

**Esistono differenti fenomeni di coniugazione ma il più studiato e senz'altro quello a carico del plasmide F di *E.coli*.**

**Affinché avvenga una coniugazione è necessario che siano presenti due tipi di batteri: un donatore (caratterizzato dal possedere un plasmide coniugativo p.e.F) e un recipiente (che ovviamente non lo possiede).**

**Altra condizione è che i due batteri devono essere molto vicini l'un l'altro.**

**Ciò è reso possibile da una struttura extracellulare denominata pilo sessuale**

**La coniugazione è un processo complesso che richiede la partecipazione di numerosi fattori**

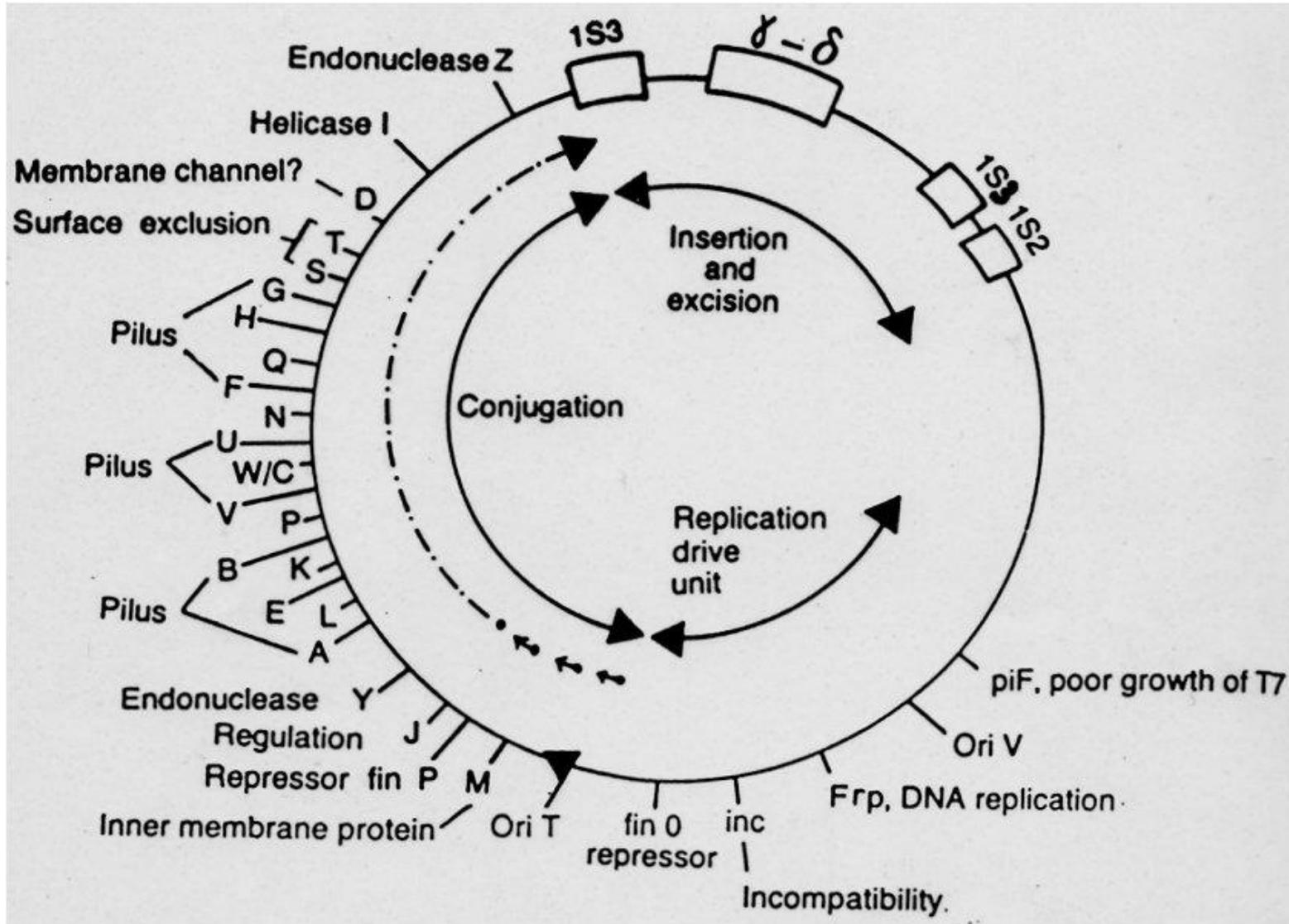
I geni vengono nell'insieme definiti geni TRA e si possono suddividere in:

**Dtr (DNA transfer and replication): geni per il processamento del DNA**

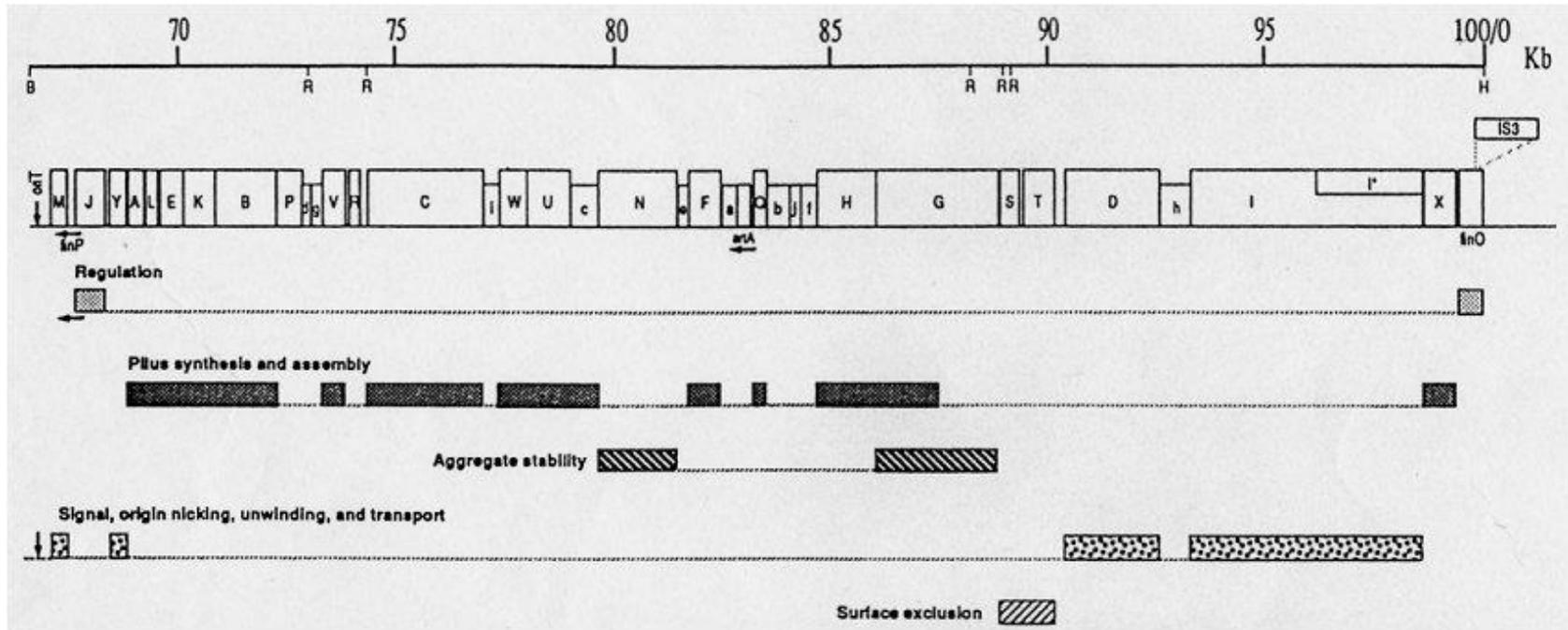
**Mpf ( Mating pair formation) che include i geni per la formazione del pilo e del canale di contatto tra le due cellule**

# Organizzazione del plasmide F:

ampia regione necessaria per il processo di coniugazione, origine di replicazione, sequenze d'inserzione

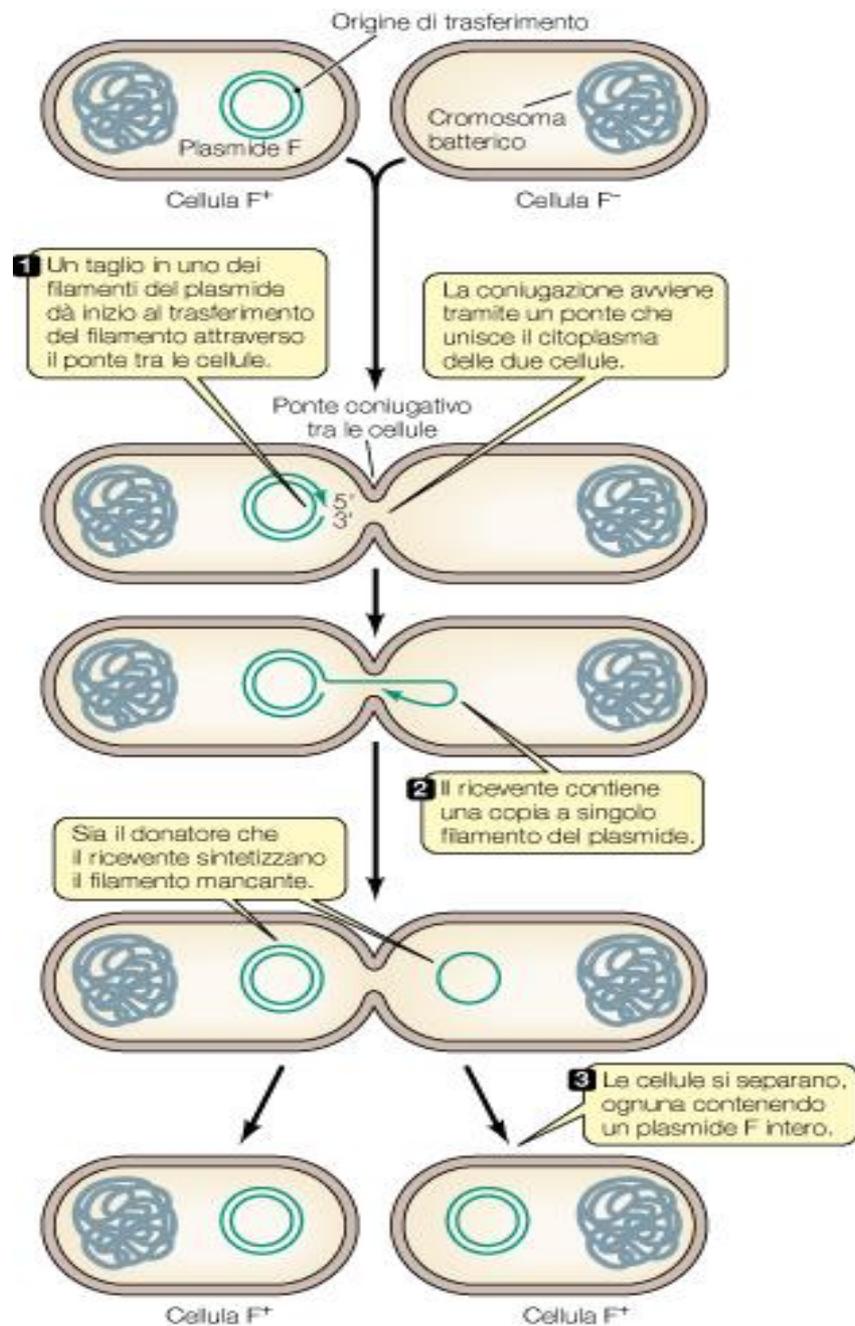


# Organizzazione dei geni del pilo sul plasmide F



**Ampia regione di oltre 30 Kb si distinguono i geni per**

- La regolazione
- Sintesi ed Assemblaggio del pilo
- Formazione e stabilità delle coppie
- Origine Taglio, trasporto del DNA
- Esclusione di superficie



# Il sistema Mpf (MATING PAIR FORMATION)

## Geni per la sintesi del pilo:

struttura tubulare esposta sulla superficie della cellula di lunghezza variabile

I pili differiscono tra plasmidi di tipo diverso.

I pili sono fondamentali per il contatto e l'adesione della cellula donatrice con quella ricevente.

## ATTENZIONE

**Il DNA non passa attraverso il PILO!!!**

**Il PILO serve come organello di adesione tra le cellule.**

La regione Tra è di circa 35 kb e contiene circa 36 geni la maggior parte dei quali denominati *tra* ed alcuni *trp*. Questi geni sono responsabili del processo di coniugazione.

Il gene *traA* codifica la pilina, ovvero la proteina che compone il pilo sessuale.

I geni *traQ* e *traX* codificano proteine coinvolte nella maturazione e nella acetilazione della pilina.

Il "recettore" del pilo è probabilmente identificabile in un complesso costituito da LPS e la proteina di superficie OmpA

il materiale genetico non passa attraverso il pilo, ma il contatto tra le due cellule determina la formazione di un ponte citoplasmatico attraverso il quale avviene il passaggio del DNA.

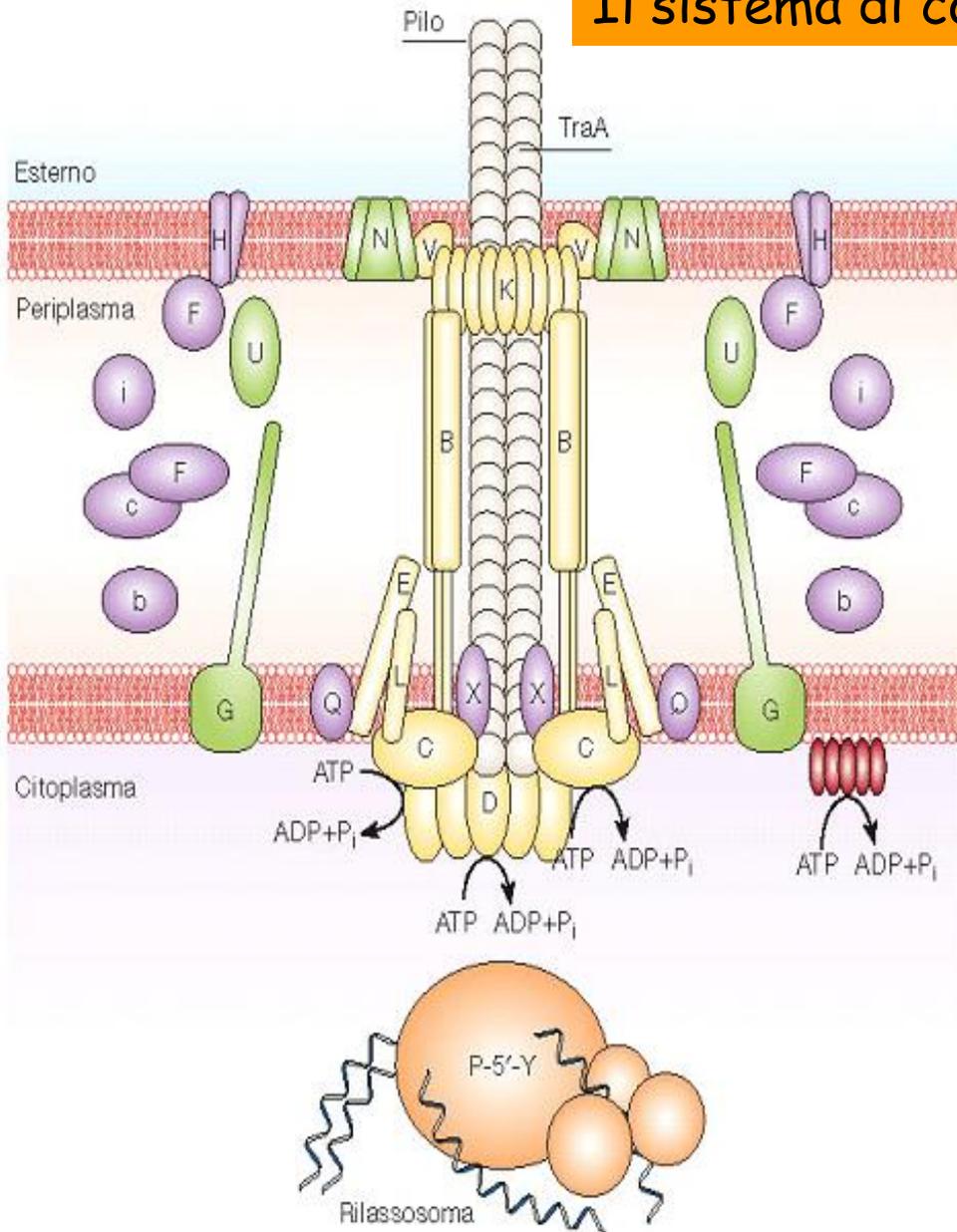
Questo DNA, nel caso più semplice, è costituito dal plasmide F

Le proteine codificate dai geni *traG* e *traN* sono responsabili del mantenimento del contatto tra le cellule in fase di coniugazione mentre la proteina *TraD* permette la formazione del ponte citoplasmatico.

Le proteine *TraT* e *TraS* sono invece responsabili del fenomeno della esclusione di superficie

Infine è centrale il ruolo svolto dal prodotto dei geni *traI* e *traY*. Queste due proteine danno il via al trasferimento del materiale genetico attraverso il ponte citoplasmatico

## Il sistema di coniugazione è un sistema di tipo IV



Il pillo e l'apparato di trasporto del DNA durante la coniugazione fanno parte del sistema di esportazione di tipo IV.

Il pillo è costituito dai ripetitori della proteina TraA che viene inserita nella IM dalla ciaperonina TraQ. Poi TraA verrà acetilata da TraX.

TraD è la proteina della IM che mette in contatto il T4SS con il rilassosoma costituito dal DNA e dal complesso TraI

I componenti **Dtr** intervengono nella preparazione del DNA per il trasferimento

**Relaxasi**: è un endonucleasi in grado di effettuare un taglio in un sito specifico di oriT(nic)

Dopo aver tagliato con un legame fosfodiesterico lega a se il nucleotide grazie ad una delle sue tirosine ( reazione di transesterificazione).

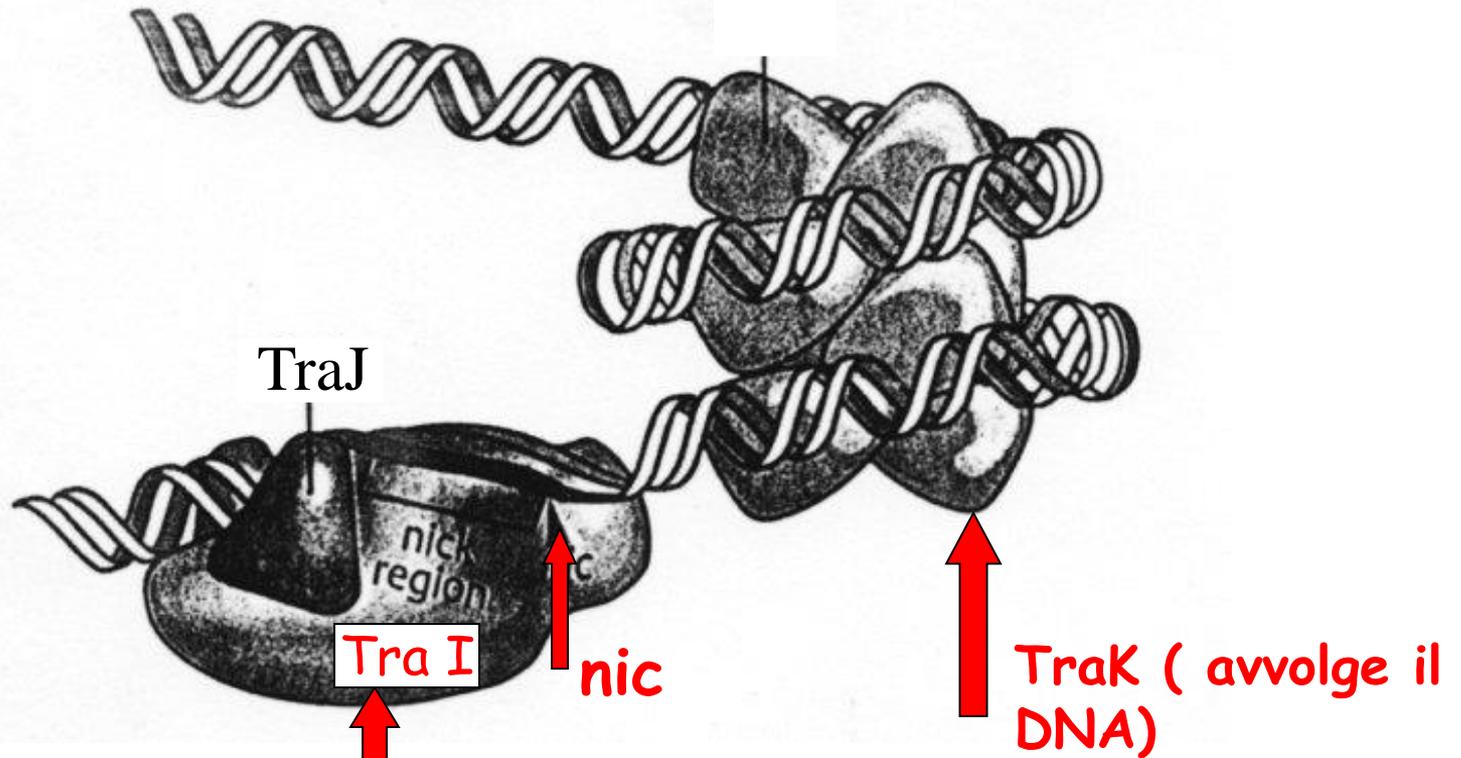
La relaxasi rimane legata al 5' del filamento e viene trasferita nella cellula recipiente con il DNA.

Nella cellula recipiente RICICLIZZA il plasmide con un processo inverso trasferendo il legame fosfato al 3'OH del DNA

# Formazione del taglio ad oriT

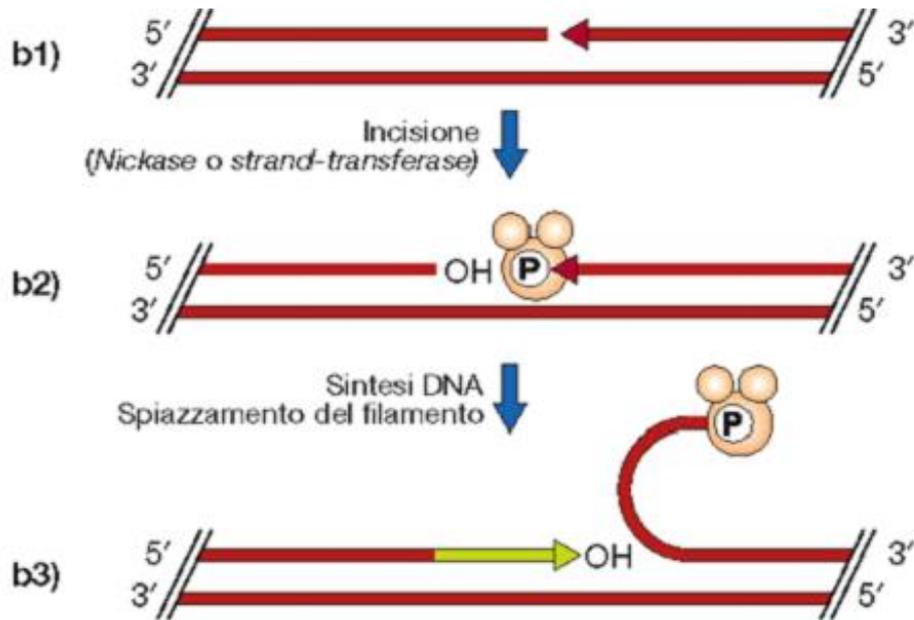
La regione oriT è anche il sito in cui avviene la riciclaggio del plasmide nella cellula figlia

Rilassosoma



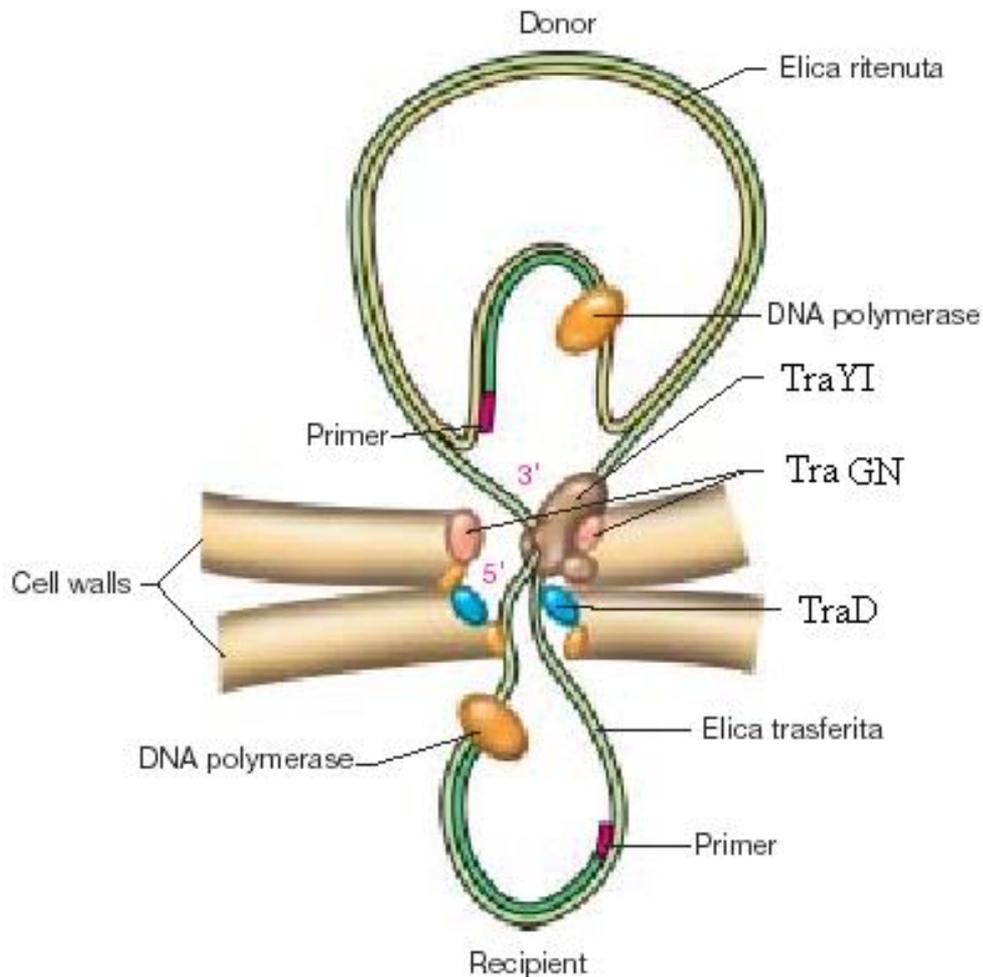
Elicasi /rilassasi promuove il taglio ad oriT

Dopo il taglio l'enzima TraI che è bifunzionale con funzione di Elicasi e Rilassasi a carico di due domini funzionali , oltre a processare il DNA legherà il 5' e promuoverà il trasferimento della singola elica nella cellula ricepitente.



L'estremità 5'-P di un residuo di citosina del filamento di DNA rimane legata covalentemente tramite il fosfato ad un residuo di tirosina dell'enzima mentre l'estremità 3-OH è rilasciata e funge da innesco per la replicazione del DNA plasmidico nella cellula donatrice .

# Modello della coniugazione di F

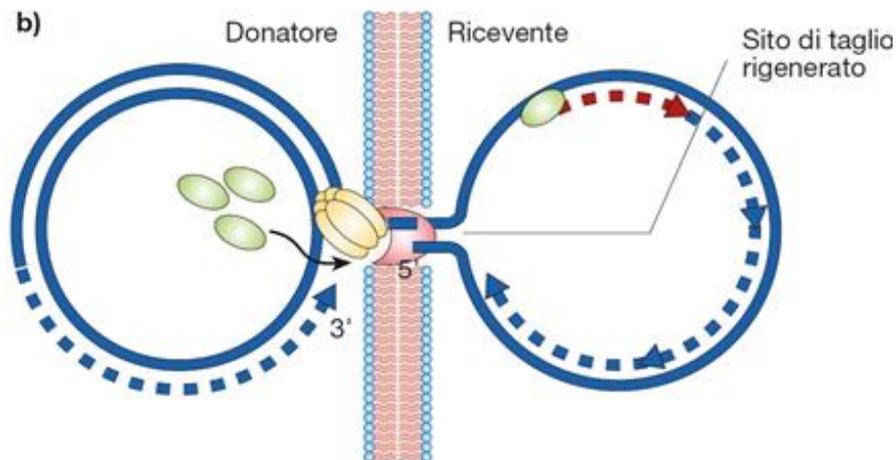
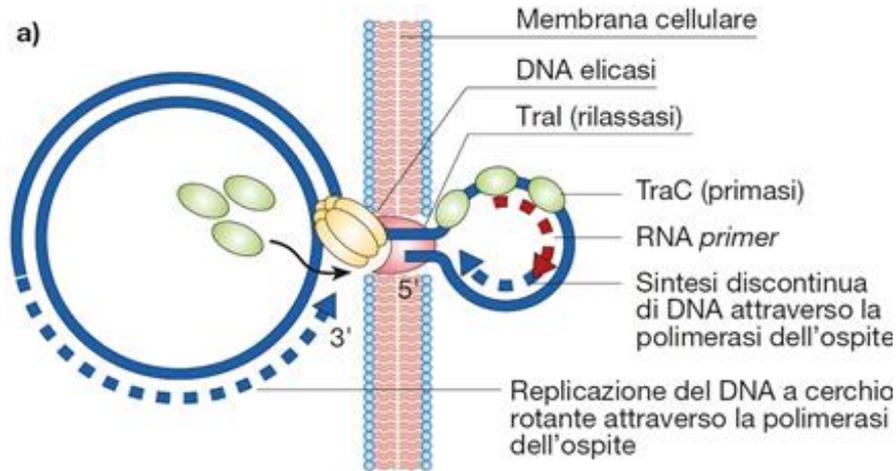


Il processo ha infatti inizio con il taglio, da parte di **TraI** del singolo filamento di DNA del plasmide F nella regione *oriT* (all'estremità della regione *tra*).

Questa proteina rimangono legate all'estremità 5' che si forma e sono responsabili dell'attraversamento di questa del ponte citoplasmatico.

La relaxasi TraI può essere coadiuvata in alcuni plasmidi da un'altra proteina TraY (Complesso TraYI) come in questo esempio

## Trasferimento di DNA nella cellula ricevente

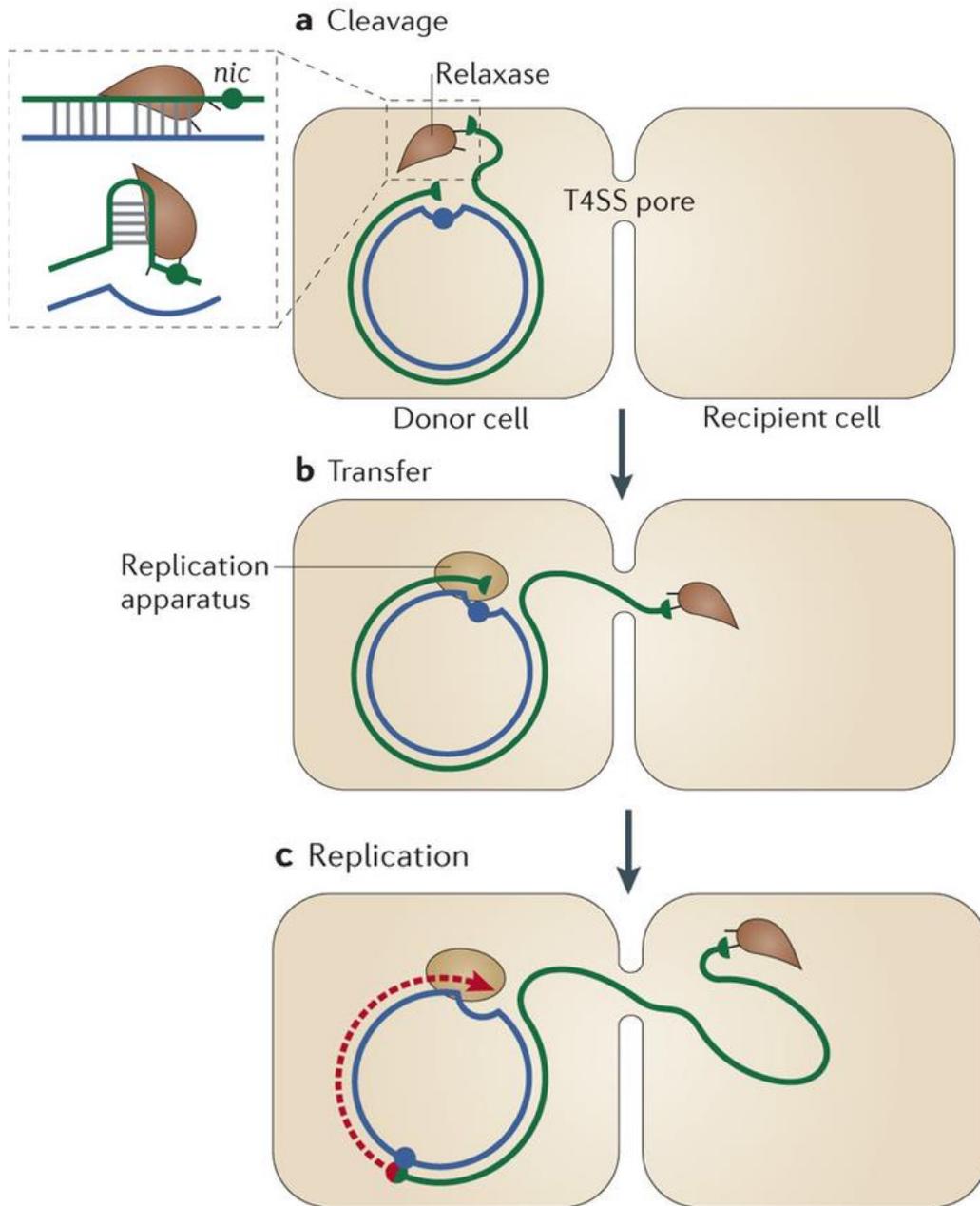


La rilassasi srotola il dsDNA e si muove in direzione 5-3 sul filamento tagliato che man mano si distacca dall'altro filamento.

Dopo il legame del rilassosoma al poro coniugativo che unisce la cellula donatrice alla cellula ricevente inizia la replicazione del DNA con il meccanismo di cerchio rotante.

Il filamento oriT /TraI è spinto nella cellula ricevente dove viene replicato tramite sintesi discontinua ( frammenti di Okazaki).

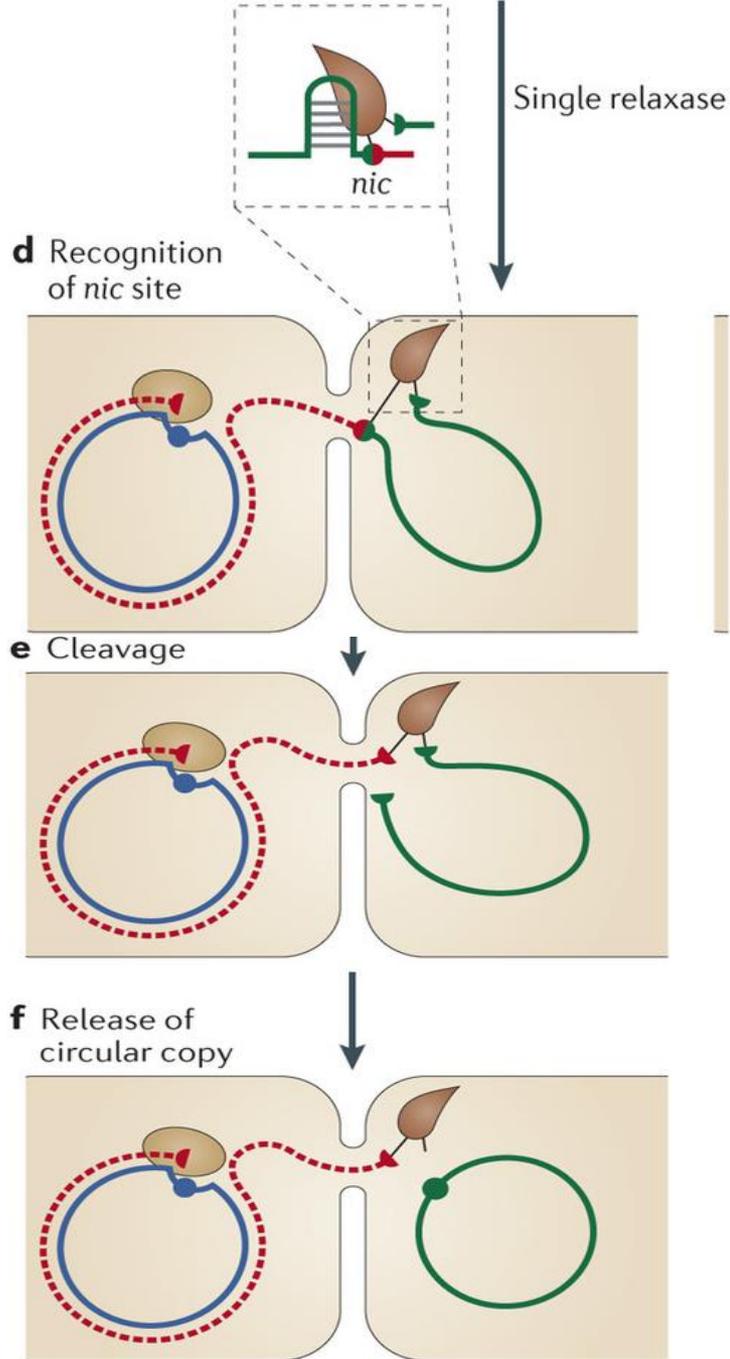
Nella cellula ricevente il frammento viene ricoperto da proteine SSB ( Single Strand Binding) che lo proteggono dall'assalto delle nucleasi. Un volta completata la replicazione il vecchio sito oriT ed il nuovo coincideranno e saranno tagliati da TraI poi la DNA ligasi chiuderà covalentemente il DNA dei 2 plasmidi



## ***Ruolo della relaxasi TraI***

La coniugazione avviene attraverso un poro che mette in comunicazione donatore e recipiente generato dal T4SS

- a) La coniugazione è iniziata dalla relaxasi che riconosce un sito localizzato al 3' del sito nic. La relaxasi poi lega a se tramite un residuo di Tyr il DNA SS tagliato a Nic
- b) Il DNA SS legato alla relaxasi viene trasferito nella cellula recipiente
- c) Inizia la replicazione nella cellula donatrice che rigenera il sito nic



**d-f** | La replicazione procede fintanto che l'intera molecola di DNA circolare non viene replicata completamente. Il sito *nic* che era stato ricostituito viene poi tagliato dalla relaxasi per generare una copia di DNA circolare SS nella cellula ricevente.

Il taglio è mediato dalla relaxasi legata al sito *nic* originale nella cellula ricevente.

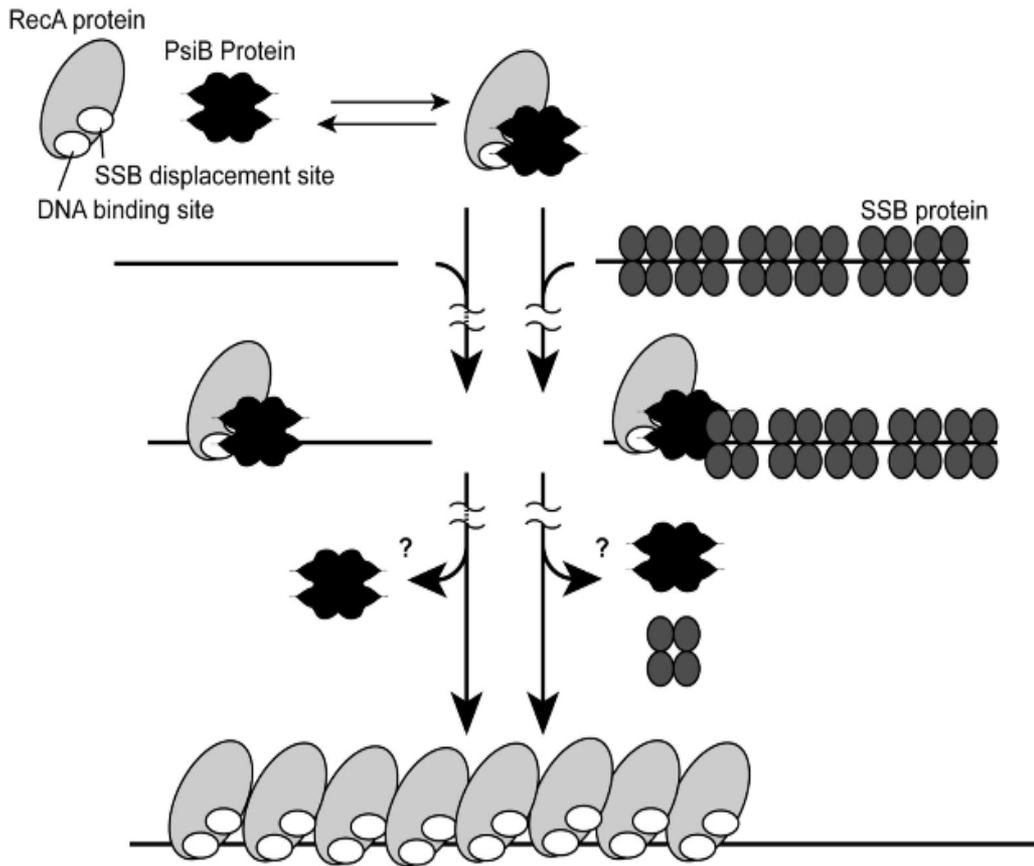
La replicazione nella cellula donatrice é generalmente accoppiata al trasferimento. La replicazione del DNA SS nella cellula ricevente è portata avanti dall'apparato di replicazione della cellula ricevente.

Il filamento trasferito viene utilizzato per la replicazione del DNA, a partire da un primer di RNA che si forma per la trascrizione di due geni denominati *ssf* e *psiB*.

Questi due messaggeri, vengono anche tradotti per sintetizzare due proteine importanti:

la prima è un omologo delle **SSB** (Single Strand Binding protein) di *E.coli*, ma specifica per il DNA di F,

la seconda **PSIB** è una proteina che sopprime il sistema SOS della cellula recipiente che potrebbe attivarsi percependo la presenza di DNA a SS.



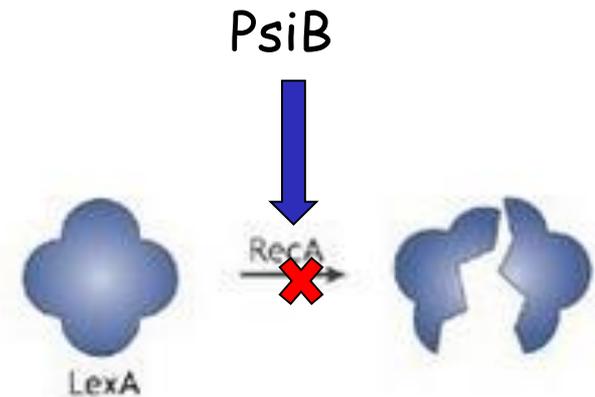
**Figure 7. Proposed mechanism of PsiB activity**

PsiB binding to free RecA in solution blocks the site on RecA which is necessary for SSB displacement and partially blocks or allosterically distorts the DNA-binding site on RecA. When the single-stranded DNA is exposed (not bound by SSB) RecA can bind to it because the DNA binding site is still partially available, while PsiB is bound in the SSB-displacement site (left panel). However, the affinity of PsiB-bound RecA for DNA decreases, which results in diminished DNA binding and ATP hydrolysis by RecA. When SSB is present, and RecA bound by PsiB, RecA cannot displace SSB (right panel). The decreased affinity for DNA reduces RecA binding to any DNA not coated with SSB. The combination of the two inhibitory effects of PsiB on RecA result in suppression of nucleation and filament extension of RecA on SSB-coated ssDNA.

Come funziona PsiB?

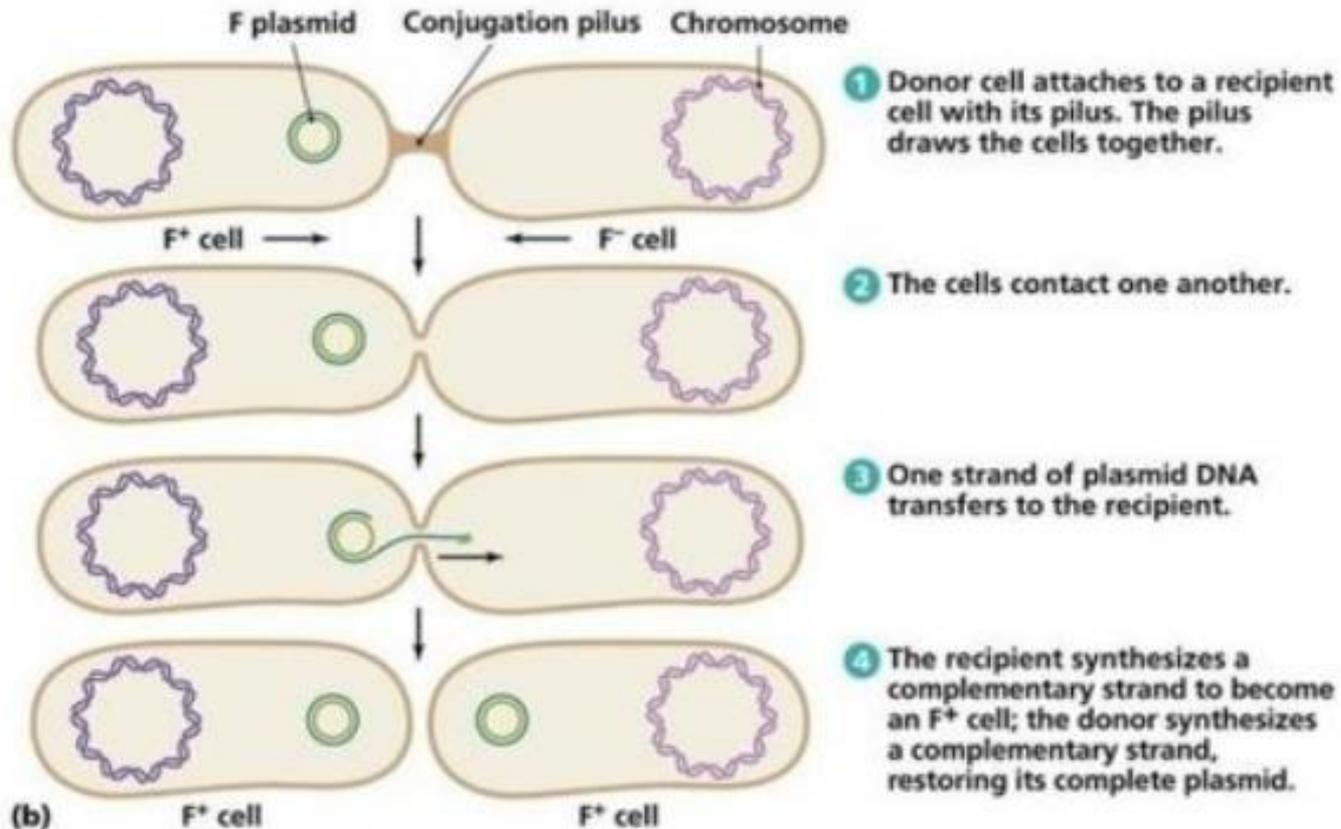
-Si lega alla proteina RecA impedendole di riconoscere correttamente il DNA a SS

-impedisce RecA dallo stimolare il taglio autocatalitico di LexA bloccando l'avvio del sistema SOS



# Processo di coniugazione tra cellula F<sup>+</sup> e F<sup>-</sup>

Il plasmide F<sup>+</sup> verrà trasferito ad alta efficienza alle cellule F<sup>-</sup>

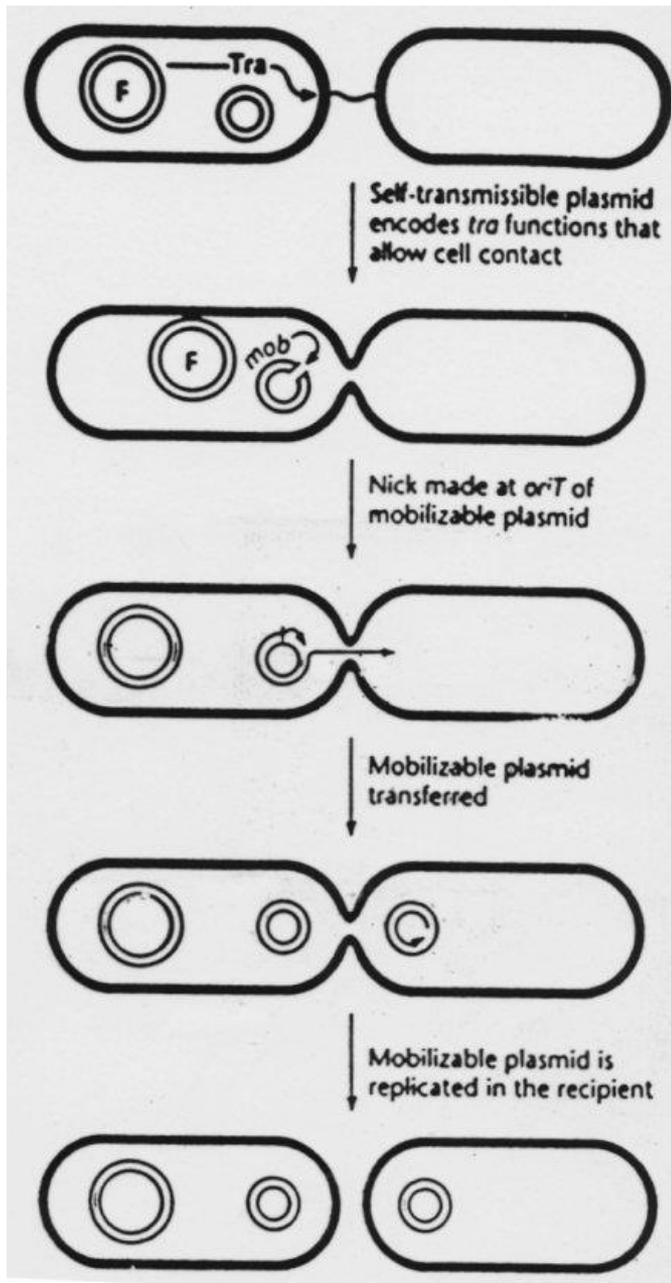


Il risultato sarà quindi una popolazione di cellule F<sup>+</sup>

## LA MOBILIZZAZIONE

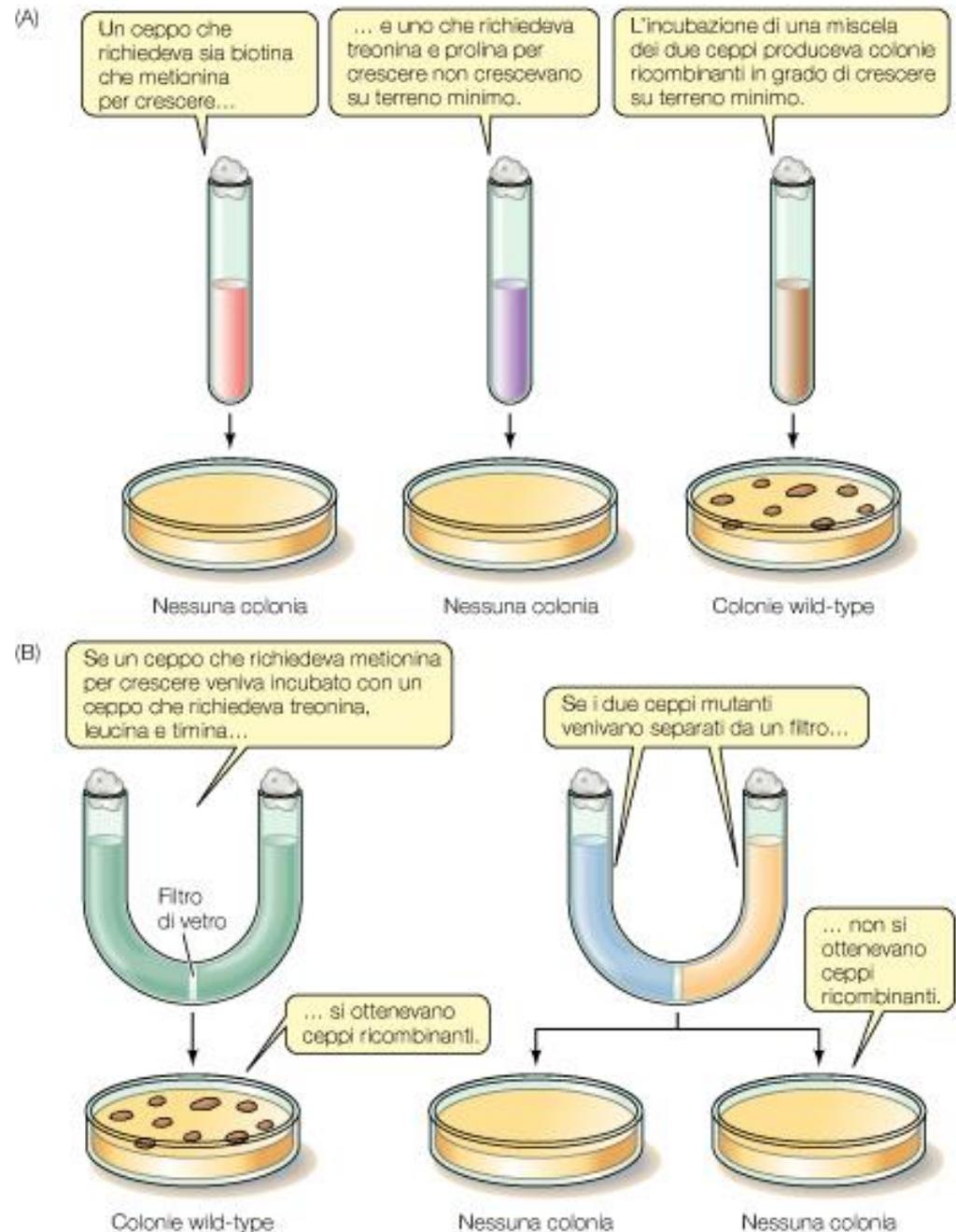
I plasmidi mobilizzabili sono plasmidi non coniugativi in grado di sfruttare il sistema di coniugazione di un plasmide compatibile presente nella cellula ospite.

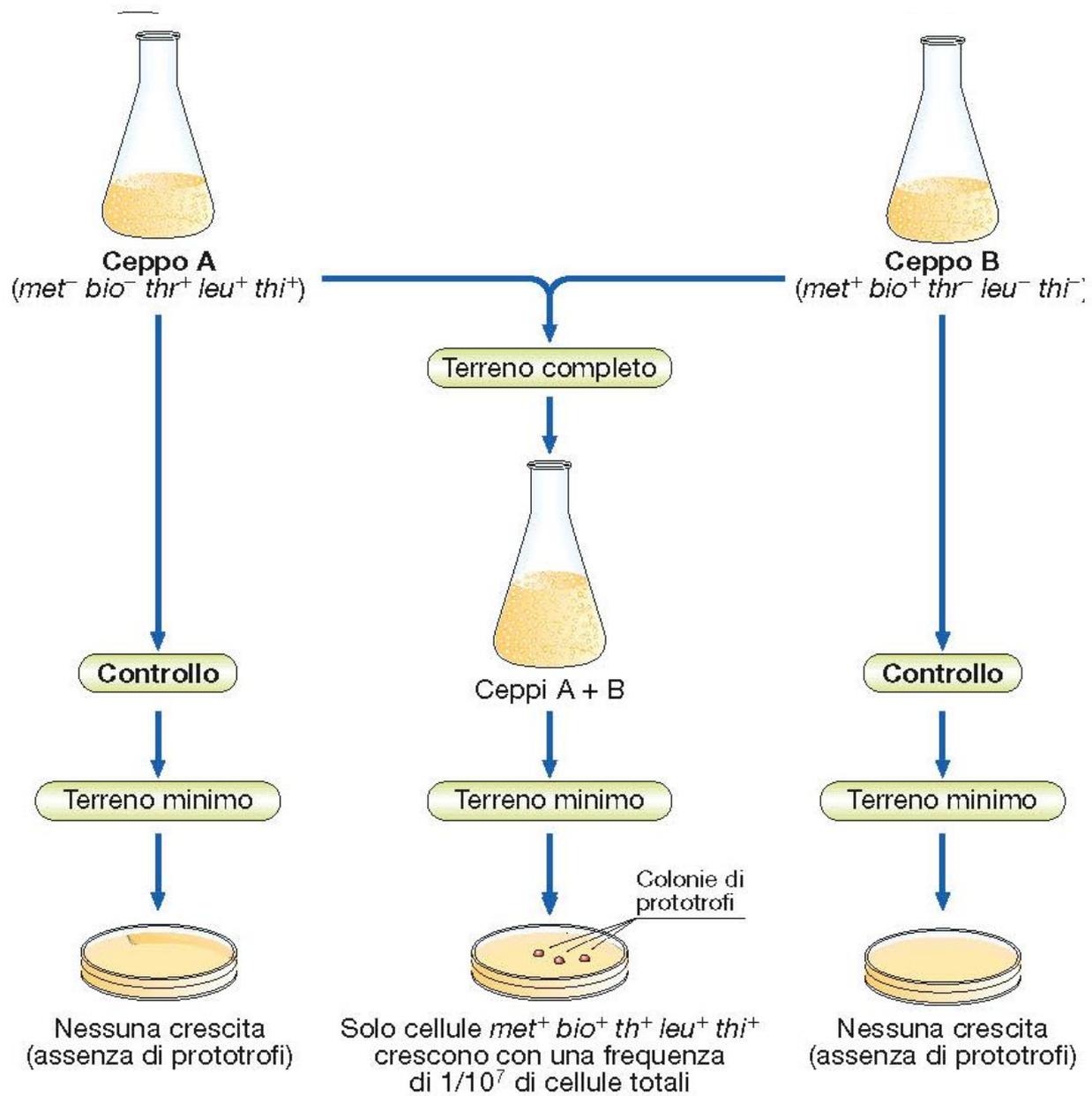
Alcuni posseggono una propria nucleasi in grado di tagliare il DNA nel sito di *oriT* per dare l'avvio al processo di coniugazione. Altri plasmidi invece posseggono semplicemente un sito *oriT* riconoscibile da varie nucleasi codificate dai plasmidi coniugativi.



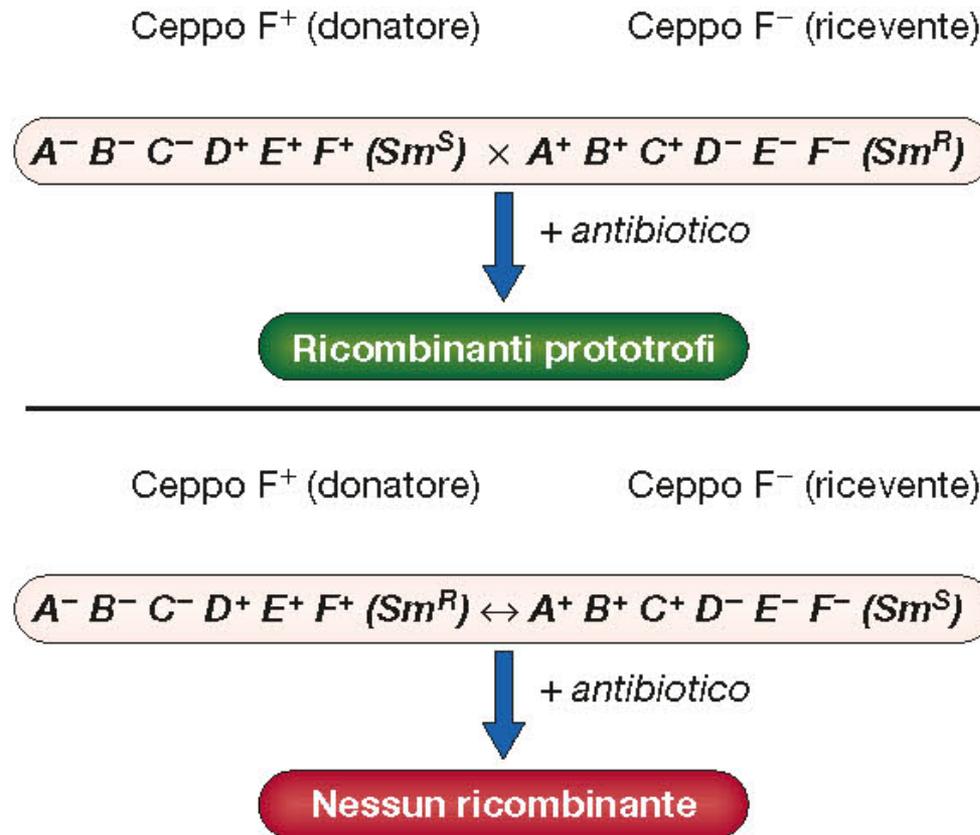
# 1946: Esperimento di Lederberg e Tatum

Scambio di materiale genetico per contatto tra le cellule batteriche





# Il trasferimento durante la coniugazione è polarizzato



Il trasferimento procede dal ceppo donatore (cellula  $F^+$  o  $Hfr$ ) verso la cellula recipiente  $F^-$ .  
Il recipiente deve essere vitale.

# Come si integra il fattore F nel cromosoma?

Meccanismo di ricombinazione generale utilizzando come regioni di omologia le sequenze IS

F si può integrare in 20 posti diversi nel cromosoma di E.coli.

Il fattore F contiene

3 copie di IS3.

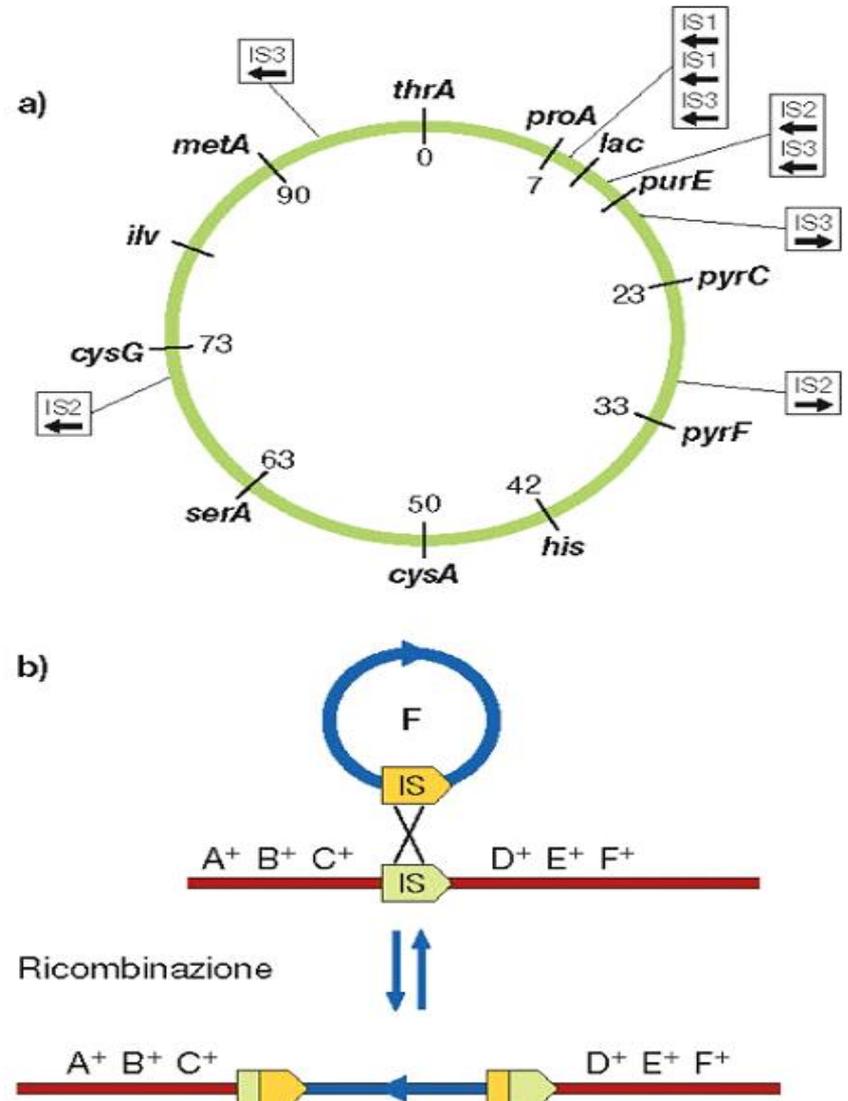
1 di IS2 e

1 di Tn1000.

Il cromosoma di E.coli contiene

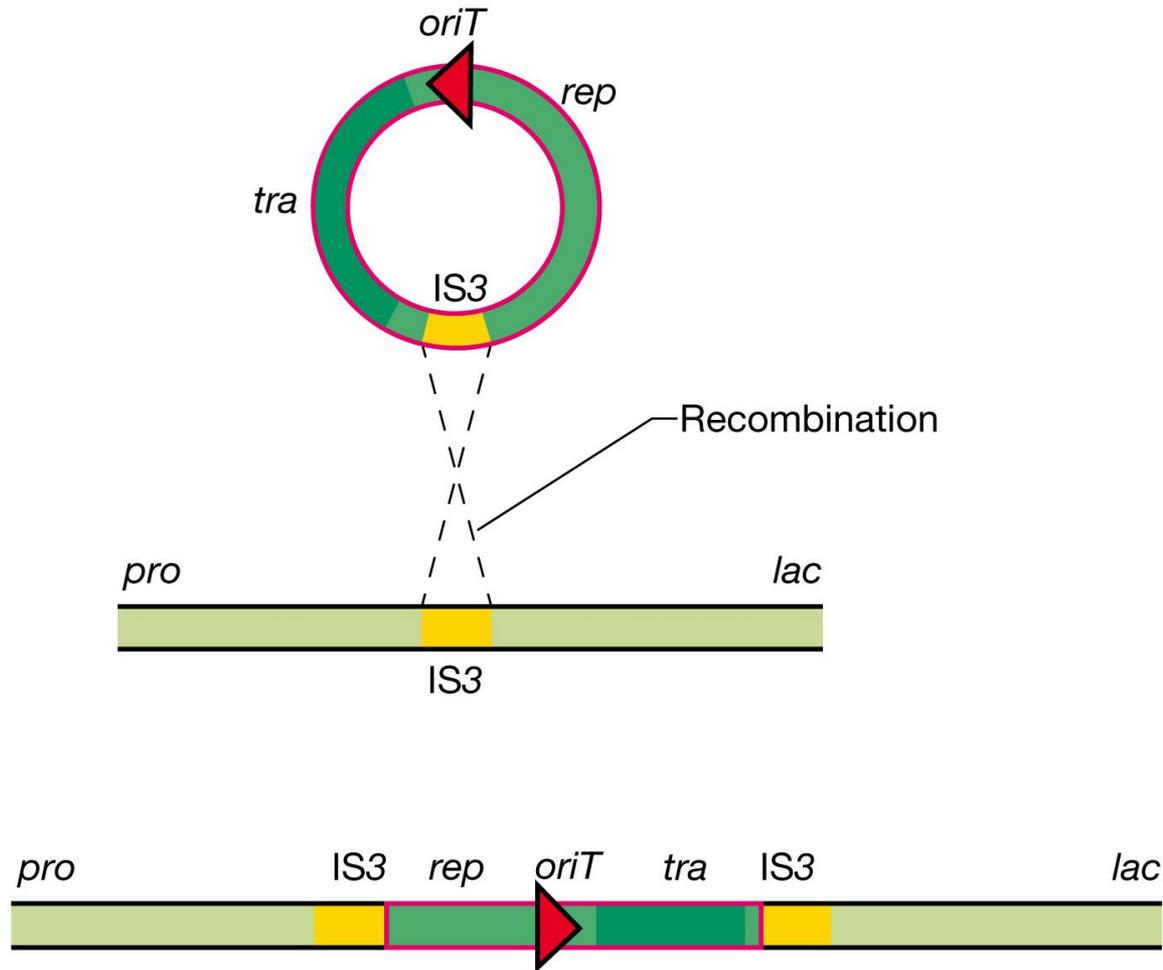
varie copie di IS1, IS2 IS3 e di Tn1000.

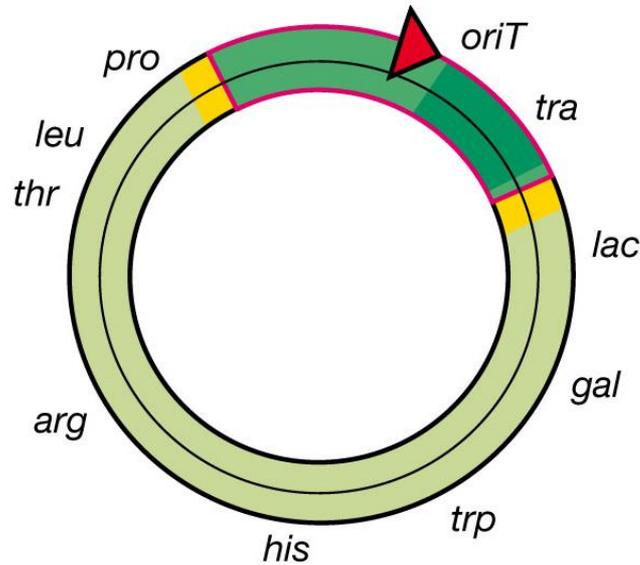
Tutte possono essere utilizzate come regioni di omologia per la ricombinazione



L'integrazione di F nel cromosoma avviene con un meccanismo di ricombinazione mediato dall'omologia tra le sequenze IS presenti sul plasmide e sul cromosoma.

Non è ricombinazione sito specifica, ma ricombinazione omologa in quanto necessita delle proteine RecA e RecBC.

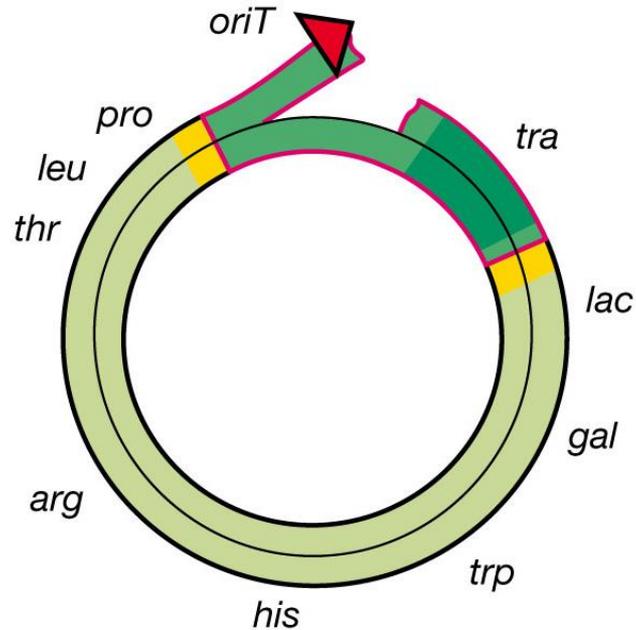




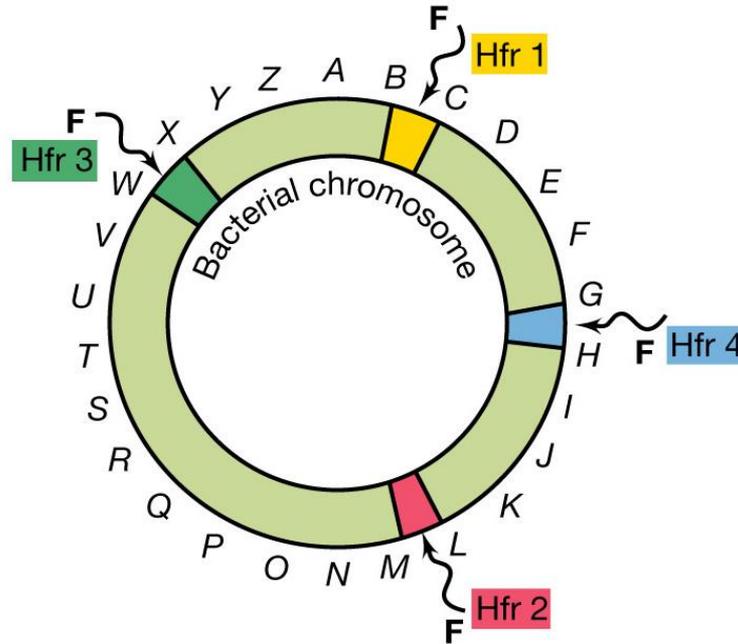
Il ceppo Hfr trasferisce solo parte dei geni plasmidici in quanto l'origine di trasferimento (*oriT*) è localizzata in posizione centrale rispetto alle sequenze IS che ne mediano l'integrazione

Transfer to F<sup>-</sup> recipient

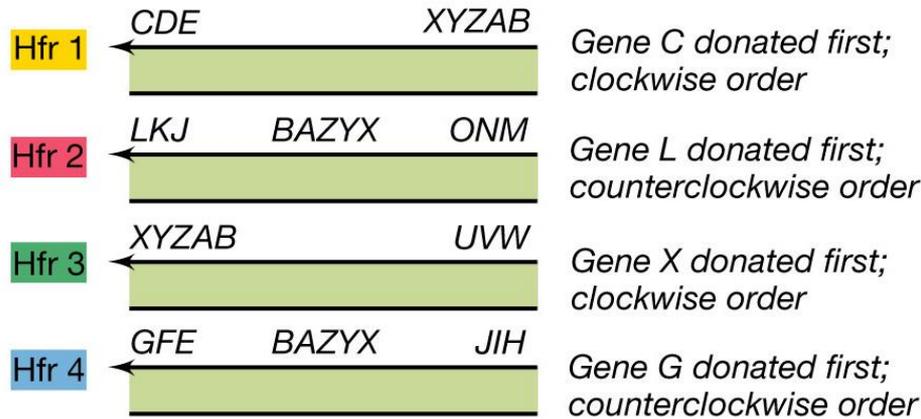
I geni TRA sono perfettamente attivi quando il plasmide F è integrato e promuovono il trasferimento a partire da *oriT*



A seconda di quale IS cromosomica viene utilizzata per l'integrazione il plasmide F si ritroverà integrato in siti diversi.



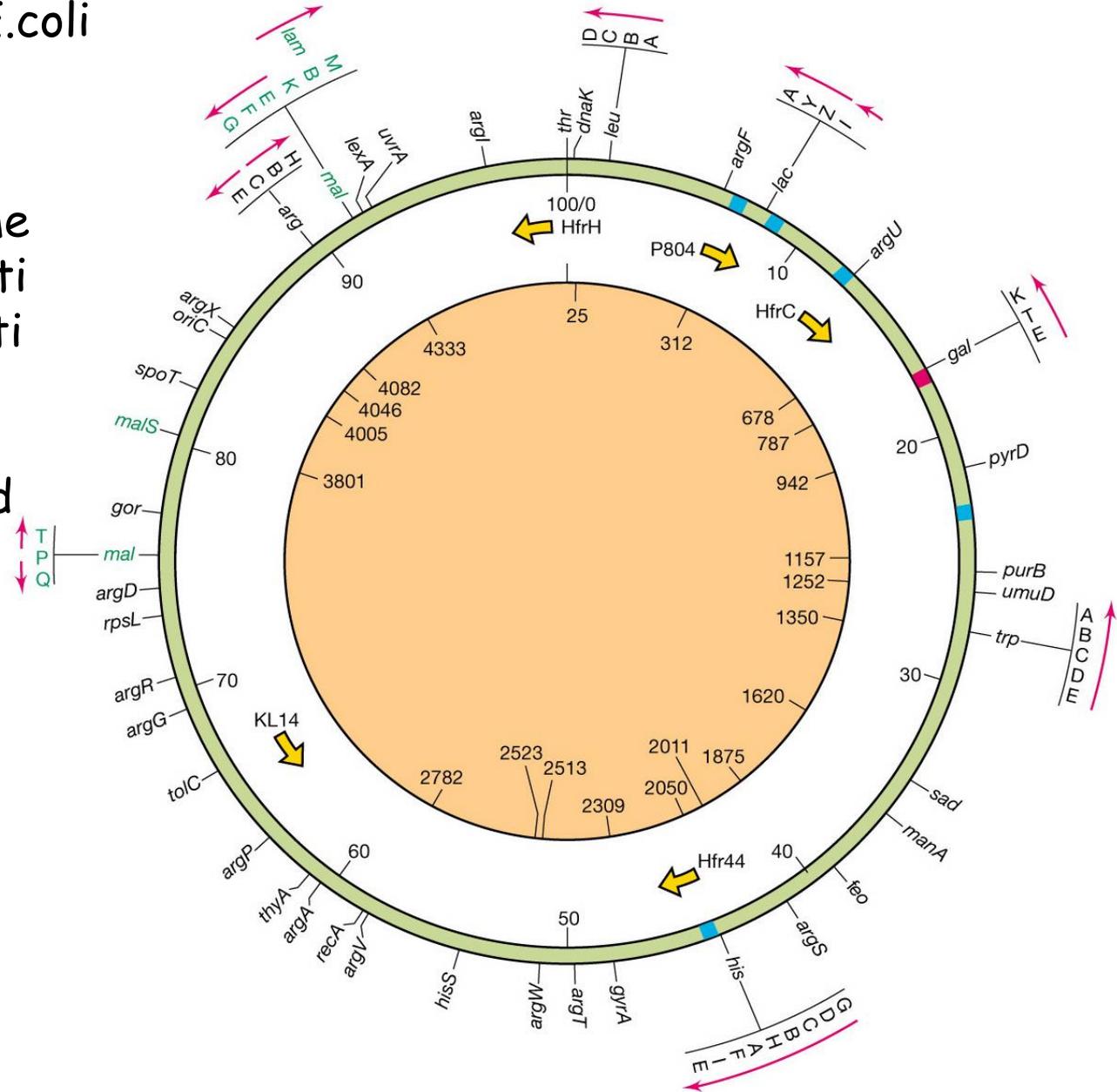
(a)



(b)

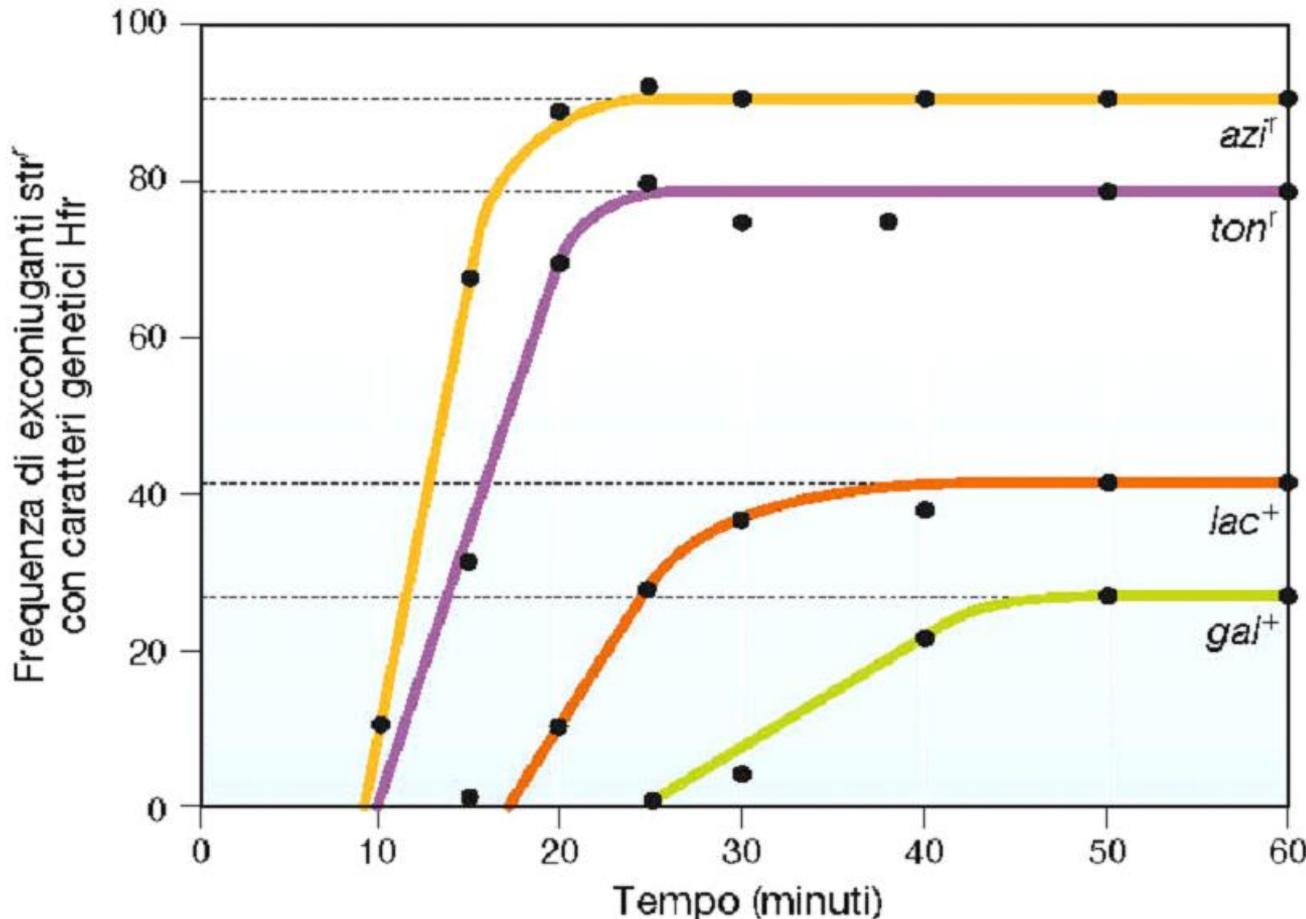
# Mappa circolare di E.coli

La mappa utilizza come unità di misura i minuti in riferimento a quanti minuti ci vogliono perché un gene sia trasferito rispetto ad un altro durante un incrocio Hfr-x F-.



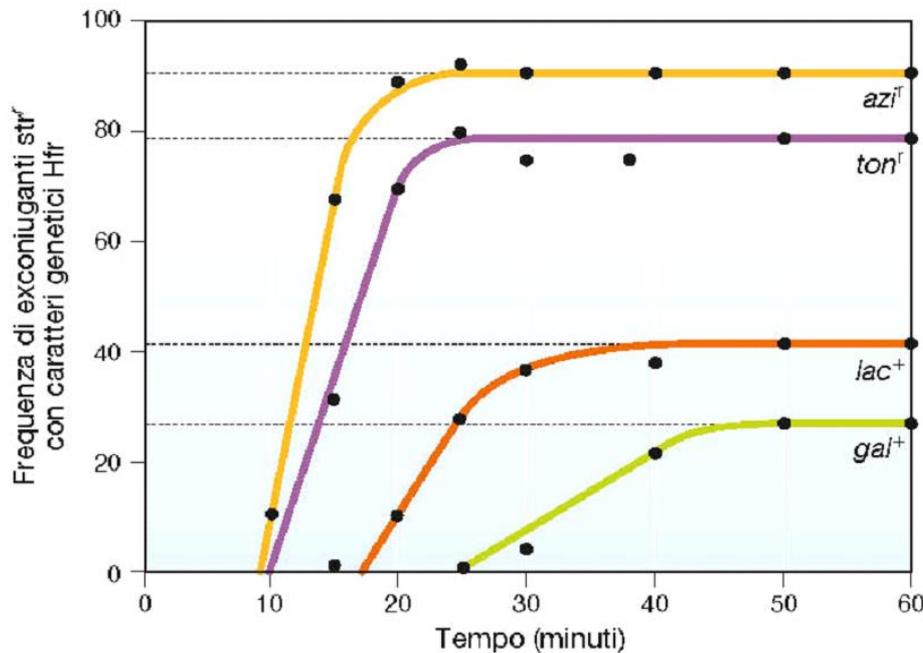
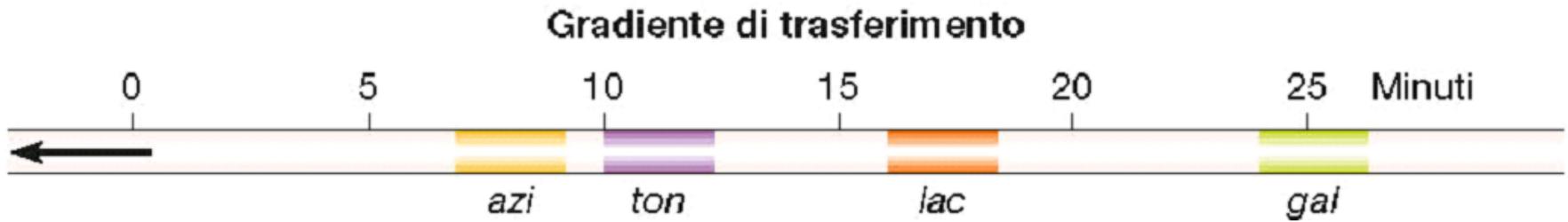
## Come si riuscì a stabilire l'ordine dei geni osservando le frequenze di ricombinanti?

Il ceppo recipiente è sensibile a sodio azide ( $azi^-$ ), al fago T1 ( $ton^s$ ) e incapace di fermentare lattosio ( $lac^-$ ) e galattosio ( $gal^-$ ) ma resistente alla streptomicina



Il grafico riporta le frequenze in funzione del tempo dei batteri "recipienti" che hanno ricevuto i caratteri del donatore  $azi^r, ton^r, lac^+, gal^+$

Sulla base dei dati ottenuti è possibile costruire una mappa genetica nella quale i geni sono distanziati a seconda di quanti minuti siano necessari perché entrino

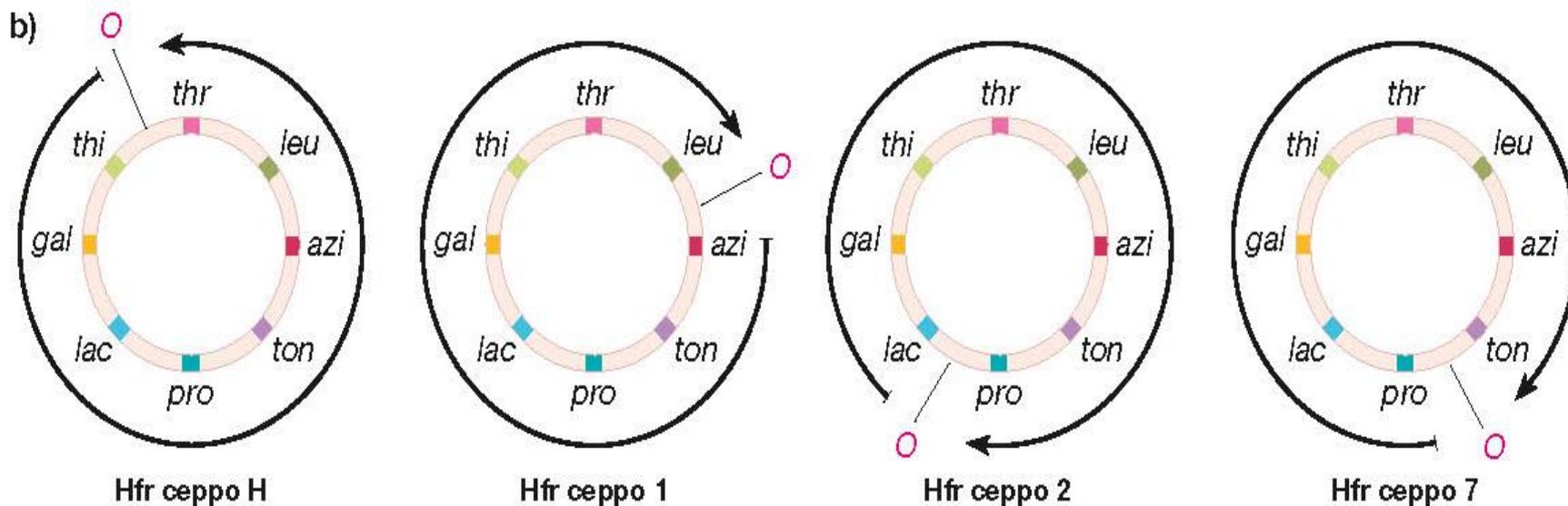


Le frequenze di ricombinazione dei geni più lontani diminuiscono in funzione della distanza dall'origine a causa di rotture dell'apparato di coniugazione

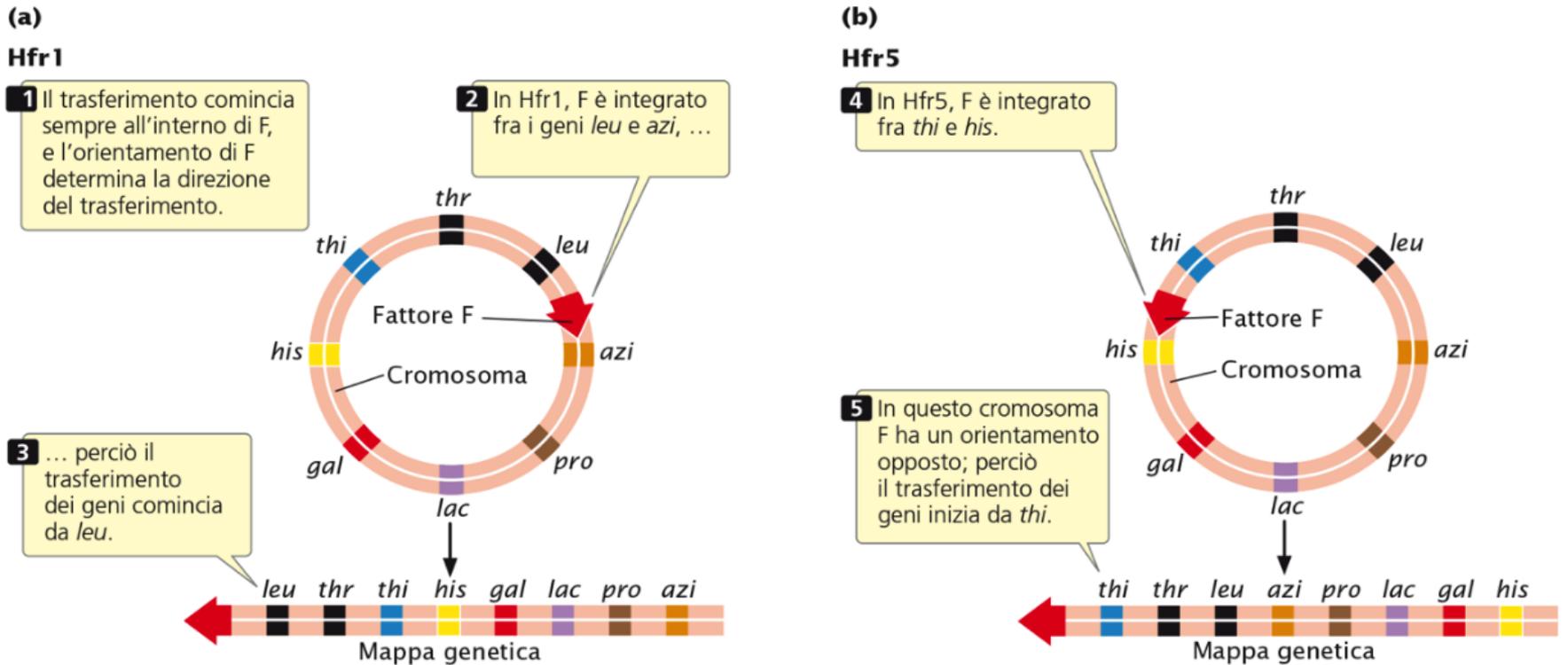
# Hfr diversi producono ricombinanti diversi

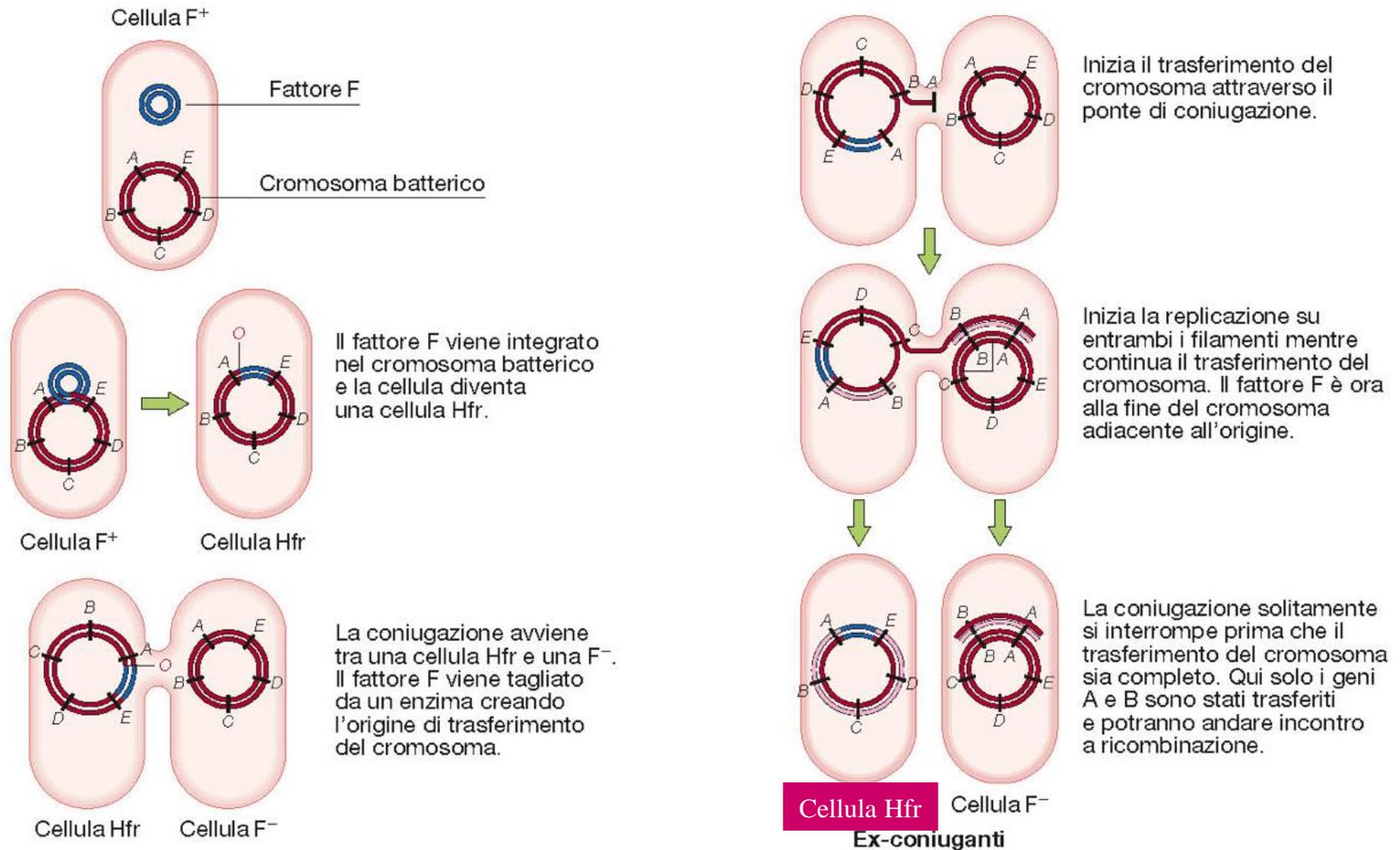
a)

Ceppo Hfr	← Ordine di trasferimento → (primi) (ultimi)
H	<i>thr</i> - <i>leu</i> - <i>azi</i> - <i>ton</i> - <i>pro</i> - <i>lac</i> - <i>gal</i> - <i>thi</i>
1	<i>leu</i> - <i>thr</i> - <i>thi</i> - <i>gal</i> - <i>lac</i> - <i>pro</i> - <i>ton</i> - <i>azi</i>
2	<i>pro</i> - <i>ton</i> - <i>azi</i> - <i>leu</i> - <i>thr</i> - <i>thi</i> - <i>gal</i> - <i>lac</i>
7	<i>ton</i> - <i>azi</i> - <i>leu</i> - <i>thr</i> - <i>thi</i> - <i>gal</i> - <i>lac</i> - <i>pro</i>



L'integrazione di F in siti diversi del cromosoma determina il trasferimento di geni diversi nella cellula ricevente. Importante sia il sito d'integrazione che l'orientamento

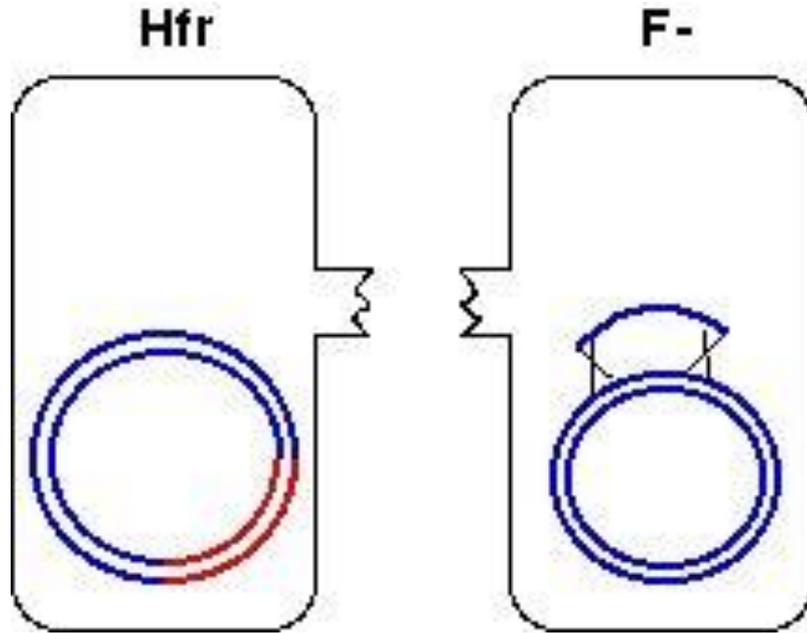




Il risultato di un incrocio Hfr x F<sup>-</sup> è una cellula Hfr ed una F<sup>-</sup>

Il genoma di F passa solo in piccola parte nella cellula recipiente ma non trovando omologia non ricombina con nessun gene cromosomico

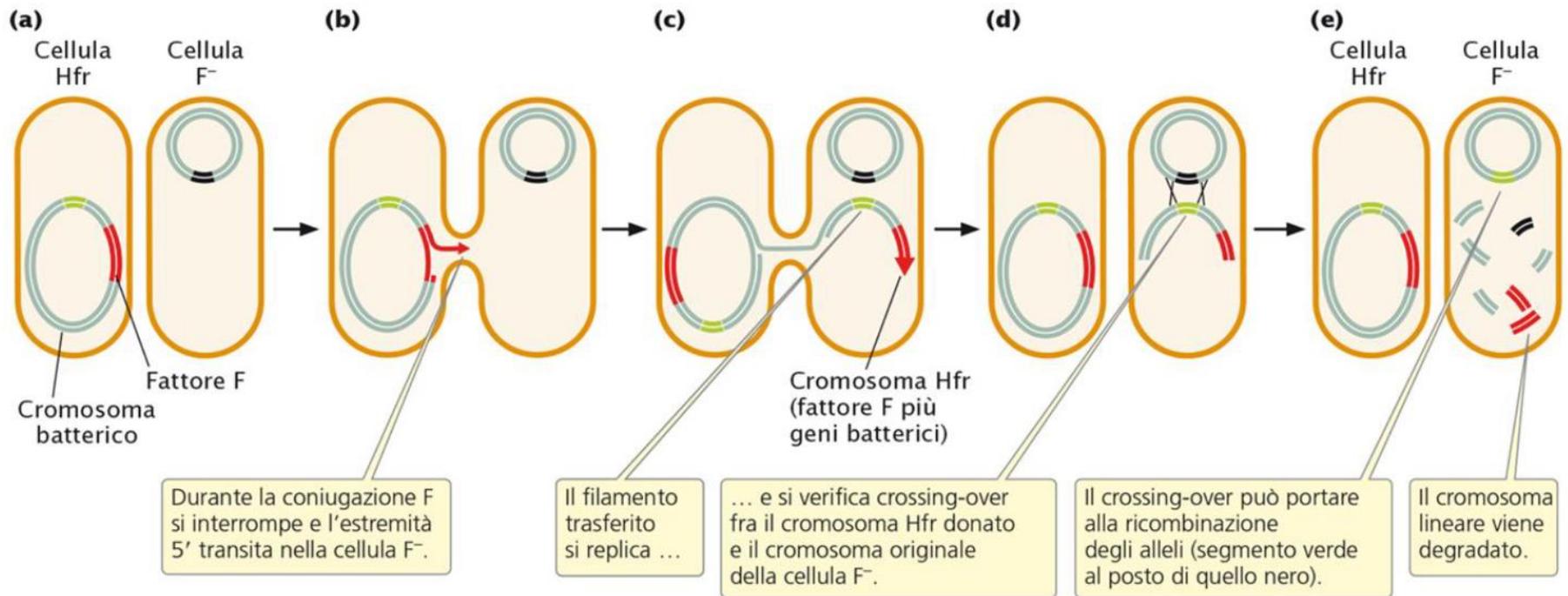
## Risultato di un incrocio Hfr x F-



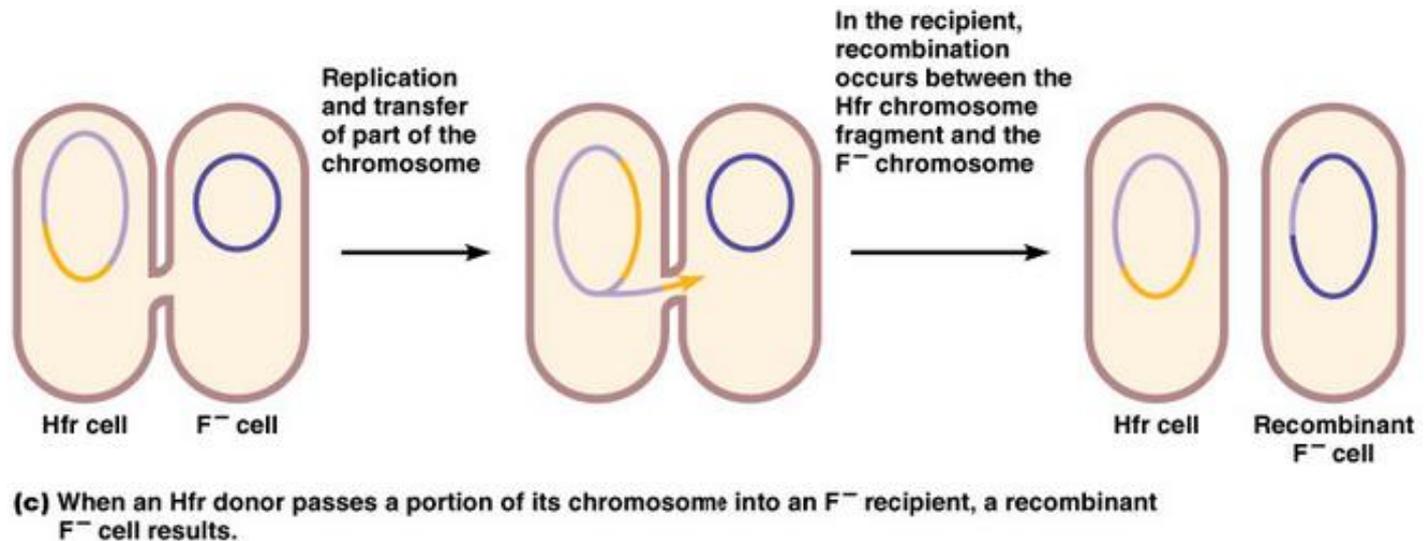
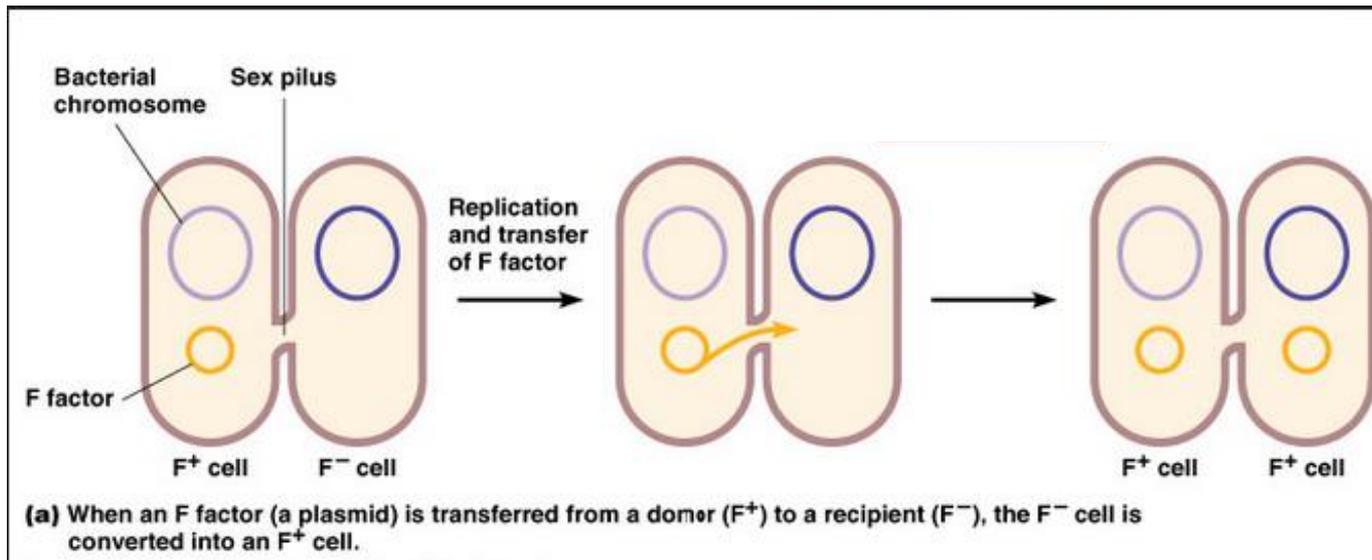
In un incrocio Hfr x F- otterremo alla fine una cellula Hfr ed una F- nella quale potrà aver luogo la ricombinazione del frammento di DNA cromosomico del donatore ereditato per trasferimento.

I ricombinanti nel ceppo recipiente si vengono a formare perchè il frammento cromosomico trasferito se troverà sequenze omologhe sul cromosoma del recipiente ricombinerà . Altrimenti verrà degradato.

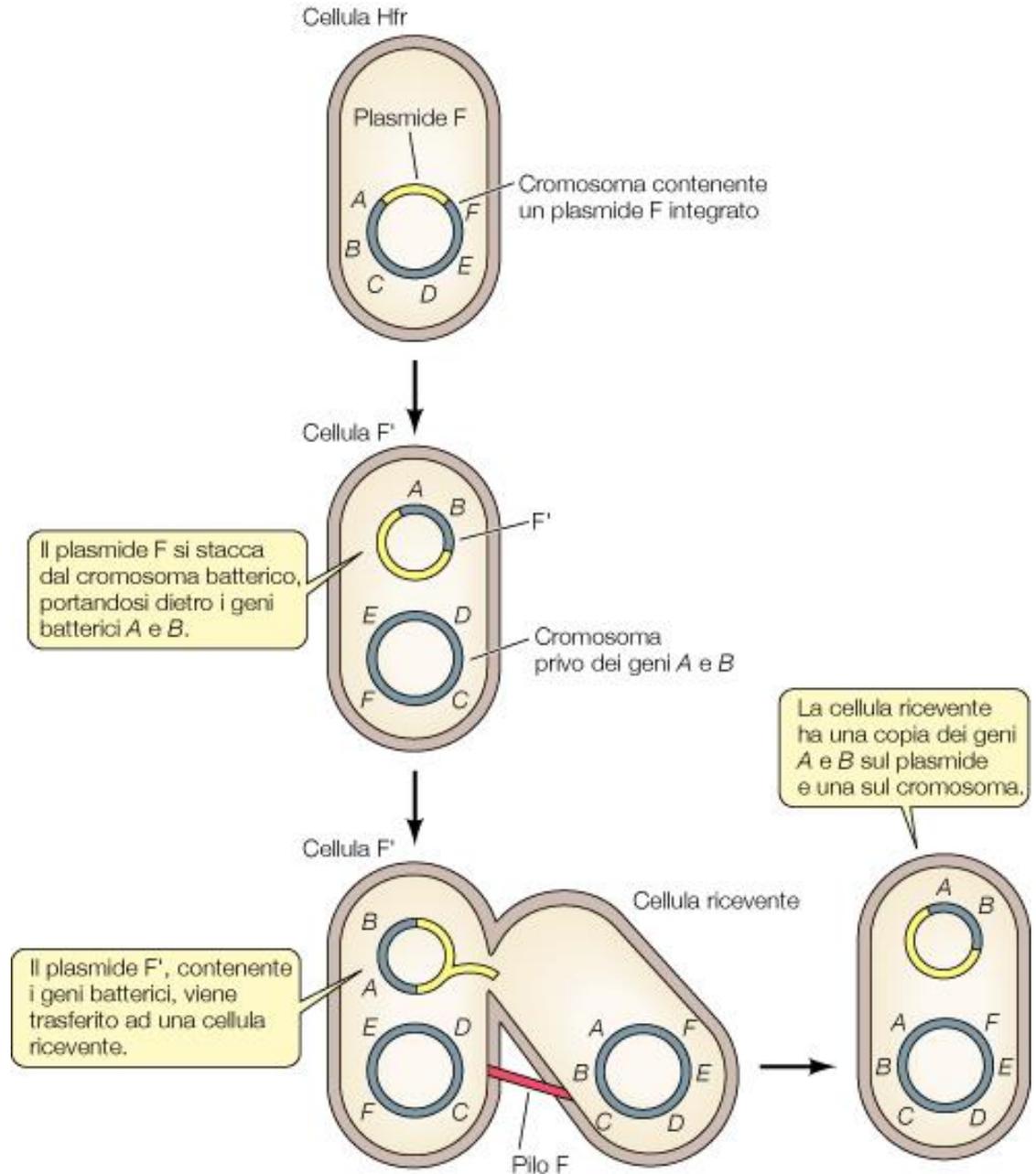
# Visione d'insieme del processo di coniugazione tra un Hfr e un F<sup>-</sup>

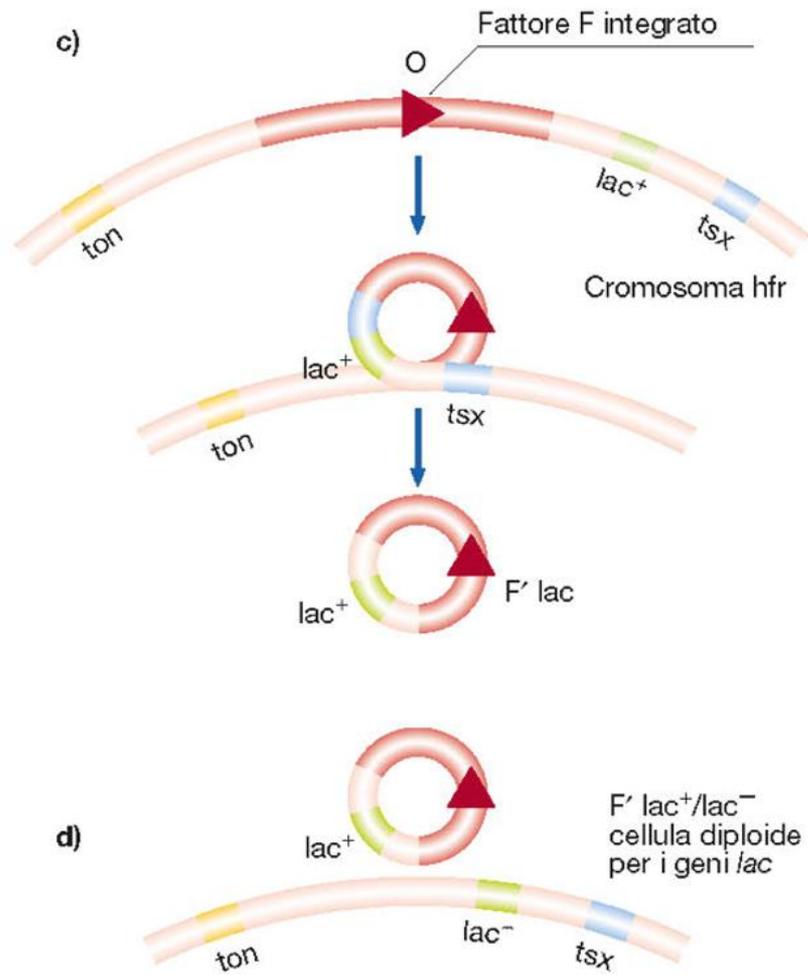


# Differenze tra la coniugazione mediata da Hfr e da F+



Formazione dei plasmidi F' contenenti regioni del cromosoma per excisione imprecisa





I plasmidi di tipo F' contengono quindi dei frammenti di DNA cromosomico che possono essere trasferiti da una cellula all'altra creando dei merodiploidi parziali .

$E.coli lac^-F'lac \times E.coli Lac^+ = E.coli Lac^+ F'lac$

L'operone lac è presente in duplice copia nel genoma della cellula ricevente.

Questo ha permesso di eseguire tutti gli esperimenti di complementazione per capire la struttura dell'operone lac

Altro argomento :

Plasmidi e tumorigenesi nelle piante

## PRODUZIONE DI

Batteriocine	diffuso
Proteasi	<i>Streptococcus lactis</i>
Esotossina	<i>Clostridium botulinum</i>
Enterotossina	<i>E.coli, Staph.aureus</i>
Emolisina	<i>E.coli, Strep.fecalis</i>
Idrogeno solforato	<i>E.coli</i>
Cloramfenicolo	<i>Streptomyces</i>
Siderofori	diffuso

## METABOLISMO DI

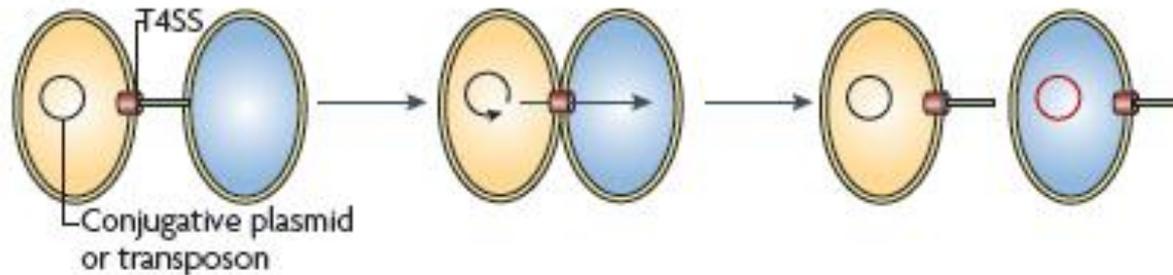
vari zuccheri	diffuso
Idrocarburi (toluene, xilene, canfora, etc)	<i>Pseudomonas</i>
Azoto (fissazione)	<i>Klebsiella</i>

## ONCOGENESI NELLE PIANTE

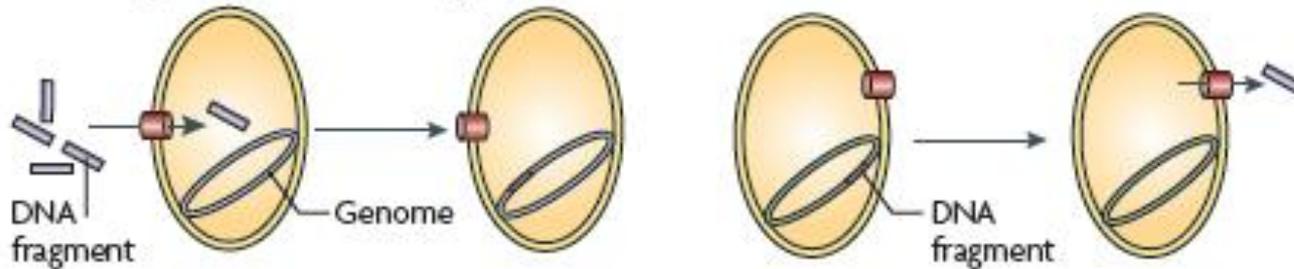
*Agrobacterium tumefaciens*

# Ruolo del sistema di tipo IV nei batteri

a Conjugation



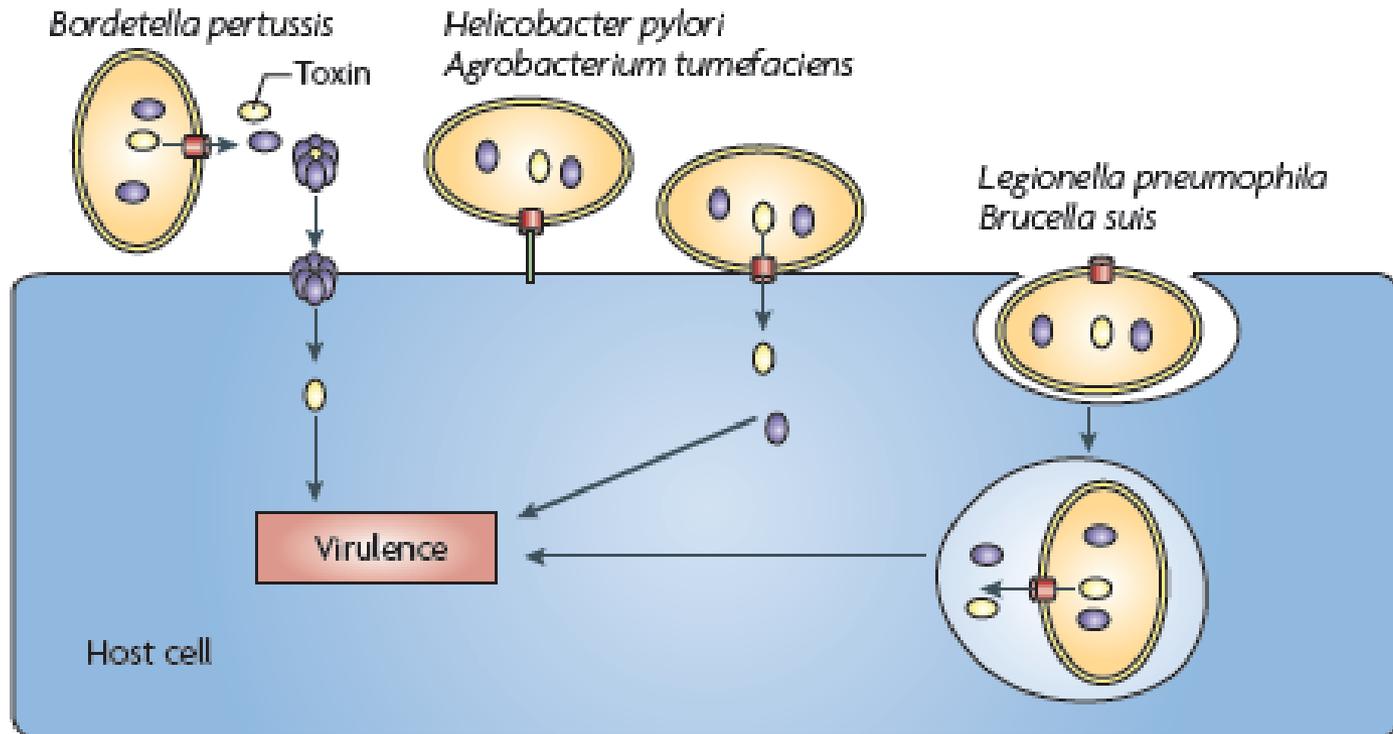
b DNA uptake (transformation) and release



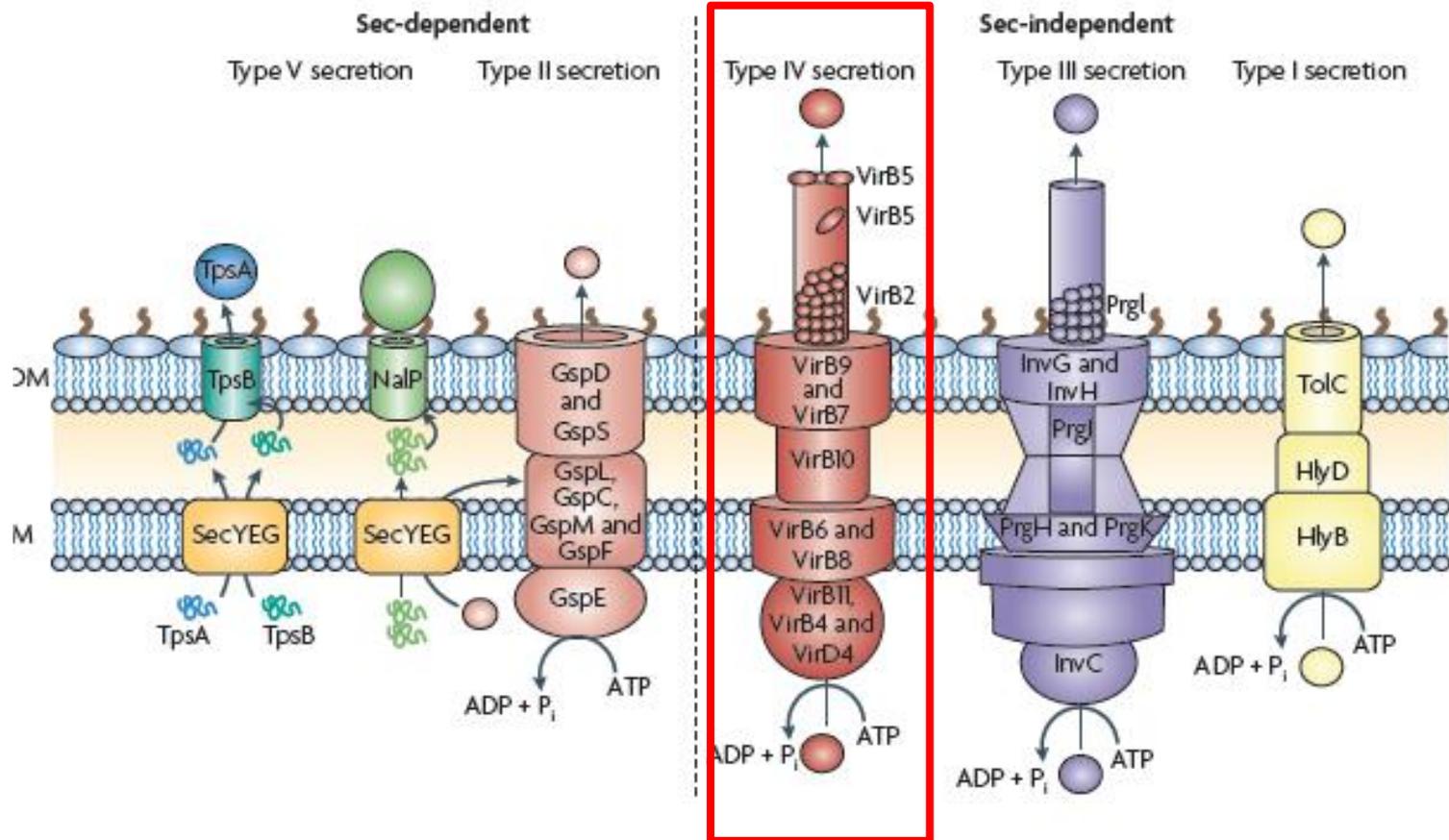
- coinvolto nel fenomeno di coniugazione
- coinvolto in nella cattura di DNA

- coinvolto nella traslocazione di DNA o proteine nelle cellule eucariotiche

**c Effector translocation**



Box 1 | Schematic overview of the major protein secretion systems in Gram-negative bacteria



Il sistema di esportazione di tipo IV è presente nei Gram+ e Gram- e può secernere un ampio numero di substrati diversi . Da singole proteine, a complessi proteici a complessi DNA-proteine.

# Il sistema di esportazione di tipo IV

Evolutivamente legato al sistema di coniugazione

Costituito da un canale di traslocazione e da un adesina ( o filamento) di superficie

Mediano il trasferimento di DNA o proteine tra cellule batteriche o a cellule di funghi, piante o animali

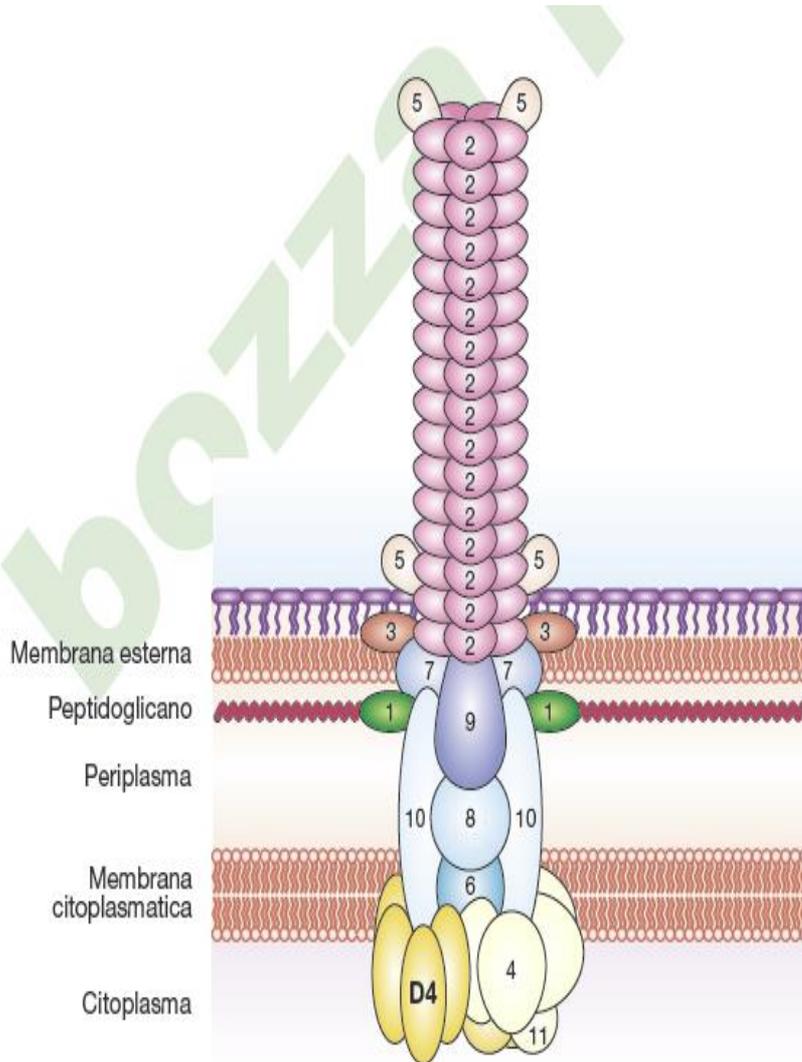
Il sistema di tipo IV è generalmente costituito

- Da 3 ATPasi citoplasmatiche forniscono l'energia (B11-B4 -D4)

- Da 2 proteine della IM che partecipano alla biosintesi dell'apparato (B6-B8)

- Da un canale di secrezione (B10-B9-B7) che attraversa le 2 membrane (IM+OM nei Gram-) attraverso il quale passano i substrati

- Da un sottile pilo o adesina che serve per il contatto con la cellula bersaglio costituito da una pilina maggiore e una minore



Considerando che durante la coniugazione assieme al trasferimento di DNA vengono trasferite proteine quali la relaxasi si può pensare che il sistema di T4S sia ancestralmente un sistema di traslocazione di fattori proteici e che incidentalmente il DNA venga trasportato all'interno di un complesso nucleoproteico.

Vi sono quindi T4S che trasportano

- DNA e proteine
- solo proteine

Il sistema di tipo IV è generalmente costituito

- Da 3 ATPasi citoplasmatiche forniscono l'energia (B11-B4 -D4)
- Da 2 proteine della IM che partecipano alla biosintesi dell'apparato (B6-B8)
- Da un canale di secrezione (B10-B9-B7) che attraversa le 2 membrane( IM+OM nei Gram-) attraverso il quale passano i substrati
- Da un sottile pilo o adesina che serve per il contatto con la cellula bersaglio costituito da una pilina maggiore e una minore

# Il plasmide TI e la formazione di tumori nelle piante

Alcuni microrganismi sono patogeni per le piante ed inducono la formazione di tumori

*Agrobacterium tumefaciens* induce la formazione di tumori a cresta di gallo

*Agrobacterium rizogenes* induce tumori alle radici

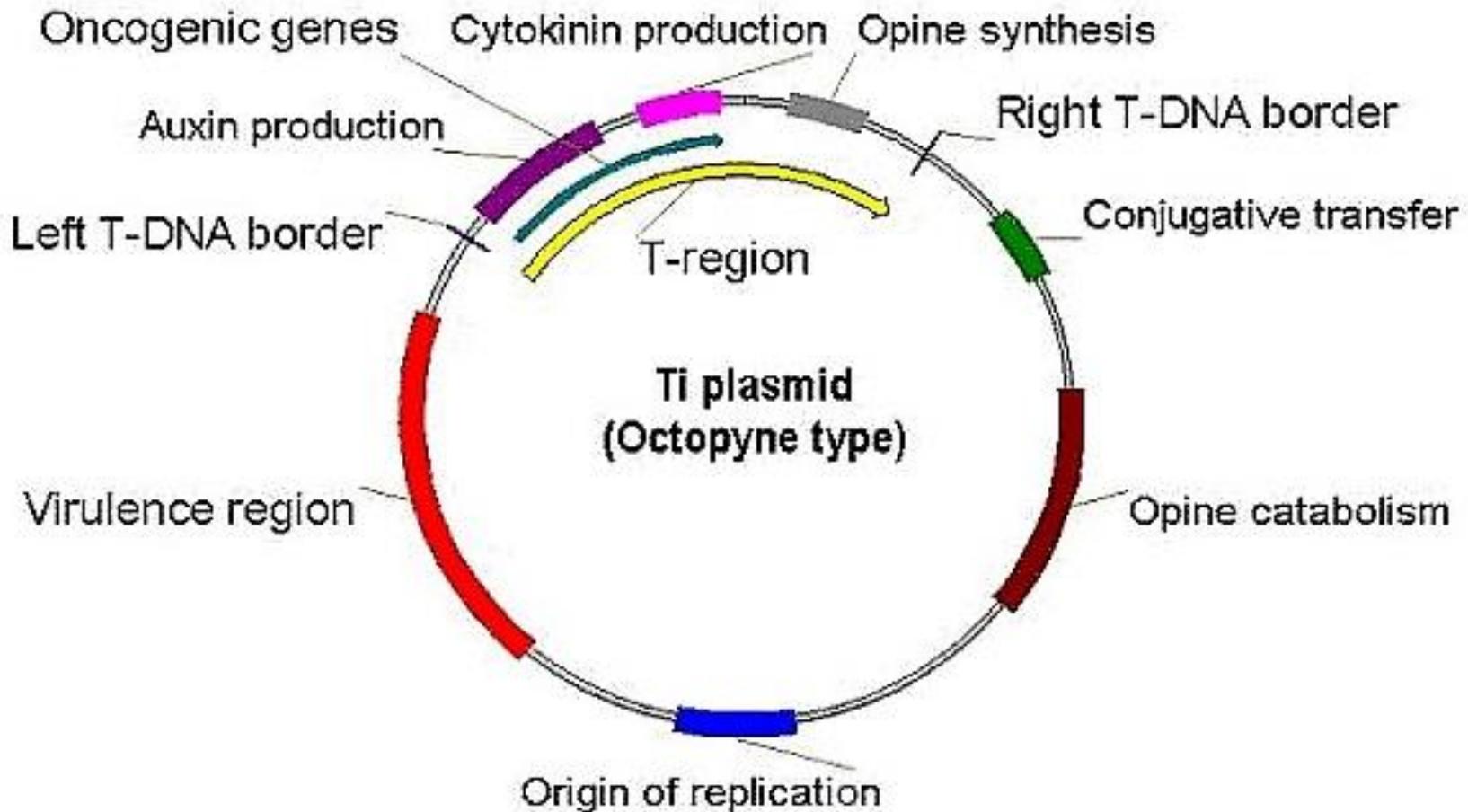


La rimozione del microrganismo dalla pianta non elimina il tumore

Il tumore viene indotto dal plasmide Ti (Tumor induction) in *A. tumefaciens* e dal plasmide Ri in *A. rizogenes*

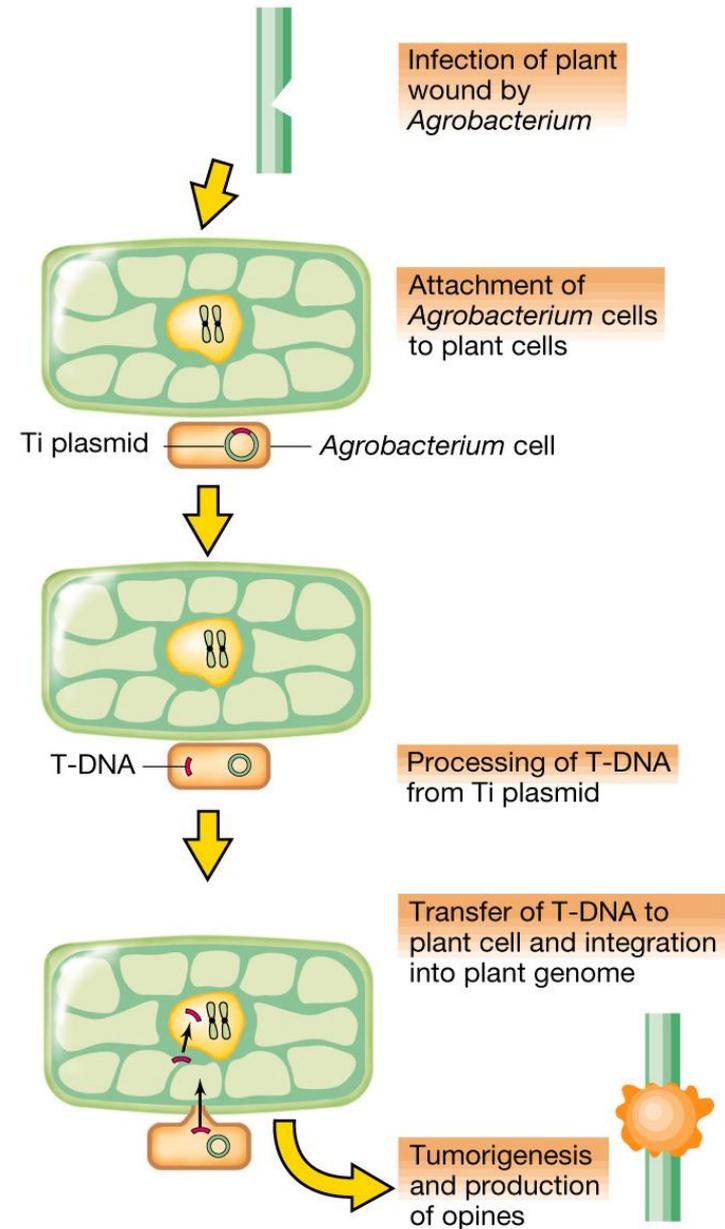
# Struttura del plasmide TI di *Agrobacterium*

La regione T (Transfer DNA) viene trasferita dal microrganismo al genoma della pianta.



Il processo di infezione prevede il riconoscimento da parte del batterio di molecole recettore presenti sulla superficie del batterio e sulla cellula vegetale.

Il recettore della pianta è costituito da una pectina (polisaccaride complesso) e quello del batterio costituito da glucani del lipopolisaccaride



Subito dopo l'attaccamento si osserva da parte del batterio la sintesi di microfibre di cellulosa che ancorano ulteriormente il batterio al sito d'infezione avvolgendolo in forma di aggregati sulla superficie della pianta.

**A questo punto il microrganismo trasferisce il DNA alla pianta.**

Nonostante molti geni del plasmide siano necessari per il trasferimento del T-DNA **solo la regione T viene trasferita.**

La sintesi dei geni **vir** necessari al trasferimento del T-DNA è indotta da segnali provenienti dal tessuto della pianta ferita.

**La regione T** del plasmide Ti contiene i geni necessari per

- **la formazione del tumore**
- **per la produzione di alcuni aminoacidi modificati definiti OPINE**

**Octopina** (N<sup>2</sup>-1,3 dicarboxyethyl)-L-arginina

**Nopalina** (N<sup>2</sup>-1,3- dicarboxypropyl)-L-arginina

sono prodotte dalla pianta in seguito a trasformazione da parte del T-DNA e sono una fonte di carbonio ed azoto per le cellule di *Agrobacterium*

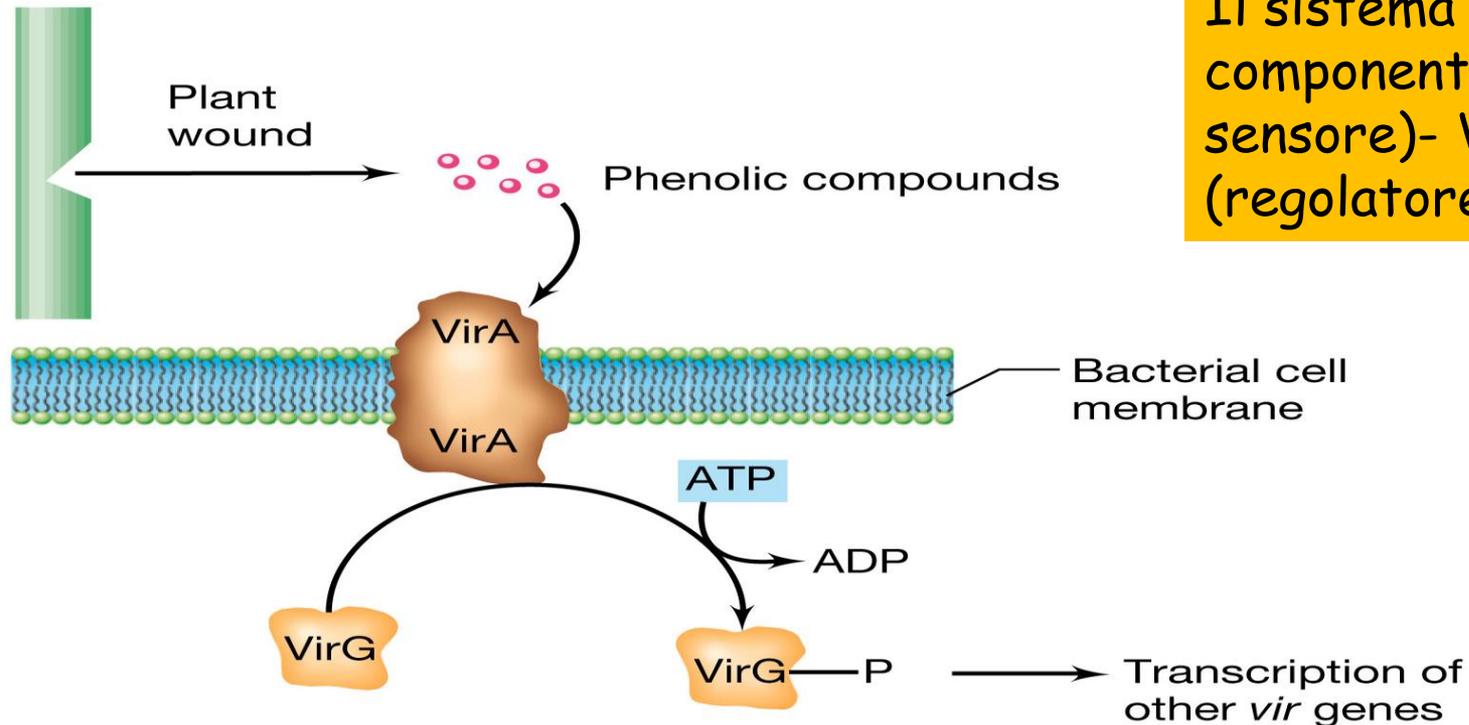
I geni vir sono essenziali per il processo di trasferimento del T-DNA

VirG fosforilata attiva gli altri geni vir.

VirD è una endonucleasi che taglia il DNA del plasmide Ti

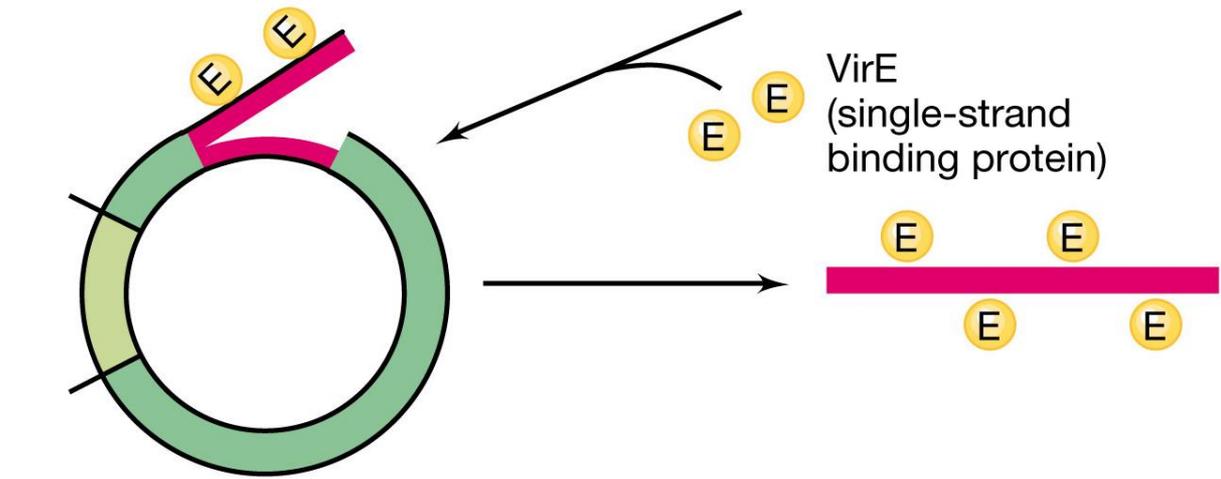
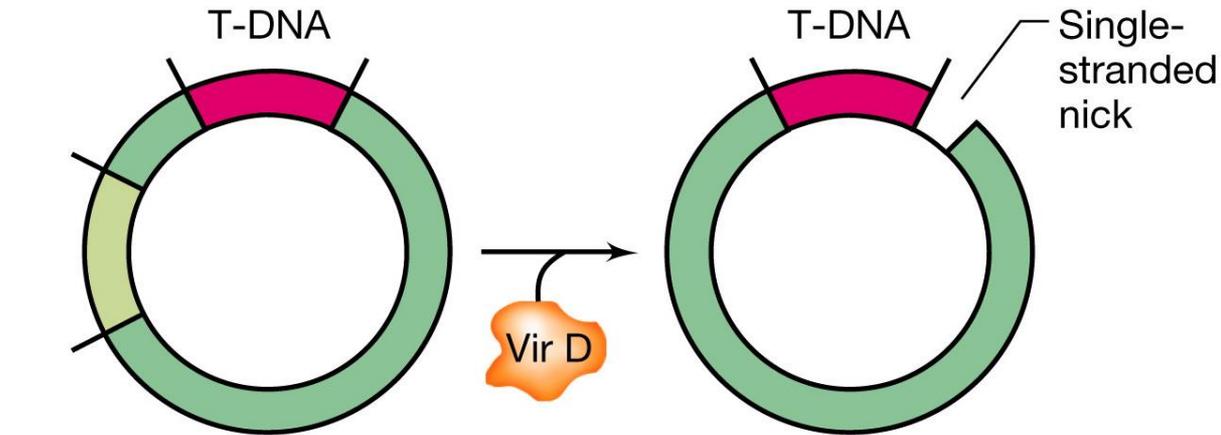
## Il sistema *VirA* -*VirG* costituisce un sistema di trasduzione del segnale a 2 componenti

*VirA* è una protein chinasi che interagisce con alcuni induttori prodotti dalla pianta (composti fenolici acetosiringone, acido para idrossi-benzoico, vanillina) e fosforila la proteina *VirG*.

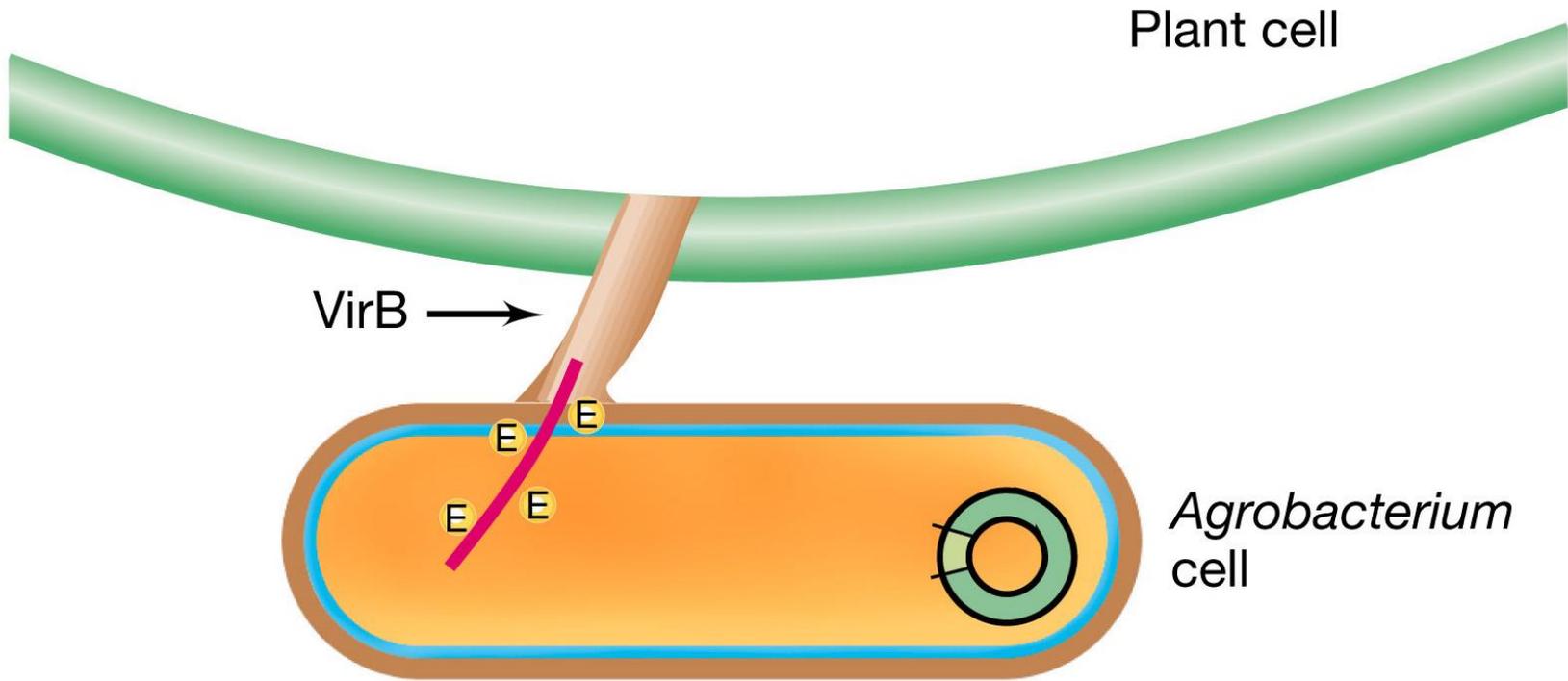


Il sistema a due componenti *VirA* (sensore)- *VirG* (regolatore)

(a)

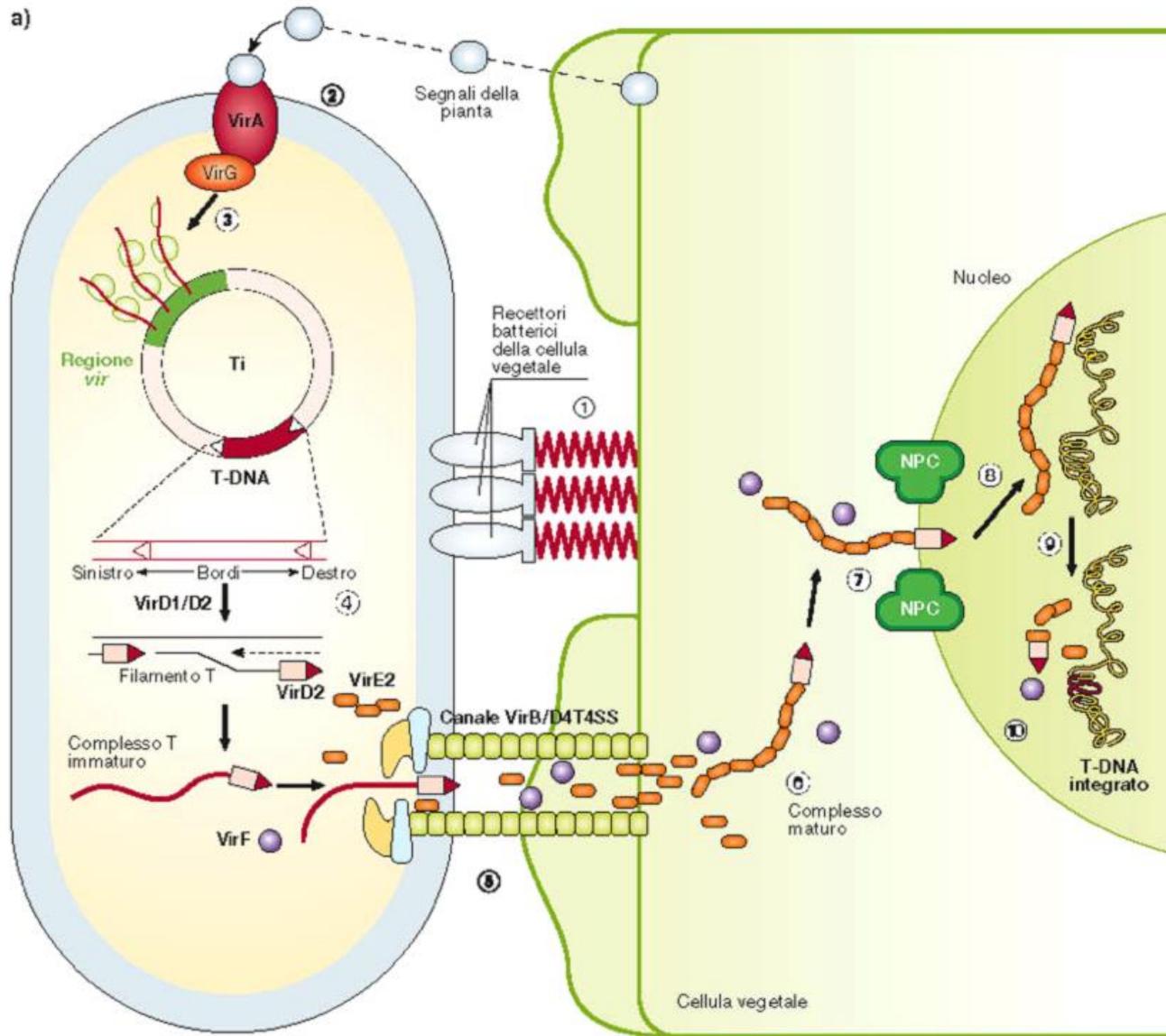


**Vir E** è la proteina che lega il DNA SS generato dal taglio della endonucleasi **VirD** e lo trasporta nella cellula vegetale



(d)

**VirB** agisce come ponte tra il batterio e la pianta.

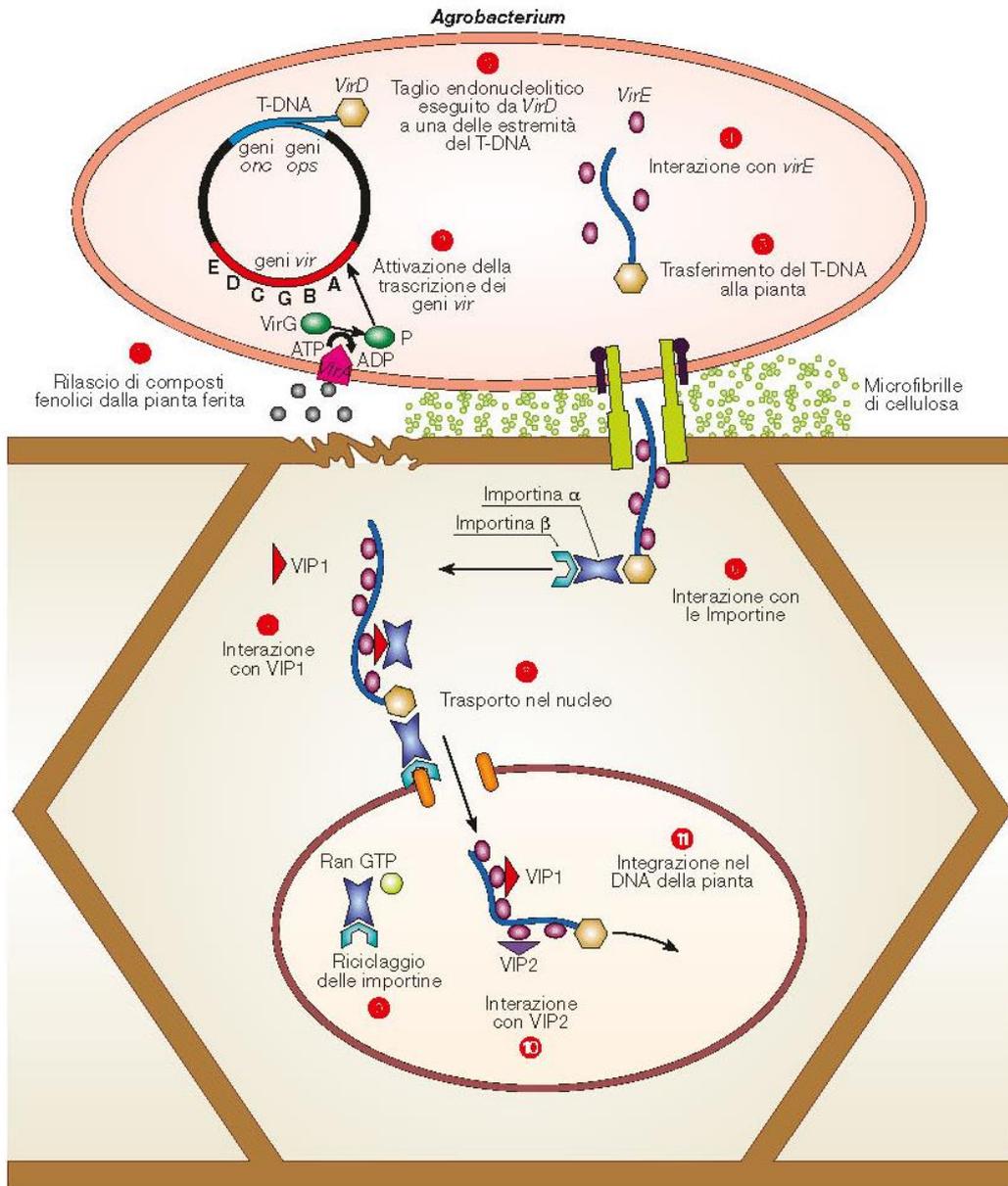


Modello recente del trasferimento di DNA da *Agrobacterium* alla piante.

Il T DNA si integra in numerosi siti del genoma della pianta dove sono presenti sequenze ripetute in orientamento diretto o inverso.

I geni tumorigenici (onc) del plasmide codificano geni coinvolti nella sintesi di ormoni da parte della pianta oltre ad enzimi coinvolti nella sintesi di ponte.

Il plasmide Ti grazie alla regione T può essere un segmento importante per la generazione di piante transgeniche



Il processo di trasferimento del frammento T è mediato dalla proteina VirB. Nel citoplasma il complesso T-DNA VirD-VirE si associa alle importine alfa e beta e alla proteina VIP1 che lo trasportano nel nucleo. A questo punto le importine vengono staccate dalla GTPasi Ran e il T-DNA viene riconosciuto da VP2

# Confronto tra il sistema di trasformazione del plasmide Ti e la coniugazione

