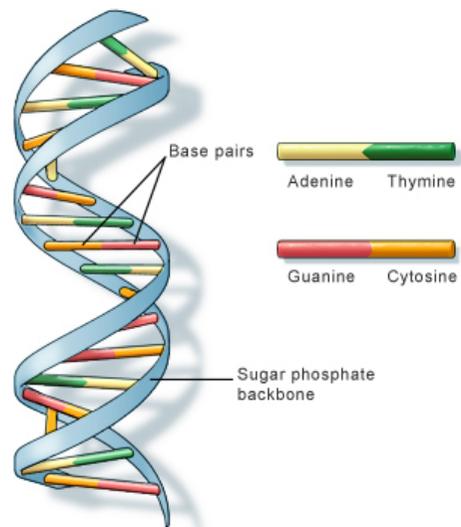


Genetica dei microrganismi

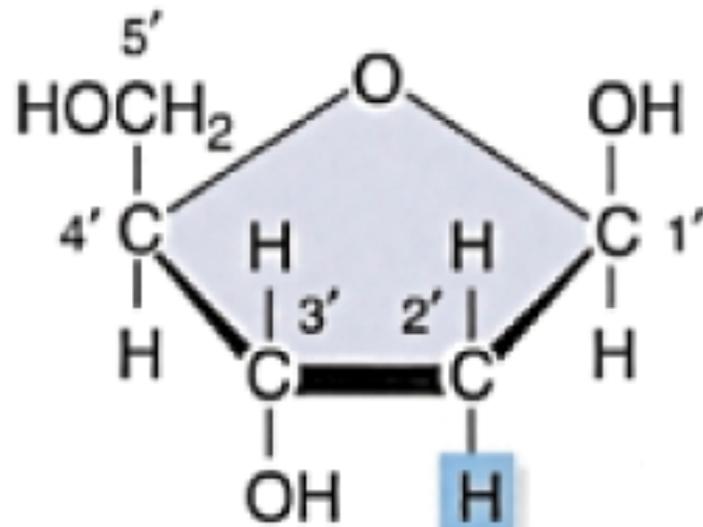


U.S. National Library of Medicine

Acidi nucleici (DNA e RNA)

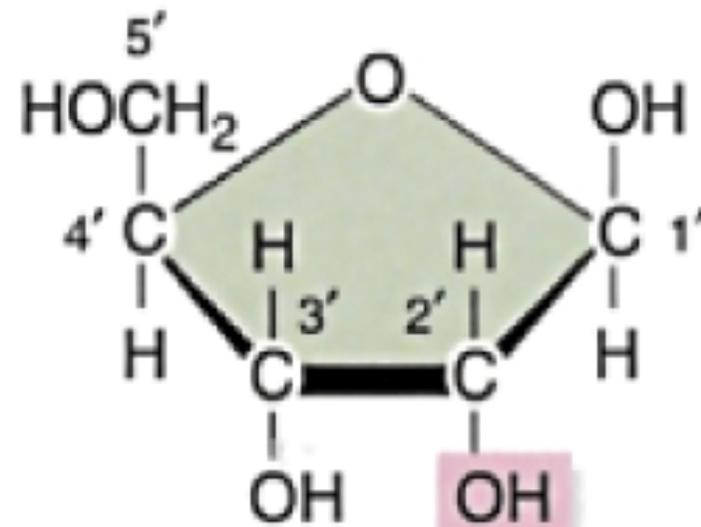
- Macromole costituite da subunità monomeriche dette nucleotidi, costituiti da:
 - uno zucchero (deossiribosio nel DNA, ribosio nell'RNA)
 - una base azotata (purinica e pirimidinica)
 - uno o più gruppi azotati

Acido desossiribonucleico



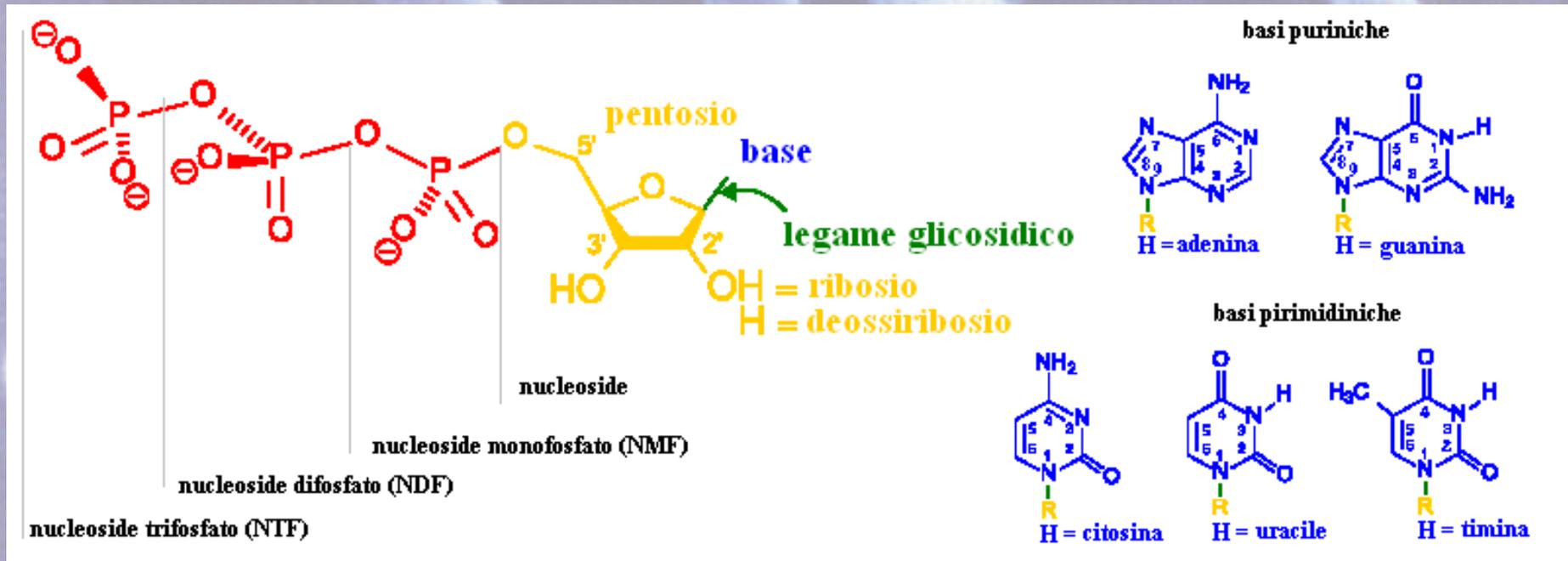
Desossiribosio

DNA



Ribosio

RNA



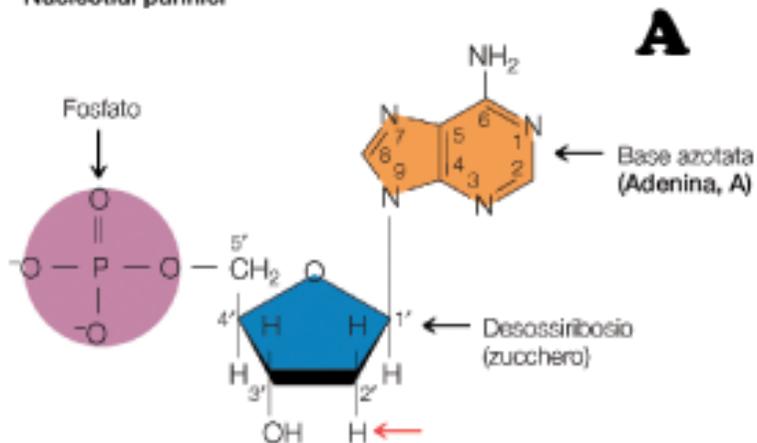
Basi azotate

Puriniche: Adenina e Guanina

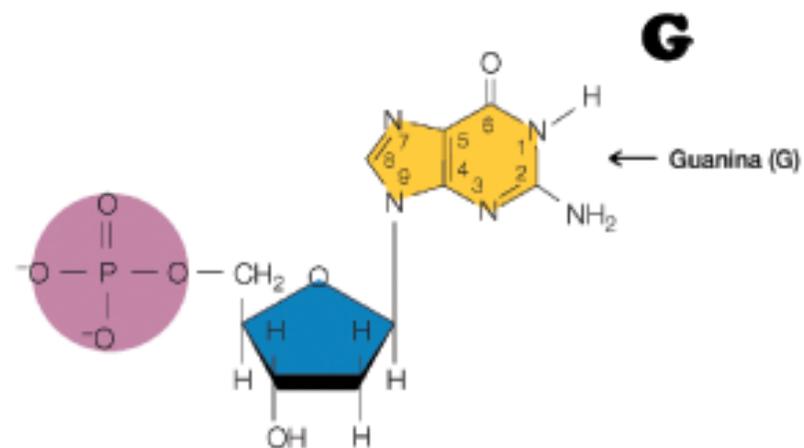
Pirimidiniche: Citosina, Timina (DNA) e Uracile (RNA)

Le unita' costitutive del DNA: i nucleotidi

Nucleotidi purinici

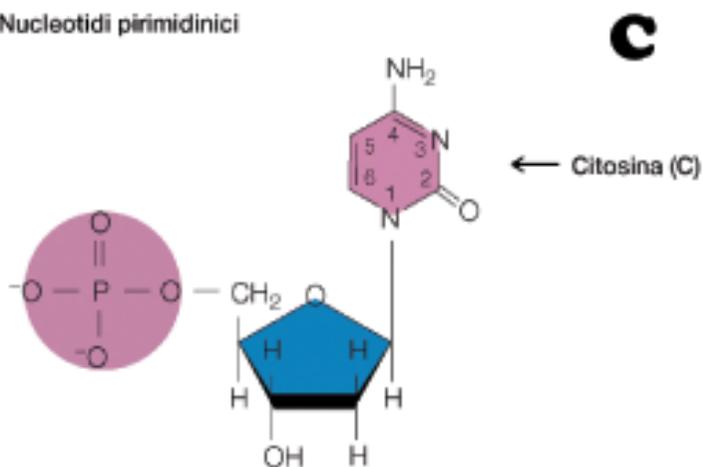


Desossadenosina 5'-monofosfato (dAMP)

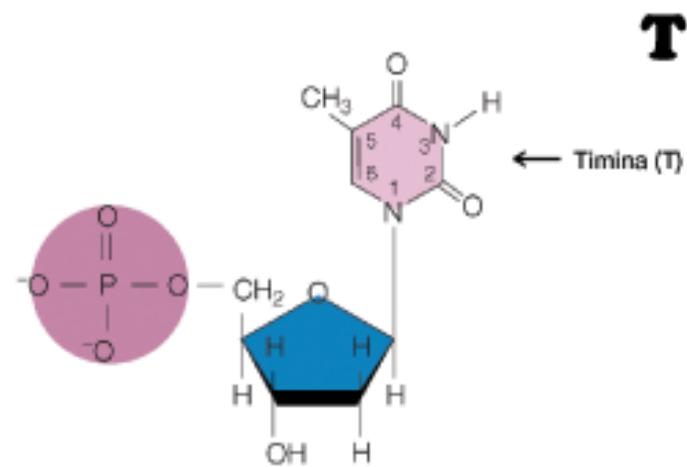


Desossiguanosina 5'-monofosfato (dGMP)

Nucleotidi pirimidinici

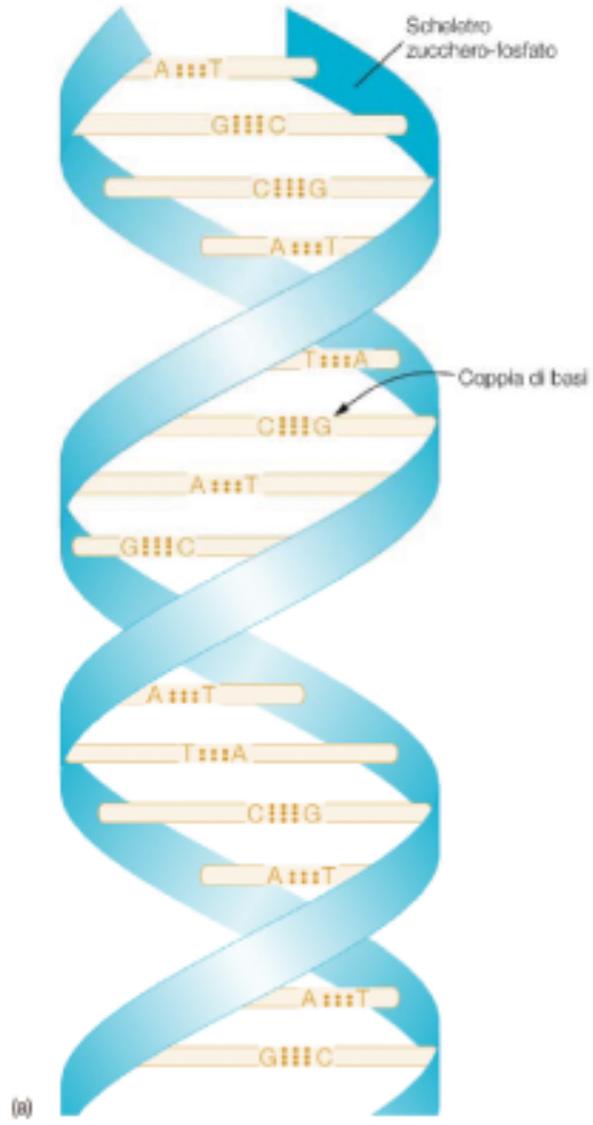


Desossicitidina 5'-monofosfato (dCMP)

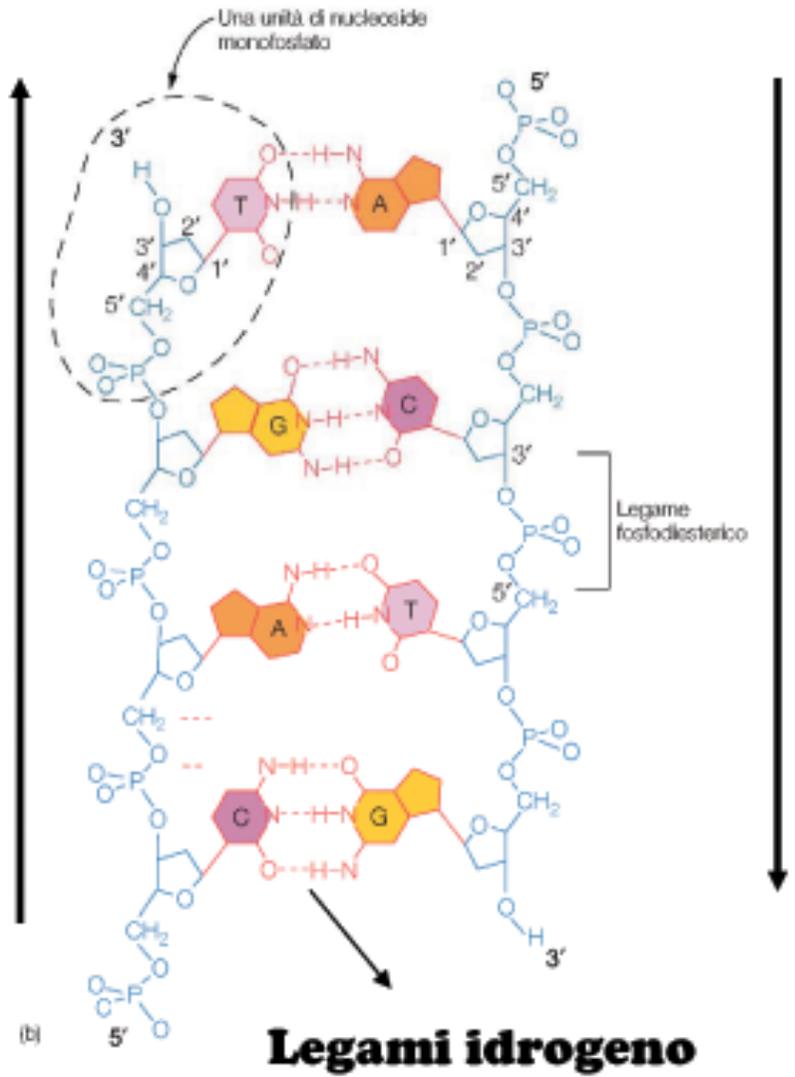


Desossitimidina 5'-monofosfato (dTMP)

Modello della struttura ad elica del DNA



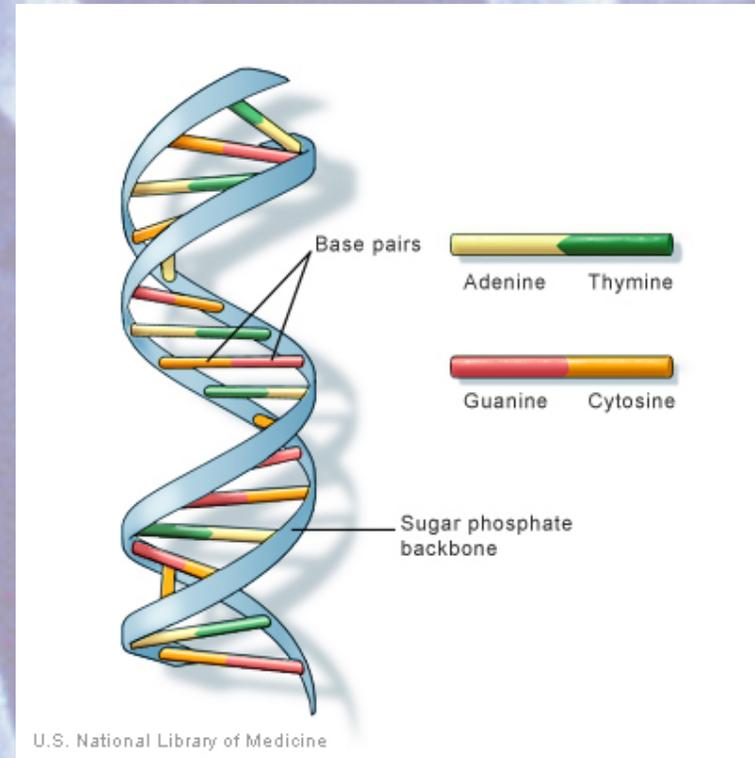
Direzioni opposte: 2 catene antiparallele



Legami idrogeno

DNA

- Doppio filamento per appaiamento delle basi complementari (A-T, G-C)
- I 2 filamenti sono orientati in senso antiparallelo (5'-3' e 3'-5'), avvolti uno intorno all'altro a formare una doppia elica



DUPLICAZIONE, TRASCRIZIONE E TRADUZIONE

DNA *Duplicazione* **DNA**



DNA
Trascrizione
RNA

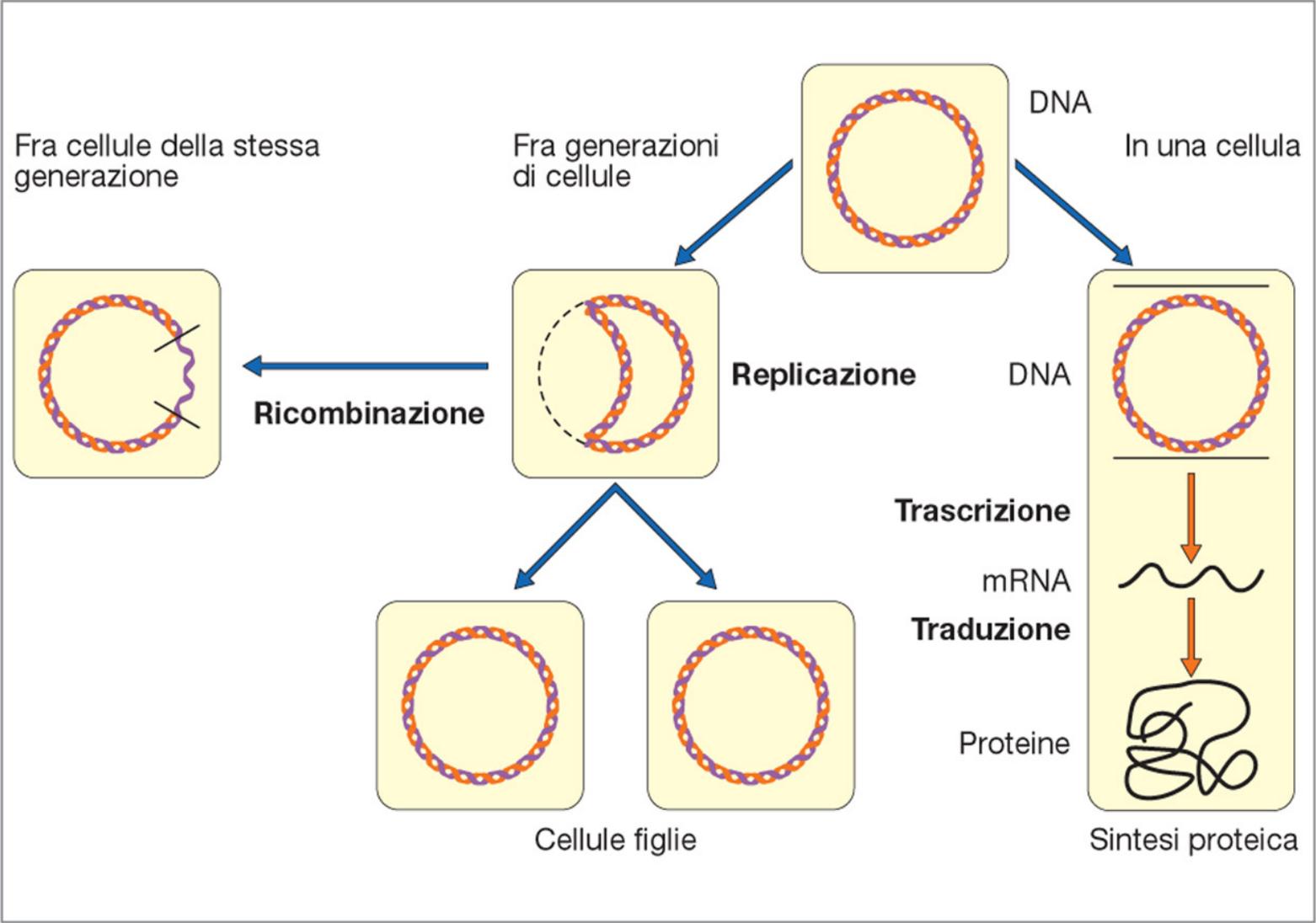


RNA
Traduzione
Proteina



- Il processo di **DUPLICAZIONE** porta alla formazione di copie delle molecole di DNA ed al trasferimento del materiale genetico.
- Il processo di **TRASCRIZIONE** è il trasferimento dell'informazione dal DNA alle molecole di RNA.
- La **TRADUZIONE** è il processo mediante il quale dall'RNA si passa alla sintesi delle proteine

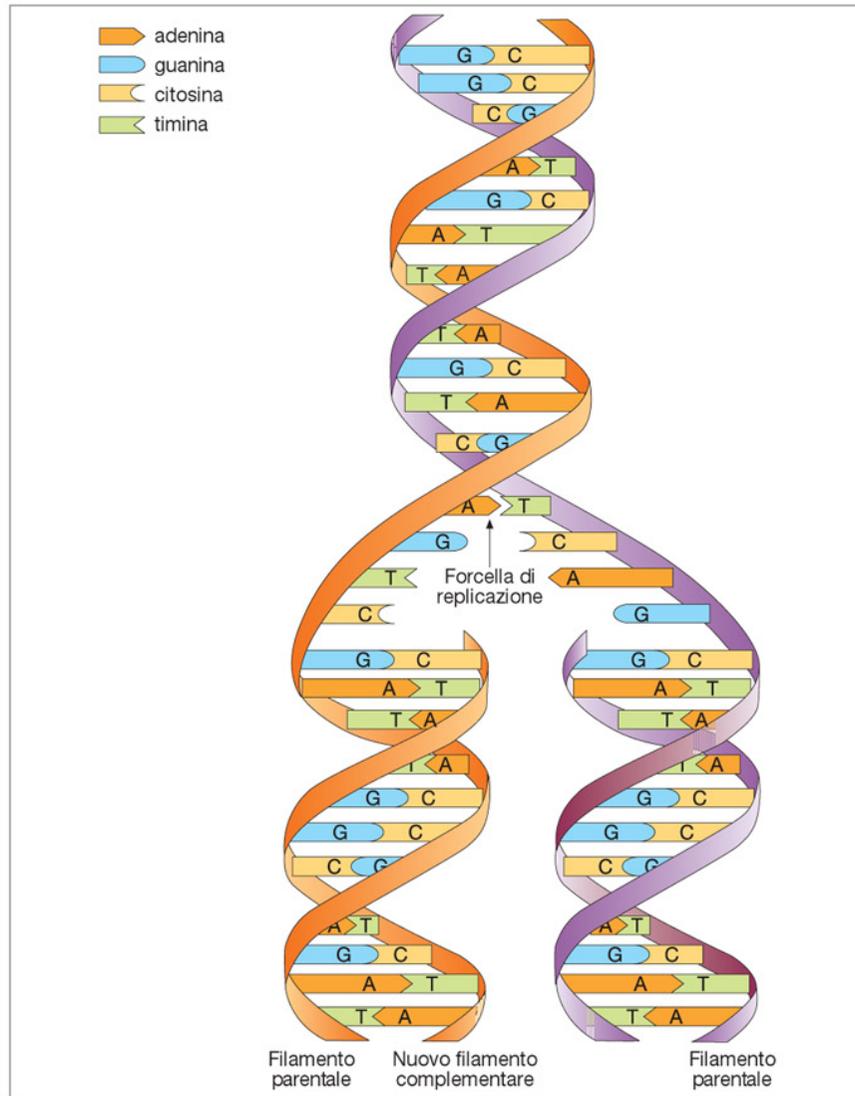
Flusso dell'informazione genetica

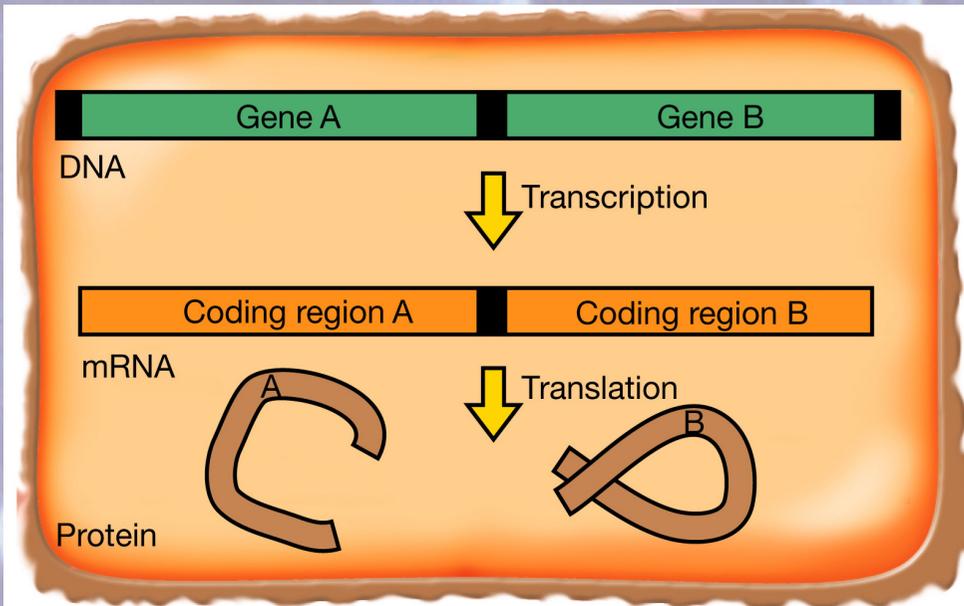


Replicazione

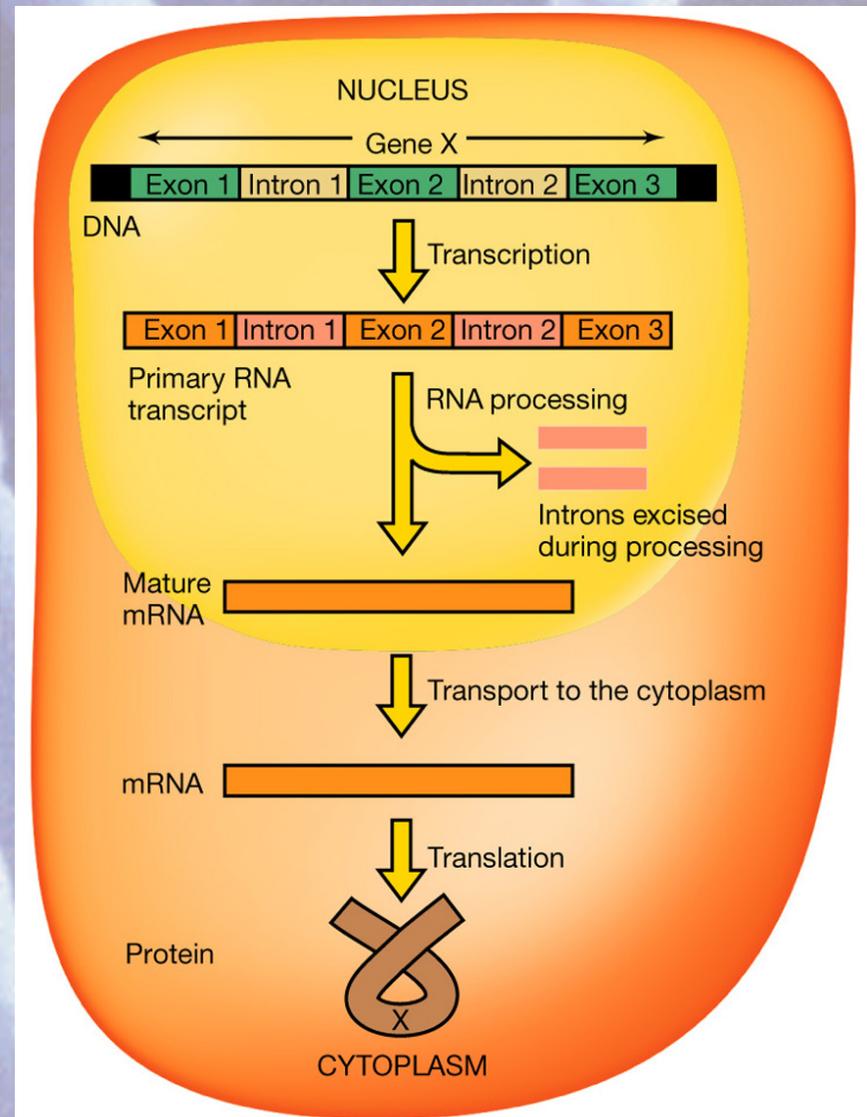
Meccanismo attraverso cui
l'informazione genetica passa da una
generazione ad un'altra

Meccanismo semiconservativo





(a) Prokaryote



(b) Eukaryote

Il genoma dei microrganismi

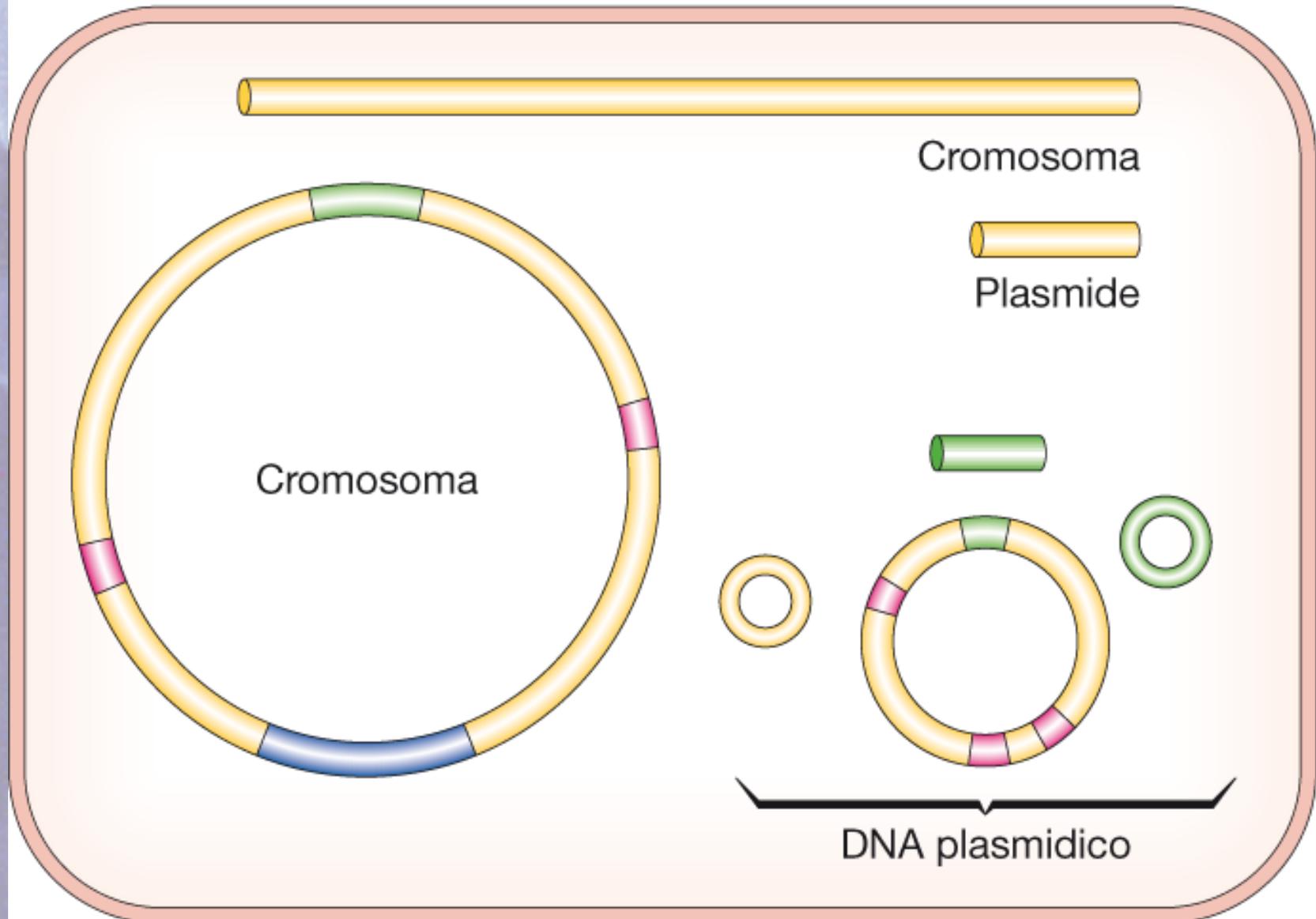
- Elementi con origine di replicazione autonoma
 - Cromosoma/cromosomi (da 1 a molti, generalmente circolari nei procarioti, lineari negli eucarioti, >0,5 Mbp)
 - Plasmidi (da 0 a >10, da 1 a alcune decine di copie per plasmide, circolari o lineari, 0,5-300 kbp)
 - Profagi (da 0 a 5, integrati o meno nel cromosoma, 5-200 kbp)
- Elementi capaci di trasposizione
 - Sequenze di inserzione (IS) (da 0 a molte, 1 o più copie, lineari, ca. 1 kbp)
 - Trasposoni (Tn) (da 0 a molti, 1 o più copie, 10-20 kbp)



Elementi virali

Elementi plasmidici

Elementi trasponibili



Genoma Procariote

Nocciolo genico
Cromosoma
(Plasmide)

Geni accessori
Isole genomiche
Batteriofagi
Plasmidi
Integrone
Trasposoni

Cromosoma

- Geni ribosomali
- Parete cellulare
- Vie del metabolismo centrale
- Replicazione del DNA
- Biosintesi dei nucleotidi
- Geni di regolazione
- Altre funzioni essenziali

Plasmide

- Funzioni essenziali per la replicazione autonoma

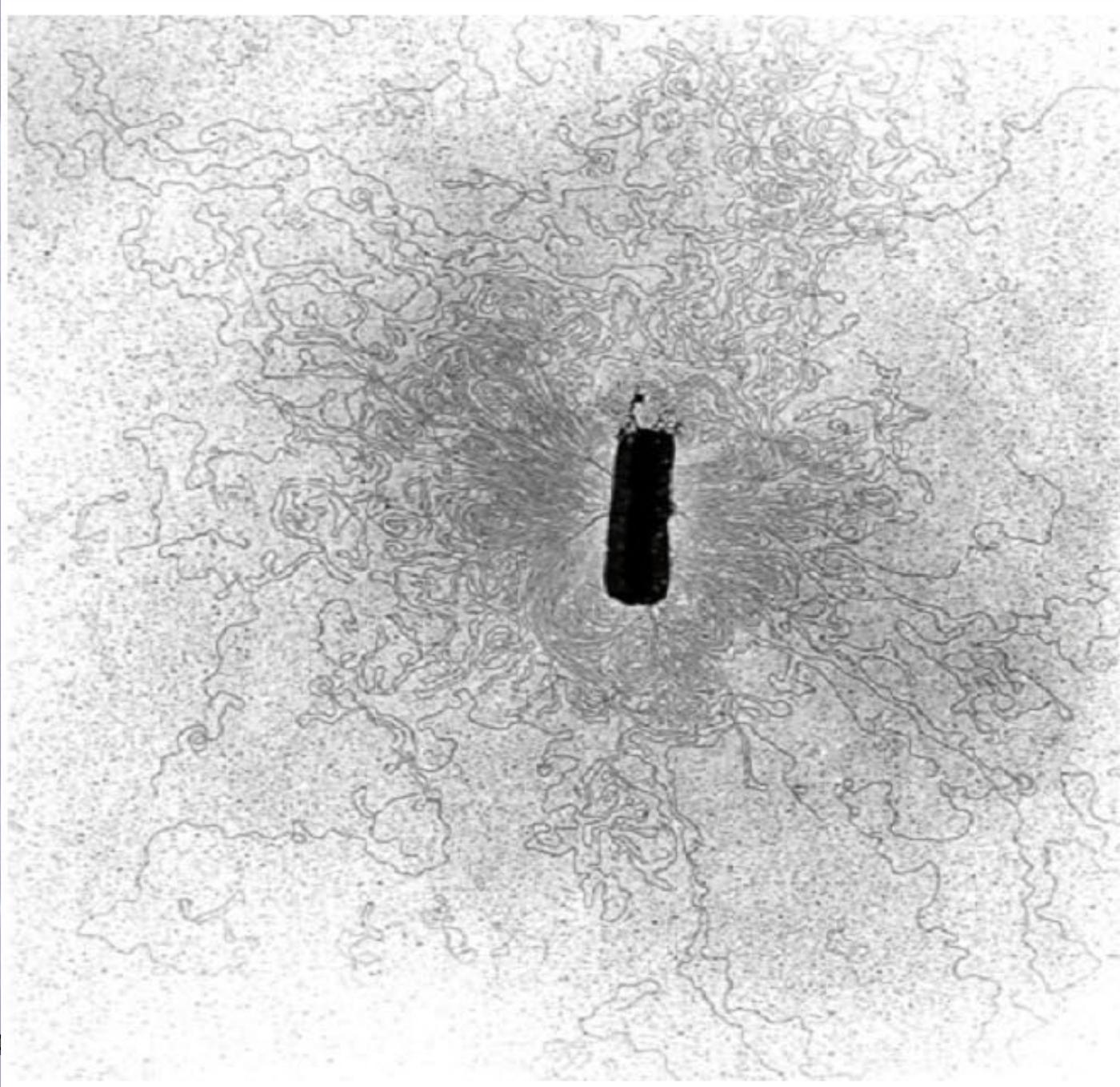
Cromosoma o Plasmide

- Patogenicità
- Resistenza ad antibiotici
- Secrezione
- Simbiosi
- Degradazione
- Metabolismo secondario
- Trasposasi/integrasi
- Restrizione-modificazione
- Altre funzioni

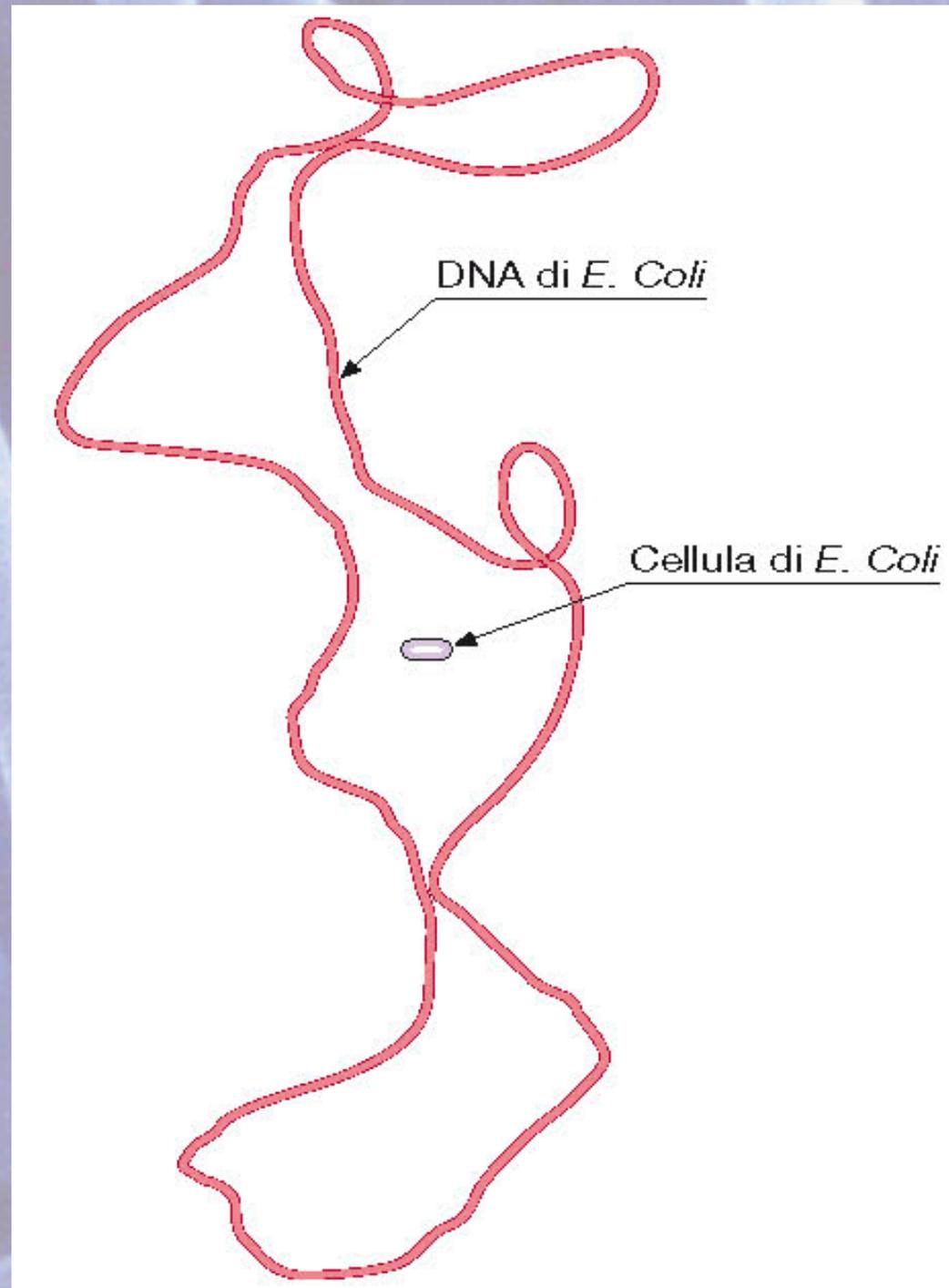
Cromosomi in batteri, archea e eucarioti

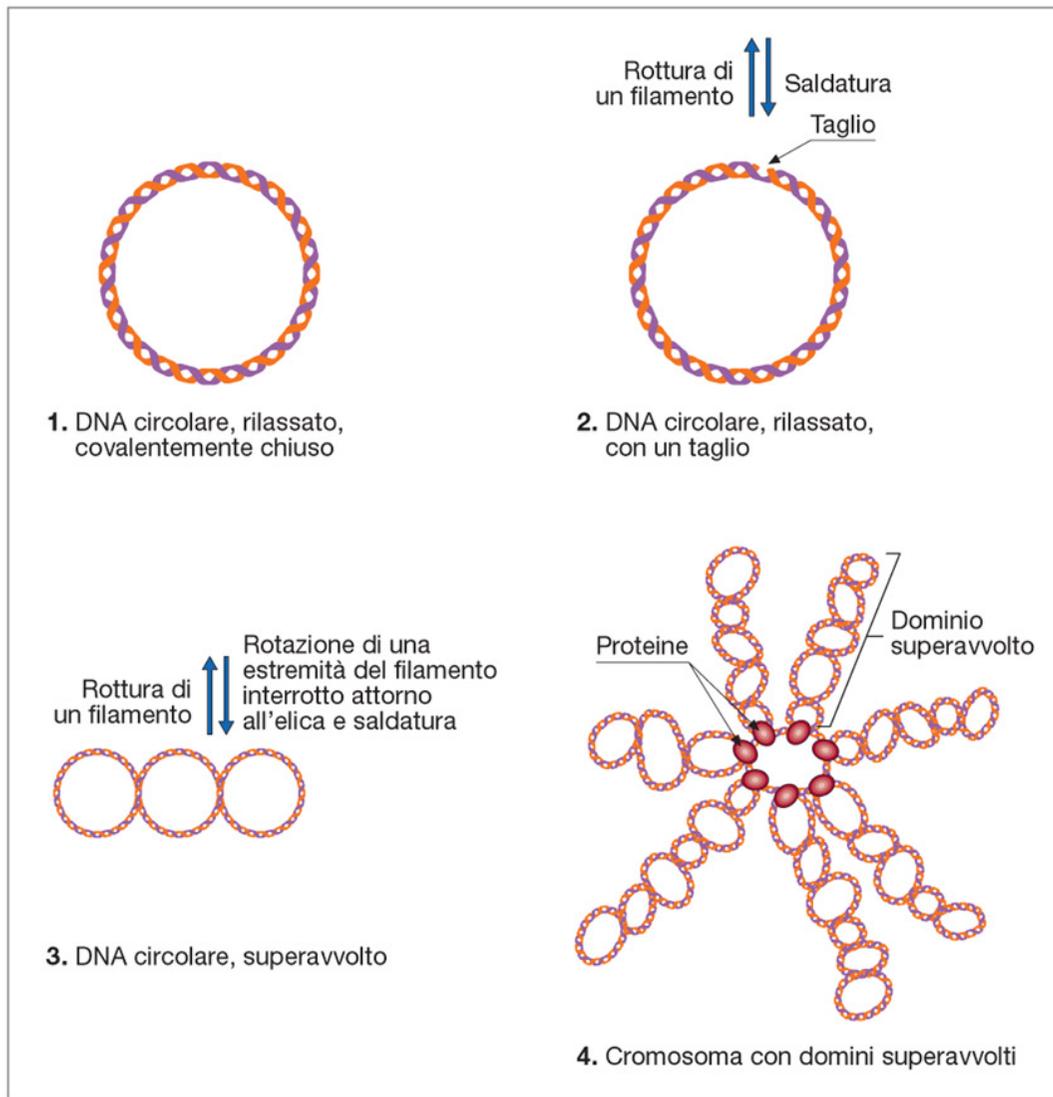
- **Eubatteri:** 0,5-10 Mbp, in genere un cromosoma circolare e covalentemente chiuso (CCC). Esempi: ***Escherichia coli***: 4,6 Mbp, 1 CCC; ***Mycoplasma genitalium***, 0,58 Mbp, 1 CCC; ***Rhodobacter sphaeroides*** 2 CCC 3,0 e 0,9 Mbp; ***Streptomyces coelicolor***, 8,7 Mbp, 1CL.
- **Archea:** *Halobacterium* NRC1, 3 CCC, 2,0, 0,19, 0,36 Mbp
- **Eucarioti:** diversi cromosomi lineari (8-130)





Una cell di *E. coli*
è lunga circa 2
micron e contiene
una molecola di
DNA di circa 4,5
milioni di coppie di
base lunga circa
1.5 mm.
Di qui la necessità
di compattamento





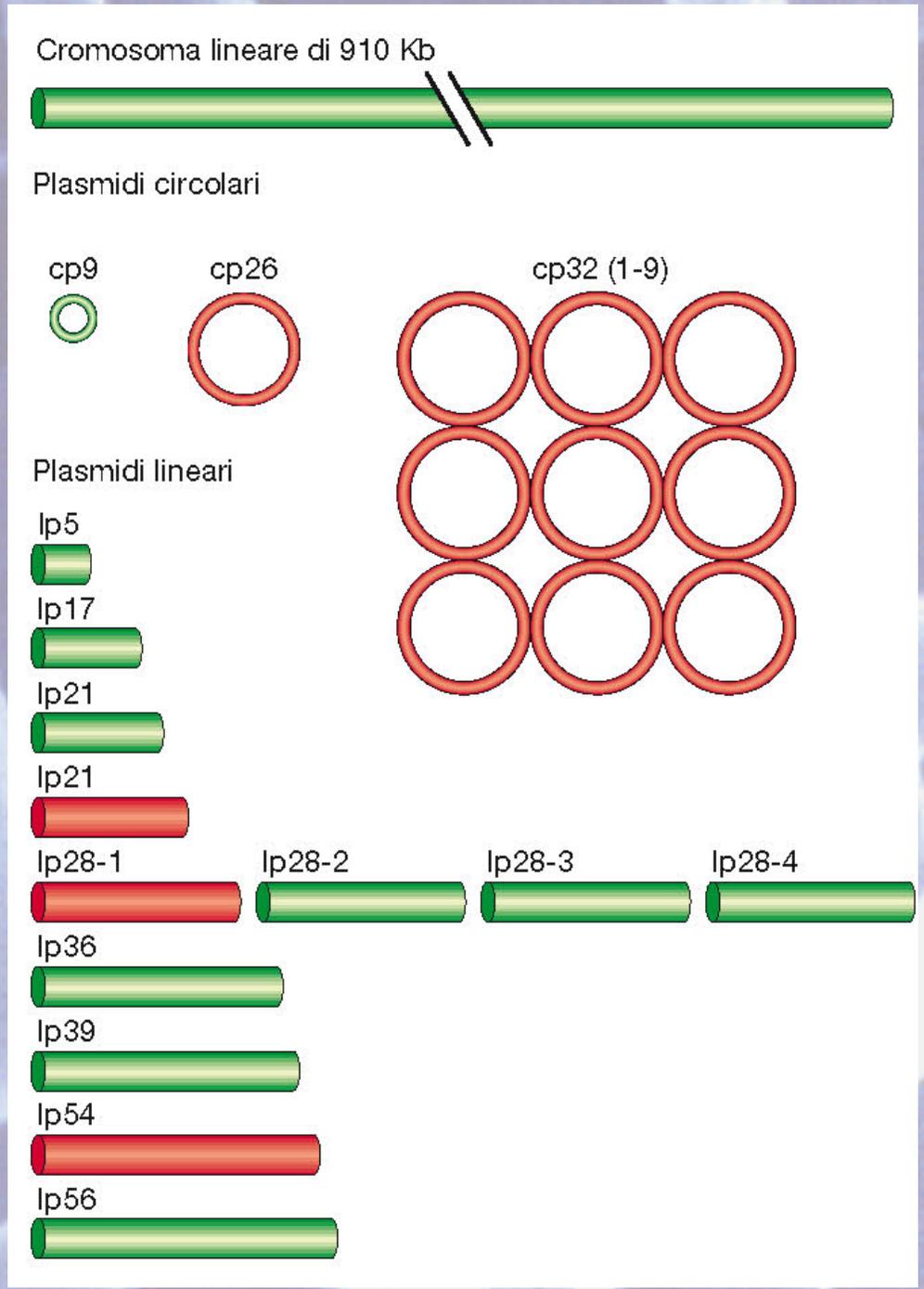
Il genoma in *E. coli* e *Borriella burgdorferi*

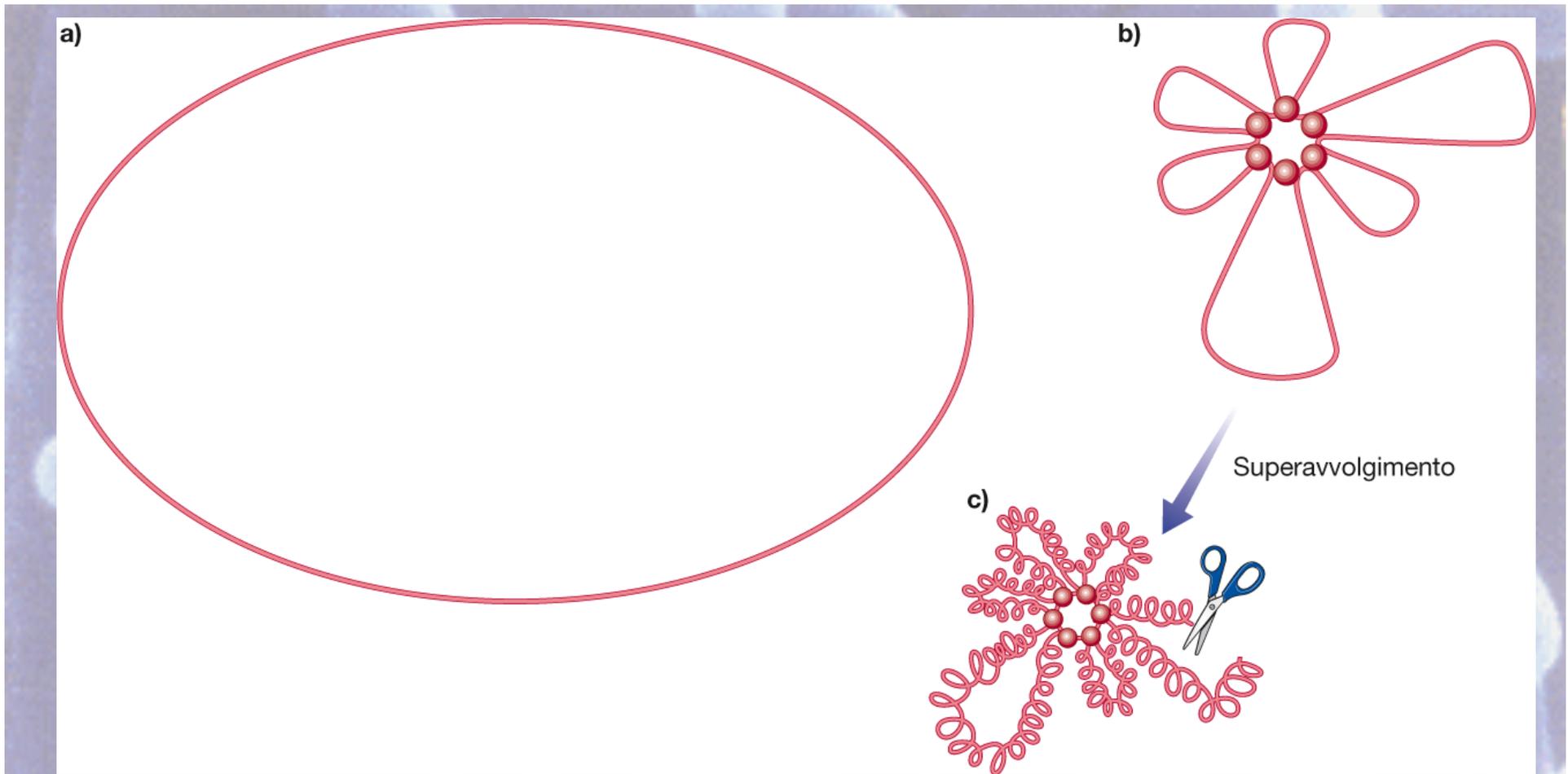
E. coli

- cromosoma circolare
- Plasmidi circolar

- *B. burgdorferi*
- Cromosoma lineare
- Plamidi cirolari e lineari

Genoma di *Borriella burgdorferi*



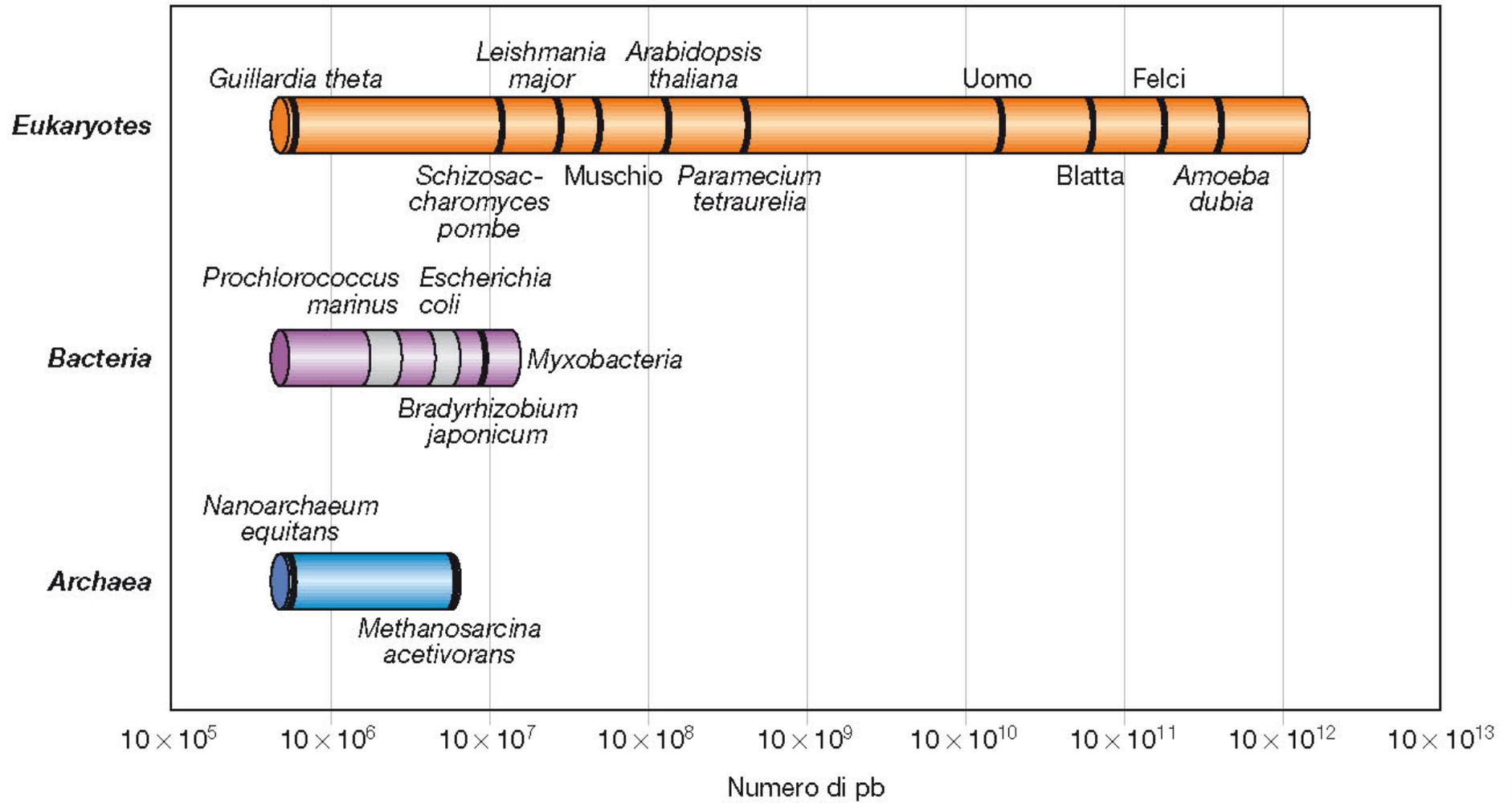


Eucarioti: il DNA è avvolto agli **istoni**, proteine con carica positiva che formano strutture dette **nucleosomi**. Inoltre **proteine SMC** (Structural Maintenance of chromosome) sono responsabili del mantenimento della struttura e della formazione di domini del DNA topologicamente separati.

Procarioti: presenti **polipeptidi** a basso peso molecolare, le **NAP** (Nucleoid associated proteins) che svolgono una funzione simile agli istoni. Sono presenti nei pro anche proteine SMC.

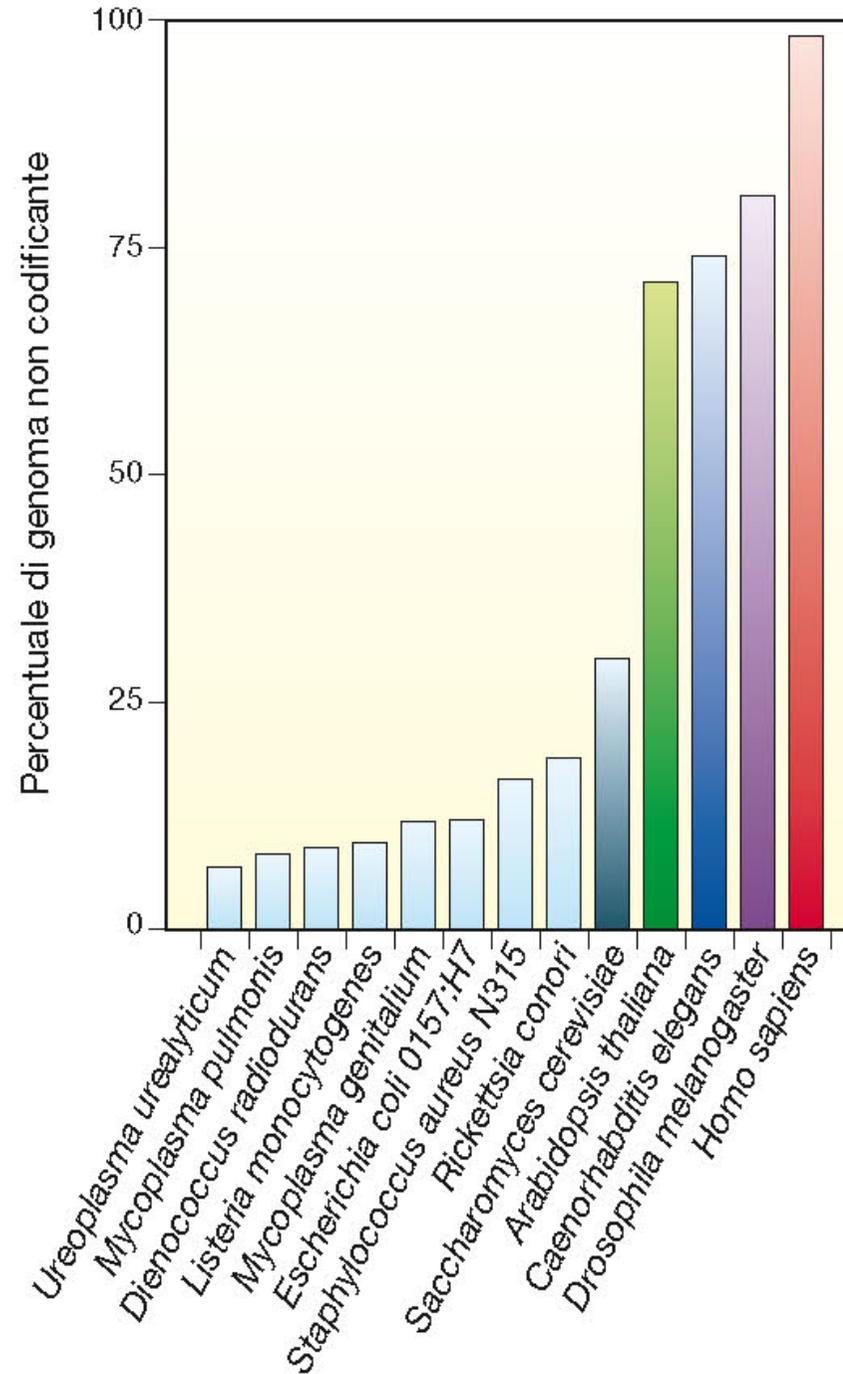
Tabella 8.2 Dimensioni, numero e struttura dei cromosomi e dei plasmidi di alcune specie microbiche.

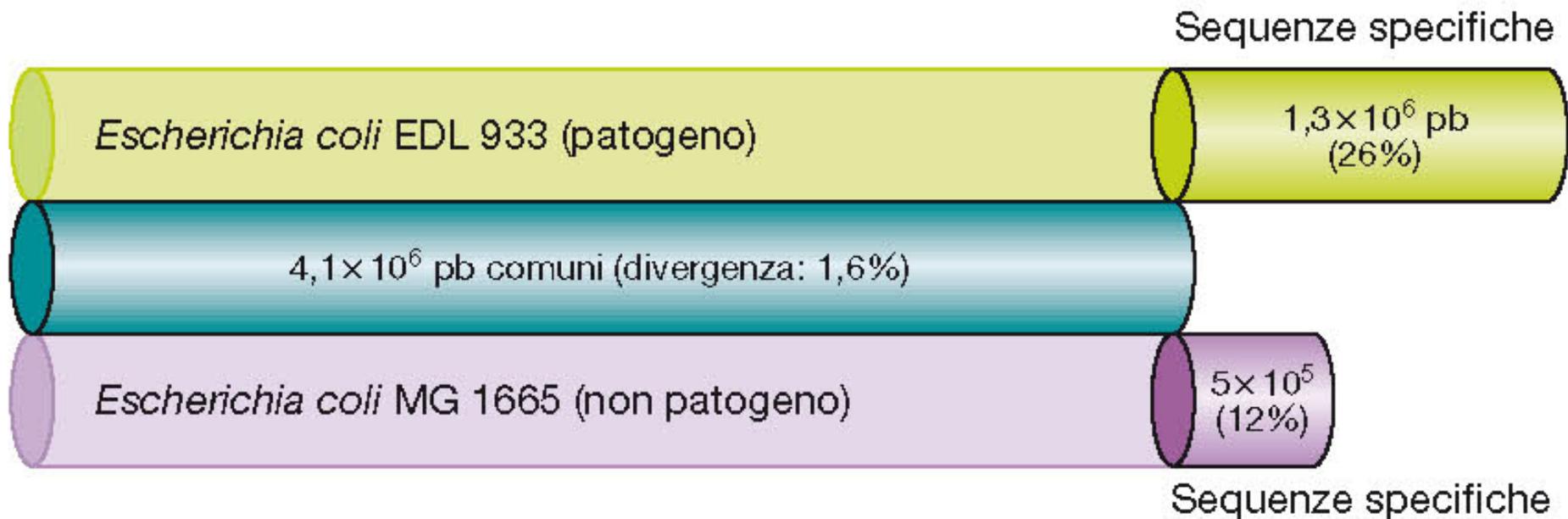
ORGANISMO	CROMOSOMI			PLASMIDI	
	DIMENSIONE (Mpb)	NUMERO	STRUTTURA	DIMENSIONE (kpb)	NUMERO
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2,1 + 3,0	2	Lineare + circolare	450 + 200	2
<i>Bacillus subtilis</i>	4,2	1	Circolare		
<i>Bacillus thuringiensis</i>	5,7	1	Circolare	> 50 ognuno	6
<i>Borrellia</i>	0,91	1	Lineare	5-200	Molteplici
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	8,7	1	Circolare		
<i>Brucella melitensis</i>	2,1 + 1,2	2	Circolare		
<i>Brucella suis</i> biovars 1, 2, 4	1,0 + 2,0	2	Circolare		
<i>Brucella suis</i> biovar 3	3,1	1	Circolare		
<i>Buchnera</i> sp. ceppo APS	0,640	1	Circolare	< 7,8 ognuno	2
<i>Deinococcus radiodurans</i>	2,6 + 0,4	2	Circolare	177 + 45	2
<i>Escherichia coli</i> K-12	4,6	1	Circolare		
<i>Leptospira interrogans</i>	4,7 + 0,35	2	Circolare		
<i>Paracoccus denitrificans</i>	2,0 + 1,1 + 0,64	3	Circolare		
<i>Rhizobacterium meliloti</i>	3,4 + 1,7	2	Circolare	1400	1
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	3,0 + 0,3	2	Circolare		
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1,75	1	Circolare		
<i>Vibrio cholerae</i>	2,9 + 1,1	2	Circolare		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3,2 + 1,9	2	Circolare		
<i>Xylella fastidiosa</i>	2,7	1	Circolare	5,1 + 1,3	2



Al contrario degli eucarioti, nei procarioti la percentuale di DNA non codificante per proteine è molto basso.

In *E. coli* circa lo 0,5% contro il 98% nel caso del genoma umano.





Ceppi di una stessa specie possono mostrare un elevato polimorfismo .

Ad es. il 26% del genoma di *E. coli* EDL933 (patogeno) contiene geni e sequenze non presenti nel ceppo non patogeno

Plasmidi

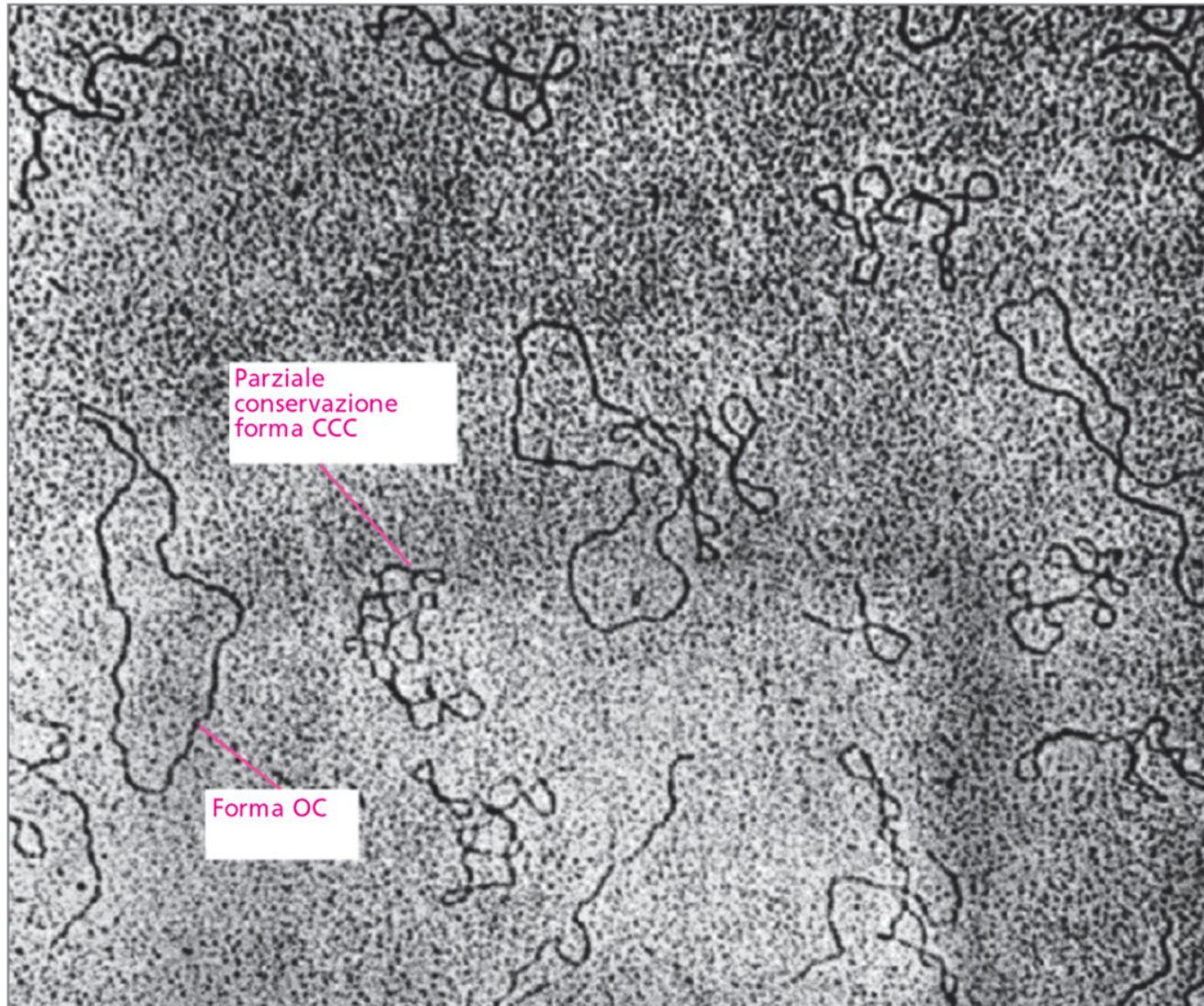
- molecole di DNA circolari a doppia elica, che codificano per la capacità di autoreplicarsi e per numerose altre proprietà
- Generalmente il DNA circolare è superavvolto nella conformazione CCC (circular covalently closed); in seguito a tagli singoli o doppi si possono formare forme circolari aperte (OC) o lineari (L)
- A differenza del cromosoma non sono ancorati alla membrana e non vengono segregati con precisione durante la divisione cellulare; possono essere perduti con elevata frequenza (curing)



Plasmidi

	Min	Max
Dimensioni	0,5 kbp	200-300 kbp
N. Copie per plasmide	1	Alcune decine
N. plasmidi diversi per cellula	0	> 10
% DNA plasmidico sul totale DNA per cellula	0	10





Funzioni dei plasmidi

- **Plasmidi R:** contengono geni che codificano per la resistenza ad antibiotici o a metalli pesanti
- **Plasmidi di virulenza:** rendono il batterio che li ospita più virulento perché diventa capace di produrre tossine
- **Plasmidi metabolici:** contengono geni che codificano per enzimi che degradano sostanze (composti aromatici, pesticidi, zuccheri)
- **Altri caratteri:** resistenza a batteriofagi, produzione di esopolisaccaridi, produzione di batteriocine
- **Plasmidi criptici:** non hanno funzioni note



Tabella 8.6 Caratteristiche di plasmidi che portano geni di resistenza o per la degradazione di composti organici inquinanti.

CEPPO BATTERICO	PLASMIDE	MARCATORI	KB
PROPRIETÀ DI PLASMIDI CHE CONFERISCONO RESISTENZA A METALLI PESANTI			
<i>Staphylococcus aureus</i>	pII147	Cd, As, Hg, Bi, Pb	30
<i>Klebsiella aerogenes</i>	pHH1508a	Sm, Tm, TeO ₃ ²⁻	208
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	pQM1	Hg, UV	254
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pUM505	CrO ₄ ²⁻	100
<i>Rhodococcus fascians</i>	pD188	Cd	138
PROPRIETÀ DI PLASMIDI CHE PORTANO GENI PER LA DEGRADAZIONE DI COMPOSTI ORGANICI NATURALI			
<i>Pseudomonas putida</i>	CAM	canfora	500
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	OCT	ottano, decano	500
<i>Pseudomonas putida</i>	TOL	xilene, toluene	115
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	pWW174	benzene	200
<i>Pseudomonas convexa</i>	NIC	nicotina, acido nicotinico	--
PROPRIETÀ DI PLASMIDI CHE PORTANO GENI PER LA DEGRADAZIONE DI COMPOSTI ORGANICI DI SINTESI			
<i>Acinetobacter sp.</i>	pSS50	PCB Policlorobifenili	53
<i>Arthrobacter sp.</i>	pKF1	PCB Policlorobifenili	80
<i>Pseudomonas putida</i>	pAC25	3CBA (acido 3-clorobenzoico)	117
<i>Pseudomonas putida</i>	pEG	stirene	37
<i>Pseudomonas putida</i>	pRE4	isopropilbenzene	105

Tabella 8.7 Il numero di copie di alcuni plasmidi.

PLASMIDE	NUMERO DI COPIE
F	1
P1 (profago)	1
RK2	4-7 (in <i>E. coli</i>)
pBR322	16
pUC18	30-50
pIJ101	40-300

Incompatibilità

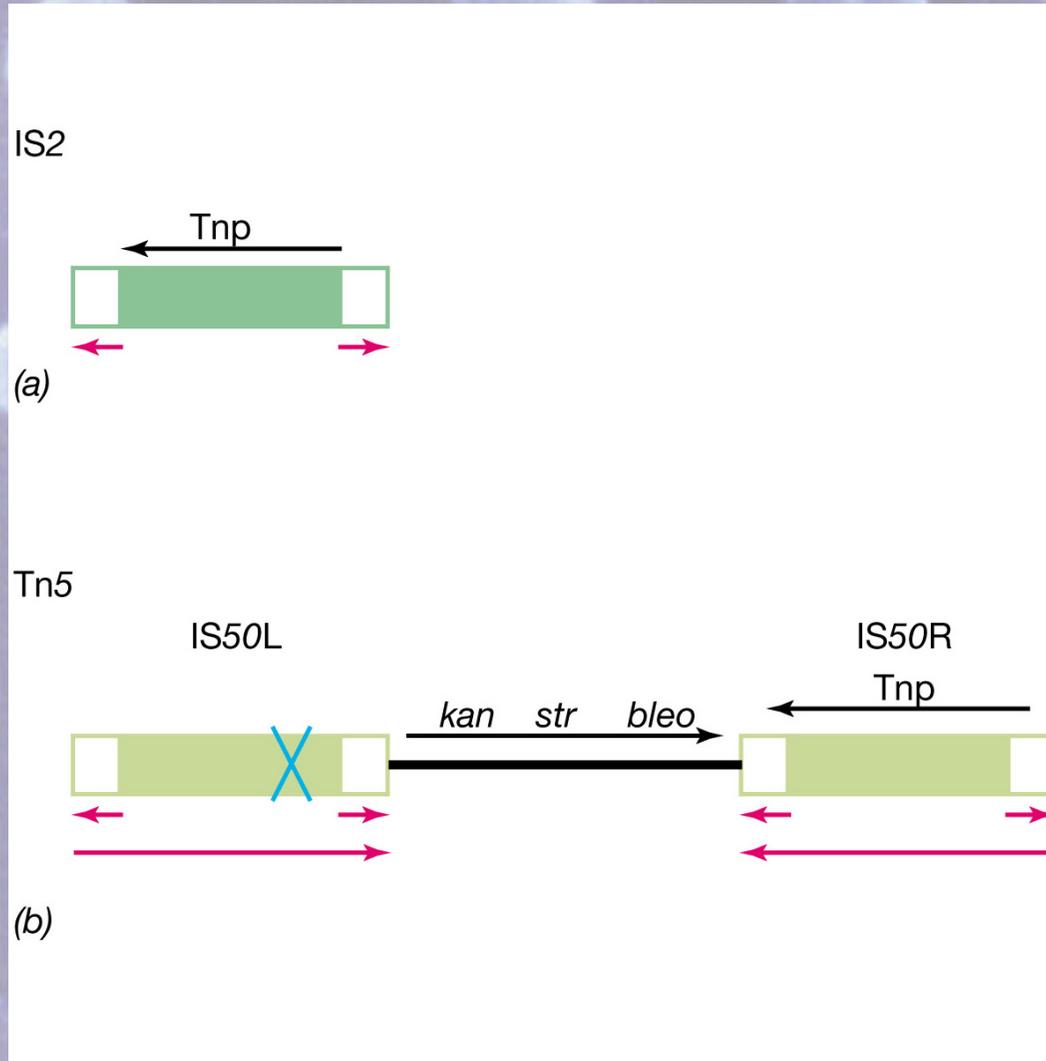
- due plasmidi appartengono allo stesso gruppo di incompatibilità quando la presenza di un plasmide inibisce l'introduzione di un altro plasmide dello stesso tipo: il secondo viene perso nel ciclo di replicazione.
- l'incompatibilità si verifica quando i due plasmidi hanno meccanismi e origini di replicazione simili



Elementi genetici trasponibili

- Entità genetiche capaci di cambiare localizzazione nel replicone in cui sono inseriti o di “saltare” su altri repliconi presenti nella cellula.
- Sono presenti in cromosomi, plasmidi e genomi virali
- Nei procarioti possono essere ricondotti a 3 classi:
 - Sequenze di inserzione
 - Trasposoni
 - Batteriofagi trasponibili

Sequenze di inserzione e trasposoni

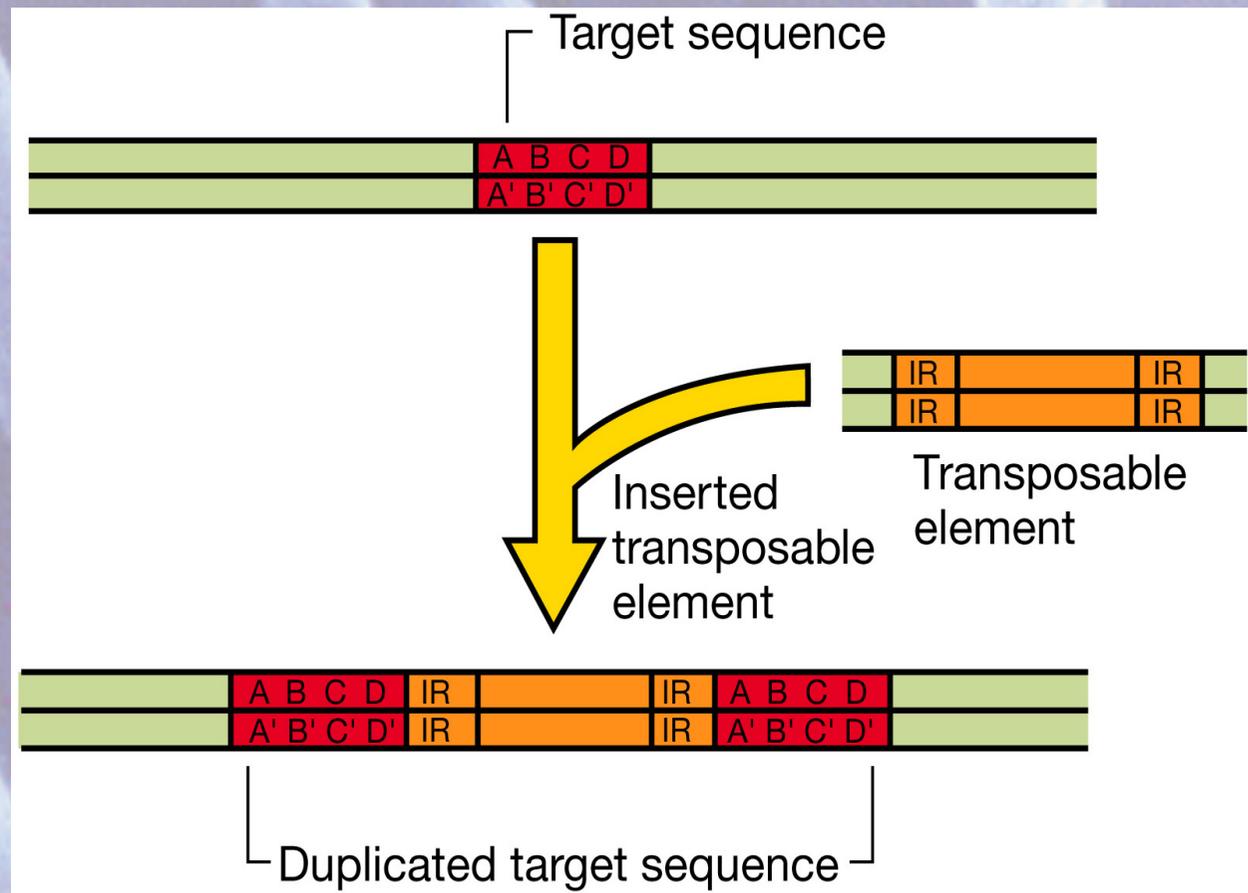


a) **Sequenza di inserzione** di 1327 pb con sequenze invertite di 41 pb alle 2 estremità

b) **Trasposone** che contiene 2 Is e geni per la resistenza agli antibiotici. Questo trasposone viene utilizzato per creare mutanti di e.coli resistenti agli antibiotici



Trasposizione



Quando un elemento trasponibile viene inserito in una sequenza di DNA (bersaglio) si verifica la **duplicazione della sequenza bersaglio**

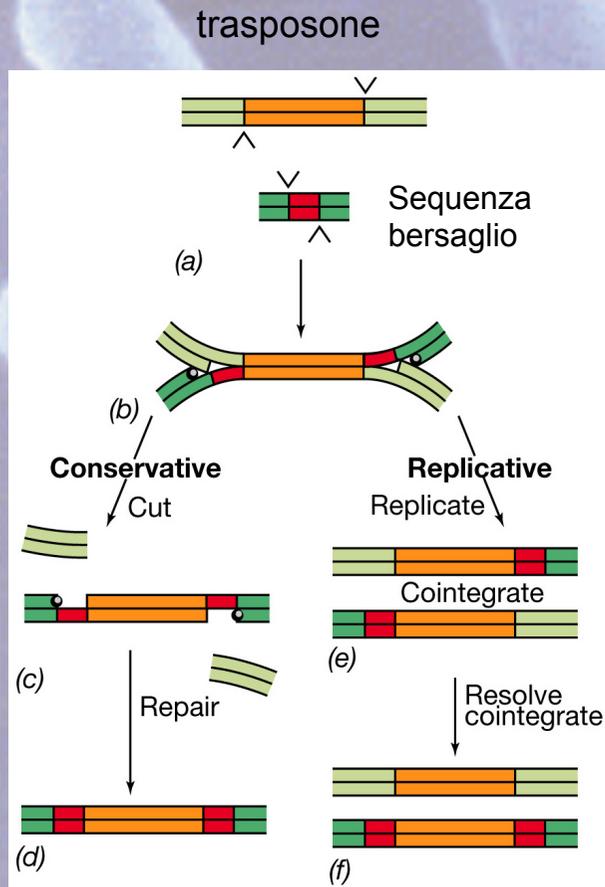


Trasposizione

- evento relativamente poco frequente (10^{-5} - 10^{-7})
- determina lo spostamento dell'IS o del Tn da una posizione all'altra (in corrispondenza di sequenze bersaglio) senza (trasposizione conservativa) o con (trasposizione replicativa) duplicazione dell'IS o del Tn
- è mediata da una trasposasi che determina ricombinazioni sito-specifiche
- causa mutazioni per inserzione, facilita eventi di ricombinazione omologa

Trasposizione

In entrambe le trasposizioni una trasposasi taglia le eliche di DNA alla fine di un elemento trasponibile e nel sito bersaglio.



Nella **conservativa** vengono eseguiti ulteriori tagli prima che avvenga la replicazione /riparo e l'elemento trasponibile viene perso dal DNA del donatore

Il riparo porta alla duplicazione del sito bersaglio e al completamento della trasposizione nel nuovo sito

Nella **replicativa**, la replicazione avviene senza il taglio dell'elemento trasponibile dal sito del donatore portando a 2 le copie dell'elemento trasponibile presenti nel cointegrato³⁸



Come può cambiare il genoma?

- **Mutazione**
- Riproduzione sessuale (negli eucarioti) o trasferimento di geni
- **Ricombinazione:** processo attraverso il quale porzioni o intere molecole di DNA di diversa origine effettuano degli scambi o si uniscono in una singola molecola di DNA



Ricombinazione

- Comporta lo scambio fisico di materiale genetico tra elementi genetici
- Nei batteri la ricombinazione è necessaria per l'integrazione nel genoma di frammenti di DNA privi di un'origine di replicazione durante la trasformazione o la trasduzione.
- 2 processi:
 - **ricombinazione omologa**: sono necessarie estese regioni di omologia, mediata da recA
 - **ricombinazione sito-specifica**: avviene in corrispondenza di brevi sequenze bersaglio (trasposoni, IS,...)



Mutazione

- cambiamento della sequenza di basi che avviene in conseguenza della normale replicazione del cromosoma o della esposizione ad agenti **mutageni**.
- (Frequenze di mutazione: in assenza di mutageni 1×10^{-8} - 1×10^{-10} ; in presenza di mutageni 1×10^{-3}).

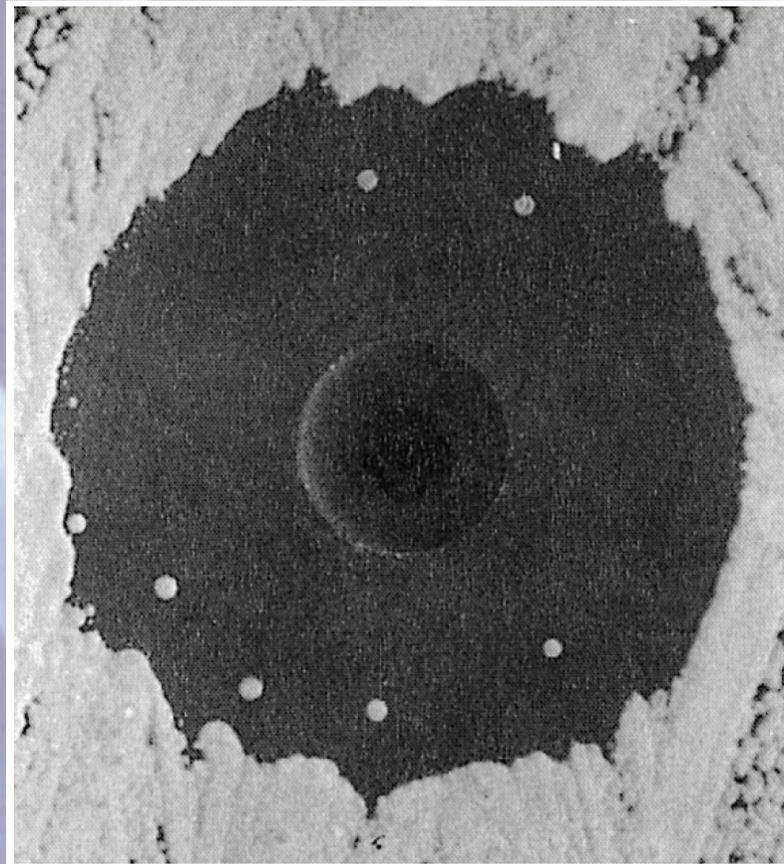


Mutageni

- Mutageni chimici:
 - es. **acido nitroso**: reagisce con tutti i gruppi amminici delle basi (A, C, G) convertendoli in gruppi ossidrilici: causa **transizioni**
- Mutageni fisici:
 - **raggi x e γ** : causano soprattutto delezioni in seguito a rotture del cromosoma.
 - **Raggi UV**: causano la formazione di dimeri di timina, che distorcono la doppia elica; la loro asportazione per excisione causa, in seguito al processo di riparazione delle regioni a singola elica formate, una replicazione soggetta ad errori.



Mutazioni spontanee



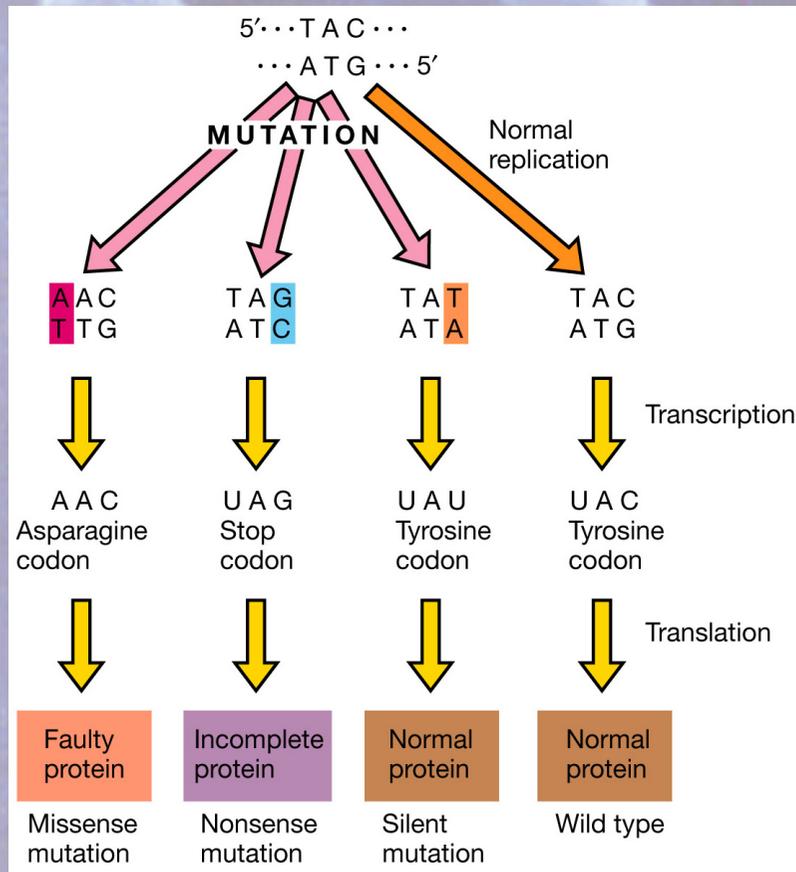
Microlesioni

Interessano una o due coppie di basi.

Sono generalmente reversibili.

- **Sostituzioni di una coppia di basi:** se una purina è sostituita da una pirimidina e viceversa: **trasversioni**; se una purina è sostituita da un'altra purina: **transizioni**. Hanno conseguenze fenotipiche variabili.
- **Inserzioni e delezioni di basi:** causano una variazione della fase di lettura (**frameshift**) del gene: questo in genere causa la comparsa di codoni nonsense; le proteine mutate sono comunque spesso inattive

Mutazioni spontanee



Effetto di mutazioni per sostituzione di singole paia di basi:

✓ possibili effetti della sostituzione di una base in un gene che codifica una proteina : **dal cambiamento di un singolo codone di DNA possono derivare 3 diversi prodotto genici**

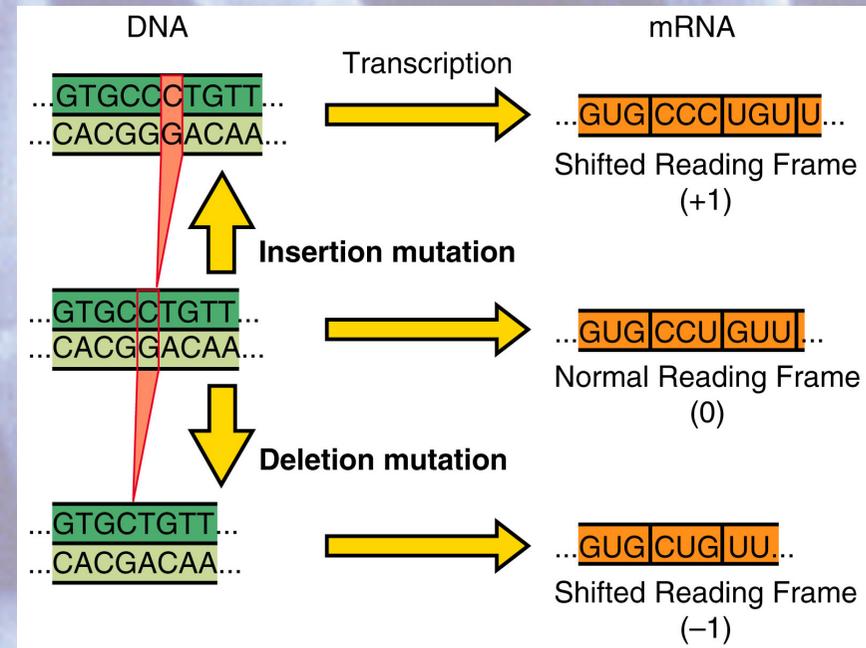
Microlesioni: 1-2 coppie di basi. Macrolesioni: anche migliaia di basi



Mutazioni spontanee

- **Effetto di mutazioni per inserzione e per delezione:**

- cambiamento sostanziale della sequenza aminoacidica del peptide



Microlesioni: 1-2 coppie di basi. Macrolesioni: anche migliaia di basi



Il codice genetico: correlazione tra le triplette di basi dell'mRNA e gli aa

		Seconda posizione								
		U		C		A		G		
Prima posizione (estremità 5')	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U C A G
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U C A G
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U C A G
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	
		AUG	Met/Start	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U C A G	
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly		
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly		
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly		

Effetti di alcuni mutageni fisici e chimici

Agente	Azione	Risultato
5-bromouracile (AB)	Incorporato come T, appaiato per errore con G	Transizioni AT->GC
Acido nitroso (AC)	Deaminazione A e C	Transizioni AT->GC e GC->AT
Etilmetano sulfonato (AA)	Metila G che si appaia con T	Transizioni GC->AT
Nitrosoguanidina (AA)	Legami crociati fra eliche, escissione delle regioni difettose	Mutazioni puntiformi e delezioni
Acridina, bromuro di etidio (AI)	Inserimento fa due paia di basi	Microinserzioni e microdelezioni
Raggi UV	Formazione di dimeri di timina	La riparazione porta a errore o delezione
Raggi gamma	Rotture a singola o doppia catena	La riparazione porta a errore o delezione



Macrolesioni

- Interessano frammenti più lunghi di DNA. Causano tutte la formazione di una o due **giunzioni improprie**, giunzioni che non si verificano normalmente.
- Se avvengono all'interno di un solo gene, influenzano soltanto il prodotto di quel gene. In genere interessano più geni.



Macrolesioni

- **Delezioni:** il 12% delle mutazioni casuali. Non sono reversibili, perchè il frammento di DNA deletato è invariabilmente perduto.
- **Duplicazioni:** abbastanza frequenti: circa 1×10^{-4} per generazione
- **Inversioni:** un segmento di DNA viene ruotato di 180° .
- **Traslocazioni:** un segmento di DNA viene rimosso dalla sua posizione originale ed inserito in un'altra.



Le conseguenze fenotipiche delle mutazioni

- mutazioni neutre
- morte
- perdita di
 - capacità di sintetizzare fattori di crescita (auxotrofia)
 - capacità di utilizzare fonti di C o N
 - perdita di mobilità, virulenza, etc.
- resistenza a fagi o ad antibiotici
- riduzione del range di condizioni per la crescita
 - mutanti sensibili al caldo, al freddo

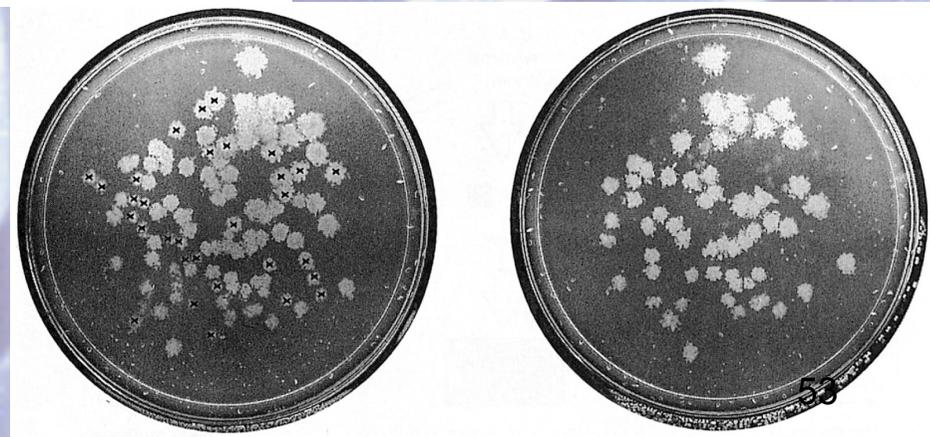
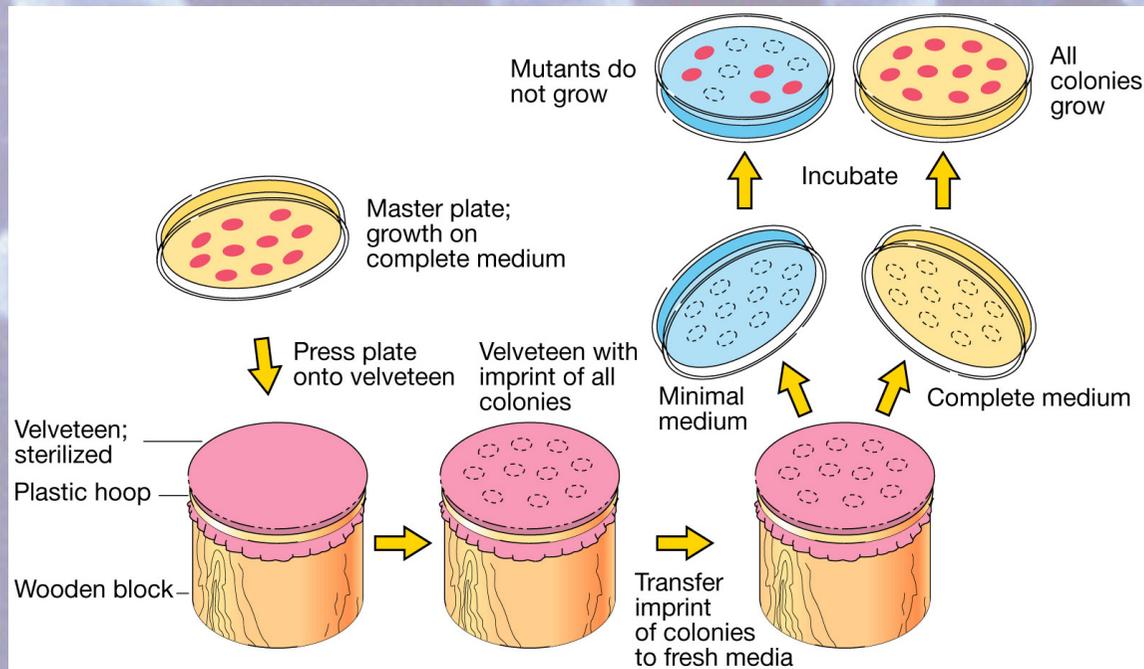


Perché i mutanti sono importanti?

- Lo studio dei mutanti ha consentito enormi progressi della conoscenza della genetica, biochimica e fisiologia dei microrganismi
- I mutanti con regolazione del metabolismo alterata possono essere sfruttati per sovrapprodurre metaboliti importanti come aminoacidi, vitamine, etc.



Replica-plating e selezione di auxotrofi



Meccanismi naturali di scambio genetico

- **trasformazione:** le cellule donatrici rilasciano nell'ambiente DNA che viene assorbito e integrato dalle cellule riceventi;
- **trasduzione:** occasionalmente, i fagi possono incorporare nei capsidi parte del genoma dell'ospite e trasferirlo ad un nuovo ospite in seguito all'infezione;
- **coniugazione:** il materiale genetico viene trasferito fra due cellule in stretto contatto fra loro in un processo che è mediato da plasmidi (molto raramente da particolari trasposoni).



Virus

- Virus: elementi genetici che contengono DNA e RNA, che alternano uno stato extracellulare (in cui non hanno alcuna funzione metabolica) a uno stato intracellulare (durante la quale si replicano all'interno dell'ospite)
- Virioni: particella virale costituita dall'acido nucleico circondato da strato proteico

Diversità delle forme e dimensioni dei virus animali

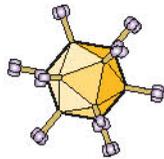
a) Virus a DNA



Poliovirus



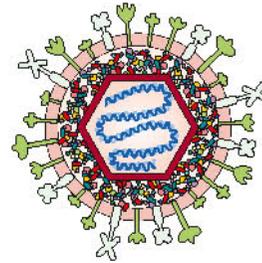
Papillomavirus



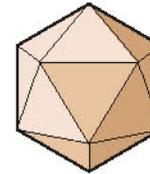
Adenovirus



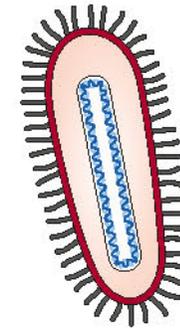
Virus dell'epatite B



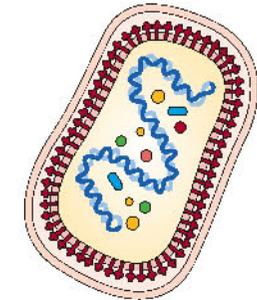
Herpesvirus



Iridovirus
(insetti, vertebrati)



Baculovirus
(insetti)



Poxvirus

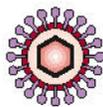
b) Virus a RNA



Picornavirus



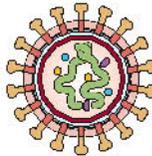
Reovirus



Flavivirus



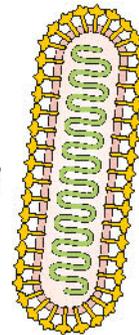
Togavirus



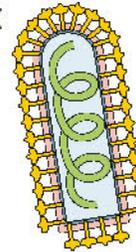
Retrovirus



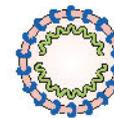
Coronavirus



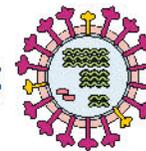
Filovirus



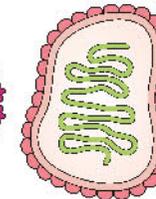
Rhabdovirus



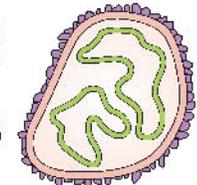
Bunyavirus



Orthomyxovirus

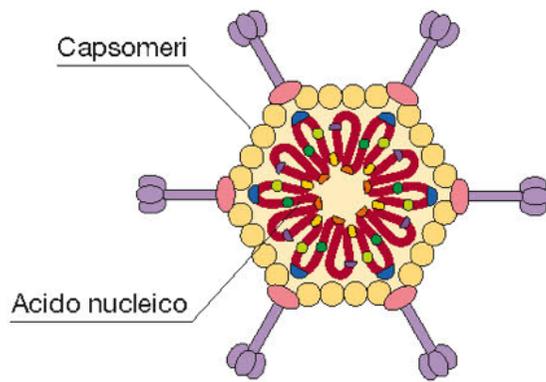


Paramyxovirus

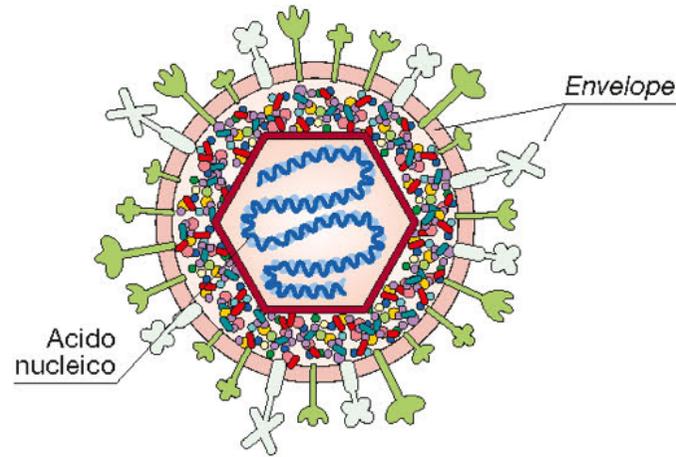


Arenavirus

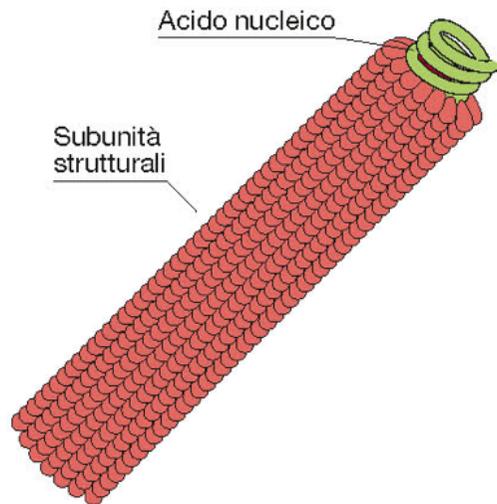
Struttura di virioni nudi e rivestiti



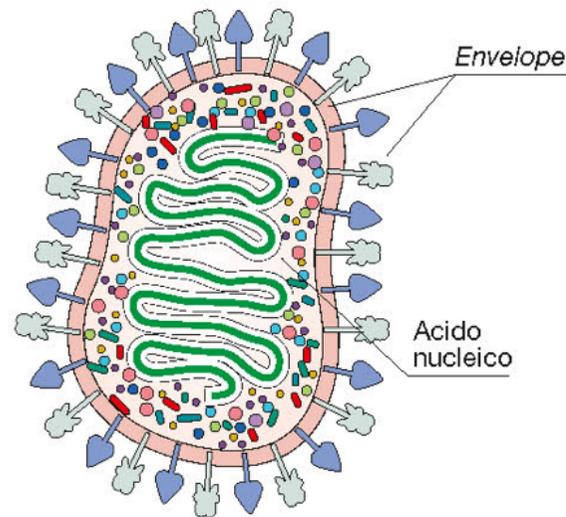
Virione nudo con capside icosaedrico (es. Adenovirus)



Virione rivestito con capside icosaedrico (es. Herpesvirus)



Virione nudo con capside elicoidale (es. TMV)



Virione rivestito con capside elicoidale (es. Paramyxovirus)

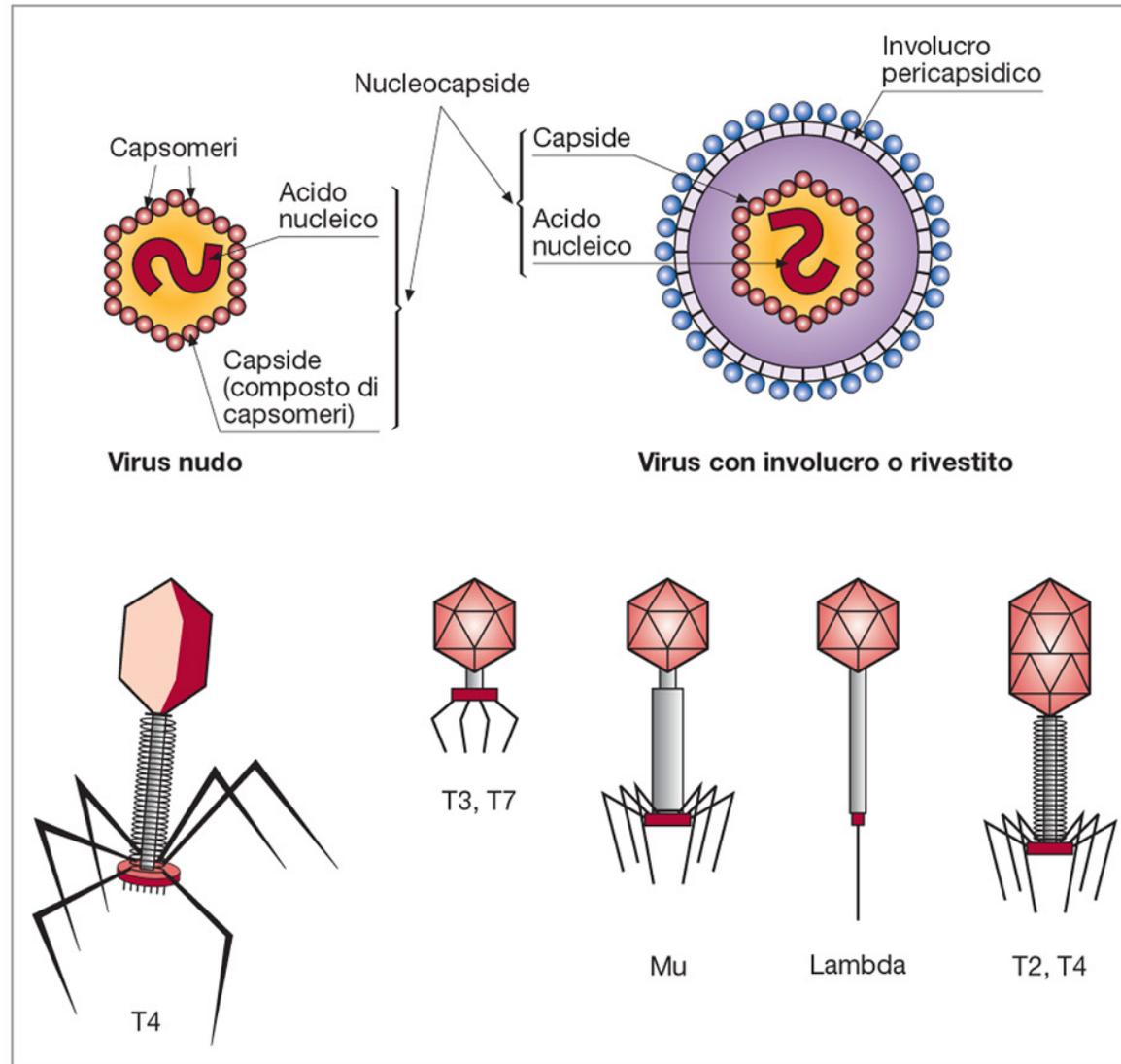
Classificazione virus

- Sulla base del tipo di acido nucleico
- In base all'ospite che infettano:
 - Virus animali
 - Virus vegetali
 - Virus batterici (batteriofagi)

I batteriofagi (virus batterici)

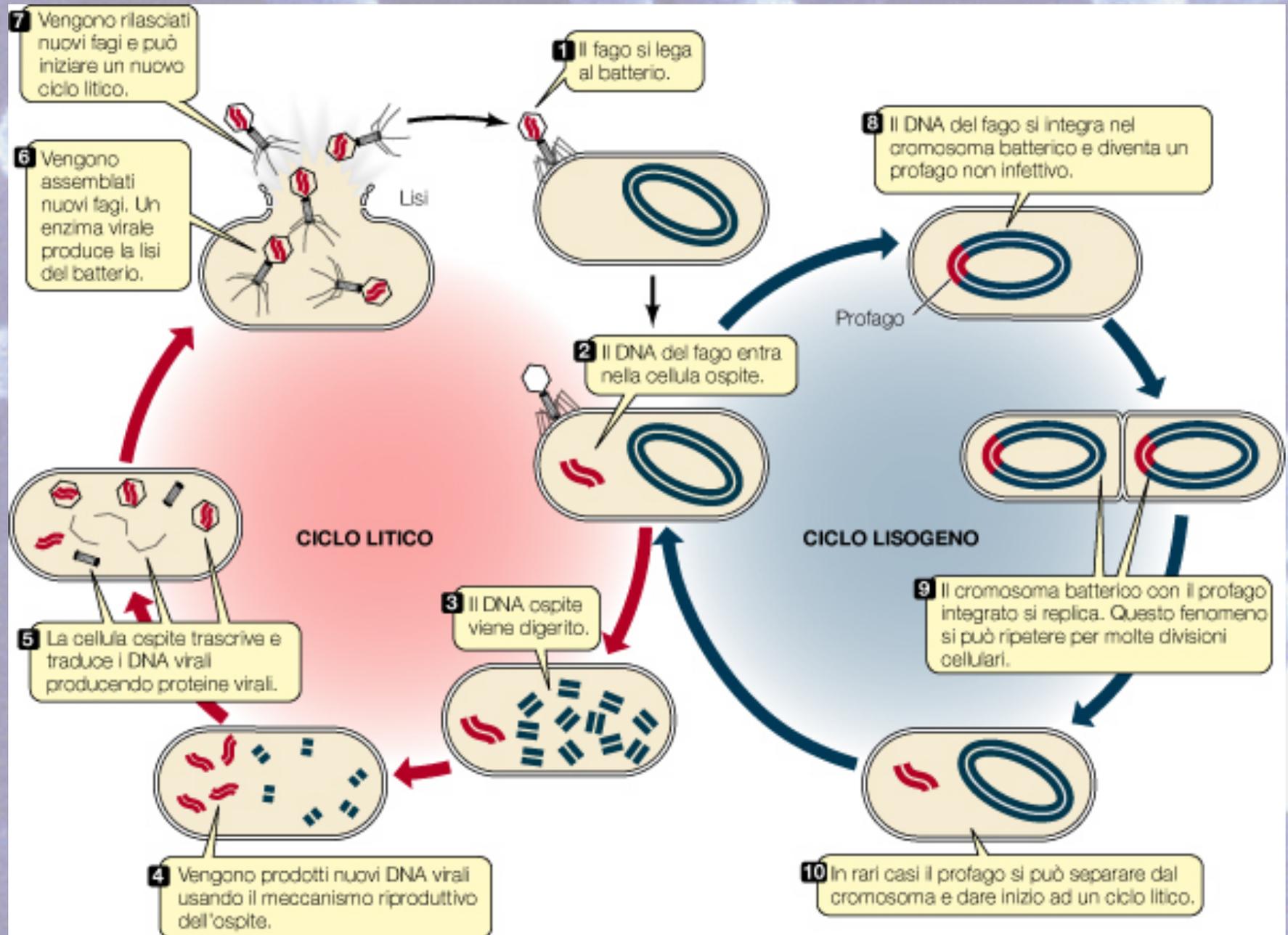
- Infettano batteri enterici (*E. coli*, *S. typhimurium*) ma anche batteri ubiquitari
- Hanno genomi a DNA (a singolo o doppio filamento) e a RNA (a singolo o doppio filamento)
- Dimensioni: da 5000 basi a 670 paia di kb (batteriofago che infetta *B. megaterium*)

Morfologia dei virus



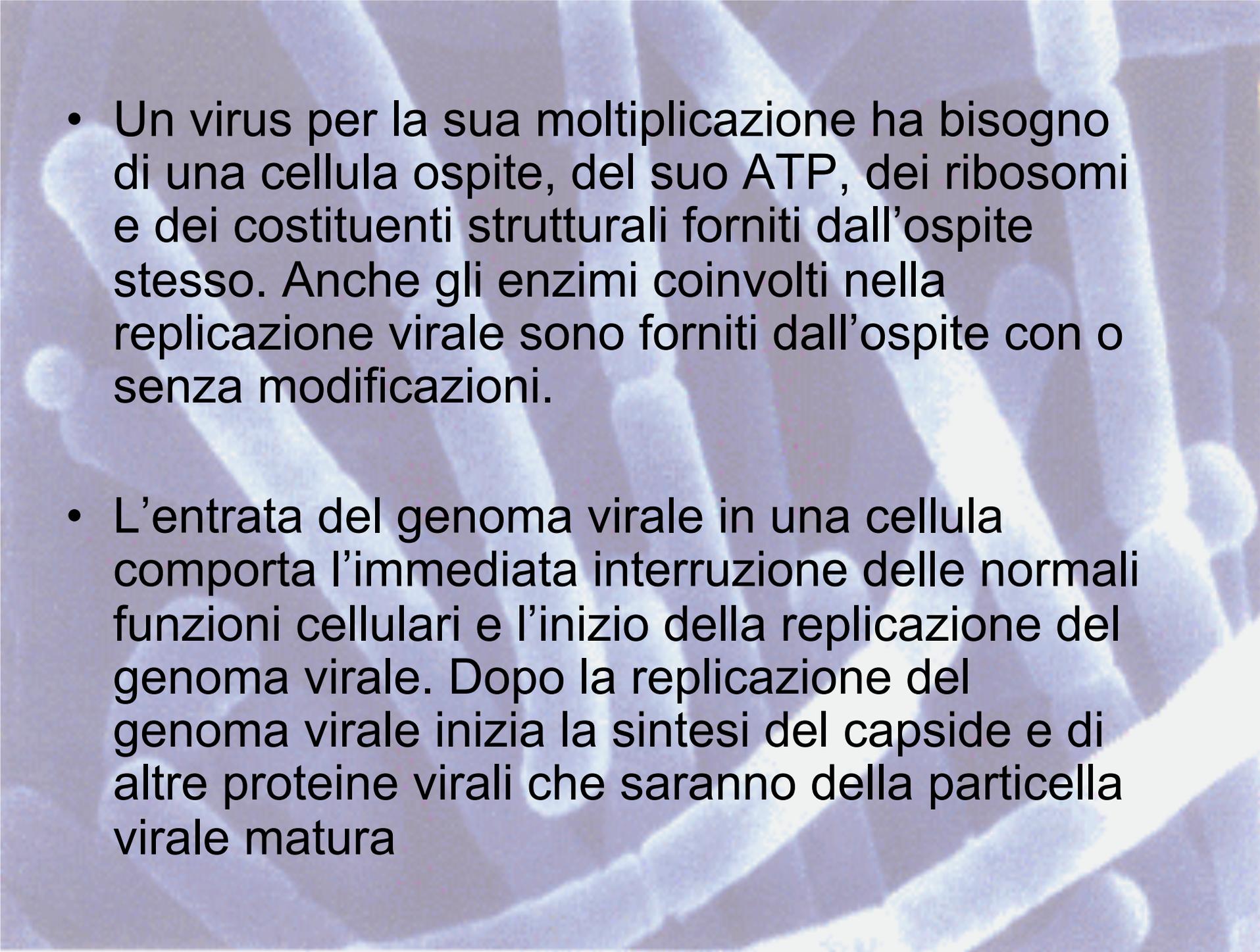
Batteriofagi

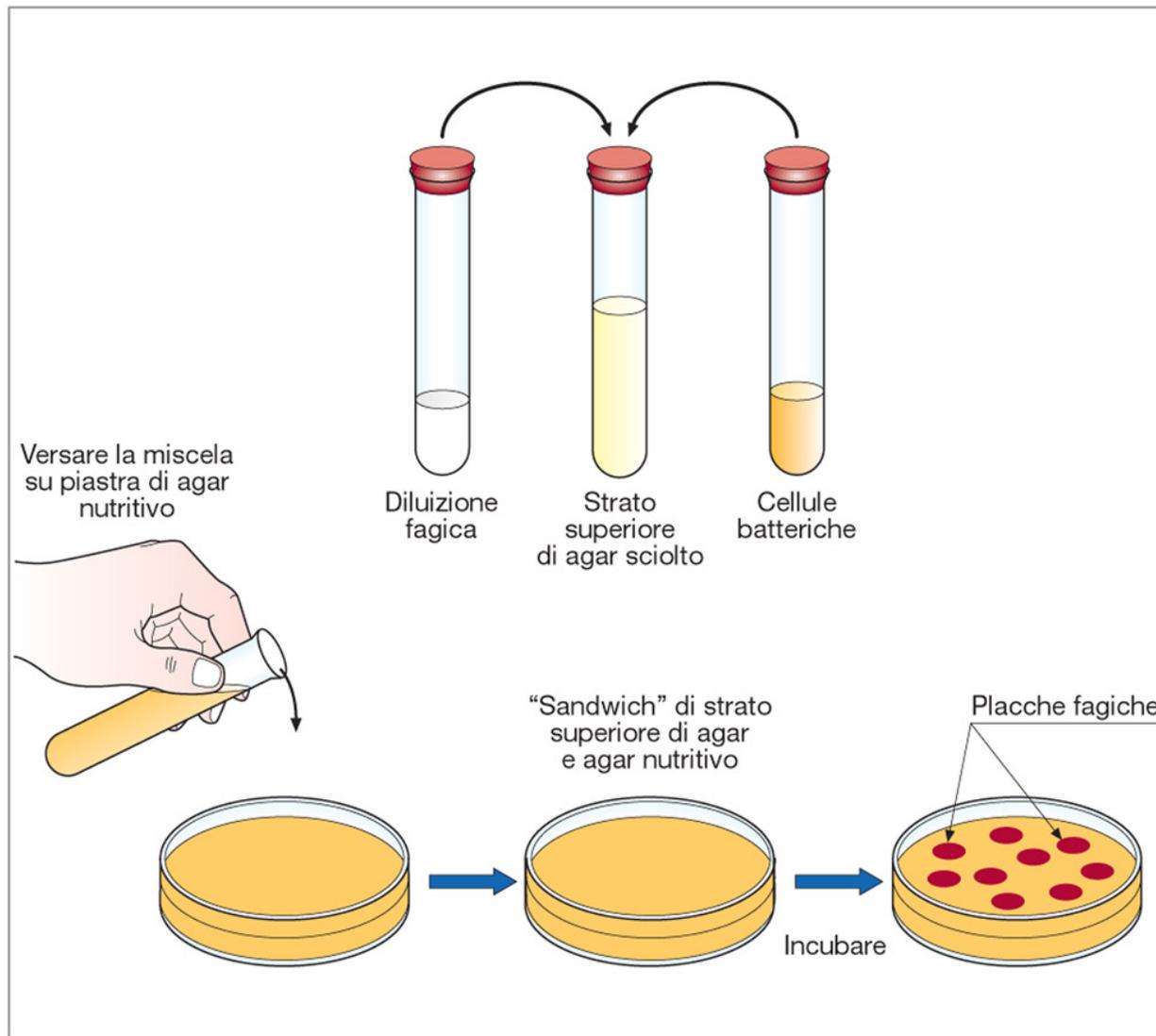
- **Virulenti:** determinano il ciclo litico:
 - lisano la cellula batterica dopo l'infezione
- **Temperati:** determinano la lisogenia:
 - il loro genoma si replica nella cellula ospite senza ucciderla



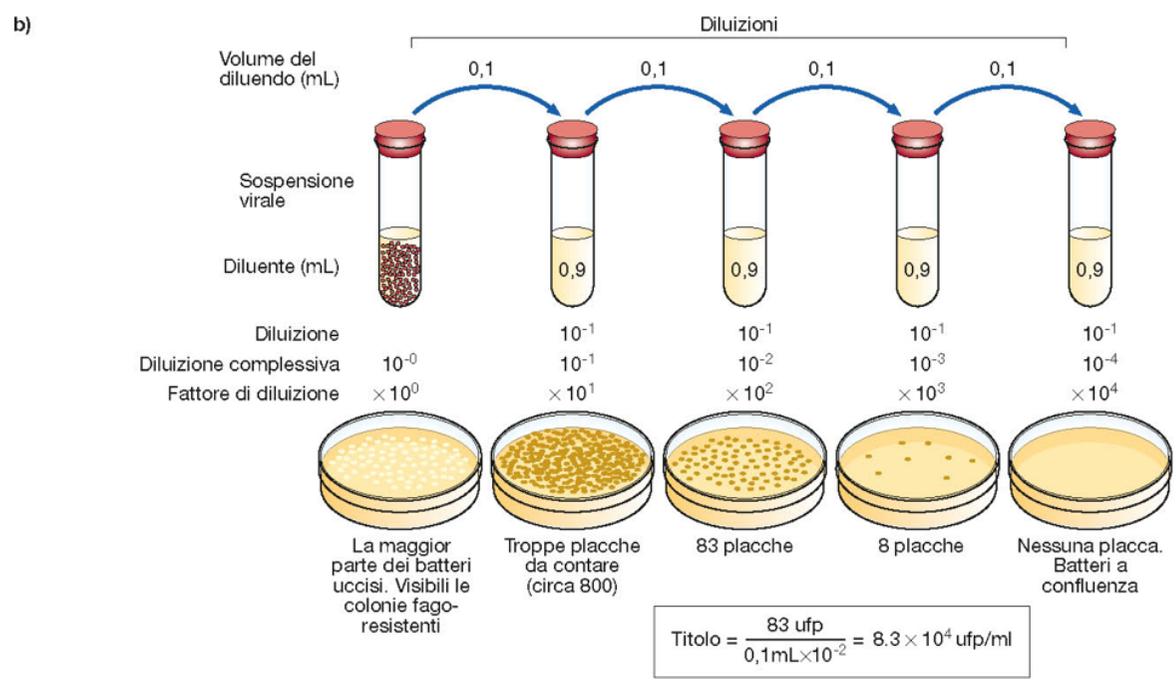
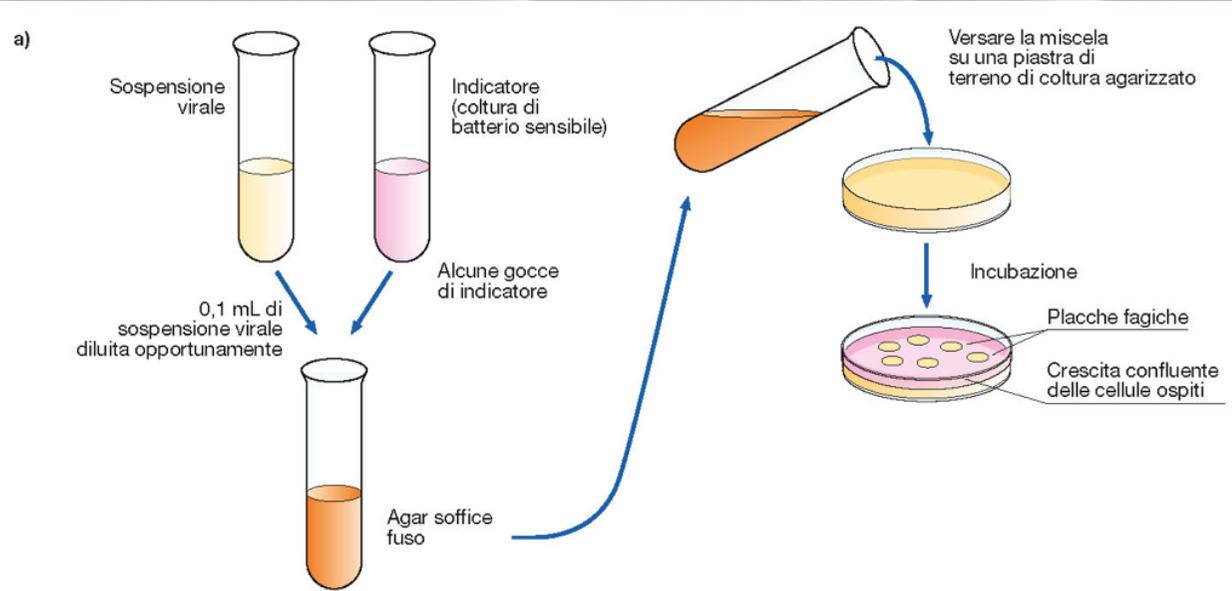
Ciclo di moltiplicazione virale

- **Attacco:** il virione adsorbe alla superficie della cellula che intende attaccare; sono presenti specifici siti di attacco (recettori virali).
- **Penetrazione:** l'acido nucleico del virus raggiunge il citoplasma della cellula ospite. I virus delle piante e dei batteri devono attraversare la parete cellulare.
- **Sintesi dell'acido nucleico:** il genoma virale viene duplicato. Formazione di prodotti genici che controllano la replicazione e la sintesi dei capsomeri.
- **Assemblaggio e liberazione dei virioni:** Dopo che l'acido nucleico è stato inserito nel capsido, il virus è pronto per la sua liberazione.

- 
- Un virus per la sua moltiplicazione ha bisogno di una cellula ospite, del suo ATP, dei ribosomi e dei costituenti strutturali forniti dall'ospite stesso. Anche gli enzimi coinvolti nella replicazione virale sono forniti dall'ospite con o senza modificazioni.
 - L'entrata del genoma virale in una cellula comporta l'immediata interruzione delle normali funzioni cellulari e l'inizio della replicazione del genoma virale. Dopo la replicazione del genoma virale inizia la sintesi del capside e di altre proteine virali che saranno della particella virale matura

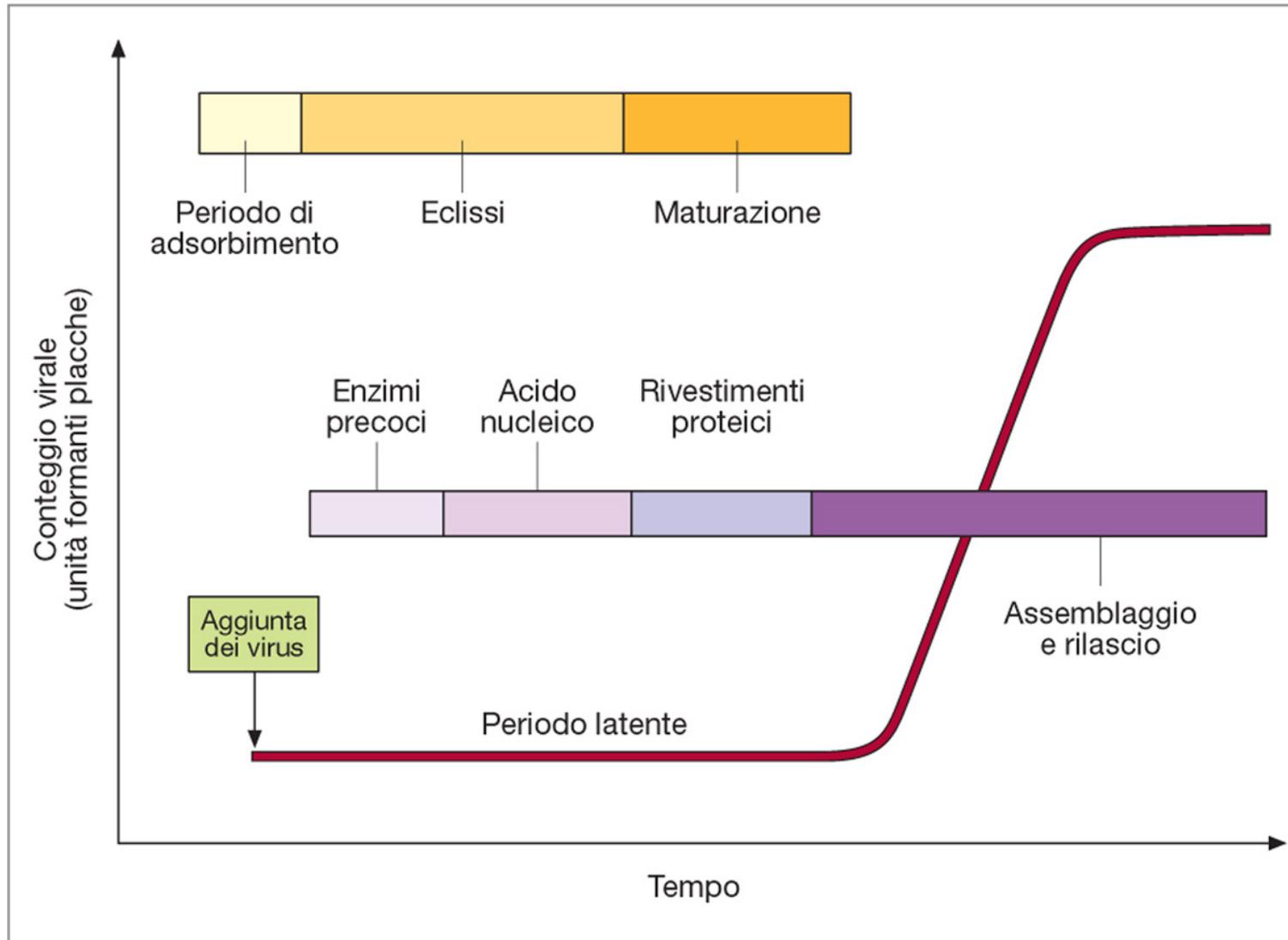


Procedura del saggio di placca



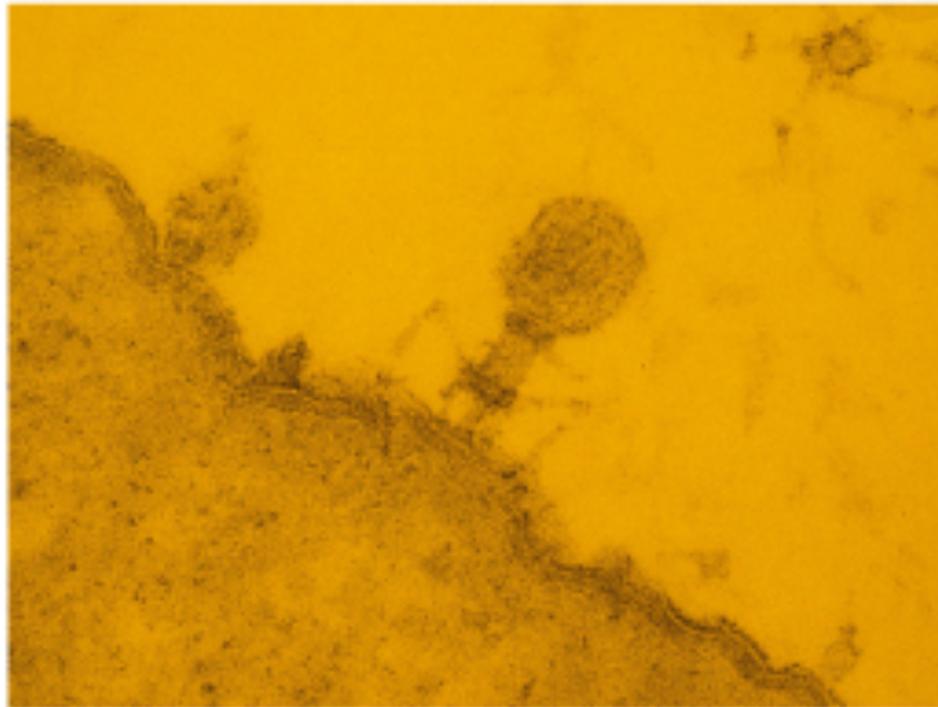
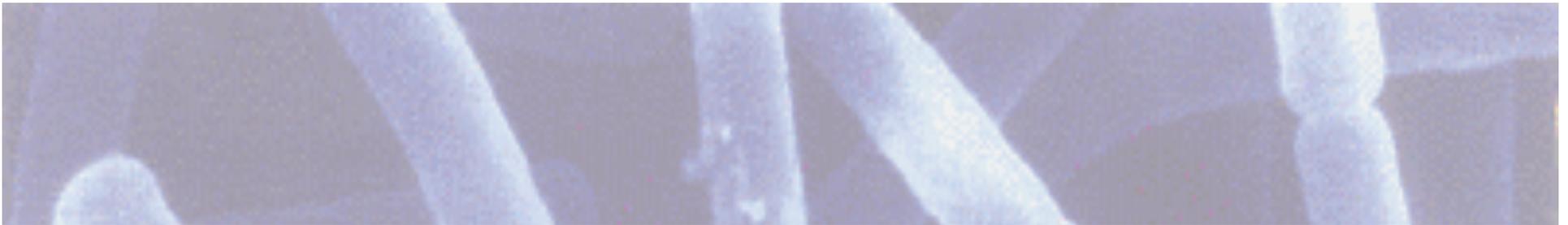
Schema di titolazione dei batteriofagi mediante saggio di placca

Curva di crescita per la replicazione di un virus

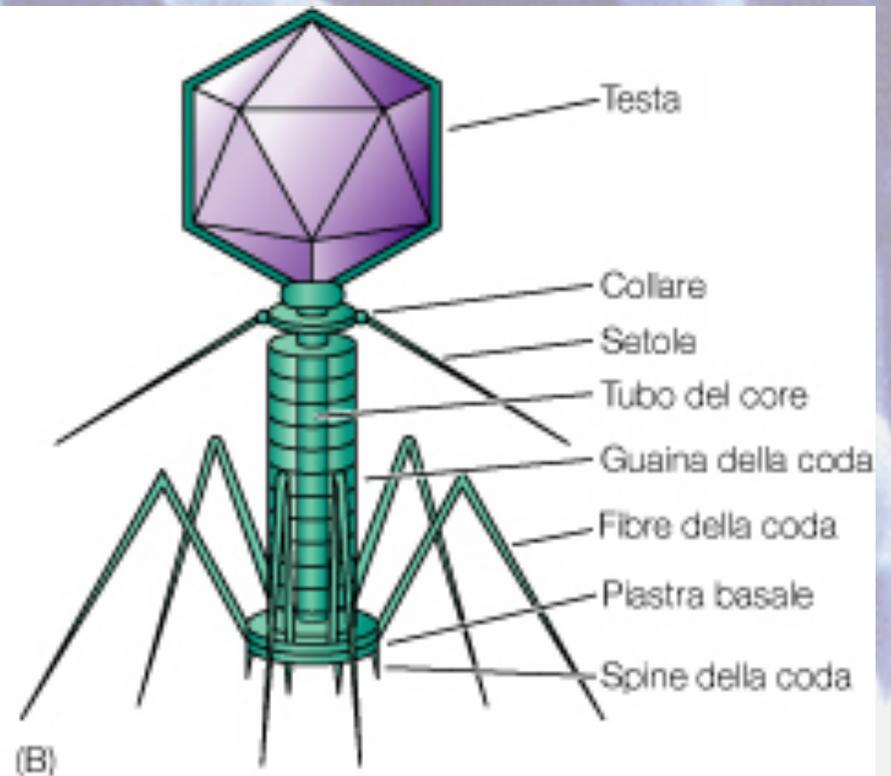


Virus litici: fago T4

- **testa** icosaedrica contenente DNA lineare a doppio filamento con 168903 coppi di basi
- **Collo** con collare
- **Coda** a struttura tubolare elicoidale
- Piastra basale con **fibre caudali**
- **Genoma: codifica per 250 proteine diverse**

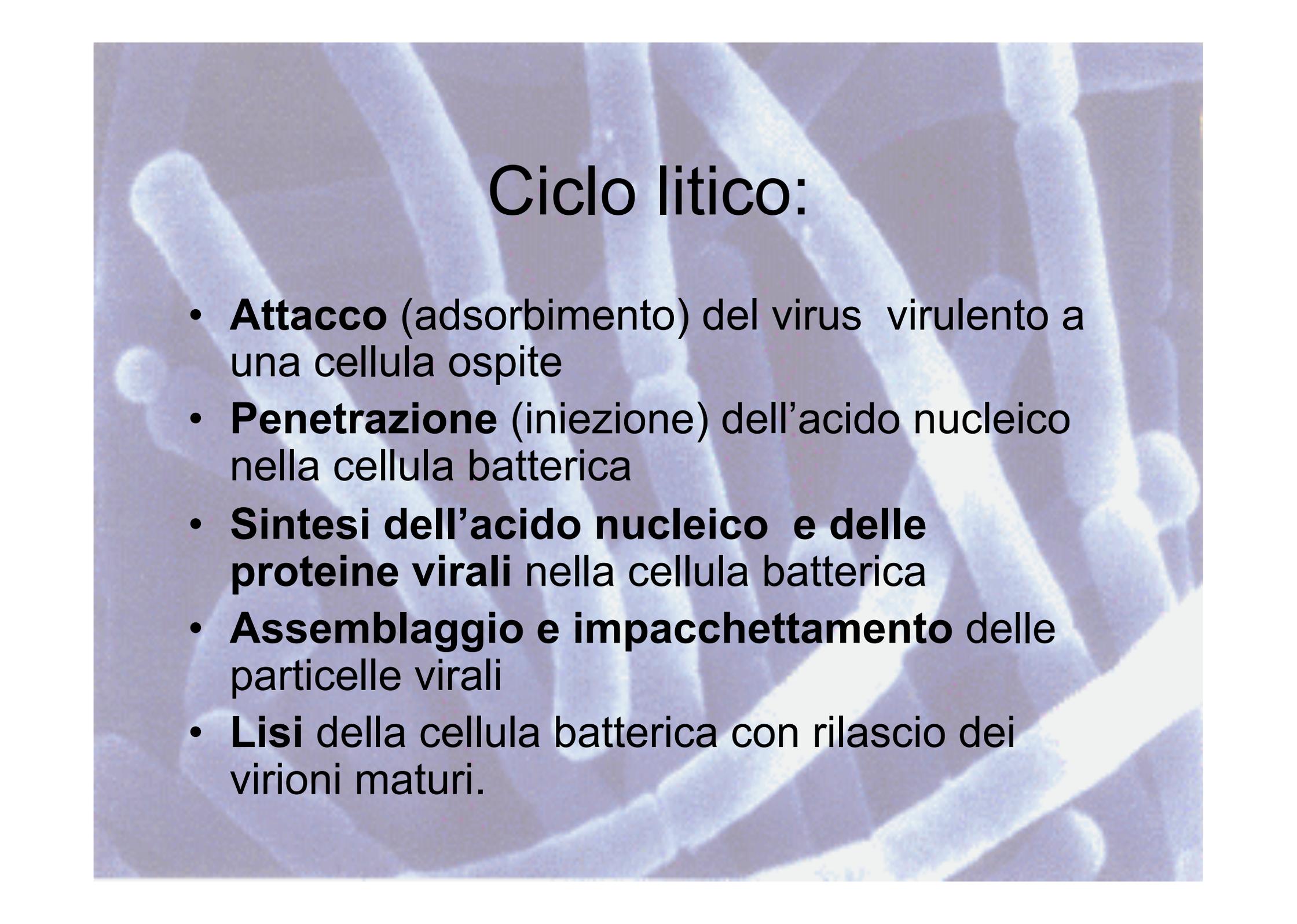


(A)



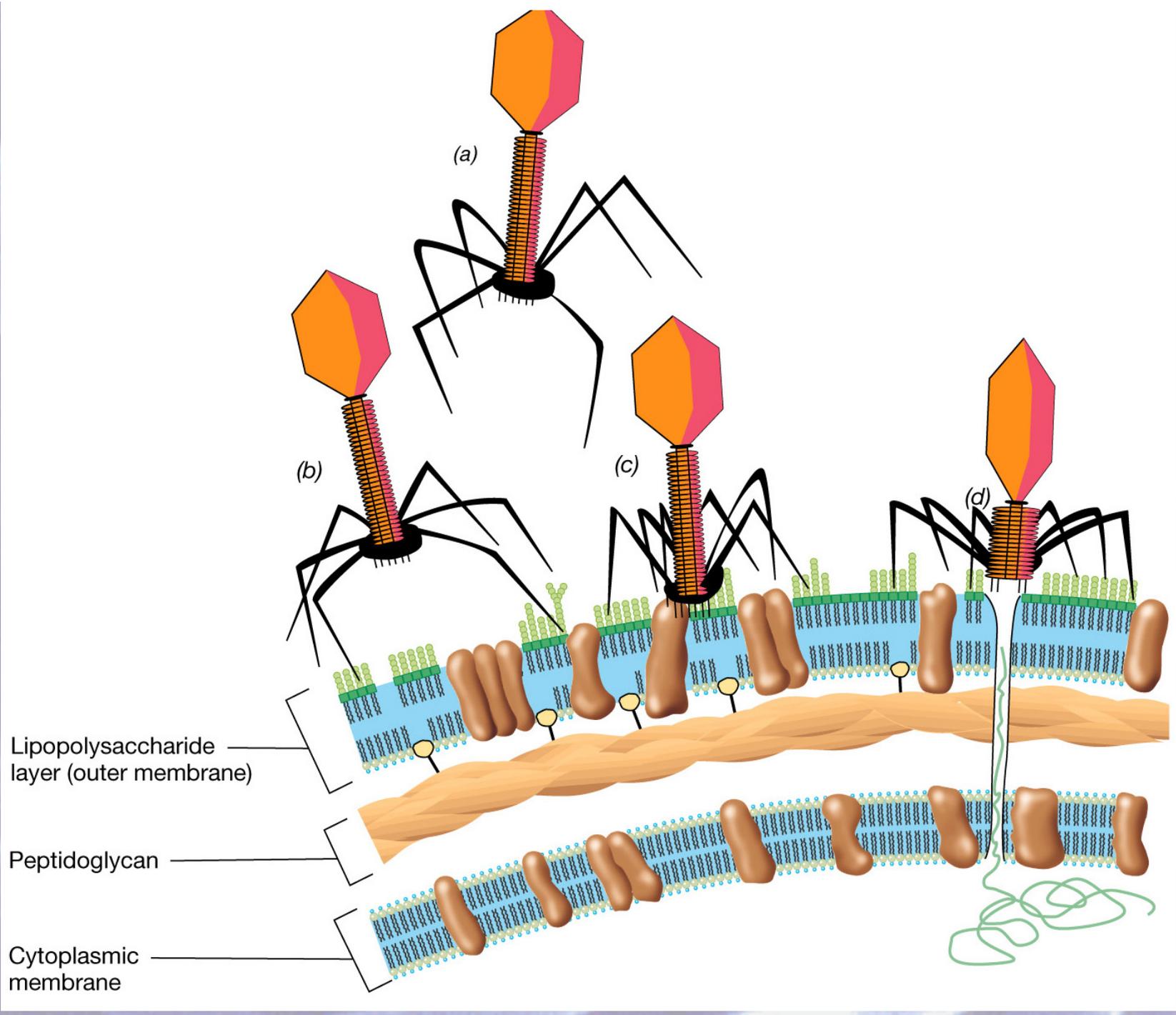
(B)

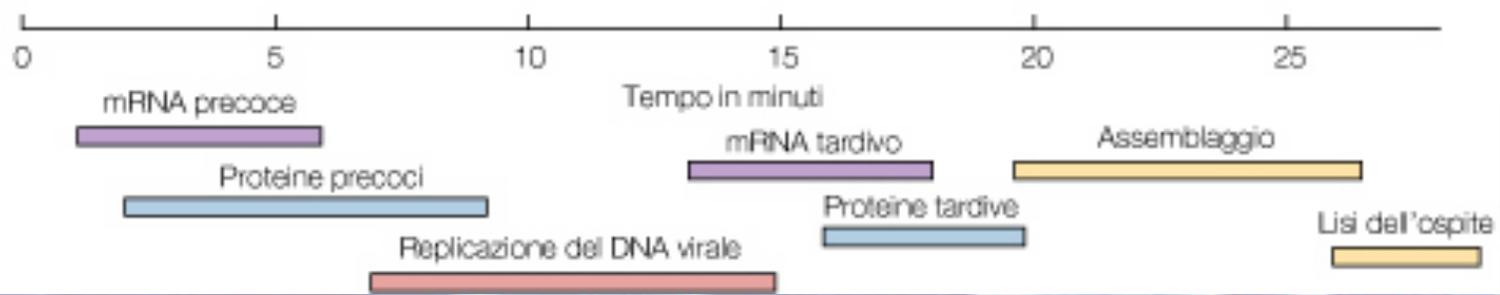
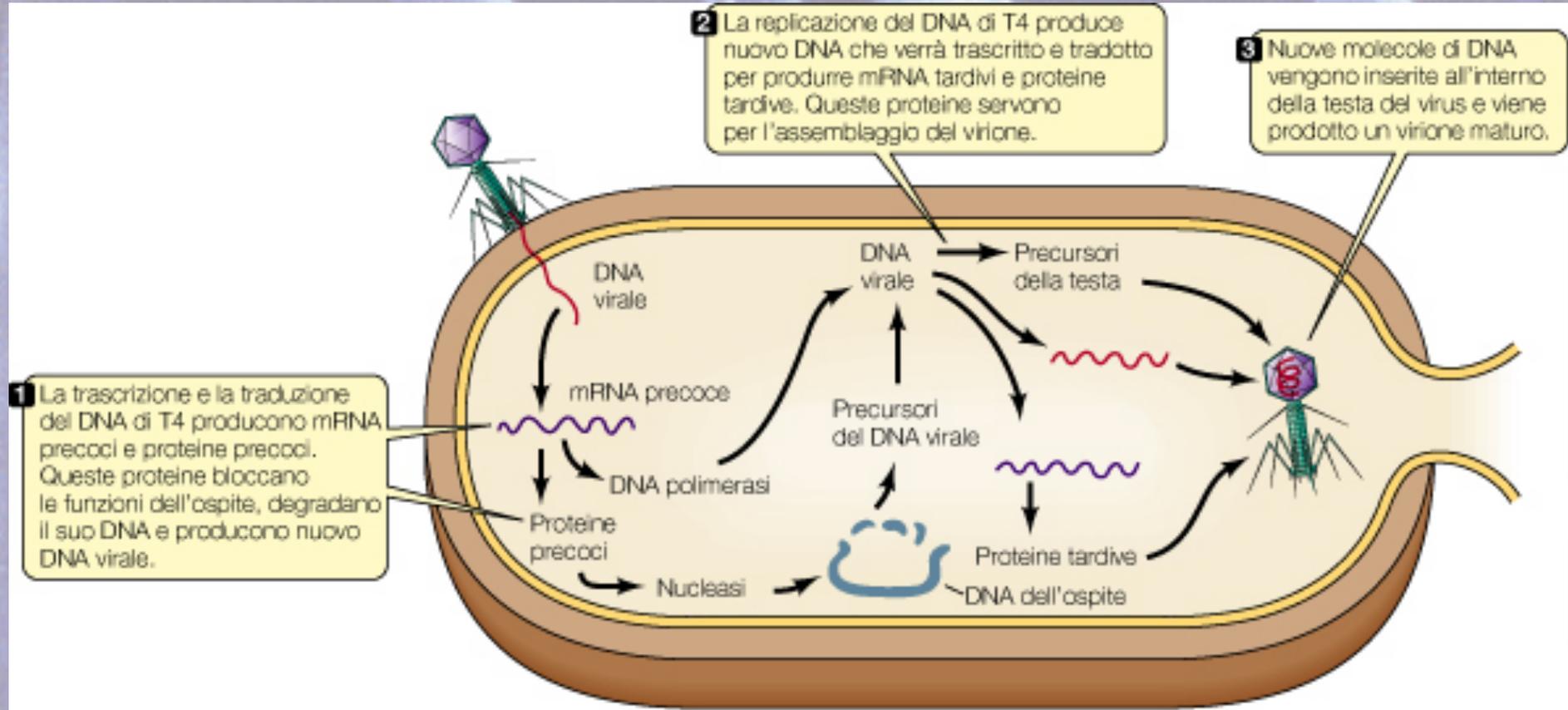


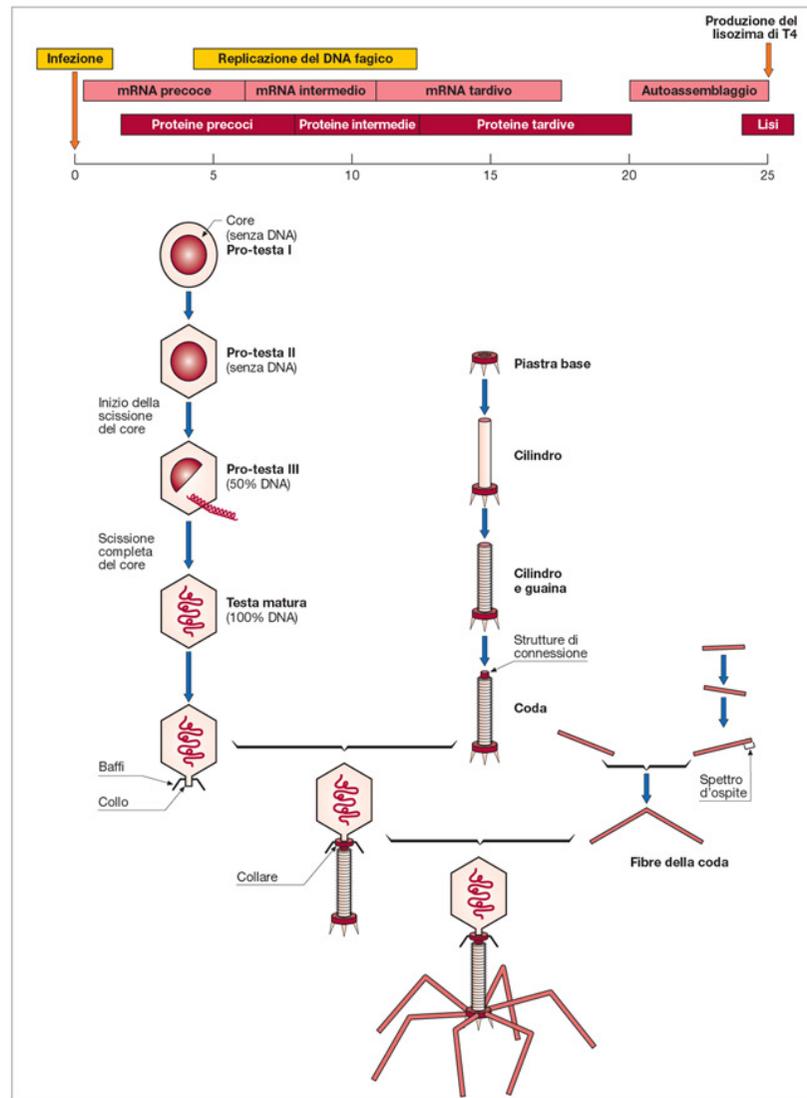
A blue-tinted electron micrograph of a bacteriophage, showing its long, cylindrical tail and the head at the end. The background is a blurred, light blue color.

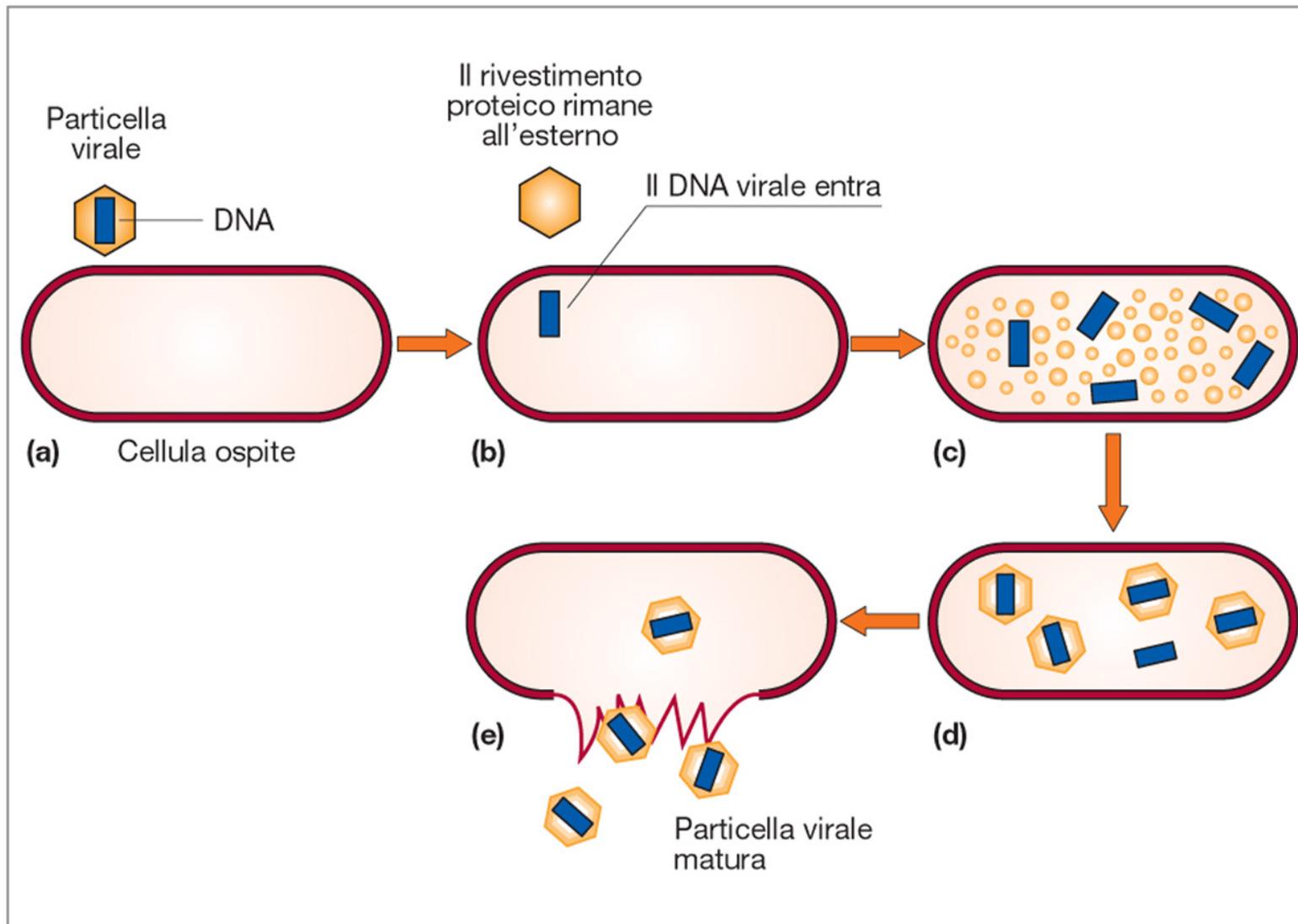
Ciclo litico:

- **Attacco** (adsorbimento) del virus virulento a una cellula ospite
- **Penetrazione** (iniezione) dell'acido nucleico nella cellula batterica
- **Sintesi dell'acido nucleico e delle proteine virali** nella cellula batterica
- **Assemblaggio e impacchettamento** delle particelle virali
- **Lisi** della cellula batterica con rilascio dei virioni maturi.









Fagi temperati:

- Determinano il ciclo lisogenico nella cellula batterica:
 - Il Dna virale si integra nel DNA batterico, senza provocare la lisi cellulare
- La conversione lisogena modifica il fenotipo della cellula e può portare ad un aumento della sua patogenicità in alcune malattie causate da batteri:
 - Ceppi lisogeni di *Corynebacterium diphtheriae* producono una potente tossina che causa la difterite

Lisogenia

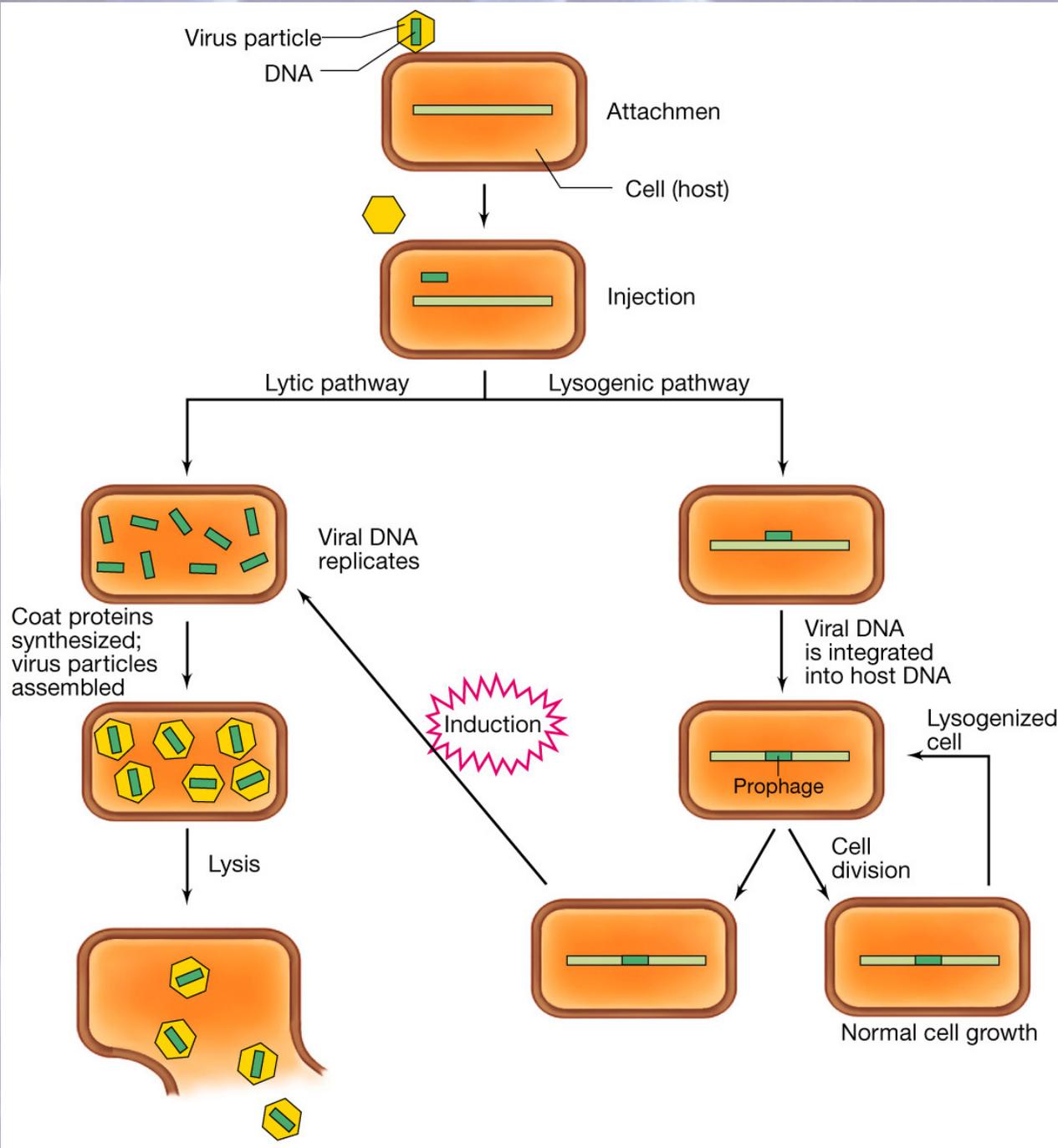
- Non si verifica l'espressione di geni fagici e il DNA fagico integrato (profago) si replica con il cromosoma dell'ospite.
- Durante la divisione cellulare il profago si duplica e viene trasmesso alle due cellule figlie

Fagi temperati

- Lo stato di profago è mantenuta da una **proteina repressore** che reprime gli enzimi litici e conferisce alla cellula batterica uno stato di immunità verso infezioni virali dello stesso tipo
- Se il repressore è inattivato, vi è **l'induzione fagica**, replicazione ed espressione del DNA virale e lisi cellulare.

Induzione allo stato litico

- In alcuni casi viene a perdersi lo stato di lisogenia: viene attivato il virione e si dà la lisi
- Avviene spontaneamente solo in pochi casi ma la frequenza può essere aumentata in presenza di mutageni (raggi UV, X)

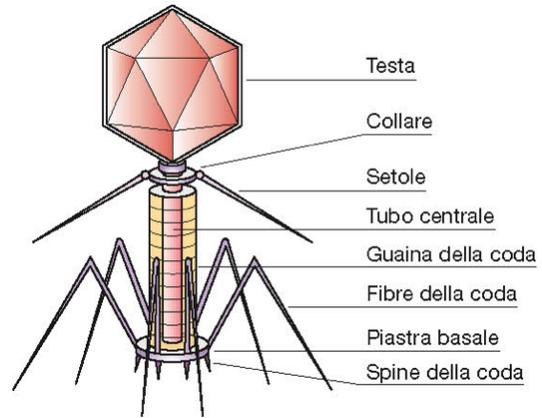


Il fago lambda (λ)

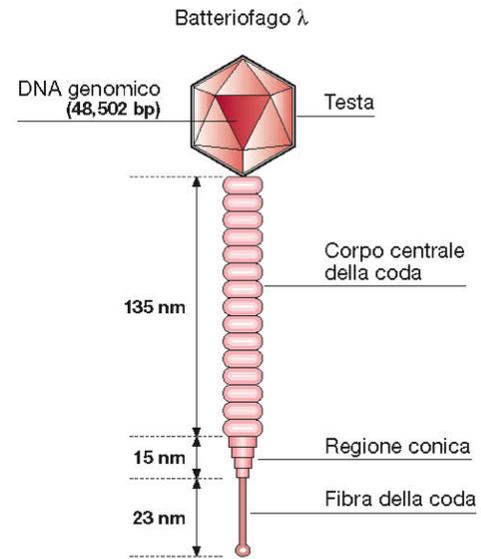
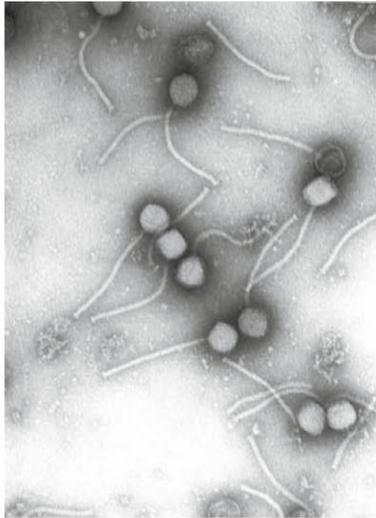
- Fago temperato che infetta *E. coli*
- Formato da una testa, una coda e una fimbria terminale
- DNA lineare a doppio filamento



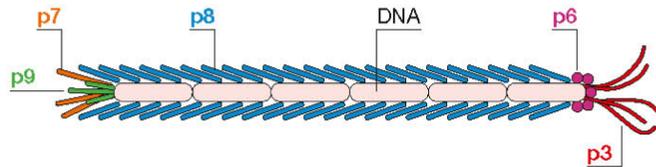
a)

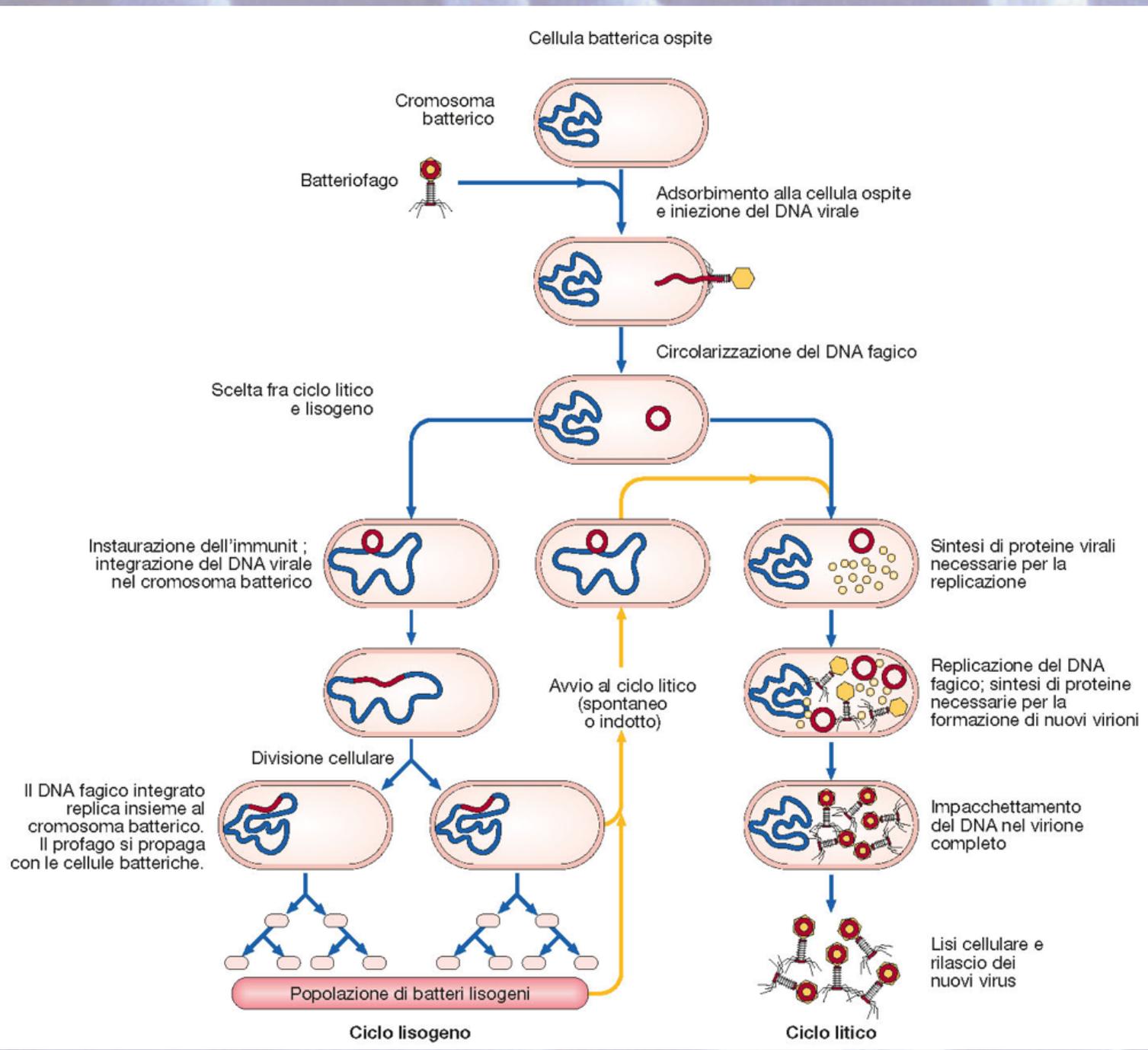


b)



c)





Sistemi di trasferimento dei geni e ricombinazione nei procarioti

il trasferimento dei geni è un evento occasionale, mediato da meccanismi diversi. Solo raramente viene trasferito l'intero patrimonio genetico. Si forma un **merozigote** (solo parte dei geni sono, almeno per un tempo limitato, presenti in due copie) a causa della presenza di un complemento genetico completo nella cellula ricevente (**l'endogenote**) e una parte dei geni della cellula donatrice (**l'esogenote**). A questi eventi segue in genere rapidamente la **ricombinazione**, con il ristabilimento dello stato aploide



Sistemi di trasferimento dei geni e ricombinazione negli eucarioti

- Il trasferimento di geni avviene sempre durante la riproduzione sessuale, con la fusione di gameti, ciascuno dei quali porta un corredo di cromosomi aploide (n) a formare lo zigote ($2n$)
- Durante la meiosi avviene una divisione riduzionale, associata ad eventi di ricombinazione fra i cromosomi provenienti dai due genitori: i gameti hanno sempre un patrimonio genetico diverso dal genitore
- Sono possibili anche scambi genici parziali con eventi di ricombinazione
- fra i microrganismi eucarioti ci sono aplonti, diplonti e aplodiplonti



Meccanismi naturali di scambio genetico

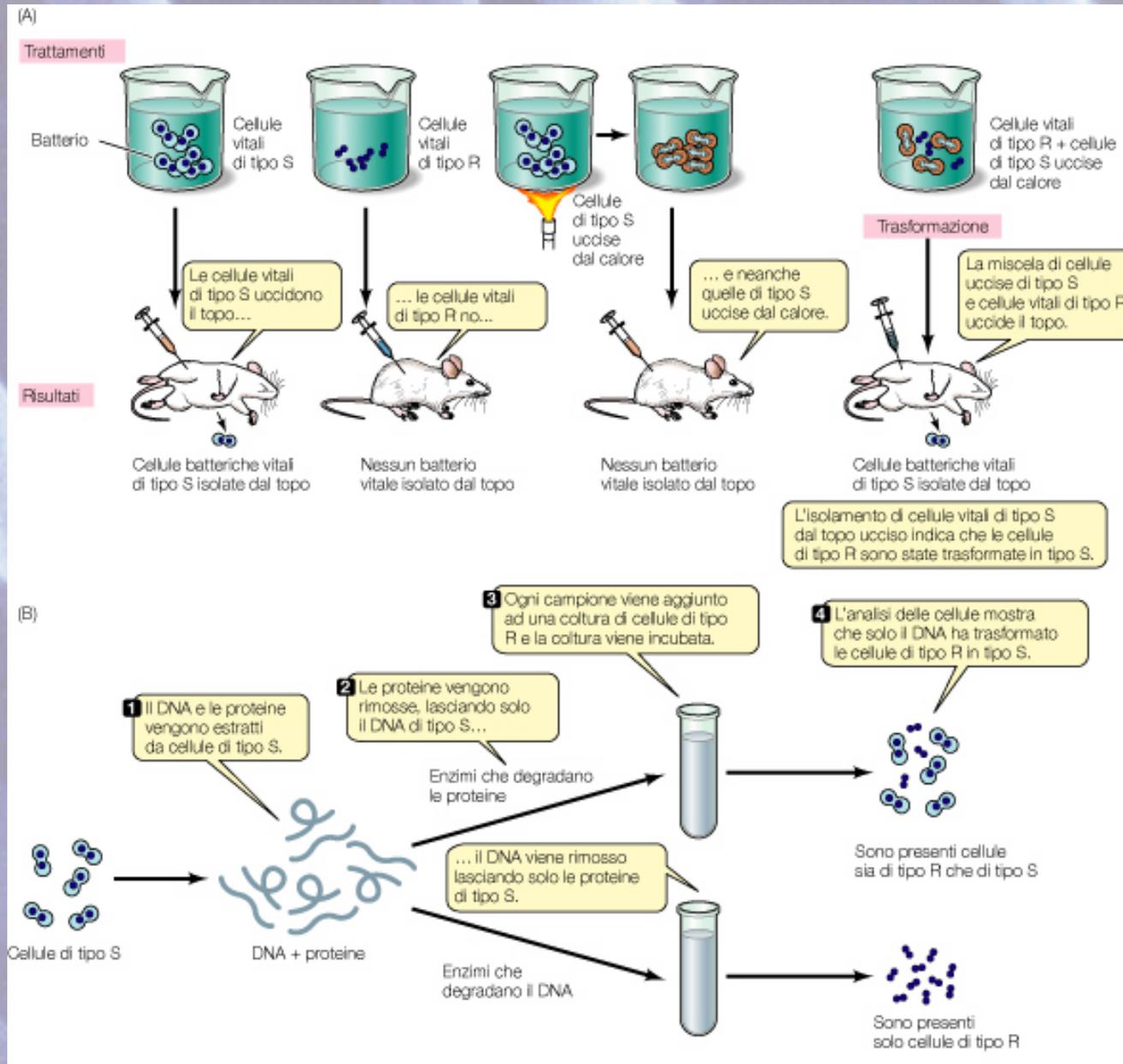
- **trasformazione:** le cellule donatrici rilasciano nell'ambiente DNA che viene assorbito e integrato dalle cellule riceventi;
- **trasduzione:** occasionalmente, i fagi possono incorporare nei capsidi parte del genoma dell'ospite e trasferirlo ad un nuovo ospite in seguito all'infezione;
- **coniugazione:** il materiale genetico viene trasferito fra due cellule in stretto contatto fra loro in un processo che è mediato da plasmidi (molto raramente da particolari trasposoni).

Trasformazione

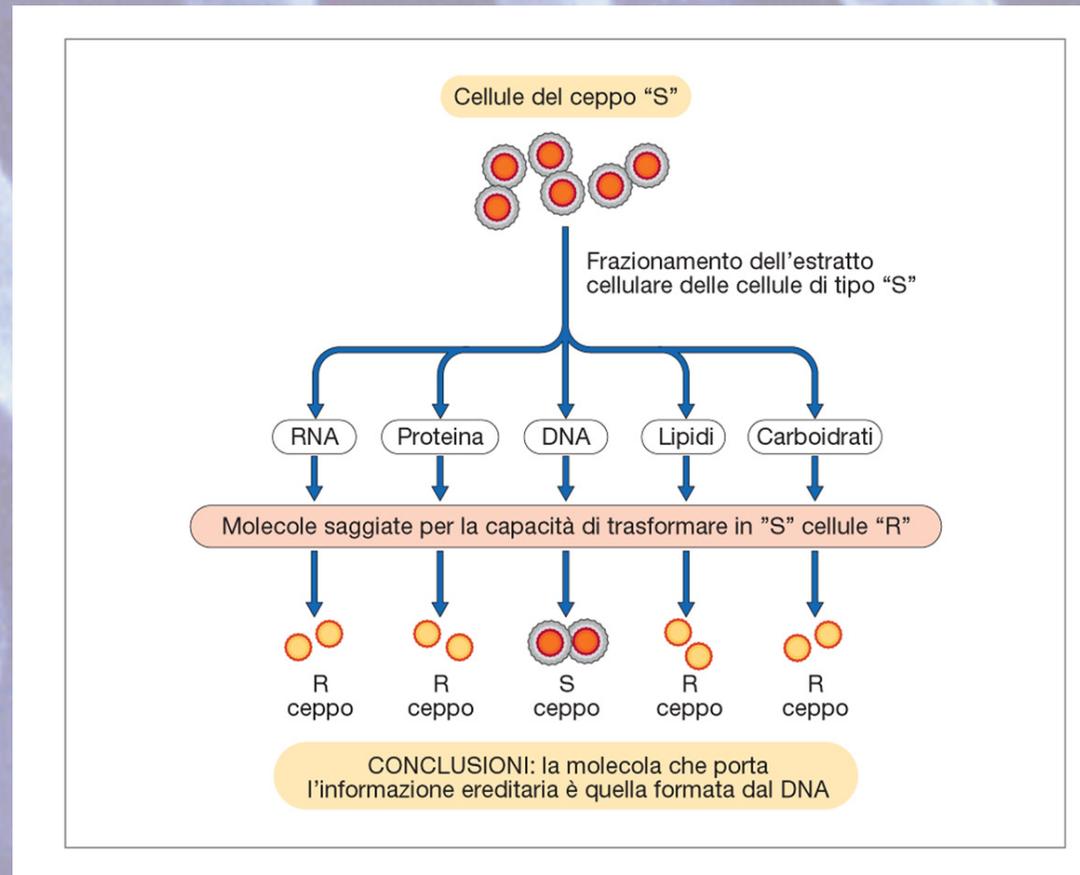
- Alcuni procarioti mostrano competenza, una condizione in cui le cellule sono in grado di acquisire DNA libero rilasciato da altri batteri
- Le cellule possono essere trasformate naturalmente (poche specie), per induzione artificiale della competenza o per elettroporazione, che comporta la modifica della membrana citoplasmatica attraverso l'esposizione a campi elettrici pulsati per facilitare il passaggio di DNA



Trasformazione in *S. pneumoniae*



La dimostrazione che il DNA e non le proteine è la molecola che conserva l'informazione genetica



Trasformazione

- Le cellule che si trovano nella condizione di essere trasformate da DNA presente nel mezzo sono dette **competenti**.
- Nei batteri **naturalmente trasformabili** la competenza si verifica in particolari condizioni in seguito all'effetto di geni che si trovano sul cromosoma.
- E' possibile **indurre artificialmente la competenza** in numerosi altri batteri, soprattutto con trattamenti con cationi divalenti.
- I frammenti di DNA introdotti per trasformazione (generalmente intorno alle 15 kb) devono generalmente subire eventi di ricombinazione per essere stabilmente integrati



Coniugazione

- Lo scambio genetico avviene fra cellule in diretto contatto fra loro e non mediante DNA in soluzione
- è sempre legato a geni presenti su plasmidi.
- Il fenomeno è stato scoperto per la prima volta per il plasmide F di *E. coli*.



Coniugazione

- Avviene se la cellula donatrice contiene plasmidi coniugativi o mobilizzabili non incompatibili con quelli presenti nella cellula riceventi
- Nei Gram- i plasmidi coniugativi sono responsabili della **sintesi di strutture tubulari** (pili sessuali) che si estroflettono dalla cellula donatrice, dotate di recettori adesivi alle loro estremità che si legano ai ligandi delle pareti cellulari delle cellule riceventi:
- Il contatto consente il passaggio di DNA da una cellula ad un'altra.

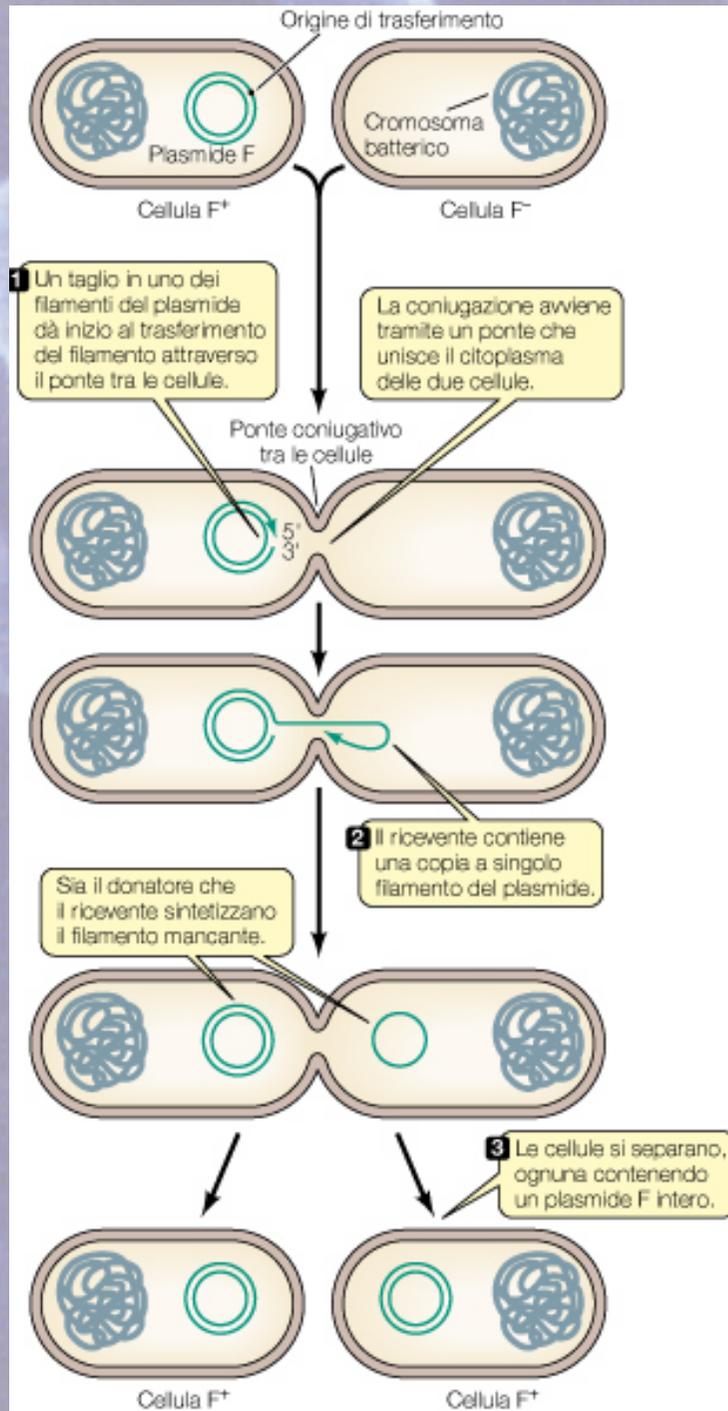


Episoma F o di fertilità in *E.coli*

- Plasmide di 94,5 kb presente in alcuni ceppi di *E. coli* (F+)
- Capace di autotrasmettersi ad altri ceppi della stessa specie (F-)
- Le cellule donatrici possono essere:
 - F⁺: plasmide non integrato nel cromosoma
 - Hfr (high frequency of recombination): plasmide integrato nel cromosoma, il trasferimento determina un'elevata frequenza di ricombinazione; la cellula ricevente non sempre diventa F⁺



Meccanismo di trasferimento di F



Trasduzione

- Meccanismo di trasferimento genetico mediato da particelle fagiche
- occasionalmente, durante la replicazione dei fagi, il DNA genomico sostituisce in tutto o in parte il DNA impaccato nelle teste dei fagi e viene trasferito alle cellule riceventi in seguito all'infezione

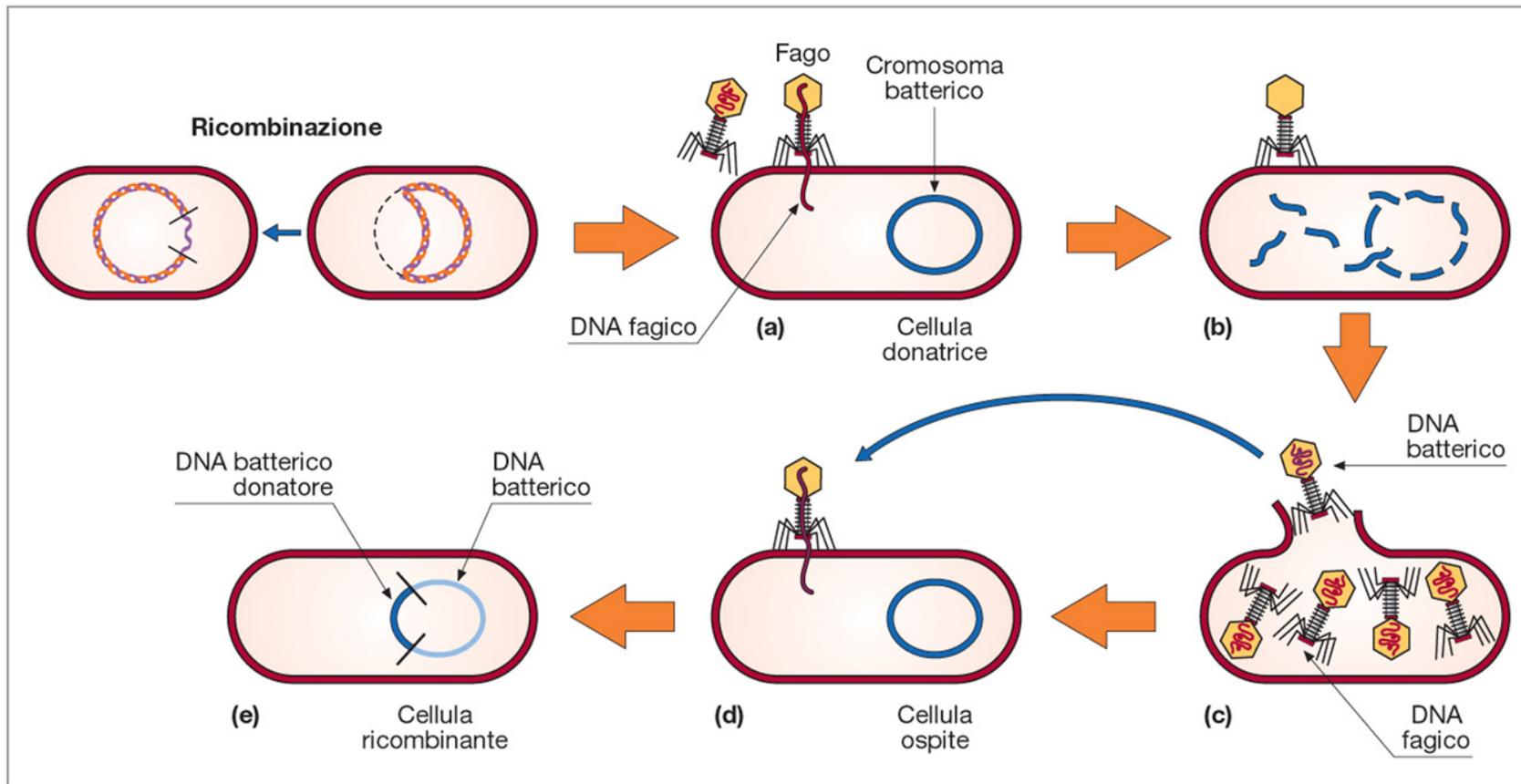


Trasduzione

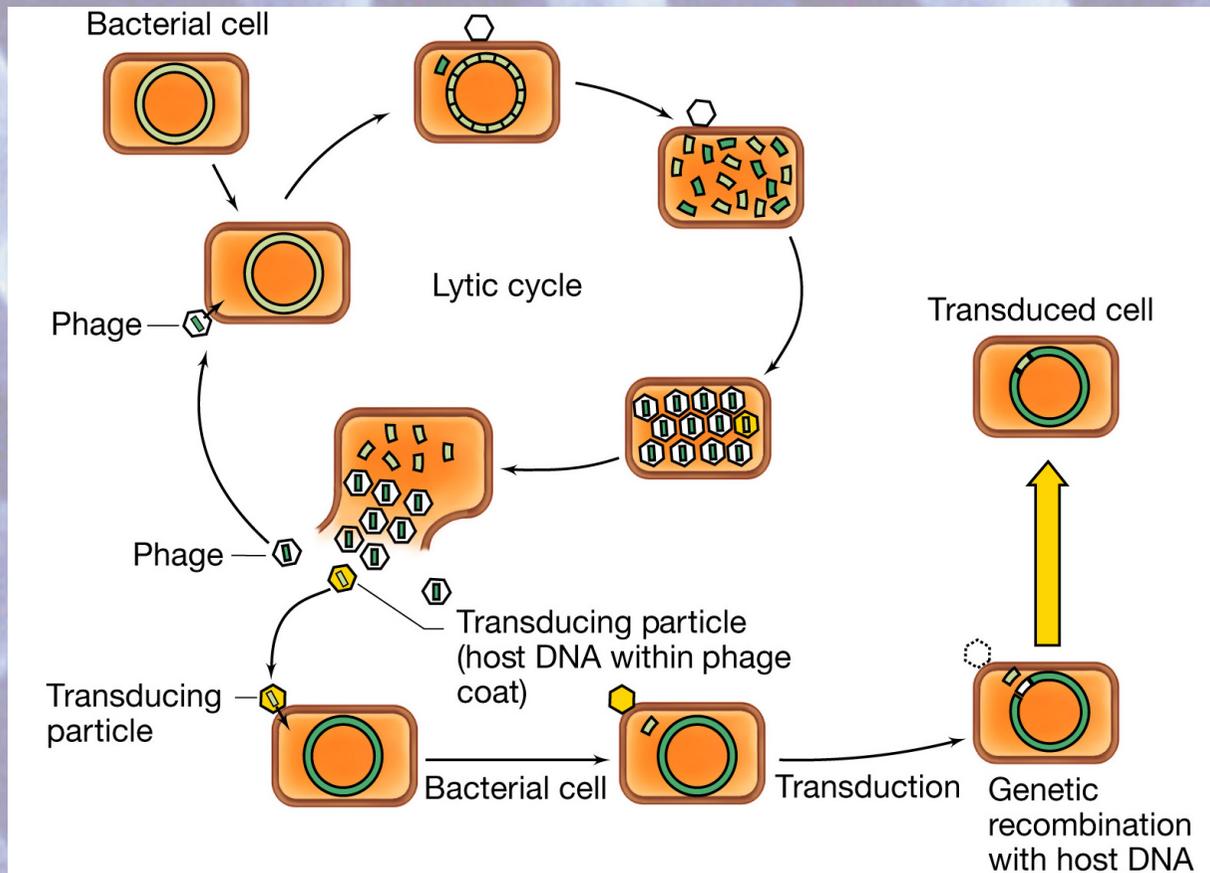
- **generalizzata:** inclusione nei capsidi del fago di qualsiasi gene cromosomico.
- **specializzata:** soltanto determinati geni vengono trasdotti, può essere mediata soltanto da fagi temperati
- In entrambe geni batterici sostituiscono geni virali: particella virale trasducente è detta difettiva



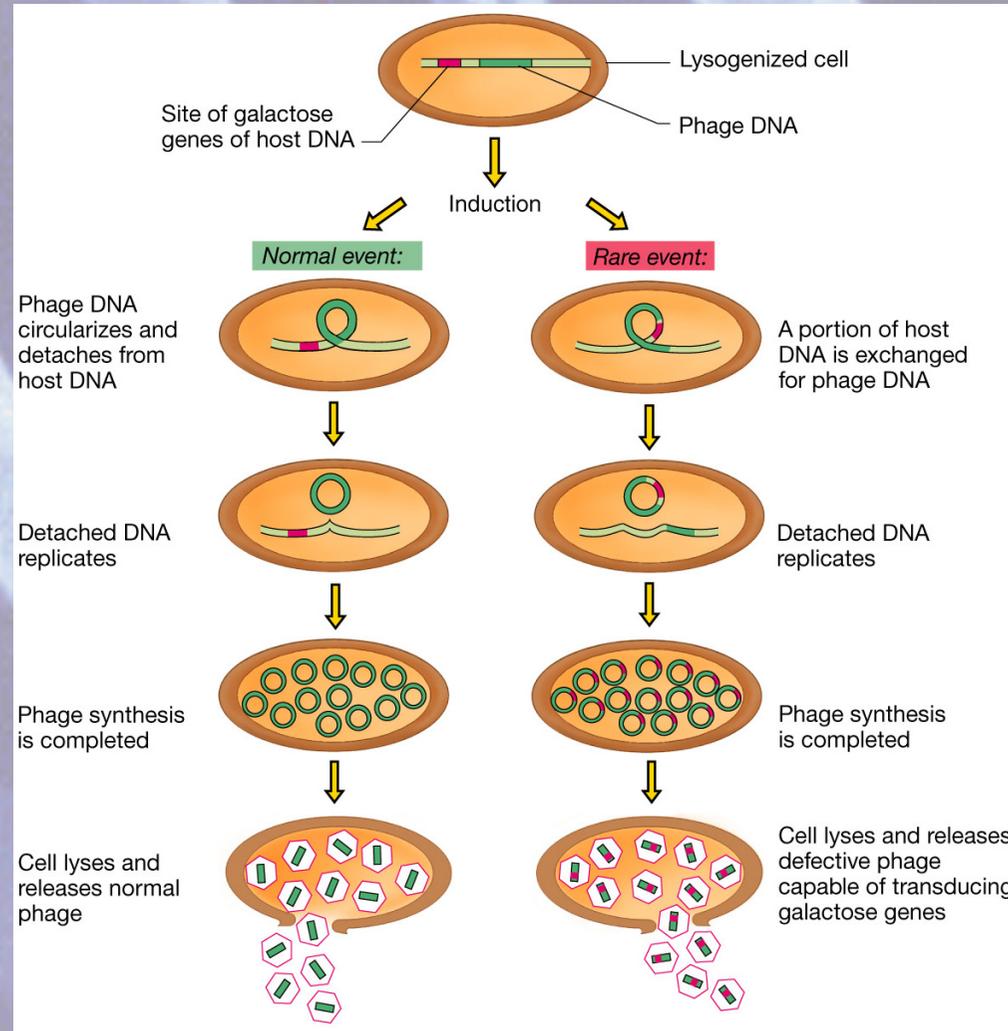
Trasduzione generalizzata



Trasduzione generalizzata



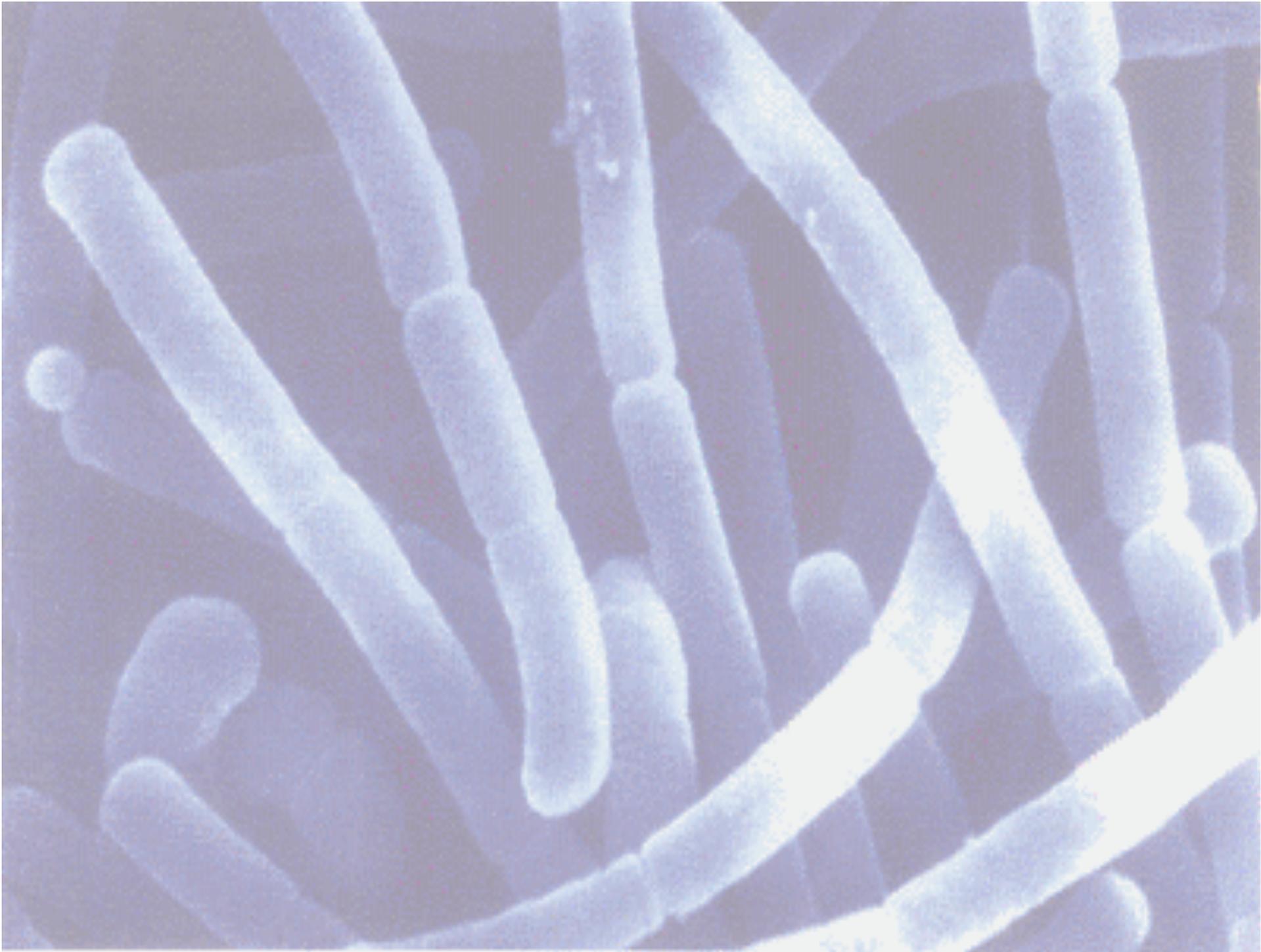
Trasduzione specializzata



4-12-2018

MGEMA 9 cfu L14

98



Regolazione

- Le cellule regolano l'espressione dei geni in modo tale che le proteine e le altre molecole siano sintetizzate nella quantità appropriata e al momento giusto durante il ciclo cellulare.
- La regolazione dell'espressione genica (trascrizione e/ o traduzione dei geni) è fortemente influenzata dall'ambiente in cui vive la cellula

Enzimi costitutivi

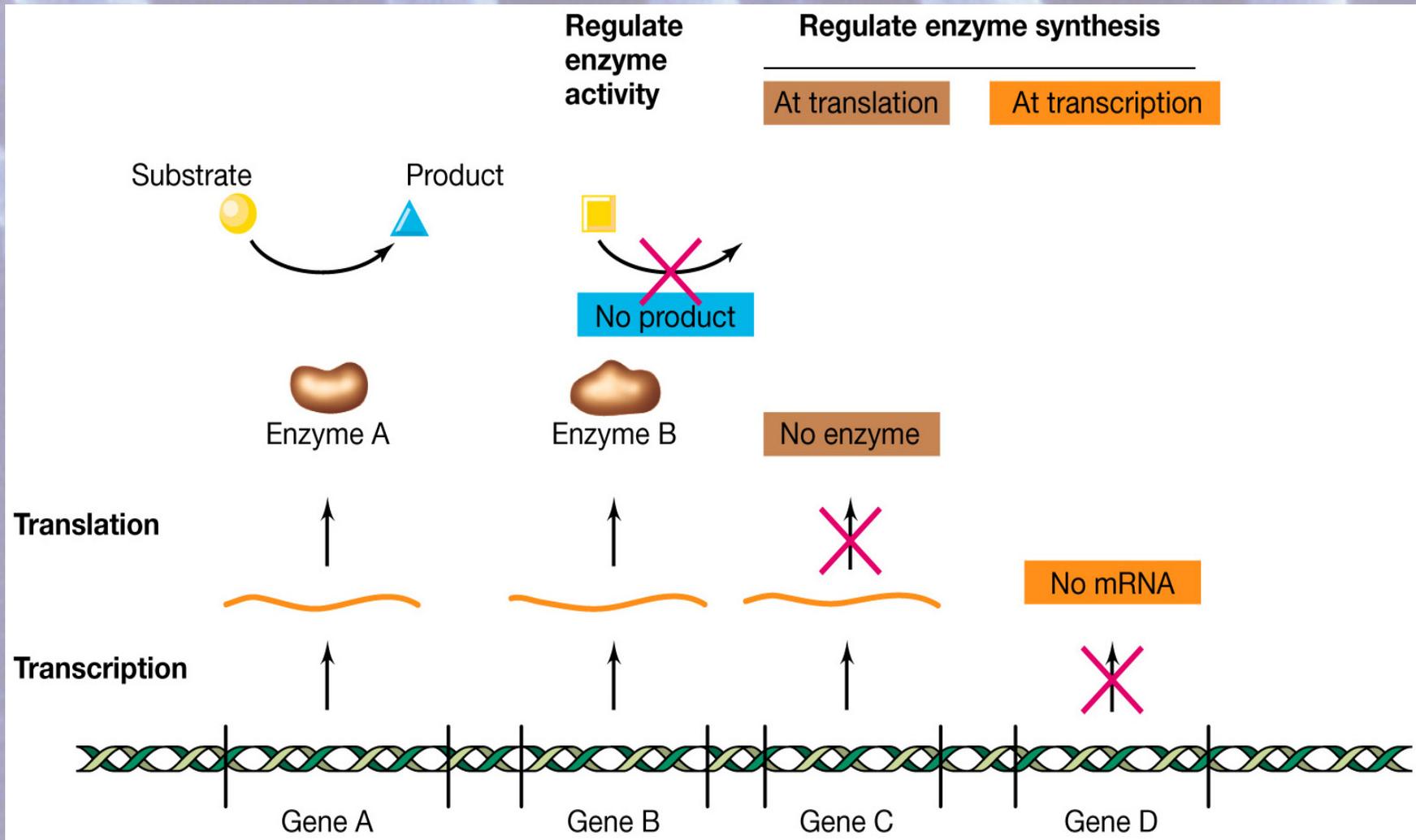
- Enzimi fondamentali, sintetizzati continuamente nella cellula in crescita
 - Es: gli enzimi delle vie metaboliche centrali della cellula (glicolisi, etc.) sono costitutivi ma il loro funzionamento può essere bloccato quando la cellula ha già a disposizione energia sufficiente e quindi sarebbe inutilmente dispendioso produrre ATP in eccesso.

Strategie principali di regolazione

- Controllo dell'attività di un enzima preesistente:
 - avviene dopo la sintesi della proteina (livello post-traduzionale)
- Controllo della quantità sintetizzata (o della presenza o assenza) di un enzima:
 - Attuata a livello di trascrizione o di traduzione

Meccanismi di regolazione

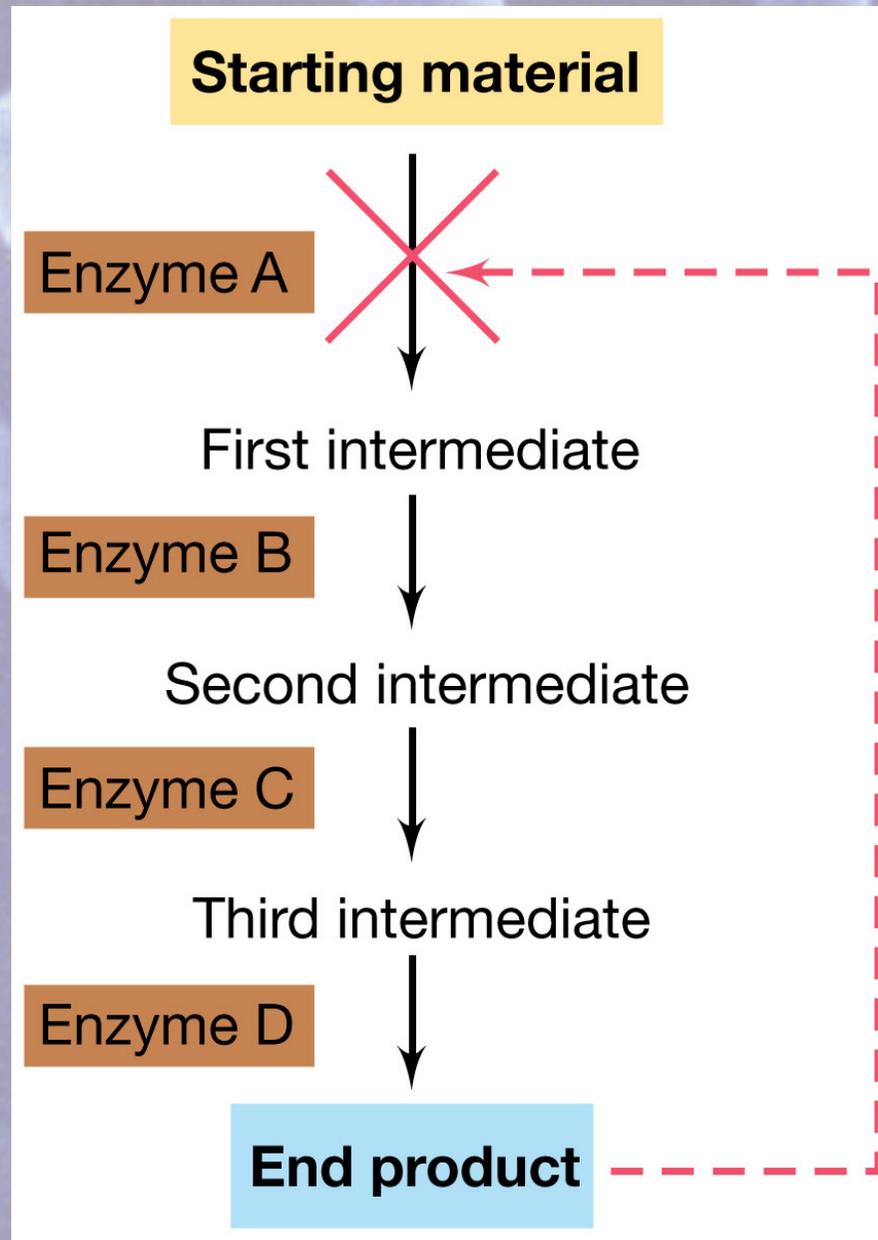
Nella cellula ci sono 2 strategie di regolazione: Controllo dell'attività di un enzima preesistente o Controllo della quantità sintetizzata (o della presenza o assenza) di un enzima



Regolazione dell'attività enzimatica

- Le reazioni metaboliche possono essere regolate attraverso il controllo degli enzimi che le catalizzano:
 - **inibizione da feedback**, in cui il prodotto finale di una via biosintetica inibisce l'attivazione del primo enzima della cellula

Inibizione da feedback



Sistemi di controllo globale

Rispondono a segnali ambientali e possono regolare simultaneamente l'espressione di molti geni:

- **Repressione da catabolita:** aiuta la cellula a usare in modo efficiente le varie fonti di C:
 - Esempio: operone *lac*

Operone

- Uno o più geni trascritti in un singolo RNA e sotto il controllo di una sola regione regolatrice.
- E' costituito da:
 - un gruppo di **geni strutturali** (che codificano gli enzimi per una certa via metabolica)
 - una regione di controllo formata dal **promotore** (regione del DNA dove l'RNA polimerasi si attacca per iniziare la trascrizione) e dall'**operatore** (regione del DNA dove si lega una proteina repressore o attivatore) prodotta dal **gene regolatore**, che regola l'attacco dell'RNA polimerasi al promotore

Controllo negativo della trascrizione: induzione e repressione

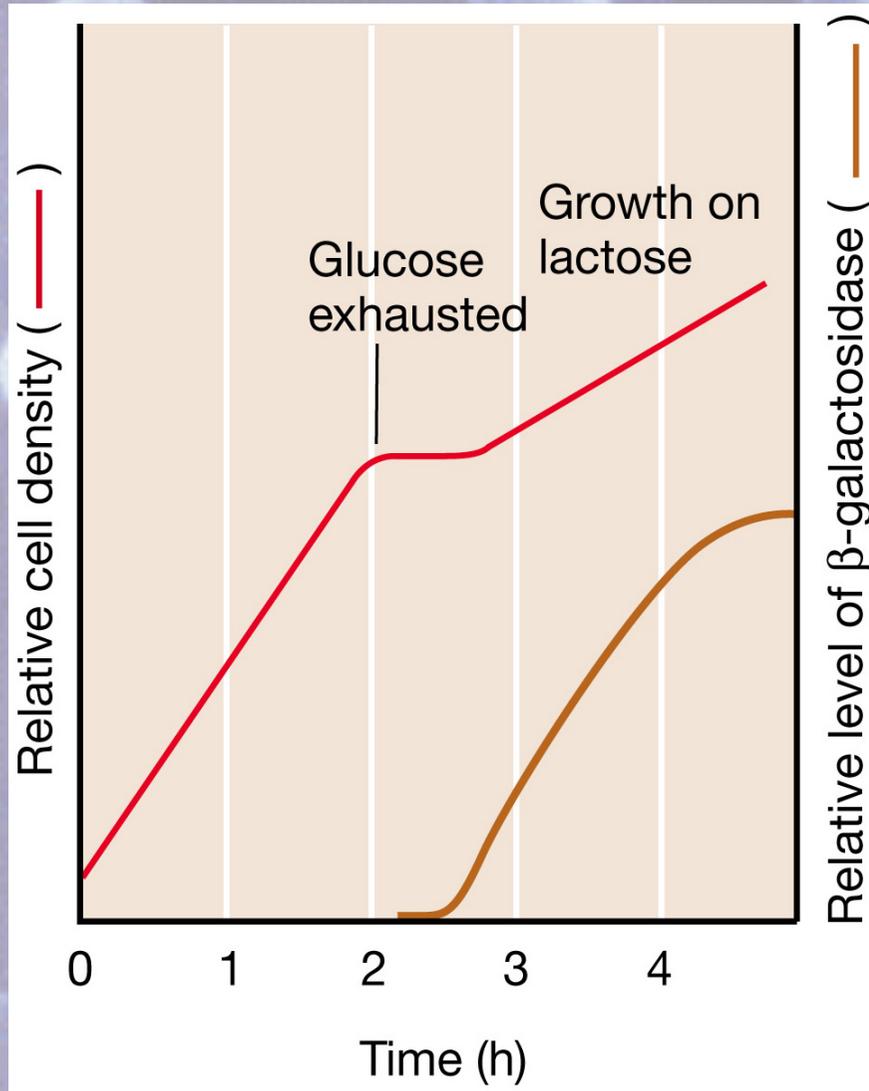
Induzione: sintesi di enzimi di una via catabolica fino a quel momento non necessaria, dal momento che si rende disponibile un substrato diverso da quello precedentemente utilizzato

Repressione: blocco della sintesi degli enzimi di una via metabolica, quando il prodotto di quella via è presente in quantità sufficiente.

Repressione da cataboliti

- la sintesi di numerosi enzimi (non correlati tra loro ma operanti nelle vie cataboliche) viene inibita se le cellule crescono in un terreno che contiene come fonte di C il glucosio (effetto glucosio)

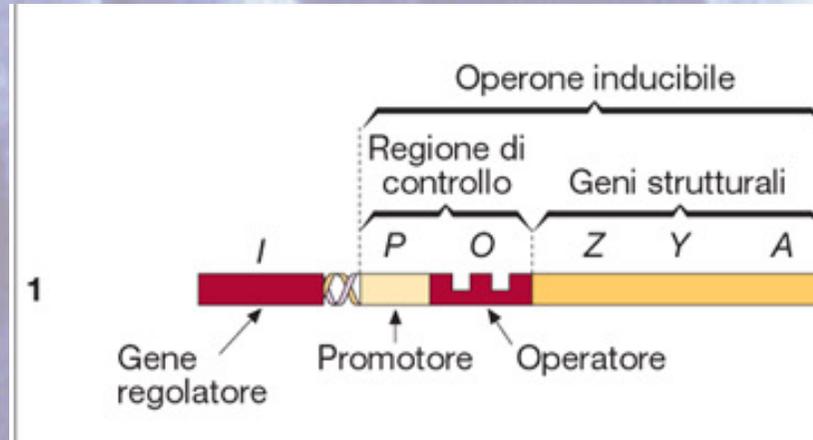
Crescita diauxica



Conseguenza della repressione da cataboliti:
crescita diauxica:

- l'organismo cresce utilizzando prima una fonte di energia, segue, poi, un intervallo prima che la crescita ricominci utilizzando la seconda fonte

Operone lac

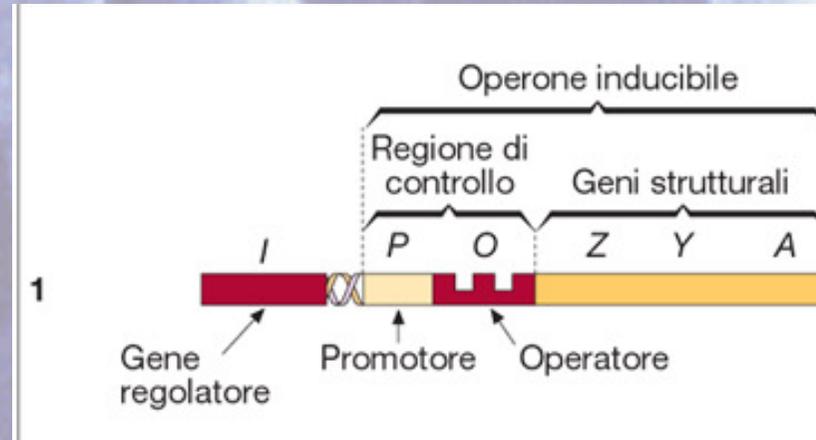


Un operone è costituito da una regione di controllo (promotore e operatore), da un gruppo di geni strutturali ed è regolato dal prodotto del gene regolatore

Enzimi del metabolismo del lattosio: b-galattoside permeasi (trasporta il lattosio nella cellula); b-galattosidasi (scinde il lattosio in glucosio e galattosio) e b-galattoside transacetilasi (metabolizza altri disaccaridi oltre il lattosio). I 3 enzimi sono codificati da 3 geni strutturali (Z,Y,A).

In presenza di lattosio i geni lac sono trascritti e tradotti

Operone *lac*

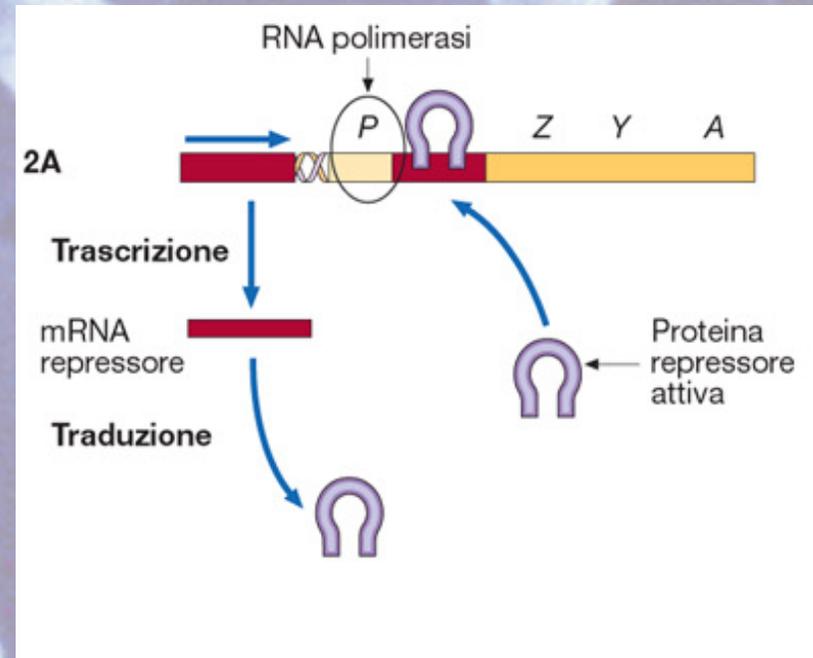


- **Geni strutturali**
- **Regione di controllo:** formata da:
 - un promotore (regione del DNA dove la RNA polimerasi inizia la trascrizione)
 - un operatore (regione dove si lega la proteina repressore)
- **Gene regolatore:** codifica per una proteina repressore

In mancanza di lattosio:

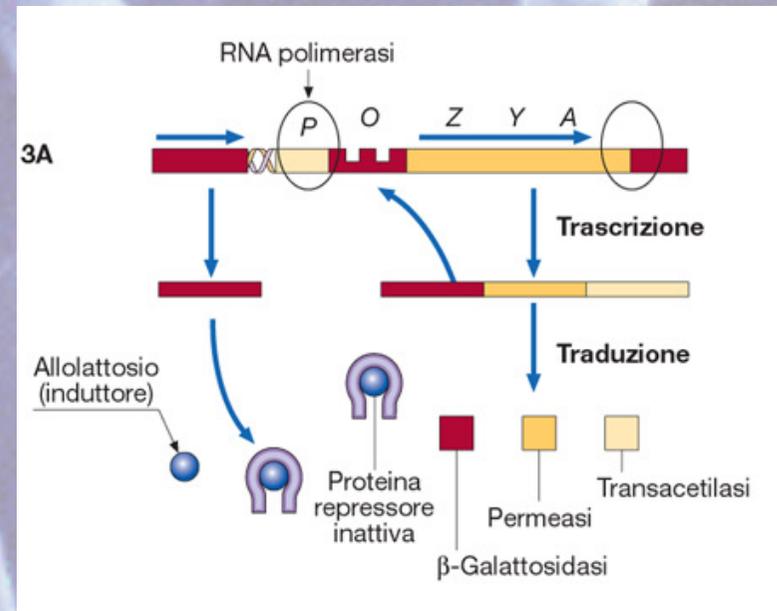
- la proteina repressore si lega al sito operatore e non permette alla RNA polimerasi di trascrivere i geni strutturali adiacenti:

- non si forma mRNA,
- non si sintetizzano gli enzimi



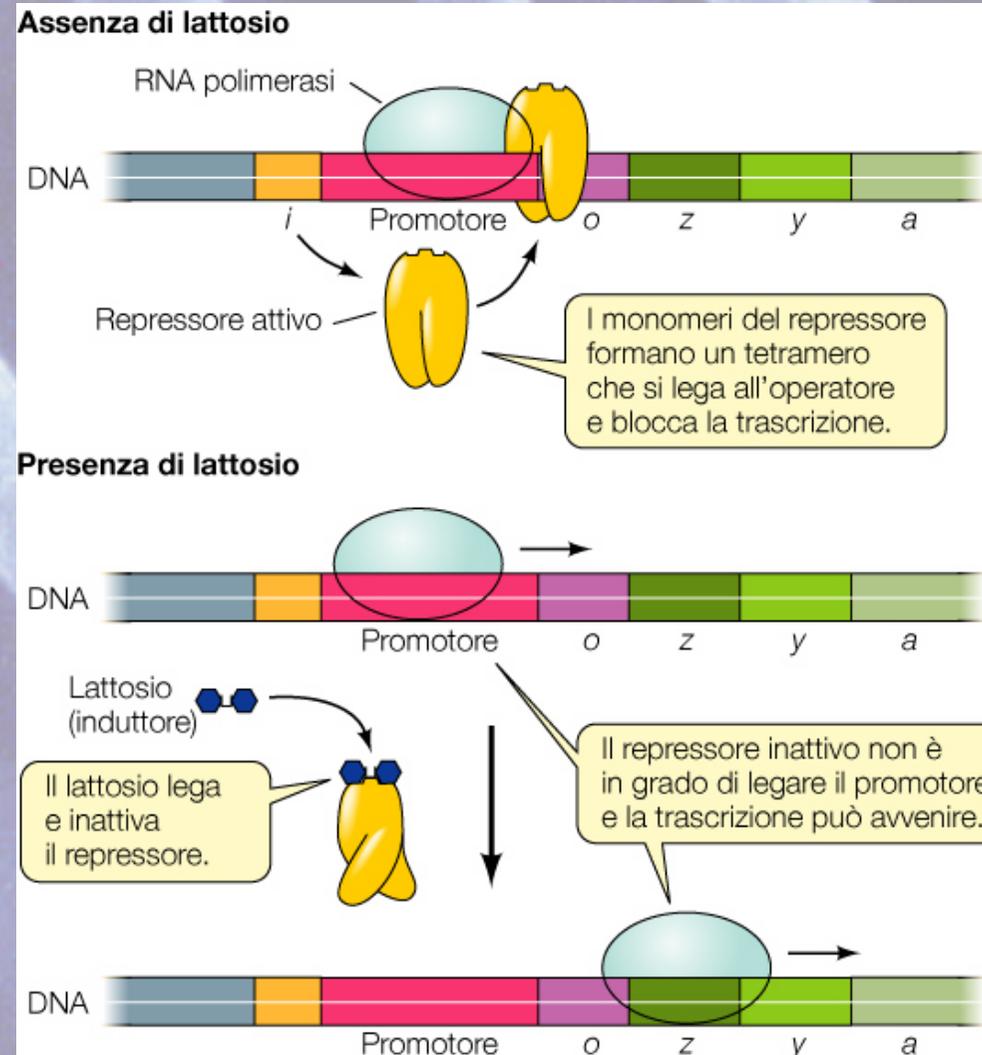
In presenza di lattosio:

- parte del lattosio entra nella cellula e si trasforma in allolattosio (induttore);
- l'allolattosio si lega alla proteina repressore, alterandone la conformazione in modo che non possa più legarsi al sito operatore.
- l'RNA polimerasi trascrive i geni strutturali in mRNA, che viene tradotto negli enzimi corrispondenti.

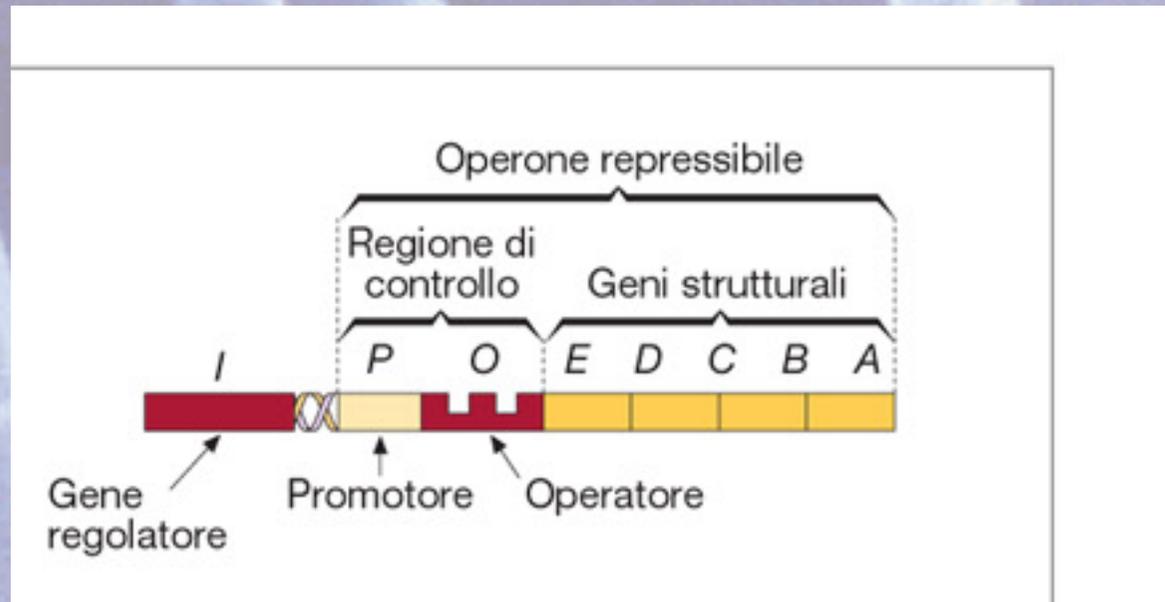


La presenza di lattosio induce la produzione degli enzimi strutturali: **l'operone *lac* è un operone inducibile**

Regolazione dell'operone lac



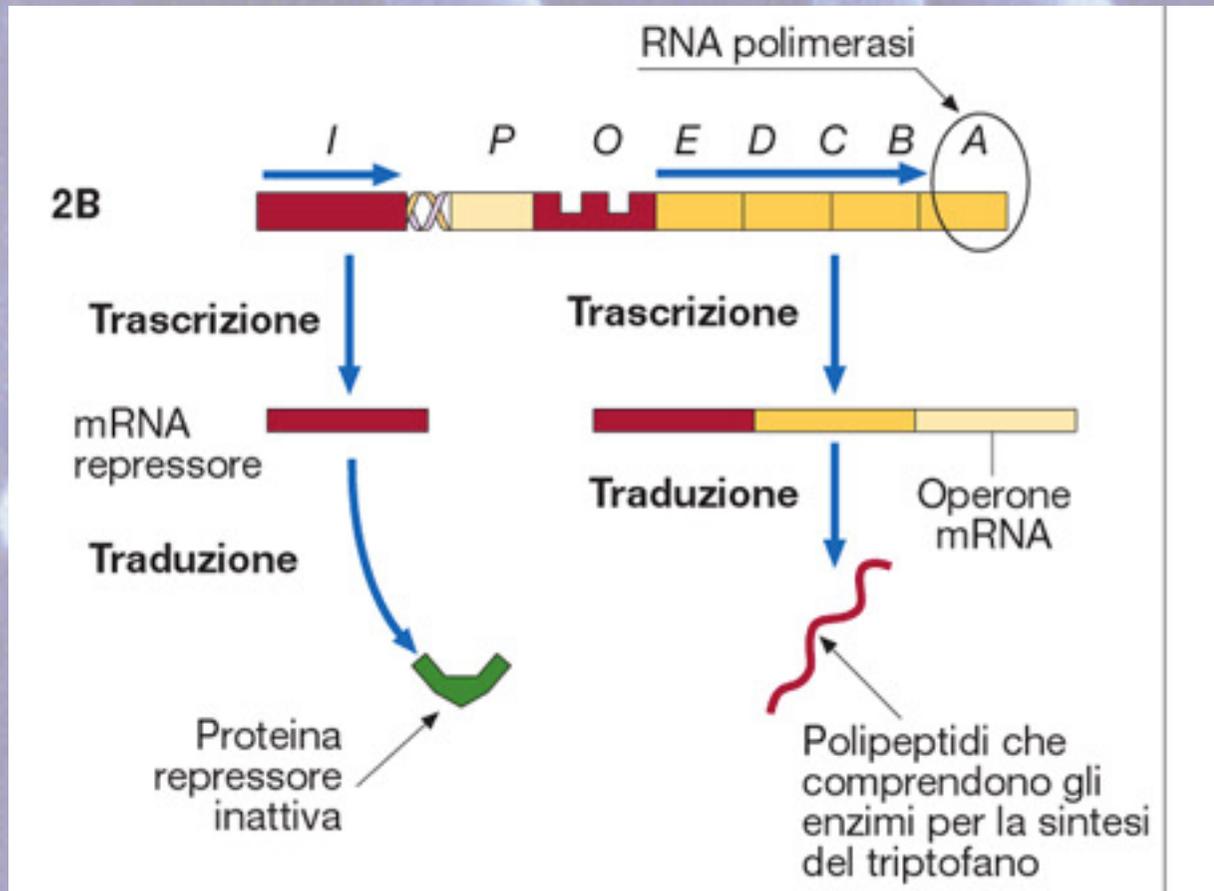
L'operone triptofano:
un esempio di
operone repressibile



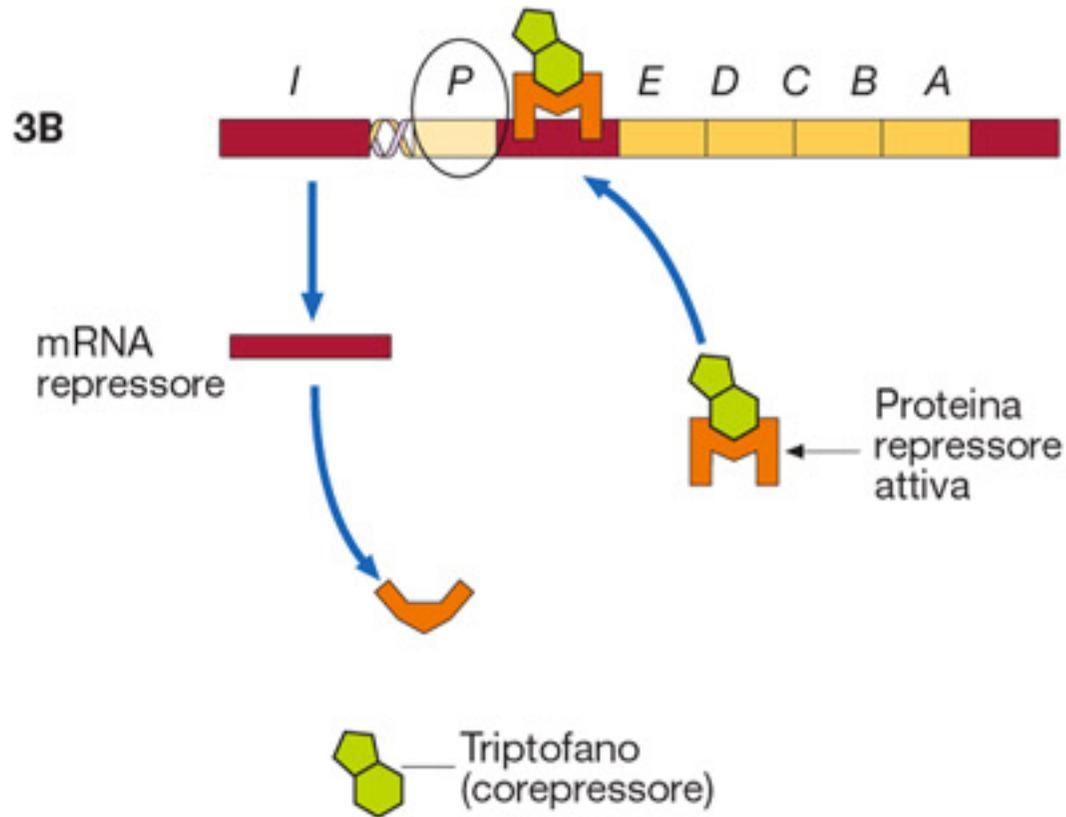
I geni strutturali sono trascritti finchè non sono repressi.

I geni per gli enzimi coinvolti nella sintesi del triptofano sono regolati con un meccanismo di repressione:

- I geni strutturali sono trascritti e tradotti determinando la sintesi del triptofano

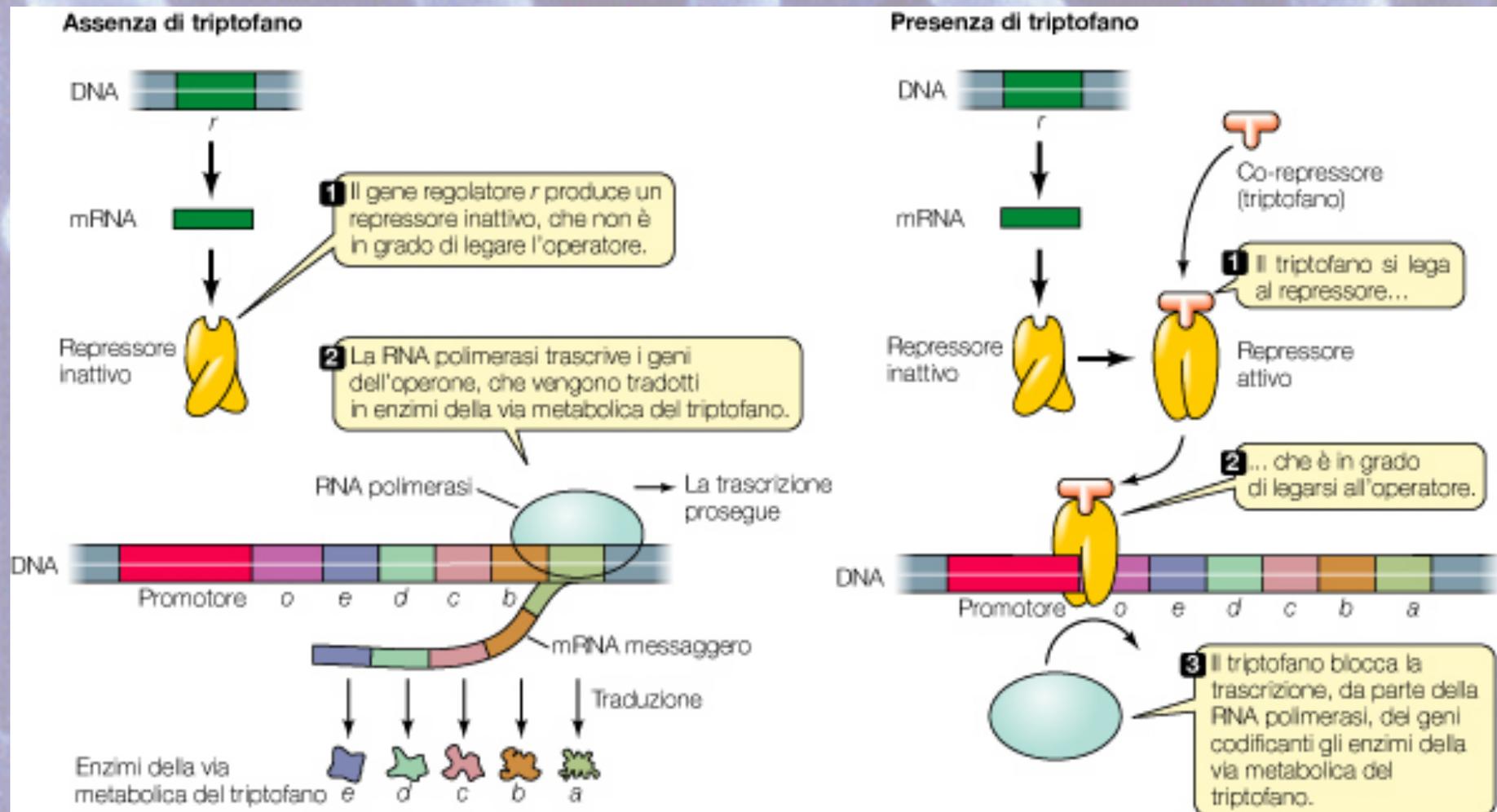


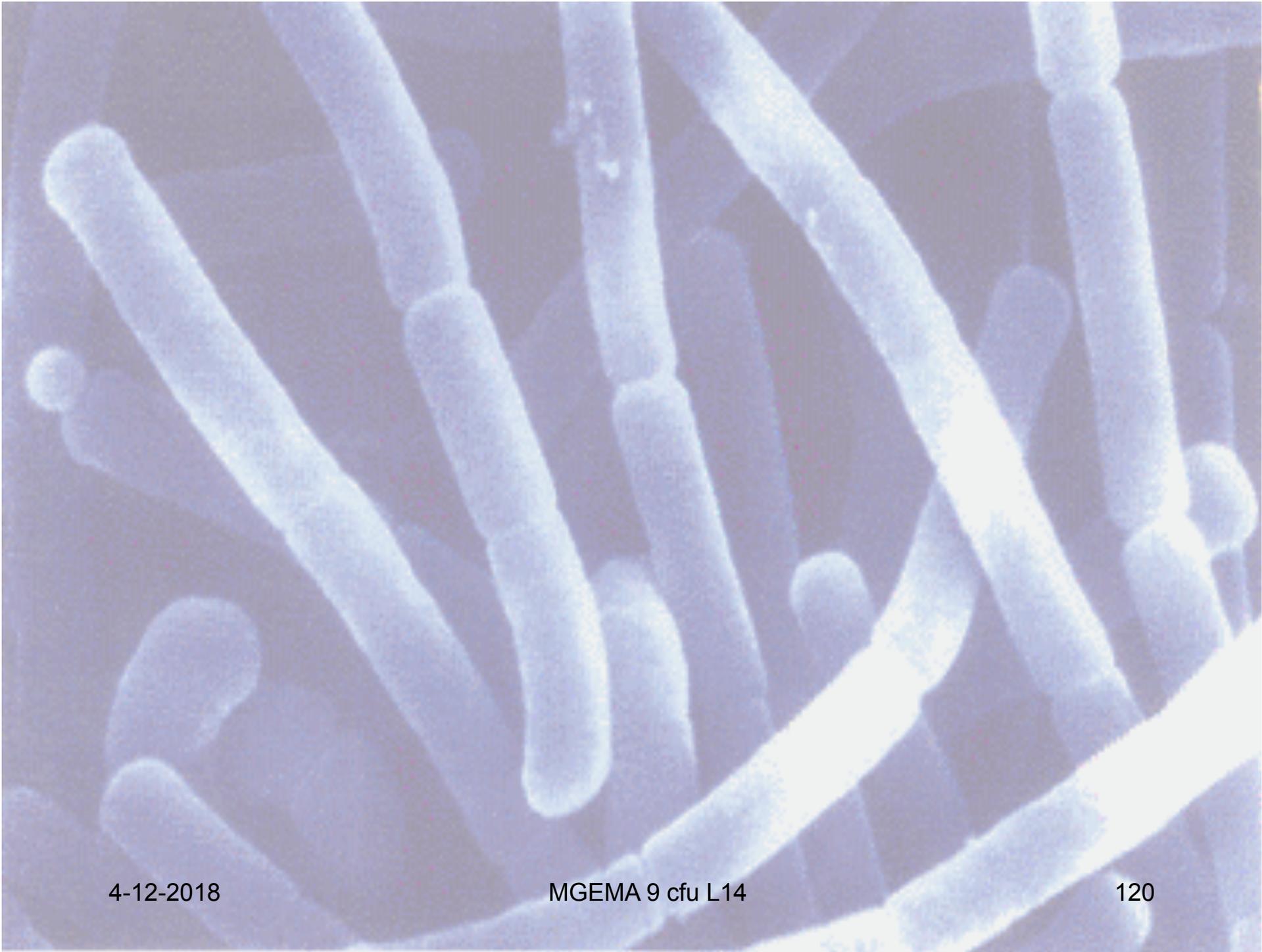
Il repressore è inattivo: la trascrizione e la traduzione procedono portando la sintesi di triptofano



Quando si produce un eccesso di triptofano, il triptofano agisce da corepressore legandosi alla proteina repressore
 La proteina repressore si lega all'operatore bloccando la sintesi dell'aminoacido

Regolazione dell'operone trp





4-12-2018

MGEMA 9 cfu L14

120