

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

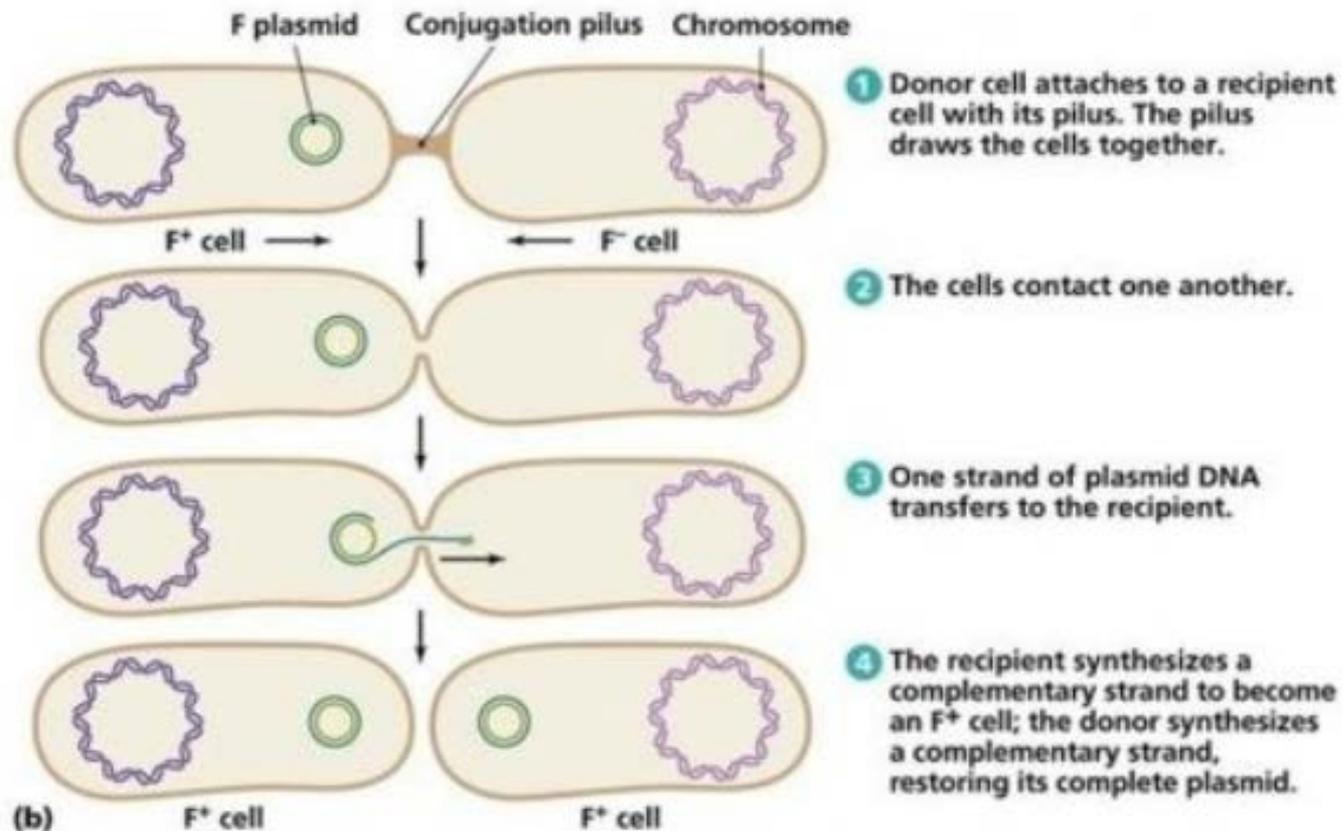
Affinché avvenga una coniugazione è necessario che siano presenti due tipi di batteri: un donatore (caratterizzato dal possedere il plasmide coniugativo F) e un recipiente (che ovviamente non lo possiede).

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

Processo di coniugazione tra cellula F⁺ e F⁻

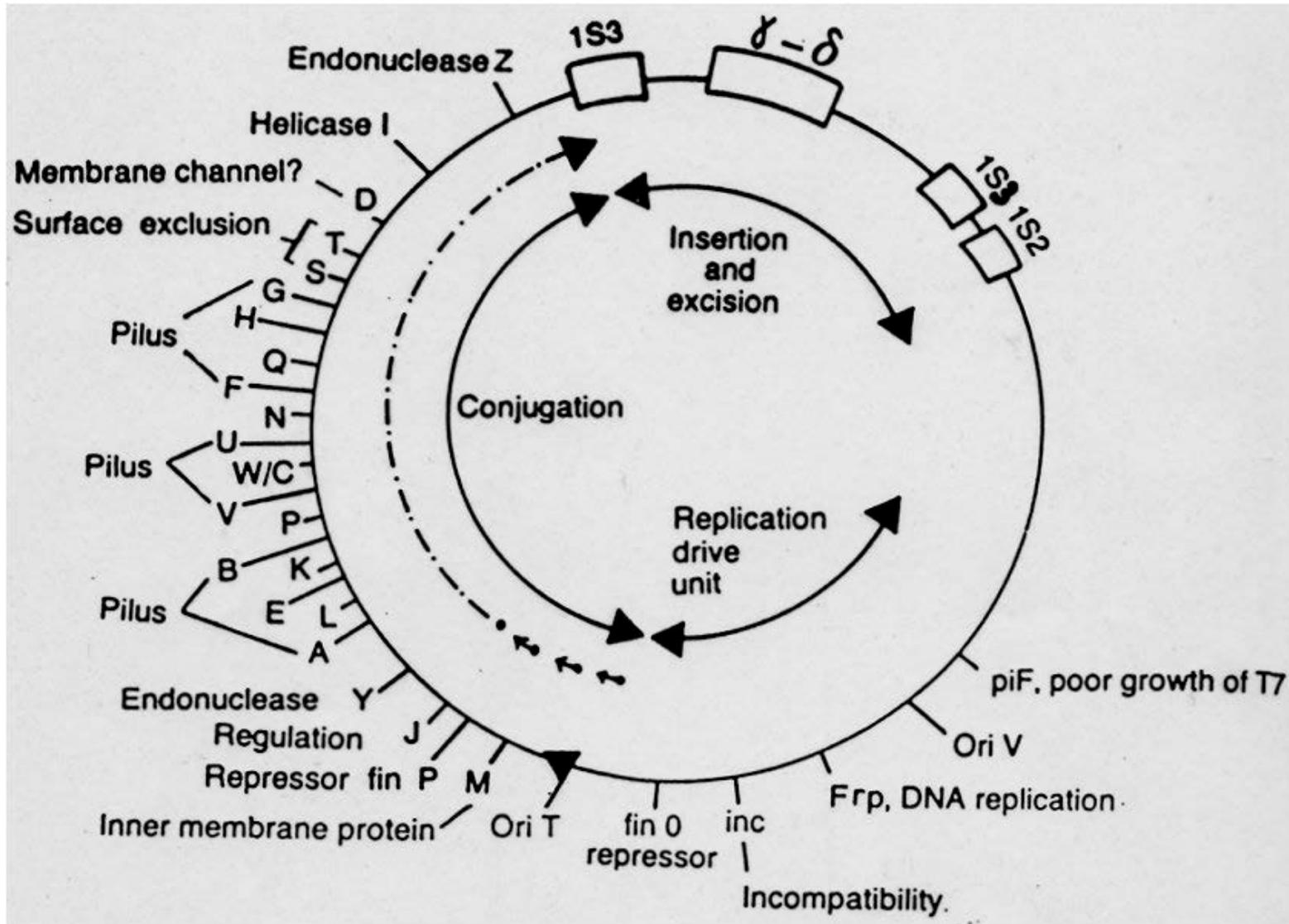
Il plasmide F⁺ verrà trasferito ad alta efficienza alle cellule F⁻



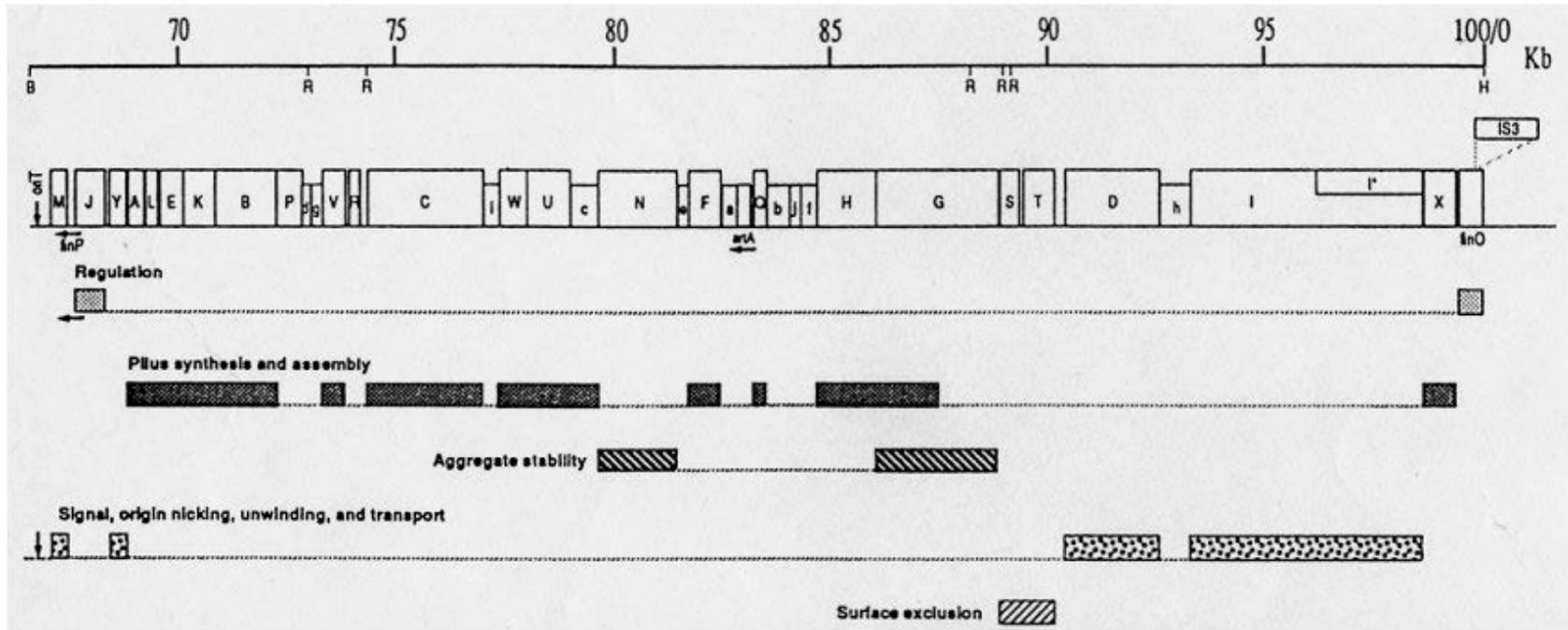
Il risultato sarà quindi una popolazione di cellule F⁺

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

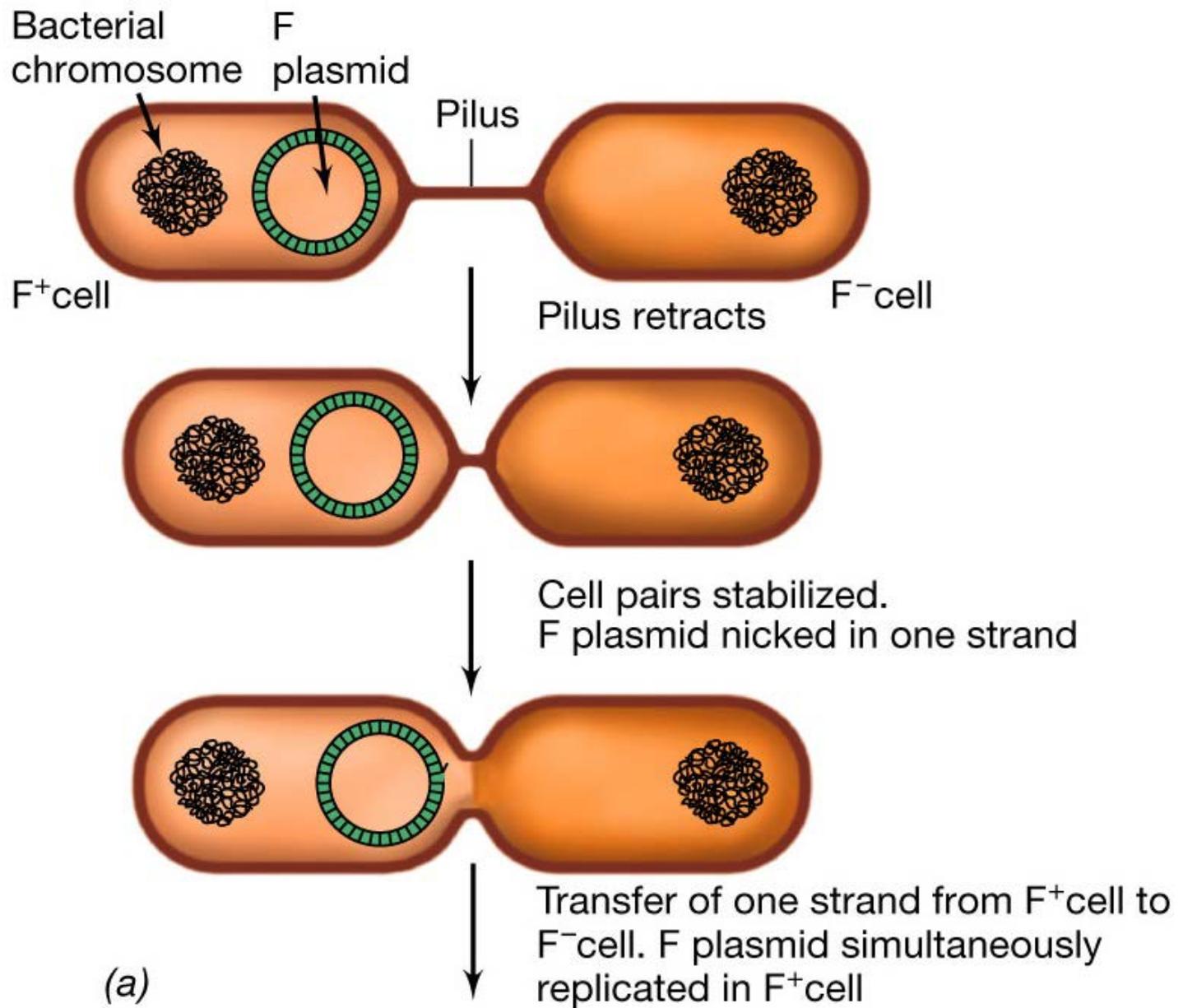
- La regolazione
- Sintesi ed Assemblaggio del pilo
- Formazione e stabilità delle coppie
- Origine Taglio, trasporto del DNA
- Esclusione di superficie

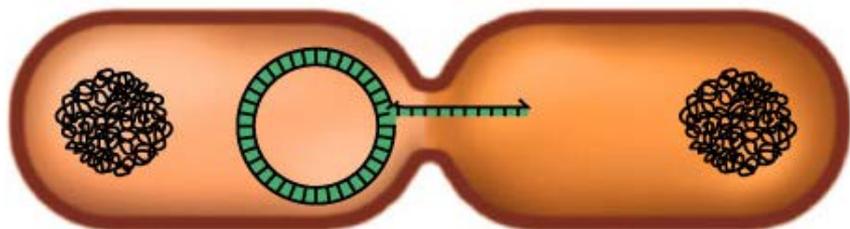
La coniugazione è un processo complesso che richiede la partecipazione di numerosi fattori

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

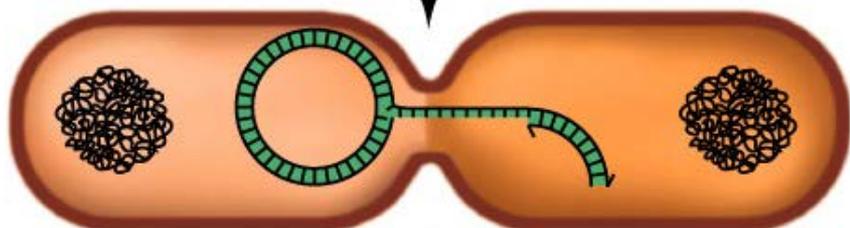
Dtr (DNA transfer and replication): geni per il processamento del DNA

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

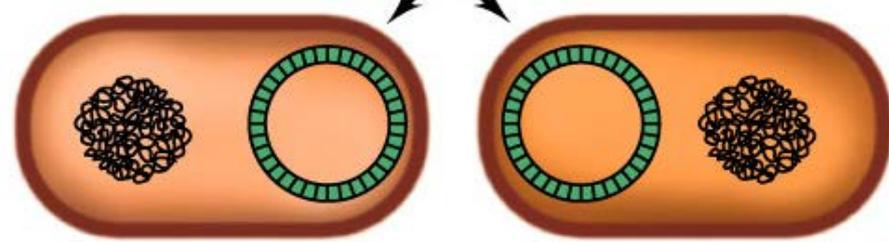




Synthesis of complementary strand begins in recipient cell

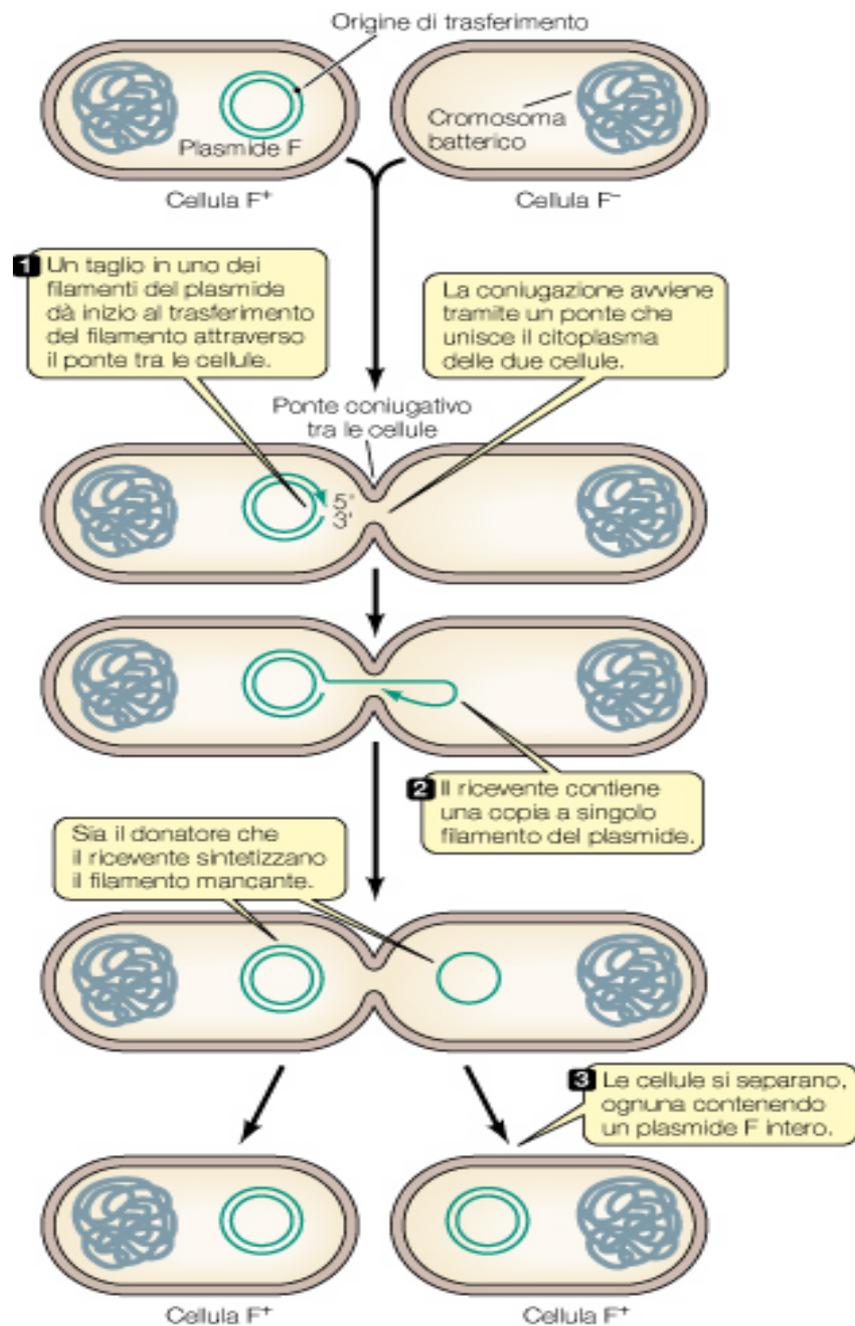


Completion of DNA transfer and synthesis. Cells separate



F⁺cell

F⁺cell



Il sistema Mpf (MATING PAIR FORMATION)

Geni per la sintesi del pilo:

struttura tubulare 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

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.

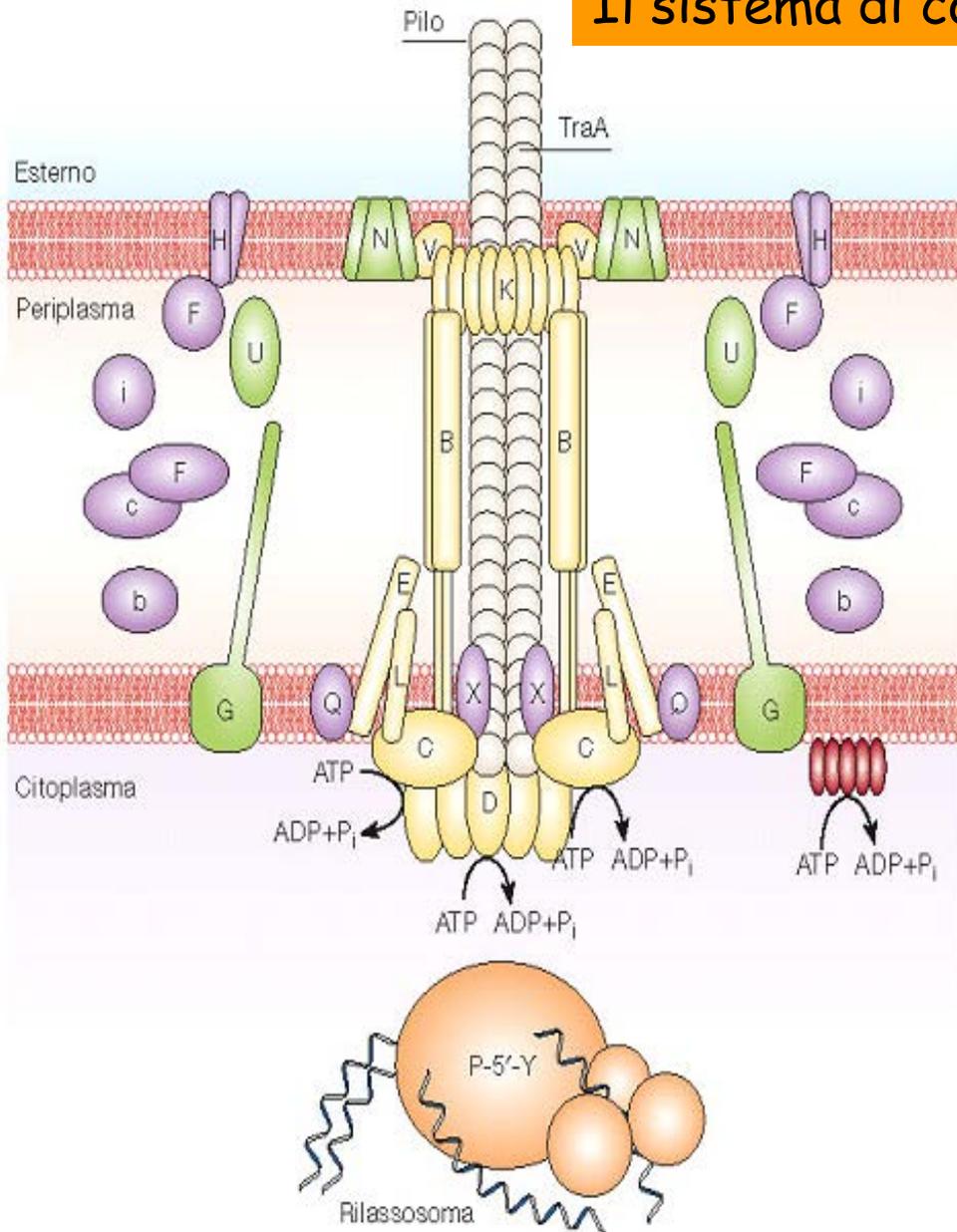
Questo DNA, nel caso più semplice, è costituito dal plasmide F

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



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

Il pilo è costituito dai ripetitori della proteina TraA che viene inserita nella IM dalla ciaperonina TraQ. Poi TraA 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 TraYI.

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 ricevente con il DNA.

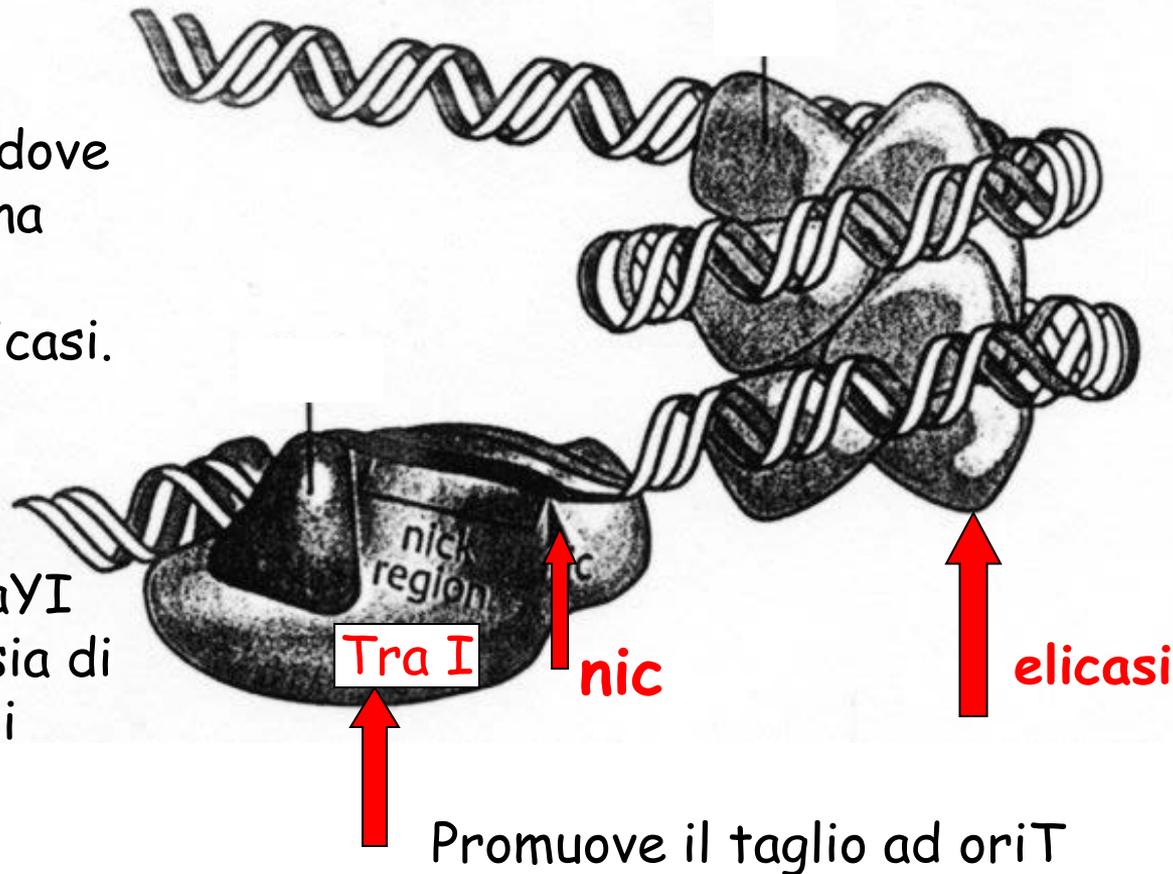
Nella cellula ricevente RICICLIZZA il plasmide con un processo inverso trasferendo il legame fosfato al 3'OH del DNA

Formazione del taglio ad oriT

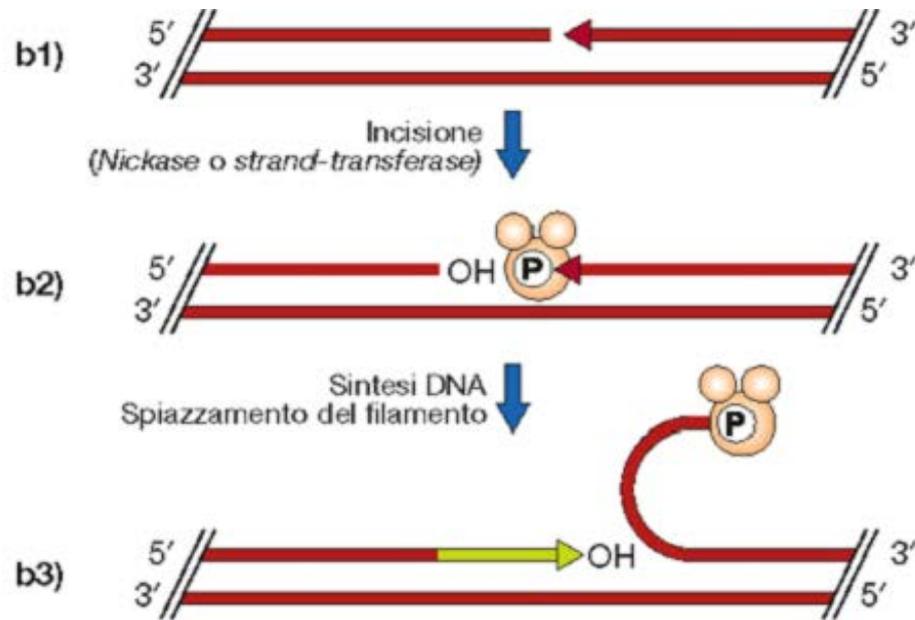
La regione oriT è anche il sito in cui avviene la riciclaggio del plasmide nella cellula figlia

Modello del plasmide RP4 dove c'è una proteina distinta con funzione di elicasi.

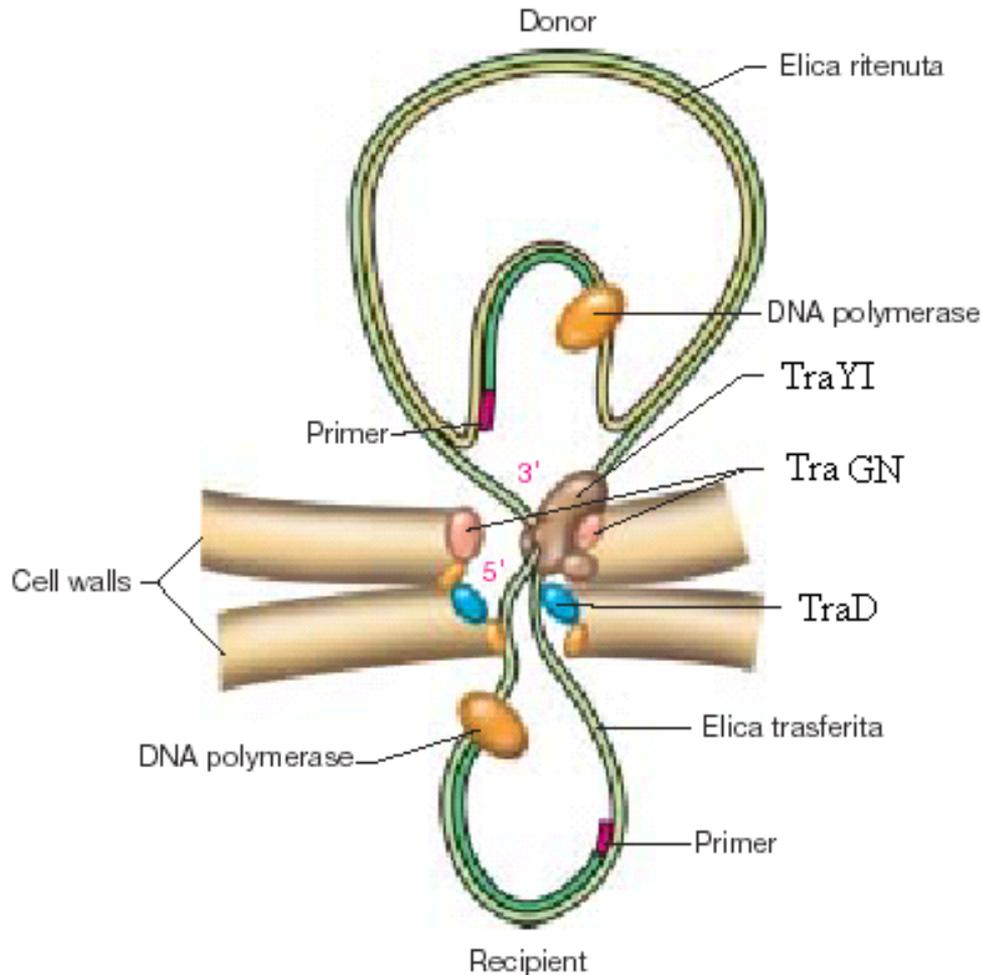
In F invece abbiamo un complesso TraYI con funzione sia di relaxasi che di elicasi



Dopo il taglio il complesso Elicasi / Rilassasi
leggerà il 5' e promuoverà il trasferimento della
singola elica nella cellula ricevente .



Modello della coniugazione di F



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.

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

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.

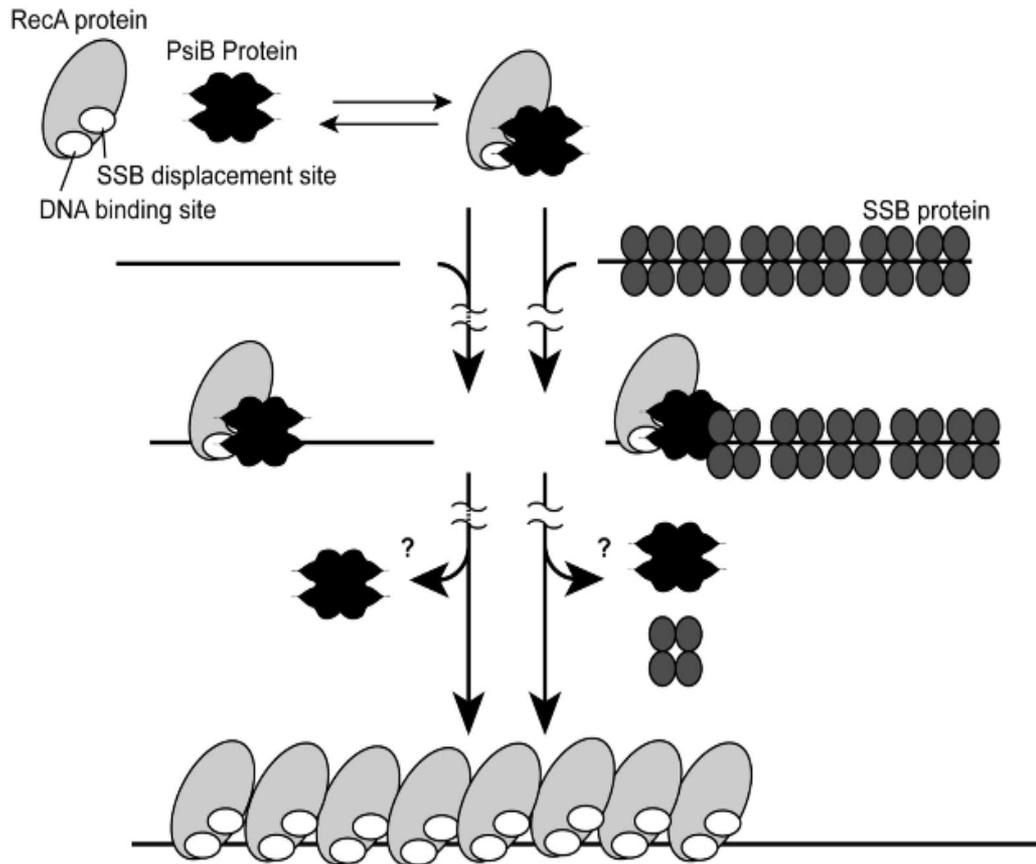


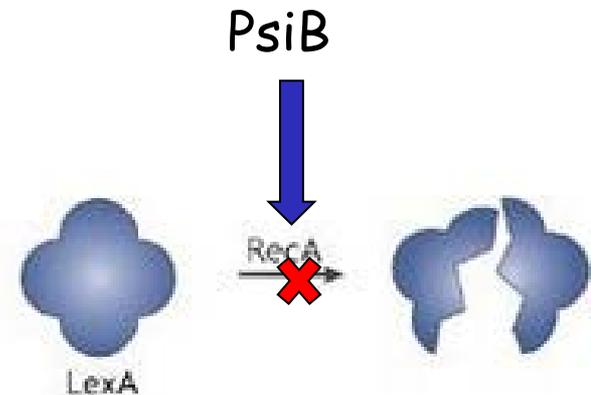
Figure 7. Proposed mechanism of PsiB activity

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 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.

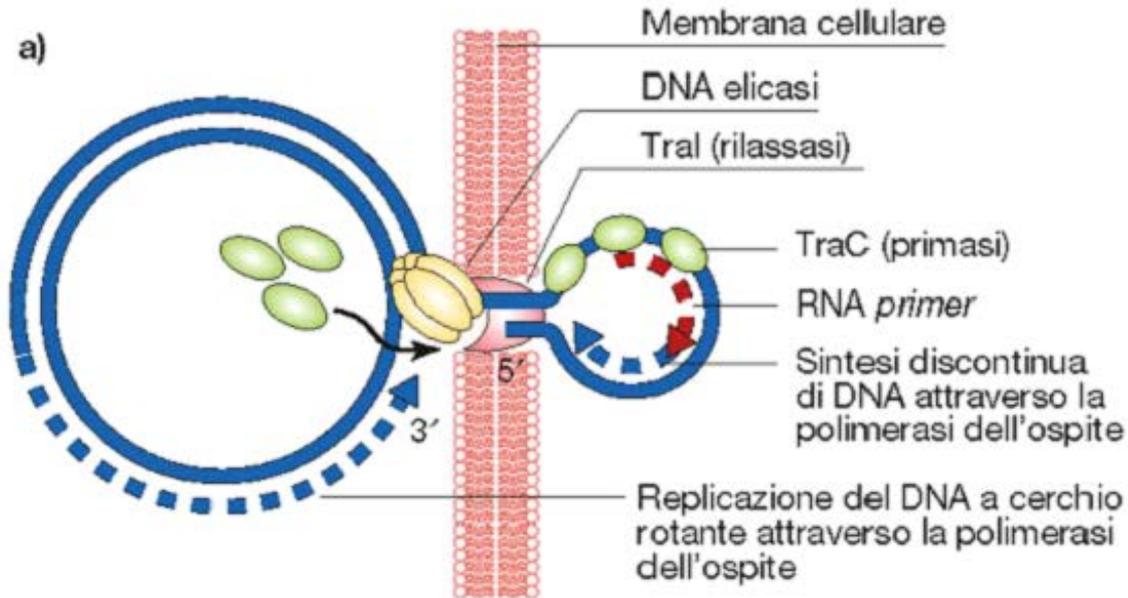
Come funziona PsiB?

-Si lega alla proteina RecA impedendole di riconoscere correttamente il DNA a SS

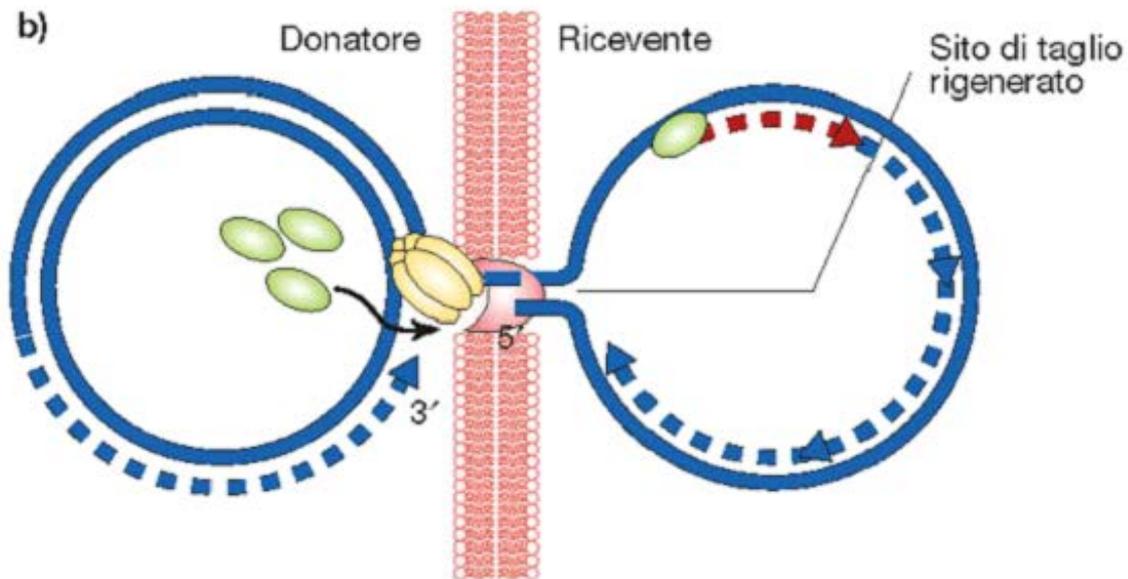
-impedisce RecA dallo stimolare il taglio autocatalitico di LexA bloccando l'avvio del sistema SOS



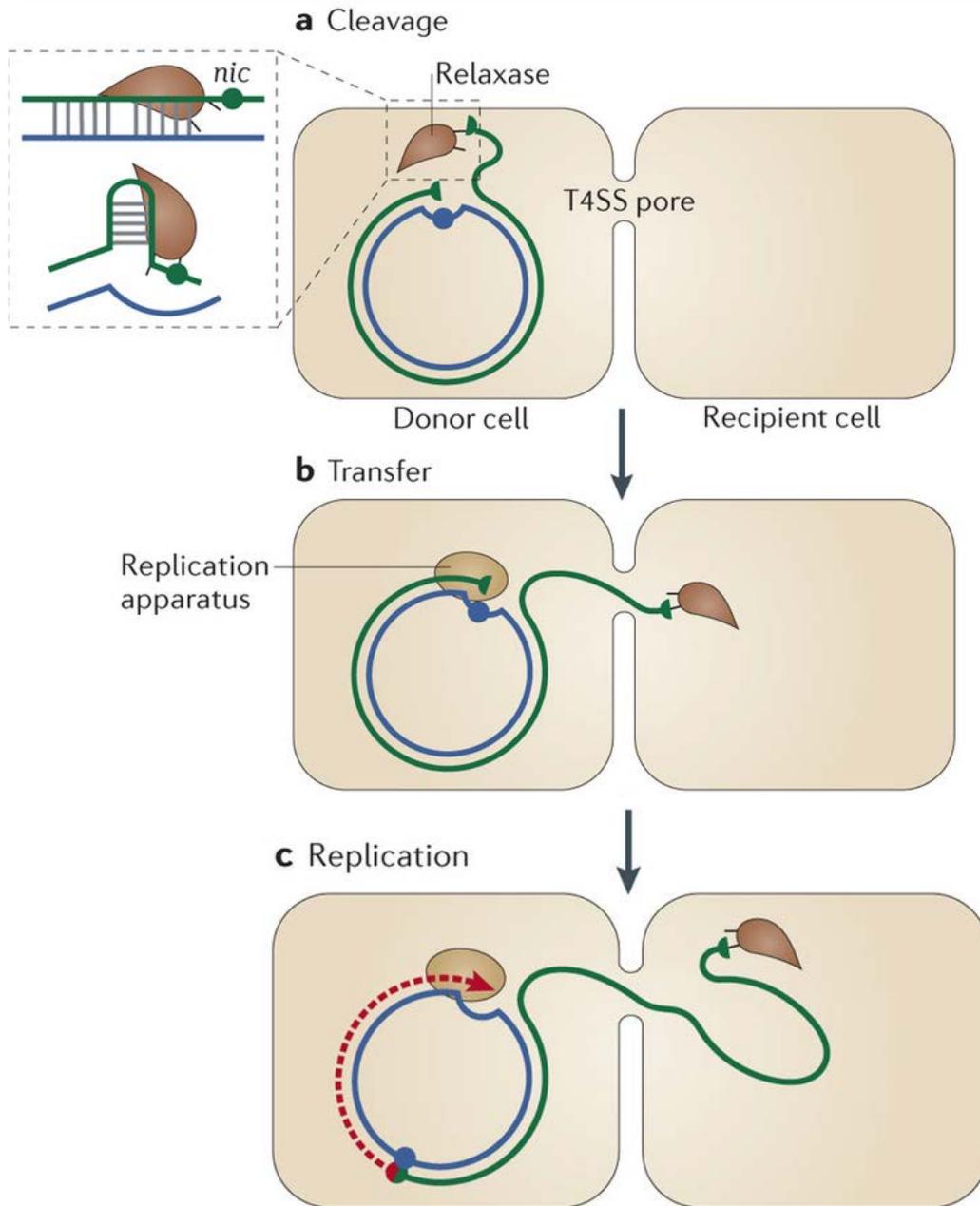
Trasferimento del DNA alla cellula ricevente



Durante la replicazione il DNAss viene sospinto nella cellula ricevente dove viene ricoperto dalle SSB



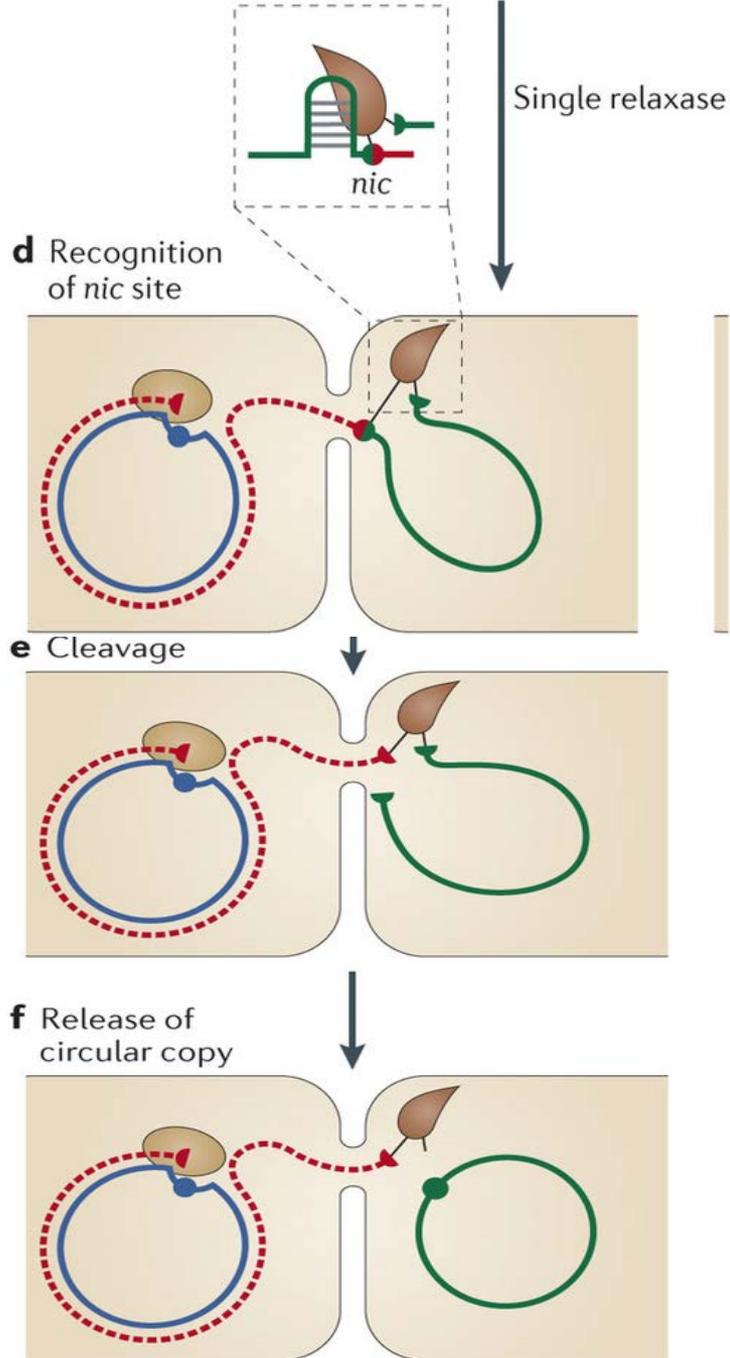
Al termine del processo la elicasi/rilassasi tagliano il DNA separando i DNA dei plasmidi tra le due cellule



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 ricevente.

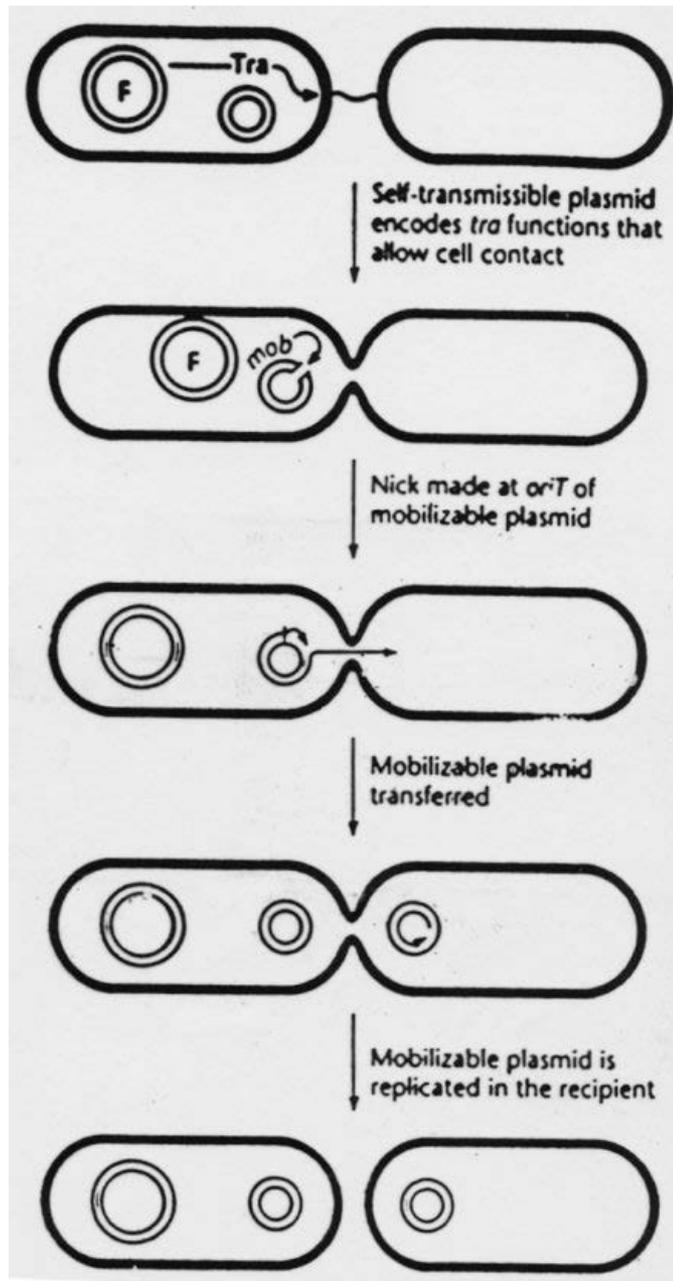
Il taglio è mediato dalla relaxasi legata al sito *nic* originale nella cellula ricevente.

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

LA MOBILIZZAZIONE

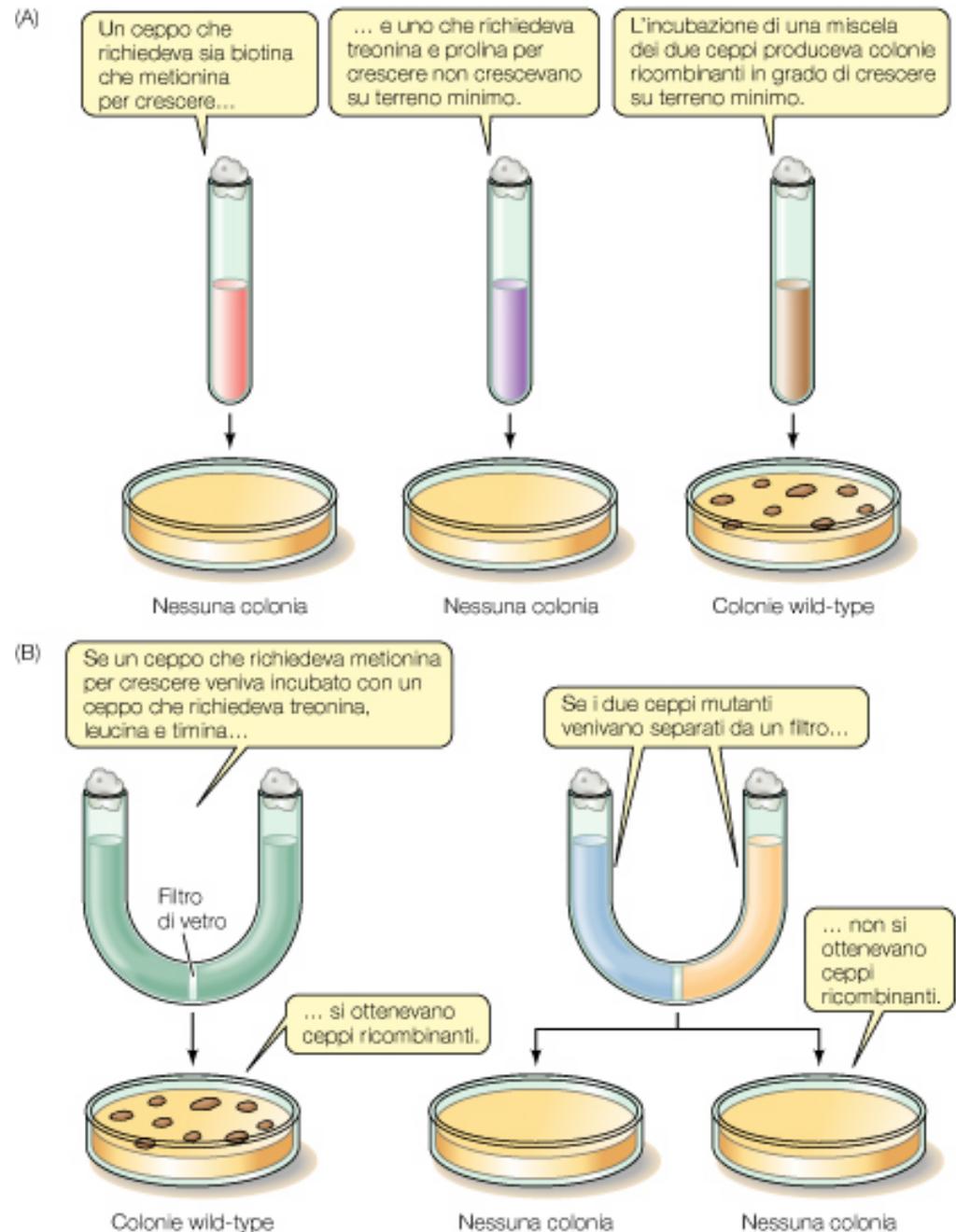
I plasmidi mobilizzabili sono plasmidi non coniugativi in grado di sfruttare il sistema di coniugazione di un plasmide compatibile presente nella cellula ospite.

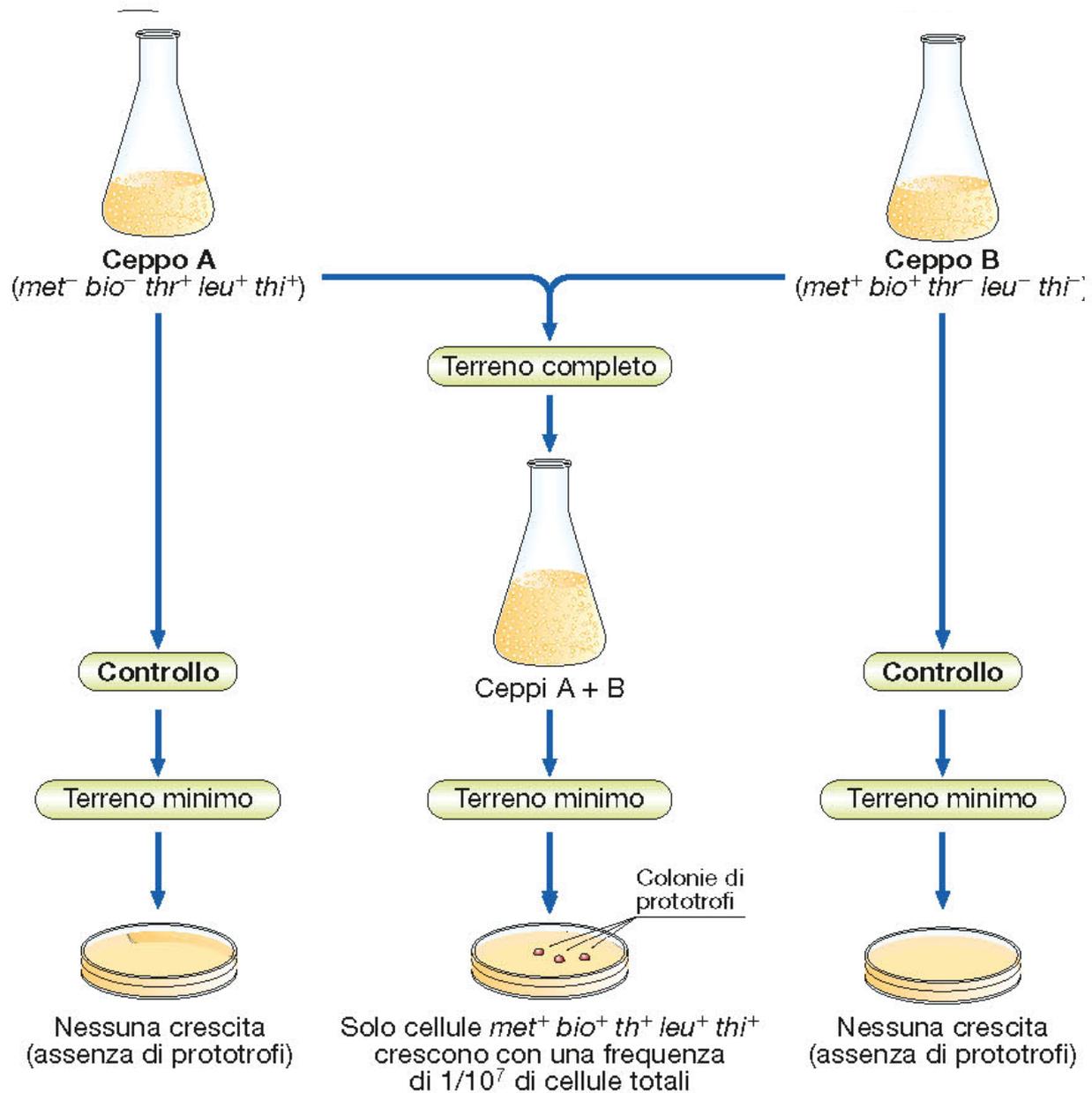
Alcuni posseggono una propria nucleasi in grado di tagliare il DNA nel sito di *oriT* per dare l'avvio al processo di coniugazione. Altri plasmidi invece posseggono semplicemente un sito *oriT* riconoscibile da varie nucleasi codificate dai plasmidi coniugativi.



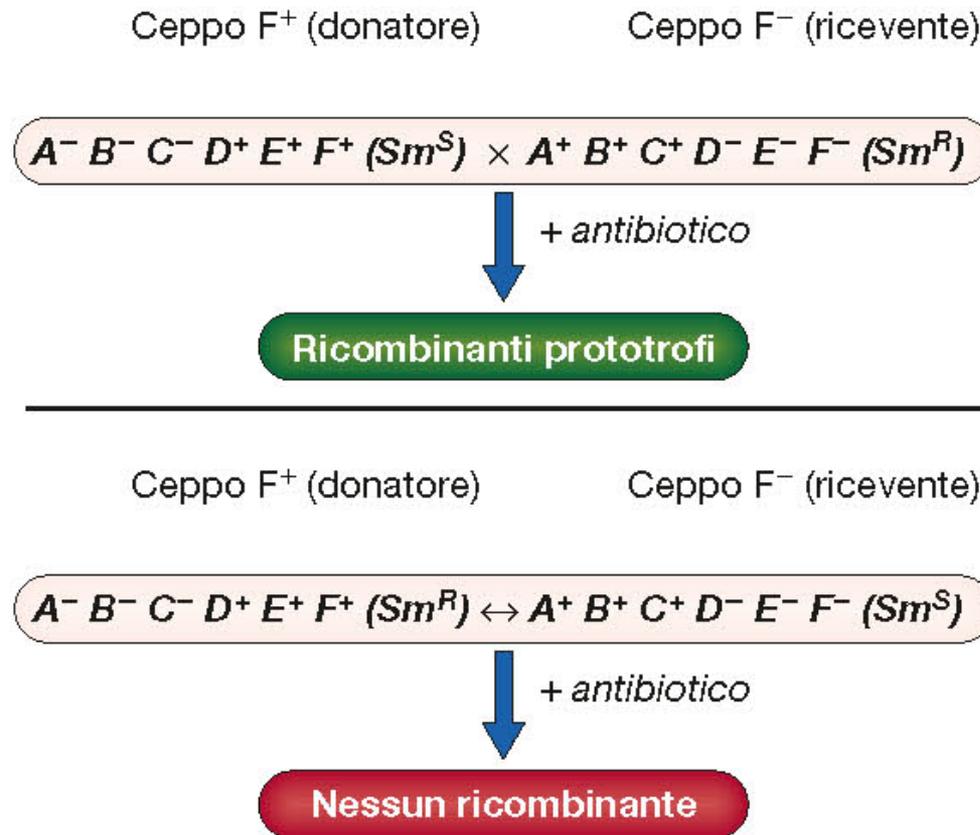
1946: Esperimento di Lederberg e Tatum

Scambio di materiale genetico per contatto tra le cellule batteriche





Il trasferimento durante la coniugazione è polarizzato



Il trasferimento procede dal ceppo donatore (cellula F^+ o Hfr) verso la cellula recipiente F^- .
Il recipiente deve essere vitale.

Come si integra il fattore F nel cromosoma?

Meccanismo di ricombinazione generale utilizzando come regioni di omologia le sequenze IS

F₊ si può integrare in 20 posti diversi nel cromosoma di E.coli.

Il fattore F contiene

3 copie di IS3.

1 di IS2 e

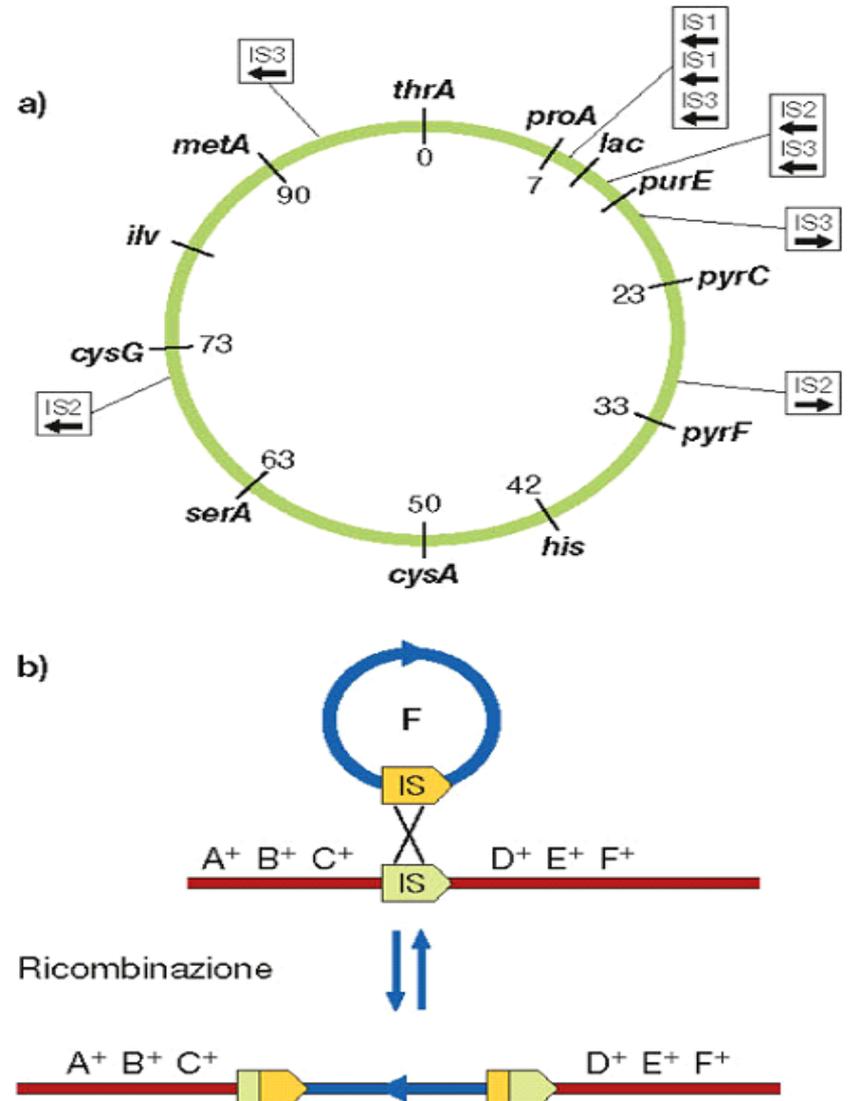
1 di Tn1000.

Il cromosoma di E.coli contiene

varie copie di IS1, IS2 IS3

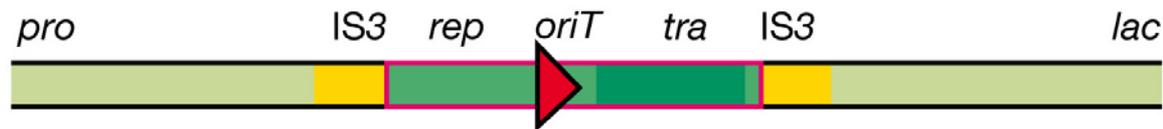
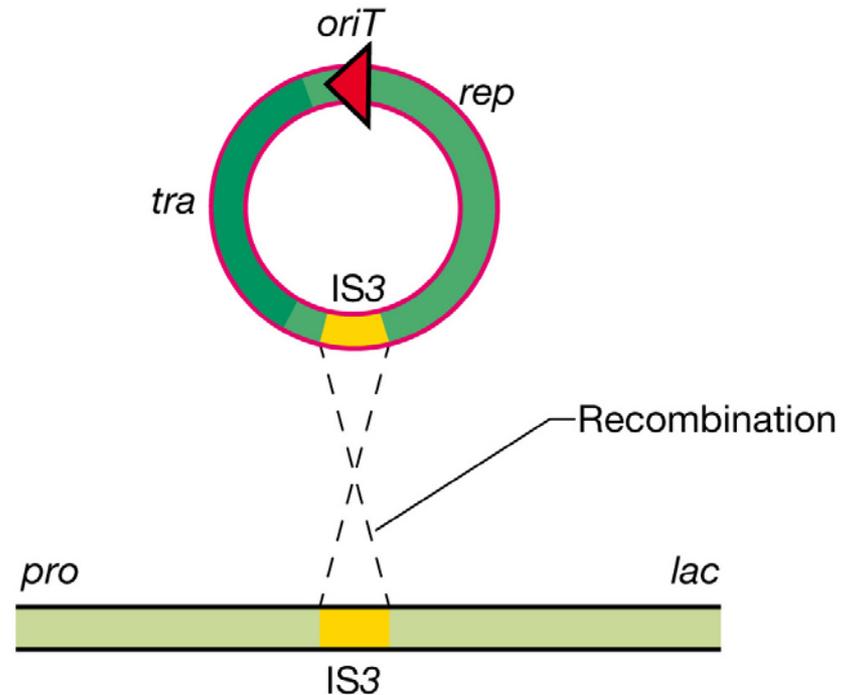
e di Tn1000.

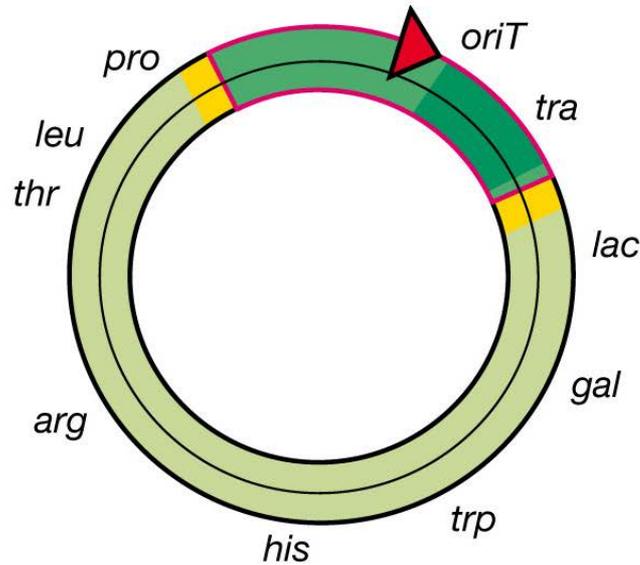
Tutte possono essere utilizzate come regioni di omologia per la ricombinazione



L'integrazione di F nel cromosoma avviene con un meccanismo di ricombinazione mediato dall'omologia tra le sequenze IS presenti sul plasmide e sul cromosoma.

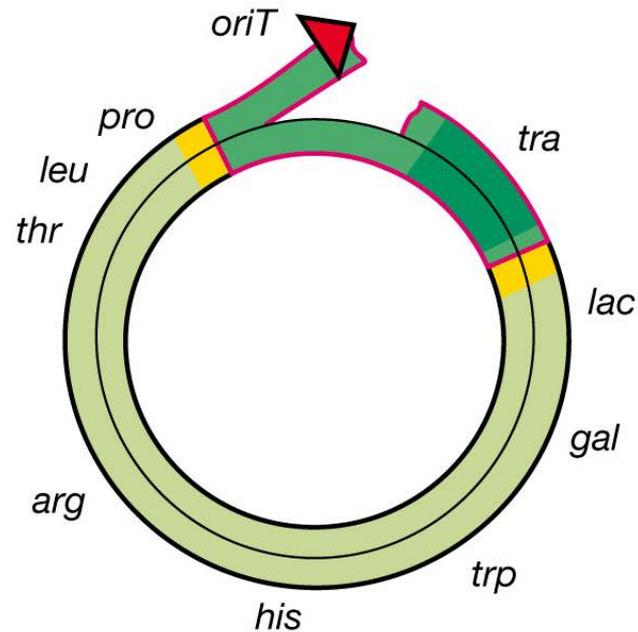
Non è sito specifica, necessita delle proteine RecA e RecBC.





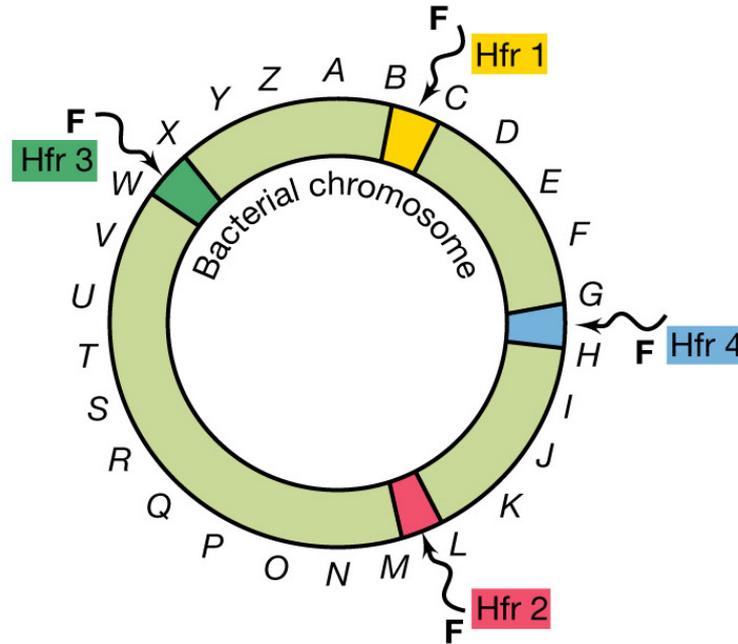
Il ceppo Hfr trasferisce solo parte dei geni plasmidici in quanto l'origine di trasferimento (*oriT*) è localizzata in posizione centrale rispetto alle sequenze IS che ne mediano l'integrazione

Transfer to F⁻ recipient

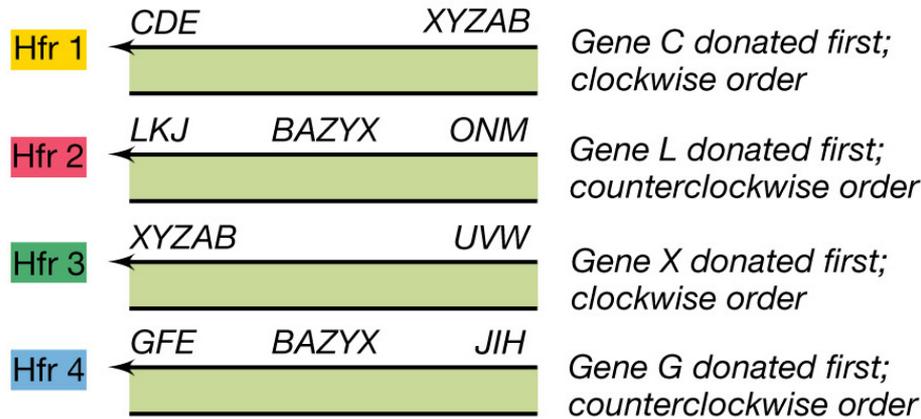


I geni TRA sono perfettamente attivi quando il plasmide F è integrato e promuovono il trasferimento a partire da *oriT*

A seconda di quale IS cromosomica viene utilizzata per l'integrazione il plasmide F si ritroverà integrato in siti diversi.



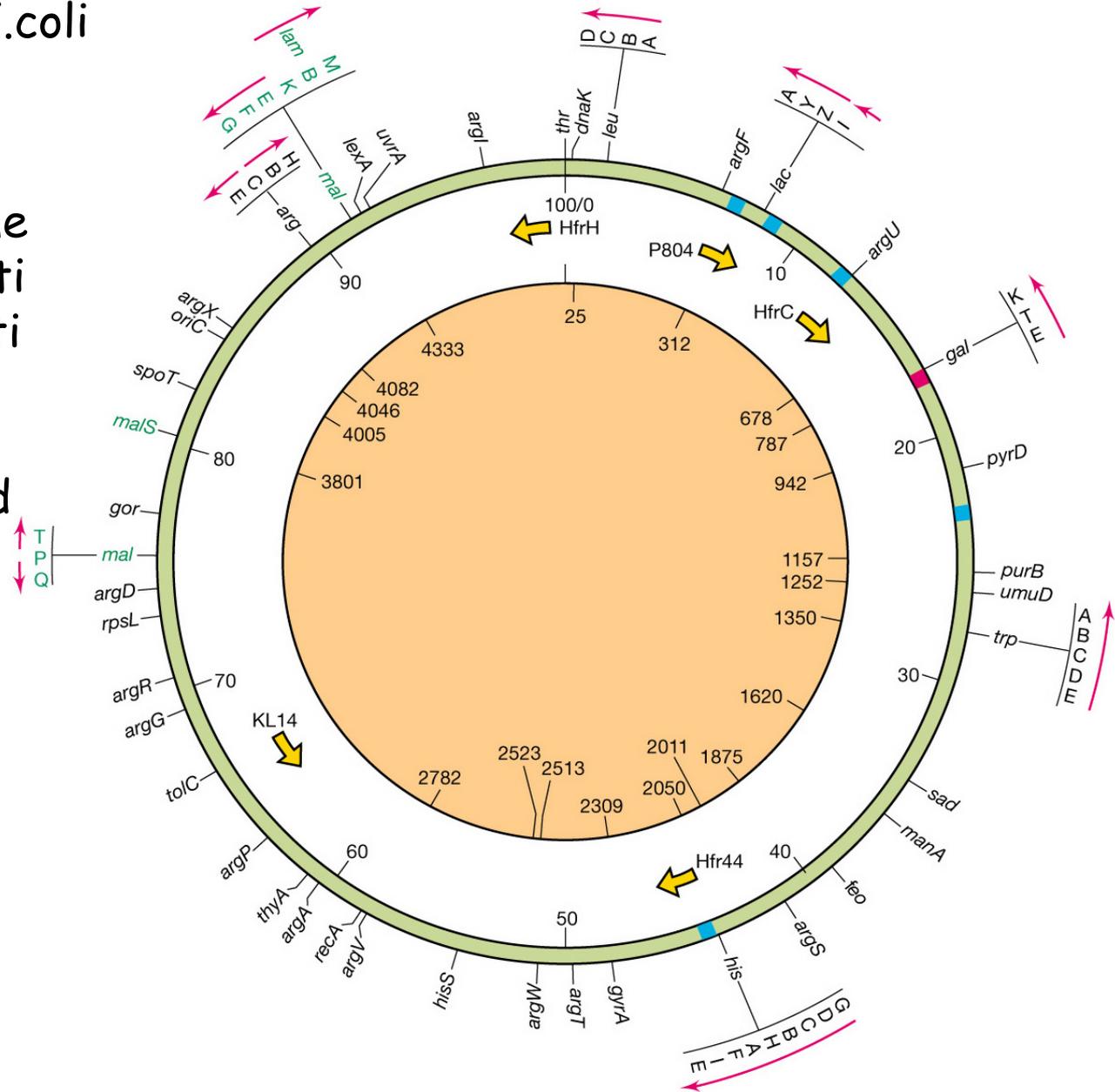
(a)



(b)

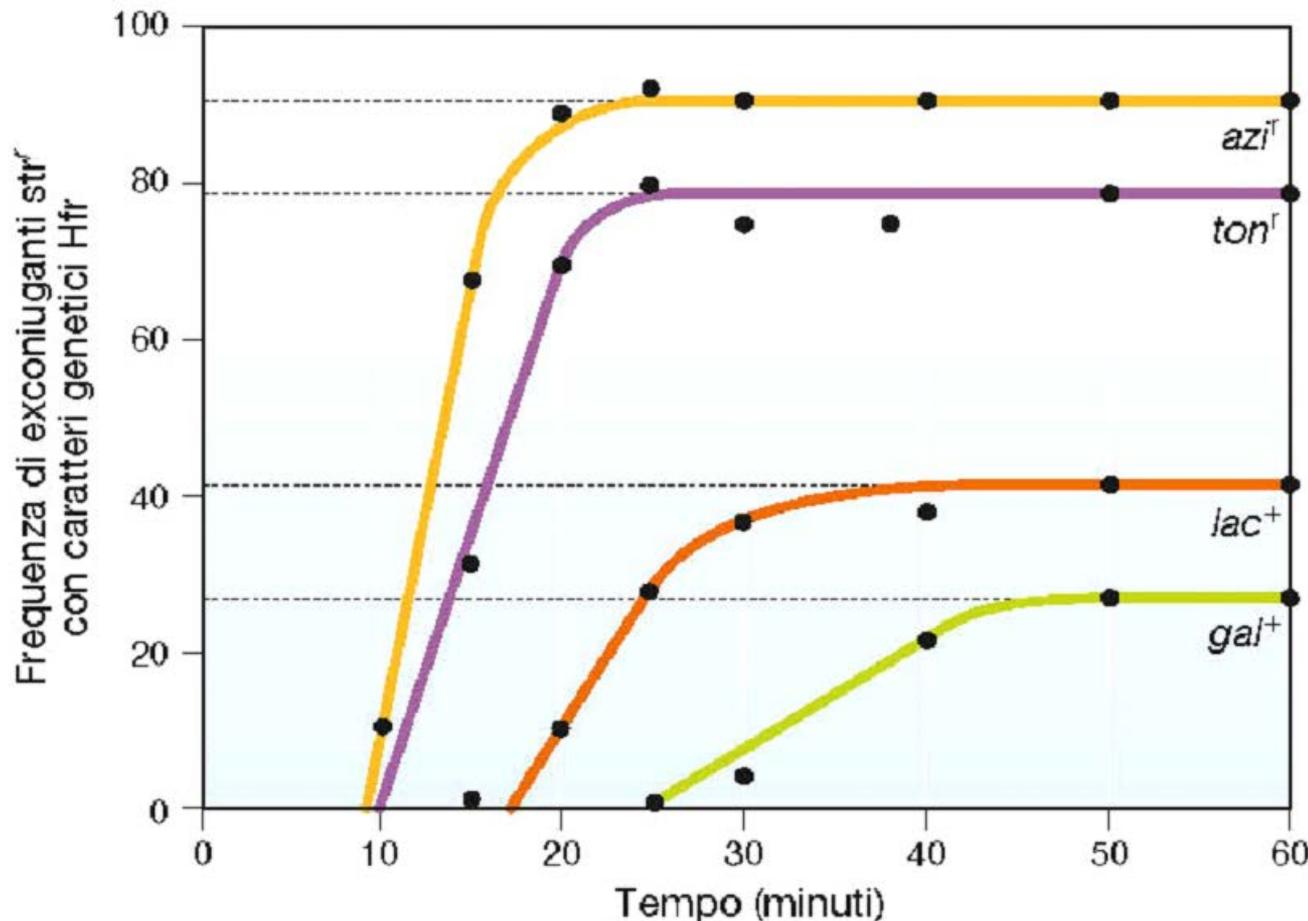
Mappa circolare di E.coli

La mappa utilizza come unità di misura i minuti in riferimento a quanti minuti ci vogliono perché un gene sia trasferito rispetto ad un altro durante un incrocio Hfr-x F-.



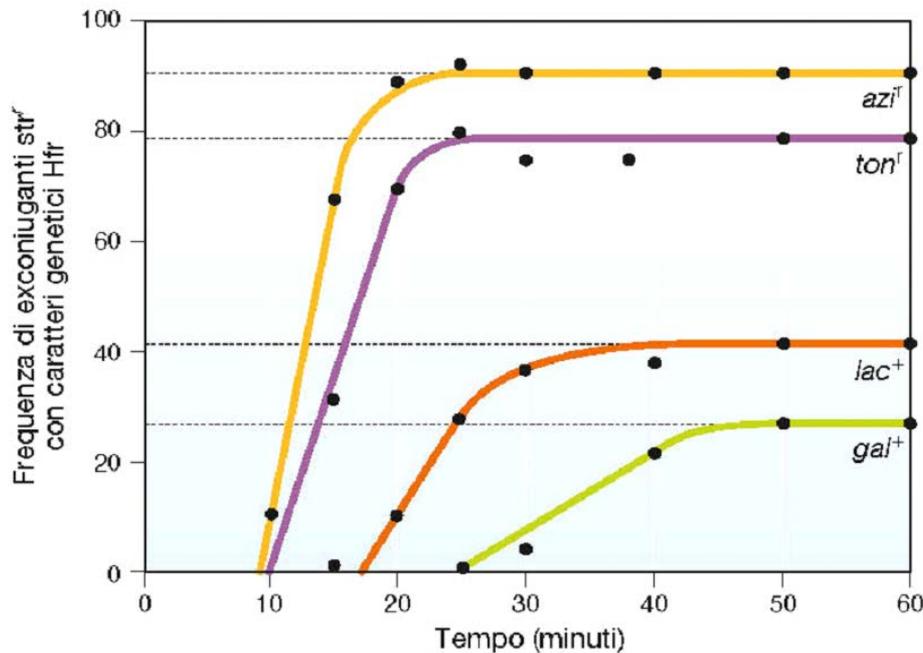
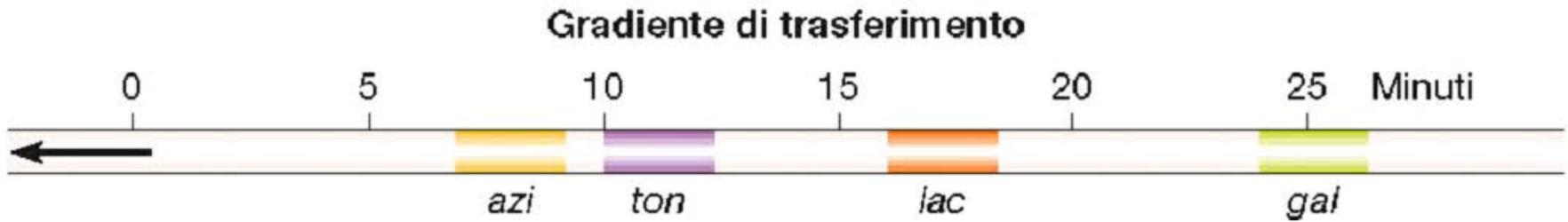
Come si riuscì a stabilire l'ordine dei geni osservando le frequenze di ricombinanti?

Il ceppo recipiente è sensibile a sodio azide (azi^-), al fago T1 (ton^s) e incapace di fermentare lattosio (lac^-) e galattosio (gal^-) ma resistente alla streptomicina



Il grafico riporta le frequenze in funzione del tempo dei batteri "recipienti" che hanno ricevuto i caratteri del donatore $azi^r, ton^r, lac^+, gal^+$

Sulla base dei dati ottenuti è possibile costruire una mappa genetica nella quale i geni sono distanziati a seconda di quanti minuti siano necessari perché entrino

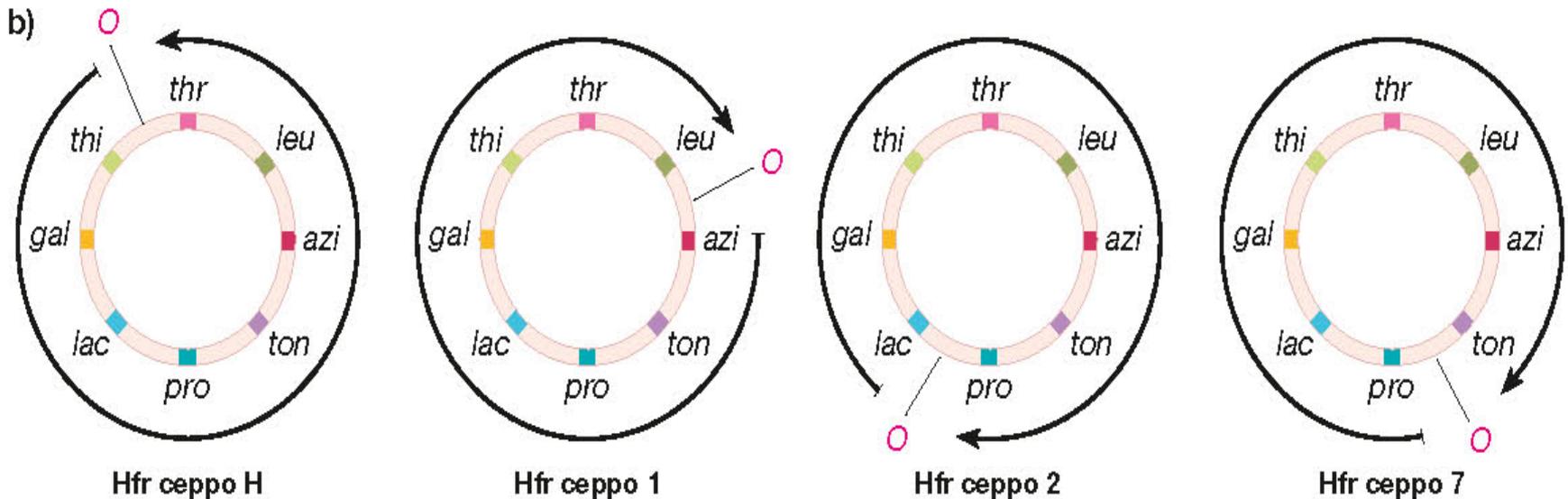


Le frequenze di ricombinazione dei geni più lontani diminuiscono in funzione della distanza dall'origine a causa di rotture dell'apparato di coniugazione

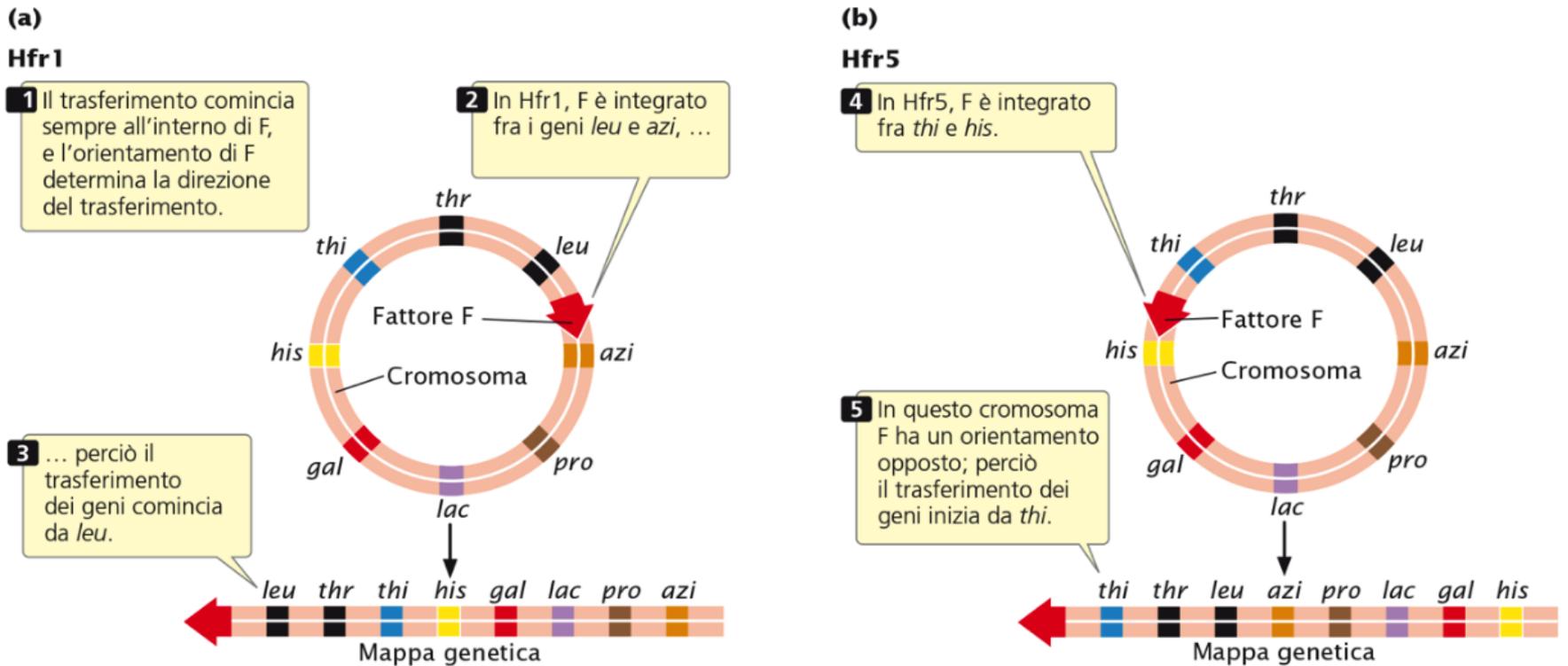
Hfr diversi producono ricombinanti diversi

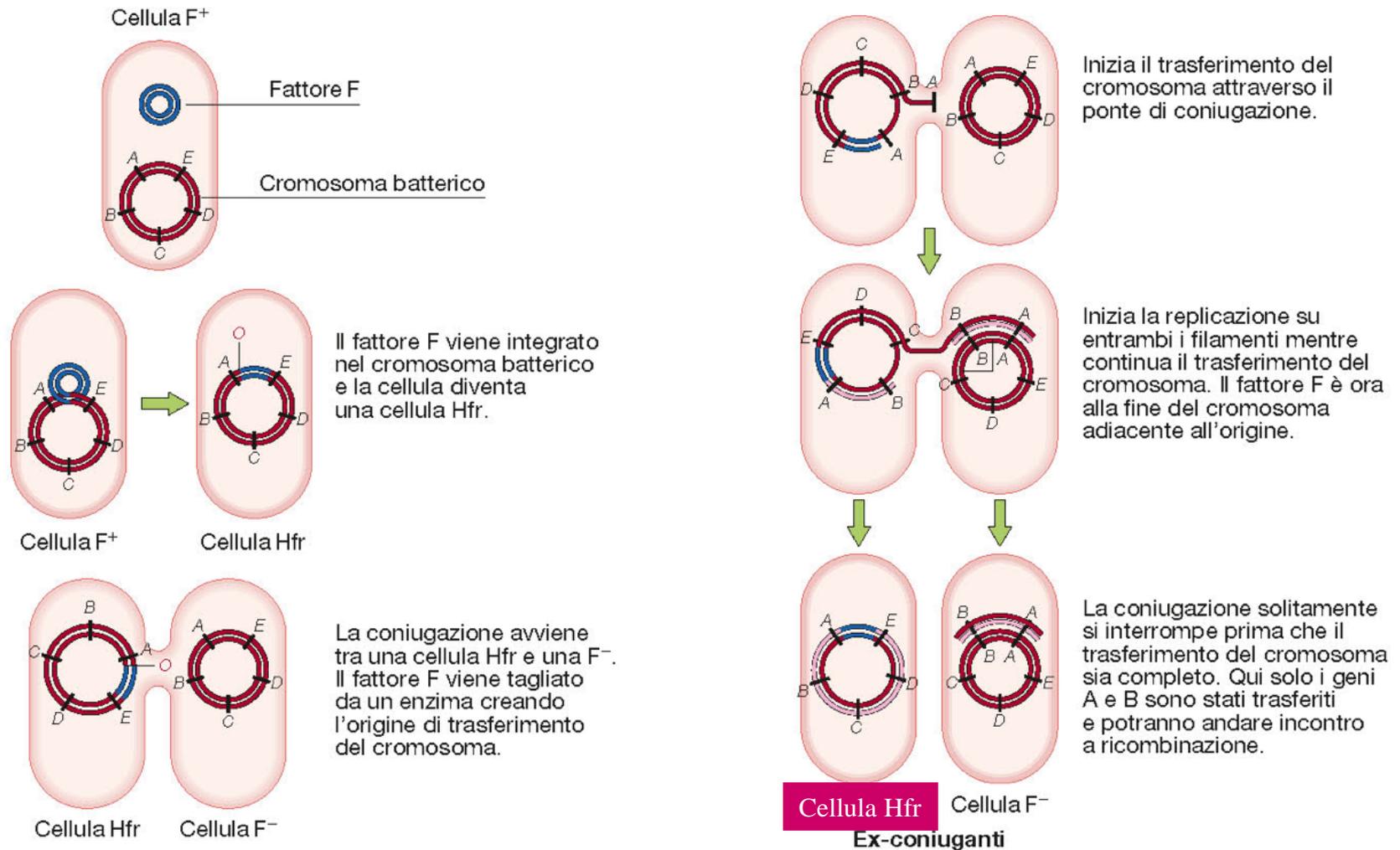
a)

Ceppo Hfr	← Ordine di trasferimento → (primi) (ultimi)
H	<i>thr</i> - <i>leu</i> - <i>azi</i> - <i>ton</i> - <i>pro</i> - <i>lac</i> - <i>gal</i> - <i>thi</i>
1	<i>leu</i> - <i>thr</i> - <i>thi</i> - <i>gal</i> - <i>lac</i> - <i>pro</i> - <i>ton</i> - <i>azi</i>
2	<i>pro</i> - <i>ton</i> - <i>azi</i> - <i>leu</i> - <i>thr</i> - <i>thi</i> - <i>gal</i> - <i>lac</i>
7	<i>ton</i> - <i>azi</i> - <i>leu</i> - <i>thr</i> - <i>thi</i> - <i>gal</i> - <i>lac</i> - <i>pro</i>



L'integrazione di F in siti diversi del cromosoma determina il trasferimento di geni diversi nella cellula ricevente. Importante sia il sito d'integrazione che l'orientamento

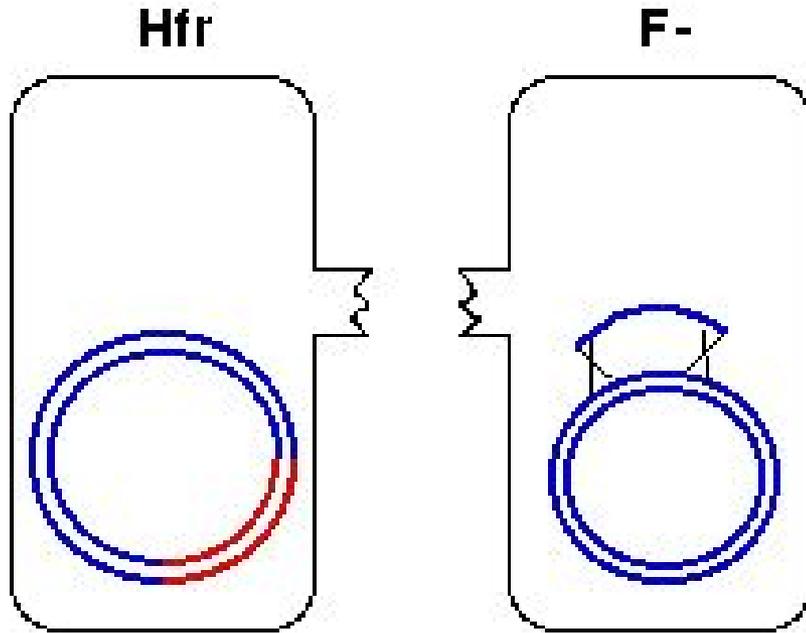




Il risultato di un incrocio Hfr x F⁻ è una cellula Hfr ed una F⁻

Il genoma di F passa solo in piccola parte nella cellula ricevente ma non trovando omologia non ricombina con nessun gene cromosomico

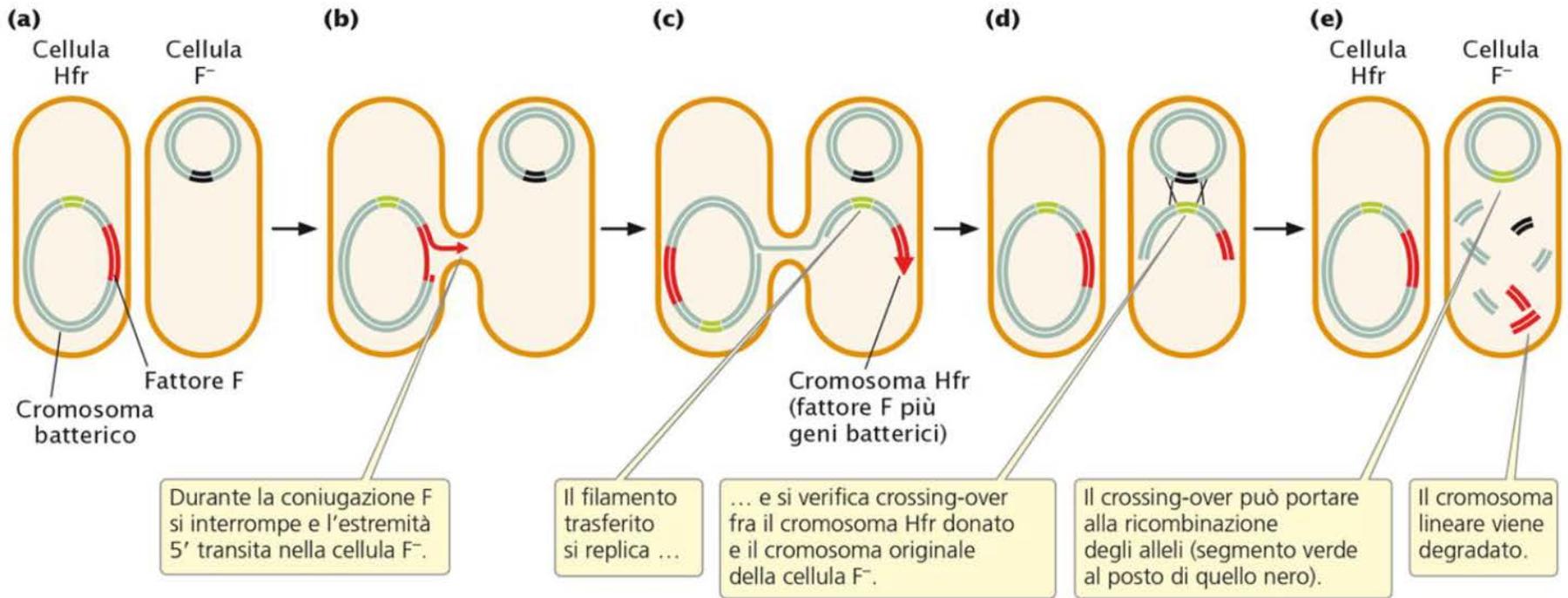
Risultato di un incrocio Hfr x F-



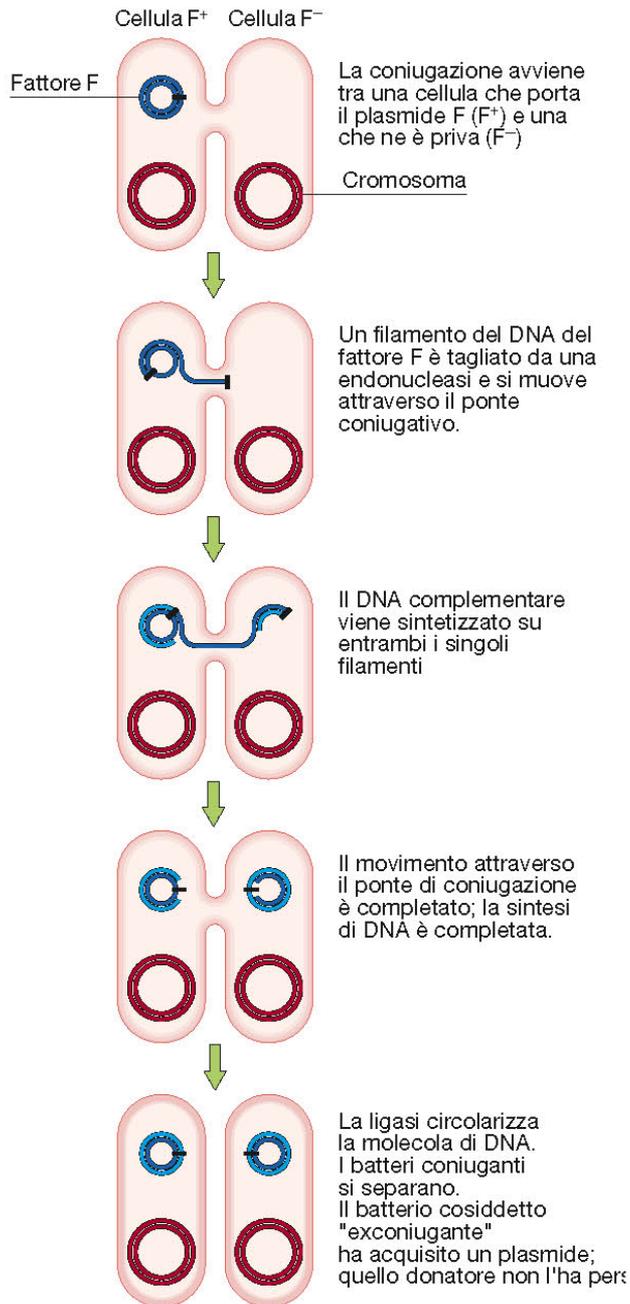
In un incrocio Hfr x F- otterremo alla fine una cellula Hfr ed una F- nella quale potrà aver luogo la ricombinazione del frammento di DNA cromosomico del donatore ereditato per trasferimento.

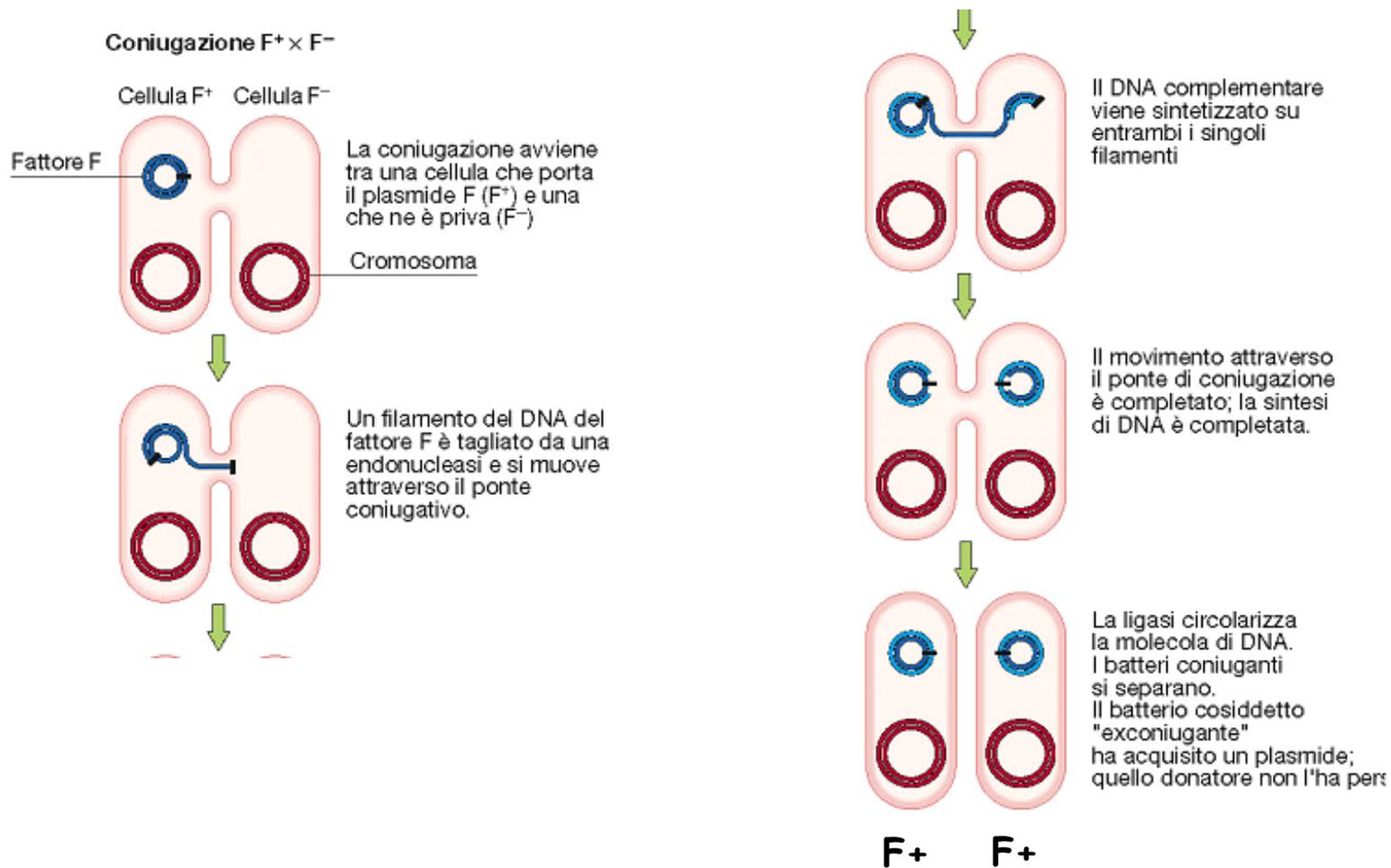
I ricombinanti nel ceppo recipiente si vengono a formare perchè il frammento cromosomico trasferito se troverà sequenze omologhe sul cromosoma del recipiente ricombinerà. Altrimenti verrà degradato.

Visione d'insieme del processo di coniugazione tra un Hfr e un F⁻



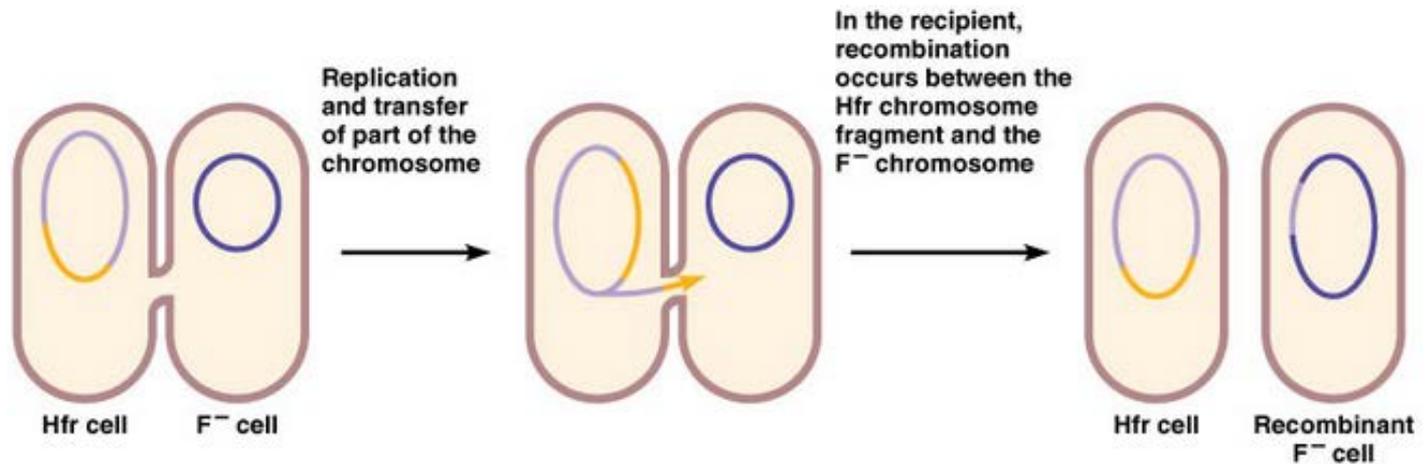
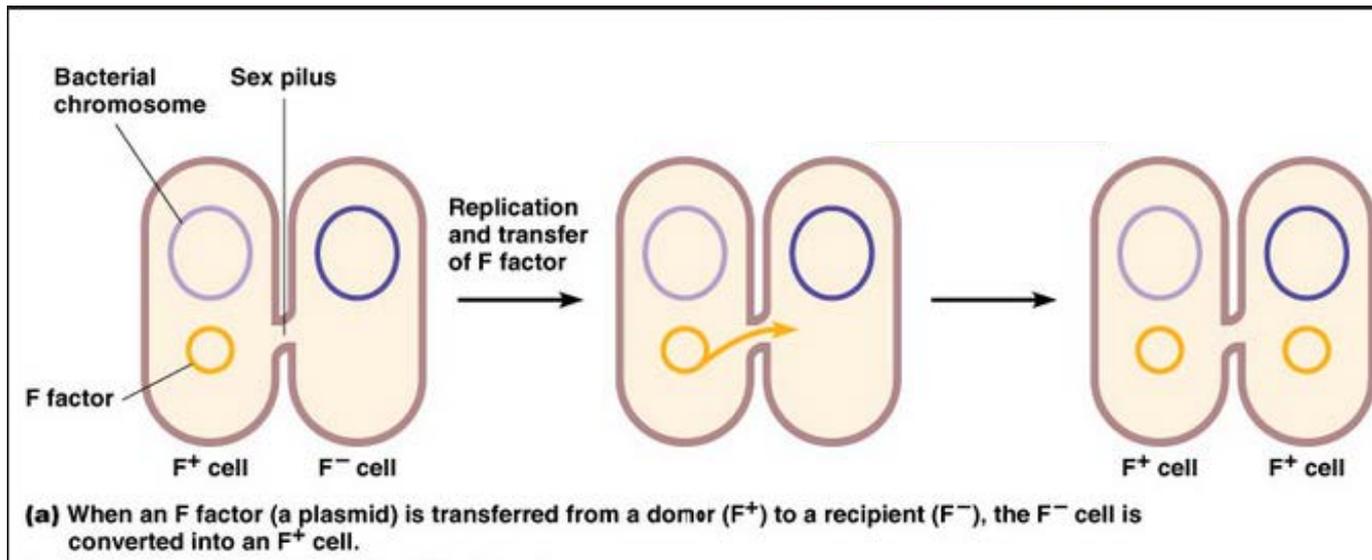
Coniugazione $F^+ \times F^-$



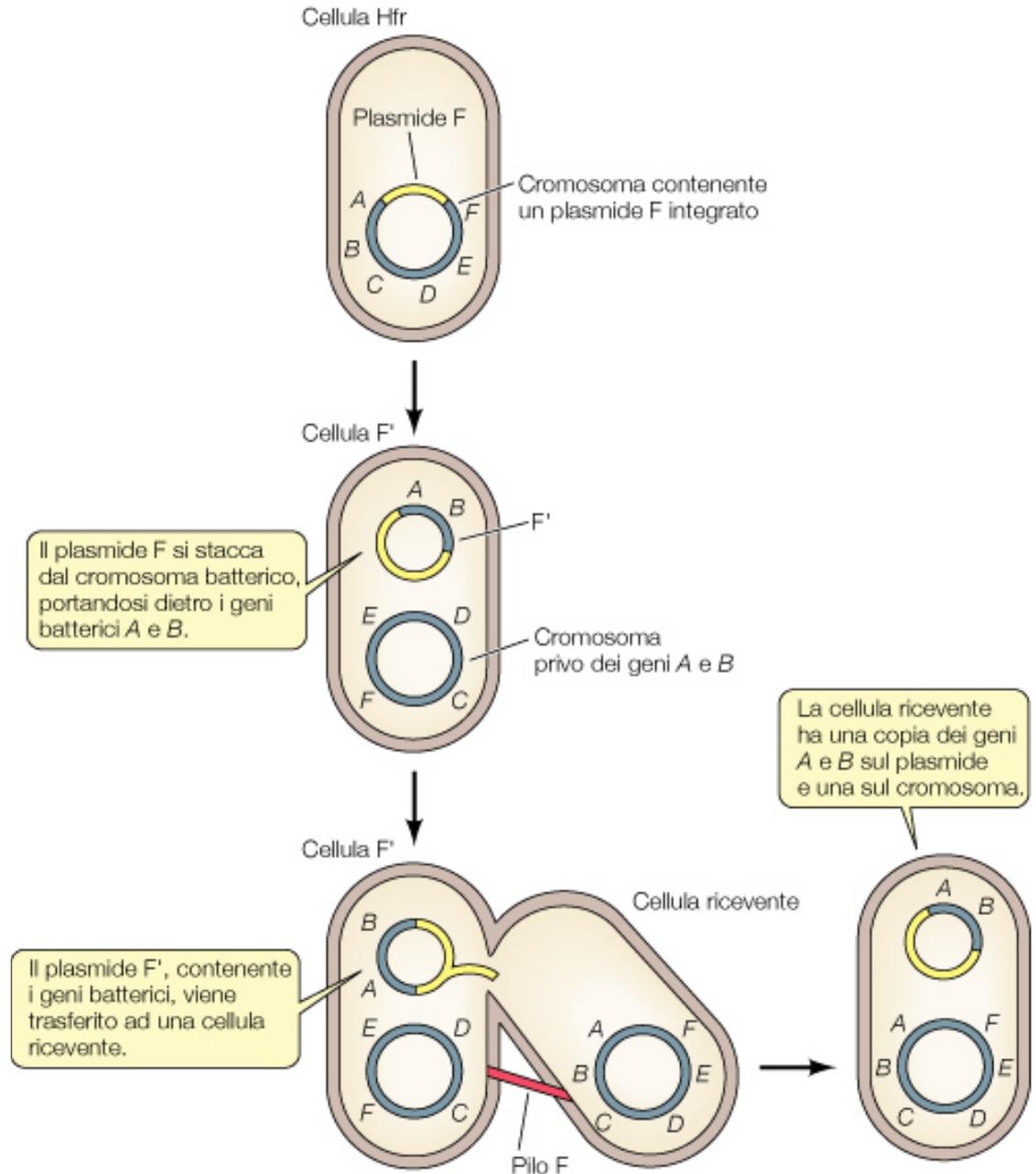


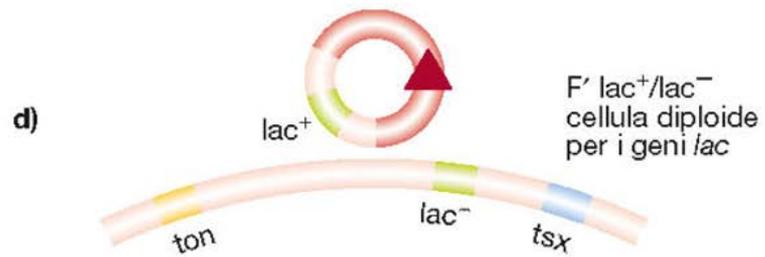
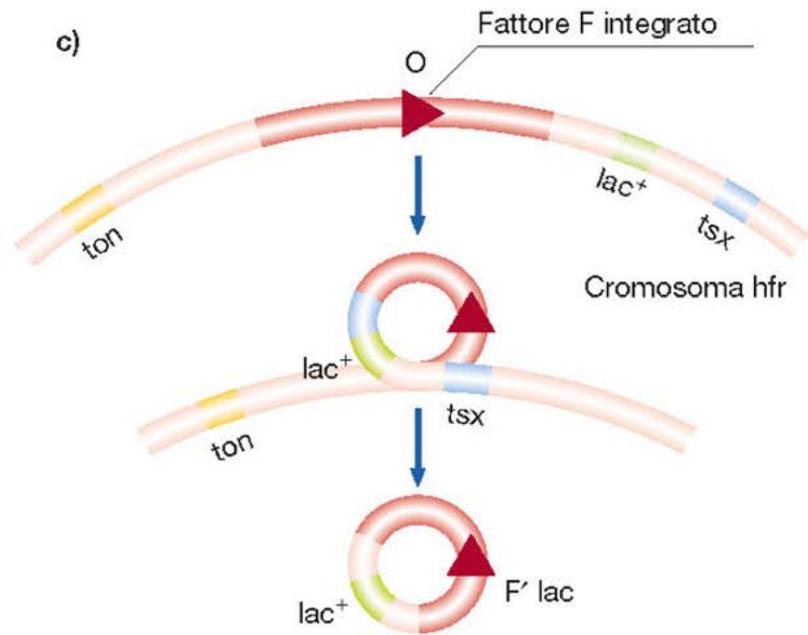
Nell'incrocio tra un F^+ ed un F^- alla fine avremo 2 cellule F^+ .
Tutte le cellule recipienti riceveranno il plasmide F

Differenze tra la coniugazione mediata da Hfr e da F⁺



Formazione dei plasmidi F' contenenti regioni del cromosoma per excisione imprecisa





I plasmidi di tipo F' contengono quindi dei frammenti di DNA cromosomico che possono essere trasferiti da una cellula all'altra creando dei merodiploidi parziali .

$E.coli lac^- F' lac \times E.coli Lac^+ = E.coli Lac^+ F' lac$

L'operone lac è presente in duplice copia nel genoma della cellula ricevente.

Questo ha permesso di eseguire tutti gli esperimenti di complementazione per capire la struttura dell'operone lac