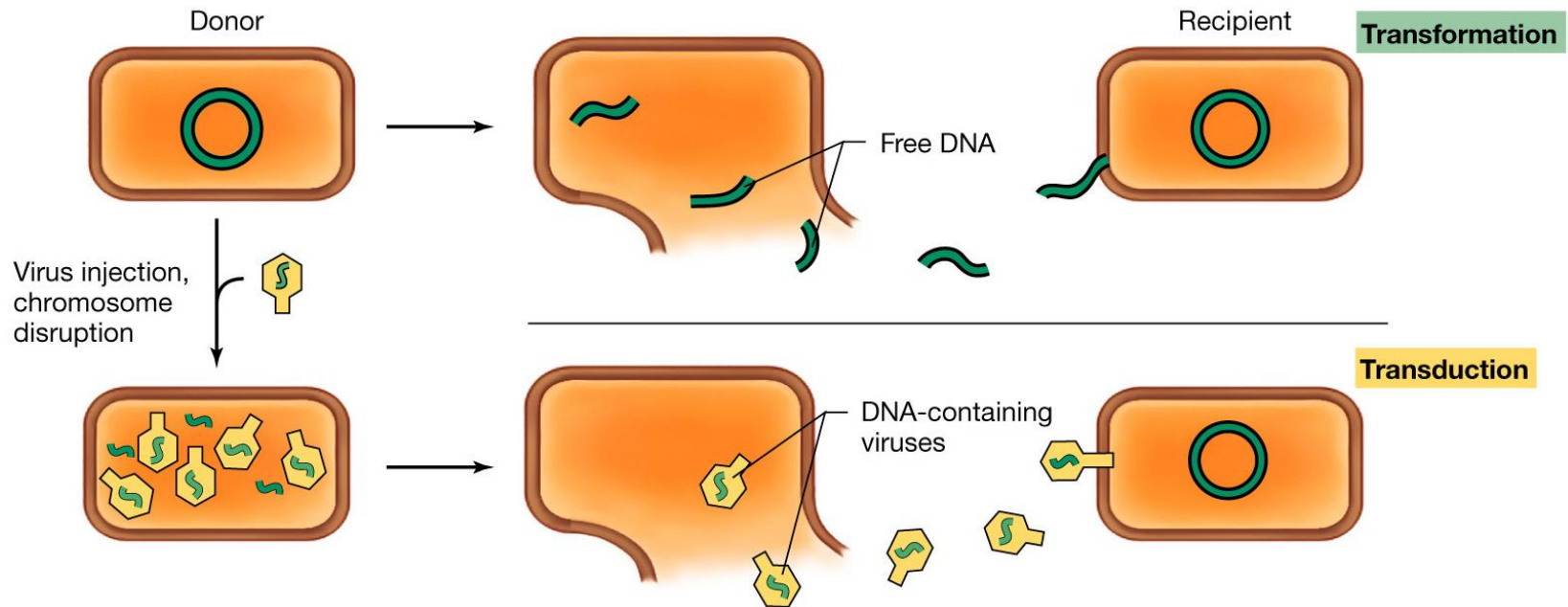


Trasformazione un altro meccanismo importante per trasferimento dell'informazione genetica nei batteri



Come nel caso della trasduzione generalizzata e nella coniugazione Hfr x F- anche nel caso della trasformazione il DNA che entra nella cellula recipiente o si integra grazie a regioni di omologia o viene degradato. Si ha quindi **scambio di materiale genetico** e non acquisizione. Solo nel caso di trasformazione con DNA plasmidico (rara in natura) si può avere acquisizione di materiale genetico

Colorazione con inchiostro di china che fa evidenziare la capsula definita colorazione negativa in quanto lo sfondo è colorato e la capsula non facendo penetrare il colorante appare



La trasformazione e la scoperta del DNA come materiale genetico.

Frederick Griffith negli anni 1920 studiava la patogenicità di *Streptococcus pneumoniae*, l'agente eziologico della polmonite.

S. pneumoniae è un microrganismo Gram+ dotato di capsula polisaccaridica.

Griffith osservò che

Ceppi di *S.pneumoniae* wt

- hanno capsula
- formano colonie lisce (S)
- sono invasivi
- uccidono i topi

Mutanti di *S.pneumoniae*

- non hanno capsula
- formano colonie rugose (S)
- non sono invasivi
- non uccidono i topi

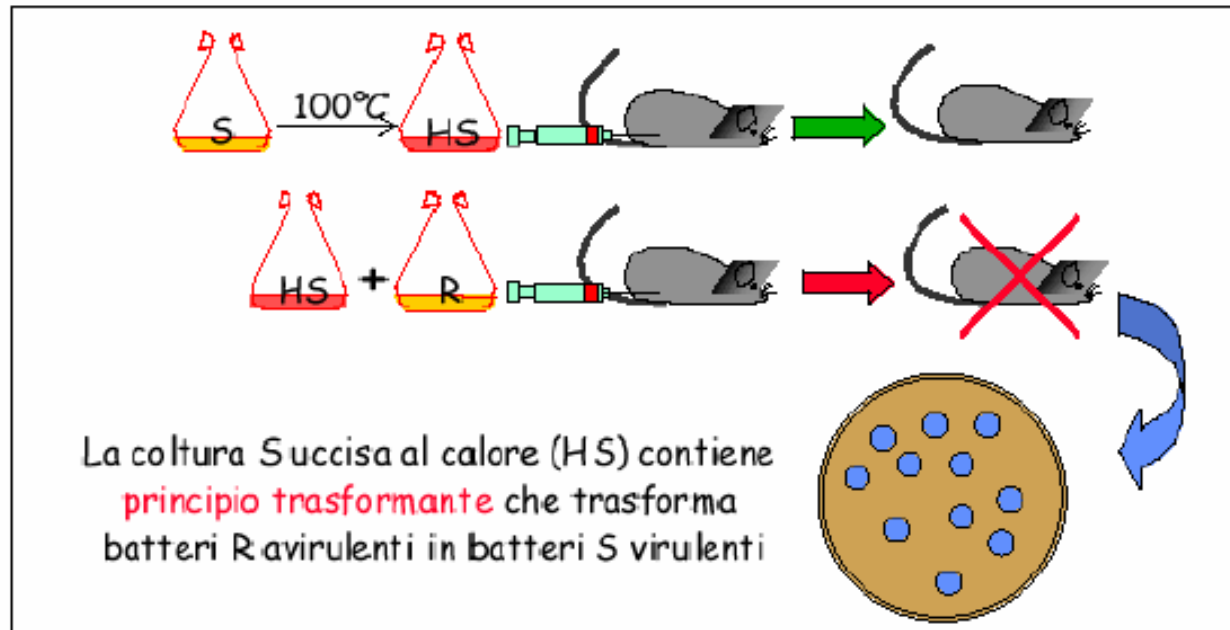
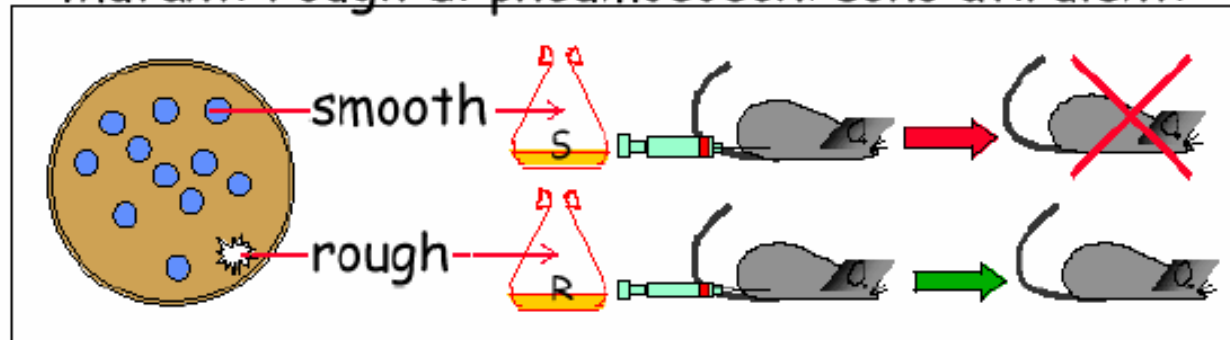
Griffith dimostrò che iniettando nei topi

cellule R assieme + cellule S uccise al calore

- i topi morivano
- dai topi si isolavano cellule S vitali

Quindi concluse che un principio trasformante
presente nelle cellule S uccise poteva
TRASFORMARE le cellule R in S.

Mutanti rough di pneumococchi sono avirulenti



Nel 1944 Avery , MacLeod e McCarty dopo aver riprodotto la trasformazione in vitro cercarono di identificare da un punto di vista biochimico il principio trasformante. *S. pneumoniae* poteva venir trasformato non solo per la capsula ma anche per altri caratteri.

Solo in seguito alla digestione con nucleasi (e non a quelle con proteasi o RNasi) il principio trasformante perdeva le proprie capacità.

Da qui la prima dimostrazione che
DNA fosse il materiale genetico di una cellula

Esperimento di Avery, McLeod, McCarty (1944)

STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE
INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES

INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION
ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III

By OSWALD T. AVERY, M.D., COLIN M. MacLEOD, M.D., AND
MACLYN McCARTY,* M.D.

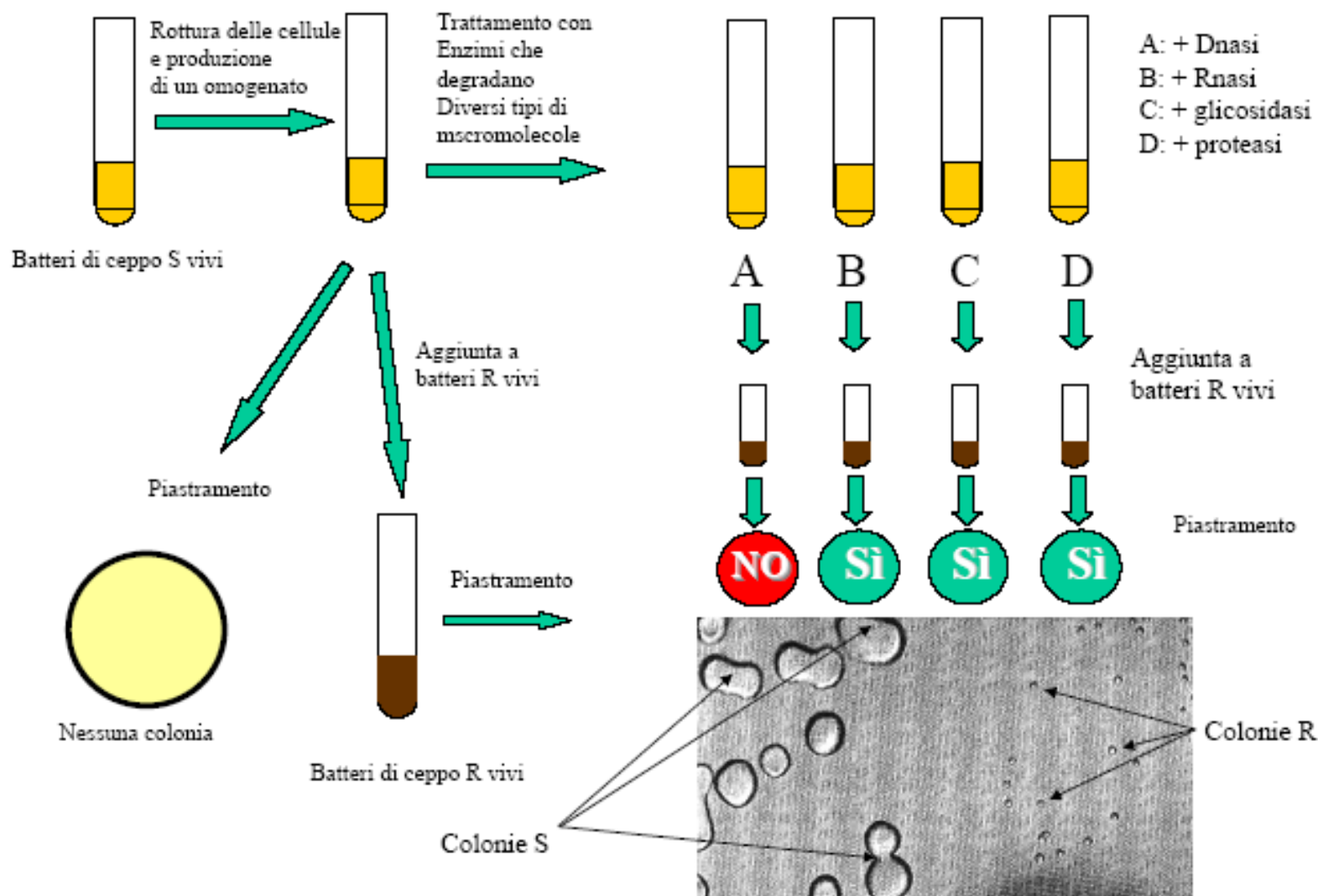
(From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research)

PLATE 1

(Received for publication, November 1, 1943)



Esperimento di Avery, McLeod, McCarty (1944)



Avery (1944) purificò il **principio trasformante** ottenendo una frazione ricca in DNA, ma contenente anche proteine, carboidrati e RNA.

Il principio trasformante fu sottoposto a trattamenti enzimatici:

ENZIMA	ATTIVITA'
Proteasi	intatta
Glicosidasi	intatta
RNasi	intatta
DNasi	assente

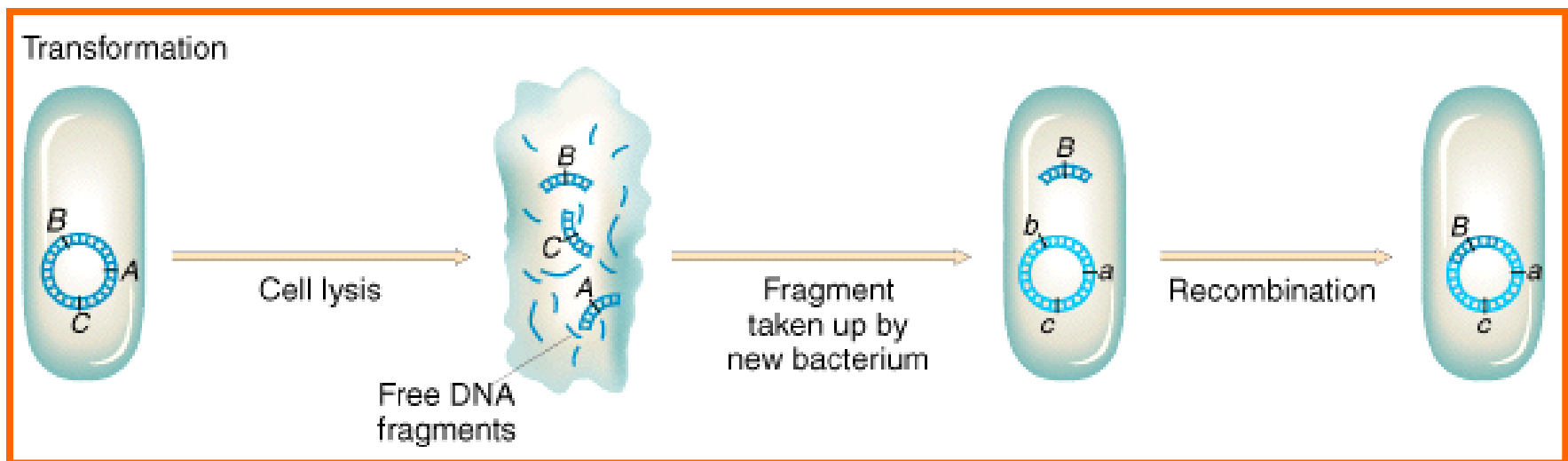
**Il principio trasformante è sensibile solo alla Dnasi,
quindi è costituito di DNA**

Avery, O.T., C.M. MacLeod and M. MacCarthy. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 79:137-158 (1944)

LA TRASFORMAZIONE

La trasformazione è il fenomeno per il quale la cellula batterica è in grado di assorbire DNA nudo dall'ambiente e integrarlo nel proprio cromosoma.

Questa capacità, detta competenza, è naturalmente espressa da alcuni microrganismi (in particolare *Gram positivi* come *Bacillus subtilis* e *Streptococcus pneumoniae*) mentre in altri può essere indotta (per esempio nei *Gram negativi* come *E.coli*).



La trasformazione "naturale" richiede DNA a doppia elica :
le dimensioni dei frammenti variano da 0.5 kb a 30-40 kb
ma l'efficienza è molto bassa con frammenti troppo piccoli o
grandi.

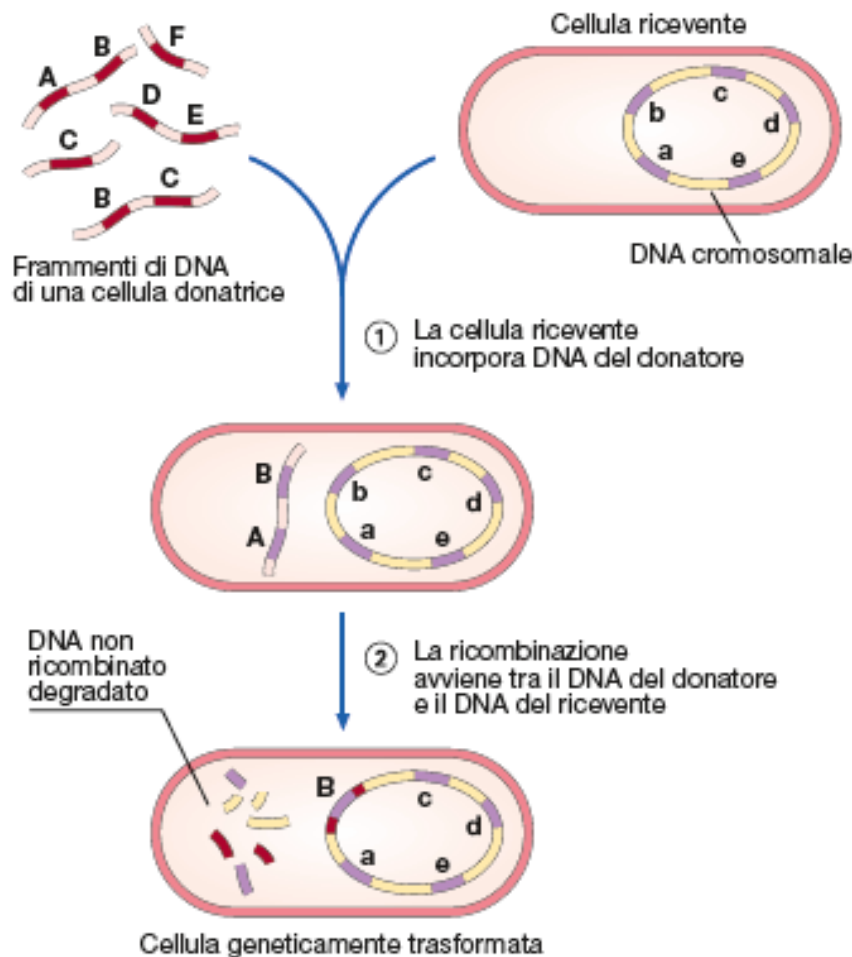
È un processo abbastanza diffuso sia nei Batteri che negli
Archea : tra i Batteri che vivono nel suolo circa il 5% è
trasformabile, la percentuale scende molto considerando
batteri di altri habitat. Tra i batteri trasformabili
"naturalmente" vi sono diversi batteri patogeni
(*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*)

Per assumere DNA dall'ambiente i batteri devono raggiungere
lo stato di competenza. La competenza è uno stato
generalmente indotto da:

Inizio fase stazionaria

Carenza nutrizionali

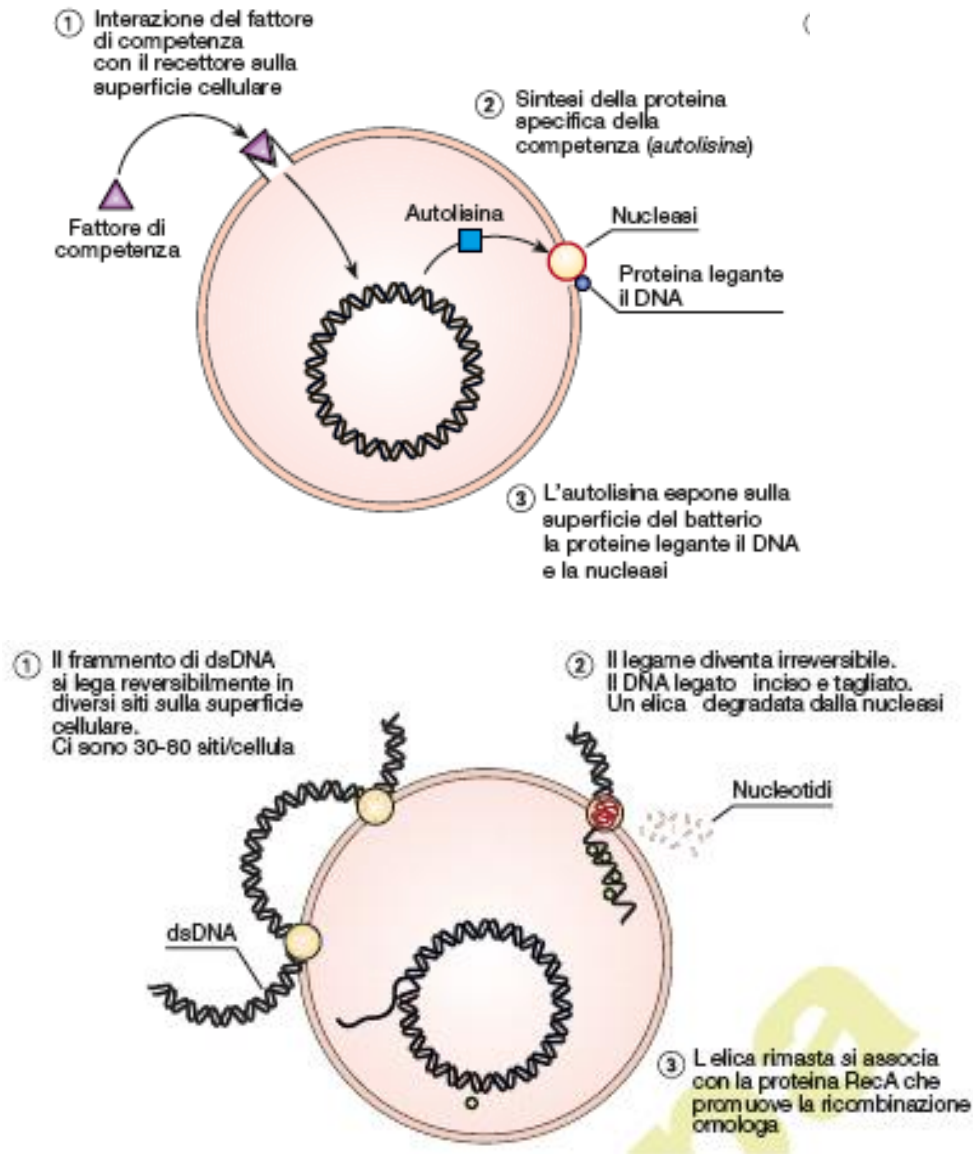
Solo in *Neisseria gonorrhoeae* le cellule sono sempre attive
per la trasformazione



La trasformazione prevede l'incorporazione di DNA libero all'interno di una cellula mediante un doppio Crossing Over (CO) nella regione corrispondente.

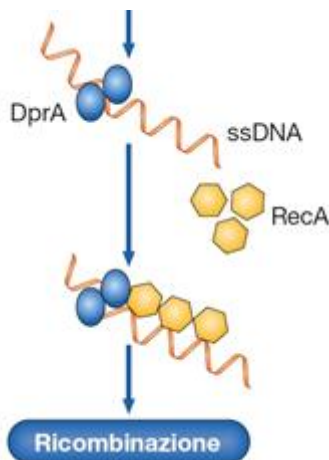
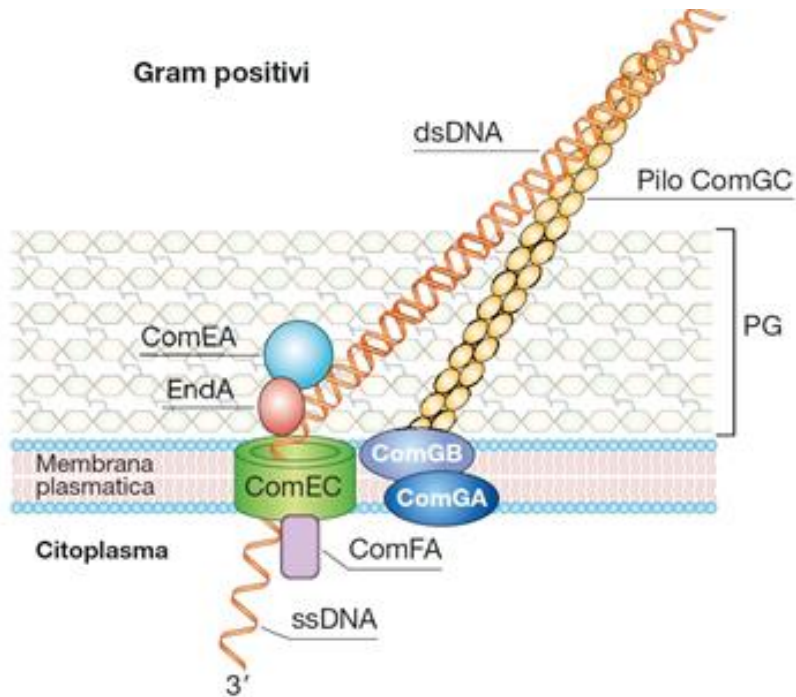
Solo il DNA omologo sarà integrato nel cromosoma sostituendo il DNA presente

Il DNA che non verrà integrato sarà degradato.



Nei batteri Gram+ in seguito alla percezione del fattore di competenza la cellula sintetizza un autolisina che permette l'esposizione sulla superficie del batterio delle proteine che legano il DNA e della nucleasi. Il DNA trasformante riconosce i recettori (da 30 a 80) sulla superficie e viene degradato in frammenti di 6-15 kb e successivamente ridotto a SS.

Proteine SSB riconoscono il singolo filamento e lo proteggono facilitandone il riconoscimento con la proteina RecA. Anche in questo caso tramite un doppio CO si avrà integrazione del frammento nel genoma.

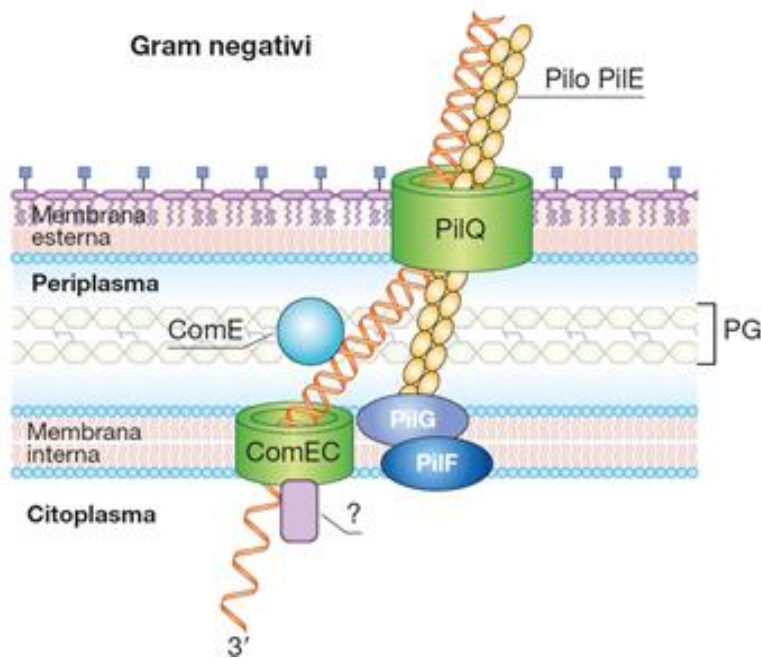


Nei batteri Gram+ quali *B.subtilis* o *S.pneumoniae*, il DNA a DS si lega irreversibilmente a proteine specifiche sulla superficie (recettori)

Dopo il legame è trasportato all'interno del citoplasma a partire da un'estremità.

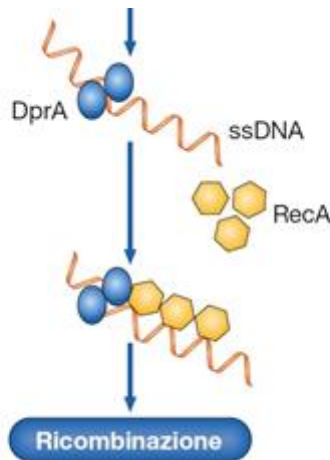
Processamento del DNA trasformante

1. viene frammentato da un'endonucleasi di superficie in frammenti da 6-15 kb a DS
2. l'endonucleasi associata alla membrana degrada uno dei due filamenti
3. Il DNA a SS viene protetto da proteine SSB
4. Il complesso DNASS-SSB si associa a RecA e può avvenire la ricombinazione



Sia nei Batteri Gram+ che Gram- è presente un pilo che attraversa la OM tramite un canale.

Il DNA trasformante deve contenere sequenze specifiche DUS (DNA Uptake Sequences) di 10-12 basi che sono ripetute ad alta frequenza nel genoma. In *N.gonorrhoeae* le DUS sono 1900 (1 ogni 1.2Kb
In *Haemophilus* le DUS sono 600 (1 ogni 4 kb) .
Questi batteri assumo DNA omologo che con un doppio CO sarà poi integrato nel cromosoma



In *H.influenzae* la competenza è comporta dei cambiamenti nella cellula stessa che sviluppa delle vescicole di membrana (10-12) dette **trasformasomi** che traslocheranno poi il DNA all'interno della cellula.

Il DNA trasformante deve contenere sequenze specifiche DUS (DNA Uptake Sequences) di 10-12 basi che sono ripetute ad alta frequenza nel genoma.

In *N.gonorrhoeae* le DUS sono 1900

In *Haemophilus* le DUS sono 600 .

Questi batteri assumo DNA omologo che con un doppio CO sarà poi integrato nel cromosoma

Significato biologico della trasformazione

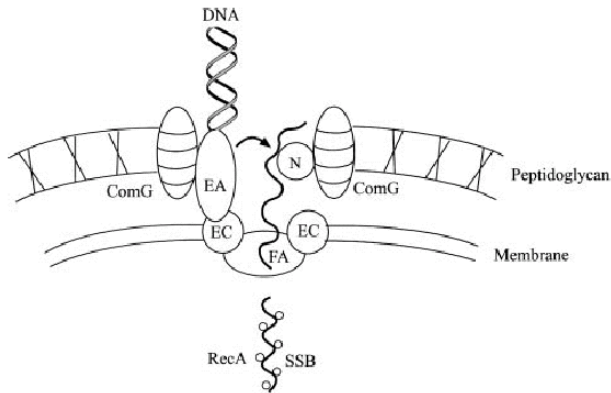
La trasformazione è una delle risposte adattative del batterio ad ambienti con scarsità di nutrienti o in presenza di stress ambientali.

In alcuni batteri la scarsità di nutrienti

1. induce la sintesi di flagelli per indurre il movimento
2. Indurre la competenza che permette al batterio di acquisire DNA esogeno come fonte di nutrienti o per aumentare diversità genetica
3. induzione della sporulazione come ultima possibilità di resistere a condizione avverse.

Competenza naturale

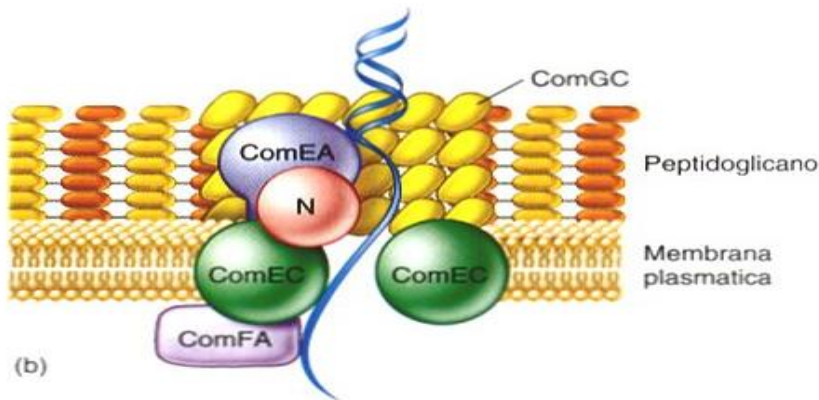
La capacità che alcuni microrganismi hanno di prelevare del DNA dall'ambiente è determinata dal possedere complessi proteici deputati a questo scopo. In *Bacillus subtilis* un complesso di numerose proteine è coinvolto in questo processo.....



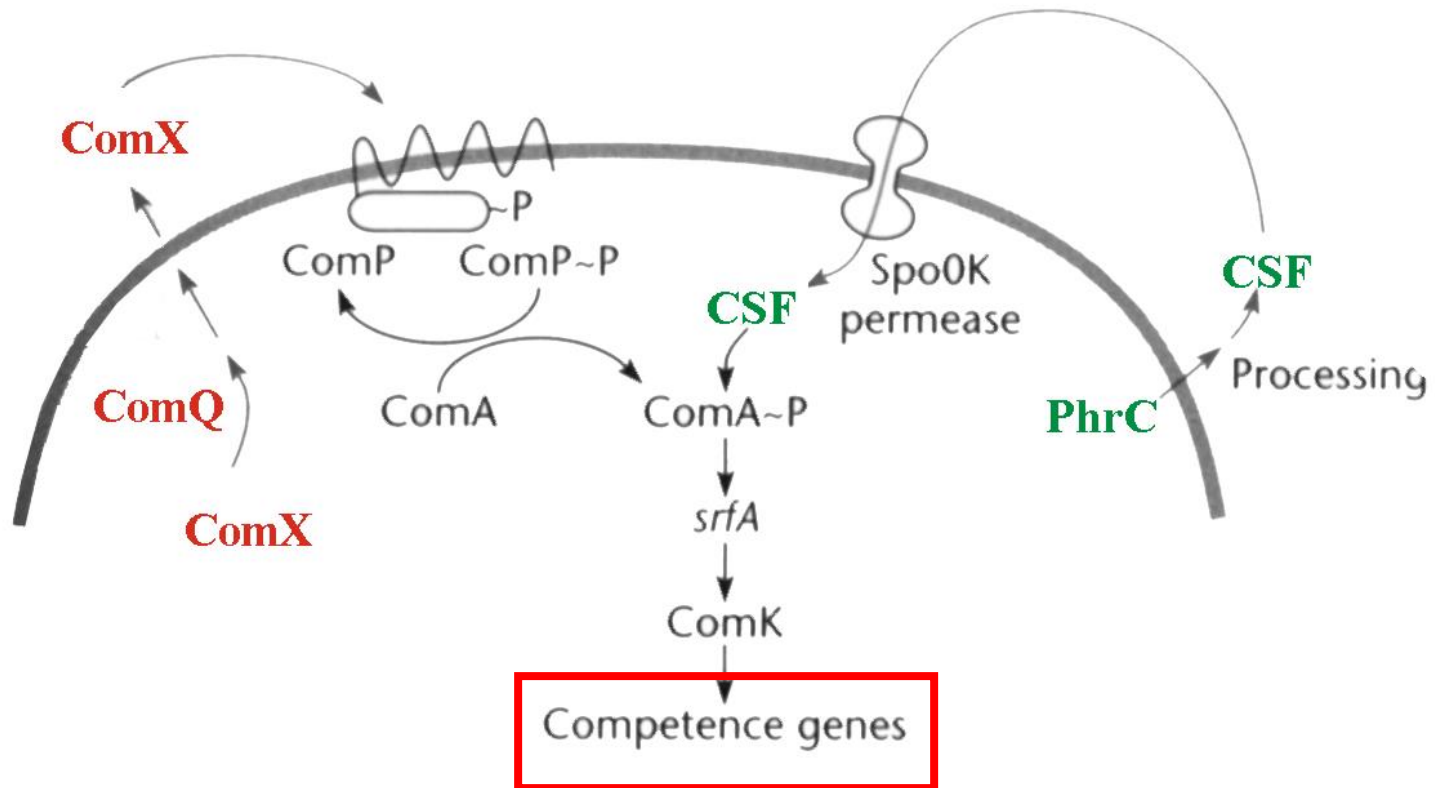
ComG forma il canale nella parete cellulare.

ComEA, EC ed FA sono responsabili del trasporto e del trasferimento del DNA nella cellula.

Infine NucA (N) è la nucleasi che trasforma il dsDNA in ssDNA



Quorum sensing ed induzione della competenza in *Bacillus subtilis*

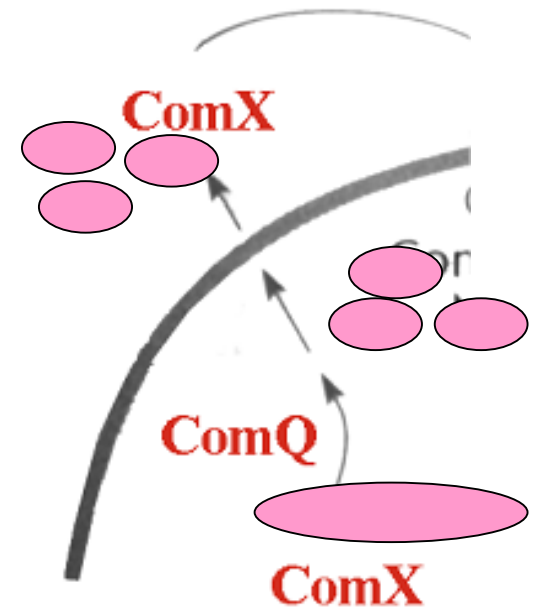


Induzione della competenza in *B. subtilis*.

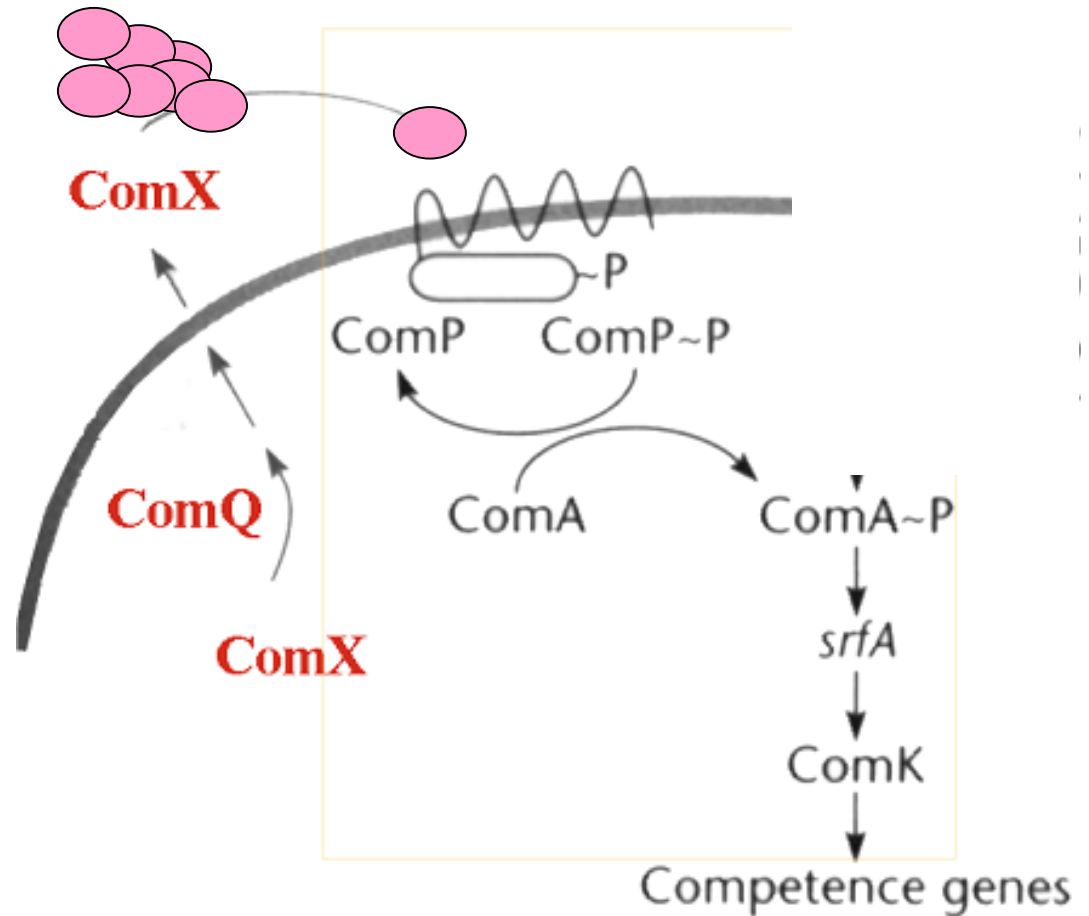
ComX è un piccolo peptide che viene attivamente secreto dalle cellule

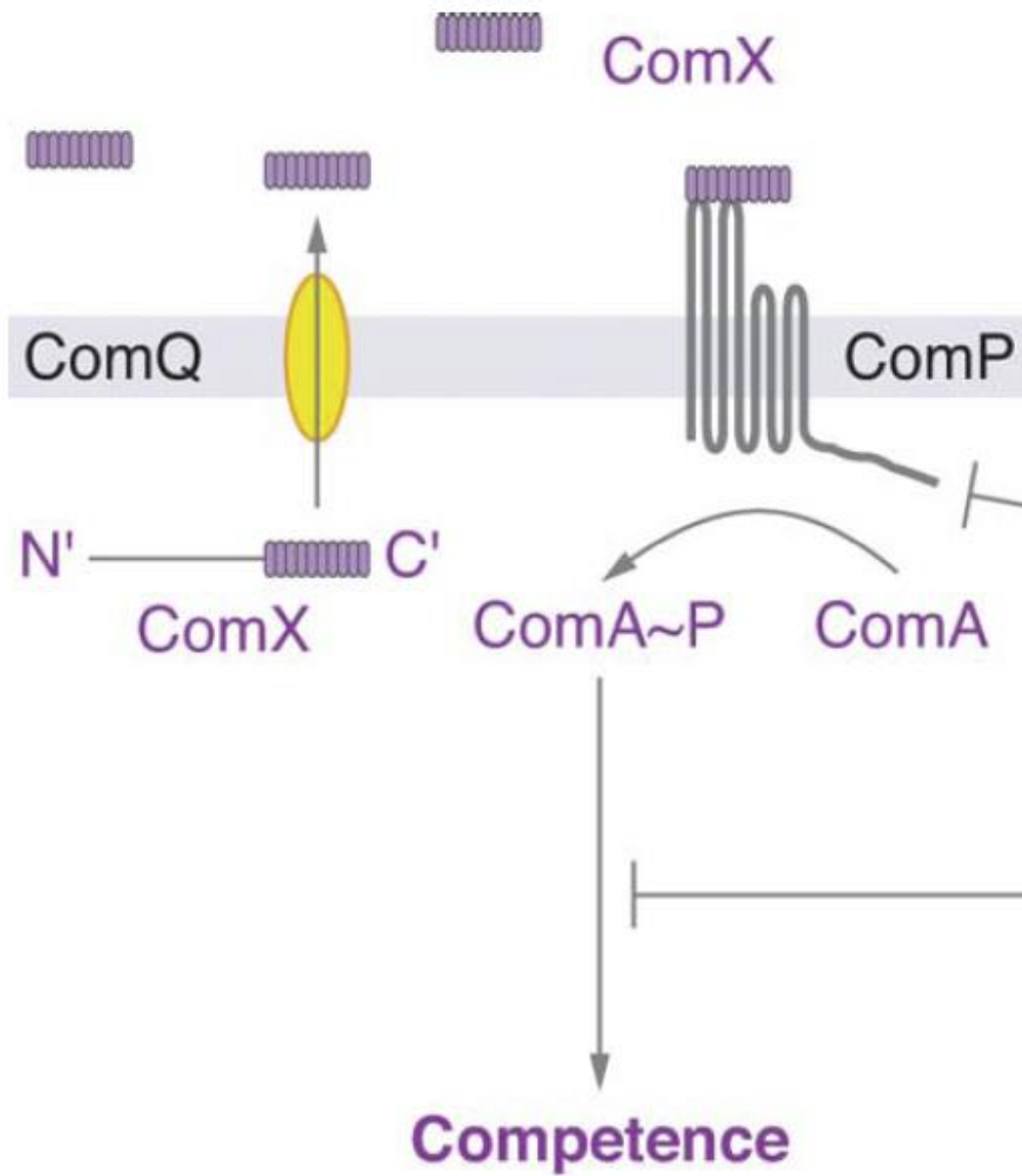
ComX viene sintetizzato nel citoplasma come una molecola più grande che viene tagliata e modificata da ComQ.

ComX matura viene secreta e raggiunge un'alta concentrazione extracellulare solo quando vi sono molte cellule batteriche



Quando i livelli di ComX diventano elevati Com X si lega al sensore di un sistema a due componenti costituito da ComP e ComA. ComP si autofosforila e ComP-P fosforila il regolatore della risposta ComA. ComA-P va ad attivare tramite l'attivazione di altri due geni , tutti i geni di competenza





Competenza indotta

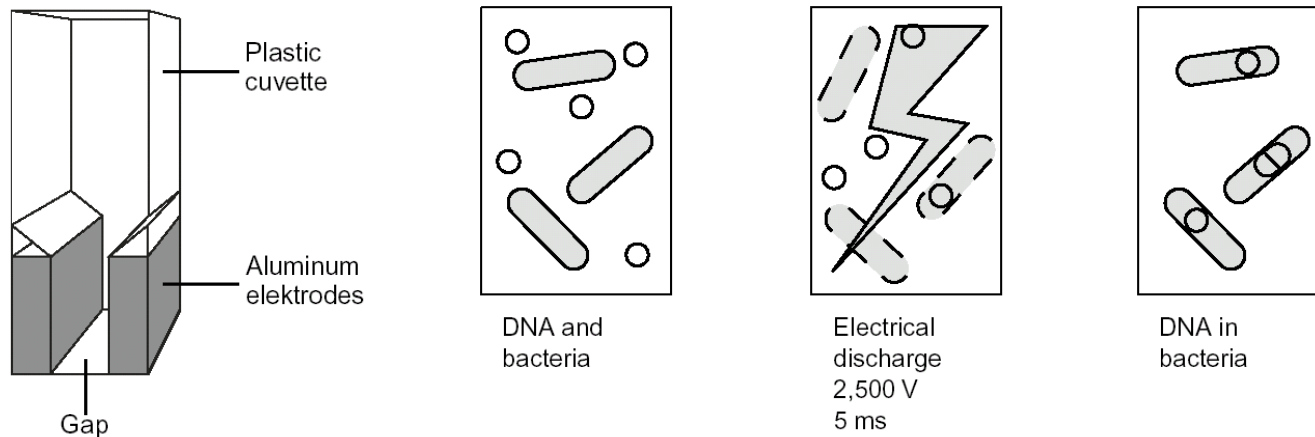
La competenza può essere indotta mediante trattamento delle cellule con opportuni agenti chimici o fisici.

- Chemical transformation
 - Calcium chloride procedure (Cohen et al. 1973)
 - Calcium chloride/rubidium chloride (Kushner 1978)
 - Hexamine cobalt etc. (Hanahan 1983)
 - PEG, DMSO and Mg^{++} (Chung et al. 1989)
- Electroporation

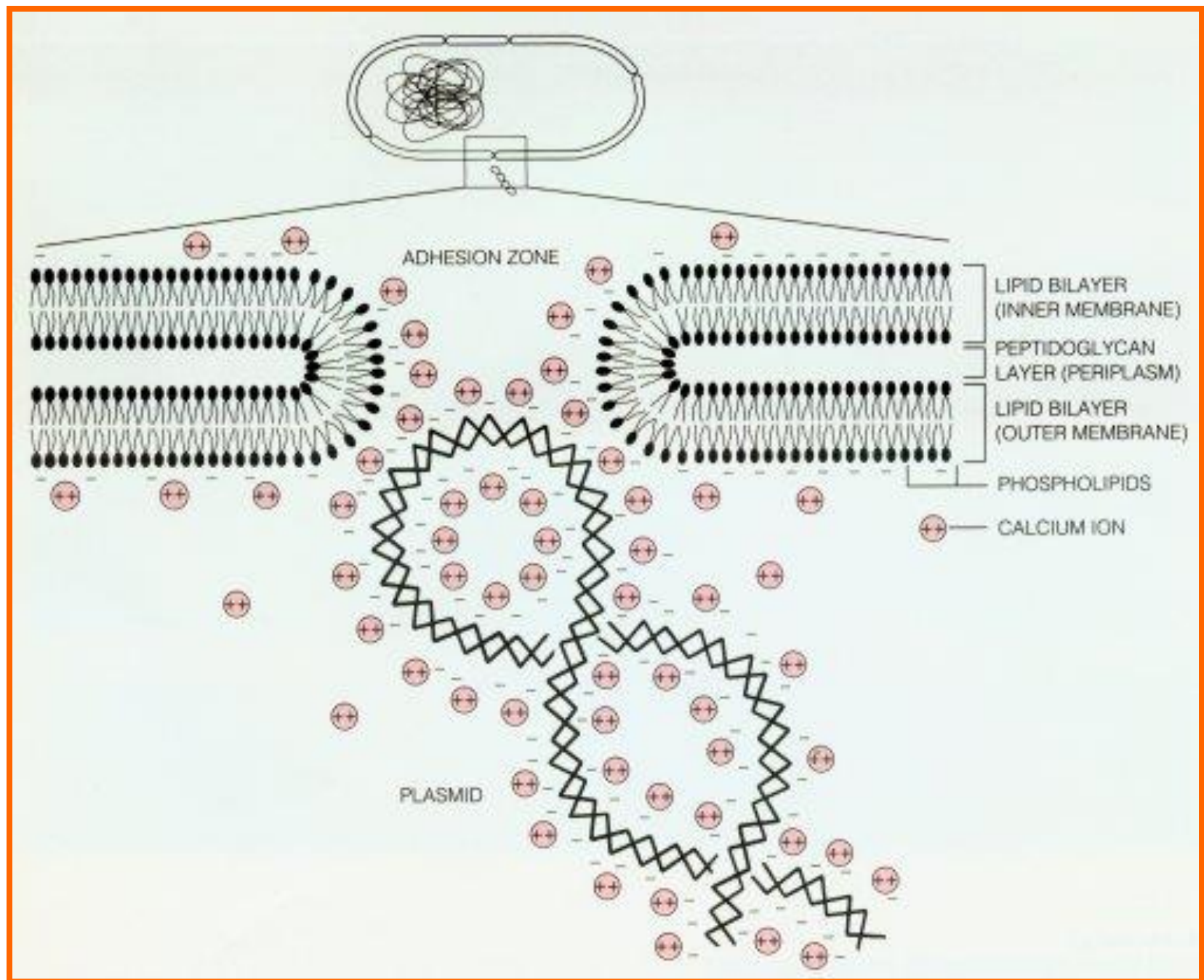
Elettroporazione

Un altro metodo sperimentale per ottenere la trasformazione dei microrganismi consiste nell'esporre le cellule e il DNA, nella stessa mix, ad una repentina e elevata scarica elettrica.

Lo shock provocato da questo trattamento determina l'internalizzazione del DNA e quindi la trasformazione.



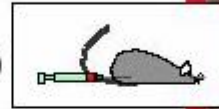
L'elettroporazione è, sperimentalmente, sino a 100 volte più efficace della trasformazione in CaCl_2 . Inoltre si propone anche come metodo di elezione nella trasformazione dei microrganismi unicellulari eucariotici come *Saccharomyces caerevisiae*



La scoperta del DNA come materiale genetico :

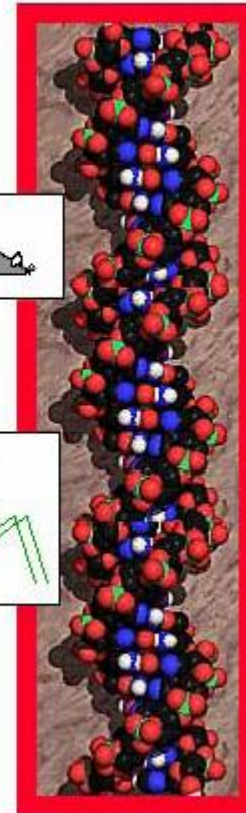
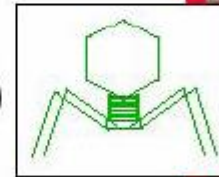
3 importanti esperimenti storici

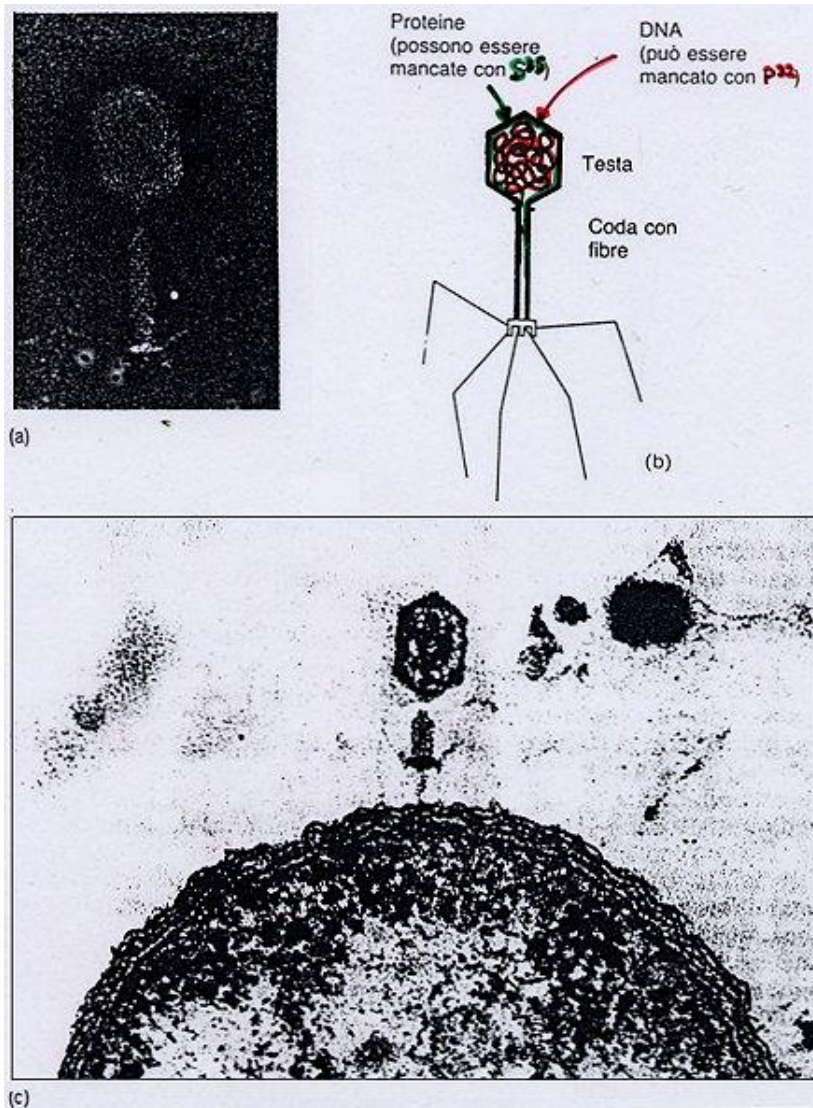
Griffith (1925)



Avery (1944)

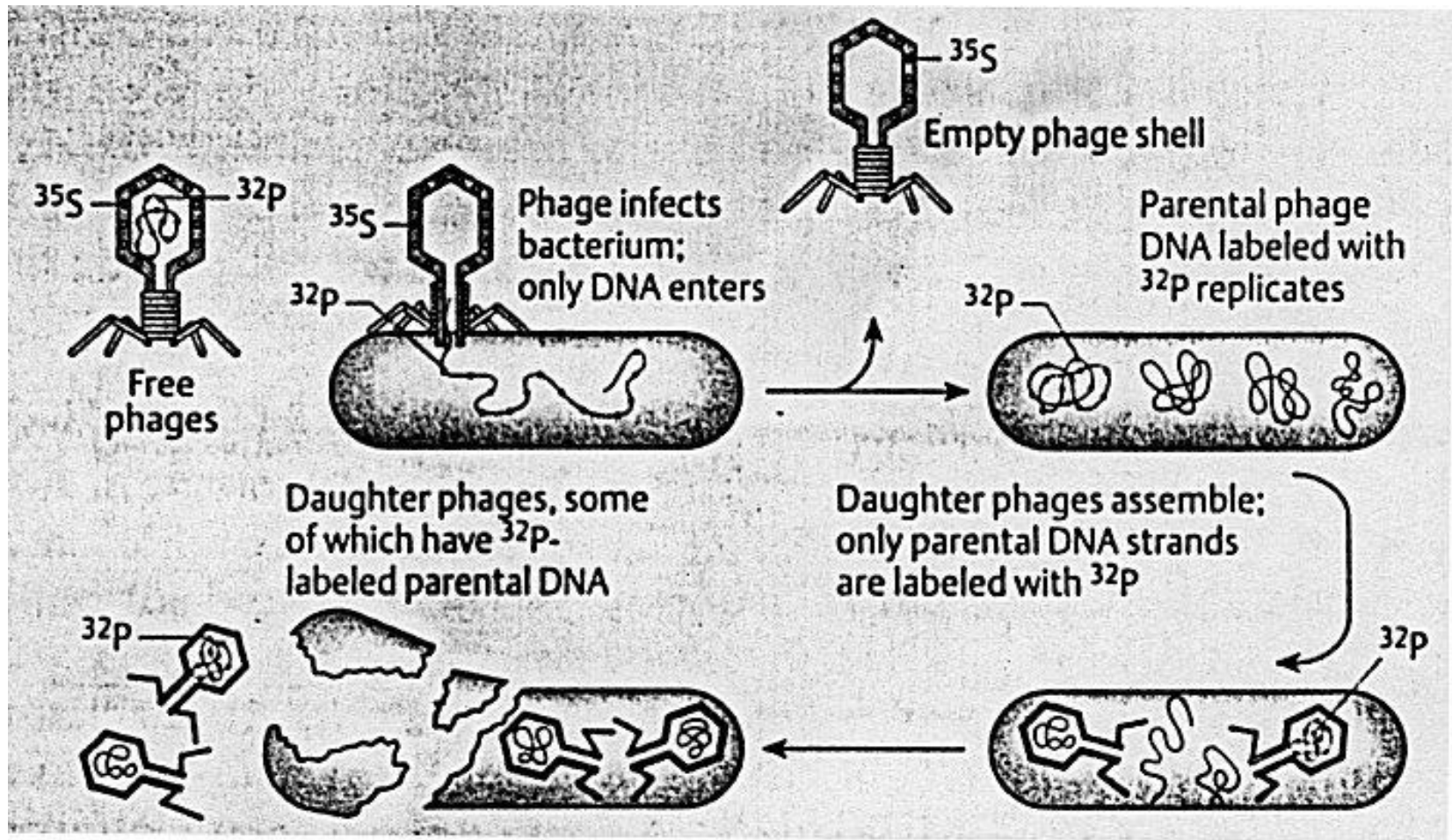
Hershey (1952)



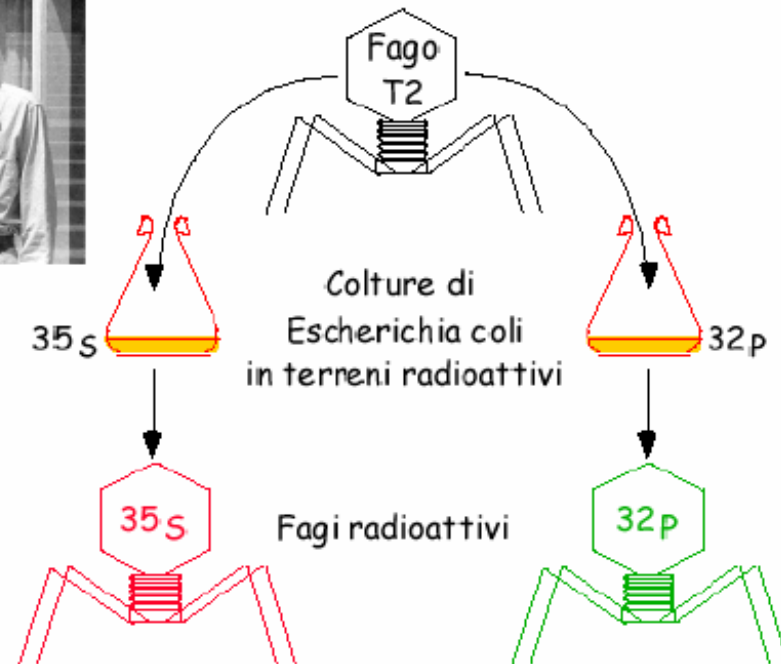


Il DNA come materiale genetico.

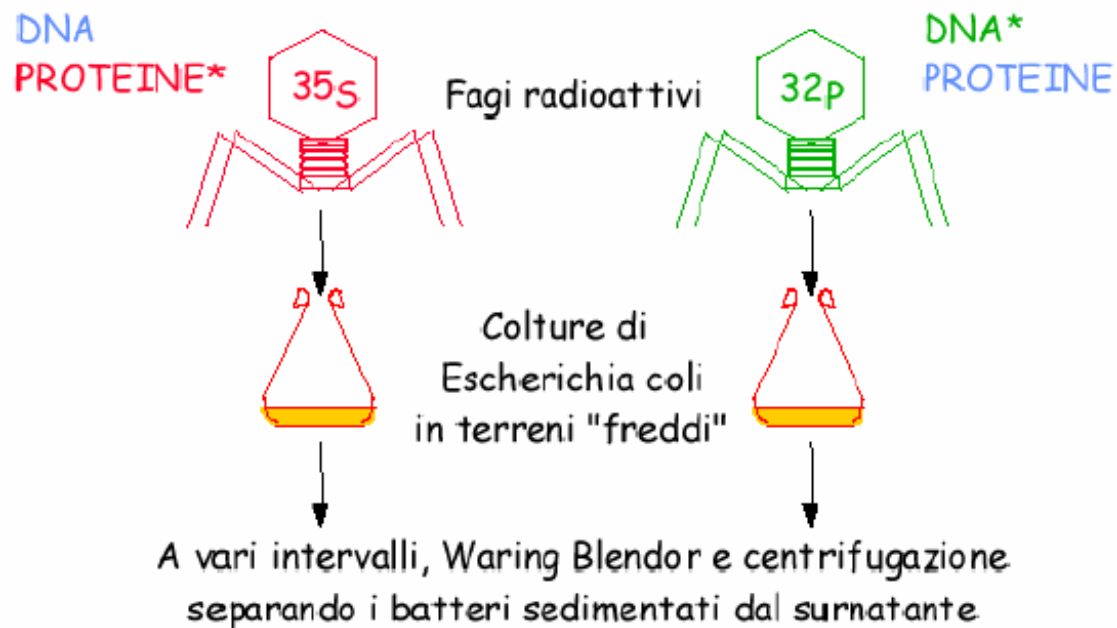
L'esperimento storico di effettuato marcando sia il DNA che le proteine del fago con due diversi isotopi radioattivi (DNA con Fosforo 32 - P^{32} e le proteine con Zolfo 35 - S^{35})



L'esperimento di Hershey & Chase (1952)

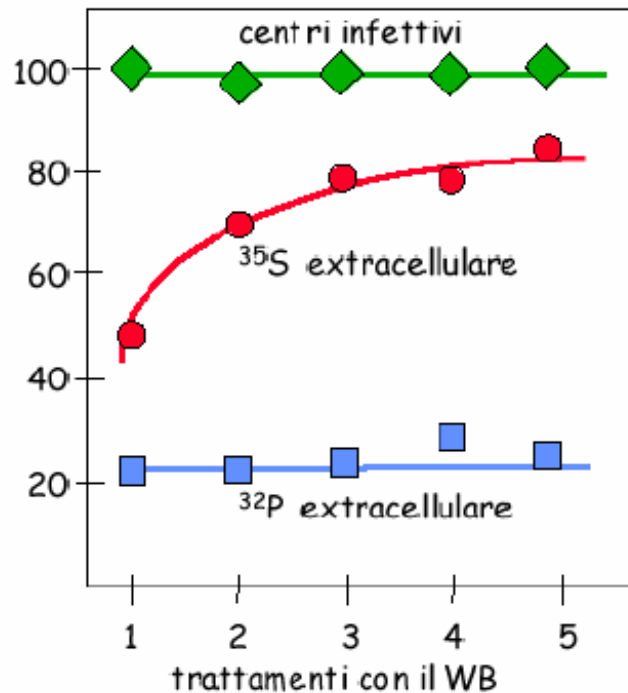


Hershey, A.D. and M. Chase. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol.* 36:39-56 (1952)



Quindi si misurano:

- nel surnatante,
i due tipi di radioattività
- nel sedimento,
i "centri infettivi"



Il trattamento con il Waring Blendor:

- Non influenza la produzione di fago
- Rimuove 80% delle proteine
- Rimuove solo il 20% del DNA



Il materiale genetico è il DNA
Le proteine costituiscono il veicolo
per trasportare il DNA
da un batterio all'altro.

Hershey stesso fornisce un resoconto chiarissimo dell'esperimento del frullatore:

"L'esperimento del frullatore è stato descritto in modo non corretto in molti libri di testo. Nella speranza di preservarne l'essenziale semplicità, voglio ripercorrerlo brevemente qui. Una sospensione batterica esposta al batteriofago T2 e poi rapidamente raffreddata in ghiaccio, viene frullata in un Waring Blendor e poi centrifugata brevemente ad una velocità sufficiente a far sedimentare i batteri in fondo ad una provetta. Si ottengono così due frazioni: un sedimento che contiene i batteri infettati ed un surnatante che contiene tutte le particelle più piccole dei batteri. Ciascuna delle due frazioni viene analizzata per la presenza di radiofosforo nel DNA o di radiozolfo nelle proteine, con i quali le particelle fagiche erano state precedentemente marcate in esperimenti separati."

I risultati sono i seguenti:

1. La maggior parte del DNA fagico (radiofosforo) sedimenta con le cellule batteriche
2. La maggior parte delle proteine fagiche (radiozolfo) si ritrova nel surnatante
3. La maggior parte dei batteri originariamente infettati rimane capace di produrre fago
4. Se si omette il trattamento con il frullatore, sia le proteine, sia il DNA fagico sedimentano con i batteri.
5. Le proteine fagiche rimosse dalle cellule per mezzo del frullatore consistono in particelle fagiche vuote, più o meno intatte, che possono quindi essere considerate come veicoli passivi per il trasporto del DNA da una cellula batterica a quella successiva e che, una volta svolto il loro compito, non giocano più alcun ruolo nella replicazione del fago."