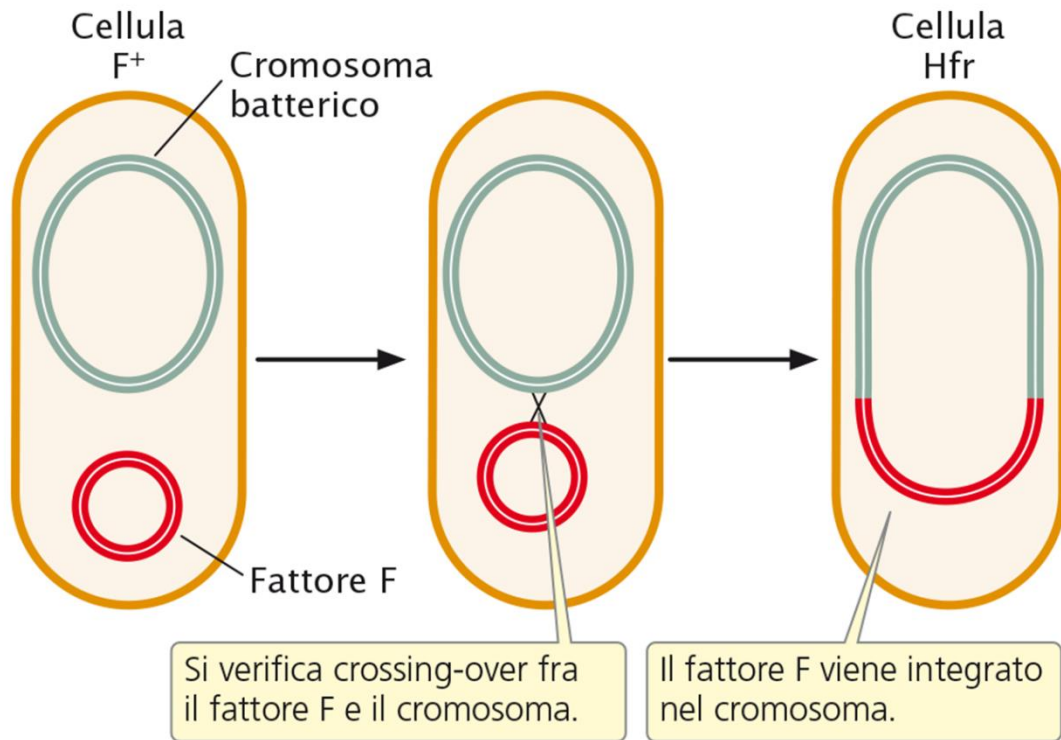


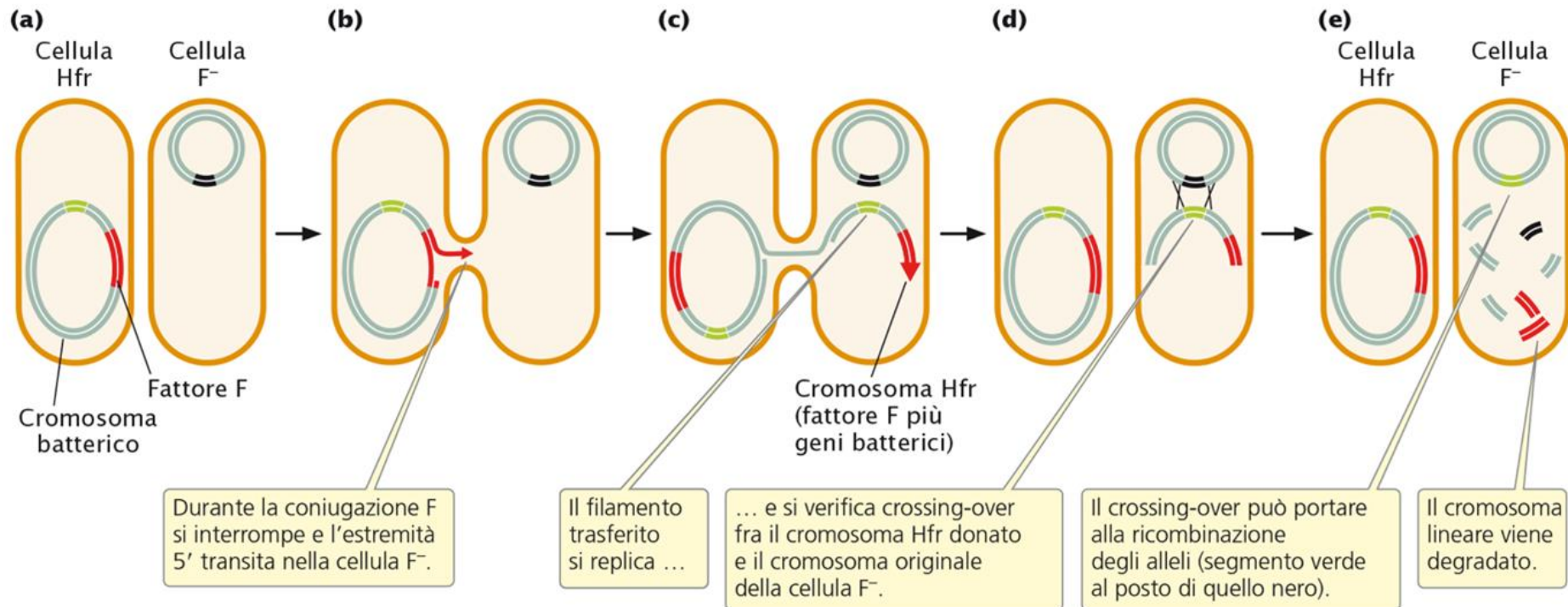
LE CELLULE HFR

La coniugazione trasferisce il materiale genetico contenuto del plasmide F dalla cellula F^+ alla F^- , ma questo non spiega il trasferimento di geni cromosomici che abbiamo visto precedentemente. Nei ceppi Hfr (ad alta frequenza di ricombinazione) il fattore F è integrato all'interno del cromosoma batterico. Le cellule Hfr si comportano come quelle F^+ , dando origine a pili sessuali e andando incontro a coniugazione con le cellule F^- .



LE CELLULE HFR

Nella coniugazione fra cellule Hfr e F^- , il fattore F integrato nel cromosoma subisce un'interruzione e l'estremità del filamento interrotto entra nella cellula F^- . Però, poiché in una cellula Hfr il fattore F è integrato nel cromosoma batterico, il cromosoma lo segue all'interno della cellula ricevente. La quantità di cromosoma batterico che viene trasferita dipende dalla quantità di tempo in cui le due cellule rimangono in coniugazione. All'interno della cellula ricevente il filamento di DNA donatore si replica e può verificarsi crossing-over fra questo e il cromosoma originale della cellula F^- .

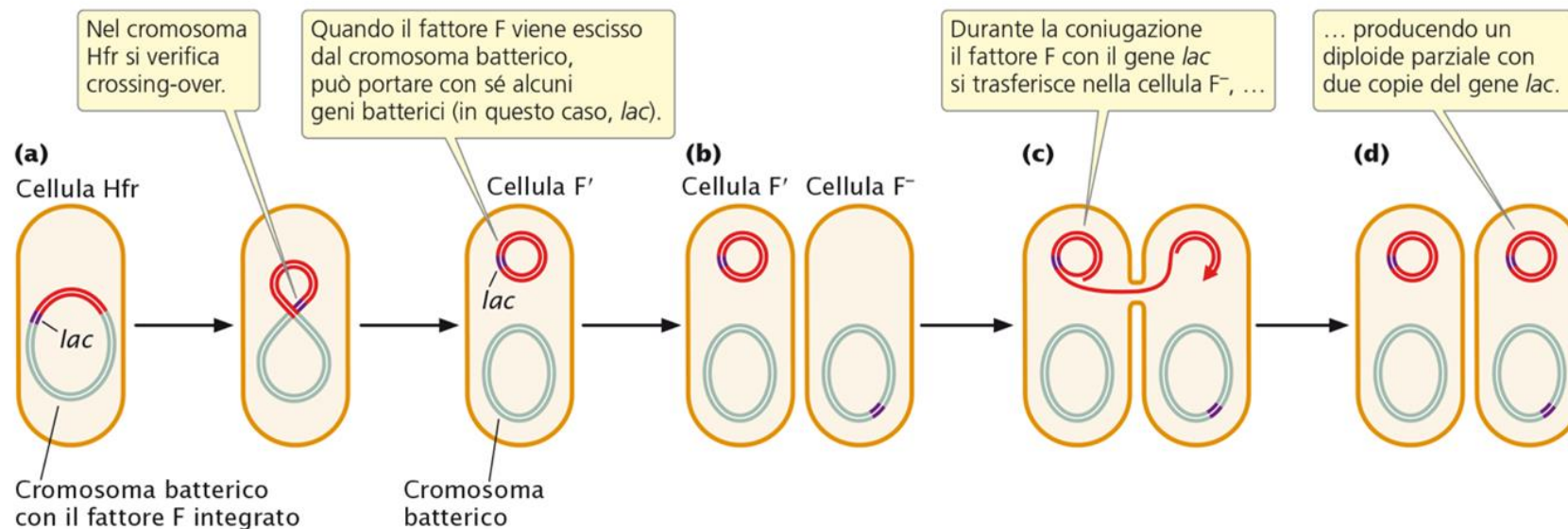


LE CELLULE HFR

Questo trasferimento genetico fra cellule Hfr e F^- spiega il modo in cui si producevano le cellule ricombinanti prototrofe osservate prima. Dopo che nella cellula ricevente si è verificato il crossing-over, il cromosoma donato va incontro a degradazione e rimane solo il cromosoma ricevente ricombinante, che verrà replicato e trasmesso alla generazione successiva per scissione binaria. Nel corso di un accoppiamento fra Hfr e F^- la cellula F^- non diventa quasi mai F^+ o Hfr poiché, quando ha inizio il trasferimento del filamento, il fattore F si spezza a metà: una parte si trova all'inizio e una alla fine del filamento che viene trasferito. Per diventare F^+ o Hfr la cellula ricevente deve accogliere un fattore F completo: perché ciò si verifichi è necessario che il cromosoma batterico venga trasferito nella sua interezza. Questa circostanza si verifica di rado, dato che la maggior parte delle cellule coniugate si separano prima che sia stato trasferito l'intero cromosoma. Il plasmide F nelle cellule F^+ batterico, facendo sì che la cellula F^+ si integra nel cromosoma diventi Hfr, con una frequenza di 1 volta ogni 10 000. Questa bassa frequenza spiega il basso tasso di ricombinazione osservato nelle cellule F^+ . È bassa anche la frequenza con cui il fattore F si separa dal cromosoma batterico, e per questo motivo poche cellule Hfr diventano F^+ .

LE CELLULE F'

Quando un fattore F si stacca dal cromosoma batterico, può portare con sé una piccola regione di quest'ultimo; i geni di questo frammento successivamente saranno portati sul plasmide F. Le cellule che contengono un plasmide F che porta alcuni geni batterici sono chiamate F primo (F'). Se per esempio, un fattore F si integra in un cromosoma adiacente ai geni *lac* (quelli che permettono alla cellula di metabolizzare il lattosio) e poi se ne distacca, può portare con sé alcuni geni *lac* adiacenti, diventando una cellula F' *lac*.



LE CELLULE F'

Dato che le cellule F' possiedono il plasmide F con tutte le informazioni genetiche necessarie alla coniugazione e al trasferimento genetico, esse possono coniugarsi con le cellule F⁻. Le caratteristiche di diversi tipi di coniugazione delle cellule di *E. coli* (con diversi fattori F) sono riepilogate nella tabella 9.2.

TABELLA 9.2 **Caratteristiche delle cellule di *E. coli* con diversi tipi di fattore F**

Tipo	Caratteristiche del fattore F	Funzione nella coniugazione
F ⁺	Presente come DNA circolare autonomo	Donatore
F ⁻	Assente	Ricevente
Hfr	Presente, integrato nel cromosoma batterico	Donatore ad alta frequenza
F'	Presente come DNA circolare a sé stante che porta alcuni geni batterici	Donatore

LE CELLULE F'

Durante la coniugazione fra una cellula F' lac e una cellula F, il plasmide F viene trasferito nella cellula F, il che significa che ogni gene del plasmide F, compresi quelli provenienti dal cromosoma batterico, può essere trasferito alla cellula ricevente F⁻. Questo processo è chiamato sexduzione e produce cellule parzialmente diploidi chiamate merozigoti, cioè cellule con due copie di alcuni geni, una sul cromosoma batterico e una sul plasmide F appena introdotto. Gli esiti della coniugazione fra tipi diversi di E.coli sono ricapitolati nella tabella 9.3.

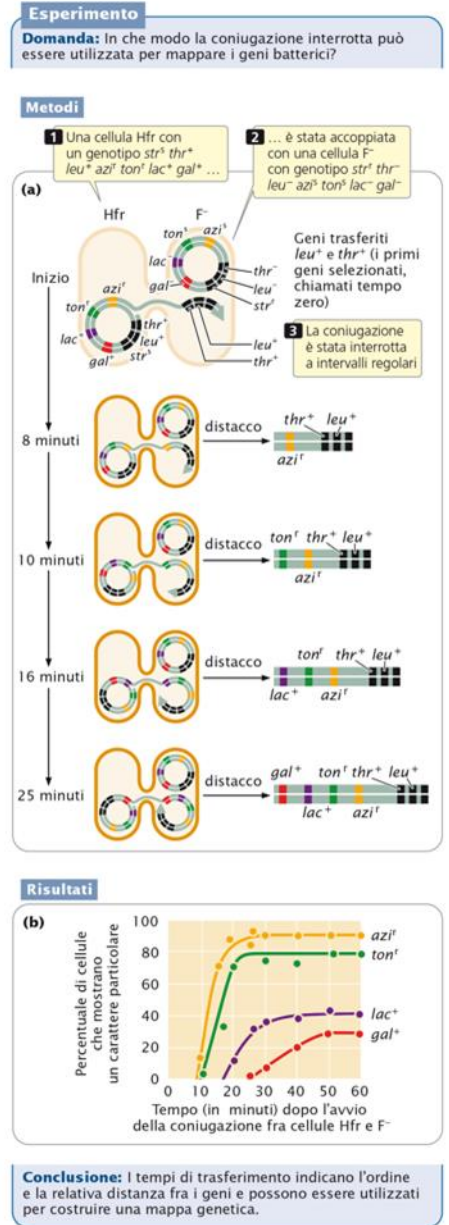
TABELLA **9.3** Risultati della coniugazione fra cellule con differenti fattori F

Coniugazione	Tipologie delle cellule presenti dopo la coniugazione
F ⁺ × F ⁻	Due cellule F ⁺ (la cellula F ⁻ diventa F ⁺)
Hfr × F ⁻	Una cellula Hfr e una F ⁻ (nessun cambiamento)
F' × F ⁻	Due cellule F' (la cellula F ⁻ diventa F')

*In una coniugazione Hfr x F⁻ raramente la cellula F⁻ diventa F⁺; perché ciò accada bisogna che l'intero cromosoma venga trasferito durante il processo.

La mappatura dei geni batterici per coniugazione interrotta

Durante la coniugazione il cromosoma della cellula Hfr viene trasferito alla cellula F⁻. Il trasferimento di un intero cromosoma di E.coli richiede circa 100 minuti; se la coniugazione viene interrotta prima che sia trascorso questo lasso di tempo, solo una parte del cromosoma di Hfr entrerà nella cellula F⁻ e avrà l'opportunità di ricombinarsi con quello della ricevente. Il trasferimento cromosomico ha sempre inizio nel fattore F integrato e procede secondo una direzione costante. In questo modo, i geni sono trasferiti in base alla loro posizione sul cromosoma. Nella maggior parte delle mappe genetiche le distanze sono espresse in forma di percentuale di ricombinazione; tuttavia, in quelle costruite per coniugazione interrotta, l'unità fondamentale della distanza è il **minuto**.



Il trasferimento direzionale e la mappatura

I vari ceppi di batteri Hfr hanno il fattore F integrato in diversi siti e secondo diversi orientamenti. Il trasferimento genico comincia sempre all'interno di F e sono proprio l'orientamento e la posizione di F a determinare direzione e punto di partenza del trasferimento genico. Nel ceppo Hfr1, F è integrato fra leu e azi.

I geni di questo ceppo saranno quindi trasferiti secondo questo ordine: ← leu-thr-thi-his-gal-lac-pro-azi,

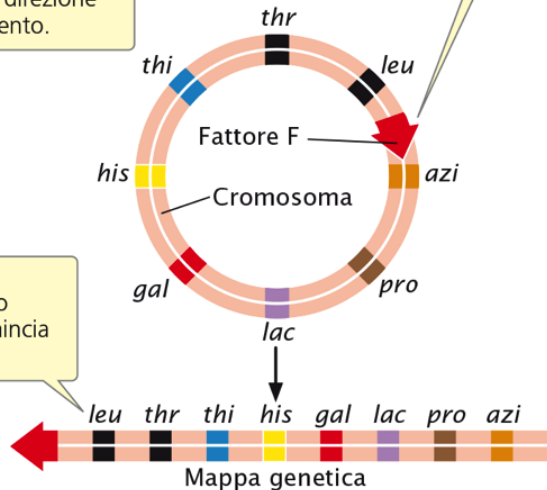
Nel ceppo Hfr5, F è integrato fra i geni thi e his e ha un orientamento opposto. In questo caso il trasferimento genico procederà in senso orario: thi-thr-leu-azi-pro-lac-gal-his

(a)
Hfr1

1 Il trasferimento comincia sempre all'interno di F, e l'orientamento di F determina la direzione del trasferimento.

2 In Hfr1, F è integrato fra i geni leu e azi, ...

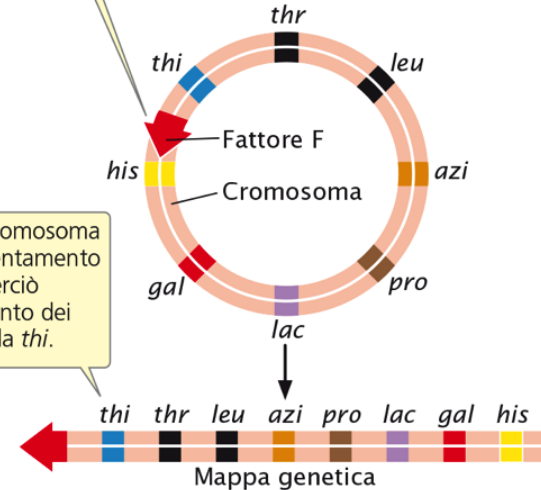
3 ... perciò il trasferimento dei geni comincia da leu.



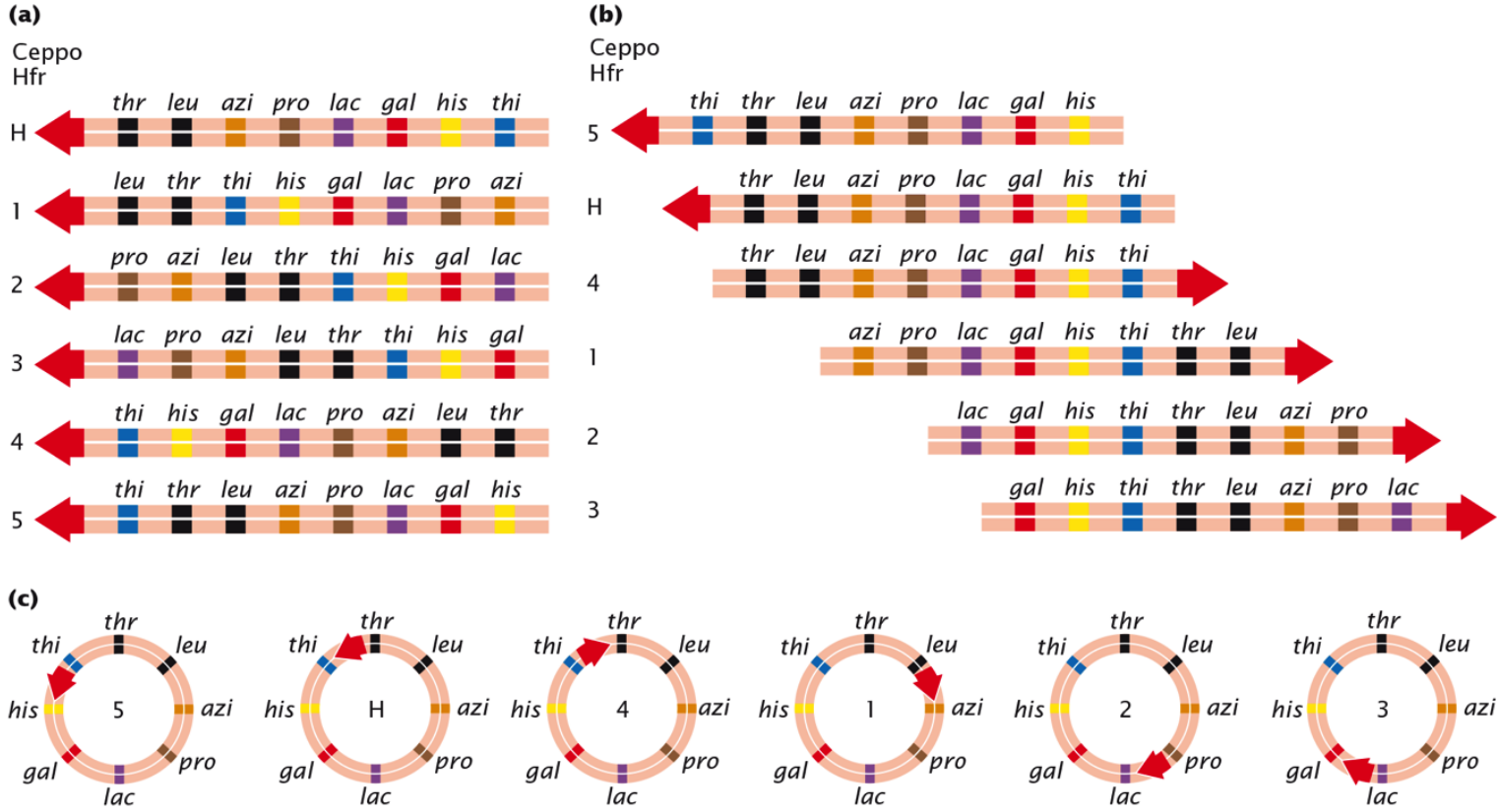
(b)
Hfr5

4 In Hfr5, F è integrato fra thi e his.

5 In questo cromosoma F ha un orientamento opposto; perciò il trasferimento dei geni inizia da thi.



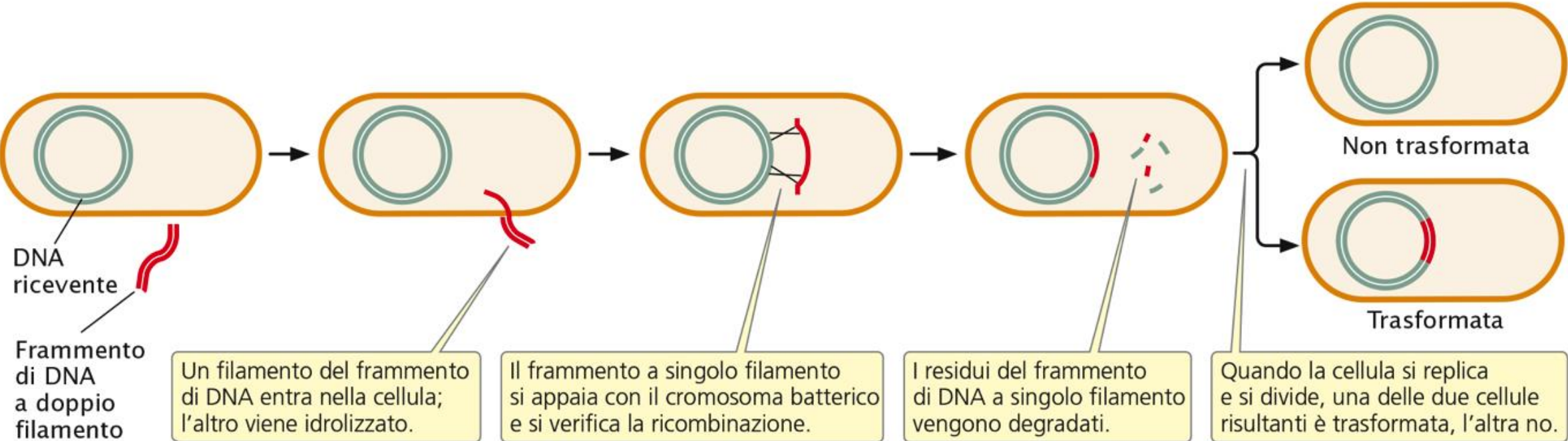
La distanza temporale relativa fra ogni coppia di geni è costante. Si osservi che l'ordine di trasferimento genico non è lo stesso nei diversi ceppi Hfr. Per esempio nel ceppo HfrH, azi viene trasferito subito dopo leu, ma nel ceppo Hfr1 questo trasferimento avviene parecchio tempo dopo leu. Se allineiamo le sequenze notiamo che i due geni situati ai lati di azi sono sempre gli stessi: leu e pro. Questa osservazione acquista significato quando pensiamo che il cromosoma batterico è circolare e il punto di inizio del trasferimento varia da ceppo a ceppo.



Conclusion: L'ordine dei geni sul cromosoma è lo stesso, ma la posizione e l'orientamento del fattore F nei due ceppi è diverso.

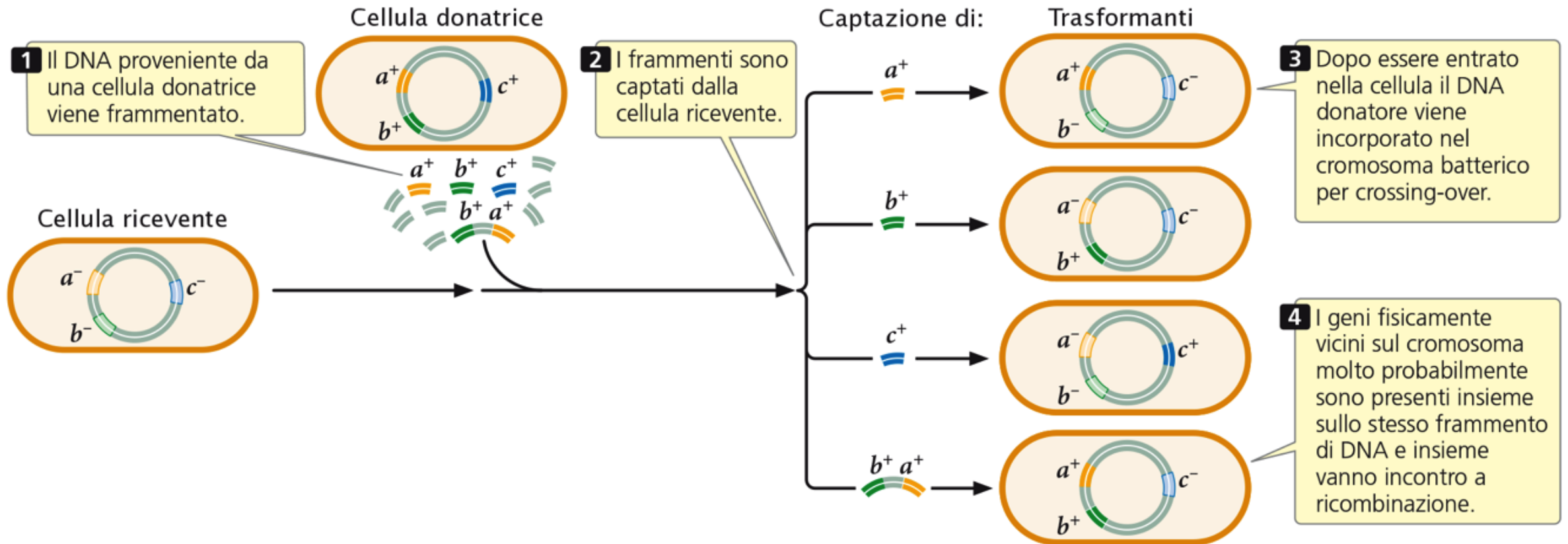
La trasformazione nei batteri

Il meccanismo della trasformazione



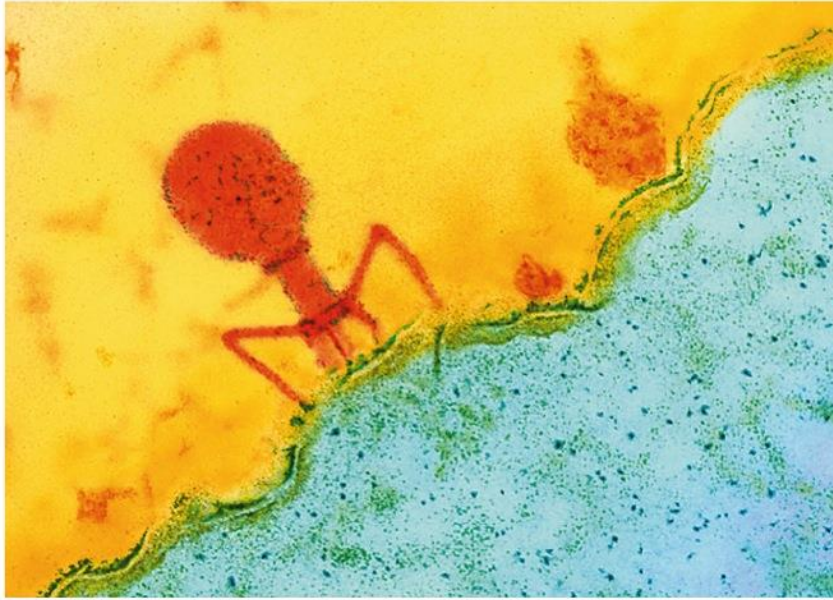
LA MAPPATURA DEI GENI PER TRASFORMAZIONE

FREQUENZA DI CO-TRASFORMAZIONE.

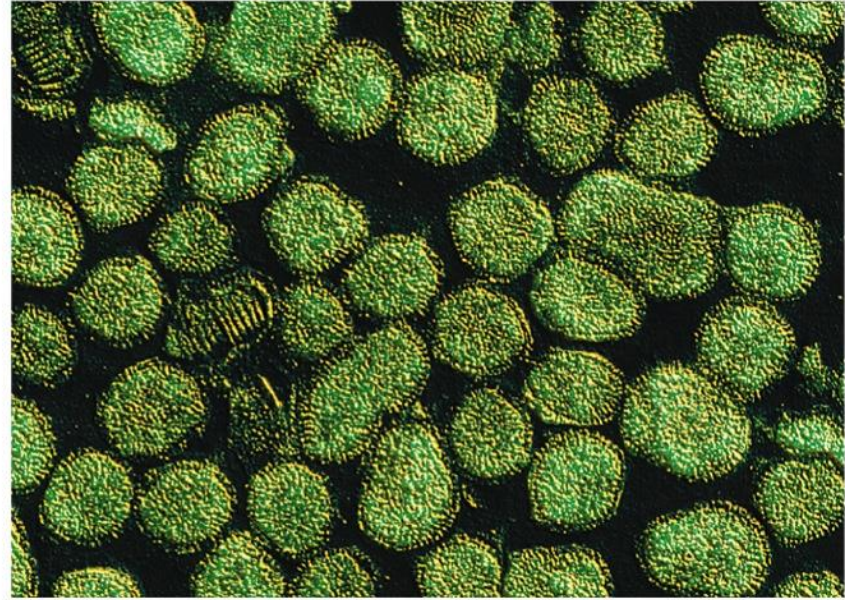


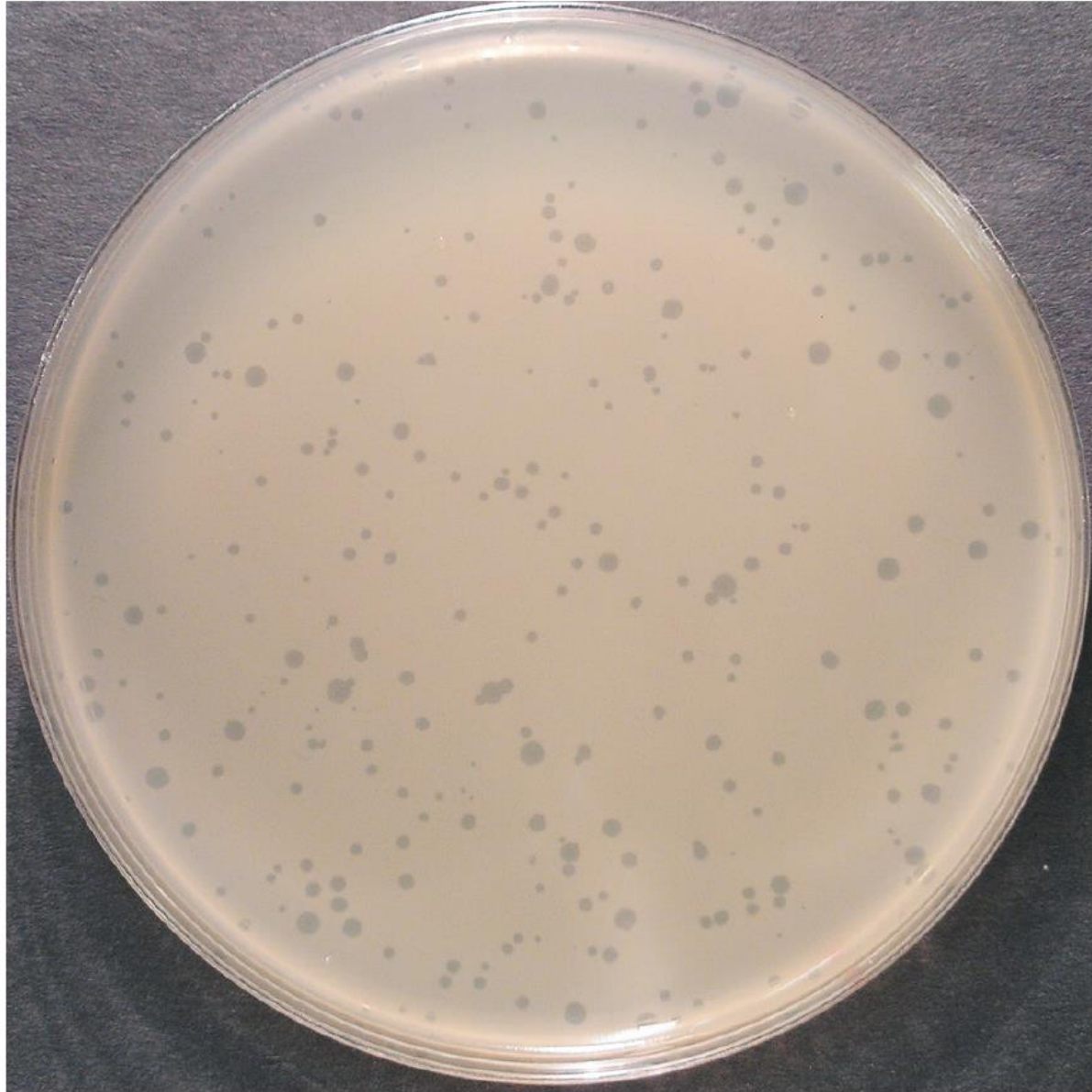
Conclusion: Il tasso di cotrasformazione è inversamente proporzionale alla distanza fra i geni.

(a)

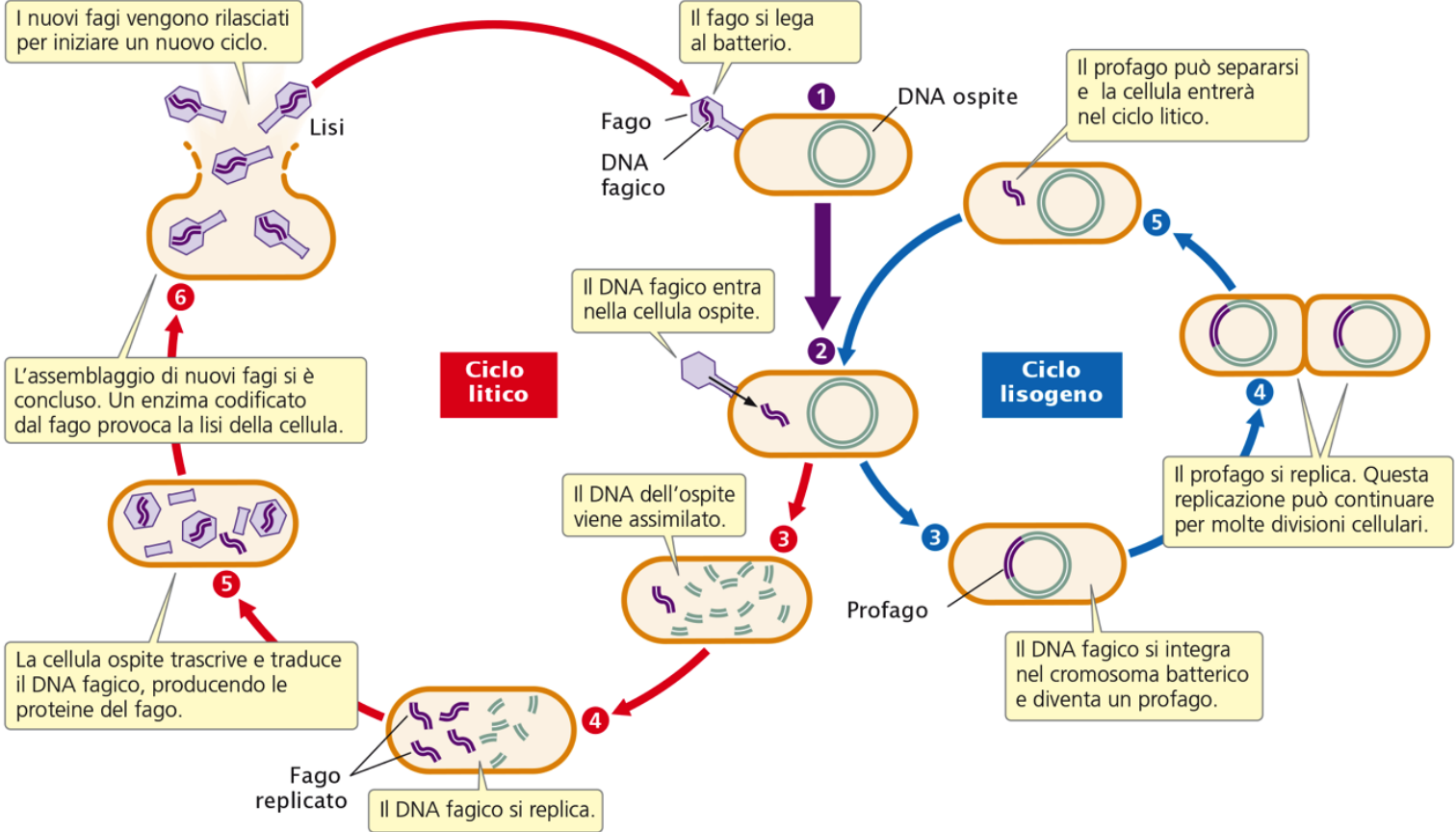


(b)

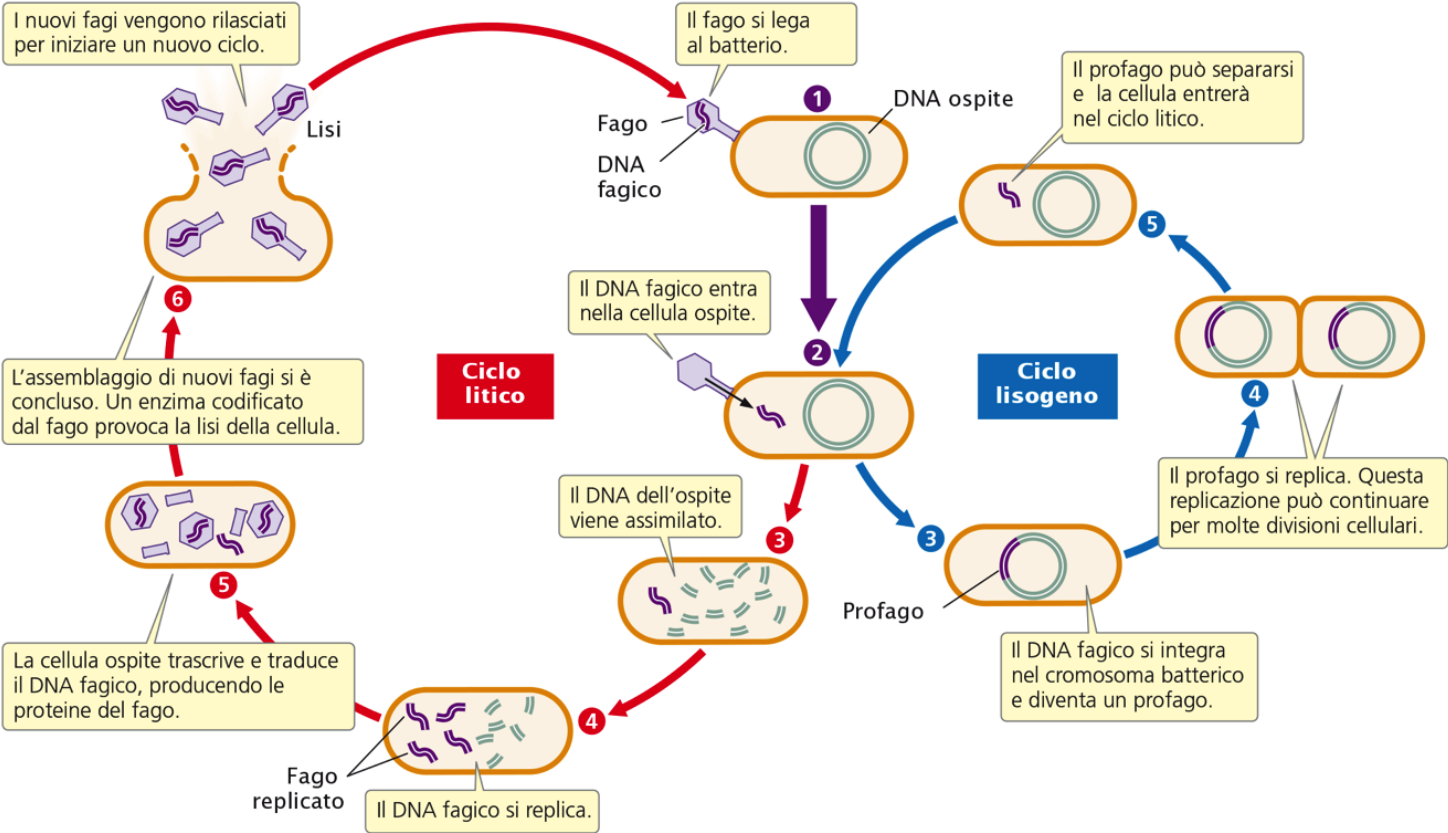


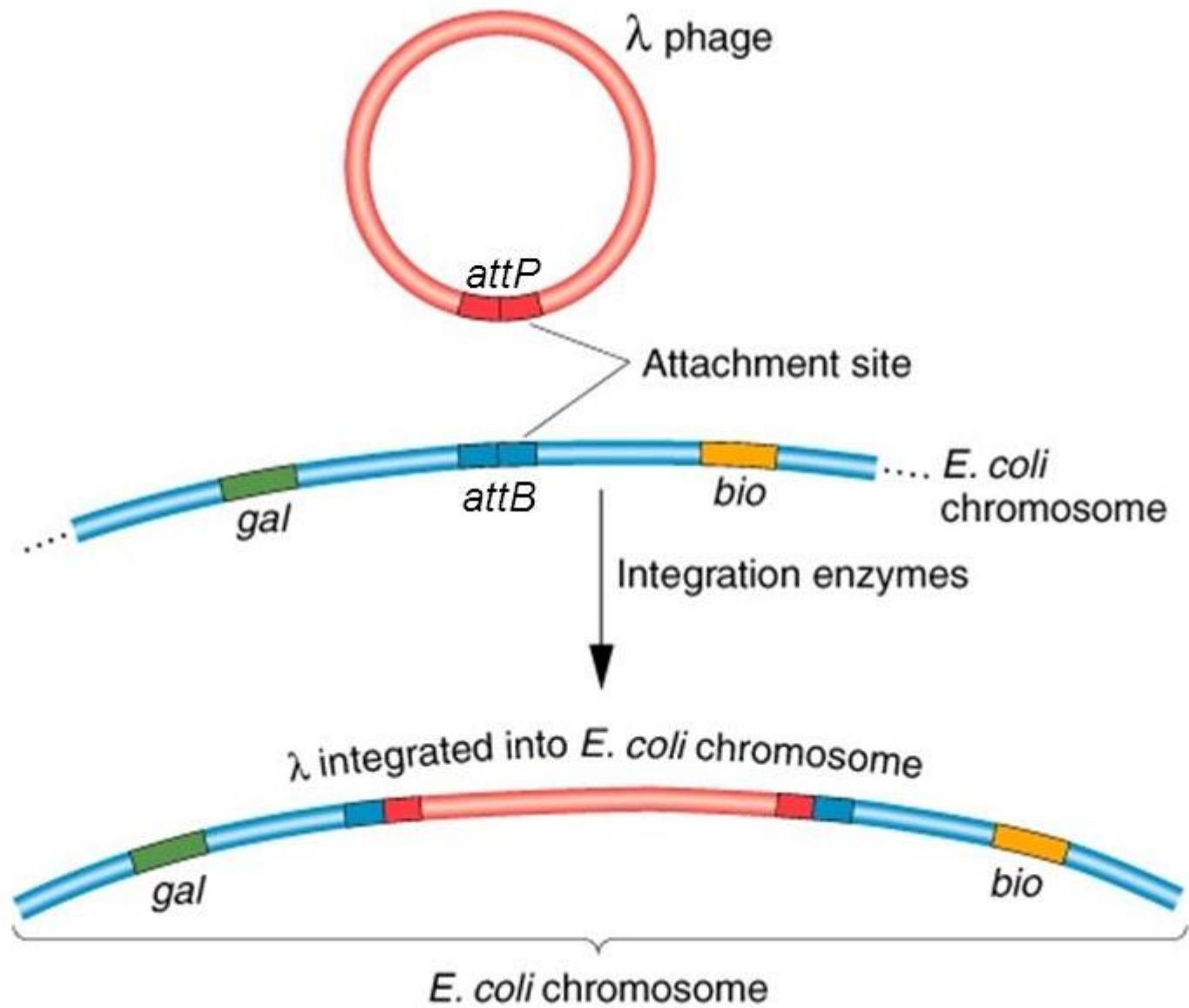


Nel ciclo litico un fago si attacca a un recettore sulla parete di una cellula batterica e vi inocula il suo DNA. All'interno della cellula ospite il DNA fagico viene replicato, trascritto e tradotto, sintetizzando ulteriore DNA e proteine fagiche. Le nuove particelle fagiche vengono sintetizzate da questi componenti e successivamente producono un enzima che provoca la lisi della cellula ospite, e il rilascio di nuovi fagi. I **fagi virulenti** si riproducono esclusivamente tramite un ciclo litico e uccidono sempre la cellula ospite



I **fagi temperati** possono avere sia il ciclo litico che quello lisogeno. Quest'ultimo ha inizio come il ciclo litico, ma, all'interno della cellula, il DNA fagico si integra nel cromosoma batterico, dove permane sottoforma di profago inattivo. Il profago si replica insieme al DNA batterico e viene trasmesso quando il batterio si divide. Sotto l'influenza di particolari stimoli il profago può separarsi dal cromosoma batterico, entrare nel ciclo litico, produrre nuove particelle fagiche e provocare la lisi della cellula.





La trasduzione: come usare i fagi per mappare i geni batterici.

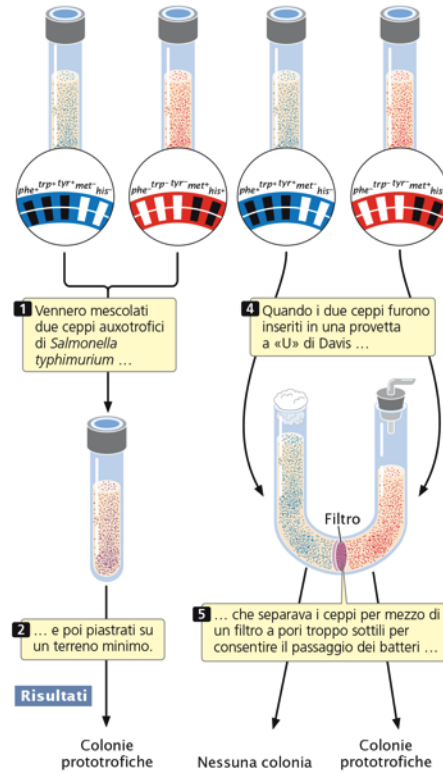
Parlando della genetica dei batteri, abbiamo identificato tre meccanismi di trasferimento genetico: coniugazione, trasformazione e trasduzione.

Nella trasduzione nel quale il trasferimento di geni fra batteri avviene tramite i virus. Mentre nella trasduzione generalizzata è possibile trasferire ogni gene, nella trasduzione specializzata possono esserne trasferiti solo alcuni.

Esperimento

Domanda: Lo scambio genetico fra batteri richiede sempre il contatto tra cellule?

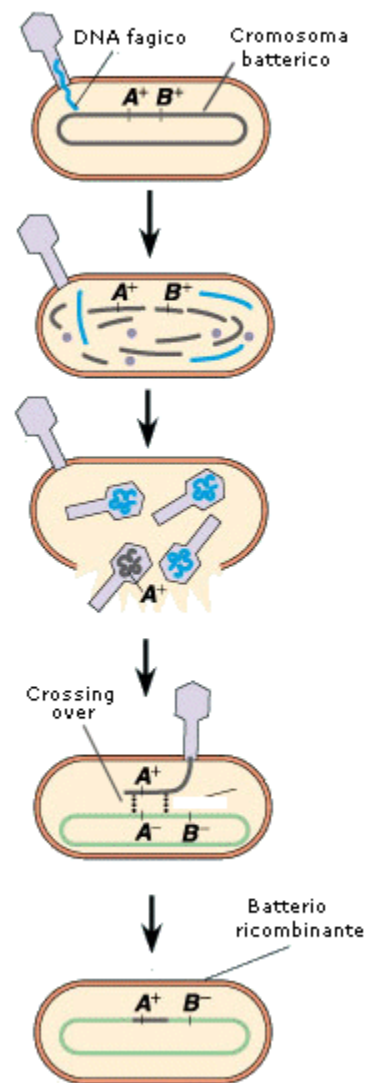
Metodi



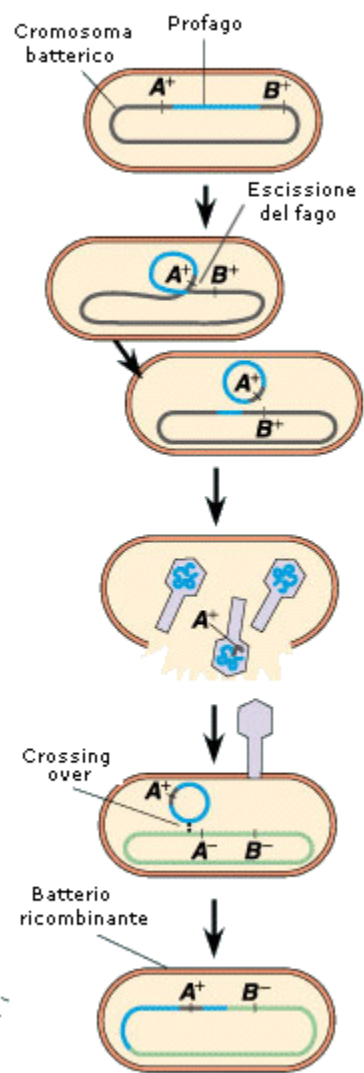
Risultati

Conclusione: Lo scambio genetico per coniugazione non si verificò. Successivamente fu dimostrato che l'agente del trasferimento era un fago.

Trasduzione generalizzata

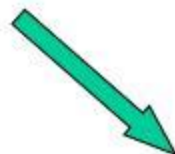
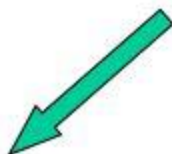


Trasduzione specializzata



Trasduzione

Modalità di scambio genetico fra batteri mediato da un virus



Trasduzione generalizzata

Qualsiasi marcatore genetico può essere trasferito da un donatore a un ricevente

P22, P1 per Gram(-)

PBS1 per Gram (+)

Trasduzione specializzata

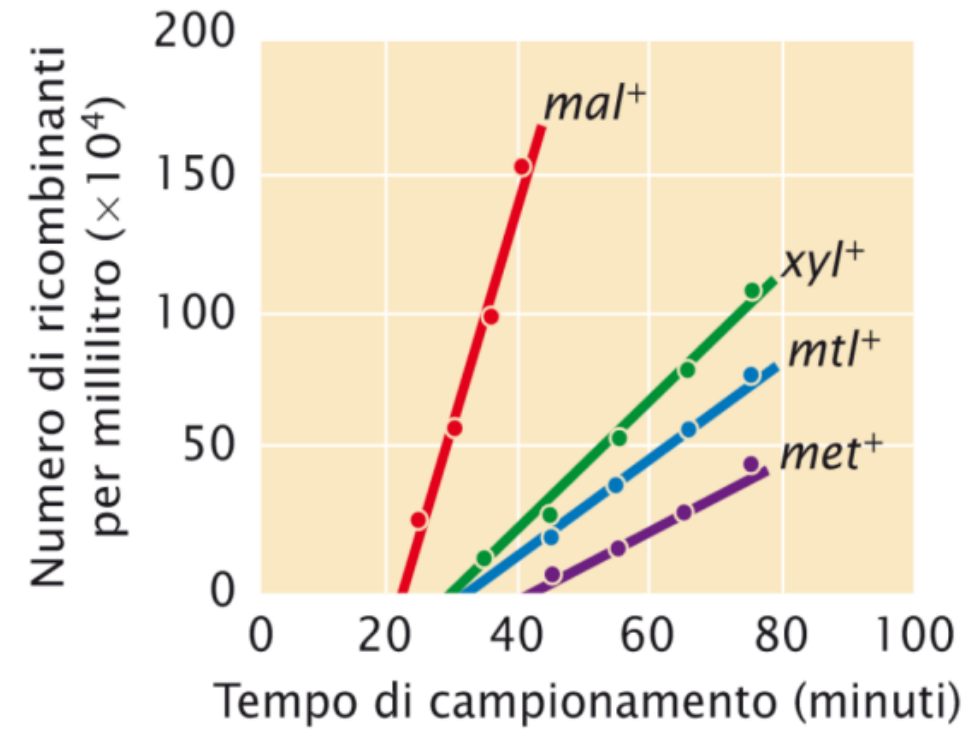
Solo marcatori specifici possono essere trasferiti

λ per *E. coli*

SP β per *B. subtilis*

Anche se non tutti i fagi trasducono e non tutti i batteri possono essere trasdotti, il fenomeno è sufficientemente diffuso da far supporre che svolga un ruolo importante nel trasferimento genico in natura

Taylor e Adelberg isolarono alcuni nuovi ceppi di cellule Hfr che utilizzarono in seguito per mappare diversi geni di *E. coli* per coniugazione interrotta. In un esperimento mescolarono cellule del ceppo Hfr AB-312, con genotipo xyl^+ , met^+ , mtl^+ , mal^+ e sensibili al fago T6, con cellule F^- del ceppo AB-531, con genotipo xyl^- , mtl^- , mal^- , met^- e resistenti al fago T6. Le cellule andavano in coniugazione e, a intervalli regolari, i ricercatori ne rimuovevano un campione e interrompevano la coniugazione distruggendo le cellule Hfr con il fago T6. Le cellule F^- resistenti al fago T6, invece, sopravvivevano e in seguito venivano sottoposte a test per la presenza di geni trasferiti dal ceppo Hfr. I risultati di questo esperimento sono illustrati dal grafico seguente. Sulla base di questi dati, ordina i geni xyl , mtl , mal e met sul cromosoma batterico e indica le distanze minime fra loro.



Una serie di ceppi Hfr con genotipo $m^+, n^+, o^+, p^+, q^+, r^+$ vengono incrociati con un ceppo F^- il cui genotipo è $m^-, n^-, o^-, p^-, q^-, r^-$. La coniugazione viene interrotta a intervalli regolari e viene stabilito l'ordine di comparsa dei geni provenienti dal ceppo Hfr nelle cellule riceventi. L'ordine di trasferimento genico per ogni ceppo Hfr è:

Hfr5	$m^+ q^+ p^+ n^+ r^+ o^+$
Hfr4	$n^+ r^+ o^+ m^+ q^+ p^+$
Hfr1	$o^+ m^+ q^+ p^+ n^+ r^+$
Hfr9	$q^+ m^+ o^+ r^+ n^+ p^+$

Qual è l'ordine dei geni sul cromosoma batterico circolare?

Per ogni ceppo Hfr individua dove è situato il fattore F sul cromosoma e la sua polarità.

Sono stati realizzati degli incroci fra tre diversi ceppi Hfr con campioni separati di un ceppo F⁻ e, attraverso studi di coniugazione interrotta, si sono ottenuti i seguenti dati di mappatura:

Comparsa dei geni nelle cellule F⁻						
Hfr1	Geni	<i>b</i> ⁺	<i>d</i> ⁺	<i>c</i> ⁺	<i>f</i> ⁺	<i>g</i> ⁺
	Tempo	3	5	16	27	59
Hfr2	Geni	<i>e</i> ⁺	<i>f</i> ⁺	<i>c</i> ⁺	<i>d</i> ⁺	<i>b</i> ⁺
	Tempo	6	24	35	46	48
Hfr3	Geni	<i>d</i> ⁺	<i>c</i> ⁺	<i>f</i> ⁺	<i>e</i> ⁺	<i>g</i> ⁺
	Tempo	4	15	26	44	58

Costruisci una mappa di questi geni indicandone ordine e distanze sul cromosoma batterico.

Il DNA di un ceppo di *Bacillus subtilis* con genotipo trp^+, tyr^+ , è stato utilizzato per trasformare un ceppo ricevente con genotipo trp^-, tyr^- . Si sono così ottenuti i seguenti numeri di cellule trasformate:

Genotipo	Numero di cellule trasformate
$trp^+ tyr^-$	154
$trp^- tyr^+$	312
$trp^+ tyr^+$	354

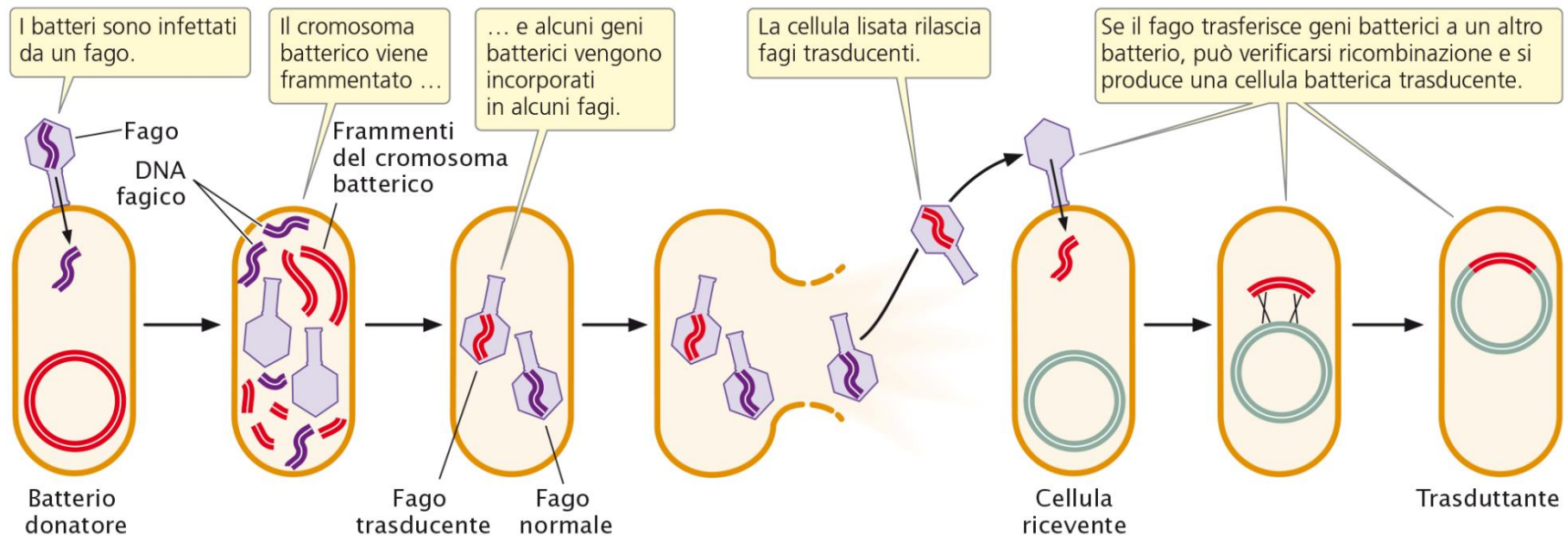
Cosa suggeriscono questi risultati in merito all'associazione dei geni *trp* e *tyr*?

E' possibile calcolare la frequenza di trasformazione? E se si a quanto ammonta?

Il DNA di un ceppo di *Bacillus subtilis* con genotipo a^+, b^+, c^+, d^+, e^+ , viene utilizzato per trasformare un ceppo con genotipo a^-, b^-, c^-, d^-, e^- . Controllando le coppie di geni per la cotrasformazione sono stati ottenuti i seguenti risultati

Coppia di geni	Cotrasformazione	Coppia di geni	Cotrasformazione
$a^+ e b^+$	no	$b^+ e d^+$	no
$a^+ e c^+$	no	$b^+ ed e^+$	sì
$a^+ e d^+$	sì	$c^+ e d^+$	no
$a^+ ed e^+$	sì	$c^+ ed e^+$	sì
$b^+ e c^+$	sì	$d^+ ed e^+$	no

In base a questi risultati qual è l'ordine dei geni sul cromosoma batterico?



Date le piccole dimensioni delle particelle fagiche, può essere trasdotto solo l'1% del cromosoma batterico. Verranno cotrasdotti insieme solo i geni che si trovano molto vicini sul cromosoma batterico, chiamati appunto cotrasducenti. Poiché l'eventualità che una cellula sia trasdotta da due diversi fagi è molto rara, se ne deduce che tutti i geni cotrasducenti devono trovarsi vicini sul cromosoma batterico.

Perciò il tasso di cotrasduzione, così come quello di cotrasformazione, ci fornisce un'indicazione della distanza fisica fra i geni presenti sul cromosoma batterico. Per mappare i geni servendosi della trasduzione, si utilizzano due ceppi batterici con alleli diversi su loci diversi. Il ceppo donatore viene infettato dai fagi

