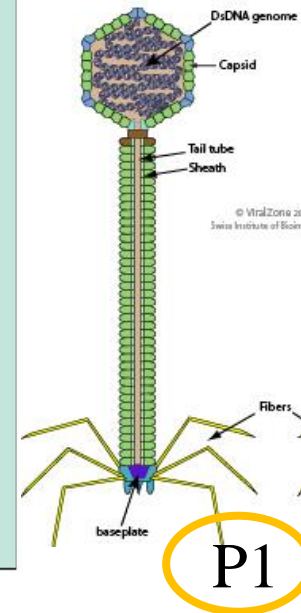
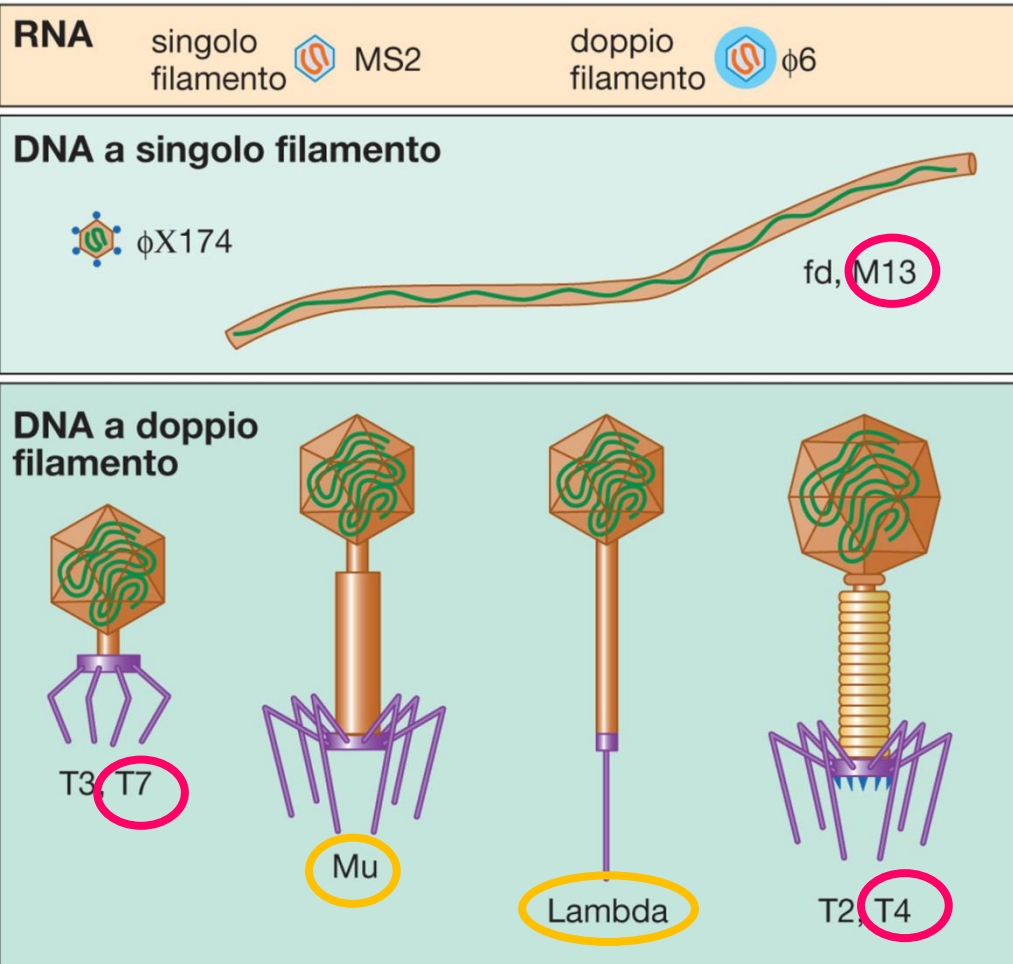
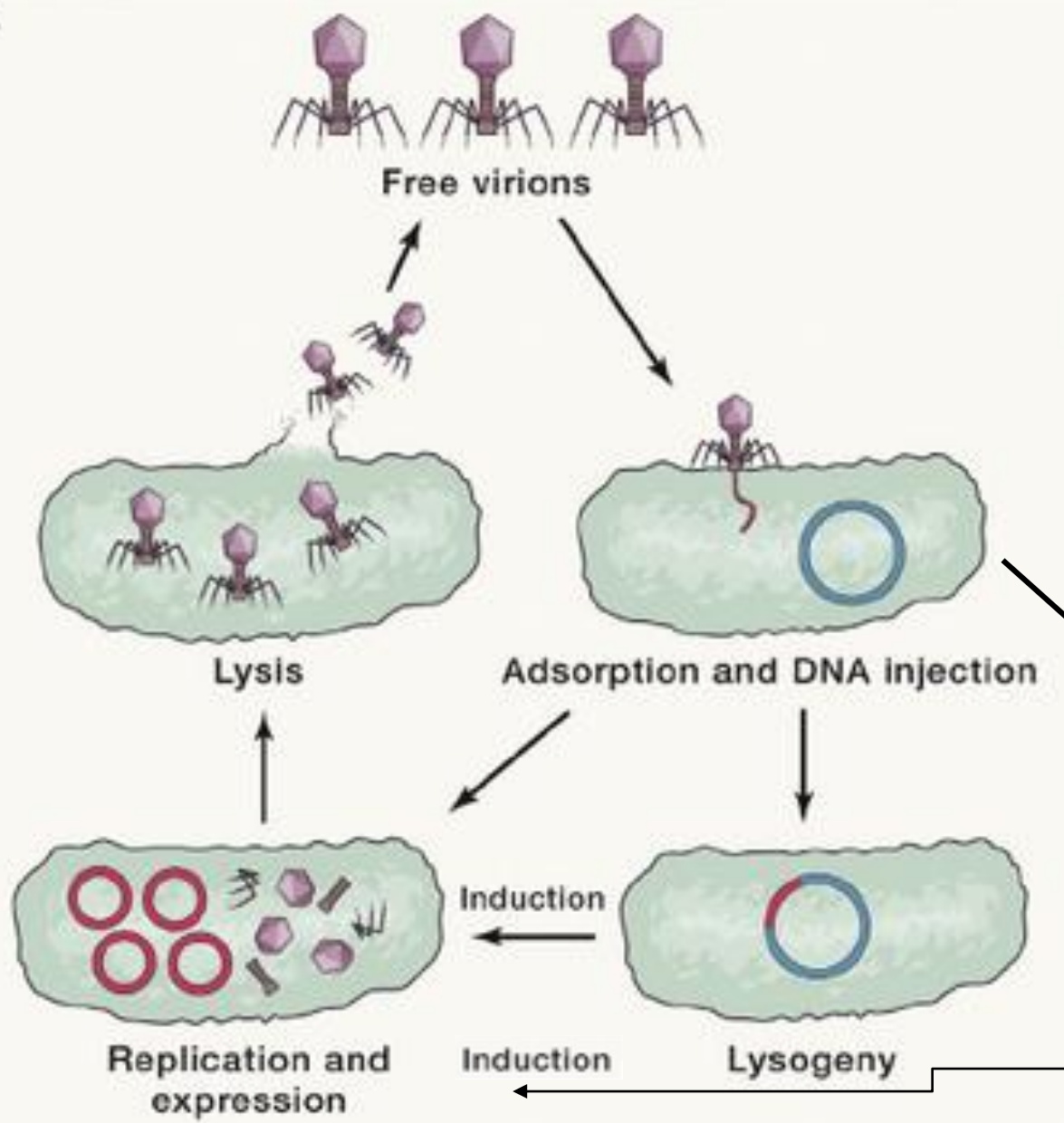


# Struttura di alcuni batteriofagi modello

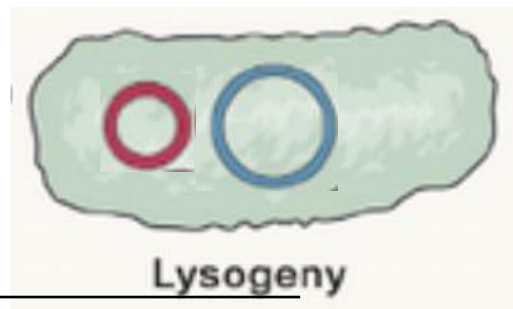
I batteriofagi temperati MU, lambda e P1 effettuano il ciclo litico e lisogenico. Nel caso del ciclo lisogenico: MU e lambda si integrano nel cromosoma mentre P1 rimane citoplasmatico



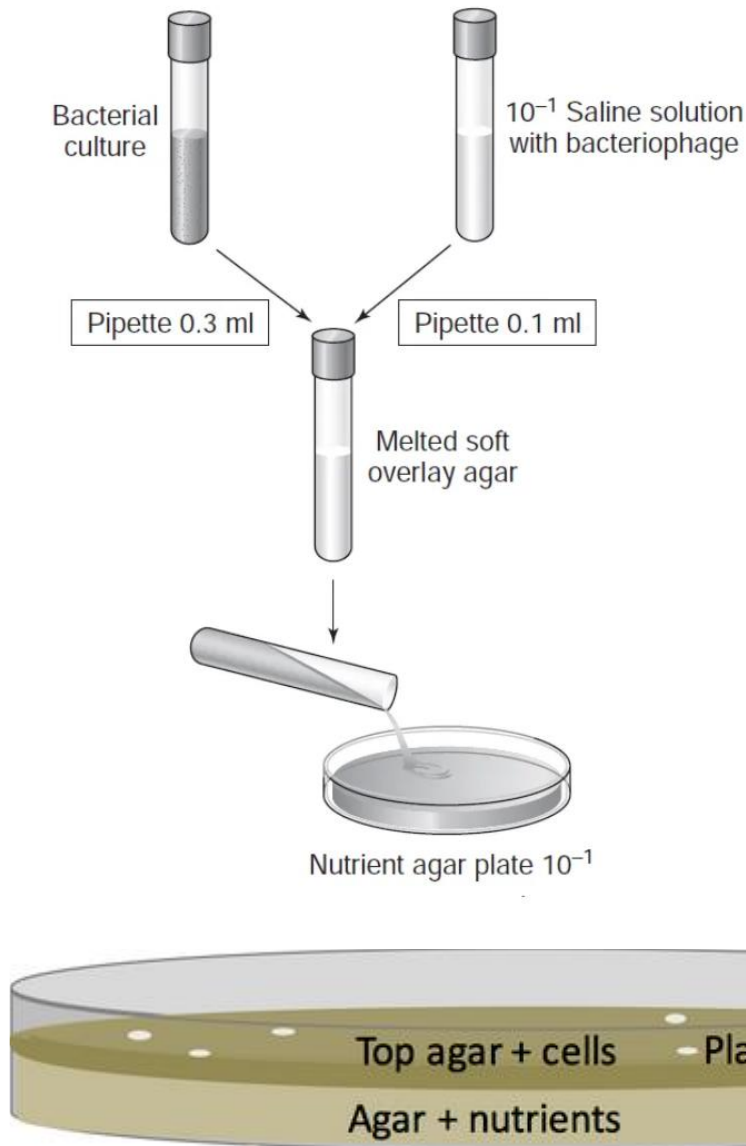
A



Alcuni batteriofagi temperati si integrano nel cromosoma della cellula ospite, altri invece rimangono ad uno stadio citoplasmatico tipo plasmidi



### Overlaying Plate with Phage-Agar Mixture

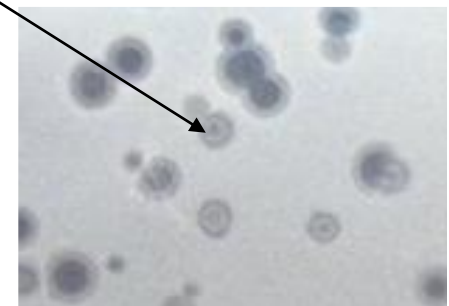


Un fago temperato da origine a placche torbide costituite da batteri lisogeni e batteri lisati

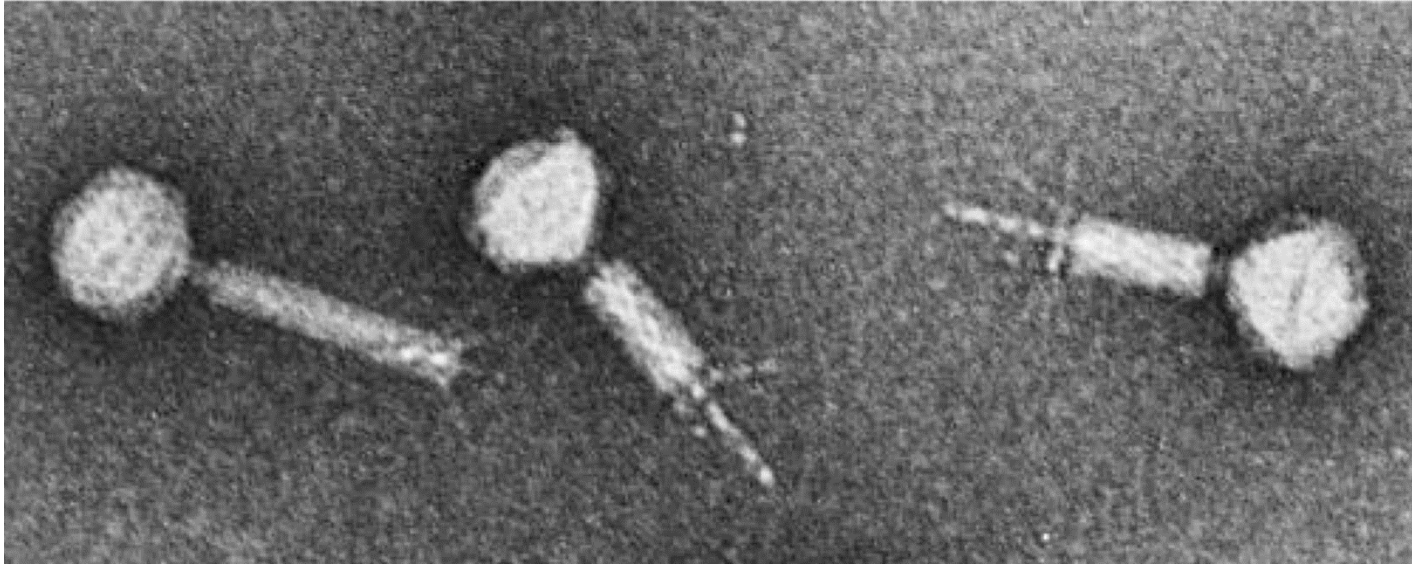
Un fago virulento da origine a placche chiare (clear).

Nei fagi temperati i geni che codificano per il repressore del ciclo litico o geni correlati si chiamano  $c$  ( $cI, cII$  etc) perché i loro mutanti danno origine a placche clear non potendo più avere un ciclo lisogeno

Placca torbida da fago lisogeno



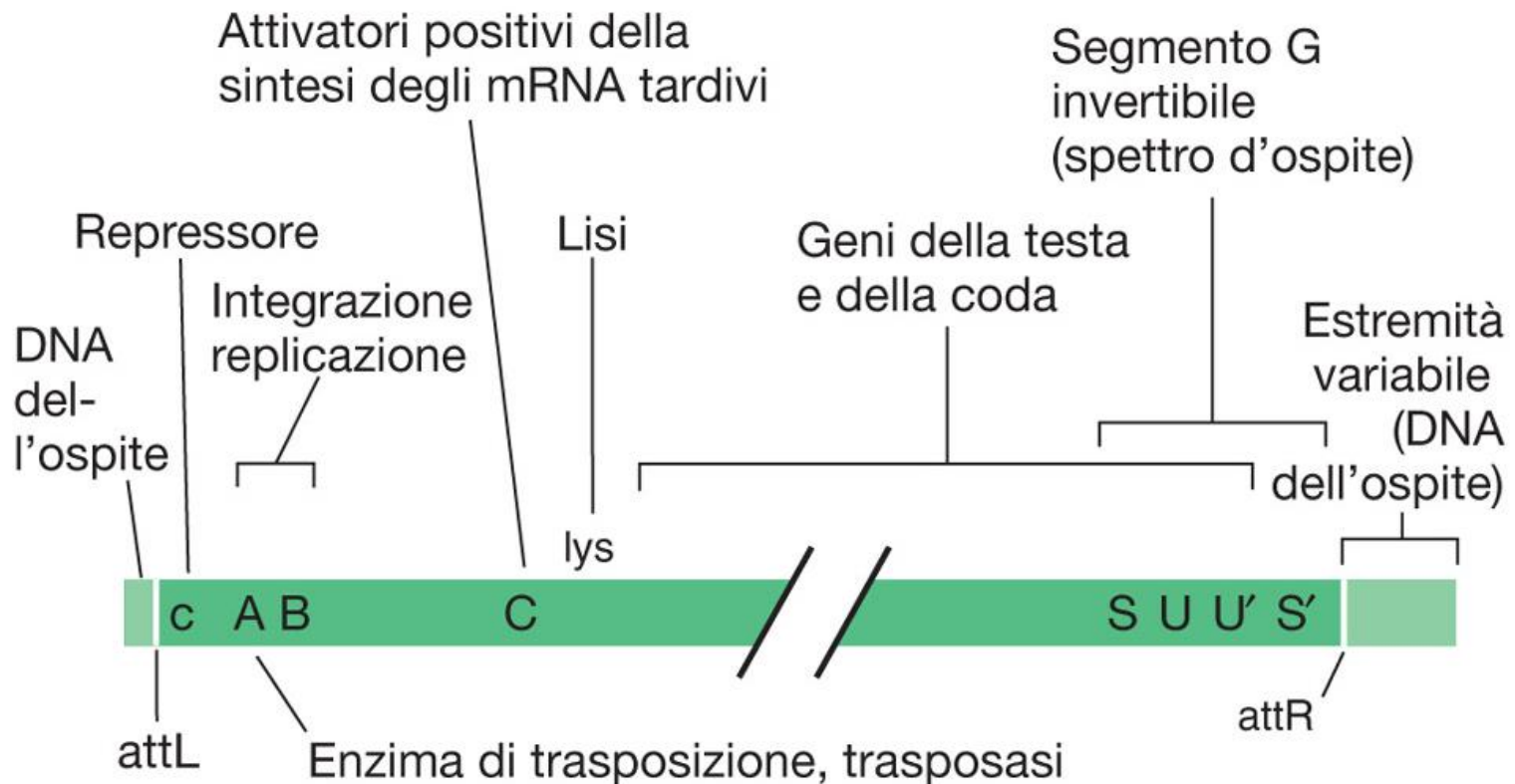
MU il fago-trasposone che si integra sempre.

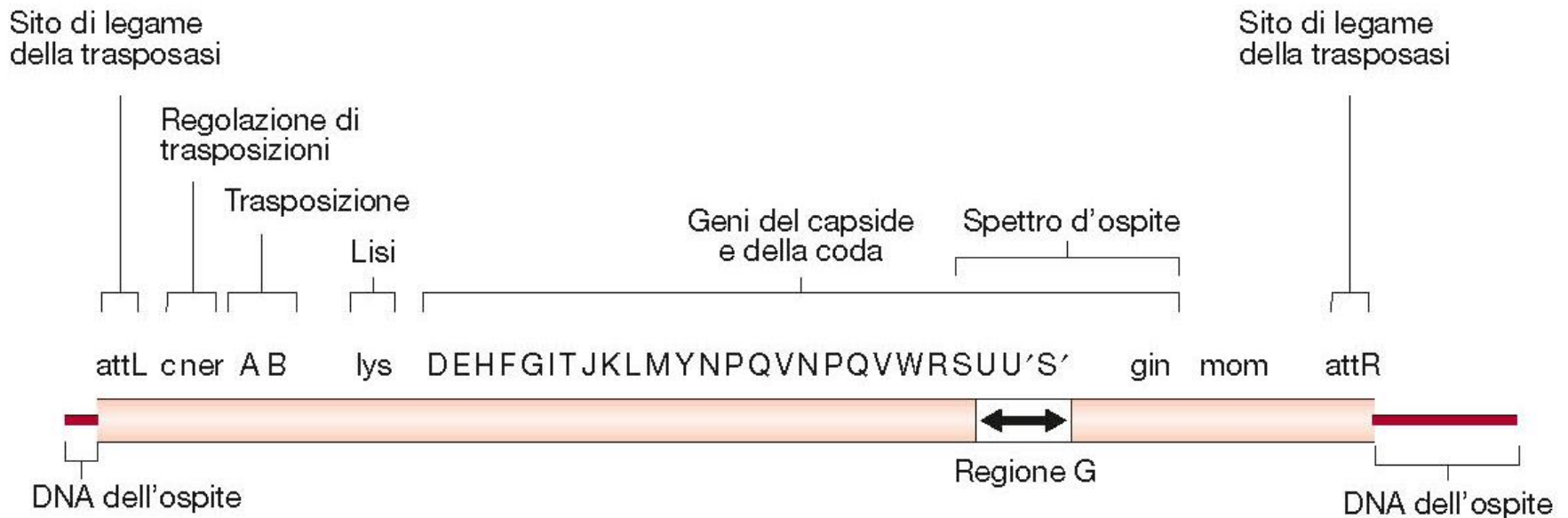


Il DNA del fago Mu si integra in qualunque sito del genoma dell'ospite come i trasposoni. Allo stato lisogeno determina quindi l'inattivazione nel gene in cui si è inserito

# Struttura di un fago temperato il fago MU

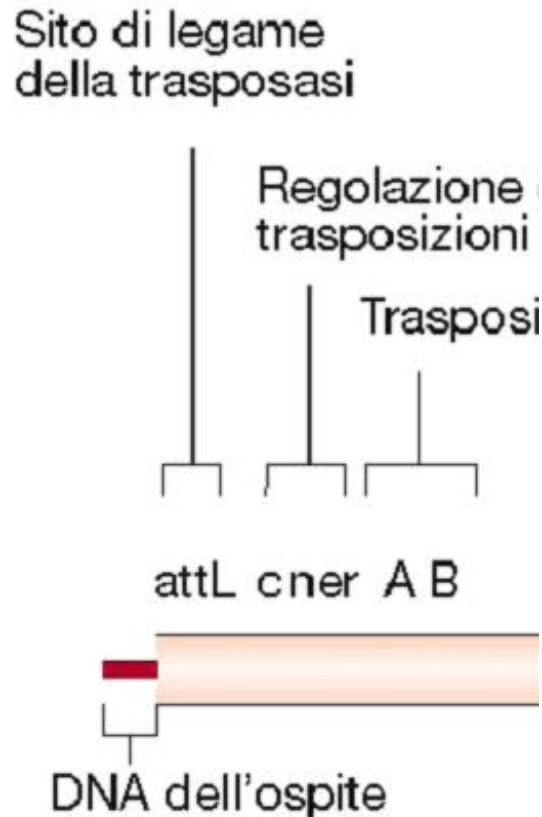
Fago a DNA a doppia elica 39 kb  
le estremità contengono DNA dell'ospite (circa 50-150 bp) a sinistra e 1-2 kb a destra





All'interno del fago MU si può riconoscere un modulo trasposon caratterizzato dal gene A che codifica per la trasposasi, il gene B che codifica per una DNA binding protein (ATP-dipendente) richiesta per un'efficiente trasposizione e le due sequenze Mu-att che sono i bersagli della trasposasi. Il sito Mu-attR è separato da circa 30Kb dal resto del modulo trasposone.

## I repressori del ciclo litico di MU

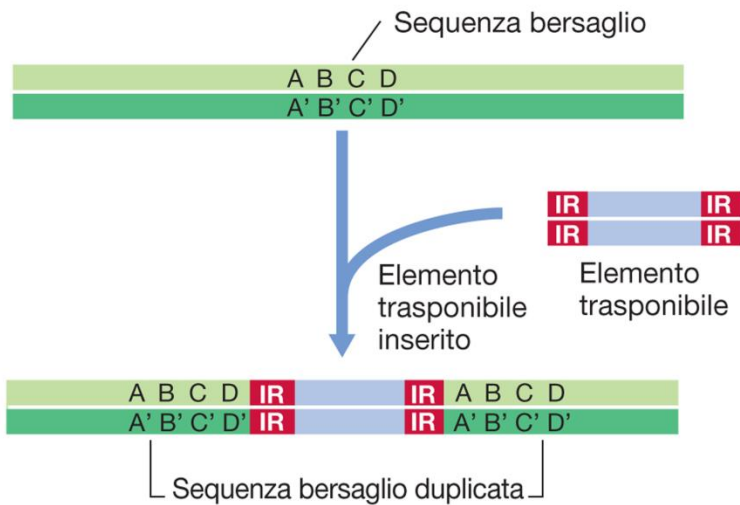


All'interno del modulo traspositivo ci sono due regolatori **C** e **Ner** che sono essenziali per la trasposizione

**C** codifica per il repressore richiesto per il mantenimento dello stato lisogenico .

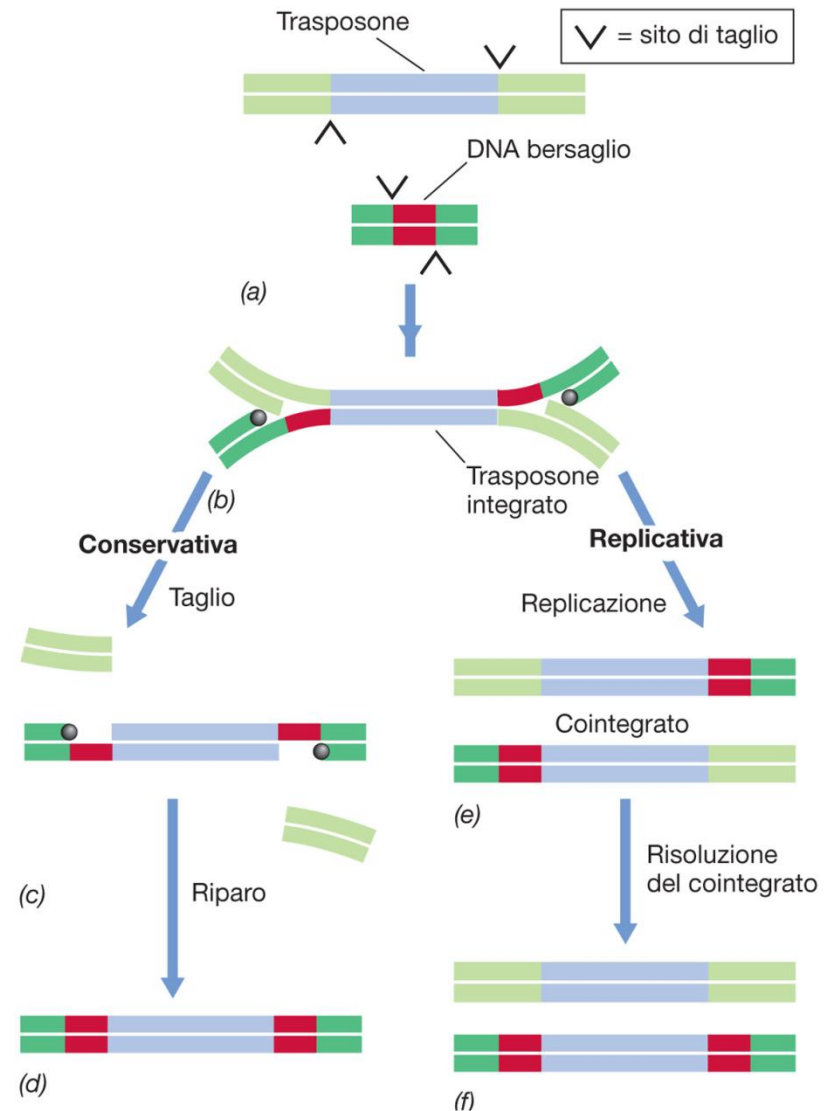
**C** reprime i geni per la trasposasi e compete con la trasposasi per i siti Mu-att

**Ner** controlla negativamente la trascrizione dei geni necessari per lo sviluppo del fago.



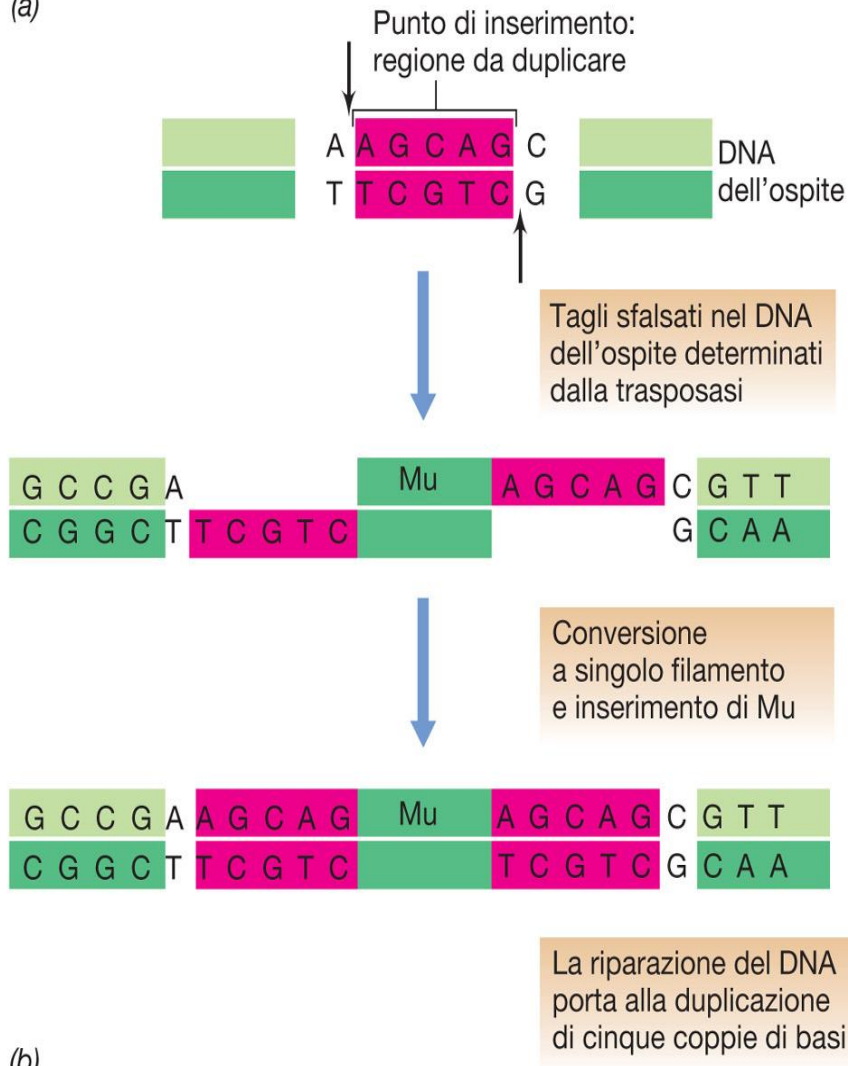
**MU è un fago/trasposone.**

Una volta iniettato il DNA di MU si integra con un meccanismo di trasposizione conservativa mentre durante l'infezione litica si moltiplica con un meccanismo di trasposizione replicativa sempre all'interno del cromosoma



# Integrazione del fago Mu nel cromosoma

(a)



(b)

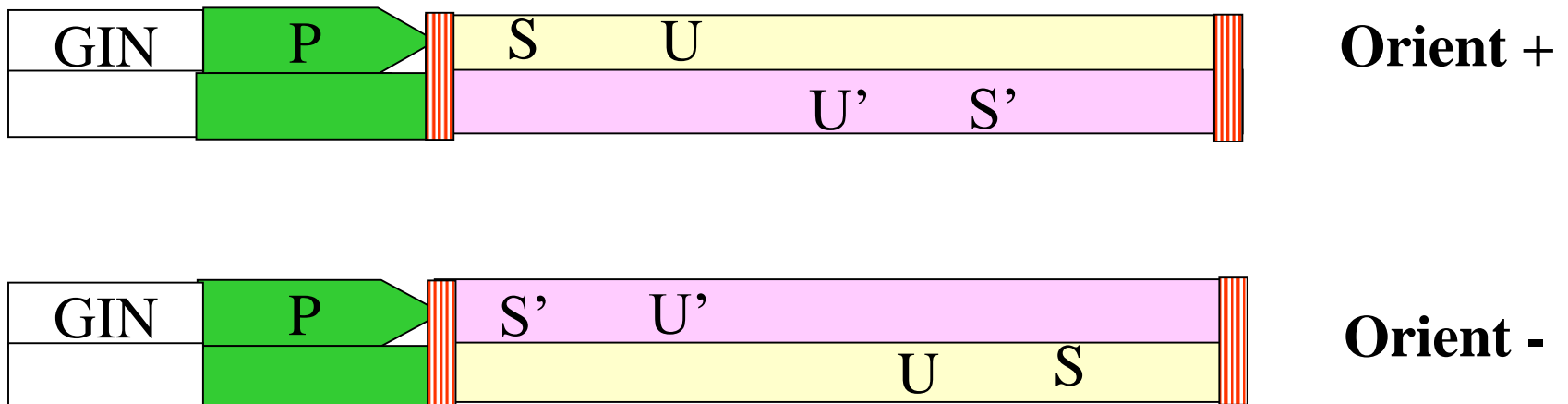
**Sia per il ciclo litico che per il ciclo lisogenico il fago MU si integra nel cromosoma.**

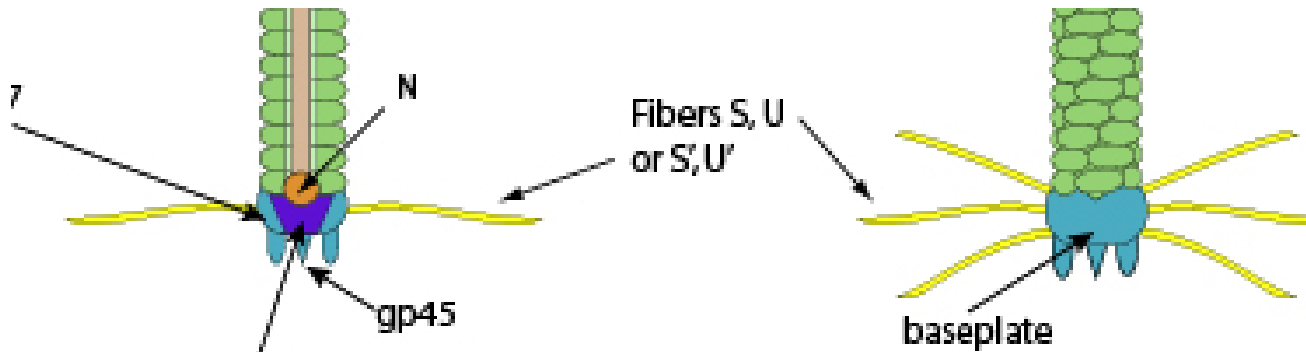
- L'integrazione è mediata dalla trasposasi sintetizzata dal fago
- avviene un taglio sfalsato nel Dna dell'ospite
- in seguito all'integrazione del fago la polimerasi dell'ospite replica i tratti a DNA SS generando così duplicazioni direttamente ripetute all'estremità del fago ( 5 bp).

Un altro esempio di ricombinazione sito -specifica mediata dall'invertasi GIN ( simile al flip-flop dei geni per la flagellina)

Il fago MU ha la potenzialità di codificare 2 tipi di fibre caudali SU oppure S'U' a seconda che il frammento che contiene questi geni ( frammento G ) si trovi nell'orientamento + o -

Dal momento che le fibre caudali servono per il riconoscimento di proteine o macromolecole situate sulla parete cellulare del batterio ospite se il frammento G si trova nell'orientamento + il fago Mu potrà infettare *E.coli* K12 se si trova nell'orientamento - potrà infettare altri enterobatteri.



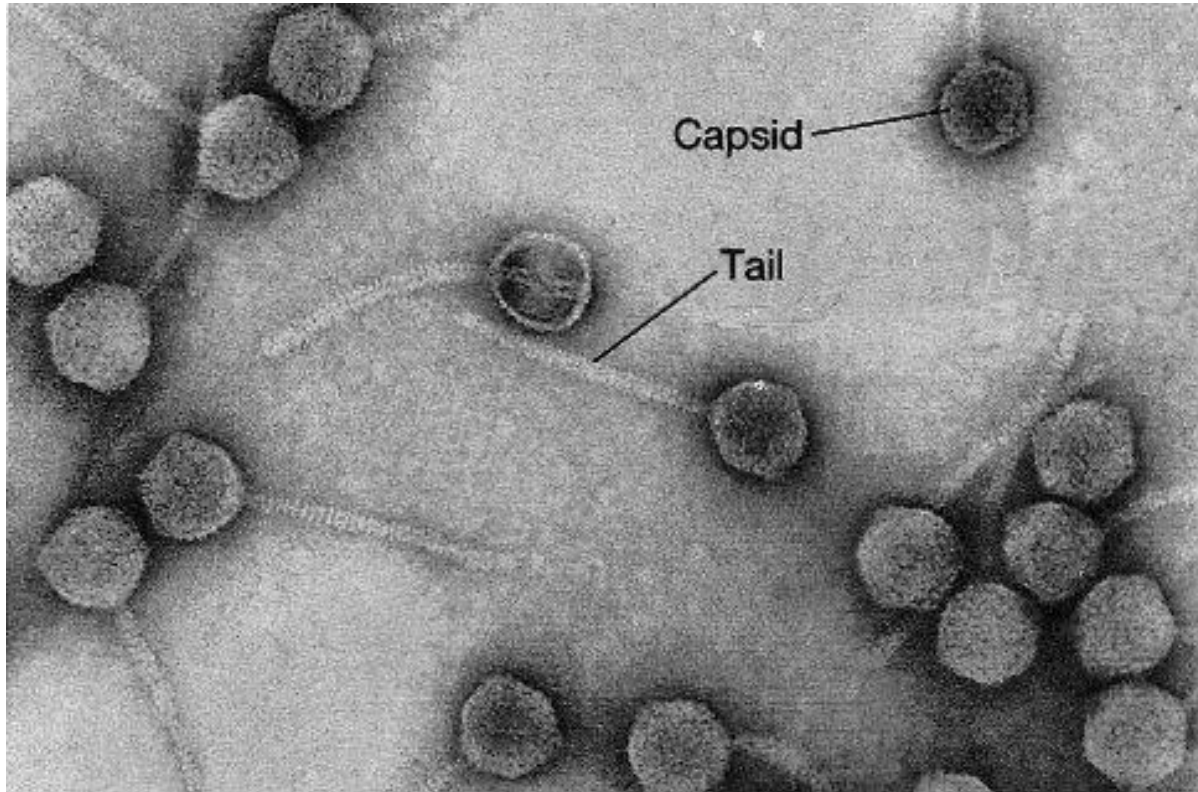


L'inversione del frammento *G* è mediata dalla proteina MU-specifica **Gin** che agendo su delle brevi sequenze omologhe situate all'estremità del segmento *G* permette l'inversione del frammento.

Si tratta di un meccanismo di ricombinazione **sito specifica** ( o illegittima) che richiede una proteina specifica (**Gin**) che agisce su sequenze localizzate nelle adiacenze del gene *gin*. Non è richiesto il sistema di ricombinazione dell'ospite.

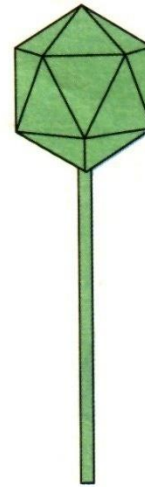
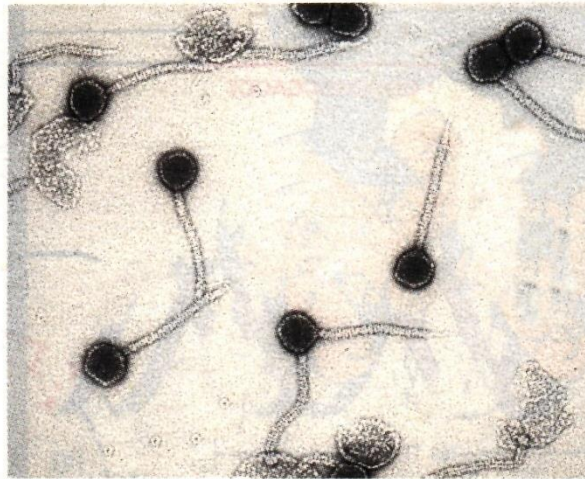
Il meccanismo è analogo a quello dell'inversione di fase dei geni del flagellina in *Salmonella* ( flip-flop in *Salmonella*)

## Struttura del batteriofago lambda : Modello di fago temperato



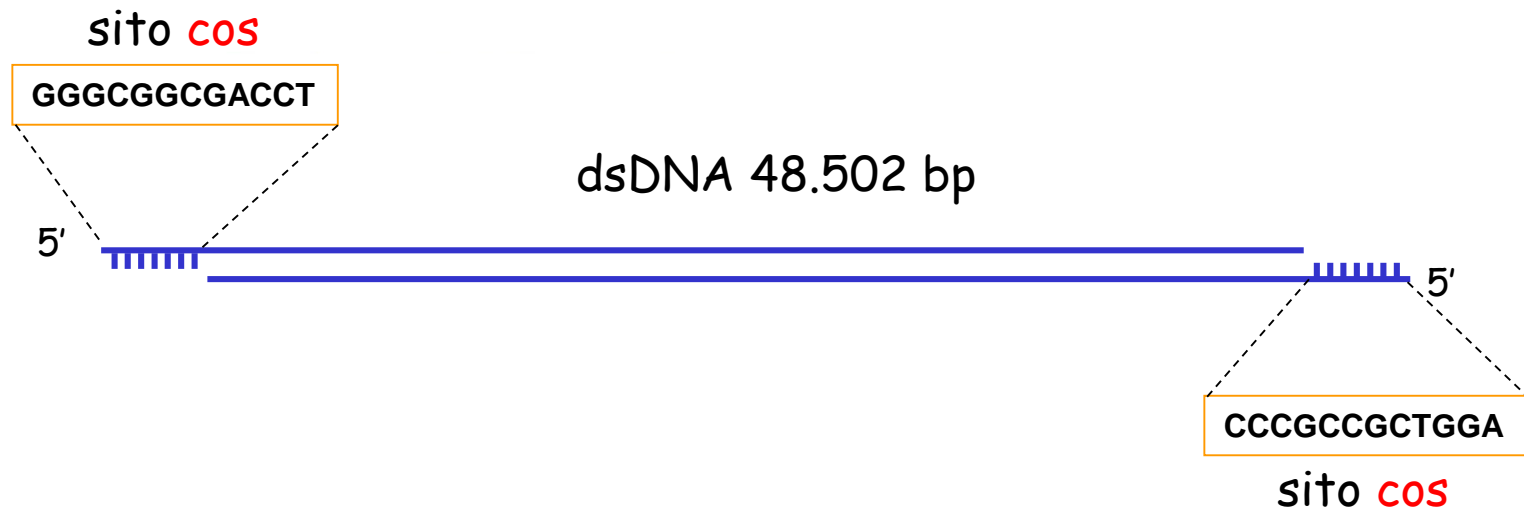
Fago temperato può dar origine ad un ciclo lisogenico oltre che al classico ciclo litico

# Il batteriofago lambda

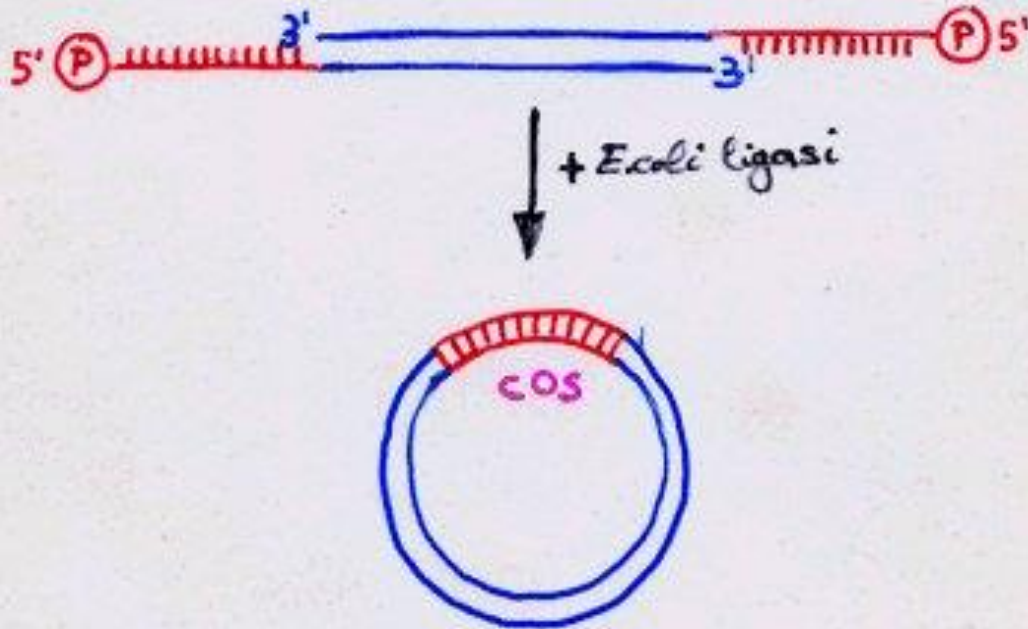


testa icosaedrica  
64 nm

coda non contrattile  
150 nm



In seguito all'infezione di un batterio sensibile, il fago lambda inietta il suo DNA lineare che circolarizza all'interno del batterio grazie alle sequenze complementari dell'estremità (siti cos).

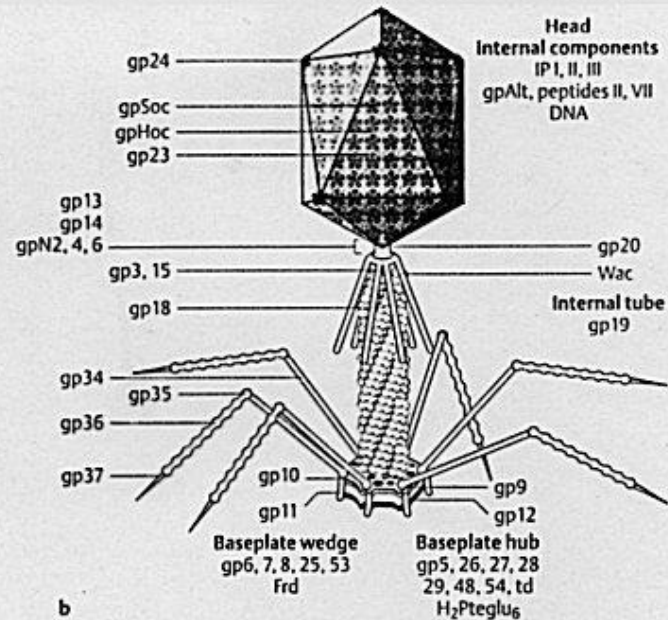
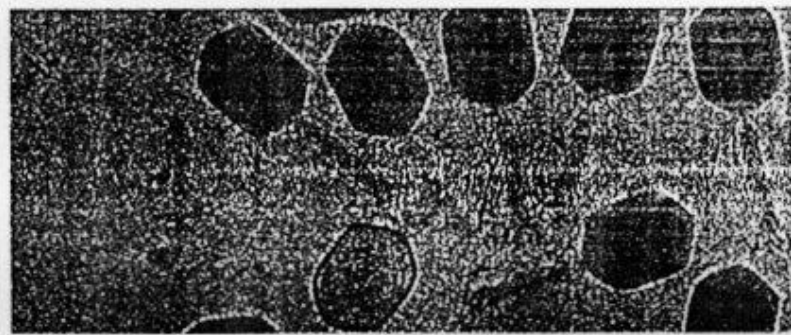
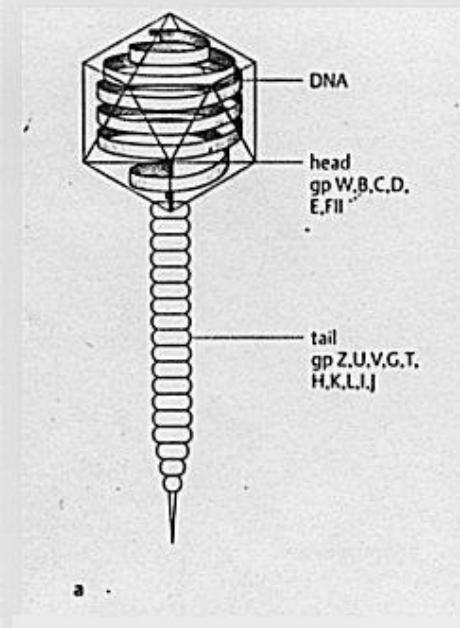


Il DNA di lambda è costituito nel virione da una molecola di DNA lineare di 48.5Kb a DS contenente a ciascuna delle estremità 5' una sequenza di 12 bp a SS complementari (sito COS).

Il DNA di lambda circularizza immediatamente grazie alla presenza di queste estremità coesive

# Strutture di batteriofagi a confronto

$\lambda$



T4

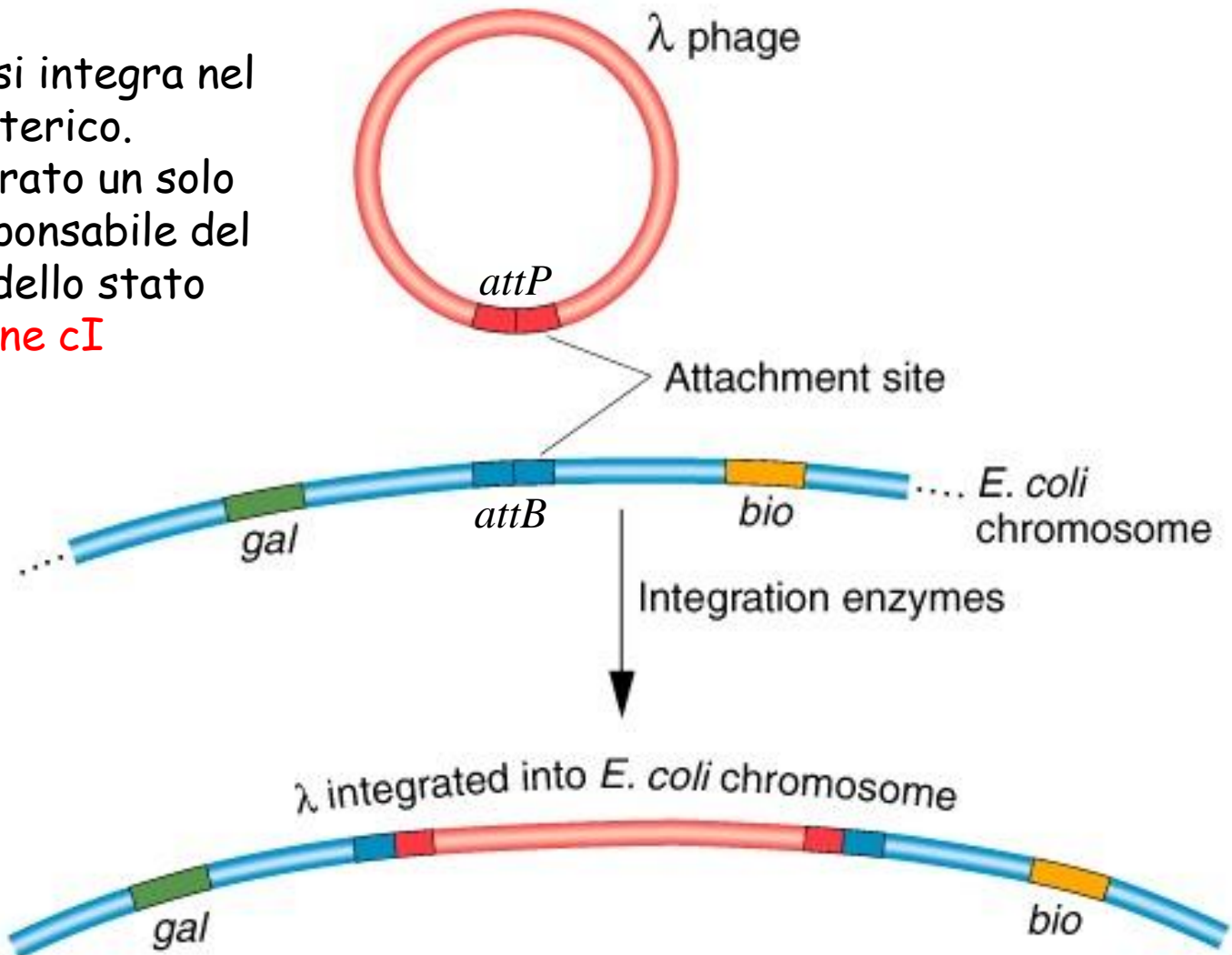
La porina LamB è il recettore del fago lambda.

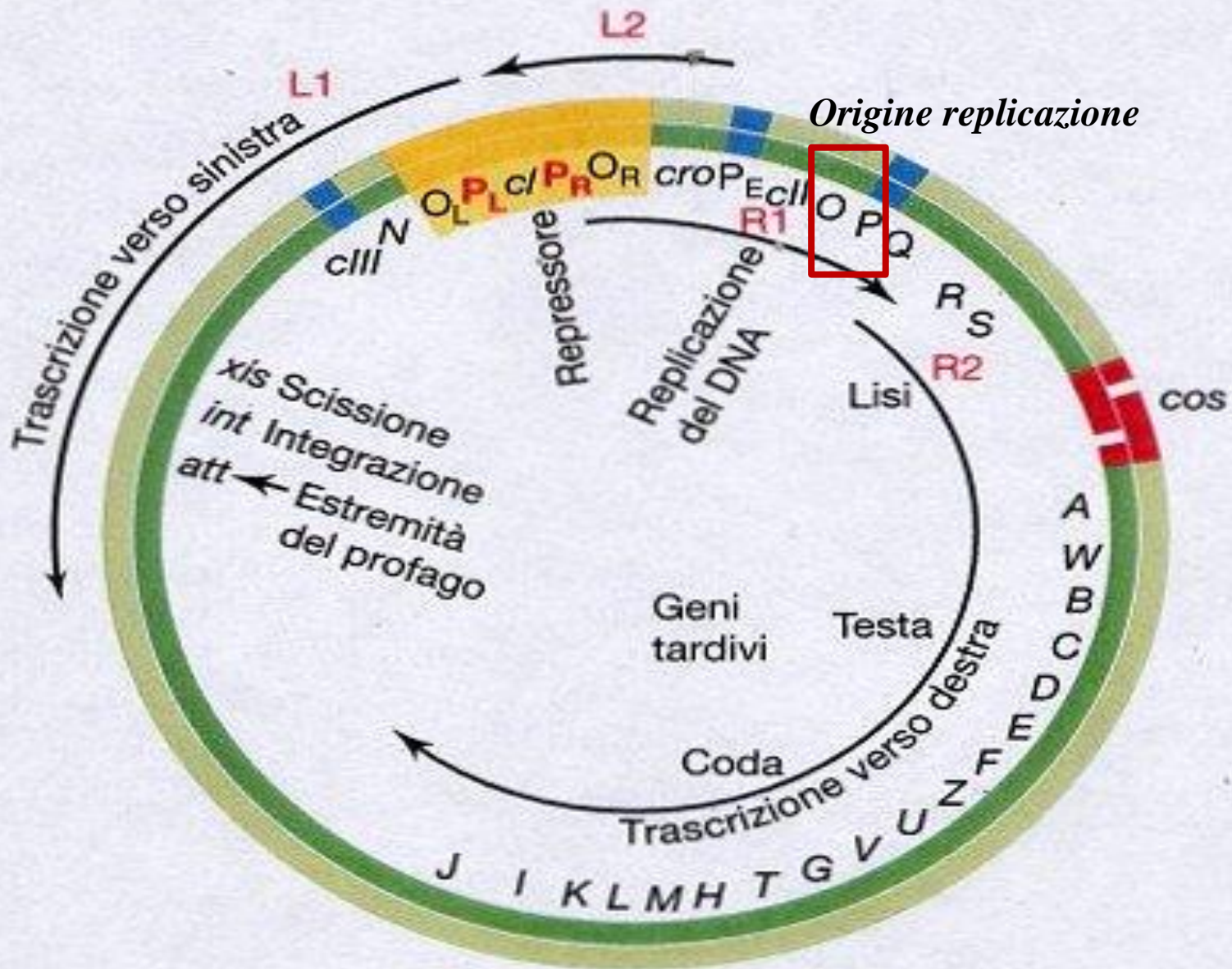
Si trova sulla OM di *E.coli* ed è la proteina necessaria per l'entrata delle maltodestrine ( polimeri del maltosio, diffusi in natura) all'interno della cellula.

Il gene *lamB* fa parte del regulone maltosio ed è espresso in presenza di maltosio. Soltanto le specie batteriche che hanno la proteina LamB saranno quindi sensibili al fago Lambda ( spettro d'ospite)

# Dopo la circularizzazione Lambda può integrarsi o replicarsi

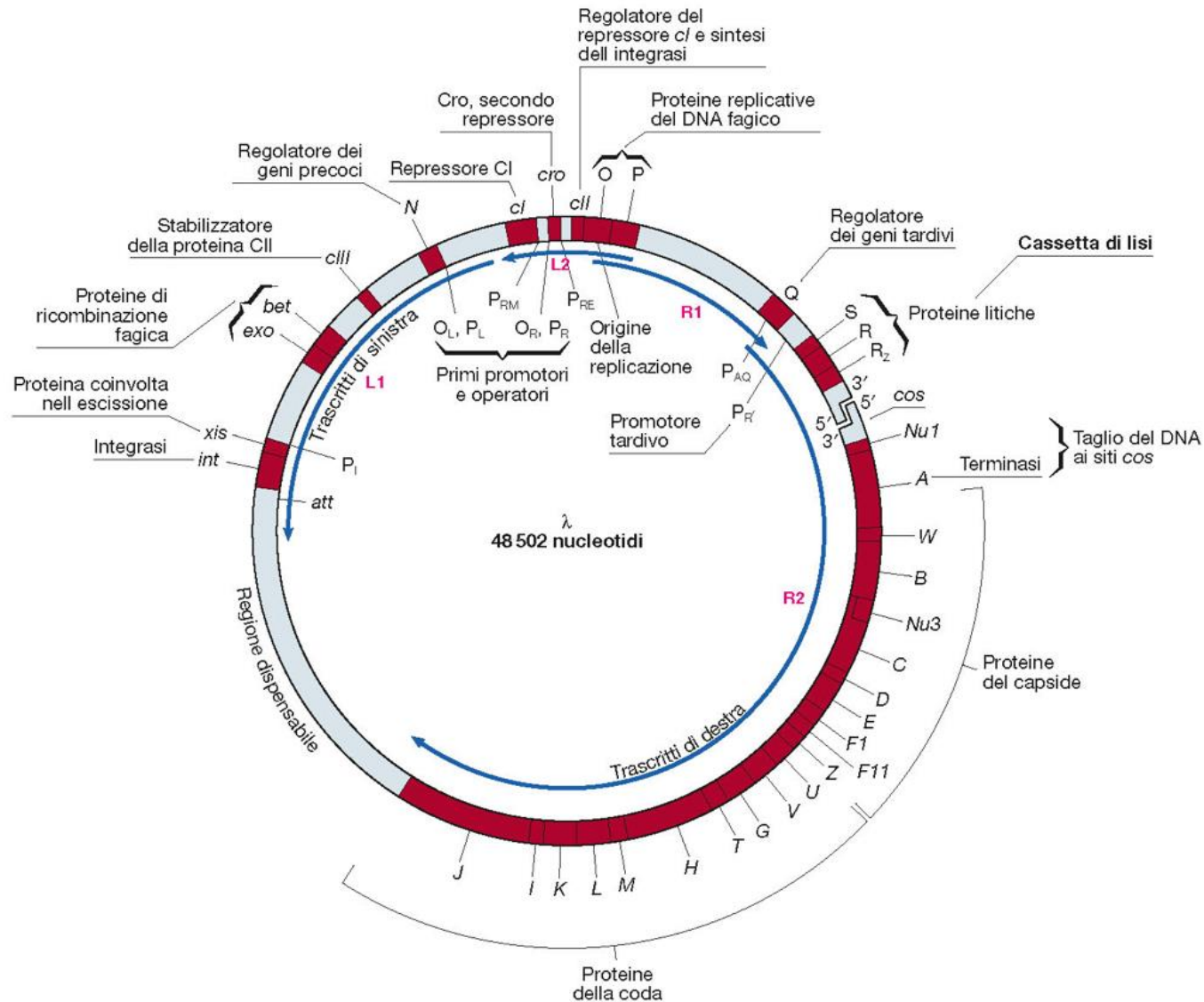
Il genoma di  $\lambda$  si integra nel cromosoma batterico.  
Una volta integrato un solo gene di  $\lambda$  è responsabile del mantenimento dello stato lisogenico: il gene *cI*





(b)

# Organizzazione del genoma del fago lambda



# La replicazione di Lambda

Il fago codifica 2 fattori per la replicazione :  
le proteine O e P.

- La proteina O analogamente a DnaA di *E. coli* riconosce l'origine della replicazione di  $\lambda$ .
- La proteina O si lega alla proteina P e questo complesso interagisce con l'elicasi DnaB.
- Il fago lambda utilizza per la replicazione le proteine dell'ospite ad eccezione di DnaA e DnaC.

L'origine di replicazione di  $\lambda$  è localizzata all'interno della regione codificante del gene O: questa sequenza è quindi **sito di origine e gene codificante**. Un'efficiente trascrizione facilita l'apertura delle eliche necessaria per la replicazione

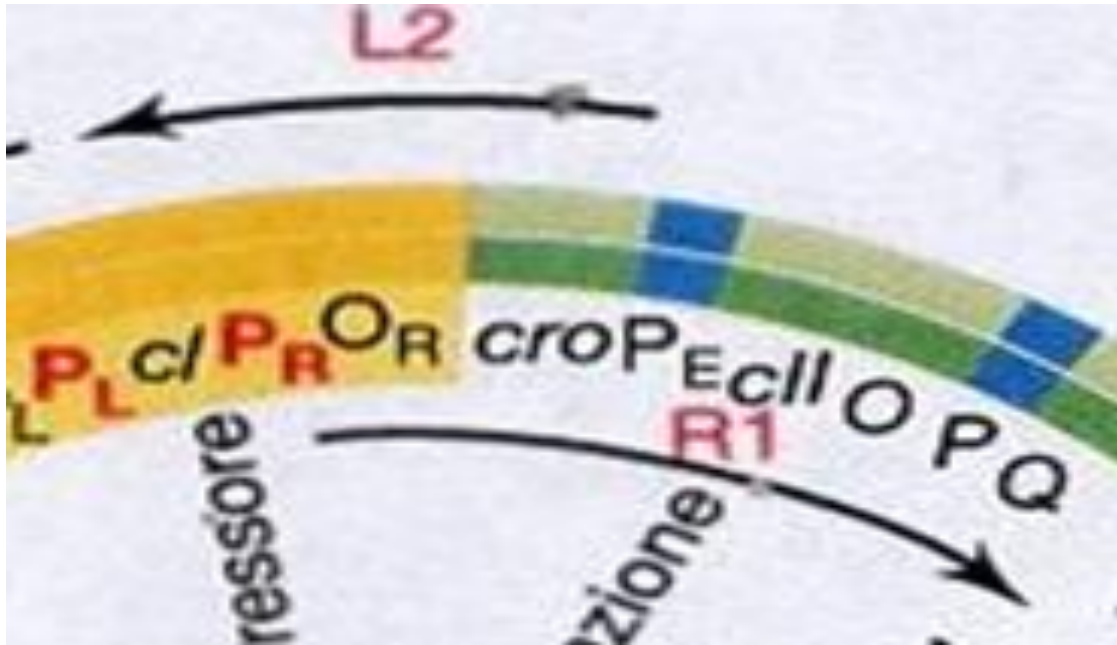
## Struttura dell'origine di $\lambda$

L'origine include 4 sequenze di 20 nucleotidi poste una accanto all'altra, quasi identiche e contenenti ripetizioni simmetriche



Quattro dimeri di proteina O si legano all'origine. Anche se le proteine O e P compaiono precocemente perché l'arresto a tr1 non è molto forte, la replicazione di  $\lambda$  inizia solo se vi è una forte trascrizione del DNA vicino all'origine.

## Replicazione di $\lambda$

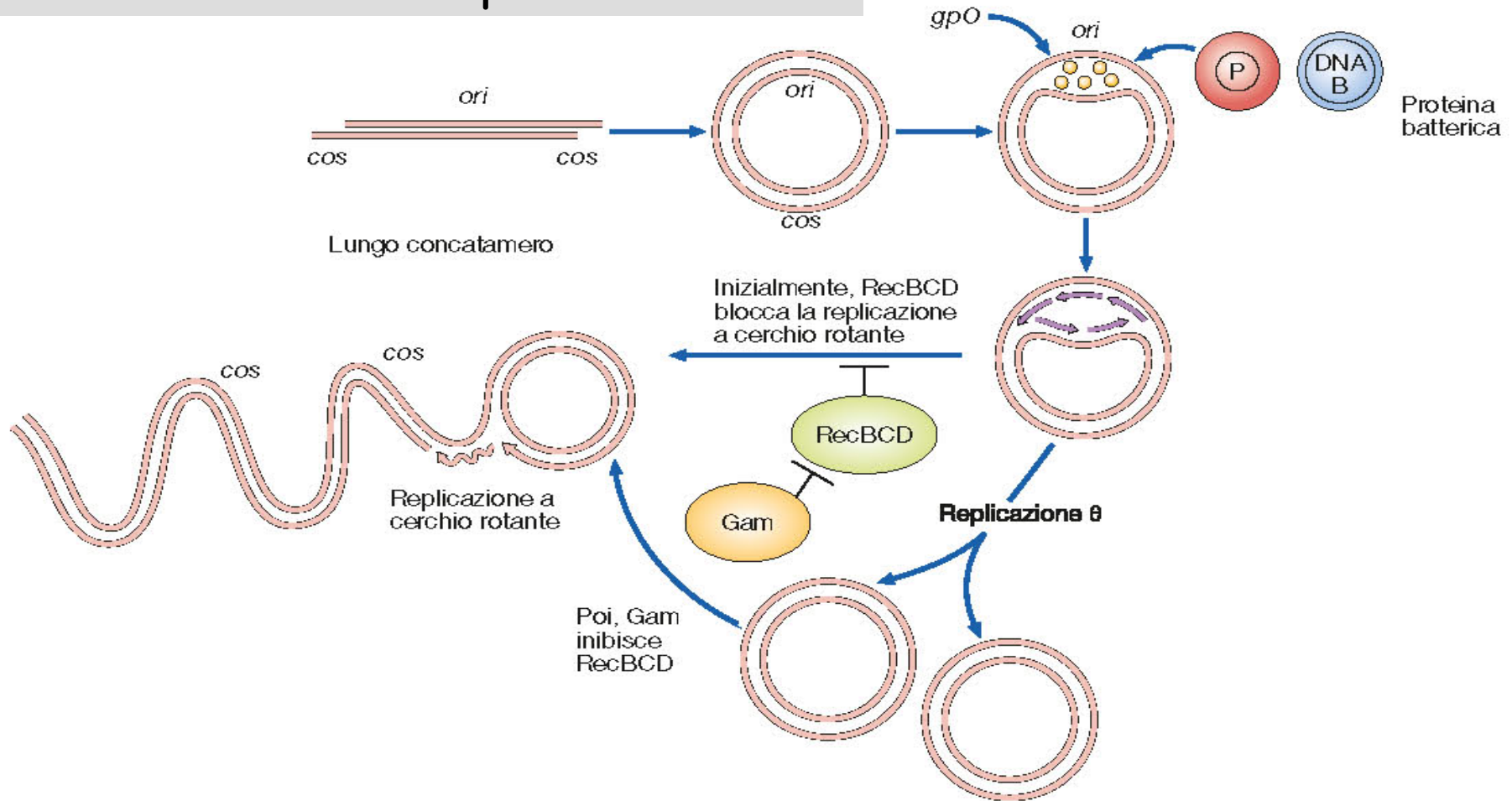


La trascrizione probabilmente apre il DNA esponendo così la regione verso cui si può dirigere la DNA primasi per sintetizzare gli inneschi di RNA. Di questa apertura dovrebbe essere responsabile una regione ricca in AT situata a destra del sito di legame della proteina O

Inizialmente la sintesi di DNA è di tipo bidirezionale a partire dall'origine localizzata all'interno del gene O e si genera un intermedio con la tipica forma theta.

Successivamente in presenza dei prodotti dei geni **red e gam** si ha il passaggio alla replicazione a cerchio rotante.

# Le due modalità di replicazione di $\lambda$



**PRECOCE** : replicazione bidirezionale

**TARDIVA** replicazione a cerchio rotante.

La proteina *Gam* permette il passaggio da una forma all'altra

Come avviene il passaggio dalla replicazione bidirezionale a quella a rolling circle?

Finché nella cellula non si è accumulata una quantità sufficiente di proteina Gam non si ottiene la transizione verso la replicazione a cerchio rotante.

**Gam** è una proteina che inibisce il complesso **RecBCD** permettendo così la replicazione a cerchio rotante. Infatti le molecole che si generano in questo tipo di replicazione sono degradate dal sistema RecBCD in assenza di Gam.

I geni *gam* e *red* sono trascritti da PL

Le molecole circolari di  $\lambda$  generate in seguito alla replicazione bidirezionale non possono venir impacchettate perché la terminasi di  $\lambda$  ha bisogno di 2 sequenze cos per poter effettuare il taglio di un' 1 unità di genoma di  $\lambda$ .

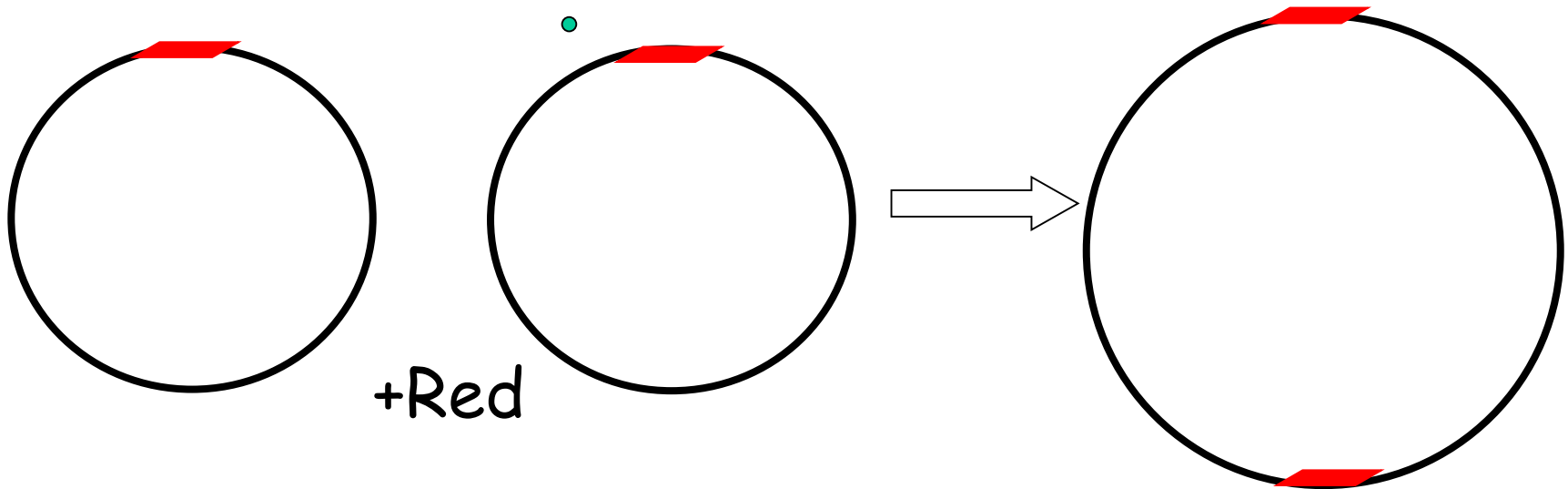
La replicazione bidirezionale sembra che serva per aumentare il numero di copie disponibili come stampo per la replicazione e per la trascrizione dei geni tardivi.

Il lungo messaggero che contiene l'informazione per le proteine tardive viene tradotto lentamente. Aumentandone il n.° di copie si aumenta la velocità di traduzione coordinando così la replicazione con al sintesi delle proteine di rivestimento.

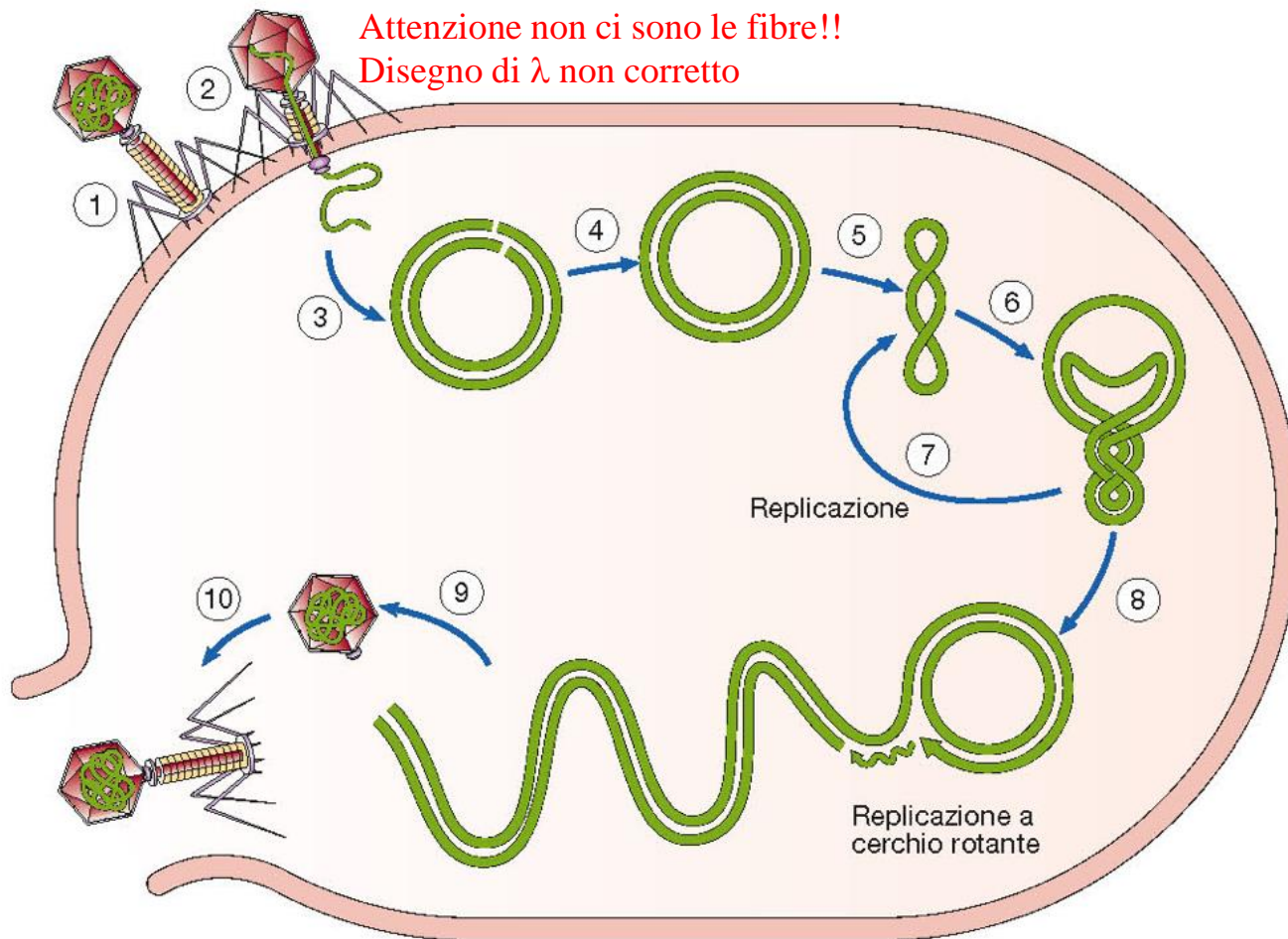
## Qual è il destino delle molecole circolari di $\lambda$

Queste molecole possono venir impacchettate se formano dei dimeri grazie all'azione del complesso proteico Red( geni *exo* e *bet*) .

In questo modo la terminasi troverà nel dimero di  $\lambda$  2 siti *cos* e potrà tagliare generando come al solito 1 genoma di  $\lambda$  fiancheggiato dall'estremità *cos* a *SS*

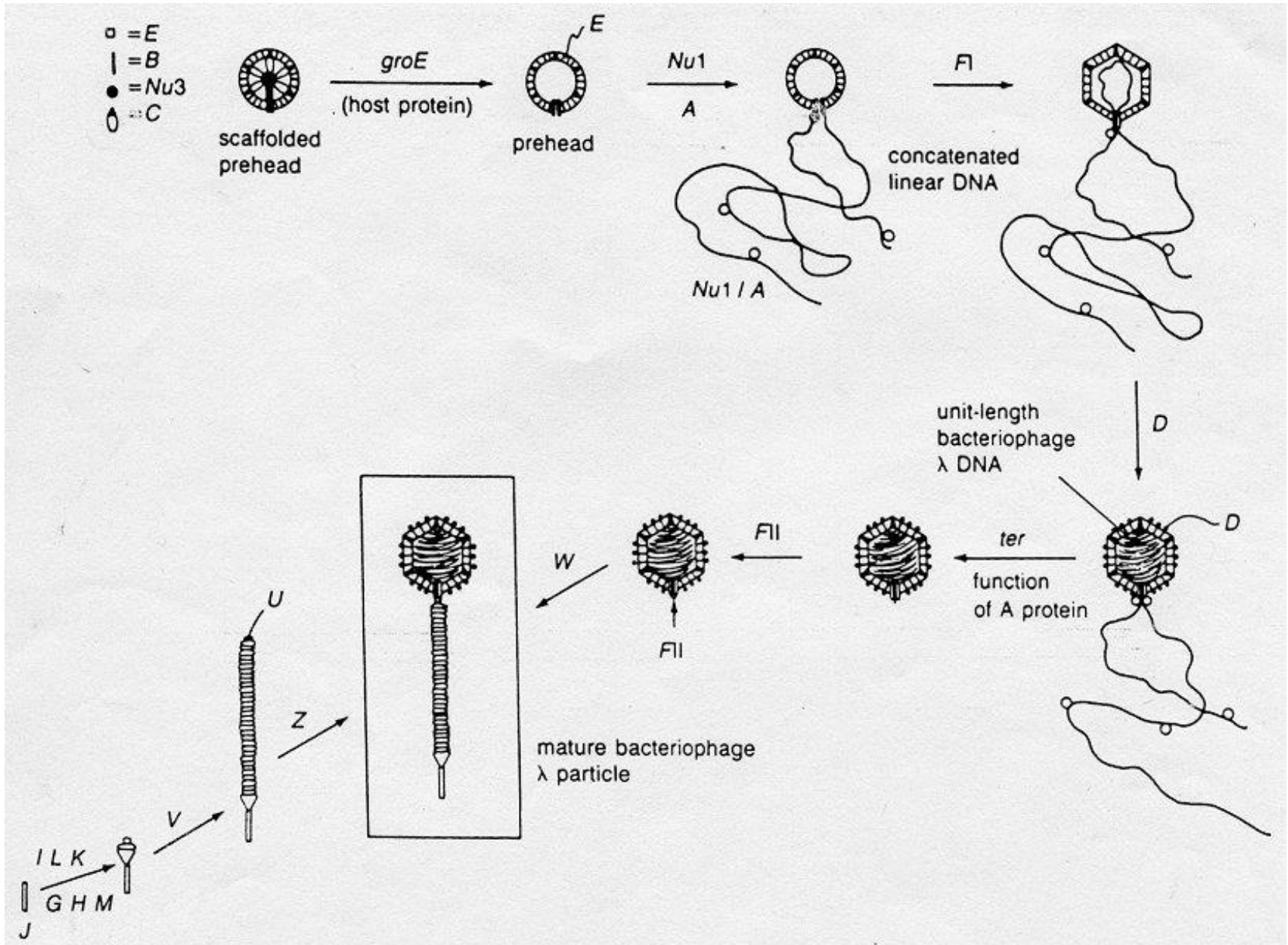


I lunghi concatenamenti che si formano sono poi risolti in monomeri di lunghezza di 1 genoma. L'enzima di scissione produce dei tagli sfalsati che generano le estremità coesive coinvolte nel processo di circularizzazione.



Le molecole sono poi impacchettate nelle teste alle quali vengono poi aggiunte le code ed altre proteine strutturali

# Questo è Lambda!!

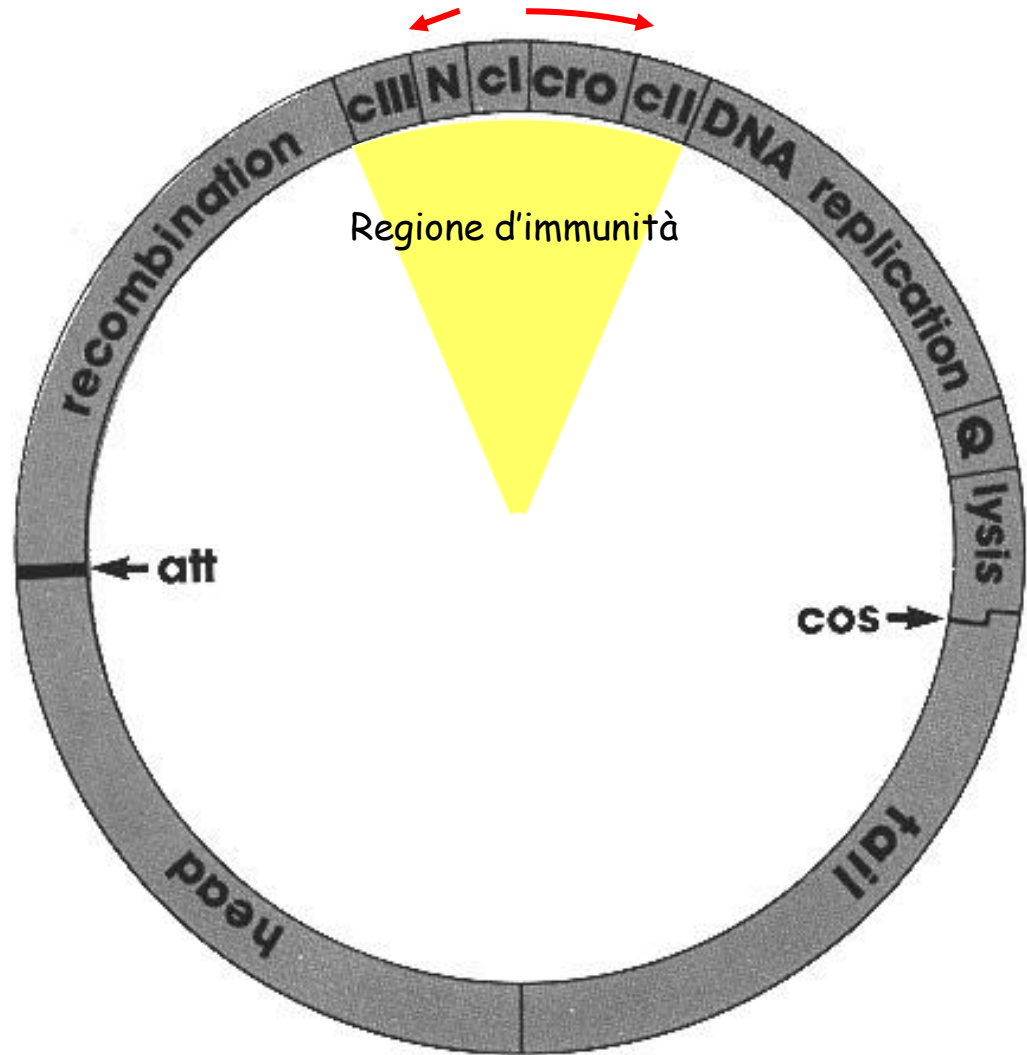


# Fase precoce immediata

Solo due geni vengono espressi: *cro* e *N*.

Sono gli unici due geni i cui promotori sono riconosciuti dalla RNA polimerasi batterica.

Il prodotto del gene *N* (antiterminatore) permette il passaggio alla fase successiva.



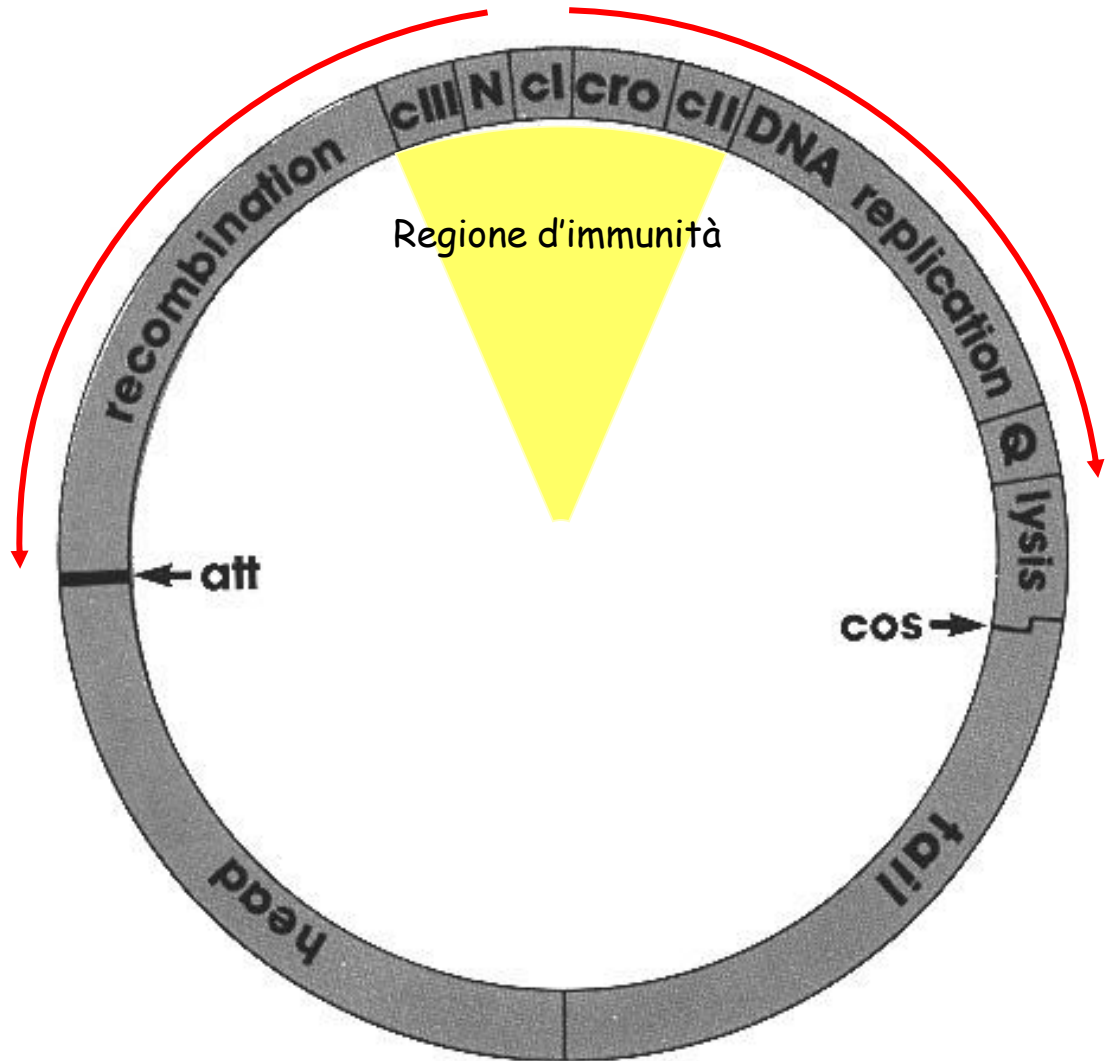
# Fase precoce ritardata

La trascrizione procede verso destra per i geni della replicazione e verso sinistra per i geni della ricombinazione.

Subito a sinistra di N viene trascritto il gene *cIII* mentre a destra di *cro* viene trascritto il gene *cII*: questi due geni sono essenziali per permettere la sintesi iniziale del repressore *cI*.

Le due fasi iniziali della trascrizione (precoce immediata e precoce ritardata) si verificano sempre e sono precedenti alla scelta tra ciclo litico e ciclo lisogenico.

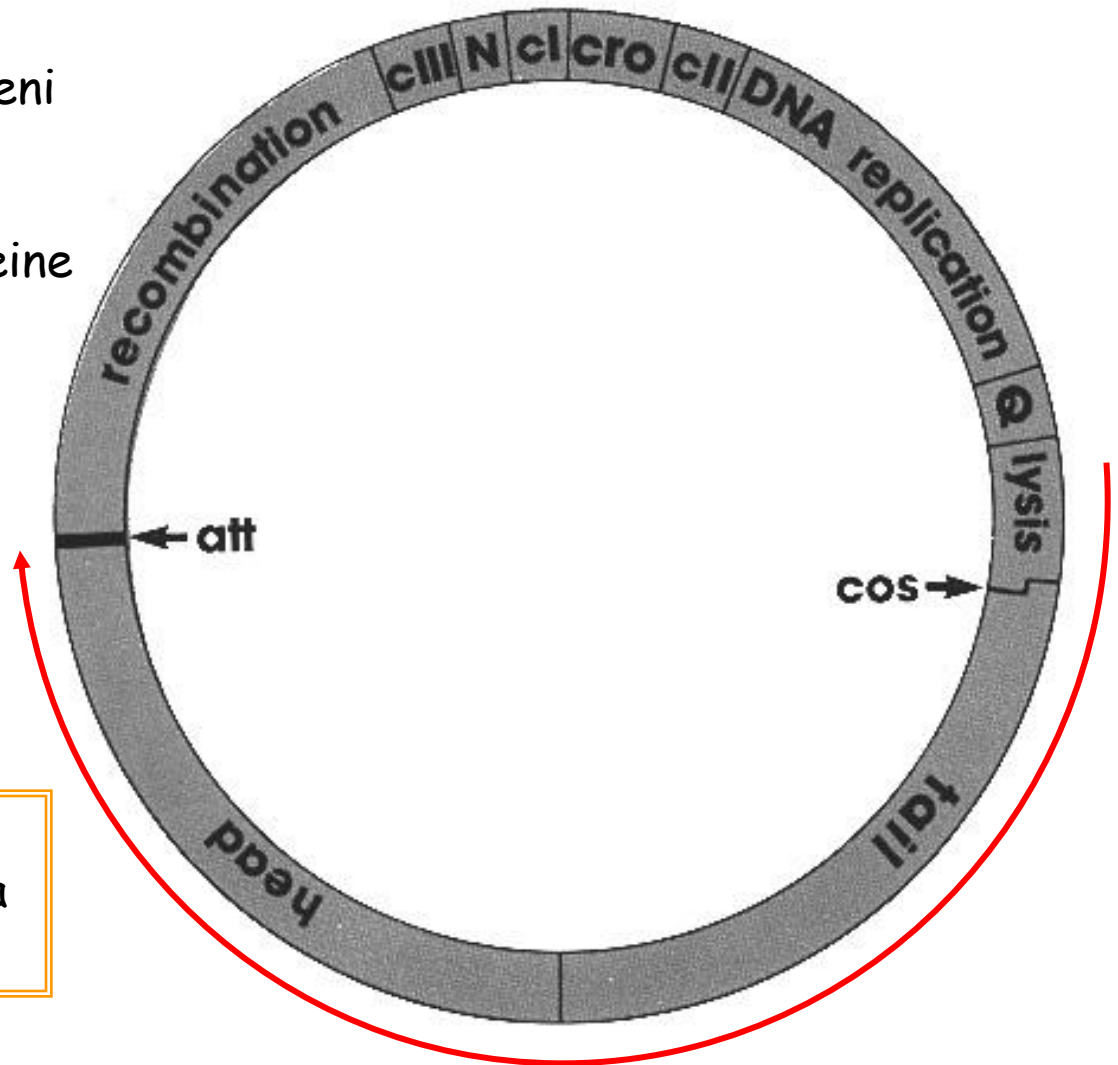
Nelle prossime diapositive verrà mostrato in modo più dettagliato ciò che avviene a livello della regione di immunità.



## Fase tardiva

È stata scelta la via litica. I geni precoci non vengono più trascritti.

Vengono sintetizzate le proteine strutturali della coda e della testa e gli enzimi responsabili della lisi.

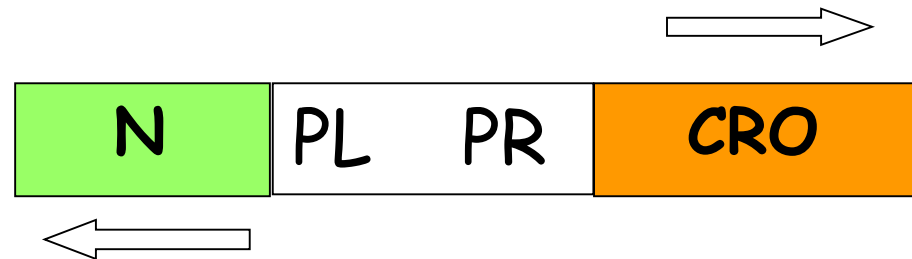


Se viene scelta la via litica il cromosoma di  $\lambda$  non si integra nel cromosoma batterico

# Trascrizione dei geni precoci di lambda.

La RNA polimerasi dell'ospite comincia a trascrivere a partire da 2 promotori chiave

PL ( promotore di sinistra ) e  
PR (promotore di destra)



La proteina N è un antiterminatore che modifica l'RNA polimerasi dell'ospite in modo che non possa più riconoscere i terminatori della trascrizione e quindi procedere oltre.

La proteina Cro è un repressore della trascrizione

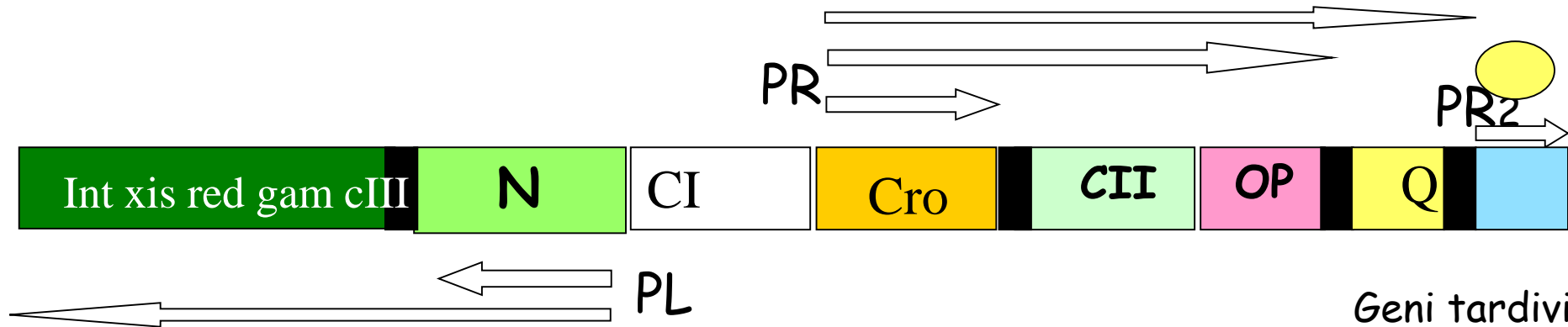
# L'antiterminazione

La regolazione della trascrizione in lambda si basa su una nuova strategia, l'**antiterminazione** in quanto i promotori PL e PR sono due promotori costitutivi trascritti dalla RNA polimerasi dell'ospite non appena il fago si è circolarizzato.

I trascritti terminerebbero però tra 100 e 1000 basi più a valle se la proteina N non permettesse alla RNA polimerasi di scorrere oltre i terminatori.

In corrispondenza di particolari siti definiti nut, N si lega al RNA neotrascritto e in cooperazione con alcuni fattori dell'ospite (Nus proteine) permette alla RNA polimerasi di non fermarsi ai terminatori.

Grazie alla presenza della proteina N la RNA polimerasi può generare dei trascritti più lunghi a partire dai promotori PL e PR che contengono i geni cIII (da PL) ed i geni cII O P (da PR).



Superando un secondo terminatore viene trascritto anche il gene Q che è un altro antiterminatore che permette alla RNA polimerasi di far avanzare mRNA sintetizzato da PR2 in modo che si trascrivano tutti i geni tardivi

A livello del terminatore a valle del gene Q la trascrizione si arresta anche in presenza di N.

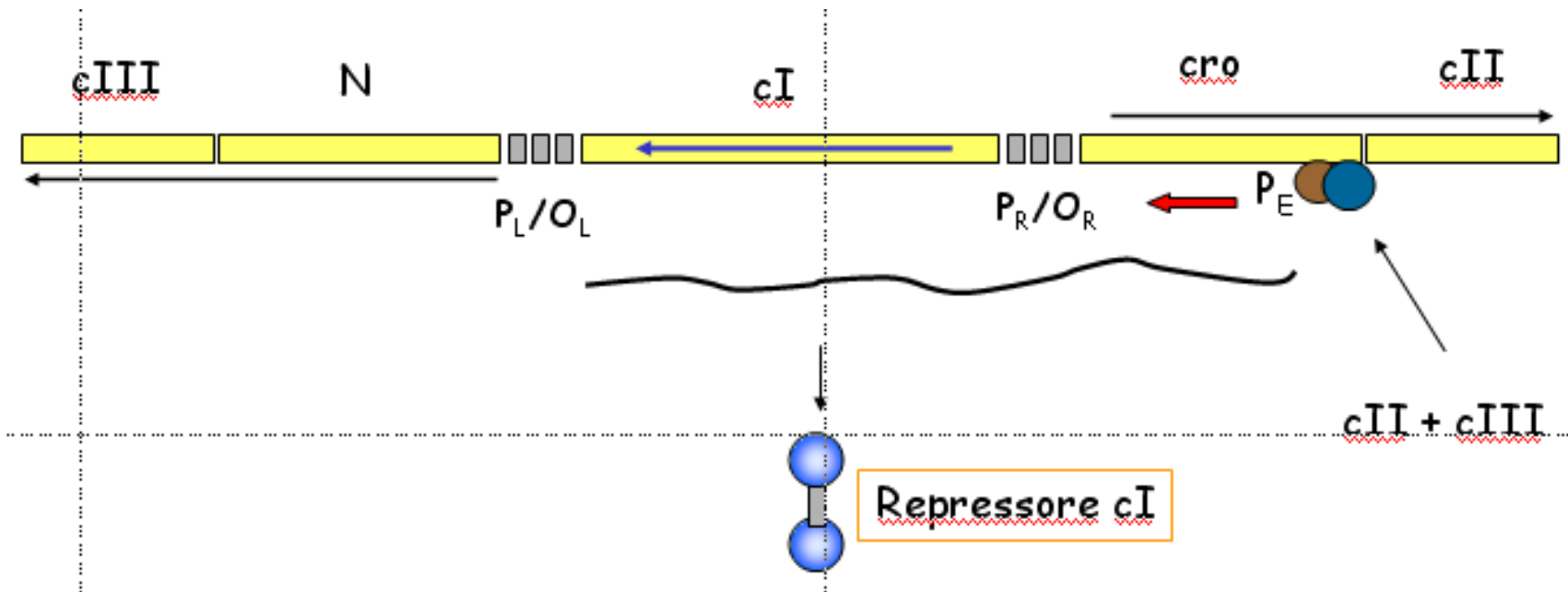
La proteina Q è anch'essa un antiterminatore e se la sua concentrazione sarà sufficiente potrà promuovere la trascrizione dei geni tardivi.

I geni tardivi codificano per le proteine necessarie per l'assemblaggio della particella virionica e per la lisi della cellula.

In contemporanea all'aumento di Q aumenta anche la concentrazione della proteina Cro che legandosi agli operatori OL e OR blocca la trascrizione a partire da PL e PR.

# Scelta tra via litica e lisogenia

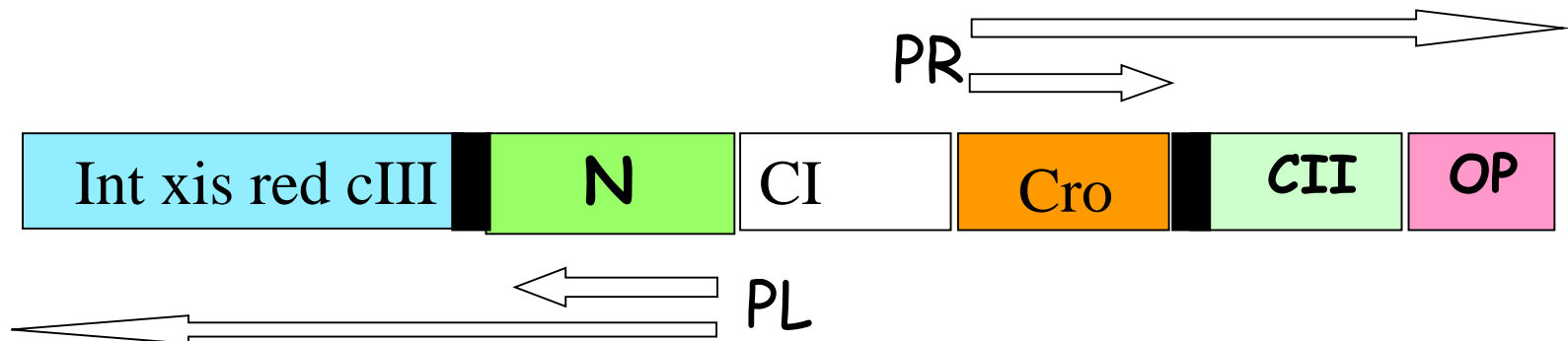
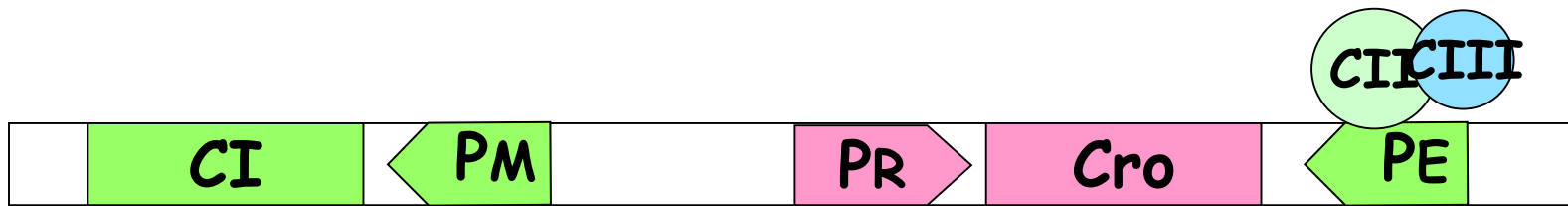
Il gene *cI* è localizzato tra *P<sub>L</sub>* e *P<sub>R</sub>* ma questi promotori sono orientati in modo tale che nessuno diriga la sintesi di *cI*



Il promotore da cui inizia la trascrizione di *cI* durante l'infezione è *P<sub>E</sub>* (establishment o instaurazione) localizzato a valle di *P<sub>R</sub>* ma in direzione opposta

Il promotore PE è attivato dalla proteina CII che viene trascritta precocemente a partire da PR.

La proteina CII nonostante sia prodotta all'inizio dell'infezione è instabile ed ha bisogno per una maggiore stabilità della proteina CIII sintetizzata a partire da PL.



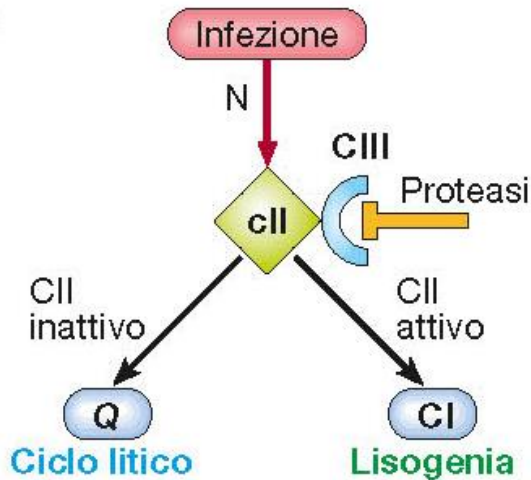
# CII è la proteina critica per la scelta tra ciclo litico e ciclo lisogenico

a)



La proteina CII è un attivatore trascrizionale che si lega al PE per promuovere la trascrizione di CI.

b)



Il promotore PE è un promotore debole con una regione -35 lontana dal classico consensus per la RNA polimerasi ( $\sigma$  factor). La proteina CII facilita il legame della RNA polimerasi alla regione -35 che costituisce anche il proprio sito di legame.

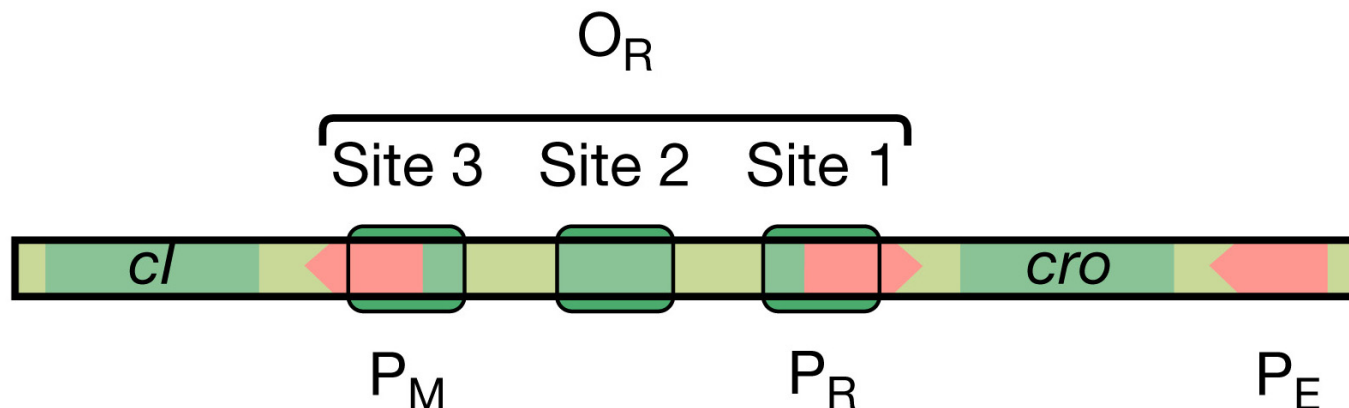
La proteina CII è in grado di attivare anche il promotore per l'integrasi PI che è localizzato a valle di PL

Se *CII* viene

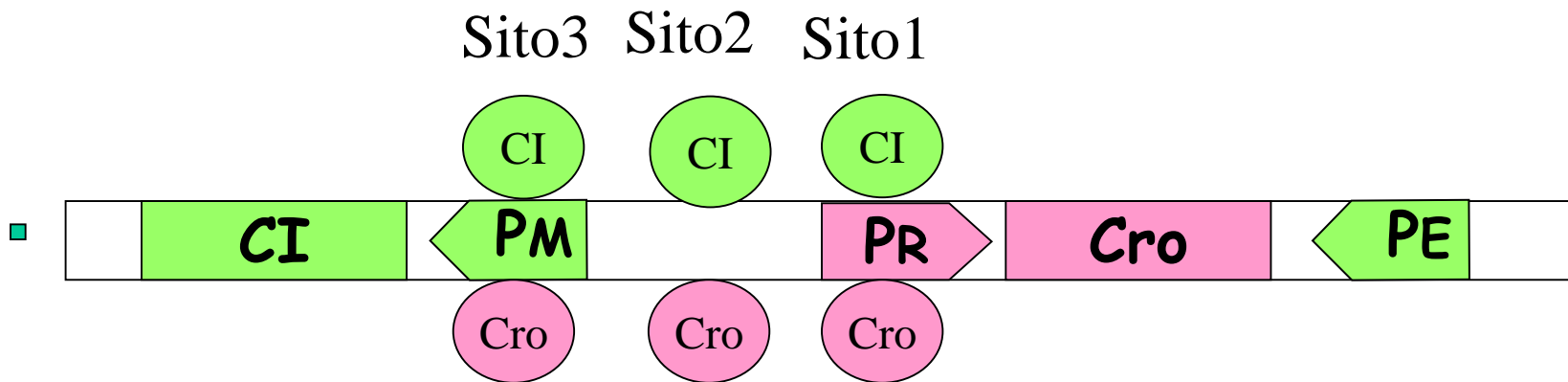
- degradata non vi è possibilità per il ciclo lisogenico
- stabilizzata da *CIII* verrà sintetizzato il repressore *CI*

Per mantenere lo stato lisogenico una volta instaurata la lisogenia, la trascrizione di *cI* procede da un altro promotore *PM* che viene attivato da *CI* stesso quando questo si lega al sito I.

Legandosi al sito I *CI* reprime *PR* ed attiva *PM*



A livello dell'operatore  $O_R$  ci sono 3 siti simili ma non identici ai quali la proteina Cro e la proteina CI (entrambi repressori) si possono legare

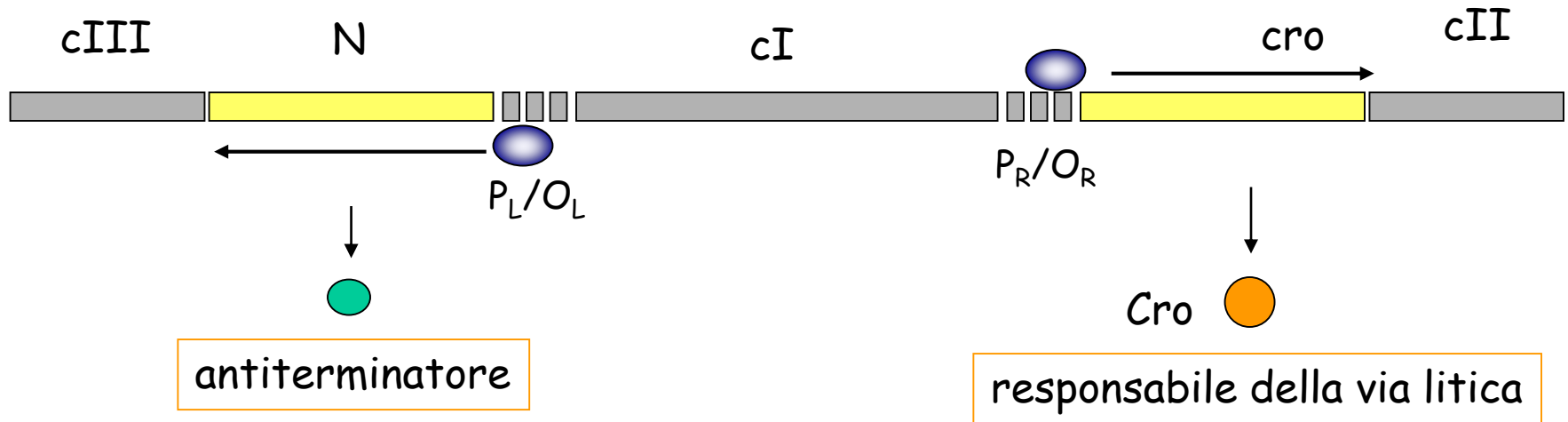


Cro si lega prima al sito 3 poi al 2 ed infine al sito 1 reprimendo dapprima la sintesi di cI e poi la propria sintesi


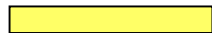

CI si lega nell'ordine opposto reprimendo prima la sintesi di cro e poi quando si lega al sito 3 anche la propria sintesi

# La regione di immunità di $\lambda$

Fase precoce immediata

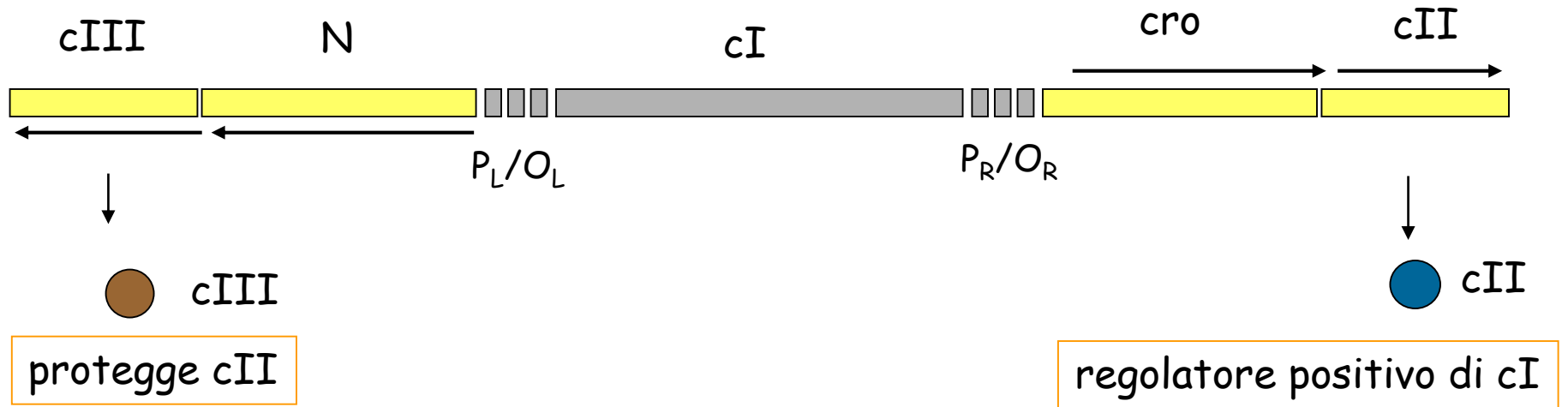


I promotori  $P_R/O_R$  e  $P_L/O_L$  sono riconosciuti dalla RNA polimerasi batterica

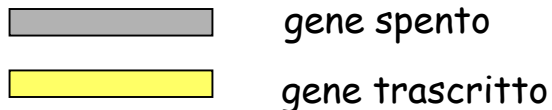
-  gene spento
-  gene trascritto
-  RNA polimerasi batterica

## La regione di immunità di $\lambda$

## Fase precoce ritardata



La proteina cII è una proteina delicata e molto sensibile alle proteasi batteriche; verrebbe rapidamente degradata se non fosse protetta dalla proteina cIII.



In conclusione, per la sintesi iniziale di cI sono necessari cII+cIII e la trascrizione parte da PE.

## Le condizioni di crescita influenzano la scelta tra ciclo litico e ciclo lisogenico.

La proteina CII viene attivamente degradata da una proteina dell'ospite la proteasi HlfB (FtsH) che è particolarmente abbondante quando la cellula cresce in terreno ricco.

Quando le condizioni sono meno ottimali la concentrazione della proteina FtsH diminuisce determinando una maggiore concentrazione della proteina CII.

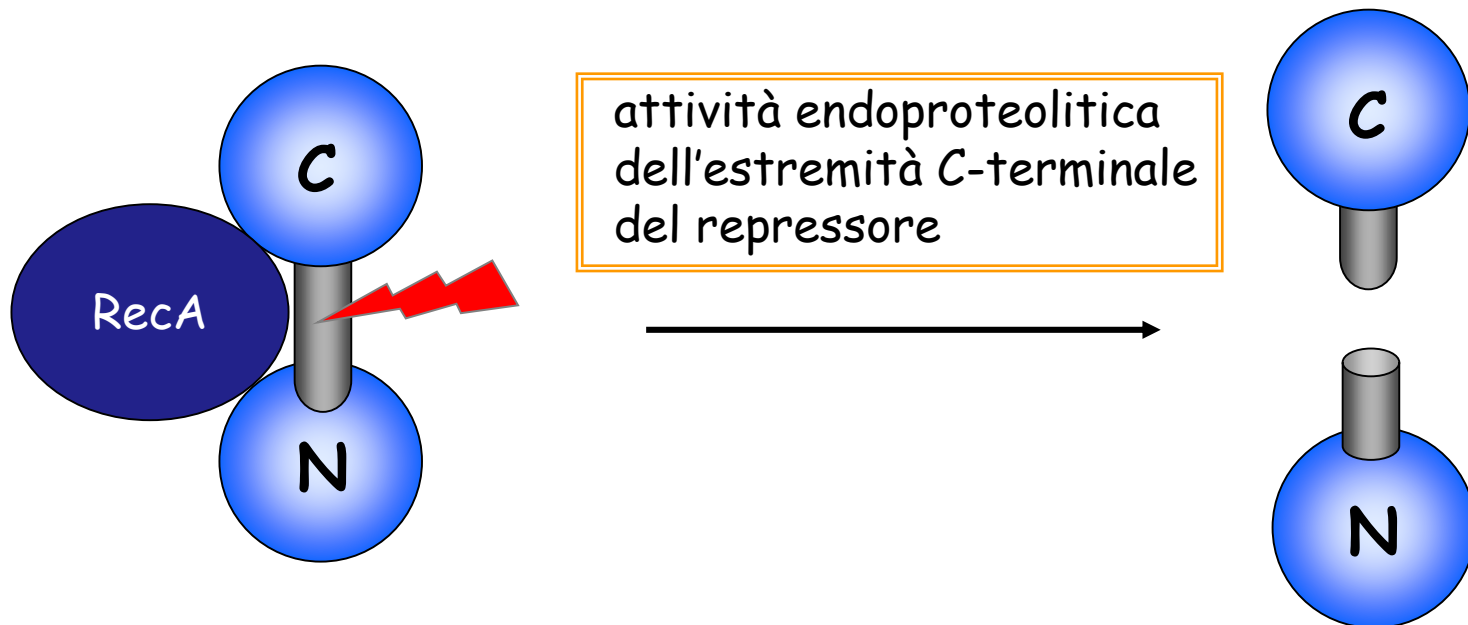
CIII contribuisce alla stabilizzazione di CII probabilmente agendo come substrato alternativo a CII per la degradazione da parte di FtsH.

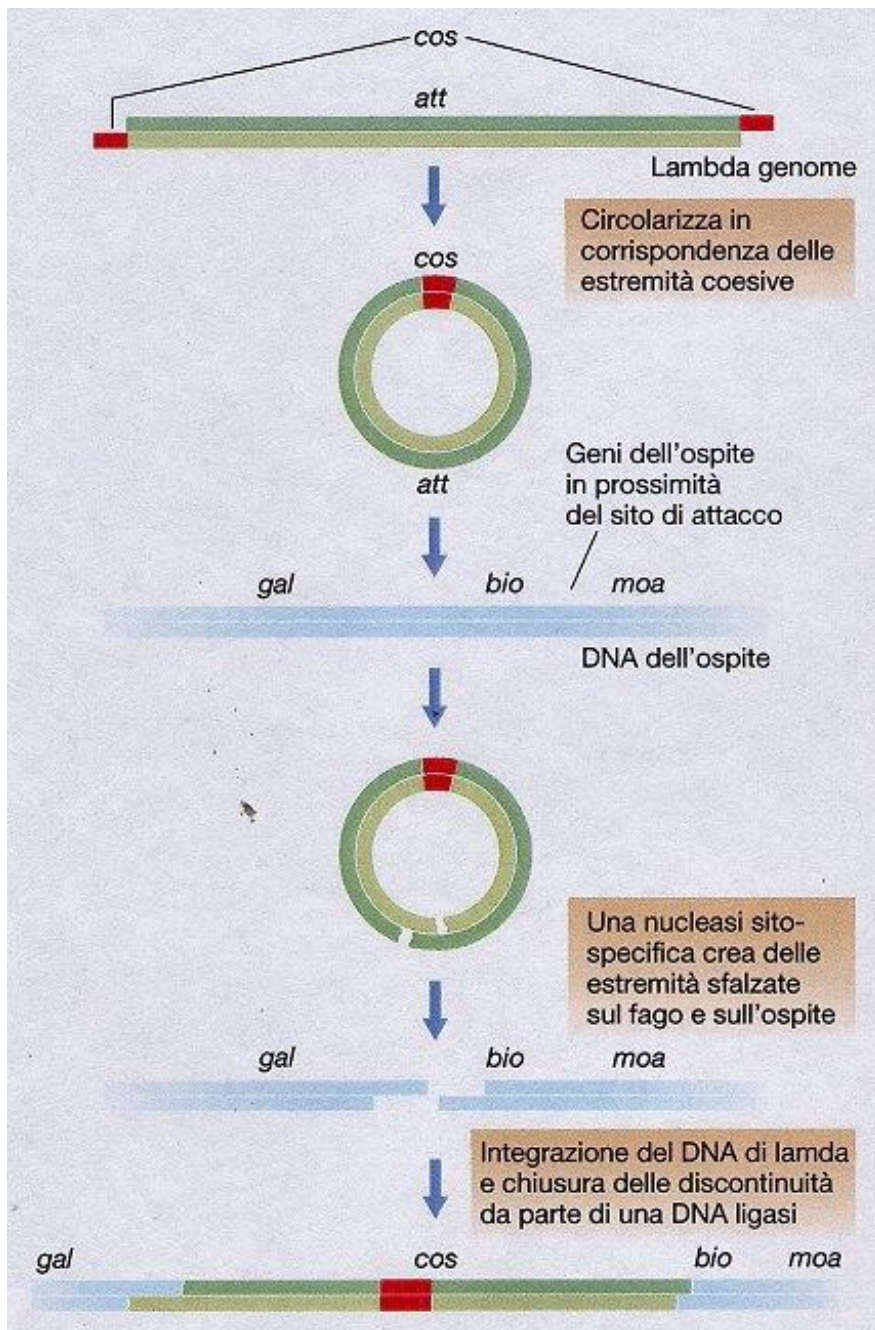
# Induzione del ciclo litico

L'induzione rappresenta una risposta a fattori ambientali (luce UV) o mutageni chimici che danneggiano il DNA dell'ospite

Come parte della risposta SOS, aumenta la concentrazione della proteina RecA che normalmente è responsabile della ricombinazione genetica

Ad alta concentrazione RecA interagisce con cI stimolandone l'attività autoproteolitica del dominio C-terminale: il risultato è la rottura di cI che si separa nei due domini N-terminale e C-terminale. Non si potranno formare dimeri di repressore, i soli domini N-terminali non sono capaci di legarsi agli operatori in modo efficace e nel giro di poco tempo non sarà più presente repressore funzionale.





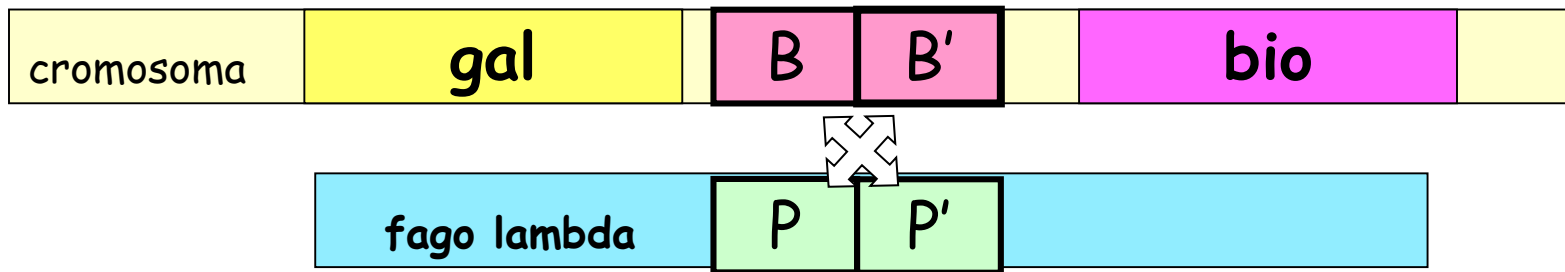
Integrazione del fago lambda nel cromosoma di E.coli K12.

Il locus attB è localizzato tra i geni degli operoni gal (galattosio) e bio (biotina).

Si tratta di un meccanismo di ricombinazione sito-specifica mediato dalla proteina del fago Int e dalla proteina del nucleotide IHF (Integration Host factor).

Per poter effettuare un ciclo lisogenico il fago lambda si deve integrare nel cromosoma della cellula ospite.

Sito attB

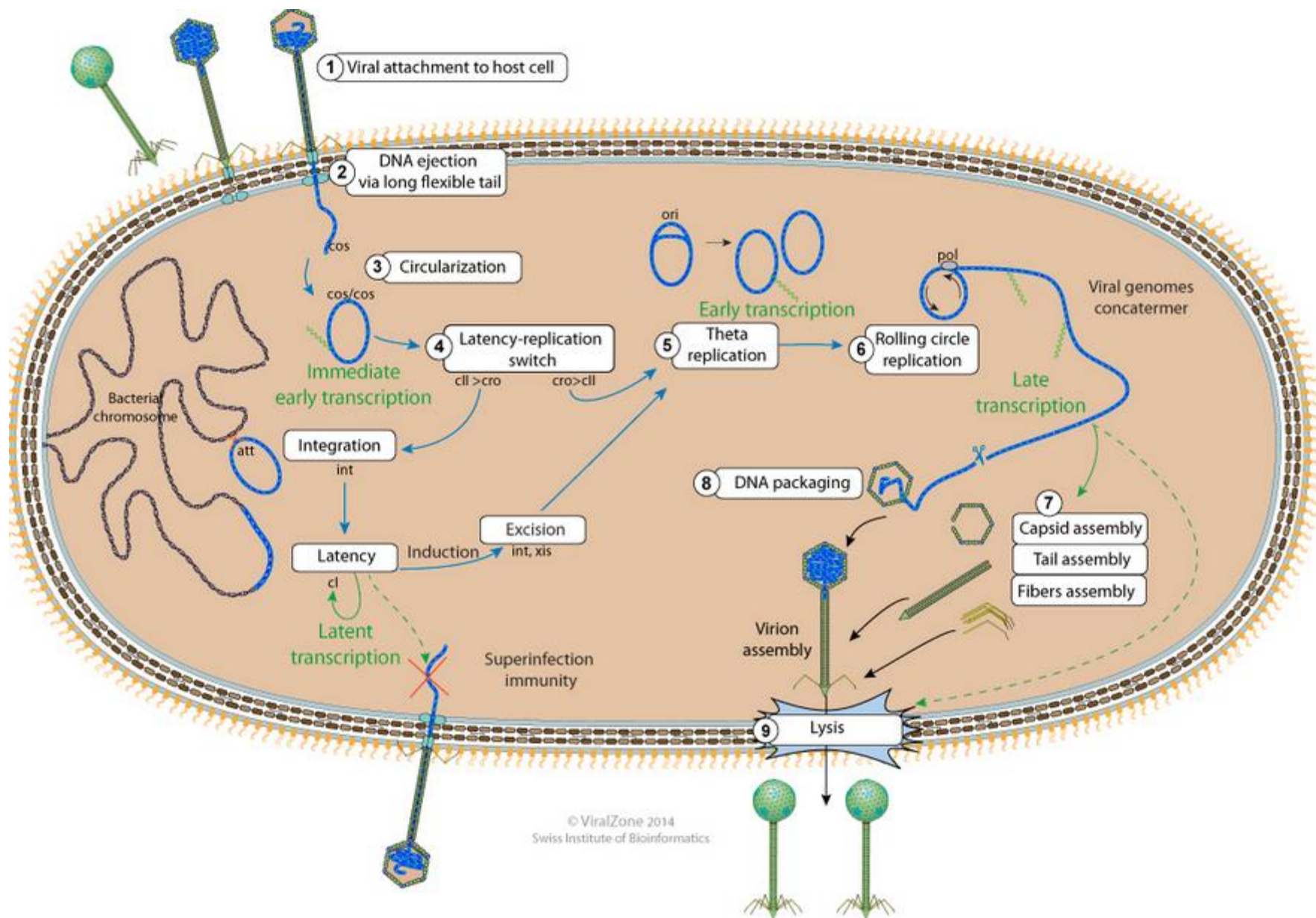


Sito attP

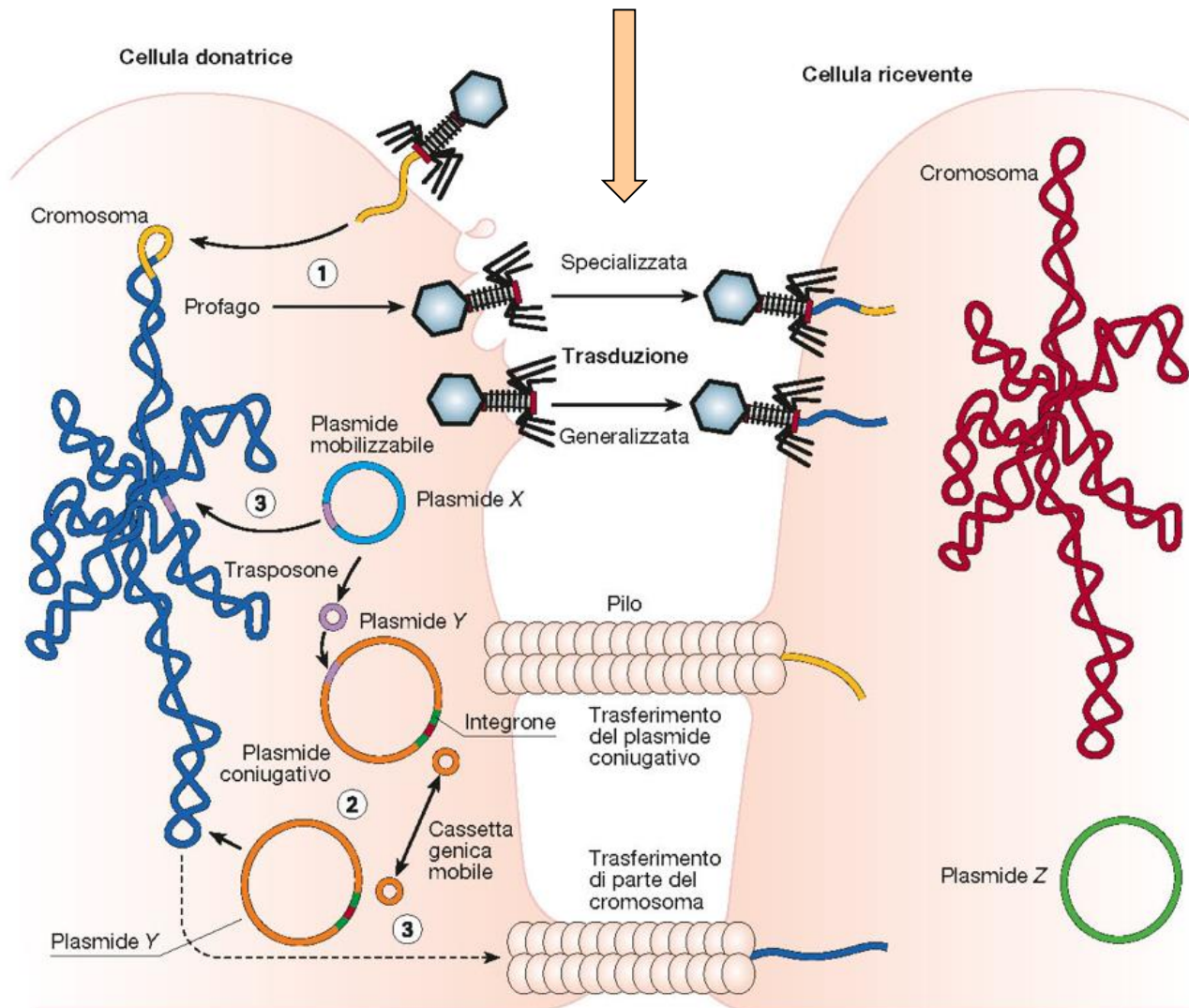


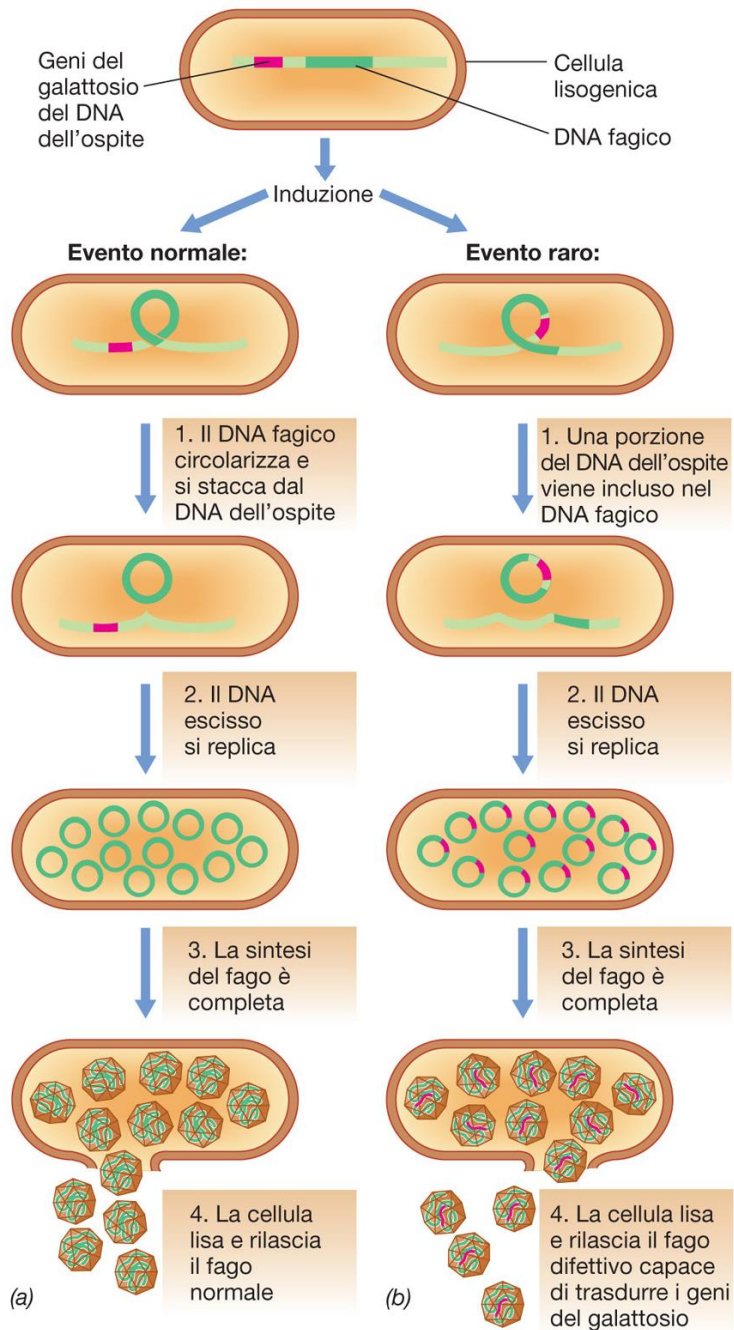
In seguito al processo di integrazione sito specifica tra i siti attB e attP si vengono a creare dei siti ibridi attBP' e attB'P che non potranno più costituire il sito d'integrazione per un fago lambda selvatico che si volesse integrare nel cromosoma.

Questi siti ibridi potranno invece costituire il sito di integrazione per un fago lambda che si è exciso in modo impreciso (lambda dgal o lambda dbio)



# Trasduzione: meccanismo di scambio di materiale genetico tra cellule batteriche mediato da fagi



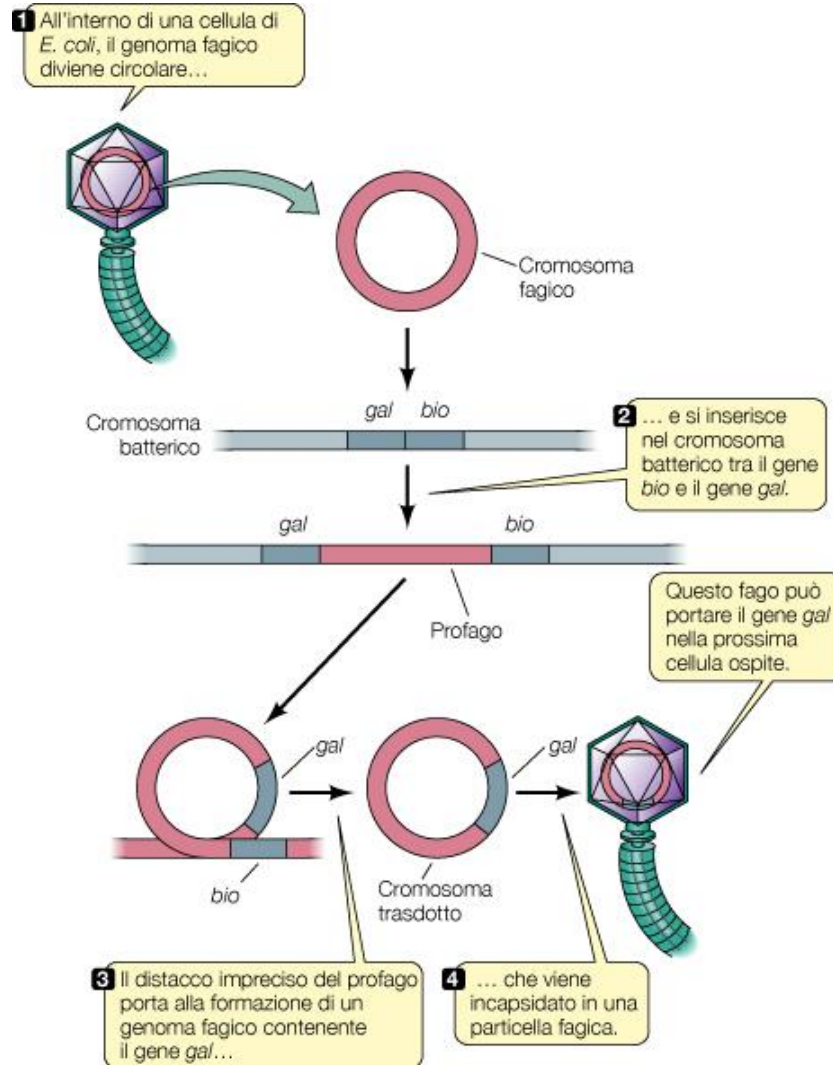


## La trasduzione specializzata

Excisione del fago lambda dal cromosoma: l'excisione imprecisa è alla base del meccanismo di trasduzione specializzata

# La trasduzione specializzata

Formazione di particelle trasducenti di lambda in seguito a lisogenizzazione ed excisione imprecisa

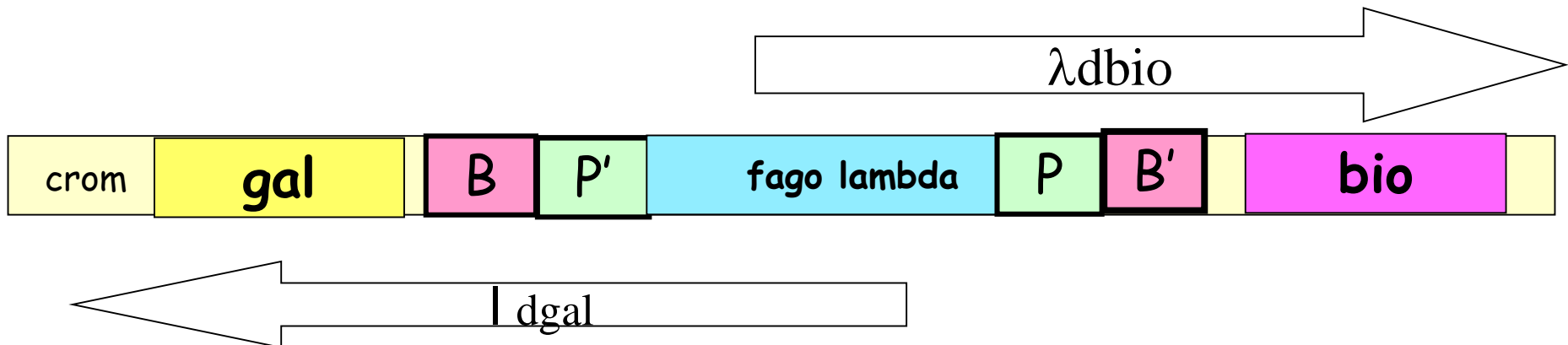


Erroneamente il fago  $\lambda$  excidendosi dal cromosoma può incorporare le regioni fiancheggianti il sito att costituite dai geni *gal* o dai geni *bio* generando così fagi difettivi per quanto riguarda il genoma fagico ma portatori di segmenti di DNA cromosomico. I fagi  $\lambda$  dgal o  $\lambda$  dbio contengono quindi sia DNA fagico che DNA cromosomico

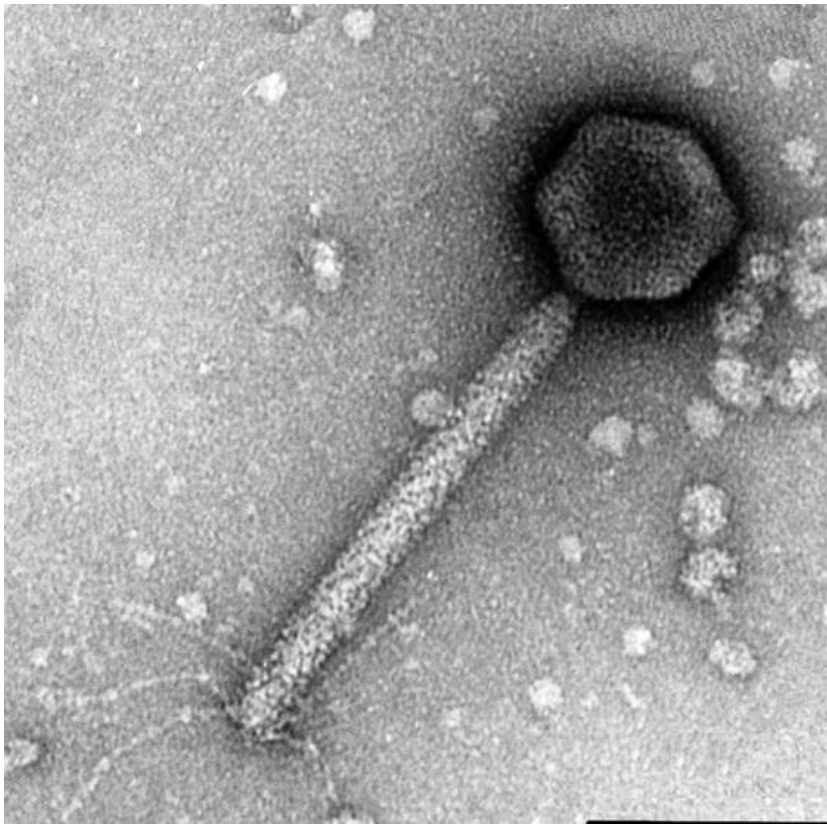
I fagi trasducenti  $\lambda$  dgal o  $\lambda$  dbio sono fagi difettivi in quanto l'acquisizione di geni cromosomici è compensata dalla perdita di genoma fagico.

Le particelle saranno quindi difettive e potranno replicarsi solo in presenza di un fago I helper (ovvero un fago wt).

L'integrazione nel cromosoma potrà avvenire solo nei ceppi lisogeni che contengono un sito ibrido in quanto la particella excidendosi in modo impreciso ha portato con se un sito di tipo BP' o PB'



## Fago P1 :il fago plasmide che non si integra mai



Il fago P1 è un fago-plasmide caratterizzato dal mantenere il suo DNA sotto forma di plasmide allo stato lisogeno. P1 è stato identificato da Bertani, scienziato italiano che tra le altre scoperte mise a punto il famoso terreno LB (Luria Bertani ).

P1 contiene nel capsido una molecola di DNA ds con le sequenze terminali ripetute con permutazione circolare (tipo T4).

Dimensioni del genoma 93 kb

Nel citoplasma P1 circularizza grazie ad una ricombinasi sito specifica (siti lox) e si mantiene sotto forma di un plasmide

- a basso numero di copie ( 1)

- meccanismo accurato di ripartizione

## Caratteristiche di P1

- si mantiene come plasmide allo stato lisogenico/litico
- codifica per un sistema di restrizione /modificazione che impedisce ad altri fagi di entrare
- impedisce l'infezione da parte di fagi dello stesso tipo tramite il fenomeno di esclusione:la proteina fagica Sim localizzata nello spazio periplasmatico o nella membrana interna lega il DNA di un nuovo fago P1 superinfettante impedendogli di infettare la cellula
- RESPONSABILE della TRASDUZIONE GENERALIZZATA in E.coli** ( in Salmonella fago P22 che a differenza di P1 si integra ).

Il fago P1 è un fago lisogeno che effettua tutto il proprio ciclo **allo stato extracromosomico come un plasmide.**

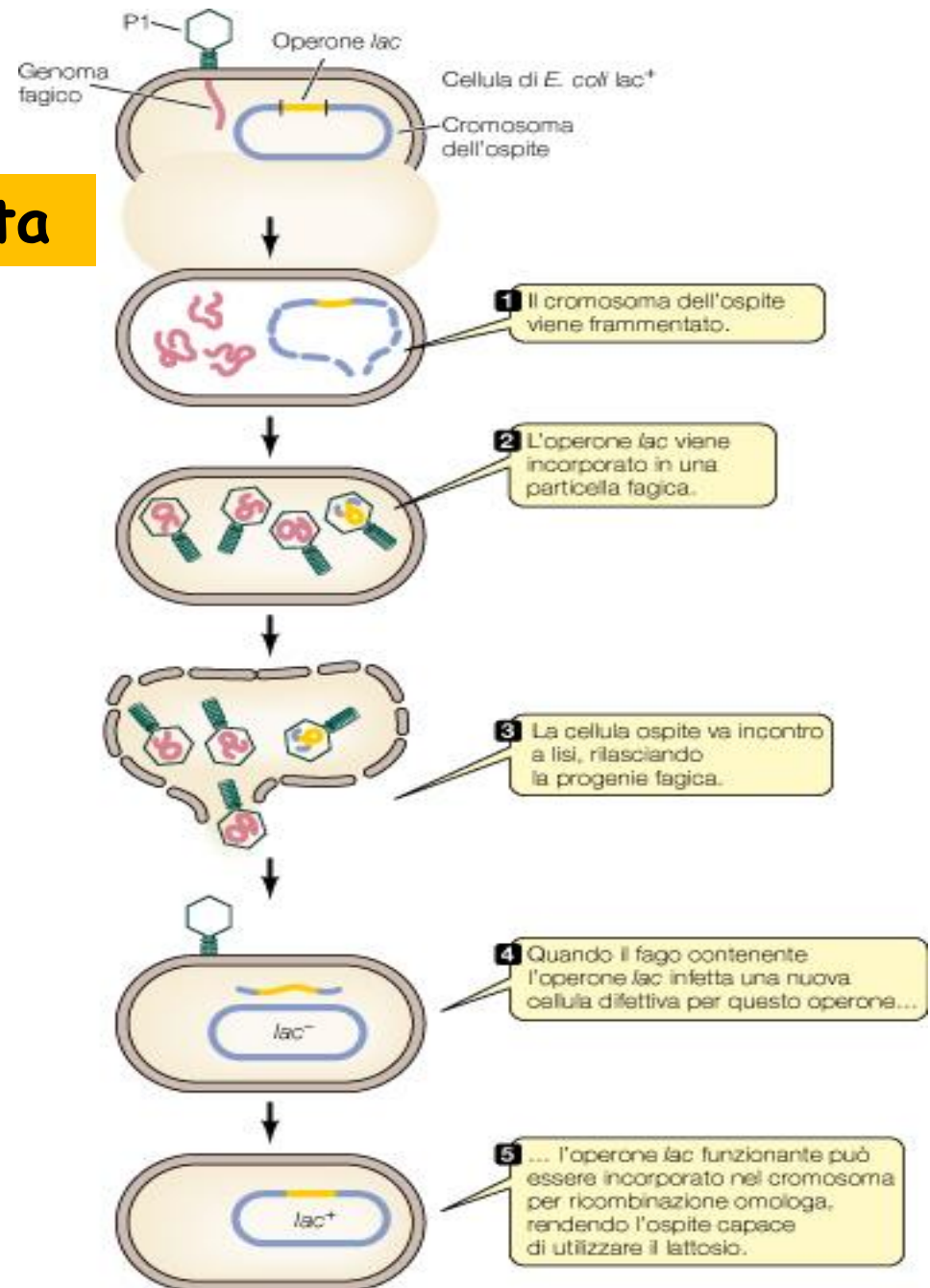
Il DNA circolare a DS viene replicato analogamente a quello di  $\lambda$  prima con una replicazione di tipo bidirezionale in seguito con la forma a cerchio rotante.

L'impacchettamento del DNA avviene con il meccanismo della testa piena a partire da un sito definito **PAC** riconosciuto dalla terminasi P1 specifica

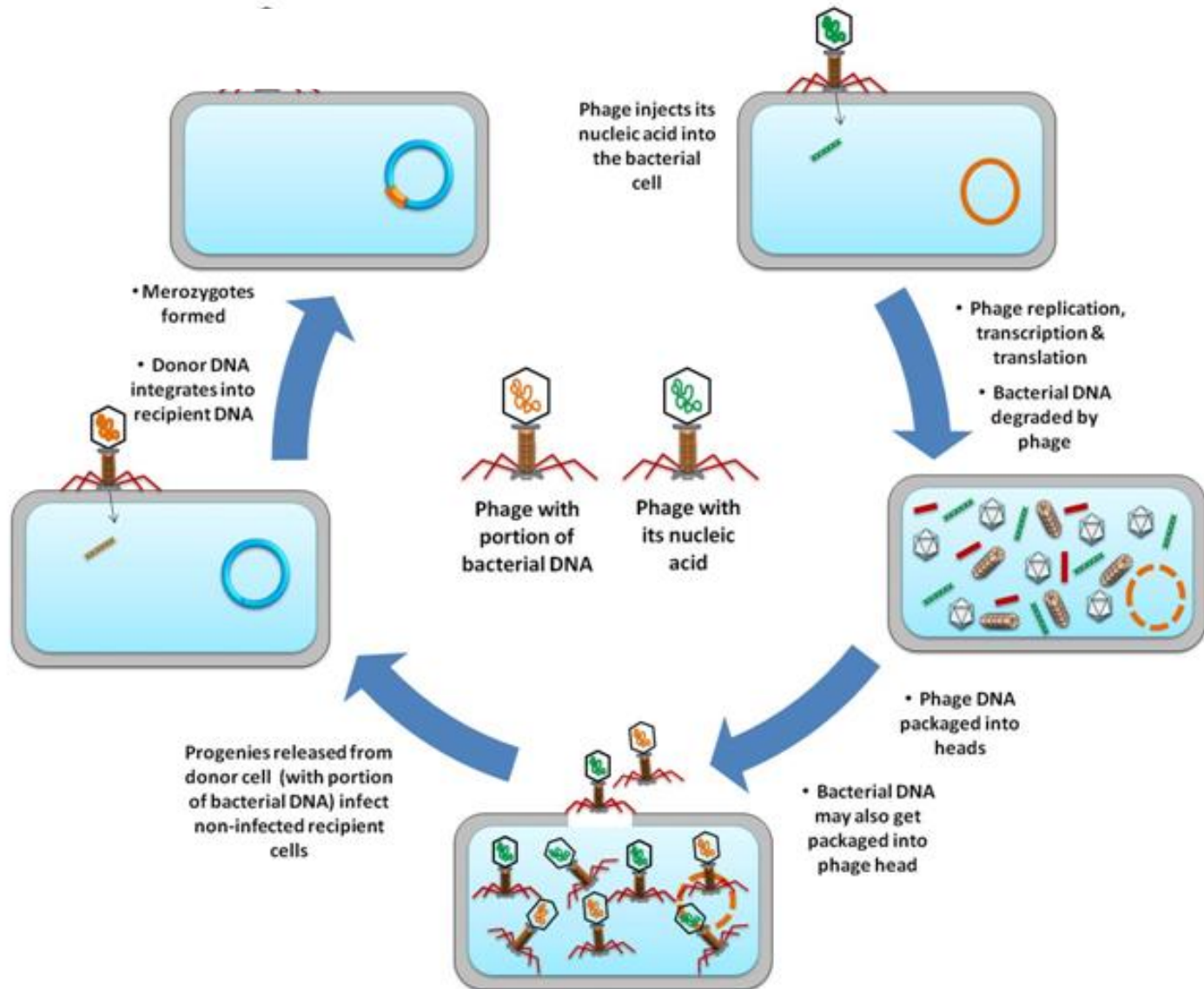
## La trasduzione generalizzata

La terminasi del fago P1 può erroneamente tagliare il cromosoma dell'ospite ed inserire nelle teste del fago frammenti di DNA cromosomico.

A differenza della trasduzione specializzata, vi saranno particelle trasducenti contenenti solamente DNA fagico o solamente DNA cromosomico (1 su 1000))



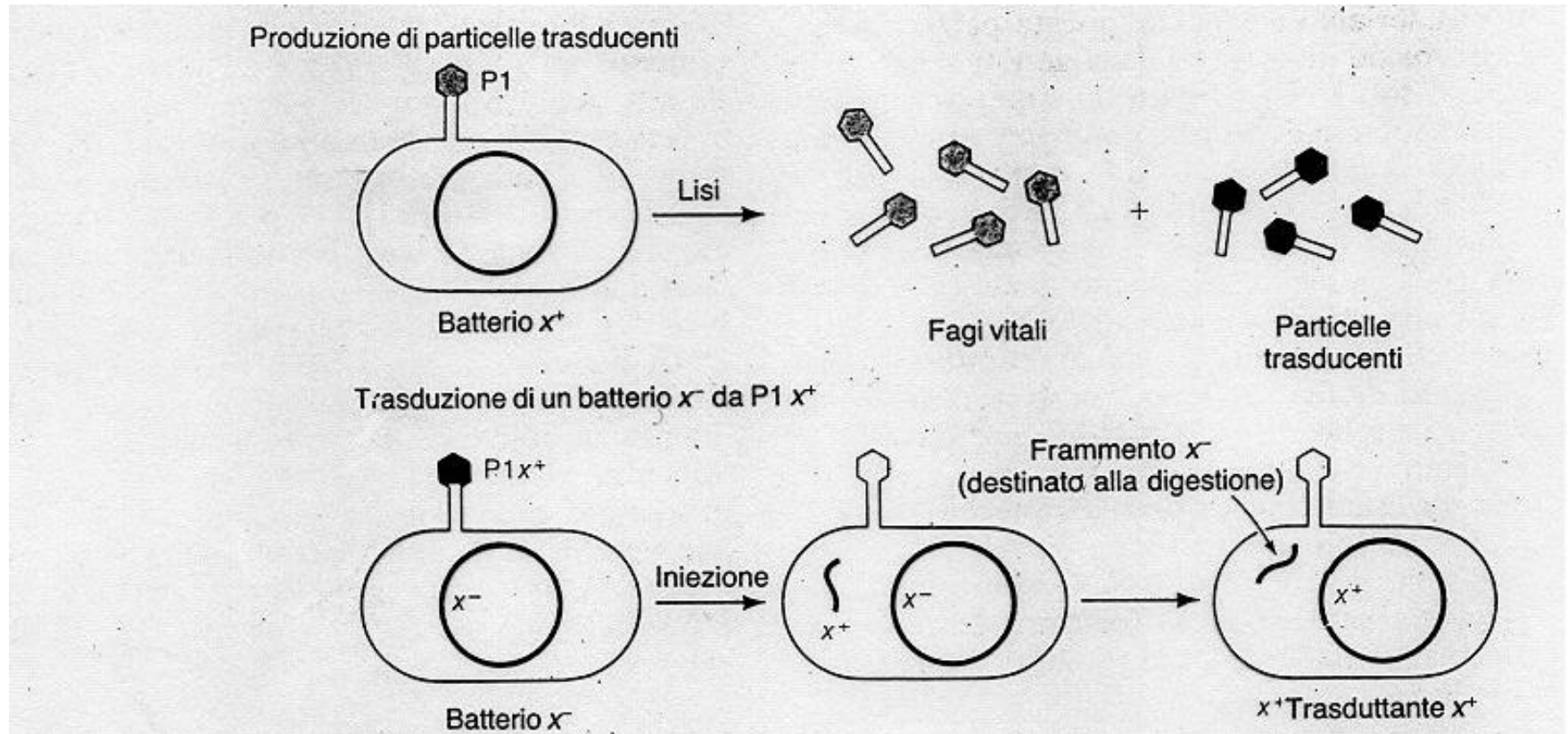
# Trasduzione generalizzata : 2 tipi di particelle fagiche



# La trasduzione generalizzata

La particella fagica trasduce frammenti di cromosoma di dimensione analoga al DNA fagico per un errore di impacchettamento. Fagi che effettuano la trasduzione generalizzata sono P1 ( E.coli ) o P22 ( Salmonella)

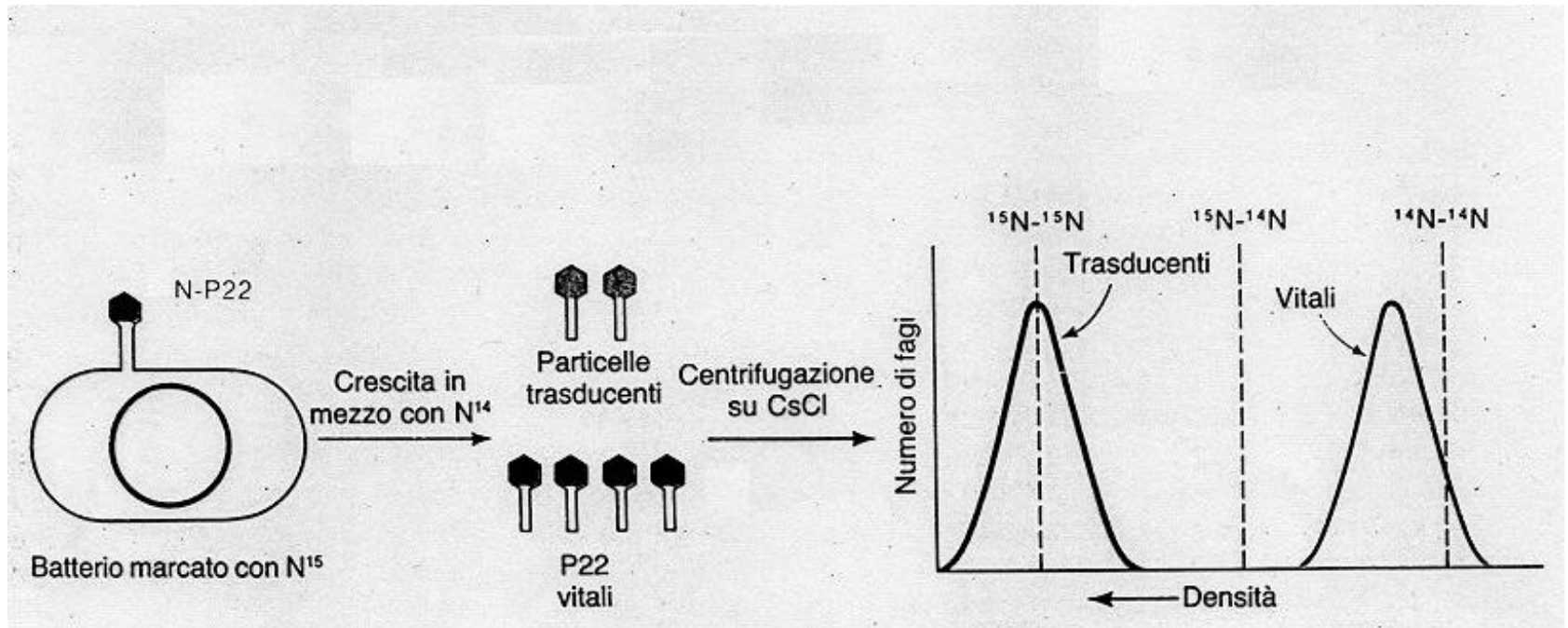
non esistono particelle ibride ma fagi traducenti o fagi normali



Un batterio cresciuto in terreno con  $N^{15}$  ( cromosoma marcato con isotopo  $N^{15}$ ) viene infettato con un fago tipo P1 (P22).  
Dopo l'infezione il batterio infettato viene fatto crescere su terreno normale ( $N^{14}$ ). In seguito a lisi si recuperano le particelle fagiche e si osservava la presenza di 2 popolazioni:

1. costituita da particelle trasducenti con DNA marcato con  $N^{15}$  (frammenti di cromosoma)
2. costituita da particelle vitali con DNA neoformato (sintetizzato in terreno normale)

### ASSENZA DI FAGI CON DNA IBRIDO



## Perché avviene la trasduzione generalizzata ?

La terminasi riconosce oltre al sito PAC anche dei siti pseudo PAC che sono localizzati sul cromosoma di E.coli ed è in grado tagliare riconoscendo le dimensioni di un frammento.

Durante l'impacchettamento il macchinario non distingue tra DNA cromosomico e DNA fagico e per questo in alcune particelle sarà inglobato solo DNA cromosomico

Qual è il destino della molecola di DNA iniettata in una cellula batterica da un fago P1 trasducente ?

- Non contiene geni fagici
- Non può replicarsi
- è un DNA a doppia elica lineare

Quindi

- Verrà degradata a meno che non riesca a ricombinare con geni omologhi presenti sul cromosoma della cellula infettata

Qual' è il destino di un fago  $\lambda$  trasducente?

- contiene geni fagici
- Può replicarsi
- è un DNA a doppia elica in grado di circolizzare

Quindi

Rimarrà allo stato extracromosomico

Se infetta un ceppo lisogeno per  $\lambda$  wt potrà integrarsi e poi dare origine a nuove particelle virali

### **Perché la phagetherapy può essere una nuova strategia?**

- Il problema della resistenza agli antibiotici sta aumentando**
- Il numero di nuovi antibiotici in sperimentazione è limitato**
- Molte infezioni croniche sono dovute alla formazione di biofilm contro i quali gli antibiotici hanno effetto limitato**

in CF-patients: *Pseudomonas aeruginosa*

Nelle otiti croniche *Haemophilus influenzae*, *Alloisococcus otitidis*?

Nelle infezioni urinarie uropathogenic *Escherichia coli*

Nelle vaginosi : *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*

Nelle ustioni *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

nelle infezioni di cateteri , valvole , protesi : *Staphylococcus* spp.

# Quali sono i possibili usi della phagetherapy?

## 1. Il classico : l'uso di un cocktail di fagi litici virulenti come antibatterici

Merril et al. 2003. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature Reviews/Drug Discovery* 2: 489-497.

## 2. l'uso di prodotti derivati da fagi quali T4-lisozima, depolimerasi della capsula, lisine etc

Loeffler et al. 2001. (Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 294: 2170-2172.

## 3. Fagi lisogenici per il rilascio in situ di geni particolari quali :

--> *in situ* delivery to bacterial cells of

- \* killing genes (doc)

- \* antisense RNA to block translation

Westwater et al. 2003. Use of a genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1301-1307.

## 4. Utilizzo dei fagi come probiotici con effetti immunomodulatori

Phages inhibit human T-cell activation and proliferation

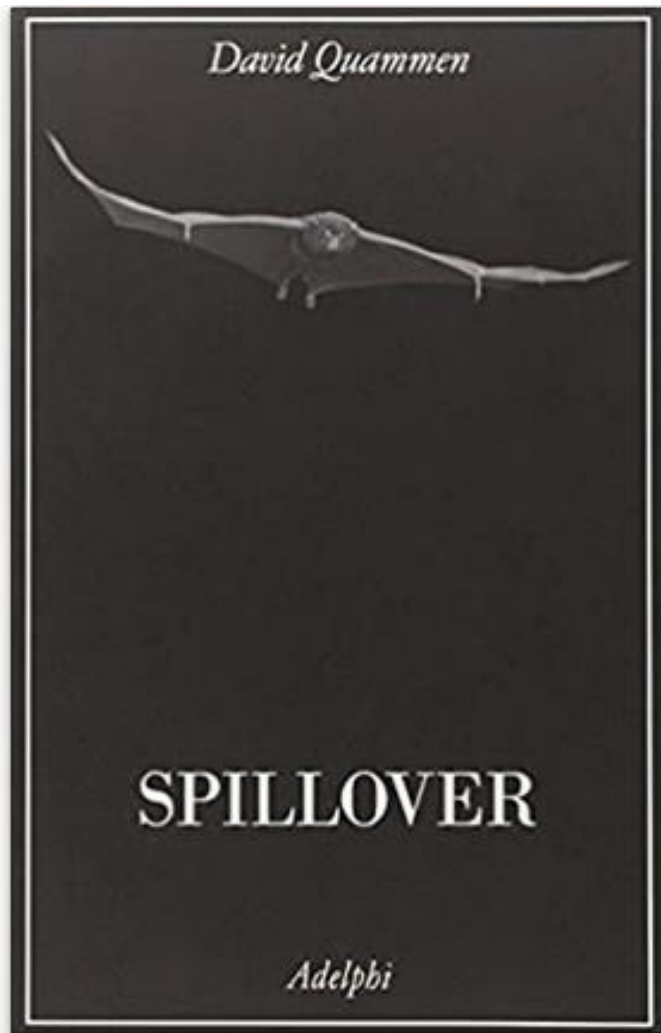
Phages diminish cellular infiltration into allogeneic skin allografts

Gorski et al. 2006. Bacteriophages and transplantation tolerance.

*Transplant. Proc.* 38: 31-333.

## Quali sono i potenziali vantaggi della phagetherapy ?

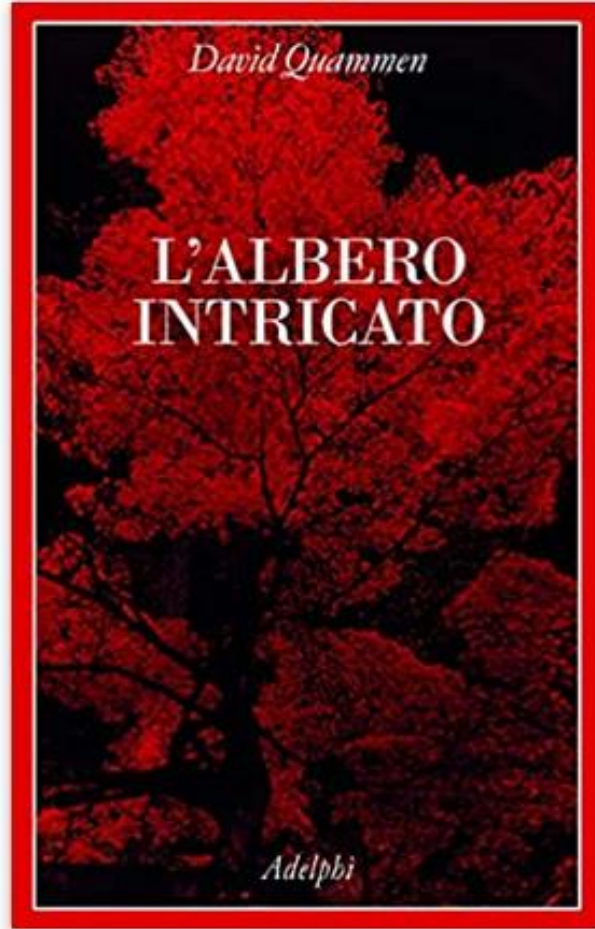
- ***Nessun effetto sul microbioma commensale***
- ***Nessun effetto di resistenza crociata***
- ***Possibilità di creare un cocktail di fagi che può essere facilmente e personalizzato sul paziente /infezione***
- ***I batteri MDR (Multi Drug Resistant) possono essere trattati***



Spillover :David Quammen

L'evoluzione delle pandemie

Tante storie sul passaggio di  
virus e batteri e parassiti  
dagli animali all'uomo



L'albero della vita e la scoperta del trasferimento genico orizzontale

Geni che si muovono tra specie diverse.....

Tra Batteri -Archea ed Eucarioti

Sei interessato ai diversi aspetti della Microbiologia ??

I nostri corsi specialistici nelle LM

Genetica dei Microrganismi ( prof. F. Ascenzioni)

Microbiologia Cellulare e Vaccinologia (Dr.ssa Martina Pasqua)

Microbiologia molecolare e genomica microbica ( Prof. B. Colonna- A. Carattoli )

Virologia Molecolare ( Prof.Matusali )

Microbiologia ambientale ( Prof. Colonna -A.Carattoli )

# **Microbiologia molecolare e genomica microbica**

## **B.Colonna A.Carattoli**

**Insegnamento del Corso di Laurea in Biotecnologie Genomiche, Industriali e Ambientali  
Selezionabile come esame a libera scelta per le LM in Biologia e Tecnologie cellulari (BTC),  
Genetica e Biologia Molecolare (GBM), Biotecnologie mediche e farmaceutiche**

### Programma del corso

#### *Genomica microbica*

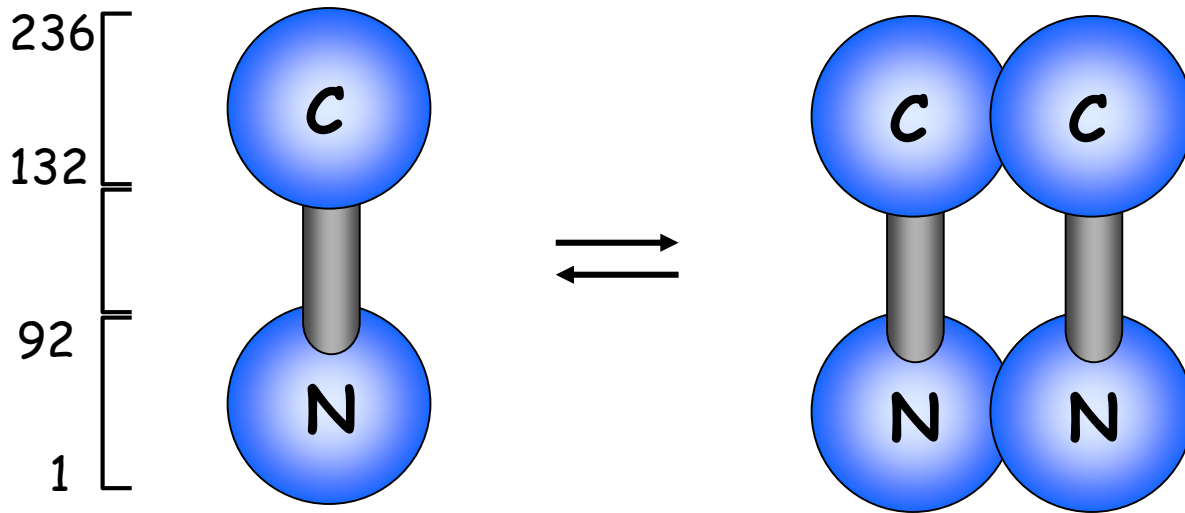
- Genoma dei batteri e analisi dati di sequenza
- Genoma minimo e genoma sintetico: verso il batterio artificiale
- Origine ed evoluzione del genoma di batteri patogeni modello:
  - Microbioma intestinale: analisi genomica e metagenomica
  - Microbioma alimentare e salute dell'uomo
- Il resistoma: evoluzione delle antibiotiche resistenze

#### *Microbiologia molecolare*

- Controllo epigenetico nei batteri
- Differenziamento nei batteri: modelli e regolazione
- Piccoli RNA e regolazione genica nei batteri
- L'immunità nei batteri, le sequenze CRISPR e la resistenza ai batteriofagi
- Nuove strategie antibatteriche: farmaci mirati e terapia fagica
- Biologia sintetica: concetti di base e potenziali applicazioni

## Approfondimento sulla regolazione di $\lambda$

# Il repressore cI di lambda



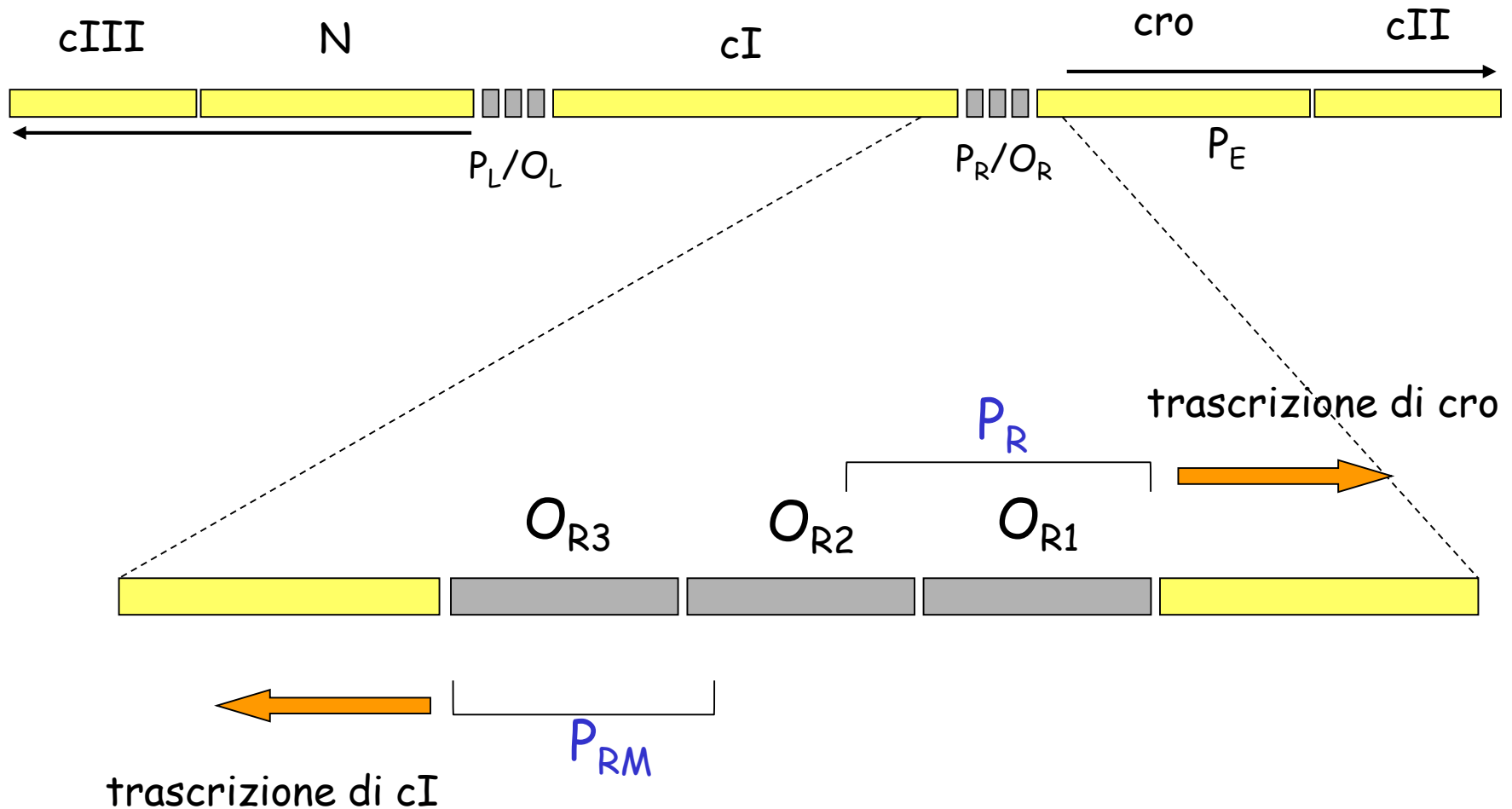
Il dominio N-terminale costituisce il sito di legame all'operatore

Il dominio C-terminale è responsabile della formazione del dimero

Il repressore è capace di legarsi al DNA solamente come dimero

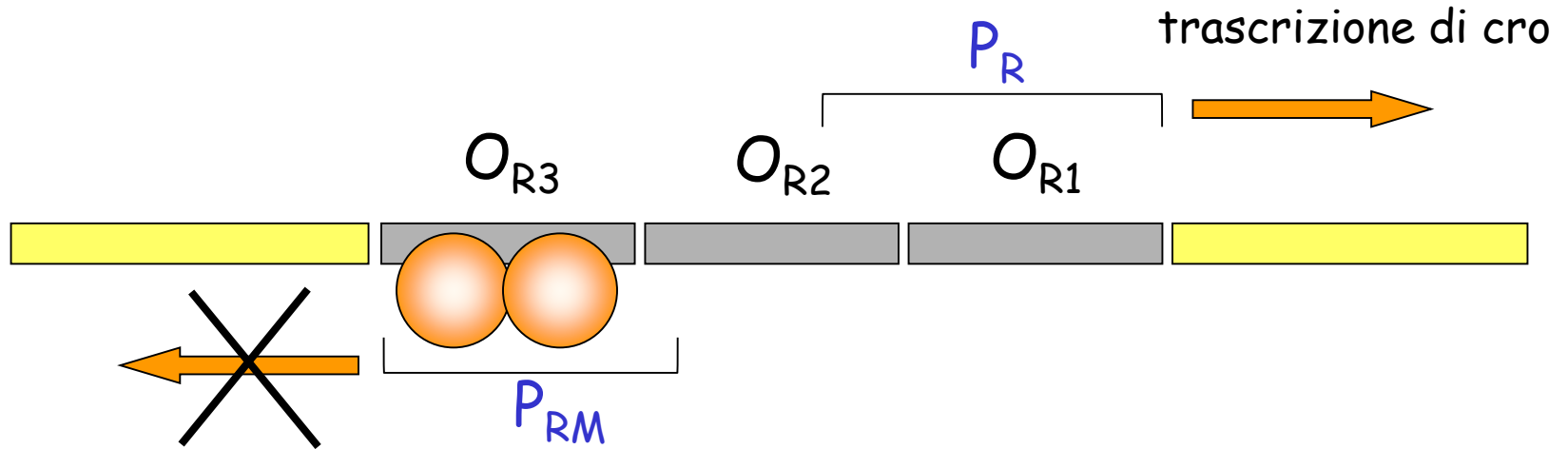
# La regione di immunità di $\lambda$

La scelta tra il ciclo litico e il ciclo lisogenico avviene a livello della regione PR/OR evidenziata in basso. In questa regione è presente il promotore PR per la trascrizione di cro e degli altri geni verso destra, e il promotore PRM, orientato verso sinistra, per la trascrizione di cI. Sovrapposte ai due promotori vi sono le sequenze di tre siti operatori: le sequenze sono molto simili tra loro ma non identiche. I tre operatori vengono riconosciuti sia dalla proteina Cro che dalla proteina cI ma con diversa affinità



# L'interruttore genetico di $\lambda$

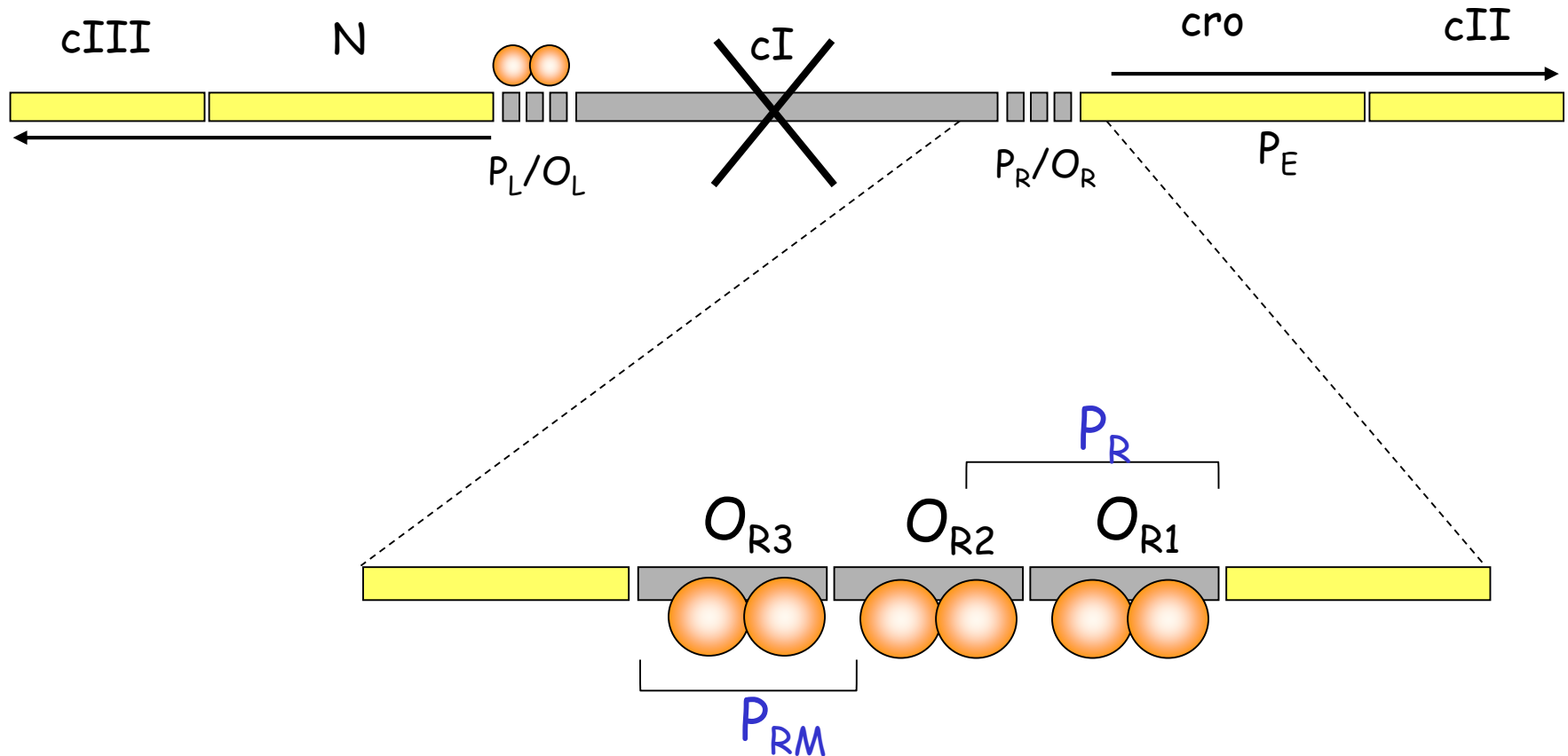
La proteina Cro riconosce con maggiore affinità l'operatore  $O_{R3}$ . In questo modo si comporta come un repressore per la trascrizione di  $cI$  a partire da  $P_{RM}$ . La RNA Polimerasi potrà continuare a legarsi a  $P_R$  e trascrivere i geni verso destra (la stessa proteina Cro e i geni precoci ritardati). Quando la proteina Cro si lega alla regione  $PR/OR$  prima della proteina  $cI$ , si procede inesorabilmente verso la via litica.



trascrizione di  $cI$

Il legame di un dimero di Cro in  $O_{R3}$  blocca la sintesi del repressore  $cI$ .  
E' stata scelta la via litica

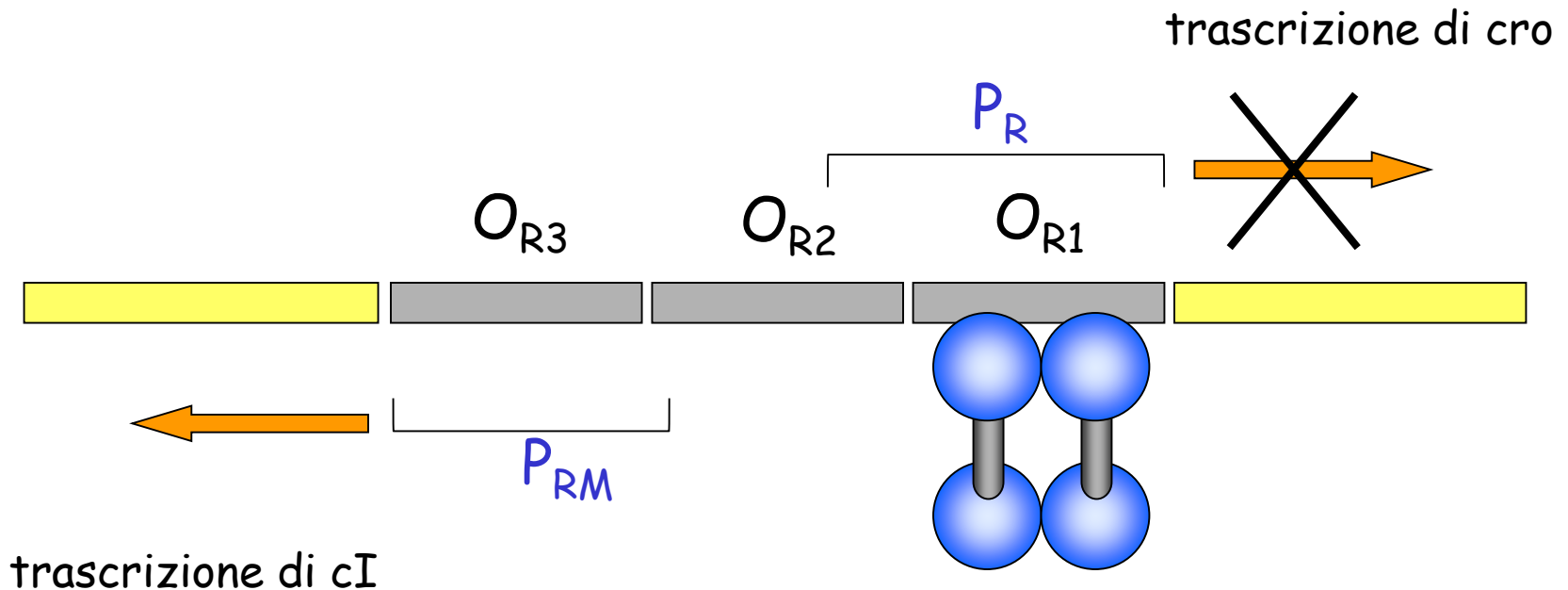
# Ciclo litico



Verso la fine della fase precoce ritardata Cro si lega anche a  $O_{R2}$  e  $O_{R3}$  come pure a  $P_L/O_L$  bloccando la trascrizione dei geni precoci. A questo punto verranno trascritti solo i geni tardivi responsabili della sintesi della testa e della coda (**vedi diapositiva 18**).

# L'interruttore genetico di $\lambda$

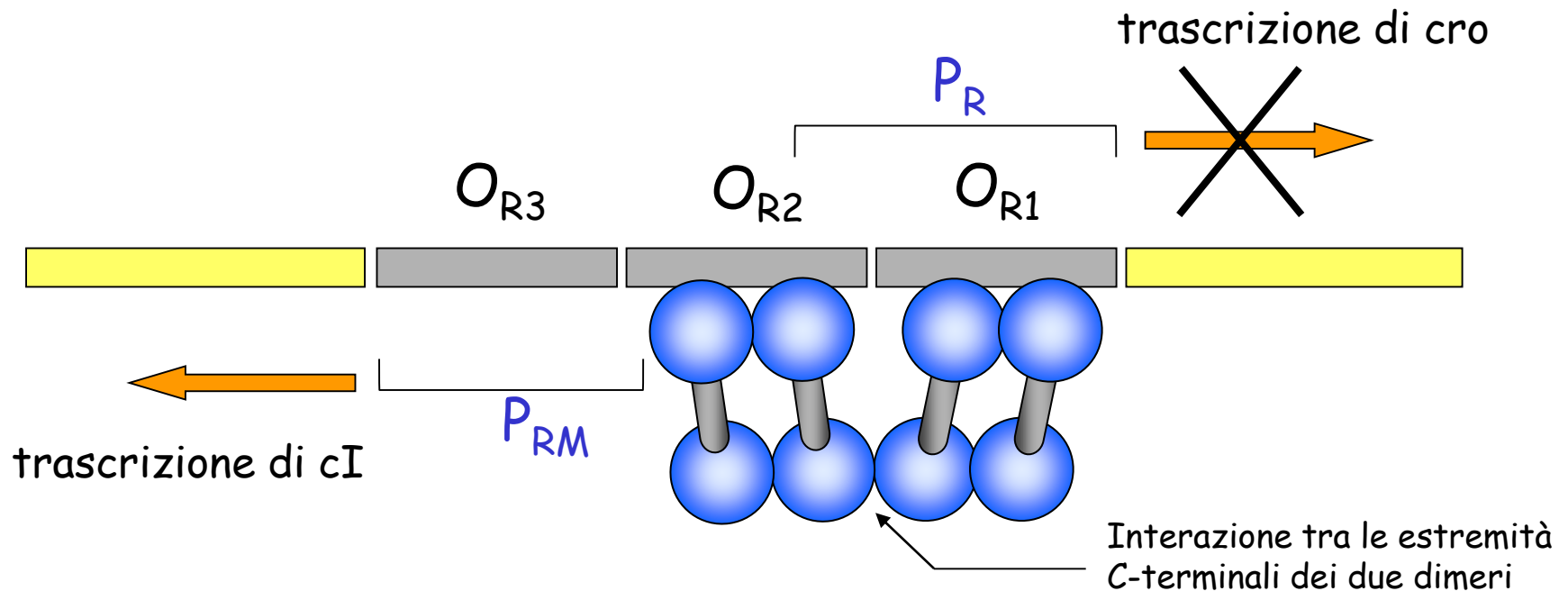
Se invece è la proteina cI a riconoscere prima la regione PR/OR gli effetti saranno diversi. La proteina cI riconosce con maggiore affinità l'operatore  $O_R1$ : questo legame impedisce alla RNA Polimerasi di legarsi al promotore PR con il risultato di impedire la trascrizione di Cro e dei geni a destra. Quindi la proteina cI in posizione  $O_R1$  si comporta da repressore (regolazione negativa).



- Il repressore cI ha una maggiore affinità per il sito  $O_{R1}$
- Il legame del repressore cI in  $O_{R1}$  blocca la sintesi di Cro.

# L'interruttore genetico di $\lambda$

Il dimero di cI può legarsi anche a  $O_{R2}$  ma con affinità minore rispetto a  $O_{R1}$ . Il legame a  $O_{R2}$  diventa possibile solo quando è già presente un dimero di repressore in  $O_{R1}$ : responsabile dell'aumento dell'affinità per  $O_{R2}$  è l'interazione che si stabilisce a livello delle estremità C-terminali dei due dimeri. Quindi il legame del dimero in posizione  $O_{R1}$  favorisce il legame del secondo dimero in  $O_{R2}$ : questo è un esempio di legame cooperativo.

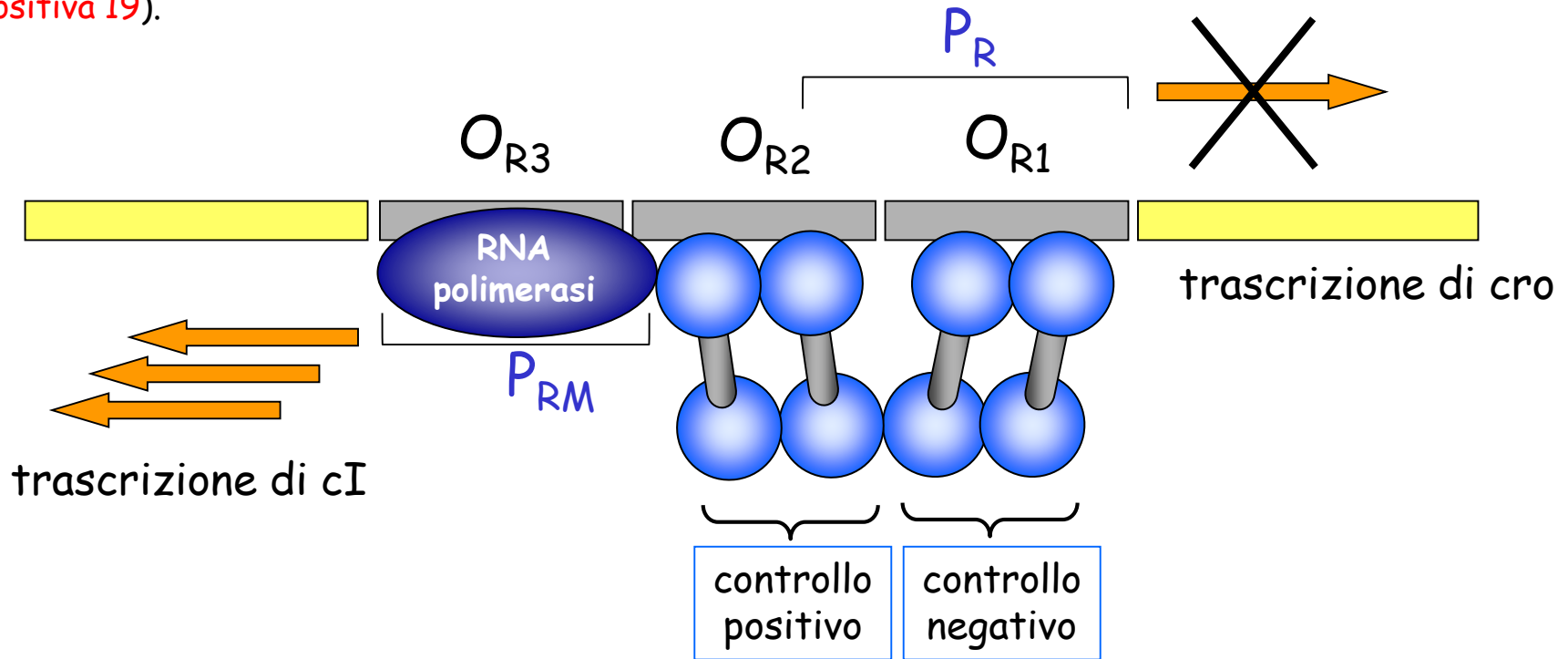


- L'affinità per  $O_{R2}$  è inferiore all'affinità per  $O_{R1}$
- Il legame del dimero in posizione  $O_{R1}$  favorisce il legame di un secondo dimero in posizione  $O_{R2}$  (**legame cooperativo**)

# L'interruttore genetico di $\lambda$

Il dimero di cI in posizione  $O_{R2}$  svolge una funzione diversa da quello in  $O_{R1}$ : è un regolatore positivo della trascrizione in quanto favorisce il legame della RNA Polimerasi al promotore  $P_{RM}$ . Da questo promotore viene trascritto solo il gene cI. E' un esempio di regolazione autogena in quanto una proteina è regolatrice della propria sintesi.

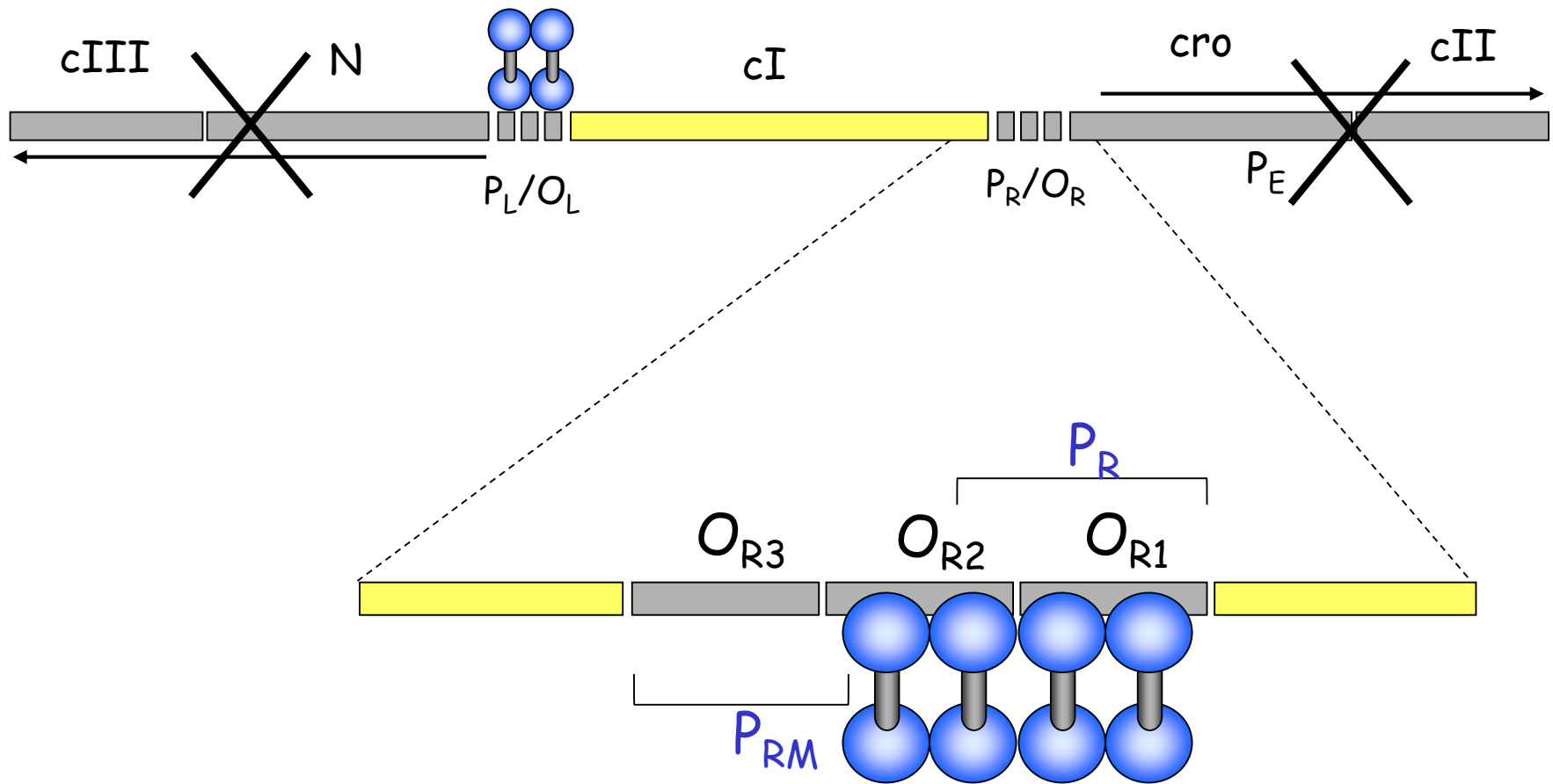
D'ora in poi la trascrizione di cI avverrà solo a partire da  $P_{RM}$  e non più da PE anche perchè cI blocca la trascrizione dei geni precoci e quindi anche di cII e cIII come si può vedere nella prossima diapositiva. E' stata scelta la via lisogenica e il DNA di lambda si integrerà nel cromosoma batterico (**vedi diapositiva 19**).



Il legame del dimero in posizione  $O_{R2}$  regola positivamente la trascrizione del repressore stesso (**regolazione autogena**)

# Ciclo lisogenico

Questa è la situazione tipica di un batterio lisogeno per lambda: l'unico gene a essere trascritto è il gene *cI*. Fintanto che il repressore *cI* sarà presente in concentrazioni adeguate sarà assicurato il blocco a livello di *P<sub>L</sub>/O<sub>L</sub>* e *P<sub>R</sub>/O<sub>R</sub>* e verrà mantenuto lo stato lisogenico.



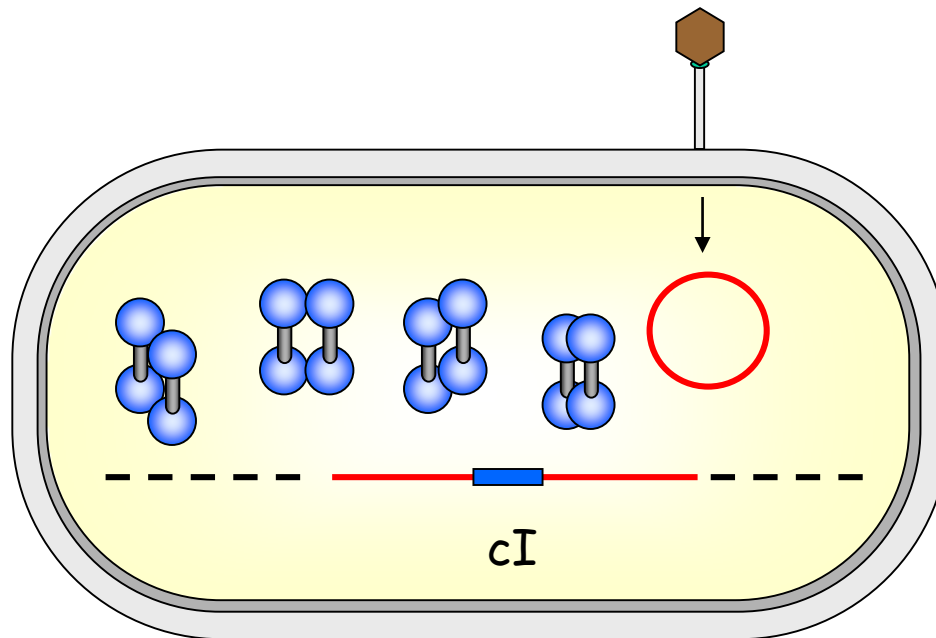
La continua trascrizione di *cI* assicura il mantenimento dello stato lisogenico. Un eccesso di *cI* viene ricondotto alla norma grazie al legame in posizione *O<sub>R</sub>3*.

# L'immunità alla superinfezione

Batterio lisogeno per  $\lambda$  risultata immune all'infezione di  $\lambda$

La presenza del repressore all'interno del batterio lisogeno spiega anche il fenomeno dell'immunità alla superinfezione ovvero un batterio lisogeno per lambda non verrà ucciso da ulteriore infezione di altri fagi lambda presenti nell'ambiente (ma può sempre essere infettato da fagi diversi da lambda!!!).

I dimeri di cI presenti nel batterio lisogeno si legheranno immediatamente ai siti  $O_R/P_R$  e  $O_L/P_L$  del DNA infettante bloccando la trascrizione dei geni precoci.



Il repressore codificato dal profago blocca la trascrizione dei geni precoci del DNA infettante legandosi a  $P_R/O_R$  e  $P_L/O_L$

# Induzione del ciclo litico

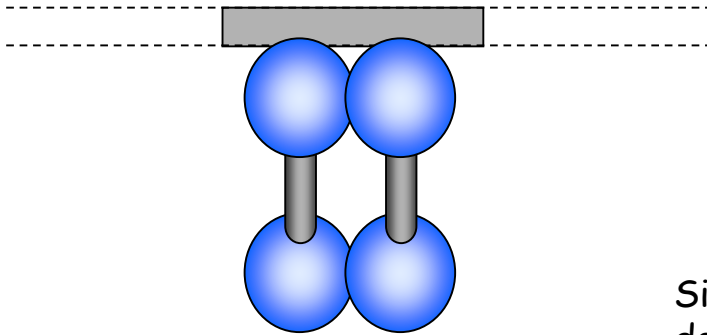
L'induzione rappresenta una risposta a fattori ambientali (luce UV) o mutageni chimici che danneggiano il DNA dell'ospite

Come parte della risposta SOS, aumenta la concentrazione della proteina RecA che normalmente è responsabile della ricombinazione genetica

Ad alta concentrazione RecA interagisce con cI stimolandone l'attività autoproteolitica del dominio C-terminale: il risultato è la rottura di cI che si separa nei due domini N-terminale e C-terminale. Non si potranno formare dimeri di repressore, i soli domini N-terminali non sono capaci di legarsi agli operatori in modo efficace e nel giro di poco tempo non sarà più presente repressore funzionale.



# Induzione del ciclo litico



Si verifica, quindi, l'induzione del ciclo litico. Gli operatori dei siti  $O_R/P_R$  e  $O_L/P_L$  non verranno più bloccati da  $cI$  e quindi partirà la trascrizione dei geni che porteranno alla sintesi di una nuova progenie virale e alla lisi del batterio.



trascrizione dei geni litici

