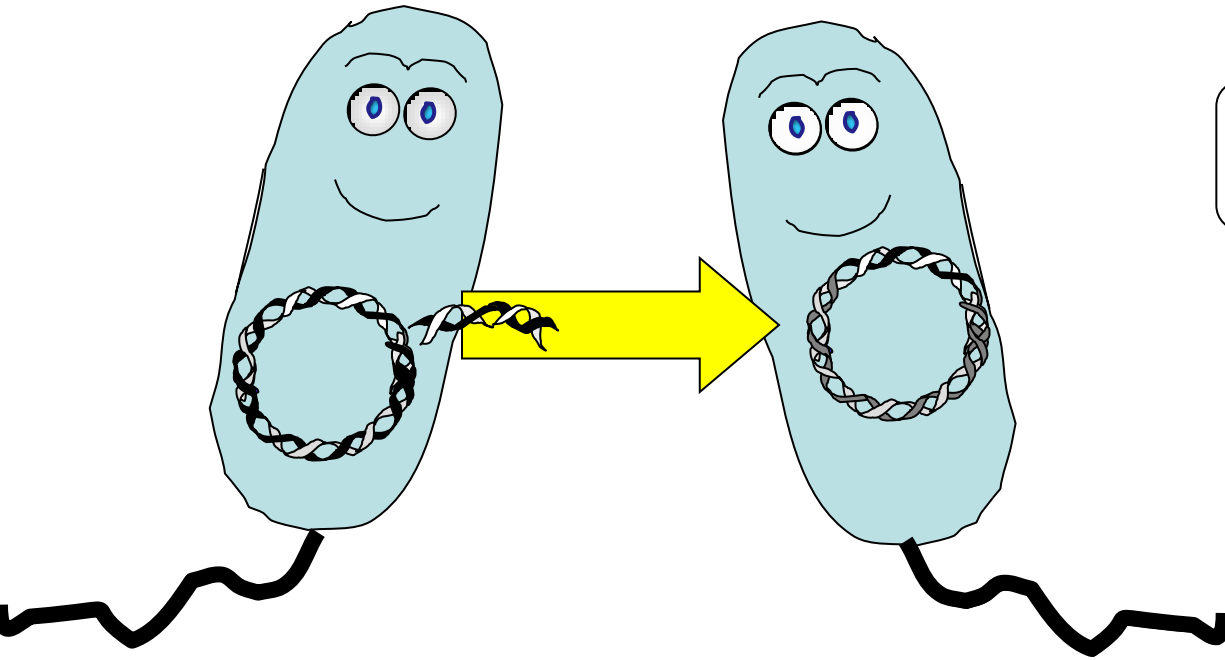


RICOMBINAZIONE GENICA



segmenti genetici contenuti in due genomi separati vengono messi insieme in un'unica unità

Si ottengono nuove combinazioni di geni anche in assenza di mutazione

Le modificazioni provocate dalla ricombinazione genica possono essere molto estese: interi geni e anche cromosomi vengono trasferiti da un organismo all'altro

RICOMBINAZIONE
omologa

Riarrangiamento genico tra
vaste sequenze omologhe

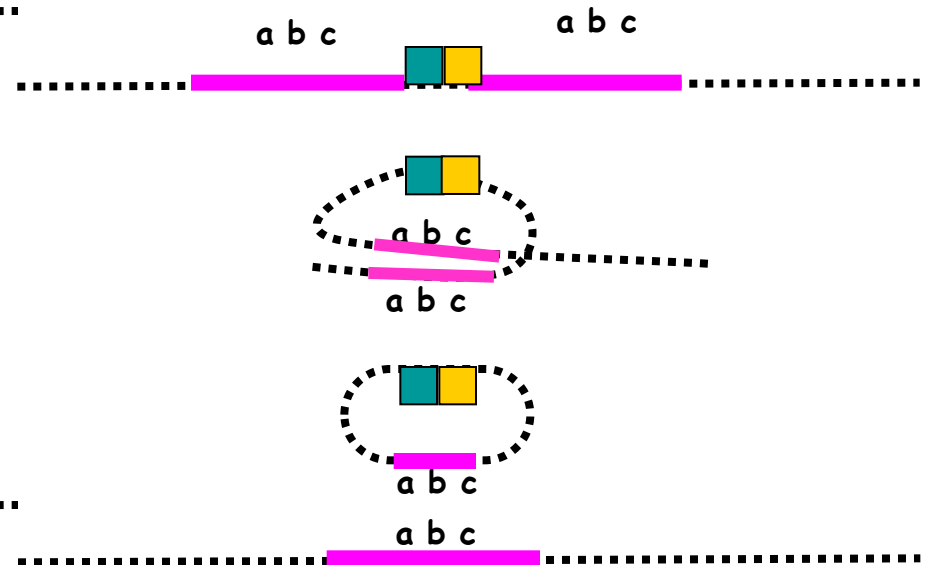
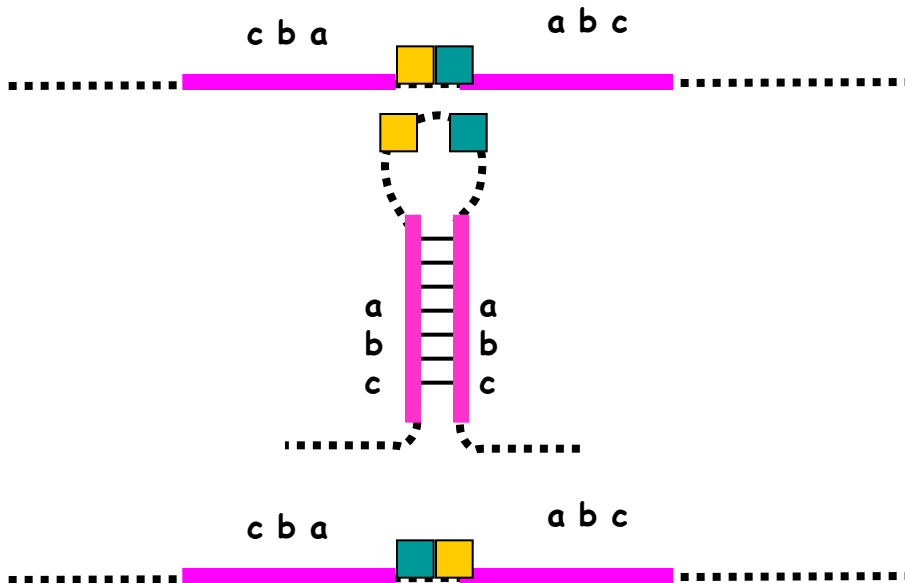
L'orientamento dei
frammenti omologhi

opposto

uguale

Inversione di segmenti

perdita di materiale
genetico



RICOMBINAZIONE
SITO SPECIFICA

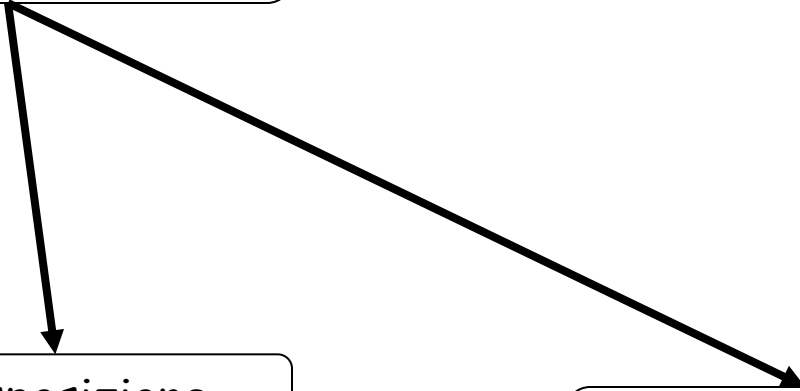
Avviene in corrispondenza
di brevi regioni omologhe

Caratterizzate da
sequenze particolari

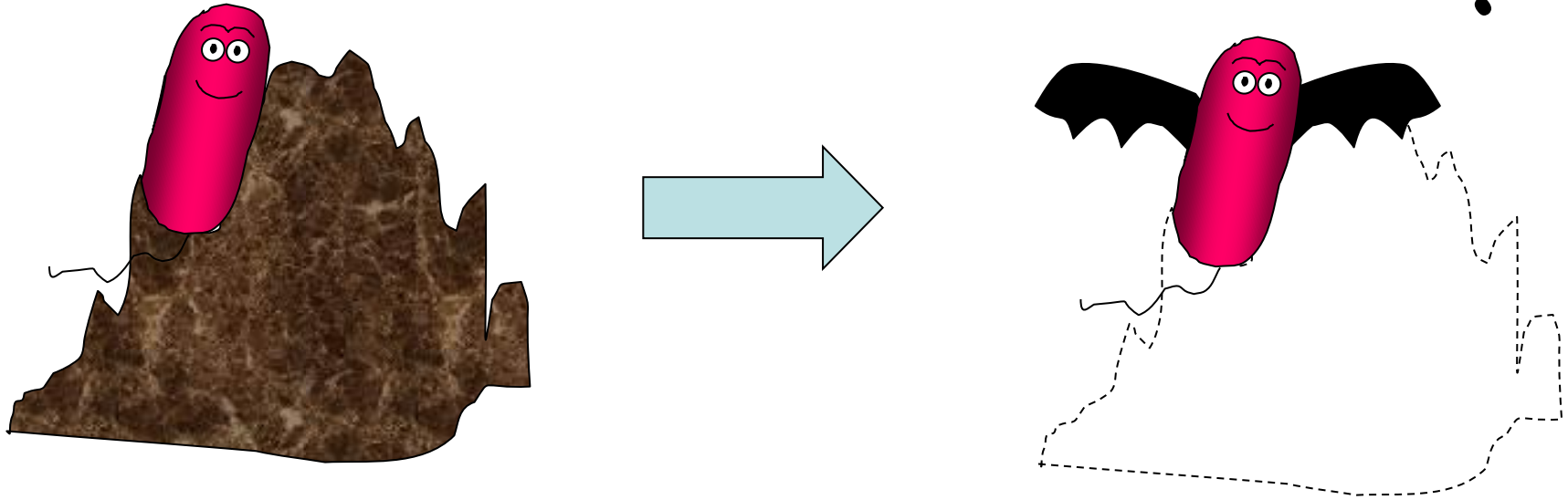
Integrazione di
genomi virali

Trasposizione

Integrazione di
cassette geniche



In una popolazione batterica le mutazioni casuali avvengono con frequenza bassa ma costante (10^{-7} 10^{-11} / n bp)

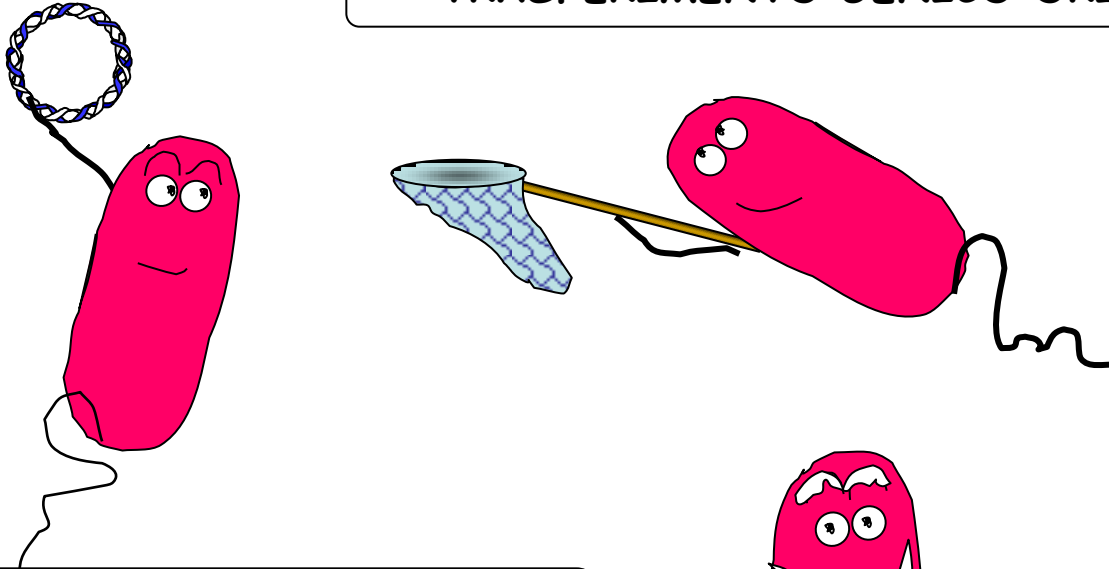


Se i cambiamenti nell'ambiente superano le capacità di adattamento, l'unica possibilità di sopravvivenza è l'acquisizione rapida di nuove caratteristiche

Nella maggior parte dei casi le mutazioni casuali non sono sufficienti e la risposta al problema è l'ACQUISIZIONE DI GENI dall'esterno

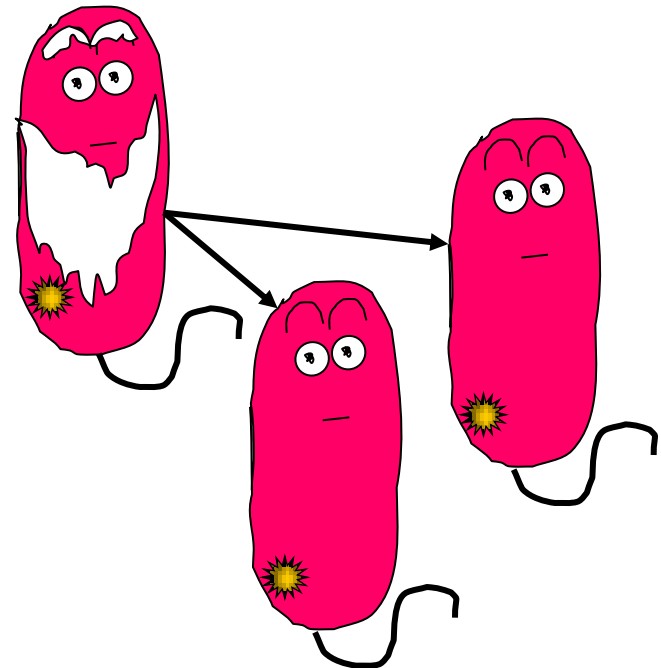
Il passaggio di geni tra microrganismi diversi, è detto

TRASFERIMENTO GENICO ORIZZONTALE

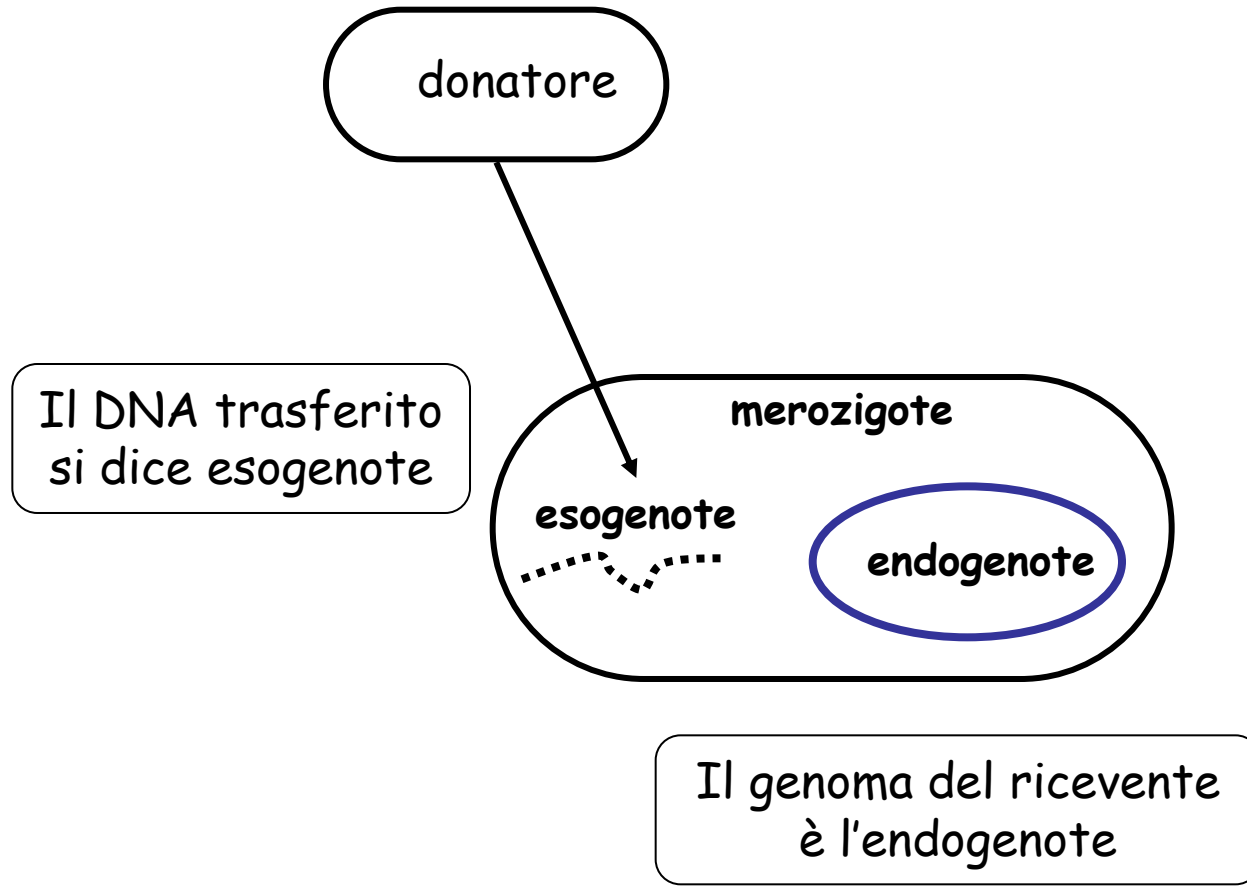


In contrapposizione al
TRASFERIMENTO VERTICALE

(passaggio di un gene da una
cellula alla propria progenie)

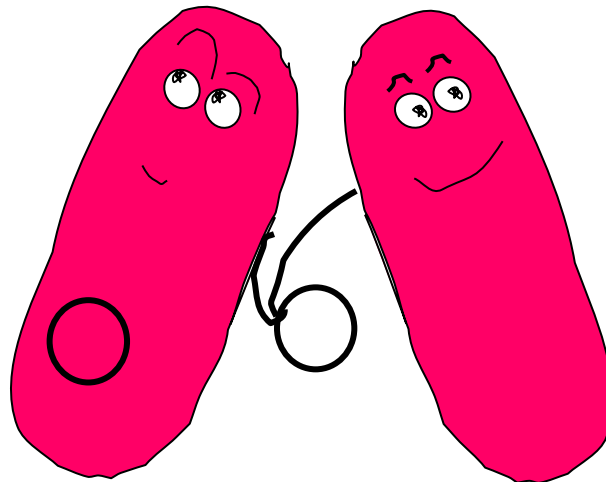


Il risultato di uno scambio genico tra procarioti, è un genoma parzialmente diploide, che si definisce **MEROZIGOTE**



MOBILITA' GENICA NEI BATTERI

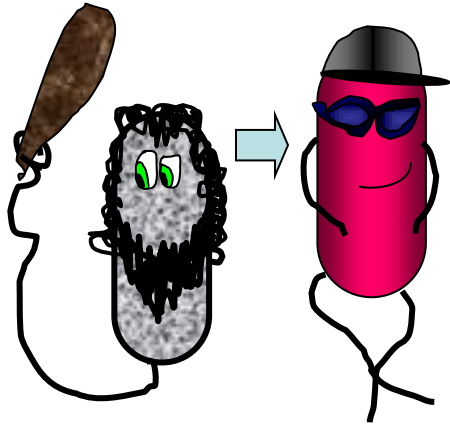
A differenza di quanto accade negli Eucarioti che si riproducono sessualmente, per i Procarioti non è previsto uno scambio genico tra individui diversi ad ogni generazione



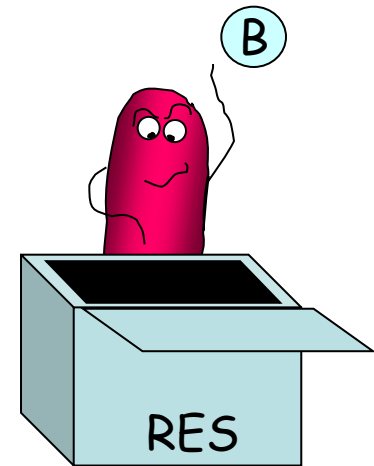
IL TRASFERIMENTO GENICO ORIZZONTALE

che permette sia il trasferimento di geni sia la ricombinazione, è importante per...

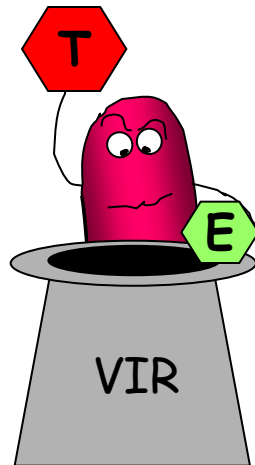
evoluzione batterica



disseminazione
di geni di resistenza



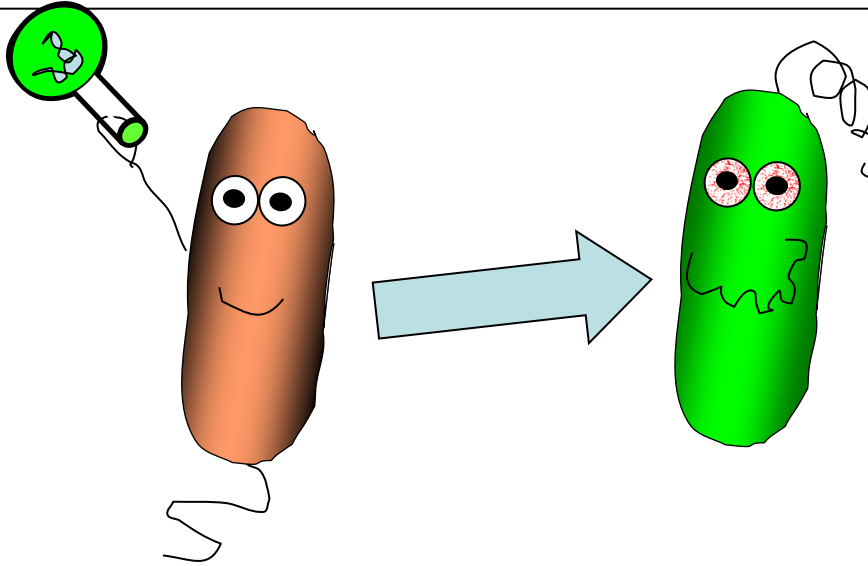
disseminazione
di geni di virulenza



Scambio di geni
metabolici



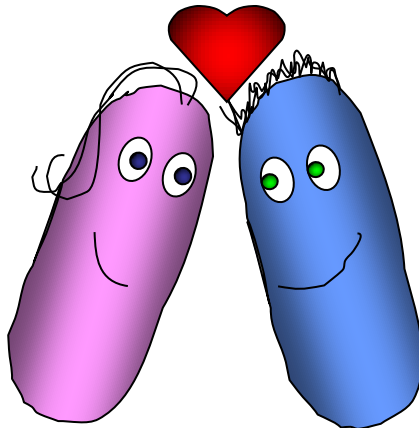
Le possibili strategie con cui materiale genetico passa da un batterio all'altro sono tre:



1 - TRASFORMAZIONE

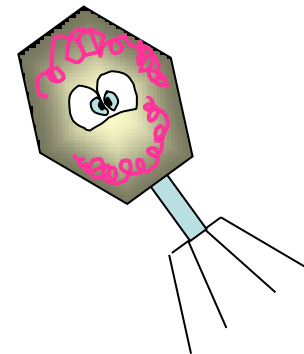
DNA LIBERO VIENE ACQUISITO E INTEGRATO NEL GENOMA DELLA CELLULA BATTERICA RICEVENTE

2 - CONIUGAZIONE



IL MATERIALE GENICO PASSA PER CONTATTO DIRETTO TRA UN BATTERIO E L' ALTRO

3 - TRASDUZIONE



IL TRASFERIMENTO E' MEDIATO DA BATTERIOFAGI

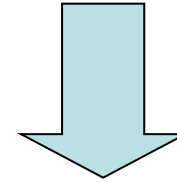
CARATTERISTICHE COMUNI ALLE TRE STRATEGIE

Il trasferimento del
cromosoma è PARZIALE

Il trasferimento è POLARE
(Donatore → Ricevente)

Il prodotto del
trasferimento è un
MEROZIGOTE

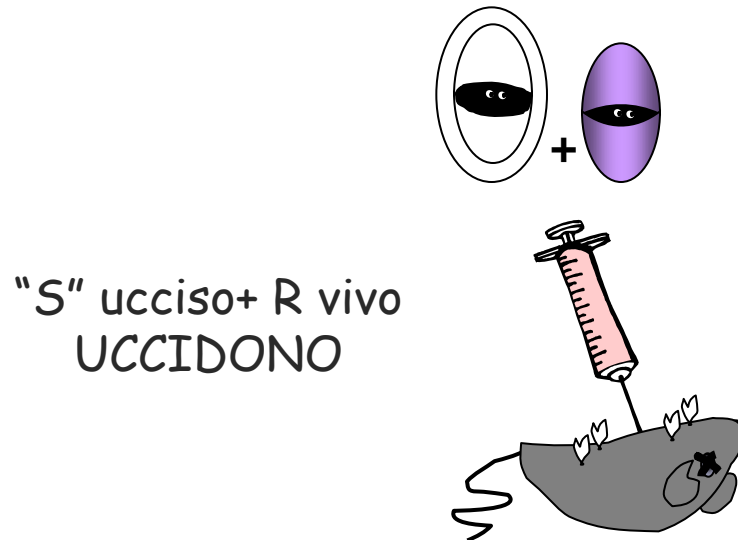
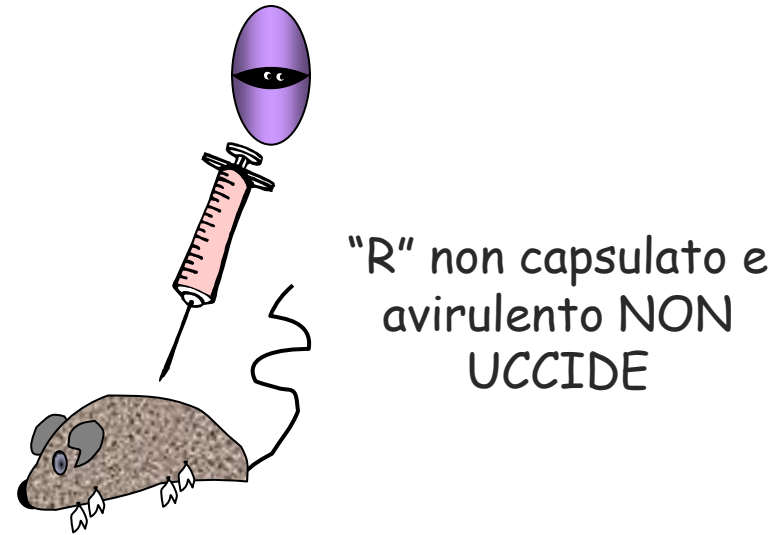
L'esogenote è trasmesso alla progenie
SOLO SE SI INTEGRA con
l'endogenote



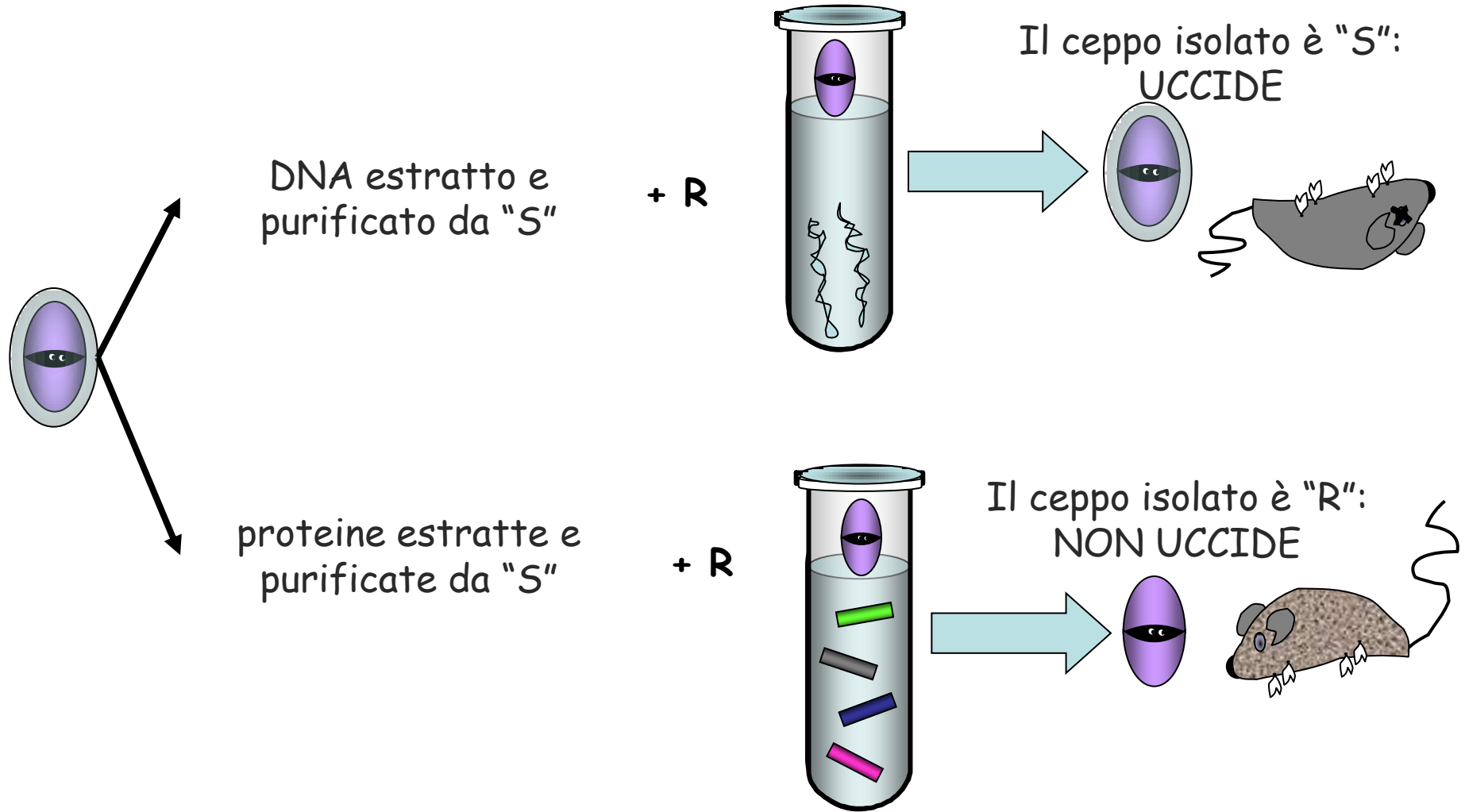
Questa regola cade se
l'esogenote è un plasmide

TRASFORMAZIONE

Fenomeno scoperto da Griffith 1928 su
Pneumococcus

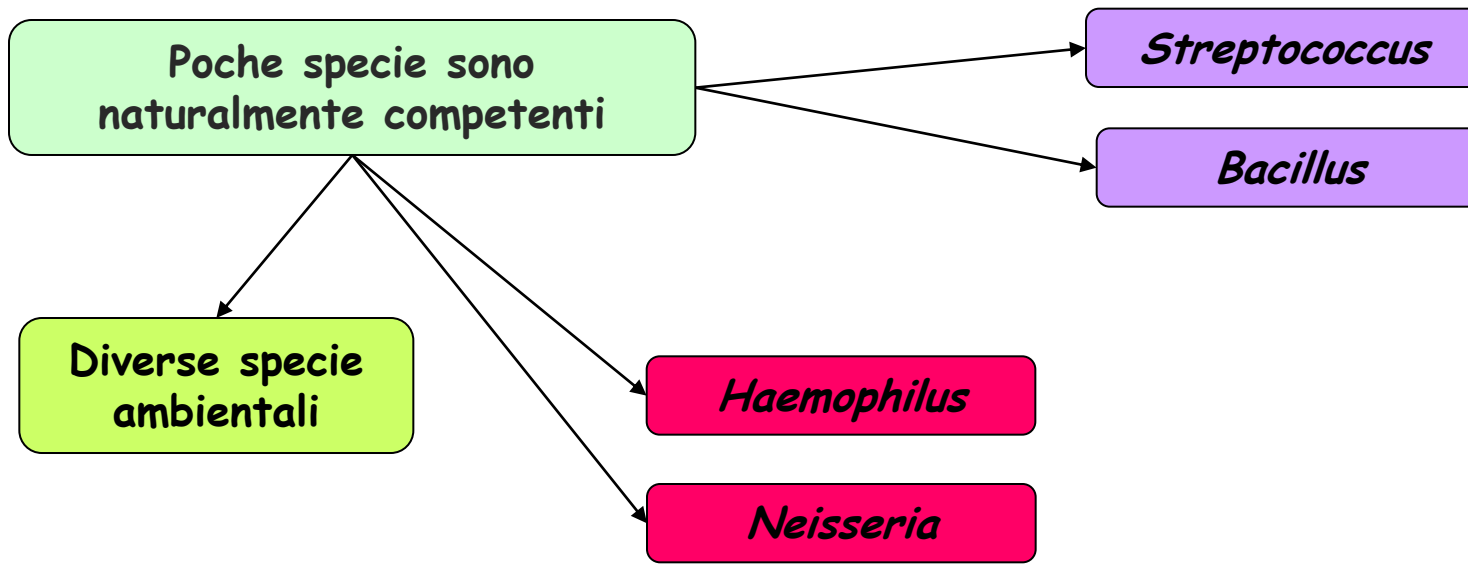


1944 AVERY DIMOSTRA "IN VITRO" CHE IL
FATTORE TRASFORMANTE E' IL DNA



Il DNA esterno viene internalizzato nella cellula ospite, integrato nella regione omologa del cromosoma e trasmesso alla progenie

Per l'internalizzazione la cellula deve essere "competente" : capace di trasportare grandi mmolecole di DNA attraverso parete e membrana



Il DNA esterno viene internalizzato nella cellula ospite, integrato nella regione omologa del cromosoma e trasmesso alla progenie

Per l'internalizzazione la cellula deve essere "competente" : capace di trasportare grandi molecole di DNA attraverso parete e membrana

Poche specie sono naturalmente competenti

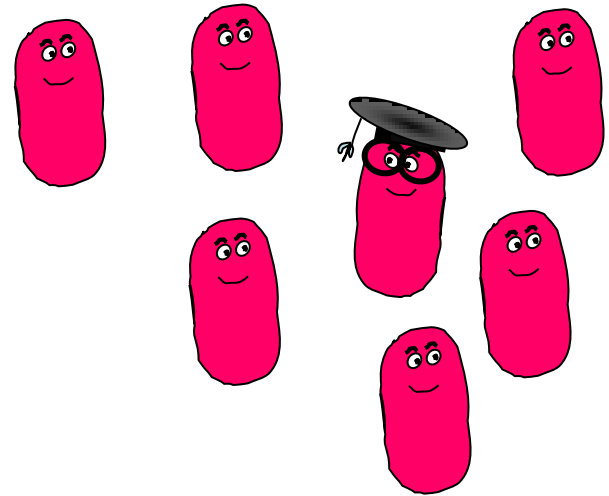
Didermi
Haemophilus
Neisseria

Monodermi
Streptococcus
Bacillus

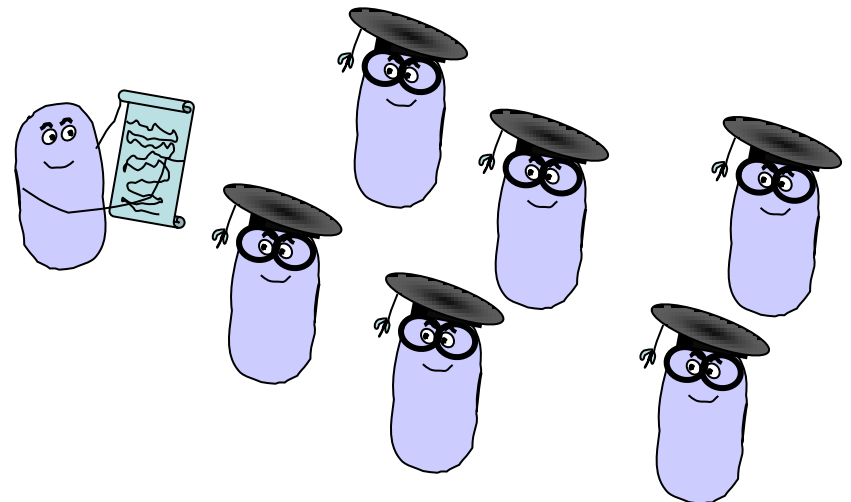
Diverse specie ambientali

la competenza è regolata e si manifesta in condizioni ambientali particolari o in una fase di crescita specifica

Nei didermi la competenza si sviluppa indipendentemente nei diversi individui

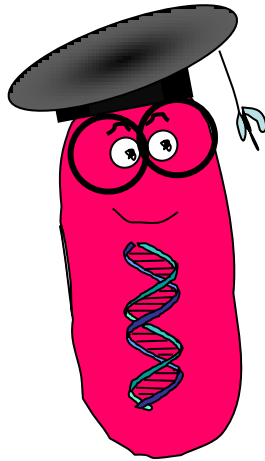


Nei monodermi la competenza è regolata da uno scambio di messaggi chimici (feromoni) all'interno di una popolazione



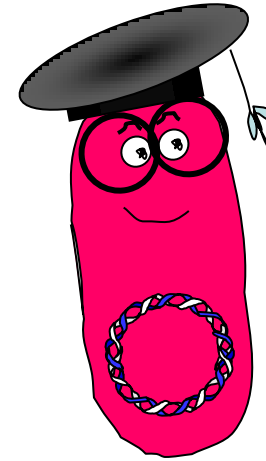
Quando una cellula è competente:

Il DNA trasformante vi si lega e si internalizza



dsDNA lineare

Si integra nel cromosoma
(ricombinazione omologa) e si esprime

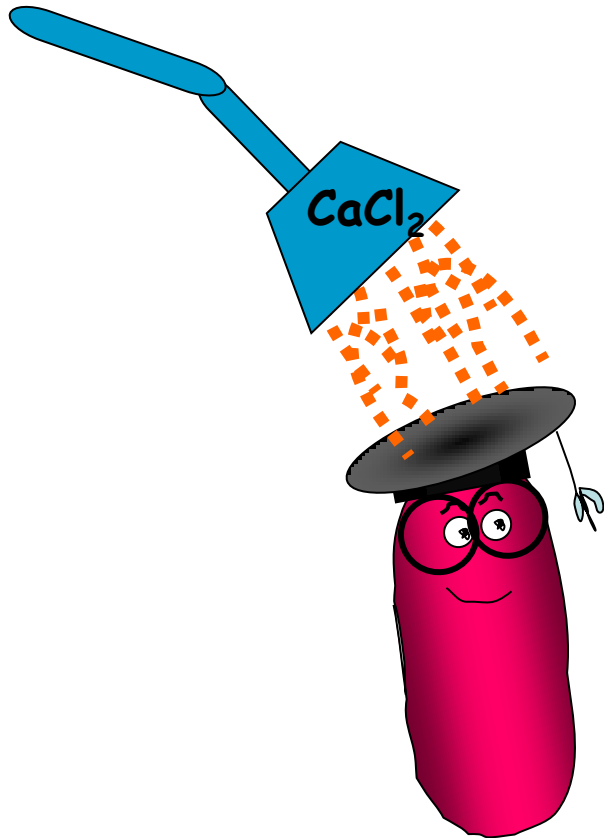


PLASMIDE

si replica e
si esprime

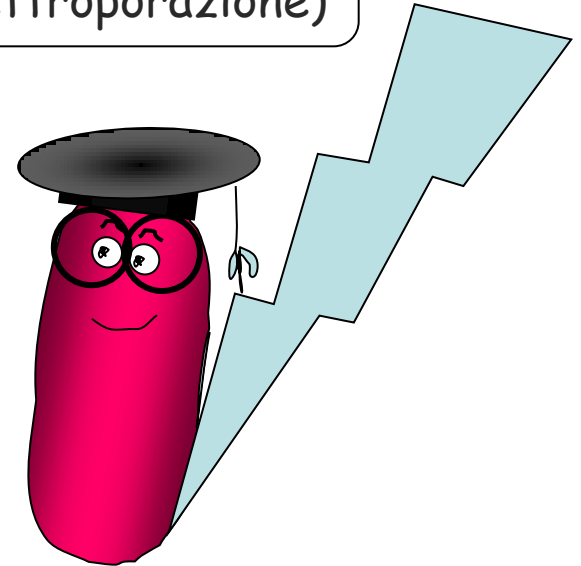
COMPETENZA ARTIFICIALE

Può essere ottenuta con shock



chimici
(Cloruro di calcio o rubidio)

elettrici
(elettroporazione)



I PLASMIDI

Sono elementi genetici capaci di replicarsi in modo **AUTONOMO** (repliconi)

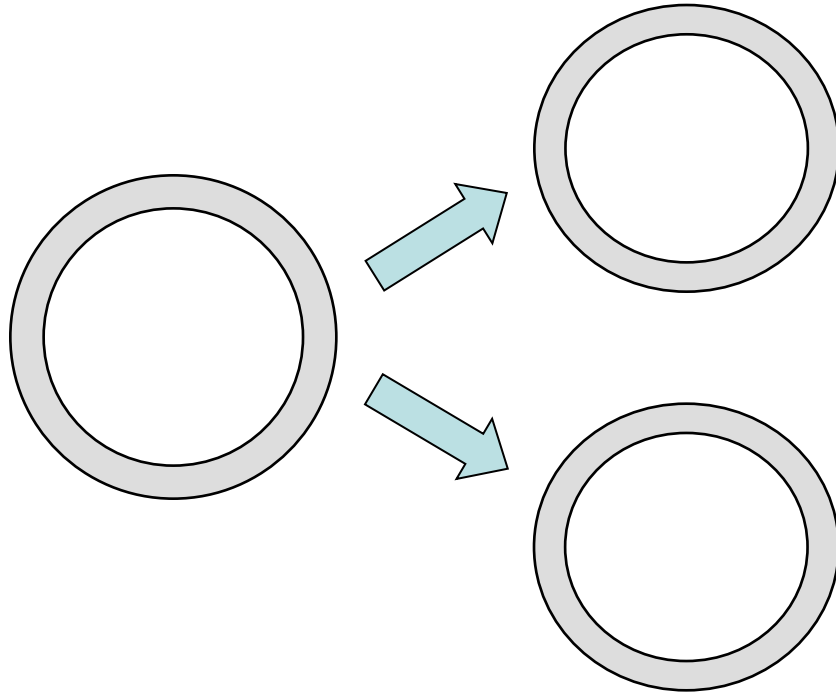
I plasmidi che possono trovarsi integrati nel cromosoma oltre che liberi nel citoplasma si dicono **episomi**

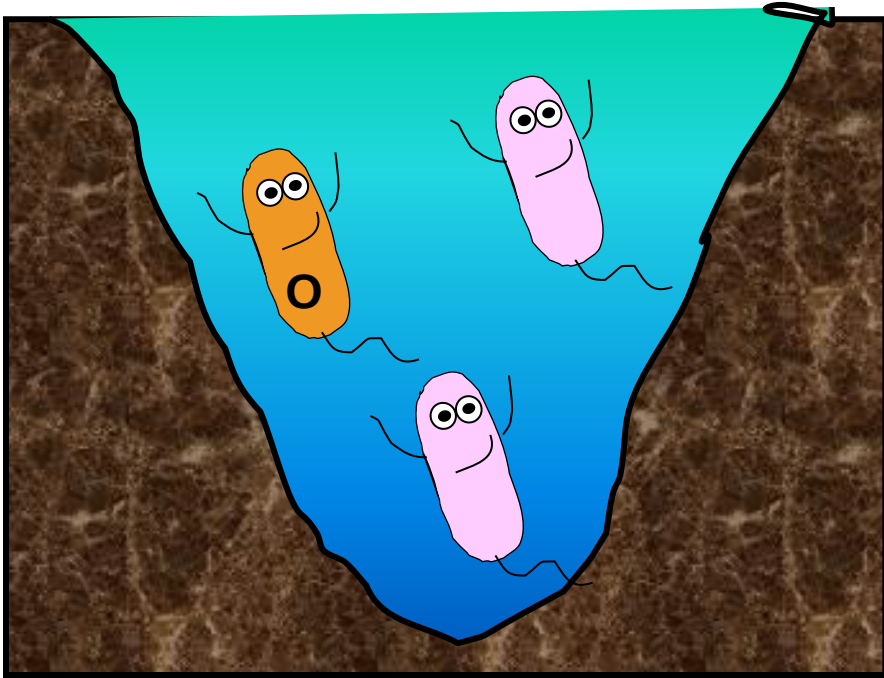
Hanno dimensioni molto variabili

Possono essere presenti nella cellula batterica

Poche copie (stringenti)

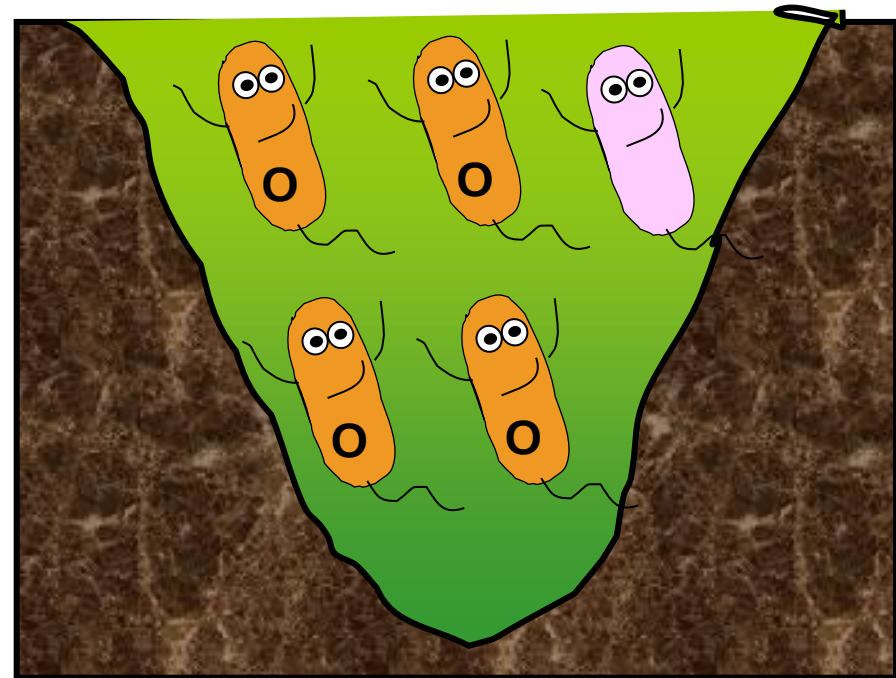
Molte copie (rilassati)



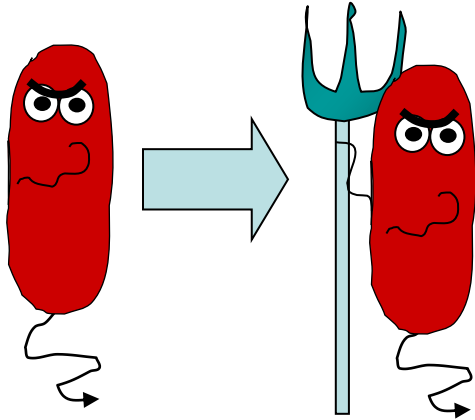


L'informazione genetica
portata dai plasmidi non è
essenziale per la cellula

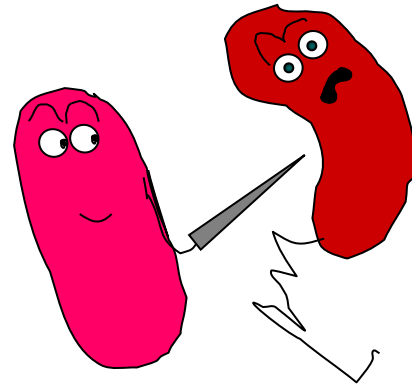
ma può conferire un
vantaggio selettivo in
particolari condizioni
ambientali



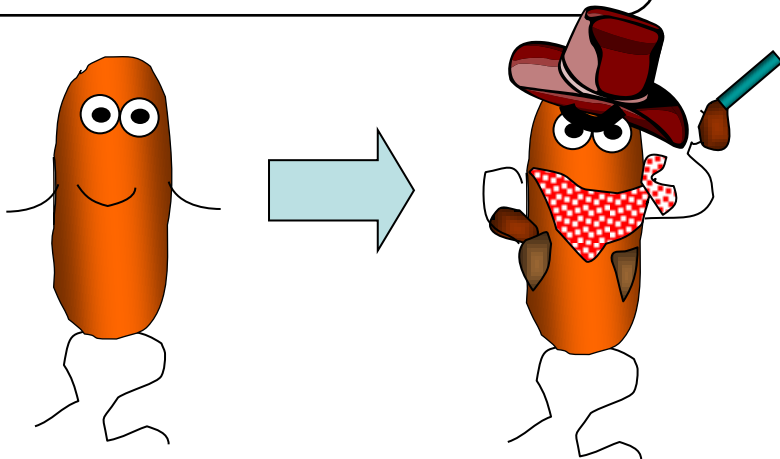
Plasmidi di virulenza: aumentano l'efficienza dei patogeni



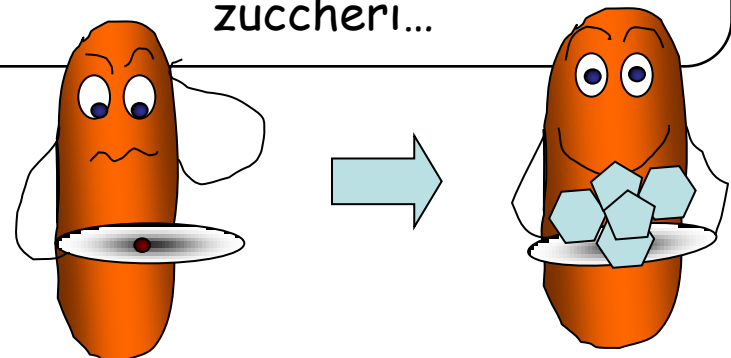
Plasmidi Col: codificano batteriocine (antagonizzanti contro cellule della stessa specie o di specie affini)



Plasmidi R: codificano enzimi capaci di distruggere o modificare gli antibiotici



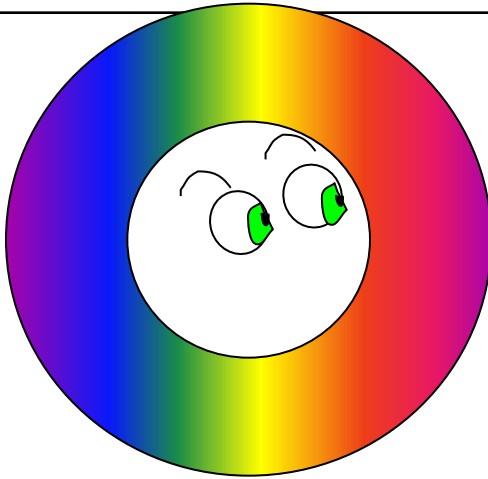
Plasmidi metabolici: codificano enzimi capaci di degradare composti aromatici, pesticidi, zuccheri...



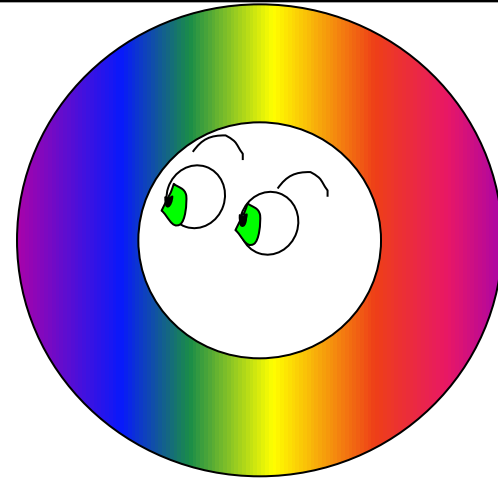
INCOMPATIBILITÀ

I plasmidi regolano la propria replicazione

Plasmidi con la stessa regolazione della replicazione NON possono coesistere nella stessa cellula



Appartengono allo stesso GRUPPO di INCOMPATIBILITÀ' (Inc)



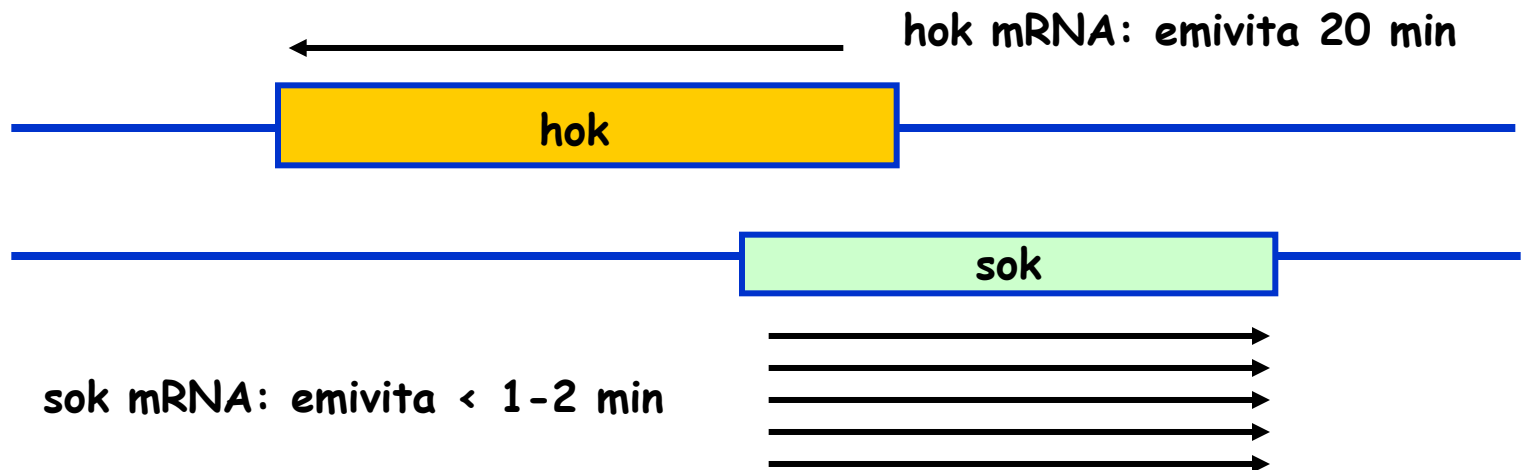
Due plasmidi dello stesso gruppo segregano (si dividono tra le cellule figlie) durante i cicli di divisione

In una cellula batterica possono coesistere plasmidi di gruppi Inc differenti

Molti plasmidi a basso numero di copie assicurano il proprio mantenimento nella cellula

Nel plasmide R1 il gene *hok* codifica una proteina che forma buchi nella membrana citoplasmatica

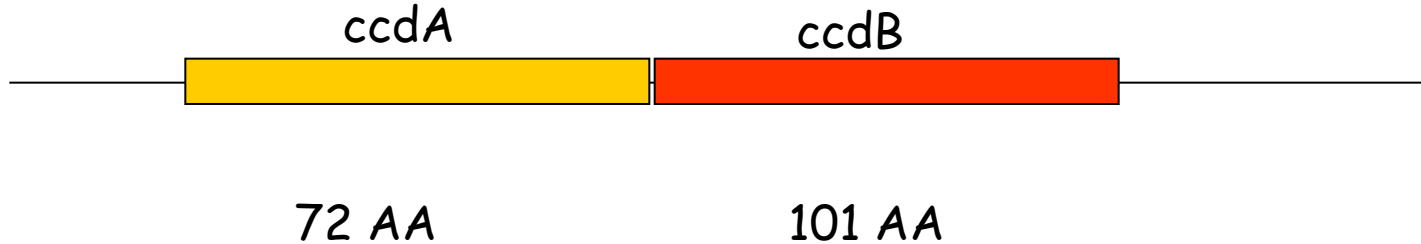
La trascrizione del gene *sok* genera un mRNA che si appaia con quello di *hok* e il duplex è distrutto da una RNAsi



Se il plasmide viene perso, l'*hok* mRNA può essere tradotto perché degrada più lentamente del *sok* mRNA

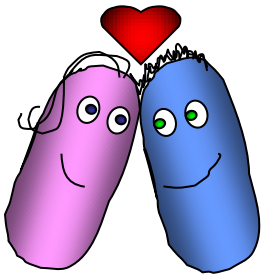
Sul plasmide F, il gene *ccdB* codifica una proteina che interferisce con la DNA girasi

Il veleno CcdB è una proteina molto stabile



Sul plasmide è anche presente il gene *ccdA* il cui prodotto blocca CcdB

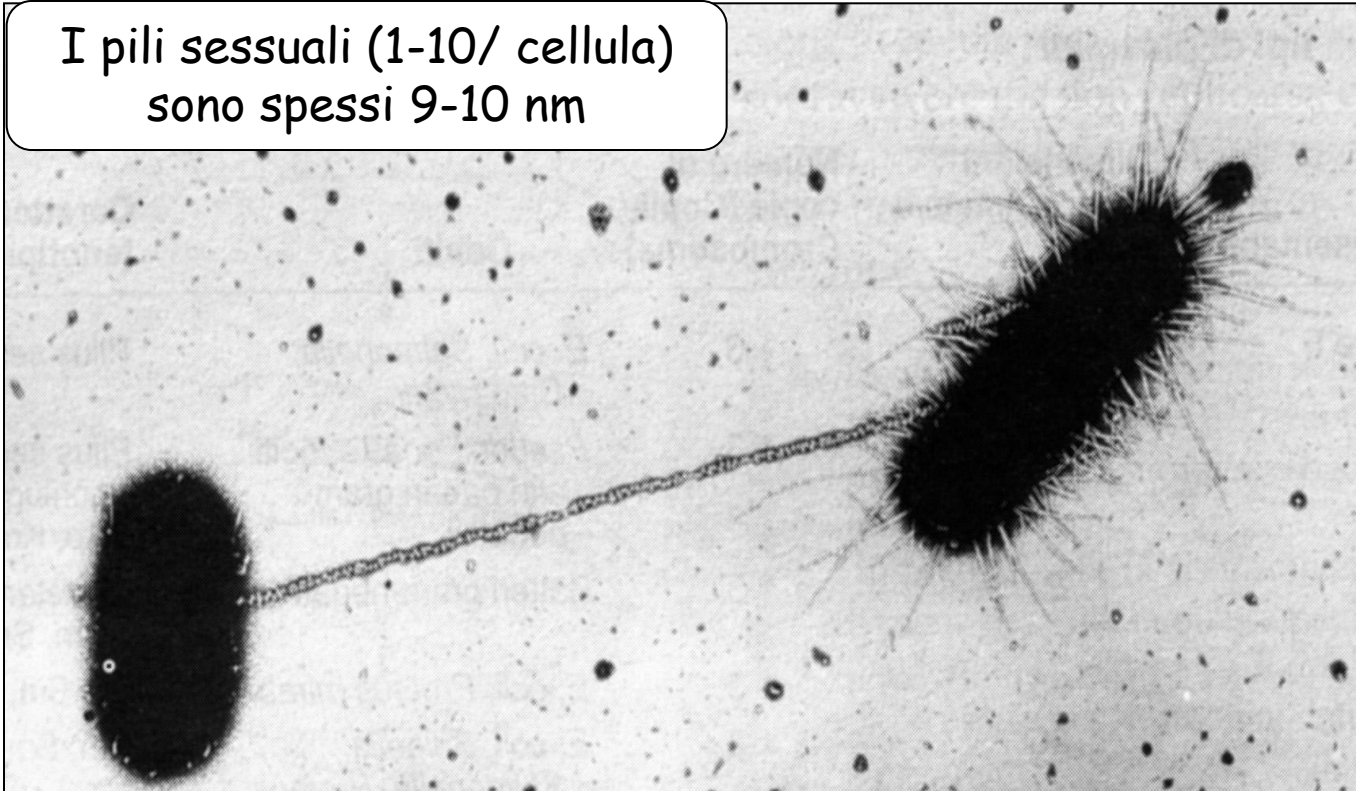
L'antidoto però si degrada molto facilmente: se il plasmide viene perso, il veleno sopravvive all'antidoto



CONIUGAZIONE

Trasferimento diretto
mediato da plasmidi

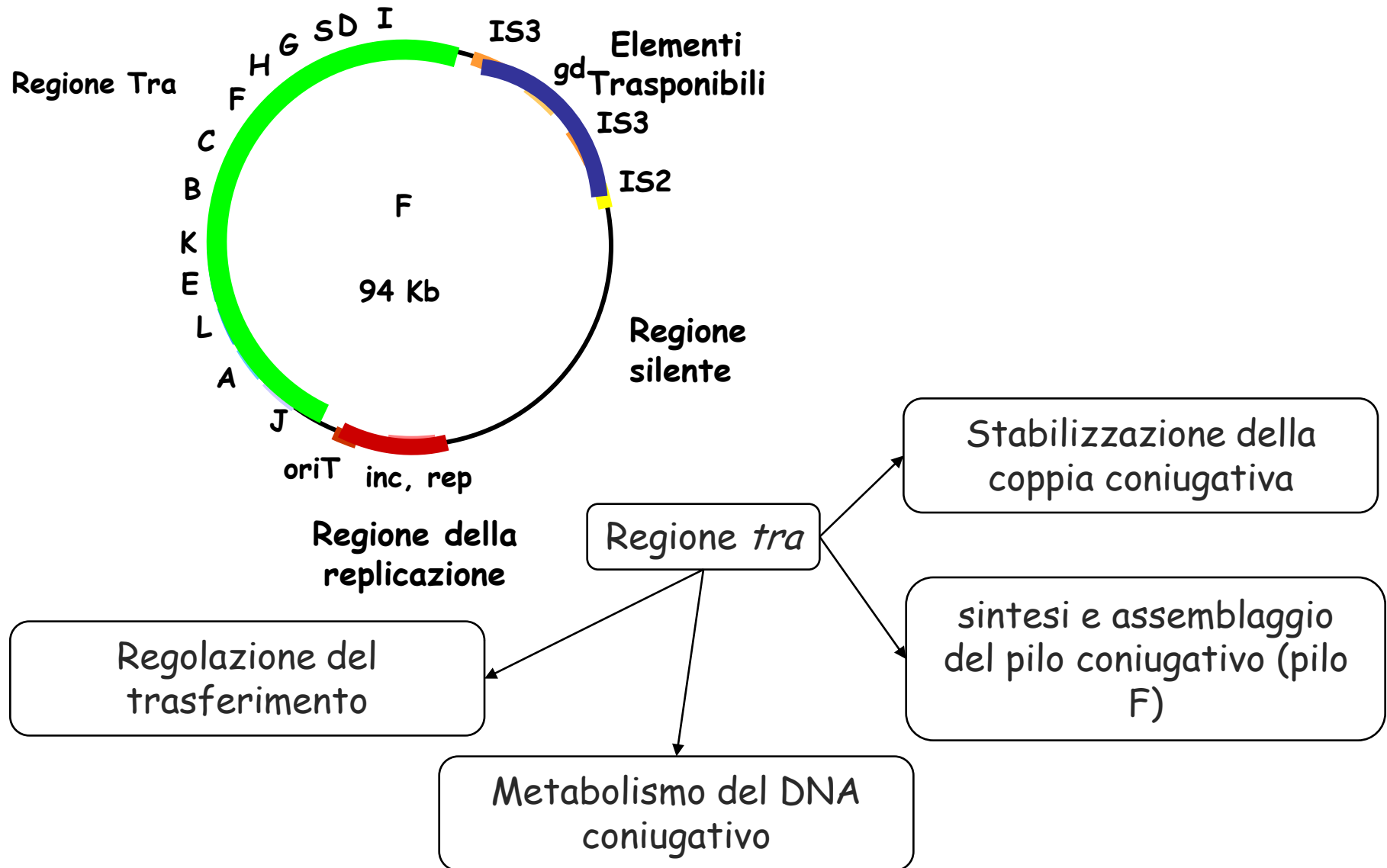
I pili sessuali (1-10/ cellula)
sono spessi 9-10 nm

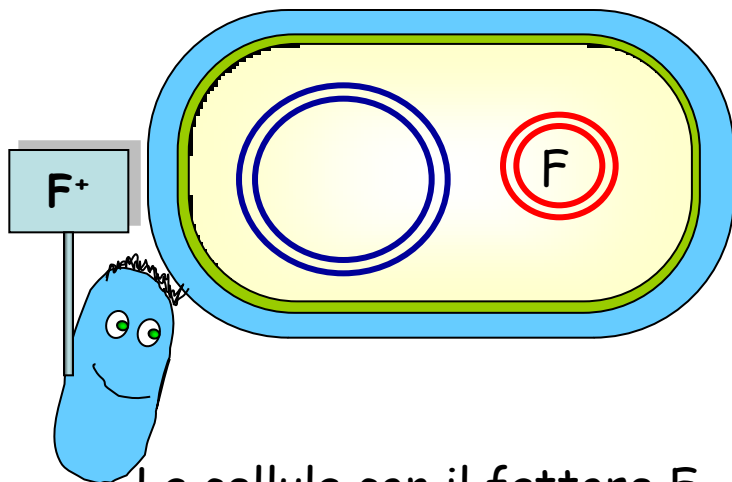


Alcuni plasmidi sono trasmessi solo alla progenie, altri
(AUTOTRASMISIBILI o CONIUGATIVI) possono trasferirsi
orizzontalmente per coniugazione

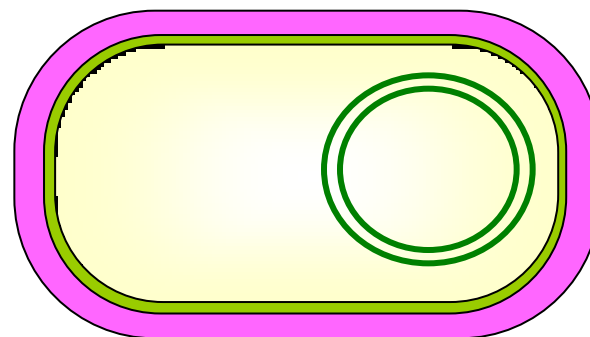
Un esempio tipico di plasmide autotrasmissibile è il

FATTORE F



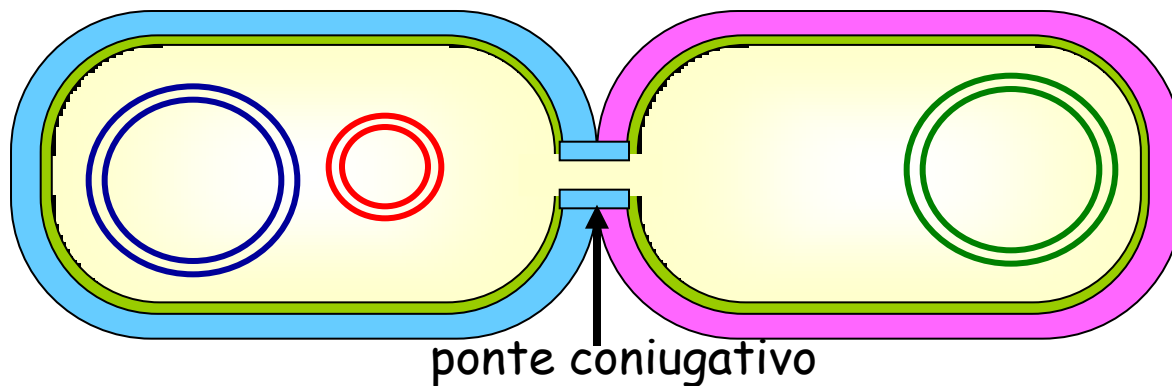


La cellula con il fattore F (F+) è il donatore

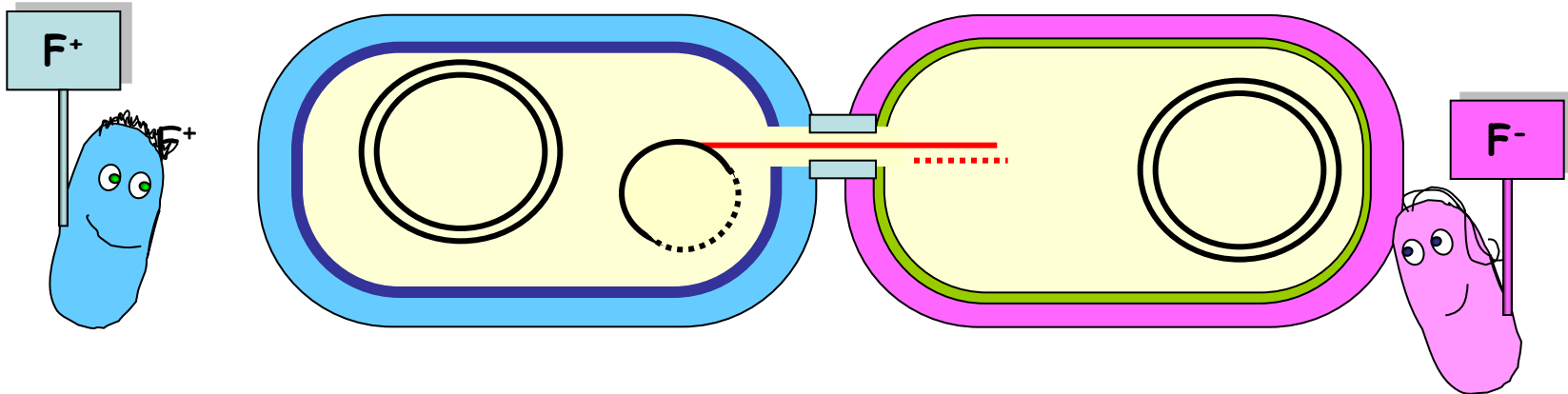


La cellula senza fattore F (F-) è il ricevente

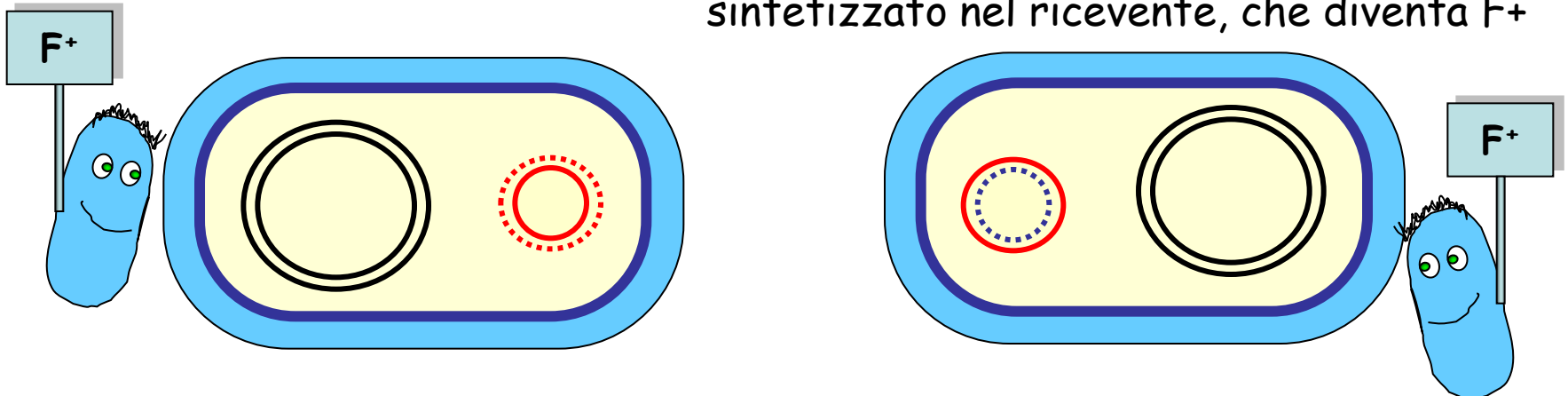
Il fattore F dirige la formazione di un ponte coniugativo tra le due cellule della coppia



Viene trasferito un
filamento singolo di F



Il filamento complementare viene
sintetizzato nel ricevente, che diventa F+



Anche nella cellula F+ la singola
elica restante viene replicata

Se il fattore F si integra nel cromosoma batterico, dirige il trasferimento di parte del cromosoma al ricevente

HFR

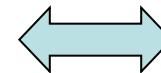
I ceppi in cui il fattore F è integrato si chiamano Hfr (High frequency ricombination)



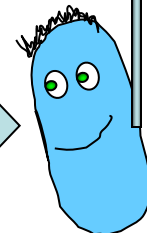
L'integrazione avviene in corrispondenza di pochi siti accomunati da una corta sequenza nucleotidica specifica

non è definitiva; in una popolazione esistono cellule Hfr e cellule F⁺

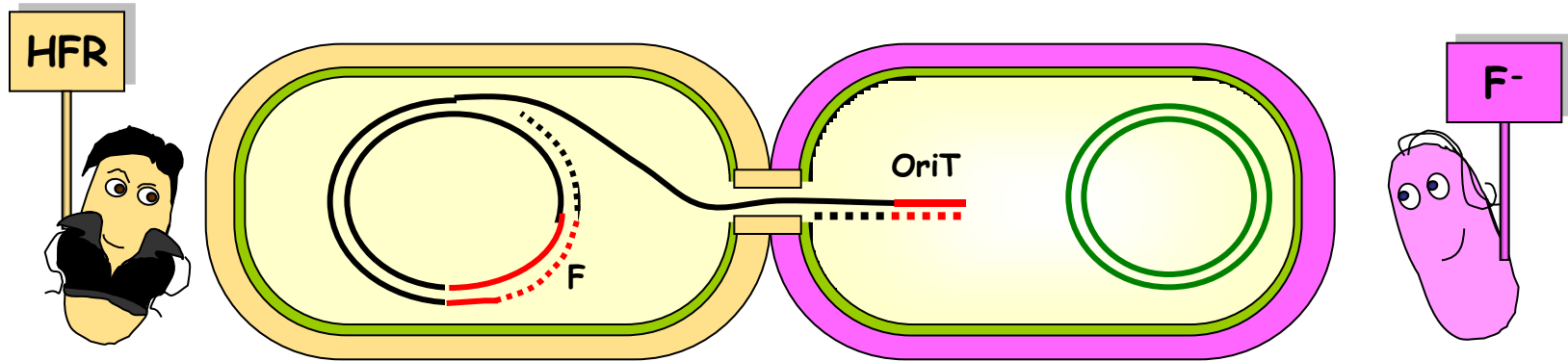
HFR



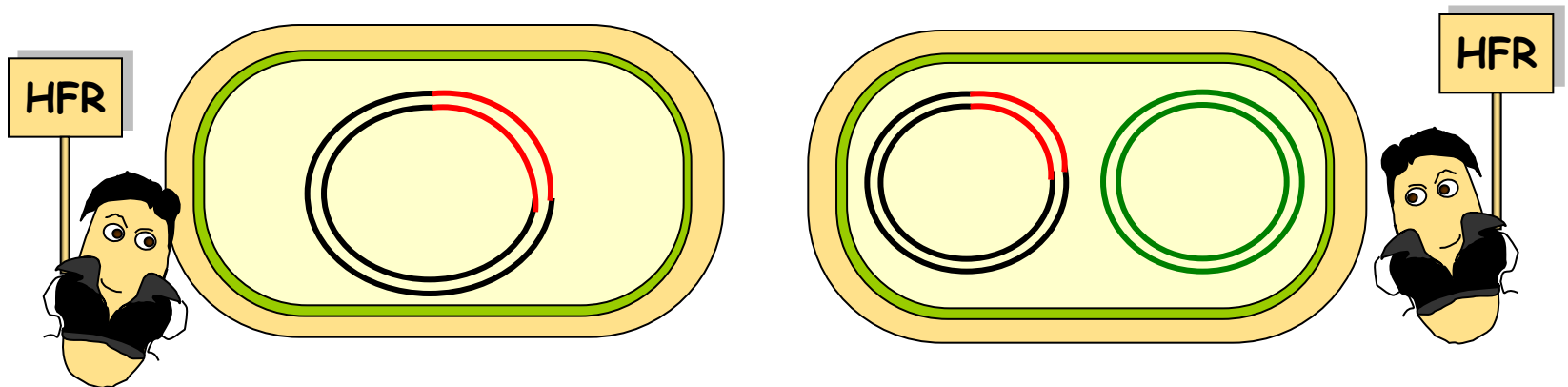
F⁺



Il trasferimento comincia da OriT e si svolge come per F, ma prosegue con i geni del cromosoma

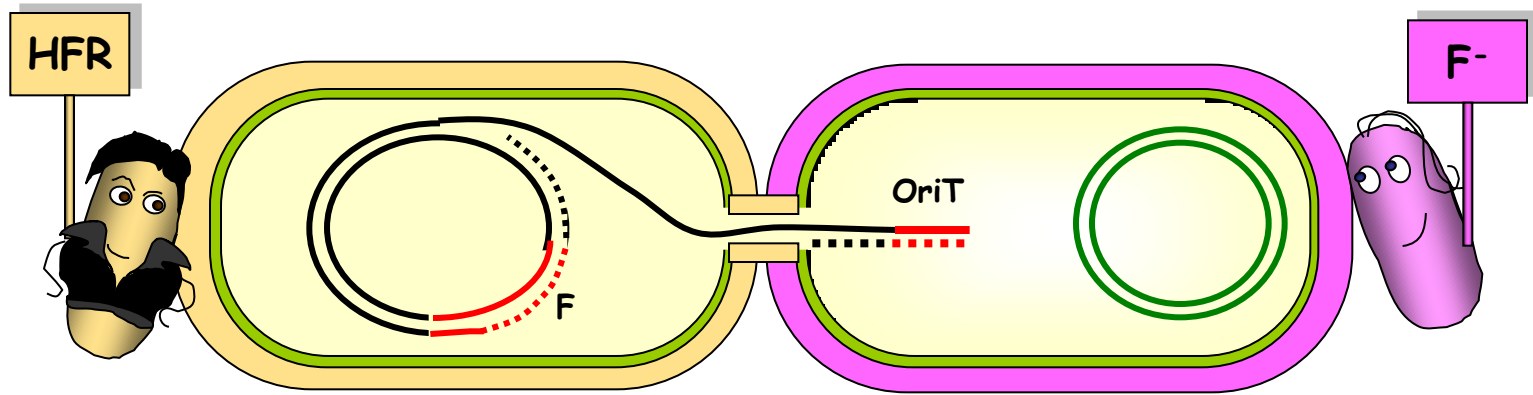


La quantità di cromosoma trasferita dipende dal tempo di contatto tra HFR e F-

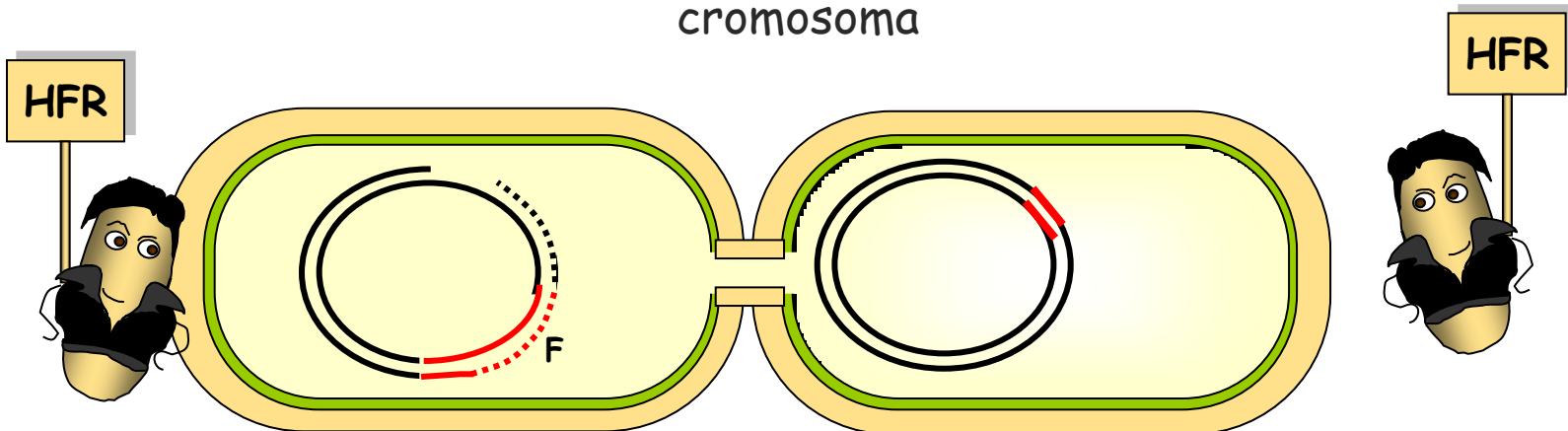


Il donatore resta Hfr; il ricevente lo diventa SOLO se il trasferimento è completo

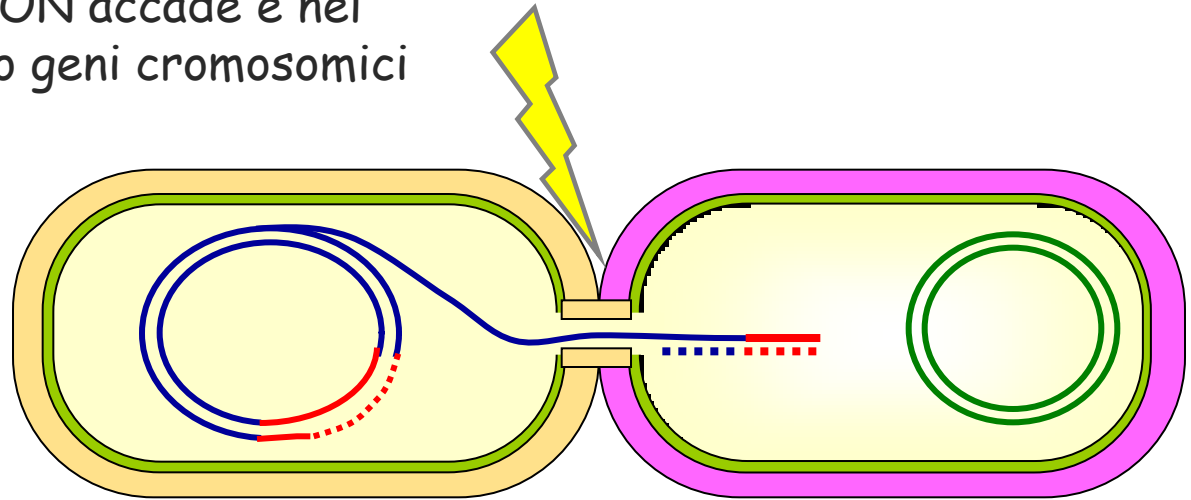
Il ricevente NON diventa Hfr a meno che non
venga trasferito l'intero cromosoma



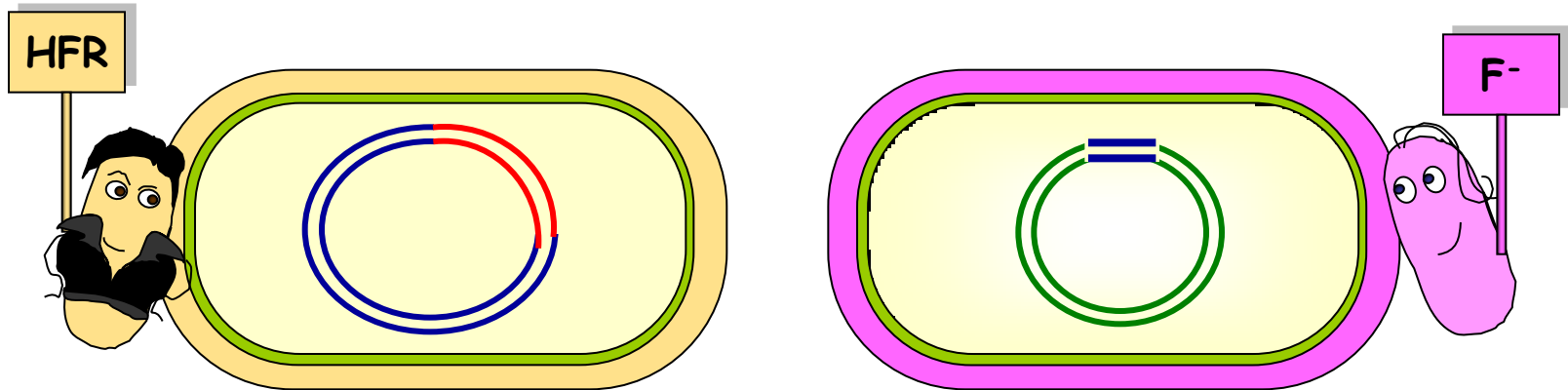
a meno che non venga
trasferito l'intero
cromosoma



In genere questo NON accade e nel ricevente passano solo geni cromosomici

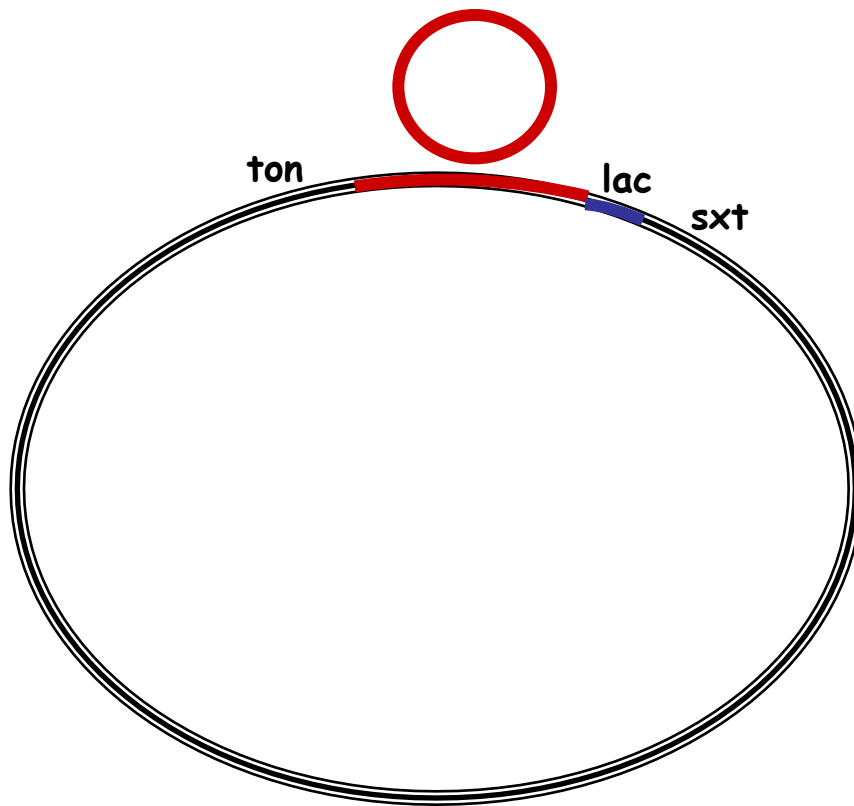


Che si integrano poi nel cromosoma con una doppia ricombinazione

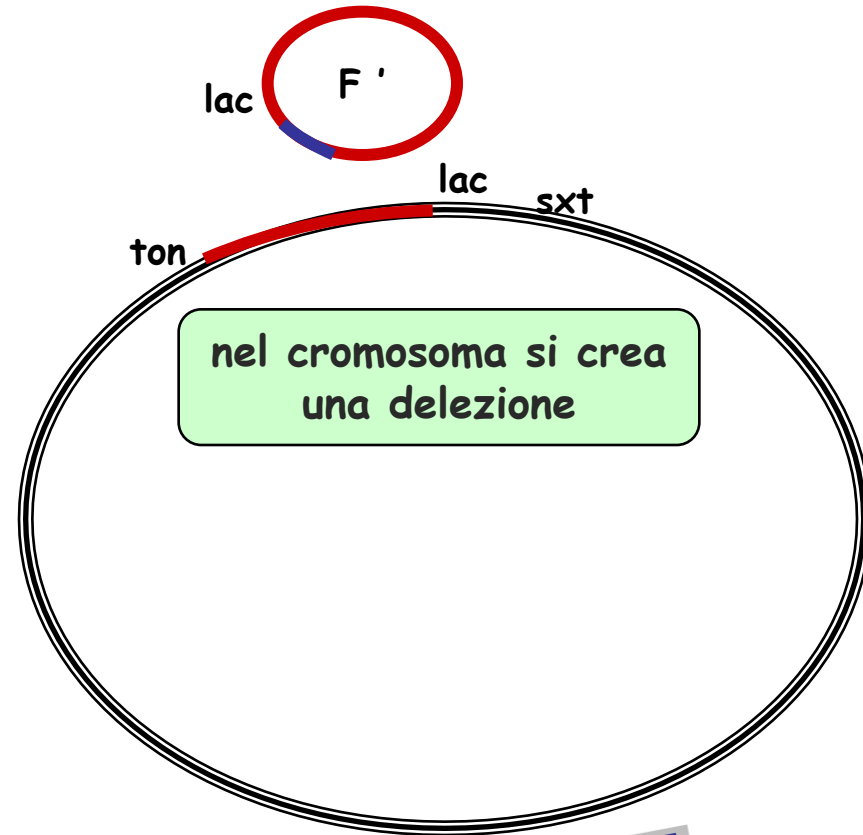


Il ricevente rimane F-

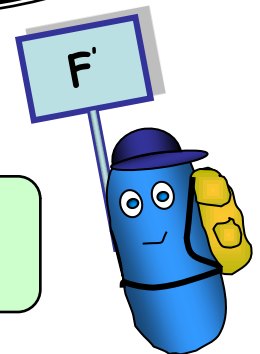
Nel passaggio $Hfr \rightarrow F^+$, il processo di escissione di F è normalmente preciso



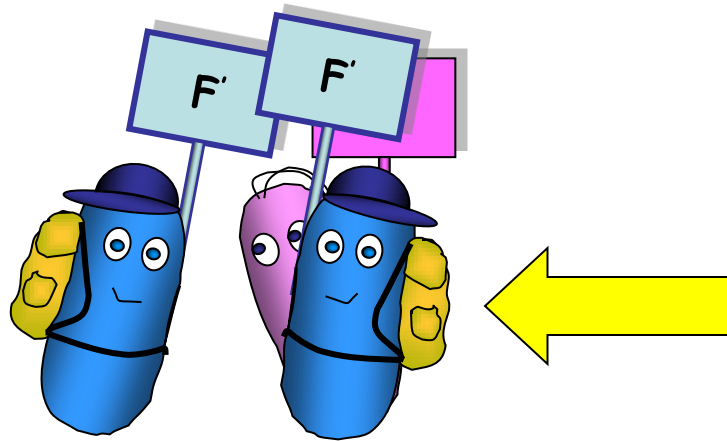
Ma a volte può accadere che un frammento di cromosoma adiacente all'episoma si stacchi con esso



In questo caso, il plasmide F porta con sé geni cromosomici (F')



IN UN INCROCIO $F' \times F^-$

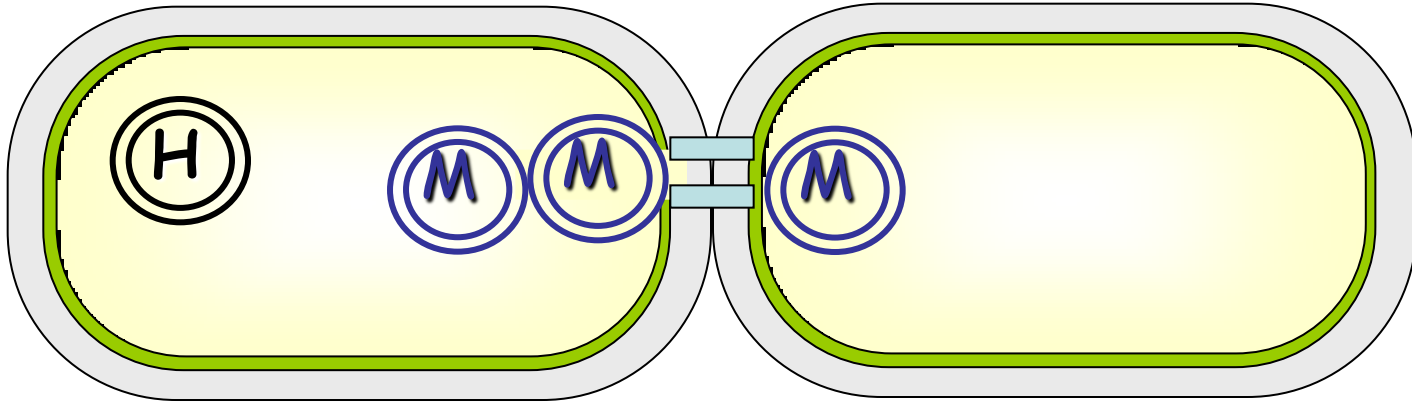


Il donatore resta F'

Il ricevente diventa F'

IL RICEVENTE DIVENTA PARZIALMENTE DIPLOIDE
(MEROZIGOTE) PER I GENI PRESENTI SU F'

Plasmidi privi di capacità di autotrasmissione possono essere trasferiti (Mobilizzati) se nella stessa cellula è presente un plasmide autotrasmissibile (Helper)



I plasmidi mobilizzabili possiedono la regione *OriT*, ma mancano di alcune funzioni, che sono vicariate dal plasmide helper

I plasmidi che non possiedono *OriT*, non possono essere trasferiti in alcun caso

TRASDUZIONE

scambio genetico fra
batteri mediato da un virus

```
graph TD; A[scambio genetico fra batteri mediato da un virus] --> B[GENERALIZZATA]; A --> C[SPECIALIZZATA];
```

GENERALIZZATA

può essere trasferito qualsiasi
marcatore genetico

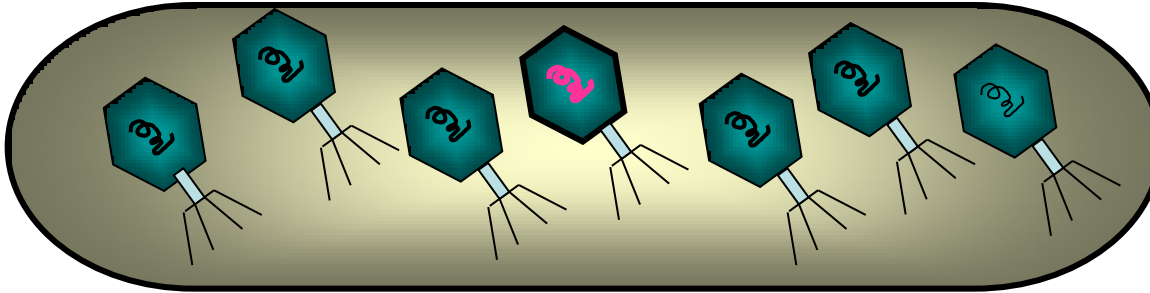
SPECIALIZZATA

possono essere trasferiti solo
marcatori specifici

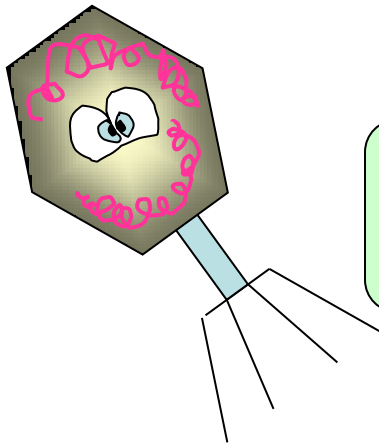
non tutti i fagi sono in grado di trasdurre e non tutti i batteri
possono essere trasdotti, ma il fenomeno è diffuso abbastanza da
avere importanza nel trasferimento genico in natura

GENERALIZZATA

alla fine di un ciclo litico può accadere che DNA dell'ospite venga impaccato in alcuni capsidi al posto di quello fagico



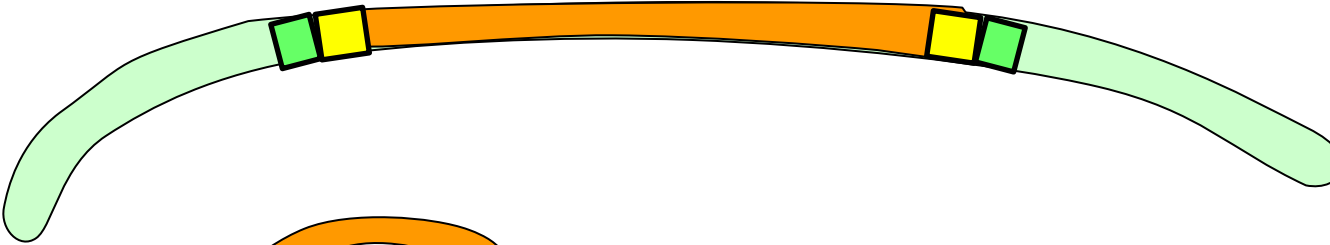
I fagi capaci di dare trasduzione generalizzata devono avere un meccanismo di impacchettamento che permetta il riconoscimento accidentale del DNA dell'ospite



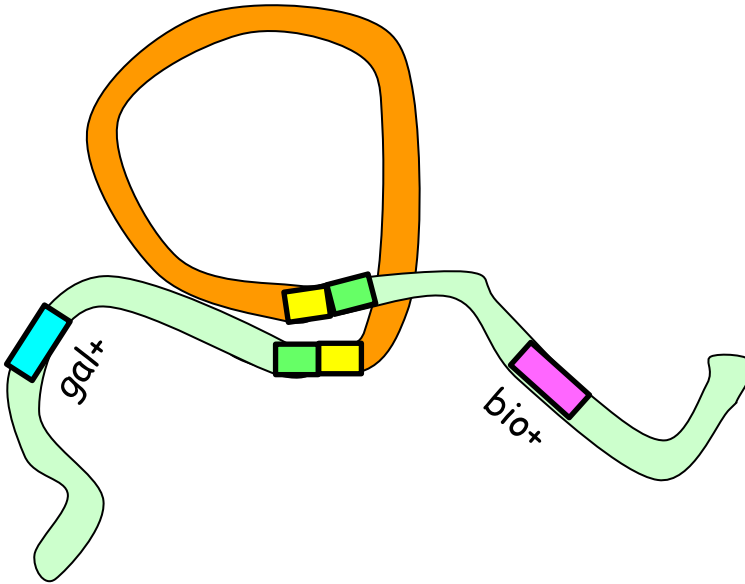
Il fago trasducente (circa 1/1000) può infettare un altro batterio ma non iniziare un normale ciclo di infezione perchè non c'è DNA virale (particella difettiva)

Es. fago lambda: può a volte trasdurre il gene *gal*

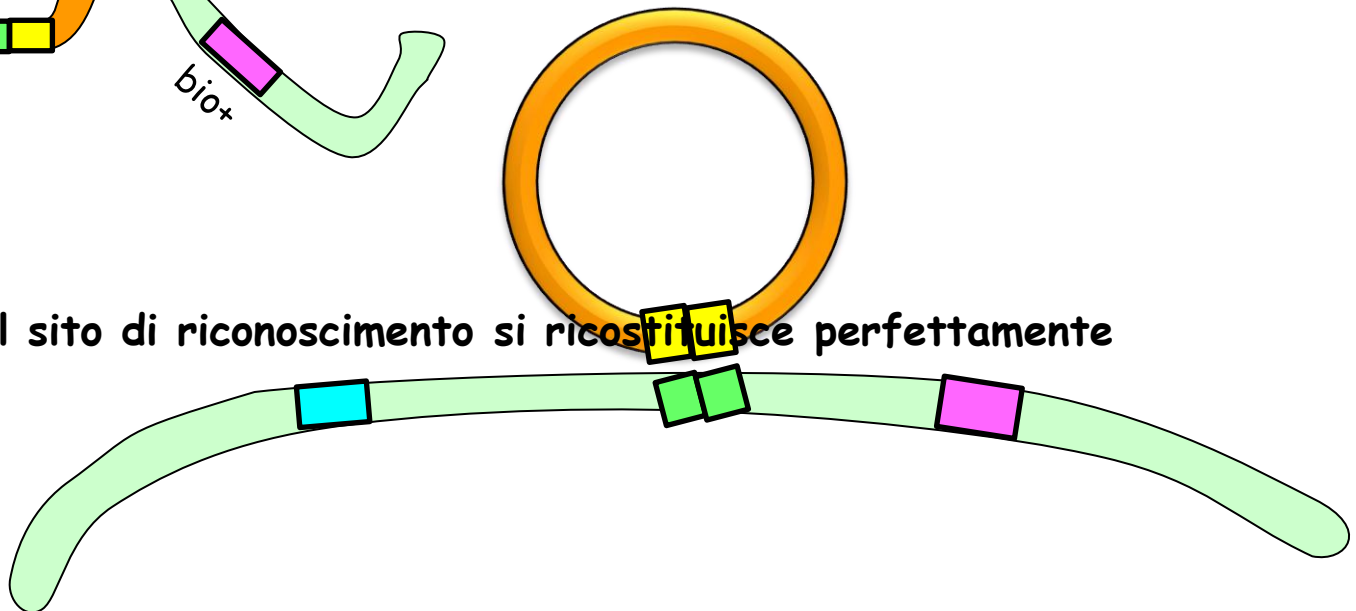
Il sito di integrazione per lambda si trova tra i geni *gal* e *bio*

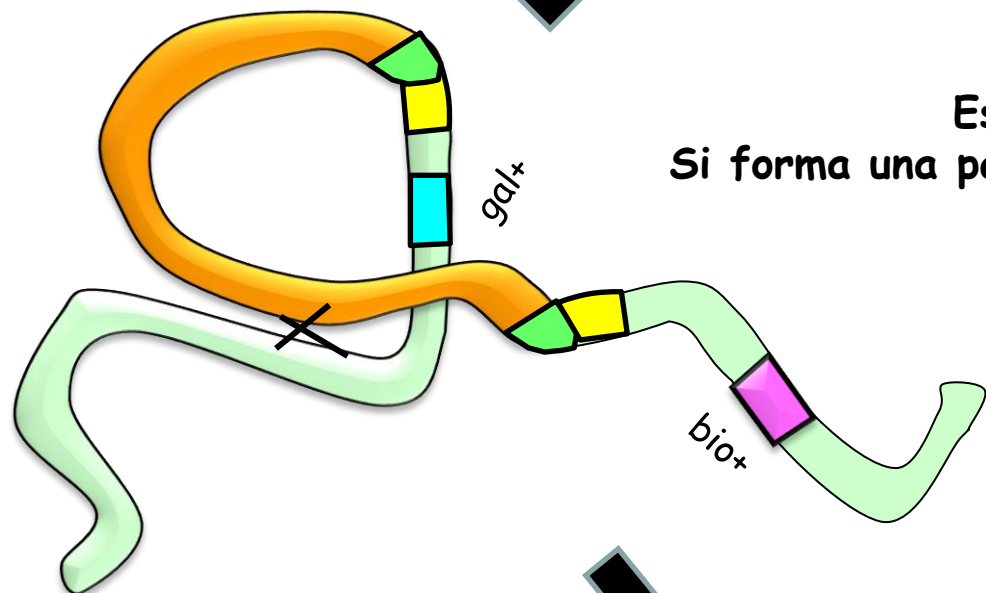
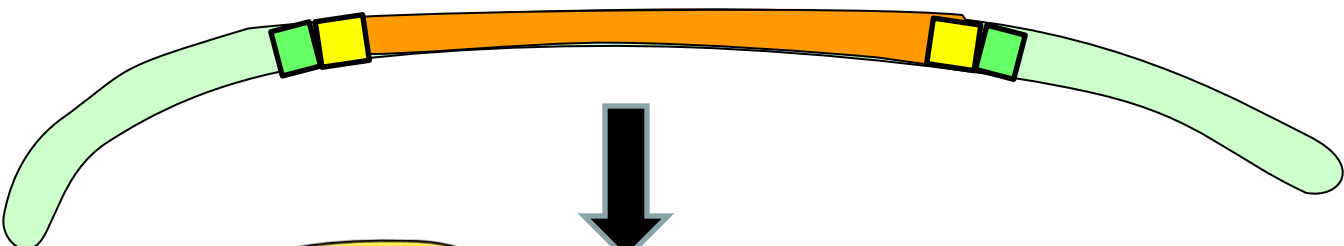


Escissione corretta
Il fago si escinde senza modificare nè il proprio genoma nè quello del batterio

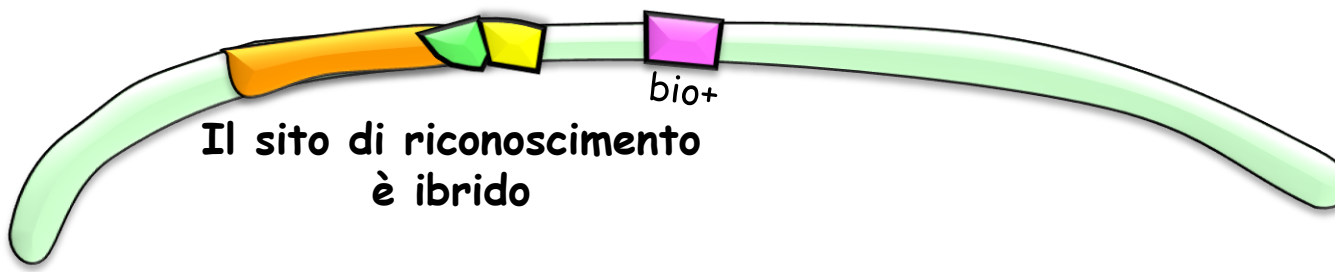
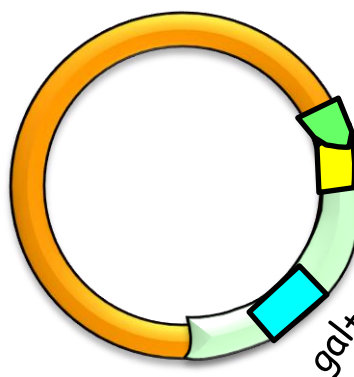


Il sito di riconoscimento si ricostituisce perfettamente



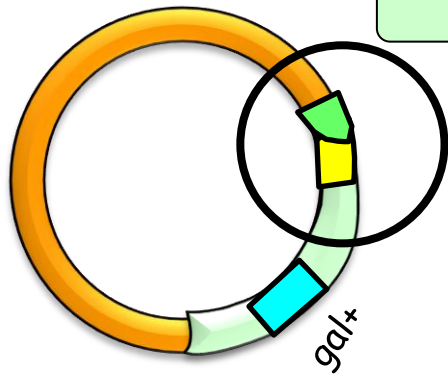


Escissione errata (rara)
Si forma una particella trasducente per il gene *gal*

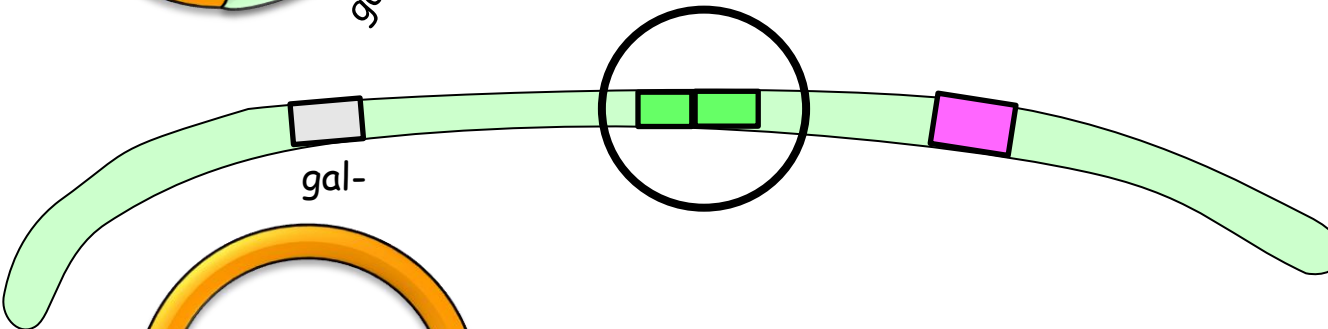


Il sito di riconoscimento
è ibrido

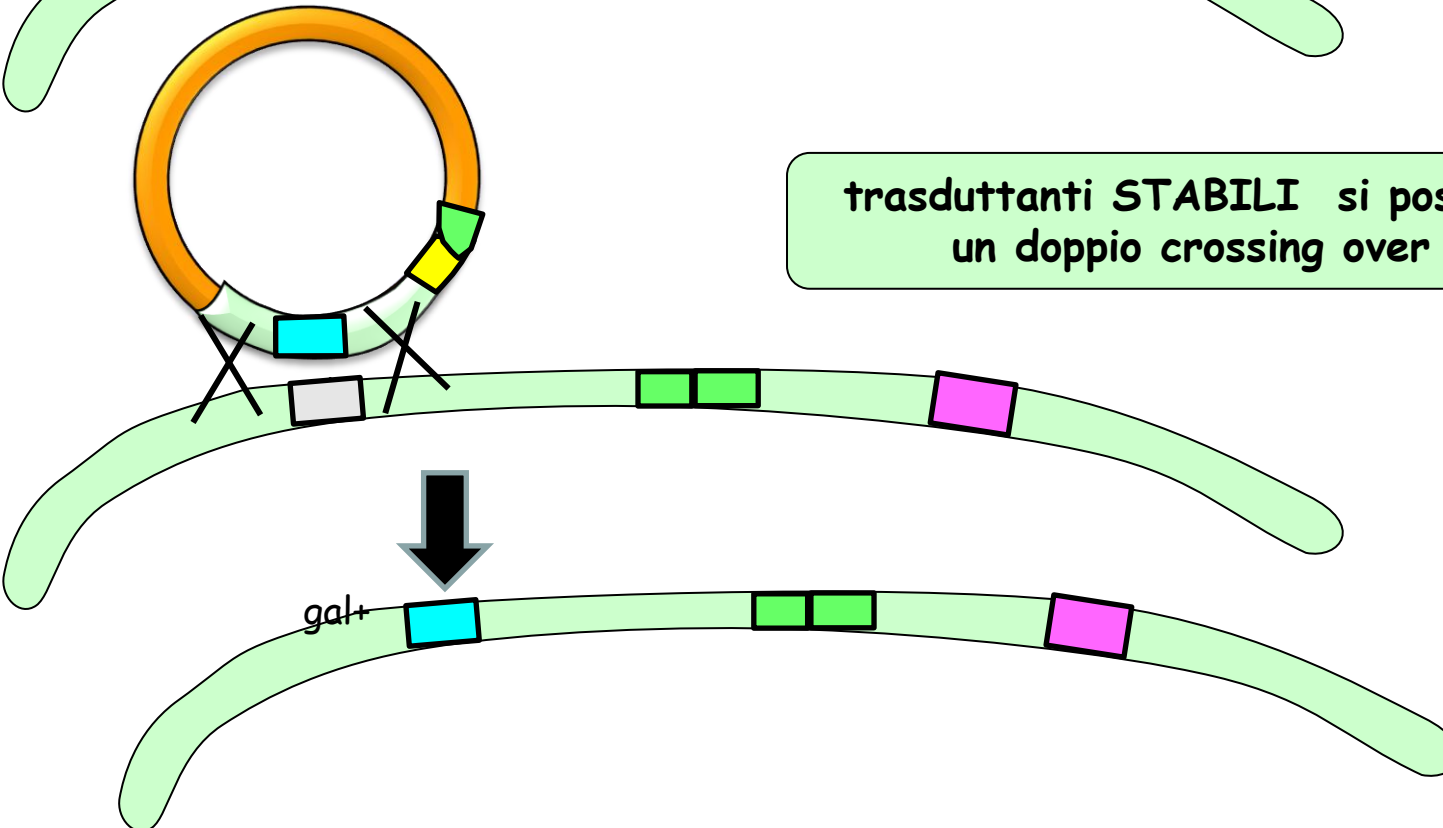
"gal" si integra stabilmente nel genoma virale



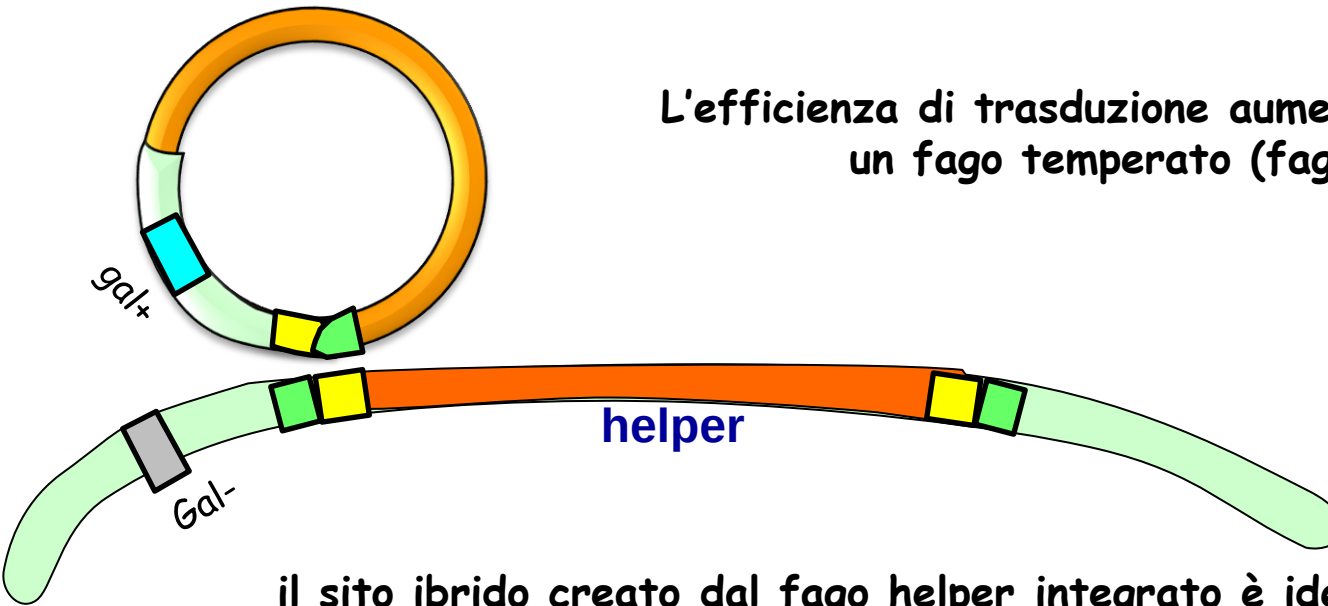
può essere trasferito a bassa efficienza: il sito di riconoscimento ibrido rende difficile l'integrazione



trasduttanti STABILI si possono formare con un doppio crossing over ai lati di *gal*



L'efficienza di trasduzione aumenta in presenza di un fago temperato (fago helper)



il sito ibrido creato dal fago helper integrato è identico a quello della particella trasducente e permette l'integrazione

Il fago helper può supplire a eventuali perdite di funzione della particella trasducente



I trasduttanti sono instabili perché il profago può essere indotto all'escissione

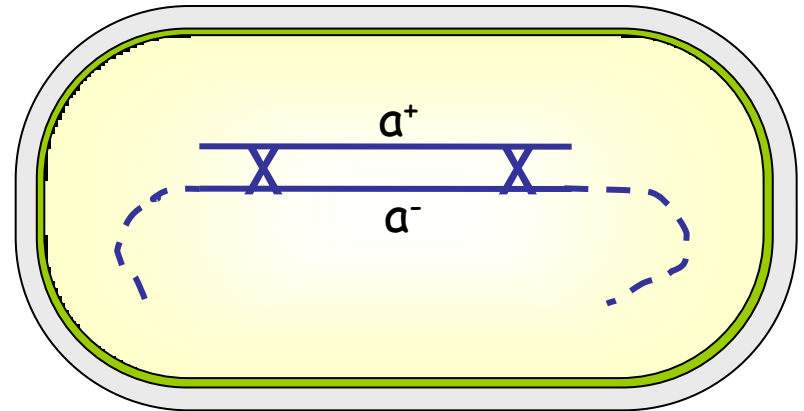
La trasduzione permette di introdurre nuovi alleli
o anche nuovi geni nel cromosoma batterico

La quantità di DNA batterico trasportato varia con le dimensioni del capside

Il fago P1 di E. coli può trasportare fino a 99
Kb (2% del cromosoma batterico)

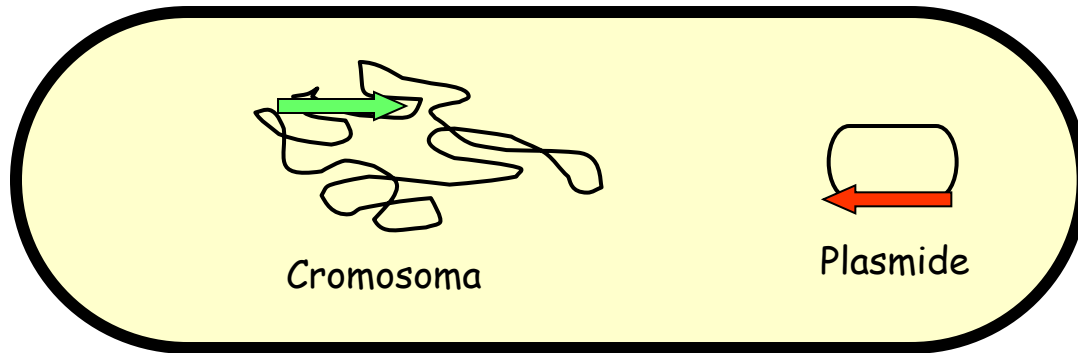
TRASDUZIONE ABORTIVA

Solo il 10-30% del DNA trasdotto si integra,
ma la parte non integrata può formare dei
diploidi parziali e esprimersi per qualche
generazione

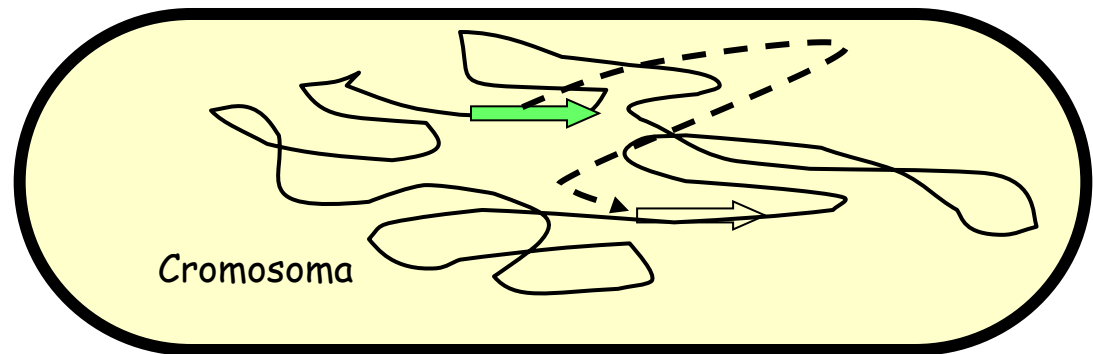


TRASPOSIZIONE

E' LO SCAMBIO DI MATERIALE GENETICO TRA REPLICONI DIVERSI



O LO SPOSTAMENTO TRA SEDI DIVERSE DELLO STESSO REPLICONE

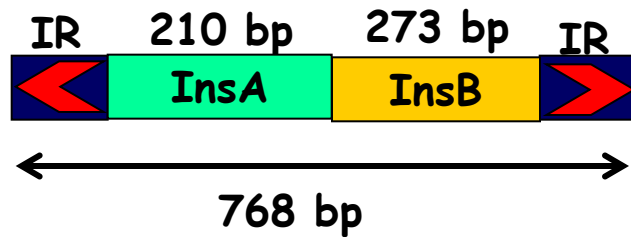


Gli elementi trasponibili sono sequenze che hanno la capacità di spostarsi e di integrarsi con una ricombinazione sito specifica, in corrispondenza di siti bersaglio

L'inserzione richiede l'intervento di enzimi specifici

i più semplici sono le SEQUENZE DI
INSERZIONE (IS) :

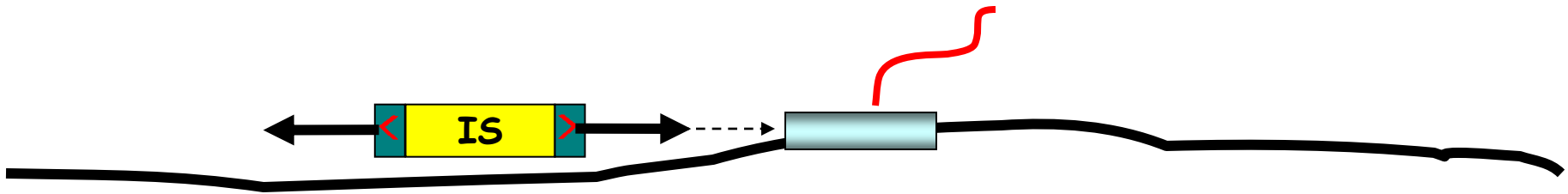
contengono solo i geni per il proprio
trasferimento (trasposasi)



sono caratterizzate da "Inverted
repeat" alle estremità

Sono comuni sia sul cromosoma che su plasmidi

Le IS sono anche chiamate "DNA egoista" ma possono avere una influenza notevole sull'espressione genica di un ceppo batterico



Sono fiancheggiate da promotori forti, diretti verso l'esterno, che possono sostituirsi a promotori regolati

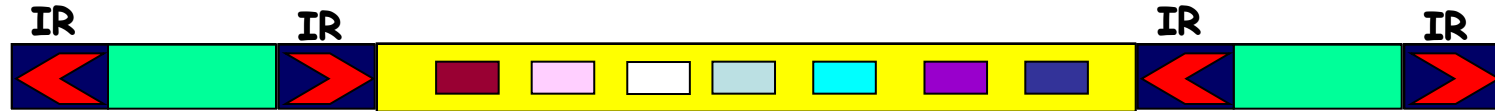


O possono inserirsi all'interno di geni bersaglio e interromperli inattivandoli



Se la trasposizione avviene in un operone si osserva un effetto "polare" con la mancata espressione anche dei geni 2 e 3

Quando due IS fiancheggiano un segmento di DNA



Si forma un trasposone composto, che si muove come un elemento unico, portando con sé anche i geni compresi tra le due IS

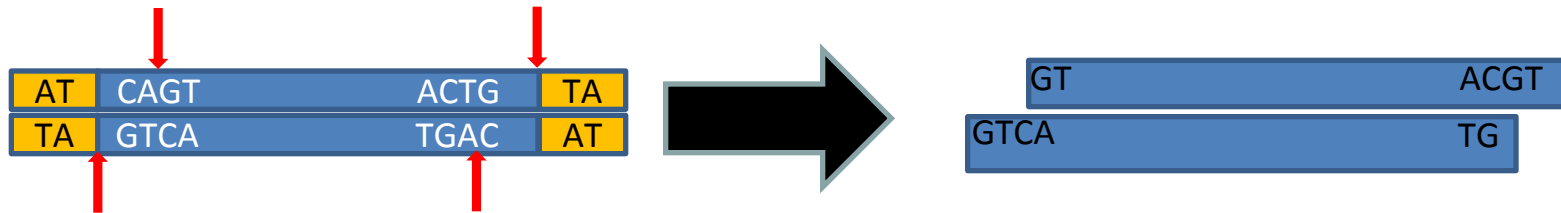
I trasposoni si inseriscono a livello di determinate sequenze di riconoscimento, con meccanismo:

REPLICATIVO
(Es Tn3)

CONSERVATIVO
(es. Tn10)

Conservativo: trasposizione semplice (taglia e cuci)

La trasposasi taglia i due filamenti in modo sfalsato in corrispondenza di ripetizioni invertite



Anche il DNA ospite è tagliato in modo sfalsato in corrispondenza del sito bersaglio



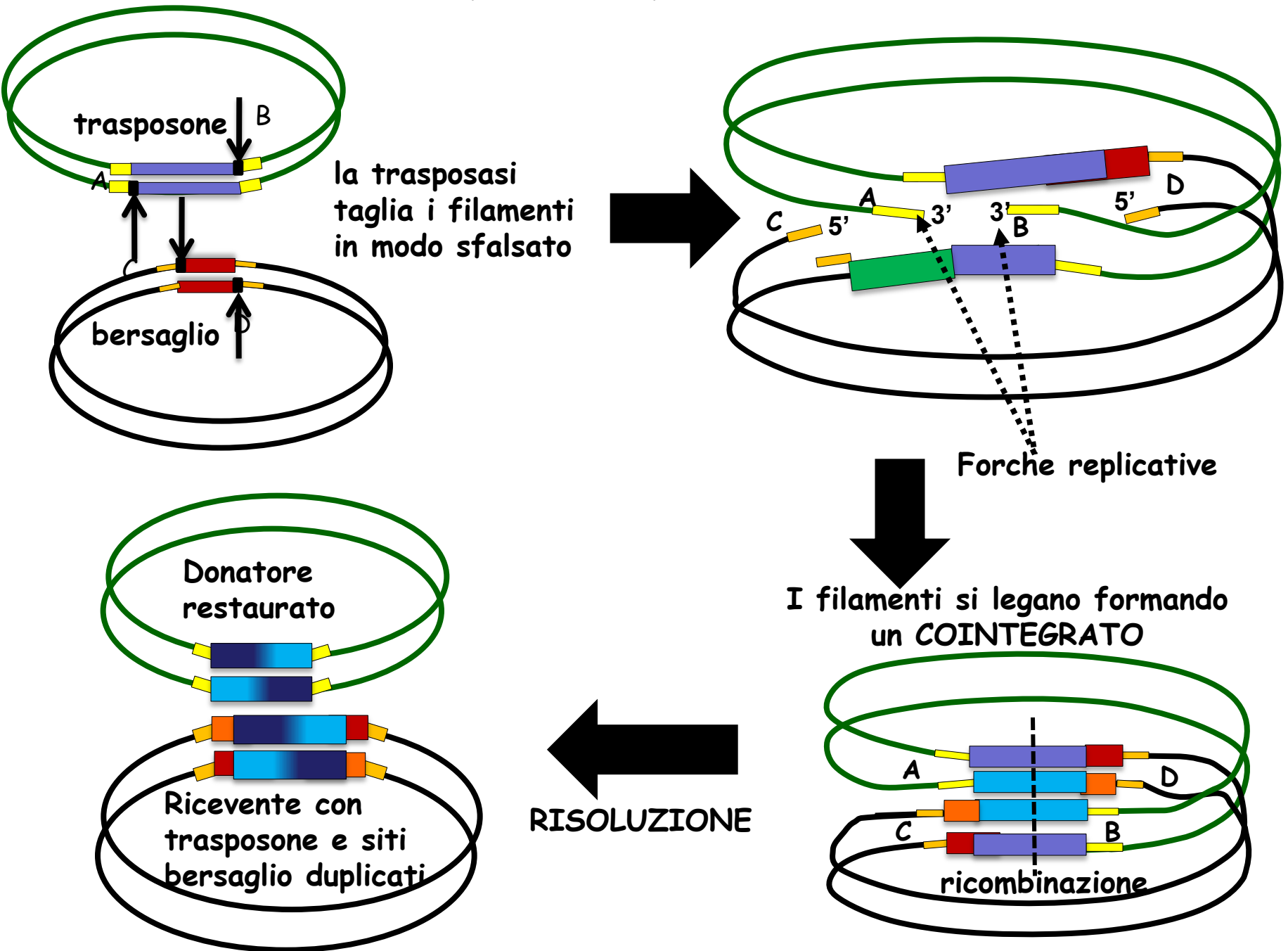
Il trasposone è legato al DNA ospite, alle due estremità, lasciando dei vuoti



I vuoti vengono riparati e il sito bersaglio si duplica

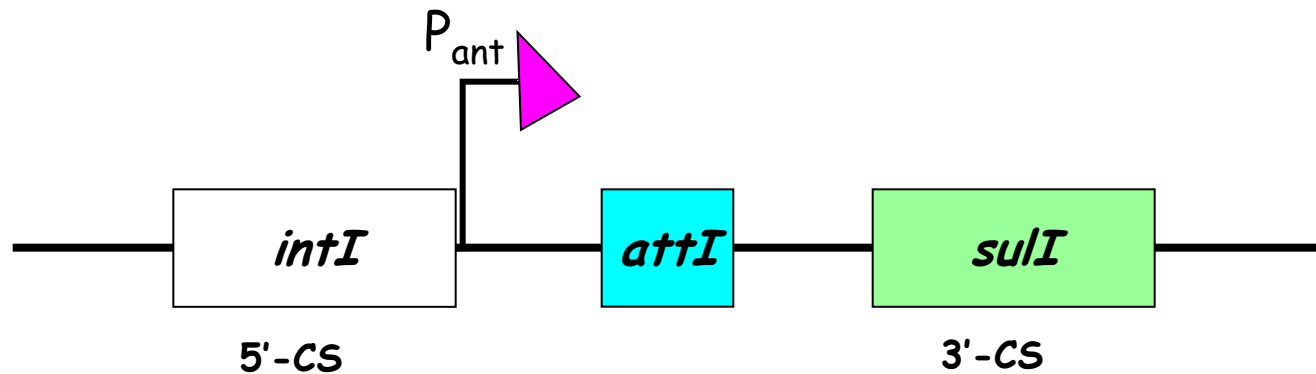


replicazione replicativa



INTEGRONI:

regioni dove geni della resistenza, di varia provenienza, possono accumularsi, integrandosi

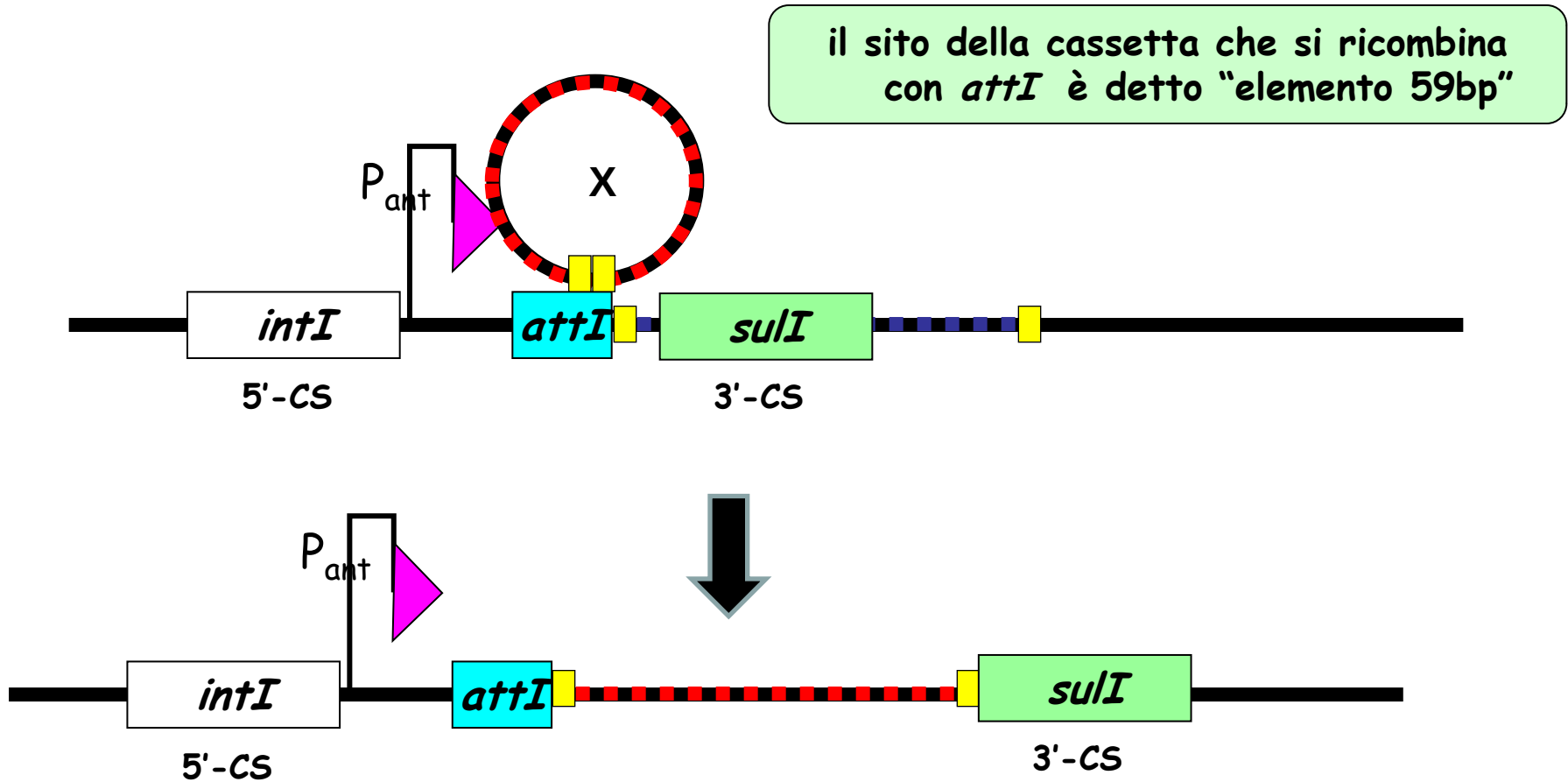


Sono caratterizzati da due regioni conservate

da un promotore (P_{ant})

e da un sito di ricombinazione (*attI*)

Le cassette di resistenza si integrano con un processo di ricombinazione sito specifico, in corrispondenza del sito *attI*



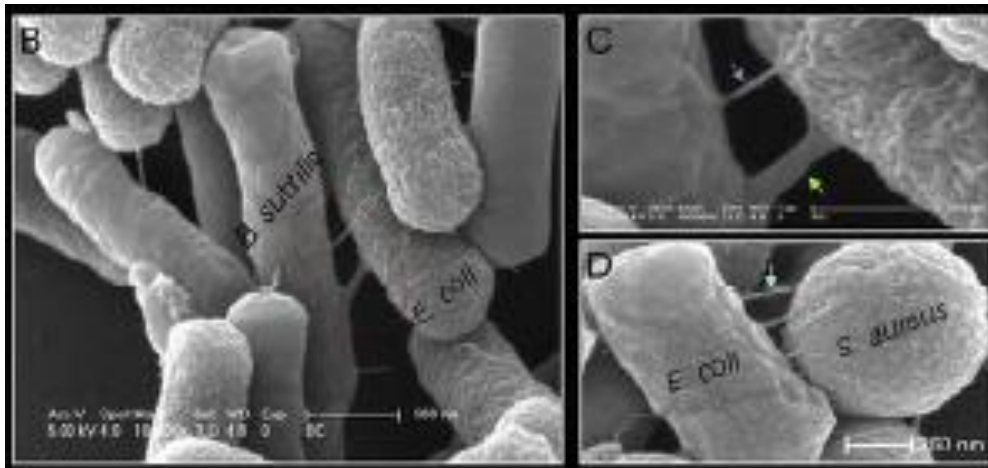
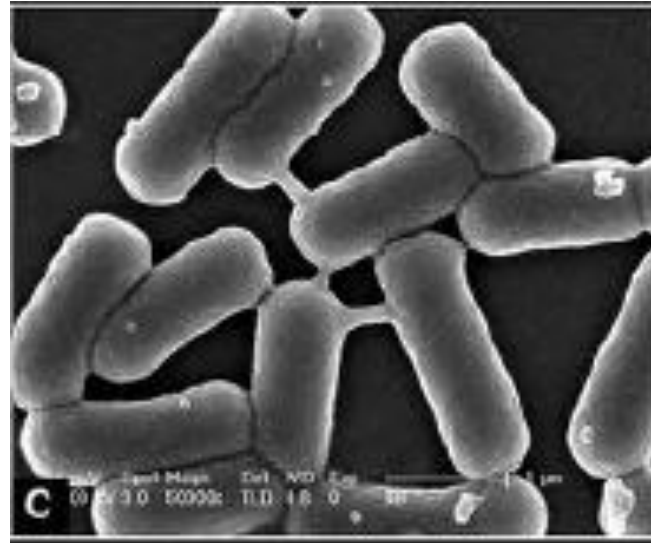
I geni delle cassette non hanno promotore, entrano tutti nello stesso orientamento, e sono co-trascritti da P_{ant}

I NANOTUBULI!!

Un nuovo modo di acquisire materiale genetico, ma anche di ottenere il risultato dell'acquisizione senza effettuarla realmente

È stato scoperto nel 2011

Ponti citoplasmatici che connettono una cellula all'altra, anche tra specie lontane come *Staphylococcus*, *E. coli* e *B. subtilis*



È POSSIBILE IL
PASSAGGIO DI
PRODOTTI