

Strane “entità” biologiche (Procarioti ed Eucarioti)

che sfidano i comuni criteri di classificazione

Organismi di difficile classificazione (“borderline”)

- Organismi procarioti ed eucarioti difficilmente “inquadrabili” nelle suddivisioni classiche dei viventi
- Molto importanti come **fonte di informazioni sull’origine della vita** e sulle principali tappe dell’evoluzione

Alcuni esempi:

- Batteri (quindi **Procarioti**) con... “nucleo” (*Gemmata obscuriglobus*, *Planctomyces sp.*) in grado di effettuare l’ossidazione anaerobia dell’azoto organico ad azoto inorganico (“anammox”)
- Batteri “giganti”, di dimensioni superiori a quelle di una normale cellula eucariotica (*Epulopiscium fishelsoni*, *Thiomargarita namibiensis*)
- Batteri resistenti a livelli letali di radiazioni (*Deinococcus radiodurans*)
- Eucarioti (“Super-Eucarioti”) con **4 genomi** (*Guillardia theta* e Chlorarachniophytes)

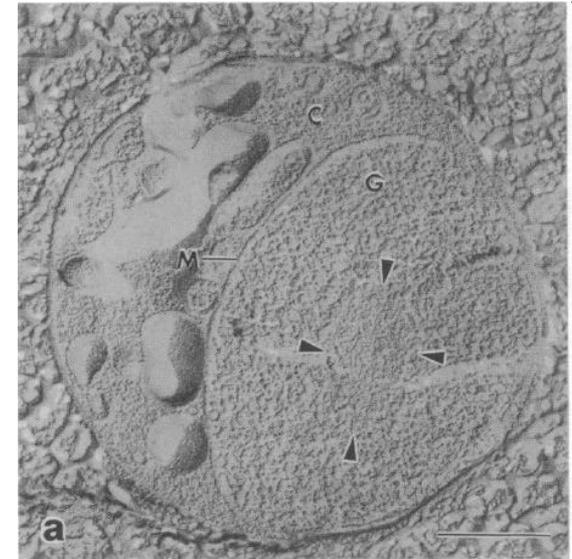
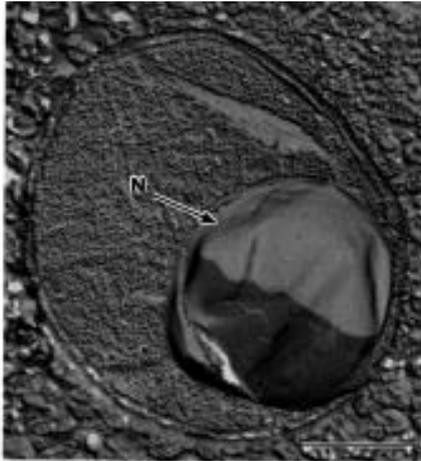
Ed infine vi sono alcuni **virus**

(che **non sono viventi** e **non sono “organismi”**, né Procarioti, né Eucarioti) ma sono **di dimensioni giganti (700 nm, cioè 0.7 µm)** rispetto a quelle di altri “normali” virus (da 30 a 360 nm): saranno trattati in seguito

Gemmata obscuriglobus

(Bacteria, Planctomycetales)

Nel 1991 è stato scoperto uno strano procariota la cui regione citoplasmatica contenente la molecola di DNA circolare tipica dei Procarioti è avvolta da una membrana (Fuerst e Webb, PNAS 88: 8184-8188, 1991)



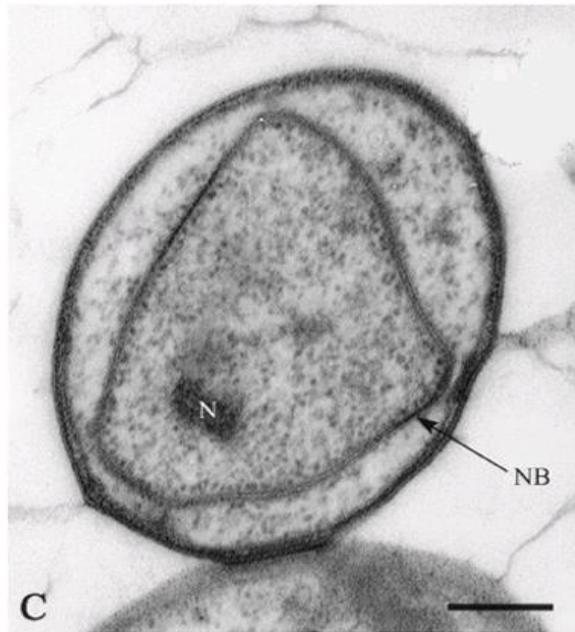
Il genoma di *G. obscuriglobus*, di grandi dimensioni rispetto a quello di un normale genoma procariotico (9 Mb, 8000 geni) è stato interamente sequenziato nel 2010 dal J.Craig Venter Institute

I geni sono quasi tutti simili a quelli dei Procarioti, ma alcuni somigliano a quelli degli Eucarioti (Devos, Curr. Biol. 23: R705-R707, 2010)

G. obscuriglobus (Planctomycetales)

“the **platypus** of microbiology”

Quando è stato scoperto, *G. obscuriglobus* è stato considerato “**strano come un ornitorinco**”



N = addensamento di DNA

NB = membrana che avvolge la regione contenente il DNA

Females lay eggs like a snake's, but feed the young milk

tail like a beaver's

fur like a beaver or otter

males have venom spur

webbed feet have claws

bill and webbed feet like a duck's

The platypus puzzle



Ornitorhynchus anatinus (Mammalia Monotremata)
in inglese “**platypus**”

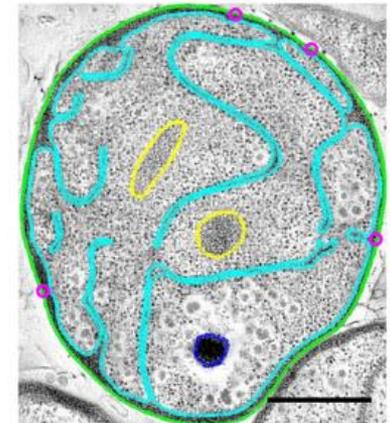
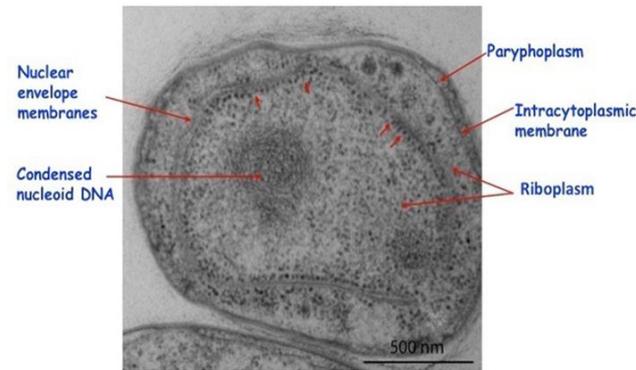
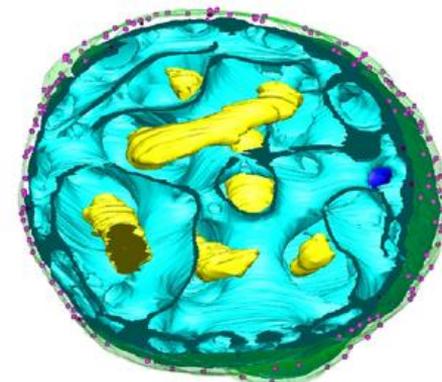
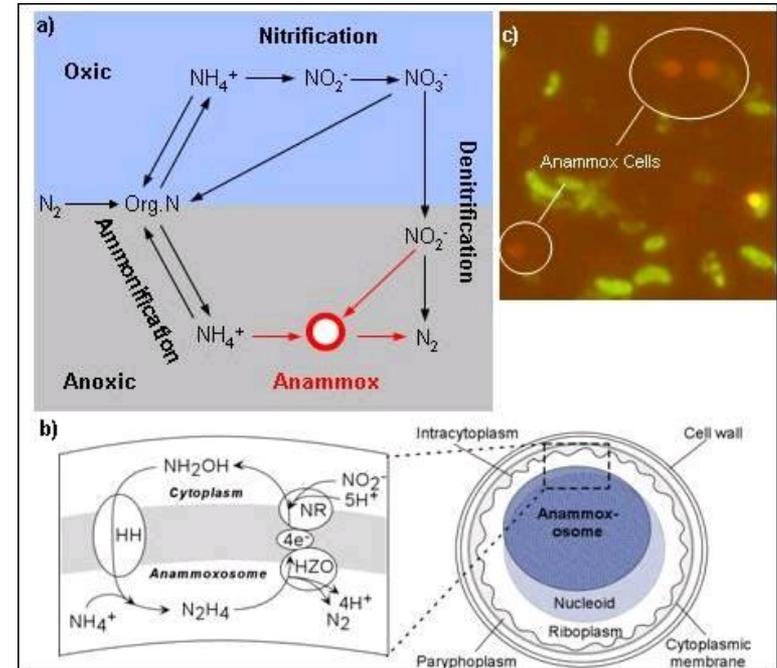
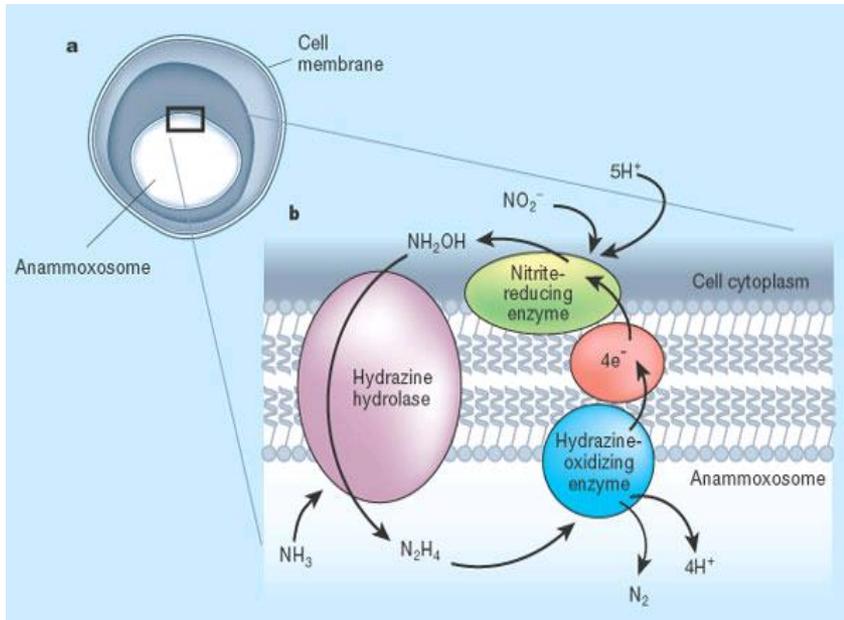


Immagine al TEM e ricostruzione al computer del sistema di membrane (in blu) che avvolgono le molecole di DNA (in giallo) (Santarella-Mellwig et al., PLoS Biol. 11: e1001565, 2013)

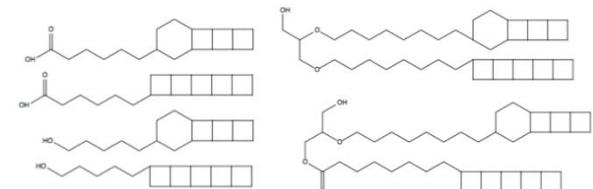
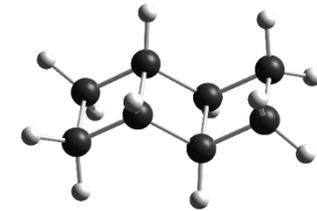


G. obscuriglobus appartiene ai Planctomycetales, batteri “ANnAMmOX” (ANerobic AMmonium OXidation) che possiedono un **anammoxosoma**



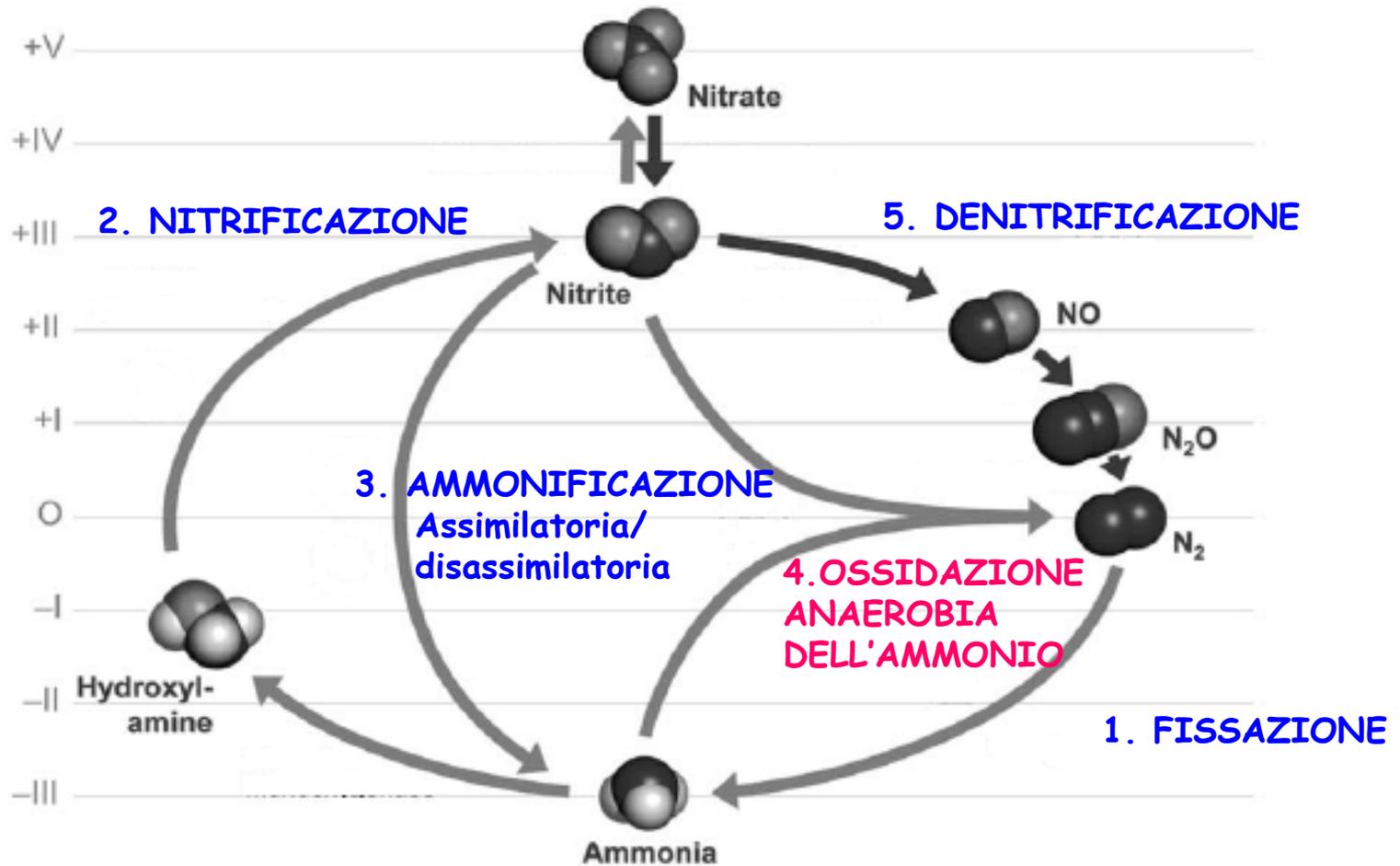
L’**anammoxosoma** è un **compartimento citoplasmatico esclusivo dei Planctomycetales**, delimitato da una singola membrana contenente un particolare lipide, il **ladderano**, formato da anelli di ciclobutano

Nell’anammoxosoma si effettuano le reazioni di ossidazione anaerobica dell’ammoniaca (“**anammox**”)

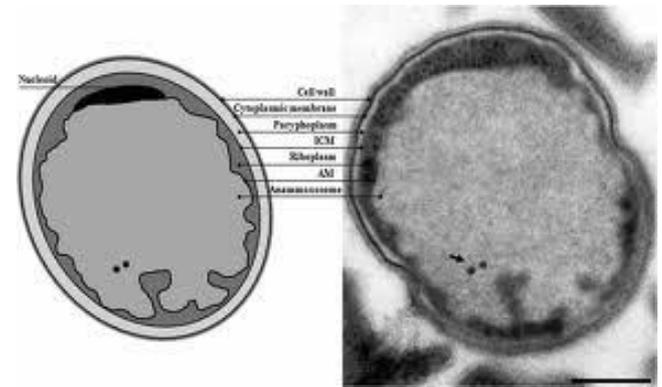


Fonte: van Niftrik e Jensen, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 76: 585-596, 2012

CICLO DELL'AZOTO



OSSIDAZIONE ANAEROBIA DELL'AMMONIO (processo anammox)



Il processo trasforma l'azoto organico in azoto molecolare (N_2), quindi è svantaggioso per i viventi che necessitano di azoto organico

Il primo microorganismo nel quale è stato identificato il processo anammox è stato *Brocadia anammoxidans* (Planctomycetales): in seguito è stato scoperto anche in *G. obscuriglobus* e altre specie

Il processo è esclusivo del phylum *Planctomycetales* (circa 30 specie) ed è di grande importanza nel campo della “bioremediation” (depurazione di materiali inquinati tramite microorganismi) per il trattamento delle acque di scarico contaminate da ammonio e nitriti

Osservato inizialmente a temperature tra 20 e 43 °C, può avvenire anche tra 36 e 52 °C nelle sorgenti calde, e tra 60 e 85 °C nelle “hydrothermal vents” della Dorsale Medio-Atlantica

I batteri anammox sono impiegati in Olanda per il trattamento dei liquami

- “Sequencing Batch Reactor” (SBR) sperimentale con coltura di arricchimento del batterio anammox *Kuenenia stuttgartiensis*, costruito in Olanda presso la Radboud University di Nijmegen (Kartal et al., Science 328, 702-703, 2010)
- Impianti per il trattamento dei liquami con batteri anammox sono in funzione dal 2006 nel depuratore cittadino di Rotterdam e in alcuni complessi industriali (Hu et al., Appl. Environm. Biol. 79, 2807-2812, 2013)



ENGINEERING

Sewage Treatment with Anammox

B. Kartal,¹ J. G. Kuenen,² M. C. M. van Loosdrecht²

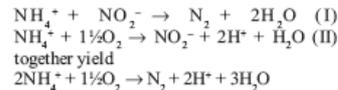
Organic matter must be removed from sewage to protect the quality of the water bodies that it is discharged to. Most current sewage treatment plants are aimed at removing organic matter only. They are energy-inefficient, whereas potentially the organic matter could be regarded as a source of energy. However, organic carbon is not the only pollutant in sewage: Fixed nitrogen such as ammonium (NH_4^+) and nitrate (NO_3^-) must be removed to avoid toxic algal blooms in the environment. Conventional wastewater treatment systems for nitrogen removal require a lot of energy to create aerobic conditions for bacterial nitrification, and also use organic carbon to help remove

nitrate by bacterial denitrification (see the figure). An alternative approach is the use of anoxic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria, which require less energy (1) but grow relatively slowly. We explore process innovations that can speed up the anammox process and use all organic matter as much as possible for energy generation.

The anammox process is responsible for at least 50% of the nitrogen turnover in marine environments (2, 3) and occurs in nature at both low and high temperatures and salinities. It is a shortcut in the nitrogen cycle (see the figure) that was discovered in the early 1990s (4). The anammox bacteria, which belong to the group Planctomycetes, contain a membrane-bound organelle in which ammonium and nitrite are converted to nitrogen gas via the toxic and extremely energy-rich hydrazine intermediate. Special

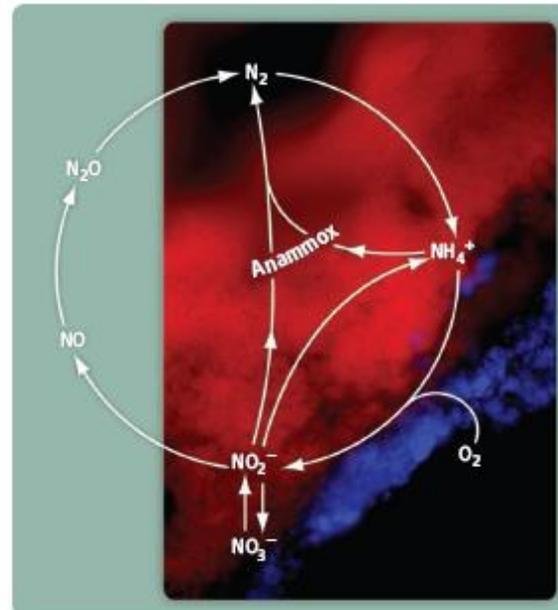
Wastewater treatment including high rate anammox processes have the potential to become energy-neutral or even energy-producing.

lipids found in these bacteria, ladderanes, are believed to assist in keeping the hydrazine within this organelle (5). The bacteria use CO_2 as their carbon source for growth and hence do not require organic carbon (1). The nitrite required for their growth may be provided by aerobic ammonium-oxidizing bacteria or archaea (2). The anammox (I) and nitrification (II) reactions



In conventional sewage treatment, organic matter is combusted to carbon dioxide by microorganisms growing in flocs, generally referred to as an “activated sludge.” This process requires a lot of electrical energy input

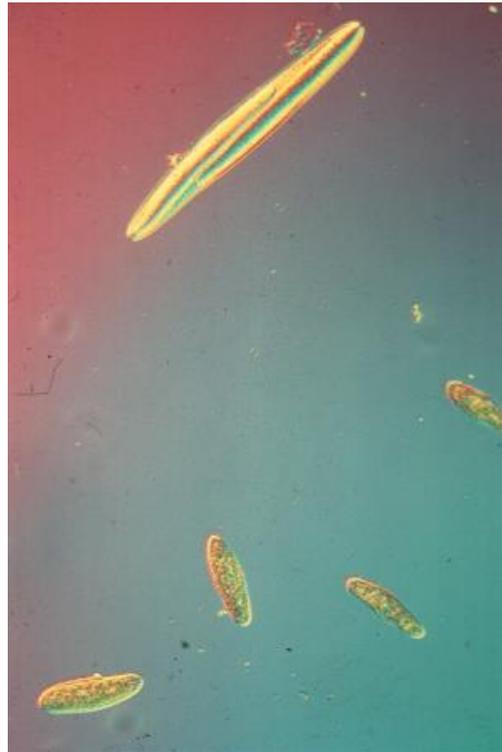
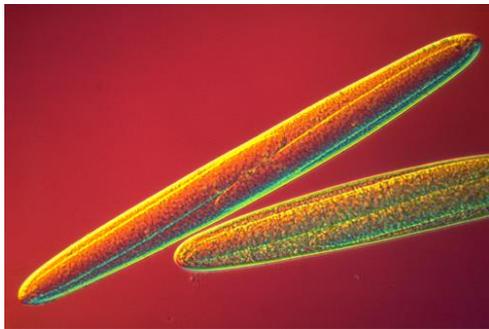
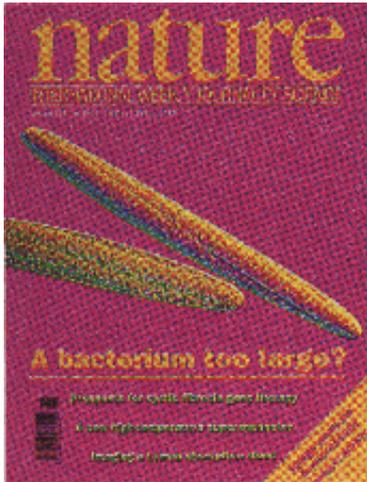
¹Microbiology, Radboud University Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525ED Nijmegen, Netherlands. ²Biotechnology, Delft University Technology, Julianalaan 67, 2628BC Delft, Netherlands. E-mail: j.g.kuenen@tudelft.nl



Un altro stranissimo batterio:

Epulopiscium fishelsoni

un eccezionale eubatterio le cui dimensioni (0.5 mm)
superano quelle di una normale cellula eucariotica...



E. fishelsoni accanto ad alcuni
parameci (Protisti Eucarioti) e ad una
cellula di *Escherichia coli* (Eubacteria)

E. fishelsoni, procariota **gigante**

- Batterio Gram-positivo, simbionte nello stomaco e nell'intestino di pesci tropicali erbivori (*Acanthurus nigrofuscus*, Perciformes)
- Non è chiaro il motivo delle sue grandi dimensioni, ma si ritiene che si siano evolute **per evitare la predazione da parte dei Protisti**, favorite anche da un **genoma complesso e poliploide**
- Per risolvere le difficoltà di distribuzione intracellulare dei materiali, il batterio ha sviluppato una **parete cellulare ripiegata** ed un complesso "cortex" contenente vescicole e tubuli simili a quelli degli Eucarioti
- Non si riproduce tramite scissione binaria, ma **tramite una insolita forma di sporulazione** che produce cellule figlie all'interno della cellula madre

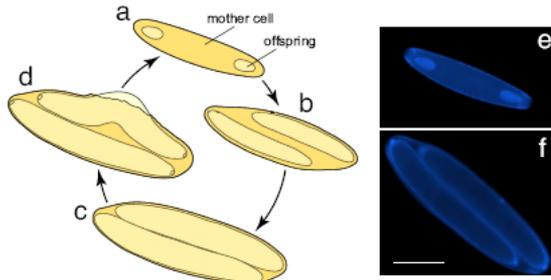
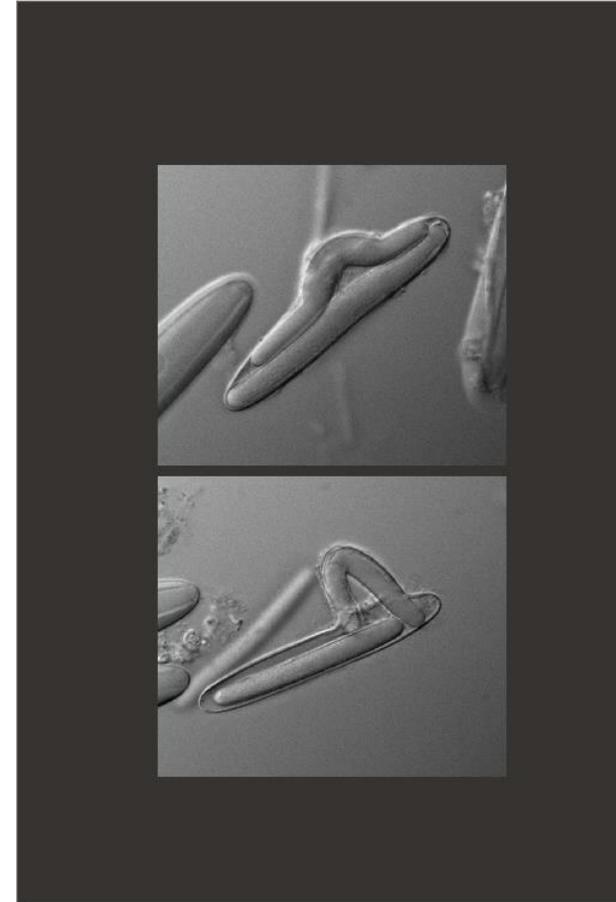
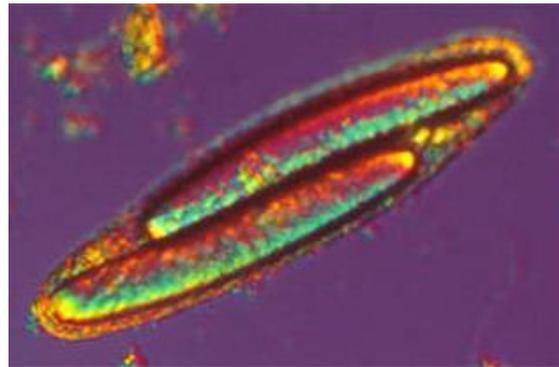
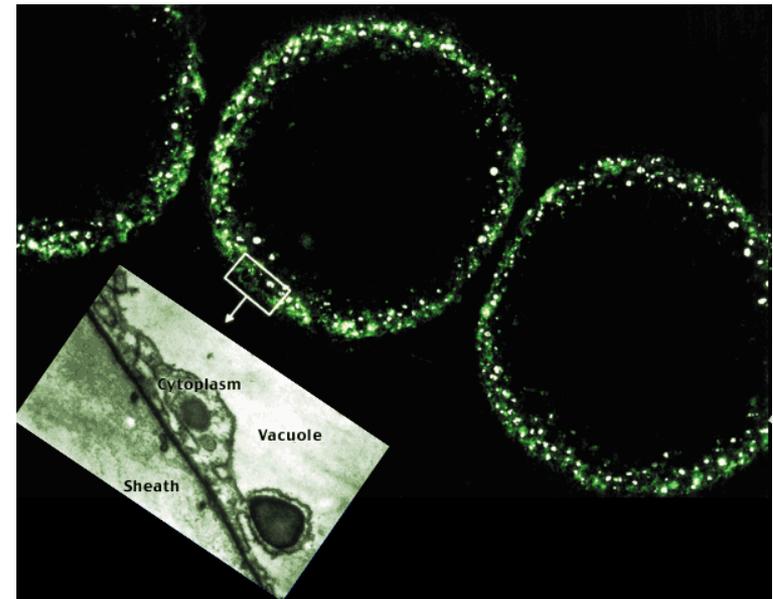
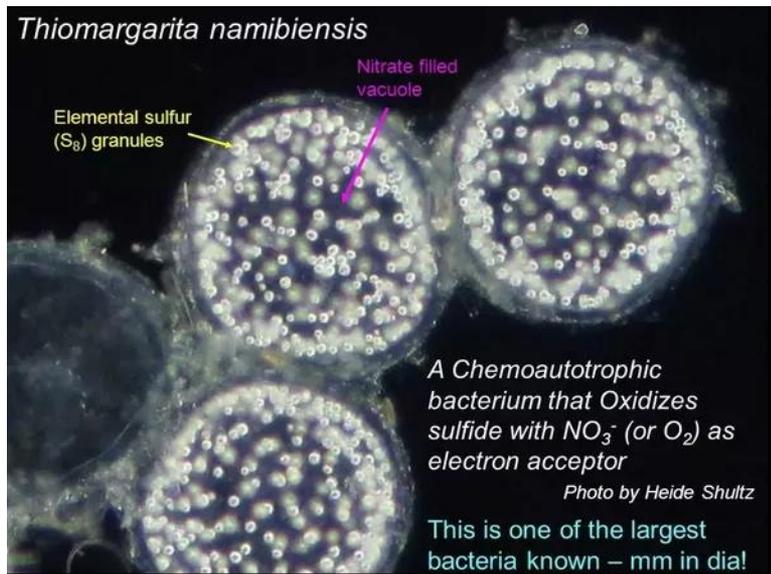


Fig. 1. *Epulopiscium* sp. type B life cycle. Offspring production follows a circadian cycle. (a) Early in the day, a mother cell possesses small, internal offspring. (b and c) Offspring size increases throughout the day (b) until they fill the mother-cell cytoplasm (c). (d) Finally, "mature" offspring cells emerge from the mother-cell envelope. Note that before emergence, these cells begin to develop the next generation of offspring. (e and f) Images of DAPI-stained cells representing the populations of small (e) and large (f) *Epulopiscium* cells used in these studies. (Scale bar: 50 μm .)



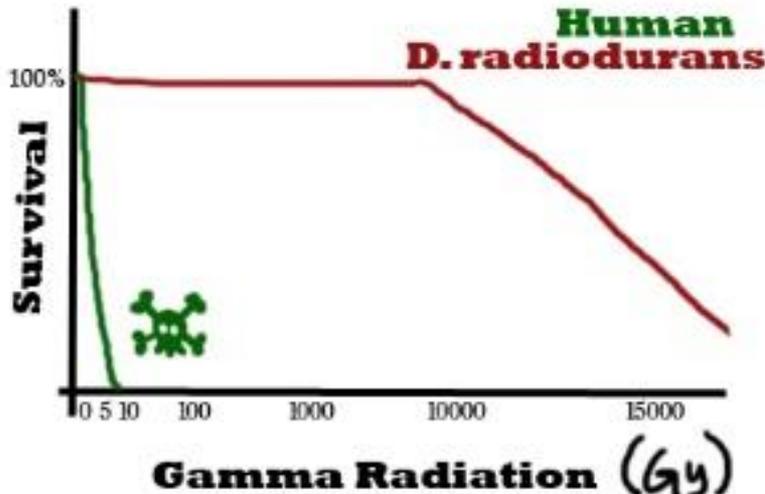
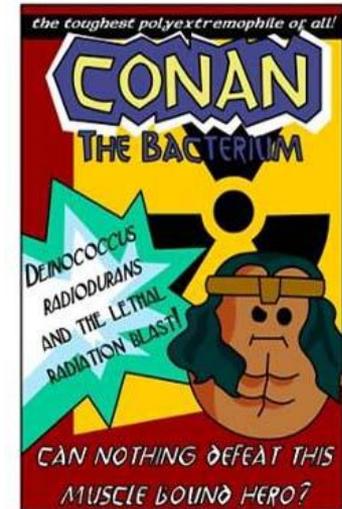
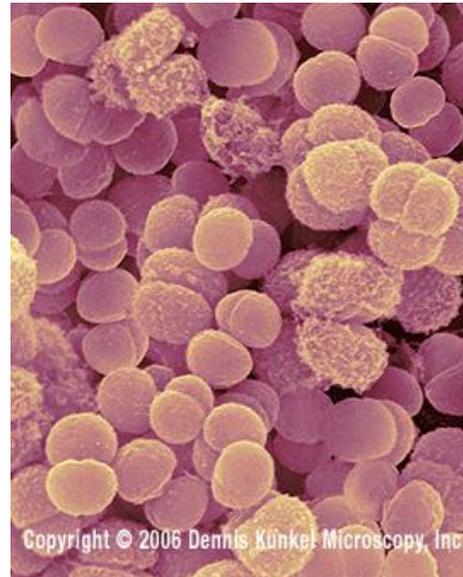
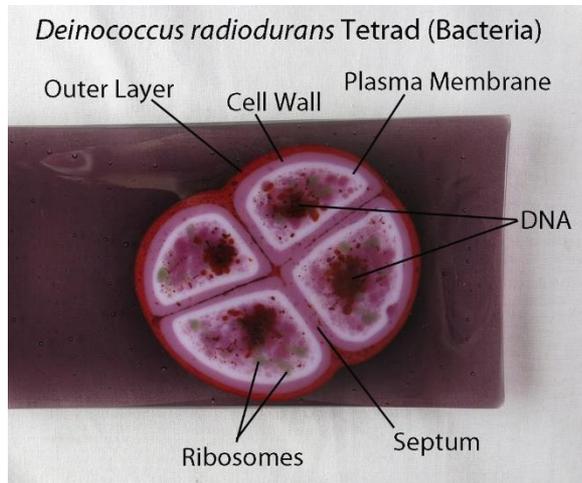
Thiomargarita namibiensis (Proteobacteriaceae) un solfobatterio ancora più grande di *E. fishelsoni*

- Solfobatterio Gram-negativo, scoperto nei sedimenti costieri della Namibia e del Golfo del Messico
- Può raggiungere l'eccezionale diametro di **0.75 mm**: è il **batterio più grande finora conosciuto**
- Le sue dimensioni sono dovute ad un **grande vacuolo citoplasmatico** nel quale il batterio accumula nitrato, che usa come accettore finale di elettroni per ossidare H_2S a zolfo ed ottenere energia (Schultz et al., Science 284, 493-495, 1999)
- Lo zolfo che si deposita alla periferia del grande vacuolo, dando alla cellula un aspetto opalescente



Deinococcus radiodurans Brooks & Murray, 1981

(soprannominato “**Conan il batterio**” e considerato la forma di vita più resistente del pianeta)



Eubatterio aerobio estremamente resistente al disseccamento, all'ossidazione e ad altri tipi di danno al DNA, e come conseguenza, **estremamente resistente alle radiazioni ionizzanti e ultraviolette fino a 15000 Gy (1500 Krad)**

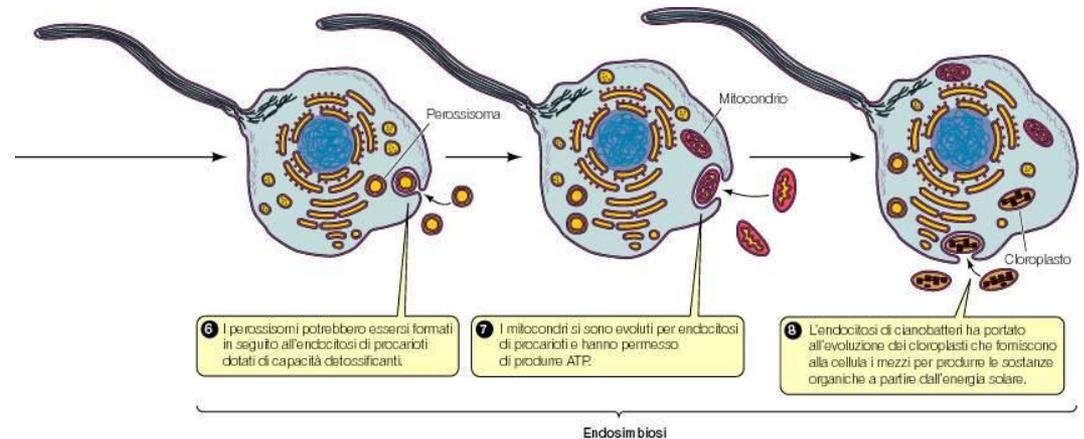
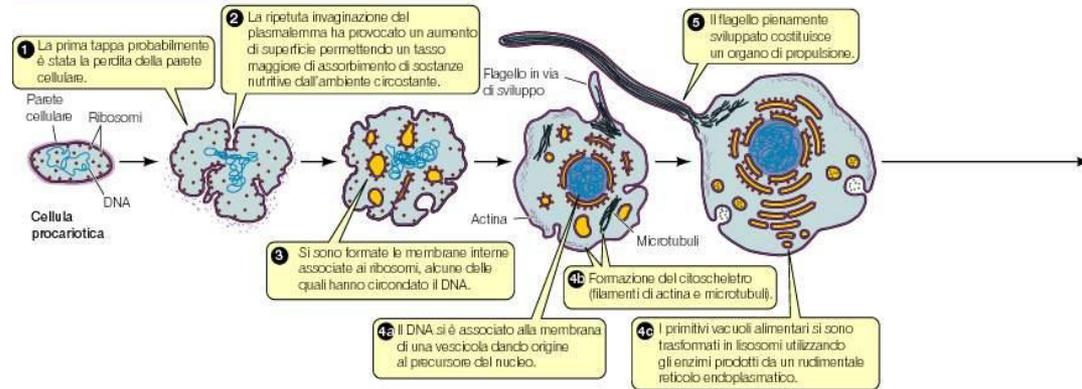
Nuclei, nucleomorfi e origine degli Eucarioti

Endosimbiosi: la teoria fondamentale di Lynn Margulis



Lynn Sagan Margulis
(1938-2011)

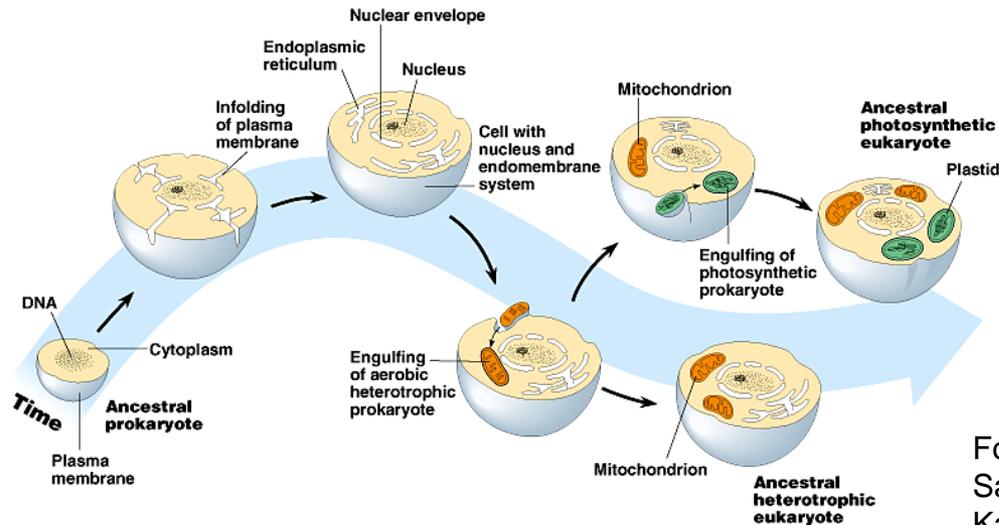
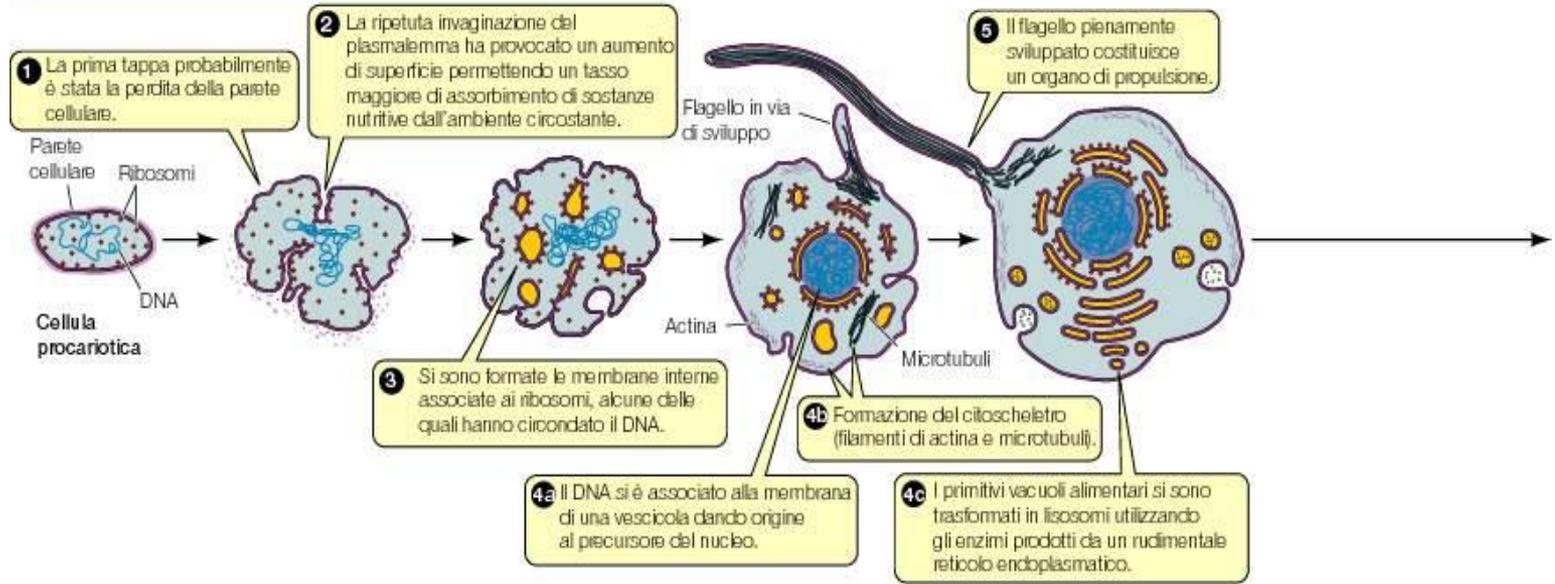
EVOLUZIONE DELLA CELLULA EUCARIOTICA



Fonti: Sadava et al., 2014; 2019

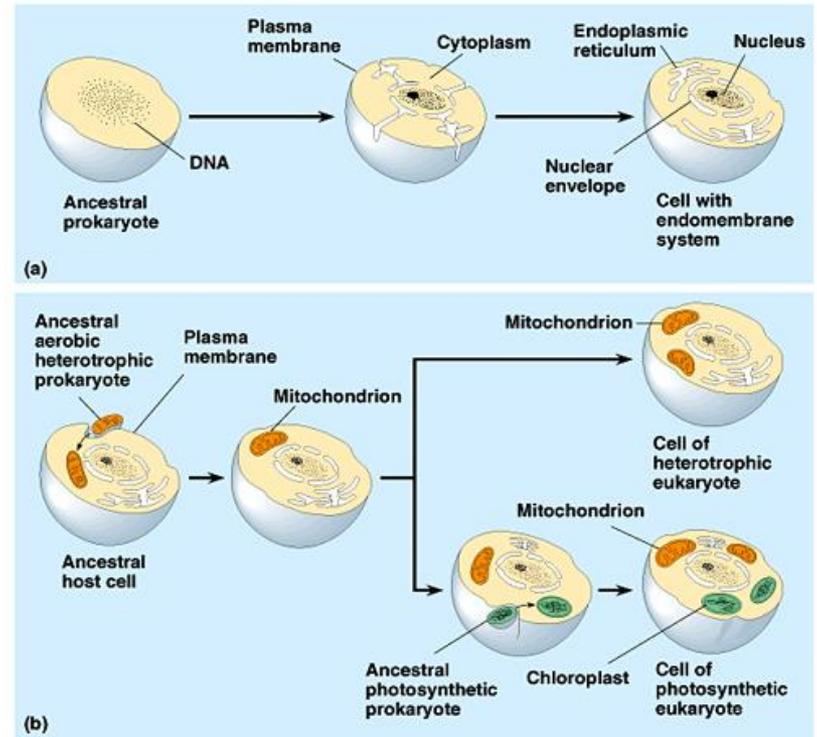
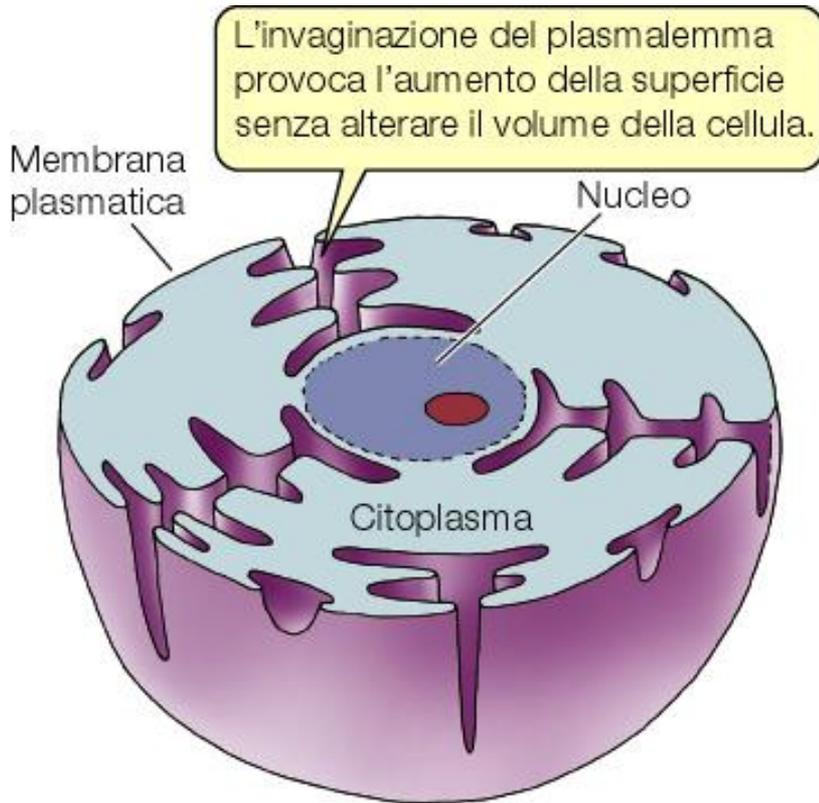
Endosimbiosi I

EVOLUZIONE DELLA CELLULA EUCARIOTICA



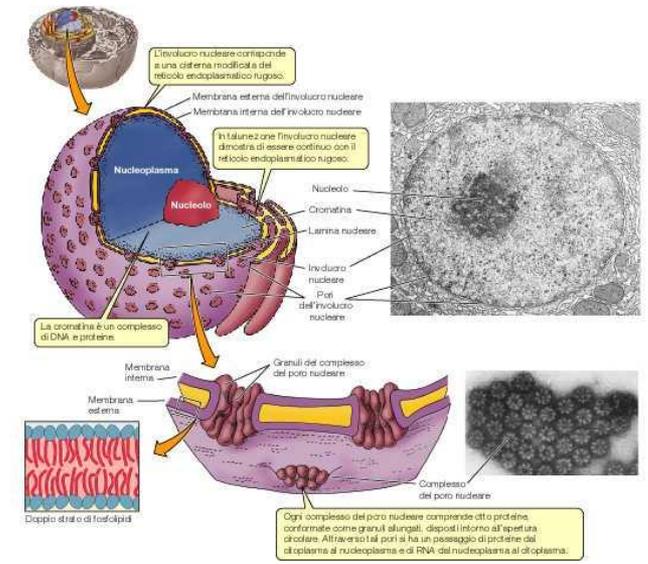
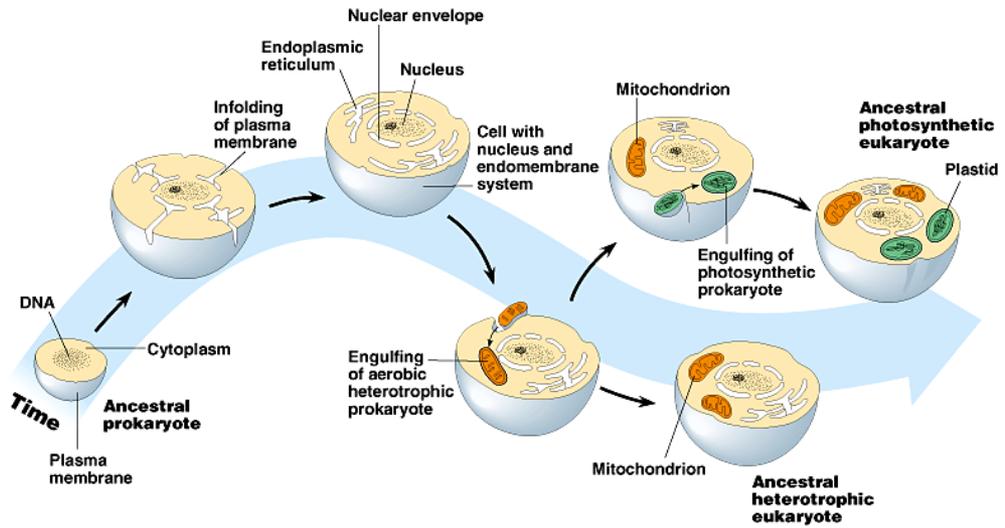
Fonti:
Sadava et al., 2014; 2019
Karp, 2010

Origine dei compartimenti cellulari

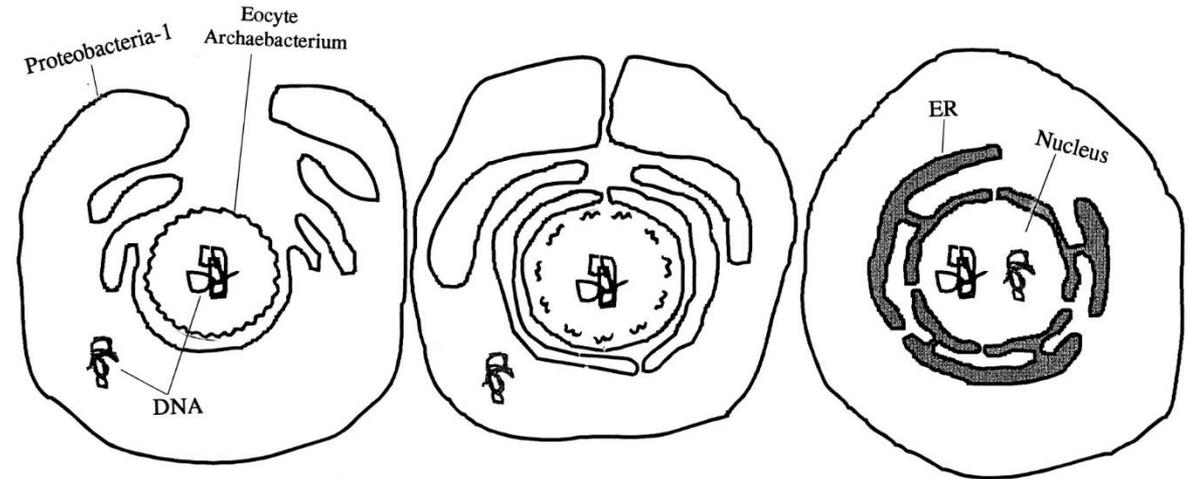


Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Origine del nucleo eucariotico

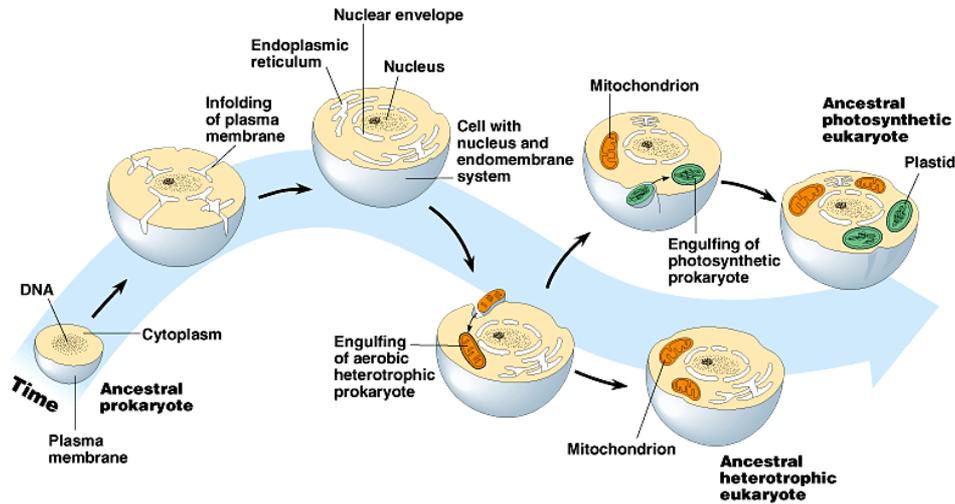
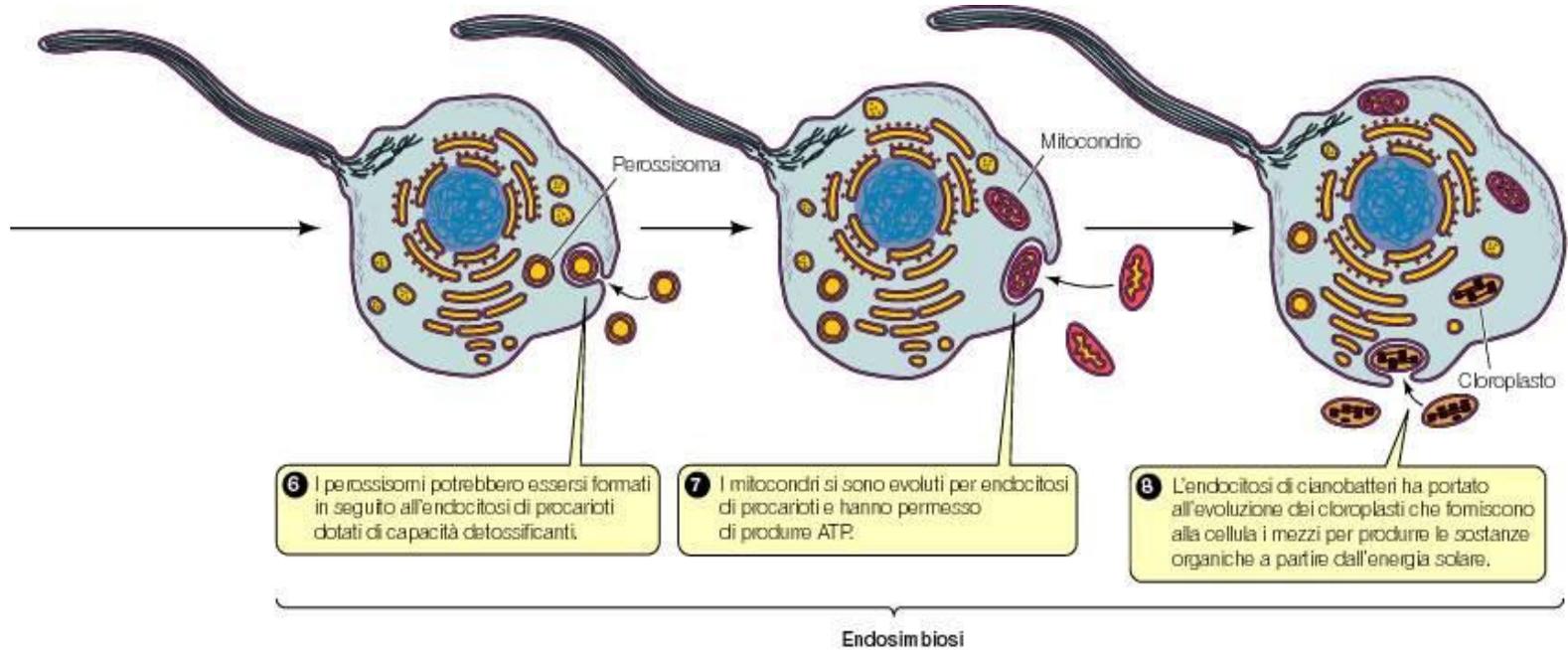


Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



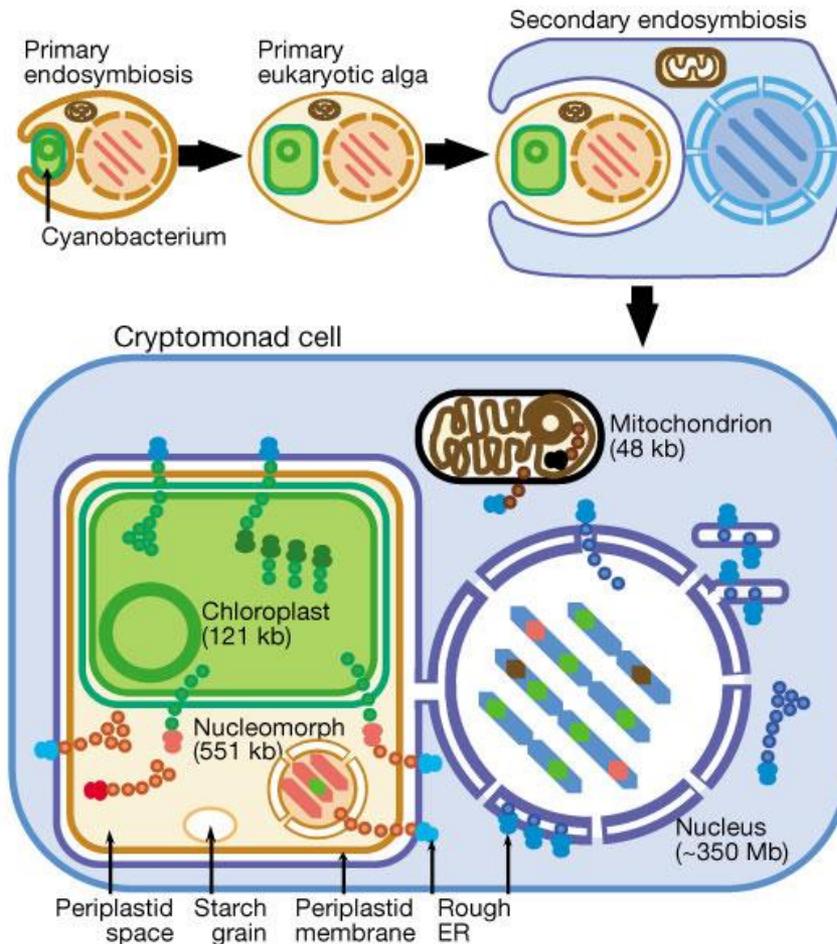
Fonti: Sadava et al., 2014; 2019
Karp, 2010

Endosimbiosi II



...ma esistono alcuni Eucarioti che sono il risultato dell'endosimbiosi di un Eucariota che ha inglobato un altro Eucariota !

Guillardia theta (Cryptomonadinae, Chromista)
un Eucariota con 4 genomi



- Genoma nucleare
- Genoma mitocondriale
- Genoma del cloroplasto
- **Nucleomorfo**

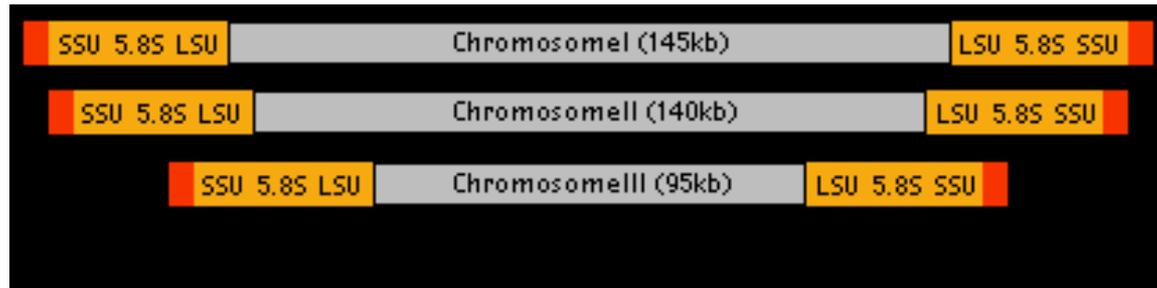
Il nucleomorfo di *G. theta* deriva da una **alga rossa**, per endosimbiosi secondaria

(→ un Eucariote che ha inglobato un altro Eucariote...)

Il nucleomorfo e l'evoluzione del genoma degli Eucarioti

- **Nucleomorfi:** piccoli nuclei eucariotici, subordinati (“enslaved”) ad altri genomi
- Sono noti **due soli gruppi di organismi contenenti nucleomorfi:** le **alghe criptomonadine** del gruppo **Chromista** (*Guillardia theta*) e i **Chlorarachniophytes** del gruppo **Rhizaria** (*Chlorarachnion* sp.); il sequenziamento del genoma ha dimostrato che il **nucleomorfo** delle **criptomonadine** deriva **dal nucleo di un'alga rossa**, mentre quello dei **Chlorarachniophytes** deriva **dal nucleo di un'alga verde**
- L'esistenza del nucleomorfo è una ulteriore prova della teoria dell'endosimbiosi, formulata nel 1967 da Lynn Margulis
- Il nucleomorfo è derivato da un iniziale evento di ingestione di un'alga verde o rossa (**eucariote fotoautotrofo**), seguito da una riduzione del genoma dell'organismo inglobato: il nucleomorfo **mantiene solo tre cromosomi** e gli altri geni sono trasferiti al nucleo della cellula ospite
- **Il risultato è un “super-eucariote” con 4 genomi:**
 - **2 genomi di tipo procariotico** (mitocondrio e **cloroplasto**)
 - **2 genomi di tipo eucariotico** (nucleo della cellula ospite e **nucleomorfo**)

Il genoma del nucleomorfo di *G. theta* (interamente sequenziato nel 2001) è **il più piccolo genoma eucariotico finora conosciuto**

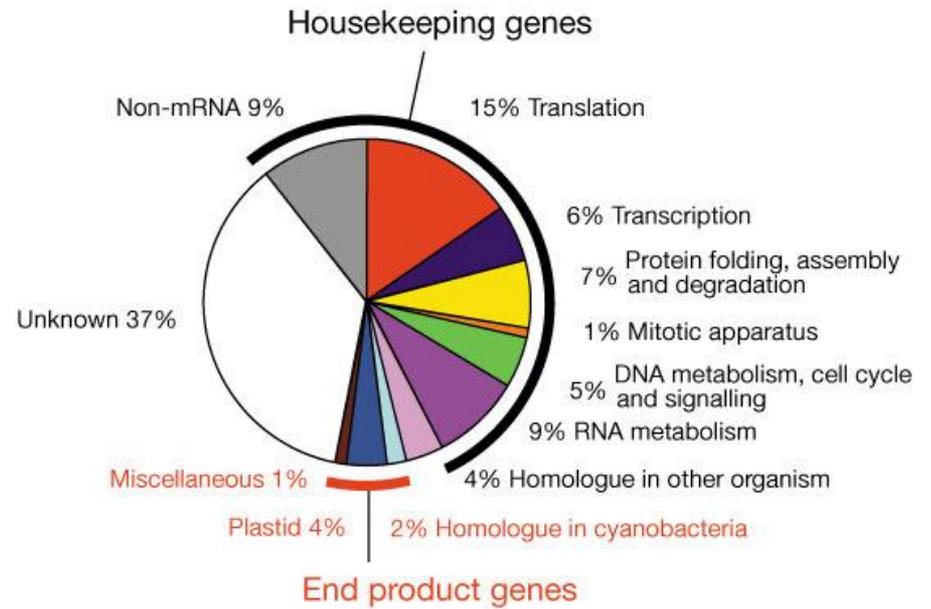
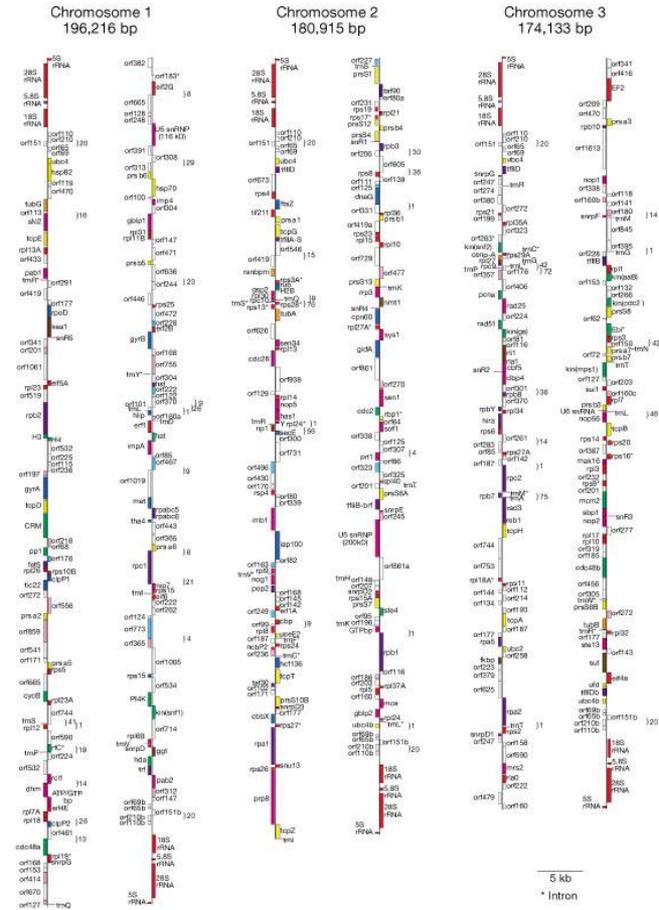


Il minuscolo e compatto genoma (551 Kb) ha **3 cromosomi lineari**, con telomeri e geni ribosomiali, codifica per **465 proteine** e ha **introni piccolissimi** (da 18 a 21 bp), più piccoli di qualsiasi altro introne (Gilson e McFadden, PNAS 93: 7737-7742, 1996)

I geni codificati sono prevalentemente “**housekeeping genes**”, cioè geni per il mantenimento dei sistemi di replicazione ed espressione

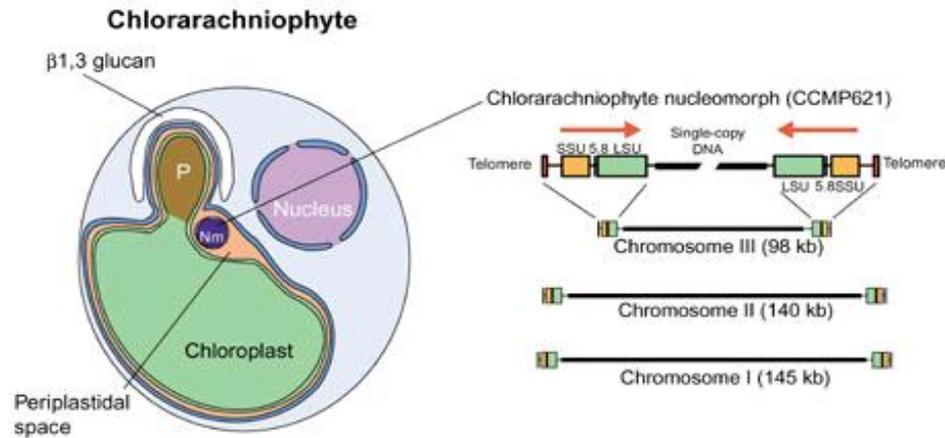
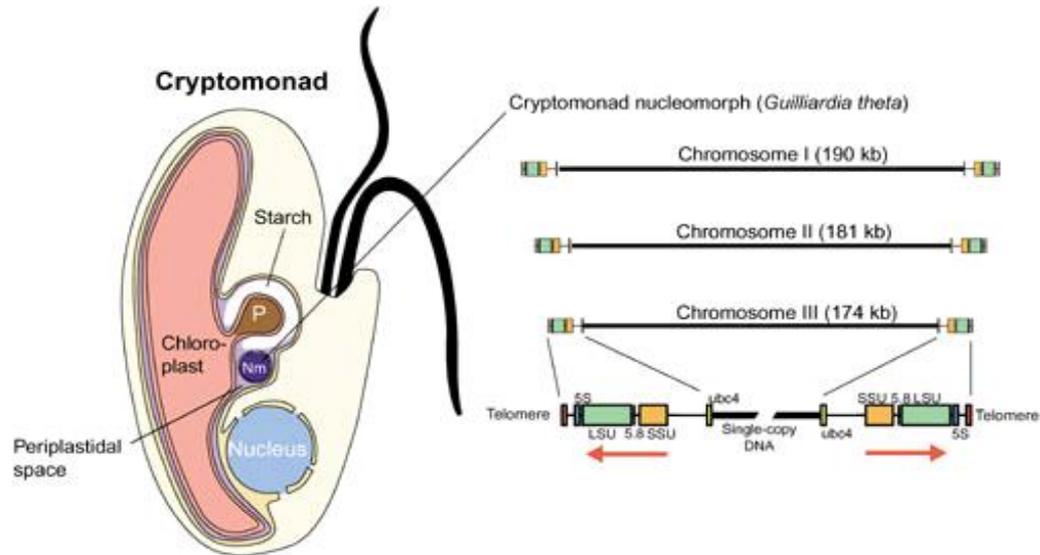
Solo alcune proteine destinate al cloroplasto sono codificate dal nucleomorfo: **la maggior parte dei geni che codificano proteine del cloroplasto è stata trasferita nel genoma nucleare dell'ospite**

Il genoma del nucleomorfo di *G. theta*



Fonti: Gilson e McFadden, 1996; Curtis et al., 2012

Nucleomorfi di *Guillardia theta* e di *Bigelowiella natans* (Chlorarchniophytes)



Genomi algali e nucleomorfi

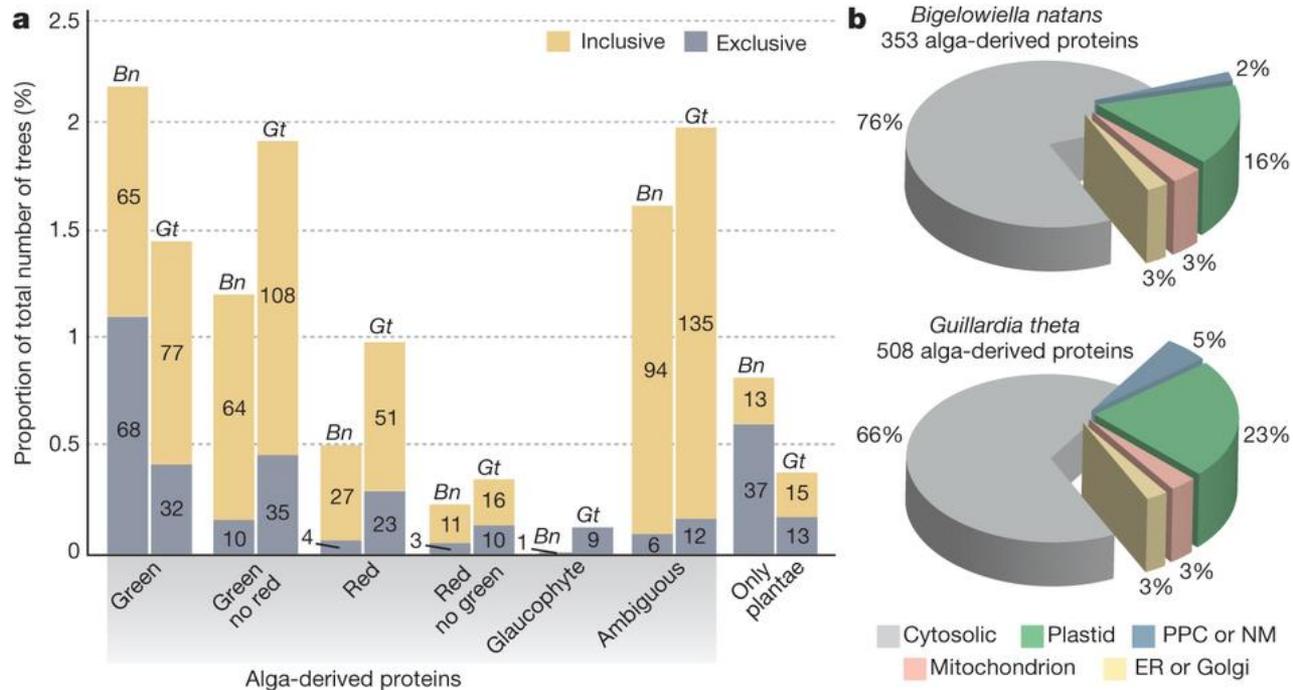
Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs

Bruce A. Curtis^{1,2,3}, Goro Tanifuji^{1,2,3}, Fabien Burki^{1,4}, Ansgar Gruber^{5,6}, Manuel Irimia⁶, Shinichiro Maruyama^{1,2,3}, Maria C. Arias⁷, Steven G. Ball⁷, Gillian H. Gilie^{2,3}, Yoshihisa Hirakawa^{1,4}, Julia F. Hopkins^{1,2,3}, Alan Kuo⁸, Stefan A. Rensing^{9,10}, Jeremy Schmutz¹⁰, Alkaterini Symeonidi⁹, Marek Elias¹¹, Robert J. M. Eveleigh^{1,2,12}, Emily K. Herman¹³, Mary J. Klute¹³, Takuro Nakayama^{1,2,3}, Miroslav Obornik^{14,15,16}, Adrian Reyes-Prieto^{1,17}, E. Virginia Armbrust¹⁸, Stephen J. Aves⁹, Robert G. Beiko²⁰, Pedro Coutinho²¹, Joel B. Dacks¹³, Dion G. Durnford¹⁷, Naomi M. Fast⁴, Beverley R. Green², Cameron J. Grisdale⁴, Franziska Hempel²², Bernard Henrissat²³, Marc P. Hoppner²³, Ken-ichiro Ishida²⁴, Eunsoo Kim²⁵, Luděk Kofeny^{14,15}, Peter G. Kroth², Yuan Liu^{1,2,26}, Shehre-Bano Malik^{1,2,4}, Uwe G. Maier²⁷, Darcy McJobse²⁷, Thomas Mock²⁸, Jonathan A. D. Nelson¹⁷, Naoko T. Onodera^{1,2,3}, Anthony M. Poole²⁹, Ellen J. Pritham³⁰, Thomas A. Richards²⁶, Gabrielle Rocap¹⁸, Scott W. Roy¹¹, Chihiro Sarai²⁴, Sarah Schaack³⁰, Shu Shirato²⁴, Claudio H. Slamovits^{1,2,3}, David F. Spencer^{1,2,3}, Shigekatsu Suzuki²⁴, Alexandra Z. Worden²⁷, Stefan Zauner²², Kerrie Barry⁸, Callum Bell³¹, Arvind K. Bharti³¹, John A. Crow³³, Jane Grimwood^{9,10}, Robin Kramer³¹, Erika Lindquist⁸, Susan Lucas³, Asaf Salamov⁸, Geoffrey I. McFadden¹⁴, Christopher E. Lane^{1,2,3,32}, Patrick J. Keeling^{1,4}, Michael W. Gray^{1,2,3}, Igor V. Grigoriev⁸ & John M. Archibald^{1,2,3}

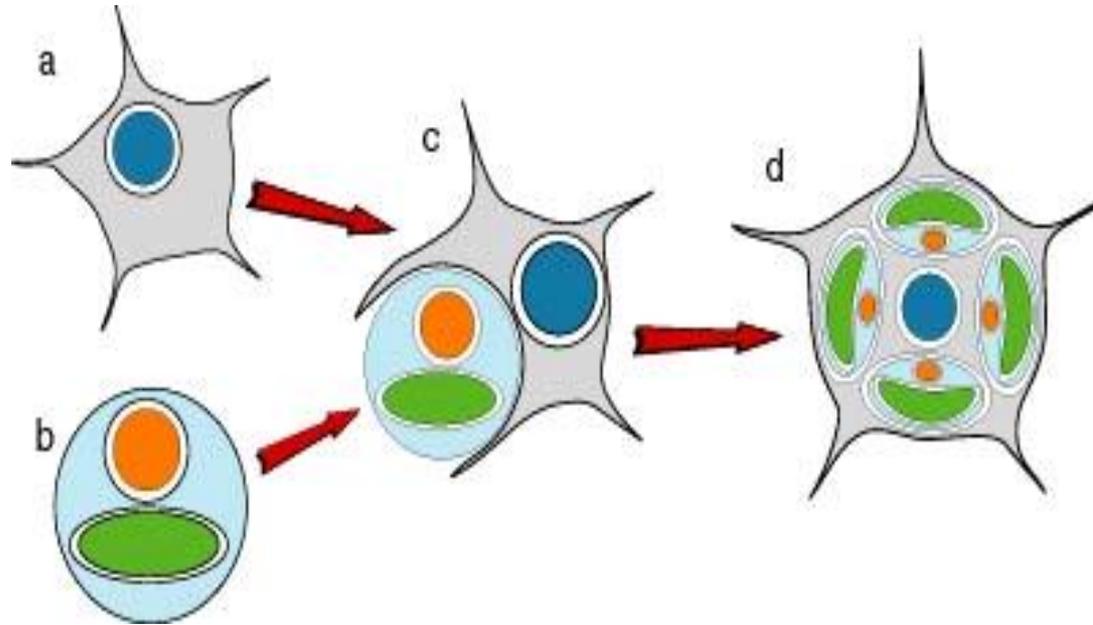
Il sequenziamento dei genomi nucleari di *G. theta* e di *B. natans* (Chlorarachniophytes) rivela un esteso mosaicism genetico e biochimico

(Curtis et al., Nature 2012)

Cryptophyte and chlorarachniophyte algae are transitional forms in the widespread secondary endosymbiotic acquisition of photosynthesis by engulfment of eukaryotic algae. Unlike most secondary plastid-bearing algae, miniaturized versions of the endosymbiont nuclei (nucleomorphs) persist in cryptophytes and chlorarachniophytes. To determine why, and to address other fundamental questions about eukaryote-eukaryote endosymbiosis, we sequenced the nuclear genomes of the cryptophyte *Guillardia theta* and the chlorarachniophyte *Bigelowiella natans*. Both genomes have >21,000 protein genes and are intron rich, and *B. natans* exhibits unprecedented alternative splicing for a single-celled organism. Phylogenomic analyses and subcellular targeting predictions reveal extensive genetic and biochemical mosaicism, with both host- and endosymbiont-derived genes servicing the mitochondrion, the host cell cytosol, the plastid and the remnant endosymbiont cytosol of both algae. Mitochondrion-to-nucleus gene transfer still occurs in both organisms but plastid-to-nucleus and nucleomorph-to-nucleus transfers do not, which explains why a small residue of essential genes remains locked in each nucleomorph.

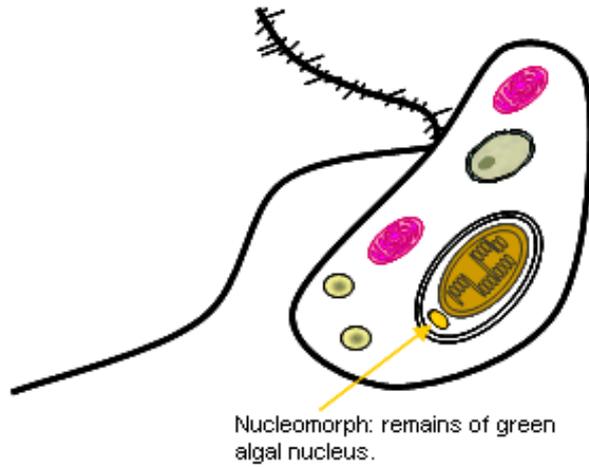


Il nucleomorfo di *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophytes) deriva da una **alga verde**

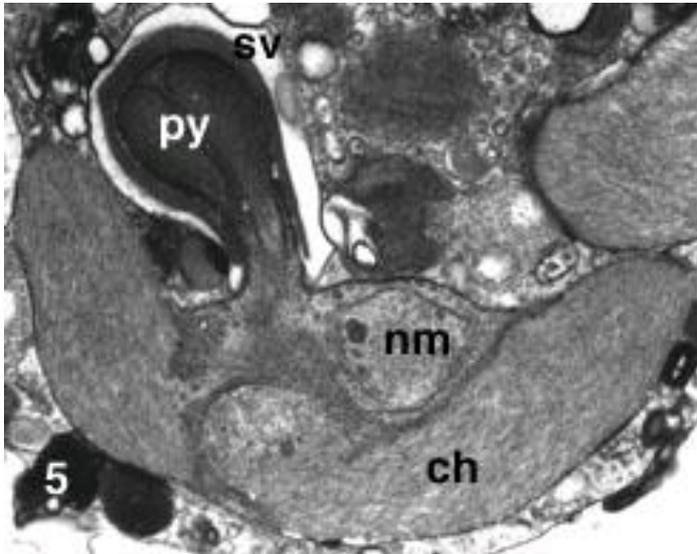


Acquisizione del cloroplasto e del nucleomorfo per endosimbiosi secondaria in *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophytes)

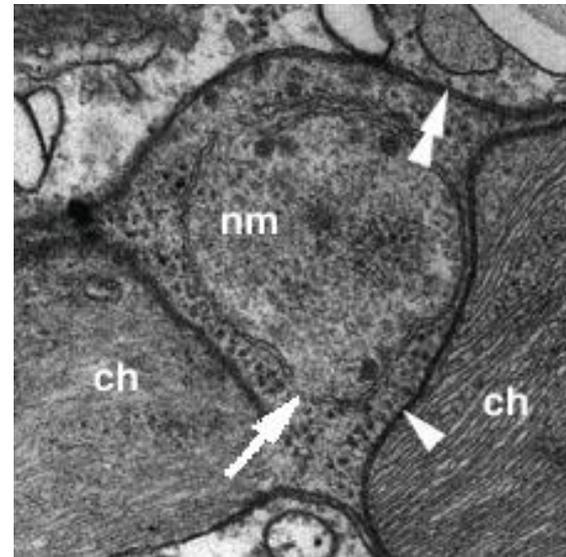
- a) Eucariota ameboflagellato
- b) **Alga verde eucariotica con nucleo e cloroplasto**
- c) Fagocitosi **dell'alga verde** da parte dell'ospite ameboflagellato
- d) Attuale cellula di *Chlorarachnion*, con **plastidi verdi** avvolti da una membrana e con accanto **un nucleomorfo ciascuno**



Nucleomorfi di Chlorarachniophytes

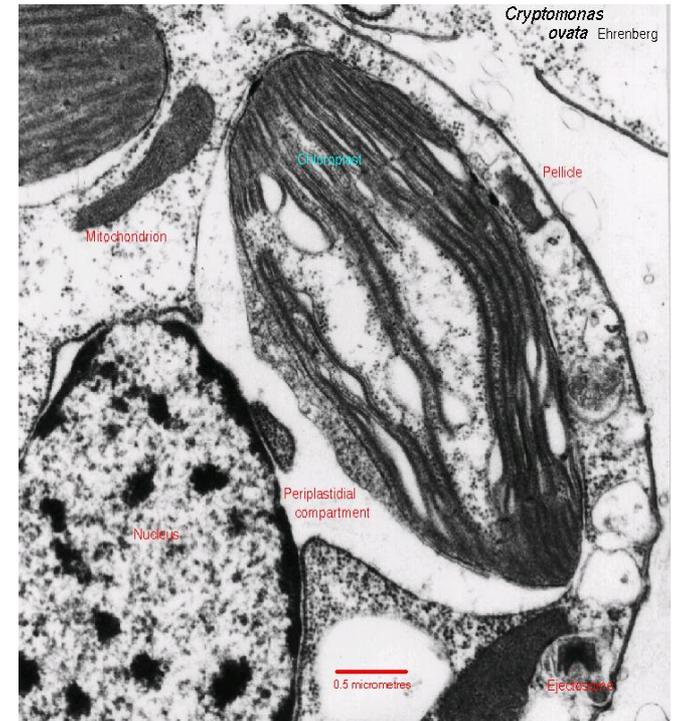
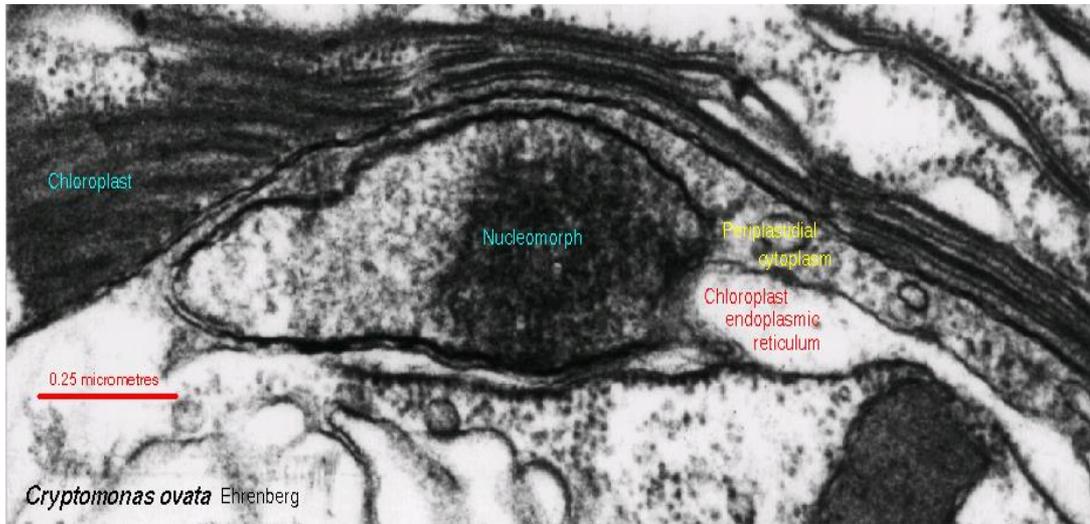


Lotharella amoebiformis



Chlorarachnion reptans

Nucleomorfo di *Cryptomonas ovata* (Cryptomonadinae)

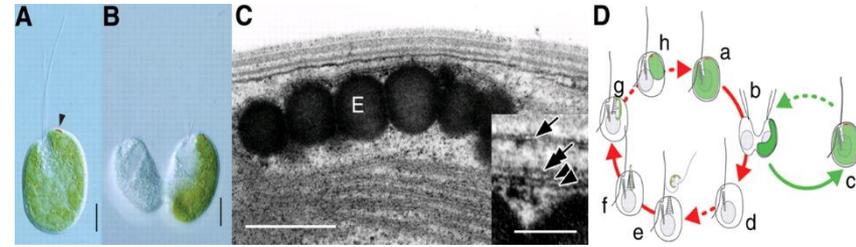


Cryptomonas possiede un unico mitocondrio

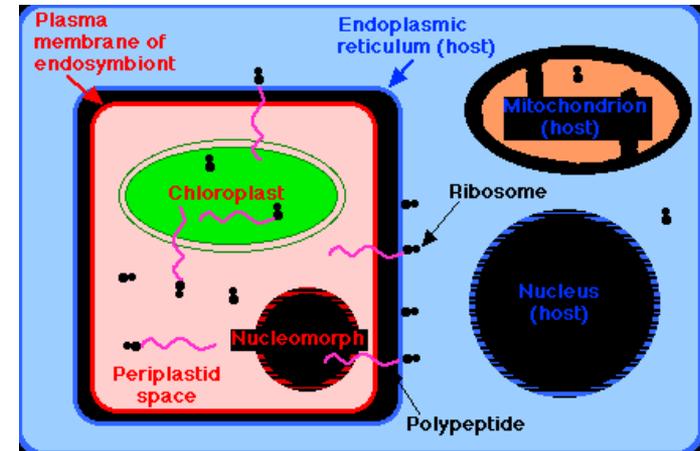
Fonte: Curtis et al., 2012

L'endosimbiosi secondaria avviene anche oggi, sotto il "naso" (cioè "sotto gli occhi") dei ricercatori...

- Due scienziati giapponesi hanno scoperto un **flagellato eterotrofo** (*Hatena arenicola*) che **ingloba abitualmente** una **alga verde unicellulare a vita libera** (*Nephroselmis* sp.) (Okamoto e Inouye, Science 310: 287, 2005)
- Una volta all'interno dell'ospite, **l'alga verde perde il proprio citoscheletro** e l'ospite **perde** la propria **capacità di nutrirsi per ingestione**
- L'ospite **modifica il proprio metabolismo da eterotrofo ad autotrofo** (acquisisce la fotosintesi) e sviluppa la capacità di movimento per **fototassi**
- Quando l'ospite si divide per mitosi, **solo una delle due cellule figlie eredita il plastidio**
- **L'altra cellula rigenera l'apparato di nutrizione eterotrofa** e si prepara ad inglobare un'altra alga



Hatena arenicola + *Nephroselmis* sp.



Fonte: Okamoto e Inouye, 2005

Lo studio delle forme di vita riserva sempre **tante sorprese...**

Hatena arenicola e il suo endosimbionte secondario (*Nephroselmis* sp.)

408 N. Okamoto and I. Inoué

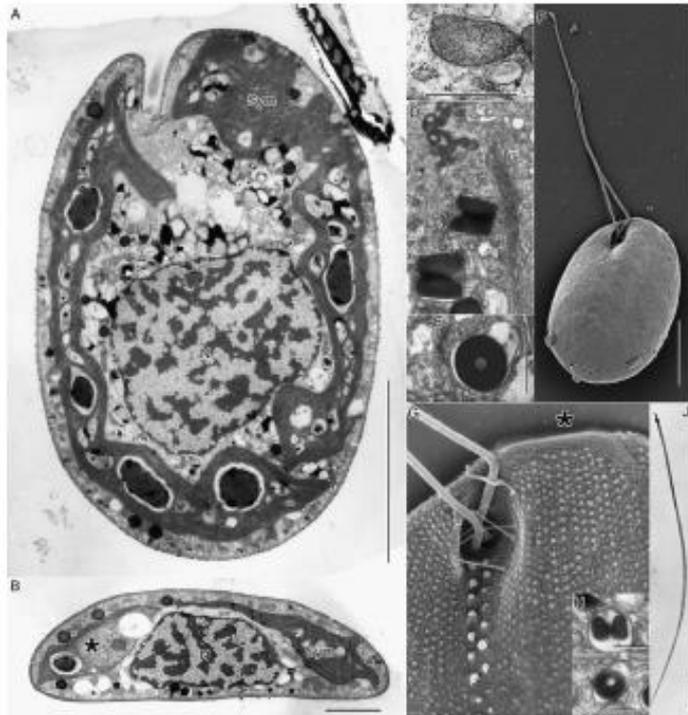


Figure 6. Ultrastructure of *Hatena arenicola*. A. A longitudinal section of a *Hatena arenicola* cell showing a nucleus (N). Most of the nuclear content is condensed. The rest of the cytoplasm is occupied by the symbiont (Sym). The symbiont has a large plastid region with multiple pyrenoids. B. A transverse section of *Hatena arenicola* showing host nucleus (N) and the symbiont (Sym) with the vestigial cytoplasm (asterisk). C. Mitochondrial profiles showing tubular cristae. D. A Golgi body near the flagellar basal bodies (arrows) and Type I ejectisomes sensu Vera 1992 (nearly longitudinal view). E. A transverse section of a Type I ejectisome sensu Vera 1992. F. SEM image of *Hatena arenicola* showing Type I ejectisomes near the flagellar insertion as well as smaller ejectisomes (Type II ejectisomes sensu Vera 1992) regularly arrayed over the cell surface. G. Magnified SEM image of the same cell. Note that the apical region of the cell (asterisk) lacks ejectisomes. H. A longitudinal section of Type II ejectisome. I. A transverse section of Type II ejectisome. J. A whole mount TEM image of a discharged type II ejectisome. The scale bar is 10 µm in A, E; 2 µm in B, G; 50 nm in C; 500 nm in D, F; 1 µm in I; 200 nm in H, L.

Fonte:

Okamoto e Inoué, Protist 157: 401-409, 2006

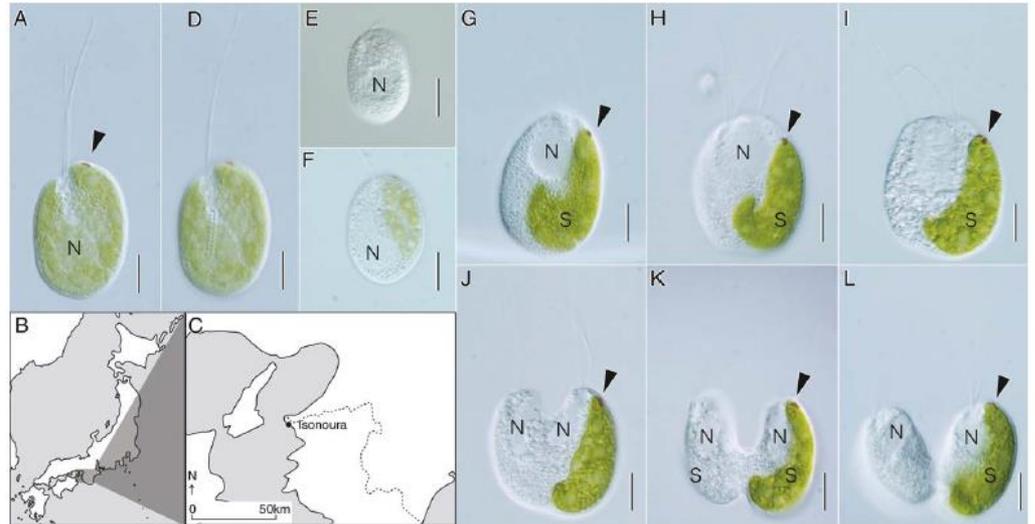


Figure 1. *Hatena arenicola* gen. et sp. nov. A. Ventral view of a symbiont-bearing cell showing two flagella and an eyespot of the symbiont (arrowhead). B, C. Sampling site. D. The same cell in a different focal plane, showing two rows of conspicuous Type I ejectisomes. E. A cell lacking the symbiont. F. A cell with an "immature" symbiont. G-L. Cell division in *Hatena arenicola*, where the arrowhead indicates an eyespot of the symbiont. Each panel shows a different individual at a different stage in cell division. N: nucleus. S: Symbiont. The scale bar is 10 µm in A, D-L.

Hatena arenicola: Halfway to a Plant? 405

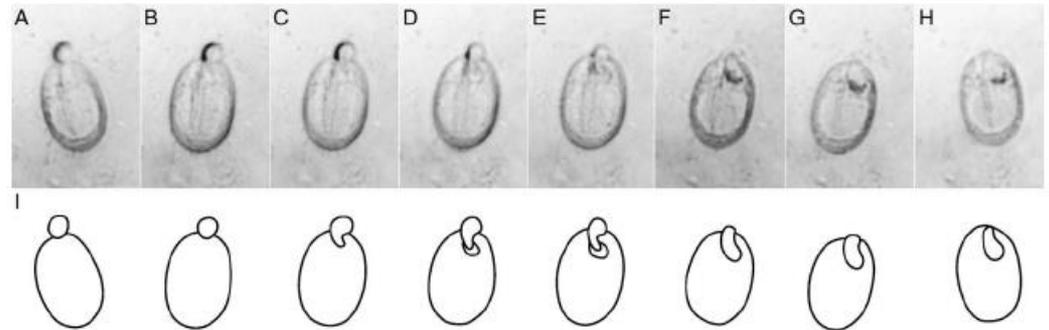


Figure 4. Uptake of *Nephroselmis* (NIES1417) by *Hatena arenicola*. A-H were taken at 6-s intervals. I: corresponds to *Hatena arenicola* and the symbiont of each frame.