

Lezione 4: Meccanismi di variabilità genetica nei microrganismi

DOTT. ROSA ANNA NASTRO – STANZA 425° - 4°PIANO, LATO NORD

EMAIL: ROSA.NASTRO@UNIPARTHENOPE.IT

Come si riproducono i batteri

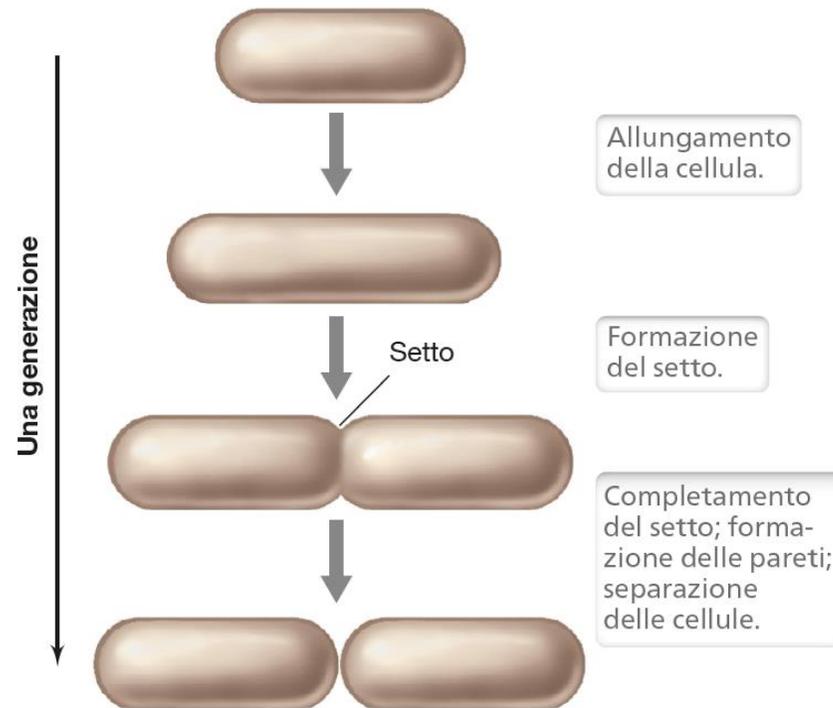
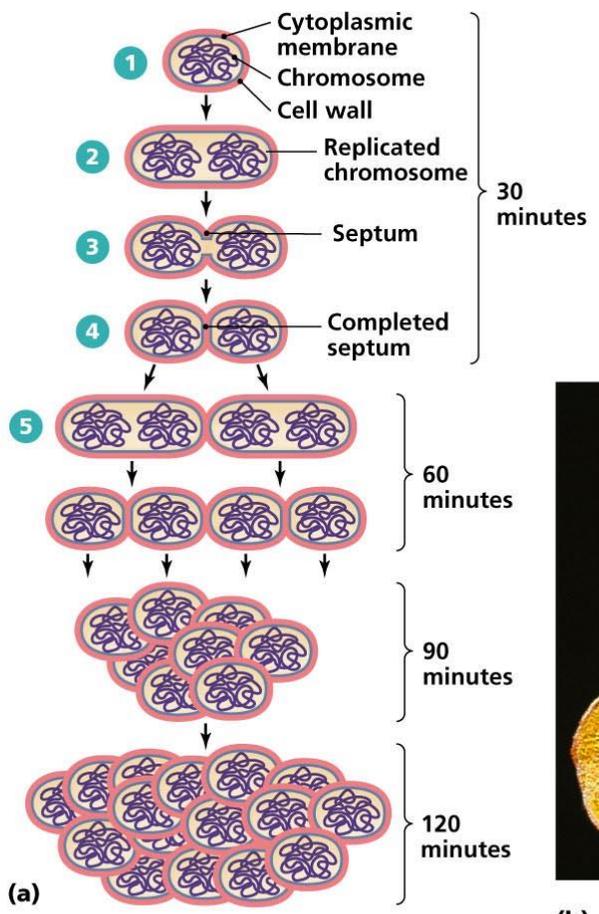


Figura 4.8 Scissione binaria in un batterio a bastoncino. Le cellule (e tutti i componenti cellulari) raddoppiano a ogni generazione.

- ❑ Scissione o fissione binaria: il DNA cromosomico si duplica, la membrana batterica e la parete cellulare si invaginano sino ad incontrarsi e la cellula si divide in due. Le due celle si separano e il processo è completo.
- ❑ la variabilità genetica è assicurata dai meccanismi di trasformazione, coniugazione e trasduzione.



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

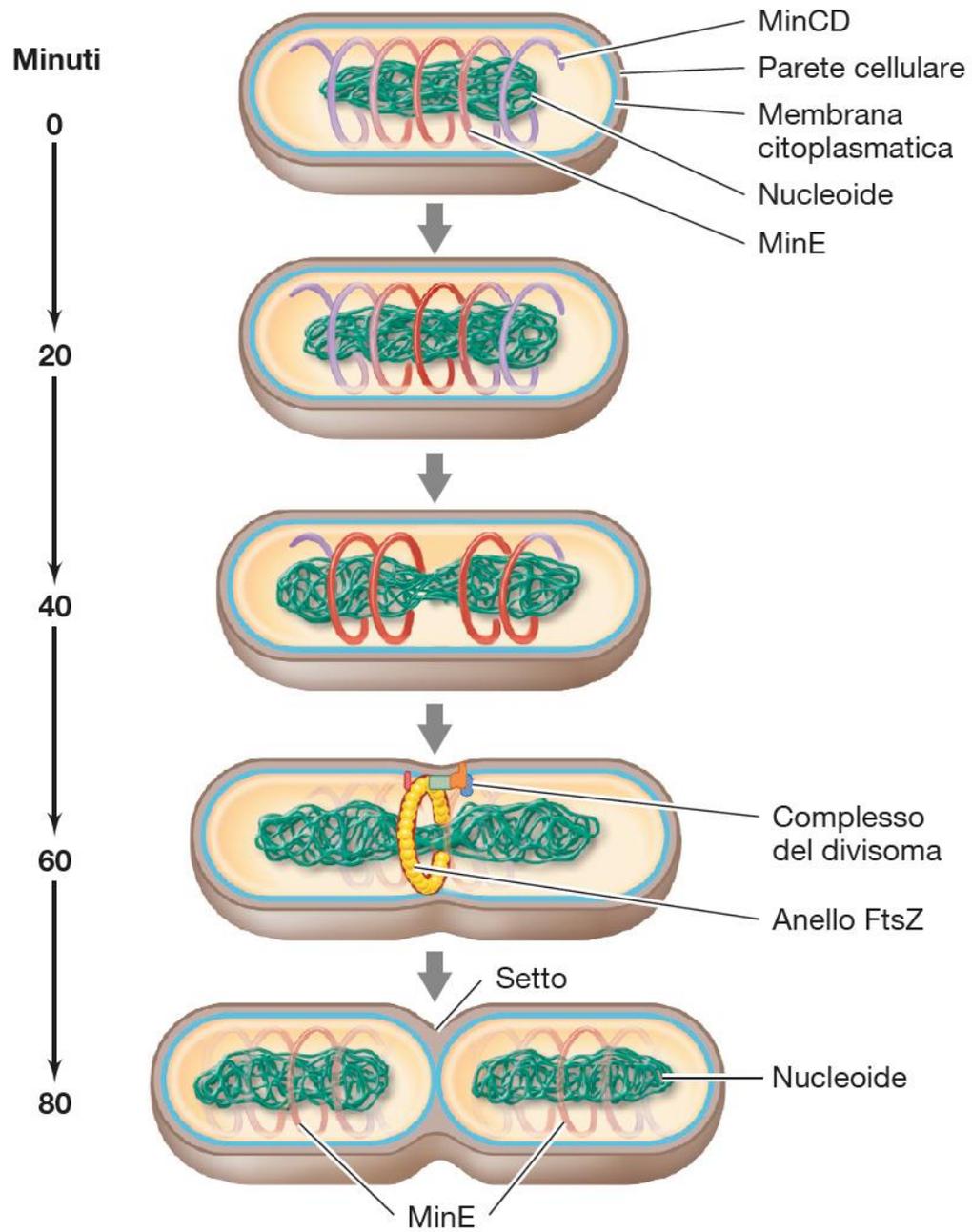
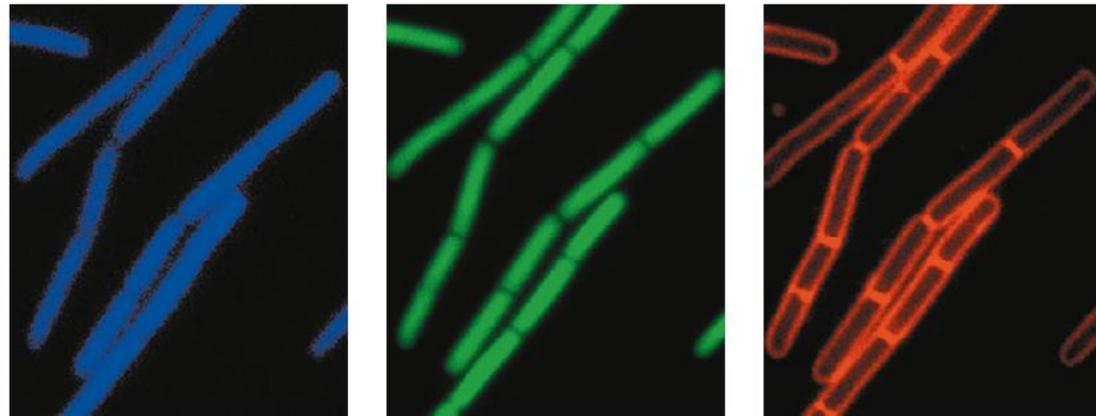


Figura 8.9 Replicazione del DNA ed eventi della divisione cellulare. La proteina MinE dirige la formazione dell'anello FtsZ e del complesso del divisoma sul piano di divisione della cellula. Nell'immagine si può vedere la rappresentazione schematica di una cellula di *Escherichia coli* in crescita con un tempo di duplicazione di 80 min. MinC e MinD sono più abbondanti ai poli della cellula durante la formazione dell'anello FtsZ.



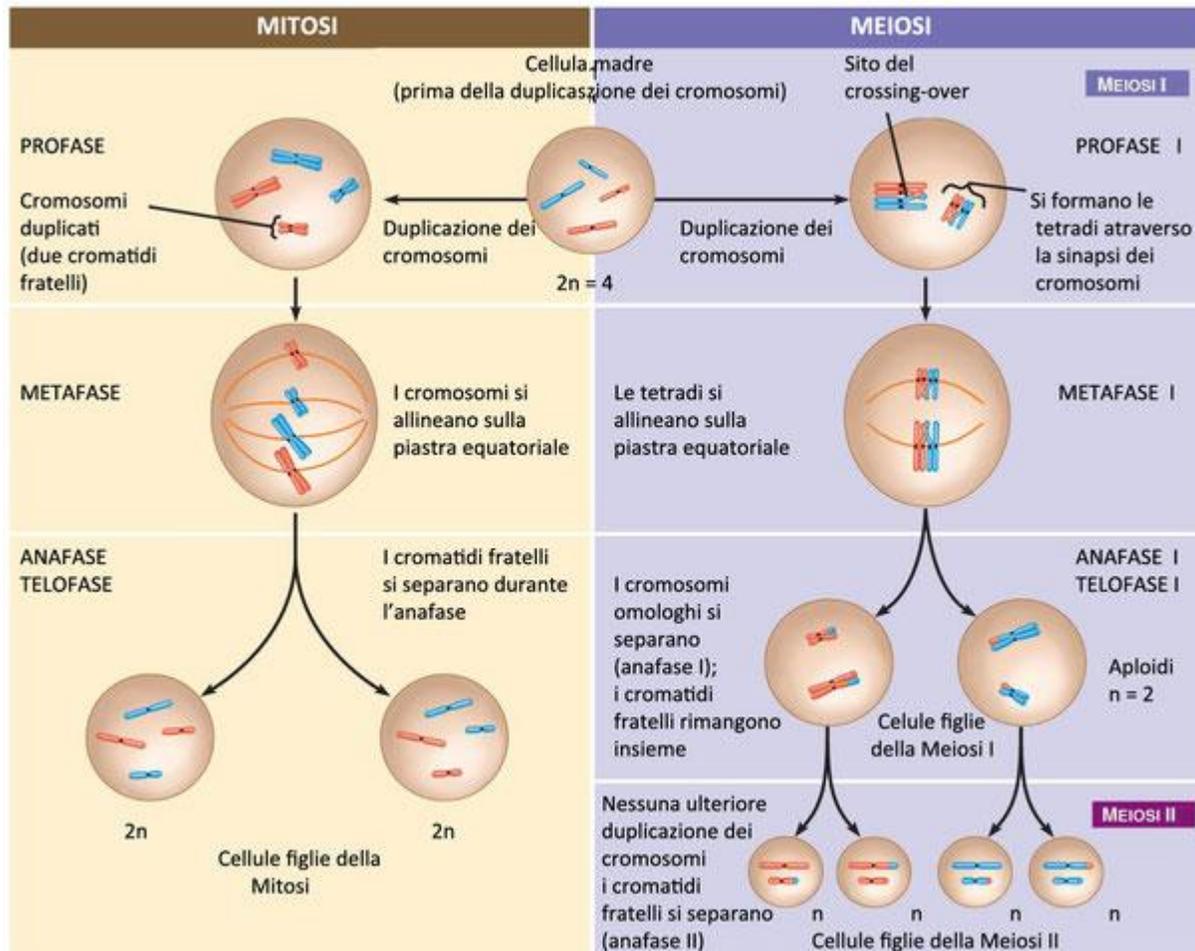
Patricia Dominguez-Cuevas

(a)

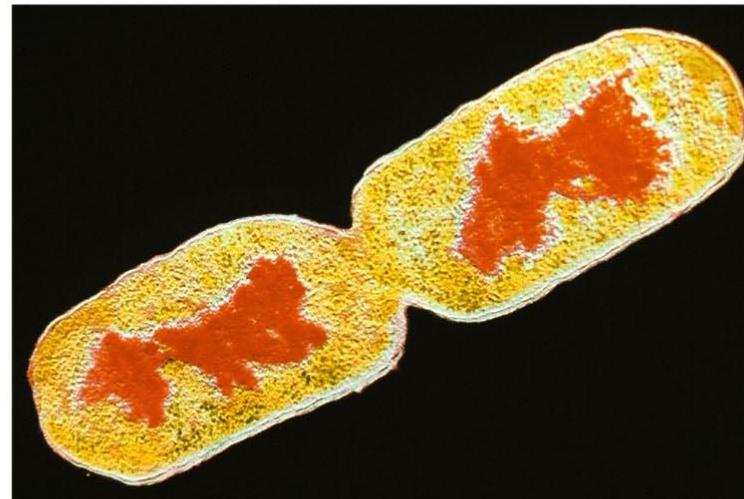
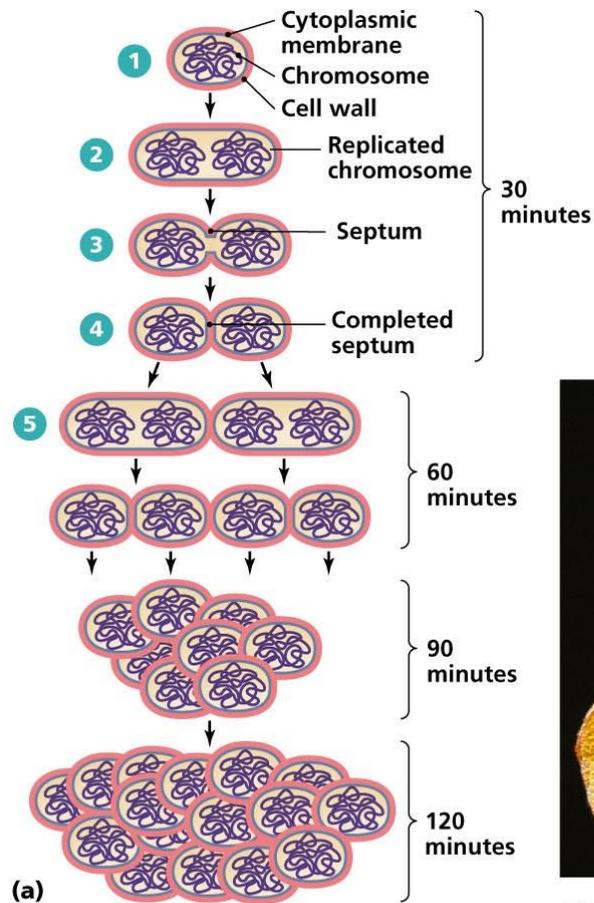
(b)

(c)

Figura 4.9 Setti. Il setto che separa le cellule in divisione del batterio *Bacillus subtilis* è ben visibile in questa serie di micrografie a fluorescenza. (a) Il DAPI colora l'intera cellula. (b) La proteina verde fluorescente illumina le cellule intere. (c) Un colorante che colora solo la membrana citoplasmatica mostra che i setti sono composti da materiale costituente la membrana (e la parete cellulare).



Nei funghi, nelle alghe unicellulari e nei protozoi, la riproduzione comporta una duplicazione del nucleo attraverso il processo della mitosi e una scissione della cellula attraverso la citochinesi. La riproduzione può anche avvenire tramite un processo sessuale in cui i nuclei aploidi si uniscono per formare una cellula diploide con due serie di cromosomi.

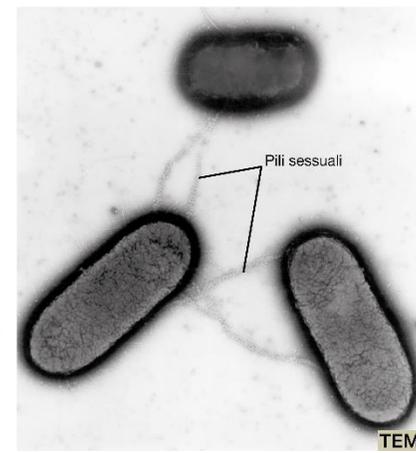
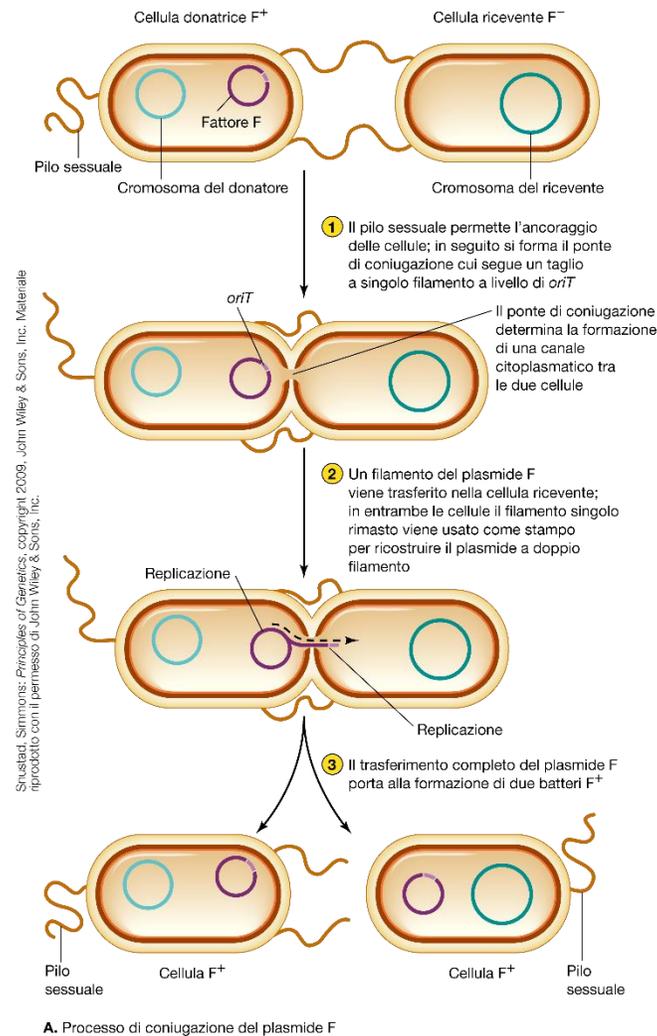


(b)

Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

I batteri si riproducono tramite il **processo asexuato della fissione binaria**. In questo processo, il DNA cromosomico si duplica, dopodiché la membrana batterica e la parete cellulare si invaginano sino ad incontrarsi e dividere la cellula in due. Le due celle si separano e il processo è completo.

La coniugazione permette il trasferimento genico anche tra cellule di domini differenti, oltre che tra specie differenti → trasferimento orizzontale

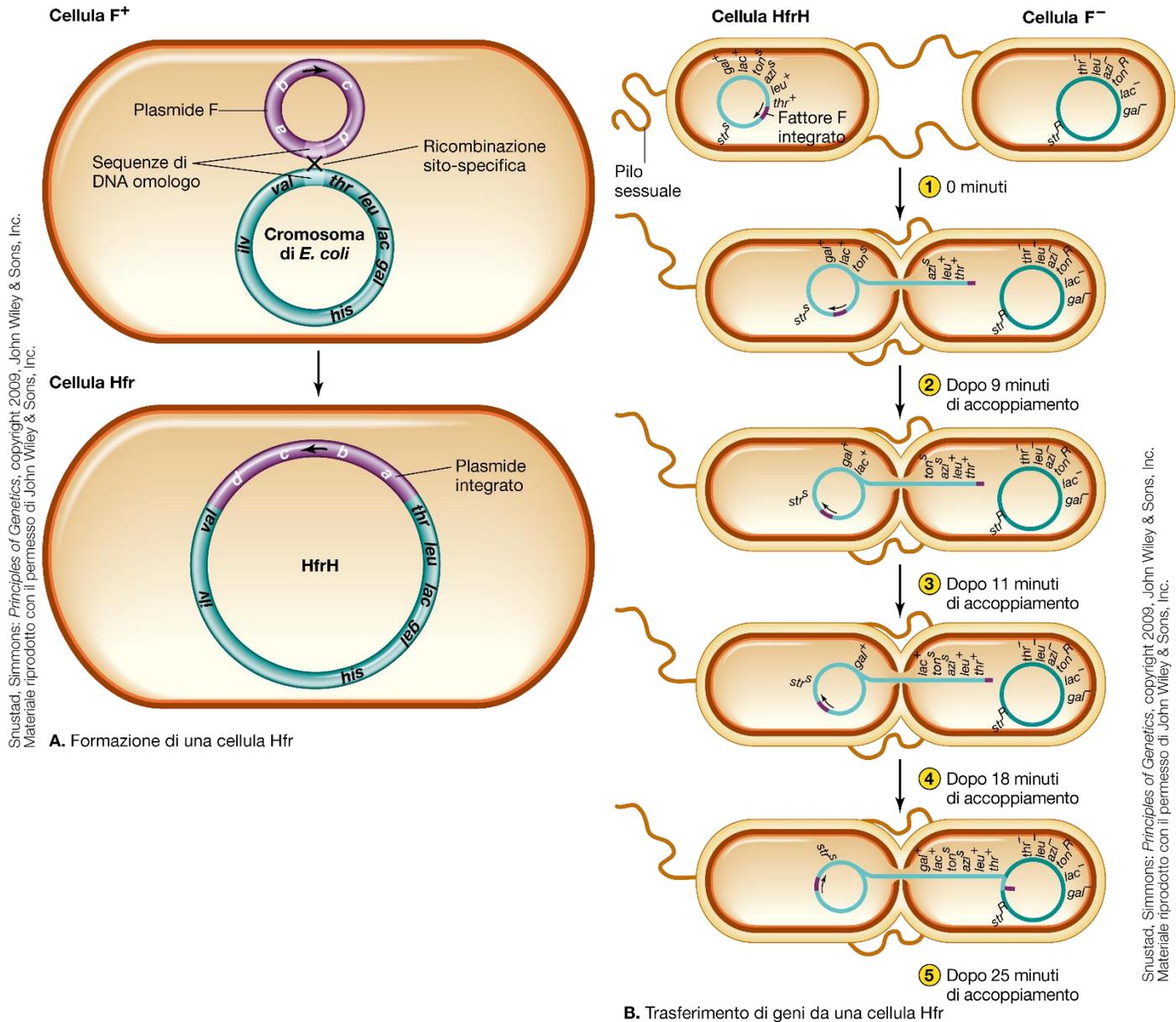


B. Coniugazione in *E. coli*

Coniugazione

Due cellule batteriche si uniscono tramite un pilo sessuale (geni *tra*) attraverso cui passa del materiale genetico

Figura 9.24. Schema di processo: formazione degli accoppiamenti tra cellule e trasferimento del DNA. La coniugazione avviene tra due cellule, una donatrice (F^+) e una ricevente (F^-) che formano ponti di coniugazione. **A.** I pili codificati dal plasmide F aiutano le cellule a mantenersi fisicamente unite e a facilitare il trasferimento del DNA, che avviene attraverso il ponte di coniugazione. **B.** Cellule di *E. coli* durante la coniugazione.

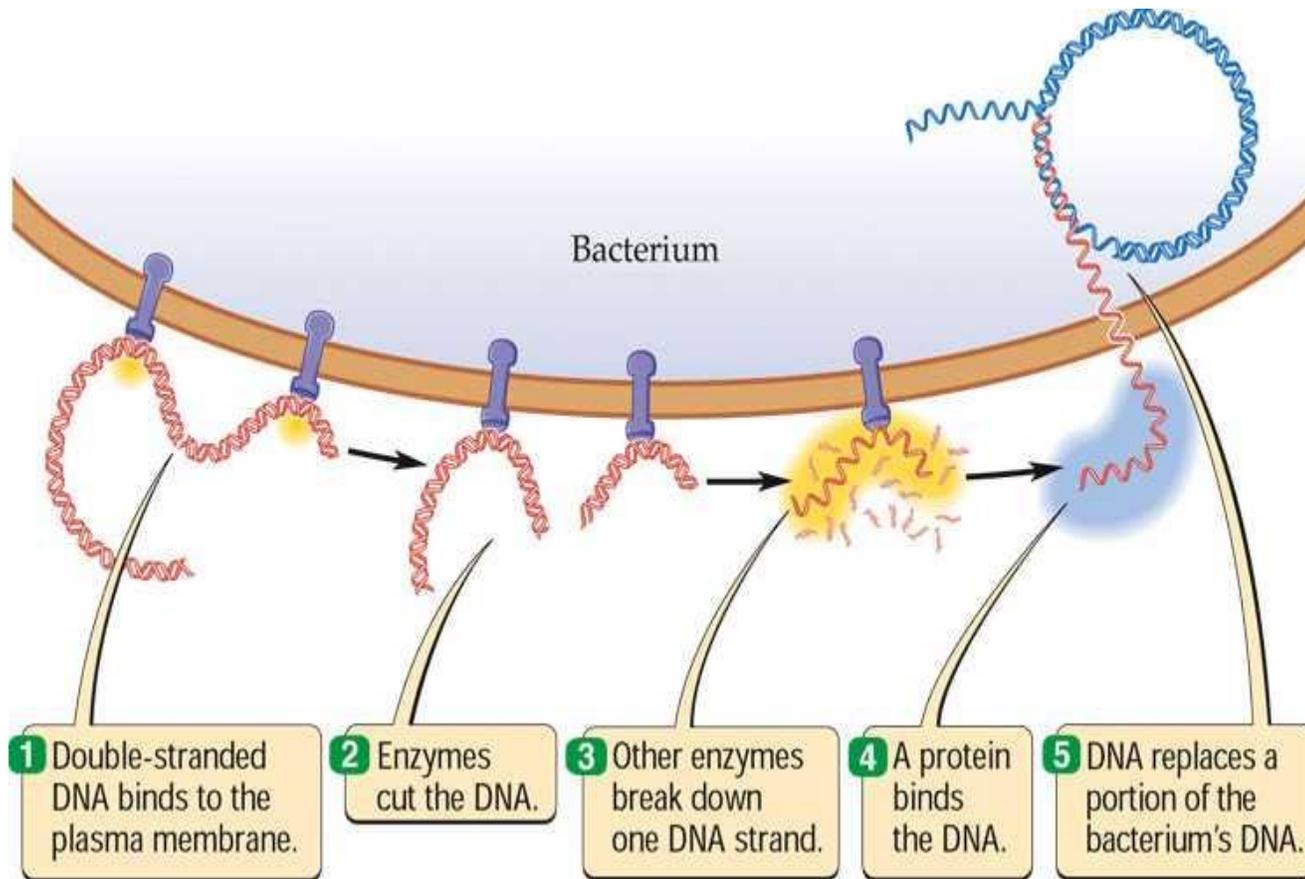


Snustad, Simmons: *Principles of Genetics*, copyright 2009, John Wiley & Sons, Inc. Materiale riprodotto con il permesso di John Wiley & Sons, Inc.

Snustad, Simmons: *Principles of Genetics*, copyright 2009, John Wiley & Sons, Inc. Materiale riprodotto con il permesso di John Wiley & Sons, Inc.

Talvolta l'integrazione del plasmide F nel DNA genomico e suo successivo distacco porta allo scambio di frammenti di DNA cromosomiale

Figura 9.25. La coniugazione mediata da un plasmide F integrato causa un'alta frequenza di ricombinanti (Hfr).



Trasformazione

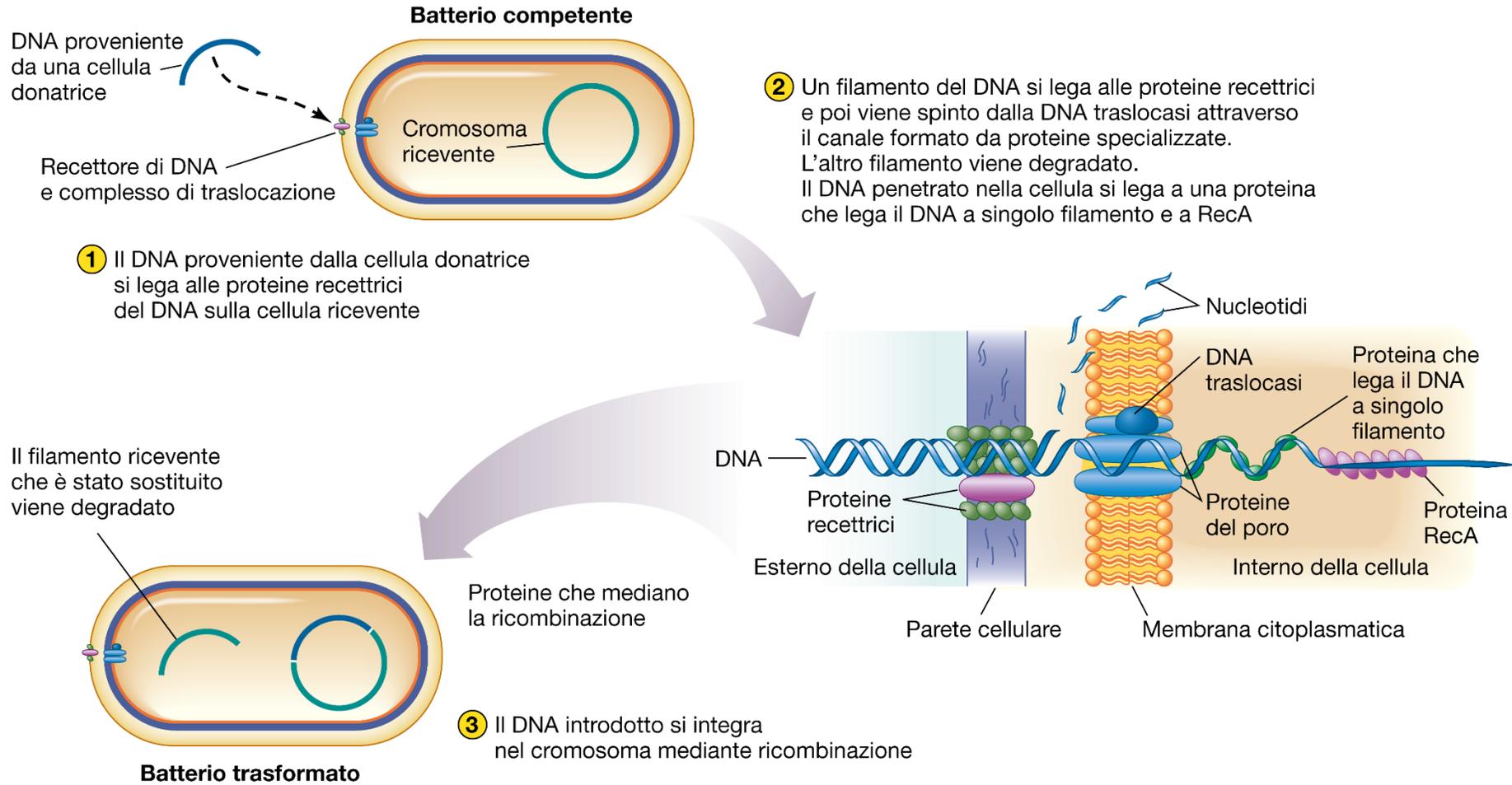
Trasferimento di DNA nudo dall'ambiente esterno alla cellula Batterica.

Alcune specie microbiche appartenenti ai generi *Bacillus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria* sono «naturalmente competenti»

NON C'E' CONTATTO CELLULARE DIRETTO!

[http://4.bp.blogspot.com/-](http://4.bp.blogspot.com/-72prEktJ3ks/TxtENntAUGI/AAAAAAAAABM/6ujEu5_9V1s/s1600/Transformation.jpg)

[72prEktJ3ks/TxtENntAUGI/AAAAAAAAABM/6ujEu5_9V1s/s1600/Transformation.jpg](http://4.bp.blogspot.com/-72prEktJ3ks/TxtENntAUGI/AAAAAAAAABM/6ujEu5_9V1s/s1600/Transformation.jpg)



Snustad, Simmons: *Principles of Genetics*, copyright 2009, John Wiley & Sons, Inc. Materiale riprodotto con il permesso di John Wiley & Sons, Inc.

Figura 9.22. Schema di processo: trasformazione di cellule batteriche competenti.

Gli elementi trasponibili (Sequenze di Inserzione e Trasposoni) operano il trasferimento di materiale genetico nell'ambito dello stesso genoma o tra genomi di organismi diversi → geni antibiotico-resistenza

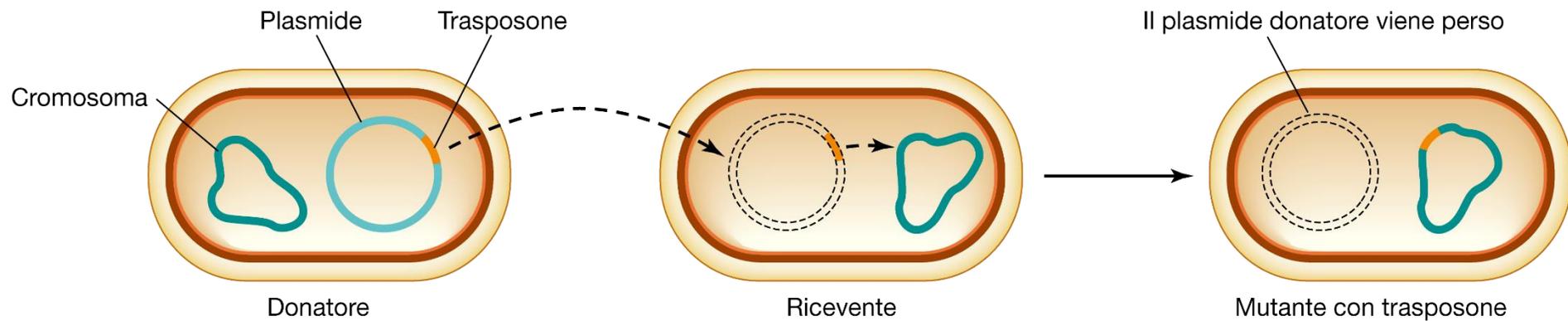
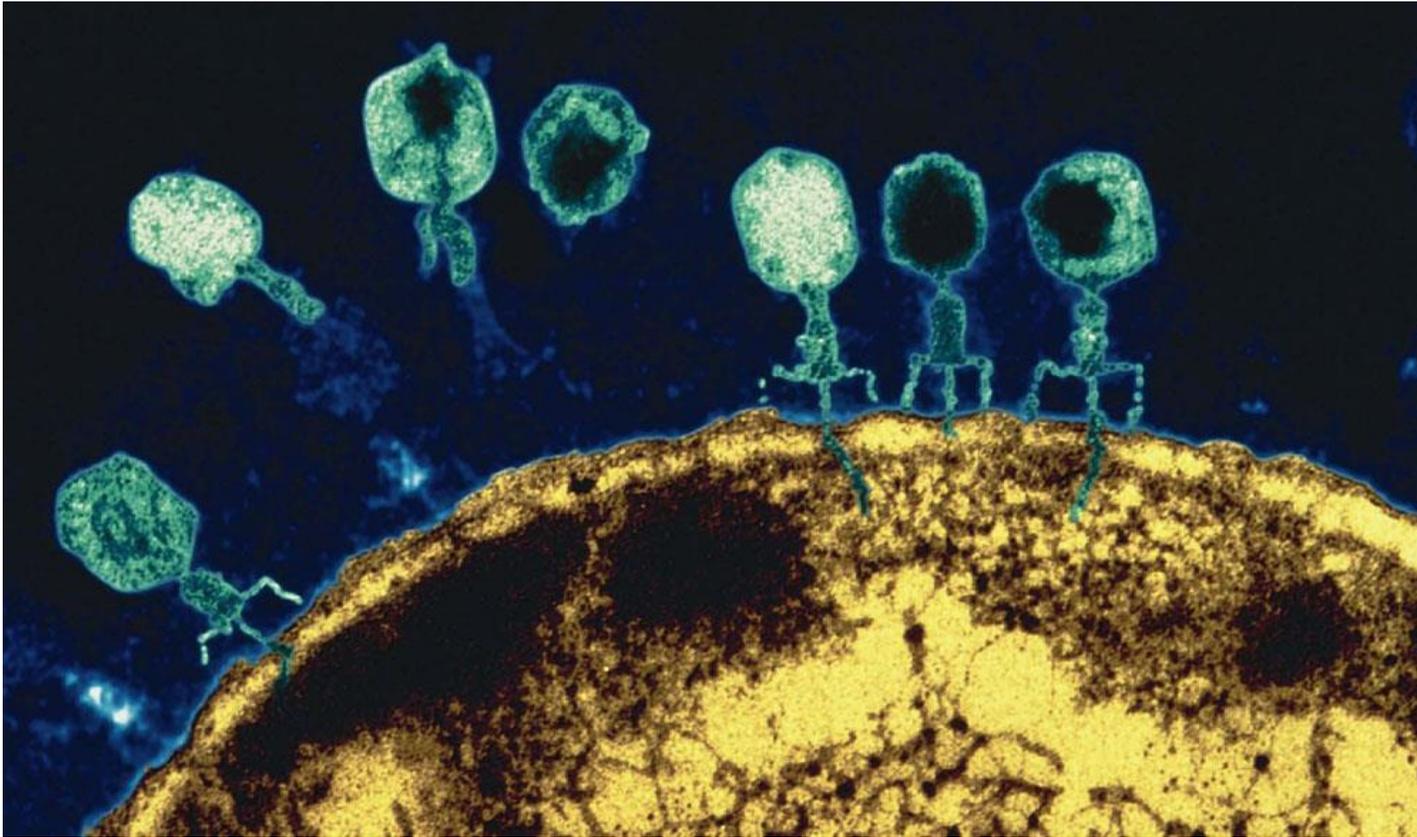
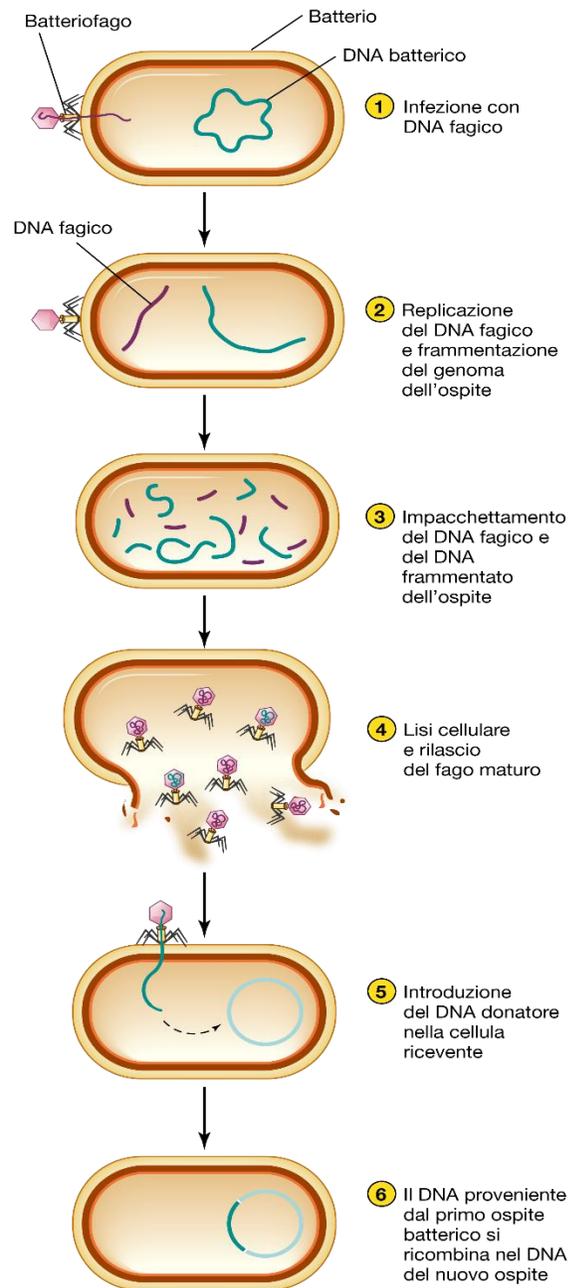


Figura 9.32. Vettore suicida per la mutagenesi con trasposoni. Un plasmide incapace di replicarsi nel ceppo ricevente può essere utilizzato per la mutagenesi mediante trasposoni. La selezione della resistenza all'antibiotico presente sul trasposone selezionerà le cellule che hanno integrato il trasposone all'interno del cromosoma.



Trasduzione

Materiale genetico di una cellula
si trasferisce in un'altra grazie
all'azione di virus



Parti del DNA genomico della cellula infettata vengono «impacchettate» per «errore» nelle particelle virali

Il DNA virale, comprensivo di frammenti di DNA batterico, si integra in un nuovo ospite

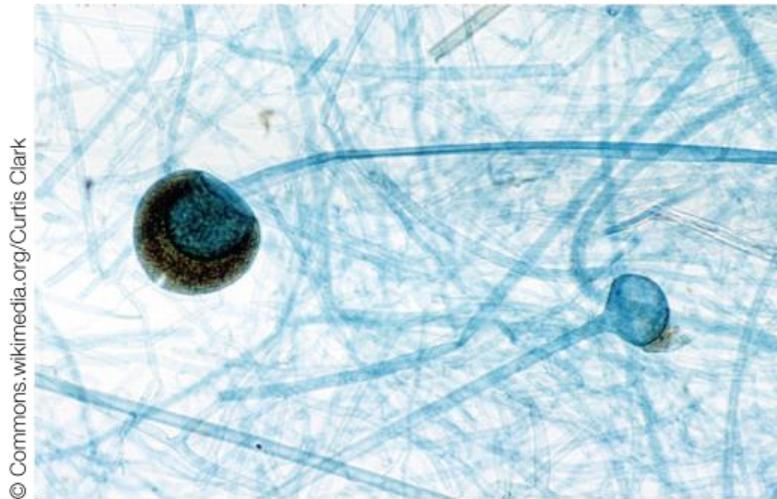
Figura 9.33. Schema di processo: formazione delle particelle trasducenti. Le particelle trasducenti si formano quando il DNA batterico viene impacchettato nelle teste dei fagi. Le particelle così formate possono iniettare il DNA batterico in una cellula ricevente opportuna e possono quindi essere utilizzate per creare ceppi ricombinanti e per esperimenti di mappatura genetica.



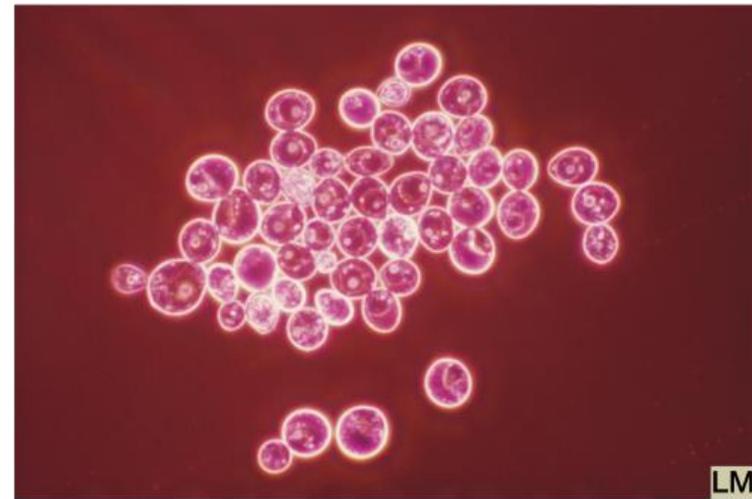
A. *Penicillium* sp.



B. *Aspergillus niger*



C. *Rhizopus*



D. *Saccharomyces cerevisiae*

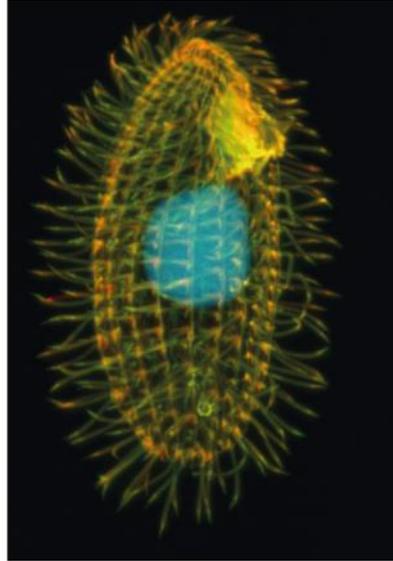
Figura 3.10. La diversità microbica dei funghi.

© Gerd Guenther/Photo Researchers, Inc.



A. *Amoeba proteus*

© Robinson R, PLoS Biology Vol. 4/9/2006, e304.
doi:10.1371/journal.pbio.0040304



B. *Tetrahymena thermophila*

© CDC/Janice Haney Carr



C. *Giardia lamblia*

Figura 3.11. La diversità dei protozoi.

© Bruno in Columbus - Eigenes Werk/Commons.wikipedia



A. *Dictyostelium discoideum*

© HelenGinger/Commons.wikipedia



B. *Physarum* sp.

Figura 3.12. Diversità delle muffe mucillaginose.

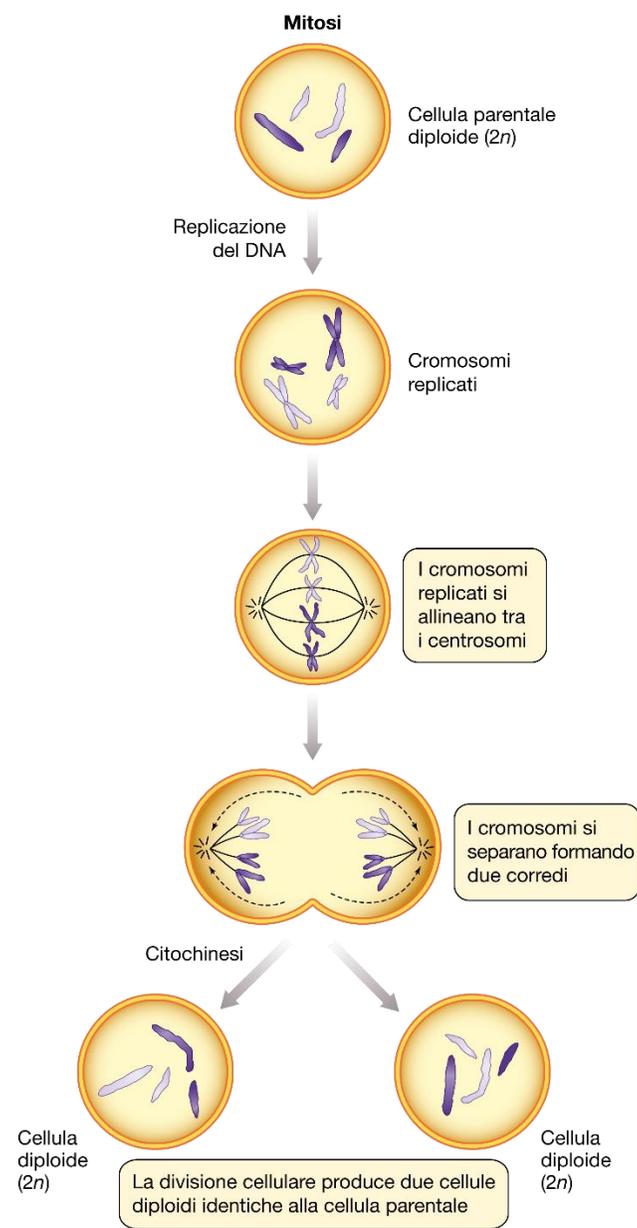


Figura 3.13. La mitosi produce cellule geneticamente identiche.

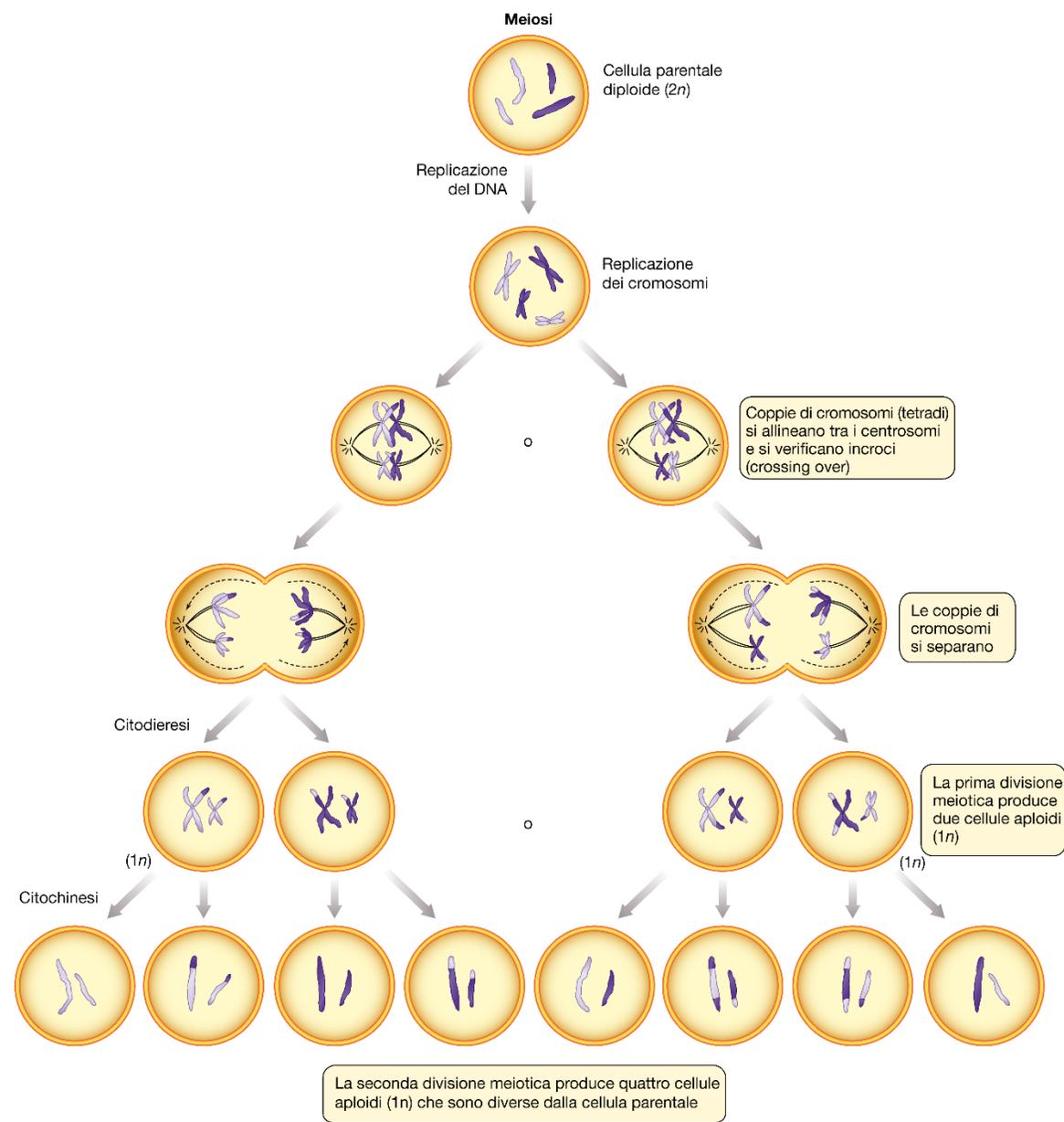
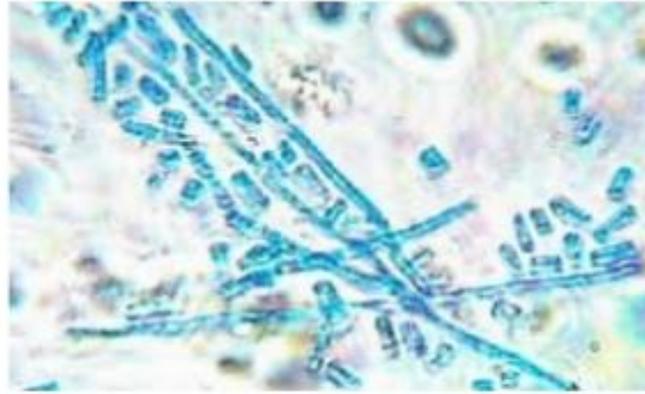


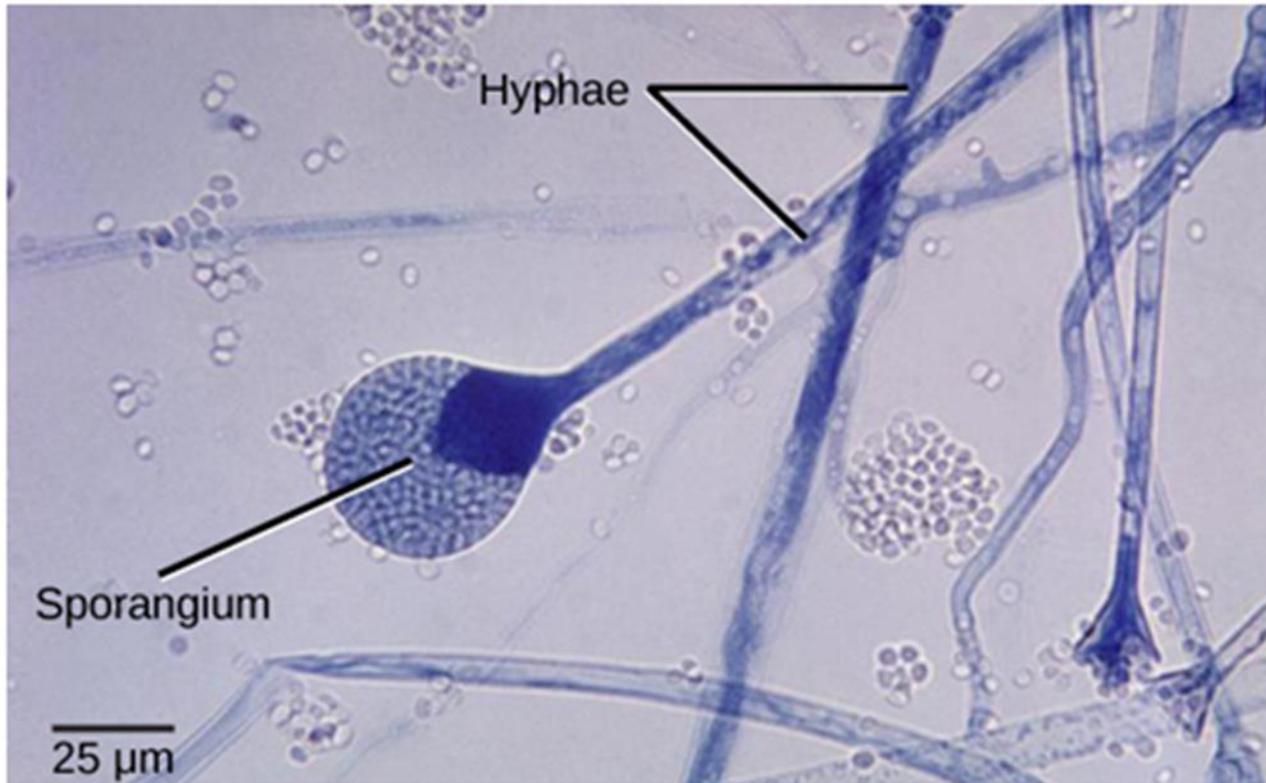
Figura 3.14. La meiosi riduce il numero di cromosomi per la formazione dei gameti.



Tipi di riproduzione
nei funghi:

- 1) **Vegetativa**
- 2) Aessuale
- 3) Sessuale

Per riproduzione vegetativa si intende la produzione di nuovi funghi attraverso la frammentazione delle ife di funghi preesistenti

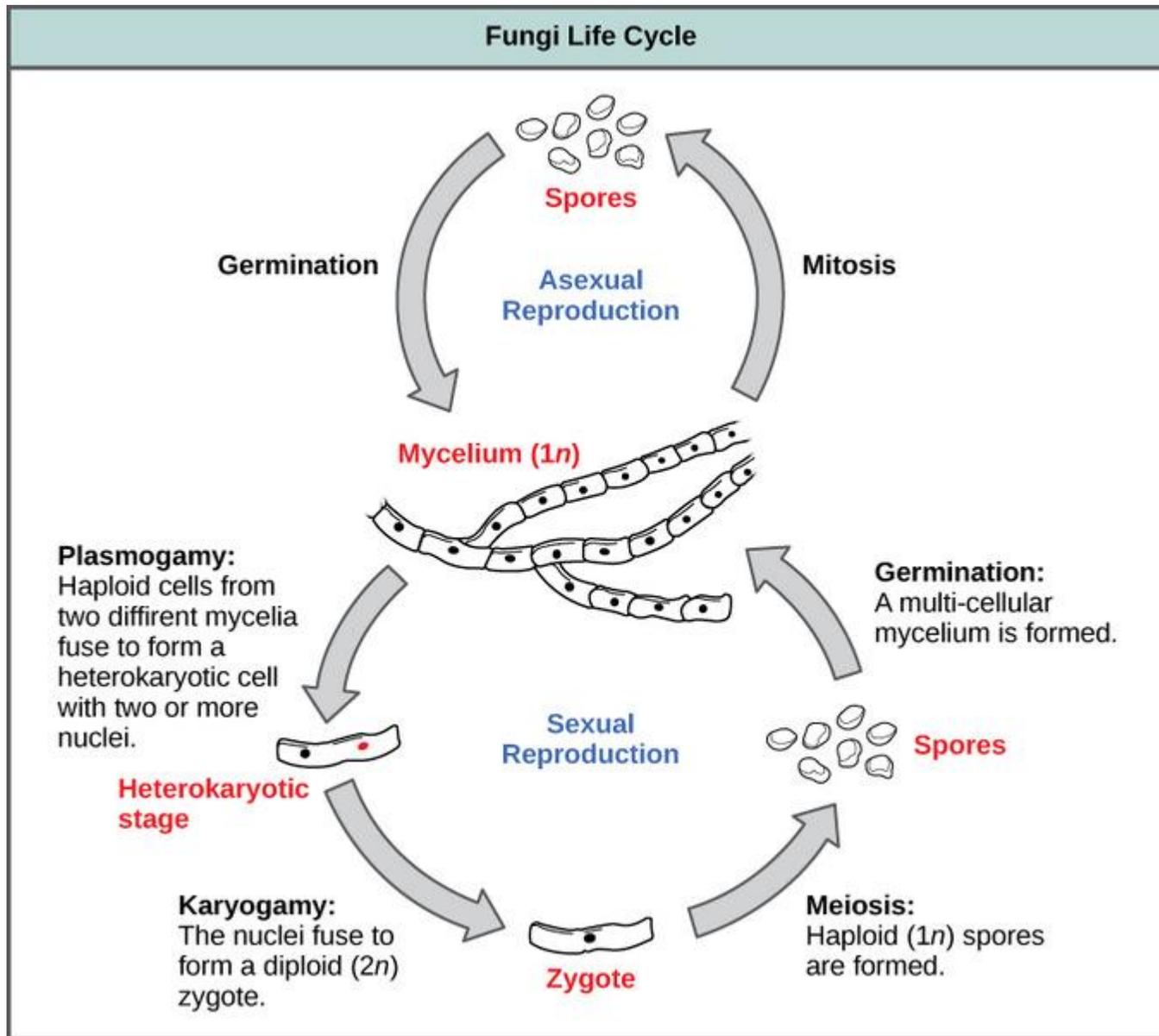


Tipi di riproduzione
nei funghi:

- 1) Vegetativa
- 2) Aessuale**
- 3) Sessuale

La riproduzione aessuata è la riproduzione in cui non si verifica alcuna fusione di gameti. Nuovi funghi possono essere prodotti aessualmente da funghi preesistenti.

Le spore di questo tipo sono chiamate spore aessuate.



Tipi di riproduzione nei funghi:

- 1) Vegetativa
- 2) Aessuale
- 3) **Sessuale**

La riproduzione sessuale nei funghi include la fusione di due gameti sessuali. La riproduzione sessuale nei funghi coinvolge

- 1) Spore sessuali
- 2) Unione o fusione di due nuclei

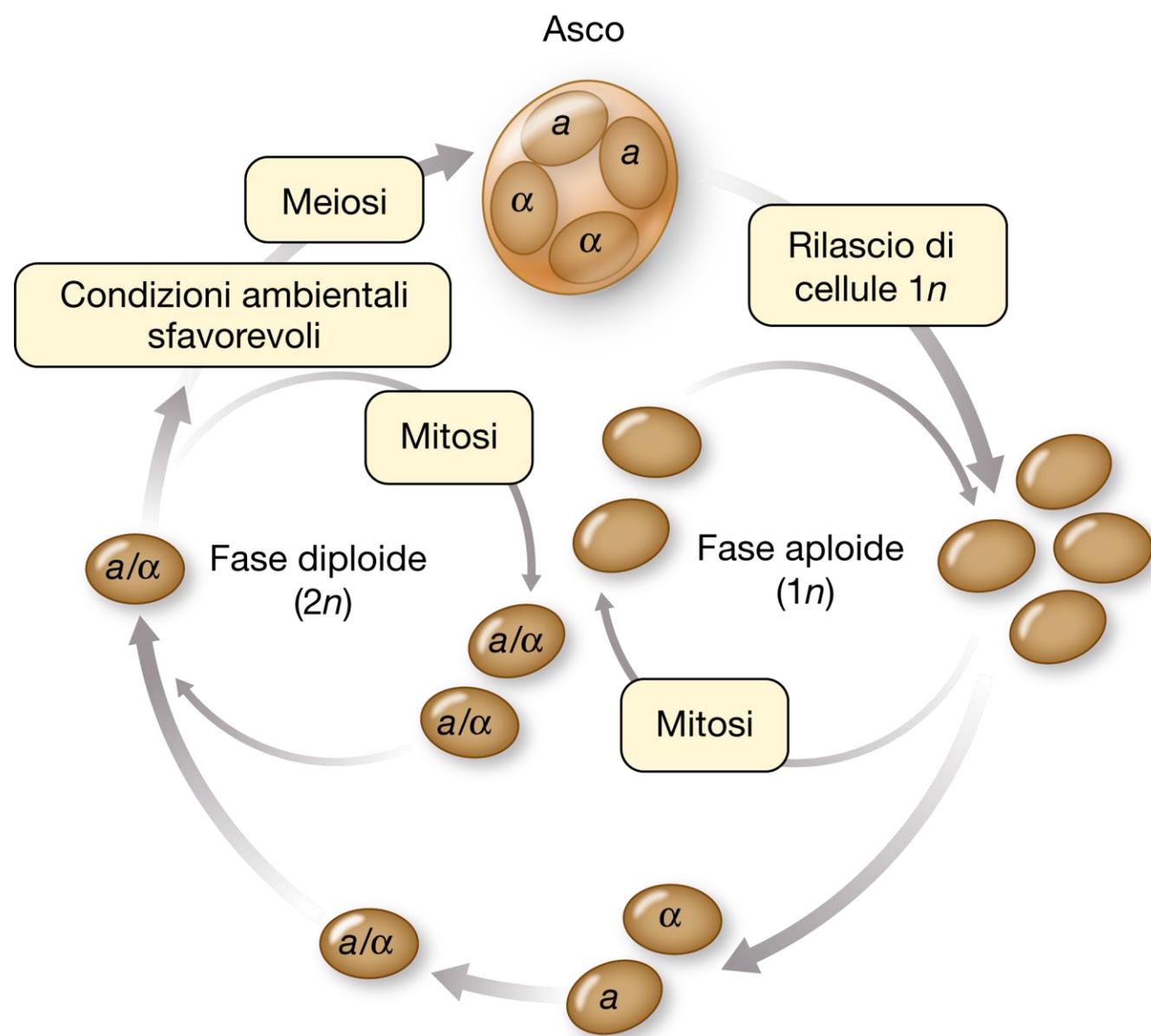
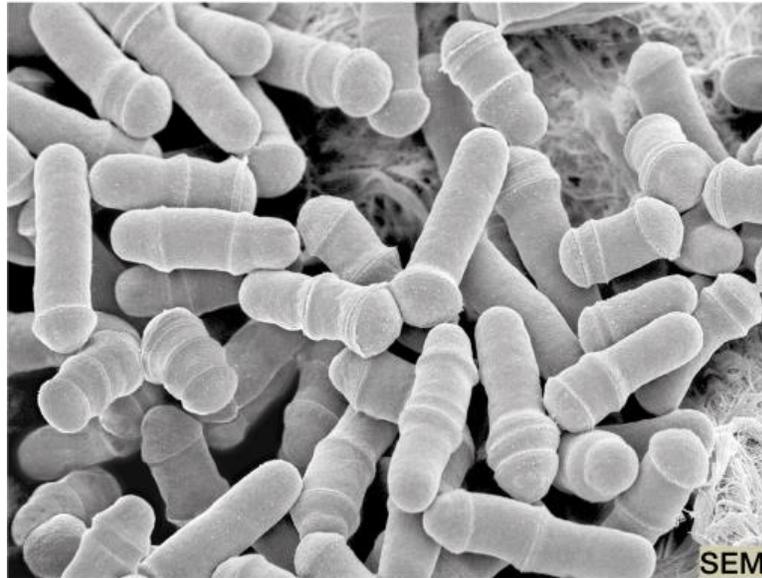


Figura 3.15. Ciclo di vita di *Saccharomyces*.



© ScilMAT/Photo Researchers, Inc.

A. *Saccharomyces cerevisiae*



© Steve Gschmeisser/Photo Researchers, Inc.

B. *Schizosaccharomyces pombe*

Figura 3.16. Gemmazione o fissione nel lievito.

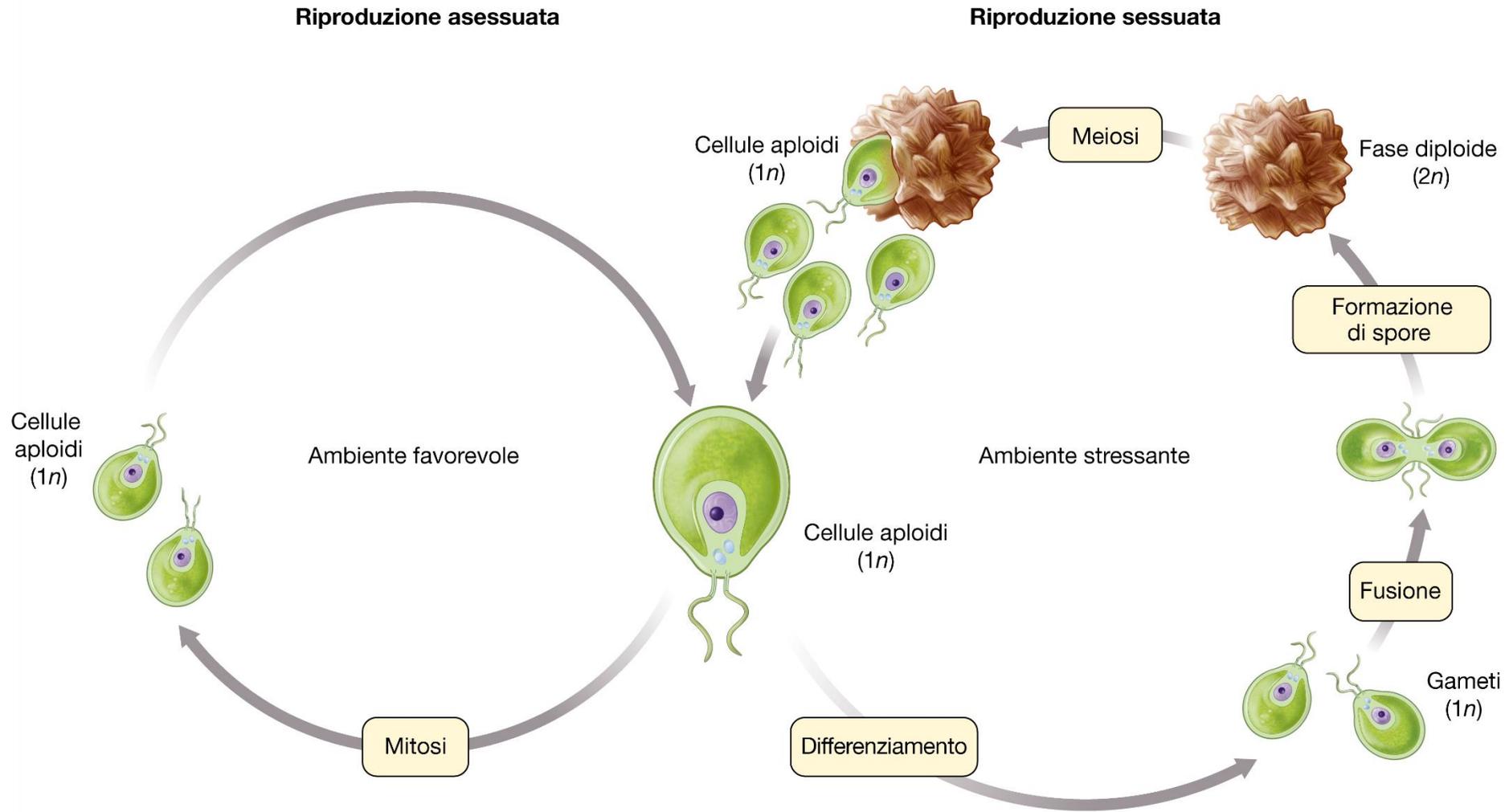


Figura 3.17. Ciclo vitale di *Chlamydomonas*.

© Bob Blaylock/Common wikimedia



Figura 3.20. *Paramecium* ed endosimbiosi: l'allevamento di alghe.

© Science Picture Co./Getty Images, Inc.



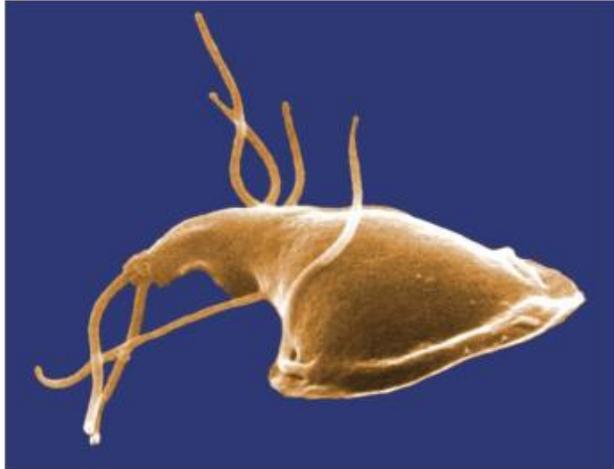
A. *Plasmodium falciparum*



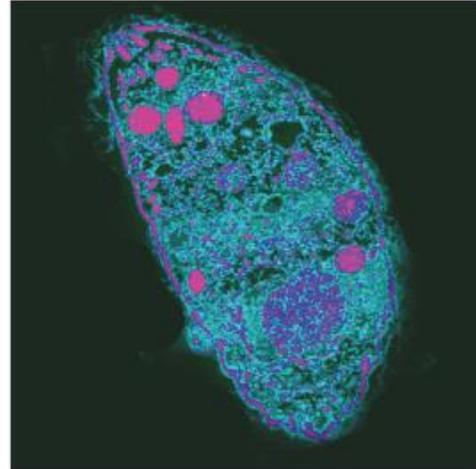
© Zephyris/Commons.wikipedia

B. *Trypanosoma brucei*

© Dr. Stan Erlandsen; Dr. Dennis Feely/CDC



C. *Giardia lamblia*



© AJ Cann/Commons.wikipedia

D. *Toxoplasma gondii*

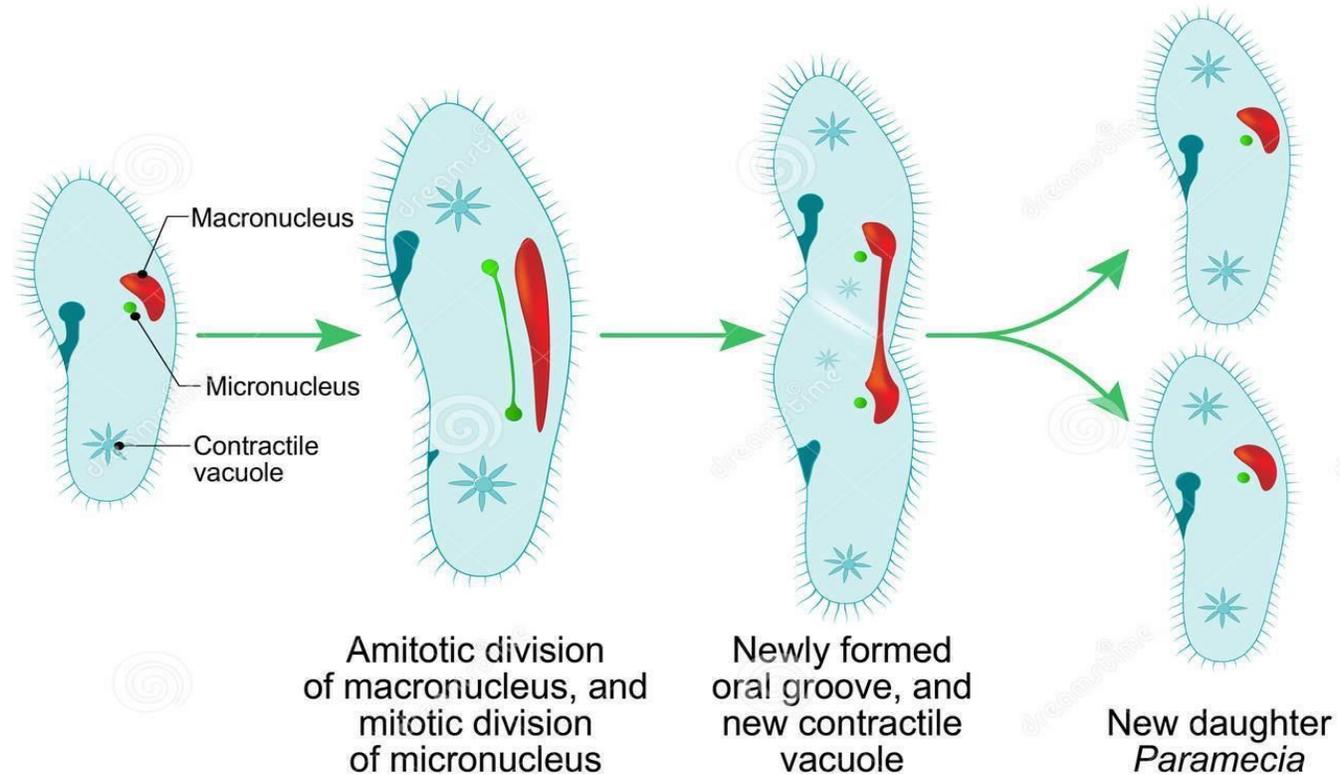
Figura 3.21. Protozoi parassiti che causano malattie umane.

© Michael Abbey/Photo Researchers, Inc.



Figura 3.24. L'intestino delle termiti contiene un protozoo che digerisce la cellulosa.

Asexual reproduction in Protozoa (transverse)



Download from
Dreamstime.com

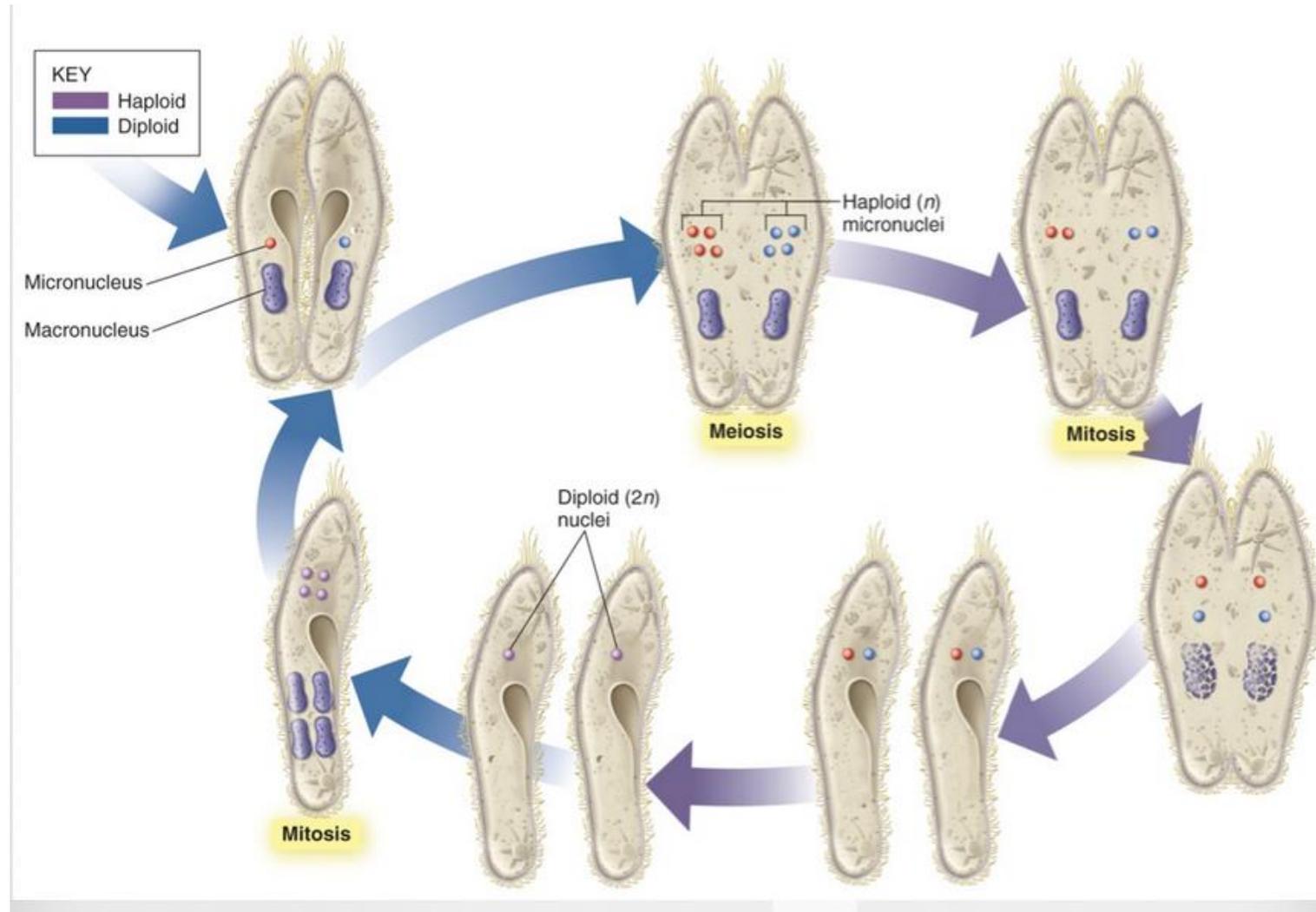
This watermarked comp image is for previewing purposes only.



ID 123207410

© Designua | Dreamstime.com

Scambio genico tra individui nei protozoi: la coniugazione



During conjugation, two ciliates line up side by side. The [macronucleus](#), which plays no part in the process, disintegrates. A series of nuclear divisions of the micronuclei in each ciliate then ensues, including [meiosis](#), during which a number of haploid micronuclei are produced in both cells. All but one of these haploid micronuclei disintegrate. The remaining haploid micronucleus in each cell then divides through [mitosis](#) into two haploid nuclei (gamete nuclei). A bridge of cytoplasm forms between the two ciliates, and one gametic nucleus from each cell passes into the other cell. The two gametic nuclei in each cell unite, thus restoring the diploid number of chromosomes. The micronucleus undergoes two mitotic divisions to produce four micronuclei: two of these will form the new micronuclei of the cell, and two are destined to become the macronucleus. Following the process of [conjugation](#), normal binary fission proceeds. The number of macronuclei and micronuclei formed is dependent on the species and remains the same as the original number.



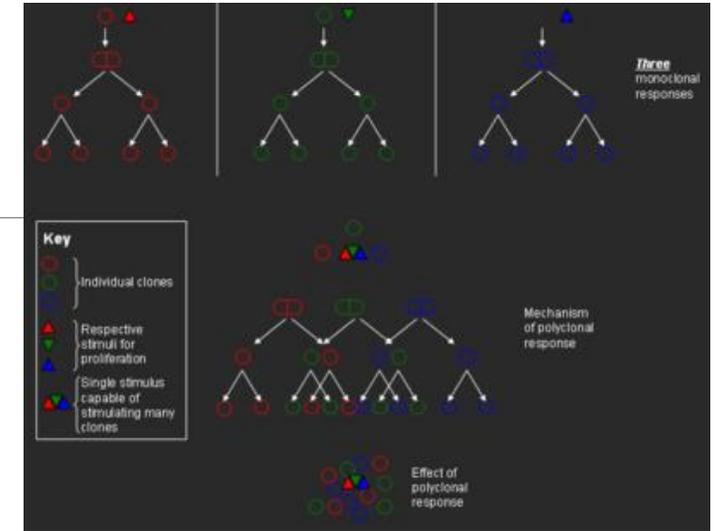
When no suitable mating partner is available, ciliates may undergo a form of conjugation called [autogamy](#), in which all the nuclear processes described above occur. But, because only one individual is involved, there is no exchange of gametic nuclei. Instead, the two gametic nuclei within the cell unite to form the restored micronucleus.

Batteri e clonalità



Clonalità: definizioni...

“Isolates of bacterial species that are indistinguishable in genotype are assigned as a **clone**, with the implication that they are descended from the same recent ancestor”*



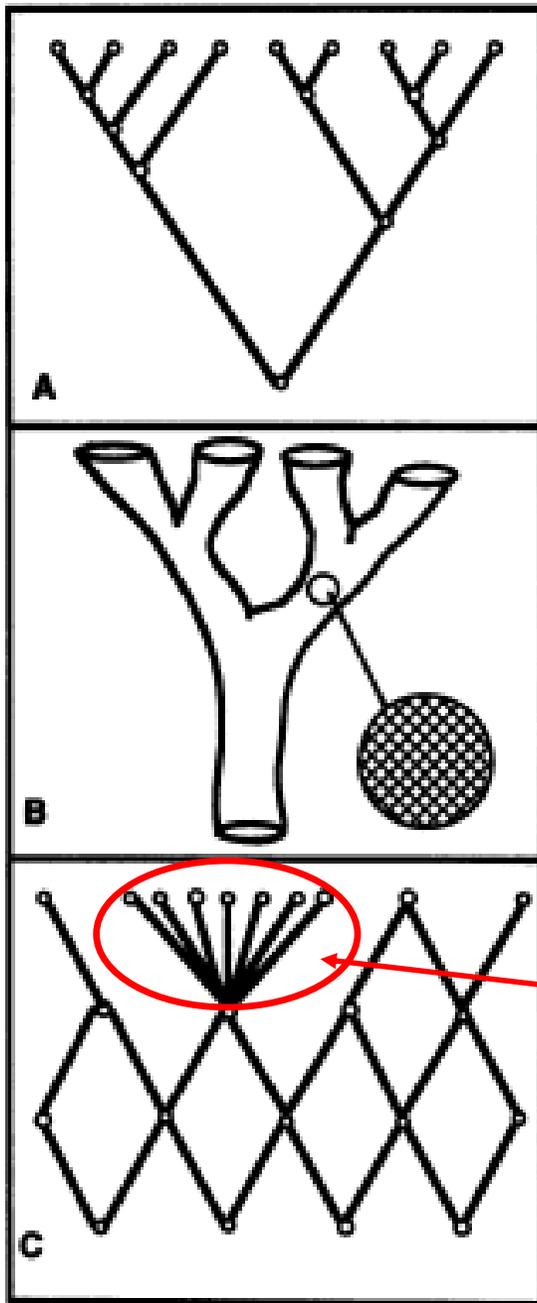
Una popolazione clonale è una popolazione microbica in cui la variabilità genetica è assicurata dal solo passaggio verticale di materiale genomico (cellula madre-cellule figlie)

Una popolazione sessuale o panmittica è costituita da individui o cellule che possono scambiare tra loro frammenti di DNA senza restrizioni

Clonalità, variabilità ed evoluzione

*Bacteria reproduce clonally but exchange genes horizontally by recombination. **Clonality is determined by the balance of recombination and natural selection.** Pathogens can arise as clonal expansions originating from a non-clonal (highly recombining) source population.*

Clonality (...) is therefore a key microbial trait, determining how quickly a population can adapt and the size of its gene pool andcan help us to even make predictions about its evolution.



Strutture delle popolazioni microbiche.

A e B: popolazioni costituite da ceppi separati in due principali rami. La struttura della popolazione in A è clonale a tutti i livelli. Il dendrogramma è un albero evolutivo: non si verifica nessuna ricombinazione, né tra isolati nello stesso né tra diversi rami di l'albero. In B la ricombinazione non si verifica tra isolati dai due rami principali, ma tra questi si verifica una ricombinazione frequente all'interno di ogni ramo principale. La struttura all'interno di questi rami è più simile a una rete a un albero.

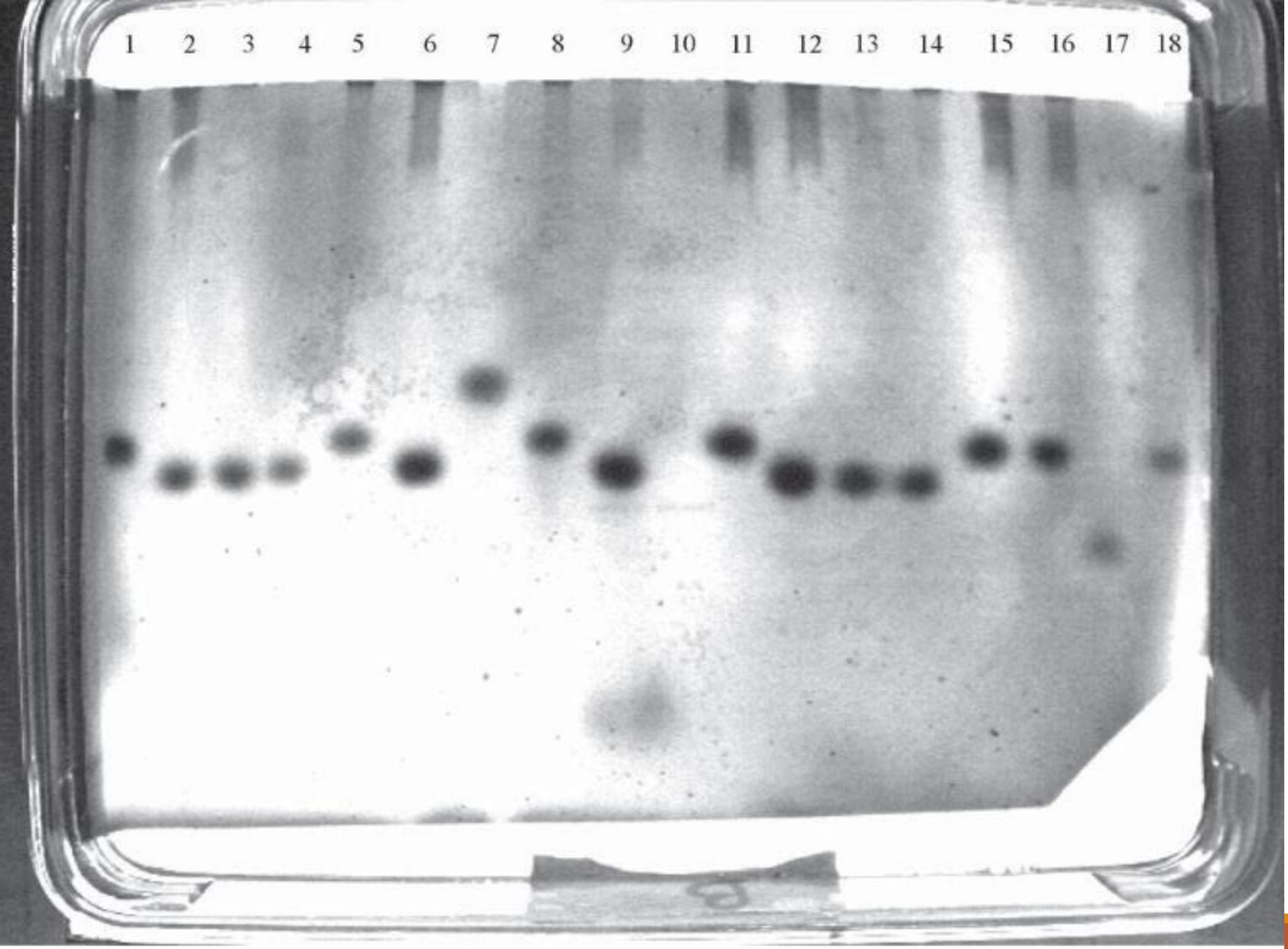
C: una struttura «epidemica» in cui vi è frequente ricombinazione all'interno di tutti i membri della popolazione, in modo tale che la struttura sia una rete piuttosto che un albero. Occasionalmente si produce un ceppo di successo che produce un clone **epidemico**.

Ci sono 4 tipi di popolazioni batteriche:

- 1) Popolazioni completamente “sessuali” come *Neisseria gonorrhoeae*;
- 2) Popolazioni “sessuali” ma superficialmente clonali come *Neisseria meningitidis*;
- 3) Popolazioni del tipo *Rhizobium* che sono “sessuali” su scala ridotta perché non ricombinano con altre popolazioni
- 4) Popolazioni del tipo *Salmonella enterica* che sono clonali a tutti i livelli

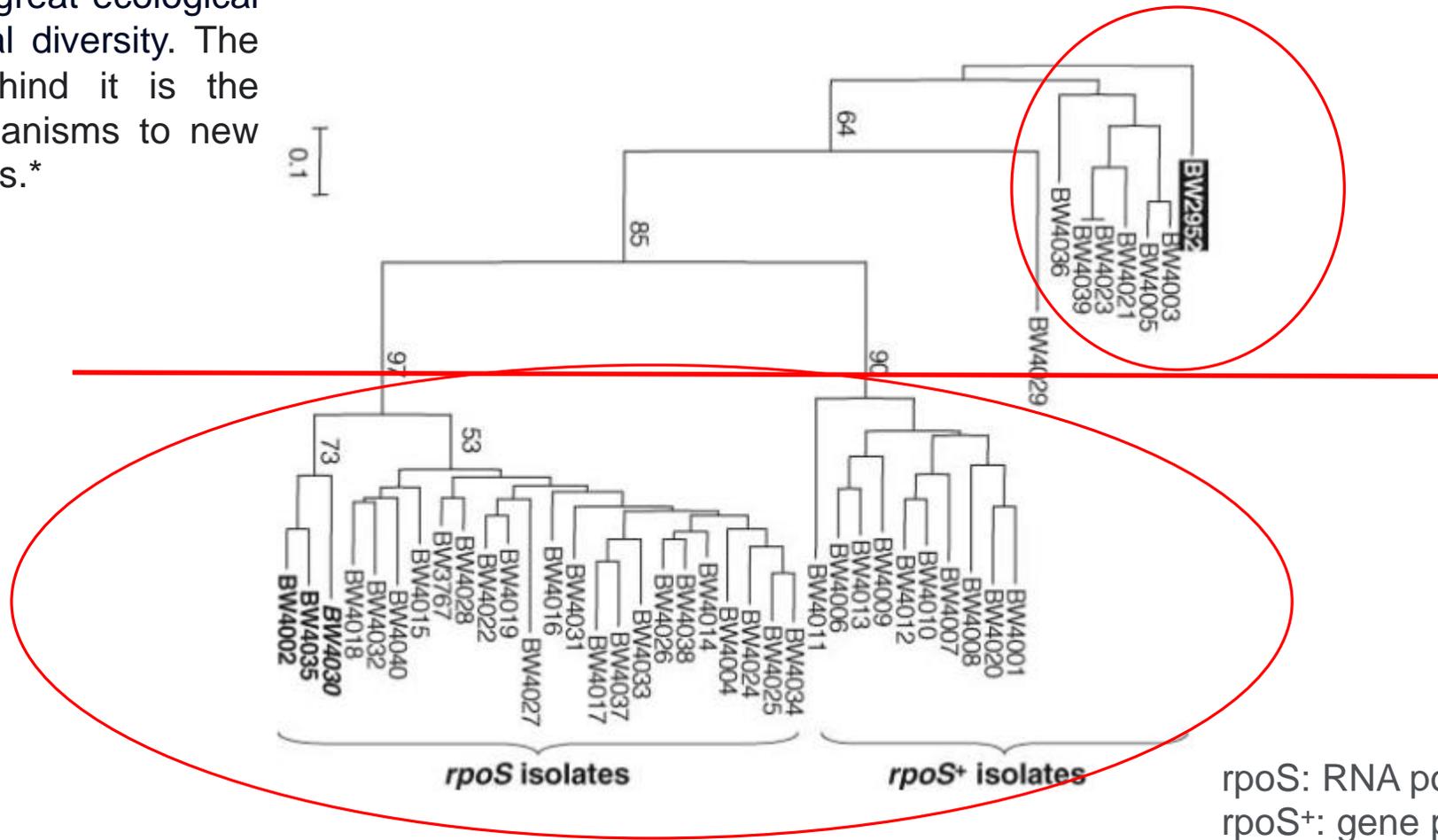
L'elettroforesi enzimatica multiloci (MLEE) è un metodo per caratterizzare gli organismi mediante le relative mobilità elettroforetica di un gran numero di enzimi intracellulari. Queste differenze di mobilità sono direttamente correlate alle mutazioni nel locus genico che causano sostituzioni di amminoacidi nell'enzima codificato dal gene. Le differenze nella carica elettrostatica tra l'amminoacido originale e quello sostituito influenzeranno la carica netta dell'enzima e quindi la sua mobilità elettroforetica. Pertanto, è possibile correlare le differenze di mobilità a diversi alleli nel locus del gene per l'enzima in questione. Queste varianti di mobilità sono chiamate elettromorfi. Il profilo unico degli elettromorfi prodotti per ogni ceppo dell'organismo è chiamato tipo elettromorfo (ET). La MLEE è stato utilizzato per la prima volta nello studio della genetica delle popolazioni di *Drosophila* e degli esseri umani. Successivamente la MLEE è stato applicata ai microrganismi, anche per la tipizzazione epidemiologica di batteri e altri microrganismi.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



Adaptive radiation is a rapid increase in the number of species with a common ancestor, characterized by great ecological and morphological diversity. The driving force behind it is the adaptation of organisms to new ecological contexts.*

Popolazioni clonali

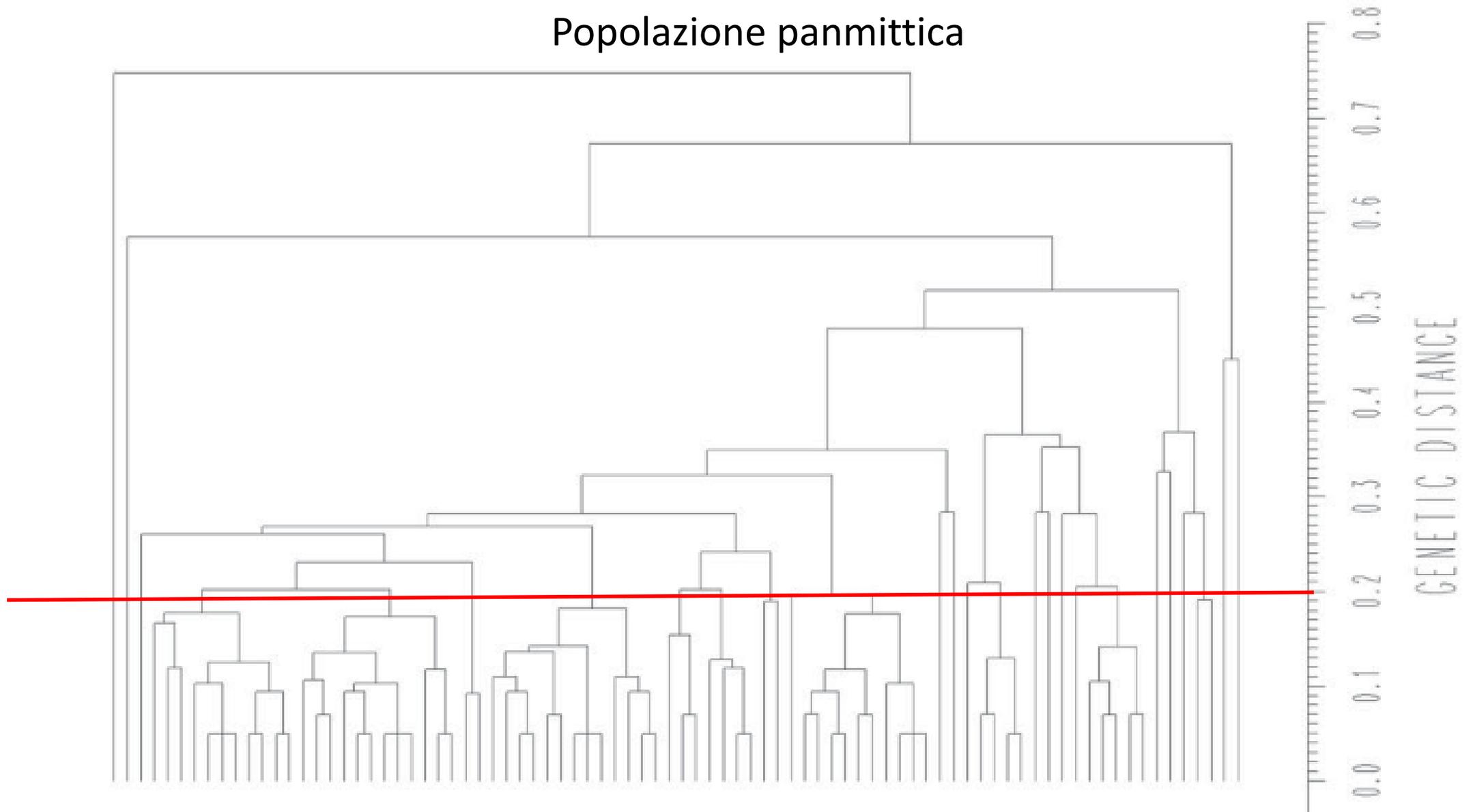


E. coli coltivata in chemostato e con progressiva diminuzione della concentrazione di glucosio

rpoS: RNA polymerase sigma factor
rpoS⁺: gene parentale

Maharjan, R., Seeto, S., Notley-McRobb, L., & Ferenci, T. (2006). Clonal adaptive radiation in a constant environment. *Science*, 313(5786), 514-517.

Popolazione panmittica



Populations in which recombination is either absent or extremely rare, or very frequent, probably represent the minority of situations, and most bacterial species are likely to have intermediate levels of recombination, and population structures that are between these highly clonal and nonclonal extremes

The utility of the clone concept is that it attempts to recognize groups of isolates that have all descended from a recent common ancestor and that therefore may have broadly similar biological properties (pathogenicity, host adaptation, and so on). The problem is that bacterial clones are not real genetic entities, since the genotype of any fitter variant that arises will continually diversify as it becomes more prevalent in the population, to produce an increasingly variable cloud of descendent genotypes

Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Tecnica per caratterizzare ceppi all'interno di una stessa specie

- comporta la caratterizzazione di 6-7 geni housekeeping (codificanti funzioni di base della cellula) e il paragone con i geni corrispondenti di diversi ceppi della stessa specie
- si procede per amplificazione PCR e sequenziamento di una regione di circa 450 bp all'interno dei gene housekeeping scelti
- ceppi con sequenze identiche per un dato gene posseggono lo stesso allele per quel gene
- all'interno di una stessa specie possono esistere circa 30 varianti per un dato gene
- Ad ogni ceppo sulla base dei vari alleli nei 6-7 geni housekeeping verranno attribuite delle sequenze di numeri

In [biologia molecolare](#), si definiscono **geni costitutivi** (*housekeeping genes* in [lingua inglese](#)) quei [geni](#) che vengono attivamente [trascritti](#) e [tradotti](#) a un livello relativamente elevato. Generalmente, essi codificano [proteine](#) ed [enzimi](#) fondamentali per la vita della [cellula](#), e che pertanto devono essere sempre presenti. (Wikipedia)

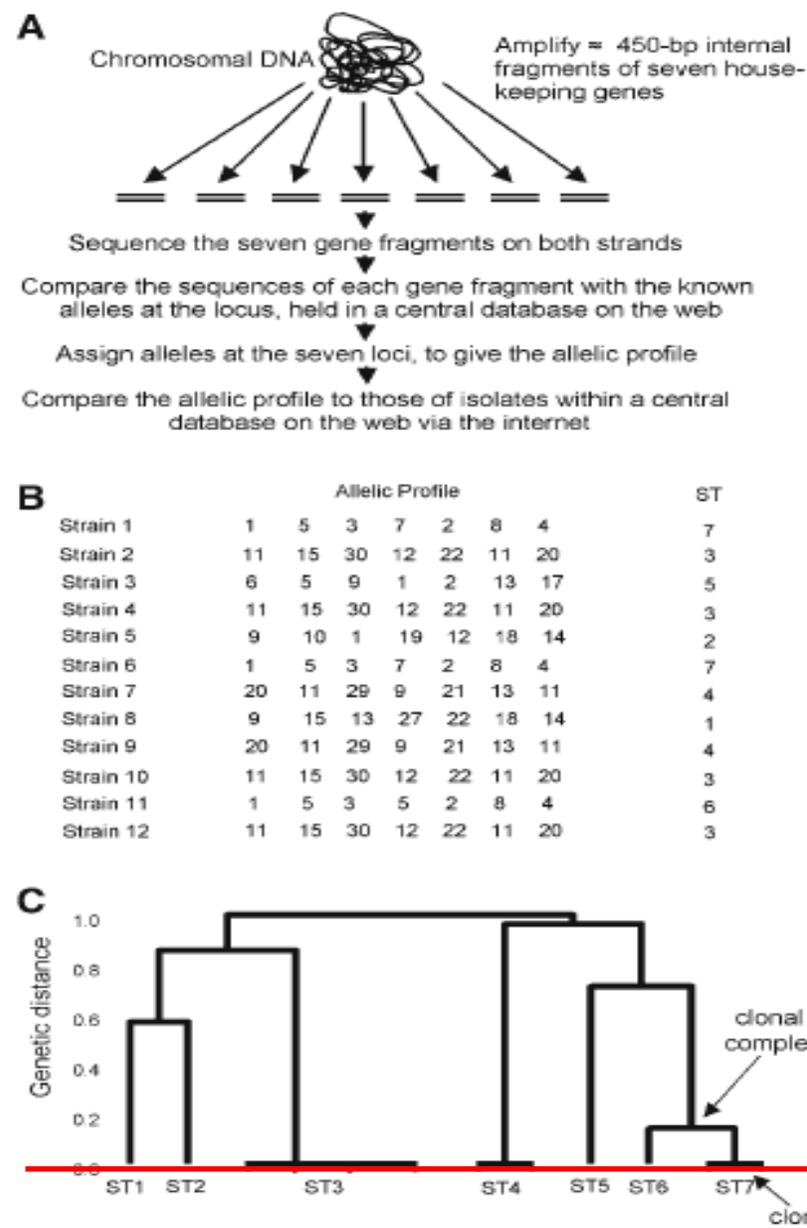
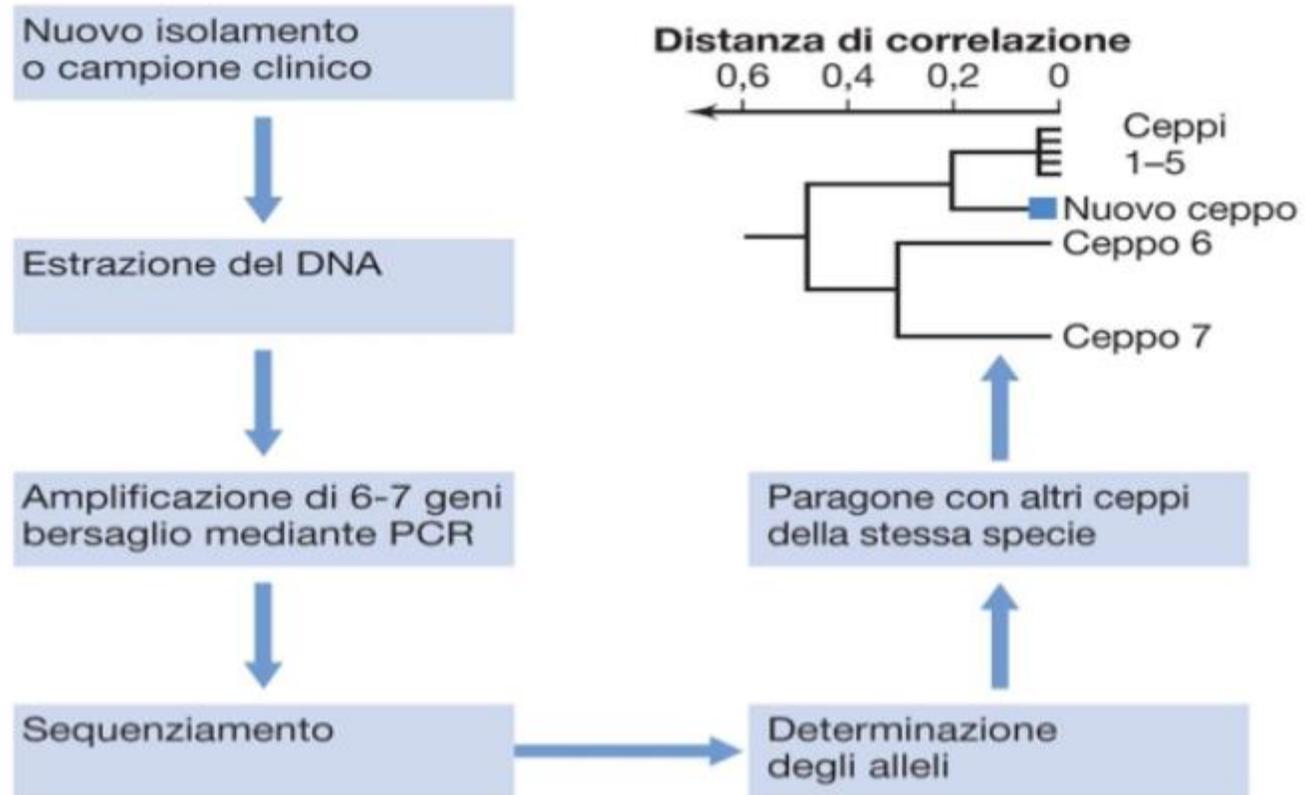


Fig. 1. Characterization of isolates of bacteria using MLST. (A) Internal fragments of seven housekeeping loci are amplified by PCR and are sequenced on both strands.

Multi Locus Sequence Typing (MLST)



The extent of recombination within bacterial populations has usually been addressed by examining the level of linkage disequilibrium between the alleles at different loci within the population. If **rates of recombination are very high**, the alleles at different loci are randomly associated (**linkage equilibrium**), and the population consists of a vast array of unique genotypes.

Conversely, if **recombination is very rare**, those fitter genotypes that arise periodically within the population will increase in frequency and lead to the loss of other genotypes from the population (periodic selection). These fitter genotypes may rise to high frequency, and will diversify only slowly in the absence of recombination, resulting in a number of clusters of isolates with identical or very closely related genotypes. The alleles at different loci in the population are therefore not randomly associated; i.e., there is significant **linkage disequilibrium** between alleles

Worldwide pandemics of some diseases can eliminate the existing variation that has built up since the previous pandemic.

For example, influenza is likely to have been around for many hundreds of years, but finding that all influenza viruses isolated during a world wide flu pandemic are closely related in genotype does not imply that the virus has remained unchanged over hundreds of years.

Influenza has unusual features and, for bacterial pathogens, the availability of isolates from diverse geographic sources, and of old isolates stored in culture collections, or of sequences obtained from archaeological material, can provide supporting evidence for assigning clonal stability over substantial periods of time.