

# Genetica dei microrganismi

Dott.ssa Silvia Preziuso

Dipartimento di Scienze Veterinarie

Università di Camerino

Sezione di Patologia Animale, Profilassi e

Igiene degli Alimenti

# Argomenti trattati

- Gli acidi nucleici e l'informazione genetica
  - struttura DNA e RNA
  - codice genetico e sintesi proteica
  - organizzazione e funzionamento del DNA
- Mutazioni
- Trasferimento di materiale genetico nei batteri: ricombinazioni genetiche

# Antibiotico-resistenza

- Ceppi batterici prima sensibili diventano insensibili all'azione di particolari antibiotici
- Prima ipotesi: mutazione
- In seguito: osservati casi di resistenza multipla = a più antibiotici (fino a 5)
- Dimostrata possibilità di trasferire la resistenza multipla: ipotesi trasmissione genetica

# Nei batteri:

- Cosa sono le “mutazioni”?
- Come avviene il trasferimento di materiale genetico (ricombinazione genetica?)
- Brevi cenni sull’informazione genetica nei batteri

# Gli acidi nucleici: DNA e RNA

- DNA: informazioni x sviluppo e funzioni biologiche e riproduttive; codificate da geni, ognuno specifico x sintesi di determinata proteina (strutturali, regolatrici, enzimi, ecc.)
- RNA: diversi tipi intervengono nella traduzione da DNA a proteina e nella sintesi proteica

# DNA e RNA

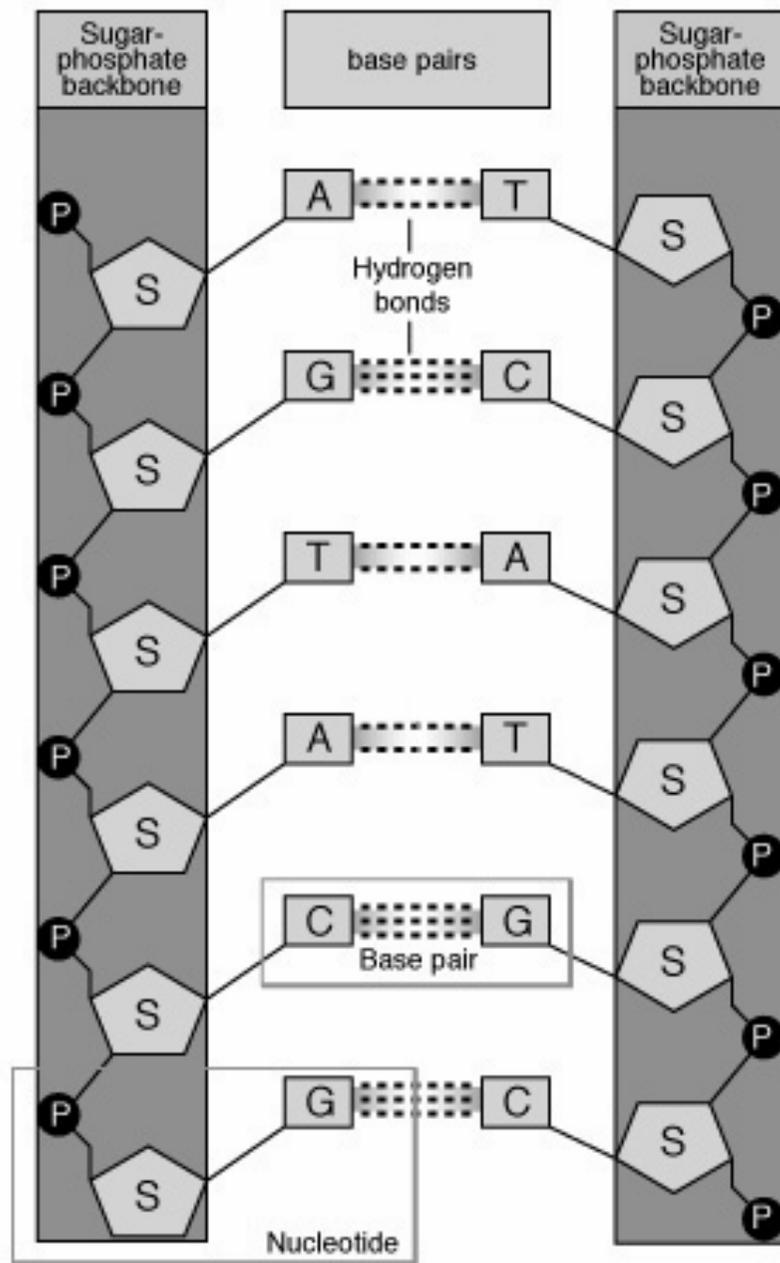
- Entrambi struttura portante costituita da molecole di un pentoso: ribosio x RNA e desossiribosio x DNA
- Ogni molecola di zucchero porta una base azotata:
  - purinica: adenina (A) o guanina (G)
  - pirimidinica: citosina (C), timina (T), uracile (U)
- T specifica x DNA, U specifica x RNA

- Una purina e una pirimidina si legano reversibilmente e in maniera complementare:

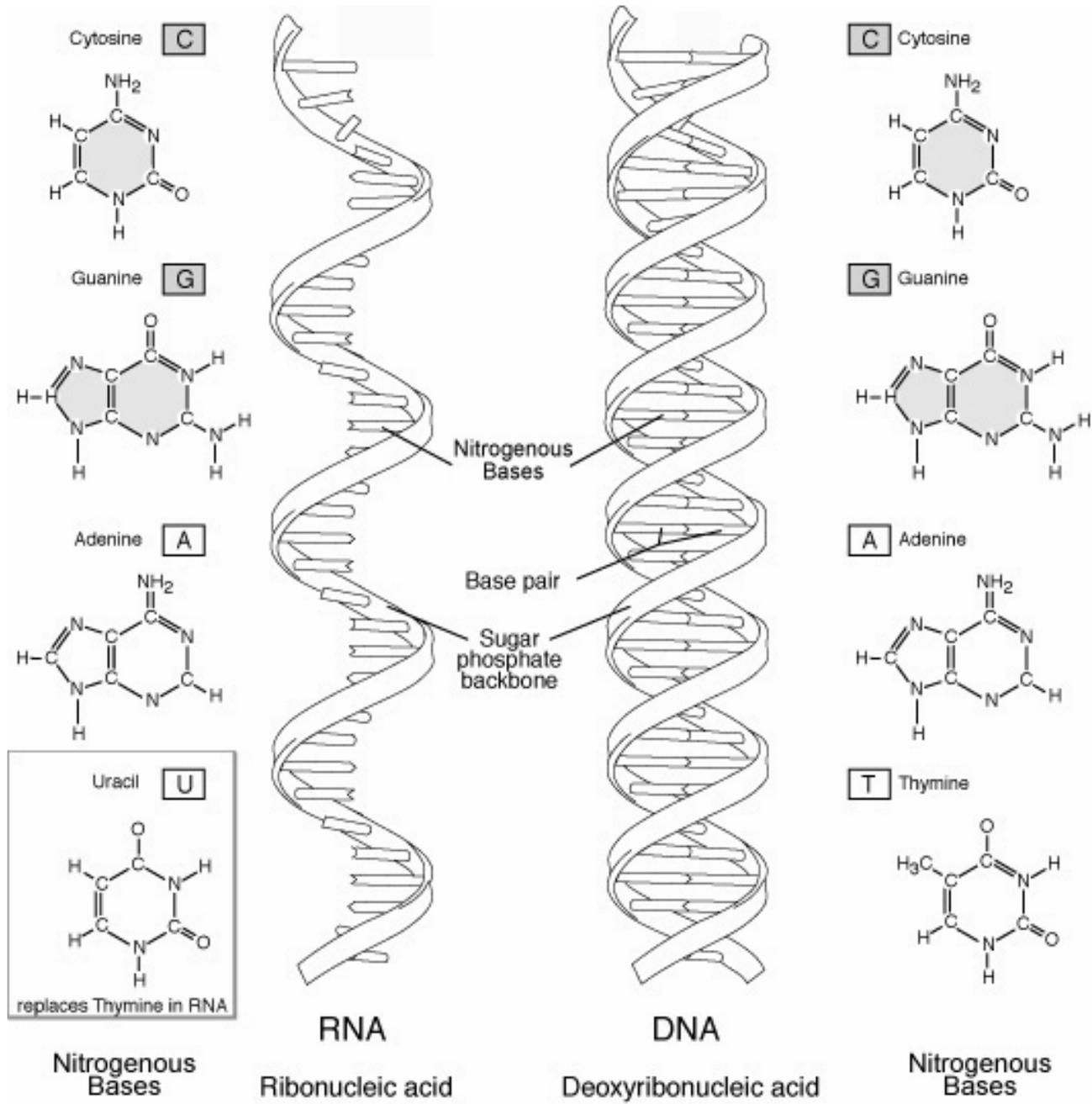
$$A = T$$

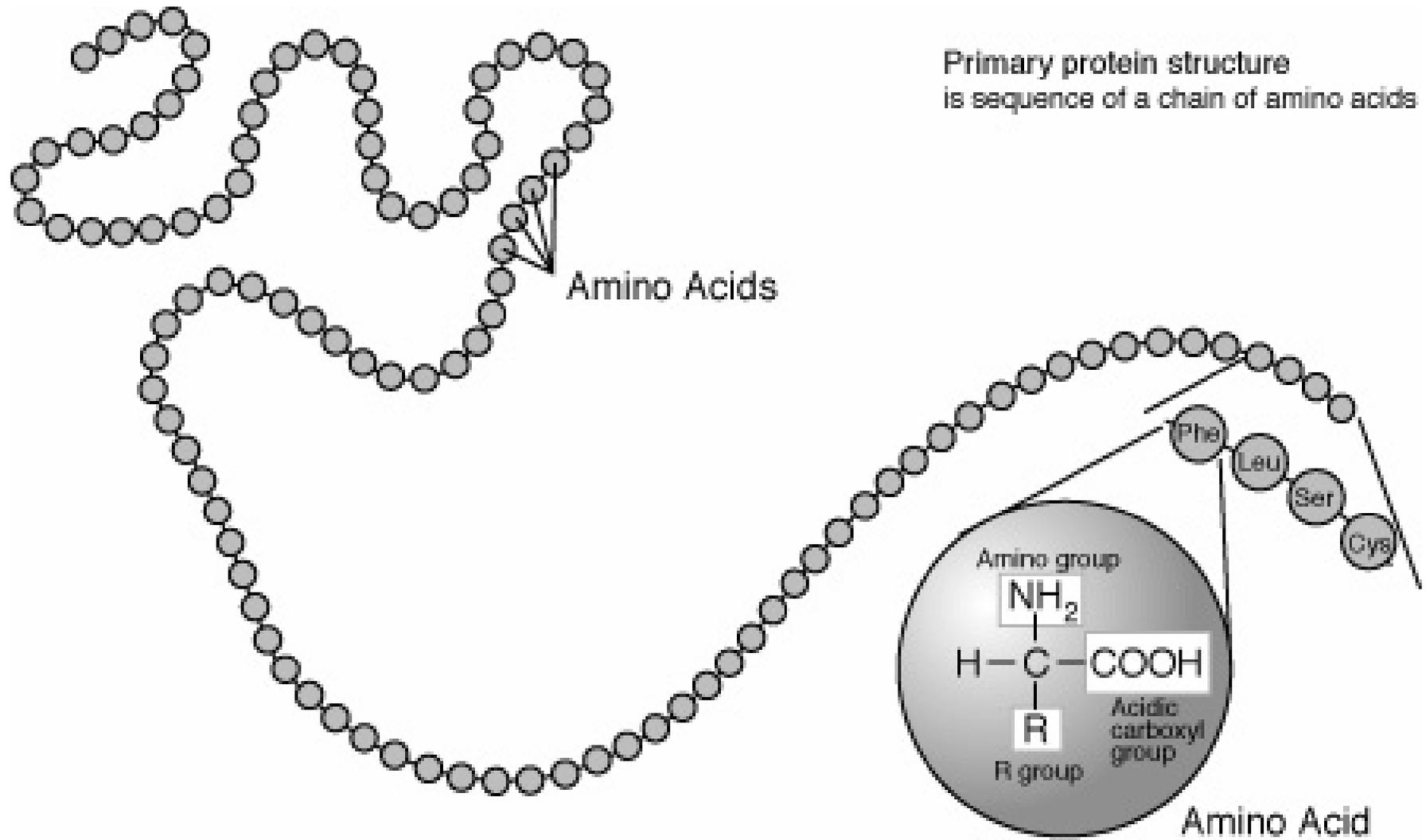
$$G = C$$

- La molecola di DNA batterica è formata da due filamenti di DNA complementari associati in base ai legami sopra indicati



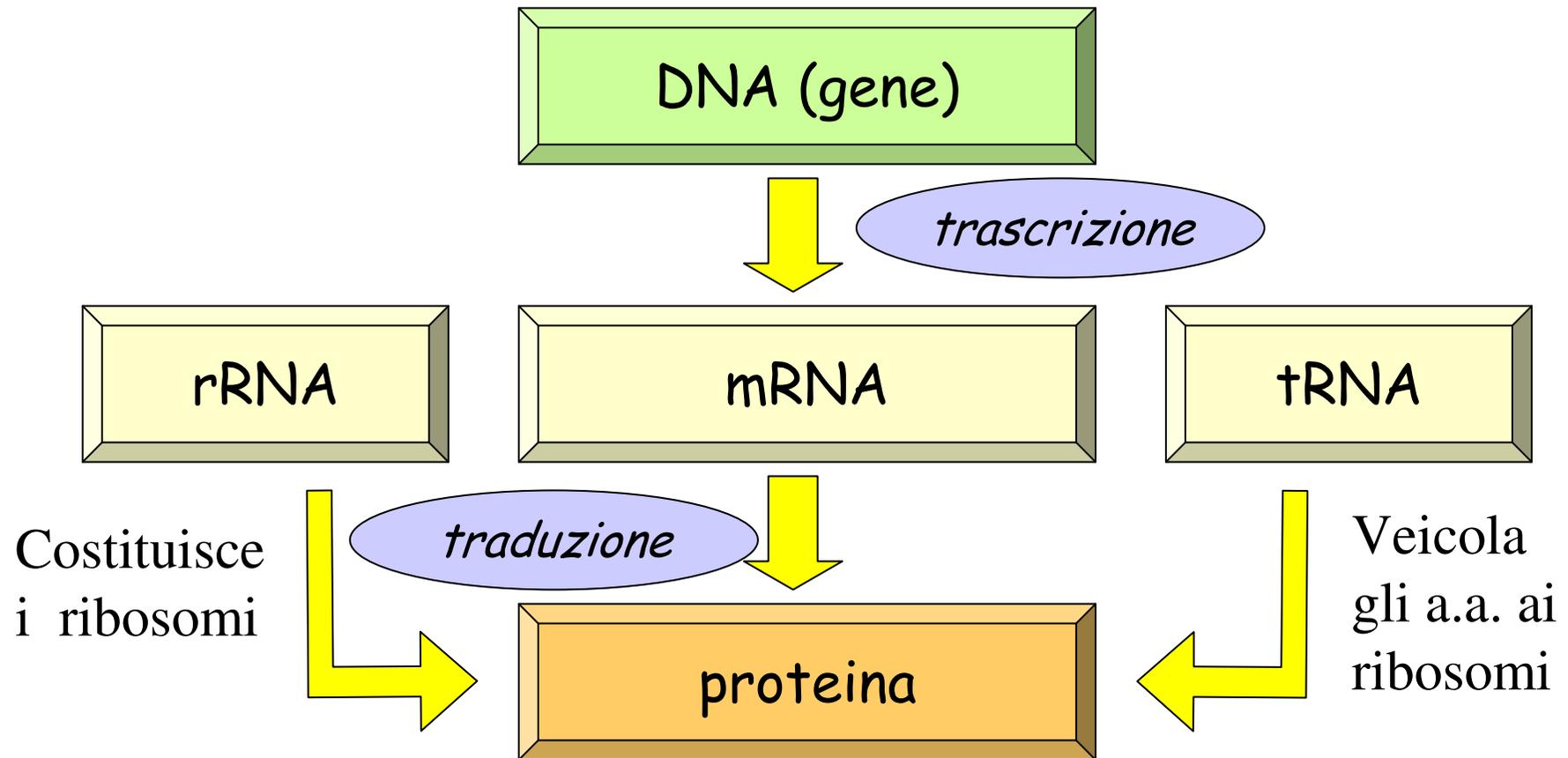
- Ogni filamento di DNA può funzionare da stampo per la sintesi del filamento complementare antiparallelo
- Questo permette la duplicazione fedele delle informazioni genetiche e la trasmissione alla progenie della cellula
- La complementarietà delle basi permette anche la traduzione fedele delle informazioni genetiche mediante la sintesi di RNA in base all'appaiamento:  
A = U  
G = C

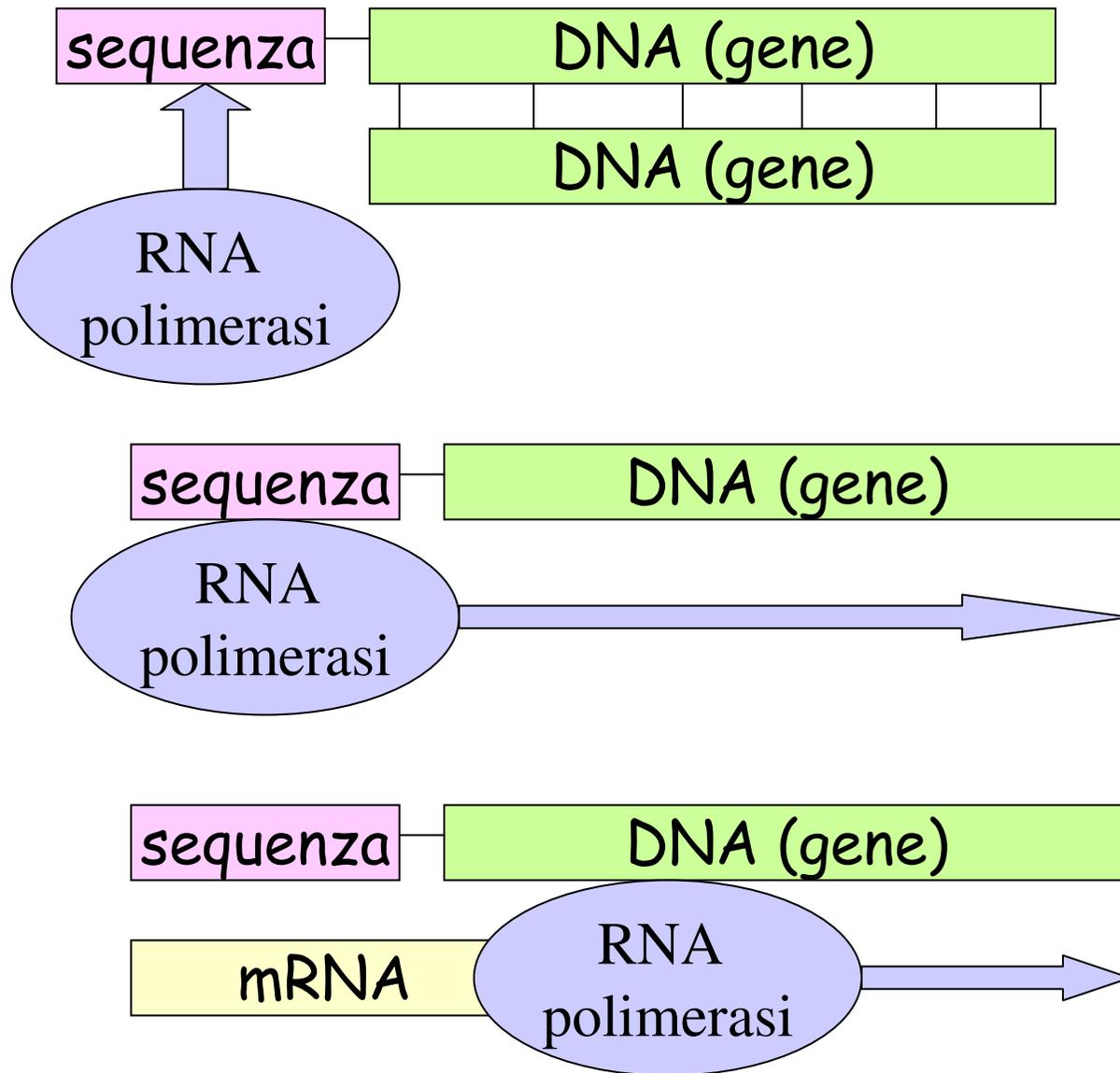


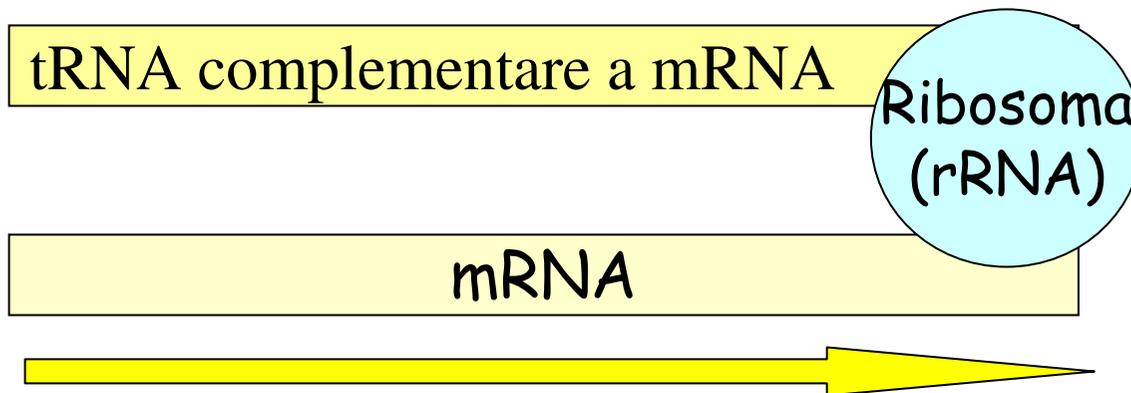
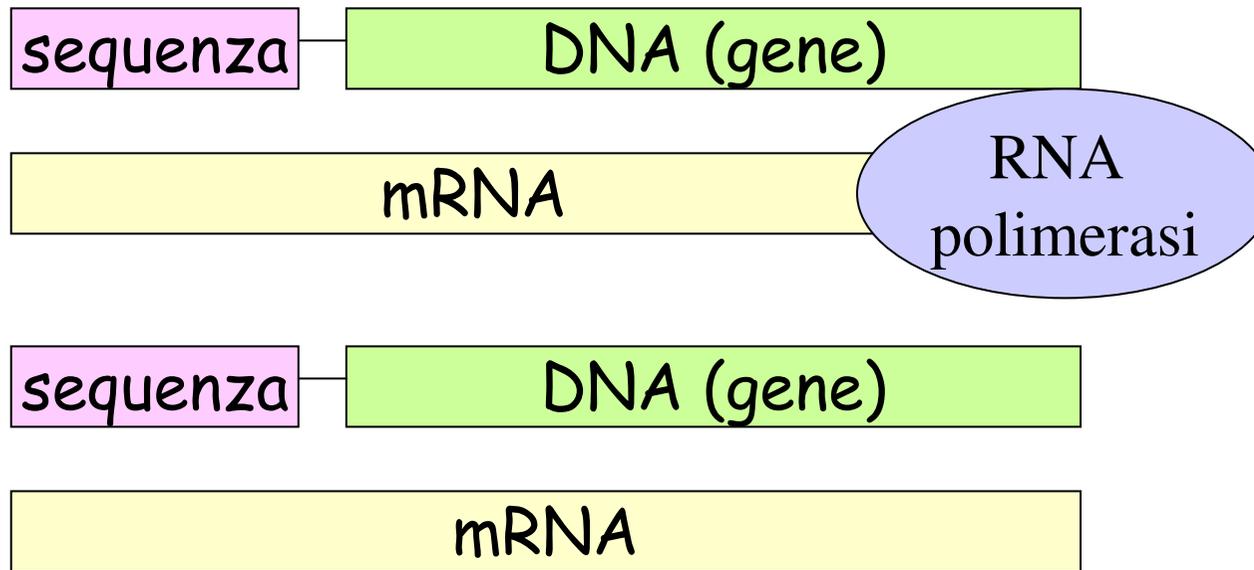


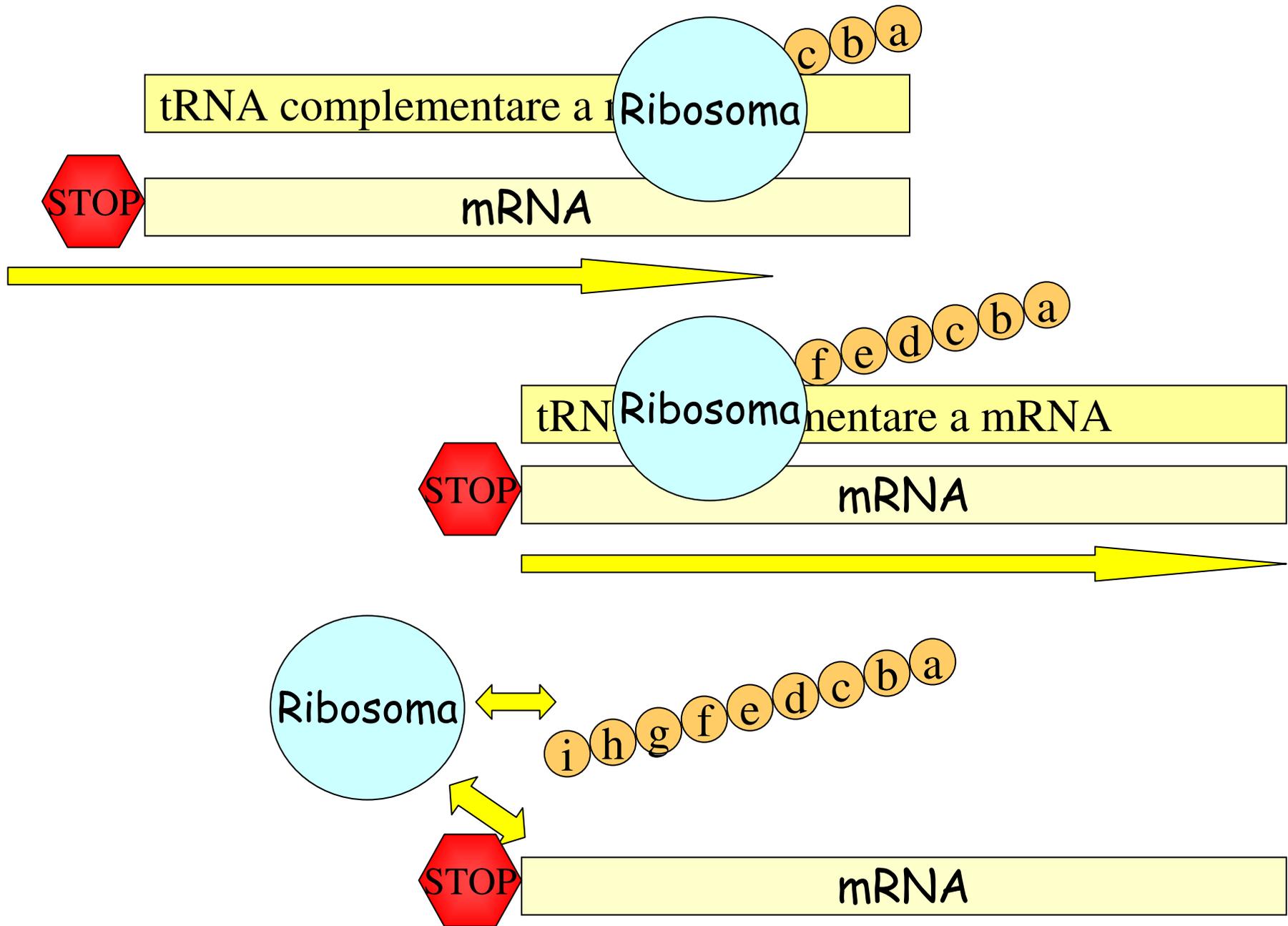
Primary protein structure is sequence of a chain of amino acids

# Dal codice genetico alla sintesi proteica: come avviene la “traduzione” da DNA a proteina?

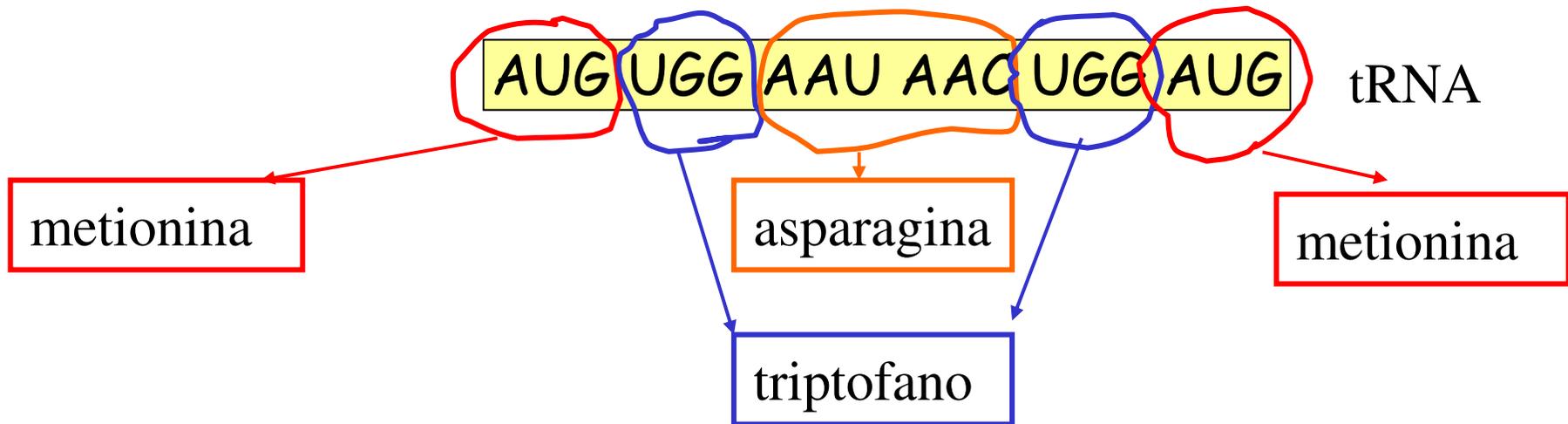
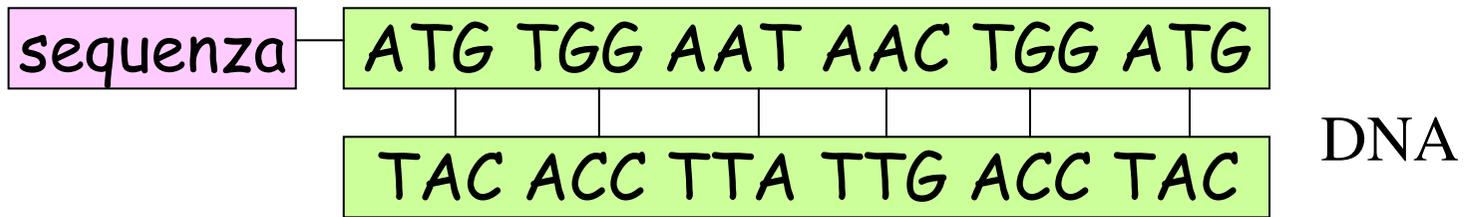








- Ogni aminoacido che compone le proteine è codificato da una o più sequenze di tre nucleotidi (triplette); es:
  - asparagina: AAU AAC
  - cisteina: UGU UGC
  - metionina: AUG
  - triptofano: UGG
- Perciò una specifica sequenza di DNA codifica x una specifica sequenza di RNA che codifica x una specifica sequenza di aminoacidi



# Proteina sintetizzata



# MUTAZIONI

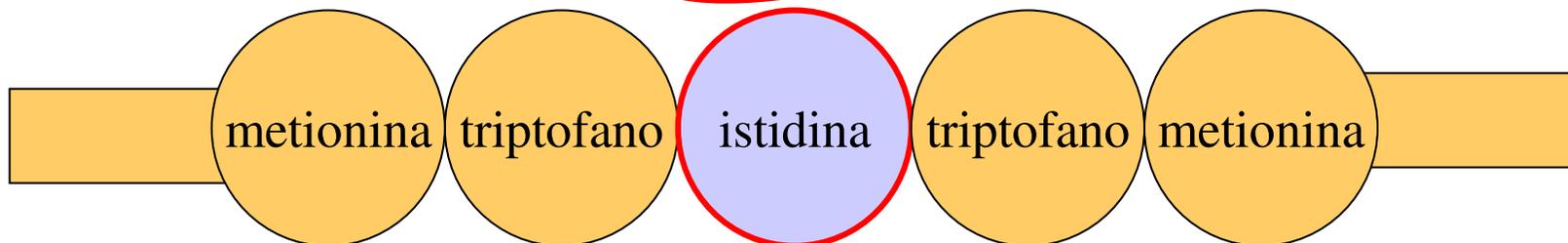
- Alterazioni del genotipo di un organismo a causa di modificazioni della sequenza nucleotidica del DNA
- Le cellule portatrici di un genotipo alterato rispetto a quello progenitore sono dette “**mutanti**”, mentre quelle che hanno mantenuto il genoma originale sono dette “**tipi selvaggi**”

# Mutazione puntiforme

AUG UGG **AAU AAC** UGG AUG



AUG UGG **CAU CAC** UGG AUG



# La mutazione può portare a:

- Comparsa di caratteristiche non vantaggiose né svantaggiose (es. cambio colore colonia)
- Essere letale se la proteina mutante è non funzionante ed essenziale per la vita dell'organismo
- favorire la sopravvivenza dell'organismo (es. resistenza ad un antibiotico, utilizzo di un substrato, ecc.)

# Agenti mutageni

- Probabilità mutazione spontanea 1:1.000.000
- Avviene durante duplicazione del DNA
- probabilità aumenta se esposizione ad “**agente mutageno**”:
  - analoghi delle basi (struttura chimica simile a basi azotate)
  - legami covalenti tra due timine adiacenti dello stesso filamento- distorsione filamento- incapacità di legare il filamento complementare (raggi X, UVA)
  - fotoriattivazione: protezione naturale delle cellule- enzimi che rompono legami covalenti T-T adiacenti

# Studio dei mutanti

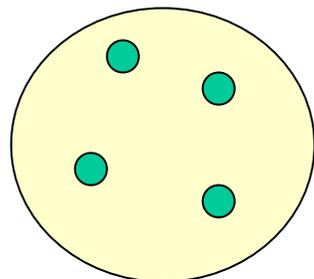
- Su cloni (colonie e progenie da una sola cellula) perché popolazione omogenea
- Su cloni batterici perché:
  - facili da coltivare
  - replicazione rapida (es. duplicazione ogni 20 minuti) e origine di cellule identiche
  - genoma semplice (poche migliaia di geni)
  - materiale genetico facilmente manipolabile (identificazione e isolamento dei geni, studio delle proteine prodotte, ecc.)

# Studio dei mutanti

- In microbiologia soprattutto AUXOTROFI (hanno perso la capacità di sintetizzare un metabolita, oppure sono diventati resistenti ad agenti dannosi (batteriofagi, antibiotici, ecc.)
- Soprattutto *E. coli* perché cresce su terreno minimo (sali ammonio, sali minerali, glucosio); si nota subito l'esigenza di sostanze diverse

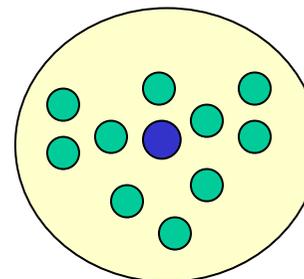
# Test di Ames

- Studio effetto sostanza sospetta cancerogena su mutante batterico per valutare se avviene la “**reversione**”
- Reversione: mutazione di un mutante nello stesso punto della prima mutazione, con ripristino della condizione primitiva
- es. colonie di Salmonella istidino-dipendenti che reversiono ad istidino-indipendenti in presenza di metil-metan-sulfonato



His-

Genetica dei microrganismi



His+

# Antibiotico-resistenza

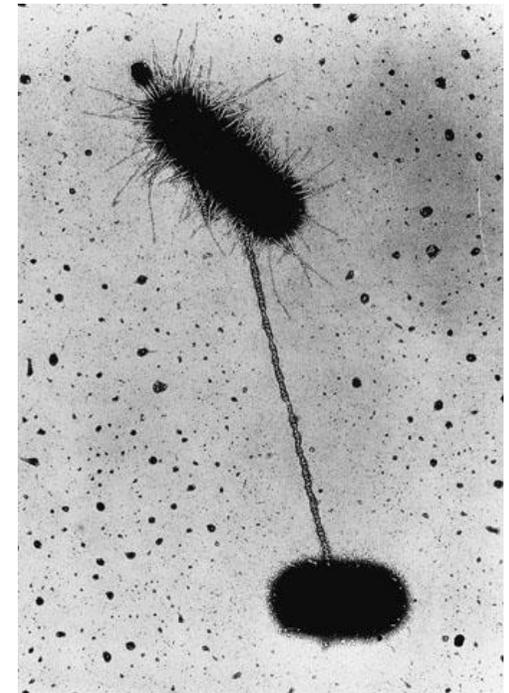
- 1952: isolato ceppo *Shigella* multi-resistente (tetraciclina, streptomina e sulfamidici)
- Isolati ceppi multi-resistenti fino a 5 antibiotici - probabilità infinitesimale che avvengano 3-5 mutazioni simultanee
- 1959: la resistenza multipla era trasferibile da *Shigella* ad *E. coli* - trasmissione genetica

# Trasferimento di materiale genetico nei batteri

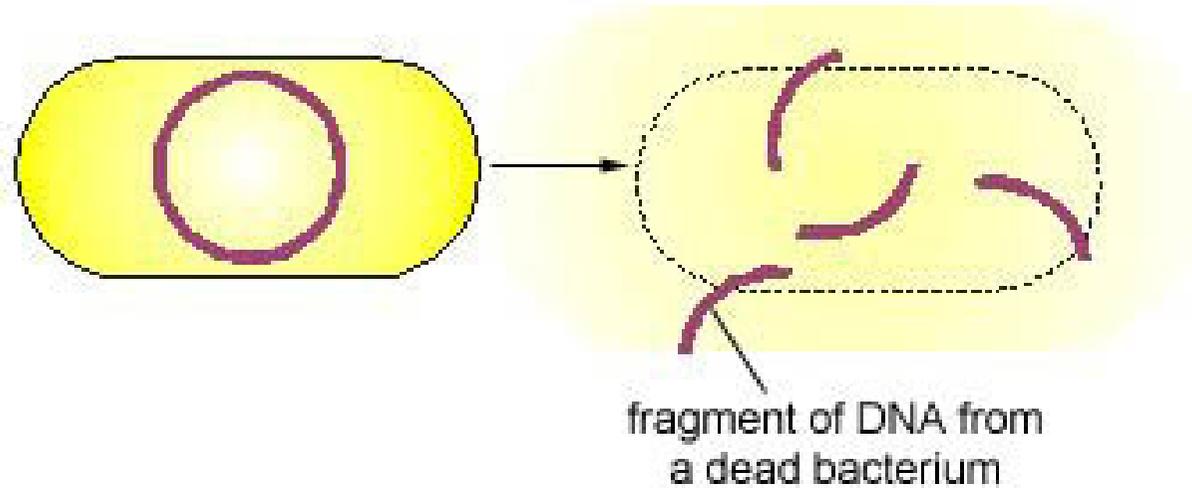
- I batteri possono passare informazioni genetiche ad altri batteri riceventi, che possono acquisire nuovi caratteri
- Trasmissione univoca: da donatore a ricevente
- Ricombinazione genetica: incorporazione stabile di nuovi geni nel cromosoma della cellula ricevente
- Sono trasmesse frazioni di DNA; il nuovo frammento sostituisce un frammento di uguale lunghezza; il frammento vecchio viene distrutto dalla DNAsi

# Meccanismi di trasferimento

- **Trasformazione:** trasferimento di informazioni genetiche mediante DNA extracellulare libero
- **Trasduzione:** trasferimento di frammenti di DNA mediante batteriofagi (generalizzata e ristretta)
- **Coniugazione:** trasferimento di DNA da batterio donatore a batterio ricevente attraverso sex-pilus (Gram-) o contatto (Gram+)

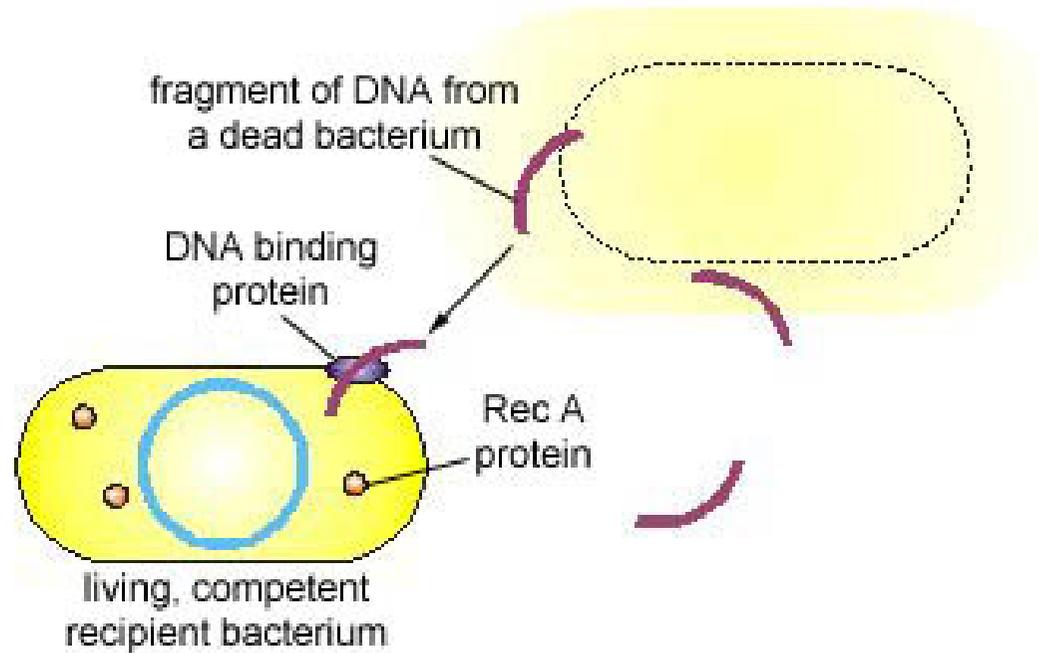


# TRASFORMAZIONE



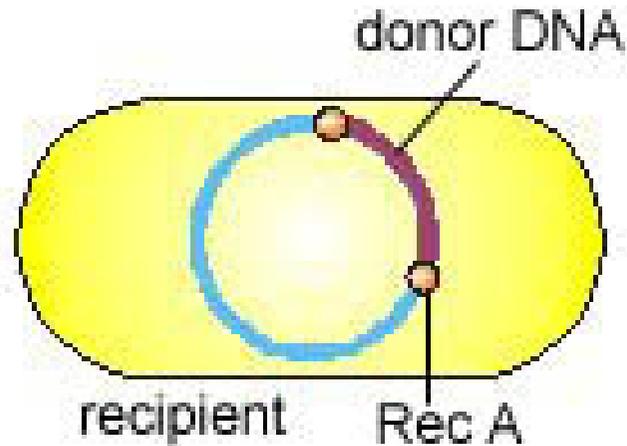
Cellula batterica lisata rilascia frammenti di DNA; il DNA conserva potenzialità di guida a sintesi proteica

# TRASFORMAZIONE

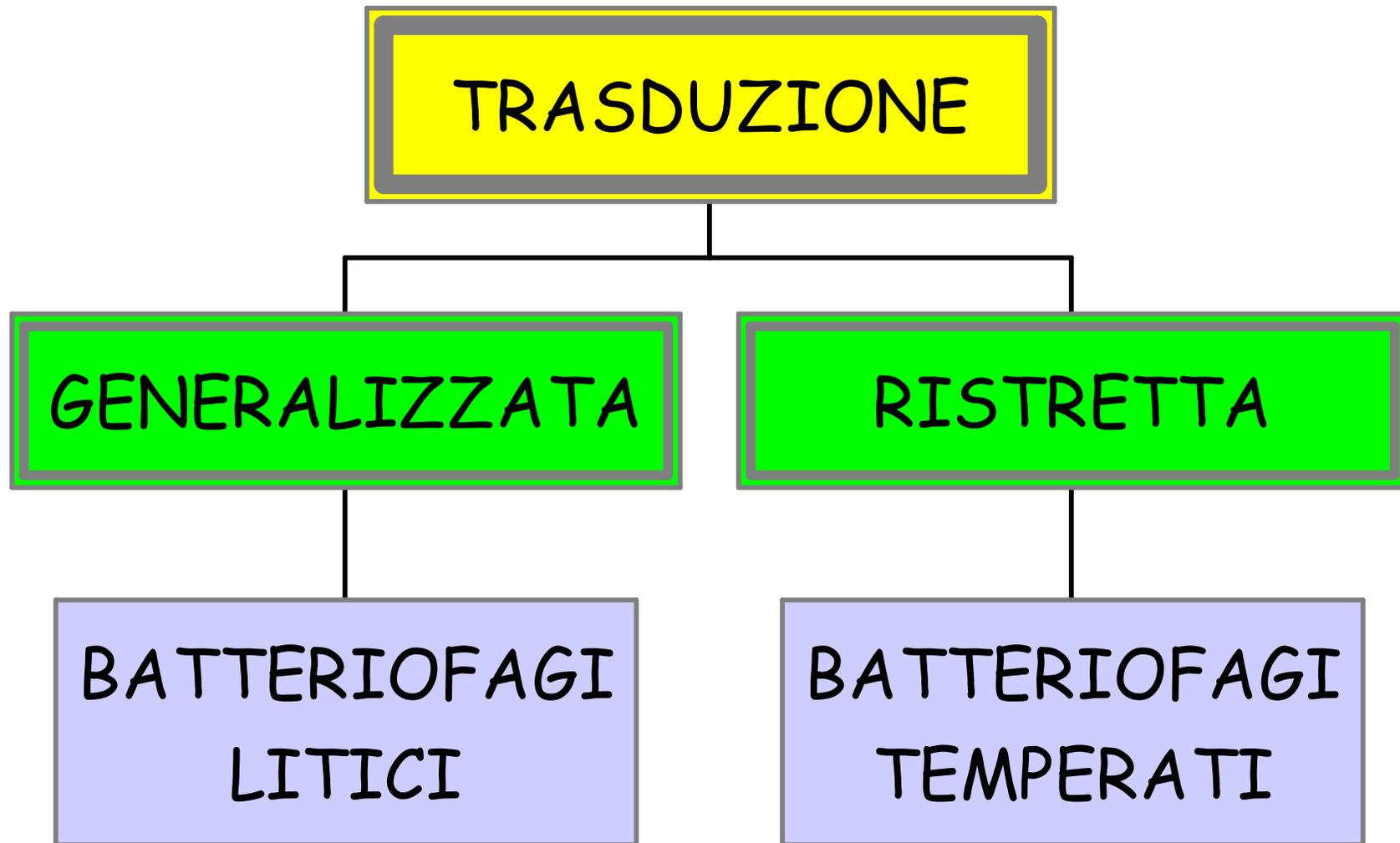


Frammenti liberi adsorbono alla cellula ricevente e attraversano la membrana cellulare

# TRASFORMAZIONE

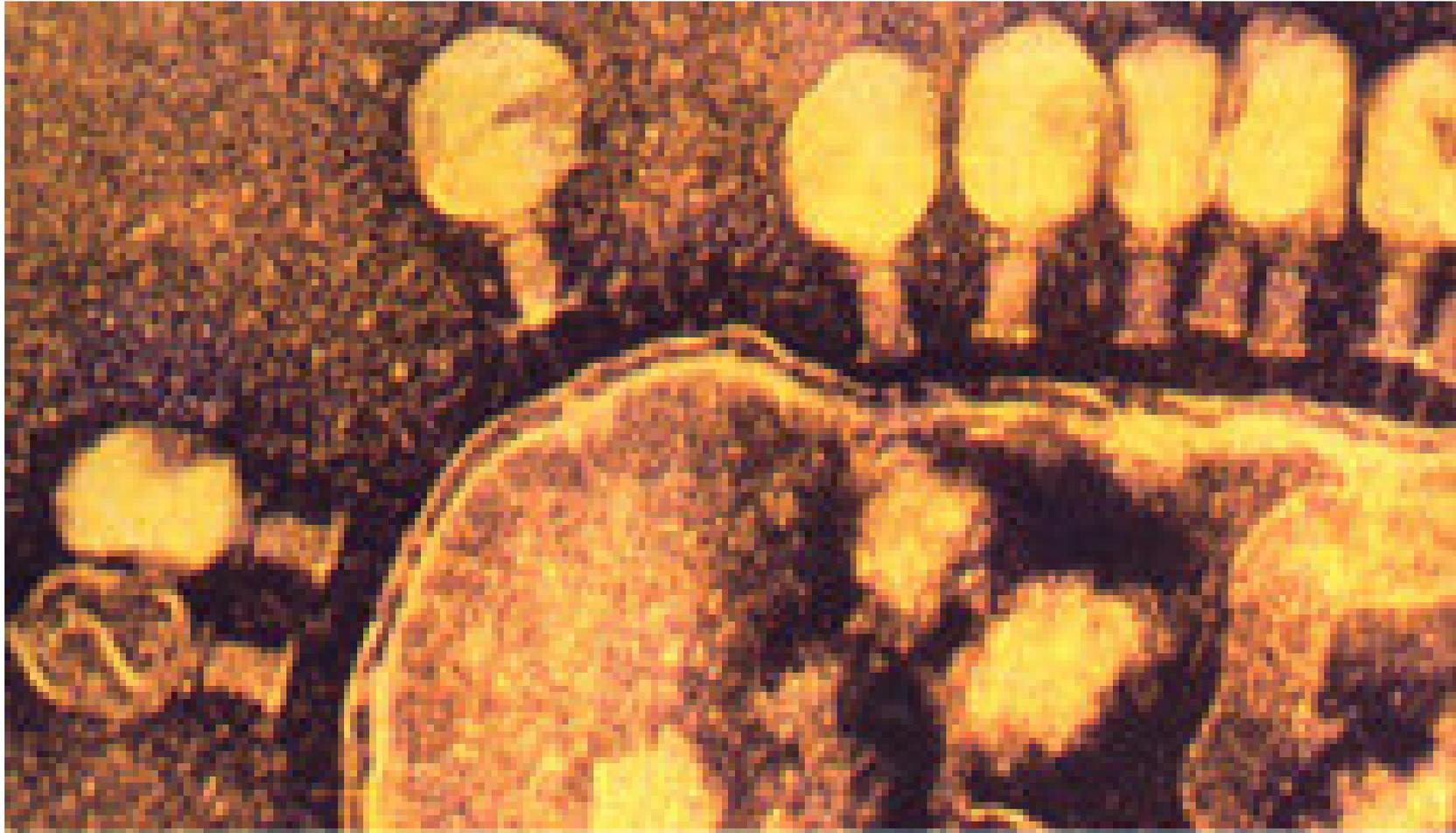


I frammenti di DNA vengono  
incorporati nel cromosoma della  
cellula ricevente



# Batteriofagi:

virus che infettano solamente batteri

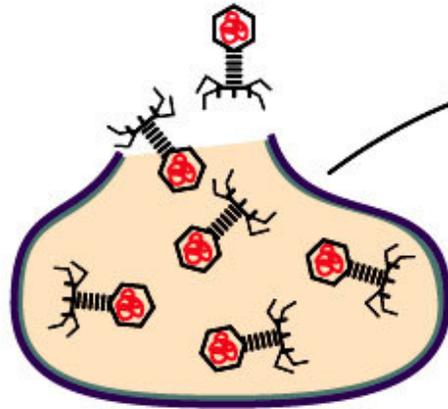


# BACTERIOFAGI LITICI (ciclo litico)

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

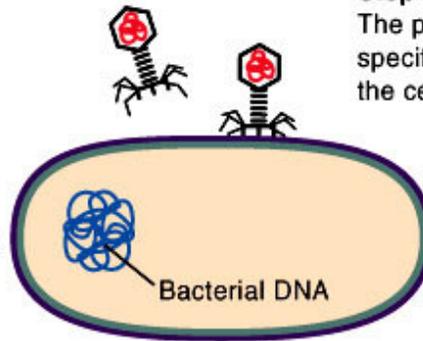
## Step 6: Release

The bacterial cell lyses and releases many infective phage.



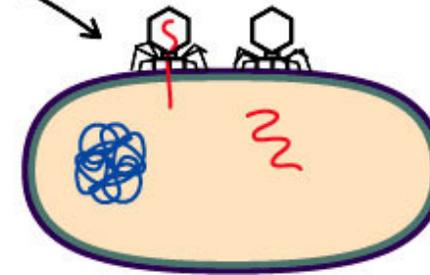
## Step 1: Attachment

The phage attach to specific receptors on the cell wall of *E. coli*.



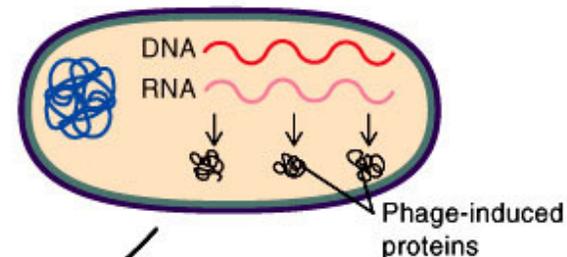
## Step 2: Penetration

Following attachment, phage DNA is injected into the bacterial cell, leaving the phage coat outside.



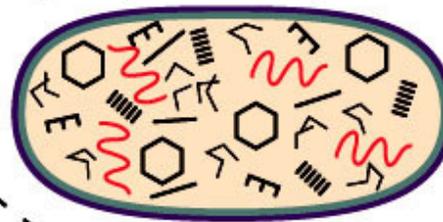
## Step 3: Transcription

Phage DNA is transcribed, producing phage mRNA, which is translated to phage proteins.



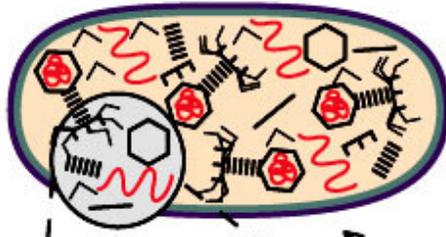
## Step 4: Replication of Phage DNA and Synthesis of Proteins

Phage coat proteins, other protein components, and DNA are produced separately. Host DNA degraded.



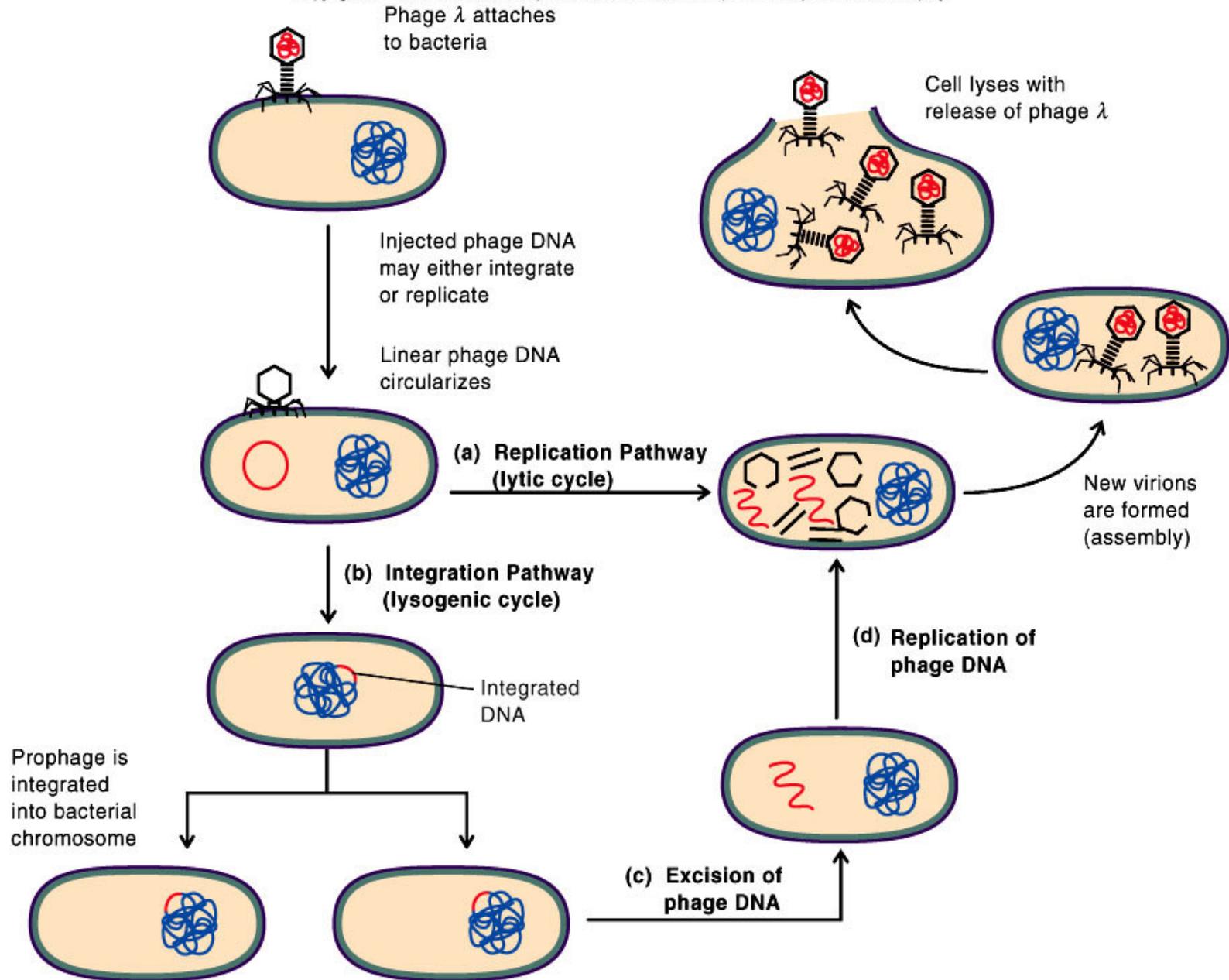
## Step 5: Assembly

Phage components are assembled into mature virions.



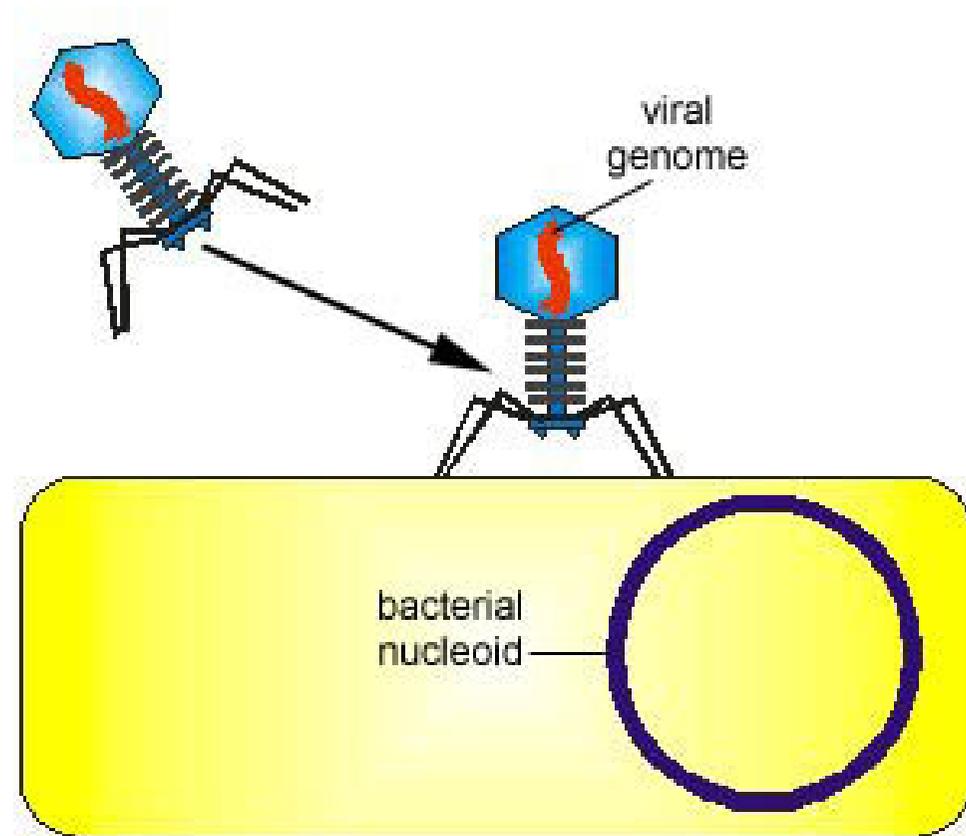
# BACTERIOFAGI TEMPERATI (ciclo lisogeno)

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



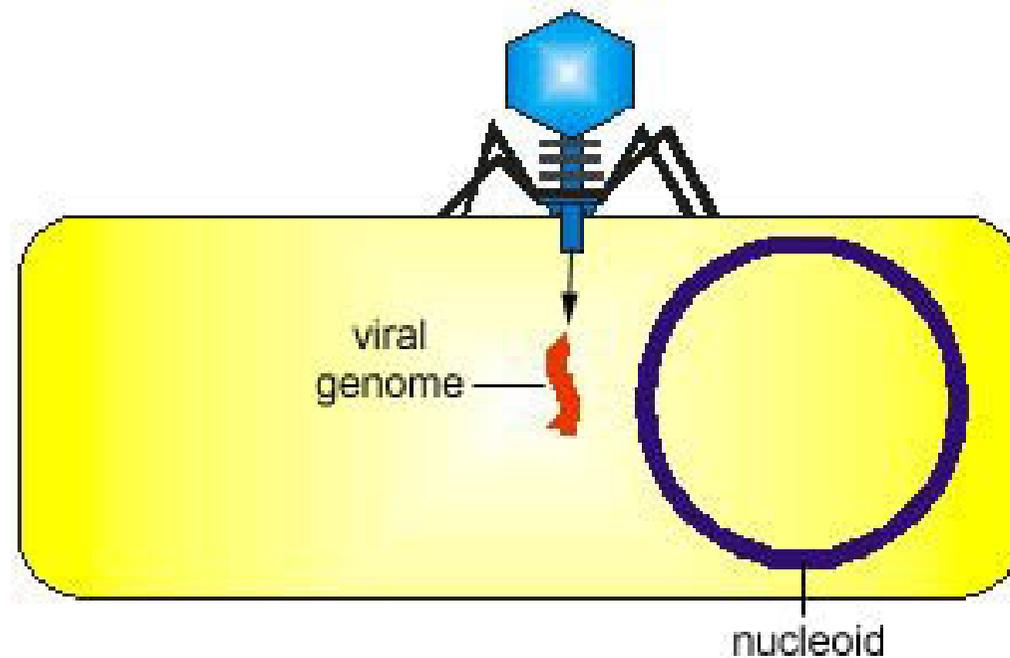
# Trasduzione generalizzata (batteriofagi litici)

Il batteriofago  
riconosce ed  
adsorbe alla  
cellula  
batterica



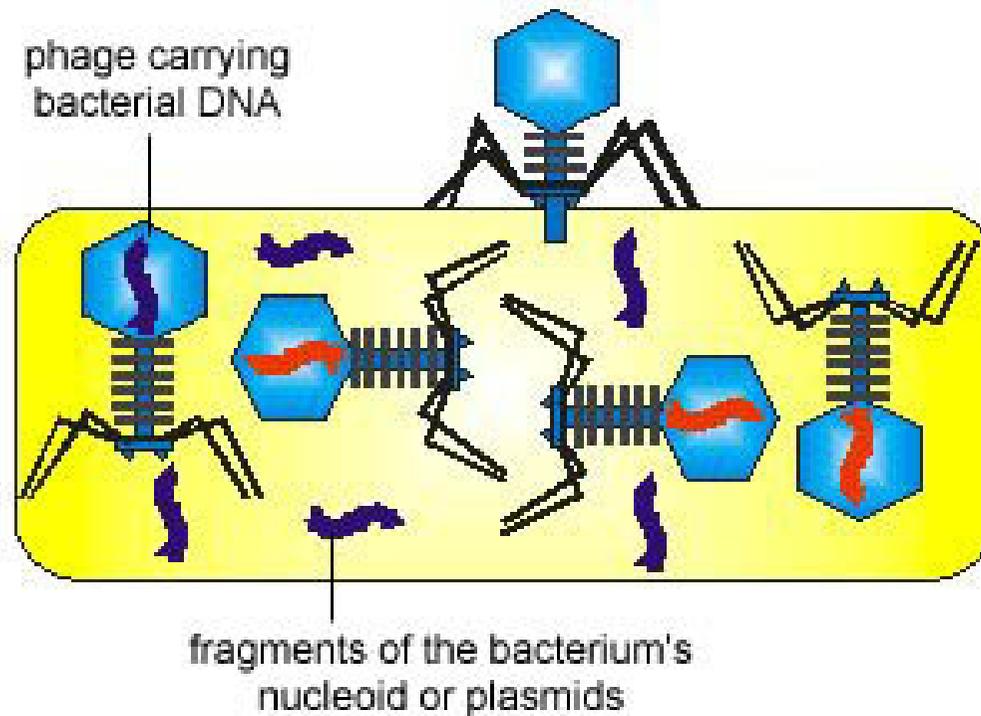
# Trasduzione generalizzata (batteriofagi litici)

Il batteriofago  
inocula il  
genoma nella  
cellula  
batterica



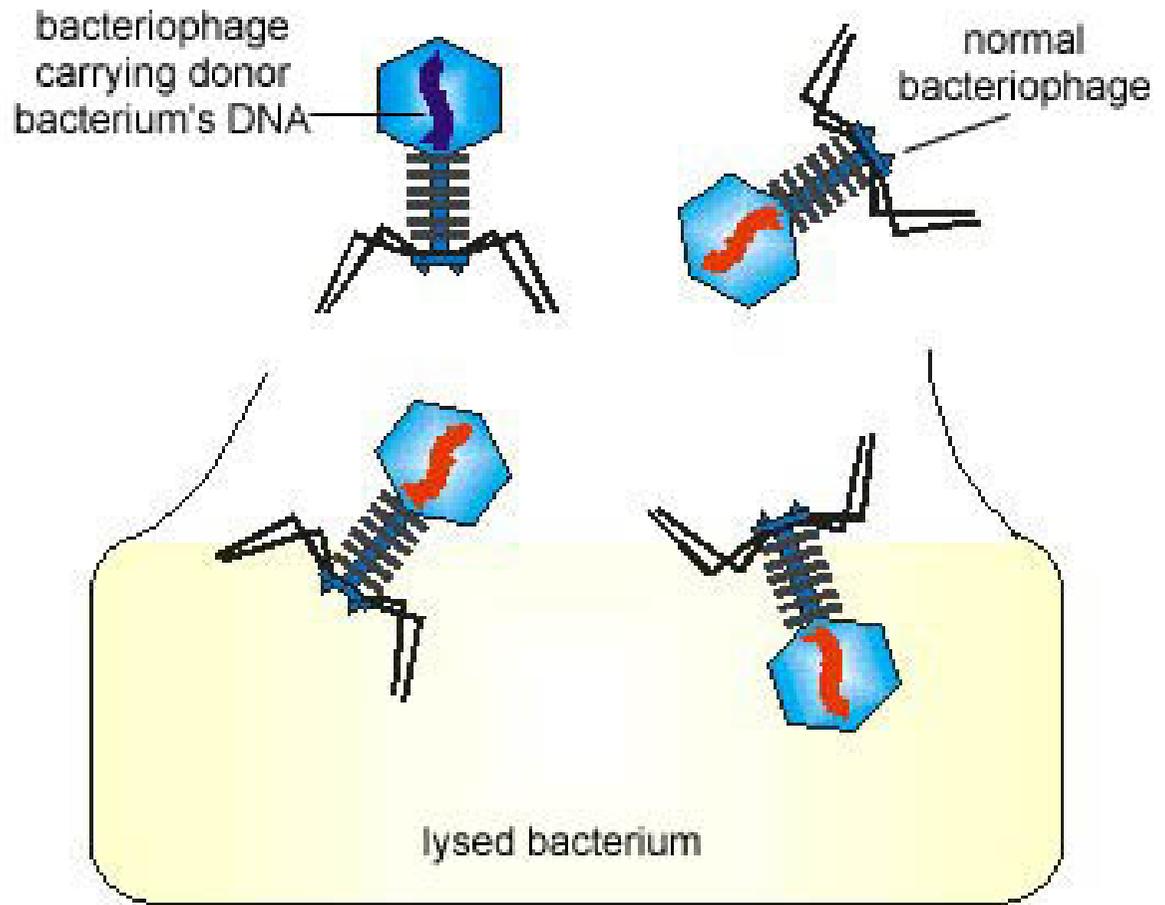
# Trasduzione generalizzata (batteriofagi litici)

- Il genoma batterico si frammenta e quello del batteriofago replica
- vengono assemblati nuovi batteriofagi
- frammenti del genoma batterico possono essere assemblati nei nuovi batteriofagi



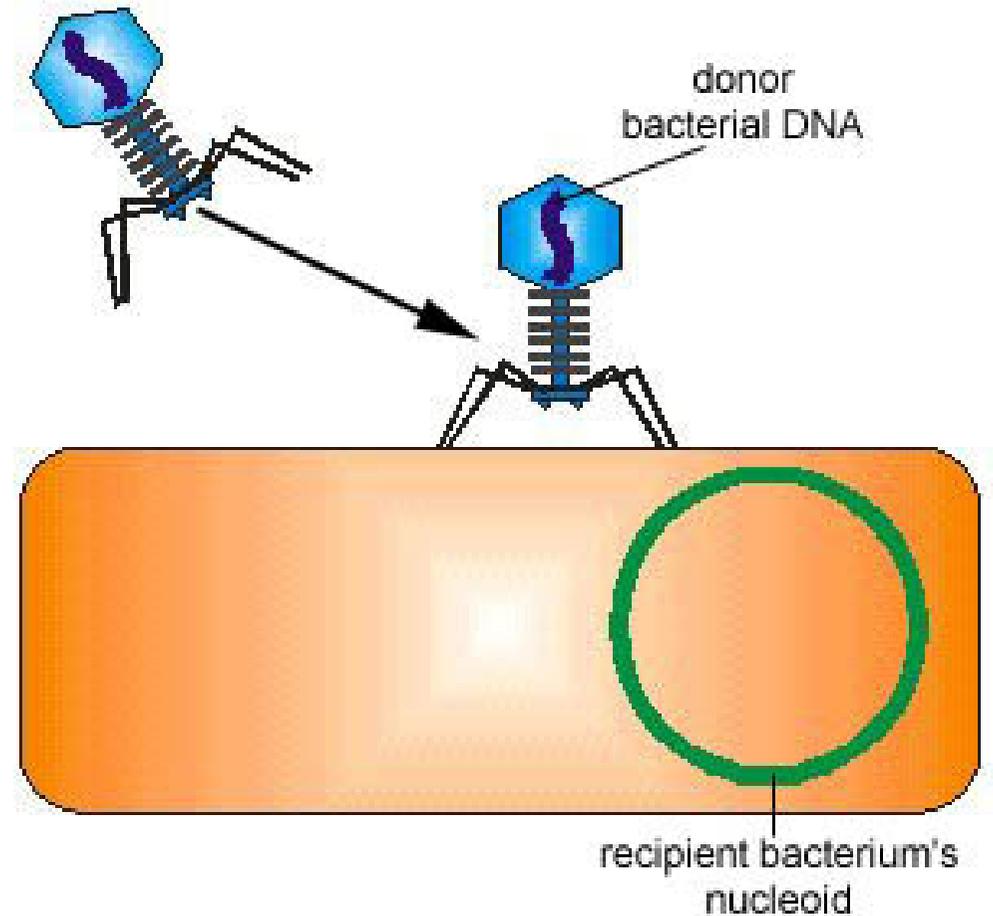
# Trasduzione generalizzata (batteriofagi litici)

I batteriofagi  
neoformati  
vengono liberati  
(lisi batterio);  
alcuni batteriofagi  
veicolano i  
frammenti del  
genoma batterico



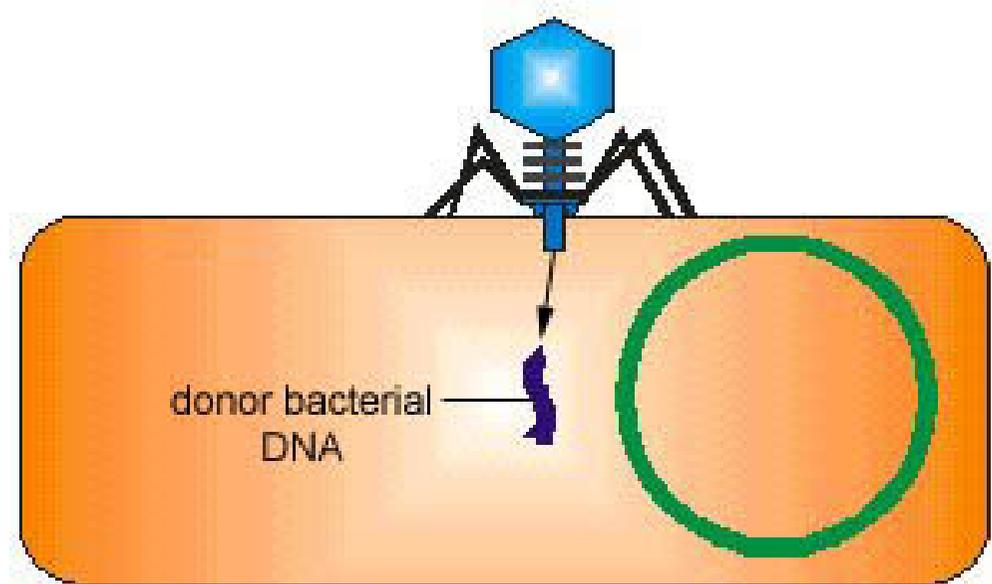
# Trasduzione generalizzata (batteriofagi litici)

I batteriofagi che veicolano i frammenti di DNA del primo batterio (donatore) adsorbendo ad un altro batterio (ricevente)



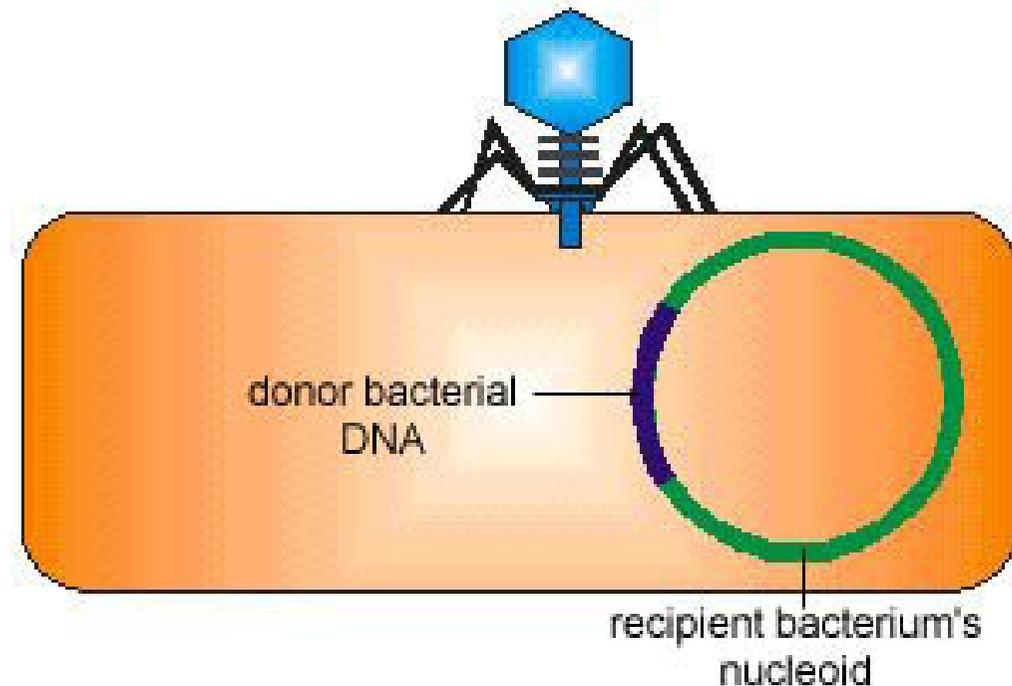
# Trasduzione generalizzata (batteriofagi litici)

Il batteriofago  
inocula il  
frammento di  
DNA del batterio  
donatore nel  
batterio ricevente



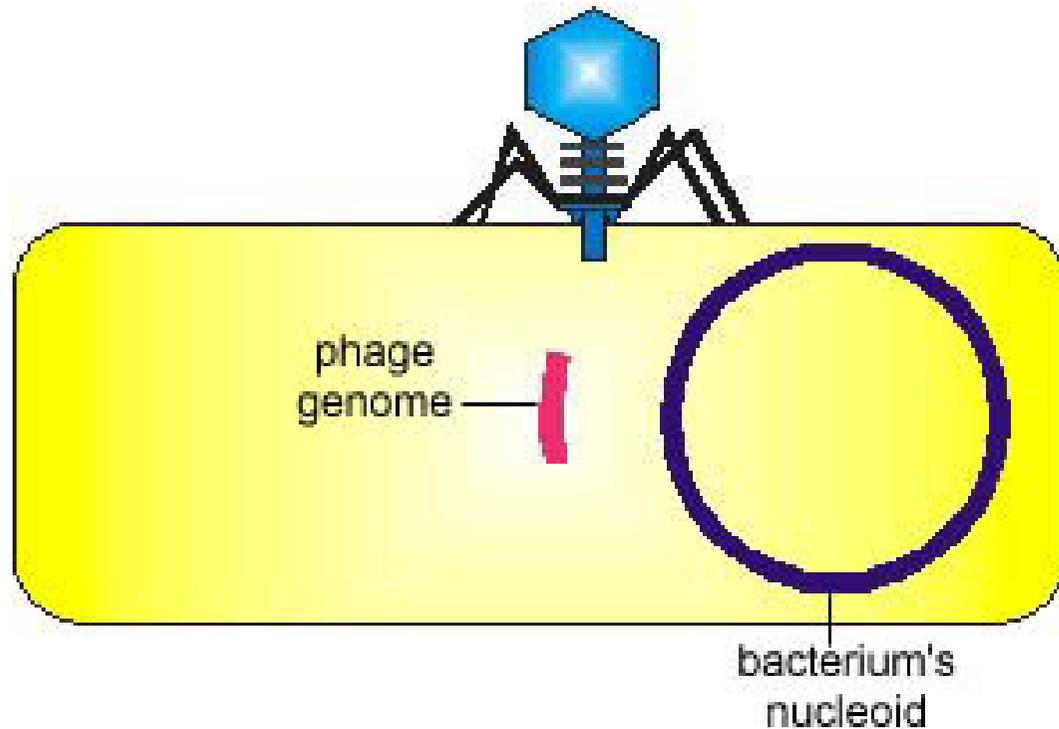
# Trasduzione generalizzata (batteriofagi litici)

Il frammento  
di DNA del  
batterio  
donatore si  
integra  
stabilmente  
nel genoma  
del batterio  
ricevente



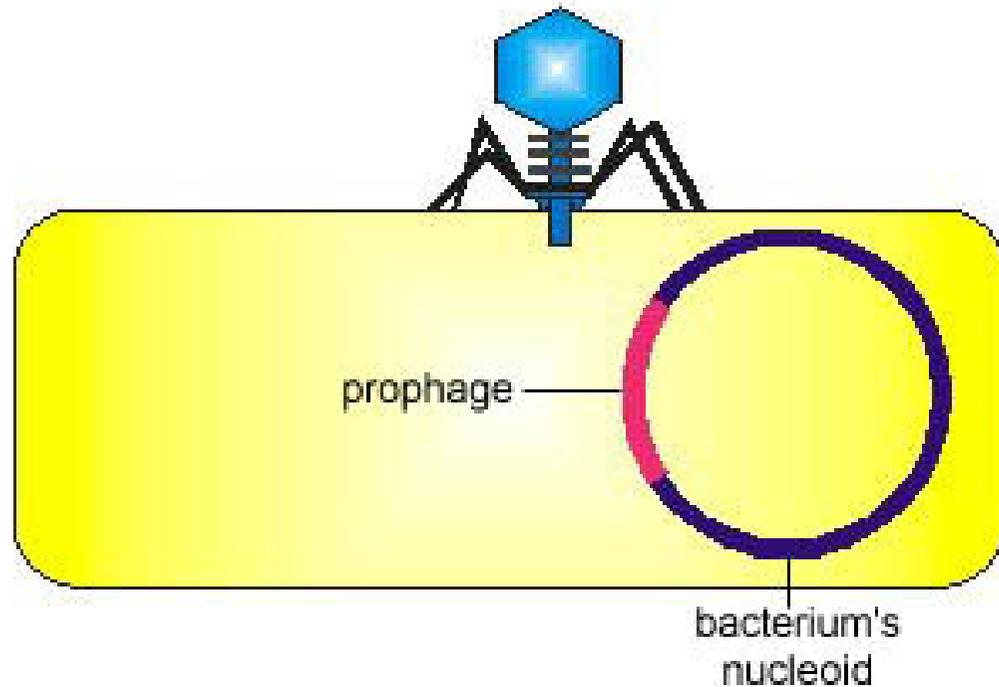
# Trasduzione ristretta (batteriofagi temperati)

Il batteriofago  
inocula il  
genoma nella  
cellula  
batterica



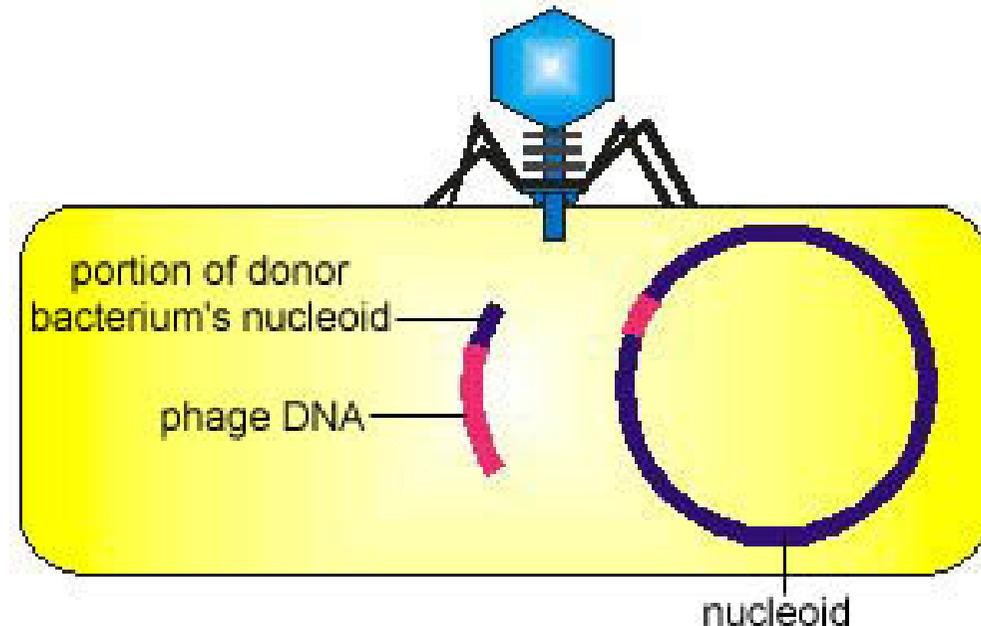
# Trasduzione ristretta (batteriofagi temperati)

Il genoma del batteriofago si integra nel genoma della cellula batterica (“profago”)



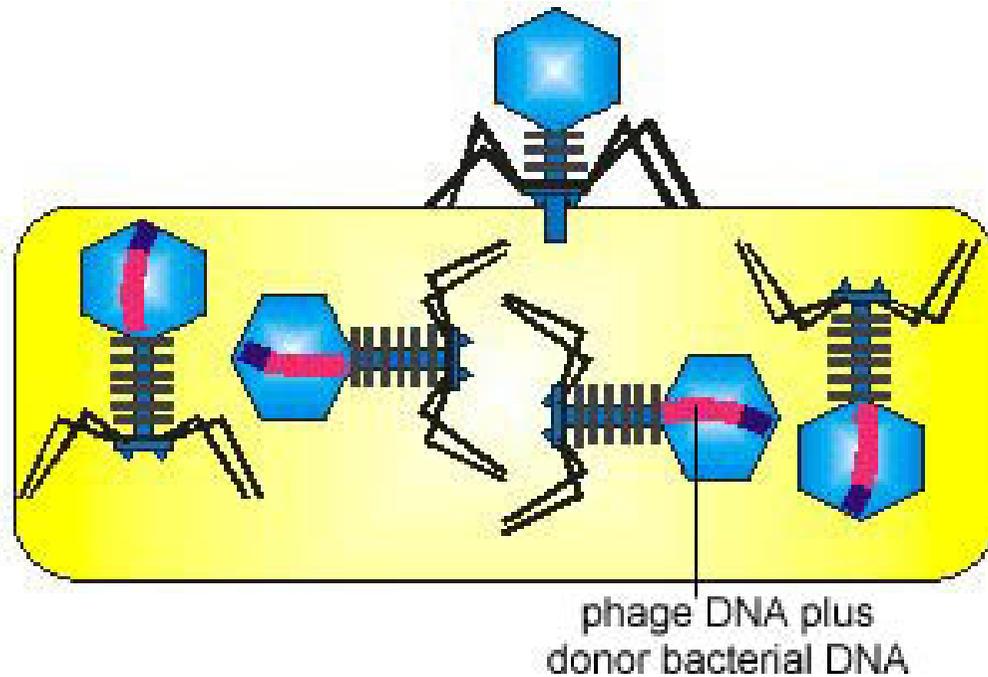
# Trasduzione ristretta (batteriofagi temperati)

Quando il  
genoma fagico  
replica, scambia  
una parte di DNA  
ed include una  
parte di DNA  
batterico



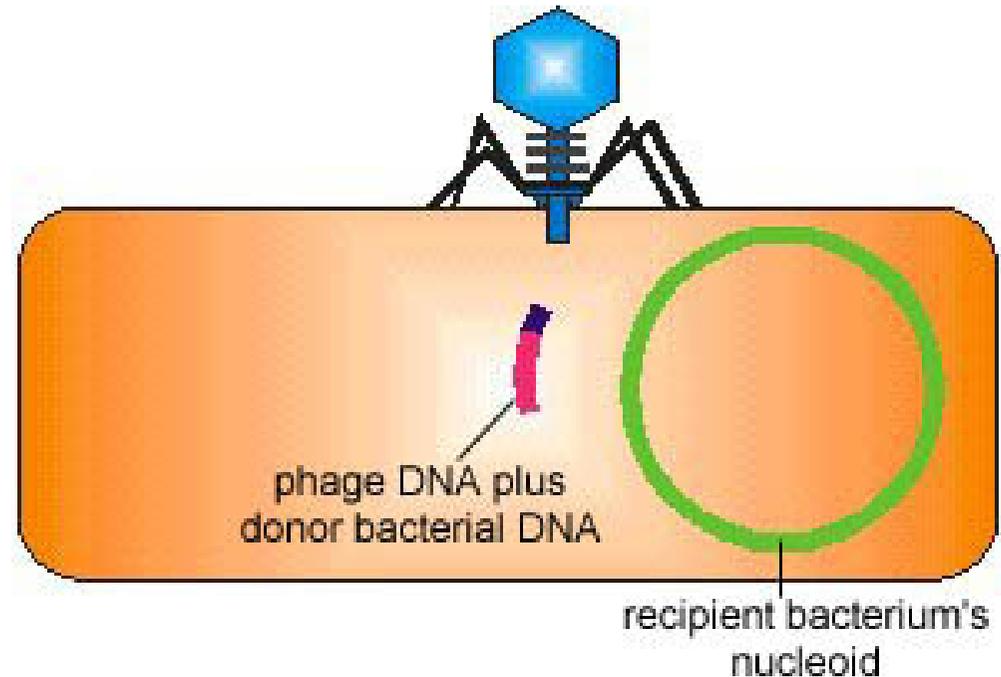
# Trasduzione ristretta (batteriofagi temperati)

Il “nuovo”  
frammento  
fagico replica e  
si formano  
batteriofagi  
veicolanti la  
porzione di  
DNA batterico



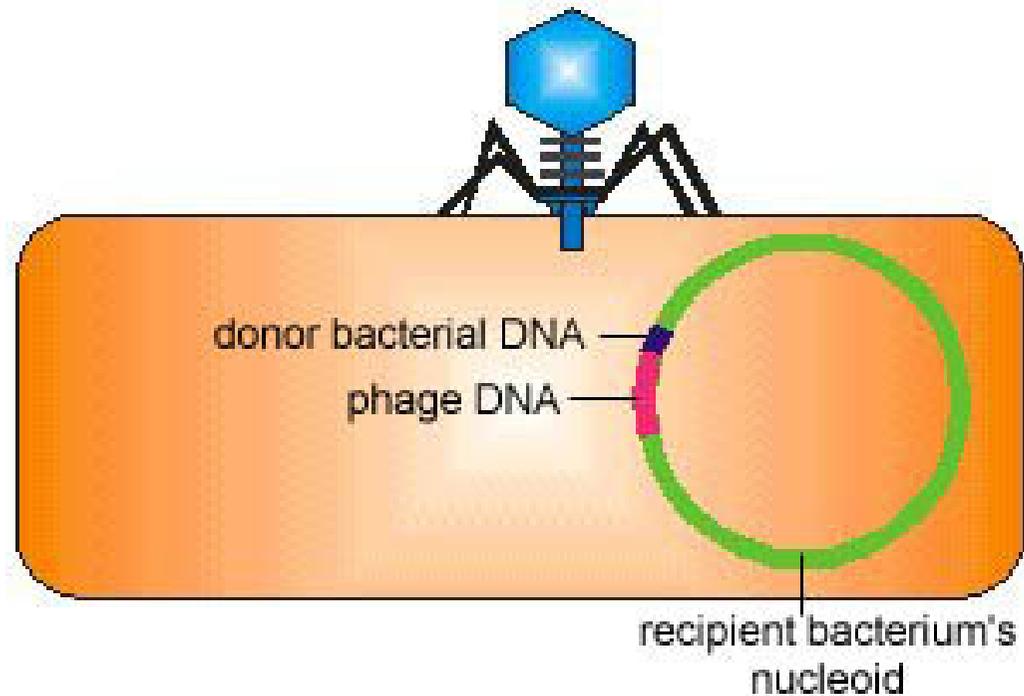
# Trasduzione ristretta (batteriofagi temperati)

Il batteriofago  
inocula il genoma  
veicolante la  
porzione di DNA  
del batterio  
donatore in un  
altro batterio  
(ricevente)



# Trasduzione ristretta (batteriofagi temperati)

Il genoma del batteriofago si integra stabilmente nel genoma del batterio ricevente, veicolando un tratto del genoma del batterio donatore



# CONIUGAZIONE

## Fattore F

(sequenza di DNA che porta informazione per sintesi *sex-pilus*)

Libero nel citoplasma  
(plasmide)

Integrato nel cromosoma

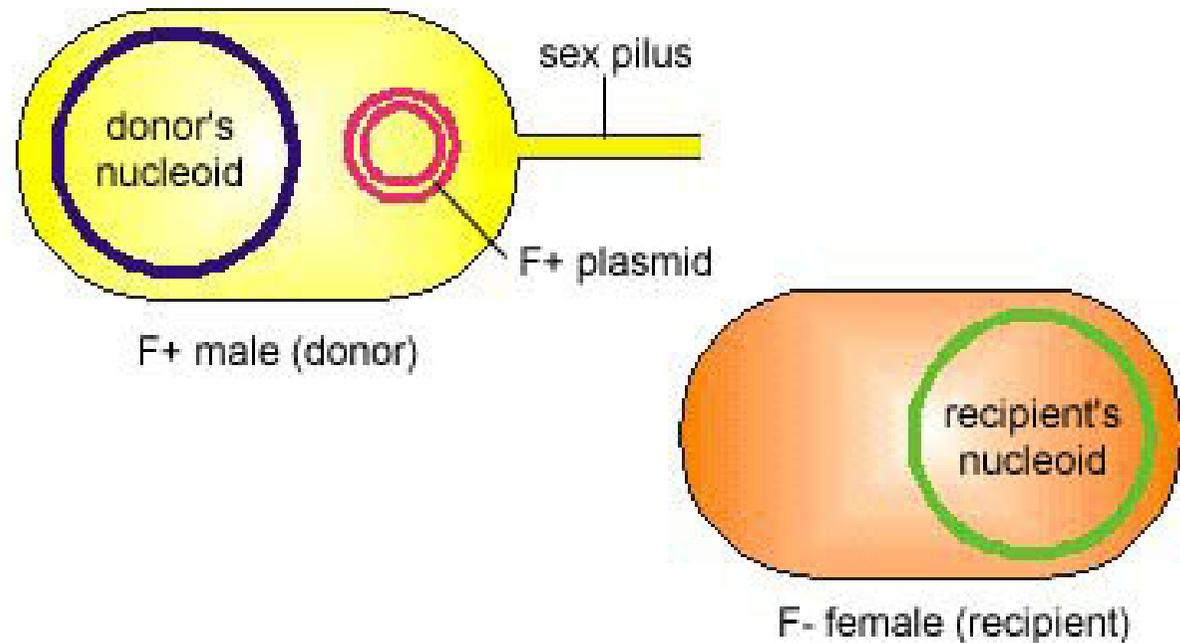
Coniugazione F

Coniugazione Hfr

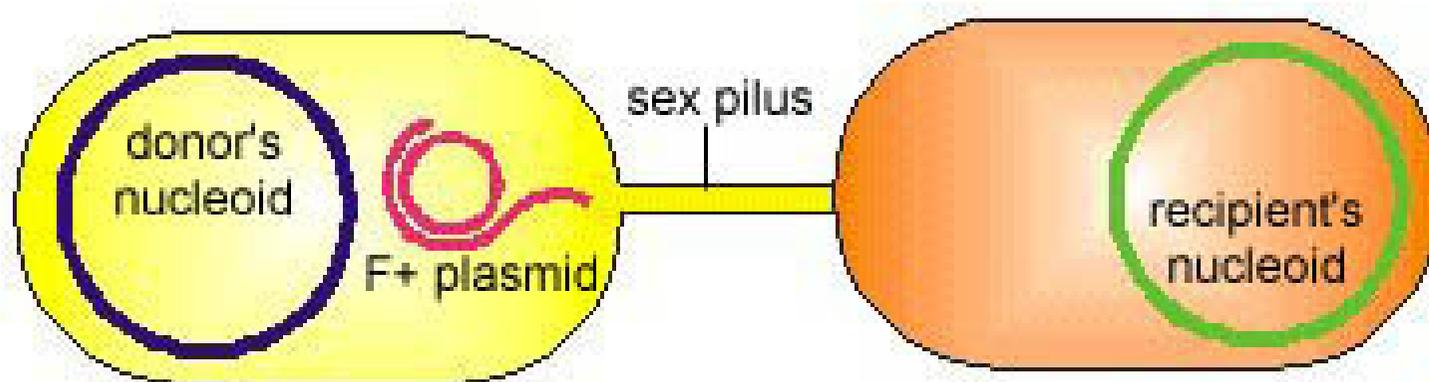
**H**igh **F**requency of **R**ecombination

# CONIUGAZIONE F

Il batterio donatore ha un plasmide F+ che codifica per sintesi del sex-pilus e può trasmetterlo a ricevente F-

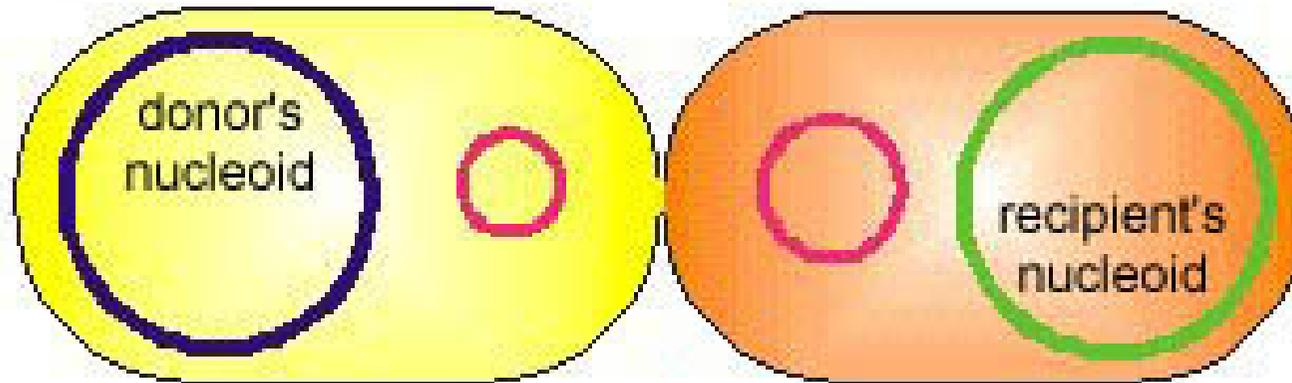


# CONIUGAZIONE F



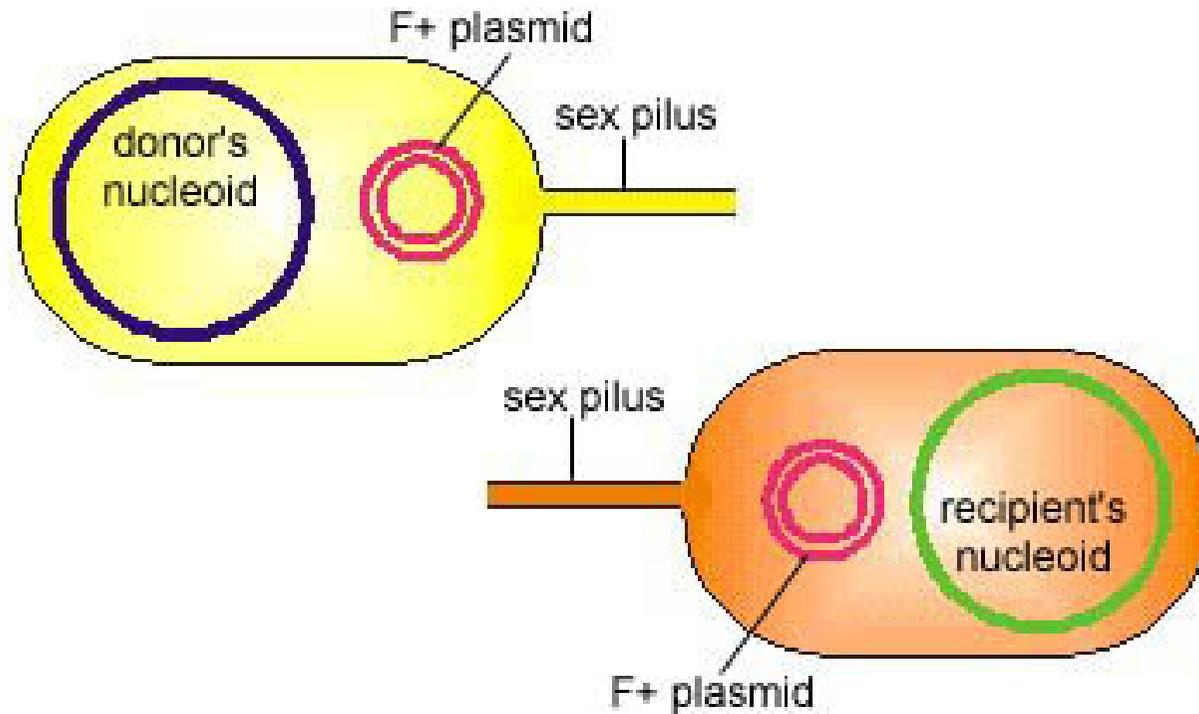
Il batterio donatore contatta il ricevente; un filamento del plasmide F+ si separa dall'altro

# CONIUGAZIONE F



Il pilo si retrae e le due cellule prendono contatto; il filamento del plasmide F+ passa nella cellula F-

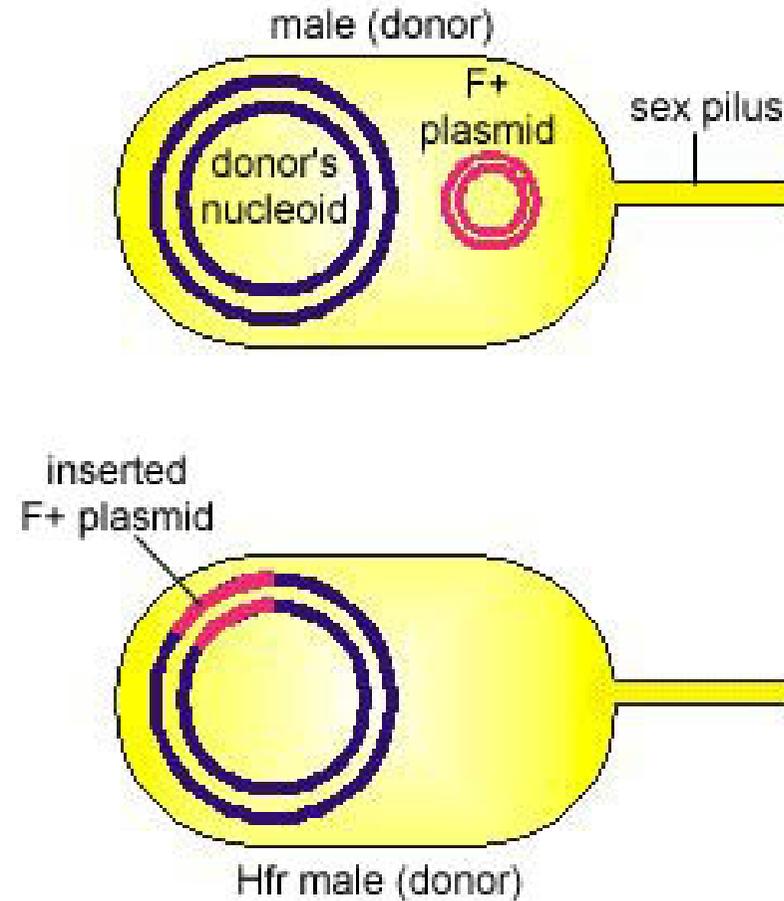
# CONIUGAZIONE F



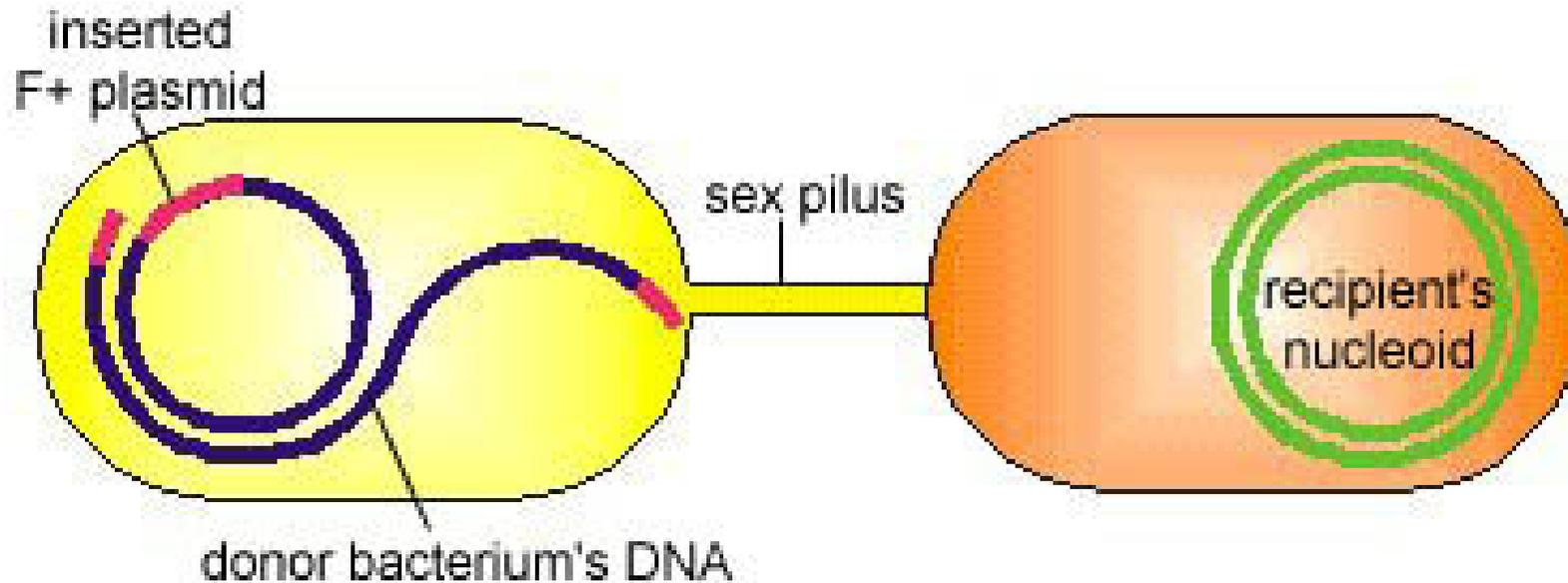
I due batteri sintetizzano i filamenti complementari a F+; il batterio ricevente diventa F+ e può produrre il sex-pilus

# CONIUGAZIONE Hfr

Il plasmide F è integrato nel nucleoide del batterio donatore

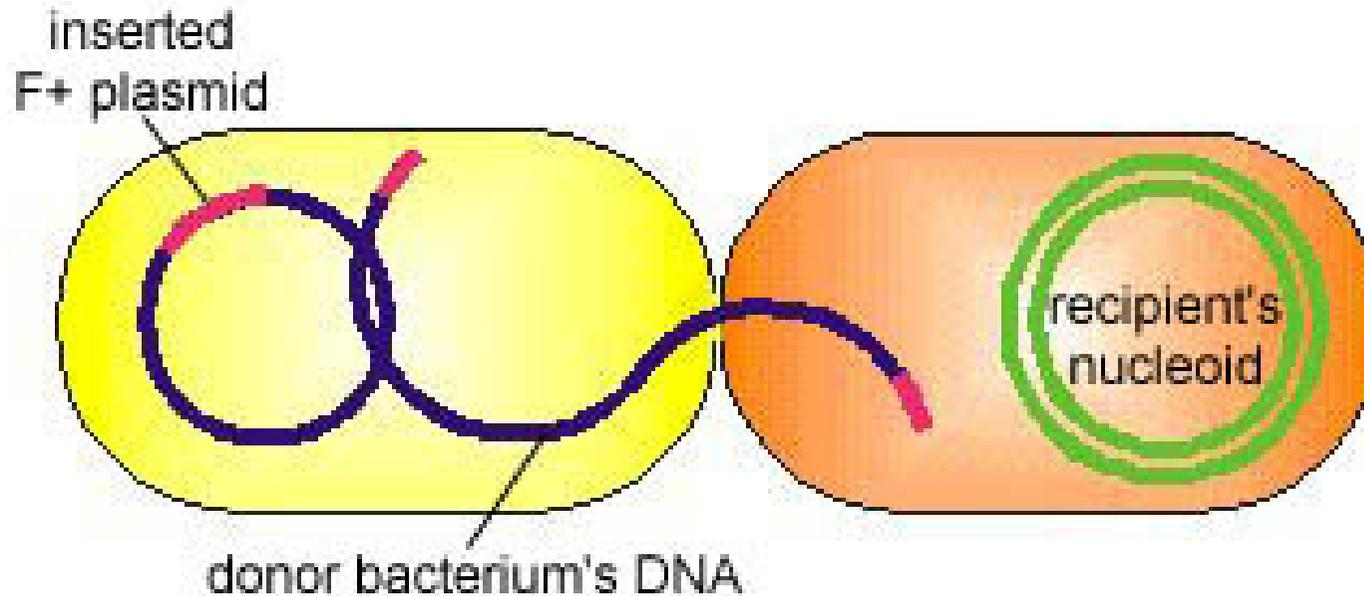


# CONIUGAZIONE Hfr



- Il batterio donatore prende contatto con il ricevente attraverso il sex-pilus
- Uno dei filamenti di DNA del donatore si spezza nel mezzo dell'inserto comprendente l'F+

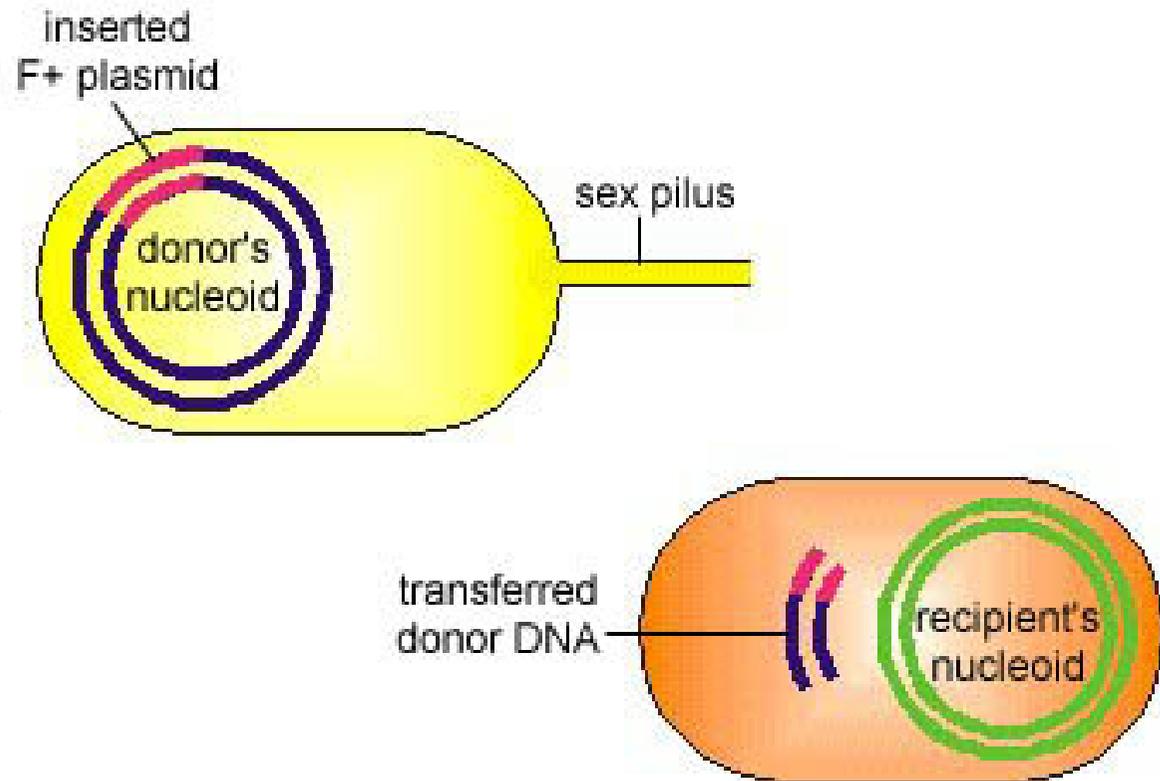
# CONIUGAZIONE Hfr



- Il sex-pilus si retrae
- Uno dei filamenti di DNA del donatore comincia a trasferirsi nella cellula ricevente

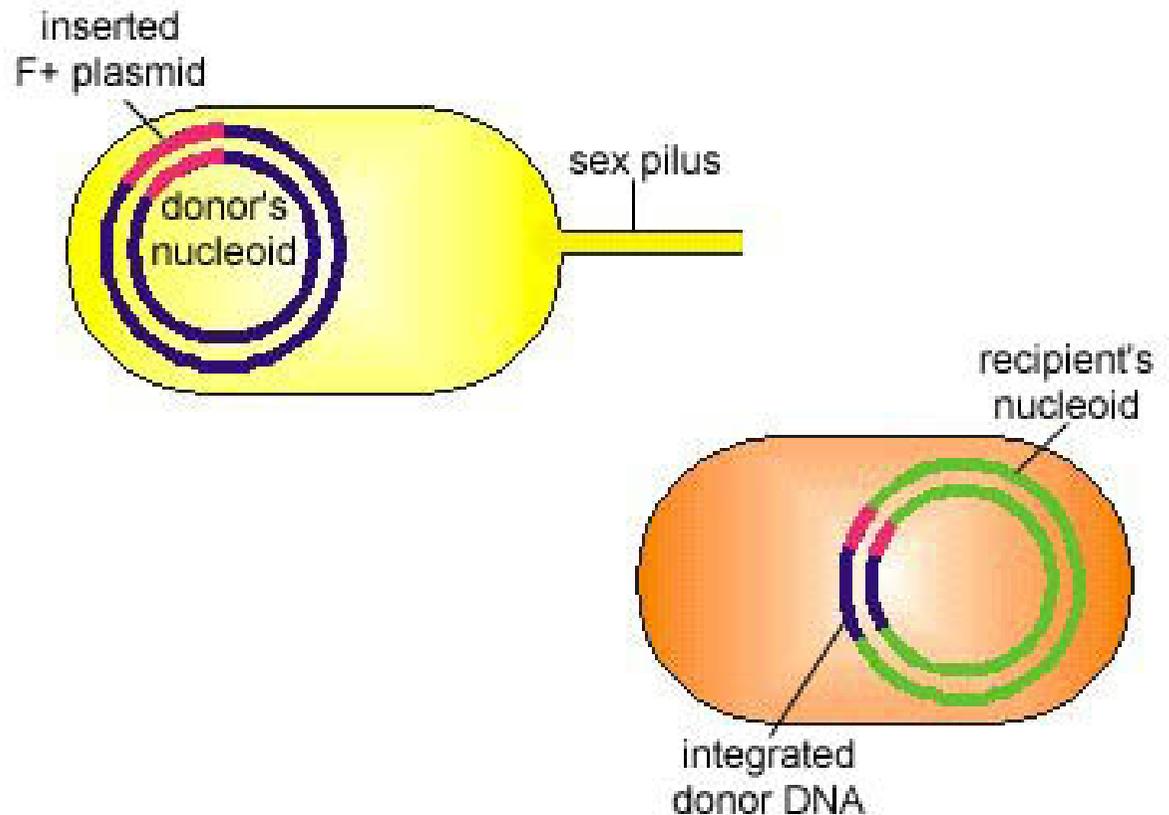
# CONIUGAZIONE Hfr

I batteri si separano prima della fine del trasferimento di DNA; il fattore F è l'ultima parte ad essere trasferita e difficilmente passa nella cellula ricevente prima della separazione. Vengono sintetizzati i complementari dei filamenti singoli



# CONIUGAZIONE Hfr

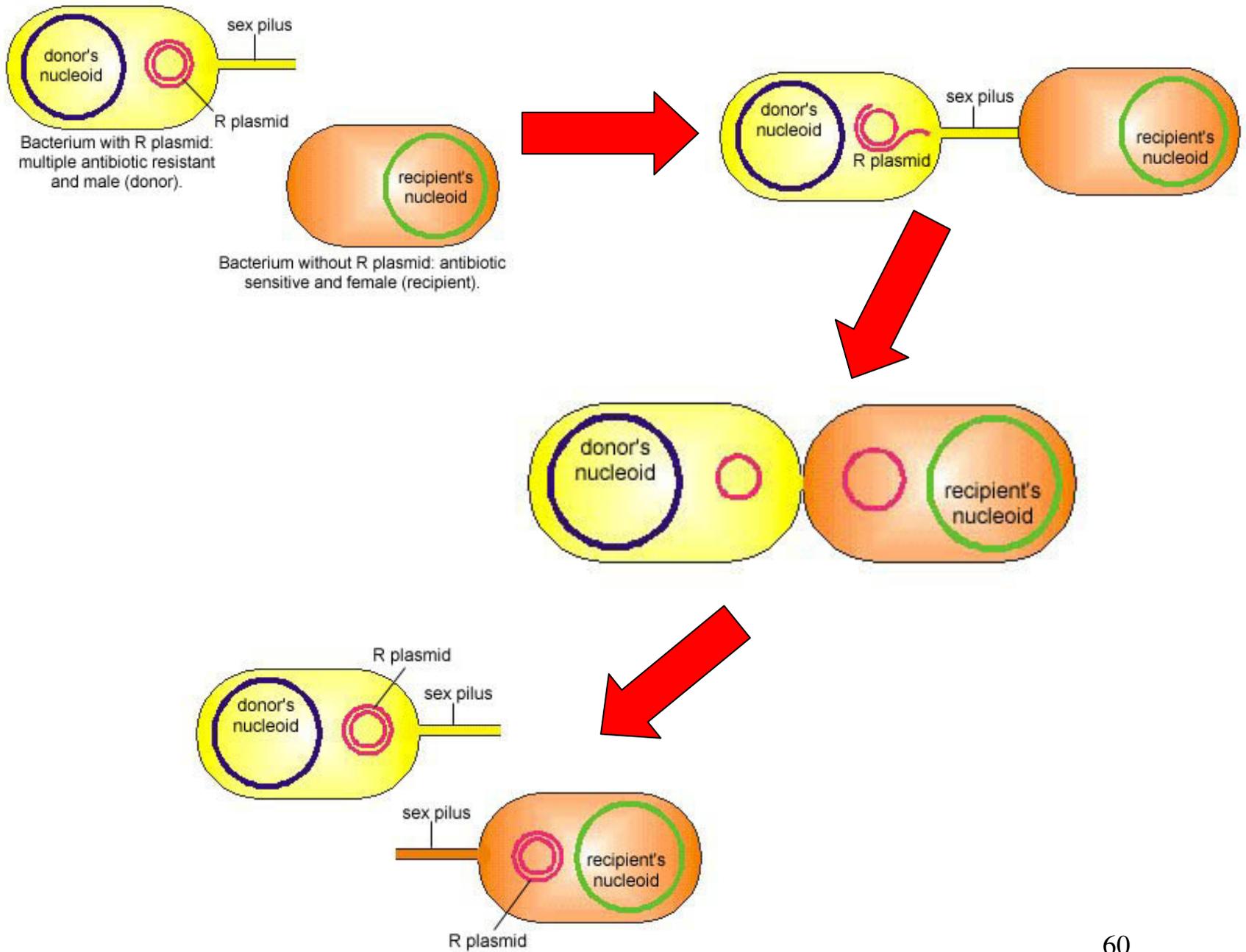
Il doppio filamento di DNA trasferito si integra nel nucleotide del ricevente; poiché il fattore F difficilmente viene trasferito, la cellula ricevente difficilmente diventa F+



# CONIUGAZIONE R

- Oltre fattore F, molti plasmidi con caratteristiche diverse; es.
  - produzione batteriocine
  - utilizzazione fonti energetiche insolite
  - antibiotico-resistenza
  - ecc.
- Fattore R: plasmide contenente geni che conferiscono antibiotico-resistenza
- Trasmissione generalmente x coniugazione (R + TF); possibile x trasduzione (es. stafilococchi - privi di TF)

# CONJUGATION



# Antibiotico-resistenza

- Pressione selettiva sui microrganismi patogeni che, in presenza dell'antibiotico, possono prevalere sui commensali
- Possibilità di trasferimento fattore R non solo nell'ambito della stessa specie, ma anche tra specie diverse (es. da E. coli ad altri Gram - [Salmonella, Pseudomonas, Vibrio, ecc.]