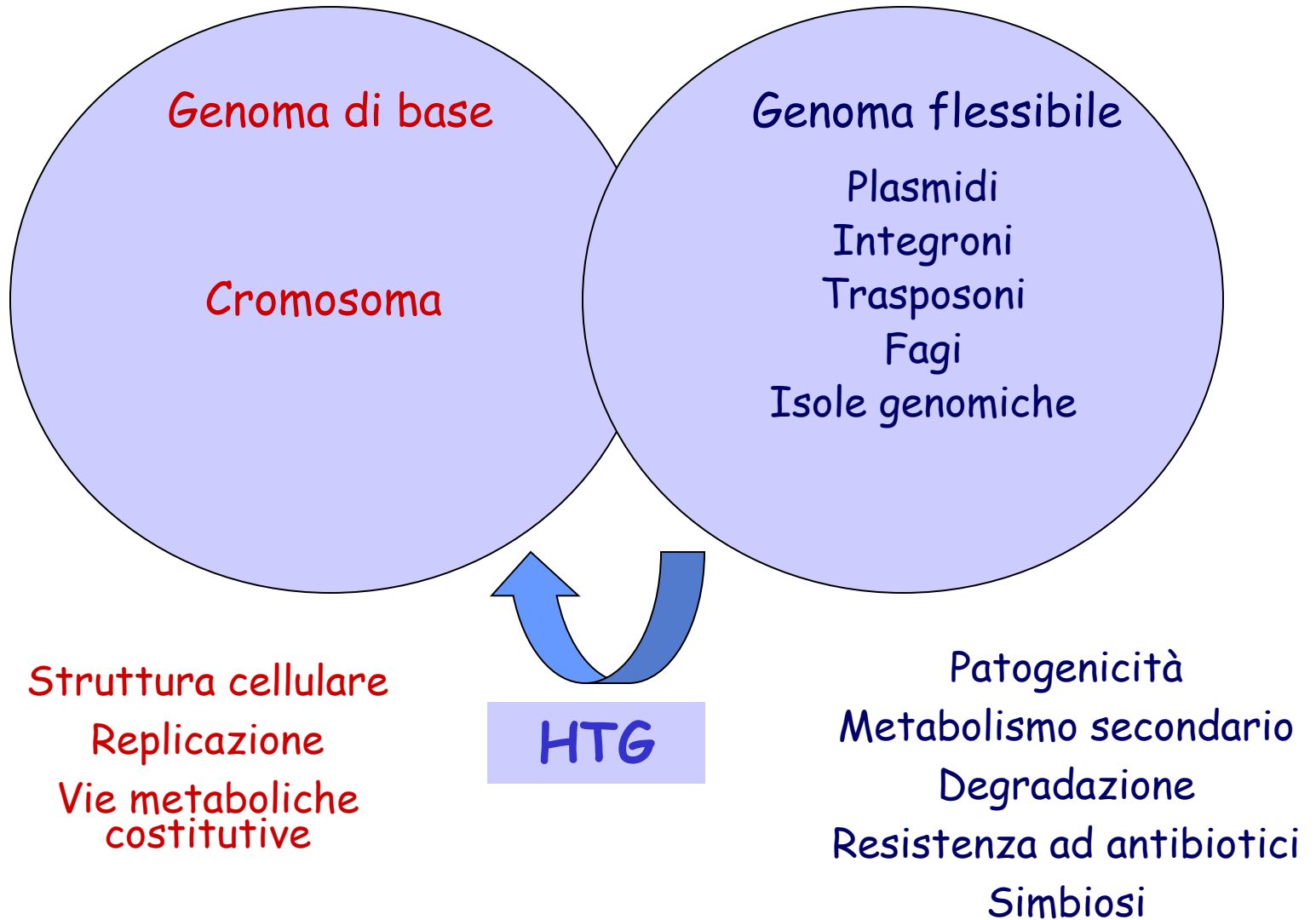
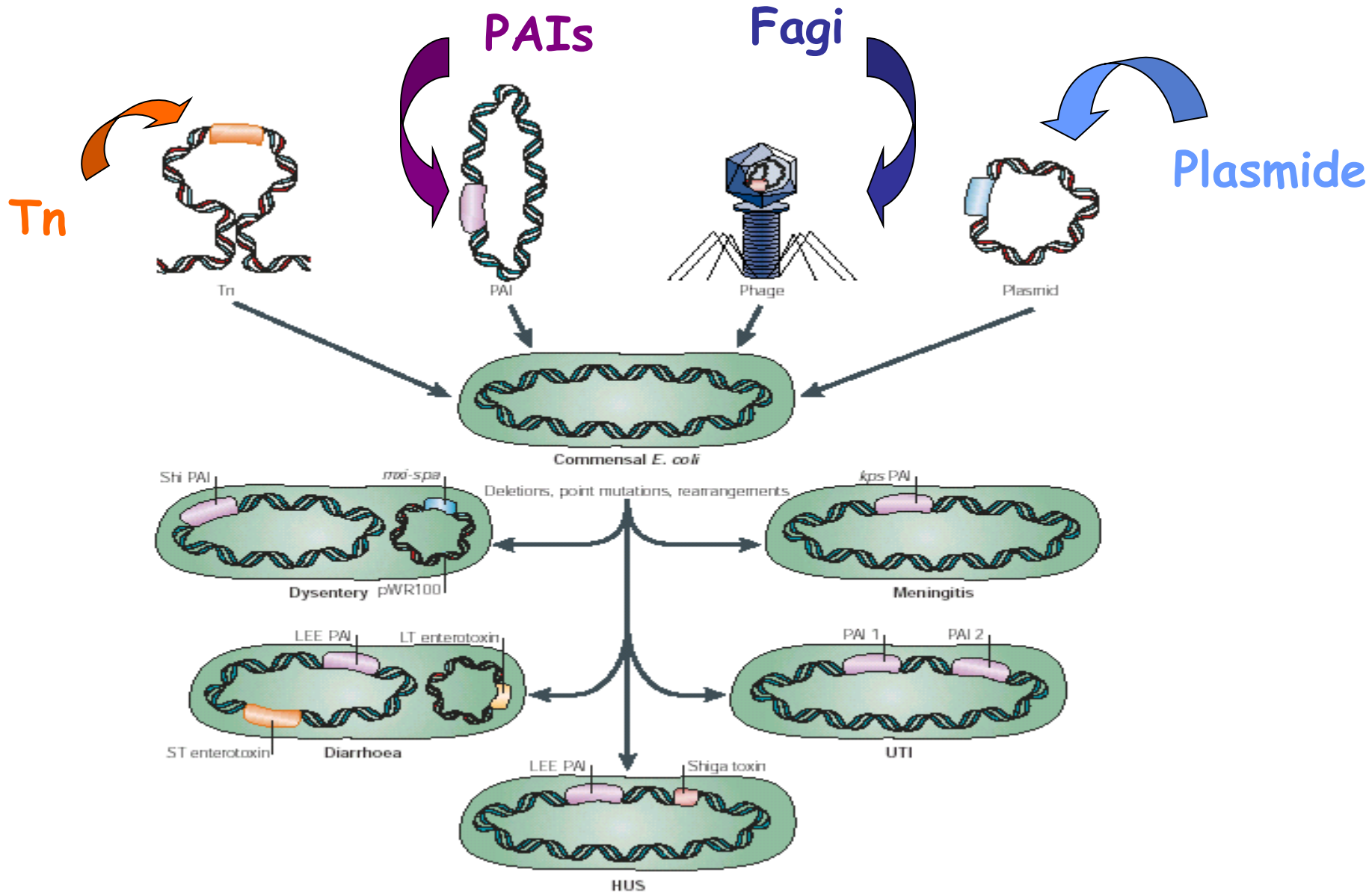


# EVOLUZIONE DEL GENOMA BATTERICO



# Le principali strutture coinvolte nel trasferimento genico orizzontale



Altri elementi genetici mobili :

gli integroni e

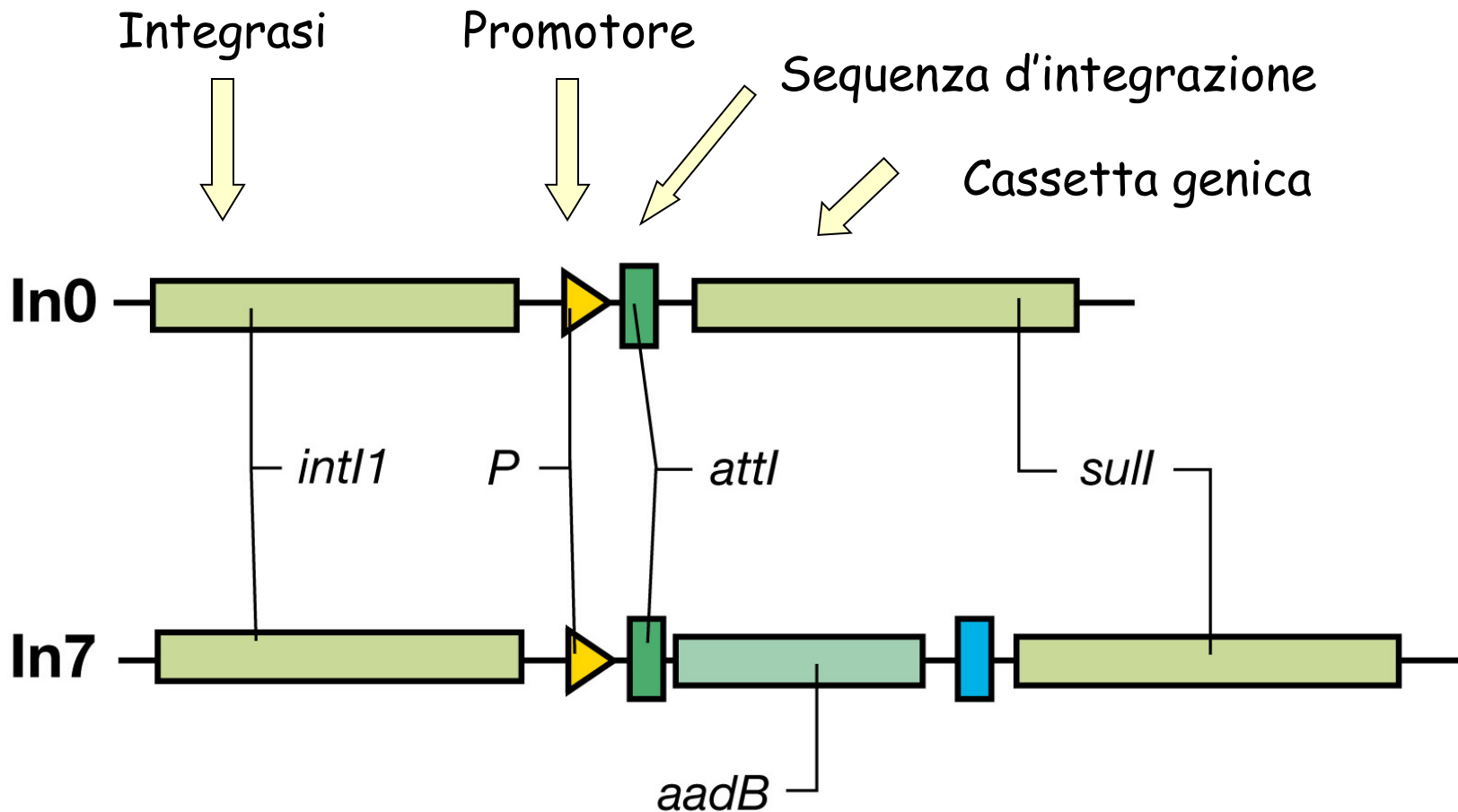
gli ICE

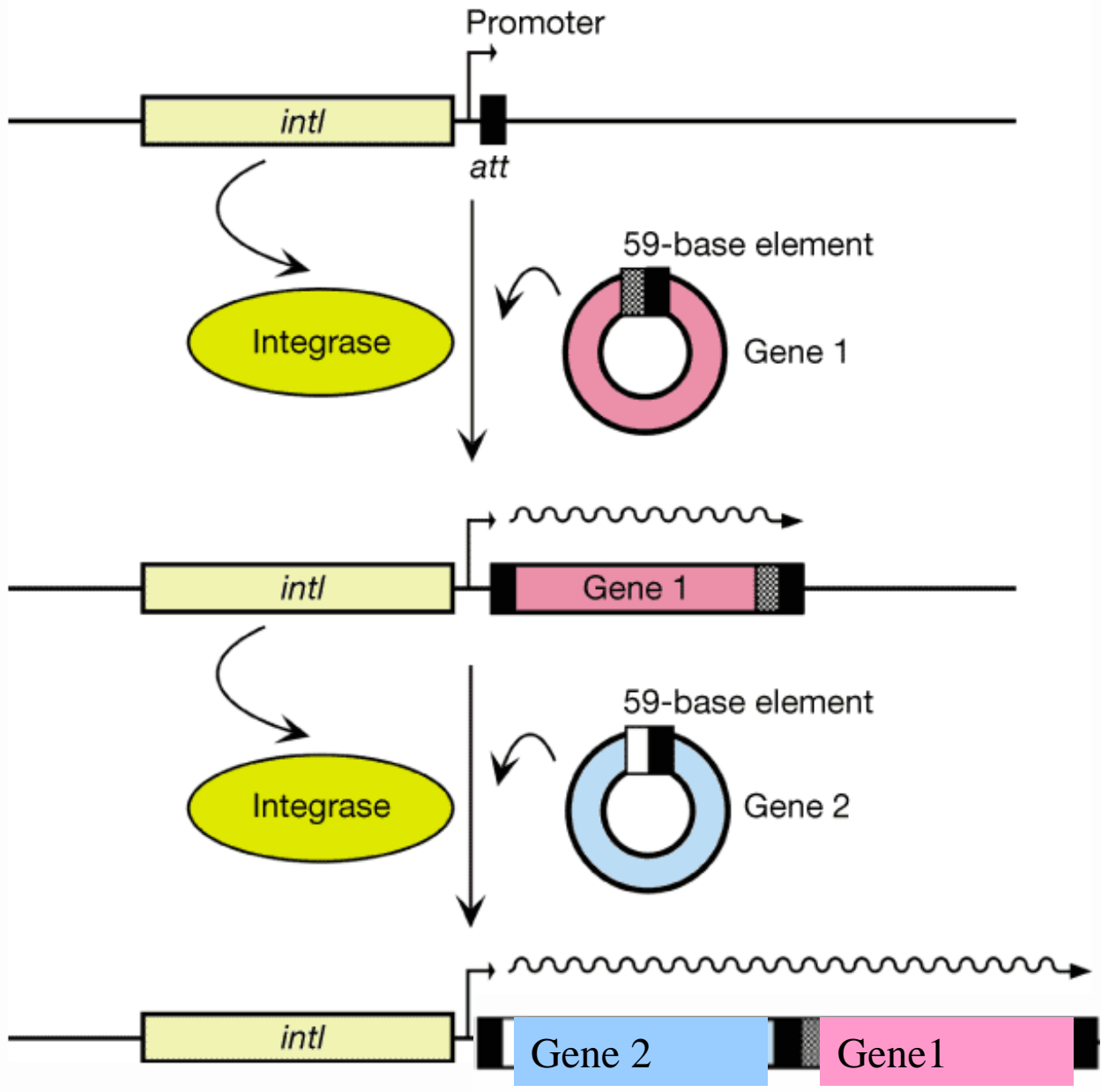
INTEGRONI sono elementi genetici che hanno la capacità di recuperare geni e di farli esprimere

Gli integroni sono caratterizzati da 3 elementi chiave:

- un gene (**intI**) che codifica per l'integrasi, un enzima in grado di indurre ricombinazione sito specifica;
- una sequenza specifica (**attI**) che viene utilizzata per l'integrazione integrasi-mediata;
- un promotore orientato verso l'esterno che permette l'espressione del gene integrato.

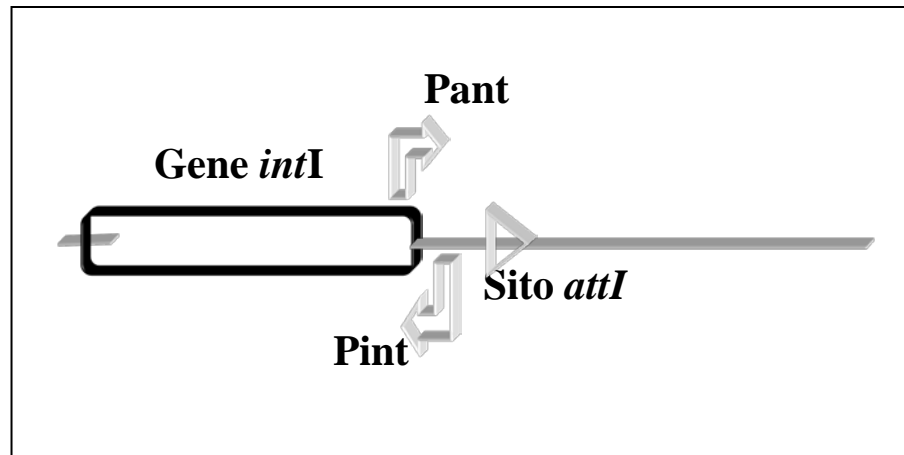
# Struttura degli integroni





## Promotore *Pant* o *P1*

- Localizzato nella regione conservata al 5'
- Trascrizione dei geni incorporati a valle
- Esiste un promotore alternativo, *P2ant*



Gli **INTEGRONI** integrano al loro interno non geni casuali ma specifiche **cassette geniche** caratterizzate:

- geni fiancheggiati da sequenze specifiche di DNA riconosciute dall'integrasi;
- geni che non si esprimono finchè non vengono integrati nell'integrone e possono essere trascritti dal promotore dell'integrone

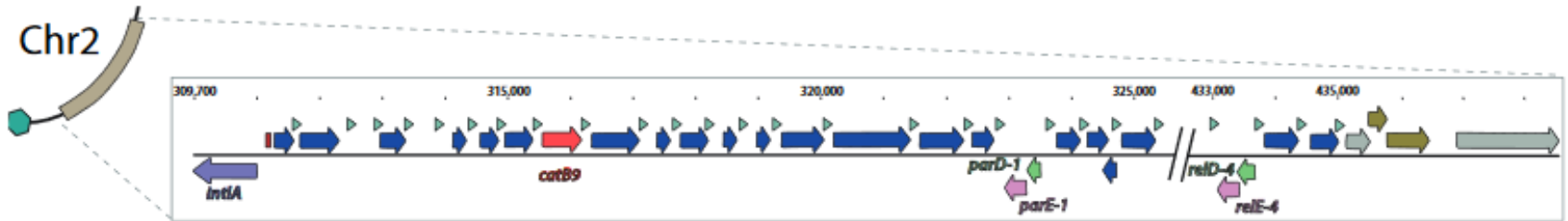


## Le cassette geniche

- condividono delle caratteristiche strutturali comuni
- generalmente contengono un singolo gene
- hanno delle sequenze invertite ripetute all'estremità 3' definito sito **attC** o sequenza 59 bp

Gli integroni non sono elementi mobili di per se come le sequenze IS o i Tn ma sono associati ad elementi trasponibili o a plasmidi coniugativi che li possono veicolare all'interno della stessa specie o tra specie diverse.

## Struttura della regione VCR sul cromosoma 2



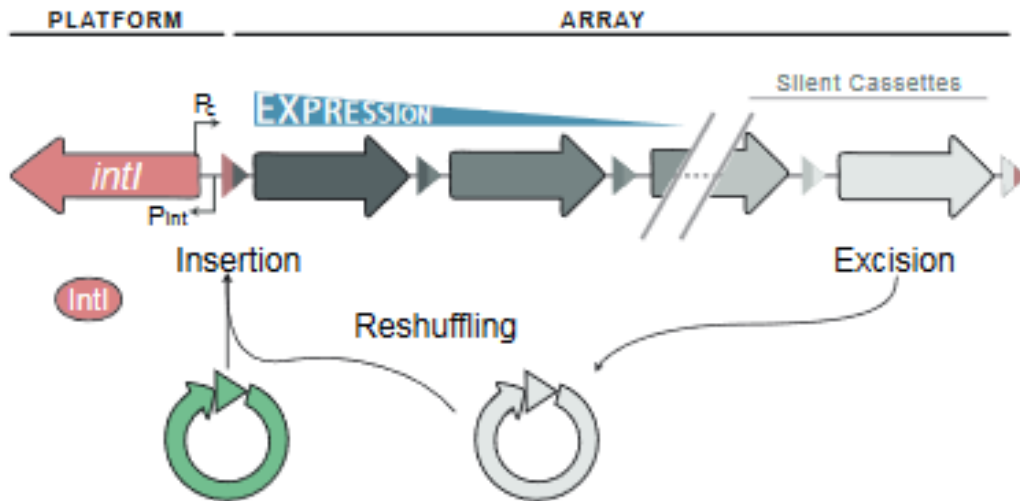
Il Cromosoma 2 contiene un largo gruppo di Intergenic Repeated sequences(VCR) che fiancheggiano gruppi di geni estremamente variabili. Questa struttura viene definita superintegrone perché contiene un integrasi, e la classica struttura di base di un integrone pur avendo dimensioni di oltre 100Kb.

All'interno si trovano geni di antibiotico resistenza, sistemi toxin/antitoxin, regolatori della trascrizione e molti geni a funzione ancora sconosciuta.

Gli integroni sono strutture genetiche mobili costituite da una regione costante ( Promotore, integrasi e sito di integrazione) e da una regione variabile in grado di codificare diverse funzioni tra le quali l'antibiotico-resistenza

Gli integroni mantengono memoria di funzioni adattative e permettono al batterio di adattarsi rapidamente alle variazioni ambientali.

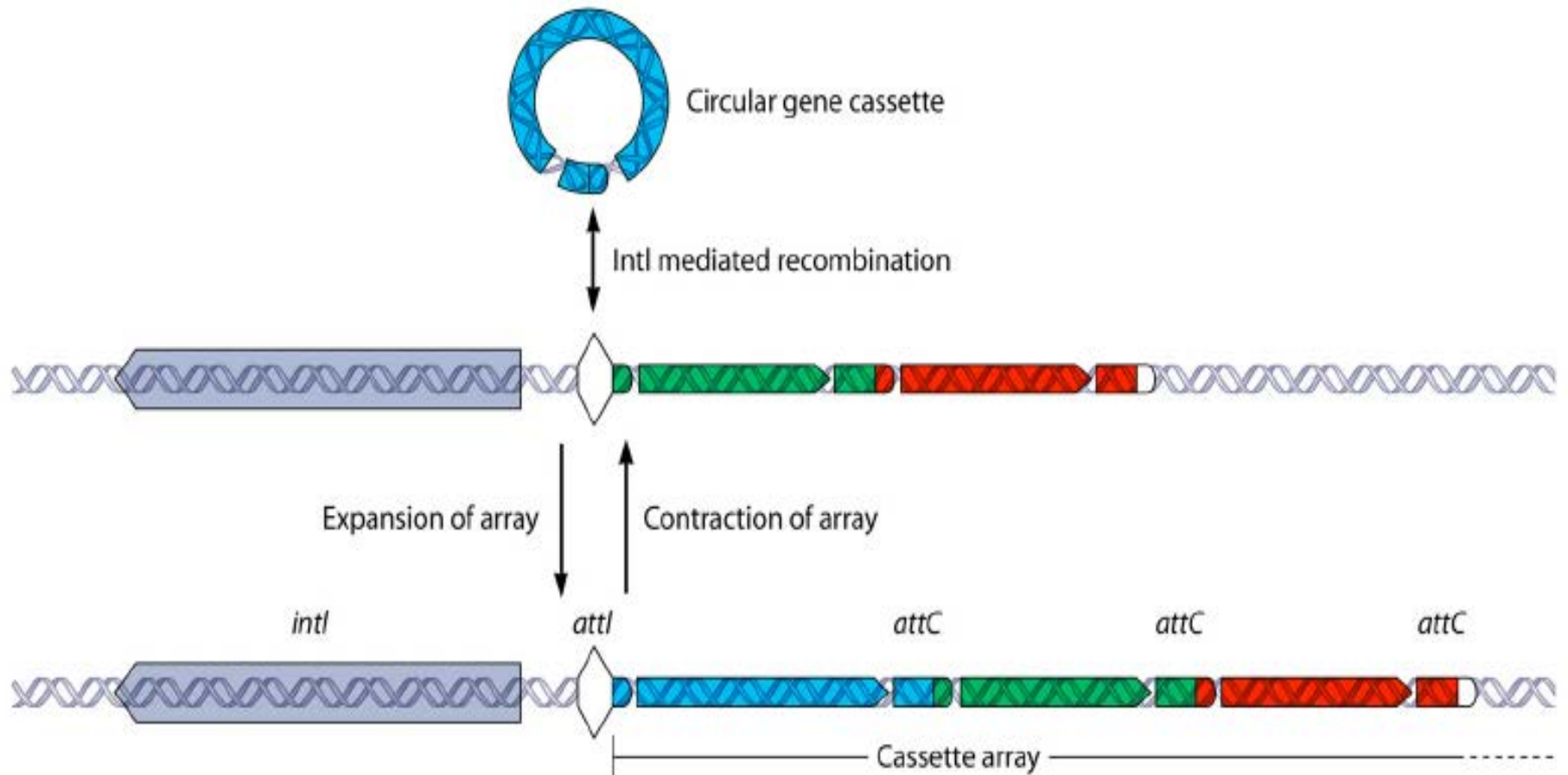
Come?

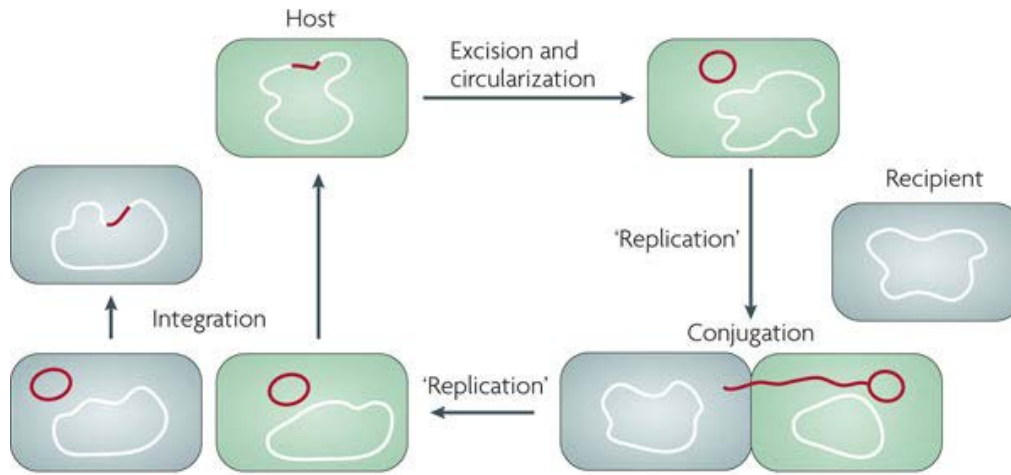


A partire dal Pc ( promotore) si stabilisce un gradiente di espressione mettendo le funzioni che sono state acquisite inizialmente lontane dal promotore al punto da diventare silenti.

In condizioni di stress le cassette possono excidersi perché il promotore dell'integrasi è sotto controllo del sistema SOS e possono quindi reinserirsi in posizioni promotore prossimali ed essere espresse.

**Fig. 3. Diagram of the integron.** Genes are represented by arrows and recombination sites as triangles. The *intI* gene encodes the integrase that governs cassette insertion and excision. Coupling of both reactions reshuffles cassette order. Cassettes are expressed from the Pc promoter in the integron platform. Multiple insertion events lead to the stockpiling of cassettes, constituting a memory of adaptive functions. Expression of cassettes is weaker when located far from the PC. Integrases are expressed from the Pint when the SOS response is triggered and can reshuffle cassettes, changing their expression levels.





Gli ICE : Integrative conjugative elements

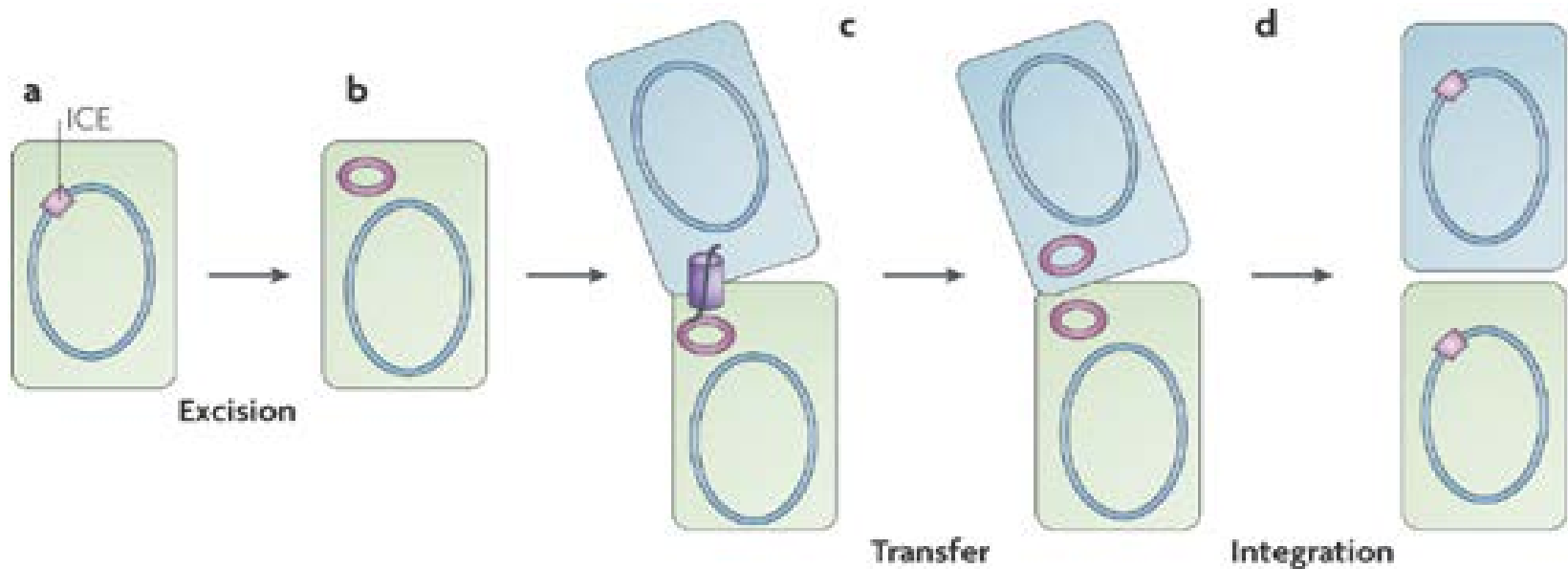
fagi , plasmidi o trasposoni?

Gli ICE si ritrovano integrati nel cromosoma dell'ospite in un sito specifico ( attB) e sono fiancheggiati da sequenze specifiche definite attL and attR. In seguito ad excisione precisa tramite ricombinazione sito specifica tra le sequenze attL e attR si ottiene la molecola di ICE circolare che conterà il sito attP mentre sul cromosoma della cellula l'ospite si troverà il sito att B.

Durante il processo di coniugazione con una cellula ICE-free, il donatore ed il recipiente vengono in contatto e una singola elica di ICE viene trasferita tramite il meccanismo a cerchio rotante.

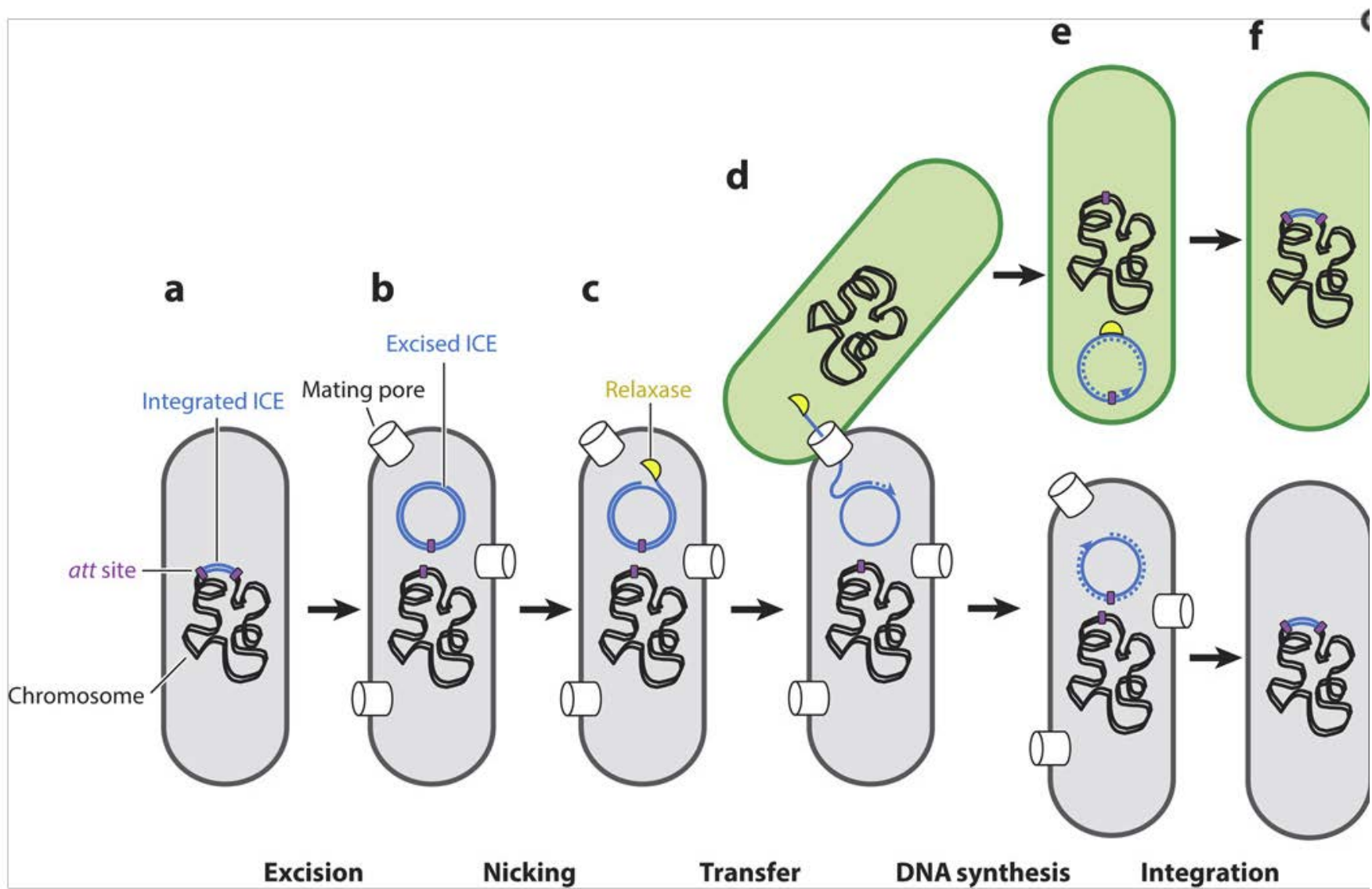
Dopo il trasferimento la DNA polimerasi del recipiente riformerà una molecola circolare a doppia elica.

Tramite ricombinazione sito specifica tra i siti attP dell'ICE e attB del cromosoma l'ICE si integrerà nel cromosoma del recipiente.



Gli ICE sono normalmente integrati nel cromosoma della cellula ospite e sono replicati e trasmessi alle cellule figlie allo stato integrato come fossero regioni del cromosoma del batterico.

In alcune condizioni gli ICE si possono excidere dal cromosoma batterico, formando un intermedio circolare. L'intermedio circolare si replica ed un filamento viene trasferito alle cellula recipiente tramite un poro di coniugazione. I componenti del sistema di trasferimento sono codificati dall'ICE.



The ICE (integrative and conjugative element) life cycle. A model of ICE conjugation is shown. The bacterium bearing the ICE (the donor) is shown in gray, and the bacterium acquiring the ICE (the recipient) is shown in green. The ICE DNA is shown in blue. (a) The ICE is found integrated into the host chromosome. Most ICE genes are not expressed, because of either repression or lack of activation. (b) When ICE gene expression is induced, the ICE excises from the host chromosome and forms a dsDNA circular plasmid. ICE-encoded proteins are produced, some of which assemble into the mating pore (cylinders spanning the donor cell envelope). (c) The ICE-encoded relaxase nicks one strand of the ICE dsDNA and covalently attaches to the 5' end of the nicked DNA, forming the transfer DNA (T-DNA). (d) If an appropriate recipient is available, the conjugation machinery transports the T-DNA into the recipient cell. (e) In the recipient cell, the relaxase ligates the 5' and 3' ends of the DNA to form a covalently closed ssDNA circle. The complementary DNA strand is synthesized to generate a dsDNA circle that is the substrate for integration into the host chromosome. In the donor, the remaining DNA strand likely serves as the template for rolling-circle replication, generating a dsDNA circle that can then reintegrate into the host chromosome. Without this synthesis and reintegration, the ICE would be lost from cells in which it had excised. (f) In both the donor and recipient, the circular dsDNA ICE integrates into the host chromosome.



Altro argomento :

Plasmidi e tumorigenesi nelle piante

## 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

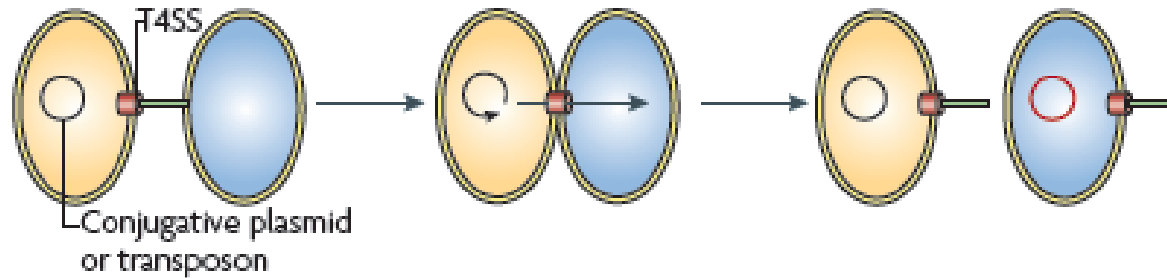
vari zuccheri	diffuso
Idrocarburi (toluene, xilene, canfora, etc)	<i>Pseudomonas</i>
Azoto (fissazione)	<i>Klebsiella</i>

## ONCOGENESI NELLE PIANTE

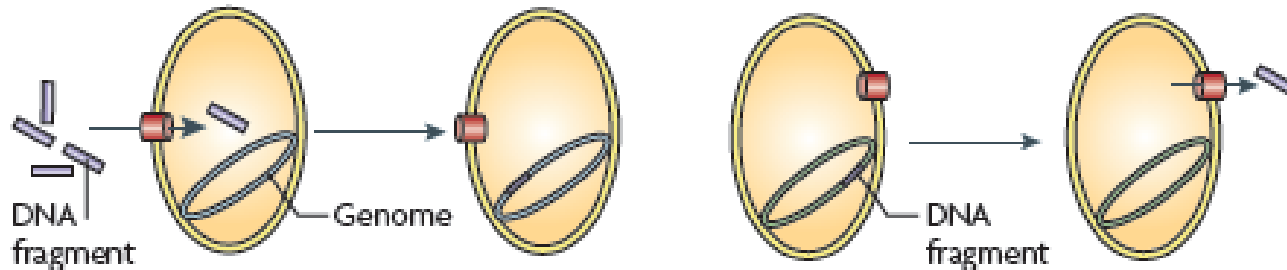
*Agrobacterium tumefaciens*

# Ruolo del sistema di tipo IV nei batteri

a Conjugation



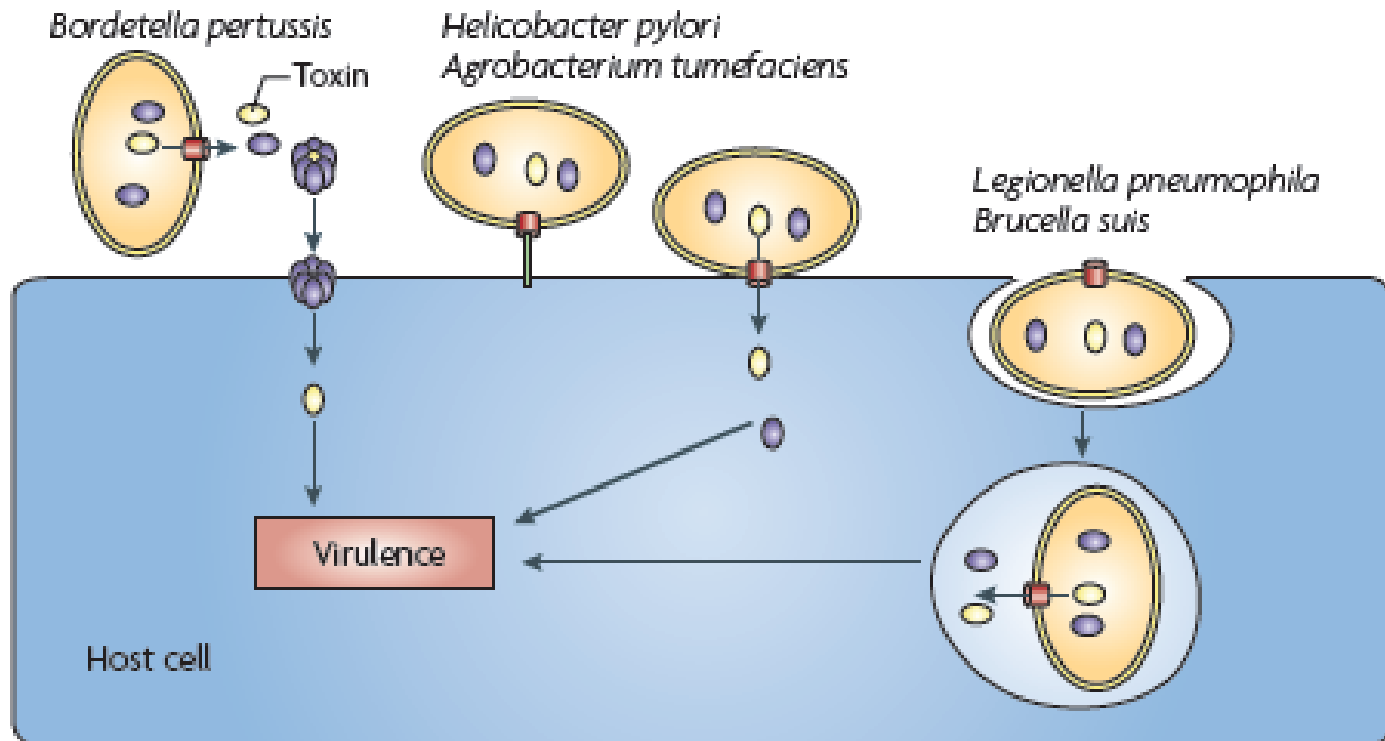
b DNA uptake (transformation) and release



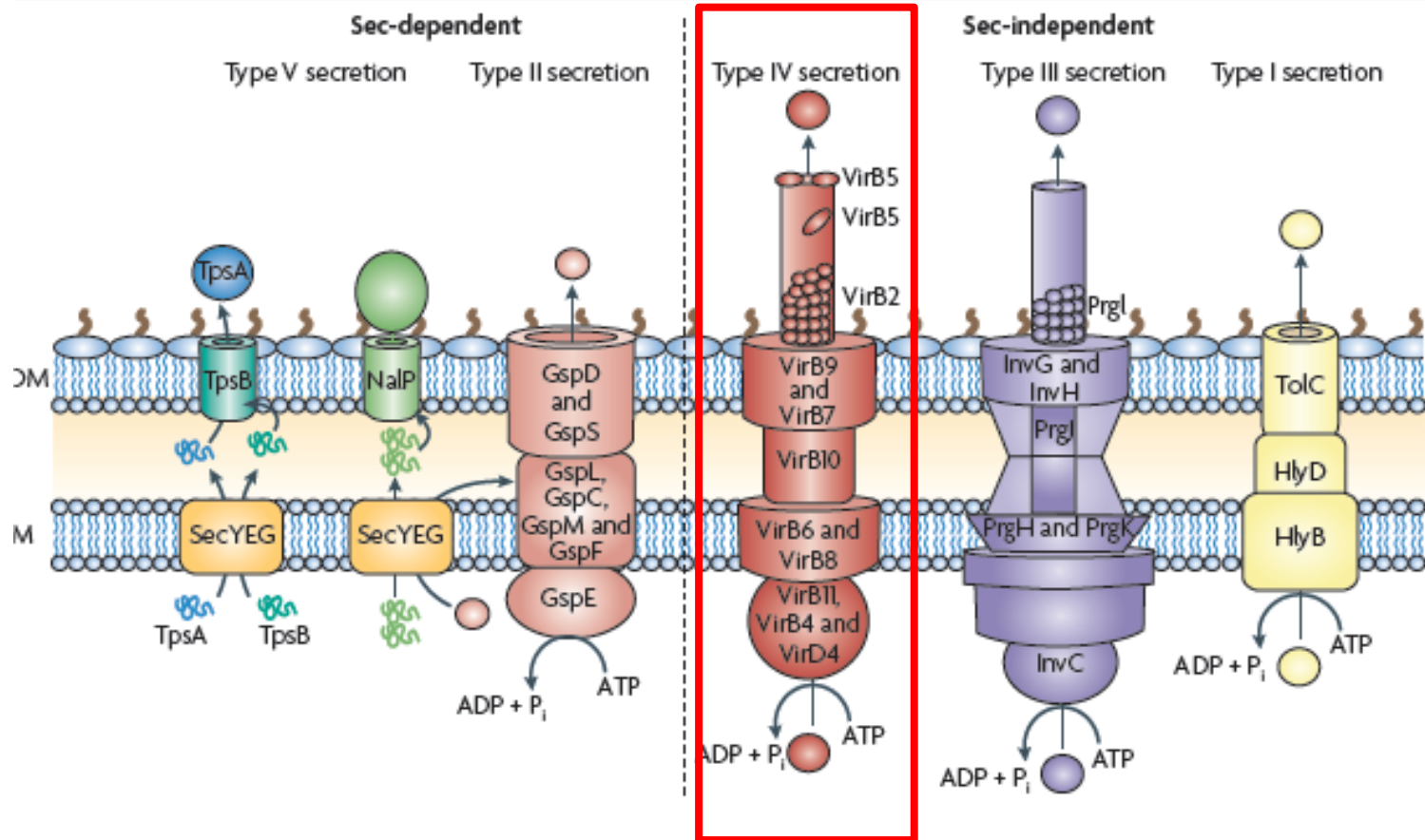
- coinvolto nel fenomeno di coniugazione
- coinvolto in nella cattura di DNA

- coinvolto nella traslocazione di DNA o proteine nelle cellule eucariotiche

**c Effector translocation**



Box 1 | Schematic overview of the major protein secretion systems in Gram-negative bacteria



Il sistema di esportazione di tipo IV è presente nei Gram+ e Gram- e può secernere un ampio numero di substrati diversi . Da singole proteine, a complessi proteici a complessi DNA-proteine.

# Il sistema di esportazione di tipo IV

Evolutivamente legato al sistema di coniugazione

Costituito da un canale di traslocazione e da un adesina ( o filamento) di superficie

Mediano il trasferimento di DNA o proteine tra cellule batteriche o a cellule di funghi, piante o animali

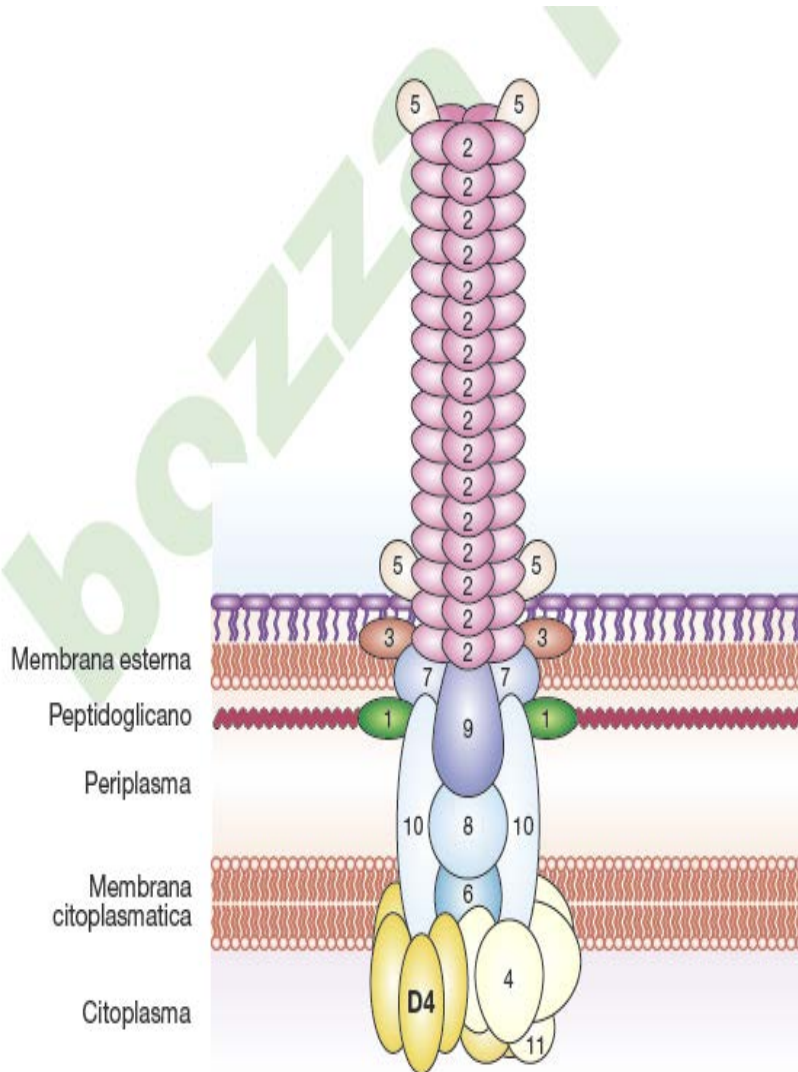
Il sistema di tipo IV è generalmente costituito

- Da 3 ATPasi citoplasmatiche forniscono l'energia (B11-B4 -D4)

- Da 2 proteine della IM che partecipano alla biosintesi dell'apparato (B6-B8)

- Da un canale di secrezione (B10-B9-B7) che attraversa le 2 membrane (IM+OM nei Gram-) attraverso il quale passano i substrati

- Da un sottile pilo o adesina che serve per il contatto con la cellula bersaglio costituito da una pilina maggiore e una minore



Considerando che durante la coniugazione assieme al trasferimento di DNA vengono trasferite proteine quali la relaxasi si può pensare che il sistema di T4S sia ancestralmente un sistema di traslocazione di fattori proteici e che incidentalmente il DNA venga trasportato all'interno di un complesso nucleoproteico.

Vi sono quindi T4S che trasportano

- DNA e proteine
- solo proteine



Il sistema di tipo IV è generalmente costituito

- Da 3 ATPasi citoplasmatiche forniscono l'energia (B11-B4 -D4)
- Da 2 proteine della IM che partecipano alla biosintesi dell'apparato (B6-B8)
- Da un canale di secrezione (B10-B9-B7) che attraversa le 2 membrane( IM+OM nei Gram-) attraverso il quale passano i substrati
- Da un sottile pilo o adesina che serve per il contatto con la cellula bersaglio costituito da una pilina maggiore e una minore

# Il plasmide TI e la formazione di tumori nelle piante

Alcuni microrganismi sono patogeni per le piante ed inducono la formazione di tumori

*Agrobacterium tumefaciens* induce la formazione di tumori a cresta di gallo

*Agrobacterium rizogenes* induce tumori alle radici

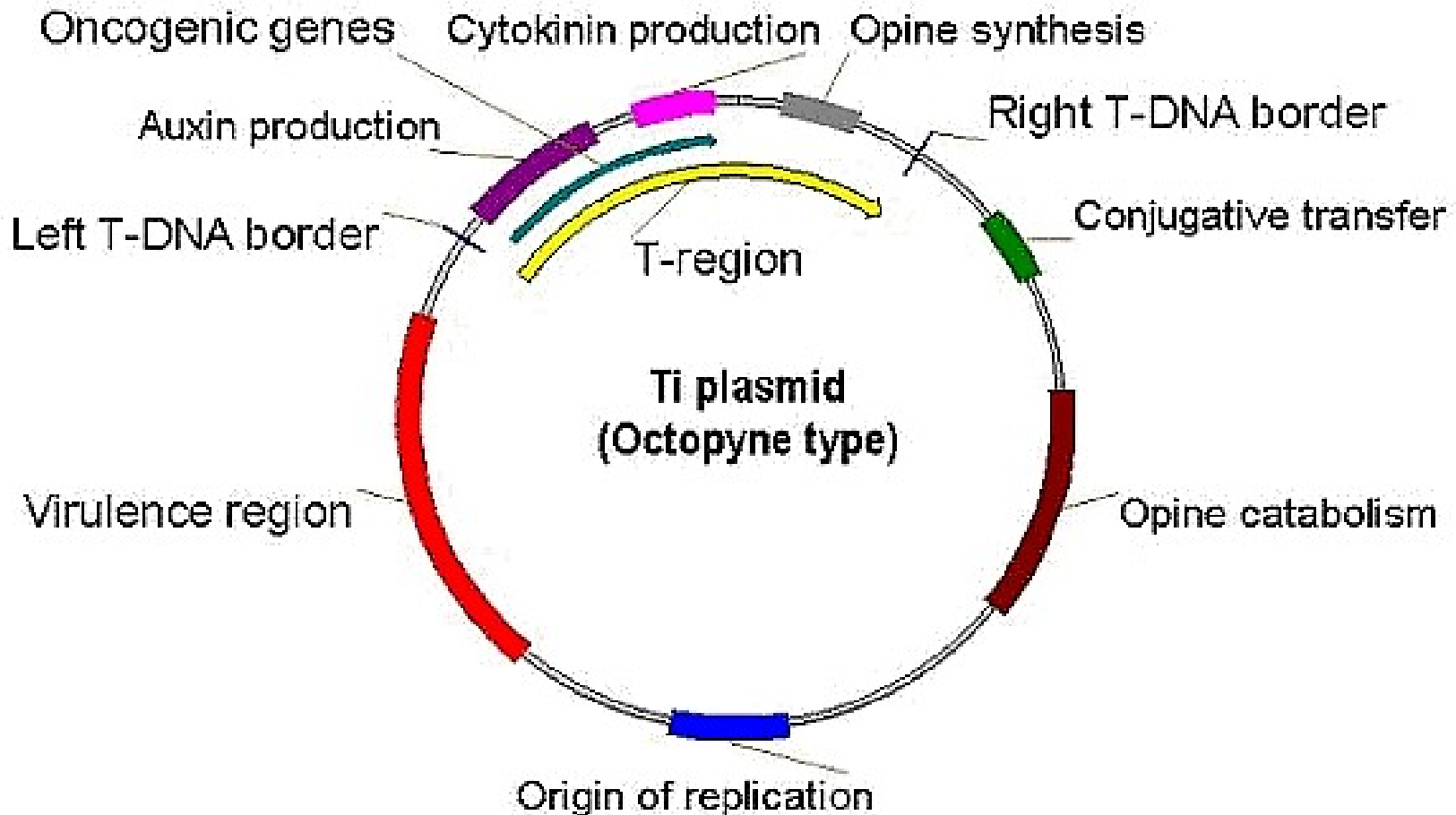


La rimozione del microrganismo dalla pianta non elimina il tumore

Il tumore viene indotto dal plasmide Ti (Tumor induction) in *A. tumefaciens* e dal plasmide Ri in *A. rizogenes*

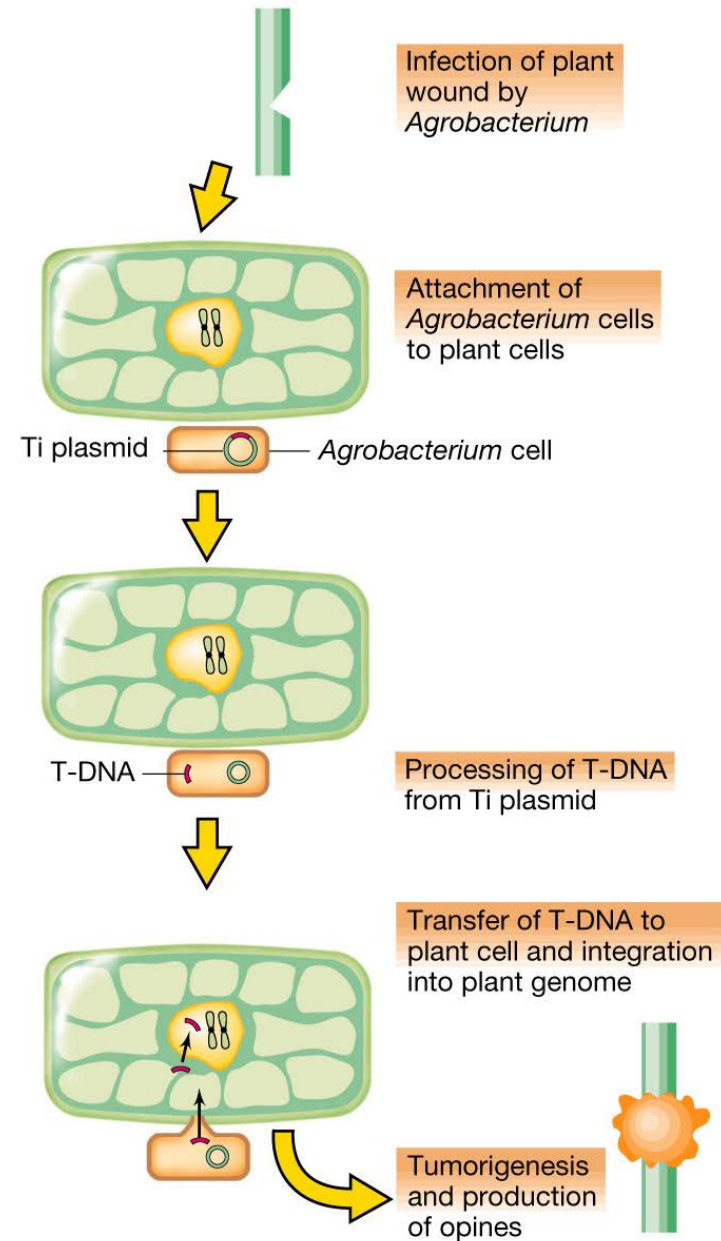
# Struttura del plasmide TI di *Agrobacterium*

La regione T (Transfer DNA) viene trasferita dal microrganismo al genoma della pianta.



Il processo di infezione prevede il riconoscimento da parte del batterio di molecole recettore presenti sulla superficie del batterio e sulla cellula vegetale.

Il recettore della pianta è costituito da una pectina (polisaccaride complesso) e quello del batterio costituito da glucani del lipopolisaccaride



Subito dopo l'attaccamento si osserva da parte del batterio la sintesi di microfibre di cellulosa che ancorano ulteriormente il batterio al sito d'infezione avvolgendolo in forma di aggregati sulla superficie della pianta.

**A questo punto il microrganismo trasferisce il DNA alla pianta.**

Nonostante molti geni del plasmide siano necessari per il trasferimento del T-DNA **solo la regione T viene trasferita.**

La sintesi dei geni **vir** necessari al trasferimento del T-DNA è indotta da segnali provenienti dal tessuto della pianta ferita.

**La regione T** del plasmide Ti contiene i geni necessari per

- **la formazione del tumore**
- **per la produzione di alcuni aminoacidi modificati definiti OPINE**

**Octopina** (N<sup>2</sup>-1,3 dicarboxyethyl)-L-arginina

**Nopalina** (N<sup>2</sup>-1,3- dicarboxypropyl)-L-arginina

sono prodotte dalla pianta in seguito a trasformazione da parte del T-DNA e sono una fonte di carbonio ed azoto per le cellule di *Agrobacterium*

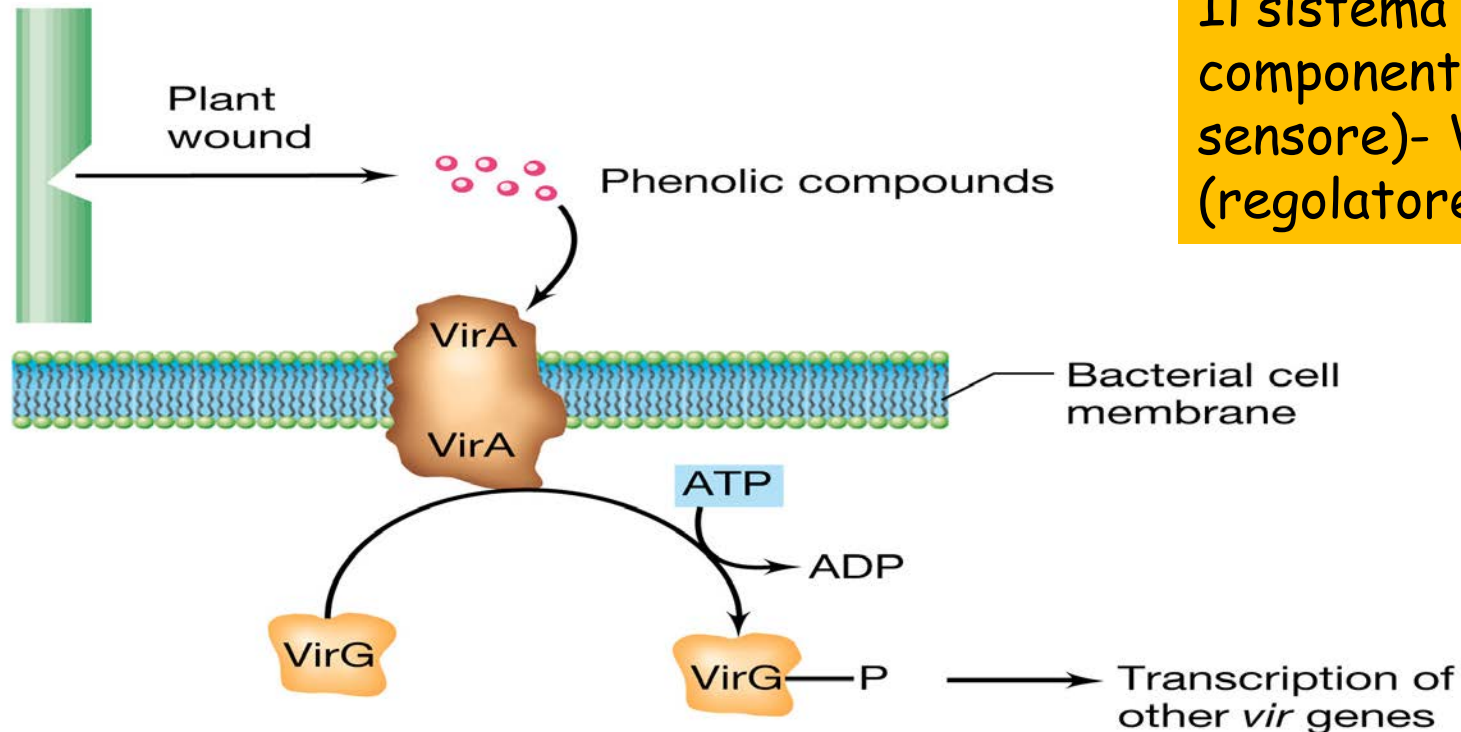
I geni vir sono essenziali per il processo di trasferimento del T-DNA

VirG fosforilata attiva gli altri geni vir.

VirD è una endonucleasi che taglia il DNA del plasmide Ti

## Il sistema *VirA* -*VirG* costituisce un sistema di trasduzione del segnale a 2 componenti

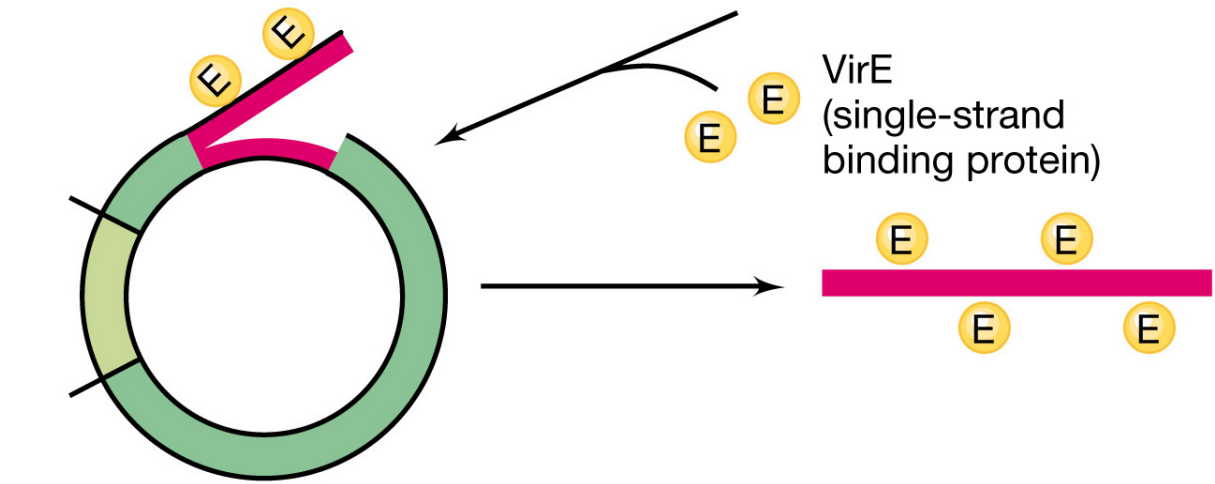
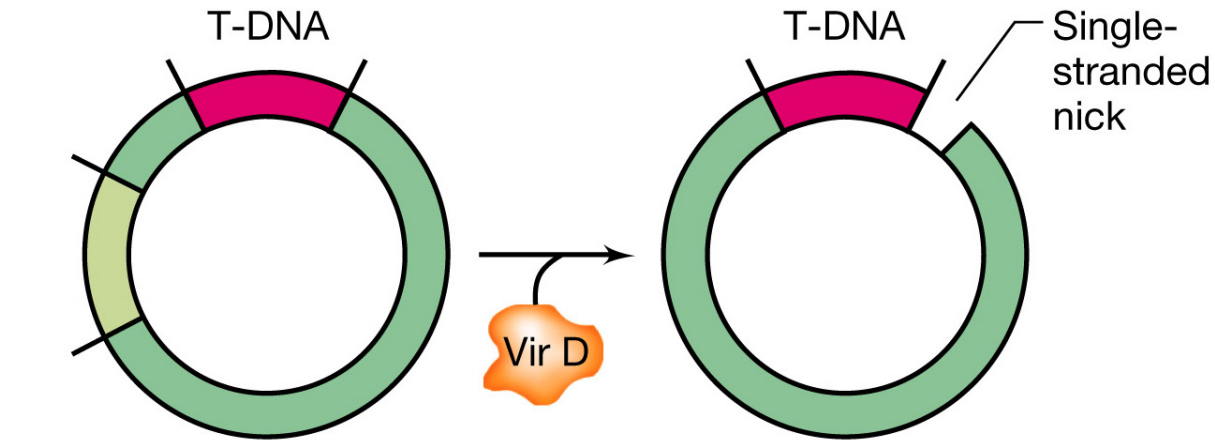
*VirA* è una protein chinasi che interagisce con alcuni induttori prodotti dalla pianta (composti fenolici acetosiringone, acido para idrossi-benzoico, vanillina) e fosforila la proteina *VirG*.



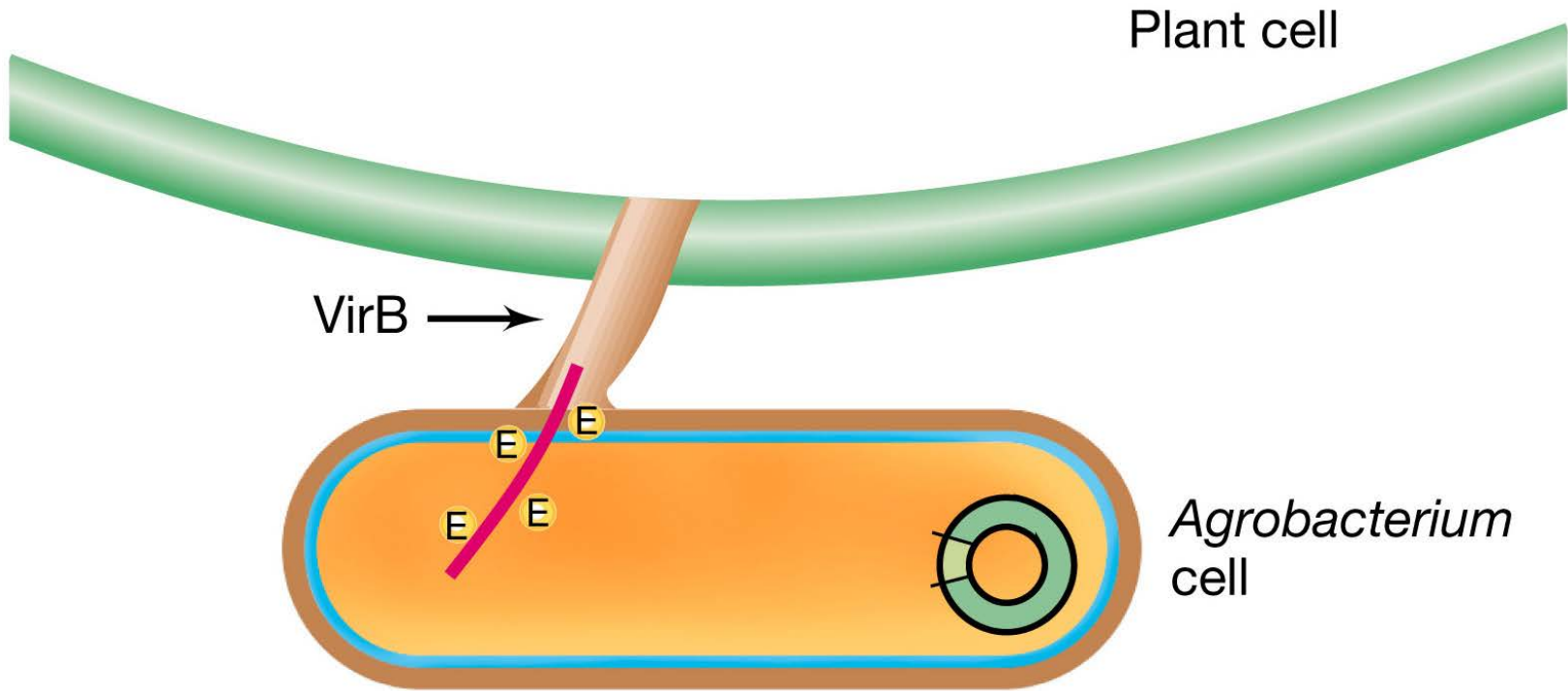
Il sistema a due componenti *VirA* (sensore)- *VirG* (regolatore)

(a)



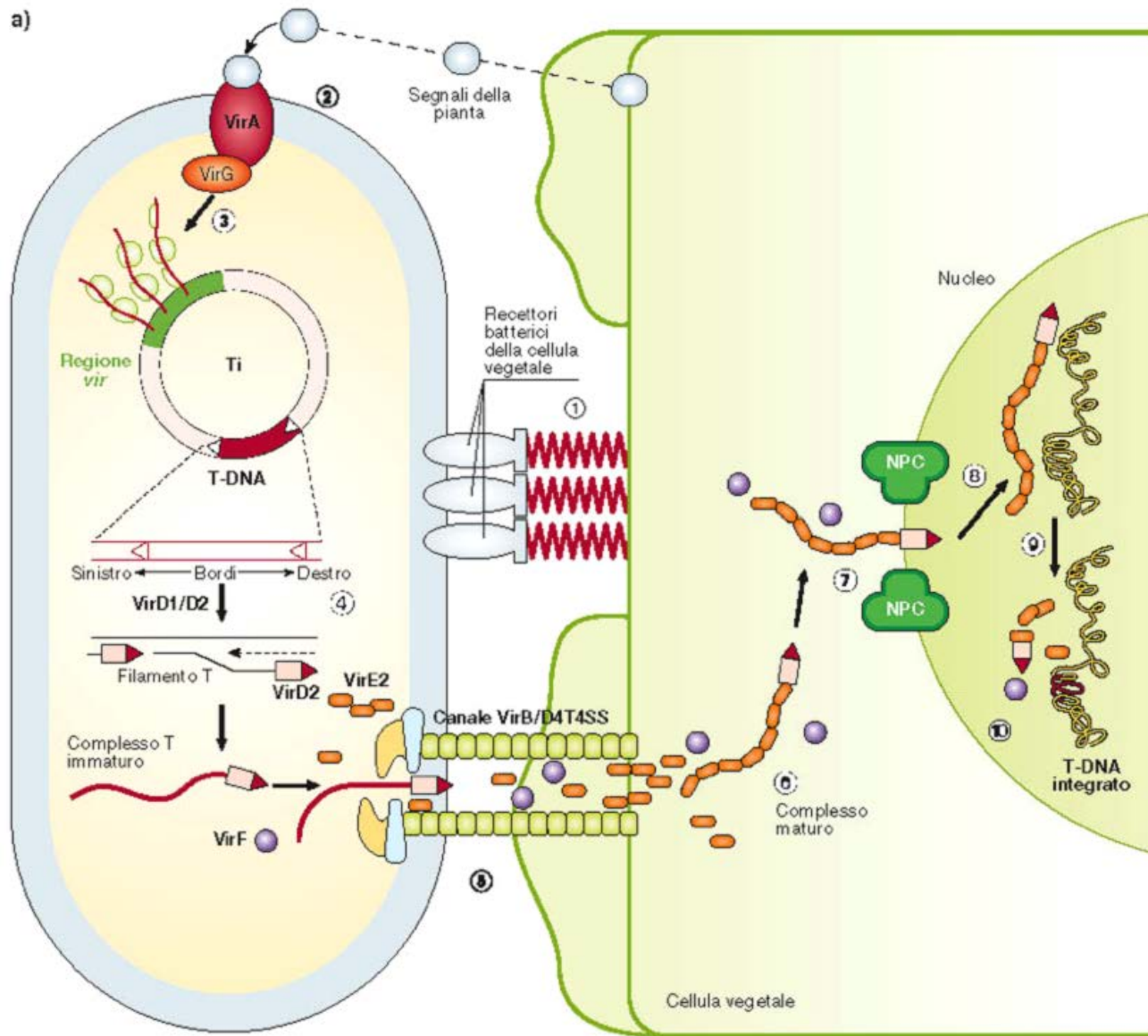


**Vir E** è la proteina che lega il DNA SS generato dal taglio della endonucleasi **VirD** e lo trasporta nella cellula vegetale



(d)

**VirB** agisce come ponte tra il batterio e la pianta.

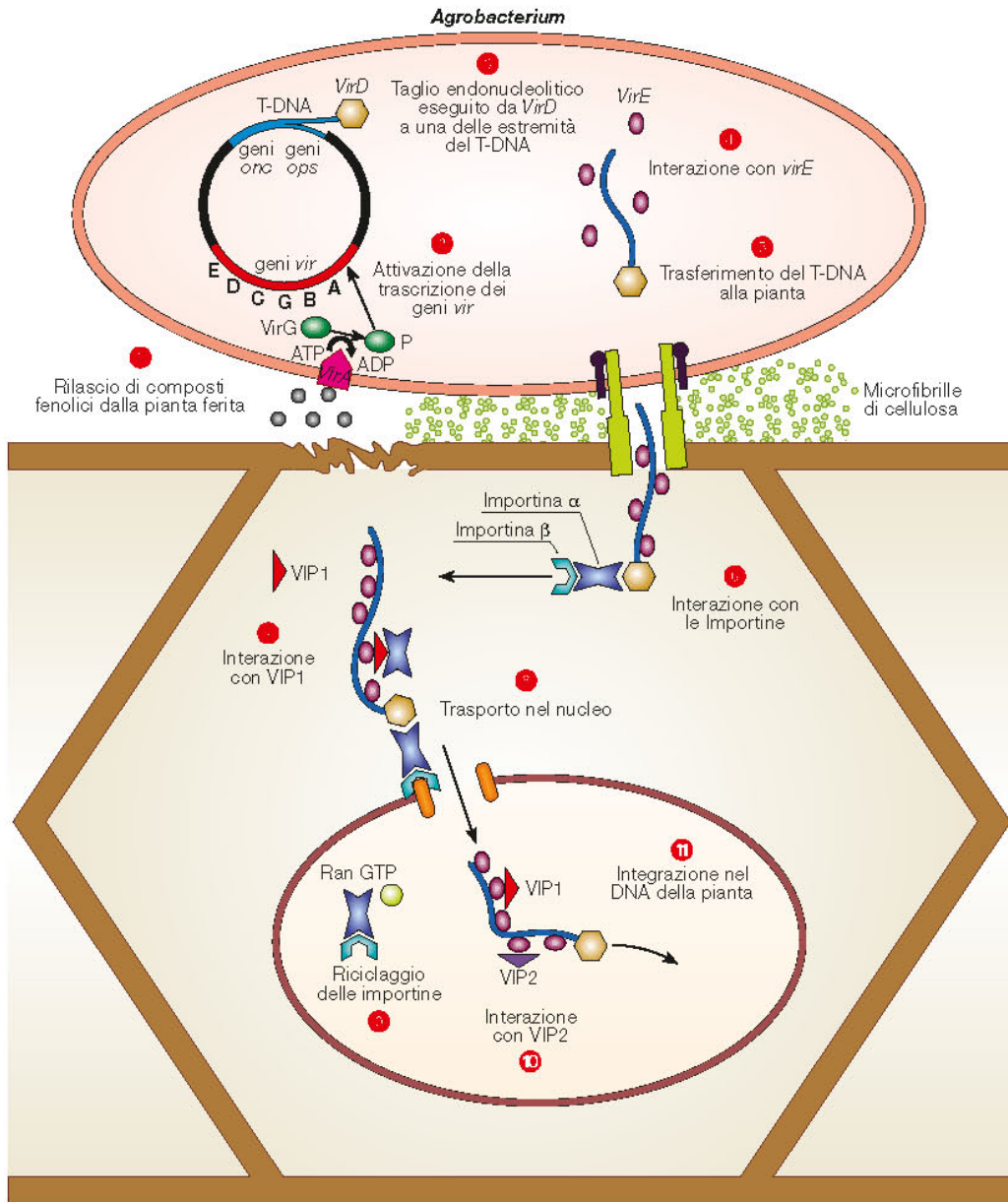


Modello recente del trasferimento di DNA da *Agrobacterium* alla piante.

Il T DNA si integra in numerosi siti del genoma della pianta dove sono presenti sequenze ripetute in orientamento diretto o inverso.

I geni tumorigenici (onc) del plasmide codificano geni coinvolti nella sintesi di ormoni da parte della pianta oltre ad enzimi coinvolti nella sintesi di ponte.

Il plasmide Ti grazie alla regione T può essere un segmento importante per la generazione di piante transgeniche



Il processo di trasferimento del frammento T è mediato dalla proteina VirB. Nel citoplasma il complesso T-DNA VirD-VirE si associa alle importine alfa e beta e alla proteina VIP1 che lo trasportano nel nucleo. A questo punto le importine vengono staccate dalla GTPasi Ran e il T-DNA viene riconosciuto da VP2

# Confronto tra il sistema di trasformazione del plasmide Ti e la coniugazione

