

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

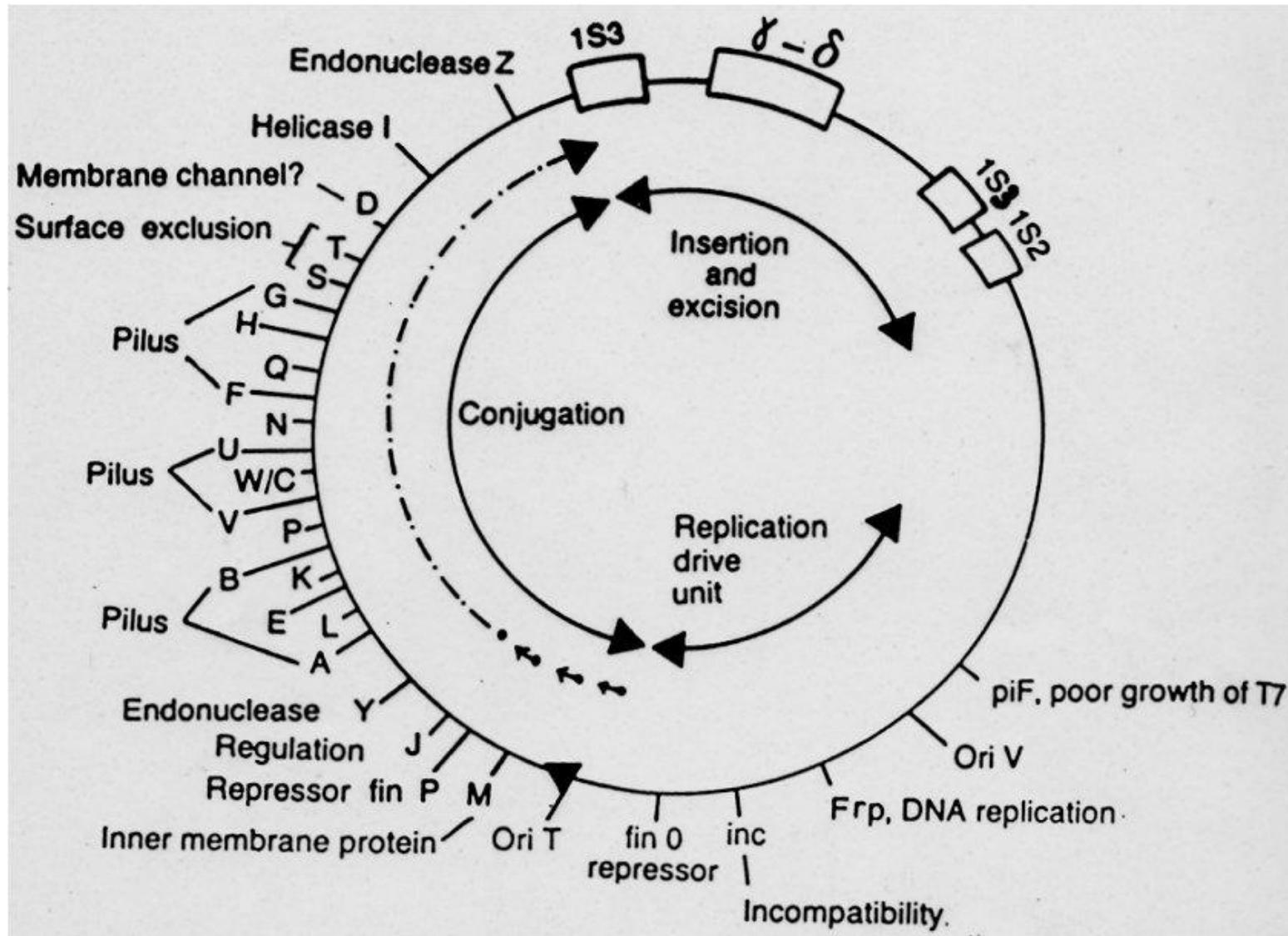
I geni vengono nell'insieme definiti geni TRA e si possono suddividere in:

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

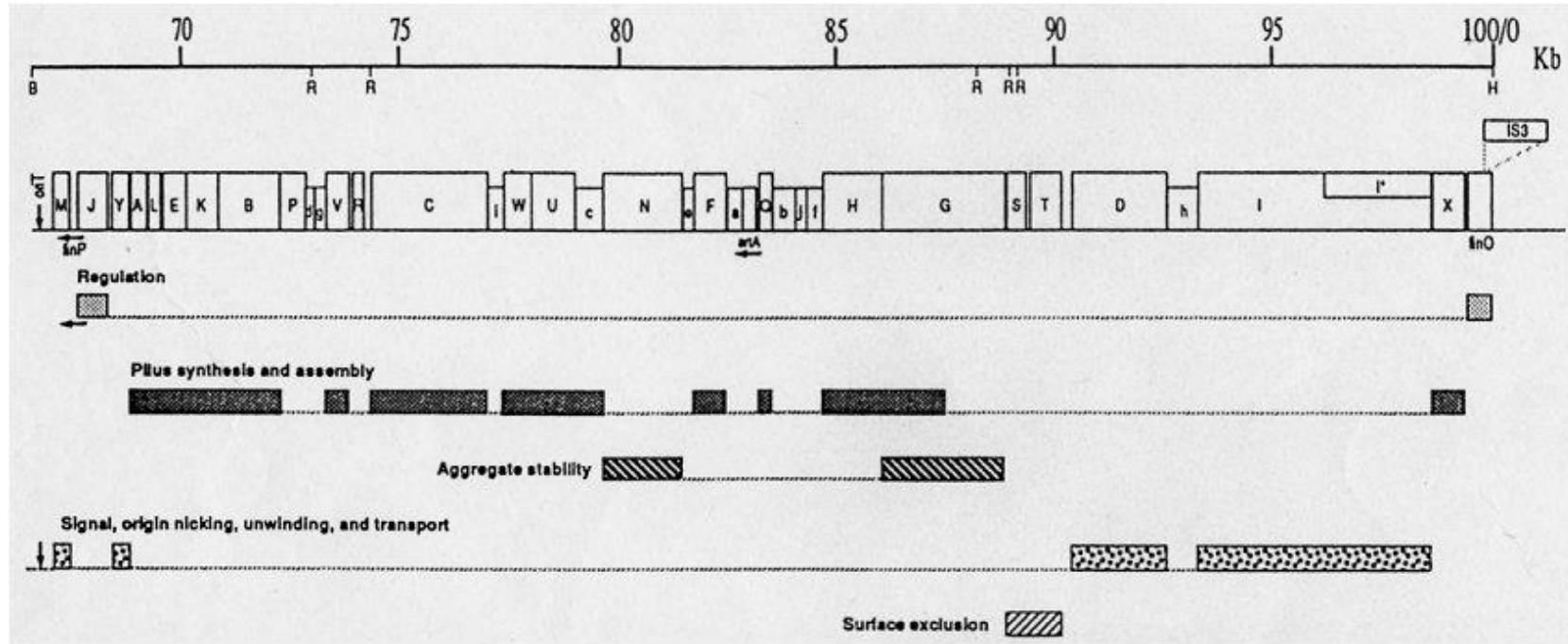
Mpf (Mating pair formation) che include i geni per la formazione del pilo e del canale di contatto tra le due cellule

Organizzazione del plasmide F:

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

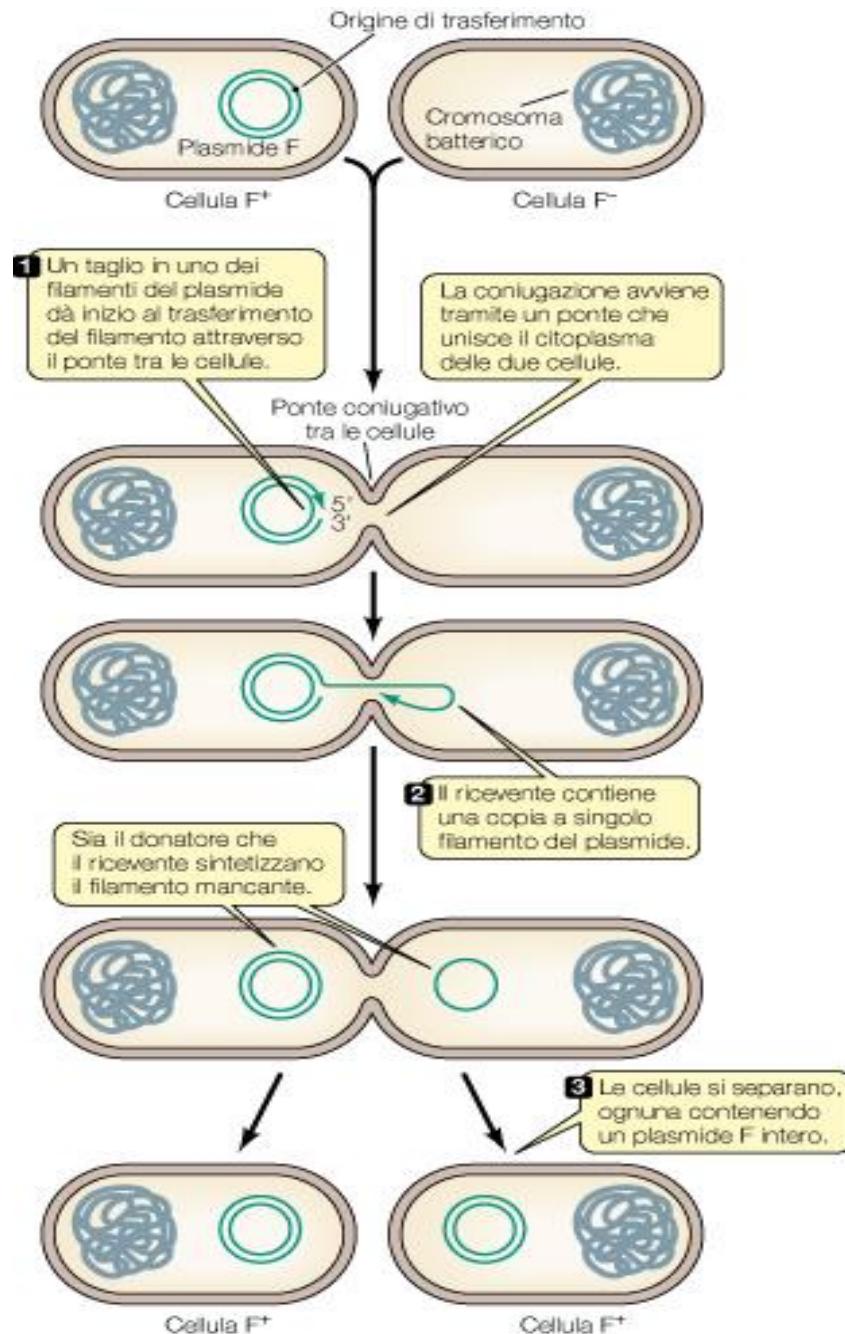


Organizzazione dei geni del pilo sul plasmide F



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 tubolare 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.

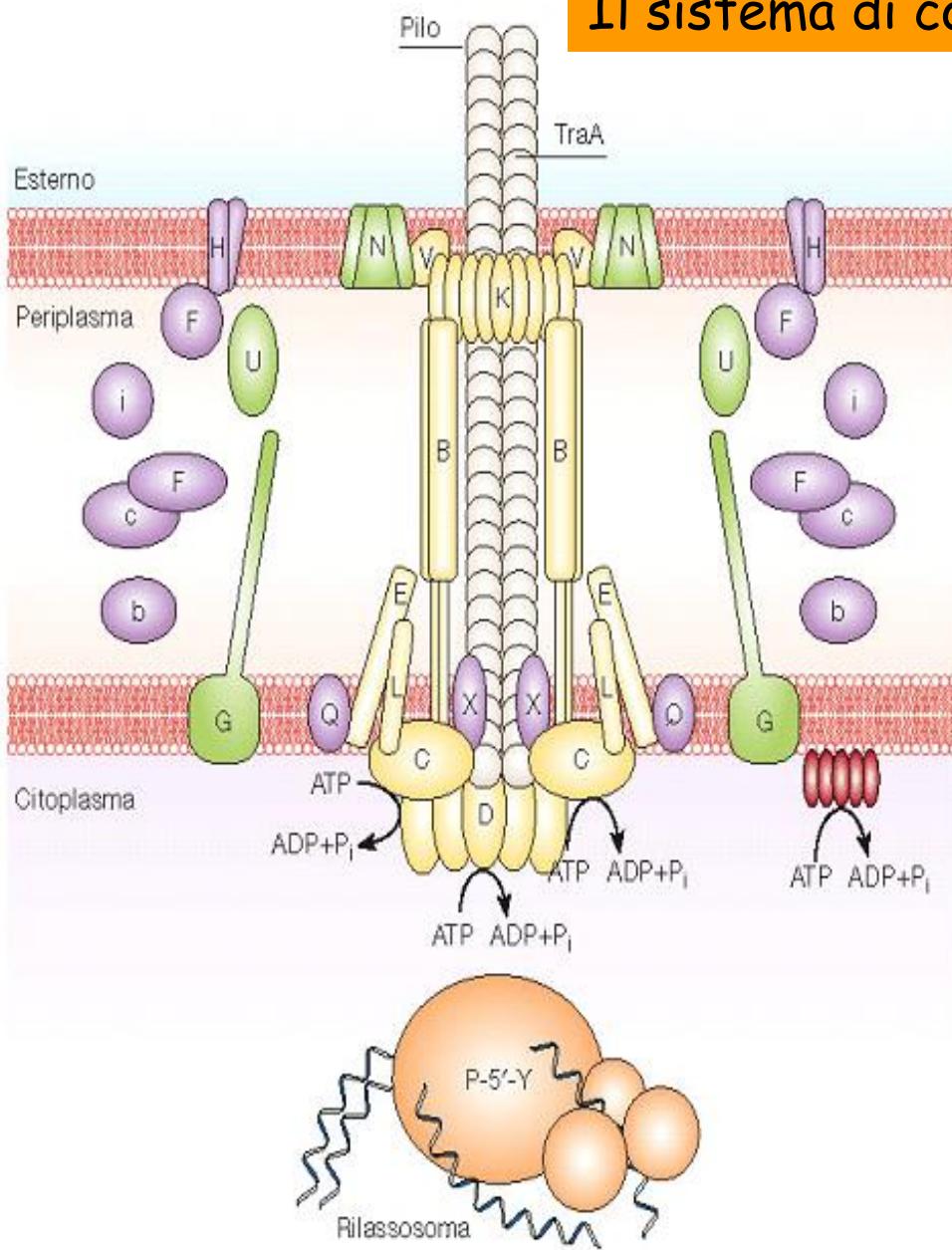
Questo DNA, nel caso più semplice, è costituito dal plasmide F

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



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

Il pilo è costituito dal ripetersi della proteina TraA che viene inserita nella IM dalla ciaperonina TraQ. Poi Tra A 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).

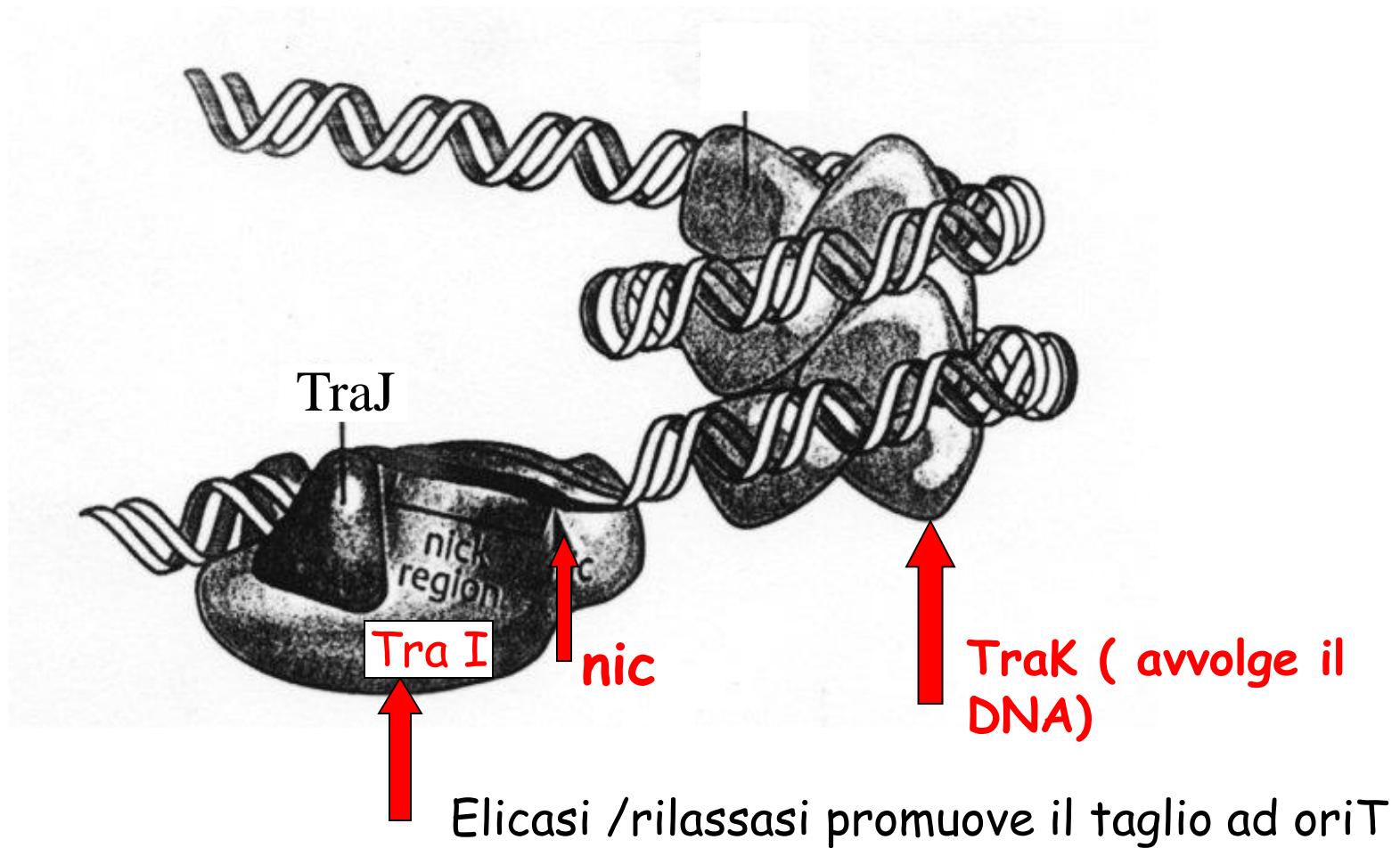
La relaxasi rimane legata al 5' del filamento e viene trasferita nella cellula recipiente con il DNA.

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

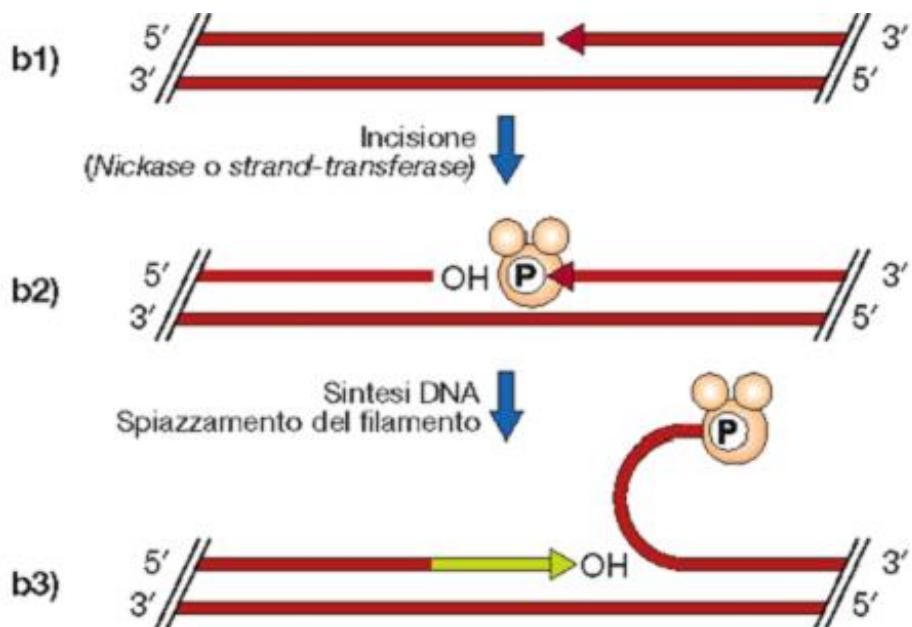
Formazione del taglio ad oriT

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

Rilassosoma

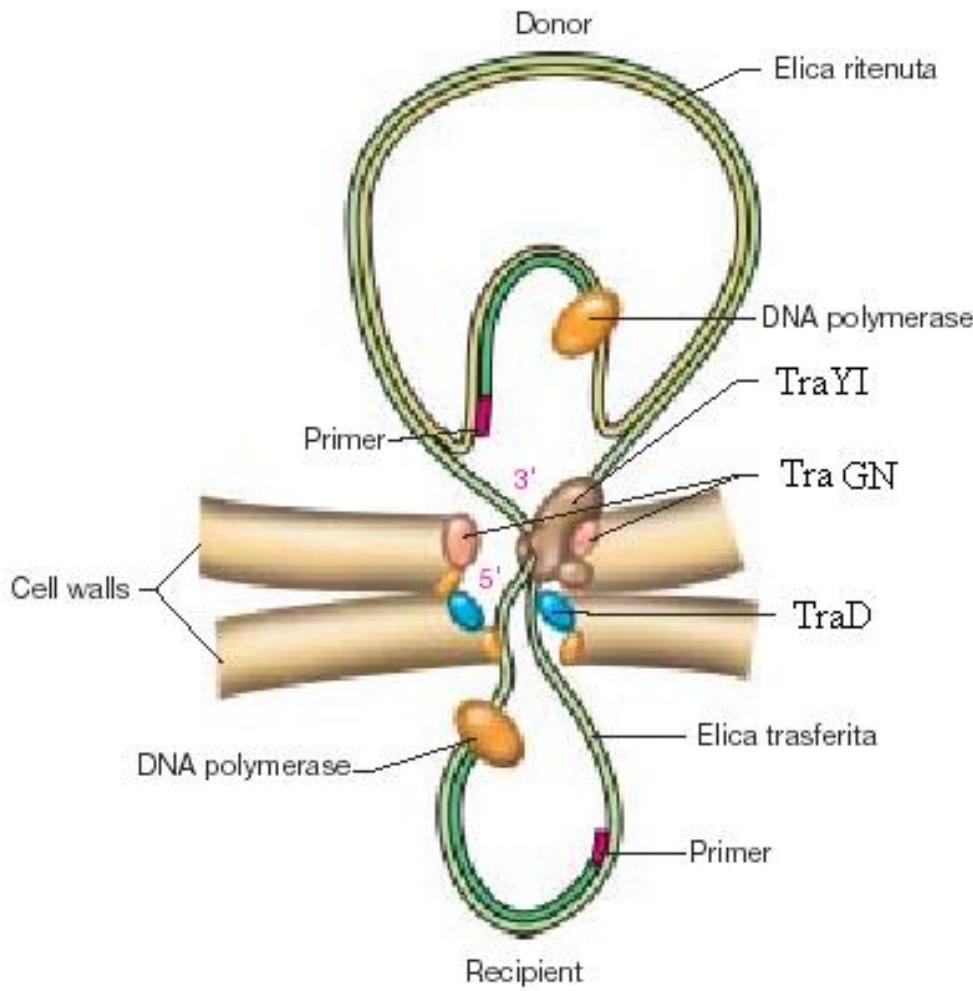


Dopo il taglio l'enzima TraI che è bifunzionale con funzione di Elicasi e Rilassasi a carico di due domini funzionali , oltre a processare il DNA legherà il 5' e promuoverà il trasferimento della singola elica nella cellula recipiente.



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



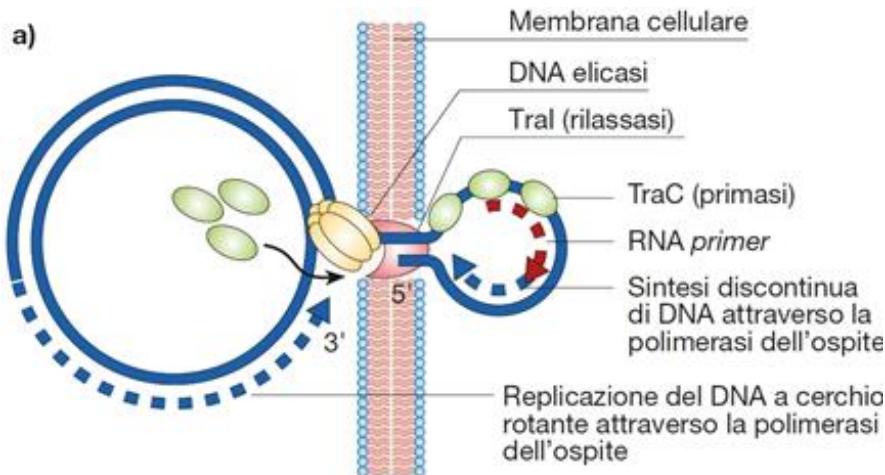
Il processo ha infatti inizio con il taglio, da parte di **TraI** del singolo filamento di DNA del plasmide F nella regione *oriT* (all'estremità della regione *tra*).

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

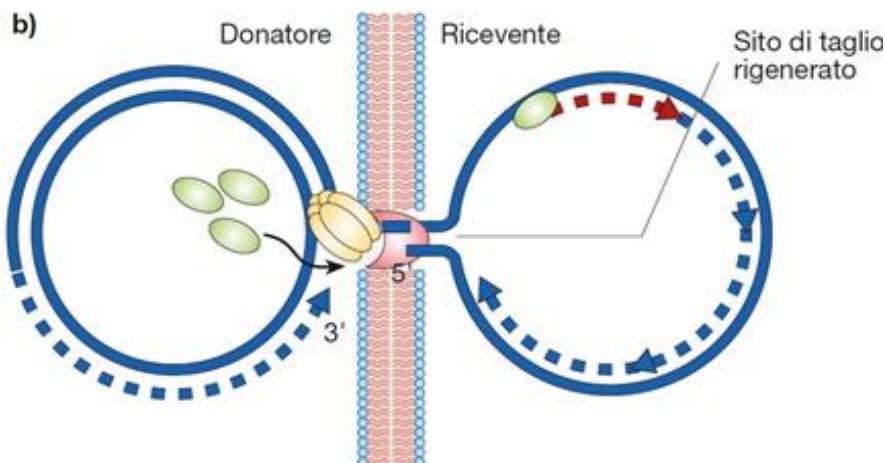
La relaxasi TraI può essere coadiuvata in alcuni plasmidi da un'altra proteina TraY (Complesso TraYI) come in questo esempio

Trasferimento di DNA nella cellula recipiente

a)



b)

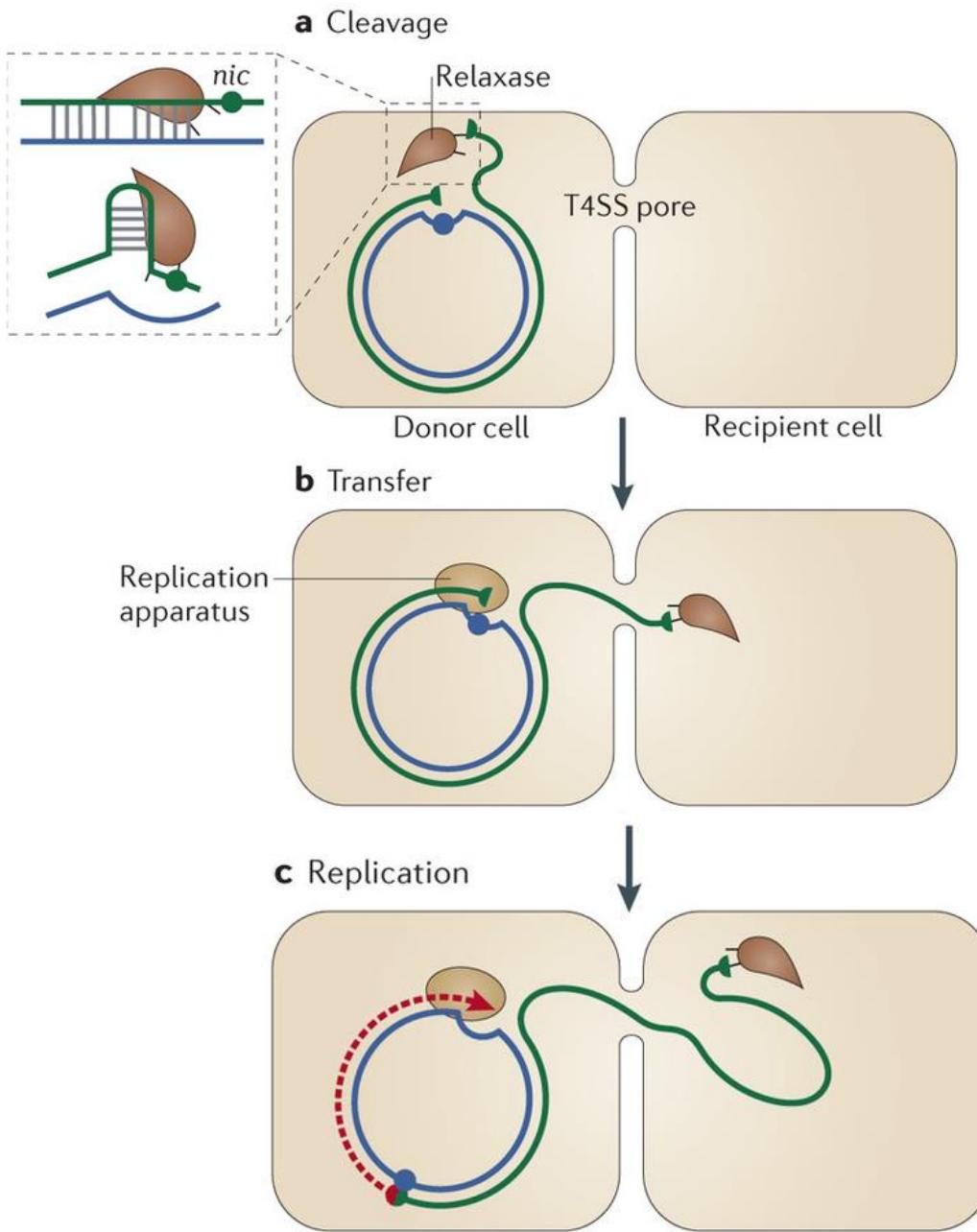


La rilassasi srotola il dsDNA e si muove in direzione 5-3 sul filamento tagliato che man mano si distacca dall'altro filamento.

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

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

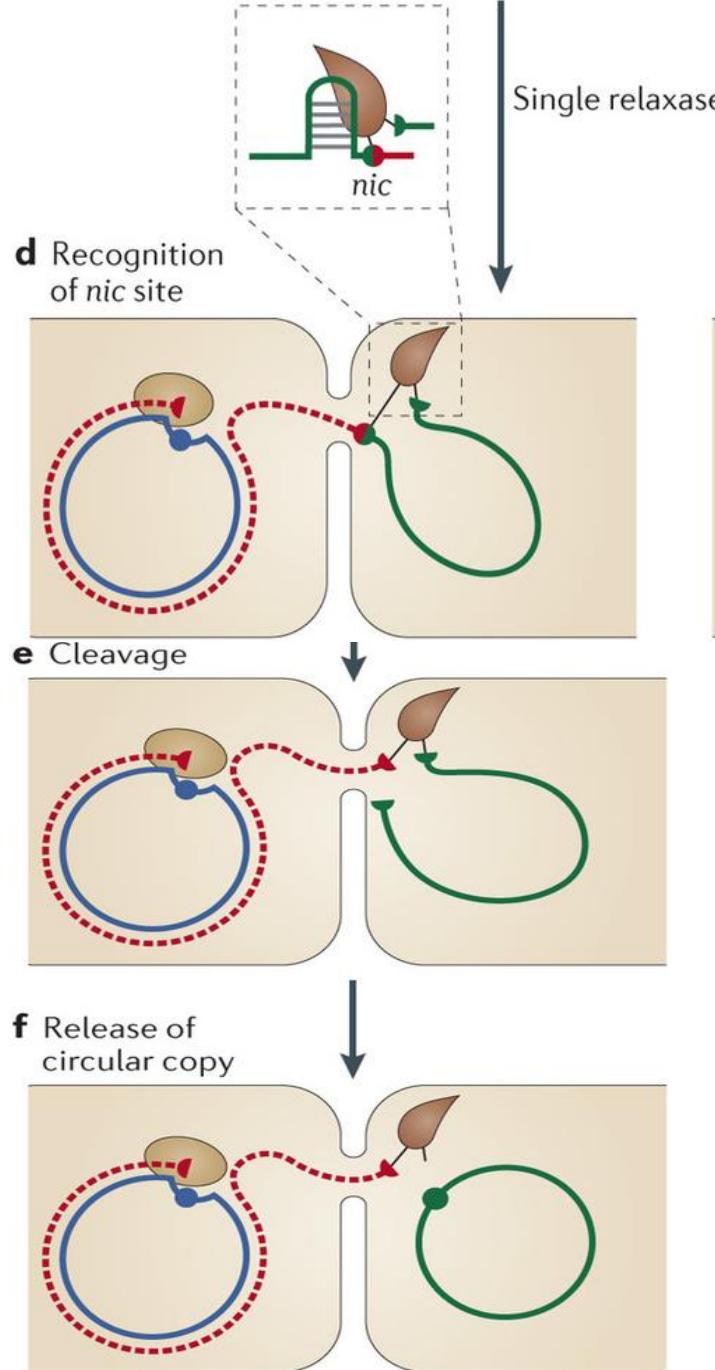
Nella cellula recipiente il frammento viene ricoperto da proteine SSB (Single Strand Binding) che lo proteggono dall'assalto delle nucleasi. Un volta completata la replicazione il vecchio sito oriT ed il nuovo coincideranno e saranno tagliati da TraI poi la DNA ligasi chiuderà covalentemente il DNA dei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

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

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

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.

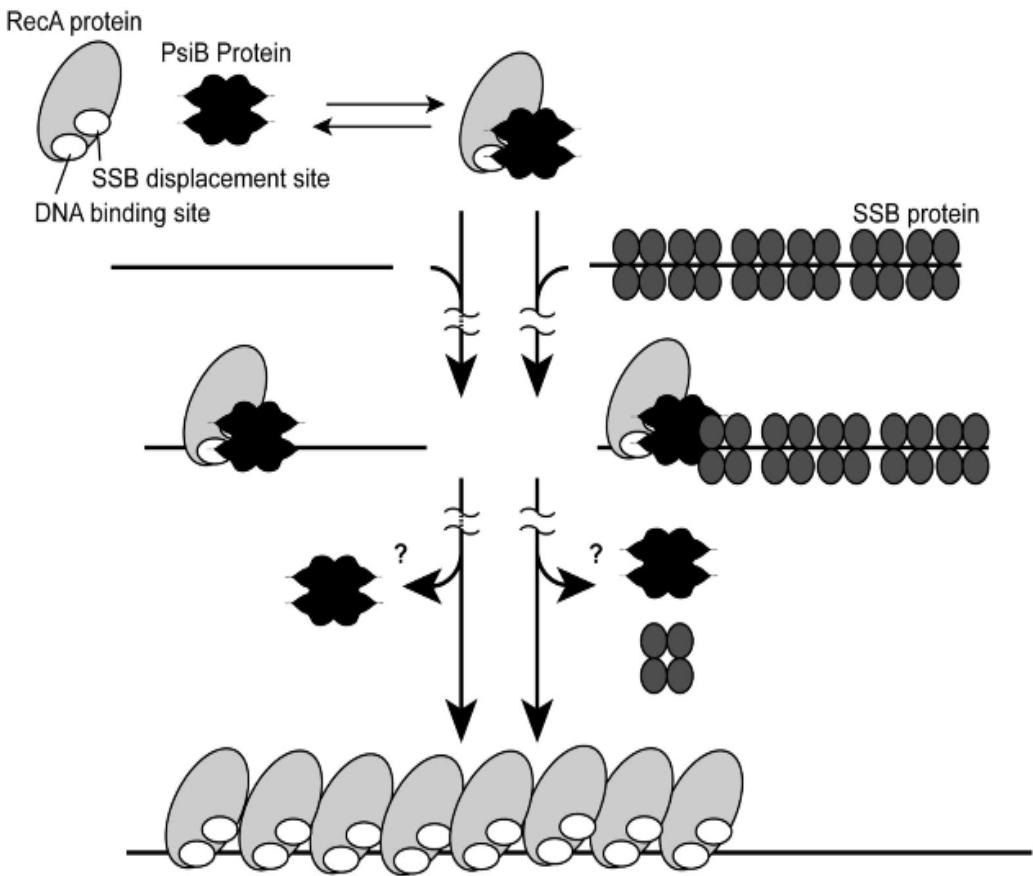
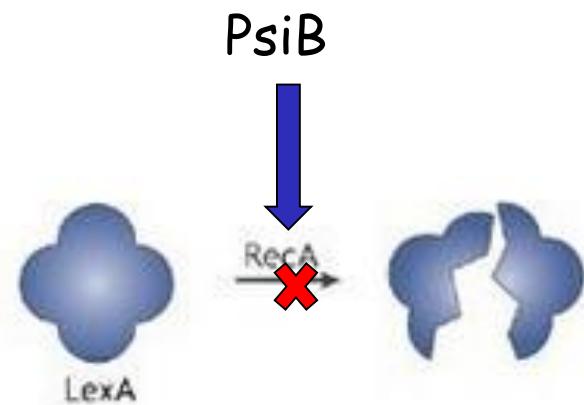


Figure 7. Proposed mechanism of PsiB activity

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 is 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.

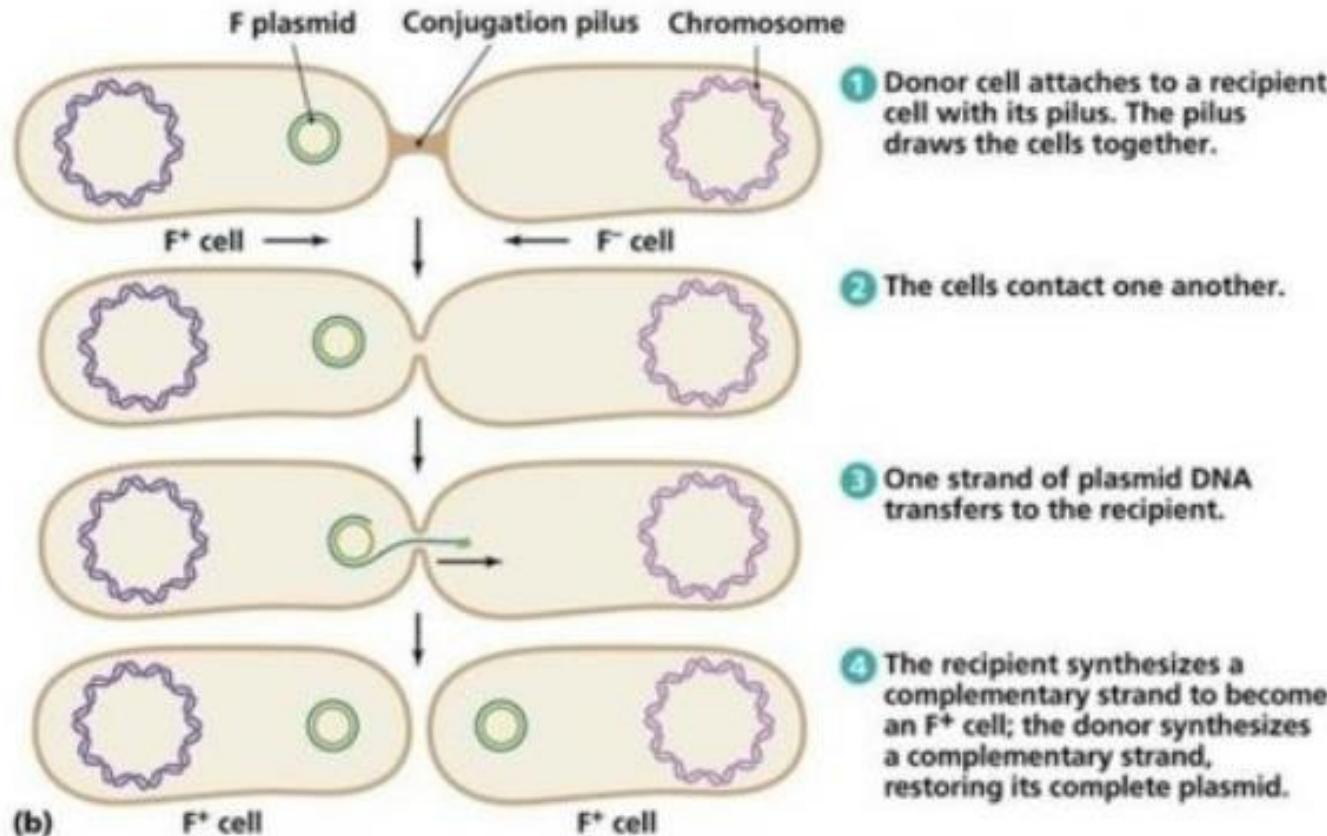
Come funziona PsiB?

- 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

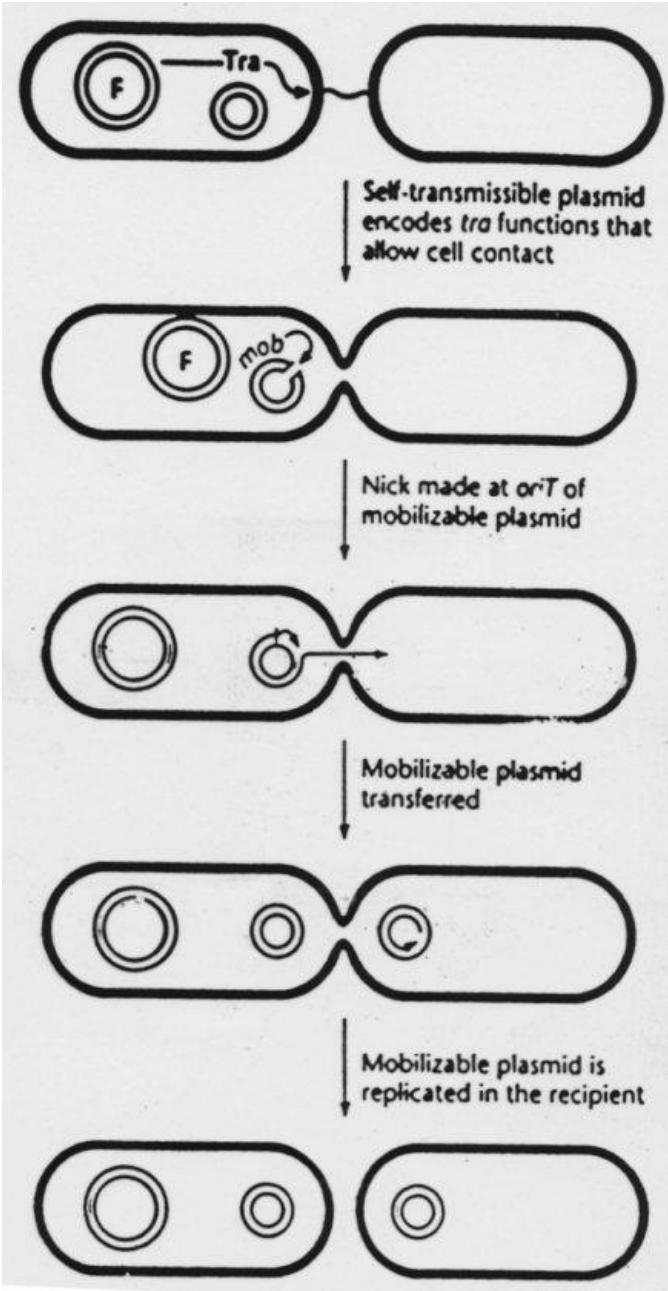


Processo di coniugazione tra cellula F⁺ e F⁻

Il plasmide F⁺ verrà trasferito ad alta efficienza alle cellule F⁻



Il risultato sarà quindi una popolazione di cellule F⁺



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.