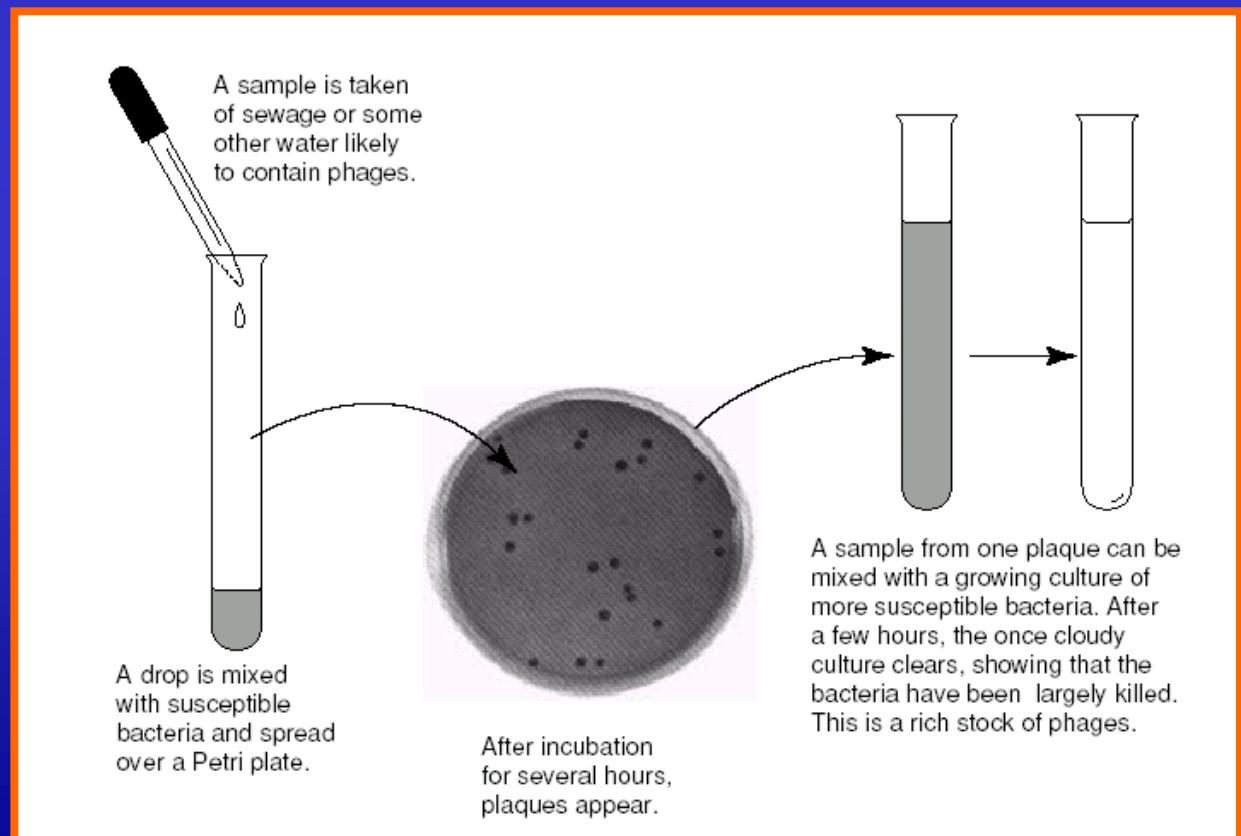


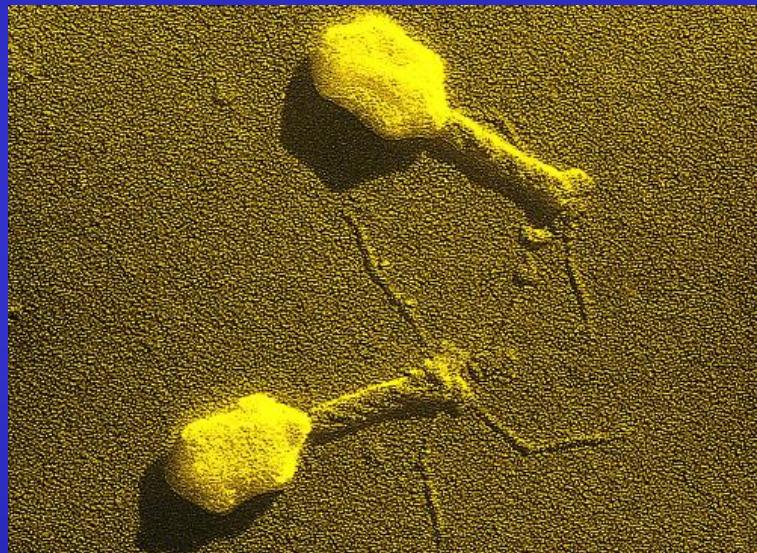
# I BATTERIOFAGI

La loro scoperta risale ai primi del 900, quando due studiosi, Twort e D'Herelle, osservarono indipendentemente la chiarificazione di una coltura batterica ....

La conferma sperimentale arrivò con lo sviluppo della tecnica delle placche, realizzata da Ellis & Delbrück (1939)



La consacrazione dell'esistenza dei batteriofagi venne però con la realizzazione delle prime immagini al microscopio elettronico ...



the cell membrane attacked

0.25  $\mu\text{m}$

Lo studio dei batteriofagi dal punto di vista genetico ha avuto un impatto enorme sulle attuali conoscenze della biologia cellulare e sulla genetica.

I batteriofagi (in particolare T2 e T4) hanno rappresentato il modello di riferimento nello studio di molti fenomeni biologici: dalla ricombinazione alla replicazione del DNA, dalla sintesi delle proteine alla definizione della sintesi e del ruolo degli RNA.

Il concetto stesso di gene non avrebbe avuto lo stesso significato senza il test di complementazione di Benzer effettuato con il fago T2

Oggi sono noti numerosi tipi di batteriofagi caratterizzati da proprietà differenti ...

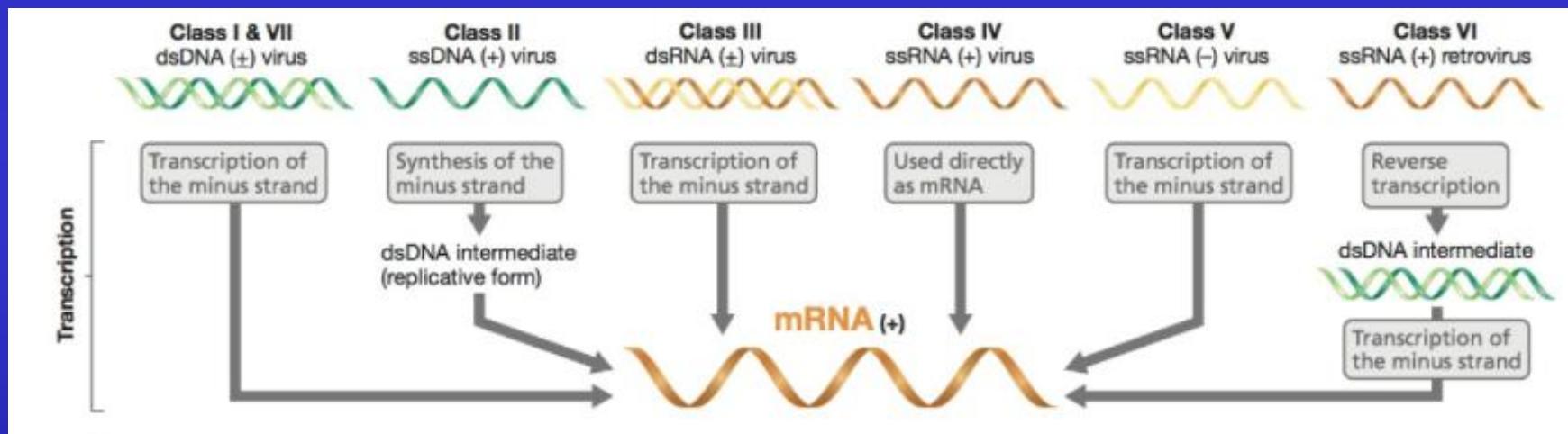
Essi possono infatti avere un genoma a DNA, RNA, a singolo e doppio filamento ....

Il loro genoma può inoltre essere lineare o circolare, e questo può dipendere dalle varie fasi del ciclo infettivo

Possono essere dotati di un capsid proteico icosaedrico o filiforme, con o senza lipidi ....

# La classificazione di Baltimore dei genomi virali

Sette classi di genomi virali sono state realizzati sulla base dei meccanismi che i virus utilizzano per generare mRNA virale (+RNA)



La replicazione e la espressione dei virus ad RNA richiede enzimi specifici (non presenti nelle cellule infettate)

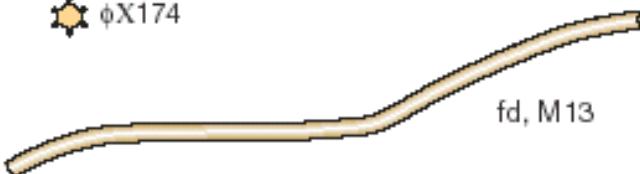
RNA

ss MS2

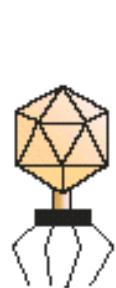
ds φ6

Singolo filamento DNA

φX174



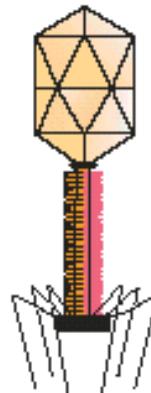
Doppio filamento DNA



T3, T7



Lambda



T2, T4

I batteriofagi possono avere morfologie differenti ....

I fagi T2 e 4 sono caratterizzati da una testa icosaedrica, da una coda retrattile, una base da cui dipartono una serie di filamenti.

Differente è la struttura dei fagi T3 e T7, di lambda e Mu.

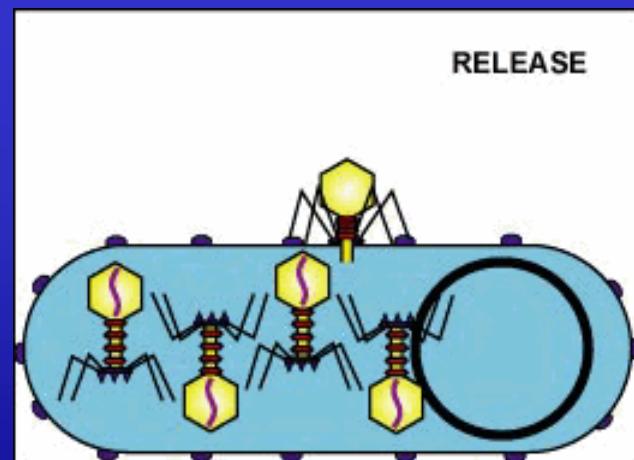
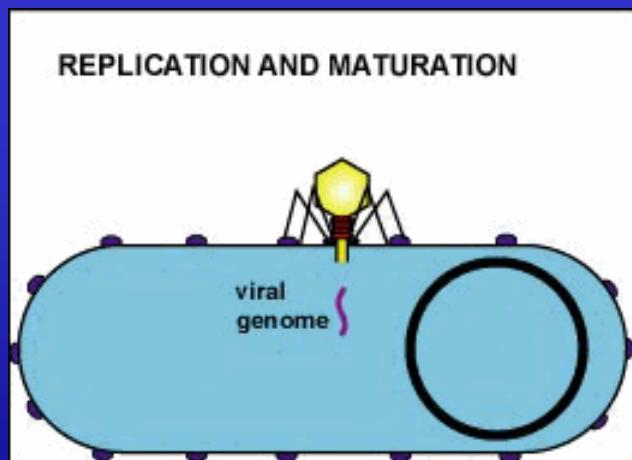
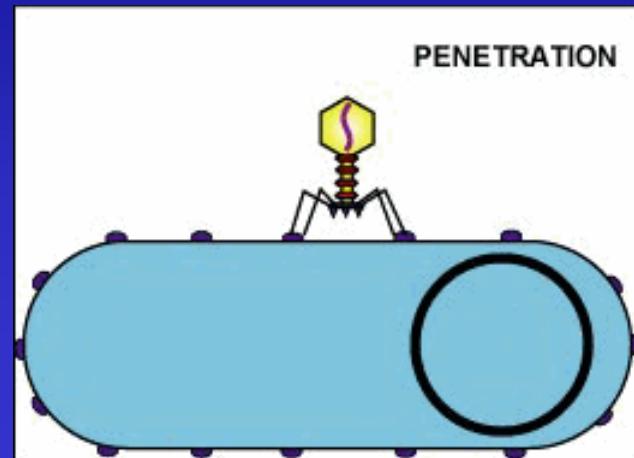
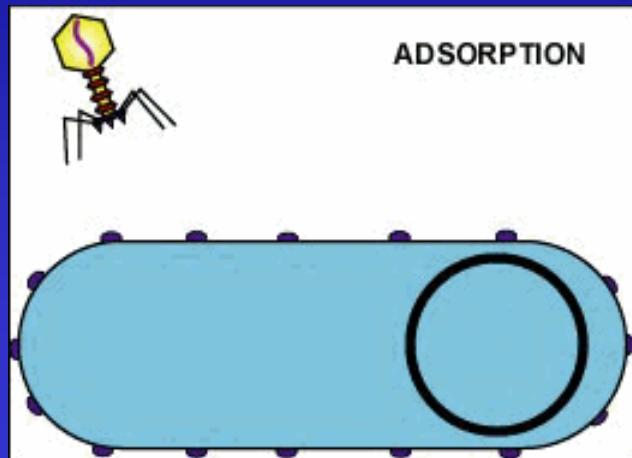
Il fago M13 è detto filamentoso perché non evidenzia un capsid icosaedrico ma uno filiforme....

Negli anni seguenti la loro identificazione, lo studio dei batteriofagi si concentrò su una serie di isolati denominati T e che andavano dal 1 al 7 (T1, T2 ....T7). In verità quelli meglio studiati furono il T4 (per la serie detta dei T-pari) e il T7 (per la serie detta dei T-dispari)

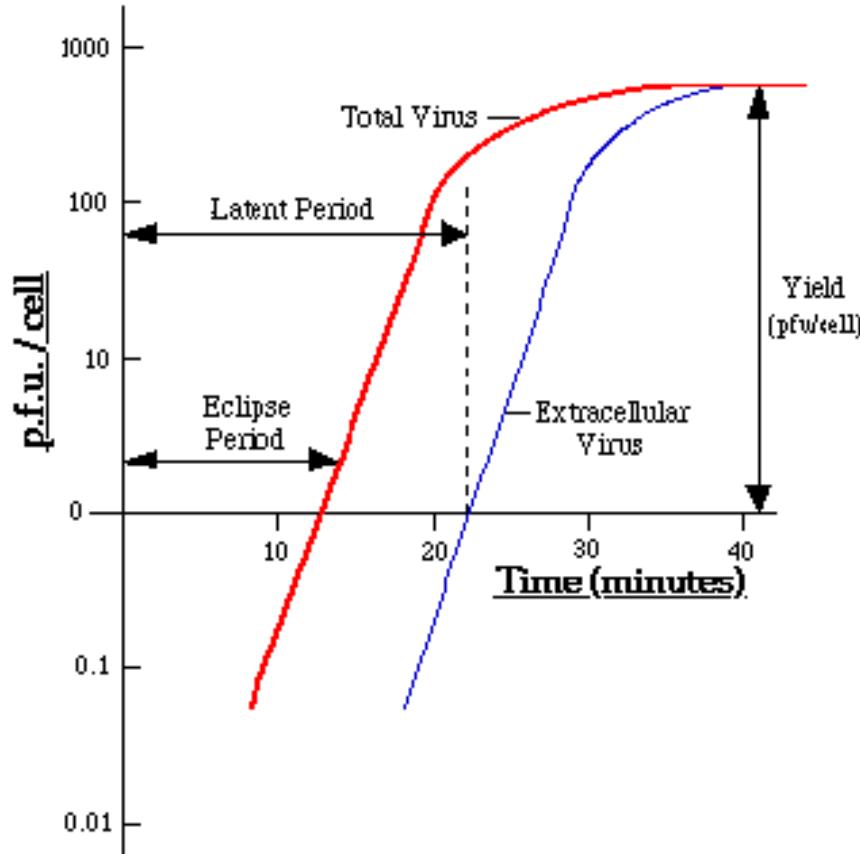
I fagi della serie T-pari sono strettamente correlati (appartengono alla stessa famiglia: *Myoviridae*).

I fagi della serie T-dispari sono meno omogenei (i T7 e T3 appartengono alla famiglia dei *Podoviridae* mentre T1 e T5 a quella dei *Siphoviridae*)

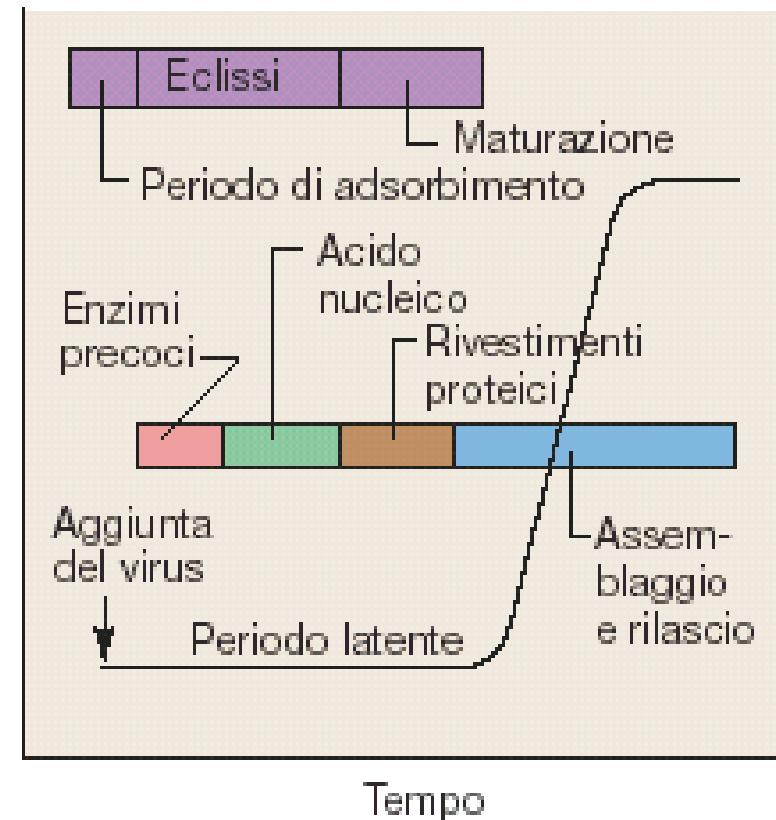
# I fagi della serie T presentano processi infettivi suddivisibili in fasi ...



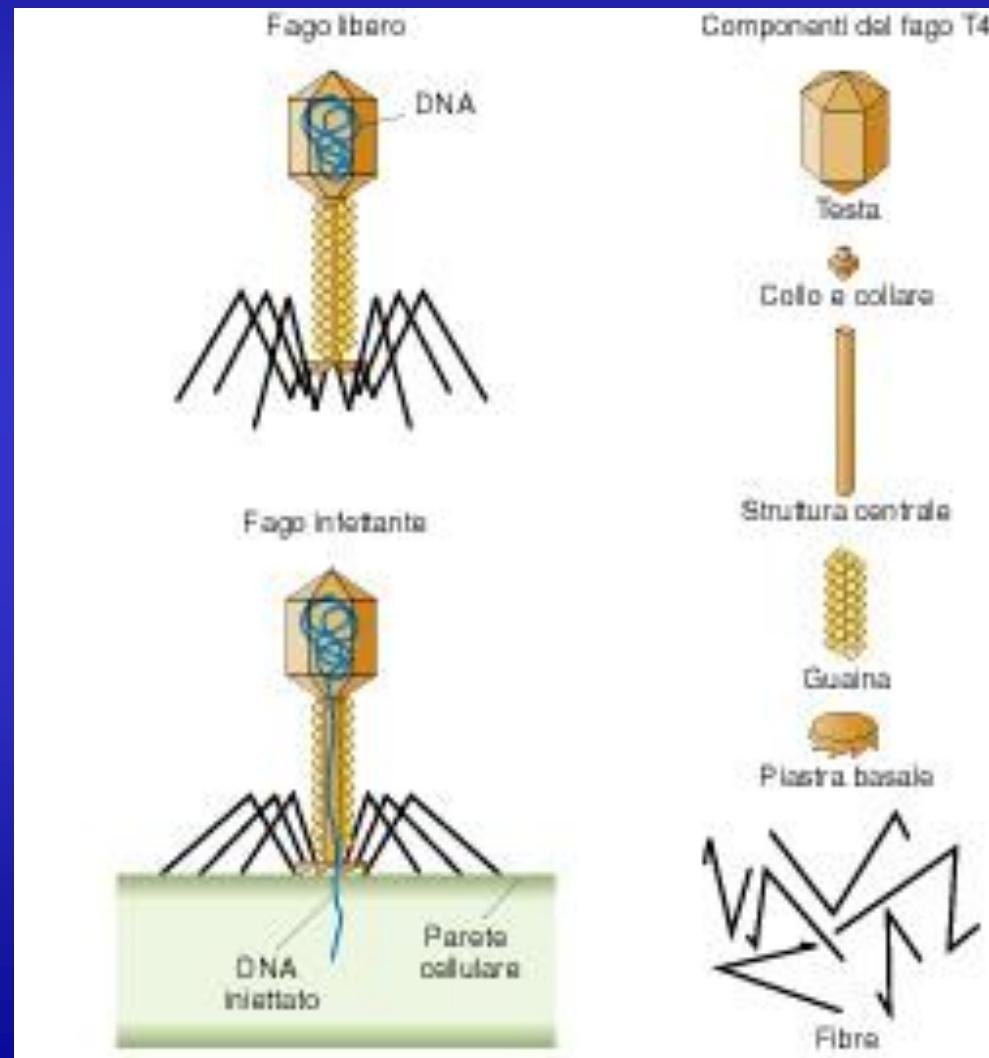
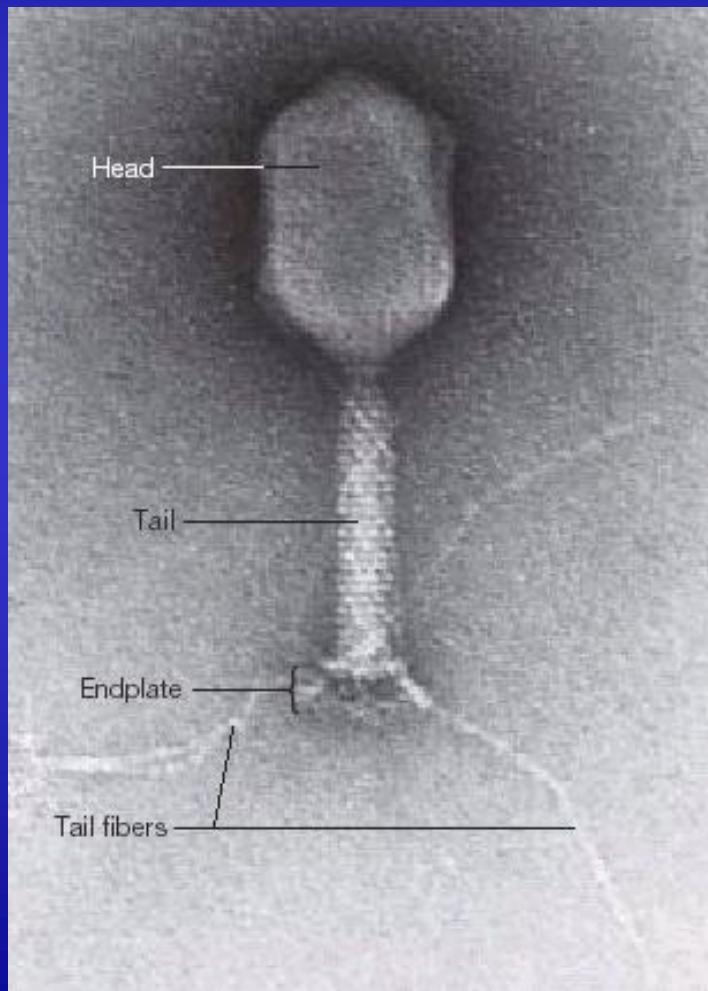
# Parametri di riferimento per una coltura fagica



Conteggio virale relativo  
(unità formanti placche)



La struttura del fago T4 è stata ben determinata mediante analisi genetica e immagini al microscopio elettronico e rappresenta oggi la struttura di riferimento dei batteriofagi:

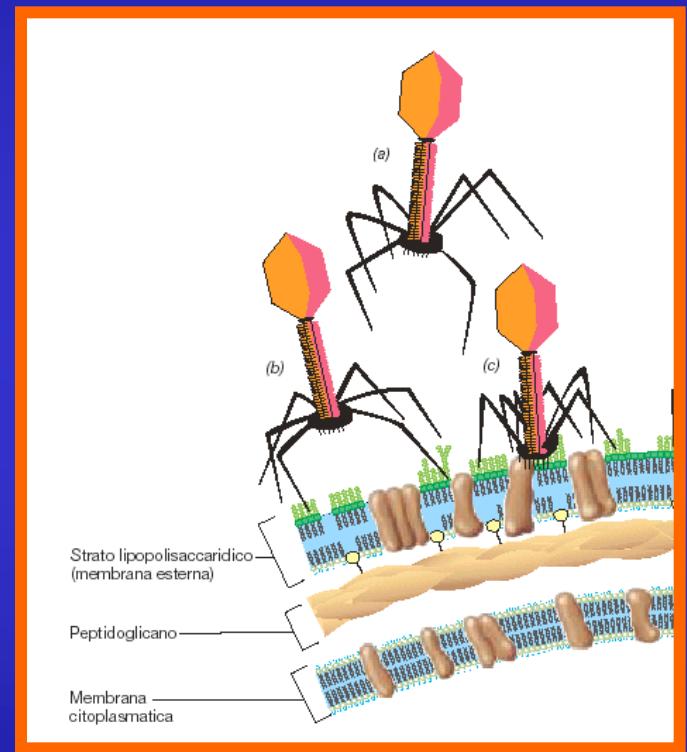


# Adsorbimento

La fase di Adsorbimento del fago T4 è caratterizzata dal riconoscimento specifico da parte dei filamenti terminali di un recettore sulla superficie del batterio. Nel caso di T4 questo è costituito dalla porina OmpC.

L'incontro tra questa proteina e i filamenti del fago è però del tutto casuale.

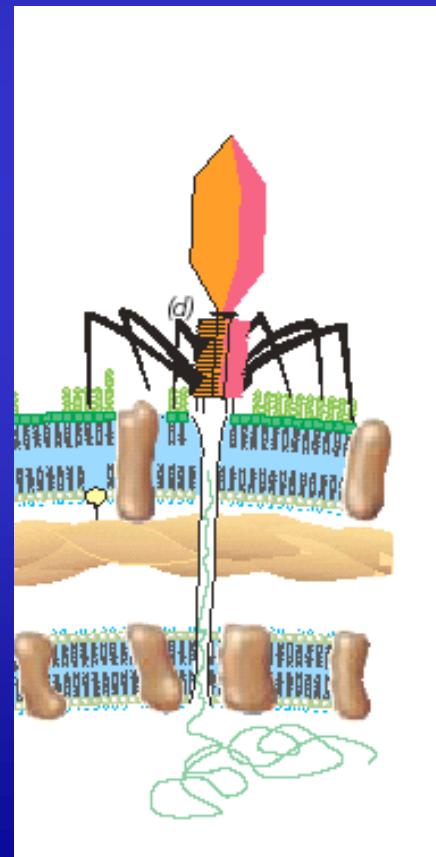
La fase seguente è l'instaurarsi di un contatto più saldo da parte del fago attraverso le «spine» di cui è dotata la piastra basale



# Penetrazione

La fase seguente è la penetrazione di parte del fago e l'iniezione, attraverso il rivestimento cellulare, del genoma fagico nella cellula batterica

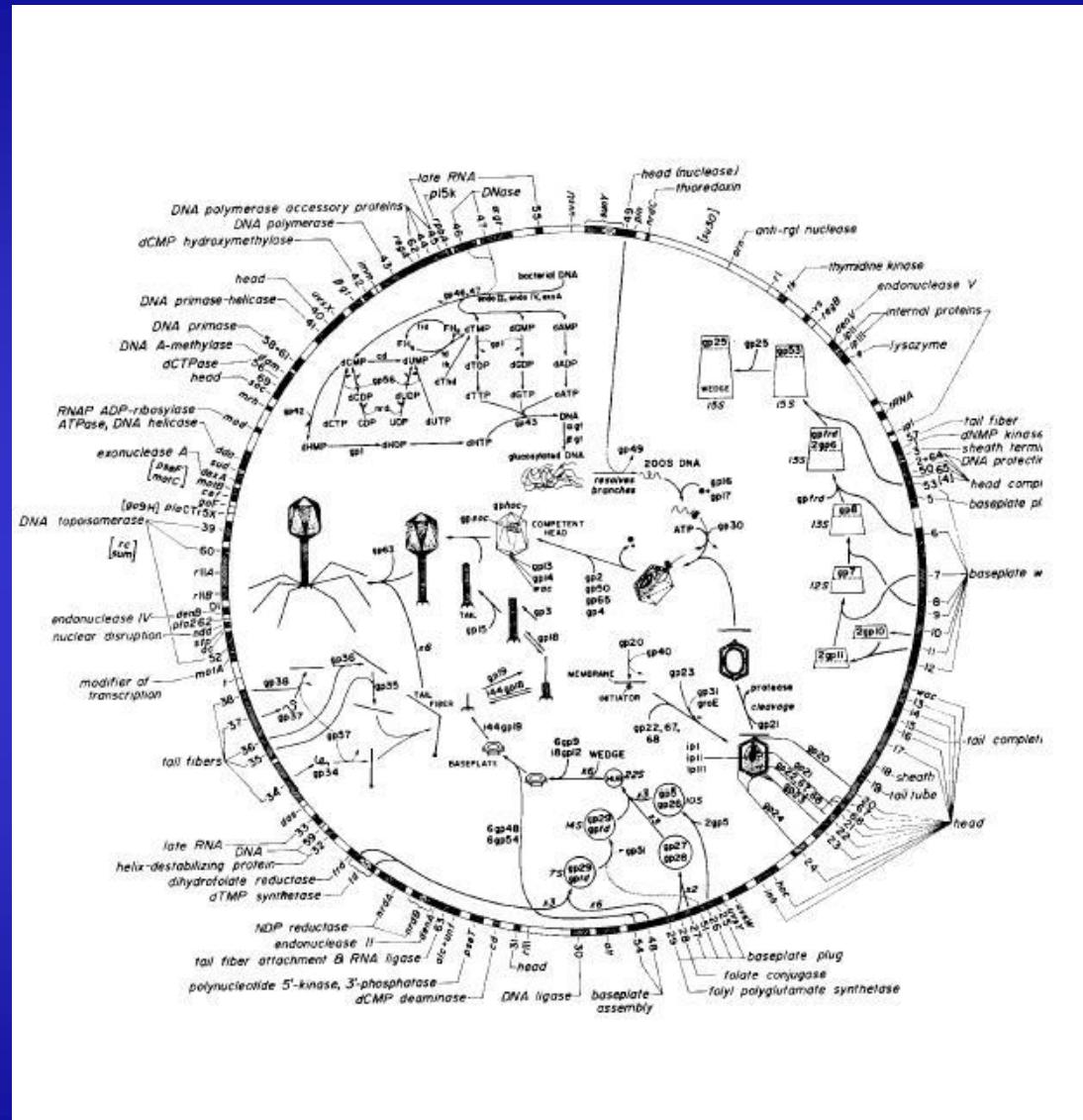
Questa fase richiede la contrazione della guaina esterna del fago che spinge la struttura centrale attraverso il rivestimento cellulare. La natura di questa contrazione non è ancora stata pienamente chiarita.



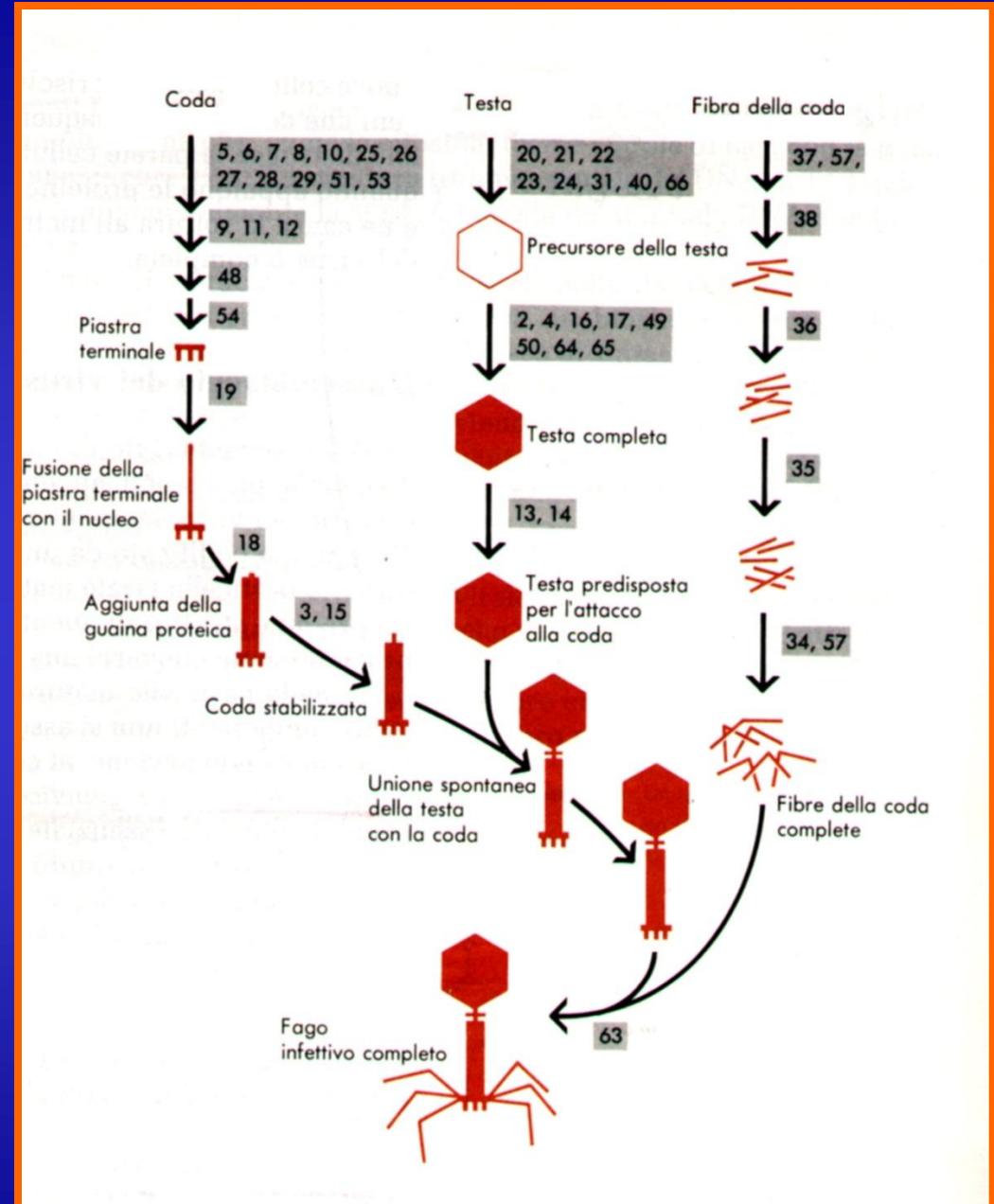
Copyleft 1996 ADORM (www.adorm.it)

**A questo punto  
inizia la fase intra-  
cellulare del ciclo  
infettivo del fago  
T4.**

**Il genoma di T4 è di  
circa 169 kbp, con  
circa 3000 geni  
conosciuti. Di questi  
il 40% codificano per  
proteine strutturali.**



**La fase di  
assemblaggio  
delle particelle  
fagiche segue  
vie indipendenti  
per ciascuna  
struttura.  
Queste vie si  
riuniscono poi a  
formare la  
particella fagica  
matura....**



# CONTRIBUTO DI T4 ALLE BIOTECNOLOGIE

- T4 DNA ligase (blunt end attiva)
- T4 DNA kinase (5' kinase - 3'fosfatase)
- T4 RNA ligase

# Caratteristiche tipiche di T4:

-T4 distingue il proprio DNA da quello batterico e lo protegge dalle endonucleasi di restrizione utilizzando un nucleotide particolare, la **5-idrossimetil citosina** al posto della citosina. Alcuni batteri hanno sviluppato endonucleasi specifiche per il DNA idrossimetilato ma i fagi hanno “risposto” glucosilando i residui di idrossimetil-citosina. E la storia continua....

-T4 sintetizza nucleasi specifiche per il DNA contenente citosina

Un aspetto importante del ciclo virale di T4 è che esso è strettamente controllato. I geni responsabili delle singole fasi infettive sono stati suddivisi in tre gruppi in funzione del loro ordine di "comparsa".

Si distinguono così:

- Geni precoci immediati
- Geni precoci tardivi
- Geni tardivi

Insieme al DNA fagico vengono anche iniettate due proteine presenti nel capsid fagico e codificate dal fago durante l'infezione precedente:

**Gpalt** (codificata dal gene virale *gplat*): questa proteina **ADP-ribosila** una delle due subunità a della RNA polimerasi batterica rendendola difettiva nel riconoscere i promotori batterici.

**Gp2**: questa seconda proteina ha la funzione di proteggere l'estremità del DNA fagico dagli enzimi degradativi dell'ospite.

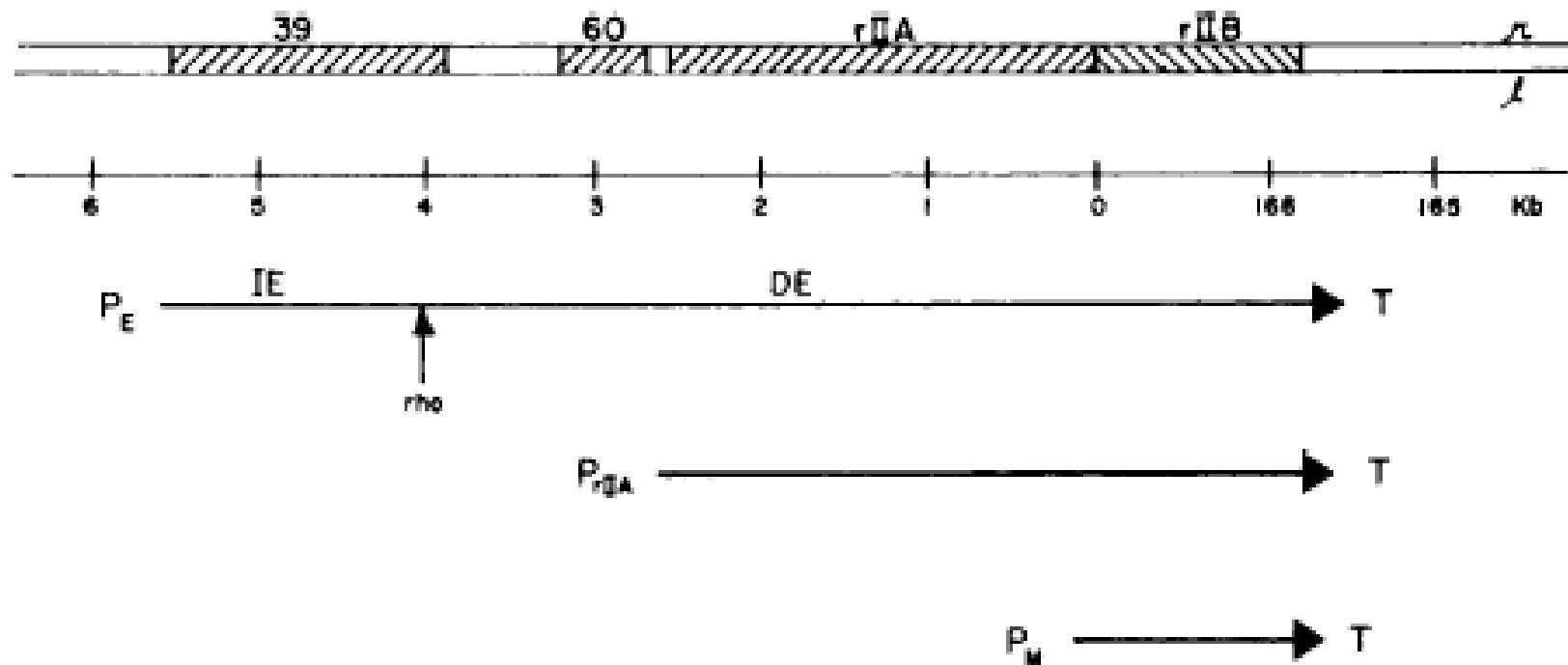
Immediatamente dopo l'iniezione del DNA fagico (**entro i primi 3 minuti**) nella cellula vengono trascritti un primo gruppo di geni fagici denominati *geni precoci immediati*.

I promotori di questi geni devono competere con quelli dell'ospite per la RNA polimerasi. La "spuntano" perché hanno sequenze -10 più simili a quella canonica (TATAAAT) e perché la RNA polimerasi batterica è stata parzialmente «desensibilizzata» dalla ADP ribosilazione (gpalt-dipendente).

## *geni precoci immediati:*

- ***gpalc***: codifica per una piccola proteina che lega sia il “core” della RNA polimerasi sia il DNA contenente citosine impedendone il riconoscimento;
- ***modA***: codifica la proteina T4ModA che ADP-ribosila la seconda subunità a della RNA polimerasi completandone la «desensibilizzazione»
- ***gpmot***: è coinvolto nell'attivazione dei geni precoci tardivi.

Il gene *gpmot* codifica una proteina che ha un doppio ruolo. Essa influenza, aumentandola, la capacità della RNA polimerasi di riconoscere il promotore dei geni precoci tardivi. Inoltre essa permette la trascrizione dei geni precoci tardivi a partire dai promotori dei geni precoci immediati:

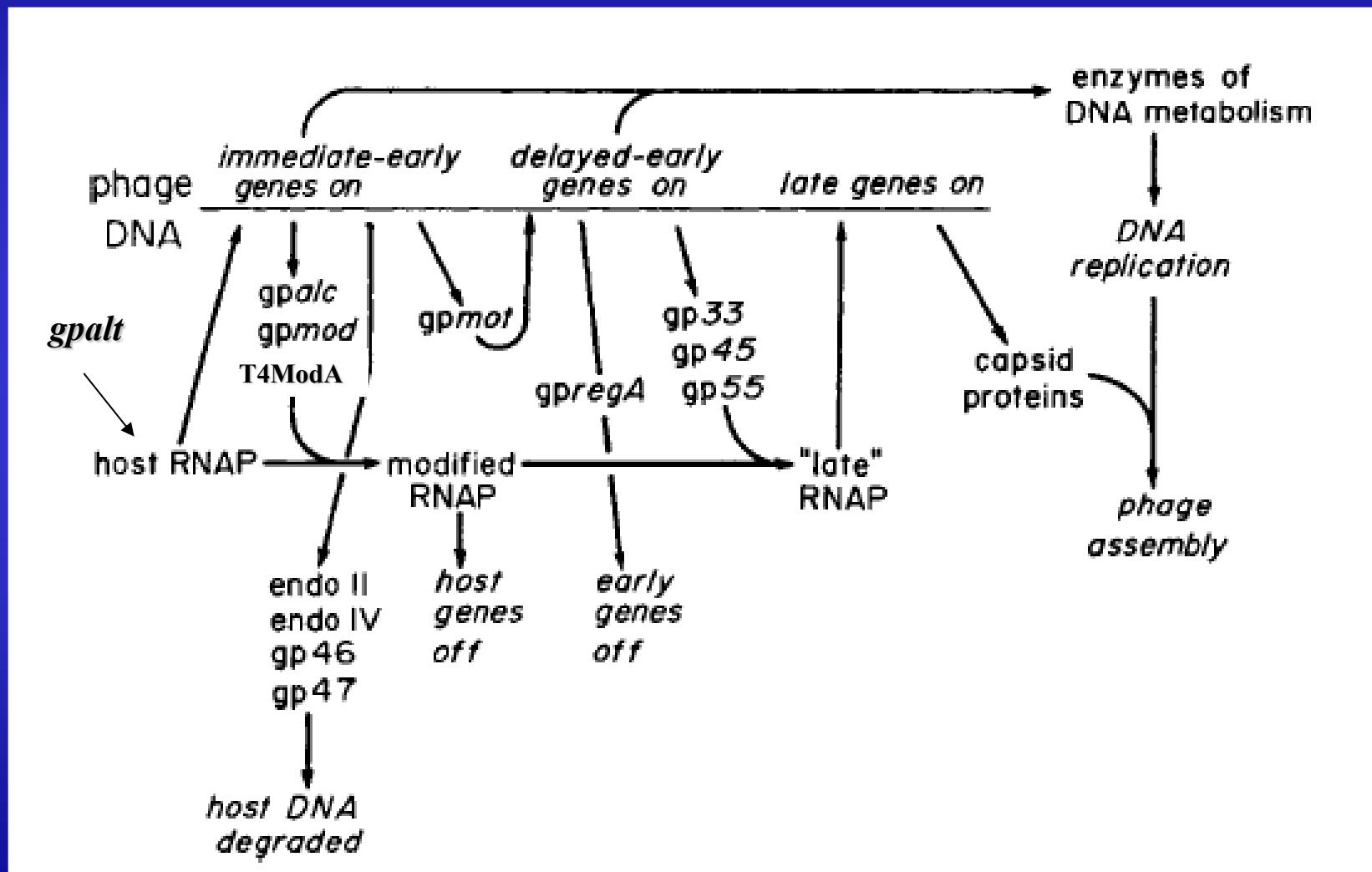


I geni precoci tardivi iniziano ad essere trascritti 2 minuti dopo l'inizio dell'infezione. Tra questi geni vi sono quelli coinvolti nella produzione dei precursori della biosintesi del DNA e nella degradazione del DNA batterico. La replicazione del DNA avviene immediatamente a seguito dell'espressione di questi geni.

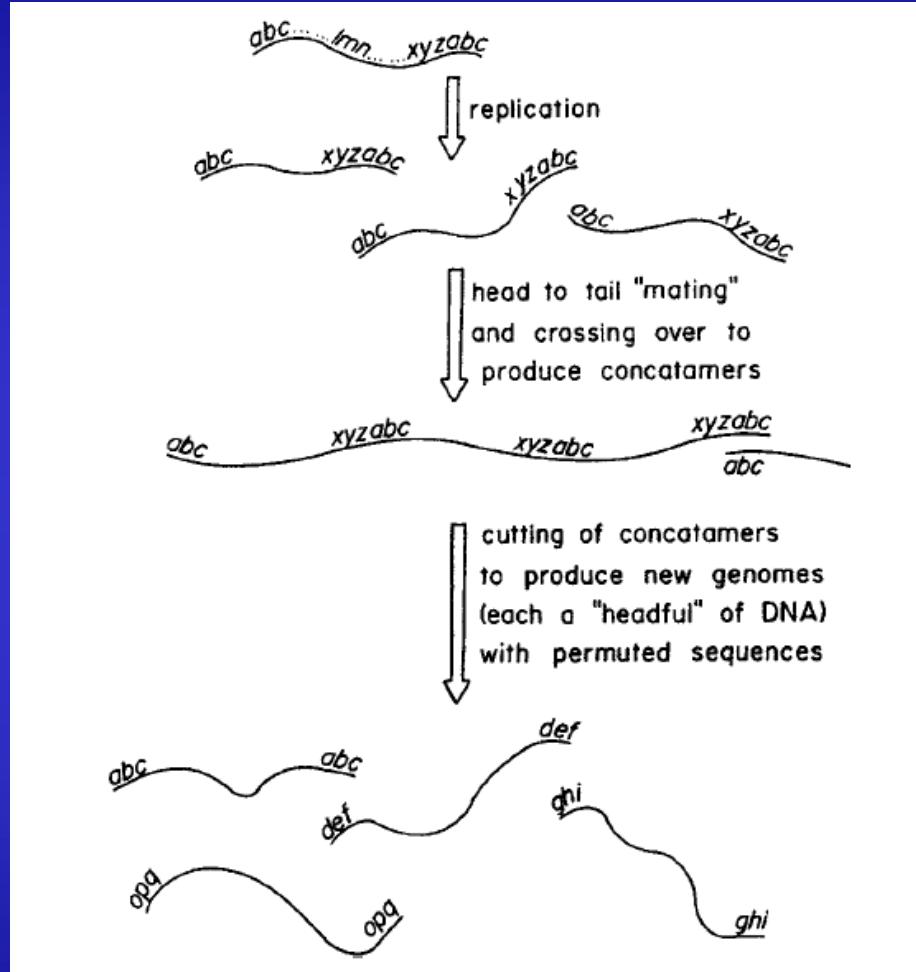
Fa parte di questo gruppo di geni *gp55* che codifica un **fattore sigma** specifico per l'espressione dei geni tardivi....

Questi sono responsabili della sintesi e dell'assemblaggio delle strutture proteiche del fago e della lisi del batterio.

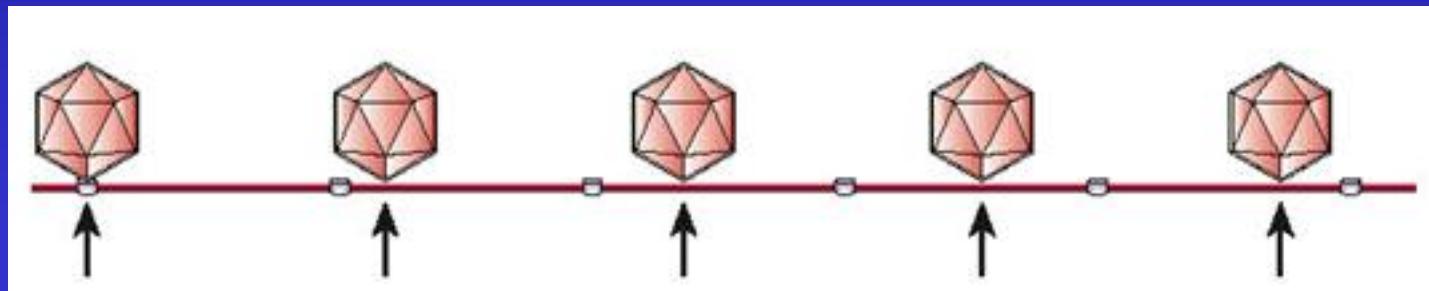
# Appropriazione della RNA polimerasi da parte di T4



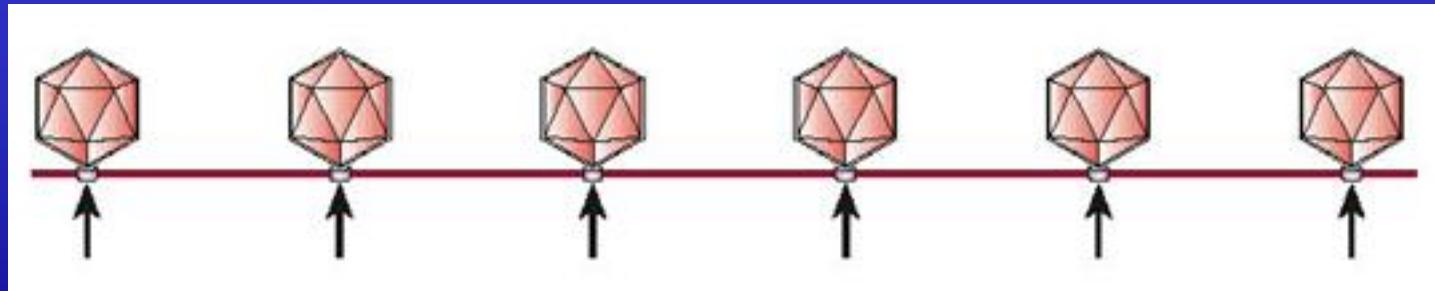
T4 ha un DNA lineare con sequenze ripetute alle estremità ... Queste sequenze danno vita a eventi di ricombinazione che portano alla formazione di lunghi concatameri.



Al momento dell'impacchettamento si ha l'introduzione del 106% del genoma fagico per ogni testa fagica. Questo significa che ogni particella porta un frammento circolarmente permutato del genoma fagico ....



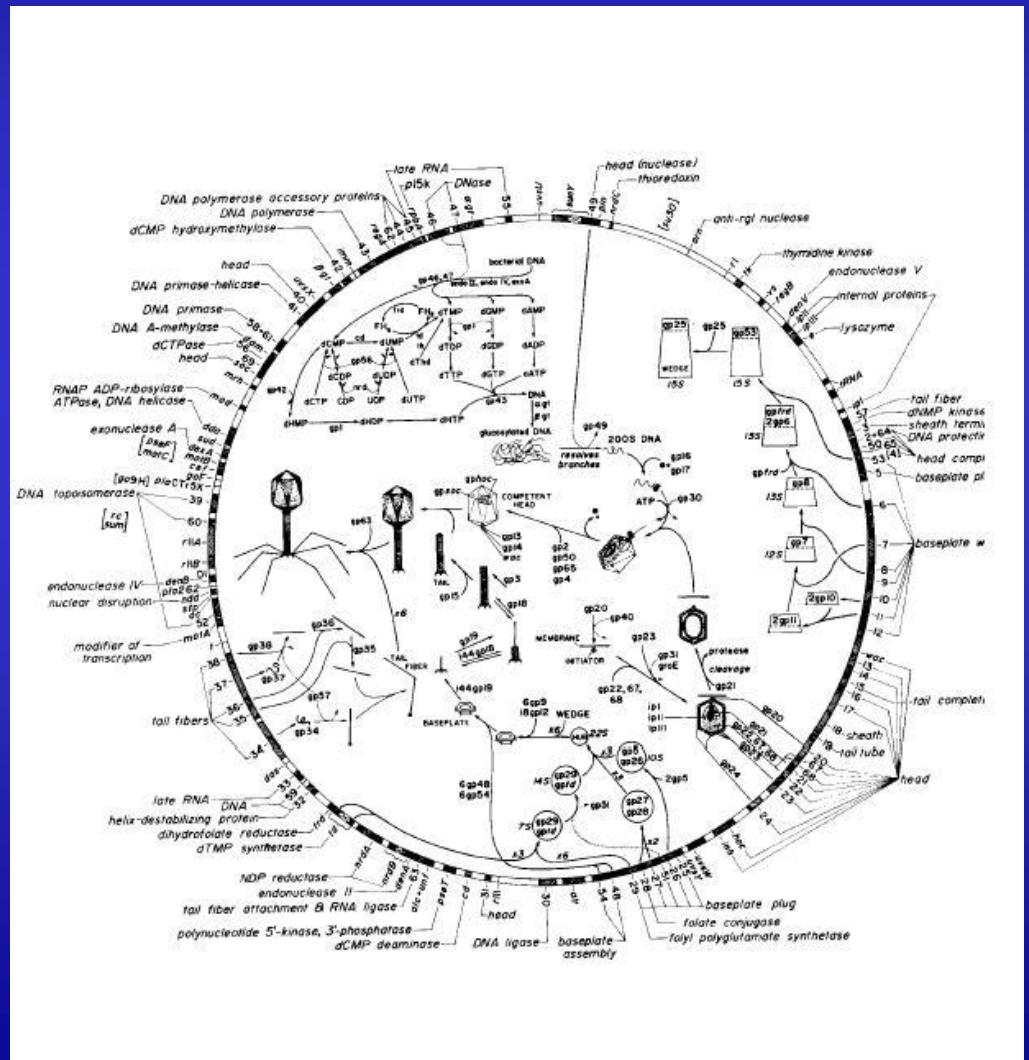
Modello "Headful " (Fago T4)



Modello "Fixed ends" (Fago λ)

Questo fenomeno ha fatto sì che la realizzazione di mappe di legame del genoma fago di T4 risultino circolari, ma si tratta di un falso storico...

Il genoma di T4  
è, a differenza  
di altri fagi  
(lambda) sempre  
lineare.



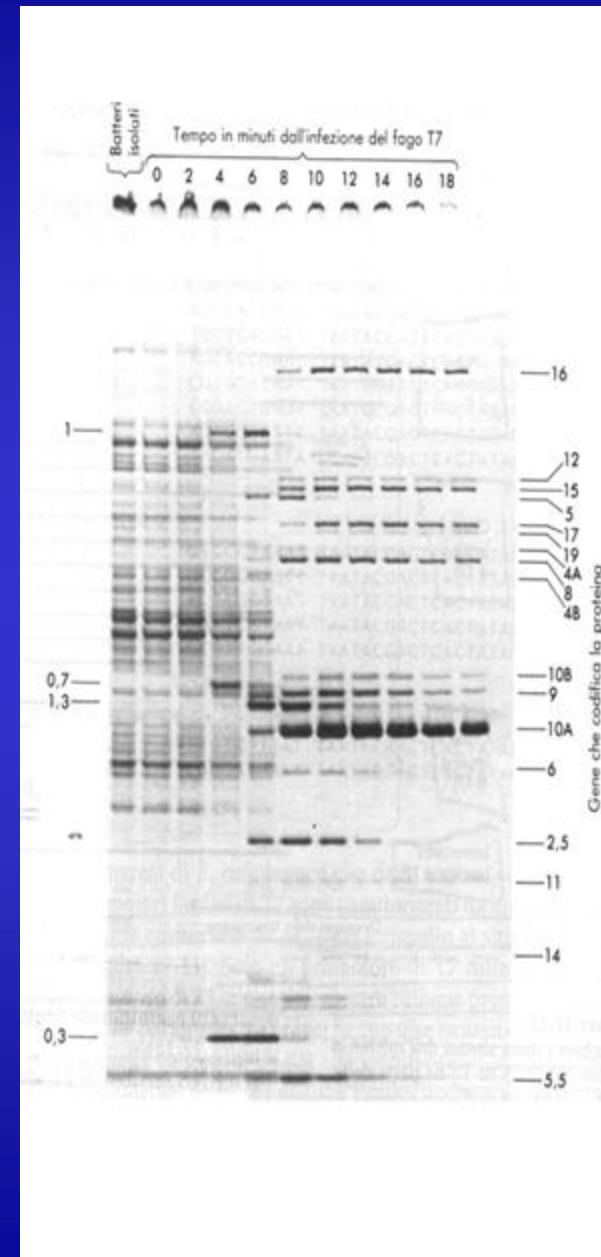
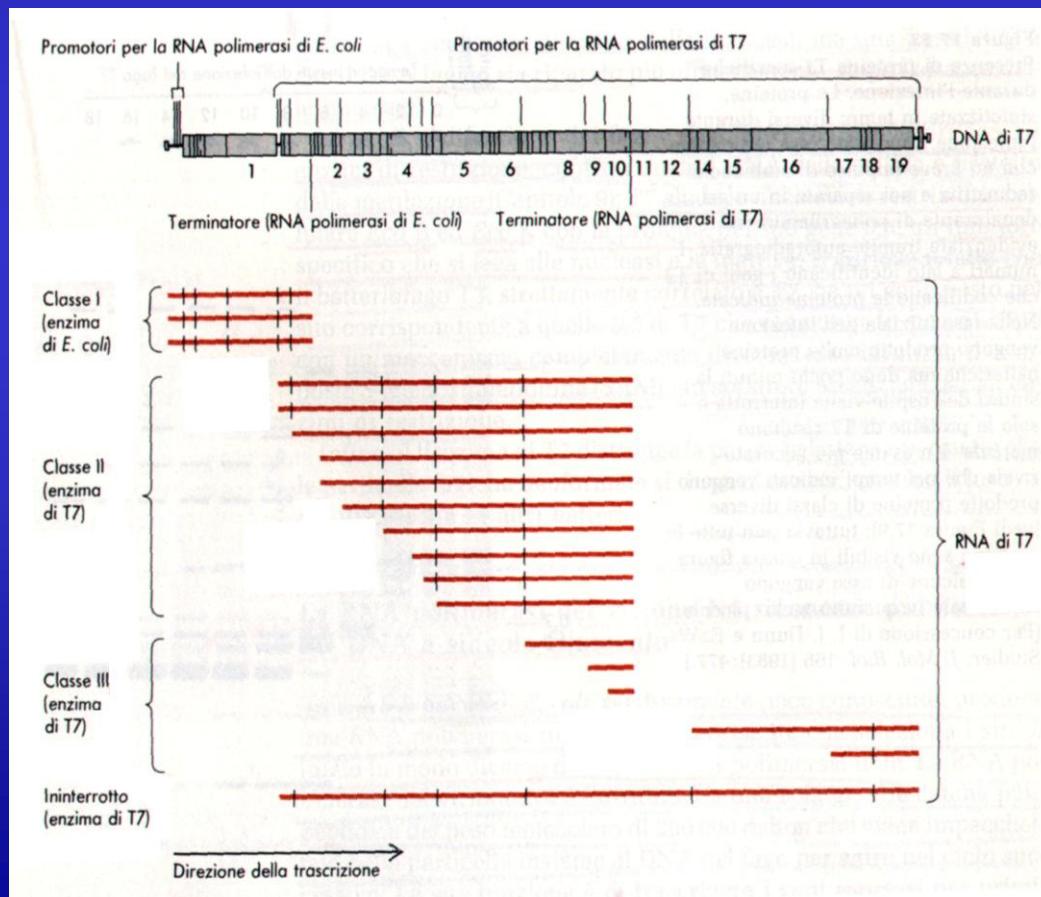
## Caratteristiche del fago T7

Questo batteriofago ha un genoma di dimensioni inferiori a quelle di T4 (circa 40 kbp), indicando una maggiore semplicità rispetto quest'ultimo.....

In verità, nonostante i suoi 55 geni riconosciuti, T7 codifica da se tutte le proteine essenziali per la sua replicazione. Inoltre è dotato di un sistema di controllo dell'espressione dei suoi geni

# I geni di T7 posso essere suddivisi in:

- Precoci (o classe I);
- Intermedi (o classe II);
- Tardivi (o classe III)



**I geni di classe I sono trascritti e tradotti nei primi 6 minuti dell'infezione. I loro promotori sono riconosciuti dalla RNA polimerasi dell'ospite.**

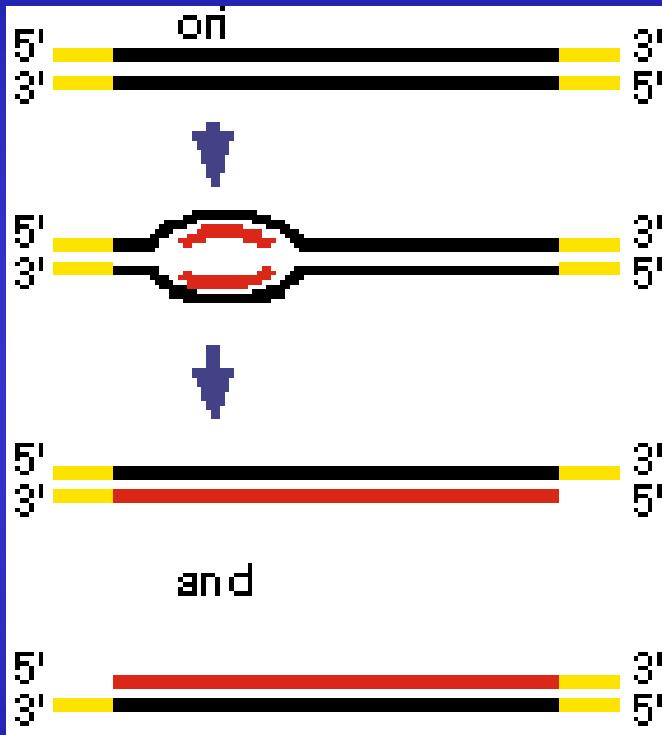
**Tra questi geni, però, ve ne è uno che codifica per la RNA polimerasi specifica di T7.**

**Questa polimerasi è in grado di riconoscere a bassa efficienza i promotori dei geni intermedi ed ad alta efficienza quelli dei geni tardivi.**

**Il controllo temporale tra geni intermedi e tardivi  
sembra essere dovuto al fatto che l'iniezione del  
genoma fagico nella cellula da parte di T7 sia molto  
lento e che in un primo momento siano disponibili  
solo i promotori dei geni intermedi ...**

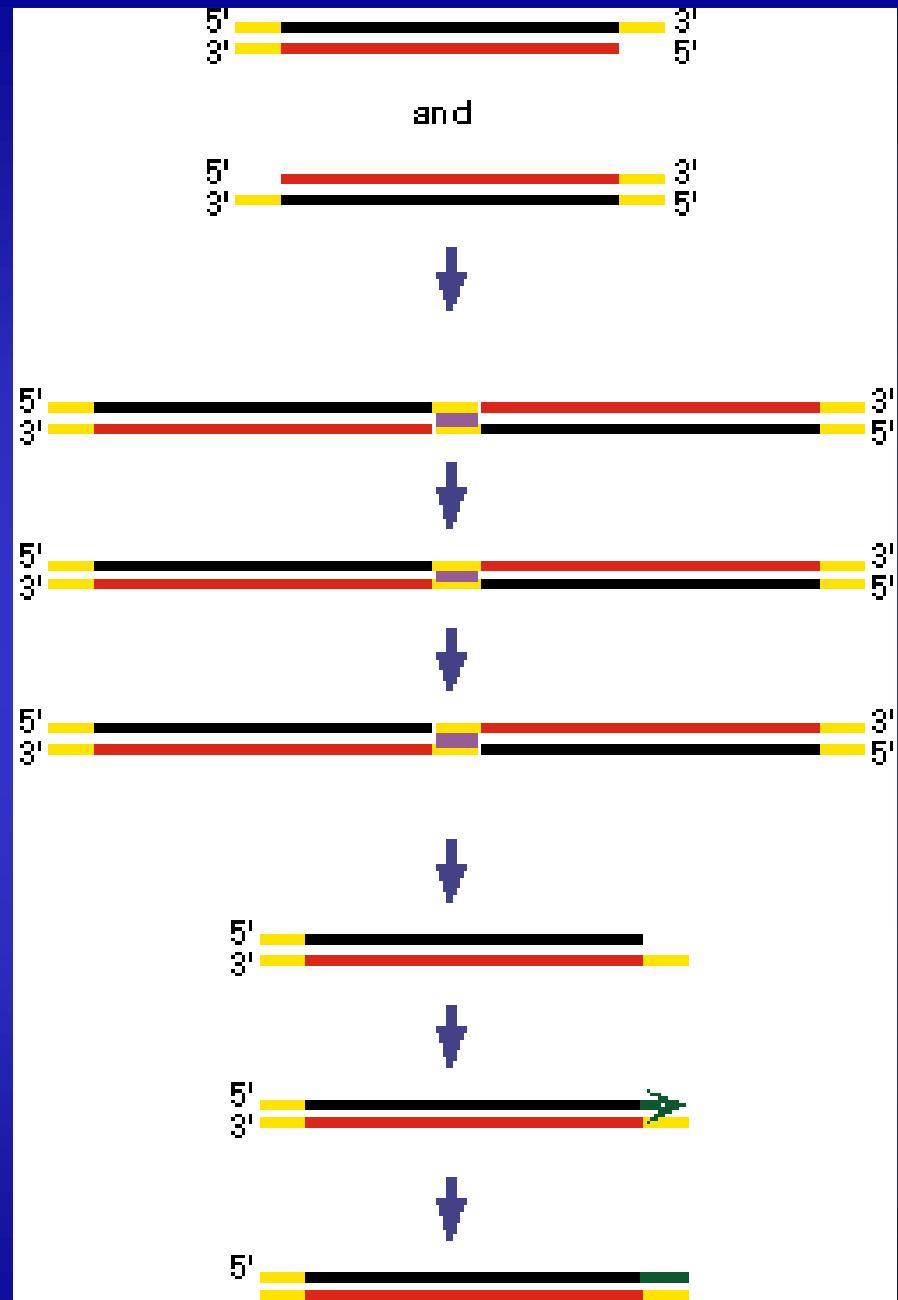
**In un secondo momento, quando tutto il genoma del  
fago è penetrato nella cellula, la maggiore specificità  
dei promotori dei geni tardivi sottrae la RNA  
polimerasi di T7 ai promotori dei geni intermedi.**

**La replicazione del genoma di T7 è caratterizzata dal non passare per un intermedio circolare ... Questo significa che si comporta come una molecola lineare ...**

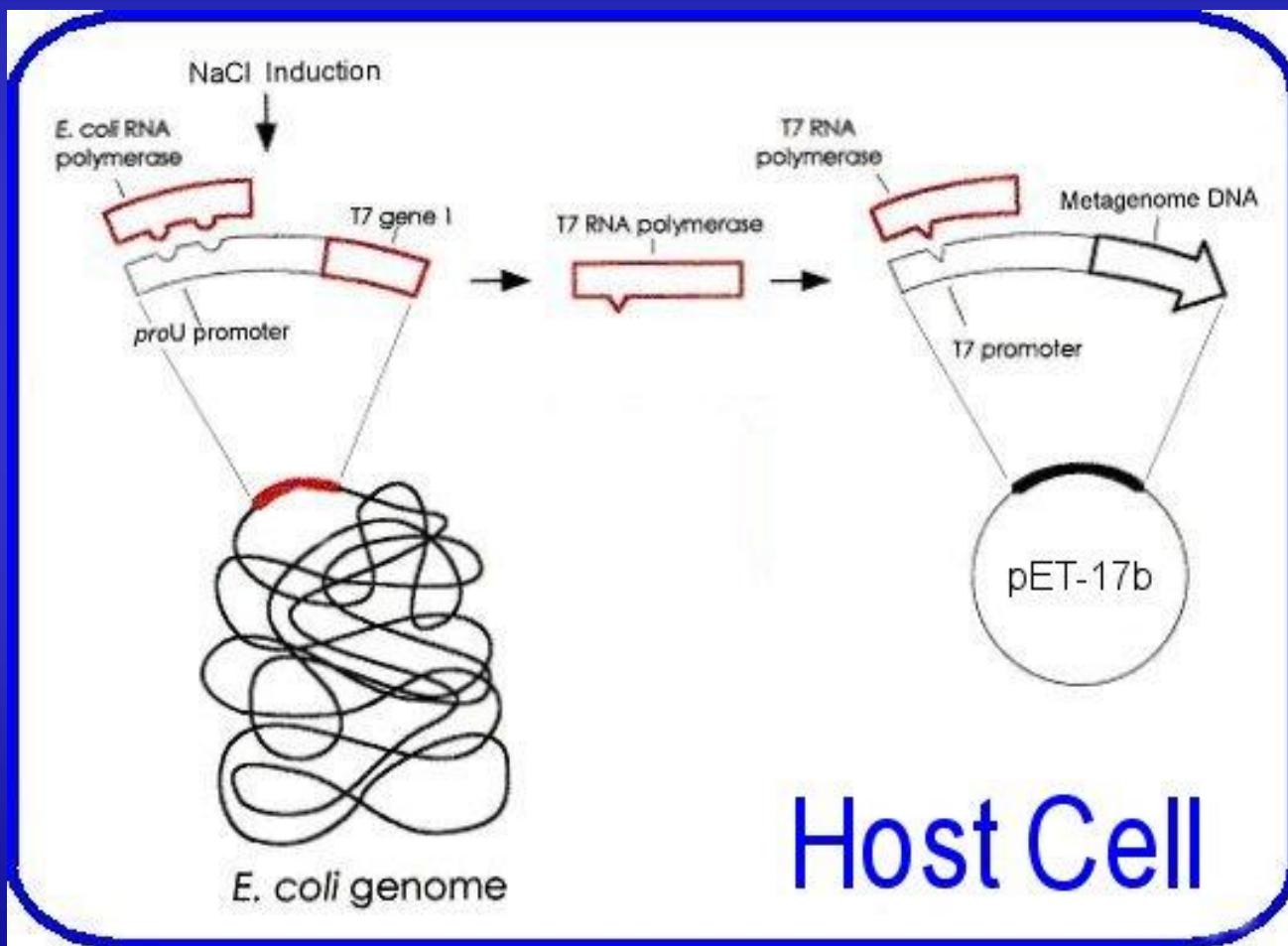


**Ovvero non è in grado di completare la replicazione ad una estremità della molecola lasciando un 3' protruding**

**T7 ha risolto questo problema attraverso la formazione di concatemer per allineamento di queste code a singolo filamento. Infatti alle estremità il genoma di T7 presenta delle sequenze ripetute ...**

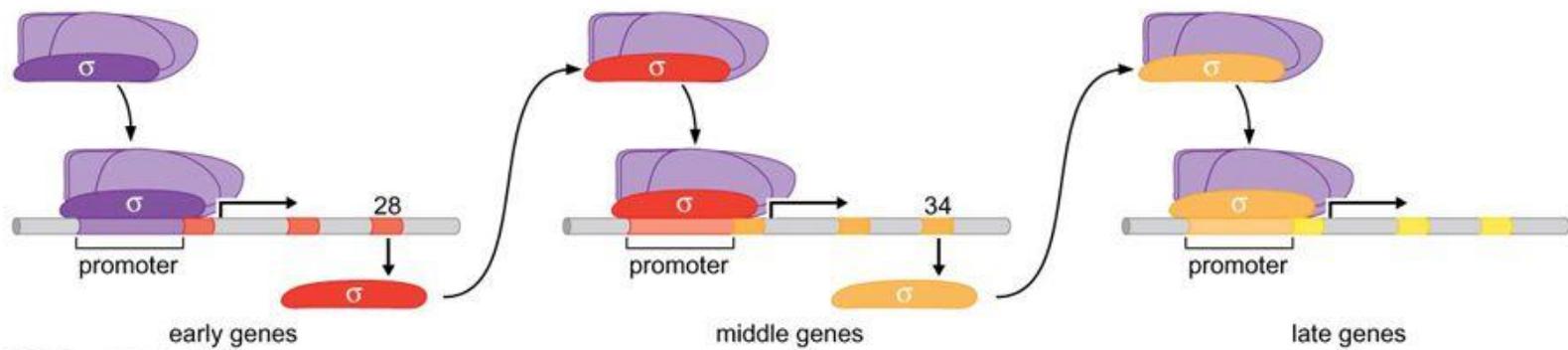


# CONTRIBUTO DI T7 ALLE BIOTECNOLOGIE



# SPO1, controllo mediato da fattori sigma

Un altro esempio di controllo temporale dei geni fagici lo possiamo trovare nel fago SPO1 di *B. subtilis*



In questo caso la sintesi e l'avvicendamento di fattori sigma batterici e fagici determina la regolazione temporale dei geni del fago.

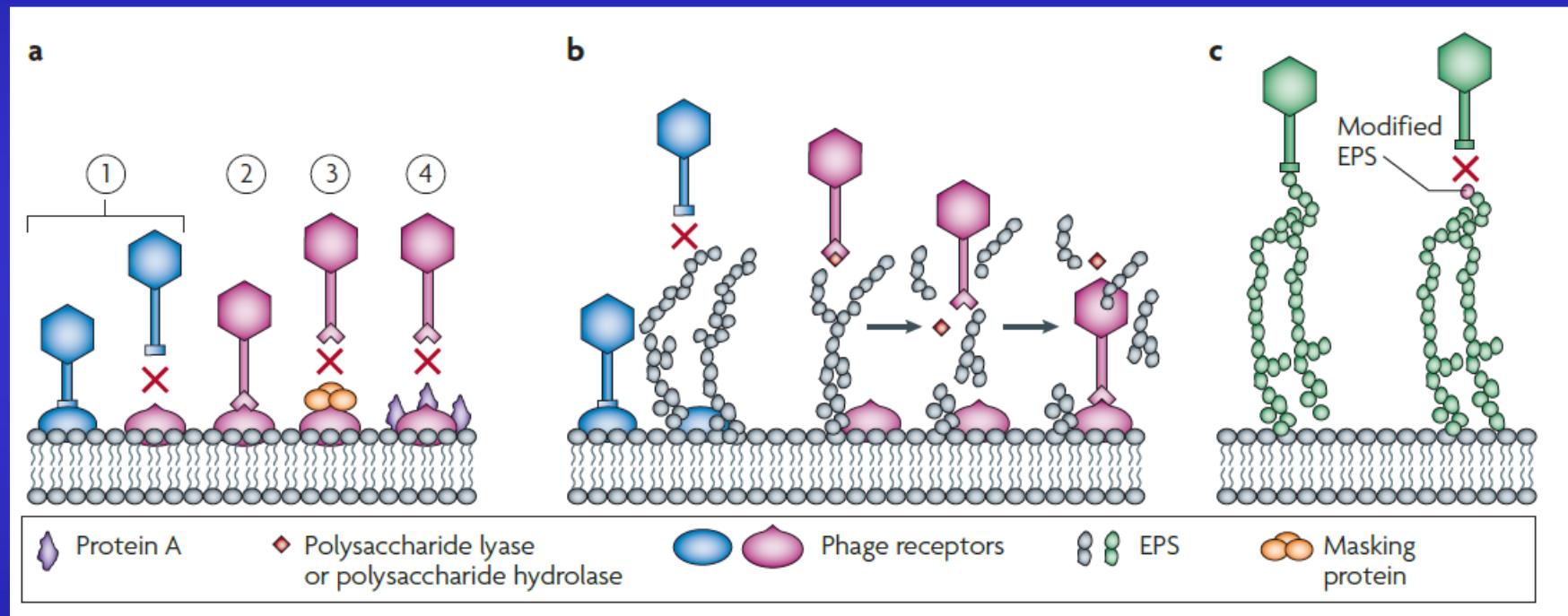
L'interazione tra batteriofagi e le cellule batteriche segue i meccanismi evolutivi della relazione «preda-predatore»

Ne consegue che le cellule hanno evoluto sistemi per resistere alle infezioni fagiche come :

- Inibizione della fase di ADSORBIMENTO
- Inibizione della fase di PENETRAZIONE
- Rex System
- Sistemi di restrizione e modificazione
- CRISPR

# Meccanismi di resistenza ai batteriofagi

## Inibizione della fase di ADSORBIMENTO



- Modifica del recettore
- Mascheramento del recettore

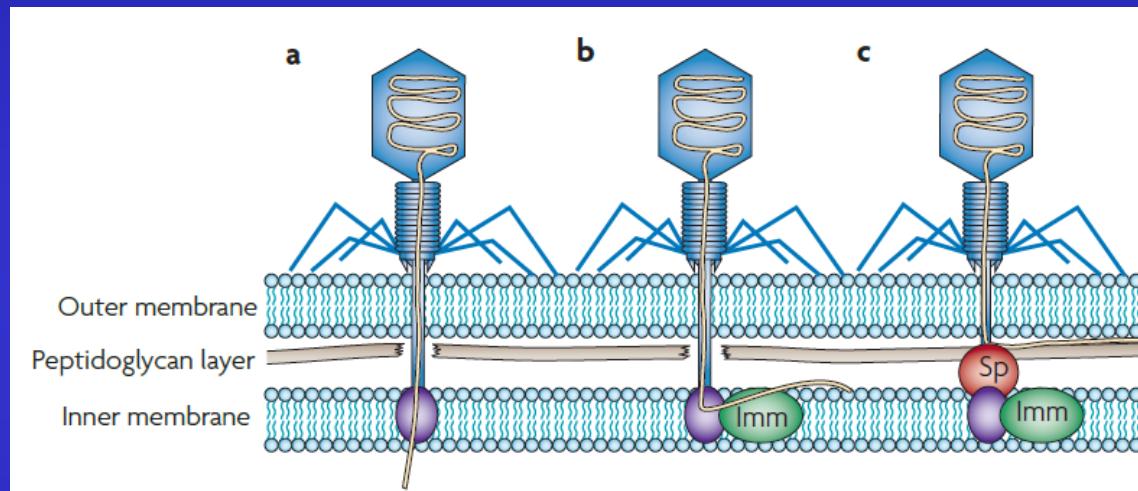
Ostruzione da EPS

Modifica dell' EPS

# Meccanismi di resistenza ai batteriofagi

## Inibizione della fase di PENETRAZIONE

T4 utilizza un enzima specifico per degradare il peptidoglicano e permettere il passaggio del proprio DNA



Alcuni batteri inibiscono l'infezione tramite le proteine: Imm e Sp

La proteina Imm blocca la traslocazione del DNA nella cellula

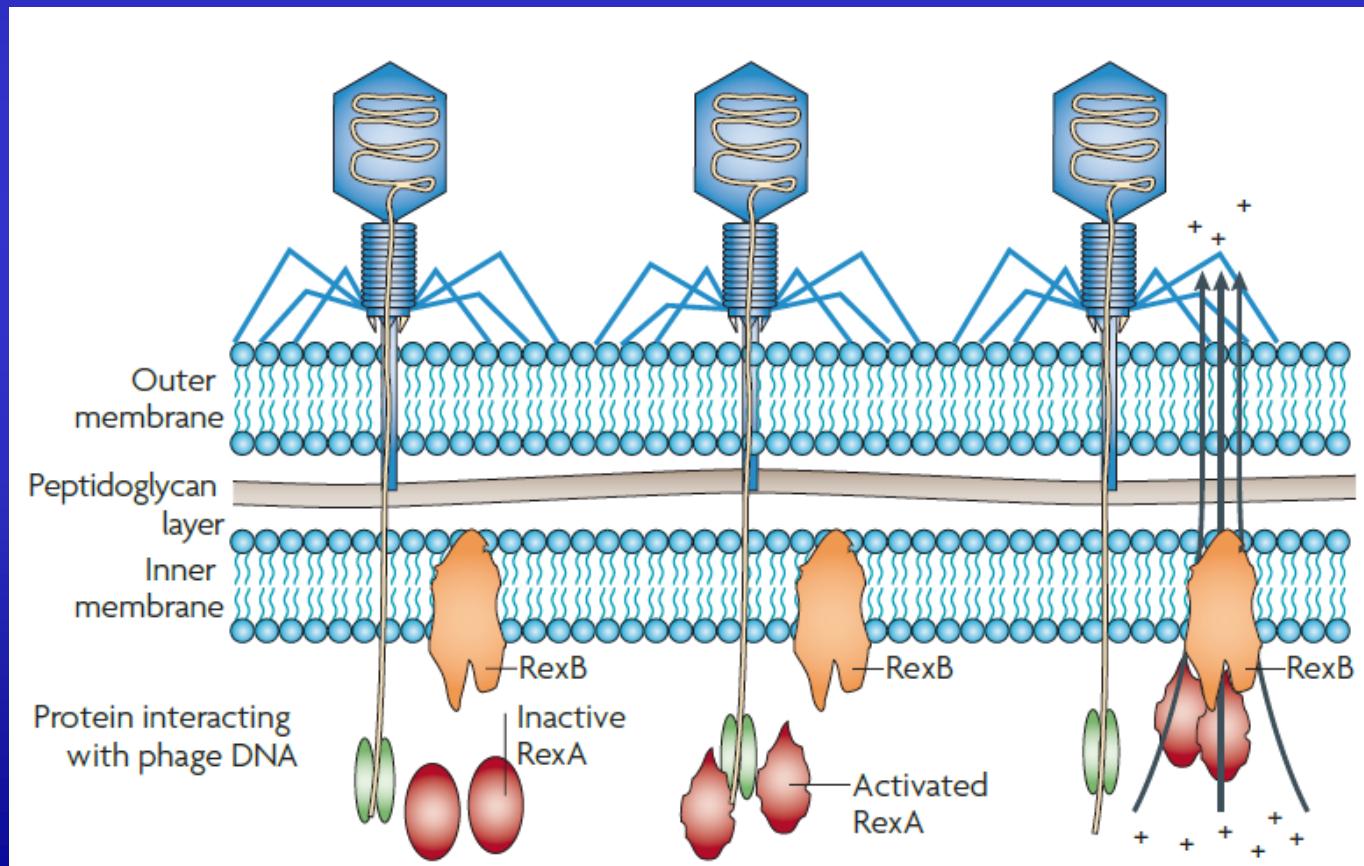
La proteina Sp inibisce la degradazione del Peptidoglicano

Le proteine Imm e Sp sono «originarie» di T4 e usate dal fago per evitare il fenomeno della superinfezione. In alcuni batteri sono state adottate per innescare meccanismi di resistenza ai fagi

# Meccanismi di resistenza ai batteriofagi

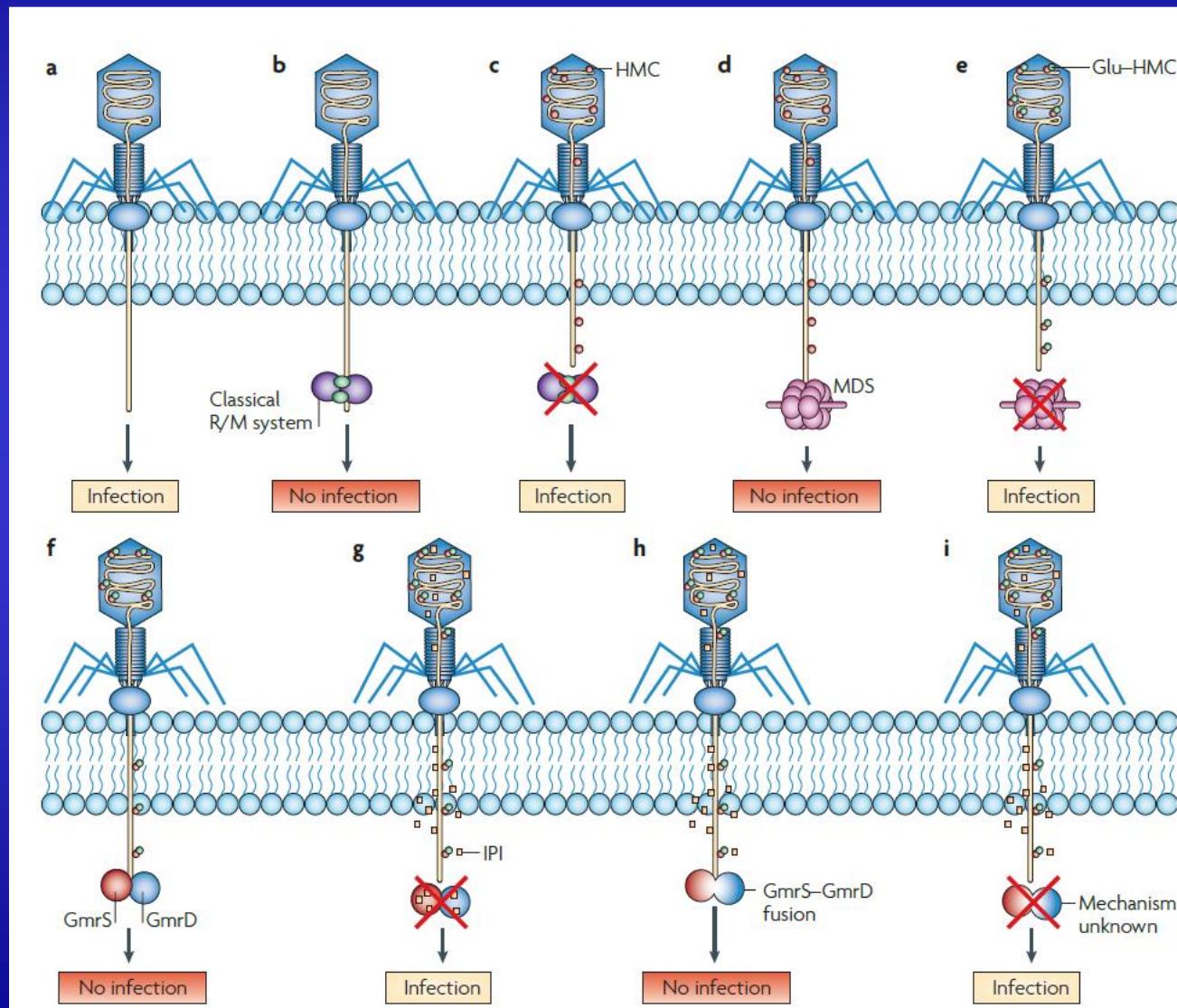
## Rex System

Il complesso RexAB è in grado, una volta attivato dal DNA fagico di deregolare il rilascio di ioni dalla cellula inducendone la morte. Questo «sacrificio» limita la replicazione del fago.



# Meccanismi di resistenza ai batteriofagi

## Sistemi di restrizione e modificazione

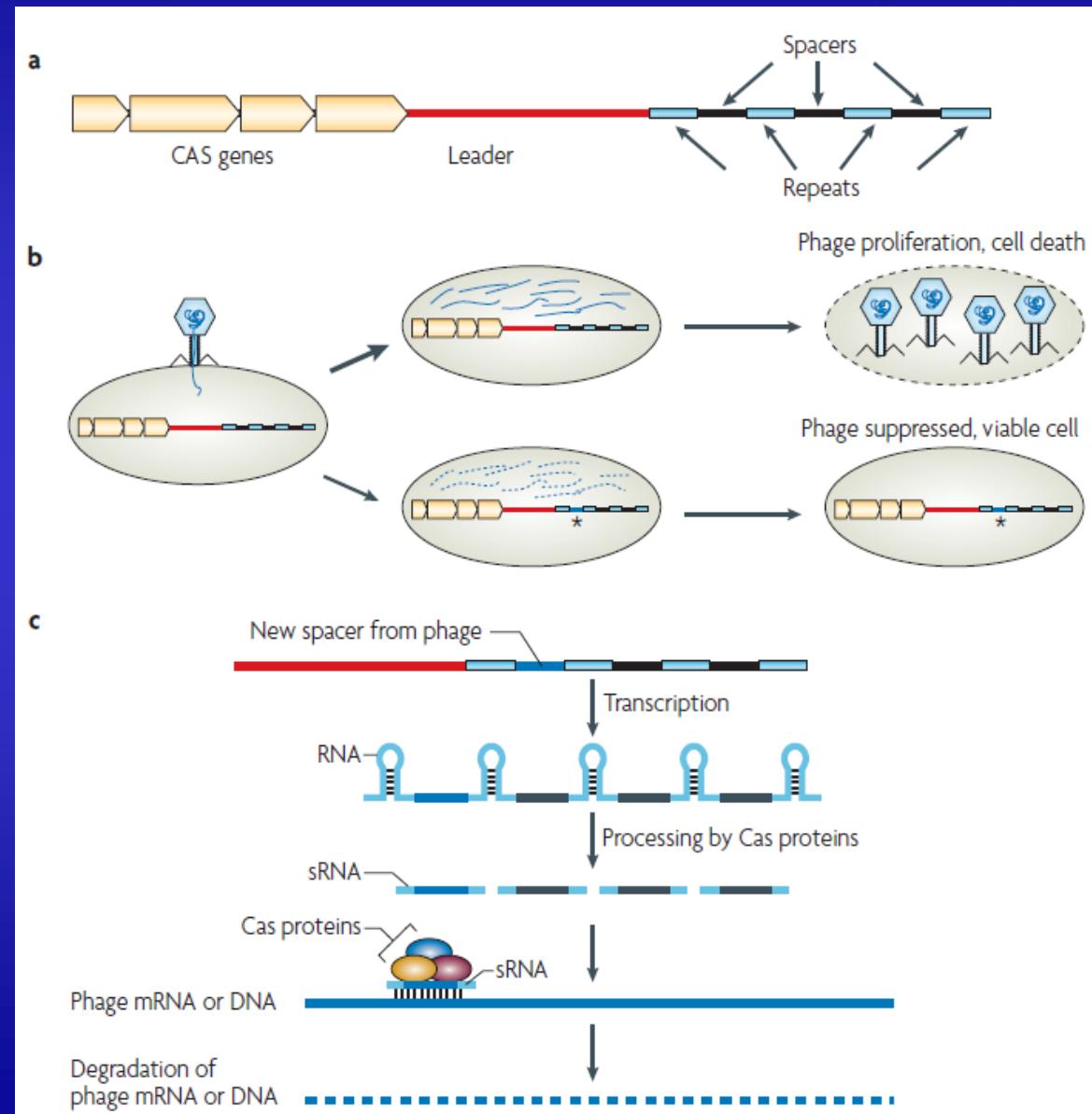


# CRISPR

(Clustered Regularly interspaced Short Palindromic Repeats)

Presenti nel 40% dei batteri e nel 90% degli archea, sono loci organizzati da sequenze ripetute brevi e dirette intervallate a sequenze “spacer”. In aggiunta si possono identificare geni, associati a queste sequenze, detti *cas*

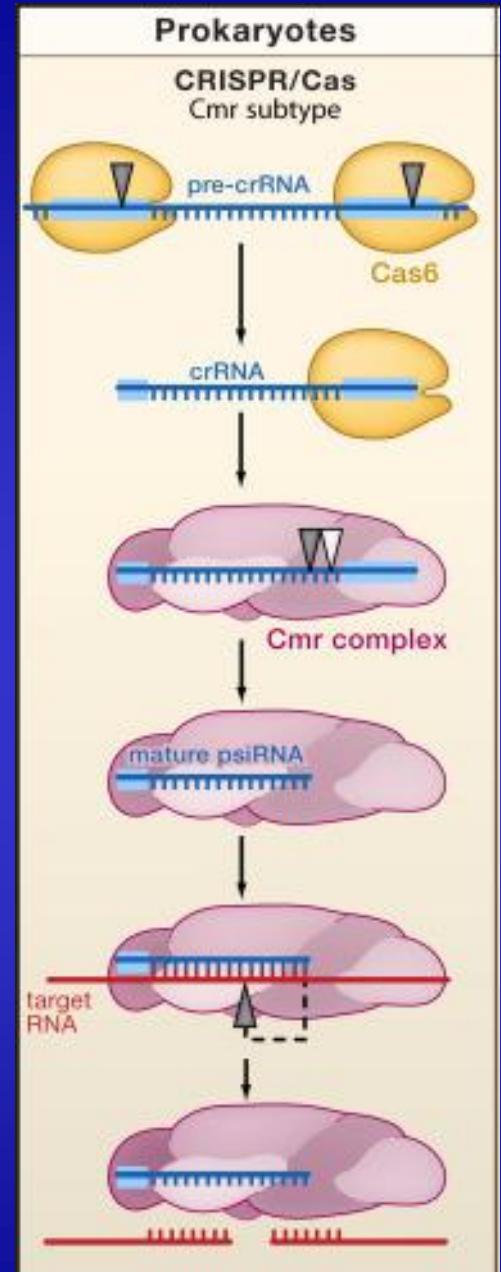
Sono assimilabili a una sorta di sistema immunitario della cellula



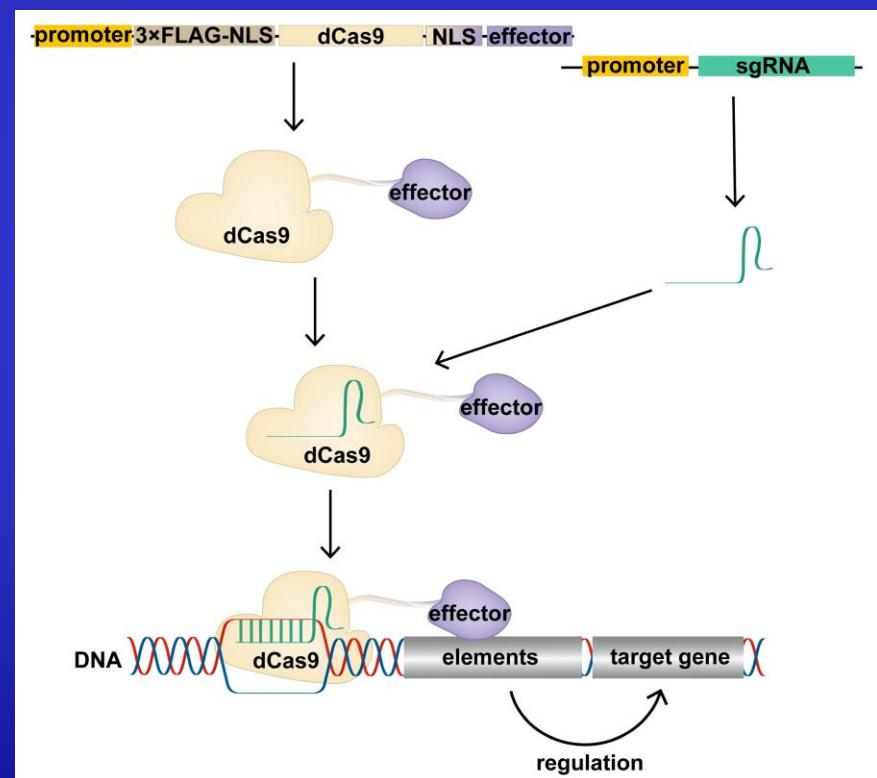
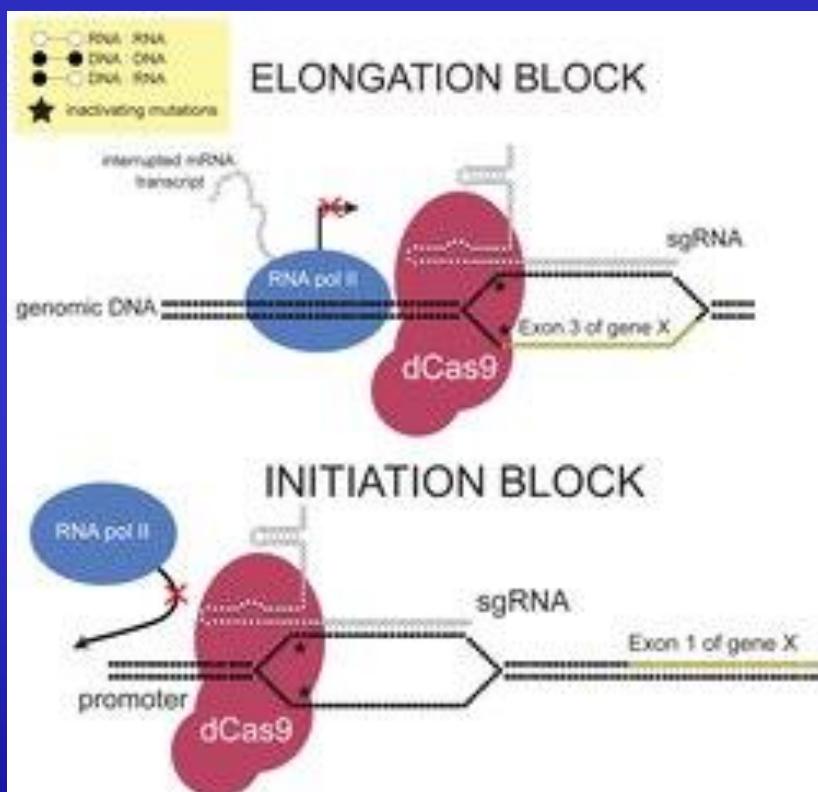
# Come sfruttare i CRISPR...

## Interferenza trascrizionale

Il sistema cas (in questo caso Cas6) può interferire con l'espressione genica inducendo la degradazione di uno specifico mRNA. La condizione è che il crRNA sia complementare alla sequenza dell'mRNA da degradare.



# Come sfruttare i CRISPR... regolazione trascrizionale

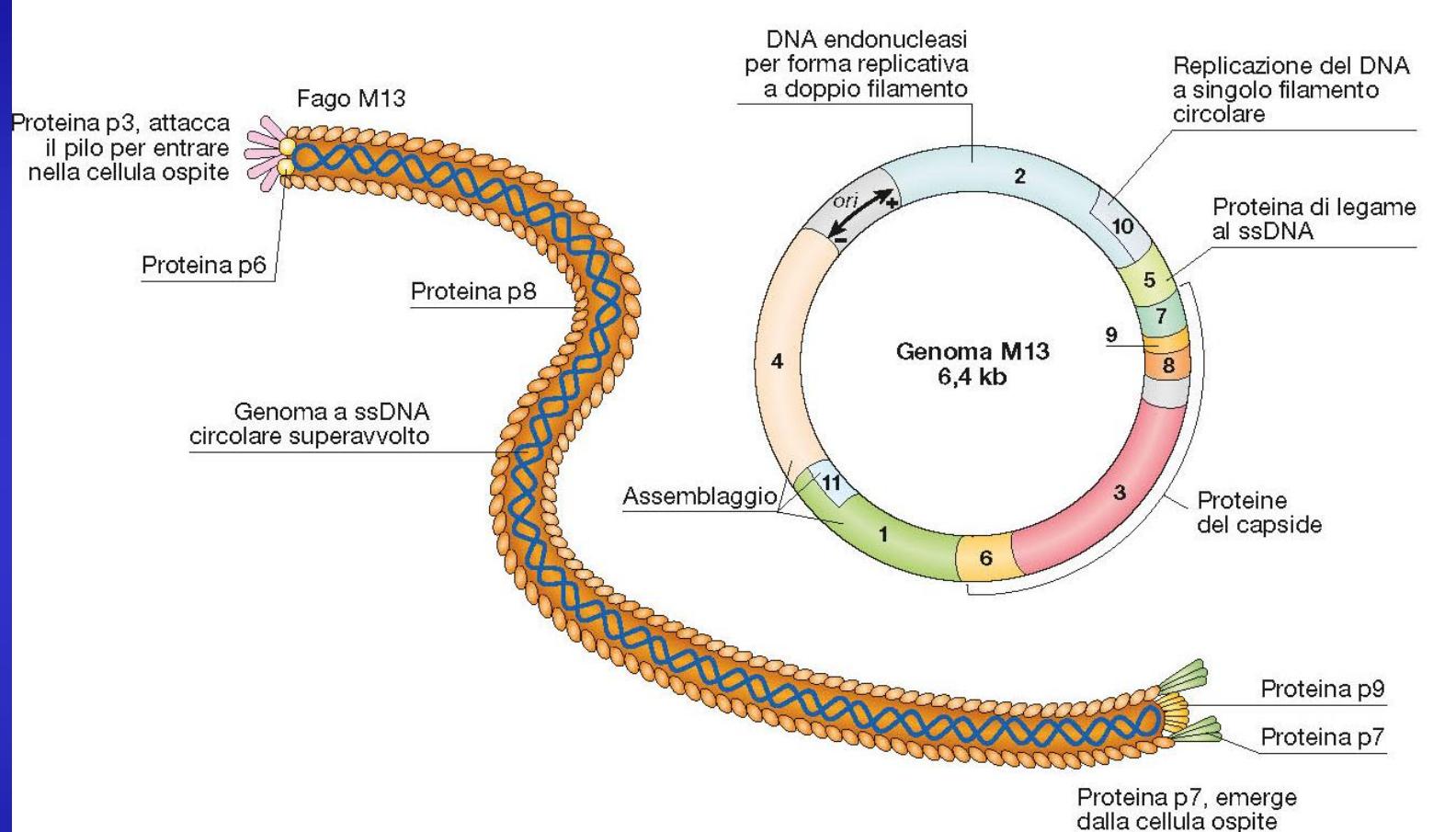


# Fagi Filamentosi

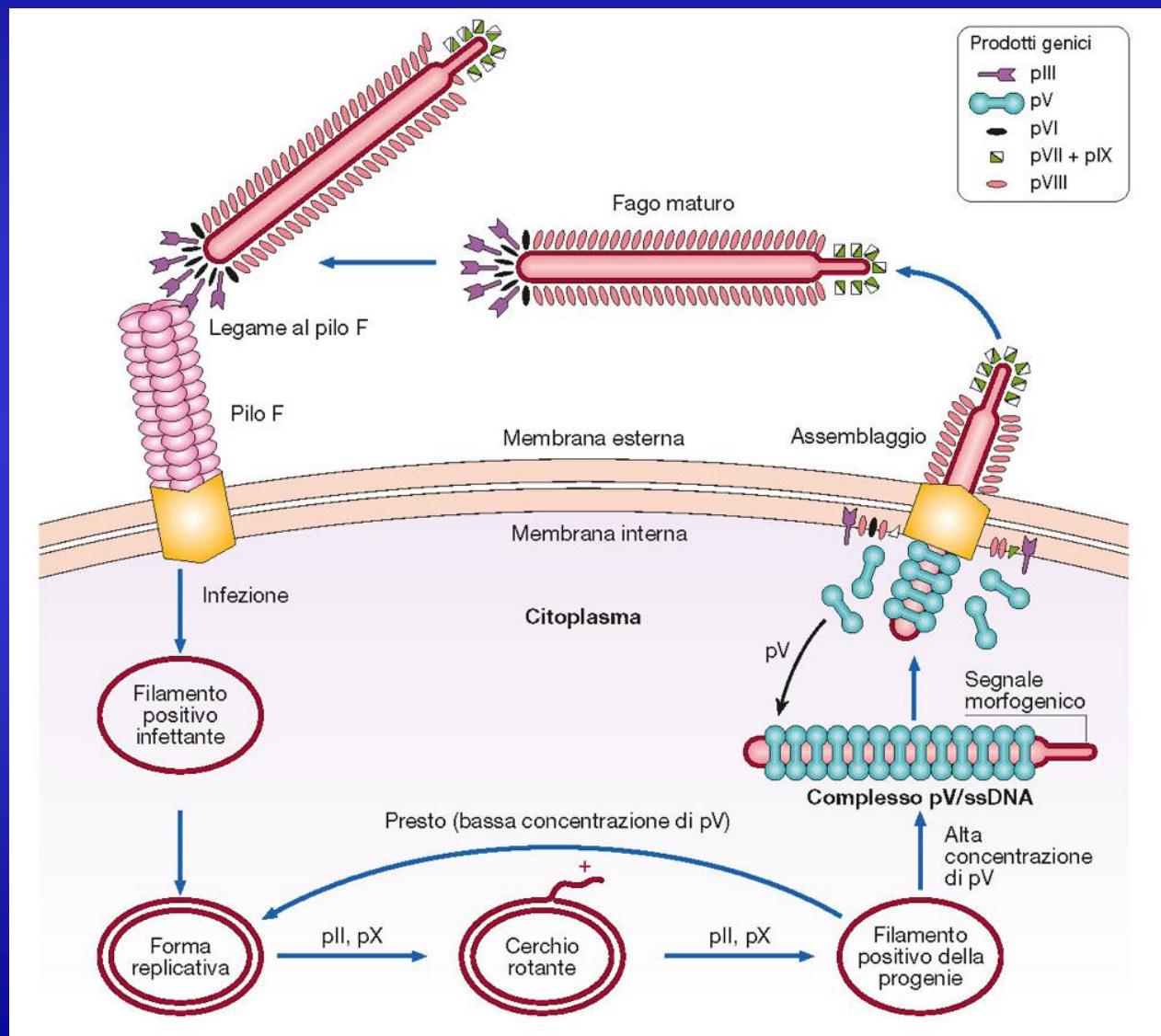
Una importante classe di batteriofagi che hanno trovato applicazione nel campo delle biotecnologie sono i fagi filamentosi.

Questi fagi (tra i più noti M13, fd e f1) sono caratterizzati dal possedere un genoma circolare a singola elica di DNA (+). La prima cosa che accade dopo una infezione è la replicazione di DNA per formare un intermedio replicativo circolare di DNA a doppio filamento (sintesi del -).

Questo secondo filamento viene utilizzato come stampo per la sintesi di numerosi genomi fagici lineari attraverso il meccanismo del circolo rotante



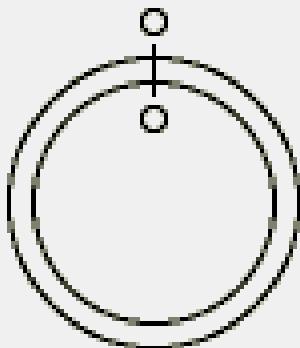
# Ciclo virale di M13



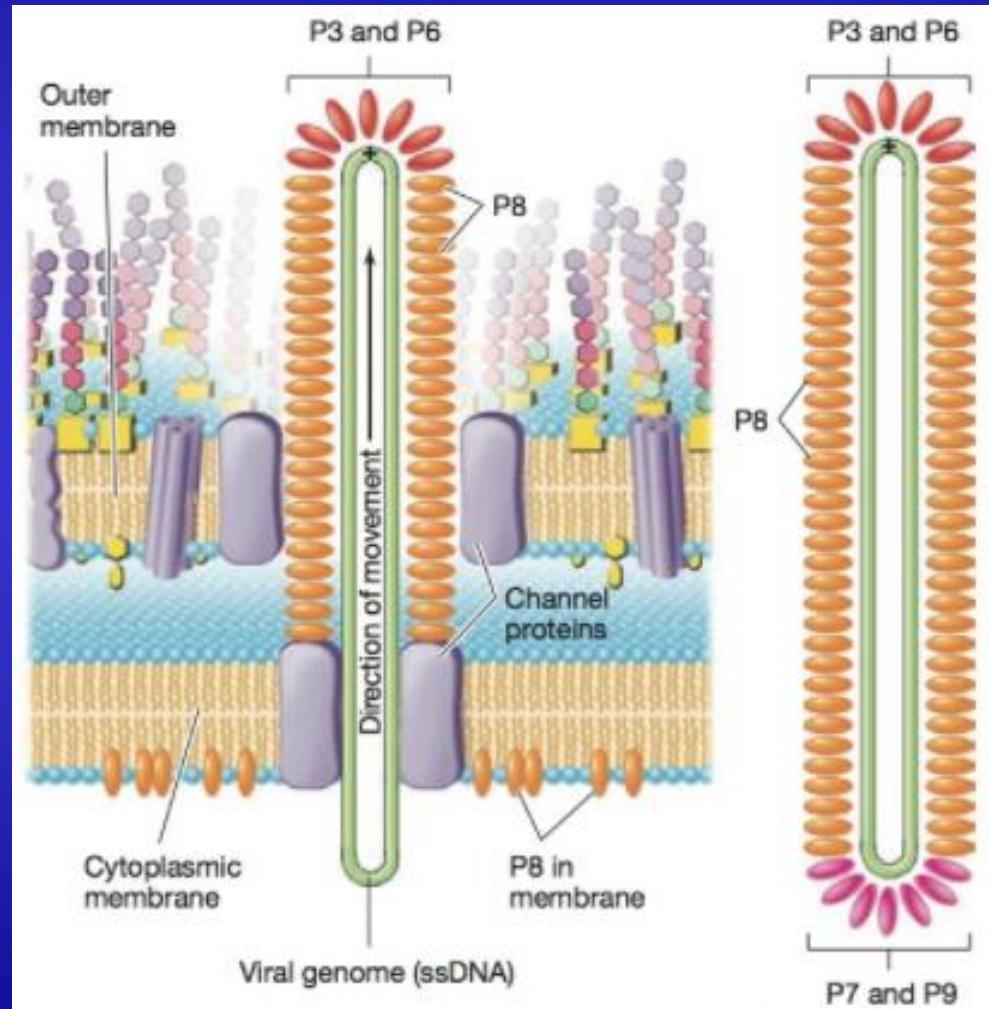
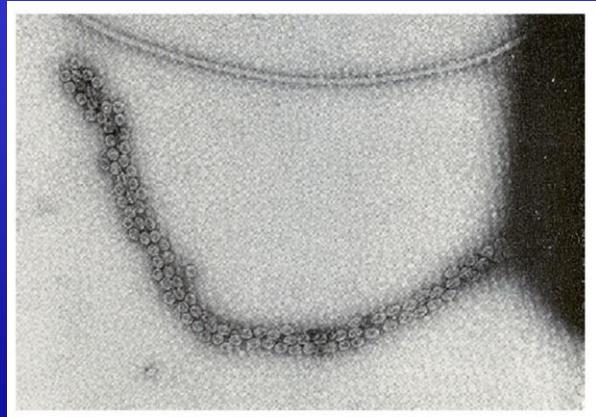
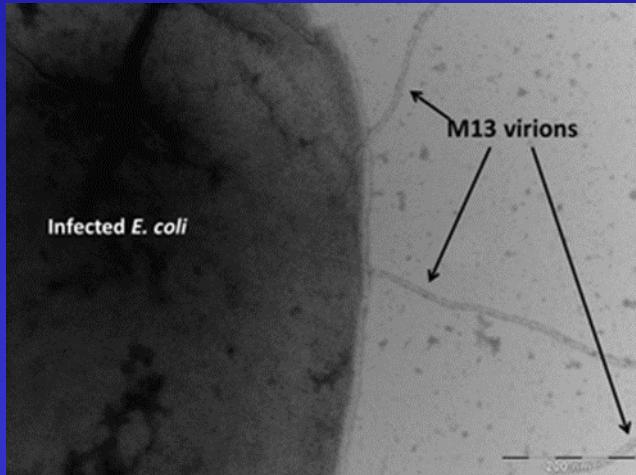
# Meccanismo di replicazione a circolo rotante

Rolling Circle DNA Replication

Animation by Kristina Lamothe & Adam Shlian



# Meccanismo di gemmazione

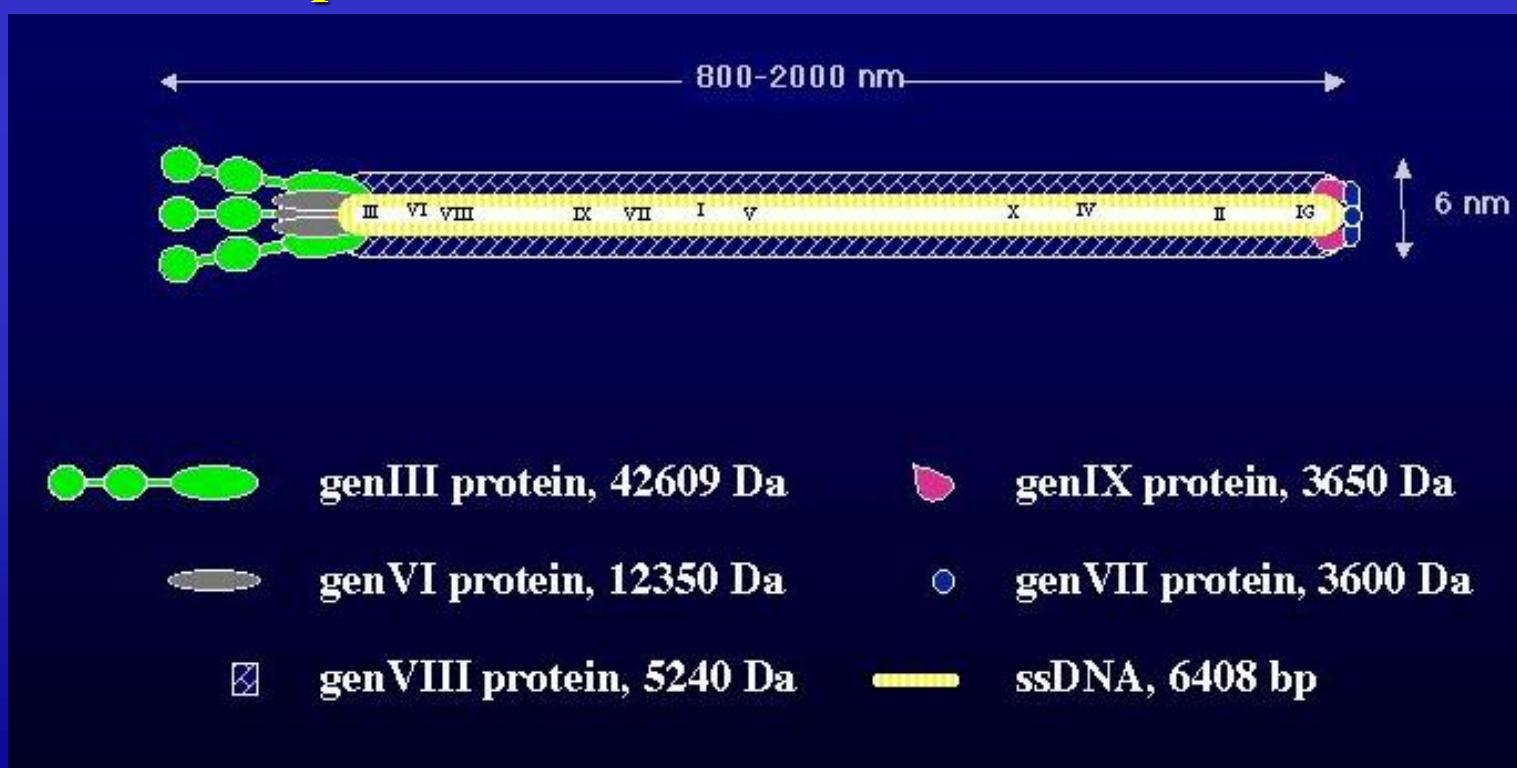
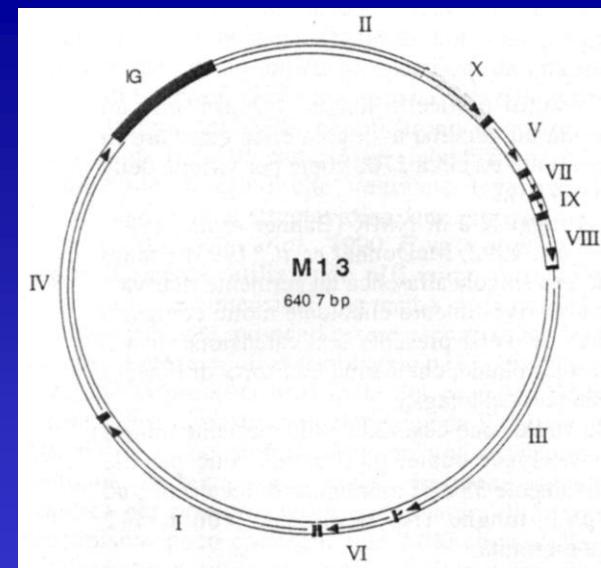


**Uno dei più interessanti sviluppi nell'uso dei fagi filamentosi è stato quello relativo alla tecnica nota come “Phage Display”**

**Si tratta di una tecnica che permette di ingegnerizzare e selezionare polipeptidi che hanno specificità di legame con un substrato (anticorpi, recettori, enzimi, proteine di regolazione, etc...)**

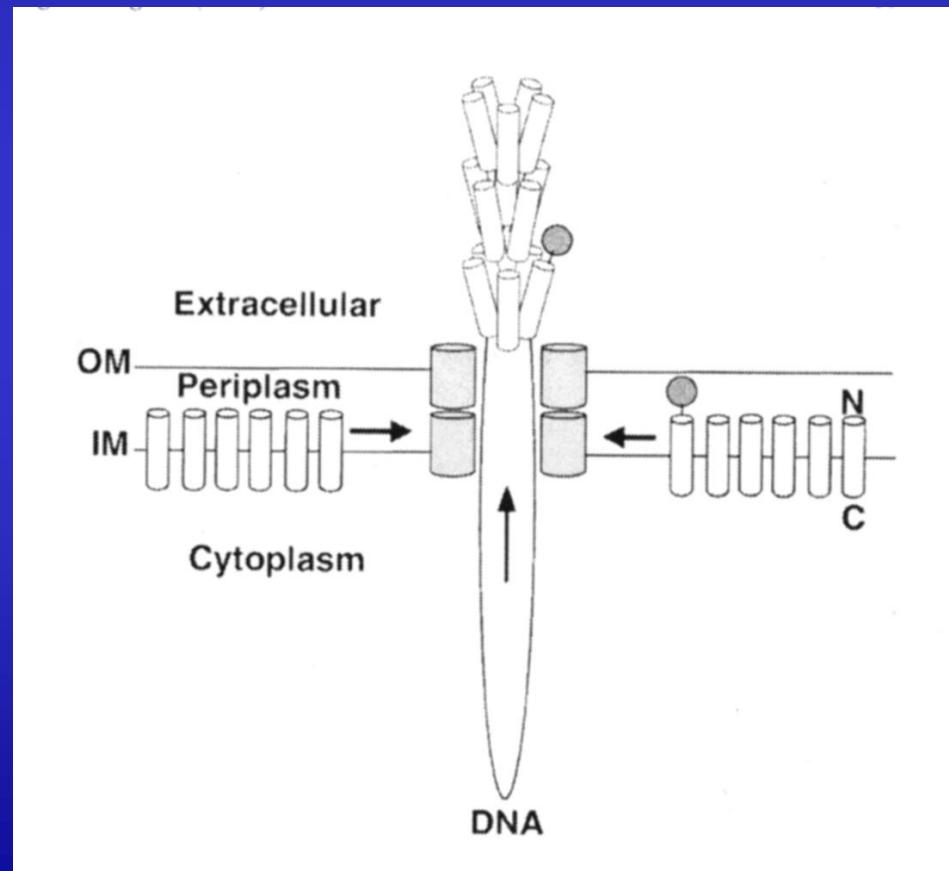
**E' una tecnica che trova applicazione in differenti aree come: l'immunologia, la biologia cellulare, la farmacologia, la diagnostica molecolare e la produzione di nuovi farmaci.**

In questa tecnica è molto utilizzato il fago M13. Si tratta di un fago con un genoma di circa 6400 bp che codifica 10 proteine. Le proteine II, V e X sono responsabili della sintesi del DNA virale; le proteine I e IV sono necessarie per la sintesi di nuove particelle virali; infine le proteine III, VI, VII, VIII e IX costituiscono il capsido



**Nel processo di liberazione delle particelle fagiche di M13, si ha il passaggio del genoma attraverso la membrana del batterio con l'assemblaggio delle proteine del capsid precedentemente esportate nella membrana.**

**Questo fenomeno caratterizza i fagi filamentosi in quanto non pone grossi limiti alle dimensioni del genoma e, soprattutto, non uccide la cellula ospite !**



**Nella tecnica del Phage Display è possibile inserire piccoli pepdidi nelle proteine dell'involturo, in particolare la proteine III e VIII senza alterare la struttura del virus.**

**Quando una popolazione di particelle mature saranno state isolate sarà possibile analizzare se uno dei peptidi utilizzati è in grado di formare un'interazione con un dato substrato.**

**Utilizzando quindi peptidi random è possibile selezionare *mimotopi* per esempio che potrebbero sostituire proteine originali nelle procedure di vaccinazione.**

**O ancora è possibile identificare ligandi per i kit diagnostici ....**

# Phage Display

