

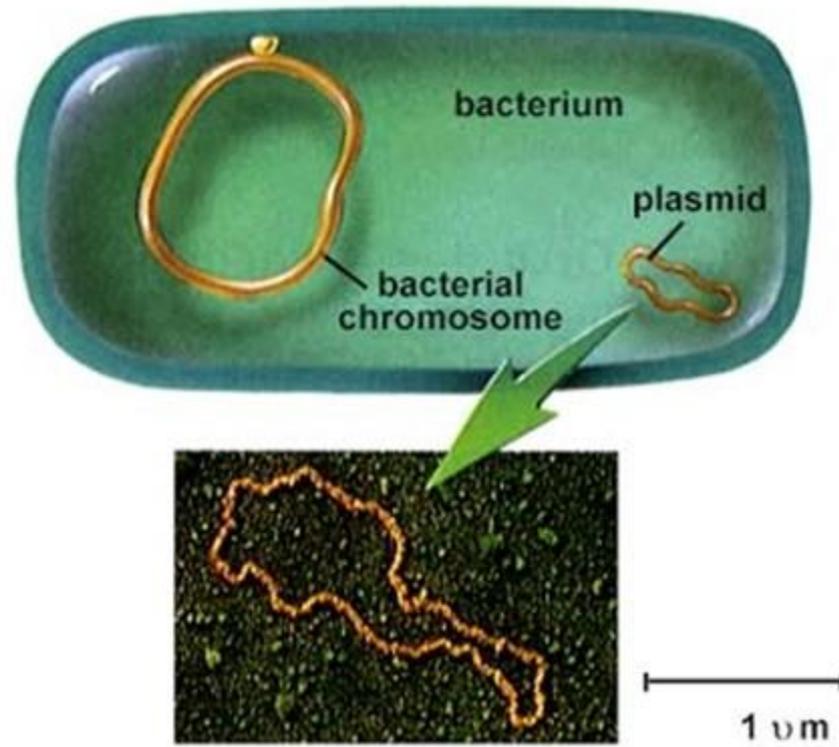
Sono disponibili vari tipi di vettori di clonaggio

Vettore	Caratteristiche	Isolamento del DNA	Contenuto massimo di DNA
Plasmide	Alto numero di copie	Fisico	10 kb
Fago	Infetta batteri	Attraverso l'impacchettamento nel fago	20 kb
Cosmide	Alto numero di copie	Attraverso l'impacchettamento nel fago	48 kb
BAC	Basato sul plasmide F	Fisico	300 kb
YAC	Origine + centromero + telomero	Fisico	>1 Mb

VETTORI

- VETTORI PLASMIDICI -> 0-10 kb
- VETTORI λ di inserzione -> 0-10 kb
- VETTORI λ di sostituzione -> 9-23 kb
- VETTORI COSMIDICI -> 30-44 kb
- VETTORI PAC (crom. artif. P1) -> 130-150 kb
- VETTORI BAC (crom. artif. batt.)-> fino a 300 kb
- VETTORI YAC (crom. artif.lievito-> 0.2-2 Mb

PLASMIDI



I plasmidi

Elementi genetici circolari, extracromosomali, capaci di replicazione autonoma (replicone)

Le dimensioni variano da 1 Kb a 250 Kb e il loro numero varia da 1 a diverse centinaia di copie per cellula ospite

La loro informazione genetica non è essenziale per la cellula ospite ma può conferire un vantaggio selettivo in particolari condizioni

Alcuni plasmidi possono esistere sia allo stato libero sia integrato nel cromosoma dell'ospite (**episomi**)

Alcuni plasmidi si mantengono stabilmente all'interno della cellula, altri hanno la capacità di diffondersi attraverso la coniugazione

Plasmidi naturali

- Molecole di DNA extracromosomiale in doppia elica, circolare lunghe da 1 a 250 Kb.
- Unità accessorie che si replicano e sono ereditate indipendentemente dal DNA del cromosoma batterico.
- Dipendono dagli enzimi dell'ospite per la loro replicazione e trascrizione.
- Meccanismi molecolari precisi mantengono un numero stabile di copie del plasmide nella cellula ospite e assicurano la loro ripartizione tra le cellule figlie
- Conferiscono un vantaggio all'ospite.
- I plasmidi **coniugativi** possiedono una dozzina di geni per il trasferimento diretto del DNA ad una cellula ricevente attraverso il pilo (coniugazione).

Sono stati identificati anche plasmidi nei lieviti che possono essere circolari e lineari. Quelli circolari sono eccellenti vettori di clonaggio in sistemi eucariotici: sono lunghi da 4 a 6 kb e presenti in 50-100 copie per cellula. Hanno localizzazione nucleare, sono assemblati con gli istoni nella cromatina e non conferiscono vantaggi particolari. I plasmidi lineari sono entità replicative autonome, localizzate nel citoplasma che conferiscono un fenotipo killer ai lieviti che li hanno poiché codificano una tossina che inibisce la crescita di ceppi di lievito sensibili ad essa



Budding Yeast
Saccharomyces cerevisiae



Fission Yeast
Schizosaccharomyces pombe

Plasmidi naturali

Regione *ori* (origine di replicazione): geni per la replicazione

Lo spettro d'ospite di un plasmide è determinato dalla sua regione *ori*

Maggiore è il numero di geni nella regione *ori*, maggiore è la possibilità di replicarsi in ospiti diversi.

Spesso codificano proteine che conferiscono nuove proprietà all'ospite (a volte di grande interesse commerciale o clinico):

- Resistenza ad antibiotici, sostanze tossiche...
- Capacità di produrre antibiotici, tossine, fattori di virulenza...
- Nuove capacità metaboliche (degradazione di composti aromatici, fermentazione di zuccheri, produzione di solfuro di idrogeno...)
- Enzimi di restrizione e modificazione
- Capacità di fare la coniugazione

Altre volte non è possibile associarli a nessun fenotipo: plasmidi **CRIPTICI**

Plasmidi F

Portano dei geni (tra=trasferimento) per promuovere la coniugazione e il trasferimento di plasmidi tra un batterio e l'altro (batterio donatore F+ e batterio ricevente F-)

Plasmidi R

Codificano per enzimi capaci di distruggere o modificare gli antibiotici come ampicillina, cloramfenicolo, tetraciclina, kanamicina ecc.

Alcuni plasmidi portano un'unica resistenza, altri fino a otto. Possono essere anche coniugativi e diffondersi rapidamente.

Plasmidi col

Conferiscono un vantaggio al batterio portatore nei confronti di batteri della stessa specie o specie affini.

Codificano per le batteriocine (colicine, subtilisine, ecc.) capaci di permeabilizzare le membrane o degradare gli acidi nucleici.

Plasmidi di virulenza

Portatori di tossine; rendono il ceppo batterico più patogeno.

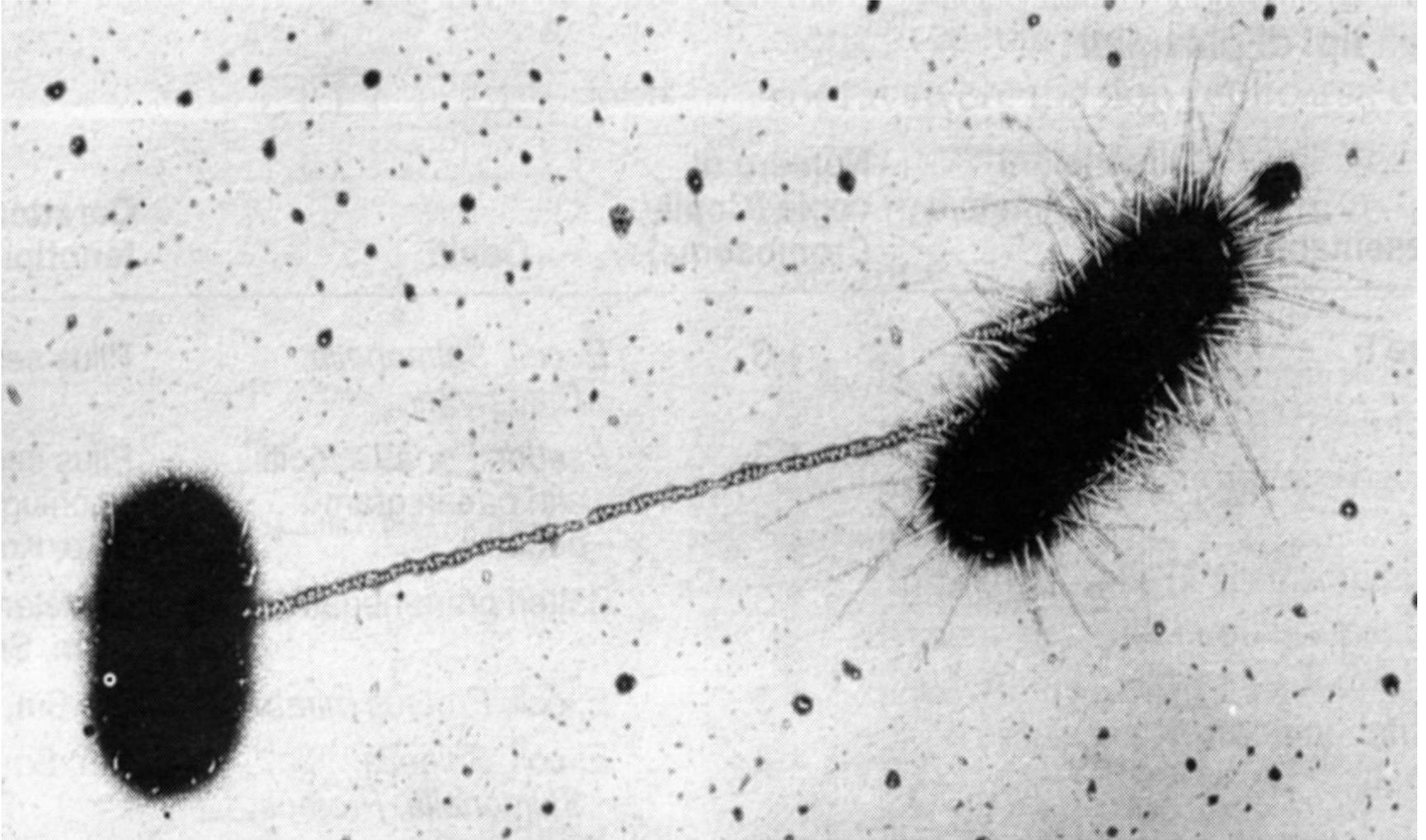
Il ceppo di *E. coli* responsabile della "diarrea del viaggiatore" è portatore di un plasmide codificante per una enterotossina.

Plasmidi metabolici

Codificano per enzimi capaci di degradare composti aromatici, pesticidi, zuccheri ecc. In alcuni ceppi di *Rhizobium* portano i geni necessari per la nodulazione nelle leguminose.

- Alcuni plasmidi denominati *plasmidi coniugativi* possiedono un set di geni (geni *tra*, da trasferimento) che sono in grado di promuovere il loro trasferimento in cellule diverse (trasmissione orizzontale) attraverso un ponte citoplasmatico

Coniugazione



Pili sessuali: presenti in numero di 1-10 per cellula, sono spessi 9-10 nm

Principali funzioni dei plasmidi di interesse medico

- **Coniugazione** : *Plasmide F*, meccanismo di trasferimento genico
- **Resistenza agli antibiotici: *Plasmidi R***
 - degradazione enzimatica** (e.g. penicillina)
 - modificazioni enzimatiche** (e.g. cloramfenicolo)
 - alterata permeabilità** (e.g. tetracicline)
 - alterazione del bersaglio**(e.g. streptomicine)
 - via metabolica alternativa** (e.g. sulfamidici)

Esempi di fenotipi conferiti da plasmidi

- Produzione di antibiotico ▶ SCP1 ▶ *Streptomyces coelicolor*
- Antibiotico-resistenza ▶ RP4 ▶ *Pseudomonas aeruginosa*
- Resistenza al batteriofago ▶ pNP40 ▶ *Lactococcus lactis*
- Produzione di batteriocina ▶ p9B4-6 ▶ *Lactococcus lactis*
- Trasferimento coniugale ▶ F ▶ *Escherichia coli*
- Cristallo proteico insetticida ▶ pHD2 ▶ *Bacillus thuringiensis*
- Competenza ecologica nel suolo ▶ pRtrW14-2c ▶ *Rhizobium leguminosarum*
- Produzione di emolisina ▶ pJH1 ▶ *Enterococcus faecalis*
- Degradazione dell'erbicida ▶ 2,4-D pJP4 ▶ *Alcaligenes eutrophus*
- Fermentazione del lattosio ▶ pLM3601 ▶ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*
- Resistenza ai metalli pesanti ▶ pMERPH ▶ *Pseudomonas* sp.
- Fissazione dell'azoto ▶ pIJ1007 ▶ *Rhizobium leguminosarum*
- Nodulazione ▶ pPN1 ▶ *Rhizobium trifoli*
- Degradazione di alcaloidi ▶ pRme41a ▶ *Rhizobium meliloti*
- Formazione di tumori ▶ Ti plasmid ▶ *Agrobacterium*
- Produzione di proteasi ▶ pLM3001 ▶ *Lactococcus lactis*
- Produzione di feromoni ▶ pAD1 ▶ *Enterococcus faecalis*
- Produzione di sideroforo ▶ pDEP10 ▶ *Escherichia coli*
- Tolleranza a NaCl ▶ pRtrW14-2b ▶ *Rhizobium leguminosarum*
- Degradazione del toluene ▶ Tol plasmids ▶ *Pseudomonas putida*

Classificazione

-Plasmidi coniugativi (plasmidi F)

recano l'informazione necessaria per trasferirsi da una cellula all'altra (*geni tra*)

-Plasmidi non-coniugativi

- Plasmidi R: portano geni che conferiscono resistenza a uno o più agenti antibatterici (es: ampicillina, mercurio)
- Plasmidi Col: codificano per colicine (proteine che uccidono altri batteri)
- Plasmidi degradativi: permettono di metabolizzare molecole insolite (es: toluene)
- Plasmidi della virulenza: conferiscono patogenicità (es: plasmidi Ti di *Agrobacterium tumefaciens*)

Oppure

-Plasmidi ad alto numero di copie (rilassati)

-Plasmidi a basso numero di copie (stringenti)

Plasmidi coniugativi e non

I plasmidi coniugativi sono **Tra+ e Mob+**, cioè possiedono una dozzina di geni per le funzioni di trasferimento (*tra*) e tutte le regioni mobilizzanti.

I plasmidi non coniugativi mancano dei geni *tra* e quindi da soli non possono infettare altre cellule. Tuttavia se nella cellula ospite è presente anche un plasmide coniugativo, l'attività *in trans* delle proteine *mob* può mobilizzare entrambi i plasmidi, a patto che abbiano un sito *nic/bom* funzionale.

Per ragioni di sicurezza biologica, i vettori plasmidici più recenti non possiedono neppure il sito *nic/bom* e pertanto non possono mai essere mobilizzati.

Incompatibilità fra plasmidi

L'incompatibilità si osserva quando un plasmide entra in una cellula dove è già presente un plasmide simile.

Il nuovo plasmide non può essere mantenuto e viene perso nei successivi cicli di divisione batterica.

Il fenomeno è controllato dai geni coinvolti nella regolazione della replicazione plasmidica

Plasmidi che **condividono lo stesso sistema di replicazione** appartengono allo stesso gruppo di incompatibilità (Inc) e sono tra loro incompatibili

Perché un batterio possa contenere diversi tipi di plasmidi, questi non devono essere strettamente correlati

Replicazione plasmidica

La caratteristica più importante dei plasmidi è quella di essere dei “repliconi”, cioè molecole capaci di replicazione autonoma, che è conferita loro dalla presenza di una **origine di replicazione**, chiamata *ori* (nel caso dei plasmidi *oriV*, per “*ori* vector”)

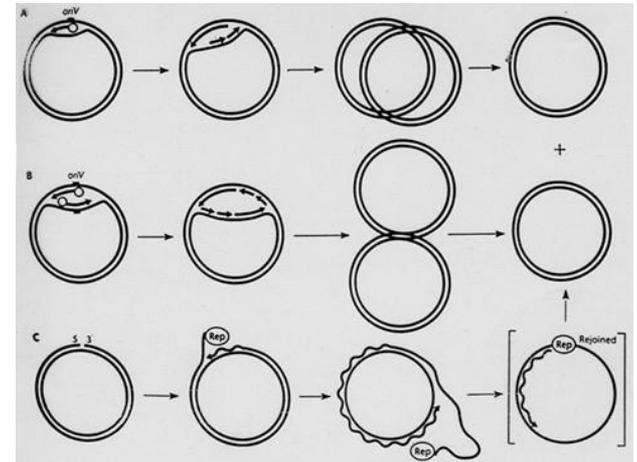
I plasmidi si replicano per **replicazione θ** (uni-A- o bi-direzionale-B-) o per **circolo rotante-C-**

Richiedono proteine plasmidiche e/o dell'ospite batterico

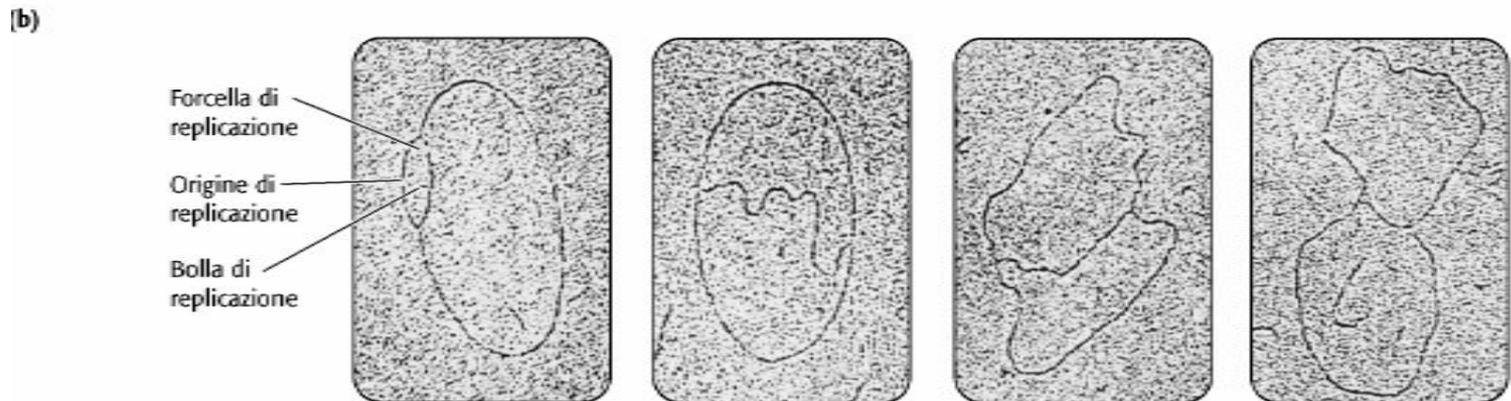
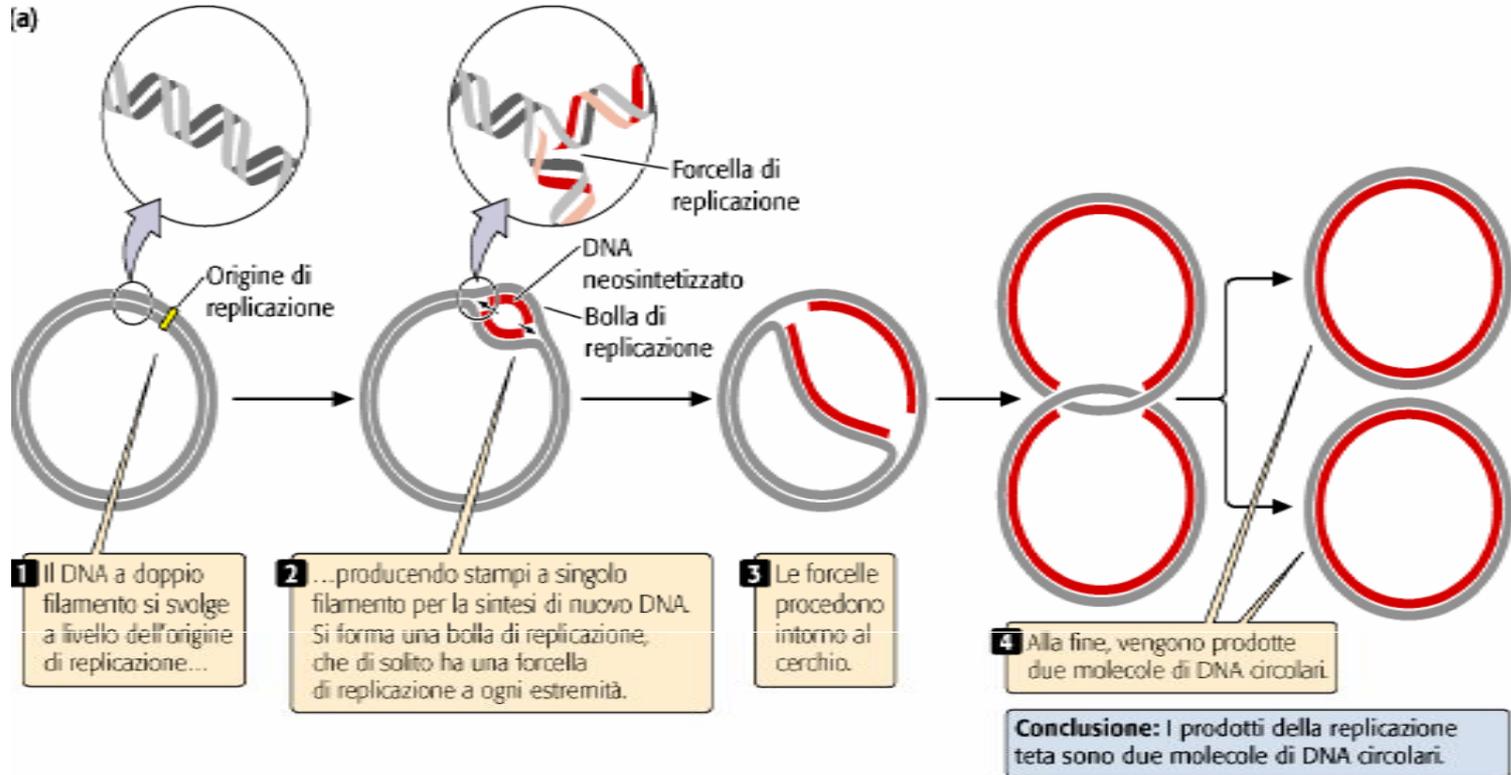
Funzioni dell'origine di replicazione

Oltre ad essere essenziale per la replicazione, l'origine di replicazione controlla:

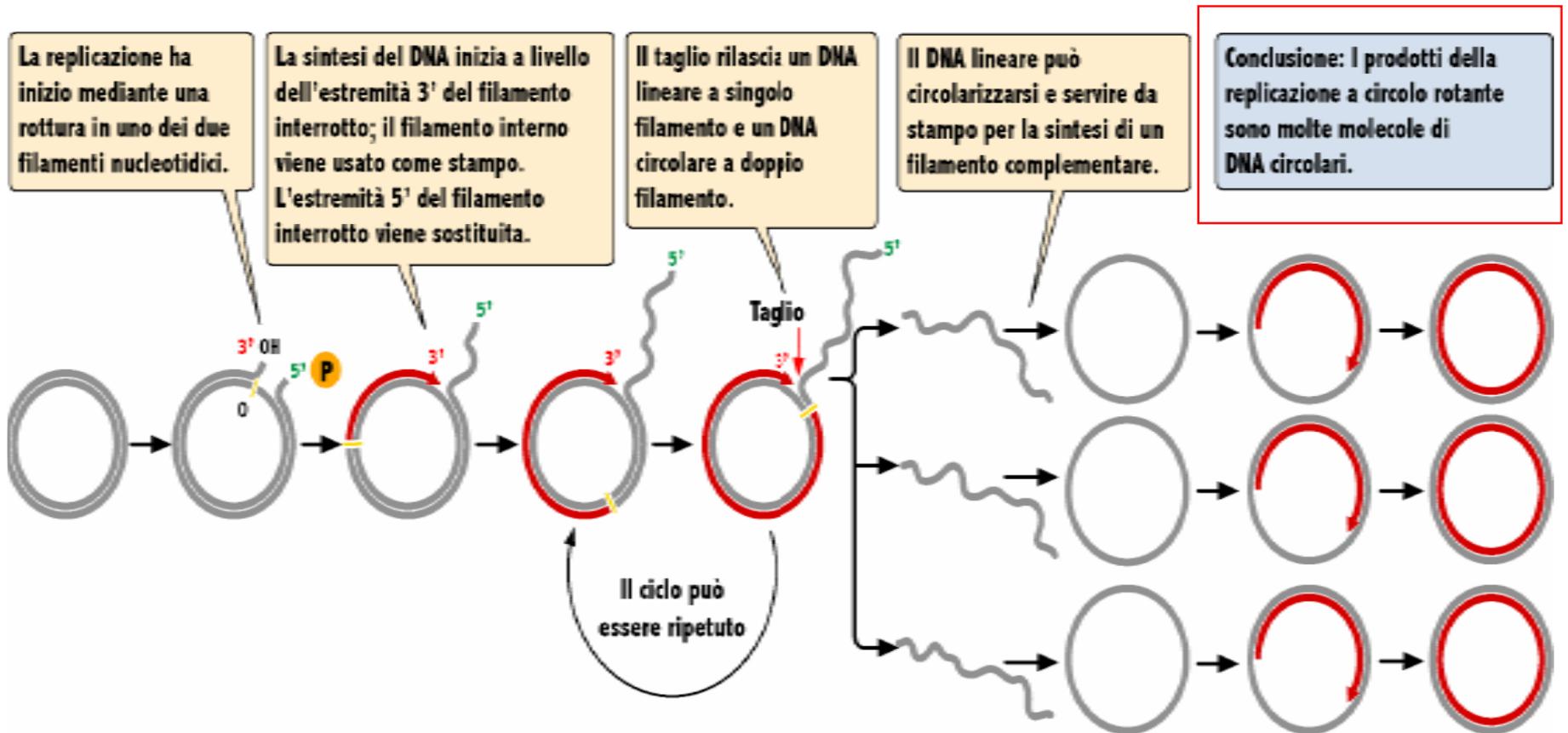
- Il numero di copie
- La specificità d'ospite
- I gruppi di incompatibilità

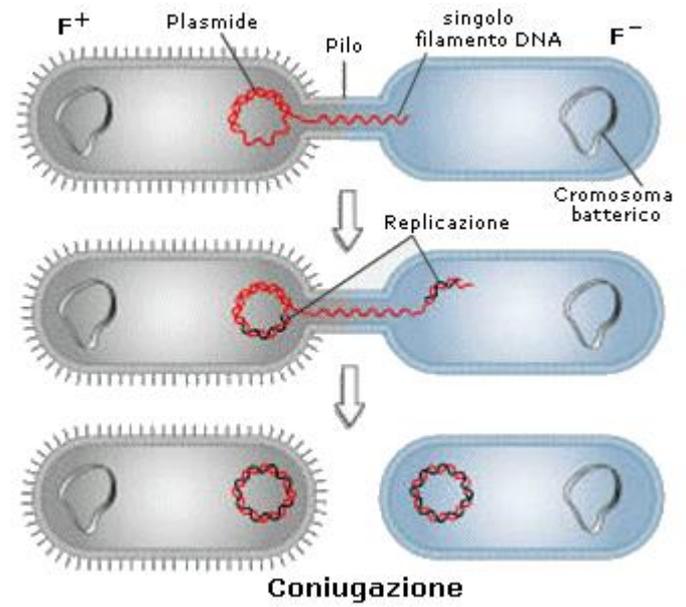
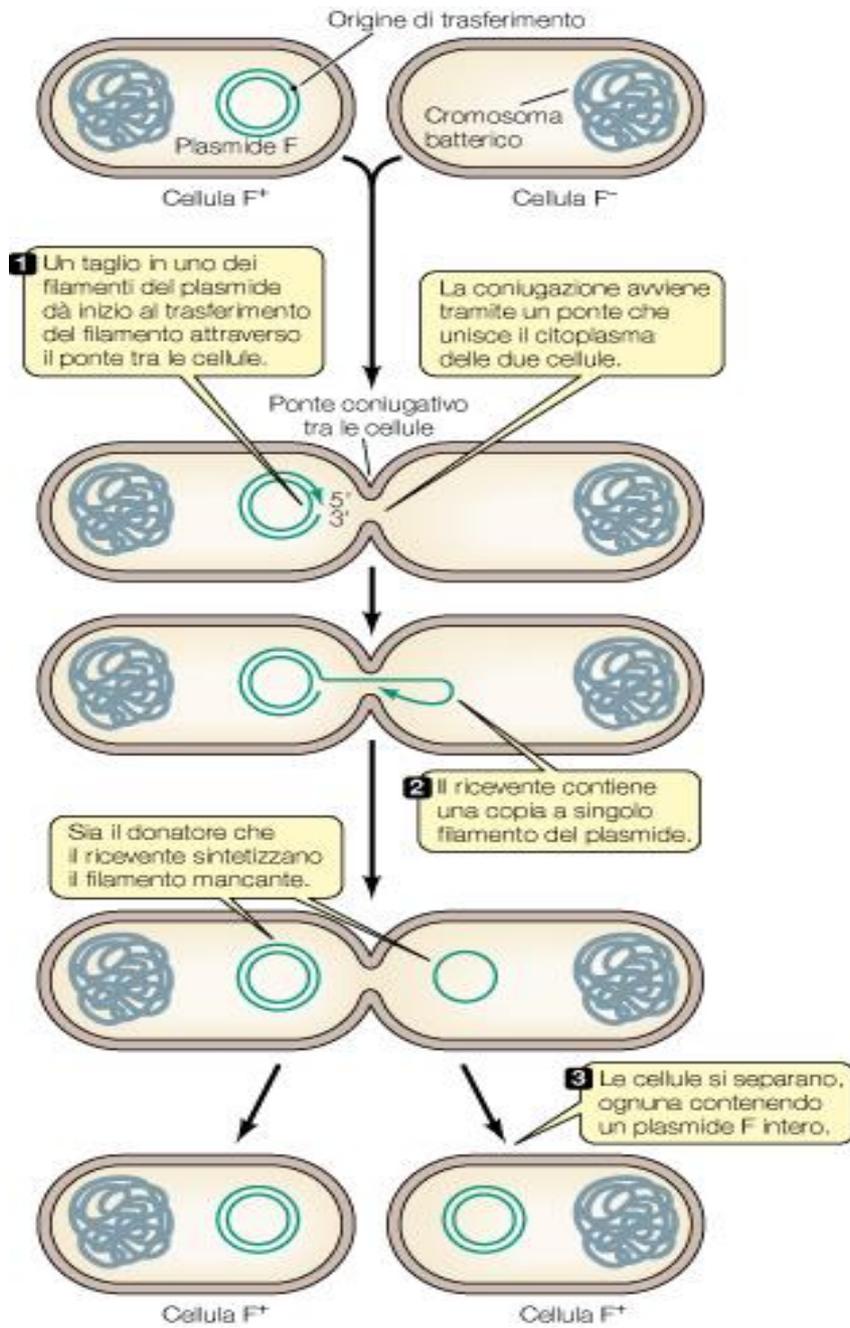


La replicazione teta



La replicazione a circolo rotante

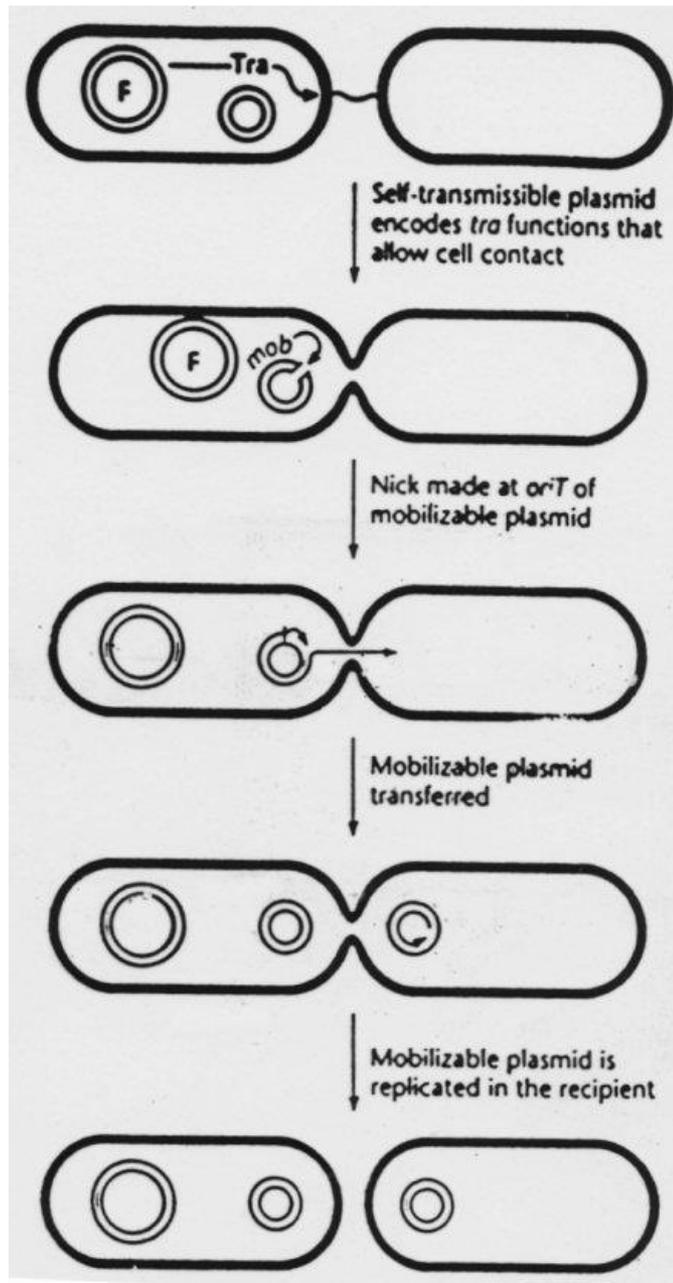




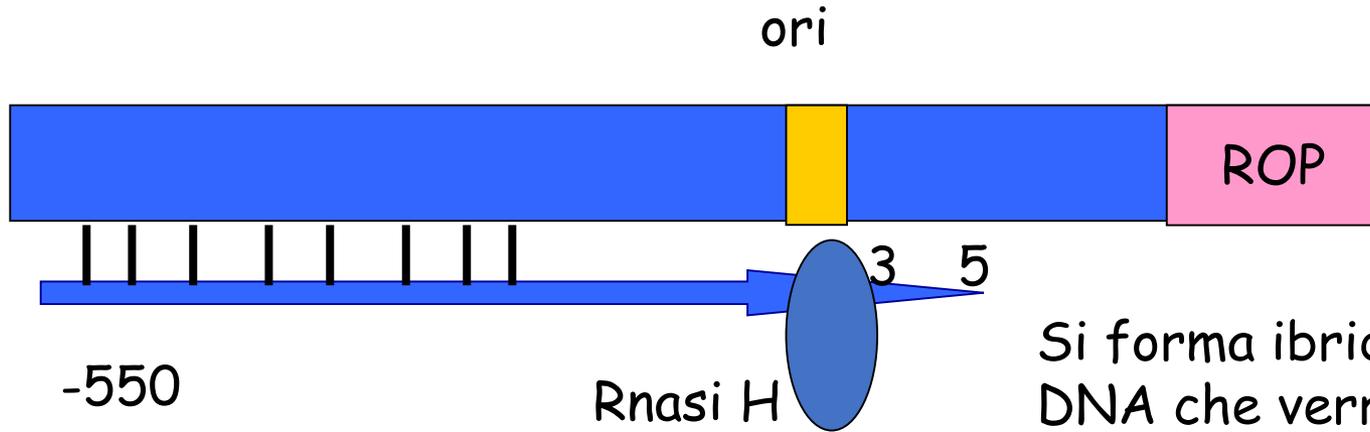
LA MOBILIZZAZIONE

I plasmidi mobilizzabili sono plasmidi non coniugativi in grado di sfruttare il sistema di coniugazione di un plasmide compatibile presente nella cellula ospite.

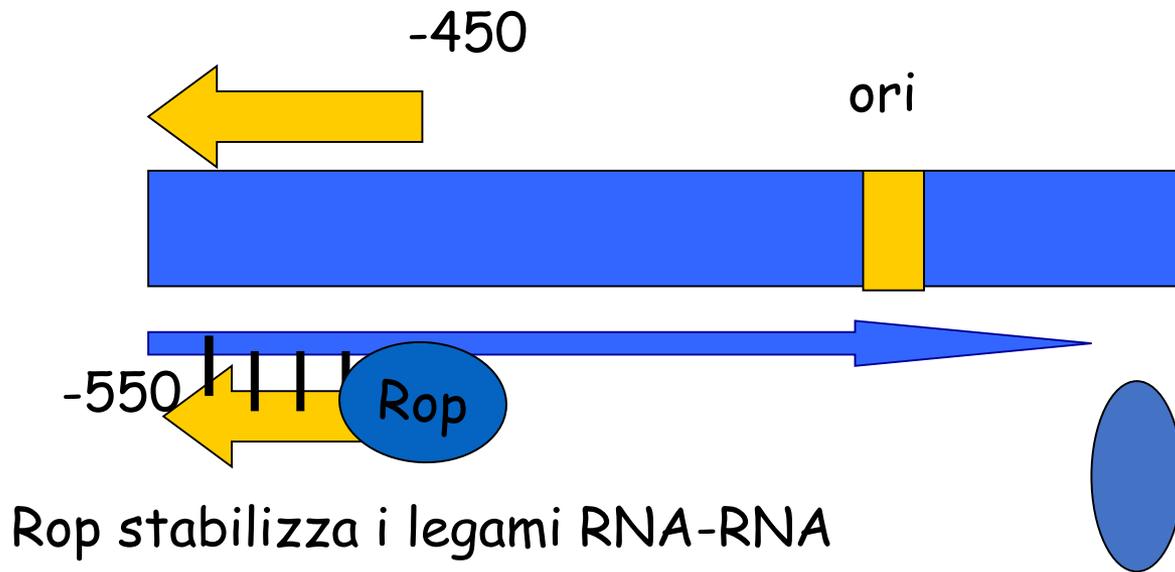
Alcuni posseggono una propria nucleasi in grado di tagliare il DNA nel sito di *oriT* per dare l'avvio al processo di coniugazione. Altri plasmidi invece posseggono semplicemente un sito *oriT* riconoscibile da varie nucleasi codificate dai plasmidi coniugativi.



Replicazione di ColE1



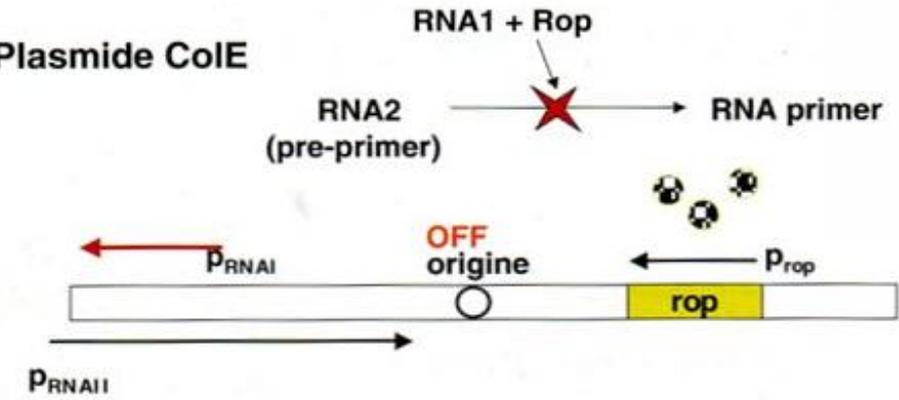
Si forma ibrido RNA-DNA che verrà tagliato da RNAsiH a livello di ori generando un primer per la replicazione



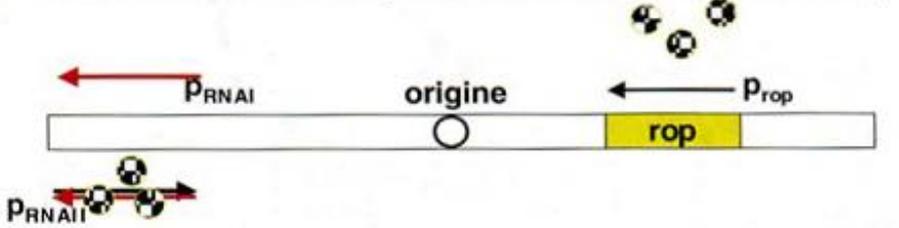
Rop stabilizza i legami RNA-RNA

La sintesi di un RNA Antisenso in grado di legarsi al mRNA inibisce la formazione dell'ibrido RNA-DNA

Plasmide ColE



Alta concentrazione di plasmidi: accumulo di RNA1 e Rop



(b)

La funzione di Rop

Rop controlla negativamente la replicazione plasmidica:
 ➔ aumenta il tasso di legame di RNAI ad RNAII.

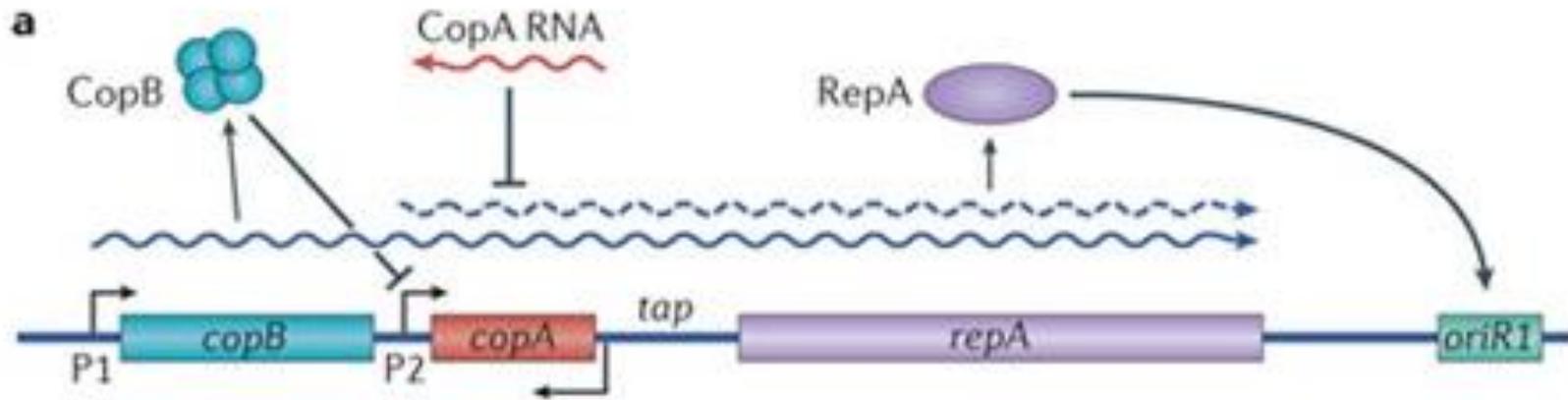
Rop assente ➔ Replicazione plasmidica più frequente

pBR322 rop⁺ 15 copie/cellula

↓
 derivativo di pBR322
 costruito per delezione

pUC18 Δrop 50-100 copie/cellula

La replicazione di R1



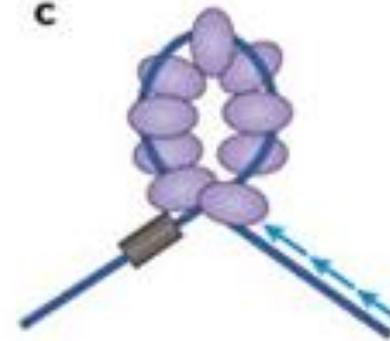
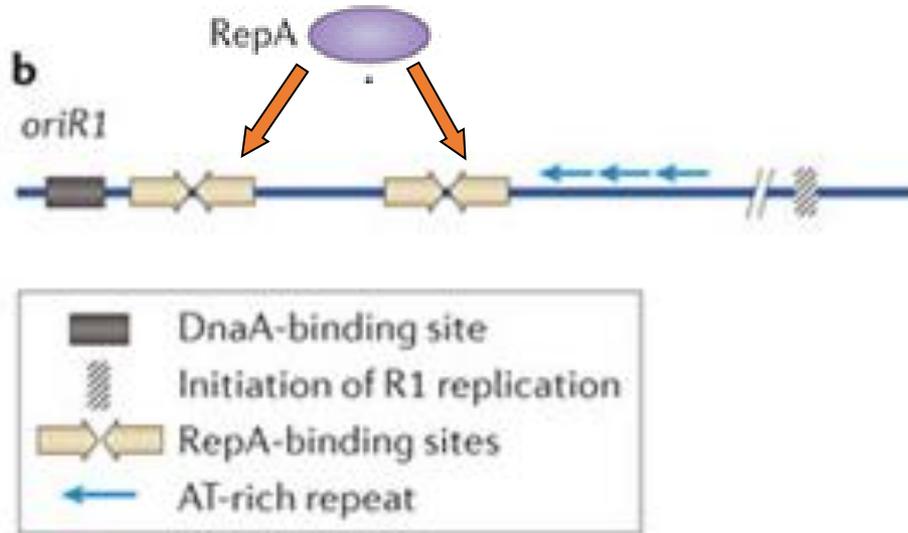
Il plasmide R1 costituisce un modello ben studiato di replicazione plasmidica .

In questo plasmide la proteina necessaria per la replicazione RepA si lega all'origine (*oriR1*) localizzata a valle del gene.

Il gene *repA* è espresso a partire da 2 promotori (P1 e P2) ed è sottoposto ad una duplice forma di controllo negativo.

Il primo repressore è CopB che viene trascritto assieme al gene *repA* quando la trascrizione parte dal promotore P1. CopB reprime la trascrizione di *repA* a partire dal promotore P2 che quindi rimane silente in condizioni normali. Oltre a CopB, il livello di *repA* è controllato anche da un piccolo RNA chiamato CopA che agisce a livello post trascrizionale legandosi mRNA di *repA*, alterandone la struttura in modo prevenirne la traduzione

La replicazione del plasmide R1



In questo plasmide la proteina necessaria per la replicazione RepA si lega all'origine (oriR1) localizzata a valle del gene.

OriR1 è caratterizzata da 4 box per RepA fiancheggiati da un lato da un sito di legame per DnaA e dall'altro da una regione ricche in A-T.

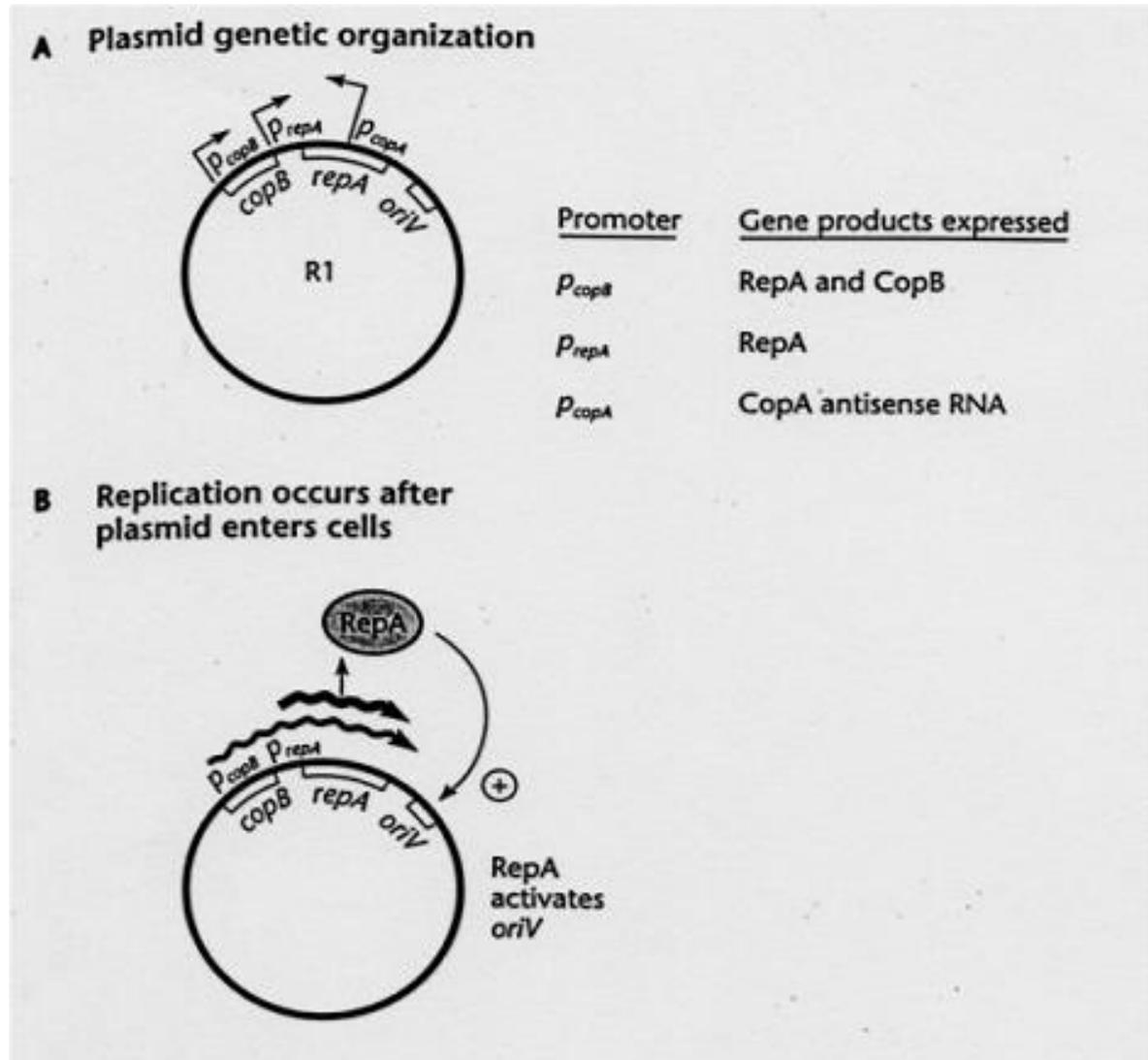
Il legame di RepA ad oriR1 provoca la formazione di un'ansa che facilita l'apertura del DNA nella regione ricca in AT. L'inizio è localizzato circa 400 bp a valle dalla regione OriR1.

Replicazione di R1(o R100)

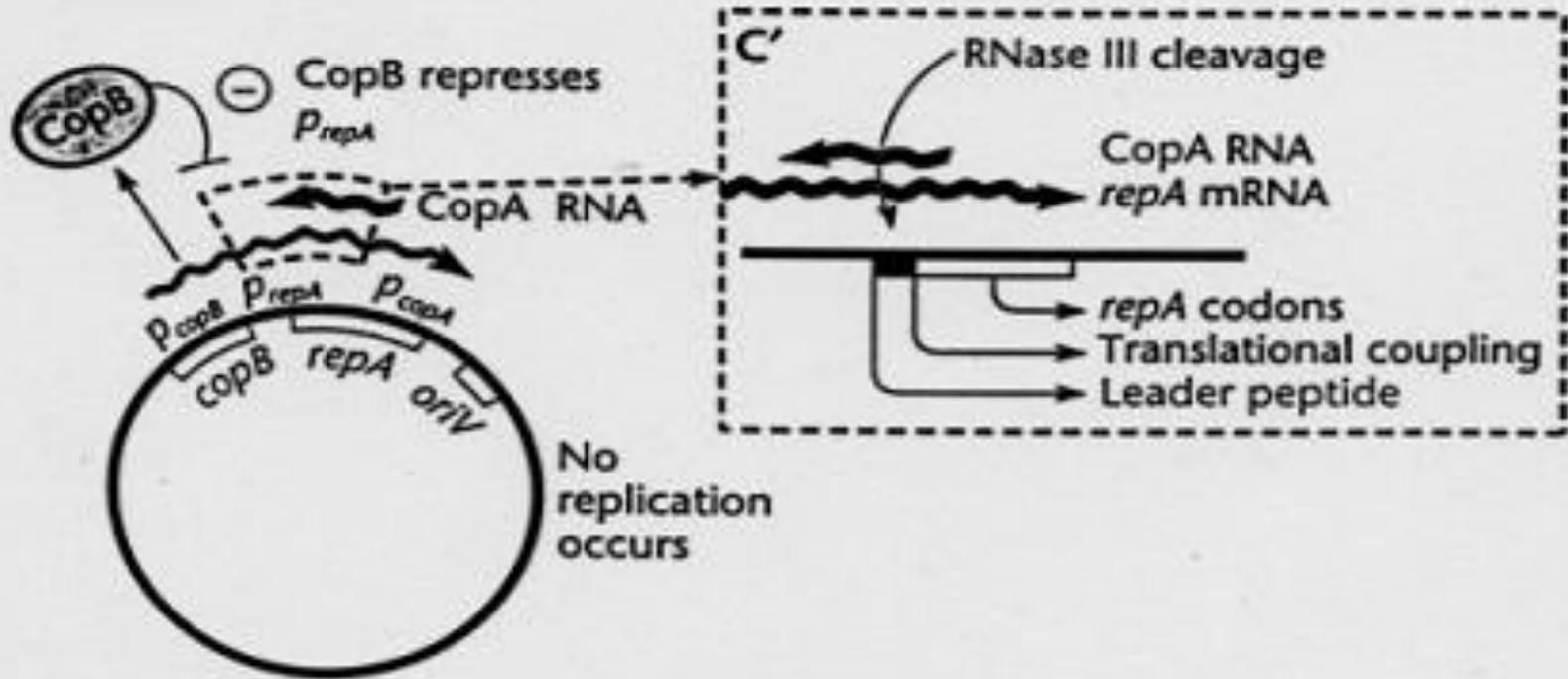
La proteina RepA necessaria per attivare la replicazione può essere trascritta a partire dal promotore

- *P_{copB}*
- *P_{repA}*

In assenza di CopB la proteina viene trascritta da entrambi i promotori



C Replication shutdown



In presenza di CopB

- CopB reprime il P_{repA} .
- *repA* viene trascritto solo dal P_{copB}
- viene trascritto sull'elica complementare il mRNA *copA* che agisce da antisenso sul mRNA *copB*-*repA*.
- L'ibrido RNA-RNA viene digerito da RNase III e non si ha traduzione di RepA

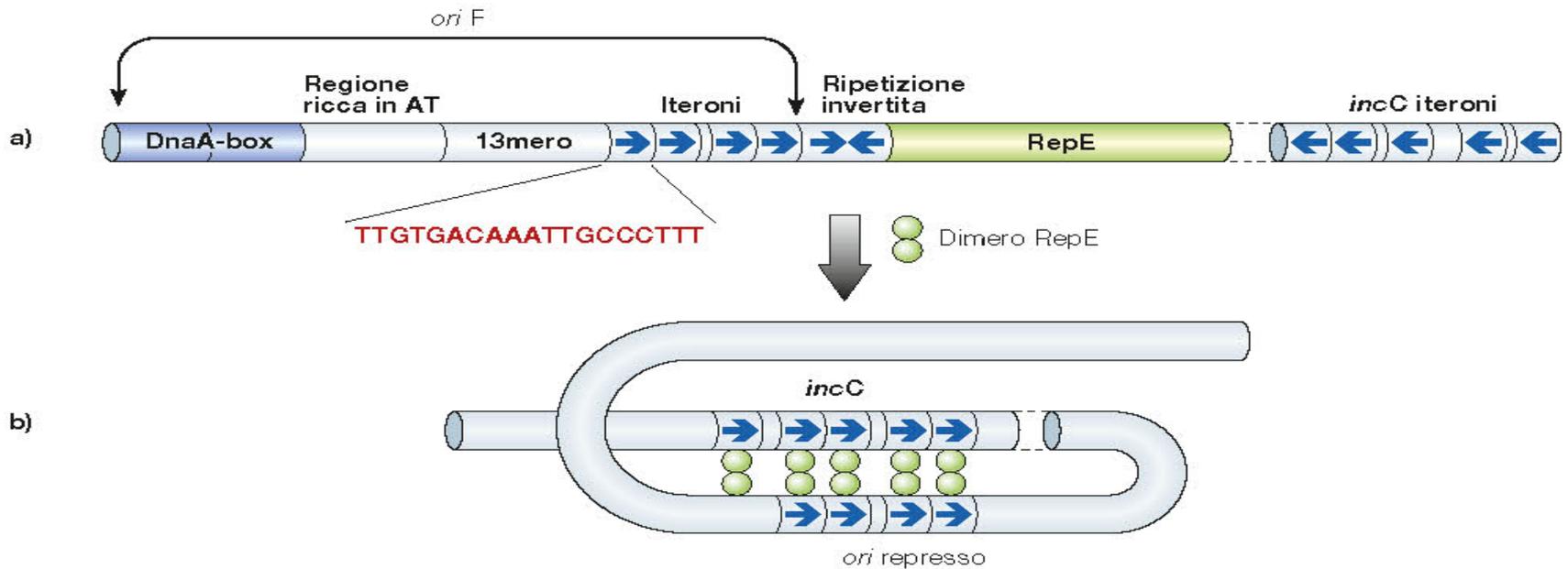
La replicazione di F

Controllo della replicazione plasmidica mediante il meccanismo degli iteroni nel plasmide F

Iterone è una breve sequenza di DNA (circa 20 bp) ricca in AT localizzata vicina all'origine che mima il vero sito di legame della proteina Rep

Compete con i normali siti di legame della proteina

L'origine di replicazione di F

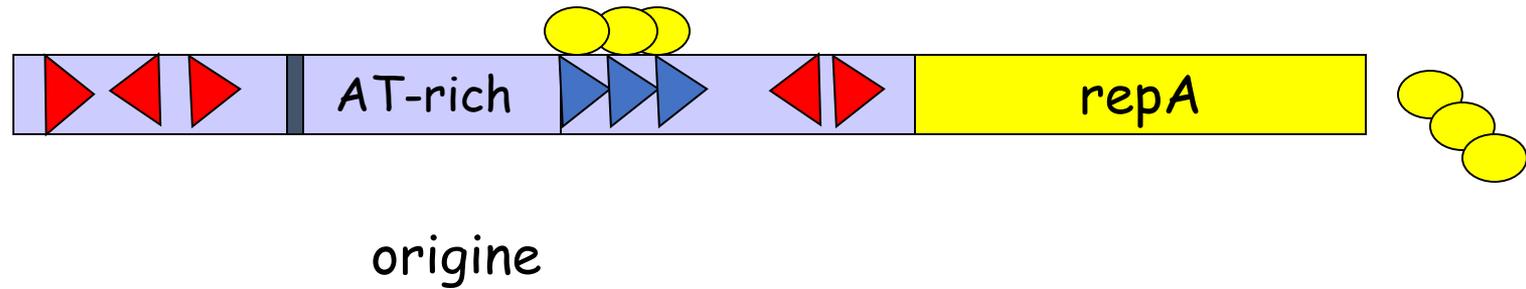


L'origine di replicazione di F è caratterizzata da:

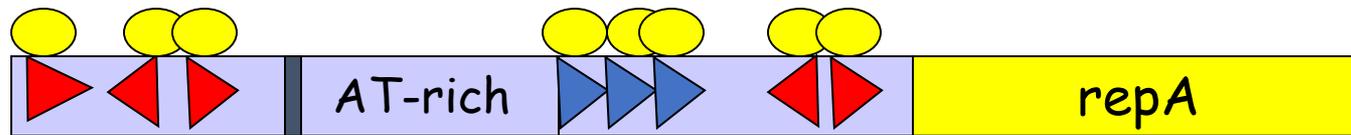
- 2 DnaA box riconosciute dalla proteina batterica DnaA
- una regione ricca in AT
- una regione di 13 nucleotidi omologa ad *oriC* del cromosoma seguita da 4 sequenze di 19 bpDR che legano la proteina d'inizio RepE.

Il legame di RepE causa un ripiegamento del DNA che facilita l'apertura della regione *oriF* con separazione dei filamenti

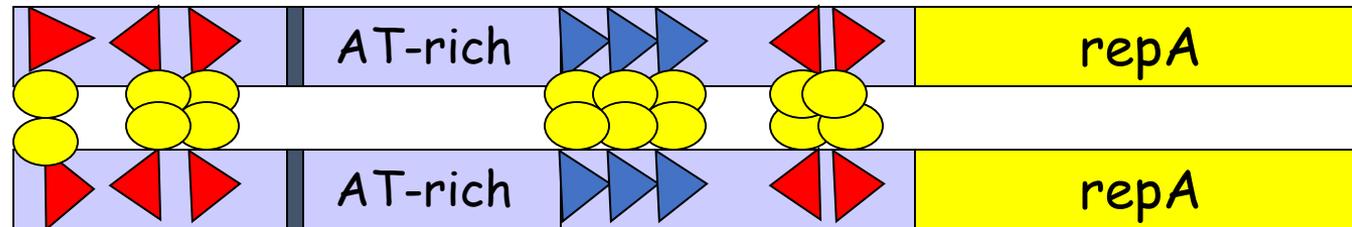
Bassa concentrazione di plasmidi e di RepE: RepE si lega ad ori



Aumento della concentrazione di RepE: RepE si lega agli iteroni



Alta concentrazione di plasmidi e RepE: ammanettamento



Controllo della replicazione di F

Come fanno i plasmidi a basso numero di copie ad assicurarsi di essere trasmessi stabilmente alle cellule figlie?

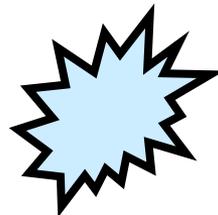
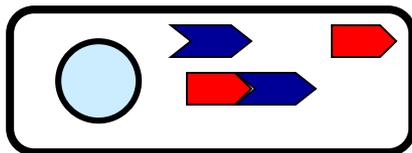
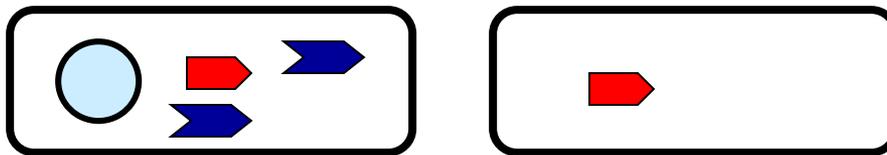
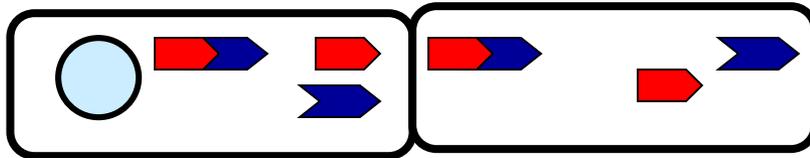
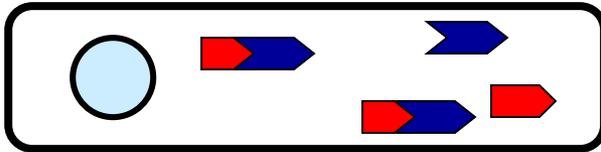
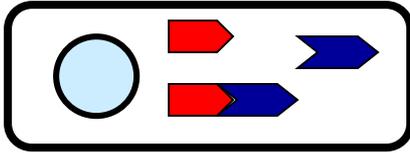
Alcuni plasmidi sintetizzano due proteine ParA e ParB che si legano ad un sito specifico sul plasmide parS mantenendo i plasmidi nel centro delle cellule in divisione (vicino al setto) fintanto che il processo di divisione non si sia concluso.

Un'altra strategia risiede nella capacità di alcuni plasmidi di produrre delle sostanze tossiche che uccidono le cellule che non hanno ereditato il plasmide. Nel caso di F il sistema **ccdAB** sintetizza una tossina che agisce come inibitore della topoisomerasi

Sistema ccdA- ccdB di F

 Tossina stabile CCdB

 Antitossina labile CCdA



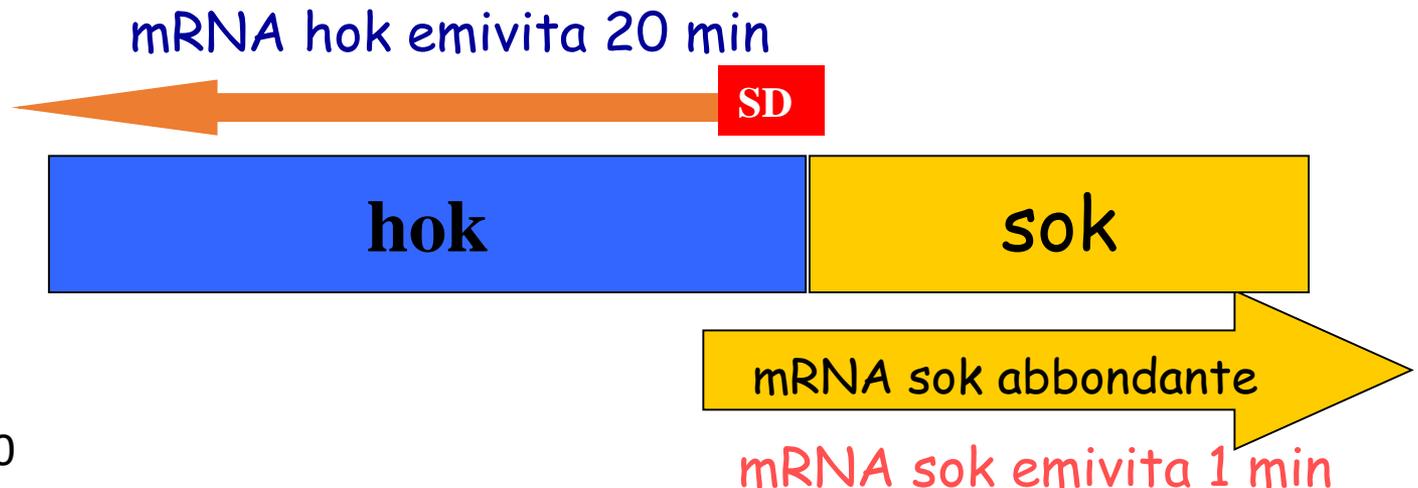
Il plasmide F sintetizza un sistema basato su tossina-antitossina in grado di eliminare le cellule che, in seguito ad un errore nella divisione cellulare non hanno ricevuto almeno una copia del plasmide F. La proteina CcdB è una tossina stabile (con bersaglio la DNA girasi) la cui funzione viene bloccata dal legame con un antitossina CcdA più facilmente degradabile. Se il plasmide è presente la continua sintesi di CcdA inibisce CcdB. Se non vi è plasmide invece CcdA verrà degradata + velocemente di CcdB che rimarrà quindi libera e potrà inibire la girasi provocando la morte delle cellule.

Ccd= control of cell death

Sistema hok -sok

Il plasmide R1(o R100) porta un gene letale *hok* (host cell killing) che codifica per una tossina in grado di provocare depolimerizzazione delle membrana.

Sull'elica complementare del DNA di *hok* viene trascritta il mRNA del gene *sok* che ha una una regione di 128 nt complementare con la regione SD di *hok*. I 2 RNA hanno diversa emivita 20 min e 1 min. Hok non viene mai tradotto per azione del mRNA di *sok* e la cellula con R1 rimane pertanto vitale. Se una cellula non eredita R1 in seguito a divisione allora mRNA_{sok} che ha una lunga emivita verrà tradotto perchè mRNA sok avendo un emivita più breve non sarà più presente.



Plasmide R1=R100

Stabilità segregativa (funzione *par*)

- Meccanismi molecolari precisi mantengono un numero stabile di copie del plasmide nella cellula ospite e assicurano la loro ripartizione tra le cellule figlie (**regione *par***)
- Fondamentale per plasmidi a basso numero di copie
- La mancanza di questa regione può portare ad una incorretta ripartizione durante la divisione cellulare fino alla perdita del plasmide in condizioni di stress, anche per plasmidi ad alto numero di copie (es: pBR322).

Incompatibilità tra plasmidi

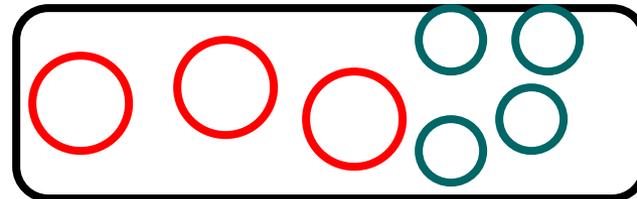
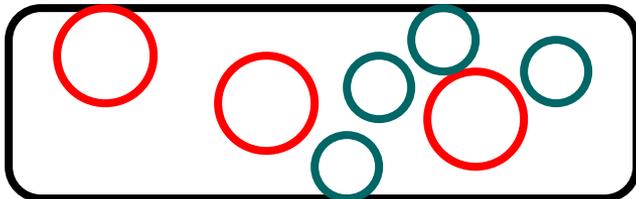
Due plasmidi che non possono coesistere nella stessa cellula –in assenza di pressione selettiva- si dicono incompatibili (appartengono allo stesso gruppo di incompatibilità)

Ciò accade quando i due plasmidi:

- Contengono la **stessa regione *par***
- Utilizzano lo **stesso meccanismo di replicazione**

Plasmidi che hanno differenti meccanismi di controllo replicheranno indipendentemente l'uno dall'altro ed ognuno sarà ripartito tra le cellule figlie

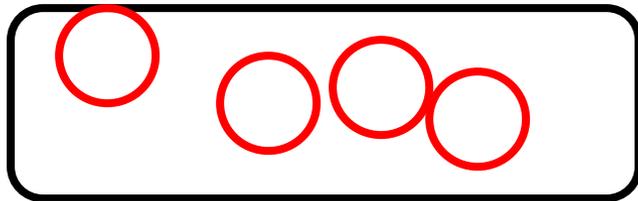
La cellula potrà mantenere entrambi i plasmidi



Se i plasmidi pur diversi nei caratteri fenotipici hanno i meccanismi di controllo simili potranno controllare in trans l'uno la replicazione dell'altro. Uno dei due nel corso delle successive divisioni sarà perso dalla cellula e alla fine avremo due popolazioni contenenti l'una un plasmide e l'altra l'altro.

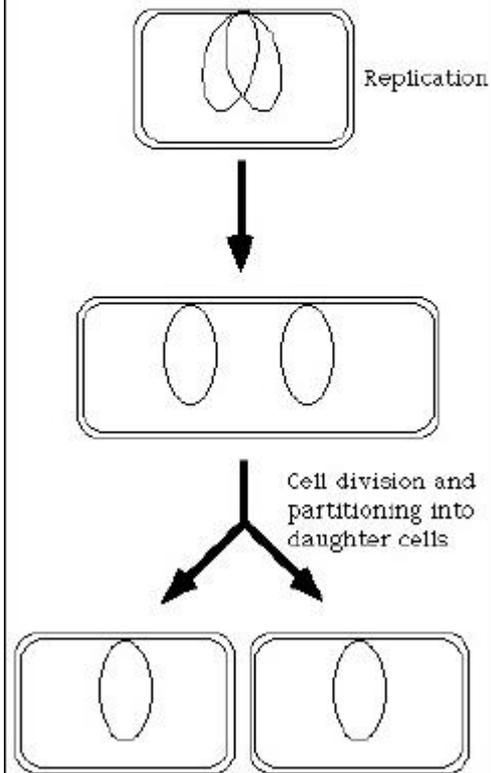


Dopo diverse generazioni una popolazione avrà un plasmide e l'altra l'altro

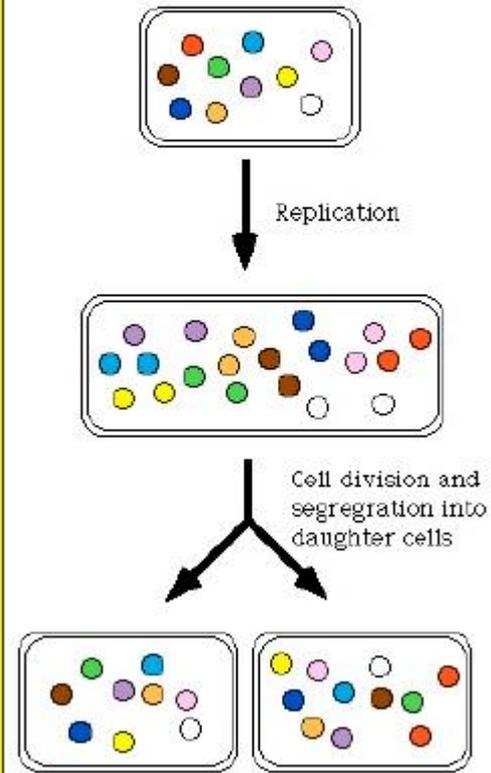


PLASMID PARTITIONING AND SEGREGATION

(A) Low copy number plasmids
(replication coordinated with
chromosome)



(B) High copy number plasmids
(random partitioning)

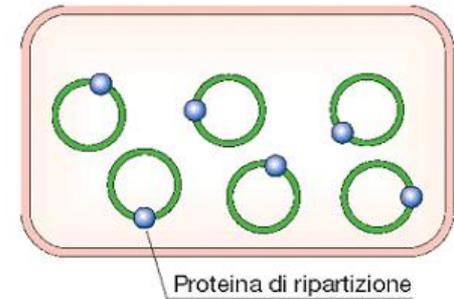


I plasmidi ad alto numero di copie si ripartiscono secondo due modalità:

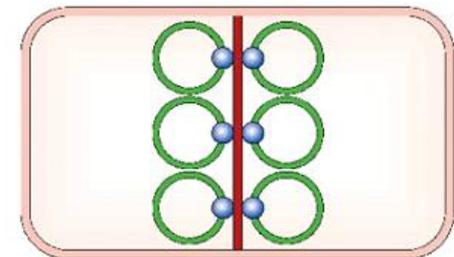
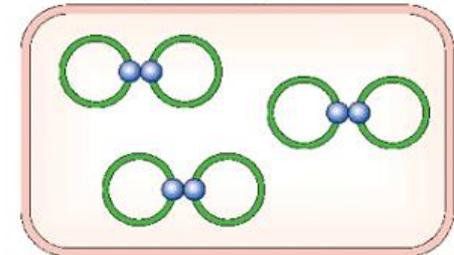
1. **STOCAISTICA** o casuale
2. **ATTIVA**

Nel caso della ripartizione attiva i plasmidi vengono riconosciuti da una proteina che dimerizzando forma delle coppie di plasmidi. La struttura DNA -proteina-DNA si localizzerà a livello del sito di divisione garantendo così la corretta divisione tra le cellule

b) Ripartizione attiva

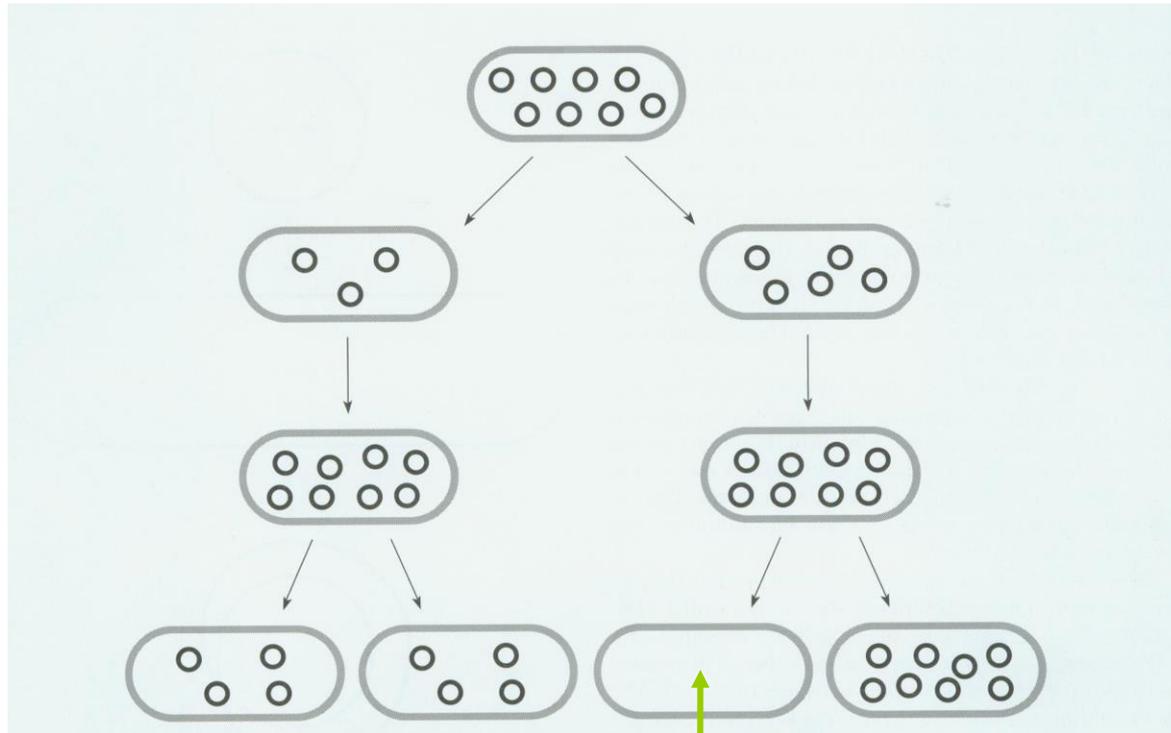


Modello di pre-accoppiamento



Sito di riconoscimento sulla membrana

Distribuzione casuale dei plasmidi



Perdita del plasmide