

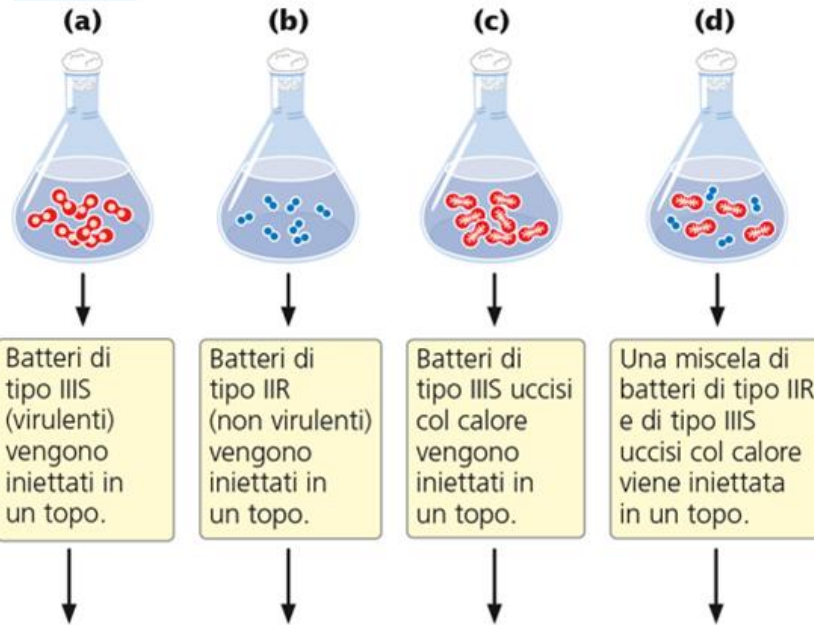
Mendel aveva scoperto le regole fondamentali dell'ereditarietà nel 1866, ma non aveva la minima idea riguardo la natura fisica dell'informazione ereditaria. Nei primi anni del Novecento i biologi giunsero alla conclusione che i geni erano posti sui cromosomi, di cui si sapeva che contenevano sia DNA che proteine. Due serie di esperimenti, uno condotto sui batteri e un altro sui virus, fornirono la prova definitiva che era il DNA, e non le proteine, a costituire il materiale genetico.

# ESPERIMENTI DI GRIFFITH

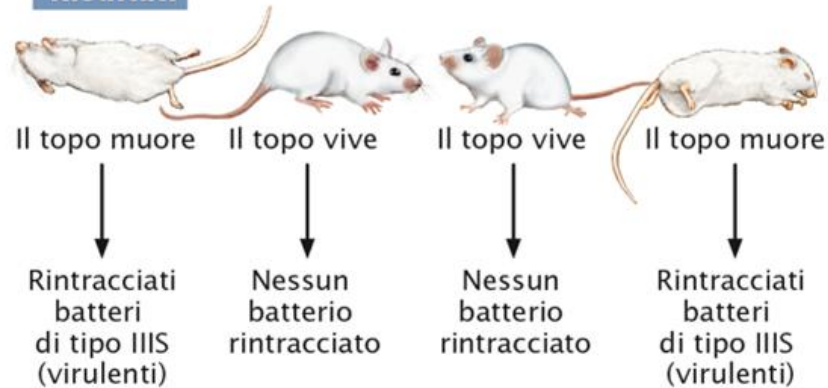
## Esperimento

**Domanda:** Un estratto proveniente da cellule batteriche morte può trasformare geneticamente cellule vive?

## Metodi



## Risultati



**Conclusione:** Una sostanza presente nei batteri virulenti uccisi col calore ha trasformato geneticamente i batteri di tipo III R in batteri di tipo III S, vivi e virulenti.

# ESPERIMENTI DI AVERY

## Esperimento

**Domanda:** Qual è la natura chimica della sostanza trasformante?

## Metodi

Batteri di tipo IIS (virulenti)

1 Uccidere per mezzo del calore i batteri virulenti, omogeneizzare e filtrare.

Filtrato di batteri di tipo IIS

2 Trattare i campioni con enzimi che distruggono le proteine, l'RNA o il DNA.

RNasi (distrugge l'RNA)

Proteasi (distrugge le proteine)

DNasi (distrugge il DNA)

3 Aggiungere i campioni trattati a colture di batteri di tipo IIR.

Batteri di tipo IIR

Batteri di tipo IIR

Batteri di tipo IIR

## Risultati

Batteri di tipo IIS e IIR

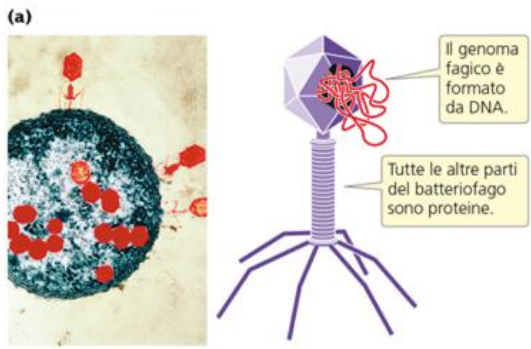
Batteri di tipo IIS e IIR

Batteri di tipo IIR

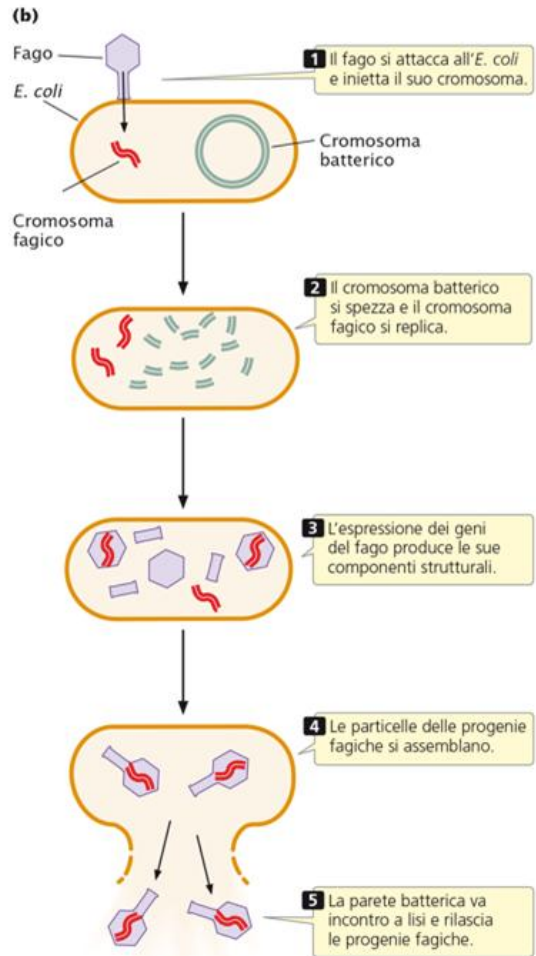
4 Le colture trattate con proteasi o RNasi contengono i batteri di tipo IIS trasformati...

5 ...ma la coltura trattata con DNasi non li contiene.

**Conclusione:** Poiché solo la DNasi ha distrutto la sostanza trasformante, questa è costituita dal DNA.



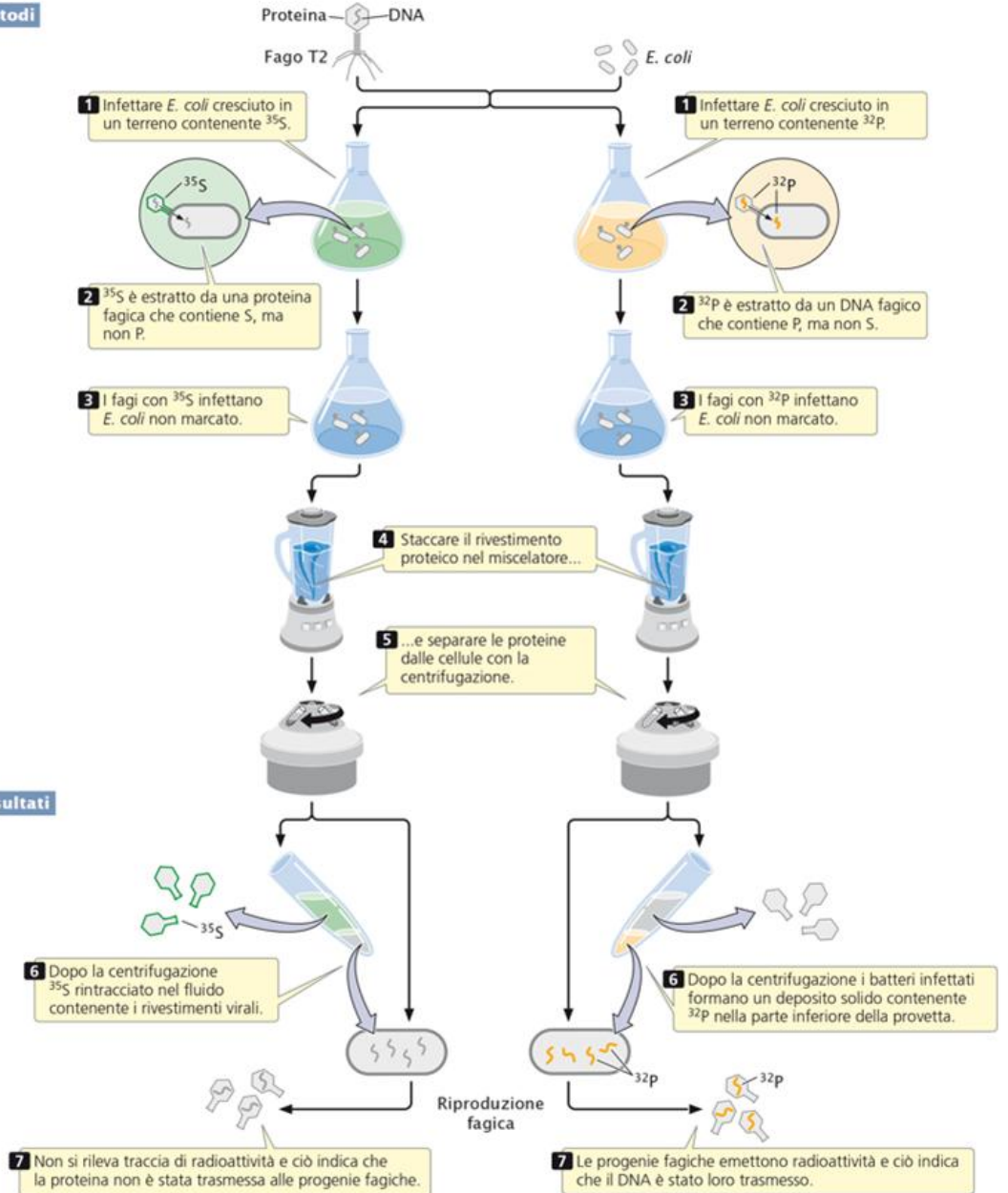
# ESPERIMENTI DI HARSHEY E CHASE



## Esperimento

**Domanda:** Quale parte del fago funge da materiale genetico e viene trasmesso alla sua progenie: il suo DNA o la sua componente proteica?

## Metodi



## Risultati

**Conclusione:** Nei batteriofagi, il materiale genetico è il DNA e non le proteine.

TABELLA **9.1** I vantaggi di utilizzare batteri e virus negli studi genetici

La riproduzione è rapida.

Generano una progenie numerosa.

Il genoma aploide consente l'espressione diretta di tutte le mutazioni.

La riproduzione asessuata facilita l'isolamento di ceppi geneticamente puri.

La crescita in laboratorio è semplice e richiede poco spazio.

I genomi hanno dimensioni ridotte.

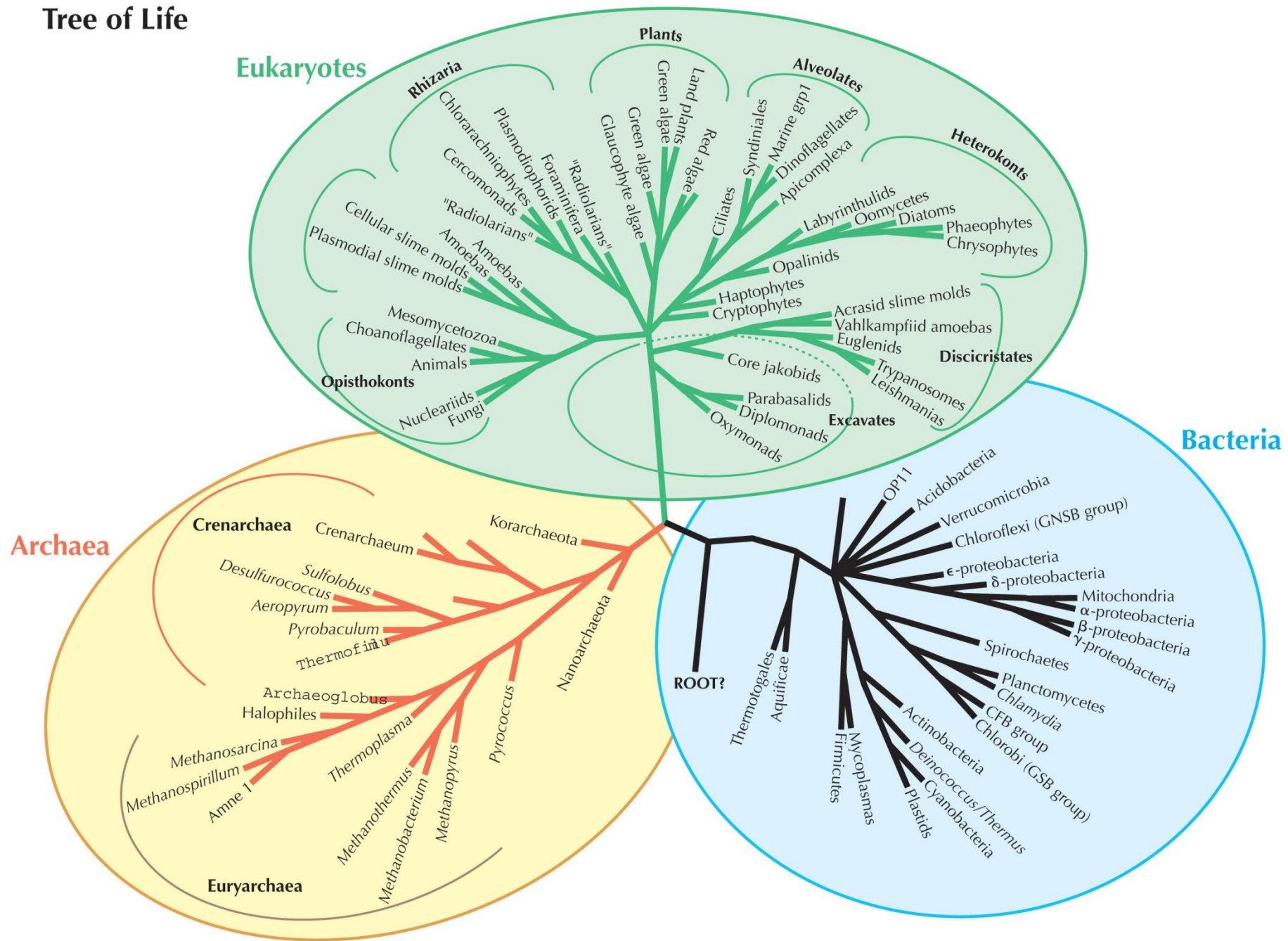
Possediamo tecniche per isolare e manipolare i loro geni.

Hanno rilevanza clinica.

Possono essere manipolati geneticamente per produrre sostanze di valore commerciale.



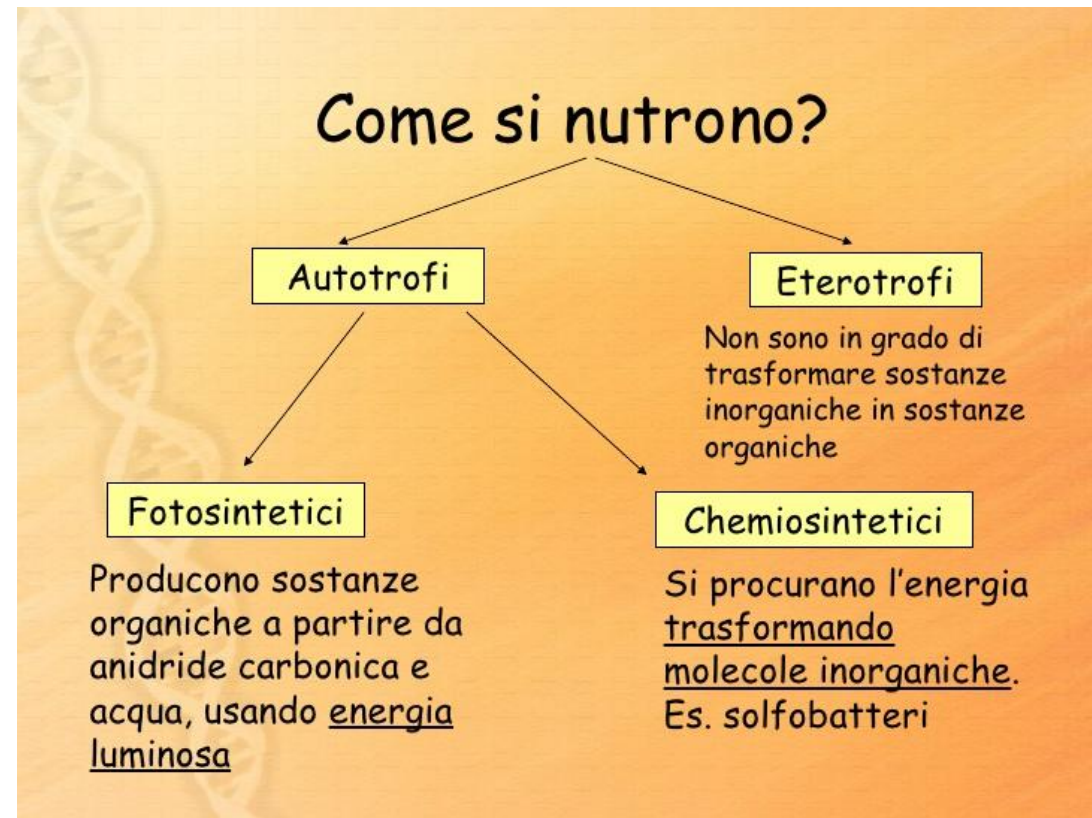
# Tree of Life



Nonostante la superficiale somiglianza nella struttura cellulare, eubatteri e archeobatteri si distinguono per il loro corredo genetico e le differenze tra di loro sono grandi quanto quelle esistenti fra eubatteri ed eucarioti. Infatti, per quanto concerne molte caratteristiche molecolari e processi genetici, gli archeobatteri sono più simili agli eucarioti degli eubatteri.

Il tipico terreno di coltura contiene una fonte di carbonio, elementi essenziali come azoto e fosforo, alcune vitamine e altri ioni e nutrienti indispensabili. I batteri selvatici o **prototrofi** possono usare questi semplici ingredienti per sintetizzare tutti i composti necessari per la loro crescita e riproduzione. Un terreno di coltura che contenga solo i nutrienti richiesti dai batteri prototrofi si chiama terreno minimo. Ceppi mutanti come i batteri **auxotrofi** mancano di uno o più enzimi necessari a sintetizzare molecole essenziali e quindi potranno crescere solo su un terreno arricchito con queste sostanze.

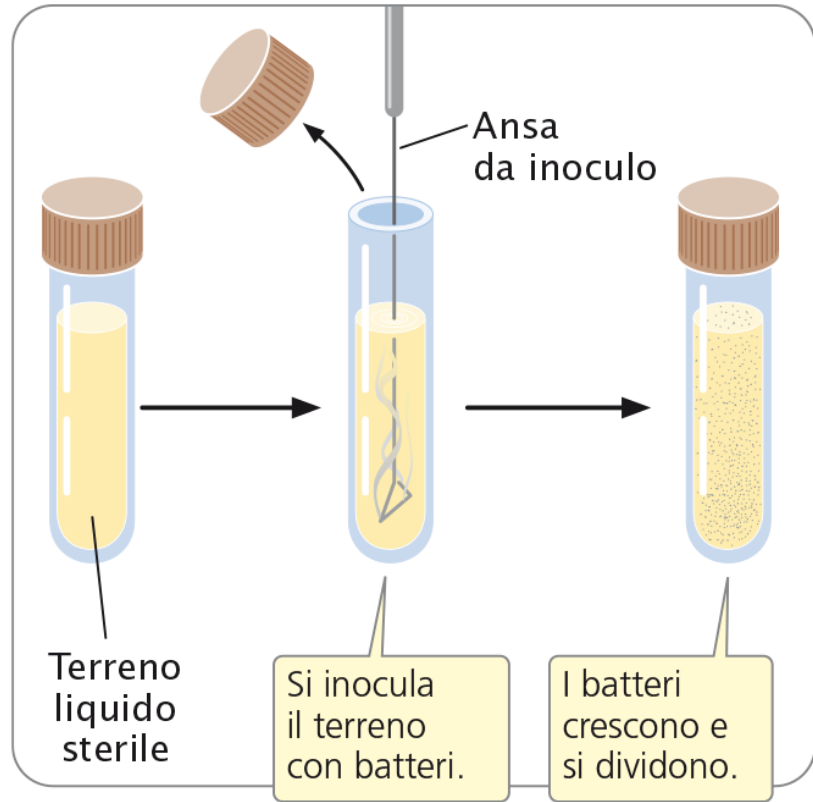
Per esempio le specie auxotrofe incapaci di sintetizzare l'amminoacido leucina non potranno crescere su un terreno minimo, ma cresceranno in un terreno al quale sia stata aggiunta leucina. Un terreno completo contiene tutte le sostanze necessarie per la crescita e la riproduzione dei batteri auxotrofi.



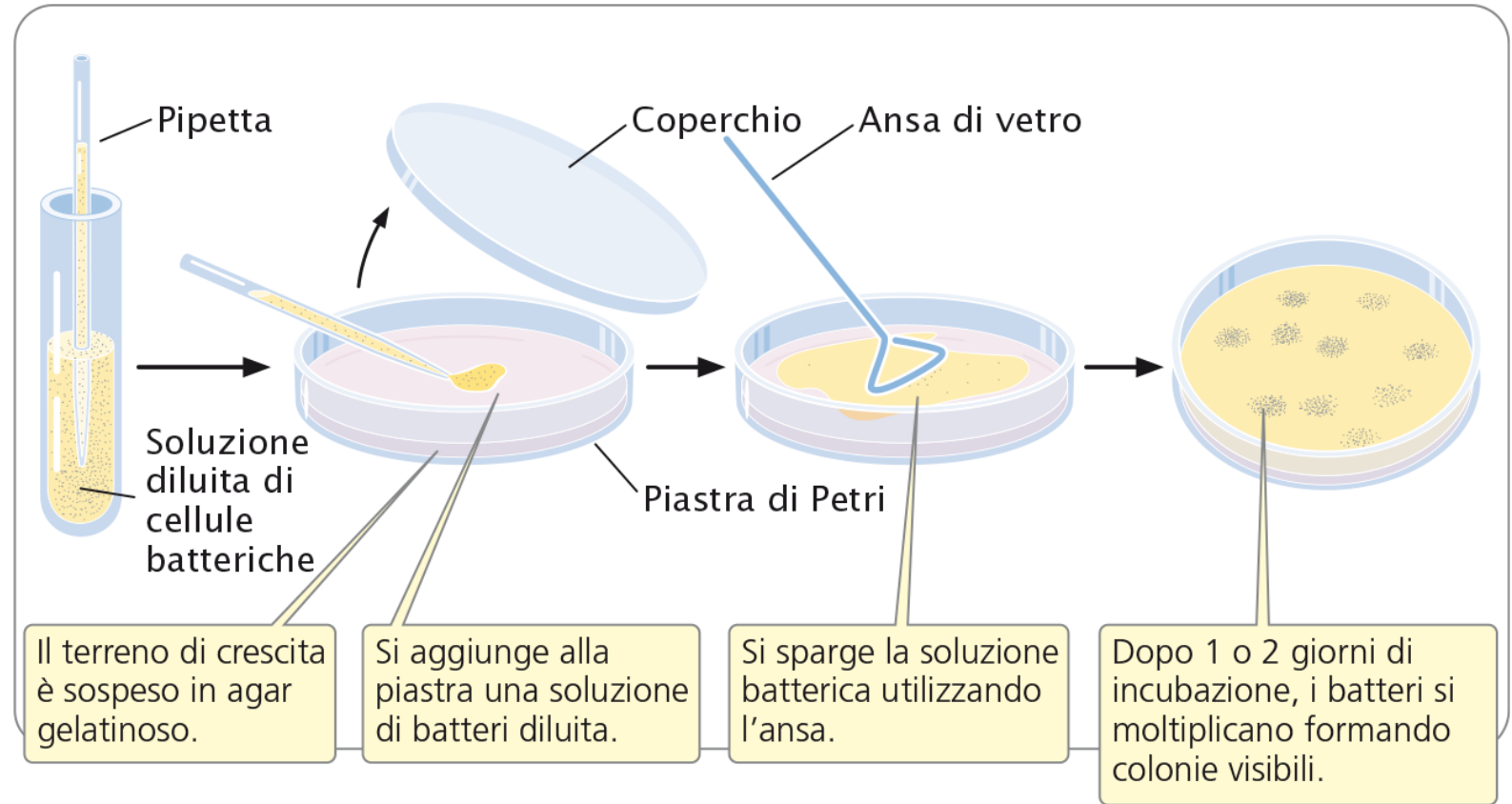


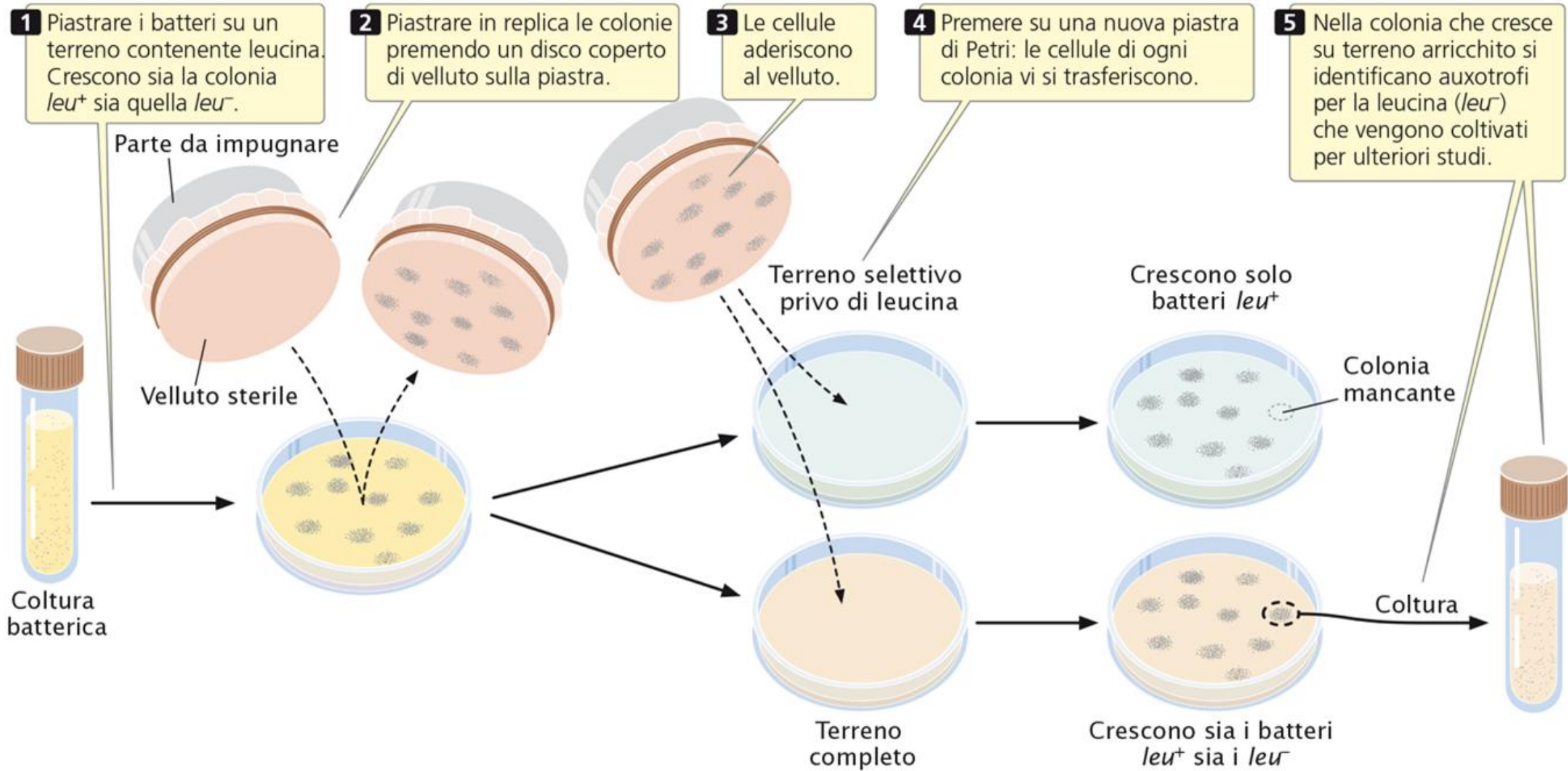
I fenotipi più comuni riguardano l'aspetto della colonia o l'incapacità di crescere su terreno minimo. Per esempio, vogliamo studiare il fenomeno della sintesi della leucina e quindi andiamo alla ricerca di batteri mutati per qualche gene che codifica per enzimi coinvolti nel pathway di biosintesi della leucina: auxotrofi che non possono sintetizzare leucina (mutanti *leu<sup>-</sup>*). Per prima cosa si spargono i batteri su una piastra di Petri che contiene un terreno che include la leucina; su di esso cresceranno sia i prototrofi *leu<sup>+</sup>*, che auxotrofi *leu<sup>-</sup>*. Successivamente, utilizzando una tecnica chiamata piastratura delle repliche, trasferiamo un po' di cellule da ciascuna delle colonie presenti sulla piastra primaria a due nuove piastre secondarie: una di queste contiene un terreno cui è stata aggiunta leucina, l'altra un terreno che ne è privo. Il terreno privo di un nutriente essenziale, come questo in cui manca la leucina, viene chiamato terreno selettivo. I batteri *leu<sup>+</sup>* cresceranno su entrambi i terreni, ma i mutanti *leu<sup>-</sup>* cresceranno solo sul terreno selettivo arricchito con leucina, poiché non sono in grado di sintetizzarla autonomamente. Ogni colonia che cresce su un terreno contenente leucina, ma non su un terreno che ne è privo, è costituita da batteri *leu<sup>-</sup>*.

(a)



(b)





**Conclusion:** Una colonia che si sviluppa solo su un terreno arricchito ha una mutazione nel gene che codifica per la sintesi di un nutriente essenziale.

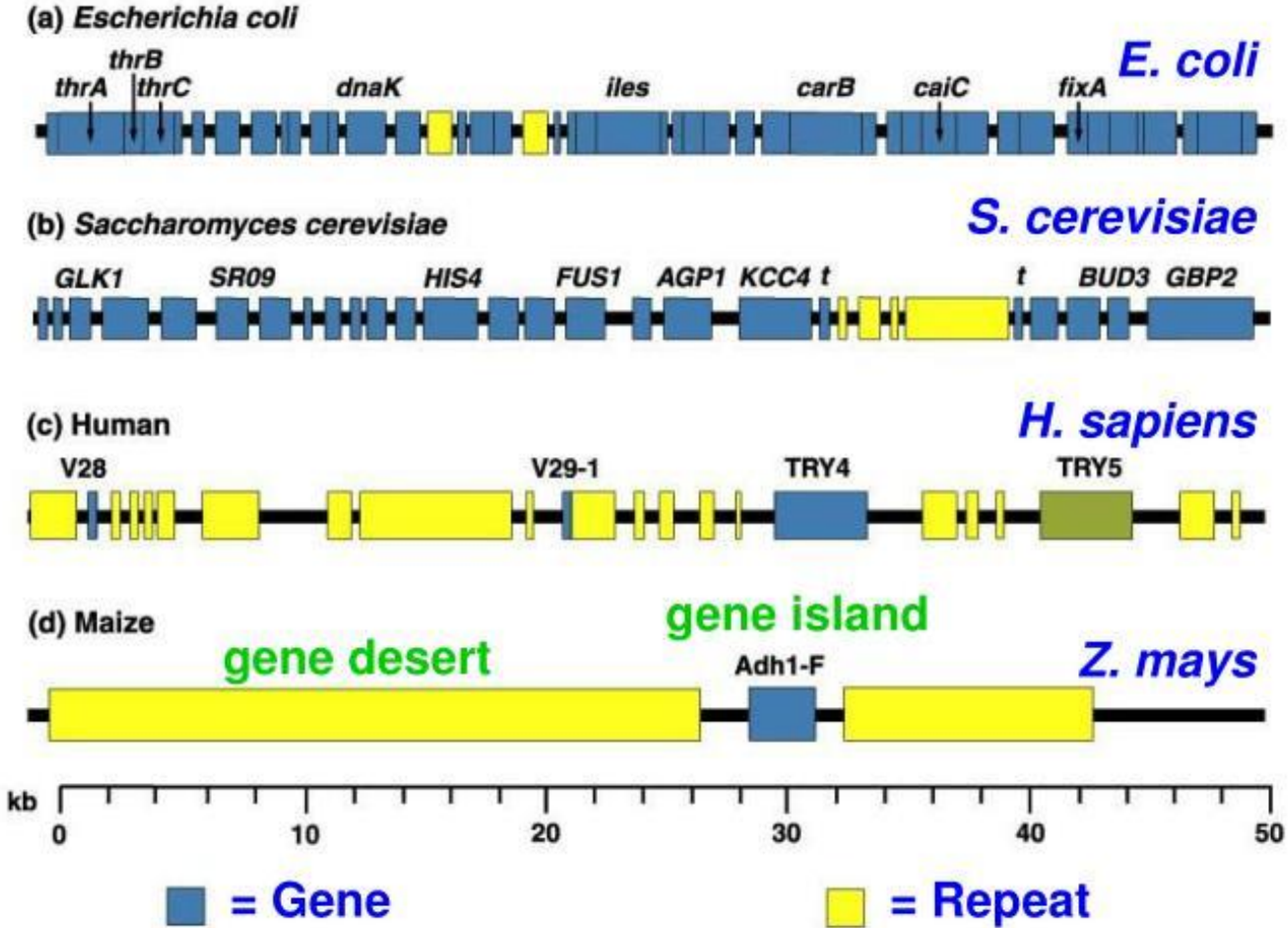


Molti genomi batterici sono costituiti da un cromosoma circolare che contiene un'unica molecola di DNA lunga diversi milioni di coppie di basi (bp). Tuttavia alcuni batteri contengono cromosomi multipli. Per esempio il *Vibrio cholerae*, che causa il colera, possiede due cromosomi circolari, e il *Rhizobium meliloti* ne ha tre. Esistono anche alcuni batteri che hanno cromosomi lineari.



Molti cromosomi batterici hanno un'organizzazione efficiente. Per esempio più del 90% del DNA dell'E. coli codifica proteine, mentre solo l'1% del DNA umano svolge questa funzione.

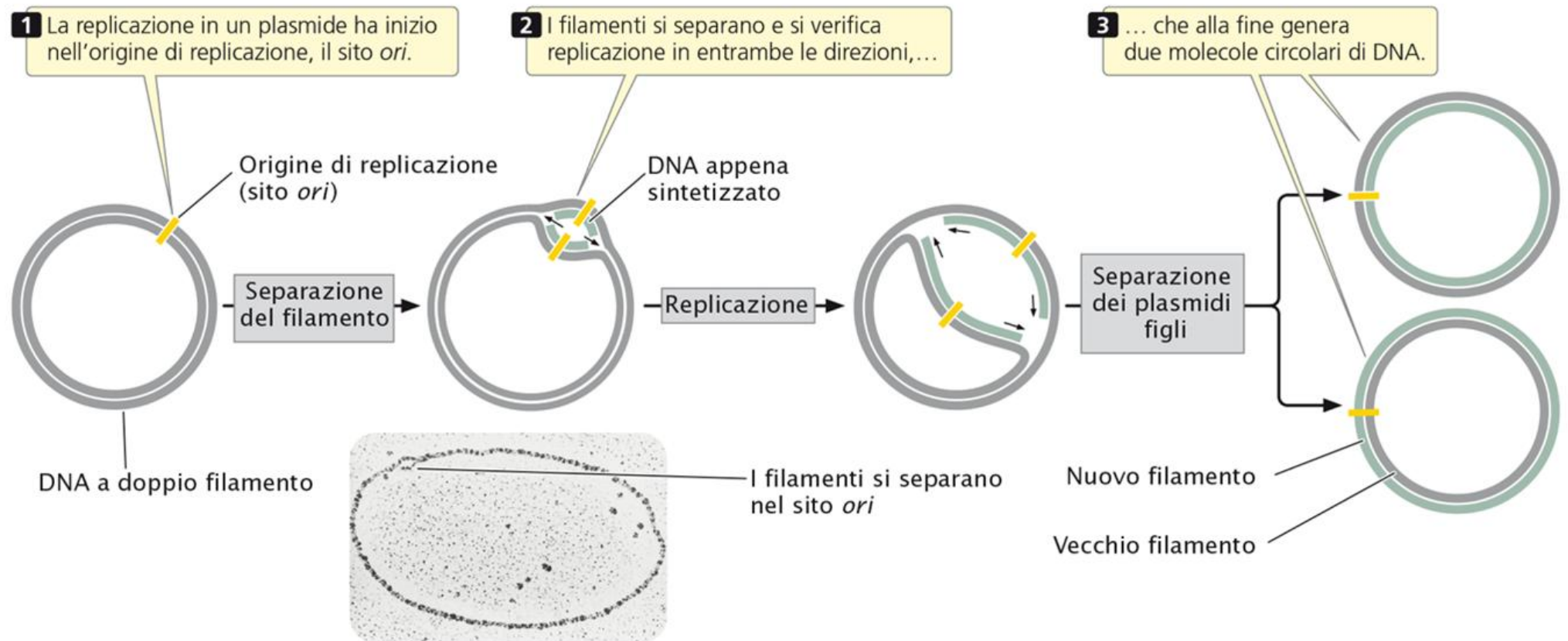
# Genome organization





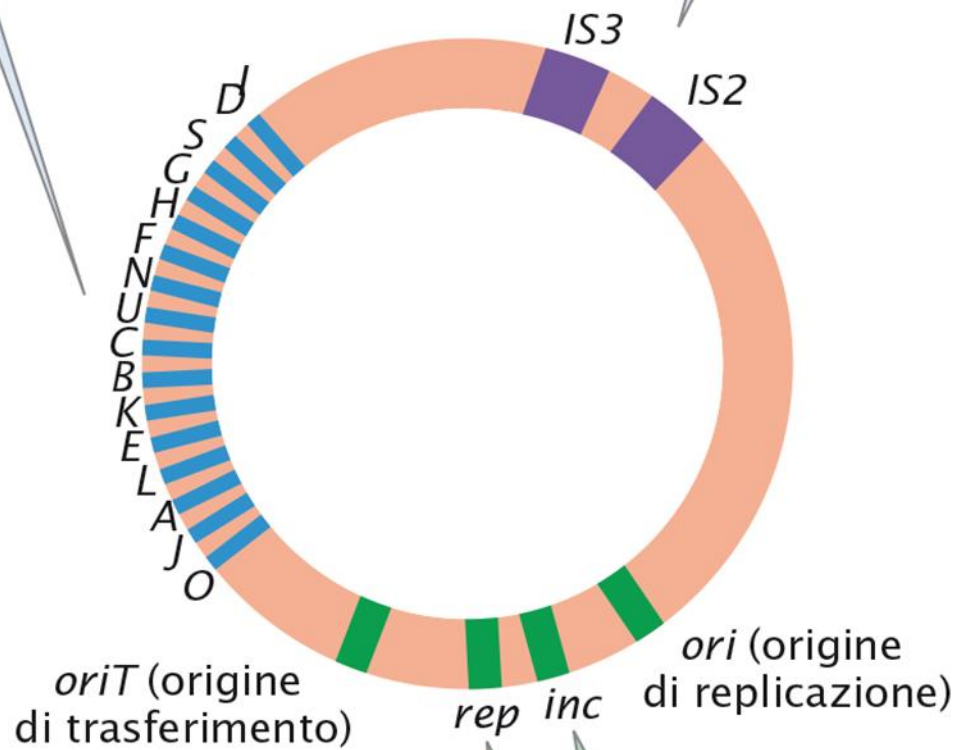
Oltre ad avere un cromosoma, molti batteri possiedono i plasmidi, piccole molecole di DNA di solito circolari. Di solito i plasmidi trasportano geni non essenziali per le funzioni batteriche, ma che possono giocare un ruolo decisivo nel ciclo di vita e crescita dei microrganismi che li ospitano. Esistono molti tipi di plasmidi; la sola *E. coli* si ritiene abbia più di 270 tipi di plasmidi presenti in natura. Ci sono plasmidi che permettono l'accoppiamento tra batteri, e alcuni di loro svolgono una funzione nella diffusione fra i batteri della resistenza agli antibiotici.

Ogni plasmide ha un'origine di replicazione, una specifica sequenza di DNA da cui ha inizio la replicazione. L'origine consente a un plasmide di replicarsi indipendentemente dal cromosoma batterico. Gli episomi sono plasmidi capaci di replicarsi liberamente e in grado di integrarsi nei cromosomi batterici. Il fattore F (fertilità) dell' E. coli è un episoma che controlla l'accoppiamento e lo scambio genico fra le cellule di E. coli.



I geni che regolano il trasferimento dei plasmidi ad altre cellule.

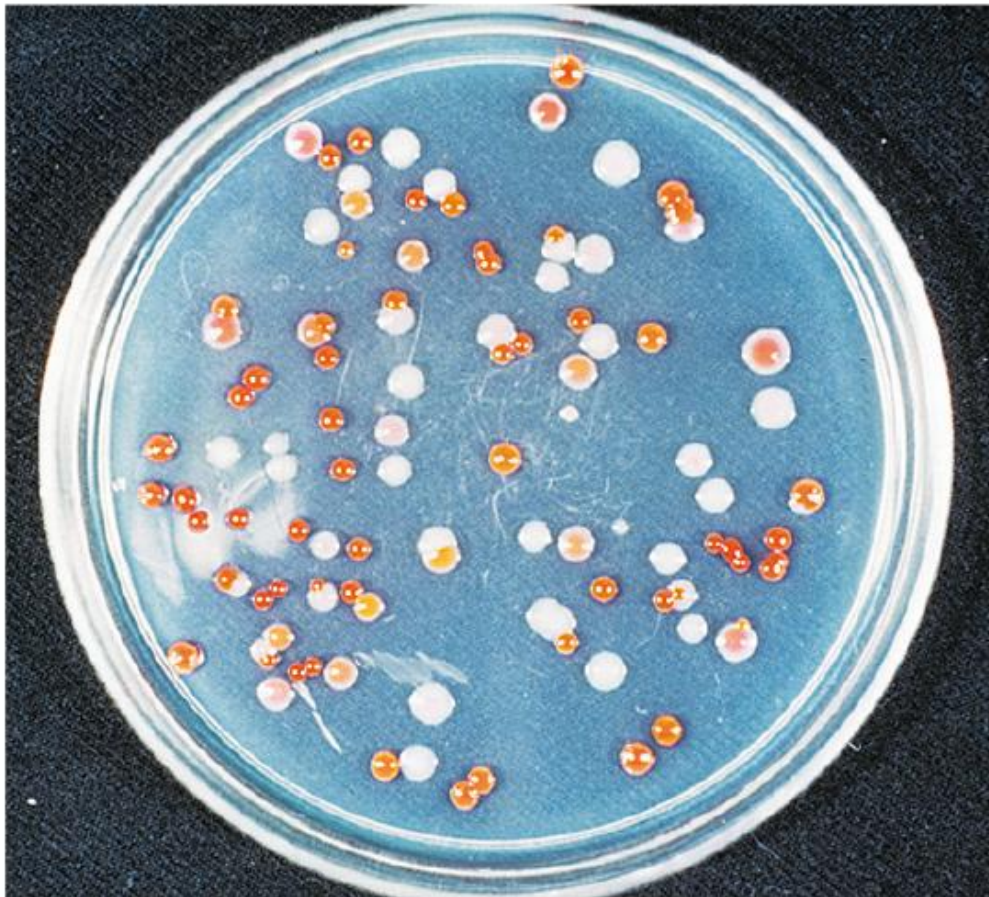
Le sequenze che regolano l'inserzione nel cromosoma batterico.



I geni che controllano la replicazione plasmidica.

**Fattore F**

**(a)**



**(b)**

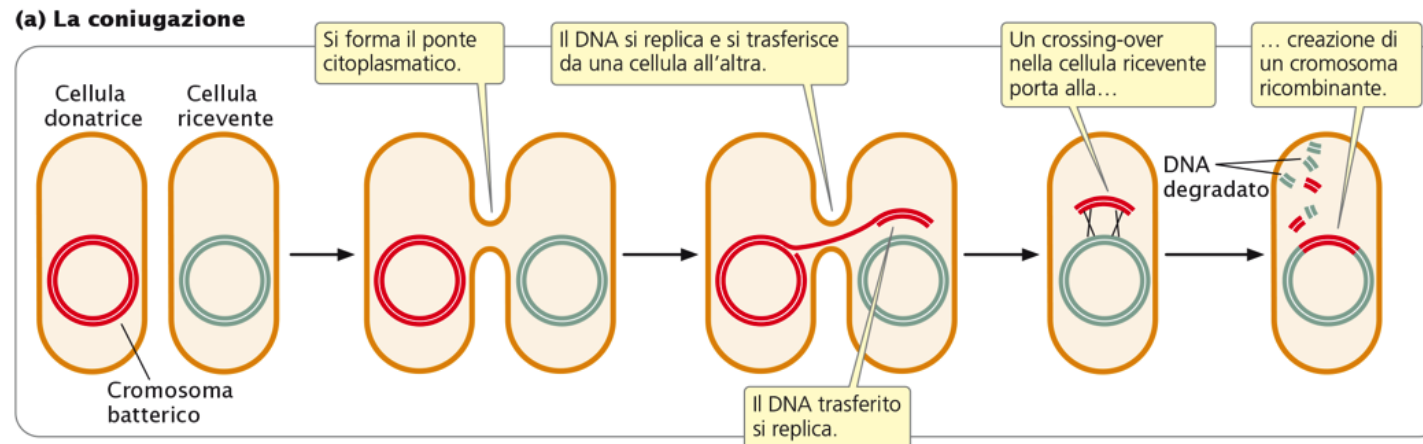




# I BATTERI SCAMBIANO GENI ATTRAVERSO CONIUGAZIONE, TRASFORMAZIONE E TRASDUZIONE

I batteri scambiano materiale genetico utilizzando tre diversi meccanismi, ciascuno dei quali implica un tipo particolare di trasferimento del DNA e successiva ricombinazione tra il materiale genetico introdotto e il cromosoma batterico.

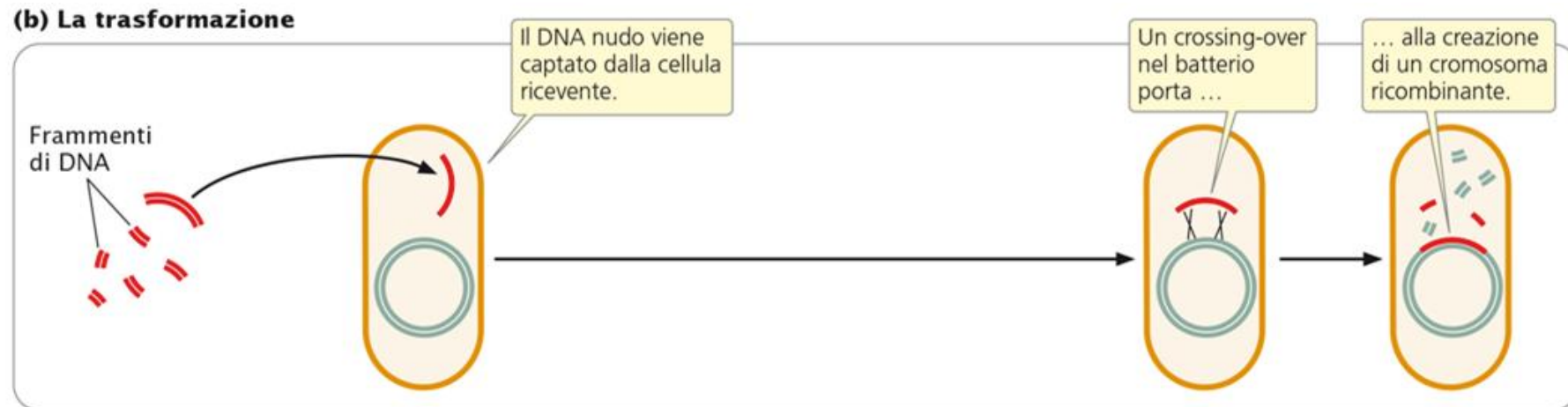
1 LA CONIUGAZIONE si verifica quando il materiale genetico passa direttamente da un batterio all'altro. Nella coniugazione due batteri si avvicinano e fra di loro si forma una connessione citoplasmatica. Un plasmide o una parte di cromosoma batterico passa da una cellula donatrice a una cellula ricevente. Dopo la coniugazione può verificarsi crossing-over fra sequenze omologhe del DNA trasferito e il cromosoma della cellula ricevente. Durante la coniugazione il materiale genetico viene trasferito solo da donatore a ricevente, senza che avvenga scambio reciproco.





# I BATTERI SCAMBIANO GENI ATTRAVERSO CONIUGAZIONE, TRASFORMAZIONE E TRASDUZIONE

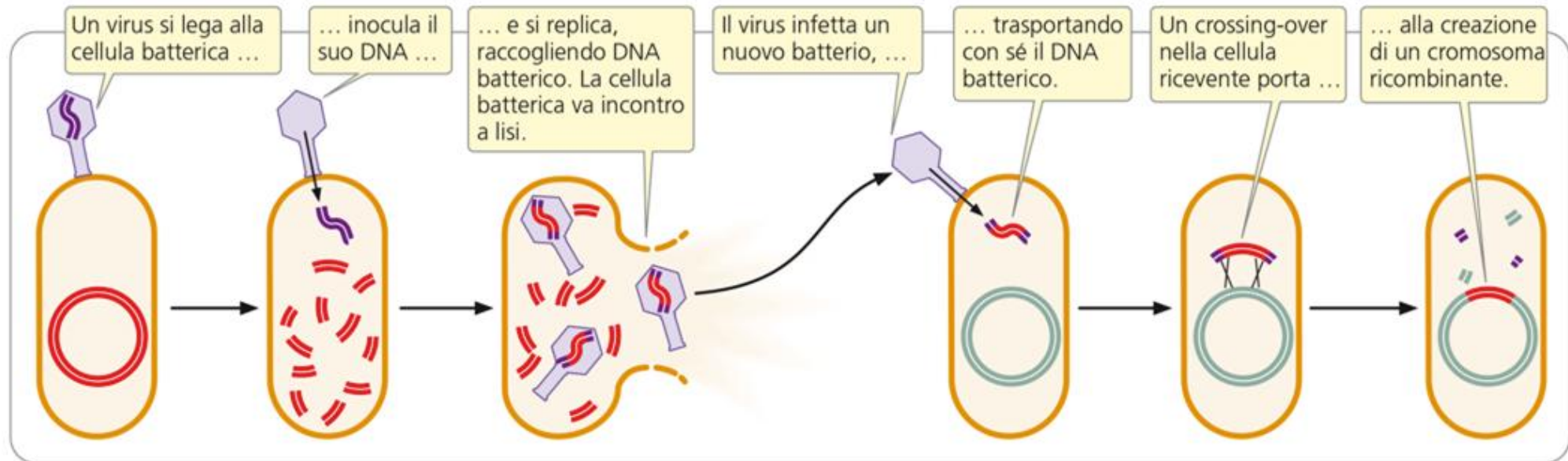
2 **LA TRASFORMAZIONE** ha luogo quando un batterio accoglie materiale genetico presente nel terreno di coltura. Dopo la trasformazione può verificarsi ricombinazione fra i geni introdotti e quelli del cromosoma batterico.



## I BATTERI SCAMBIANO GENI ATTRAVERSO CONIUGAZIONE, TRASFORMAZIONE E TRASDUZIONE

3 Parliamo invece di **TRASDUZIONE** quando virus batterici (i batteriofagi) trasportano materiale genetico da un batterio a un altro. All'interno del batterio il nuovo DNA introdotto può andare incontro a ricombinazione con il cromosoma batterico.

### (c) La trasduzione



Non tutte le specie batteriche presentano i tre i tipi di trasferimento genetico. La coniugazione si verifica più frequentemente in alcune specie che in altre. In molte specie di batteri la trasformazione ha luogo in misura limitata, ma le tecniche di laboratorio sono in grado di aumentare la percentuale di captazione di DNA dal mezzo esterno. Molti batteriofagi hanno un numero limitato di organismi ospiti, perciò la trasduzione si verifica di solito fra batteri della stessa specie o di specie strettamente imparentate.

Come vedremo nei paragrafi seguenti, per mappare i geni possiamo utilizzare tutte e tre queste forme di trasferimento genetico

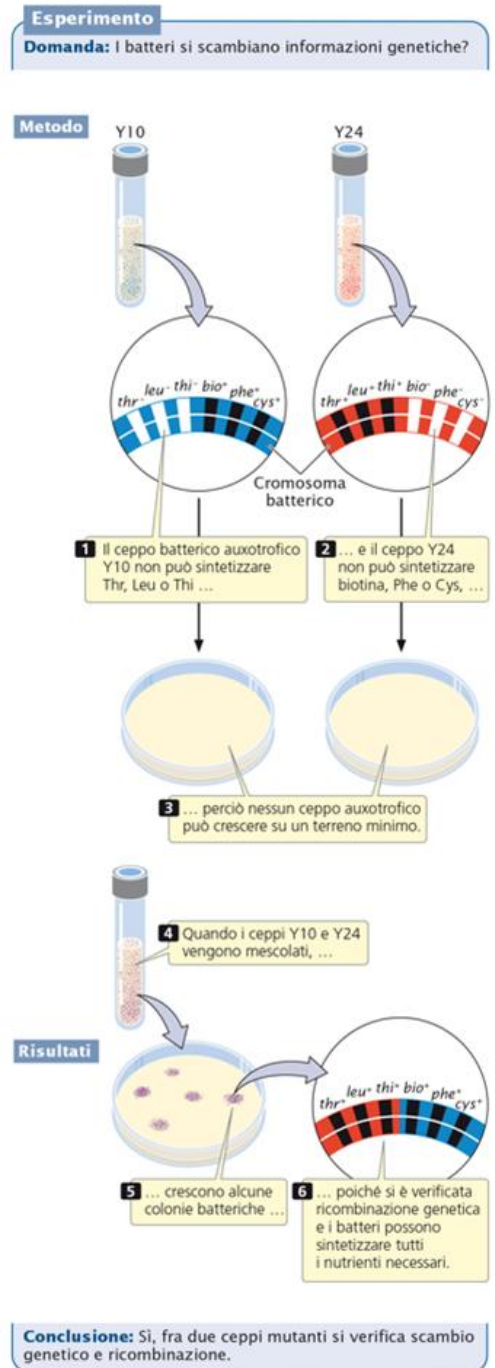
# LA CONIUGAZIONE

Il ceppo Y10 di E. Coli, per crescere ha bisogno degli amminoacidi treonina e leucina ( $thr^-$  e  $leu^-$ ) e della vit. tiamina ( $thi^-$ ).

Non aveva invece bisogno della vit. biotina ( $bio^+$ ) o degli amminoacidi fenilalanina ( $phe^+$ ) e cisteina ( $cys^+$ ). Il genotipo di questo ceppo può essere quindi scritto come segue:  $thr^- phe^+ leu^- thi^- bio^+ cys^+$ . Il ceppo Y24 aveva l'insieme di alleli opposto: per

crescere aveva bisogno di biotina, fenilalanina e cisteina, ma non richiedeva treonina, leucina o tiamina; il suo genotipo è  $thr^+ leu^+ thi^+ bio^- phe^- cys^-$ . I batteri Y10 e Y24 vengono mescolati e piastrati su un terreno minimo. Su questo tipo di terreno

ogni ceppo viene piastrato anche separatamente. Né il ceppo Y10 né l'Y24 riuscirono a crescere sul terreno minimo. Il ceppo Y10 non poteva svilupparsi perché gli servivano treonina, leucina e tiamina che mancavano nel terreno di coltura; il ceppo Y24, dal canto suo, non poteva crescere poiché aveva bisogno di biotina, fenilalanina e cisteina. Sulla piastra che ha ricevuto i due ceppi mescolati cresce qualche colonia.



# LA CONIUGAZIONE

Questi batteri erano per forza prototrofi, cioè avevano genotipo  $phe^+ thi^+ bio^+ cys^+ thr^+ leu^+$ : da dove vengono? Se della comparsa delle colonie prototrofe fosse stata responsabile la mutazione, allora alcune colonie avrebbero dovuto crescere anche sulle piastre che contenevano Y10 o Y24 da soli, ma nessun batterio era cresciuto su quelle piastre. Perché entrambi i ceppi diventassero prototrofi per mutazione avrebbero dovuto esserci mutazioni multiple simultanee:  $thr^- \rightarrow thr^+$   $leu^- \rightarrow leu^+$  e  $thi^- \rightarrow thi^+$  nel ceppo Y10 e  $bio^- \rightarrow bio^+$   $phe^- \rightarrow phe^+$  e  $cys^- \rightarrow cys^+$  nel ceppo Y24, una circostanza assolutamente improbabile. La Conclusione è che si è verificato un qualche tipo di trasferimento e ricombinazione di materiale genetico:

Ceppo auxotrofico

Y10

$thr^- leu^- thi^- bio^+ phe^+ cys^+$

Y24

$thr^+ leu^+ thi^+ bio^- phe^- cys^-$



$thr^- leu^- thi^-$   $bio^+ phe^+ cys^+$   
 $thr^+ leu^+ thi^+$   $bio^- phe^- cys^-$



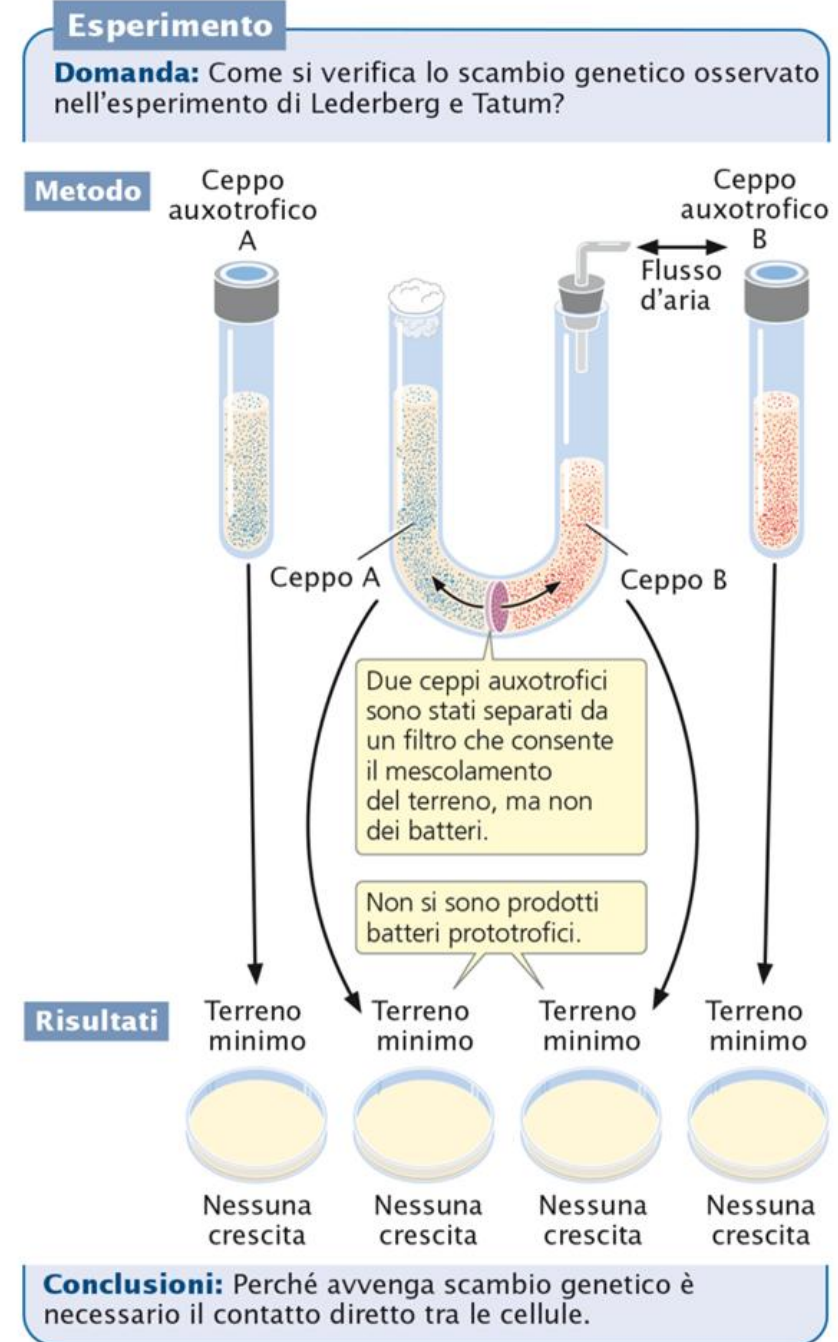
$thr^- leu^- thi^- bio^- phe^- cys^-$

Ceppo prototrofico

$thr^+ leu^+ thi^+ bio^+ phe^+ cys^+$

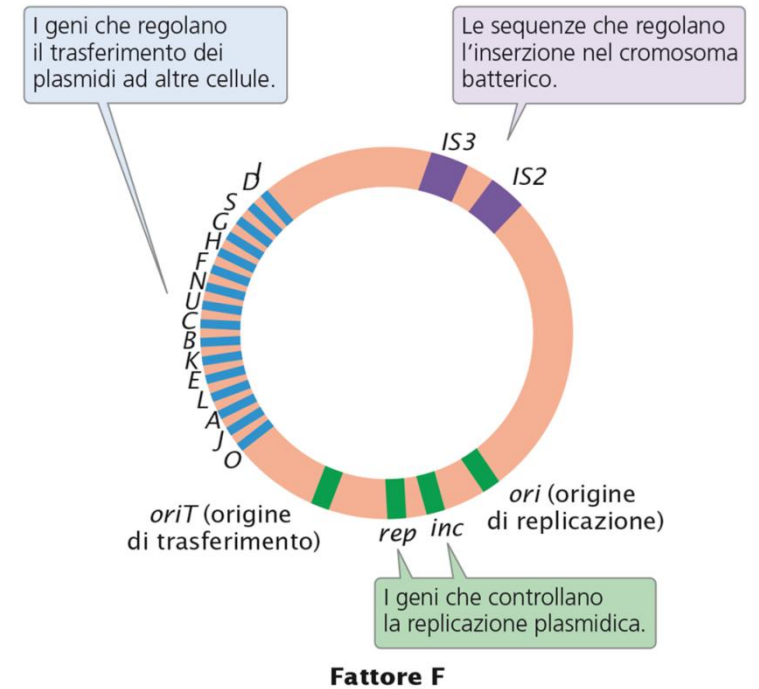


Quello che non sapevano era come ciò si fosse verificato. Per studiare il problema, Bernard Davis costruì una provetta a «U» divisa in due compartimenti da un setto filtrante a pori fini. Questo filtro permetteva al terreno liquido di passare da una parte all'altra della provetta, ma i suoi pori erano troppo piccoli per consentire il passaggio dei batteri. Nelle due parti della provetta furono collocati i due ceppi batterici auxotrofi e, per provocare il flusso del terreno fra i due comparti, venne applicata un'aspirazione alternata ora a una estremità ora all'altra della provetta a U. Nonostante il lungo periodo di incubazione in provetta, quando si prelevavano i batteri e si piastravano su terreno minimo non si osservava nessuna crescita: non c'era stato scambio di materiale genetico fra i due ceppi. Lo scambio di materiale genetico esige chiaramente un contatto diretto, o coniugazione, tra le cellule batteriche.



## Le cellule F<sup>+</sup> e F<sup>-</sup>

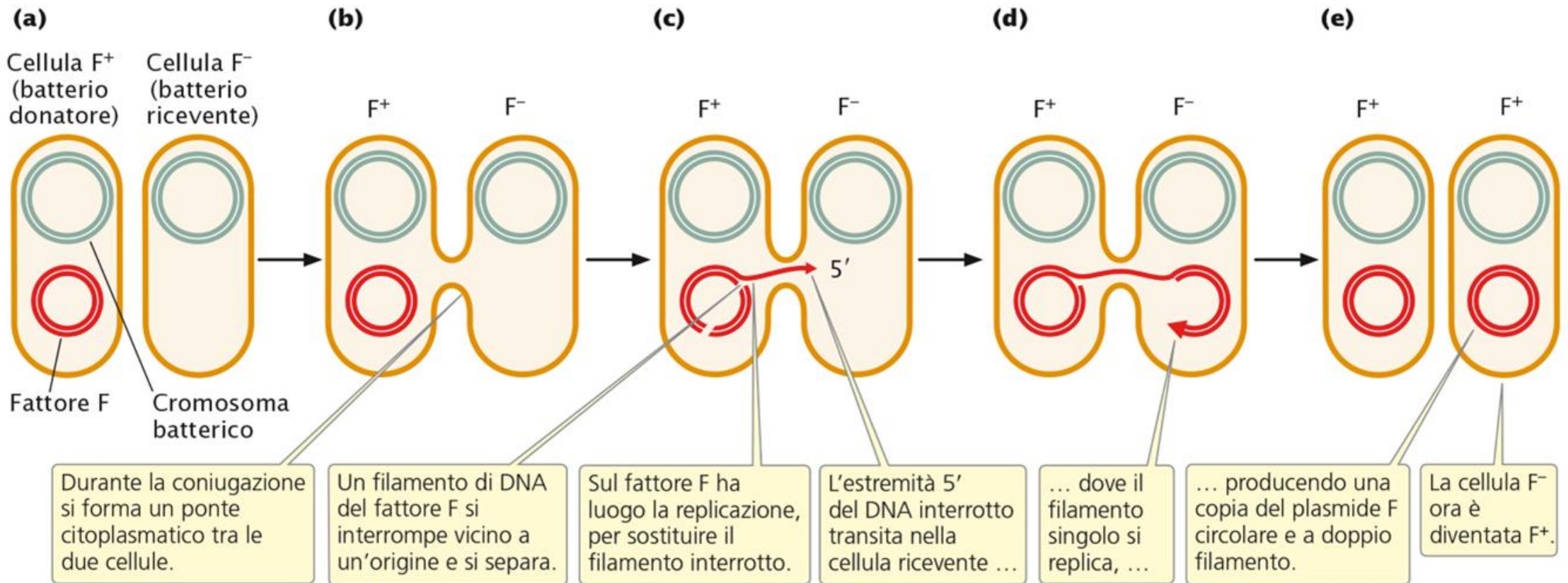
Nella maggior parte dei batteri la coniugazione dipende da un fattore di fertilità (F) presente nella cellula donatrice e assente nella cellula ricevente. Le cellule che contengono F sono chiamate F<sup>+</sup>, quelle prive di F sono dette F<sup>-</sup>. Il fattore F contiene un'origine di replicazione e alcuni geni necessari per la coniugazione.



Alcuni di questi geni, per esempio, codificano per i pili sessuali. Una cellula che contiene il fattore F produce dei pili sessuali uno di quali entra in contatto con un recettore su una cellula F<sup>-</sup> facendo avvicinare le due cellule. In questo modo il materiale genetico transita dalla F<sup>+</sup> alla F<sup>-</sup>.

# Le cellule F<sup>+</sup> e F<sup>-</sup>

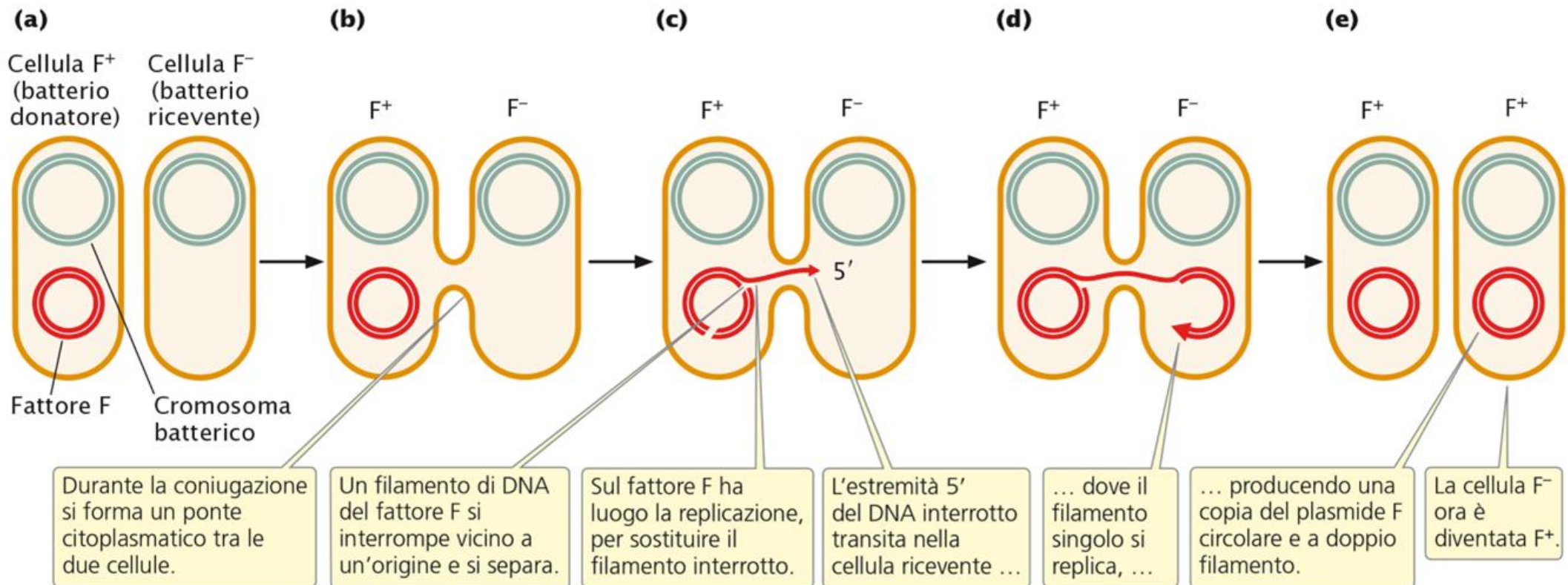
Il trasferimento ha inizio quando uno dei filamenti di DNA sul fattore F si interrompe vicino al sito di origine della replicazione (oriT). Un'estremità del DNA interrotto si separa dal resto del plasmide e passa nella cellula ricevente. Sul filamento interrotto, nella cellula F<sup>+</sup>, inizia una replicazione che procede lungo il plasmide circolare e sostituisce il filamento trasferito.





## Le cellule F<sup>+</sup> e F<sup>-</sup>

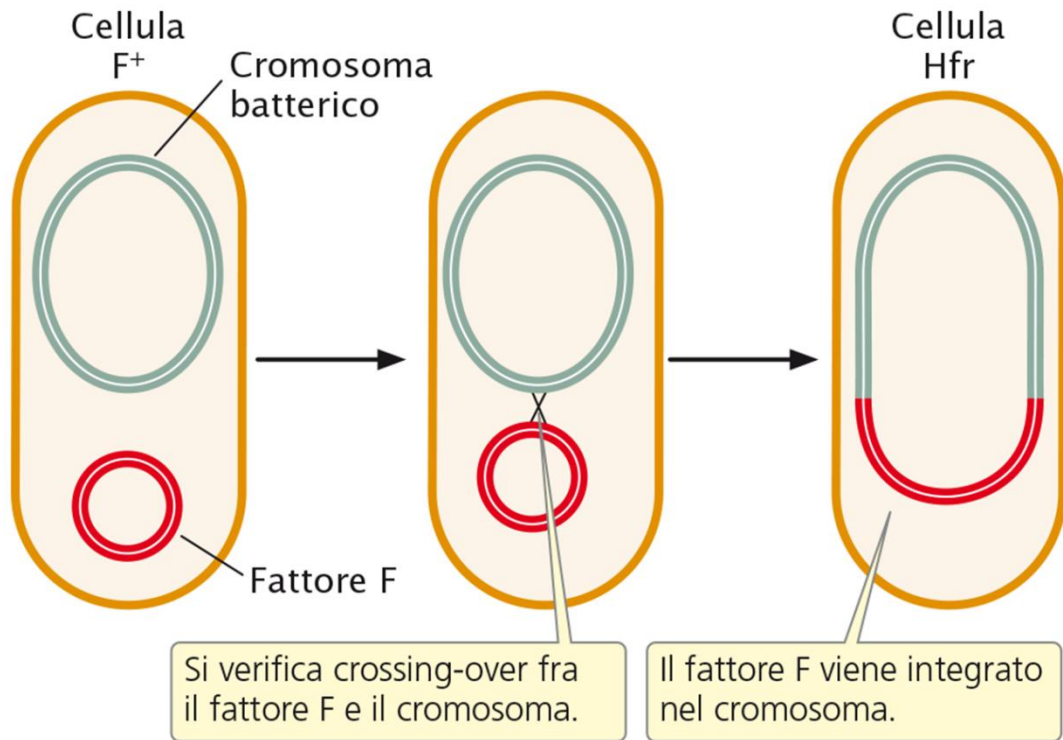
Dal momento che il plasmide nella cellula F<sup>+</sup> si interrompe sempre vicino al punto oriT, è a partire da questo punto che il DNA della cellula donatrice entra nella cellula ricevente, seguito dal resto del plasmide. Perciò il trasferimento di materiale genetico segue una direzione precisa. All'interno della cellula ricevente, il singolo filamento si replica, producendo una copia circolare a doppio filamento del plasmide F. Se il fattore F viene totalmente trasferito nella cellula ricevente, questa diventa F<sup>+</sup>.





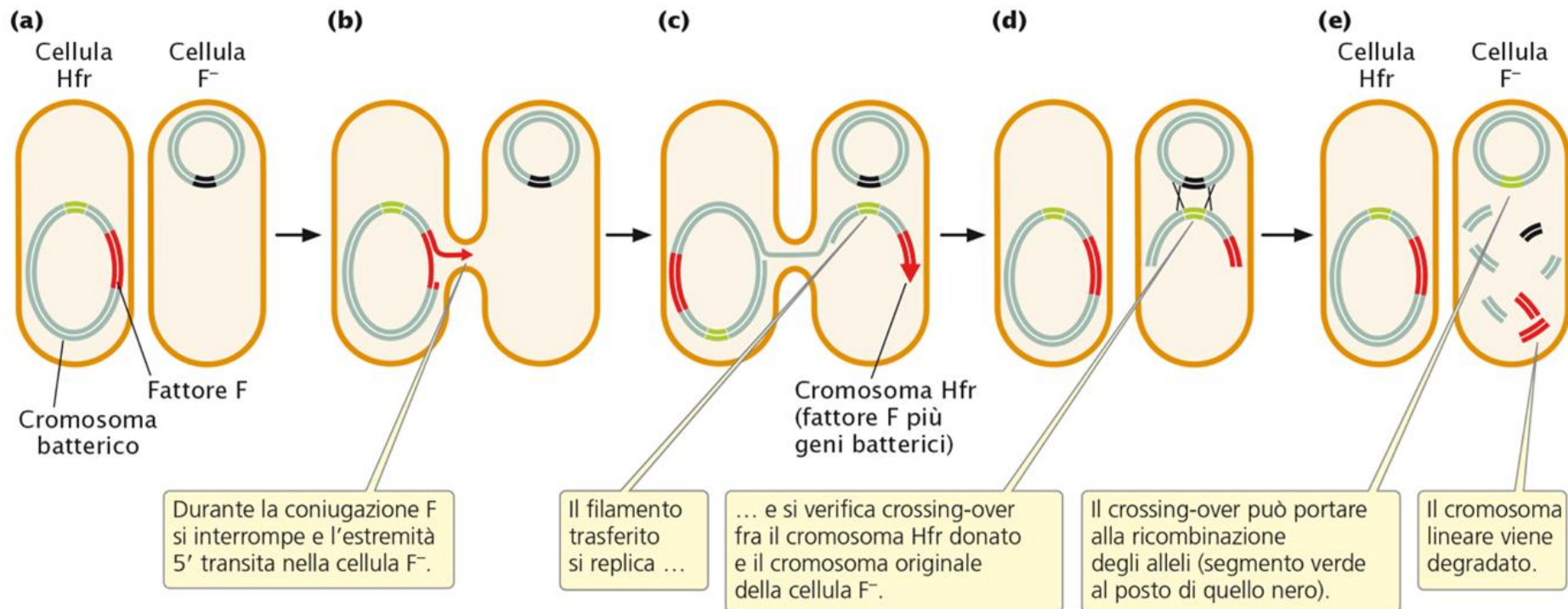
## LE CELLULE HFR

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  $F^-$ .

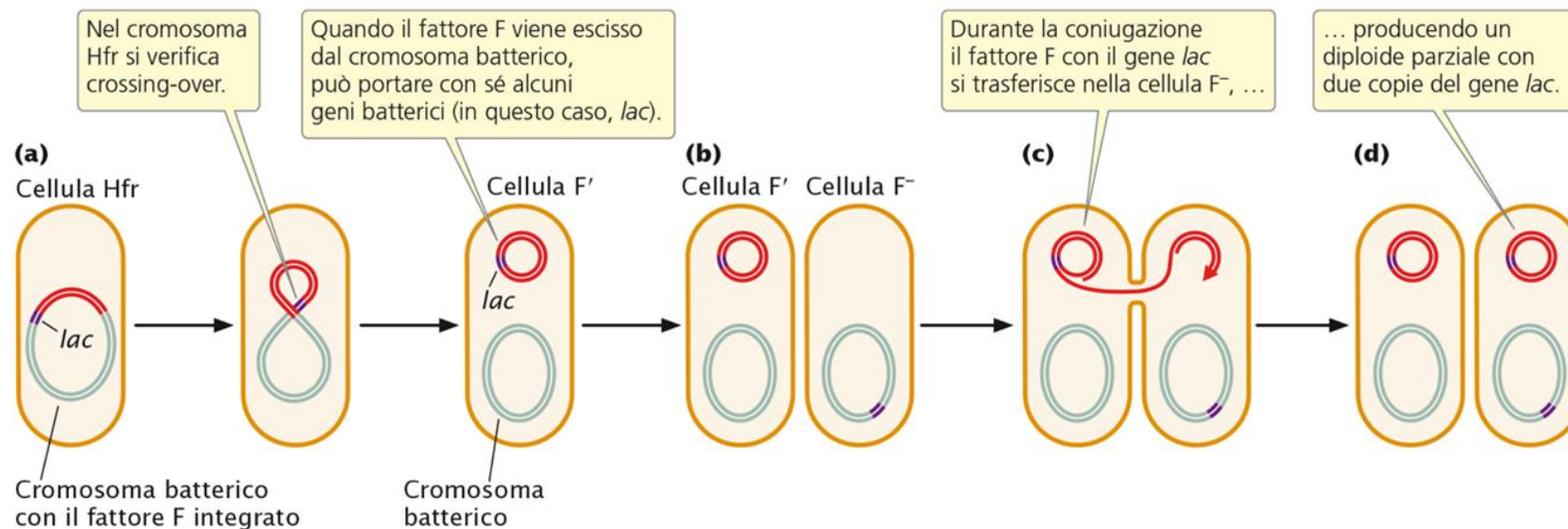


## LE CELLULE HFR

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<sup>-</sup>. 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 <sup>+</sup>	Presente come DNA circolare autonomo	Donatore
F <sup>-</sup>	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<sup>-</sup>. 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 <sup>+</sup> × F <sup>-</sup>	Due cellule F <sup>+</sup> (la cellula F <sup>-</sup> diventa F <sup>+</sup> )
Hfr × F <sup>-</sup>	Una cellula Hfr e una F <sup>-</sup> (nessun cambiamento)
F' × F <sup>-</sup>	Due cellule F' (la cellula F <sup>-</sup> diventa F')

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