



GENETICA BATTERICA



Prof.ssa Vivian Tullio



GENETICA BATTERICA

GENI POSSONO CAMBIARE



MUTAZIONE

errore che si verifica nella
trasmissione delle
informazioni genetiche da una
cellula all'altra

RICOMBINAZIONE

scambio di materiale genetico tra 2
DNA simili (omologhi),
dando origine a caratteristiche
genetiche nuove

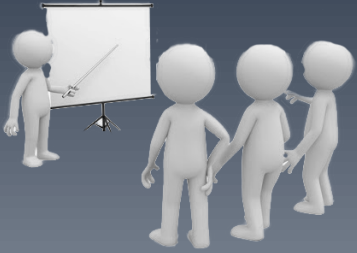
cellula donatrice - cellula ricevente

plasmidio - plasmidio

DNA virale - DNA cromosomiale

DNA plasmidico - DNA cromosomiale

GENETICA BATTERICA



IL BATTERIO È L'ESPRESSIONE
(FENOTIPO) DI UN CODICE
GENETICO (GENOTIPO)

FENOTIPO BATTERICO

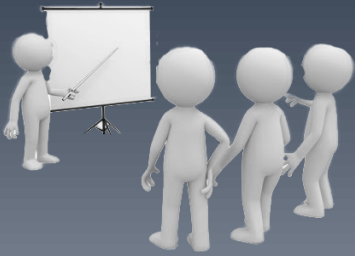
Il fenotipo è determinato da caratteristiche:

- ☐ strutturali
- ☐ fisiologiche
- ☐ metaboliche

FENOTIPO BATTERICO

Le caratteristiche che permettono di identificare un batterio sono la sua capacità di:

- ☐ utilizzare certe sostanze come fonte di C
- ☐ dare reazioni colorate
- ☐ utilizzare certi aminoacidi.



GENETICA BATTERICA

GENOTIPO BATTERICO

DNA CIRCOLARE

Un batterio possiede circa 5000-6000 geni = 5/6 milioni di nucleotidi (PM = 3 miliardi di daltons).

DNA PLASMIDICO (PM = 10.000 daltons).

Alcuni plasmidi sono dotati di particolari geni che permettono loro di replicarsi in modo indipendente dal DNA cromosomico e di avere vita autonoma.

GENETICA BATTERICA

MUTAZIONI BATTERICHE



L'evoluzione dei batteri ha avuto come punto di partenza un microrganismo ancestrale dal quale, attraverso innumerevoli variazioni, sono originate, differenziandosi, tutte le attuali specie.

Questo processo può essere determinato da:

VARIAZIONI GENOTIPICHE

- ➡ Trasmesse ereditariamente
- ➡ Non influenzate dall'ambiente
- ➡ Interessa una percentuale limitata della popolazione
- ➡ Evento raro

VARIAZIONI FENOTIPICHE

- ➡ Non ereditarie
- ➡ Adattamento fisiologico (ambiente)
- ➡ Reversibili
- ➡ Non interessano il genoma batterico

GENETICA BATTERICA

MUTAZIONI BATTERICHE



Variazioni a livello di colonia (derivano da mutazioni geniche)

Colonie S (smooth): colonie lisce, convesse, margini regolari, lucide. I batteri in fase S sono virulenti, con capacità metaboliche maggiori, forniti di capsula.

Colonie R (rough): colonie rugose, margini irregolari, opache.

Variazione **H**

(colonie con alone intorno, per la presenza del flagello).

Variazione **O**

(senza aloni e corrisponde all'antigene somatico).



GENETICA BATTERICA

MUTAZIONI BATTERICHE

SPONTANEE

avvengono raramente (una su un miliardo)

INDOTTE

prodotte da agenti mutageni

- di natura fisica (raggi X, U.V.)
- o di natura chimica (analoghi della timina e dell'adenina, basi azotate, idrossilammina, ecc).

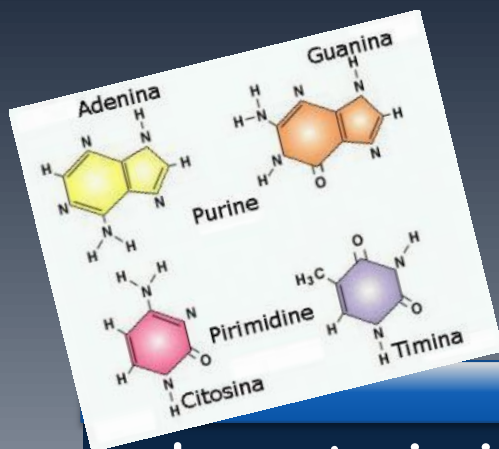


GENETICA BATTERICA

MUTANTI NUTRIZIONALI O AUXOTROFI)

batteri che, in seguito alla mutazione, non sono più in grado di sintetizzare determinati composti.

I batteri **auxotrofi** sono sfruttati in vari tipi di industria (farmaceutica, alimentare ecc.) per il dosaggio (titolazione biologica) di determinate sostanze: la loro crescita rivela la presenza di quantità anche infinitesimali di quelle sostanze dalle quali il batterio è dipendente (es. **Vit.B12**).



GENETICA BATTERICA

MUTAZIONI PUNTIFORMI

Le mutazioni interessano una sola base e possono avvenire attraverso meccanismi diversi

TRANSIZIONE

sostituzione di una pirimidina con un'altra pirimidina o di una purina con un'altra purina (silente).

DELEZIONE

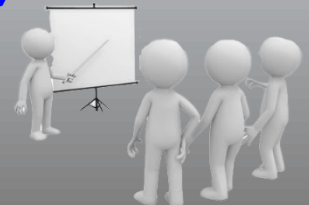
perdita di una sola base (mutazione per sfasamento - *frame shift*), letale perché il DNA dopo la mutazione non è letto correttamente

TRANSVERSIONE

una purina è sostituita da una pirimidina e viceversa; (silente)

INSERZIONE

di una sola base (mutazione per sfasamento), letale



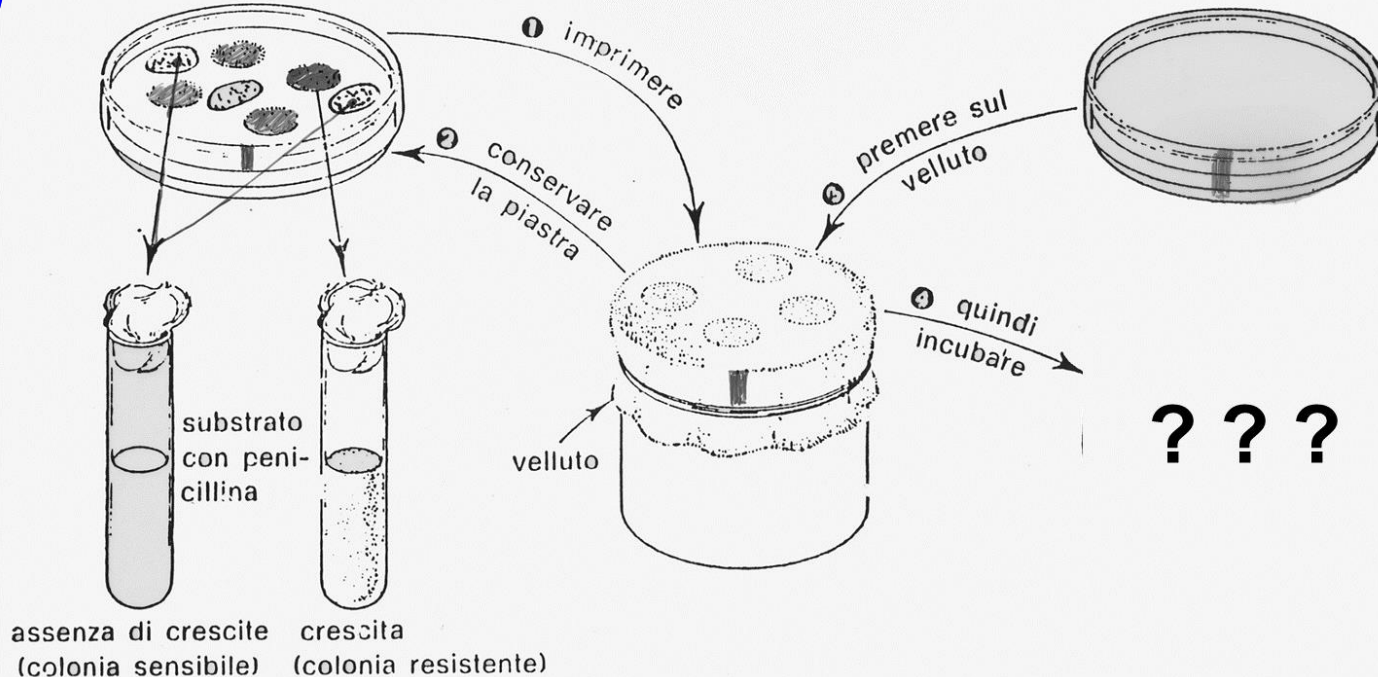
REPLICA-PLATING

E. Zimmer Lederbergh



piastre senza penicillina
colonie resistenti e sensibili

piastre con penicillina



Il metodo per la selezione indiretta di mutanti con l'uso del « replica plating ».

A

**Crescono
tutte le colonie
seminate**

B

**Crescono
solo colonie
resistenti alla
penicillina**

REPLICA-PLATING

E. Zimmer Lederbergh

A

**Crescono tutte le
colonie seminate**



Antibiotico non ha agito???



I batteri sono tutti resistenti ???

HA SENSO ???

REPLICA-PLATING

E. Zimmer Lederbergh

B

**Crescono solo colonie
resistenti alla penicillina**



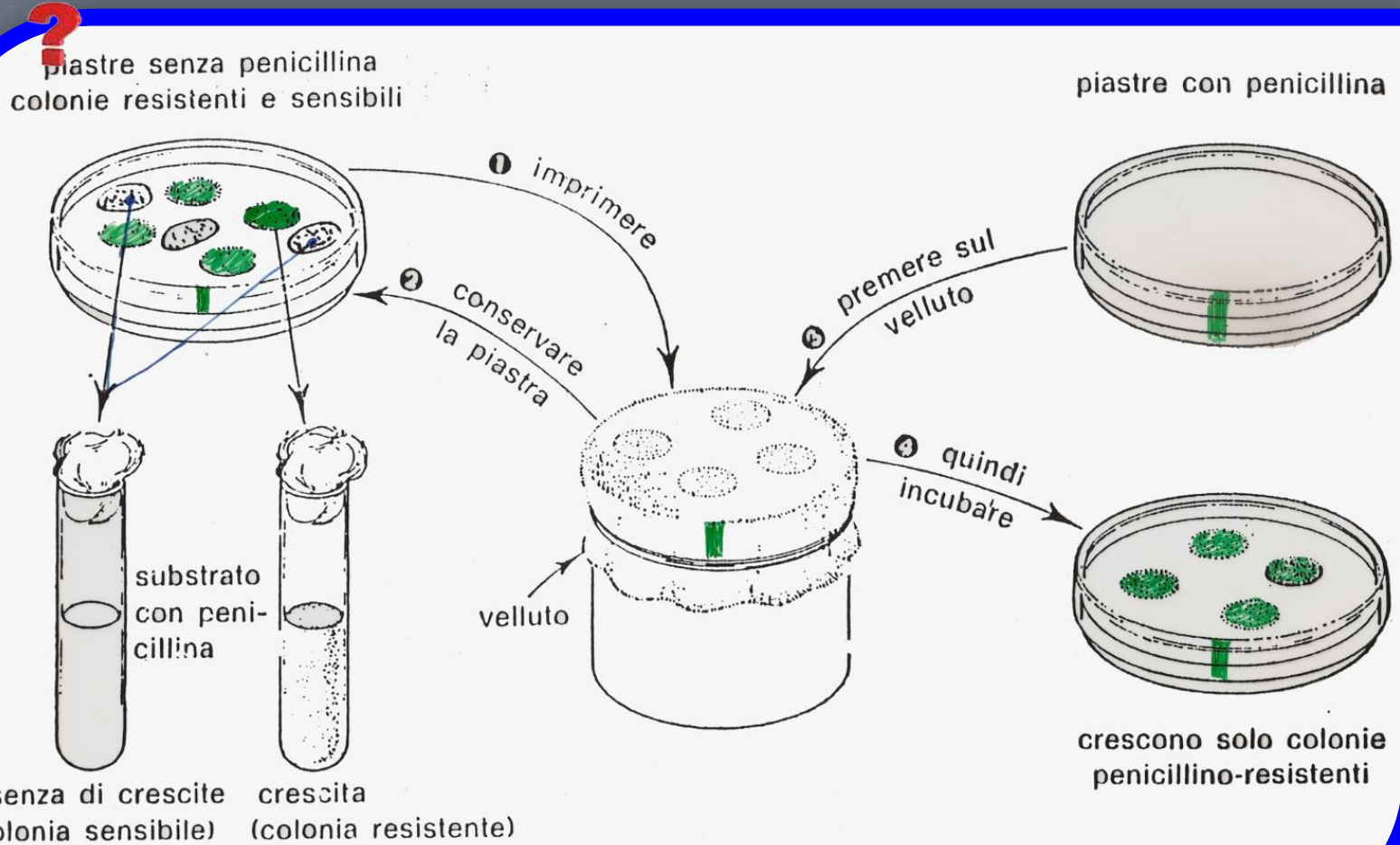
**La penicillina ha indotto resistenza
(Lamarck)**



**I batteri erano resistenti prima del
contatto con la penicillina, l'ambiente
seleziona mutazione favorevole
(Darwin)**

REPLICA-PLATING

E. Zimmer Lederbergh

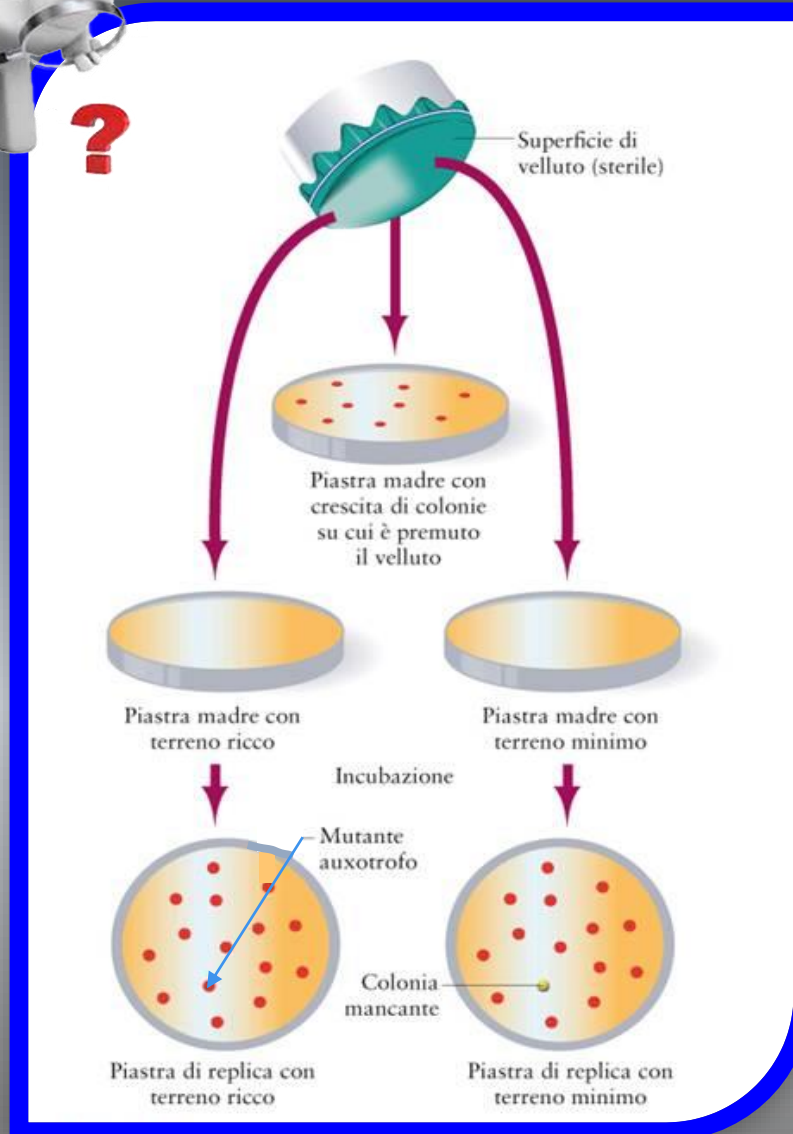


Il metodo per la selezione indiretta di mutanti con l'uso del « replica plating ».

REPLICA-PLATING

Lederbergh

Selezione mutanti
auxotrofi



RICOMBINAZIONE GENICA



E' il processo mediante il quale due molecole di DNA realizzano lo scambio di regioni omologhe dando origine a strutture cromosomiali con nuove combinazioni di geni. Nei batteri la ricombinazione coinvolge il genoma di due cellule con caratteristiche di unidirezionalità: **una donatrice, l'altra ricevente.**

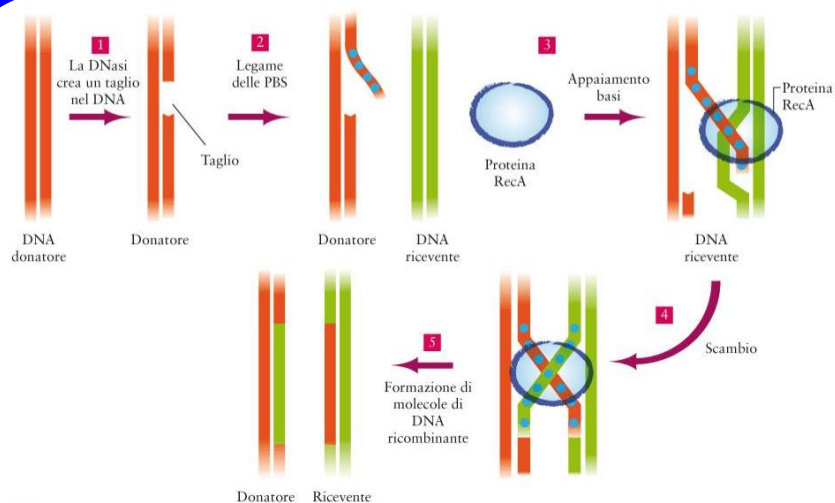
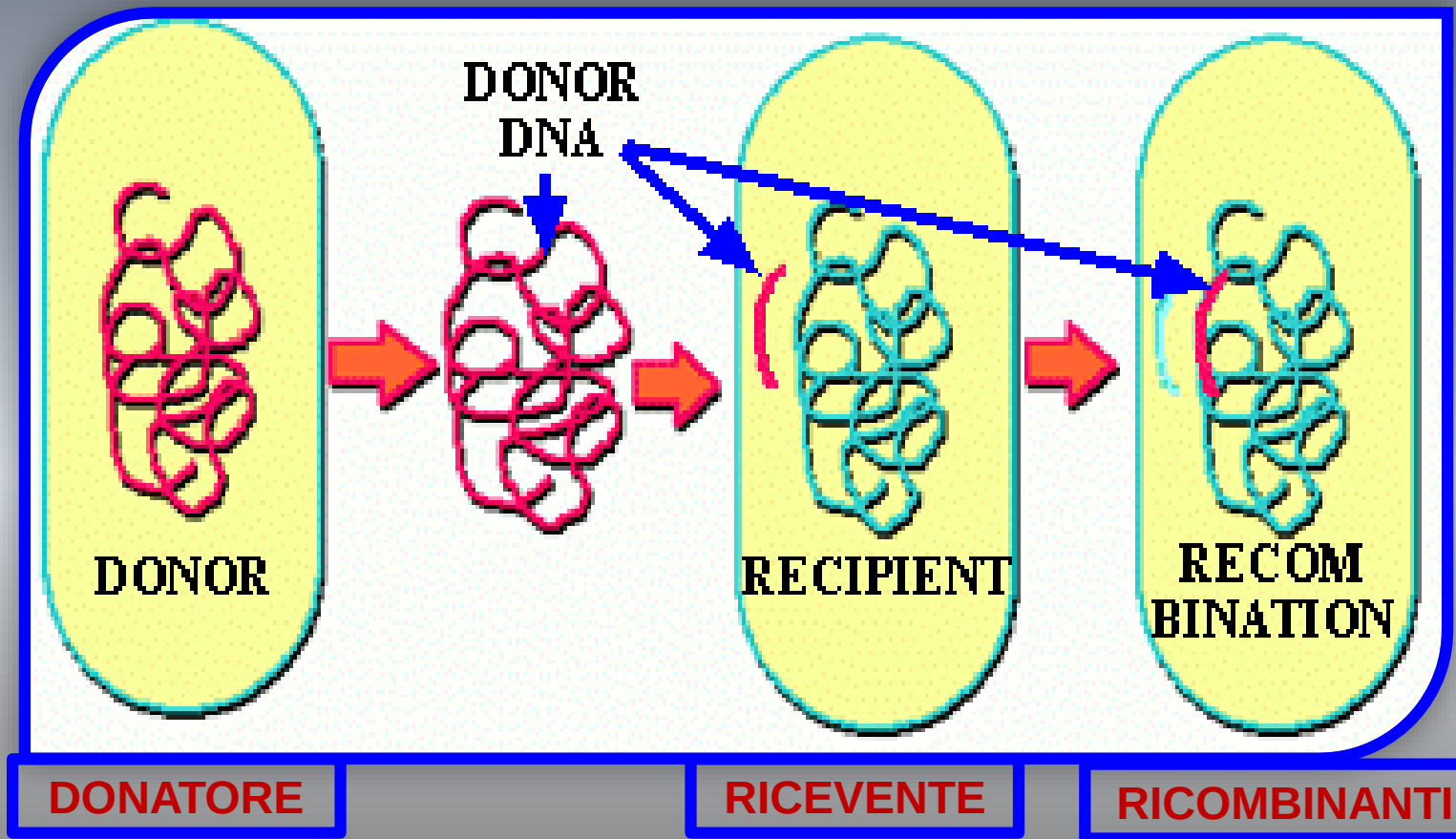


Figura 6.2 Ricombinazione omologa: 1) Una DNasi opera un taglio (nick) nella molecola di DNA; 2) intervento delle PBS (proteine capaci di legare il DNA a singolo filamento); 3) intervento della proteina RecA che lega il frammento a singolo filamento in modo da posizionarlo in maniera idonea da consentire l'appaiamento con l'altra molecola di DNA; 4) si verifica lo scambio; 5) si formano molecole ricombinanti.

RICOMBINAZIONE NEI BATTERI

TRASFERIMENTO GENETICO ORIZZONTALE

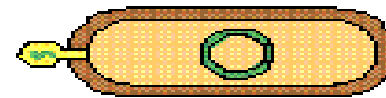


RICOMBINAZIONE NEI BATTERI

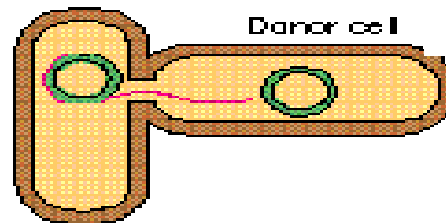
MECCANISMI DI TRASFERIMENTO GENICO NEI BATTERI (ORIZZONTALE)



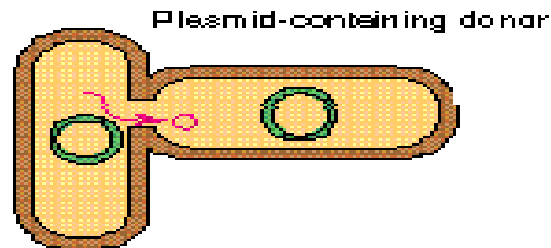
trasformazione



trasduzione



coniugazione

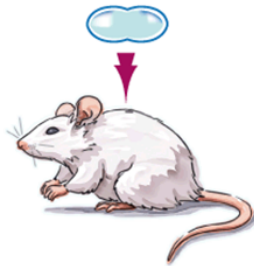


TRASFORMAZIONE

(GRIFFITH, 1928 studi sulla polmonite da *Streptococcus pneumoniae*)

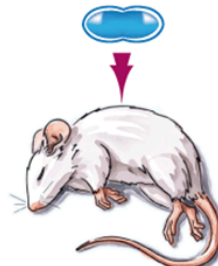


Pneumococchi capsulati,
virulenti, S I, uccisi al calore



Il topo sopravvive

Pneumococchi capsulati,
virulenti, S I, vivi



Il topo muore

Pneumococchi vivi non
virulenti, R II, non capsulati



Il topo sopravvive

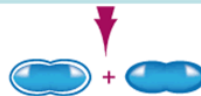
Pneumococchi capsulati,
S I, uccisi al calore



Pneumococchi vivi non
virulenti, R II, non capsulati



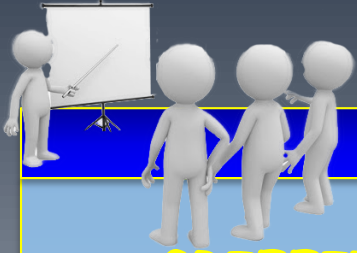
Il topo muore



Pneumococchi vivi capsulati, virulenti,
S I più alcuni pneumococchi vivi R II,
senza capsula isolati dal topo morto

Figura 6.3 Esperimenti di Griffith: scoperta della trasformazione.

TRASFORMAZIONE

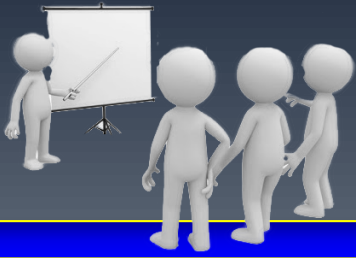


GRIFFITH ipotizzò la presenza di un principio trasformante

I batteri R incorporano nel cromosoma frammenti di DNA liberatisi dai batteri S lisati, contenenti i geni per la costruzione della capsula

Nel 1944 O. Avery, C. MacLeod e M. McCarty dimostrarono che il **principio trasformante era il DNA**

Esperimenti di Griffith segnano la **nascita della genetica molecolare** (in quegli anni si riteneva che l'informazione genetica risiedesse nelle proteine!)



DNA

Nel **1953 J.Watson e F.Crick** determinarono la struttura del DNA. Nel 1962 Watson, Crick e Maurice Wilkins ottennero il Premio Nobel per la Medicina per la scoperta della struttura del DNA. Anche se non avevano più nulla da temere, poiché il Nobel viene conferito solo a persone viventi, non riconobbero il contributo di Rosalind Franklin neppure durante il loro discorso di ringraziamento.

Rosalind Franklin

Chimica e fisica britannica
(Londra, 25 luglio 1920-1958)





DNA «rubato»

Nei libri di scuola si legge che la **struttura del DNA** è stata scoperta da Francis Crick e James Watson nel 1953 ma, in realtà, fu Rosalind!! Fu lei a **fotografare ai raggi X la doppia elica**. I colleghi non volevano la sua presenza in laboratorio e spesso deridevano i suoi risultati! Dopo la guerra si trasferì a Parigi per **specializzarsi nella tecnica della diffrazione ai raggi X**, usato per molecole di grandi dimensioni, come la struttura del carbonio. Per le sue competenze **fu invitata al King's College di Londra** dove erano **iniziate le ricerche sul DNA**. Alla stessa ricerca lavoravano all'Università di Cambridge il biofisico Maurice Wilkins (1916), il biologo James Watson (1928) e il biochimico Francis Crick (1916).

Rosalind **realizzò un particolare dispositivo per scattare fotografie ad alta definizione di singoli filamenti di DNA** e ottenne una serie di immagini per diffrazione dei raggi X. Definì anche due caratteristiche strutturali del DNA: la forma ad elica, e la forma B, in cui due catene molecolari formate da gruppi di zuccheri e di fosfati sono rivolte verso l'esterno, mentre le basi nucleiche si trovano tra queste catene. **Watson si impossessò dei dati delle immagini realizzate da Rosalind con i raggi X**, provenienti dal laboratorio della scienziata e su questi fondò con il collega il celebre modello a doppia elica.

TRASFORMAZIONE

Non richiede uno stretto contatto cellula-cellula

Utilizza DNA libero (ESOGENO)

Il DNA esogeno è un DNA trasformante se:

- 
- ➡ È a doppia elica
 - ➡ Ha PM uguale o maggiore a 1×10^6 daltons
 - ➡ Ha elevato grado di omologia con il DNA della cellula ricevente (ceppi stessa specie o specie vicine)

TRASFORMAZIONE

Le cellule in grado di captare il DNA libero si trovano in uno stato fisiologico detto

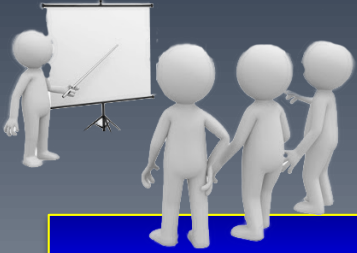
COMPETENZA

Dal punto di vista metabolico nelle cellule competenti si ha:

- ➡ Arresto della sintesi di DNA
- ➡ Rallentamento sintesi del cell-wall
- ➡ Aumento sintesi proteica ecc.



TRASFORMAZIONE



La competenza si instaura in momenti precisi della fase di crescita batterica

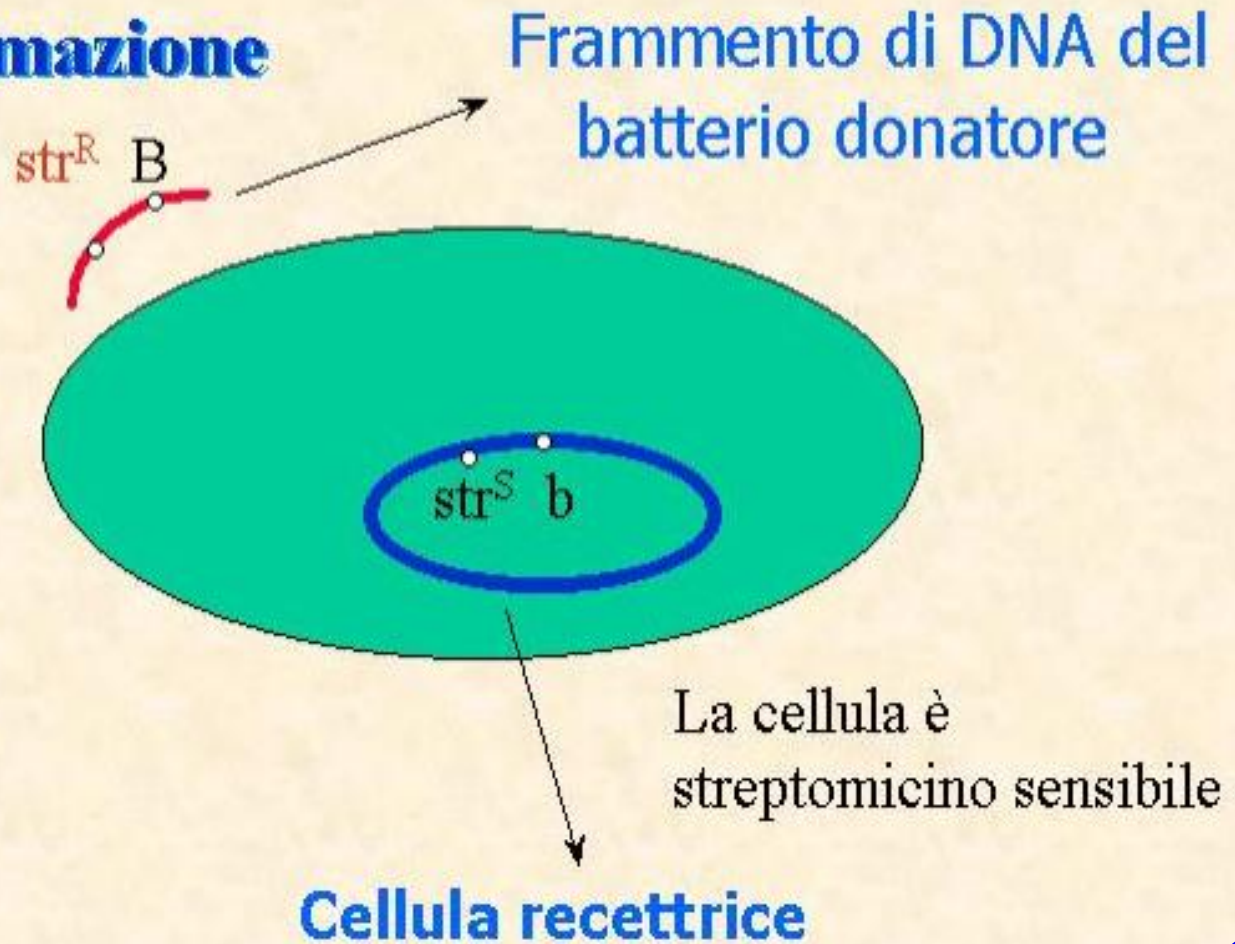
In *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis* si ha nell'ultimo periodo della fase esponenziale

In *Neisseria meningitidis* si ha all'inizio della fase logaritmica di crescita

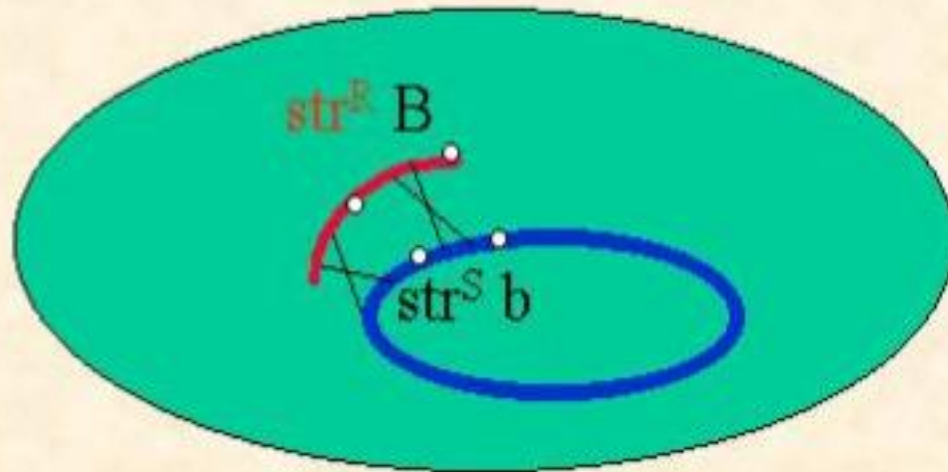
TRASFORMAZIONE



Trasformazione



TRASFORMAZIONE



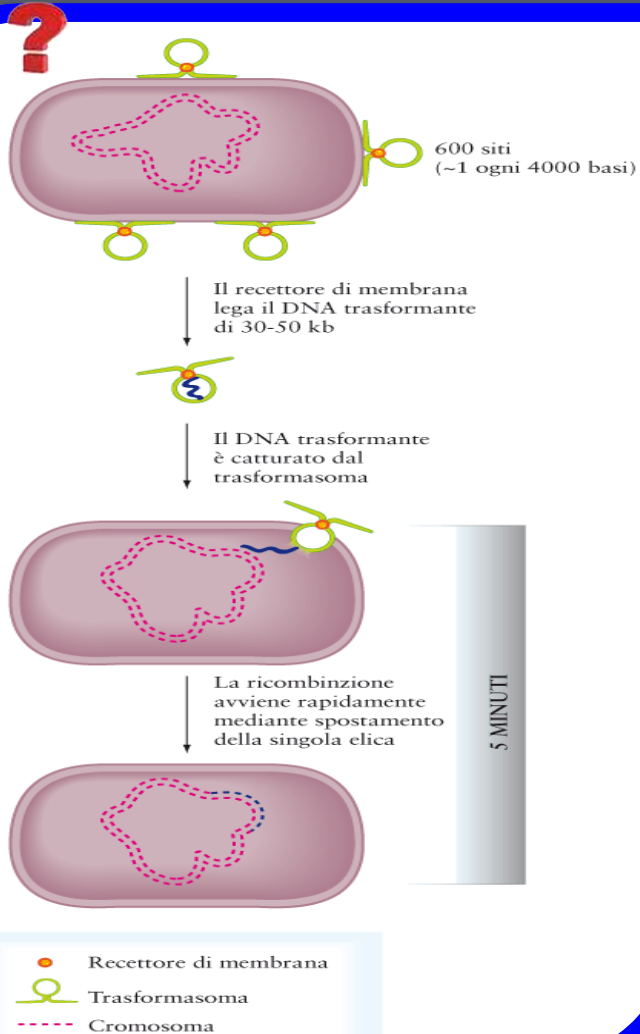
Un doppio cross-over è necessario per inserire il DNA trasformante nel cromosoma.

NEI BATTERI GRAM POSITIVI



TRASFORMAZIONE

NEI BATTERI GRAM NEGATIVI *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*





TRASFORMAZIONE

HAEMOPHILUS INFLUENZAE

Fattore di competenza non viene prodotto

La competenza insorge come conseguenza della crescita in un terreno ricco
Solo DNA omologo si lega alle cellule riceventi e viene adsorbito (stessa specie di *Haemophilus* o specie strettamente correlate)

DNA omologo contiene una sequenza di basi (11 coppie) ripetuta 600 volte sul DNA cromosomiale

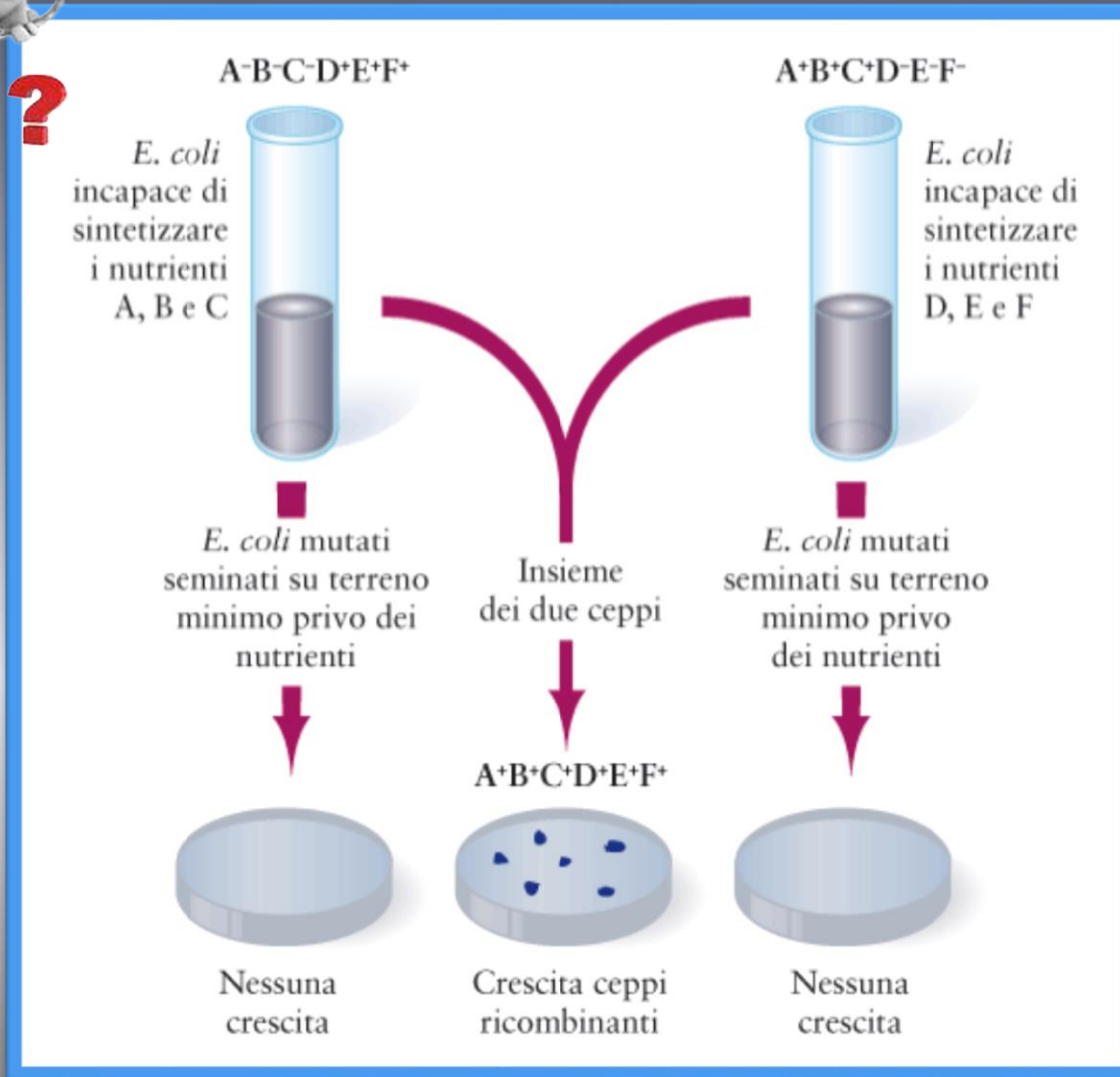
Sulla membrana esterna delle cellule competenti ci sono 10 strutture vescicolari (protusioni con pori) contenenti una proteina che lega il DNA trasformante a doppia elica

Le vescicole esterne scompaiono, mentre compaiono all'interno della membrana i **TRASFORMASOMI** (DNA omologo + superficie vescicole = invaginazione e intrappolamento DNA)

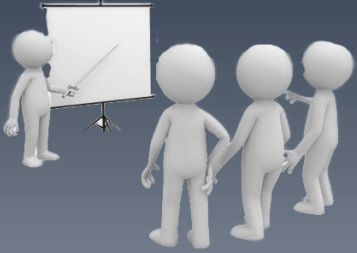
DNA nei trasformasomi non è attaccabile dalle DNAsi

DNA resta nei trasformasomi e ne esce sottoforma di singola elica solo prima della ricombinazione

CONIUGAZIONE



Lederberg & Tatum, 1946



CONIUGAZIONE

La coniugazione fu spiegata solo
quando venne scoperto il
Fattore F

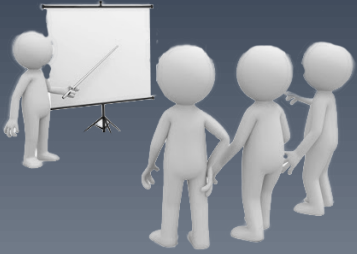


FATTORE SESSUALE F =
DNA CIRCOLARE

Fattore F

OMOLOGIA STRUTTURALE
con il cromosoma di *E.coli*

- 90% DNA di F ha $G+C =$ DNA cromosoma
- 10% DNA di F ha contenuto suo peculiare



CONIUGAZIONE

BATTERICA

DONATORE

Contiene un plasmide F
(=fattore di fertilità)

Esiste in due forme **F+** e **Hfr**

RICEVENTE

Non contiene F

Chiamato **F-**

CONIUGAZIONE

CARATTERISTICHE DI F

 Citoplasmatico (plasmidio)

 Replicone indipendente con elevata frequenza di replicazione

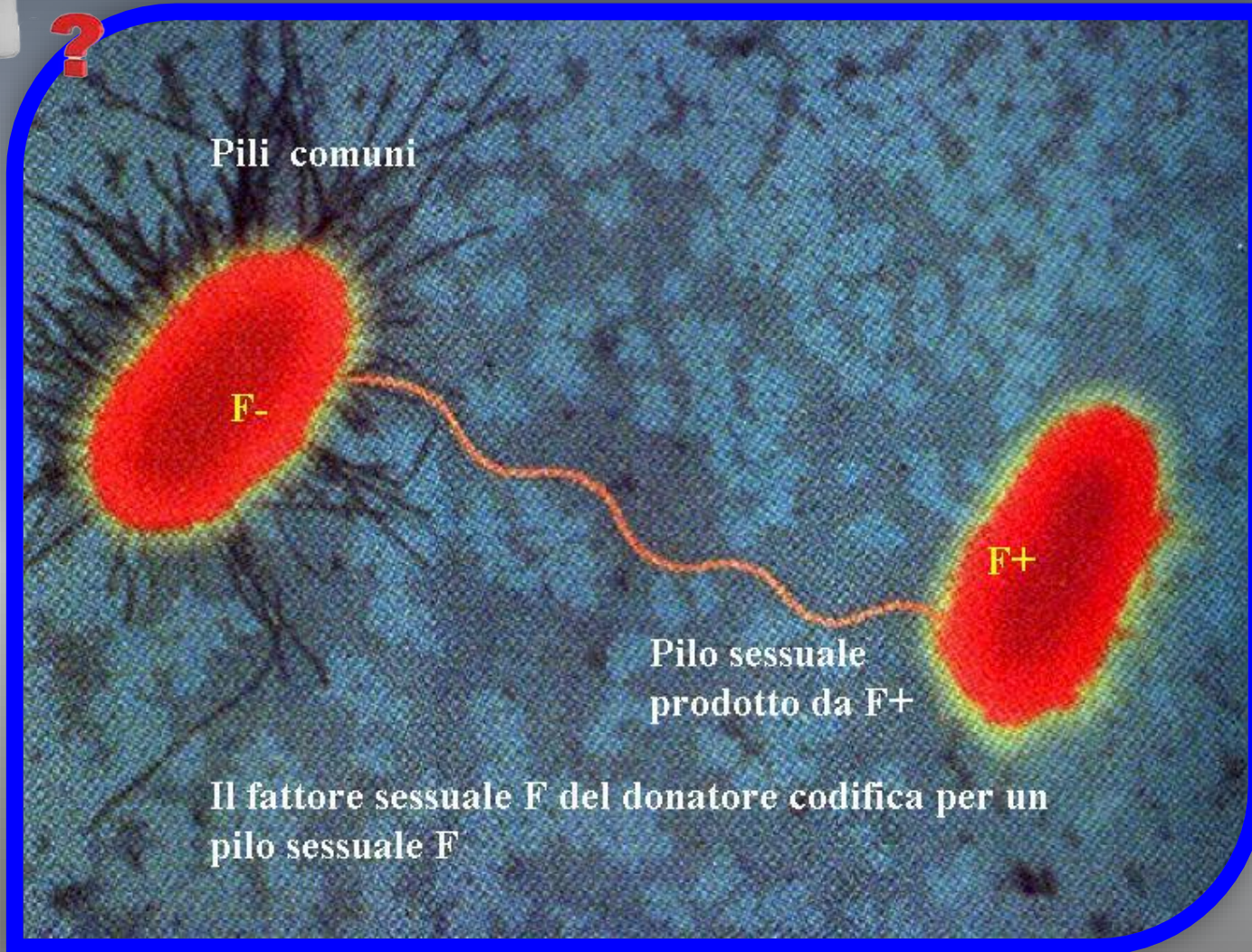
 Determina sintesi dei PILI SESSUALI o PILI F (ogni cellula F⁺ presenta 1-2 pili F) →PONTE DI CONIUGAZIONE

 Trasferimento F⁺ → F⁻ (diventa F⁺)



CONIUGAZIONE

PILO F



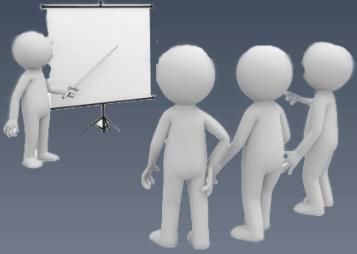
Pili comuni

F-

F+

Pilo sessuale
prodotto da F+

Il fattore sessuale F del donatore codifica per un
pilo sessuale F

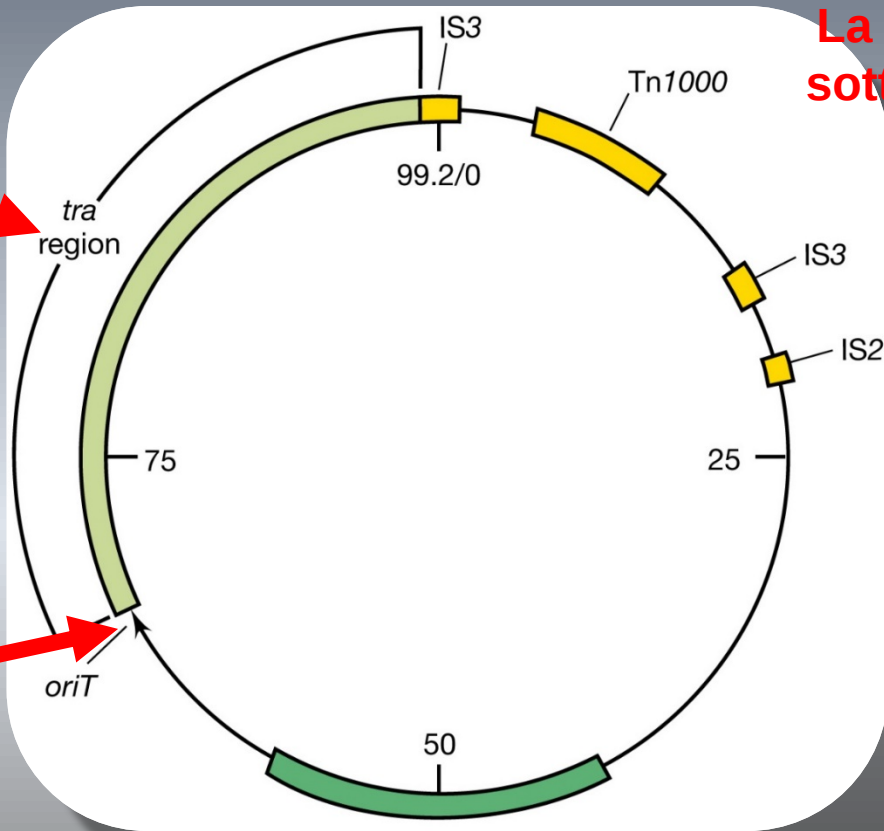
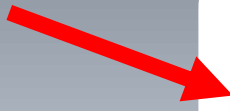


CONIUGAZIONE

PLASMIDE F

È costituito da circa 22 geni.
La formazione del pilo F è
sotto il controllo di 12 geni

Geni per il
trasferimento



Punto di
origine del
trasferimento

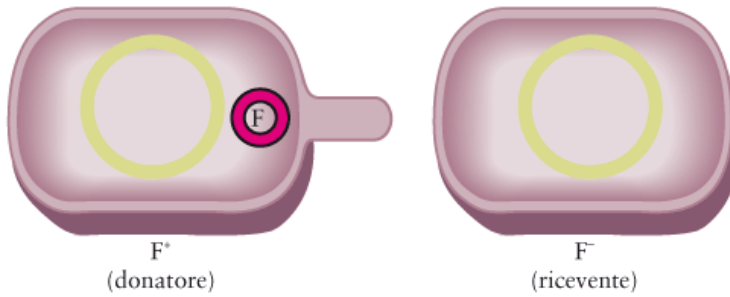


CONIUGAZIONE

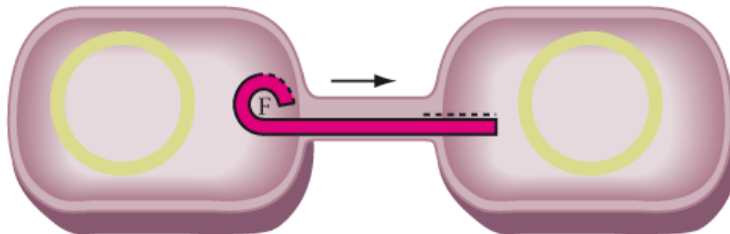
Da F^+ a F^-



FASE 1



FASE 2



FASE 3

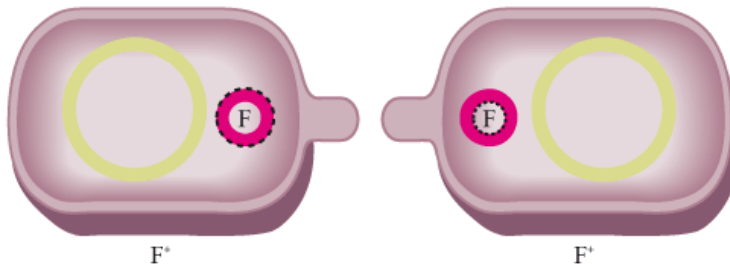


Figura 6.9 Trasferimento del fattore F per coniugazione in un incrocio $F^+ F^-$.

CONIUGAZIONE



$F + \rightarrow Hfr$

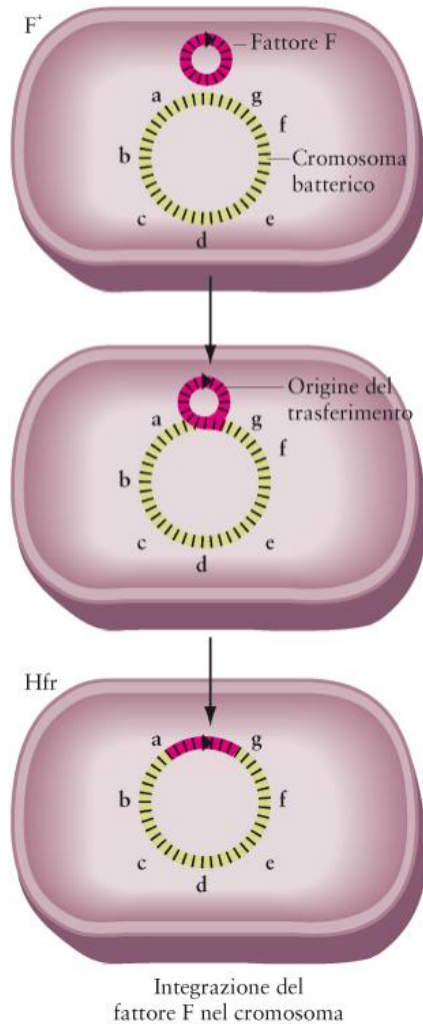


Figura 6.10 Passaggio del fattore F dalla condizione citoplasmatica (plasmide) a quella cromosomiale (episoma Hfr).

CONIUGAZIONE

Da Hfr a F-

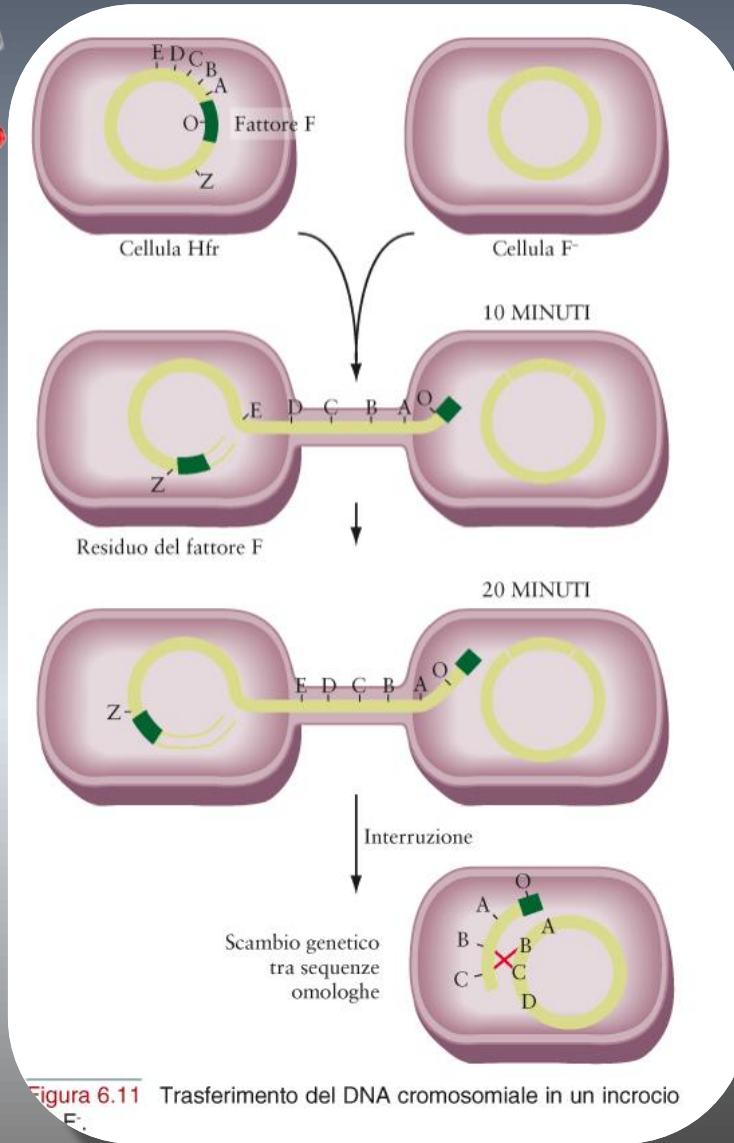
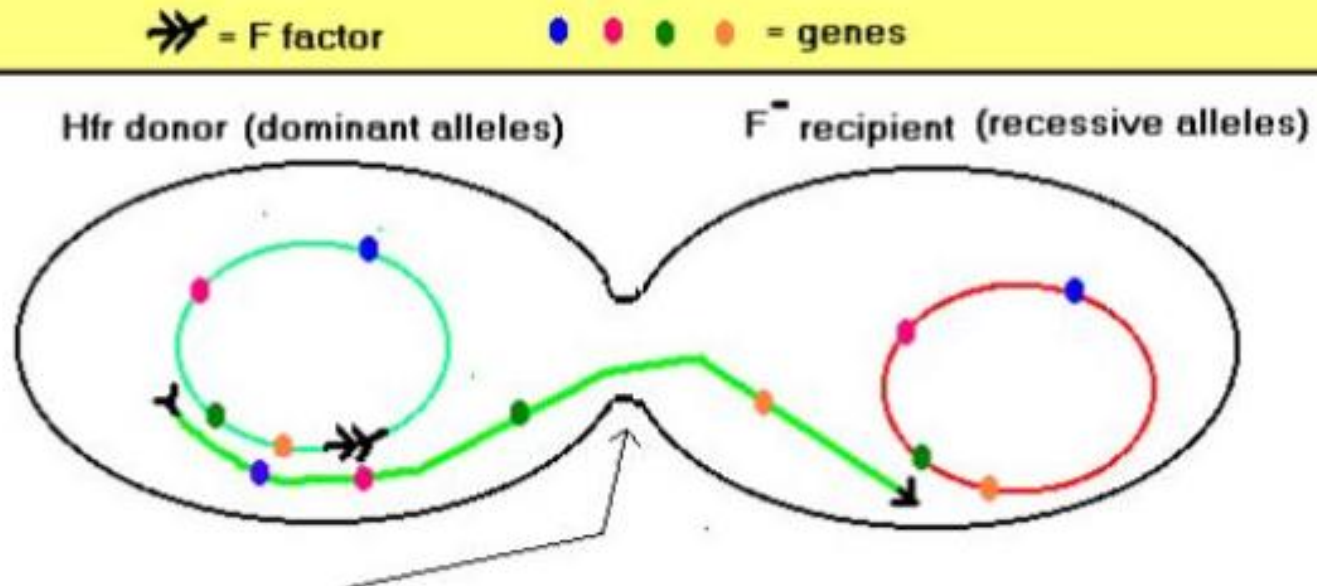


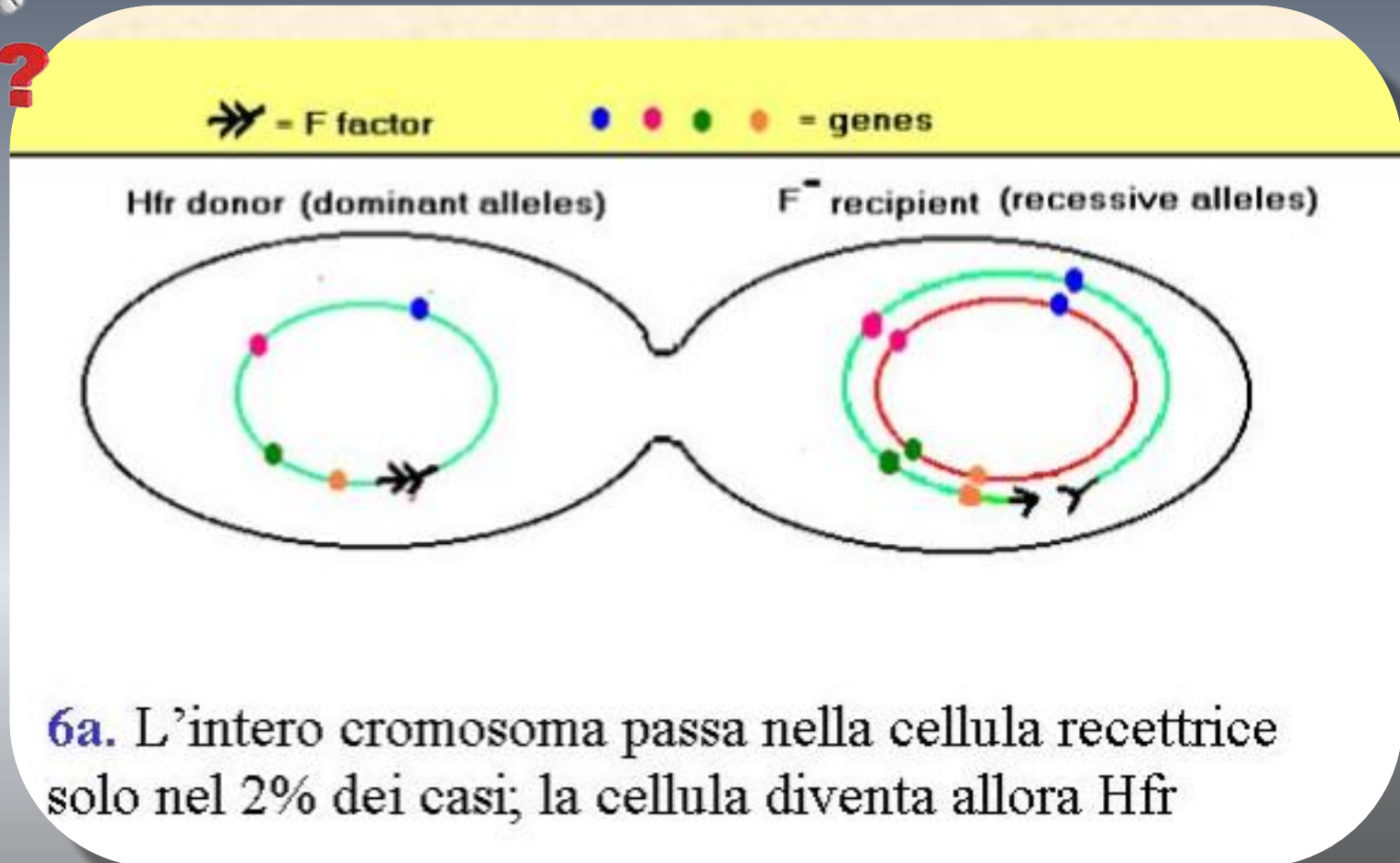
Figura 6.11 Trasferimento del DNA cromosomiale in un incrocio Hfr x F⁻.

CONIUGAZIONE Hfr



4. Il ponte di coniugazione è fragile e può rompersi in qualsiasi momento; di conseguenza le cellule recettrici ricevono solo un frammento di F e qualche gene del cromosoma

CONIUGAZIONE Hfr



MAPPA GENETICA

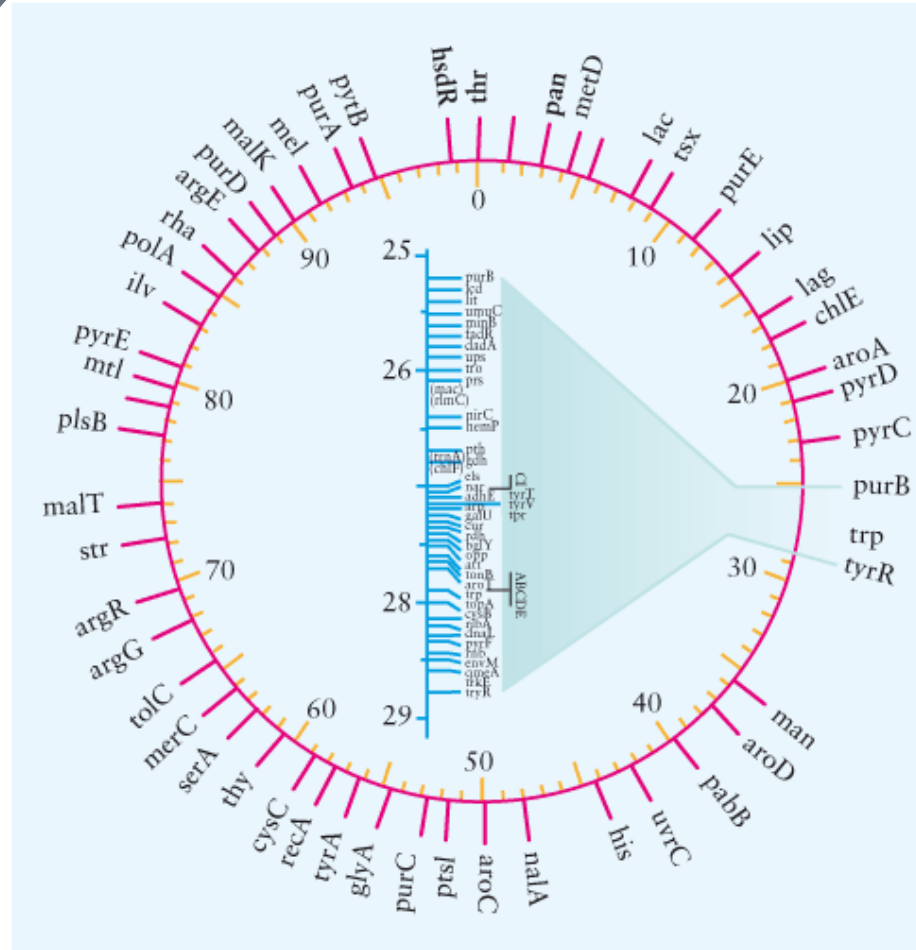


Figura 6.12 Mappa genetica (parziale) di *Escherichia coli*.

CONIUGAZIONE

Da Hfr+ a F'



?

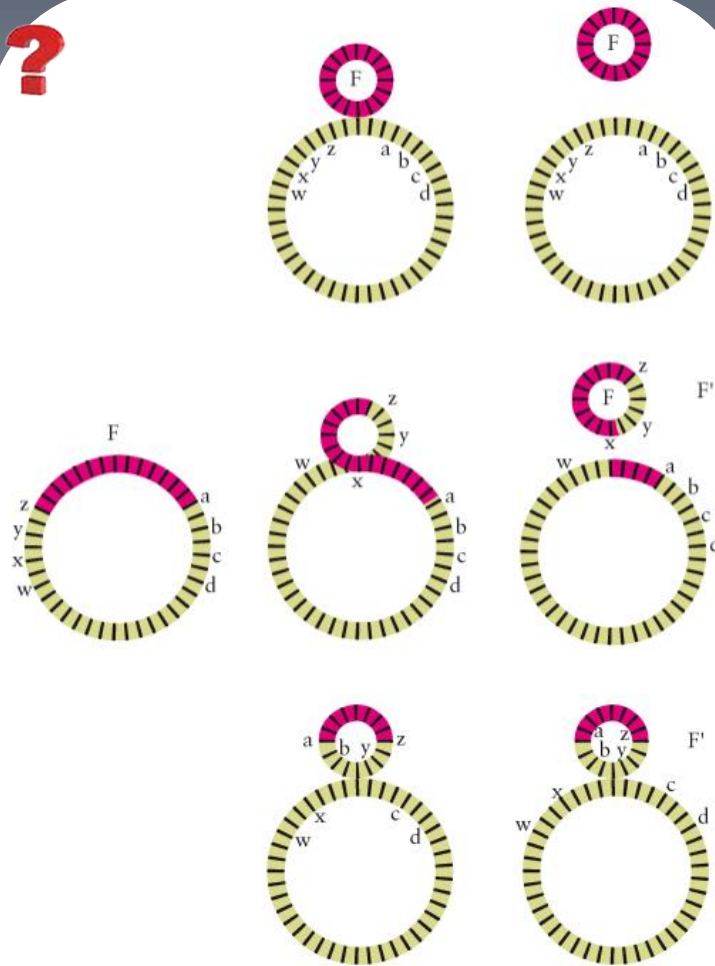


Figura 6.13 Distacco del fattore F dal cromosoma.



TRASPOSONI

Sono dei segmenti DNA mobili che si spostano da una zona all'altra del cromosoma
(JUMPING GENES).

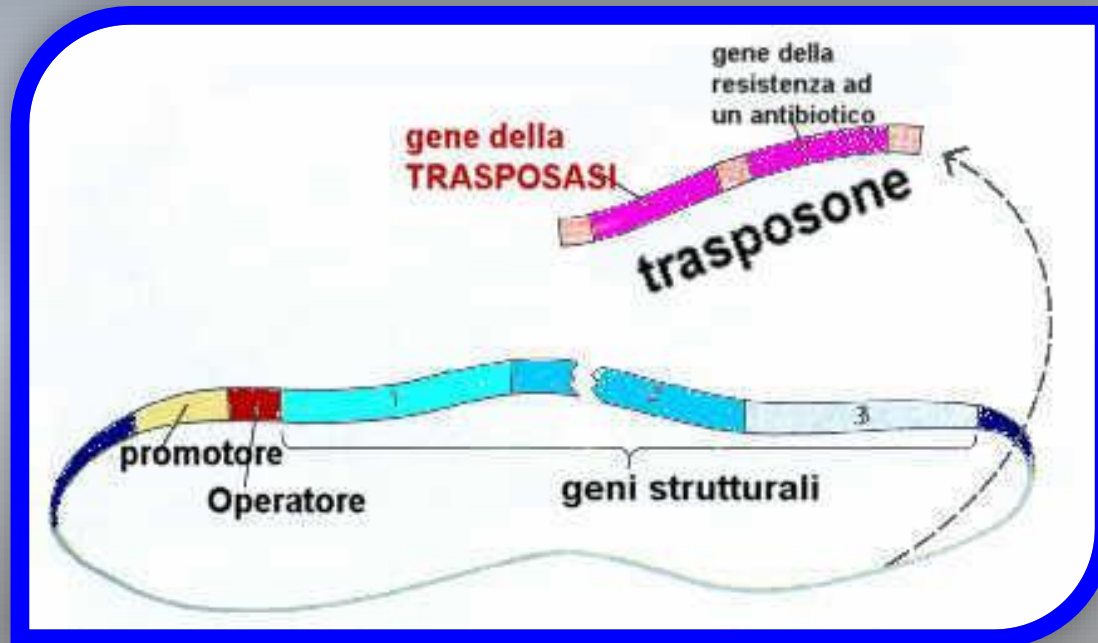
Sono caratterizzati da un gene che codifica per la **TRASPOSASI**, che catalizza la loro inserzione in un nuovo sito e media il trasferimento.

La sequenza genica che si muove è detta
ELEMENTO TRASPONIBILE o TRASPOSONE



TRASPOSONI

I trasposoni possono integrarsi in molte sequenze di DNA non omologhe e si possono spostare («saltare») in posizioni nuove sullo stesso cromosoma o su plasmidi o fagi. I plasmidi dei batteri e i virus possono funzionare come vettori, trasportando geni da un cromosoma a un altro.





TRASPOSONI

I trasposoni a differenza dei plasmidi non contengono geni per la propria replicazione, pertanto la loro replicazione dipende dalla loro integrazione in un replicone

La trasposizione è un evento raro che si verifica con una frequenza da 10^{-5} a 10^{-7} per generazione



TRASPOSONI

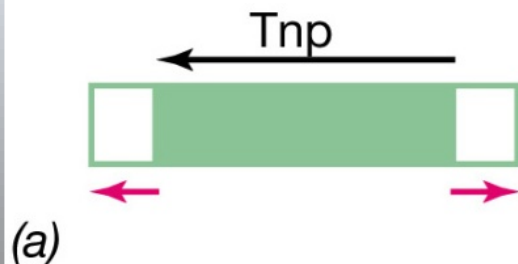
Nei procarioti sono stati identificati
due tipi di trasposoni

I TRASPOSONI SEMPLICI

(IS= sequenze di inserzione) sono corti, 750-2000 paia di basi, che codificano solo per la TRASPOSASI (trasferimento).

designati con IS + un numero in corsivo es.: IS1, IS2, IS3

IS2



IS

Sequenze di inserzione



TRASPOSONI

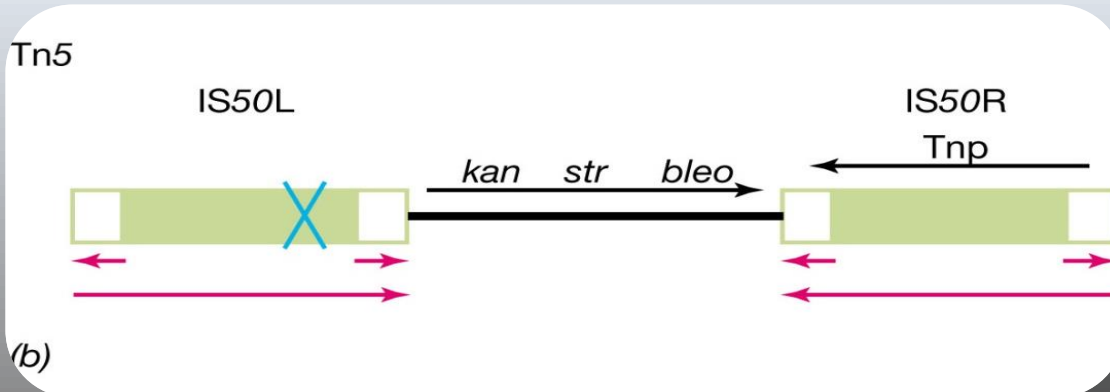
Nei procarioti sono stati identificati
due tipi di trasposoni

I TRASPOSONI COMPLESSI

sono molto più grandi e portano geni che codificano anche per altre proteine;

- ❖ si trovano in mezzo a due (IS) una a ogni estremità
- ❖ Designati con Tn + un numero in corsivo Es. Tn5, Tn10

Elementi genetici mobili



Tn
Trasposone



TRASPOSIZIONE

MECCANISMO

TAGLIA E INCOLLA

il trasposone viene tagliato dalla sua posizione nella sequenza di DNA ed è inserito in una nuova posizione

REPLICATIVO

il trasposone è replicato; una copia rimane nella posizione di origine e un'altra è collocata in una nuova

- ➡ SONO FACILMENTE IDENTIFICABILI perché PROVOCANO MUTUAZIONI
- ➡ SE UNO DI TALI TRASPOSONI VIENE INSERITO IN UN GENE, QUESTO NE RISULTA INATTIVATO



TRASPOSIZIONE



I geni che fanno parte di un **trasposone complesso** possono spostarsi da un punto all'altro dello stesso cromosoma o da un cromosoma a un altro.



ES. I **geni per la resistenza ai farmaci** sono spesso parti di trasposoni complessi e ciò spiega come mai possano essere velocemente trasferiti da un plasmide a un altro plasmide, da un plasmide a un cromosoma batterico e poi ancora a un plasmide.

TRASDUZIONE

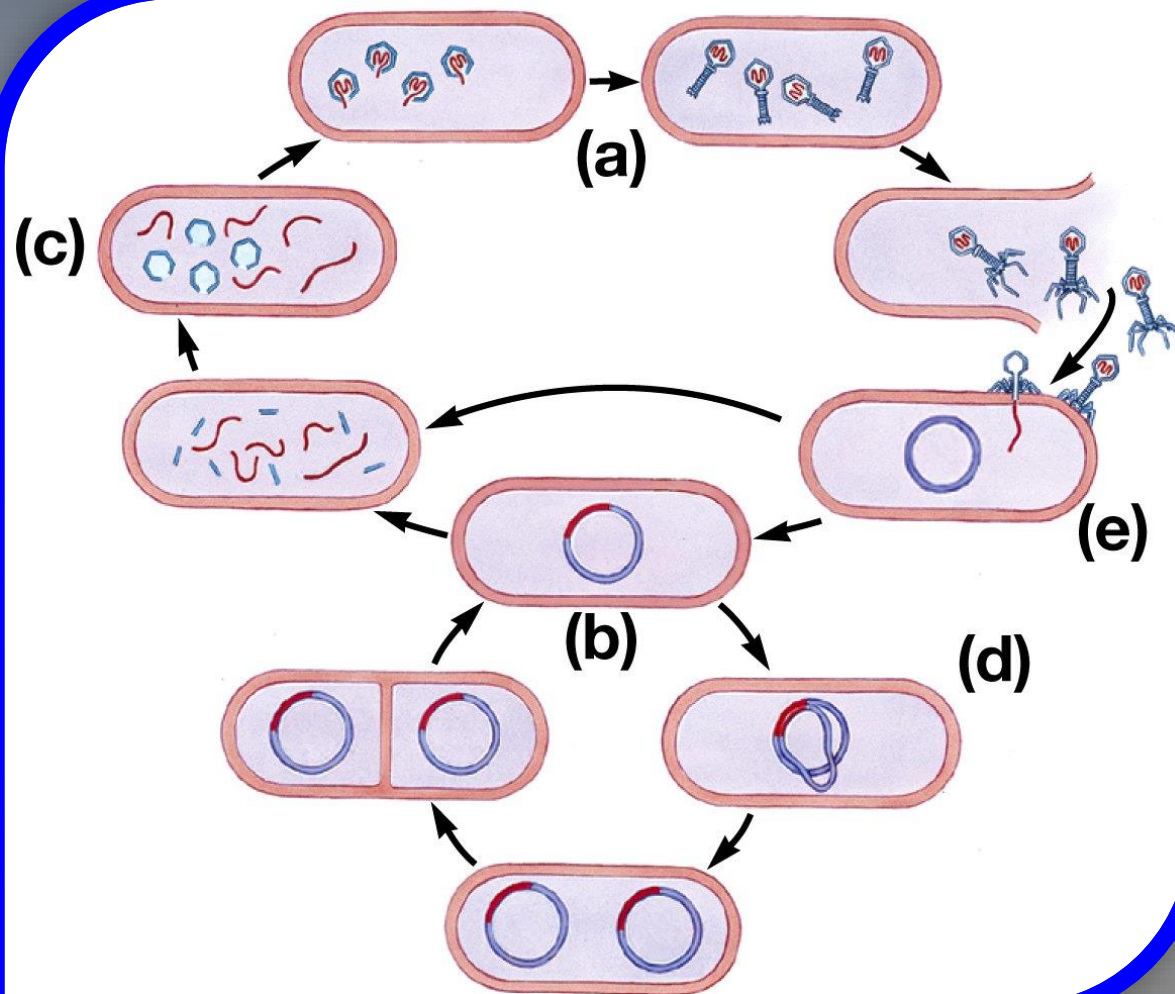


Batteriofago lambda



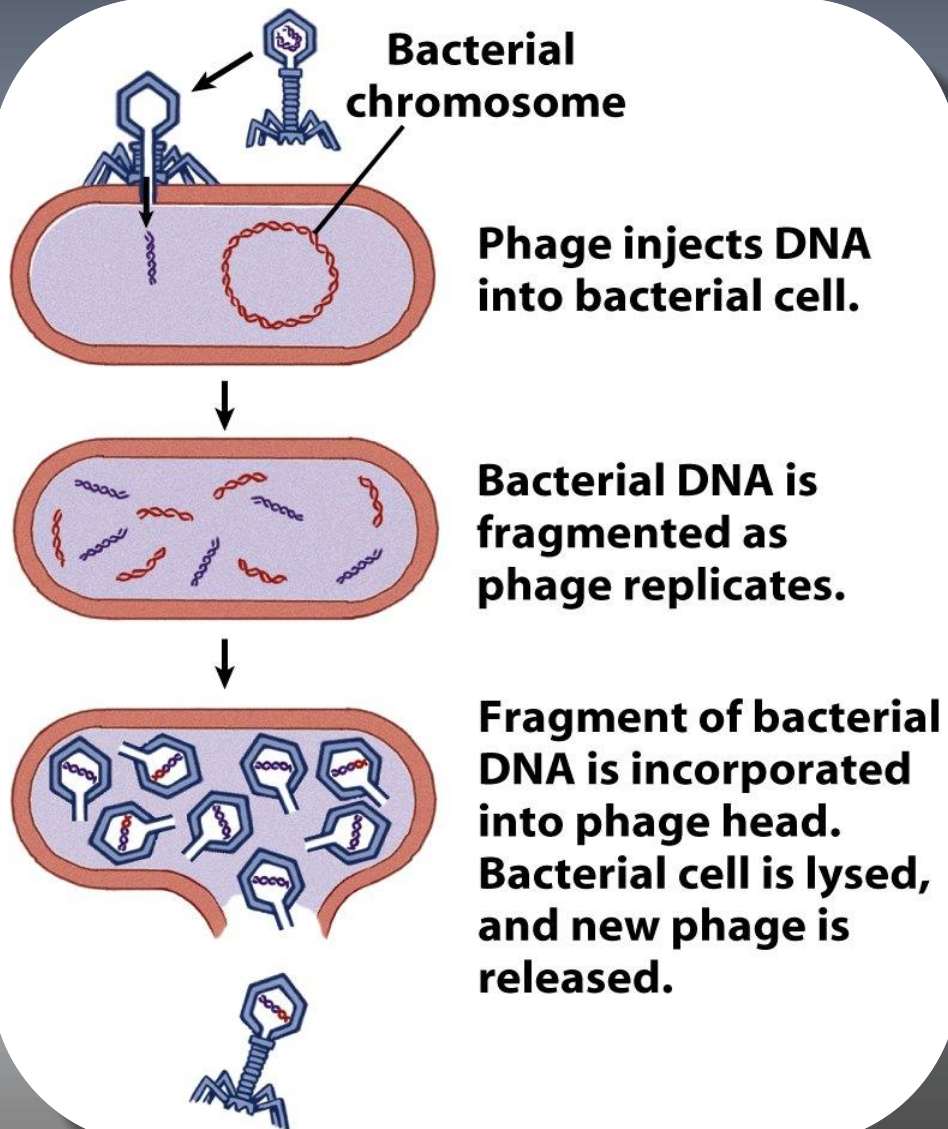
TRASDUZIONE

CICLO LITICO E CICLO LISOGENO



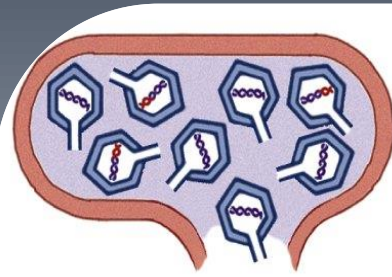
TRASDUZIONE

GENERALIZZATA

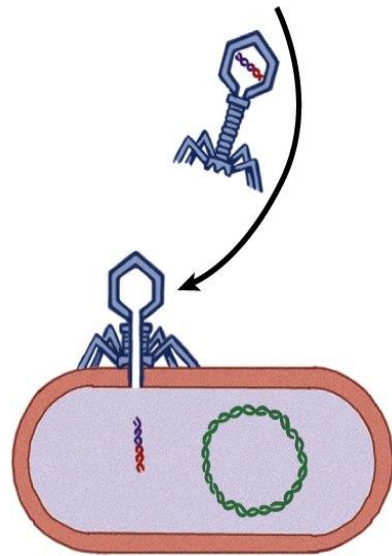


TRASDUZIONE

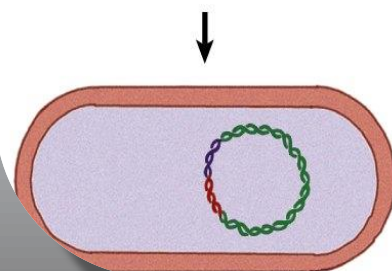
GENERALIZZATA



Fragment of bacterial DNA is incorporated into phage head. Bacterial cell is lysed, and new phage is released.



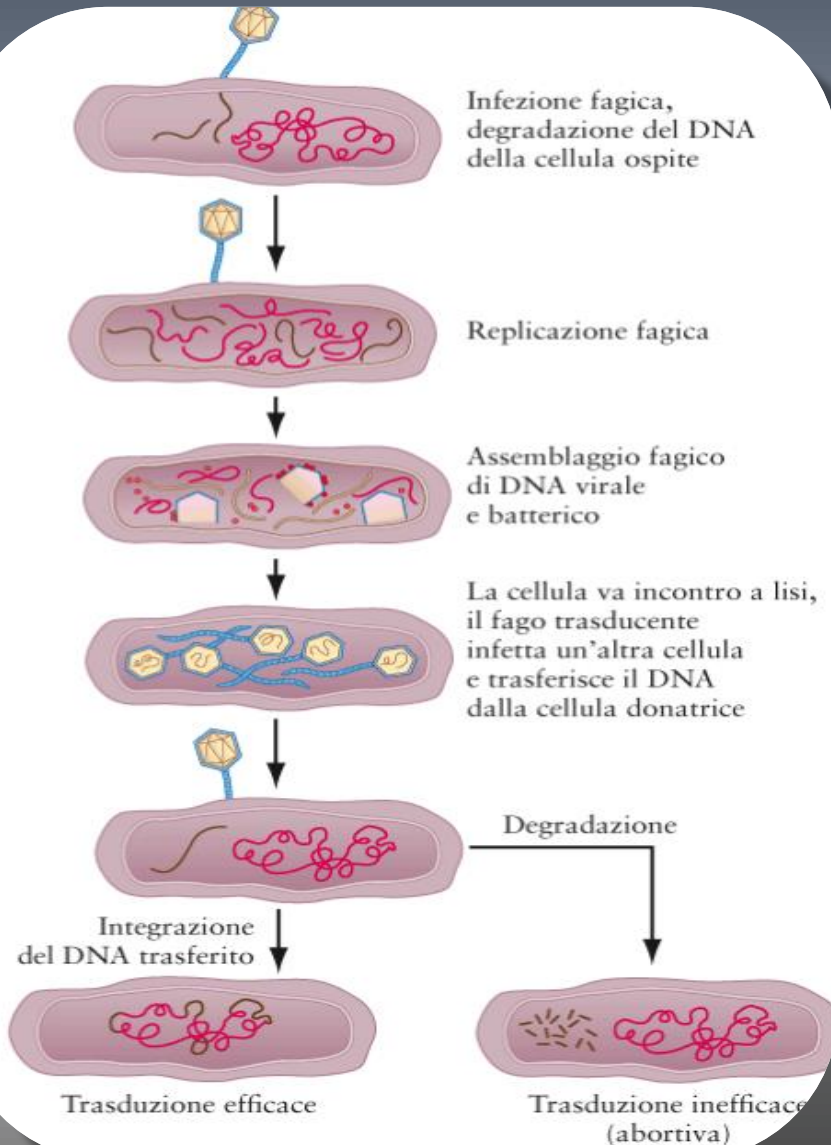
Phage containing bacterial DNA infects new cell.



Genes from first bacterial host are incorporated into chromosome of new host

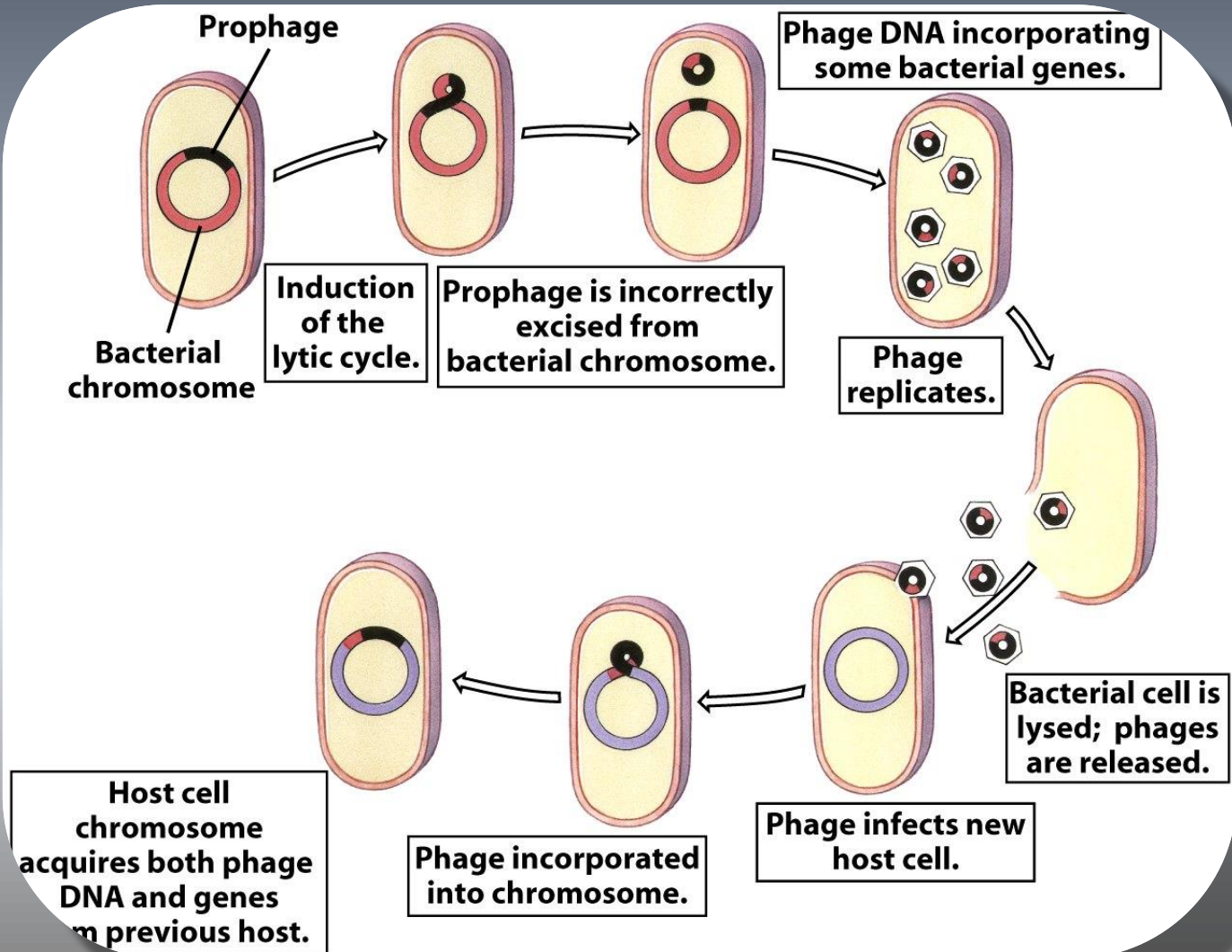
TRASDUZIONE

GENERALIZZATA E ABORTIVA



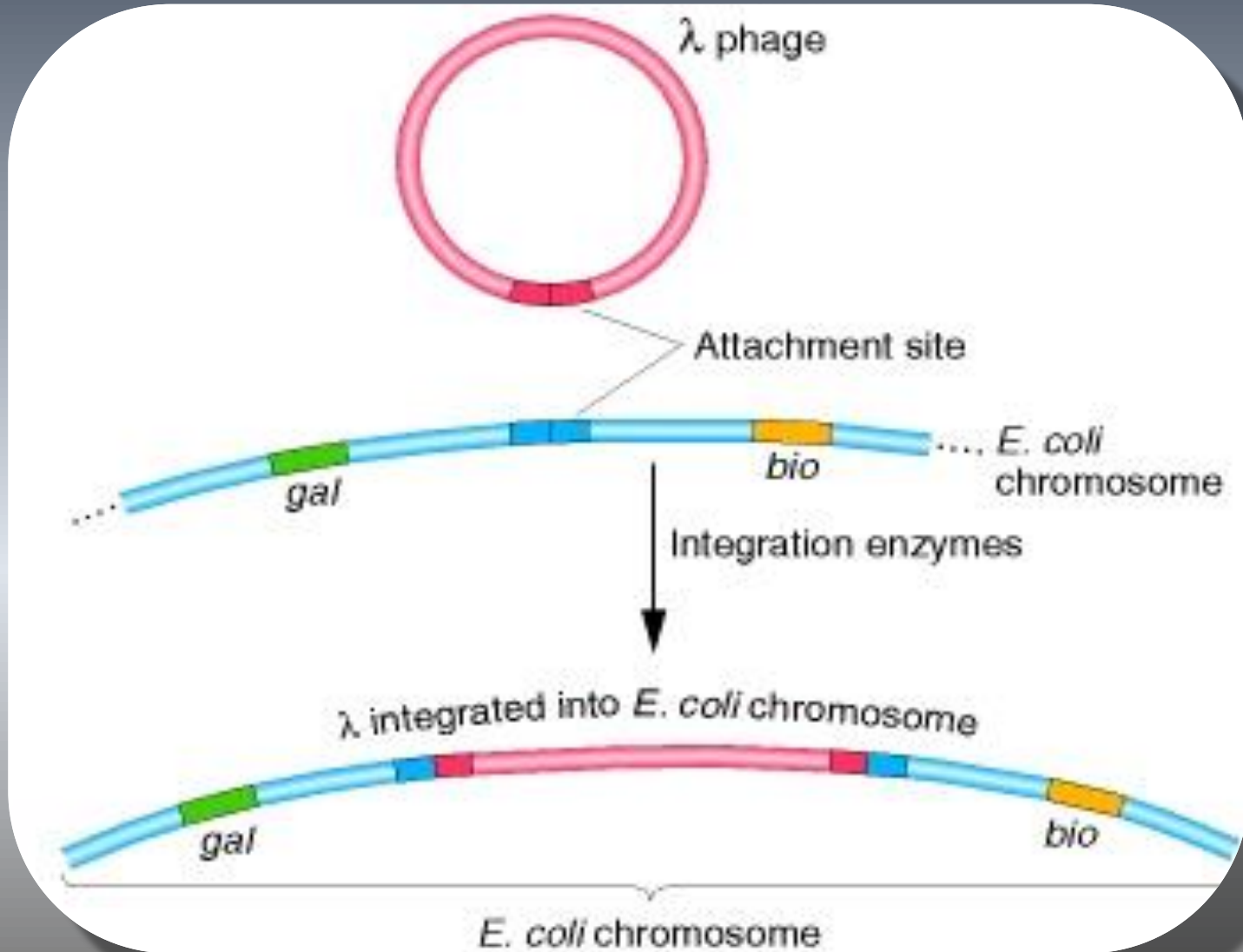
TRASDUZIONE

SPECIALIZZATA



TRASDUZIONE

SPECIALIZZATA





TRASDUZIONE

GENERALIZZATA

DNA incorporato rappresenta 1-2 centesimi del cromosoma intero.

La **FREQUENZA DI UN GENE** è bassa perché il frammento di DNA trasdotto non presenta sempre gli stessi geni



TRASDUZIONE

SPECIALIZZATA

Il PROFAGO può rimanere tale a lungo

La situazione può essere interrotta:

- ❖ spontaneamente quando una piccola aliquota di cellule di una popolazione lisogena subisce la lisi ad ogni generazione
- ❖ per induzione da UV, shock termico, altre radiazioni, ecc.
- ❖ Il profago è di norma **REPRESSO** nella cellula da un repressore citoplasmatico codificato dallo profago



CONVERSIONE FAGICA

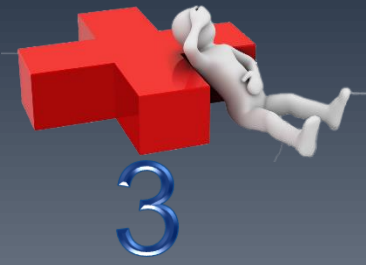
o LISOGENICA

1

Nei batteri lisogeni il DNA del profago si replica con il cromosoma, ma i suoi geni non vengono, di regola, trascritti ed espressi e non esercitano influenze fenotipiche nella cellula ospite (batterio).

2

In alcuni casi, una frazione del genoma fagico non subisce questa forma di regolazione repressiva e può specificare la sintesi di un prodotto genico che arricchirà il fenotipo della cellula batterica di un nuovo carattere (conversione fagica o lisogenica).



CONVERSIONE FAGICA

4

Il **PROFAGO** invece di essere represso produce, e quindi, esprime fenotipicamente, alcuni suoi geni.

La conversione fagica non è un meccanismo di scambio genetico perché il carattere che conferisce alla cellula lisogena è controllato da un gene fagico e non batterico (tuttavia filogeneticamente il gene è di origine batterica e successivamente di integrazione fagica).

CONVERSIONE FAGICA

➡ Tossina del *Corynebacterium diphtheriae* (fago beta)

➡ Tossina del *Clostridium botulinum*

➡ Enterotossina, leucocidina di *Staphylococcus aureus*

➡ Tossina eritrogenica di *Streptococcus pyogenes*

➡ Antigeni di *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*



CONVERSIONE FAGICA

Tabella 6.2 Esempi di alcuni fattori di patogenicità e virulenza codificati da geni batteriofagici.

Proteina	Gene	Batteriofago	Batterio
Esotossine:			
Tossina difterica	<i>Tox</i>	β	<i>C. diphtheriae</i>
Tossine botuliniche	<i>C1, d</i>	C1, d16 Φ	<i>C. botulinum</i>
Tossina colerica	<i>ctxAB</i>	CTX Φ	<i>V. cholerae</i>
Tossine di Shiga	<i>stx1, stx2</i>	H-19B, 933W	<i>E. coli</i>
Enterotossine	<i>vari (entA, see, ecc.)</i>	<i>vari</i> (Φ 315, Φ 13, ecc.)	<i>S. aureus</i>
Tossina esfoliativa A	<i>eta</i>	Φ ETA	<i>S. aureus</i>
Leucocidina	<i>pvl</i>	Φ PVL	<i>S. aureus</i>
Superantigeni (tossina eritrogenica)	<i>vari (spe-, ecc.)</i>	8232.1 (T12)	<i>S. pyogenes</i>
Antigeni modificanti l'LPS:			
Glicosidasi Ag O	<i>gtr</i>	P22	<i>S. enterica</i>
Acetilasi Ag O	<i>oac</i>	Sf6	<i>S. flexneri</i>
Glucosiltransferasi	<i>gtrII</i>	SfII (V, X)	<i>S. flexneri</i>
Enzimi:			
Superossido dismutasi	<i>sodC</i>	Sp4 (10)	<i>E. coli</i> O157
Superossido dismutasi	<i>sodC-I, sodC-III</i>	GIFSY-2, Fels-1	<i>S. enterica</i>
Neuroaminidasi	<i>nanH</i>	Fels-1	<i>S. enterica</i>
Ialuronidasi	<i>hylP</i>	H4489A	<i>S. pyogenes</i>
Stafilochinasi	<i>sak</i>	Φ 13	<i>S. aureus</i>
Fosfolipasi	<i>sla</i>	315.4	<i>S. pyogenes</i>
DNasi/streptodornasi	<i>sdn, sda</i>	315.6, 8232.5	<i>S. pyogenes</i>
Resistenza al siero:			
OMP ^a	<i>bor, eib</i>	λ , simil- λ	<i>E. coli</i>
Altri fattori:			
Virulenza	<i>gtgE</i>	GIFSY-2	<i>S. enterica</i>

^a OMP, proteine della membrana esterna; Φ (fi); λ (lambda).



*Per qualunque domanda o problema
puoi contattarmi al*

- Tel: **3386428032**
- e-mail: vivian.tullio@unito.it

