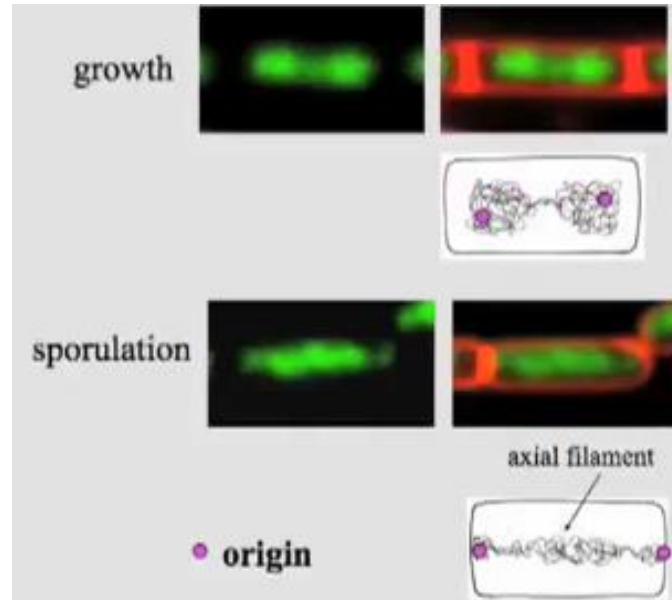
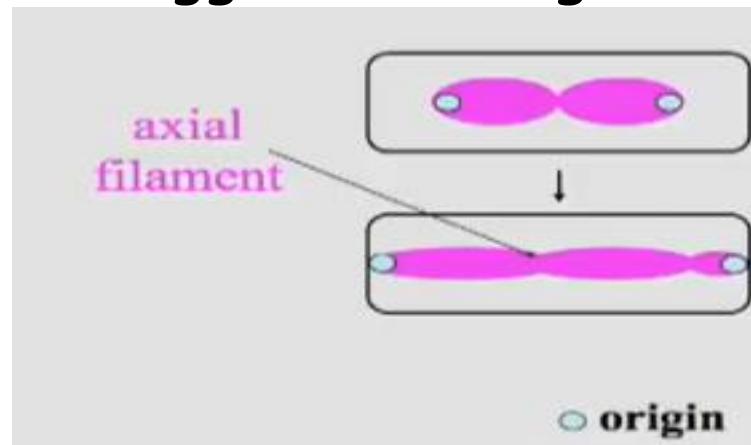
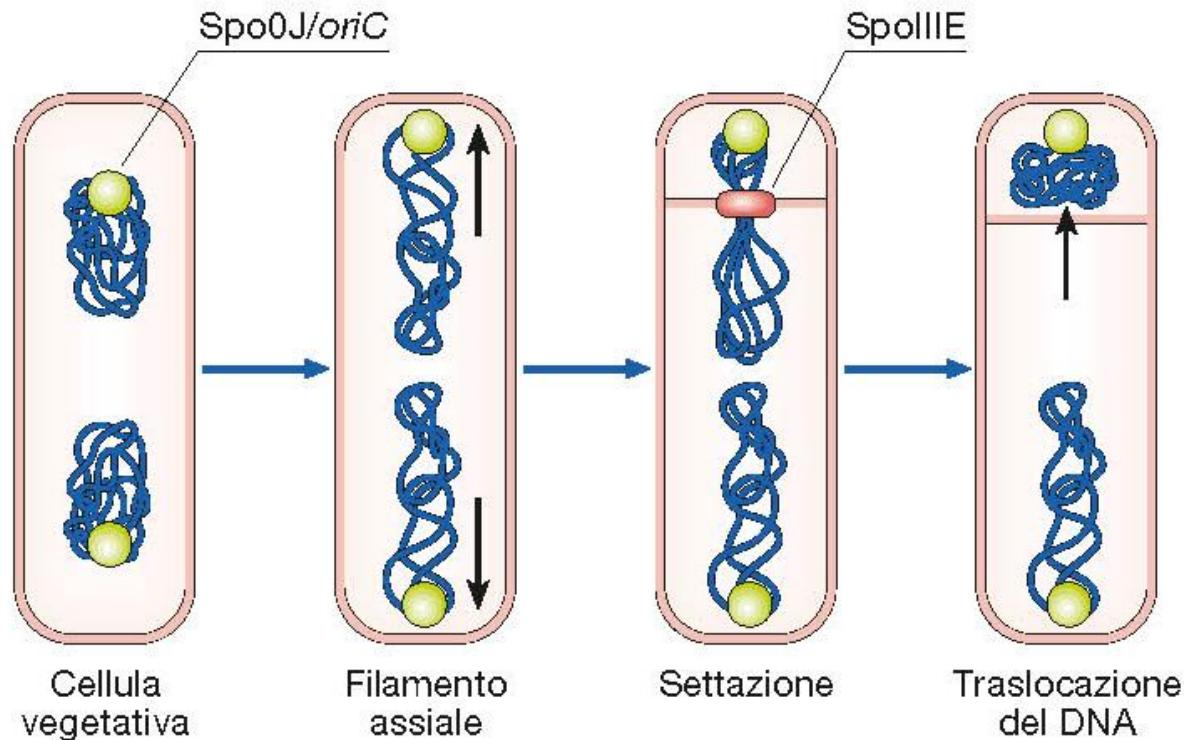


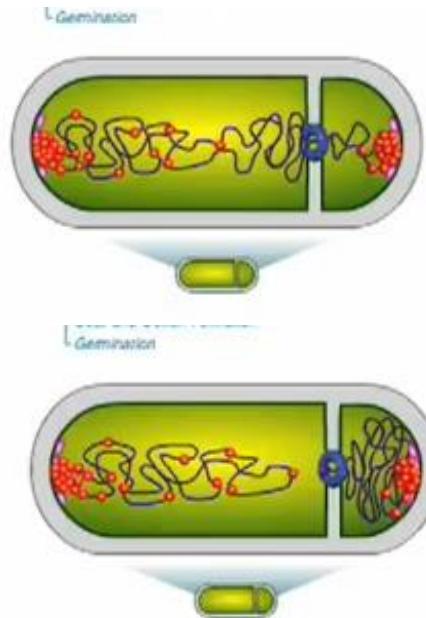
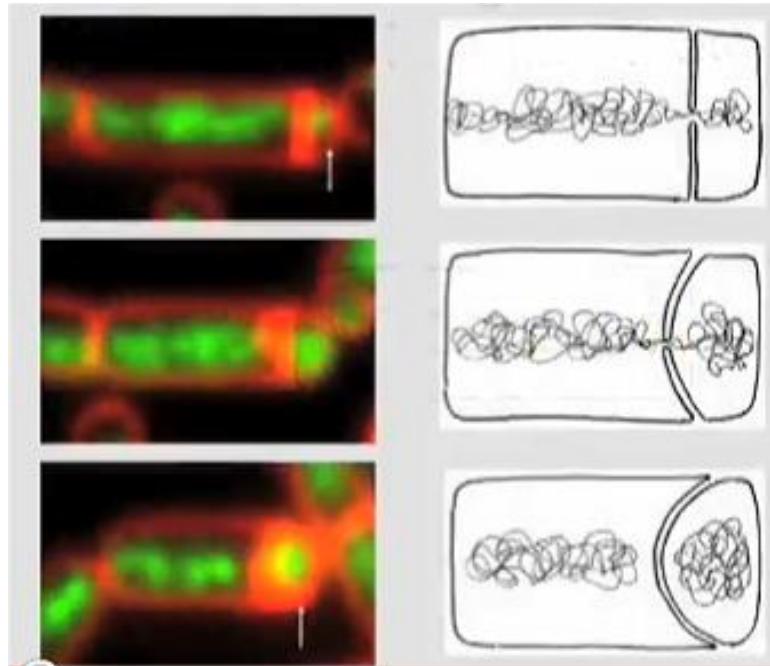
Una delle prime tappe nella segregazione dei cromosomi è costituita dall'ancoraggio delle origini di replicazione ai poli



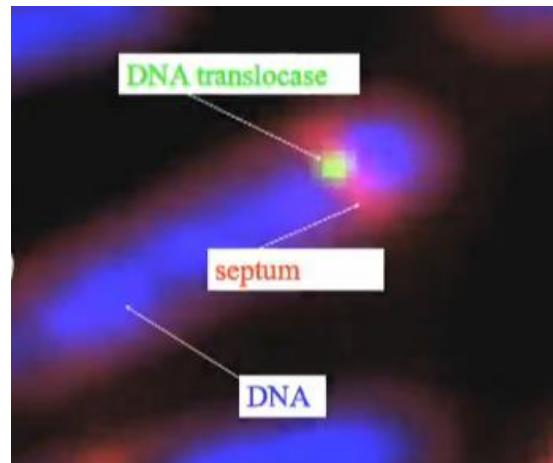


Nella cellula vegetativa la proteina SpoOJ si lega intorno ad *OriC* per formare un complesso importante per la segregazione corretta dei cromosomi, posizionandosi ad un  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{3}{4}$  della cellula. Durante la sporulazione i complessi SpoOJ/*OriC* si muovono verso i poli della cellula grazie all'azione di altre proteine. La proteina SpoIIIE viene reclutata a livello del bordo superiore del setto dove forma un poro attraverso il quale verrà traslocato tutto il cromosoma della spora.

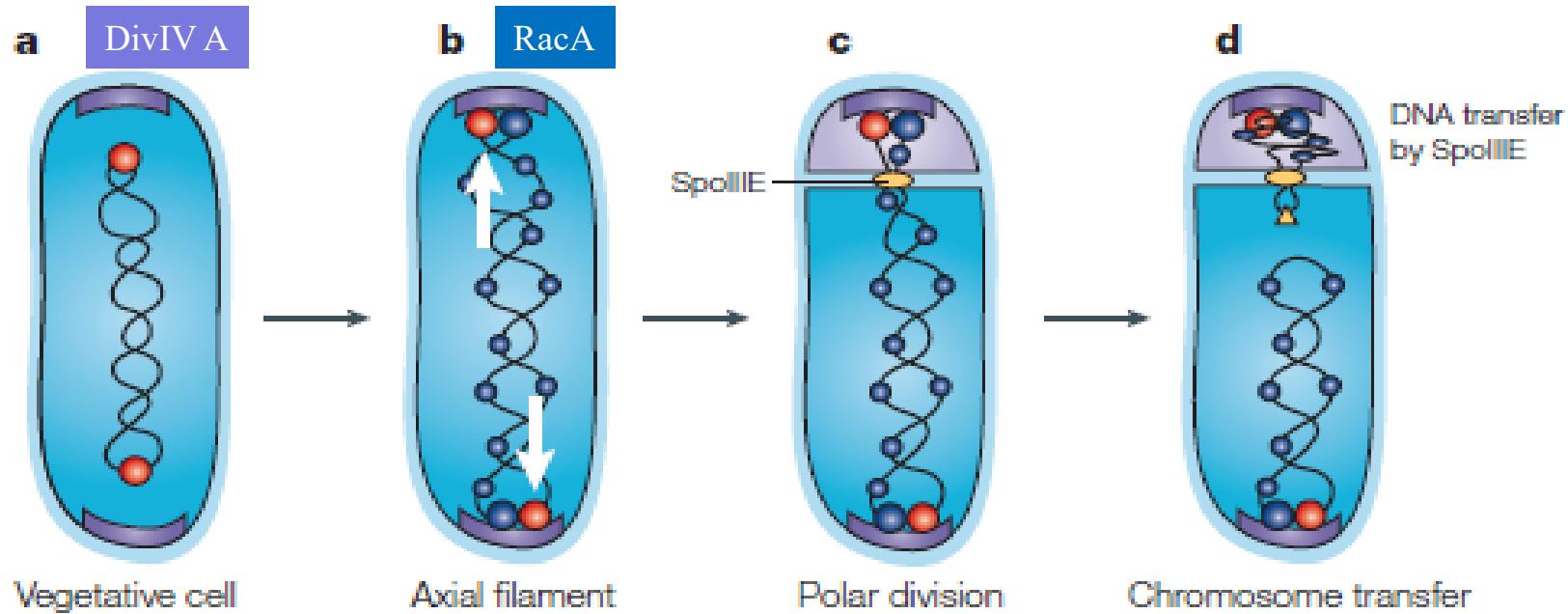
Quando il setto polare si forma, solo parte del cromosoma è entrato nella prespora



Il processo di inserzione di tutto il cromosoma nella prespora viene effettuato da una DNA traslocasi localizzata nel setto che pompa il DNA all'interno della prespora



## OriC/SpoOJ



**Figure 3 | Prespore chromosome segregation.** **a** | In the vegetative cell, SpoOJ protein binds to sites around the *oriC* regions of the chromosome to form condensed foci that are important for proper chromosome segregation. The *oriC*/SpoOJ complexes (red) are typically positioned at about the one-quarter and three-quarter positions along the length of the cell.

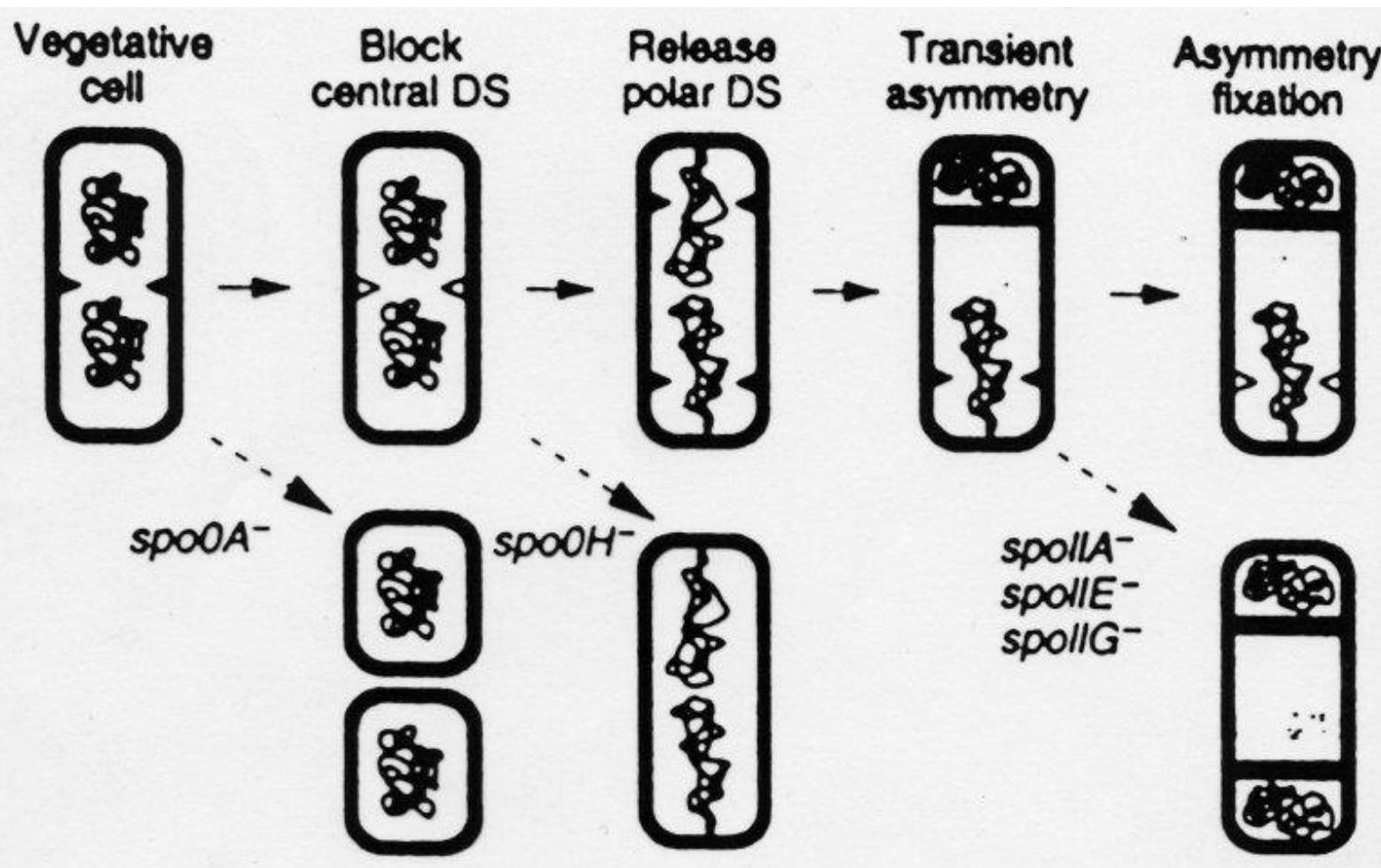
**b** | During the early stages of sporulation, the *oriC* regions move towards the cell poles and are bound to the poles by the combined action of the Soj (not shown) and RacA (blue) proteins, together with the polar anchor protein, DivIV A (purple). **c** | Asymmetric division results in trapping of the one-third of the chromosome that is attached to the *oriC* region in the prespore compartment. **d** | The SpoIII E protein (yellow) is recruited to the leading edge of the septum, where it forms a pore through which it translocates the remaining portion of the chromosome, thereby completing the segregation of the prespore chromosome.



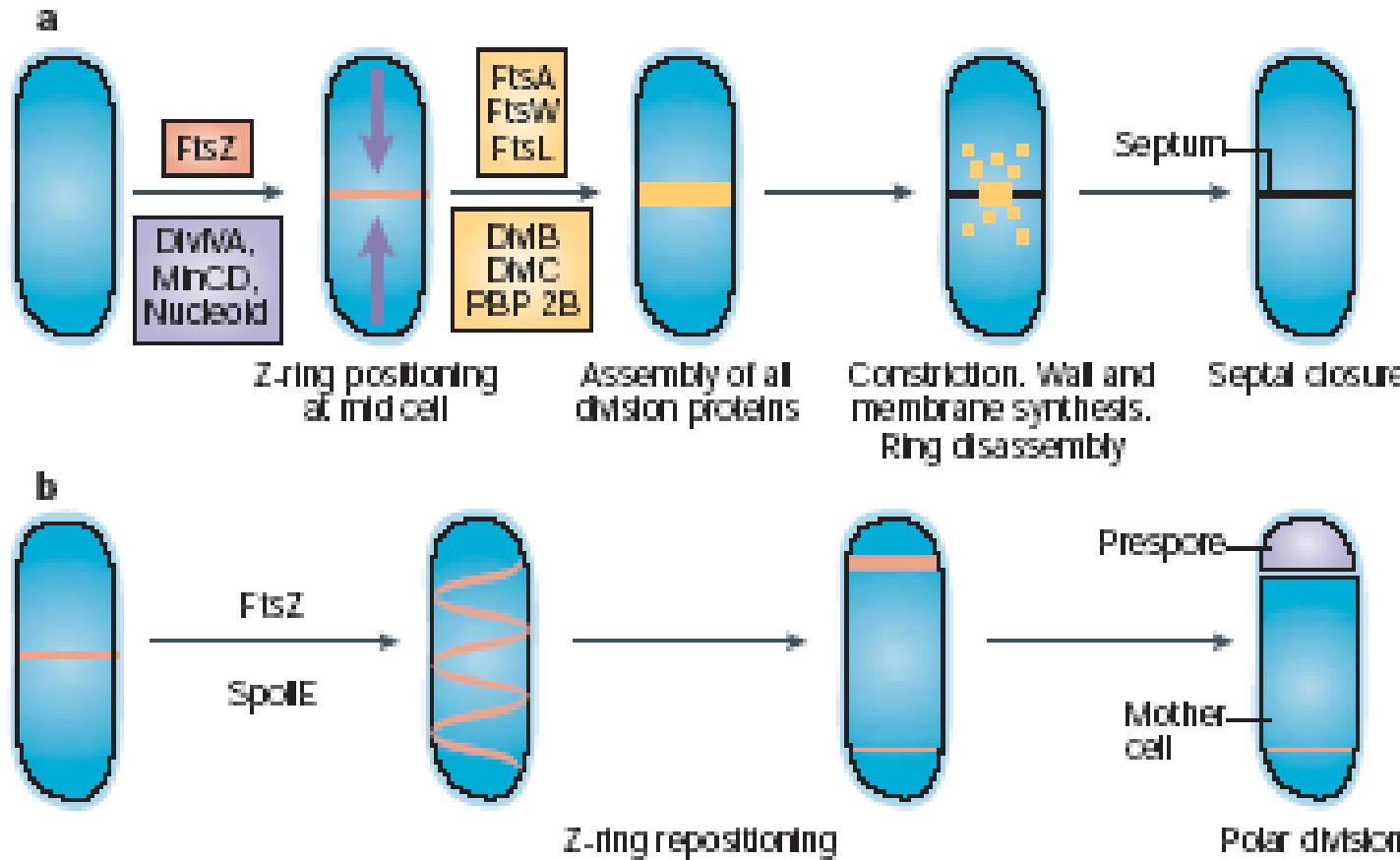
Successivamente la prespora viene rivestita dalla membrana della cellula madre e si formano vari rivestimenti che conferiranno alla prespora resistenza

La formazione del setto laterale avviene in più tappe:

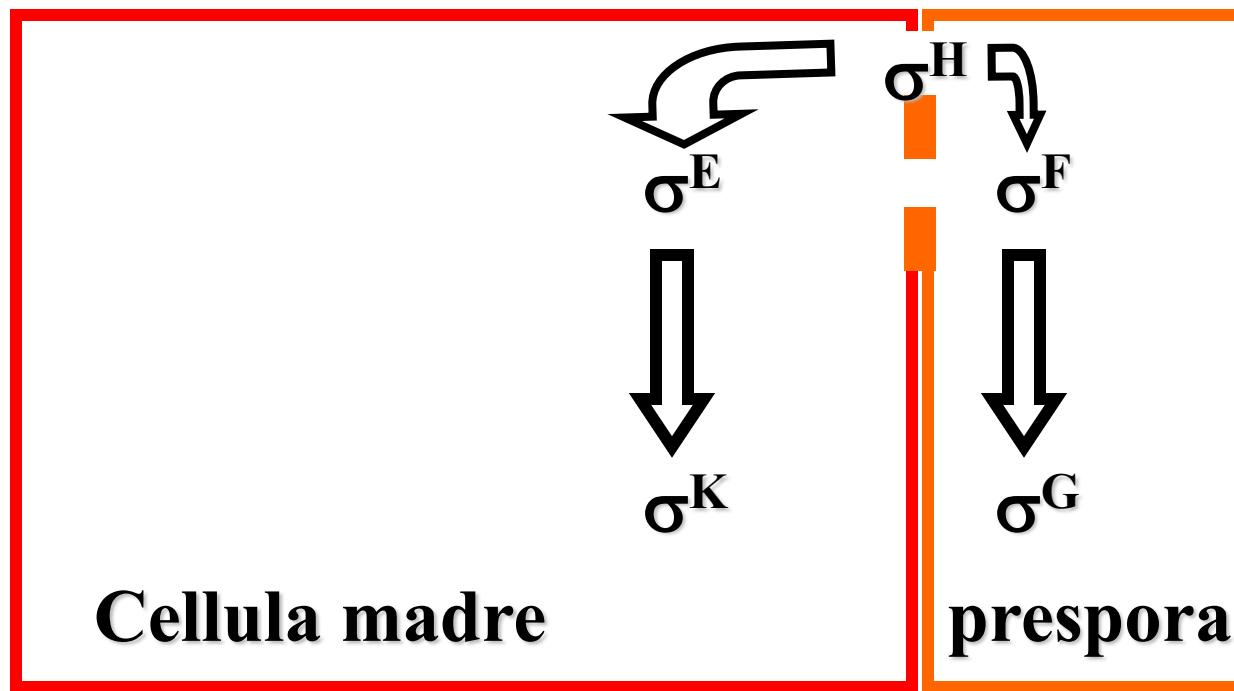
- blocco del setto centrale
- Attivazione dei setti laterali
- Silenziamento di uno dei due setti laterali



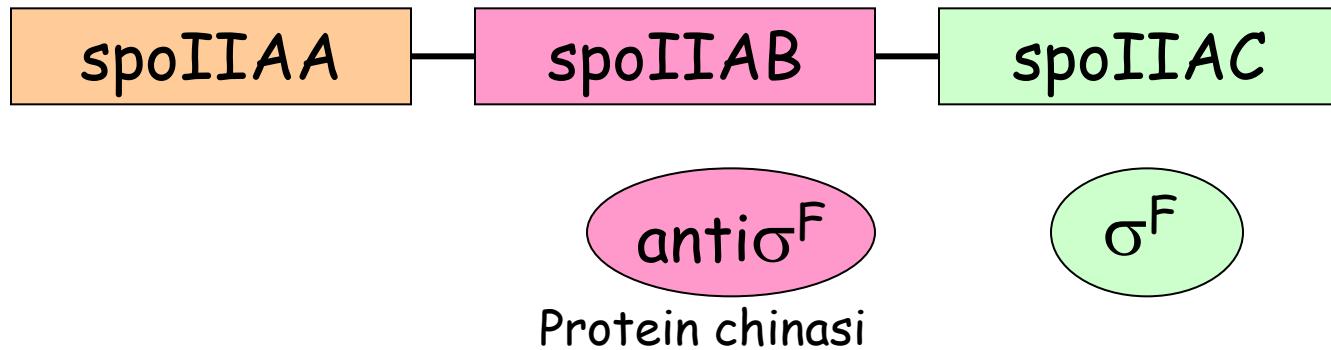
Riposizionamento del setto: lo Z ring mediano si disassembla e si dissolve a spirale diringendosi verso i poli . Uno dei due anelli ai poli poi diventerà il nuovo setto. Incremento della proteina FtsZ e richiesta di spoIIE



**Il fattore  $\sigma^H$  è il primo fattore  $\sigma$  del processo. Esso sarà seguito da altri 4 fattori  $\sigma$  che però sono organizzati sia spazialmente che temporalmente. Infatti .....**



# $\sigma^F$ attivo nella prespora



Bassa concentrazione di ATP (SPORA)

spoIIAB si lega a spoIIIAA

$\sigma^F$  LIBERO

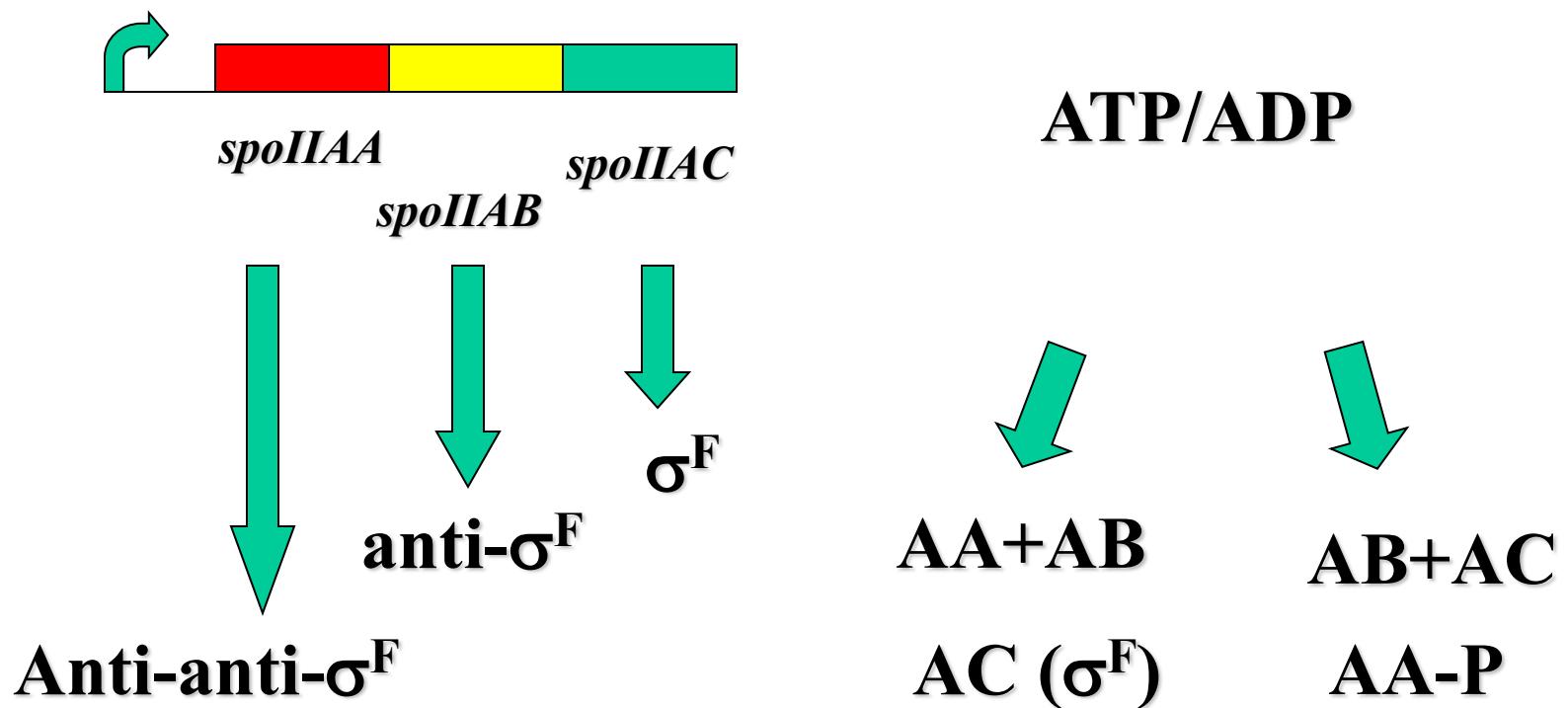
Alta concentrazione di ATP (cellula madre)

spoIIAB fosforila spoIIIAA  $\longrightarrow$  spoIIIAA-P

spoIIAB non riconosce spoIIIAA-P e si lega a  $\sigma^F$

# Comparsa e regolazione di $\sigma^F$

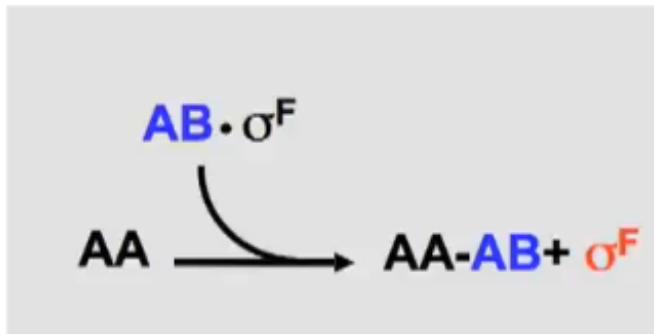
Questo fattore è caratteristico della prespora ma viene trascritto e tradotto prima della formazione del setto ed è quindi potenzialmente presente anche nella cellula madre



Un ulteriore fattore che determina la riduzione della fosforilazione di SpoIIA è la proteina SpoIIE. Si tratta di una defosforilasi che, essendo presente nella membrana del setto interviene in entrambi i compartimenti .....

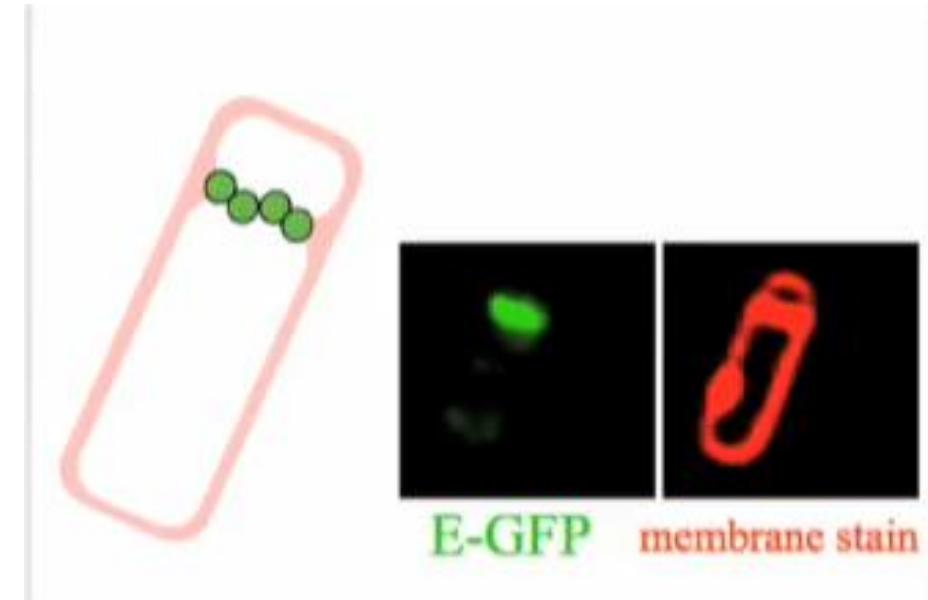
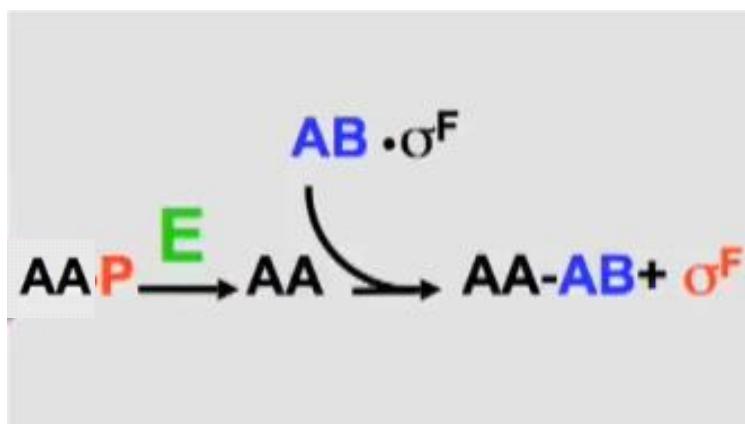
La sua attività è però più efficace nella prespora perché ha un volume inferiore !!!!

AA è l'anti –antisigma che libera  $\sigma^F$  da AB

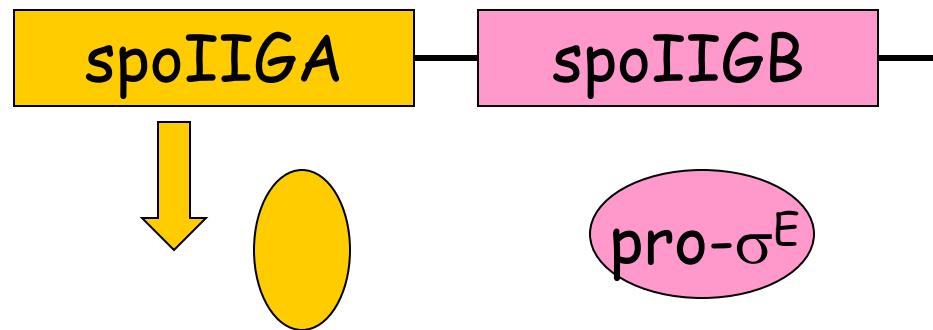


La fosfatasi spoE si localizza nel setto permettendo l'attivazione di  $\sigma^F$  grazie alla defosforilazione di spoAA-P

spoE è la fosfatasi che defosforila AA-P



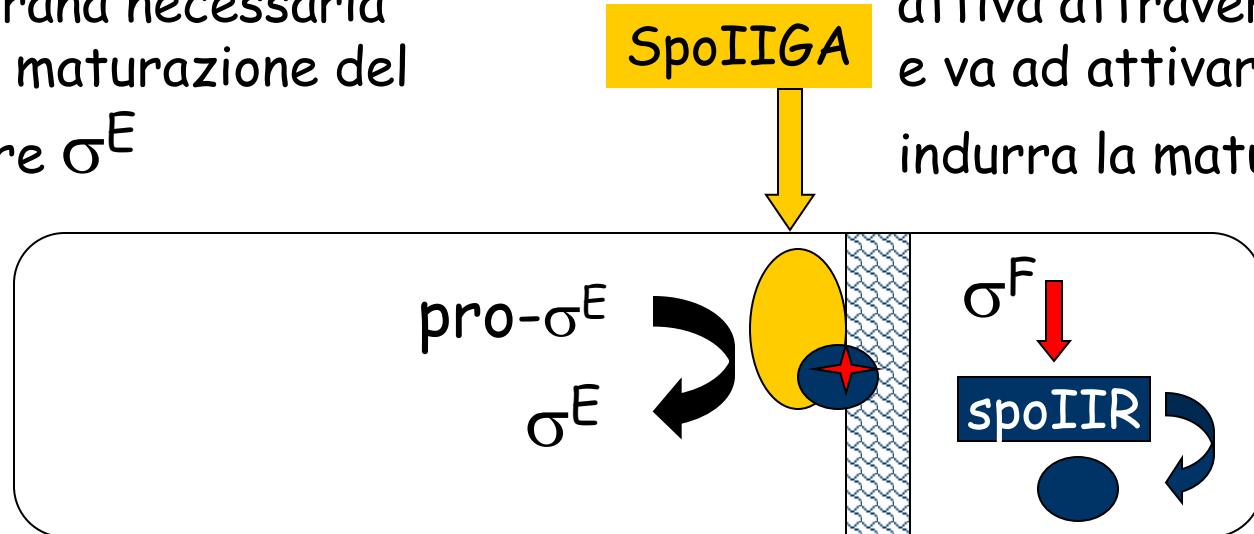
# $\sigma^E$ attivo nella cellula madre



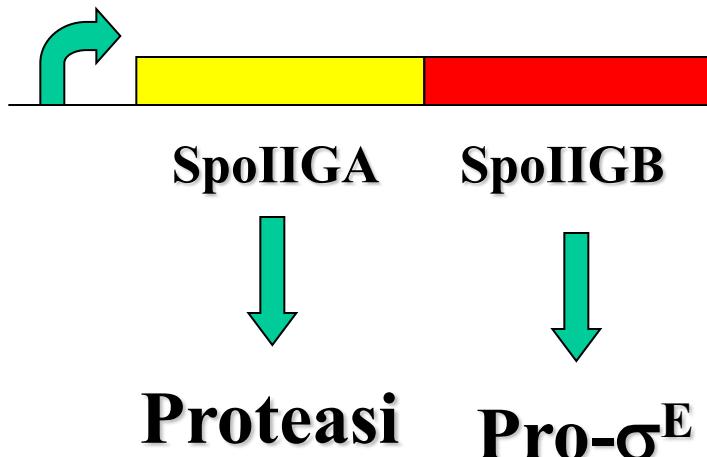
Codifica un proteina di membrana necessaria per la maturazione del fattore  $\sigma^E$

Fattore  $\sigma^E$  non maturo

SpoIIR prodotto nell'spora si attiva attraversando il setto e va ad attivare spoIIGA che indurrà la maturazione di  $\sigma^E$



# Il primo fattore $\sigma$ specifico per la cellula madre è il fattore $\sigma^E$



Il prodotto del gene SpoIIGA elimina 27 aminoacidi all'estremità NH<sub>2</sub> del fattore pro-  $\sigma^E$  convertendolo in un fattore  $\sigma^E$  funzionale

Questo processo avviene però solo dopo che si è sintetizzato il fattore  $\sigma^F$  nella prespora !!!!

Infatti  $\sigma^F$  permette la trascrizione del gene SpoIIR nella prespora. La proteina corrispondente, forse diffondendo attraverso il setto, interagisce con SpoIIGA e attiva la proteolisi della proteina pro-  $\sigma^E$

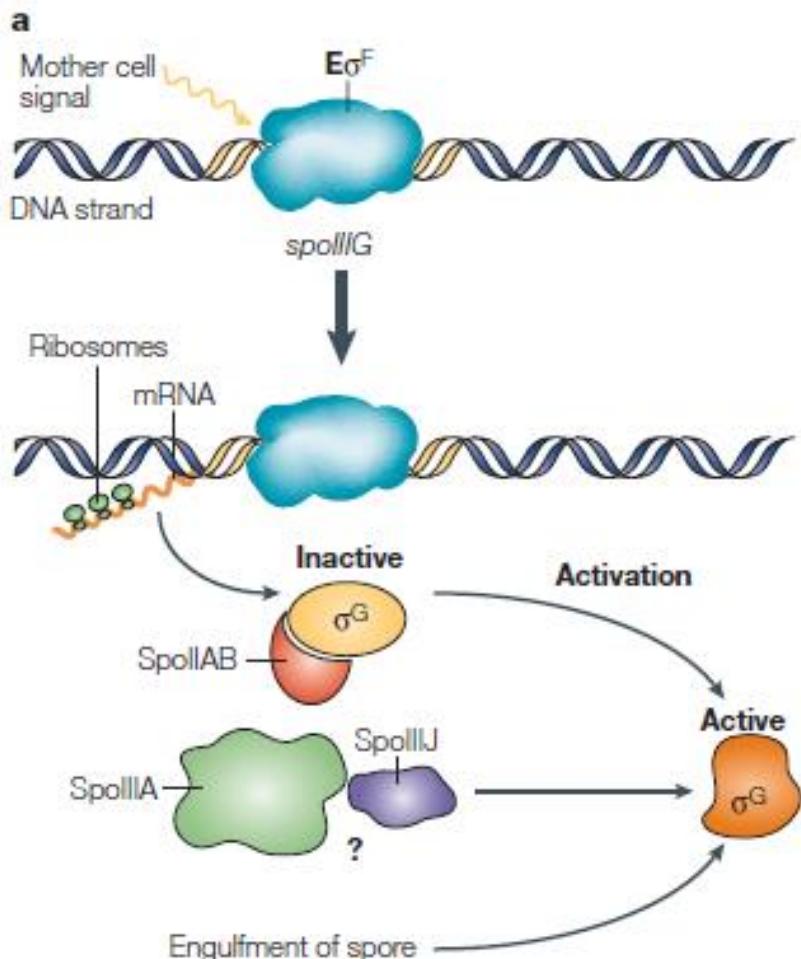
# Regolazione del fattore $\sigma^G$

**La regolazione del fattore  $\sigma^G$  non è stata completamente definita.**

**Si ipotizza, sulla base di alcuni dati sperimentali, che  $\sigma^G$  sia controllata dal fattore SpoIIAB (che abbiamo visto essere responsabile anche del controllo di  $\sigma^F$  nella cellula madre).**

**SpoIIAB inibirebbe la funzione di  $\sigma^G$  immediatamente dopo la sua sintesi. Affinché questa inibizione venga eliminata (e quindi  $\sigma^G$  abbia un ruolo funzionale) è necessaria la presenza della proteina SpoIII A.**

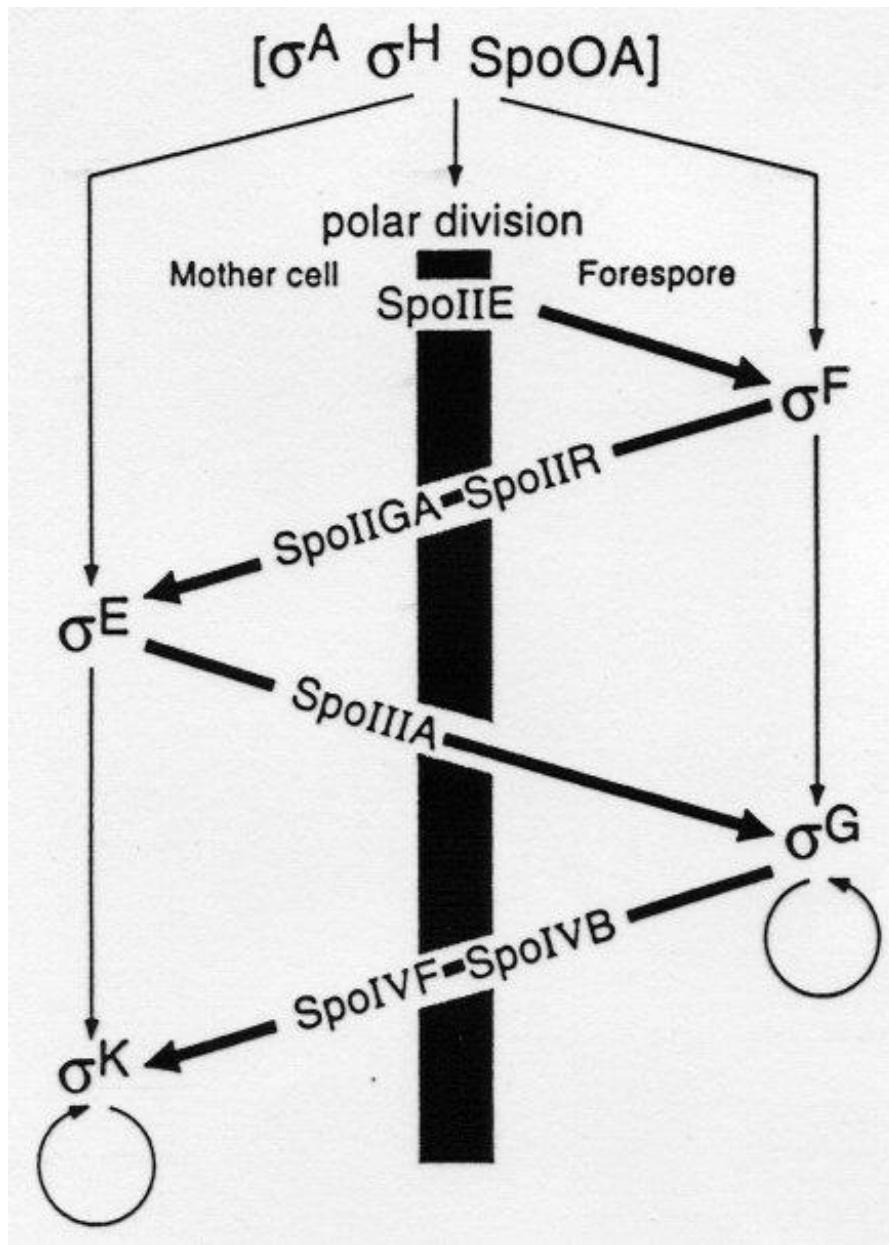
# $\sigma^G$ nella prespora



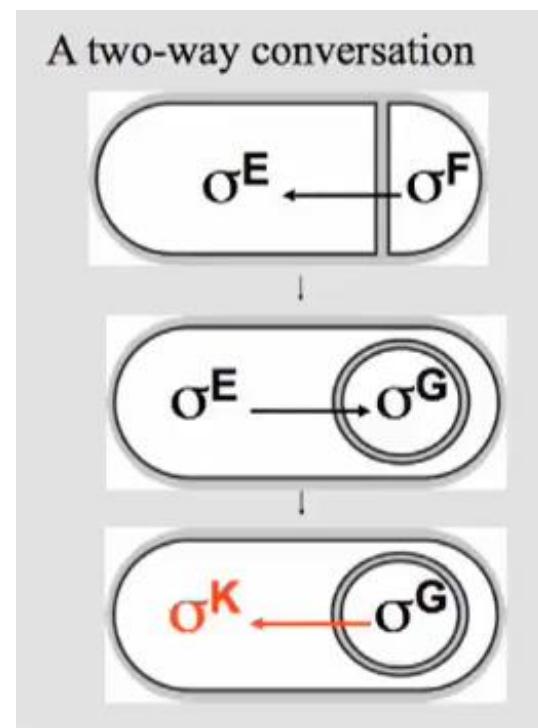
Il fattore  $\sigma^G$  viene codificato nella prespora su controllo di una Rna Polimerasi contenente  $\sigma^F$  in seguito a segnali provenienti dalla cellula madre.

Il fattore  $\sigma^G$  rimane inattivo fino alla fase di ingolfamento della spora.

Il fattore spoIIAB (anti sigmaF) è in grado di legare anche  $\sigma^G$  e di mantenerlo nello stato inattivo fino al completamento dell'ingolfamento della spora da parte della membrana della cellula madre.



Sincronizzazione tra  
l'espressione dei geni nella  
spora e nella cellula madre



Il fattore  $\sigma^E$ , per la cellula madre, ed il fattore  $\sigma^F$ , per la prespora, sono i fattori responsabili dell'espressione dei geni della fase IV della sporulazione. In questa fase il setto è completato !!!

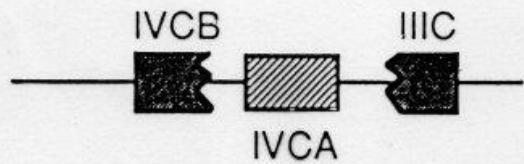
Il fattore  $\sigma^E$   
permette anche la  
trascrizione del  
fattore  $\sigma^K$  per la  
cellula madre

Il fattore  $\sigma^F$  permette  
anche la trascrizione  
del fattore  $\sigma^G$  per la  
prespora

Anche in questo caso, però, perché sia funzionale il fattore  $\sigma^G$  è necessario che si sia espresso il fattore  $\sigma^E$ . ed ancora perché si esprimi il fattore  $\sigma^K$  è necessario che si sia espresso il fattore  $\sigma^G$

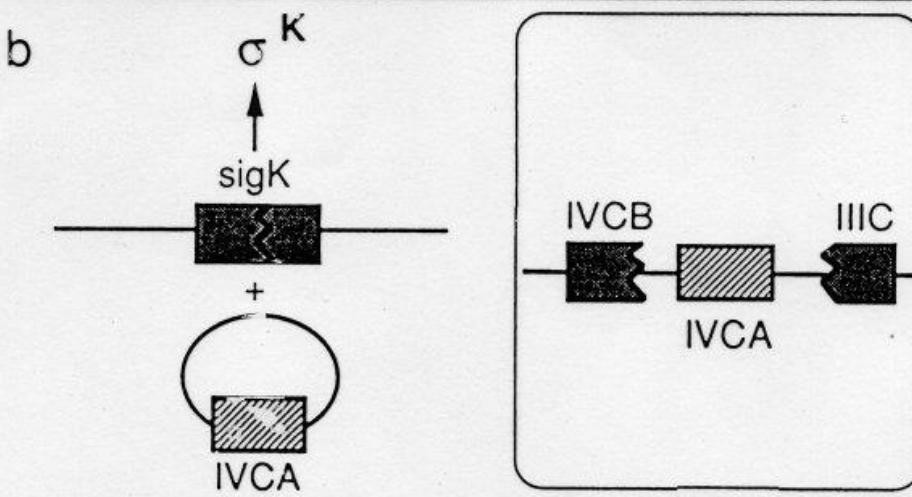
## Sintesi di $\sigma K$

a



Vegetative cell

b

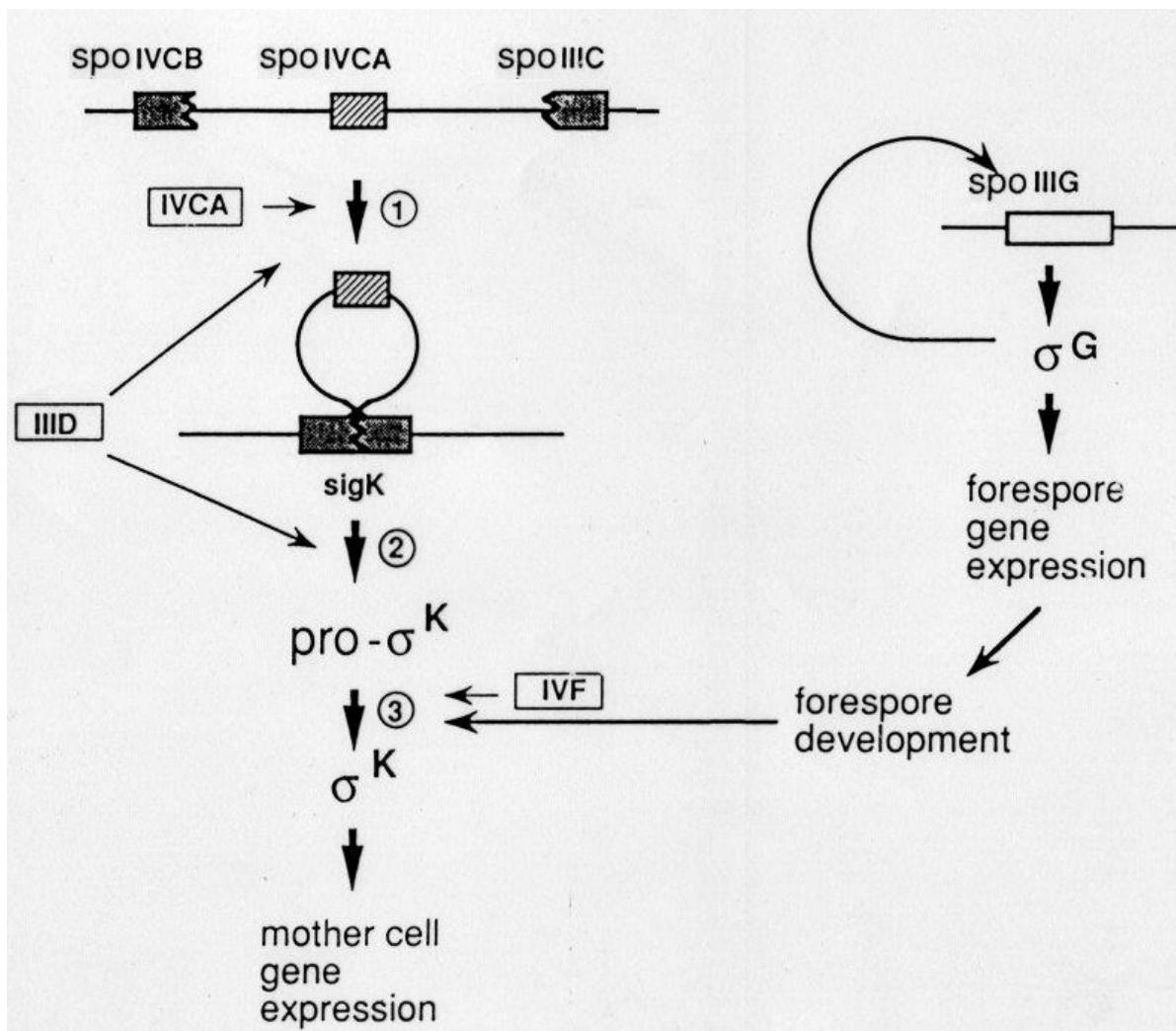


Mother cell

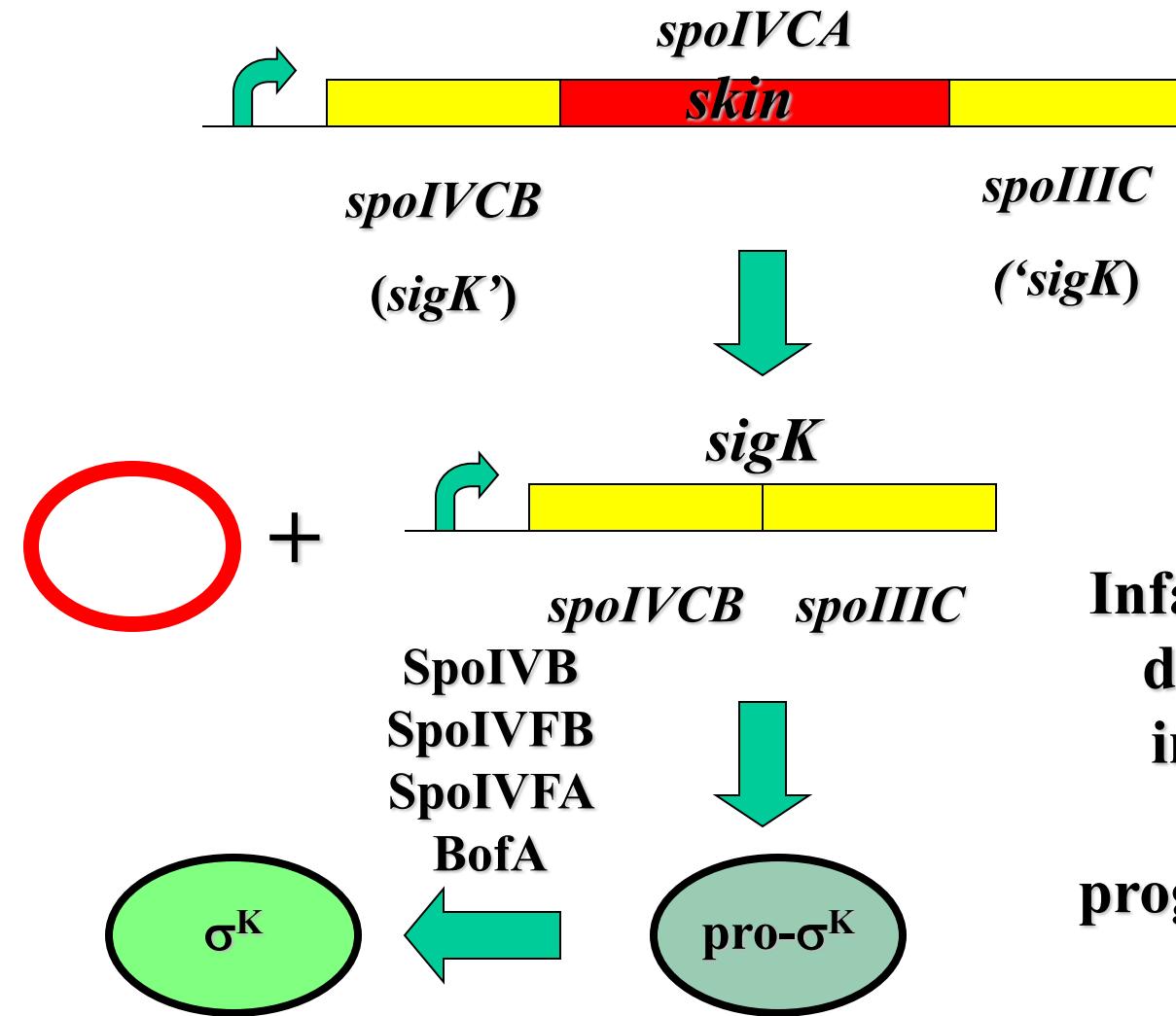
Forespore

le regioni genetiche che codificano per il fattore  $\sigma K$  sono localizzate su due emigeni localizzati a distanza di circa 48 kb

L'elemento di 48 kb che separa i due emigeni definito Skin codifica per la recombinasi spoIVCA ed potrebbe essere un residuo di un fagi in quanto contiene infatti alcune ORF che codificano per proteine simili a proteine fagiche (un repressore tipo Cro, uno per l'immunità fagica)



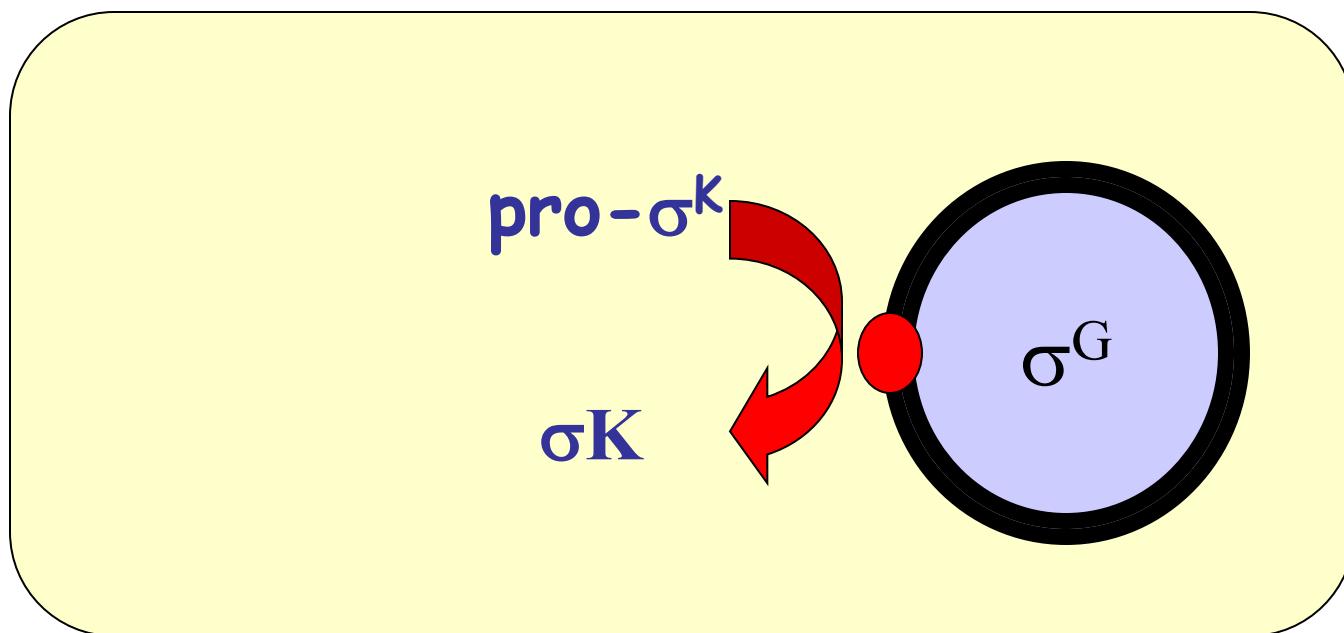
# Regolazione del fattore $\sigma^K$



**Questo processo è irreversibile e non avviene nella prespora**

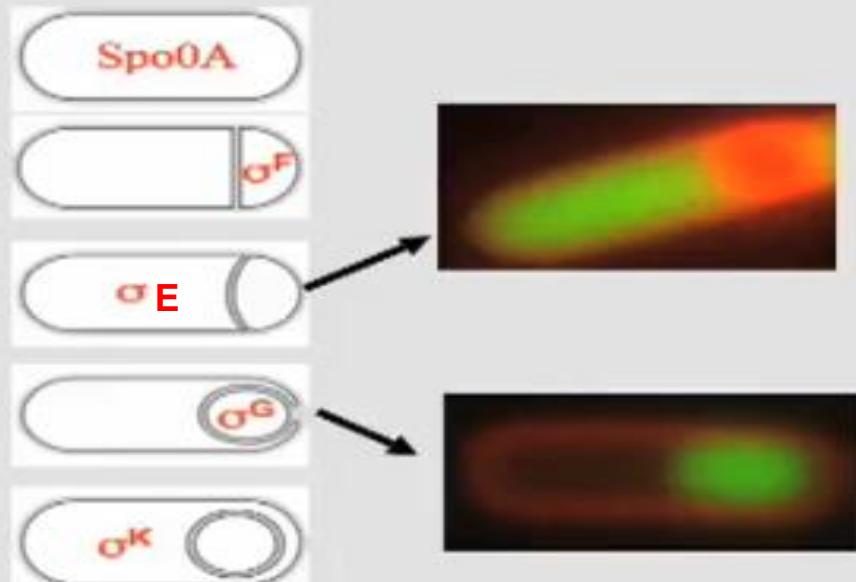
**Infatti con la germinazione della spora si mantiene intatta la possibilità di eseguire un nuovo programma di sporulazione**

Maturazione del fattore  $\sigma^K$  nella cellula madre ad opera di una proteasi localizzata nel cortex della prespora e prodotta sotto controllo di  $\sigma^G$  nella presopora



# Compartimentalizzazione dell'espressione genica

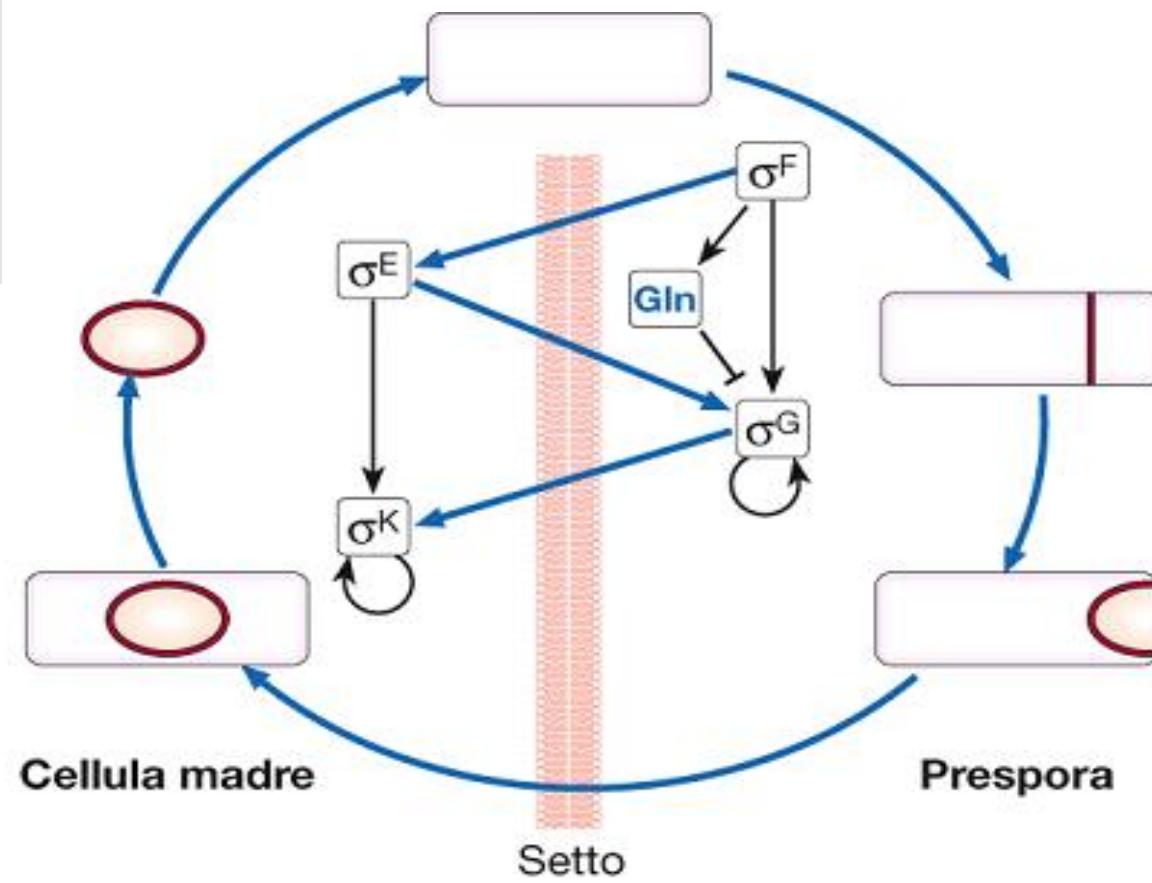
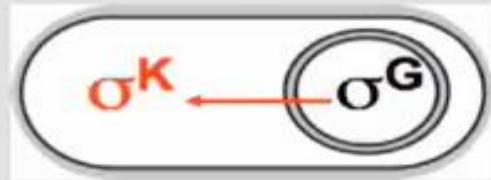
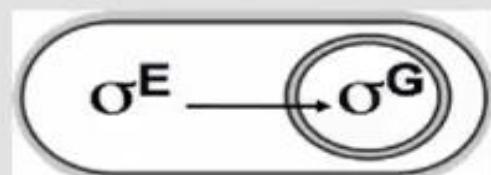
Sporulation transcription factors  
are cell-specific.



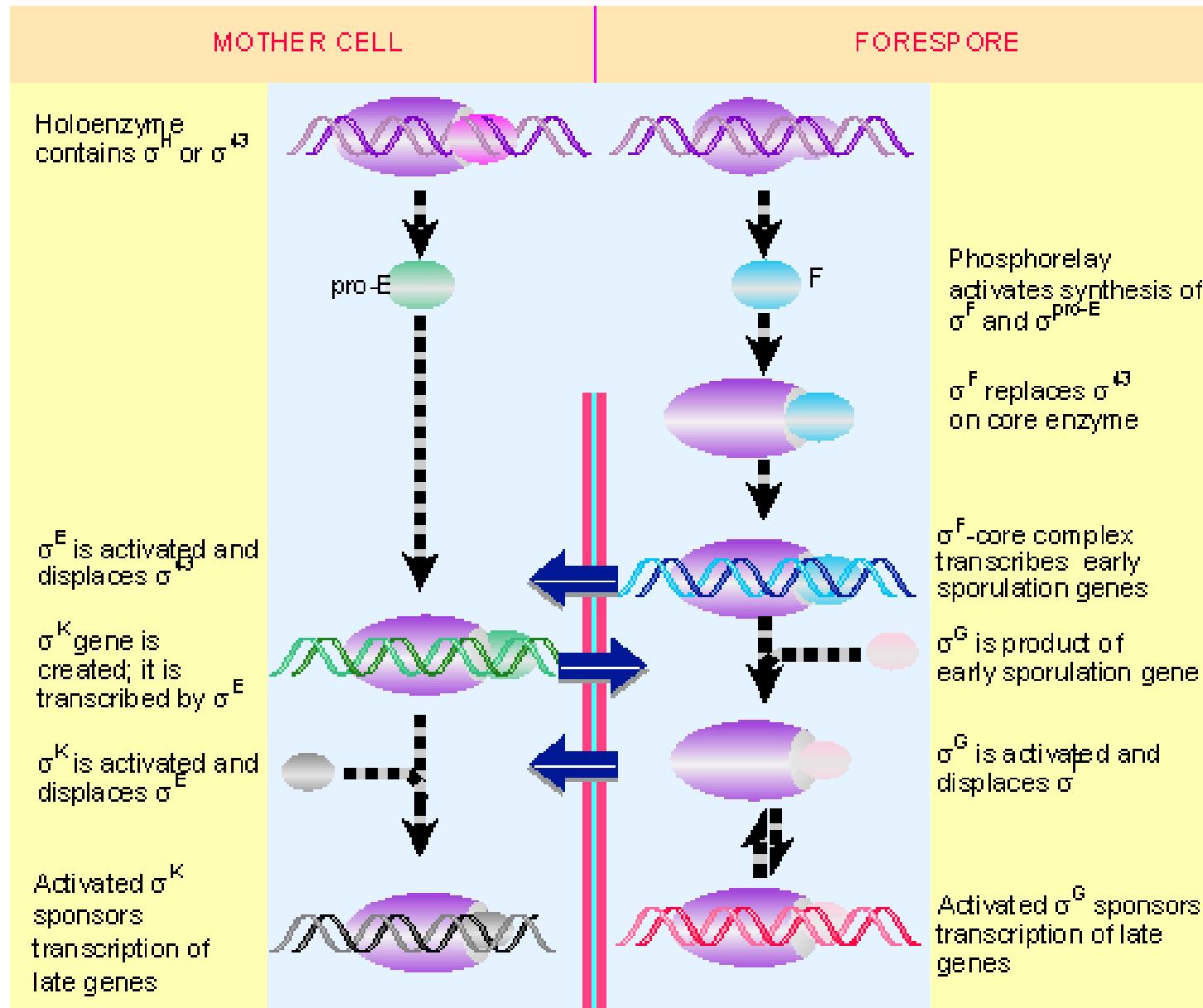
GFP fusa con geni  $\sigma^E$  controllati: l'espressione dei geni  $\sigma^E$  avviene solo nella cellula madre

GFP fusa con geni  $\sigma^G$  controllati: l'espressione dei geni  $\sigma^G$  avviene solo nella prespora

### A two-way conversation

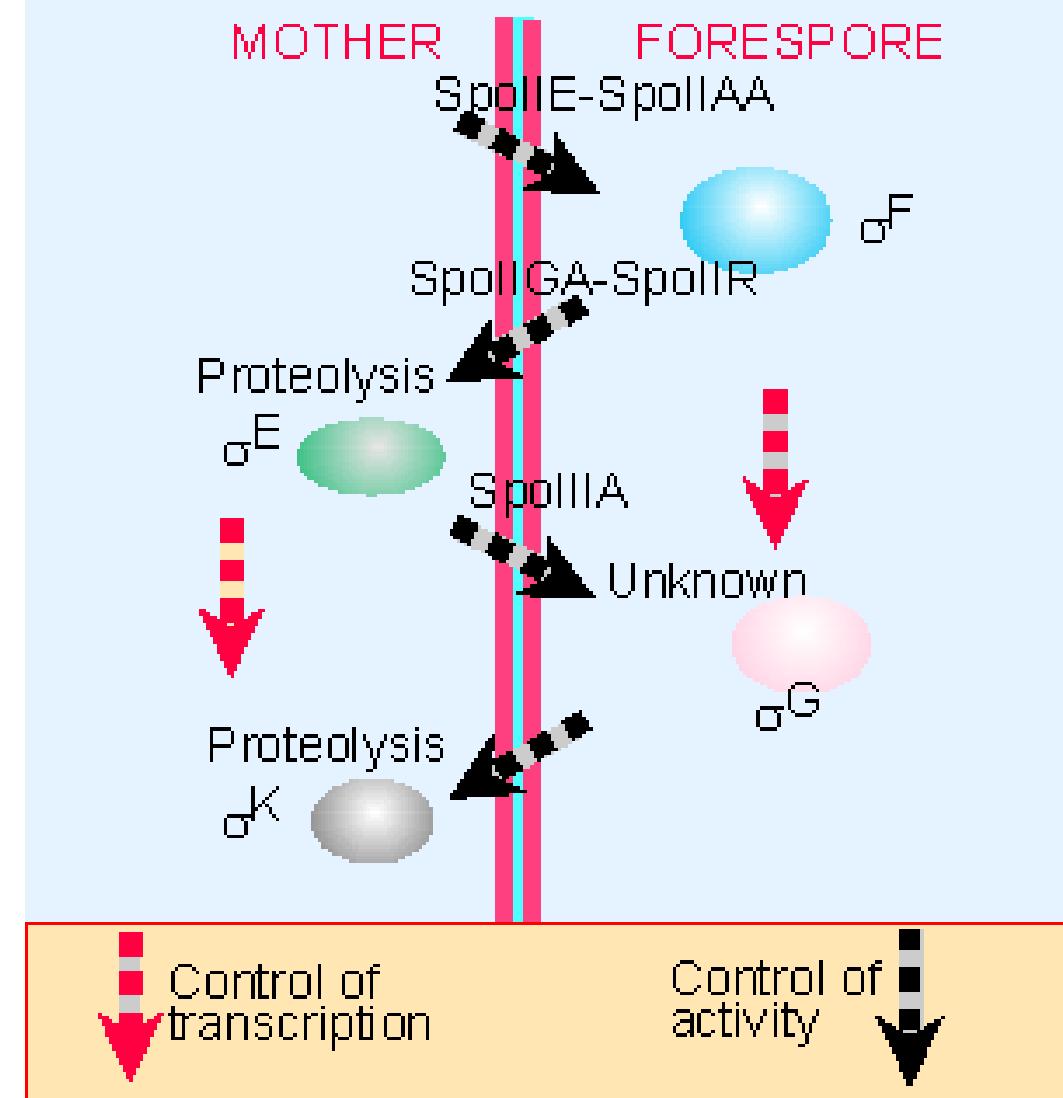


# Regolazione della trascrizione nella cellula madre e nella prespora



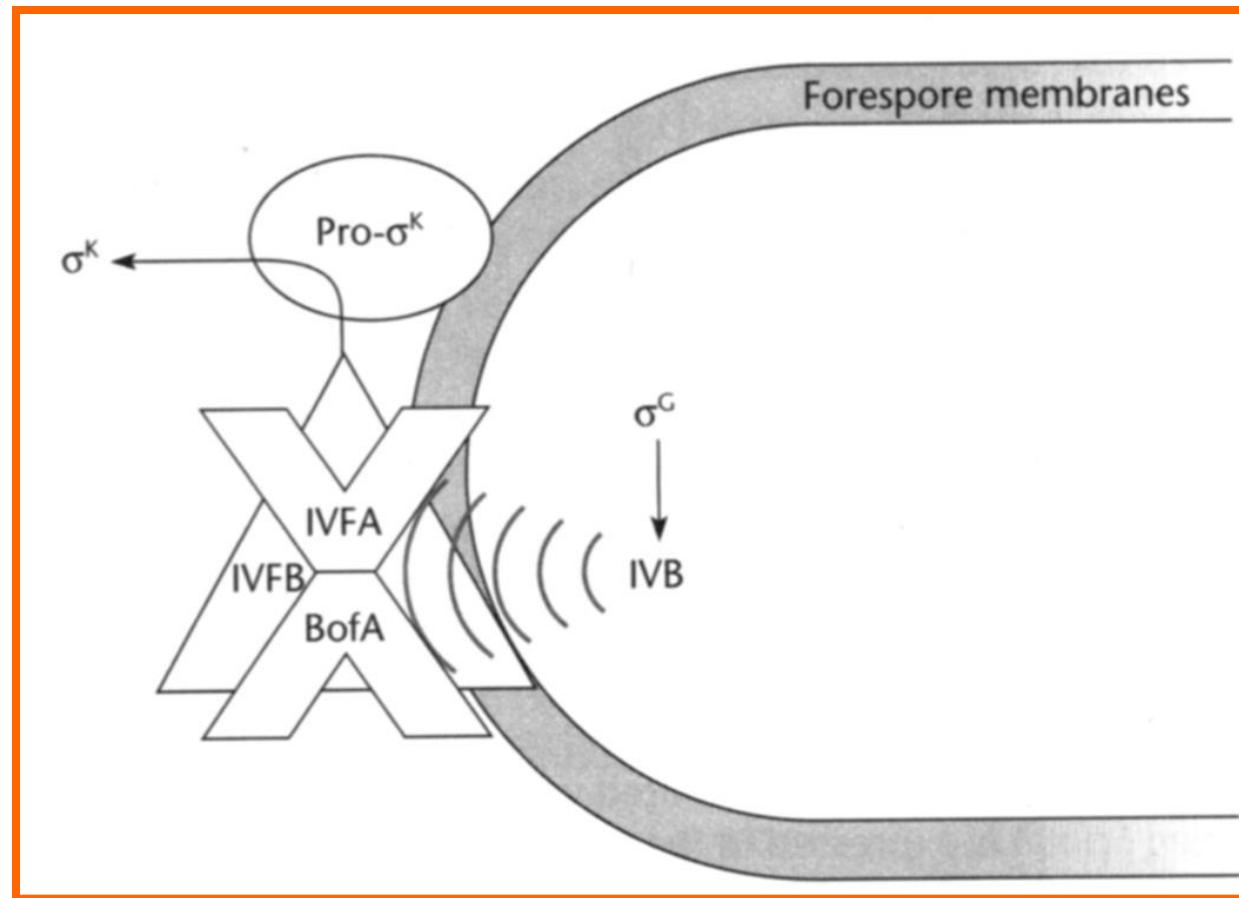
# CRISS-CROSS MODEL: il modello a incrocio

Controllo avviene sia a livello della trascrizione all'interno dello stesso comparto (prespora o cellula madre) sia a livello dell'attività tra comparti diversi.



Importante distinguere tra  
controllo a livello di trascrizione  
e a livello di attività ( controllo  
post trascrizionale)

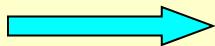
# MATURAZIONE DI PRO- $\sigma^K$ $\sigma^G$ -DIPENDENTE



# Espressione differenziale dei geni per l'involucro della spora (cot) e per le proteine ssp nella cellula madre e nella prespora

$\sigma^K$

**cot** **ssp**



Cellula madre

$\sigma^G$

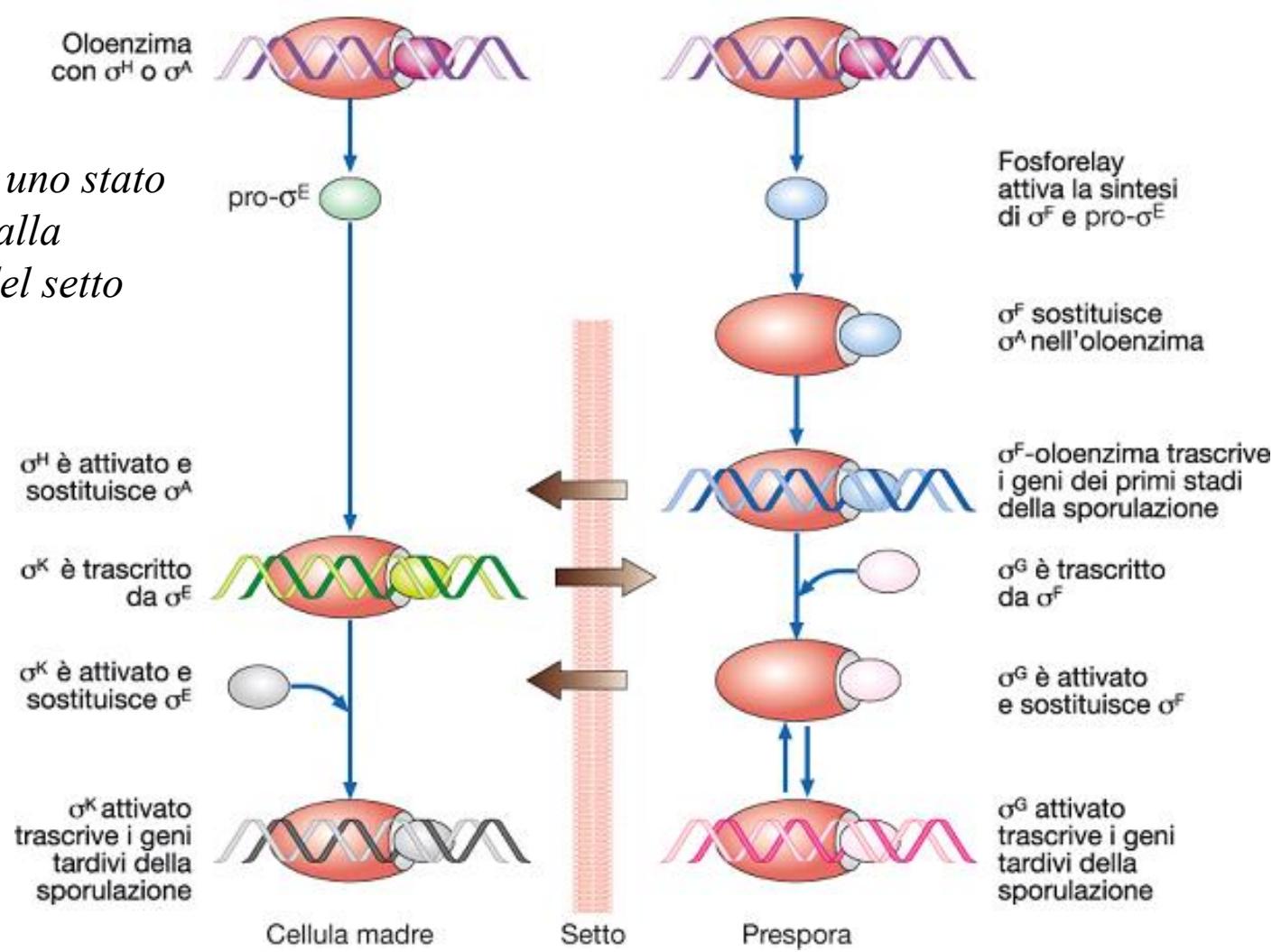
**cot** **ssp**



Prespora

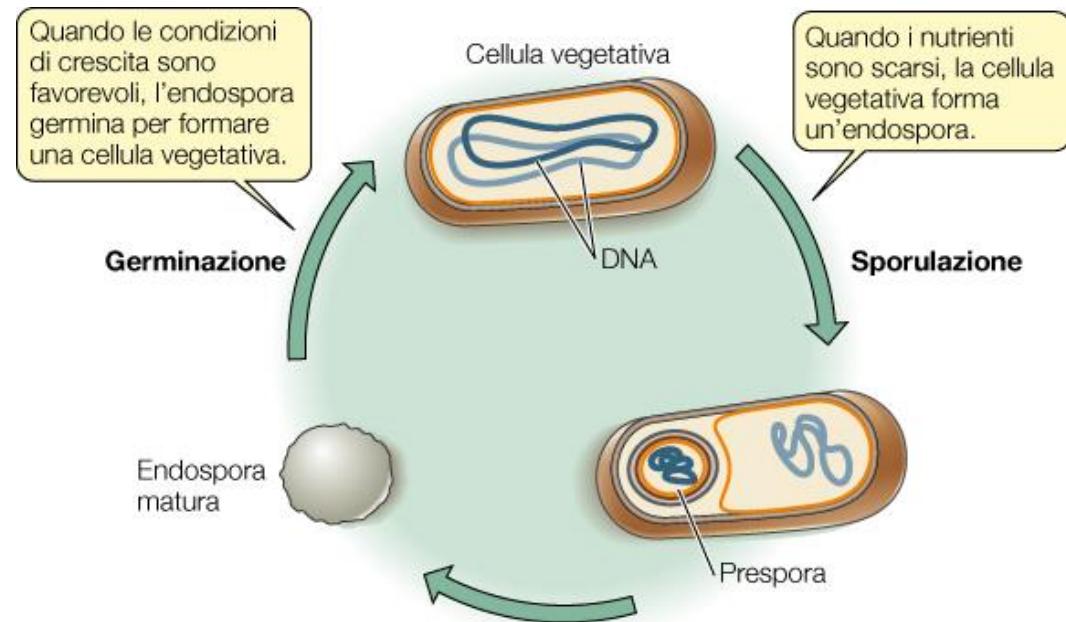
$\sigma^F$  e  $\sigma^E$  la loro attivazione è temporalmente sequenziale e spazialmente compartimentalizzata.

Mantenuti in uno stato inattivo fino alla formazione del setto



Un'endospora può rimanere in uno stato inattivo (criptobiosi) per molti anni poi può essere riconvertita in cellula vegetativa

- attivazione
- germinazione
- esocrescita



## ATTIVAZIONE

- un **esospora** non riesce a germinare anche se si trova in un ambiente ricco di nutrienti se prima non è stata attivata
  - è innescata da vari fattori tra i quali il riscaldamento a T subletale

## GERMINAZIONE

implica

- la perdita di rifrangenza
- la perdita della resistenza al calore
- la perdita di resistenza sostanze chimiche
- perdita di dipicolinato di calcio e dei componenti della corteccia
- aumento dell'attività metabolica
- le SASP vengono degradate ed utilizzate come fonte di carbonio e di energia per la nuova cellula

## ESOCRESCITA

- visibile rigonfiamento dovuto all'assorbimento di acqua e alla sintesi di nuovo RNA, proteine e DNA
- il protoplasto sintetizza nuovi componenti ed emerge dai resti del rivestimento della spora.



I batteri che formano endospore si ritrovano principalmente

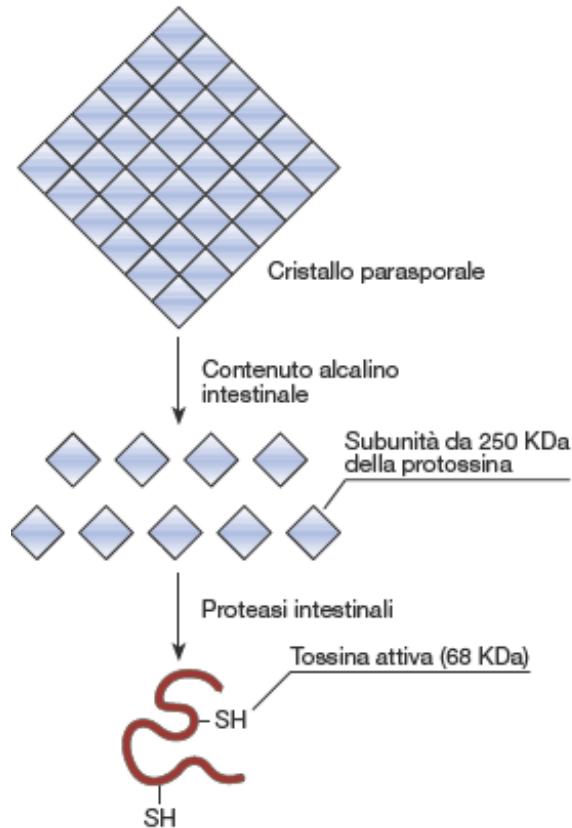
- nei suoli
- nei sedimenti acquatici
- nei fanghi

Un 'insetticida biologico

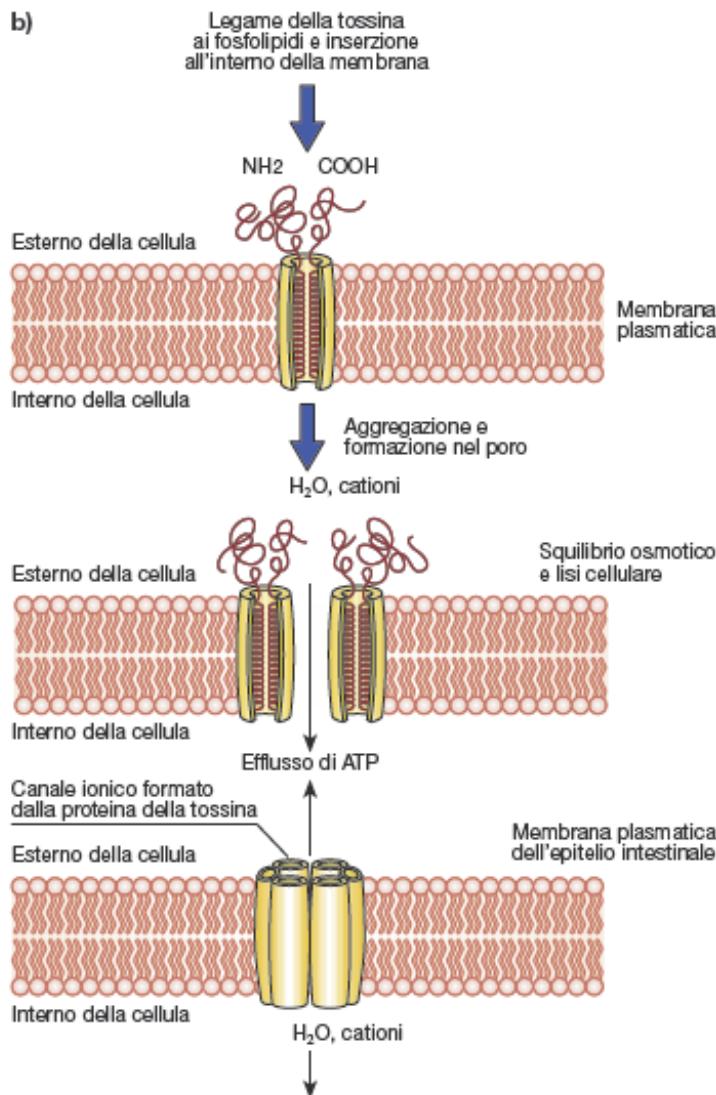
*Bacillus thuringiensis* produce durante la sporulazione una grande quantità di una proteina Bt in forma cristallina definita corpo parasporale.

Sia le cellule vegetative che le spore si localizzano sulle foglie delle piante e sono ingerite da insetti.

Questi insetti (falene e farfalle -Lepidoptera) hanno un sistema digerente alcalino che riesce a dissolvere la proteina che svolge un ruolo di neurotossina provocando paralisi e morte nei bruchi



Durante la sporulazione in *Bacillus thuringiensis* si producono accanto alla spora dei cristalli parasporali che contengono la protossina inattiva. Il pH alcalino dei succhi intestinali della larva permette la dissoluzione dei cristalli di protossina: successivamente proteasi intestinali determinano la formazione della tossina attiva costituita da un frammento N-terminale.



La tossina matura si lega a specifici recettori sulla membrana delle cellule epiteliali dell'intestino intestinale delle larve e si inserisce snella membrana creando dei pori che alterano la permeabilità della membrana portando a morte le larve per eccessivo afflusso di acqua.

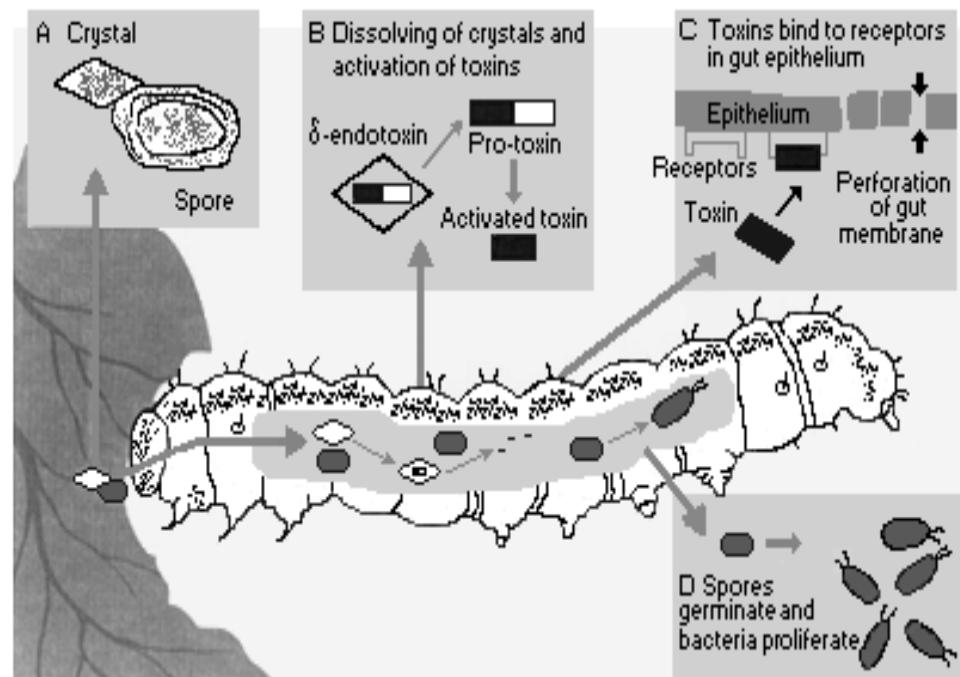
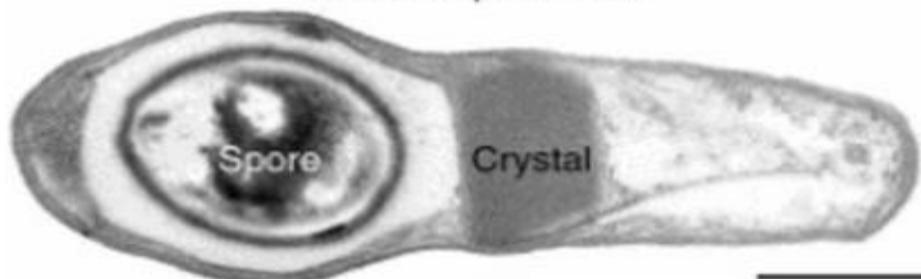


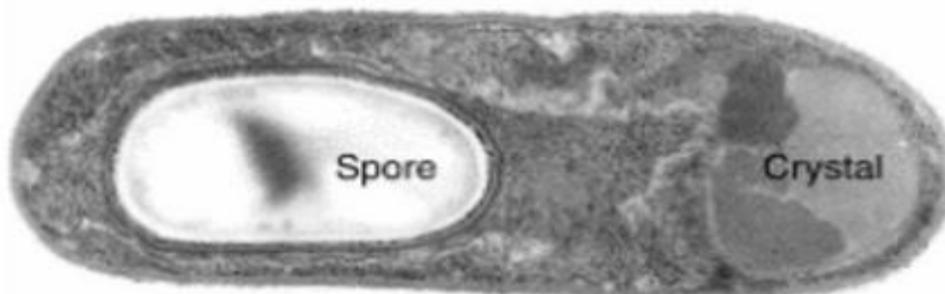
Fig. 1. Mechanism of toxicity of Bt

*Bacillus sphaericus*

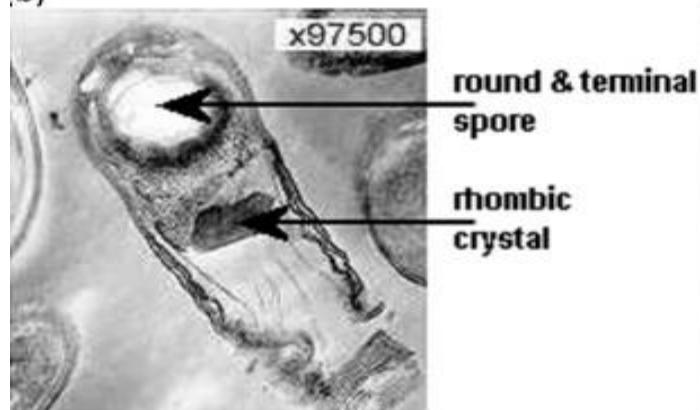


[a)

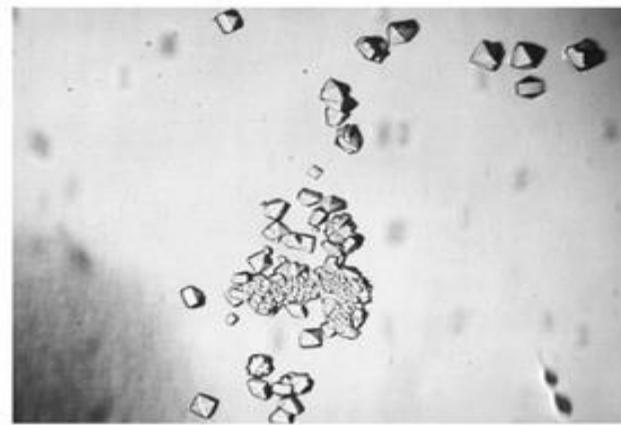
*Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*



[b)



[c)



(d)