

**CORSO DI
MICROBIOLOGIA GENERALE,
BIOTECNOLOGIE MICROBICHE ED
ELEMENTI DI MICROBIOLOGIA MEDICA**

II° MODULO

a.a. 2024-25

Gianni Prosseda

gianni.prosseda@uniroma1.it

Tel 0649917593

Orario lezioni

Mercoledì 11:30 13:30

Giovedì 09:30 10:30

Venerdì 09:30 11:30

Testi suggeriti e materiale didattico

- “Brock – Biologia dei Microrganismi” (dalla 10a edizione) Madigan et al.
- Galli-Dehò “Biologia dei microrganismi”, 3a edizione
- Slide lezioni su E-learning.

Alla fine del corso

Facoltativo
Gennaio

Test scritto

Superato

Non superato

Su richiesta,
per mail

Esame orale

Superato

Non superato

Gennaio-Luglio

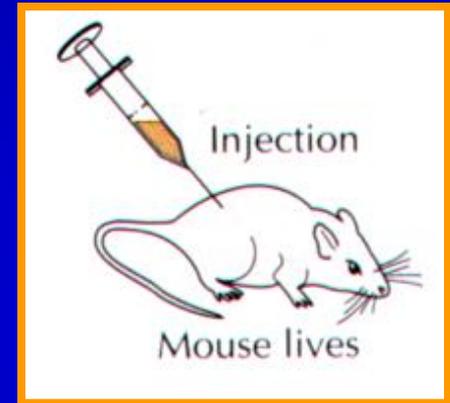
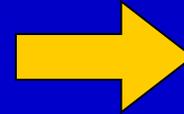
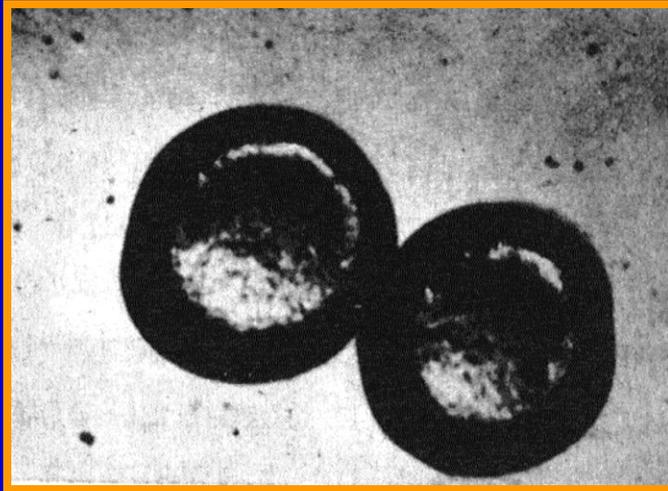
Registrazione esito esame (12 cfu)
prima data utile su INFOSTUD

Momenti salienti della storia della GENETICA microbica

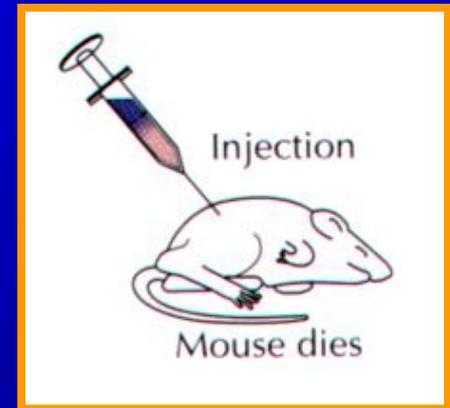
- 1865** i geni sono fattori particolati
(Mendel)
- 1928** Individuazione dell'esistenza di un
“principio trasformante” (Griffith)
- 1944** Il DNA è il materiale
genetico (Avery, MacLeod,
McCarty)
- 1945** Teoria un gene-una proteina
(Beadle, Tatum)
- 1953** Definita la struttura del DNA
(Watson, Crick)
- 1953-62** Test complementazione e concetto
di cistrone (Benzer)

Streptococcus pneumoniae (polmonite)

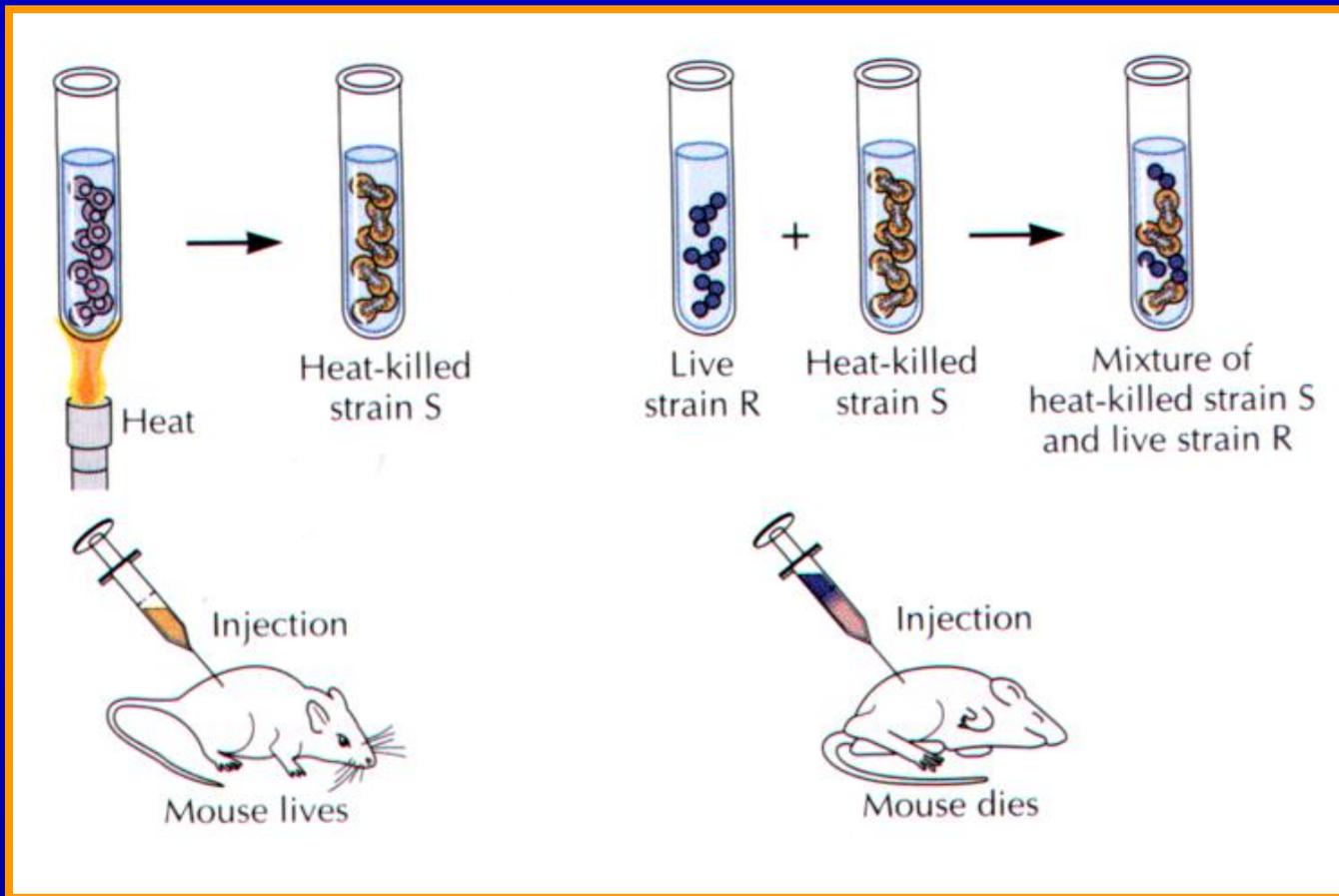
R



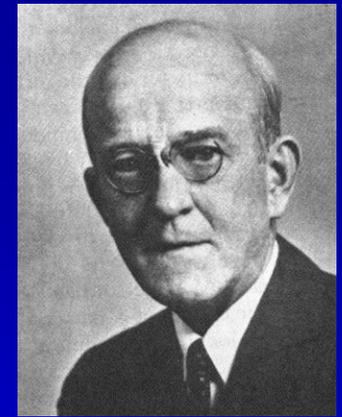
S



ESPERIMENTO DI GRIFFITH (1928)

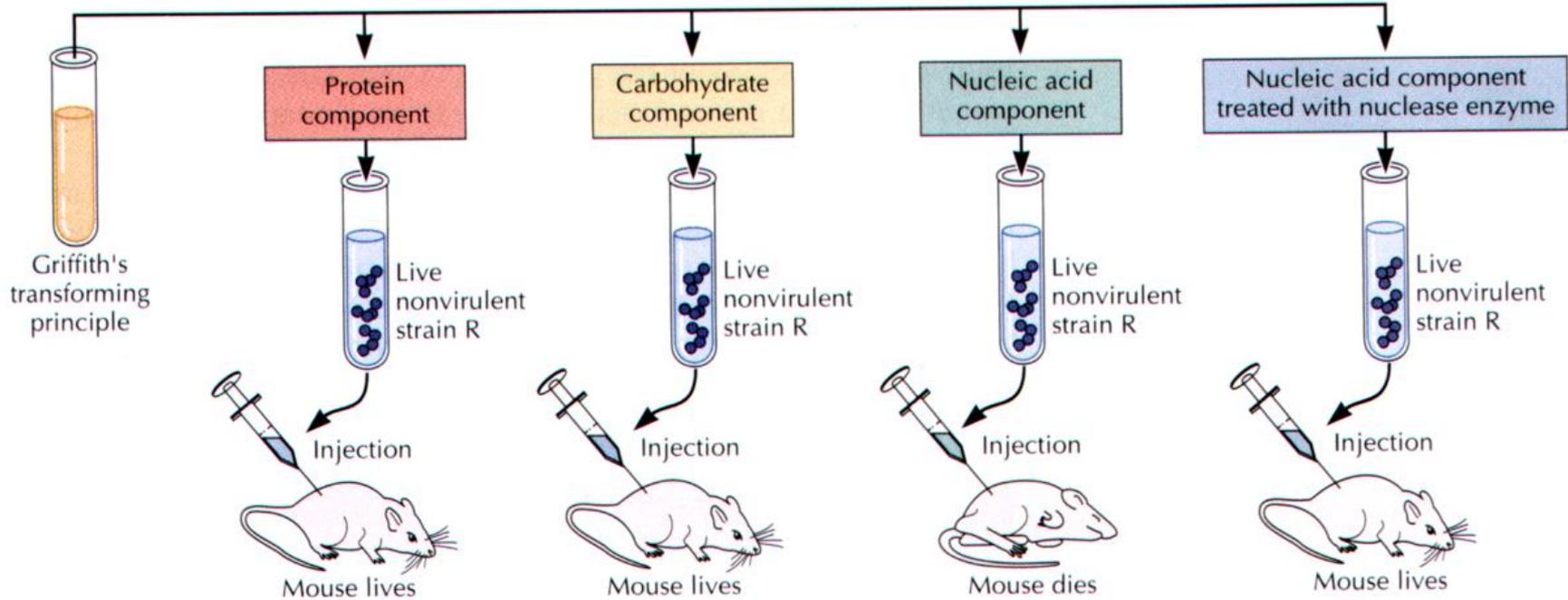


IL DNA É IL MATERIALE GENETICO (Avery- 1944)



Avery, MacLeod, McCarty (1944)

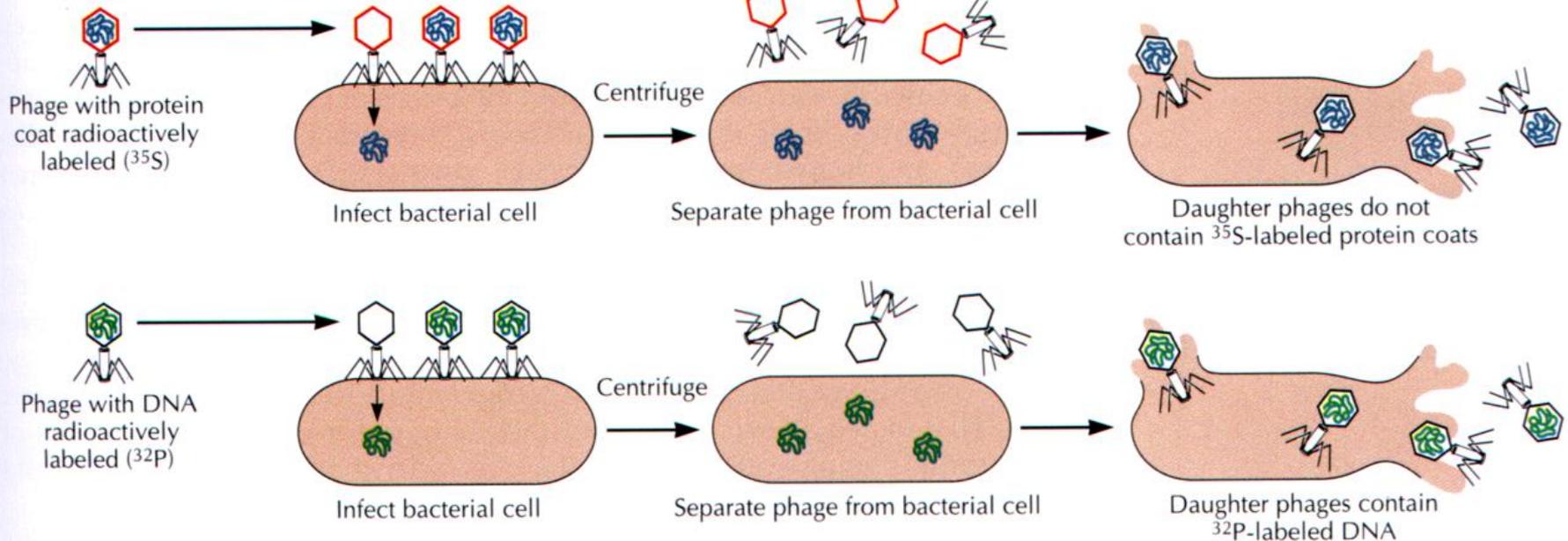
Biochemical separation



DIMOSTRAZIONE DEFINITIVA CHE IL DNA É MATERIALE GENETICO (Hershey-Chase 1952)



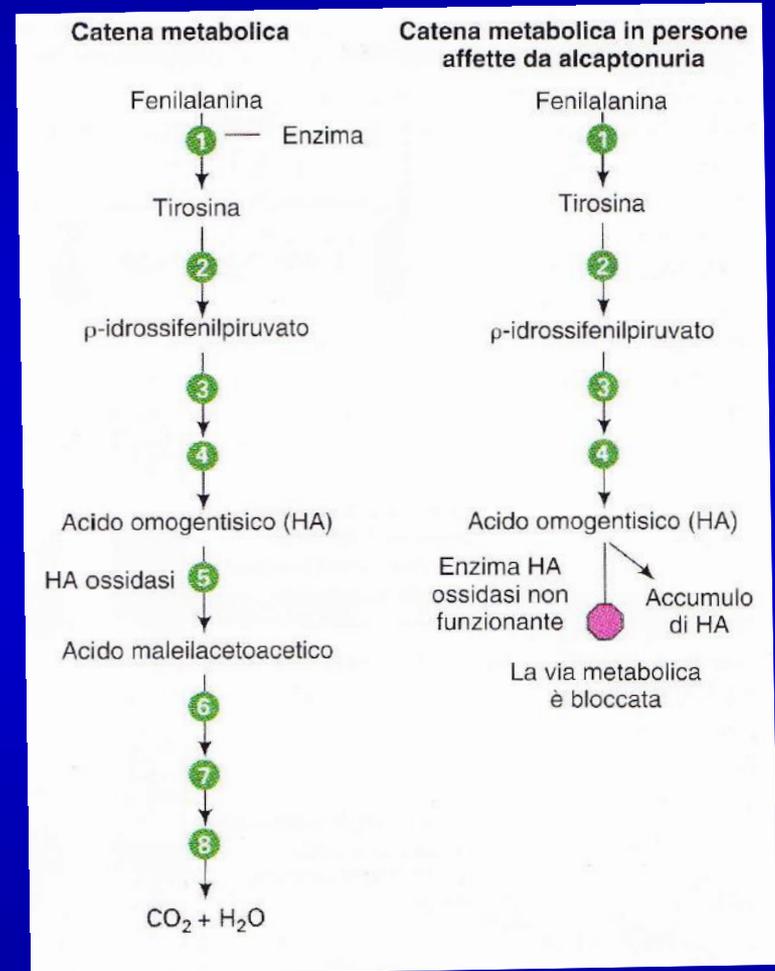
C Hershey, Chase (1952)



Ma qual'è il ruolo dei geni ?

All'inizio del secolo XX un medico inglese, **Archibald Garrod**, ipotizzò che alcune malattie metaboliche umane ereditarie fossero dovute alla carenza o totale assenza di un determinato enzima.

Ipotizzò quindi che i determinanti dell'ereditarietà, qualunque cosa essi fossero, controllassero la produzione degli enzimi !



Negli anni '40 questa osservazione venne ripresa ed applicata ad un sistema sperimentale che prevedeva l'uso Neurospora. Da queste analisi venne elaborata la teoria:

un gene-un enzima (Beadle & Tatum)

Beadle & Tatum selezionarono una serie di mutanti auxotrofici indipendenti per l'Arginina. Ne analizzarono il fenotipo per caratterizzare il metabolismo di questo aminoacido e osservarono che queste mutazioni erano classificabili in tre tipi differenti, a seconda di quale composto chimico riusciva a ristabilire la crescita: argE, argF, argG e argH..

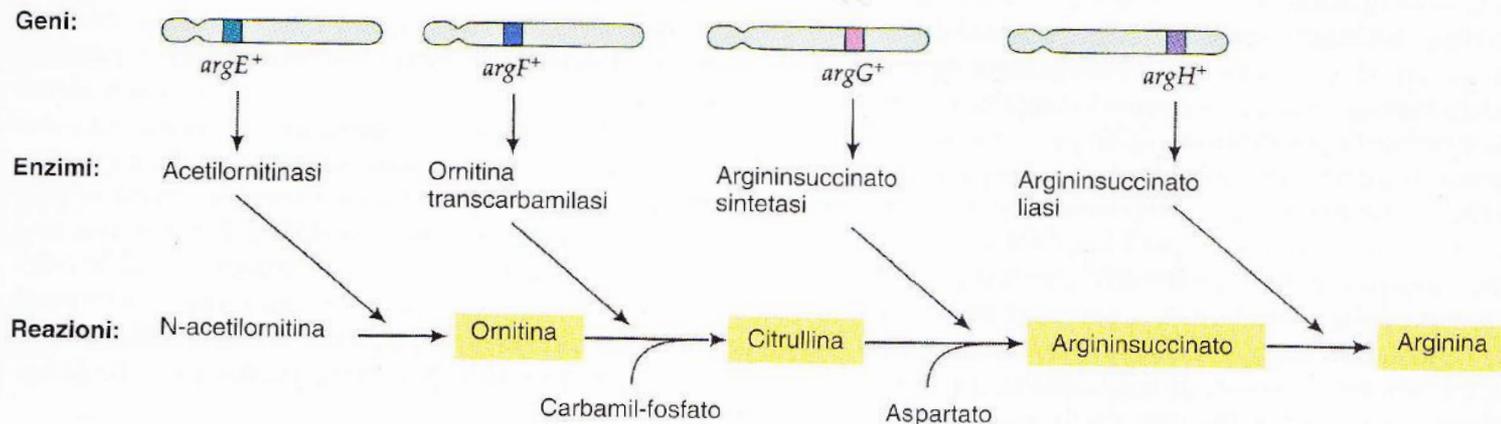
Essi osservarono che :

- gli argE era in grado di crescere su Ornitina, Citrullina, Arginina-Succinato e Arginina
- gli argF erano in grado di crescere su Citrullina Arginina-Succinato e Arginina
- gli argG crescevano solo su Arginina-Succinato e Arginina
- gli argH crescevano solo su Arginina

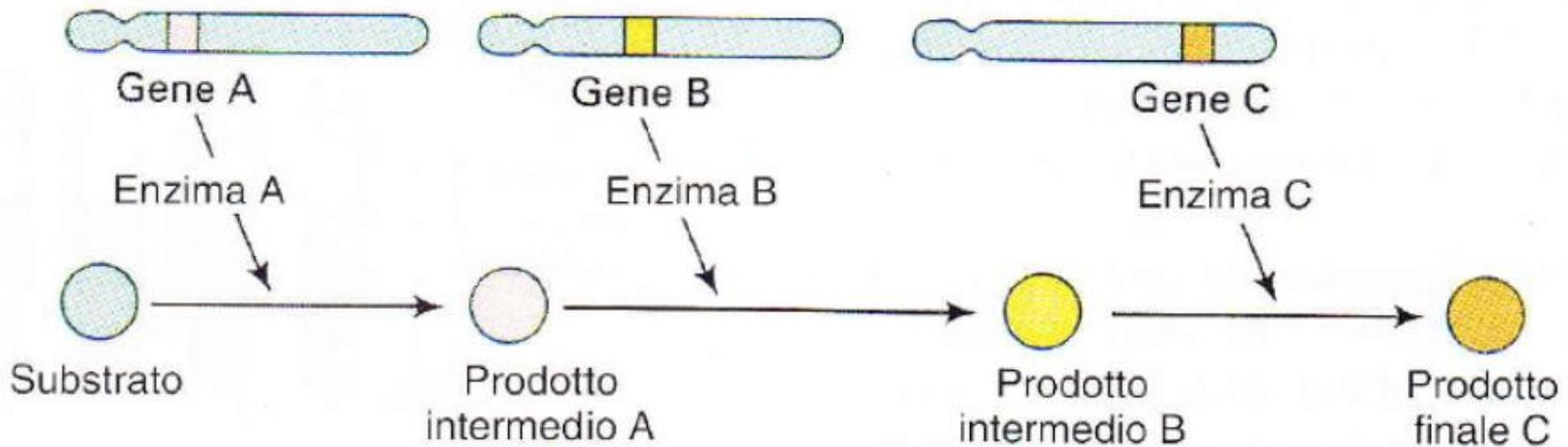
Ne dedussero che

Via metabolica dell'Arginina in *Neurospora*

CEPPO MUTANTE	NIENTE	ORNITINA	CITRULLINA	ARGININA-SUCCINATO	ARGININA
Selvatico	+	+	+	+	+
<i>argE</i>	-	+	+	+	+
<i>argF</i>	-	-	+	+	+
<i>argG</i>	-	-	-	+	+
<i>argH</i>	-	-	-	-	+



1 gene – 1 enzima

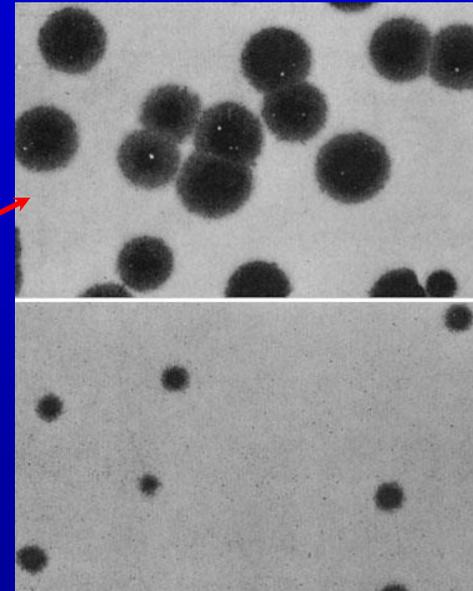


Il lavoro di Benzer 1953-1960

I geni, prima di Benzer, erano considerati unità discrete e indivisibili di ricombinazione, di funzione e di mutazione dell'informazione genetica.

Benzer ne chiarisce la natura dimostrando che non sono unità indivisibili, ma contengono numerosissimi “siti” mutabili e ricombinabili.

Mutanti rII di T4:
placche più
grandi su *E. coli*
ceppo B



<u>genotipo T4</u>	<u>Ceppo batterico</u>	
	<u>E. coli B</u>	<u>E. coli K</u>
selvatico	piccola	piccola
rII	grande	nessuna

- Il ceppo B permette di differenziare il fago selvatico dal mutante rII in base al tipo di placca di lisi
- Il ceppo K impedisce la crescita del mutante rII

QUAL E' L'UNITA' FUNZIONALE DI BASE?

Test di complementazione

Co-infezione con due fagi mutanti diversi su ceppo batterico non permissivo (*E. coli* K12) al alta m.o.i. .

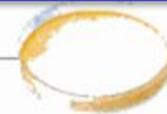
Con alcune combinazioni di fagi mutanti si ottengono placche, con altre no....

Strato di *E. coli* K12(λ)



Placche di T4 selvatiche

Strato di *E. coli* K12(λ)



Nessuna placca

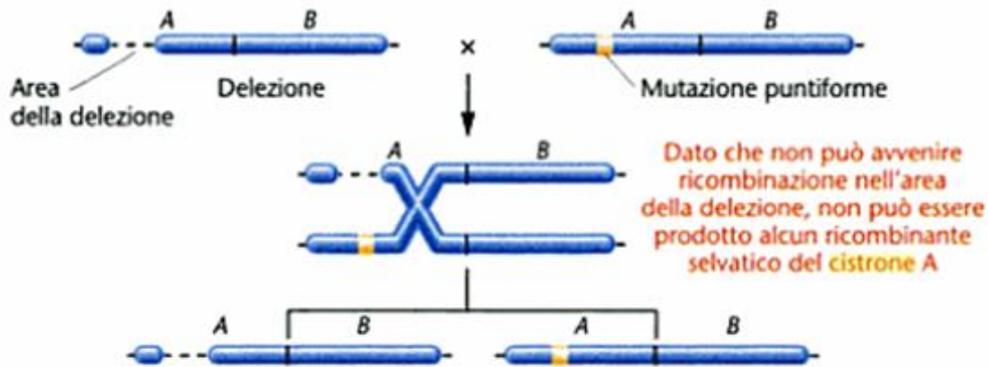
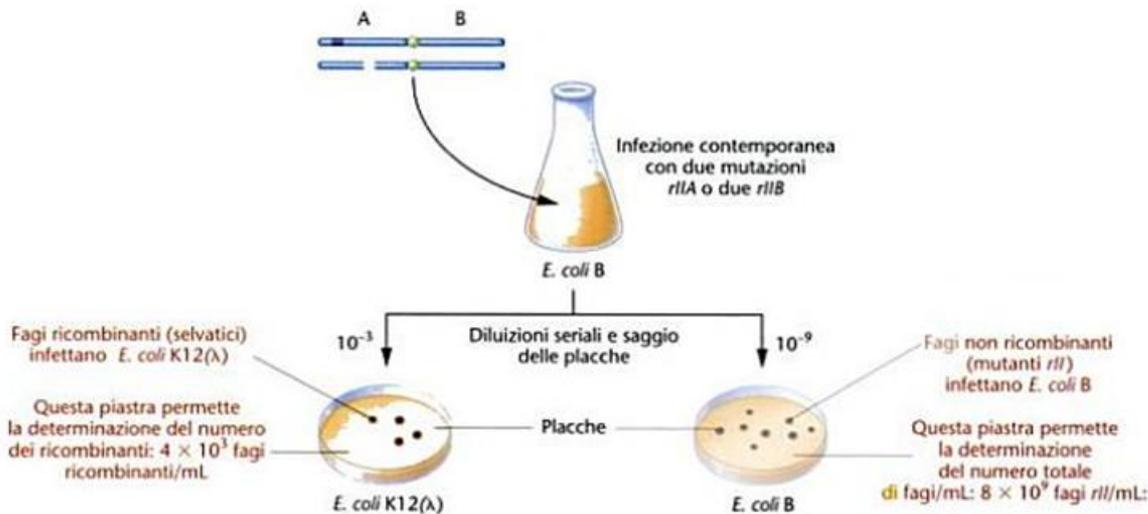
I cistroni A e B di Benzer rappresentano i due geni (unità funzionali) separati del singolo locus rII

QUAL E' L'UNITA' RICOMBINAZIONALE DI BASE?

Analisi di ricombinazione:

Co-infezione con due mutanti rIIA in *E. coli* B appartenenti allo stesso cistrone (es.: A)

Se si ottengono placche su *E. coli* K12, si è realizzato un evento di ricombinazione



In assenza di cloni virulenti su K12 ne consegue che le due mutazioni rII coincidono....

BENZER IDENTIFICO' LE UNITA'
MINIME DI :

- FUNZIONE (TEST DI COMPLEMENTAZIONE)
- MUTAZIONE
- RICOMBINAZIONE

E DIMOSTRO' CHE ERANO PU' PICCOLE
DEL GENE COME ERA IDENTIFICATO
IN PRECEDENZA....

Genetic Fine Structure

ALLELES



LOCUS

Classic c.o mapping

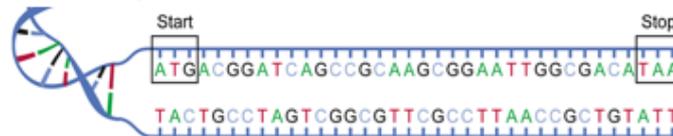


CISTRON

Complementation mapping

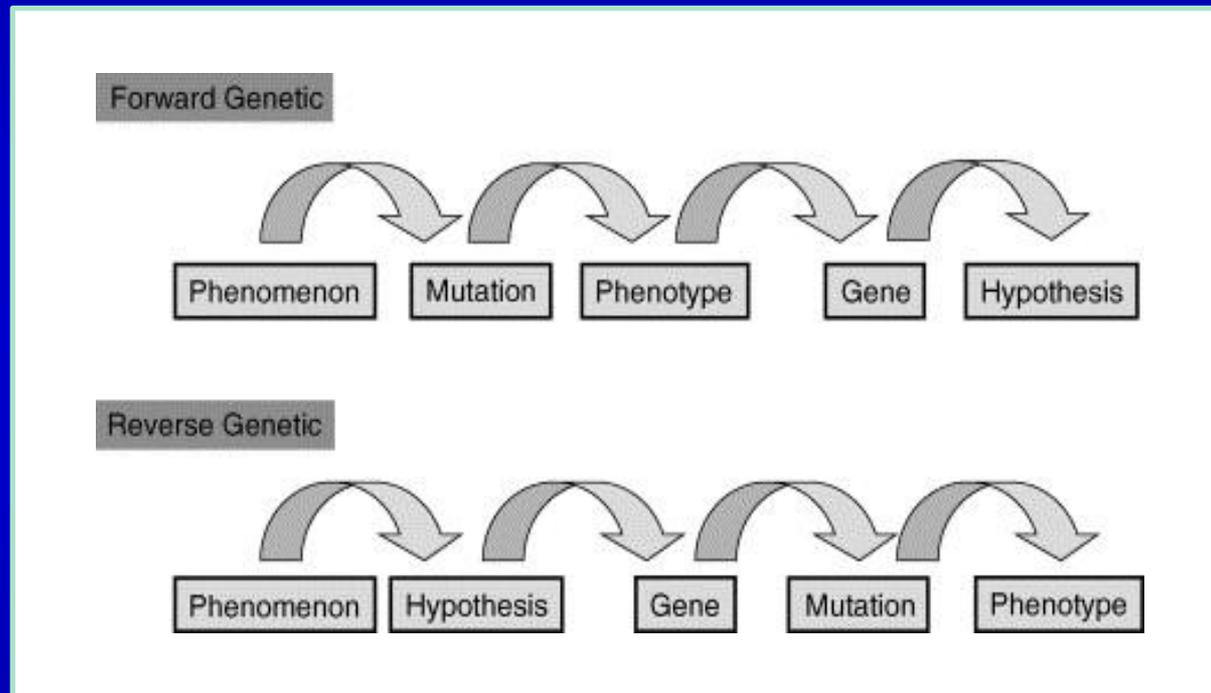


GENE

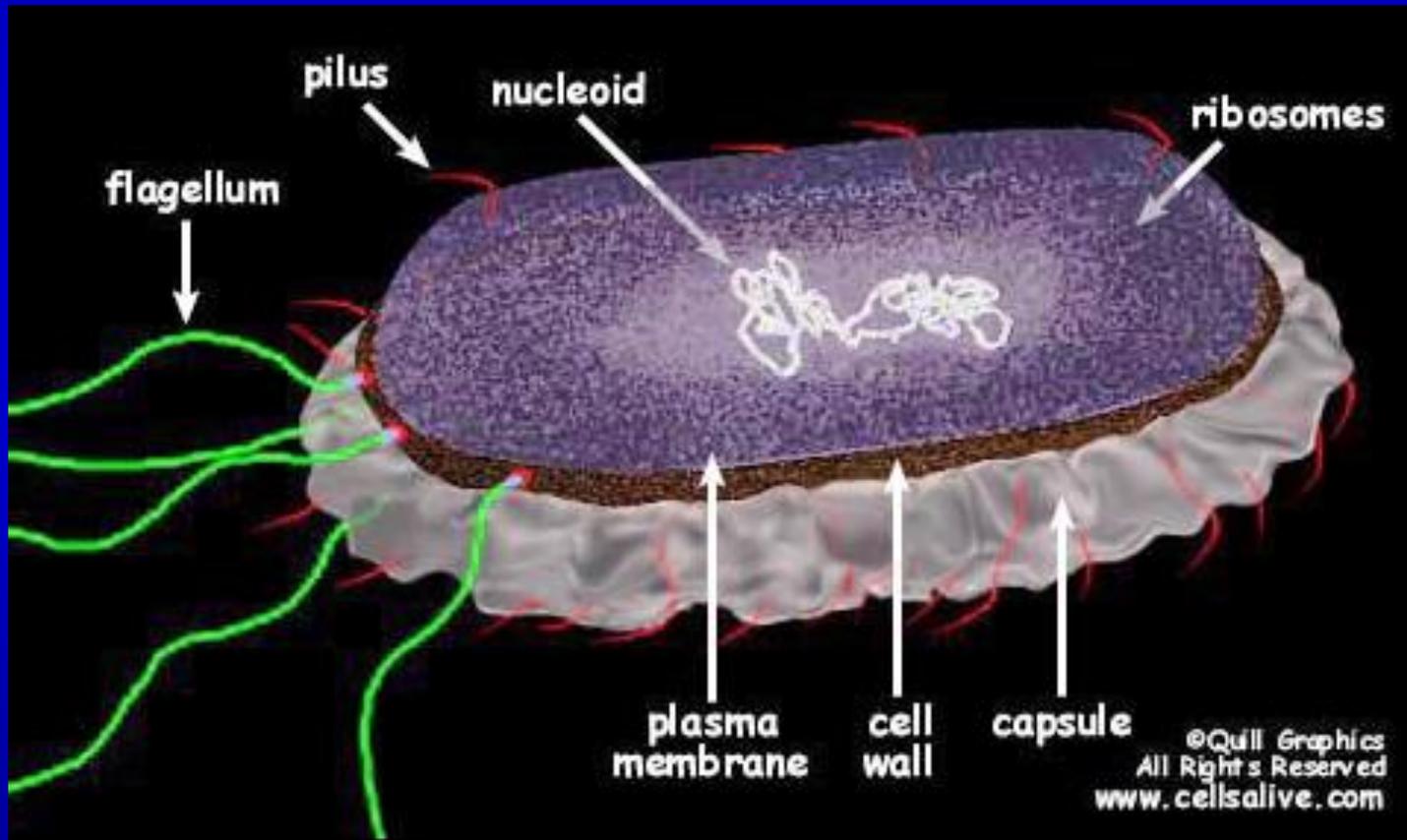


ORF (Open Reading Frame)

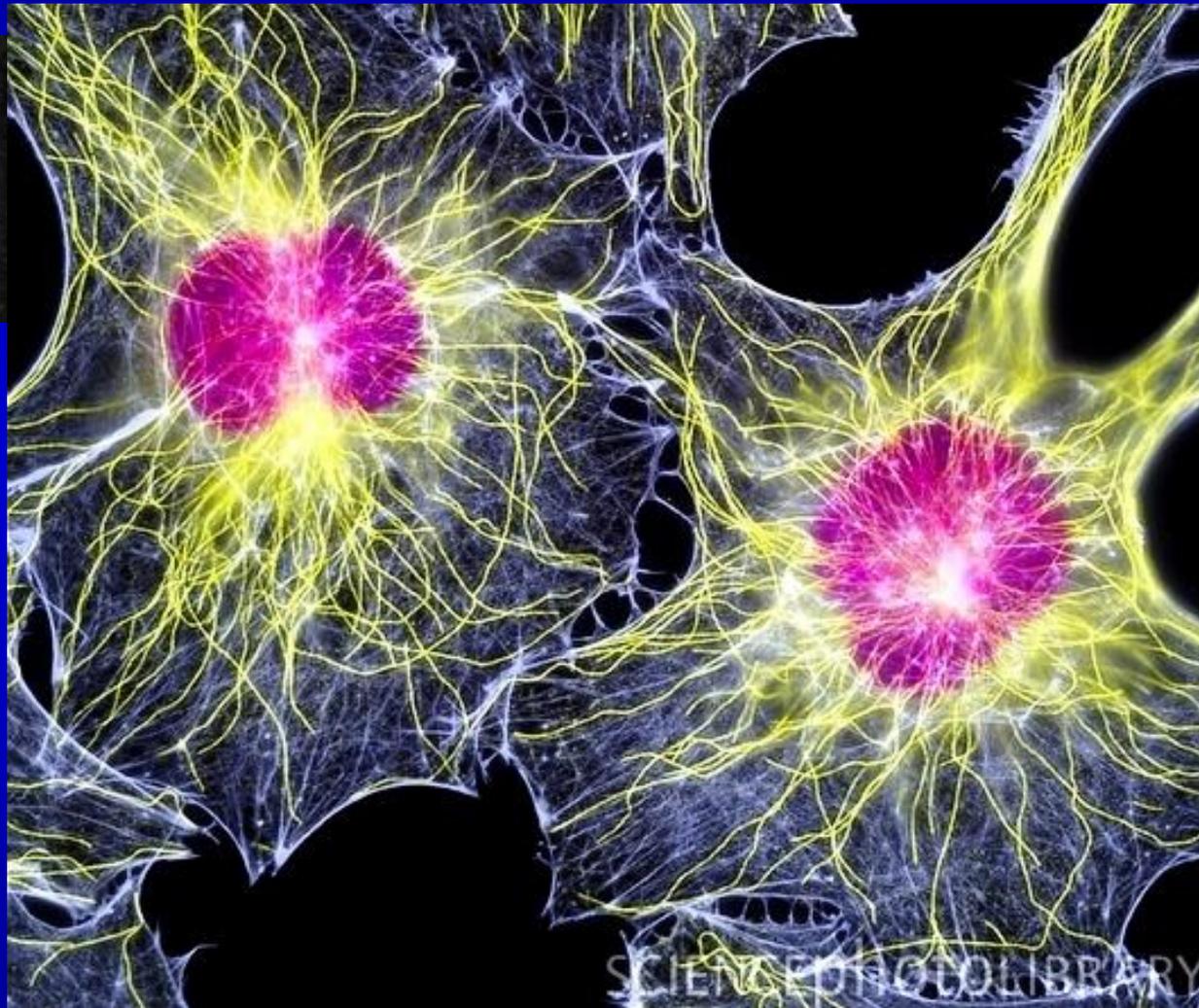
APPROCCIO GENETICO: METODO SCIENTIFICO IRRINUNCIABILE



STRUTTURA DELLA CELLULA BATTERICA



Il citoscheletro eucariotico



(-like)

di

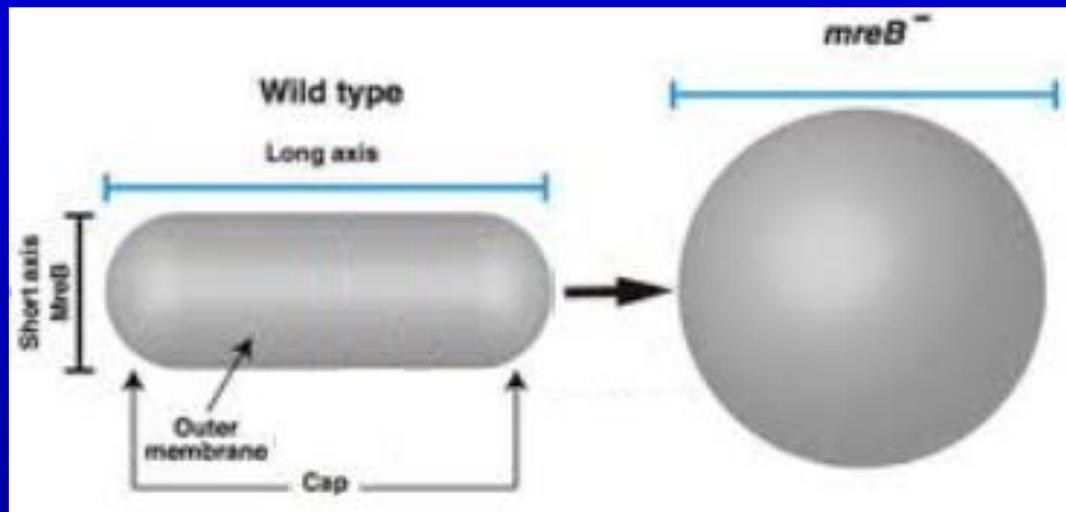
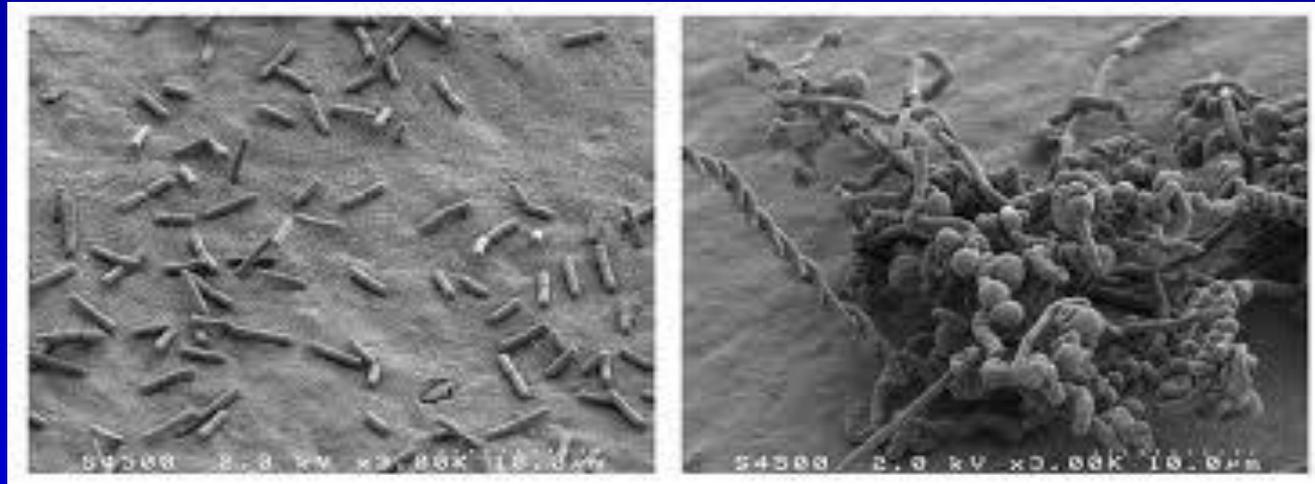
• **Microfilamenti**
(es.: actina 7 nm)

• **Filamenti intermedi** (8-12 nm)

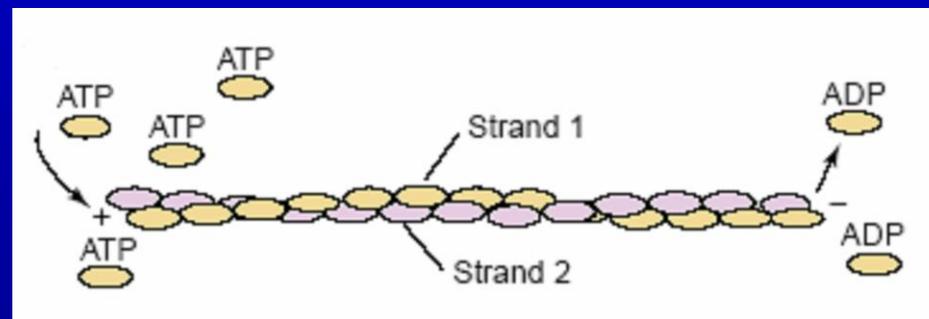
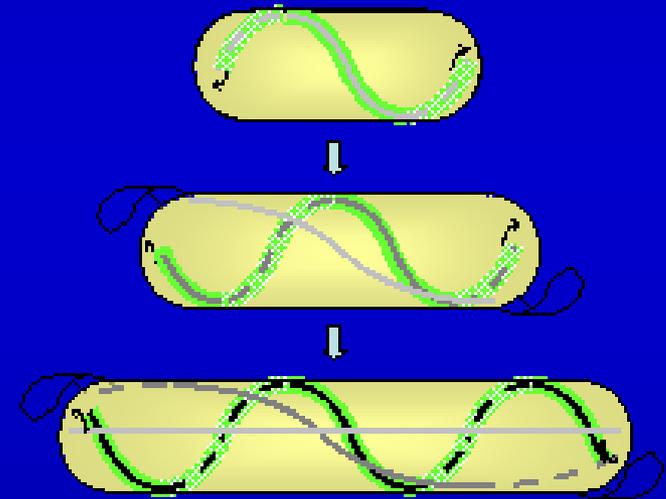
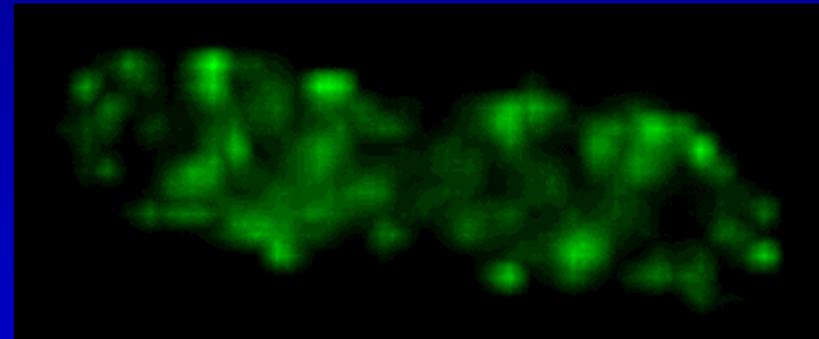
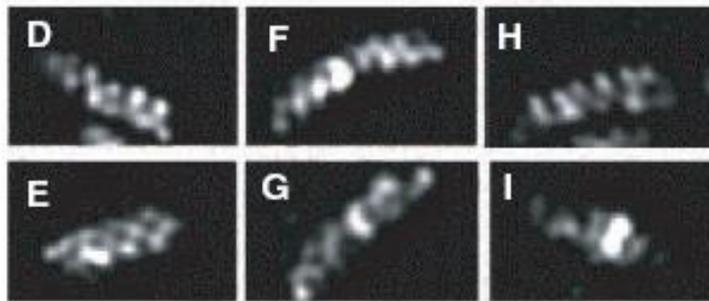
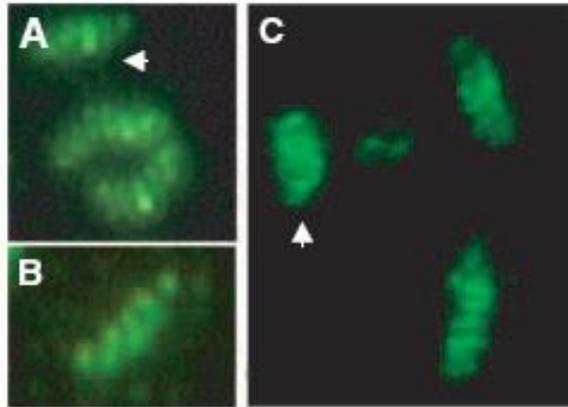
• **Microtuboli**
(25 nm)



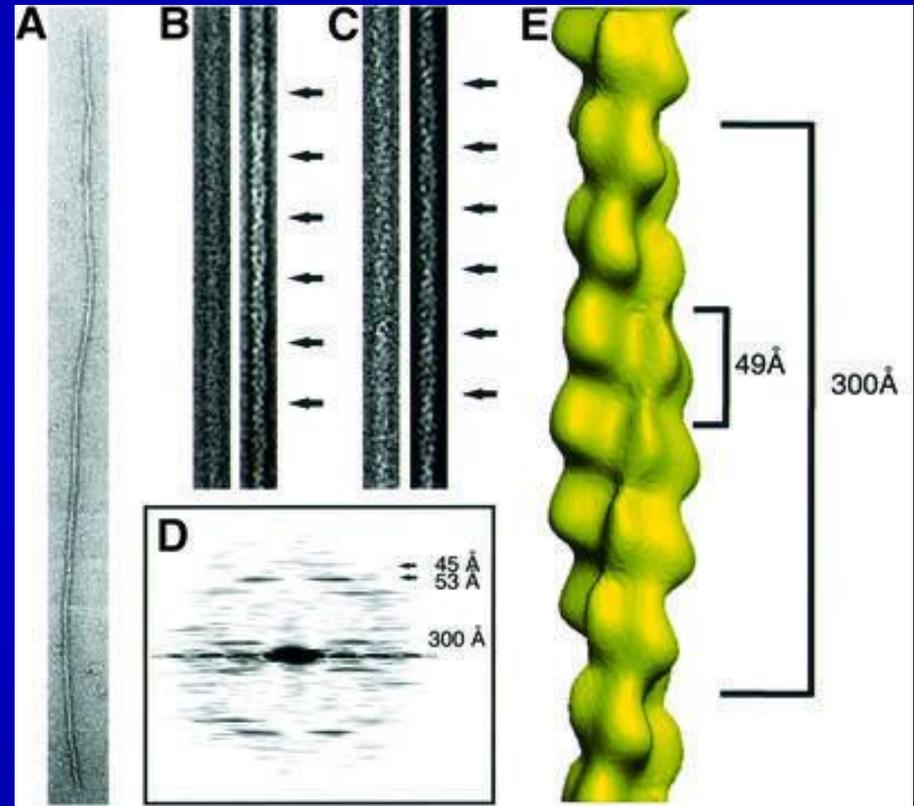
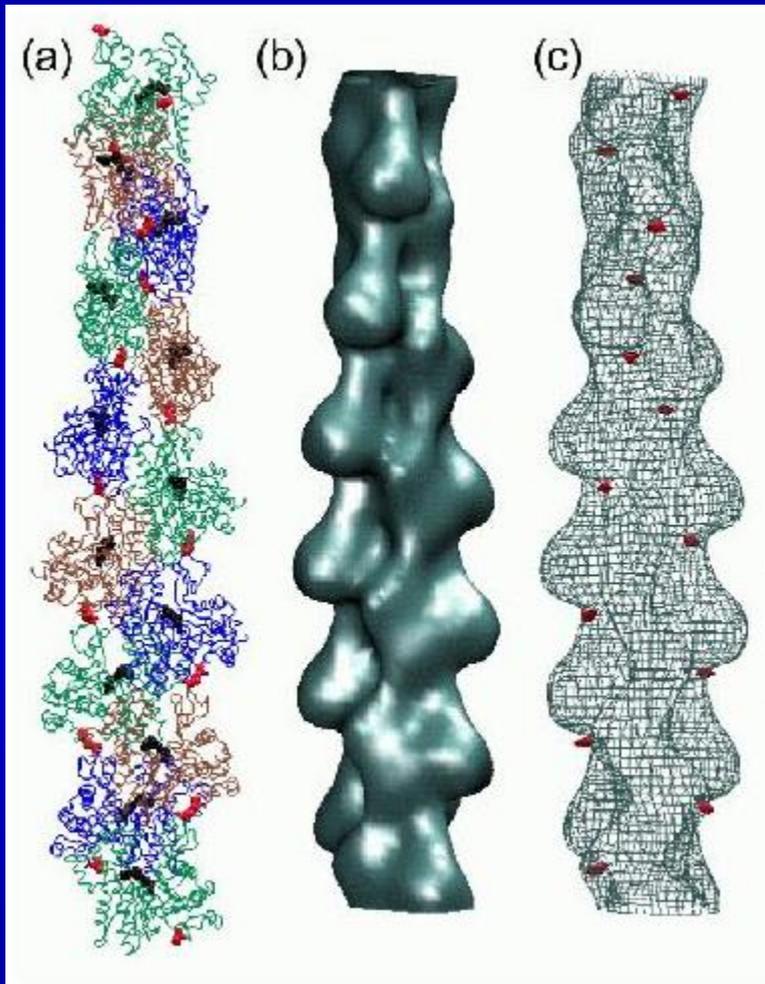
MreB (actin-like)



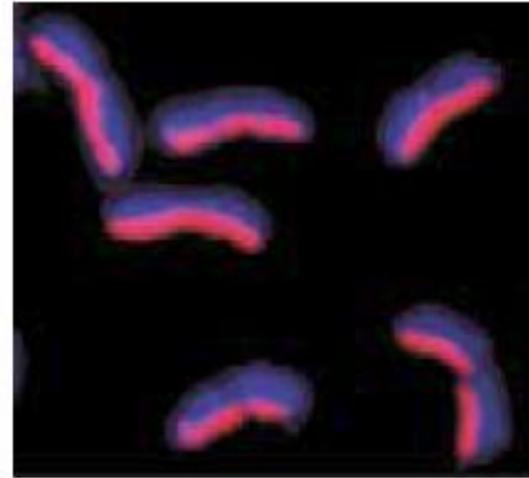
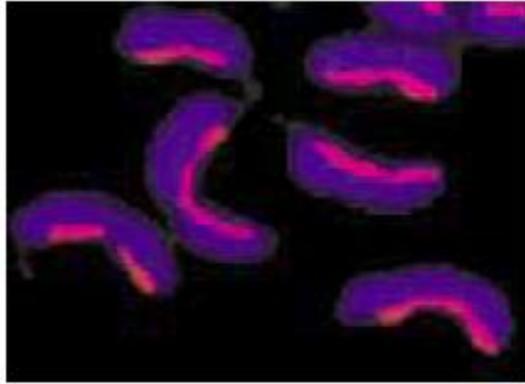
MreB (actin-like)



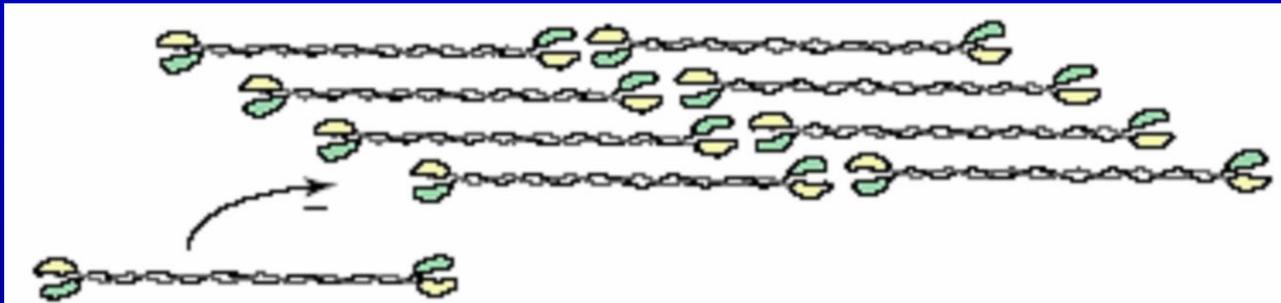
Struttura molecolare di ParM (Actin-like)



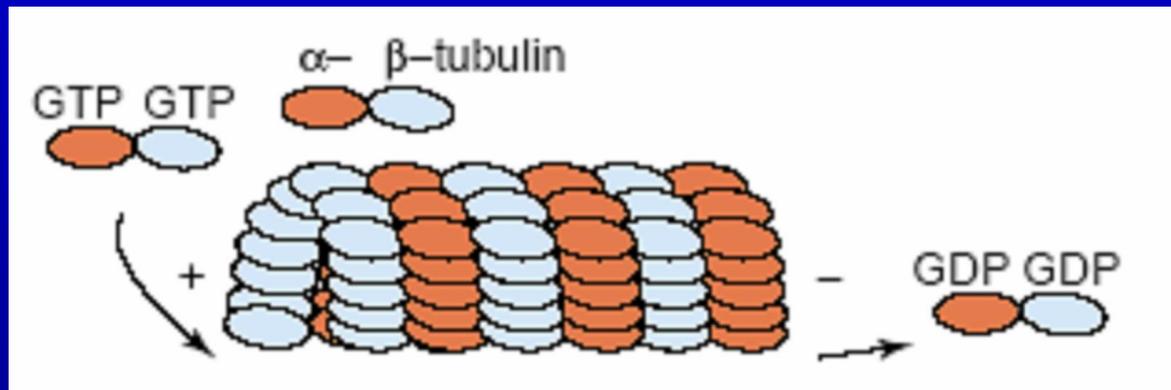
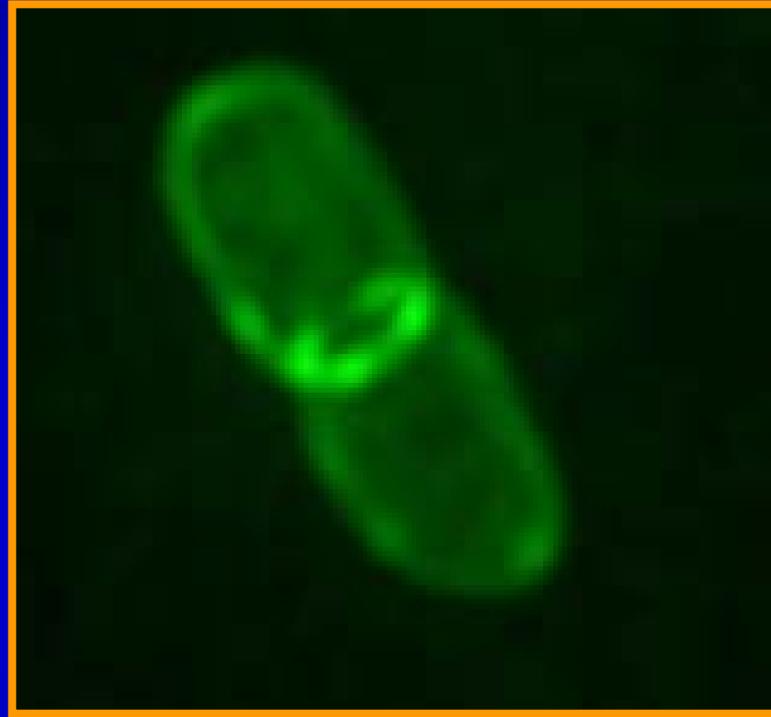
La crescentina: un esempio di IF nei batteri



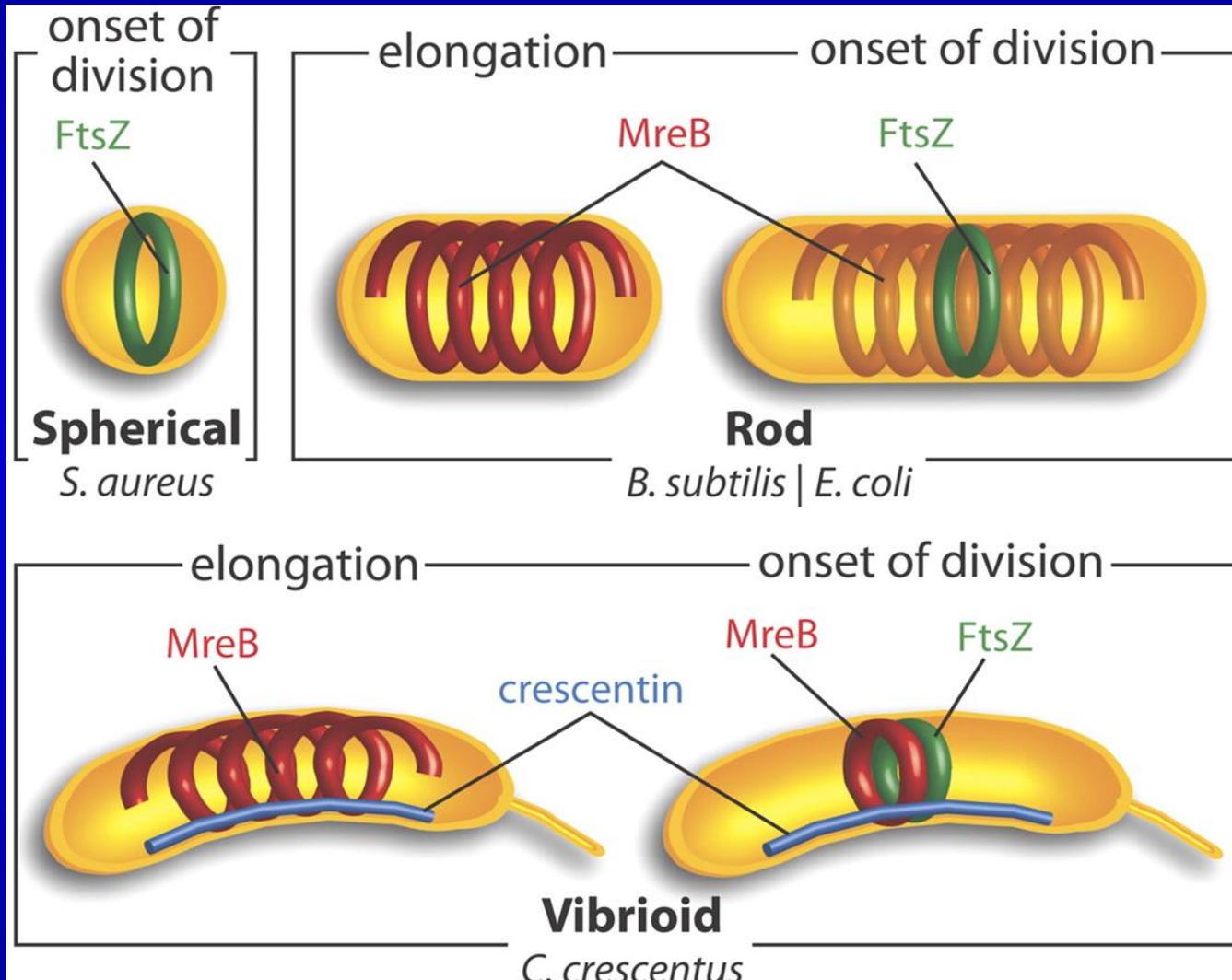
CreS (IF) / DAPI



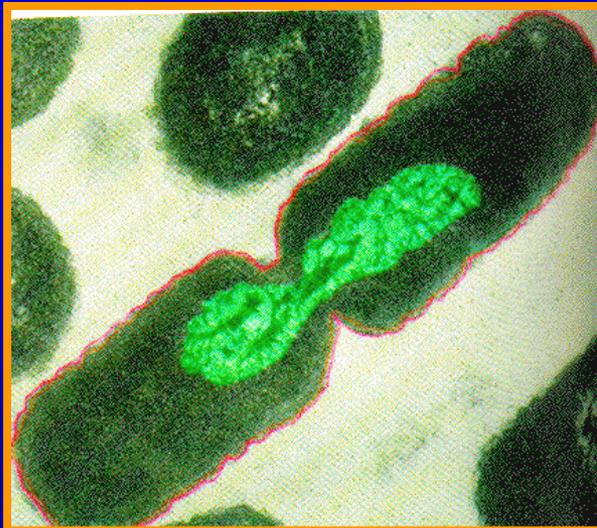
FtsZ: tubulin-like filament



RIASSUMENDO



Divisione cellulare nei batteri



Divisioni
cellulari
“canoniche” e
“non
canoniche”

Products of cell division are equal:



Binary fission: conventional bacteria

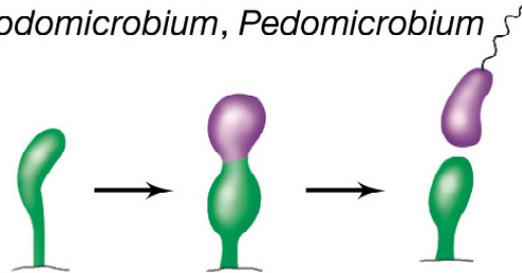
Products of cell division are unequal:



Simple budding: *Pirella*, *Blastobacter*



Budding from hyphae: *Hyphomicrobium*,
Rhodomicrobium, *Pedomicrobium*

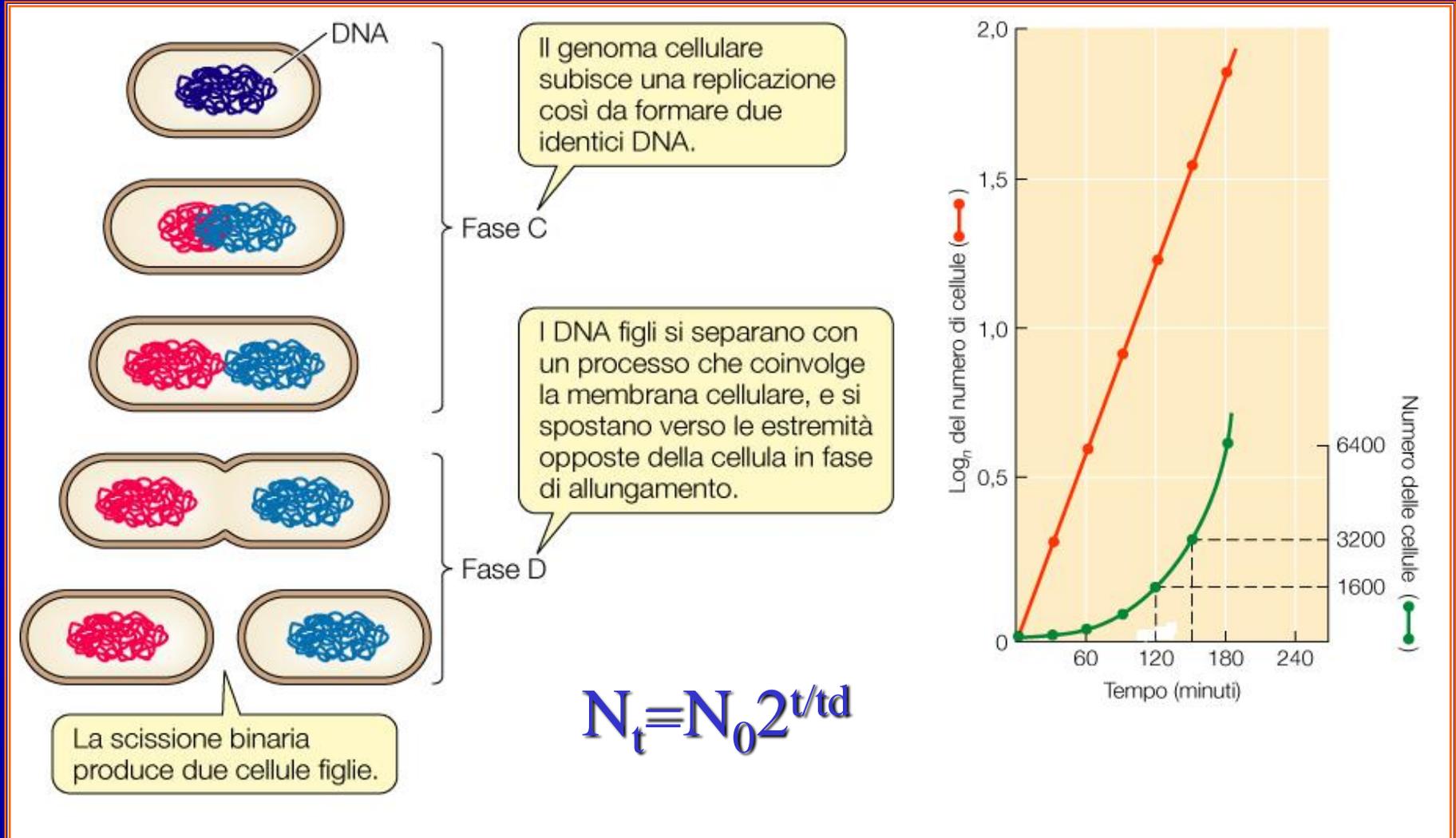


Cell division of stalked organism: *Caulobacter*



Polar growth without differentiation of cell size:
Rhodopseudomonas, *Nitrobacter*, *Methylosinus*

Crescita e divisione batterica



MUTANTI CHE INFLUENZANO LA DIVISIONE CELLULARE

MUTANTI *fts*

(filamentating temperature
sensitive)

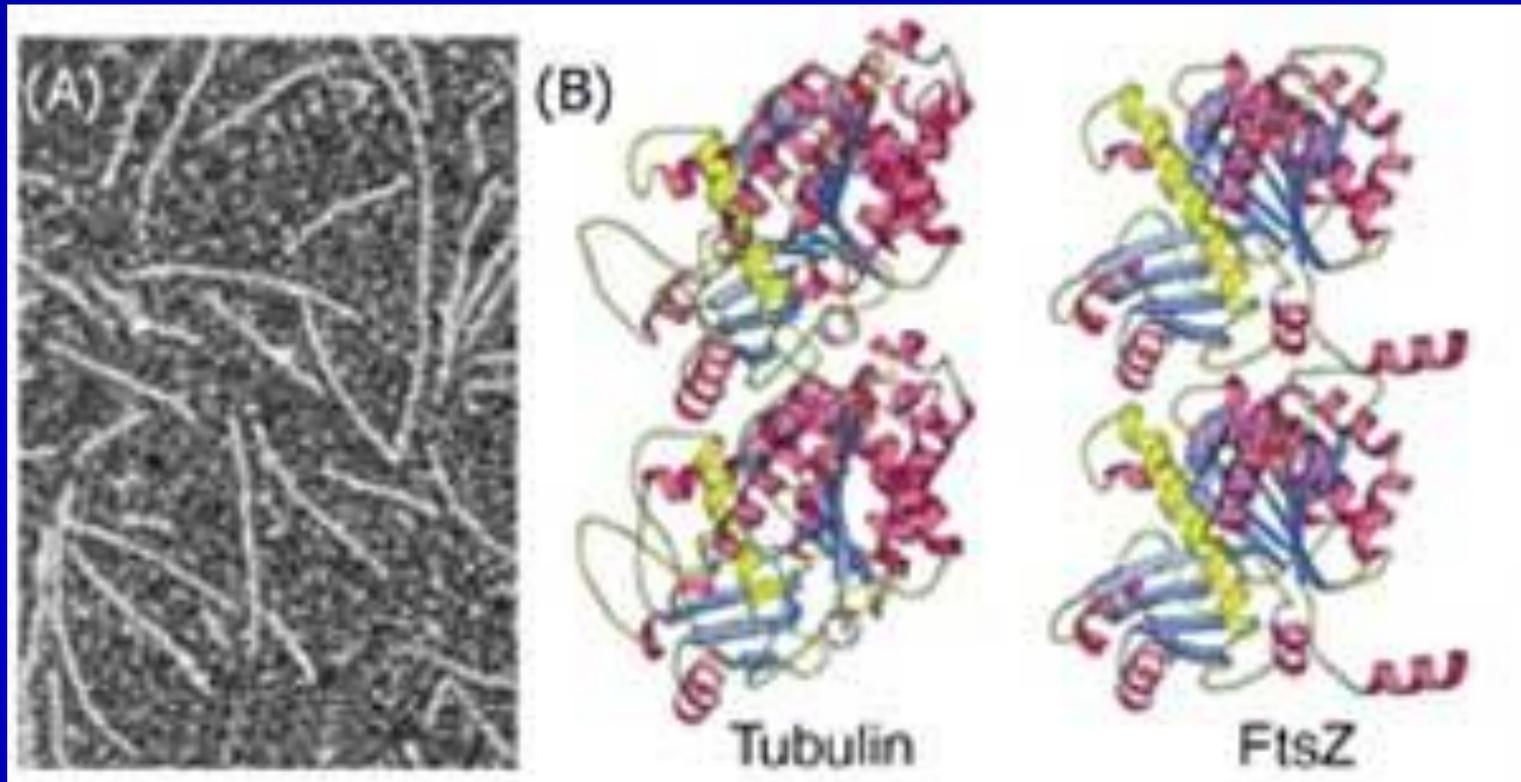


- *ftsZ*- questi mutanti formano batteri lineari senza setto
- *ftsA*- questi mutanti formano batteri lineari con un setto iniziale
- *ftsI*- questi mutanti vanno incontro a lisi
- *Fts N, Q, L*

FtsZ

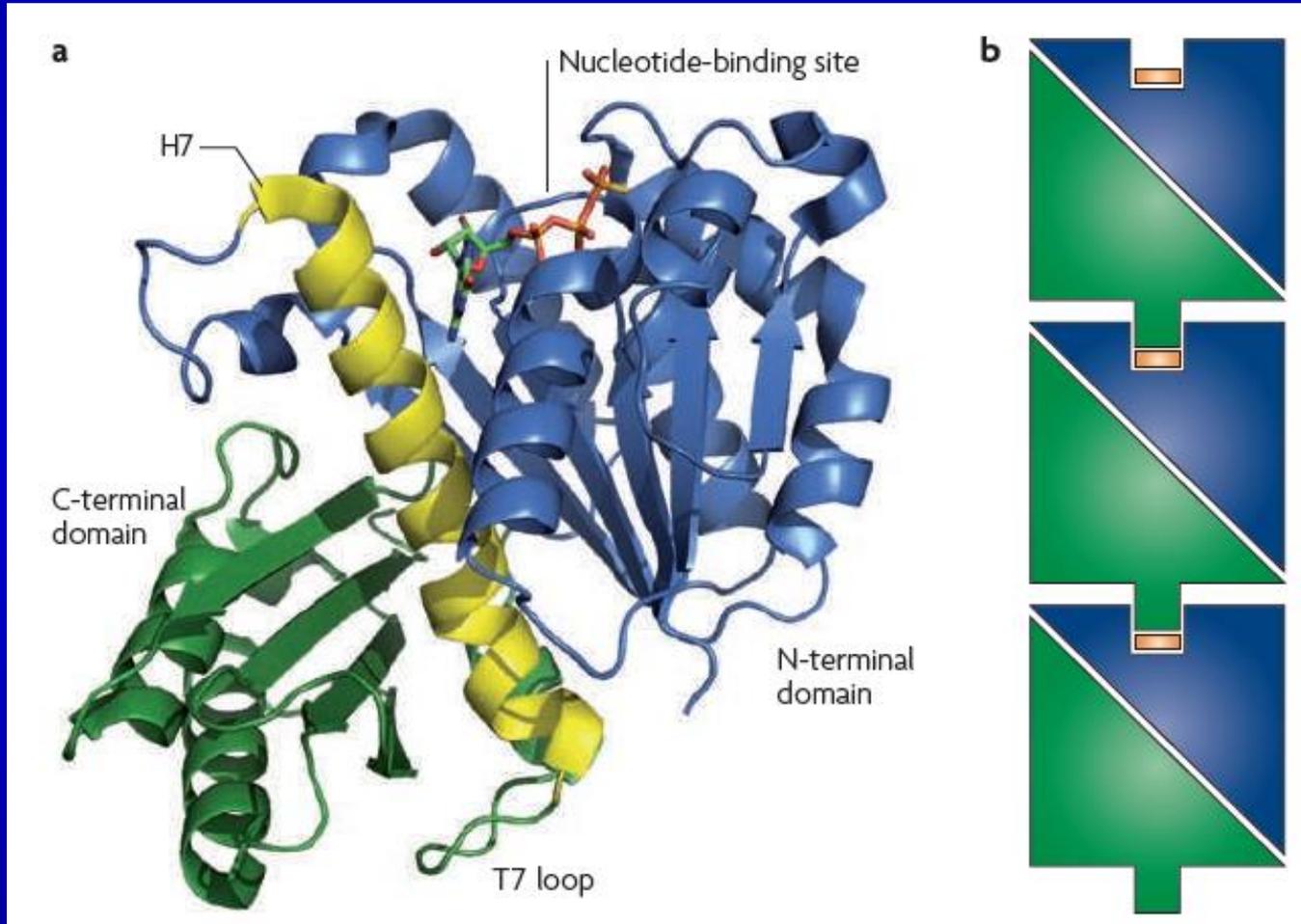
- È il primo componente del “Divisoma” che si assembla nella regione del setto
- Si tratta di una proteina dotata di attività GTPasica responsabile della formazione di un anello nella regione dove si formerà il setto divisionale.
- È la proteina che determina l’invaginazione della membrana cellulare e inizia il processo di divisione cellulare.

FtsZ e Tubulina: un confronto

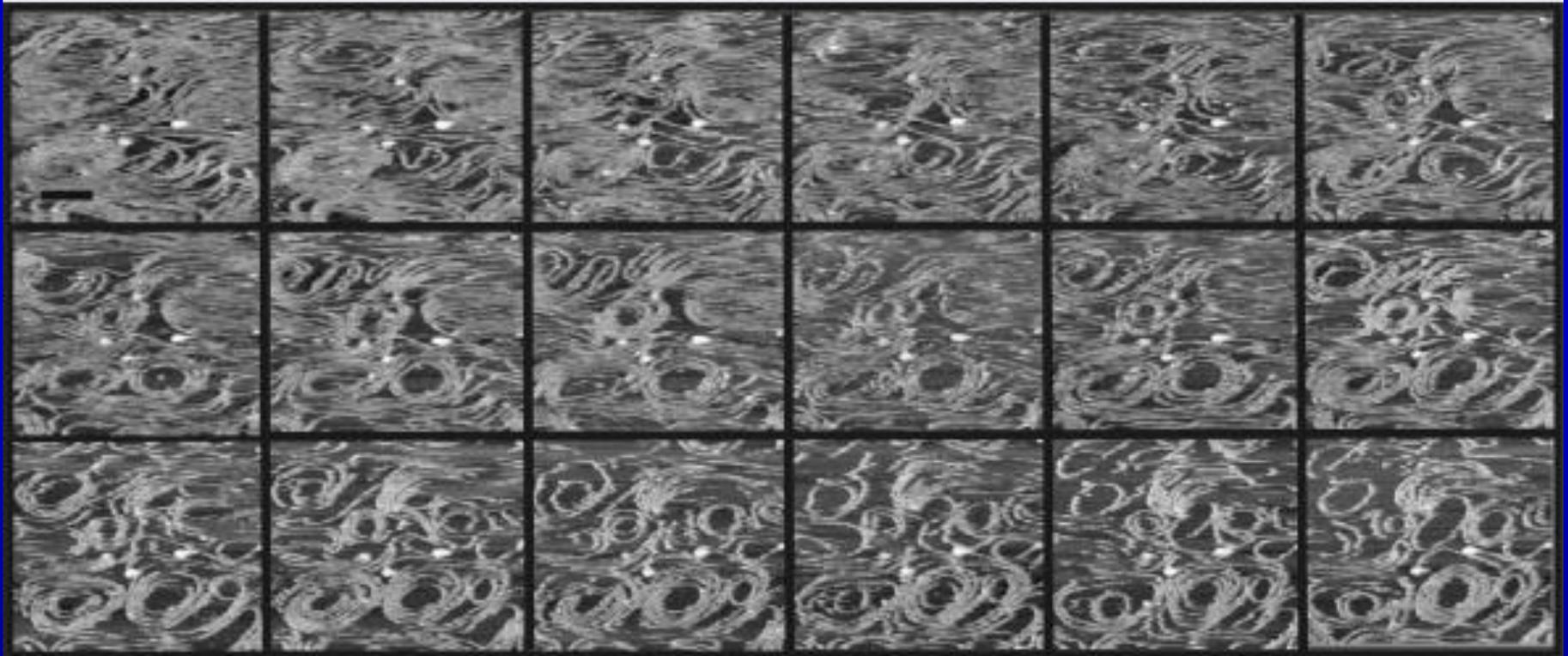


Carballido Lopez et al. 2003

Struttura di FtsZ



FtsZ con 1 mM GTP (40 min)



FtsZ

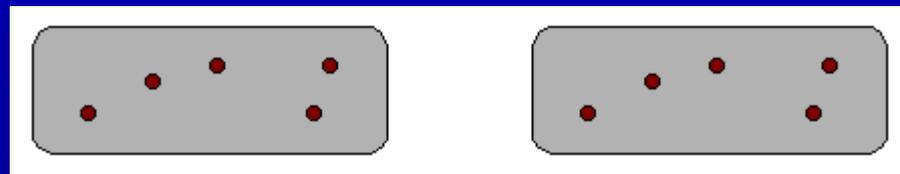
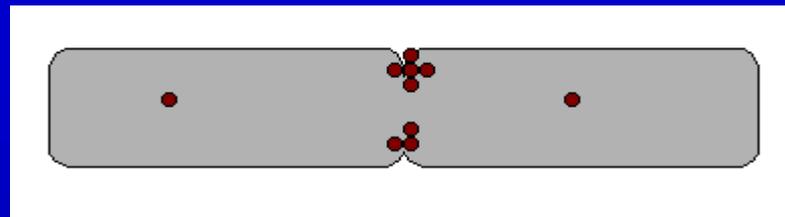
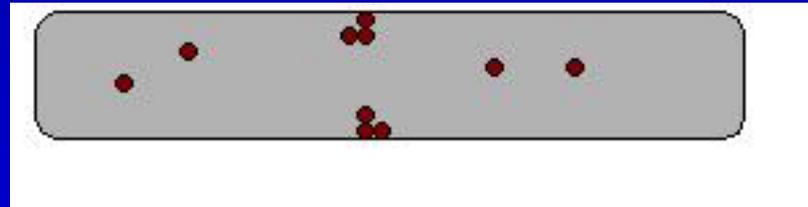
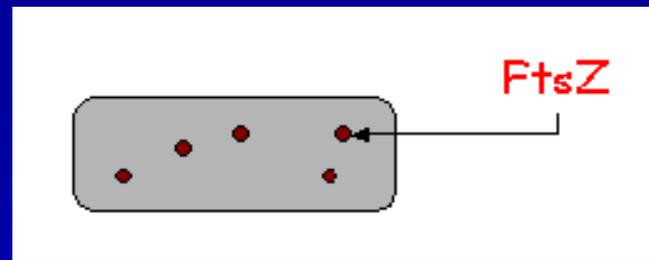
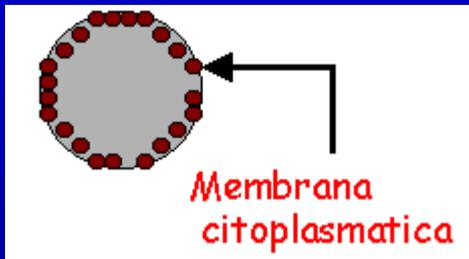
GTP

FtsZ*

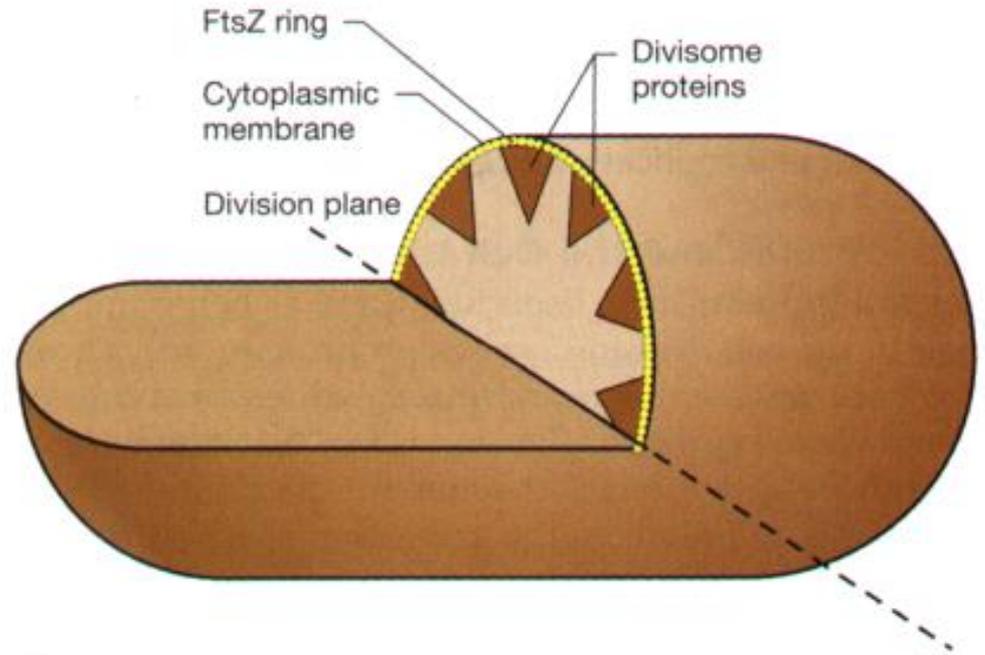
GDP + Pi

FtsZ

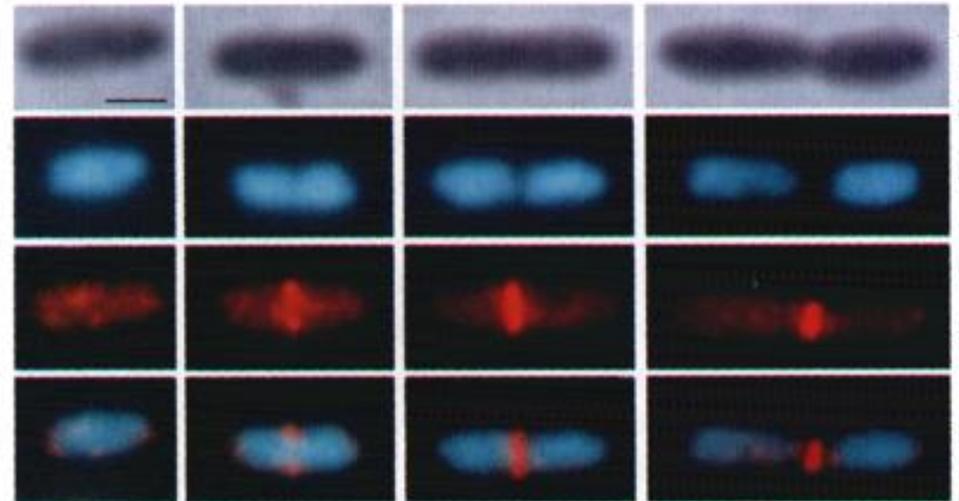
Sezione trasversale



LOCALIZZAZIONE DELL'ANELLO Z

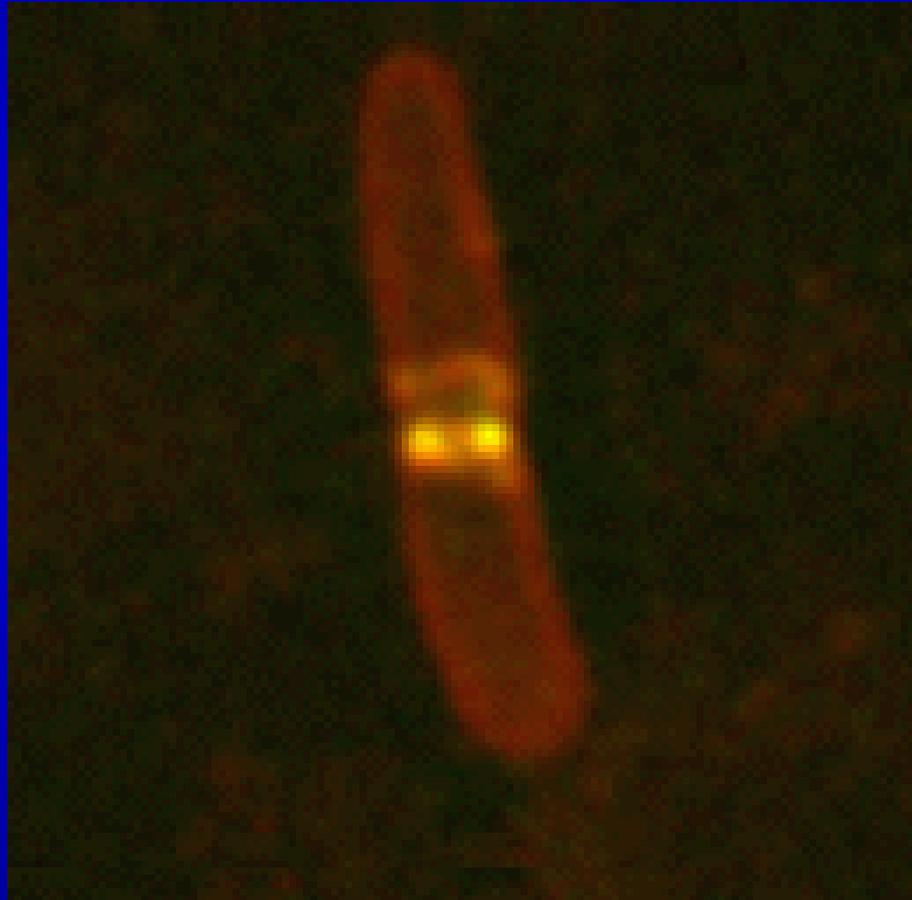


(a)

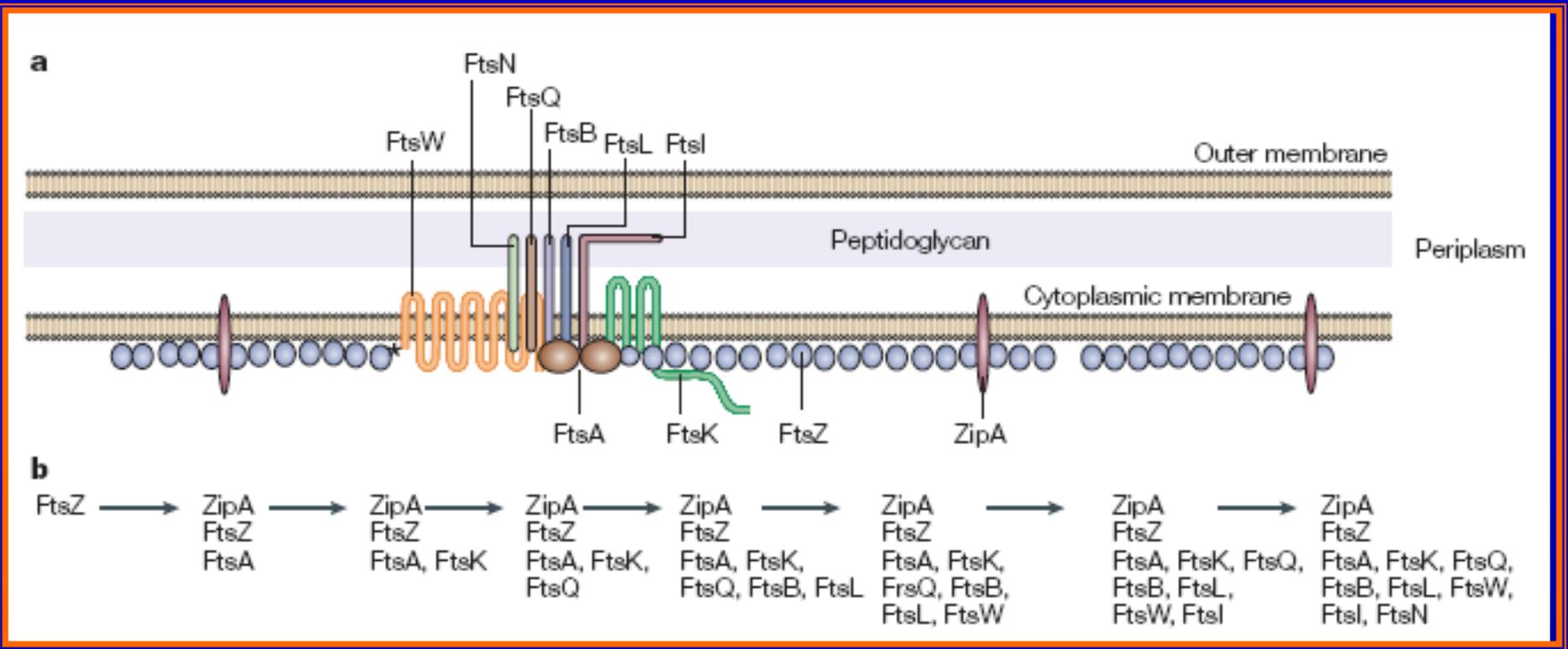


T. den Blaauwen & Nanne Nanninga, Univ. of Amsterdam

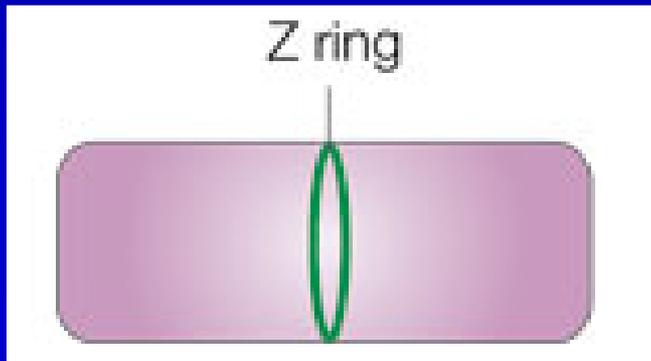
Movimento dell'anello Z



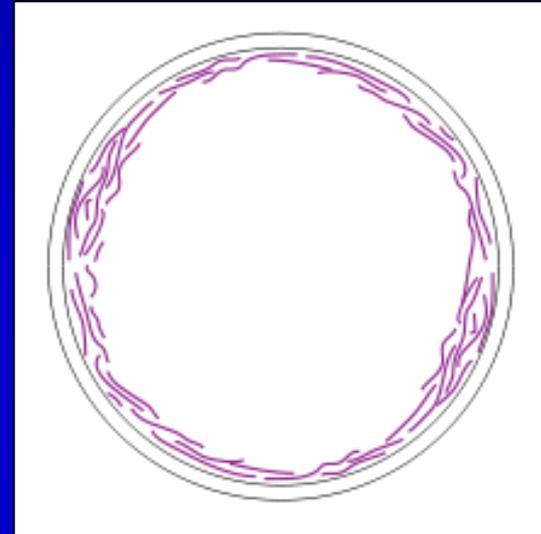
Cascata dei fattori associati all'anello Z



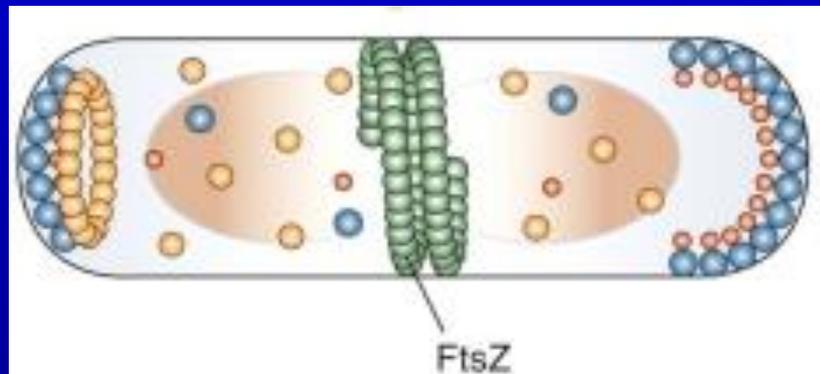
Possibili strutture dell'anello Z



Anello chiuso

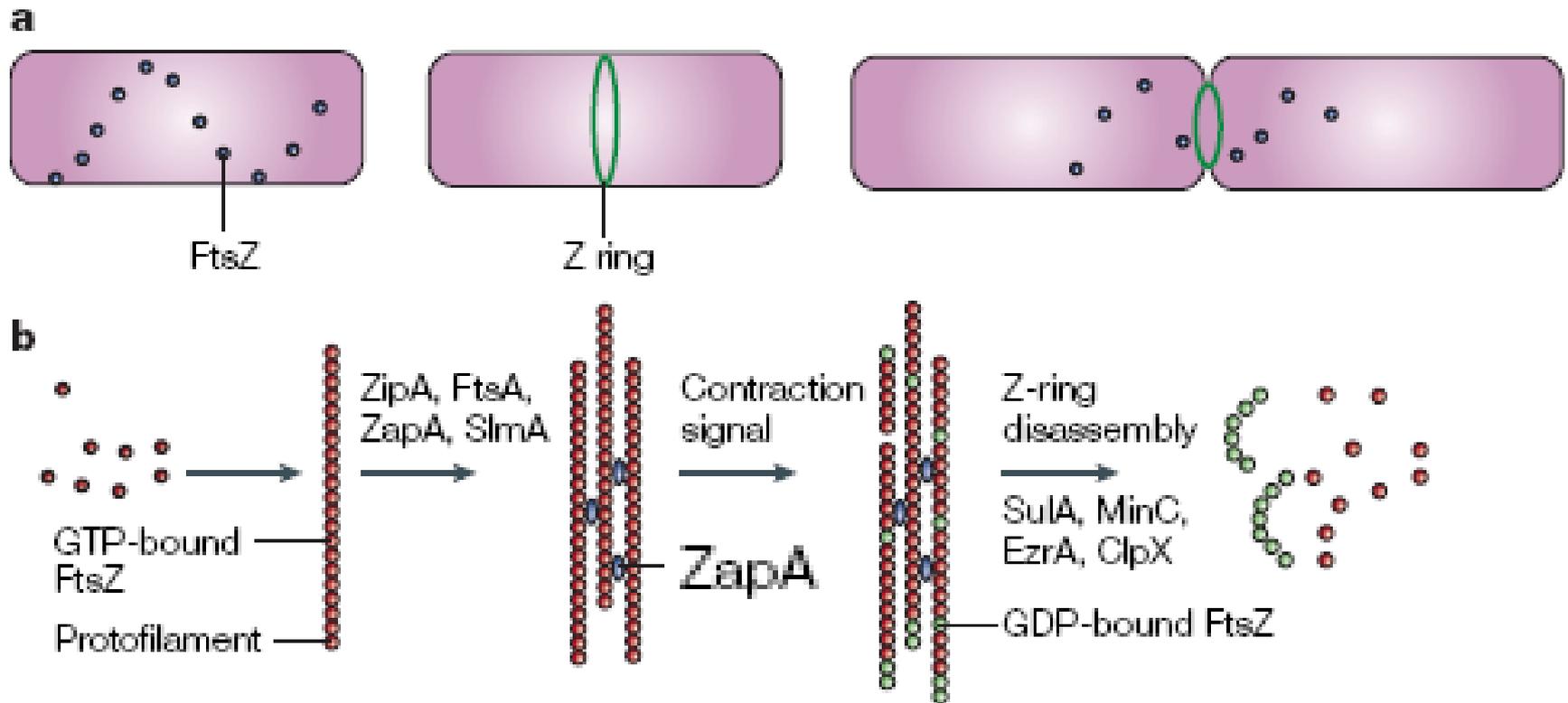


Anello composto

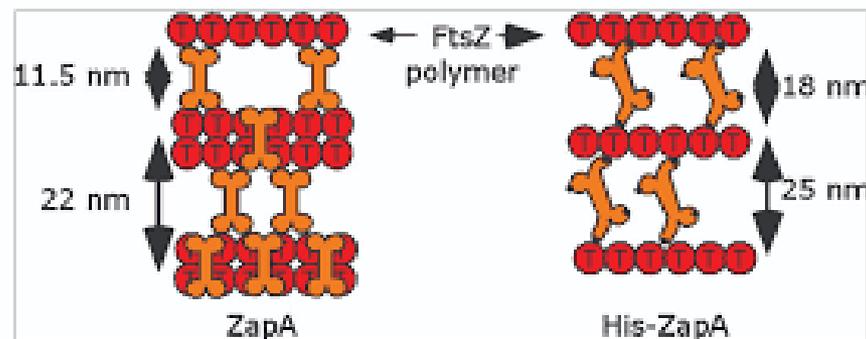
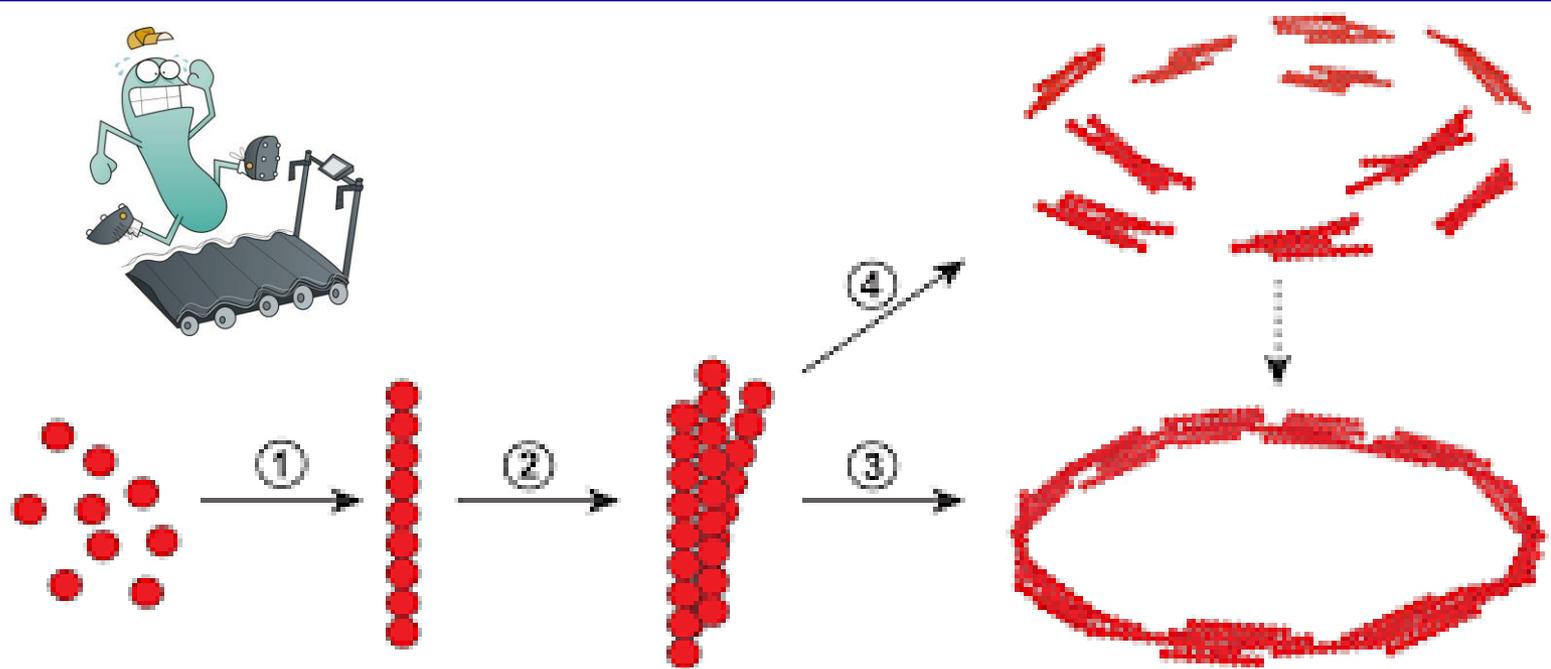


Spirale compressa

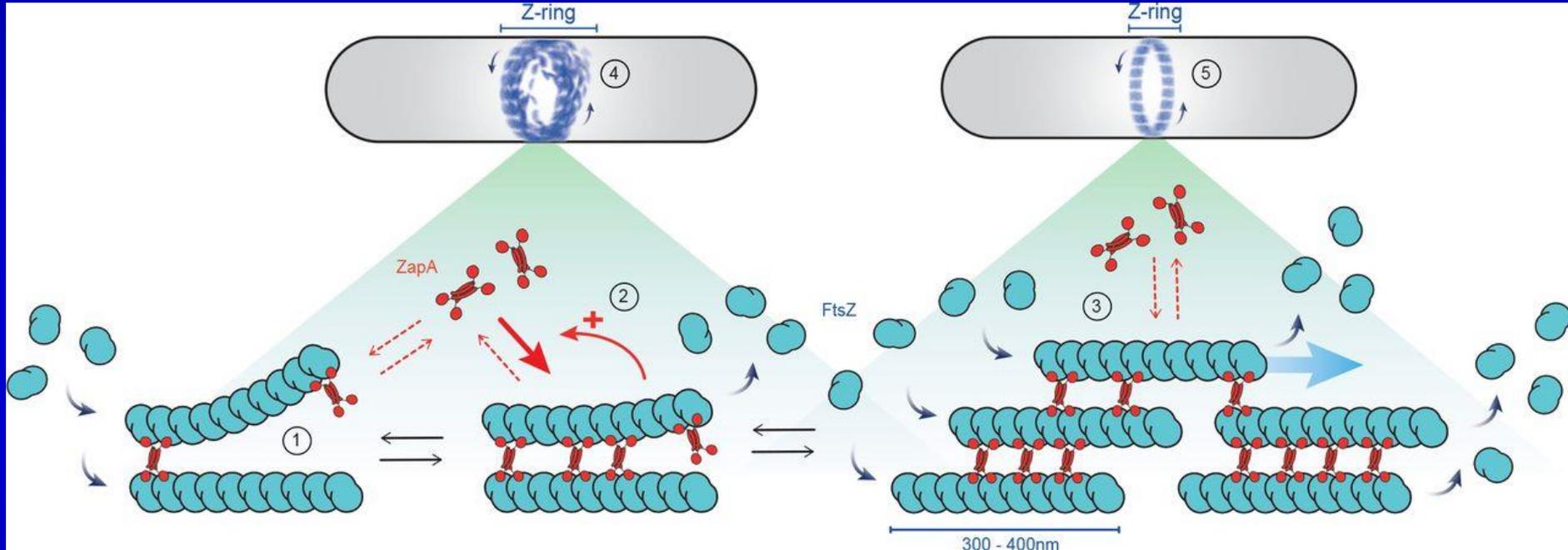
ASSEMBLAGGI DELL'ANELLO Z (Z-ring)



Modello del tapis roulant o «treadmilling»

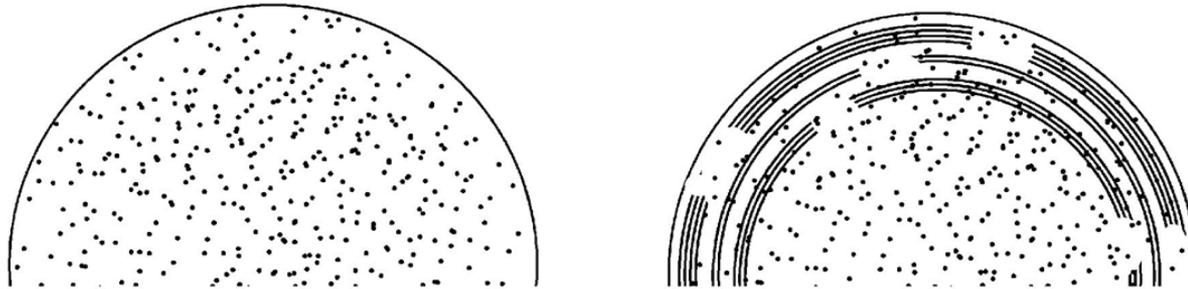


Modello del tapis roulant o «treadmilling»



Modalità di formazione dell'anello Z

A. End polymerization of multi-stranded polymers



B. Isodesmic assembly of single protofilaments

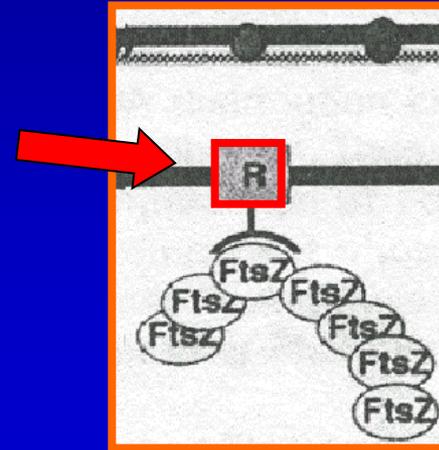


cytoplasm

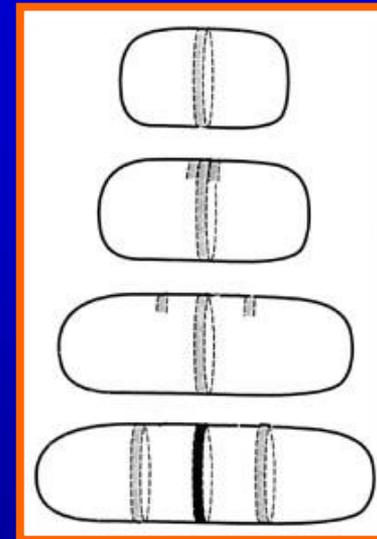
division site

POSIZIONAMENTO DELL'ANELLO Z

1) Localizzatore topologico

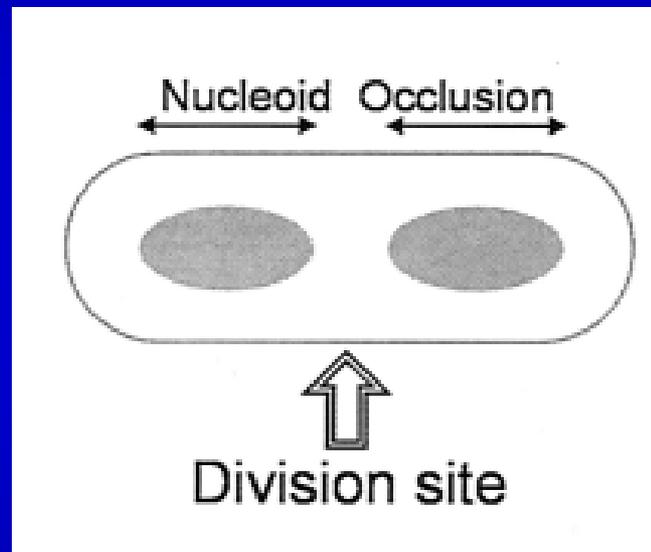


2) Anelli perisettali

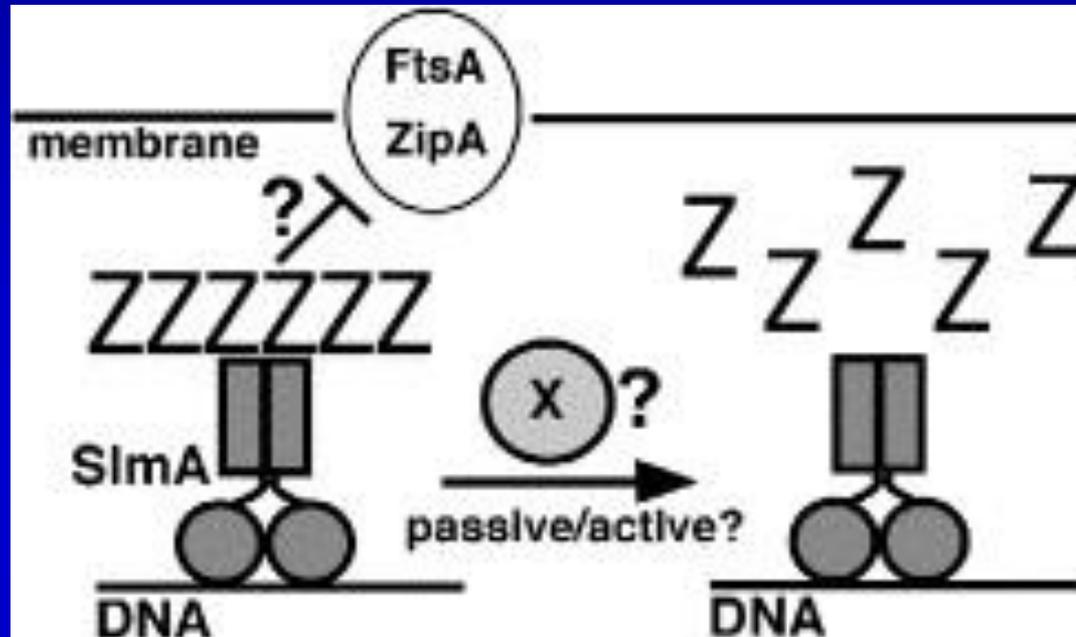


POSIZIONAMENTO DELL'ANELLO Z

3) Occlusione da nucleoide



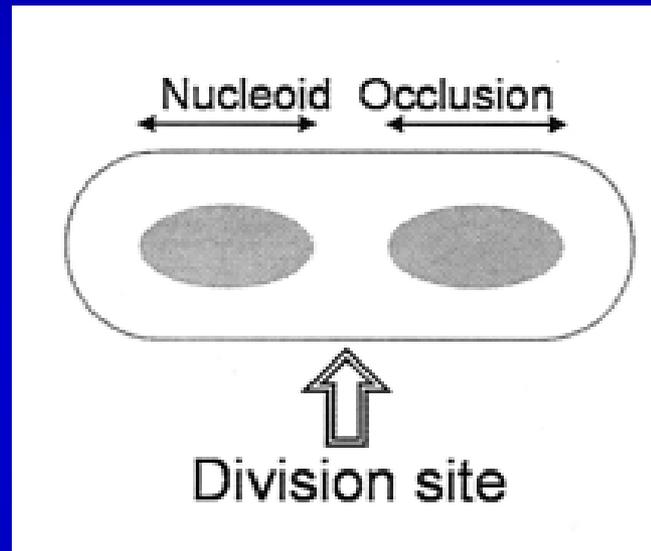
Il modello del “Nucleoid occlusion”



In questo modello la proteina SlmA associata al DNA del nucleotide titola la proteina FtsZ sottraendola alla formazione dello Z ring

POSIZIONAMENTO DELL'ANELLO Z

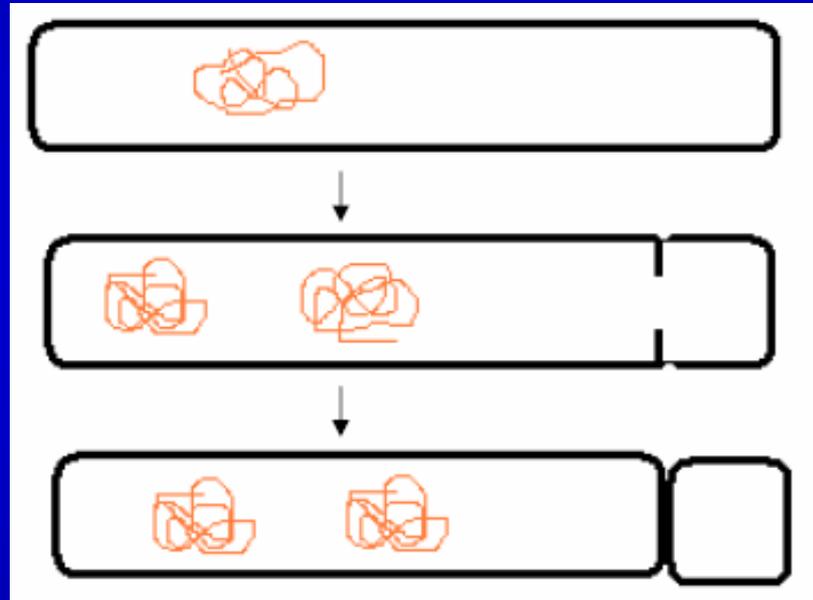
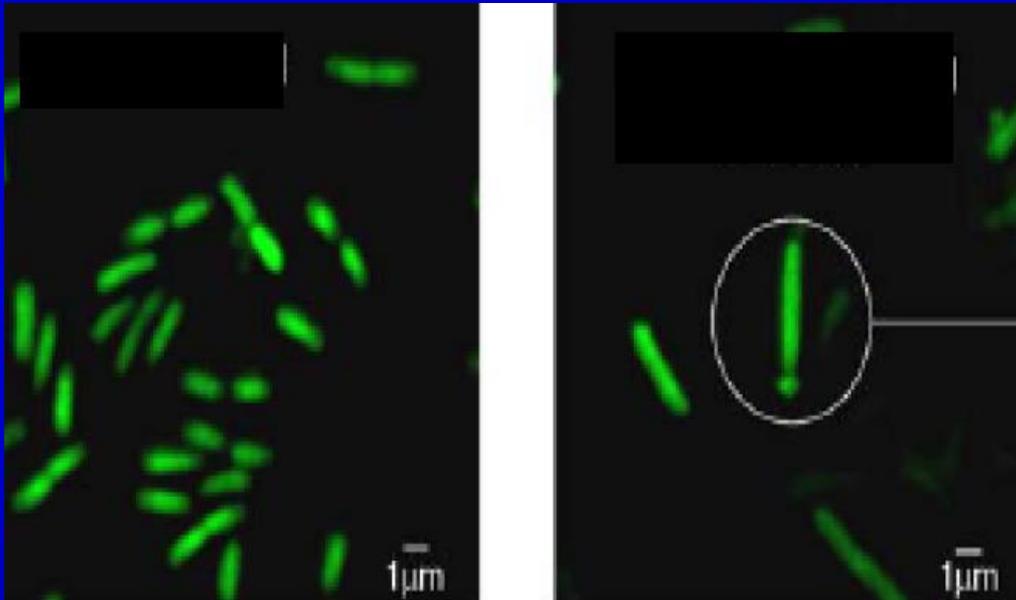
3) Occlusione da nucleoide



4) Proteine MinCDE



Minicell



Il *locus min* (26.3')

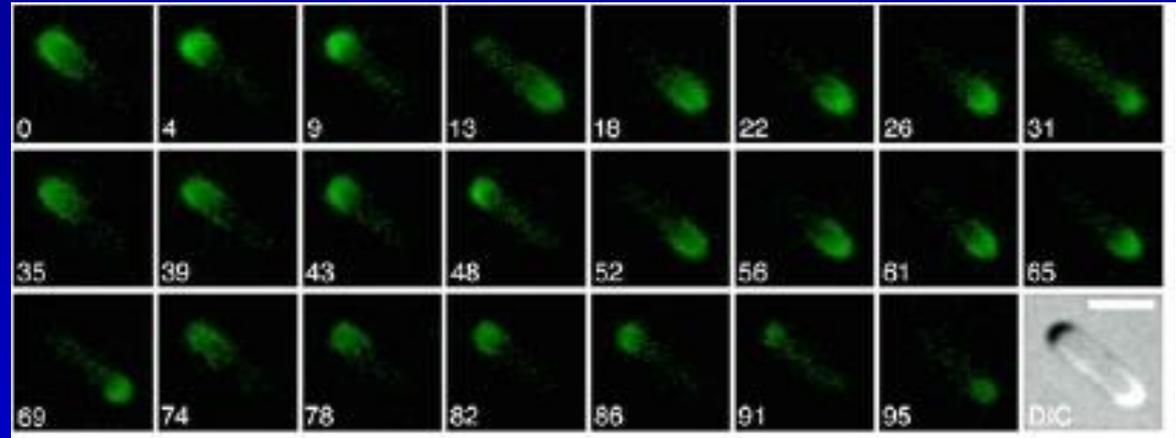
Esso è caratterizzato da tre geni: *minC*, *minD*, *minE*.

- I mutanti *minD* vanno incontro a formazioni del setto anomale (es. polari) formando le *mini-cell*
- La delezione dell'intero *locus* determina il medesimo fenotipo
- La combinazione delle iper-espressioni dei singoli geni hanno suggerito un effetto negativo da parte del complesso MinCD sulla formazione del setto ed uno positivo da parte di MinE (*mini-cell*)

Caratteristiche delle proteine Min

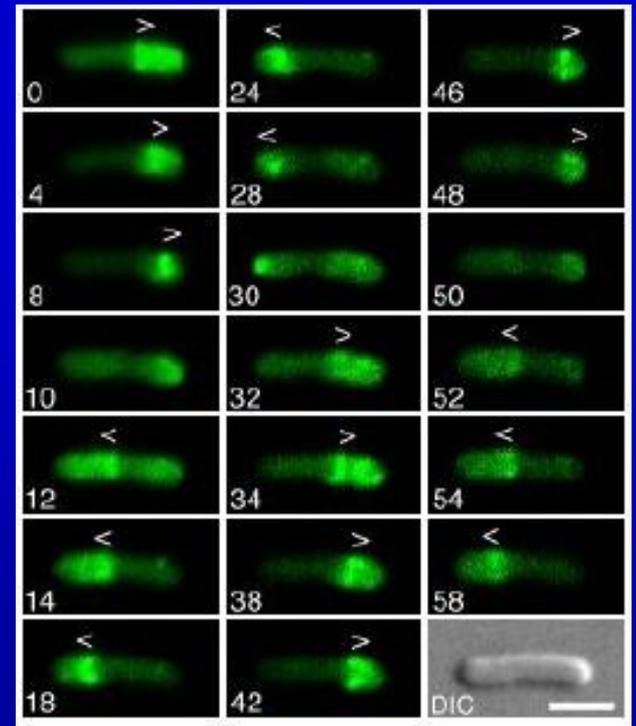
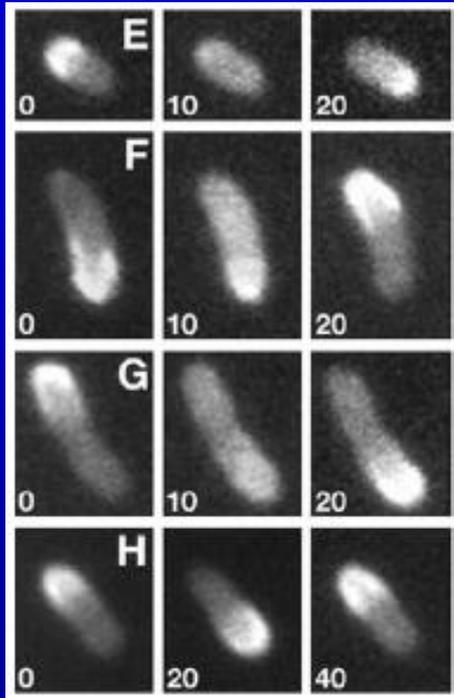
- **La proteina MinD ha attività ATPasica . Essa lega l'ATP e questo legame, oltre a favorire l'interazione con la membrana, è stabilizzato dall'interazione con MinC.**
- **Il complesso MinCD-ATP determina l'inibizione della formazione dell'anello da parte di FtsZ.**
- **MinE interagisce con MinC-ATP, ne stimola l'attività ATPasica inibendo l'interazione tra MinC e MinD e dissocia MinD dalla membrana.**
- **MinE è concentrato nella regione centrale della cellula e si sposta oscillando verso un'estremità della cellula per poi scomparire e ricomparire al centro della cellula. Di qui si sposta nuovamente verso il polo opposto.**

MinC-GFP

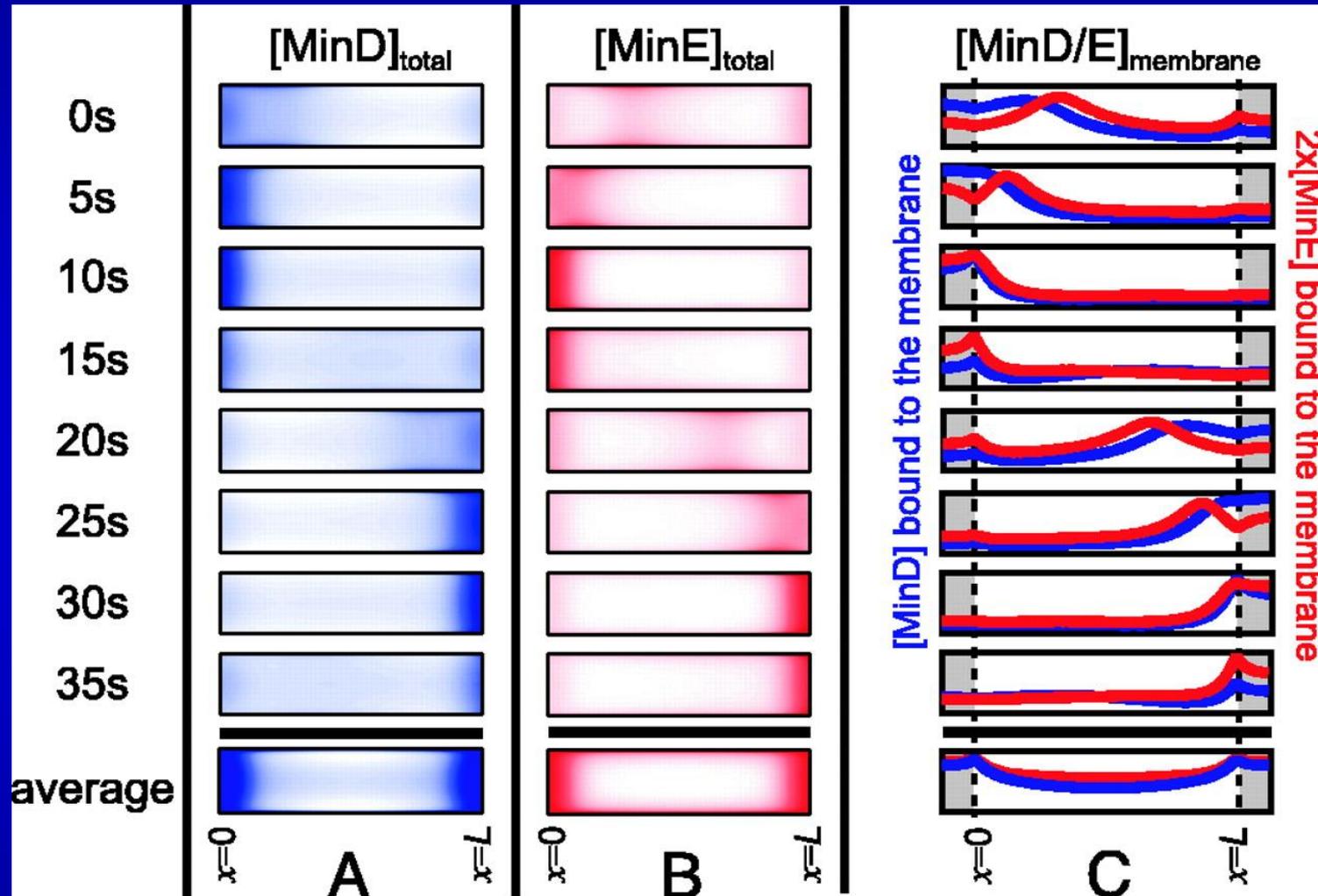


MinD-GFP

MinE-GFP



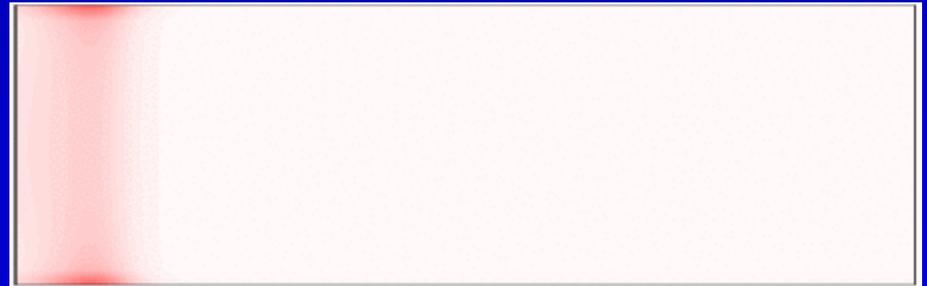
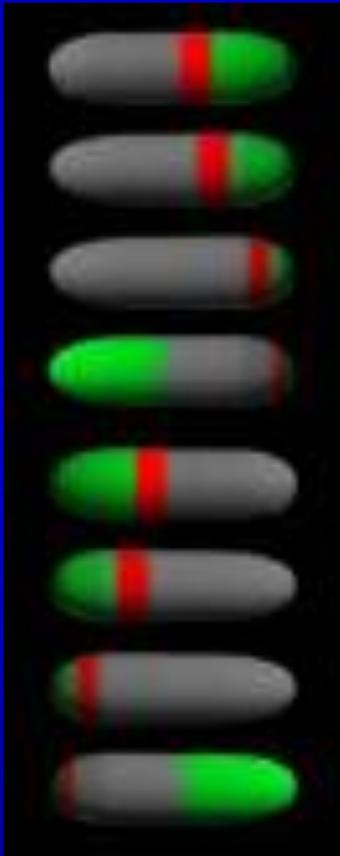
Time slices in 5-sec increments of one complete MinD, MinE oscillation in a 4- μm cell.



Huang K C et al. PNAS 2003;100:12724-12728

PNAS

MinDE movie

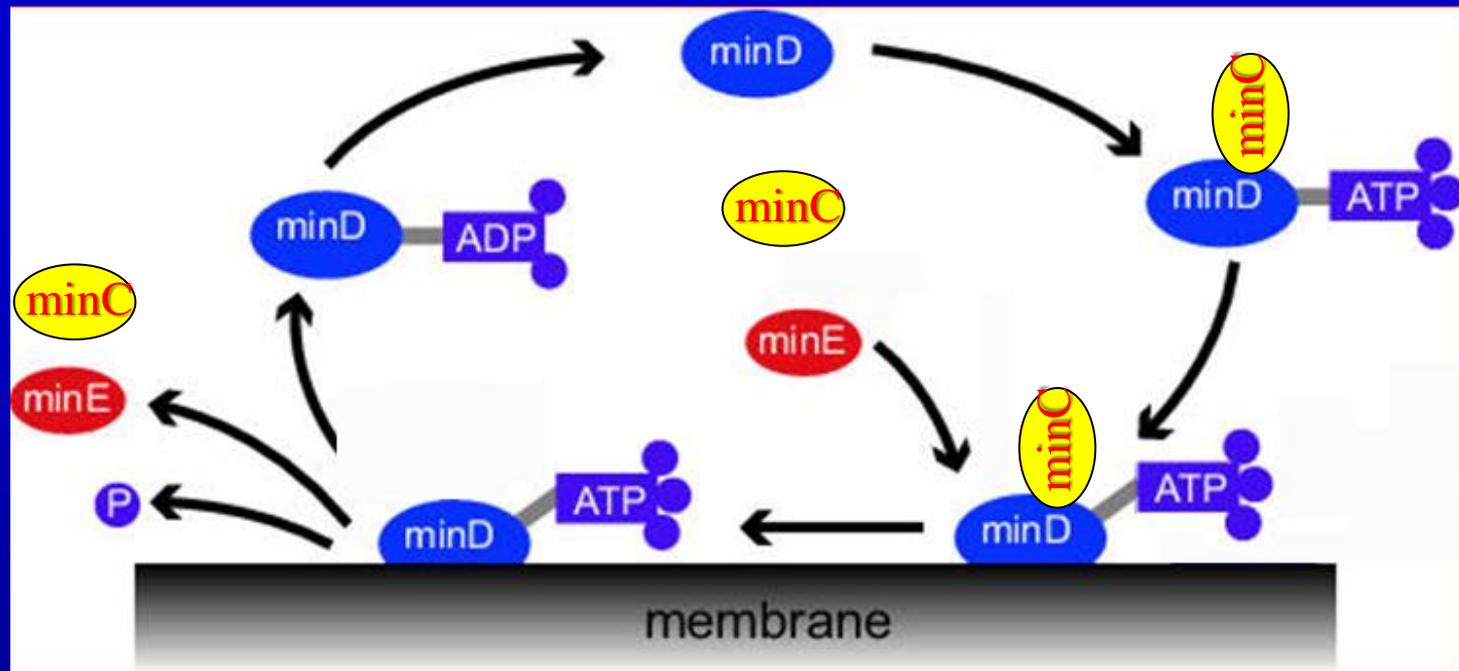
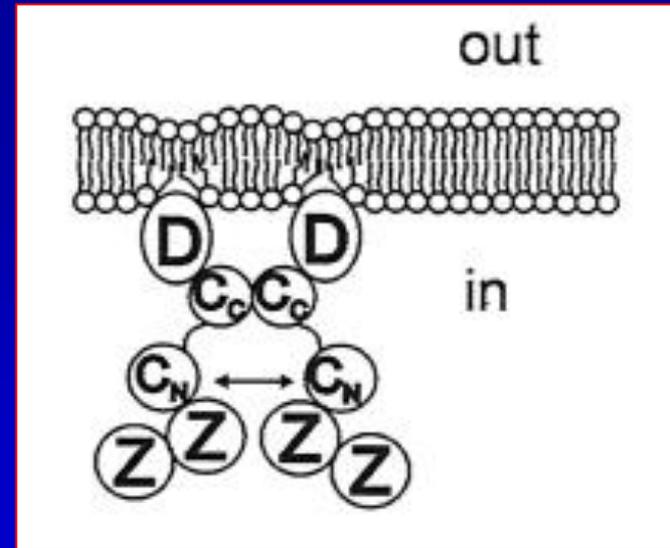


MinE

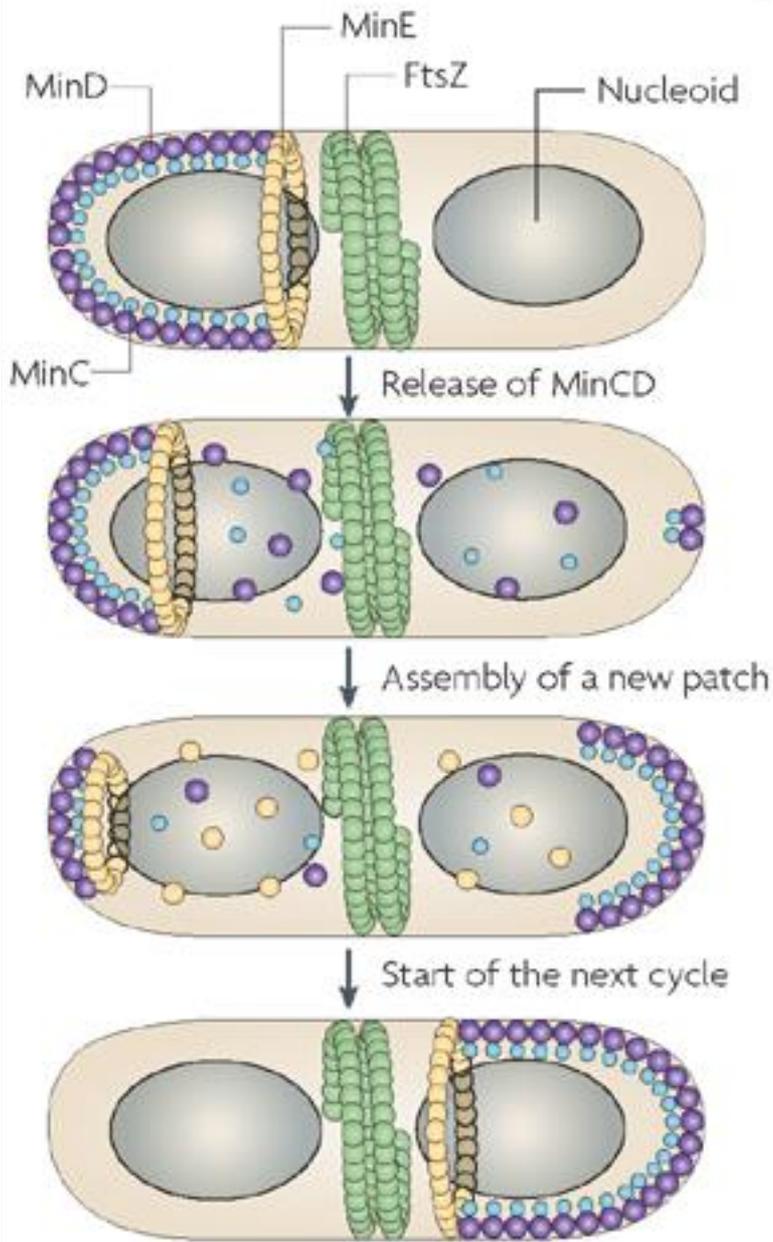


MinD

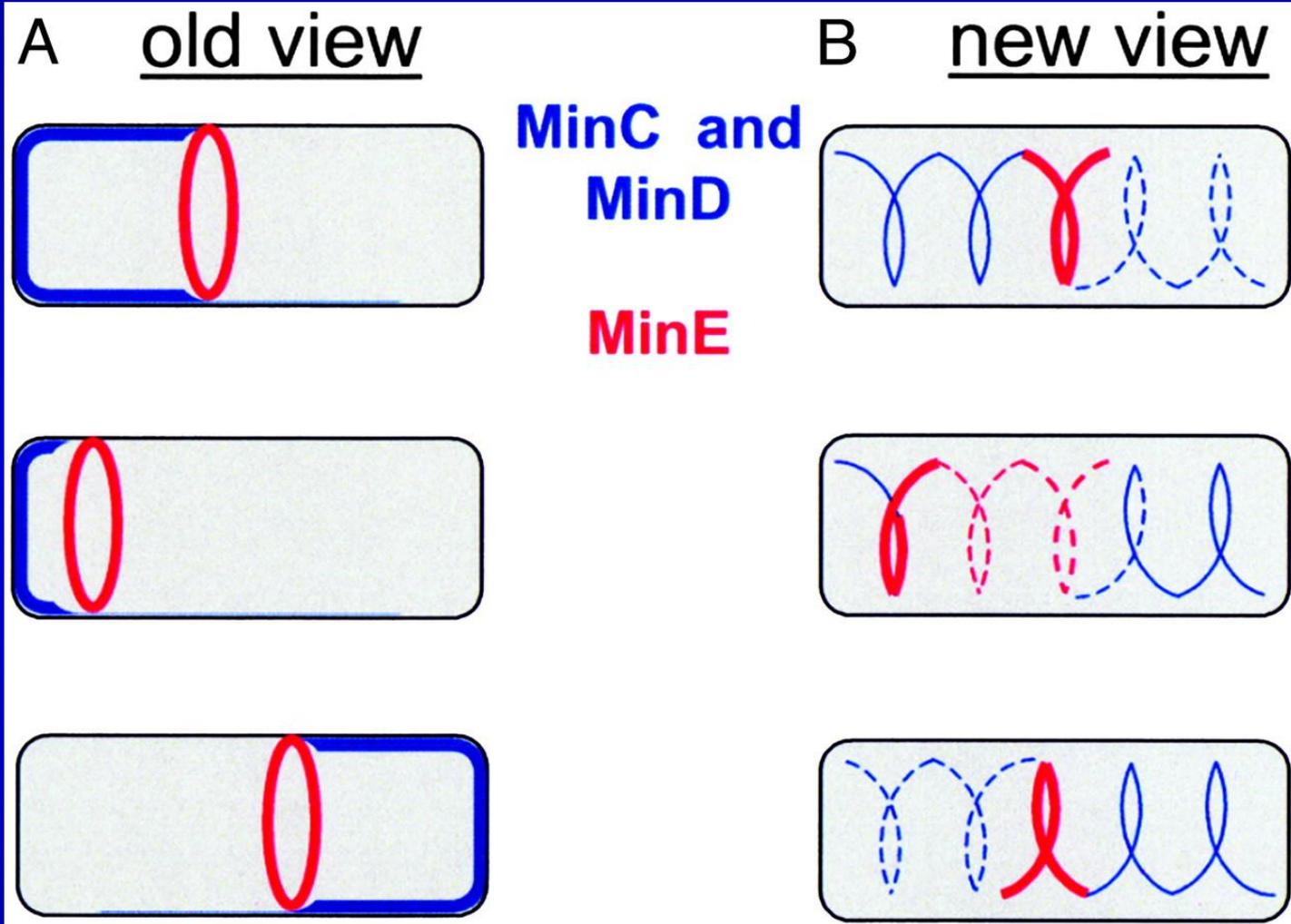
Meccanismo d'azione di MinCDE



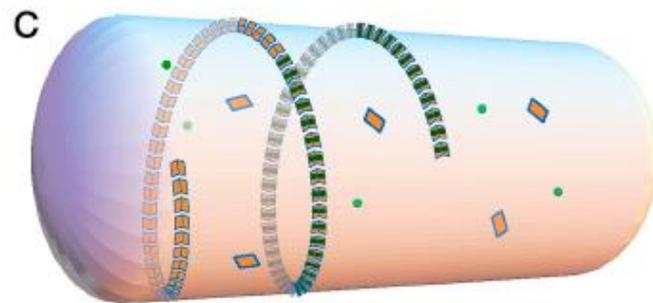
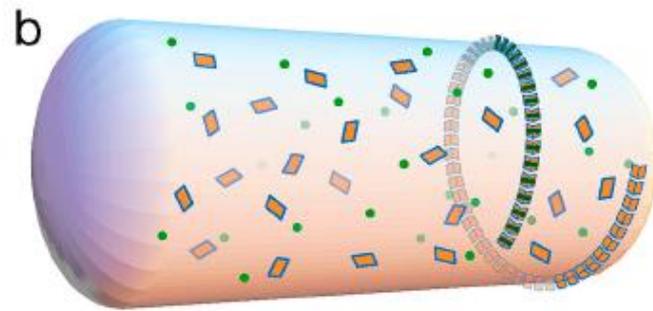
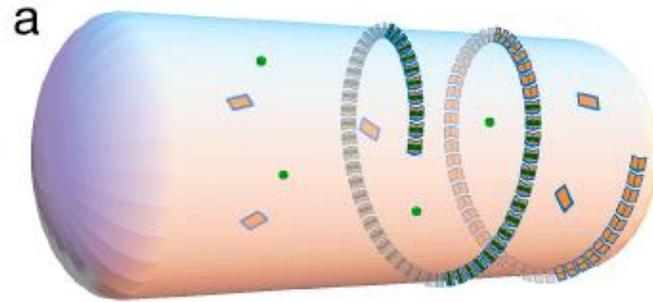
b



The old view of the organization of MinC, MinD, and MinE proteins within E.



Gitai Z , Shapiro L PNAS 2003;100:7423-7424



 MinD  MinD-filament
 MinE  MinDE-complex

INIBIZIONE DELLA DIVISIONE CELLULARE

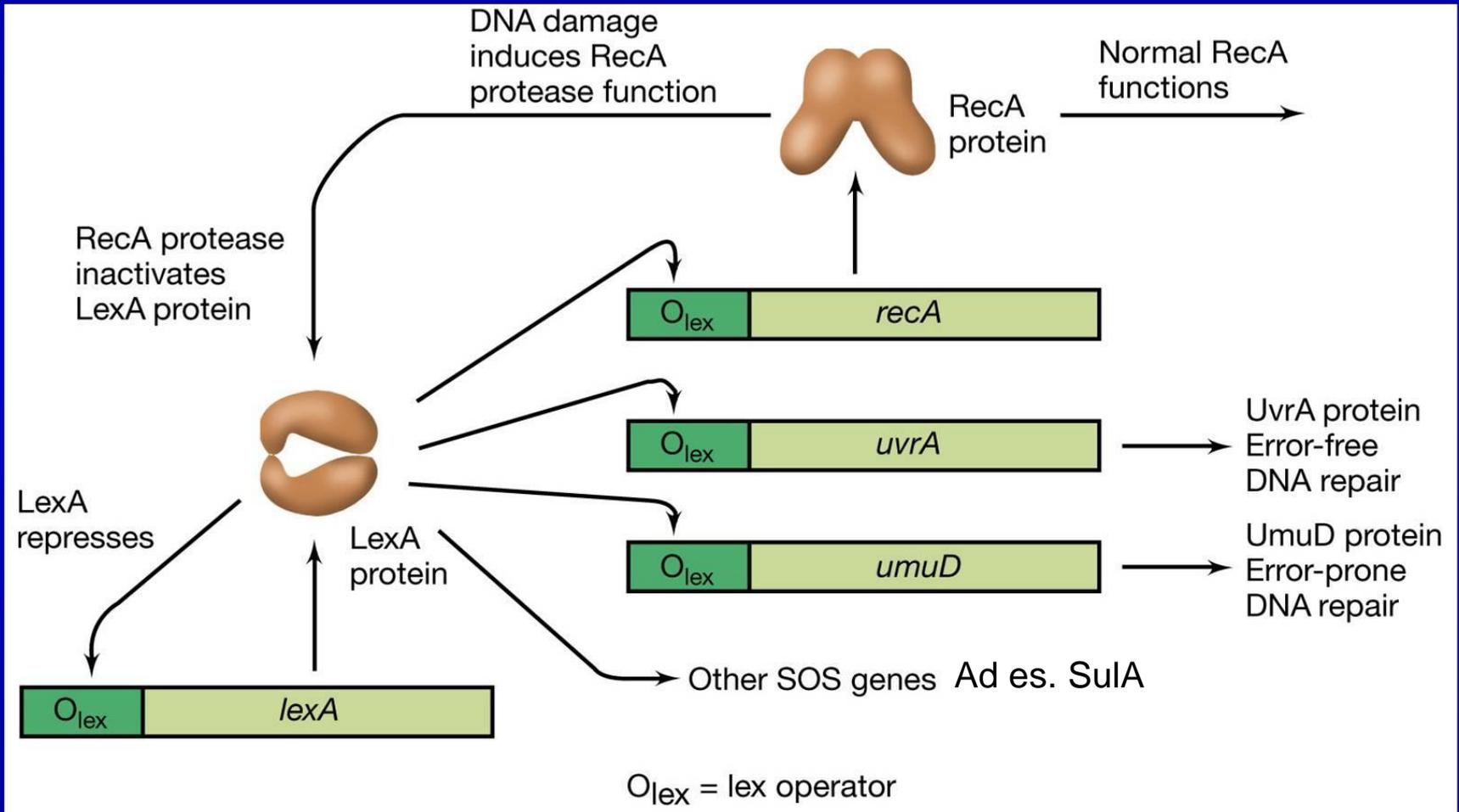
La divisione cellulare manifesta un'apprezzabile correlazione con la replicazione del DNA e con il partitioning.

La divisione cellulare si blocca, in particolare, quando la cellula riporta alcuni danni al proprio DNA.

Questo fenomeno è ben conosciuto e dipende da una proteina che fa parte del sistema SOS:

SulA

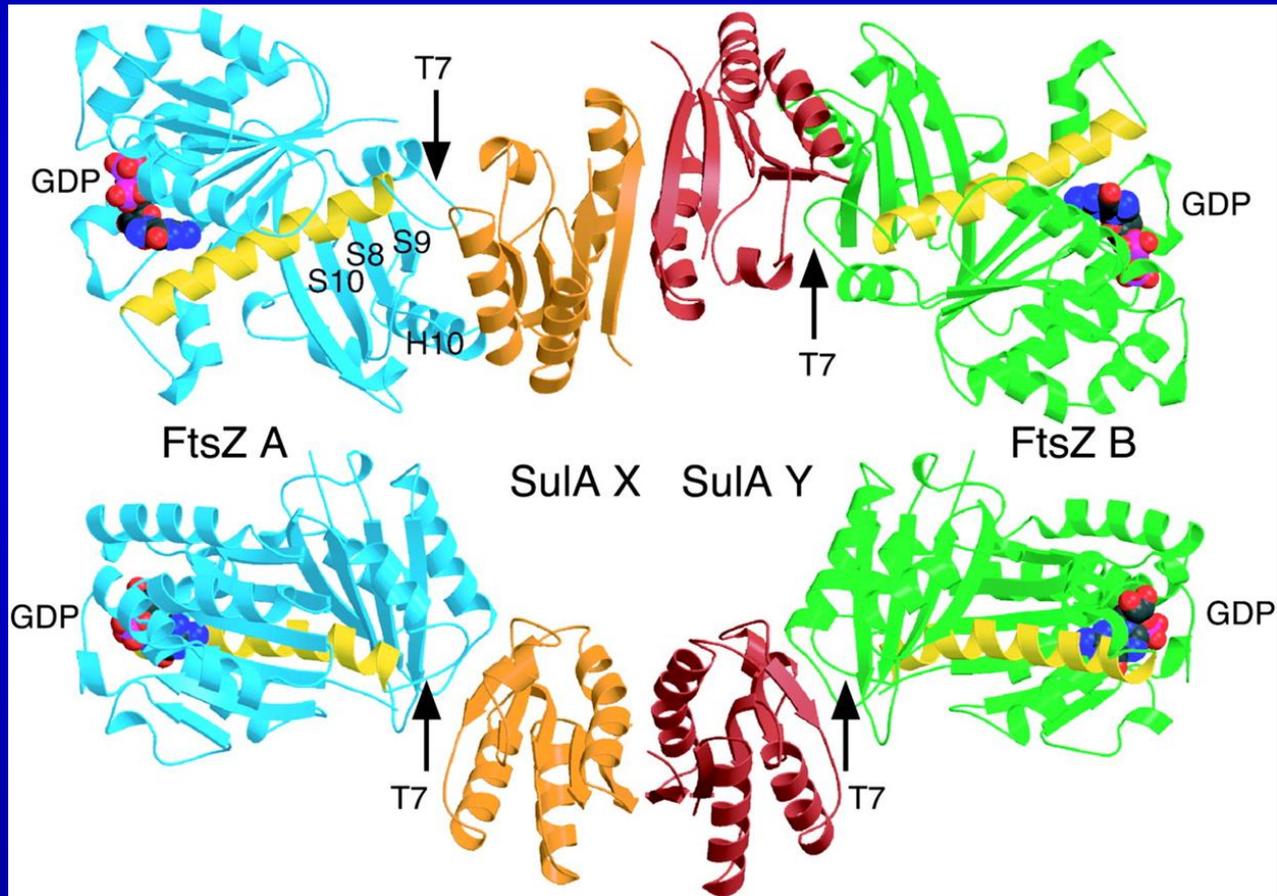
SISTEMA S.O.S.



Circuito di Sula



Interazione tra SulA e FtsZ



Riferimenti

- Löwe et al. “Molecules of the Bacterial Cytoskeleton”. *Ann.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 2004 33:177-198
- Margolin w. “FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles”. *Nature reviews-Molecular Cell Biology.* 2005 Vol.6 pp. 862-872
- Lutkenhaus J., “Assembly dynamics of the Bacterial MinCDE System and Spatial Regulation of the Z Ring”. *Ann.Rev.Biochem.* 2007 76:539-562
- Graumann PL, “Cytoskeletal element in bacteria” *Ann. Rev. Microbiol.* 2007 (61). Pp 589-618

https://youtu.be/6dq2_gqKPfU