

FATTORI SIGMA ALTERNATIVI

Ogni fattore sigma riconosce una classe di promotori con specifiche sequenze consensus -35 e -10

<i>E. coli</i>	Geni trascritti	Segnale
s 70	maggior parte dei geni	
s 32	geni heat-shock	temperatura elevata
s 55	geni regolati dall'azoto	carenza di ammonio
s 38	geni da stress ossidativi	agente ossidante

AGENTI CHIMICI E FISICI POSSONO
INDURRE MUTAZIONI

E DANNEGGIARE GLI ACIDI NUCLEICI



Blocco della forza replicativa nel punto
del danno → ssDNA



RISPOSTA SOS

REAZIONE A TUTTO QUELLO
CHE CAUSA DANNI AL DNA

recA + ssDNA → cambio
conformazione

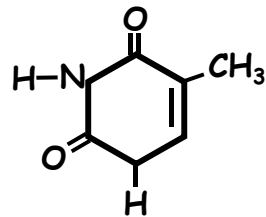


Attività di co-proteasi su LexA
(repressore)

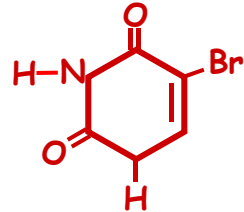


Espressione dei geni SOS

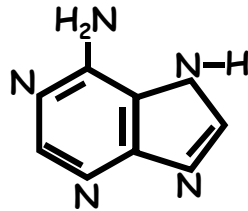
MUTAGENI CHIMICI-1



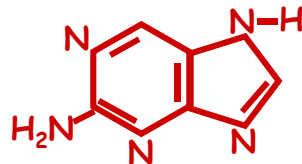
Timina



5-BromoUracile



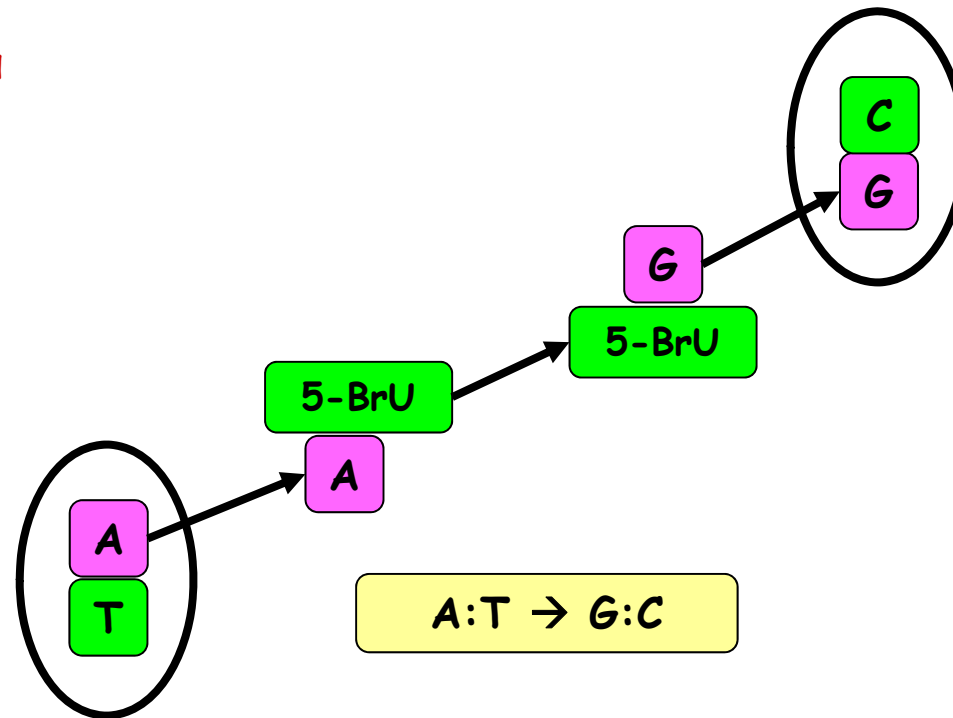
Adenina



2-Aminopurina

ANALOGHI DELLE BASI

Es. 5-BrU: a differenza della Timina, il suo legame con "G" è stabile



MUTAGENI CHIMICI-2

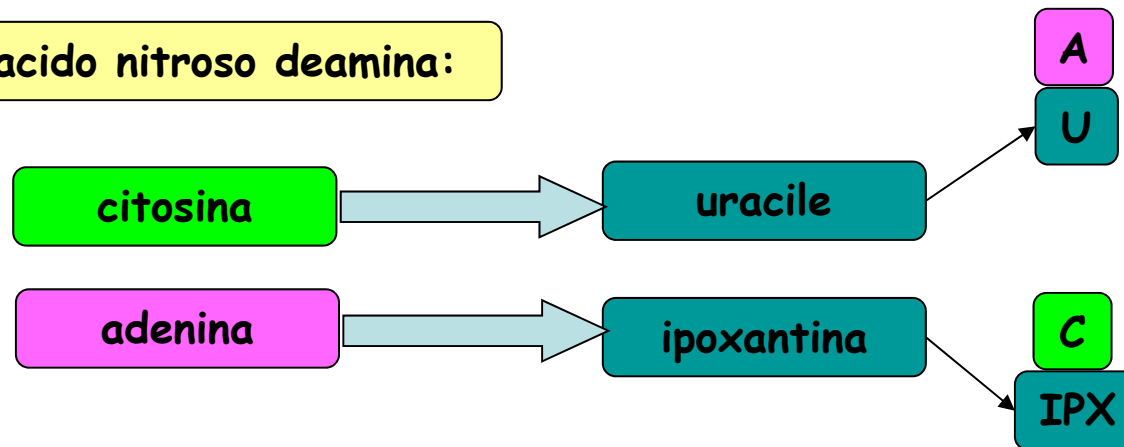
AGENTI ALCHILANTI

trasformano le basi alterandone le proprietà di appaiamento

Inducono mutazioni con frequenza molto più alta degli analoghi delle basi

Nitrosoguanidina, Acido nitroso, Idrossilamina; etilmetanosulfonato

Es acido nitroso deamina:

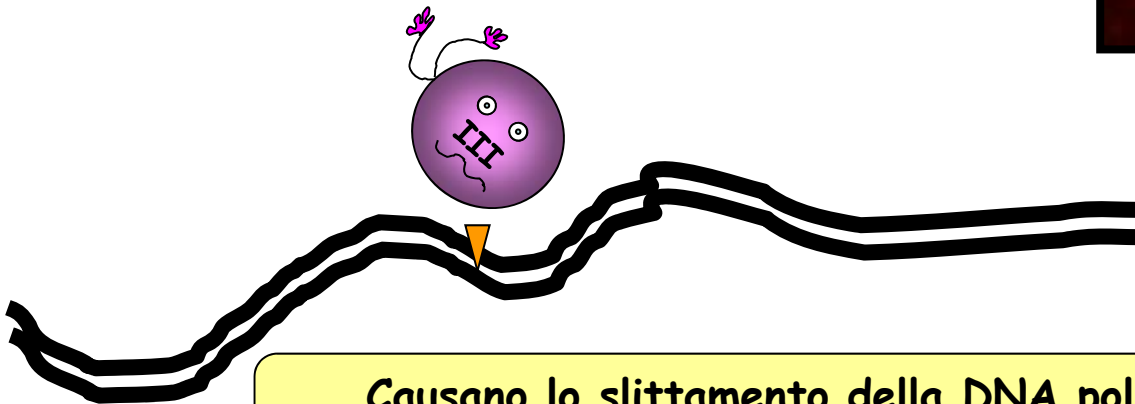
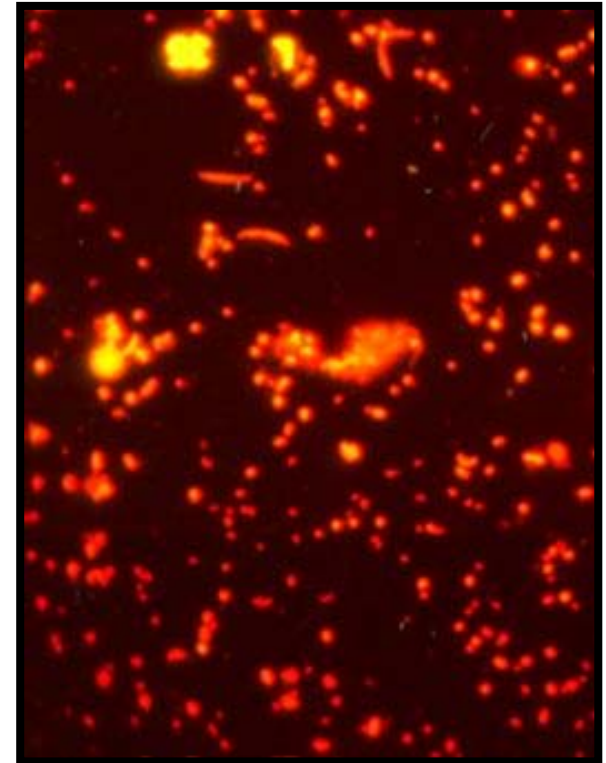


MUTAGENI CHIMICI-3

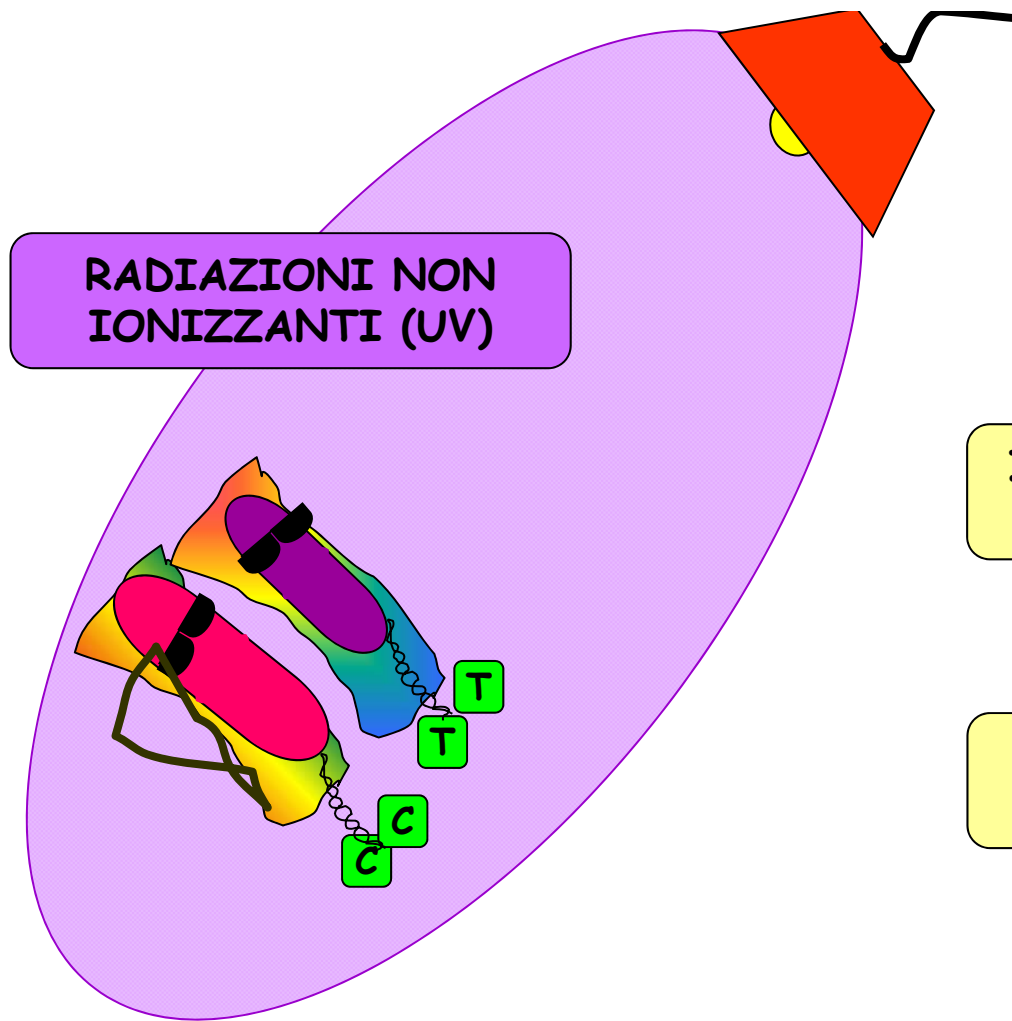
AGENTI INTERCALANTI

Arancio di acridina, proflavina;
bromuro di etidio

si inseriscono tra due basi
del DNA, separandole



Causano lo slittamento della DNA polimerasi, provocando
microinserzioni e microdelezioni durante la replicazione



MUTAGENI FISICI-1

I nucleotidi assorbono i raggi UV
con picco a 269 nm

UV₂₆₀ provoca la formazione di
DIMERI di PIRIMIDINE

Tra due C o T adiacenti si
formano legami covalenti

i dimeri aumentano la probabilità che la DNA
polimerasi inserisca un nucleotide errato

MUTAGENI FISICI-2
Radiazioni ionizzanti

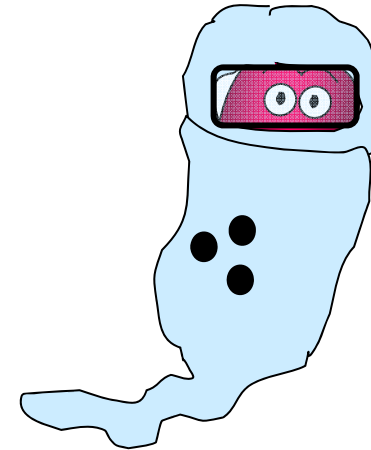
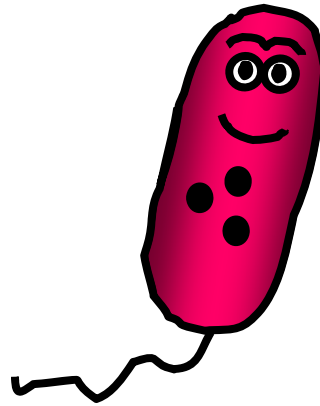
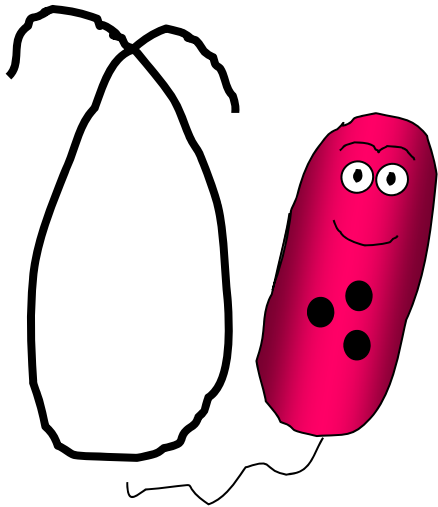
Radiazioni a onda corta
molto penetranti

RAGGI

gamma

X

cosmici

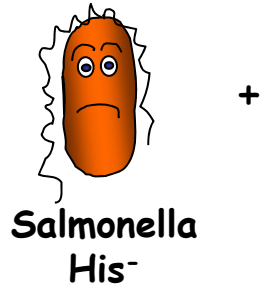


ionizzazione di H_2O e
altre sostanze

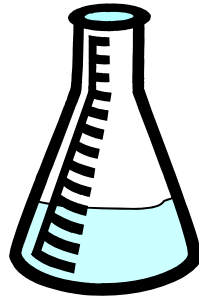
radicali liberi es OH^-

azione mutagena
indiretta

Molti composti chimici possono essere mutageni (cancerogeni)



+



controllo



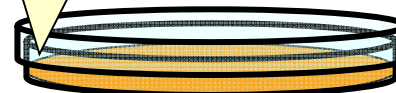
+ Composto
da analizzare

Pochi
retromutanti



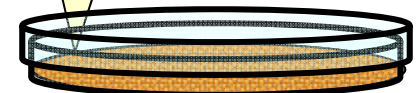
Terreno privo
di istidina

Frequenza invariata
Il composto NON è
mutageno



Terreno privo
di istidina

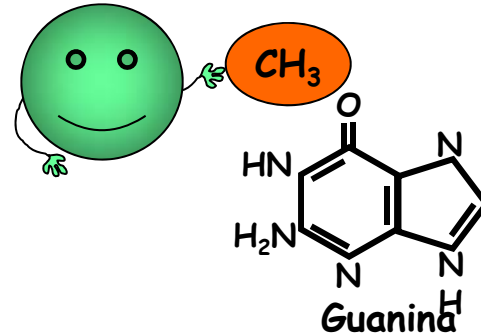
Frequenza aumentata:
il composto E'
MUTAGENO



Terreno privo
di istidina

**Riparazione DNA
diretta**

**Riparazione della base
modificata**
Es. Metilguanina transferasi



**Trasferisce su di sé
il gruppo metile**

**Separazione dei
dimeri di pirimidine
(fotoliasi)**

**Assorbe radiazioni
nel visibile**



TT

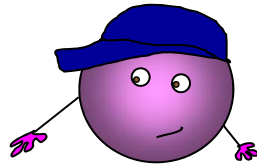
TT

**Rompe i legami covalenti e
ricostruisce la struttura corretta**

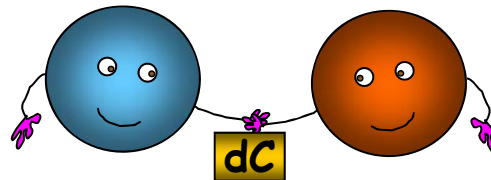
**Riparazione DNA
Indiretta (escissione e ricostruzione)**

La base mutata è estratta e
sostituita con quella giusta

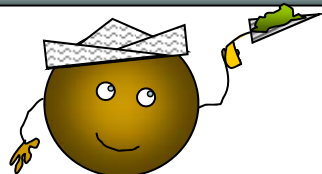
Es: DNA-glicosilasi individua
l'uracile derivato dalla deaminazione
della citosina e lo rimuove



Il "vuoto" è chiamato sito "AP"



AP-endonucleasi e
deossiribofosfodiesterasi introducono
la base corretta nel sito AP



La DNA polimerasi stabilizza
la base nell'elica

Alterazioni più ampie (errato appaiamento
o dimeri da radiazioni)

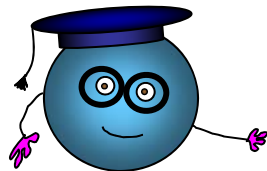
devono essere riparate
in altro modo

Filamenti che contengono dimeri
di pirimidine NON possono
essere replicati normalmente

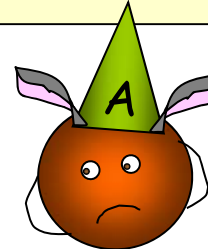
E' essenziale che la
riparazione avvenga

I sistemi di riparazione sono attivati dalla
presenza dei danni al DNA (sistema SOS)

UvrA..
(non provoca errori)



DNA polimerasi IV e V (DNA mutasi)
provocano errori= MUTAZIONI

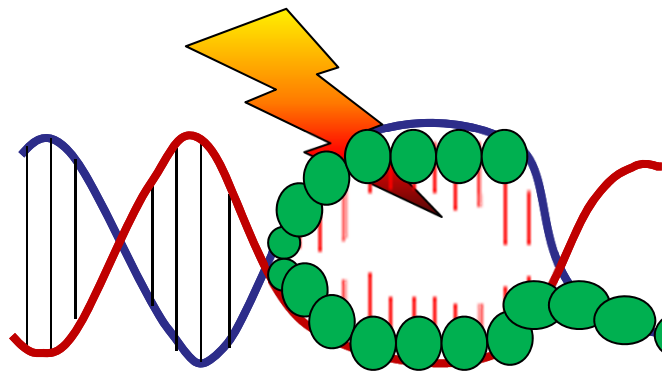


Sono indotte tardivamente e aumentano la variabilità e le possibilità di
sopravvivenza di fronte a uno stress di vasta portata

NELLA RISPOSTA SOS

Induzione: danno da UV
e/o ROS

Attivazione coordinata di
>30 geni per la riparazione



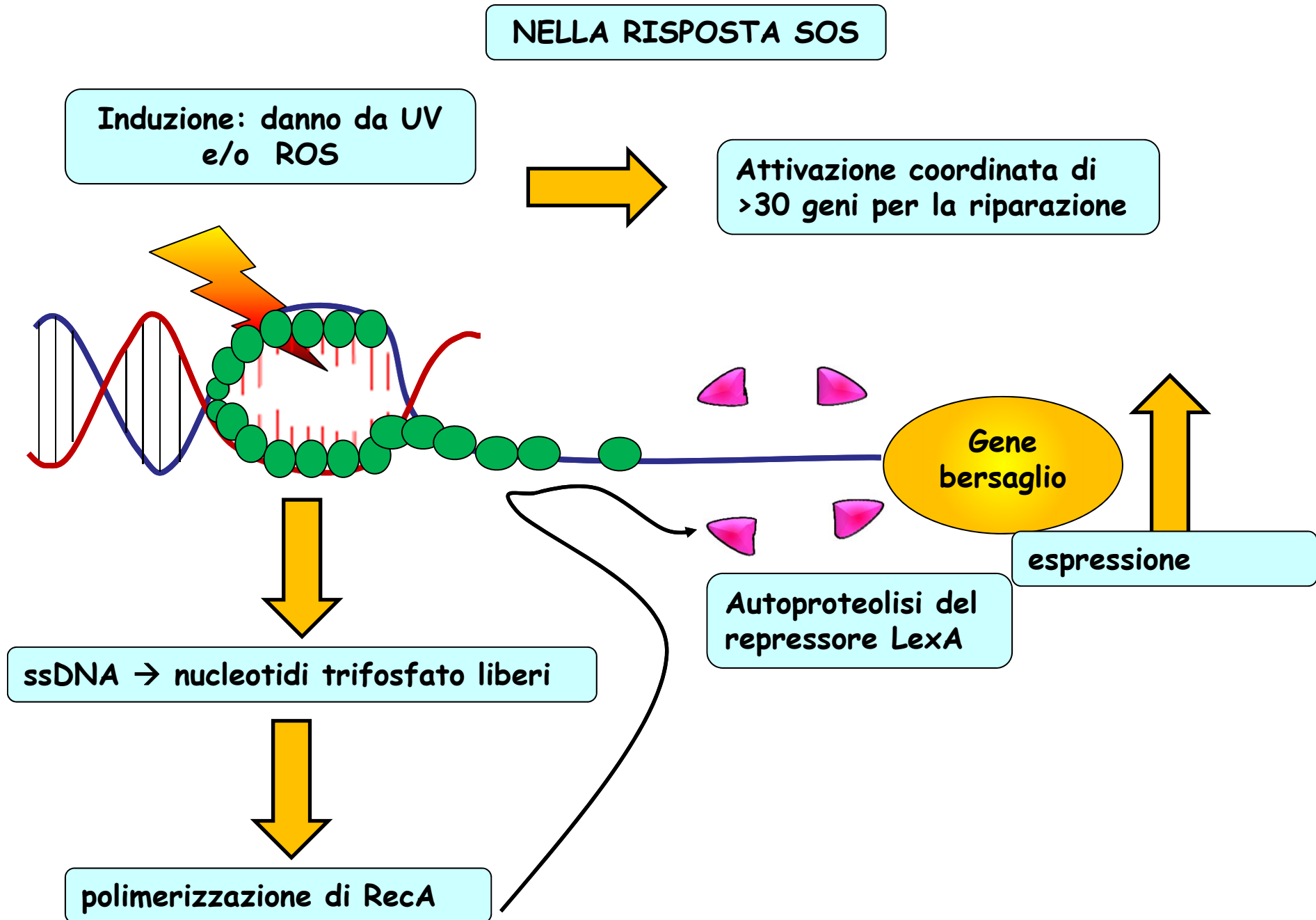
ssDNA → nucleotidi trifosfato liberi

polimerizzazione di RecA

Autoproteolisi del
repressore LexA

Gene
bersaglio

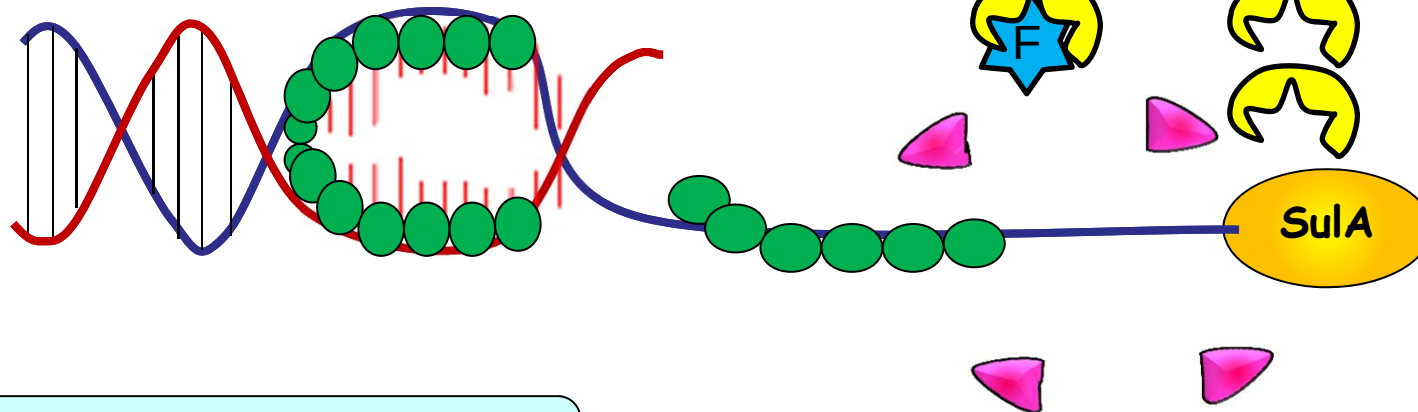
espressione



La risposta SOS blocca anche la
divisione cellulare

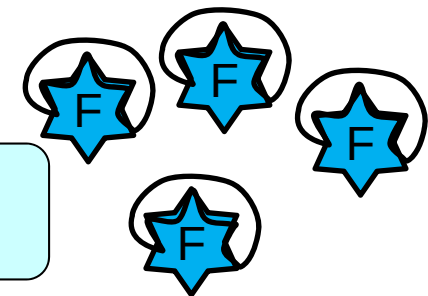
SulA, normalmente
represso da LexA

Si lega a FtsZ e impedisce la
formazione dell'anello



A riparazione completa, la
repressione si ripristina

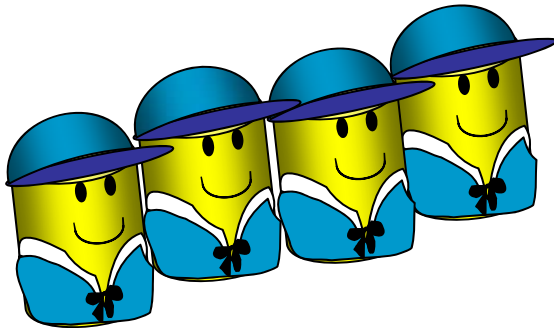
La proteasi Lon degrada SulA
liberando FtsZ



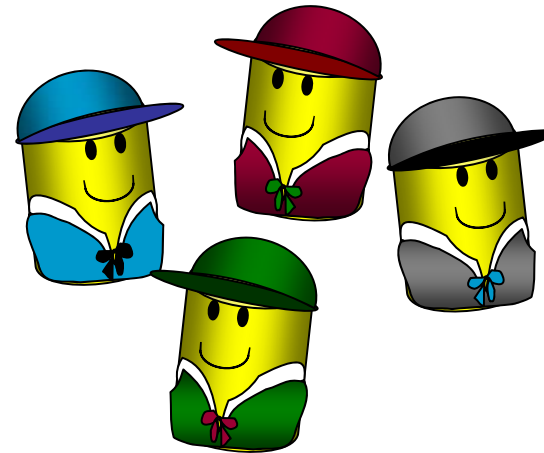
CONTROLLO GLOBALE

insieme di più geni o operoni sotto il controllo della stessa proteina regolatrice

Regulone:
i geni appartengono allo stesso pathway



Modulone:
i geni appartengono a pathway diversi



Molti geni e operoni che sono sotto un controllo globale possono essere contemporaneamente regolati, positivamente o negativamente con altre strategie

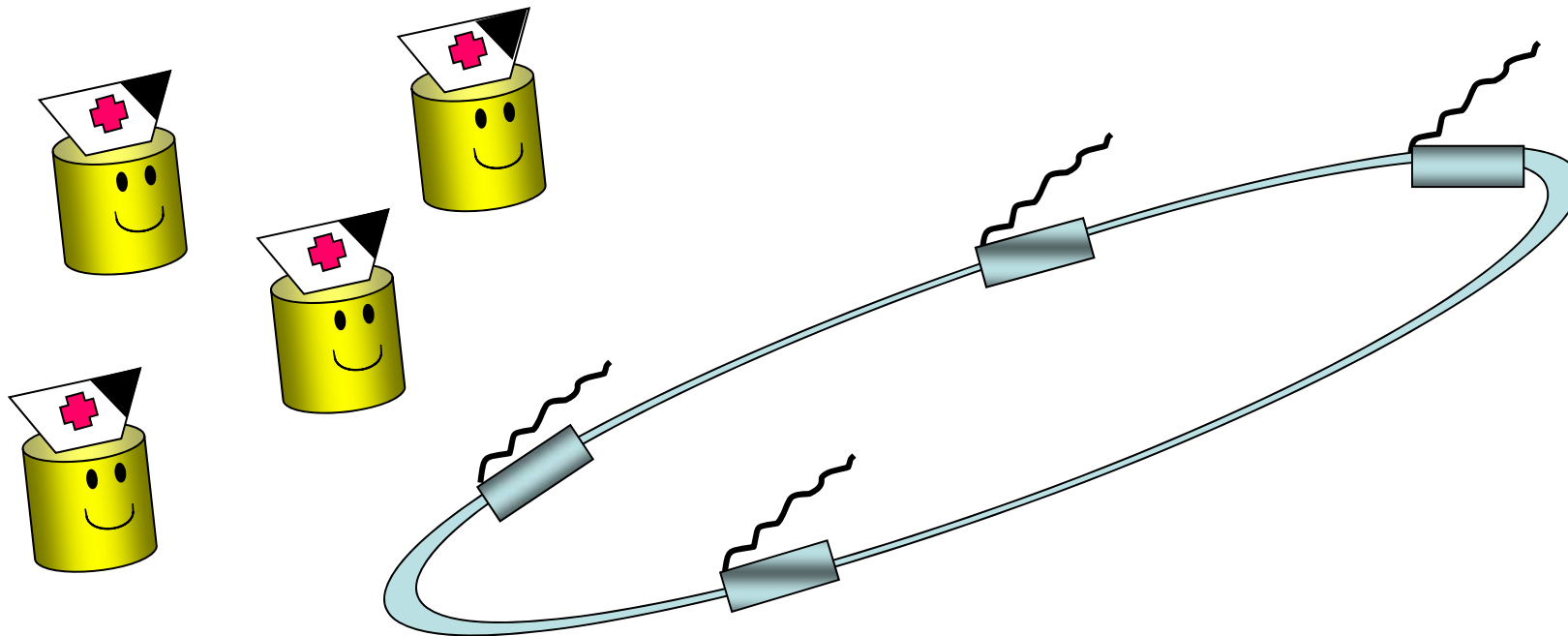
REGULONE DEL MALTOSIO



L'attivatore MalT è inattivo

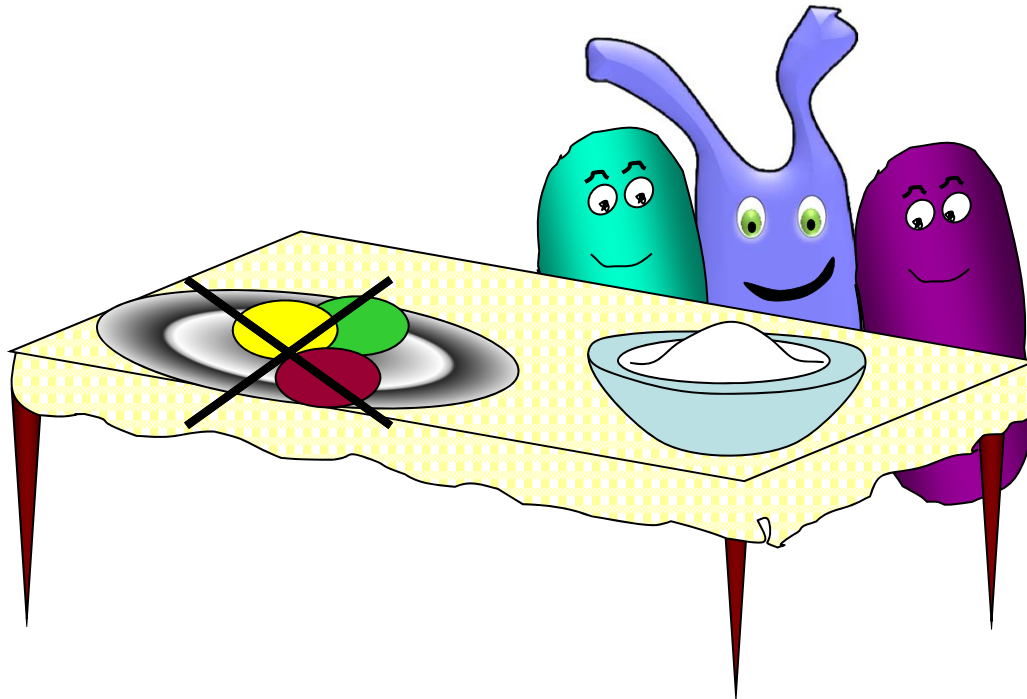
La forma attivata di MalT interagisce con 4 operoni, attivandone l'espressione

Quando è presente, il maltosio si lega a MalT e lo attiva



REPRESSIONE DA CATABOLITA un controllo globale su diversi operoni catabolici (es. Lac, ara..)

Se è disponibile glucosio come fonte di energia, la sintesi degli enzimi catabolici per altre fonti viene inibita

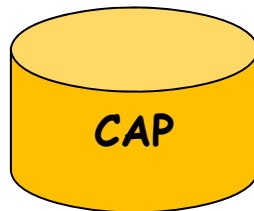
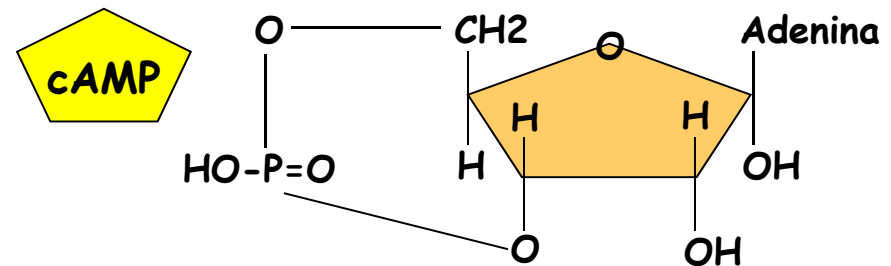


La cellula può così scegliere tra le diverse fonti di energia e/o carbonio disponibili, la più facile da utilizzare

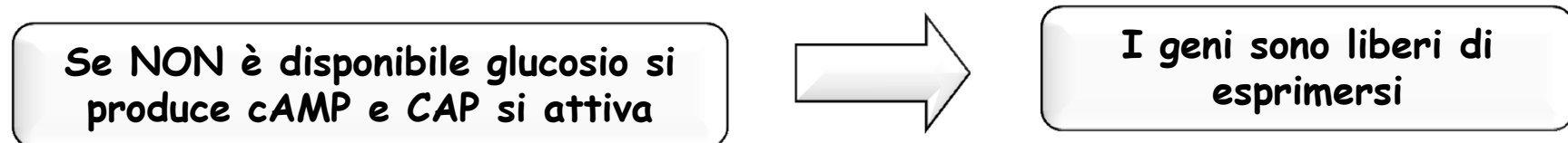
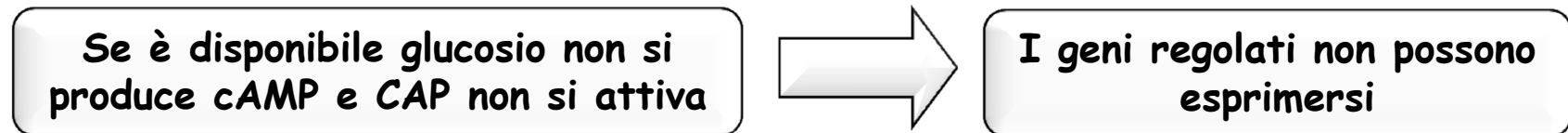
La molecola effettrice nella repressione da catabolita è cAMP

cAMP si lega alla proteina CAP, che si attiva e si comporta da regolatore

AMP ciclico

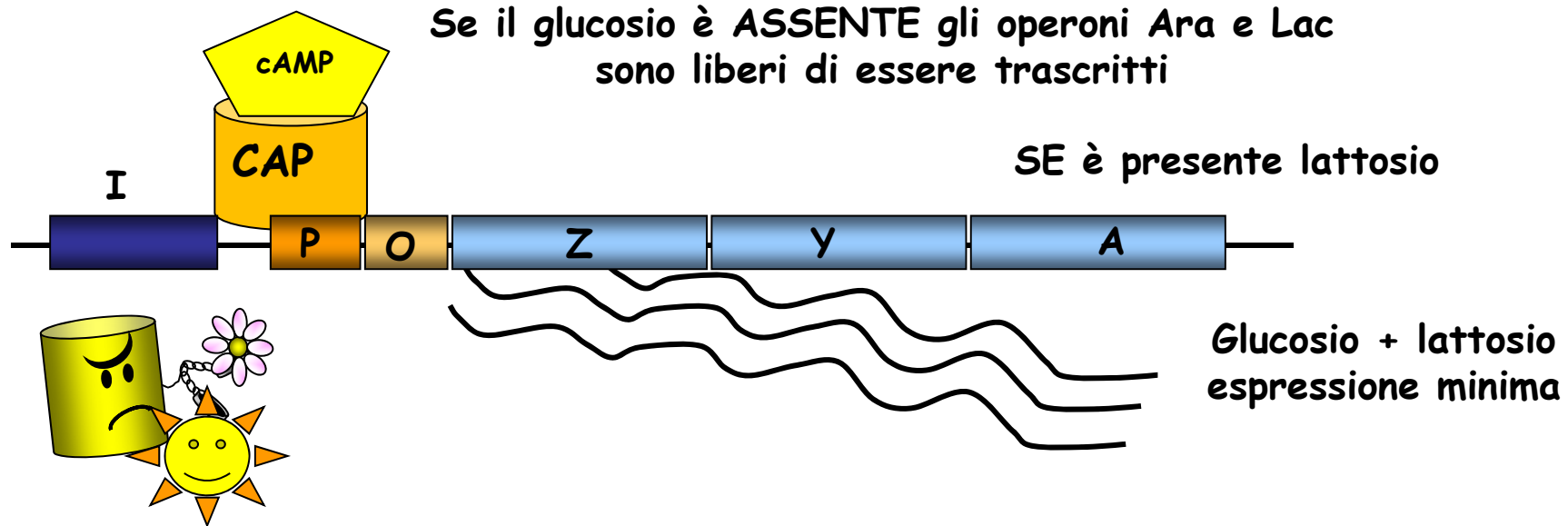


Ognuno degli operoni controllati da CAP è controllato anche da una proteina regolatrice specifica

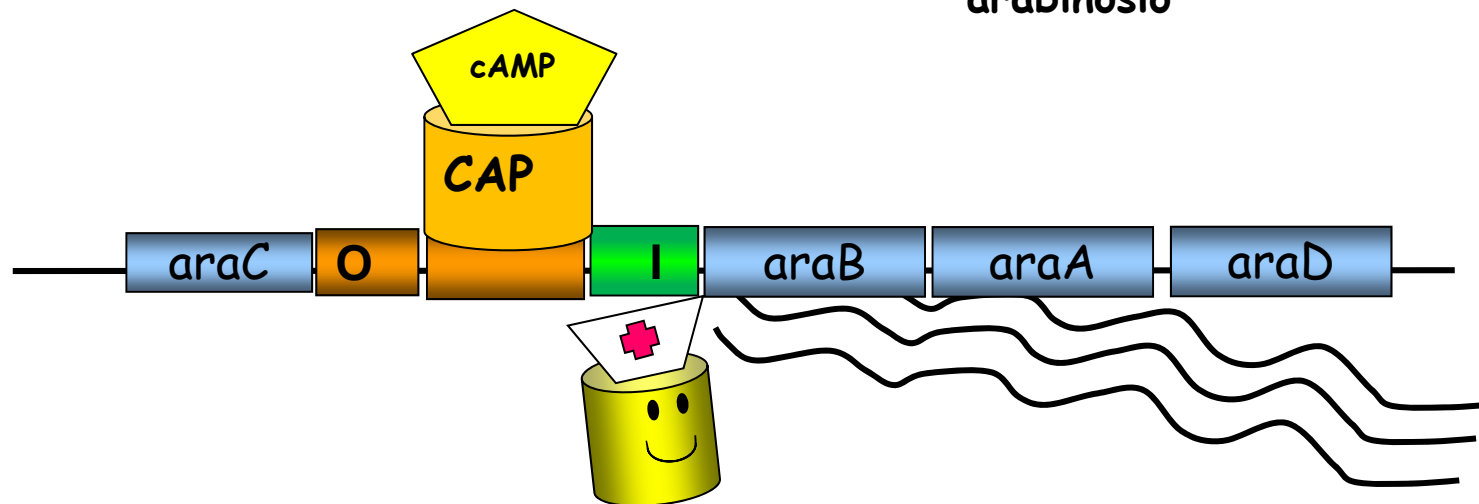


SECONDO LA REGOLAZIONE SPECIFICA

**L'operone Lac (regolato negativamente in modo specifico)
È regolato positivamente da CAP**

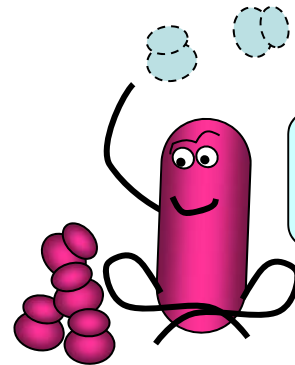


OPPURE SE è presente arabinosio

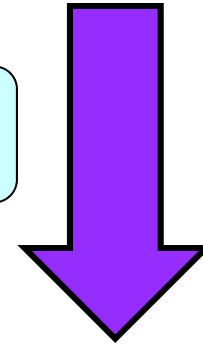


RISPOSTA STRINGENTE

risposta globale con cui i batteri affrontano
situazioni di emergenza

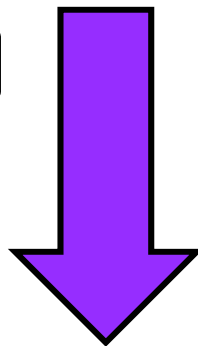


la quantità di ribosomi e di
tRNA si riduce

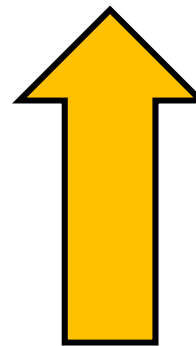


sintesi di nuove proteine

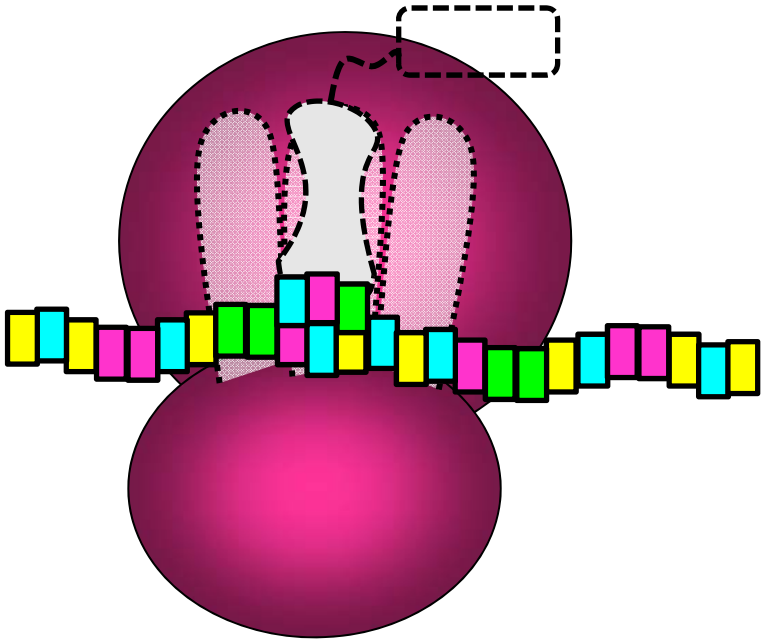
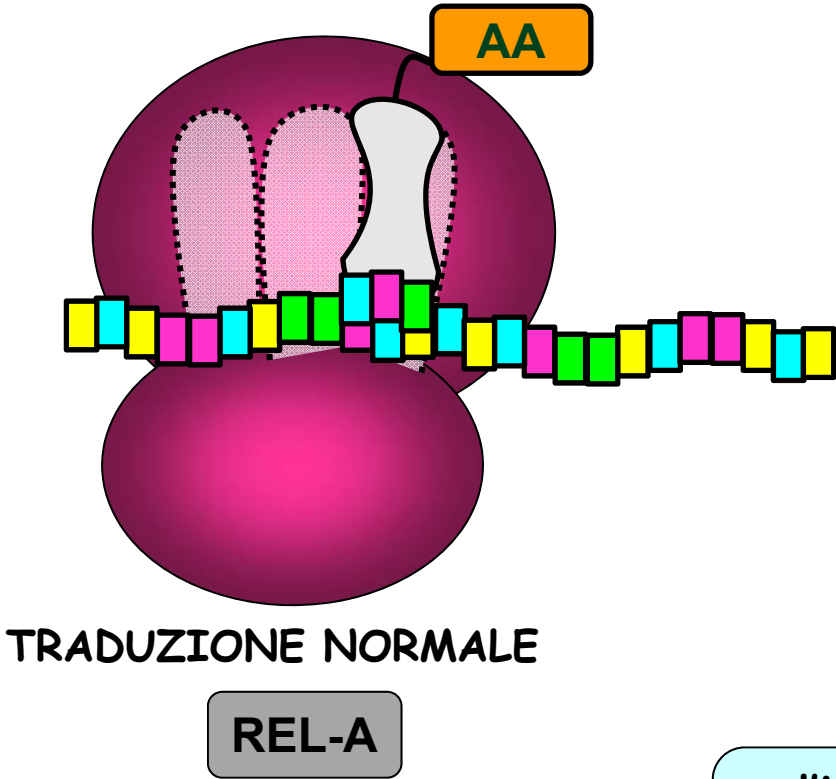
Duplicazione del DNA



Attivazione/repressione
di operoni biosintetici o
catabolici



Il segnale è la presenza di tRNA scarichi durante la traduzione



RISPOSTA STRINGENTE

REL-A

GTP
ATP

ppGpp

l'interazione di questi tRNA con il ribosoma induce la produzione di un nucleotide inusuale (ppGpp - allarmone) che agisce da regolatore

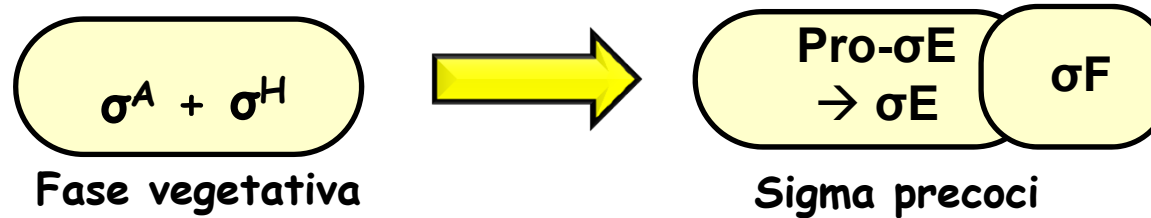
FATTORI SIGMA ALTERNATIVI

Ogni fattore sigma riconosce una classe di promotori con specifiche sequenze consensus -35 e -10

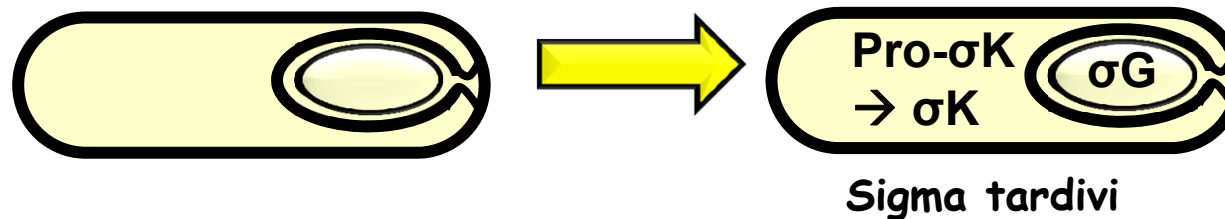
<i>E. coli</i>	Geni trascritti	Segnale
$\sigma 70$	maggior parte dei geni	
$\sigma 32$	geni heat-shock	temperatura elevata
$\sigma 55$	geni regolati dall'azoto	carenza di ammonio
$\sigma 38$	geni da stress ossidativi	agente ossidante

SPORULAZIONE

La formazione dell'endospora (8-10h) è controllata da diversi meccanismi tra cui la sintesi di fattori sigma alternativi, particolarmente importanti



al segnale di scarsità di nutrienti nell'ambiente, si avviano i processi che portano alla sintesi di fattori sigma alternativi

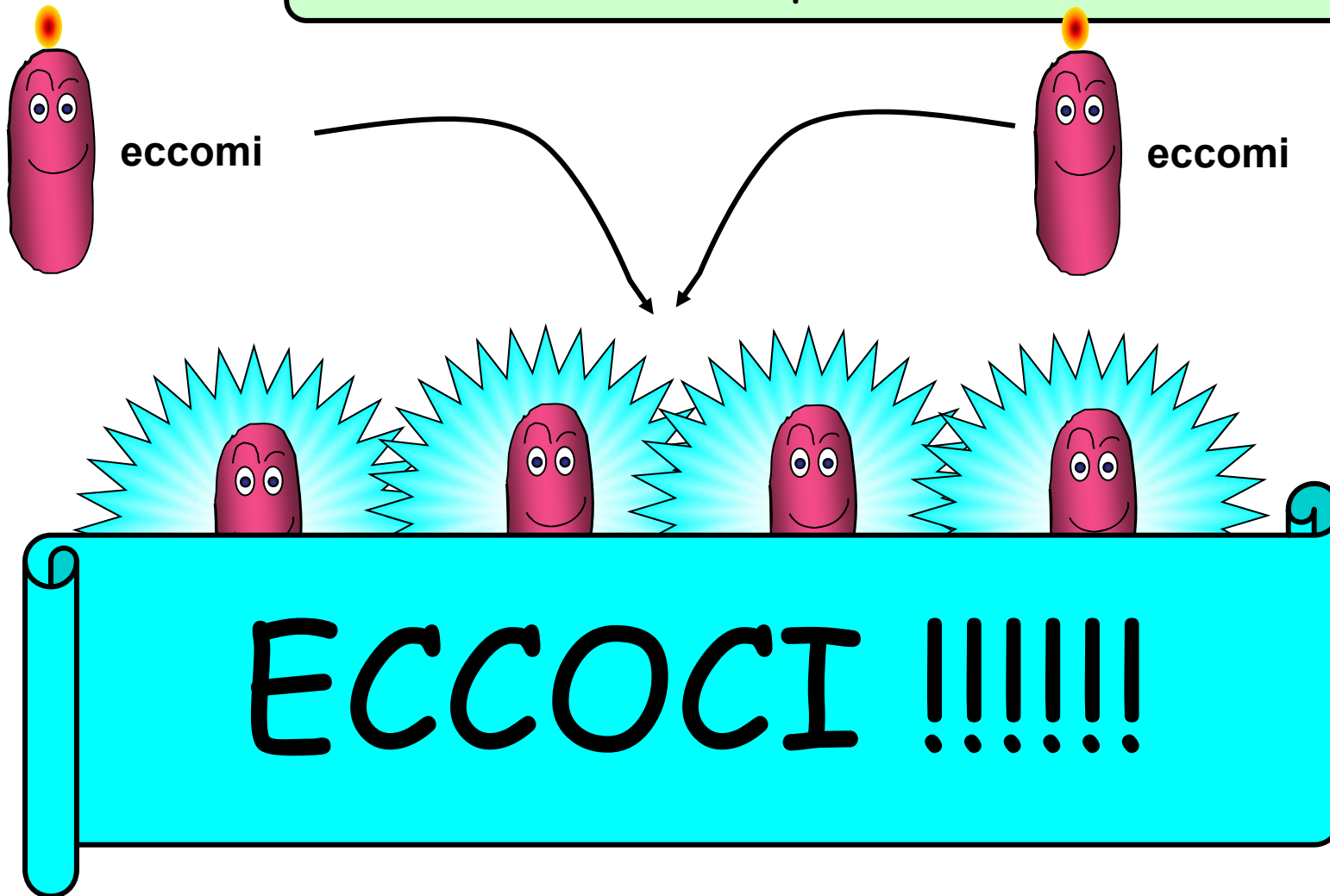


L'inizio della sporulazione è controllato da Spo0A-(P) che riceve il segnale dai sensori KinA,B attraverso la fosforilazione di Spo0F,B e induce o reprime ~ 500 geni



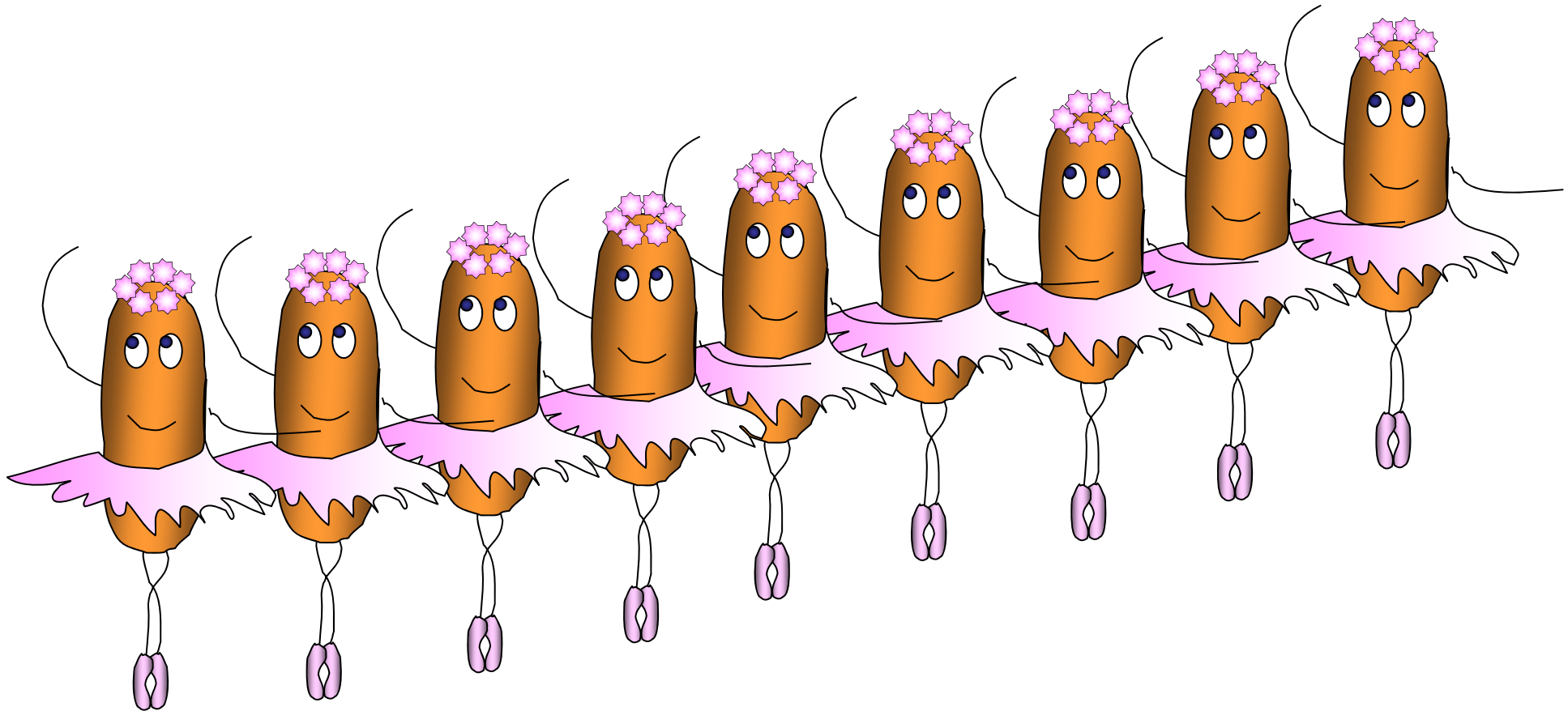
REGOLAZIONE QUORUM SENSING

La regolazione Quorum-sensing permette la sincronizzazione dell'espressione in cellule diverse



I batteri avvertono la presenza e la densità di altri batteri, grazie a una molecola segnale che loro stessi producono (AUTO-INDUTTORE)

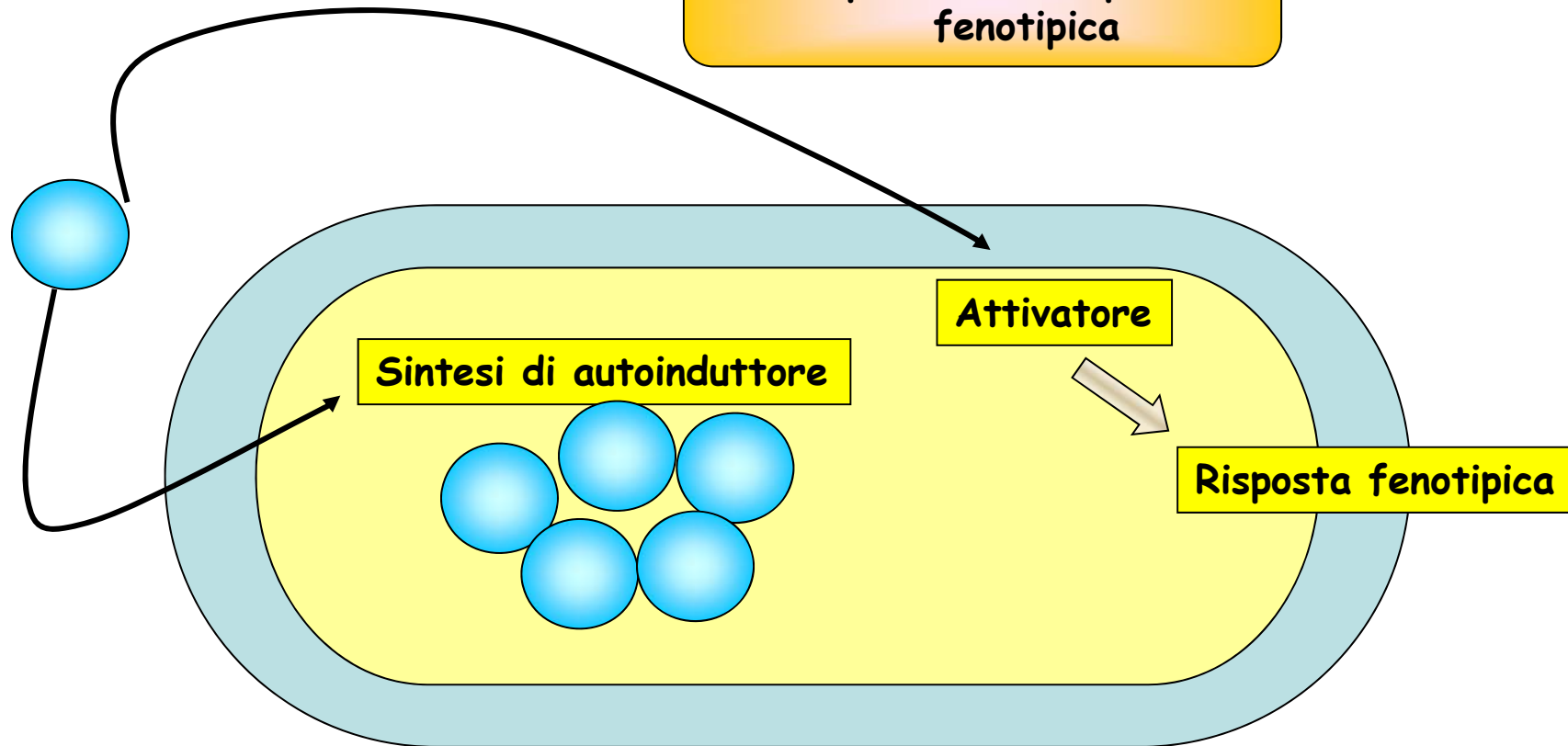
una volta raggiunta una soglia critica, la popolazione batterica assume comportamenti uniformi



gli autoinduttori entrano facilmente
all'interno della cellula batterica

La molecola segnale induce un attivatore trascrizionale

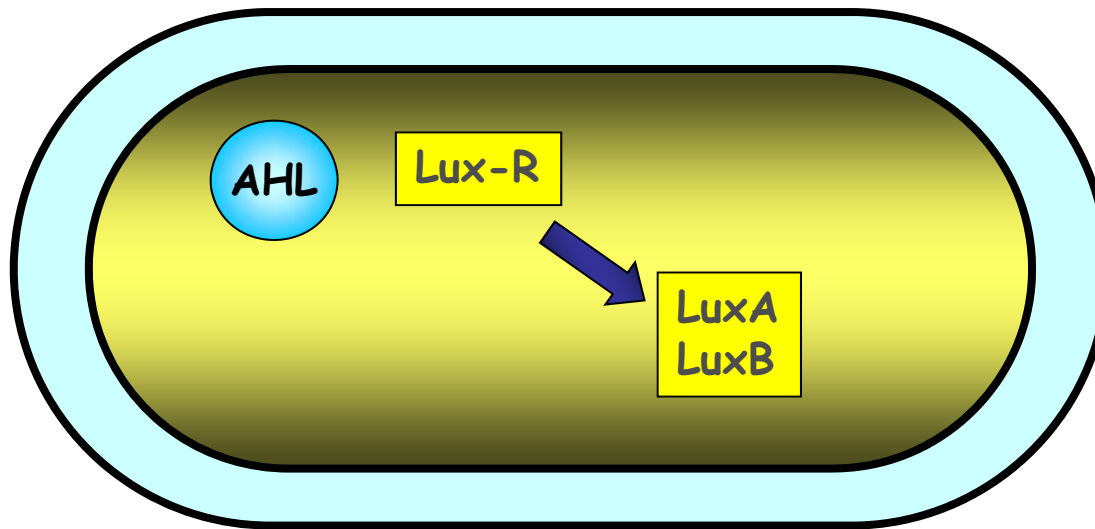
Che provoca la risposta
fenotipica



E un gene per la sintesi di altre molecole segnale

La regolazione QS è stata scoperta in *Vibrio fischeri*

L'autoinduttore induce i geni *luxR* (attivatore trascrizionale) e *luxI* (sintesi di autoinduttore)

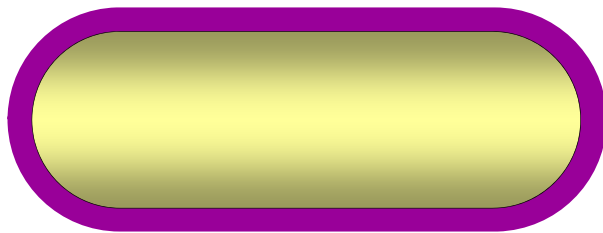


LuxR è un attivatore trascrizionale: si lega al DNA e attiva i geni per la sintesi della luciferina: *luxA* e *luxB*

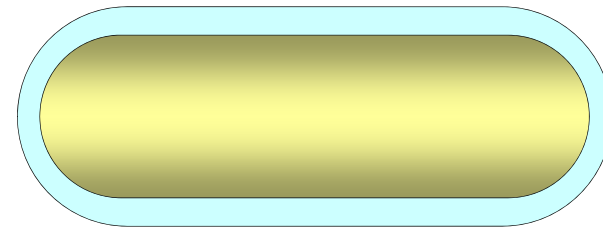
come funziona la risposta QS?

Il modello dei Monodermi e quello dei didermi sono
leggermente diversi

monodermi
(Gram-positivi)

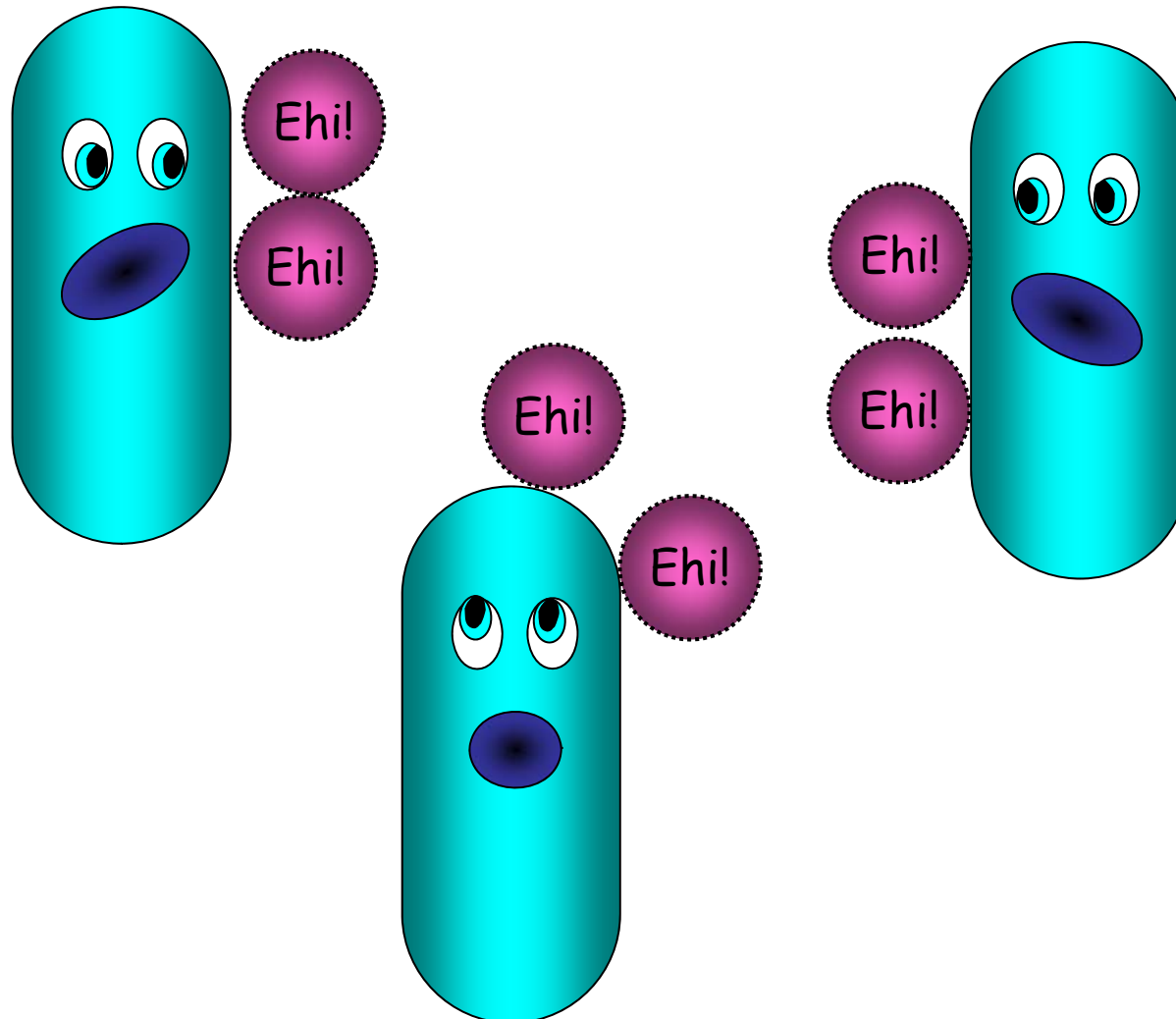


didermi
(Gram-negativi)

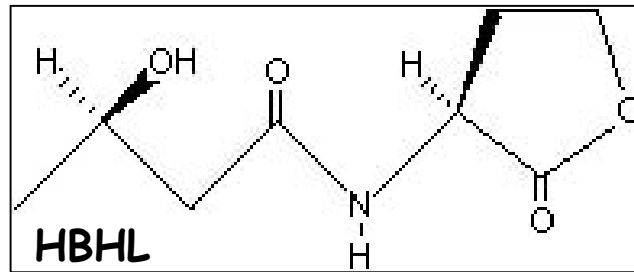


Anche se il meccanismo della risposta QS è presente in
entrambi i gruppi

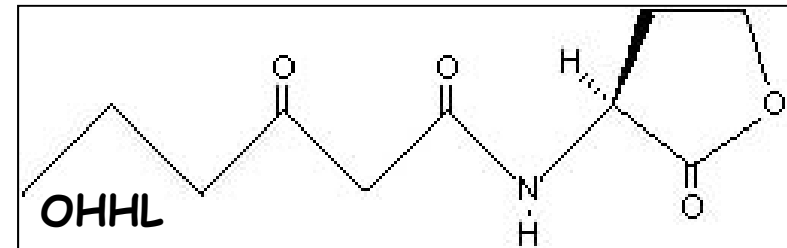
In entrambi i gruppi i batteri producono
continuamente gli autoinduttori



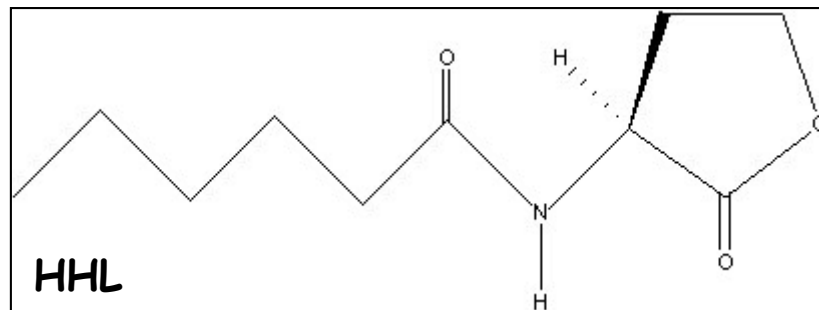
Nei batteri didermi il messaggio è portato da N-acyl-omoserina-lattoni (N-AHL)



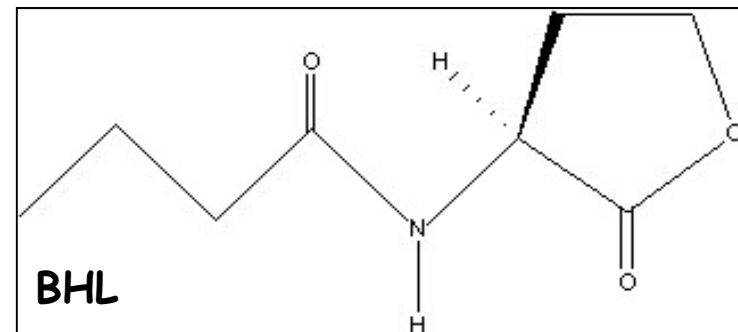
N-(3-hydroxybutanoyl)-HL



N-(3-oxooctanoyl)-HL



N-hexanoyl- HL



N-butanoyl- HL

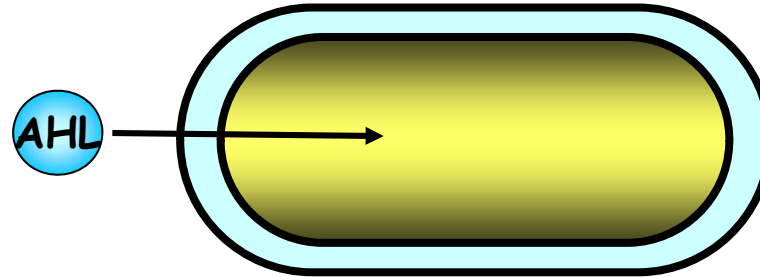
differiscono leggermente da specie a specie
per la catena laterale acilica

L'autoinduttore passa liberamente
attraverso gli involucri esterni,

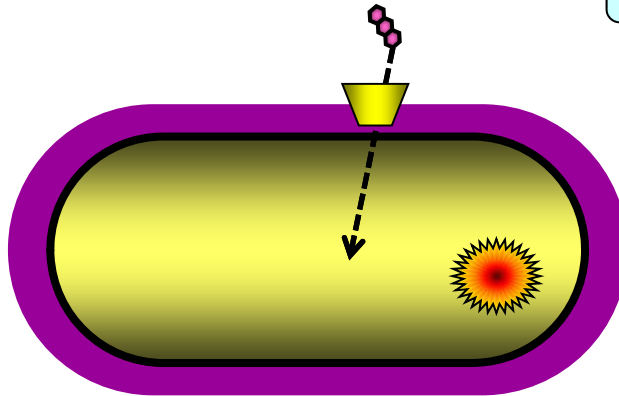
DIDERMI

gli AHL entrano facilmente nella cellula batterica

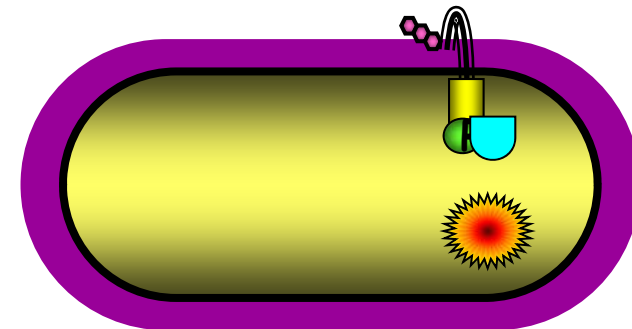
attivano la risposta fenotipica e la produzione di AHL



MONODERMI



La molecola segnale è trasportata da una oligopeptide permeasi all'interno della cellula



Una proteina di membrana (sensore) si modifica legandosi al segnale, e interagisce con un effettore

**Molte specie possiedono più
sistemi QS nella stessa cellula**

Gerarchici (*Pseudomonas*, *Yersinia*)

**Si inducono in sequenza
amplificando progressivamente
l'effetto fenotipico**

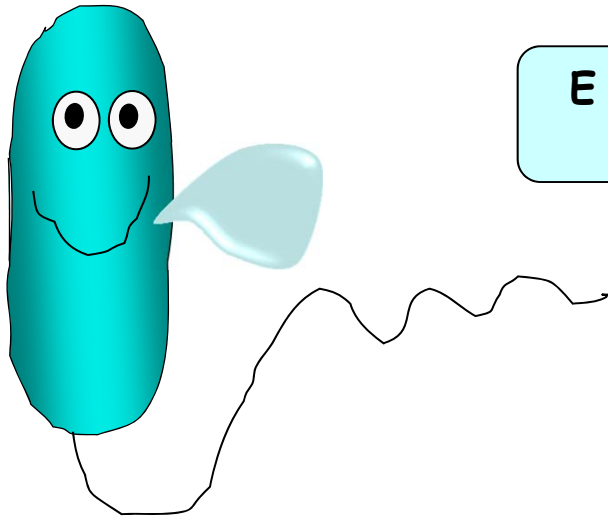
alternativi (*Bacillus*)

**Si escludono a vicenda, inducendo
comportamenti differenti**

sinergici (*Vibrio*)

**Inducono entrambi la medesima
risposta fenotipica**

Pseudomonas non possiede AI2 ma ha tre sistemi QS, che attivano differenti set di geni



E interagiscono tra di loro per garantire una regolazione fine

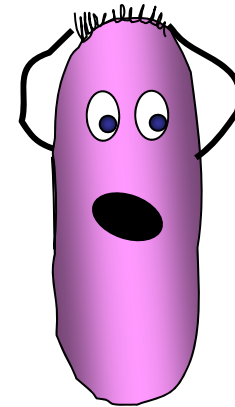
La molecola segnale del terzo sistema è rilasciato dalla cellula all'interno di un bleb di membrana esterna ed è accompagnato da una batteriocina

La degradazione degli AHL provoca
l'uscita dalla risposta di QS

In ambienti con pH
intorno a 6, tuttavia

Gli AHL sono stabili

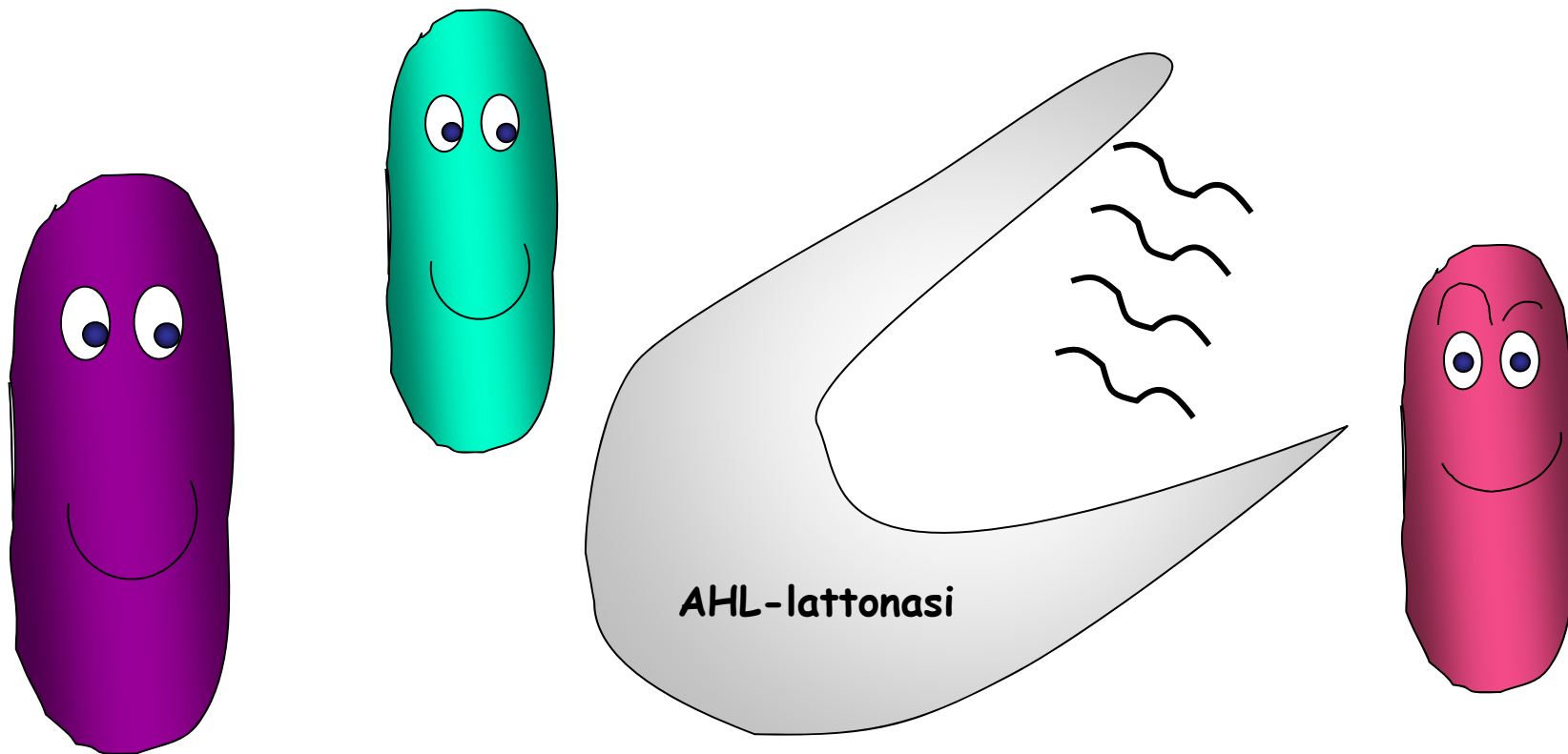
Gli AHL si degradano spontaneamente
perdendo la catena laterale

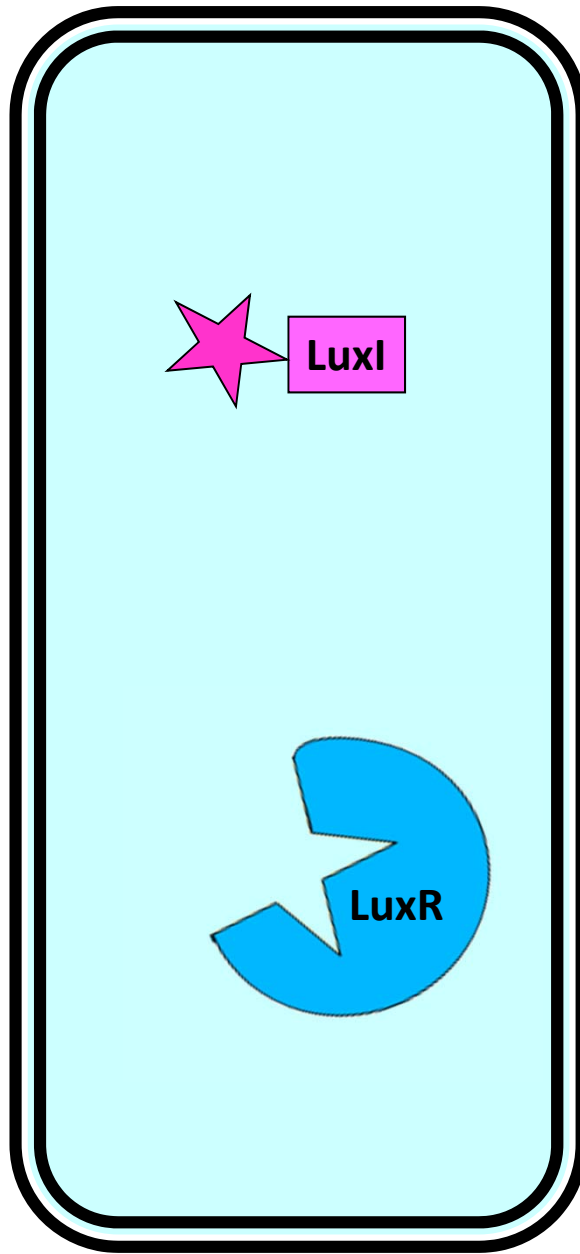


In queste condizioni uscire dalla risposta
può essere un problema

**Sono stati recentemente scoperti enzimi che degradano gli AHL
(AHL-lattonasi)**

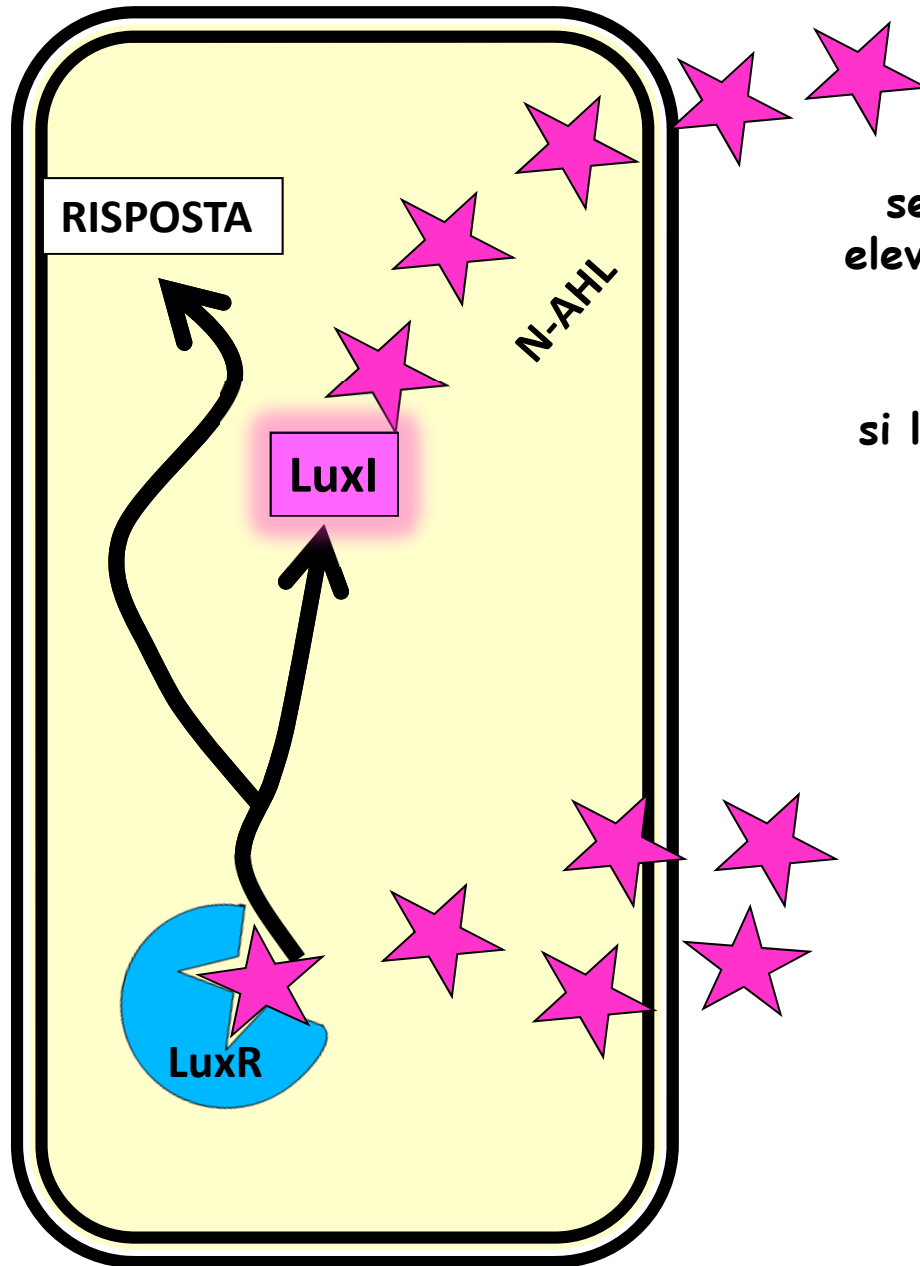
**Potrebbero avere una notevole importanza nell'equilibrio tra
specie e nell'ecologia microbica**





In condizioni di non attivazione l'induttore è prodotto a livelli basali

A bassi livelli non si lega con l'attivatore LuxR



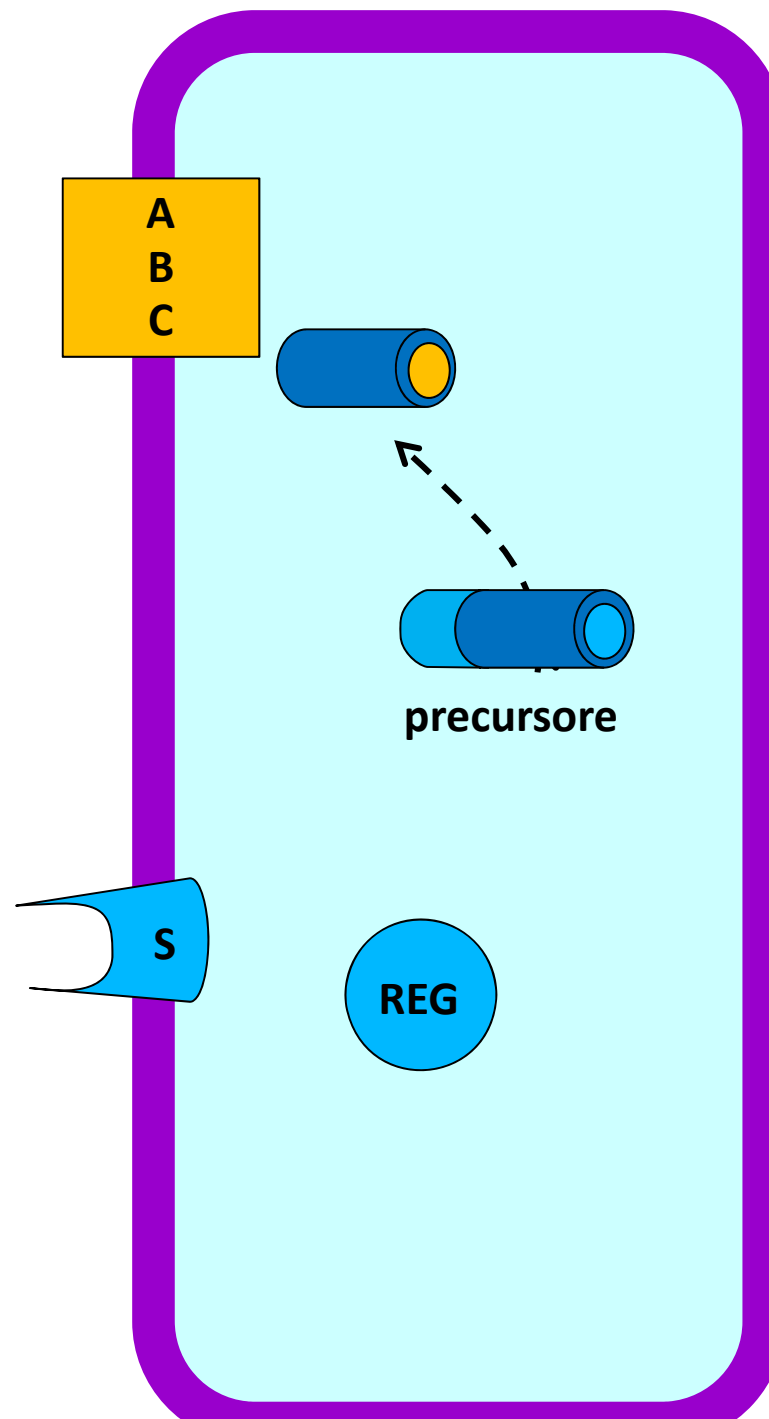
se la concentrazione del segnale è elevata, l'induttore attiva il gene *luxR*

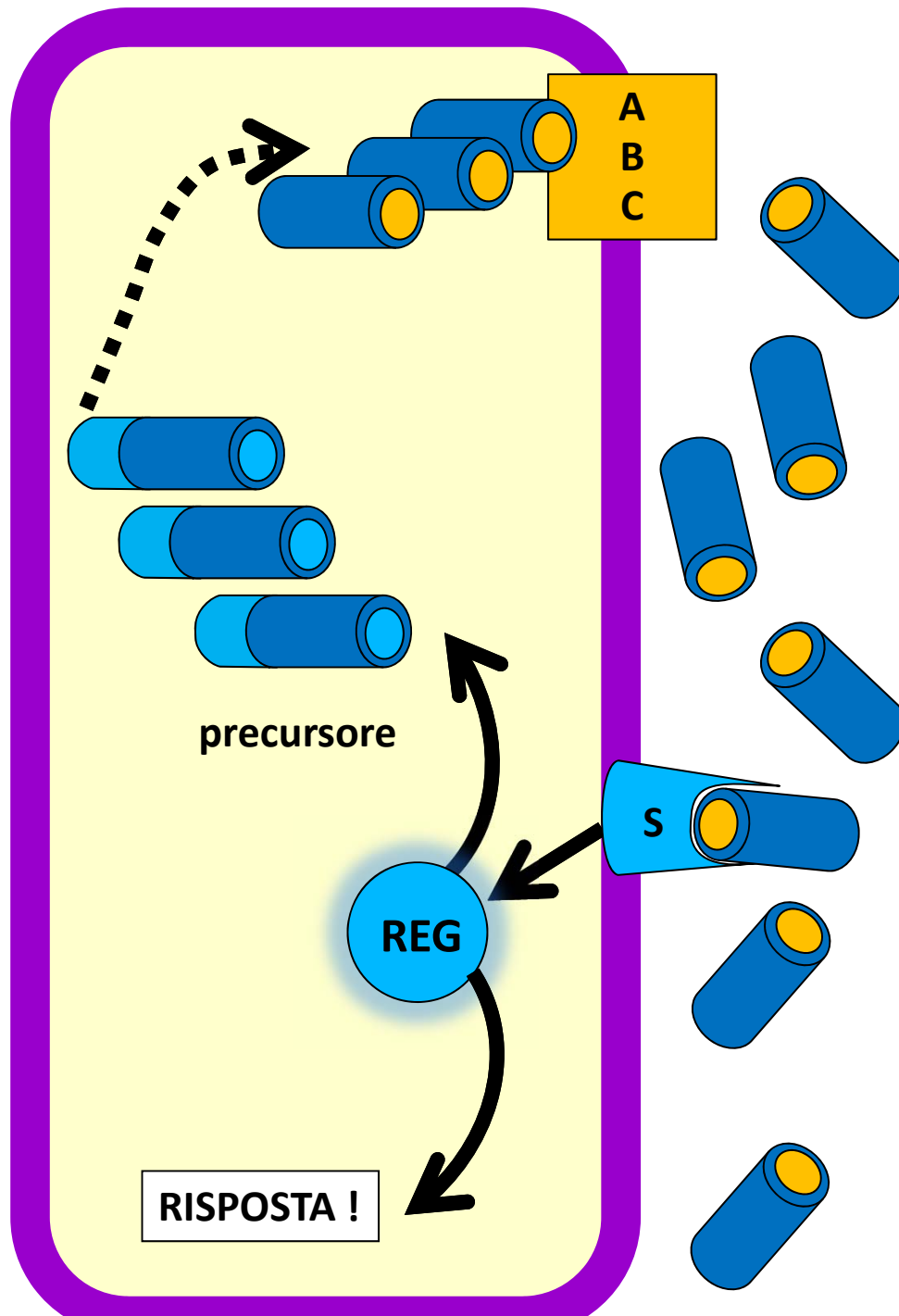
si lega all'attivatore trascrizionale LuxR, che ne è il prodotto

Il complesso induce LuxI, che produce nuove molecole segnale, e mantiene la risposta finché persiste lo stimolo.

E attiva la risposta fenotipica

Nei monodermi la molecola segnale è
un oligopeptide, processato nella
cellula e rilasciato nell'ambiente

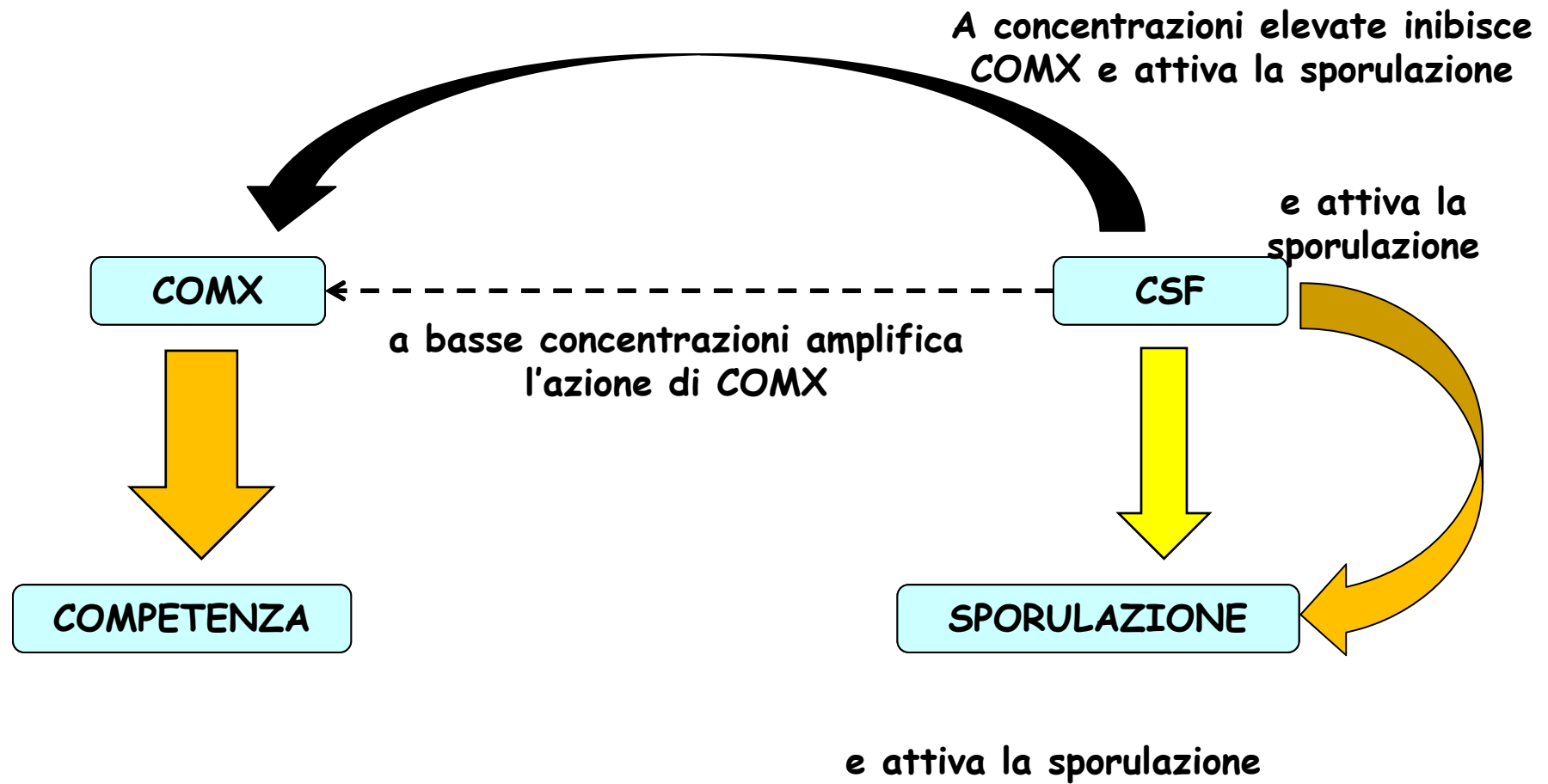




È percepito da chinasi sensore che trasferiscono il segnale all'effettore corrispondente

Gli streptomiceti usano γ -butirro-lattoni con una struttura simile a quella degli N-AHL ma non è mai stato dimostrato alcun tipo di comunicazione tra i due gruppi

In *Bacillus*, due diversi sistemi scelgono tra differenti stili di vita



LUX-S

Oltre a LuxR/I è stato scoperto un altro sistema in *Vibrio harvey*

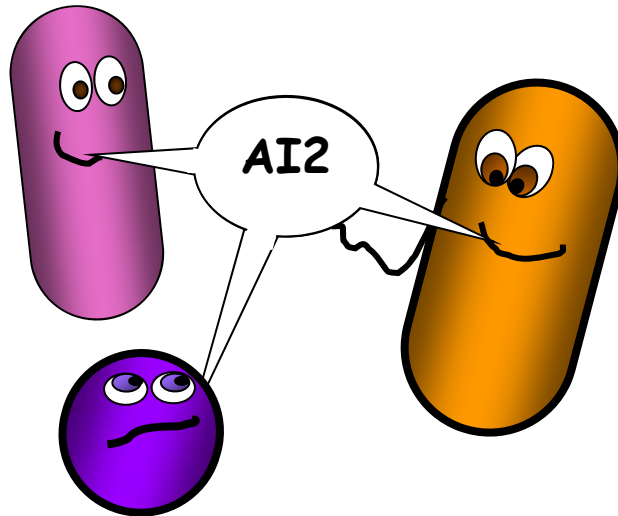
la sintasi LuxS non omologo di LuxI

E l'autoinduttore è il peptide AI2

Il sistema LuxS è presente in

MONODERMI

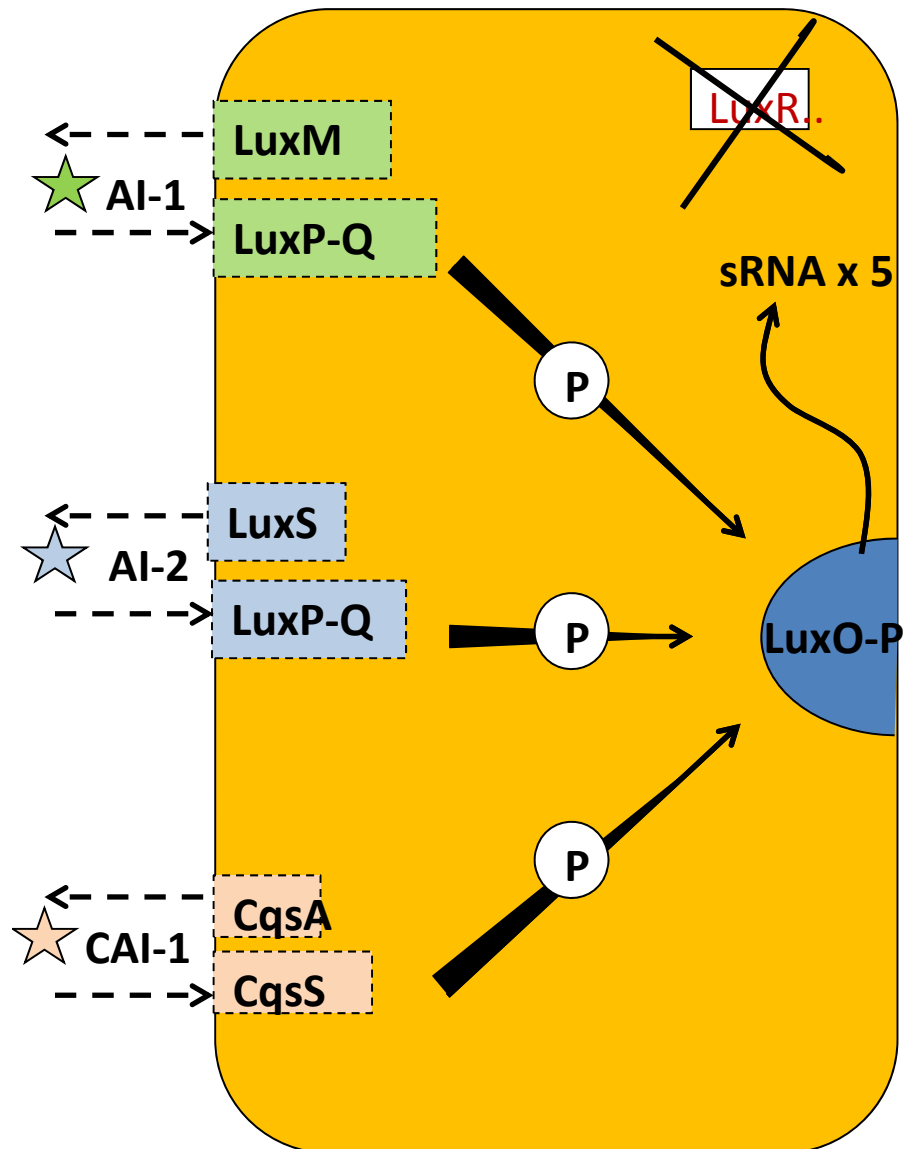
DIDERMI



LUX-S è probabilmente dedicato a comunicazioni interspecifiche e presumibilmente più antico di LuxR/I

In *Vibrio harvey*, sono presenti anche altri due sistemi QS: uno di tipo LuxI/R e l'altro (CAI-1) con un induttore di struttura non nota

La risposta dipende dal bilancio tra le attività chinasiche o fosfatasiche dei singoli recettori di questi tre sistemi



La concentrazione dell'attivatore chiave LuxR, dipende da quella di 5 piccoli RNA regolatori, la cui presenza è determinata dallo stato di fosforilazione di LuxO

Quando la concentrazione di auto induttori è bassa, i recettori corrispondenti si comportano da chinasi e fosforilano LuxO

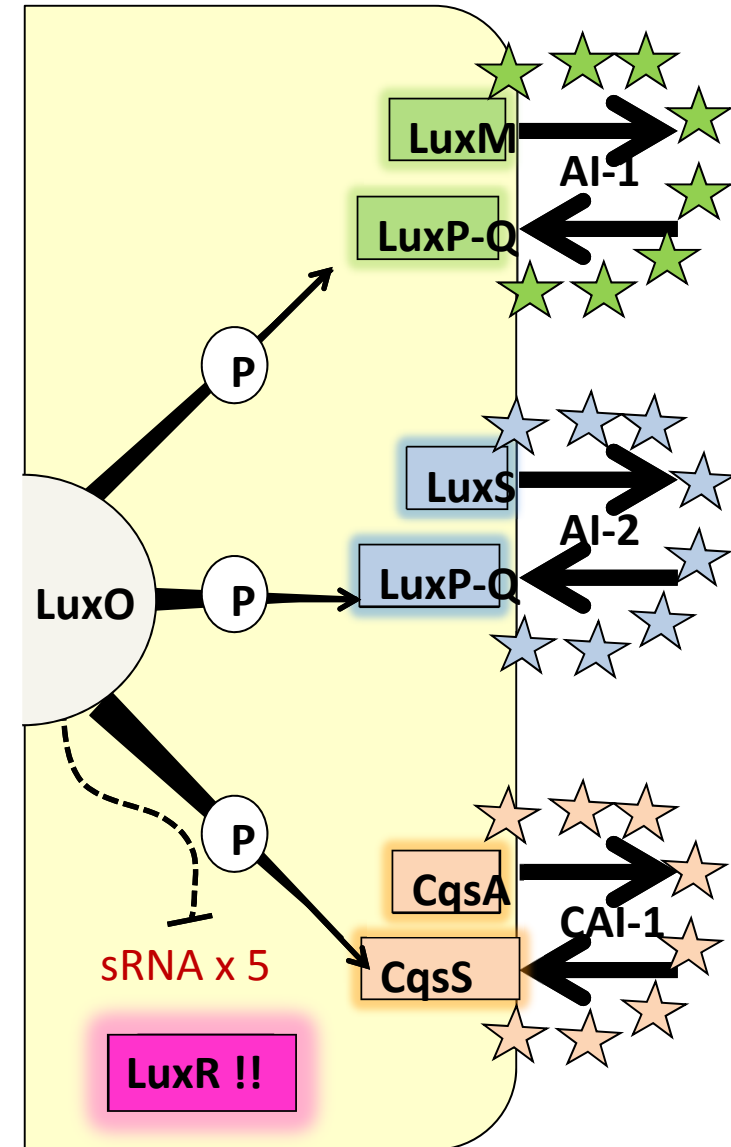
i 5 sRNA sono sintetizzati e LuxR non si esprime

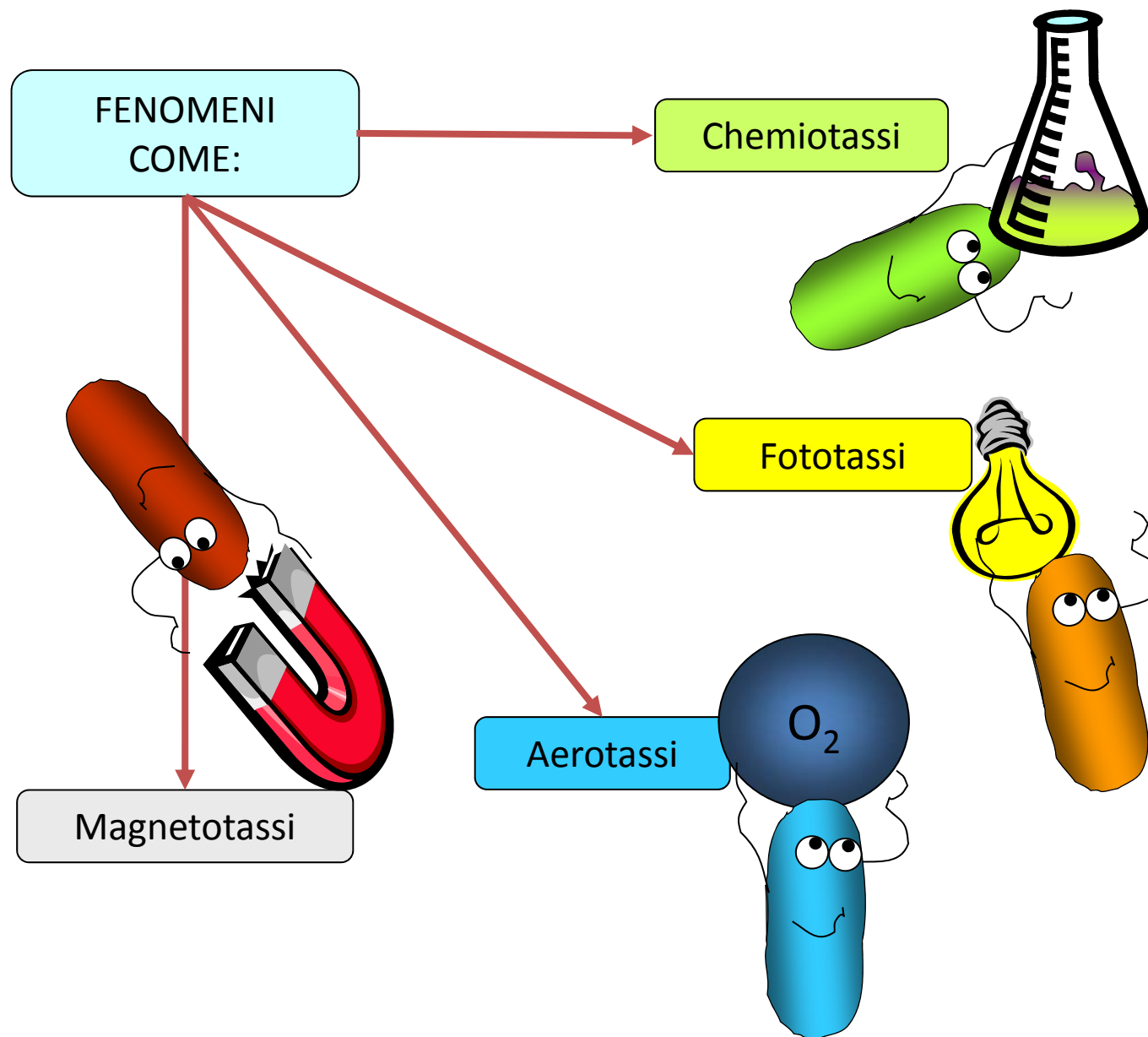
quando gli auto induttori sono abbondanti, i loro recettori si comportano da fosfatasi

sottraggono fosfati a LuxO

i piccoli RNA non sono sintetizzati

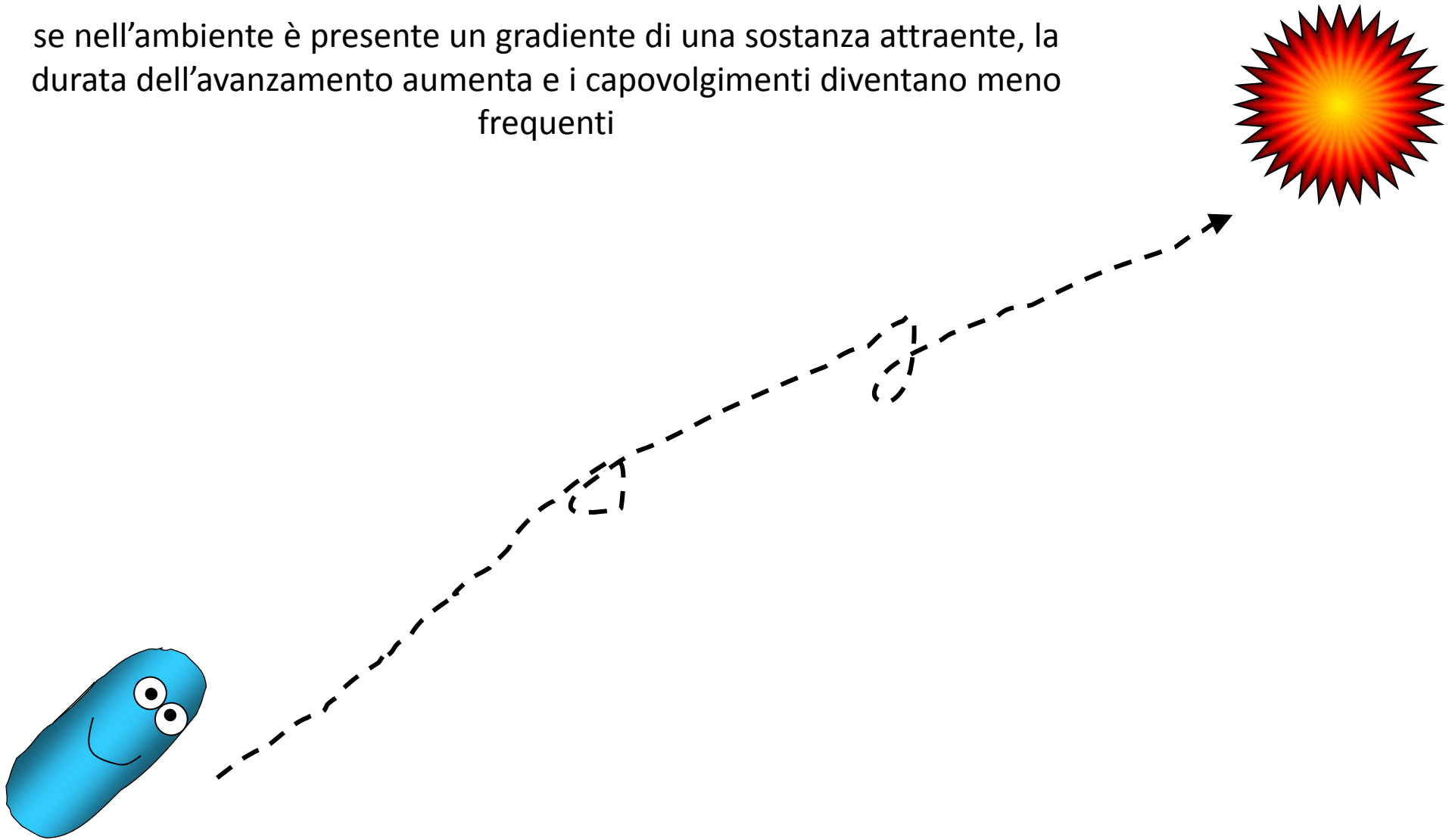
LuxR si esprime e induce la risposta





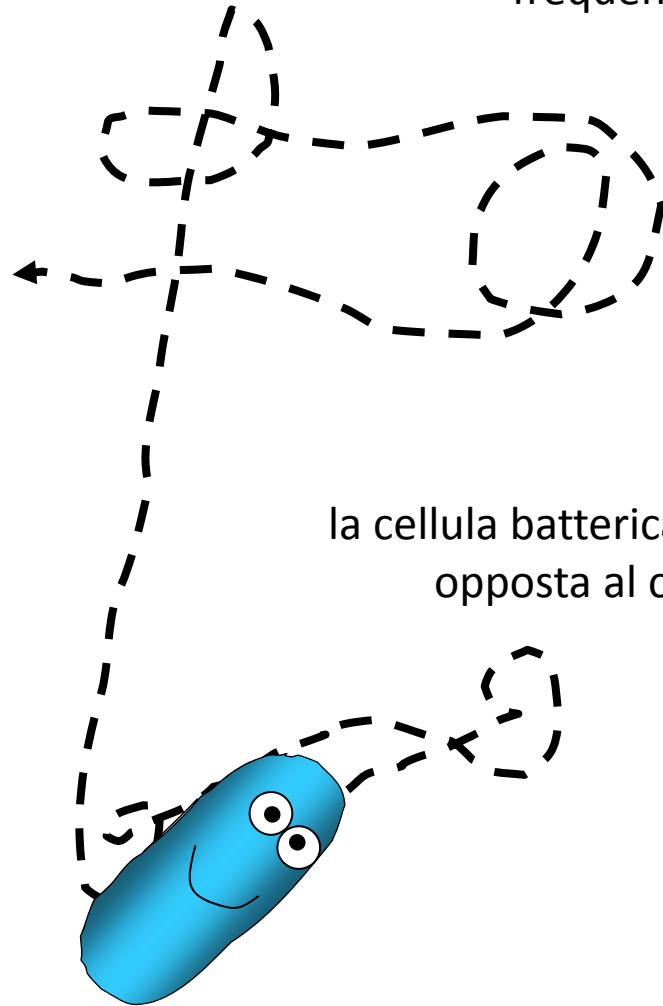
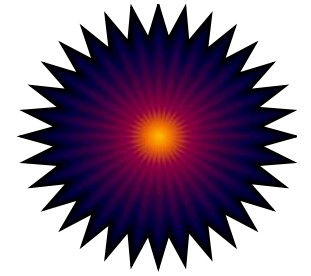
Permettono ai microrganismi di muoversi in risposta alle variazioni del proprio ambiente, sfruttandole a proprio vantaggio

se nell'ambiente è presente un gradiente di una sostanza attraente, la durata dell'avanzamento aumenta e i capovolgimenti diventano meno frequenti



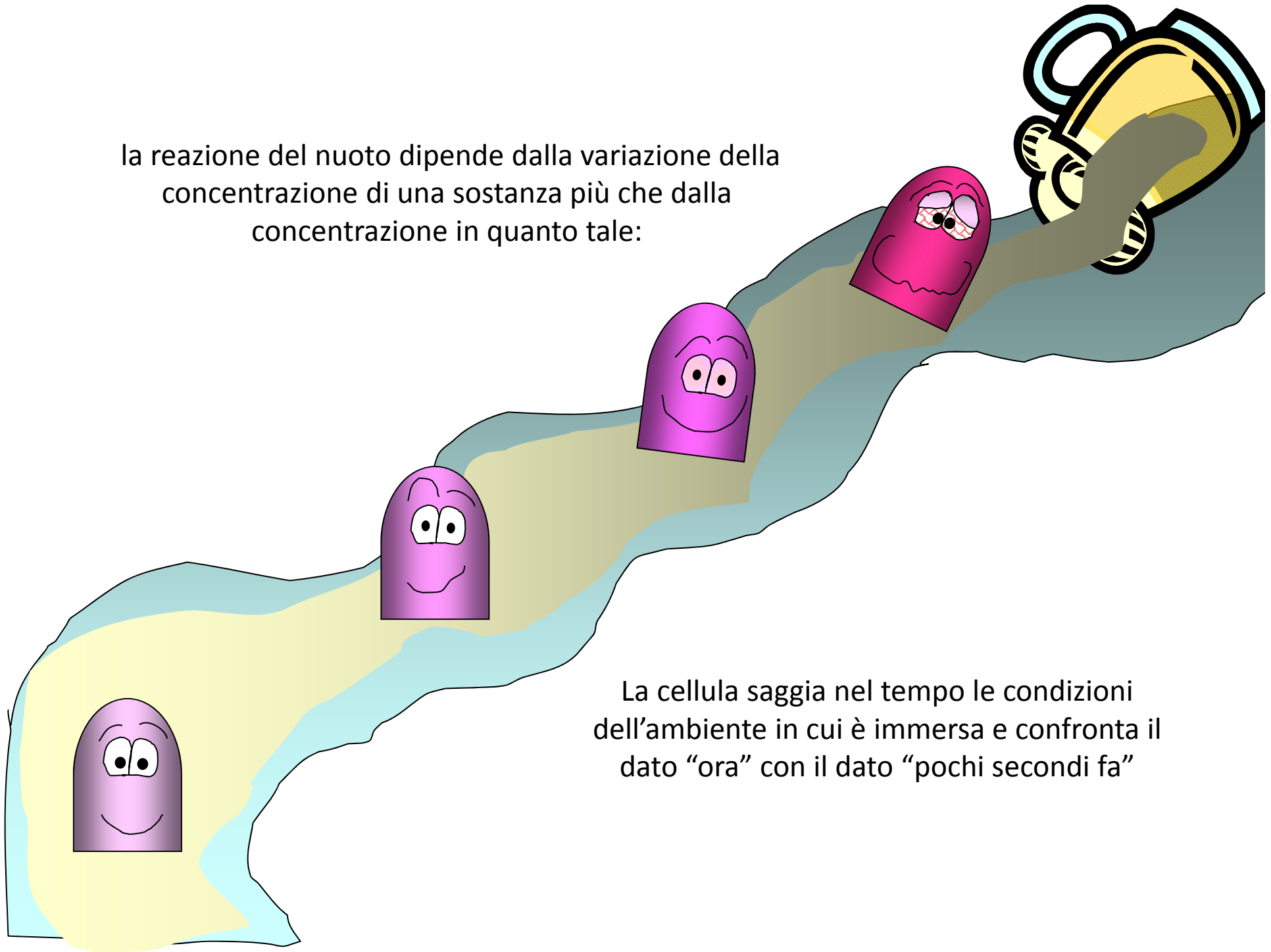
la cellula batterica si sposta nella direzione del
composto attraente

Se la sostanza è repellente, la
frequenza delle capriole aumenta



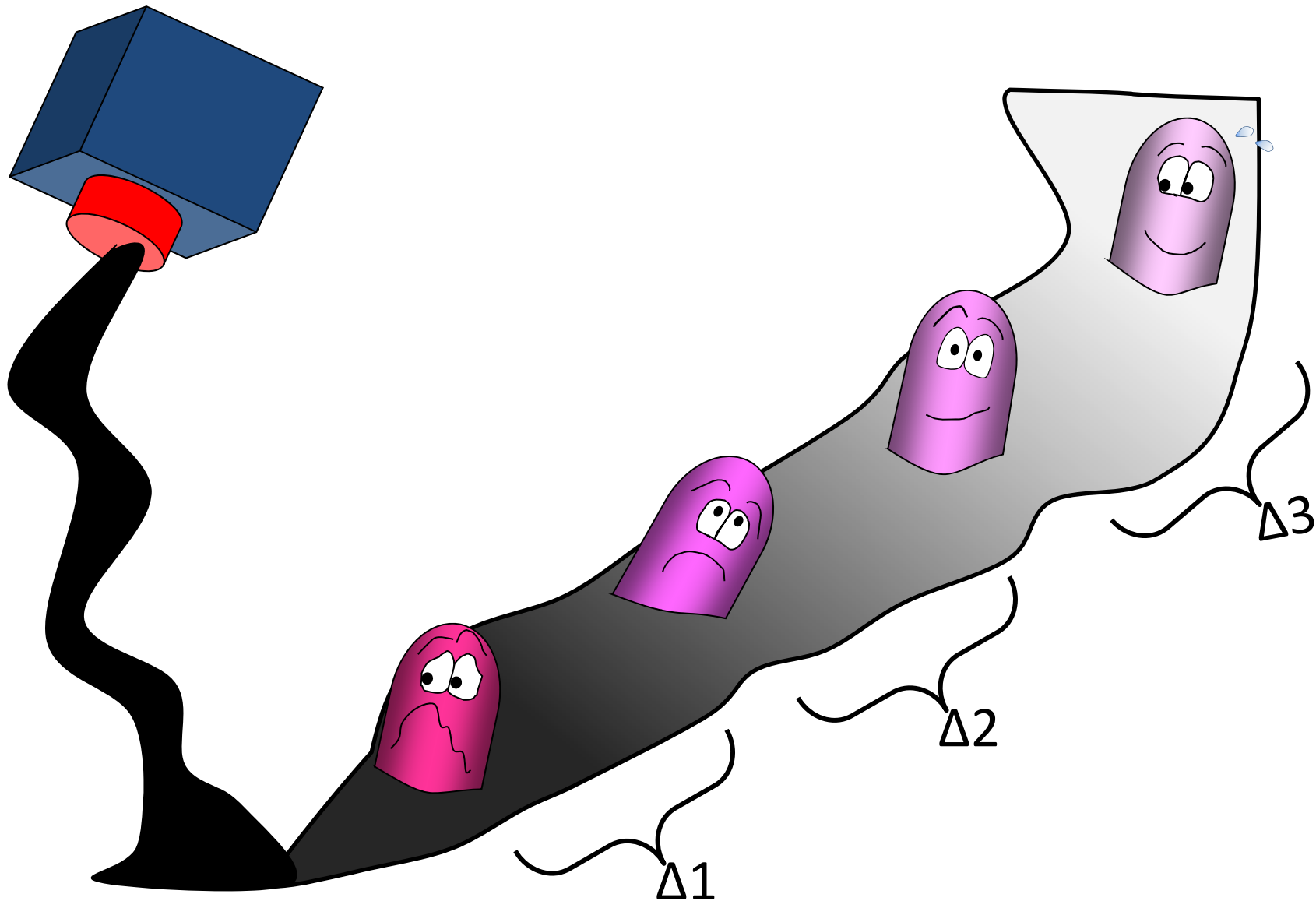
la cellula batterica si sposta nella direzione
opposta al composto repellente

la reazione del nuoto dipende dalla variazione della
concentrazione di una sostanza più che dalla
concentrazione in quanto tale:

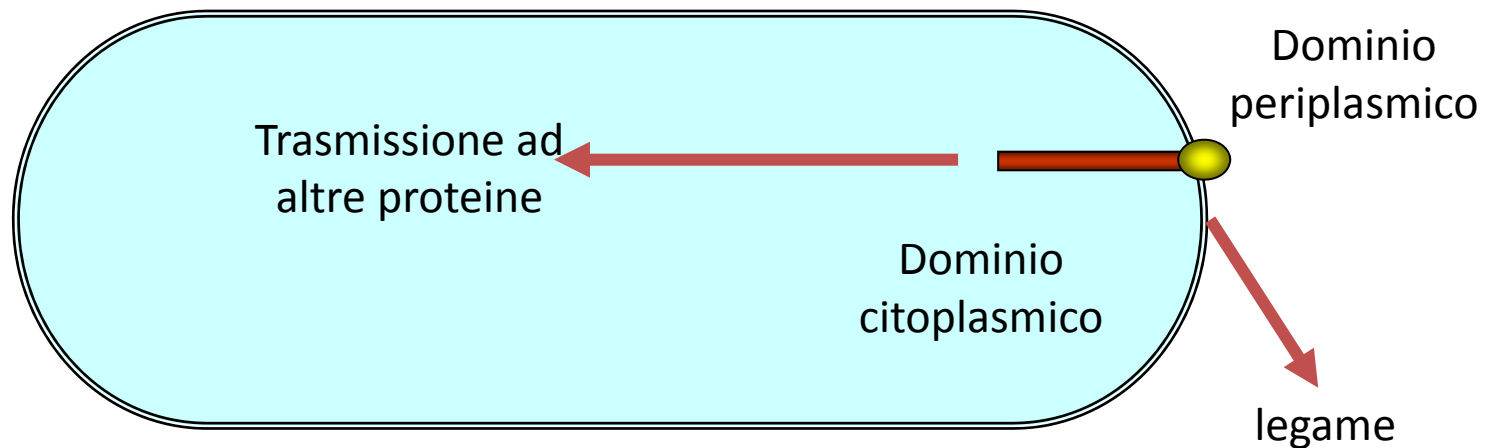


La cellula saggia nel tempo le condizioni
dell'ambiente in cui è immersa e confronta il
dato "ora" con il dato "pochi secondi fa"

La concentrazione relativa della sostanza attraente o repellente influisce sui tempi delle fasi di corsa o capriola

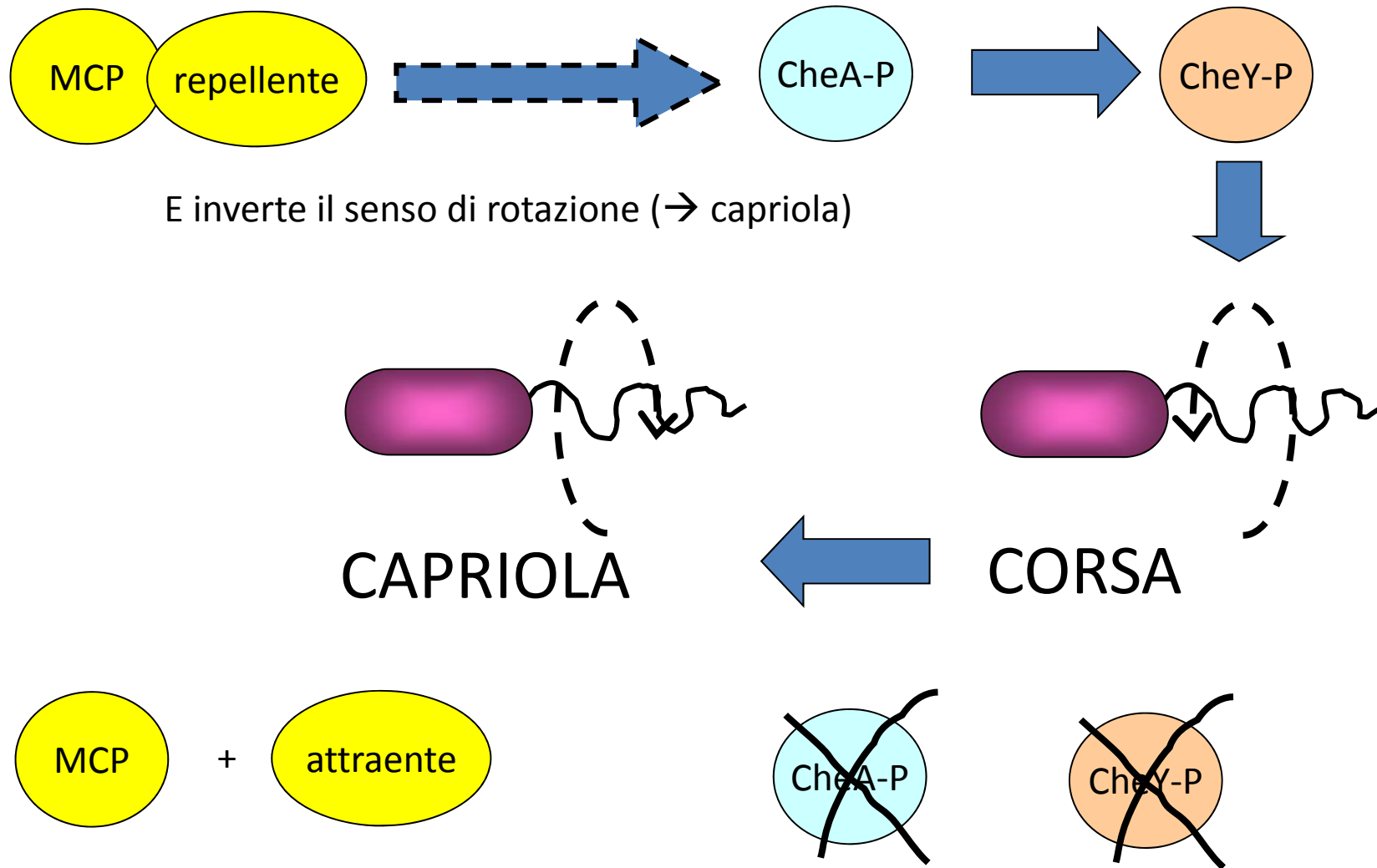


La variazione di concentrazione viene percepita dalle MCP proteine methyl-accepting chemotactic proteins

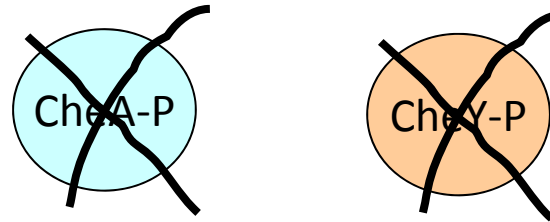
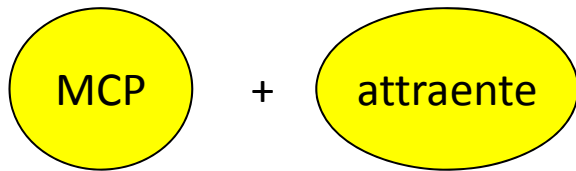


hanno due domini con cui interagiscono con la sostanza chemiotattica (esterno) e altre proteine (citoplasmatico)

CheY-P si lega al motore flagellare che ruota in senso antiorario (→ corsa)

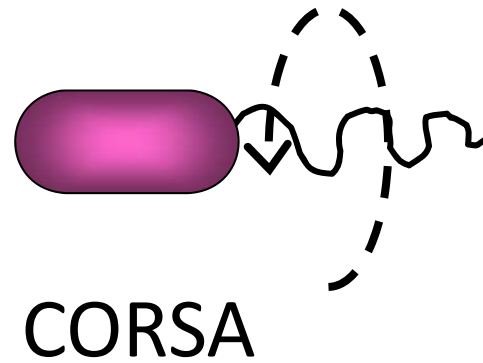
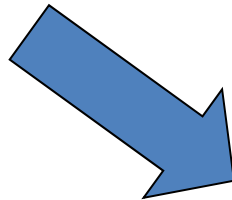


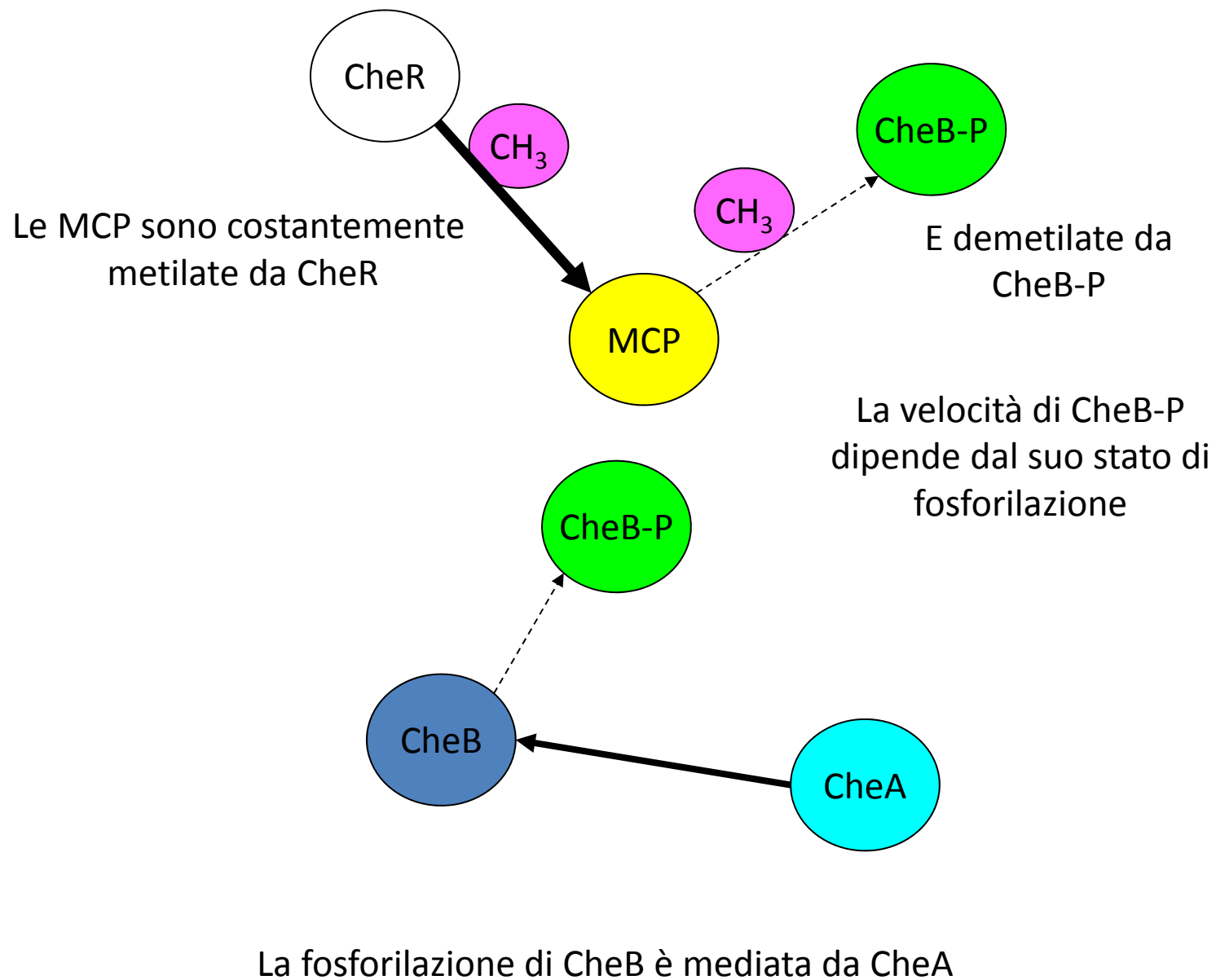
CheY non si fosforila e non si lega

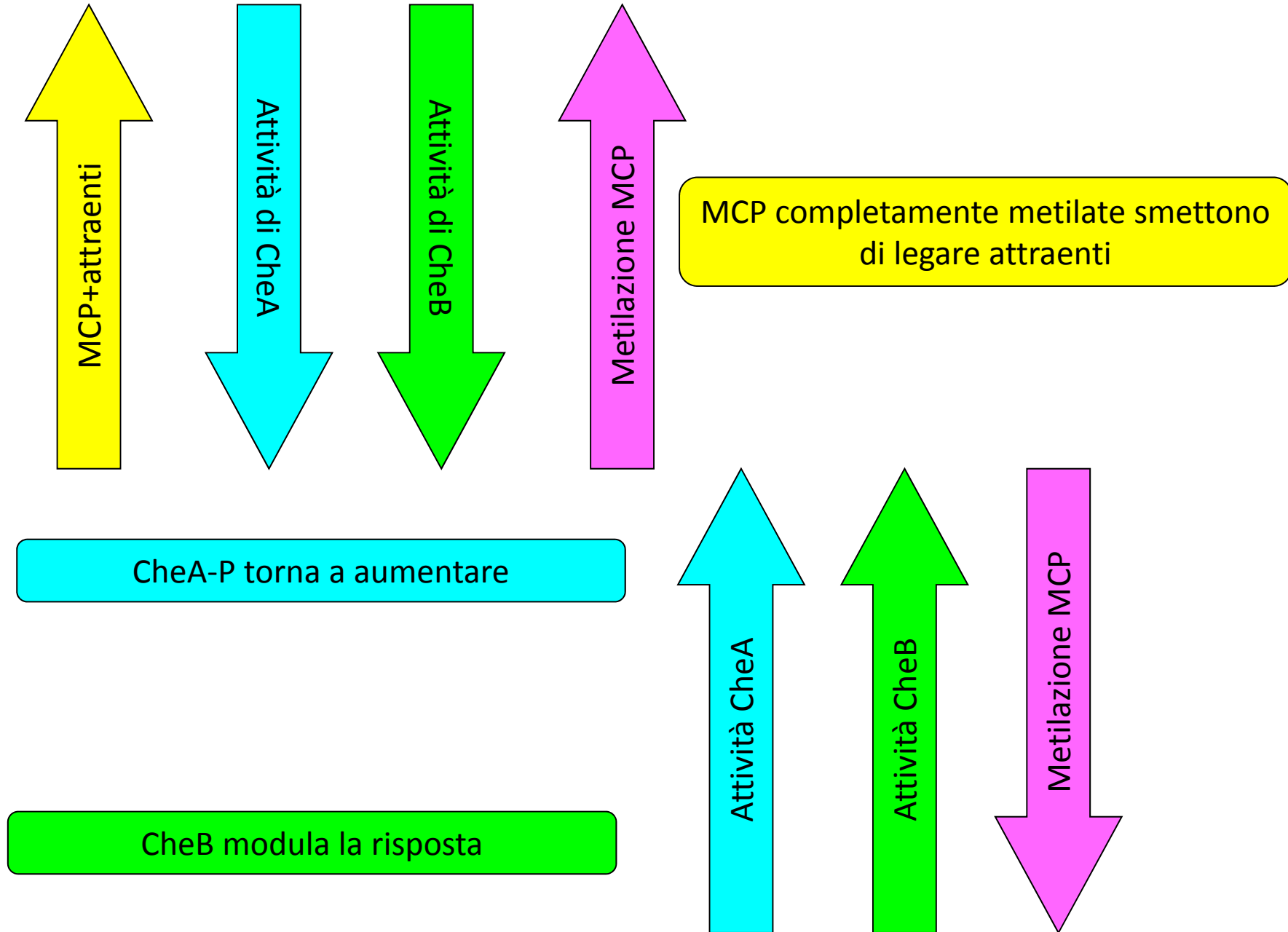


CheA non si fosforila

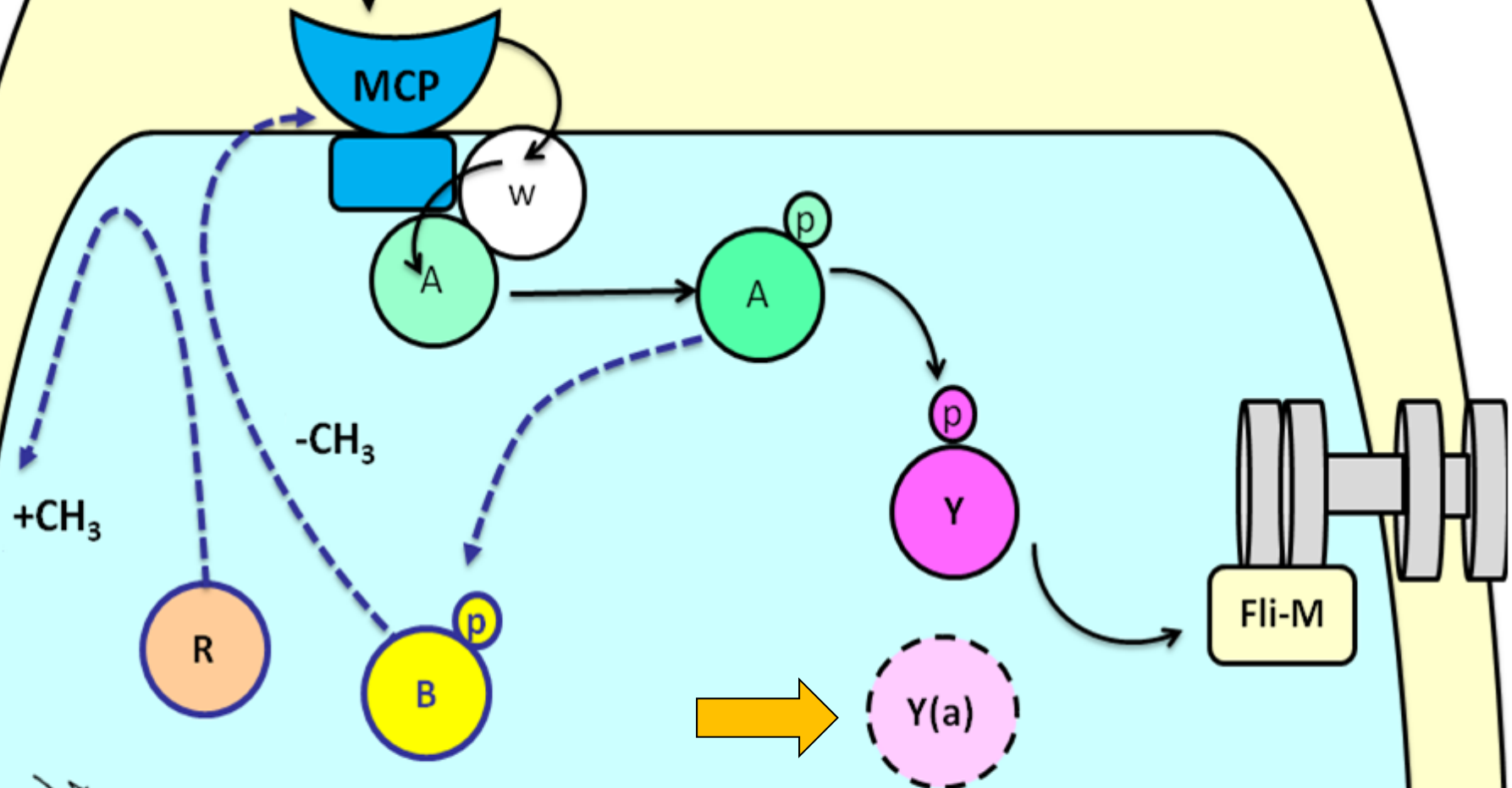
la rotazione resta
immutata







A modulare ulteriormente la risposta,
una quota di CheY è acetilata [Y(a)] e
non in grado di partecipare alla risposta

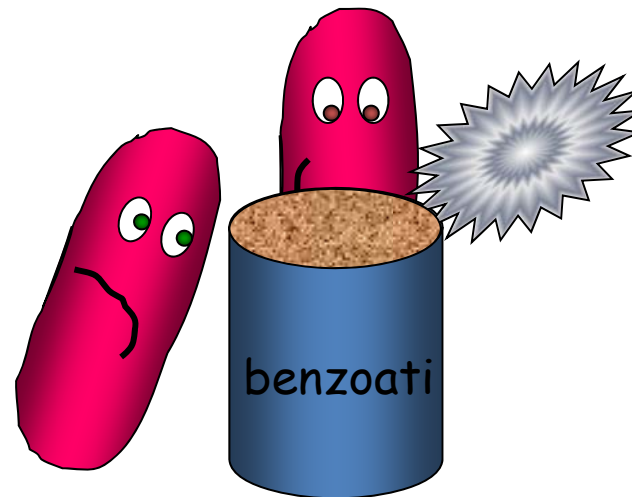


La proporzione delle frazioni di CheY
presenti nella cellula in un dato
momento, è legata allo stato metabolico

De/boh

Ognuno ha i suoi gusti

Pseudomonas putida è fortemente attratto dai benzoati



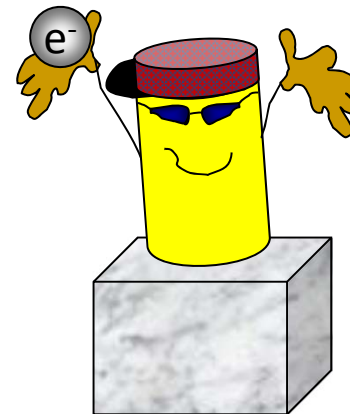
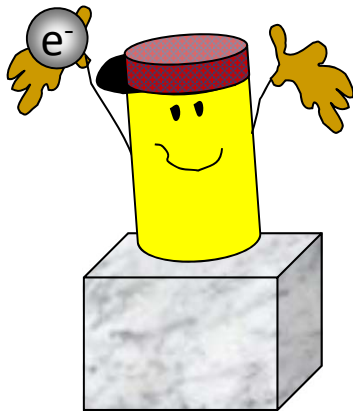
che sono repulsivi per *Escherichia coli*

AEROTASSI

La tensione di ossigeno è
percepita attraverso lo
stato redox

di uno dei trasportatori di elettroni
della catena respiratoria

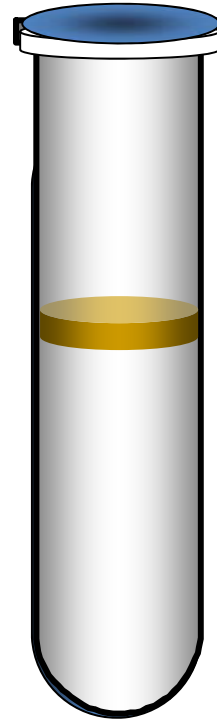
Degli enzimi dei sistemi di
fotofosforilazione (fototrofi)



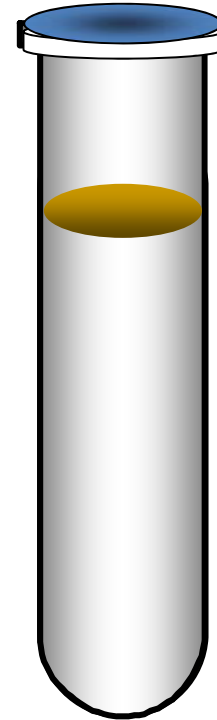
AEROTASSI



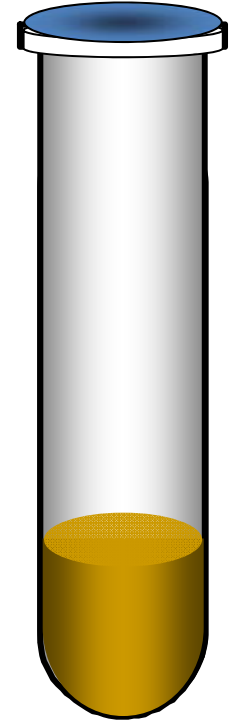
aerobio



microaerofilo



facoltativo



anaerobio

La tensione di ossigeno è
percepita attraverso lo stato
redox

di uno dei trasportatori di elettroni della
catena respiratoria

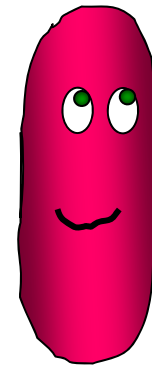
Degli enzimi dei sistemi di
fotofosforilazione (fototrofi)

La luce può essere fonte di energia



FOTOTASSI

Diverse specie fotosintetiche utilizzano lunghezze d'onda differenti

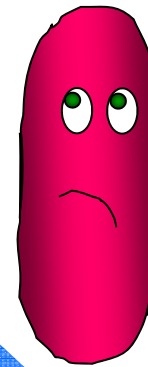


Hanno quindi la necessità di collocarsi nella zona che meglio ottempera alle loro esigenze

Lunghezze d'onda particolari
sono dannose:

UV (basso potere di
penetrazione)

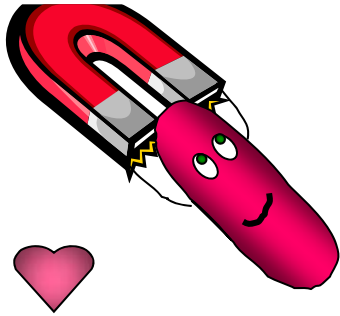
Luce blu:
Innesca fototassi
negativa



Nella maggior parte dei casi il segnale per la fototassi è dato
dalla foto-ossidazione di porfirine dell'eme

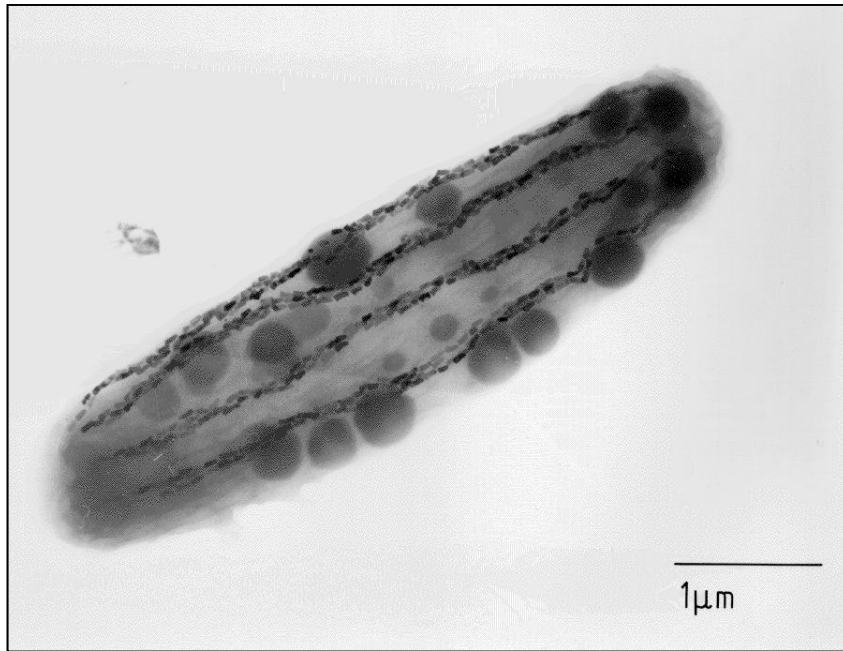
Halobacterium

Cambio di conformazione e spettro di assorbimento
della batteriorodopsina-sensore



MAGNETOTASSI

I magnetobatteri si orientano e migrano lungo il campo magnetico terrestre, grazie alla presenza di strutture magnetiche intracellulari, i magnetosomi.

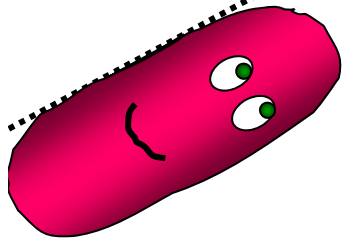


I magnetosomi sono formati da minerale magnetico incluso in vescicole di membrana e disposti lungo l'asse della cellula batterica

Magnetosomi isolati da *Magnetospirillum gryphiswaldense*, attaccati a un magnete permanente, tengono sospesa la provetta che li contiene

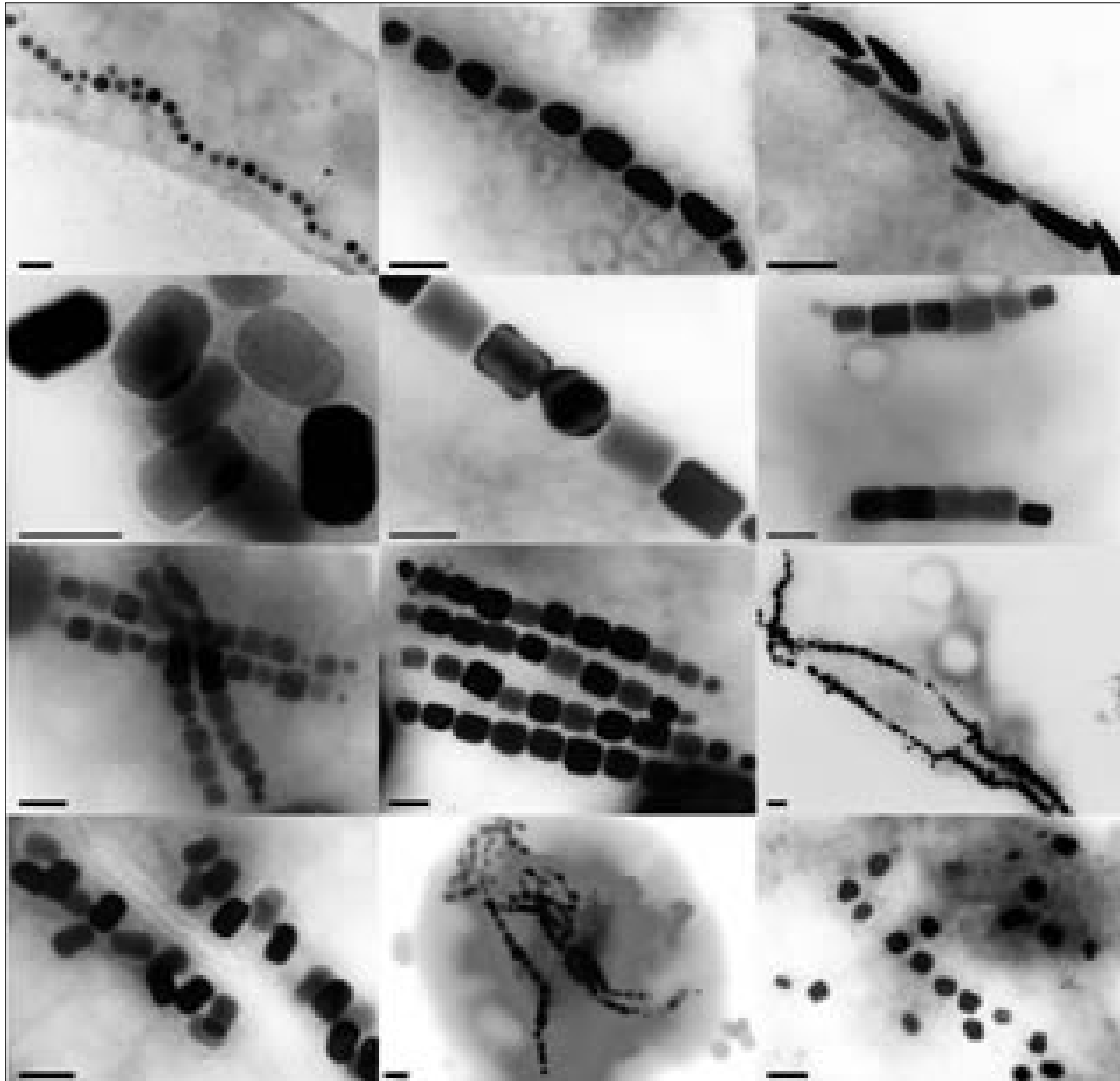


questi batteri nuotano solo in due direzioni, e si orientano muovendosi lungo le linee del campo geomagnetico



La direzione del nuoto è regolata anche da sistemi sensoriali che rispondono a concentrazioni di soluti o al potenziale redox

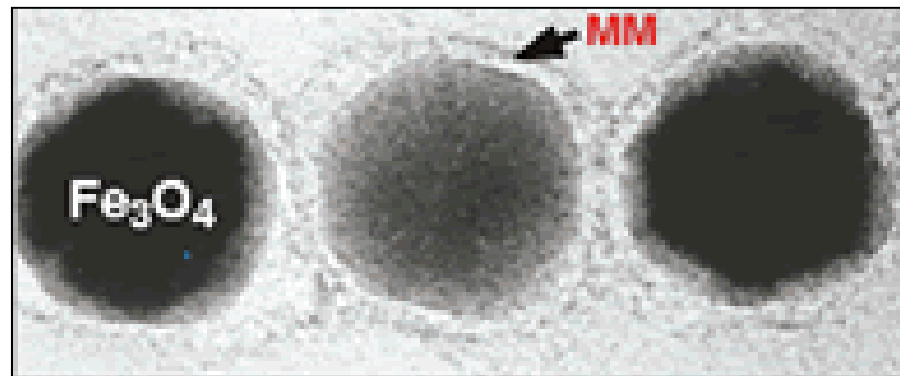
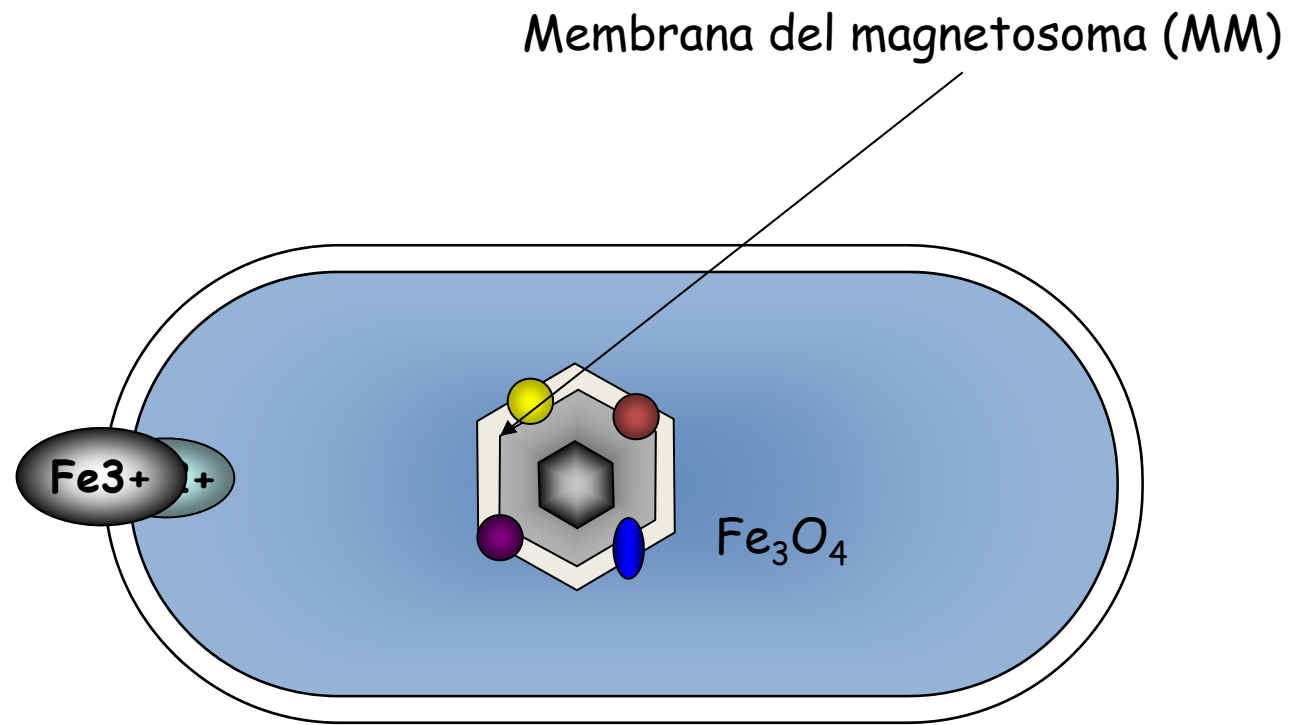
un gruppo eterogeneo di microrganismi acquatici
(magnetotattici) che organizzano il ferro in magnetite (Fe_3O_4) o greigite
(Fe_3S_4)



I cristalli dell'ordine
di grandezza dei
nanogrammi, sono
circondati da una
membrana

Le formazioni prendono il
nome di magnetosomi

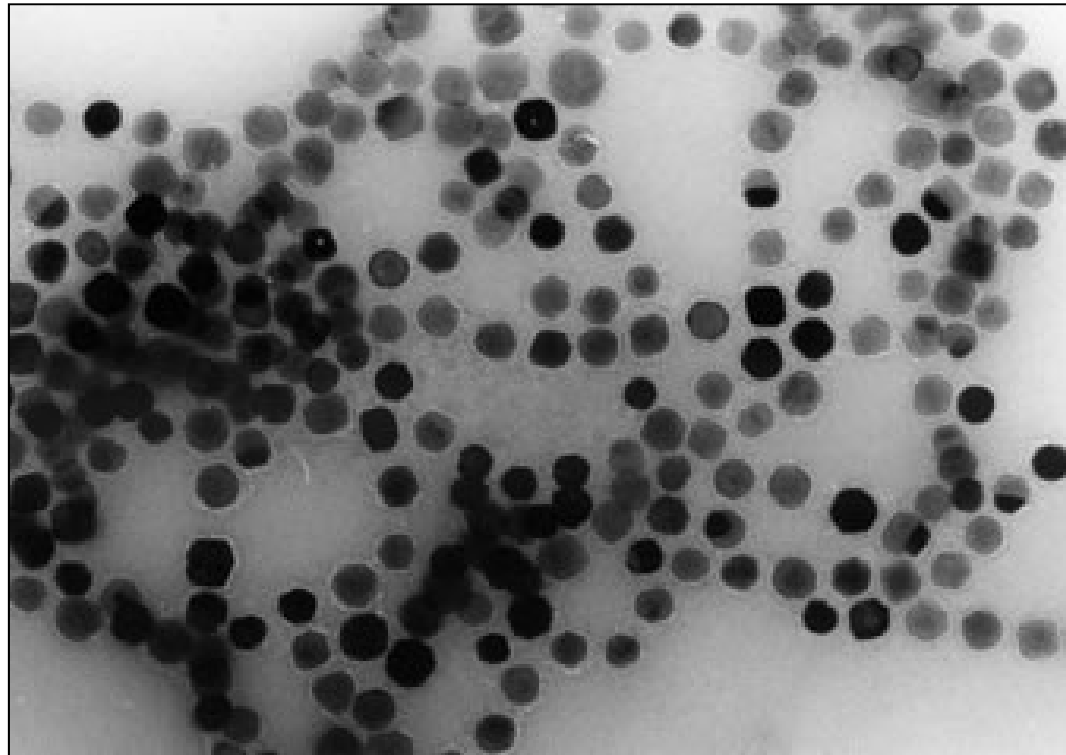
Modello proposto per la formazione del magnetosoma



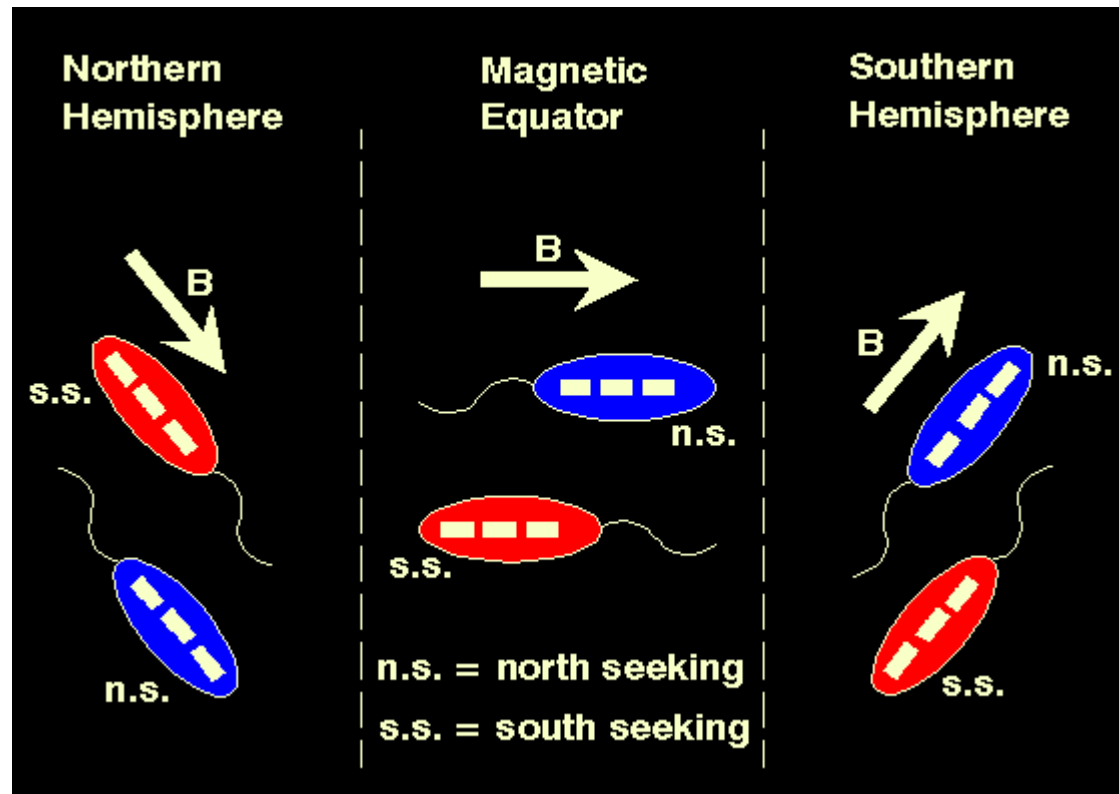
La membrana del magnetosoma
(monostrato di fosfolipidi)

Contiene proteine che partecipano
all'organizzazione della magnetite

Tiene separati i magnetosomi
impedendone l'agglomerazione



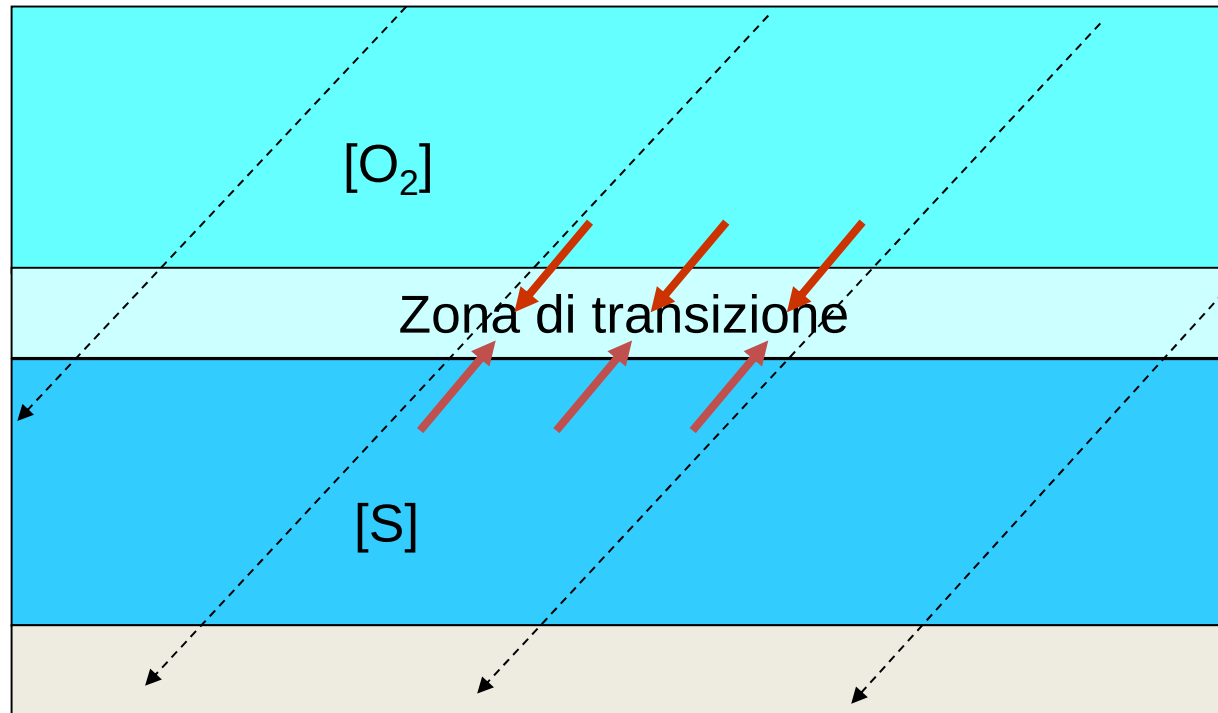
I magnetobatteri possono orientarsi “cercando il Nord” (NS) o “cercando il Sud” (SS) a seconda dell’orientamento del dipolo magnetico nella cellula



Le forme NS dominano nell’emisfero nord, mentre le SS dominano in quello Sud.
All’equatore le due forme si equivalgono.

con questo comportamento i magnetobatteri restano nella stretta zona di transizione tra zona ossica e anossica, che è il loro habitat

dal limite superiore della zona di transizione
nuotano verso il basso



Al limite inferiore invertono il senso del
nuoto lungo le stesse linee

Il senso di nuoto si inverte invertendo il
senso di rotazione del flagello