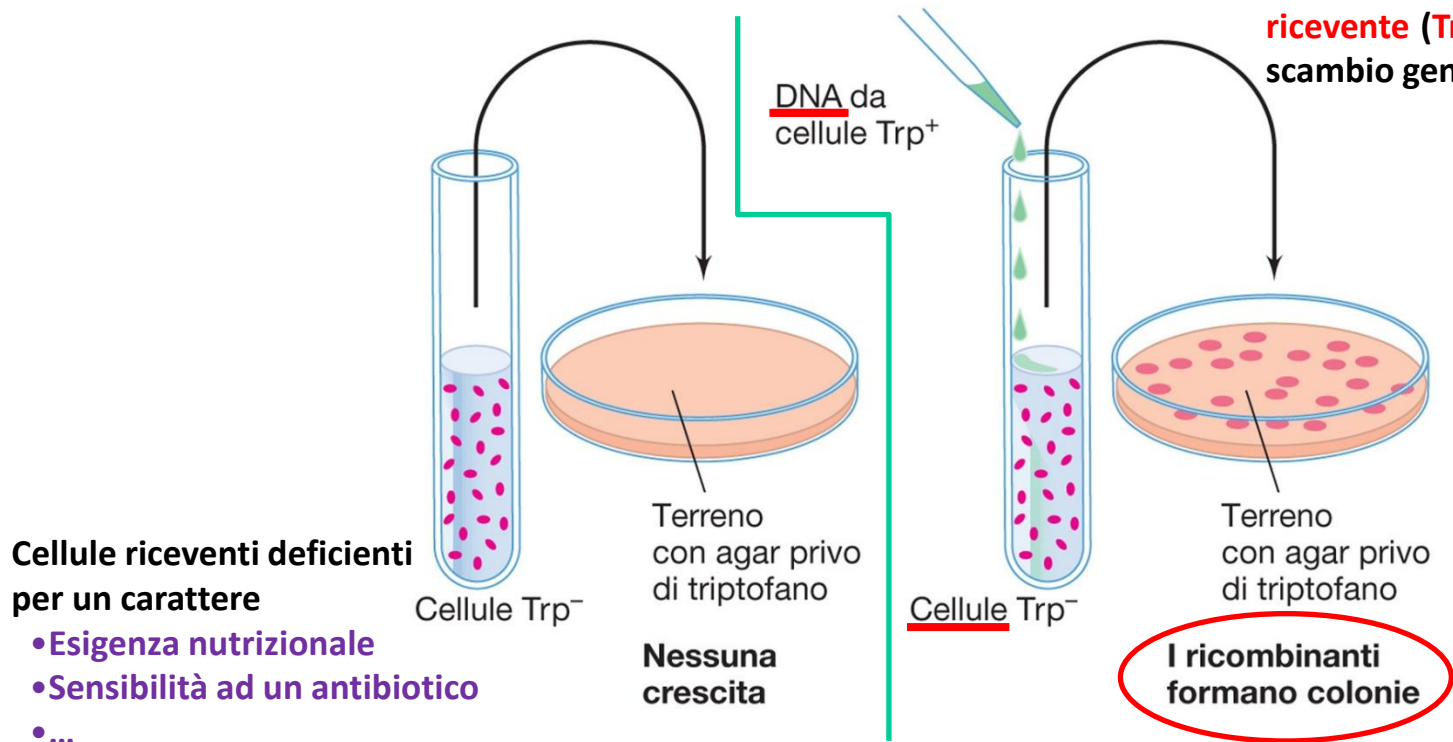


Nei procarioti, affinché la ricombinazione omologa possa avvenire, un frammento di DNA omologo deve essere trasferito dal **cromosoma della cellula donatrice** alla **cellula ricevente** attraverso

- **trasformazione**
- **trasduzione**
- **coniugazione**

Identificazione dei ricombinanti dopo un eventuale meccanismo di ricombinazione

Esempio di come evidenziare un ricombinante

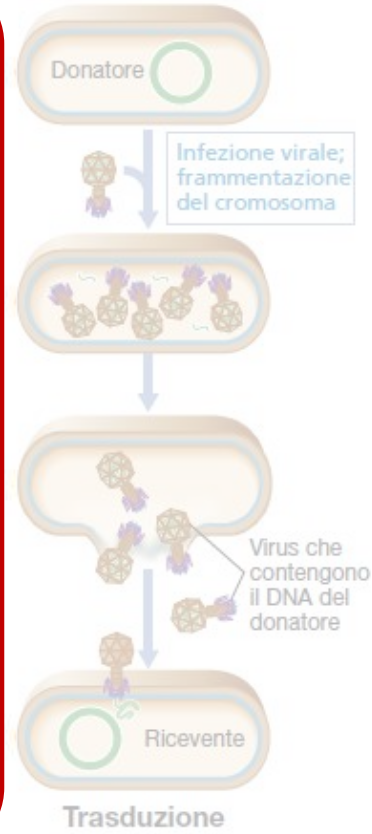
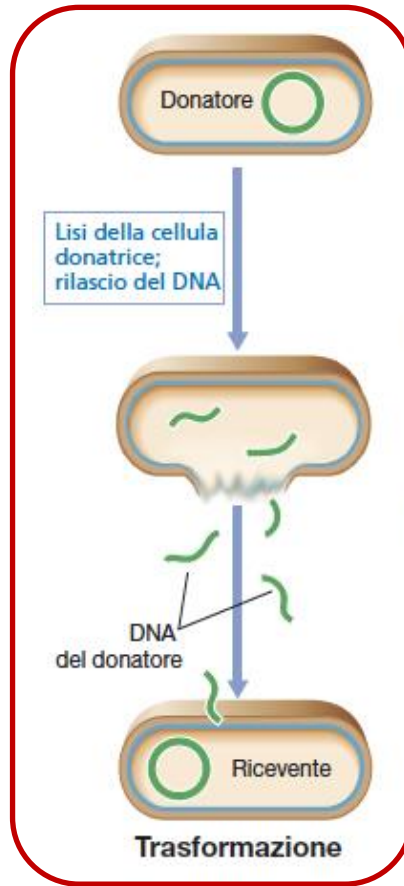


Un **frammento di DNA (Trp⁺)** libero penetra all'interno della **cellula ricevente (Trp⁻)**, la quale opera uno scambio genetico con il suo DNA.

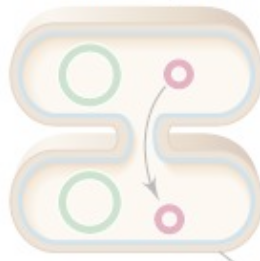
Processi che possono portare a **scambio genico** nei procarioti (**ricombinazione**).

trasformazione

Subito dopo la lisi batterica, il cromosoma si frammenta in pezzi di ~10 Kbp



Cellula donatrice contenente il plasmide



Coniugazione: trasferimento del plasmide

Cellula donatrice con il plasmide integrato



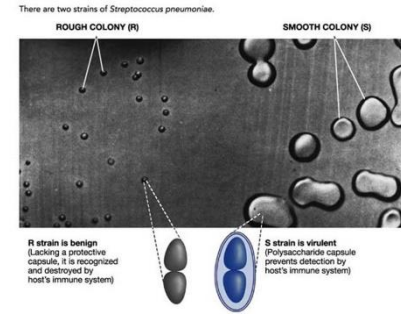
Coniugazione: trasferimento del cromosoma

TRASFORMAZIONE

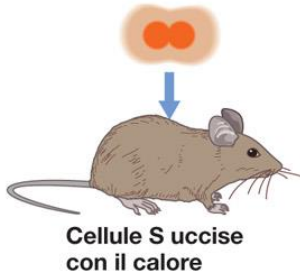
Esperimento di Griffith

Pneumococco (*Streptococcus pneumoniae*)

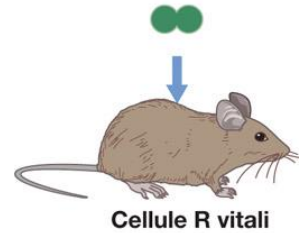
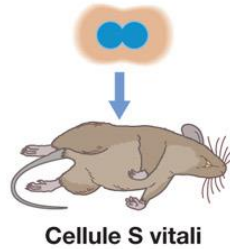
- **Cellule (S)** con capsula (colonie lisce) → **patogene**
- **Cellule (R)** senza capsula (colonie rugose) → **non patogene**



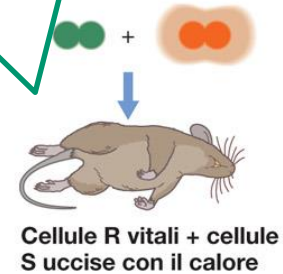
Cellule lisce di pneumococco capsulate (S), trattate al calore, non causano la morte del topo



Cellule vitali rugose di pneumococco, non capsulate (R), non causano la morte del topo



Cellule vitali rugose di pneumococco, non capsulate (R), in seguito al contatto con frammenti di DNA di cellule lisce (S) trattate al calore, causano la morte del topo



Cellule lisce di pneumococco capsulate (S), non trattate al calore, causano la morte del topo

Dal topo morto vengono isolate cellule vitali di pneumococco capsulate!

TRASFORMAZIONE

Non tutti i procarioti sono trasformabili. Una cellula in grado di legare una molecola di DNA viene definita **competente**.

La competenza è una proprietà definita geneticamente. La **competenza** in alcuni batteri è legata alla sintesi di piccoli peptidi (**quorum sensing**), il cui accumulo rende competenti le cellule per un tempo limitato.

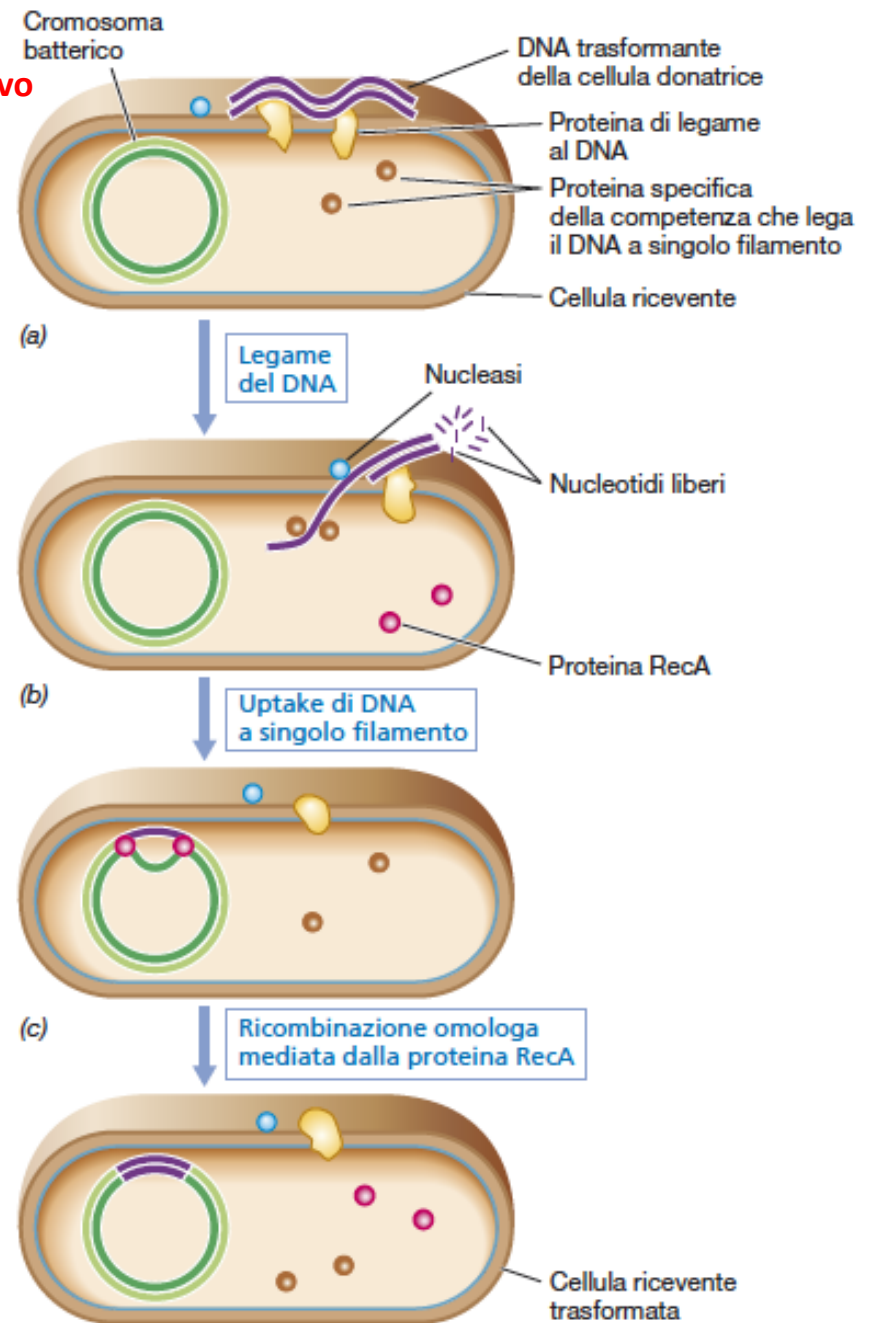
Nella trasformazione intervengono diverse proteine

- **Proteine associate alle membrane che legano il DNA**,
- **Autolisine** (digeriscono parte della parete cellulare),
- **Nucleasi** (digeriscono un filamento di DNA).

In generale, gli eventi di trasformazione batterica aumentano la **diversità** e la **fitness** (capacità di sopravvivenza o di replicazione) della comunità microbica.

Transfezione - I batteri possono andare incontro a fenomeni di trasformazione anche con DNA proveniente da virus batterici (batteriofagi).

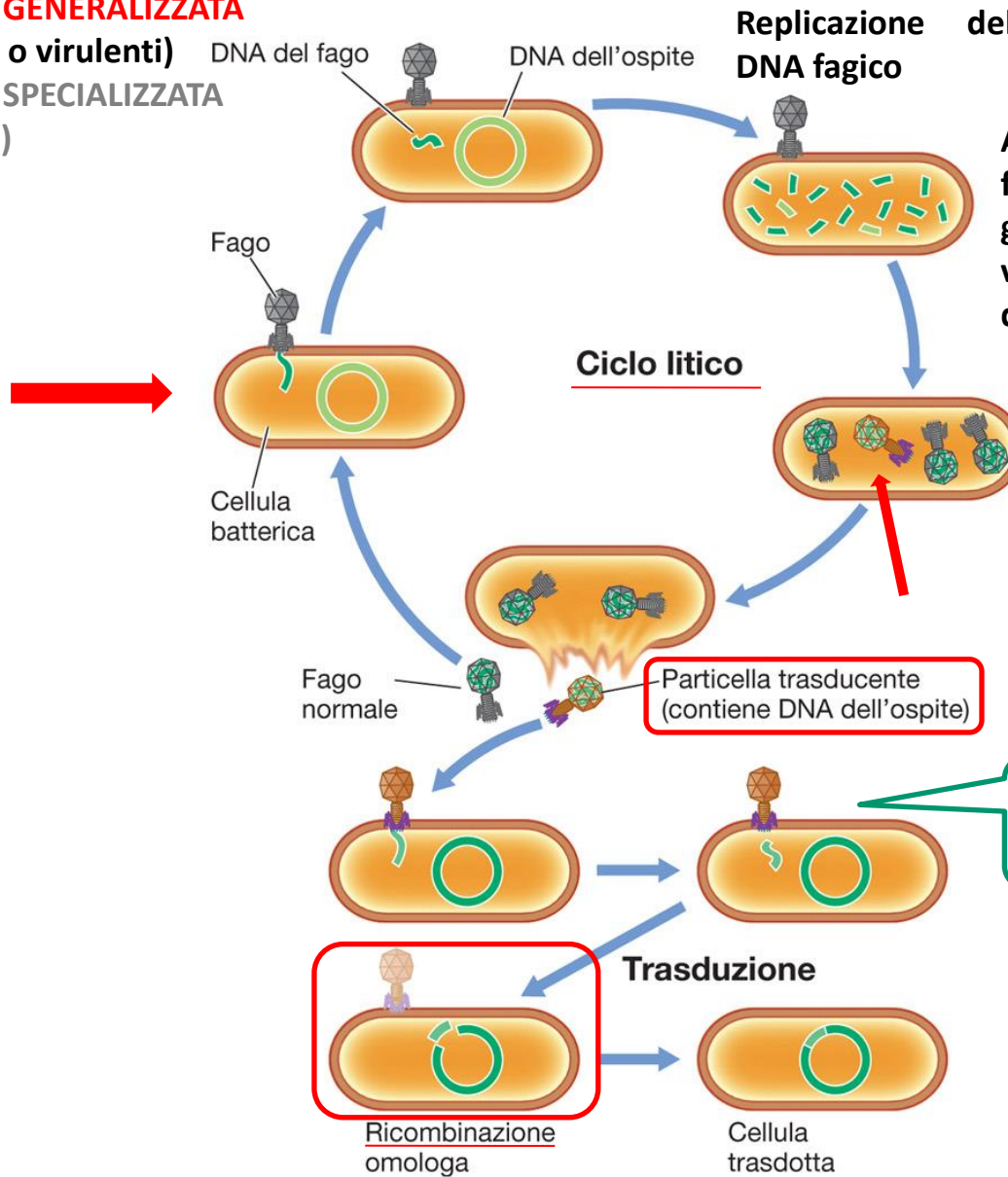
Gram positivo



TRASDUZIONE

Trasferimento del DNA da una cellula all'altra mediante un batteriofago.

- **TRASDUZIONE GENERALIZZATA**
(fagi temperati o virulenti)
- **TRASDUZIONE SPECIALIZZATA**
(fagi temperati)



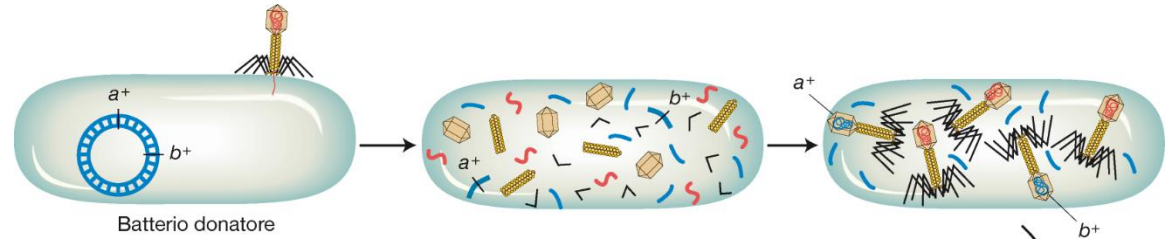
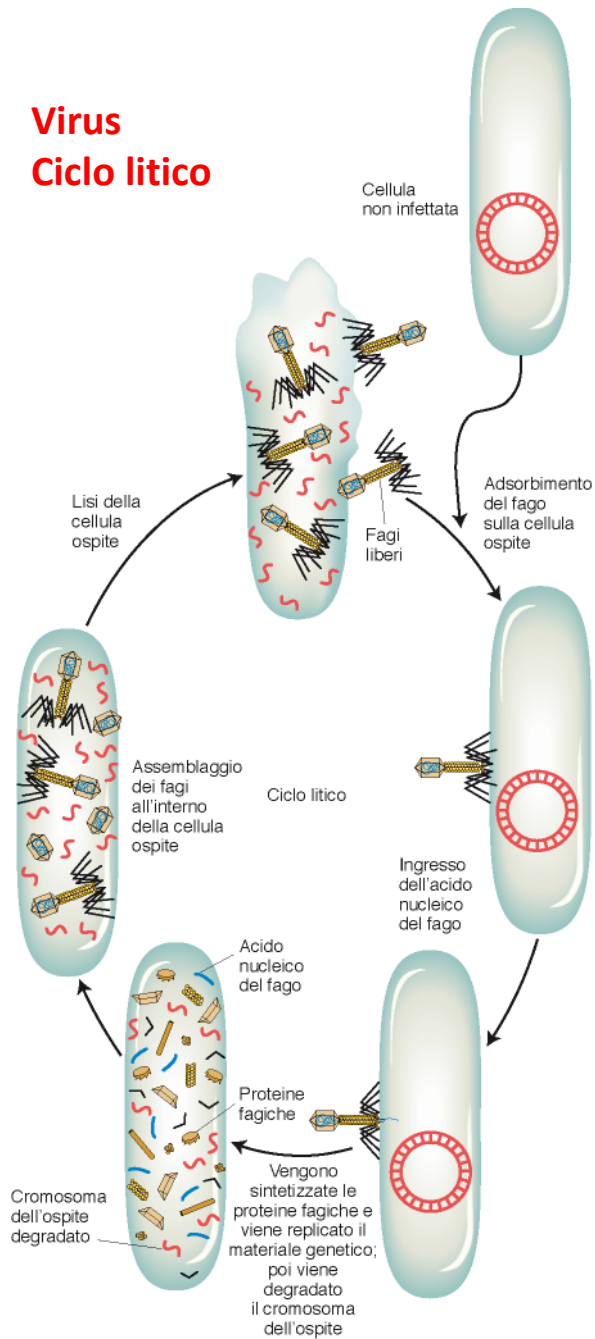
Accidentalmente, durante la fase di impacchettamento del genoma del virus, nel capside viene introdotto un frammento di DNA dell'ospite.

Un qualsunque frammento di DNA (gene) della cellula ospite può essere introdotto nel capside al posto dei geni virali, ed essere trasferito poi ad una cellula ricevente. Trasferimento a bassa frequenza!

La particella trasducente non da origine al ciclo litico in quanto difettiva dei geni virali

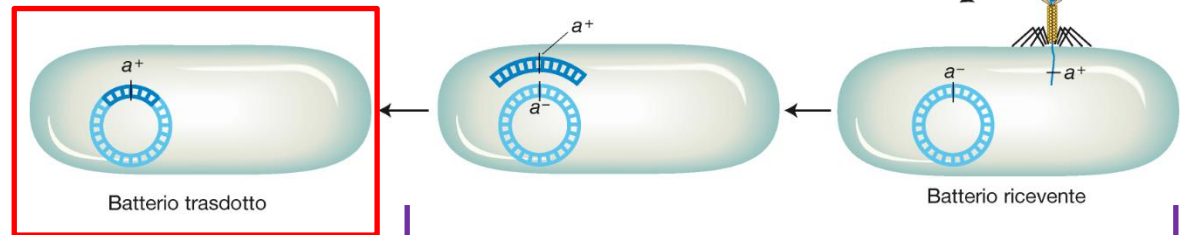
Non tutti i fagi possono trasdurre e non tutti i batteri sono trasducibili!

Virus Ciclo litico



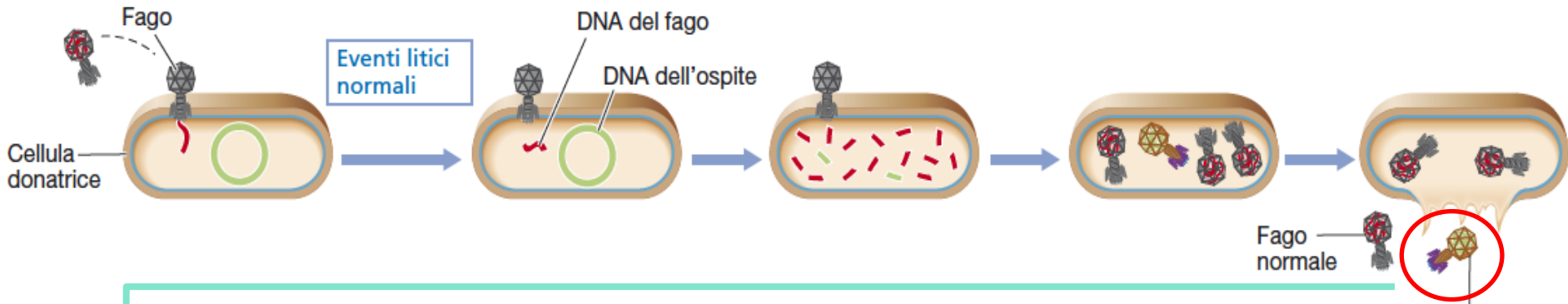
Trasduzione generalizzata

Fagi che portano geni del donatore



Fase che porta variabilità genetica

Ciclo litico



Trasduzione

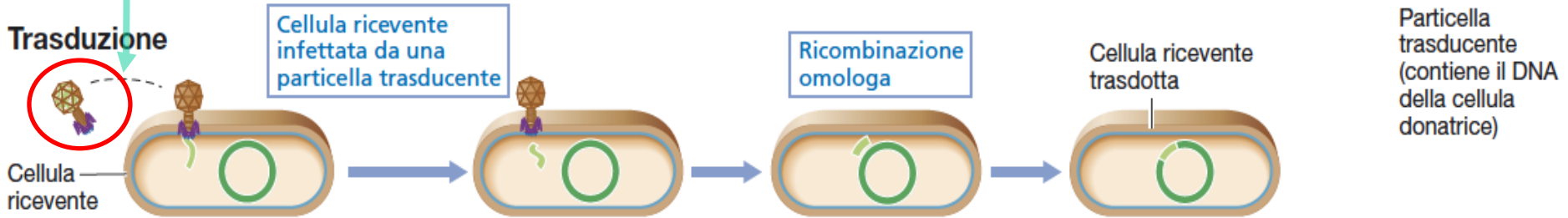
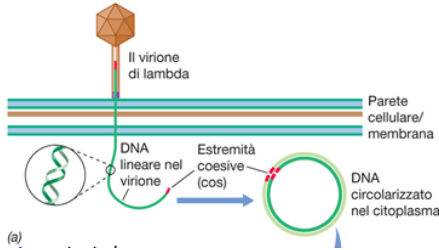


Figura 10.14 Trasduzione generalizzata. Si noti che i virioni "normali" contengono i geni fagici, mentre le particelle trasducenti contengono i geni dell'ospite.

TRASDUZIONE SPECIALIZZATA (virus temperati: fago lambda, ...)

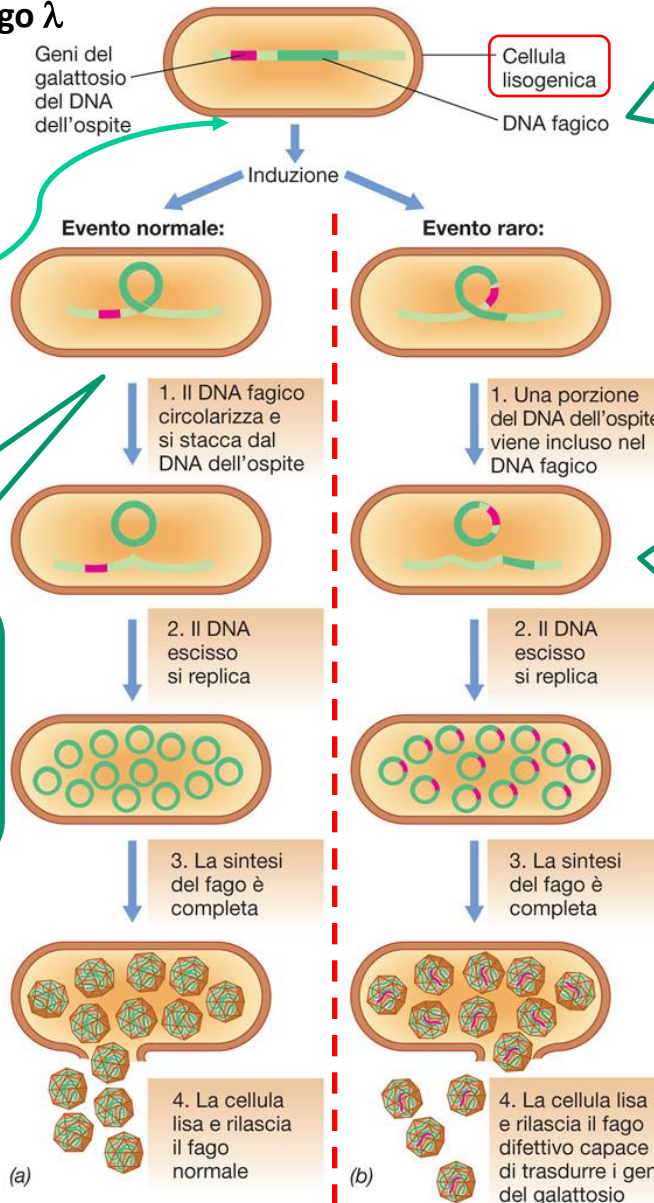
Trasferimento, a **frequenza più alta**, di un **particolare segmento di DNA** da un batterio all'altro

E. coli infettata dal fago λ



Nel **ciclo lisogenico**, il DNA virale si replica contemporaneamente al cromosoma in cui si è integrato.

In seguito ad induzione, il DNA fagico si stacca dal cromosoma ospite con un meccanismo **inverso all'integrazione**.



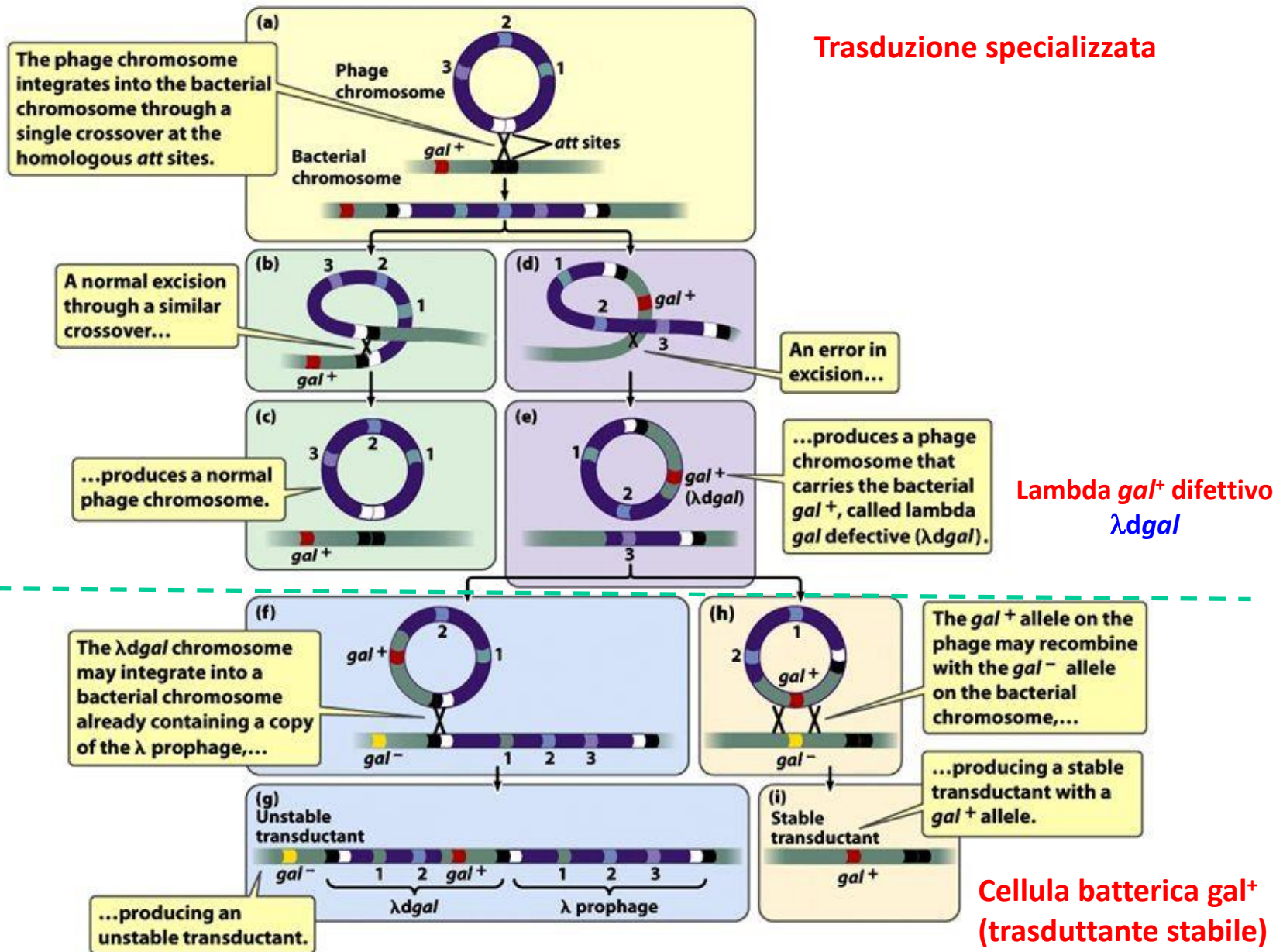
Il DNA fagico si integra nel cromosoma batterico in un sito specifico. La lisogenia rende immuni le cellule all'infezione di un virus dello stesso tipo.

La lisogenia, con profagi ricombinati, può apportare cambiamenti fenotipici nella cellula batterica. La comparsa di un nuovo fenotipo nella cellula ospite, in seguito a lisogenia, è definito **conversione fagica**

In seguito ad **errati eventi di escissione**, geni, adiacenti a uno dei due lati del cromosoma fagico integrato, vengono inseriti nel DNA virale, mentre parte dei geni virali restano legati al cromosoma della cellula ospite.

La quantità di DNA batterico che può essere trasdotta è limitata!

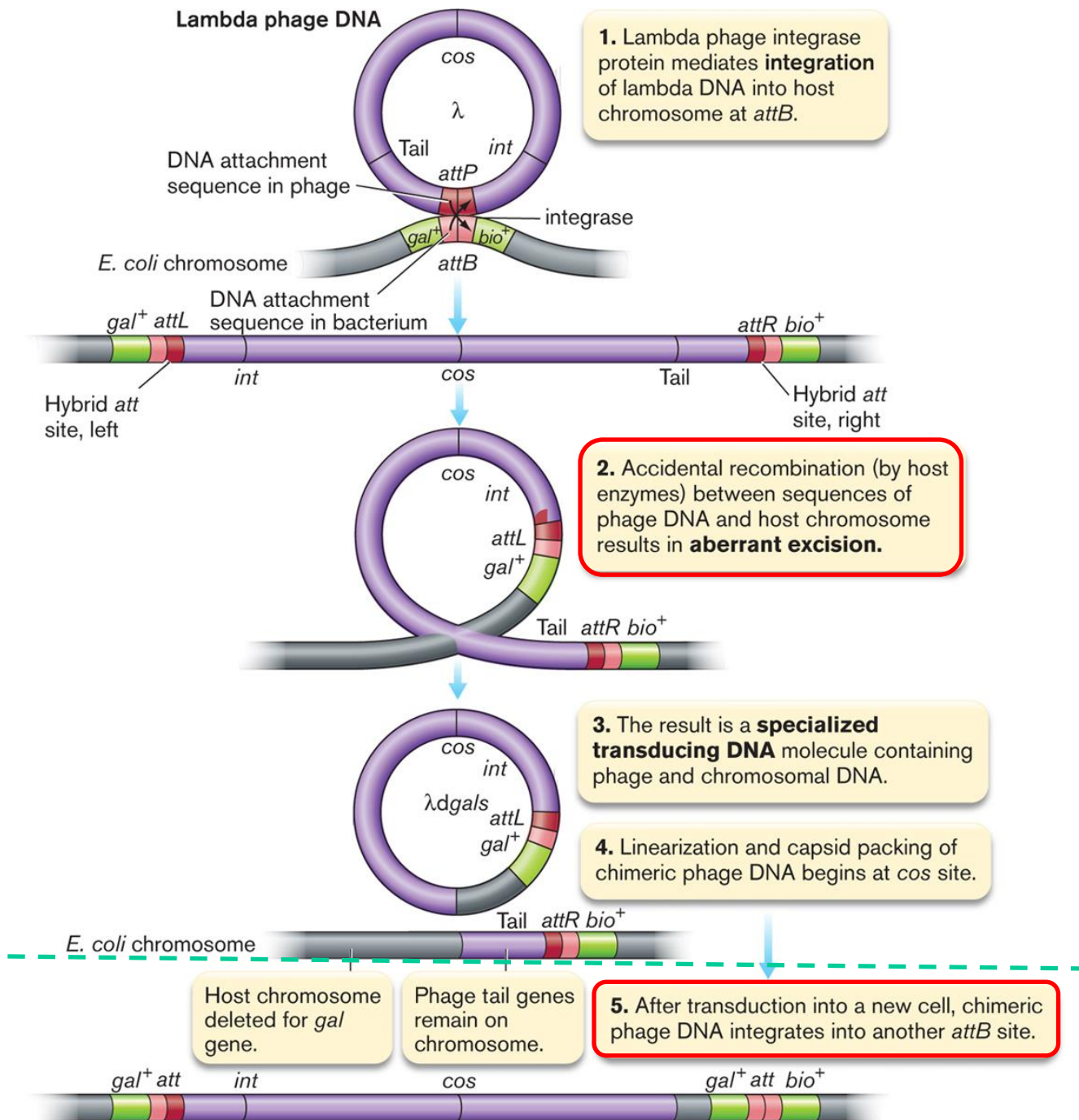
Trasduzione specializzata



Lambda *gal*⁺ difettivo
 λ d*gal*

Cellula batterica *gal*⁺
(trasducente stabile)

Figure 8-29
Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition
© 2009 W.H. Freeman and Company



PLASMIDI

Molecole di DNA a doppia elica

Elementi extracromosomali che si replicano autonomamente

La cellula può contenere diversi tipi di plasmidi, purchè non siano geneticamente correlati (incompatibili)

Non hanno forma extracellulare

Possono essere presenti in più copie

Nel citoplasma, esistono come molecole di DNA, solitamente circolari, libere.



Alcuni plasmidi sono in grado di integrarsi nel cromosoma e di replicarsi con esso (episomi).

Si presentano in configurazione superavvolta ed hanno dimensioni <5% del cromosoma

Molti dei plasmidi dei G+ si replicano con un meccanismo detto “a cerchio rotante”

Huntington Potter and David Dressler

I plasmidi non portano geni essenziali per la sopravvivenza della cellula batterica in condizioni normali.

**Caratteristiche osservabili (fenotipi)
correlate alla presenza di plasmidi**

Tab. 10.3 Alcuni fenotipi conferiti dai plasmidi nei procarioti

Classe di fenotipo^a	Organismo^b
Produzione di antibiotico	<i>Streptomyces</i>
Coniugazione	<i>Escherichia coli, Pseudomonas, Rhizobium, Staphylococcus, Streptococcus, Sulfolobus, Vibrio</i>
<u>Funzioni fisiologiche</u>	
Degradazione dell'ottano, canfora, naftalina	<i>Pseudomonas</i>
Degradazione di erbicidi	<i>Alcaligenes</i>
Formazione di acetone e butanolo (➤ vol. 2A, cap. 16.20)	<i>Clostridium</i>
Utilizzazione di lattosio, saccarosio o urea, fissazione dell'azoto (➤ vol. 2A, cap. 20.22)	<i>Batteri enterici</i>
Nodulazione e fissazione simbiotica dell'azoto	<i>Rhizobium</i>
Produzione di pigmenti	<i>Erwinia, Staphylococcus</i>
<u>Resistenza</u>	
Resistenza agli antibiotici (➤ cap. 14.12)	<i>Campylobacter, batteri enterici, Neisseria, Staphylococcus</i>
Resistenza a cadmio, cobalto, mercurio, nichel e/o zinco (➤ vol. 2A, cap. 20.16)	<i>Acidocella, Alcaligenes, Listeria, Pseudomonas, Staphylococcus</i>
Resistenza (e produzione) di batteriocine	<i>Bacillus, batteri enterici, Lactococcus, Propionibacterium</i>
<u>Virulenza</u>	
Invasione della cellula ospite	<i>Salmonella, Shigella, Yersinia</i>
Coagulasi, emolisina, enterotossina (➤ vol. 2B, cap. 25.9 e 25.11)	<i>Staphylococcus</i>
Enterotossina, antigene K (➤ vol. 2A, cap. 16.11 e vol. 2B, cap. 25.11)	<i>Escherichia</i>
Tumorigenicità nelle piante (➤ vol. 2A, cap. 20.21)	<i>Agrobacterium</i>

^a Sono indicati solo alcuni dei molti fenotipi associati ai plasmidi.

^b Sono forniti solo alcuni esempi ben caratterizzati. Tutti gli organismi inseriti nella lista sono Batteri eccetto per *Sulfolobus*, che è un membro degli Archea.

Plasmide F (F → fertilità)

E. coli → 99159 paia di basi

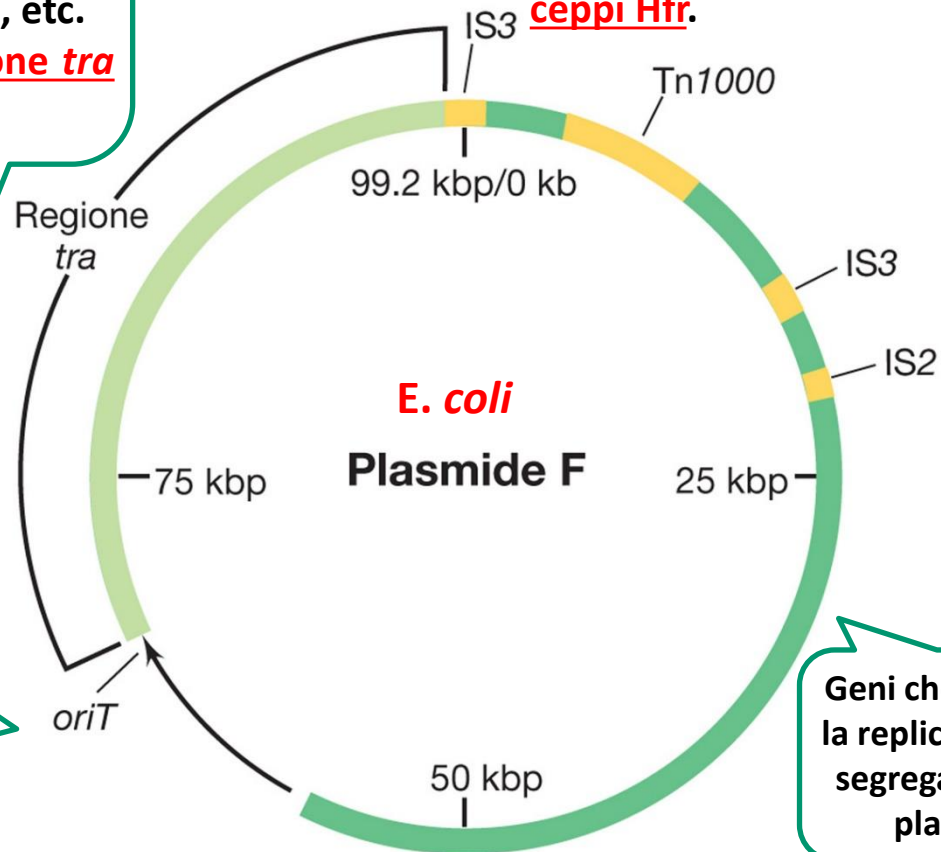
La **regione tra** contiene geni che intervengono nel trasferimento del plasmide da una cellula all'altra (coniugazione), nella replicazione, etc.

Durante la coniugazione, la regione tra è l'ultima ad essere trasferita.



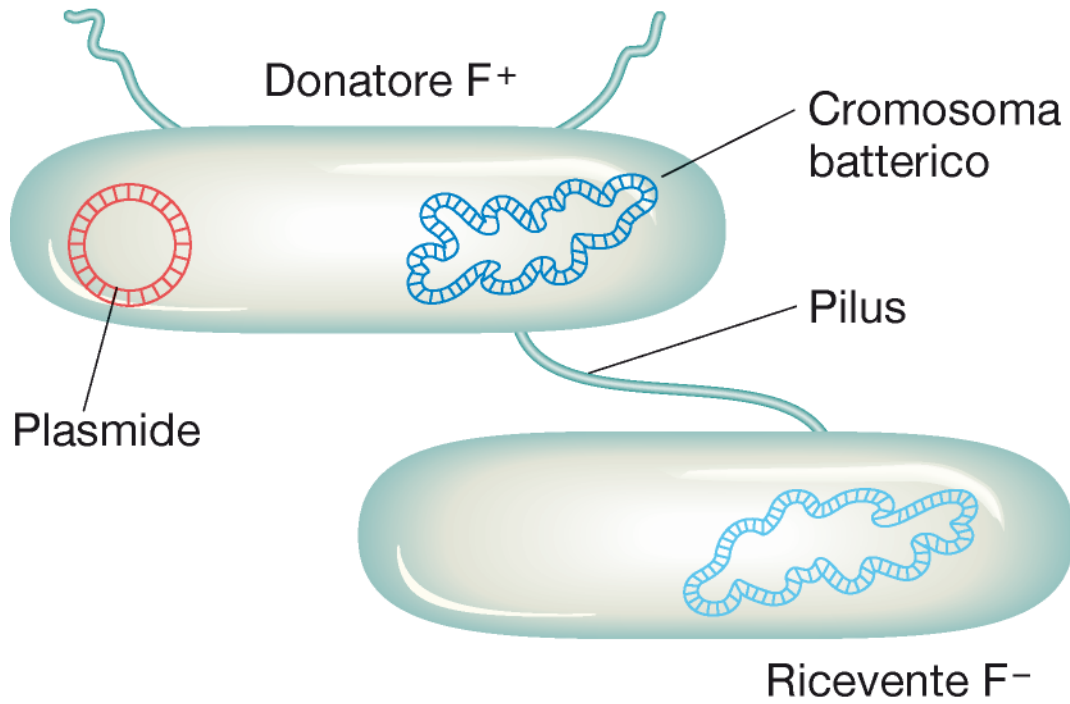
La **Sequenza oriT** contiene l'**origine del trasferimento** durante la coniugazione.

Le **regioni IS** e **Tn** rappresentano le sequenze trasponibili, che ricombinando con tratti del DNA cromosomico batterico, consentono la formazione di **ceppi Hfr**.

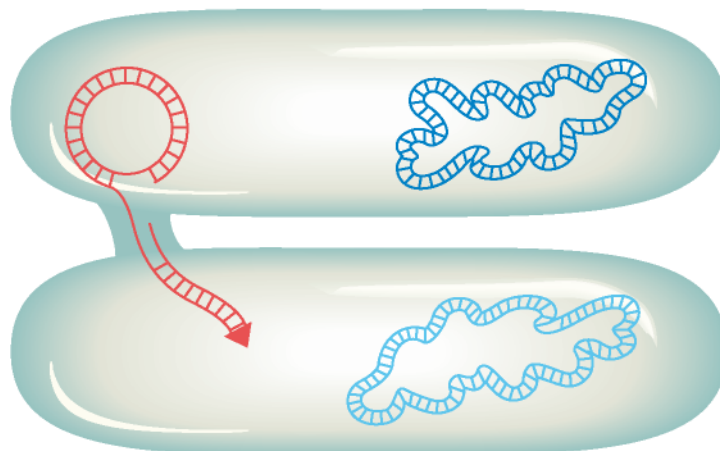


Geni che regolano la replicazione e la segregazione del plasmide

(a)



(b)



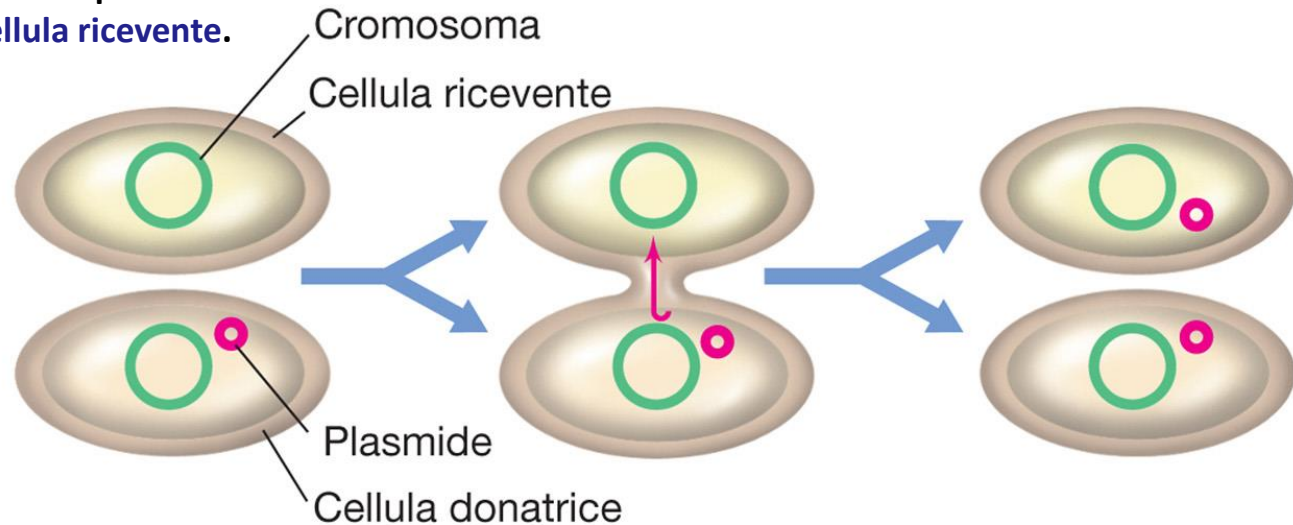
Molti dei plasmidi dei G⁺ si replicano con un meccanismo detto "a cerchio rotante"

Trasferimento dei plasmidi

I trasferimenti dei plasmidi avvengono frequentemente per **coniugazione**, in seguito a processi replicativi.

I plasmidi che sono in grado di trasferirsi da una cellula all'altra sono detti **coniugativi**.

La coniugazione coinvolge una **cellula donatrice** (contenente un plasmide coniugativo) ed una **cellula ricevente**.

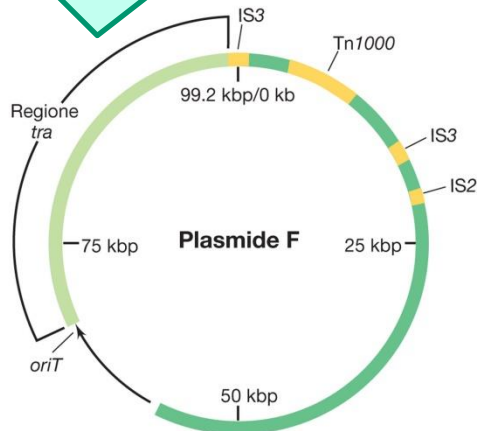


In rari casi, in seguito alla lisi di una cellula batterica, plasmidi liberati nell'ambiente possono essere acquisiti da un nuovo ospite.

I plasmidi possono essere scambiati anche tra specie batteriche molto diverse (tra G+ e G-, batteri e cellule vegetali, batteri e funghi).

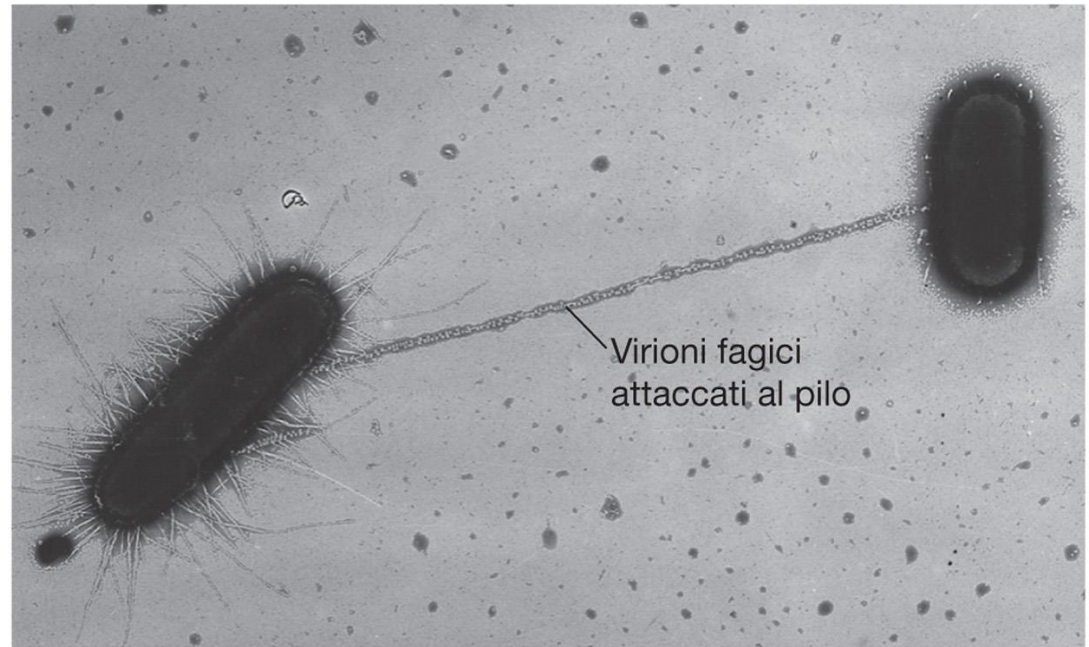
I geni che dirigono il processo di coniugazione sono localizzati sul plasmide.

Alcuni geni della **regione tra** del plasmide (F o coniugativo) codificano la sintesi del **pilo sessuale** (pilo F).



M.T. Madigan, J.M. Martinko Brock, Biologia dei Microrganismi Copyright © 2007 Casa Editrice

La coniugazione comporta il contatto cellula-cellula.



C. Brinton

M.T. Madigan, J.M. Martinko

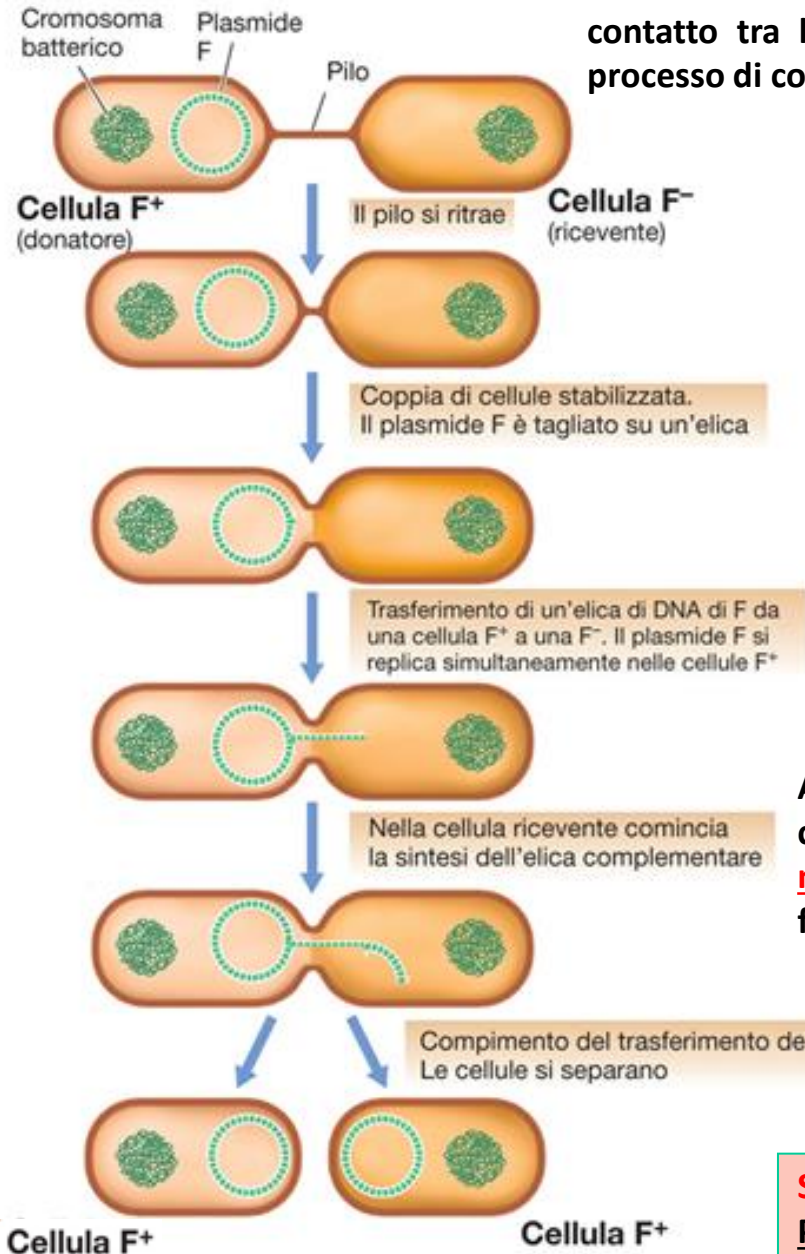
Brock, Biologia dei Microrganismi

Copyright © 2007 Casa Editrice Ambrosiana

Il pilo riconosce dei **recettori** presenti sulla superficie della **cellula ricevente**. Dopo il legame, il pilo ritraendosi (depolimerizzazione) permette il contatto tra proteine delle membrane del donatore e del ricevente consentendo, infine, il trasferimento del DNA.

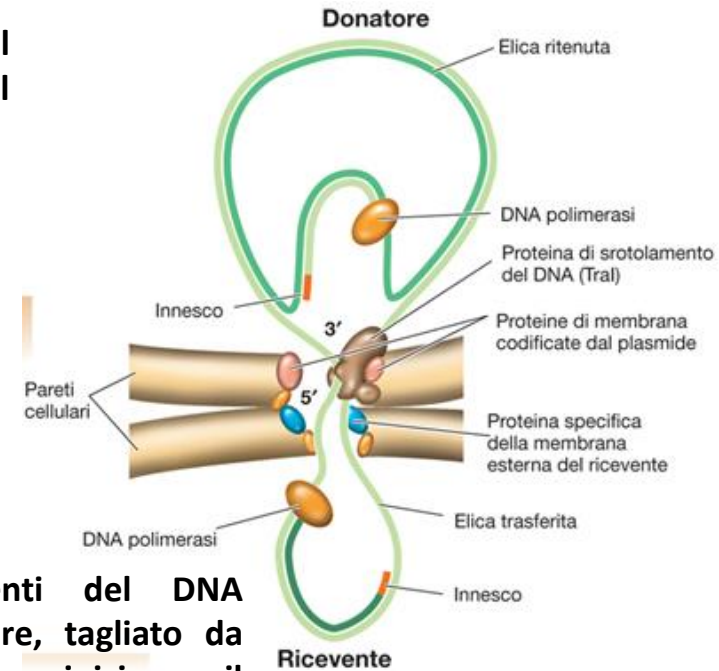
Se il plasmide si è precedentemente integrato nel cromosoma batterico (**EPISOMA**), nel corso della coniugazione possono essere mobilizzati (trasferiti) geni che fanno parte del cromosoma.

Processo di coniugazione



Alla fine del processo di coniugazione entrambe le cellule avranno una copia del plasmide.

Nel momento in cui avviene il contatto tra le cellule ha inizio il processo di coniugazione.



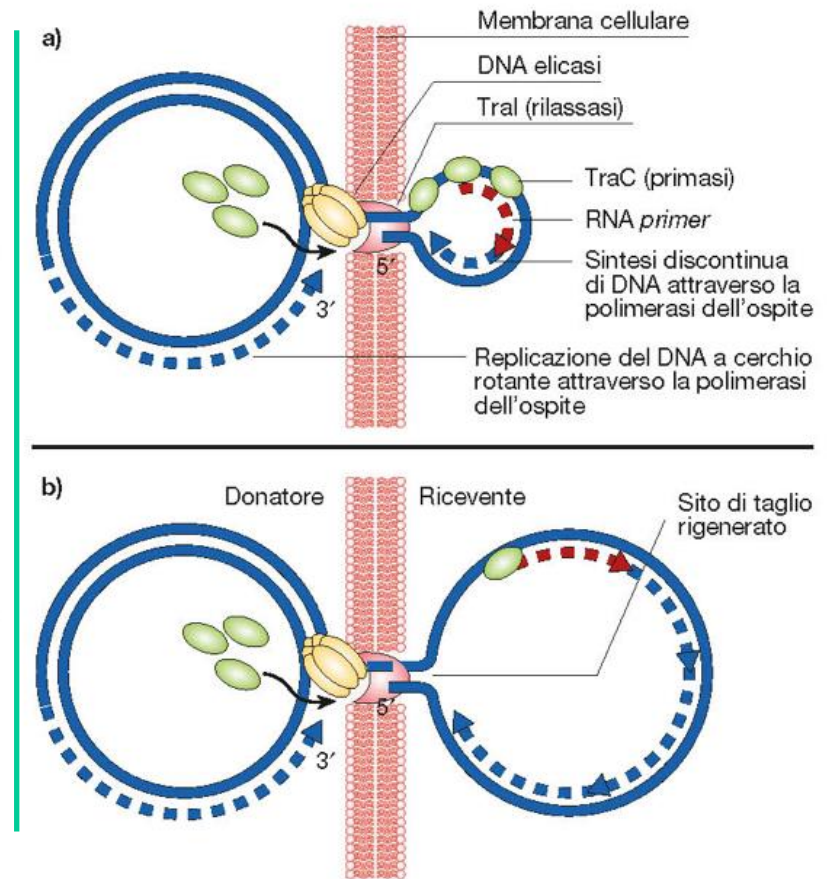
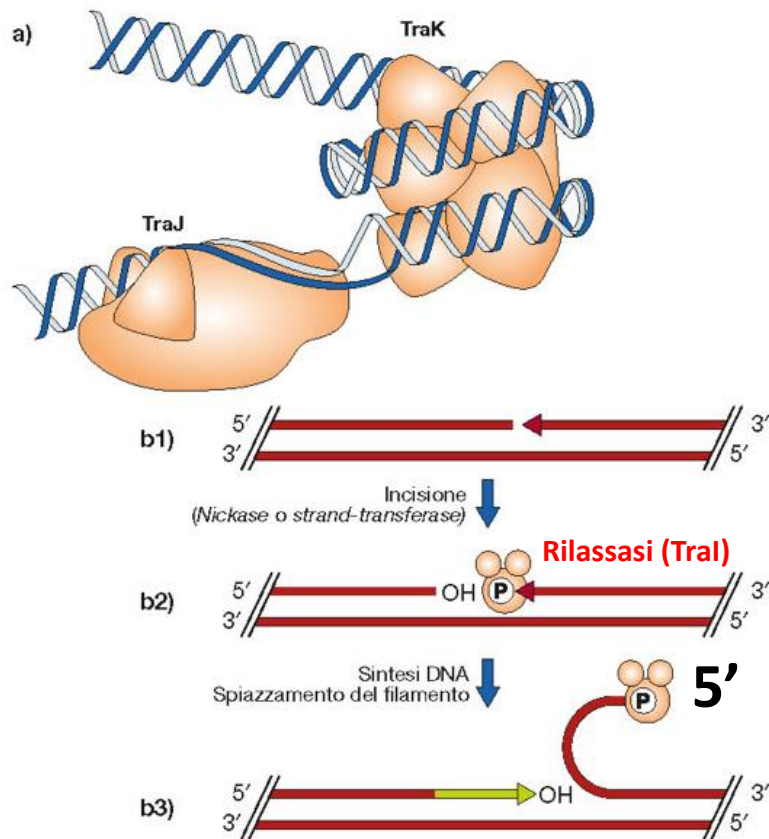
Uno dei filamenti del DNA plasmidico circolare, tagliato da una **nucleasi**, inizia il trasferimento verso la cellula ricevente.

Appena iniziato il trasferimento del filamento spezzato (5'), la cellula donatrice avvia la **sintesi continua** di DNA, mediante il **meccanismo del cerchio rotante**, per sostituire il filamento in fase di trasferimento.

Contemporaneamente nella cellula ricevente viene sintetizzato (**sintesi discontinua**) un filamento complementare al filamento in trasferimento.

Significato ecologico

Poche cellule portatrici di plasmidi, che conferiscono **vantaggio selettivo** in particolari condizioni, possono convertire in brevissimo tempo un'intera popolazione di riceventi.



Nel processo di coniugazione sono coinvolte numerose proteine.

- Le **elicasi** srotolano la doppia elica del DNA.
- Le **DNA girasi** eliminano i superavvolgimenti positivi indotti dall'attività dell'elicasi a monte della forza replicativa.
- La proteina **TraI (rilassasi)** effettua un taglio in uno dei filamenti del plasmide nel sito *nic* di *oriT* ed avvia il trasferimento.
- La **DNA polimerasi III**, nella cellula donatrice, presiede all'allungamento (continuo) del nuovo filamento di DNA in direzione 5'→3', utilizzando come stampo il filamento 3'→5'.
- Sul filamento 5'→3', nella cellula ricevente, la replicazione procede dopo l'aggiunta di **inneschi di RNA** da parte della **primasi (TraC)**.
- Alla primasi succede la **polimerasi III** che procede con l'allungamento della catena (discontinuo).

Formazione di ceppi HFR e mobilizzazione del cromosoma

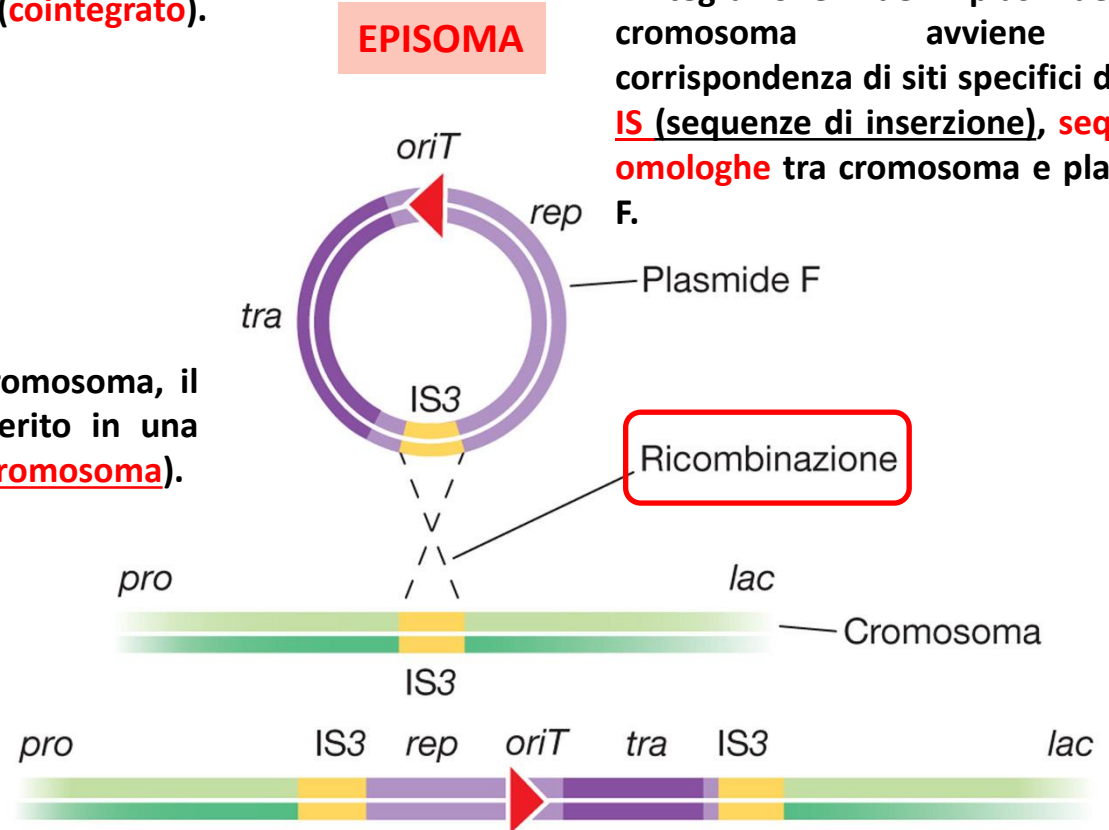
La coniugazione consente il trasferimento di geni dal cromosoma di una cellula batterica all'altra.

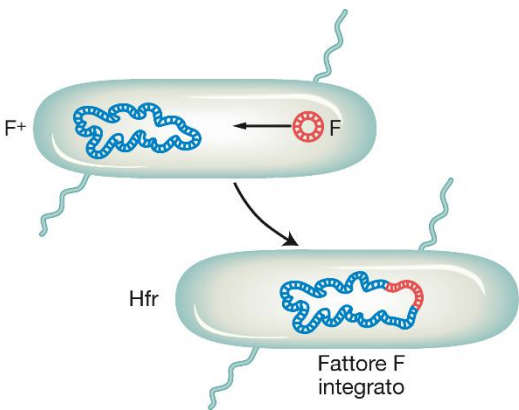
Il plasmide F, in corrispondenza di particolari sequenze, può integrarsi nel cromosoma dell'ospite (**cointegrato**).

L'integrazione del plasmide nel cromosoma avviene in corrispondenza di siti specifici definiti **IS (sequenze di inserzione)**, **sequenze omologhe** tra cromosoma e plasmide F.

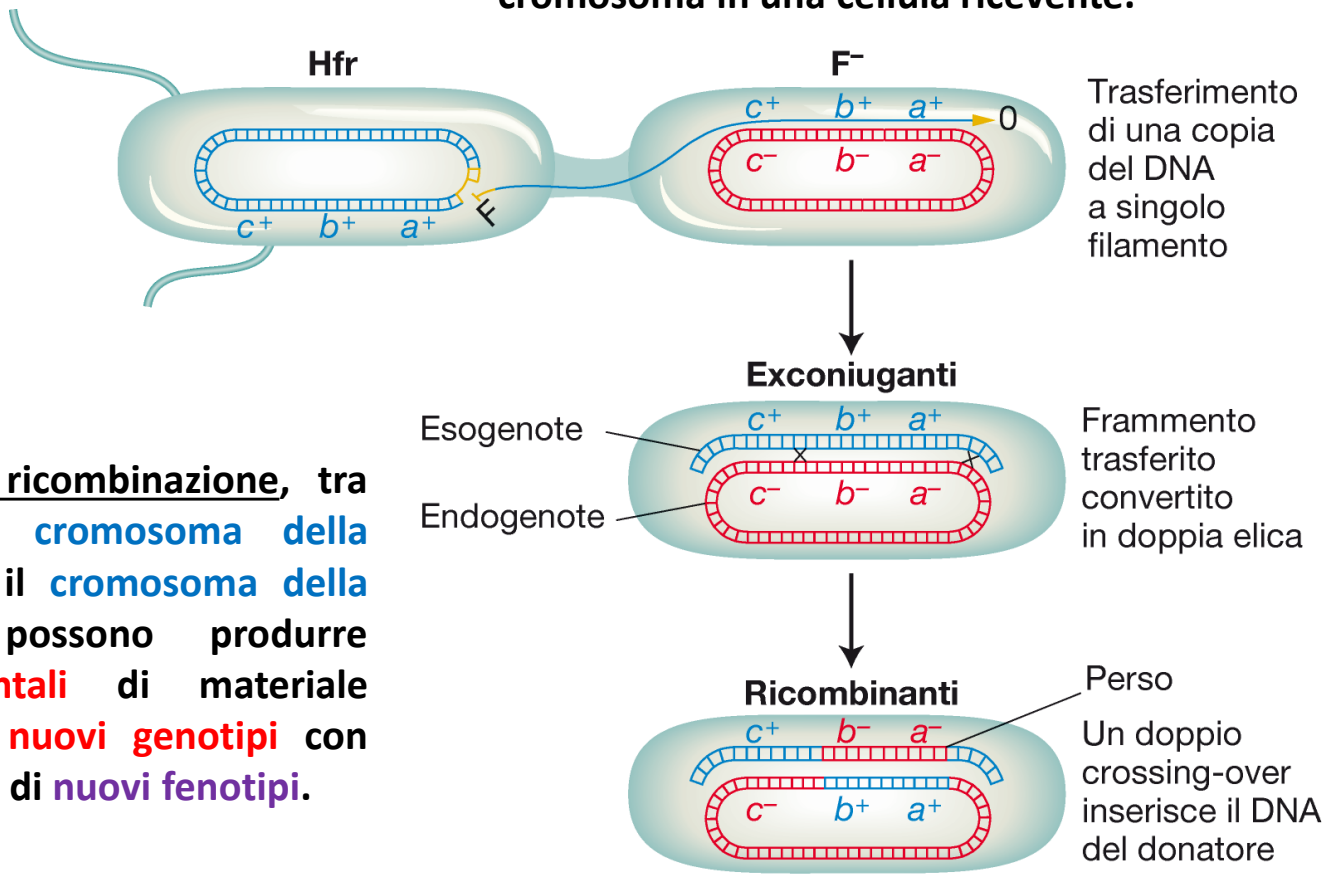
Quando il plasmide si integra nel cromosoma, il cromosoma stesso può essere trasferito in una cellula ricevente (**mobilizzazione del cromosoma**).

Le cellule che hanno un plasmide integrato nel cromosoma vengono definite **CELLULE HFR!**





Cellule HFR possono, **solo** **potenzialmente**, trasferire l'intero cromosoma in una cellula ricevente.



Trasferimento di una copia del DNA a singolo filamento

Exconiuganti

Frammento trasferito convertito in doppia elica

Ricombinanti

Perso
Un doppio crossing-over inserisce il DNA del donatore

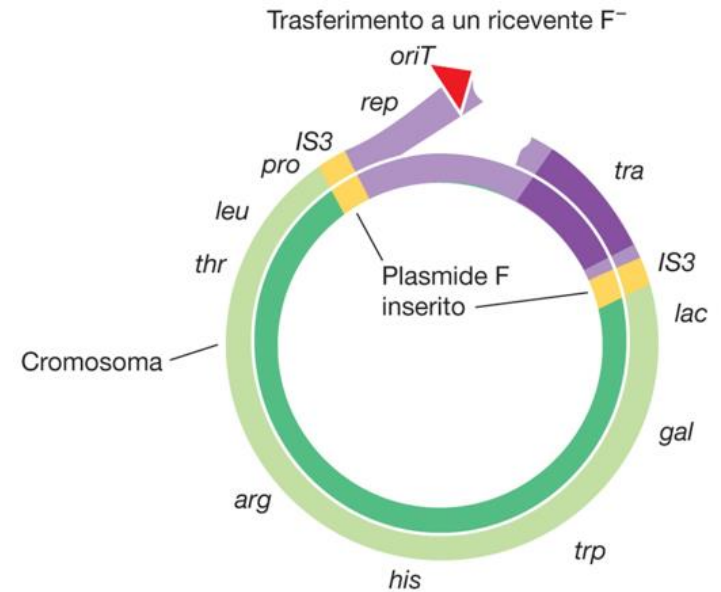
Successivi eventi di ricombinazione, tra **tratti omologhi del cromosoma della cellula donatrice** ed il **cromosoma della cellula ricevente**, possono produrre **trasferimenti orizzontali** di materiale genetico, generando **nuovi genotipi** con eventuale espressione di **nuovi fenotipi**.

Il plasmide integrato, pur dipendendo per la sua replicazione dal cromosoma, continua ad essere in grado di dirigere la sintesi del *pilus*.

Quando la cellula donatrice stabilisce un contatto con la cellula ricevente, il plasmide avvia il **trasferimento del DNA partendo dalla regione *oriT***.

Appena terminato il passaggio di parte del plasmide (*oriT*, *rep*, *IS3*, ...) comincia, senza interruzione, il **trasferimento del DNA cromosomico** (*pro*, *leu*, ...).

Il trasferimento terminerebbe, infine, con un tratto del plasmide che comprende la regione *tra*.



Tuttavia, durante questo processo, solitamente avviene una rottura nel filamento di DNA, prima che il trasferimento dell'intero cromosoma nella cellula ricevente sia completato.

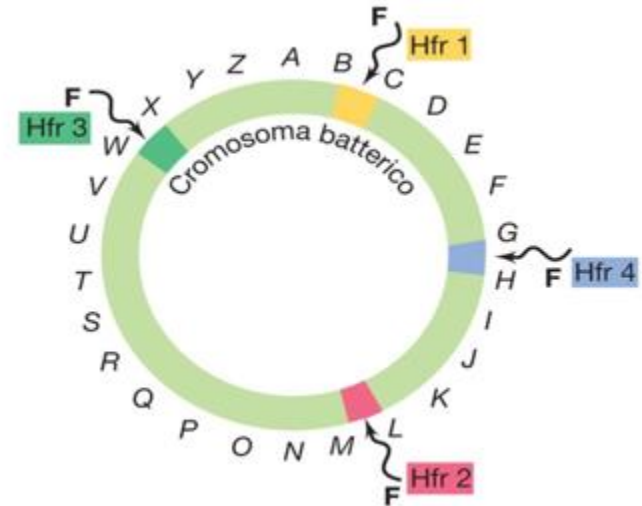
Eventi di ricombinazione possono avvenire solo tra tratti del cromosoma del donatore, che sono penetrati nel ricevente, e regioni omologhe del cromosoma del ricevente!

Di solito, i ceppi Hfr non convertono le cellule F⁻ in F⁺

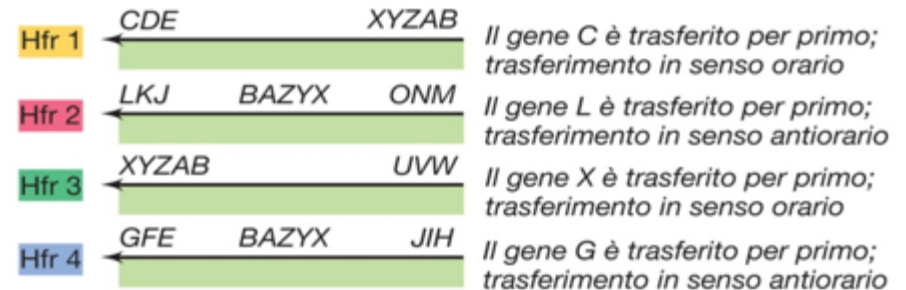
↑
raramente l'intero plasmide integrato viene trasportato all'interno della cellula ospite.

Per **alta frequenza di ricombinazione** si intende la ricombinazione tra cromosoma del donatore e cromosoma del ricevente.

Dall'unione di ceppi Hfr⁺ con cellule F⁻ derivano cellule Hfr e **cellule F⁻ con un nuovo genotipo** (o fenotipo).



Formazione di differenti ceppi Hfr in funzione del sito di integrazione del plasmide nel cromosoma.



Il plasmide integrato può separarsi dal cromosoma.

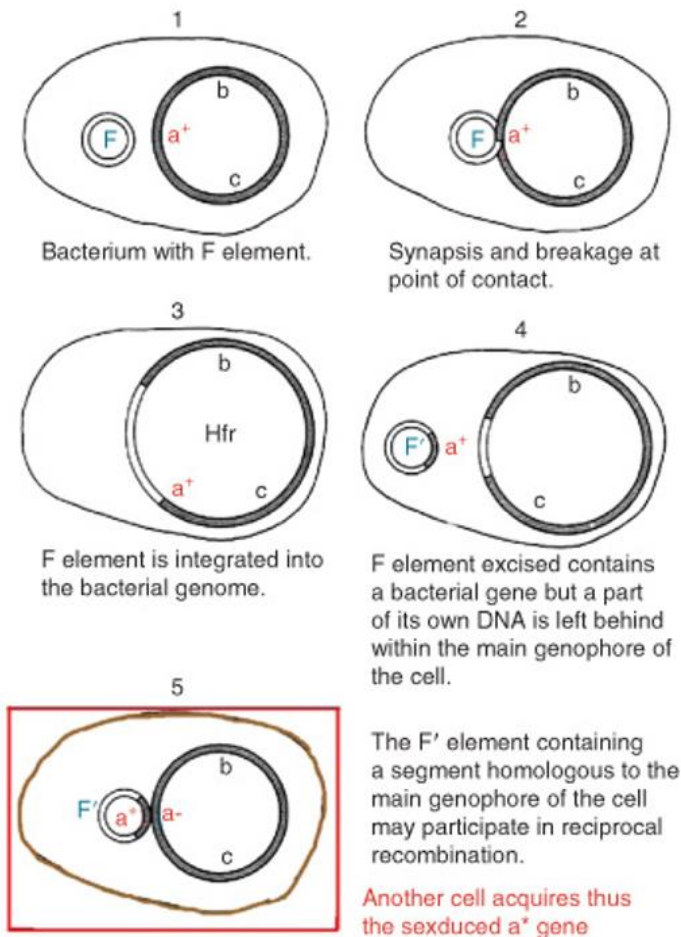
Durante l'escissione, per errore, geni cromosomici possono restare legati al plasmide liberato.

Il plasmide contenente geni cromosomici viene detto **plasmide F'**.

Processo noto come **F-DUZIONE**.

I geni cromosomici entrano a far parte del plasmide stabilmente e vengono trasferiti alla cellula ricevente.

Tale fenomeno è molto simile al trasferimento mediato dai virus (trasduzione).



(2008) **Sexduction (F-duction)**. In: Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics. Springer, Dordrecht.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_15485

Nella cellula ricevente, il plasmide F' determina la coesistenza di 2 copie di uno o più geni, generando dei **diploidi parziali (merodiploidi)**.

Trasposoni e sequenze di inserzione

Elementi trasponibili

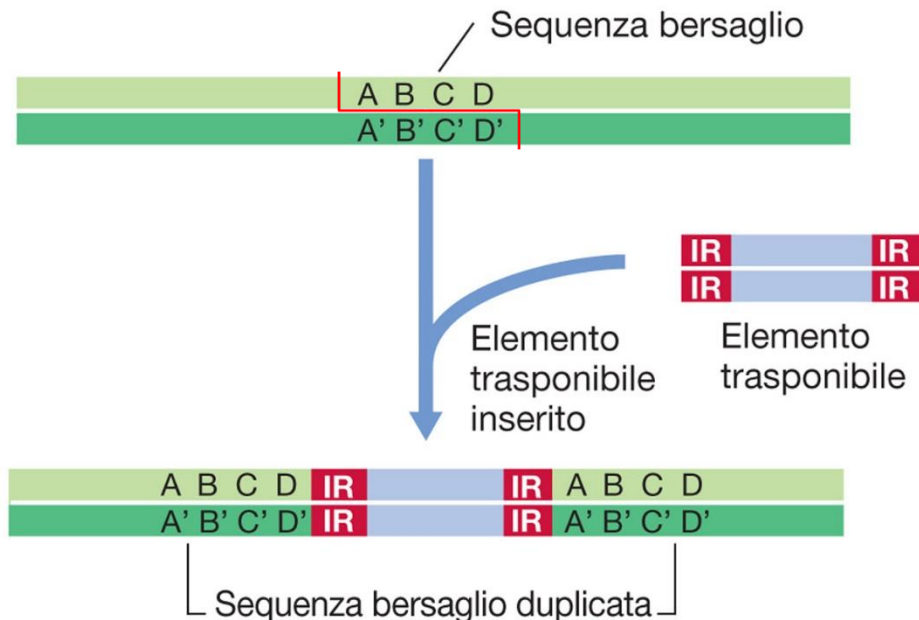
- Tratti di DNA che possono spostarsi da un punto all'altro della stessa molecola o di molecole diverse.
- Non hanno origine di replicazione autonoma.
- Esistono solo come molecole integrate nei cromosomi, nei plasmidi, nei genomi virali.
- Contribuiscono alla variabilità genetica.

Sequenze d'inserzione (IS) → contengono solo l'informazione genetica per la propria trasposizione.

Trasposoni (Tn) → oltre ai geni per la trasposizione portano altri geni (es. resistenza antibiotici).

Le **sequenze d'inserzione (IS)** sono gli elementi trasponibili più semplici

Mediante un processo di **trasposizione** i geni possono spostarsi all'interno del cromosoma. Anche la trasposizione contribuisce all'**evoluzione microbica**



Inserzione di un elemento trasponibile:

Per la trasposizione sono necessarie le **ripetizioni invertite** presenti alle estremità dell'elemento trasponibile e l'enzima **trasposasi**

l'inserzione genera la duplicazione della sequenza bersaglio sul cromosoma