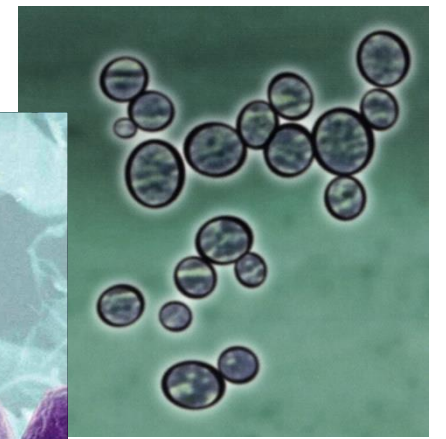
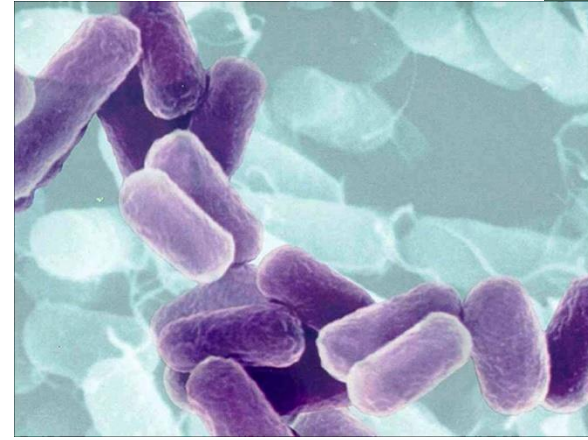


Lezione 3-4: Basi genetiche dell'evoluzione. Batteri e clonalità



DOTT. ROSA ANNA NASTRO – STANZA 401° - 4°PIANO, LATO SUD
EMAIL: ROSA.NASTRO@UNIPARTHENOPE.IT

Come si riproducono i batteri

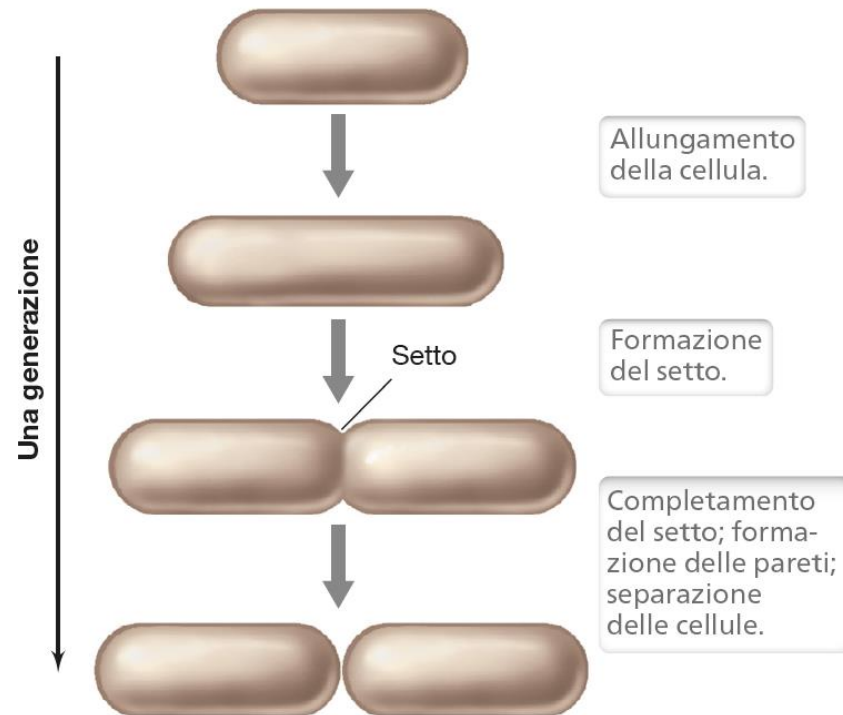


Figura 4.8 Scissione binaria in un batterio a bastoncino. Le cellule (e tutti i componenti cellulari) raddoppiano a ogni generazione.

- ❑ 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.

Minuti

0

20

40

60

80

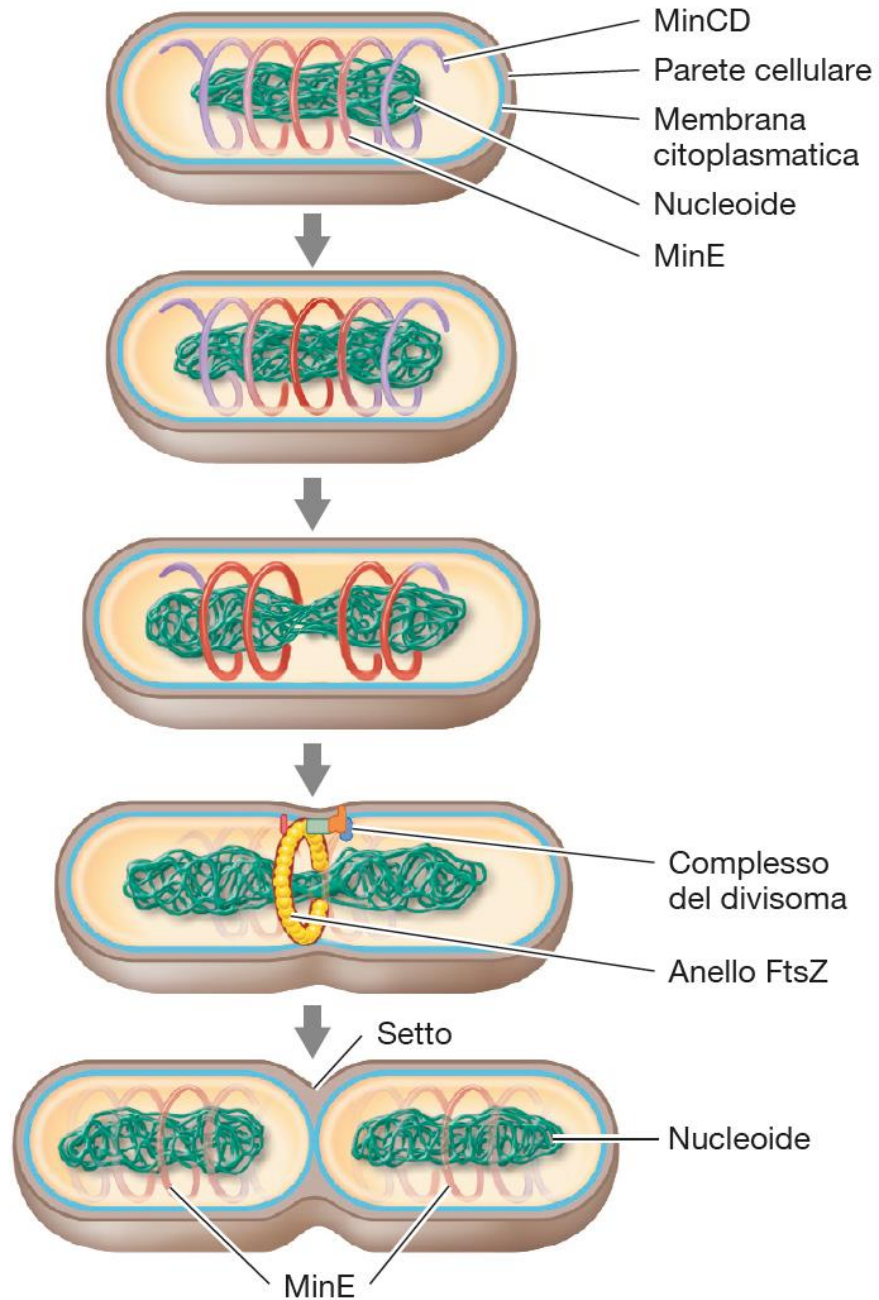
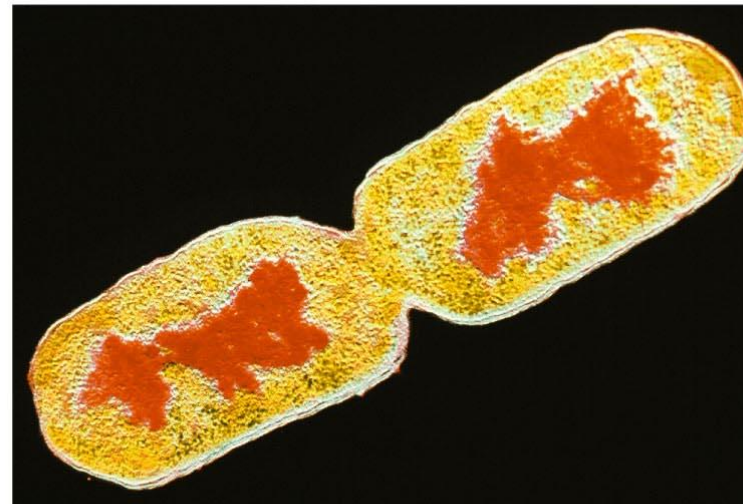
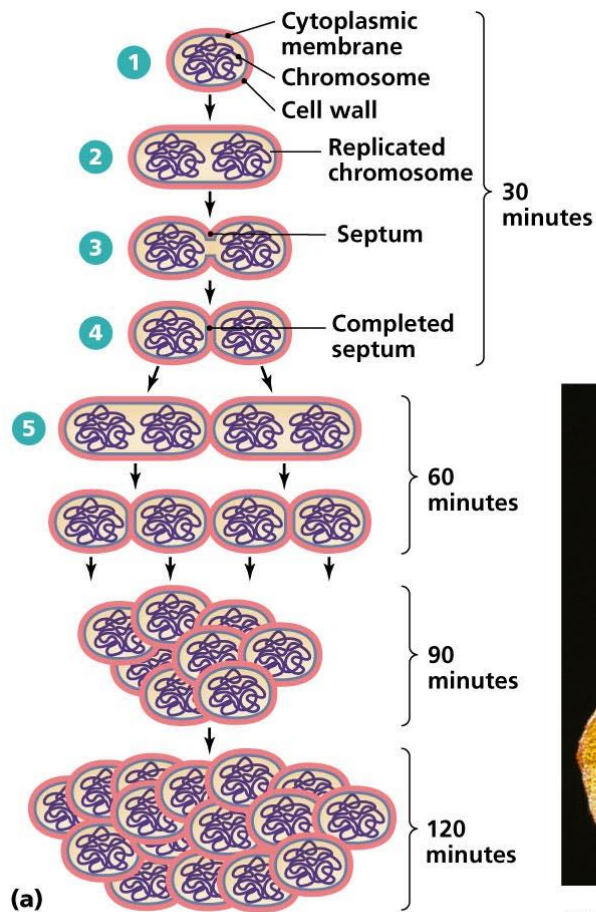


Figura 8.9 Replicazione del DNA ed eventi della divisione cellulare. La proteina MinE dirige la formazione dell'anello FtsZ e del complesso del divisoma sul piano di divisione della cellula. Nell'immagine si può vedere la rappresentazione schematica di una cellula di *Escherichia coli* in crescita con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

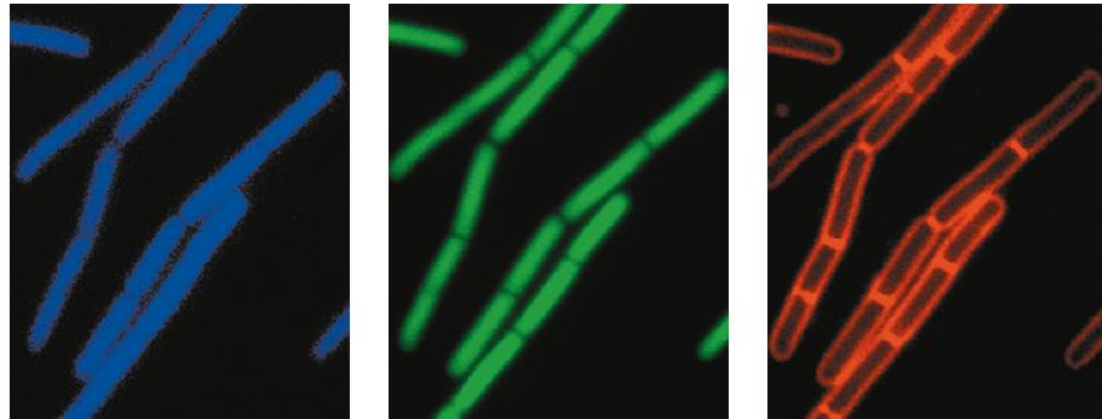


(b)

TEM 0.5 μm

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.

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



Patricia Dominguez-Cuevas

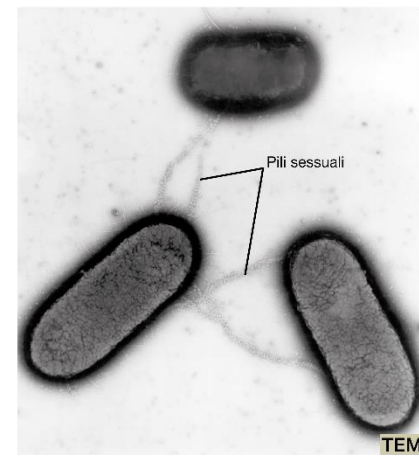
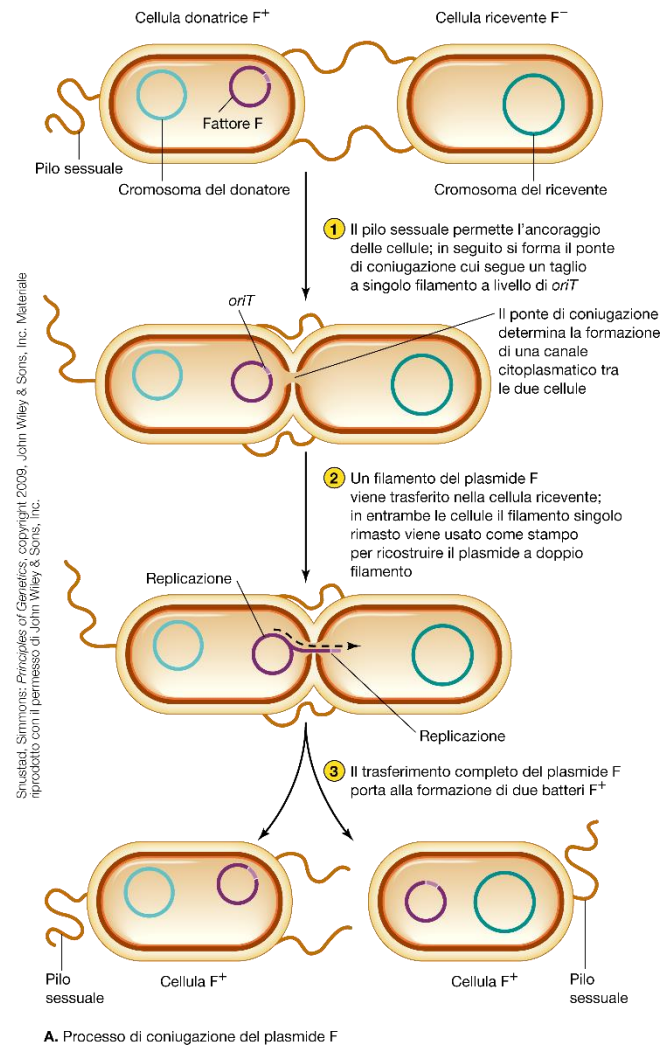
(a)

(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).

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

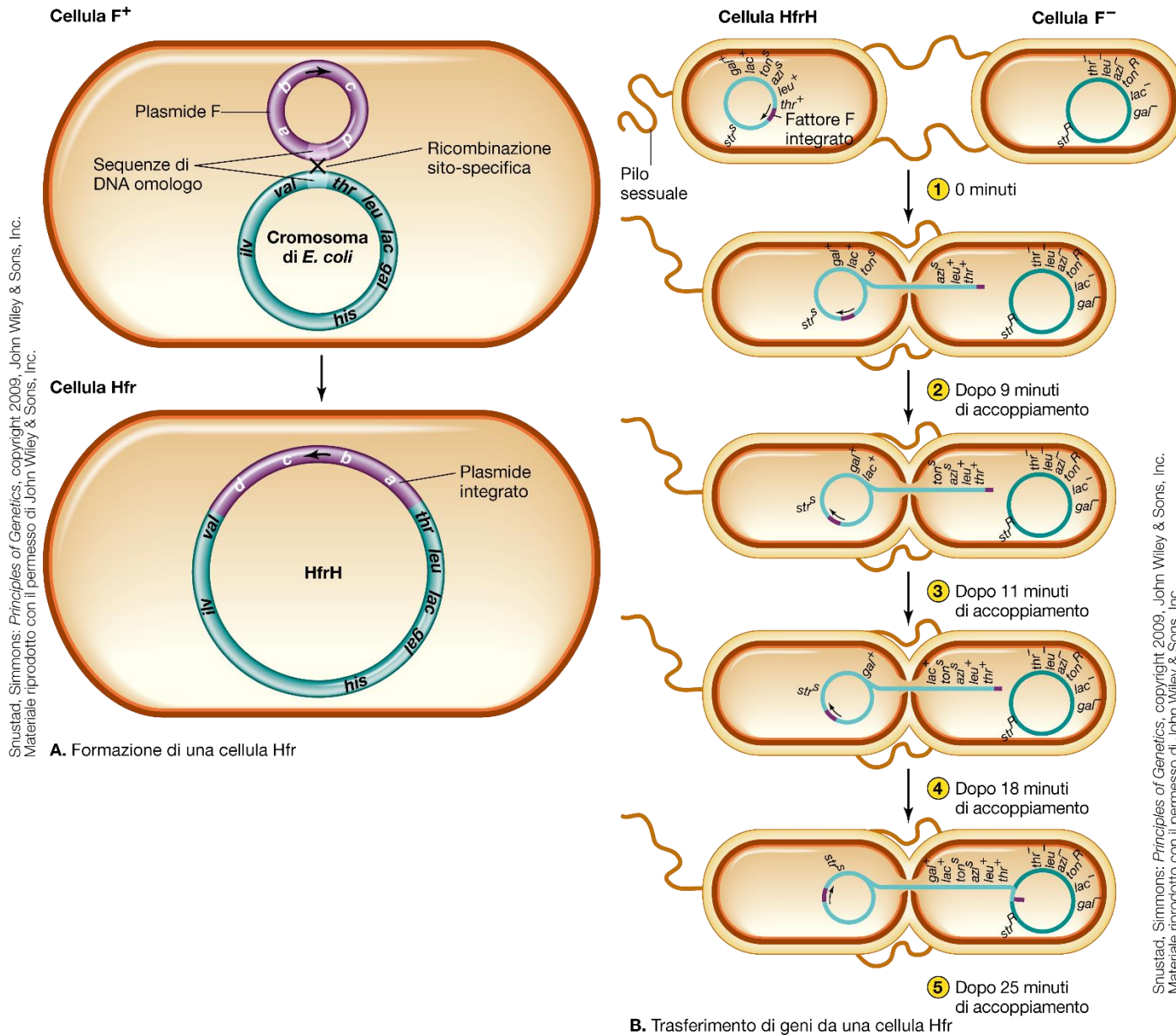


B. Coniugazione in *E. coli*

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.

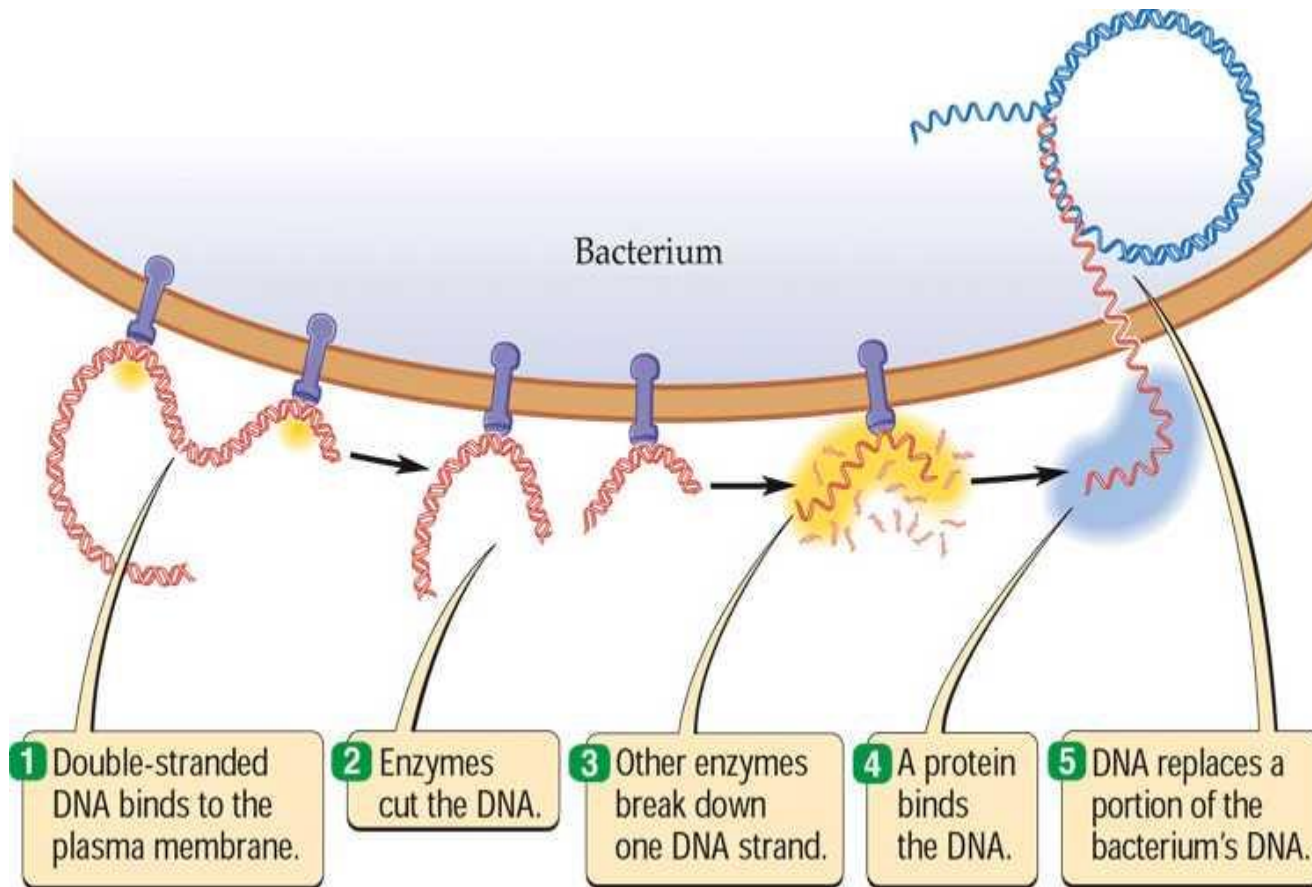


Snustad, Simmons: *Principles of Genetics*, copyright 2009, John Wiley & Sons, Inc. Materiale riprodotto con il permesso di John Wiley & Sons, Inc.

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

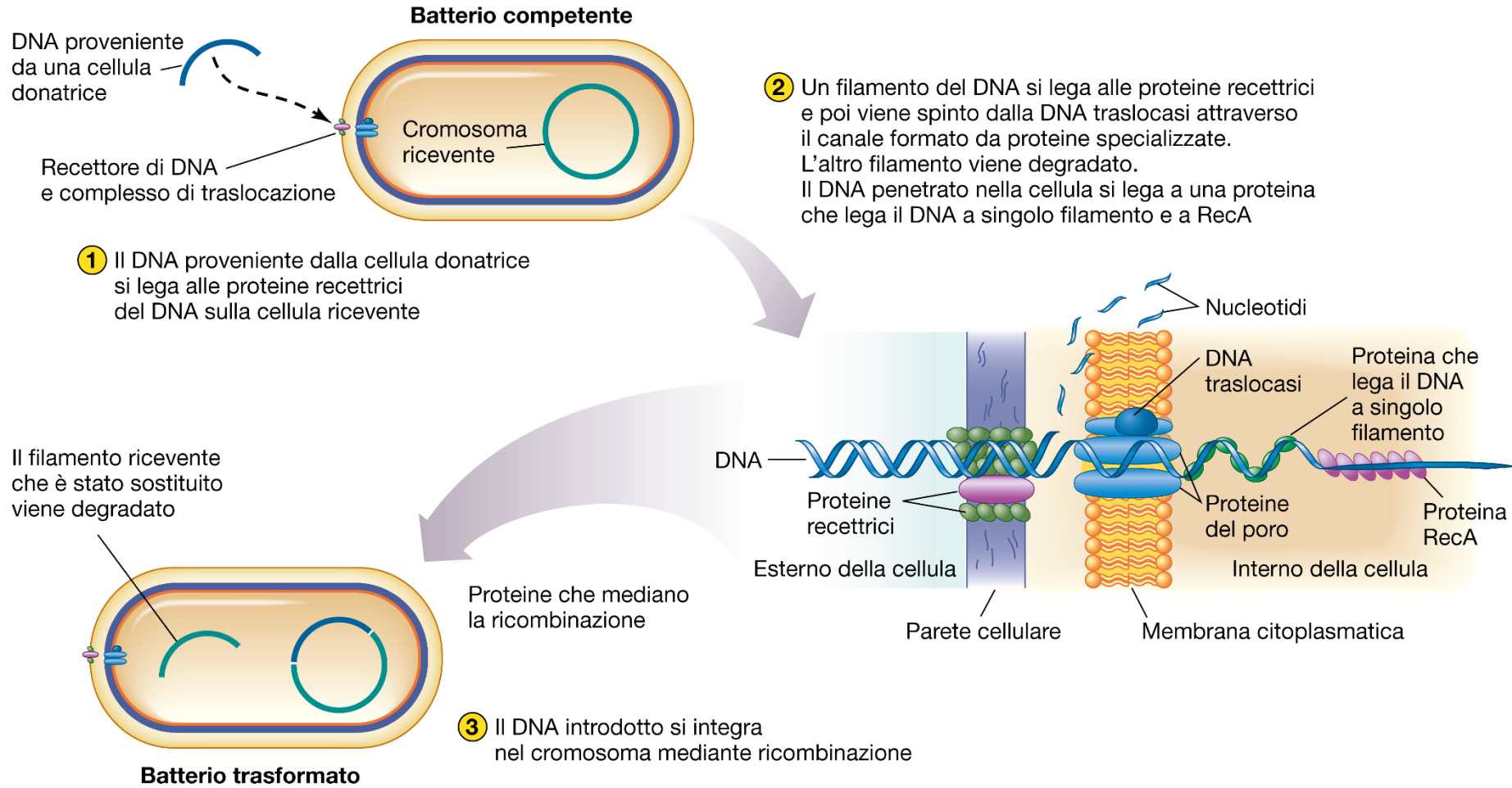
Trasferimento di DNA nudo dall'ambiente esterno alla cellula Batterica.

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/TxtENntAUgl/AAAAAAAAABM/6ujEu5_9V1s/s1600/Transformation.jpg)

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

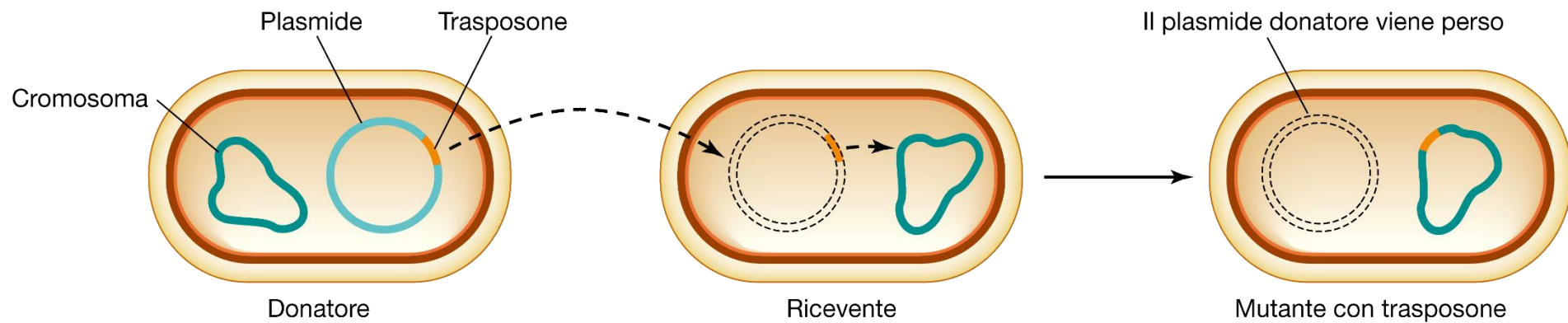
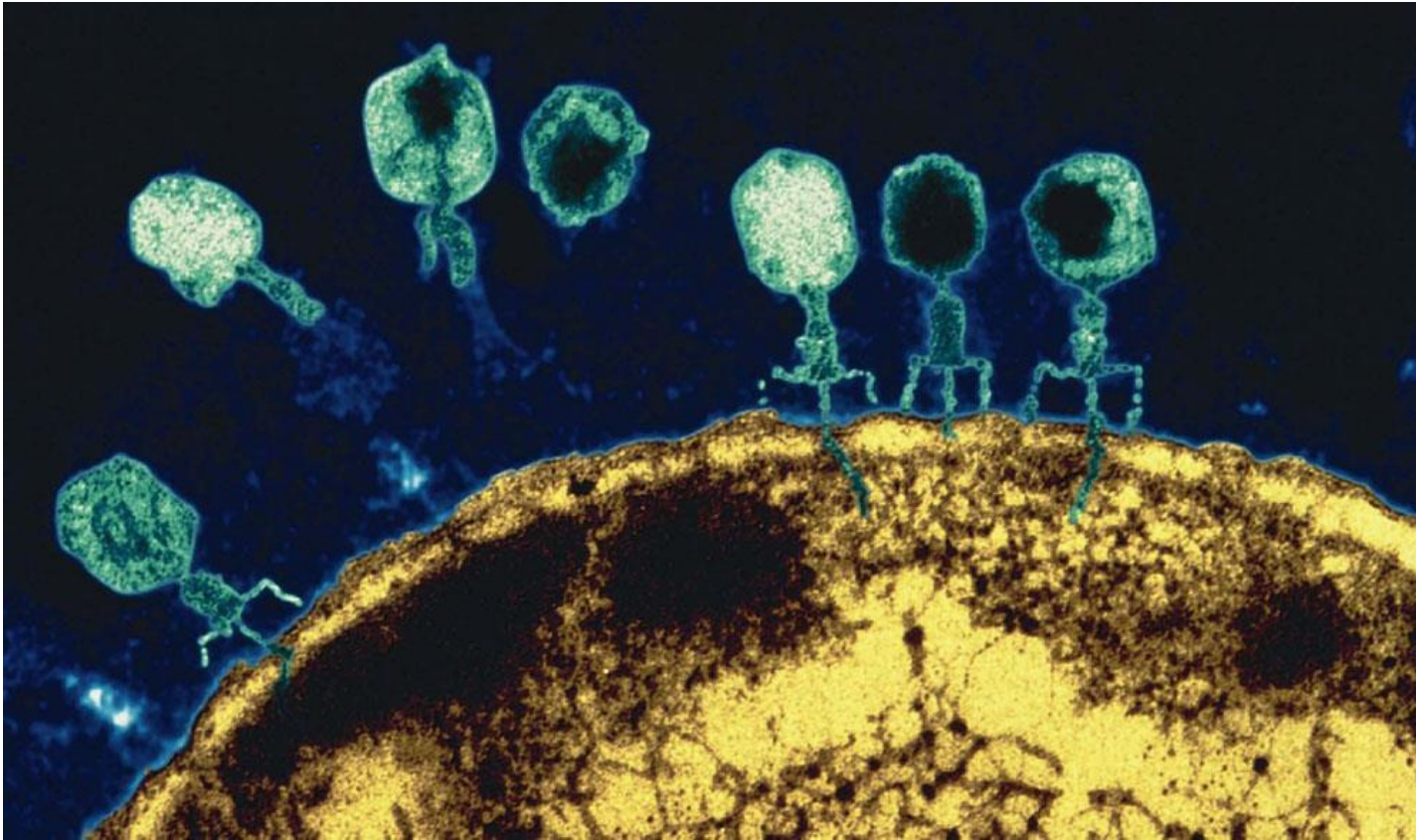
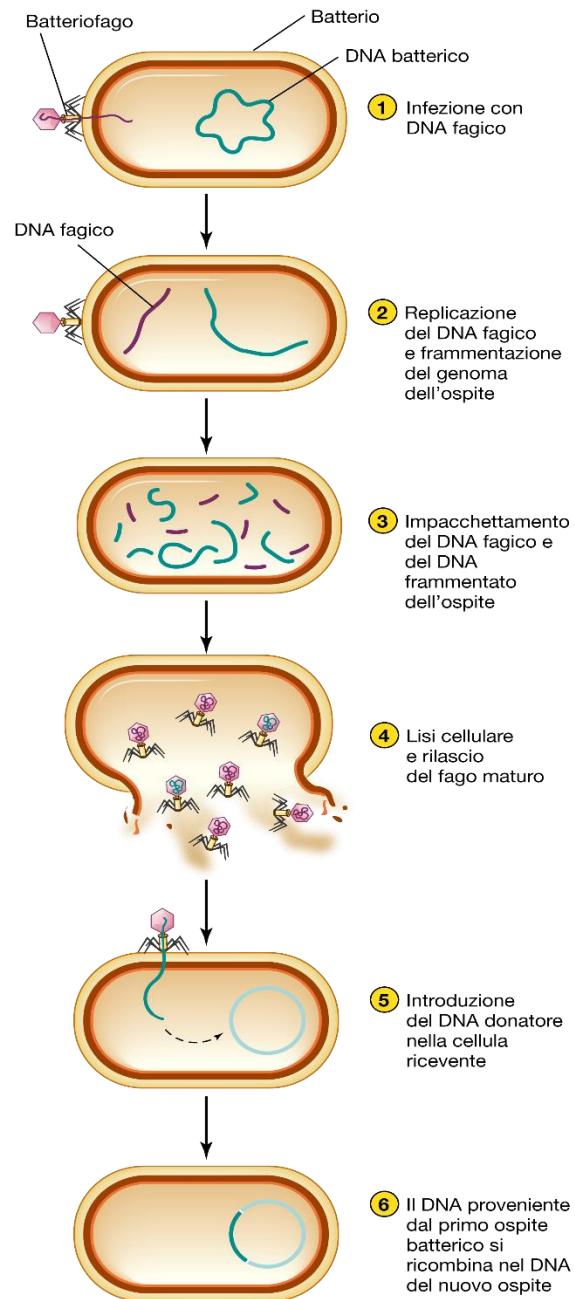


Figura 9.32. Vettore suicida per la mutagenesi con trasposoni. Un plasmide incapace di replicarsi nel ceppo ricevente può essere utilizzato per la mutagenesi mediante trasposoni. La selezione della resistenza all'antibiotico presente sul trasposone selezionerà le cellule che hanno integrato il trasposone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

COMPLEMENTAZIONE

Se il DNA trasferito da un donatore non subisce ricombinazione con il cromosoma della cellula ricevente, il DNA del donatore verrà perso perché incapace di replicarsi nella cellula ricevente. Tuttavia è possibile che una cellula batterica diventi parzialmente diploide o merodiploide quando mantiene due copie di un particolare segmento cromosomico. In genere, una copia si trova sul cromosoma e l'altra su di un plasmide o su di un batteriofago.

La copia addizionale può andare a compensare la mancata funzionalità di un gene mutato presente nel cromosoma della cellula ricevente. In questo caso si parla di complementazione

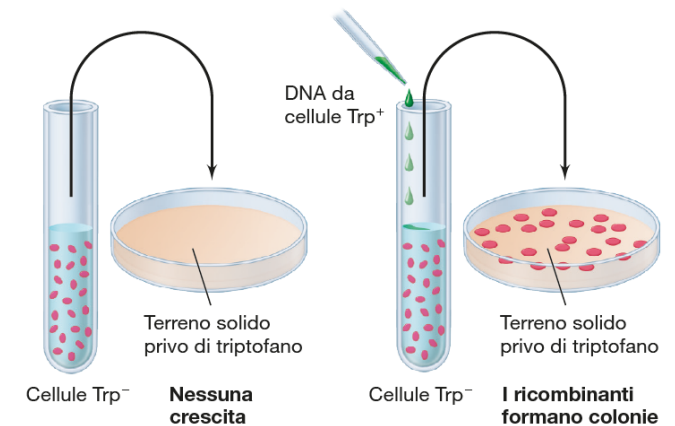
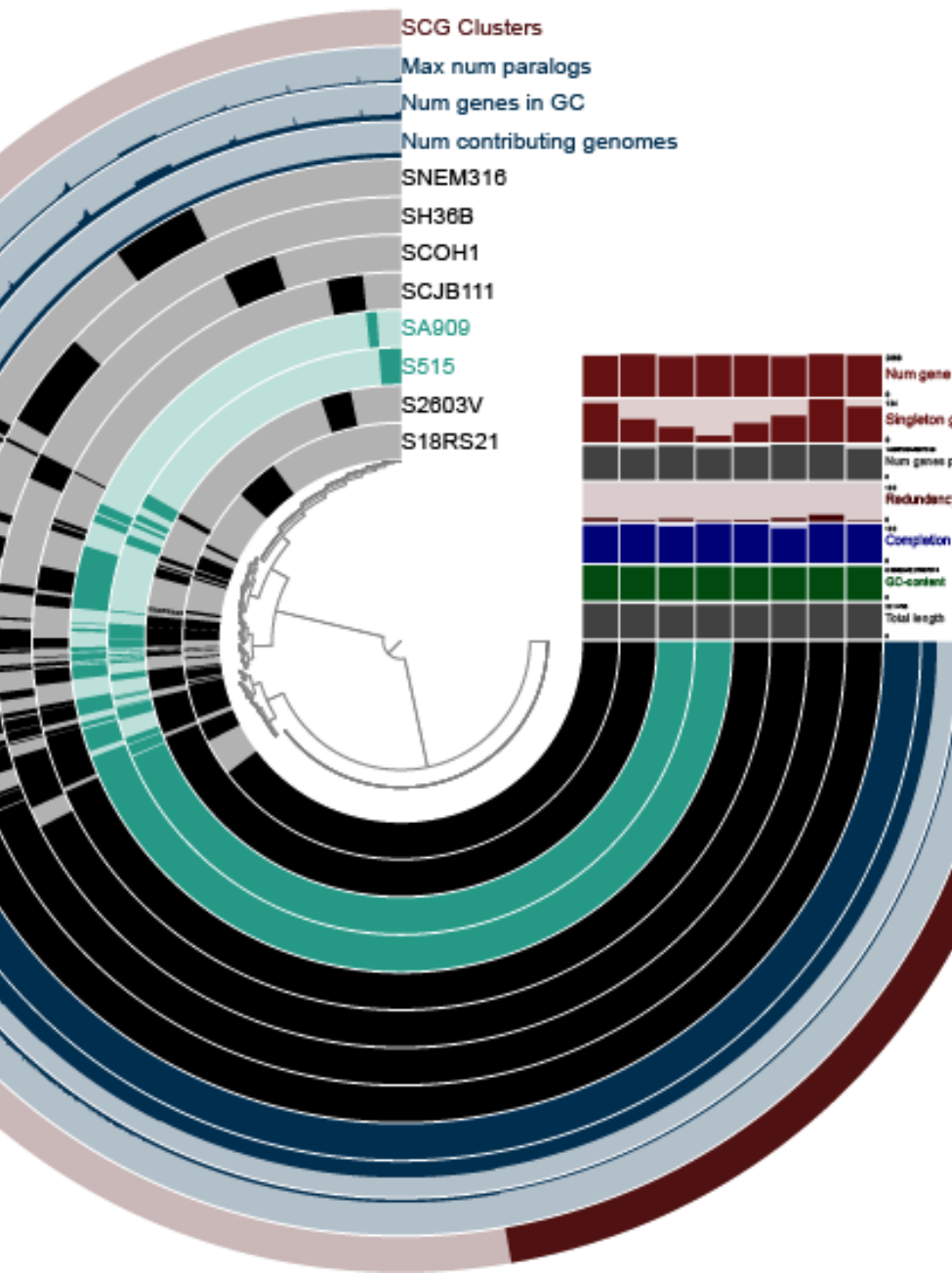


Figura 9.13 Utilizzo di un terreno selettivo per individuare ricombinanti genetici rari. In un terreno selettivo, anche se è stata piastrata una popolazione batterica molto numerosa, solo i ricombinanti rari presenti formano colonie. Procedimenti come questo, che offrono un'alta risoluzione per l'analisi genetica, di soli possono essere utilizzati soltanto con i microrganismi. Il tipo di scambio genetico illustrato è la trasformazione, ma un risultato simile si può ottenere da qualsiasi altra forma di trasferimento genico orizzontale (Figura 9.1).

Streptococcus agalactiae

er: Presence absence (D: Euclidean; L: Ward) | Current view: gene_cluster_presence_absence | Samples order: custom



Uno, dieci, cento genomi: che cos'è il pangenoma

Il primo studio di **pangenomica** risale al 2005, quando la rivista *PNAS* ha pubblicato un articolo sull'[analisi del genoma di diversi ceppi di *Streptococcus agalactiae*](#), un batterio responsabile di frequenti infezioni nei neonati e negli anziani. Questo studio ha contribuito a mettere in luce differenze significative tra i genomi dei ceppi studiati, dimostrando quanto sia importante, per **capire l'evoluzione e la patogenicità di una specie**, avere a disposizione i genomi di più ceppi, cioè un pangenoma. Come suggerisce l'etimologia greca (*pan*, tutto), per **pangenoma** si intende quindi l'intero corredo genico di tutti i ceppi di una certa specie.

<https://aulascienze.scuola.zanichelli.it/blog-scienze/omics/pangenoma>

Per capire meglio di che cosa stiamo parlando, è utile considerare le due categorie in cui la pangenomica classifica i geni di un organismo.

- **Geni core:** fanno parte di questo gruppo i geni che sono presenti in tutti gli individui di una specie; coincidono, grosso modo, con quelli che vengono spesso indicati come [geni housekeeping](#), che codificano per **funzioni essenziali** per l'organismo, come la struttura della membrana cellulare, le proteine di legame, le funzioni regolatorie, ecc. Questi geni identificano, in un certo senso, *l'essenza genetica di quella specie*, ovvero le funzioni che vengono trasferite verticalmente da una generazione all'altra e che molto difficilmente potrebbero essere rimpiazzate da altri geni o andare perdute senza gravi conseguenze.

- **Geni variabili:** in questo gruppo sono raggruppati i geni presenti solo in pochi ceppi (*geni shell*) o, in casi estremi, solo in un unico ceppo (*geni cloud*). Esempi di geni variabili sono quelli che codificano per la resistenza a un antibiotico o per l'adattamento a specifici ambienti in cui quel ceppo deve sopravvivere.

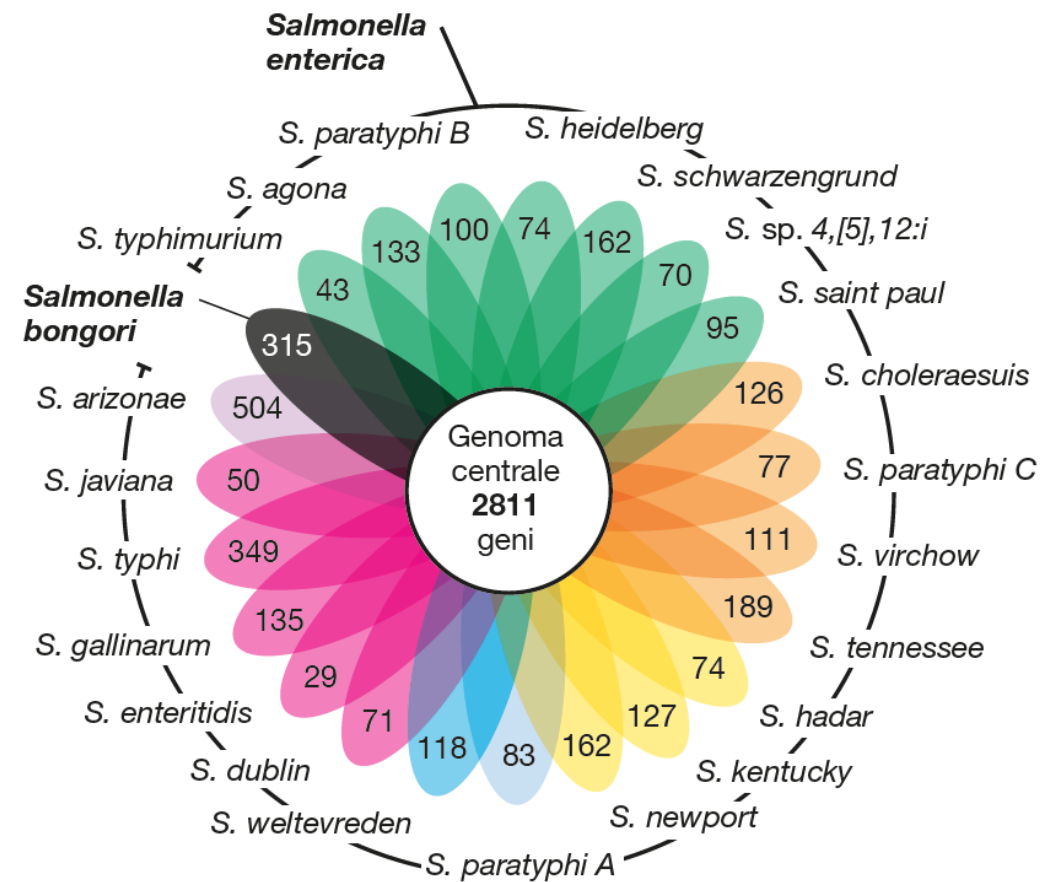
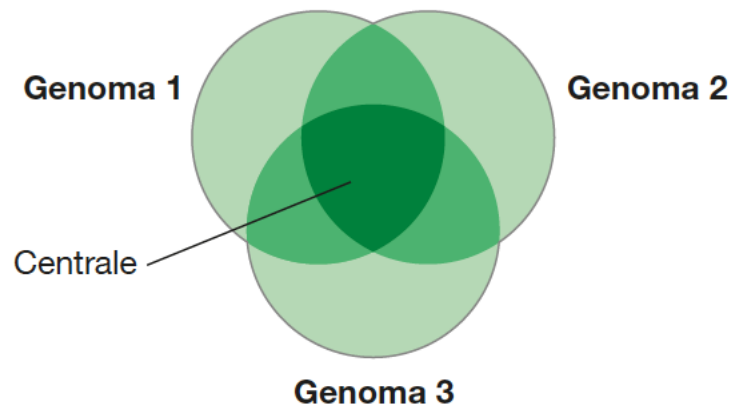
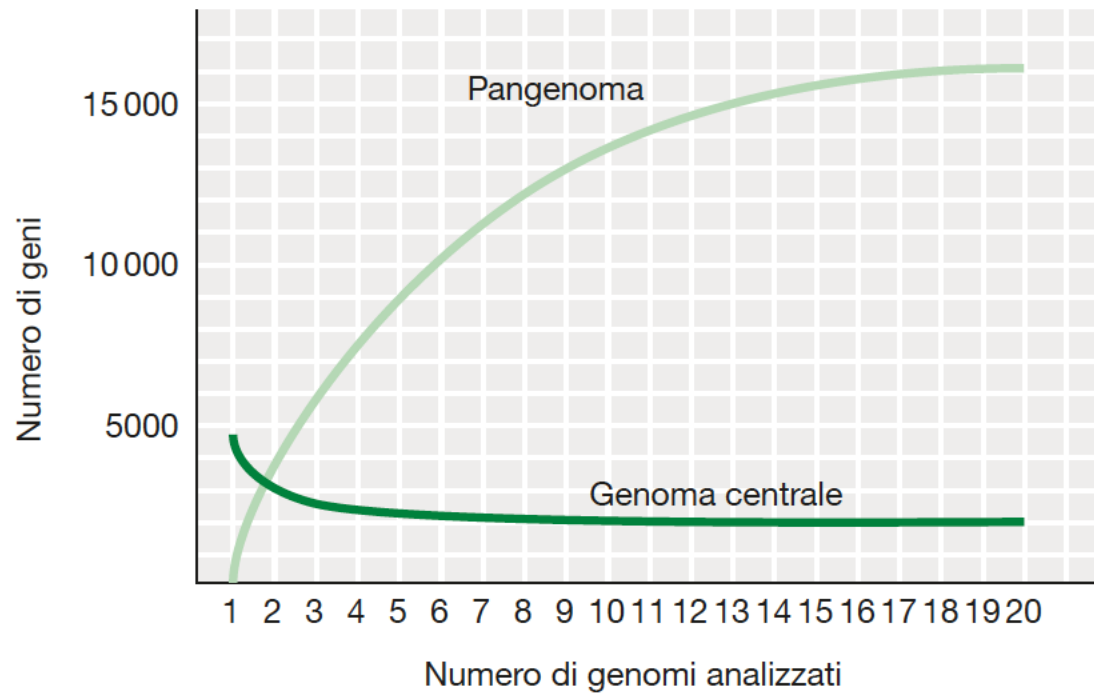


Figura 13.21 Il pangenoma di *Salmonella enterica* comprende molti geni ceppo-specifici. La specie *Salmonella enterica* include molti ceppi che differiscono per svariati tratti, compresa la patogenicità. Tutti i ceppi condividono un genoma centrale, composto da 2811 geni, ma ognuno possiede anche una serie di geni specifici. *Salmonella bongori* è una specie distinta da *S. enterica*. Dati da: Jacobsen, A., R.S. Hendriksen, F.M. Aaresturp, D.W. Ussery e C. Friis. 2011. The *Salmonella enterica* pan-genome. *Microb Ecol* 62: 487-504.



(a)



(b)

Figura 13.22 Concetto di genoma centrale e pangenoma.

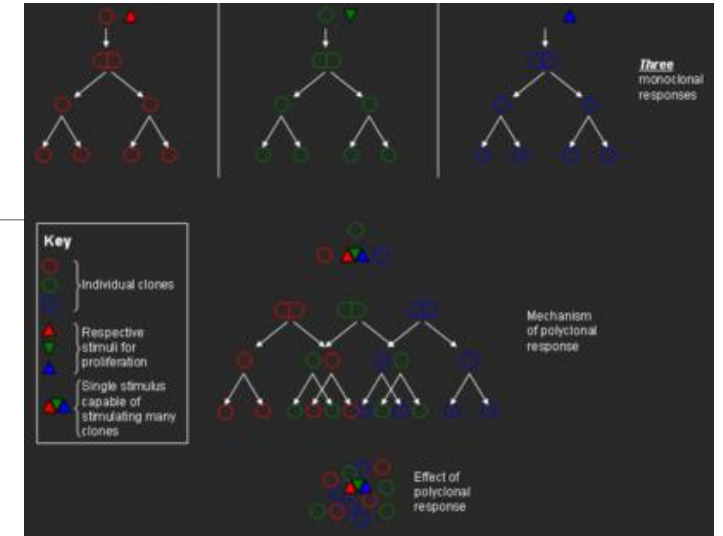
I genomi microbici sono dinamici ed eterogenei. I primi tre genomi sequenziati da ceppi differenti di *E. coli* avevano in comune solo il 39% dei geni. Il genoma centrale è l'insieme dei geni condivisi da tutti i membri di una specie [in verde scuro nella parte (a)], mentre il pangenoma è l'insieme di tutti i geni presenti nei diversi ceppi di una specie [tutti i geni dei genomi 1-3 della parte (a)]. La dimensione del genoma centrale e del pangenoma può variare da una specie all'altra. In *E. coli* il genoma centrale è composto da circa 1976 geni. (b) La dimensione del pangenoma in *E. coli* non è fissa dal momento che ogni ceppo ha uno specifico insieme di geni acquisiti per trasferimento genico orizzontale. Dati adattati da: Touchon, M. *et al.* 2009, *PLoS Genetics* 5:(1)e1000344.

Batteri e clonalità



Clonalità: definizioni...

«La clonalità implica lo stato di una cellula o di una sostanza derivata da una fonte o dall'altra. Quindi ci sono termini come derivati policlonali da molti cloni; oligoclonali[2]-derivanti da alcuni cloni; e derivato monoclonale da un clone.[da Wikipedia]



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

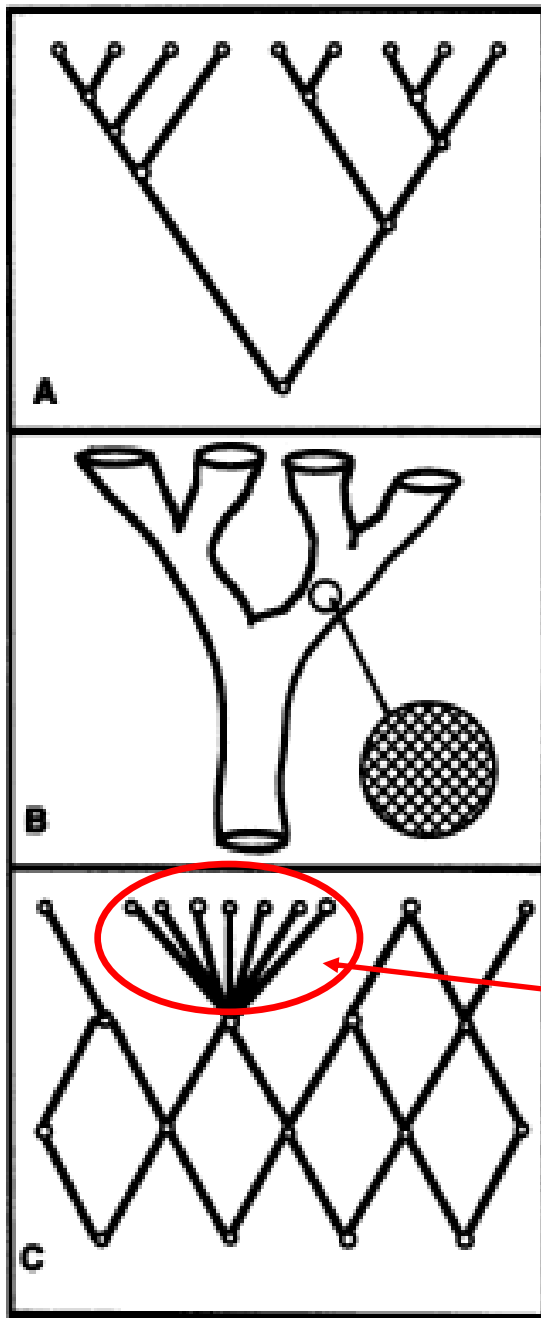
Clonalità, variabilità ed evoluzione

*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 andcan help us to even make predictions about its evolution.

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



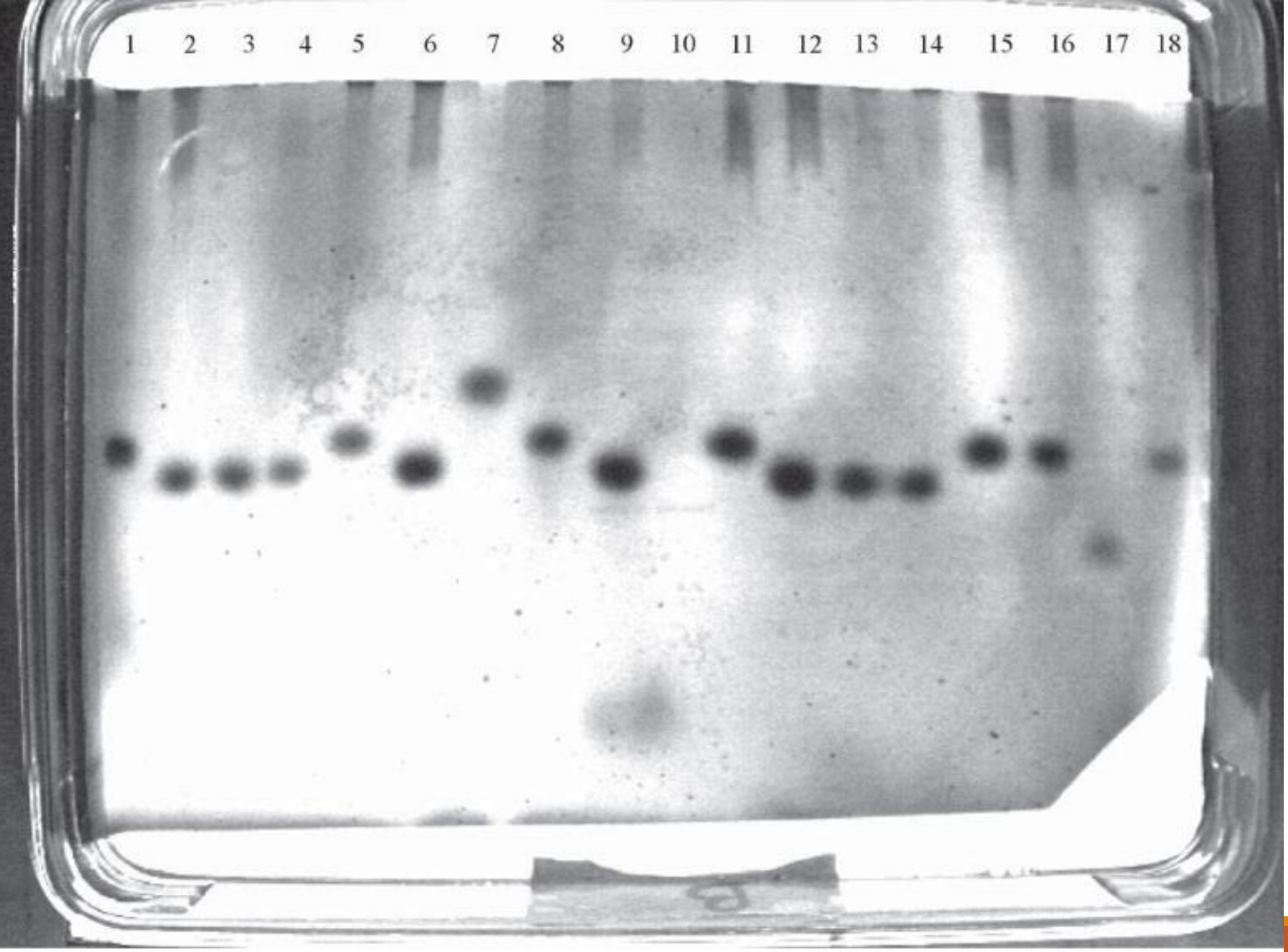
Strutture delle popolazioni microbiche.

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**.

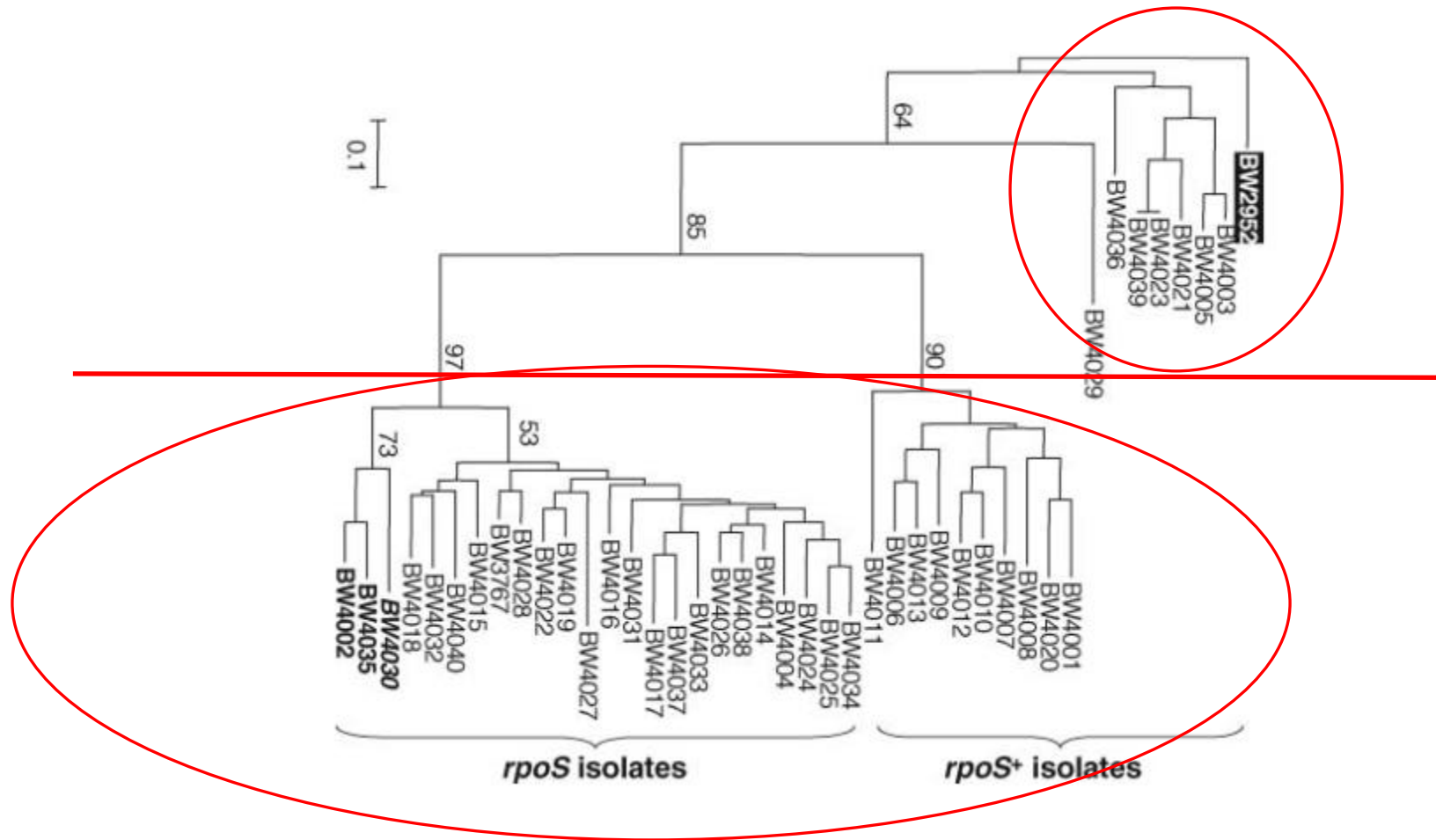
L'elettroforesi enzimatica multiloci (MLEE) è un metodo per caratterizzare gli organismi mediante le relative mobilità elettroforetica di un gran numero di enzimi intracellulari. Queste differenze di mobilità sono direttamente correlate alle mutazioni nel locus genico che causano sostituzioni di amminoacidi 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



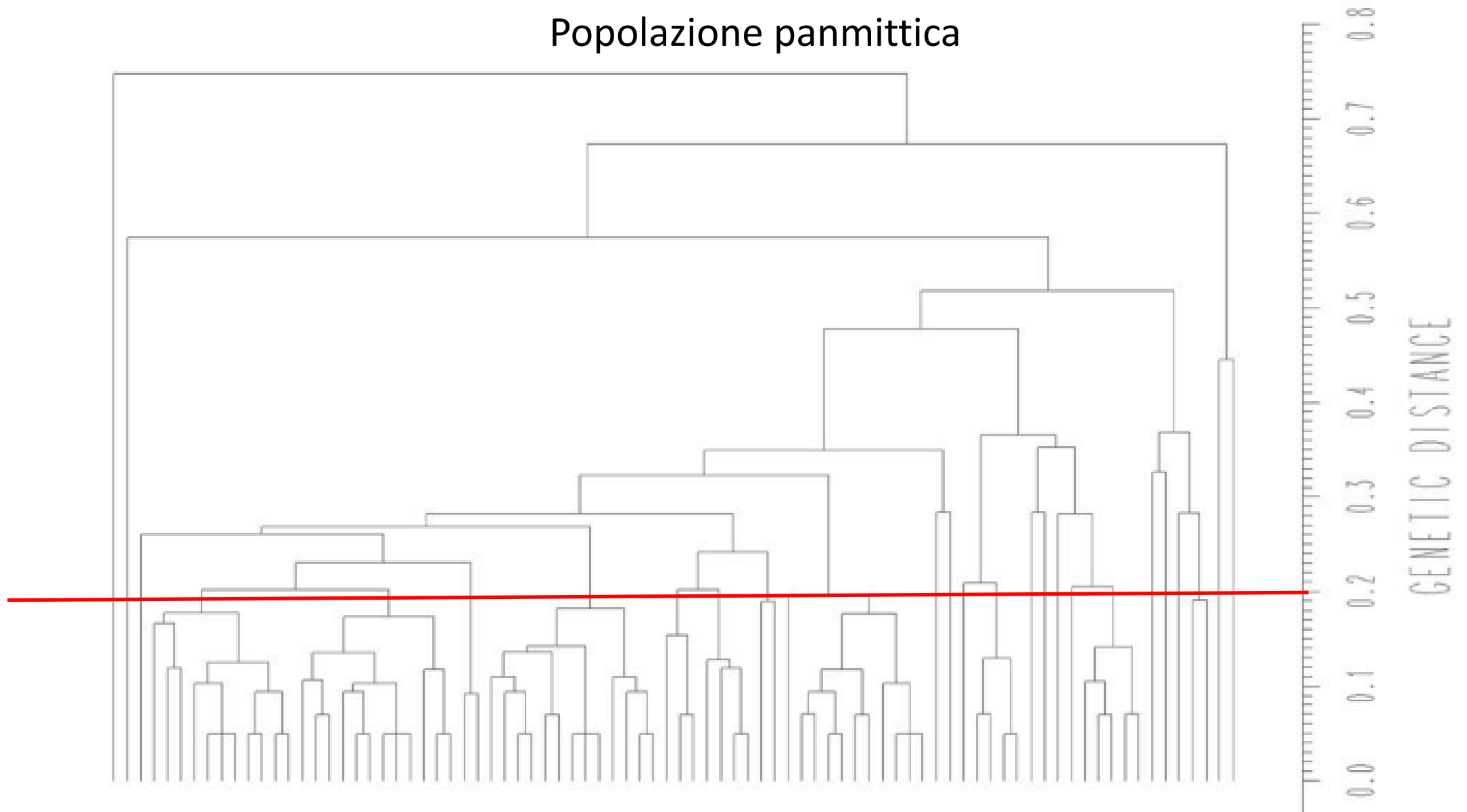
8

Popolazioni clonali



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

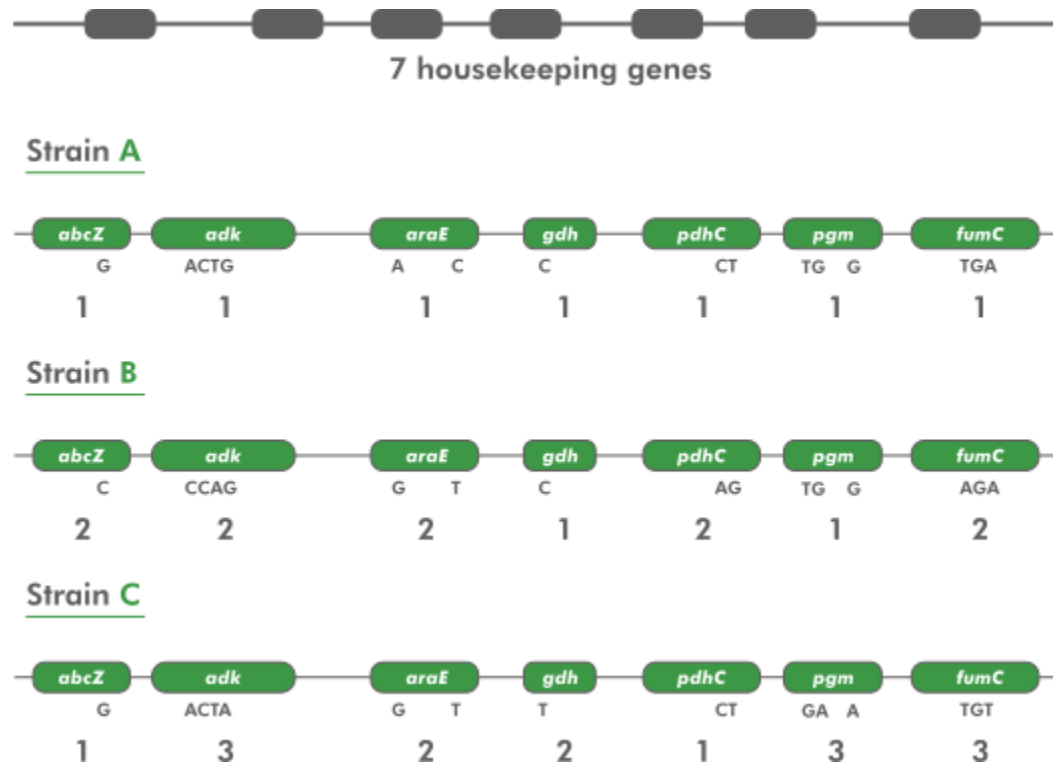
Popolazione panmittica



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

Multilocus sequence typing (MLST) is a molecular typing technique whereby a number of well chosen housekeeping genes (loci) are sequenced, usually in part.



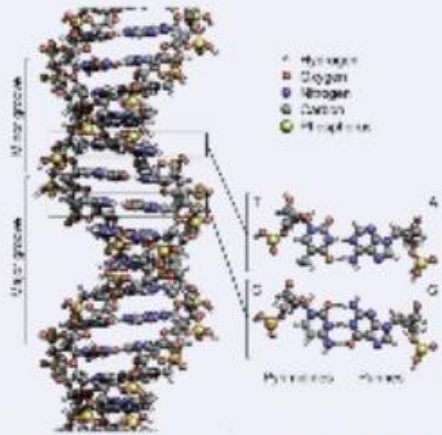
In a typical MLST approach, recombination is expected to occur with a much higher frequency than point mutations. Therefore, one does not look at the total sequence similarity between strains. Instead, each sequence for a given locus is screened for identity with already known sequences for that locus. If the sequence is different, it is considered to be a new allele and is assigned a unique (arbitrary) allele number. In case seven housekeeping genes are studied, each strain is thus characterized by a profile of seven allele numbers. The *allelic profiles* can be considered as a character set of 7 *categorical characters*. MLST has been used successfully to study population genetics and reconstruct micro-evolution of epidemic bacteria and other micro-organisms.

Multilocus sequence typing (MLST)

E' una procedura che caratterizza isolati di specie batteriche utilizzando le sequenze di frammenti di (solitamente) sette *housekeeping genes*. Vengono utilizzati frammenti interni di ciascun gene di circa 450-500 bp. Per ogni *housekeeping gene* esistono diverse sequenze, ognuna di loro caratteristica per ogni specie batterica. Queste sequenze differiscono per uno o più nucleotidi e sono considerate come alleli distinti. Per ogni isolato, gli alleli in ciascuno dei sette loci definiscono il profilo allelico, detto anche *sequence type* (ST). Ciascun isolato di una specie è quindi caratterizzato in modo inequivocabile da una serie di sette numeri interi che corrispondono agli alleli dei sette *housekeeping genes*.

Il numero di differenze nucleotidiche tra gli alleli viene ignorato e alle sequenze vengono assegnati numeri di alleli diversi indipendentemente dal fatto che differiscano in un singolo o in molti nucleotidi. Un singolo evento genetico che dà luogo a un nuovo allele può verificarsi per una mutazione puntiforme (che altera solo un singolo nucleotide) o per una sostituzione ricombinazionale (che spesso cambierà più nucleotidi).

Bacterial genomes



Four letters: A, C, T, G
Two strands complementary:
A : T, C : G

Bacterial genomes are most often circular

Campylobacter jejuni genome:
1.68 million basepairs

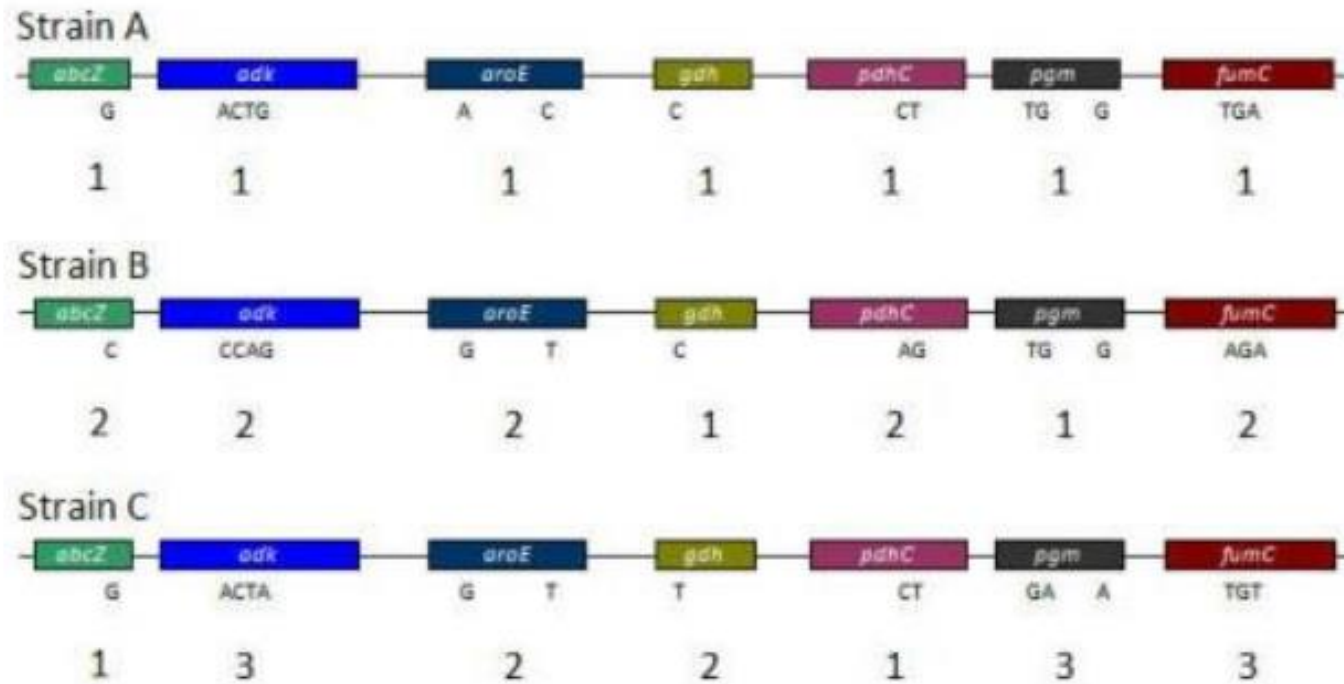


Genes: DNA that encode for proteins
Often regarded as the "functional" regions of the genome
Bacteria: genes approx 90% of the genome

TGAGGGACCAAACCGAT
↓
TGAGGGACGAAACCGAT

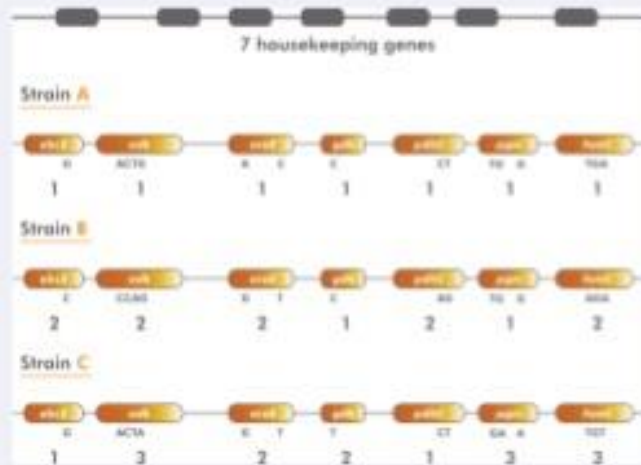
Mutations: single letter character changes

In genetica, un locus (al plurale loci) è una posizione fissa specifica su un cromosoma in cui si trova un particolare gene o marker genetico. Ogni cromosoma ha molti geni e ogni gene occupa un locus specifico



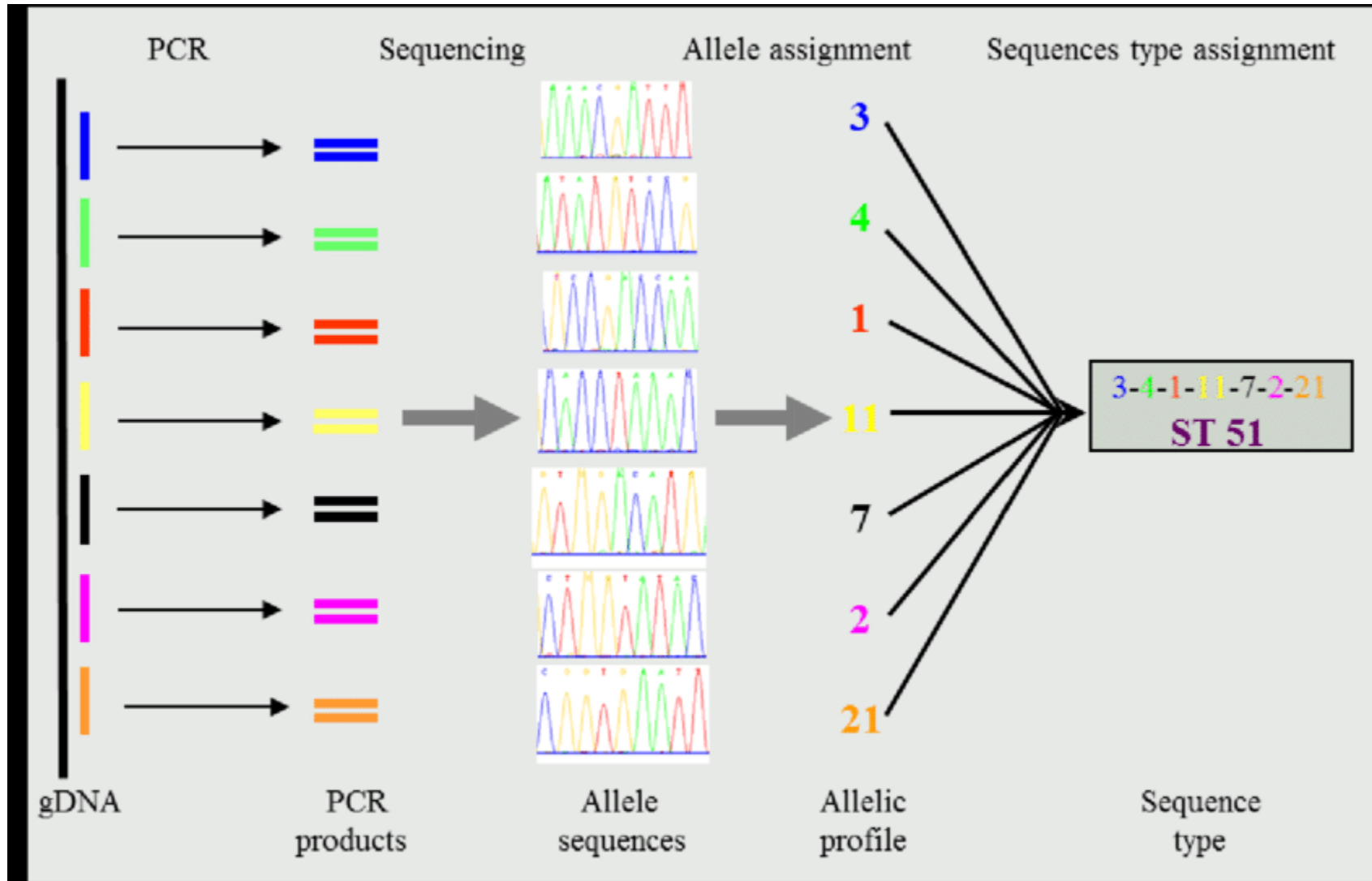
Each sequence for a given locus is screened for identity (not for similarity) with already known sequences for that locus. If the sequence is different, it is considered to be a new allele and is assigned a unique (arbitrary) allele number

Multi Locus Sequence Typing



- Set of genes
- Each variant is assigned a categorical number
- Cluster types on # shared variants
- Numbers becomes Sequence type (ST)
- Similarity is # of identical loci numbers

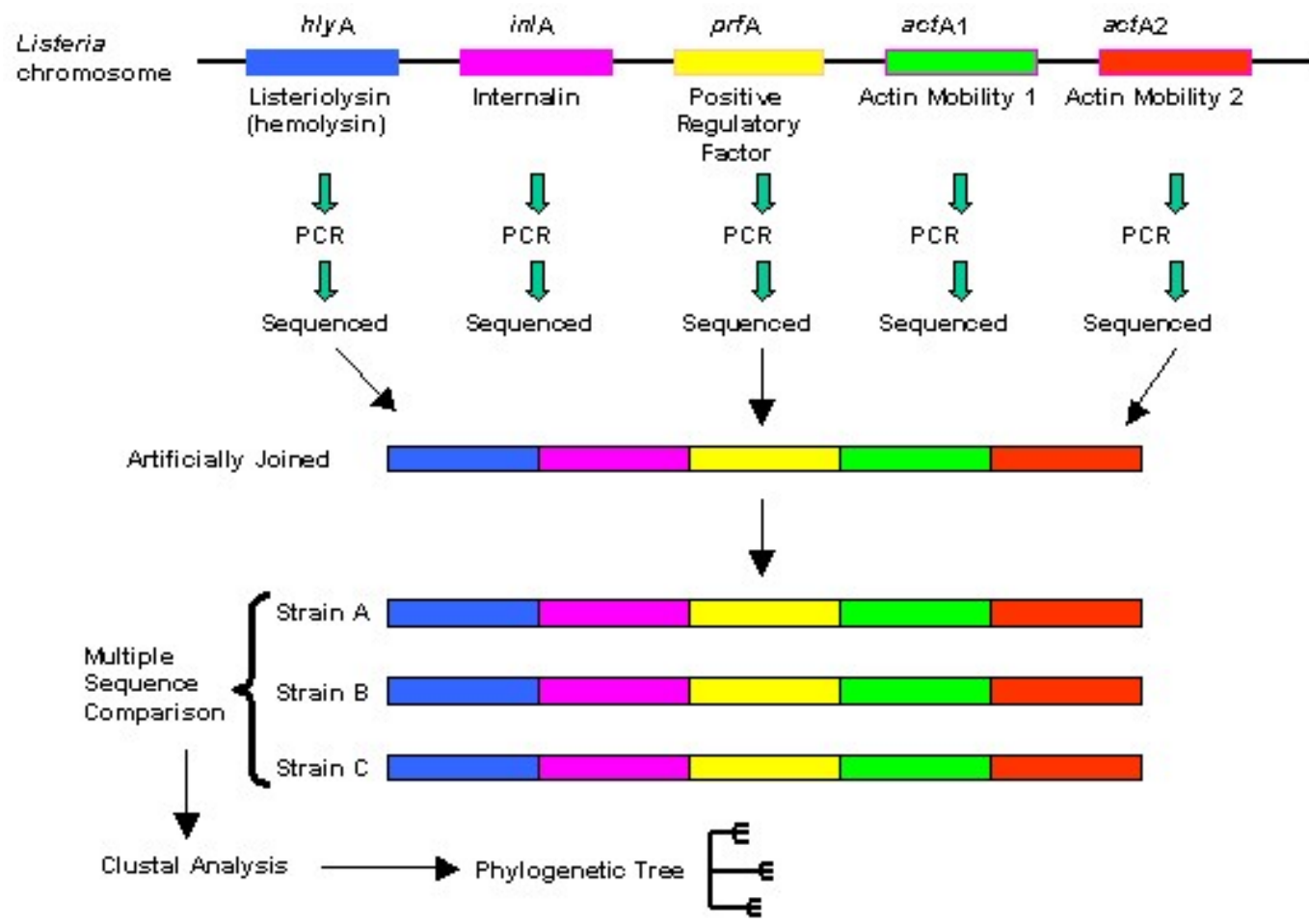
- MLST: 7 genes
- rMLST: ribosomal genes



<https://external->

[content.duckduckgo.com/iu/?u=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FWerner_Ruppitsch%2Fpublication%2F313256513%2Ffigure%2Fdownload%2Ffig6%2FAS%3A4577942194503](https://external-content.duckduckgo.com/iu/?u=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FWerner_Ruppitsch%2Fpublication%2F313256513%2Ffigure%2Fdownload%2Ffig6%2FAS%3A4577942194503)

[71%401486158055299%2FScheme-for-multilocus-sequence-typing-adapted-from-mlstnet-MLST-uses-sequence.png&f=1&nofb=1](https://external-content.duckduckgo.com/iu/?u=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FWerner_Ruppitsch%2Fpublication%2F313256513%2Ffigure%2Fdownload%2Ffig6%2FAS%3A457794219450371%401486158055299%2FScheme-for-multilocus-sequence-typing-adapted-from-mlstnet-MLST-uses-sequence.png&f=1&nofb=1)



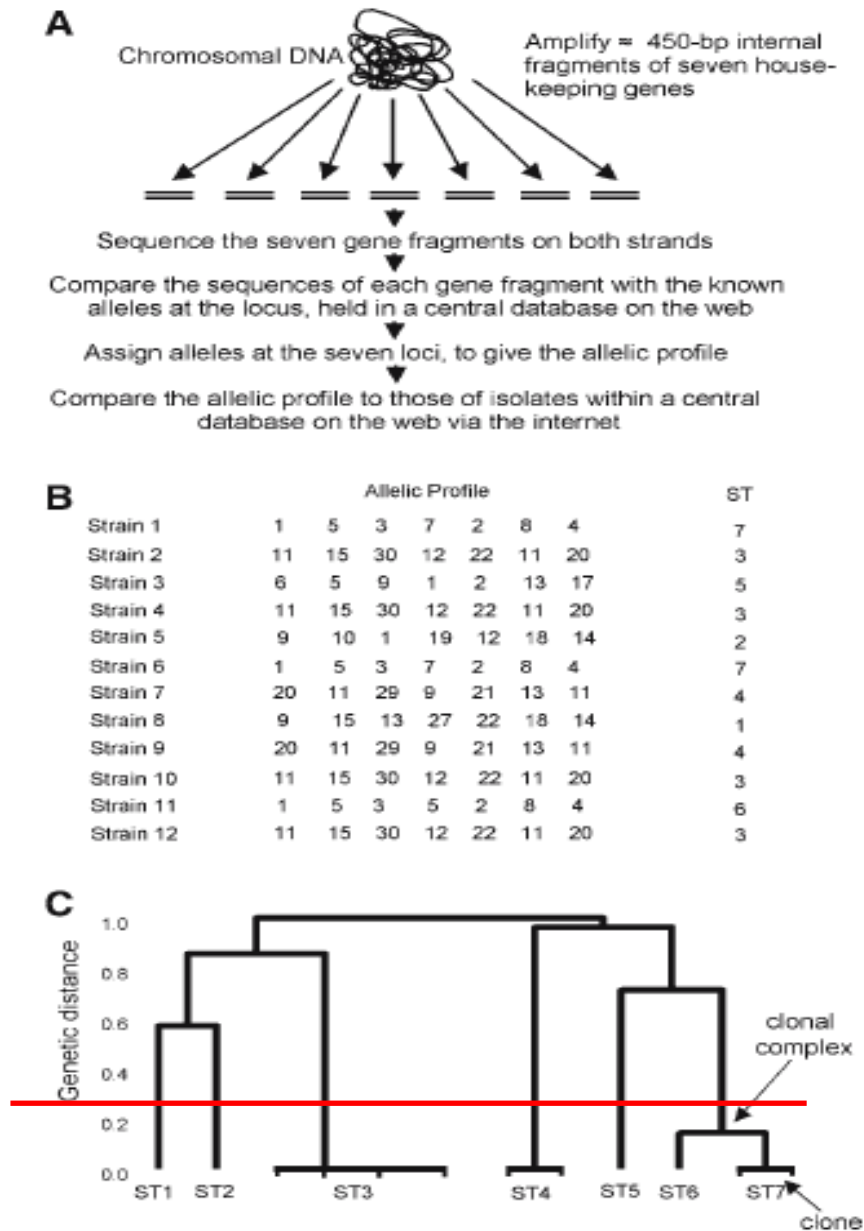
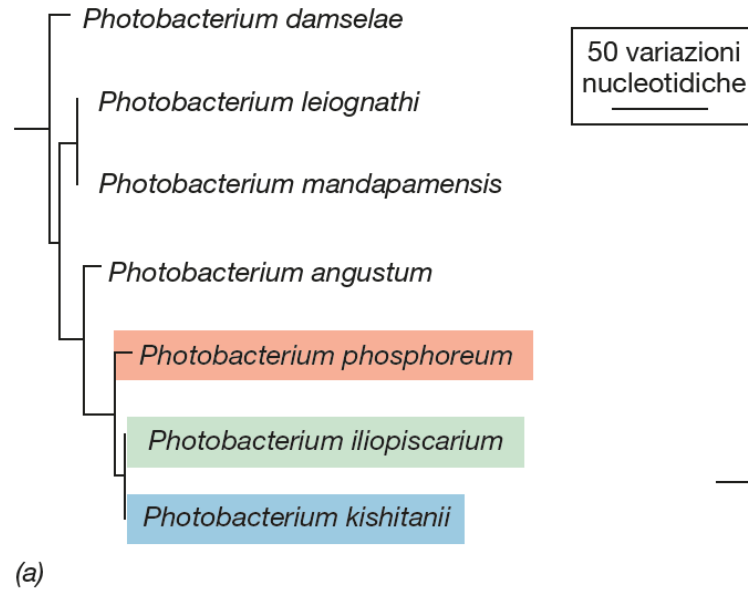


Fig. 1. Characterization of isolates of bacteria using MLST. (A) Internal fragments of seven housekeeping loci are amplified by PCR and are sequenced on both strands.

Albero disegnato sulla base dell'rRNA 16S



Albero disegnato sulla base dell'analisi multigene

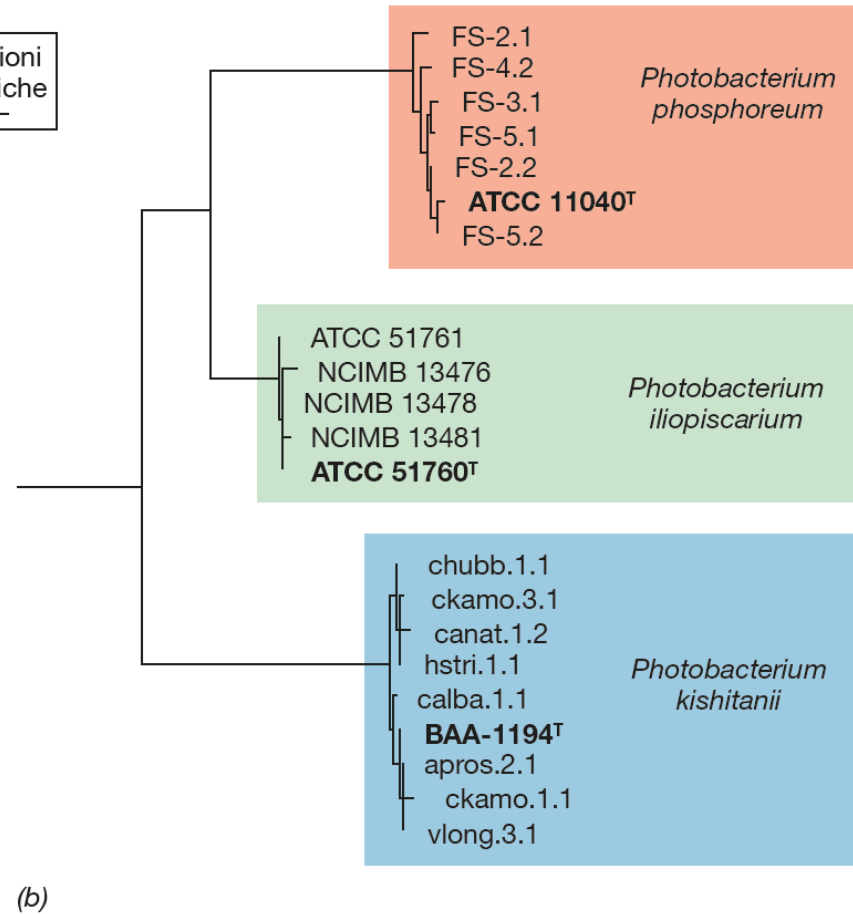


Figura 13.32 Analisi di sequenza multilocus (MLSA). La figura illustra la filogenesi del genere *Photobacterium*. (a) Albero del gene dell'rRNA 16S, che dimostra scarsa efficacia nel discriminare specie diverse. (b) MLSA basata sull'analisi combinata del gene dell'rRNA 16S e dei geni *gyrB* e *luxABFE* di 21 ceppi appartenenti a tre specie di *Photobacterium*. L'MLSA discrimina chiaramente i ceppi in tre distinte specie filogenetiche, *P. phosphoreum*,

P. iliopiscarium e *P. kishitanii*. La scala graduata indica la lunghezza di diramazione pari a 50 variazioni nucleotidiche. In grassetto è indicato il ceppo di riferimento (*type strain*) di ogni specie (i vari ceppi sono indicati con le rispettive abbreviazioni di riferimento). Analisi filogenetiche riportate per gentile concessione di Tory Hendy e Paul V. Dunlap, University of Michigan.

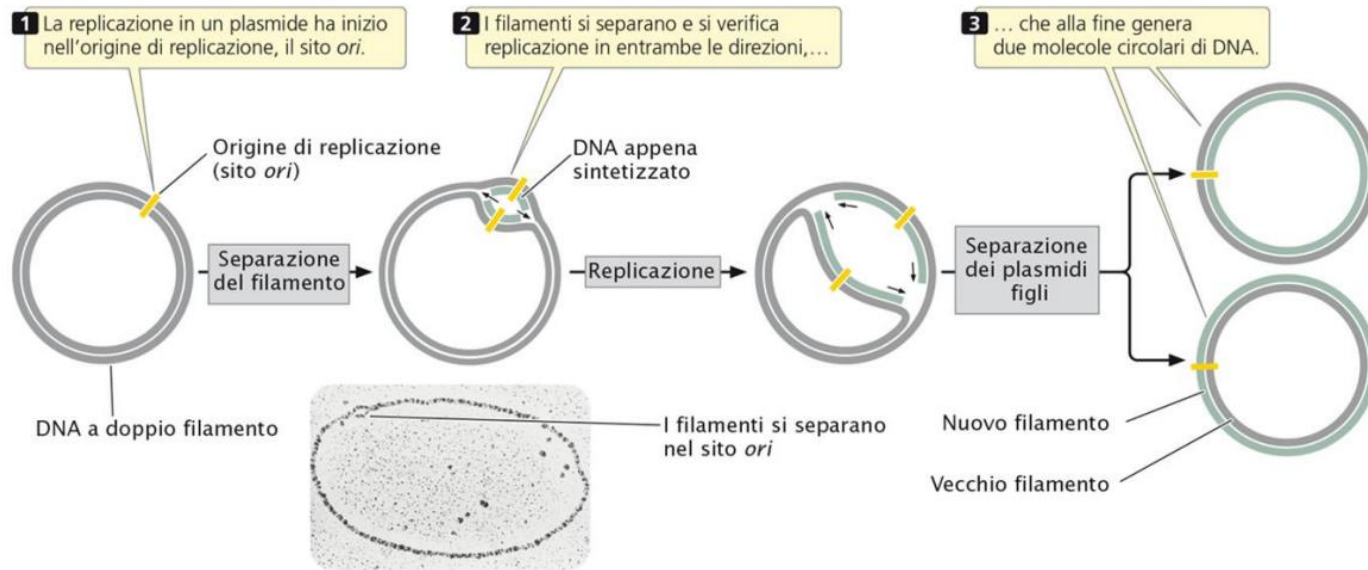


Huntington Potter and David Dressler

Diversità microbica: il DNA cromosomico e plasmidico

Il cromosoma batterico e i plasmidi batterici visti al microscopio elettronico. I plasmidi (nei cerchi rossi) sono strutture circolari molto più piccole del DNA cromosomico principale. La cellula batterica (struttura bianca) è stata rotta delicatamente in modo da non danneggiare il suo DNA.

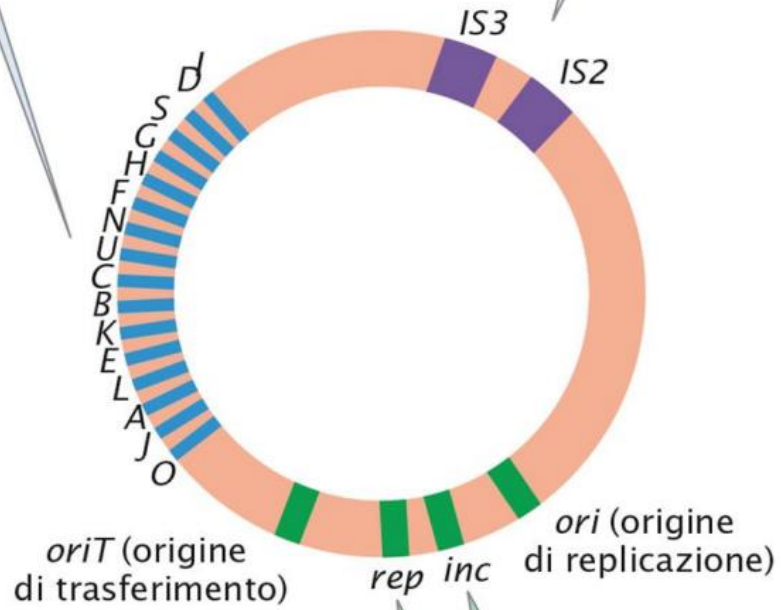
Di solito i plasmidi trasportano geni non essenziali per le funzioni batteriche, ma che possono giocare un ruolo decisivo nel ciclo di vita e crescita dei microrganismi che li ospitano. Esistono molti tipi di plasmidi; la sola *E. coli* si ritiene abbia più di 270 tipi di plasmidi presenti in natura. Ci sono plasmidi che permettono l'accoppiamento tra batteri, e alcuni di loro svolgono una funzione nella diffusione fra i batteri della resistenza agli antibiotici.



Ogni plasmide ha un'origine di replicazione, una specifica sequenza di DNA da cui ha inizio la replicazione. L'origine consente a un plasmide di replicarsi indipendentemente dal cromosoma batterico. Gli episomi sono plasmidi capaci di replicarsi liberamente e in grado di integrarsi nei cromosomi batterici. Il fattore F (fertilità) dell' *E. coli* è un episoma che controlla l'accoppiamento e lo scambio genico fra le cellule di *E. coli*.

I geni che regolano il trasferimento dei plasmidi ad altre cellule.

Le sequenze che regolano l'inserzione nel cromosoma batterico.

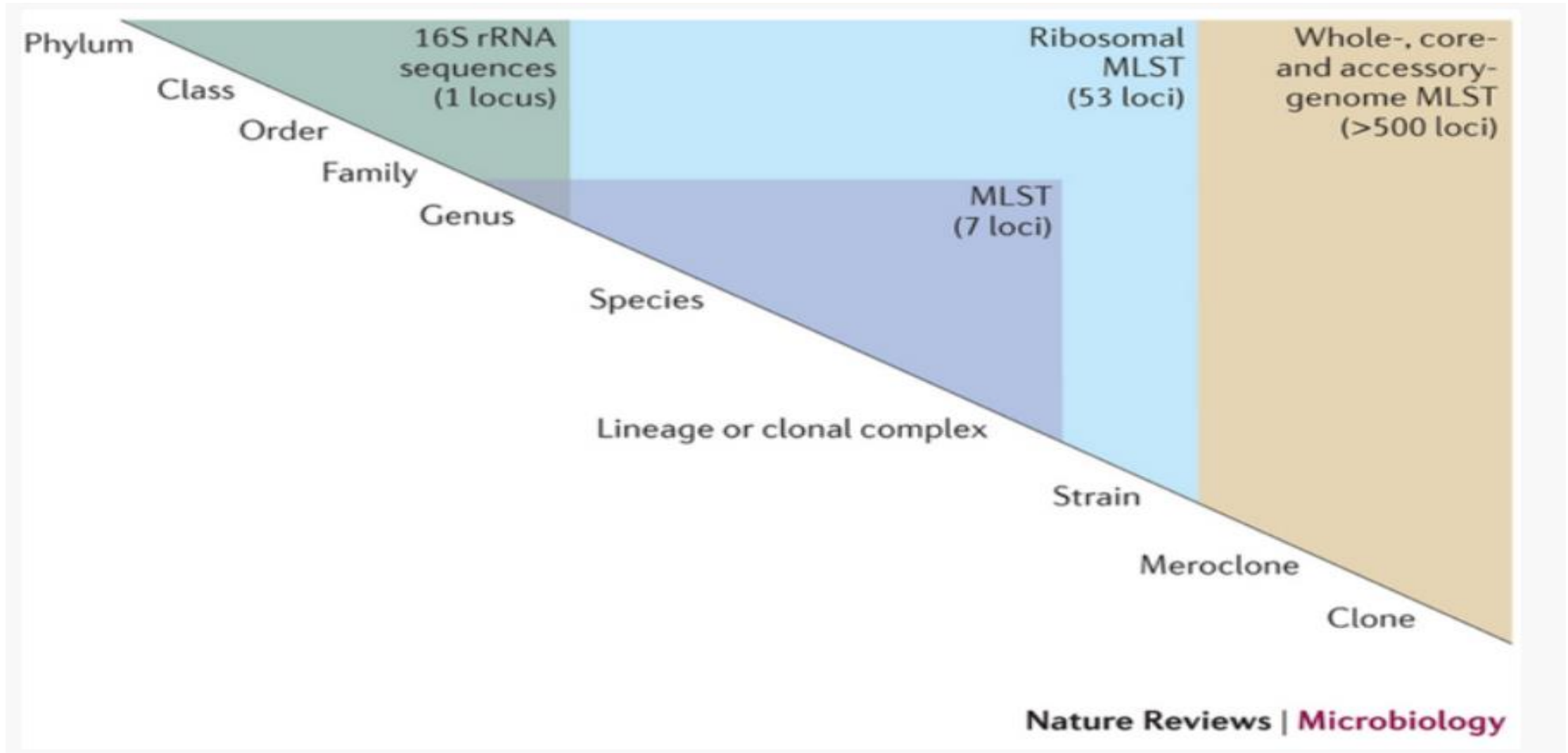


I geni che controllano la replicazione plasmidica.

Fattore F

Tecniche di ricerca sulla diversità microbica.

- 1) DNA fingerprinting: noto anche come DNA typing o DNA profiling, è un metodo utilizzato per il confronto del DNA, o la determinazione delle caratteristiche del DNA di un organismo, studiando una serie di frammenti di DNA dopo averli separati mediante elettroforesi su gel.
- 2) DNA microarray: noto anche come gene chip, in cui una serie di sequenze o geni sono disposti ordinatamente in microarray per rilevare DNA o RNA target consentendo ai ricercatori di identificare i microrganismi e di analizzare l'espressione di migliaia di geni in una singola reazione.
- 3) Sequenziamento 16S/18S: l'RNA ribosomiale è la forma predominante di RNA in una cellula (circa l'80%) ed è costituito da più regioni conservative e variabili. Il sequenziamento dell'RNA ribosomiale può essere utilizzato per identificare e confrontare i microrganismi attraverso amplificazione dei geni.
- 4) Whole-genome sequencing (WGS): il WGS funziona come un potente strumento per fornire una visione completa dell'intero genoma. Può essere applicato in molteplici aree, tra cui la diagnosi, il monitoraggio dei focolai di malattie, la caratterizzazione delle mutazioni causali e l'identificazione dei geni di resistenza ai farmaci. I principali processi del sequenziamento dell'intero genoma sono l'allineamento, l'identificazione di varianti, l'annotazione e il calcolo delle metriche correlate.
- 5) Sequenziamento metagenomico: il sequenziamento metagenomico (o sequenziamento shotgun dell'intero genoma) legge miliardi di coppie di basi del DNA in una singola corsa senza arricchimento selettivo di una popolazione specifica. Non solo è in grado di profilare la composizione e la diversità della comunità microbica, ma fornisce anche le informazioni per rivelare le funzioni codificate dai genomi.



Maiden M. C.; et al. A nomenclature for discussing the genetic relatedness of bacteria. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11: 728–736.