

Il processo di sporulazione come modello di differenziamento nei batteri

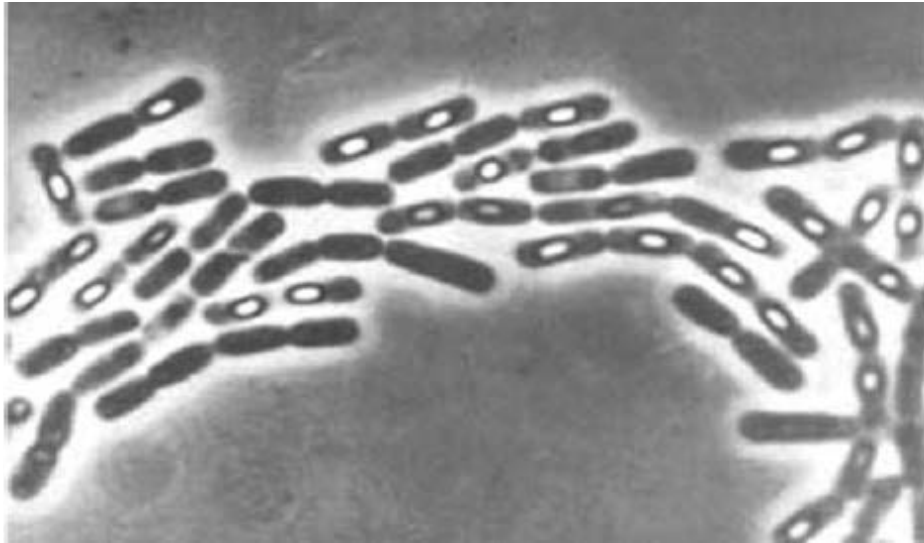
Avviene nei Batteri Gram positivi  
*Clostridium tetani*,  
*Clostridium botulinum*  
*Bacillus anthracis* e in alcuni Gram-

Le spore svolgono un ruolo cruciale nella diffusione di alcuni gravi malattie

*Potete trovare una bella lezione sulla spora on line a questo sito*

Ibioseminar.org  
Prof. Richard Losick  
Spore formation

# I batteri possono produrre sia endospore che esospore.

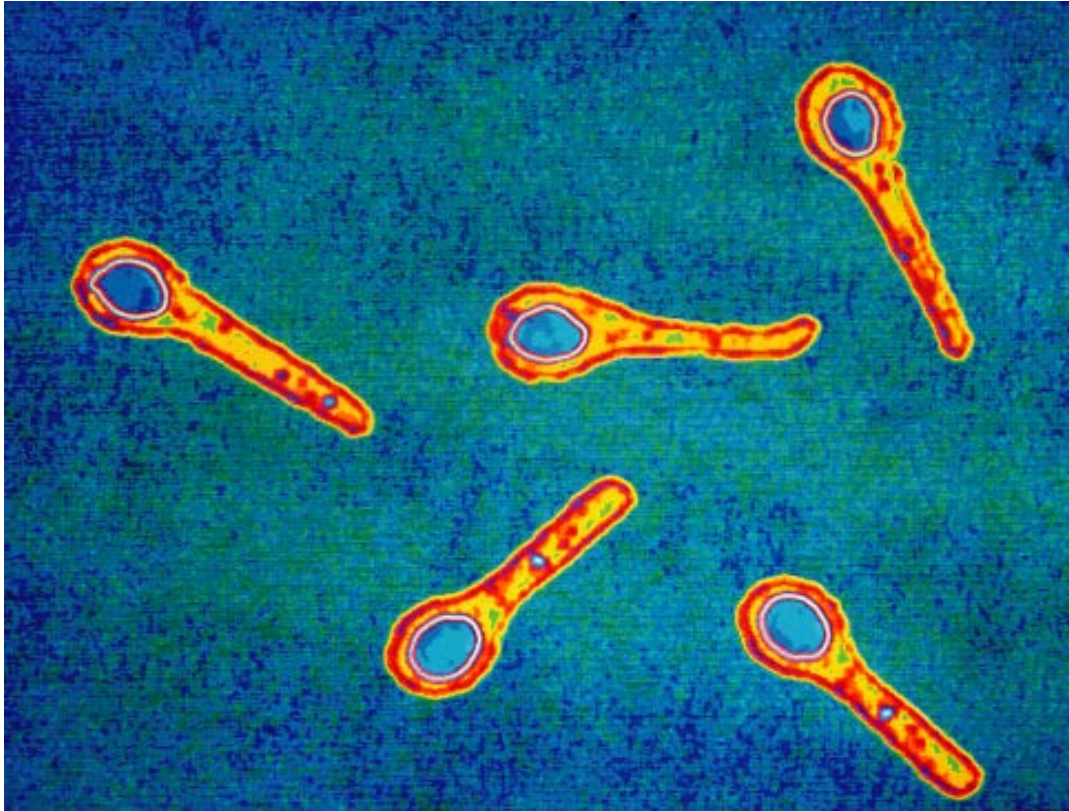


Le endospore rappresentano delle forme di sopravvivenza a condizioni impossibili per la cellula vegetativa infatti sono in grado di resistere a diversi agenti chimici (cloroformio, etanolo, metanolo) o fisici (calore e pH estremi, raggiUV). Sono prodotte da diversi batteri Gram positivi tra i quali i più noti sono Bacillus e Clostridium ma anche da alcuni Gram - (Sporomusa e Coxiella burneti)

Alcuni batteri producono delle esospore che sono diverse dalle endospore infatti le esospore si generano con un processo completamente diverso ed hanno una resistenza solo leggermente superiore a quella delle cellule vegetative

La localizzazione dell'endospora nella cellula e la sua forma sono caratteristiche importanti per la classificazione.

La maggior parte delle specie hanno endospore di forma ovale localizzate in posizione più o meno centrale all'interno della cellula madre ( o sporangio) .



*Clostridium tetani* rappresenta un'eccezione in quanto le cellule producono endospore in posizione laterale con un diametro superiore a quello della cellula dando alla cellula madre un aspetto a clava

Quando le condizioni di crescita sono favorevoli, l'endospora germina per formare una cellula vegetativa.

**Germinazione**

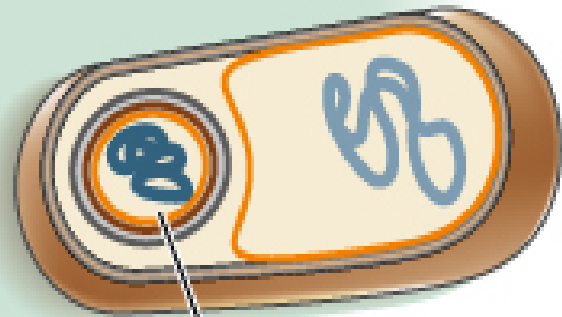
Cellula vegetativa



DNA

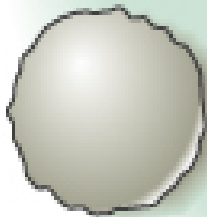
Quando i nutrienti sono scarsi, la cellula vegetativa forma un'endospora.

**Sporulazione**



Prespora

Endospora matura



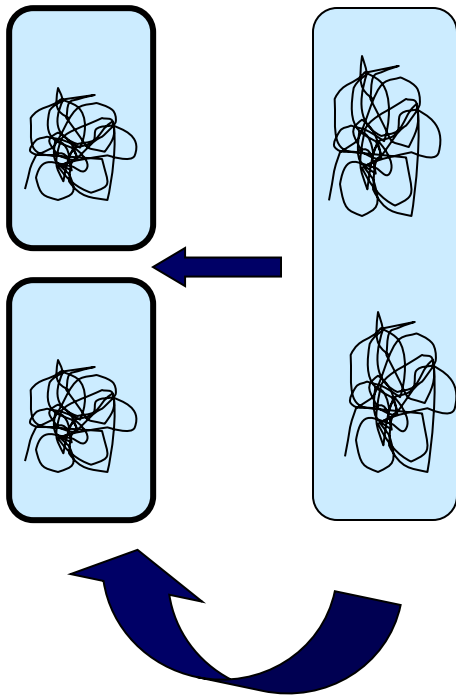
# SPORULAZIONE

Rappresenta il fenomeno meglio studiato per la differenziazione nel mondo dei microrganismi

La sua caratteristica principale è data da una organizzazione ed una coordinazione spaziale e temporale dell'espressione dei geni coinvolti in ciascuna fase.

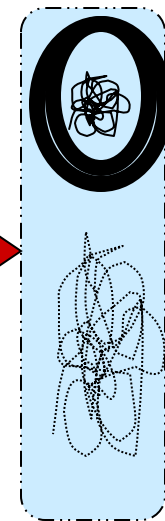
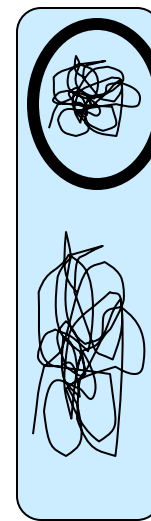
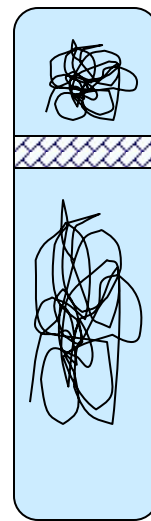
Tutto il processo si basa sull'espressione differenziale di fattori  $\sigma$  differenti che attivano la trascrizione di pattern genici differenti

# Ciclo vegetativo



# Sporulazione

Prespora

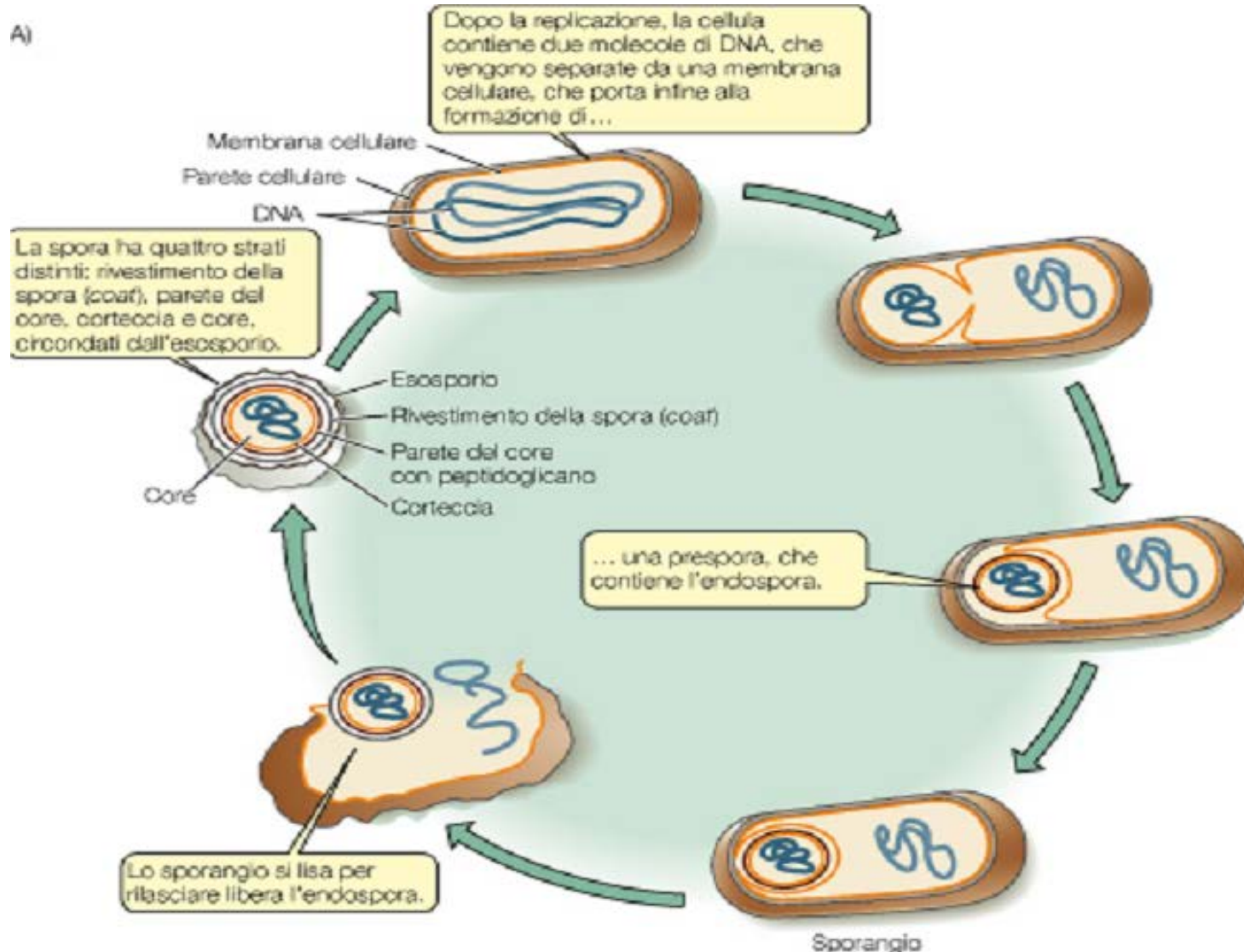


Spora matura

Lisi della cellula madre



# Le tappe della formazione della spora



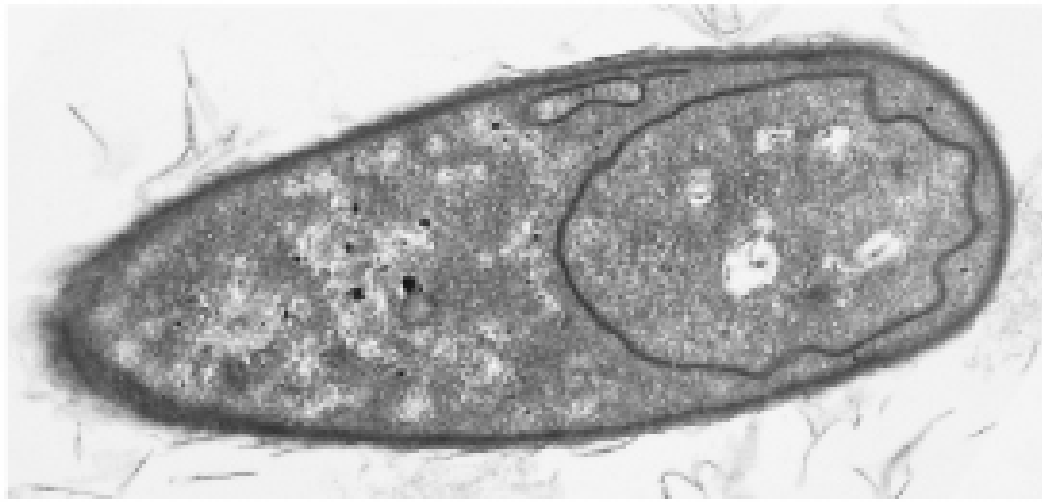


Il protoplasto di una spora matura è molto diverso dalla cellula vegetativa.

- Si trova in uno stato di parziale disidratazione ( 10 al 30% di H<sub>2</sub>O)
- Il grado di disidratazione del core aumenta la resistenza al calore dell'endospora e conferisce resistenza ad alcune sostanze chimiche come H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e causa inattività degli enzimi

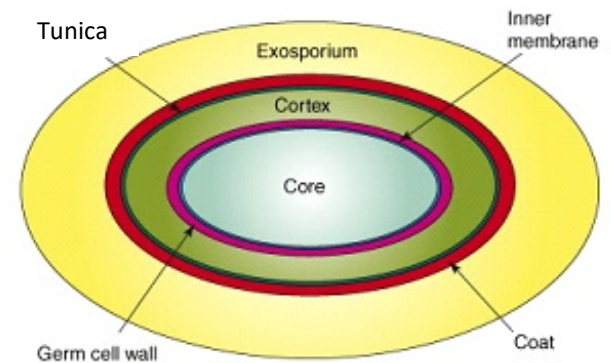
Il citoplasma della spora contiene una gran quantità di proteine "core specifiche" **SASPs Small Acid Soluble Spore Proteins**

SASPs legano fortemente il DNA e lo proteggono da potenziali danni da UV, essiccazione e calore  
inoltre funzionano come fonte di carbonio e di energia per la formazione della cellula vegetativa dall'endospora.

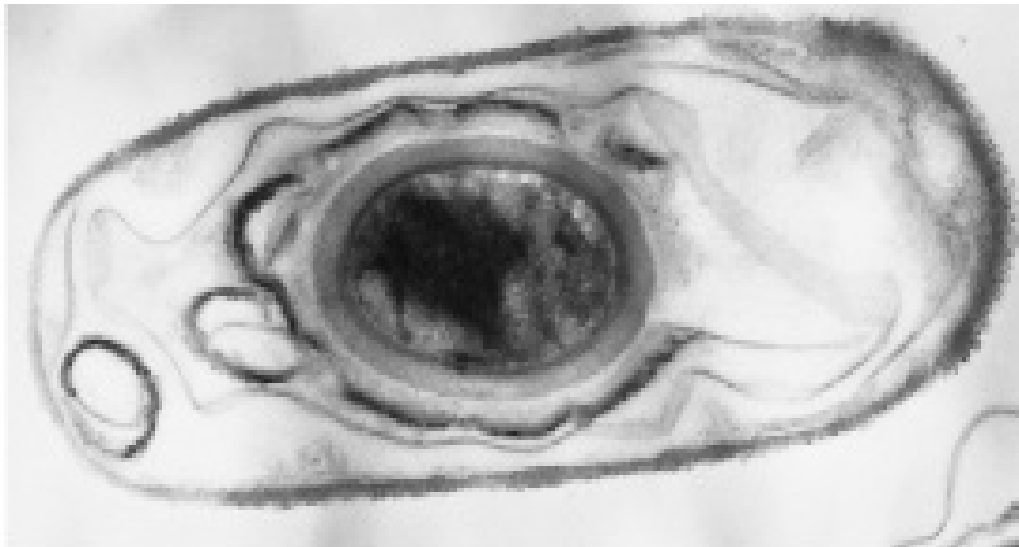


Stadio iniziale di formazione della spora

## I rivestimenti della spora



- Parete del core con peptidoglicano
- Cortex o corteccia
- Rivestimento della spora o tunica sporale
- Esosporio



Spora matura all'interno della cellula madre o sporangio

La spora spesso è circondata da un sottile strato definito  
**ESOSPORIO**

Subito sotto si trova la **TUNICA SPORALE** costituita da  
vari strati proteici. **La tunica**

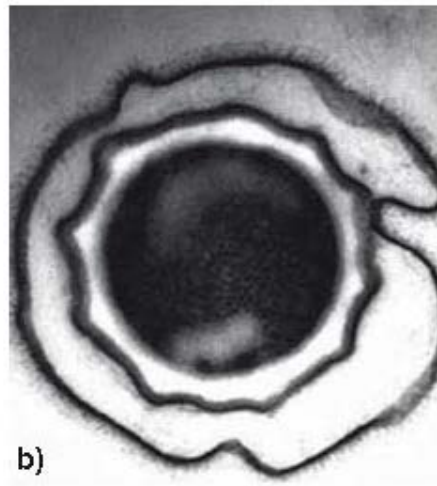
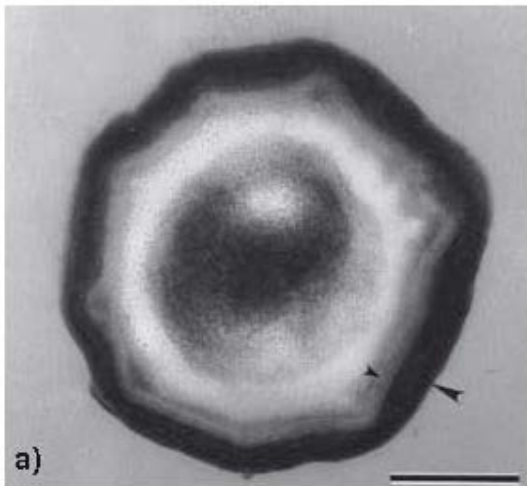
- conferisce resistenza a molecole tossiche ed ad agenti chimici
- probabile sede degli enzimi coinvolti nella germinazione

**CORTECCIA (CORTEX)** circa metà del volume della spora  
costituita da peptidoglicano con meno legami crociati

**PARETE del core** della spora è all'interno della corteccia e  
circonda il core

La parte centrale della spora contiene il citoplasma disidratato.

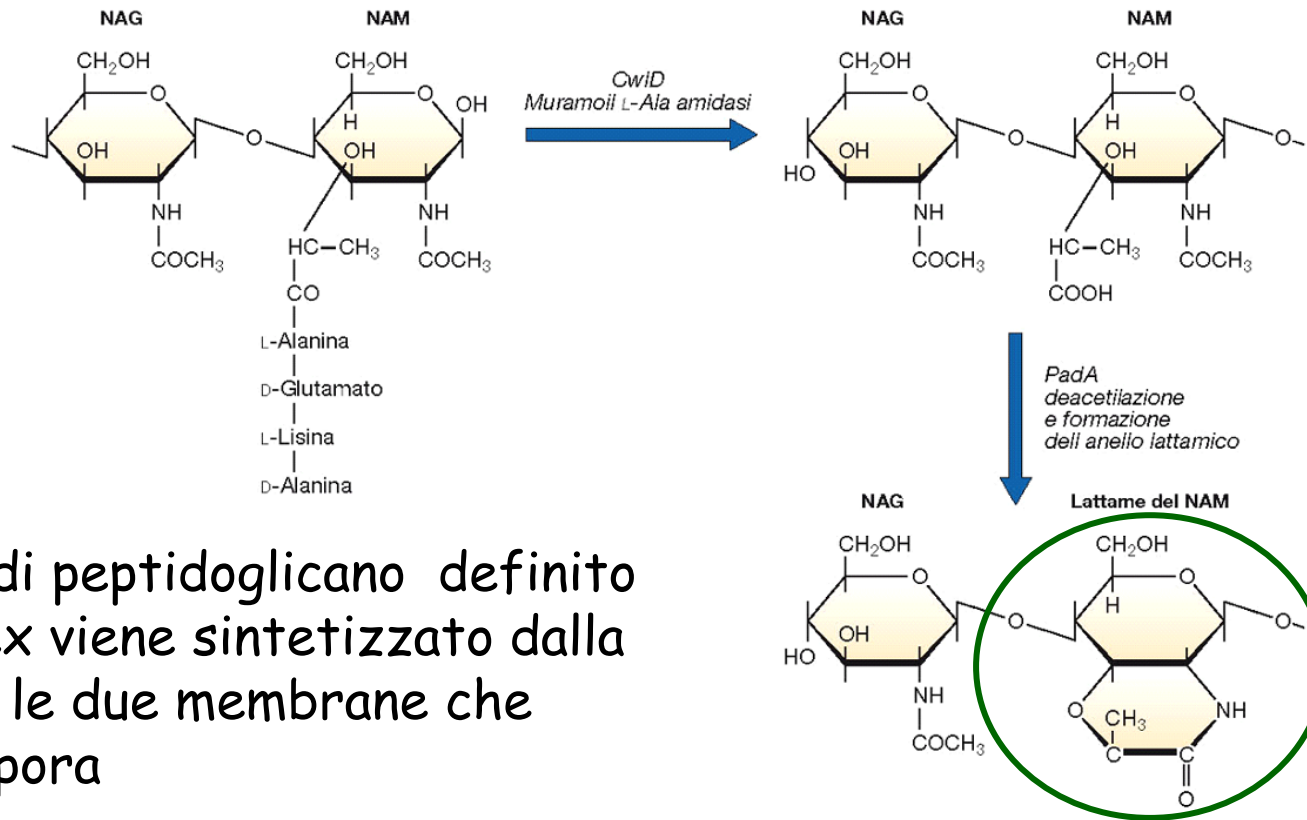
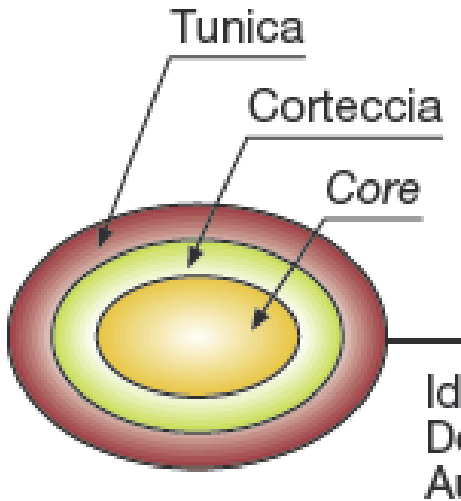
Il cromosoma è rivestito dalle proteine SASP, RNA ribosomiali, da enzimi e da un'elevata concentrazione di dipicolinato di calcio



Tunica sporale  
costituita da un  
foglietto interno ed uno  
esterno

Esosporio nettamente  
separato dalla tunica  
esterna strato basale  
paracristallino a cui è  
associato proteine  
glicosilate

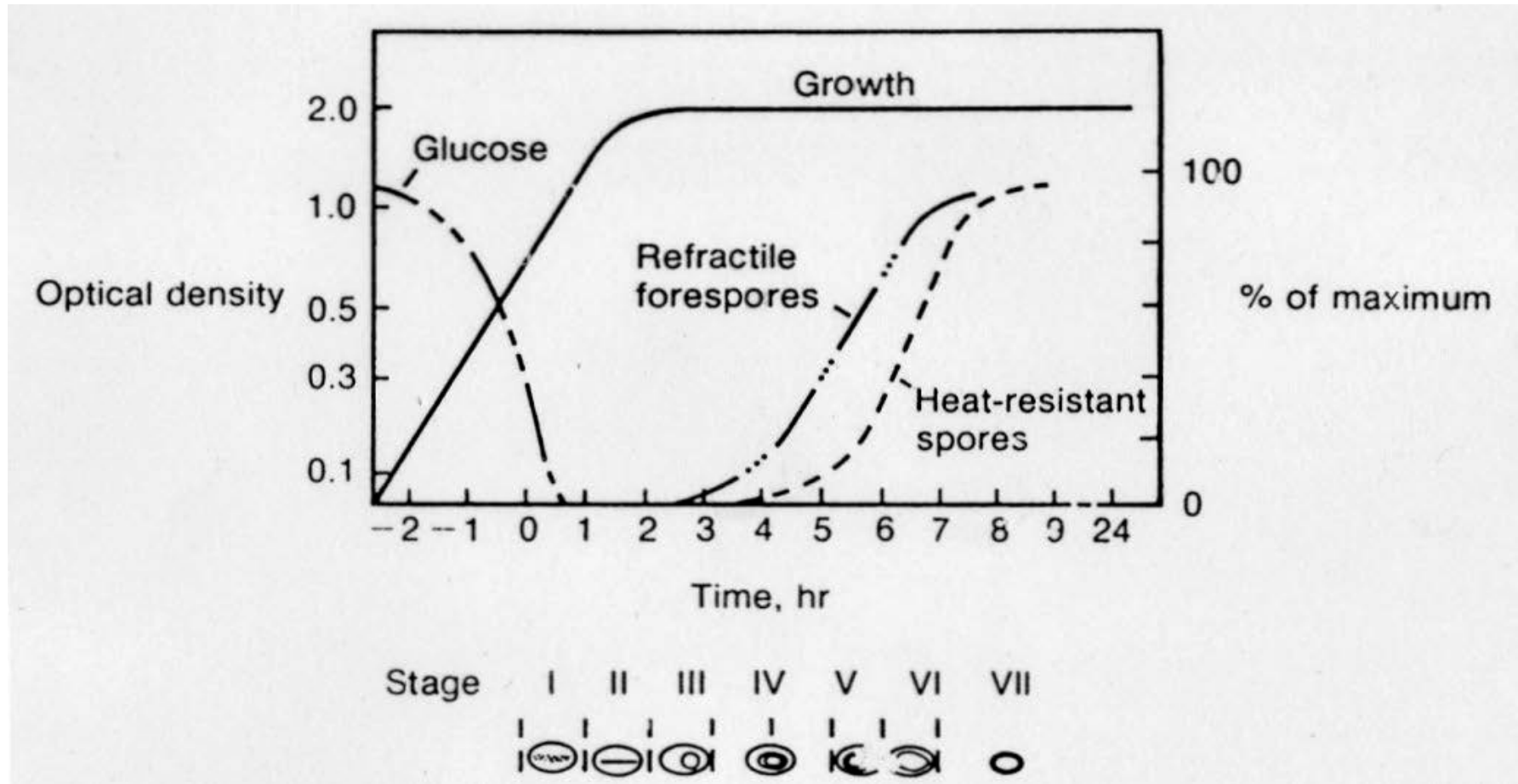
# Formazione della corteccia ( cortex) .



Un denso strato di peptidoglicano definito corteccia o cortex viene sintetizzato dalla cellula madre tra le due membrane che avvolgono la prespora

Il peptidoglicano presente nella corteccia è modificato in quanto circa il 50% dei residui di NAM non contengono la catena peptidica e presentano una ciclizzazione intramolecolare con formazione di un anello lattamico

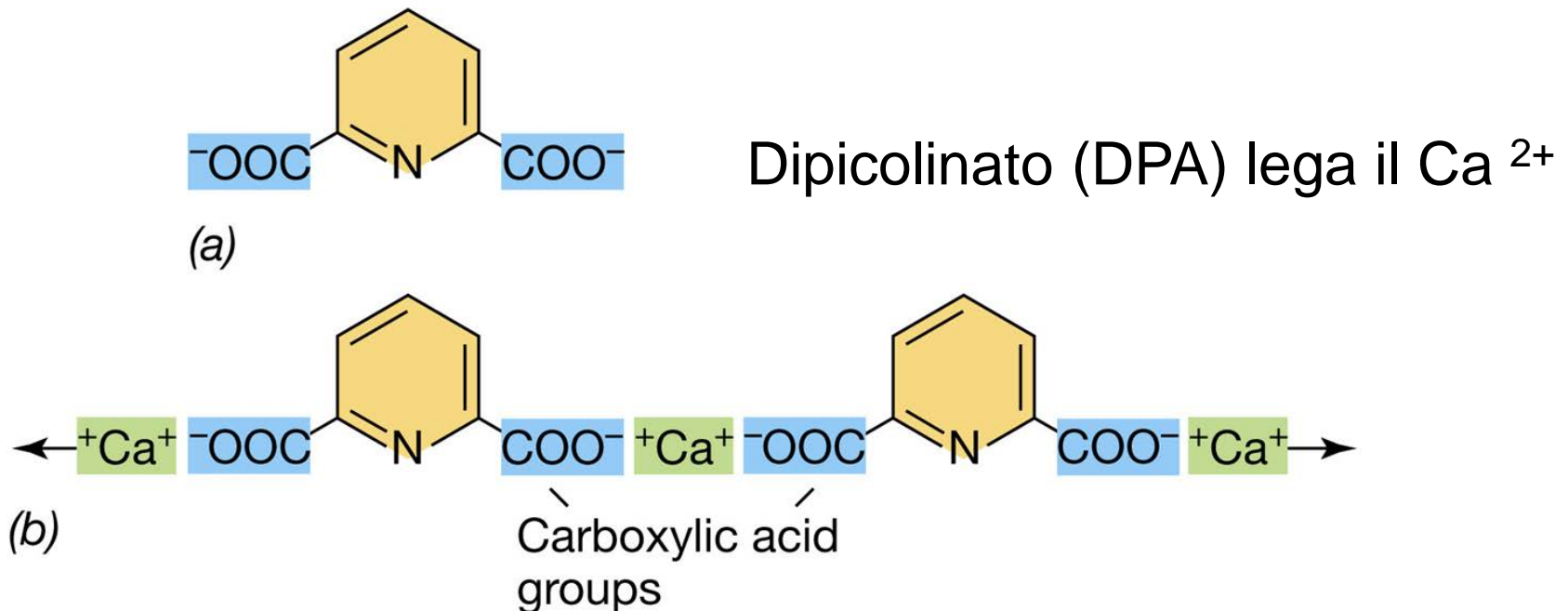
Formazione della spora nel tempo: le varie tappe possono essere seguite al microscopio osservando l'aumento della rifrangenza





L'endospora è ricca di ioni calcio e di un composto specifico l'acido dipicolonico.

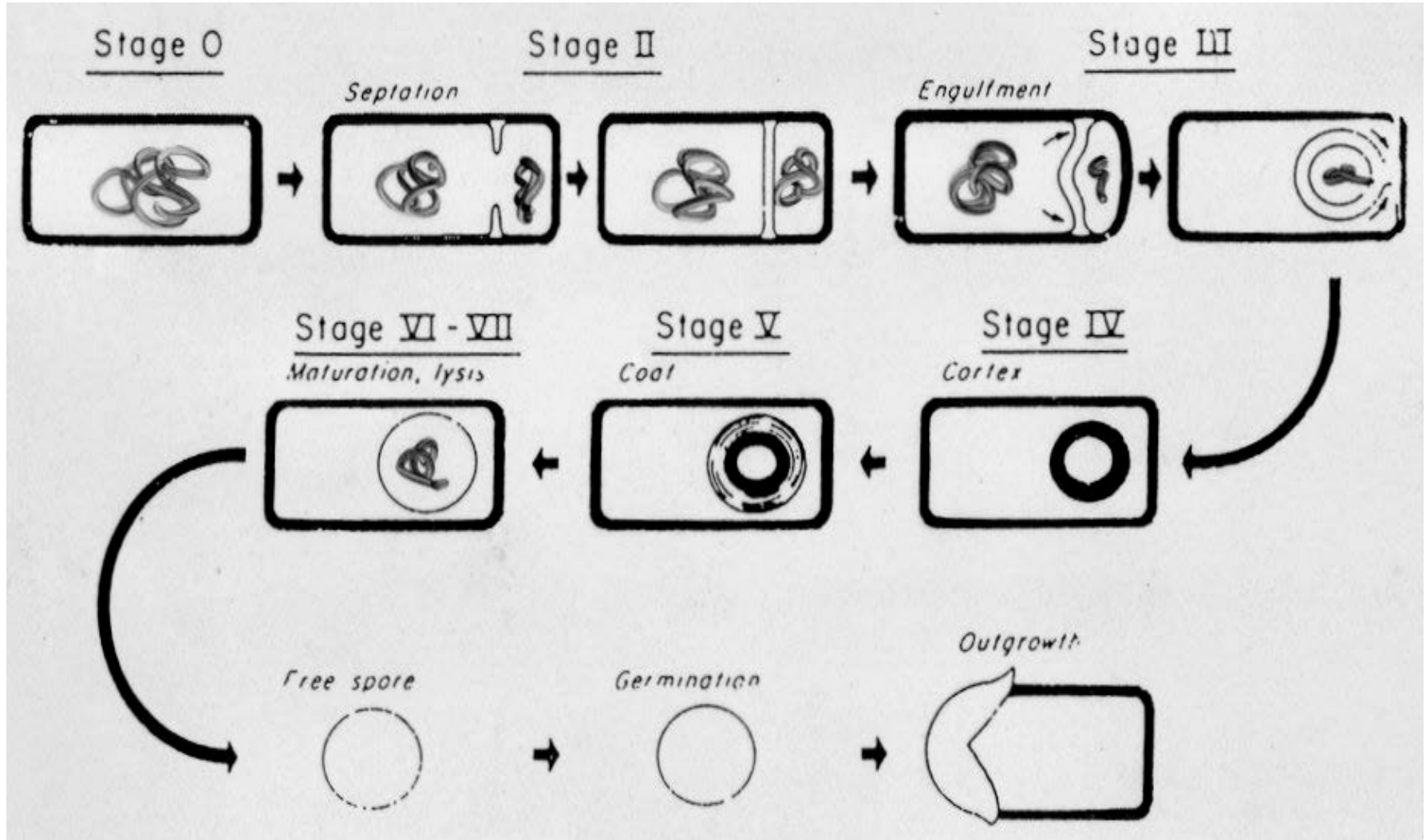
Nella spora si viene a formare il dipicolinato di calcio che contribuisce alla resistenza al calore

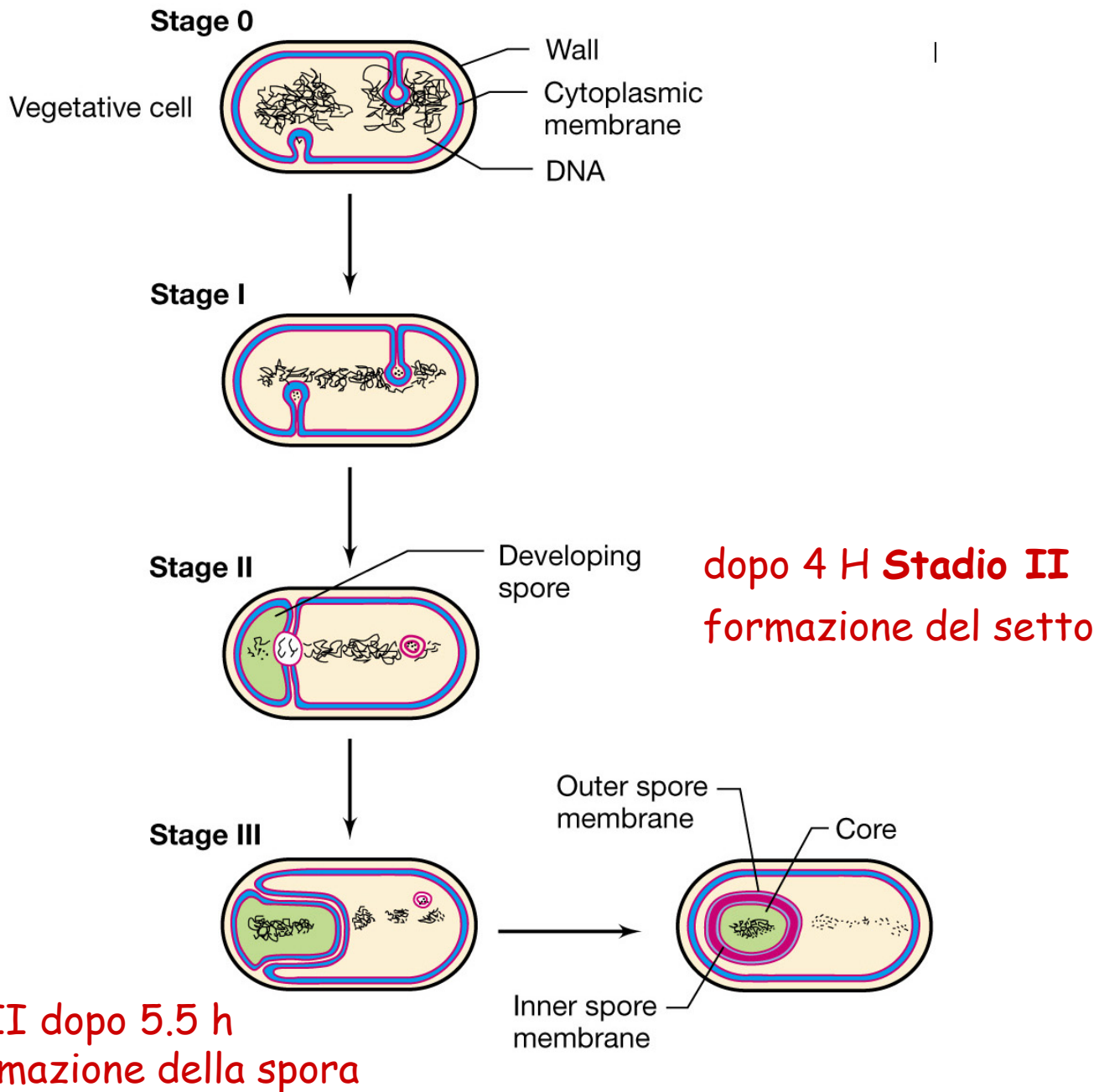


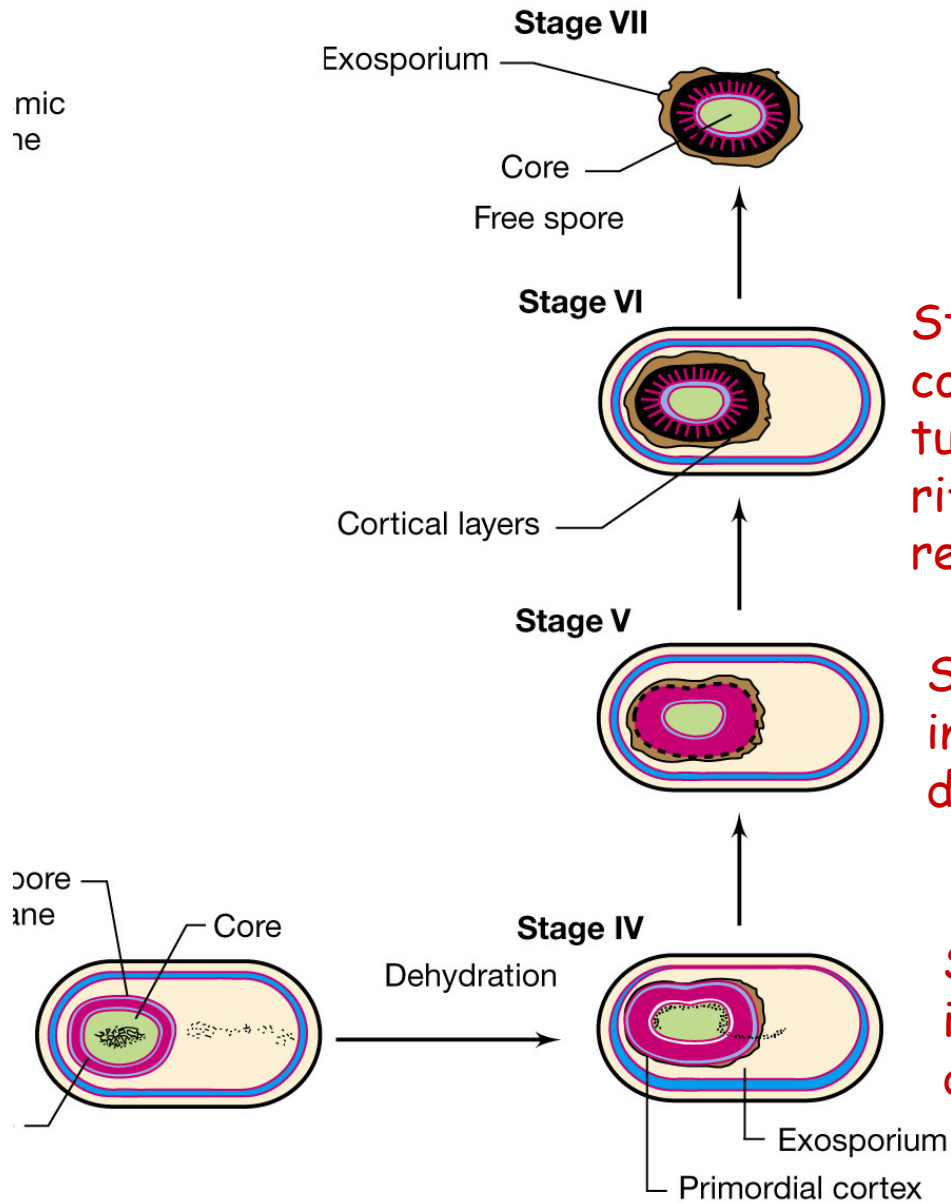
Il 15% del peso secco della spora è acido dipicolinico con ioni calcio

Il complesso calcio dipicolinato contribuiscono alla resistenza al caldo umido, ad agenti ossidanti e possono avere un effetto stabilizzante sugli acidi nucleici

# Il processo di sporulazione può essere suddiviso in 7 tappe





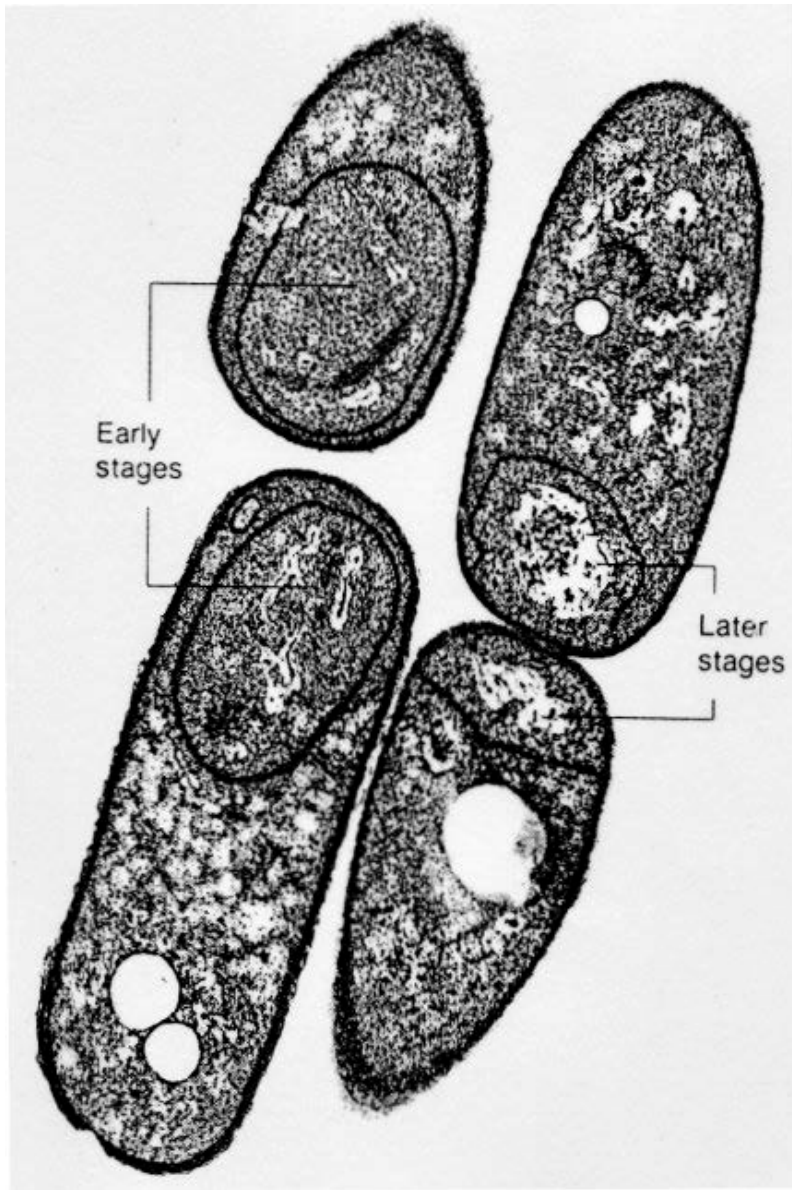


mic  
re

Stadio VI dopo 10.5 h  
completamento della  
tunica aumento della  
rifrangenza e  
resistenza al calore

Stadio V dopo 8 h  
inizio formazione  
della tunica

Stadio IV dopo 6.5 h  
inizio formazione  
della corteccia



Differenti stadi dello sviluppo della endospora



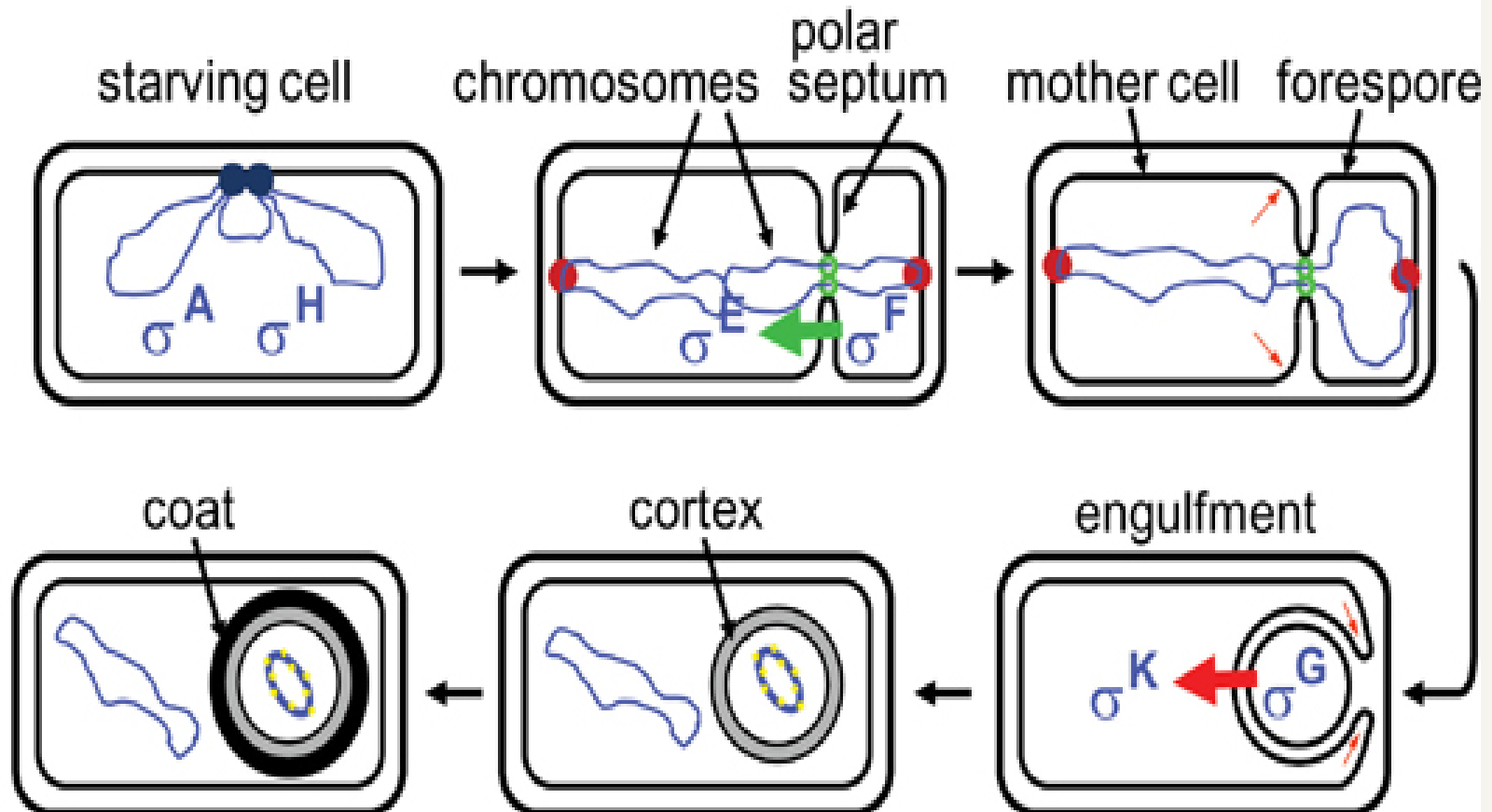
## La resistenza della spora al calore dovuta a molteplici fattori

- stabilizzazione del DNA dovuta al complesso calcio-dipicolinato e da proteine acido solubili
- Disidratazione del protoplasto
- La presenza della tunica sporale
- Attività dei meccanismi di riparazione del DNA
- Maggiore stabilità delle proteine

## La sporulazione è un processo altamente regolato a vari livelli:

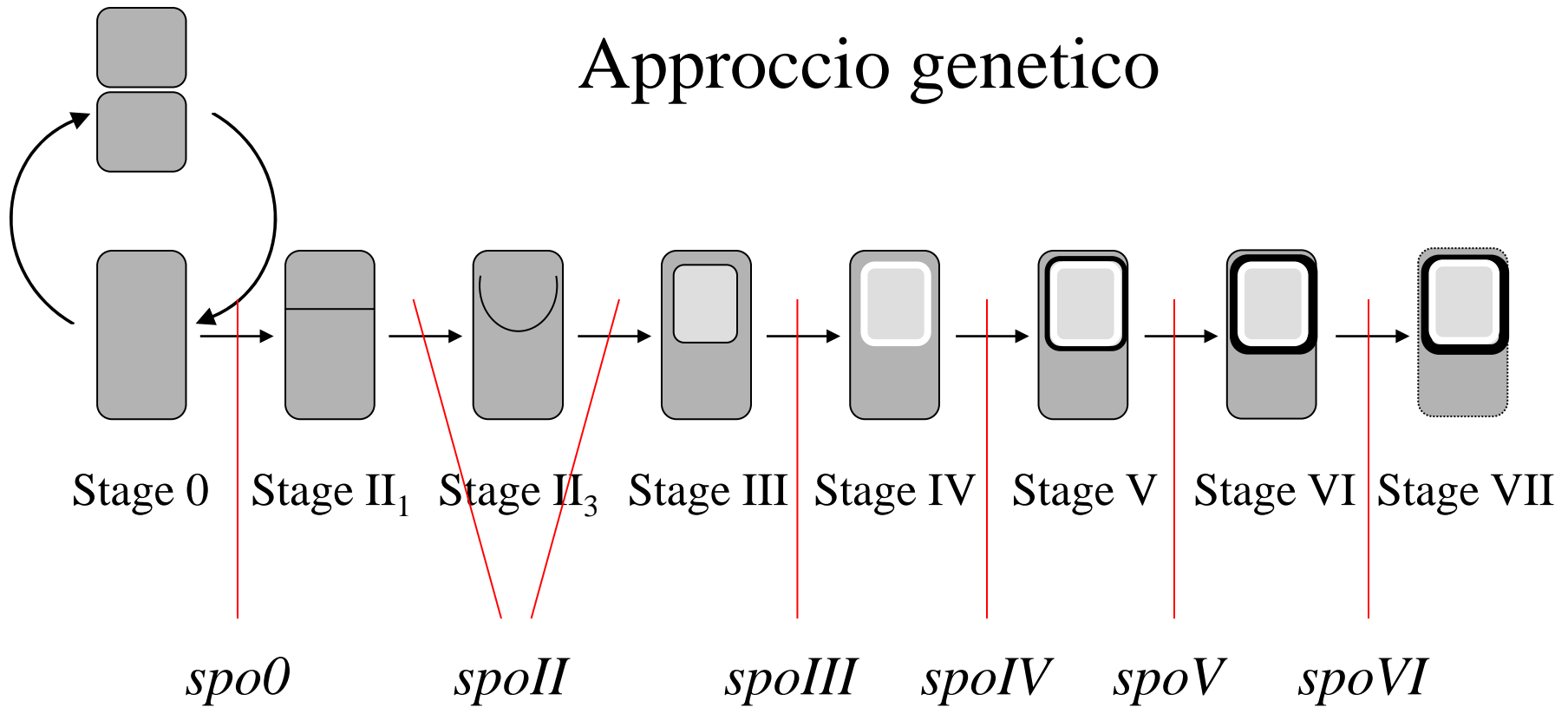
- Sistema di trasduzione del segnale
- Dalla modificazione post-trascrizionale delle proteine
- Da fattori sigma alternativi
- Da regolatori trascrizionali specifici

# Fasi dello sviluppo della spora e dei suoi rivestimenti



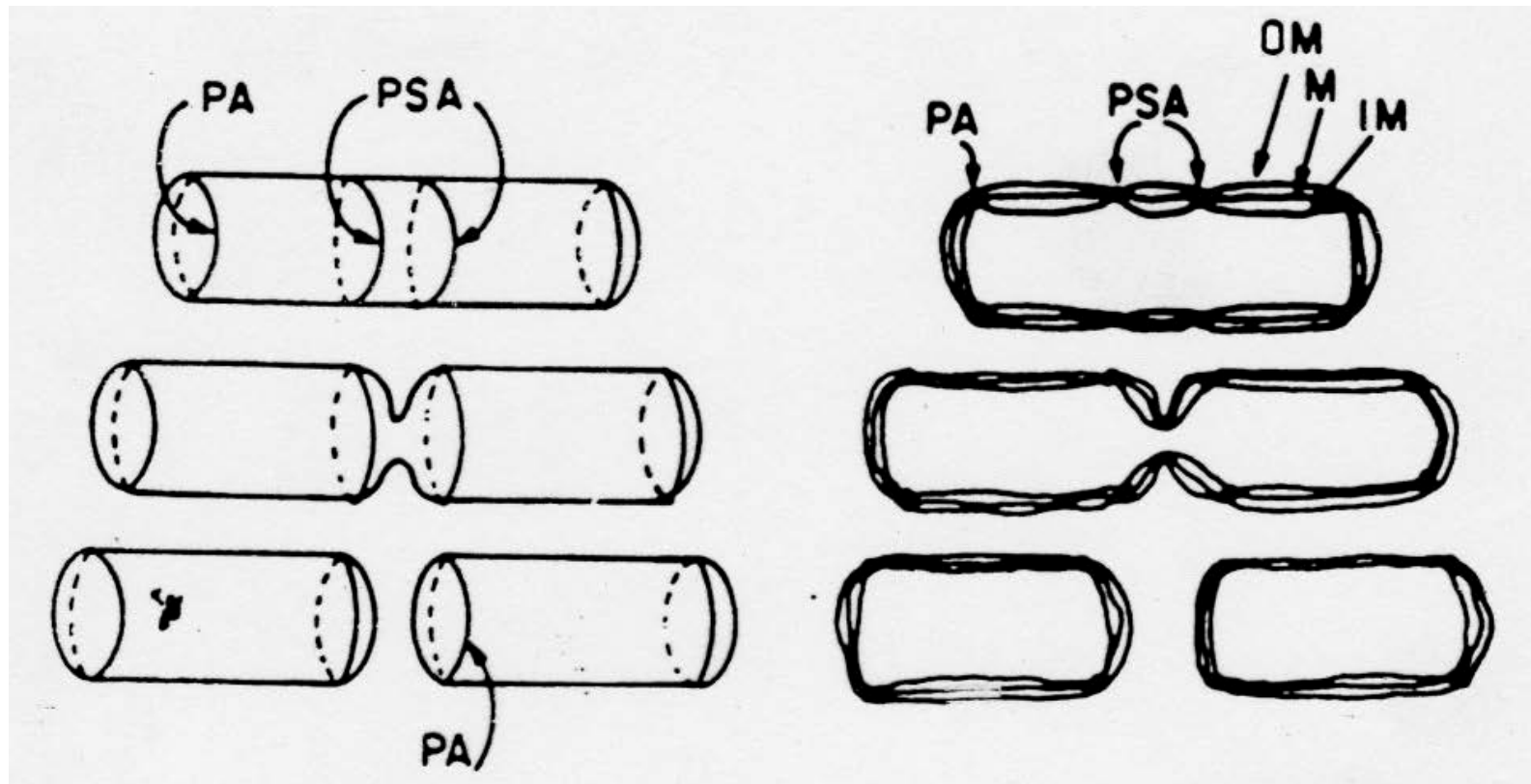
# Stadi della sporulazione di *Bacillus subtilis*

Approccio genetico

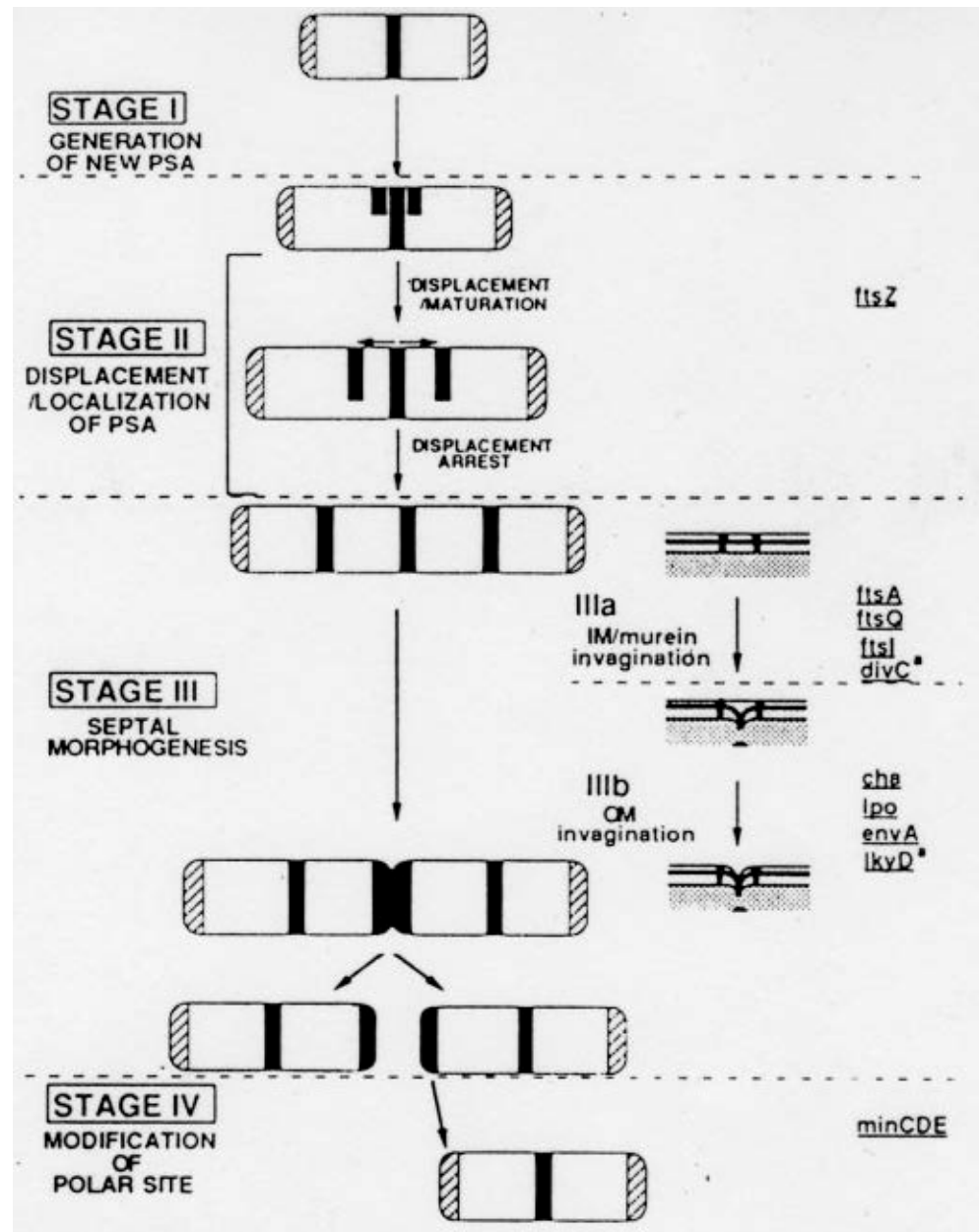


La formazione del setto è preceduta dalla formazione degli anelli perissettali

Gli anelli perissettali sono delle regioni della parete in cui la membrana interna è strettamente connessa con la parete cellulare e con la membrana esterna



1. Nella nuova cellula l'anello perissettale è presente dapprima in posizione centrale
2. Man mano che la cellula aumenta di dimensione si forma il setto proprio all'interno della zona delimitata dagli anelli perissettali e si cominciano a formare nuovi anelli ad enambi i lati dell'anello iniziale.
3. Questi nuovi anelli si muovono lungo la cellula fino a posizionarsi a  $1/4$  e  $3/4$  della lunghezza della cellula in accrescimento
4. Inizia ad invaginarsi il setto fino alla divisione delle cellule

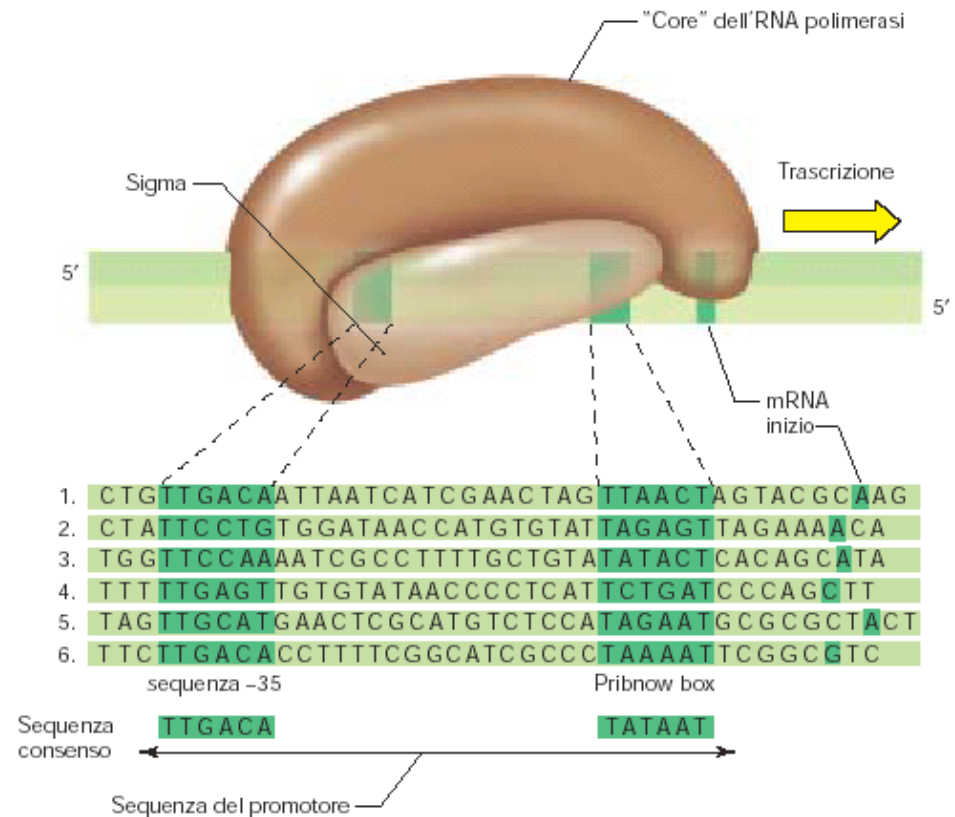




# ■ Cos'è un fattore $\sigma$

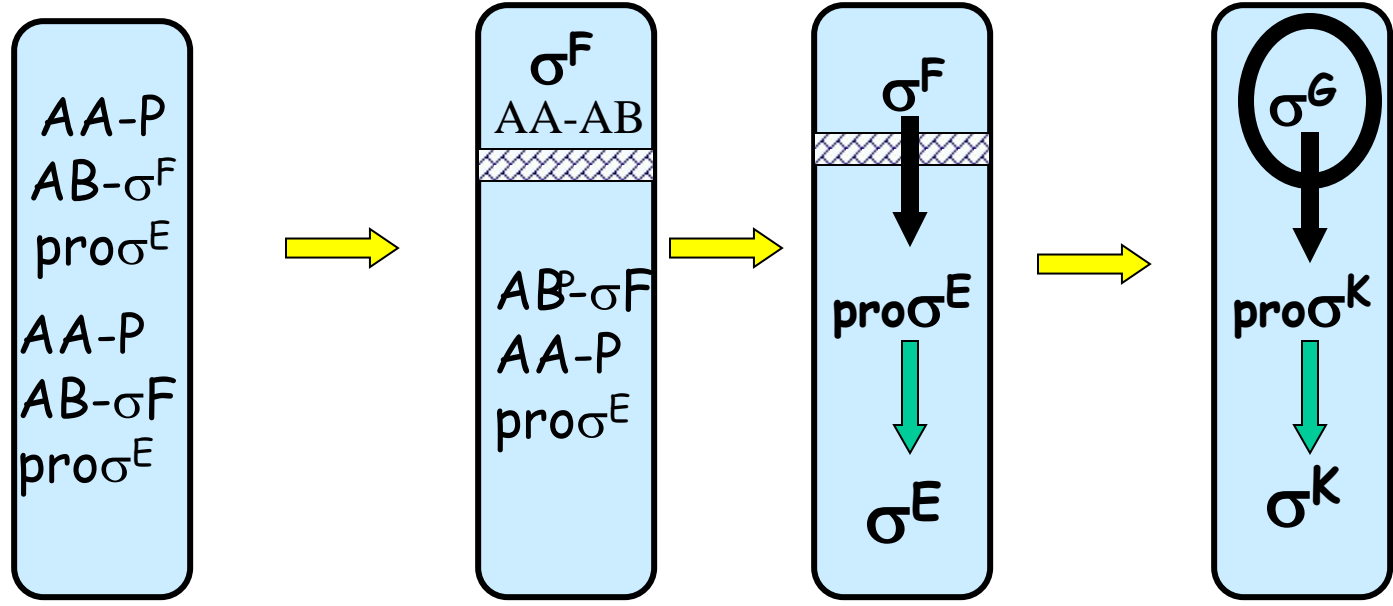
La trascrizione nei procarioti è un processo complesso che inizia con il riconoscimento di specifiche sequenze sul promotore localizzate a -35 e a -10 nucleotidi dal sito d'inizio della trascrizione

Questo riconoscimento viene effettuato da una particolare subunità della RNA polimerasi batterica denominata "fattore sigma  $\sigma$ "



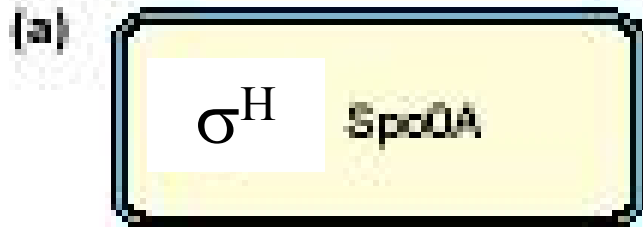
# Attivazione a cascata dei diversi fattori sigma

SpoOA-P  
→  
attivazione  
dei geni  
precoci  
per la  
sporulazione

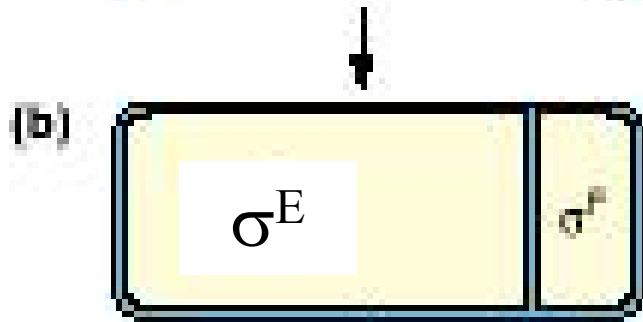


Attivazione di  $\sigma^F$   
nella prespora e  
disattivazione  
nella cellula  
madre

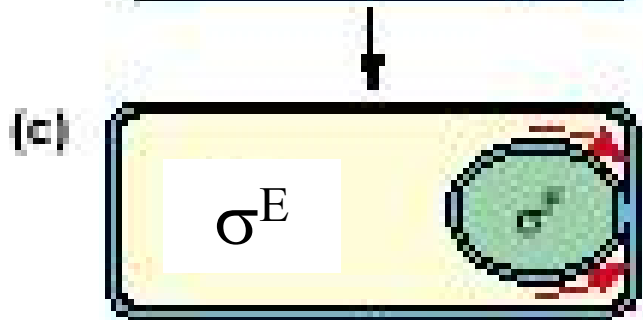
# Nascita e fine del setto laterale nella spora



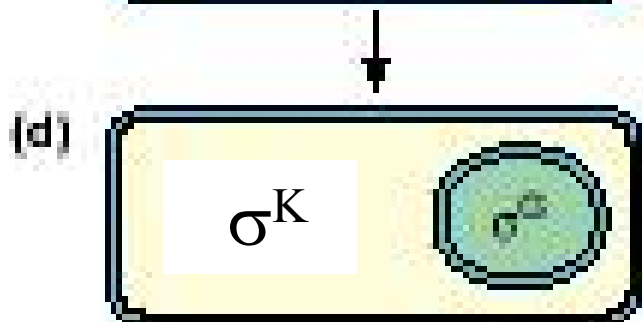
L'attivazione di SpoOA e  $\sigma^H$  nella cellula prima della divisione induce divisione asimmetrica



Compartimentalizzazione dell'espressione genica grazie all'attivazione di  $\sigma^E$  nella cellula madre e  $\sigma^F$  nella prespora



Una serie di proteine sintetizzate dalla cellula madre inducono la degradazione del setto e promuovono la migrazione della IM intorno alla prespora, definito ingolfamento



Quando la membrana ha completamente avvolto la prespora questa si libera nel citoplasma ed abbiamo espressione genica compartimentalizzata grazie alla presenza di  $\sigma^K$  nella prespora e  $\sigma^G$  nella madre

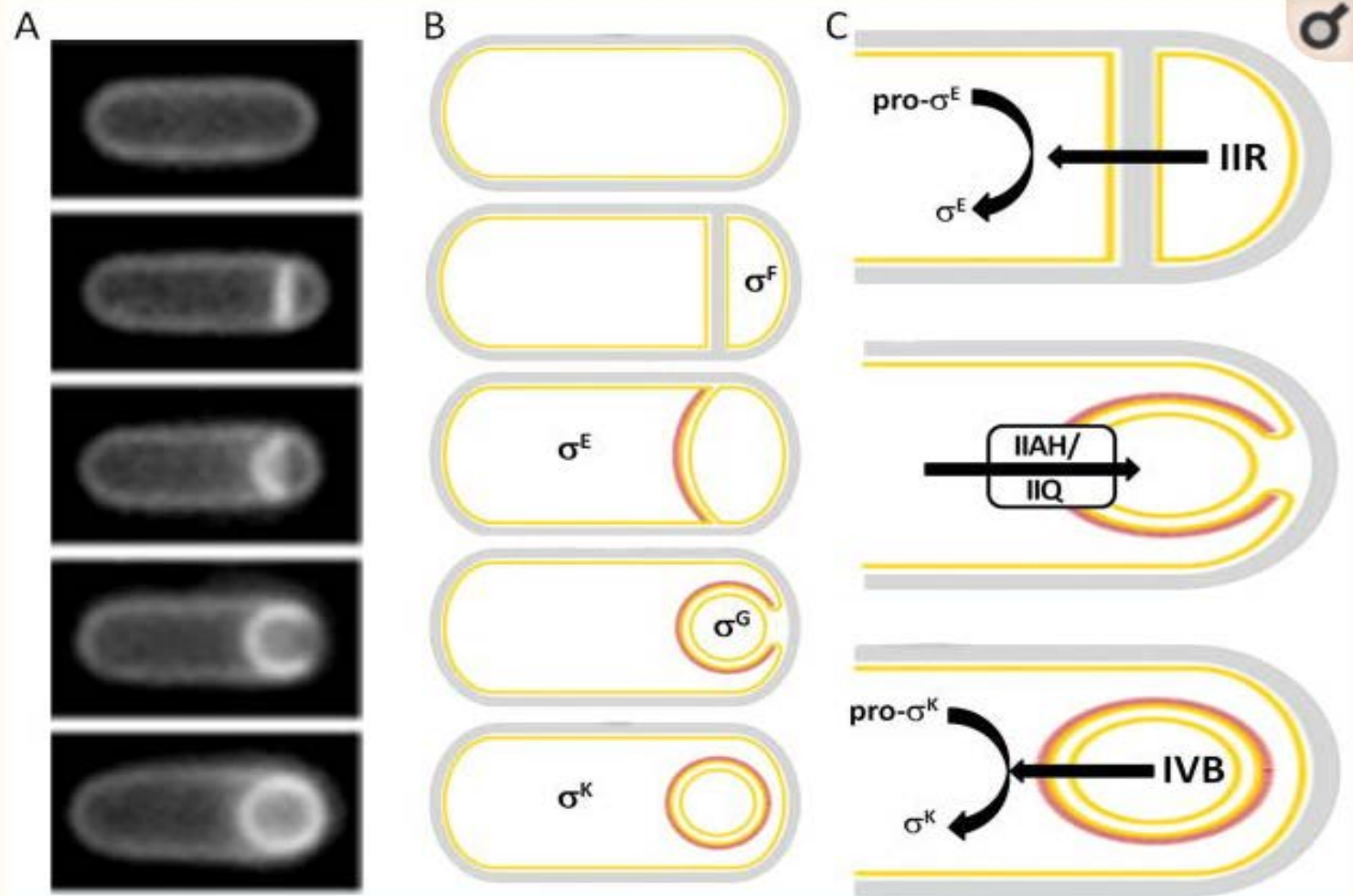
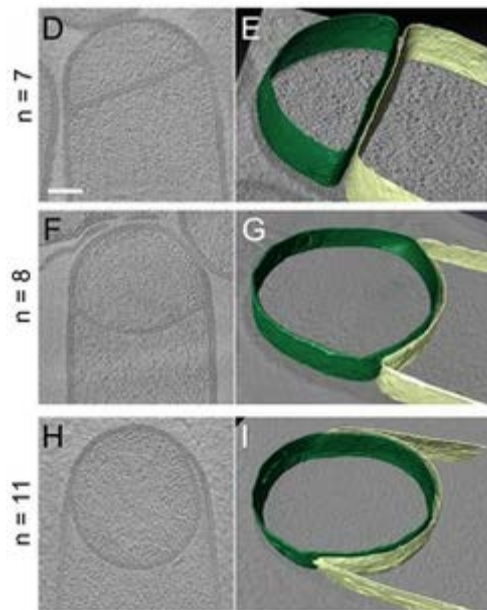
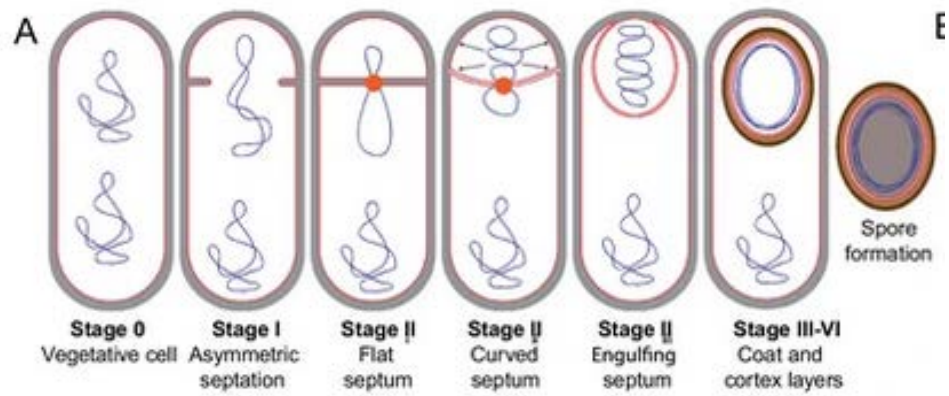
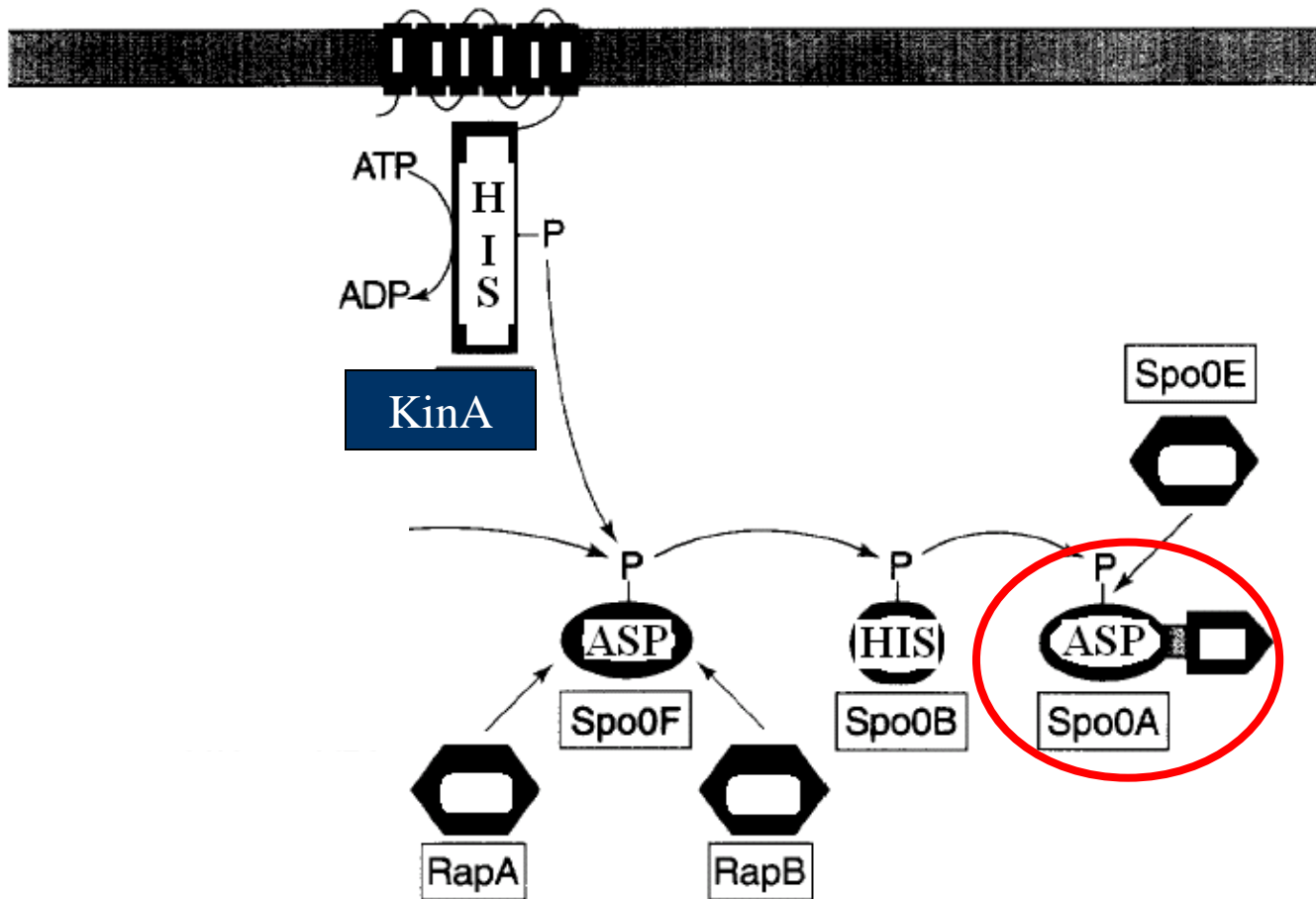


Figure 2

Morphological and genetic asymmetry during sporulation



# Inizio della sporulazione



L'elemento chiave per l'inizio della sporulazione è la fosforilazione di Spo0A

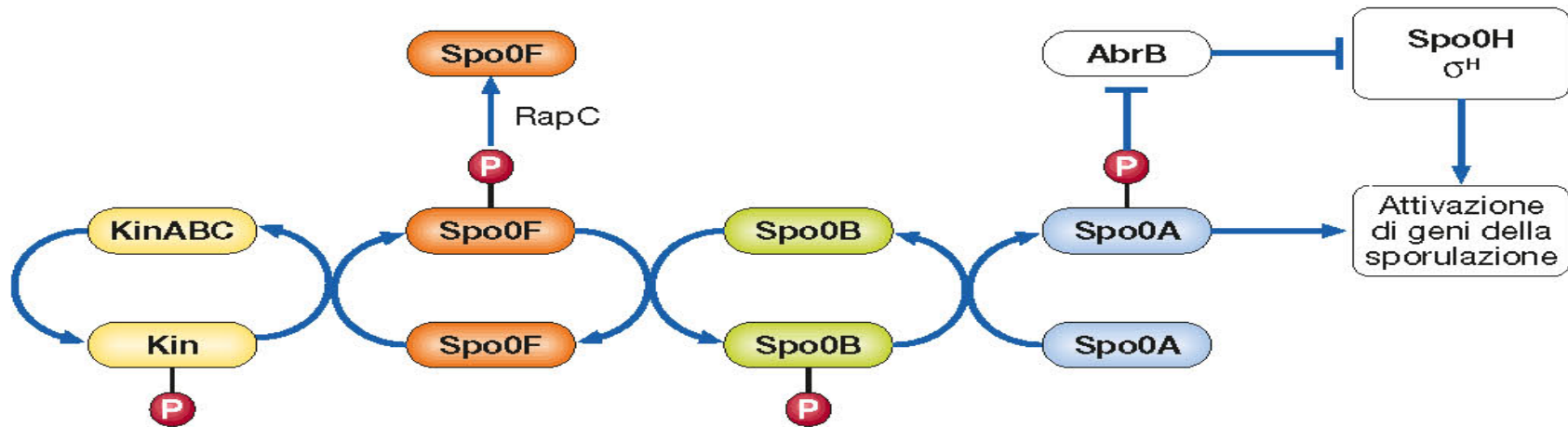
La RNA polimerasi di *B. subtilis* utilizza normalmente il fattore sigma A ( $\sigma^{43}$ ).

Segnali ambientali quali la carenza di nutrienti stimolano una chinasi (**KinA\***) a catalizzare la fosforilazione della proteina **SpoOF** che trasferisce il fosfato a **SpoOB** che a sua volta lo trasferisce a **SpoOA**.

**SpoOA-P** ha numerosi effetti :

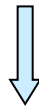
- inibisce **AbrB** che è il repressore di molti geni non necessari durante la crescita vegetativa (geni per la sporulazione)
- attiva assieme a sigma H la sintesi di due fattori sigma  $\sigma^F$  e pro- $\sigma^E$  inattivo

\*Esistono più chinasi che operano in questa fase KinA-E

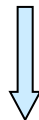


**SpoOA** svolge un ruolo chiave nel processo di sporulazione. L'attivazione di SpoOA dipende dalla sua fosforilazione che avviene con un processo a cascata

**SpoOF** è fosforilato dalle kinasi KinA-E

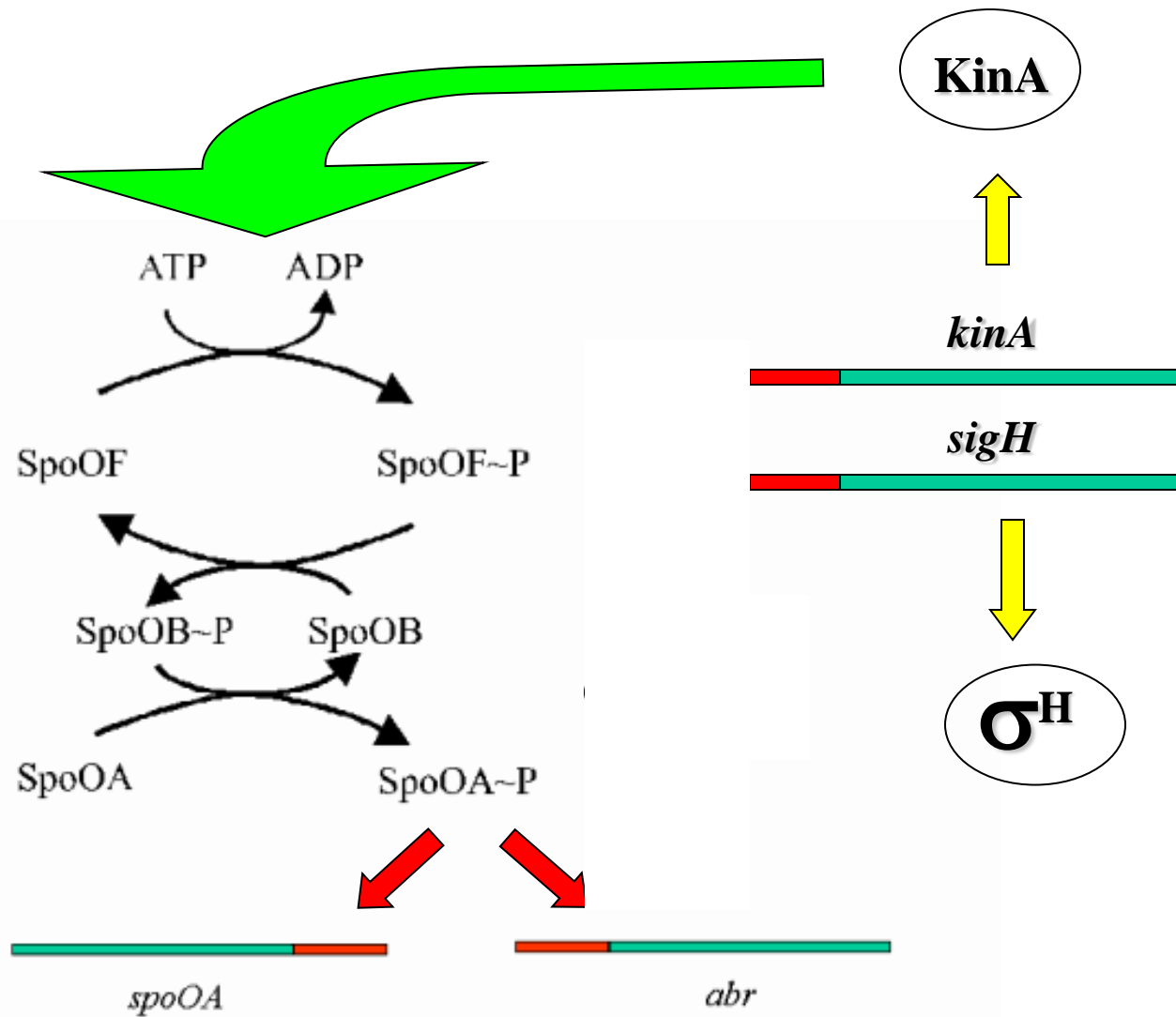


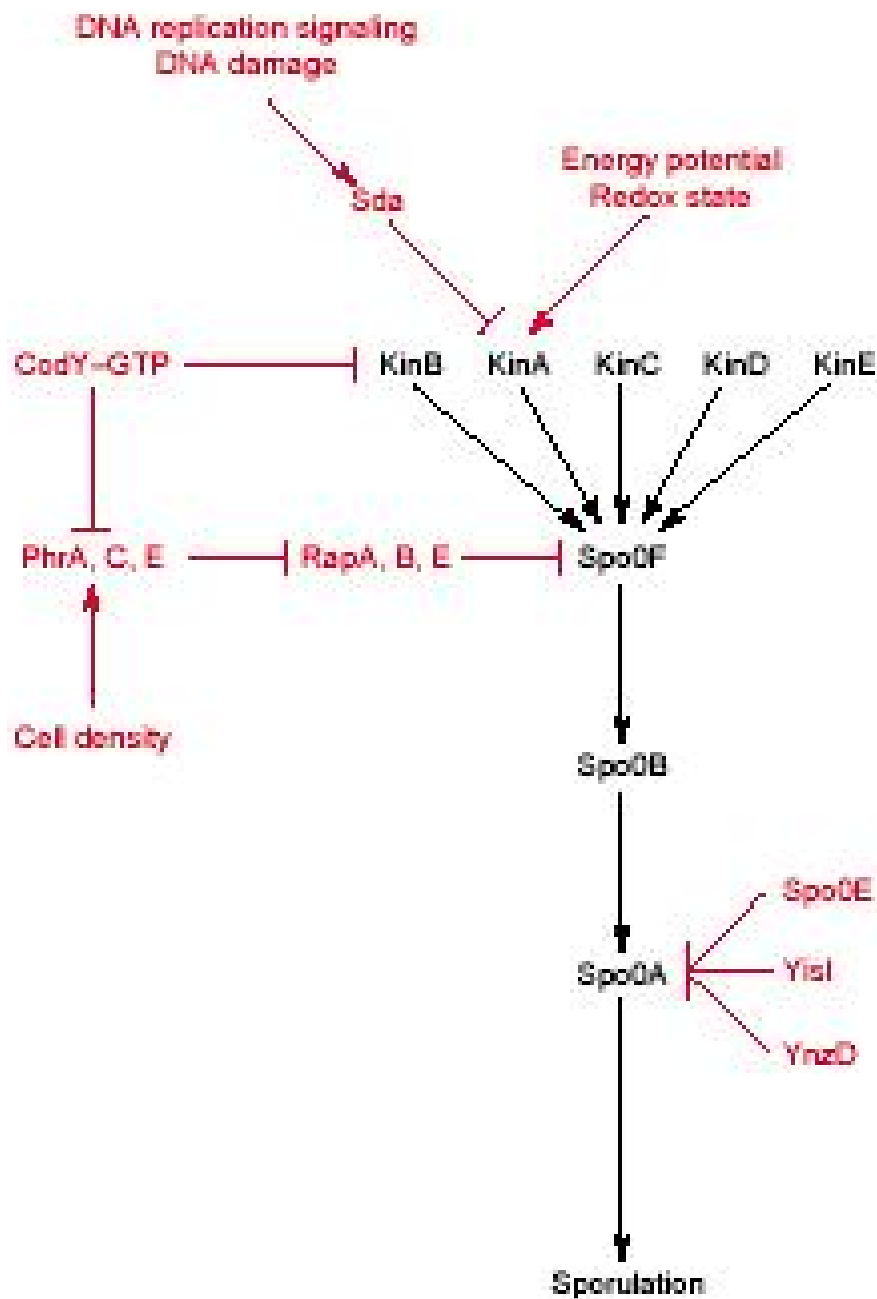
**SpoOF-P** fosforilato fosforila SpoOB



**SpoOB-P** fosforilato fosforila SpoOA







KinA grazie al suo dominio N terminale percepisce lo stato redox della cellula e si attiva legando ATP

- in presenza di danni al DNA o di replicazione incorretta si attiva SdaA che blocca KinA, bloccandone l'autofosforilazione

- un alta densità cellulare inibisce le proteine Rap (fosfatasi) che legandosi a SpoOF ne causano la defosforilazione