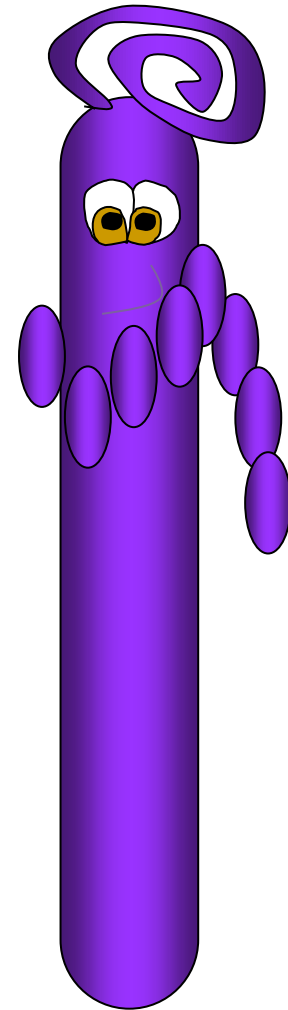
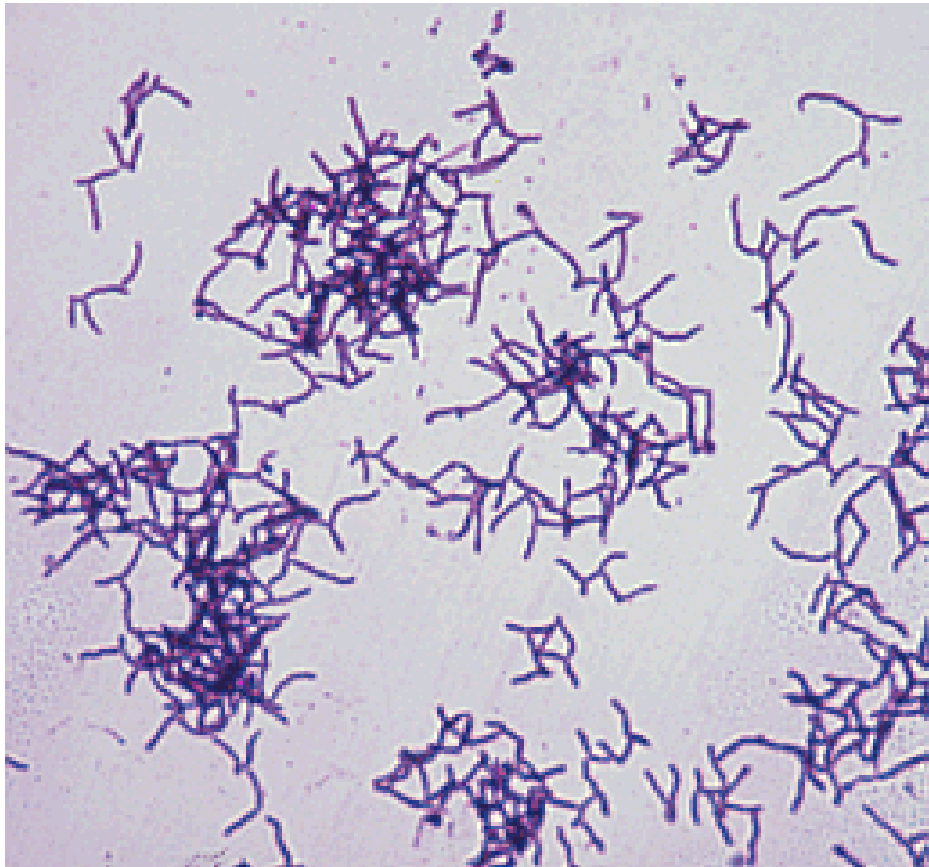


STREPTOMICETI

Gli streptomiceti appartengono al gruppo delle *Actinomycetales* (monodermi ad alto contenuto G+C)

Hanno cellule filamentose, immobili, (circa 1 μm di diametro) con tendenza a ramificare che formano ammassi irregolari



**sono una frazione importante della comunità
microbica del suolo (1-20%)**

**Dove hanno un ruolo importante nella degradazione della materia organica in
generale e di sostanze difficilmente attaccabili come cheratina, lignina o pectina**

**L'interesse industriale nei loro confronti deriva dalla produzione
di antibiotici:**

Cloramfenicolo

Eritromicina

Neomicina

Nistatina

Streptomicina

Tetracicline

Carbapenemi

Kanamicina

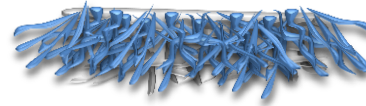
Novobiocina

**Ma anche di erbicidi, antitumorali,
antifungini e molti altri composti**



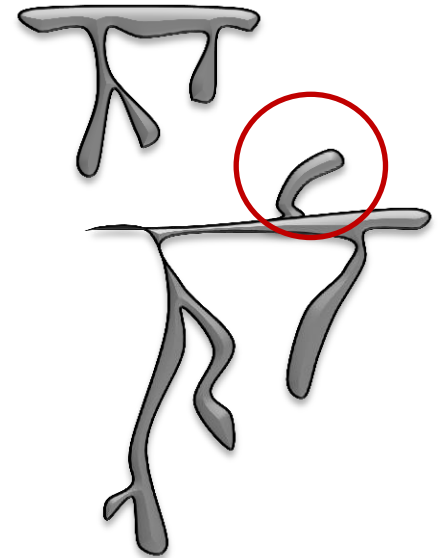
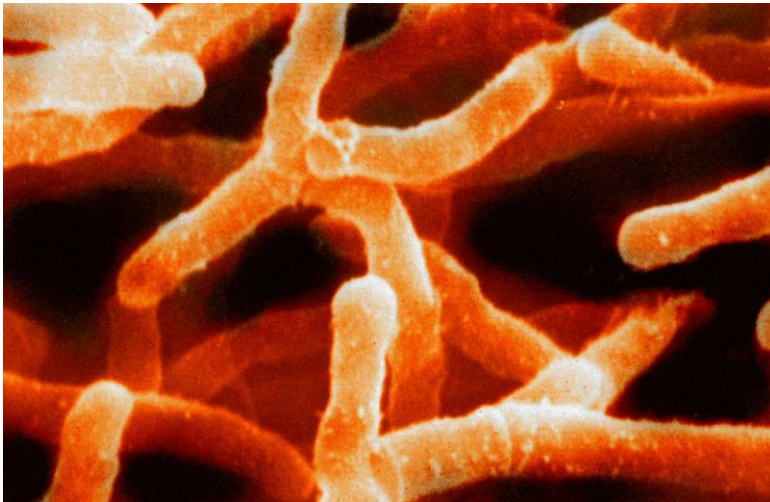
Il ciclo vitale di *Streptomyces* uno dei cicli più complessi tra i procarioti

1) Micelio del substrato



Un micelio vegetativo (Micelio del substrato) formato da ife intrecciate, dà luogo a una colonia

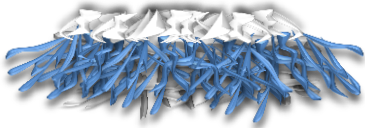
Le ife si affondano nel terreno, traendone i necessari nutrienti



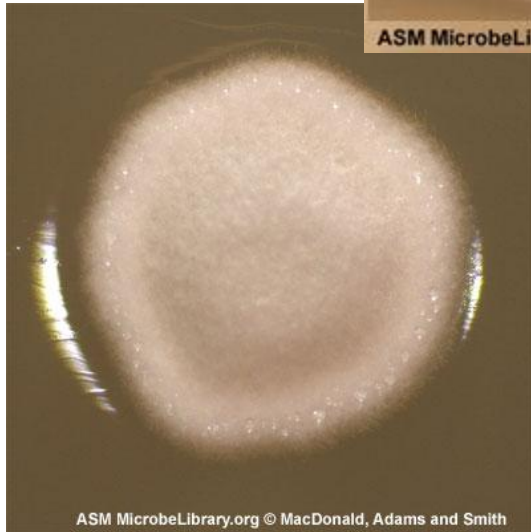
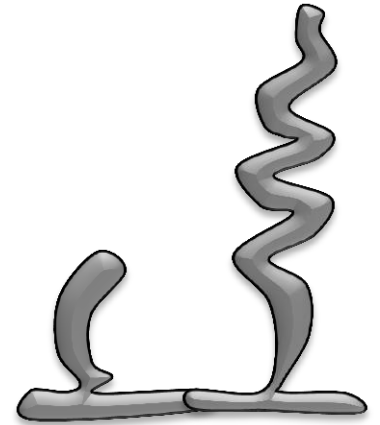
Nel micelio del substrato i filamenti non sono settati e intrecciandosi danno alla colonia una consistenza compatta

lo sviluppo coordinato multicellulare porta alla produzione di antibiotici e, contemporaneamente, inizia a comparire un micelio aereo specializzato

2) MICELIO AEREO



Quando le ife aeree sono cresciute, inizia un secondo momento di sviluppo che porta a una nuova e articolata regolazione della crescita, del ciclo cellulare e dei processi di morfogenesi



Quando si formano gli sporofori (e poi le spore)
la colonia assume un aspetto polveroso

Per la formazione del micelio aereo sono necessari due cluster genici

Geni *bld*
(bald=calvo)
regolatori



Geni *ram*
Rapid Aerial Mycelium formation
Un repressore e 4 geni

La cascata *bld* porta alla
produzione della proteina SapB

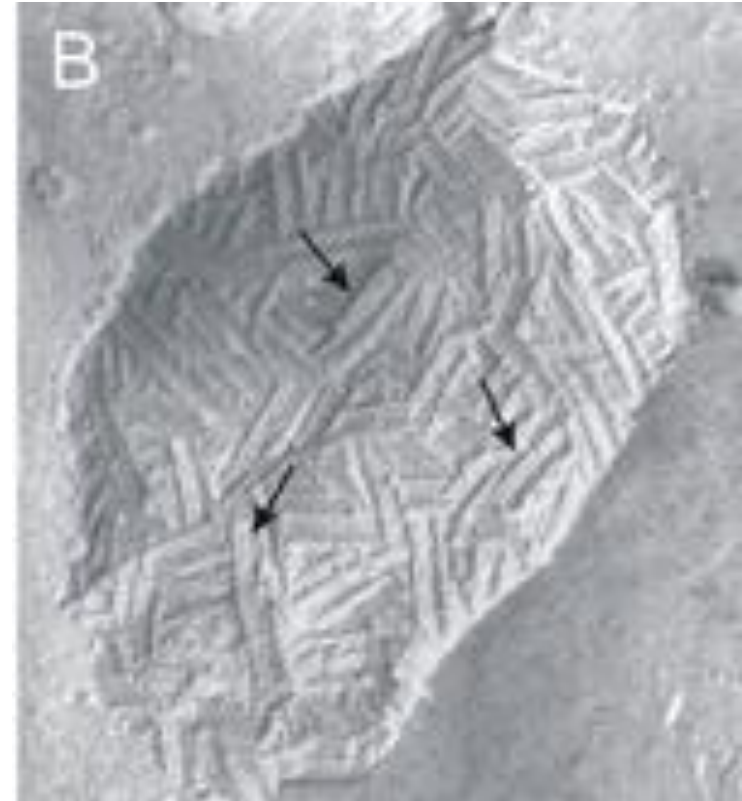
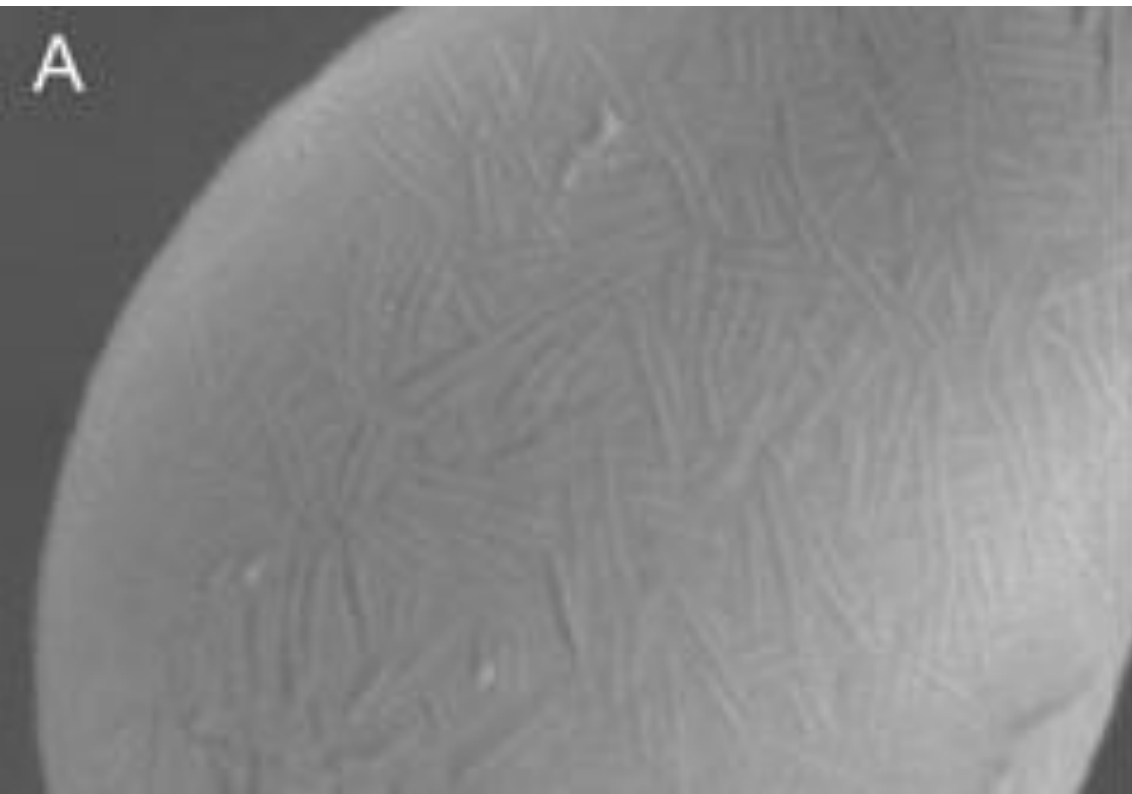
Un peptide ottenuto dal prodotto di RamS per
modificazione post-traduzionale

SapB
RamS

SapB è strutturalmente un
lantibiotico ma è privo di attività

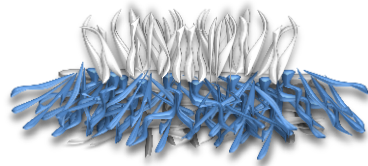
Insieme a piccole proteine idrofobiche abbassa la
tensione superficiale all'interfaccia aria acqua,
permettendo alle ife aeree di crescere verso l'alto

Le ife aeree (e poi le spore) sono rivestite di uno strato a mosaico (rodlet lay) formato da proteine idrofobiche



Rodlins + chaplins, assemblate in strutture bastoncellari (rodlets)

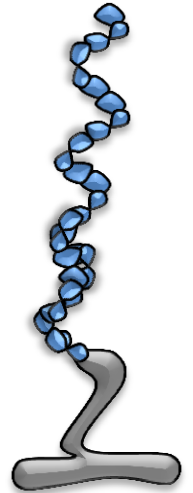
3) SPORULAZIONE



Le ife aeree, lunghe e multinucleate si convertono in catene di prespore



Le prespore maturano dando origine a spore singole, che provvedono alla sopravvivenza e alla dispersione della specie

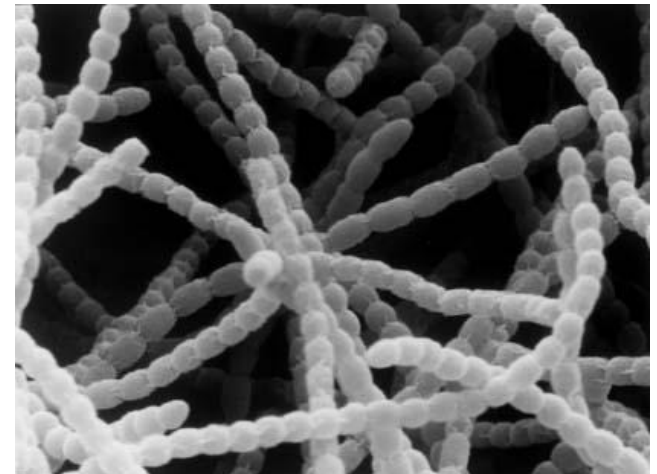


4) GERMINAZIONE

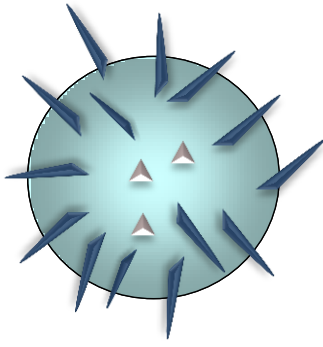
Germinando quando le condizioni tornano favorevoli, per formare un nuovo micelio



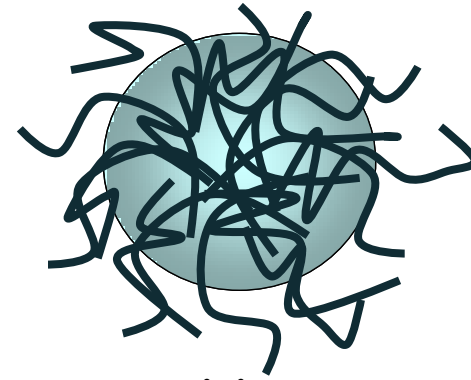
A differenza di altri Actinomycetales gli streptomiceti non producono sporangi, le spore sono attaccate direttamente alle ife aeree (sporofori) in file di 5-50 elementi



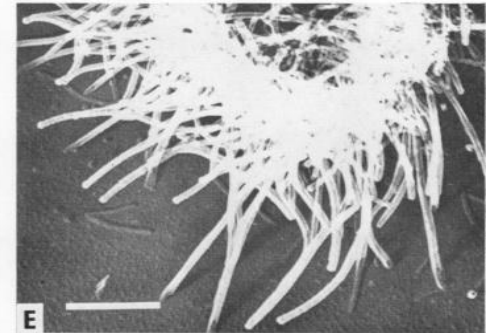
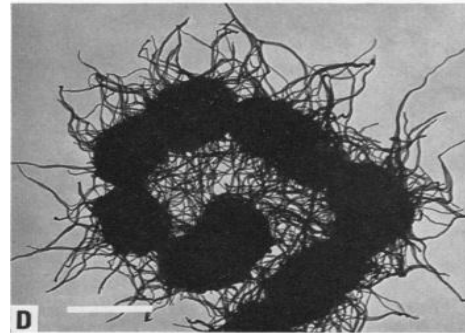
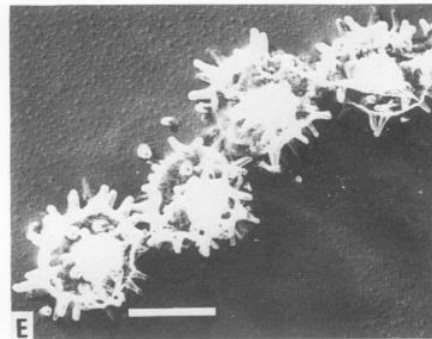
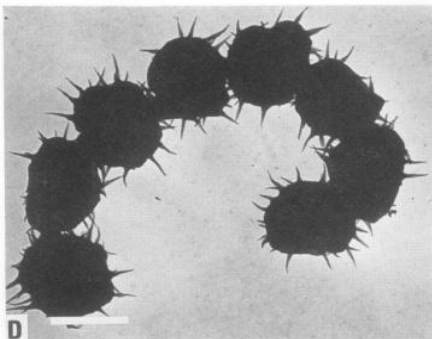
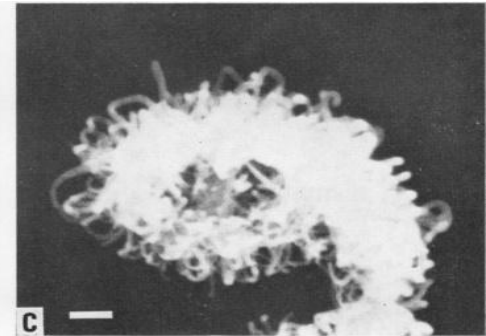
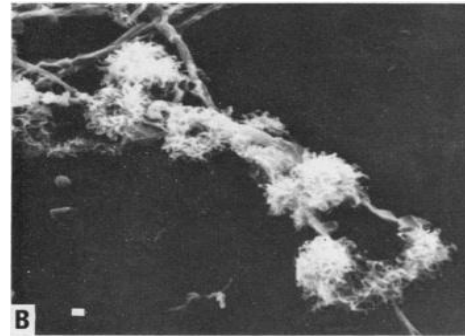
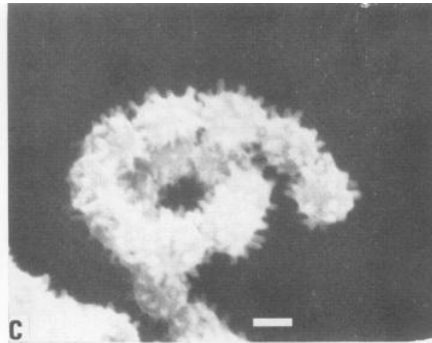
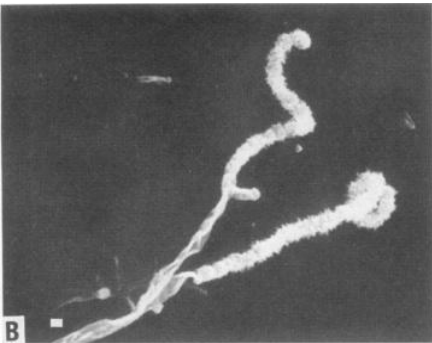
Le spore possono avere caratteristiche diverse e sono
divise in 5 gruppi in base alla morfologia



spinose

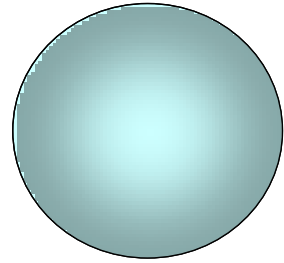
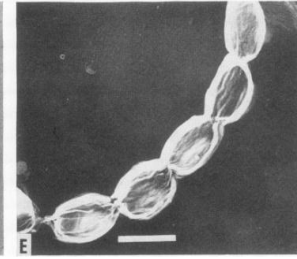
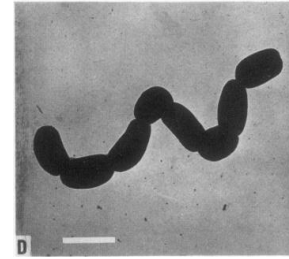
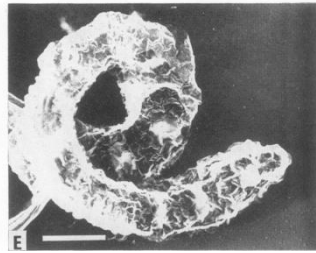
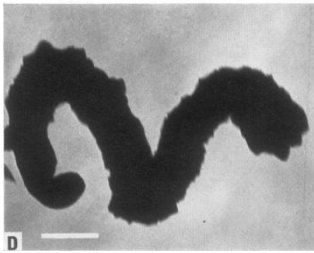
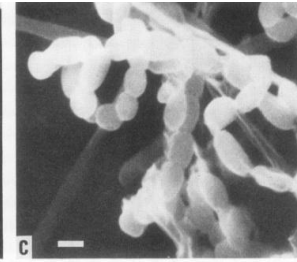
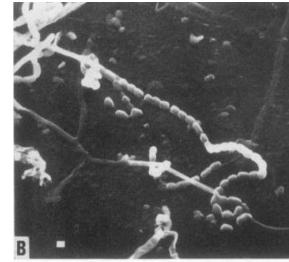
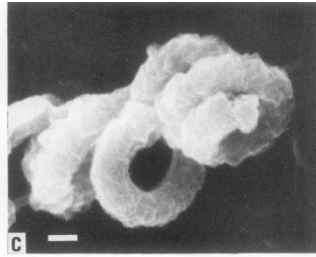
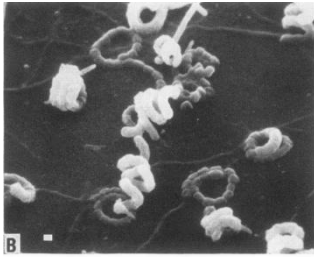


crinite

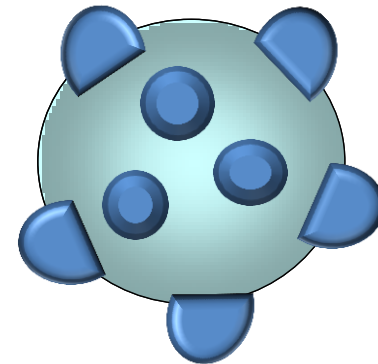
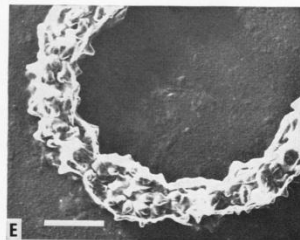
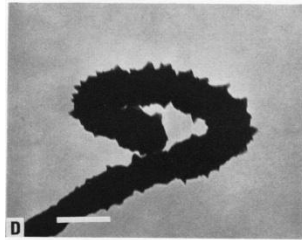
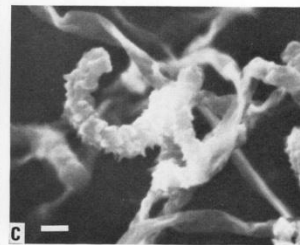
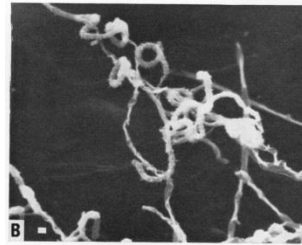


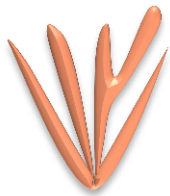
rugose

lisce

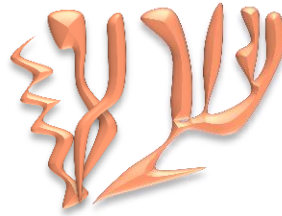


verrucose

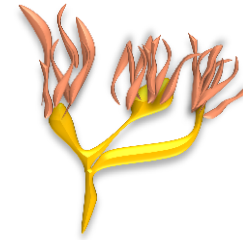




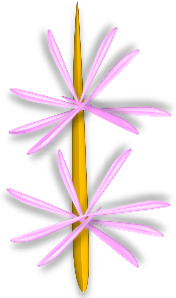
Dritti



Flessuosi



Fascicolati



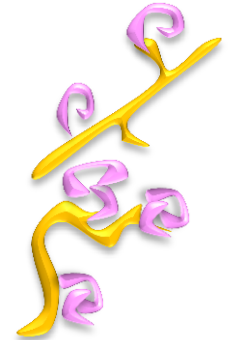
**Monoverticillati
senza spirali**



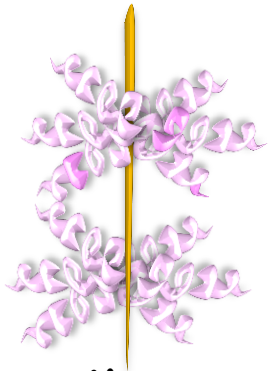
**Anse aperte
Spirali primitive
Uncini**



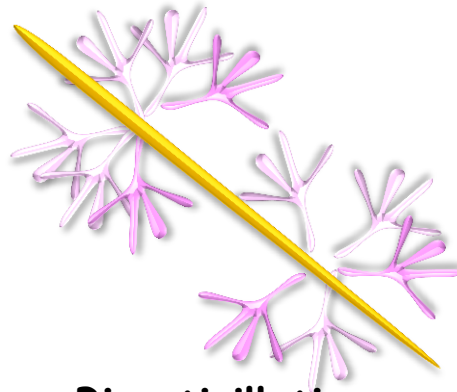
Spirali aperte



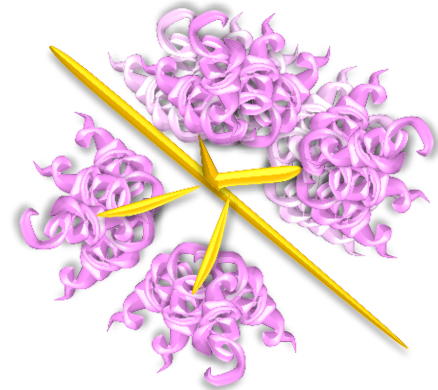
Spirali chiuse



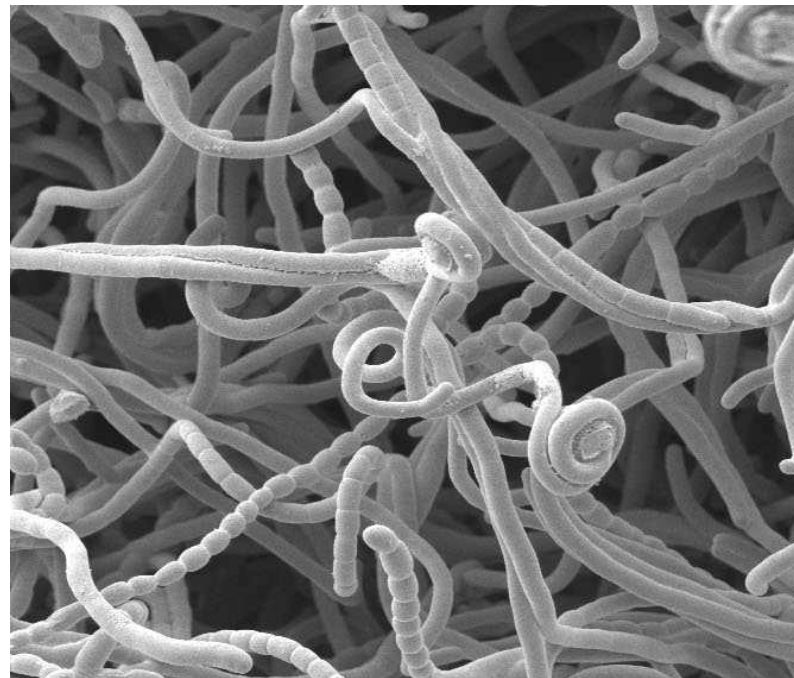
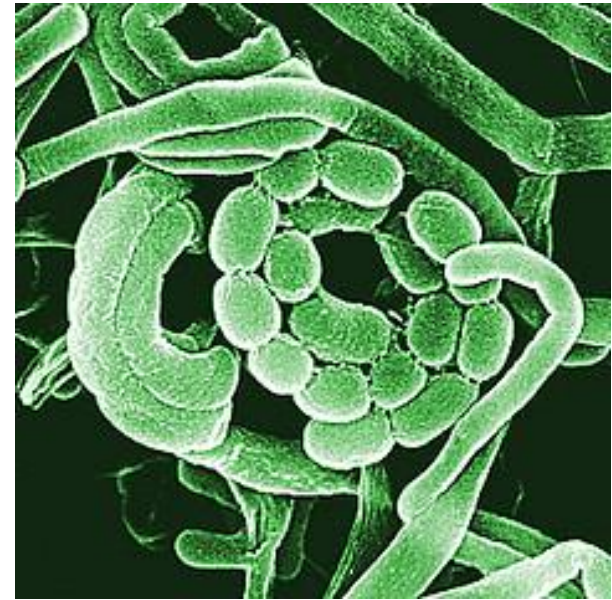
**Monoverticillati
con spirali**



**Biverticillati
senza spirali**

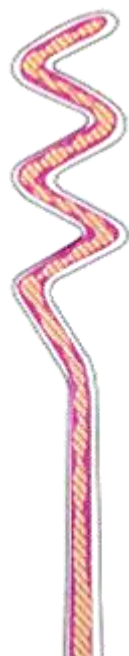


**Biverticillati
con spirali**

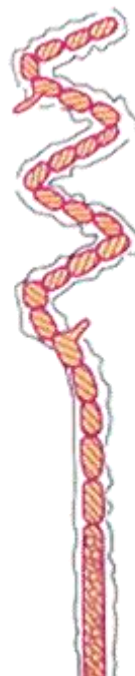


Il meccanismo di formazione dei conidi è del tutto diverso da quello della sporulazione in *Bacillus*

All'inizio della sporulazione il filamento è sinciziale, multinucleato



Poi si divide in compartimenti mononucleati

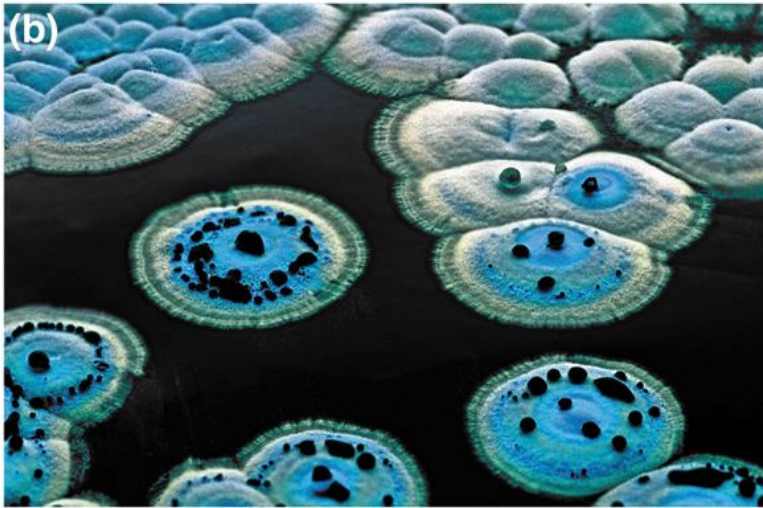


Formando le prespore



Le prespore diventano poi spore vere e proprie, ovali

**Le spore, come anche le ife aeree,
sono spesso pigmentate**



**Il colore del micelio maturo è
caratteristico delle diverse specie**



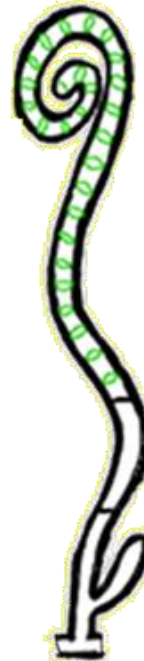
**La pigmentazione della colonia, la forma e la disposizione delle spore sono
elementi morfologici importanti per l'identificazione degli streptomiceti**

La sporulazione in *Streptomyces* comporta
l'assemblaggio e il rimodellamento di polimeri di FtsZ

La catena di spore nasce dalla trasformazione
delle cellule apicali di un'ifa aerea



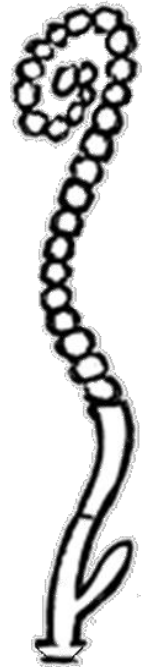
La proteina
polimerizza in forme
elicoidali



Che vengono
rimodellate in Z-ring



creando i setti che
dividono le prespore



Nella cellula originale *ftsZ* inizia ad
essere iperespresso e la
concentrazione di FtsZ aumenta

Anche la struttura e le caratteristiche dei conidi sono molto diverse da quelle delle endospore

A differenza delle endospore di *Bacillus* le spore degli streptomiceti hanno

ATP: livelli significativi

Respirazione 10-15% rispetto alle cellule vegetative

Metabolismo percettibile

Assenza di acido dipicolinico

calore (55-65 °C)

Essiccamento

raggi UV

Lisozima

Rispetto alle cellule vegetative le spore hanno una maggior resistenza verso

Le strutture proteinacee che ricoprono le spore sono probabilmente responsabili per la maggiore resistenza agli stress meccanici e al LSZM

I pigmenti accumulati proteggono probabilmente gli acidi nucleici dall'azione degli UV

La resistenza al calore blando e all'essiccamento è legata all'accumulo di larghe quantità di trealosio (25-50% del peso secco delle spore che si formano dal micelio aereo)



Il trealosio infatti è molto efficace nel prevenire danni, particolarmente quelli da essiccamento, alle proteine e alle membrane

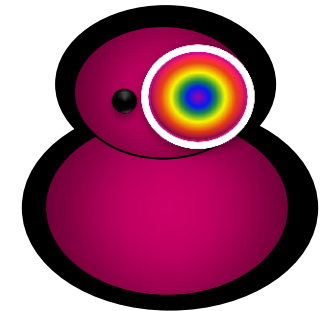
Gli streptomiceti sono largamente usati in campo industriale (producono, tra l'altro, circa 2/3 degli antibiotici noti) e per migliorare l'efficienza di produzione sono state impiegate diverse tecniche

La più tradizionale (ricerca di mutanti) ha portato alla scoperta di una relazione tra mutazioni in *rpsL* e *rpoB* e una migliorata produzione di antibiotici

***rpsL* codifica la proteina ribosomale
SI2 situata Sulla subunità 30S**

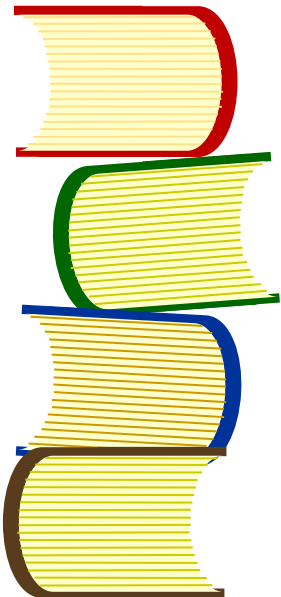
**vicino al sito di legame
per la streptomicina**

**La sua mutazione accresce la sintesi
proteica in fase stazionaria**



**Maggiore stabilità del
complesso 70S**

**Aumentata espressione di
fattori di traduzione**

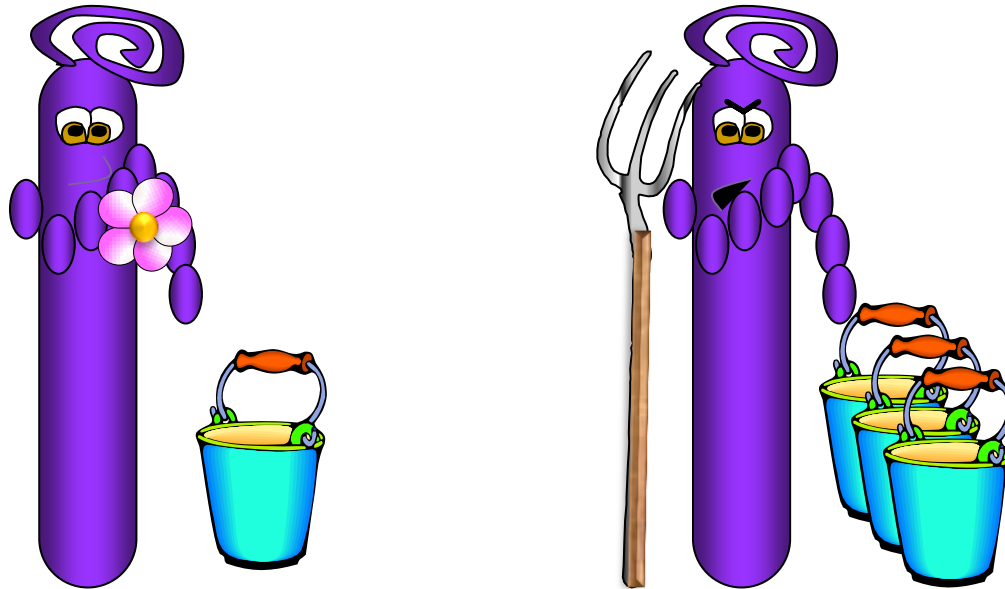


rpoB codifica la subunità β della RNA polimerasi

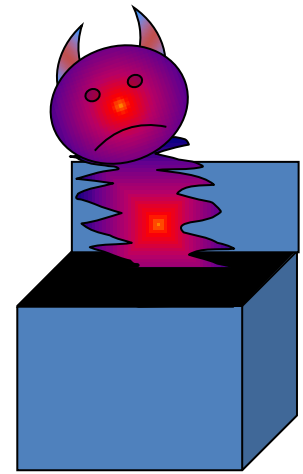
La sua mutazione accresce l'efficienza dell'oloenzima sui promotori del metabolismo secondario

la terza mutazione che aumenta la resa è quella che determina la resistenza alla gentamicina ma non è stata chiaramente identificata

Mutanti resistenti ai tre antibiotici hanno una maggiore resa almeno per quanto riguarda la produzione di antibiotici



La ricerca di mutanti spontanei non da informazioni sulla natura delle mutazioni e sui possibili effetti collaterali

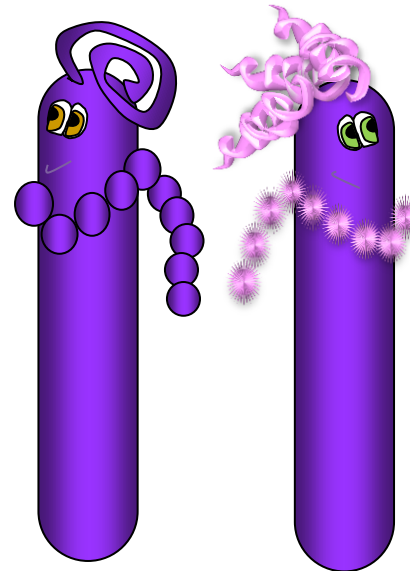


La ricombinazione genetica tra streptomiceti come mezzo per ottenere ceppi più produttivi non è stata molto utilizzata

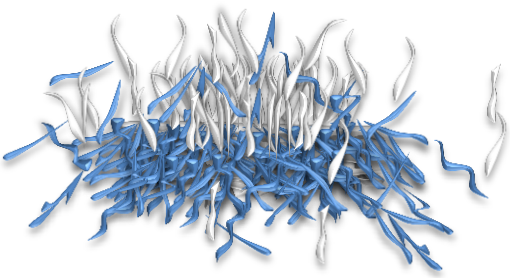
A causa della bassa frequenza di ricombinazione tra i ceppi di interesse industriale



Manipolazione genetica attraverso la fusione dei protoplasti



La preparazione dei protoplasti di *Streptomyces* richiede un passo preliminare di omogenizzazione per frammentare la massa miceliale in unità più piccole che si disgregano poi trattandole con ultrasuoni



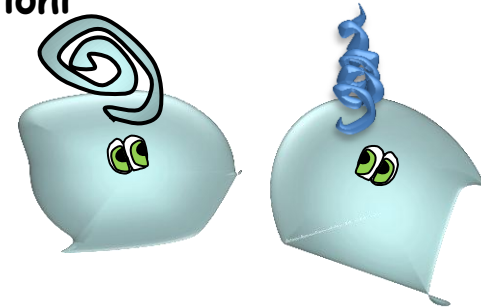
Poi si procede in modo analogo a quello usato per altri batteri Monodermi (es. *Bacillus*)

L'avvenuta formazione dei protoplasti si può controllare al microscopio a contrasto di fase (non ci devono più essere frammenti di micelio)

Se sono presenti "fantasmi" o molti protoplasti irregolari è necessario ripetere il procedimento controllando meglio la temperatura e la concentrazione dei cationi



Queste forme, infatti non sono vitali



Se i protoplasti non si formano
le cause possono essere

Fase di crescita della
coltura non idonea

Lisozima insufficiente

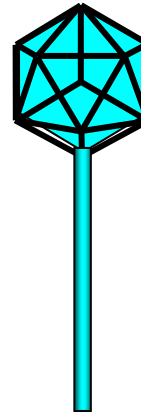
LA FUSIONE DEI PROTOPLASTI E'

Una tecnica versatile adatta a indurre ricombinazione genetica in diversi microrganismi eucarioti e procarioti

particolarmente utile con per microrganismi di interesse industriale, come gli Actinomiceti: **NON RICHIEDE**



sviluppo di competenza



trasduzione fagica

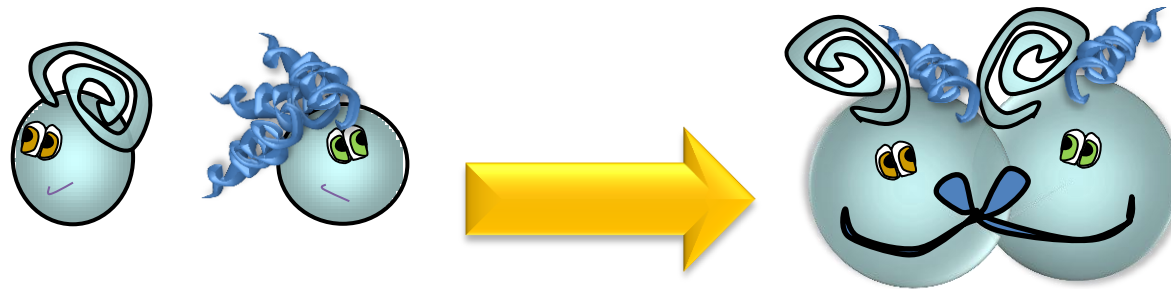


fattori sessuali

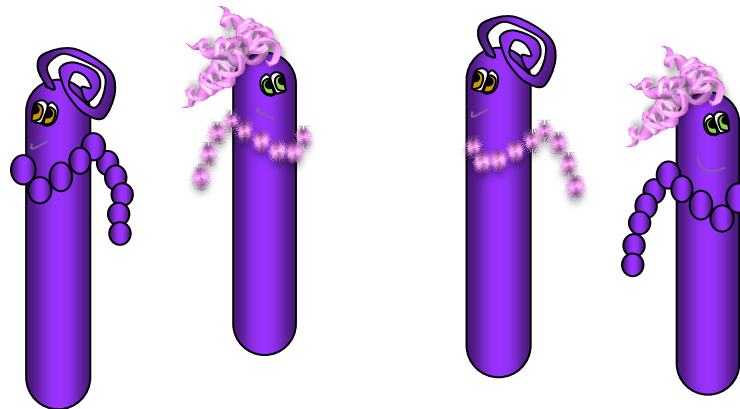
Richiede però la messa a punto delle procedure idonee a generare protoplasti stabili, a facilitarne la fusione e ad ottenere cellule vitali dai protoplasti fusi

**I ceppi parentali che si impiegano hanno dei caratteri marcatori
(in genere auxotrofie) che permettono di riconoscerli**

**in presenza di un agente fusogeno come il PEG (polietilen-glicole) i protoplasti
vengono indotti a fondersi dando luogo alla formazione di ibridi di transizione**



**Durante lo stato ibrido si può avere ricombinazione genica
(particolarmente alta frequente nei procarioti)**



**La fase finale (e la più critica) è quella di
ottenere cellule vitali dagli ibridi fusi**

Alcuni aspetti vanno tenuti in particolare considerazione per il successo della RIGENERAZIONE

TEMPERATURA

Quella che garantisce la maggior maggior ricrescita di microrganismi va determinata con prove sperimentali

In genere ~ 29-30 C, mentre temperature più alte (37-42 C) inibiscono la rigenerazione

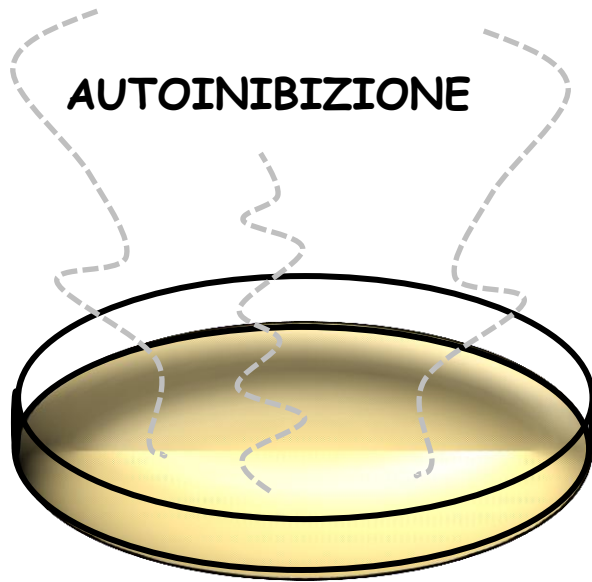
CONCENTRAZIONE E MASSA MOLECOLARE DEL PEG

In genere 40-60% e 1000-6000

Ma a volte è necessario arrivare anche oltre (es. *S. parvulus*: PEG4000 65%)

ALTERAZIONE DEL pH

Può essere causata dalla concentrazione di glicina usata per preparare i protoplasti e interferire con la rigenerazione



AUTOINIBIZIONE

A volte i protoplasti che rigenerano più velocemente impediscono la rigenerazione degli altri

E' un fenomeno comune in *Streptomyces*, ma può essere prevenuto disidratando parzialmente il terreno (fino a una perdita in peso del 15-20%)

AGGREGATI MICELIALI

Alcuni ceppi formano aggregati miceliali resistenti all'omogenazione e alla sonicazione

L'aggiunta di saccarosio (10%) è normalmente sufficiente ad eliminare il problema

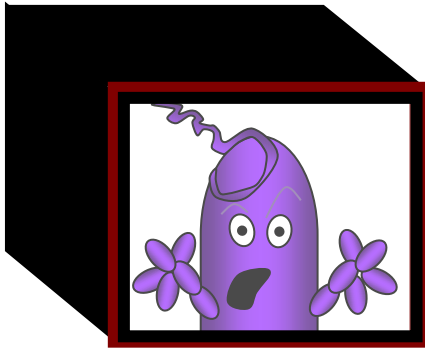
E' possibile che uno dei ceppi parentali produca sostanze
(antibiotici o altro) che possono uccidere l'altro

In questo caso va inattivato il parentale produttore per impedirne che rigeneri
ma senza danneggiare l'integrità dei protoplasti che devono donare DNA

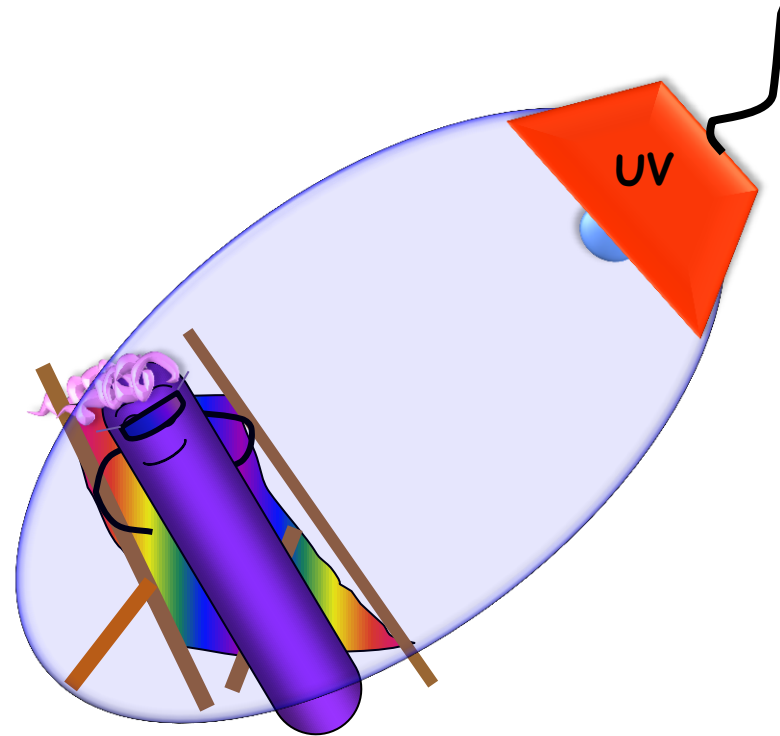
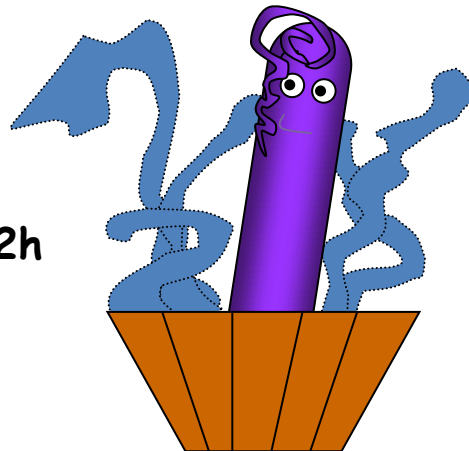
Si possono impiegare

CALORE

60 C 5'
(spesso eccessiva)



50 C 2h



UV (Durata
modulabile)

***Streptomyces* è soggetto a una
notevole instabilità genetica**

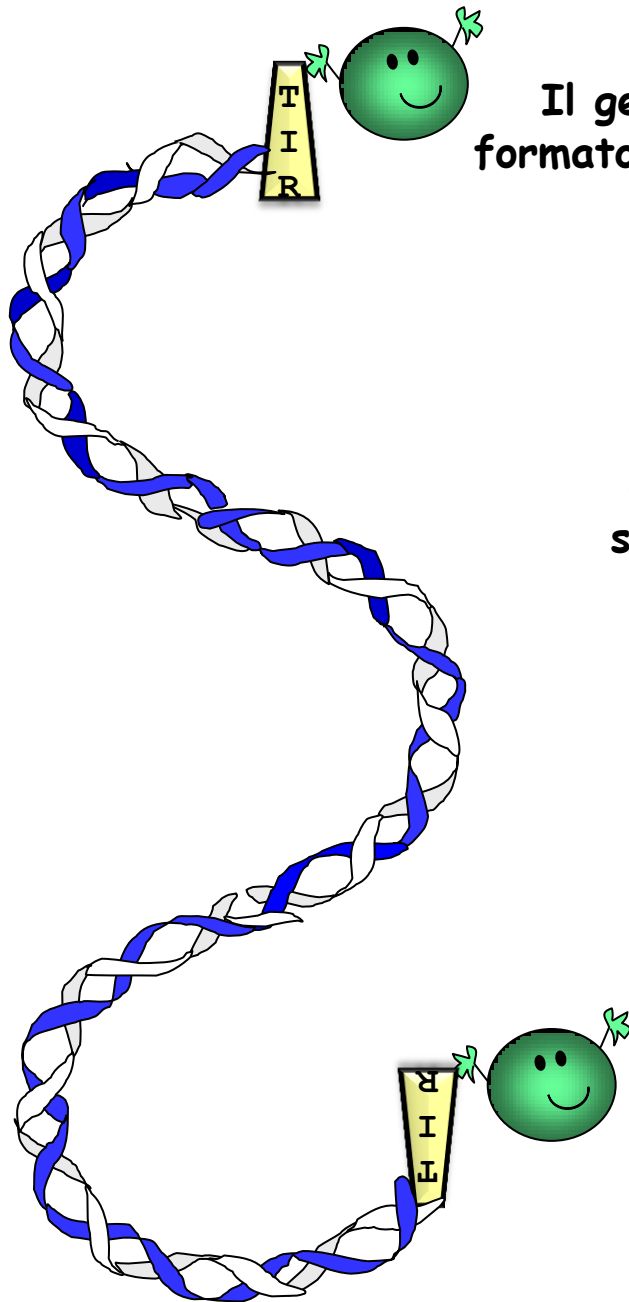
**La frequenza di mutazioni spontanee è nell'ordine di 10^{-4} to 10^{-2}
(~ 3 - 4 ordini di grandezza maggiori di quella tipica)**

**riguarda soprattutto geni correlati a metaboliti secondari, con l'eccezione
dello sviluppo di un'auxotrofia per arginina, (*argG* argininosuccinato sintetasi)**

**L'instabilità può spesso provocare la perdita della capacità di
sporulare, o di produrre tratti desiderabili, o di entrambe**

**I caratteri persi sono associati a delezioni di considerevoli
dimensioni nel cromosoma (decine di migliaia di kb)**

STRUTTURA DEL GENOMA



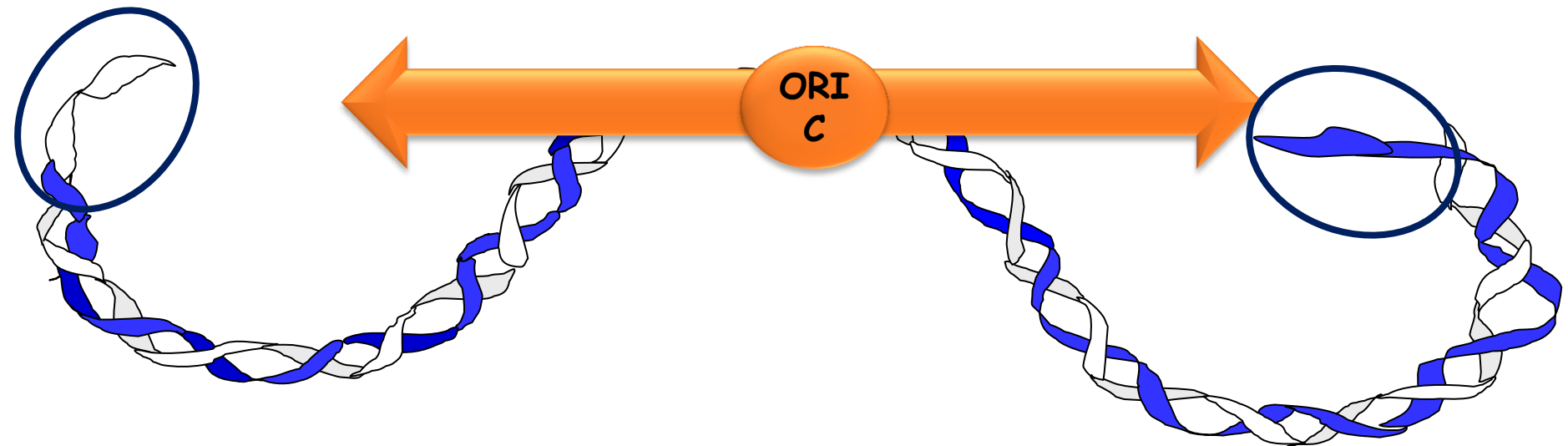
Il genoma degli streptomiceti è
formato da un solo cromosoma lineare

Con estremità caratterizzate da
sequenze ripetute invertite (TIR)

A cui si legano proteine
telomeriche

possiede un'unica origine di replicazione (*oriC*), ricca di A/T
localizzata nella regione centrale del cromosoma

OriC interagisce con *DnaA* in modo del tutto simile a
quello che si osserva in *E. coli*



La replicazione procede da *oriC* verso le estremità

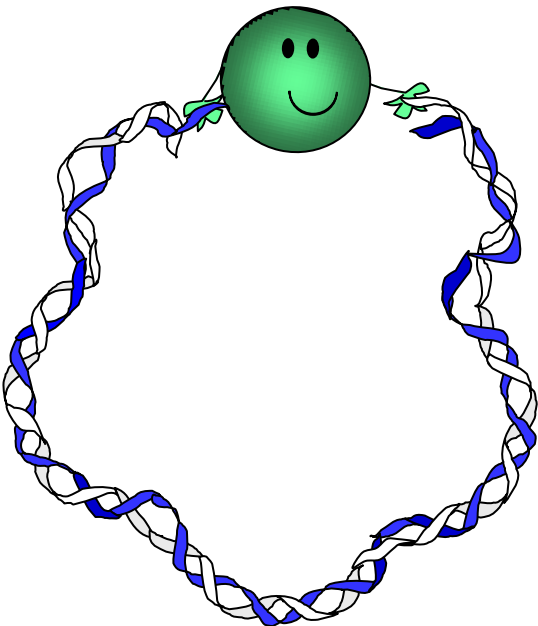
Ai telomeri, l'estremità 3' dei filamenti resta a singola elica

LE PROTEINE TELOMERICHE HANNO DIVERSE FUNZIONI

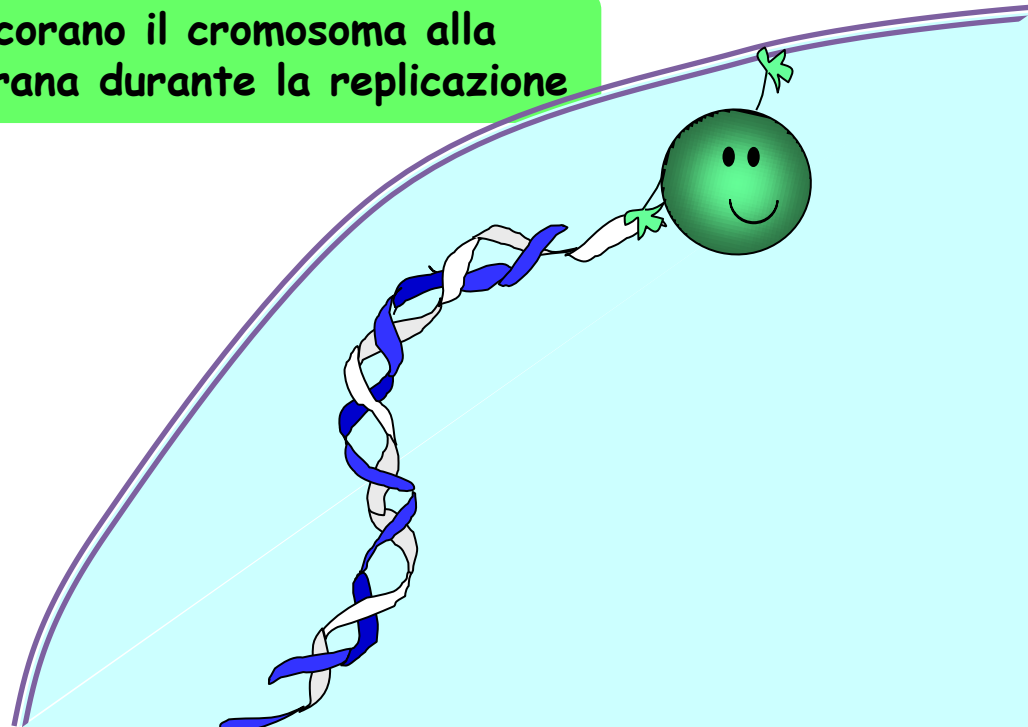
Fanno primer per la sintesi
del DNA alle estremità

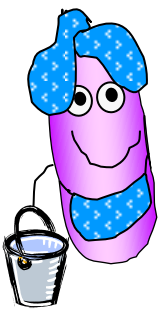


favoriscono l'interazione tra i
telomeri di un cromosoma a
formare strutture circolari



ancorano il cromosoma alla
membrana durante la replicazione





Nel CORE si addensano i geni correlati alle funzioni primarie della cellula

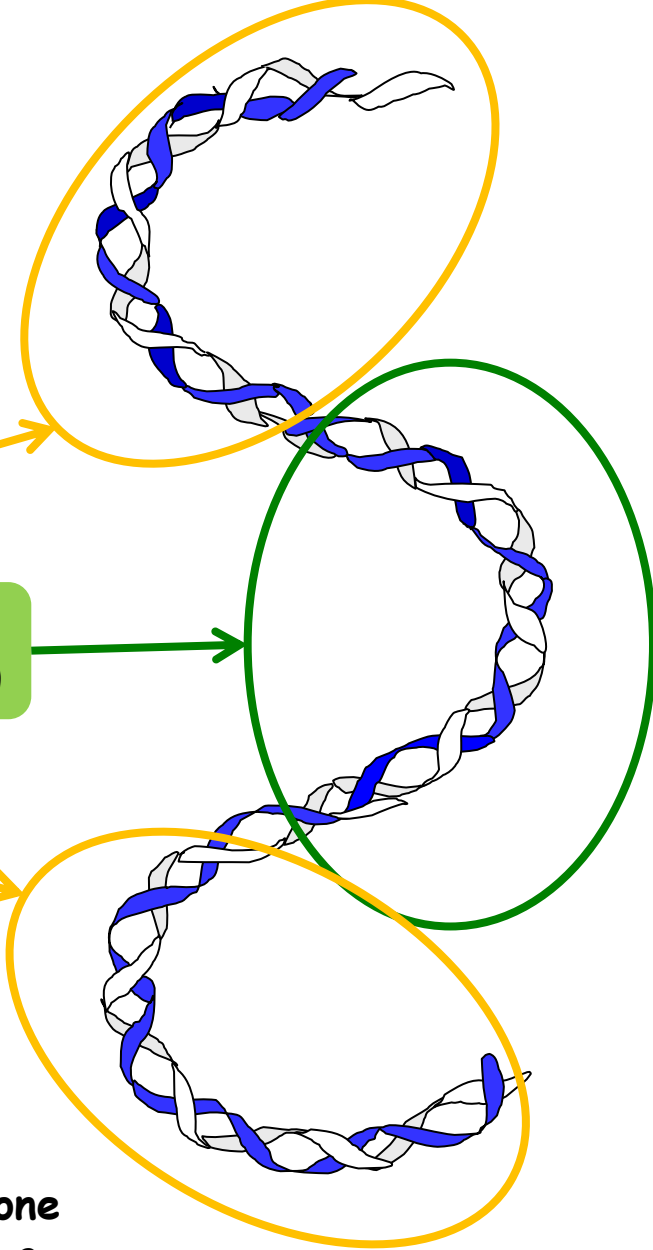
È la parte più antica, conservata tra le due specie di *Streptomyces* sequenziate e con altri attinomiceti

e regioni laterali (braccia)

il cromosoma ha una regione centrale (core)

le braccia sono più caratteristiche e probabilmente più recenti

Vi si trovano soprattutto geni connessi con la produzione di metaboliti secondari, risposte a stimoli ambientali, o che codificano enzimi idrolitici, e trasposoni



Una delle caratteristiche salienti degli streptomiceti è l'enorme variabilità

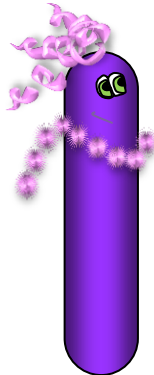
Tra ceppi della stessa specie

All'interno dello stesso ceppo, nel tempo
(Instabilità di alcuni caratteri)

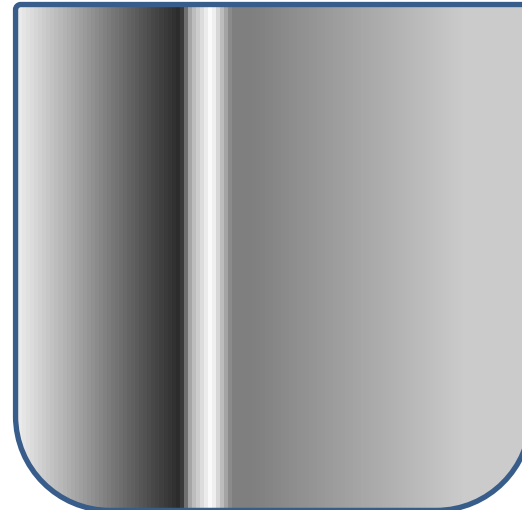
L'instabilità costituisce un problema per i ceppi industriali



È stata oggetto di studi approfonditi



È stata messa in correlazione con la frequente formazione di delezioni sul cromosoma



L'instabilità riguarda principalmente caratteri legati al metabolismo secondario, con l'eccezione dell'auxotrofia per arginina, molto frequente

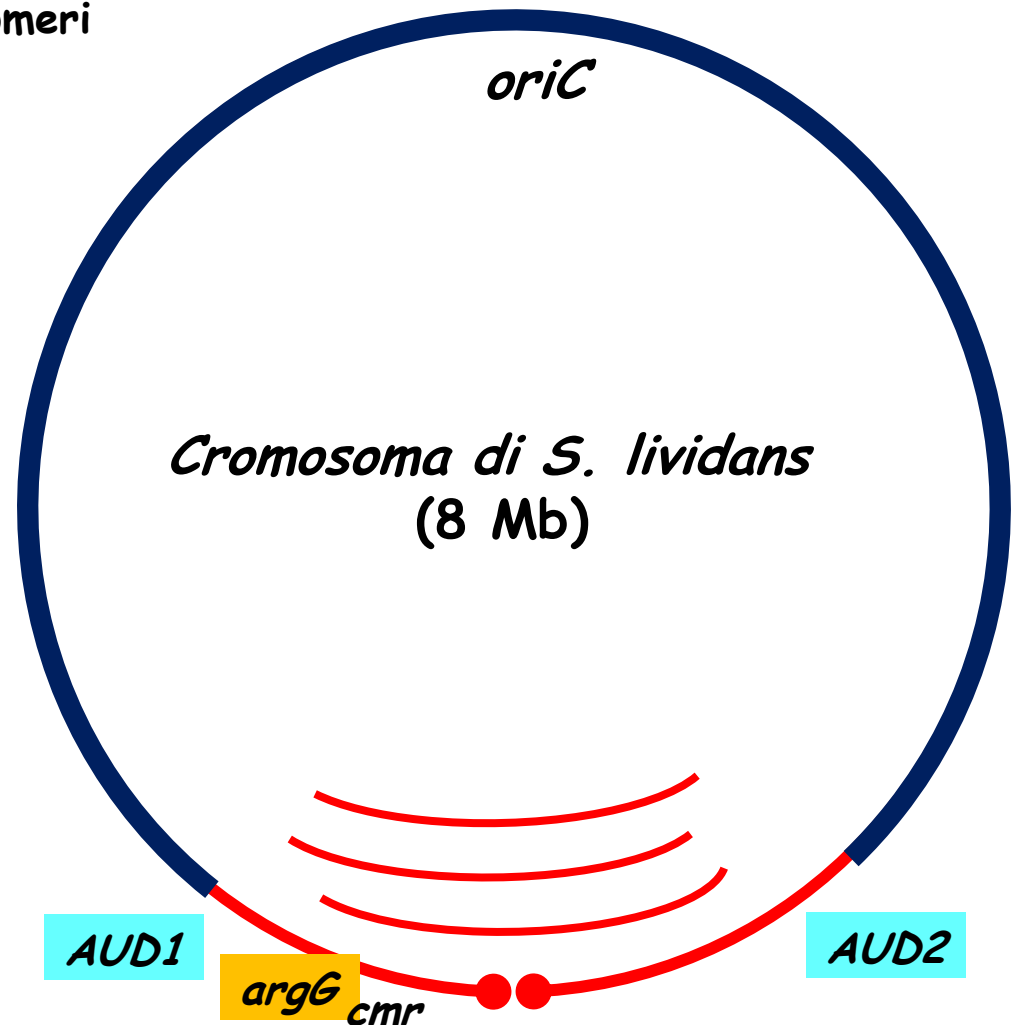
La caratteristica comune ai geni coinvolti è la localizzazione nei pressi dei telomeri

Tipica per il metabolismo secondario e condivisa da *argG*

Le delezioni riguardano spesso entrambe le estremità, lasciando supporre che il cromosoma possa circularizzare spontaneamente

Le delezioni sono accompagnate dalla presenza delle AUD (amplifiable units of DNA)

Spesso in tandem fino a diverse centinaia di copie (3-100 kb)



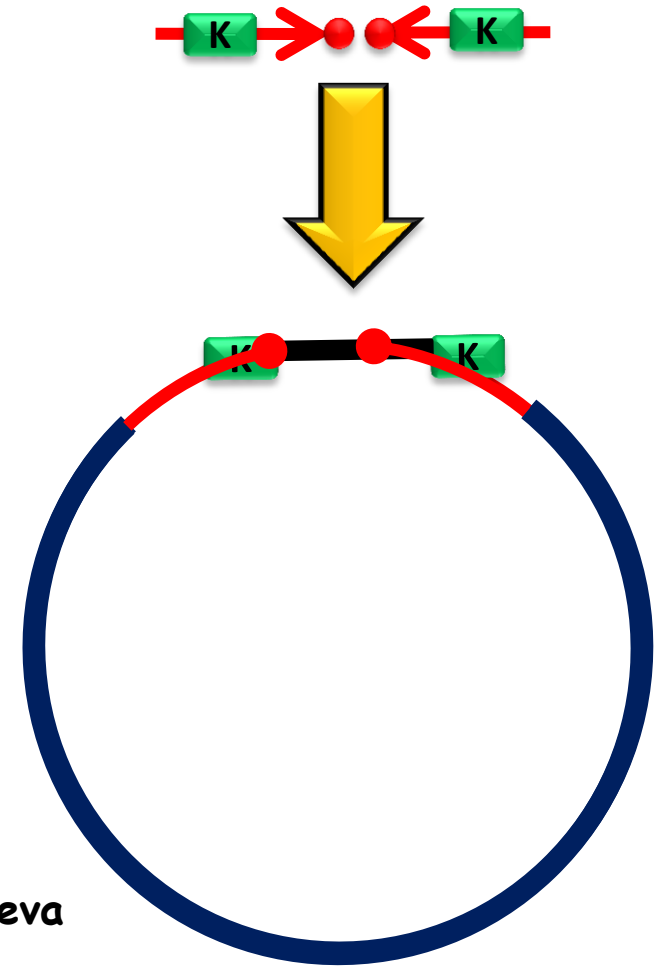
In un esperimento svolto per ottenere la
circularizzazione artificiale del cromosoma

È stato inserito il gene *aph* (resistenza alla
kanamicina) facendo ricombinare i telomeri

Il cromosoma circularizzato
restava stabile sotto kanamicina

Ma ricombinava rapidamente
in assenza di selezione

Finchè il cromosoma restava circolare il ceppo cresceva
male e aveva notevoli difficoltà a sporulare



E' possibile che una circolarizzazione stabile interferisca con la duplicazione del cromosoma, impedendo il riconoscimento dei terminatori

O che i telomeri di *Streptomyces* possano avere funzioni importanti per l'ancoraggio, la mobilità e la ripartizione dei cromosomi nelle cellule

Al momento la circolarizzazione artificiale non appare una strada facilmente percorribile per guadagnare in stabilità

Altre strategie proposte sono state



```
graph TD; A[Altre strategie proposte sono state] --> B[LO SPOSTAMENTO DI GENI ESSENZIALI NELLE BRACCIA PER PREVENIRE DELEZIONI]; A --> C[LA PREVENZIONE DELLA PERDITA DEI CLUSTER BIOSINTETICI DESIDERABILI MEDIANTE LO SPOSTAMENTO NEL "CORE"];
```

LO SPOSTAMENTO DI GENI ESSENZIALI NELLE BRACCIA PER PREVENIRE DELEZIONI

LA PREVENZIONE DELLA PERDITA DEI CLUSTER BIOSINTETICI DESIDERABILI MEDIANTE LO SPOSTAMENTO NEL "CORE"

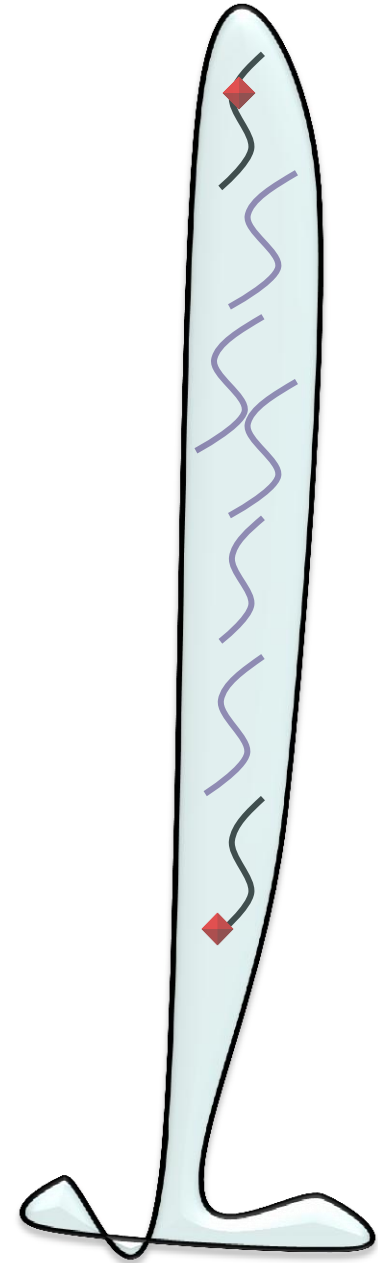
SPOSTARE GENI ESSENZIALI NON RISOLVE IL PROBLEMA

Questa strategia può essere utile per gli studi di genetica in cui si manipolano spore aploidi

Ma le colture in liquido delle fermentazioni industriali non sporulano

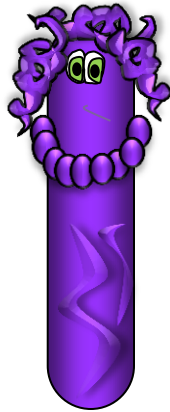
i nucleoidi nel micelio non sono isolati ma si trovano in cellule sinciziali

Di conseguenza genomi con delezioni in geni essenziali possono persistere perché complementati da genomi intatti presenti nel medesimo citoplasma

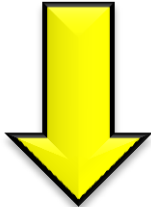


**SPOSTARE GENI IMPORTANTI
NELLA REGIONE DEL "CORE"**

Cluster biosintetico per
OSSITETRACICLINA
(*S. rimosus*)

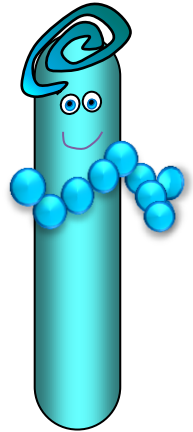


Localizzazione terminale

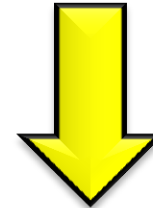


PERDITA MOLTO FREQUENTE

Cluster biosintetico per
ACTINORODINA
(*S. coelicolor*)



Localizzazione interna



MOLTO STABILE

Spostare i geni interessanti su localizzazioni più stabili
può essere una soluzione ma implica la creazione di un
ceppo ingegnerizzato per ogni singolo cluster

Inserire i geni in plasmidi avrebbe invece anche il
vantaggio di ottenere un maggior livello di espressione

CLONAZIONE GENICA IN STREPTOMYCES

Vantaggi: grande capacità di secrezione
tecniche di manipolazione disponibili

PROBLEMI

La natura filamentosa pone problemi di natura fisica nel bilancio e nel controllo delle condizioni di crescita all'interno dei fermentatori

i sistemi di restrizione costringono spesso a usare ceppi di *E. coli* particolari per allestire il DNA

i ceppi studiati e utilizzabili sono ancora pochi
e i sistemi in gran parte poco sperimentati

La regolazione è molto complessa



La secrezione di aminopeptidasi può danneggiare il prodotto (in modo sequenza-dipendente)

Problema osservato, per esempio, con l'espressione del TNFa da cui venivano rimossi 4 aa all'N-terminus

Questo inconveniente può essere limitato

con la creazione di ceppi deficienti

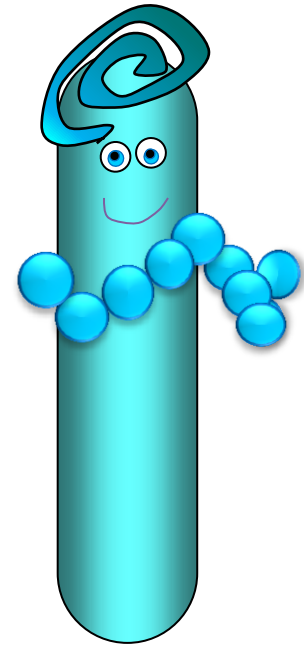
posizionando oculatamente sequenze segnale specifiche al 5' dei geni da esprimere

in modo da fornire un substrato per le aminopeptidasi extracellulari conosciute di *Streptomyces*

SCELTA DELLA SPECIE

Streptomyces è un gruppo molto vasto → il problema della scelta delle specie idonea è importante

la specie più caratterizzata è *S. coelicolor* (ceppo A3-2)



Ma, come la maggior parte degli streptomiceti, ha sistemi di restrizione potenti che formano un barriera quasi insormontabile per l'uso di plasmidi shuttle propagati in *E. coli*

per la produzione di proteine eterologhe è stato usato quasi esclusivamente *S. lividans* 66

S. lividans

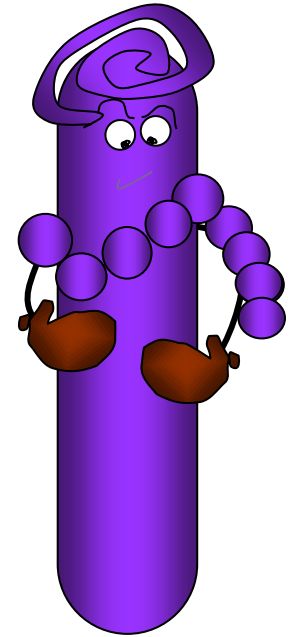
manca dei sistemi di restrizione

Ha un livello particolarmente basso di
attività proteolitica esocellulare endogena

conserva la caratteristica degli streptomiceti di
produrre notevoli quantità di proteine extracellulari

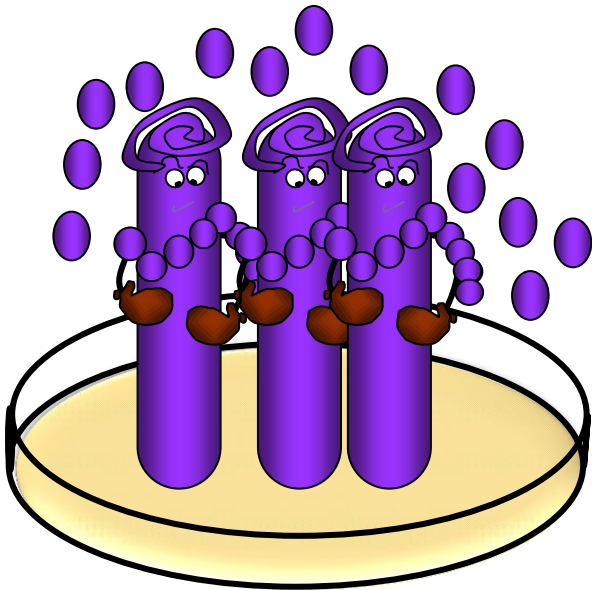
Due mutanti di S.lividans 66 (ceppi TK64 e 3104)
Sono stati curati dai plasmidi naturali SLP2 e SLP3

TK64 e 3104 hanno due marcatori cromosomiali utili:
pro-2 (auxotrofia per la prolina) e
str-6 oppure spc-1 (rispettivamente resistenza a streptomicina e spectinomicina)

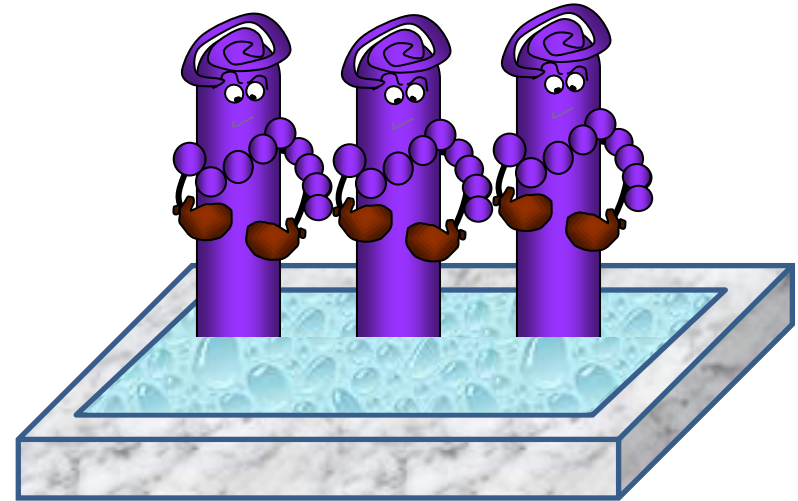


S. lividans 66 e i ceppi
che ne derivano

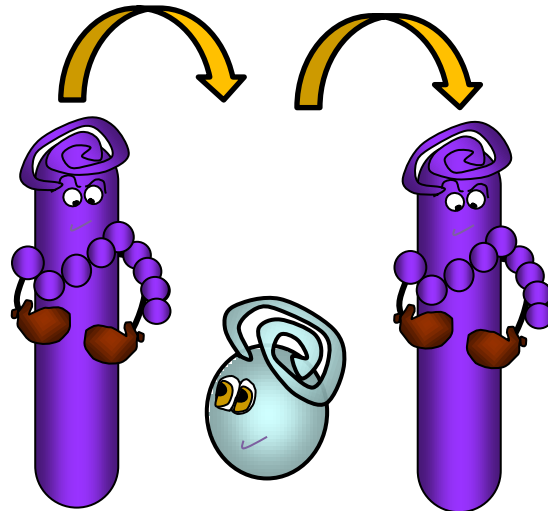
crescono e sporulano
bene sui terreni solidi

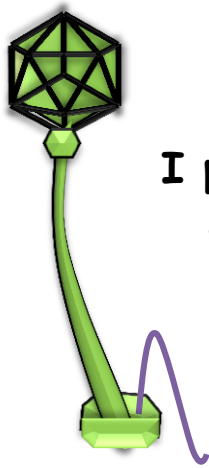


Si convertono facilmente in protoplasti
che rigenerano prontamente

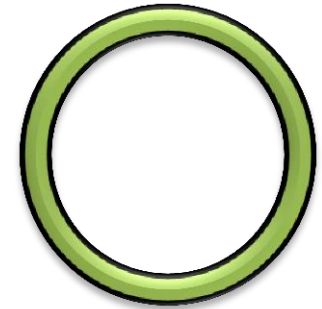


Crescono bene nei terreni
liquidi (senza sporulare)



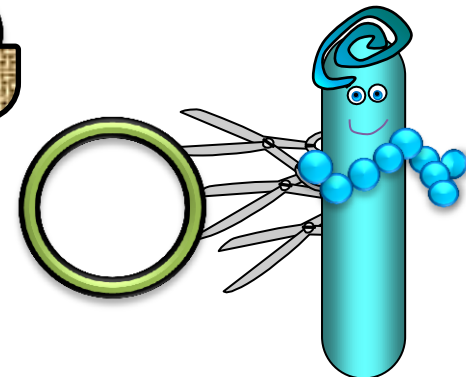
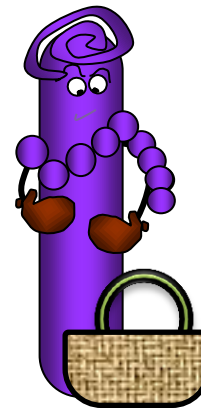


I protoplasti si trasformano bene con i plasmidi e si transfettano agevolmente con il fago ϕ C31



Non hanno repliconi noti che interferiscano con la replicazione o l'analisi di vettori plasmidici o fagici usati come vettori di clonazione

non restringono il DNA estraneo proveniente da una grande varietà di donatori, inclusi molti altri *Streptomyces*



A differenza di molti altri streptomiceti, tra cui *S. coelicolor*

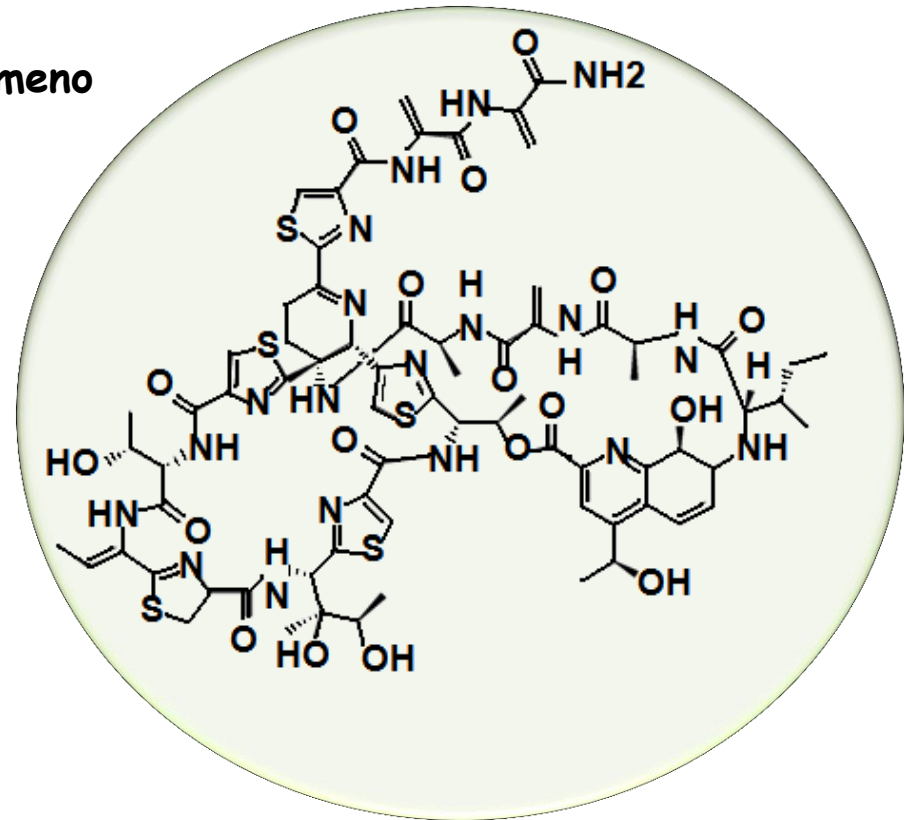
POSSIBILI SELEZIONI

Gli Streptomiceti sono tra i principali produttori di antibiotici, di conseguenza sono insensibili alla maggior parte di essi

La scelta di marcatori per la selezione è meno agevole che per *E. coli* o *Bacillus*

il principale marcatore di resistenza usato per la selezione dei ricombinanti in *S. lividans* è la resistenza al tiostreptone

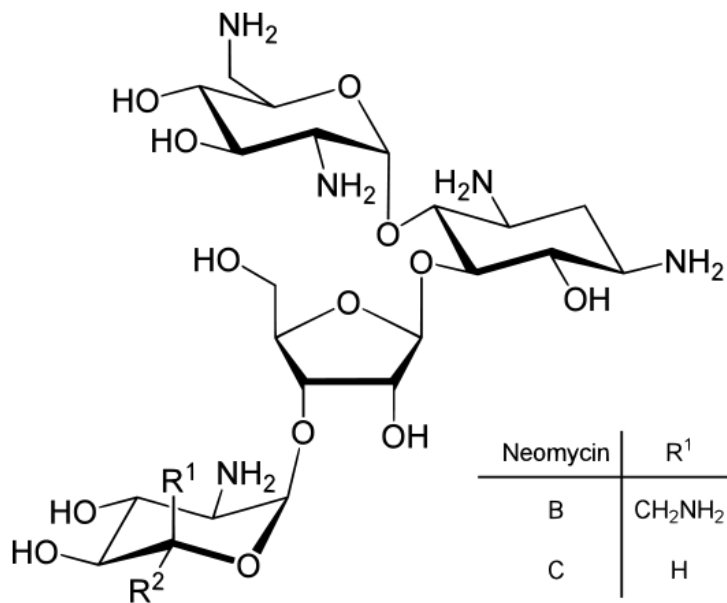
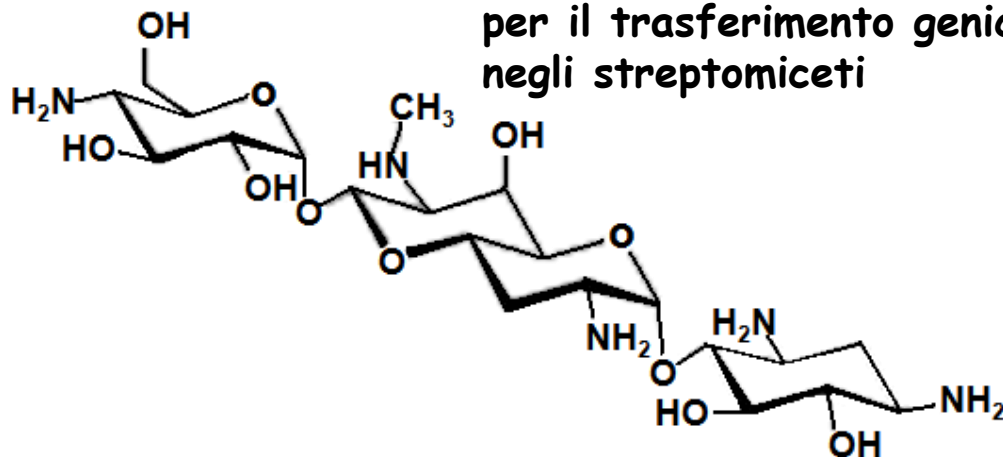
I tiostreptoni (oligopeptidi ciclici) si legano ai ribosomi bloccando le funzioni connesse con il sito A



Il gene per la resistenza è derivato da *S. azureus*, una delle specie produttrici di questi antibiotici

Apramicina (Nebramicina II) antibiotico aminoglicosidico (aminociclitol) a largo spettro d'azione

Farmaco veterinario, si usa come marcatore
per il trasferimento genico nei micobatteri e
negli streptomiceti



Neomicina: antibiotico aminoglicosidico
con spettro d'azione ristretto e
tossicità elevata

Neomycin	R ¹	R ²
B	CH ₂ NH ₂	H
C	H	CH ₂ NH ₂

PROMOTORI

I frammenti di DNA con attività di promotore in *Streptomyces* possono essere classificati in due categorie

Simili a $E\sigma_{70}$

Diversi da $E\sigma_{70}$

Il primo gruppo mantiene, almeno in parte, la struttura dei promotori σ_{70} di *E. coli*, con sequenze definite a distanze fisse (-10 e -35) a monte del +1

Consensus dei promotori $E\sigma_{70}$ -like

-35: T-T-G-A-C-(Pu)

-10: T-A-g-(Pu)-(Pu)-T

In questo gruppo di promotori se ne trovano diversi che sono funzionali in *S. lividans* e in *E. coli* (es. XP55-p o SEP2).

SECONDO GRUPPO DI SEQUENZE DI PROMOZIONE

È il più vasto e non è funzionale in *E. coli*



Caratterizzato da motivi di riconoscimento multipli, sovrapposti o in tandem, per i fattori σ implicati nella trascrizione specifica dei geni regolati da fattori temporali, di sviluppo o nutrizionali

Il promotore *aph*, formato da due sequenze in tandem, è uno dei più potenti promotori costitutivi di questo tipo

Isolato dal gene che codifica l'aminoglicoside fosfotransferasi e che conferisce la resistenza alla neomicina in *S. fradiae* (produttore)

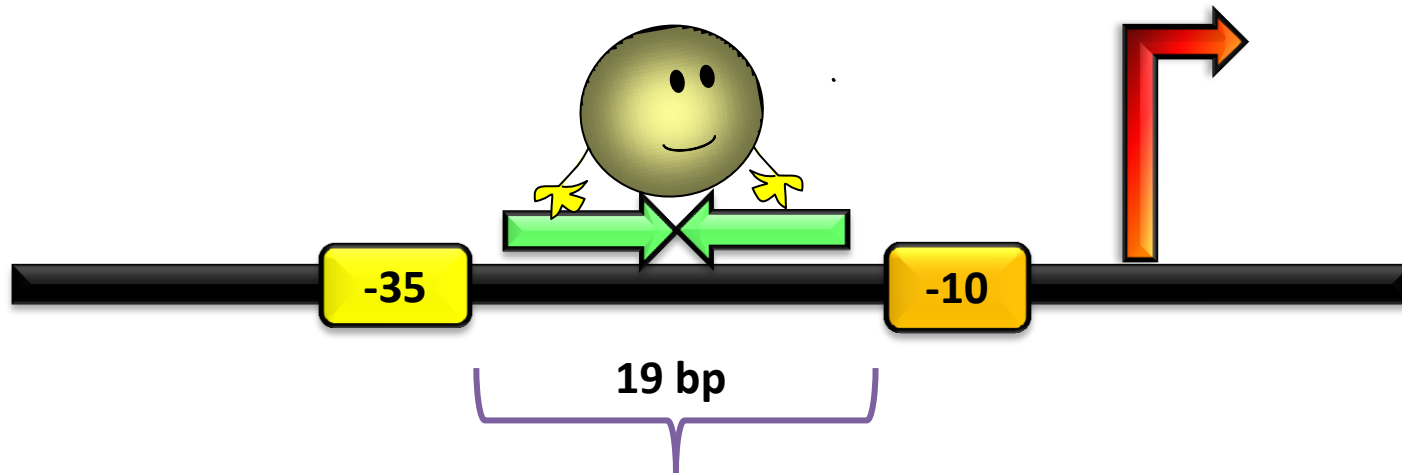
Anche il promotore *ermEup* (resistenza all'eritromicina in *Saccharopolyspora erythraea*) è costitutivo, ha caratteristiche simili a quelle di *aph* ed è considerato uno dei promotori più forti in *Streptomyces*

Il promotore *STI-II*, costitutivo, deriva dal gene per l'inibitore di una serina proteasi di *S. longisporus* ed è stato usato con successo per esprimere derivati solubili del recettore cD4 umano (resa fino a 300 mgL⁻¹)

PROMOTORI INDUCIBILI

Il promotore PtipA è inducibile con il tiostreptone e regolato attraverso la pressione osmotica

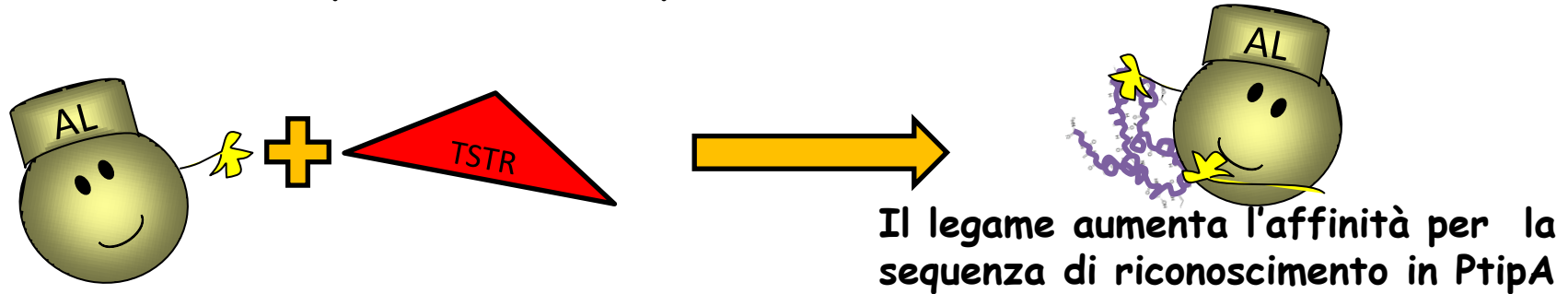
Il suo attivatore trascrizionale TipAL si lega a un IR, situato tra gli esameri -10 e -35, separati da 19 bp



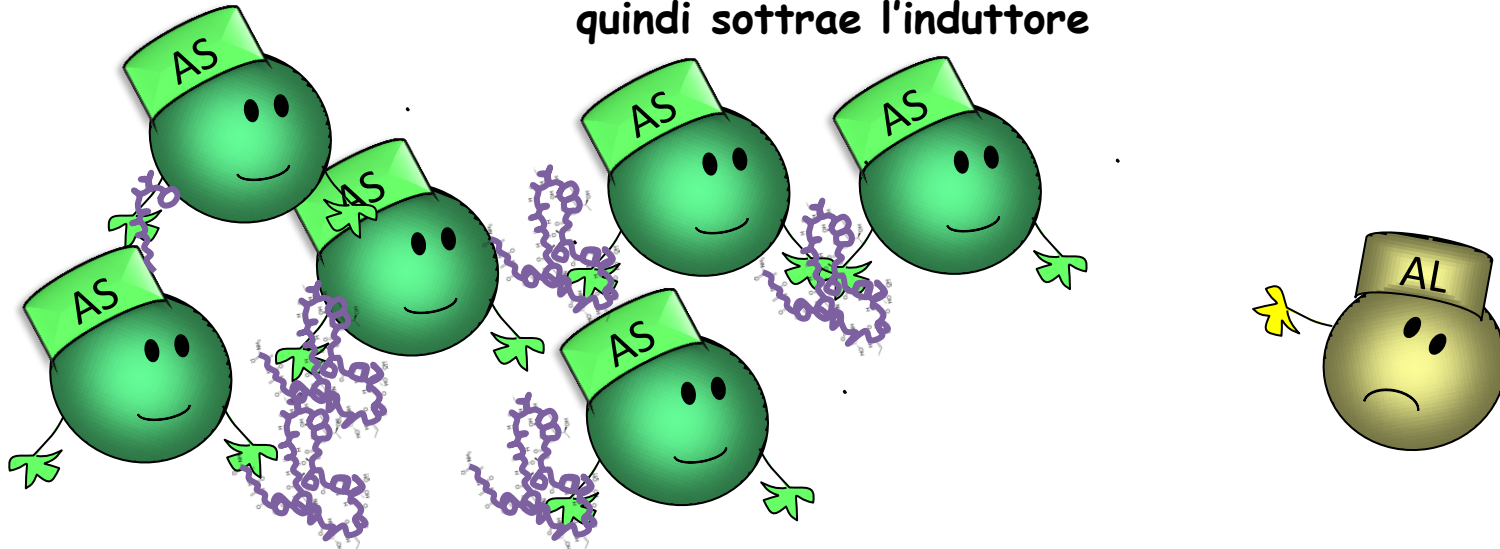
Nel suo contesto naturale questo promotore controlla la sintesi di un mRNA che codifica due proteine: TipAL (31kDa) e TipAS (17kDa)

TipAL è un attivatore trascrizionale regolato in modo autogeno, che attiva l'espressione di *tipA*

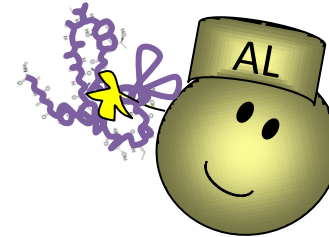
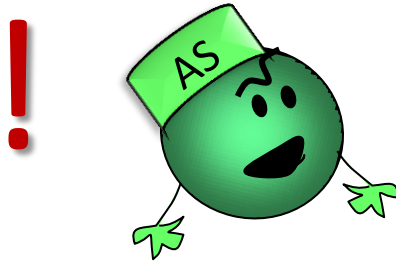
Il tiostreptone si lega a TipAL già in dosi $>10^{-7}M$, $<10^{-9}M$ molto inferiori a quelle necessarie per l'attività antibiotica



TipAS modula l'attivazione perché condivide con TipAL il dominio C- term di legame al tiostreptone ed è prodotta in eccesso molare rispetto a TipAL a cui quindi sottrae l'induttore



L'aumento degli osmoliti nel terreno, però modifica
la struttura della regione di riconoscimento



Il cambio di conformazione rafforza il
legame del promotore con TipAL



l'azione di TipAS diventa influente

Alzare l'osmolarità
del terreno



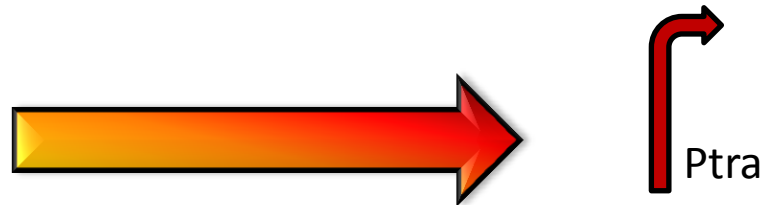
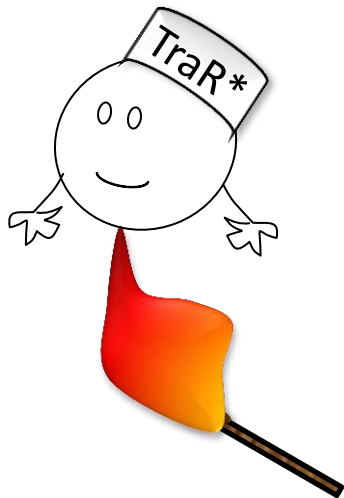
Permette di ottenere un'espressione
forte e duratura
anche senza aggiunte di tiostreptone

Un altro sistema regolabile è quello usato in una cassetta di espressione basata sul promotore *Ptra*

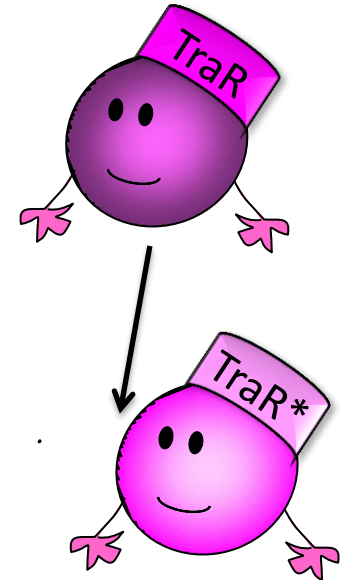
Ptra trascrive l'operone necessario al trasferimento coniugativo del plasmide SN22 di *S. nigrifaciens*

Il promotore è molto forte e viene inibito dal prodotto di *traR*, un repressore autoregolato codificato dal plasmide

Nel sistema di espressione il repressore è stato modificato rendendolo temperatura-sensibile

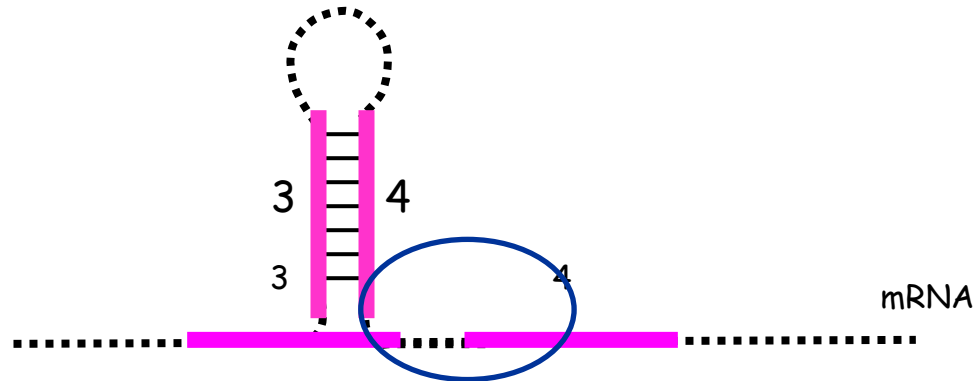


Inattivando il repressore con la temperatura si ottiene indirettamente, l'attivazione del promotore

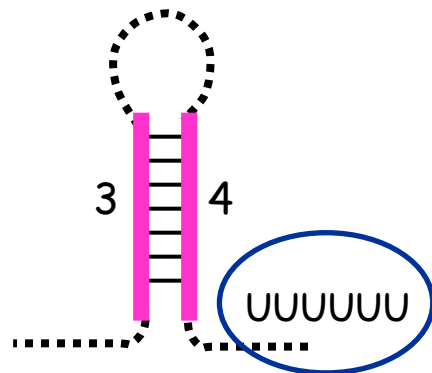


TERMINATORI

i terminatori trascrizionali di *Streptomyces* sono simili a quelli di altri batteri con palindromi lunghe, imperfette, in grado di formare forcine



A differenza dei terminatori rho- indipendenti di *E. coli*, a cui sono simili, mancano delle sequenze poliU



SEGNALI PER LA TRADUZIONE

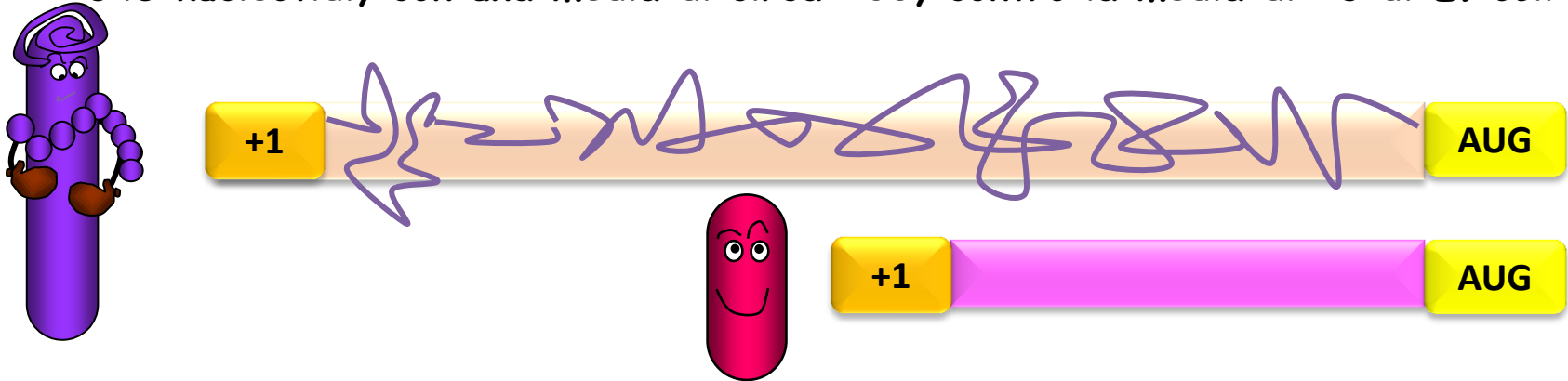
La struttura degli mRNA noti degli streptomiceti è diversa da quelle osservate in *E. coli* e *Bacillus*

Diversamente da altri batteri, alcuni geni di *Streptomyces* sono tradotti da trascritti in cui lo start point coincide con la prima base del codone di inizio per la traduzione

Questo gruppo di geni include *aph* e *ermE*, i cui promotori sono molto forti e usati spesso nei sistemi di espressione

Quando esiste, la regione non tradotta del mRNA in *Streptomyces*, è di lunghezza molto variabile ma comunque maggiore di quella di *E. coli*

La distanza tra l'inizio della trascrizione e la regione codificante spazia da 9 a 345 nucleotidi, con una media di circa 100, contro la media di 23 di *E. coli*



Le regioni più lunghe osservate finora sono di 298, 335 e 345 bp; in questi casi la regione tra +1 e AUG è ricca di strutture secondarie, implicate nelle regolazioni, e/o di antiterminatori

Il consensus SD nei geni degli streptomiceti è **(A/G)GGAGG**

Le sequenze SD si trovano 5-12 nucleotidi a monte del codone di inizio (media 8,5) (*E. coli* 5-9 e *Bsub* 7-14)

Geni eterologhi con SD deboli, tuttavia, sono espressi in modo soddisfacente in *Streptomyces* es. *ampC* TATGGAA

i ribosomi di streptomiceti non richiedono una complementarietà molto pronunciata tra SD e l'estremità 3' del 16S rRNA

SEGNALI PER LA SECREZIONE E FATTORI DI OSPITE

I peptidi segnale per la secrezione in *Streptomyces* si conformano alle regole generali descritte per i gram-positivi

Ma in genere le SP di *Streptomyces* sono anche più lunghe di quelle di *Bacillus*

Fusioni con geni particolarmente espressi non sono state tentate a livello sistematico in *Streptomyces* ma un paio di tentativi sembrano incoraggianti

I sistemi di espressione meglio sviluppati in *Streptomyces* utilizzano SP da geni nativi ben espressi

proteine inibitrici della subtilisina di
S. albogriseolus, *S. venezuelae* e *S. longisporus*,

proteasi B di *S. griseus*

tendamistatina di *S. tendae*
(inibitore della alfa-amilasi)

USO DEI CODONI

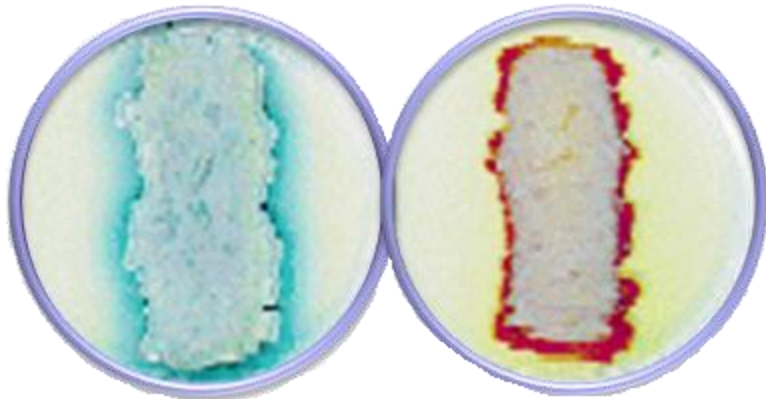
Il genoma di *Streptomyces* ha un GC% molto alto (70%) correlato a un uso dei codoni diverso da quello di altri microrganismi

Con una sensibile deviazione verso i codoni ricchi di GC

TTA e CTA si trovano solo in pochi geni

Uno dei geni bld (bldA) codifica l'unico tRNA UUA del cromosoma

Nei mutanti bld (calvi) mancano funzioni cruciali perché tra i pochi geni in cui si trova questo codone ci sono regolatori importanti:



adpA: attivatore trascrizionale di geni necessari per il metabolismo secondario e il differenziamento morfologico

I repressori dei geni per la sintesi degli antibiotici actinorodina e undecilprodigiosina

PLASMIDI

La maggior parte dei plasmidi sviluppati per l'espressione in *S. lividans* sono vettori shuttle *Streptomyces* /*E. coli*, ottenuti dal replicone pIJ101



pIJ101 è un plasmide coniugativo purificato dal ceppo di *S. lividans* ISP5434 e con un ampio spettro di ospite in *Streptomyces*

È estremamente stabile e mantiene un alto numero di copie, anche in assenza di selezione, in diverse specie di streptomiceti

Si introduce nell'ospite trasformando i protoplasti e i metodi di rigenerazione disponibili sono efficienti

pIJ101 si replica a cerchio rotante grazie al prodotto del gene *rep* presente sul plasmide

Rep introduce un'interruzione a livello di *DSO* (origine a dsDNA) per dare origine alla replicazione a ssDNA

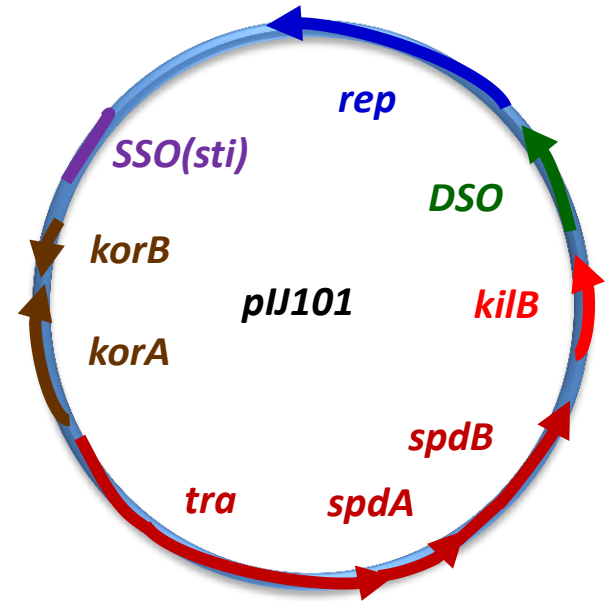
(*SSO* o *sti*) è l'origine ssDNA da cui ha inizio la sintesi del secondo filamento

tra, *spdA*, *spdB* fanno parte di un operon regolato negativamente da *KorA* (repressore di pIJ101) e sono deputati alla trasmissione del plasmide

kiB è trascritto dal proprio promotore, represso da *KorB* che ne previene l'iperespressione (l'accumulo di *KilB* è letale)

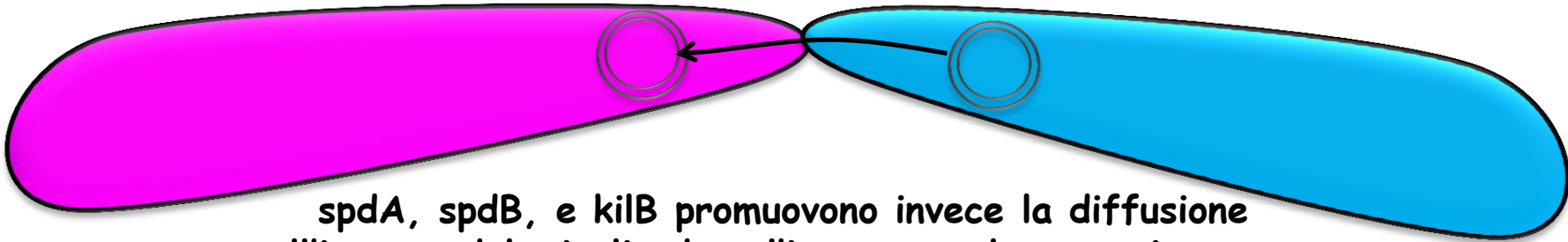
Quando si attiva il promotore dell'operone di trasmissione, tuttavia la trascrizione prosegue anche su *kiB*, co-esprimendolo

tra, *spdA*, *spdB*, e *kiB* formano un operone in cui uno stretto controllo (*KorB*) sul gene distale è sovrapposto sulla regolazione coordinata (da parte di *KorA*)

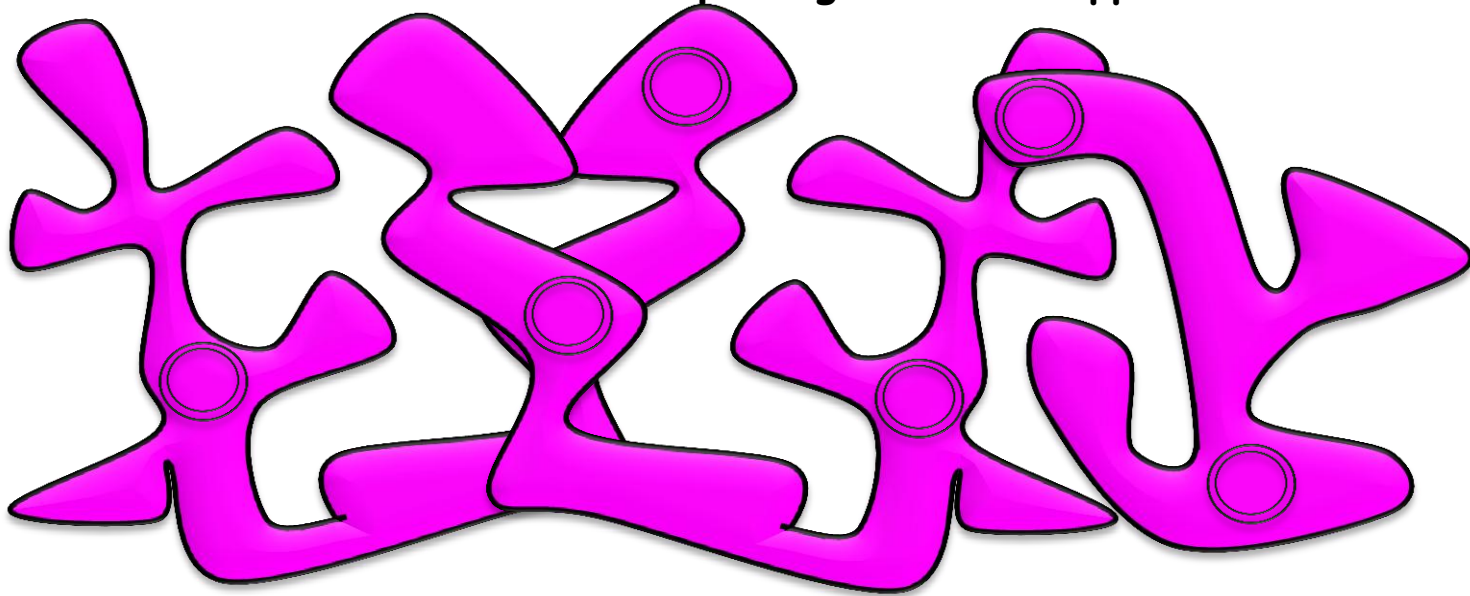


Nell'operone di trasmissione

Il gene tra provvede al trasferimento efficiente per coniugazione, tra miceli diversi



spdA, spdB, e kilB promuovono invece la diffusione all'interno del micelio dopo l'ingresso nel ceppo ricevente

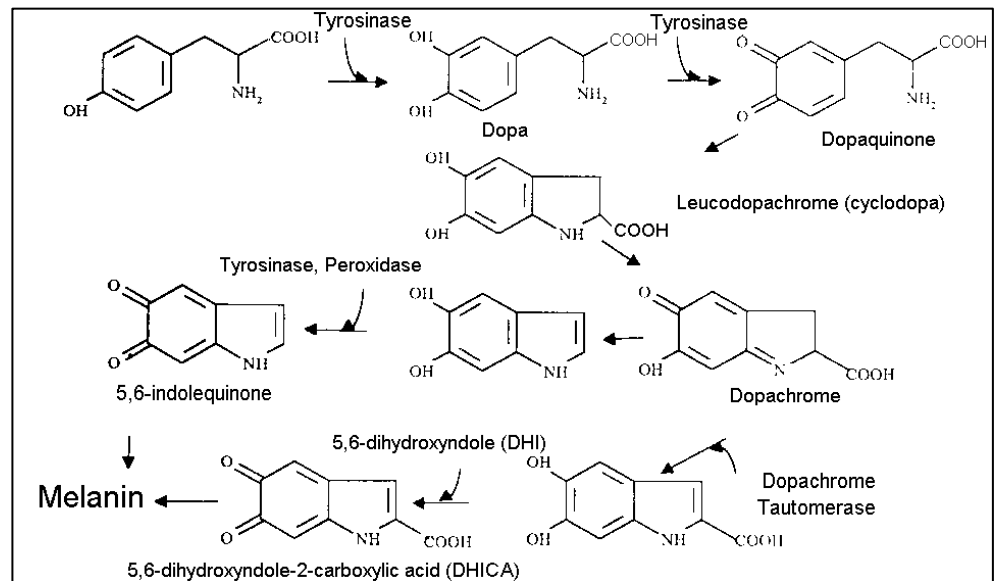
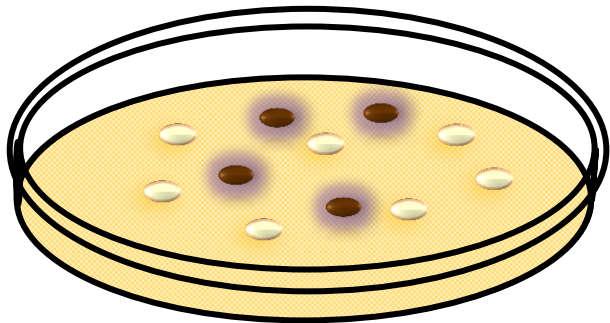


La coniugazione di *Streptomyces* è particolare e coinvolge il trasferimento di dNA a doppia elica

Il meccanismo preciso non è chiaro ma prevede il contatto tra gli apici delle ife aeree

Dal plasmide naturale pIJ702, alto numero di copie, non coniugativo, sono stati ottenuti molti vettori

pIJ702 porta il gene per la resistenza al tiostreptone (*tsr*) e l'operone *mel* di *Streptomyces antibioticus*, che codifica una tirosinasi da cui dipende la produzione di melanina



Nell'operone si trovano tre siti di clonazione che permettono di ottenere l'inattivazione inserzionale di *mel* (selezione bianco/nero)

L'uso di plasmidi multicopie non sempre permette di ottenere il prodotto

TOSSICITA'

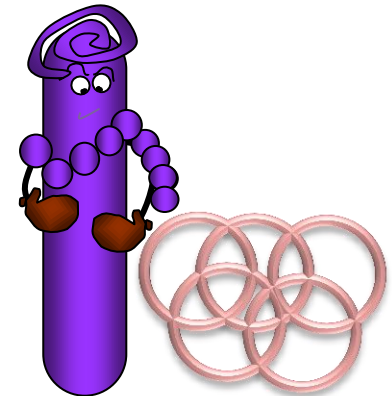
DELEZIONI

RIARRANGIAMENTI

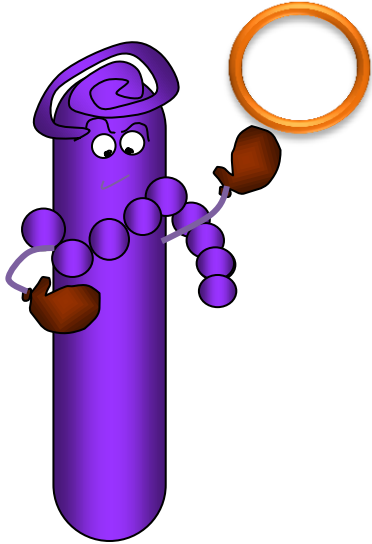


Dal plasmide naturale SP1 2, a basso numero di copie, sono stati ottenuti altri vettori

Il più noto è pIJ61, coniugativo, a spettro d'ospite ristretto, codifica la resistenza alla neomicina e, in *S. lividans*, raggiunge circa 5 copie per cellula

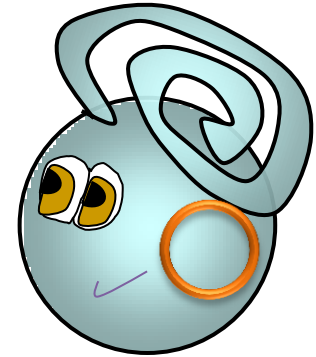


Su pIJ61 sono presenti molti siti unici, idonei per la clonazione, ma senza il vantaggio dell' inattivazione inserzionale



Le cellule integre non sono trasformabili

bisogna ricorrere alla trasformazione dei protoplasti, come per *B. megaterium*



La frequenza di trasformazione è buona con i plasmidi entro le 20 kb;
si abbassa con l'aumentare della massa del plasmide ed è molto bassa
se si usa DNA cromosomico

per trasformare con DNA genomico è utile includerlo in liposomi e usare
questi nella tecnica di fusione con i protoplasti

trasformazione con plasmidi
transfezione con batteriofagi



richiedono l'introduzione
di DNA nei protoplasti

molti streptomiceti possiedono potenti sistemi di restrizione che abbassano il rendimento di trasformazione (es. *coelicolor* degrada i DNA con N6-metiladenina e 5-metilcitosina) con altri actino non si riesce a ottenere e rigenerare protoplasti con efficienza sufficiente

si ricorre sempre più spesso quindi a coniugazioni intergeneriche con *E. coli* (ceppi particolari che aggirano il rischio di restrizioni)

Per molto tempo si è ritenuto che una coniugazione tra didermi e monodermi non fosse possibile

Verso la fine degli anni '80 è stata invece dimostrata la possibilità di trasferire DNA, per coniugazione, da *E. coli* a diversi batteri monodermi

Streptococcus

Bacillus

Enterococcus

Lactococcus

Listeria

Ma non *Streptomyces*

i plasmidi usati per i primi esperimenti non erano idonei ed è stato necessario costruire plasmidi shuttle idonei e i primi successi sono stati conseguiti già nel 1989

Da allora il processo è si è dimostrato funzionale in diverse specie di *Streptomyces* ma anche in *Saccharopolyspora* spinosa e vari ceppi di altre *Actinomycetales*

Sono stati costruiti molti vettori di clonazione che non si replicano in *Streptomyces* ma possono integrarsi nel cromosoma in corrispondenza del sito di attacco del batteriofago ϕ C31

Questi vettori sono mobilizzati grazie alle funzioni coniugative di altri plasmidi

pRK2: plasmide criptico a largo spettro d'ospite di *E. coli*, da cui deriva il frammento oriT (origine di trasferimento) necessario per la trasmissibilità usato anche in altri vettori

pUZ8002 ha una mutazione in oriT: la sua efficienza di trasferimento per coniugazione è 1000 volte inferiore a quella di RK2 ma mobilizza altri plasmidi con molta efficienza

Con la coniugazione intergenerica si è ottenuta l'integrazione di cluster biosintetici per antibiotici nel sito di integrazione del batteriofago ϕ C31, con buoni risultati, in diverse specie di *Streptomyces* e in *Saccharopolyspora erythraea*

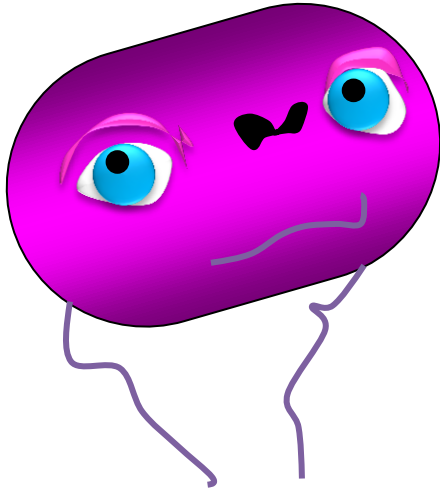
**Il trasferimento per coniugazione di un plasmide o di un cosmide
in *S. coelicolor* è limitato da due fattori**

**1) La coniugazione intergenerica si può ottenere solo se il vettore
contiene l'origine di trasferimento (oriT) derivata dal plasmide RK2**

**2) Il costrutto deve essere propagato in un
ceppo che non metili il proprio DNA**

**E che eluda quindi i meccanismi di restrizione metile-specifici che alcuni
streptomiceti impiegano per difendersi dall'introduzione di DNA estraneo**

**Molte specie di Streptomiceti, infatti, restringono il DNA
metilato in N6-metiladenina e 5-metilcitosina**



Un ceppo molto usato per le coniugazioni intergeneriche è **ET12567** (*dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM Cm^R*)

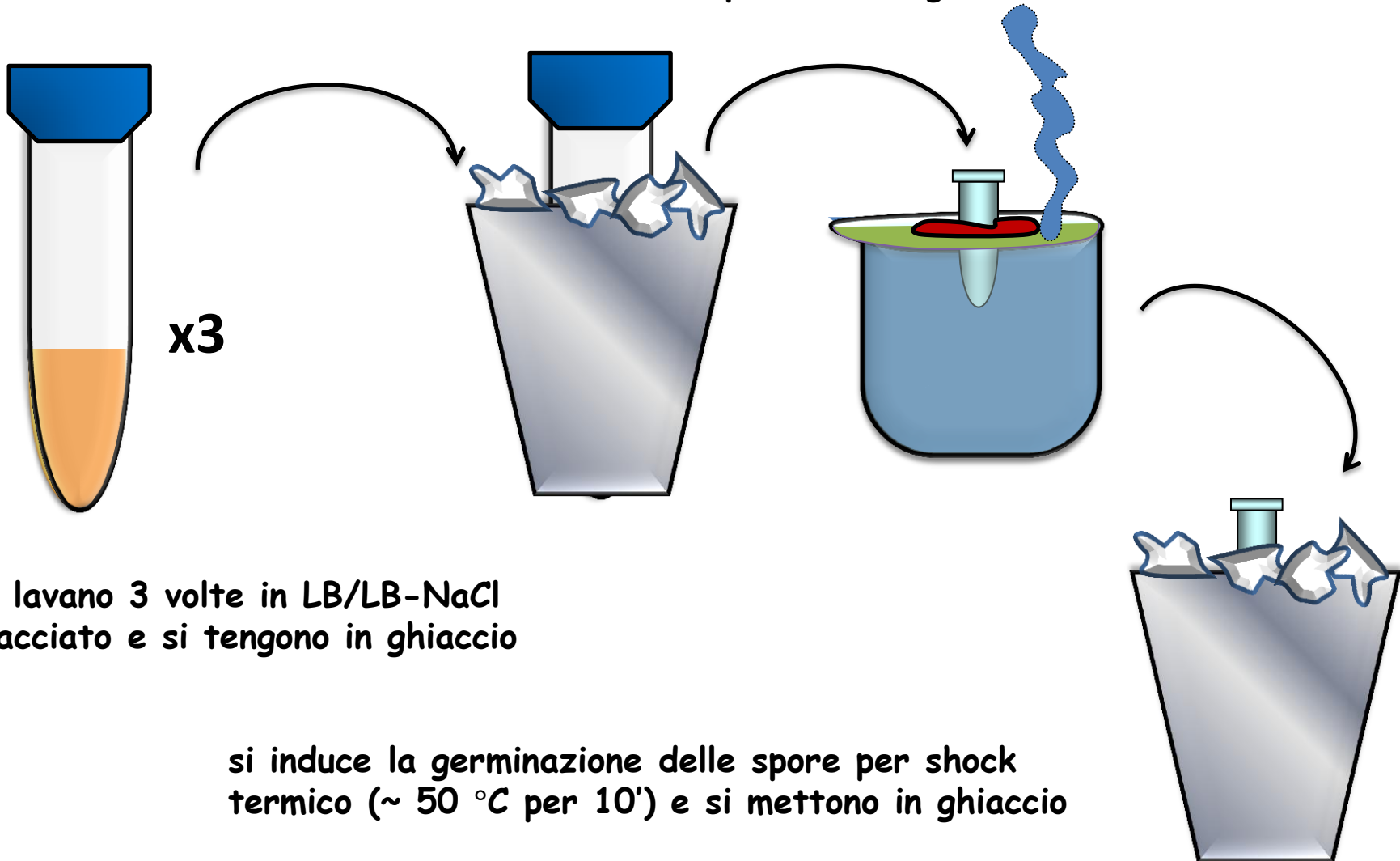
Uno svantaggio nell'uso di ET12567 è il suo tasso di crescita: il tempo generazionale è maggiore di quello di DH5a

Le subcolture quindi necessitano di tempi più lunghi (fino a 4h) e le piastre devono essere lasciate a incubare qualche ora in più

Se il ceppo di streptomicete che si intende utilizzare non possiede sistemi di restrizione si possono usare altri ceppi come per es. DH5a

In ogni caso deve essere presente un plasmide con *oriT*: molto usato pUZ8002 che rende anche possibile la mobilizzazione in trans dei vettori difettivi per il gene *tra*

Le cellule di *E. coli* vanno preparate per la coniugazione raccogliendo la crescita di una brodocoltura di 18-24 h per centrifugazione a freddo



Si lavano 3 volte in LB/LB-NaCl ghiacciato e si tengono in ghiaccio

si induce la germinazione delle spore per shock termico (~ 50 °C per 10') e si mettono in ghiaccio

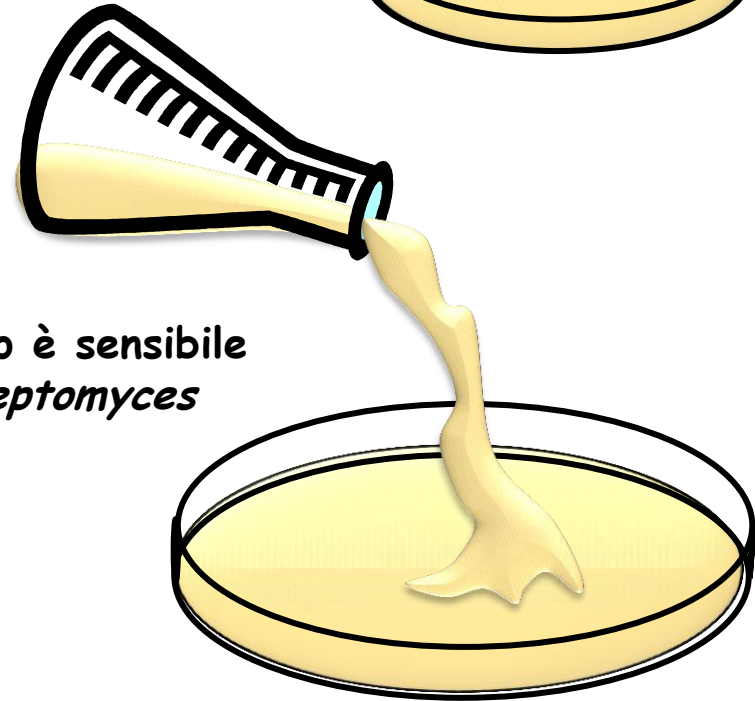
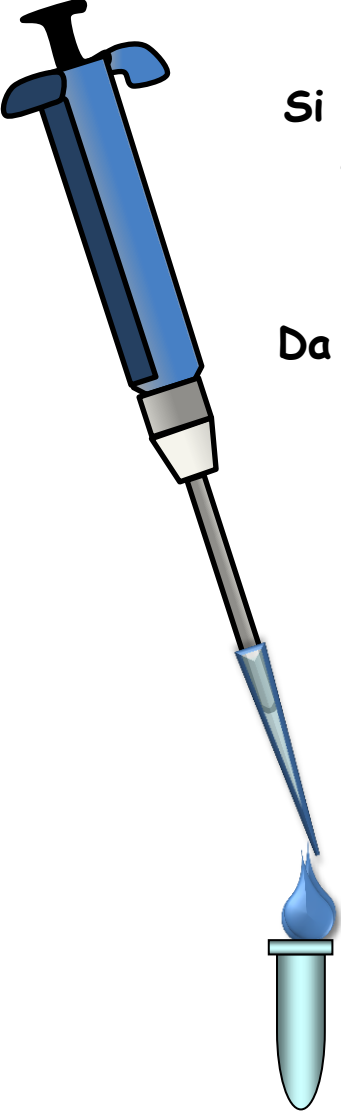
Si mescolano $\sim 10^8$ cellule di *E. coli* e 10^7 spore di *Streptomyces* e si preparano diluizioni seriali

Da cui si seminano 100 μ l per spatolamento su SFM (Farina di soia mannitolo) + $MgCl_2$

Dopo 18-24h di incubazione a 30 °C si stratifica un overlay con gli antibiotici opportuni

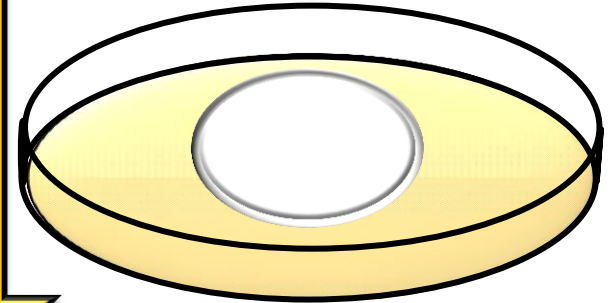
Ac. nalidixico per *E.coli* se il ceppo è sensibile
Apramicina o neomicina per *Streptomyces*

Incubare per 3-4 giorni a 30 °C



La coniugazione non è particolarmente efficace in terreno liquido
(caratteristica dei plasmidi coniugativi IncP usati per il trasferimento genico)

Per evitare l'inclusione in agar delle colonie si può
effettuarla su filtri poggiati sulle piastre ma
l'efficienza decresce di un ordine di grandezza



Lo stato fisiologico del ricevente è essenziale:

la pregerminazione delle spore aumenta
l'efficienza di trasferimento di 5-10 volte



Tentativi di trasformare direttamente i
miceli sono stati inconcludenti



Non tutte le specie di *Streptomyces* sono trasformabili per coniugazione
integenerica: con *S. pristinaespiralis* (ATCC 25486) e *S. viridochromogenes* (DSM
40736) si sono confermati i risultati ottenuti su *S. lividus*, mentre le stesse
procedure hanno fallito con *S. parvullus* o *S. hygroscopicus*

COLTIVAZIONE

Gli streptomiceti sono versatili dal punto di vista metabolico, : si coltivano su terreni complessi, senza particolari difficoltà

Particolarmente indicati il terreno SFM
(farina di soya+ mannitolo)

Lo YEME (estratto di lievito, glucosio, malto)



Le piastre per coltivare Streptomiceti vanno preparate un po' più spesse dell'usuale per evitare che si asciugano per via dei tempi di crescita più lunghi

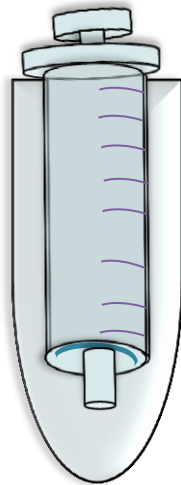
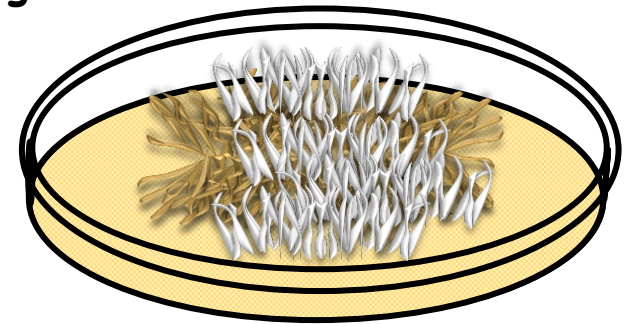
CONSERVAZIONE DEI CEPPI: PREPARAZIONE DI SPORE

un buon metodo per conservare con successo i ceppi di *Streptomyces* che sporulano con efficienza

Lo stock si conserva a -20°C in glicerolo sterile al 20% per molti anni se maneggiato con accuratezza

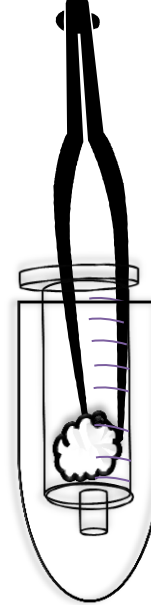
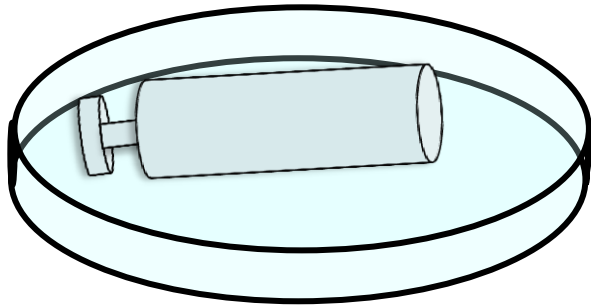
Se il ceppo contiene un plasmide non integrativo bisogna partire da un terreno che mantenga la selezione

Si coltiva il ceppo per 4-5 giorni a 30°C

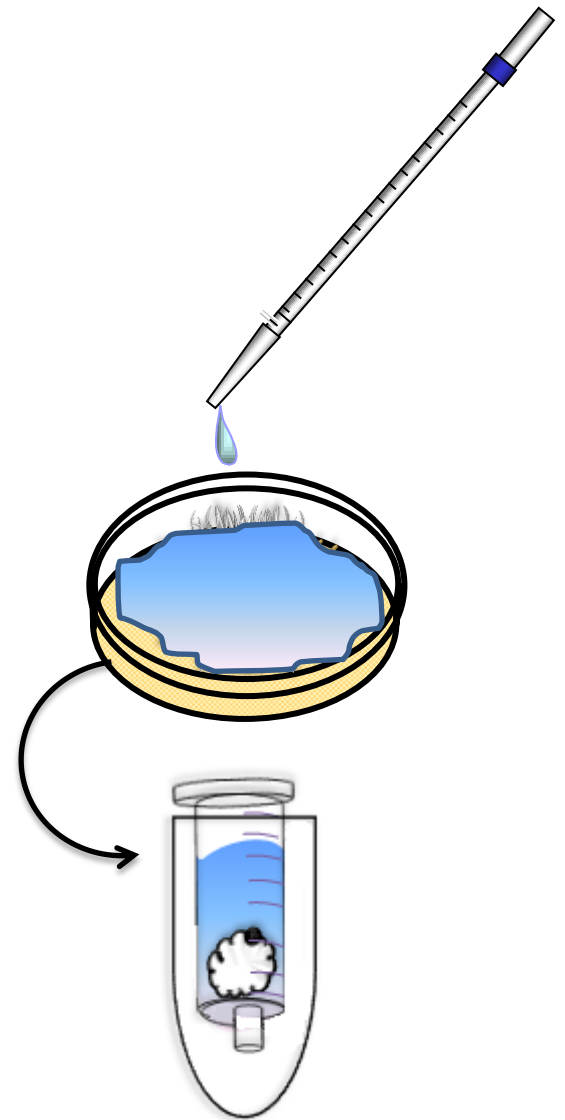
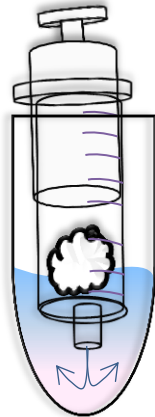


Si introduce una siringa da 10 mL in una provetta Falcon da 50mL

Si toglie lo stantuffo e si introduce un quadratino di garza sterile nella siringa



Si lava la coltura con 5 ml di H_2O sterile per raccogliendo le spore, evitando di staccare frammenti di agar e si passano nella siringa



Rimettendo lo stantuffo si spingono le spore nella Falcon, si raccolgono per centrifugazione e si congelano a -20 sospese in glicerolo sterile