

Microbiologia generale

Giacomo Fantoni

Elisa Pettinà

Gaia Faggin

Telegram: @GiacomoFantoni

Github: <https://github.com/giacThePhantom/MicrobiologiaGenerale>

9 maggio 2020

Indice

| | |
|--|-----------|
| 1 Introduzione | 4 |
| 1.1 Albero della vita | 4 |
| 1.1.1 Batteri e archei | 4 |
| 1.1.2 Virus | 4 |
| 1.1.3 Caratterizzazione dei microbi | 5 |
| 1.2 La macchina cellulare | 5 |
| 1.2.1 Impatto dei microbi sulle attività umane | 6 |
| 1.2.2 Ricombinazione del DNA | 6 |
| 1.3 Microrganismi come modello | 6 |
| 1.3.1 Il conflitto sulla generazione spontanea | 7 |
| 1.3.2 Postulati di Koch | 7 |
| 1.4 Differenze tra batteri, archei ed eucarioti | 8 |
| 1.5 I batteri | 9 |
| 1.5.1 Composizione elementare | 9 |
| 1.5.2 Strutture e loro funzioni | 10 |
| 2 La struttura della cellula | 12 |
| 2.1 La parete cellulare | 12 |
| 2.1.1 Peptidoglicano | 12 |
| 2.1.2 Parete cellulare nei gram-positivi e gram-negativi | 13 |
| 2.1.3 Lisozima | 15 |
| 2.2 La membrana citoplasmatica | 16 |
| 2.2.1 La struttura | 16 |
| 2.3 Membrana e parete degli archaea | 17 |
| 2.4 Locomozione microbica | 19 |
| 2.4.1 Il flagello | 19 |
| 2.4.2 Il movimento flagellare | 21 |
| 2.4.3 La sintesi flagellare | 21 |
| 2.4.4 I flagelli negli spirochetti | 22 |
| 3 Popolazione batterica | 23 |
| 3.0.1 Conta vitale | 23 |
| 3.0.2 Misura della torbidità | 23 |
| 3.0.3 Most Probable Number | 24 |
| 3.1 Sistemi di coltivazione microbica | 24 |
| 3.1.1 Chemostato | 24 |

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 4 Meccanismi di trasporto cellulare | 25 |
| 4.1 Tipologie di trasporto | 25 |
| 4.1.1 Diffusione passiva | 25 |
| 4.1.2 Diffusione facilitata | 25 |
| 4.1.3 Trasporto attivo | 26 |
| 4.2 Sistemi di traslocazione nei procarioti | 27 |
| 4.2.1 Via di secrezione dipendente da Sec | 28 |
| 4.2.2 Sistema di secrezione di tipo II | 28 |
| 4.2.3 Sistema di secrezione a 2 partner (TPS, Two Partner Secretion) | 29 |
| 4.2.4 Sistema dell'autotrasporto, tipo V | 29 |
| 4.2.5 Secrezione attraverso la via "chaperon/usher" | 29 |
| 4.3 Vie delle secrezioni indipendenti da Sec | 29 |
| 4.3.1 Il sistema Tat: Twin-arginine translocation system | 29 |
| 4.3.2 I trasportatori ABC: ATP-Binding Cassette | 30 |
| 4.3.3 Il sistema di secrezione di tipo III | 30 |
| 4.3.4 Il sistema di secrezione di tipo IV | 30 |
| 5 Metabolismo dei microrganismi | 31 |
| 5.1 Catalisi ed enzimi | 31 |
| 5.1.1 Enzimi | 32 |
| 5.1.2 Parametri esterni che alterano l'azione degli enzimi | 32 |
| 5.1.3 Inibitori | 33 |
| 5.2 Redox | 33 |
| 5.3 Trasportatori di elettroni e ciclo NAD/NADH | 33 |
| 5.4 ATP | 34 |
| 5.5 Catabolismo dei carboidrati | 34 |
| 5.6 Glicolisi | 34 |
| 5.7 Respirazione cellulare | 35 |
| 5.7.1 Sintesi acetilCoA | 35 |
| 5.7.2 Ciclo di Krebs | 36 |
| 5.7.3 Catena di trasporto degli elettroni | 36 |
| 5.7.4 ATPsintasi | 37 |
| 5.8 Bilancio globale | 37 |
| 5.9 Le altarnative cataboliche | 38 |
| 5.10 La fermentazione | 38 |
| 5.10.1 Fermentazione lattica | 38 |
| 5.10.2 Fermentazione alcolica | 38 |
| 5.10.3 Prodotti alimentari o industriali derivati da processi di fermentazione | 39 |
| 5.11 Altre vie cataboliche | 39 |
| 5.12 La fotosintesi | 40 |
| 5.12.1 Reazioni dipendenti dalla luce | 40 |
| 5.12.2 Reazioni non dipendenti dalla luce | 41 |
| 6 Genomica microbica | 42 |
| 6.1 Sequenziamento genomico di prima generazione (1995) | 43 |
| 6.1.1 Cromosomi artificiali batterici: i BAC | 43 |
| 6.1.2 YAC: i cromosomi artificiali di lievito | 43 |
| 6.2 Sequenziamento del DNA | 43 |

INDICE

| | | |
|----------|--|-----------|
| 6.2.1 | Metodo Sanger | 44 |
| 6.2.2 | Sequenziamento shotgun | 44 |
| 6.3 | Mappe genomiche | 45 |
| 6.3.1 | Categorie geniche | 46 |
| 6.4 | Genomica comparativa | 46 |
| 7 | Virologia | 49 |
| 7.1 | Struttura dei virus | 49 |
| 7.1.1 | Capside e simmetria | 49 |
| 7.1.2 | Virus con capsidi a simmetria complessa | 50 |
| 7.1.3 | Genomi virali | 51 |
| 7.2 | Tassonomia virale | 51 |
| 7.3 | Ciclo replicativo di un virus animale | 53 |
| 7.3.1 | Herpes simplex, classe I | 53 |
| 7.3.2 | Poxvirus (vaiolo), classe I | 54 |
| 7.3.3 | Picornavirus (poliovirus), classe IV | 54 |
| 7.3.4 | Virus dell'influenza umana di tipo A, classe V | 54 |
| 7.3.5 | Retrovirus animale, classe VI | 55 |

Capitolo 1

Introduzione

I microbi sono organismi unicellulari origine di tutte le forme di vita, mostrano una grande differenza tra di loro, maggiore di quella esistente tra piante e animali, sono estremamente numerosi e ubiquitari. Trasformano e riciclano la materia organica e influenzano il clima. Hanno relazioni simbiotiche con animali, piante e altri microorganismi. Alcuni sono patogeni. Possono sopravvivere a condizioni estreme:

- 5 megarad di radiazioni gamma.
- pH estremi: da 0 a 11.4.
- Temperature estreme: da -15 a 121 gradi centigradi.
- Pressione idrostatica di 1300 ATM.
- Pressione osmotica corrispondente a 5.2 di NaCl.

Si trovano sulla terra da molto prima della nascita di organismi pluricellulari.

1.1 Albero della vita

Oltre all'evoluzione in verticale nell'albero della vita possono accadere degli scambi in orizzontale tra specie molto distanti tra di loro.

1.1.1 Batteri e archei

Batteri e archei sono organismi procarioti, ovvero non hanno nucleo cellulare, possiedono una parete cellulare polisaccarida di peptidoglicano. Svolgono una riproduzione asessuata e sono tipicamente dalle 10 alle 100 volte più piccoli delle cellule eucariote, nell'ordine dei micrometri.

1.1.2 Virus

I virus sono acellulari e costituiti da un materiale genetico a DNA o RNA, di un capsido proteico e eventualmente di un ulteriore strato lipidico. Dipendono dalla cellula ospite per la loro riproduzione.

1.2. LA MACCHINA CELLULARE

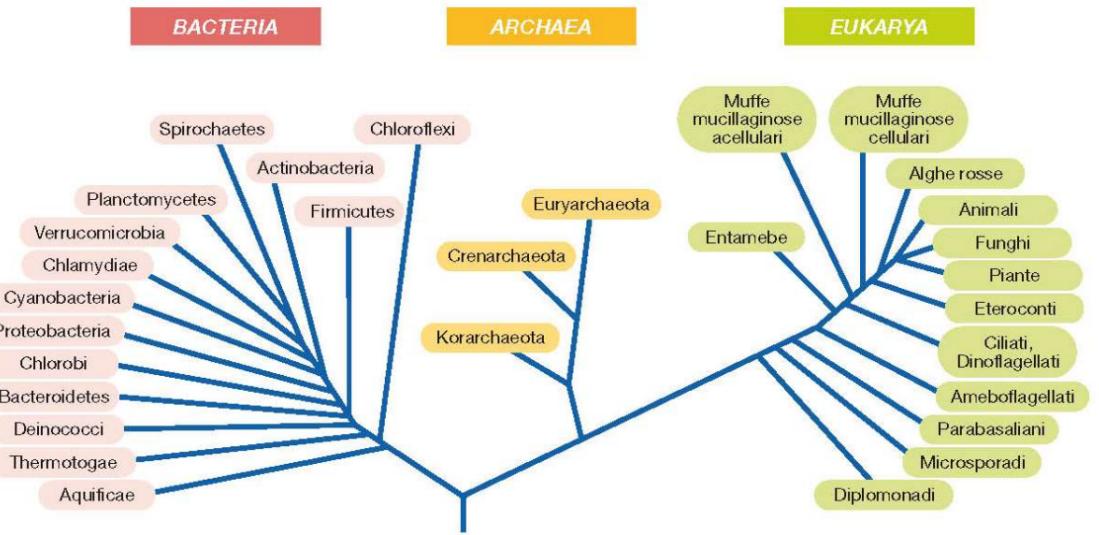


Figura 1.1: Albero della vita

1.1.3 Caratterizzazione dei microbi

| | Individuo | Popolazione | Comunità |
|----------|---|---|---|
| Ecologia | Fisiologia: differente espressione di geni in risposta a cambiamenti | Demografica: nascita, morte, immigrazione, emigrazione | Ecologia comunitaria: interazioni interspecie che danno forma a struttura e funzione della comunità |
| Genomica | Mappatura fine di singoli genomi | Genomica della popolazione: analisi genomica comparativa per determinare variazioni | Metagenomica: potenziale genetico dei membri della comunità |
| Genetica | Genetica dei batteri: ruolo dei geni sotto certe variazioni | Genetica della popolazione: frequenza della distribuzione degli alleli | Genetica comunitaria: interazione tra la composizione genetica della comunità e le proprietà della comunità ecologica |

1.2 La macchina cellulare

Le condizioni necessarie affinché la cellula possa riprodursi comprendono un adeguato supporto energetico e la presenza di precursori per la sintesi di nuove macromolecole. Le istruzioni codificate nel genoma devono essere replicate in modo che ogni cellula figlia possa riceverne una copia. Infine i geni devono essere espressi attraverso trascrizione e traduzione per formare le proteine e le macromolecole necessarie per dare origine a una nuova cellula.

1.3. MICRORGANISMI COME MODELLO

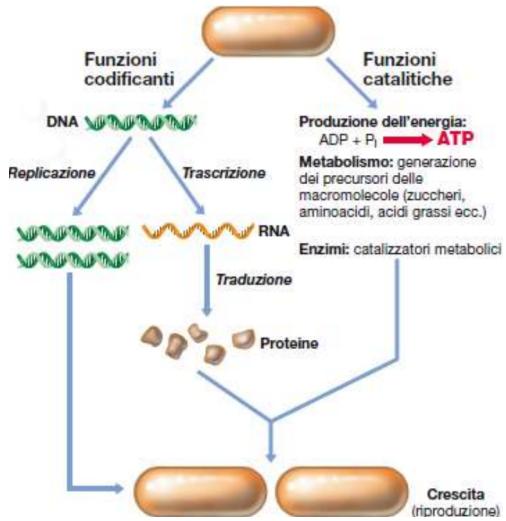


Figura 1.2: Funzioni codificantи della macchina cellulare

1.2.1 Impatto dei microbi sulle attività umane

I microbi svolgono un ruolo fondamentale in varie attività umane:

- Agricoltura: fissazione di N_2 ($N_2 \rightarrow 2NH_3$), necessario per il ciclo dei nutrienti, permettono ai ruminanti di consumare erba.
- Cibo: preservazione del cibo, creazione di cibi fermentati e additivi.
- Alcuni sono agenti patogeni.
- Creazione di biofuels, bioremediation nel caso di petrolio disperso nell'ambiente e microbial mining.
- Biotecnologie: produzione di organismi geneticamente modificati, produzione di prodotti farmaceutici, terapia genetica per certe malattie.

1.2.2 Ricombinazione del DNA

I microbi sono utilizzati per ricombinare il DNA. Il DNA plasmidico e quello del donatore possono essere tagliati attraverso un'endonucleasi di restrizione in modo da ottenere frammenti compatibili. Mescolando e legando il plasmide linearizzato al DNA estraneo digerito i frammenti sono incorporati nel plasmide formando un plasmide ricombinante che viene inserito in cellule batteriche. Quando si riproduce viene riprodotto anche il DNA estraneo. Se il donatore contiene un gene questo può essere espresso producendo una proteina eterologa.

1.3 Microrganismi come modello

I microrganismi sono stati ampiamente utilizzati per la ricerca in quanto si replicano velocemente, sono economici da coltivare e hanno strutture relativamente semplici. Sono stati pertanto utilizzati per studiare i processi cellulari come replicazione del DNA, trascrizione e traduzione.

1.3. MICRORGANISMI COME MODELLO

1.3.1 Il conflitto sulla generazione spontanea

Fino all'esperimento di Redi si credeva che gli organismi viventi potessero svilupparsi da matrice non vivente o in decomposizione. Questa teoria viene confutata ponendo della carne in putrefazione in tre vasi: uno scoperto (con conseguenza di deposito di larve di mosca), uno sigillato (che rimase senza larve) e uno coperto da una garza (su cui le mosche, attratte dall'odore deposero le larve).

1.3.2 Postulati di Koch

1. Il microrganismo deve essere presente in tutti gli individui affetti dalla malattia e assente in quelli sani.
2. Il microrganismo deve essere isolato dall'individuo affetto e, posto in coltura, deve dare origine a una popolazione cellulare omogenea.
3. L'inoculo di una cultura pura del microrganismo in individui sani può causare la comparsa della malattia di cui è ritenuto responsabile.
4. Il microrganismo deve essere reisolato dall'organismo infetto sperimentalmente in cui la malattia sia insorta.

I postulati di Koch molecolari

1. Il gene implicato nella patogenicità o virulenza deve trovarsi in tutti i ceppi patogeni di una data specie ed essere assente dalle specie non patogene.
2. L'inattivazione selettiva del gene deve portare a una diminuzione misurabile della patogenicità o virulenza.
3. La complementazione o reversione della mutazione deve ripristinare il livello originale di patogenicità o virulenza. Parimenti l'introduzione del gene in un ceppo non patogeno lo trasforma in patogeno.

1.4. DIFFERENZE TRA BATTERI, ARCHEI ED EUCA RIOTI

1.4 Differenze tra batteri, archei ed eucarioti

| CARATTERISTICA | BACTERIA | ARCHAEA | EUKARYA |
|---|----------|---------|---------|
| Struttura cellulare procariota | + | + | - |
| Membrana nucleare | - | - | + |
| DNA cromosomale circolare | + | + | - |
| Operoni | + | + | - |
| RNA polimerasi | 1 | > 1 | 3 |
| Mureina nella parete cellulare | + | - | - |
| Sensibilità ad antibiotici β -lattamici | + | - | - |
| Lipidi di membrana: legame | Estere | Etere | Estere |
| Ribosomi | 70S | 70S | 80S |
| t-RNA di inizio traduzione | fMet | Met | Met |
| Sensibilità alla tossina difterica | - | + | + |
| Sensibilità a cloramfenicolo, streptomicina, kanamicina | + | - | - |
| Chemiolitotrofia | + | + | - |
| con produzione di metano | - | + | - |
| con ossidazione di ammonio | + | - | - |
| Respirazione con ossigeno | + | + | + |
| Respirazione con altri accettori di elettroni | + | + | - |
| Fissazione di azoto elementare | + | + | - |
| Fotosintesi senza produzione di O_2 | + | + | - |
| Fotosintesi con produzione di O_2 | + | - | + |
| Crescita a $T > 80^\circ C$ | + | + | - |
| Crescita a $T > 100^\circ C$ | - | + | - |

a) + indica presenza della caratteristica in una parte o nella totalità dei componenti del raggruppamento; - indica che di norma la caratteristica è assente.

Figura 1.3: Differenze tra batteri, archei ed eucarioti

1.5. I BATTERI

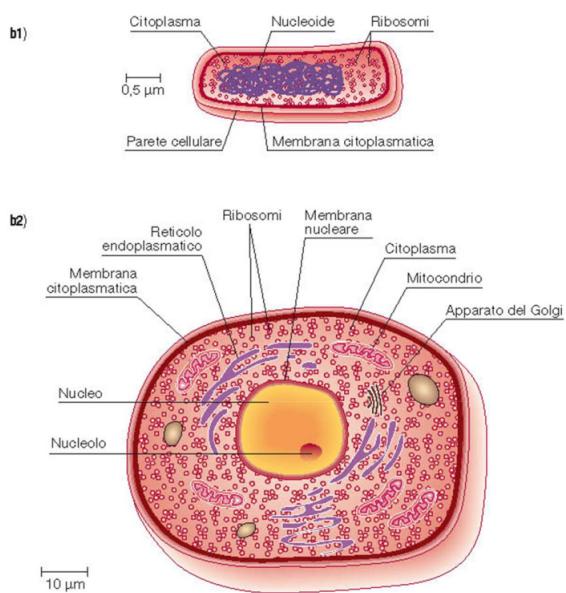


Figura 1.4: Cellula procariote ed eucariote

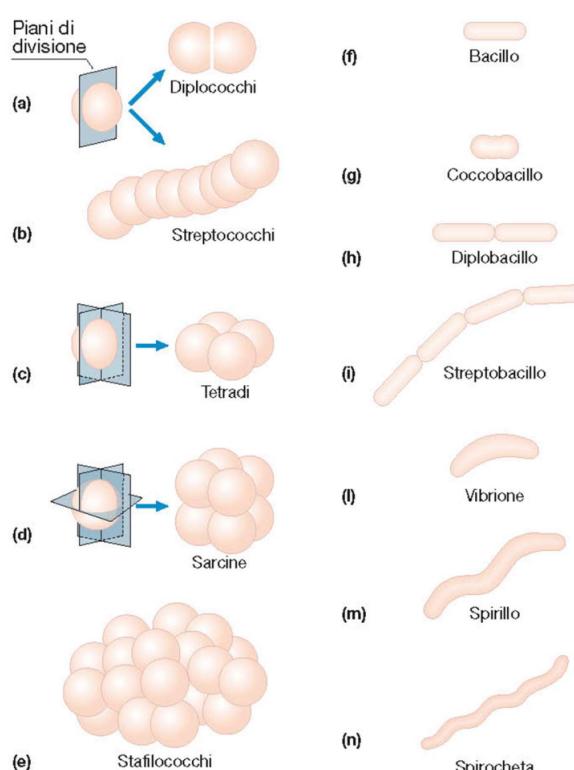


Figura 1.5: Tipiche forme di aggregati batterici

Si nota come nei procarioti manchi la compartizione cellulare.

Si noti come alcuni batteri possiedono steli o peduncoli e ife per l'acoramento al substrato.

1.5 I batteri

1.5.1 Composizione elementare

Le cellule batteriche sono composte per l'8% da idrogeno (H), per il 20% da ossigeno (O), per il 50% da carbonio (C), per il 14% da azoto (N), per il 3% da fosforo (P) e per l'1% da zolfo (S). Se lo zolfo si trova unicamente nelle proteine e il fosforo in proteine e lipidi e polisaccaridi gli altri sono presenti in tutte le marcomolecole che formano la cellula che sono:

- Polisaccaridi semplici e complessi per il 7%.
- Lipidi e lipopolisaccaridi per l'11%.
- Acidi nucleici per il 23%.
- Proteine per il 55%.

1.5. I BATTERI

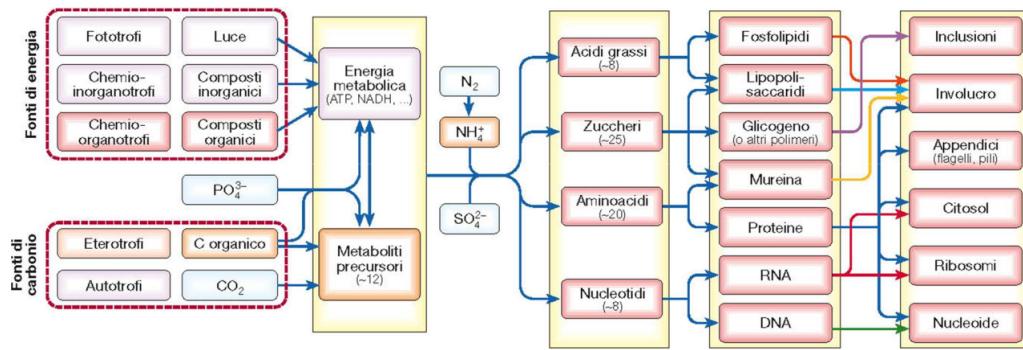


Figura 1.6: Costruzione di una cellula batterica

1.5.2 Strutture e loro funzioni

Membrana plasmatica

La membrana plasmatica è una barriera dotata di permeabilità selettiva. È il confine fisico della cellula, si occupa del trasporto di nutrienti e prodotti di rifiuto, è sede di molti processi metabolici come respirazione e fotosintesi e si occupa di rilevare gli stimoli ambientali per la chemiotassi.

Vacuolo gassoso

Il vacuolo gassoso garantisce la proprietà di galleggiamento in ambienti acquosi.

Ribosomi

I ribosomi si occupano della sintesi proteica. Sono composti principalmente da RNA e proteine.

Corpi d'inclusione

I corpi d'inclusione svolgono il compito di riserva di carbonio, fostato e altre sostanze. Sono molto variabili, composti tipicamente da carboidrati, lipidi, proteine e sostanze inorganiche.

Nucleoide

Il nucleoide è il sito del materiale genetico (DNA).

Spazio periplasmatico

Lo spazio periplasmatico contiene enzimi idrolitici e proteine per l'assorbimento dei nutrienti e il loro utilizzo metabolico. Composto da fosfolipidi e proteine.

Parete cellulare

La parete cellulare conferisce ai batteri la loro forma caratteristica e li protegge dalla lisi in soluzione ipotoniche. Composta principalmente da peptidoglicano (mureina).

1.5. I BATTERI

Capsule e strati mucosi

Le capsule e gli strati mucosi offrono resistenza alla fagocitosi e aderenza alle superfici. Sono composti da polisaccaridi o polipeptidi.

Fimbrie e pili

Le fimbrie e pili permettono adesione alle superfici e coniugazione batterica (pili sessuali). Sono composti da proteine.

Flagelli

I flagelli si occupano del movimento. Sono composti da proteine.

Endospora

Le endospore consentono la sopravvivenza in condizioni ambientali molto avverse.

Capitolo 2

La struttura della cellula

2.1 La parete cellulare

Tutti i batteri dispongono di una parete cellulare, la quale assume un ruolo strutturale, conferendo la forma specifica della specie e rigidità, e protettivo, ad esempio contro la lisi. Il citoplasma dei batteri infatti contiene un'alta concentrazione di soluti, creando una pressione osmotica significativa dell'ordine di 2atm. Lo studio della parete cellulare è stato importante non solo per capire ulteriormente i processi vitali di una cellula procariote, ma anche per la sintesi di antibiotici. Questi ultimi infatti distruggono la parete cellulare causando la morte dell'agente patogeno senza causare effetti secondari sul paziente in quanto le cellule umane sono prive di essa.

2.1.1 Peptidoglicano

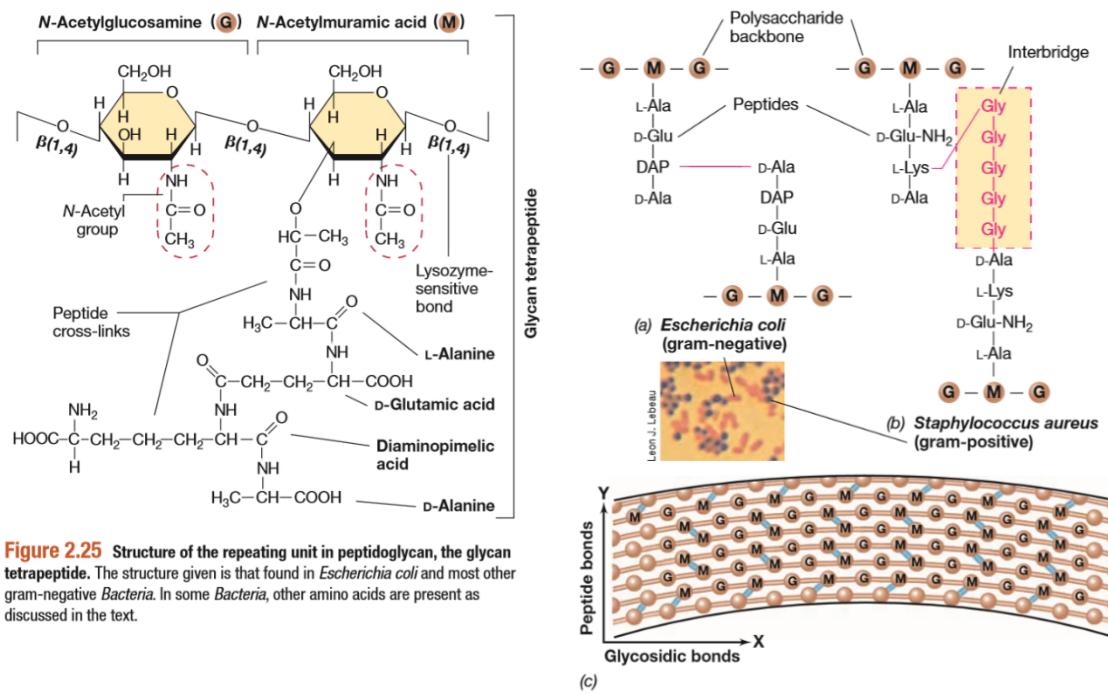
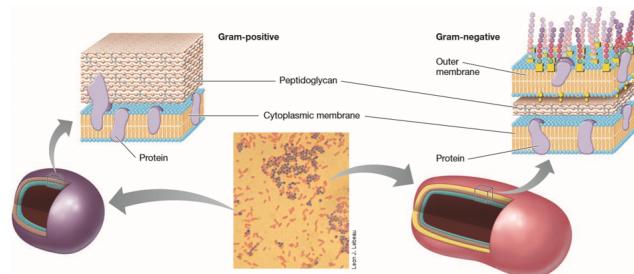


Figure 2.25 Structure of the repeating unit in peptidoglycan, the glycan tetrapeptide. The structure given is that found in *Escherichia coli* and most other gram-negative Bacteria. In some Bacteria, other amino acids are present as discussed in the text.

2.1. LA PARETE CELLULARE

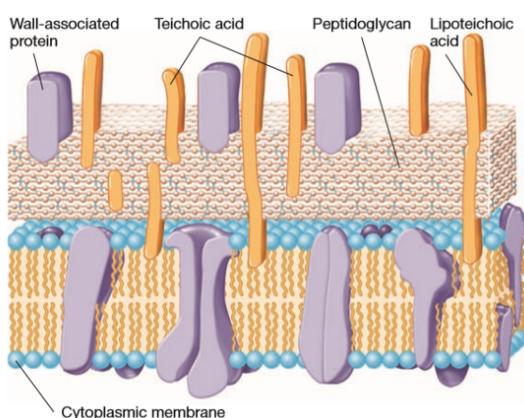
La parete cellulare dei batteri possiede uno strato di peptidoglicano (mureina) che conferisce rigidità. È un polisaccaride composto principalmente da due derivati dello zucchero, N-acetilglucosamina (NAG) e acido N-acetilmuramico (NAM), entrambi strutturalmente simili al glucosio. Lunghe catene di peptidoglicano (formate da NAM e NAG covalentemente associate) vengono sintetizzate vicine tra di loro, creando un foglio che circonda la cellula. Sono connesse da quattro amminoacidi (solitamente L-Alanina, D-Alanina D-Acido glutammico e Acido diamino-pimelico (DAP)) che formano legami crociati diretti o indiretti (con ponte peptidico) a seconda della natura della cellula. Nei batteri gram-negativi il legame crociato è formato da un legame peptidico dal gruppo amminico di DAP di una catena con il gruppo carbossile dell'ultimo D-Alanina dell'altra catena. Nei batteri gram-positivi invece, il legame spesso avviene tramite un corto ponte peptidico il cui numero e tipo di amminoacidi varia da specie a specie.

2.1.2 Parete cellulare nei gram-positivi e gram-negativi



viene estratto dall'alcol dai batteri gram-negativi ma non dai gram-positivi. Come si è visto i batteri gram-positivi hanno una parete cellulare molto spessa che consiste principalmente di peptidoglicano. Durante il Gram-staining tale parete è disidratata dall'alcol causando la chiusura dei pori della parete e impedendo al complesso cristallino di uscire. In contrasto nei batteri gram-negativi l'alcol penetra facilmente la membrana esterna ricca di lipidi ed estrae il complesso cristallino dalla cellula. Dopo il trattamento con l'alcol le cellule gram-negative sono quasi invisibili a meno che siano contro-macchiate da un secondo colorante, parte della procedura standard durante il Gram stain.

Parete cellulare nei gram+



Le pareti cellulari nel mondo dei batteri assumono principalmente due strutture diverse, che hanno portato ad una classificazione che consiste nel suddividere i microrganismi in gram-positivi e gram-negativi. Le differenze strutturali tra le pareti cellulari dei batteri gram-positivi e gram-negativi sono responsabili della reazione diversa alla reazione di gram-staining. Durante il Gram staining un complesso cristallino insolubile e violetto si forma nella cellula. Questo complesso

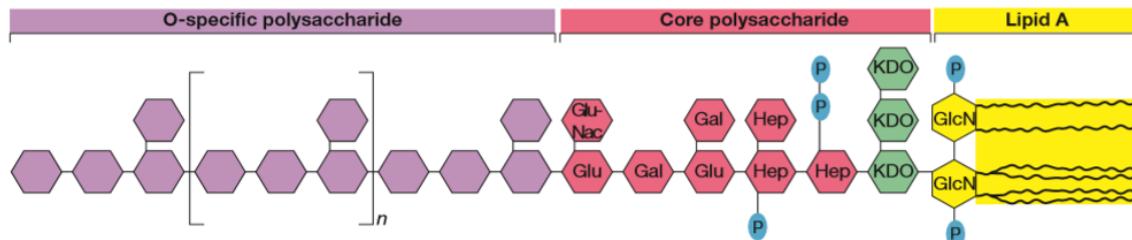
La prima differenza che si nota tra le due classificazioni di batteri è la quantità di peptidoglicano che possiedono: i gram-positivi sono infatti ricoperti da un solido strato di peptidoglicano che è anche 50 volte più spesso di quello dei gram-negativi, che invece ne possiedono solo un piccolo strato chiuso tra due membrane cellulari. Nei gram-positivi il 90% della parete cellulare è formato da diversi "fogli" di peptidoglicano sovrapposti (alcuni presentano un solo strato). Si pensa che il peptidoglicano sia sinte-

2.1. LA PARETE CELLULARE

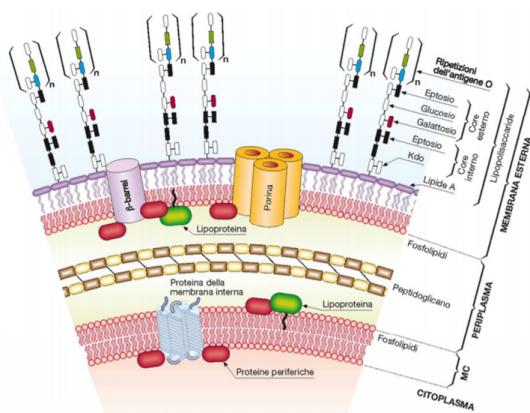
tizzato in "tupi" di 50nm di dimensione, i quali contengono al loro interno legami crociati di fili di glicano. Mentre questi tubi vengono sintetizzati, formano legami tra di loro aumentando la stabilità della struttura. Oltre alle proteine che svolgono la funzione di trasporto e strutturale i

gram-positivi presentano sulla parete cellulare anche acidi teicoici e lipoteicoici. Il termine "acidi teichoici" comprende tutte le pareti cellulari, la membrana citoplasmica e i polimeri capsulari composti da fosfato glicerol o fosfato di ribitololo (pag73 pdf?????). Gli acidi teichoici sono legati covalentemente all'acido muramico nella parete. Poiché i fosfati sono caricati negativamente, gli acidi teichoici sono in parte responsabili della carica elettrica negativa complessiva della superficie cellulare. Hanno anche la funzione di legare Ca_2^+ e Mg_2^+ per l'eventuale trasporto nella cellula. Alcuni di essi sono legati covalentemente ai lipidi della membrana, e questi sono chiamati acidi lipoteichoici. Gli acidi lipoteicoici assumono quindi la funzione di ancoraggio della parete alla membrana citoplasmatica. Microplasma, batteri patogeni legati ai batteri gram-positivi che causano diverse malattie infettive degli esseri umani e di altri animali, thermoplasma e simili, specie di Archaea riescono a vivere anche se non possiedono una parete cellulare. Questi organismi sono in grado di sopravvivere senza parete cellulare perché contengono membrane citoplasmiche insolitamente forti o perché vivono in habitat osmoticamente protetti come il corpo animale. La maggior parte dei microplasma hanno steroli nelle loro membrane citoplasmiche, e queste molecole conferiscono forza e rigidità alla membrana, come fanno nelle membrane citoplasmiche delle cellule eucariotiche. Anche le membrane dei termoplasma contengono molecole chiamate lipolicani che svolgono una funzione di rafforzamento simile.

Parete cellulare nei gram-



2.1. LA PARETE CELLULARE

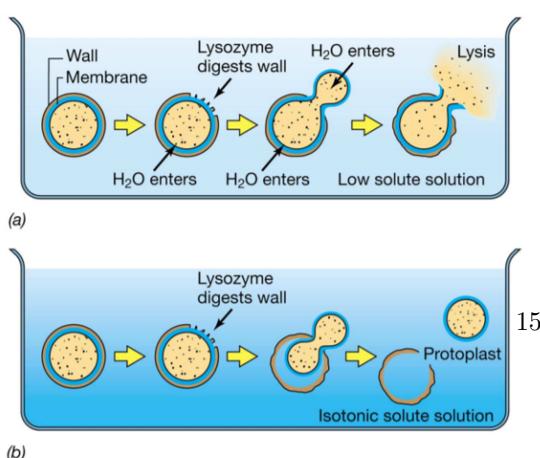


smatica si diffondono all'esterno dalla cellula. Queste proteine sono presenti in una regione chiamata periplasma. Questo spazio, situato tra la superficie esterna della membrana citoplasmica e la superficie interna della membrana esterna, è largo circa 15nm. Il periplasma ha una consistenza simile a quella di un gel, dovuta all'alta concentrazione di proteine. A seconda dell'organismo, il periplasma può contenere diverse classi di proteine:

- Enzimi idrolitici: svolgono un ruolo nella degradazione iniziale delle molecole alimentari.
- Proteine leganti: iniziano il processo di trasporto dei substrati.
- chemiorecettori: proteine che governano la risposta chemiotattica.

La maggior parte di esse raggiunge il periplasma tramite un sistema di esportazione di proteine presente nella membrana citoplasmatica. La membrana esterna è solo in parte impermeabile alle piccole molecole per la presenza di porine, proteine che fungono da canali per l'entrata e l'uscita di soluti. Sono note diverse porine, tra cui classi specifiche e non specifiche. Le porine non specifiche formano canali pieni d'acqua attraverso i quali può passare qualsiasi piccola sostanza, mentre quelle specifiche contengono un sito di legame per solo una o un piccolo gruppo di sostanze strutturalmente correlate. Strutturalmente, le porine sono proteine transmembrana composte da tre sotto unità identiche. Oltre ai tre canali principali che si vengono a formare, nel centro della porina si trova un piccolo foro di circa 1nm di diametro attraverso il quale possono viaggiare molecole estremamente piccole.

2.1.3 Lisozima



L'enzima lisozima è una proteina che può rompere i legami $\beta(1,4)$ degli zuccheri NAM-

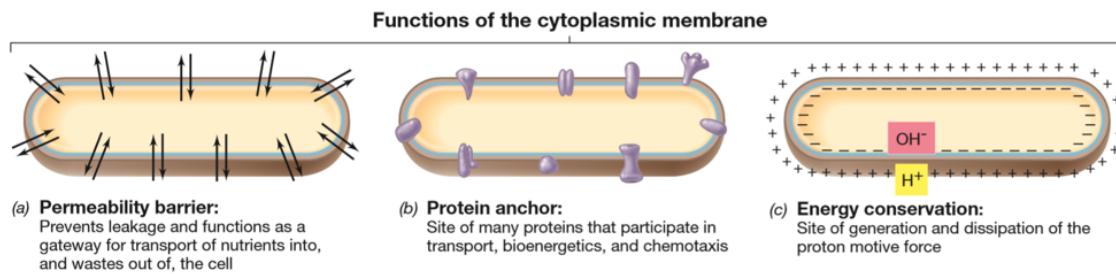
2.2. LA MEMBRANA CITOPLASMATICA

NAG.

seguito all'ingresso di acqua nella cellula

- (a) In una soluzione diluita (ipotonica) la degradazione della parete con il lisozima rilascia il protoplasto che va incontro a lisi in
- (b) In una soluzione isotonica non c'è nessun movimento netto di acqua tra ambiente e protoplasti ed essi rimangono stabili.

2.2 La membrana citoplasmatica

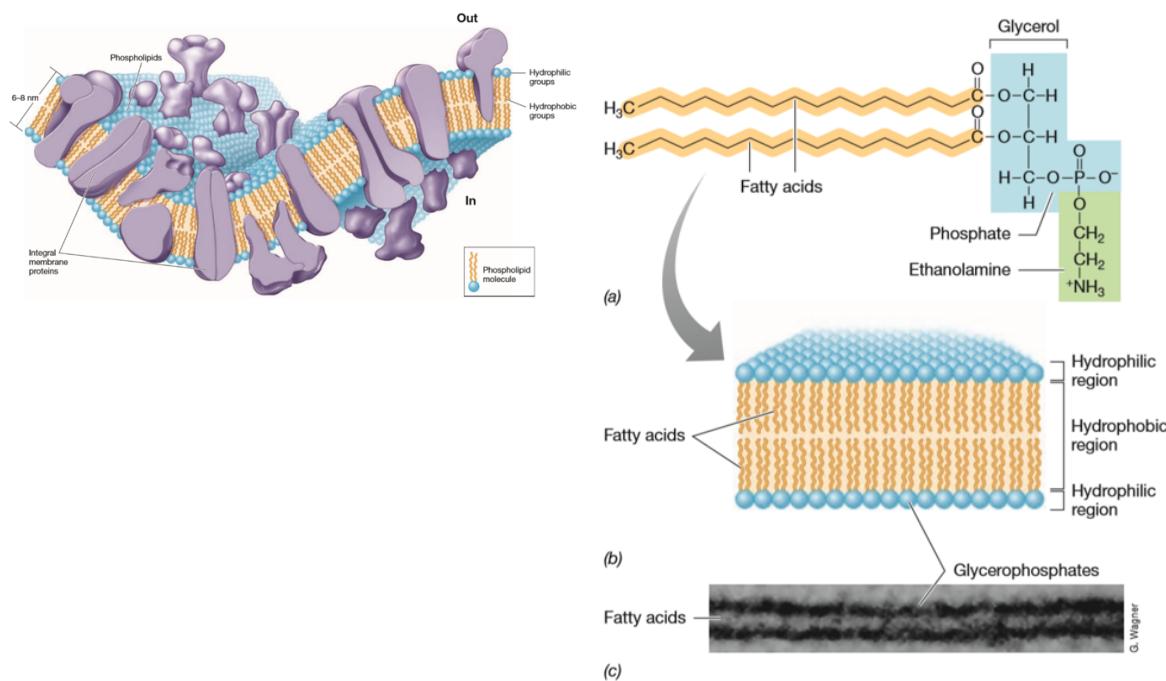


La membrana citoplasmatica circonda il citoplasma e lo separa dall'ambiente. Nel caso in cui la membrana citoplasmatica sia compromessa, l'integrità della cellula viene distrutta, il citoplasma si disperde e di conseguenza il batterio muore. La membrana non è così rigida da conferire un'adeguata protezione contro la lisi, ma la sua mobilità le permette di svolgere la sua funzione principale: la permeabilità selettiva. Non solo, la membrana funge anche da sito di ancoraggio per proteine che sono coinvolte in alcuna attività e da conservatrice di energia.

2.2.1 La struttura

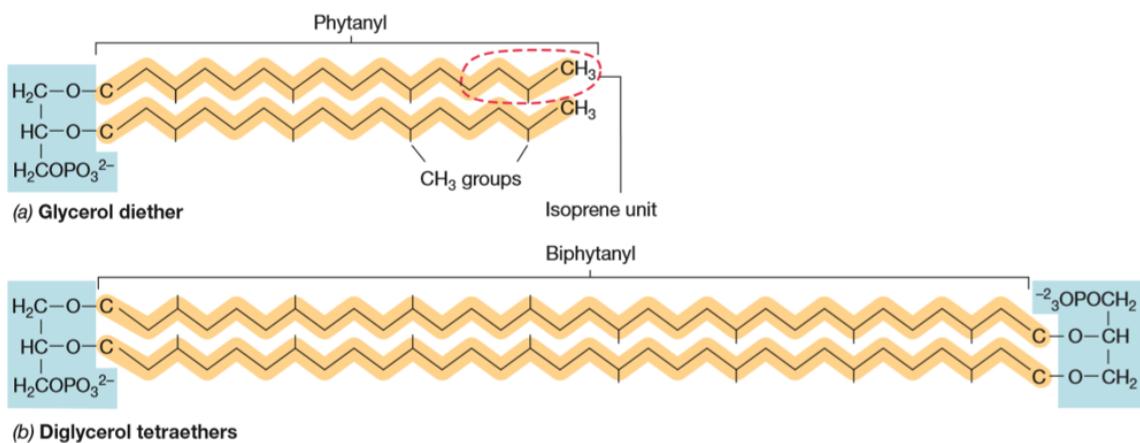
La struttura generale della membrana è quella di un doppio strato fosfolipidico. I fosfolipidi sono molecole composte da una coda idrofobica (acidi grassi) e una testa idrofila (glicerolo-fosfato) (Figura 2.14). Quando i fosfolipidi si aggregano in una soluzione acquosa, formano naturalmente bistrati. In una membrana fosfolipidica, le code puntano verso il centro del bistrato per formare un ambiente idrofobico, e le teste rimangono esposte all'ambiente esterno o al citoplasma. Gli acidi grassi comuni nella membrana citoplasmatica hanno catene da 14 a 20 atomi di carbonio. Le membrane citoplasmiche di alcuni batteri sono rafforzate da molecole simili allo sterolo chiamate opanoidi. Gli steroli sono molecole rigide e planari che funzionano per rafforzare le membrane delle cellule eucariote, e gli opanoidi svolgono una funzione simile nei batteri. La membrana contiene inoltre un alto numero di proteine, che hanno tipicamente superfici idrofobe in regioni che attraversano la membrana e superfici idrofile in regioni che sono a contatto con l'ambiente e il citoplasma. Molte di esse sono saldamente incorporate nella membrana e sono chiamate proteine integrali. Altre hanno una porzione ancorata nelle regioni della membrana e dell'extramembrana che puntano dentro o fuori la cellula. Altre proteine ancora, chiamate proteine della membrana periferica, non sono incorporate nella membrana, ma rimangono comunque associate alla sua superficie. Alcune di queste proteine periferiche sono le lipoproteine, molecole che contengono una coda lipidica che ancora la proteina alla membrana. Le proteine della membrana periferica in genere interagiscono con le proteine integrali della membrana in importanti processi cellulari come il metabolismo energetico e il trasporto. Spesso le proteine che devono interagire tra loro in qualche processo sono tipicamente raggruppate in cluster per consentire loro di rimanere adiacenti l'una all'altra nell'ambiente semifluido della membrana.

2.3. MEMBRANA E PARETE DEGLI ARCHAEA

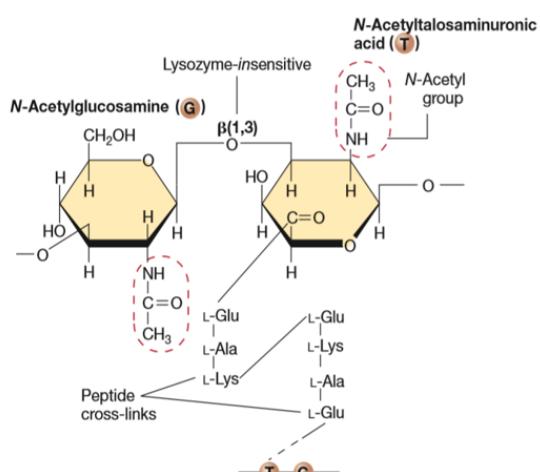
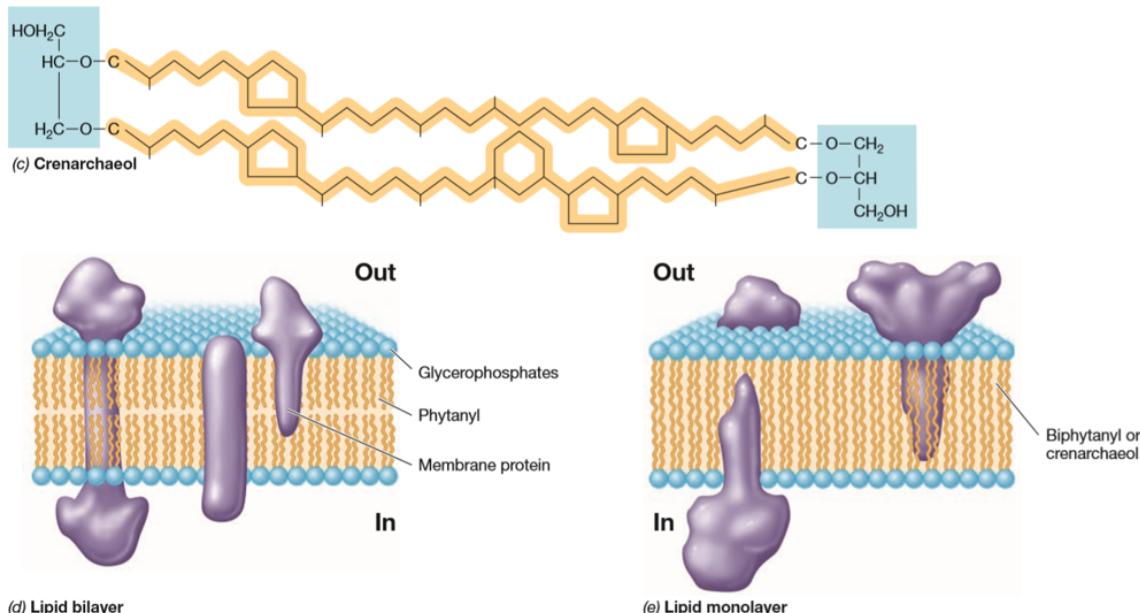


2.3 Membrana e parete degli archaea

In contrasto con i lipidi di batteri ed Eukarya in cui ci sono legami estere tra acidi grassi e glicerolo, i lipidi degli Archaea contengono legami etere tra glicerolo e le loro catene laterali idrofobiche (catena alifatica). I lipidi degli Archaea mancano quindi di acidi grassi, di per sé, anche se le catene laterali idrofobiche svolgono lo stesso ruolo funzionale degli acidi grassi.



2.3. MEMBRANA E PARETE DEGLI ARCHAEA



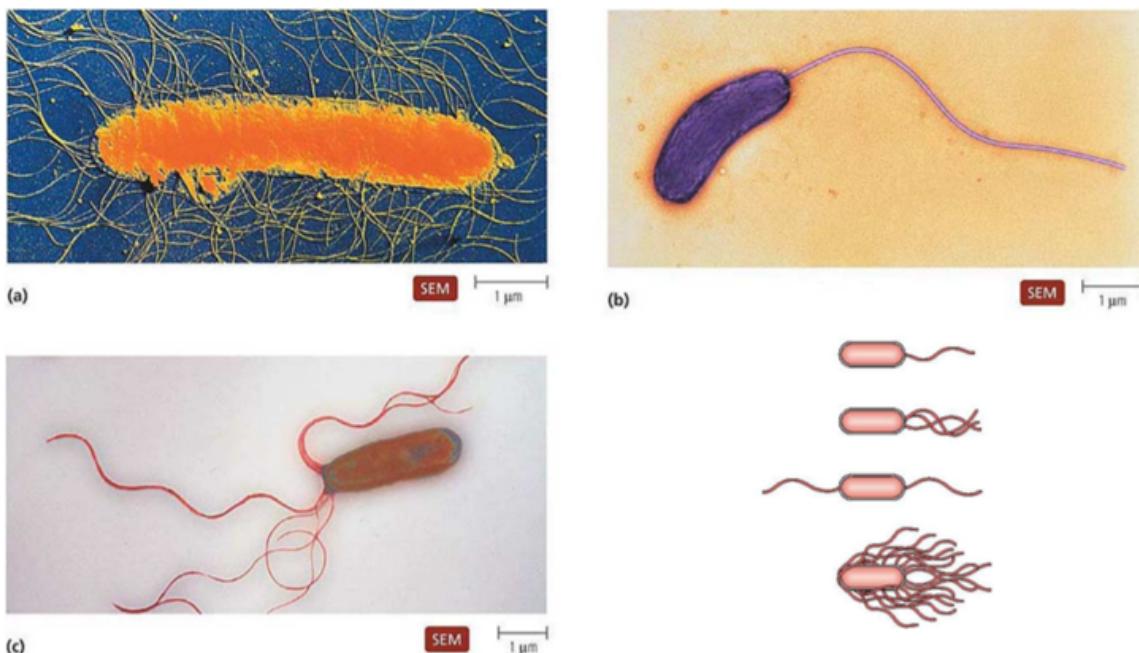
Le principali differenze sono le catene isopreniche e il fatto che alcune sono a monostrato invece che bistrato. A differenza dei bistrati lipidici, le membrane monostrato lipidiche sono estremamente resistenti al calore e sono quindi ampiamente distribuite tra Archaea ipertermofili, organismi che crescono a temperature superiori a 80 gradi centigradi. Esistono anche membrane con una miscela di carattere bistrato e monostrato, con alcuni dei gruppi idrofobici opposti covalentemente legati e altri no. Un'altra differenza tra i batteri e gli Archaea è la frequente assenza sia di una parete cellulare, sia di una membrana esterna, che vengono sostituiti da una grande varietà di diverse pareti cellulari, alcune delle quali hanno delle bio-componenti molto simili a quelle dei batteri, come polisaccaridi, proteine e glicoproteine. Alcuni archaea metanogeni (producono metano) hanno una parete costituita da pseudopeptidoglicano, costituita da NAG e, al posto di avere il NAM, ha l'acido N-acetyltaulosaminuronic acid (NAT). Questo porta ad avere legami $\beta(1,3)$, che li rende insensibili al lisozima e alla penicillina, che invece nei batteri distruggerebbero il peptidoglicano o ne arresterebbero la sua biosintesi. Alcuni archaea possiedono ulteriori polisaccaridi diversi anche dallo pseudopeptidoglicano.

tuita da NAG e, al posto di avere il NAM, ha l'acido N-acetyltaulosaminuronic acid (NAT). Questo porta ad avere legami $\beta(1,3)$, che li rende insensibili al lisozima e alla penicillina, che invece nei batteri distruggerebbero il peptidoglicano o ne arresterebbero la sua biosintesi. Alcuni archaea possiedono ulteriori polisaccaridi diversi anche dallo pseudopeptidoglicano.

2.4 Locomozione microbica

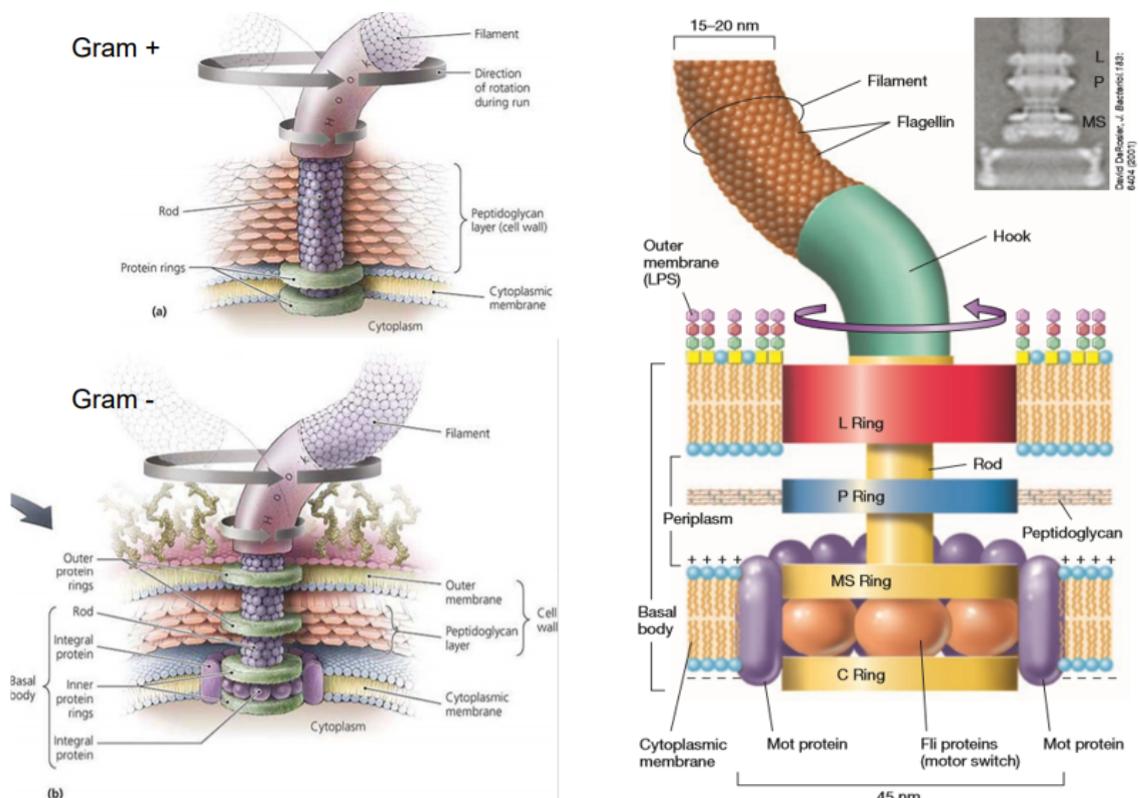
Molti batteri hanno la capacità di potersi muovere sotto il loro controllo, spesso con l'aiuto di strutture chiamate flagelli che permettono loro di rispondere a degli stimoli ambientali, detti tassi. I due principali tipi di movimento sono nuotare e moto a scorrimento (gliding).

2.4.1 Il flagello



I flagelli batterici sono lunghe e sottili appendici libere da un'estremità e attaccate alla cellula all'altra estremità. I flagelli batterici sono così sottili (15-20nm, a seconda della specie) che un singolo flagello non può essere visto dalla microscopia ottica a meno che non sia macchiato per aumentarne il diametro. Tuttavia, i flagelli sono facilmente visibili con il microscopio elettronico. I flagelli differiscono per numero e posizione a seconda della specie. Possono assumere un'organizzazione peritrica (peritrichous) (a) quando numerosi flagelli sono distribuiti su tutta la superficie cellulare. Flagelli polari si trovano soltanto alle estremità della cellula (b). L'organizzazione lofotrica (lophotrichous) (c) indica la presenza di più di un flagello polare.

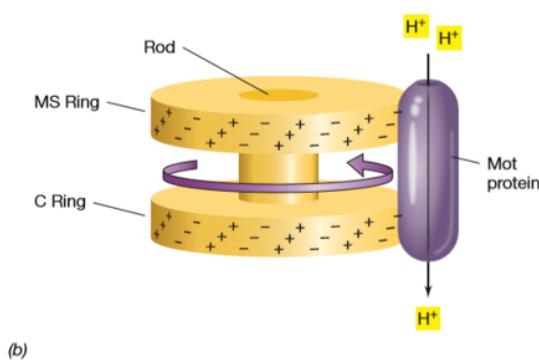
2.4. LOCOMOZIONE MICROBICA



Il flagello è un'elica la cui la distanza tra curve adiacenti è costante. Questa lunghezza d'onda è una caratteristica che differisce da specie a specie. È composto principalmente da tre parti: il filamento, l'uncino (hook) e la base. Mentre le prime due hanno una composizione chimica e una struttura molto simile tra i vari batteri, il modo in cui il batterio sia gram-positivo o gram-negativo. Il filamento è composto da molte copie della proteina flagellina. La forma e la lunghezza d'onda del flagello sono in parte determinate dalla struttura della proteina flagellina e in dalla direzione di rotazione del filamento. La sequenza di amminoacidi della flagellina è altamente conservata in specie di batteri, suggerendo che la motilità dei flagelli si è evoluta presto e ha radici profonde all'interno di questo dominio. L'uncino è chimicamente diverso dal filamento ed è costituito da un solo tipo di proteina. La base è ancorata alla membrana citoplasmatica e alla parete cellulare e ha una funzione meccanica, con un funzionamento analogo a quello di un motore a propellenza. Il motore consiste in un'asta centrale, chiamata bastoncello, che attraversa diversi anelli. Nei batteri gram-positivi, che non hanno una membrana esterna, possiedono solo la coppia di anelli più interna. Intorno all'anello interno e ancorato nella membrana citoplasmatica c'è una serie di proteine chiamate proteine Mot. Un insieme finale di proteine, chiamate proteine Fli, funzionano come l'interruttore del motore, invertendo la direzione di rotazione del flagello in risposta ai segnali intracellulari. Nei batteri gram-negativi, un anello esterno, chiamato anello L, è ancorato nello strato di lipopolissaccaride. Un secondo anello, chiamato anello P, è ancorato nello strato di peptidoglicano della parete cellulare. Una terza serie di anelli, chiamati anelli MS e C, si trovano rispettivamente all'interno della membrana citoplasmatica e del citoplasma.

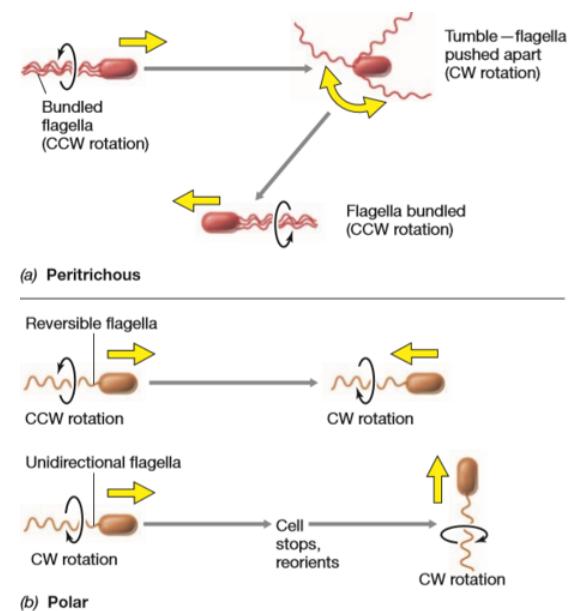
2.4. LOCOMOZIONE MICROBICA

2.4.2 Il movimento flagellare



verso i canali delle proteine Mot esercitano forze elettrostatiche su cariche disposte ad elica sulle proteine del rotore. Le attrazioni tra cariche positive e negative causano quindi la rotazione del corpo basale man mano che i protoni scorrono attraverso le proteine Mot.

Il movimento flagellare nelle diverse categorie



Il flagello è un piccolo motore rotativo. Questi motori contengono due componenti principali: il rotore e lo statore. Nel motore del flagello, il rotore è costituito dall'asta centrale e dagli anelli L, P, C e MS. Collettivamente, queste strutture costituiscono il corpo basale. Lo statore è costituito dalle proteine Mot che circondano il corpo basale e generano momento. La rotazione del flagello è impartita dal corpo basale. L'energia necessaria per la rotazione del flagello proviene dalla forza protomotrice. Il movimento dei protoni attraverso la membrana citoplasmica attraverso il complesso Mot aziona la rotazione del flagello. Circa 1000 protoni sono traslocati ad ogni rotazione del flagello. In questo modello di turbina protonica, i protoni che scorrono attraverso i canali delle proteine Mot esercitano forze elettrostatiche su cariche disposte ad elica sulle proteine del rotore. Le attrazioni tra cariche positive e negative causano quindi la rotazione del corpo basale man mano che i protoni scorrono attraverso le proteine Mot.

Viene descritto il movimento in procarioti peritrichous e polarizzati.

- Peritrichous: il movimento in avanti è causato da tutti i flagelli che rotano in senso antiorario (CCW) in un fascio. La rotazione oraria (CW) causa un "ruzzolamento" (tumble) della cellula, che le permette di modificare la direzione all'inizio di una nuova rotazione dei flagelli in senso antiorario.
- Polare: la cellula cambia direzione invertendo la rotazione flagellare passando dal tirare allo spingere la cellula o, con flagelli unidirezionali, fermandosi periodicamente per riorientarsi e successivamente muovendosi in avanti attraverso una rotazione in senso orario.

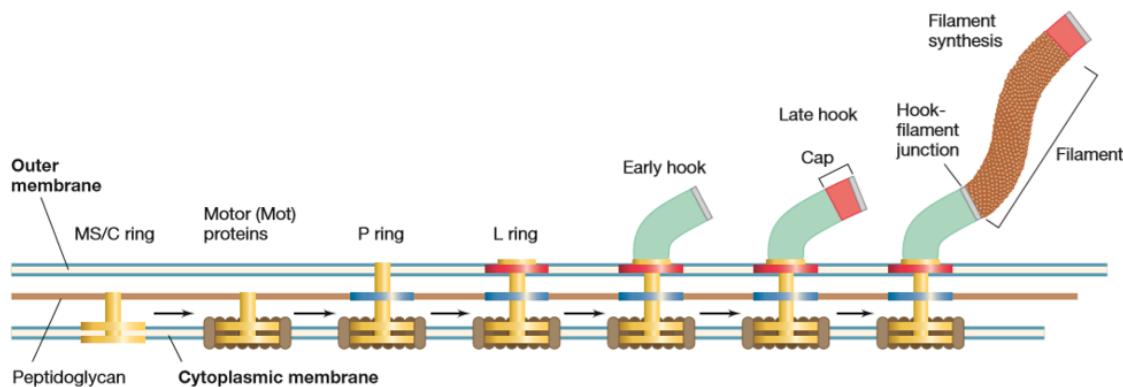
La freccia gialla mostra la direzione in cui la cellula si sta muovendo.

2.4.3 La sintesi flagellare

La sintesi del flagello non avviene alla base, come ad esempio i capelli umani, ma dalla pun-

2.4. LOCOMOZIONE MICROBICA

ta. Per primo viene sintetizzato l'anello MS ed inserito nella membrana citoplasmatica. Successivamente altre proteine di ancoraggio vengono sintetizzate insieme all'uncino, prima che il filamento cominci a formarsi. Le subunità di flagellina, sintetizzate nel citoplasma, vengono estruse attraverso un canale di 3nm all'interno del filamento e si aggiungono alla fine per formare il flagello maturo. Un "cap" proteico è presente alla fine del flagello in crescita, che aiuta le molecole di flagellina che si sono diffuse attraverso il canale del filamento ad assemblarsi in modo corretto.



2.4.4 I flagelli negli spirochetti

Nei batteri "spirochetti", ossia che assumono una forma a spirale, i flagelli sono assiali e si trovano tra la membrana citoplasmatica e quella esterna (sono gram-negativi). La rotazione dell'endoflagello porta l'intera cellula a ruotare su se stessa in un movimento elicoidale che consente lo spostamento anche in ambienti molto viscosi.



Capitolo 3

Popolazione batterica

Il grafico a slide 29 mostra le scale logaritmiche (andamento in moltiplicazioni di 10) e aritmetiche per mostrare l'andamento della popolazione batterica. Il tempo di generazione può essere calcolato come:

- N il numero finale di cellule.
- N_0 il numero iniziale di cellule.
- n il numero di generazioni.
- $N = N_0 2^n$.
- $n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$.

La popolazione ha un andamento in quattro fasi: latenza (assenza di crescita significativa, le cellule costituiscono tutte le operazioni necessarie alla crescita), esponenziale (crescita massima), stazionaria (la popolazione si stabilizza per mancanza di spazio e nutrienti, il numero di cellule che si dividono è uguale a quello di quelle che muoiono), morte (esponenziale ma più lenta della fase di crescita, causata da assenza di nutrienti e l'accumulo di materiale di scarto tossico).

3.0.1 Conta vitale

Piastre con lo spread-plate method con terreno solido con un volume di colura ($100\mu l$), dopo una notte si osserva il numero di colonie. Nel pour-plate method si aggiunge il terreno successivamente alla coltura. Per determinare quante colonie sono presenti si fa una diluizione seriale: si prende un ml di coltura e lo si aggiunge a $9ml$ di terreno, ripetendo l'operazione fino a che si riesce a stimare la popolazione micròbica (tra le 30 e le 300 colonie per avere una conta affidabile). Alla conta si moltiplica per l'inverso della diluizione. È importante ovviamente segnare i tempi in quanto la popolazione varia nel tempo. Misura solo le cellule vive.

3.0.2 Misura della torbidità

Avviene attraverso uno spettrofotometro: una fonte di luce è presente e attraversa un campione in una cuvetta con del terreno di coltura. Una fotocellula misura la quantità di luce che è riuscita ad attraversare la cuvetta. La misura calcolata è la densità ottica (OD) il logaritmo della luce incidente diviso il valore della luce non deviata. Valore compreso tra 0 e 1. Può generare una sovrastima in

3.1. SISTEMI DI COLTIVAZIONE MICROBICA

quanto non distingue tra cellule vive e cellule morte. A differenza della conta vitale in caso di alti valori di OD la misura tende a perdere di precisione in quanto i raggi di luce in alte concentrazioni possono rimbalzare più volte e colpire lo stesso il sensore. Quando si raggiunge un OD di 0.6-0.7 si diluisce la coltura. Quando si lavora con campioni ambientali bisogna concentrare il campione, pertanto si filtra a vuoto con filtro di membrana che trattiene le cellule batteriche in quanto più grandi dei pori e le rende osservabili e vengono messe su un terreno di coltura.

3.0.3 Most Probable Number

Utilizzata per stimare la popolazione microbica all'interno di un campione. Un metodo statistico basato sul fatto che maggiore la concentrazione della popolazione, maggiori le diluizioni necessarie per portare questo numero a 0. Prendo un campione, lo diluisco serialmente e partendo da ciascuna diluizione si incuba in 5 tubi un millilitro con un indicatore di pH che ritorna giallo quando il pH si abbassa, indicamento di metabolismo attivo e di presenza microbica. Si contano quanti tubi hanno cambiato colore. Nel campione più concentrato ci sono più campioni positivi. E si ottiene un codice, il numero di tubi positivi per ciascuna diluizione. Che può essere letto attraverso una tabella di riferimento.

3.1 Sistemi di coltivazione microbica

3.1.1 Chemostato

Utilizzati per volumi molto grandi (si dice in batch per una coltura in un sistema chiuso e rapidamente si arriva a saturazione), questo è un sistema che consente di mantenere la coltura in crescita esponenziale per tempi indefiniti. C'è la necessità di un rubinetto che regola la sterilità e un altro che elimina l'overflow. C'è sempre terreno fresco che entra e esausto che esce insieme alle cellule. All'equilibrio il volume del chemostato, il numero di densità e la concentrazione dei nutrienti rimangono costanti. La velocità di crescita è pertanto determinata dalla velocità di flusso, ovvero la concentrazione del nutriente limitante. INSERIRE GRAFO BATCH INSERIRE GRAFO CHEMOSTATO

Capitolo 4

Meccanismi di trasporto cellulare

La membrana citoplasmatica svolge numerose e fondamentali funzioni:

- **Barriera di permeabilità:** previene la dispersione di sostanze e funziona come una porta di controllo per il trasporto di nutrienti verso l'interno e di sostanze di scarto verso l'esterno della cellula;
- **Sito di ancoraggio:** sito di ancoraggio di molte proteine coinvolte nel trasporto, nella bioenergetica e nella chemiotassi;
- **Conservazione dell'energia:** sito di generazione e di utilizzazione della forza proton-motrice.

4.1 Tipologie di trasporto

Ci sono 3 tipi di trasporto principali:

1. **Diffusione passiva:** le molecole possono passare liberamente e secondo gradiente;
2. **Diffusione facilitata:** le molecole possono passare ma hanno bisogno di particolari canali. Vanno anche esse secondo gradiente;
3. **Trasporto attivo:** molecole che necessitano un canale appropriato e l'apporto di ATP, dato che si muovono contro-gradiente.

4.1.1 Diffusione passiva

Le molecole si muovono dalla regione a più alta concentrazione a quella a più bassa per agitazione termica. Si possono diffondere liberamente molecole di H₂O, O₂ e CO₂.

4.1.2 Diffusione facilitata

È simile alla diffusione passiva:

- Movimento di molecole non energia dipendente;
- Direzione del movimento da alta a bassa concentrazione;

4.1. TIPOLOGIE DI TRASPORTO

- Il valore del gradiente di concentrazione incide sul tasso di assorbimento.

Differisce dalla diffusione passiva:

- Uso di molecole trasportatrici (carrier o permeasi);
- Un minore gradiente di concentrazione è necessario per un significativo assorbimento delle molecole;
- trasporta glicerolo, zuccheri ed aminoacidi.

Esistono vari tipi di diffusione facilitata:

- **Non specifico** → alcune proteine consentono il passaggio di molecole di una certa dimensione o carica elettrica;
- **Specifico** → le proteine permeasi sono più specifiche grazie ad un sito di legame per il substrato del trasportatore.

Osmosi

L'osmosi è un esempio di diffusione facilitata. È la diffusione di acqua attraverso una membrana selettivamente permeabile, dal compartimento con minor concentrazione di soluti verso quello con la maggior concentrazione di soluti.

Una membrana separa due soluzioni con diverse concentrazioni. Questa membrana è permeabile all'acqua ma non ha soluti. L'acqua si sposta verso il compartimento con maggiore concentrazione in soluti. Quindi la pressione osmotica contrasta la forza di gravità. In base alla differenza di concentrazione si possono definire tre tipologie di ambienti:

- **Isotonica** → nessun movimento netto di acqua;
- **Ipertonica** → uscita di acqua causando la diminuzione del volume cellulare;
- **Ipotonica** → ingresso di acqua nella cellula che porta la lisi delle cellule prime di parete.

Dato che i batteri presentano una parete cellulare sono in grado di resistere bene ai vari stress osmotici.

4.1.3 Trasporto attivo

Il trasporto attivo richiede energia per movimentare le sostanze contro il proprio gradiente di concentrazione. Questa energia viene fornita dall'idrolisi dell'ATP o dalla forza proton-motrice. Possono essere di diverso tipo:

- **Uniporto** → portano un solo tipo di sostanza in una sola direzione;
- **Antiporto** → portano due tipi di sostanze in direzioni opposte (una fuori e l'altra dentro);
- **Simporto** → portano due molecole diverse nella stessa direzione.

Un esempio è l'assunzione del lattosio in *E. coli* tramite Lac permeasi.

La lac permeasi richiede energia per importare il lattosio nella cellula. Man mano che trasporta il lattosio, l'energia della forza proton-motrice si riduce a causa del trasporto simultaneo di protoni all'interno della cellula.

Esistono tre tipi di movimenti:

4.2. SISTEMI DI TRASLOCAZIONE NEI PROCARIOTI

1. **Trasporto semplice** → guidato dall'energia associata alla forza proton-motrice;
2. **Traslocazione di gruppo** → modificazione chimica della sostanza trasportata guidata dal fosfoenolpiruvato. Per esempio, viene utilizzato per far entrare nella cellula il glucosio. Il glucosio viene traportato attraverso un canale e modificato chimicamente con l'aggiunta di un gruppo fosfato. Nella fosforilazione del glucosio a glucosio 6-P è il primo stadio del suo metabolismo cellulare: la glicolisi. Il sistema prepara il glucosio in modo che possa essere immediatamente assunto in una via metabolica;
3. **Sistema ABC (ATP - Binding Cassette)** → coinvolge le proteine periplasmatiche di legame e l'energia proviene dall'ATP. Vengono impiegati tre componenti:
 - proteine di legame periplasmatiche;
 - proteine integrali di membrana;
 - proteine per l'idrolisi dell'ATP.

Le proteine di legame periplasmatiche mostrano un'elevata affinità per il loro substrato; una volta sequestrato, esso forma un complesso che interagisce con la proteina integrale di membrana. È un processo altamente specifico per vari tipi di substrato, come zuccheri, aminoacidi, solfati, fosfati, metalli, e sensibile.

I gram-negativi richiedono un sistema di trasporto più complicato rispetto a quello dei gram-positivi. Per esempio il trasporto di ferro nei gram-negativi richiede un sistema ABC e l'uso della forza proton-motrice (attraversamento della membrana esterna tramite un recettore TonB-dipendente). Questo è un sistema combinato, dove:

1. ABC serve per l'attraversamento della membrana interna;
2. Enterochelina riconosce il ferro e lo passa alla proteina sottostante.

4.2 Sistemi di traslocazione nei procarioti

La traslocazione è il trasferimento di una proteina da un comportamento ad un altro. Molte proteine necessitano di essere trasportate fuori dalla cellula o di essere inserite in modo specifico nella membrana. Nei procarioti l'esportazione delle proteine avviene attraverso l'attività di proteine chiamate traslocasi.

Il riconoscimento di una proteina da parte del sistema Sec avviene prima che venga ultimata la sintesi del ribosoma. La prima regione a venire sintetizzata a livello della porzione N-terminale delle proteine è un sito di riconoscimento che si chiama sequenza segnale. La sequenza segnale è formata da 15-30 aminoacidi:

- Porzione idrofila basica;
- Regione idrofoba;
- Porzione polare.

Nel momento in cui la proteina viene portata fuori, viene rimossa la sequenza segnale.

4.2. SISTEMI DI TRASLOCAZIONE NEI PROCARIOTI

4.2.1 Via di secrezione dipendente da Sec

Questa via di secrezione è formata da 3 componenti:

- Complesso transmembrana;
- "Motore" citoplasmatico che fornisce l'energia;
- Sistema citoplasmatico che riconosce le proteine da trasportare.

Normalmente questa via è composta da vari passaggi:

1. Il ribosoma traduce l'mRNA per la proteina da trasportare;
2. SecB lega la proteina nascente e ne rallenta il ripiegamento aiutandola a raggiungere il complesso di membrana;
3. SecA lega SecB e porta la proteina a prossimità di SecYEG;
4. SecB rilascia la proteina; il legame dell'ATP a SecA ne cambia la conformazione, iniziando il processo di traslocazione;
5. L'idrolisi dell'ATP in ADP + P_i fornisce l'energia necessaria alla traslocazione;
6. La sequenza segnale viene rimossa da una peptidasi segnale.

Alcune proteine non devono essere portate all'esterno, ma devono essere inserite nella membrana come canali o strutture per il riconoscimento. Per fare questo viene utilizzato il sistema SRP, che è costituito da una proteina e da una molecola di RNA.

1. SRP lega una specifica sequenza segnale della proteina nascente;
2. FtsY lega il complesso SRP-ribosoma e lo indirizza alla membrana, verso il complesso SecY o verso un'altra proteina di membrana, YidC;
3. La proteina si ripiega all'interno della membrana nella sua conformazione funzionale.

4.2.2 Sistema di secrezione di tipo II

È un sistema altamente specifico e viene utilizzato per:

- Produzione di tossina, cellulasi, proteasi, lipasi in molti batteri patogeni;
- assemblaggio di strutture superficiali come i pili.

Funzionamento:

1. Attraversamento della membrana con il sistema Sec;
2. Taglio della sequenza sengale nel periplasma e ripiegamento della proteina;
3. Secrezione attraverso il complesso di Golgi che fornisce anche l'energia necessaria tramite l'idrolisi di ATP o GTP.

4.3. VIE DELLE SECREZIONI INDEPENDENTI DA SEC

4.2.3 Sistema di secrezione a 2 partner (TPS, Two Partner Secretion)

È un sistema costituito da una singola proteina di trasporto che funge da canale. Infatti questo tipo di secrezione non ha un canale dedicato già presente.

La proteina trasportata (TpsA) possiede, oltre alla sequenza segnale, un dominio TPS importante per il riconoscimento della proteina canale (TpsB) che ne media il trasporto.

Una volta secreta, la proteina può rimanere associata alla superficie del batterio o rilasciata nell'ambiente extracellulare.

4.2.4 Sistema dell'autotrasporto, tipo V

In questa via la proteina non necessita di altri fattori: il dominio C-terminale della proteina ne media la secrezione.

La sequenza segnale N-terminale viene riconosciuta e traslocata attraverso Sec nel periplasm; il dominio interno passa nel periplasma (passenger domain, dominio funzionale della membrana). Poi il dominio C-terminale va a formare il canale di trasporto. Avviene il taglio della proteina funzionale tramite autoproteolisi o proteolisi mediata da una proteasi specifica nella membrana esterna.

4.2.5 Secrezione attraverso la via "chaperon/usher"

Questa via viene utilizzata per la secrezione e l'assemblaggio di strutture della superficie cellulare, come alcuni tipi di pili, strutture di adesione. Viene richiesta la presenza di 2 proteine:

- Chaperonina periplasmatica;
- Proteina di membrana estrerna (usciere).

Per prima cosa il sistema Sec trasporta le subunità di pilina nel periplasma. Dopo viene rimossa la sequenza segnale e si instaura un legame tra chaperonina PapD ad una regione C-terminale conservata. Questo evita l'aggregamento prematuro delle subunità di pilina. PapD porta le subunità alla proteina usher che procede con la secrezione e l'assemblaggio.

4.3 Vie delle secrezioni indipendenti da Sec

4.3.1 Il sistema Tat: Twin-arginine translocation system

Questo sistema è costituito da 3 proteine di membrana: TatA, TatB, TatC, con la presenza di arginina.

1. Viene riconosciuta la sequenza N-terminale;
2. Produzione e ripiegamento della proteina con l'intervento di chaperonine e aggiunta di eventuali co-fattori;
3. Indirizzamento al complesso di membrana TatBC;
4. Il canale di trasporto (TatA) si associa al complesso TatBC e ne consente il passaggio. La sequenza segnale viene rimossa nel periplasma.

L'energia viene fornita dalla forza proton-motrice.

4.3. VIE DELLE SECREZIONI INDEPENDENTI DA SEC

4.3.2 I trasportatori ABC: ATP-Binding Cassette

In questa via non vi è un passaggio da un intermedio periplasmatico. È costituita da 3 componenti:

- Proteina associata alla membrana interna per idrolizzare ATP (dominio ABC);
- Proteina che si estende nel periplasma (MFP);
- Proteina associata alla membrana esterna (OMP).

Non è presente la sequenza segnale N-terminale, ma una sequenza di riconoscimento C-terminale che alla fine non viene rimossa.

4.3.3 Il sistema di secrezione di tipo III

È un sistema che viene annoverato come fattore di virulanza e deve attraversare 3 membrane: quella interna, quella esterna e quella della cellula bersaglio.

Il batterio secerne proteine tossiche direttamente nel citoplasma di una cellula eucariota bersaglio e in questo modo ne causa la morte. Il sistema viene attivato dal contatto con la cellula ospite e presenta un struttura complessa composta di più di 20 proteine diverse. Questo sistema presenta una certa omologia con le proteine che costituiscono il corpo basale del flagello.

La secrezione necessita di energia ed è assistita dalle chaperonina (Syc) che hanno il compito di portare la proteina alla base del canale di trasporto.

La proteina YopN funge da apertura/chiusura del canale.

Dopo si ha la formazione di un poro (canale) nella cellula bersaglio (YopB e YopD).

4.3.4 Il sistema di secrezione di tipo IV

Questo è un processo molto versatile che secreta DNA (coniugazione) o proteine.

Avviene una traslocazione direttamente nelle cellule bersaglio. Sono presenti almeno 12 proteine diverse che formano una struttura che abbraccia gli involucri del batterio. Questo sistema porta all'assemblamento di monomeri che formano il pilo IV a spirale.

Capitolo 5

Metabolismo dei microrganismi

Il metabolismo è un insieme di reazioni biocimiche controllate. Alcuni degli elementi fondamentali sono:

- nutrienti: elementi chimici essenziali;
- energia: ricavata dalla luce o dalla degradazione dei nutrienti;
- enzimi: catabolizzano e anabolizzano i nutrienti;
- macromolecole: assemblaggio e polimerizzazione partendo da monomeri;
- struttura cellulare: assemblaggio di più macromolecole.

Il metabolismo viene diviso in due principali tipi di reazioni: cataboliche e anaboliche. Il catabolismo è la parte del cataclismo che libera energia, grazie alla scomposizione di molecole organiche. Una parte dell'energia viene conservata sotto forma di legami nell'ATP, mentre altra viene dispersa come calore. È una via esergonica. L'anabolismo utilizza l'energia che viene liberata dal catabolismo per creare molecole più grandi. Anche in questo tipo di processi viene persa dell'energia sotto forma di calore. È una via endergonica. Una via metabolica non è costituita da una sola reazione, ma da una serie complessa di reazioni. Durante una reazione chimica l'energia libera è definita come energia rilasciata disponibile per compiere un lavoro utile. Se ΔG^0 è negativo significa che essa procederà con liberazione di energia libera. Se ΔG^0 è positivo la reazione per aver luogo richiede energia.

5.1 Catalisi ed enzimi

Il calcolo dell'energia libera ci dice solo se in una certa reazione l'energia sia liberata o richiesta, ma non ci viene detto nulla sulla velocità di reazione. Consideriamo la reazione di formazione dell'acqua con $\Delta G^0 = -237\text{kJ}$. La reazione è energeticamente favorevole, ma se noi mescoliamo ossigeno e idrogeno all'interno di una bottiglia l'acqua non si forma, perché è necessario rompere prima i legami dei reagenti. Per rompere questi legami è necessaria l'energia di attivazione. Gli enzimi sono dei catalizzatori che diminuiscono l'energia di attivazione e quindi aumentano la velocità della reazione.

5.1. CATALISI ED ENZIMI

5.1.1 Enzimi

Gli enzimi sono i catalizzatori biologici. Sono proteine, o raramente RNA, altamente specifici per la reazione da essi catalizzata. Quindi ciascun enzima catalizza un solo tipo di reazione oppure una classe di reazioni strettamente affini. Questa sua specificità dipende dalla sua struttura tridimensionale. In una reazione catalizzata da un enzima (E), questo si combina con il substrato (S) formando un complesso (E-S). Mentre questa reazione procede viene rilasciato il prodotto (P) e l'enzima torna allo stato originale.



Normalmente l'enzima è molto più grande del substrato e la porzione a cui si lega il substrato è chiamato sito attivo.

Molti enzimi contengono delle piccole molecole non proteiche che partecipano alla funzione catalitica. Molti enzimi sono composti da più elementi organici e inorganici. L'apoenzima, la porzione proteica degli enzimi, è attiva solo se associata a cofattori. I cofattori possono essere di due tipi: molecole inorganiche, normalmente ioni metallici quali il ferro, il magnesio, lo zinco o il rame; oppure molecole organiche chiamate coenzimi. Questi ultimi sono o contengono vitamine. Queste sono delle molecole indispensabili al metabolismo e che molti organismi non sono in grado di sintetizzare, per questo motivo vanno assunte con la dieta. La forma completa e attiva dell'enzima è detta oloenzima. Esistono diversi tipi di enzimi e la maggior parte dei nomi degli enzimi contiene il suffisso "-asi" e spesso fa riferimento al tipo di substrato e di reazione biochimica mediata:

- idrolasi → catalizzano la rottura di un legame chimico con l'intervento di una molecola d'acqua (catabolismo);
- isomerasi → catalizzano l'interconversione tra due isomeri (né catabolismo, né anabolismo);
- ligasi e polimerasi → assemblano molecole della stessa natura chimica (anabolismo);
- liasi → catalizzano la rottura di diversi legami chimici attraverso processi differenti dall'idrolisi e dalla ossidazione (catabolismo);
- ossidoriduttasi → catalizzano il trasferimento di elettroni da una molecola (donatrice di elettroni) ad un'altra (accettore di elettroni) (catabolismo o anabolismo);
- trasferasi → spostano gruppi funzionali (amino, fosfato, acetile, etc.) da una molecola all'altra (anabolismo).

5.1.2 Parametri esterni che alterano l'azione degli enzimi

Temperatura → L'alzarsi della temperatura tende ad incrementare la velocità delle reazioni biochimiche. Tuttavia, le reazioni enzimatiche hanno un range di temperatura in cui possono svolgersi. Sopra una determinata temperatura i legami non-covalenti dell'enzima si rompono ed esso si denatura, portando alla perdita della struttura tridimensionale e della funzionalità. La denaturazione può essere permanente e reversibile a seconda degli enzimi.

pH → valori estremi di pH portano alla denaturazione quando gli ioni rilasciati da acidi o basi interferiscono con i legami idrogeno che assicurano la struttura tridimensionale dell'enzima.

Concentrazione del substrato o dell'enzima → l'attività enzimatica aumenta in funzione della concentrazione di substrato fino a raggiungere il punto di saturazione quando tutti i siti attivi sono legati al substrato.

5.2. REDOX

5.1.3 Inibitori

Gli inibitori hanno il compito di regolare l'attività enzimatica. Ne esistono di vario tipo:

- Competitivi → sono in grado di legare il sito attivo e presentano una forma e struttura chimica simile a quella del substrato. Competono con il substrato per il sito attivo dell'enzima. In linea generale, la loro inibizione è reveribile e può essere superata con l'aumento della concentrazione del substrato. Un esempio è la sulfanilamide che presenta una forte affinità per il sito attivo dell'enzima che catalizza la conversione del PABA in acido folico, un precursore dei nucleotidi fondamentale per la sintesi del DNA.
- Non-competitivi → Non legano il sito attivo ma un'altra regione chiamata sito allosterico, portando ad un cambiamento conformazionale del sito attivo. Esistono due forme: inibitorie ed eccitatorie; alcuni le posseggono entrambi.
- Feedback negativo → regola la quantità di una certa sostanza in base alla sua concentrazione. Il prodotto finale della via metabolica è un inibitore allosterico di un enzima che interviene più a monte nel pathway. Dato che il prodotto di ogni reazione è anche il substrato della successiva, l'intero pathway viene disattivato quando il prodotto finale è presente in concentrazione sufficiente. In una via ramificata ciascuno dei tre prodotti finali inibisce una delle tre enzimi sintetasi. Solo quando tutti i tre prodotti finali sono presenti in concentrazione deguata la sintesi del loro precursore, DHAP, viene interrotta.

5.2 Redox

Molte reazioni metaboliche prevedono il trasferimento di una molecola (e^- donor) ad un'altra (e^- acceptor). L'acceptor viene ridotto perché il guadagno di elettroni riduce la sua carica elettrica totale. Le molecole che predono elettroni si ossidano perché spesso cedono ossigeno. Un esempio di reazione di ossido-riduzione è quella per la formazione dell'acqua: per ogni ossidazione occorre che avvenga una conseguente riduzione.

Potenziale di riduzione standard (E_0) → è la tendenza di una sostanza di ossidarsi e ridursi. È espresso in Volt e prende come riferimento una sostanza standard H_2 . Se E_0 è più negativo è un miglior donatore di elettroni; mentre se è più positivo è un miglior accettore di elettroni.

La torre degli elettroni rappresenta il campo dei potenziali di riduzione possibili per le coppie redox in natura da quelle con E_0^l più negativo in cima alla torre a quelle con il valore di E_0^l più positivo alla sua base. La sostanza ridotta nella coppia redox posta in cima alla torre redox ha la massima tendenza a donare elettroni, mentre la sostanza ossidata nella coppia redox sul fondo della torre redox ha la massima tendenza ad accettare elettroni.

5.3 Trasportatori di elettroni e ciclo NAD/NADH

Le reazioni redox sono mediate da piccole molecole. Un intermedio redox molto comune è il NAD^+ (nicotinammide adenina dinucleotide) e la sua forma ridotta $NADH$. NAD^+ è un coenzima e trasportatore di elettroni, $NADH$ è la sua forma ridotta. $NADP^+$ e $NADPH$ hanno solamente un gruppo fosfato in più. Entrambe le forme ridotte sono buoni donatori di elettroni ($E'_0 = -0,32$). $NAD^+/NADH$ è coinvolta nelle reazioni cataboliche che generano energia, mentre $NADP^+/NADPH$ è coinvolta nelle reazioni biosintetiche (anaboliche).

NAD^+ e $NADH$ sono coenzimi e per questo motivo facilitano il lavoro di un enzima senza essere

5.4. ATP

consumati. Alcuni di questi si legano al NAD⁺ e se incontrano un substrato adatto, legano anche quello in prossimità del coenzima non ridotto. A questo punto il NAD prende due elettroni e un H⁺ e diventa NADH e cambia anche la conformazione del substrato. Se invece NADH si lega ad un enzima col suo substrato specifico, accade il contrario: viene donato un H⁺ e si trasforma in NAD⁺.

5.4 ATP

L'adenosina trifosfato (ATP) è il più importante composto fosforilato; è costituito dal ribonucleoside adenosina a cui sono legati in serie tre molecole di fosfato. Viene generato durante le reazioni esoergoniche e consumato nelle reazioni endoergoniche.

Nel catabolismo l'energia rilasciata dalla degradazione dei nutrienti viene stoccati nei legami ad alta energia tra i gruppi fosfato della molecola di ATP. Si forma dalla fosforilazione dell'ADP.

Le cellule fosforilano l'ADP per formare ATP in tre modi:

- Fosforilazione a livello di substrato → prevede il trasferimento del fosfato da una molecola organica all'ADP per formare ATP;
- Fosforilazione ossidativa → l'energia derivata da reazioni redox della respirazione cellulare viene utilizzata per aggiungere fosfato inorganico (P_i) all'ADP;
- Fotofosforilazione → l'energia luminosa viene utilizzata per fosforilare l'ADP con fosfato inorganico.

5.5 Catabolismo dei carboidrati

Il glucosio ed altri zuccheri vengono catabolizzati dai microrganismi tramite due processi:

- la respirazione cellulare → consiste nella completa demolizione del glucosio per formare anidride carbonica ed acqua;
- fermentazione → produce molecole organiche di scarto.

Entrambi i processi iniziano con la glicolisi nel quale ogni molecola viene catabolizzata in due molecole di piruvato con la produzione netta di 2 molecole di ATP. La respirazione cellulare, poi, prosegue con il ciclo di Krebs e la catena di trasporto elettronico con sostanziale produzione di ATP; mentre la fermentazione converte l'acido piruvico in altre molecole organiche senza produzione di ATP. Nello stesso organismo è possibile utilizzare sia la respirazione cellulare che la fermentazione.

5.6 Glicolisi

La glicolisi, anche detta Via di Embden-Meyerhof-Parnas, è il primo passo per la metabolizzazione del glucosio. Questo processo scinde il glicosio (6 Carboni) a piruvato (3 Carboni). Può essere suddivisa in 3 parti, che a loro volta racchiudono 10 reazioni enzimatiche:

1. Investimento energetico (1-3);
2. Rottura della molecola (4-5);
3. Conservazione dell'energia (6-10).

5.7. RESPIRAZIONE CELLULARE

Vengono formati 4 ATP e consumti 2 ATP, quindi il bilancio netto è die 2 ATP. Due molecole di NAD⁺, invece, vengono ridotte a NADH.

Gli step della glicolisi sono:

- (1) Fosforilazione del glucosio ($ATP \rightarrow ADP$) per formare glucosio-6-fosfato. L'enzima utilizzato è l'esochinasi.
- (2) Fosforilazione ($ATP \rightarrow ADP$). L'enzima utilizzato è l'isomerasi.
- (3) Isomerizzazione per formare fruttosio 1,6-bifosfato. L'enzima utilizzato è il fosfofruttachinasi.
- (4) Il fruttosio 1,6-bifosfato viene tagliato per formare gliceraldeide 3-fosfato (G3P) e diidrossiacetone fosfato (DHAP). Sono delle molecole con 3 Carboni. L'enzima utilizzato è l'aldolasi.
- (5) Il DHAP viene isomerizzato a G3P, grazie all'enzima triosofosfato isomerasi.
- (6) Dopo l'aggiunta di 2 fosfati c'è la formazione di 2 NADH da 2 NAD⁺. Si forma il 1,3-difosfoglicerico. L'enzima impiegato è il G3P deidrogenasi.
- (7) Formazione di 2 ATP da 2 ADP.
- (8-9) Rilascio di 2 molecole di H_2O e isomerizzazione con conseguente produzione di fosfoenolpiruvato (PEP).
- (10) Viene tolto l'ultimo fosfato dalle 2 PEP per formare 2 ATP e formazione di 2 piruvati. In questo step avviene un passaggio diretto di un fosfato dal PEP a una molecola di ADP. Questo è mediato da un enzima, con attraccato Mg²⁺; il complesso è quindi un cloenzima.

5.7 Respirazione cellulare

Durante il processo della respirazione cellulare è prevista la degradazione completa della molecola, in seguito ad una serie di reazioni redox. Le tre fasi sono:

1. sintesi di acetyl-CoA;
2. ciclo di Krebs;
3. una sequenza di reazioni redox detta catena di trasporto elettronico.

5.7.1 Sintesi acetilCoA

L'enzima decarbossilasi rimuove un atomo di carbonio dall'acido piruvato sotto forma di CO_2 , poi media l'attacco con l'acetato al coenzima-A con un legame ad alta energia. In questo ultimo processo una molecola di NAD⁺ è ridotta a NADH.

5.7.2 Ciclo di Krebs

Il ciclo di Krebs o ciclo dell'acido citrico è composto da 8 reazioni enzimatiche che trasferiscono l'energia contenuta nei legami dell'acetyl-CoA ai coenzimi NAD e FAD, infine riducendoli. Si può dividere nei seguenti passaggi:

- (1) Acetyl-CoA entra nel ciclo unendosi all'acido ossaloacetico per formare acido citrico;
- (2-4) due ossidazioni e decarbossilazioni e l'aggiunta di CoA formano il succinyl-CoA
- (5) Fosforilazione a livello di substrato
- (6-8) Ulteriori ossidazioni regenerano l'acido ossaloacetico

Durante lo step 5, una piccola parte dell'energia del processo viene stoccati in 1 molecola di ATP grazie alla fosforilazione, utilizzando il GTP prodotto come intermedio.

La maggior parte dell'energia viene conservata sotto forma di elettroni in reazioni redox, nei traspontatori di elettroni NADH (step 3, 4, 8) e FADH (step 6). L'energia di questi elettroni servirà a valle per produrre ATP.

Va ricordato che vengono prodotte anche 3 molecole di CO_2 .

Il ciclo di Krebs ha anche un ruolo biosintetico, infatti molti dei suoi intermedi possono essere usati come precursori per la costruzione di altre molecole (amminoacidi, anelli porfirinici dei citocromi...). Questo vale anche per la glicolisi.

5.7.3 Catena di trasporto degli elettroni

Durante questa fase, indirettamente, viene prodotta la maggior parte di ATP. Non c'è un vero e proprio passaggio di gruppi fosfato in questa catena, ma essi generano un gradiente che viene sfruttato per fosforilare l'ADP.

La catena di trasporto elettronico consiste in una serie di molecole associate alla membrana che a turno ricevono e cedono elettroni fino ad un accettatore finale di elettroni. L'energia prodotta viene utilizzata per pompare elettroni attraverso la membrana, creando la forza proton-motrice.

Tipi di molecole carrier nella catena di trasporto elettronico:

- Flavoproteine → sono delle proteine integrali di membrane che contengono il coenzima flavina, molecola derivata dalla vitamina B_2 . La flavina mononucleotide (FMN) è l'accettatrice iniziale di elettroni. Accettano i $2H^+$ e 2 elettroni, ma donano soltanto elettroni. Come tutti gli altri componenti della catena alternano tra stato ridotto e ossidato;
- Proteine ferro-zolfo → è un gruppo di proteine di membrana che contiene ioni metallici (Fe e S) i quali si ossidano e riducono durante il passaggio di elettroni. Come i citocromi trasportano solamente elettroni; i ferri si legano a cisteine. Possono alternare tra stato ridotto e ossidato;
- Ubichinone → sono dei carrier non proteici derivati dalla vitamina K e altamente idrofobici, vengono chiamati anche Coenzima Q. Accettano i $2H^+$ e 2 elettroni;
- Citocromi → sono delle proteine integrali. Legano un gruppo eme, che è costituito da un anello porfirinico e un atomo di ferro. Il ferro alternava tra stato ridotto (Fe^{2+}) ed ossidato (Fe^{3+}). Il citocromo c serve da intermedio far il bc e l'aa. Subiscono delle ossidazioni e riduzioni mediante la perdita o l'acquisto di un singolo elettrone da parte del ferro. Sono diversificati e possono formare complessi fra loro, come il citocromo bc_1 .

5.8. BILANCIO GLOBALE

Alla fine gli elettroni vengono accettati dall'ossigeno. La reazione tra elettroni, ossegeno e H^+ forma l'acqua. Proprio per questa specifica funziona l'ossigeno è molto importante per un organismo ed è proprio questo il motivo per cui respiriamo.

Man mano che gli elettroni si spostano lungo la catena, il livello dell'energia si abbassa e vengono pompati ioni H^+ all'esterno. Questi derivano o dai trasporttori di elettroni NADH e FADH o dall'idrolisi dell'acqua nei citocromi. Questi protoni passando attraverso l'ATP sintasi, la quale genera ATP. Ogni 2 H^+ viene, approssimativamente, generato un ATP.

5.7.4 ATPsintasi

L'ATPsintasi o ATPasi è un grande complesso enzimatico di membrana che serve da catalizzatore della conversione della forza proton-motrice in ATP. Contiene due porzioni principali, una testa con subunità multiple (F_1), collocata nella faccia citoplasmatica della membrana, e un canale conduttore di protoni (F_0) che attraversa la membrana. Questo complesso, F_1/F_0 catalizza una reazione da ADP+Pi verso ATP.

F_0 :

- Subunità a: è il canale attraverso il quale passano gli ioni H^+ , che provoca il movimento delle subunità c;
- Subunità c: è il rotore ed è composto da 12-15 subunità singole. È la sua torsione che provoca dei movimenti e dei cambiamenti conformazionali che permettono di generare ATP.

F_1 :

- Subunità ε e γ : connettono il rotore alla parte più massiccia di F_1 . La torsione della subunità c genera la rotazione accoppiata dalle due subunità;
- Subunità α : sono 3 e hanno principalmente una funzione strutturale;
- Subunità β : sono 3, sono alternate a quelle α e hanno il ruolo di sintetizzare. Hanno tutte la stessa funzione, ma la attuano a turno: la prima è vuota, la seconda contiene ATP+P e la terza contiene solo ATP. Poi il ciclo si sposta avanti e ritorna come partito. L'ATP viene generato quando la subunità torna alla sua conformazione originale;
- Subunità b_2 e δ :

L'ATP può funzionare anche al contrario: idrolizzando l'ATP e pompando all'esterno H^+ .

5.8 Bilancio globale

Glicolisi: Glucosio + NAD⁺ + 2ATP → 2 piruvato + 4ATP + 2NADH

Dato che 1 NADH → 3 ATP, si ha un totale di 8 ATP prodotti: 2 dalla fosforilazione a livello del substrato e 6 dalla respirazione cellulare del NADH.

Ciclo di Krebs: Piruvato + 4 NAD⁺ + FAD → 4 NADH + 1 FADH + 1 GTP + 3CO₂

Dato che da un FADH si ottengono 2ATP, si ha: 1ATP generato dalla fosforilazione a livello di substrato, e 14 ATP dalla respirazione dei 4 NADH e del FADH. Questi 15 ATP devono essere moltiplicati per due, poichè nel circolo entrano 2 molecole di piruvato, ottenendo così 30 ATP.

In totale, da una molecola di glucosio si ottengono circa 38 ATP e ogni giorno un uomo genera una quantità di ATP pari alla sua massa.

5.9 Le altarnative cataboliche

I microrganismi anaerobi non hanno l'ossigeno come accettore finale di elettroni. L'ossigeno viene sostituito con un'altra molecola: SO_4^{2-} per ridurlo ad H_2S ; altri riducono carbonati CO_3^- a metano CH_4 ; altri utilizzano i nitrati NO_3^- per produrre N_2 o N_2O . Quando vengono utilizzati questi trasportatori al posto dell'ossigeno si verifica una perdita di energia. perchè hanno E_0 meno positivo. Gli aerobi e anaerobi facoltativi sono in grado di utilizzare entrambe le vie.

La chemiolitotrofia prevede l'utilizzo di sostanza inorganiche come donatori di elettroni (come FAD o NAD). Esempi sono l'idrogeno solforato (H_2S), idrogeno gassoso (H_2), ferro ferroso (Fe^{2+}), ammoniaca (NH_3). I chemiorganotrofi usano come unica fonte il carbonio per produrre energia e per la biosintesi composti organici. I chemilitotrofi utilizzano anidride carbonica per la biosintesi delle loro molecole e composti inorganici per produrre energia.

Nella fototrofia viene utilizzata come fonte di energia la luce; mentre l'ATP viene generato tramite il processo di fosforilazione. I fotoautotrofi assimilano CO_2 come fonte di carbonio; mentre i fotoeterotrofi usano come fonte di carbonio composti inorganici.

Esistono due tipi di fotosintesi: ossigenica, che nei cianobatteri produce CO_2 e annossigenica.

La diversità metabolica nella respirazione e nella fotosintesi ruota intorno alla generazione della forza proton-motrice.

Nella fermentazione, la fosforilazione avviene solamente al livello del substrato e quindi dipende dalla forza proton-motrice.

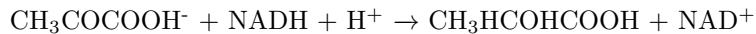
5.10 La fermentazione

È una via metabolica alternativa in caso di mancanza di un accettore finale di elettroni nel processo di respirazione cellulare. Se manca un accettore finale di elettroni tutta la via respiratoria si blocca. L'ATP necessario potrebbe essere sintetizzato dalla glicolisi e dal ciclo di Krebs, ma questo non può succedere perchè entrambi i processi richiedono di NAD^+ .

La fermentazione avviene grazie all'aggiunta di 2H a un piruvato per formare acido lattico; oppure grazie alla decarbossilazione del piruvato e alla successiva aggiunta di 2H per produrre etanolo. La fermentazione non produce direttamente ATP, ma fa sì che la sua produzione possa avvenire durante il ciclo di Krebs. Anche se l'energia stocata è in quantità minore rispetto a quella della respirazione, essa consente di produrre ATP senza un accettore di elettroni.

5.10.1 Fermentazione lattica

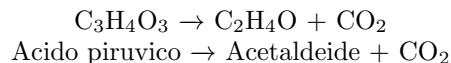
Nel processo della fermentazione lattica i due atomi di idrogeno vengono trasferiti sul carbonio in posizione 2 dell'acido piruvico, producendo l'acido lattico.



È un processo che viene attuato da alcuni batteri, come i lattobacilli, e dalle cellule del corpo umano in condizioni di anaerobiosi, come i muscoli.

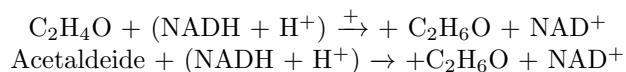
5.10.2 Fermentazione alcolica

1^a reazione:



5.11. ALTRE VIE CATABOLICHE

2^a reazione:



Dalla fermentazione del glucosio si possono avere vari prodotti. a glicosi produce piruvato, che può essere convertito ad acido lattico attraverso la fermentazione lattica o entanolo attraverso la fermentazione alcolica. La fermentazione acido-mista produce una miscela di etanolo, acido lattico, succinico, formico e acetico.

5.10.3 Prodotti alimentari o industriali derivati da processi di fermentazione

Pane → Durante la panificazione il lievito fermenta gli oligosaccaridi che si staccano dall'amido durante la fase di impasto e di riposo della massa in lavorazione. I prodotti della fermentazione alcolica (alcol etilico ed anidride carbonica) passano in fase gassosa formando le caratteristiche bolle durante la lievitazione e la cottura.

Vino → Il vino viene prodotto a partire da soluzioni zuccherine ottenute dallo schiacciamento del grappolo d'uva asciatte a fermentare con i lieviti del genere *Saccharomyces* presenti sulla buccia dell'acino o provenienti da colture selezionate. A seconda delle condizioni di fermentazione, si differenziano le qualità organolettiche (colore, saperi, aromi...) del vino.

Birra → La birra si ottiene per l'azione di lieviti su un mosto contenente malto di orzo e quantità variabili di altri cereali. La lavorazione è tale da consevare nel prodotto anche l'anidride carbonica.

Yogurt → Lo yogurt è il risultato della fermentazione lattica operata da ceppi selezionati di lattobacilli sul latte. L'abbassamento del pH dovuto all'accumulo dell'acido lattico determina la denaturazione della caseina che coaugula conferendo al prodotto la caratteristica consistenza.

5.11 Altre vie cataboliche

Lipidi e proteine contengono una grande quantità di energia nei loro legami. Perchè questa energia venga utilizzata dalla cellula, essi devono essere scomposti nei loro monomeri e entrare come substrati nella glicolisi e nel ciclo di Krebs.

I **lipidi** più utilizzati per la produzione di ATP sono i grassi (composti da glicerolo e code di acidi grassi). Alcuni enzimi chiamati lipasi idrolizzano i lipidi producendo glicerolo e tre catene di acidi grassi. Il glicerolo viene convertito in DHAP che integra la via metabolica della glicolisi, mentre gli acidi grassi sono degradati in un processo chiamato β -ossalidazione. Durante questo processo degli enzimi tagliano 2 carboni idrogenati che formano le code di acidi grassi, e li uniscono ad una molecola di coenzima. Vengono prodotte così delle molecole di acetyl-CoA, che può entrare all'interno del ciclo di Krebs. Il processo prosegue finchè tutti gli acidi grassi non vengono convertiti in acetyl-CoA. Vengono, quindi, generate delle grandi quantità di trasportatori di elettroni NADH e FADH₂, usate per la catena di trasporto degli elettroni.

Altri microbi catabolizzano **proteine** come un importante fonte di energia. La maggior parte delle cellule le catabolizza solo quando non ci sono a disposizione fonti di carbonio come il glucosio. Dato che le proteine sono troppo grosse per superare la membrana plasmatica, procarioti iniziano a catabolizzarli all'esterno. Gli enzimi protesi degradano le proteine in aminoacidi idrolizzando i legami peptidici. Vengono quindi portati all'interno della cellula e subiscono modificazioni chimiche (deaminazione). La molecola risultante può entrare nel ciclo di Krebs.

5.12 La fotosintesi

Gli organismi fotosintetici catturano l'energia luminosa e l'utilizzano per la sintesi di carboidrati a partire da CO_2 and H_2O . I cianobatteri sono stati i primi organismi fotosintetici. Ora anche molte alghe, batteri verdi sulfurei e non, piante e alcuni protozoi fanno parte di questo gruppo. Essi riescono a catturare l'energia della luce solare grazie a delle piccole molecole, la più importante delle quali è la clorofilla. La clorofilla è forata da una coda idrocarburica idrofobica attaccata a un centro che assorbe uce composto anche da uno ion Mg^{2+} . La clorofilla assomiglia ai citocromi, ma al posto del magnesio contengono il ferro al centro dell'anello.

Esistono due tipi di clorofille:

- clorofille che si trovano nelle piante, nelle alghe e nei cianobatteri;
- batterioclorofille che si trovano nei batteri verdi e porpora, e negli eliobatteri.

La loro differenza principale è la diversa lunghezza d'onda alla quale assorbono. Questa diversità ha determinato diversi habitat in cui gli organismi si sono insediati.

La fotointesi avviene al livello della membrana citoplasmatica dove ci sono molte clorofille a formare i tilacodi. Le code idrofobiche sono immerse nella membrana, mentre il sito attivo che contiene Mg^{2+} è esterno ad essa.

I fotosistemi sono formate dall'insieme di clorofille e proteine nella membrana; i tilacodi dei fotosistemi dei procarioti sono invaginazioni della membrana citoplasmatica e questo permette un aumento di superficie.

Esistono due tipi di fotosistemi PSI e PSII. Questi assorbono la luce solare e stoccano l'energia in molecole di ATP e NADPH grazie a reazioni redox. Queste reazioni sono dette dipendenti dalla luce. Tuttavia, ci sono anche delle reazioni non dipendenti dalla luce, nelle quali il glucosio è sintetizzato a partire da CO_2 e H_2O .

5.12.1 Reazioni dipendenti dalla luce

Nei fotosistemi dipendenti dalla luce, le centinaia di clorofille in essi, si passano l'energia da uno all'altro grazie all'eccitamento degli elettroni provocato dalla luce. I pigmenti del fotosistema assorbono l'energia della luce e la trasferiscono a molecole adiacenti per indirizzarla presso una molecola di clorofilla detta centro di reazione.

Fosforilazione ciclica La fosforilazione ciclica avviene in tutti gli organismi fotosintetici. Gli elettroni vengono eccitati nel fotosistema, passano dal centro di reazione a una molecola di Fe, e da qui vanno ai citocromi. In questi il livello di energia scende e questo permette il passaggio degli ioni H^+ (anche se contro gradiente). Gli elettroni che non sono più eccitati, tornano al fotosistema I e il ciclo ricomincia. Il gradiente di protoni creato viene utilizzato per la sintesi di ATP.

Fosforilazione non ciclica Questo tipo di fosforilazione è utilizzata da alcuni batteri fotosintetici e da tutte le piante, alghe e protisti fotosintetici. Richiede l'utilizzo di due fotosistemi, PSI e PSII; produce ATP, ma anche potere riducente sotto forma di NADPH. Gli elettroni vengono eccitati nel PSII, trasmessi in sequenza ad accettatori di elettroni ed ulteriormente energizzati nel PSI. L'accettore finale di elettroni è il NADP^+ che viene ridotto NADPH e verrà ulteriormente utilizzato nelle reazioni luce-dipendenti. Il PSII deve essere continuamente rifornito di elettroni; nella fotosintesi ossegenica essi provengono dalla dissociazione di H_2O . Questa reazione produce 2 elettroni e 2 protoni ed ossigeno molecolare (O_2) come prodotto di scarto. Nella fotosintesi anossiegenica i batteri ottengono elettroni da altri donatori inorganici come H_2S .

5.12.2 Reazioni non dipendenti dalla luce

Questi sistemi utilizzano l'ATP ed il NADPH prodotti dalle reazioni luce-dipendenti. La loro funzione principale è la fissazione del carbonio e la formazione di molecole di glucosio. Tutto questo avviene durante il ciclo di Calvin-Benson. Questo ciclo include le seguenti fasi:

- **Fissazione** → 3 molecole di CO₂ (3 molecole di C) legano 3 molecole di RuBP (15 atomi di C), che vengono scisse per formare 6 molecole di acido fosfoglicerico (18 atomi di C);
- **Riduzione** → 6 molecole di NADH riducono 6 molecole di acido fosfoglicerico per formare 6 molecole di G3P. Questa fase consuma 6 molecole di ATP;
- **Rigenerazione di RuBP** → 3 molecole di RuBP vengono prodotte da 5 molecole di G3P. La molecola di G3P rimanente è utilizzata per sintetizzare glucosio attraverso una serie di reazioni inverse a quelle della glicolisi.

Due giri di ciclo producono 2 molecole di G3P. Queste vengono polimerizzate e defosforilate per produrre glucosio.

La fotosintesi processa gli elettroni in una direzione opposta rispetto alla respirazione aerobica. Gli elettroni vengono donati dall'acqua per produrre ossigeno, e ceduti (tramite NADPH) all'anidride carbonica per sintetizzare glucosio.

Capitolo 6

Genomica microbica

Il termine genomica fa riferimento alla mappatura, al sequenziamento e all'analisi dei genomi. La conoscenza della sequenza di un genoma non rivela solamente i geni dell'organismo ma fornisce anche informazioni sulle sue funzionalità e sulla sua storia evolutiva. Esistono differenti tipi di genomicca:

- Strutturale: esamina la struttura fisica dei genomi con l'obiettivo di determinare e analizzare la sequenza di DNA del genoma (annotazione dei geni).
- Funzionale: indaga i meccanismi di funzionamento del genoma, in particolare i trascritti (mRNA) e le proteine codificate da essi.
- Comparate: pone a confronto diversi genomi per risalire alle affinità e alle differenze tra di essi, identificare le porzioni genomiche conservate che codificano per proteine essenziali e determinare modelli di funzione e di regolazione. I dati servono anche per lo studio dell'evoluzione microbica e del trasferimento orizzontale di geni.

Quindi le differenze di genoma portano a delle differenze fenotipiche.

I procarioti presentano un genoma compatto fatto quasi solamente di geni. In questi genomi microbici si misura un elevato grado di poliformismo, anche nella stessa specie. Questo significa che sono molto variabili e che due ceppi di una stessa specie possono presentare notevoli differenze.

Il genoma è composto da due parti distinte:

- Core genome → è la parte in comune tra le componenti della stessa specie;
- Genoma accessorio → è composto dai geni che distinguono un individuo da un altro. Sono delle sequenze specifiche che arrivano a essere fino al 26% di tutto il genoma. Questo è un valore estremamente elevato ed è dovuto ai vari casi di ricombinazione del DNA a cui i batteri vanno incontro. Spesso in queste regioni si trovano i fattori che rendono patogeno un batterio.

Il genoma minimo è il numero di geni essenziali alla vita di uno specifico organismo. È formato da:

- Core genome → anche detto COGs, cioè Cluster of Orthologous Genes;
- NOGD → sta per "Non Orthologous Gene Displacement". Sono dei geni che hanno la stessa funzione e la stessa sequenza ma non derivano da un antenato comune. Sono geni analoghi, ma non omologhi).

6.1 Sequenziamento genomico di prima generazione (1995)

Per poter sequenziare un genoma bisogna per prima cosa clonare l'insieme dei suoi frammenti:

- clonaggio con vettori plasmidici (tipo puC19), che presentano dei frammenti di circa 2kb;
- clonaggio con batteriofagi lambda, che presentano frammenti di circa 20 kb;
- clonaggio con vettori BAC (Bacterial Artificial Chromosome), che presentano frammenti di circa 300 kb;
- clonaggio con vettori YAC (Yeast Artificial Chromosome), che presentano frammenti di circa 800 kb.

Il sequenziamento genomico di prima generazione avviene seguendo queste fasi:

- frammentando l'estratto di DNA (enzima di restrizione);
- mescolando i frammenti con il plasmide;
- introducendo i plasmidi nel batterio.

6.1.1 Cromosomi artificiali batterici: i BAC

I BAC sono derivati dai plasmidi F. Sono composti:

- Closing region → sequenze dove si inserisce il frammento che deve essere clonato;
- oriS e repE → sono necessari per la replicazione;
- sopA e sopB → mantengono il numero di copie/cellula basso.

I ceppi di batteri utilizzati per il clonaggio con vettori BAC sono difettivi dei normali sistemi di restrizione, per prevenire la degradazione del BAC, e dei sistemi di ricombinazione, per prevenire il riarrangiamento del DNA clonato nei BAC al cromosoma dell'ospite.

6.1.2 YAC: i cromosomi artificiali di lievito

Questi vettori si replicano nel lievito come cromosomi normali ma presentano dei siti dove può essere inserito del DNA esogeno di grandi dimensioni (200-800 kb). I YAC possiedono: un origine di replicazione, dei telomeri, un centromero, un sito di clonaggio e un gene di selezione.

Presentano problemi notevoli di ricombinazione e riarrangiamento del DNA clonato rispetto al DNA clonato nei batteri.

6.2 Sequenziamento del DNA

Il sequenziamento del DNA può avvenire per mezzo di due tecniche principali: metodo Sanger o shotgun.

6.2. SEQUENZIAMENTO DEL DNA

6.2.1 Metodo Sanger

È il sequenziamento classico ed è stato inventato alla fine degli anni '70. Viene chiamato anche metodo dei "dideoossinucleotidi terminali". Consente di generare frammenti di DNA che terminano in corrispondenza di ognuno delle 4 basi marcate con isotopi radioattivi o marcatori fluorescenti. Il principio è basato sulla sintesi di un filamento copia del DNA da studiare con la DNA polimerasi. Per fare questo si mettono nella miscela di incubazione degli analoghi dei deossiribonucleosidi trifosfati (dNTP). Ne vengono inseriti 4 nel caso del sequenziamento con isotopi radioattivi e 1 nel caso dei marcatori fluorescenti. I dideoossinucleotidi presentano in posizione 3' solamente un H e quindi mancano del gruppo ossidrile. Questa particolarità influenza sull'attività della DNA polimerasi che, incontrando questi nucleotidi anomai, non riesce a continuare la sintesi: si ha quindi l'interruzione della molecola di DNA e frammenti di lunghezza variabile che permettono la loro separazione.

Sequenza di Sanger:

1. Fase di clonaggio, che è seguita dal taglio e l'isolamento di una specifica sequenza;
2. Denaturazione a 95°C, quindi la doppia elica si apre;
3. Visto che si conosce il punto in cui è stato effettuato il taglio si può procedere all'attacco di un singolo primer;
4. La DNA polimerasi si attacca al filamento e comincia la sintesi di uno nuovo. Quando i dideoossinucleotidi entrano nel meccanismo, la replicazione si ferma in corrispondenza della base modificata e opportunamente marcata con isotopi radioattivi;
5. Si procede con la loro separazione su gel di poliacrilamide, isotopi radioattivi, o in tubo capillare, con i marcatori fluorescenti.
Poi, si usa la tecnica dell'elettroforesi: i frammenti si spostano verso il polo positivo: i più piccoli in modo più veloce, mentre i più grandi più lentamente. Si ricava il sequenziamento andando in ordine e aggiungendo la base marcata con il fuoroforo o il radioattivo.

Se viene utilizzato l'isotopo radioattivo è necessario avere una pista per ciascun nucleotidice per capire quale dei quattro è stato aggiunto progressivamente. Se vengono utilizzati i marcatori fluorescenti, ogni base verrà marcata con un diverso colore e quindi sarà necessaria solamente una pista per frammento. In questo secondo caso il sequenziaento può essere fatto anche automaticamente.

Dal 2005 si sono iniziate ad adottare delle nuove tecnologie, come NGS (Next Generation Sequencing), che hanno portato ad un aumento di resa, cioè del numero di nucleotidi in un determinato intervallo di tempo, e ad un abbassamento dei costi.

6.2.2 Sequenziamento shotgun

La tecnica shotgun applicata al genoma prevede il clonaggio dell'intero genoma e il sequenziamento casuale dei cloni risultanti. Questa tecnica genera molti frammenti ridondanti o che si sovrappongono parzialmente. L'ordinamento dei frammenti è detto assemblaggio. Questo prevede di collocare tutti i frammenti nel corretto ordine, eliminare le sovrapposizioni e generare un genoma utilizzabile per l'annotazione.

Poi avviene l'annotazione che riconosce ORFs (Open Reading Frame), sequenze di DNA con schema di lettura aperto, con l'identificazione di un gene di inizio (AUG) o terminazione (UAA, UGA o UAG). Queste sequenze appaiono anche casualmente ed è quindi necessario prendere in considerazione anche la dimensione degli ORFs:

6.3. MAPPE GENOMICHE

- la maggior parte delle proteine contiene 100 aminoacidi;
- tra start e stop devo avere multipli di tre;
- ricercare anche informazioni aggiuntive in geni non codificanti (promotori e terminazione di trascrizione) oppure sequenze di legame al ribosoma.

Nel DNA che viene annotato:

- faccio 6 quadri possibili di lettura: 1 per ogni aminoacido delle sequenze ATG e sui due filamenti;
- la versione che presenta meno sequenze di stop è da preferire.

Si trovano poi delle regioni più o meno conservate nei vari individui. Un esempio sono le proteine di membrana che si trovano in tutti i batteri e che presentano particolari domini idrofobici per inserirsi nelle membrane.

6.3 Mappe genomiche

Le informazioni che si possono ottenere sono su:

- Ordine → i geni vengono espressi in pacchetti, solitamente 8-10 geni sono espressi insieme in proteine che lavorano nello stesso processo;
- Categorie funzionali → hanno lo stesso colore;
- Lunghezza;
- Orientamento → il gene trascritto è espresso solo su un filamento rispetto all'altro.

Nella mappa del genoma di *Haemophilus influenzae* si ha:

- cerchio esterno: regioni codificanti;
- primo cerchio interno: regioni ad elevato contenuto di GC o di AT;
- secondo cerchio interno: copertura dei cloni usati per il sequenziamento;
- terzo cerchio interno: profagi, tRNA, rRNA;
- quarto cerchio interno: sequenze ripetute (funzione regolatoria) e origine di replicazione.

Tuttavia la mappa genomica non dice quali e quanti geni sono espressi in un solo momento. L'analisi complessiva dell'insieme dei trascritti (RNA) viene chiamata trascrittomica; in alcuni casi questo porta ad avere genomi uguali ma trascrittomi diversi.

Il contenuto genico riflette lo stile di vita dell'organismo. Per esempio:

- un parassita obbligatorio come *Treponema pallidum* non possiede geni per la sintesi degli aminoacidi perché vengono tutti forniti dal suo ospite;
- *E. coli* possiede 131 geni coinvolti nella biosintesi degli aminoacidi;
- ***Bacillus subtilis***, un organismo che vive nel suolo, ha 200 geni coinvolti.

6.4. GENOMICA COMPARATIVA

Il numero di geni identificati in un dato genoma, per confronto con altri genomi, corrisponde a circa il 50-60% delle ORFs individuate.

Infatti, ci sono delle ORFs che non vengono identificate come proteine ipotetiche e che probabilmente esistono ma di cui non è nota la funzione. Per esempio, in *E. coli* le funzioni assegnate sono relative a 2700 geni su un totale di 4300 (63%). Si prevede che la maggior parte delle funzioni codificate dalle ORFs non identificate non siano essenziali e coinvolte in attività di regolazione, catabolismo di substrati inusuali, proteine ridondanti utilizzate come sistemi di "riserva", etc.

Dall'analisi del genoma si possono derivare molte capacità metaboliche: trasportatori ABC per zuccheri, peptidi, fosfato, ferro, zinco; principali rami del metabolismo energetico; sintesi del flagello; ATP sintasi, ecc.

6.3.1 Categorie geniche

La percentuale dei geni dedicata a una data funzione cellulare è in rapporto alle dimensioni del genoma. La percentuale dei geni dedicati alla replicazione del DNA e alla sintesi proteica è alta nei genomi di piccola dimensione, come i parassiti. La percentuale dei geni dedicata al metabolismo e alla regolazione è alta nei genomi di grandi dimensioni.

Gli organismi con grandi genomi vivono per la maggior parte nel suolo (quelli con piccoli genomi sono normalmente dei parassiti). Il suolo è un habitat nel quale le fonti di carbonio e energia sono scarse, disponibili in una grande varietà di tipi differenti e spesso fruibili in maniera intermittente.

6.4 Genomica comparativa

Concetto di differenziazione tra genomi:

- Genoma core è esterno alla membrana ed è uguale per tutti i ceppi;
- Buchi sono presenti nello strato del core e rappresentano il genoma accessorio, che varia in un ciascuno dei ceppi di un determinato batterio.

I vari ceppi hanno quindi un diverso aspetto clinico, in cui le regioni intersecanti, dato che comuni a tutti, hanno delle funzioni importanti.

Si possono distinguere quindi:

- Genoma → mappa a livello del singolo individuo;
- Pangenoma → mappa al livello della popolazione, quindi della specie;
- Metagenoma → mappa a livello della comunità.

Nei procarioti all'aumento delle dimensioni del genoma corrisponde un conseguente aumento del numero dei geni: dimensioni del genoma e il totale di ORF sono quindi direttamente proporzionali. Questo è quello che testimonia la compattezza del genoma procariote.

Il più piccolo genoma procariotico noto è quello di specie del genere *Mycoplasma*: 470 ORFs.

Confrontando i genomi di due specie di *Mycoplasma*, *M. genitalium* e *M. pneumoniae*, e portando avanti studi di mutagenesi con trasposoni, si è concluso che sono necessari circa 300 geni codificanti proteine per stabilire la minima funzionalità cellulare.

I più grandi genomi procariotici sono di oltre 8 Mb, come ad esempio quello di *Bradyrhizobium japonicum*, responsabile della fissazione dell'azoto nei noduli delle radici delle piante di soia, e contiene

6.4. GENOMICA COMPARATIVA

8846 ORFs (2800 in più rispetto a quello del lievito *S. cerevisiae*).

Mycoplasma genitalium:

- patogeno umano (vie respiratorie, sistema immunitario), 580 Kb, corredo genico minimo di 517 geni;
- 90 coinvolti nella sintesi delle proteine;
- 29 nella replicazione del DNA;
- 140 codificano per proteine di membrana;
- 5 geni implicati nei meccanismi di regolazione.

Haemophilus influenzae:

- patogeno umano (vie respiratorie superiori), 1.8 Mb, 1743 geni;
- 40% con funzione sconosciuta;
- 64 geni di regolazione;
- sprovvisto di 3 geni del ciclo di Krebs;
- il genoma contiene 1465 copie della sequenza di riconoscimento usata nell'uptake di DNA durante la trasformazione.

Methanococcus jannaschii:

- Archaea, 1.66 Mb, 1738 geni;
- soltanto il 44% dei geni corrispondono a quelli degli altri organismi;
- geni per funzioni essenziali (replicazione, trascrizione, traduzione);
- simili a quelli degli eucarioti.

Escherichia coli:

- 4.6 Mb, 4288 geni; molto simile a *H. influenzae*;
- 5% dei geni per proteine di membrana, 13% trasporto, 10% metabolismo, 4% regolazione, 8% per replicazione, trascrizione, traduzione;
- 2500 geni dissimili da geni noti.

Deinococcus radiodurans:

- batteri del suolo. Sono in grado di ricongiungere frammenti di DNA generati dall'esposizione a forti radiazioni. 2 cromosomi, 2.6 Mb e 0.4 Mb;
- un megaplasmide 177 Kb, un plasmide 45 Kb;
- il batterio dispone di maggior quantità di geni impegnati in processi di riparazione del DNA. Esempio MmutT (eliminazione dei nucleotidi ossidati) è presente in 20 versioni (1 sola nella maggior parte dei microrganismi).

6.4. GENOMICA COMPARATIVA

Rickettsia prowazekii:

- parassita endocellulare obbligato dei pidocchi e dell'uomo, agente del tifo epidemico;
- 1.1 Mb (25% non codificante), geni con affinità a quelli mitocondriali. Processo di sintesi dell'ATP simile a quello osservato dal mitocondrio. Mancanza di geni dedicati alla sintesi di diversi aa (come nel mitocondrio).

Chamydia trachomatis:

- batteri privi di motilità, parassiti intracellulari. Privo di peptidoglicano, ma possiede tutti i geni per costruirlo;
- non ha il gene FtsZ (formazione del setto divisorio), meccanismo molecolare di divisione cellulare sconosciuto;
- contiene più di 20 geni di origine eucariotica di cui alcuni provenienti da piante.

Treponema pallidum:

- agente della sifilide. È metabolicamente deficitario: manca del ciclo di Krebs e della fosforilazione ossidativa e di diverse vie di biosintesi;
- 5% dei geni codificano per proteine di trasporto;
- funzione do 40% dei geni sconosciuta.

Mycobacterium tuberculosis:

- agente della tubercolosi, 4.4 Mb;
- 4000 geni, 60% sconosciuti. 250 geni per il metabolismo dei lipidi (50 in *E. coli*). Il batterio ottiene molta energia dalla degradazione dei lipidi dell'ospite;
- 10% del genoma formato da 2 famiglie di proteine che potrebbero conferire variabilità antigenica e quindi un meccanismo di difesa contro il sistema immunitario dell'ospite.

Mycobacterium leprae:

- agente della lebbra, genoma molto diverso di quello di *M. tuberculosis*;
- 50% del genoma da geni non funzionali. Privo di enzimi coinvolti nella produzione di energia e nella replicazione del DNA (tempo di replicazione nel topo, circa 2 settimane).

Staphylococcus aureus:

- agente di varie infezioni come le intossicazioni alimentari o infezioni nosocomiali;
- 2.6 Mb, 2600 geni. Possiede molti geni di resistenza;
- agli antibiotici, alcuni collocati su plasmidi o trasposoni.

Streptococcus pyogenes:

- tre principali ceppi in grado di causare diversi tipi di infezioni;
- i tre ceppi differiscono principalmente per il contenuto dei profagi, in cui sono ospitati i geni che codificano per fattori di virulenza.

Capitolo 7

Virologia

Un virione è una particella virale completa, funzionale e in grado di infettare. Consiste di almeno una molecola di DNA o RNA racchiusa in un rivestimento proteico, detto capsid. Può presentare anche degli strati addizionali. È un parassita endosimbionte obbligato che non può riprodursi indipendentemente dalle cellule viventi e che non può duplicarsi in assenza di un organismo ospite come fanno eucarioti e procarioti.

Quindi, i virus sono degli elementi genetici che si replicano indipendentemente dai cromosomi cellulari, ma non dalle cellule stesse. Al contrario di alcuni elementi genetici, come i plasmidi, possiedono una forma extracellulare che ne permette la persistenza al di fuori dell'ospite.

7.1 Struttura dei virus

La dimensione del virione è compresa fra 10-400 nm in diametro, ma la maggior parte del virus è troppo piccola per essere visibile al microscopio ottico. Tutti i virioni:

- nucleocapside composto da acido nucleico (DNA o RNA);
- rivestimento proteico (capside);
- componenti addizionali, come per esempio l'envelope (rivestimento lipidico).

Si distinguono due tipi di virus:

- nudi → presentano solo l'involucro proteico del capsid;
- rivestiti → envelope o involucro percapsidico, con membrana formata da un doppio strato lipidico al quale sono associate delle proteine. La componente lipidica deriva dalla membrana dell'ospite, mentre la componente proteica è codificata dal virus.

7.1.1 Capside e simmetria

Una prima classificazione viene fatta sulla struttura base del capsid:

- Isocaedrico;
- Isocaedrico con envelope;

7.1. STRUTTURA DEI VIRUS

- Elicoidale senza envelope;
- Elicoidale con envelope.

La capsida è una struttura macromolecolare che serve da rivestimento proteico del virus. Protegge il materiale genetico virale e aiuta il suo trasferimento fra le cellule ospiti.

È formato da delle unità morfologiche dette capsomeri. Questi sono formati a loro volta da delle subunità strutturali proteiche dette protomeri. I protomeri hanno la capacità di autoassemblarsi spontaneamente, combinandosi in strutture elicoidali o icosaedriche. I capsidi elicoidali hanno forma di un tubo vuoto con parete proteica.

L'acido nucleico si trova all'interno della particella, circondato dal capsidge.

Si riconoscono due differenti simmetrie a cui corrispondono le due forme principali:

1. bastoncellari a simmetria elicoidale, come per esempio il *Virus del Mosaico del Tabacco*. Il capsidge a elica forma un tubo vuoto con parete proteica.
2. sferoidali a simmetria icosaedrica, composti da 20 facce o capsomeri. Un esempio è il virus dell'influenza che è rivestito da un nucleocapside a elica. È poliequivalente perché il suo genoma è presente su più nucleocapsidi diversi. Oltre a questo le proteine sono distribuite a intervalli regolari sulla superficie. (→ nucleocapside+involturco lipidico → simmetria marcata).

La simmetria icosaedrica rappresenta la disposizione più efficiente delle subunità nella formazione della capsida. Il capsidge assomiglia ad una sfera ed è un solido in cui la superficie è minima con volume massimo (→ il rapporto tra volume e superficie è massimo). In questo modo si minimizza il numero di subunità necessarie alla sua costruzione.

La disposizione più semplice è di 3 protomeri per capsomero, per un totale di 60 protomeri per virione. Le altre configurazioni conosciute sono 180, 240, 360 e 420 unità.

Il capsidge icosaedrico è normalmente composto da:

- P = pentoni, in corrispondenza dei vertici circondati da 5 esoni;
- H = esoni, formano i lati e le facce dell'icosaedrico.

In totale, quindi, si hanno 42 capsomeri con un solo tipo di protomeri.

Questi tipi di capsidi hanno la capacità di autoassemblaggio: si assegnano in maniera autonoma, non hanno bisogno della presenza di fattori cellulari che controllino o regolino la loro formazione. Proprio per questo motivo è possibile realizzarli in vitro.

7.1.2 Virus con capsidi a simmetria complessa

Alcuni virus non ricadono nelle categorie con capsidi ad elica o icosaedrici. Degli esempi sono i poxvirus ed i grandi batteriofagi.

- i Poxvirus sono formati da un core centrale biconcavo che contiene i genomi e numerosi enzimi virali, due corpi laterali e un doppio involucro di membrana;
- il Batteriofago T4 presenta una simmetria binaria, con combinazione di simmetria icosaedrica (testa, capsidge con acido nucleico) ed elicoidale (guaina). Presenta anche una piastra basale esagonale e delle fibre caudali, con cui interagisce con la cellula ospite e inietta il suo genoma.

Alcuni virus presentano anche l'envelope: un doppio strato fosfolipidico esterno. Questa membrana viene acquisita dal virus durante il processo di uscita della cellula ospite, detto budding (gemmazione). Mentre i virus senza envelope abbandonano la cellula lisandola, il processo di budding non altera l'integrità cellulare.

7.2. TASSONOMIA VIRALE

- Il genoma viene replicato nella cellula ospite;
- Vengono create le proteine strutturali;
- Le proteine virali con parte idrofobica vengono espresse. Questo permette di inserirsi nella membrana della cellula ospite.
- Le glicoproteine sulla membrana dell'ospite crescono di numero man mano che aumentano le proteine virali della matrice;
- Dal nucleocapside intracellulare si forma un virione libero. La membrana si richiude intorno al nucleo del capsid.

7.1.3 Genomi virali

I genomi virali hanno dimensioni ridotte e codificano quelle funzioni che non possono essere fornite dai loro ospiti. Il virus riprogramma le funzioni metaboliche e biosintetiche dell'ospite finalizzandole alla sua replicazione e all'assemblaggio di nuovi virioni. Le particelle virali hanno dimensioni da 20 a 300 nm; mentre i genomi virali sono compresi tra 500 e 5000 kb (a volte possono essere più grandi di alcuni batteri).

7.2 Tassonomia virale

La mancanza d'informazione sull'origine e sulla storia evolutiva rende la classificazione virale difficile. Mentre per gli eucarioti si è riuscito a costituire un sistema tassonomico su specie, genere, famiglia, ordine, classe e fila, e più recentemente anche su sinapomorfie e simplesiomorfie, per i virus questo non è possibile.

Nel 1971 l'International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) ha sviluppato un sistema di classificazione uniforme che descrive circa 2000 virus. Questa classificazione si basa sulla natura del genoma, sulla simmetria del capsid, sulla presenza o assenza di envelope e sulle dimensioni del virione e del capsid. Per la classificazione dei virus esiste un database chiamato ICTVdB.

I virus dimostrano un'assenza di autonomia replicativa e da questo si deduce che siano comparsi dopo gli altri gruppi. Infatti essi non presentano una replicazione sessuata o asessuata e per questo motivo non danno luogo a una linea evolutiva classica. Non esiste, quindi, un albero filogenetico dei virus, come invece c'è per gli altri esseri viventi.

Si è deciso così di stilare la classificazione di Baltimore che si occupa dell'espressione dell'informazione genetica.

1. **Classe I** → è la classe di virus più convenzionale perché le sue caratteristiche sono simili a quelle dell'ospite: presentano un DNA a doppio filamento.
Si ha la trascrizione del filamento negativo per produrre un mRNA positivo, che porta quindi alla traduzione grazie a ribosomi e alla produzione di proteine funzionali. Dato che il DNA è standard (a doppio filamento e con direzioni opposte), può replicarsi grazie ai meccanismi della cellula ospite. Questo tipo di classe non richiede alcun tipo di modifica.
Degli esempi sono: *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae*, *Poxviridae*.
2. **Classe II** → questi virus presentano un DNA a singolo filamento. C'è la necessità di un filamento complementare, costruzione di un intermedio di DNA a doppio filamento, prima della trascrizione.

7.2. TASSONOMIA VIRALE

Per prima cosa avviene la sintesi di un filamento di DNA complementare, poi si ottiene un DNA a doppio filamento standard.

Si può procedere con la trascrizione come avviene nella Classe 1. Si utilizza uno dei due filamenti stampo per produrre un mRNA che possa poi essere tradotto in proteine strutturali grazie a enzimi. Per la generazione di nuove unità genomiche l'acido nucleico viene processato in modo da ottenere la separazione della doppia elica che porta a un unico filamento (DNA+ o DNA-).

Per esempio: *Circoviridae*, *Parvoviridae*.

3. **Classe III** → questo tipo di virus presenta un RNA a doppio filamento. La cellula ospite non sa produrre altro RNA da RNA a doppio filamento.

Il filamento negativo viene trascritto e porta a sintesi di proteine funzionali con l'aiuto degli enzimi. Vengono introdotti nuovi enzimi virali, che non sono presenti nella cellula ospite: RNA polimerasi RNA-dipendente (= RNA replicasi) codificata dal genoma virale. Questa ha la capacità di leggere il filamento di RNA ed è in grado di ricostruire il genoma originale.

Per esempio: *Reoviridae*.

4. **Classe IV** → questo tipo presenta un RNA a singolo filamento positivo che può essere usato direttamente come mRNA per la sintesi di proteine strutturali dato che la cellula ospite è in grado di riconoscerlo. Per la codifica del nuovo virale si necessita di RNA polimerasi RNA-dipendente (= RNA replicasi). Con questo metodo si può produrre RNA positivo a partire da uno stampo, dato che non è possibile replicarlo direttamente.

Per esempio: *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Coronaviridae*.

5. **Classe V** → questi virus presentano un RNA a singolo filamento negativo, che viene trascritto. Si necessita di un enzima virale RNA replicasi sia:

- per la trascrizione perchè non c'è la polarità giusta. Una volta che il lo stampo di RNA positivo viene prodotto si possono codificare nuove proteine;
- per la replicazione non è possibile produrre un nuovo filamento direttamente ma ho bisogno di sintetizzare uno stampo di RNA positivo per produrne delle copie.

Per esempio: *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*

- **Classe VI** → sono dei retrovirus a RNA. Presentano un singolo filamento di RNA positivo (simile alle classe 4). Necessità di una trascrittasi inversa codificata dal genoma virale. In questo modo si ha:

- RNA positivo;
- Intermedio a DNA a singolo filamento (DNA-);
- Intermedio a DNA a doppio filamento;
- Trascrizione del filamento DNA-, in modo da ottenere mRNA+ per sintesi di proteine strutturali e RNA+ per la replicazione del genoma virale per virioni successivi.

Per esempio: *HIV*, *Retroviridae*.

6. **Classe 7** → presenta un DNA a doppio filamento.

- Costruzione di un intermedio a RNA+;
- Attraverso la trascrittasi inversa ottengo DNA- come versione complementare;
- Così può essere generato un DNA a doppio filamento come genoma per le popolazioni successive.

Per esempio: *Hepadnaviridae*.

7.3. CICLO REPLICATIVO DI UN VIRUS ANIMALE

7.3 Ciclo replicativo di un virus animale

In una cellula ospite animale il virus deve adottare delle strategie per produrre proteine e nuove copie del genoma. Il ciclo replicativo virale si può dividere in 6 fasi:

1. Adsorbimento o attacco

Avviene il contatto tra il virione e la membrana. La specificità tra il virus e l'ospite è molto forte ed è mediata dal contatto tra superficie nuda o envelope e recettori della membrana citoplasmatica. Se il virus non trova determinati recettori, il ciclo replicativo non avviene.

2. Penetrazione e decapsidazione.

L'attacco di un virus alla cellula ospite provoca delle modificazioni nel virus e nella superficie cellulare che portano alla penetrazione. Questa entrata assomiglia ad una endocitosi.

La cellula che permette lo svolgimento di un intero ciclo replicativo di un virus è definita permissiva per quel determi virus. Durante la fase di penetrazione avviene anche la spoilazione, cioè il processo attraverso cui i virioni perdono il loro rivestimento esterno e il genoma virale viene così esposto all'ambiente cellulare.

3. Espressione genica e sintesi delle proteine vitali.

Per i virus, soprattutto per quelli che entrano in cellule non permissive, è fondamentale l'espressione genica per produrre le proteine. Queste possono essere:

- Strutturali, cioè vanno a formare il capsid per consentire la formazione di nuovi virioni;
- Non strutturali, che sono quindi necessari per la replicazione del genoma.

4. Replicazione del genoma virale.

5. Assemblaggio e maturazione dei virioni.

In particolar modo nei virus con envelope, il processo di maturazione comprende anche il passaggio attraverso organuli come il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi per produrre delle glicoproteine presenti sull'envelope stesso.

6. Rilascio e fuoriuscita della cellula.

Se il virus presenta l'envelope si parla di gemmazione. Viene così chiamato perchénel momento dell'uscita del virus viene circondato da parte della membrana doppio strato fosfolipidico della cellula ospite.

7.3.1 Herpes simplex, classe I

La replicazione del genoma virale avviene nel nucleo. Il genoma viene trascritto come vari mRNA, che vengono poi esportati nel citoplasma per essere tradotti. Questa espressione genica virale avviene in tre fasi:

1. Immediate-Early (Immediata precoce): porta alla regolazione delle fasi successive;
2. Early (precoce): produzione degli enzimi necessari alla replicazione del genoma virale. Ciò implica che la proteina venga prodotta nel citoplasma, ma rientra in seguito nel nucleo per controllare la trascrizione e la replicazione;
3. Late (tardiva): sintesi delle proteine strutturali.

Dopo queste fasi possono seguire dei processi di concatenamento in cui molte unità di genoma vengono messe insieme in un'unica molecola. La maturazione del virione continua con il passaggio nel reticolo endoplasmatico e nel Golgi, per portare all'aggiunta di numerosi altre proteine sulla superficie (es. envelope). Infine si arriva all'espulsione del virione dalla cellula ospite (gemmazione).

7.3. CICLO REPLICATIVO DI UN VIRUS ANIMALE

7.3.2 Poxvirus (vaiolo), classe I

La maggior parte dei processi avviene nel citoplasma: sia il rilascio del nucleocapside e sia la replicazione del genoma virale.

Il virus deve fornire gli enzimi necessari per la replicazione del DNA e la trascrizione dell'RNA visto che la cellula ospite non è in grado di soddisfare questi compiti al di fuori del nucleo. Poi c'è un passaggio per il reticolo endoplasmatico e per l'apparato di Golgi che porta ad aggiungere dei nuovi strati endoplasmatici e proteine al virione maturo (MV). Alla fine si arriva allo stato di virione extracellulare (EV) che si distingue dal precedente MV per la tipologia dell'involucro esterno, che questa volta deriva dalla membrana plasmatica.

7.3.3 Picornavirus (poliovirus), classe IV

Questo virus presenta un genoma ad RNA positivo, che funge da mRNA e quindi può venire tradotto direttamente. Non è protetto da envelope e il suo nucleocapside non entra nella cellula durante la penetrazione.

Viene prodotta una poliproteina che viene poi scissa da delle protesasi per la produzione delle proteine strutturali.

La RNA polimerasi RNA-dipendente sintetizza l'RNA a polarità negativa che viene utilizzato da stampo per il nuovo RNA genomico positivo.

7.3.4 Virus dell'influenza umana di tipo A, classe V

Presenta un genoma a RNA negativo e segmentato. Questo significa che è composto da un insieme di frammenti con le informazioni necessarie per compiere un ciclo replicativo.

La proteina HA (emoagglutinina) lega recettori sulla superficie cellulare (contatto con la membrana):

- Introduzione e rilascio del nucleocapside;
- Trascrizione e replicazione del genoma all'interno del nucleo;
- Traduzione nel citoplasma.

Alcune proteine tornano nel nucleo per l'assemblaggio del nucleocapside. Poi le proteine dell'envlope inserite nella membrana del reticolo endoplasmatico e trasportate poi dal Golgi.

Infine avviene la gemmazione.

Per il virus dell'influenza non esiste un vaccino che rimane attivo e valido per molti anni. Questo avviene perché:

- a causa del suo genoma segmentato muta molto velocemente;
- non presenta una specificità particolarmente elevata per l'ospite;
- va incontro alla deriva antigenica, piccole variazioni (mutazioni puntiformi) che determinano epidemie influenzali ogni 2-3 anni;
- riassortimento antigenico o shift. Questo può essere alla base di pandemie, ogni 10-40 anni, per comparsa di nuovi tipi di HA e NA. Il riassortimento è dovuto all'infezione spontanea in un ospite permissivo di ceppi virali provenienti da ospiti diversi. In questo modo si ottengono strutture ibride;
- saltano da una specie all'altra.

7.3. CICLO REPLICATIVO DI UN VIRUS ANIMALE

7.3.5 Retrovirus animale, classe VI

L'HIV è il retrovirus più conosciuto globalmente. Questo virus colpisce il sistema immunitario dell'ospite fino a portarlo alla morte. È composto da un genoma a RNA negativo a singolo filamento. Per questo motivo necessita di alcuni enzimi propri per poter portare a compimento il suo ciclo replicativo:

- Proteasi PR;
- Integrasi IN;
- Trascrittasi inversa RT.

Dopo l'attacco avviene la fusione dell'envelope con la membrana cellulare, che viene seguita dal rilascio immediato del nucleocapside. Il suo genoma è organizzato in tre regioni principali:

- Gag che codifica per proteine strutturali;
- Pol che codifica per enzimi virali;
- Env che codifica per le glicoproteine del capsido.

Per prima cosa si ha la sintesi di DNA/RNA e quindi una doppia elica di DNA da parte della trascrittasi inversa. Una copia di questo doppio filamento viene integrato nel cromosoma dell'ospite e viene chiamato provirus. In questo modo il DNA virale diventa leggibile dall'apparato di lettura delle cellula ospite. Ora avvengono l'espressione del genoma virale e la sintesi delle proteine virali. Le proteine che vengono tradotte possono essere: dell'envelope, funzionali o strutturali.

Grazie alla proteasi si ha la maturazione del genoma, l'assemblaggio dei virioni, la traslocazione della proteina di superficie del reticolo endoplasmatico al Golgi e per finire alla membrana plasmatica. Alla fine avviene la gemmazione.