

Microbiologia generale

Giacomo Fantoni

Elisa Pettinà

Gaia Faggin

Telegram: @GiacomoFantoni

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

7 dicembre 2020

Indice

1	Introduzione	7
1.1	Albero della vita	7
1.1.1	Alcuni organismi	7
1.1.2	Batteri e archea	8
1.1.3	Virus	8
1.1.4	Caratteristiche degli esseri viventi	8
1.1.5	Caratterizzazione dei microbi	9
1.2	La macchina cellulare	9
1.2.1	Impatto dei microbi sulle attività umane	9
1.2.2	Ricombinazione del DNA	9
1.3	Microorganismi come modello	10
1.3.1	Il conflitto sulla generazione spontanea	10
1.3.2	Postulati di Koch	10
1.4	I batteri	10
1.4.1	Composizione elementare	10
1.4.2	Strutture e loro funzioni	11
1.4.3	Classificazione	12
2	La struttura della cellula	13
2.1	La parete cellulare	13
2.1.1	Peptidoglicano	13
2.1.2	Gram positivi	13
2.1.3	Gram negativi	14
2.1.4	Lisozima	15
2.2	La membrana citoplasmatica	15
2.2.1	La struttura	15
2.3	Membrana e parete degli archaea	16
2.4	Flagelli	16
2.4.1	Tipologie di flagelli	16
2.4.2	Struttura	16
2.4.3	Movimento flagellare	17
2.4.4	Sintesi flagellare	17
2.4.5	Tipologie di movimento flagellare	17
2.4.6	Spirocheti	18
2.4.7	Motilità batterica	18
2.5	Strutture esterne	19

2.5.1	Glicocalice	19
2.5.2	Fimbrie	19
2.5.3	Pili	19
2.5.4	Biofilm	19
2.6	Inclusioni cellulari	20
2.6.1	Tipologie di inclusioni cellulari	20
2.7	Endospore	21
2.7.1	Struttura	21
2.7.2	Formazione	21
2.7.3	Riattivazione della cellula	21
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
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 alternative 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	Genetica batterica	42
6.1	Mutazione	42
6.2	Isolamento dei mutanti	43
6.2.1	Mutazioni selezionabili	43
6.2.2	Isolamento di mutanti nutrizionali per selezione indiretta	43
6.2.3	Le basi molecolari delle mutazioni	43
6.2.4	Retromutazioni o reversioni	44
6.2.5	Frequenza di mutazione	44
6.2.6	Mutagenesi	45
6.2.7	Saggi di laboratorio per l'identificazione del mutante	46
6.3	Ricombinazione genetica omologa	47
6.3.1	Trasformazione	47
6.3.2	Trasduzione	49
6.3.3	Coniugazione	51
6.4	I trasposoni e la trasposizione	55
6.4.1	Esperimento di trasposizione	56
6.4.2	Mutagenesi con elementi trasponibili	56
6.5	Genetica batterica e clonaggio genico	57
6.5.1	I plasmidi come vettori di clonaggio	57
6.5.2	Il batteriofago lambda come vettore di clonaggio	58
6.5.3	La mutagenesi sito-diretta cosente di causare mutazioni all'interno di uno specifico gene	59
6.5.4	Mutagenesi a cassetta e inattivazione genica	59
7	Genomica microbica	60
7.1	Sequenziamento genomico di prima generazione (1995)	61
7.1.1	Cromosomi artificiali batterici: i BAC	61
7.1.2	YAC: i cromosomi artificiali di lievito	61
7.2	Sequenziamento del DNA	61
7.2.1	Metodo Sanger	62
7.2.2	Sequenziamento shotgun	62
7.3	Mappe genomiche	63
7.3.1	Categorie geniche	64
7.4	Genomica comparativa	64

8	Virologia	67
8.1	Struttura dei virus	67
8.1.1	Capside e simmetria	67
8.1.2	Virus con capsidi a simmetria complessa	68
8.1.3	Genomi virali	69
8.2	Tassonomia virale	69
8.3	Ciclo replicativo di un virus animale	71
8.3.1	Herpes simplex, classe I	71
8.3.2	Poxvirus (vaiolo), classe I	72
8.3.3	Picornavirus (poliovirus), classe IV	72
8.3.4	Virus dell'influenza umana di tipo A, classe V	72
8.3.5	Retrovirus animale, classe VI	73
8.4	I Batteriofagi	73
8.5	Replicazione dei batteriofagi	74
8.5.1	Batteriofago T4	74
8.5.2	Permutazione circolare	76
8.5.3	Batteriofagi temperati	76
8.5.4	Il batteriofago lambda	76
8.5.5	Crescita litica di lambda	78
8.6	Genomi dei batteriofagi	78
8.7	Coltivazione dei virus animali	78
8.8	Purificazione di virus	79
8.8.1	Centrifugazione differenziale	79
8.8.2	Centrifugazione in gradiente di densità	80
8.8.3	Precipitazione differenziale dei virus	80
8.8.4	Denaturazione dei contaminanti	80
8.8.5	Digestione enzimatica dei costituenti delle cellule ospiti	80
8.9	Particelle sub-virali	80
8.9.1	Viroidi	80
8.9.2	Prioni	81
9	Regolazione metabolica	82
9.1	Regolazione dell'attività enzimatica	82
9.1.1	Inibizione da feedback	82
9.1.2	Modificazione covalente degli enzimi	83
9.1.3	Processamento delle proteine	83
9.2	Regolazione a livello trascrizionale	83
9.2.1	DNA binding proteins (DBP)	83
9.2.2	Il controllo negativo della trascrizione	83
9.2.3	Controllo positivo della trascrizione	84
9.2.4	Sistemi di controllo globale	84
9.3	Altri sistemi di controllo globale	86
9.3.1	Fattori sigma alternativi	86
9.3.2	Risposta allo shock termico	86
9.3.3	Quorum sensing	86
9.3.4	Trasduzione di segnale e sistemi di regolazione a 2 componenti	87

10	Controllo della crescita microbica	89
10.1	Metodi fisici	90
10.1.1	Caldo umido	90
10.1.2	Trattamenti fisici alternativi	92
10.2	Metodi chimici	93
10.2.1	Controllo della crescita in vivo	93
10.3	Misurazione dell'attività antimicrobica	95
10.3.1	Test di Kirby-Bauer	95
10.3.2	Test di Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	95
10.3.3	Etest	95
10.3.4	Minimum bactericidal concentration (MBC)	95
10.4	Meccanismi di azione degli antibiotici	95
10.4.1	Inibizione della sintesi della parete cellulare	96
10.4.2	Inibizione della sintesi proteica	97
11	Laboratorio	98
11.1	Prima esperienza - preparazione del terreno di coltura sterile	98
11.1.1	Introduzione	98
11.1.2	Primo giorno	99
11.2	Seconda esperienza - Determinazione della curva di crescita di un ceppo batterico (<i>E. coli</i>)	99
11.2.1	Introduzione	99
11.2.2	Primo giorno	100
11.3	Terza esperienza - Caratterizzazione dei batteri del cavo orale	102
11.3.1	Introduzione	102
11.3.2	Secondo giorno	103
11.3.3	Procedimento	104
11.4	Quarta esperienza - Conta standard su piastra	105
11.4.1	Introduzione	105
11.4.2	Secondo giorno	105
11.5	Quinta esperienza - test di aerobiosi/anaerobiosi su terreno solido	107
11.5.1	Introduzione	107
11.5.2	Seconda giornata	107
11.6	Sesta esperienza - test Kirby-Bauer	108
11.6.1	Introduzione	108
11.6.2	Secondo giorno	109
11.7	Settima esperienza - test biochimico <i>API 20E</i>	110
11.7.1	Introduzione	110
11.7.2	Secondo giorno	111
11.8	Ottava esperienza - Colorazione di Gram	112
11.8.1	Introduzione	112
11.8.2	Terzo giorno	113
11.9	Nona esperienza - Trasformazione di batteri	114
11.9.1	Introduzione	114
11.9.2	Terzo giorno	115
11.10	Decima esperienza - Osservazione della motilità batterica di tipo "swimming" al microscopio ottico	116
11.10.1	Introduzione	116

11.10.2 Terza giornata	117
----------------------------------	-----

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 enormemente 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

Si chiama LUCA il last universal common ancestor, l'antenato comune a tutti i tre regni della vita, un organismo termofilo. Si nota come confrontando rRNA conservati gli eucarioti e gli archea si trovano vicini tra di loro mentre i batteri sono enormemente diversificati rispetto agli altri due. 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 Alcuni organismi

- I funghi sono eucarioti dotati di cellule con nucleo incapaci di fotosintesi ma possiedono parete cellulare.
- Le muffe sono funghi filamentosi multicellulari, crescono come lunghi filamenti detti hyphae alle cui estremità sono presenti spore. Possono riprodursi sia sessualmente che asessualmente, alcuni uccidono i batteri come *Penicillium chrysogenum* da cui si estrae la penicillina.
- I lieviti sono piccoli organismi unicellulari che si riproducono asessualmente per gemmazione.

- Protozoi: sono eucarioti unicellulari che si muovono attraverso pseudopodi, ciglia e flagelli in acqua o all'interno di organismi.
- Le alghe sono organismi unicellulari o pluricellulari che svolgono fotosintesi, producono emulsificanti e una gelatina usata per i terreni di coltura.

1.1.2 Batteri e archea

Batteri e archea sono organismi procarioti, ovvero non hanno nucleo cellulare, possiedono una parete cellulare polisaccaride di peptidoglicano. Svolgono una riproduzione asessuata e sono tipicamente dalle 10 alle 100 volte più piccoli delle cellule eucariote, nell'ordine dei micrometri. Gli archea sono presenti in ambienti inospitali ed estremi. I batteri permettono la degradazione degli animali e il riciclo del materiale che li compone. Differiscono tra di loro per le proprietà chimiche della parete cellulare e delle membrane, i batteri sono sensibili agli antibiotici e possono essere patogeni, mentre gli archea non lo sono e utilizzano enzimi per produrre proteine e acidi nucleici simili agli eucarioti.

1.1.3 Virus

I virus sono acellulari e costituiti da un materiale genetico a DNA o RNA, di un capside proteico e eventualmente di un ulteriore strato lipidico. Dipendono dalla cellula ospite per la loro riproduzione e per questo non possono essere definiti come organismi viventi.

1.1.4 Caratteristiche degli esseri viventi

- Sono dotati di un metabolismo: la cellula è un sistema aperto che assume sostanze nutritive dall'esterno, le elabora ed espelle il materiale di scarto.
- Si riproducono e crescono: le sostanze chimiche assunte dall'ambiente sono utilizzate dalle cellule per fabbricarne di nuove.
- Sono differenziate: presentano strutture specializzate.
- Comunicano attraverso sostanze chimiche rilasciate nell'ambiente.
- Si muovono.
- Si evolvono: acquisiscono nuove proprietà biologiche, gli alberi filogenetici mostrano le relazioni evolutive tra le cellule.

1.1.5 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.

1.2.1 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 il 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.

1.3.1 Il conflitto sulla generazione spontanea

Fino all'esperimento di Redi si credeva che gli organismi viventi potessero svilupparsi da materia 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). Un altro esperimento è quello di Pasteur in cui si prende un'infusione in un pallone a collo di cigno e la si sterilizza. L'apertura del collo permette il passaggio dell'aria fino al punto più basso dove si formano dei sedimenti. Si nota come l'infusione rimane sterile fino a quando non la si fa entrare in contatto con i sedimenti.

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 I batteri

1.4.1 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 macromolecole 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%.

1.4.2 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, fosfato 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).

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.

1.4.3 Classificazione

Le pareti cellulari dei batteri assumono due tipi di strutture caratteristiche, permettendo una loro classificazione in Gram-negativi e Gram-positivi. Le differenze strutturali sono responsabili del diverso comportamento rispetto al Gram-staining. Durante l'esperimento un complesso cristallino insolubile e violetto viene fatto formare nella cellula e poi estratto dall'alcol nei Gram-negativi ma non nei Gram-positivi. Questo avviene in quanto i secondi possiedono una parete cellulare molto spessa che quando disidratata dall'alcol chiude i pori e non permette l'uscita del complesso cristallino. Nei primi invece l'alcol penetra facilmente la membrana esterna estraendo poi il complesso cristallino.

Capitolo 2

La struttura della cellula

2.1 La parete cellulare

Tutti i batteri possiedono una parete cellulare che svolge vari ruoli:

- Strutturale: conferisce forma e rigidità alla cellula.
- Protettivo: impedisce la lisi in un ambiente tipicamente ipotonico in quanto il citoplasma possiede un'alta concentrazione di soluti e crea una pressione osmotica nell'ordine delle 2atm.

Oltre a permettere di capire i processi vitali di un procariote lo studio della parete cellulare ha permesso la sintesi di diversi antibiotici che la attaccano specificatamente in quanto assente nelle cellule dell'organismo infetto.

2.1.1 Peptidoglicano

La parete cellulare dei batteri è composta principalmente da peptidoglicano (mureina), un polisaccaride complesso composto da l'*N*-acetilglucosamide (*NAM*) e da *N*-acetilmuramico (*NAG*) che si alterano formando lunghi polisaccaridi formando un legame $\beta - 1, 4$. La sintesi delle catene avviene in zone concentrate, favorendo la formazione di fogli che circondano la cellula. Tra le catene si formano legami crociati tra 4 amminoacidi legatisi in posizioni specifiche al *NAM* creando ponti tetrapeptidici la cui composizione è variabile (tipicamente *L*-alanina, *D*-alanina, *D*-acido glutammico e acido diamino-pimelico).

- Nei Gram negativi il legame crociato si forma tra *DAP* e *D*-alanina.
- Nei gram positivi il legame crociato si forma attraverso un ponte peptidico tipicamente di 5 glicine.

2.1.2 Gram positivi

I Gram positivi possiedono una parete costituita da uno strato solido di peptidoglicano anche 50 volte più spesso e meno elaborato rispetto a quello dei Gram negativi. La parete cellulare è formata per il 90% da fogli di peptidoglicano sovrapposti. Si trovano nella parete oltre a proteine di trasporto e strutturali acidi teicoici e lipoteicoici. Questi sono formati da catene di alcol e zucchero come glicerolo o ribitolo unite da legami fosfodiesterici grazie a gruppi fosfato. Sono spesso associati ad

altri zuccheri come glucosio e *D-alanina*. Si dicono lipoteicoici gli acidi teicoici contenenti glicerolo e pertanto legati con i lipidi della membrana citoplasmatica. Queste molecole possiedono una carica negativa e sono in parte responsabili della carica elettrica negativa della superficie cellulare. Sono inoltre fondamentali per il trasporto di ioni calcio e magnesio. Gli acidi lipoteicoici in particolare ancorano la parete cellulare alla membrana citoplasmatica.

2.1.3 Gram negativi

I Gram negativi sono formati da due membrane, una interna e una esterna e nello spazio tra di esse, detto periplasmatico, si trova la parete cellulare di peptidoglicano.

Spazio periplasmatico

Lo spazio periplasmatico è largo circa 15nm, ha una consistenza simile ad un gel e contiene:

- Enzimi idrolitici: con ruolo nella degradazione iniziale delle molecole alimentari.
- Proteine leganti: iniziano il processo di trasporto dei substrati.
- Chemiorecettori: che governano la risposta chemiotassica.
- Acqua.
- Nutrienti.

La maggior parte di questi elementi raggiunge il periplasma attraverso un sistema di esportazione di proteine presente nella membrana citoplasmatica.

Membrana esterna

La membrana esterna presenta una forte resistenza contro composti chimici dannosi ed è formata nel lato interno da fosfolipidi e proteine, mentre in quello esterno da lipopolisaccaridi *LPS*. Questo è formato da tre parti:

- Lipide *A*: un glicolipide formato da un disaccaride *NAG* legato a fosfati ed acidi grassi grazie ad un legame estere-amminico. Questi disaccaridi sono legati al core polisaccaridico attraverso il chetodeossiottonato *KDO*.
- Core polisaccaridico: oltre il legame con *KDO* è formato da zuccheri a 7 atomi di carbonio *eptosi*, glucosio, galattosio e *NAG*.
- Polisaccaride *O*-specifico o antigene *O*: è una catena di zuccheri lunga fino a 40 residui legata al core contenente galattosio, ramnosio e mannosio oltre a uno o più dideozizuccheri (abequosio, colitosio, paratosio o tivelosio) legati a formare catene lunghe 4-5 elementi, spesso ramificate. La loro ripetizione porta alla sua formazione.

Porine Le porine sono proteine transmembrana che attraversano completamente la membrana esterna e la rendono parzialmente permeabile a piccole molecole idrofiliche. Sono formate da tre subunità identiche ciascuna con un poro di 1nm che non permette la fuoriuscita di enzimi del periplasma. Le porine si dividono in specifiche o aspecifiche in base alla selettività della molecola a cui permettono il passaggio. Tipicamente le prime formano canali d'acqua attraverso i quali può passare qualsiasi piccola molecola, mentre le seconde presentano un sito di legame specifico.

Lipoproteine Le lipoproteine sono presenti nello strato interno della membrana esterna e servono da giunzione fra questa e il peptidoglicano.

2.1.4 Lisozima

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

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

Esistono archea e micoplasmi che si trovano naturalmente nella forma di protoplasti in quanto vivono in habitat osmoticamente protetti e non necessitano una protezione contro la pressione osmotica. Sono pertanto spesso parassiti.

2.2 La membrana citoplasmatica

La membrana citoplasmatica è spessa 8nm e circonda il citoplasma separandolo 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. È una barriera altamente selettiva e funziona anche come sito di ancoraggio per proteine. L'isolamento che fornisce con l'ambiente permette la creazione di un gradiente ionico negativo all'interno e positivo all'esterno che viene usato per generare energia o forza proton-motrice.

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). 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

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. 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-acetiltalosaminuronico (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 Flagelli

I flagelli sono lunghe e sottili strutture di forma elicoidale che si estendono oltre il corpo del microorganismo. La loro funzione principale è la locomozione: esercitano un movimento rotatorio e funzionano come organi propulsori. La distanza tra curve adiacenti dell'elica è costante ma differisce per ogni specie.

2.4.1 Tipologie di flagelli

Esistono diversi tipi di flagelli:

- Peritrico: comprende i microorganismi con moltissimi flagelli che ricoprono tutto il corpo.
- Polari: si trovano a un'estremità del microorganismo in numero variabile.
- Lofotrichi: gli organismi hanno più di un flagello in un'unica estremità. A differenza dei polari possiedono più di un flagello nell'estremità.

2.4.2 Struttura

I flagelli sporgono dalla cellula per una lunghezza fino a 3 volte del corpo che li contiene e sono divisi in:

- Filamento: struttura elicoidale formata da flagellina.
- Uncino: struttura incurvata a gancio che connette il filamento al corpo basale.
- Corpo basale: è formato da 15 proteine aggregate a fare un bastoncino a cui sono attaccati anelli che tengono ancorata la struttura e le permettono di ruotare.

Gli anelli dei corpi basali sono 2 nei Gram+ e 4 nei Gram-, 2 nella membrana plasmatica esterna e 2 nella parete cellulare.

Corpo basale - Gram—

Il corpo basale nei Gram— è formato da 4 anelli:

- Anello *C*: lega il citoplasma.
- Anello *MS*: si trova all'interno della membrana citoplasmatica.
- Anello *P*: ancora la parete cellulare.
- Anello *L*: lipopolisaccaride.

Attraverso questi anelli passa il bastoncello che completa il corpo basale. Due proteine di membrana circondano la struttura di base:

- *Mot*: le proteine motrici, pompano protoni nello spazio periplasmatico e utilizzano l'energia generata dal gradiente elettrochimico per creare una forza motrice con velocità molto elevate.
- *Fli*: funzionano da invertitore, ribaltano il senso di rotazione del flagello in risposta a segnali intracellulari.

2.4.3 Movimento flagellare

Il motore flagellare è composto da un rotore e uno statore. Il rotore è composto dagli anelli *C*, *MS* e *P*, mentre lo statore dalle proteine *Mot*. Il movimento del flagello viene impartito dal corpo basale e l'energia viene fornita dalla forza proton-motrice. Gli ioni H^+ attraversano *Mot* conferendo il moto rotatorio al flagello. Per compiere un giro sono necessari 1000 protoni.

2.4.4 Sintesi flagellare

Nei Gram— per la sintesi flagellare avviene in sequenza:

1. Formazione degli anelli *MS* e *C* nella membrana interna.
2. Formazione del bastoncello e sua chiusura.
3. Formazione anello *P*.
4. Formazione anello *L*.
5. Formazione Hook.
6. Formazione Cap.
7. 20 000 proteine di flagellina attraversano l'hook e formano il filamento.

Cap

Il cap controlla la sintesi del filamento che avviene dall'alto verso il basso aiutando l'organizzazione della flagellina.

Flagellina

La flagellina è la proteina monomerica che forma il filamento. Viene formata all'interno del microorganismo e trasportata all'esterno andando a formare il flagello disponendosi a forma di spirale. Il filamento rimane cavo all'interno. Ha inoltre proprietà antigeniche ed è rigida.

2.4.5 Tipologie di movimento flagellare

- Peritrico: alterna tumble e run in base se si vuole avvicinare ad un nutriente o allontanarsi da un repellente. La direzionalità della cellula è data dal fascio dei flagelli lungo lo stesso asse che ruota in senso orario. Affinchè avvengano tumble avviene una rotazione oraria.
- Polare: microorganismi dotati di un unico flagello hanno la possibilità di ruotarlo in entrambi i sensi: in uno vanno avanti nell'altro indietro. Altri possono muoversi in un unico senso con movimento aleatorio.

Velocità

I flagelli permettono spostamenti al secondo fino a 60 volte la lunghezza del corpo.

2.4.6 Spirocheti

Gli spirocheti sono una classe di microorganismi a forma di spirale e Gram—. I loro flagelli si trovano all'interno del corpo tra periplasma e membrana esterna. Vengono detti filamenti assiali e percorrono il corpo formando una spirale ancorata alla membrana interna. La rotazione sincrona dei filamenti fa muovere l'intero corpo. Gli spirocheti sono pertanto in grado di muoversi in ambienti viscosi come nei liquidi interni del corpo umano e molti di essi sono patogeni.

2.4.7 Motilità batterica

Motilità per scivolamento

I batteri possono muoversi anche in altri modi oltre a quello che utilizza i flagelli. Nei batteri bastoncellari o filamentosi la motilità per scivolamento non usa strutture esterne, ma la cellula si muove lungo il suo asse maggiore. Questo movimento è più lento rispetto a quello flagellare e richiede una superficie solida. Nei cianobatteri è accompagnato dalla secrezione di una sostanza mucosa o *slime*, un polisaccaride che fa aderire meglio il microorganismo alla superficie solida. In altri batteri si trovano proteine di membrana citoplasmatica che utilizzano l'energia rilasciata dalle pompe di ioni H^+ per subire cambiamenti conformazionali che vengono trasmessi alle proteine di membrana esterna e consentono lo scivolamento della cellula sulla superficie.

Chemiotassi

Si intende per chemiotassi il movimento dovuto alla presenza di un attrattante o repellente nell'ambiente segnalato grazie a chemiorecettori. In presenza di attrattante i moti di avanzamento sono orientati e il numero di run è maggiore rispetto a quello di tumble, mentre in presenza di repellente avviene l'inverso. Si possono scoprire nuove forme per combattere i patogeni analizzando i loro repellenti.

Fototassi

Si intende per fototassi il movimento di microorganismi verso la luce. È in risposta a uno stimolo che un batterio riceve se esposto a una specifica lunghezza d'onda. Si orientano per ottenere il livello di luce ottimale. Il responsabile di tale risposta è il fotorecettore.

Aerotassi

Si intende per aerotassi l'avvicinamento o allontanamento da fonti ricche di O_2 . Esistono batteri che necessitano di ossigeno per vivere, mentre altri che ne sono inerti o per cui è tossico.

Osmotassi

Si intende per osmotassi il movimento di allontanamento o avvicinamento ad alte concentrazioni ioniche.

2.5 Strutture esterne

2.5.1 Glicocalice

Il glicocalice è una struttura variabile costituita principalmente da polisaccaridi e polipeptidi. È un polisaccaride ad elevato peso molecolare, eteropolimerico od omopolimerico.

Capsula

La capsula è un tipo di glicocalice con struttura rigida, solida e forte. È presente nei patogeni grazie alla quale riescono ad aderire a molti substrati: circonda le difese immunologiche degli eucarioti in quanto gli zuccheri che la compongono sono simili a quelli presenti nelle cellule degli eucarioti. Può superare le dimensioni del batterio ed è la principale linea di difesa contro la fagocitosi.

Strato mucoso

Lo strato mucoso è un tipo di glicocalice con struttura più morbida e meno attaccata alla cellula. Può essere disciolto in acqua e la sua funzione fondamentale è di protezione dalla essiccazione oltre a conferire capacità adesive.

2.5.2 Fimbrie

Le fimbrie sono filamenti molto più corti e numerosi che non partecipano al processo di locomozione ma a quello di aderenza ad altre cellule o per la creazione di biofilm.

2.5.3 Pili

I pili sono costituiti da proteine diverse, sono più lunghi delle fimbrie e sono presenti in poche quantità. La loro funzione è quella di connettersi ad un altro microorganismo e scambiare materiale genetico attraverso coniugazione o per iniettare tossine attraverso i sistemi di secrezione. La capacità di adesione è mediata dalle adesine, proteine presenti alle estremità. Sono sintetizzati quando la cellula li necessita. Sono responsabili di un tipo di variazione genetica e sono più lunghi del corpo batterico. Permettono la motilità agganciandosi ad una cellula nelle vicinanze e depolimerizzandosi all'interno della cellula madre permettono l'avvicinamento con motilità contrattile. Crescono dall'interno verso l'esterno.

2.5.4 Biofilm

I biofilm sono masse viscosi di batteri raggruppati in un'unica zona. Le cellule hanno un comportamento diverso rispetto a quando sono isolate. La massa è circondata da fimbrie e polisaccaridi. Nei biofilm i batteri sono più resistenti ad antibiotici in quanto è presente una barriera supplementare.

Quorum sensing

Per produrre i biofilm i batteri devono essere in grado di comunicare tra loro per ottenere una struttura tridimensionale adatta. Questo avviene attraverso il rilascio di proteine captate da recettori specifici. Queste vie di segnale permettono ai microorganismi di capire quando il loro numero è sufficiente per creare un biofilm. I recettori saturi infatti indicano un numero ottimale per la creazione di un biofilm. Si smette di produrre le molecole di segnale si inizia a formare il biofilm.

2.6 Inclusioni cellulari

Le inclusioni cellulari sono strutture batteriche interne composte da lipidi, proteine, glicogeno e amido. Sono riserve di nutrienti e presenti in condizioni favorevoli come previsione. Arrivano a occupare i $\frac{3}{4}$ della cellula. Isolano il materiale di riserva dal citoplasma. Sono circondate da membrana lipidica.

2.6.1 Tipologie di inclusioni cellulari

Acido *poli- β -idrossibutirrico* *PBH*

Il *PBH* è formato da monomeri dell'acido che si legano tramite legami estere formando polimeri che si aggregano in granuli. Sono sintetizzati in eccesso di carbonio e utilizzati per produrre *ATP*.

Glicogeno

Il glicogeno è un polimero del glucosio, funge da riserva di energia e di carbonio.

Polifosfati

I polifosfati sono sorgenti di fosfati per sintesi di acidi nucleici e di fosfolipidi per la membrana citoplasmatica.

Globuli di zolfo elementare

I globuli di zolfo elementare si formano ossidazione del solfuro di idrogeno accoppiate con reazioni di metabolismo energetico e fotosintesi. Quando lo zolfo si esaurisce si ossidano. Si trova nel periplasma.

Magnetosomi

I magnetosomi sono particelle cristalline costituite da magnetite Fe_3O_4 e creano un dipolo magnetico permanente. I batteri che li contengono svolgono magnetotassi.

Vescicole gassose

Le vescicole gassose sono strutture di natura proteica, vuote e rigide nel citoplasma. Conferiscono alla cellula la capacità di galleggiare diminuendone la densità. La membrana proteica è impermeabile all'acqua. Permettono al batterio di aggiustare la posizione verticale nella colonna d'acqua. Sono formate da *GvpA* e *GvpC*: la prima idrofobica ricca di β -foglietti, mentre la seconda ricca di α -eliche. *GvpA* si allinea in nastri paralleli formando una superficie impermeabile rafforzata da *GvpC* attraverso legami crociati.

2.7 Endospore

Le endospore sono strutture uniche che alcuni batteri sono in grado di produrre. Nella sporulazione una cellula trasforma sè stessa in un'endospora a causa di ambiente ostile. L'endospora è molto resistente a calore, agenti chimici e radiazioni.

2.7.1 Struttura

L'endospora è formata da:

- Esosporio: lo strato più esterno, sottile e delicato.
- Tunica: parete della spora, più strati proteici.
- Corteccia: peptidoglicano lasso.
- Core: parete cellulare, membrana citoplasmatica, nucleotide e ribosomi.

Il metabolismo viene rallentato di molto.

Acido dipicolinico

Una sostanza chimica la cui caratteristica è l'acido dipicolinico che forma un complesso con gli ioni calcio che riduce la presenza d'acqua all'interno dell'endospora. Si intercala inoltre con il DNA rendendolo più resistente alla denaturazione per riscaldamento.

Small acid-soluble spore protein *SASP*

Le *SASP* legano il DNA e lo proteggono da UV e sostanze chimiche. Sono fonte di carbonio e forniscono l'energia per la germinazione. Proteggono il DNA modificandolo nella forma *A*, resistente alla formazione di dimeri e pirimidina

Gram–

Nei pochi gram – che producono endospore si trova il core, la corteccia sostituisce il peptidoglicano e si trova dopo il coat. Nella corteccia viene contenuto l'acido dipicolinico che la protegge e conferisce rigidità. Compatta il DNA nel core per renderlo più resistente al caldo.

2.7.2 Formazione

Un segnale extracellulare interpretato dalla cellula attiva una serie di geni: il DNA si replica in due cromosomi identici in cui un'estremità rimane legata alla membrana cellulare. Si allungano lungo l'asse della cellula e inizia a formarsi una seconda membrana. Crea un'invaginazione all'interno del batterio fino a creare due compartimenti distinti. Un DNA viene digerito, mentre intorno all'altro si crea una seconda membrana. Si forma la corteccia e il coat. L'endospora viene rilasciata dalla cellula madre.

2.7.3 Riattivazione della cellula

L'endospora può rimanere inattiva per molti anni, ma può essere riconvertita a cellula vegetativa molto rapidamente. Questo processo avviene in tre stadi.

Attivazione

L'attivazione è innescata dal riscaldamento di endospore appena formate o dalla presenza di nutrienti specifici.

Germinazione

Durante la germinazione l'endospora perde l'acido dipocolinico in complesso con il calcio e i componenti della corteccia.

Esocrescita

Durante l'esocrescita avviene un rigonfiamento dovuto all'assorbimento di acqua e alla sintesi di nuovi RNA, DNA e proteine.

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 coltura ($100\mu l$), dopo una notte si osserva il numero di colonie. Nel pour-plate method si aggiunge il terreno successivamente alla colonia. 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 microbica (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

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 diluizioni si incuba in 5 tubi un millilitro con un indicatore di pH che ritorna giallo quando il pH si abbassa, indicazione di un 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 H_2O , O_2 e CO_2 .

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 ai 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;
- **Iperotonica** → uscita di acqua causando la diminuzione del volume cellulare;
- **Ipotonica** → ingresso di acqua nella cellula che porta alla lisi delle cellule prive 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 formata 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:

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 trasportato 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 compartimento 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.

4.2.1 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 tossine, 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 segnale 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.

4.2.3 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 periplasma; 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 esterna (usciera).

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.

4.3.2 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 virulenza 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 una 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 chaperonine (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'assemblaggio 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.

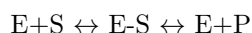
Il metabolismo viene diviso in due principali tipi di reazioni: cataboliche e anaboliche. Il catabolismo è la parte del metabolismo che libera energia, grazie alla scomposizione di molecole organiche. Una parte dell'energia viene conservata sotto forma di legami nell'ATP, mentre altra viene dispersa come calore. È una via esoergonica. 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 endoergonica. 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 $\Delta G^{0'}$ è negativo significa che essa procederà con liberazione di energia libera. Se $\Delta G^{0'}$ 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.

5.1.1 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 il 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'apoezima, 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 (nè catabolismo, nè 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 o 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.

5.1.3 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 reversibile 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 adeguata 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 perchè il guadagno di elettroni riduce la sua carica elettrica totale. Le molecole che predono elettroni si ossidano perchè 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^I più negativo in cima alla torre a quelle con il valore di E_0^I 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

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 in 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 stoccata 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 \rightarrow prevede il trasferimento del fosfato da una molecola organica all'ADP per formare ATP;
- Fosforilazione ossidativa \rightarrow l'energia derivata da reazioni redox della respirazione cellulare viene utilizzata per aggiungere fosfato inorganico (P_i) all'ADP;
- Fotofosforilazione \rightarrow 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 \rightarrow consiste nella completa demolizione del glucosio per formare anidride carbonica ed acqua;
- fermentazione \rightarrow 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 consumati 2 ATP, quindi il bilancio netto è di 2 ATP. Due molecole di NAD^+ , invece, vengono ridotte a NADH.

Gli step della glicolisi sono:

- (1) Fosforilazione del glucosio ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$) per formare glucosio-6-fosfato. L'enzima utilizzato è l'esochinasi.
- (2) Fosforilazione ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$). L'enzima utilizzato è l'isomerasi.
- (3) Isomerizzazione per formare fruttosio 1,6-bisfosfato. L'enzima utilizzato è il fosfofruttachinasi.
- (4) Il fruttosio 1,6-bisfosfato 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 Mg^{2+} ; il complesso è quindi un oloenzima.

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 acetylCoA

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 rigenerano l'acido ossaloacetico

Durante lo step 5, una piccola parte dell'energia del processo viene stoccata 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 trasportatori 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 accettore 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'accettrice 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 alterna tra stato ridotto (Fe^{2+}) ed ossidato (Fe^{3+}). Il citocromo c serve da intermedio fra 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 .

Alla fine gli elettroni vengono accettati dall'ossigeno. La reazione tra elettroni, ossigeno e H^+ forma l'acqua. Proprio per questa specifica funzione 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 pompate ioni H^+ all'esterno. Questi derivano o dai trasportatori 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 $ADP + P_i$ 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: $\text{Glucosio} + NAD^+ + 2ATP \rightarrow 2 \text{ piruvato} + 4ATP + 2NADH$

Dato che $1 NADH \rightarrow 3 ATP$, 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: $\text{Piruvato} + 4 NAD^+ + FAD \rightarrow 4 NADH + 1 FADH + 1 GTP + 3CO_2$

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 alternative 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 fototroterotrofi 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.

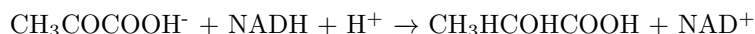
5.10 La fermentazione

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 conservata è in quantità minore rispetto a quella della respirazione, essa consente di produrre ATP senza un accettore di elettroni.

5.10.1 Fermentazione lattica

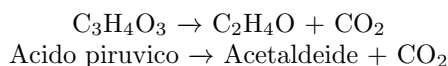
Nel processo della fermentazione lattica i due atomi di idrogeno vengono trasferiti sul carbonio in posizione 2 dell'acido piruvico, producendo l'acido lattico.



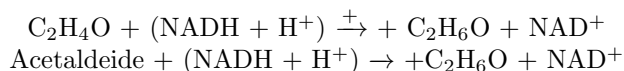
È un processo che viene attuato da alcuni batteri, come i lattobacilli, e dalle cellule del corpo umano in condizioni di anaerobiosi, come i muscoli.

5.10.2 Fermentazione alcolica

1^a reazione:



2^a reazione:



Dalla fermentazione del glucosio si possono avere vari prodotti. a glicolisi produce piruvato, che può essere convertito ad acido lattico attraverso la fermentazione lattica o etanolo 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, sapori, 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 conservare 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 coagula 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 -ossidazione. 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 catabolizzarle all'esterno. Gli enzimi proteasi degradano le proteine in amminoacidi 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 solfurei 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 luce 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 fotosintesi avviene al livello della membrana citoplasmatica dove ci sono molte clorofille a formare i tilacoidi. 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 tilacoidi 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 accettori 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 ossigenica 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 anossigenica 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 CO_2 (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

Genetica batterica

La genetica batterica tratta:

- Mutazioni;
- Ricombinazione genetica;
- Scambio di materiale genetico;
- Clonaggio genico.

Dogma centrale della biologia:

DNA \rightarrow RNA \rightarrow proteine

Il dogma centrale della biologia enuncia che: il DNA esprime le informazioni racchiuse nei geni attraverso la trascrizione in mRNA. A sua volta questo è composto da codoni. Quest'ultimi sono delle triplette di nucleotidi che codificheranno poi le proteine che verranno sintetizzate nel processo di traduzione.

Nei procarioti la trascrizione e la traduzione sono meccanismi relativamente semplici visto che non sono compartimentati e avvengono quasi simultaneamente, mentre negli eucarioti il processo è più complesso. Per prima cosa nei geni degli eucarioti sono presenti delle zone non codificanti, introni, che devono venire eliminate tramite lo splicing. Questo avviene nel nucleo. Così facendo e grazie ad altre modifiche, viene prodotto un mRNA maturo che è in grado di spostarsi nel citoplasma per andare incontro a traduzione. Trascrizione e traduzione presentano delle differenze spaziali e temporali.

6.1 Mutazione

La mutazione è un cambiamento ereditabile nella sequenza delle basi nucleotidiche del genoma. Un ceppo che porta un cambiamento viene detto mutante, mentre quello non mutato viene detto selvatico o wild type.

Le proprietà osservabili del mutante rappresentano il suo fenotipo. Viene indicato da tre lettere con un apice più o meno, che indica la presenza o meno di una certa proprietà. Per esempio **HisC⁻** non è in grado di produrre istidina.

Il genotipo viene indicato con tre lettere minuscole seguite da una lettera maiuscola, tutte in corsivo. Per esempio il gene *hisC* di *E. coli* codifica una proteina denominata **HisC**, coinvolta nella sintesi dell'aminoacido istidina. Le mutazioni del gene *hisC* sono indicate come *hisC1*, *hisC2* e via dicendo.

6.2 Isolamento dei mutanti

6.2.1 Mutazioni selezionabili

Le mutazioni possono essere selezionabili in quanto conferiscono alcuni vantaggi, mentre altre non sono selezionabili, anche se portano eventualmente a un profondo cambiamento del fenotipo dell'organismo.

Un esempio di mutazione selezionabile è la resistenza ai farmaci: antibiotici. Un mutante antibiotico può crescere in presenza di una concentrazione del farmaco che inibisce o uccide il tipo selvatico. Procedimento:

- Piastra di coltura con tappeto uniforme di batteri;
- Disco antibiotico che diffonde radialmente. Più ci si allontana dall'anello, minore è la concentrazione del farmaco;
- Si nota il fenotipo bianco su antibiotico nero. C'è una resistenza maggiore.

La selezione è quindi uno strumento estremamente potente che permette l'isolamento di un singolo mutante all'interno di una popolazione.

6.2.2 Isolamento di mutanti nutrizionali per selezione indiretta

Con la tecnica di "replica plating" possono essere identificati mutanti nutrizionali diretti. Procedimento:

- Un terreno di coltura ricco di nutrienti con diluizione corretta in modo da far crescere colonie individuabili e non sovrapposte tra loro;
- Viene utilizzato un velluto sterile per ottenere una stampa delle colonie da una piastra madre su un'altra piastra mancante di alcuni nutrienti.

Risultati:

- L'incapacità di una colonia a crescere sulla piastra replicata la segnala come mutante;
- Altri mantengono la capacità di produrre proteine.

Viene detto auxotrofo un mutante che presenta una richiesta nutrizionale particolare, cioè presenta una perdita di un enzima nella sua via biosintetica; mentre il suo contrario viene definito prototrofo. Esempi di mutanti selezionabili....Aggiungi tabella

6.2.3 Le basi molecolari delle mutazioni

La sostituzione di una coppia di basi viene chiamata mutazione puntiforme (point mutation). L'errore del DNA viene trascritto nell'mRNA che viene tradotto per produrre la proteina. Quando questo errore avviene in una regione codificante del DNA la mutazione risulta generalmente nell'alterazione della sequenza degli aminoacidi della proteina codificata dal gene mutato. In questo caso si chiama **mutazione missenso**. Non tutte queste mutazioni portano ad un malfunzionamento della proteina. Il risultato dipende da quale effetto ha la mutazione sul ripiegamento del polipeptide.

A causa della degenerazione del codice genetico, non tutte le mutazioni determinano un cambiamento nella proteina. Queste sono dette **mutazioni silenziose**. Queste mutazioni si presentano spesso

nella terza base del codone perché è la più degenerata.

Le **mutazioni non sense** portano alla formazione di un codone di stop e portano alla formazione di una proteina incompleta. Nello **scivolamento dello schema di lettura (frameshift)** perdite o integrazione di basi determinano uno scivolamento del frameshift ed una modifica dell'intera sequenza della proteina. La perdita o l'inserimento di multipli di 3 basi risultano nell'acquisto o nella perdita di aminoacidi senza scivolamento del frameshift, questo lo rende meno dannoso di tutti.

Spesso il frameshift porta alla sintesi di proteine non funzionanti.

Secondo il concetto di codone genetico degenerato esistono più codoni che codificano per un singolo aminoacido. In particolare ci sono 64 codoni possibili, ma solo 20 aminoacidi. Questo consente di produrre meno aminoacidi di quanti potrebbero essere i potenziali, limitando i danni causati da un appaiamento sbagliato. Normalmente i codoni che portano alla traduzione di uno specifico aminoacido hanno le prime due lettere conservate, mentre la terza variabile. Questo spiega le mutazioni silenziose.

Le sequenze importanti da ricordare sono:

- Sequenze di STOP della sintesi proteica (traduzione) → UAA, UAG e UGA;
- Sequenza di inizio traduzione che corrisponde all'aminoacido della metionina → AUG.

Solo una minoranza degli aminoacidi vengono considerati critici, per esempio quelli presenti nel sito attivo oppure quelli che determinano la struttura. Quindi non tutte le mutazioni a carico di aminoacidi causano grandi mutazioni sulle proteine.

6.2.4 Retromutazioni o reversioni

Le mutazioni puntiformi sono generalmente reversibili attraverso le reversioni. Un revertante viene definito come un ceppo in cui il fenotipo selvatico, che era stato perso nel mutante, viene ripristinato. Esistono due tipi di revertanti:

1. "Dello stesso sito" → la mutazione che ripristina l'attività si verifica nel medesimo sito in cui è avvenuta la mutazione originale;
2. "Di secondo sito" → la mutazione avviene in un sito differente del DNA. Queste mutazioni sono dette soppressive, perché compensano l'effetto della mutazione originale e ripristinano il fenotipo selvatico. Esse possono essere:
 - una mutazione nello stesso gene che ristabilisce il frameshift originale;
 - una mutazione in un altro gene che può ripristinare la funzione del gene originale mutato;
 - una mutazione in un altro gene che determina la produzione di un enzima che può sostituire quella mutante.

6.2.5 Frequenza di mutazione

Gli errori nella replicazione del DNA ricorrono con una frequenza di circa 10^{-7} - 10^{-11} per coppia di basi durante un ciclo di replicazione. Un gene tipo possiede circa 1000 paia di basi, quindi la frequenza di questi errori in un dato gene sarebbe 10^{-4} - 10^{-8} per generazione.

In una coltura batterica, avente circa 10^8 cellule/ml esiste la probabilità che in ciascun ml di coltura, per un dato gene, ci sia almeno un mutante. Le mutazioni non hanno la stessa probabilità di avvenire: missenso, silenziose, nonsense. Se si prende come esempio un codone GGG, aminoacido codificato Gly, le possibilità di mutazioni puntiformi sono:

- GGU → Gly (silent);
- GGC → Gly (silent);
- GGA → Gly (silent);
- GUG → Val (missense);
- GCG → Ala (missense);
- GAG → Glu (missense);
- UGG → Trp (missense);
- CGG → Arg (missense);
- AGG → Arg (missense).

Se a cambiare è solo l'ultimo nucleotide di un codone otteniamo una mutazione silente. Se cambia il primo o il secondo nucleotide sicuramente abbiamo una mutazione missenso. Le mutazioni nonsense avvengono per un raro caso di coincidenza.

6.2.6 Mutagenesi

La frequenza di mutazione può essere aumentata da vari agenti chimici, fisici o biologici.

Mutageni chimici

I mutageni chimici portano ad analoghi delle basi nucleotidiche. Questi sono simili nella struttura alle basi del DNA ma si dimostrano difettosi nell'appaiamento. Aumentano con gli errori nella replicazione del DNA con l'incorporazione di una base sbagliata nell'elica di DNA completa. Due esempi di analoghi dei nucleotidi che causano sostituzioni da AT e GC sono:

- 5-Bromouracil si associa con G anziché A;
- 2-Aminopurine si associa con C anziché T.

Per esempio la timina e il suo analogo bU: l'inserimento di bU al posto di T causa una prima mutazione (G anziché A) dopo il primo ciclo replicativo. Dopo il secondo ciclo replicativo avviene la sostituzione completa di un paio di basi AT in GC. Questo porta ad errori.

I mutageni chimici possono essere:

- **Agenti alchilanti** → interagiscono direttamente con il DNA, ad esempio creando dei legami crociati tra le eliche del DNA. Inducono cambiamenti anche in assenza di replicazione del DNA;
- **Agenti intercalanti** → si inseriscono tra due coppie di basi del DNA, separandole. Portano a microinserzioni o microdelezioni e inducono mutazioni frameshift.

Un esempio di meccanismo di azione di un frameshift mutagen è l'inserimento dell'acridina. L'acridina si inserisce nella doppia elica del DNA. Questo porta all'inserimento o alla delezione di un nucleotide da parte della DNA polimerasi.

Queste sostanze vengono chiamate teratogene o cancerogene: con l'aumento di queste mutazioni è possibile l'origine di tumori.

Agenti fisici

Le mutazioni possono essere indotte anche da agenti fisici come le radiazioni:

- **Raggi UV** → inducono la formazione di dimeri di pirimidine (C o T), uno strato in cui le basi vengono legate covalentemente durante la replicazione del DNA. Questo legame impedisce la formazione di legami idrogeno con le basi del filamento complementare. Aumentando la probabilità che la DNA polimerasi inserisca in questa posizione un nucleotide sbagliato;
- **Radiazioni ionizzanti** (raggi X e raggi γ) → determinano effetti mutageni indiretti tramite la ionizzazione dell'acqua e la formazione del radicale libero OH^\cdot . Questo crea stress ossidativo e può recare danni alla molecole di DNA.

6.2.7 Saggi di laboratorio per l'identificazione del mutante

Identificazioni di mutazione per selezione positiva

Si prende una coltura batterica con vari batteri e la si versa su una piastra contenente penicillina:

- Solo i batteri resistenti alla penicillina resistono;
- Eliminazione dei fenotipi wild-type;
- Come prova verso la stessa coltura batterica su piastra senza penicillina e osservo che crescono molte colonie batteriche.

Poi si aggiunge alla coltura la sostanza che voglio testare come mutagena. Se è mutagena si nota che, dopo aver fatto crescere la coltura sulla piastra con penicillina, il numero di colonie aumenta e di conseguenza cresce anche la frequenza di mutazione. (resistenza all'antibiotico).

Calcolo della frequenza di mutazione

$$\frac{N^\circ \text{colonie con mutagene} - N^\circ \text{colonie senza mutagene}}{N^\circ \text{colonie senza mutagene}} \times 100$$

Test di Ames

Il test di Ames utilizza mutanti del genere *Salmonella* con una mutazione puntiforme che impedisce la biosintesi dell'aminoacido istidina (His^-). Se il terreno non presenta istidina, allora la colonia non cresce per mancanza di questo aminoacido.

Ad una sospensione di mutanti viene aggiunto un estratto di fegato, che simula le condizioni fisiologiche nelle quali gli enzimi epatici possono trasformare varie sostanze innocue in agenti mutageni.

I batteri vengono piastrati su un terreno senza istidina: la comparsa di colonie revertanti (His^+) è indicativa della mutagenicità della sostanza testata.

Se i revertanti compaiono sia nella piastra di controllo sia nella piastra di testa, con l'aggiunta della sostanza si ha un netto aumento del numero di revertanti attorno al disco. Questo dimostra la sua azione mutagena. In prossimità della sostanza non sono presenti batteri. Questo accade perchè la concentrazione della sostanza mutagena è troppo alta e causa una quantità eccessiva di mutazioni all'interno del batterio che portano alla morte dell'individuo.

6.3 Ricombinazione genetica omologa

Si intende uno scambio fisico di materiale genetico. Consiste nello scambio genetico tra sequenza omologhe di DNA. Le sequenze omologhe di DNA non sono complementari, ma presentano un alto tasso di identità che permette l'appaiamento. Il processo inizia con un **taglio** (nick) prodotto da una endonucleasi (enzima che taglia il DNA) e che spesso presenta anche un'attività elicasica per srotolare il DNA. A questo taglio si legano le proteina **SSB** + **RecA** che formano un complesso che facilita il riappaiamento con la sequenza complementare del DNA recipiente, mentre spontaneamente avviene lo spostamento del filamento residente. Dopo l'appaiamento può avvenire uno scambio di molecole omologhe di DNA, che porta alla formazione di intermedi di ricombinazione. Questi contengono delle regioni eteroduplici (heteroduplex) dove ciascun frammento è originato da cromosomi differenti. In fine avviene la **risoluzione**, ossia la liberazione delle molecole dell'ibrido. Può avvenire in due modi:

1. **Patches** → solo un filamento presenta lo scambio e quindi si presenta ibrido;
2. **Splices** → entrambi i filamenti si presentano come ibridi.

Identificazione dei ricombinati

Di solito vengono utilizzati dei ceppi riceventi che mancano di alcune caratteristiche selezionabili che i ricombinanti dovranno possedere.

Per la vera identificazione di un'avvenuta ricombinazione è importante che il tasso di retromutazione per il carattere studiato sia basso dato che oltre ai ricombinanti anche i revertanti potranno formare colonie. Vengono utilizzati spesso doppio mutanti, cioè ceppi che presentano mutazioni diverse, perché è poco probabile che possano avvenire retromutazioni nella stessa cellula. Se la coltura viene messa su una piastra dove non è presente non dovrebbe crescere nulla.

Viene preso del DNA libero estratto da delle cellule di Trp^+ e lo si mette nella stessa provetta della coltura batterica. Una volta che vengono rimesse sulla piastra, solo le cellule che hanno integrato il nuovo estratto sono in grado di crescere e formare delle colonie.

Nei procarioti è possibile osservare la ricombinazione genetica quando i frammenti di DNA omologo vengono trasferiti da una cellula donatrice (donor) ad una cellula ricevente (recipient) mediante uno dei tre seguenti processi di trasferimento genico orizzontale:

- **Trasformazione** → il DNA di una cellula viene assimilato da un'altra cellula, senza che ci sia contatto diretto;
- **Trasduzione** → il DNA del donatore si trasferisce grazie alla mediazione di un virus;
- **Coniugazione** → il trasferimento coinvolge il contatto cellula-cellula.

6.3.1 Trasformazione

Il processo di trasformazione è stato scoperto con l'esperimento di Frederick Griffith nel 1928.

In questo esperimento viene osservato il batterio *Streptococcus pneumoniae* che si divide in due ceppi principali:

- **Ceppo S** (smooth) → ceppo patogeno. Presenta una capsula polisaccaridica esterna;
- **Ceppo R** (rough) → è il mutante non patogeno. Non presenta geni per la produzione della capsula ed è quindi incapace di causare l'infezione.

Vengono condotte quattro diverse prove sperimentali:

1. Ceppo S vivo iniettato nel topo → il topo muore e si trovano cellule vive del ceppo S nel cuore;
2. Ceppo R vivo iniettato nel topo → il topo è sano e non viene trovata nessuna cellula batterica nel cuore;
3. Ceppo S inattivato dal calore (lisi) → il topo è sano e non viene trovata nessuna cellula batterica nel cuore;
4. Ceppo R vivo + ceppo S inattivato dal calore → il topo muore e vengono trovate delle cellule vive del ceppo S nel cuore.

Questo mette in luce il ruolo centrale della capsula batterica e mostra anche che una cellula batterica è capace di acquisire determinate caratteristiche da un altro. Tuttavia non si conosceva ancora quale molecola si occupasse di questo. Oggi si sa che le cellule acquisiscono una parte di DNA del ceppo S. Il materiale genetico viene rilasciato nell'ambiente esterno e mantiene la capacità di codificare per qualche informazione.

Questa trasformazione dal ceppo R al ceppo S avviene anche in vitro ed è fondamentale per modificare gli organismi.

La trasformazione è un processo mediante il quale una molecola di DNA libero viene incorporata in una cellula ricevente e determina un cambiamento genetico (ricombinazione).

A causa della sua estrema lunghezza (ad esempio in $1700 \mu\text{m}$ in *Bacillus*) la molecola di DNA si può rompere facilmente. Anche dopo un'estrazione delicata un cromosoma batterico si riduce in frammenti di circa 15 kb. Questa dimensione rappresenta un tipico frammento trasformabile.

Le cellule con l'abilità di acquisire DNA dall'ambiente sono dette competenti. La competenza è il risultato delle alterazioni degli involucri cellulari (membrane e parete) e può essere di due tipi:

- **Naturale;**
- **Artificiale o indotta** → è alla base delle moderne biotecnologie. Molte specie non sono dotate di competenza per la trasformazione e lo possono diventare in seguito a shock elettrici o esposizione a cloruro di calcio. Così facendo la membrana cellulare diventa più permeabile al DNA.

Trasformare i batteri con DNA plasmidico è più semplice perché:

- i plasmidi non si degradano con facilità quanto i frammenti lineari;
- non richiedono necessariamente integrazione nel cromosoma batterico tramite ricombinazione omologa;
- possono replicarsi all'interno della cellula ospite.

Processo di trasformazione:

1. Processo di entrata nella cellula e ricombinazione

Il DNA trasformante (lineare) si lega alla superficie della cellula mediante una proteina legante il DNA. Poi o penetra l'intero frammento a doppio filamento o una nucleasi degrada un filamento e l'altro viene acquisito. Quest'ultimo filamento si associa ad una proteina specifica che lo protegge dall'attacco della nucleasi.

Poi viene integrato nel genoma del ricevente mediante un processo di ricombinazione omologa non reciproca che coinvolge la proteina RecA.

Durante la replicazione di questa molecola di DNA eteroduplice si formeranno una molecola di DNA parentale e una molecola di DNA ricombinante.

2. Ricombinazione omologa non reciproca

Per prima cosa si ha l'associazione dei segmenti omologhi a cui segue l'apertura della doppia elica del DNA (ricevente). Ciò permette l'appaiamento con la sequenza omologa sul DNA donatore.

Per prima cosa l'endonucleasi taglia parte del filamento donatore e poi effettua delle fratture presso le zone sul filamento dell'ospite sopra il quale si è posizionato il nuovo DNA. Vengono riparate le lacune lungo il filamento e in questo modo si ottiene un DNA eteroduplice nel DNA ospite.

Questo processo di ingresso avviene sia nei gram negativi che nei positivi.

Gram negativi:

- PilQ contribuisce al movimento attraverso la membrana esterna;
- PilE trasferisce il DNA attraverso la parete e lo spazio periplasmatico;
- ComE è una proteina di legame al DNA;
- N è la nucleasi che degrada un filamento di DNA;
- ComA è un canale che consente il passaggio del DNA nel citoplasma.

Gram positivi (molto simile con il sistema dei gram-negativi):

- ComGC = PilE;
- ComEA = ComE;
- Nucleasi (N);
- ComEC = ComA;
- ComFA è un DNA traslocasi in grado di trasferire il DNA nel citoplasma. Non è noto nessun equivalente nei gram-negativi.

6.3.2 Trasduzione

La trasduzione implica il trasferimento di DNA da una cellula donatrice ad una cellula ricevente tramite un virus. Può avvenire sia tra cellule eucariote che procariote, ed è limitata dalla specificità di infezione del virus stesso. I virus che infettano i batteri vengono chiamati batteriofagi o fagi. La loro struttura è composta da una testa (capside proteico) che contiene RNA o DNA, da un collo seguito da collare e guaina della coda. All'estremità si trova una piastra basale con attaccata la coda di filamenti proteici.

Meccanismo della trasduzione:

1. Il fago entra in contatto con la cellula ospite, inietta il proprio materiale genetico e devia il metabolismo cellulare verso la sintesi di nuove particelle virali (virioni);
2. Durante l'assemblaggio dei virioni, i frammenti di DNA della cellula ospite possono essere incapsulati e trasferiti a un'altra cellula ospite.

Il trasferimento di geni dell'ospite mediante i virus può avvenire in due modi:

1. **Trasduzione generalizzata** → qualunque frammento di DNA derivante dal genoma dell'ospite può diventare la componente di DNA dei nuovi virus, al posto del genoma del virus. Quando una cellula batterica viene infettata da un fago, iniziano gli eventi del ciclo litico. Alle volte gli enzimi responsabili per l'impacchettamento del DNA virale nella testa del fago,

impacchettano accidentalmente anche DNA dell'ospite. La particella che ne risulta viene chiamata particella trasducente. Queste particelle vengono rilasciate alla lisi della cellula assieme a virioni normali che sono potenzialmente litici. Le particelle trasducenti non possono dar luogo a una normale infezione virale e vengono dette difettive. Questo perchè i geni batterici hanno sostituito alcuni geni virali indispensabili.

Il lisato, formato da particelle e da virioni normali, viene usato per infettare una popolazione di cellule riceventi. Una parte di esse entrano in contatto con le particelle trasducenti che iniettano all'interno della cellula batterica il DNA del precedente batterio ospite. Il DNA delle particelle trasducenti non può replicarsi, ma può subire una ricombinazione genetica con il DNA del nuovo ospite;

2. **Trasduzione specializzata** → il DNA di una specifica regione cromosomica dell'ospite viene integrato nel genoma del virus. Può permettere un trasferimento efficiente e garantire a una piccola regione del cromosoma batterico di venire trasdotta indipendentemente dal resto. Un esempio è la trasduzione dei geni del galattosio a opera del fago lambda di *E. coli*:

- La regione in cui lambda si integra nel cromosoma è adiacente ai geni dell'ospite che controllano gli enzimi coinvolti nell'utilizzazione del galattosio;
- Durante la fase di induzione il DNA del profago viene escisso come un'unità e si riproduce;
- Raramente il genoma fagico viene escisso in modo non corretto e alcuni geni del cromosoma batterico sono erroneamente escissi insieme al DNA fagico.

Questa particella fagica alterata **lambda dgal** è difettiva dato che i geni fagici si sono persi e non possono generare fagi maturi in un'infezione successiva. Un virione lambda non difettivo chiamato **fago helper** può fornire le informazioni mancanti nelle particelle difettive.

Quando le cellule sono coinfezzate da lambda dgal e da un fago helper, il lisato ottenuto conterrà alcune particelle dgal con un gran numero di virioni normali. Se una coltura batterica auxotrofa per il galattosio (Gal^-) viene infettata con questo lisato misto, si possono selezionare i batteri trasducenti Gal^+ . Si possono ottenere doppi lisogeni contenenti sia lambda helper che lambda dgal. Se i doppi lisogeni vengono indotti si otterrà un lisato molto "ricco" di fagi gal in grado di trasdurre i geni gal ad alta efficienza.

Ciclo litico

1. Il batteriofago si fissa alla superficie batterica e inietta il suo acido nucleico;
2. Il genoma del virus si chiude ad anello, si replica e sfruttando gli organuli dell'ospite presiede alla sintesi di nuove particelle virali;
3. Le nuove particelle virali si assemblano e formano nuovi virus che degradano la cellula ospite.

Ciclo lisogenico → evento reversibile

1. Il batteriofago si fissa alla superficie batterica e inietta il suo acido nucleico;
2. Il genoma del virus si chiude ad anello e si integra con quello della cellula ospite;
3. La cellula ospite si divide mantenendo il genoma virale integrato nel proprio DNA.

La capacità di svolgere il ciclo litico e lisogenico è differente nelle diverse specie di batteriofagi. I fagi detti temperati sono in grado di compiere, a seconda delle diverse condizioni, uno dei due cicli. I fagi virulenti, invece, possono solo compiere il ciclo litico e per questo motivo risultano immediatamente patogeni.

6.3.3 Coniugazione

La coniugazione è il principale meccanismo di trasferimento dei plasmidi da cellula a cellula. Questa funzione viene codificata dagli stessi plasmidi. Si tratta di un processo replicativo alla fine del quale entrambe le cellule conterranno una copia del plasmide. La trasmissibilità mediante coniugazione viene controllata da una serie di geni localizzati nella regione *tra* del plasmide. Alcuni plasmidi hanno la capacità di trasferirsi tra organismi molto diversi fra loro: tra gram-negativi e gram-positivi, tra batteri e cellule vegetali, tra batteri e funghi).

I plasmidi

I plasmidi sono degli elementi genetici, solitamente di forma circolare, in grado di replicarsi indipendentemente dal cromosoma dell'ospite. Contengono geni non essenziali, ma che in certe condizioni possono diventare utili alla vita dell'ospite.

La loro dimensione varia da 1 Kb a 1 Mb e sono presenti da 1 ad oltre 100 copie/cellula ospite. Sono conosciuti migliaia di tipi differenti e sono presenti oltre 300 tipi in *E. coli*.

Gli enzimi che vengono coinvolti nella replicazione dei plasmidi sono gli stessi utilizzati per la replicazione del genoma della cellula ospite.

I plasmidi detti **incompatibili** non possono essere mantenuti assieme nella cellula ospite e competono l'un l'altro per l'inizio della replicazione. Si parla di gruppi di incompatibilità. I plasmidi appartenenti a questo gruppo condividono un meccanismo comune di regolazione della replicazione e quindi sono correlati. Quindi una cellula batterica può contenere differenti tipi di plasmidi, purché non siano geneticamente correlati.

I **plasmidi episomi** sono in grado di integrarsi nel cromosoma e in queste condizioni la loro replicazione procede sotto il controllo del cromosoma stesso.

Si definisce **curing** la perdita di un plasmide da parte della cellula. Avviene spontaneamente in popolazioni naturali quando non vi è una pressione selettiva per il suo mantenimento.

Dimostrazione della coniugazione batterica

Due ceppi con doppia o tripla auxotrofia vengono mescolati. Se avviene crescita su terreno minimo questo indica eventi di interazione tra i 2 cromosomi batterici (ricombinazione). Questo esperimento non dà alcuna informazione sulla direzione del trasferimento del materiale genetico.

Esperimento del tubo a U

Questo esperimento dimostra che la ricombinazione genetica nel processo di coniugazione avviene per contatto diretto tra cellule batteriche.

Viene preso un tubo di coltura e una sua estremità viene collegata a una pompa per far circolare il liquido. Nel mezzo si mette un filtro di vetro poroso che consente il passaggio dei nutrienti ma non delle cellule batteriche (separa due popolazioni autotrofe opposte). Poi i batteri vengono piastrati su un terreno minimo e non si osserva alcuna crescita. Il filtro ha impedito il contatto diretto e quindi la ricombinazione delle due popolazioni.

Mappa genetica del plasmide F (fertility) di *E. coli*

Questo plasmide è formato da 99159 bp.

AGGIUNGI IMMAGINE!!!

- La regione in verde scuro contiene geni coinvolti nella replicazione del plasmide;
- La regione in verde chiaro (*tra*) contiene geni coinvolti nel trasferimento coniugativo;
- La regione oriT è l'origine del trasferimento durante la coniugazione;
- Le regioni in giallo sono elementi trasponibili (mobili) che consentono l'integrazione del plasmide nel cromosoma batterico.

Coniugazione tra una cellula F⁺ e una F⁻

1. Si crea la struttura coniugativa;
2. Il pilo si depolimerizza così da portare le due cellule a mettersi in contatto;
3. Un filamento del DNA del fattore F viene tagliato da una endonucleasi e si muove attraverso il ponte coniugativo;
4. Il DNA complementare viene sintetizzato su entrambi i singoli filamenti;
5. Il movimento attraverso il ponte di coniugazione e la sintesi del DNA sono completati;
6. La ligasi circolarizza la molecola di DNA. I batteri coniugati si separano. In questo modo il batterio "exconiugante" ha acquisito un plasmide e quello donatore non l'ha perso.

Il sistema di replicazione viene chiamato cerchio rotante. Questa è una replicazione asimmetrica e procede in una sola direzione perchè soltanto una delle eliche parentali viene replicata. Per prima cosa l'endonucleasi taglia il plasmide in un punto preciso (oriT); dopo un giro completo il filamento comincia il processo di trasferimento; durante il processo di trasferimento avviene la replicazione di un filamento del plasmide.

In corrispondenza del poro coniugativo si trova un enzima bifunzionale, che viene chiamato rilassosoma o Tra1. Questo viene codificato dalla stessa cellula donatrice, che possiede sia un'attività nucleasica che una elicasica.

Il processo di coniugazione:

- L'enzima Tra1 taglia il DNA in oriT e porta a un rilassamento della molecola stessa (srotolamento). L'estremità 5' del filamento che deve essere trasferito (external strand) si lega covalentemente all'aminoacido tirosina dell'enzima. Il primo tratto del filamento codifica per le proteine SSB che proteggono il singolo filamento di DNA trasferito dall'azione delle nucleasi.
- Una volta avvenuto il legame dell'enzima al poro coniugativo inizia la replicazione del retained strand. Questo è un filamento che serve da stampo e non viene trasferito. Avviene la sintesi del DNA donatore mediante il meccanismo a cerchio rotante;
- Il filamento di DNA viene spinto nel batterio ricevente dove viene convertito in DNA a doppio filamento. La cellula ricevente presenta sulla superficie delle specifiche proteine che riconoscono il sito di attacco.

Visto che la DNA polimerasi lavora in una sola direzione si hanno due sistemi di replicazione diversi:

1. **Sintesi continua** → del nuovo filamento nella cellula donatrice;
2. **Sintesi discontinua** → in più punti (simili ad Okazaki) nella cellula ricevente.

La formazione di ceppi Hfr e la mobilitazione del cromosoma

Il plasmide F è un episoma e quindi può integrarsi nel cromosoma dell'ospite e trasferire il cromosoma alla cellula ricevente. Le cellule che possiedono questo plasmide non integrato sono dette F^+ , mentre quelle che hanno il plasmide integrato vengono chiamate Hfr (High frequency of recombination). Entrambe agiscono come donatori ma son in grado di acquisire stabilmente una seconda copia del plasmide F o di plasmidi ad esso correlati.

La presenza del plasmide F induce 3 distinti cambiamenti nella cellula:

- La capacità di sintetizzare il pilo;
- La mobilitazione del DNA cromosomico per trasferimento in un'altra cellula;
- Alterazione dei recettori di superficie, in modo che la cellula non sia più in grado di comportarsi come un ricevente nella coniugazione.

Le cellule Hfr trasferiscono una porzione del loro DNA e del plasmide F ad una cellula ricevente, che diventa una cellula ricombinata ma rimane F^- . Questo perchè il plasmide passato è incompleto. La struttura non è stabile se non viene integrata nel genoma.

Integrazione del plasmide F

L'inserzione può avvenire in varie regioni del cromosoma in corrispondenza di siti specifici IS (insertion sequence) che mostrano omologia con la sequenza del plasmide. Una volta che il plasmide è stato integrato, non è più in grado di controllare la propria replicazione ma rimane capace di sintetizzare il pilus.

La coniugazione da un ceppo Hfr a F^- procede come da un ceppo F^+ a F^- , con l'eccezione che vengono anche trasferiti geni cromosomali.

Uso dei ceppi Hfr negli incroci genetici

Durante la coniugazione sia le cellule del donatore sia quelle del ricevente sono vitali. C'è la necessità di selezionare dove solamente i ricombinanti desiderati possono crescere senza che i ceppi parentali possano formare colonie. Normalmente si utilizza:

- Un ricevente resistente a un antibiotico ma auxotrofo per qualche sostanza;
- Un donatore sensibile all'antibiotico ma prototrofo per la stessa sostanza.

Per esempio si ha:

- Donatore Hfr che è sensibile alla streptomicina e prototrofo per il lattosio;
- Ricevente F^- che è resistente alla streptomicina e uxotrofo per il lattosio;
- Un terreno selettivo che contiene la streptomicina.

La miscela tra le due popolazioni viene piastrata e così viene eliminato il ceppo donatore. Se il terreno minimo non presenta le sostanze per le quali il ceppo ricevente era auxotrofo, ma comunque viene osservata la crescita di colonie. In questo caso è avvenuta un'efficiente coniugazione. La frequenza del processo di coniugazione e la ricombinazione può essere misurata contando il numero di colonie cresciute.

Processo di coniugazione tra un ceppo Hfr e un ceppo F⁻:

1. Il fattore F viene integrato nel cromosoma batterico e la cellula diventa una cellula Hfr;
2. Avviene la coniugazione tra una cellula Hfr e una F⁻. Il fattore F viene tagliato da un enzima creando l'origine di trasferimento del cromosoma;
3. Inizia il trasferimento del cromosoma attraverso il ponte di coniugazione;
4. Inizia la replicazione su entrambi i frammenti mentre continua il trasferimento del cromosoma. Il fattore F è ora alla fine del cromosoma adiacente all'origine;
5. La coniugazione solitamente si interrompe prima che il trasferimento del cromosoma sia completato. Qui solo alcuni dei geni sono stati trasferiti e potranno andare incontro a ricombinazione.

Coniugazione interrotta

L'ordine in cui i geni sono presenti sul cromosoma donatore può essere determinato dalla cinetica di trasferimento dei geni individuali. Le due cellule possono essere separate per agitazione a un dato tempo per controllare i ricombinanti sul terreno selettivo.

I geni più vicini all'origine di trasferimento (oriT) sono quelli che entrano per primi nelle cellule riceventi e sono quindi presenti in una percentuale più alta dei ricombinanti rispetto ai geni che poi entreranno.

IMMAGINE MAPPATURA A TEMPO

Trasferimenti di geni cromosomali al plasmide F

I plasmidi F integrati possono occasionalmente separarsi dal cromosoma incorporando geni cromosomici, chiamati plasmidi F'. Questi contengono stabilmente dei geni cromosomali normalmente espressi che possono essere trasmessi ad altre cellule. Trasferendo un plasmide F' in una cellula ricevente si possono creare delle cellule diploidi che possono contenere due copie dello stesso gene. La coniugazione con F' deriva da un'escissione scorretta del fattore F nel cromosoma ospite. Alcuni geni dell'ospite vengono prelevati dall'F e possono essere trasferiti ad un'altra cellula mediante la coniugazione.

Alle volte l'escissione avviene in modo impreciso e il plasmide F porterà con sé una sequenza adiacente del cromosoma batterico. Si ottiene un plasmide F' portatore del marcatore lac⁺. Se F' lac⁺ viene trasferito per coniugazione in una cellula lac⁻, si otterrà un diploide parziale (merodiploide) lac⁺/lac⁻. Formazione di un fattore F' e coniugazione con un ceppo F⁻:

1. Il fattore F può anche escindere in modo illegittimo;
2. Dopo l'escissione illegittima F può acquisire una porzione di cromosoma batterico e diventare F';
3. La cellula portatrice di F' può coniugare e trasferire il plasmide a una cellula F⁻;
4. Formazione della coppia coniugativa;

5. Il fattore F' replica mentre il filamento viene trasferito;
6. La cellula F' ricevente diventa parzialmente diploide ed è chiamata merozigote.

6.4 I trasposoni e la trasposizione

Alcuni geni o gruppi di geni hanno la capacità di muoversi da una posizione ad un'altra nel genoma e sono detti elementi trasponibili o trasposoni. Contengono dei geni che codificano una trasposasi e brevi ripetizioni terminali invertite (IR) alle estremità del loro DNA. La trasposasi riconosce le proprie sequenze IR nel genoma, taglia il DNA del sito bersaglio ed inserisce il trasposone o una sua copia.

Le sequenze di inserzione (IS) sono i tipi più semplici di elementi trasponibili e non trasportano informazioni geniche oltre a quelle necessarie per muoversi in nuovi siti.

I trasposoni complessi contengono uno o più geni non coinvolti nel meccanismo di trasposizione stesso, come ad esempio geni di antibiotico-resistenza.

La trasposizione è un evento di ricombinazione che non avviene tra sequenze omologhe e non richiede l'uso del sistema di ricombinazione della cellula.

Questo meccanismo non avviene random e richiede il riconoscimento di una specifica sequenza di basi. La ricombinazione mediata dai trasposoni viene detta ricombinazione sito specifica (site specific recombination).

Per prima cosa la trasposasi riconosce, taglia e lega il DNA durante il processo di trasposizione. Poi una breve sequenza di basi del DNA bersaglio viene duplicata nel sito di integrazione. Questo avviene perché vengono creati dei tagli sfalsati di DNA a singolo filamento. Il trasposone si lega alle estremità a singolo filamento e il conseguente riparo delle sequenze genererà una duplicazione. Si ha la formazione di sequenze ripetute dirette (direct repeats, DR) che fiancheggiano i trasposoni.

La duplicazione delle sequenze del bersaglio avviene grazie al fatto che il taglio che compie la trasposasi sul DNA bersaglio è asimmetrico:

- I due filamenti saranno sfalsati;
- La trasposasi inserisce la sequenza del trasposone;
- Altri enzimi colmano i buchi. In questo modo sintetizzano un nuovo filamento per creare una giunzione a livello della catena di nucleotidi (ligasi). Le sequenze che si trovano sulle estremità risultando una copia.

Sono conosciuti due meccanismi di trasposizione. Entrambi i tipi di trasposizione cominciano nello stesso modo: avviene il riconoscimento da parte della trasposasi dei punti IR, il taglio e l'inserzione del trasposone all'interno del DNA bersaglio. Poi si differenziano:

1. **Conservativo** → l'elemento viene escisso da un sito del cromosoma e reinserito in un secondo sito. In questo caso il numero di copie resta invariato. Poi vengono fatti altri tagli prima che avvenga la replicazione o la riparazione del DNA. In questo modo il trasposone viene espulso completamente dal DNA donatore. La riparazione porta alla duplicazione delle sequenze target e al completamento della trasposizione. Quindi la trasposasi agisce come dimeri o tetrameri e l'operazione di taglio e di riunione avvengono in contemporanea sul trasposone o il sito bersaglio.
2. **Replicativo** → una nuova copia del trasposone viene prodotta e inserita in un nuovo sito. La replicazione avviene senza il taglio completo dei trasposoni dal sito donatore. Questo forma

una struttura ibrida intermedia, la struttura co-integrata, dove le due molecole si fondono per un breve periodo. La replicazione del riparo, con DNA polimerasi e ligasi, avviene mentre l'elemento mobile è ancora attaccato sia al sito originale sia al bersaglio. Questo porta, grazie alla risoluzione, alla scomposizione delle strutture separate, ciascuna provvista di una copia dell'elemento trasponente.

6.4.1 Esperimento di trasposizione

Vengono prese in esame due cellule batteriche: F^+ e F^- . Si vuole dimostrare la mobilità di un trasposone Tn3 dal suo sito donatore sul plasmide X a quello ricevente sul plasmide F.

Il ceppo F^+ è:

- resistente all'ampicillina che è codificata da Tn3;
- resistente alla kanamicina che è codificata da un gene sul plasmide F;
- il fattore F viene modificato per impedirne l'inserimento nel cromosoma.

Il ceppo F^- presenta:

- una mutazione *polA1* che impedisce al plasmide di replicarsi;
- resistenza a Nal che è l'acido nalidixico.

Se il trasposone salta da X a F si forma una struttura F-Tn3 che è teoricamente trasferibile per coniugazione al bettiro F. Dopo l'incrocio i batteri vengono selezionati per piastramento su terreni che presentano i tre antibiotici. Nal serve per selezionare il ricevente, mentre gli altri due per verificare il corretto trasferimento di informazioni geniche.

Il cointegrato, lo stadio intermedio di questo processo, è formato da due plasmidi F e X e due coppie di Tn3. In questo stadio si prevede la risoluzione del cointegrato in due plasmidi F e X ognuno portatore di Tn3. Si parla quindi di trasposizione replicativa che si svolge in due fasi principali:

- Produzione del cointegrato;
- Risoluzione di questa struttura.

6.4.2 Mutagenesi con elementi trasponibili

Se il sito di inserzione per un elemento trasponibile è all'interno di un gene l'inserzione del trasposone porterà all'attivazione (disruption) del gene considerato. Si ha una variazione del ceppo e questa mutagenesi viene indotta con elementi trasponibili.

Random Mutagenesis Protocol

I batteri che contengono il trasposone possono essere selezionati attraverso l'isolamento di colonie su un terreno ricco contenente antibiotico kanamicina. Questo tipo di approccio viene utilizzato, per esempio, per identificare i geni essenziali di un certo batterio.

Nella prima piastra viene utilizzato il DAP per permettere la crescita del batterio donatore (*E. coli*). In questo modo sia il donatore sia il ricevente possono crescere.

Nella seconda piastra viene eliminato il DAP per isolare il batterio ricevente. Infatti, senza DAP, l'*E. coli* donatore non riesce a vivere. Dopo viene aggiunto l'antibiotico per selezionare il nuovo batterio che avrebbe dovuto ricevere la resistenza dell'antibiotico.

6.5 Genetica batterica e clonaggio genico

Il clonaggio ha lo scopo di isolare una grande quantità di geni specifici in forma pura. La strategia è quella di spostare il gene o la regione di interesse da un genoma grande e complesso a uno piccolo e più semplice.

Le finalità sono:

- Isolare un gene specifico e replicarlo, definire la struttura del gene clonato;
- Definire la modalità di espressione (spaziale, temporale, induzione ambientale);
- Esprimere il gene in altri organismi per studiarne la funzione;
- Produrre una grande quantità della proteina codificata.

Per fare tutto questo vengono utilizzati degli enzimi di restrizione. Questi sono degli enzimi specifici che hanno la funzione di riconoscere determinate sequenze nel DNA. Sono sempre delle sequenze palindromiche, stessa sequenza sui filamenti di DNA, anche se di lunghezza variabile.

Se il taglio viene fatto dritto e simmetrico, le parti vengono chiamate blunt ends (es. *AluI* e *HaeIII*); mentre se viene fatto in modo asimmetrico, sono dette sticky ends (es. *BamHI*, *HindIII* e *EcoRI*).

Le fasi principali del clonaggio sono:

1. Isolamento e frammentazione del DNA originario, anche da specie diverse da quelle batteriche, con enzimi di restrizione che viene poi usato per la restrizione;
2. Giunzione dei frammenti ad un vettore di clonaggio, derivato da un plasmide o da un virus;
3. Introduzione, mantenimento e moltiplicazione del DNA clonato nell'organismo ospite. Rendo i batteri competenti, cioè con l'abilità di acquisire DNA dall'ambiente, e li forzo a esprimere il gene.

6.5.1 I plasmidi come vettori di clonaggio

Questi plasmidi presentano determinate caratteristiche:

- **Dimensione ridotta** → facilita l'isolamento e la manipolazione del DNA;
- **Origine di replicazione** → replicazione indipendente del DNA batterico;
- **Numero elevato di copie** → facilita l'amplificazione del DNA;
- **Presenza di marcatori selezionabili** → facilitano il riconoscimento e la selezione dei cloni.

Per garantire la loro integrità, i plasmidi che vengono utilizzati per il clonaggio genico sono modificati in modo da prevenire il loro trasferimento coniugativo e per questo motivo sono F^- . La loro inserzione nelle cellule avviene per trasformazione.

Vettori plasmidici di prima generazione

L'inserimento di DNA provoca la disattivazione del gene di resistenza alla tetraciclina. Si ha una selezione indiretta dei plasmidi con DNA esogeno.

Si ipotizza di avere un batterio con due resistenze agli antibiotici, tra cui la tetramicina. L'inserimento di DNA provoca la disattivazione del gene. L'enzima riconosce una sequenza interna al gene

e inserisce lì il frammento, così facendo il batterio diventa sensibile alla tetraciclina.

Il DNA viene tagliato con gli stessi enzimi che poi vengono utilizzati per il taglio del plasmide perchè così facendo le estremità del gene e del plasmide divengono complementari così da poter ricostruire l'integrità del plasmide.

Se non si riesce a inserire nulla nel plasmide e si aggiunge la ligasi per chiudere la struttura, quello che si ottiene è un plasmide vuoto (senza modifiche). Per distinguerli dagli altri devo usare la tecnica di replica planting, quindi li sottopongo a entrambi gli antibiotici, in modo da eliminare una popolazione di batteri, quella in cui c'è stato l'inserimento nel gene, e poi ad uno solo.

Se confronto le due piastre riesco a selezionare i primi che sono stati utilizzati.

Vettori plasmidici di seconda generazione

Questo metodo richiede meno tempo rispetto a quello visto in precedenza.

Con l'inserzione del DNA da clonare viene inattivato il gene lacZ che codifica la beta-galattosidasi, che esegue la scissione del galattosio.

L'X-Gal viene aggiunto al terreno di coltura. Questo è un omologo del galattosio che prende un colore blu intenso quando viene scisso. Le colonie blu hanno quindi un gene lacZ funzionale dato che non contengono nessun insert.

Se la β -galattosidasi non funziona X-Gal non viene scisso e non diventa blu; mentre se il gene è stato inserito in mezzo al sito della β -galattosidasi la colonia diventa bianca.

Alcuni siti di restrizione possono essere riconosciuti da più enzimi e questo aumenta la probabilità e la facilità di apertura di questo sito. Vengono dette regioni polilinker.

Un gene che viene selezionato per essere analizzato non deve avere sequenze interne riconosciute dall'enzima di restrizione usato perchè altrimenti ci si troverebbe davanti ad un gene non funzionante.

6.5.2 Il batteriofago lambda come vettore di clonaggio

Il fago lambda può essere usato come vettore di clonaggio. La regione tra i geni J e N del genoma virale non è essenziale e può essere sostituita con un DNA esogeno.

Queste regioni permettono l'entrata del batterio nel ciclo litogenico. Si possono utilizzare come luoghi per inserire i geni d'interesse se si vuole che il batterio abbia solamente il ciclo litico.

Con questa tecnica è possibile creare frammenti anche piuttosto grandi.

Fasi di clonaggio con il vettore lambda

1. Isolamento del DNA del fago e digestione con un enzima di restrizione;
2. Ligazione dei due frammenti di lambda ai frammenti del DNA esogeno. Vengono selezionati i frammenti di DNA esogeno della lunghezza appropriata, circa 20 kb);
3. Impacchettamento del DNA per aggiunta di estratti cellulari contenenti le proteine della testa e della coda con formazione spontanea di particelle fagiche (incapsulamento);
4. Infezione di *E. coli* con sospensione di fagi che contengono il gene preso come riferimento. Si piastra il tutto e creano dei buchi trasparenti nel tappeto batterico. Si procede con l'isolamento dei cloni fagici tramite analisi delle placche formatesi su una coltura del ceppo ospite;
5. Analisi dei fagi ricombinanti.

6.5.3 La mutagenesi sito-diretta cosente di causare mutazioni all'interno di uno specifico gene

La mutagenesi sito-diretta viene utilizzata per studiare l'azione di proteine che contengno specifiche sostituzioni aminoacidiche. Il vettore contenente il DNA mutato viene inserito in un ceppo batterico mutante incapace di produrre la proteina in questione.

Per prima cosa si ha l'introduzione del gene d'interesse in un vettore a singolo filamento. Il frammento di DNA modificato (oligonucleotide sintetico) si può legare al vettore per complementarità e viene esteso attraverso la DNA polimerasi. Poi seguono le fasi di clonaggio e selezione.

6.5.4 Mutagenesi a cassetta e inattivazione genica

1. Un plasmide contenente il gene X viene tagliato con l'enzima di restrizione EcoR1 per introdurre una cassetta di resistenza alla kanamicina;
2. Dopo la ligazione abbiamo un plasmide che contiene la cassetta di kanamicina come mutazione di inserzione nel gene X. Il plasmide viene linearizzato con un altro enzima di restrizione BamH1;
3. Vengono trasformate le cellule batteriche che contengono una versione wildtype del gene X;
4. Dopo la ricombinazione di possono selezionare i batteri mutanti (gene X inattivato) su terreno contenente kanamicina.

Capitolo 7

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 genomica:

- **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).

7.1 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.

7.1.1 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.

7.1.2 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.

7.2 Sequenziamento del DNA

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

7.2.1 Metodo Sanger

È il sequenziamento classico ed è stato inventato alla fine degli ann '70. Viene chiamato anche metodo dei "dideossinucleotidi terminali". Consente di generare frammenti di DNA che terminano in corrispondenza di ognuno delle 4 basi marcare 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 dideossinucleotidi presentano in posizione 3' solamente un H e quindi mancano del gruppo ossidrilico. Questa particolarità influisce sull'attività della DNA polimerasi che, incontrando questi nucleotidi anomali, 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 dideossinucleotidi 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 fluoroforo o il radioattivo.

Se viene utilizzato l'isotopo radioattivo è necessario avere una piastra per ciascun nucleotide 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 sequenziamento 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.

7.2.2 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:

- 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.

7.3 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 perchè 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.

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.

7.3.1 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.

7.4 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

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).

7.4. 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).

Chlamydia 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 di 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 8

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 capside. 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.

8.1 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 capside;
- 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.

8.1.1 Capside e simmetria

Una prima classificazione viene fatta sulla struttura base del capside:

- Isocaedrico;
- Isocaedrico con envelope;

- 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 capsido.

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 capsido a elica forma un tubo vuoto con parete proteica.
2. sferoidali a simmetria isocaedrica, composti da 20 facce o capsomeri. Un esempio è il virus dell'influenza che è rivestito da un nucleocapsido 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. (→ nucleocapsido+involucro lipidico→ simmetria marcata).

La simmetria isocaedrica rappresenta la disposizione più efficiente delle subunità nella formazione della capsida. Il capsido 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 capsido isocaedrico 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 assemblano 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.

8.1.2 Virus con capsidi a simmetria complessa

Alcuni virus non ricadono nelle categorie con capsidi ad elica o isocaedrici. 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 isocaedrica (testa, capsido 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.

- 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.

8.1.3 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).

8.2 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 perchè 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.

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*.

8.3 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** del virione ad una cellula ospite.
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 determinato 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 capsido 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 particolare 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 perché nel momento dell'uscita del virus viene circondato da parte della membrana doppia strato fosfolipidico della cellula ospite.

8.3.1 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).

8.3.2 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.

8.3.3 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 proteasi 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.

8.3.4 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'enevelope 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.

8.3.5 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 della cellula ospite. Ora avvengono l'espressione del genoma virale e la sintesi delle proteine virali. Le proteine che vengono prodotte 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.

8.4 I Batteriofagi

Per la quantificazione della crescita dei batteriofagi si può eseguire il seguente esperimento:

- Diluzione di una sospensione contenente materiale virale viene mescolato in una piccola mistura di agar con un ospite suscettibile. Questa viene messa su una piastra di nutrient agar;
- Il batterio ospite inizia a crescere sulla superficie della piastra di agar e, dopo un'incubazione overnight, forma un tappeto di crescita batterica;
- Allo strato precedente viene aggiunta la componente virale. Ogni particella virale che si attacca a una cellula e si riproduce, causa la lisi della cellula stessa e le particelle virali rilasciate possono diffondere alle cellule adiacenti, infettarle, portare di nuovo alla lisi con ciclo litico e venire rilasciate nuovamente;
- Si formano dei buchi nella piastra in corrispondenza delle colonie lisate, chiamate placche. La dimensione delle placche dipende dal virus, dall'ospite e dalle condizioni della coltura.

Contando il numero di placche si può calcolare il numero delle unità infettive virali presenti nel campione di partenza.

Il titolo, ossia la concentrazione del virus, viene espresso in PFU (plaque forming unit) per ml. Questo si calcola:

$$\frac{n.placche}{V \times diluizione}$$

8.5 Replicazione dei batteriofagi

Nel ciclo replicativo dei batteriofagi si distinguono cinque fasi principali:

1. Adsorbimento o fase di attacco;
2. Penetrazione, in cui avviene l'iniezione del materiale genetico;
3. Sintesi dell'acido nucleico e di proteine strutturali;
4. Autoassemblaggio dei capsomeri e impacchettamento;
5. Rilascio di virioni maturi.

Il tempo totale di replicazione varia dai 20 ai 60 minuti per i batteriofagi (T4, 20-22 minuti), fino ad arrivare dalle 8 alle 40 ore per i virus animali.

Si possono così tracciare dei grafici in particolare sul ciclo litico che riportano sull'asse delle ascisse il tempo, mentre sull'asse delle ordinate le unità formanti placca (il numero di placche che posso vedere) e l'OD della popolazione batterica sottoposta ad attacco da parte dei batteri.

Avvenuto il contatto, il numero di cellule virali cala di un ordine di grandezza. Questo numero rappresenta i fagi che riescono a infettare le cellule batteriche:

- **Fase di latenza** → i fagi entrano nelle cellule e le infettano, ma non accade nulla. All'inizio di questa fase si ha il periodo di eclissi. Il genoma virale è separato dal capsido proteico. Durante questo stadio il virione non viene considerato come una particella infettiva.
- **Maturazione** → ha inizio non appena i genomi neo-sintetizzati vengono impacchettati all'interno dei capsidi. Nella fase di scoppio si ha un brusco aumento nel numero di batteriofagi (2 ordini di grandezza), associato con una drastica diminuzione dei batteri presenti. Questo corrisponde al momento di lisi delle cellule e al rilascio dei fagi dell'ambiente extracellulare.

8.5.1 Batteriofago T4

Il ciclo del batteriofago T4 è molto veloce:

- 1 minuto dopo l'attacco la sintesi del DNA e del RNA dell'ospite cessano e inizia la trascrizione di alcuni geni fagici;
- dopo 2 minuti vengono sintetizzate le prime proteine virali;
- dopo 4 minuti inizia la replicazione del DNA virale;
- l'assemblaggio di nuovi virioni inizia dopo 20 minuti;

T4 utilizza la RNA polimerasi dell'ospite. Questo enzima riconosce preferenzialmente i promotori virali. La trascrizione nel batterio viene soppressa da una proteina virale che lega il fattore sigma dell'ospite.

Ulteriori modifiche della RNA polimerasi batterica portano alla trascrizione dei "middle" e "late" RNA. Le ultime proteine ad essere sintetizzate sono quelle strutturali.

La fuoriuscita avviene grazie alla lisi della cellula provocata dalla produzione di un enzima virale che attacca il peptidoglicano dell'ospite.

Fase di adsorbimento

L'integrazione virus-ospite è altamente specifica. Questa specificità viene data dall'interazione delle proteine di superficie del virus con componenti della membrana dell'ospite (recettori come proteine, carboidrati, lipidi). I recettori svolgono delle funzioni normali per la cellula. Per esempio il recettore per il batteriofago T1 è una proteina per l'assorbimento del ferro.

In assenza di uno specifico recettore, il virus non è in grado di adsorbirsi; possono però insorgere forme mutanti del virus in grado di infettare un ospite resistente.

Fase di iniezione

Una cellula che permette la penetrazione e la replicazione di un virus viene detta permissiva. Le particelle virali si attaccano alla cellula attraverso le fibre caudali che interagiscono in maniera specifica con i polisaccaridi della membrana esterna. Queste fibre si contraggono e la parte centrale della coda entra in contatto con la parete del batterio attraverso una serie di spine situate all'estremità della coda.

L'azione di un enzima virale determina la formazione di un poro di peptidoglicano. Dopo la contrazione della guaina caudale, il DNA virale viene spinto all'interno della cellula.

Restrizione e modificazione del virus da parte dell'ospite

I procarioti si possono difendere dall'infezione virale con un meccanismo basato sulla distruzione del DNA genomico virale a doppio filamento, operata da endonucleasi di restrizione. Questo fenomeno, detto restrizione, non è efficiente contro i virus a RNA o a DNA a singolo filamento.

Il DNA dell'ospite deve essere protetto dall'azione dei propri enzimi di restrizione attraverso un processo di modificazione che coinvolge la metilazione di basi specifiche sulla sequenza di riconoscimento.

Alcuni virus a DNA possono superare i meccanismi di restrizione modificando il proprio genoma, metilazioni e glicosilazioni, e rendendolo resistente all'attacco enzimatico.

Questo fenomeno di restrizione non è efficace contro i virus a RNA o DNA a singolo filamento.

Il DNA di T4 presenta una base insolita, la 5-idrossimetilcitosina al posto della citosina. I gruppi ossidrilici sono modificati dall'aggiunta di residui di glucosio rendendo il DNA resistente agli enzimi di restrizione della cellula ospite.

Il batteriofago T4 presenta:

- testa isocadrata, 85 x 110 nm;
- coda con struttura tubolare elicoidale 25 x 110 nm;
- più di 25 tipi di proteine strutturali;
- DNA lineare a doppio filamento, 168903 bp, che codifica più di 250 proteine diverse;
- DNA premutato circolarmente;
- DNA con ripetizioni terminali di 3-6 kb.

8.5.2 Permutazione circolare

Il DNA di T4 viene replicato, prima come singole unità. Poi le diverse unità genomiche vengono legate tra di loro per formare un'unica molecola denominata concatenamero.

L'impacchettamento del DNA nella testa dei virioni necessita il taglio della molecole, indipendentemente dalla sequenza nucleotidica. La testa di T4 può ospitare una molecola di DNA leggermente più lunga di un intero genoma e si ha la comparsa di terminazioni ridondanti.

Il genoma viene letto e replicato più volte e le estremità si possono combinare tra loro per omologia delle basi. Poi viene tagliato in più punti per produrre il genoma virale. I frammenti tagliati hanno alle estremità sequenze ripetute ma diverse tra loro.

8.5.3 Batteriofagi temperati

Nel ciclo lisogenico un gene codificato dal profago gioca il ruolo di repressore dell'espressione del genoma virale. Questo repressore previene anche l'espressione di qualsiasi altro genoma virale introdotto nella stessa cellula: conferisce ai batteri lisogenizzati uno stato di immunità.

8.5.4 Il batteriofago lambda

Il batteriofago lambda può intraprendere sia la via litica che la via lisogenica. Non possiede fibre caudali e presenta un genoma di DNA lineare a doppio filamento con una coda di 12 nucleotidi a singola elica (regione cos).

All'interno della cellula batterica queste sequenze terminali complementari si associano e il DNA è rilegato in una forma circolare contenente 48502 bp. Il genoma di questo fago presenta:

- Regioni che codificano per le varie funzioni;
- Possibilità di essere letto in entrambe le direzioni:
 - Lettura in senso orario (Right T) controlla le funzioni del ciclo litico;
 - Lettura in senso antiorario (Left T) controlla le funzioni del ciclo litogenico.

Sono presenti due proteine che hanno un ruolo chiave:

- **Repressore di lambda** → è prodotto dal gene *cI* e ha il compito di bloccare la trascrizione del gene *cro* e degli altri geni necessari per il ciclo litico;
- **Proteina Cro** → prodotta dal gene *cro* e serve per inibire la trascrizione del gene del repressore lambda.

Il processo tramite il quale avviene l'infezione con il fago λ :

- il virione di lambda si attacca a uno specifico recettore della membrana esterna di *E. coli* e inietta il proprio DNA all'interno della cellula;
- il DNA circolarizza e ha inizio l'espressione del genoma virale;
- la RNA polimerasi dell'ospite comincia a trascrivere a partire da 2 promotori P_L e P_R . Verranno prodotti i trascritti L1 e R1. Questo è dovuto al fatto che le sequenze non sono palindromiche: si può trascrivere in una sola direzione, o su un filamento o sull'altro;
- Vengono prodotti 2 mRNA tradotti nelle proteine Cro e N, coinvolte in processi di regolazione;

- Cro definisce l'entrata nella via litica o lisogenica;
- N è un antiterminatore, consente alla RNA polimerasi di continuare la trascrizione oltre ai terminatori, allungando i trascritti a partire da P_L e P_R , in particolare i geni impegnati nella replicazione del DNA.
- i geni tardivi vengono attivati dopo la sintesi della proteina Q che attiverà un ulteriore evento di trascrizione dei geni codificanti le proteine strutturali (trascritto R2);
- una volta che la proteina Cro raggiunge una certa concentrazione lega gli operatori O_R e O_L , bloccando la trascrizione guidata dai promotori P_R e P_L . Ha la funzione di repressore insieme al prodotto del gene cI .

I prodotti dei geni cro e cI determinano l'entrata nella via litica o lisogenica:

- Ordine di legame cI : sito 1, 3 → via lisogenica (geni cII , $cIII$ attivi);
- Ordine di legame di Cro: sito 3, 2, 1 → via litica (geni cII , $cIII$ inattivi).

Via litica o lisogenica: l'interruttore genetico

Per entrare nella via lisogenica devono verificarsi due condizioni:

1. deve essere inibita la produzione di proteine tardive;
2. una copia del genoma virale deve essere inserita nel cromosoma dell'ospite.

L'inibizione delle proteine tardive avviene dopo l'espressione del gene cI , il repressore di lambda. cI viene trascritto con l'attivazione di un promotore P_E , che viene attivato dal gene cII . Anche se la proteina viene sintetizzata precocemente dopo l'infezione diventa poco stabile e quindi necessita della presenza di $cIII$. Entrambi cI e $cIII$ controllano l'espressione del proprio gene reprimendo o attivando i promotori P_M e P_R rispettivamente.

Cro inibisce la trascrizione di cI e stimola la trascrizione rightward; mentre cI inibisce la trascrizione di cro e stimola la trascrizione leftward.

Schema riassuntivo delle fasi dell'infezione di lambda

- Attivazione dei promotori P_L e P_R ;
- Trascrizione di L_1 e R_1 ;
- L'antiterminatore N consente di allungare i trascritti oltre ai terminatori. Inizia la replicazione del DNA virale;
- Trascrizione di Q. Attivazione della trascrizione dei geni tardivi R2 e inizio della via litica;
- Trascrizione di cII e $cIII$, che sono entrambi necessari alla trascrizione di cI . $cIII$ stabilizza cII , che a sua volta attiva P_E che controlla la trascrizione di cI .

Integrazione di lambda

Avviene in un singolo sito specifico del cromosoma batterico. Necessita l'attivazione dei geni *cI* e *int* (integrasi, ossia nucleasi sito-specifica) per catalizzare il taglio sito-specifico e la ricombinazione tra il sito att del virus e quello del batterio.

In questo modo avviene un crossing over che permette la ricombinazione cromosomica e di conseguenza la duplicazione del genoma.

Se il sistema di repressione di lambda (controllato dal gene *cI*) viene interrotto, il virus riprende il ciclo litico, liberandosi del cromosoma batterico. Questa escissione richiede il prodotto del gene *xis* e *int*.

8.5.5 Crescita litica di lambda

Gli agenti che inducono l'induzione del ciclo litico dono quelli che danneggiano il DNA: radiazioni UV, raggi X, mutageni chimici.

Durante la risposta SOS, l'attività proteasi della proteina RecA distrugge il repressore di lambda e possono avere inizio nuovi eventi litici.

8.6 Genomi dei batteriofagi

I genomi dei batteriofagi hanno una struttura a mosaico e sono composti da blocchi di sequenze correlate che sono condivise in diverse combinazioni. Questo ci suggerisce che il trasferimento genico orizzontale e la ricombinazione non omologa hanno avuto un ruolo importante nell'evoluzione fagica.

8.7 Coltivazione dei virus animali

La coltivazione dei virus animali necessita dell'inoculo in un ospite permissivo. L'uovo embrionato offre una varietà di tessuti differenziati o in via di differenziamento che fungono da ospite per la crescita virale.

Le colture cellulari è il sistema ospite più utilizzato. Lo sviluppo della replicazione virale si manifesta con la comparsa di effetti citopatici. Sono delle alterazioni morfologiche pronunciate:

- Aumento di rifrangenza e dimensioni;
- Comparsa di vacuolizzazione;
- Comparsa di inclusioni cellulari;
- Distacco dalla superficie di crescita;
- Necrosi;
- Fusione tra più cellule;
- etc.

Normalmente si lavora in vitro con delle cellule suscettibili all'infezione dei virus.

Si sa che il ciclo di replicazione è attivo ma non si sa quale due due e non si hanno nemmeno maggiori informazioni riguardo al numero.

Saggio delle placche

Il saggio delle placche si utilizza per condurre un'analisi quantitativa.

Il titolo virale, espresso in plaque-forming unit/ml (PFU/ml), può essere determinato con metodologie che determinano l'infettività, ossia la capacità di iniziare e concludere un ciclo replicativo. Questo saggio consiste nell'infezione di colture cellulari in monostrato con diluzioni scalari/seriali della preparazione di particelle virali. Dopo l'adsorbimento si rimuove l'inoculo virale e le cellule vengono ricoperte da terreno di coltura con agar in modo da mantenere la vitalità cellulare e limitare la diffusione delle particelle virali al resto della coltura.

Alcuni virus animali non producono effetti riconoscibili su colture cellulari e per questo motivo si procede con delle diluizioni seriali fino a quando si ottiene un fenomeno contabile:

- la stima quantitativa viene fatta con l'iniezione di una diluizione seriale in un certo numero di animali;
- si determina una diluizione al punto finale, alla quale muore la metà degli animali inoculati (LD_{50}).

Conta delle particelle virali

È un tipo di conta diretta che viene praticata con l'ausilio del microscopio elettronico. Il campione virale viene miscelato ad una concentrazione nota di "beads" (biglie). I volumi del campione virale e di beads sono uguali. Dal rapporto che si presenta tra beads e virus riesco a trovare la concentrazione.

8.8 Purificazione di virus

Si hanno diverse tipologie per la purificazione dei virus:

- Centrifugazione differenziale;
- Centrifugazione in gradiente di densità;
- Precipitazione differenziale dei virus;
- Denaturazione dei contaminanti;
- Digestione enzimatica dei costituenti delle cellule ospiti.

8.8.1 Centrifugazione differenziale

1. Si ha una prima centrifugazione per separare le particelle virali e gli organelli cellulari dalle molecole più piccole;
2. Si toglie il surnattante;
3. Si risciacqua quello che si è ottenuto e si risospende il tutto;
4. Si ha una centrifugazione più leggera;
5. Sedimentazione di organelli seguita da separazione tra surnattante con virus e pellet di batteri;
6. Seconda ultra centrifugazione per ottenere la precipitazione dei virus.

8.8.2 Centrifugazione in gradiente di densità

In questo tipo di centrifugazione si ottengono una migliore precisione e migliore purificazione. Per prima cosa viene preparata una provetta con un certo gradiente, che viene dato dalla presenza di certi zuccheri. Poi vengono aggiunti i componenti che si devono separare in queste soluzione e vengono successivamente recuperati per frazioni. Ci sono 2 tipi principali:

- Nella **centrifugazione isotonica** il fondo del gradiente è più denso che qualsiasi particella. Queste particelle si posizionano nella porzione in cui la densità di gradiente è uguale alla propria densità.
- Nella **centrifugazione zonale** il fondo del gradiente è meno denso delle particelle, ed esse si separano secondo il proprio coefficiente di sedimentazione. Questo coefficiente tiene conto della forma, della densità e della struttura della particella.

8.8.3 Precipitazione differenziale dei virus

Viene utilizzato il solfato di ammonio o glicol polietilenico, che è una precipitazione di proteine. Viene aggiunto il solfato di ammonio fino a portare la sua concentrazione a un livello appena inferiore al punto di precipitazione del virus. Dopo aver rimosso i contenuti precipitati si aumenta la concentrazione del solfato d'ammonio per precipitare i virus stessi.

8.8.4 Denaturazione dei contaminanti

Vengono utilizzati calore, pH e solventi organici. Alcuni virus tollerano il trattamento con solventi organici, per esempio il cloroformio. Il trattamento con solventi viene usato per denaturare i contaminanti proteici e per estrarre i lipidi. Il virus rimane nella fase acquosa, i lipidi si dissolvono nella fase organica mentre le sostanze denaturate dai solventi si raccolgono in corrispondenza dell'interfaccia tra le due fasi.

8.8.5 Digestione enzimatica dei costituenti delle cellule ospiti

Si usano le proteasi (es. tripsina) e nucleasi (es. ribonucleasi) per rimuovere proteine e acidi nucleici cellulari.

8.9 Particelle sub-virali

Non sono dei virus, ma hanno delle proprietà simili ai virus e ad organismi che causano malattie e patologie.

8.9.1 Viroidi

Sono delle piccole molecole di RNA circolare a singolo filamento (250-400 bp) e sono la causa di malattie delle piante. L'RNA non contiene geni che codificano proteine e dipendono totalmente dalle funzioni dell'ospite per la loro replicazione.

Formano delle strutture secondarie che assomigliano a molecole a doppio filamento. I viroidi entrano nell'ospite attraverso una ferita e si replicano nel nucleo della cellula ospite con l'aiuto della RNA polimerasi dell'ospite. Hanno il ruolo di RNA regolatori che interferiscono con le normali funzioni dell'ospite.

8.9.2 Prioni

I prioni hanno una struttura interamente proteica. Il prione è responsabile della BSE (encefalopatia spongiforme bovina, anche chiamata mucca pazza). Questa malattia può infettare l'uomo e causa una variante della malattia di Kreutzfeldt-Jakob, caratterizzata da aggregati della proteina prionica del cervello causata alla perdita di solubilità delle proteine stesse.

La forma normale del prione PrP^c è repressa nelle cellule nervose e viene modificata nella forma anomala PrP^{sc}. Quest'ultima mostra una certa resistenza alla proteasi ed è insolubile, portando così alla formazione di aggregati.

Il prione non si replica autonomamente. Infatti, converte la proteina normale cellulare in una forma patogena inducendo uno stato conformazionale auto-propagante.

Capitolo 9

Regolazione metabolica

Per poter sopravvivere in natura i microrganismi devono essere in grado di rispondere ai cambiamenti delle condizioni ambientali. Grazie all'aiuto delle mappe metaboliche si possono notare strutture complesse dove i punti e le linee rappresentano rispettivamente i composti e le reazioni enzimatiche che portano alla loro formazione. I due meccanismi centrali sono la glicolisi e il ciclo di Krebs. Per coordinare in modo efficiente le loro reazioni chimiche, le cellule devono regolare il tipo e la quantità di macromolecole che sintetizzano. La maggior parte dei microrganismi possiede geni che codificano molte più proteine di quante ne siano presenti all'interno della cellula in qualunque condizione di crescita.

Le strategie di regolazione sono:

- Controllo dell'attività enzimatica, infatti bisogna evitare di produrre proteine e quindi bisogna esercitare un tipo di regolazione a livello post-traduzionale;
- Controllo della quantità sintetizzata:
 - Controllo a livello trascrizionale → viene determinato se il gene viene trascritto oppure no controllando che i fattori che interagiscono con il DNA permettono o meno la trascrizione;
 - Controllo a livello trasduzionale → sono presenti i trascritti ma non vengono presi in considerazione.

9.1 Regolazione dell'attività enzimatica

9.1.1 Inibizione da feedback

In questo tipo di regolazione è il prodotto finale di una data via biosintetica a inibire l'attivazione del primo enzima della via. Questo tipo di inibizione è reversibile perchè non appena il prodotto finale si esaurisce la sintesi può riprendere.

L'inibizione è detta non covalente dato che avviene tramite il legame, reversibile, del prodotto finale all'enzima ad un sito detto "allosterico". La conformazione dell'enzima cambia in modo che il substrato non riesce più a legarsi al sito attivo.

Esempi:

- In una via ramificata entrambi i prodotti finali possono controllare l'enzima specifico per la propria sintesi;

- Gli isoenzimi, che sono gli enzimi isofunzionali, catabolizzano la stessa reazione ma che sono soggette a sistemi di regolazione indipendenti. Ognuno dei tre prodotti della reazione regola il proprio enzima. La quantità totale d'attività enzimatica si azzerà soltanto quando sono presenti in quantità adeguata tutti i tre prodotti di reazione.

9.1.2 Modificazione covalente degli enzimi

Questo tipo di modificazione avviene generalmente per addizione o delezione di piccole molecole alla proteina (ad esempio AMPc, ADP, PO_4^{2-} , CH_3).

Il legame covalente del gruppo modificante provoca un cambiamento conformazionale della proteina alternandone l'attività enzimatica.

Per esempio, l'enzima glutammina sintetasi viene modificato con l'aggiunta di gruppi AMP. Ha 12 siti dove può accogliere questi gruppi e la sua attività enzimatica diminuisce gradualmente man mano che aumentano gli AMP legati.

Viene chiamata covalente per via della natura del legame che si forma tra il gruppo e l'enzima. Nel caso dell'inibizione da feedback, invece, si tratta di un legame tra domini, ma non covalente.

9.1.3 Processamento delle proteine

Alcune proteine batteriche vengono attivate da dei meccanismi post-traduzionali come il "proteine splicing". Sono presenti dei segmenti simili agli introni del RNA, ma sono chiamati inteine. Questi vengono eliminati per rendere funzionale la proteina. Esempi:

- Girasi → taglio proteolitico che le permette il funzionamento;
- Proteasi per degradazione di peptidi → la proteina viene attivata solo quando esce dalla cellula.

9.2 Regolazione a livello trascrizionale

9.2.1 DNA binding proteins (DBP)

Sono le proteine che legano il DNA. Sono fattori di trascrizione che possono agire positivamente attivando la trascrizione o negativamente non facendola avvenire. Sono composte da dimeri o tetrameri che si legano al DNA in determinati punti specifici. Ne esistono di vari tipi:

1. **Elica-giro-elica** → è costituito da aminoacidi in grado di formare una struttura secondaria ad alpha-elica composta da un elica di riconoscimento del DNA e da un'elica stabilizzante. Il riconoscimento di sequenze specifiche del DNA avviene tramite interazioni non covalenti;
2. **Zinc finger** → proteina che lega uno ione zinco. Sono presenti almeno due strutture "a dito" coinvolte in questo tipo di legame. Zn è legato, a sua volta, a due cisteine e due istidine;
3. **Leucine zipper** → proteina che contiene regioni con residui di leucina regolarmente ripetuti che formano una specie di cerniera. Non interagisce direttamente con il DNA ma serve a tenere unite due altre alpha eliche nella posizione corretta.

9.2.2 Il controllo negativo della trascrizione

Si intende un controllo effettuato tramite l'azione di un repressore. Induttori e repressori agiscono in modo indiretto, combinandosi con le proteine di legame DNA che influenzano la sintesi dell'mRNA. Ne esistono due tipi:

1. **Repressione** → gli enzimi che catalizzano la sintesi di uno specifico prodotto non vengono sintetizzati se questo è presente nel mezzo in quantità sufficiente. Un esempio è l'arginina;
2. **Induzione** → la sintesi ha luogo solo quando è presente il suo substrato. Il fenomeno riguarda spesso gli enzimi catabolici. Un esempio è il lattosio.

Per prima cosa, la RNA polimerasi necessita del fattore sigma per riconoscere la sequenza promotrice.

- **Meccanismo di repressione** → descrive il comportamento della cellula quando reagisce soprattutto alla presenza di aminoacidi. Se il corepressore non è presente nell'ambiente cellulare, la cellula prototrofa deve adoperarsi per produrlo. Nel caso in cui sia presente in giuste quantità, la sintesi dell'mRNA viene bloccata per evitare di produrlo e di andare così a spendere energia inutilmente. In questo caso il repressore è attivato in presenza di corepressore: legandosi, infatti, l'aminoacido induce un cambio conformazionale nel repressore che porta a un forte aumento di affinità per il DNA.

Il repressore dunque si attacca al filamento di DNA ingombrando così lo spazio e impedendo alla RNA polimerasi di associarsi al DNA per cominciare la trascrizione.

Un esempio può essere l'arginina.

Si tratta sempre di reazioni reversibili dato che, in mancanza dell'aminoacido, la cellula deve essere in grado di rimuovere il repressore dal DNA per cominciare la trascrizione e successiva traduzione.

- **Meccanismo di induzione** → è l'esatto contrario del meccanismo precedente. Il repressore è sempre attaccato al DNA. In presenza dell'induttore (es. lattosio) viene attaccato da questa molecola che porta a un cambio conformazionale interno che modifica la sua affinità per il DNA. Così facendo il sito per l'attacco della RNA polimerasi viene lasciato libero e si può procedere con la trascrizione e traduzione dell'operone per il metabolismo del lattosio. Se il lattosio non è presente, non vi è nemmeno la necessità di produrre enzimi per processarlo e dunque il repressore rimane attaccato al suo sito.

9.2.3 Controllo positivo della trascrizione

Questo tipo di controllo coinvolge proteine che promuovono il legame dell'RNA polimerasi al promotore ed all'aumento della sintesi di mRNA. Per esempio, la proteina attivatrice del maltosio non può legarsi al DNA se prima non è legata al suo effettore, cioè il maltosio.

I promotori degli operoni controllati positivamente hanno una sequenza che non assomiglia fedelmente alla sequenza consenso: anche in presenza del fattore sigma corretto l'RNA polimerasi ha difficoltà a riconoscerli. La proteina attivatrice aiuta l'RNA polimerasi a riconoscere il promotore. Per fare questo il complesso della RNA polimerasi viene scortata dalla proteina che presenta una particolare affinità con il DNA se legata all'effettore.

Non sempre il sito di legame dell'attivatore e il promotore sono vicini. In tal caso si rende necessaria la formazione di strutture a loop.

9.2.4 Sistemi di controllo globale

Sono dei meccanismi di regolazione che rispondono a dei segnali ambientali regolando l'espressione di molti geni diversi.

Effetto glucosio

Questo sistema viene chiamato anche repressione da catabolita.

In queste condizioni si può osservare una curva di crescita con 2 fasi esponenziali. Questo tipo di crescita è detta crescita diauxica.

Quando *E. coli* si trova in presenza di varie fonti di carbonio, il glucosio viene sempre utilizzato per primo dato che è facilmente metabolizzabile. Così facendo gli enzimi che catabolizzano altri substrati vengono repressi.

Quando non è più presente abbastanza glucosio la crescita si ferma per poi ricominciare utilizzando il lattosio o un'altra fonte di carbonio. Questa curva è meno veloce perchè il processamento è meno veloce.

Nel caso di enzimi reprimibili da catabolita, il legame della RNA polimerasi al DNA che li codifica avviene solo quando vi si è legata un'altra proteina chiamata attivatore proteico del catabolismo (CAP). Quest'ultima è una proteina allosterica, che si può legare al DNA soltanto se prima si è legata all'AMP ciclico.

In presenza di glucosio la sintesi dell'AMPc a cura dell'adenilato ciclasi viene inibita. In questo modo il livello di AMPc diminuisce. La RNA polimerasi non si lega più ai promotori dei geni regolati da catabolita. Si possono presentare varie condizioni:

1. **Assenza di glucosio e lattosio** → livelli di AMPc molto alti. CAP si lega sul sito a monte del promotore. Dato che il lattosio non è presente e quindi c'è il repressore che inattiva l'operone Lac. Anche se sono presenti alte concentrazioni di AMPc, la trascrizione viene repressa.
2. **Presenza di glucosio ma assenza di lattosio** → è presente il repressore che inattiva l'operone. CAP non si lega al sito dato che AMPc è a bassi livelli. Anche in questo caso la trascrizione viene repressa.
3. **Presenza di glucosio e lattosio** → la presenza del lattosio provoca la rimozione del repressore. Ha luogo la trascrizione, ma sarà basale a causa dei bassi livelli AMPc. Questi livelli sono causati dalla presenza del glucosio.
4. **Assenza di glucosio ma presenza di lattosio** → in questo caso la cellula ha un assoluto bisogno di glucosio. Il lattosio rimuove il repressore, CAP si lega al sito di attacco (dati gli alti livelli di AMPc). La trascrizione si attiva in modo efficiente.

Risposta stringente

In seguito alla carenza di aminoacidi ottiene un blocco della sintesi degli RNA ribosomiali e dei tRNA con conseguente mancanza di assemblaggio di nuovi ribosomi.

La risposta stringente viene indotta da 2 nucleotidi di guanina modificati con l'aggiunta di gruppi fosfato:

- ppGpp;
- pppGpp.

In carenza di aminoacidi un tRNA scarico può legarsi al ribosoma che funge da segnale per la proteina RelA. Questa proteina gruppo fosfato da GTP e ATP per produrre ppGpp e pppGpp. Questi ultimi svolgono un ruolo di regolatori globali:

- Inibiscono la sintesi degli rRNA e dei tRNA, interferendo direttamente con la RNA polimerasi per l'inizio della trascrizione in corrispondenza dei geni relativi a questi RNA;

- Attivano operoni deputati alla sintesi degli aminoacidi mancanti integrando cofattori di trascrizione.

9.3 Altri sistemi di controllo globale

Aggiungi tabella

9.3.1 Fattori sigma alternativi

Il fattore sigma è una proteina che si attacca alla RNA polimerasi per facilitare l'attacco al DNA dato che riconosce particolare sequenze specifiche. Molti dei geni impegnati nei processi di controllo globale utilizzano fattori sigma alternativi. La regolazione è determinata dalla quantità (concentrazione) o dall'attività (fattori antagonisti antisigma) dei diversi fattori sigma in quanto ogni fattore riconosce nel genoma soltanto un certo gruppo di promotori. Ci sono 7 fattori sigma in *E. coli*, 14 in *B. subtilis* dei quali 4 sono specifici per i geni necessari alla formazione dell'endospora. σ^{70} è il fattore più diffuso.

9.3.2 Risposta allo shock termico

Nel caso di uno shock termico la degradazione del fattore σ^{32} viene inibito. Questo dà luogo a una massiccia sintesi di proteine codificate da geni sotto il controllo di σ^{32} , in particolare le proteine heat shock (Hsp).

- La proteina **Hsp70** (DnaK) previene l'aggregazione delle proteine neosintetizzate e stabilizza quelle ancora non ripiegate.
- Le proteine **Hsp60** (GroEL) e **Hsp10** (GroEs) catalizzano il corretto ripiegamento di proteine ripiegate erroneamente.

9.3.3 Quorum sensing

Sono sistemi di regolazione dipendenti dalla percezione della densità delle cellule della stessa specie presenti nella popolazione. Permette alle cellule di attivare una particolare risposta biologica soltanto quando un numero sufficiente di cellule sono presenti nell'ambiente circostante.

L'omoserina lactone (AHL) viene sintetizzata dalle specie dotate di quorum sensing e diffonde all'esterno della cellula. AHL è un induttore. Quando raggiunge una data concentrazione, si combina ad una proteina attivatrice permettendo l'avvio della trascrizione di geni specifici.

Esempi:

- Regolazione della luminescenza in *Vibrio fischeri*: induzione dell'operone lux, sotto il controllo della proteina attivatrice LuxR + AHL;
- Formazione di biofilms da *Pseudomonas aeruginosa*;
- Produzione di fattori di virulenza in *Staphylococcus aureus*.

Sistema per la sintesi di triptofano basato sulla presenza di un peptide leader (L) a monte dell'operone deputato alla biosintesi di uno specifico aminoacido. Questa sequenza leader è ricca di residui dell'aminoacido in questione.

Questo fenomeno, nei procarioti, può avvenire perchè i processi di trascrizione e traduzione avvengono simultaneamente.

L'attenuazione ha luogo perchè una parte dell'mRNA si ripiega a formare un'ansa a doppia elica che determina il blocco dell'attività della RNA polimerasi.

- Se il Trp è abbondante → il ribosoma potrà tradurre rapidamente la sequenza del peptide leader. In questo modo la regione 2 dell'mRNA non si può appaiare con la regione 3. Si forma una struttura a loop nelle regioni 3 e 4 che blocca l'attività della RNA polimerasi.
- In caso di carenza di Trp → il peptide leader verrà sintetizzato più lentamente. Questo consente la formazione di una struttura ansa-stelo alternativa (tra le regioni 2 e 3) che previene la formazione dell'ansa-stelo di terminazione (tra le regioni 3 e 4). La trascrizione e la successiva traduzione procedono normalmente, portando così alla biosintesi del triptofano.

Tutto dipende dalla velocità con cui i ribosomi possono tradurre.

9.3.4 Trasduzione di segnale e sistemi di regolazione a 2 componenti

Il sistema è composto da due componenti principali:

1. una proteina di membrana, che ha il ruolo di sensore;
2. una proteina regolatrice della risposta.

La proteina sensore ha un'attività di tipo chinasi ed è in grado di autofosforilarsi. Il gruppo fosforico viene poi trasmesso alla proteina regolatrice della risposta. Questa proteina è generalmente una proteina di legame al DNA che regola la trascrizione.

Questo è un tipo di sistema dinamico che per funzionare necessita di avere la possibilità di ritornare sempre al punto di partenza. Questo è reso necessario dalla fosfatasi. La fosfatasi è un enzima che rimuove il gruppo fosforico della proteina regolatrice per ripristinare il sistema.

Un esempio di questo meccanismo è la regolazione della chemiotassi.

- **MCP** → può rilevare una varietà di composti attraenti e/o repellenti. Svolge quindi il ruolo di sensore. Le MCP si possono presentare libere oppure legate agli attraenti/repellenti direttamente o indirettamente tramite interazioni con proteine di legame periplasmatiche.
- **CheW** e **CheA** → sono delle chinasi sensore. Si autofosforilano quando MCP si lega ad una determinata sostanza.
- **CheY** e **CheB** → regolatori della risposta. A loro viene ceduto il gruppo fosfato portato da CheA.

Controllo della rotazione del flagello

Il controllo della rotazione del flagello avviene tramite **CheY-P**. Esso induce il motore del flagello a ruotare in senso orario. Se **CheY** non è fosforilato o viene defosforilato da **CheZ**, non può legarsi al motore del flagello che continua a ruotare in senso antiorario.

Gli attraenti diminuiscono la frequenza di autofosforilazione e quindi consentono alla cellula di proseguire nel suo moto di avanzamento regolare; mentre i repellenti aumentano la frequenza e questo permette al flagello di cambiare frequentemente la direzione della corsa per allontanarsi dalla sostanza.

Il processo di adattamento

Questo processo consente di ripristinare il sistema di regolazione. **CheR** aggiunge continuamente gruppi metilici alle MCP, mentre **CheB-P** le rimuove. Anche **CheB** presenta una fosforilata e una defosforilata.

Il livello di metilazione delle MCP influenza la loro conformazione e controlla l'adattamento a un dato segnale.

Il fattore decisivo per questo tipo di regolazione viene dato dal cambiamento di concentrazione di attrattante o repellente nel tempo, non della concentrazione assoluta.

Capitolo 10

Controllo della crescita microbica

Questi tipi di controllo tengono conto solamente delle caratteristiche biologiche dei microrganismi da selezionare e non dell'ambiente in cui vivono.

Vi sono vari metodi:

- **Sterilizzazione** → uccisione o rimozione di tutti gli organismi viv all'interno di un terreno di crescita;
- **Inibizione** → riduzione della crescita microbica causata dalla diminuzione del numero di organismi presenti o dalle alterazioni nell'ambiente microbico;
- **Decontaminazione** → trattamento di oggetti o superfici che le rende tali da poter essere utilizzate senza rischio di contaminazione;
- **Disinfezione** → processo che colpisce direttamente i microrganismi, uccidendone o inibendone la crescita;ù
- **Pastorizzazione** → riduzione della carica microbica nei liquidi sensibili al calore con lo scopo di distruggere tutti i microrganismi patogeni e ridurre il numero dei microrganismi responsabili del deterioramento degli alimenti;

Ci sono tre tipi di agenti o trattamenti antimicrobici a seconda dell'effetto che hanno sul batterio:

- **Battericida** → agente antimicrobico che uccide i microrganismi. La conta vitale subisce una deflessione, mentre la conta totale rimane costante. Questo avviene perchè lo spettrofotometro non ha la capacità di differenziare le cellule vive da quelle morte, visto che non perdono l'integrità;
- **Batteriolitico** → agente antimicrobico che uccide i microrganismi provocando la lisi. C'è una totale distruzione della cellula, quindi si nota sia un calo della conta vitale che nella conta totale;
- **Batteriostatico** → agenti antimicroico che inibisce la crescita dei microrganismi. Dopo la sua aggiunta, la conta totale e la conta vitale rimangono costanti.

10.1 Metodi fisici

Si possono fare dei controlli della crescita batterica mediante trattamenti fisici solo se il controllo viene fatto su oggetti o terreni di coltura. Non si possono applicare a sistemi in vivo in quanto si porterebbe alla morte dell'organismo ospite.

Questi metodi si dividono in due gruppi principali:

- **Caldo umido** → bollitura, autoclave, pastorizzazione e sterilizzazione;
- **Caldo secco** → aria calda o incenerizzazione.

Il metodo con caldo umido è più efficace, infatti l'acqua presenta una capacità calorifica maggiore dell'aria ed è così un veicolo più efficiente per trasmettere la temperatura.

10.1.1 Caldo umido

Sterilizzazione mediante calore

La letalità dovuta all'incremento della temperatura è una funzione esponenziale. Il tempo necessario per uccidere una determinata frazione di cellule è indipendente dal numero iniziale di cellule.

Il tempo di riduzione decimale (D) viene definito come il tempo necessario per ridurre di dieci volte, a una data temperatura, la densità della popolazione.

Nei grafici vengono utilizzate sempre due scale diverse di misurazione:

- Sull'asse delle ascisse si trova il tempo (scala lineare);
- Sull'asse delle ordinate si trova il numero dei microbi (scala logaritmica).

Si ottiene così un grafico semilogaritmico. Su un'ampia scala temporale si nota che le sostanze o i trattamenti battericidi uccidono una percentuale costante di cellule per ogni intervallo di tempo. Dal punto di vista grafico questo si nota tracciando una retta che rappresenta una decrescita esponenziale e che indica un tasso di morte costante.

Tuttavia non è assicurato che applicando questi metodi, si arrivi a un numero di individui pari a zero: dipende tutto dal numero di microbi iniziale. Quando una popolazione diminuisce di un certo ordine di grandezza, si può dire che è diminuita del 90%. Partendo da una popolazione di 10^9 e affermando che con un determinato prodotto si riesce a ridurla del 99,99%, si ottiene che la popolazione finale è ancora composta da 10^5 microbi.

Un grafico che si basa sulla relazione tra D e la temperatura è esponenziale. La posizione della retta offre un'indicazione quantitativa della sensibilità al calore dell'organismo in esame.

(GRAFICO) Se confrontiamo il comportamento di due batteri, uno mesofilo e uno termofilo, si nota che:

- Nel mesofilo con un'esposizione a 100°C il tempo di riduzione decimale è a pari a meno di 20 s;
- Nel termofilo, adatto a sopravvivere a temperature elevate, con una temperatura sempre di 110°C il tempo di riduzione decimale è di 10 minuti.

Si necessita dell'allestimento di un numero elevato di conte vitali.

Alternativamente si può utilizzare il tempo di inattivazione termica, cioè il tempo necessario per uccidere tutte le cellule di una popolazione a una data temperatura, che dipende dal numero di cellule iniziali.

I batteri che presentano la capacità di fornire endospore sono quelli che hanno la maggiore resistenza al calore.

Autoclave

L'autoclave è composto da una camera a chiusura ermetica che permette l'immissione di vapore sotto pressione. La normale procedura prevede il riscaldamento a una pressione di $1,1 \text{ kg/cm}^2$ (= 15 pounds per square inch, psi) che consente di raggiungere una temperatura di 121°C .

La morte dei microrganismi non viene provocata dall'alta pressione, ma dall'elevata temperatura che può essere raggiunta in condizioni di vapore a una pressione superiore a quella atmosferica. Se la pressione non venisse aumentata, la temperatura di ebollizione sarebbe di 100°C . Questa temperatura è capace di denaturare le proteine e di distruggere le membrane, ma non di uccidere le endospore.

L'autoclave è simile ad una pentola a pressione ed è composta da:

- Tappo ermetico;
- Tubo per l'ingresso del vapore caldo;
- Sistema per abbassare la temperatura in seguito all'avvenuta operazione. Circa 20 minuti.

(GRAFICO) Se si osserva il grafico si può vedere che le linee che rappresentano la temperatura in autoclave e la temperatura dell'oggetto sono sfasate. La temperatura dell'oggetto sterilizzato aumenta più lentamente della temperatura dell'autoclave. Normalmente il tempo di sterilizzazione dura 10-15 minuti, mentre l'intero processo dura circa 60 minuti.

Questo è l'unico metodo che riesce a debellare le endospore.

Queste ultime sono la forma di vita più resistente in assoluto. Possono sopravvivere a valori estremi di temperatura e di pH e resistono all'azione di molte sostanze chimiche utilizzate come disinfettanti, per esempio l'etanolo al 70%. Alla temperatura di 121°C si rendono necessari 5-6 minuti per la riduzione decimale delle endospore, mentre bastano 0,1 minuti per la riduzione decimale delle cellule vegetative a 65°C .

Per verificare l'avvenuta eliminazione possono essere utilizzati due metodi.

Il primo prevede un nastro che diventa di colore nero se la sterilizzazione è stata svolta nel modo corretto, quindi si basa su un sistema chimico.

Nel secondo, invece, è presente un'ampolla che contiene un terreno di crescita con indicatore pH colorimetrico, mentre lo strip contiene le endospore. Durante l'autoclavaggio si verifica la rottura della provetta di vetro e l'esposizione delle endospore al terreno di coltura. Se dopo il ciclo l'indicatore di colorimetrico resta rosso significa che le endospore sono morte; mentre se c'è un cambiamento di colore, significa che c'è stato un abbassamento di pH e di conseguenza l'attività metabolica delle endospore.

Pastorizzazione

La pastorizzazione è un processo che utilizza una temperatura controllata per ridurre la carica microbica nel latte e in altri alimenti particolarmente sensibili al calore. Lo scopo di questo processo è quello di prevenire la diffusione di patogeni e il procrastinare della crescita di microrganismi responsabili del deterioramento degli alimenti. Alcuni esempi di batteri che vengono prevenuti grazie all'utilizzo della pastorizzazione sono: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia Coli* O15:H7, specie di *Campylobacter* e *Salmonella*.

Processi possibili:

- **Pastorizzazione istantanea** → piccoli volumi riscaldati a 72°C per 15 secondi;
- **Pastorizzazione di massa** → grandi volumi riscaldati a $63-66^\circ\text{C}$ per 30 minuti;

- **Pastorizzazione UHT** → processo detto "flash heating" con getto di vapore a 134°C per 1 secondo;
- **Sterilizzazione UHT** → getto di vapore a 140°C per 1-3 secondi, seguito da un rapido raffreddamento.

Altri metodi con temperatura

1. **Caldo secco:** viene utilizzata per sostanze che tollerano l'umidità, come ad esempio le polveri. È meno efficace rispetto al caldo umido; per esempio un'autoclave sterilizza un oggetto in 15 min a 121°C, un forno alla stessa temperatura ha bisogno di 16 ore. Questo dipende dal fatto che l'energia termica nell'acqua ha una migliore capacità di stoccaggio. Il processo di sterilizzazione con caldo secco avviene tipicamente a 170°C per 1 ora.
2. **Refrigerazione (0-8°C) e congelamento (-10°C):** il freddo rallenta o ferma il metabolismo microbico. La refrigerazione inibisce la crescita della maggioranza dei patogeni umani, che sono per lo più mesofili. Il congelamento lento consente la formazione di cristalli di ghiaccio che danneggia le membrane ed è per questo motivo più efficace del congelamento rapido. Per questo motivo quando si scongela un alimento si assiste alla sua perdita di consistenza (le cellule vengono lise dai cristalli di ghiaccio).
3. **Essiccazione e liofilizzazione:** entrambi i processi inibiscono la crescita microbica perché le reazioni metaboliche si svolgono in soluzione acquosa. La liofilizzazione combina il congelamento rapido con azoto liquido seguito dalla rimozione dell'acqua tramite sublimazione.

10.1.2 Trattamenti fisici alternativi

Sterilizzazione con radiazioni

1. **Sterilizzazione mediante radiazioni non-ionizzanti:** hanno una lunghezza d'onda maggiore di 1 nm (UV, luce visibile, infrarosso, onde radio), ma vengono utilizzati solamente i raggi UV (260 nm) sono sufficientemente energetici per essere utilizzati come agente antimicrobico. Inducono la formazione di dimeri di pirimidina nel DNA. Le radiazioni UV non penetrano nella materia e vengono quindi usate per sterilizzazione di superficie, acqua, liquidi trasparenti.
2. **Sterilizzazione mediante radiazioni ionizzanti:** hanno una lunghezza d'onda minore di 1 nm (fascio di elettroni, raggi X, raggi gamma). Possono produrre ioni che interagiscono con le macromolecole biologiche ad esempio rompendo legami idrogeno o producendo ioni OH⁻. L'irradiazione con fascio di elettroni è molto efficace in quanto ad alta energia, ma non penetra bene nella materia; al contrario, i raggi gamma sono meno energetici ma penetrano più in profondità. Questo tipo di radiazioni vengono usate nel trattamento della frutta, infatti, se viene bombardata da radiazioni ionizzanti aumenta la sua "shelf life", ossia il tempo per il quale l'alimento può essere messo in vendita.
L'energia di irraggiamento emessa dalla sorgente viene misurata per quantificarne gli effetti. Lo standard per le applicazioni biologiche come la sterilizzazione è dato dalla dose di radiazione assorbita. Questa dose viene espressa in rad (100 egr/g, dove 1 erg = 10⁻⁷ J) o in Gray (1 Gy = 100 rad). La relazione tra la frazione di sopravvivenza microbica, riportata su scala logaritmica, e la dose di radiazioni è lineare.
La dose letale standard per una completa sterilizzazione con radiazioni è 12 volte D10 ed equivale a:

- 39600 Gy per *Clostridium botulinum*;
- 2400 Gy per *Salmonella typhimurium*;
- 10 Gy per l'uomo.

ù

Strerilizzazione per filtrazione

Viene utilizzata per sterilizzare soluzioni sensibili al calore. Necessita dell'utilizzo di un dispositivo in grado di trattenere microrganismi di dimensione comprese tra 0.3 e 10 micrometri.

1. **Filtri a spessore:** sono costituiti da strati fibrosi di carta, amianto o lana di vetro. Vengono usati come prefiltri per la rimozione delle particelle di maggiore dimensione che potrebbero intasare quelli utilizzati nel processo di sterilizzazione vera e propria. Questa tipologia viene utilizzata nei sistemi di condizionamento, filtri HEPA delle cappe biologiche. In quest'ultime si crea un flusso di aria laminare, che evita che l'aria contaminata e quella di laboratorio si mescolino. Questo flusso passa attraverso i filtri HEPA che consentono di trattenere i microbi e di avere un sistema di ricircolo dell'aria.
2. **Membrane filtranti:** vengono utilizzate per la sterilizzazione di liquidi e sono costituite da dischetti di acetato di cellulosa o di nitrocellulosa. Aggiustando le condizioni di polimerizzazione durante la fabbricazione può essere controllata in maniera precisa la dimensione dei pori, normalmente da 0.1 a 10 micrometri. Esistono vari tipi di membrane filtranti e quelle più utilizzate per il controllo della crescita batterica sono da 0.45 (batteri di grandi dimensioni) e da 0.22 (maggior parte dei batteri e i virus più grandi).
3. **Il filtro Nucleopore:** viene prodotto trattando un sottile strato di polycarbonato con un composto chimico corrosivo. Vengono maggiormente usati per la preparazione di campioni per la microscopia elettronica. L'organismo viene facilmente rimosso dalla fase liquida e distribuito su un unico piano alla superficie del filtro.

10.2 Metodi chimici

AGGIUNGI TABELLA

10.2.1 Controllo della crescita in vivo

Nel 1929 Alexander Fleming riporta per la prima volta l'azione antibatterica della penicillina, prodotta da *Penicillium chrysogenum* (fungo). Gli agenti che vengono utilizzati per controllare la crescita batterica in vivo, che sia per uso clinico o veterinario, sono detti antibiotici. Esistono antibiotici naturali, semisintetici e sintetici. Gli antibiotici agiscono solamente contro i batteri e non anche contro virus e funghi.

Vengono prodotti da funghi o batteri e si possono riassumere le informazioni principali sul loro utilizzo nei seguenti punti:

1. Sono farmaci salva-vita;
2. Trattano solamente infezioni batteriche;
3. Alcune infezioni all'orecchio non necessitano la cura antibiotica;

4. La maggior parte delle infezioni alla gola non richiede cura antibiotica;
5. Il muco di colore verde non necessita l'utilizzo di antibiotico;
6. Ci sono molti rischi se vengono assunti senza prescrizione medica.

Spesso la terapia antimicrobica è molto complessa se applicata in vivo: è difficile trovare delle molecole che rispettino tutte le caratteristiche necessarie.

Va considerata la tossicità selettiva, quindi bisogna adottare dei metodi che prevedono l'uccisione dei microbi ma che allo stesso tempo preservino l'organismo ospite. Bisogna anche prendere in considerazione il funzionamento delle drug delivery, quindi la molecola che si deve adottare deve raggiungere la regione bersaglio senza subire alcuna alterazione. Dovrebbe passare per i vari tessuti del corpo e arrivare al sito target con la giusta concentrazione.

Ci possono essere numerose complicazioni durante il loro utilizzo:

- Ritezione del farmaco: l'ospite può degradare o disattivare l'antibiotico;
- Utilizzo di un farmaco errato: bisogna conoscere lo spettro di resistenza prima di utilizzarlo;
- Problemi di delivery;
- Tossicità sull'ospite, reazioni allergiche, alterazioni del microbioma interno.

Vanno considerati i seguenti quattro aspetti principali:

1. Pericolo di sviluppo di resistenza;
2. Pericolo di rilascio di tossine dopo la lisi. Esotossine e endotossine provenienti dalla parte lipidica che portano ad un peggioramento nell'ospite. Si parla in particolare di gram-negativi;
3. Uso corretto e per il giusto periodo;
4. Possibilità di utilizzare varie tipologie di antibiotici in cicli sequenziali.

Le caratteristiche dell'antibiotico ideale sono:

- Disponibilità;
- Basso costo → deve essere facile da preparare, poco dispendioso e molto vendibile;
- Chimicamente stabile (trasporto e stoccaggio);
- Semplice da somministrare;
- Non allergenico;
- Tossicità selettiva.

Nella realtà nessuna molecola ha tutte queste caratteristiche contemporaneamente.

L'utilizzo di antibiotici ad ampio spettro pone il problema di "super-infections" dovute all'alterazione delle comunità microbiche naturalmente associate all'ospite umano e all'eventuale comparsa di infezioni secondarie.

10.3 Misurazione dell'attività antimicrobica

10.3.1 Test di Kirby-Bauer

Questo test viene utilizzato per determinare la suscettibilità o la resistenza di un determinato batterio a una cura con un certo antibiotico.

Viene formato un tappeto uniforme di batteri in cui vengono posti dei dischetti imbevuti di antibiotici diversi. Poi si misurano gli aloni di inibizione, che sono le zone che si trovano intorno al disco in cui i batteri non sono stati in grado di crescere.

Va comunque indagata anche la sopportazione dell'organismo all'agente usato.

10.3.2 Test di Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

La MIC è la minore concentrazione di un antibiotico in grado di inibire la crescita batterica.

Vengono poste uguali quantità di batteri in una serie di tubi in cui vengono aggiunte delle soluzioni con differenti concentrazioni di antibiotici diversi. Una volta avvenuta l'incubazione, la torbidità indica la crescita batterica e quindi la sua assenza individua i tubi dove i batteri o sono stati uccisi o la replicazione è stata bloccata.

Per misurare la MIC viene utilizzato il metodo dell'assorbanza.

10.3.3 Etest

L'Etest associa le caratteristiche del test di Kirby-Bauer con il test MIC. Si basa su una coltura in terreno solido dove viene applicato uno striscio che contiene concentrazioni differenti di antibiotico. Data la concentrazione diversa si ottiene un alone di inibizione a forma di goccia. Questo permette di avere una lettura immediata per trovare il MIC dove comincia la goccia di inibizione.

10.3.4 Minimum bactericidal concentration (MBC)

Questo test è un'estensione del test MIC e determina la concentrazione minima necessaria di antibiotico per uccidere i batteri presenti.

Le provette utilizzate per MIC e le si piastra su terreni di coltura ma senza antibiotico. Questo assicura di trovarsi in presenza di antibiotici battericidi che portano alla morte di tutti i batteri e non solo di quello batteriostatici, che vanno ad inibire la crescita dei microrganismi.

10.4 Meccanismi di azione degli antibiotici

Gli antibiotici hanno diverse modalità di azione e queste dipendono anche dalle diverse specie:

- Inibizione della sintesi della parete cellulare, β lattamici e glicopeptidi;
- Inibizione della sintesi delle proteine (traduzione), amminoglicosidi;
- Inibizione delle vie metaboliche;
- Inibizione della sintesi di acidi nucleici;
- Inibizione del riconoscimento o attacco del patogeno al suo ospite, colpiscono fattori di virulenza e le patogenicità frequenti.

Classificazione degli antibiotici:

- Aminoglicosidi e tetracicline → inibiscono la sintesi proteica legando la subunità 30S dei ribosomi batterici;
- Beta-lattamici e glicopeptidi → interferiscono con la sintesi della parete batterica;
- Fluoroquinolones → inibiscono l'attività della DNA girasi o topoisomerasi coinvolti nella replicazione del DNA;
- Macrolidi → inibiscono la sintesi proteica legando la subunità 50S dei ribosomi batterici;
- Sulfonamidi → inibiscono la biosintesi dell'acido folico.

10.4.1 Inibizione della sintesi della parete cellulare

La parete cellulare dei batteri è composta da macromolecole di peptidoglicano formato a sua volta da catene di NAM-NAG che sono legate da ponti peptidici tra le subunità di NAM. Al processo di sintesi di questa parete prendono parte due classi di antibiotici.

β lattamici

Questi rappresentano (cefalosporine e penicillina) quasi la metà delle 500 tonnellate di antibiotici che vengono utilizzati ogni anno. Questi agiscono solamente sui batteri in fase di divisione. In questa classe di antibiotici sono presenti dei composti con gruppi funzionali differenti tra loro. Tuttavia, tutti presentano l'anello β lattamico che gli impedisce di formare dei legami crociati peptidici tra subunità di NAM del peptidoglicano.

Il legame con gli enzimi transpeptidasi non blocca la sintesi della parete, ma la indebolisce progressivamente visto che le catene di peptidoglicano non sono più unite tra loro. La cellula non è in grado di resistere alla pressione osmotica e va incontro alla lisi.

Sono divisi in due gruppi principali:

- Peniciline naturali, come per esempio la Benzilpenicillina;
- Penicilline semisintetiche → non sono presenti in natura e hanno un'attività più efficace della penicillina naturale. Le più conosciute sono la Meticillina, l'Oxacillina, l'Ampicillina e la Carbenicillina. Queste hanno vari vantaggi:
 - Sono attive anche contro i gram-negativi;
 - Sono resistenti alla beta-lattamasi;
 - Sono più stabili in ambiente acido, come lo stomaco;
 - Vengono assorbite più facilmente dall'epitelio intestinale.

Glicopeptide

Queste hanno il compito di legare il ponte peptidico in corrispondenza di ogni filamento prima che la transpeptidasi possa agire. Questa classe di antibiotici riconosce gli antibiotici e si legano a loro prima che gli enzimi deputati alla loro fusione possano essere in grado di assemblarli. Anche qui si ottiene una cellula debole, che non ha la capacità di far fronte alla forza osmotica:

- Vancomicina → interferisce con la formazione dei ponti Ala-Ala dei legami crociati nei gram positivi;

- Bacitracina → blocca la defosforilazione del bacitoprenolo, inibendo la secrezione delle subunità NAM e NAG del citoplasma.

Questi antibiotici hanno efficacia solo nei confronti di cellule in divisione attiva.

Un batterio ha la possibilità di diventare resistente a questa classe modificando l'ultimo aminoacido della sequenza. In questo modo l'antibiotico non è capace di riconoscere più le catene visto che si viene a creare un legame imperfetto.

Isoniazide ed etambutolo

I batteri del genere *Mycobacterium*, agenti del morbo di Hansen (lebbra) e della tubercolosi, presentano una parete cellulare peculiare contenente uno strato di acidi micolici e arabinogalattano. L'isoniazide e l'etambutolo inibiscono la formazione di questo involucro.

(AGGIUNGI IMMAGINE)

10.4.2 Inibizione della sintesi proteica

La tossicità selettiva di alcuni antibiotici si basa sulle lievi differenze strutturali tra ribosomi procariotici ed eucariotici.

Aminoglicosidi

Alterano la struttura della subunità 30S portando alla lettura erranea dei codoni e all'incorporazione di aminoacidi scorretti.

Tetracicline

Bloccano il sito di legame del tRNA impedendo l'elongazione della proteina.

Cloramfenicolo

Il cloramfenicolo blocca l'attività enzimatica della subunità 50S impedendo la formazione dei legami peptidici.

Macrolidi

Legano la subunità 50S interferendo con il movimento del ribosoma lungo la molecola di mRNA. Un esempio è l'eritromicina.

Capitolo 11

Laboratorio

11.1 Prima esperienza - preparazione del terreno di coltura sterile

11.1.1 Introduzione

Categorie di terreni batterici

Determinazione in base allo stato fisico In base allo stato fisico i terreni batterici si distinguono in:

- Terreni liquidi o brodi: usati per la coltivazione batterica.
- Terreni solidi o gel: usati sia che per la coltivazione batterica che per l'isolamento. Sono terreni liquidi gelificati tramite *AGAR*, sostanza polisaccaride isolata da un'alga rossa in Giappone. Gelifica a temperature inferiori ai 45%.

Determinazione in base alla quantità di sostanze In base alla quantità di sostanze presenti i terreni batterici si distinguono in:

- Terreni minimi: sono utilizzati per la crescita dei soli batteri autotrofi. Contengono solo gli elementi essenziali N , C , S , P come sali inorganici in composizione e quantità note.
- Terreni sintetici o definiti: vengono preparati *ad hoc* a seconda delle esigenze nutrizionali del microorganismo. Se ne conosce l'esatta composizione.
- Terreni complessi: permettono la crescita di più organismi con esigenze nutrizionali diverse. Non se ne conosce l'esatta composizione.

Determinazione in base alla qualità delle sostanze In base alla qualità delle sostanze presenti i terreni batterici si distinguono in:

- Terreni nutritivi: favoriscono la crescita di microorganismi particolari dal punto di vista nutritivo: al terreno vengono aggiunte sostanze nutritive come siero, latte o sangue per favorire una specie specifica.

11.2. SECONDA ESPERIENZA - DETERMINAZIONE DELLA CURVA DI CRESCITA DI UN CEPPPO BATTERICO (*E. COLI*)

- Terreni selettivi: favoriscono la crescita di particolari specie batteriche grazie alla presenza di fattori che inibiscono lo sviluppo di altre specie. I fattori vengono detti sostanze inibenti e possono essere antibiotici, coloranti o sali.
- Terreni differenziali: permettono l'identificazione batterica in relazione all'attività metabolica o aspetti morfologici delle colonie. Questo avviene grazie a particolari substrati o indicatori in grado di dimostrare con una variazione cromatica l'azione metabolica del microorganismo ricercato.

11.1.2 Primo giorno

Per la preparazione di un terreno si utilizza un preparato in polvere pesato accuratamente tramite bilancia digitale.

Coltura liquida

Per la preparazione di una coltura liquida si misura una specifica quantità di acqua distillata tramite cilindro e la si aggiunge alla polvere all'interno del contenitore in cui si vuole ottenere il terreno. Una volta mescolata la polvere si posiziona il contenitore all'interno dell'autoclave per la sterilizzazione del terreno mediante pressioni elevate 1.5atm senza bollire il terreno e rovinare il nutriente per 20 minuti. Non bisognerà poi più aprire il contenitore se non sotto cappa, quando viene steso il terreno sulle piastre.

Terreni preparati

Vengono preparati 4 terreni di coltura sterili:

- *LB agar*: terreno di base. ceppi non capaci di sintetizzare i nutrienti.
- *LB agar-ampicillina*: terreno di coltura selettivo per i terreni ampicillina-resistenti.
- *Mueller-Hinton agar*: terreno di coltura che non contiene sostanze che interferiscono con antibiotici e si usa per il test per determinare l'antibiotico-resistenza.
- *Nutrient agar*: terreno nutritivo adatto a

11.2 Seconda esperienza - Determinazione della curva di crescita di un ceppo batterico (*E. coli*)

11.2.1 Introduzione

Fattori che influenzano la crescita batterica

I fattori che influenzano la crescita batterica sono:

- Nutrienti: fonti di carbonio, energia, acqua, vitamine, azoto e oligoelementi.
- Concentrazioni di sale: divide i batteri in alofili, alotolleranti o alofili estremi.
- Ossigeno: divide i batteri in aerobi obbligati, aerobi facoltativi, microaerofili, anaerobi aerotolleranti e anaerobi obbligati.
- *pH*: divide i batteri in alcalinofili, basofili e neutrofil.
- Temperatura: divide i batteri in psicrofili ($-10-30^{\circ}$), mesofili ($10-50^{\circ}$), termofili ($40-90^{\circ}$) e termofili estremi.

11.2. SECONDA ESPERIENZA - DETERMINAZIONE DELLA CURVA DI CRESCITA DI UN CEPPPO BATTERICO (*E. COLI*)

Quantificazione

Fasi della crescita microbica

1. Lag: adattamento del batterio alle nuove condizioni.
2. Esponenziale: crescita continua grazie alla presenza di nutrienti. Il tempo di replicazione specifico del batterio influisce sulla velocità: *Mycobacterium tuberculosis* impiega 16 ore, *E. coli* 20 minuti.
3. Stazionaria: ci sono troppi batteri sul terreno e i nutrienti iniziano ad esaurirsi. Gli eventi di replicazione e morte sono in equilibrio tra di loro.
4. Morte: avviene progressivamente la morte per mancanza di nutrienti.

11.2.2 Primo giorno

Micropipetta

La micropipetta è uno strumento in grado di prelevare volumi diversi. Possiede una scala graduata.

Tipologie

- *p20*: da 2µl a 20µl, i numeri letti vanno divisi per 10.
- *p200* da 20µl a 200µl.
- *p1000* da 200µl a 1000µl, i numeri letti vanno moltiplicati per 10.

Utilizzo

1. Si inserisce un nuovo puntale ogni volta che si cambia sostanza.
2. Si schiaccia lo stantuffo fino al primo scatto per verificare il volume da prelevare.
3. Si inserisce nella sostanza da prelevare e si rilascia lo stantuffo superiore per prelevare
- il volume.
4. Si inserisce nella sostanza il cui volume deve essere rilasciato e si preme lo stantuffo fino in fondo.
5. Si rilascia il puntale tramite un pulsante vicino allo stantuffo.

Tempo di generazione

Si intende per tempo di generazione il tempo di duplicazione della massa di una colonia batterica. Questo valore è specifico per ogni specie:

- *E. coli*: 20 minuti.
- *Staphylococcus aureus*: 30 minuti.

11.2. SECONDA ESPERIENZA - DETERMINAZIONE DELLA CURVA DI CRESCITA DI UN CEPPO BATTERICO (*E. COLI*)

Procedimento

1. Inoculo: si prelevano 100 μ l di *E. coli* da una provetta preparata dagli esercitatori overnight tramite la *p200* e la si inserisce in una beuta con 100mL di brodo. Si ottiene una diluizione 1 : 100 e si mescola.
2. Si preleva 1mL di coltura con una *p1000* e la si pone nella cuvetta in modo da inserirla poi nello spettrofotometro per monitorare la crescita batterica. Si misura la densità ottica e la si annota. Si è ora a $t = 0$. Ci si deve assicurare che lo spettrofotometro sia a $OD = 600\text{nm}$ e che sia stato tarato secondo il brodo sterile o bianco in modo da eliminarne il rumore.
3. Si trasferisce la beuta in uno shaker o incubatore termostato orbitale che la mescola uniformemente e peremette una corretta areazione.
4. Si puliscono micropipetta e cuvetta per mantenerli sterile. Per la cuvetta si getta il brodo nei contenitori e la si risciacqua con acqua distillata. La si fa asciugare a testa in giù su carta assorbente.
5. Si procede allo stesso modo ogni 20 minuti per ottenere un totale di 12 misurazioni.
6. Quando si nota una $OD = 0.8$ si procede con diluizioni 1 : 2 per rimanere nel range di sensibilità dello spettrofotometro: si prelevano 500 μ l di coltura e 500 μ l di terreno. Quando necessario si fa una diluizione 1 : 5 con 200 μ l di coltura e 800 μ l di terreno.
7. Una volta terminate le misurazioni si versa la sospensione nella cuvetta nei rifiuti biologici liquidi e si cestina la cuvetta nei rifiuti biologici solidi. Si versa la sospensione nella bottigliata in vetro da 100ml nei rifiuti biologici liquidi e la si pone nel contenitore con la vetreria da lavare.

Analisi dei dati

1. Si effettua un grafico a punti con la curva di crescita microbica tramite i dati ottenuti. Sull'asse delle x si pone il tempo, mentre su quello delle y la densità ottica a 600nm.
2. Si individuano le fasi di crescita osservate durante la crescita microbica.
3. Si calcolano il numero di generazioni e al tempo di generazione della coltura.

Per calcolare il numero di generazioni n dopo un intervallo si usa la formula:

$$N_{t_f} = N_0 \cdot 2^n$$
$$\log N_{t_f} = \log N_0 + n \log 2$$

Dove:

- N_0 è il numero di batteri a $t = 0$.
- N_{t_f} è il numero di batteri a t_f .
- t_f è $\Delta t = t_i - t_0$.

Da cui deriva che il numero di generazioni n è:

$$n = \frac{\log N_{t_f} - \log N_0}{\log 2}$$

Si può anche calcolare il tempo di generazione g avvenute in un $\Delta t = t_2 - t_1$:

$$g = \frac{t_2 - t_1}{n}$$

Dati raccolti

N_0	60 000
N_{t_f}	38 000 000
t	300min
n	12.6 generazioni
g	23.8min

11.3 Terza esperienza - Caratterizzazione dei batteri del cavo orale

11.3.1 Introduzione

Nel caso orale si trovano numerosi batteri anche simbiotici in un pattern specifico alla persona in quanto dipende da:

- pH .
- Umidità.
- Nutrienti della dieta.

Piastra su agar-sangue

Il risultato del tampone viene seminato su una piastra di agar-sangue con il 5% di sangue di montone. Questo in quanto alcuni batteri come lo Streptococco sono in grado di attuare emolisi, ovvero di degradare i globuli rossi.

Emolisi Ci sono tre tipi di emolisi:

- Emolisi β o emolisi completa: il sangue viene completamente degradato e il terreno appare giallo.
- Emolisi α o emolisi incompleta: il sangue viene degradato parzialmente e il terreno appare verdognolo.
- Emolisi γ o non-emolisi: il sangue non viene degradato e il terreno rimane rosso.

Semina sulla piastra

1. Prima patch: si striscia il tampone in modo da occupare la parte superiore della piastra.
2. Seconda patch: si ruota la piastra di 90° e si striscia il tampone in modo che solo qualche strisciata si sovrapponga alla prima patch.
3. Terza patch: si ruota ancora la piastra di 90° e si ripete il procedimento.

Morfologia dei batteri del cavo orale

Per identificare le colonie le si distinguono in base a colore, forma, spessore e margini.

Aspetto

11.3. TERZA ESPERIENZA - CARATTERIZZAZIONE DEI BATTERI DEL CAVO ORALE

- Puntiforme.
- Circolare.
- Filamentoso.
- Irregolare.
- Rizoide.
- Lenticolare.
- Raggiato.

Rilievo

- Rasato.
- Poco convesso.
- Convesso.
- Pulvinato.
- Umbonato.
- Diffuso.
- Rilevato.
- Cupuliforme.
- Mammellonato.
- Con o senza margine smussato.

Superficie

- Liscia.
- Rugosa.
- Raggiata.
- Opaca o luccicante.
- Inglobata.
- Asciutta o umida.

Margini

- Continui
- Interi.
- Ondulati.
- Lobati.
- Erosi.
- Filamentosi.
- Stratificati.
- Diffusi.
- Seghettati.

Struttura

- Amorfa.
- Granulare.
- Filamentosa.
- Ondulata.

Altri fattori

- Dimensione.
- Colore.
- Opacità.
- Consistenza
- sa, mucosa, friabile, membranosa).
- (cremo-

11.3.2 Secondo giorno

All'interno della bocca sono contenuti diversi tessuti a cui sono associati diversi ceppi batterici. Alla nascita la cavità orale è sterile: la prima colonizzazione avviene tra le 6 e le 10 ore dopo la nascita.

Equilibrio plastico

Le popolazioni microbiche si dicono in equilibrio plastico in quanto si trovano in una condizione di equilibrio dinamico, con cambiamenti dovuti ad abitudini alimentari sbalzi ormonali e altri cambiamenti che si subiscono durante la vita.

Ecosistema orale

L'ecosistema orale è formato da microorganismi orali e dalla cavità orale che li ospita. La popolazione batterica è estremamente diversificata e abbondante: si contano più di 300 specie in grado di colonizzarla. Questa convivenza, per lo più pacifica, si dice di simbiosi o commensalismo. Con l'insorgenza di fenomeni patologici si passa a rapporti opportunistici. Oltre ai batteri sono anche presenti virus e funghi.

Esempi Lo *Streptococcus pyogenes* del gruppo A è un fungo che può essere presente nella cavità orale e patogeno: produce tossine, fattori di virulenza ed emolisine. Se raggiunge il cuore può produrre endocarditi gravi.

11.3.3 Procedimento

1. Si prepara una piastra Petri agar-sangue e la si contrassegna sul bordo con data, nome gruppo, protocollo e piastra *A*.
2. Con spatola e tampone sterile si preleva del materiale dalla parte superiore della lingua.
3. Si usa il tampone su una porzione della piastra (un quinto) e si striscia con un'ansa sterile la popolazione microbica prelevata tramite la tecnica del quadrante. Grazie all'ansa si notano quattro strisciate complessive. L'ultima permette di isolare le colonie.
4. Si pone la piastra capovolta nell'incubatore statico termostato a 37° per 24 ore.
5. Il giorno successivo si notano diverse colonie batteriche che vengono distinte per fenotipo.
6. Si selezionano due colonie con morfologia e/o emolisi diversa sulla piastra e si contrassegna una nuova piastra agar-sangue con data, nome gruppo e protocollo e piastra *B*.
7. Attraverso lo striscio continuo si piastrano sulla piastra *B* le colonie batteriche che si vogliono isolare e si pone la piastra capovolta nell'incubatore come la prima.
8. Il giorno successivo si effettua un'analisi dettagliata del fenotipo batterico in riferimento alle colonie isolate.
9. Si confrontano i risultati con la piastra *A*.
10. Si gettano nei biobox entrambe le piastre.

11.4 Quarta esperienza - Conta standard su piastra

11.4.1 Introduzione

Conta microbica indiretta

La conta microbica indiretta avviene tramite spettrofotometro: la densità ottica nella cuvetta è proporzionale alla quantità di batteri presenti. Non permette però di distinguere tra cellule vive e morte.

Conta vitale

La conta vitale su piastra permette di contare unicamente le cellule vive.

Processo

1. Si prende la provetta contenente le colonie batteriche.
2. Si fanno diluizioni seriali su piastra in brodo di coltura o soluzione salina.
3. Si prelevano 0.1mL dalla diluizione e si distribuiscono uniformemente su piastra tramite ansa a l.
4. Si incuba ogni diluizione.
5. Si conta la piastra in cui le colonie si distinguono correttamente e non sono ammassate (tipicamente tra le 10 e le 200).

11.4.2 Secondo giorno

Metodi della conta batterica

Conta diretta La conta diretta avviene al microscopio o allo spettrofotometro e non si distinguono cellule vive e morte.

Conta indiretta La conta indiretta avviene in coltura e si contano solo le cellule vive, le uniche in grado di riprodursi e formare una colonia nel terreno. Per attuare una conta batterica indiretta si procede per diluizioni seriali provenienti da un unico brodo di coltura *LB* sterile standard. Si attuano diluizioni seriali 1 : 10. Avviene poi piastratura di 1mL di ogni soluzione e si incubano le piastre.

Conta vitale La conta vitale consente di contare solo cellule vive presenti in una sospensione batterica. Si dice anche conta su piastra o conta delle colonie.

Colonia

Si definisce colonia un gruppo di cellule batteriche appartenenti allo stesso ceppo o specie che ha origine da una sola cellula vitale. Una cellula in grado di formare una colonia è detta unità formante colonia o *UFC* o *CFU*. Il numero di colonie contate sulla piastra corrisponde al numero di *UFC* dell'inoculo.

Procedimento

1. Si contrassegna ognuna delle 9 provette con 900µl di brodo *LB* sterile con la diluizione rispettiva: 10^{-1} ; 10^{-9} .
2. Si contrassegna il bordo del fondo delle 9 piastre di *LB-agar* da 90mm di diametro con nome gruppo, nome protocollo, diluizione della provetta corrispondente e volume piastrato.
3. Si contrassegna la piastra rimanente con nome gruppo e non diluita, è dedicata alla sospensione batterica non diluita.
4. Si agita la provetta con la coltura batterica non diluita con il vortex e si prelevano 100µl e la si trasferisce nella provetta 10^{-1} . Questa è la prima diluizione seriale.
5. Dopo aver agitato con il vortex si prelevano 100µl dalla diluizione e si trasferiscono nella provetta 10^{-2} e si mescola. Questa è la seconda diluizione seriale.
6. Si ripete la procedura fino ad arrivare all'ultima diluizione.
7. Si prelevano 100µl della sospensione batterica di partenza, si trasferiscono al centro della piastra corrispondente e si piastra con ansa sterile.
8. Si prelevano 100µl dalla sospensione diluita e si trasferiscono al centro della piastra corrispondente e si piastra con ansa sterile.
9. Si uniscono le piastre con nastro adesivo su cui si scrive il gruppo. Si pongono capovolte nell'incubatore a 37° per 18-24 ore.
10. Una volta concluso si versa il contenuto delle provette in plastica nei rifiuti biologici liquidi e si buttano le provette in plastica nei rifiuti biologici solidi.
11. Si conta e annota il numero di colonie presenti in ogni piastra.
12. Per la conta si inizia dalla piastra con il maggior contenuto di colonie contabili. Si escludono le piastre con numero di colonie minore di 10.

Analisi dei risultati

Si calcola la concentrazione della sospensione batterica tramite il calcolo della media delle *CFU* ottenute nelle piastre contate.

$$\text{Concentrazione} = \frac{n \cdot f}{v} \frac{\text{CFU}}{\text{mL}}$$

Dove:

- n è il numero di colonie contate su una piastra.
- f è il fattore di diluizione (inverso della diluizione operata).
- v è il volume di sospensione batterica piastrata.

11.5 Quinta esperienza - test di aerobiosi/anaerobiosi su terreno solido

11.5.1 Introduzione

Distinguere i batteri in base alla richiesta di ossigeno

In base alla loro richiesta di ossigeno i batteri si dividono in:

- Anaerobi obbligati: non tollerano l'ossigeno. presente nell'aria: 5-10%.
- Anaerobi facoltativi: crescono con la respirazione cellulare in presenza di ossigeno ma se è assente con altri metabolismi.
- Microaerofili: batteri che richiedono una quantità di ossigeno inferiore a quella
- Aerotolleranti: sono indifferenti alla presenza di ossigeno, effettuano la fermentazione, preferiscono una quantità di ossigeno inferiore al 20%.
- Aerobi obbligati: richiedono ossigeno.

Batteri modello

Per verificare l'aerobiosi o anaerobiosi di una colonia si utilizzano:

- *Citrobacter freundii*: anaerobio facoltativo, Gram—.
- *Micrococcus luteus*: aerobio obbligato, Gram+.

Processo

1. Si prendono due piastre di terreno solido e le si divide a metà.
2. In ogni piastra si semina su una metà *Citrobacter freundii* e sull'altra *Micrococcus luteus*.
3. Una piastra viene posta in condizioni di aerobiosi mentre l'altra viene posta all'interno di una giara in cui si produce una condizione di anaerobiosi.
4. Si verifica che *Citrobacter freundii* cresce in entrambe le piastre mentre *Micrococcus luteus* solo nella piastra con ossigeno.

Nella giara vengono inseriti dei filtri in grado di eliminare l'ossigeno presente grazie a reazioni attuate all'interno della giara stessa.

11.5.2 Seconda giornata

Si verifica su terreno solido l'aerobiosi o anaerobiosi di due ceppi batterici:

- *Citrobacter freundii*: bacillo anaerobio facoltativo Gram—, in piastra di agar-sangue.
- *Micrococcus luteus*: cocco aerobio obbligato Gram+, in piastra *TLC*.

I due ceppi rimangono ignoti e detti ceppo 1 e ceppo 2.

Creazione di condizione di anaerobiosi

Per creare una condizione di anaerobiosi si utilizzano giare, contenitori a chiusura ermetica in cui vengono inseriti sistemi *GAS-PACK*, sacchetti contenenti reagenti chimici con la capacità di eseguire una reazione chimica che elimina l'ossigeno nell'ambiente. Si aggiungono pochi mL di acqua al gas-pack in modo da attivare la reazione con liberazione di $CO_{2(g)}$ e $H_{2(g)}$. Sul tappo della giara è presente un catalizzatore al palladio sulla quale si forma acqua.

Verificare l'assenza di ossigeno Per verificare l'assenza di ossigeno si usano indicatori come:

- Resazurina: azzurra in presenza di ossigeno e rosa in sua assenza.
- Blu di metilene: blu in presenza e incolore in assenza di ossigeno.

Procedimento

1. Si disegnano due quadranti sul fondo di due piastre di Nutrient-agar con un pennarello. Si marca ogni quadrante con una cifra e si scrive su una piastra aerobiosi e sull'altra anaerobiosi.
2. Si preleva 1 colonia dalla piastra del ceppo 1 e la si deposita sul quadrante corrispondente di entrambe le piastre con ansa.
3. Si distribuisce la colonia con lo striscio continuativo non uscendo dal quadrante.
4. Si ripete l'operazione con l'altro ceppo.
5. Si dispone la piastra anaerobiosi vicino alla giara in cui gli esercitatori inseriscono blu di metilene, bustina del catalizzatore. Avviene incubazione a 37°. Si attendono 24 ore.
6. Il giorno successivo si paragona il fenotipo di crescita di ogni ceppo batterico in condizioni aerobiche e anaerobiche e si annotano le osservazioni.
7. Si classificano i 2 ceppi in base al risultato del test.

11.6 Sesta esperienza - test Kirby-Bauer

11.6.1 Introduzione

L'abuso di antibiotici ha causato lo sviluppo di antibiotico-resistenza da parte dei batteri per alcuni antibiotici. Si tratta della minaccia mondiale più pericolosa dal punto di vista sanitario vista la facilità del trasferimento genico orizzontale.

Test di Kirby-Bauer

Durante il test di Kirby-Bayer per la verifica dell'antibiotico-resistenza:

Procedimento

1. Si prende una piastra con agar solido Mueller-Hinton e si semina uniformemente una certa specie batterica.
2. Si applicano dischetti imbevuti ognuno da un antibiotico specifico
3. Si incubano le piastre.

lettura dei risultati La sensibilità a un antibiotico viene determinata come alone di inibizione: il diametro dell'alone indica il grado di sensibilità. L'assenza di alone indica un antibiotico-resistenza.

11.6.2 Secondo giorno

Resistenza

Si definisce resistenza lo sviluppo della capacità di un microorganismo di sopravvivere a farmaci che dovrebbero ucciderlo o indebolirlo. Se la resistenza diventa a diversi farmaci, trattare l'infezione può diventare difficile. I microorganismi resistenti tendono a essere trasmessi da persona a persona. In questo modo infezioni difficili da trattare possono diffondersi con conseguenze serie fino alla morte.

Sviluppo della resistenza Se la cura antibiotica non si protrae per il giusto periodo di cura, alcuni batteri che stanno sviluppando la resistenza non vengono uccisi e insorgono.

Superbatteri Si definiscono superbatteri batteri resistenti a più antibiotici contemporaneamente, a volte a tutti gli antibiotici conosciuti.

Identificazione della resistenza La suscettibilità batterica ai farmaci può essere individuata in due modi:

- Test Kirby-Bauer su terreno solido. concentrazione inibente *MIC* su terreno liquido.
- Test di determinazione della minima

Procedimento

1. Si marca la piastra di *MH-agar* con nome gruppo e protocollo, data e tipo di Gram.
2. Si disegnano sul fondo della piastra le due diagonali e quattro linee aggiuntive.
3. Si prelevano 1-2 colonie con un diametro maggiore di 1.5mm dalla piastra Petri con un bastoncino cotonato sterile e si stemperano nella fiala di soluzione fisiologica sterile.
4. Si rimuove l'eccesso di liquido dal bastoncino cotonato premendo e ruotandolo vigorosamente sulle pareti interne della fiala.
5. Si distribuiscono i batteri su ogni millimetro della piastra Petri di *MH-agar* con lo stesso bastoncino. Per garantire una distribuzione uniforme si ruota la piastra di 45° e la si striscia nuovamente con lo stesso bastoncino.
6. Si lascia asciugare la superficie dell'agar sul bancone per 3-5 minuti.
7. Si sterilizza una pinzetta in etanolo al 70% e lo si lascia evaporare.
8. Si depone con la pinzetta sulla superficie di agar il dischetto *CAZ/CLA* al centro della piastra e si preme delicatamente per assicurarsi il contatto completo.
9. Si dispongono gli altri dischetti da almeno 15mm dalla piastra. In senso orario *E*, *AM*, *VA* e *GM*.

11.7. SETTIMA ESPERIENZA - TEST BIOCHIMICO API 20E

10. Si dispongono le piastre capovolte all'interno dell'incubatore statico termostato a 37° per 16-18 ore.
11. A fine protocollo si svuota il contenuto della fiala in vetro nei rifiuti biologici liquidi e si cestina quella in vetro nei rifiuti biologici taglienti.
12. Il giorno successivo si verifica la presenza degli aloni di inibizione: in caso positivo si misurano i diametri e si annota il diametro per ogni antibiotico e il tipo di Gram a disposizione.
13. Si consultano i breakpoint *EUCAST* per determinare a quali antibiotici il microorganismo è sensibile, intermedio o resistente. Si annota il profilo di resistenza del ceppo batterico.

Breakpoint *EUCAST*

Antibiotico	Diametro di alone di inibizione (mm)		
	Resistente	Intermedio	Sensibile
Ampicillina Gram–	≤ 13	14-16	≥ 16
Ampicillina Gram+	≤ 28		≥ 29
Eritromicina	≤ 13	14-22	≥ 23
Gentamicina	≤ 12	13-14	≥ 15
Ceftazidime/Acido clavulanico	≤ 13	14-17	≥ 18
Vancomicina Gram–	≤ 3		> 3
Vancomicina Gram+	≤ 14		≥ 15

11.7 Settimana esperienza - test biochimico *API 20E*

11.7.1 Introduzione

Esistono molti metodi biochimici per determinare la specie di una coltura batterica. Uno dei più utilizzati è il test *API 20E*.

Test *API 20E*

Il test *API 20E* si compone di 21 reazioni metaboliche e 6 test biochimici supplementari. Verrà utilizzato per identificare *Enterobacteriaceae* e altri Gram–.

Processo

1. Si preleva una colonia.
2. Si stempera la colonia in acqua sterile.
3. Si riempiono i microtubuli o microgallerie con la colonia stemperata. I microtubuli sono alti 1cm e larghi 0.5cm e contengono terreno liofilizzato.
4. Si incubano a 37° per una notte.

Lettura dei risultati In base alla reazione chimica metabolica che avviene in ogni pozzetto o microtubulo o galleria si nota una colorazione diversa. Il colore denota l'avvenimento o meno della reazione. Moduli identificano la specie.

Lettura dei moduli A ogni pozzetto corrisponde un numero. Se la reazione è avvenuta nel pozzetto considero il numero, altrimenti no. I pozzetti sono divisi in tritici: sommando i numeri da considerare per ogni tritico si ottiene un codice univoco per la specie.

11.7.2 Secondo giorno

Caratteristiche individuate

Il test biochimico *API 20E* permette di identificare il profilo biochimico di una data specie batterica individuando:

- | | | |
|--|----------------------------|-------------------------------------|
| • Richiesta di ossigeno per la crescita. | • fonte di carbonio. | • Produzione di enzimi. |
| | • Produzione di substrati. | |
| • Utilizzo di zuccheri come | • Utilizzo del citrato. | • Decarbossilazione di amminoacidi. |

Procedimento

1. Si contrassegna il bordo del contenitore di incubazione e il suo coperchio con nome gruppo, data e nome microorganismo.
2. Si distribuisce con la spruzzetta acqua distillata sul fondo del contenitore di incubazione fino a riempire tutti i pozzetti per creare un ambiente umido ed evitare il disseccamento dei test durante l'incubazione in termostato.
3. Si rimuove l'eventuale eccesso di acqua con la micropipetta *p1000* inclinando il fondo del contenitore.
4. Si blocca con il nastro di carta il contenitore di incubazione al bancone e si blocca il coperchio verso il basso al bancone in modo da creare una corsia tra contenitore e coperchio per disporre la galleria.
5. Si pone la galleria *API 20E* inclinata verso l'alto nella corsia tra il contenitore e il coperchio come supporto.
6. Si apre una fiala con 3mL di soluzione salina sterile 0.85% applicando pressione verso l'esterno sulla zona zigrinata del coperchio in modo da rompere la punta in vetro.
7. Si preleva sterilmente con un bastoncino cotonato sterile 4 coline dalla piastra di *LB-agar*.
8. Si stemperano le colonie nella soluzione salina ruotando il bastoncino cotonato sulle pareti interne della fiala.
9. Si risospendono le cellule batteriche pipettando più volte con la *p1000*.
10. Si prelevano 300µl di sospensione batterica e si riempiono cambiando puntale per ogni test le microprovette e le cupole corrispondenti ai test *|CIT|*, *|VP|*, *|GEL|*. Si appoggia la punta del puntale sul bordo laterale della cupola per evitare la formazione di bolle d'aria all'interno della microprovetta.
11. Si prelevano con la *p200* 100µl di sospensione batterica e si riempiono, cambiando puntale le microprovette di *ADH*, *LDC*, *ODC*, *H₂S* e *URE*. Si appoggia la punta del puntale sul bordo laterale della cupola per evitare la formazione di bolle d'aria all'interno della microprovetta.
12. Si aggiungono nei 5 test gocce d'olio di paraffina fino a riempire la cupola per far avvenire le reazioni in anaerobiosi.

11.8. OTTAVA ESPERIENZA - COLORAZIONE DI GRAM

13. Si prelevano con la *p200* 120µl di sospensione batterica e si riempiono le microprovette dei test rimasti.
14. Si dispone la galleria *API 20E* orizzontalmente all'interno del contenitore di incubazione e si chiude con il coperchio. Si mette la galleria nell'incubatore statico termostato a 37°.
15. Si svuota il contenuto della fiala in vetro con la sospensione microbica nei rifiuti biologici liquidi vicino al lavandino e la fiala in vetro nei rifiuti taglienti.
16. Si determinano quali test sono positivi e quali negativi tranne *TDA*, *VP*, *IND*:
 - Se *GLU* è negativo (blu, blu-verde) e ci sono meno di 3 reazioni positivi ci si ferma in quanto l'organismo non è un enterobatterio e necessita di un tempo di incubazione più lungo.
 - Se il test *GLU* è positivo (giallo) o ci sono più di 3 reazioni positive si procede con il sistema.
17. Si aggiunge il reagente *TDA* (cloruro di ferro 10%) al test *TDA* della galleria. La reazione, se positiva è istantanea ed è rosso mattone.
18. Si aggiunge una goccia di reattivo di James al test *IND* della galleria. Una reazione positiva di colore rosa intenso o rossa avviene nell'arco di due minuti. L'acido nel reagente può reagire con la cupola di plastica e produrre un viraggio verso il rosso marrone che non indica positività.
19. Si aggiunge una goccia di reattivo *VP1* e *VP2* nel test *VP*. Il colore rosa chiaro immediato non è indice di positività: la reazione impiega 10 minuti e risulta rosa intenso o rosso.
20. Si annota sulla scheda di lettura il risultato di ogni test della galleria. Si annota la cifra data dalla somma dei valori dei test positivi e il codice a 7 cifre ottenuto.
21. Si individua nell'indice di profilo analitico il codice ottenuto. Si annota e le reazioni di dubbia interpretazione.
22. Si annotano i codici alternativi possibili e le specie corrispondenti.
23. Si utilizza il codice per l'identificazione.
24. Si cestina la galleria nei rifiuti biologici solidi, si svuota la fiala con la sospensione batterica nei rifiuti biologici liquidi e la fiala nel contenitore per materiale acuminato infetto.

11.8 Ottava esperienza - Colorazione di Gram

11.8.1 Introduzione

La colorazione di Gram differenzia batteri Gram+ che appaiono di color violetto e batteri Gram- che appaiono rosa. Questo avviene in quanto viene usata la sostanza Crystal Violet che colora di violetto lo strato di peptidoglicano: essendoci nei Gram+ uno strato più spesso mentre nei Gram- uno strato più sottile contenuto tra le membrane.

Procedimento

1. Si applicano i batteri sulla piastra e si applica il Crystal Violet.
2. Si applica iodio che funge da mordente: attacca al peptidoglicano il Crystal Violet.
3. Si decolora tramite alcol: solo i batteri su cui il Crystal Violet ha attaccato grazie al mordente rimangono colorati (Gram+).
4. Si utilizza la safranina per colorare i Gram– di rosa.

Identificare i Gram+

I batteri vengono anche raggruppati in base alla forma che appare al microscopio come:

- I cocci Gram+ sono stafilococchi (in gruppi) o streptococchi (in catene).
- I bastoncelli Gram+ includono *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* e *Listeria*.

Identificare i Gram–

I Gram– vengono classificati in tre gruppi:

- Cocchi, dalla forma sferica sono più comunemente *Neisseria*.
- Bastoncelli, allungati e sottili sono *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* e altri. Il *Vibrio cholerae* può essere a forma di normale bastoncello o ricurvo.
- Coccoidi o coccobacilli, di forma intermedia tra cocci e bacilli sono *Bordetella*, *Brucella*, *Haemophilus* e *Pasteurella*.

11.8.2 Terzo giorno

Procedimento

Preparazione del vetrino La preparazione avviene al bancone e sotto cappa biologica:

1. Si marca una provetta da microcentrifuga da 2mL sterile con id campione.
2. Si trasferisce con la *p200* 100µl di acqua distillata sterile nella provetta da 2mL.
3. Si preleva una colonia batterica sterilmente con un'ansa da inoculazione sterile e la si trasferisce nei 100µl di acqua distillata sterile.
4. Si risposende pipettando su e giù.
5. Si pulisce e sgrassa con alcol 70% il vetrino portaoggetti e lo si asciuga con carta assorbente.
6. Si scrive a matita sullo spazio laterale satinato del vetrino portaoggetti nome gruppo e nome campione.
7. Si trasferisce 20µl di sospensione batterica al centro del vetrino portaoggetti.
8. Si striscia delicatamente la sospensione batterica con l'ausilio di un'ansa sterile fino ad occupare 1-2cm al centro del vetrino.
9. Si lascia asciugare completamente il vetrino per evaporazione sul bancone o sotto cappa biologica.

Fissazione del preparato La fissazione del preparato avviene sotto cappa chimica.

1. Si copre la parte centrale del vetrino con lo striscio con 1-2 gocce di etanolo o acido acetico con la pipetta Pasteur, lavorando sopra il becker per i rifiuti chimici.
2. Si rimuove l'eccesso di etanolo o acido acetico su carta assorbente e si fa asciugare all'aria sotto cappa chimica fino a completa evaporazione.

Colorazione del preparato La colorazione del preparato avviene sotto cappa chimica.

1. Si pipetta sul vetrino la soluzione di crystal violet fino a coprire lo striscio e la si lascia agire per 1 minuto.
2. Si rimuove il colorante in eccesso sciacquando con acqua distillata sopra il becker per i rifiuti chimici fino a che il preparato non rilascia più colore.
3. Si pipetta sul vetrino il reattivo di Lugol e si lascia agire per 1 minuto.
4. Si rimuove il reattivo di Lugol in eccesso sciacquando con acqua distillata sopra il becker per i rifiuti chimici.
5. Si versa con il contagocce la soluzione decolorante per Gram sul preparato. Una decolorazione troppo prolungata può rimuovere il colorante anche dai Gram+, si procede per al massimo 30 secondi.
6. Si rimuove il decolorante sciacquando con acqua distillata sopra il becker per i rifiuti chimici.
7. Si pipetta sul vetrino la soluzione di safranina e la si lascia agire per 1 minuto.
8. Si rimuove il colorante in eccesso sciacquando con acqua distillata sopra il becker per i rifiuti chimici fino a che il preparato non rilascia più colore.
9. Si sgocciola il vetrino su carta assorbente e lo si lascia asciugare all'aria.
10. Si pone il vetrino sul tavolino portaoggetti del microscopio.
11. Si osserva al microscopio dimensione, forma e colore dei batteri, si annota il tipo di colorazione e la disposizione delle cellule prevalente.

11.9 Nona esperienza - Trasformazione di batteri

11.9.1 Introduzione

Per produrre batteri ricombinanti si utilizza la tecnologia del DNA ricombinante tramite inserimento di un gene in un battere per mezzo dei plasmidi.

Trasformazione batterica

La trasformazione batterica è un processo di trasferimento genico orizzontale con cui batteri competenti acquisiscono frammenti di DNA dall'ambiente. Questa proprietà viene usata per il clonaggio genico, tecniche di mutagenesi e per la produzione di proteine ricombinanti. Esistono procedure per trasformare batteri naturalmente non competenti.

Trasformazione chimica Non richiede strumenti dedicati e consiste nel pre-trattamento delle cellule con alte concentrazioni di cloruro di calcio per renderle competenti. Un trattamento termico rapido o heat-shock in presenza delle molecole di DNA permette l'internalizzazione del DNA.

Trasformazione elettrica È più efficiente di quella chimica ma richiede l'elettroporatore. Gli impulsi elettrici permeabilizzano la membrana cellulare permettendo al DNA di entrare nella cellula.

Plasmidi

I plasmidi sono molecole di DNA extracromosomico in grado di replicarsi indipendentemente dal cromosoma della cellula. Contengono tipicamente un marcatore di selezione, un sito di restrizione enzimatica multipla e un marcatore per la visualizzazione di plasmide. Si utilizzerà un plasmide contenente:

- *GFP*: green fluorescent protein.
- Gene per la resistenza all'ampicillina: creazione di un terreno selettivo.

Questo verrà inserito in *E. coli*.

Processo di trasformazione

Si trasformano i batteri tramite shock termico, abbassando la temperatura da 43° a 3° per facilitare l'entrata nel plasmide. Si semina su un terreno contenente ampicillina *Amp* e si incuba. In questo modo si eliminano le cellule non trasformate (non resistenti ad ampicillina). Le cellule trasformate contengono fluorescenza e resistenza ad *Amp*.

11.9.2 Terzo giorno

Procedimento

1. Si marca una provetta da 1.5mL con *TR-NEG* e la si raffredda in ghiaccio.
2. Marcare la provetta con il DNA con *TR* e la si mantiene in ghiaccio.
3. Si aliquotano 48µl di cellule competenti in *TR-NEG* e la si mantiene in ghiaccio.
4. Si aliquotano 48µl di cellule competenti in *TR* e si pipetta per mescolare e la si mantiene in ghiaccio.
5. Si incubano le due provette con cellule competenti in ghiaccio per 30 minuti.
6. Si marcano le piastre con:
 - Piastra Petri di *LB-agar*: nome gruppo, nome protocollo *DH5α*.
 - Piastra Petri di *LB-agar* e ampicillina: nome gruppo, nome protocollo *TR-NEG*.
 - Piastra Petri di *LB-agar* e ampicillina: nome gruppo, nome protocollo *TR-100µl*.
 - Piastra Petri di *LB-agar* e ampicillina: nome gruppo, nome protocollo *TR-resto*.
7. Si preleva il volume restante di cellule competenti dal tubo di partenza e li si pipetta nella piastra Petri *LB-agar DH5α*.

11.10. DECIMA ESPERIENZA - OSSERVAZIONE DELLA MOTILITÀ BATTERICA DI TIPO “SWIMMING” AL MICROSCOPIO OTTICO

8. Si distribuisce con ansa sterile per inoculazione la sospensione batterica.
9. Si pone la piastra capovolta nell'incubatore termostato a 37°.
10. Si esegue lo shock termico incubando le due provette in un termoblocco a 42° per 90 secondi.
11. Si raffredda in ghiaccio per 2 minuti.
12. Si aggiunge 750µl di brodo *LB* a ciascuna provetta.
13. Si incuba nell'incubatore ad agitazione orbitale per 37° per 1 ora.
14. Si risospendono le cellule batteriche con il vortex.
15. Si prelevano 100µl a *TR-NEG* e li si piastra in *TR-NEG*. I restanti vengono scartati.
16. Si prelevano 100µl da *TR* e li si piastra sulla piastra *TR-100µl*.
17. Si centrifuga la provetta da 1.5mL con la restante coltura batterica a $4000 \times g$ per 3 minuti.
18. Si verifica che sia avvenuta la separazione tra i batteri e brodo di coltura.
19. Si rimuovono 600µl di surnatante da *TR* con la *p1000*.
20. Si risospende il pellet nei 100µl di surnatante rimasti con la *p200*.
21. Si piastra con un'ansa a *L* sterile i 10µl rimanenti sulla piastra *TR-resto*.
22. Si incubano le 3 piastre di *LB-agar* e ampicillina e la piastra con lo striscio a quadrante di *E. coli* competenti unite da un pezzo di nastro adesivo a 37° per 18-24 ore.

11.10 Decima esperienza - Osservazione della motilità batterica di tipo “swimming” al microscopio ottico

11.10.1 Introduzione

I Batteri si distinguono anche grazie alla loro motilità, che può avvenire attraverso flagelli o pili.

Flagelli

I flagelli sono lunghe appendici proteiche che servono al moto della cellula batterica.

Tipi di movimento Il movimento può essere:

- Tumbling: casuale, con continui cambi di direzione.
- Swimming: in una sola direzione.

Distinzione in base a numero e posizione dei flagelli

11.10. DECIMA ESPERIENZA - OSSERVAZIONE DELLA MOTILITÀ BATTERICA DI TIPO “SWIMMING” AL MICROSCOPIO OTTICO

- Monotrofico: un solo flagello all'estremità.
- Lofotrico: un gruppo di flagelli all'estremità.
- Anfitrico: flagelli a estremità opposte.
- Peritrico: flagelli distribuiti su tutta la superficie.

11.10.2 Terza giornata

In piastra si possono osservare le motilità tramite un alone trasparente attorno alla colonia inoculata. Si attua un'analisi tramite microscopio ottico su terreno liquido in modo da poter distinguere i moti browniani da moti di swimming.

Procedimento

1. Si pulisce e sgrassa il vetrino con alcol 70%.
2. Si agita la sospensione batterica e si prelevano 10µl con la *p20*.
3. Si depone la goccia al centro del vetrino portaoggetti.
4. Si pone il vetrino coprioggetti sopra la goccia.
5. Si rimuove l'eccesso di liquido tamponando con della carta.
6. Si pone il preparato a fresco sul tavolino portaoggetti del microscopio ottico.
7. Si osserva la motilità batterica e si annotano le osservazioni come il tipo di movimenti e la quantità di cellule motili.
8. Si cestina il vetrino nell'apposito contenitore per rifiuti taglienti e acuminati.