

Modelli di divisione nei Batteri

Il modello più comunemente studiato è la **DIVISIONE BINARIA** che prevede la formazione di due cellule figlie a partire da una cellula madre che si è ingrandita nel corso del ciclo cellulare

Products of cell division are equal:



Binary fission: conventional bacteria

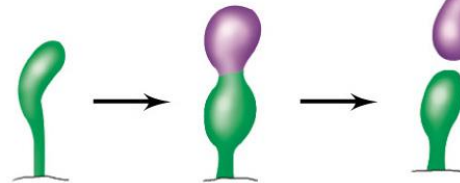
Products of cell division are unequal:



Simple budding: *Pirella*, *Blastobacter*



Budding from hyphae: *Hyphomicrobium*, *Rhodomicrobium*, *Pedomicrobium*

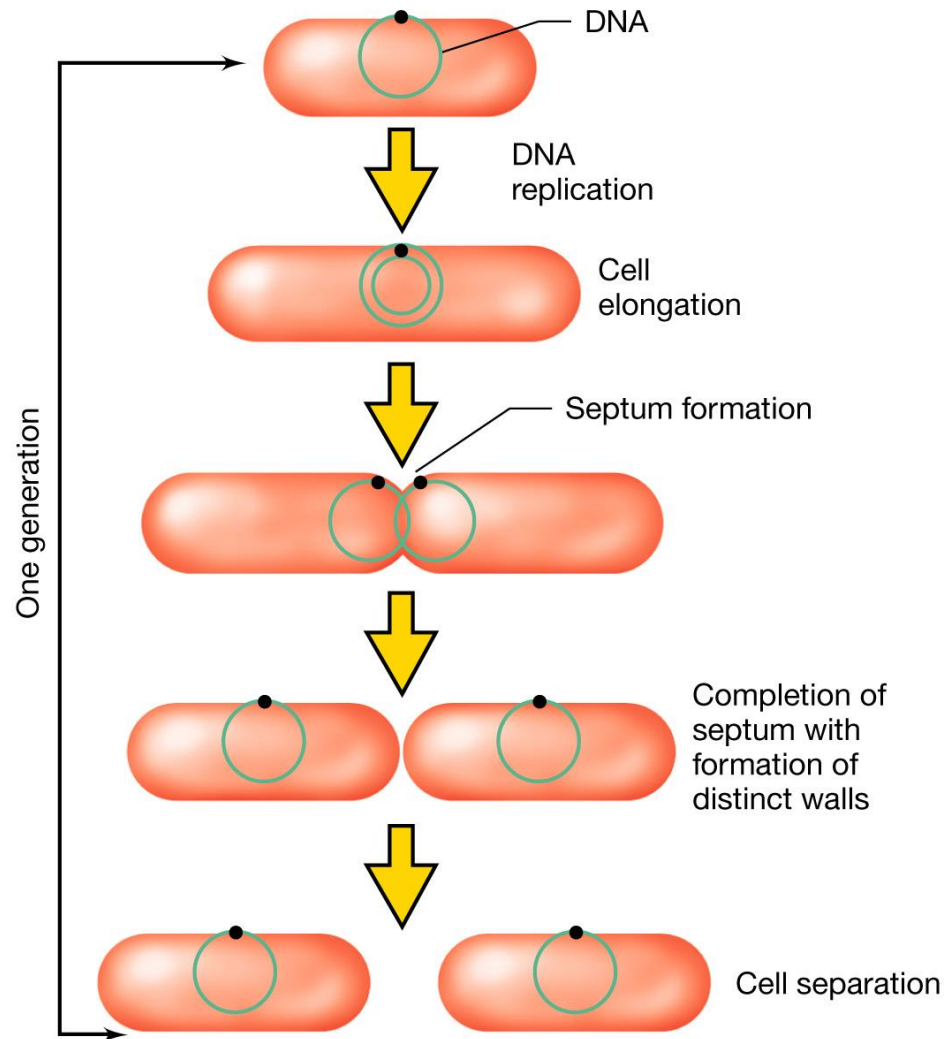


Cell division of stalked organism: *Caulobacter*



Polar growth without differentiation of cell size: *Rhodopseudomonas*, *Nitrobacter*, *Methylosinus*

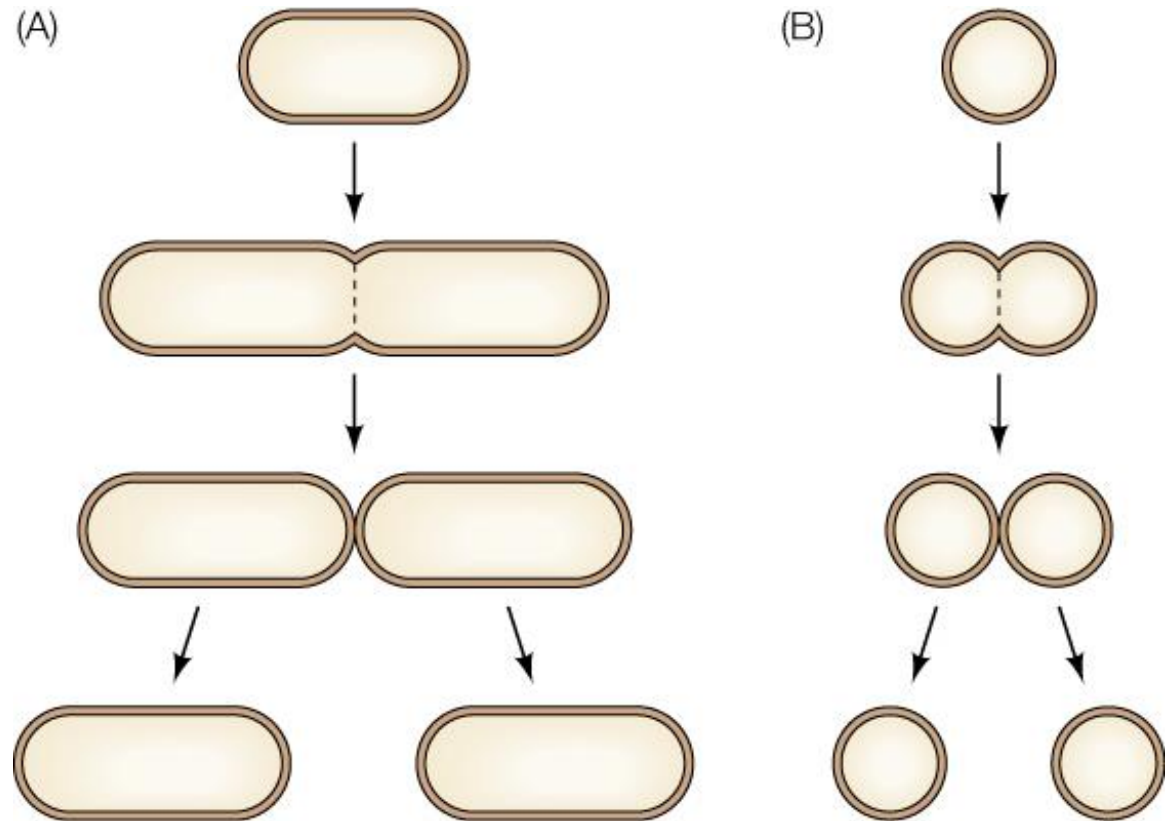
Il modello corrente prevede che vi sia una perfetta coordinazione tra il replicazione del DNA e divisione cellulare in modo da assicurare la corretta segregazione del materiale genetico

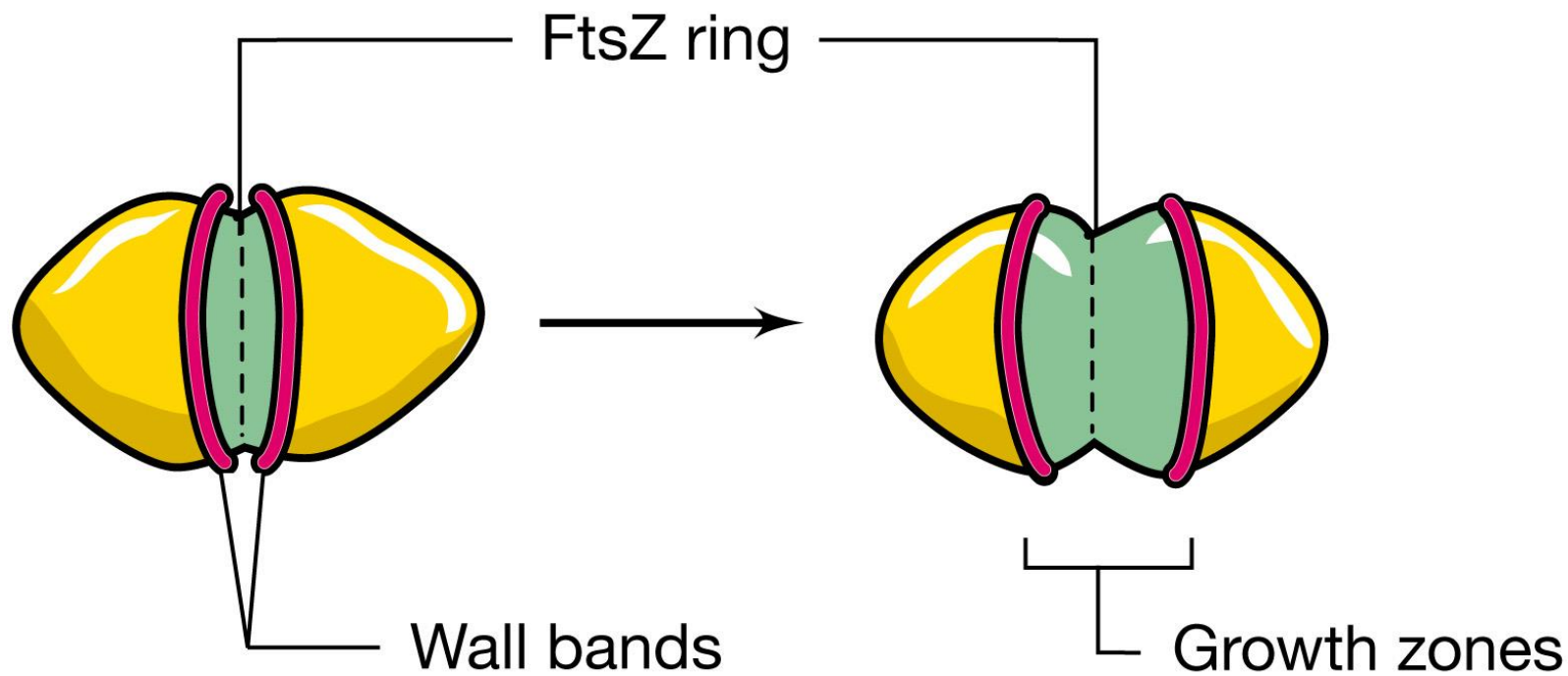


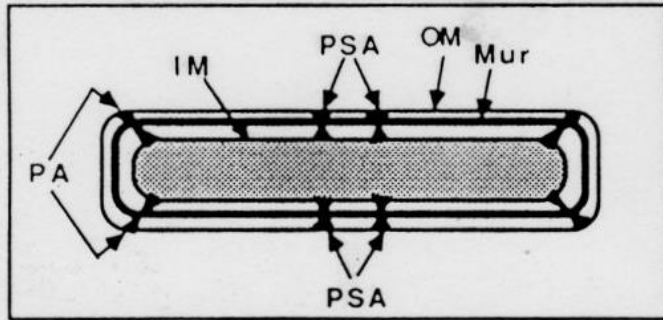
La divisione del batterio in due cellule figlie avviene in seguito alla formazione del setto

Setto è una struttura che si forma al centro della cellula come un'invaginazione della parete

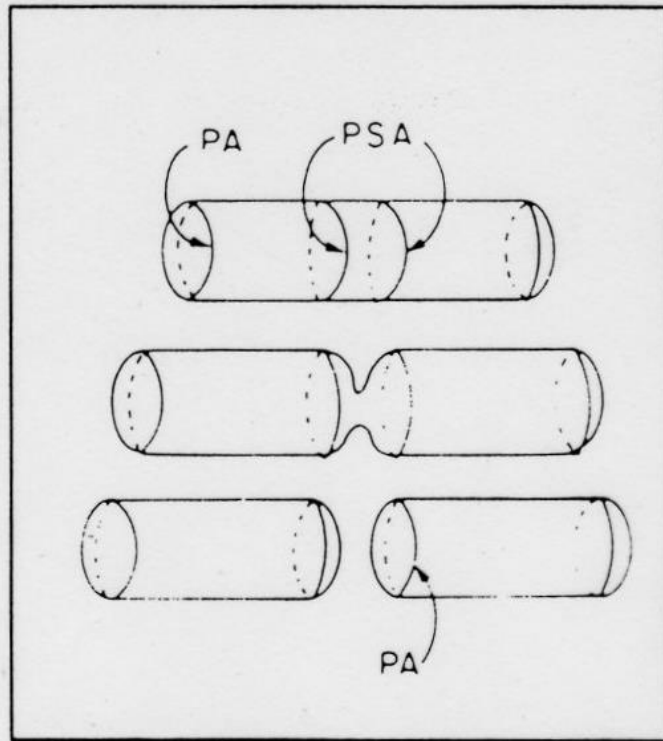
Il setto forma una barriera impenetrabile tra le due parti della cellula e costituisce il sito nel quale si separano le due cellule figlie.







Struttura della cellula in divisione.

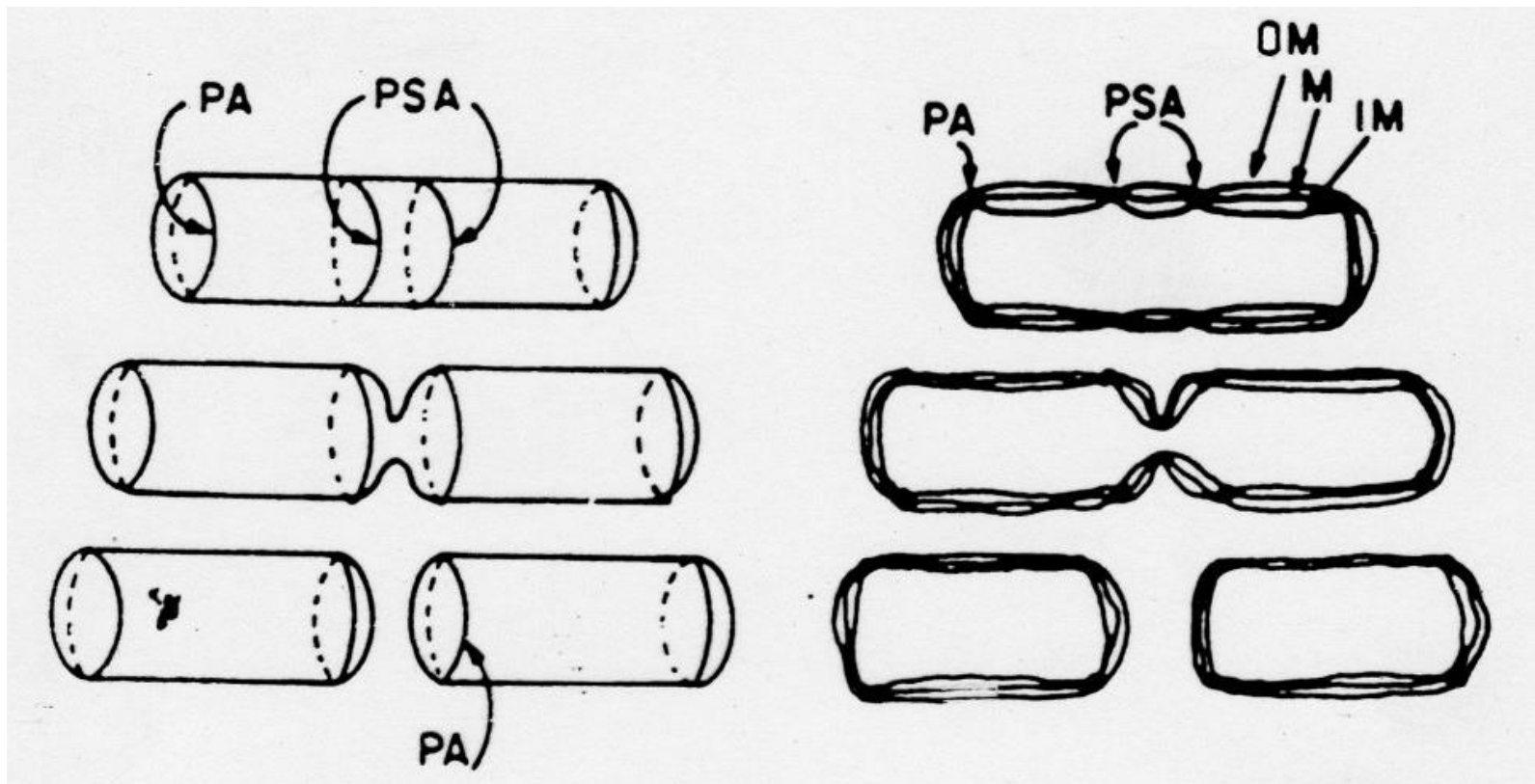


Si notino gli anelli perisettali centrali all'interno dei quali si formerà il setto e gli anelli perisettali localizzati all'estremità reminescenza degli anelli centrali prima della divisione

Dove si forma il setto?

La formazione del setto è preceduta dalla formazione degli anelli perisettali

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

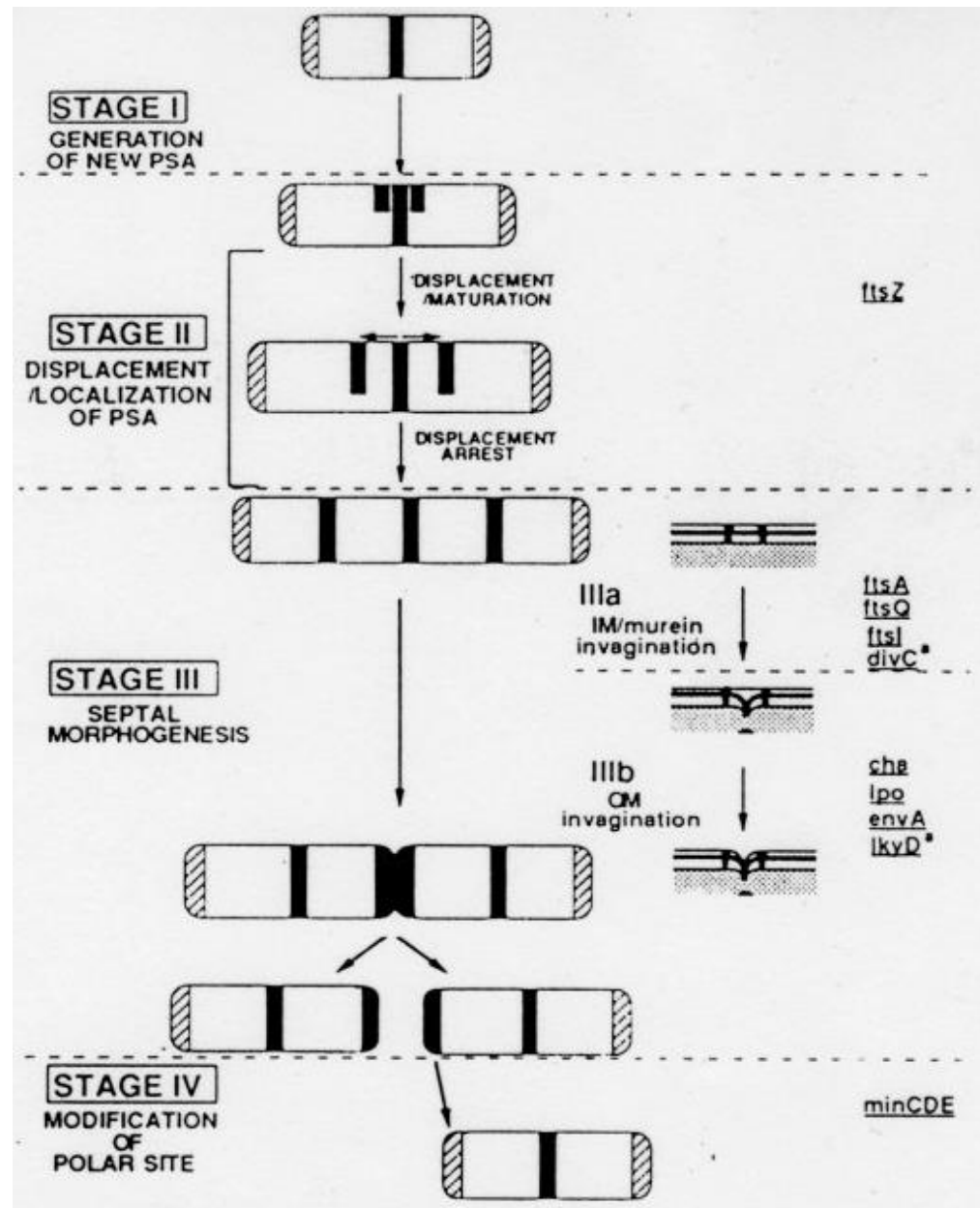


1. Nella nuova cellula l'anello perissettale è presente dapprima in posizione centrale

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 entrambi 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



Mutanti della divisione cellulare

Mutanti fts

le cellule formano lunghi filamenti senza setti ma con i nucleoidi regolarmente distribuiti in tutta la lunghezza della cellula

Mutanti min

mutanti nella divisione con generazione di minicellule

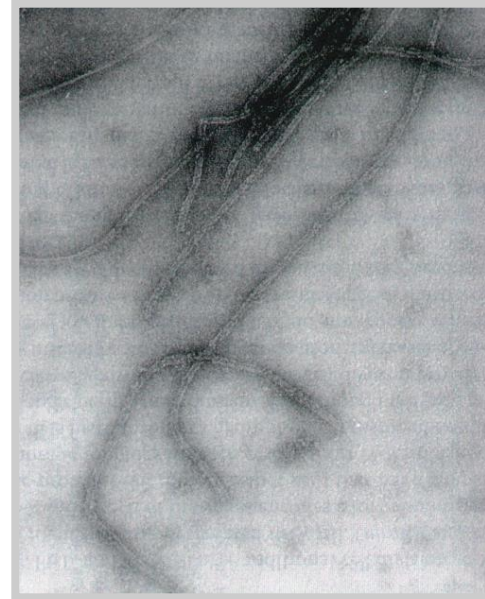
Mutanti par

le cellule si dividono ma sono anucleate in quanto è difettivo l'apparato di ripartizione del DNA genomico

MUTANTI CHE INFLUENZANO LA DIVISIONE CELLULARE

MUTANTI *fts*

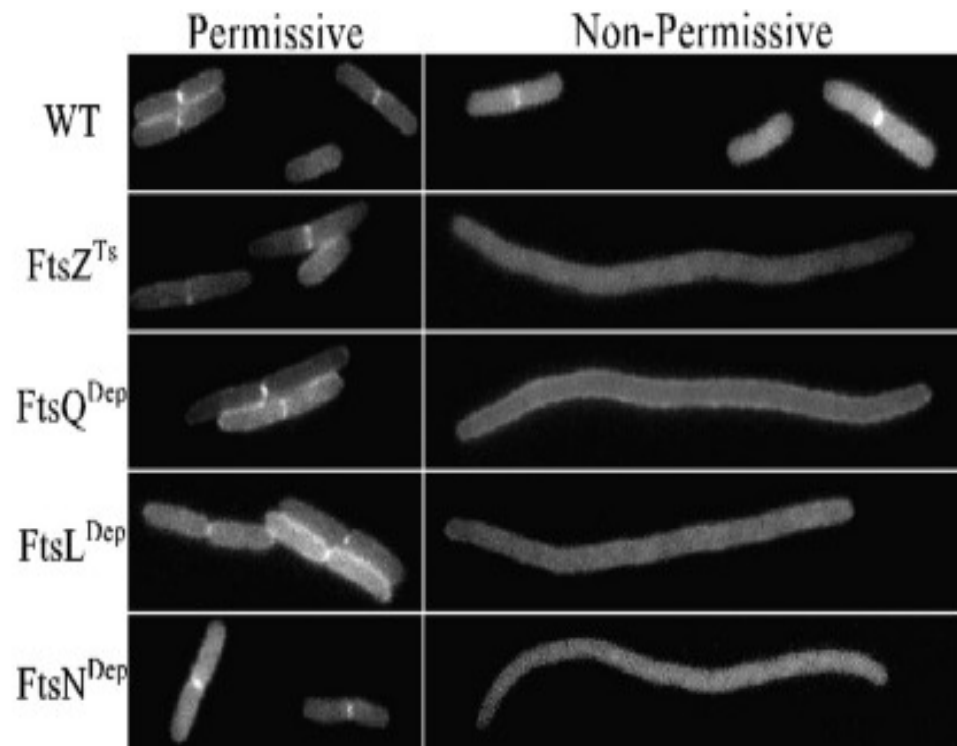
(filamentating temperature
sensitive)



- *ftsZ*- questi mutanti formano batteri lineari senza setto
- *ftsA*- questi mutanti formano batteri lineari con un setto iniziale

Mutanti Fts : condizioni permissive e non

Recruitment of SufI to septal rings requires other Fts proteins. The top two panel sets show a wild-type (WT) strain or *ftsZ*(Ts) mutant grown at 30 °C in LB (permissive) or 37 °C in LB0N (non-permissive). The strains shown are EC1873 and EC2065, both of which carry a chromosomal *sufI-gfp* fusion. Traditionally, 42 °C has been used as the non-permissive temperature for *ftsZ*84(Ts), but we found that SufI-GFP was not fluorescent at 42 °C. The bottom three panel sets show *FtsQ*, *FtsL* or *FtsN* depletion strains. The strains shown are JM265, JOE170 and EC1908 and carry the *sufI-gfp* plasmid pDSW932. These strains produce the indicated Fts protein from an arabinose-dependent promoter and were grown in the presence of arabinose (permissive) or glucose (non-permissive). The cells shown are representative. For quantitative data, see Supplemental Table 1.



Permissive

Non-Permissive

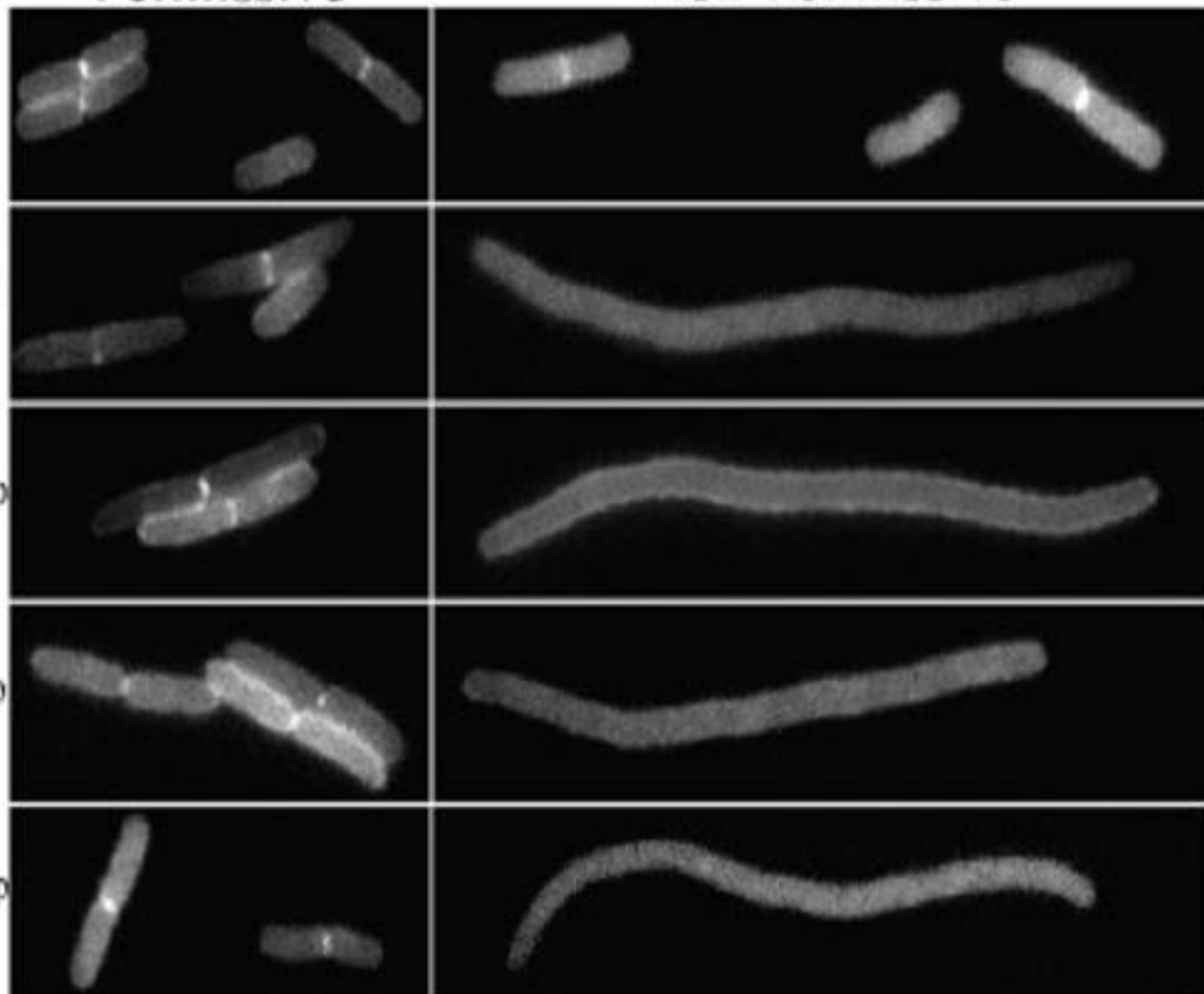
WT

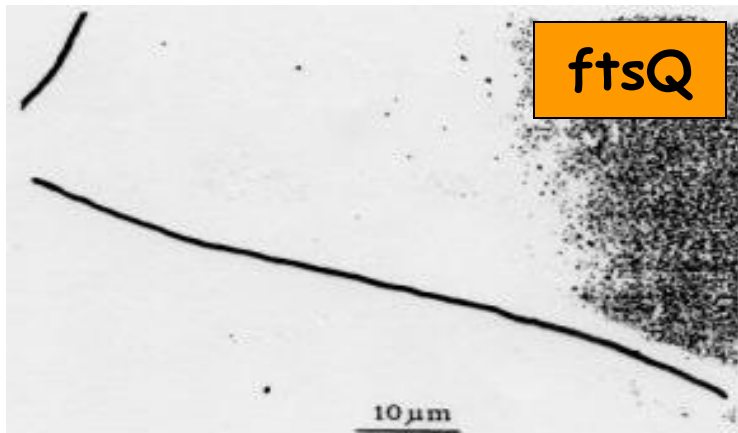
FtsZ^{Ts}

FtsQ^{Dep}

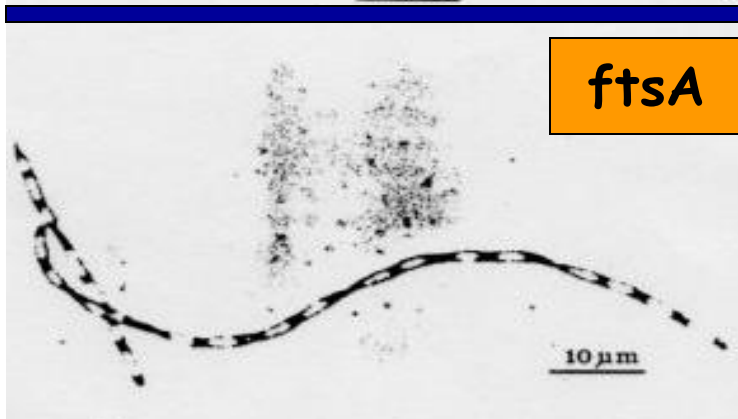
FtsL^{Dep}

FtsN^{Dep}

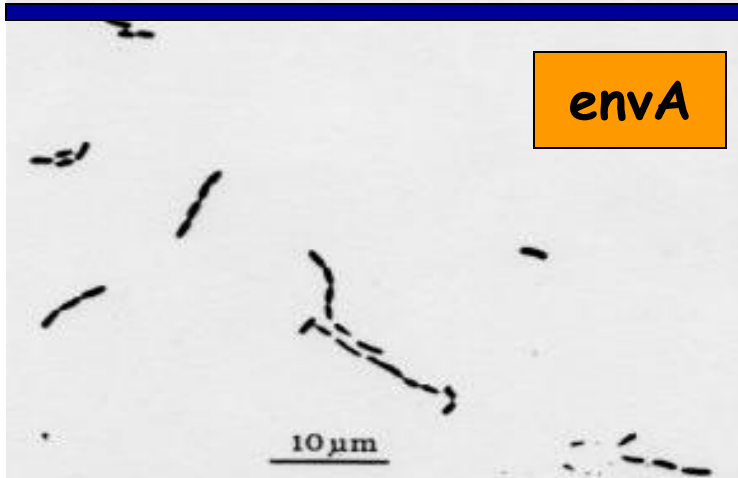




Mutanti in **ftsQ** (*ts*) a 42°C
non si ha neanche l'inizio
della formazione di setto



Mutanti in **ftsA** (*ts*) a 42°C
si nota uno strozzamento nella
posizione di divisione mediana



Mutanti nel gene **envA**: il
setto è formato ma non si ha
distacco delle cellule figlie

Principali geni richiesti per la divisione cellulare

Gene	N.molecole	Localizzazione	Funzione
ftsA	200	Superficie interna M.I.	ATPasi
ftsI (pbpB)	50	Periplasma ancorata M.I.	Transpetidasi
ftsL	50	Periplasma ancorata M.I.	-
ftsQ	20	Periplasma ancorata M.I.	-
ftsN	nd	Periplasma	-
ftsW	nd	Proteina integrale M.I.	
ftsZ	20.000	Citoplasma	GTPasi

FtsZ

- È il primo componente del "Divisoma" che si assembla nella regione del setto
- Si tratta di una proteina dotata di attività GTPasica associata alla formazione di un anello nella regione dove si formerà il setto divisionale.
- È la proteina che determina l'invaginazione della membrana cellulare e inizia il processo di divisione cellulare.

Struttura della proteina FtsZ

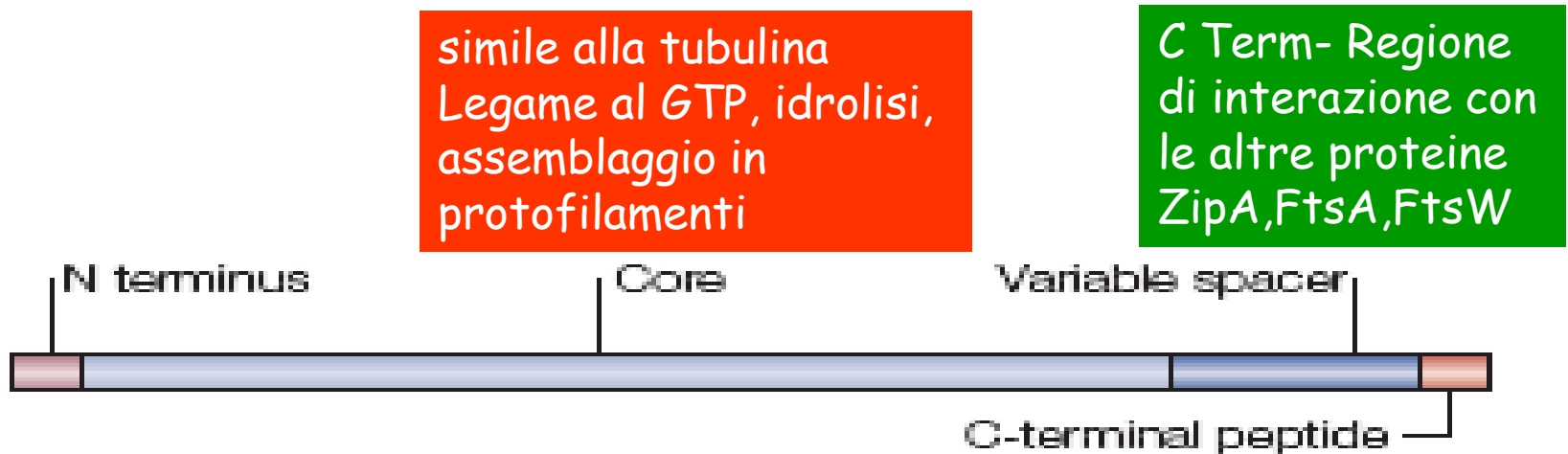
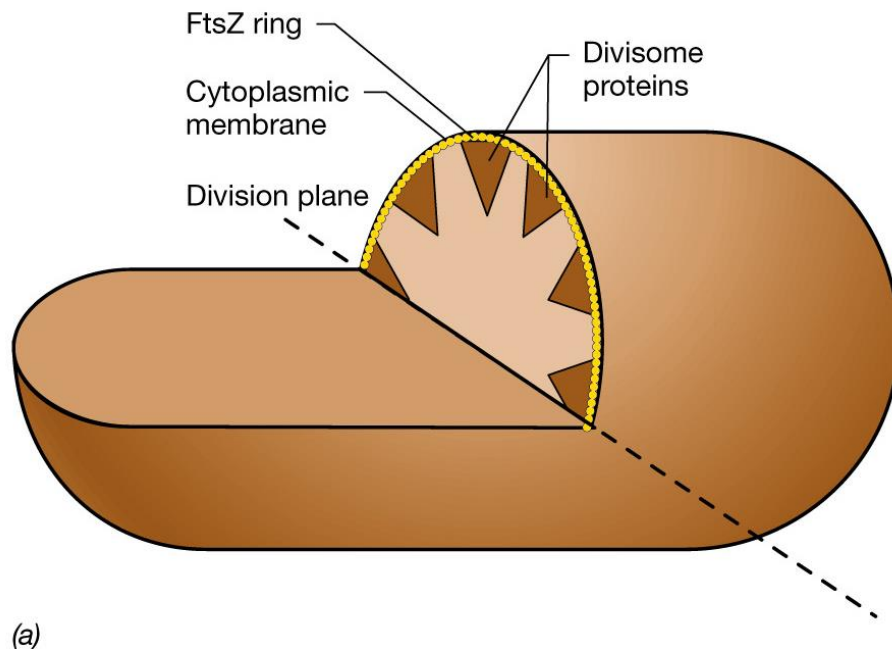


Figure 2 | **The domain structure of FtsZ.** The domain structure applies to most FtsZ proteins. The N terminus and variable spacer domains are highly variable in length, and their precise functions are unknown. The core region displays most similarity to tubulin and is required for GTP binding and hydrolysis as well as assembly into protofilaments. The C-terminal peptide interacts with other cell-division proteins recruited by FtsZ such as ZipA, FtsA and FtsW, and might function mainly to anchor the Z ring to the membrane using these proteins.



(a)

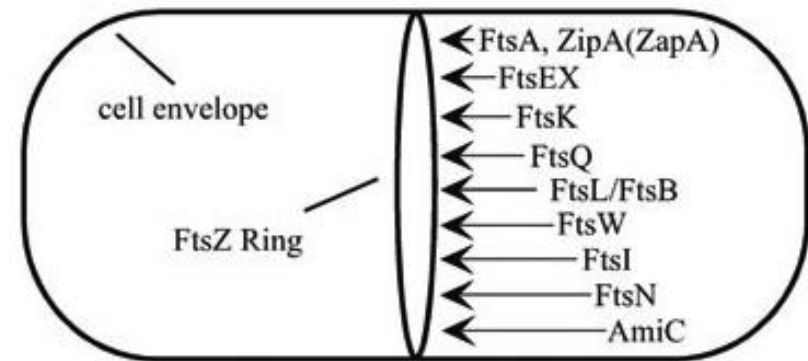


Fig. 1. The septal ring. Top: GFP-FtsL visualized by deconvolution microscopy (modified from Ghigo *et al.*, 1999). Bottom: model for assembly of proteins into the septal ring of *E. coli*. First, FtsZ forms the Z ring. FtsA and ZipA join next, independently of one another. Once both FtsA and ZipA have localized, the remaining proteins join the ring in the order indicated. Localization of ZapA has not been studied in detail, and the position of EnvC (not shown) is not yet known. Dependence of FtsK and other downstream proteins on FtsEX is leaky (Schmidt *et al.*, 2004).

FtsZ

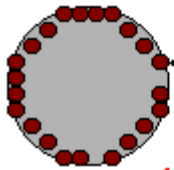
GTP

FtsZ*

GDP + Pi

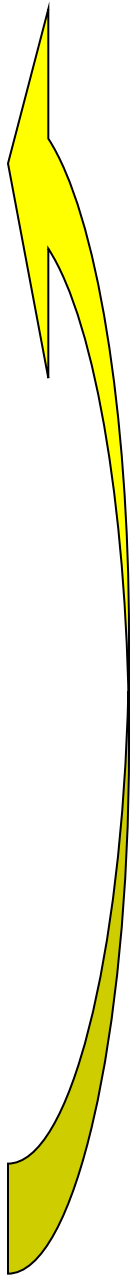
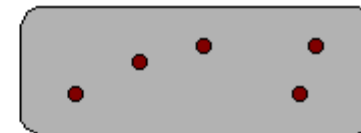
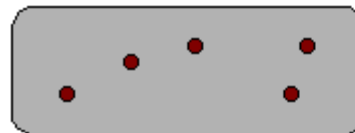
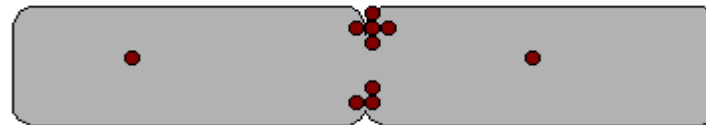
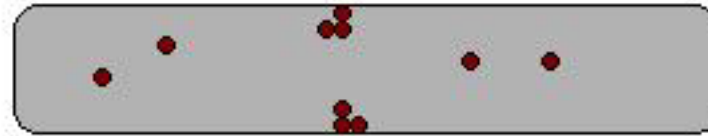
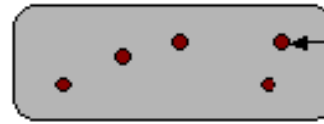
FtsZ

Sezione trasversale

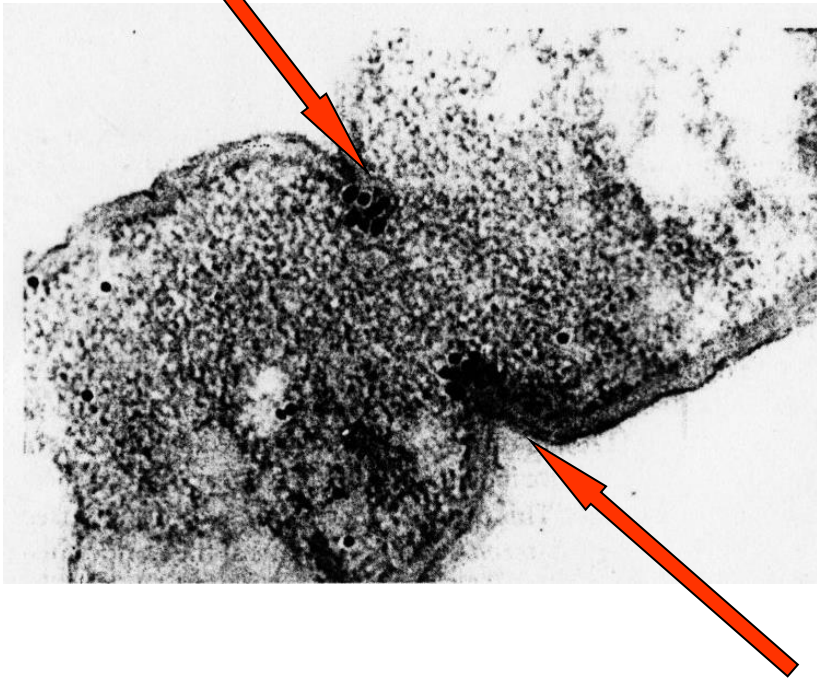


Membrana
citoplasmatica

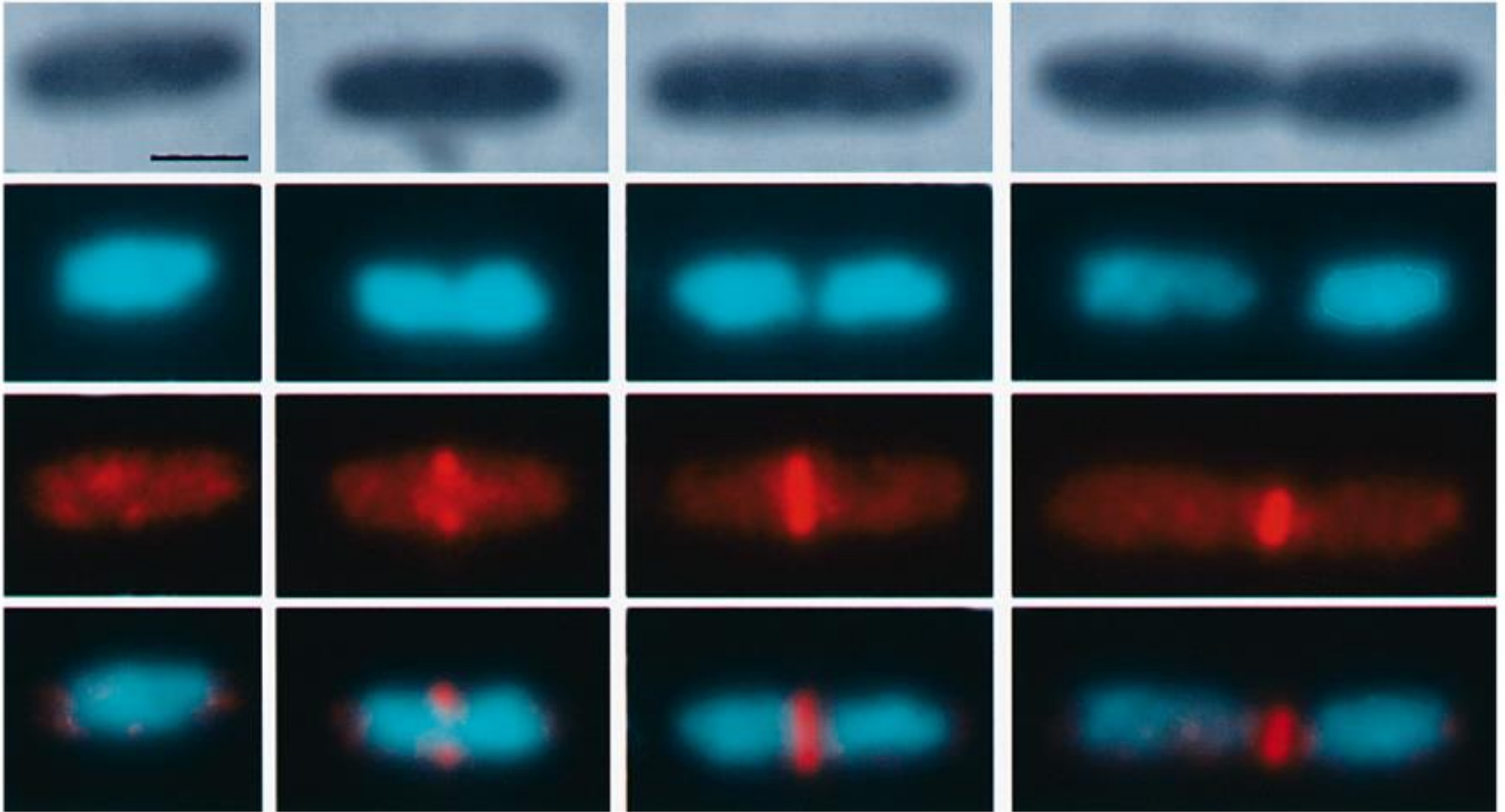
FtsZ



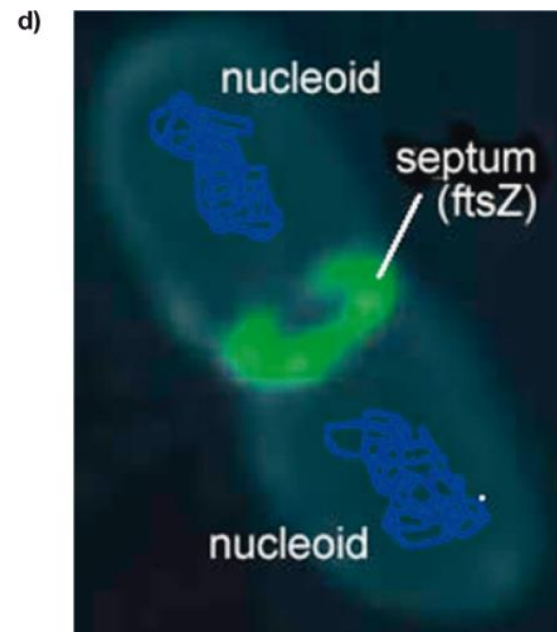
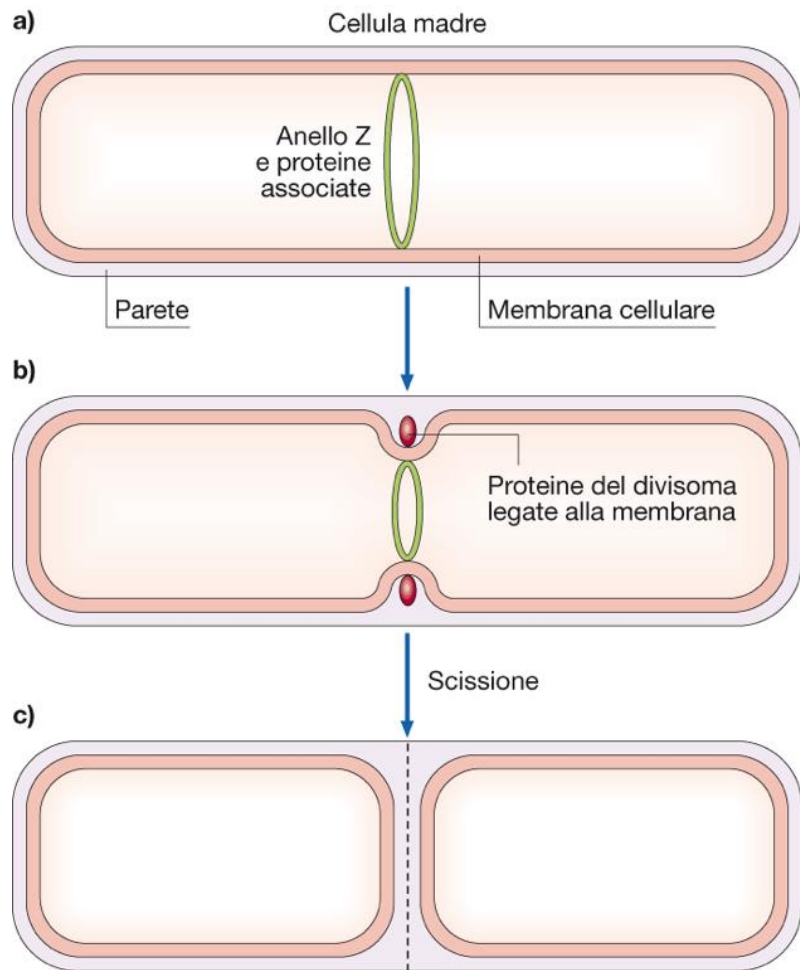
La proteina FtsZ si accumula a livello del setto



La divisione cellulare al microscopio a fluorescenza



In rosso è marcata la proteina FtsZ



Le proteine del Divisoma

FtsZ è la proteina che forma Z ring
è una GTPasi funzionalmente omologa alla tubulina eucariotica

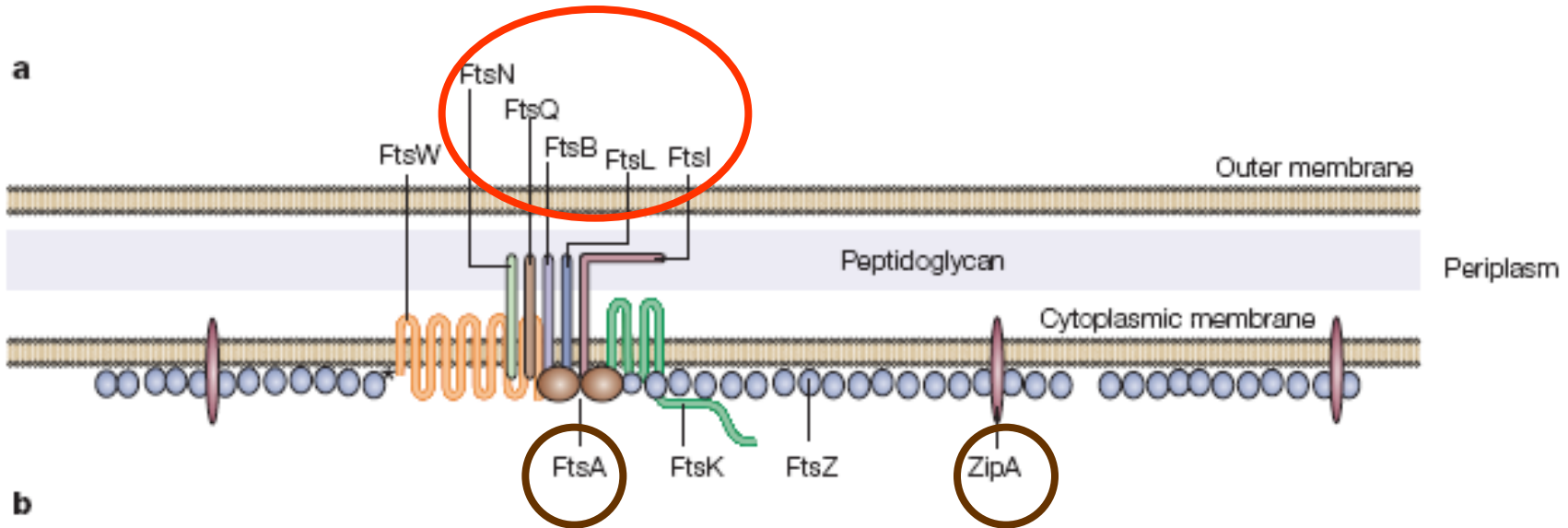
Qual è il ruolo delle altre proteine ?

- Assistono la formazione dell'anello Z e lo stabilizzano
- Reclutano e stabilizzano il divisoma
- Liberano il DNA replicato e lo separano nelle cellule sorelle
- Dirigono l'invaginazione del setto

Le proteine del divisoma si possono dividere in :

- proteine a migrazione precoce e contemporanea
- proteine precoci e proteine tardive.

FtsI è l'unica proteina che viene inibita dalle penicilline



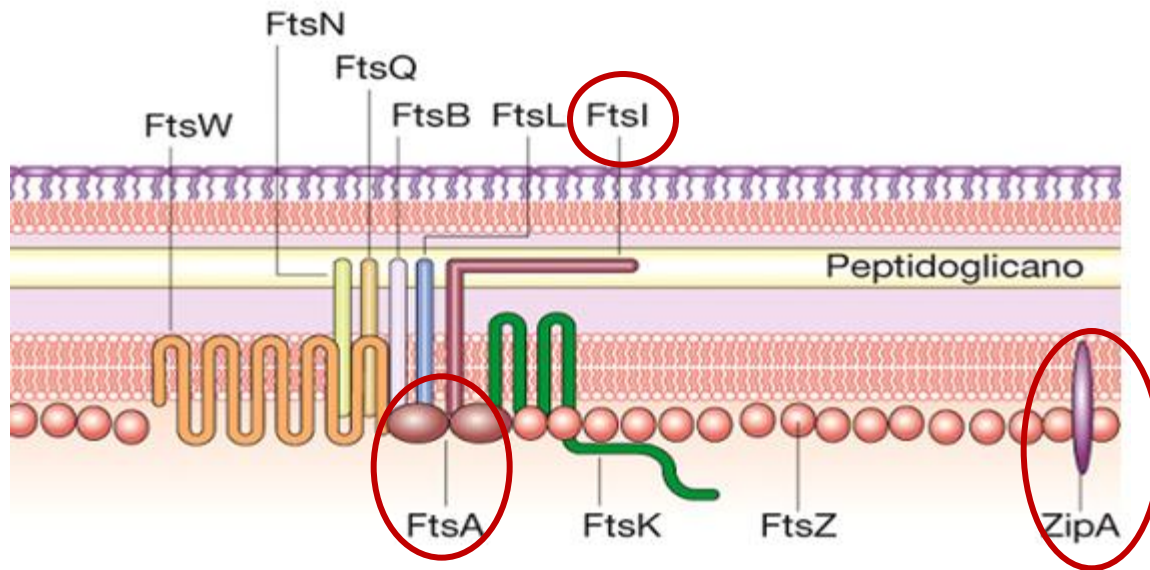
ZipA e **FtsA** contattano direttamente sia **FtsZ** che la membrana

FtsQ, FtsB, FtsL, FtsI, FtsN sono proteine di membrana con un dominio periplasmatico.

FtsW e **FtsK** hanno più domini transmembrana e nello spazio periplasmatico

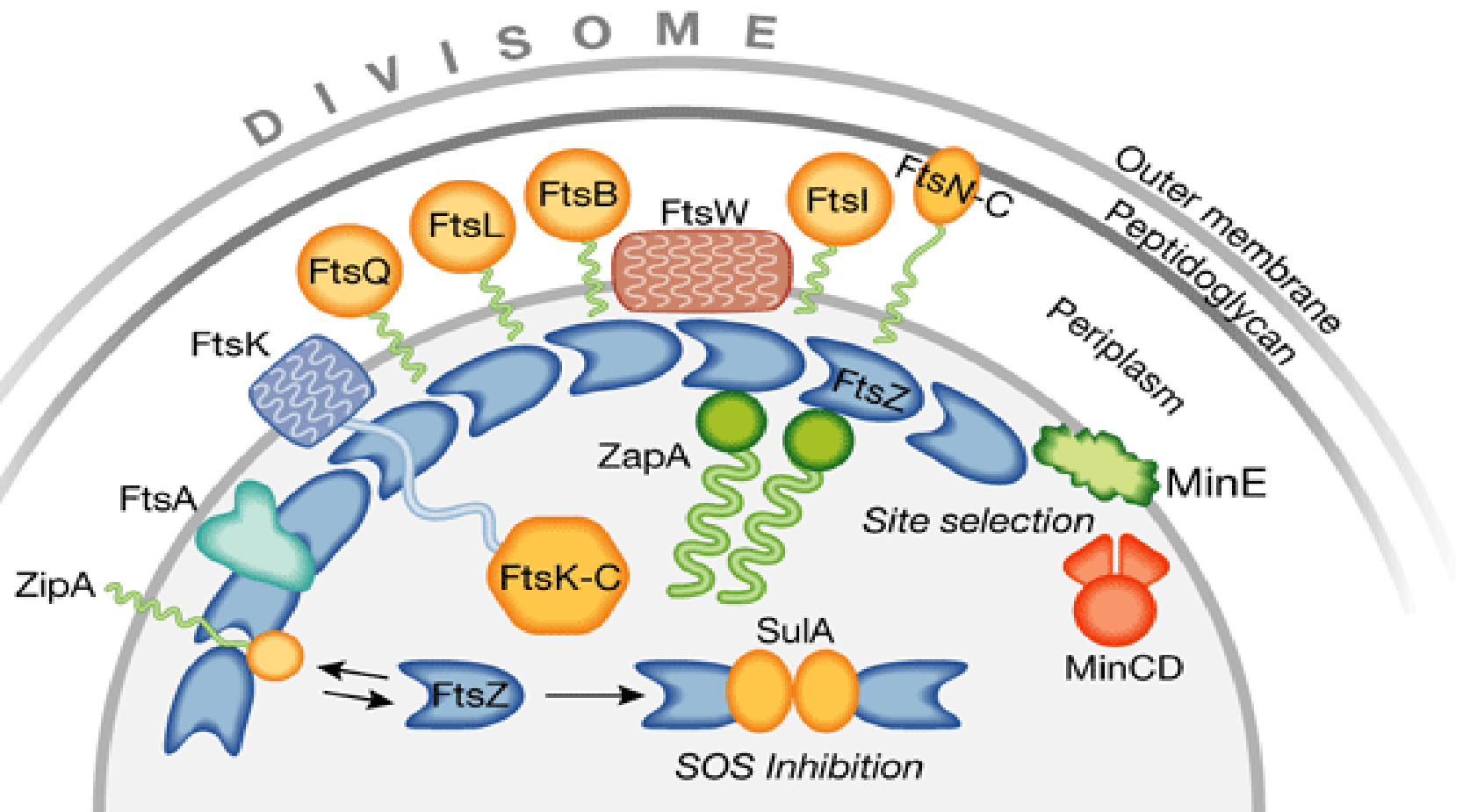
FtsI è necessaria per la formazione del peptidoglicano settale. Il dominio C terminale ha attività transpeptidasica (lega la penicillina) dominio N terminale serve per l'ancoraggio alla IM.

Le altre proteine del DIVISOMA

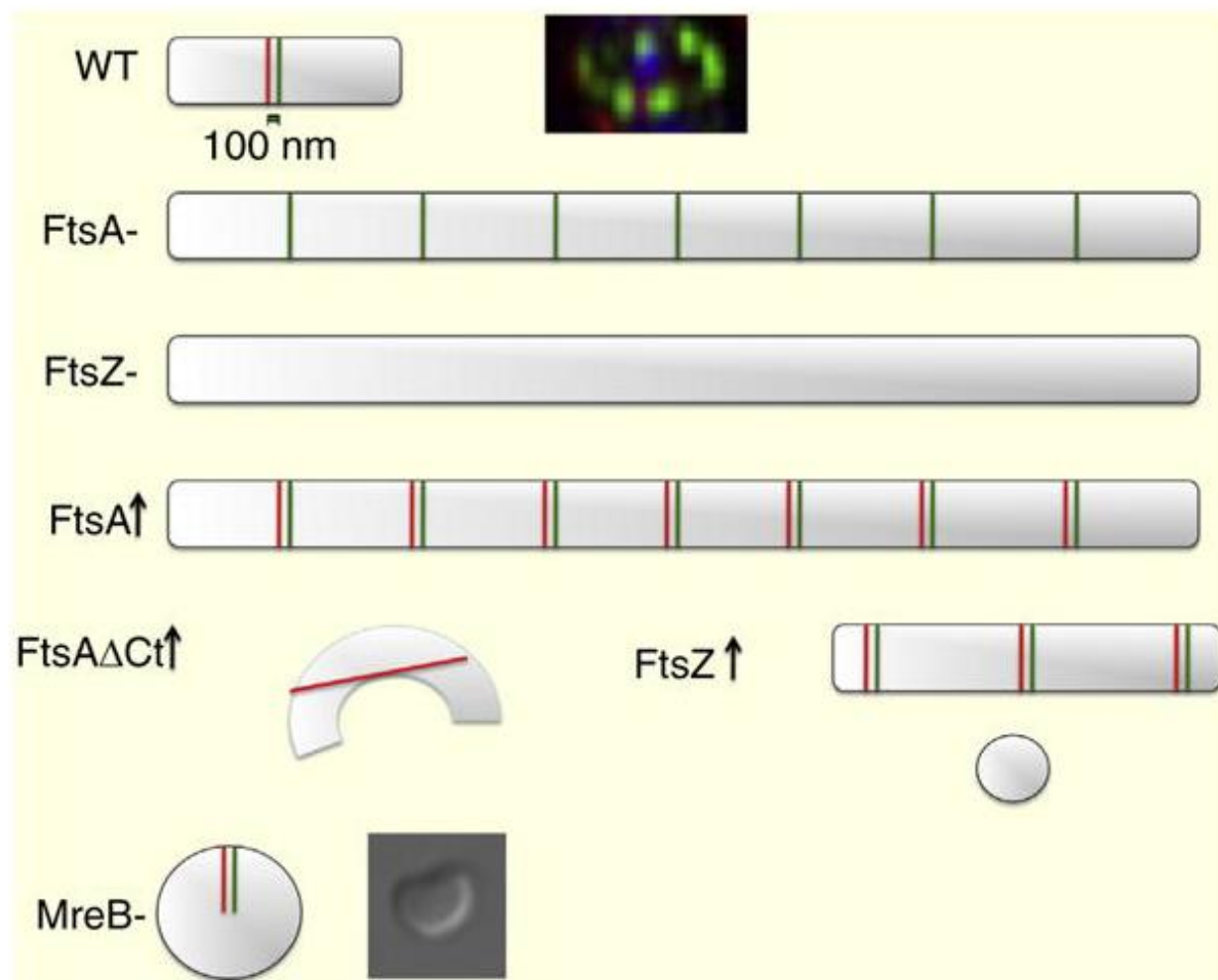


FtsA forma una struttura ad anello

ZipA è una proteina integrale di membrana che ancora l'anello Z alla IM



FtsK posizionata con il dominio N terminale a livello del divisoma mentre C terminale coinvolto nella segregazione.
 Zap A promuove l'assemblaggio dello Z ring
 Fts QLB formano una struttura trimerica : connettono le proteine dell'anello con le altre del divisoma in via di formazione.

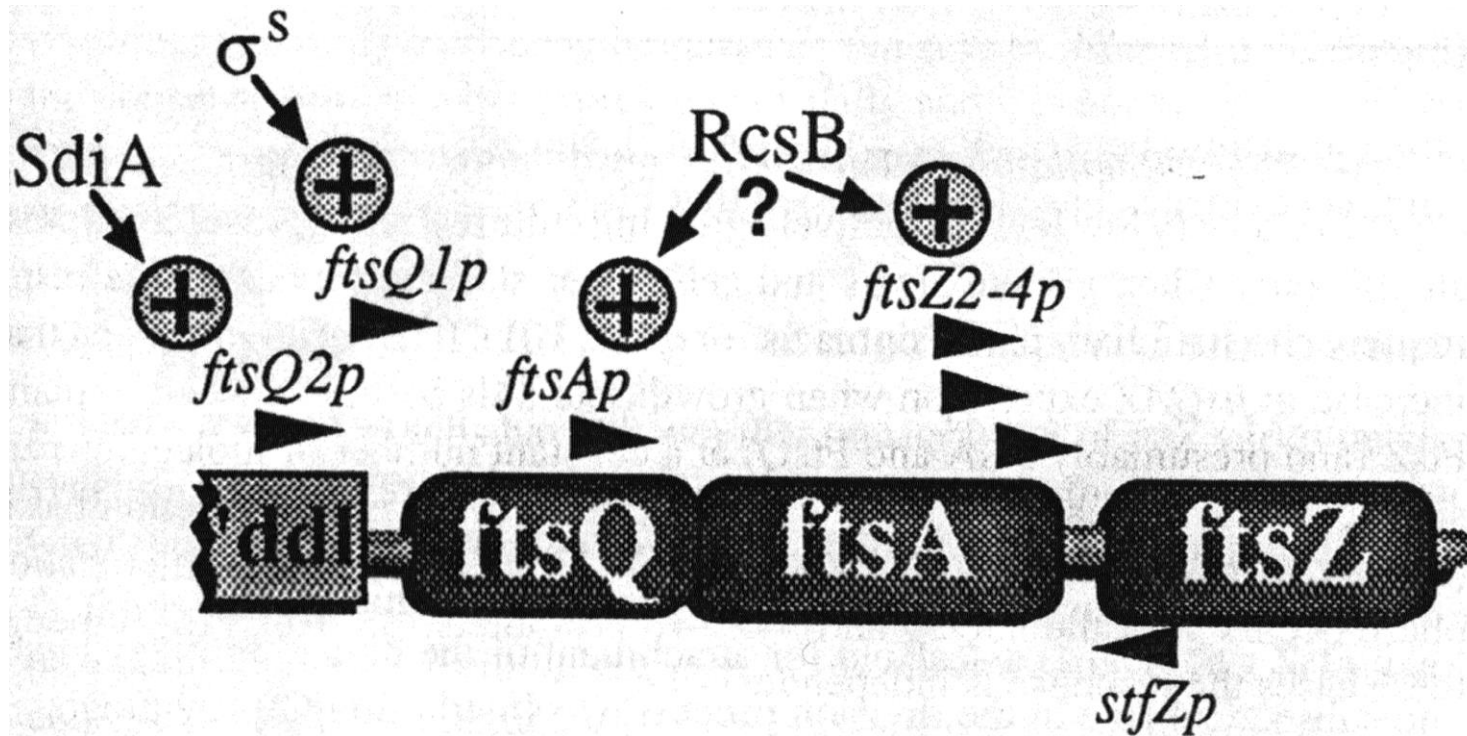


Different cellular morphologies and localization patterns in *E. coli* depending on the levels of FtsA, FtsZ or MreB.

Shown are schematics of typical cell shapes and localization of FtsZ (green) or FtsA (red) under various conditions, along with a micrograph of a normal punctate *E. coli* Z ring (FtsZ in green) imaged by 3D-SIM. FtsAΔCt is missing the carboxy-terminal membrane-targeting sequence and forms large bundled polymers in the cell when overproduced that often causes the cells to curve. FtsZ overproduction results in Z rings near cell poles, which can divide off to yield minicells. The lack of MreB abolishes rod shape, forcing cells to grow and divide as spheroids, often with an asymmetric invagination as shown in both the schematic and the micrograph.

REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE DELLA REGIONE 2' min DEL CROMOSOMA DI *E. coli*

Presenza di promotori multipli interni alla regione codificante del gene a monte



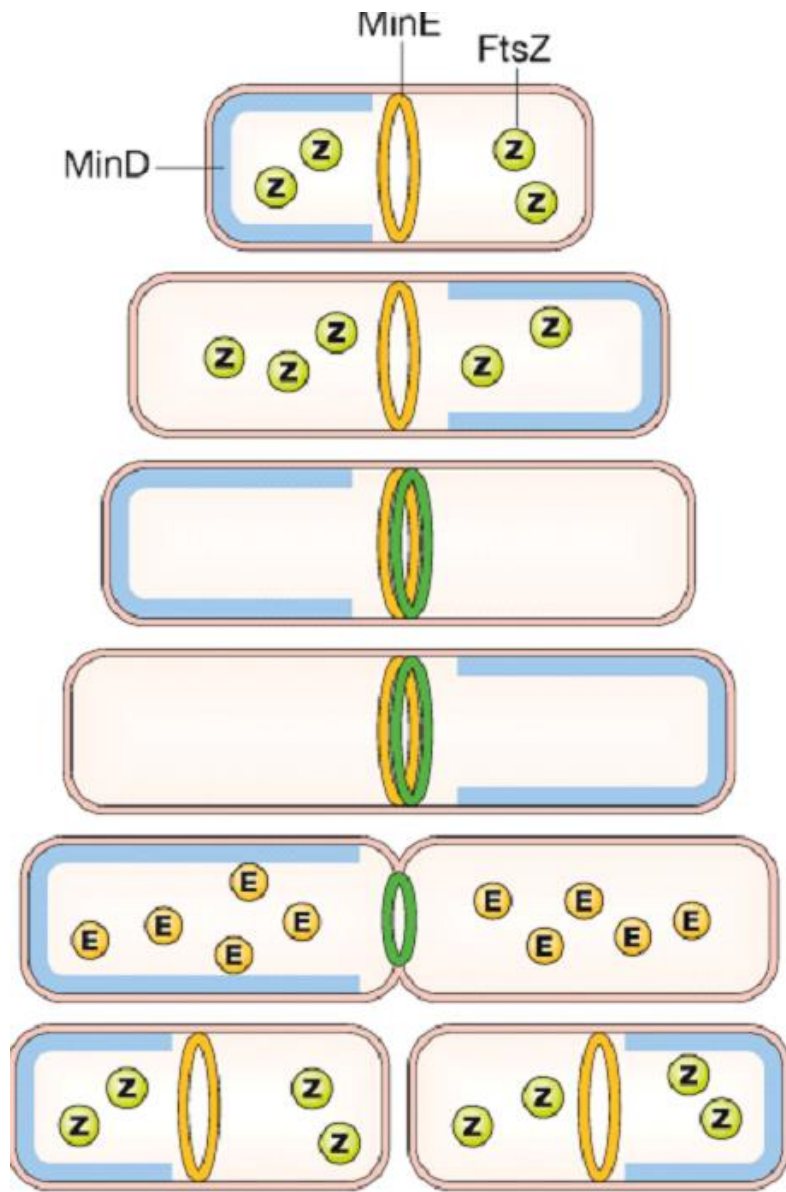
rapporto tra le diverse proteine **FtsQ: FtsA: FtsZ**
25: 200: 20.000

Il *locus min* (26.3')

Esso è caratterizzato da tre geni: *minC*, *minD*, *minE*.

- I mutanti *minD* vanno incontro a formazioni del setto anomale (es. polari) formando le *mini-cell*
- La delezione dell'intero *locus* determina il medesimo fenotipo
- La combinazione delle iperespressioni dei singoli geni hanno suggerito un effetto negativo da parte del complesso MinCD sulla formazione del setto ed uno positivo da parte di MinE (*mini-cell*)

- La proteina MinD è transmembrana ed ha attività ATPasica . Essa interagisce con MinC. Il consumo di ATP è necessario per attivare MinC.
- Il complesso MinCD-ATP determina l'inibizione della formazione dell'anello da parte di FtsZ.
- MinE è in grado di "spostare" MinCD
- MinE è concentrato nella regione centrale della cellula e si sposta oscillando verso un'estremità della cellula per poi scomparire e ricomparire al centro della cellula. Di qui si sposta nuovamente verso il polo opposto.



E. coli

Il posizionamento del complesso MinCD ai poli determina l'inibizione della formazione del setto in posizione $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ della cellula.

La presenza di MinE in posizione mediana contrasta l'effetto inibitorio di MinCD e favorisce la formazione dello Z ring a $\frac{1}{2}$ della cellula



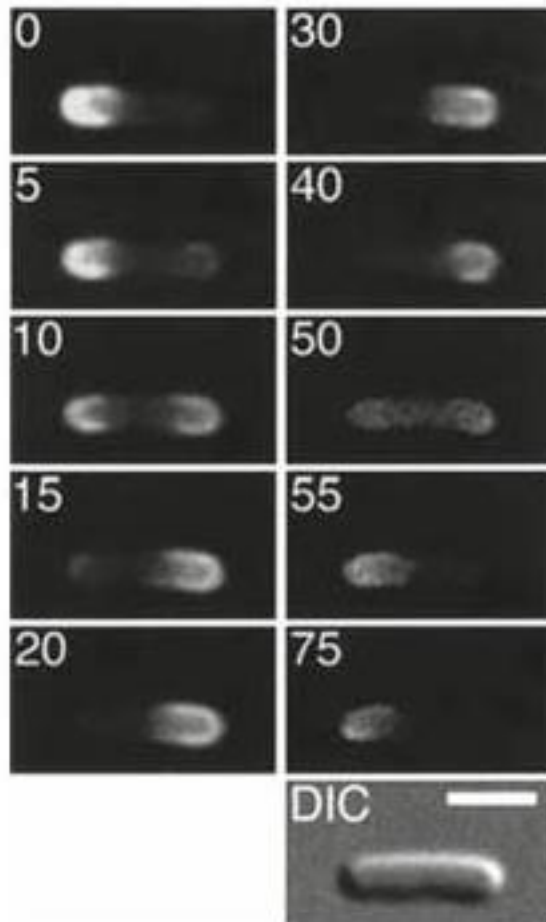
MinD è un ATPasi di membrana che legata a ATP si colloca nella parte interna della IM. MinC interagisce con MinD.

MinE è reclutata da MinD-ATP e provoca idrolisi ATP e distacco MinCD dalla Membrana favorendo l'oscillazione del complesso MinCD.

Questa oscillazione provoca:

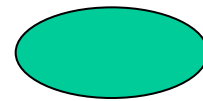
- accumulo di MinCD ai poli dove inibirà la formazione del setto
- Diminuzione di MinCD nella parte mediana favorendo la formazione del setto.

In E.coli le proteine Min hanno la proprietà di oscillare da un polo all'altro della cellula ogni 20s



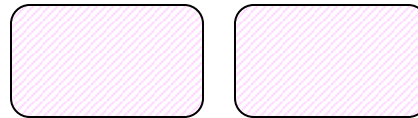
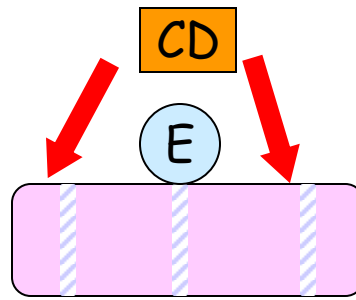
Utilizzando un ceppo che conteneva una fusione MinD - GFP

minD gfp

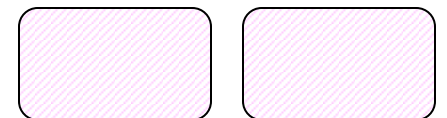
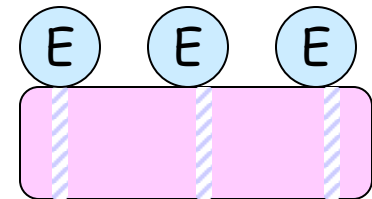


Proteina di fusione MinD-GFP

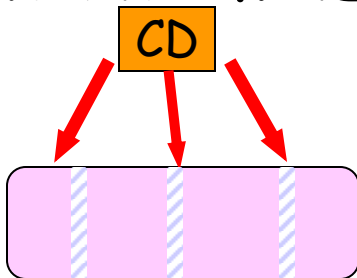
WT



Mutanti minDC⁻



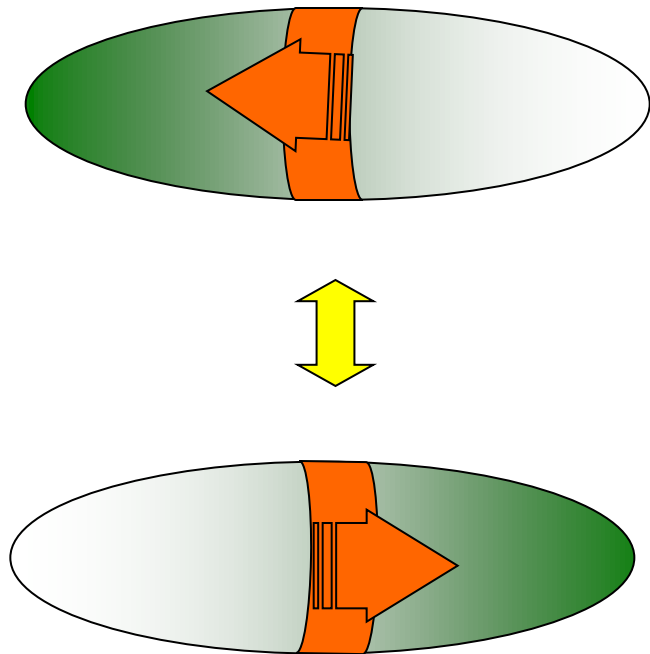
Mutanti minE⁻



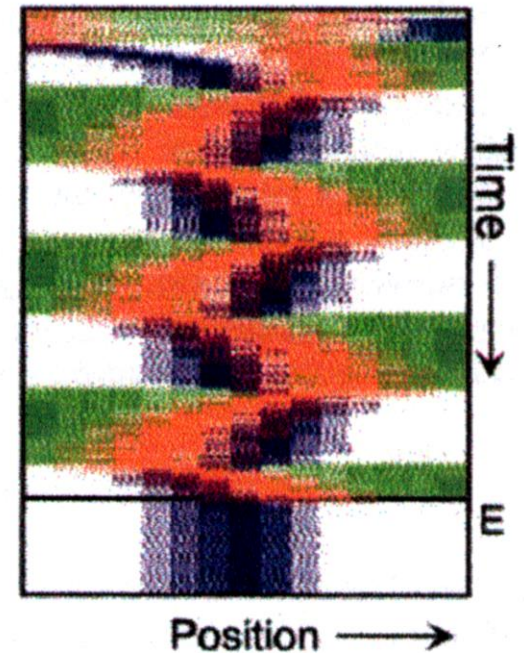
Minicellule

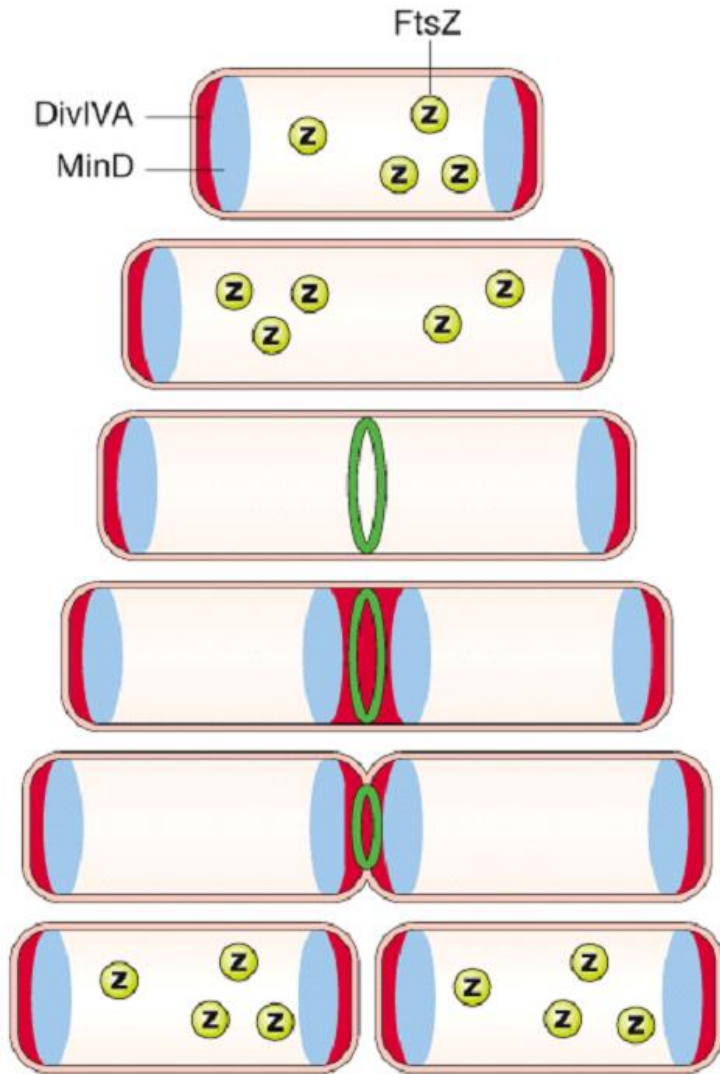
Distribuzione dinamica delle proteine Min e di FtsZ

Cellula batterica



- MinCD
- MinE
- FtsZ





B. subtilis

In *Bacillus subtilis* manca MinE e il posizionamento del setto viene stabilito dalla proteina DivIVA

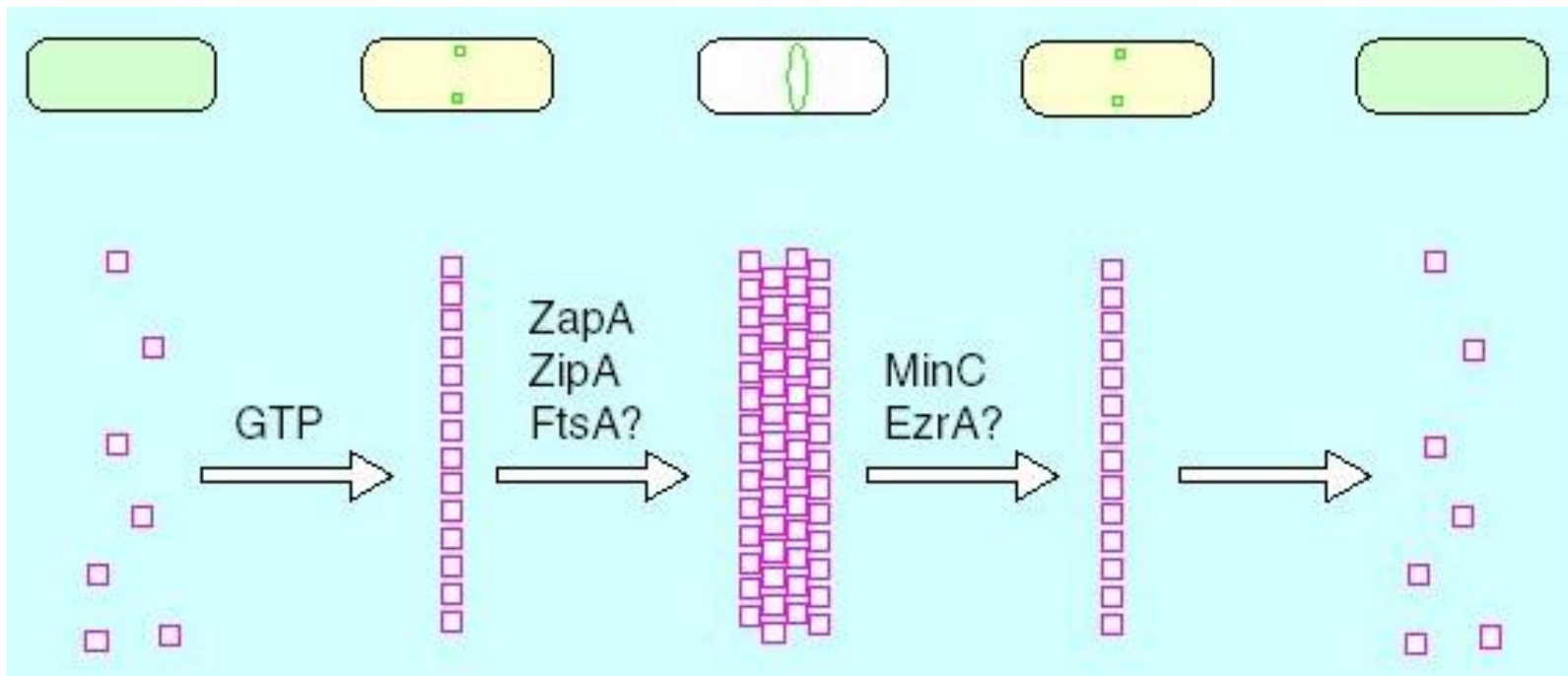
DivIVA si localizza sia ai poli che in posizione mediana e non oscilla.

DivIVA e **MinD** si ritrovano ai poli della cellula dove inibiscono la formazione del setto.

Dopo la replicazione del DNA si viene a formare un setto mediano grazie ad FtsZ e altre proteine che impediscono il legame di MinD.

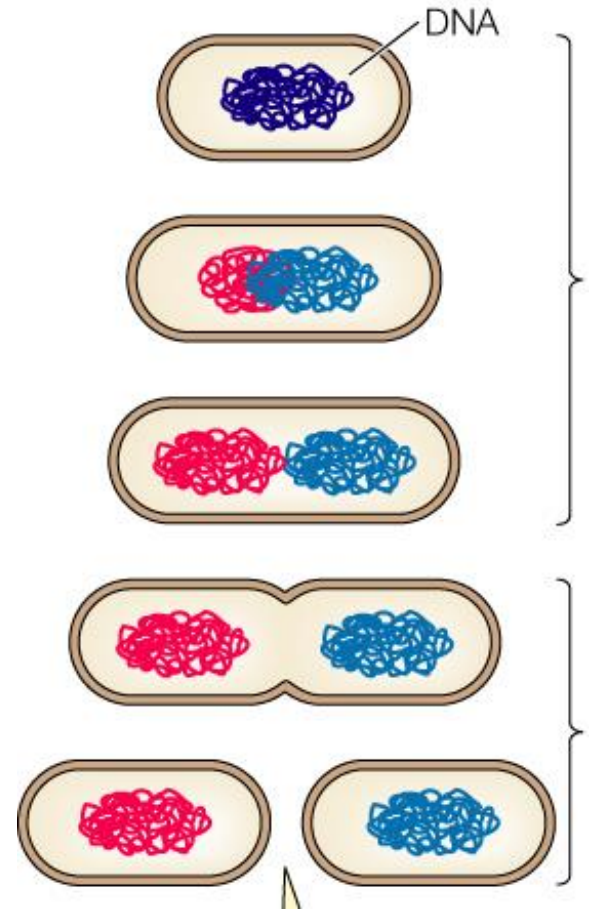
Successivamente vengono attratte in posizione mediana MinD e DivIVA che partecipano alla costrizione dello Z ring. FtsZ viene poi rilasciato mentre MinD e DivIV rimarranno ai nuovi poli delle cellule sorelle.

Nascita e morte del setto



Il processo di segregazione dei cromosomi nei batteri coinvolge solamente un piccolo numero di componenti e non è stato ancora pienamente elucidato.

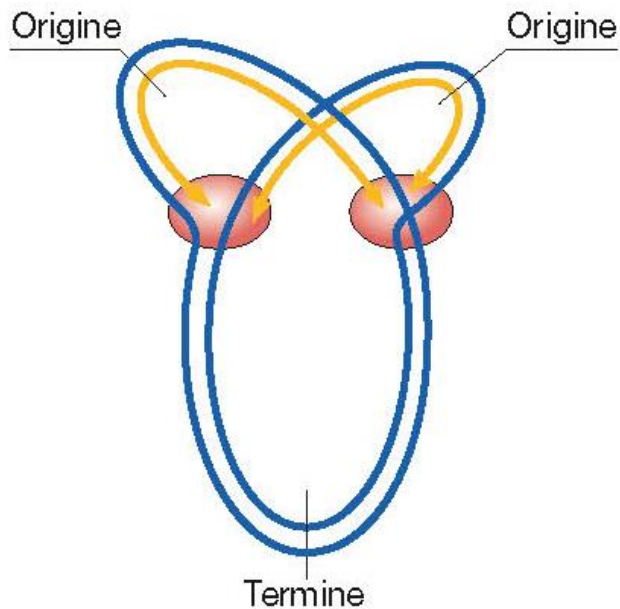
L'apparato batterico è abbastanza accurato in quanto si osservano cellule anucleate solamente nel 0.03% della popolazione



I è l'intervallo che separa due inizi ossia il tempo di generazione
 C è il tempo richiesto per replicare il cromosoma
 D è il tempo richiesto perché i cromosomi replicati possano essere ripartiti nelle cellule figlie

$$I \geq C + D$$

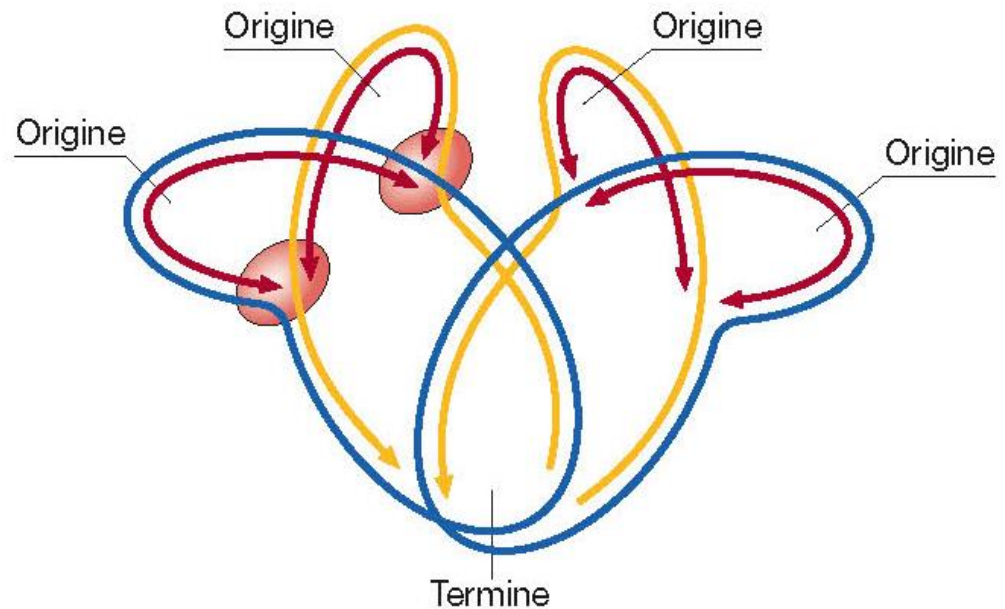
*Tempo di generazione
 \geq di 60 min*



Cellula a crescita lenta

$$I < C + D$$

*Tempo di generazione
< di 60 min*



Cellula a crescita rapida

Le proteine antighiottina del nucleotide

La ricerca in cellule min difettive di mutanti alterati nella segregazione dei nucleotidi ha permesso di mettere in evidenza 2 proteine: Noc in *B. subtilis* e SlmA in *E. coli*.

Noc è una proteina che si localizza sul nucleotide e riconosce una sequenza specifica 5'-
ATTTCCTGGGAAAT-3'

SlmA è associata al nucleotide e si lega al DNA riconoscendo una sequenza palindromica di 12 b 5'-
GTGAGTACTCAC-3'.

Sono entrambe "DNA binding protein" ma non hanno omologia di sequenza pur svolgendo la stessa funzione

Come agisce la proteina SlmA?

SlmA interagisce con FtsZ GTP alterandone la polimerizzazione ed impedendo così la formazione del setto nella zona in cui è presente il nucleotide.

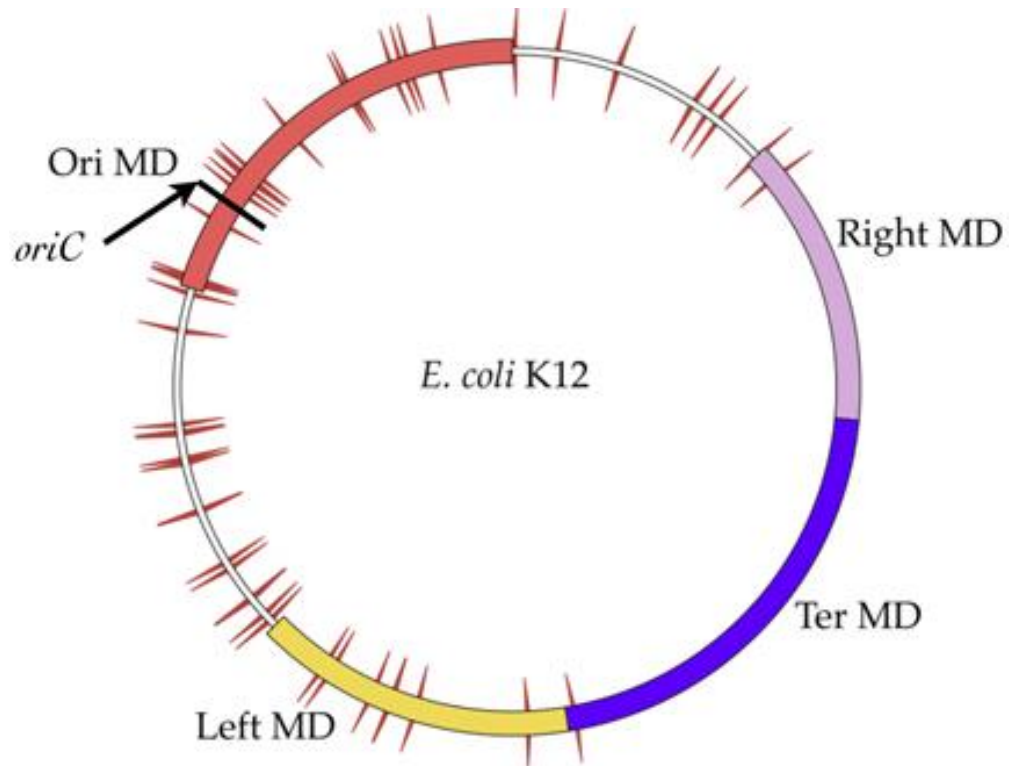
Si associa con le regioni del nucleotide prossime ai poli della cellula

Ci sono circa 50 siti per SlmA nel cromosoma di *E. coli* ma sono

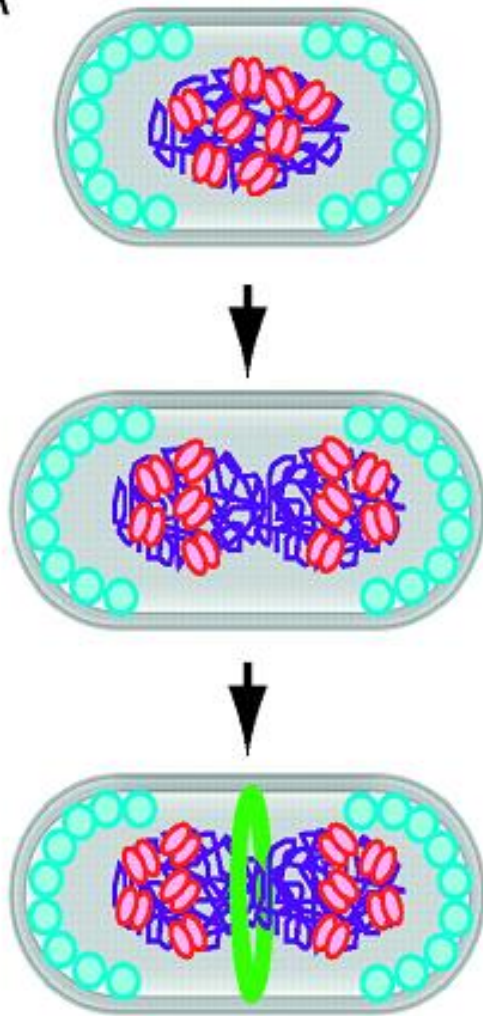
localizzati in tre domini

- Vicino all'origine
- A destra e sinistra dell'origine

Mai vicino al sito di terminazione



A



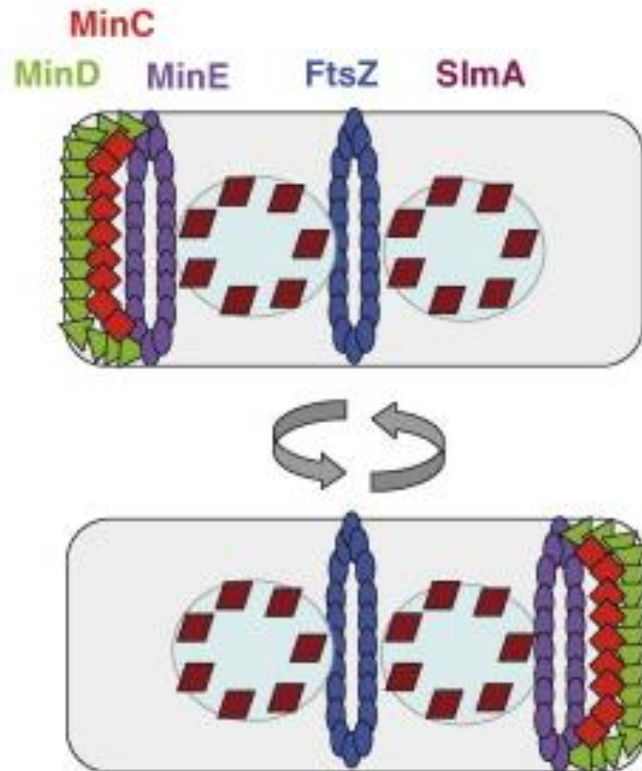
● MinCD ○ SlmA ■ Z-ring
 ● (SlmA)₂ ■ SBS — DNA

All'inizio del ciclo cellulare SlmA si trova associata ad ori nella zona mediana bloccando l'assemblaggio anello Z.

Man mano che la replicazione procede l'origine di replicazione si sposta ed i nucleoidi nascenti si spostano verso i poli liberando la zona mediana dove si trovano la regione ter del cromosoma che non contiene siti SmlA.

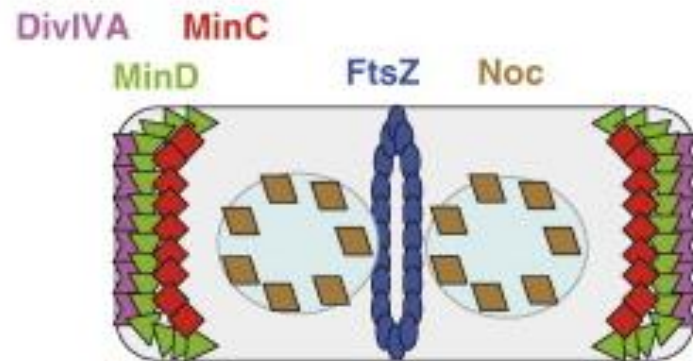
In questo modo si permette la formazione del setto assicurandosi che i nucleoidi formati siano ormai lontani dalla parte mediana.

E. coli



MinE drives pole-to-pole MinCD oscillation
SlmA associates with nucleoid
MinC and SlmA regulate FtsZ

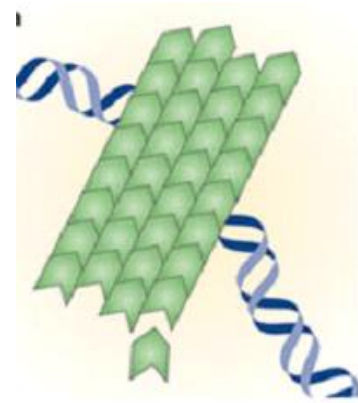
B. subtilis



DivIVA fixes MinCD to both poles
Noc associates with nucleoid
MinC and Noc regulate FtsZ

Come fa SlmA ad impedire la formazione dello Z ring?

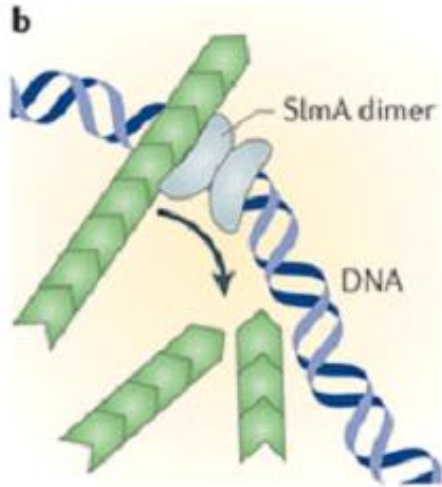
Nelle regioni senza siti per SlmA, FtsZ può polimerizzare e formare lo Z ring



In presenza di SlmA:

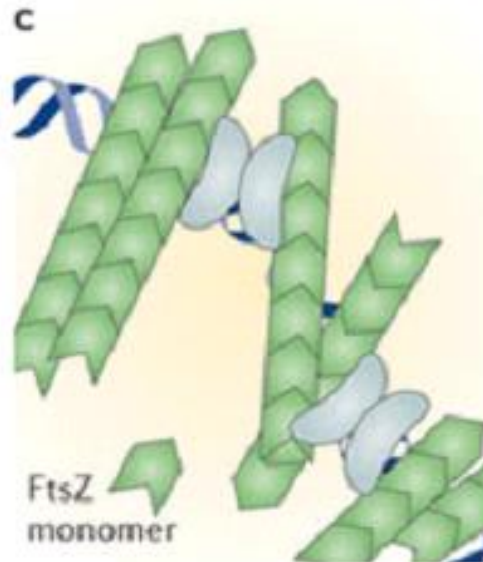
Modello 1.

I dimeri di SlmA si legano ai siti SlmA sul cromosoma e interagiscono con FtsZ distruggendo i polimeri di FtsZ formati

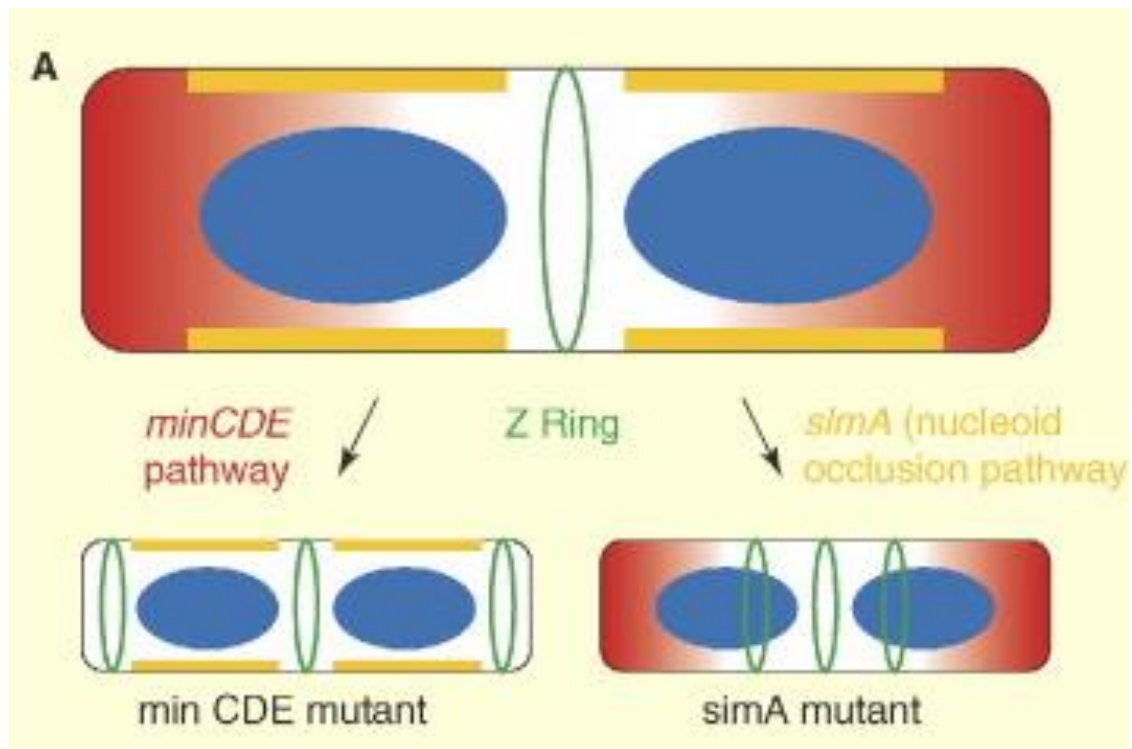


Modello 2.

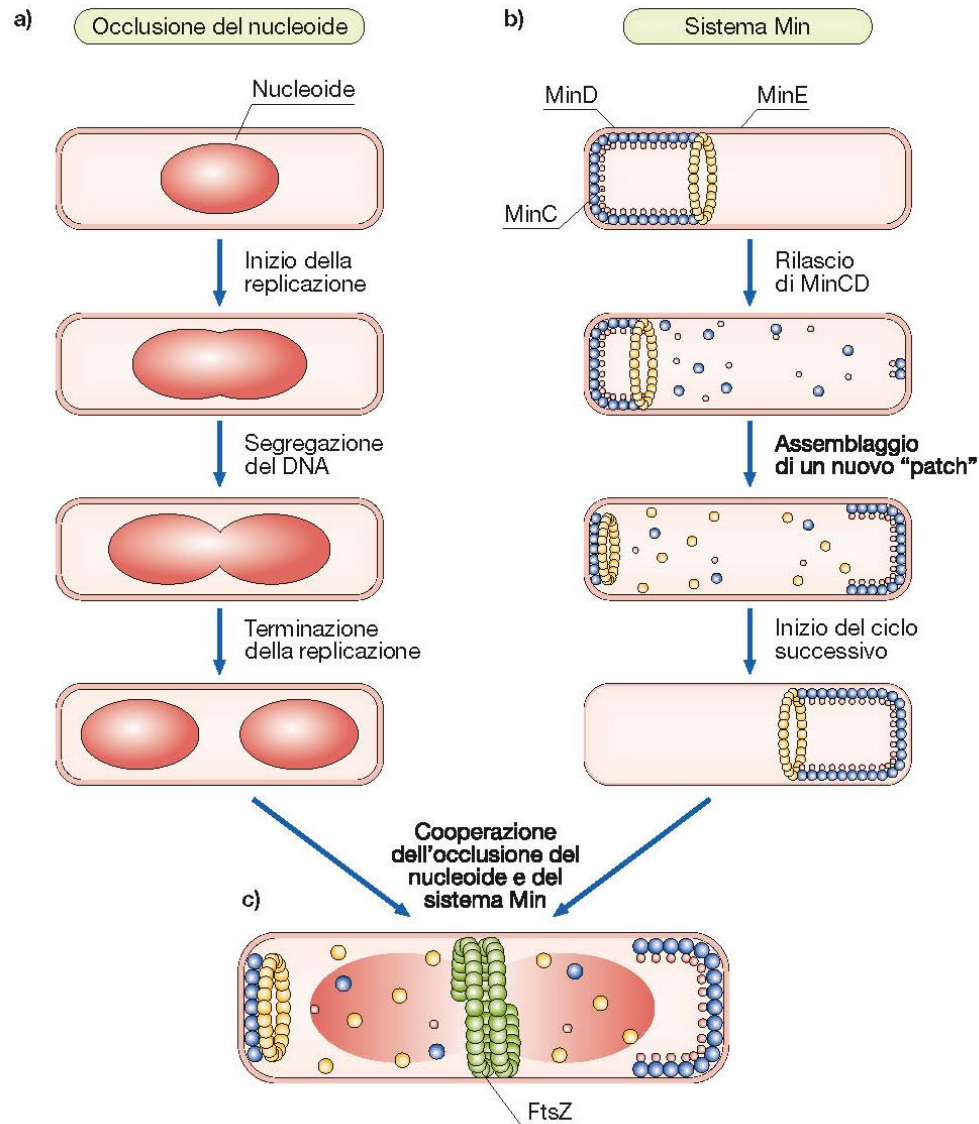
I dimeri di SlmA reclutano le molecole di FtsZ e le fanno polimerizzare in direzioni opposte in modo che non si possa formare un corretto anello Z



Ruolo della proteina *SlmA* nella corretta separazione dei nucleoidi

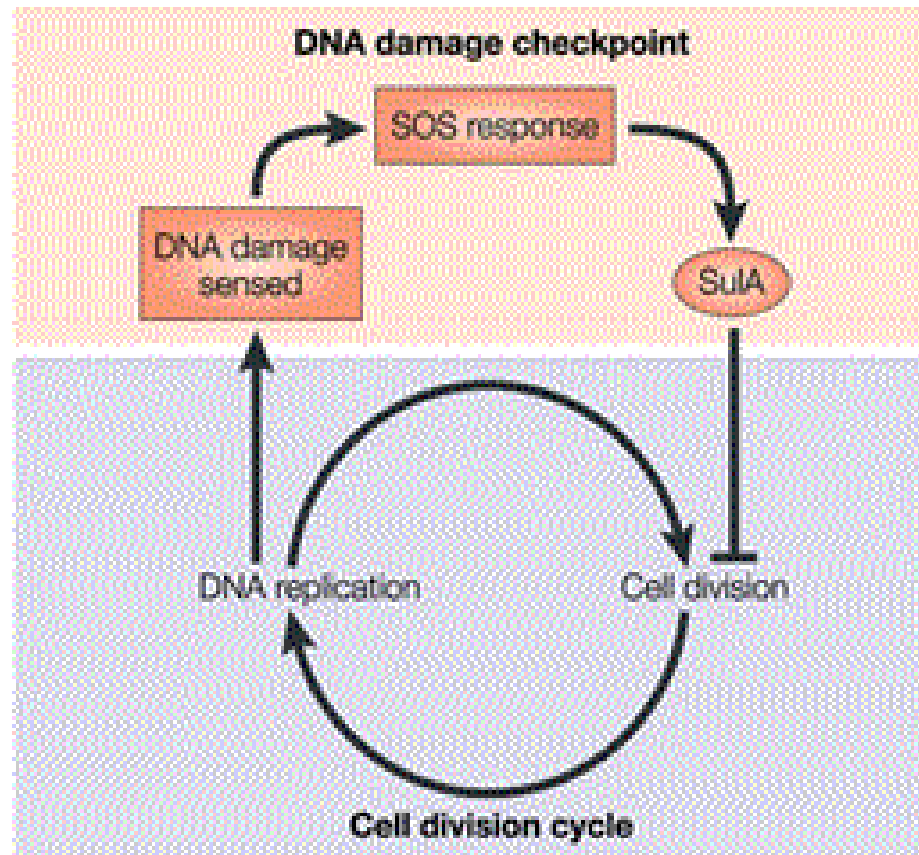


Cooperazione tra il sistema MIN ed il sistema dell'occlusione nella corretta divisione cellulare



Percezione di danni al DNA e Blocco della divisione cellulare

b *Escherichia coli* DNA damage response



INIBIZIONE DELLA DIVISIONE CELLULARE

La divisione cellulare manifesta un'apprezzabile correlazione con la replicazione del DNA e con il partitioning.

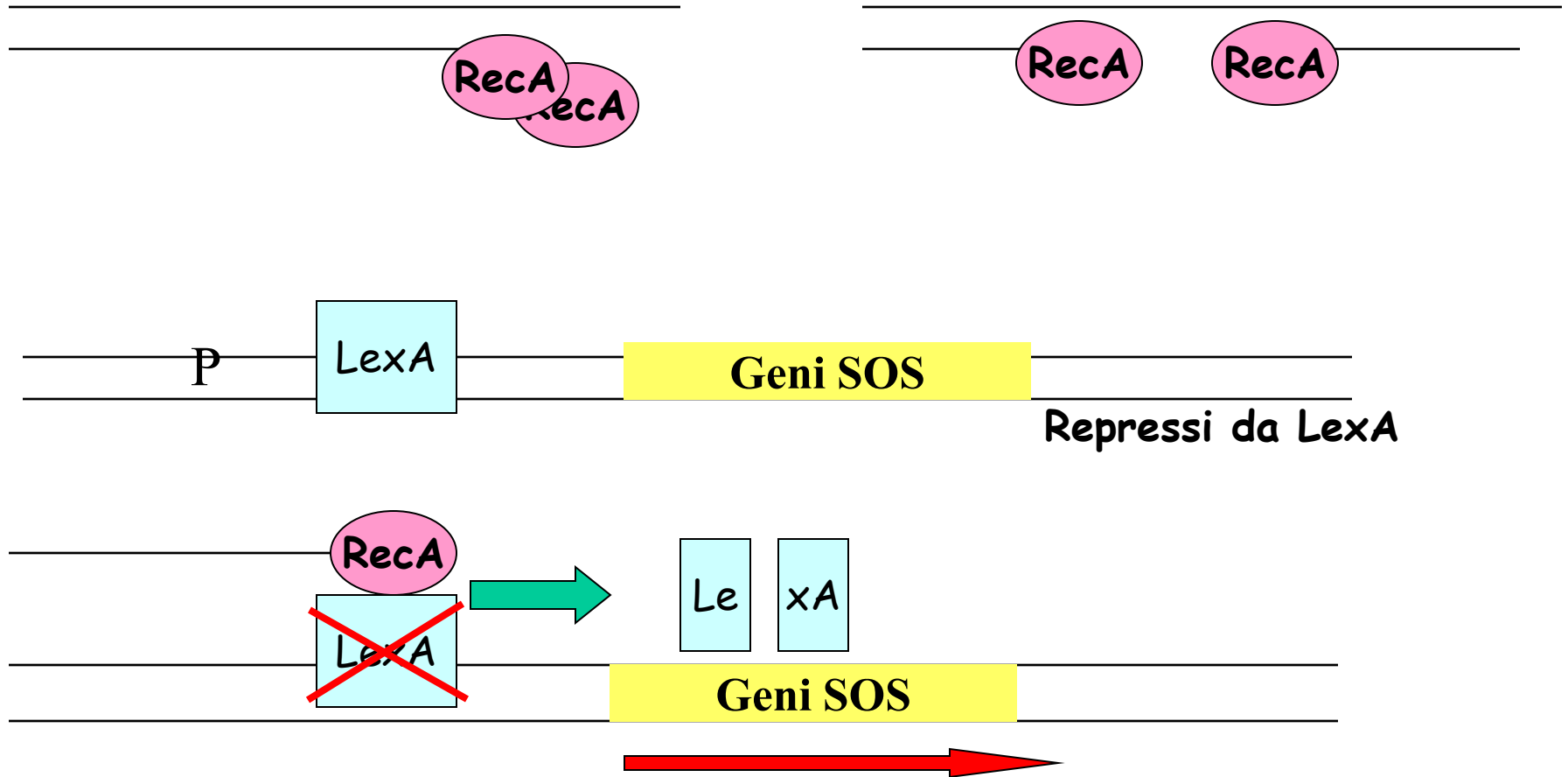
La divisione cellulare si blocca, però, anche quando la cellula riporta alcuni danni al proprio DNA.

Questo fenomeno è ben conosciuto e dipende da una proteina che fa parte del sistema SOS:

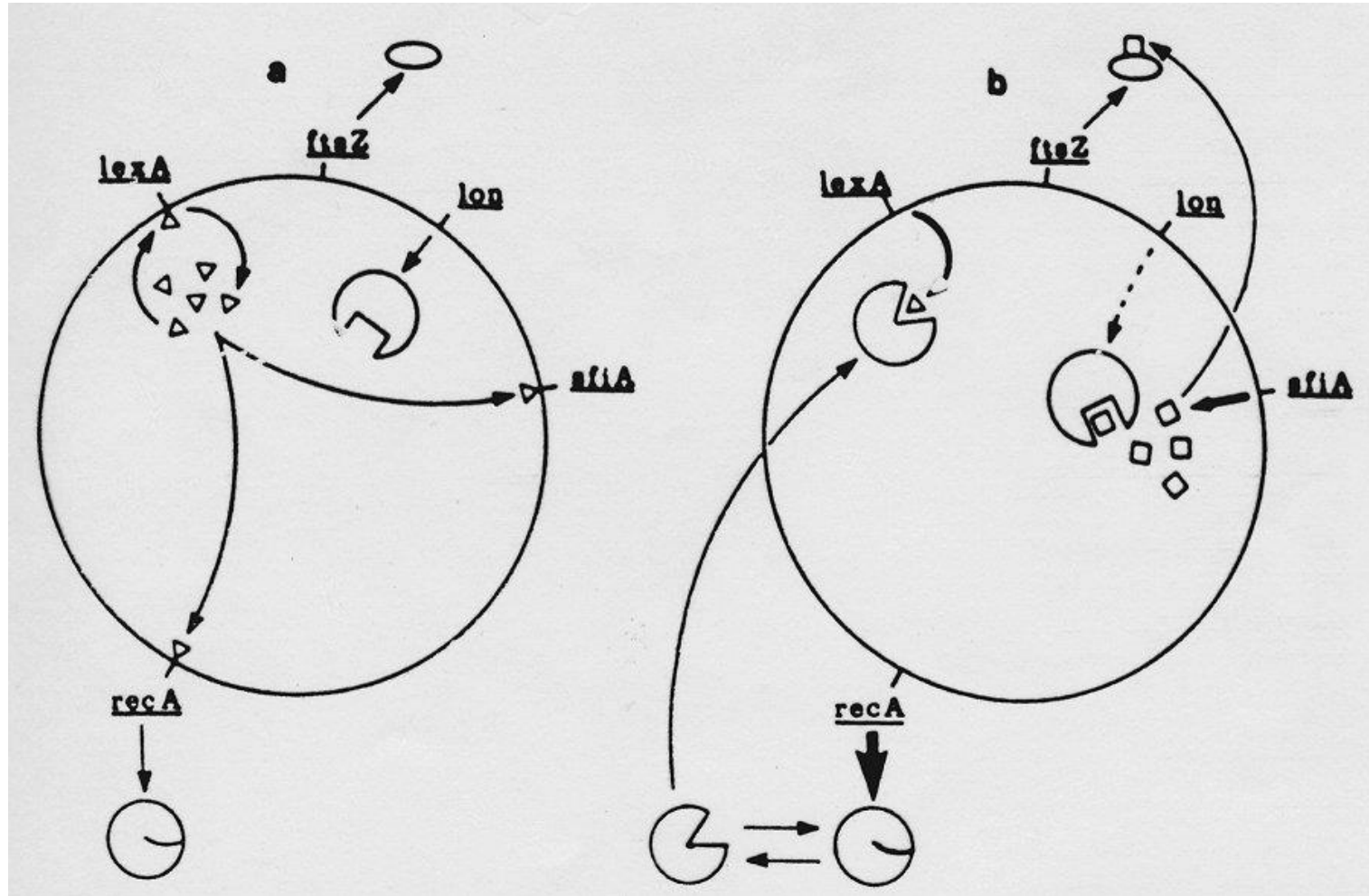
SulA o SfiA

Attivazione del sistema SOS

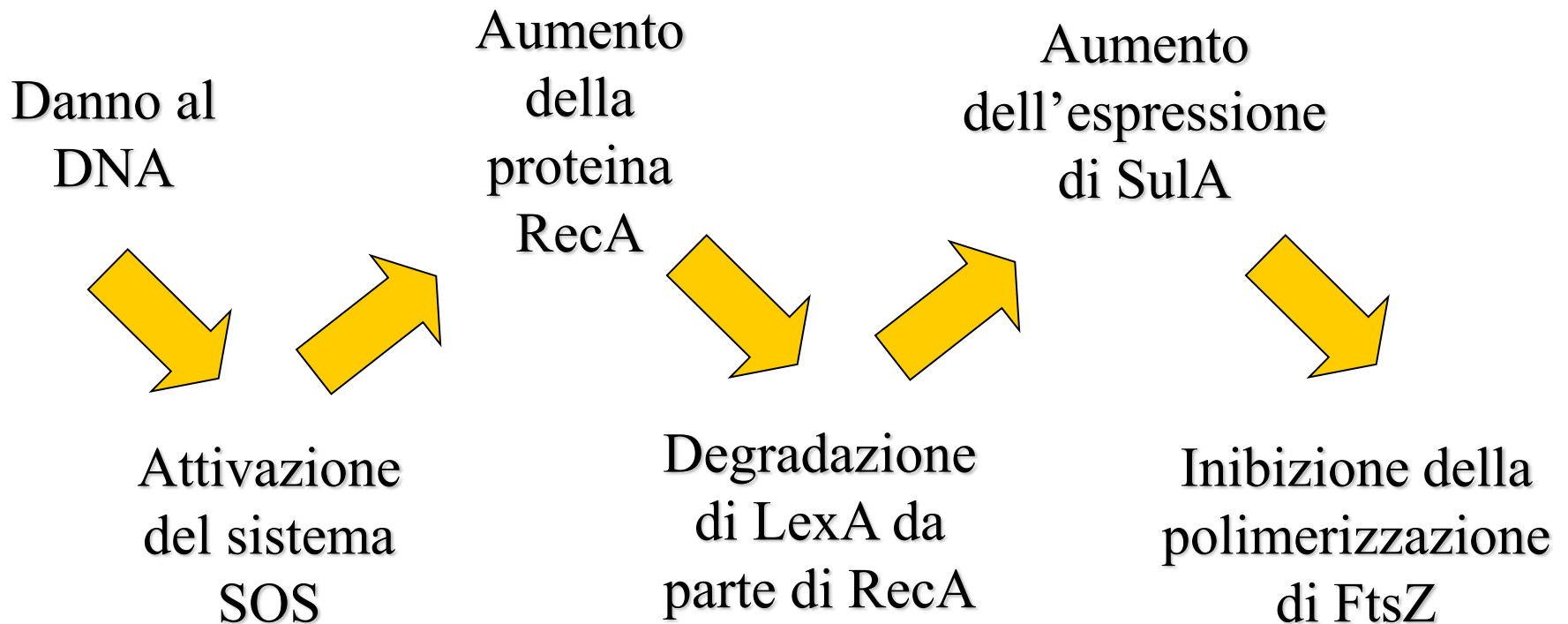
UV



Il sistema SOS: blocco della divisione cellulare mediato da *sulA* (*sfiA*)

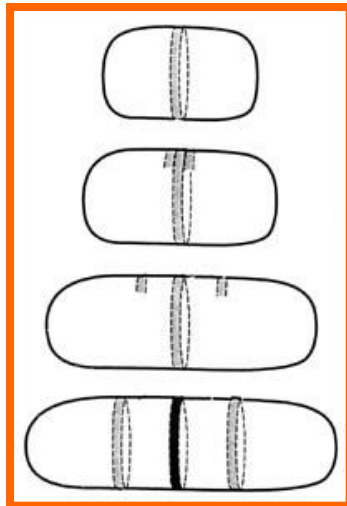
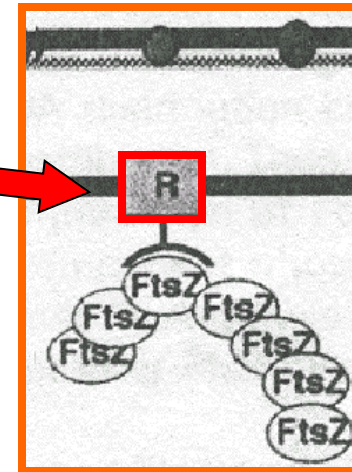
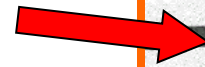


Circuito di Sula



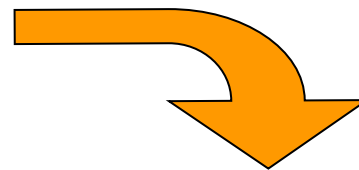
POSIZIONAMENTO DELL'ANELLO Z

1) Localizzatore topologico

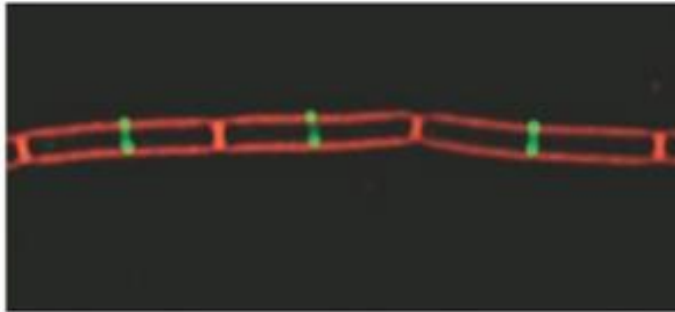


2) Anelli perisettali

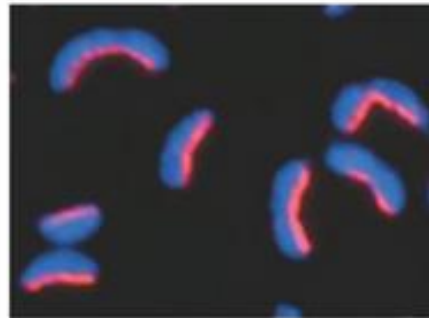
3) Proteine Min



- FtsZ – many bacteria and archaea Tubulin
 - forms ring during septum formation in cell division
- MreB – many rods, some archaea Actin
 - maintains shape by positioning peptidoglycan synthesis machinery
- CreS – rare, maintains curve shape Intermediate filament

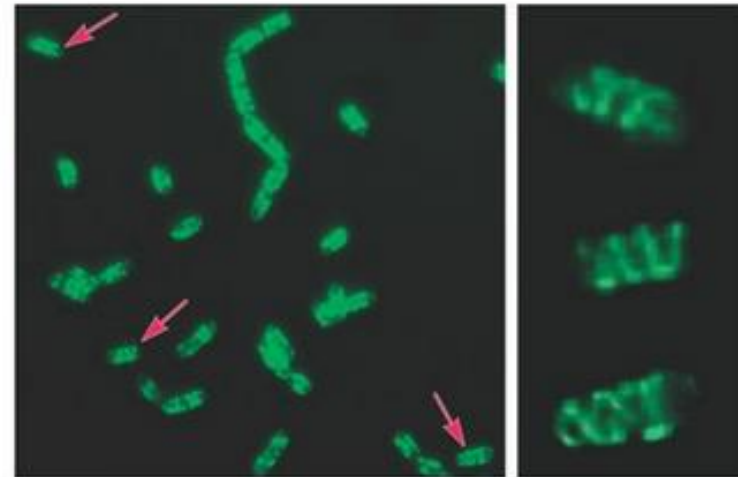


(a) FtsZ



(d) Crescentin

Dr. Christine Jacobs-Wagner



(b) Mbl

(c) Mbl

Image courtesy of Rut Carballido-López and Jeff Errington