

# *Microbiologia molecolare e genomica microbica*

*Docenti Bianca Colonna*

*Alessandra Carattoli*

**Quando? Martedì e giovedì 16.00-18.00**

**Dove? Aula Franco Tatò in Via dei Sardi 70 (San Lorenzo)**

**Iscriversi sulla pagina e-learning del Corso**

Giovedì 12 ottobre Prof.ssa Alessandra Carattoli che proseguirà poi le lezioni nei seguenti giorni

Mercoledì 18 Ottobre in quanto Martedì 17 non abbiamo disponibilità dell'Aula x le Lauree

Giovedì 19 Ottobre etc

Attenzione lezione di Martedì 17 spostata a Mercoledì 18

## Modalità d'esame

Per gli studenti e studentesse che hanno seguito con assiduità il corso è previsto l'esame tramite tesina individuale su un argomento correlato a quanto svolto a lezione -a libera scelta dello studente ma concordato almeno 15 giorni prima con il docente .

Gli articoli dovranno essere scelti dallo studente con molta cura e facendo riferimento a lavori comparsi su giornali prestigiosi e recenti

Le tesine saranno esposte agli altri durante le reverse lessons previste a fine corso ( 15-20 dicembre o 10-15 gennaio)

# STRUTTURA DEL CORSO

- Organizzazione del genoma: concetto di cromosoma e di plasmide
- Meccanismi di evoluzione: trasferimento genico orizzontale e perdita di materiale genetico. Il genoma minimo e genomi sintetici Tecniche di identificazione molecolare dei batteri
- Origine ed evoluzione del genoma di batteri patogeni modello: *Shigella*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella*
- Genoma dei batteri delle profondità marine
  
- Microbioma intestinale: analisi genomica e metagenomica
- Microbioma della pelle
  
- regolazione genica nei batteri ( Piccoli RNA e TCS )
- Organizzazione del nucleotide e proteine
- L'immunità nei batteri, le sequenze CRISPR , i Retroni
- Epigenetica nei batteri
- Emergenza dei persister

Nuove strategie antibatteriche: farmaci mirati e terapia fagica  
Biologia sintetica : concetti di base e potenziali applicazioni

# Programma indicativo delle lezioni

OTTOBRE. Introduzione , genomi a cromosoma multiplo	Bianca Colonna
Tecniche cellulari/ molecolari per identificazione batteri	Alessandra Carattoli
Organizzazione del nucleotide	Bianca Colonna
Epigenetica nei batteri	Bianca Colonna
Persisters	Bianca Colonna
CRISPR-CAS Phage therapy	Bianca Colonna
Nuovi approcci di mutagenesi genomica	Martina Pasqua
Organizzazione genoma procarioti	Alessandra Carattoli
NOVEMBRE. Resistoma	Alessandra Carattoli
Plasmidi ,fagi , isole di patogenicità e trasferimento genico orizzontale	Alessandra Carattoli
Sistemi di trasduzione del segnale	Marco Coluccia
Tecniche di epidemiologia molecolare	Alessandra Carattoli
Evoluzione di Shigella	Bianca Colonna
Genomi dei batteri delle profondità marine	Costantino Vetriani (Rutgers,US)
Microbioma intestinale	Federica Del Chierico
Microbioma della pelle	Enea di Domenico
DICEMBRE Biologia sintetica	Giordano Rampioni
Farmaci antiviruenza	Giordano Rampioni
Evoluzione dei genomi di Peste e Colera	Bianca Colonna
Evoluzione di Klebsiella	Alessandra Carattoli
Reverse lessons	studenti
GENNAIO Reverse lessons	studenti
Reverse lessons	studenti
	studenti

Mondo microbico è il prodotto di 3.7 miliardi di anni di evoluzione

I microrganismi hanno quindi esplorato :

- 
- Una moltitudine di nicchie ecologiche
  - tutte le varie combinazioni di condizioni climatiche

•ENORME SFRUTTAMENTO DELLE CAPACITA' BIOCHIMICHE DI UNA CELLULA

•ENORME DIVERSITA' DI SEQUENZA

Una delle maggiori differenze con gli eucarioti è costituita dalla

**DIVERSITA' DELLA SEQUENZA PER LA STESSA FUNZIONE GENICA**

E' proprio questa **diversità di sequenza** che fornisce diverse proprietà

- **cinetica**
- **regolazione**
- **stabilità delle macromolecole ( proteine, enzimi etc) che sono importanti per lo sfruttamento globale degli elementi della terra**

# Quante specie di procarioti ci sono?

Per gli animali e le piante viene considerata una specie una popolazione di individui che può riprodursi dando origine ad individui riproducibili

I batteri sono aploidi e si riproducono asessualmente .  
Come si definisce quindi una specie?

## Concetto di specie nei procarioti:

- due ceppi appartengono alla stessa specie quando la percentuale di ibridazione DNA-DNA è uguale o superiore al 70%
- due ceppi appartengono alla stessa specie quando le sequenze di RNA 16S hanno un omologia del 97% (meno del 3% di divergenza)

Specie ---Generi---Famiglie---Ordini---Classi---Phyla---- Dominio

Batteri Archea Eucarioti

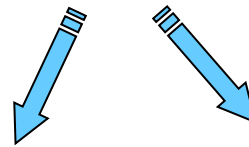
# La gran parte del mondo microbico rimane **NON COLTIVABILE**

Tramite l'estrazione e l'analisi del DNA dall'ambiente ci si è resi conto che questo mondo è molto più ampio di quanto si potesse pensare:

Phyla da 12 ( 1987)



29



Identificati  
prevalentemente tra gli  
Archea negli ambienti  
estremi

10 presenti solo come  
SSU rRNA



# Quante specie ci sono? Qualche numero.....molto provvisorio

Bergey's, Manual 2005

	Batteri	Archea	Totale
Dominio	1	1	2
Phyla	25	4	29
Classe	34	9	43
Ordine	78	13	91
Famiglie	230	23	243
Genere	1227( 871 )	79(69)	1306(941)
Specie	6740(5007)	217(289)	7029(5224)

\* si sono identificati oltre 15 nuova Phyla tramite sequenziamento batteri NON COLTIVABILI

Soltanto una piccola frazione della comunità microbica coltivabile  
0.5-1 %

Possono esserci

- in un campione di suolo fino a  $8 \times 10^3$  specie diverse
- in un campione d'acqua fino a  $8 \times 10^2$  specie diverse

Tenendo conto dei parametri di associazione tra comunità diverse del suolo si calcola vi possano essere  $10^9$  specie di procarioti nel suolo

La differenza nel numero di specie tra suolo ed acqua può essere spiegata:

- alta diversità delle risorse del suolo
- isolamento della specie che ne riduce la competizione

# LIMITI dell'identificazione di microrganismi non COLTIVABILI

le conoscenze rimangono limitate alla sequenza ma sulla fisiologia , biochimica regolazione ?????

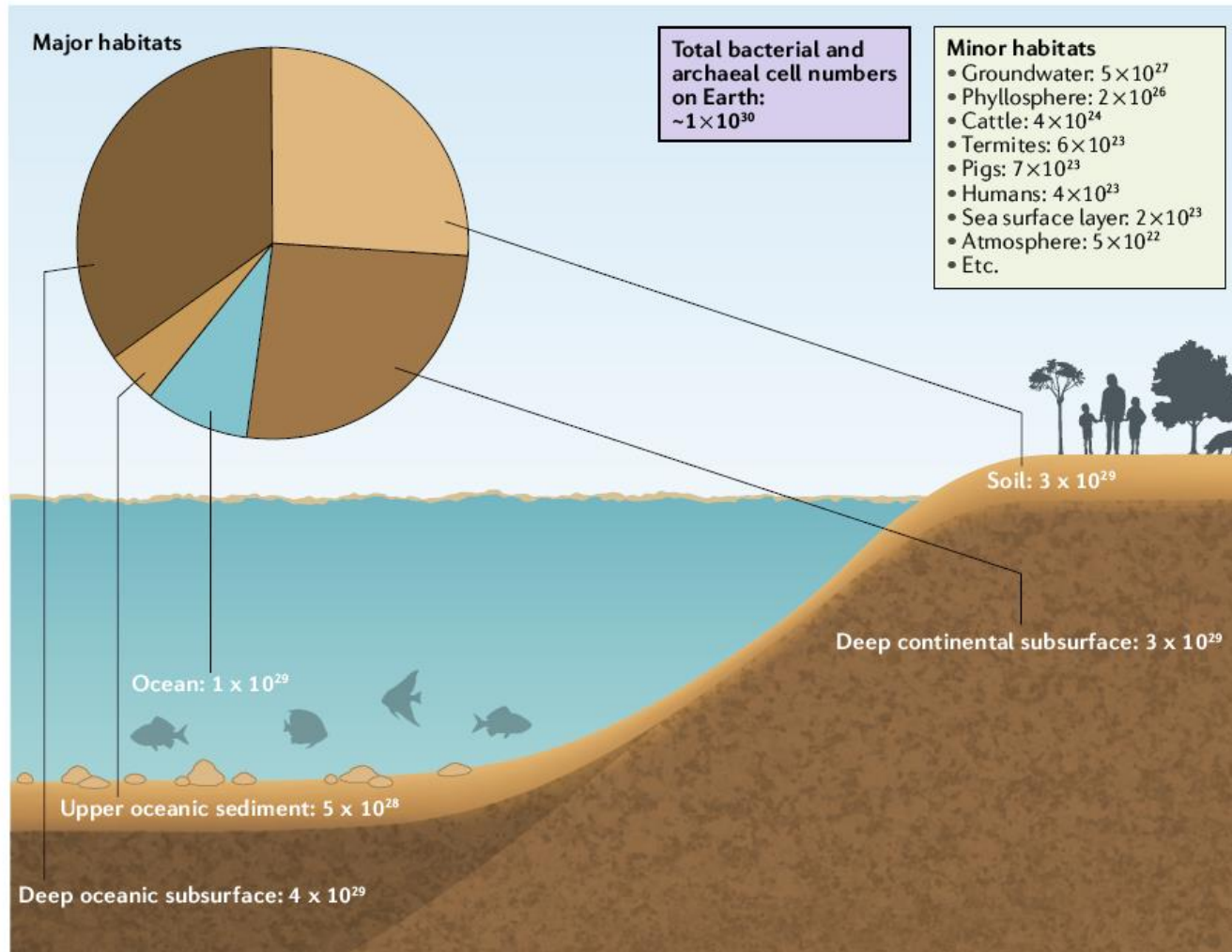
POSSIAMO grazie alla sequenza possiamo sapere

- quali geni siano dominanti in un certo ambiente
- quali specie siano predominanti
- progettare degli strumenti idonei allo studio dei microrganismi non coltivabili

# I «Big Five» Habitats: per un totale di $10^{30}$ cellule procariotiche

## 3 habitat marini

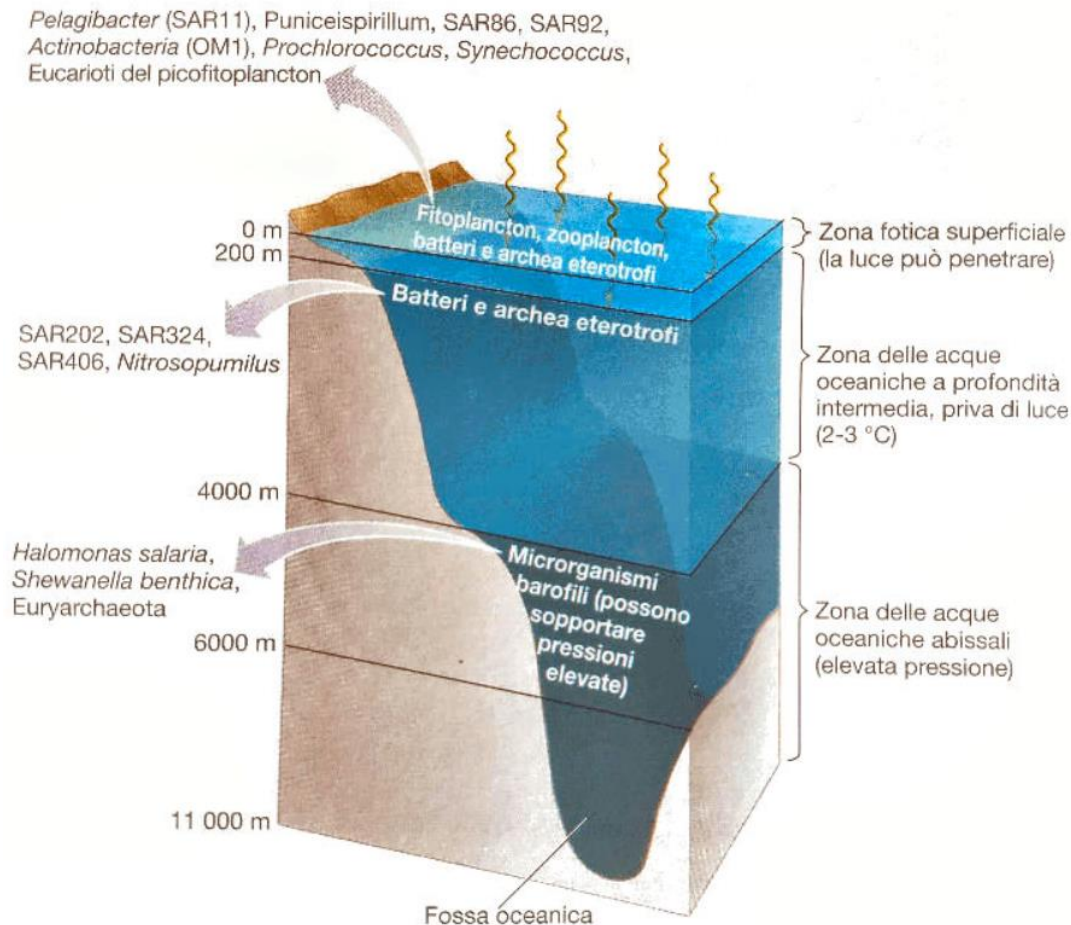
1. Oceani
2. Sedimenti oceanici superiori
3. Sottosuolo oceanico profondo.



## 2 habitat terrestri

1. Suolo
2. Sottosuolo continentale profondo.

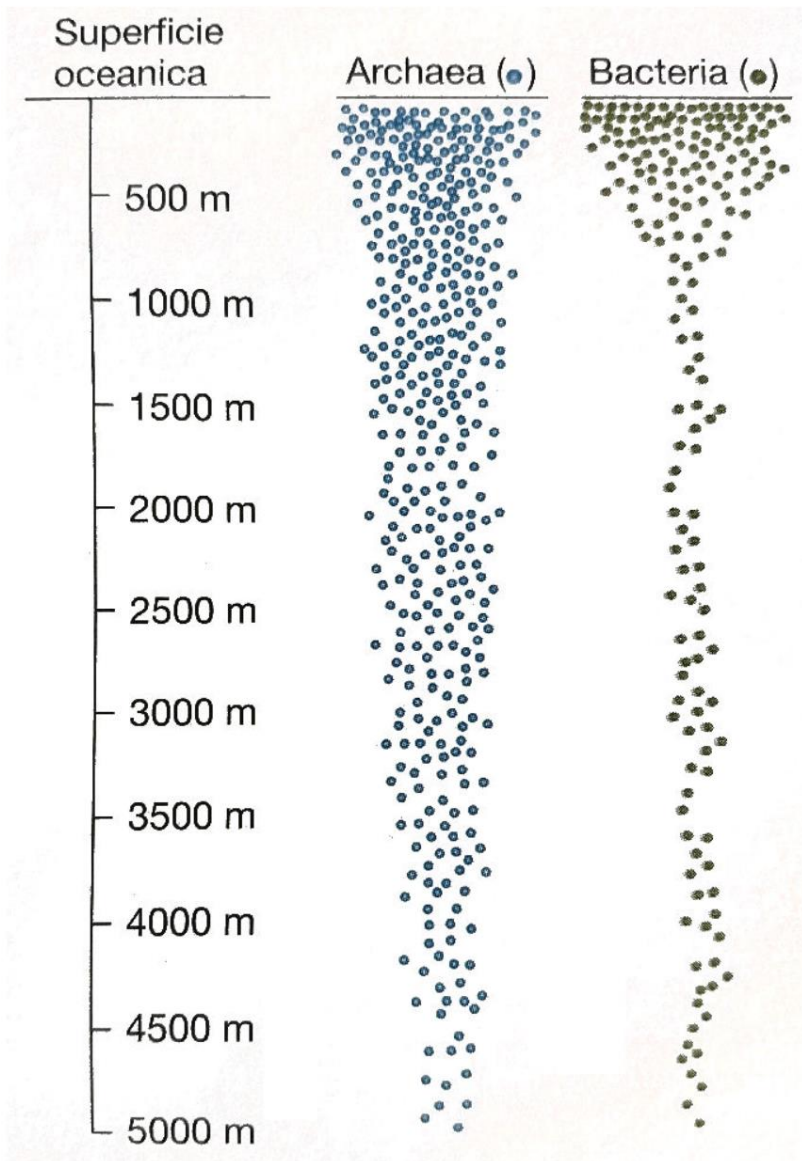
Sottosuolo oceanico profondo + sottosuolo continentale profondo nel loro insieme contengono 60% dei Batteri/Archea presenti sulla Terra



Le acque oceaniche possono essere suddivise in base alla profondità. Ogni zona è caratterizzata da particolari condizioni di luce pressione e temperatura.

Dal sequenziamento del DNA estratto da campioni di acqua è stato possibile individuare la distribuzione dei microrganismi nelle diverse zone.

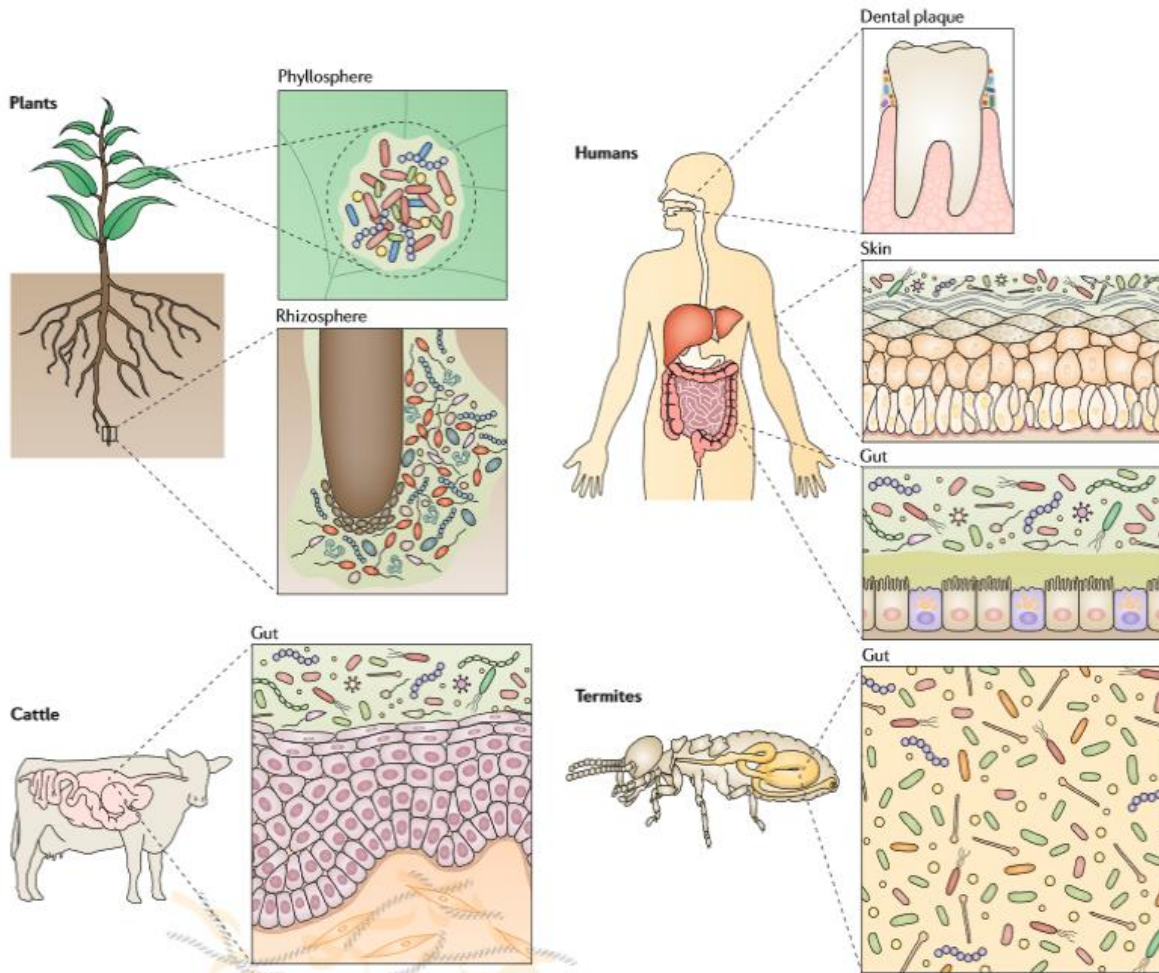
La maggior parte di questi batteri non è coltivabile per cui la loro fisiologia ed il loro ruolo rimane sconosciuto



Abbondanza relativa di Batteri e Archea nelle acque oceaniche.

L'analisi della sequenza del DNA ottenuta da campioni raccolti nelle profondità oceaniche ha messo in evidenza come l'abbondanza degli Archea aumenti con la profondità. Nell'insieme negli oceani gli Archea a ( $3.1 \times 10^{28}$ ) potrebbero essere più numerosi dei Batteri ( $1.3 \times 10^{28}$ )

# Gli Habitat minori: piante, uomo, animali, insetti



Piante :  $2 \times 10^{26}$   
 Uomo:  $4 \times 10^{23}$   
 Bestiame :  $4 \times 10^{24}$   
 Termiti:  $6 \times 10^{23}$

Fig. 4 | Biofilms in eukaryotic habitats. Plant leaves, humans, cattle and termites are colonized by microorganisms. These host-associated communities, ranging from the phyllosphere and rhizosphere to the gut microbiota, exhibit many of the key biofilm characteristics (BOX 2).

**Soil** is the major reservoir of organic carbon and an important habitat for prokaryotes. Many studies indicate that the total number of microbes is less in forest soils than in others; curiously the number of prokaryotes in Negev desert soil is comparable to the number in cultivated soil.

Table 2. Number of prokaryotes in soil

Ecosystem type*	Area, $\times 10^{12} \text{ m}^2$	No. of cells, <sup>†</sup> $\times 10^{27} \text{ m}^3 \text{ of soil, } 1,3 \times 10^6 \text{ g}$
Tropical rain forest	17.0	1.0
Tropical seasonal forest	7.5	0.5
Temperate evergreen forest	5.0	0.3
Temperate deciduous forest	7.0	0.4
Boreal forest	12.0	0.6
Woodland and shrubland	8.0	28.1
Savanna	15.0	52.7
Temperate grassland	9.0	31.6
Desert scrub	18.0	63.2
Cultivated land	14.0	49.1
Tundra and alpine	8.0	20.8
Swamps and marsh	2.0	7.3
Total	123.0	255.6

\*From ref. 73.

<sup>†</sup>For forest soils, the number of prokaryotes in the top 1 m was  $4 \times 10^7$  cells per gram of soil, and in 1–8 m, it was  $10^6$  cells per gram of soil (16). For other soils, the number of prokaryotes in the top 1 m was  $2 \times 10^9$  cells per gram of soil, and in 1–8 m, it was  $10^8$  cells per gram of soil (18). The boreal forest and tundra and alpine soils were only 1 m deep. A cubic meter of soil was taken as  $1.3 \times 10^6$  g.



## Gli orologi evolutivi

Alcuni **geni** ed alcune **proteine** possono servire come **orologi evolutivi** ovvero come misura dei cambiamenti che sono avvenuti nel corso dell'evoluzione

Le differenze di sequenza nucleotidica o aminoacidica di macromolecole simili da un punto di vista funzionale (quindi omologhe) ci possono indicare la distanza evolutiva

.

## Criteri per la scelta di una molecola ideale come orologio evolutivo

deve essere distribuita universalmente nel gruppo in esame

- deve essere funzionalmente omologa
- deve contenere regioni di sequenza conservate
- non deve aver subito troppi cambiamenti di sequenza

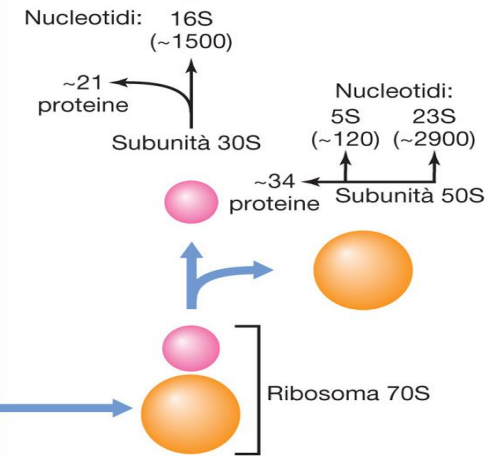
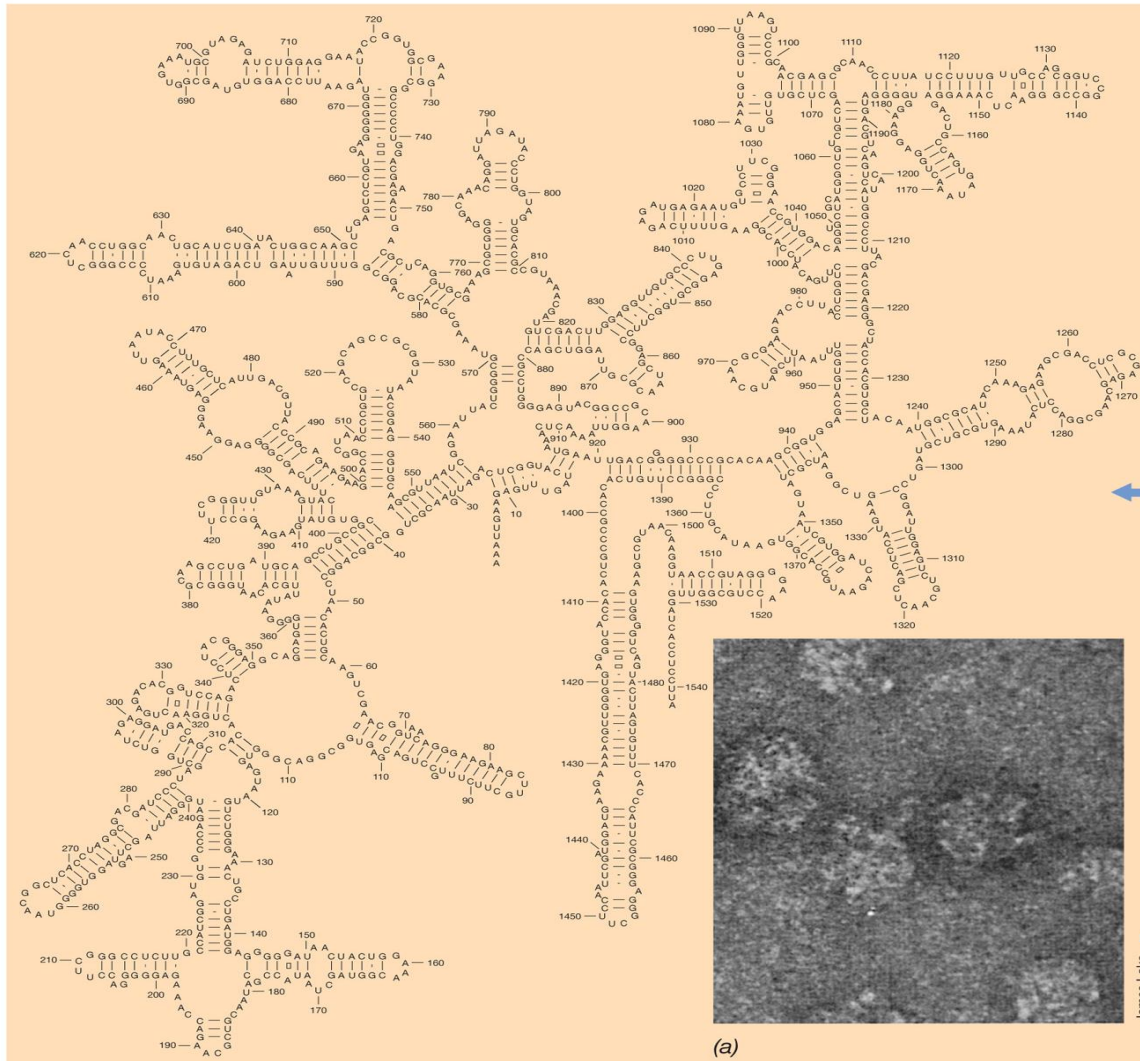
### I migliori candidati:

**RNA ribosomiale** (componenti chiave del processo di traduzione)

•  
**Le proteine con attività ATPasi** (i componenti enzimatici che idrolizzano ATP)

•  
**RecA** (la proteina chiave della ricombinazione)

# Ribosomal Database Project (RDP) contiene oltre 100.000 sequenze di rRNA <http://rdp.cme.msu.edu/>



(c)

(a)

(b)

# RNA ribosomiale come orologio evolutivo

- eccellente orologio evolutivo
- molecole relativamente grandi
- dotate della medesima funzione
- presenti in tutti gli organismi
- contengono regioni nucleotidiche ben conservate

Esistono 3 molecole di RNA ribosomiale

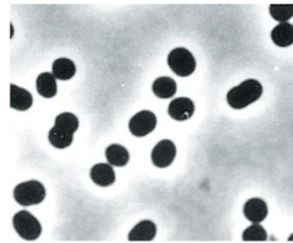
**5S 16S e 23S**

RNA 16 S è stato molto utilizzato negli studi di filogenesi nei procarioti  
RNA 18S negli Eucarioti

SSU : dato che entrambe le molecole fanno parte della subunità piccola del ribosoma ( 30S o40S) per SSU si intende sequenziamento della Small Subunit

# Quali sono le principali tecniche molecolari per l'identificazione dei microrganismi?

## Sequenziamento dell'RNA ribosomiale subunità 16 S (SSU RNA)



Gene dell'rRNA 16S



1. Isolare il DNA

2. Scaldare per separare i filamenti e aggiungere primer specifici

3. Estensione dei primer con la DNA polimerasi

4. Ripetere i precedenti passaggi per ottenere molte copie del gene dell'rRNA 16S

5. Separare su un gel di agarosio e controllare la corretta grandezza del prodotto

6. Purificare il prodotto della PCR

# Albero filogenetico basato sulle distanze evolutive tra sequenze di RNA ribosomiale SSU

Organismo	Sequenza	Analisi
A	C G U A G A C C U G A C	Per A → B, esistono tre differenze su un totale di dodici; quindi $\frac{3}{12} = 0,25$
B	C C U A G A G C U G G C	
C	C C A A G A C G U G G C	
D	G C U A G A U G U G C C	

(a) Allineamento e analisi della sequenza

Due algoritmi ampiamente utilizzati sono

- distanza
- parsimonia

	Distanza evolutiva	Distanza evolutiva corretta
$E_D$	A → B 0,25	0,30
$E_D$	A → C 0,33	0,44
$E_D$	A → D 0,42	0,61
$E_D$	B → C 0,25	0,30
$E_D$	B → D 0,33	0,44
$E_D$	C → D 0,33	0,44

(b) Calcolo della distanza evolutiva

# Distanza evolutiva ( $E_D$ )

Si calcola la distanza evolutiva sulla base delle differenze presenti per ogni singolo nucleotide una volta che le sequenze sono state allineate

- la  $E_D$  rappresenta quindi la percentuale di nucleotidi non omologhi tra gli RNA di una qualsiasi coppia  
Si può quindi costruire una matrice di distanza che mostra le ED tra tutte le coppie di nucleotidi presenti
- la  $E_D$  viene poi modificata in base ad un fattore di correzione che tiene conto dei cambiamenti multipli che possono essere avvenuti ad ogni sito. Si applica una correzione statistica che tiene conto delle retromutazioni che riconducono al genotipo originale sia di altre mutazioni che possono essere avvenute nello stesso sito.

## PARSIMONIA :

altro algoritmo importante per l'analisi filogenetica

Gli alberi evolutivi sono generati sulla base dell'assunzione che

la **DIVERGENZA** tra due linee, a partire da un antenato comune, si sia prodotta in seguito alla **QUANTITA'** **MINIMA** di modificazioni necessarie.

Come il metodo della  $E_D$  anche questo richiede la somma del numero di differenze di sequenza in un particolare insieme di dati .

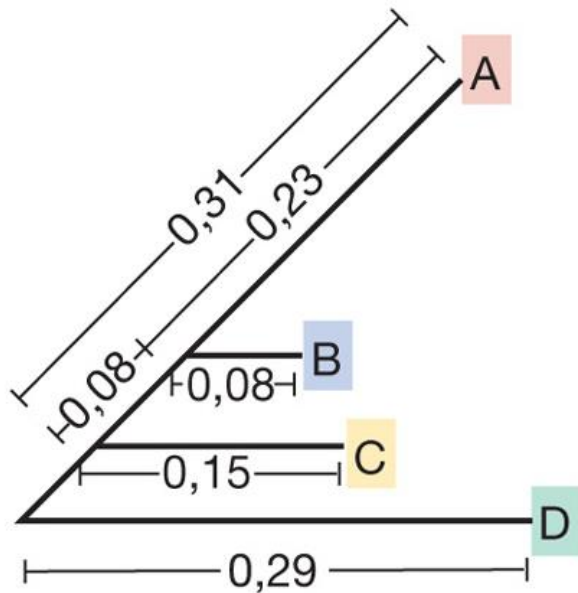
L'ordine di ramificazione degli alberi ottenuti secondo i due parametri può talvolta differire.



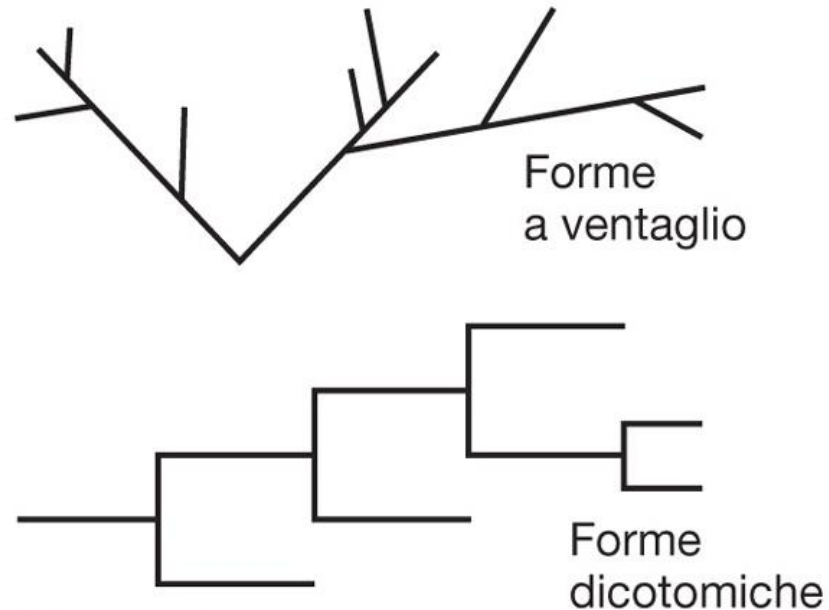
# Alberi filogenetici

Vengono generati sulla base della distanza evolutiva

- forme a ventaglio o forme dicotomiche



(c) Albero filogenetico

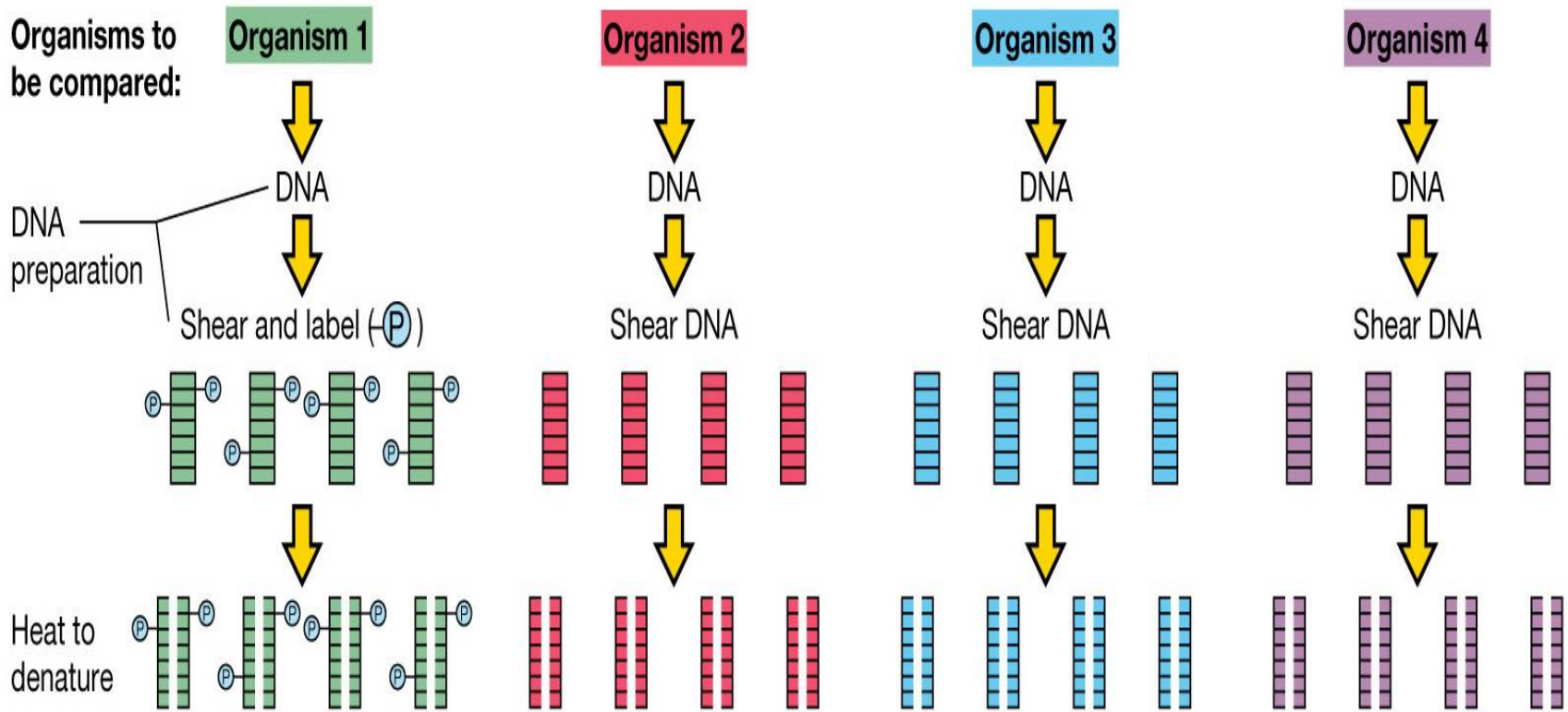


(d) Topologie dell'albero

In entrambi i formati la lunghezza totale dei rami che separano una coppia di organismi è proporzionale alla distanza evolutiva esistente tra essi

# Tecniche di ibridazione DNA-DNA per classificare le specie

L'ibridazione genomica misura il grado di omologia di sequenza ed è particolarmente utile per differenziare microrganismi correlati

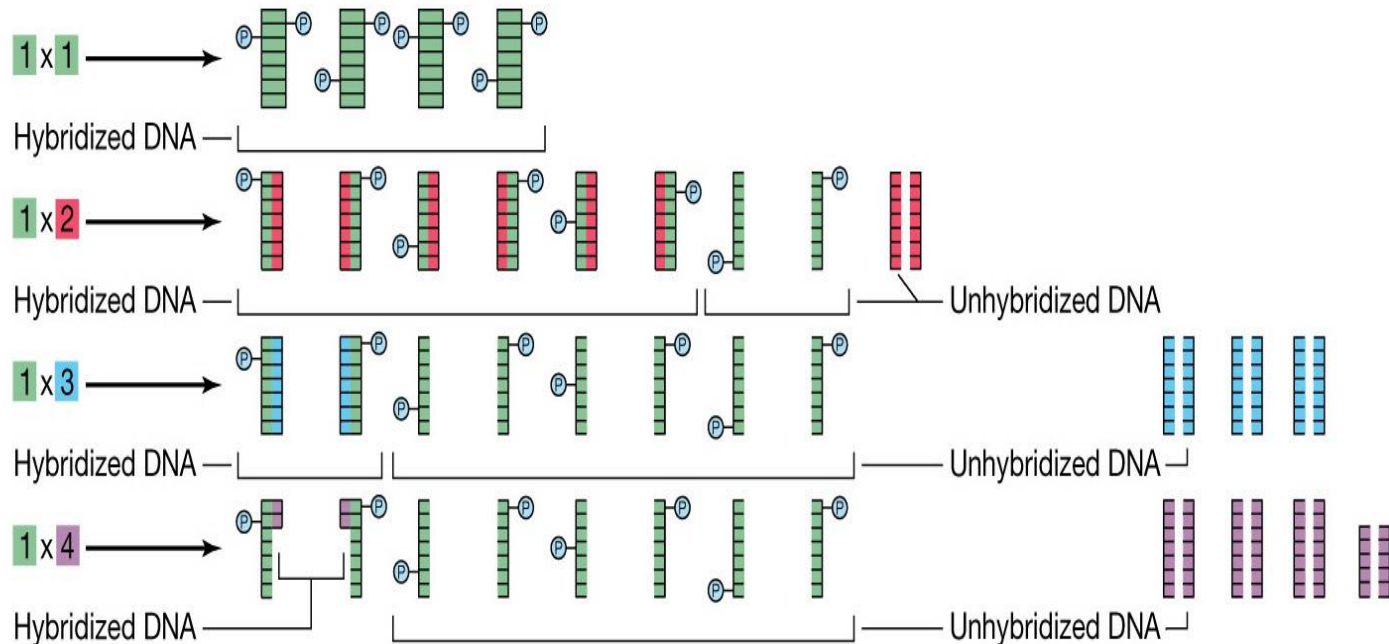


(a)

# La percentuale di DNA ibridizzato fornisce una stima dell'omologia tra le due specie

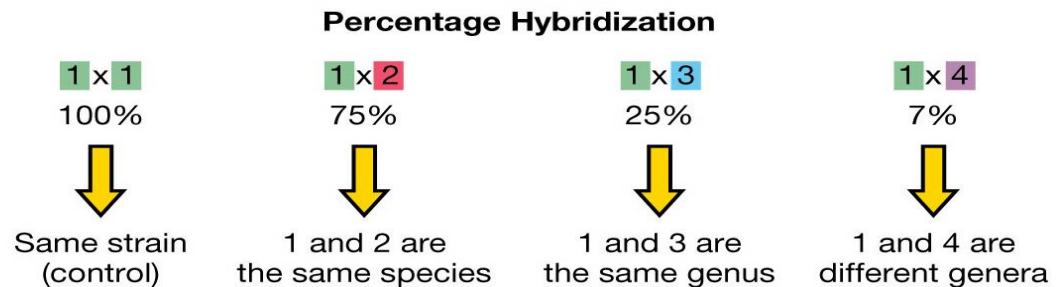
## Hybridization

**experiment:** Mix DNA from two organisms—unlabeled DNA is added in excess:



(b)

## Results and interpretation:



(c)

## Relazione tra diversi microrganismi ottenute utilizzando la tecnica del sequenziamento del SSU RNA e della ibridazione DNA-DNA

Punti nella box ARANCIONE= elevata omologia

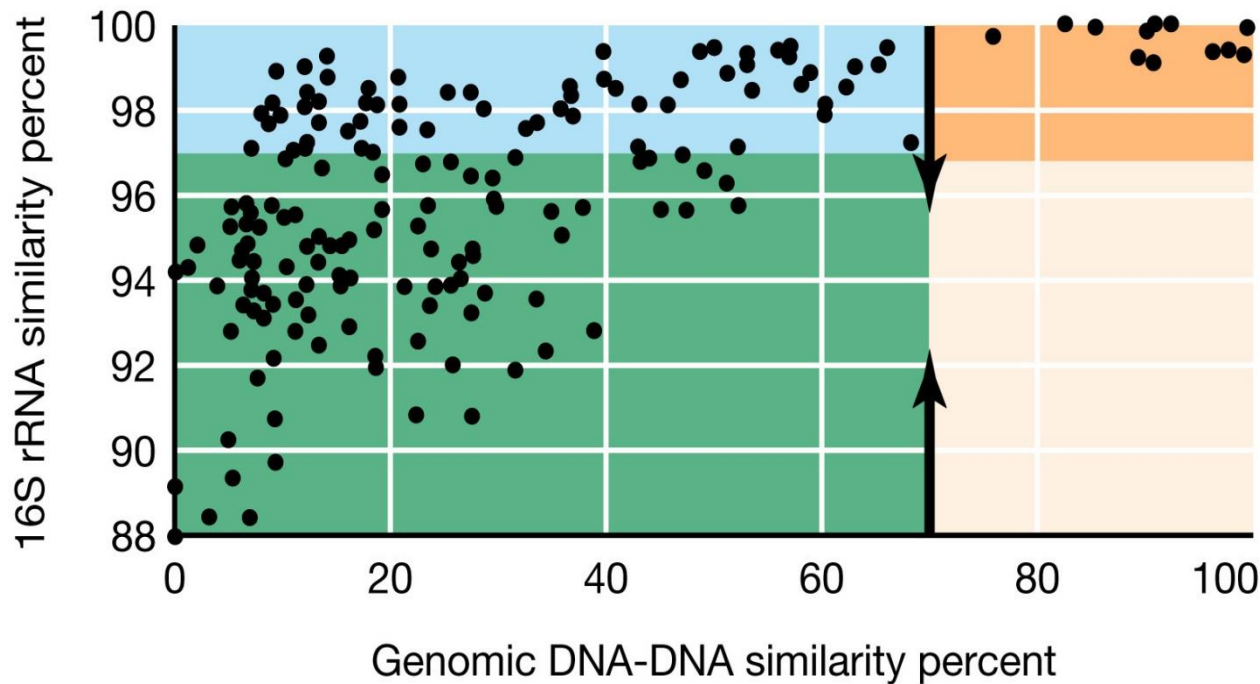
stessa specie

Punti nella box VERDE = bassa omologia

specie diverse

Punti nella Box AZZURRA = risultati contrastanti

specie diverse



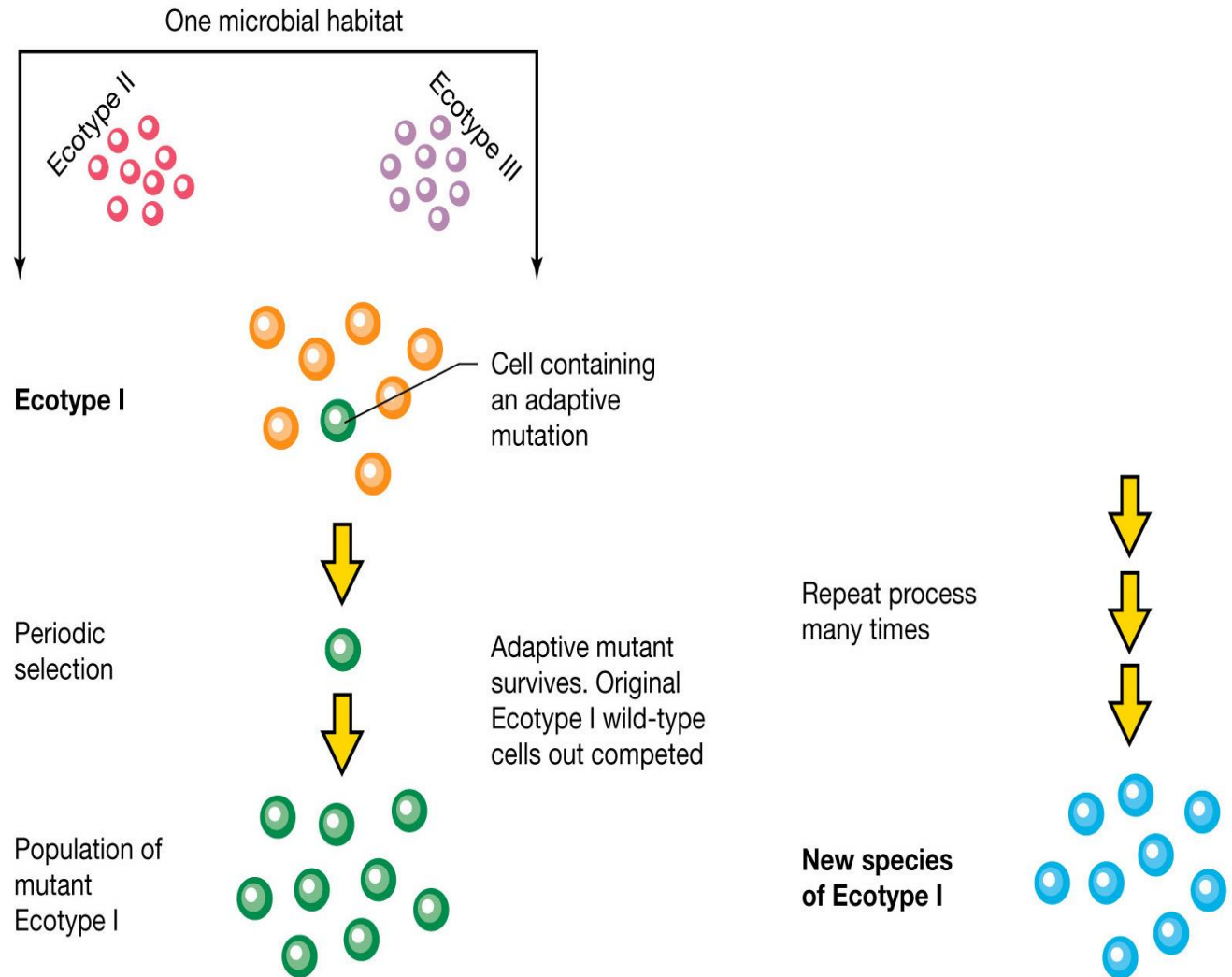
La tecnica di ibridazione DNA-DNA rimane una tecnica molto sensibile e riesce a rivelare differenze tra due specie anche quando non siano viste con la sequenza di RNA SSU ribosomale e con analisi fenotipiche

# Possibile meccanismo di speciazione nei batteri

Diversi ecotipi possono coesistere nella stessa nicchia

Se interviene una modificazione che conferisce un vantaggio selettivo questa popolazione prenderà il sopravvento sulla parentale

Se il processo si ripete più volte si originerà una popolazione geneticamente distinta



# Organizzazione del genoma nei procarioti

- *Escherichia coli* : dotato di un solo cromosoma circolare
- *Bacillus subtilis* : dotato di un solo cromosoma circolare

I due microrganismi maggiormente studiati da un punto di vista genetico e biochimico sembrano avere la stessa organizzazione del materiale genetico

Da qui la generalizzazione o "dogma" che il genoma batterico sia costituito da un singolo cromosoma circolare.

L'idea che i batteri potessero avere più di un cromosoma inizia a sorgere a meta degli anni '80

## I batteri possono avere più di un cromosoma?

*Rhodobacter sphaeroides*, un microrganismo

- appartenente al gruppo alfa dei Proteobatteri rossi e non sulfurei
- utilizzato come modello negli studi sulla struttura , regolazione e biofisica del processo di fotosintesi batterica
- ha un genoma costituito da 2 cromosomi CI (2.9 Mb) e CII (0.9 Mb) oltre a 5 plasmidi compresi tra 100 e 42 kb)

Perché CII è un cromosoma e non un grande plasmide ?

## PLASMIDE : metamorfosi di un nome

Il termine PLASMIDE fu coniato da Joshua Lederberg nel 1952 per identificare qualunque forma di elemento genetico extracromosomico stabilmente mantenuto

Non vi erano distinzioni tra elementi di origine procariotica o eucariotica

- mitocondri , cloroplasti particelle virali o fagiche

1970-1980 introduzione delle tecniche di clonaggio



Il termine PLASMIDE descrive piccoli elementi di DNA circolare

Questa definizione risulta ben presto limitata in quanto :

- alcuni plasmidi non sono piccoli (2-25 kb) ma grandi (25-200 kb)
- alcuni plasmidi sono lineari



Alcuni plasmidi sono più grandi di genomi  **MEGAPLASMIDI**

*Sinorhizobium meliloti* ha due megapalsmidi di 1.35 ( pSymBA) e 1.68 Mb(pSymB)

*Treponema pallidum* una spirocheta agente eziologico della sifilide ha un cromosoma di 1.1 Mb; *Mycoplasma genitalium* 0.58 Mb

La definizione STRUTTURALE ( i.e. dimensioni ) per differenziare plasmide e cromosoma non può essere valida

RICERCA di una definizione FUNZIONALE:

PLASMIDI codificano funzioni accessorie per la vita della cellula ( antibiotico resistenza, utilizzazione di substrati, detossificazione metalli pesanti)

pSymB codifica l'unico tRNA che riconosce la tripletta CCG in *Rhizobium*  
: è quindi un cromosoma?

## Definizione funzionale di CROMOSOMA:

- elemento cellulare che porta l'informazione ereditaria in forma di geni
- cromosoma è sempre indispensabile a differenza del plasmide che indispensabile solo in talune condizioni

Prima di distruggere il dogma dell'"unicità" del cromosoma batterico si è cercato di rimuovere i cromosomi aggiuntivi :

se si rimuove "curing"  
se non si rimuove

→ MEGAPLASMIDE  
→ CROMOSOMA



- : - contiene funzioni essenziali
- non ci sono tecniche efficaci di curing

GENI ESSENZIALI geni per gli RNA ribosomiali 1 su CI  
2 su CII

CAPIRE QUALI SIANO LE FUNZIONI CODIFICATE DA UN  
GRANDE ELEMENTO GENETICO

Definizione funzionale di CROMOSOMA si basa sulla presenza di uno o più geni essenziali in ogni condizione di crescita (???) - può il laboratorio riprodurre le condizioni di vita naturali?  
ma che cosa vuol dire GENE ESSENZIALE ?

È un concetto generale o variabile da specie a specie?

Per esempio quello che è essenziale per *E.coli* non lo è per *Micoplasma*  
capacità di sintetizzare nucleotidi essenziale per *E.coli*

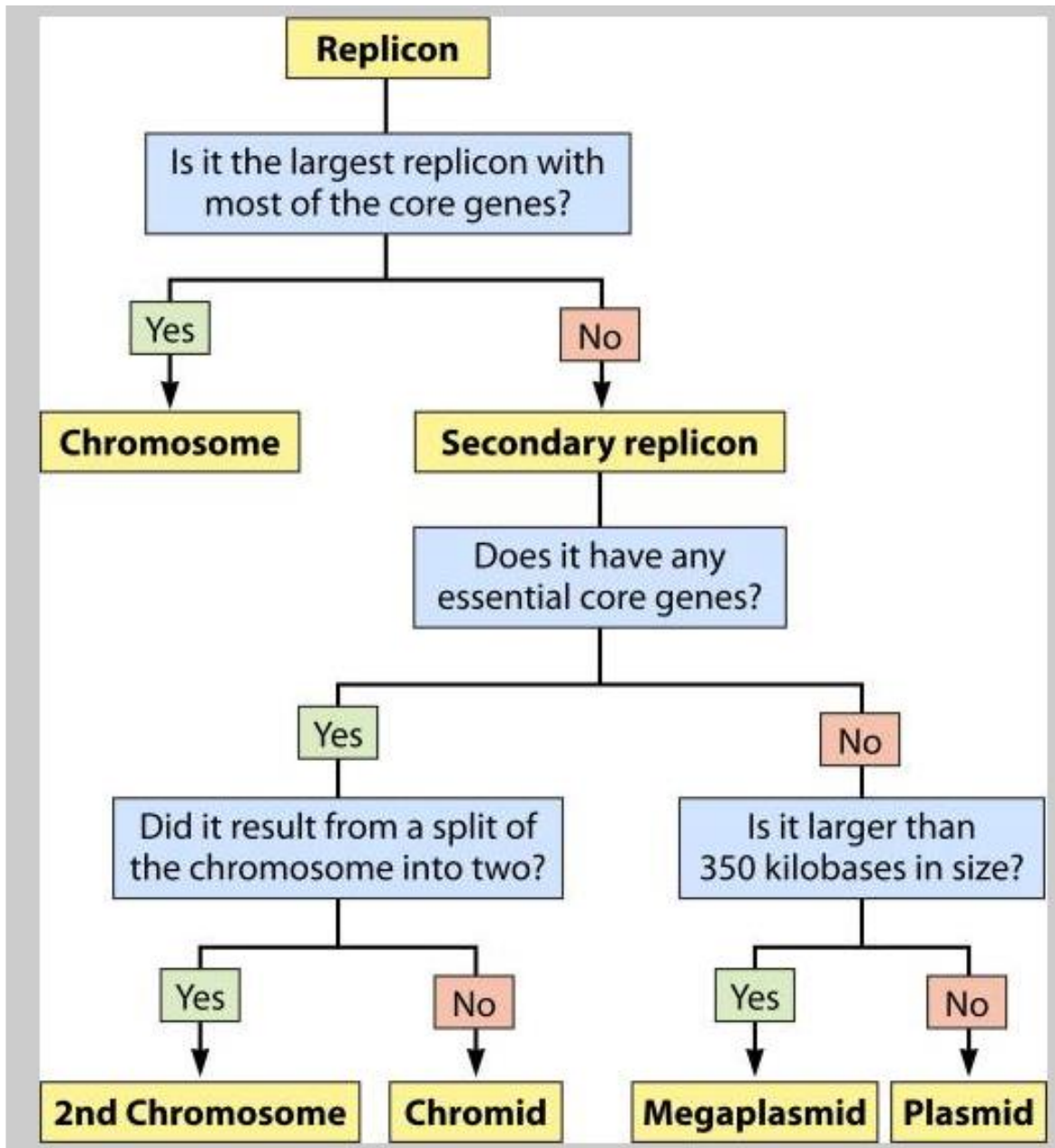
GENE ESSENZIALE è un gene che non può essere distrutto perché porterebbe a morte la cellula

geni RNA polimerasi o geni per le proteine ribosomiali

I geni per la biosintesi degli AA sono essenziali?

E se un gene codifica per una funzione la cui mancanza rende la cellula molto malata è un gene essenziale (i .e *recA* o *mutL*)?

SOLTANTO un a dettagliata conoscenza del "lifestyle" di un batterio può permetterci di definire quali siano i suoi geni essenziali



# MULTIPLE CHROMOSOME -LIKE REPLICONS

# MCLR

diffuso tra molti batteri specialmente Proteobatteri gruppo alfa  
identificato tramite PFGE nella gran parte dei casi  
solo con il sequenziamento in altri,

La presenza di geni per RNA 16S o di operoni *rrn* definisce

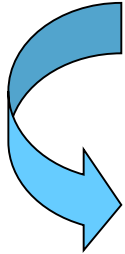
MCLR  CROMOSOMA

	N. Cromosomi	Dimensioni in Mb		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2	3	2	
<i>Brucella</i>	2	2.1	1.2	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	2	3.1	0.9	
<i>Burkholderia cepacia</i>	3	3.7	3.2	1.1
<i>Vibrio cholerae</i>	2 (1)	3	1	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	3.2	1.9	

### Some examples of bacterial genome organization

Bacteria	Chromosome(s)	Plasmid(s)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	one linear (2.1 Mb) + one circular (3.0 Mb)	two circular (450 + 200 Kb)
<i>Bacillus subtilis</i>	one circular (4.2 Mb)	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	one circular (5.7 Mb)	six (each >50 Kb)
<i>Borrelia</i>	one linear (0.91 Mb)	multiple circular + linear (5-200 Kb)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	one circular (8.7 Mb)	
<i>Brucella melitensis</i>	two circular (2.1 + 1.2 Mb)	
<i>Brucella suis</i> biovars 1, 2, 4	two circular (1.0 + 2.0 Mb)	
<i>Brucella suis</i> biovar 3	one circular (3.1 Mb)	
<i>Buchnera sp.</i> strain APS	one circular (640 Kb)	two circular (< 7.8 Kb each)
<i>Deinococcus radiodurans</i>	two circular (2.6 + 0.4 Mb)	two circular (177 + 45 Kb)
<i>Escherichia coli</i> K-12	one circular (4.6 Mb)	
<i>Leptospira interrogans</i>	two circular (4.7 + 0.35 Mb)	
<i>Paracoccus denitrificans</i>	three circular (2.0 + 1.1 + 0.64 Mb)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	single circular (6.3 Mb)	
<i>Rhizobacterium meliloti</i>	two circular (3.4 + 1.7 Mb)	one circular megaplasmid (1,400 Kb)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	two circular (3.0 + 0.3 Mb)	
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	one circular (0.75 Mb)	
<i>Vibrio cholerae</i>	two circular (2.9 + 1.1 Mb)	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	two circular (3.2 + 1.9 Mb)	
<i>Xylella fastidiosa</i>	one circular (2.7 Mb)	two circular (51 + 1.3 Kb)

## ORIGINE DEI CROMOSOMI MULTIPLI?



- 1 - Frazioni di un unico grande cromosoma
- 2 - Sono derivati da plasmidi per l'aggiunta di geni essenziali
- 3 - Catturati durante eventi di scambio genetico

1. *Brucella melitensis* possiede 2 cromosomi circolari  
CI di 2.1Mb e CII di 1.1 Mb.

Entrambi hanno origini di replicazione di tipo cromosomico ricche in AT  
3 operoni RNA ribosomiali 2 su CI e 1 su CII

Ipotesi : i due cromosomi potrebbero essersi originati da un singolo  
cromosoma ancestrale tramite ricombinazione degli operoni *rrn*

Esperimento in sostegno di quest'ipotesi: Suddividendo il cromosoma di  
*B.subtilis* in due cromosomi la cellula è vitale

## 2. Integrazione di geni cromosomici in un plasmide

L'analisi comparata del genoma di

*S.melitoti* (1 cromosoma circolare e due megaplastmidi)

e di *A.tumefaciens* (1 cromosoma circolare, 1 lineare e due megaplastmidi)


ha rivelato che le due specie sono strettamente correlate e si sono evolute recentemente da un progenitore comune.

- I cromosomi circolari mostrano omologia nell'ordine dei geni

- Il cromosoma lineare di *A.tumefaciens* ha un'origine di replicazione e le proteine di segregazione simili a quelle dei due megaplastmidi.

Ipotesi : il cromosoma lineare ( protocromosoma) si è evoluto da un plasmide ancestrale e si è poi diffuso in ceppi diversi.

Ipotesi 1 (o del frazionamento)  diffusione verticale

Ipotesi 2 ( origine plasmidica )  diffusione orizzontale.

Ipotesi 3. Cattura di un cromosoma da un'altra specie. Differenze sostanziali nel livello di contenuto in CG tra cromosomi non è ancora stata evidenziata

**Synorizobium melitoti**  
**Agrobacterium tumefaciens**



## SECONDO CROMOSOMA o CROMIDE?

# Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid

**Peter W. Harrison, Ryan P.J. Lower, Nayoung K.D. Kim and J. Peter W. Young**

Department of Biology, University of York, PO Box 373, York, YO10 5YW, UK

La discussione è ancora aperta : in questo lavoro (2010) si critica l'attribuzione del nome "secondo cromosoma" a dei repliconi che portano geni essenziali per la crescita ma contengono origini di replicazione simili a quelle dei plasmidi .

Infatti nessun secondo cromosoma ha un sistema di replicazione di tipo cromosomico ma usano una replicazione simile a quella dei grandi plasmidi.

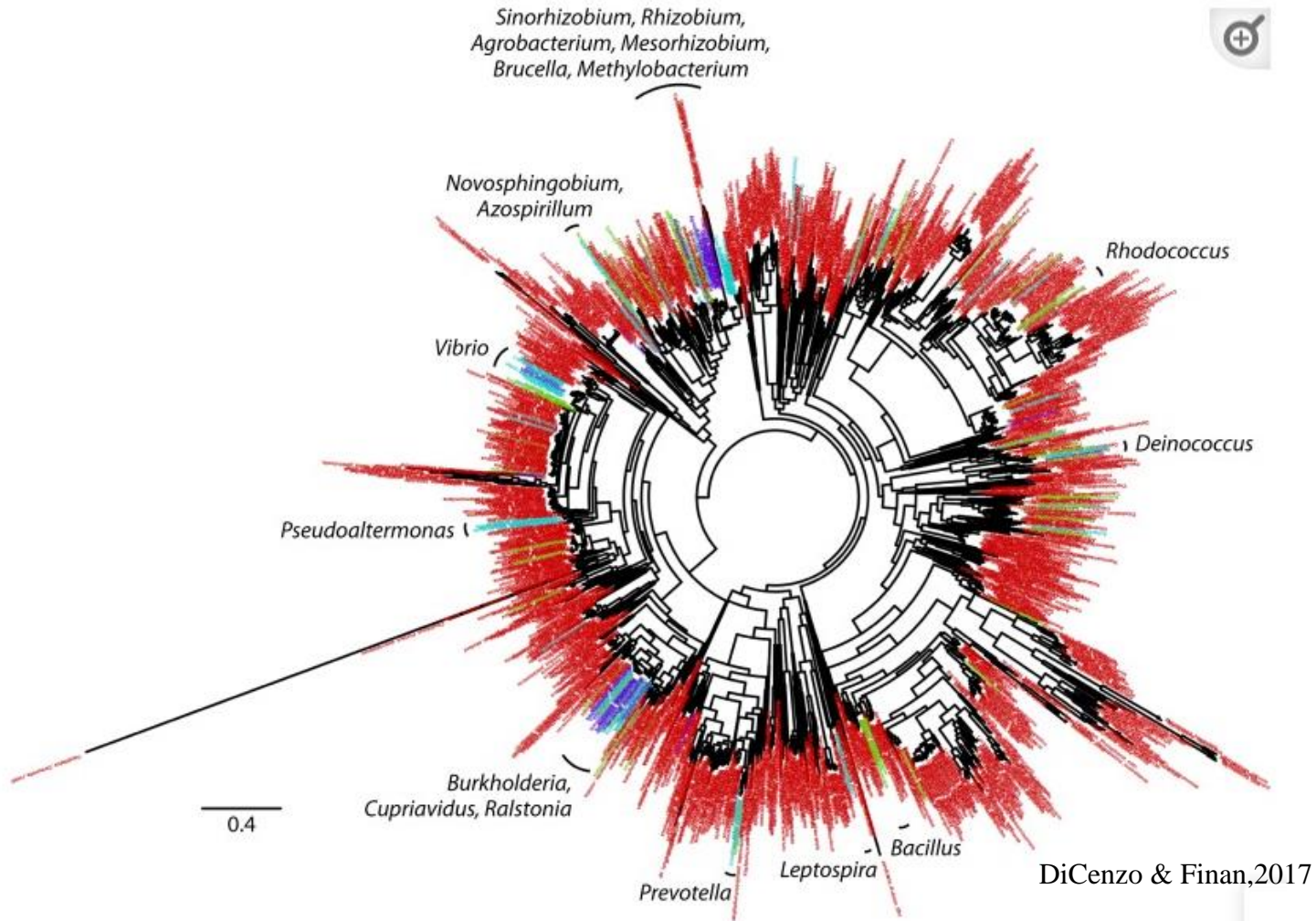
Da qui la proposta di definire questi elementi cromidi.

Un'analisi effettuata nel 2010 su circa 900 genomi batterici ne ha identificati ben 80 con un secondo cromosoma caratterizzato da un contenuto in G+C simile a quello del cromosoma.

La gran parte dei batteri dotati di più cromosomi appartengono ai Proteobatteri (Rhizobium, Burkholderia, Rhodobacter, Vibrio) ma anche alle Spirochete ed ai Cianobatteri.

L'uso dei codoni nei secondi cromosomi (cromidi) è molto più simile a quello dei cromosomi che a quello dei plasmidi a dimostrazione che hanno trascorso già un lungo periodo di coabitazione con il cromosoma del batterio che li ospita.

Non vi sono geni "cromidi" specifici comuni a tutti questo tipo di repliconi ma contengono sia geni del Core genome o geni più specifici di adattamento etc.



Distribution of multipartite genomes throughout the bacterial phylogeny. A phylogenetic distribution of 1,708 bacterial species with a complete genome available in the NCBI genome database is shown (accessed 21 March 2016). The taxon names are colored based on genome structure, with red for species with no megaplasmid or chromid, green for species with a megaplasmid(s) but no chromid, blue for species with a chromid(s) but no megaplasmid, and purple for species with both a megaplasmid(s) and a chromid(s). Several genera enriched for megaplasmids and/or chromids are labeled. For species with more than one completed genome available in the NCBI

# PUÒ ESSERCI UN VANTAGGIO SELETTIVO NELL' AVERE PIÙ CROMOSOMI?

**Ipotesi 1: può servire per sfruttare più rapidamente nicchie ecologiche diverse?**

Microrganismi correlati come *Rhodobacter spheroides* o *R. capsulatum* che occupano nicchie simili hanno un diverso numero di cromosomi

**Ipotesi 2: può la ricombinazione intermolecolare essere più rapida ed efficiente di quella intramolecolare?**

Non vi sono dati di cinetica di ricombinazione

**Ipotesi 3 : può favorire gli scambi interspecie?**

Se rimangono come megaplasmidi trasmissibili favoriscono la diversità genetica

## C'è una suddivisione conservativa tra i geni nei diversi cromosomi?

- In *Vibrio cholerae* c'è un grande sbilanciamento nella distribuzione dei geni : sul grande cromosoma sono presenti tutti i geni importanti sia nei processi vitali della cellula che i geni coinvolti nella patogenicità

- In *Rhodobacter spheroides* 1/5 dei geni appare duplicato : i geni per alcuni pathway biosintetici come triptofano sono suddivisi tra i due genomi

CII appare derivato per frammentazione da un grande cromosoma

In *Ralstonia solanacearum* sul secondo cromosoma la distribuzione dei geni non è casuale

sono localizzati geni coinvolti nell'adattamento ad ambienti diversi, un sistema di secrezione di tipo III, sintesi di esopolisaccaridi

Cromosomi multipli possono conferire un vantaggio selettivo ma quale sia questo vantaggio è ancora da chiarire!

## Principali ipotesi sul ruolo e sull'evoluzione dei genomi multipartiti

1<sup>a</sup> ipotesi Aumento del genoma : dividendo il genoma si può ottenere un genoma di dimensioni maggiori

A sostegno: I genomi multipartiti sono in media più grandi dei genomi a singolo chr. : la differenza nella grandezza del genoma dipendono dalle dimensioni dei repliconi secondari più che dal cromosoma.

Contro : alcuni piccoli genomi sono multipartiti mentre alcuni grandi genomi sono con un solo cromosoma. Soltanto 3 dei 50 genomi più grandi sono multipartiti(!) .Non è chiaro se il fatto di avere un genoma multipartito permette di avere un genoma più grande o se i genomi sono più grandi perché sono multipartiti

2<sup>a</sup> ipotesi : il genoma multipartito aumenta la velocità di crescita

La suddivisione del genoma in più cromosomi facilita una più elevata velocità di crescita dovuta ad una più rapida replicazione

A sostegno : alcuni dei batteri che si riproducono più rapidamente hanno un genoma multipartito (p.e. *Vibrio*). I rizobi che si dividono rapidamente hanno genomi multipartiti mentre quelli che si dividono più lentamente no

Contro: Alcuni batteri che crescono molto lentamente hanno genomi multipartiti e batteri che crescono velocemente no. Sembra non esserci correlazione tra velocità di crescita e suddivisione o meno dei genomi

### 3<sup>a</sup> ipotesi : Coordinamento dell'espressione genica

La localizzazione di geni correlati sul medesimo replicone ne facilita la regolazione coordinata

A sostegno: Il replicone che contiene il gene può influenzare il dosaggio genico di quel particolare gene

Contro Il dosaggio genico ha effetto soltanto nei batteri in rapida crescita. Non è chiaro se il coordinamento dell'espressione genica sia stato un forza propulsiva per la generazione di genomi multipartiti o sia il frutto ad una co-localizzazione dei geni correlati in un singolo replicone



## 4 ipotesi: Adattamento ad una nuova nicchia

I repliconi secondari contengono generalmente geni coinvolti nella colonizzazione o nell'adattamento a nuovi ambienti

A sostegno Spesso i repliconi secondari a) hanno diversi tassi di variabilità e evoluzione; b) possono mostrare specifici pattern di regolazione genica in risposta all'ambiente; C9 sono spesso arricchiti in geni associati all'adattamento all'ambiente

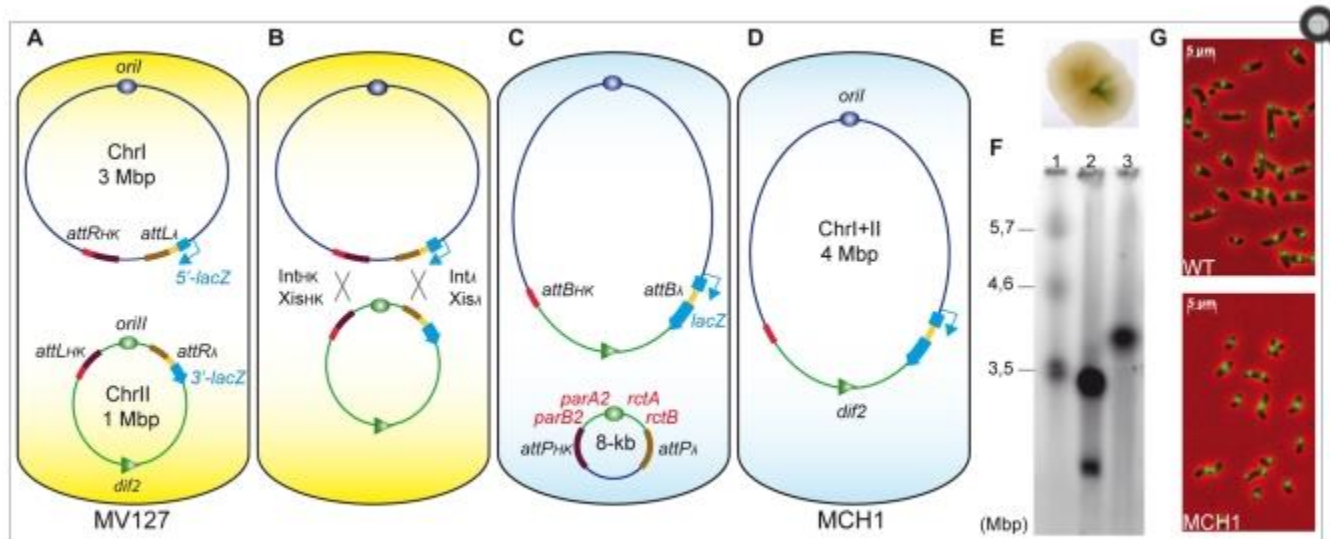
Contro: molti microrganismi con genomi multipartiti occupano le stesse nicchie di batteri non multipartiti (!!)

**TABLE 3**

Summary of the four described hypotheses on the role and evolution of multipartite genomes<sup>a</sup>

<b>Hypothesis</b>	<b>Main tenant</b>	<b>Support</b>	<b>Contradiction(s)</b>
Increased genome size	Dividing the genome allows for a larger genome than if only a chromosome was present	Multipartite genomes are on avg larger than nonmultipartite genomes; difference in genome sizes is due to the size of the secondary replicons and not chromosomal differences	Some small genomes are multipartite, while some large genomes are not multipartite; only 3 of the largest 50 bacterial genomes are multipartite; unclear if being multipartite allows larger genomes or if genomes are larger because they are multipartite
Increased rate of bacterial growth	Dividing the genome allows a higher growth rate due to faster replication of the genome	Some of the fastest-growing species (e.g., <i>Vibrio</i> ) have multipartite genomes; fast-growing rhizobia contain chromids, whereas slow-growing rhizobia do not	Many slower-growing species have a multipartite genome, and some fast-growing species (e.g., <i>Clostridium</i> ) do not have a multipartite genome; no correlation between genome size and growth rate; chromosomes and chromids are not equally sized
Coordinated gene regulation	Localization of related genes on the same replicon facilitates their coordinated regulation	The replicon that the gene is on can influence gene dosage; individual replicons are often over- or underrepresented in genes up- or downregulated in different environments	Gene dosage effect is likely limited to fast-replicating species; unclear if coordinated gene regulation was a driving force of multipartite genome evolution or a by-product of the colocalization of related genes on 1 replicon
Adaptation to novel niches	The secondary replicons are specialized for colonization and fitness in new environments	Consistent with several features of secondary replicons, including genetic variability and evolutionary rates; different replicons can show environment-specific patterns of gene regulation; secondary replicons are often enriched in genes associated with environmental adaptation	Many organisms without multipartite genomes occupy the same niches as those with multipartite genomes and display equal levels of genetic variability

## Un esempio *Vibrio cholerae*



### A mono-chromosomal *V. cholerae* model, MCH1.

A. *V. cholerae* MV127 strain with *attR/L* sites from  $\lambda$  and HK022 phages inserted at precise loci. Recombination sites [*attR<sub>HK</sub>* and *attL<sub>λ</sub>*] replaced *dif1* on chrI and [*attL<sub>HK</sub>* and *attR<sub>λ</sub>*] flanked [*parAB2-oriII-rctAB*] on chrII. B. Recombination [*attR<sub>λ</sub>*×*attL<sub>λ</sub>*] and [*attR<sub>HK</sub>*×*attL<sub>HK</sub>*] mediated by the expression of *Int<sub>λ</sub>*+*Xis<sub>λ</sub>* and *Int<sub>HK</sub>*+*Xis<sub>HK</sub>*. C. Recombination events [*attR<sub>λ</sub>*×*attL<sub>λ</sub>*] regenerate *lacZ*, allowing for phenotypic detection of rearranged chromosomes. D. Without selection, the 8 kb excised molecule (carrying a kanamycin resistance gene) was lost. E. Blue sector appearing within single conjugant on X-Gal supplemented LB-agar plates indicates recombination events between [*attR<sub>λ</sub>*×*attL<sub>λ</sub>*]. F. Ethidium bromide stained PFGE of genomic DNA: Lane 1, *S. pombe* marker (BioRad) ; Lane 2, WT (N16961) ; Lane 3, MCH1. G. Microscopic observation of WT (top panel) versus MCH1 (bottom panel). Nucleoids of exponentially growing cells stained with DAPI (green) merged with phase-contrast images (red).

## **Coordinamento nella replicazione : Il caso di *Vibrio cholerae***

One of the important differences between plasmids and chromosomes is that the latter replicate during a defined period of the cell cycle, ensuring a single round of replication per cell.

*Vibrio cholerae* carries two circular chromosomes, Chr1 and Chr2, which are replicated in a well-orchestrated manner with the cell cycle and coordinated in such a way that replication termination occurs at the same time.

The initiation of Chr2 replication is triggered by the replication of a 150-bp locus positioned on Chr1, called *crtS*. This *crtS* replication-mediated Chr2 replication initiation mechanism explains how the two chromosomes communicate to coordinate their replication.