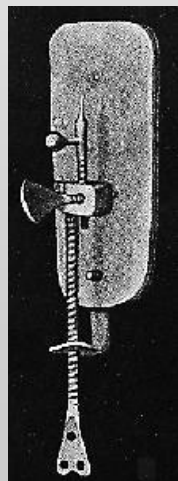
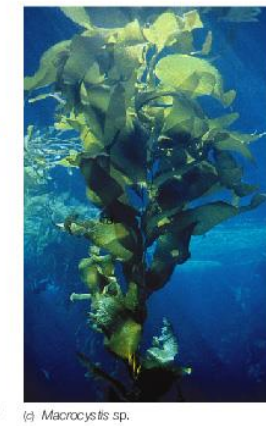
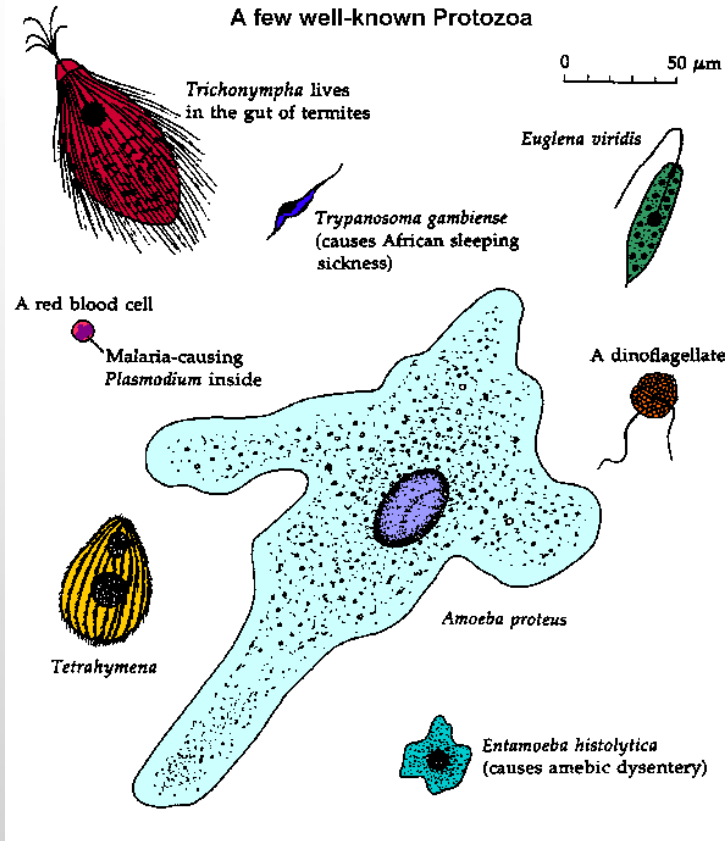


I Protisti, Eucarioti unicellulari (con qualche eccezione: alcune specie sono coloniali)



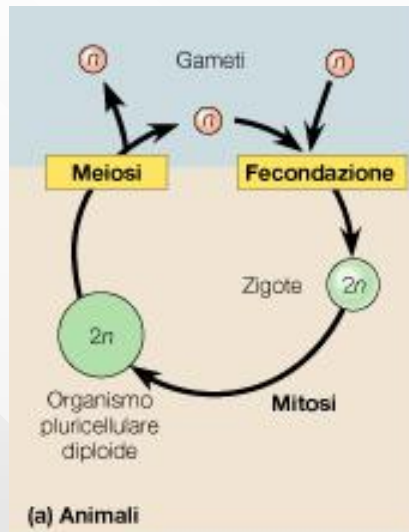
Google-Doodle dedicato ad Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723), costruttore di microscopi e scopritore dei Protisti



I tre tipi fondamentali di ciclo biologico negli Eucarioti

**Diplonti
(Animali)**

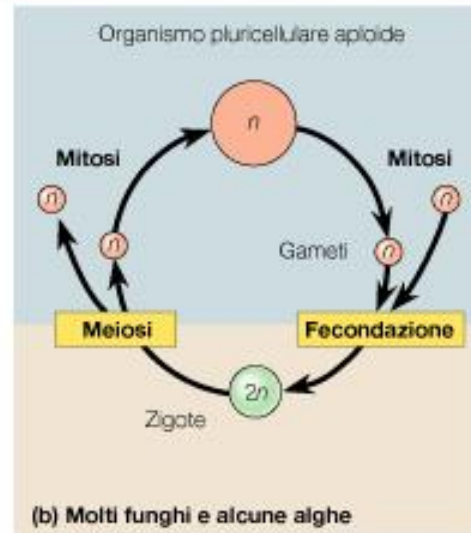
Meiosi gametica



Aplonti

(Protisti e Funghi)

Meiosi zigotica

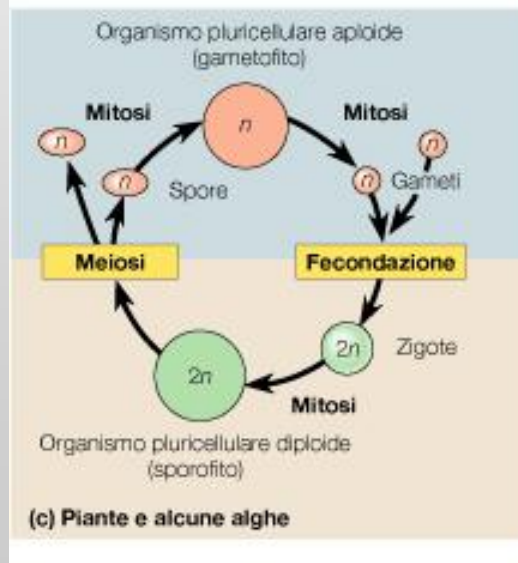


Aplodiplonti

**con alternanza di
generazione**

(Piante)

Meiosi intermedia

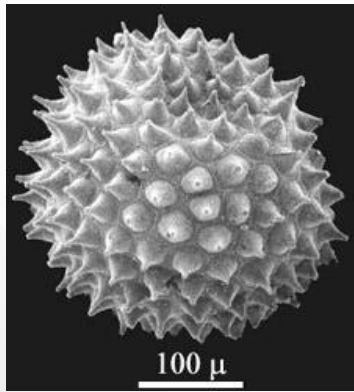


Negli Eucarioti la divisione cellulare avviene per mitosi: da una cellula diploide ($2n$) si formano altre due cellule diploidi ($2n$)

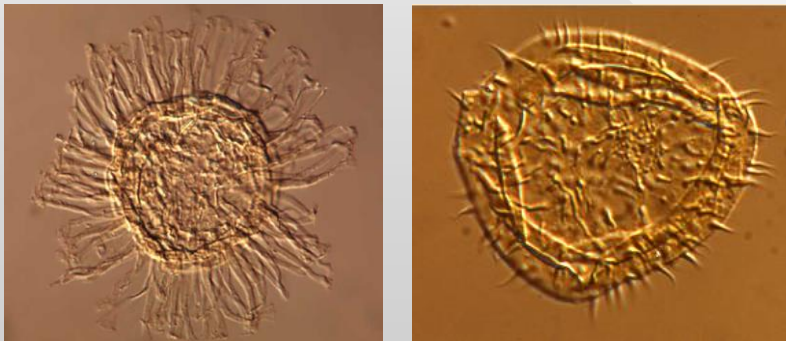
La riproduzione sessuata avviene invece tramite meiosi, che forma gameti aploidi (n), destinati ad unirsi per formare una nuova cellula diploide ($2n$), detta “zigote”

■ Aploide
■ Diploide

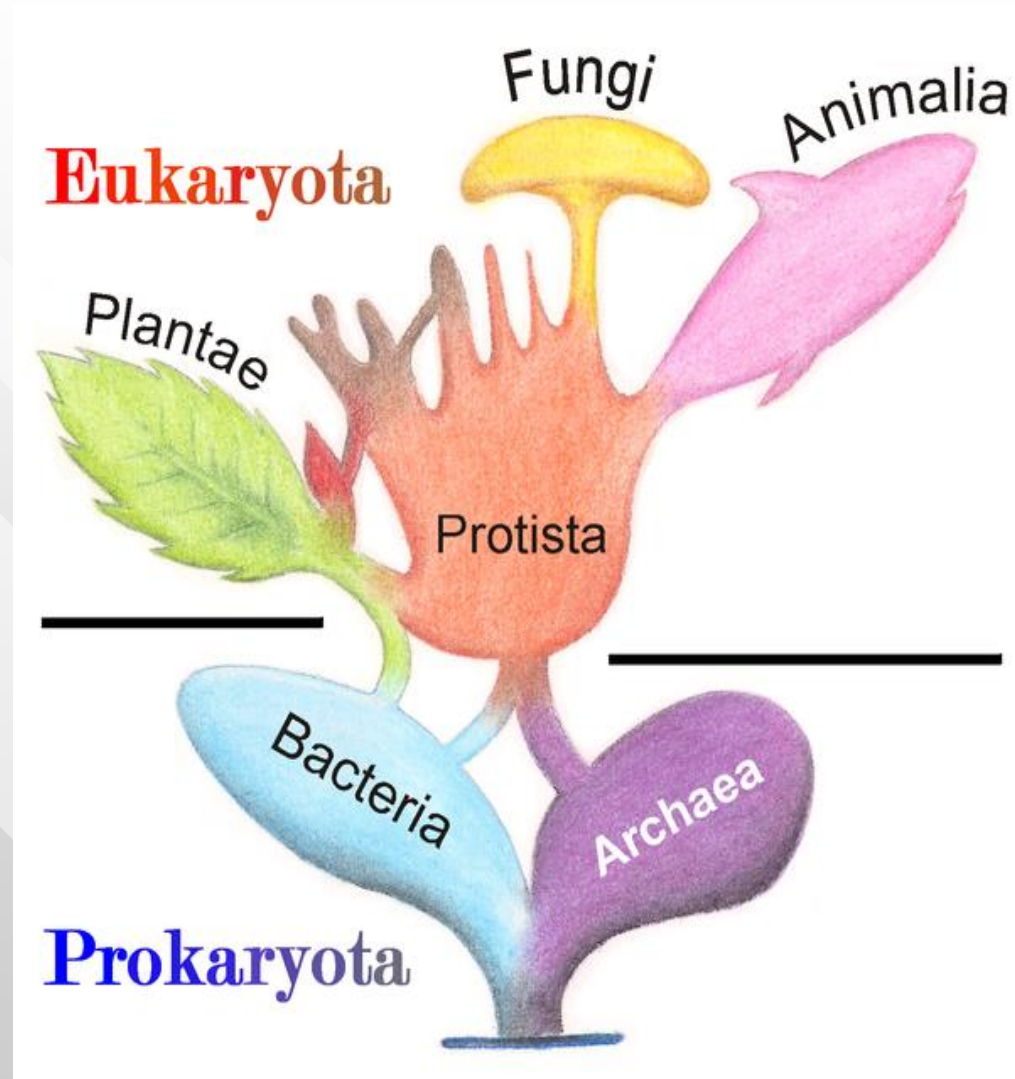
I Protista, primi eucarioti ed unicellulari di fondamentale importanza evolutiva, hanno avuto origine da **complesse interazioni tra batteri, archaea e cellule eucariotiche primitive** dopo la glaciazione globale del Criogeniano (“Snowball Earth”, 800 milioni di anni fa)



Fossile di un “acritarco” spinoso (probabilmente un’alga) appartenente alla fauna di Ediacara (formazione Doushantuo, 600 milioni di anni fa)



Skiagia e *Globosphaeridium*, protisti primitivi (“acritarchi”) del Cambriano (550 milioni di anni fa)



Fonte:

http://www.fossilmuseum.net/Fossil_Sites/doushantuo.htm

I Protisti sono un Regno eterogeneo, di classificazione molto difficile e tuttora discussa

Suddivisione “tradizionale” dei Protisti

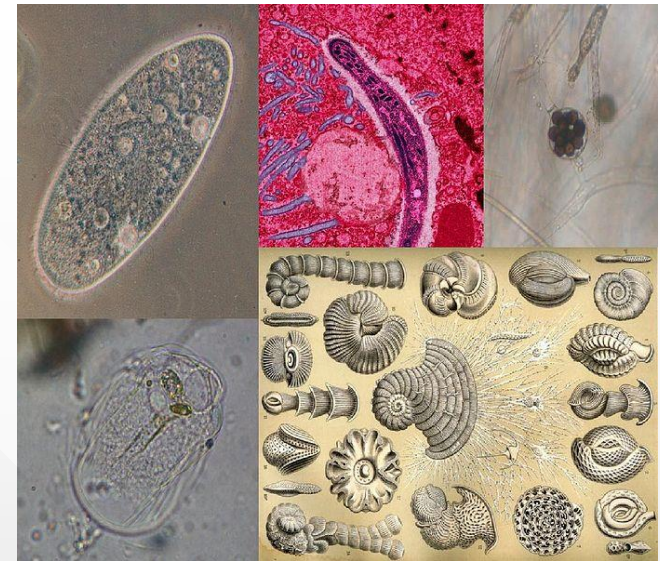
Fonti: Sadava et al., 2014; 2019

Protist Kingdom		Kingdom Protista
Phylum	Some characteristics	Examples
Euglenophyta (euglenoids)	one-celled make or take in food most have one flagellum	<i>Euglena</i> <i>Phacus</i>
Chrysophyta (golden algae)	most are one-celled make own food yellow-brown color	<i>Synedra</i> <i>Diatoma</i>
Pyrrophyta (dinoflagellates)	one-celled take in food have two flagella	<i>Gonyaulax</i> <i>Peridinium</i>
Sarcodina (sarcodines)	one-celled take in food have pseudopods	<i>Amoeba</i> <i>Globigerina</i>
Ciliophora (ciliates)	one-celled take in food have cilia	<i>Paramecium</i> <i>Didinium</i> <i>Vorticella</i>
Mastigophora (flagellates)	one-celled take in food have two or more flagella	<i>Trypanosoma</i> <i>Trichomonas</i>
Sporozoa (sporozoans)	one-celled take in food no means of movement	<i>Plasmodium</i> <i>Gregarina</i>
Myxomycetes (slime molds)	many- or one-celled absorb food change form during life cycle	<i>Dictyostelium</i> <i>Physarum</i>

Protista:

classificazione attuale (in continuo adattamento)

- **Excavata** (Mastigophora, Euglenophyta)
- **Rizaria** (Foraminifera, Radiolaria)
- **Stramenopila** (Diatomee)
- **Alveolata** (Dinoflagellates, Apicomplexa, Ciliata)
- **Amebozoa** (Lobosa, Thecata, Myxomycetes)
- **Opisthokonta** (Choanoflagellates)



Phylum **Excavata** (Mastigophora)



Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyceae, Volvocales)

organismo modello per i Protisti fotosintetici

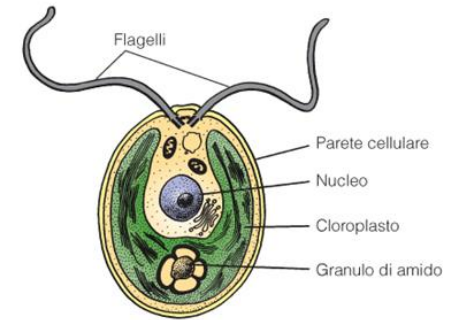
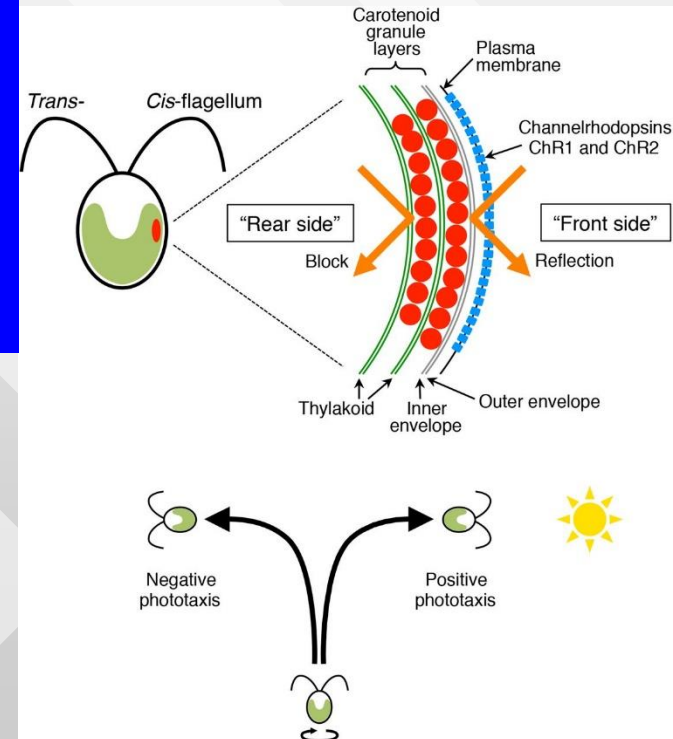
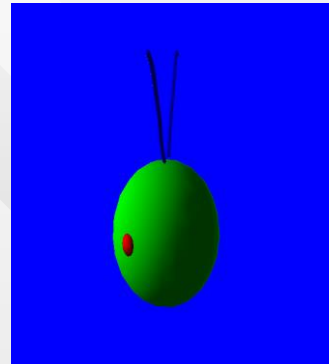
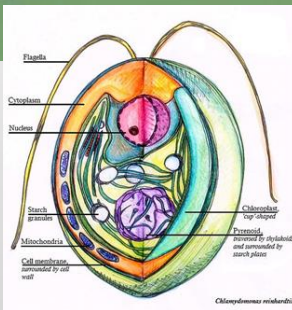
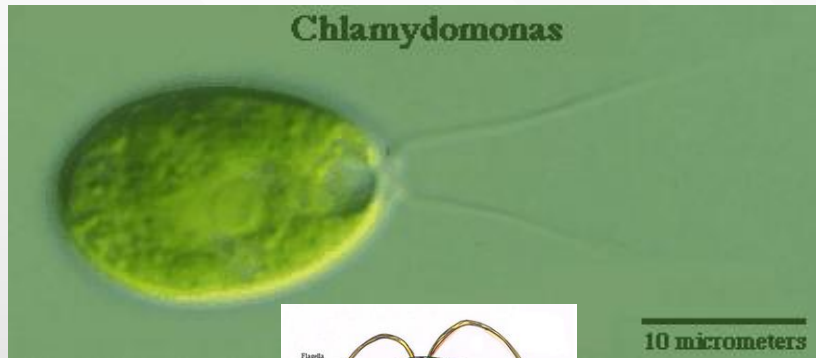


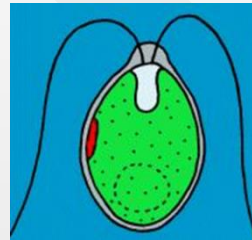
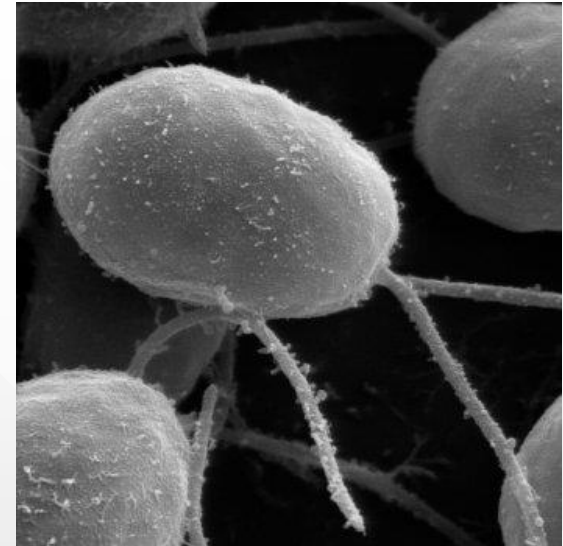
FIGURA 24-1 Chlamydomonas, un protista unicellulare. Chlamydomonas è un organismo mobile dotato di due flagelli ed un unico cloroplasto a forma di calice.



Eucariota unicellulare fotosintetico di acqua dolce, con un **unico grande cloroplasto**, due flagelli e una regione fotosensibile con carotenoidi (“**macchia oculare**”) che guida il movimento del protista verso la luce

Chlamydomonas reinhardtii

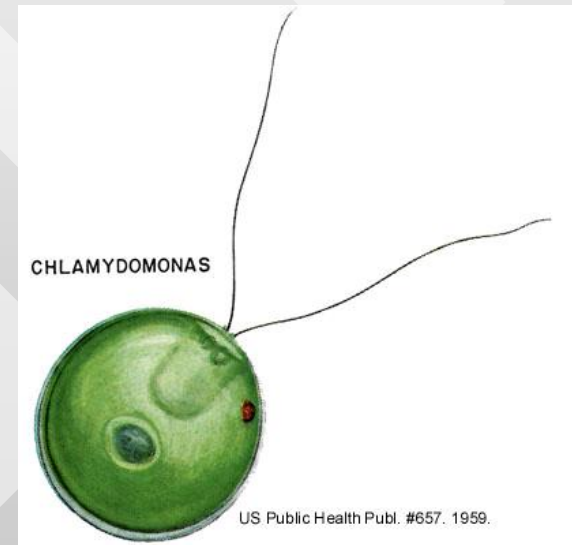
- Chiamata confidenzialmente “Chlamy”, è un **organismo modello** per lo studio della **motilità flagellare**, **fotosintesi**, **fototassi** e **proteoma flagellare**
- Genoma a 17 cromosomi, completato nel 2007 (Merchant et al., Science 318, 245-251)



Banche dati dedicate a *C. reinhardtii*

Chlamy Connection
<http://www.chlamy.org/>

Phytozome
<http://www.phytozome.net/chlamy>



Ciclo biologico e rigenerazione flagellare in *C. reinhardtii*

C. reinhardtii ha un tipico ciclo biologico da aplonte, con meiosi zigotica

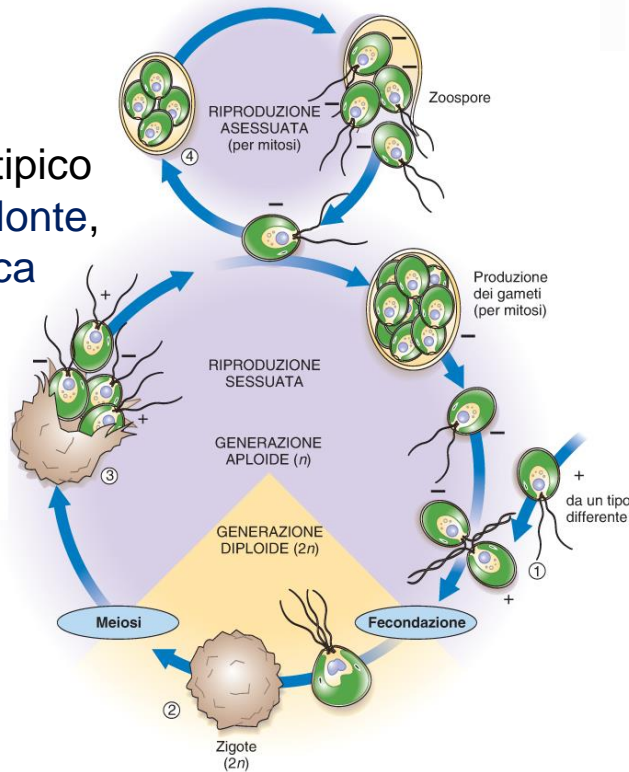
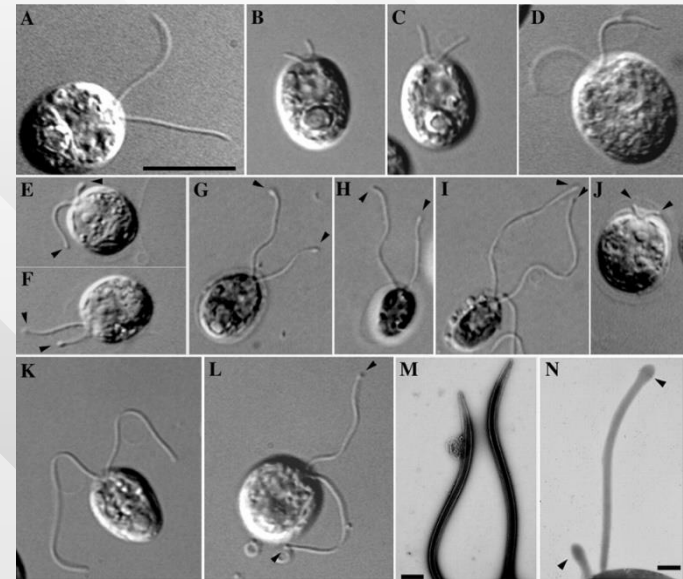
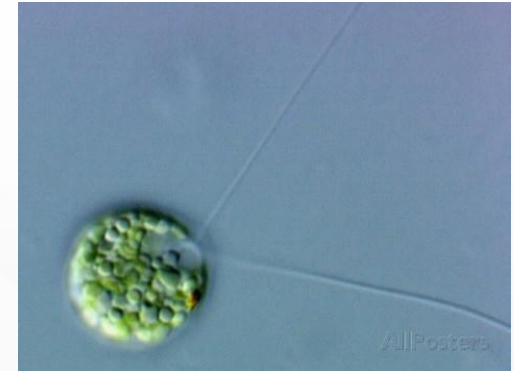
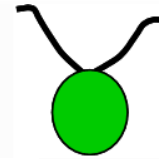


FIGURA 24-19 Il ciclo vitale di *Chlamydomonas* sp.

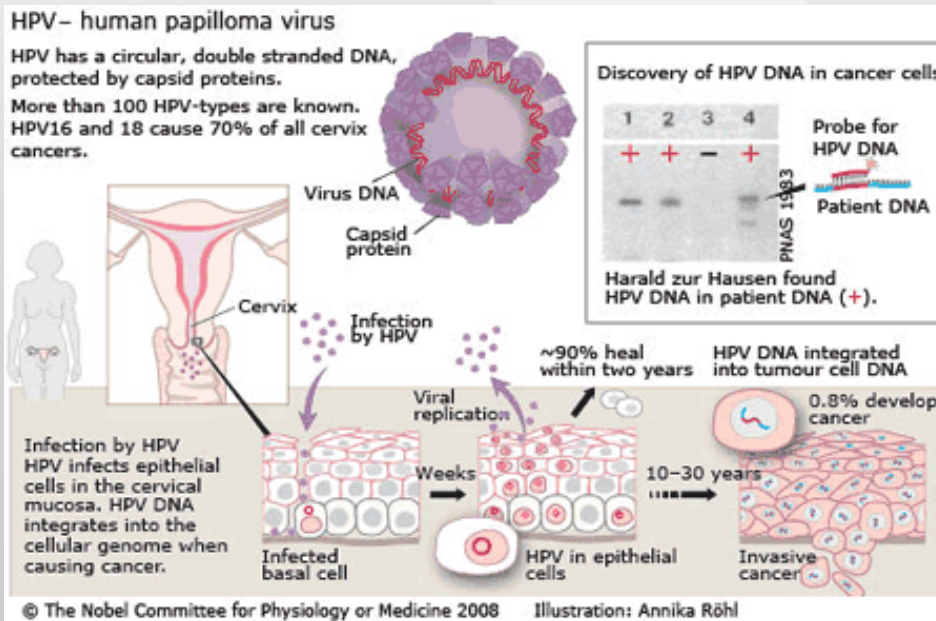
Chlamydomonas, un'alga verde aploide con due tipi di coniuganti, (+) e (-), è un esempio di riproduzione sessuata isogama. ① Durante la riproduzione sessuata, un gamete (+) si fonde con un gamete (-), formando uno zigote diploide. ② Quando avviene la meiosi, ③ si formano quattro cellule aploidi, due (+) e due (-). ④ Entrambi i tipi si riproducono asessualmente per mitosi; nel disegno è mostrato solo il tipo (-).



Se *C. reinhardtii* perde uno dei due flagelli, la capacità di movimento è compromessa: la cellula allora **riassorbe l'altro flagello** e li fa **ricrescere entrambi in modo sincrono**

“Molecular biopharming” (produzione di vaccini e molecole antitumorali) in *C. reinhardtii*

- Un gruppo di ricerca italiano ha proposto di usare *C. reinhardtii* come **sistema economico di espressione** per il gene codificante l'oncoproteina **E7 del virus del papilloma umano**, HPV (Demurtas et al., PLoS 2013)
- Il gene è inserito nel cloroplasto e la proteina è prodotta in forma solubile
- L'oncoproteina E7 è un antigene fondamentale per lo sviluppo di un vaccino antitumorale contro HPV



OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

A *Chlamydomonas*-Derived Human Papillomavirus 16 E7 Vaccine Induces Specific Tumor Protection

Olivia C. Demurtas^{1,2}, Silvia Massa¹, Paola Ferrante¹, Aldo Venuti³, Rosella Franconi^{1*}, Giovanni Giuliano^{1*}

1 ENEA, Italian National Agency for New Technologies, Energy and Sustainable Economic Development, Casaccia Research Center, Rome, Italy, **2** Ylichron S.r.l., ENEA Casaccia Research Center, Rome, Italy, **3** Laboratory of Virology, Regina Elena National Cancer Institute, Rome, Italy

Abstract

Background: The E7 protein of the Human Papillomavirus (HPV) type 16, being involved in malignant cellular transformation, represents a key antigen for developing therapeutic vaccines against HPV-related lesions and cancers. Recombinant production of this vaccine antigen in an active form and in compliance with good manufacturing practices (GMP) plays a crucial role for developing effective vaccines. E7-based therapeutic vaccines produced in plants have been shown to be active in tumor regression and protection in pre-clinical models. However, some drawbacks of in whole-plant vaccine production encouraged us to explore the production of the E7-based therapeutic vaccine in *Chlamydomonas reinhardtii*, an organism easy to grow and transform and fully amenable to GMP guidelines.

Methodology/Principal Findings: An expression cassette encoding E7GGG, a mutated, attenuated form of the E7 oncoprotein, alone or as a fusion with affinity tags (His6 or FLAG), under the control of the *C. reinhardtii* chloroplast *psbD* 5' UTR and the *psbA* 3' UTR, was introduced into the *C. reinhardtii* chloroplast genome by homologous recombination. The protein was mostly soluble and reached 0.12% of total soluble proteins. Affinity purification was optimized and performed for both tagged forms. Induction of specific anti-E7 IgGs and E7-specific T-cell proliferation were detected in C57BL/6 mice vaccinated with total *Chlamydomonas* extract and with affinity-purified protein. High levels of tumor protection were achieved after challenge with a tumor cell line expressing the E7 protein.

Conclusions: The *C. reinhardtii* chloroplast is a suitable expression system for the production of the E7GGG protein, in a soluble, immunogenic form. The production in contained and sterile conditions highlights the potential of microalgae as alternative platforms for the production of vaccines for human uses.

Citation: Demurtas OC, Massa S, Ferrante P, Venuti A, Franconi R, et al. (2013) A *Chlamydomonas*-Derived Human Papillomavirus 16 E7 Vaccine Induces Specific Tumor Protection. PLoS ONE 8(4): e61473. doi:10.1371/journal.pone.0061473

Editor: Wei Ning Chen, Nanyang Technological University, Singapore

Received: November 19, 2012; **Accepted:** March 11, 2013; **Published:** April 23, 2013

Copyright: © 2013 Demurtas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

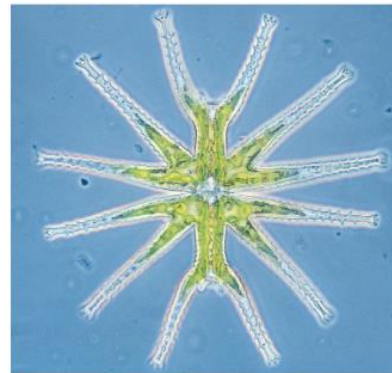
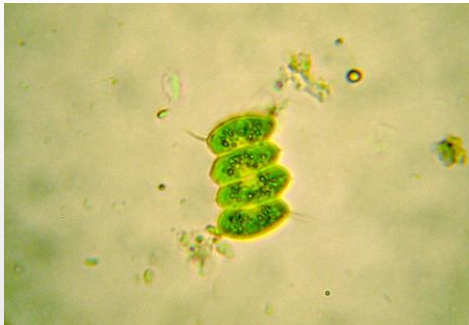
Funding: Work funded by the Italian Ministry of Agriculture (Project Hydrobio), by RILAS SpA and by AIRC (IG 12916). The funding bodies did not have any role in design, or interpretation of experiments or writing of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

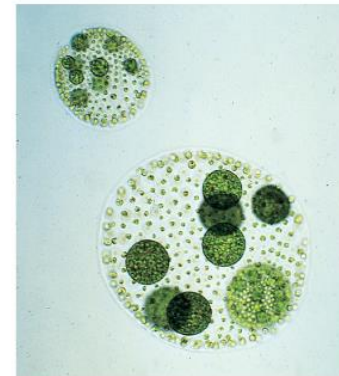
* E-mail: rosella.franconi@enea.it (RF); giovanni.giuliano@enea.it (GG)

Fonte: Demurtas et al., PLoS ONE 8: e61473, 2013

Le alghe verdi (*Chlorophyceae*), alcune unicellulari ed altre coloniali, sono classificate spesso come Protisti



(a) 25 µm



(b) 100 µm

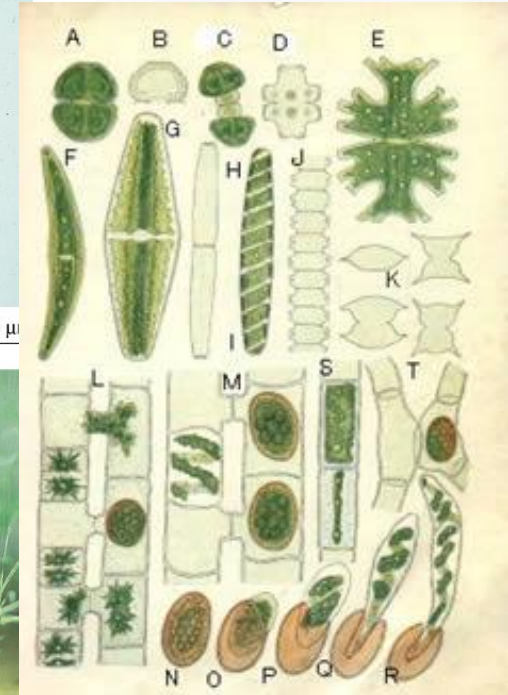


FIGURA 24-18 Le alghe verdi.

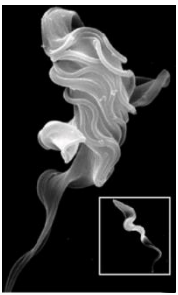
(a) MO di un'alga verde unicellulare (*Miracisterias* sp.), con due metà speculari. Quest'alga è ampiamente distribuita. (b) MO di due colonie di *Volvox*, ognuna composta da più di 50000 cellule. All'interno delle colonie parentali, si possono osservare nuove colonie che possono essere rilasciate per rottura delle parentali. (c) La tipica organizzazione in sottilissime foglie ha conferito ad *Ulva* sp. il nome comune di "lattuga di mare". *Ulva* può raggiungere dimensioni di 30 cm. (d) *Chara* sp., un'alga verde, è strettamente correlata alle piante. *Chara* è ampiamente distribuita nelle acque dolci, dove cresce fino ad altezze di 30 cm o più.



(c)



(d)



Phylum **Excavata**

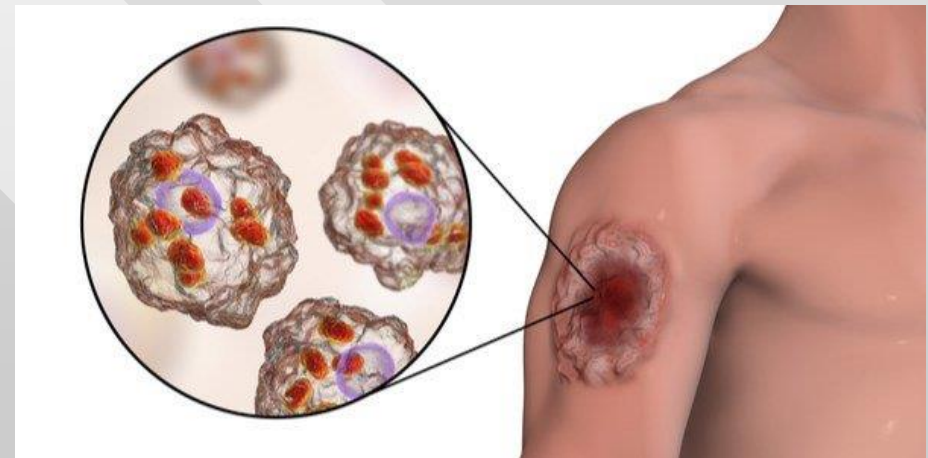
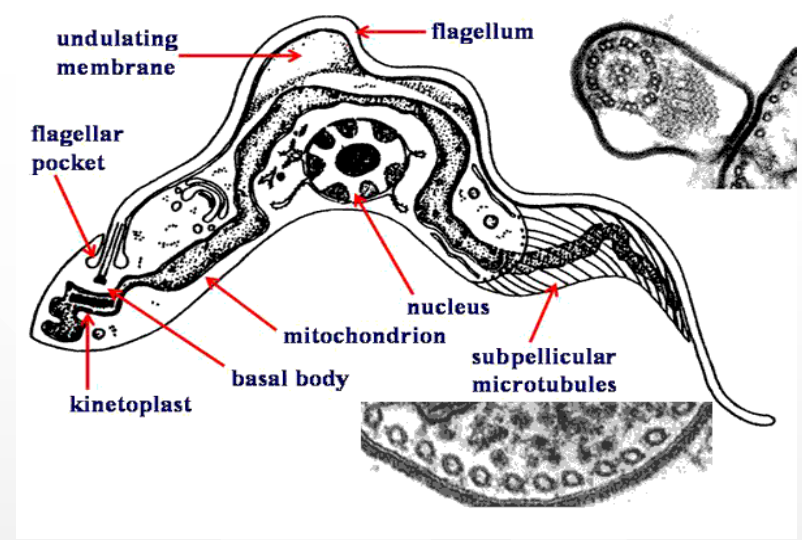
Kinetoplastida

Protisti flagellati **con un unico mitocondrio** collegato ad un organello specializzato, detto **cinetoplasto**

Il cinetoplasto contiene numerose molecole di DNA (10000 minicircoli concatenati, simili al DNA mitocondriale, e 50 macrocircoli)

Trypanosoma brucei è l'agente della "malattia del sonno" (tripanosomiasi africana, HAT)

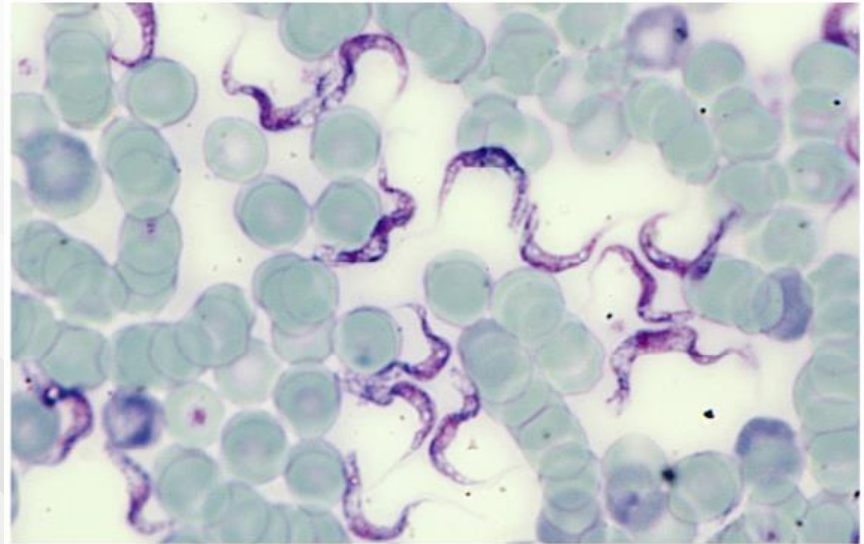
Leishmania major è l'agente della leishmaniosi cutanea e viscerale



Phylum **Excavata**

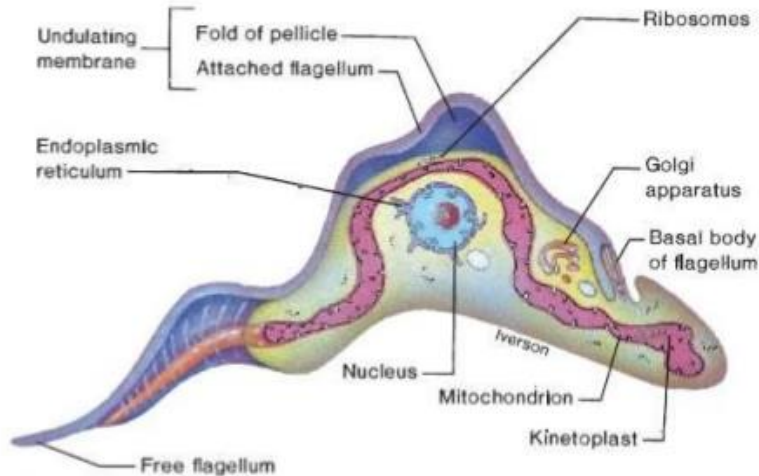
Trypanosoma brucei var. *gambiense*

T. brucei è l'agente della “**malattia del sonno**”, encefalite letargica fatale ed endemica in molte regioni africane



Trypanosoma gambiense

25 μ m

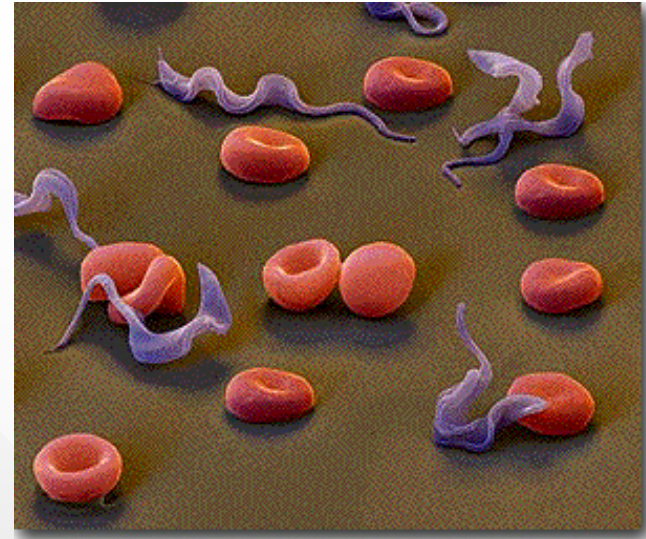
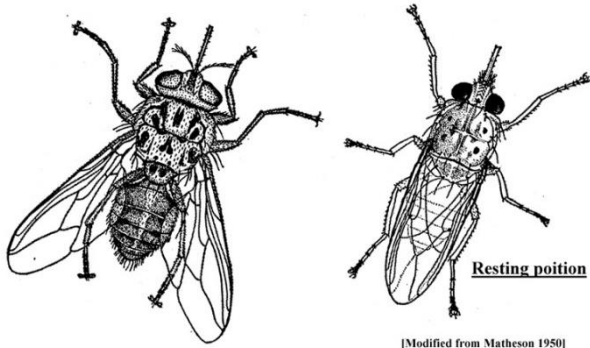


Ha un flagello unito alla cellula da una **membrana ondulante**, il **cinetoplasto** alla base del flagello ed un **unico grande mitocondrio**

Si riproduce esclusivamente per scissione ed ha una **elevata variabilità del genoma**, al punto che le sue proteine di superficie “imitano” quelle dei mammiferi per eludere il sistema immunitario

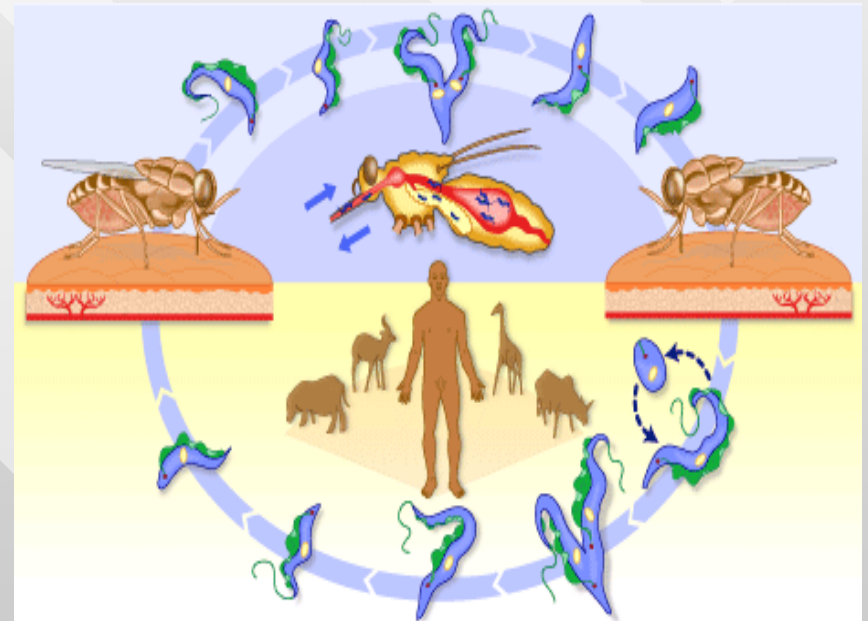
Trypanosoma brucei e il suo vettore

GLOSSINA PALPALIS
Tsetse Fly



Il vettore di *T. brucei*, la mosca “tsé-tsé” (*Glossina* sp., Diptera Glossinidae), si è coevoluto insieme al parassita

Le forme flagellate di *T. brucei* (**tripomastigoti**) si dividono asessualmente nel sangue, eludono le difese immunitarie e superano la barriera emato-encefalica, **provocando l'encefalite letargica**



Fonte: http://www.who.int/trypanosomiasis_african/en/
<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>

Leishmania major (Kinetoplastida)

Trasmessa dal moscerino *Phlebotomus* sp. (“sandfly”), alterna **stadi flagellati circolanti** nel sangue a **stadi endocellulari amastigoti** (privi di flagello)

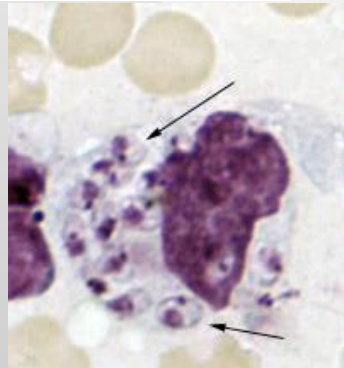
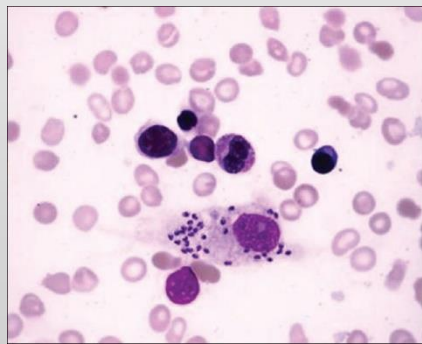
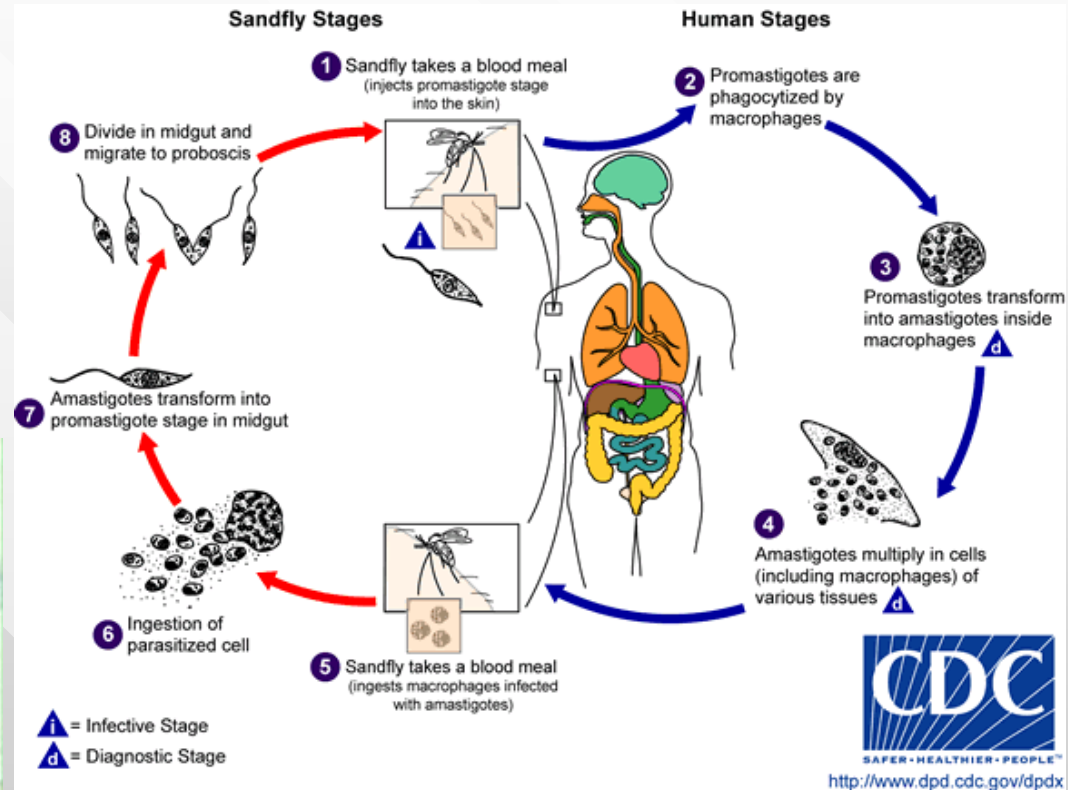
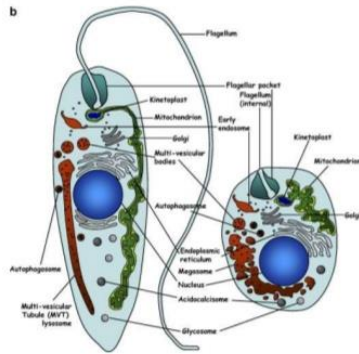


MORPHOLOGY

(same in all species)

The parasite exists in 2 forms:-

1. **Amastigotes** – aflagellar stage
2. **Promastigotes**-flagellar stage



Una altra specie, *Leishmania infantum*, agente della leishmaniosi viscerale detta “kala-azar” (o “black fever”) è trasmessa da moscerini del genere *Phlebotomus* in Africa, Asia ed Europa e del genere *Lutzomyia* nelle Americhe

Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease

Christopher S Peacock¹, Kathy Seeger¹, David Harris¹, Lee Murphy¹, Jeronimo C Ruiz², Michael A Quail¹, Nick Peters¹, Ellen Adlem¹, Adrian Tivey¹, Martin Aslett¹, Arnaud Kerhornou¹, Alasdair Ivens¹, Audrey Fraser¹, Marie-Adele Rajandream¹, Tim Carver¹, Halina Norbertczak¹, Tracey Chillingworth¹, Zahra Hance¹, Kay Jagels¹, Sharon Moule¹, Doug Ormond¹, Simon Rutter¹, Rob Squares¹, Sally Whitehead¹, Ester Rabbinowitsch¹, Claire Arrowsmith¹, Brian White¹, Scott Thurston¹, Frédéric Bringaud³, Sandra L Baldauf⁴, Adam Faulconbridge⁴, Daniel Jeffares¹, Daniel P Depledge⁴, Samuel O Oyola⁴, James D Hilley⁵, Loislene O Brito², Luiz R O Tosi², Barclay Barrell¹, Angela K Cruz², Jeremy C Mottram⁵, Deborah F Smith⁴ & Matthew Berriman¹

Leishmania parasites cause a broad spectrum of clinical disease. Here we report the sequencing of the genomes of two species of *Leishmania*: *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. The comparison of these sequences with the published genome of *Leishmania major* reveals marked conservation of syntenic and identifies only ~200 genes with a differential distribution between the three species. *L. braziliensis*, contrary to *Leishmania* species examined so far, possesses components of a putative RNA-mediated interference pathway, telomere-associated transposable elements and spliced leader-associated SLACS retrotransposons. We show that pseudogene formation and gene loss are the principal forces shaping the different genomes. Genes that are differentially distributed between the species encode proteins implicated in host-pathogen interactions and parasite survival in the macrophage.

I genomi sequenziati di tre specie di *Leishmania* sono stati oggetto della **prima comparazione multipla tra genomi parassitari** (Peacock et al., Nature Genetics, 2007)

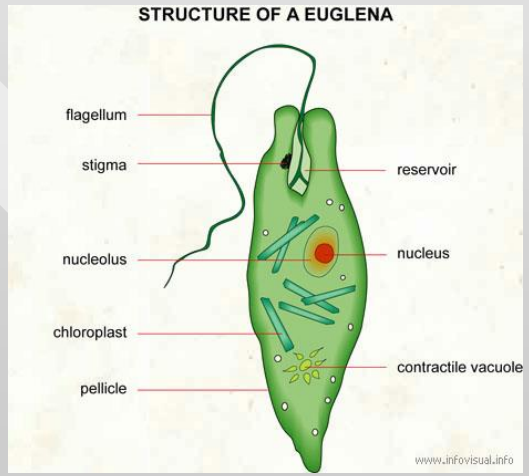
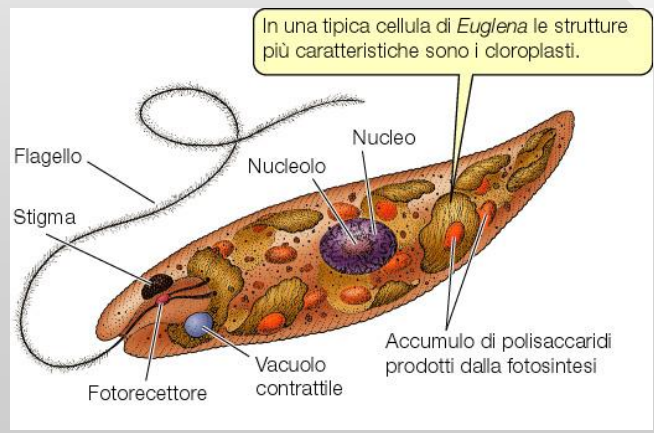
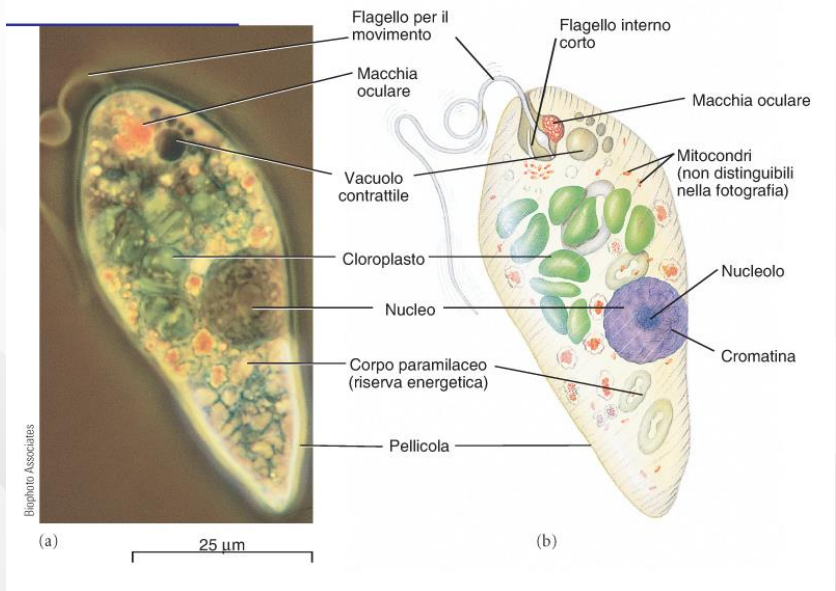
Table 1 Summary of the *L. major*, *L. infantum* and *L. braziliensis* genomes

	<i>L. major</i> (V5.2)	<i>L. infantum</i> (V2)	<i>L. braziliensis</i> (V2)
Chromosome number	36	36	35
Contigs	36	562	1,041
Size (bp)	32,816,678	32,134,935	32,005,207
Overall G+C content (%)	59.7	59.3	57.76
Coding genes	8,298	8,154	8,153
Pseudogenes ^a	97	41	161
Coding G+C content (%)	62.5	62.45	60.38

^aPseudogenes include genes that have in-frame stop codons and/or frameshifts but have other characteristics of coding regions, as assessed by similarity to other genes or by codon bias.

Euglena gracilis (Excavata Euglenoideae)

protista con due flagelli asimmetrici e una speciale pellicola flessibile

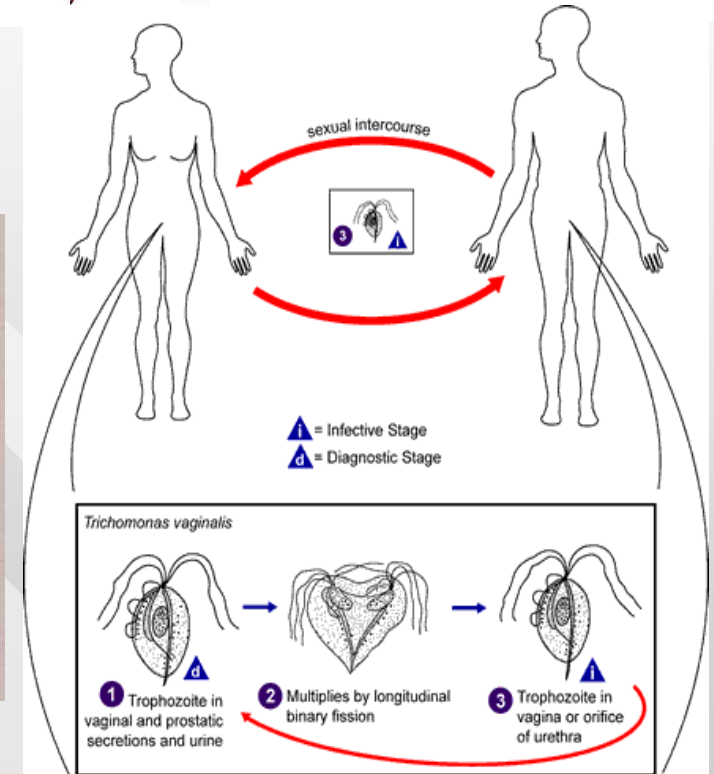
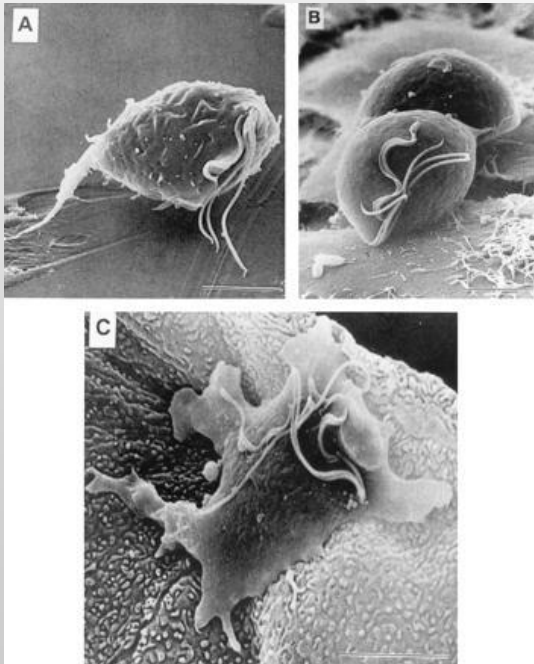
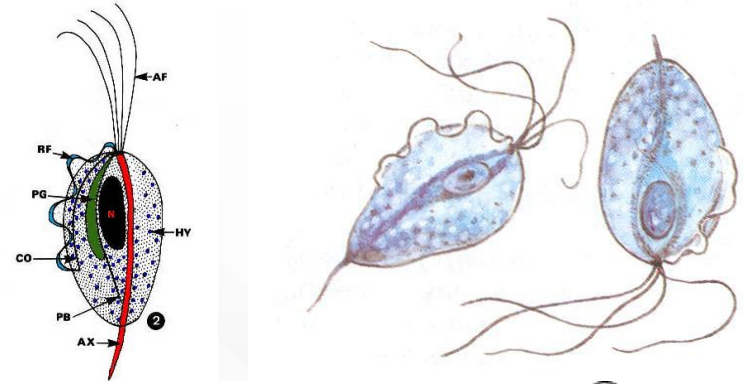


Trichomonas vaginalis

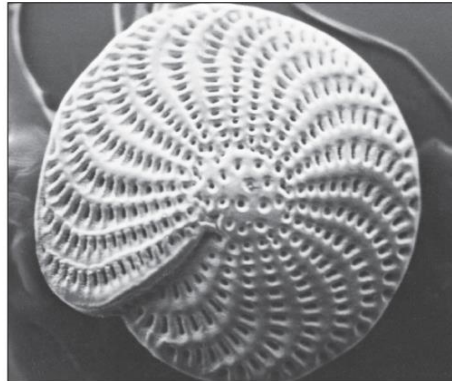
Flagellato parassita agente della trichomoniasi, trasmesso per contatto sessuale: la forma vegetativa (**trofozoite**) provoca infiammazioni ed ulcerazioni

Ha 4 flagelli ed una membrana ondulante

Si divide esclusivamente per scissione (una mitosi estremamente semplificata) ed ha un genoma a 6 cromosomi, interamente sequenziato nel 2007



Phylum **Rizaria**:
i **Foraminiferi**, splendidi protisti marini
con **involucro calcareo**



(a)

500 μm



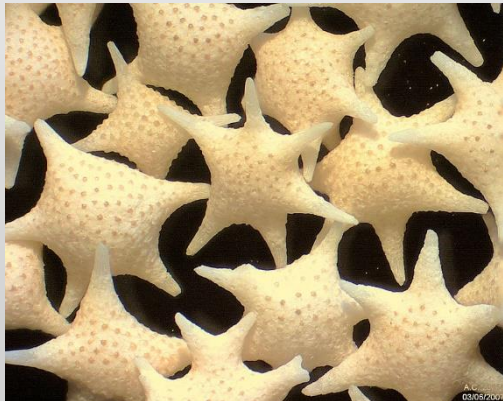
(b)

FIGURA 24-15 I foraminiferi.

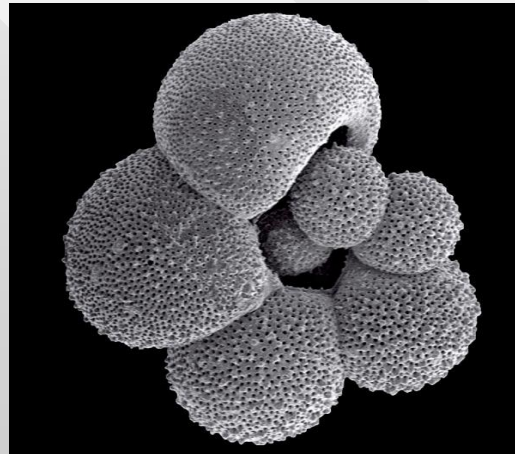
(a) MES di un guscio di foraminifero. Da notare i pori attraverso i quali fuoriescono i raggi di citoplasma. Molti foraminiferi possiedono un guscio multicamera come questo. (b) Le bianche scogliere di Dover, Inghilterra, sono costituite in maggioranza da gusci di foraminiferi.



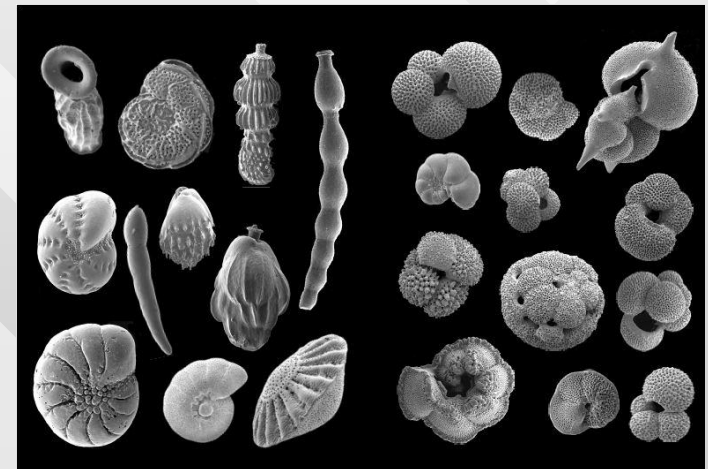
© A.C. 991d
22/10/2007



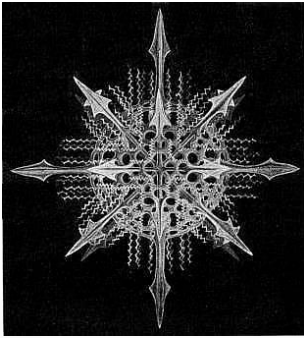
Baculogypsina sphaerulata



Globigerina sp.

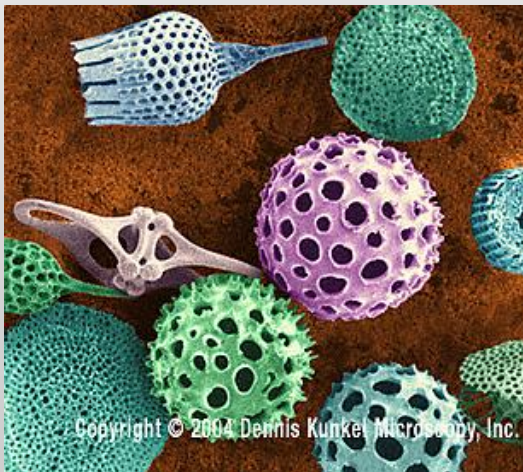
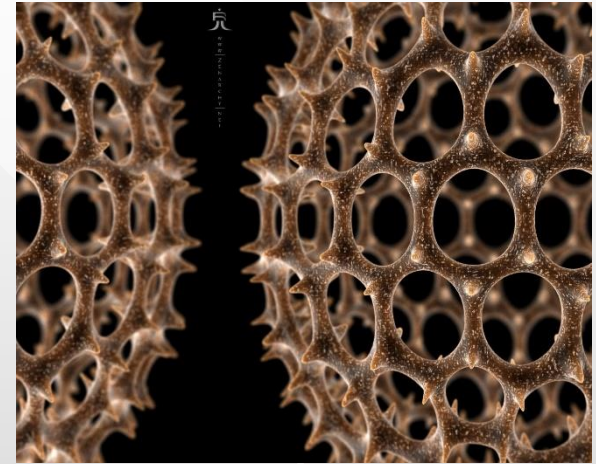
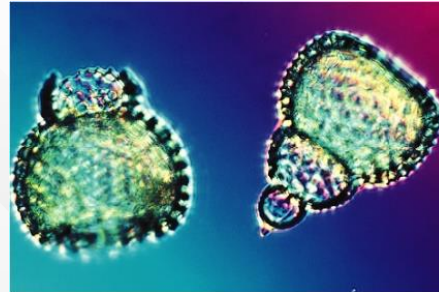
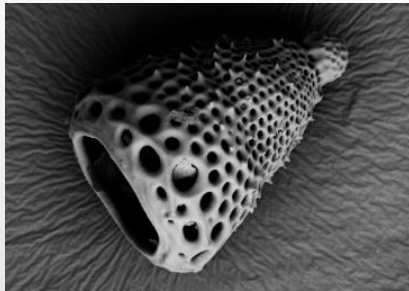


Fonti: Sadava et al., 2014; 2019
Solomon et al., 2014



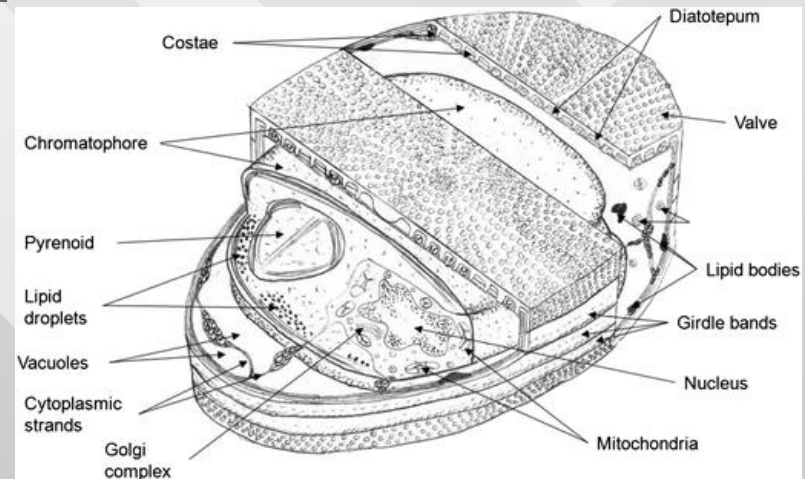
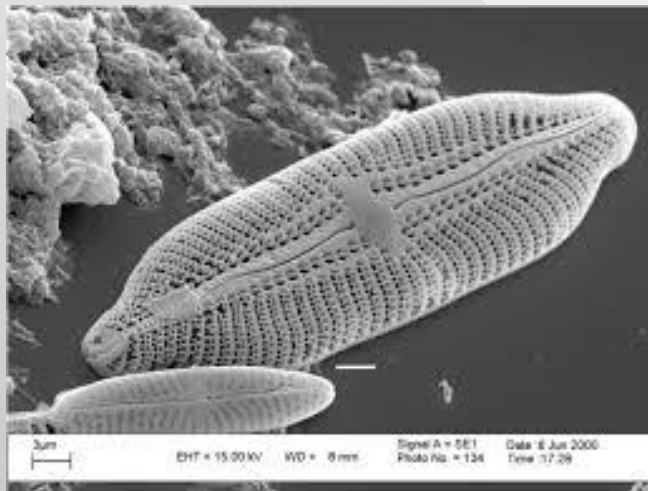
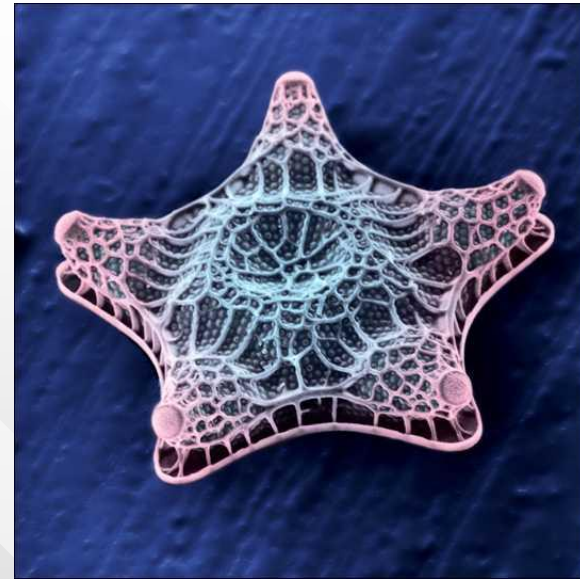
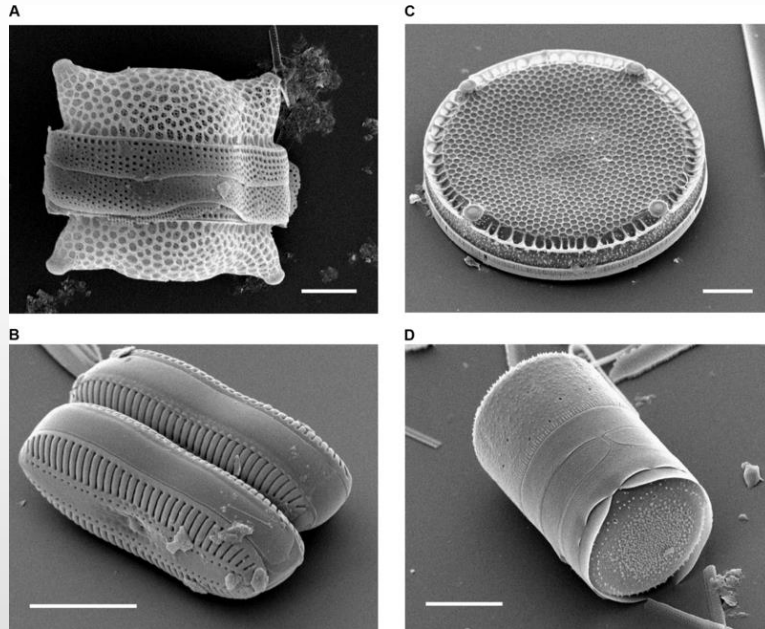
I Radiolari

altri straordinari protisti marini
con involucro siliceo

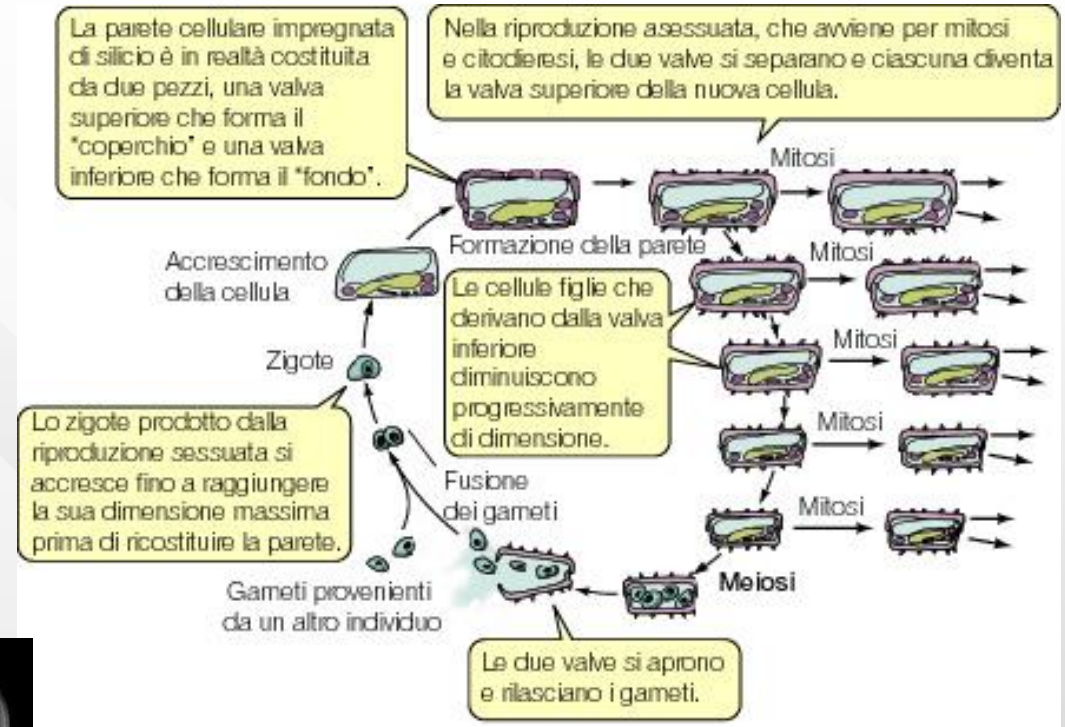
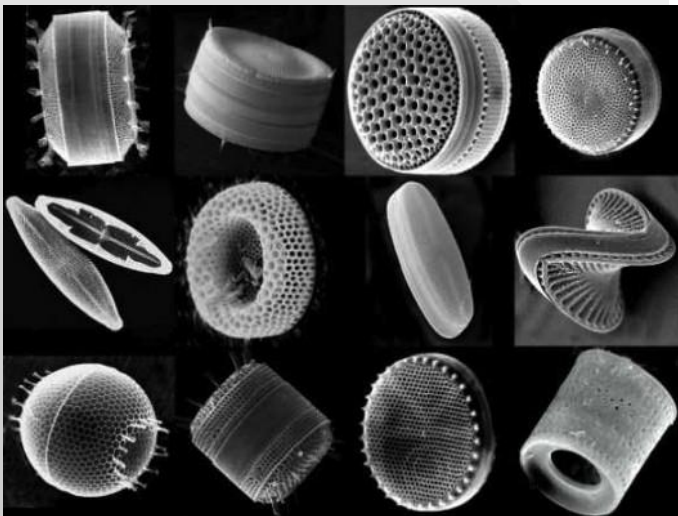


Fonti: Sadava et al., 2014; 2019
Solomon et al., 2014

Le **Diatomee** (Phylum **Stramenopyla**)
splendide **alghe unicellulari marine** e di **acqua dolce**
con **guscio siliceo con due valve a "scatolina"** ("teca")



Riproduzione a sessuata e sessuata nelle Diatomee



Le ornamentazioni del guscio siliceo delle Diatomee **sono così fini da essere state usate per lungo tempo per verificare la nitidezza delle immagini nei microscopi ottici**

Diatomee, dinamite e Premi Nobel

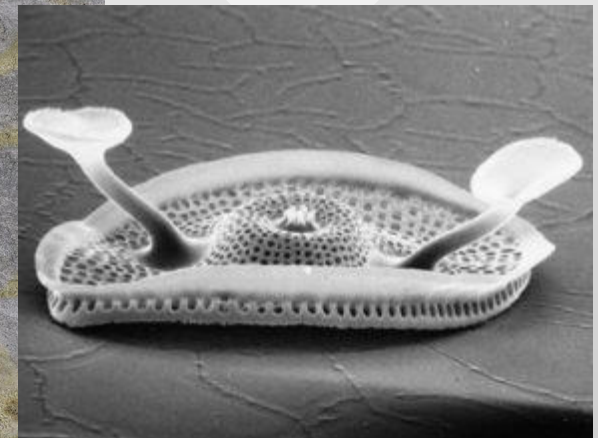
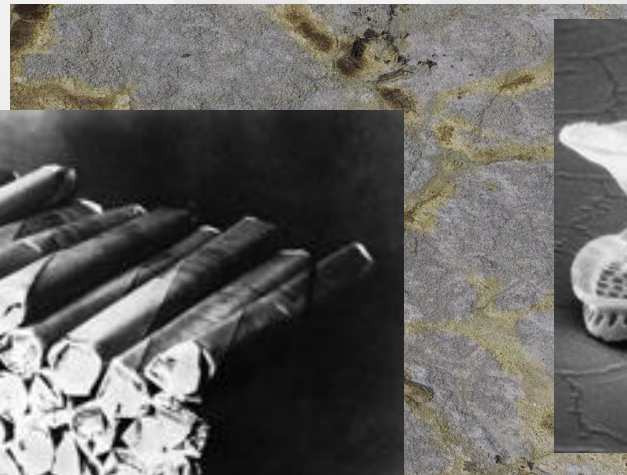
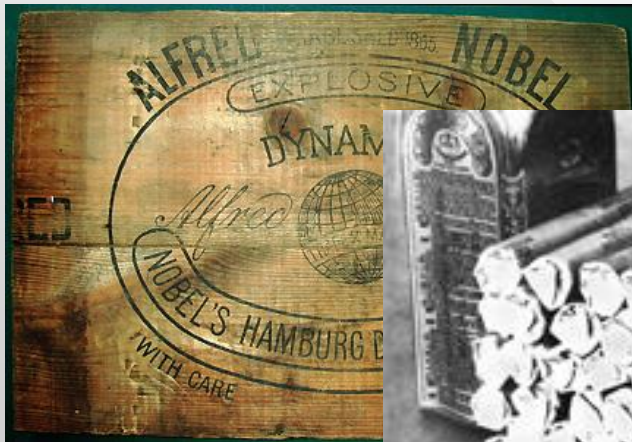
- L'accumulo dei piccolissimi involucri di protisti ad involucro siliceo (Diatomee e Radiolari) per milioni di anni ha prodotto **grandi depositi sedimentari marini** detti "**farina fossile**" (diatomite o "kieselguhr")

- Il chimico svedese **Alfred Nobel** ebbe l'idea di mescolare la "farina fossile" alla pericolosissima **nitroglicerina**, rendendo trasportabile il composto ("**dinamite**") e quindi dando **maggiore sicurezza al lavoro in miniera**

- L'invenzione fu usata purtroppo anche **a scopo bellico** e fruttò a Nobel **elevati guadagni**: lo scienziato decise di investire questi proventi economici in una **fondazione** per premiare le più elevate attività umane (**scienza, letteratura, pace**)



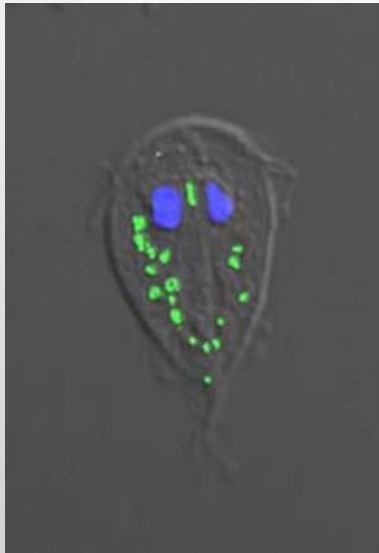
Alfred Bernhard Nobel
(1833-1896)



Alcuni Protisti sono “senza mitocondri”

In realtà questi Protisti sono provvisti di un particolare organello a doppia membrana, privo di genoma (“**mitosoma**”, “**idrogenosoma**”), che probabilmente svolge le funzioni del mitocondrio

Si ritiene che la perdita dei mitocondri sia un adattamento alla vita parassitaria e in condizioni anaerobiche, avvenuto in phyla e tempi diversi



Mitosomi evidenziati da un colorante fluorescente verde in *G. lamblia*

Protisti con mitosomi

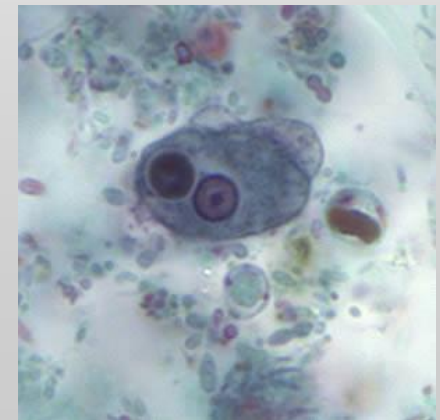
Phylum Excavata

Giardia lamblia (syn. *G. intestinalis*)

Trichomonas vaginalis

Phylum Amebozoa

Entamoeba histolytica



Phylum Excavata

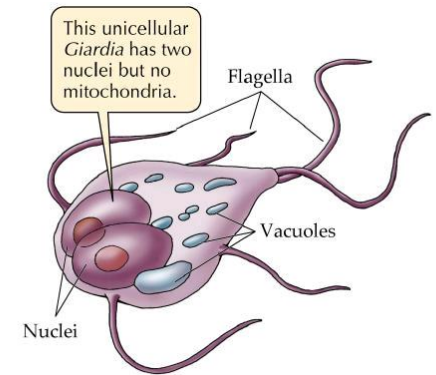
Giardia lamblia (syn. *G. intestinalis*)

protista flagellato parassita con molte strane caratteristiche

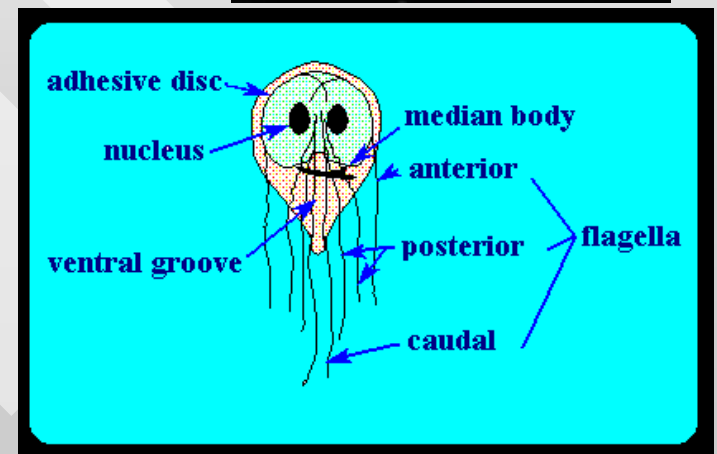
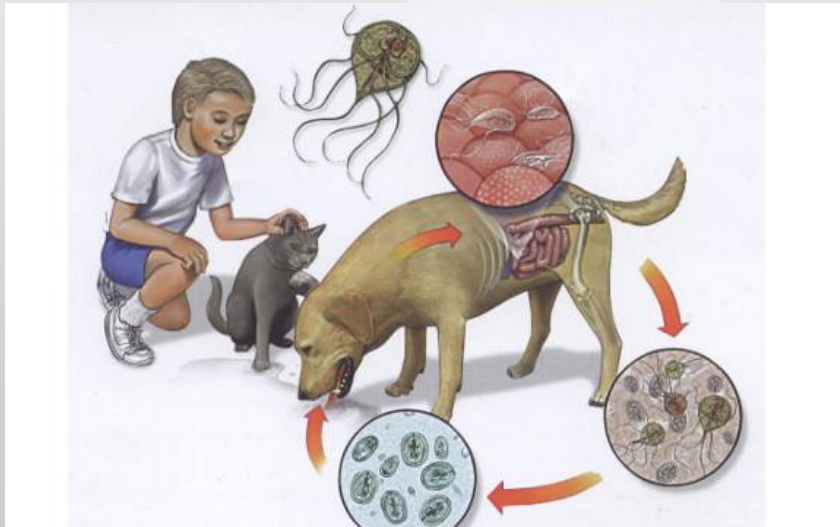
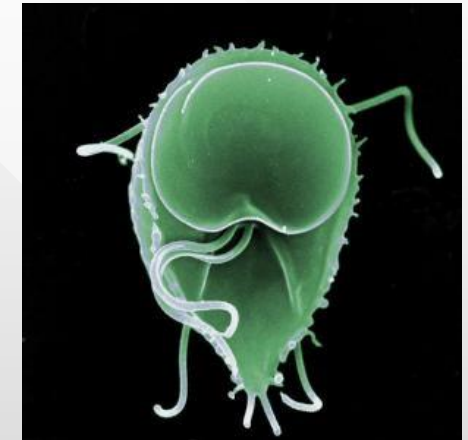
Ha **due nuclei** ed è **privo di mitocondri, nucleoli e perossisomi**

E' **uno degli Eucarioti più primitivi finora noti**

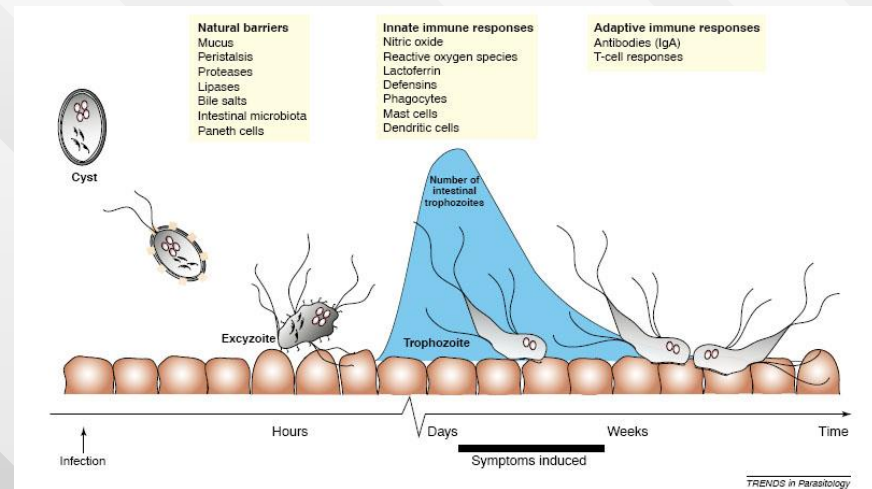
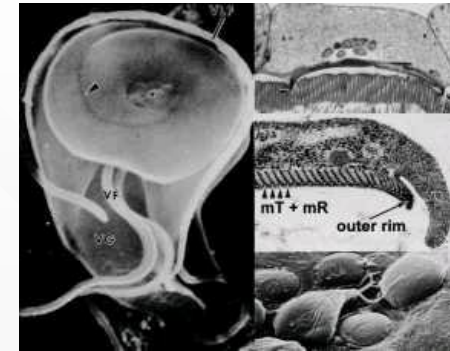
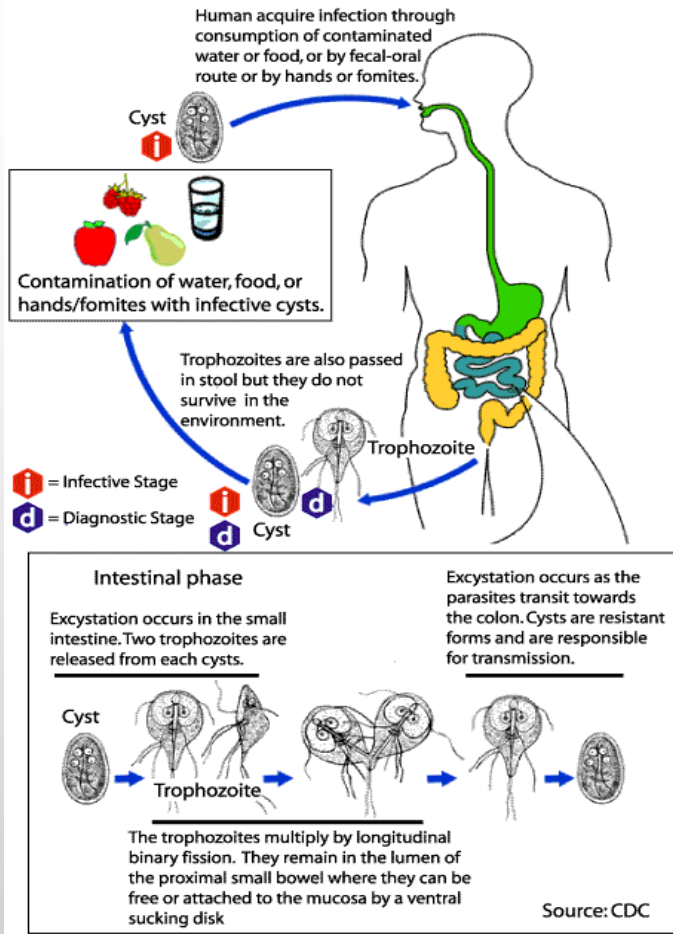
Provoca **gravi infezioni intestinali nei bambini** che vivono in condizioni igieniche precarie



© 1998 Sinauer Associates, Inc.



Ciclo biologico e genoma di *G. lamblia*



Il genoma di *G. lamblia*, interamente sequenziato nel 2007, ha entrambi i nuclei attivi nella trascrizione

Giardia Genome Database (GiardiaDB)

<http://giardiadb.org/giardiadb/>

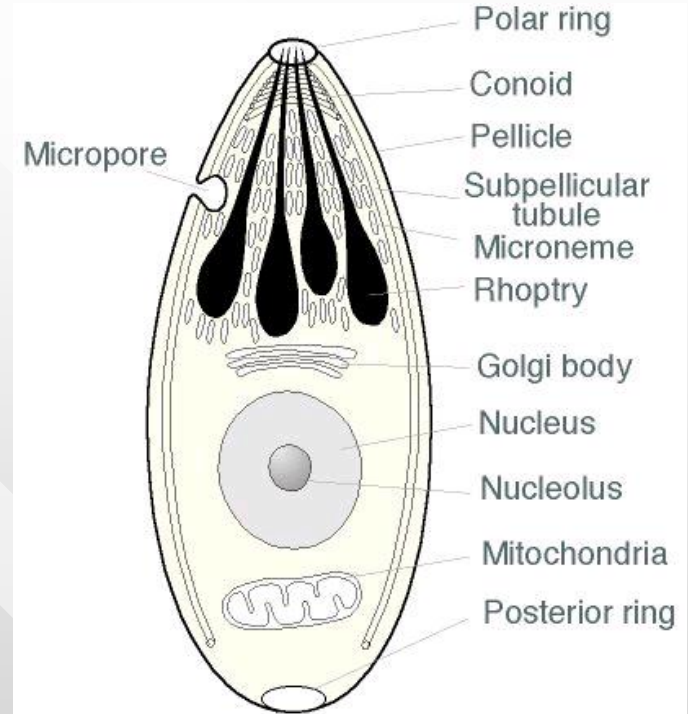
Il superphylum Alveolata (Dinoflagellata, Chromerida, Ciliata, Apicomplexa)



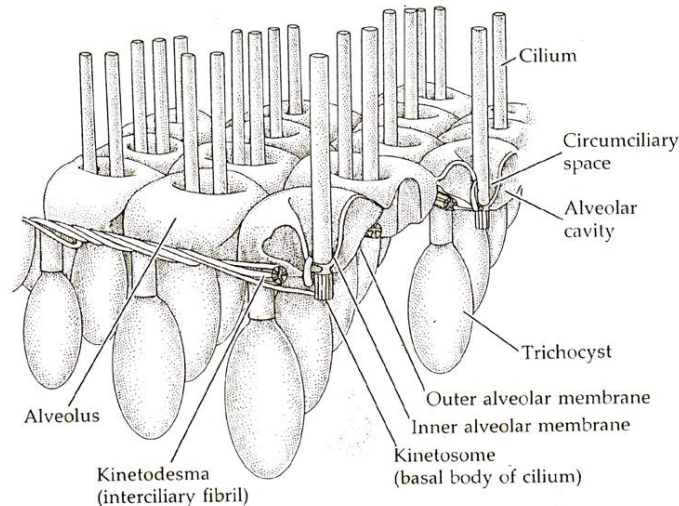
- Gli Alveolata sono caratterizzati da microstrutture cave (“**alveoli corticali**”) sotto la membrana plasmatica, a funzione di supporto

- Ciliata e Apicomplexa non hanno plastidi, mentre **Dinoflagellata e Chromerida li possiedono**

→ **Probabilmente li hanno acquisiti secondariamente tramite complessi eventi di simbiosi**



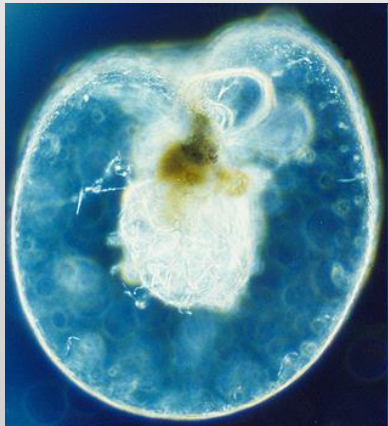
Infrastructure of Paramecium plasma membrane and pellicle (from Brusca & Brusca, 1990).



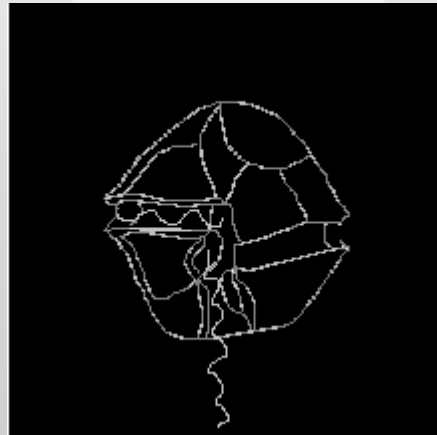
Nonostante il loro successo evolutivo e la loro importanza biologica, probabilmente sono **forme “relitte” di Eucarioti primitivi**

Dinoflagellata

- Alveolata fotosintetici di grande interesse ambientale:
 - responsabili di fioriture algali (“red tide”) e produttori di **neurotossine**
 - simbionti di varie specie di coralli (“coral bleaching”)
 - bioluminescenti
- Hanno genomi nucleari molto grandi e difficilmente sequenziabili, caratterizzati da strani **cromosomi** “mesoeucariotici”, **privi di istoni**

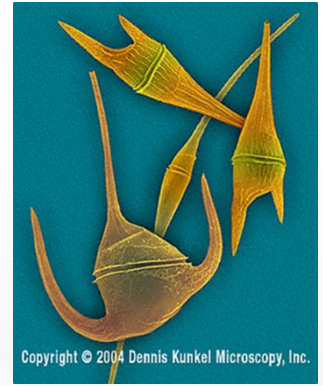


Noctiluca scintillans



Gonyaulax polyhedra

(dinoflagellato fluorescente)



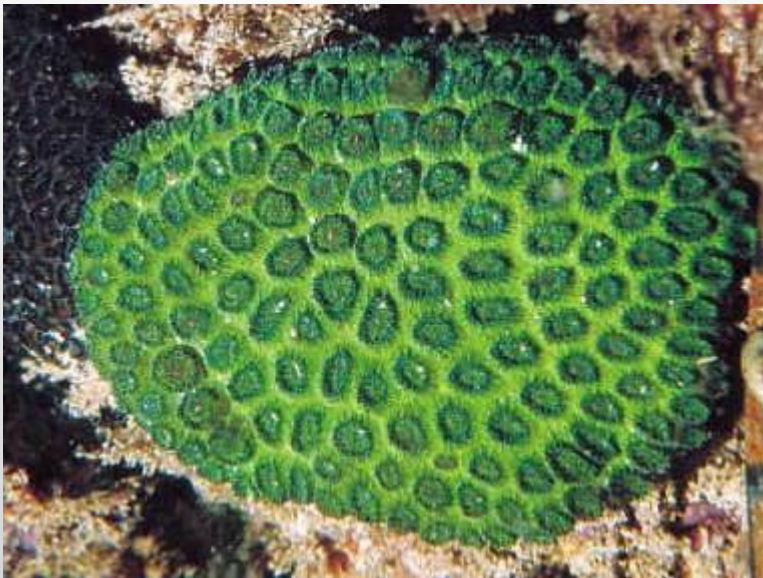
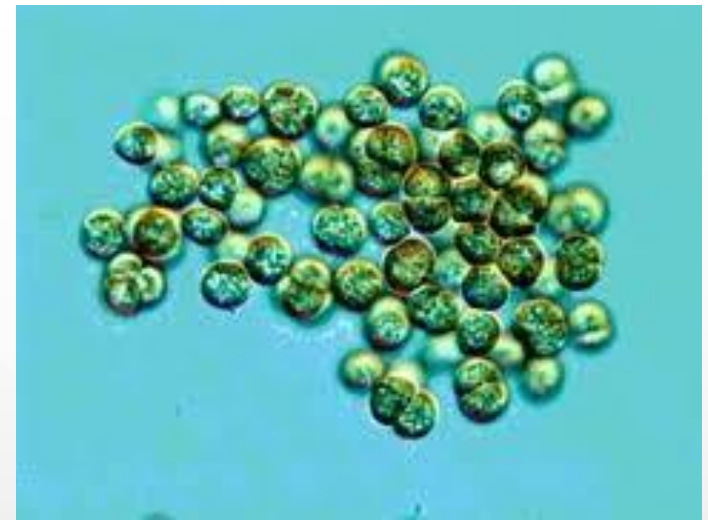
Ceratium sp., dinoflagellato fotosintetico con parete a piastre di cellulosa



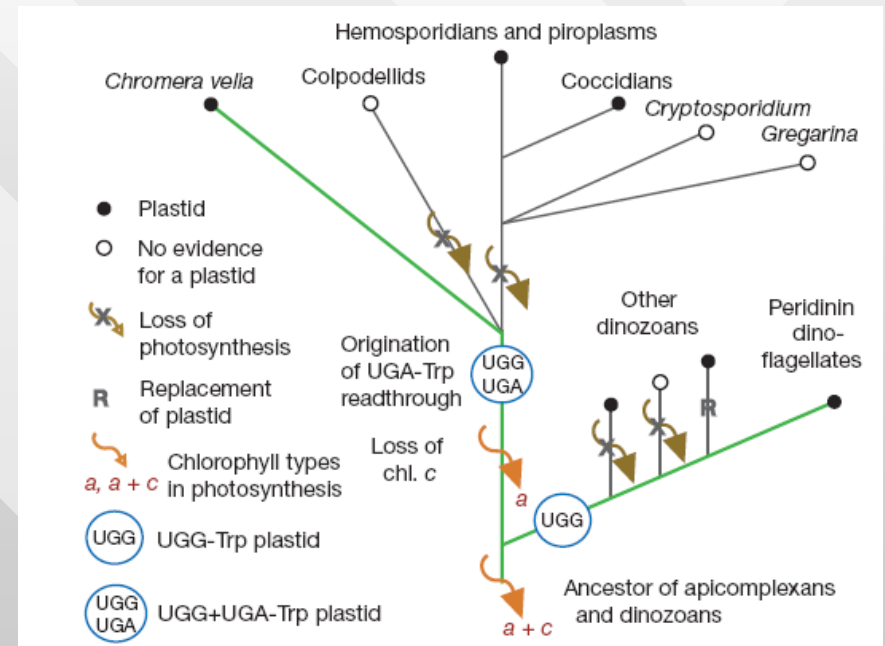
“Coral bleaching”, morte della colonia corallina privata dei **simbionti fotosintetici** (*Zooxanthella* sp.)

Chromera velia (Chromerida)
alveolato fotosintetico marino

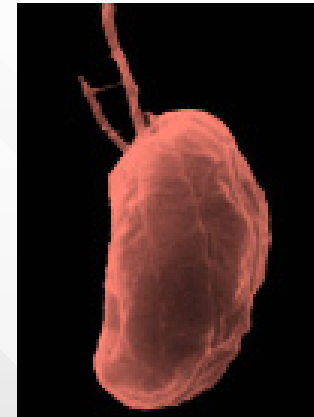
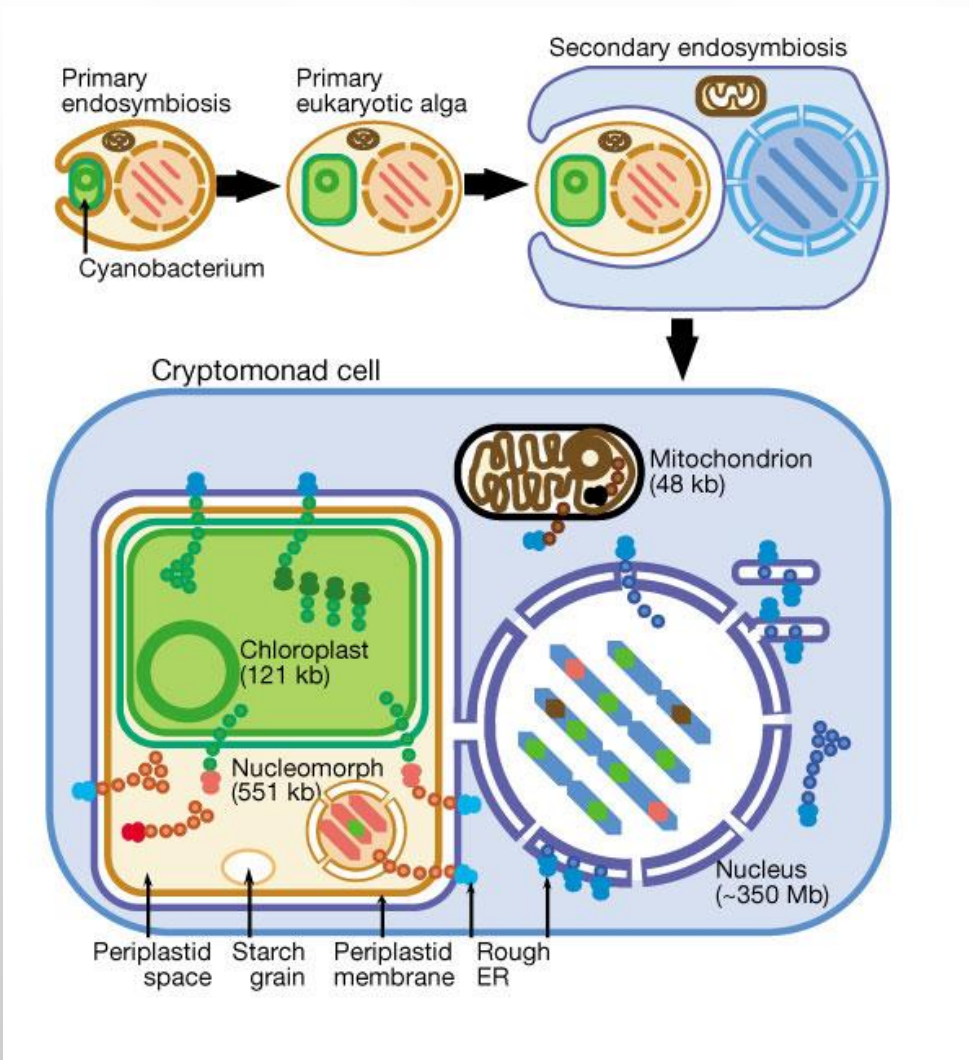
Chromera velia è stato isolato nel 2008
come simbionte del corallo madreporico
Plesiastrea versipora (Cnidaria Faviidae)



Le sue relazioni filogenetiche con gli altri
Alveolata sono state verificate tramite il
“codon usage” del plastidio **UGA = Trp**



Guillardia theta (Chromalveolata Cryptomonadales),
Eucariota unicellulare con 4 genomi



G. theta possiede il proprio genoma nucleare, il proprio genoma mitocondriale, ed inoltre il genoma del cloroplasto e del nucleo "subordinato" ("nucleomorfo") di un altro Eucariota endosimbionte

I Ciliati (Phylum Ciliata) “vertice” dell’organizzazione unicellulare dei Protisti



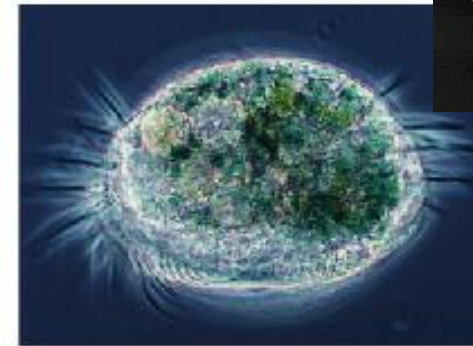
(a) *Paramecium bursaria* 10 μ m



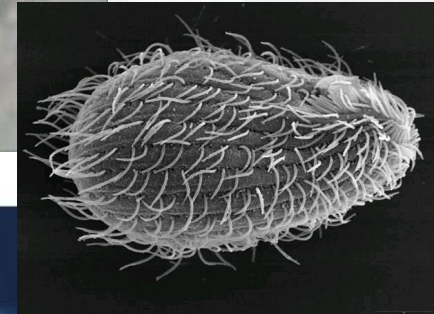
(b) *Epistylis* sp. 60 μ m



(c) *Paracineta* sp. 20 μ m



(d) *Euplotes* sp. 25 μ m



Fonti: Sadava et al., 2014; 2019
<https://microbewiki.kenyon.edu>

Organizzazione di un ciliato

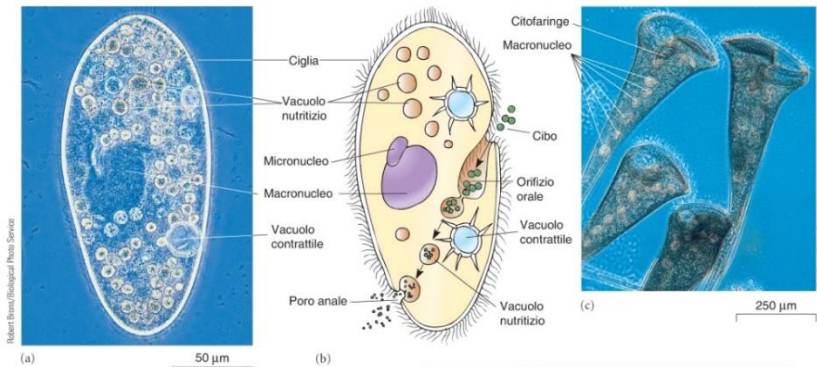
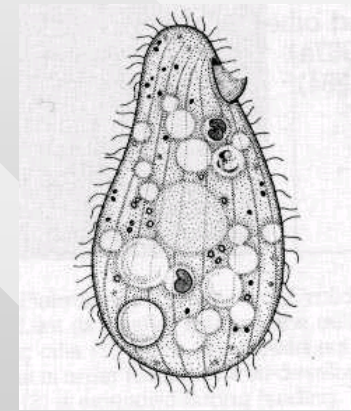
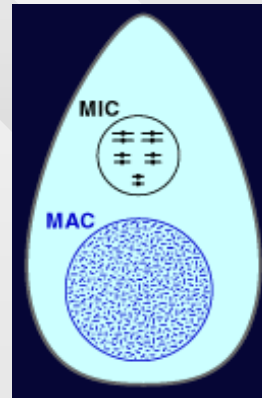
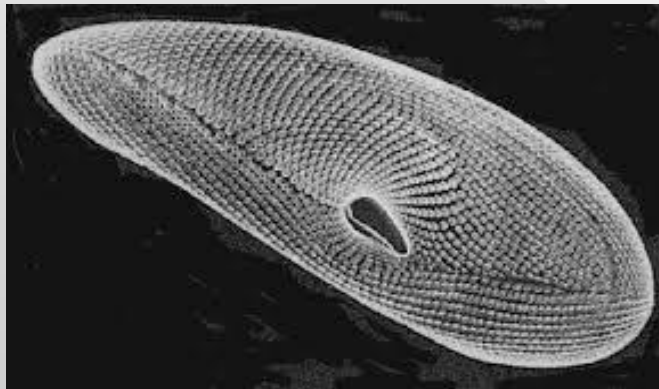
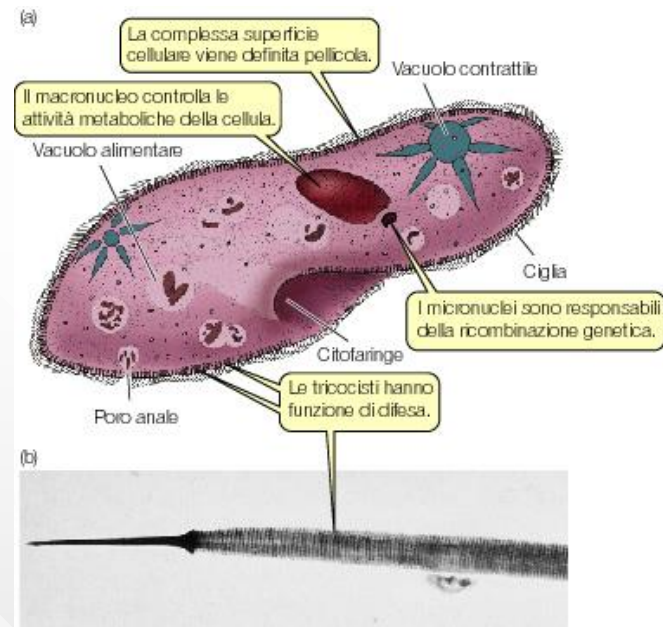


FIGURA 24-7 I ciliati.

(a) Da notare la complessa struttura cellulare, visibile in questa MO, del *Paramecium* sp., un ciliato d'acqua dolce. Come molti ciliati, il *Paramecium* possiede più nuclei: un macronucleo e uno o più micronuclei di dimensioni inferiori. (b) Le particelle di cibo vengono introdotte nell'orifizio orale, contornato da ciglia, del *Paramecium* e incorporate nei vacuoli nutritivi. I lisosomi si fondono con i vacuoli nutritivi permettendo la digestione e l'assorbimento; gli scarti non digeriti vengono eliminati attraverso il poro anale. (c) MO di *Stentor* sp., un ciliato sessile. Da notare le numerose ciglia che indirizzano le particelle di cibo nella "bocca" a imbuto. Il macronucleo allungato assomiglia ad una collana di perle. (d) MO di *Euplotes*, un ciliato ipotrico; notare i ciuffi compatti detti cirri. (Sorgente da 24-7(d): By H. Machemer, in K. G. Grell, *Protozoology*, © 1973 Springer-Verlag).



Filmati

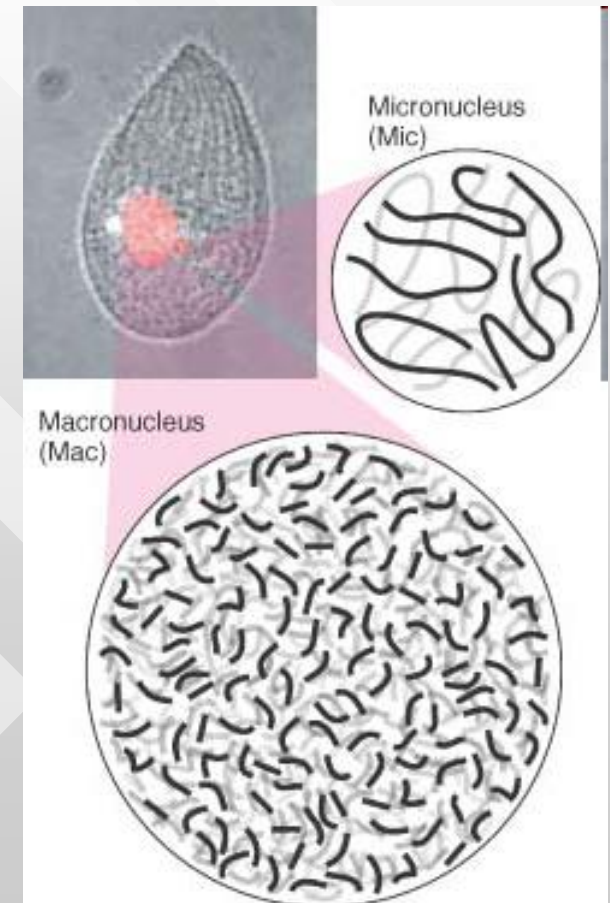
I Ciliati sono caratterizzati da una superficie cellulare molto complessa e da **due nuclei**, un **micronucleo a funzione riproduttiva** e un **macronucleo a funzione trascrizionale e traduzionale**

Tetrahymena thermophila (Phylum Ciliata)

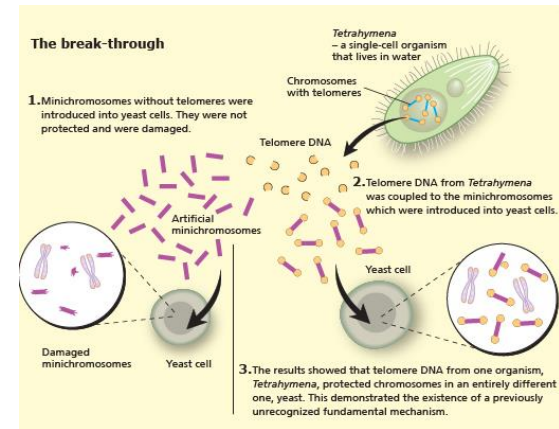
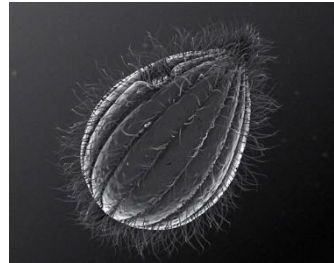
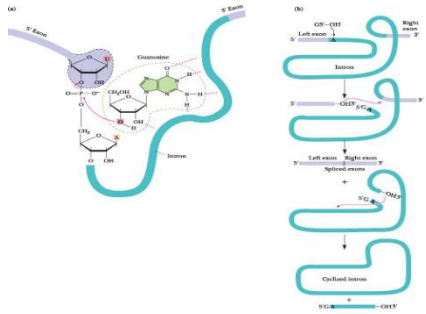
- **Organismo modello fondamentale** tra i Protisti
- Il fenomeno di “autosplicing” dell’RNA è stato osservato per la prima volta in questo organismo da T. R. Cech e S. Altman (Premio Nobel 1989)
- Anche gli studi fondamentali sui telomeri e sulla telomerasi (Premio Nobel 2009) sono stati effettuati su *Tetrahymena*
- Genoma molto complesso con due nuclei, tipici dei Ciliata
 - un **micronucleo a funzione riproduttiva**, con **5 cromosomi**
 - un **macronucleo**, derivato per suddivisione e replicazione dei cromosomi micronucleari, con **225 cromosomi privi di centromeri** (Eisen et al., 2006)
- *Tetrahymena* e altri Ciliati hanno un diverso “codon usage”, cioè un **“uso alternativo” dei codoni** rispetto al codice genetico “universale”:
 - UAA (Stop) → Glutamina
 - UAG (Stop) → Glutamina
 - UGA Stop



Tetrahymena Genome Database (TGD)
<http://www.ciliate.org/>



Due premi Nobel (1989 e 2009) sono stati assegnati per studi su *Tetrahymena*



Premio Nobel per la Chimica 1989
 "for their discovery of catalytic properties of RNA"



Sydney Altman



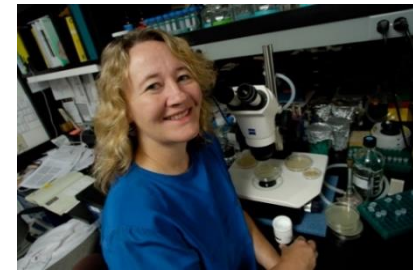
Thomas R. Cech

Premio Nobel per la Medicina e la Fisiologia 2009

"for the discovery of how chromosomes are protected by telomeres and the enzyme telomerase"



Elizabeth H. Blackburn



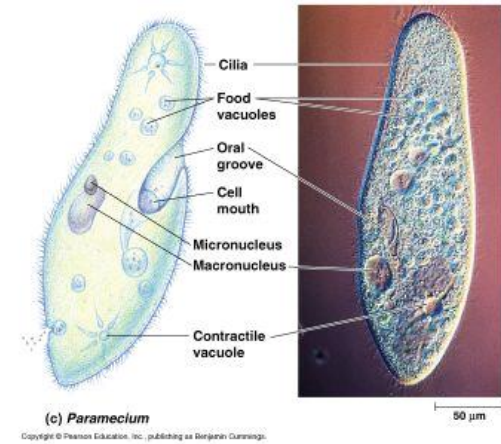
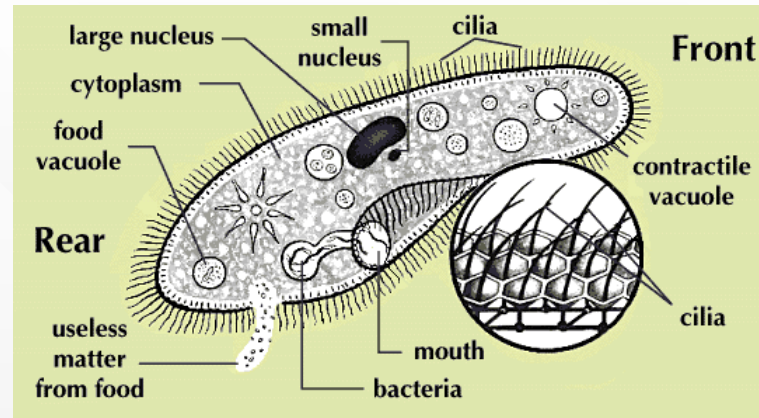
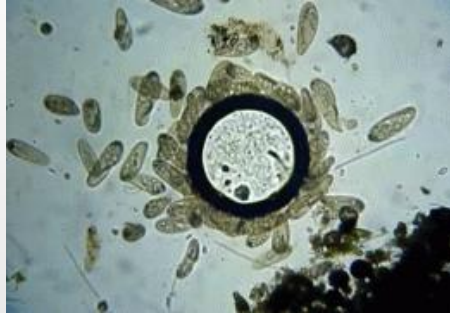
Carol W. Greider

Nella storia dei Premi Nobel, è stata la prima volta in cui due donne lo hanno ricevuto contemporaneamente nella stessa disciplina

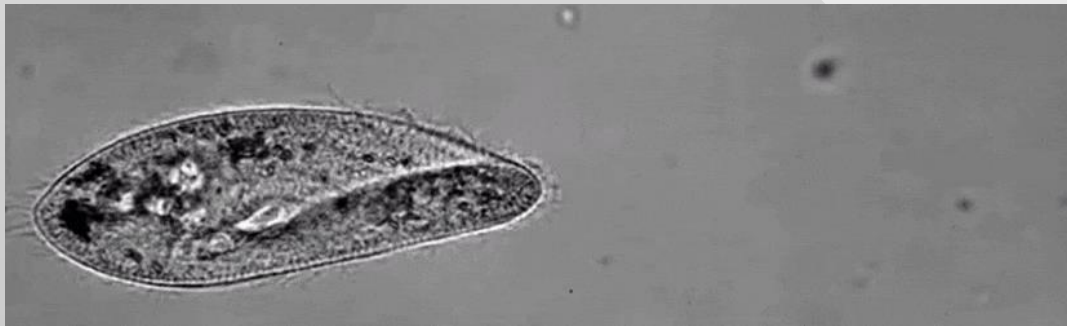


Jack W. Szostak

Paramecium tetraurelia



- Ciliato di grandi dimensioni (120 µm), visibile anche a occhio nudo, con una cellula altamente specializzata
- Macronucleo poliploide (1000n), contenente 85-90% del genoma, interamente sequenziato nel 2010



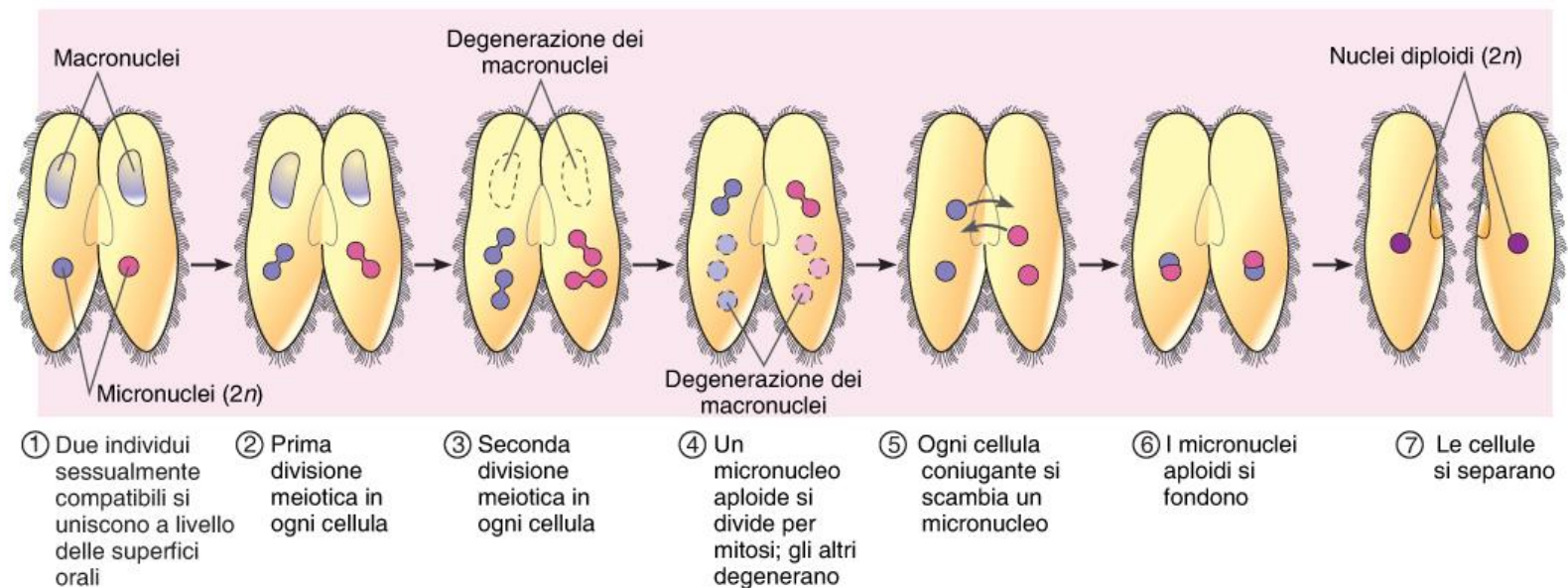
Database dedicato a *Paramecium*
(ParameciumDB)

<http://paramecium.cgm.cnrs-gif.fr/>

Complessa riproduzione sessuata (**coniugazione**) in *Paramecium* sp. e altri Ciliati

FIGURA 24-8

La coniugazione del *Paramecium caudatum*.



Gli Apicomplexa, organismi “mosaico” tra i Protisti

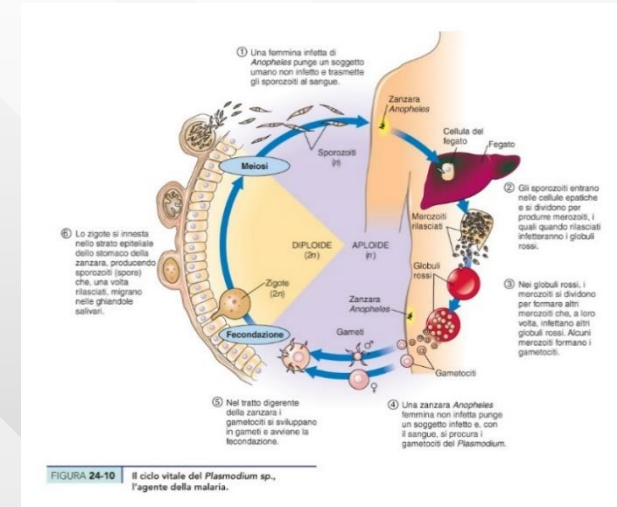
Gli Apicomplexa sono **i Protisti di maggiore importanza per la salute umana**

→ *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium parvum* causano elevati tassi di mortalità e di morbilità in tutto il mondo, e rendono disabili o provocano la morte di milioni di persone all'anno

Sembra che gli Apicomplexa siano **mosaici di un antico organismo eucariotico** costituita da **una alga** (con il suo cloroplasto derivato dai cianobatteri) e da **un proteobatterio**, che hanno formato rispettivamente l'**apicoplasto** e i **mitocondri**

La spinta evolutiva ha portato ad una perdita o a silenziamento selettivo dei geni, e in alcuni casi (*Cryptosporidium*) all'estrema riduzione dei mitocondri e alla perdita dell'apicoplasto

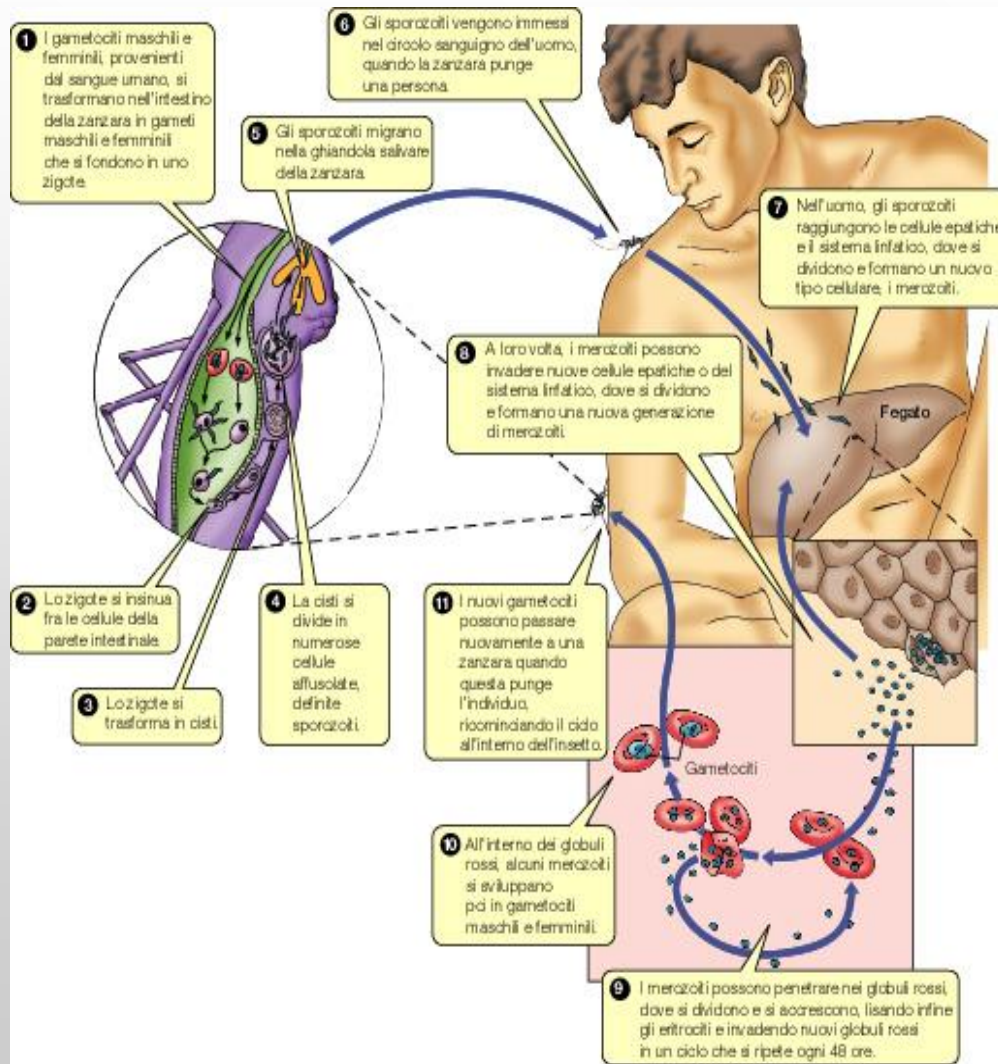
Lo studio delle peculiari caratteristiche degli Apicomplexa, diverse da quelle delle cellule animali e umane, potrebbe fornire **bersagli molecolari per nuovi tipi di agenti antimicrobici**



"Se esistesse la vita su Marte, potrebbe essere tanto ordinaria da risultare deludente in paragone ad alcune creature terrestri veramente bizzarre..."

G. I. McFadden, *Nature* 400:119-20, 1999

Plasmodium falciparum (Protista, Apicomplexa) agente della malaria



La malaria è **la malattia che colpisce il maggior numero di persone sul pianeta**

3.3 miliardi di persone a rischio in 91 paesi

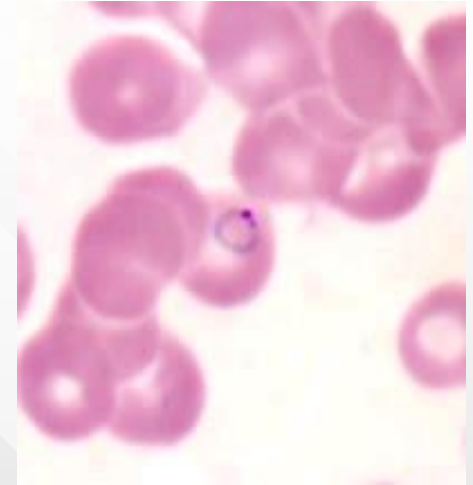
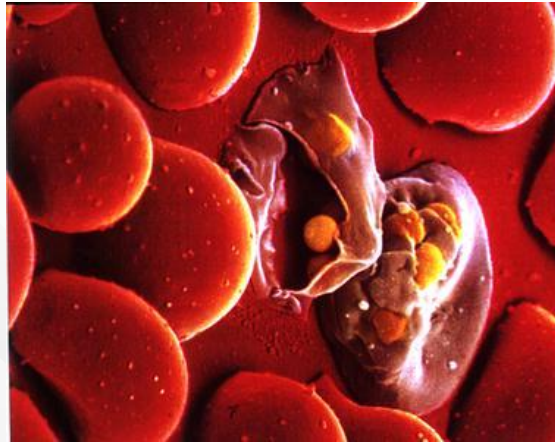
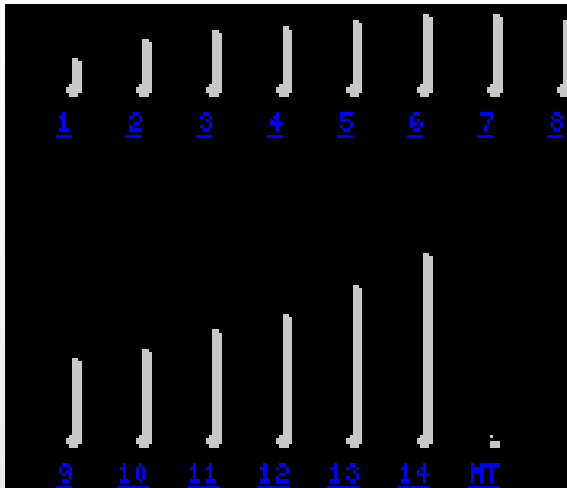
219 milioni di persone affette

435 000 morti all'anno
(93% in Africa,
quasi tutti bambini sotto i 5 anni)

(WHO - World Malaria Report 2018)

Fonte: World Health Organization 2018

Genoma di *P. falciparum*



- Completamente sequenziato (ceppo 3D7) nel 2002
Gardner MJ *et al.*, "Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.", *Nature* 419: 498-511, 2002.

- 14 cromosomi, 23 Mb, 4500 geni
(Hall *et al.*, *Science* 307: 82-86, 2005)



Il genoma di *P. falciparum* è stato sequenziato in parallelo con quello del suo vettore, *Anopheles* sp. (Diptera Culicidae), completato nel 2007

Buone (o cattive...) notizie per la lotta ai vettori della malaria da *P. falciparum* e di altre gravi malattie

Andrea Crisanti e Tony Nolan, docenti di parassitologia molecolare all'Imperial College di Londra, hanno sviluppato un metodo per **modificare in modo permanente il genoma di *Anopheles gambiae***, vettore di *P. falciparum*

nature
biotechnology

OPEN

A CRISPR–Cas9 gene drive targeting *doublesex* causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes

Kyros Kyrou^{1,2}, Andrew M Hammond^{1,2}, Roberto Galizi¹, Nace Kranjc¹, Austin Burt¹, Andrea K Beaghton¹, Tony Nolan¹ & Andrea Crisanti¹

In the human malaria vector *Anopheles gambiae*, the gene *doublesex* (*Agdsx*) encodes two alternatively spliced transcripts, *dsx-female* (*AgdsxF*) and *dsx-male* (*AgdsxM*), that control differentiation of the two sexes. The female transcript, unlike the male, contains an exon (exon 5) whose sequence is highly conserved in all *Anopheles* mosquitoes so far analyzed. We found that CRISPR–Cas9-targeted disruption of the Intron 4–exon 5 boundary aimed at blocking the formation of functional *AgdsxF* did not affect male development or fertility, whereas females homozygous for the disrupted allele showed an intersex phenotype and complete sterility. A CRISPR–Cas9 gene drive construct targeting this same sequence spread rapidly in caged mosquitoes, reaching 100% prevalence within 7–11 generations while progressively reducing egg production to the point of total population collapse. Owing to functional constraint of the target sequence, no selection of alleles resistant to the gene drive occurred in these laboratory experiments. Cas9-resistant variants arose in each generation at the target site but did not block the spread of the drive.



Il metodo usa la tecnica CRISPR-Cas9 per modificare in modo mirato e preciso un tratto fondamentale di DNA (un esone sul cromosoma 2R) che determina il sesso di *A. gambiae*

La modifica non ha effetto sui maschi, ma **rende le femmine totalmente sterili ed è ereditabile**: questo significa che in poche generazioni **la popolazione di *A. gambiae* “collassa” e scompare completamente**

S	A	T	O	R
A	R	E	P	O
T	E	N	E	T
O	P	E	R	A
R	O	T	A	S

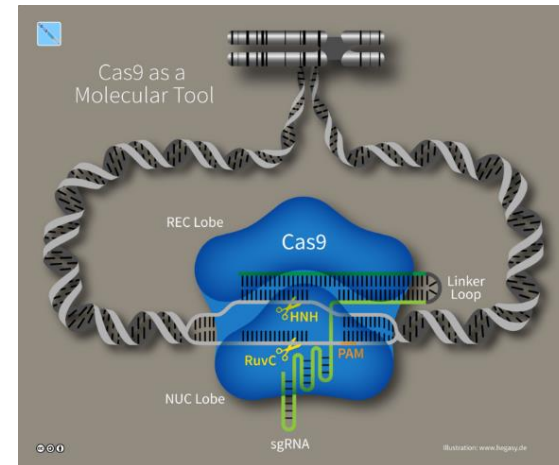
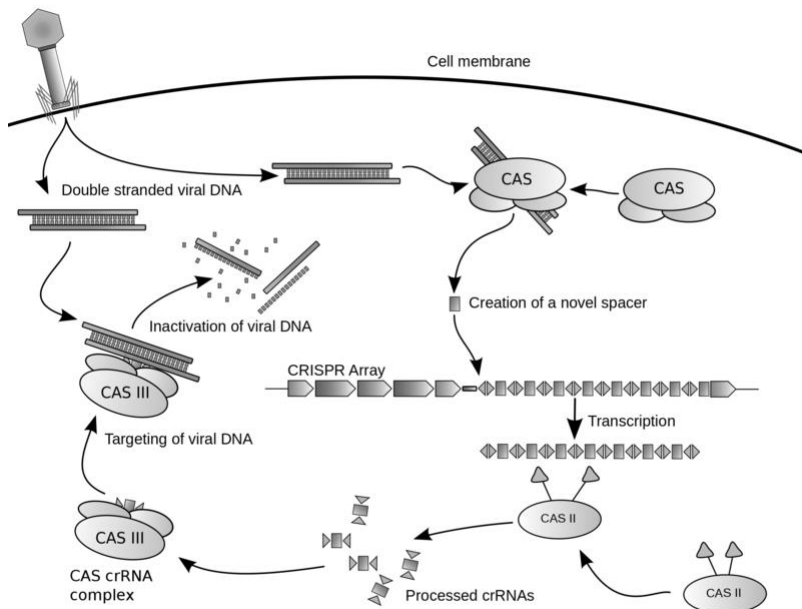
CRISPR

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats,
(brevi ripetizioni palindrome raggruppate a intervalli regolari)



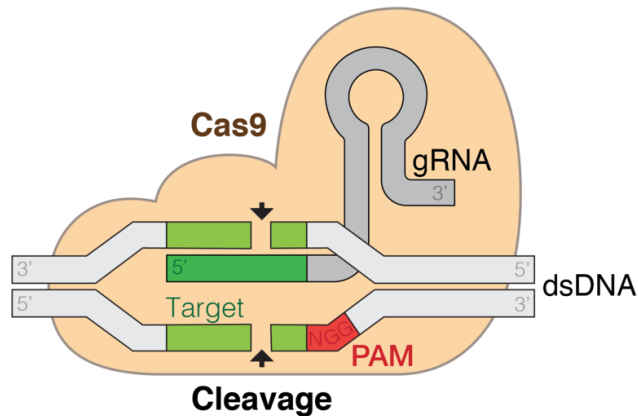
Le CRISPR sono tratti di DNA contenenti **brevi sequenze ripetute** e leggibili in entrambe le direzioni (“**palindrome**”) presenti nel 50% degli Eubatteri e nel 90% degli Archaea

Le sequenze sono state inserite nel genoma batterico da batteriofagi (virus dei batteri) o da plasmidi, nel corso dell’evoluzione: i batteri le usano **come una sorta di primitivo “sistema immunitario” (CRISPR-Cas)** per riconoscere e distruggere il DNA di virus simili a quelli che hanno inserito originariamente le sequenze



Sulla base di CRISPR-Cas è stato ideato nel 2012 un sistema molto **preciso, facile ed economico** per modificare il DNA

- Nell'eubatterio Gram-positivo *Streptococcus pyogenes* è presente una endonucleasi (enzima che taglia il DNA) associata al sistema CRISPR, detta Cas9: questa proteina funziona insieme a due piccoli tratti di RNA
- Due scienziate, **Jennifer Doudna** ed **Emmanuelle Charpentier**, hanno modificato Cas9, fondendo le due molecole di RNA in una sola, in grado di “guidare” Cas9 con grande precisione verso specifiche sequenze di DNA (“DNA editing”)



Questo sistema (CRISPR-Cas9) si è rivelato non solo estremamente potente e preciso per modificare il DNA, ma molto più facile e più economico di altri metodi biotecnologici

Tramite CRISPR-Cas9 è possibile modificare permanentemente i geni di molti organismi modello, tra i quali il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, la pianta *Arabidopsis thaliana*, il nematode *Caenorhabditis elegans*, il moscerino *Drosophila melanogaster*, il roditore *Mus musculus*, il primate *Macaca fascicularis* e anche (con seri problemi etici) il genoma umano



J. Doudna e E. Charpentier ricevono il Premio UNESCO “Women in Science” 2016 per la loro scoperta

Crisanti e Nolan hanno usato CRISPR-Cas9 per disattivare in modo mirato ed ereditario il DNA di *A. gambiae*, rendendo le femmine sterili **ed in grado di trasmettere la sterilità alla progenie**: tramite questa tecnica è quindi possibile **eliminare completamente una specie presente in natura**

Si pone quindi un **difficile problema etico**:

Eliminare totalmente una specie che è vettore della malattia che colpisce più persone al mondo (219 milioni) e **ne uccide 435000 ogni anno**?

Date le conseguenze impreviste quasi sempre osservate in seguito all'estinzione di specie animali e vegetali, **siamo certi che l'eliminazione totale di *A. gambiae* non provocherebbe danni inaspettati e molto gravi** ?

Ad esempio, è noto che alcune specie di ragni africani si nutrono di *A. gambiae*, ma sembra che possano sostituire questa specie con altre simili: non è noto però se questo possa avvenire **anche per altri animali** (crostacei, pesci e rettili) che si nutrono di zanzare

Siamo sicuri che l'eliminazione di *A. gambiae* non provochi il **“collasso a catena” di molte altre specie**, tra cui alcune di fondamentale importanza per gli umani?

Sono in corso studi per ottenere maggiori dati, ma **non sarà facile trovare una risposta a questo complesso interrogativo**

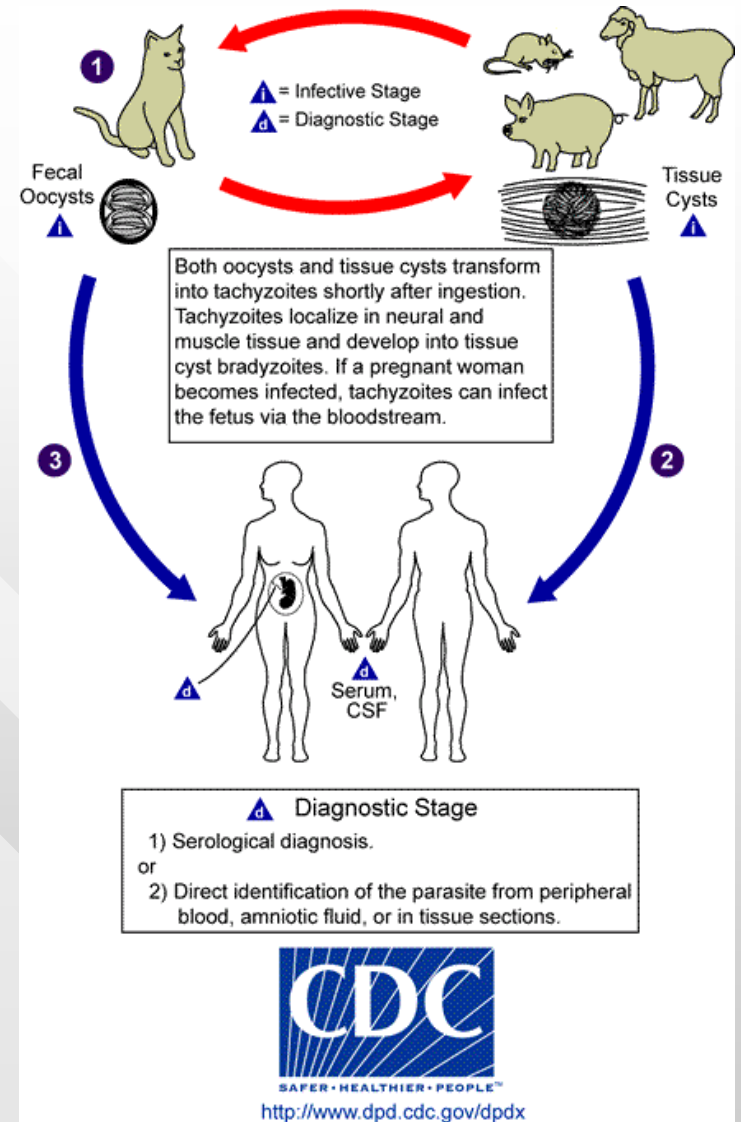
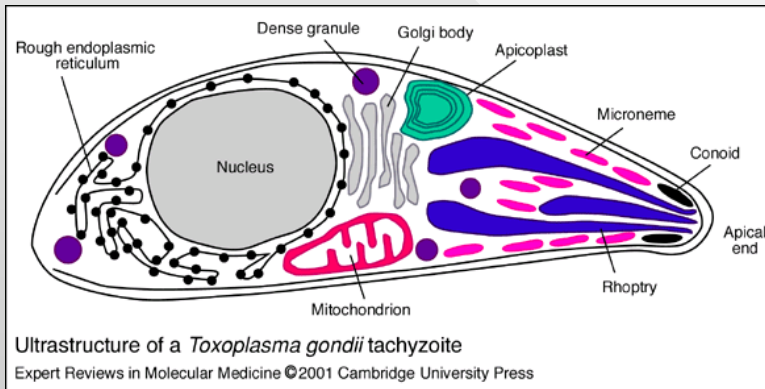


Evarcha culicivora (Arachnida Salticidae)
ragno vampiro saltatore e predatore
selettivo di *A. gambiae*

Toxoplasma gondii



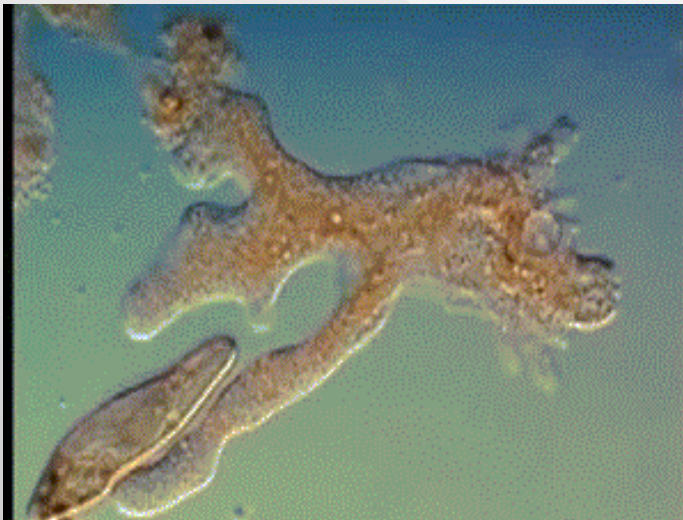
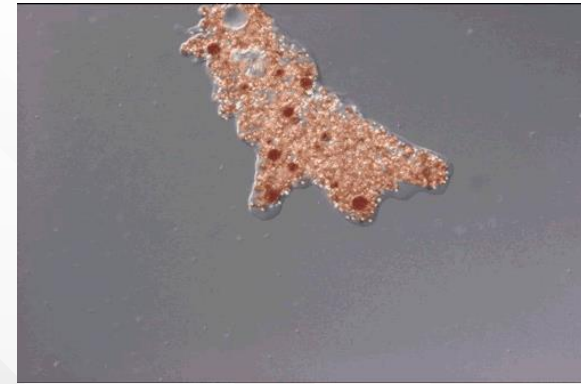
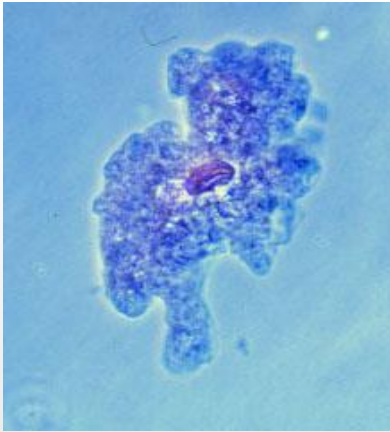
- Agente della toxoplasmosi a ciclo complesso predatore, nel quale l'uomo è ospite accidentale
- La forma infettiva (tachizoite) è pericolosa in gravidanza perché forma cisti nel cervello e nel fegato del feto
- Il genoma di *T. gondii* a 14 cromosomi è stato completamente sequenziato nel 2006, compreso il piccolo DNA circolare dell'apicoplasto



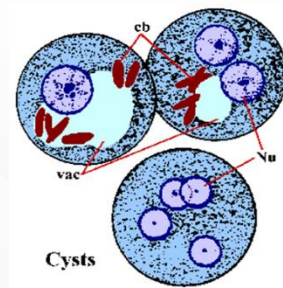
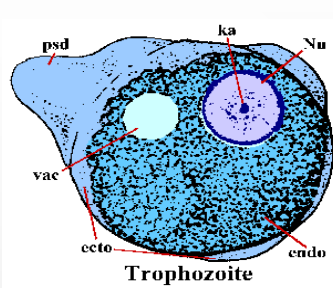
Database di *Toxoplasma* – ToxoDB

<http://toxodb.org/toxo/>

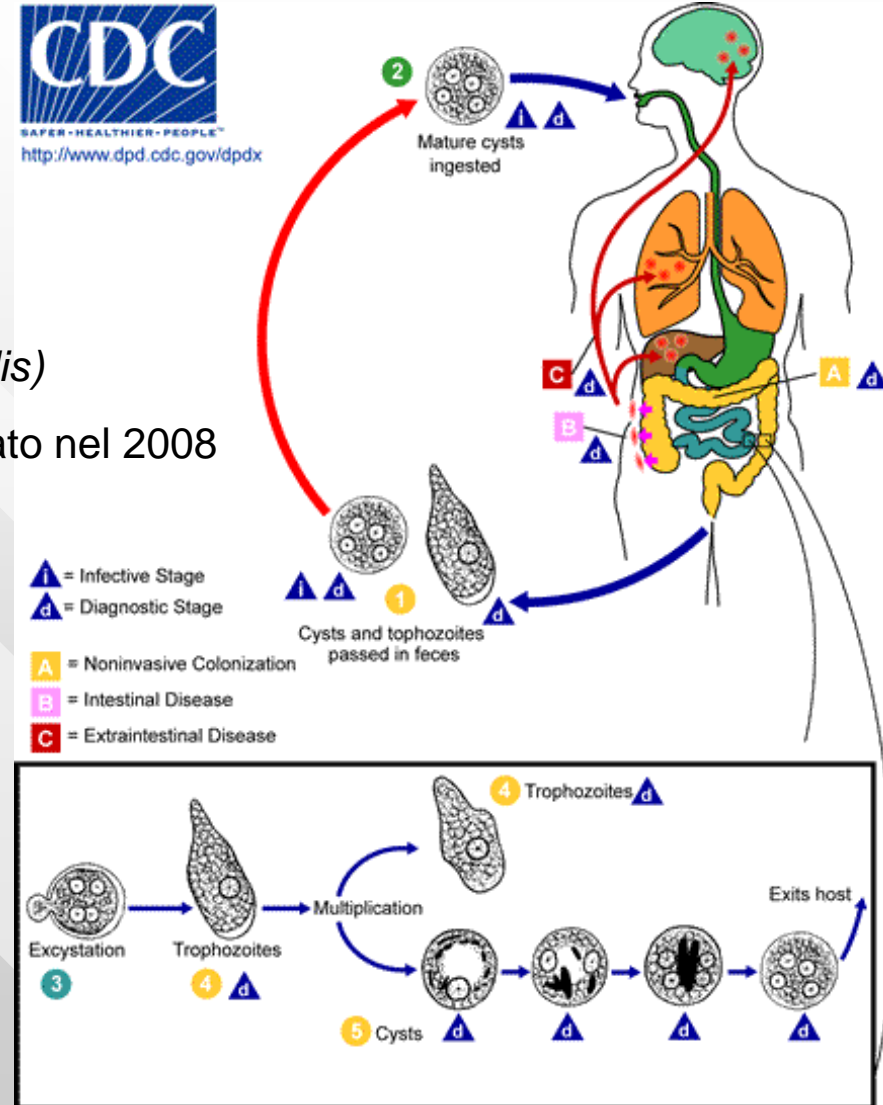
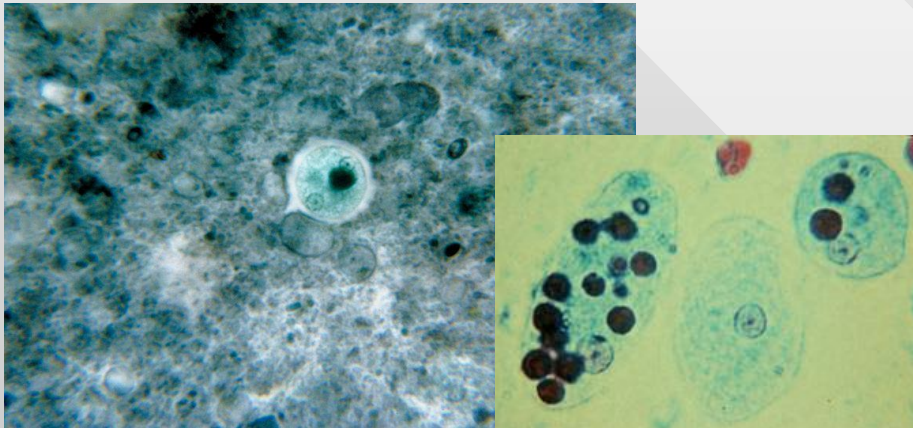
Phylum Amebozoa: le amebe, protisti con pseudopodi lobati



Entamoeba histolytica (Lobosa, Phylum Amebozoa) agente della amebiasi intestinale



- Privo di mitocondri (come *G. lamblia* e *T. vaginalis*)
- Genoma a 14 cromosomi interamente sequenziato nel 2008
- Parassitosi a tipica contaminazione oro-fecale



Fonte:
<https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>

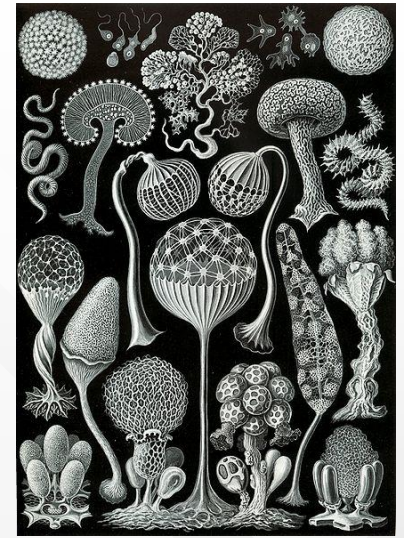
The background of the slide features a series of parallel diagonal stripes in various shades of gray, creating a textured, modern aesthetic.

Protisti che formano colonie

Le “muffe mucillaginose”
 (“slime molds”, Protista Amebozoa)

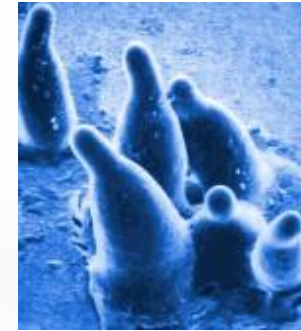
amebe sociali

modello della transizione da unicellularità a pluricellularità



Dictyostelium discoideum (Mycetozoa Dictyostelidae)

(“slime mold”, “Dicty”)

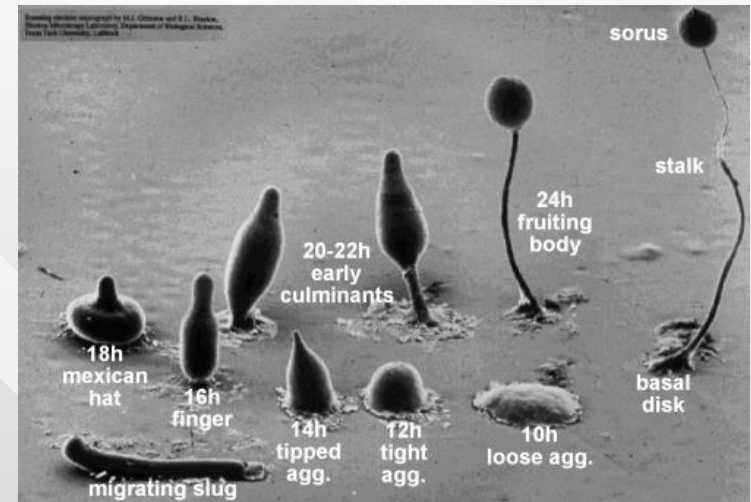
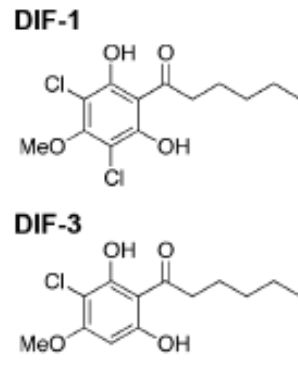


Organismo modello fondamentale per la transizione unicellularità-pluricellularità e per il differenziamento cellulare

10000-50000 amebe singole (**mixamebe**) si uniscono per formare un corpo fruttifero, tramite segnali basati sull'**adenilato ciclasi che ciclizza l'AMP** (cAMP, segnale di carenza energetica), su glicoproteine di superficie (fase di aggregazione) e su **fattori di differenziamento (DIF)**

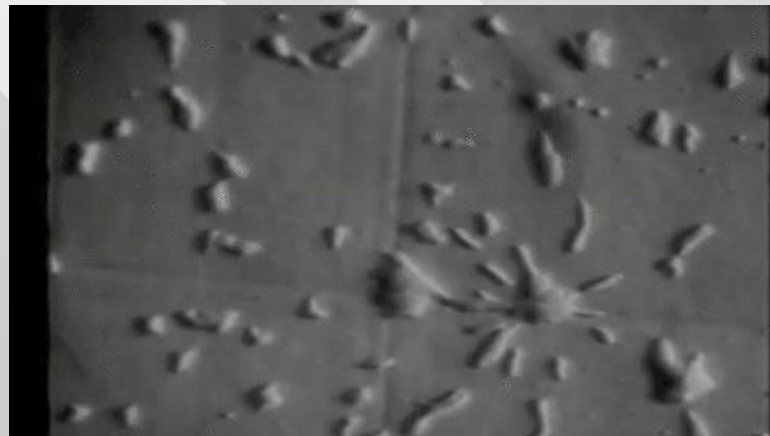
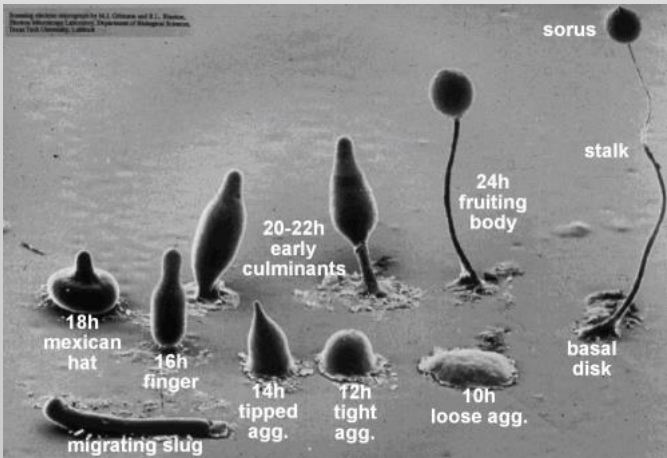
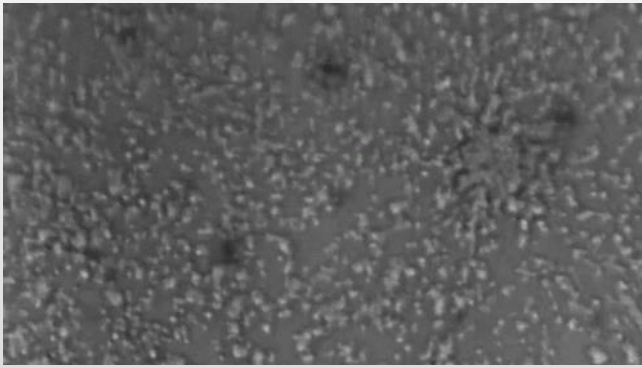
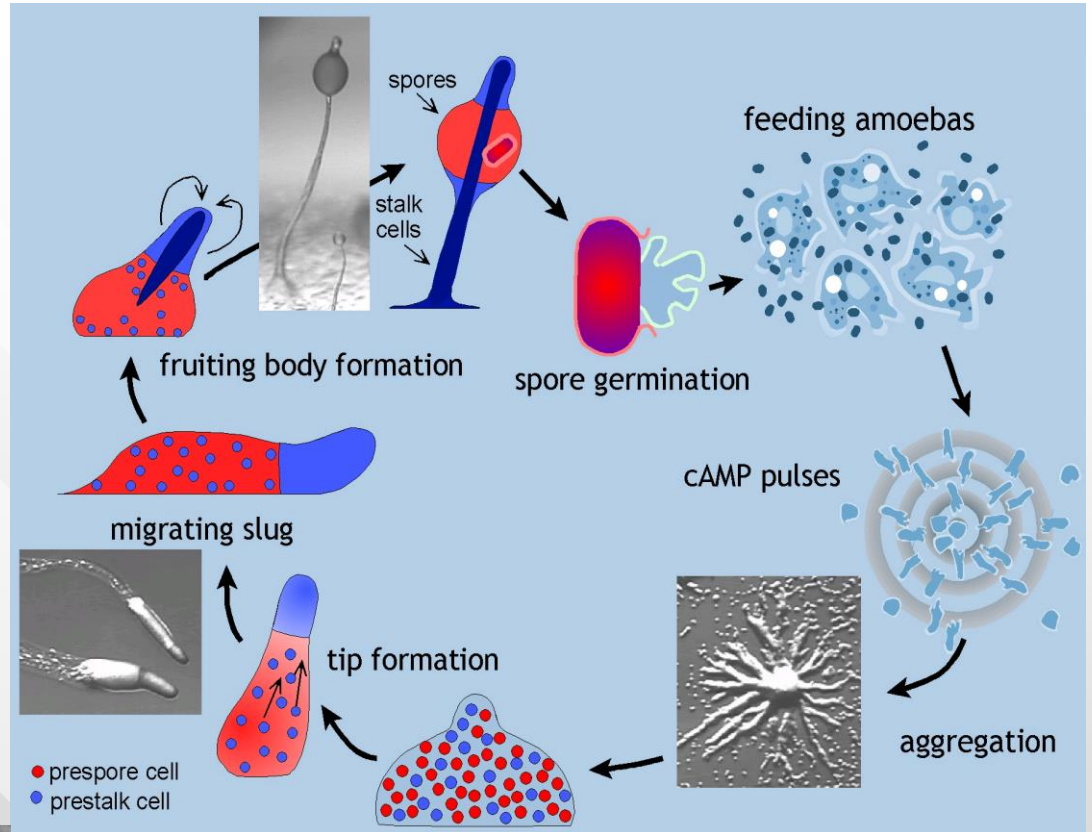
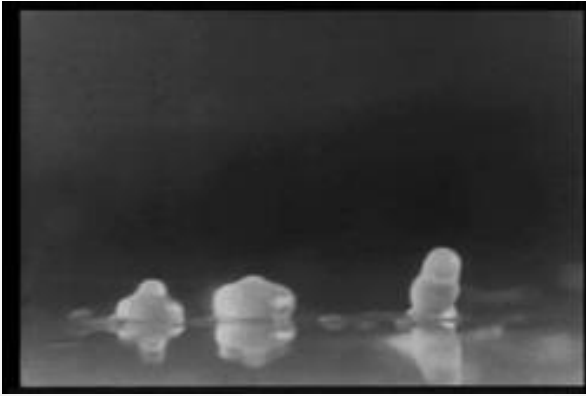
Genoma a 6 cromosomi interamente sequenziato nel 2005 (Eichinger et al., Nature 435, 2005), con geni omologhi a quelli degli Eucarioti superiori

I **DIF di *D. discoideum*** (esafenoni clorurati) sono **potenti agenti antitumorali**, interferendo con il funzionamento dei mitocondri nelle cellule cancerose umane HeLa (Kubohara et al, 2013)

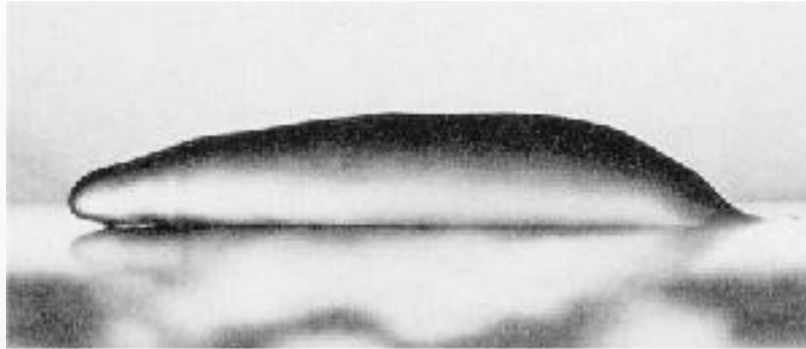


Database di *D. discoideum*: <http://dictybase.org/>

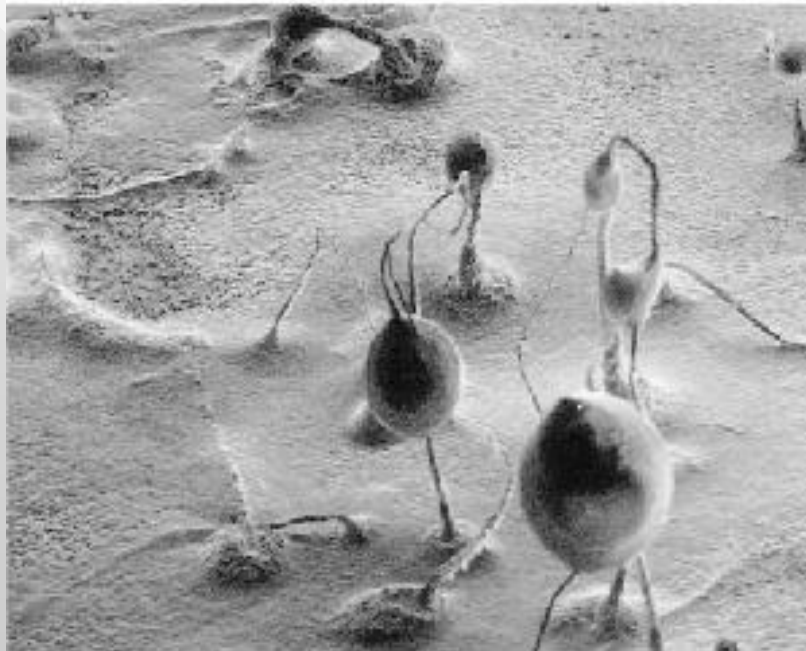
Ciclo vitale di *D. discoideum*



“Slug” (in inglese “lumaca”) e corpo fruttifero di *D. discoideum*



(a) *Dictyostellum discoideum*



(b) *Dictyostellum discoideum*

Alcuni ceppi di *D. discoideum* hanno un sistema primitivo di “agricoltura” simbiotica (Nature, 2011)

- Le amebe si nutrono normalmente di batteri (*E. coli* e *Klebsiella aerogenes*) ma non li “digeriscono” tutti
- Ne “conservano” una parte in fagosomi non attivi, fino alla formazione del corpo fruttifero
- Quando le spore germinano, i batteri escono dalle cellule per escitosi e si dividono, restando accanto alle amebe

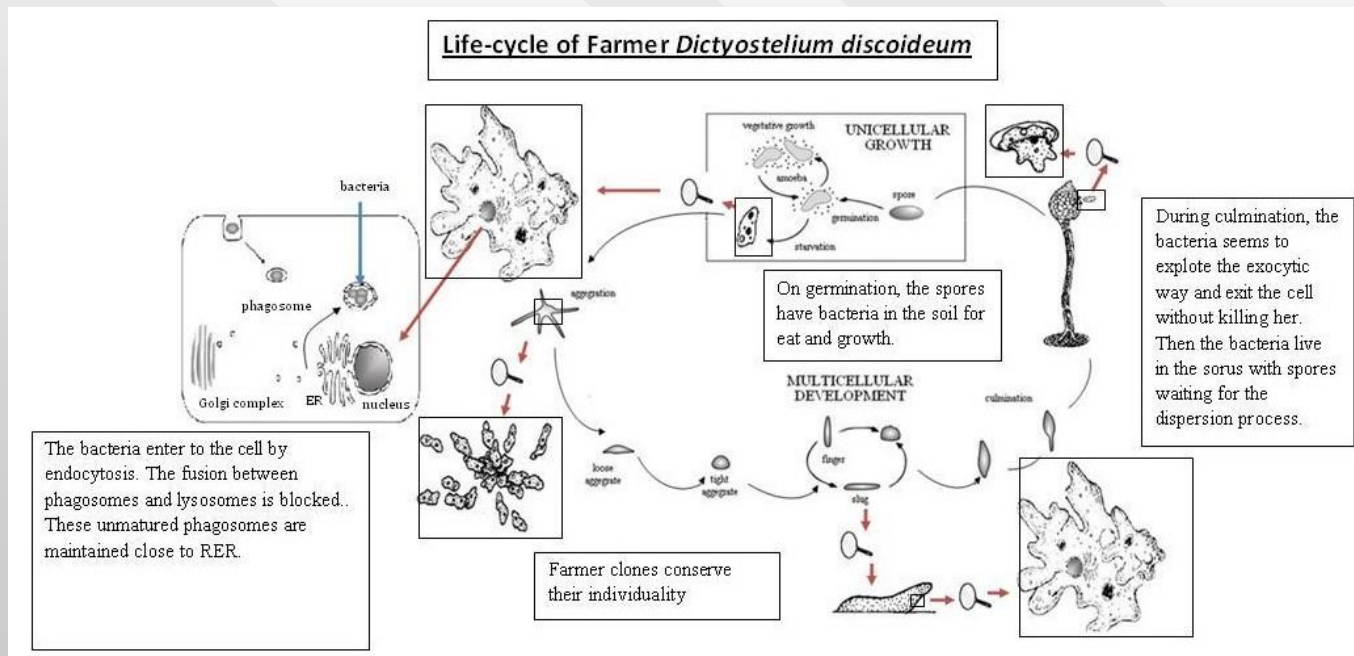
doi:10.1038/nature09668

Primitive agriculture in a social amoeba

Debra A. Brock¹, Tracy E. Douglas¹, David C. Queller¹ & Joan E. Strassmann¹

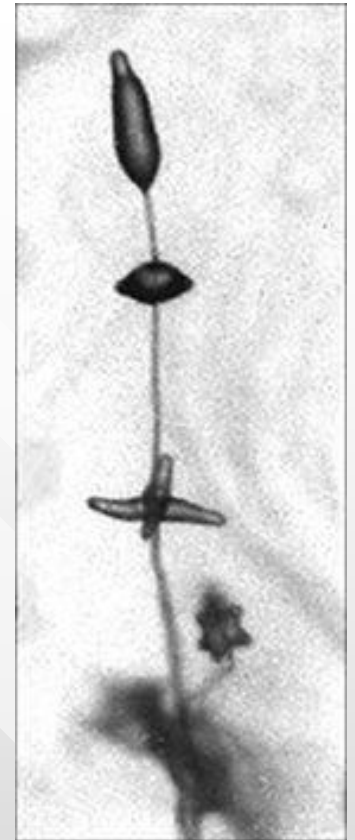
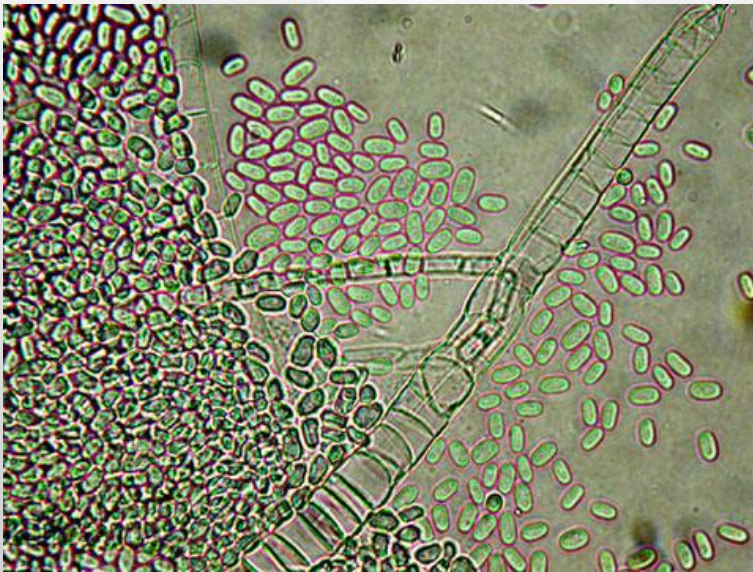
Agriculture has been a large part of the ecological success of humans¹. A handful of animals, notably the fungus-growing ants, termites and ambrosia beetles²⁻⁴, have advanced agriculture that involves dispersal and seeding of food propagules, cultivation of the crop and sustainable harvesting⁵. More primitive examples, which could be called husbandry because they involve fewer adaptations, include marine snails farming intertidal fungi⁶ and damselfish farming algae⁷. Recent work has shown that microorganisms are surprisingly like animals in having sophisticated behaviours such as cooperation, communication^{8,9} and recognition^{10,11}, as well as many kinds of symbiosis¹²⁻¹⁵. Here we show that the social amoeba *Dictyostelium discoideum* has a primitive farming symbiosis that includes dispersal and prudent harvesting of the crop.

fruiting bodies from each and then spotted these individually on nutrient agar plates to test for bacterial growth. This assay confirmed that sori from some clones consistently contained bacteria that could initiate new populations (Fig. 1c, top panel) and that sori from other clones did not (Fig. 1c, bottom panel). Bacteria also grew when directional light induced the multicellular slugs to migrate away from the original locations to bacteria-free zones of a plate before fruiting, indicating that bacteria are carried in the slugs. Four sets of wild isolates tested in this way yielded 36% farmers: 13 of 35 tested overall; 4 of 9 from Minnesota; 5 of 14, 3 of 9 and 1 of 3 from three sample dates from Virginia. These data suggest that farmer clones are common, are found in the same locations as non-farmer clones and are therefore likely to have access to similar bacteria.



Polyspondylium pallidum (Mycetozoa Dictyostelidae)
un altro organismo modello tra le “slime molds”

Nel 2011 è stato completato il sequenziamento di *Polyspondylium pallidum*, un'altra muffa mucillaginosa modello appartenente alla famiglia Dictyostelidae



Fase di aggregazione delle mixamebe di *P. pallidum*, causata dall'emissione di una acrasina (N-propionil-gamma-glutamil-ornitina, estere etilico)