

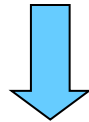
PLASMIDE : metamorfosi di un nome

Il termine PLASMIDE fu coniato da Joshua Lederberg nel 1952 per identificare qualunque forma di elemento genetico extracromosomico stabilmente mantenuto

Non vi erano distinzioni tra elementi di origine procariotica o eucariotica

- mitocondri , cloroplasti particelle virali o fagiche

1970-1980 introduzione delle tecniche di clonaggio



Il termine PLASMIDE descrive piccoli elementi di DNA circolare

Questa definizione risulta ben presto limitata in quanto :

- alcuni plasmidi non sono piccoli (2-25 kb) ma grandi (25-200 kb)
- alcuni plasmidi sono lineari

Alcuni plasmidi sono più grandi di genomi  MEGAPLASMIDI

Sinorhizobium meliloti ha due megapalsmidi di 1.35 (pSymBA) e 1.68 Mb(pSymB)

Treponema pallidum una spirocheta agente eziologico della sifilide ha un cromosoma di 1.1 Mb; *Mycoplasma genitalium* 0.58 Mb

La definizione STRUTTURALE (i.e. dimensioni) per differenziare plasmide e cromosoma non può essere valida

RICERCA di una definizione FUNZIONALE:

PLASMIDI codificano funzioni accessorie per la vita della cellula (antibiotico resistenza, utilizzazione di substrati, detossificazione metalli pesanti)

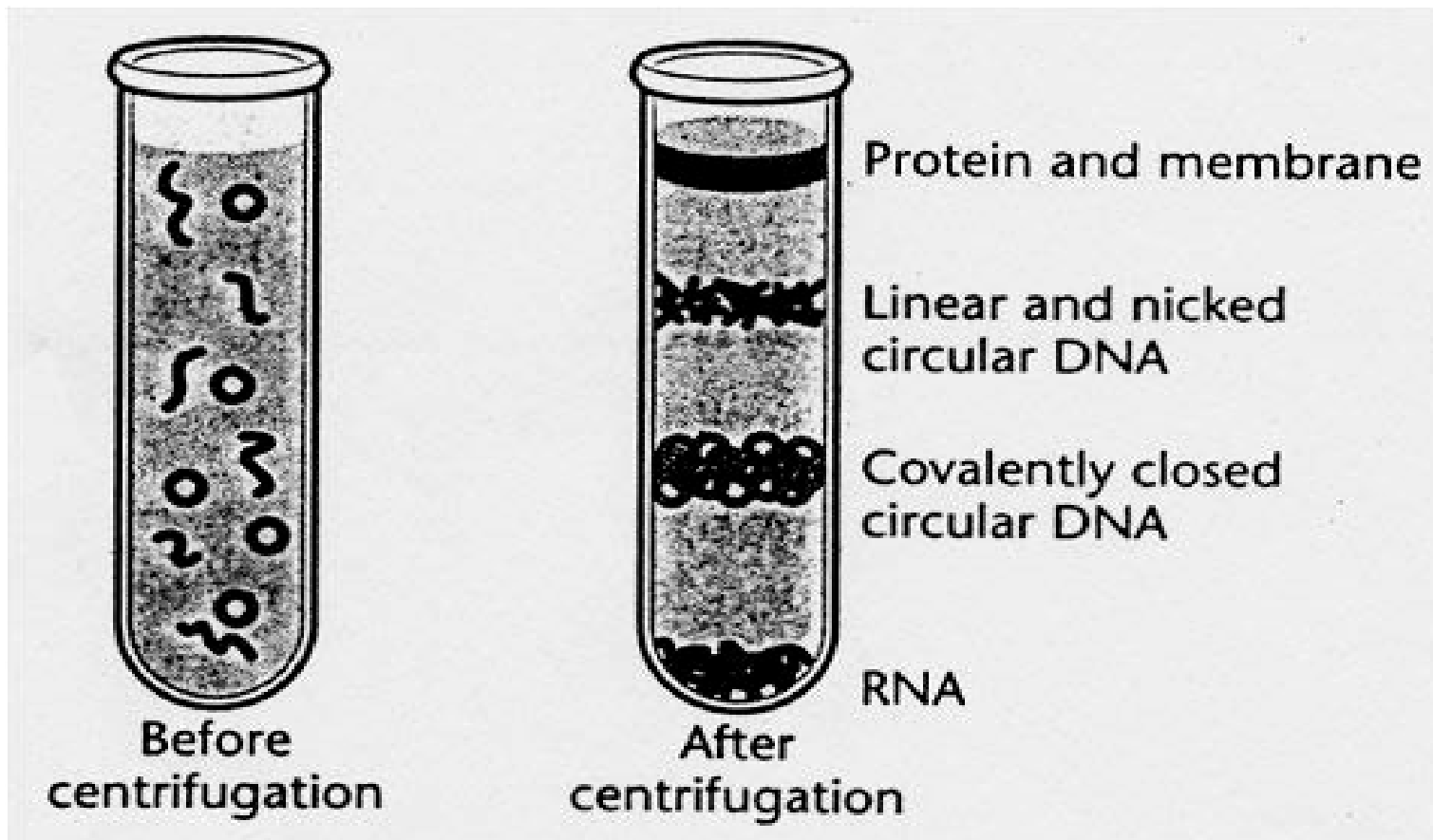
pSymB codifica l'unico tRNA che riconosce la tripletta CCG in *Rhizobium* : è quindi un cromosoma?

I plasmidi

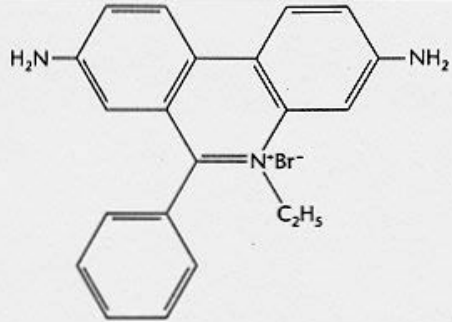
sono molecole a doppia elica di DNA in
grado di replicarsi autonomamente

REPLICONI

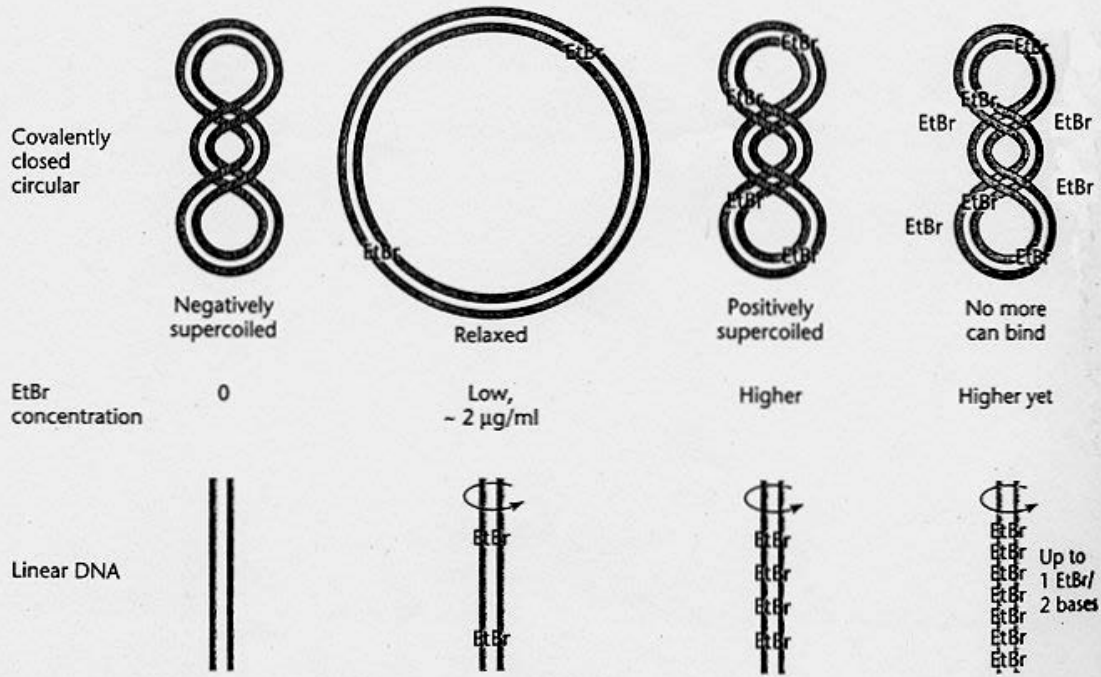
- Circolari covalentemente chiusi e superavvolti nella gran parte dei batteri
- Lineari nei batteri che contengono un cromosoma lineare (ad esempio Borrelia)



In un gradiente di **Cloruro di Cesio** in presenza di **Bromuro d'Etidio** si possono separare i plasmidi come molecole di DNA circolare covalentemente chiuso



Chemical structure of ethidium bromide



La presenza di Bromuro d'Etidio amplifica la differenza tra DNA lineare e DNA circolare covalentemente chiuso

Plasmidi di grandi dimensioni (50-300 kb)

 Basso numero di copie 1-3 / cellula
es. F, R100

Plasmidi di piccole dimensioni

 Alto numero di copie 20-30 /cellula
es. ColE1, pBR322, pUC18

Plasmidi di grandi dimensioni
generalmente CONIUGATIVI
es. F, R100

o difettivi coniugativi
es. pINV di Shigella, pVIR di Yersinia

Plasmidi di piccole dimensioni

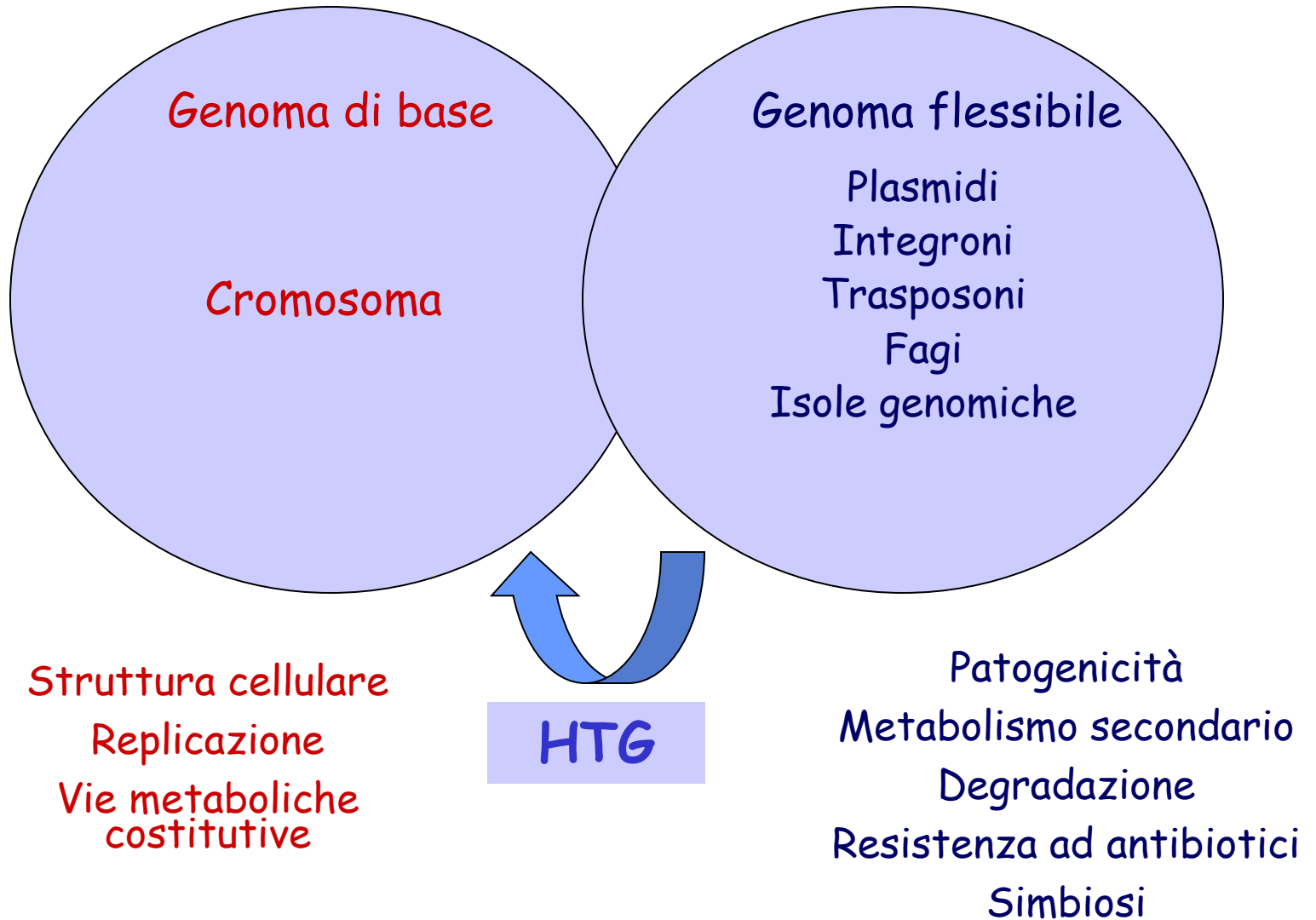
NON CONIUGATIVI

(ovvero privi del sistema TRA)

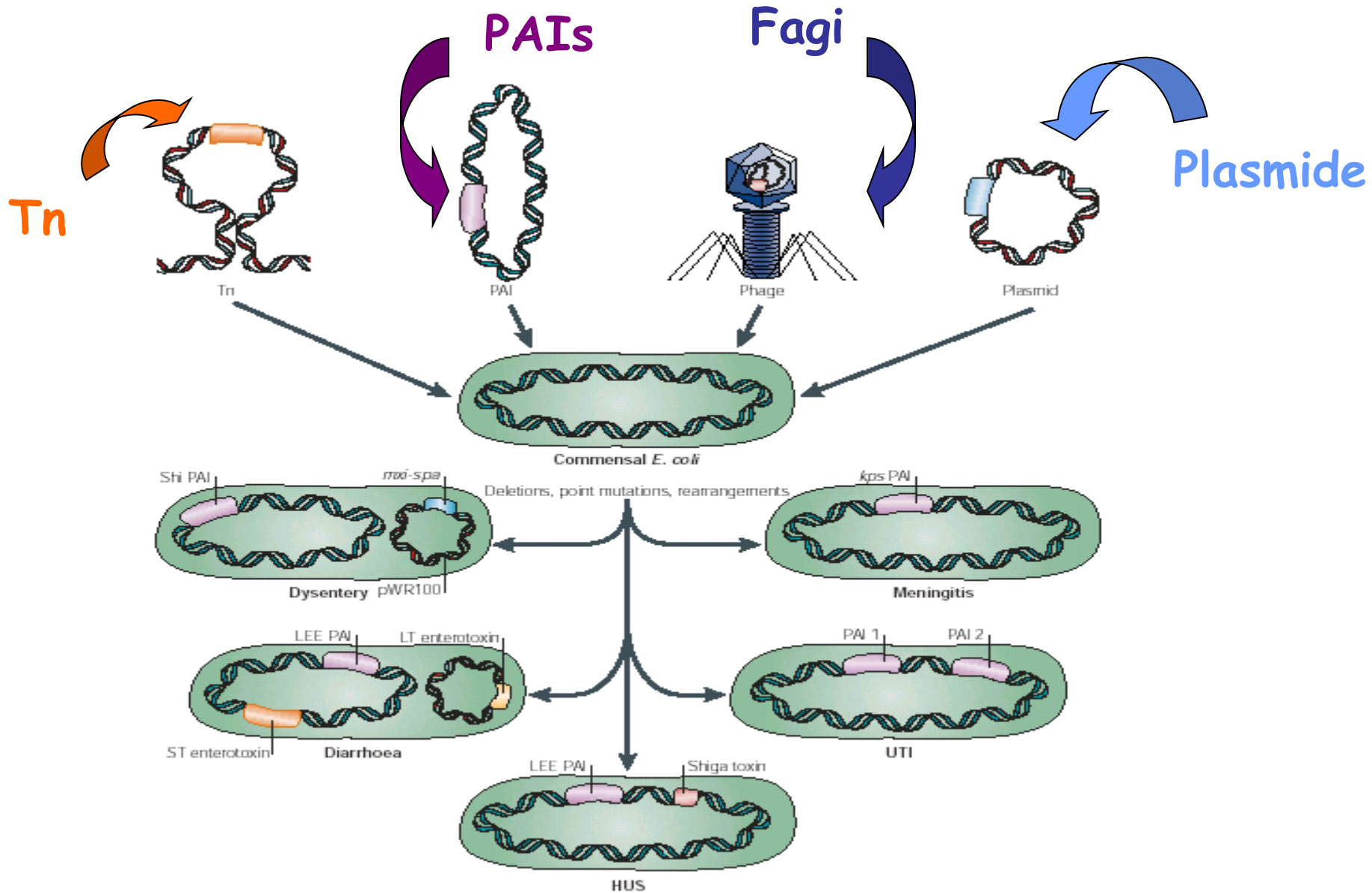
spesso MOBILIZZABILI

(ovvero capaci di utilizzare il sistema di trasferimento di un altro plasmide di tipo coniugativo presente nella cellula)

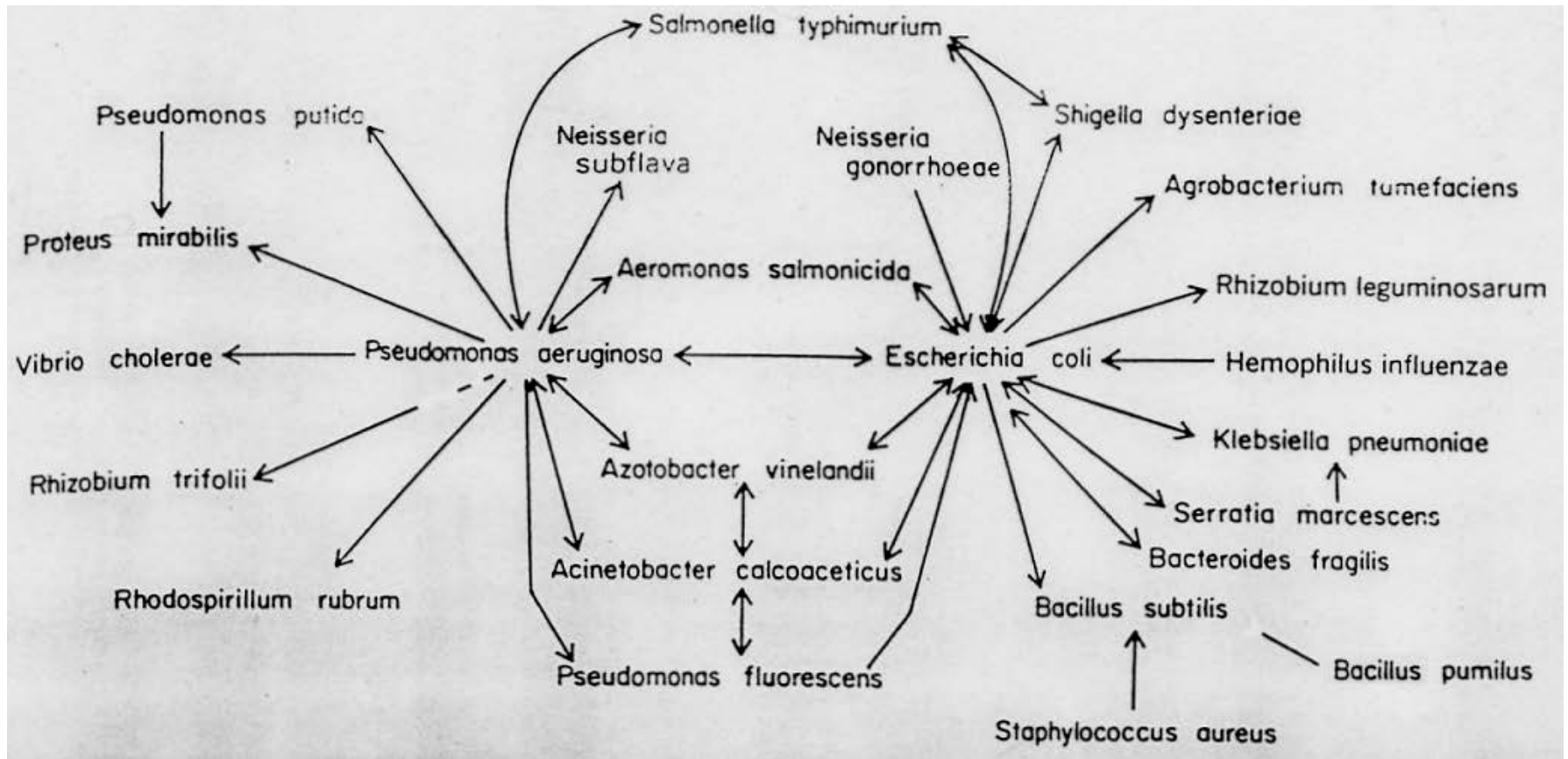
EVOLUZIONE DEL GENOMA BATTERICO



Le principali strutture coinvolte nel trasferimento genico orizzontale



I plasmidi permettono lo scambio genetico tra le diverse specie e sono tra i principali responsabili del **Trasferimento Genico Orizzontale (HGT)**



Caratteri fenotipici batterici associati alla presenza di plasmidi

Carattere

Specie batterica

FERTILITA'

La maggior parte degli organismi Gram-negativi;
Streptococcus faecalis
Streptomyces

RESISTENZA A:

Vari antibiotici

Diffuso

Vari ioni metallici

Diffuso

Fagi

E.coli

Attività battericida
del siero

E.coli

PRODUZIONE DI

Batteriocine	diffuso
Proteasi	<i>Streptococcus lactis</i>
Esotossina	<i>Clostridium botulinum</i>
Enterotossina	<i>E.coli, Staph.aureus</i>
Emolisina	<i>E.coli, Strep.fecalis</i>
Idrogeno solforato	<i>E.coli</i>
Cloramfenicolo	<i>Streptomyces</i>
Siderofori	diffuso

METABOLISMO DI

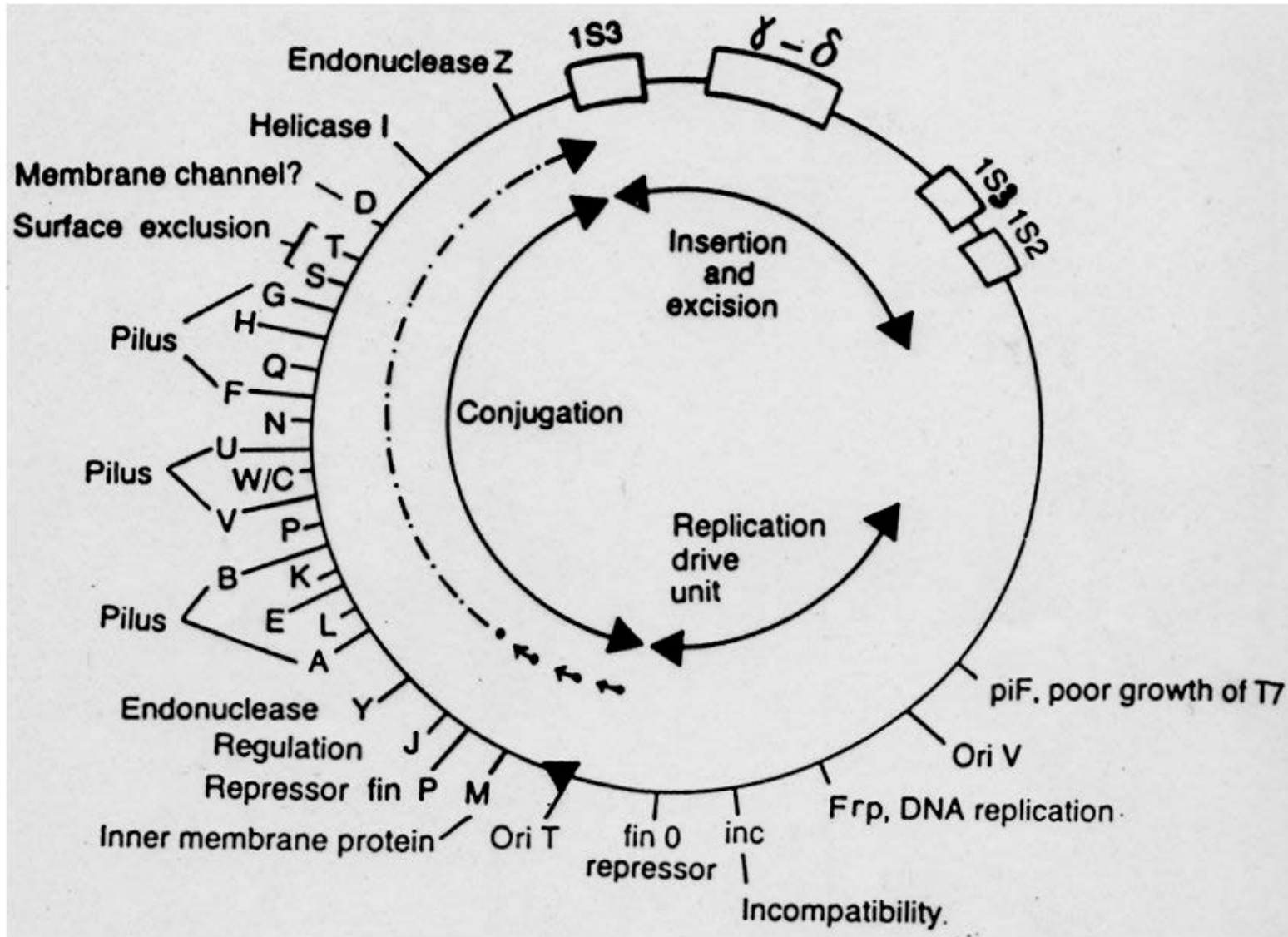
vari zuccheri	diffuso
Idrocarburi (toluene, xilene, canfora, etc)	<i>Pseudomonas</i>
Azoto (fissazione)	<i>Klebsiella</i>

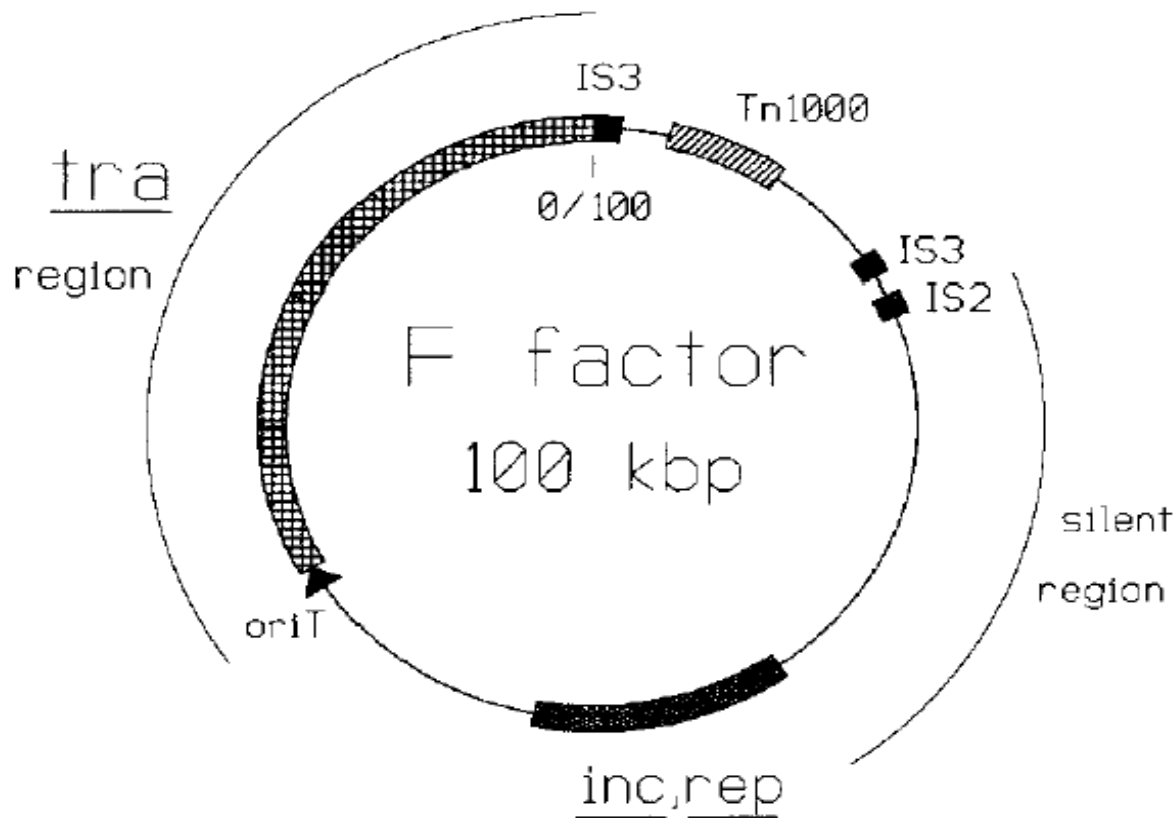
ONCOGENESI NELLE PIANTE

Agrobacterium tumefaciens

Organizzazione del plasmide F:

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



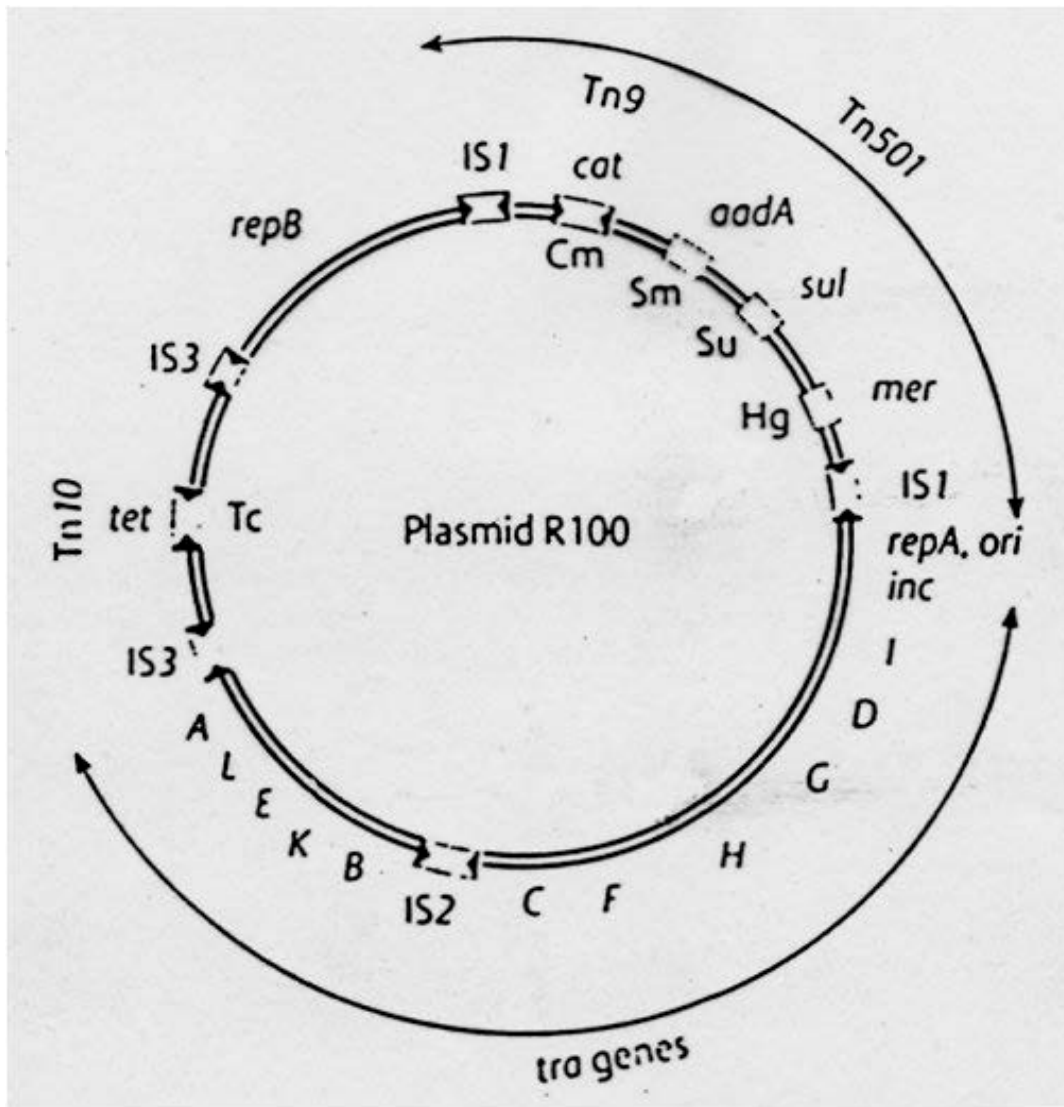


Organizzazione
di un plasmide:

F come sistema
modello

F può essere
suddiviso 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
- la regione responsabile del processo coniugativo

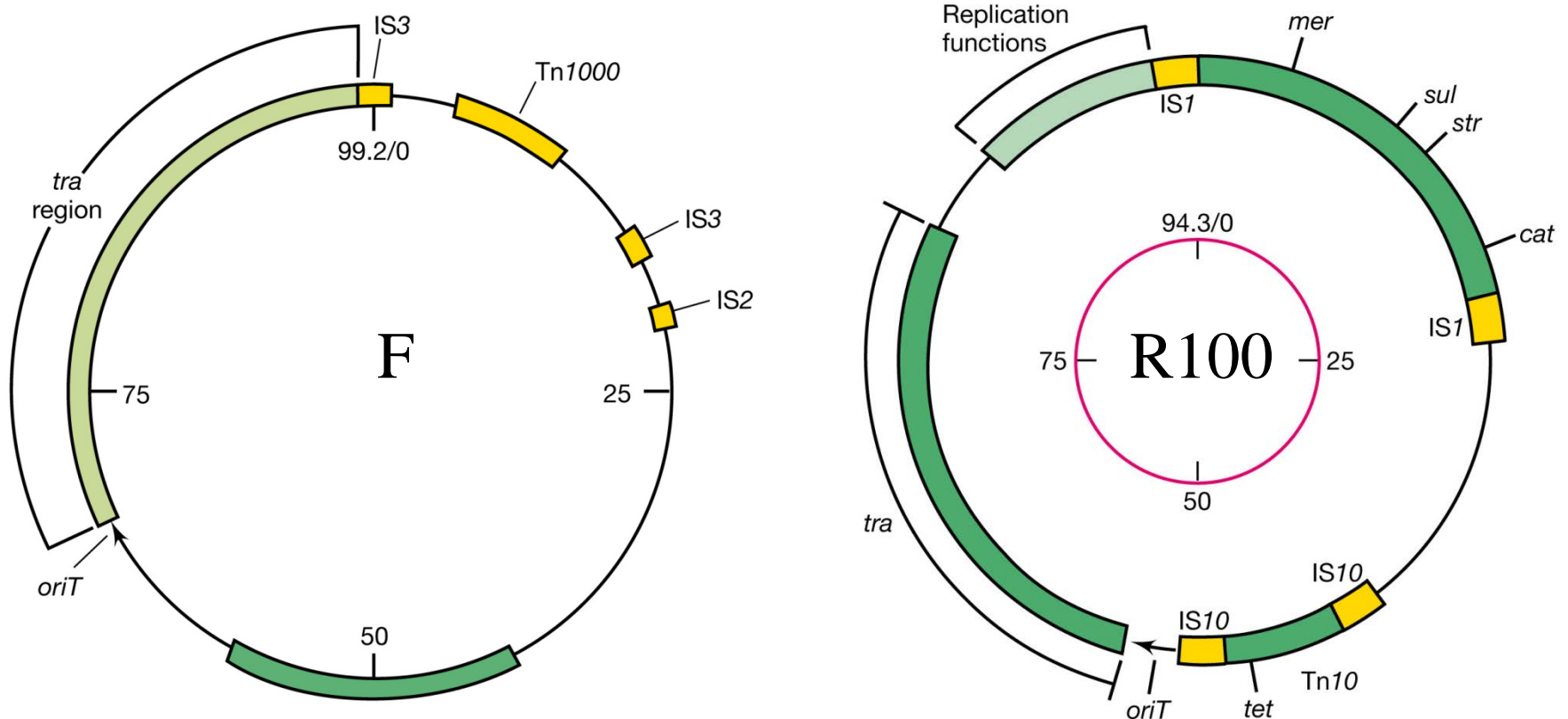


Organizzazione del plasmide R100(detto anche R1), uno dei primi plasmidi R identificati.

Struttura simile ad F con

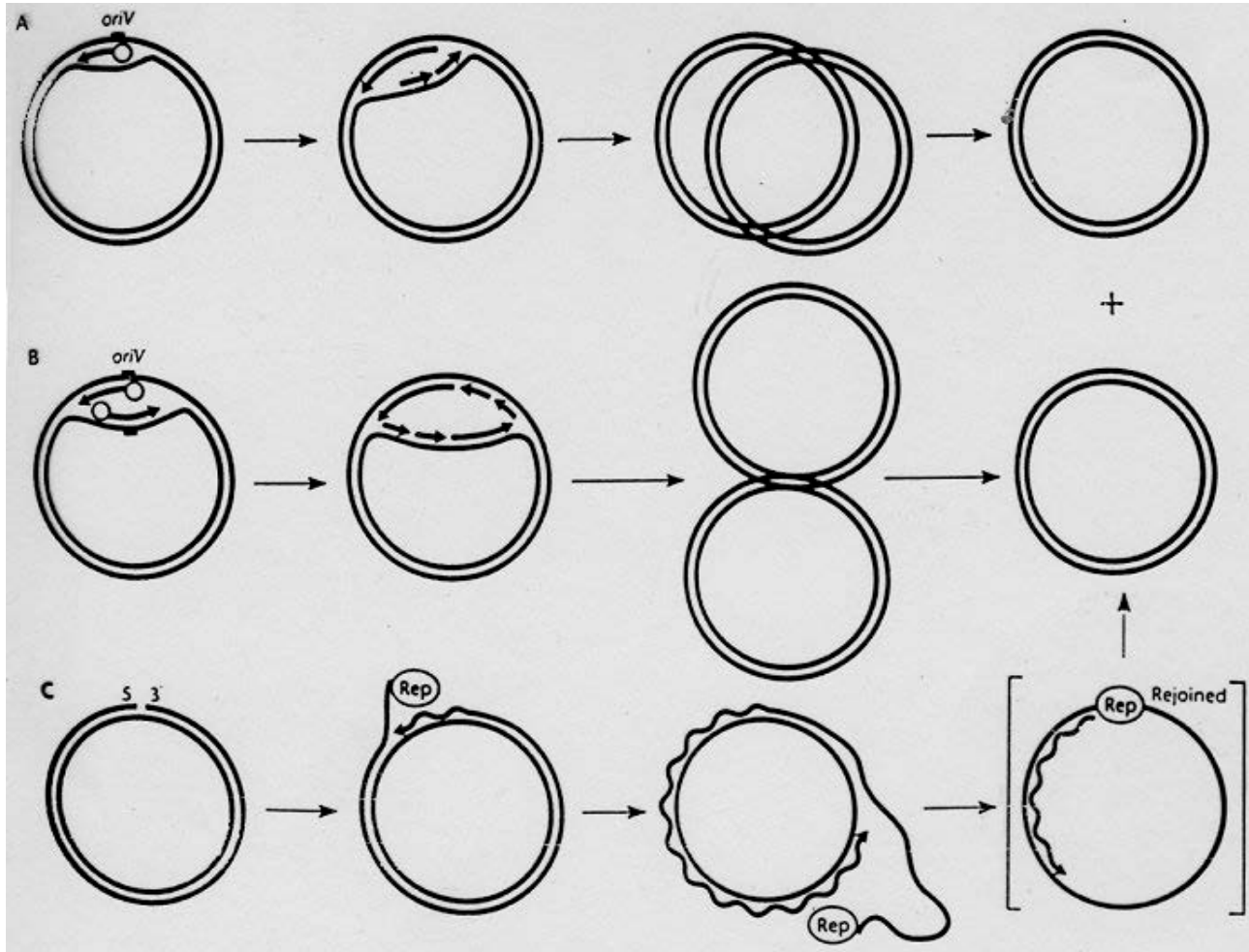
- ampia regione Tra,
- l'origine di replicazione , sequenze IS
- e geni di antibiotico resistenza (Tn, Tn compositi)

Confronto tra F ed R100: si noti come in R100 al posto di sequenze di inserzione (IS) vi siano trasposoni (Tn) portatori di geni di antibiotico resistenza



Come si replicano i plasmidi?

- replicazione monodirezionale (1 forca di replicazione)
- replicazione bidirezionale (2 forche di replicazione)
- replicazione a cerchio rotante



Plasmidi ed incompatibilità

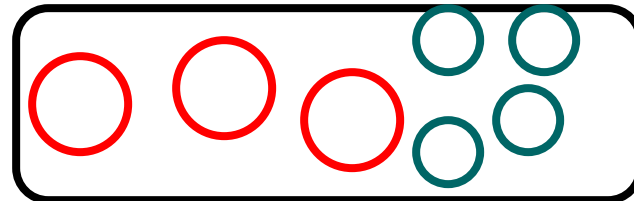
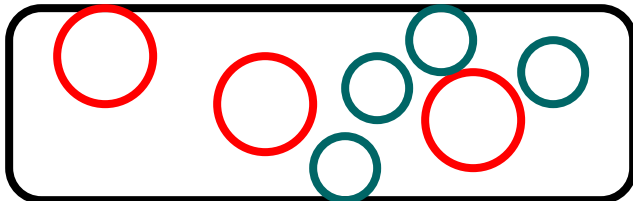
Viene definita incompatibilità l'incapacità di due plasmidi con sistemi simili di replicazione di coesistere nella stessa cellula.

L'arrivo in una cellula di un plasmide (B), che già possiede un plasmide (A) può determinare la competizione tra i 2 plasmidi per il raggiungimento del numero di copie prefissato per quel plasmide. Quindi se A è simile a B e se il loro numero di copie è 3/ cellula nel corso di alcune generazioni si verranno a creare cellule con plasmide A e cellule con plasmide B

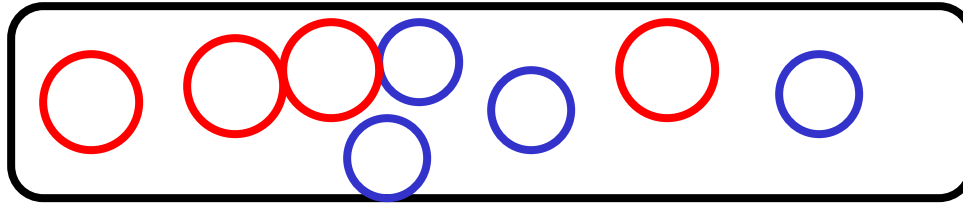
Invece se A e B sono diversi possono coesistere nella medesima cellula.

Plasmidi che hanno differenti meccanismi di controllo replicheranno indipendentemente l'uno dall'altro ed ognuno sarà ripartito tra le cellule figlie

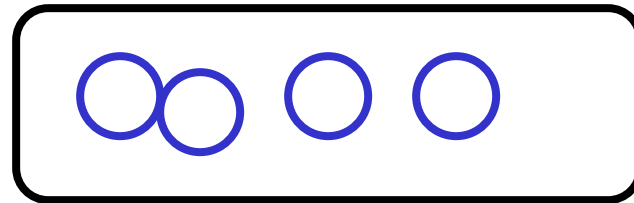
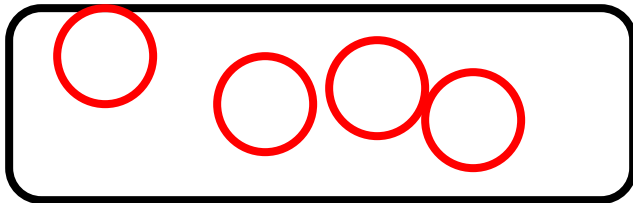
La cellula potrà mantenere entrambi i plasmidi



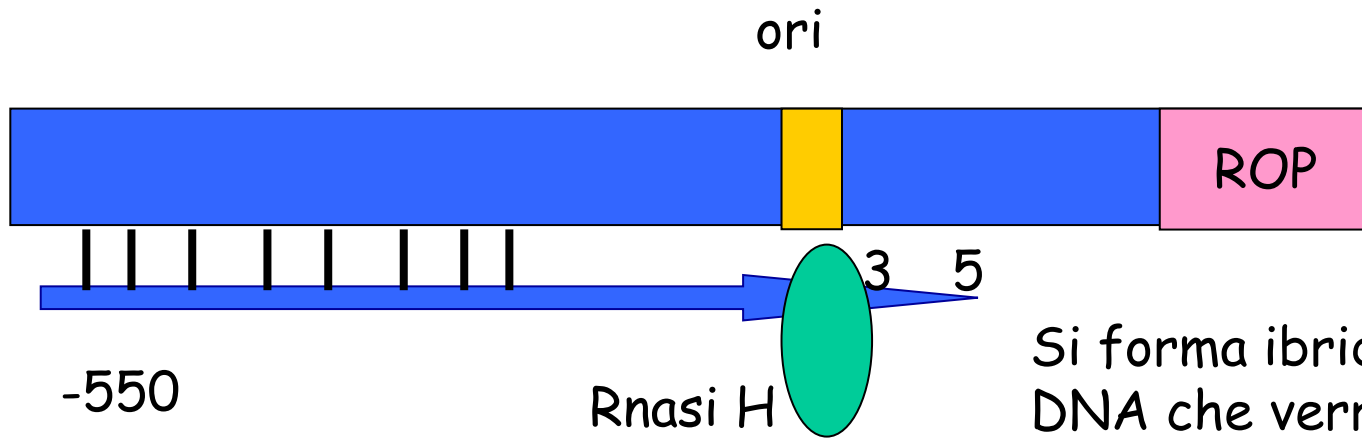
Se i plasmidi pur diversi nei caratteri fenotipici hanno i meccanismi di controllo simili potranno controllare in trans l'uno la replicazione dell'altro. Uno dei due nel corso delle successive divisioni sarà perso dalla cellula e alla fine avremo due popolazioni contenenti l'una un plasmide e l'altra l'altro.



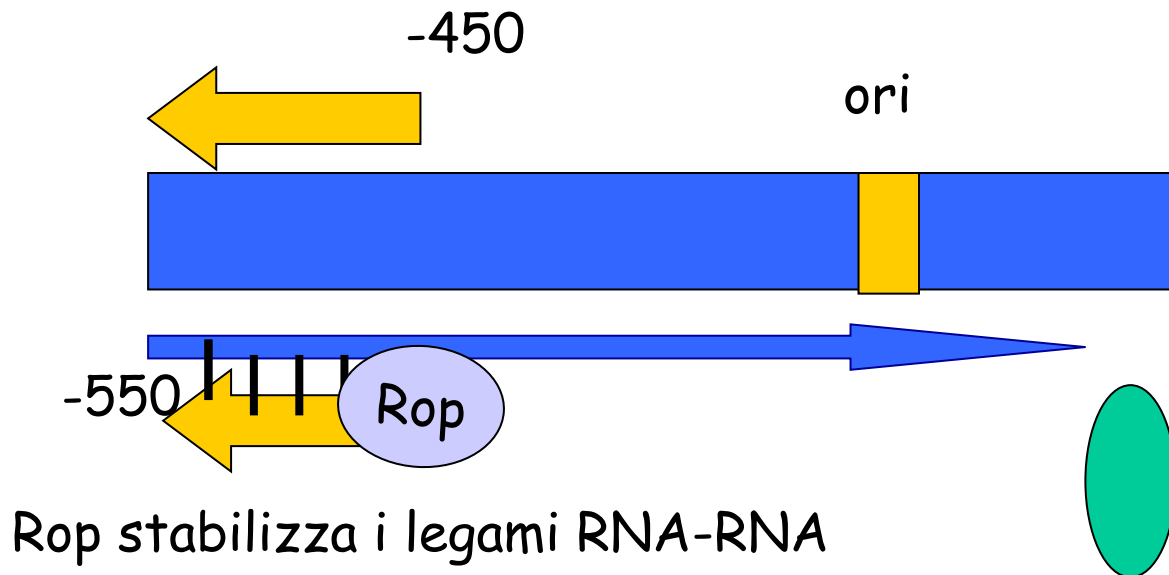
Dopo diverse generazioni una popolazione avrà un plasmide e l'altra l'altro



Replicazione di ColE1

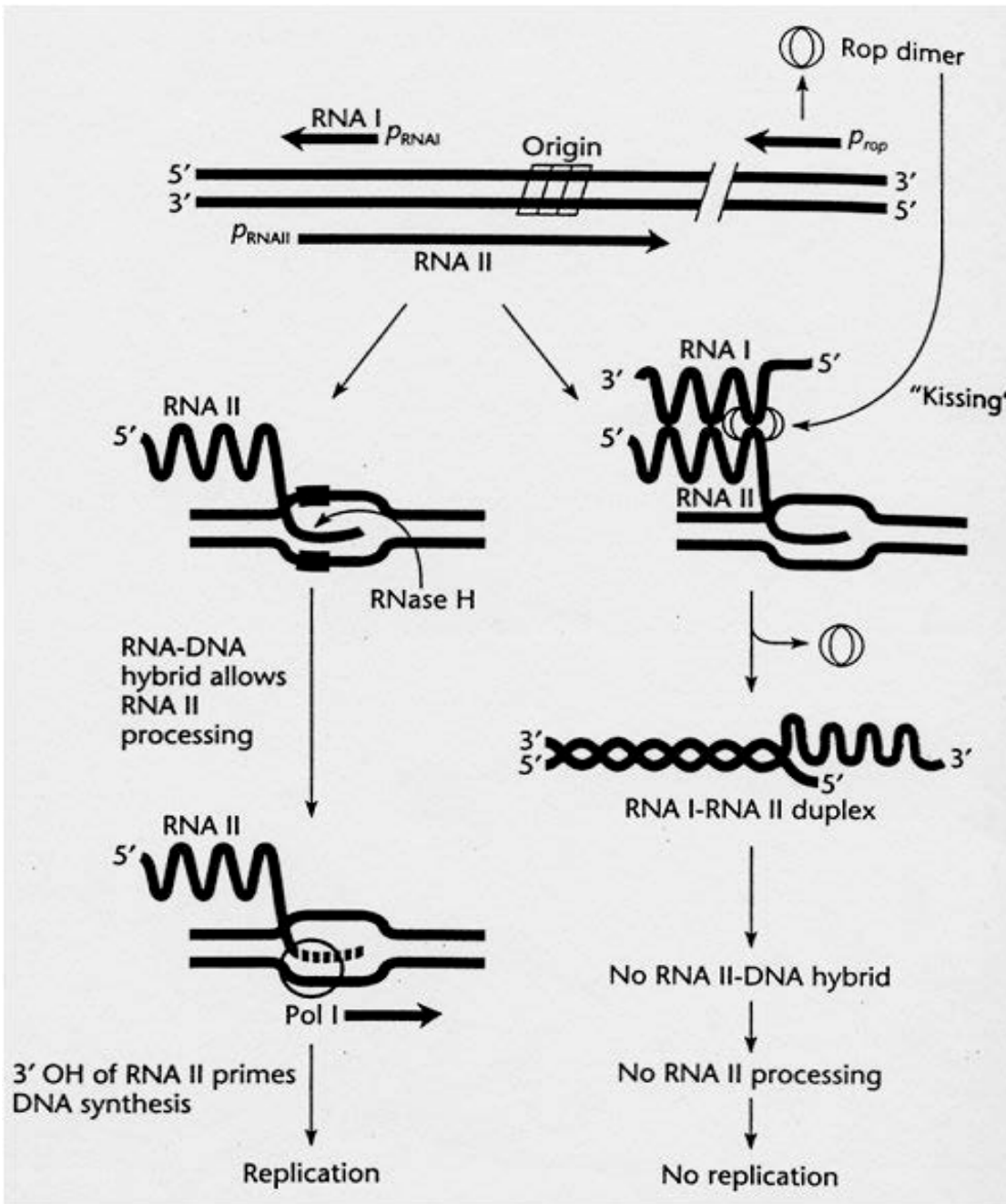


Si forma ibrido RNA-DNA che verrà tagliato da RNAsiH a livello di ori generando un primer per la replicazione



La sintesi di un RNA Antisenso in grado di legarsi al mRNA inibisce la formazione dell'ibrido RNA-DNA

Rop stabilizza i legami RNA-RNA

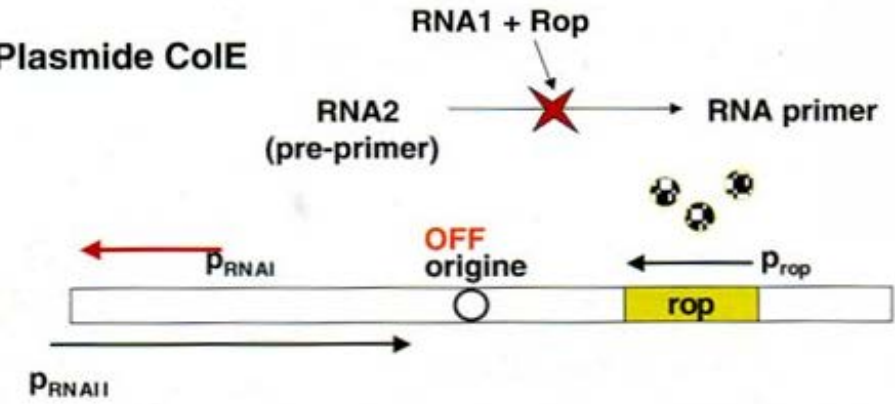


Controllo della replicazione nei plasmidi di tipo ColE1.

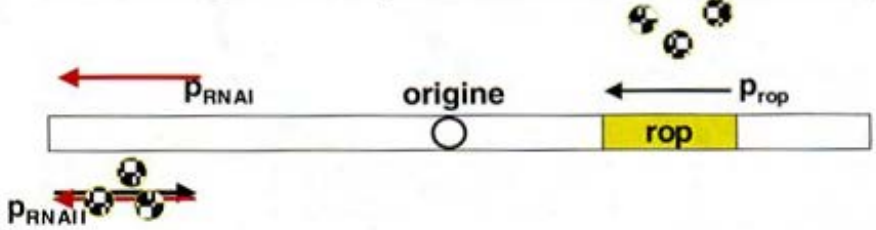
L'ibrido RNAII-DNA viene riconosciuto da RNase H che taglia creando l'innesco per la replicazione da parte di PolI

Se viene sintetizzato mRNAI si crea un ibrido RNAI -RNAII che impedisce il riconoscimento da parte di RNAII del filamento di DNA

Plasmide ColE



Alta concentrazione di plasmidi: accumulo di RNA1 e Rop



(b)

La funzione di Rop

Rop controlla negativamente la replicazione plasmidica:
 ➔ aumenta il tasso di legame di RNAI ad RNAII.

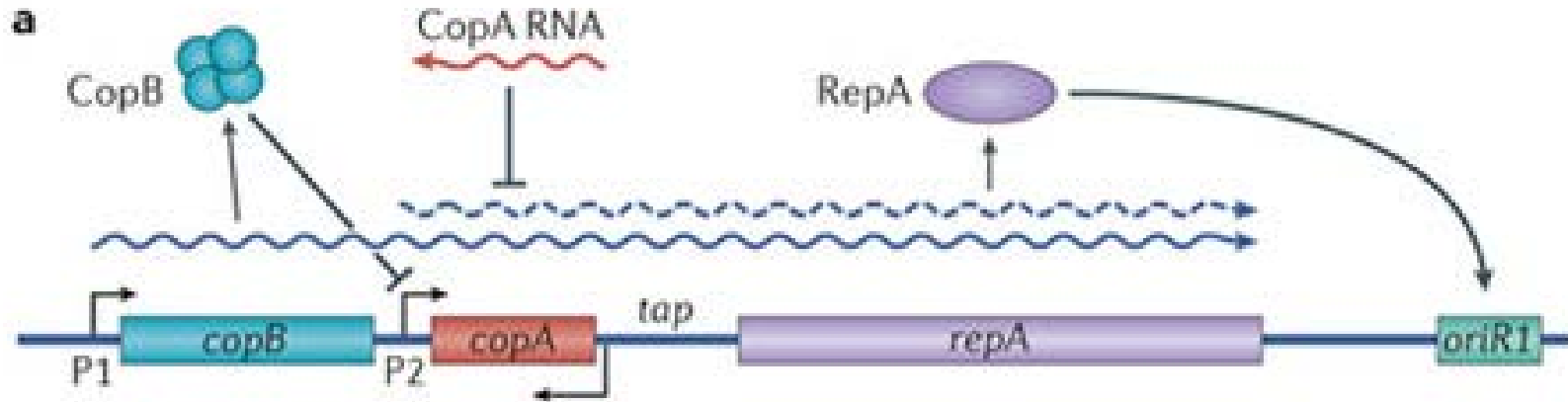
Rop assente ➔ Replicazione plasmidica più frequente

pBR322 rop⁺ 15 copie/cellula

↓
 derivativo di pBR322
 costruito per delezione

pUC18 Δrop 50-100 copie/cellula

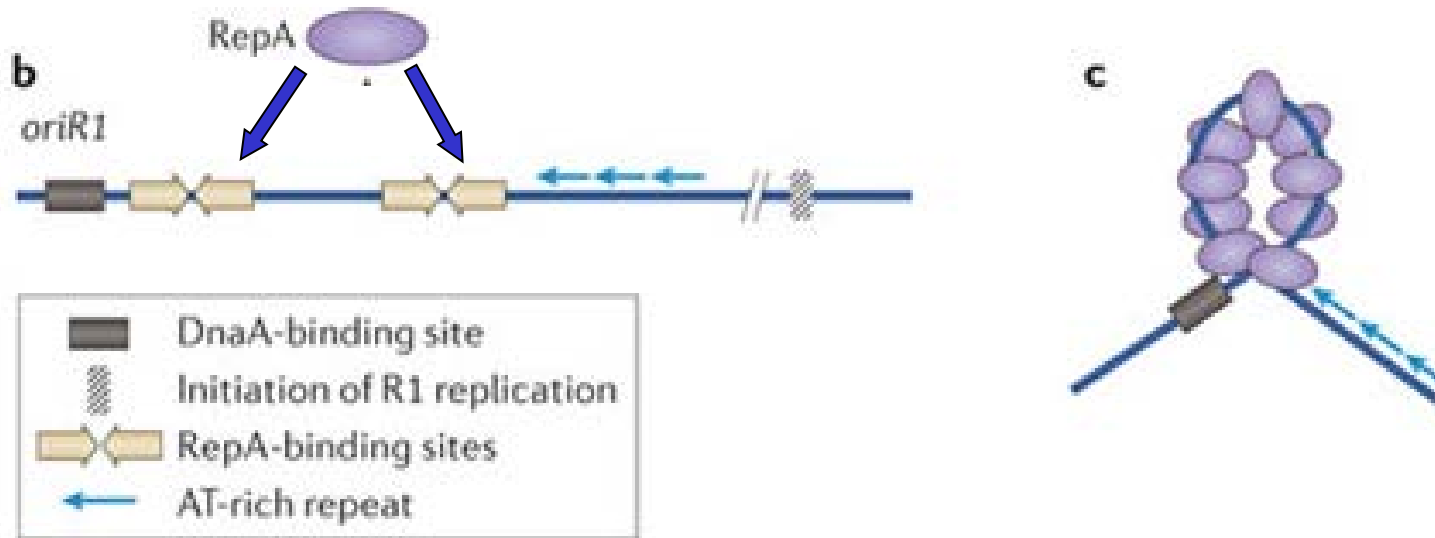
La replicazione di R1



Il plasmide R1 (R100) costituisce un modello ben studiato di replicazione plasmidica .
In questo plasmide la proteina necessaria per la replicazione RepA si lega all'origine (oriR1) localizzata a valle del gene.
Il gene *repA* è espresso a partire da 2 promotori(P1 e P2) ed è sottoposto ad una duplice forma di controllo negativo.

Il primo repressore è CopB che viene trascritto assieme al gene *repA* quando la trascrizione parte dal promotore P1. CopB reprime la trascrizione di *repA* a partire dal promotore P2 che quindi rimane silente in condizioni normali. Oltre a CopB , il livello di *repA* è controllato anche da un piccolo RNA chiamato CopA che agisce a livello post trascrizionale legandosi mRNA di *repA* , alterandone la struttura in modo prevenirne la traduzione

La replicazione del plasmide R1



In questo plasmide la proteina necessaria per la replicazione RepA si lega all'origine (oriR1) localizzata a valle del gene.

OriR1 è caratterizzata da 4 box per RepA fiancheggiati da un lato da un sito di legame per DnaA e dall'altro da una regione ricche in A-T.

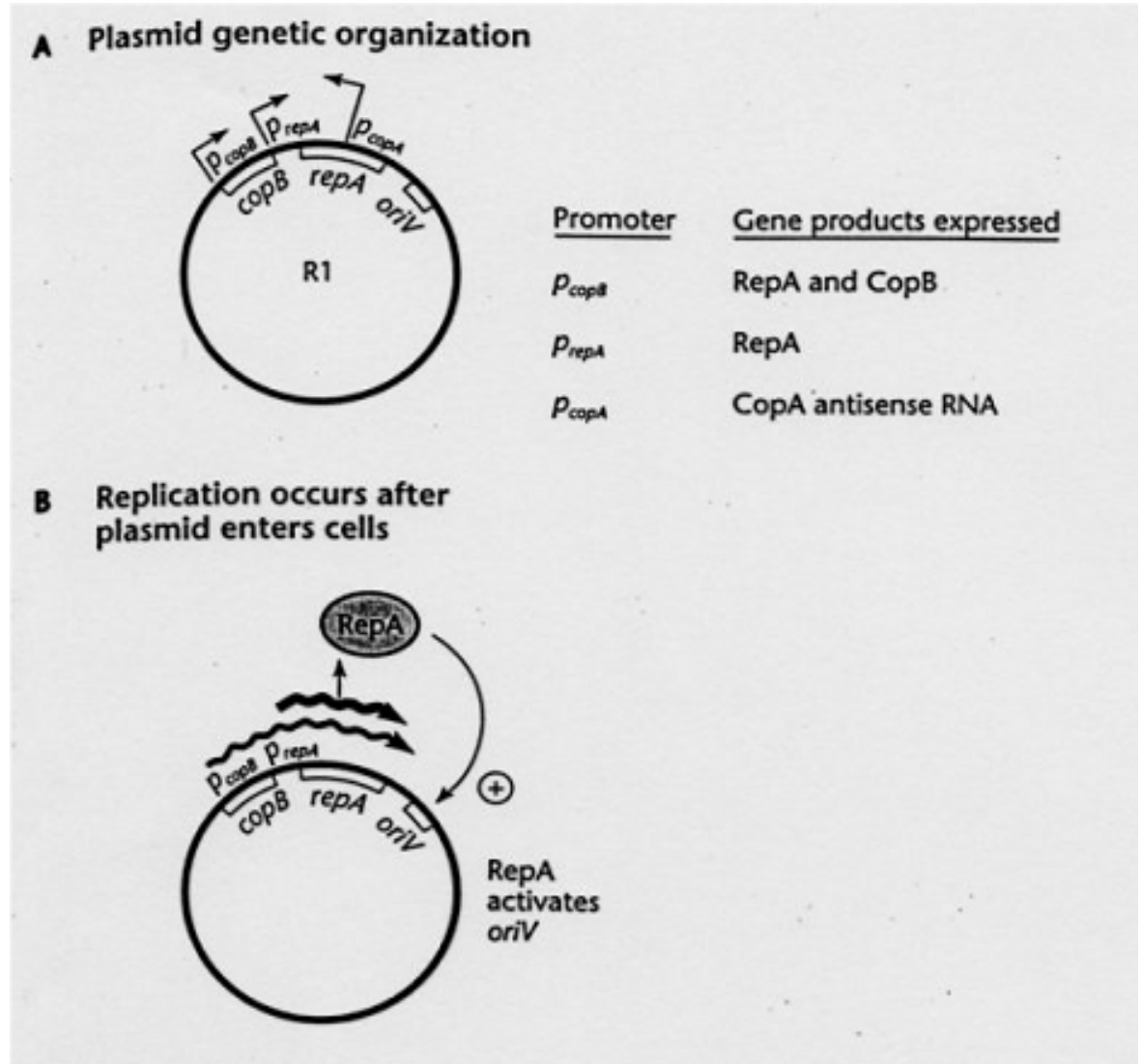
Il legame di RepA ad oriR1 provoca la formazione di un'ansa che facilita l'apertura del DNA nella regione ricca in AT. L'inizio è localizzato circa 400 bp a valle dalla regione OriR1.

Replicazione di R1(o R100)

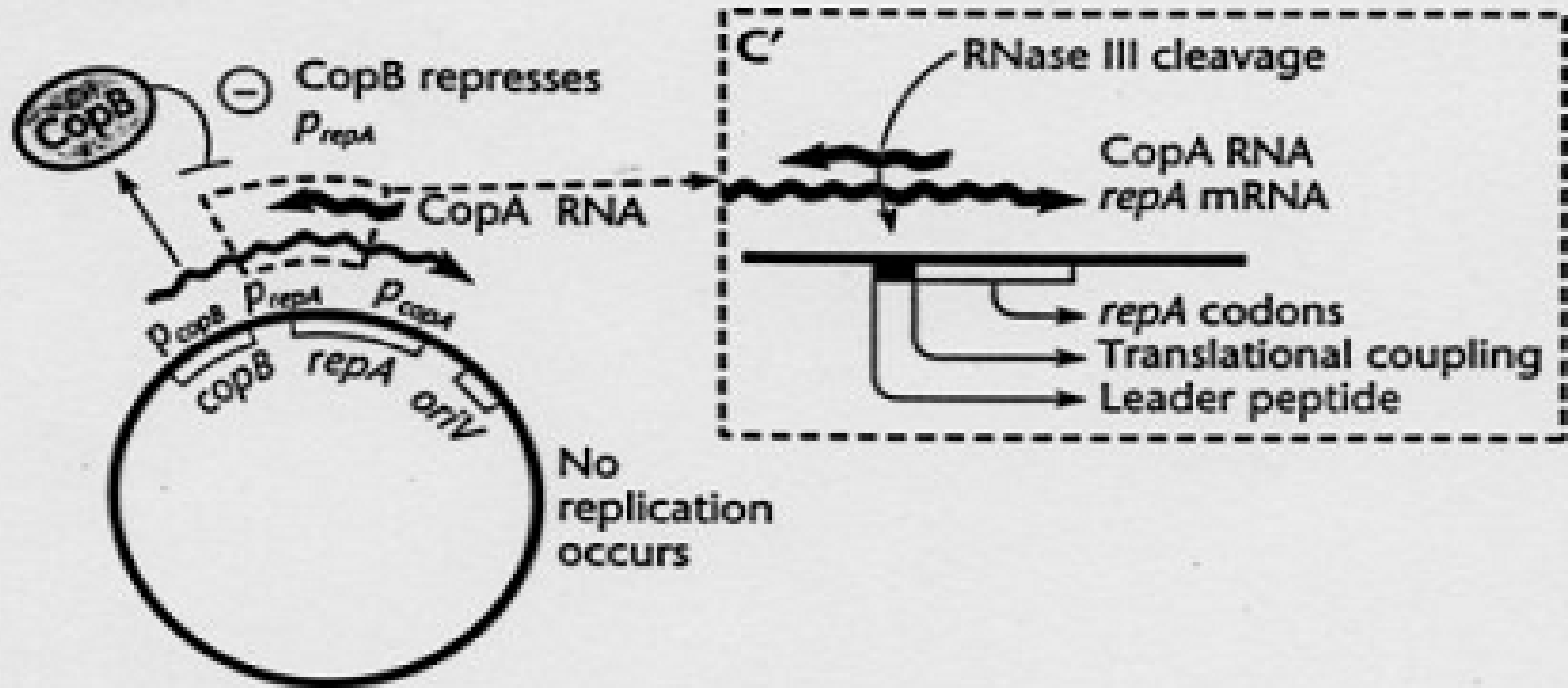
La proteina RepA necessaria per attivare la replicazione può essere trascritta a partire dal promotore

- *P_{copB}*
- *P_{repA}*

In assenza di CopB la proteina viene trascritta da entrambi i promotori:
Quando succede?
Quando il plasmide entra in una cellula o dopo la divisione cellulare per diluizione di CopB



C Replication shutdown



In presenza di CopB

- CopB reprime il P_{repA} .
- $repA$ viene trascritto solo dal P_{copB}
- viene trascritto sull'elica complementare il mRNA $copA$ che agisce da antisenso sul mRNA $copB$ - $repA$.
- L'ibrido RNA-RNA viene digerito da RNase III e non si ha traduzione di RepA

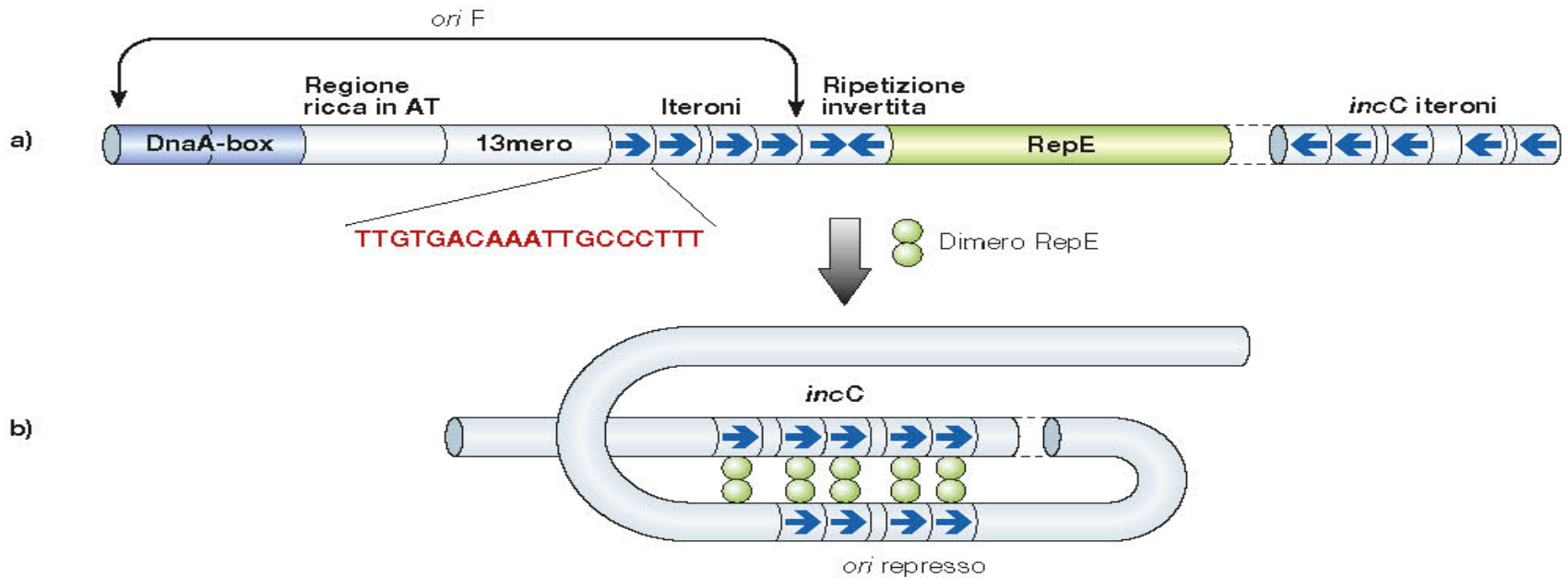
La replicazione di F

Controllo della replicazione plasmidica mediante il meccanismo degli iteroni nel plasmide F

Iterone è una breve sequenza di DNA (circa 20 bp) ricca in AT localizzata vicina all'origine che mima il vero sito di legame della proteina Rep

Compete con i normali siti di legame della proteina

L'origine di replicazione di F

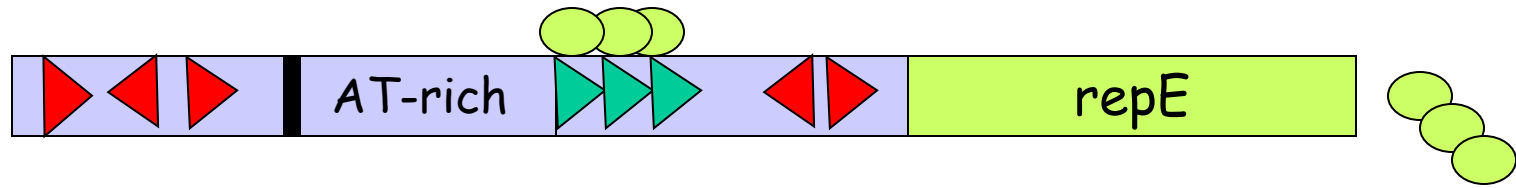


L'origine di replicazione di F è caratterizzata da:

- 2 DnaA box riconosciute dalla proteina batterica DnaA
- una regione ricca in AT
- una regione di 13 nucleotidi omologa ad *oriC* del cromosoma seguita da 4 sequenze di 19 bp DR (dette ITERONI) che legano la proteina d'inizio RepE.

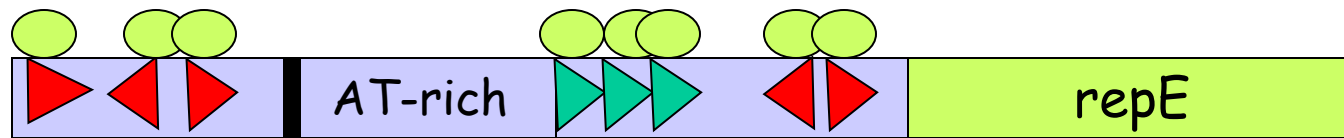
Il legame di RepE causa un ripiegamento del DNA che facilita l'apertura della regione *oriF* con separazione dei filamenti

Bassa concentrazione di plasmidi e di RepE: RepE si lega ad ori

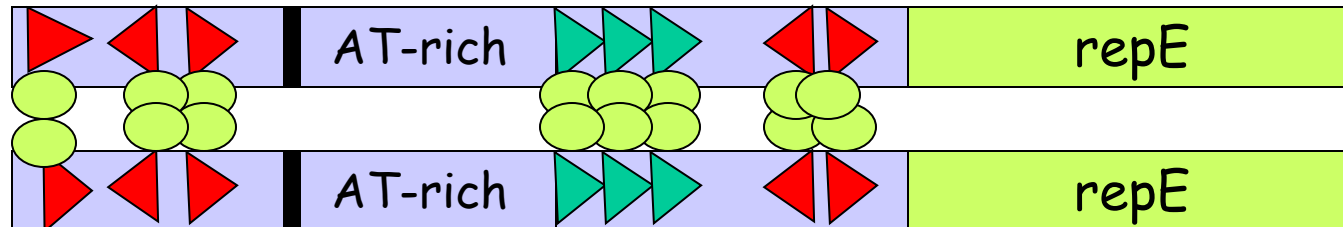


origine

Aumento della concentrazione di RepE: RepE si lega agli iteroni



Alta concentrazione di plasmidi e RepE: ammanettamento



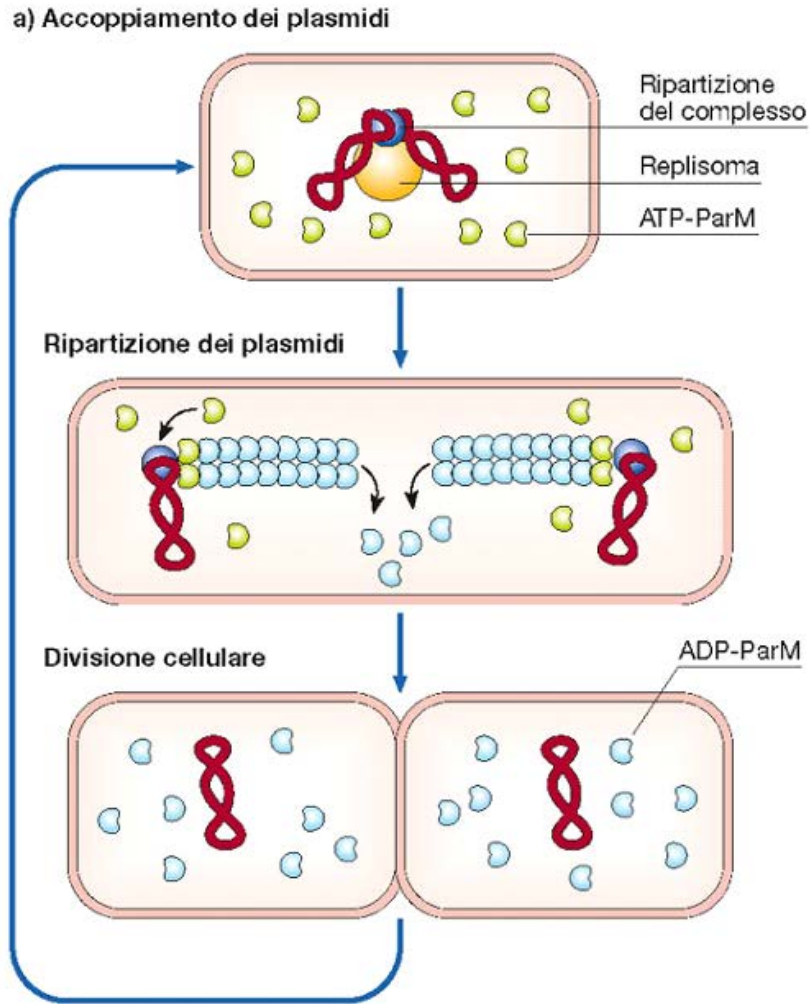
Controllo della replicazione di F

Come fanno i plasmidi a basso numero di copie ad assicurarsi di essere trasmessi stabilmente alle cellule figlie?

Alcuni plasmidi sintetizzano due proteine ParA e ParB che si legano ad un sito specifico sul plasmide parS mantenendo i plasmidi nel centro delle cellule in divisione (vicino al setto) fintanto che il processo di divisione non si sia concluso.

Un'altra strategia risiede nella capacità di alcuni plasmidi di produrre delle sostanze tossiche che uccidono le cellule che non hanno ereditato il plasmide. Nel caso di F il sistema **ccdAB** sintetizza una tossina che agisce come inibitore della topoisomerasi

La ripartizione del plasmide R1 tra le cellule figlie



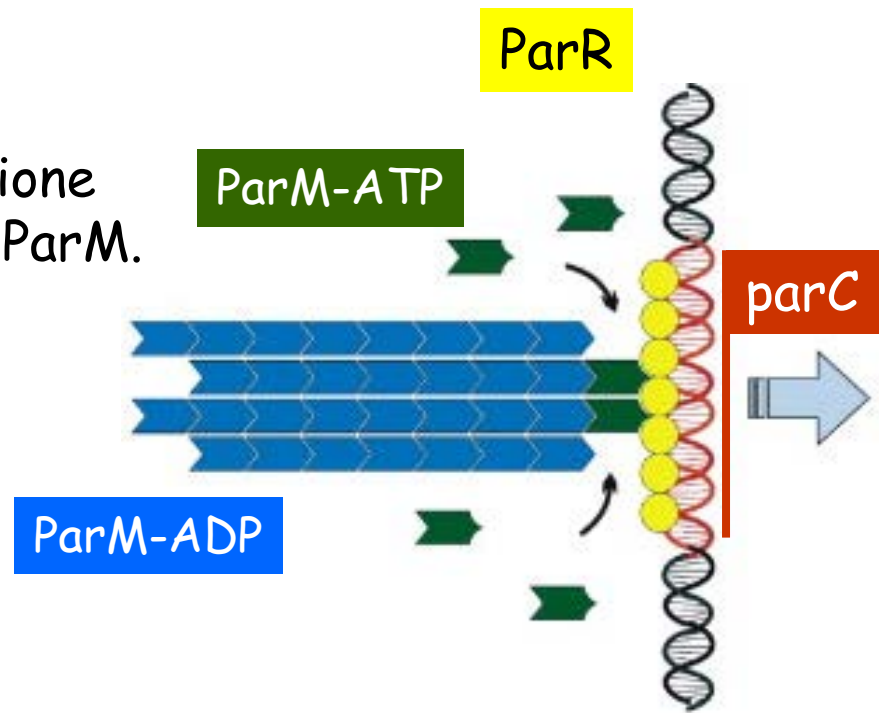
Il plasmide R1 viene replicato dall'apparato di replicazione e viene riconosciuto dalla proteina **ParR** che si lega alle sequenze centromero-simili *parC*.

Questo complesso diventa il punto di nucleazione di ParM .

L'allungamento dei filamenti di ParM con l'aggiunta di ParM-ATP permette l'allungamento del filamento che spinge i plasmidi ai poli.

Dopo la divisione l'idrolisi dell'ATP libera destabilizza il polimero di ParM liberando il plasmide

parC è il sito centromerico e costituisce il punto di nucleazione dove si forma un filamento di ParM.



La proteina ParR funge da legame tra la regione centromero like parC e i filamenti di ParM. Le molecole di ParM -ATP (in verde) si legano al complesso ParR-parC attivando l'attività ATPasica di ParM.

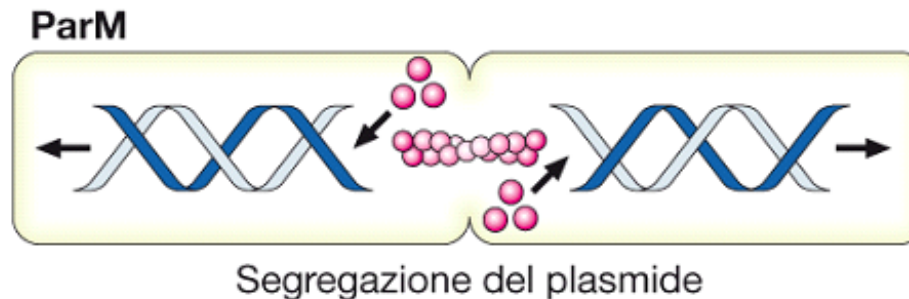
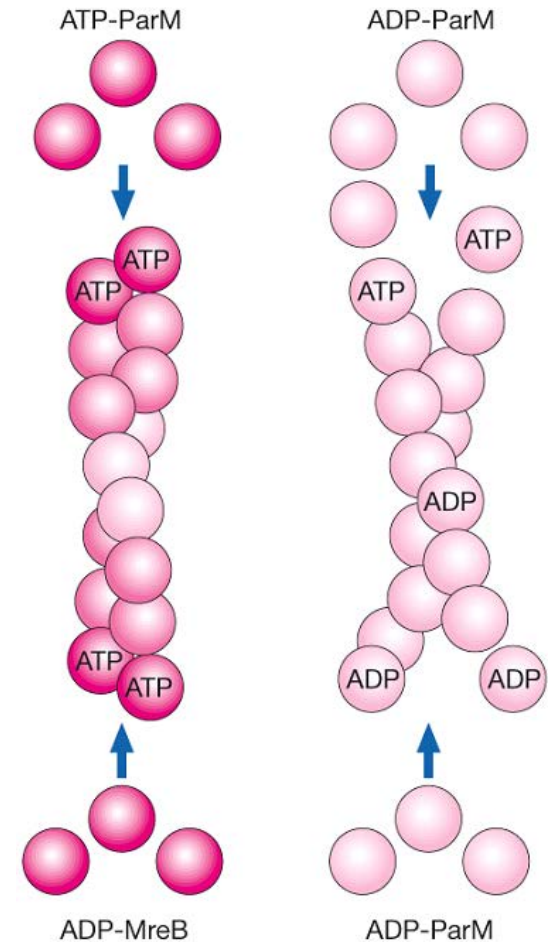
L'idrolisi di ParM-ATP in ParM-ADP porta al distacco del filamento di ParM da ParR permettendo l'entrata di altre molecole di ParM-ATP dalla parte apicale che spingono quindi il plasmide ai poli

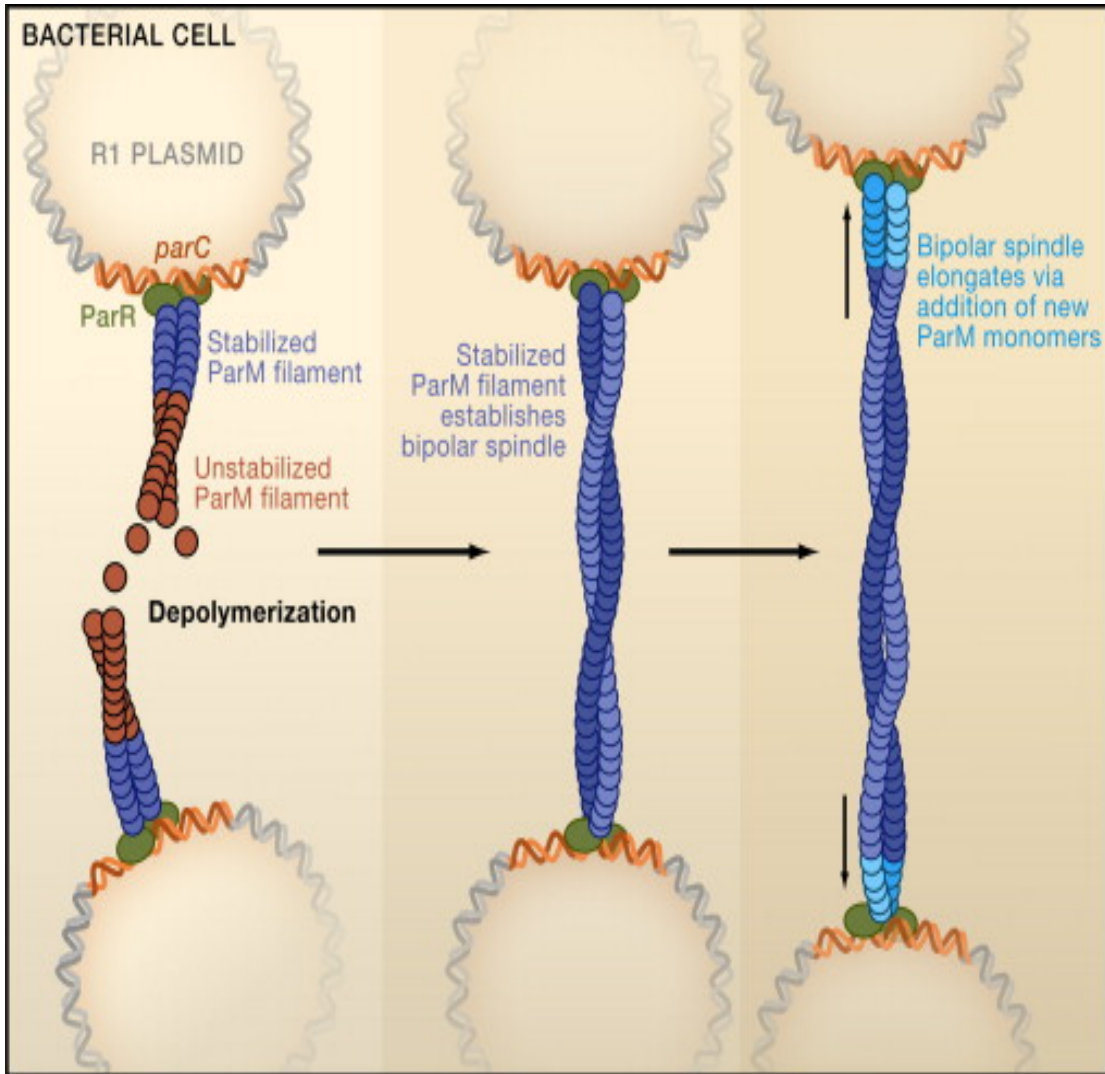
ParM

La proteina ParM codificata dal plasmidi R1 può formare sia filamenti che strutture più brevi a forma di nastri.

I cicli di assemblaggio in modo bidirezionale e di depolimerizzazione di parM sono il meccanismo alla base della corretta segregazione dei plasmidi.

Durante la fase di allungamento ogni copia di DNA plasmidico viene spinta nella zona polare in una o l'altra delle cellule figlie

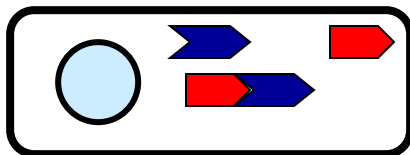
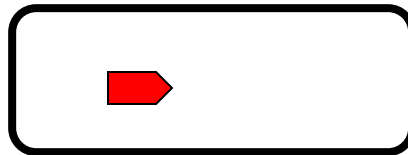
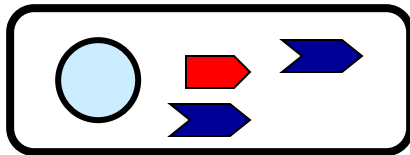
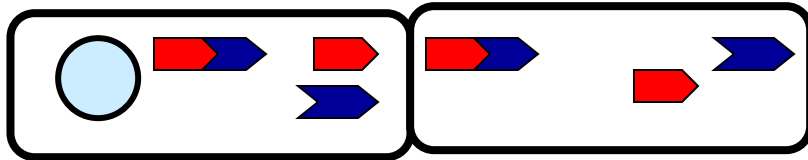
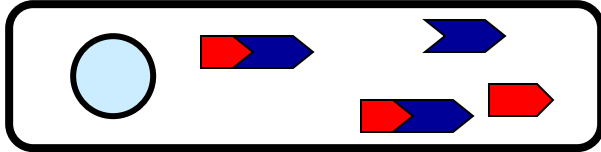
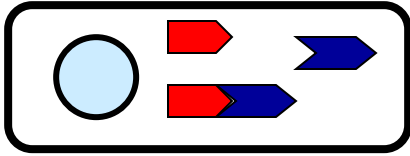




The force for the segregation of these plasmids is provided by the actin homolog ParM. ParM forms a filament that is dynamically unstable, similar to the eukaryotic microtubule spindle. However, upon binding of the *parC*/ParR complex, the ParM filament is protected from further shortening. The binding of a *parC*/ParR complex at each end of the ParM filament establishes a bipolar spindle. Extension of this filament via the addition of new ParM monomers allows the spindle to elongate, propelling the plasmids to either end of the dividing cell to achieve chromosome segregation.

 Tossina stabile CCdB

 Antitossina labile CCdA



Ccd= control of cell death

I sistemi Tossina-Antitossina

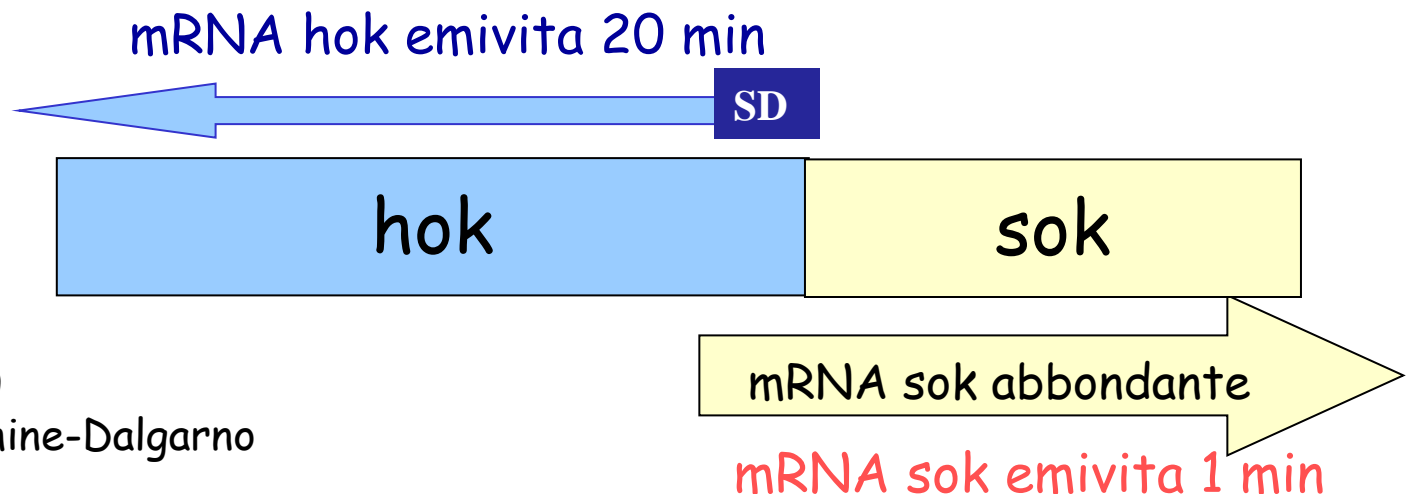
1. Sistema *ccdA- ccdB* di F

Il plasmide F sintetizza un sistema basato su tossina-antitossina in grado di eliminare le cellule che, in seguito ad un errore nella divisione cellulare non hanno ricevuto almeno una copia del plasmide F. La proteina CcdB è una tossina stabile (con bersaglio la DNA girasi) la cui funzione viene bloccata dal legame con un antitossina CcdA più facilmente degradabile. Se il plasmide è presente la continua sintesi di CcdA inibisce CcdB. Se non vi è plasmide invece CcdA verrà degradata + velocemente di CcdB che rimarrà quindi libera e potrà inibire la girasi provocando la morte delle cellule.

2. Il sistema hok-sok

Il plasmide R1(o R100) porta un gene letale *hok* (host cell killing) che codifica per una tossina in grado di provocare depolimerizzazione delle membrana.

Sull'elica complementare del DNA di *hok* viene trascritta il mRNA del gene *sok* che ha una una regione di 128 nt complementare con la regione SD di *hok*. I 2 RNA hanno diversa emivita 20 min e 1 min. Hok non viene mai tradotto per azione del mRNA di *sok* e la cellula con R1 rimane pertanto vitale. Se una cellula non eredita R1 in seguito a divisione allora mRNAsok che ha una lunga emivita verrà tradotto perchè mRNA sok avendo un emivita più breve non sarà più presente.



Plasmide R1=R100

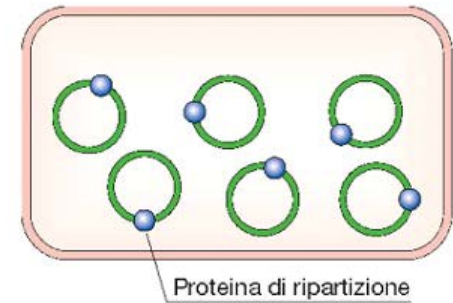
SD = sequenza Shine-Dalgarno

I plasmidi ad alto numero di copie si ripartiscono secondo due modalità:

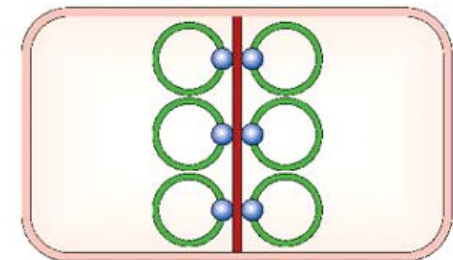
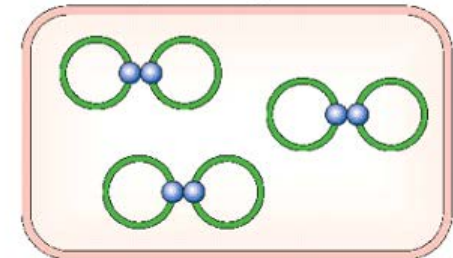
1. **STOCAISTICA** o casuale
2. **ATTIVA**

Nel caso della ripartizione attiva i plasmidi vengono riconosciuti da una proteina che dimerizzando forma delle coppie di plasmidi. La struttura DNA -proteina-DNA si localizzerà a livello del sito di divisione garantendo così la corretta divisione tra le cellule

b) Ripartizione attiva



Modello di pre-accoppiamento



Sito di riconoscimento sulla membrana