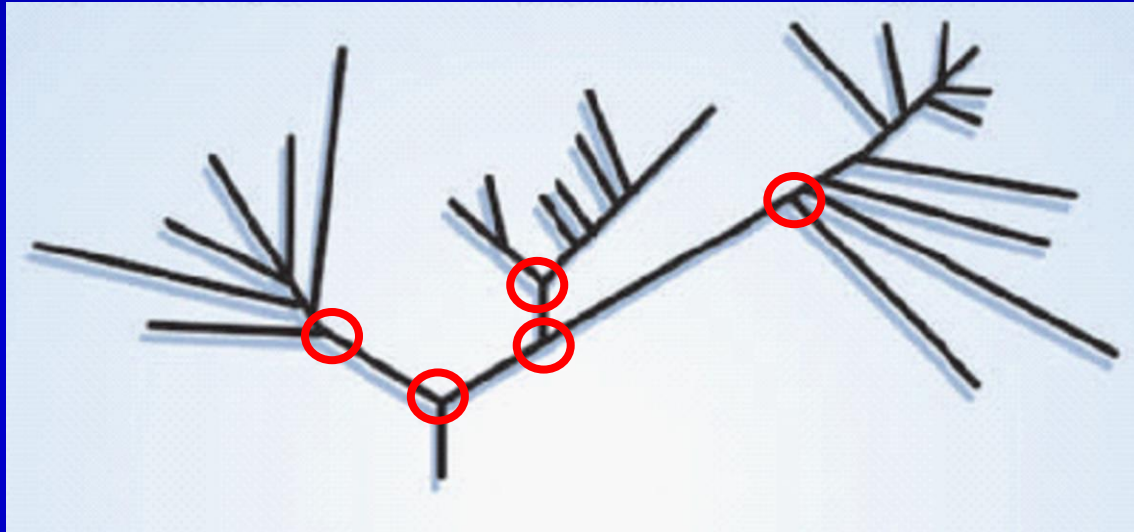


## **DEFINIZIONE DI SPECIE:**

**complesso di individui con uguali caratteristiche e che riproducendosi danno individui fertili.**

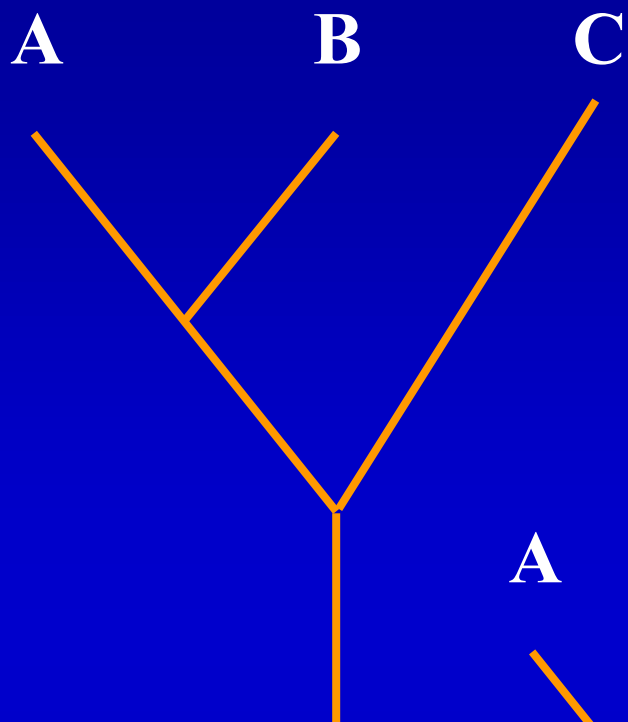


**Definizione di specie nei microrganismi: una specie batterica è costituita da un gruppo di ceppi che mostra un grado elevato di somiglianza e che si distinguono da altri gruppi di ceppi correlati per un grande numero di caratteri indipendenti.**

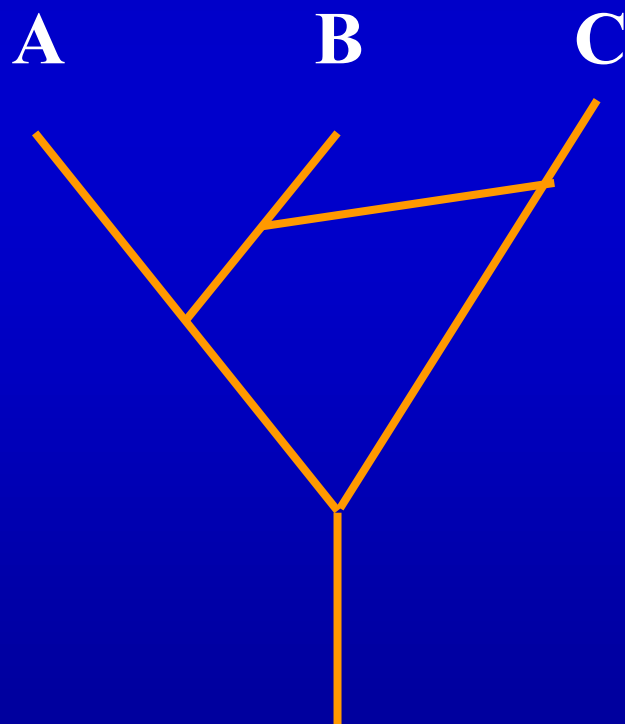
**Ceppo: popolazione di organismi che discende da un unico microrganismo o da un isolato in coltura pura**

# **I «nuovi» approcci nella tassonomia batterica:**

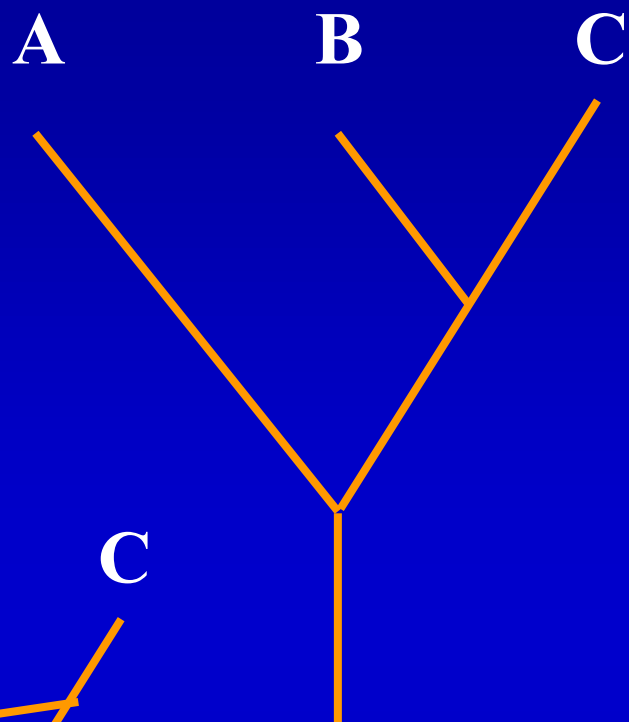
- **Composizione in basi del DNA**
- **Ibridazione degli acidi nucleici**
- **Sequenziamento genomico  
(comparazione sequenze housekeeping,  
e.g. MLST)**

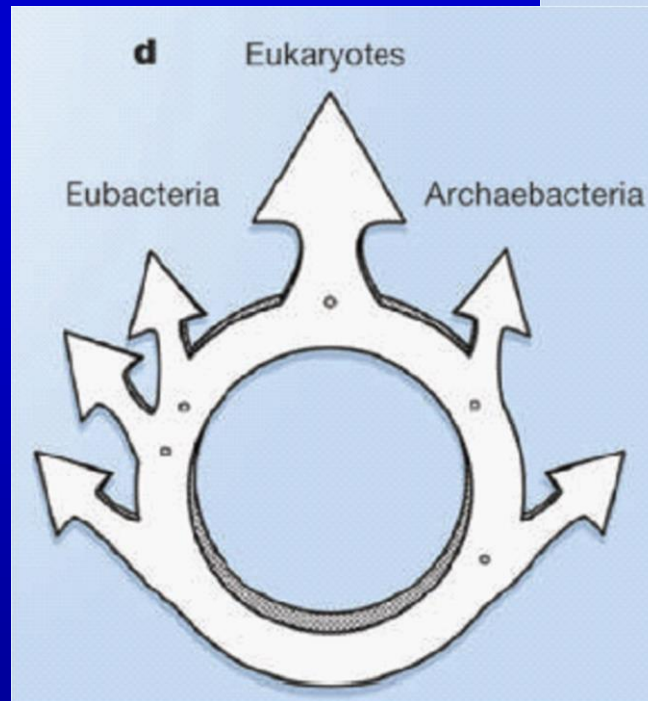
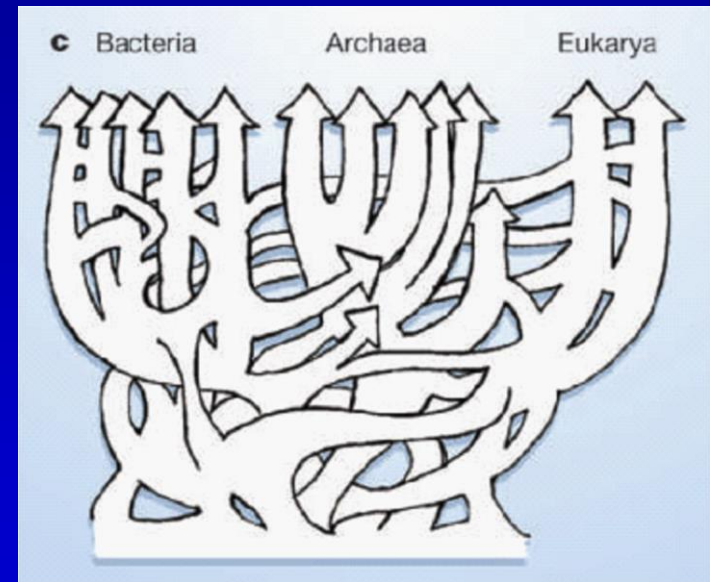
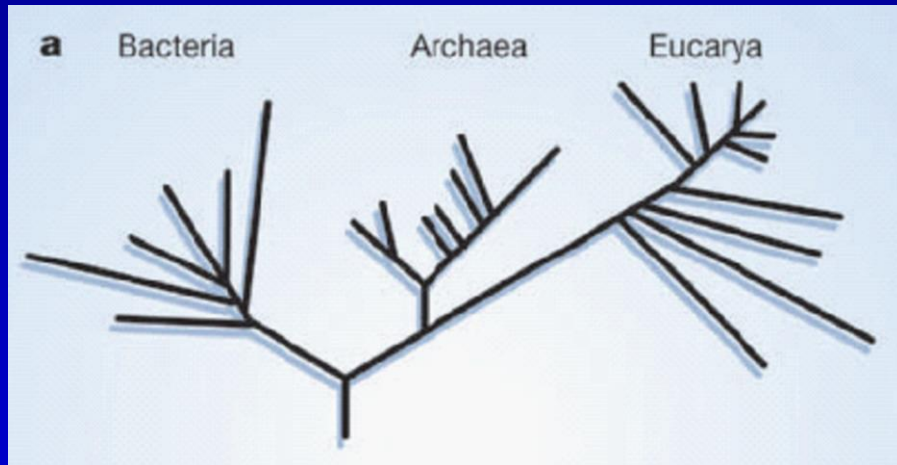


Profilo gene X



Profilo gene Y





# **TRASFERIMENTO GENICO ORIZZONTALE**

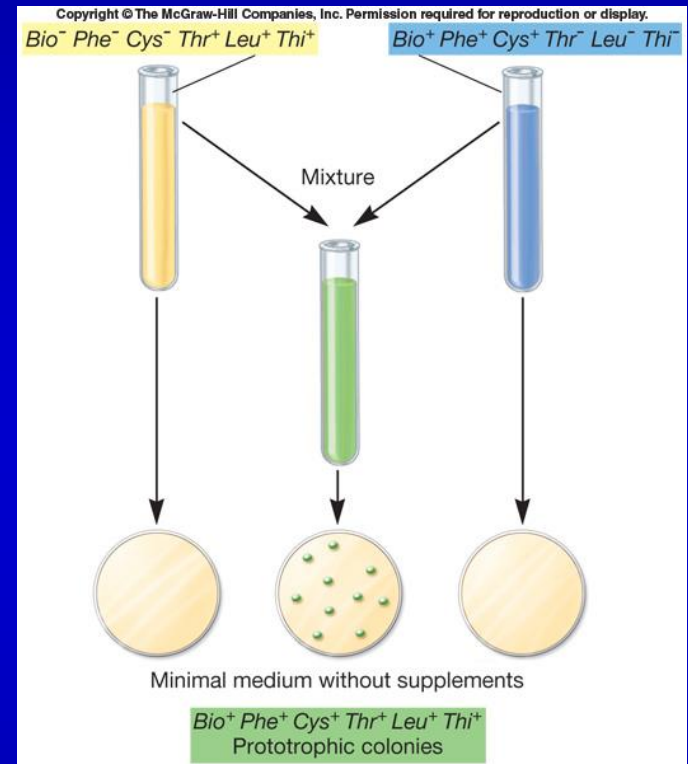
**Il trasferimento genico orizzontale è il fenomeno per il quale si ha un trasferimento di materiale genetico (e quindi di informazione genetica) tra organismi indipendenti e non per via ereditaria.**

**I meccanismi che sono responsabili di questo fenomeno sono:**

- La coniugazione**
- La trasformazione**
- La trasduzione fagica**

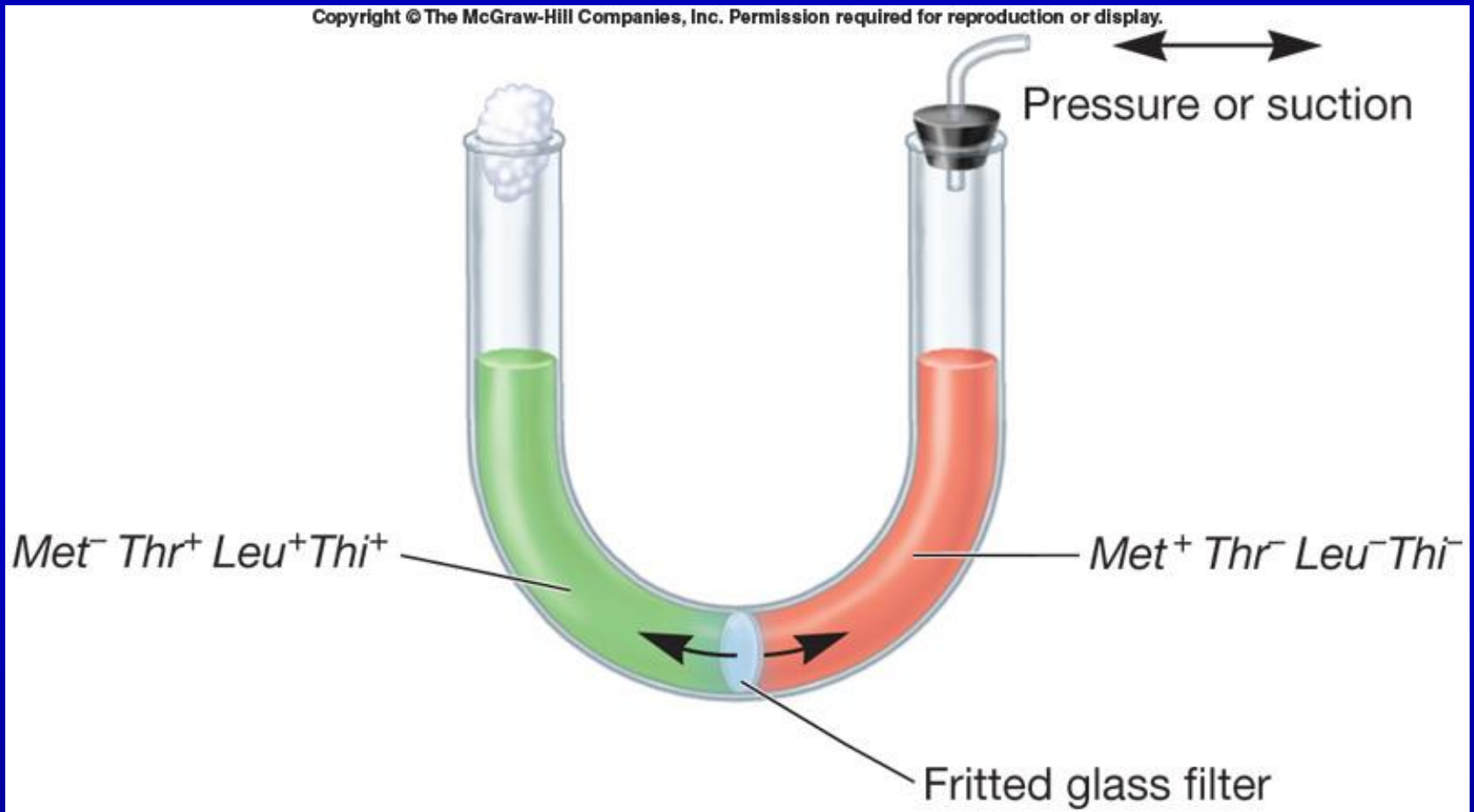
# LA CONIUGAZIONE

Gli effetti della coniugazione furono osservati già a partire del 1946 da Ledenberg e Tatum che osservarono come due ceppi di *E. coli* caratterizzati da almeno due mutazioni auxotrofiche potevano, se mescolate, dare un ceppo prototrofo.



Ben presto ci si rese conto che questo fenomeno era determinato dallo scambio di materiale genetico tra i due batteri. Questa osservazione ha portato all'individuazione e allo studio della coniugazione batterica

# Esperimenti del tubo ad U





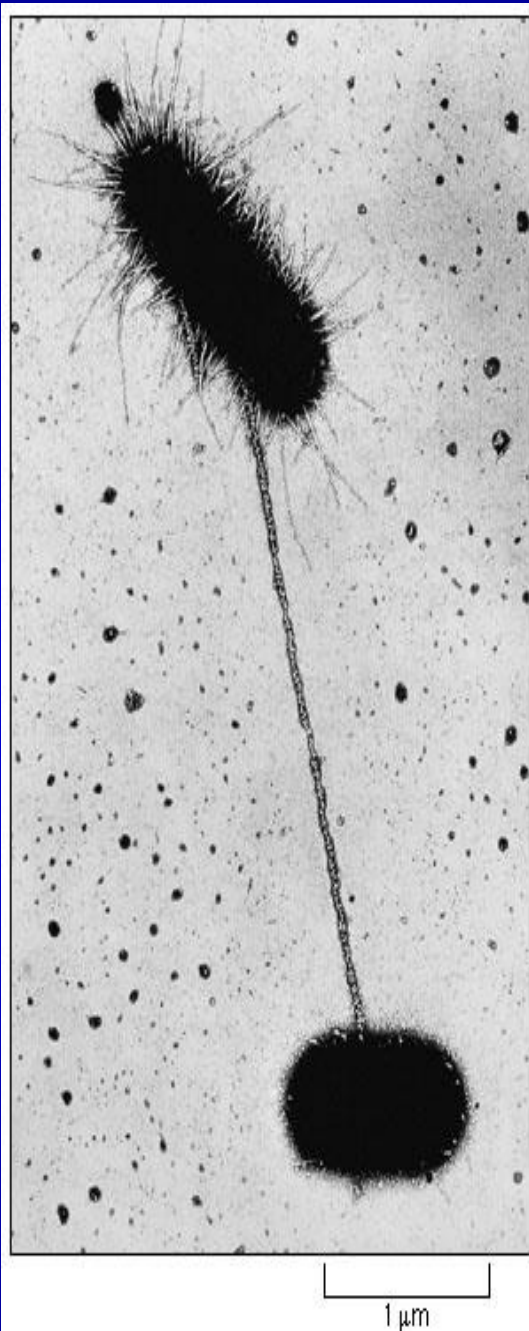
**Esistono differenti fenomeni di coniugazione ma il più studiato e senz'altro quello a carico del plasmide F di *E.coli*.**

**Affinché avvenga una coniugazione è necessario che siano presenti due tipi di batteri: un donatore (caratterizzato dal possedere il plasmide coniugativo 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**





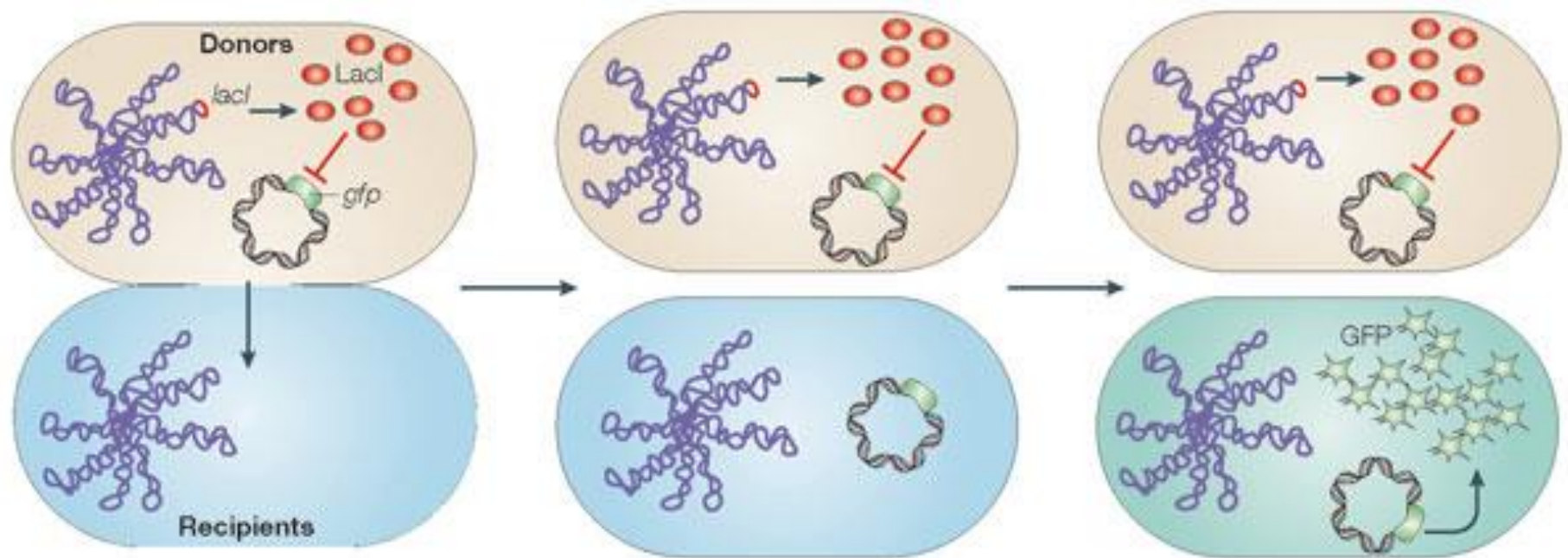
**Il pilo sessuale ha una struttura a cilindro cavo con una sezione esterna di 8 nm e una interna di 2 nm. La lunghezza può arrivare anche a 20 μm**

**Una volta che il pilo contatta la cellula recipiente comincia ad accorciarsi in maniera tale da avvicinare le due cellule**

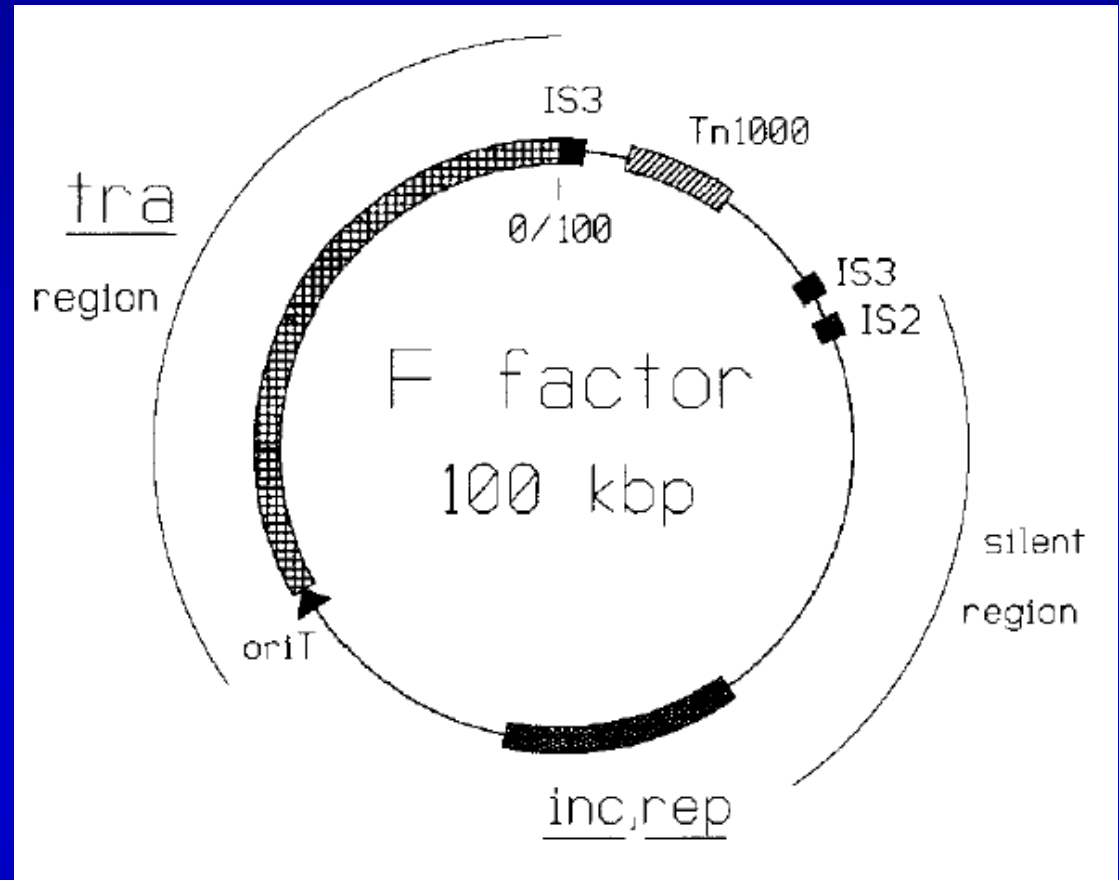


**Il “recettore” del pilo è probabilmente identificabile in un complesso costituito da LPS e dalla proteina di superficie OmpA**

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



# Plasmide F



Il plasmide è divisibile in una regione contenente gli elementi della replicazione e della incompatibilità plasmidica (*inc, rep*); una regione caratterizzata dalla presenza di quattro elementi trasponibili; una regione silente e infine la regione responsabile del processo coniugativo .....

**La regione *tra* (35 kb) contiene circa 36 geni (*tra*, *trp*) responsabili del processo di coniugazione....**

***traA* codifica la pilina, principale componente del pilo F.**

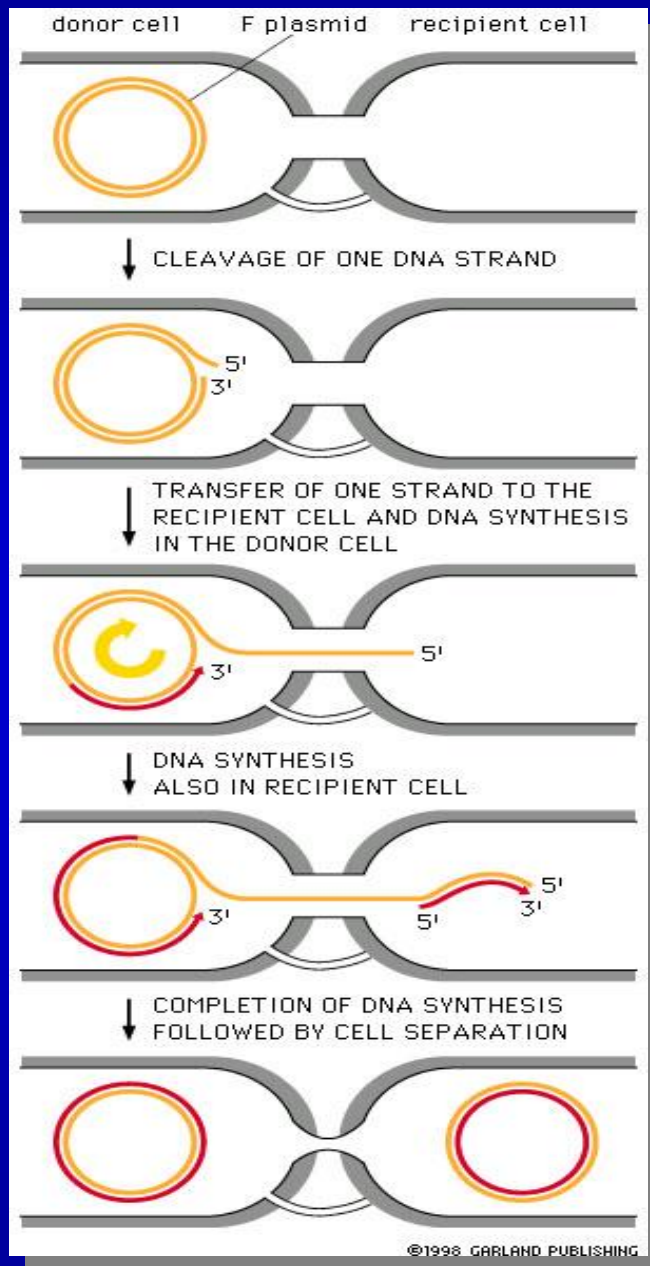
***traQ* e *traX* codificano proteine coinvolte nella maturazione e nella acetilazione della pilina.**

***traG* e *traN* codificano le proteine responsabili del mantenimento del contatto tra le cellule in fase di coniugazione mentre *traD* codifica il fattore che permette la formazione del ponte citoplasmatico.**

***traT* e *traS* codificano le protein responsabili del fenomeno della esclusione di superficie**

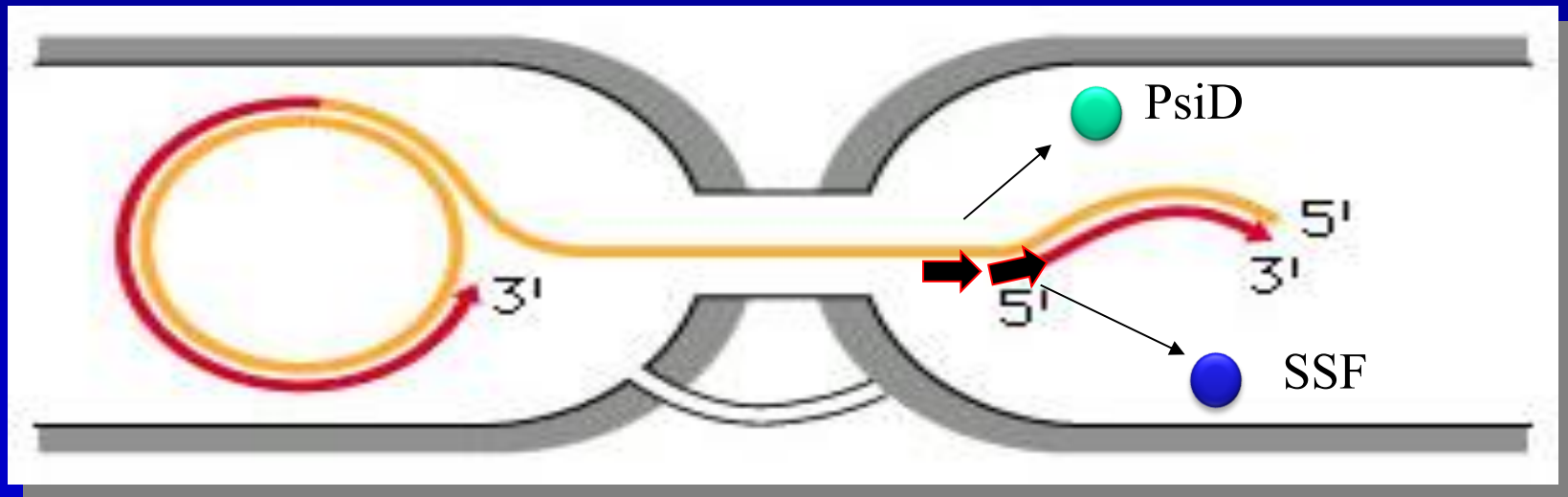
**Infine è centrale il ruolo svolto dal prodotto dei geni *traI* e *traY*. Queste due proteine danno il via al trasferimento del materiale genetico attraverso il ponte citoplasmatico**





**Il processo ha infatti inizio con il taglio, da parte di TraI e TraY del singolo filamento di DNA del plasmide F nella regione *oriT* (all'estremità della regione *tra*). Queste proteine rimangono legate all'estremità 5' che si forma e sono responsabili dell'attraversamento di questa del ponte citoplasmatico.**

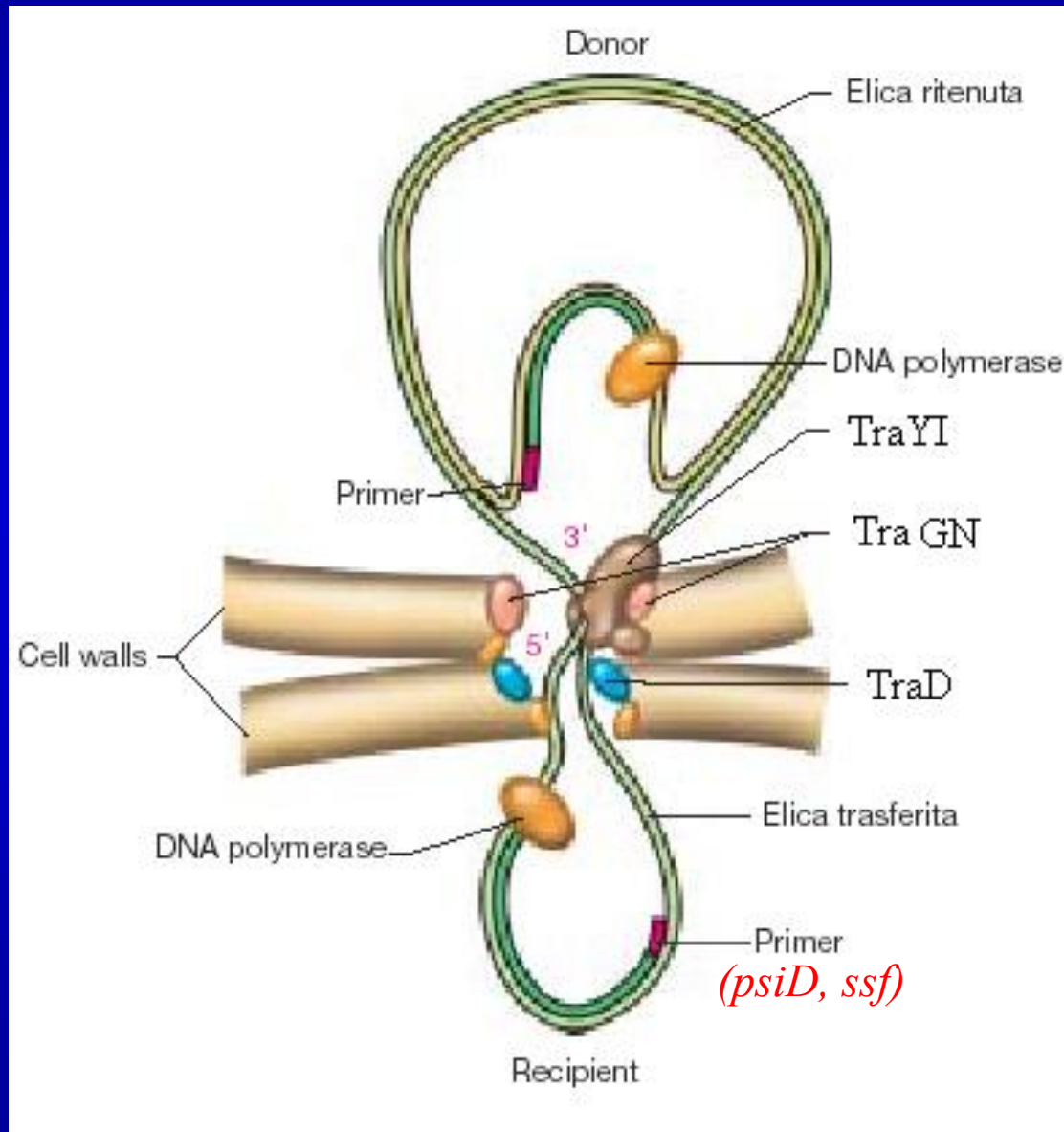
**Il singolo filamento lineare viene sfilato da quello circolare e contemporaneamente avviene la sintesi di un nuovo filamento, che lo sostituisce, attraverso il meccanismo di replicazione a circolo rotante.**



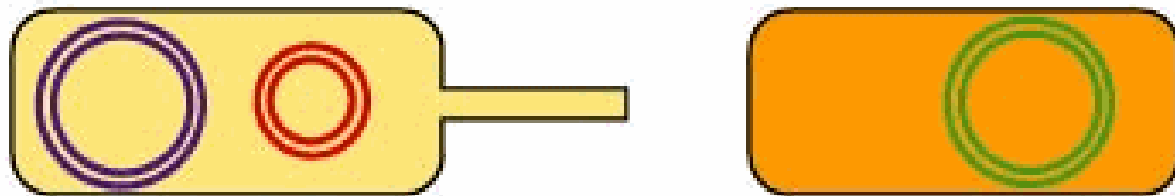
**Il filamento trasferito viene utilizzato per la replicazione del DNA, a partire da un primer di RNA che si forma per la trascrizione di due geni denominati *ssf* e *psiD*. Questi due messaggeri, vengono anche tradotti per sintetizzare due proteine importanti: la prima è un omologo delle SSB di *E.coli*, ma specifiche per il DNA di F, la seconda è una proteina che sopprime il sistema SOS della cellula recipiente**



# Modello della coniugazione di F

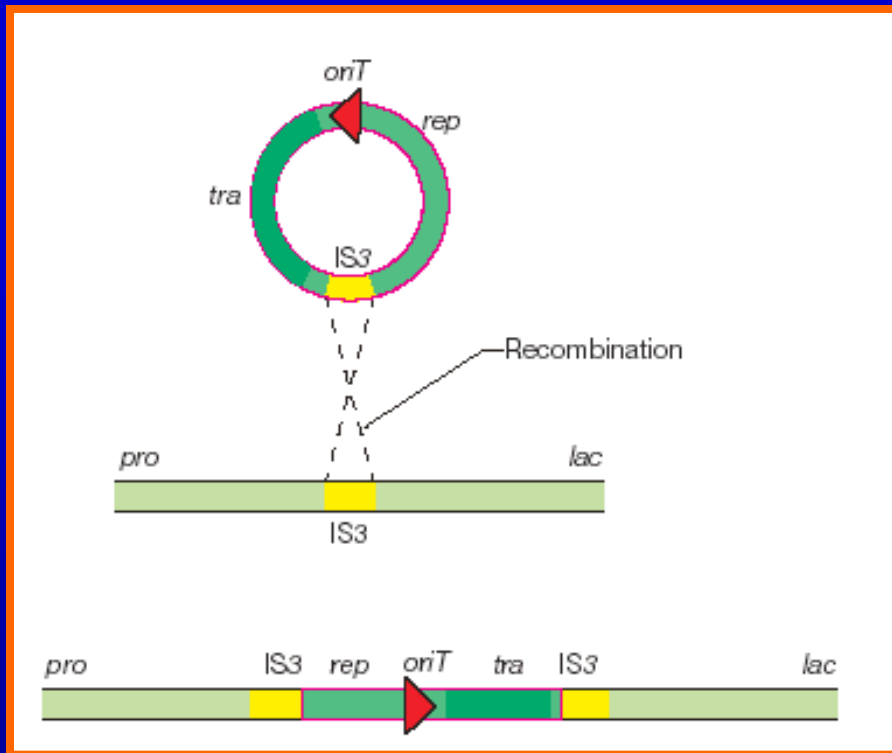


# SCHEMATIZZAZIONE DEL PROCESSO DELLA CONIUGAZIONE



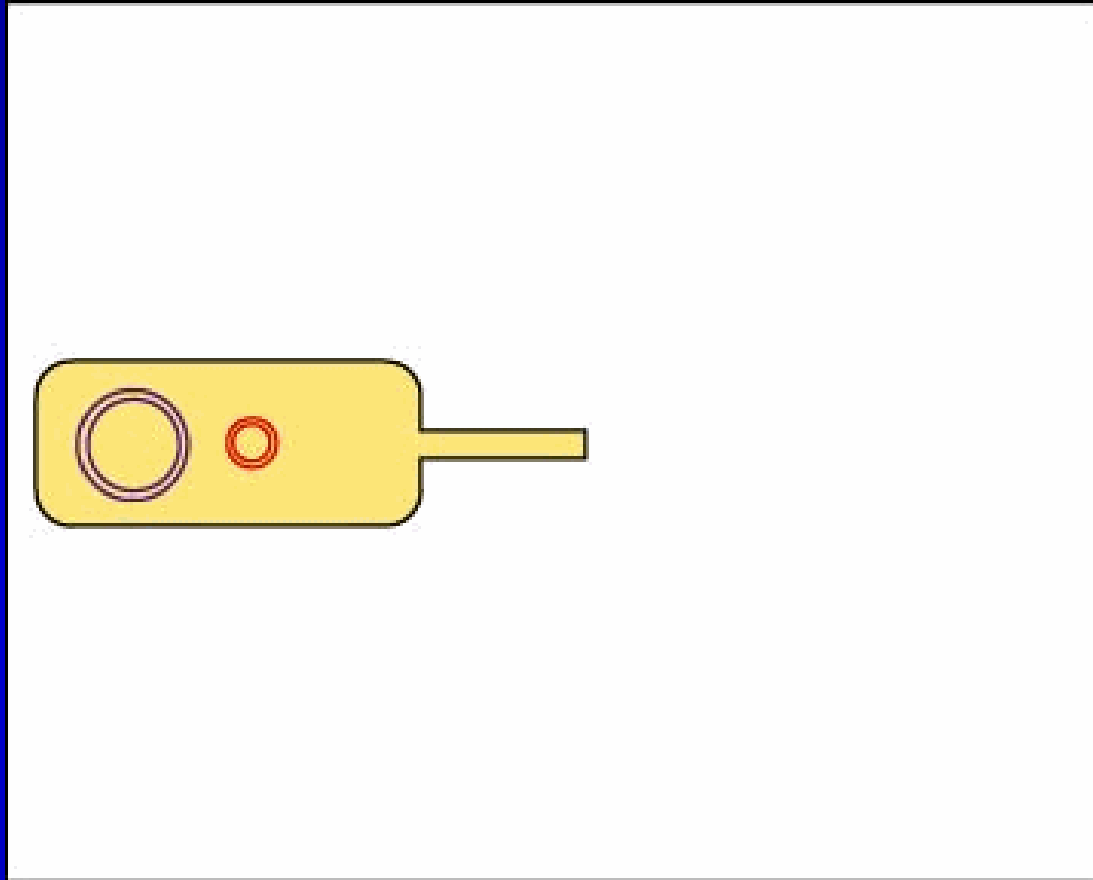
**La coniugazione avviene tra ceppi  $F^+$  e ceppi  $F^-$ . In verità esiste un altro tipo di ceppi in grado di effettuare la coniugazione e vengono definiti Hfr.**

**In questi microrganismi è avvenuto un evento di ricombinazione omologa tra le sequenze IS (IS2 e IS3) o la formazione di un cointegrato per la trasposizione replicativa di Tn1000.**



**Questi ceppi presentano il plasmide F integrato nel cromosoma batterico. La capacità di effettuare una coniugazione è però rimasta inalterata.**

# CONIUGAZIONE DI UN Hfr



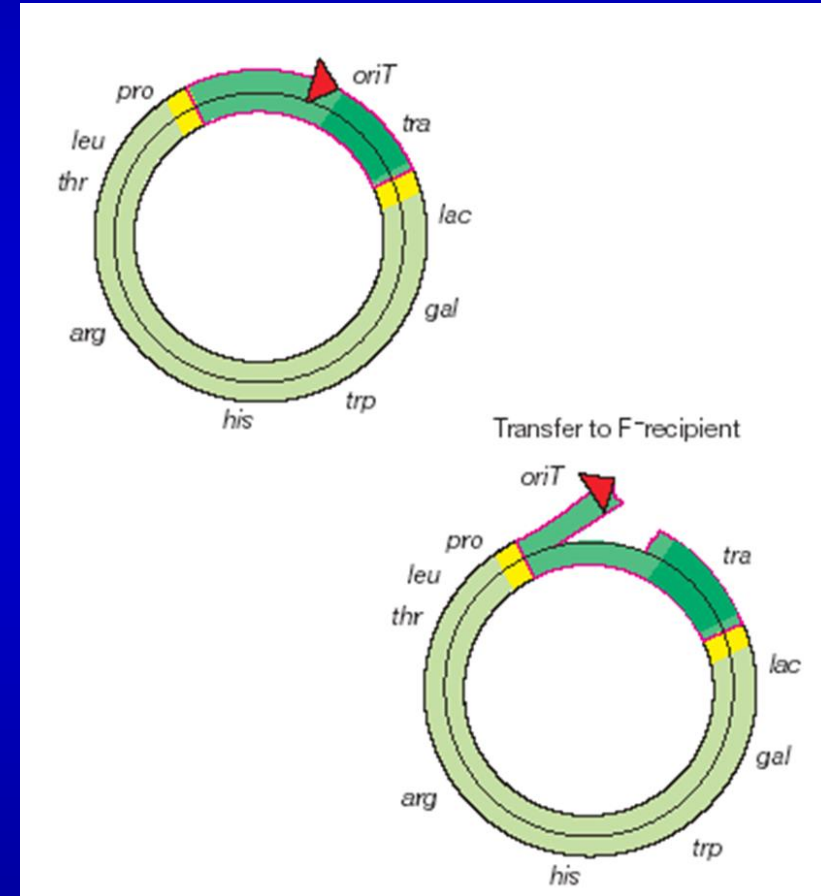
**il DNA trasferito non è dotato di una propria origine di replicazione e la presenza dell'elevata omologia con il DNA cromosomale dà vita a eventi di ricombinazione. Due eventi di ricombinazione determinano lo scambio del materiale genetico del cromosoma del ceppo recipiente con il DNA del ceppo donatore.**

L'interruzione sperimentale delle coniugazioni è stato lo strumento che ha permesso di determinare la posizione relativa dei geni nel cromosoma di *E.coli* in epoca pre-sequenziamento e di dimostrare che il cromosoma di questo microrganismo è circolare.

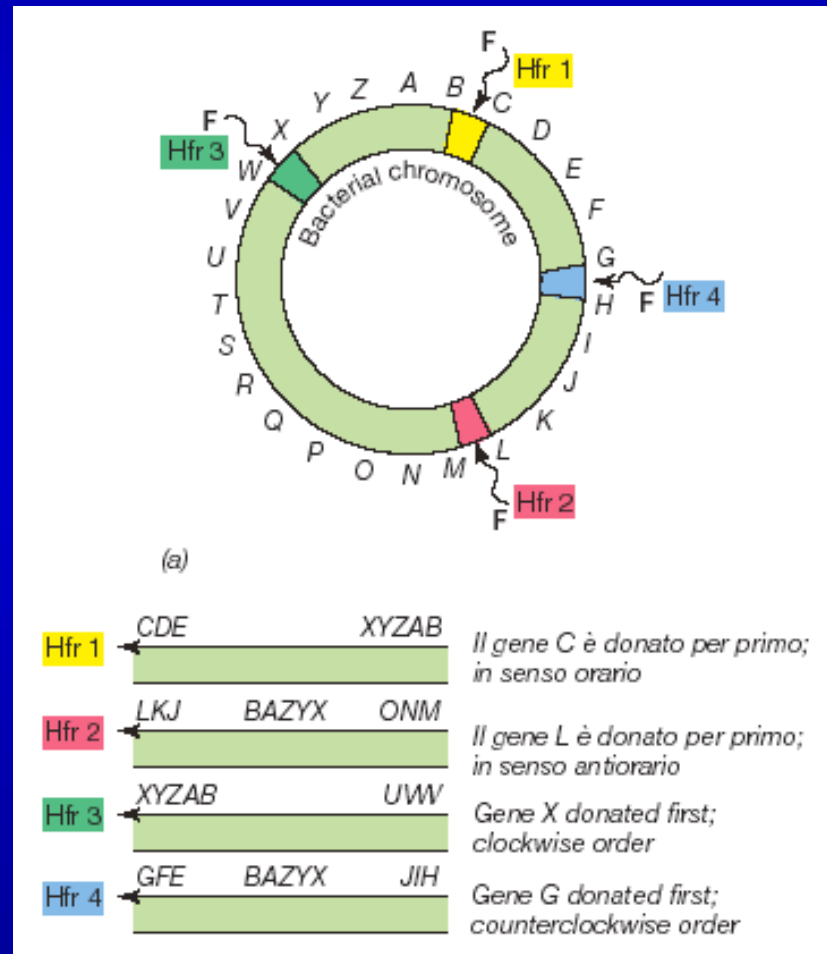
Dato un ceppo Hfr con un fenotipo *leu*<sup>+</sup> *thr*<sup>+</sup> *pro*<sup>+</sup> e un ceppo recipiente *leu*<sup>-</sup> *thr*<sup>-</sup> *pro*<sup>-</sup> si può effettuare una coniugazione selezionando per i singoli prototrofi.

La frequenza di reversione di ciascun fenotipo ci permette di risalire alla loro posizione. Ad esempio se avessimo frequenze del tipo *leu* = 30%, *thr* = 15% e *pro* = 50% la sequenza esatta sarà:

*pro* → *leu* → *thr*



**La regione del cromosoma del ceppo donatore che andrà ad essere trasferita dipende dal sito di inserzione del plasmide F nel cromosoma e dal suo orientamento**



**Dalla combinazione dei risultati di differenti ceppi Hfr (con il plasmide F integrato in punti differenti) è stato possibile concludere che .....**

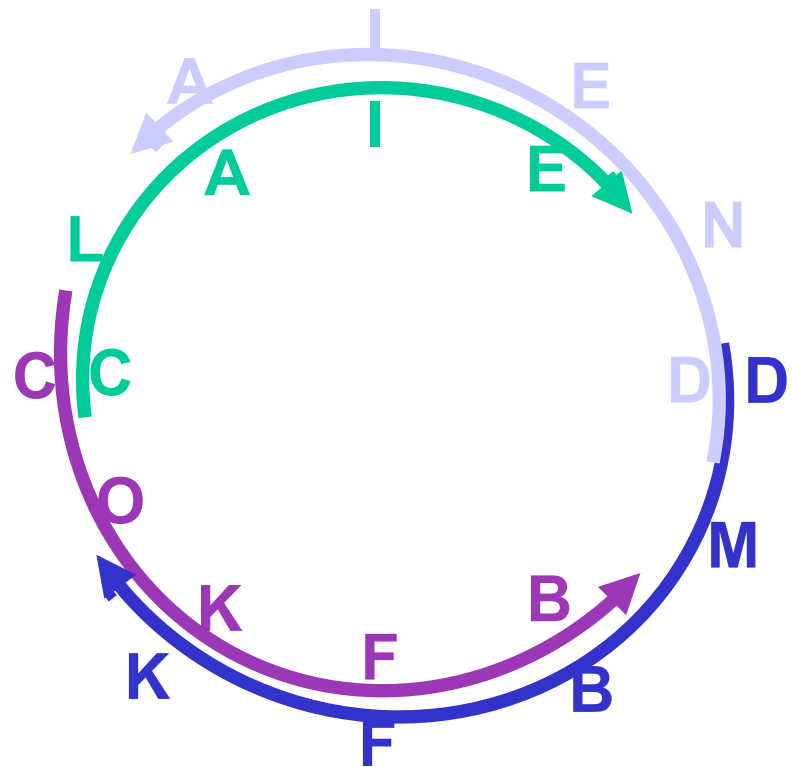
first ←———— last

A I E N D

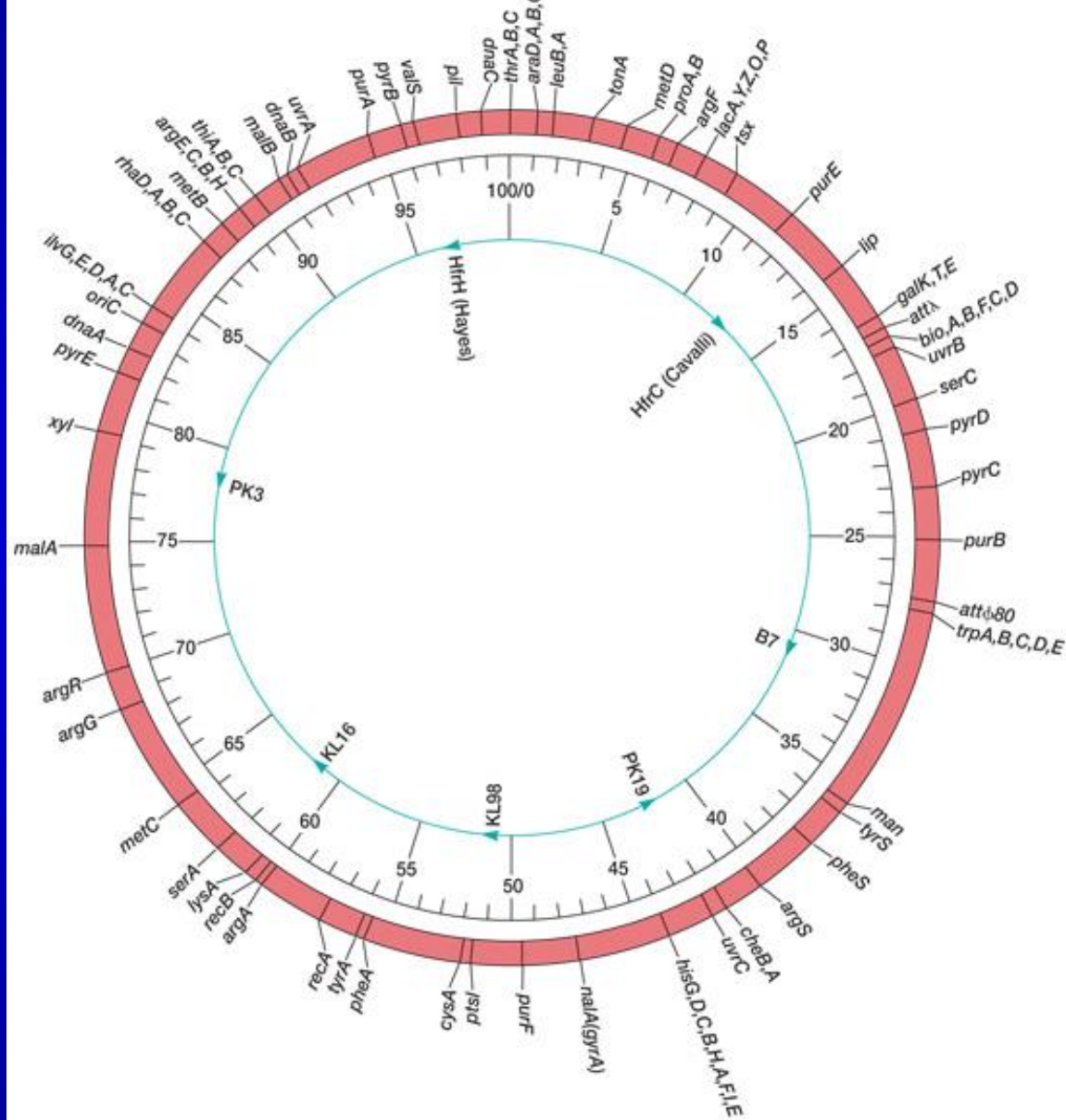
E I A L C

B F K O C

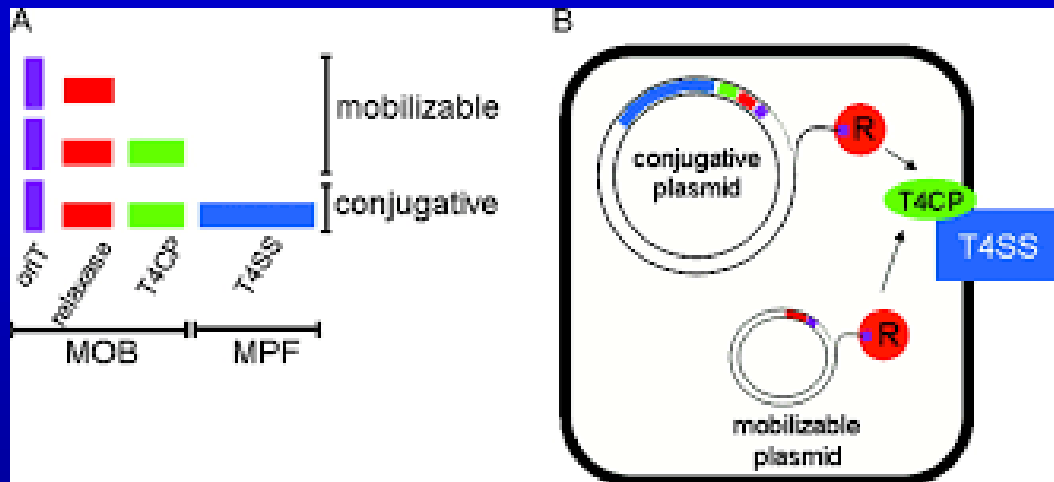
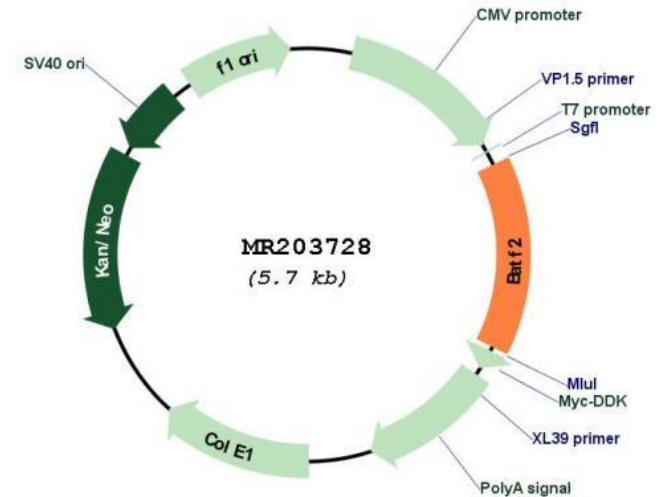
K F B M D







**Il plasmide F, se privato della regione responsabile della coniugazione si comporta come un plasmide qualunque e viene definito mini-F.**

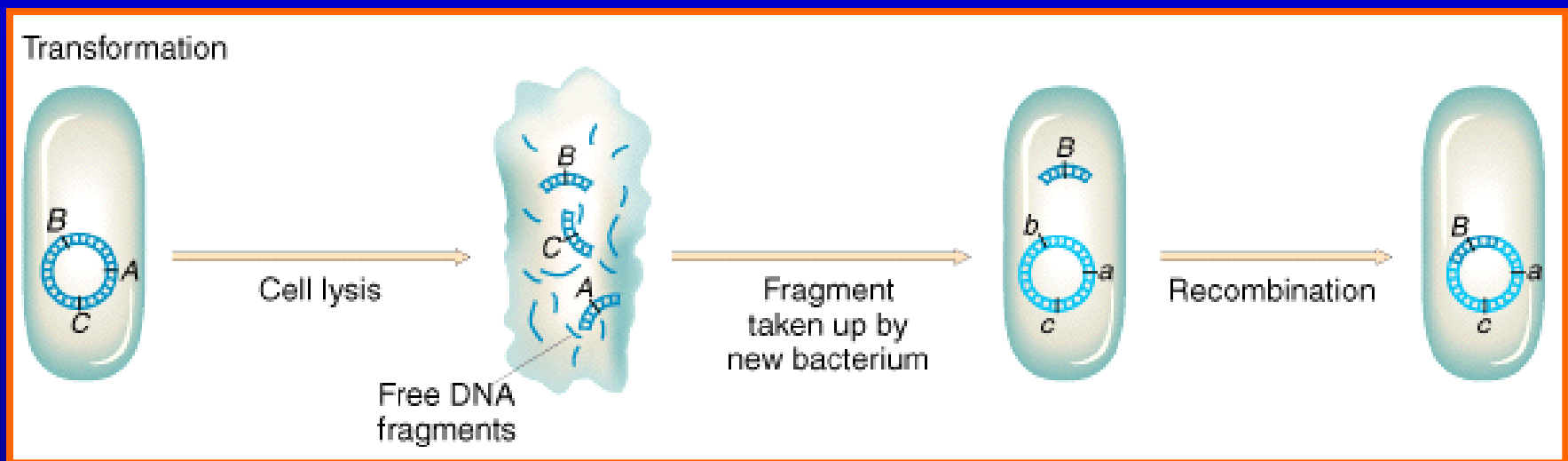


**Allo stesso modo si può rendere mobilizzabile un plasmide**

# LA TRASFORMAZIONE

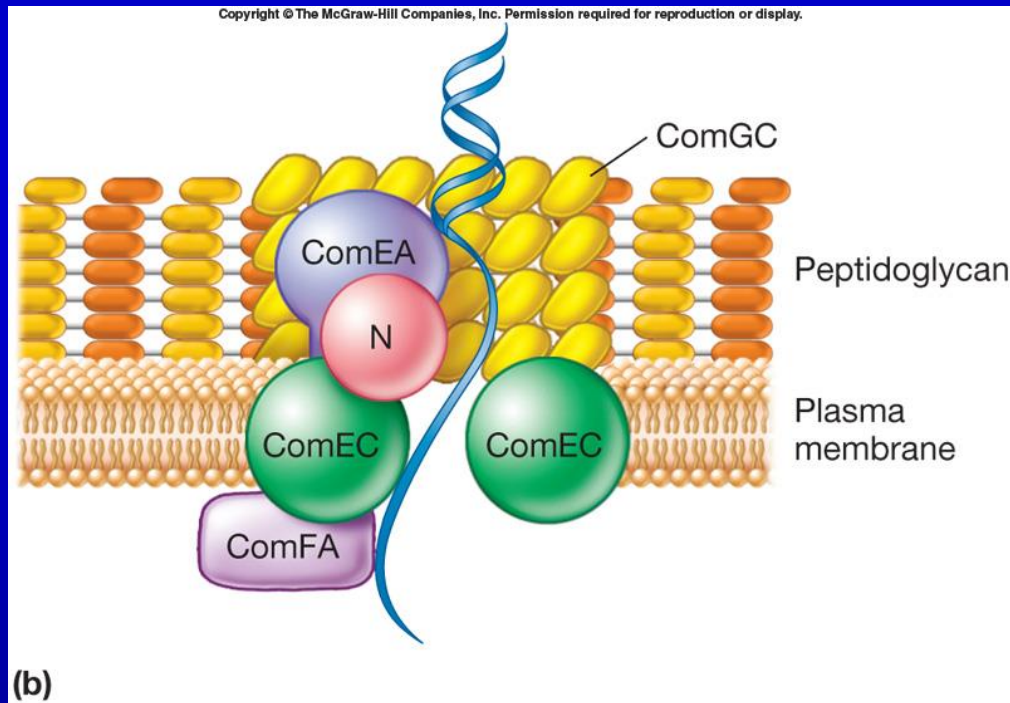
La trasformazione è il fenomeno per il quale la cellula batterica è in grado di assorbire DNA nudo dall'ambiente e integrarlo nel proprio cromosoma.

Questa capacità, detta competenza, è naturalmente espressa da alcuni microrganismi ( *Bacillus subtilis* e *Streptococcus pneumoniae*) mentre in altri può essere indotta (per esempio in *Escherichia coli*).



# Competenza naturale

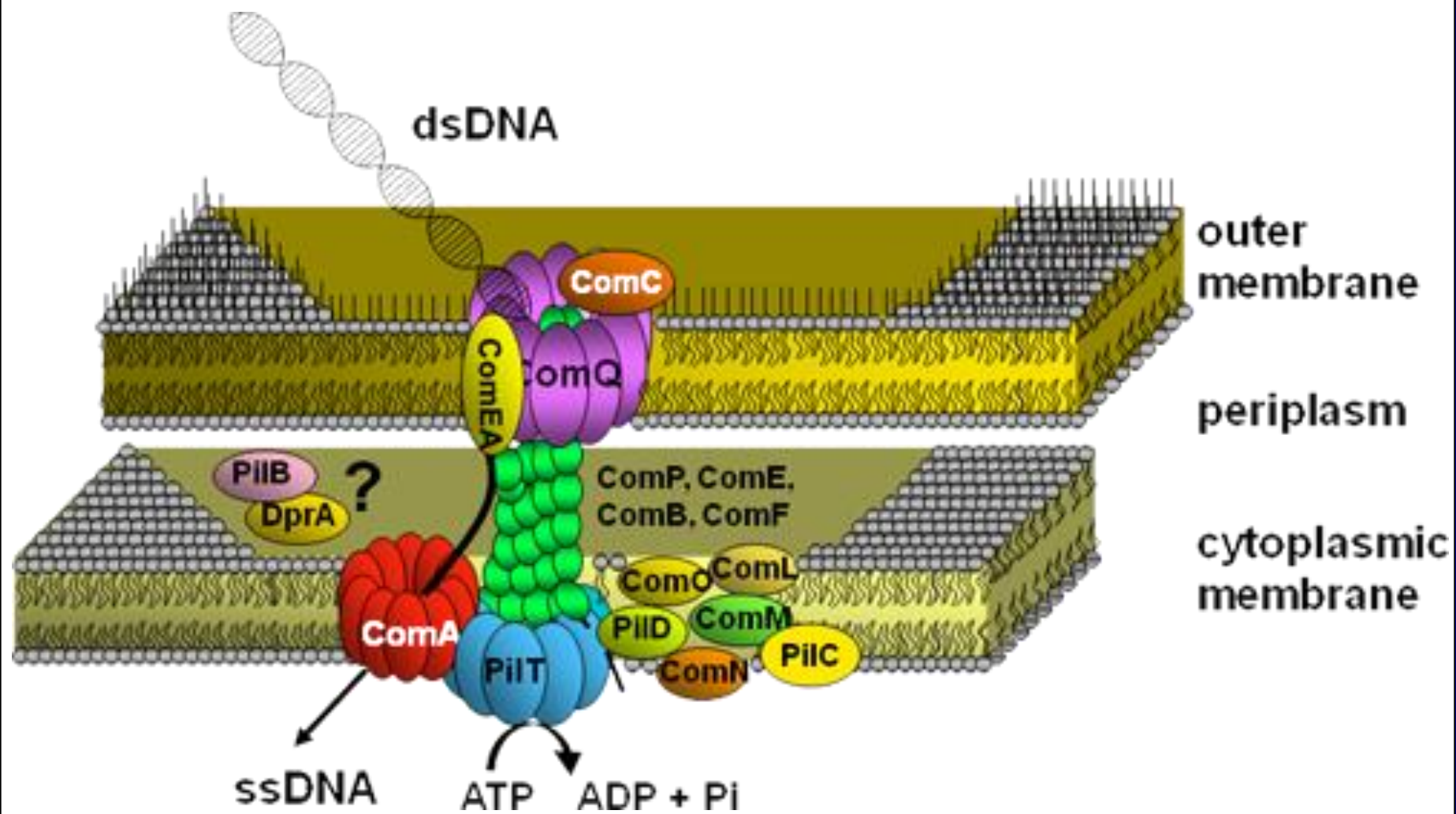
La capacità che alcuni microrganismi hanno di prelevare del DNA dall'ambiente è determinata dal possedere complessi proteici deputati a questo scopo. In *Bacillus subtilis* un complesso di numerose proteine è coinvolto in questo processo.....



ComGC forma il canale nella parete cellulare.

ComEA, EC ed FA sono responsabili della formazione del canale citoplasmatico e del trasporto del DNA nella cellula.

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

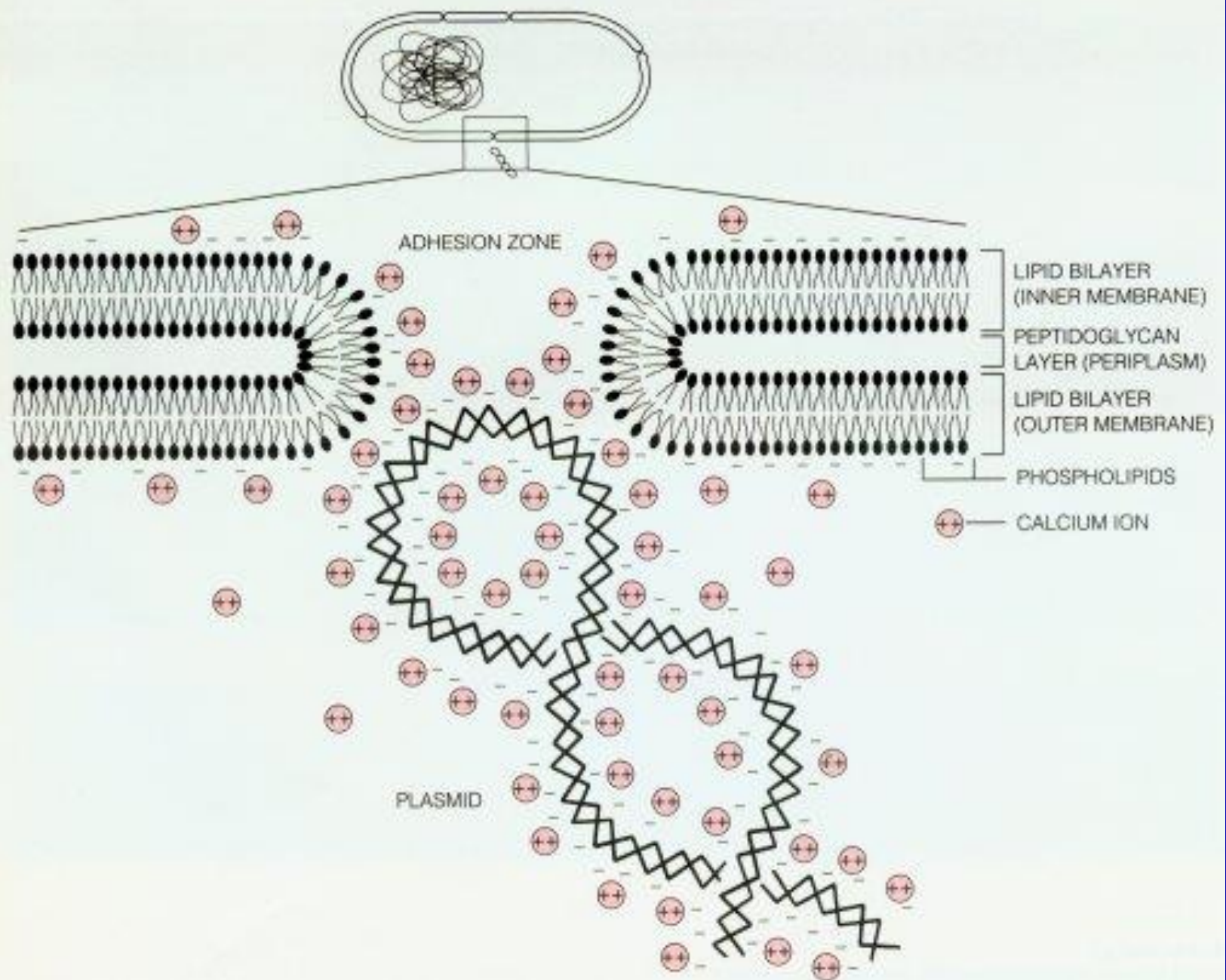


# Competenza indotta

**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



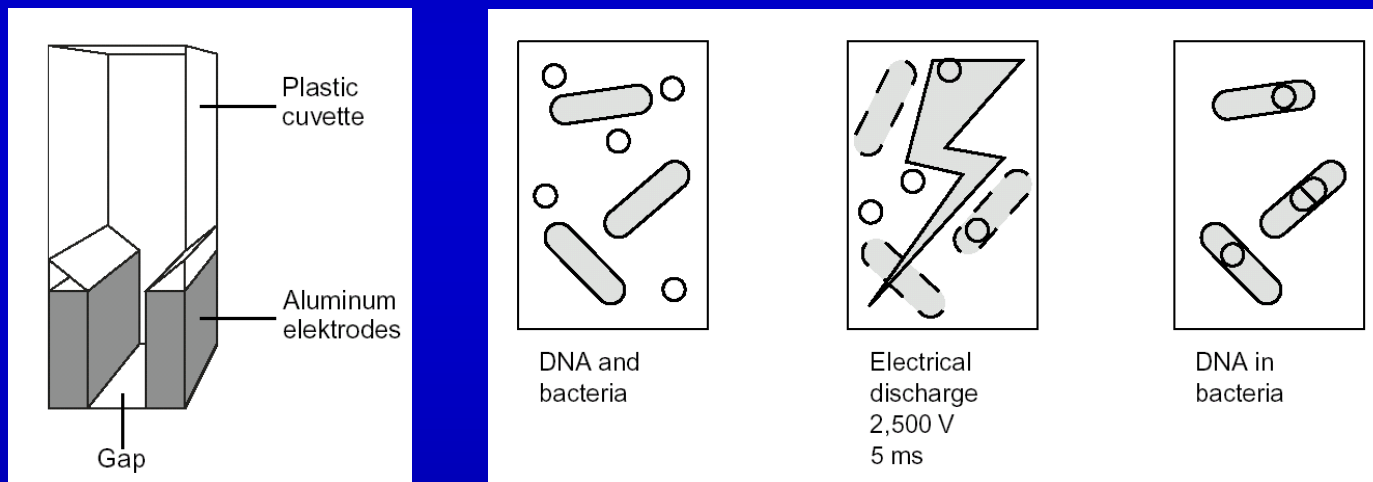




# Elettroporazione

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  $\text{CaCl}_2$ . Inoltre si propone anche come metodo di elezione nella trasformazione dei microrganismi unicellulari eucariotici come *Saccharomyces caerevisiae*

# La trasduzione

Esistono due tipi di trasduzioni fagiche che vengono distinte in :

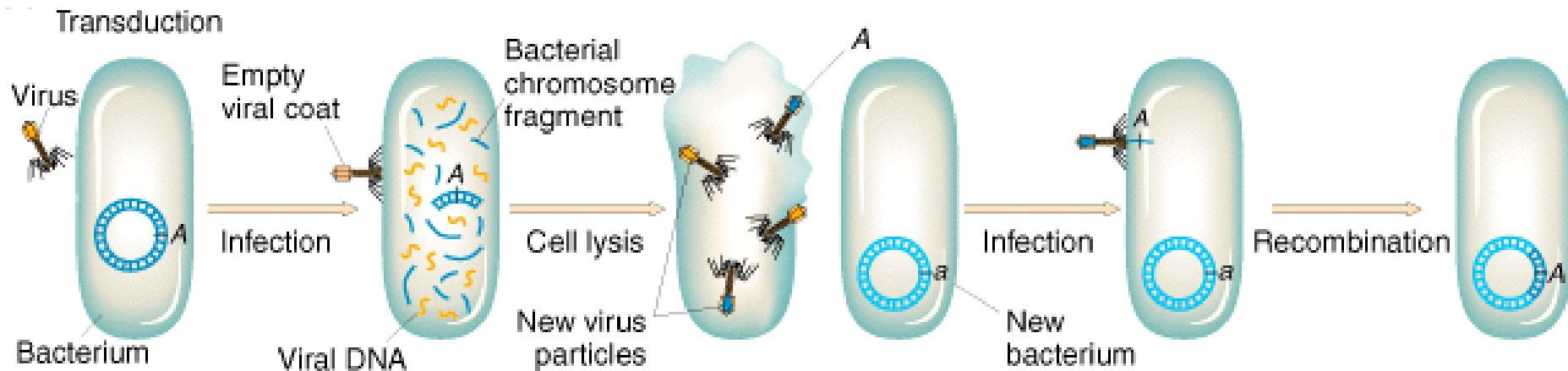
- TRASDUZIONE GENERALIZZATA
- TRASDUZIONE SPECIALIZZATA

La prima è esercitata da batteriofagi come P1 e P22 (rispettivamente per *E.coli* e *Salmonella*), mentre la seconda è tipica del fago  $\lambda$ .

**Nella trasduzione generalizzata potenzialmente tutti i geni contenuti nel ceppo donatore possono essere trasferiti in un ceppo recipiente.....**

**Nella trasduzione specializzata solamente i geni presenti nei pressi del sito di inserzione cromosomale del genoma di un fago possono essere trasferiti !!!!**

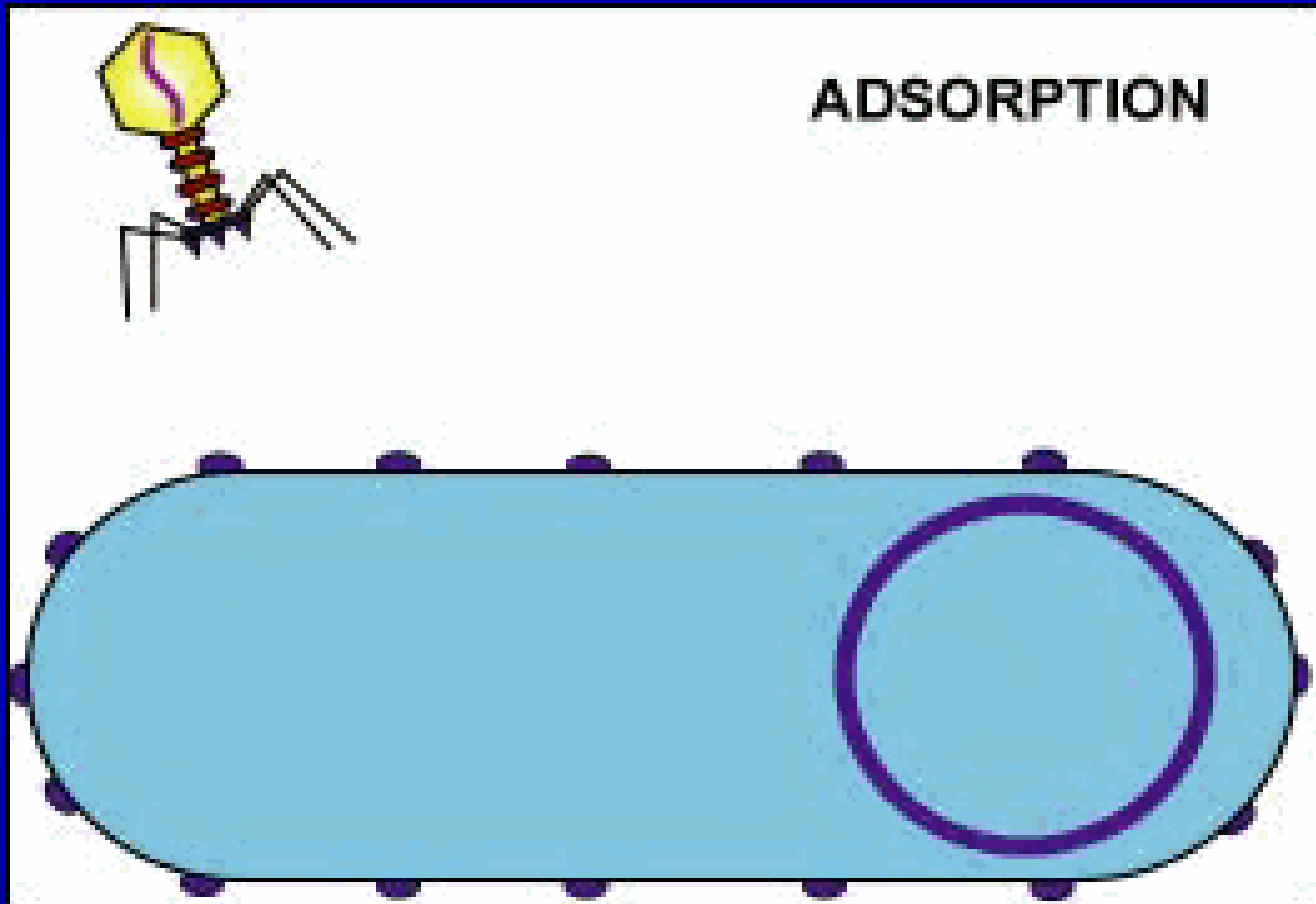
# TRASDUZIONE GENERALIZZATA



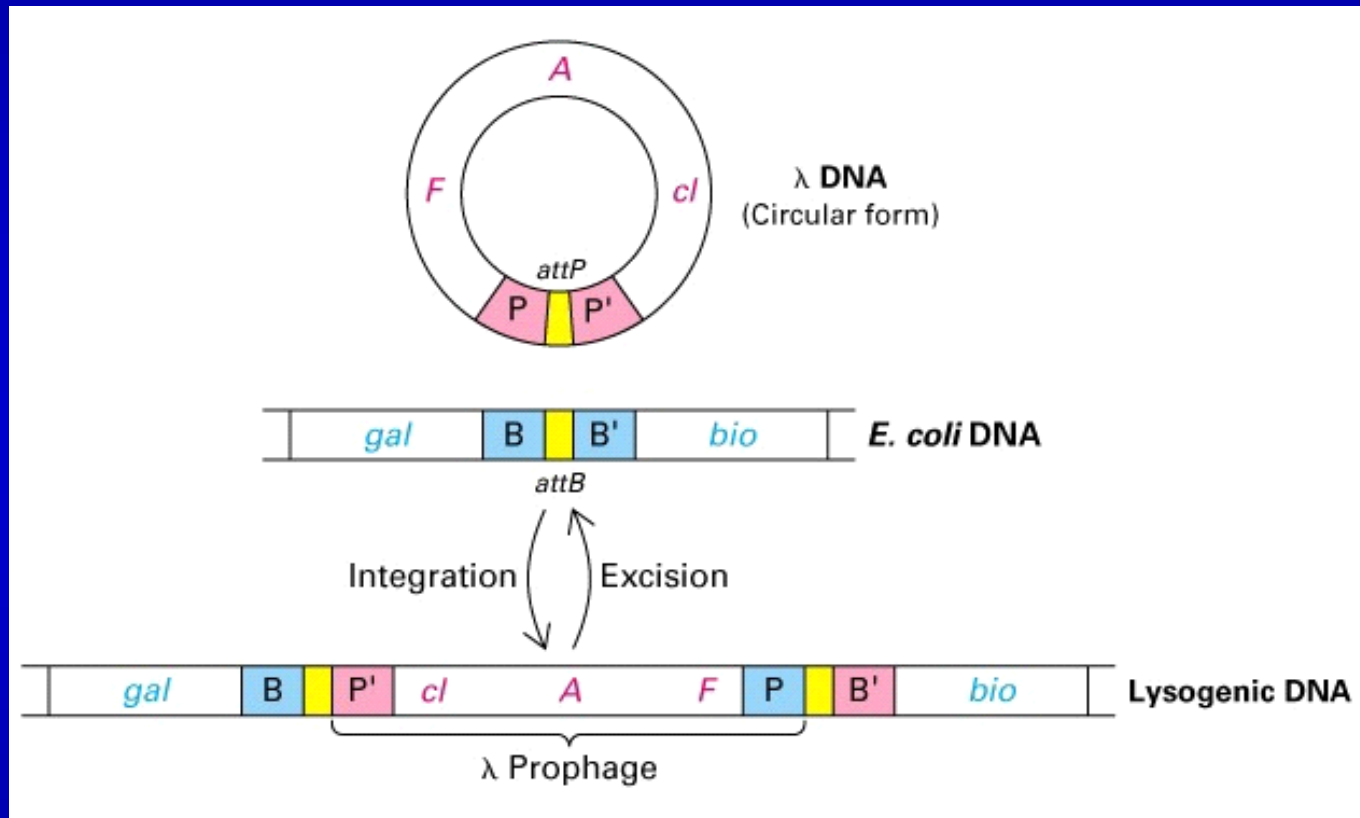
**Nella trasduzione generalizzata l'infezione da parte di un batteriofago determina la frammentazione del genoma della cellula ospite. La maturazione delle particelle fagiche può determinare una errata incorporazione di DNA batterico in una testa fagica. L'infezione da parte di questa particella fagica determina l'inserzione di DNA batterico in una cellula batterica.**

**Un evento di ricombinazione può determinare uno scambio genico**

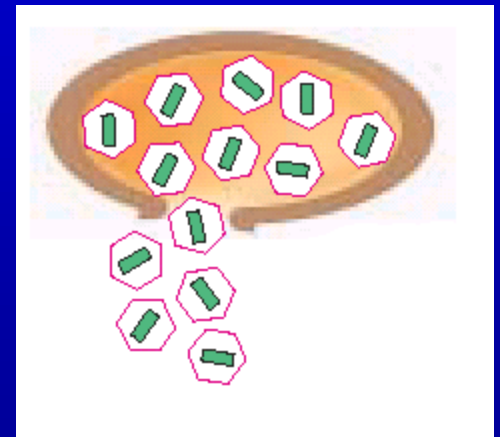
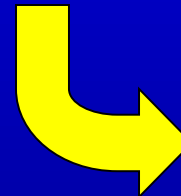
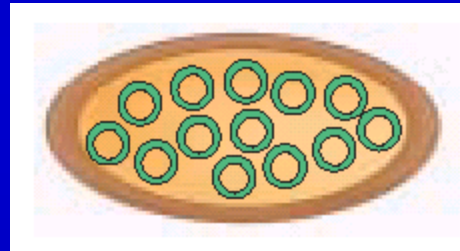
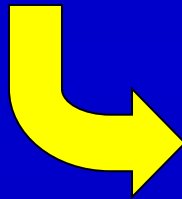
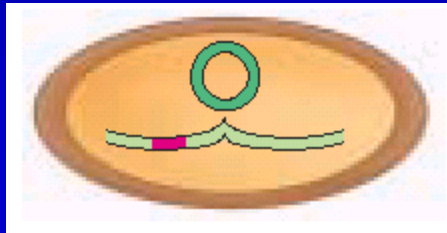
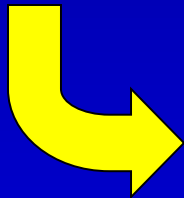
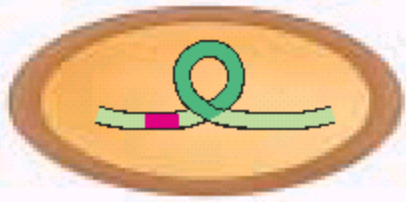
# TRASDUZIONE GENERALIZZATA



# TRASDUZIONE SPECIALIZZATA

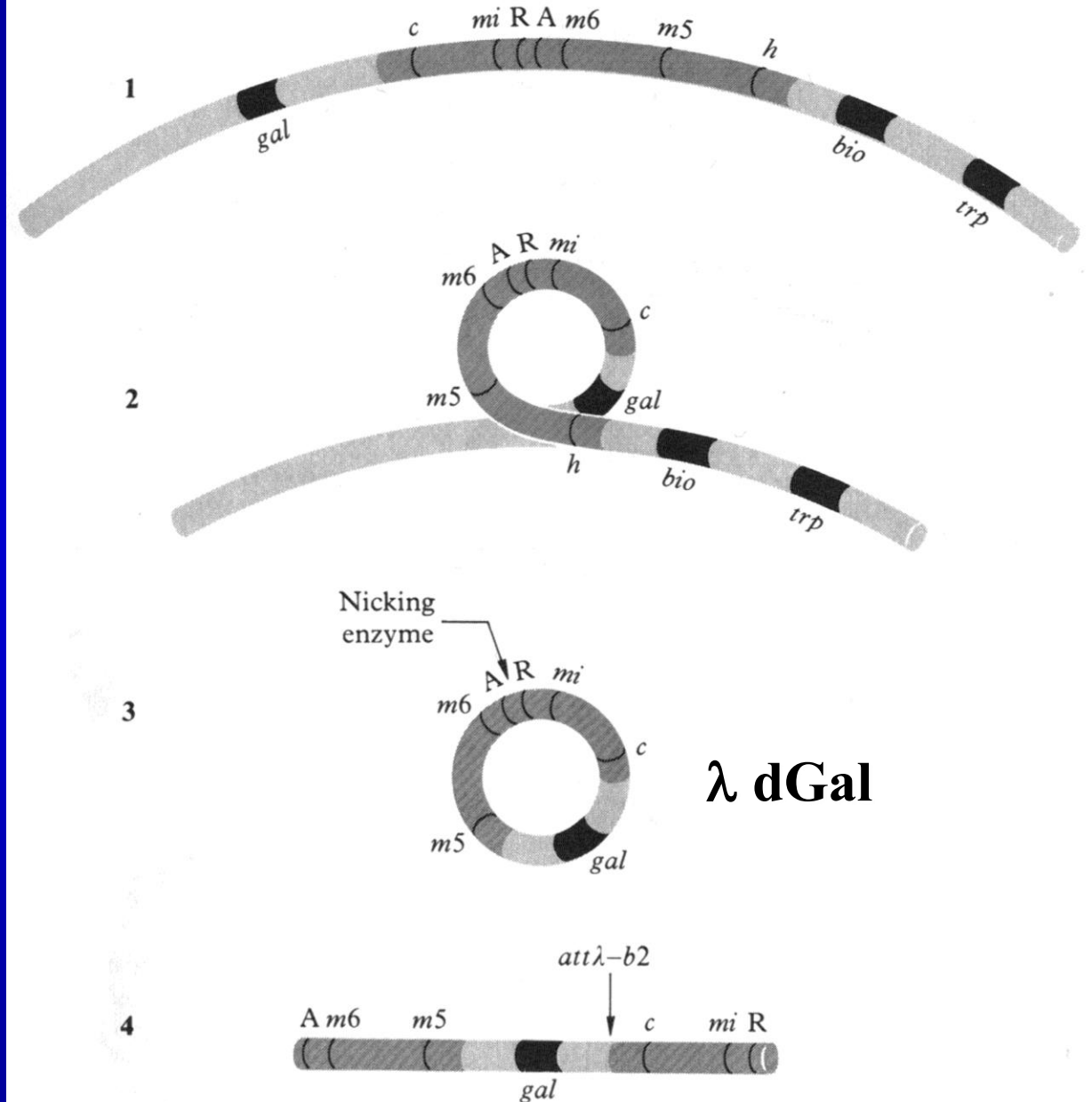


Evento normale:

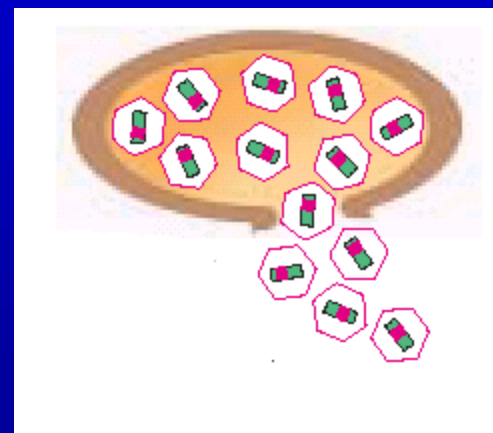
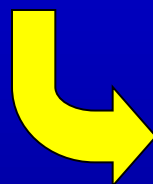
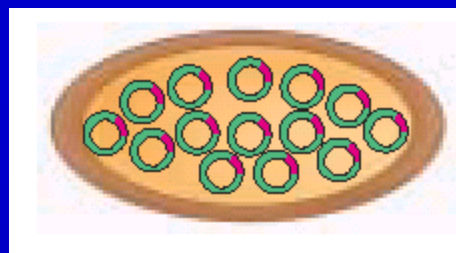
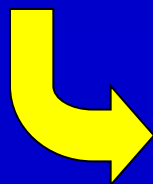
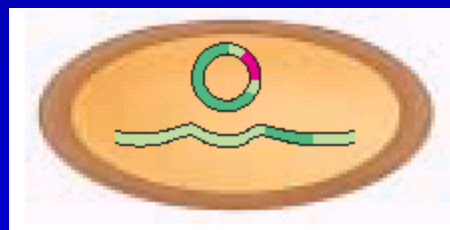
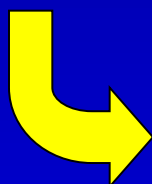
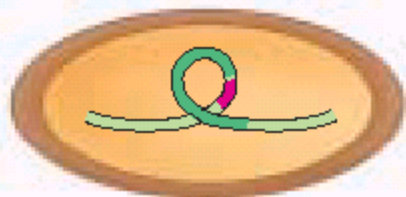




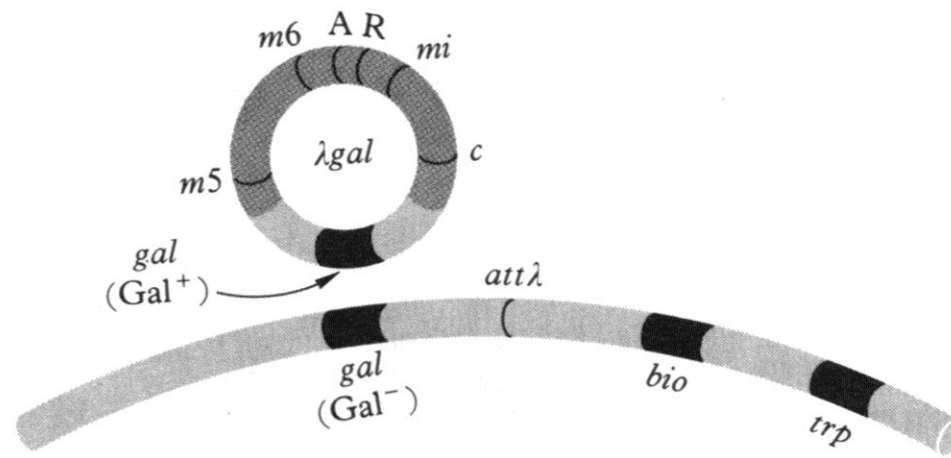
Con una frequenza di  $10^{-6}$  l'excisione del genoma di  $\lambda$  avviene in modo anomalo. Il risultato è che parte di tale genoma rimane nel cromosoma di *E.coli* e un piccolo frammento di questo entra a far parte di un genoma difettivo di  $\lambda$



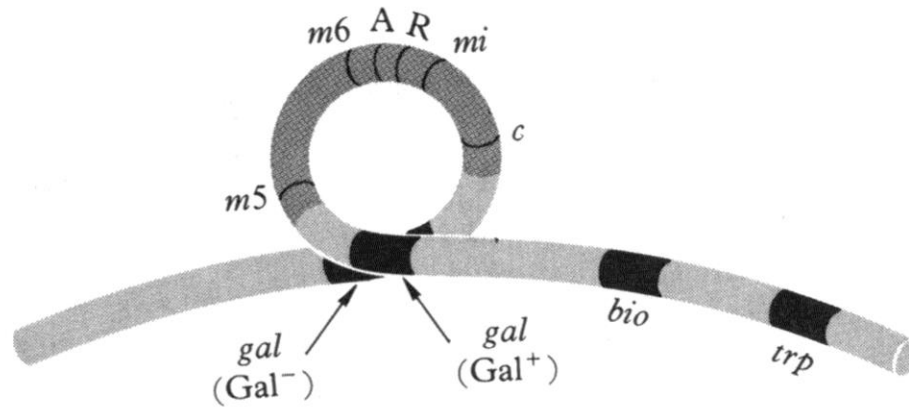
Evento raro:



1



2



3

