

La possibilità di mutazioni spontanee impone una continua correzione di bozze nel corso della replicazione

PolIII deve avere alle spalle una coppia di nucleotidi appaiati correttamente (necessità dell'innesco!)



In caso contrario si ferma

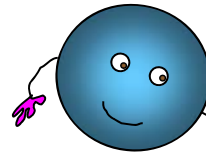
Torna indietro

Elimina la base sbagliata e la sostituisce

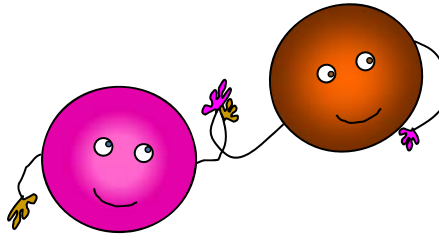
Poi riprende la sintesi del nuovo filamento

Anche il sistema MMR serve a correggere gli errori

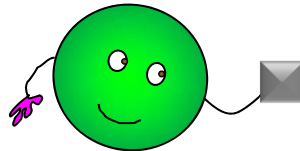
Riconoscimento
(MutS)



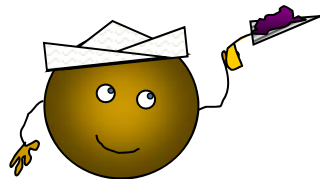
Escissione
(MutL MutH)



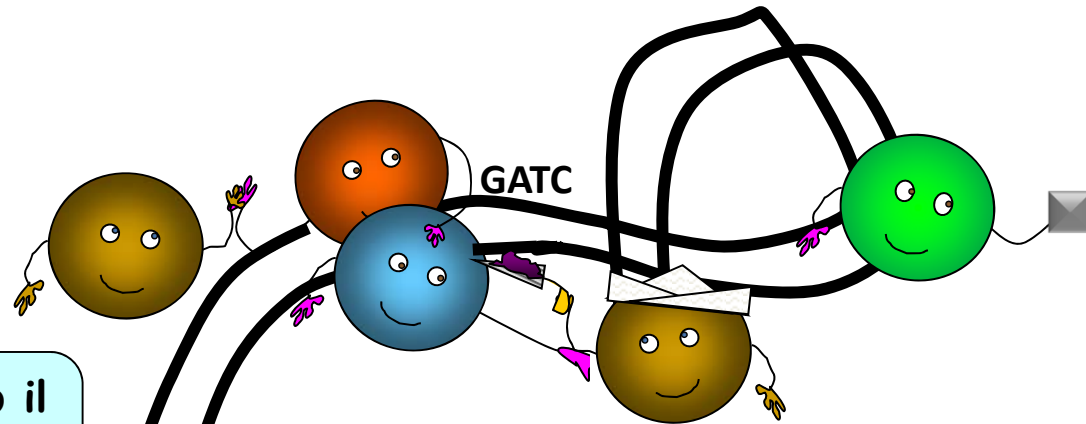
Sintesi di
riparazione
(PolIII)



consolidamento
(DNA ligasi)



Come scegliere quale è la base da sostituire all'interno della coppia?



Il DNA passa attraverso il complesso MutS-L finchè non arriva un GATC

MutL riconosce il filamento parentale (metilato)

MutH taglia il filamento nuovo su GATC

L'elicasi svolge il DNA dal taglio

Una esonucleasi distrugge il filamento fino alla base errata

PolIII sintetizza nuovamente il filamento nuovo

La DNA ligasi salda le estremità

La scansione temporale tra l'inizio di una replicazione è regolata attraverso tre parametri

```
graph TD; A[La scansione temporale tra l'inizio di una replicazione è regolata attraverso tre parametri] --> B[Rapporto ATP/ADP]; A --> C[Rapporto DnaA/cassette]; A --> D[Stato di emimetilazione di OriC];
```

Rapporto
ATP/ADP

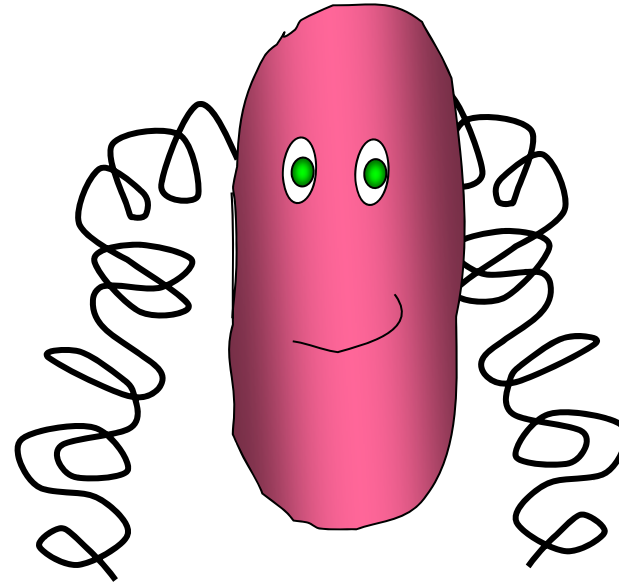
Rapporto
DnaA/cassette

Stato di
emimetilazione di
OriC

Rapporto
ATP/ADP

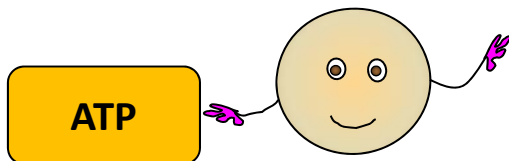
la presenza di ATP è segno
che la cellula ha raggiunto le
dimensioni per dividersi

La quantità di DNA è abbondante:
è tempo di dividersi

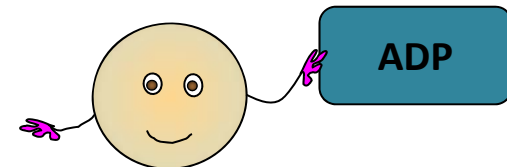
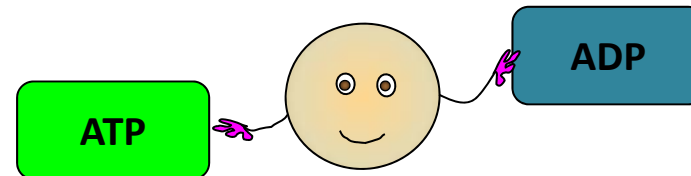


DnaA ha la stessa affinità per
ATP o ADP

Ma solo DnaA-ATP può iniziare la
duplicazione del cromosoma



DUPLICAZIONE SI'



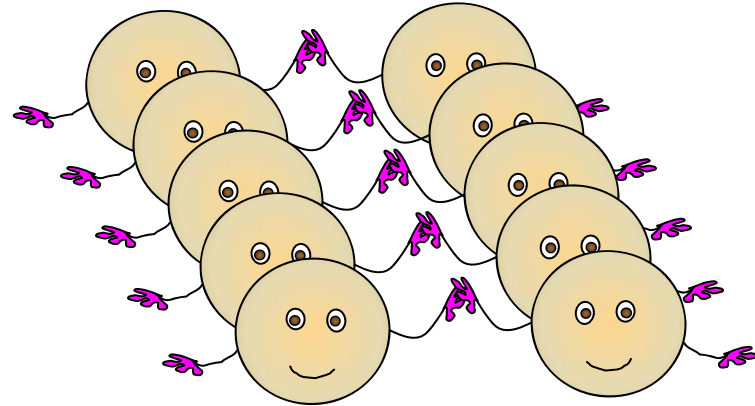
DUPLICAZIONE NO

Per ogni replicazione che ha inizio
sono necessari 5 dimeri di DnaA

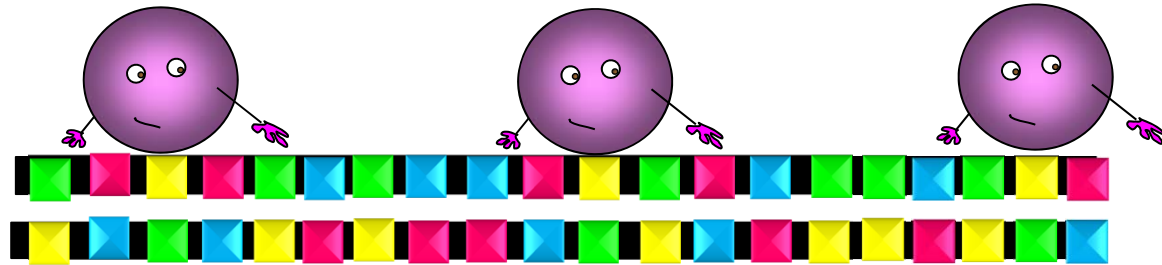
Il rapporto tra proteina e siti
bersaglio è importante

La sintesi di DnaA è
strettamente regolata

Dopo la divisione è necessario che i livelli di proteina
tornino a salire prima di un nuovo inizio



**Il filamento parentale è metilato
Quello neo formato non lo è ancora**



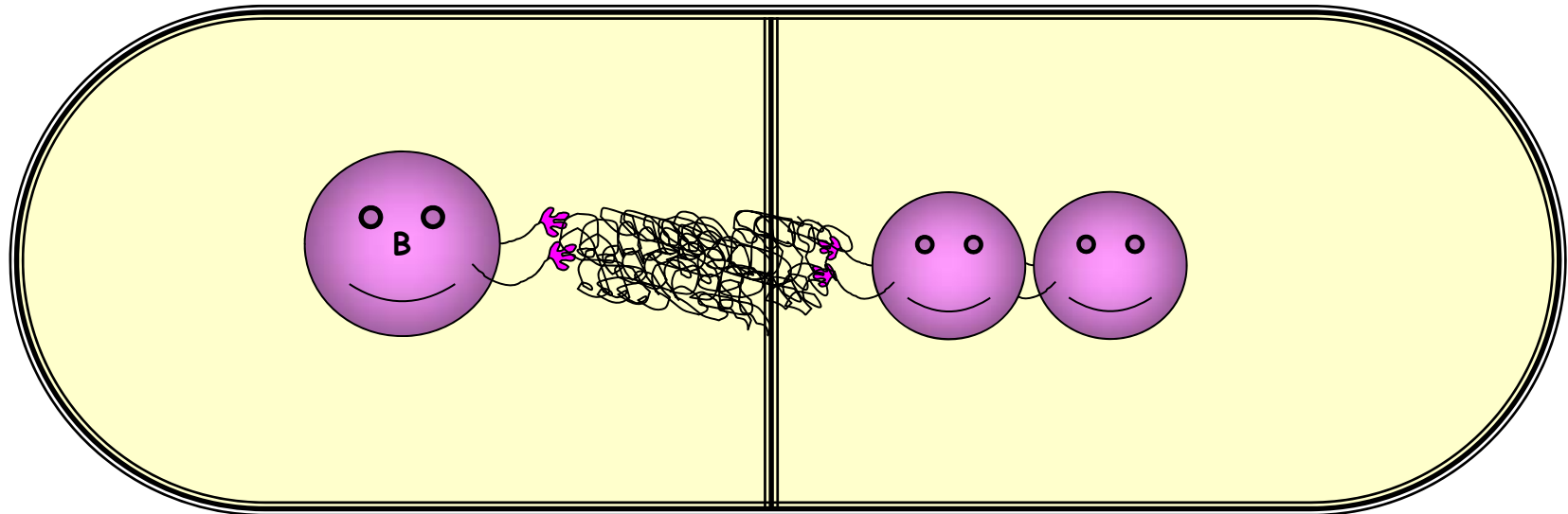
**SeqA si lega a oriC sul filamento parentale (metilato)
mascherando le cassette DnaA**

Finchè SeqA è legata non si verifica un nuovo inizio

DnaA, SeqA e Dam-metilasi competono per lo stesso sito bersaglio

DAM → METILAZIONE NUOVO FILAMENTO → SPIAZZAMENTO SeqA → LEGAME DnaA → NUOVO INIZIO

I nucleoidi si distribuiscono nelle cellule figlie: al processo di segregazione partecipa l'operon mukFEB

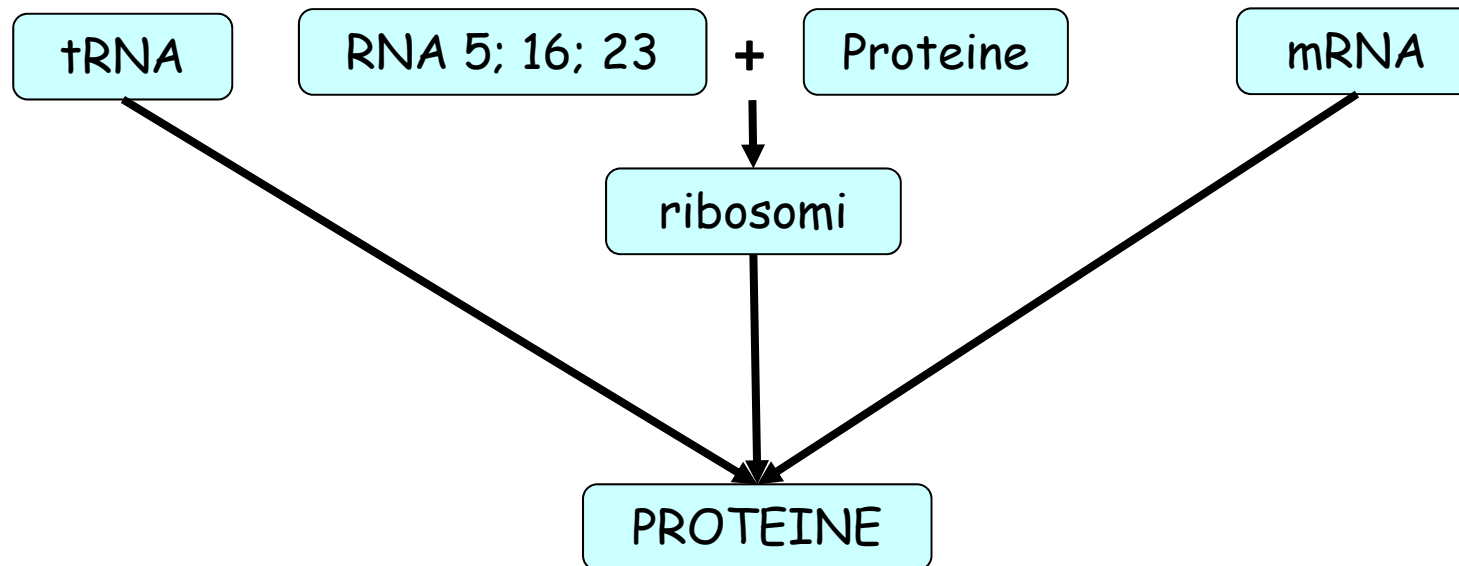


Ceppi mutanti che non esprimono mukB danno origine a cellule prive del nucleoide

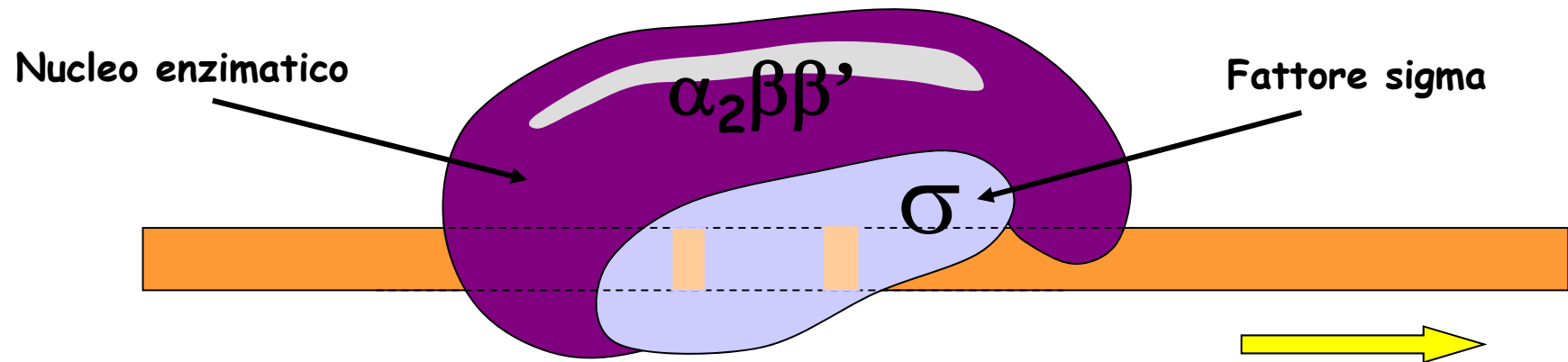
durante la replicazione l'informazione genetica è copiata (DNA→DNA) per essere perpetuata

Ma durante la vita della cellula l'informazione genetica è copiata per ottenere l' RNA e le proteine necessarie

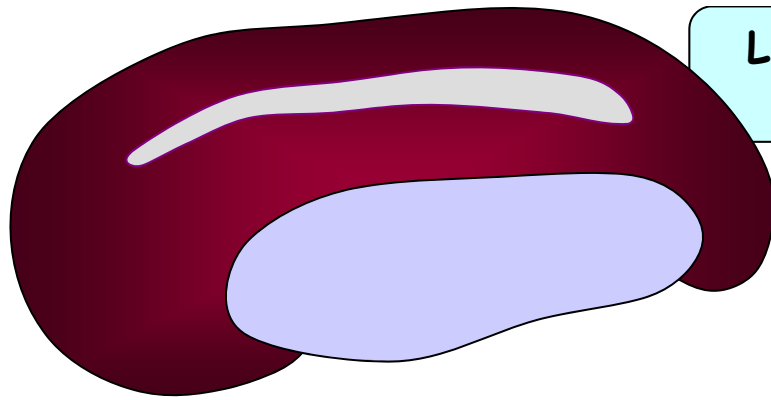
(DNA→RNA = trascrizione dei geni)



La RNA polimerasi batterica è un complesso proteico costituito da 5 subunità: $\alpha_2\beta\beta'\sigma$



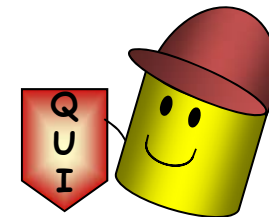
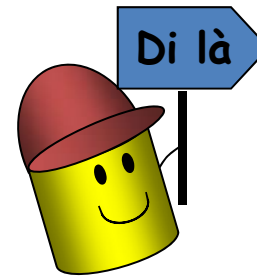
Il fattore sigma riconosce il promotore e viene rilasciato dopo che sono state trascritte le prime 5-6 basi



L'inizio del gene da copiare è indicato alla RNA polimerasi da una regione del promotore

La regione -10 indica l'inizio del gene da trascrivere

La regione -35 determina il senso della trascrizione

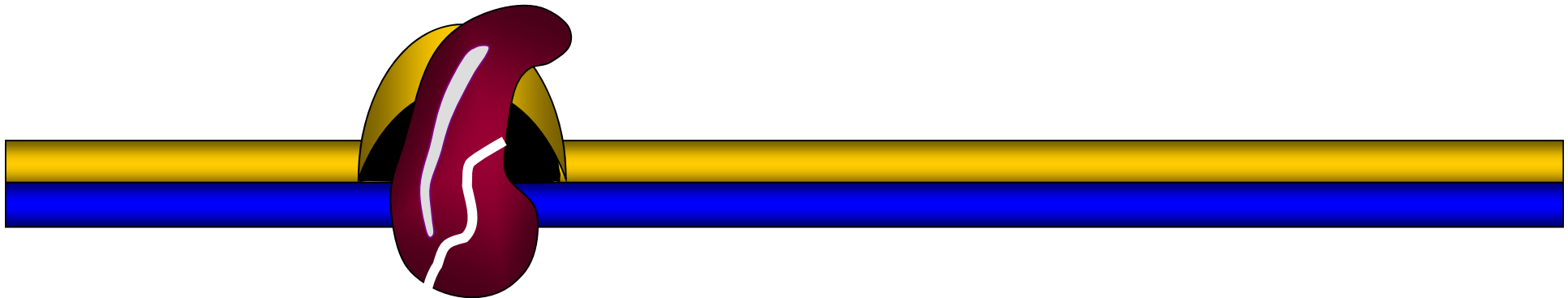


regione -35
 $T_{82} T_{84} G_{78} A_{65} C_{54} A_{45}$

regione -10
 $T_{80} A_{95} T_{45} A_{60} A_{50} T_{96}$

Il nucleo enzimatico sintetizza RNA sullo stampo di DNA

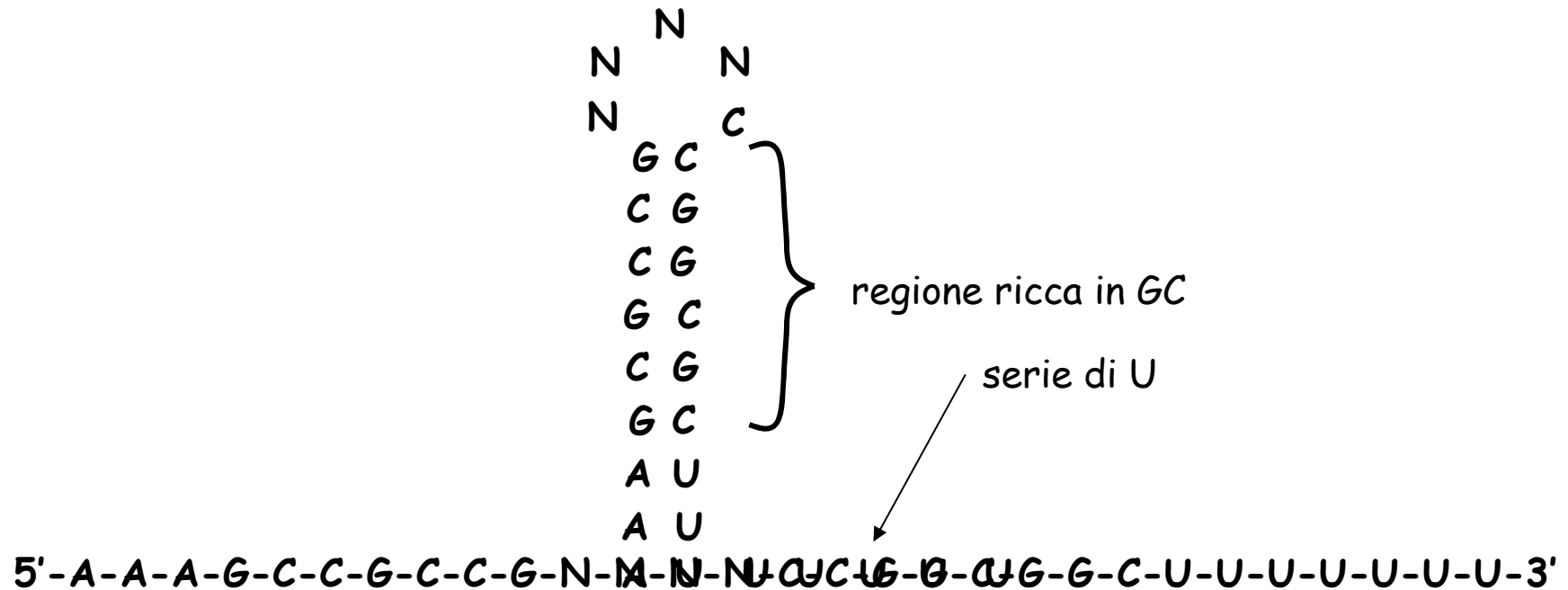
**Aprenodo la doppia elica, che si richiude
alle sue spalle e copiando lo stampo**



"TERMINAZIONE"

Rho-indipendente

la sequenza di terminazione causa
il distacco della polimerasi



Formando una forcina grazie all'appaiamento
delle sequenze invertite e ripetute

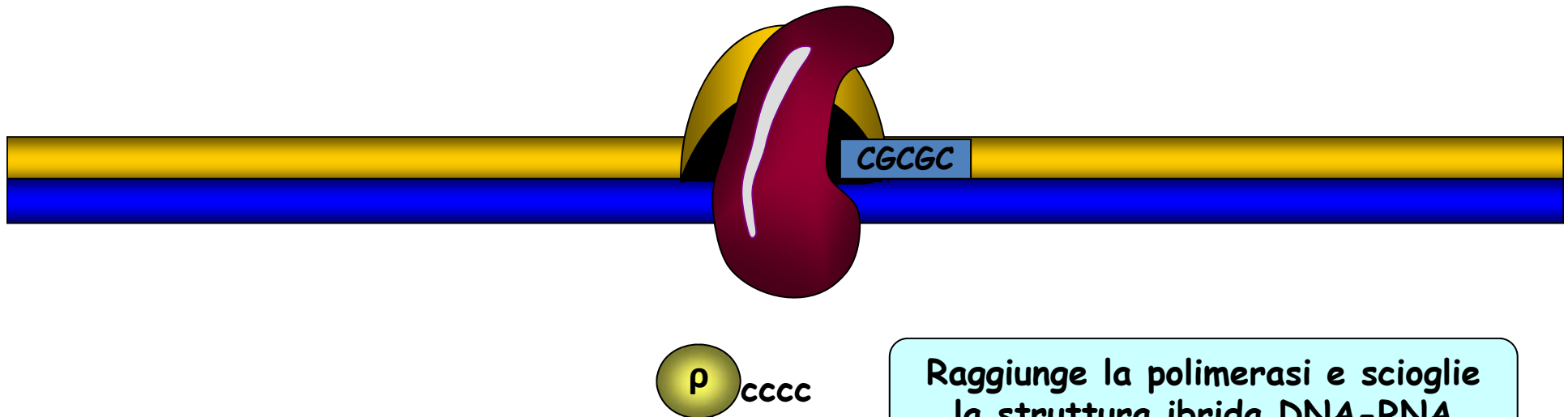
Rho-dipendente

la sequenza di terminazione arresta la polimerasi; Rho ne causa il distacco

la polimerasi è ferma in una regione ricca di GC

La proteina Rho riconosce una sequenza ricca di "C" nel trascritto

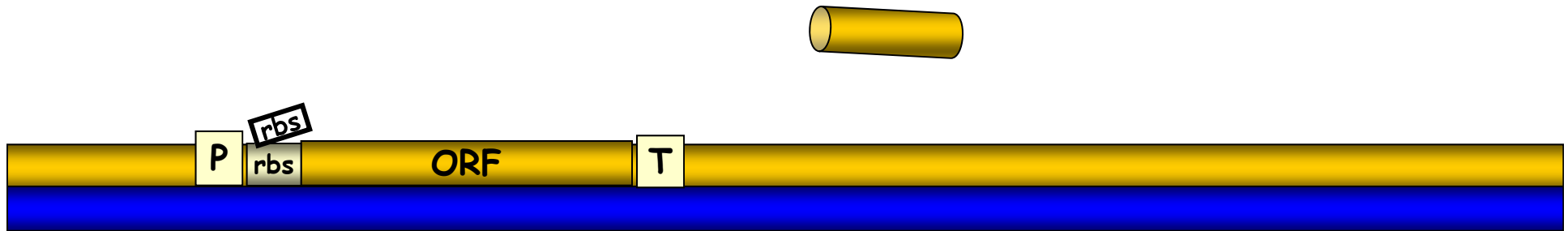
Vi si lega e avanza in direzione 5'→3'



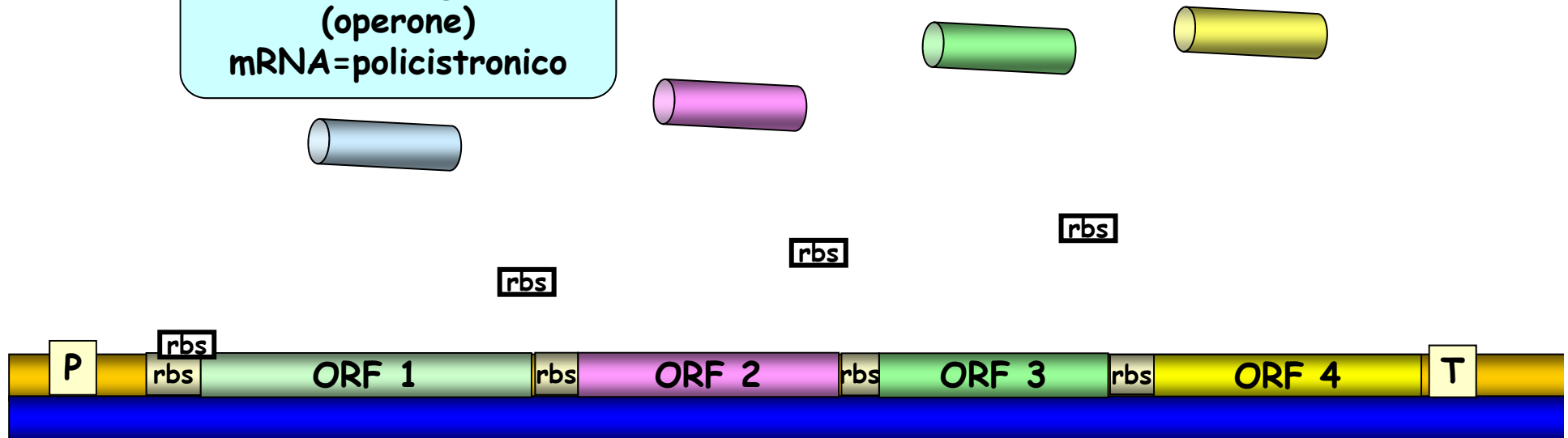
Raggiunge la polimerasi e scioglie la struttura ibrida DNA-RNA

Il tratto compreso tra un promotore e un terminatore è la "unità di trascrizione"

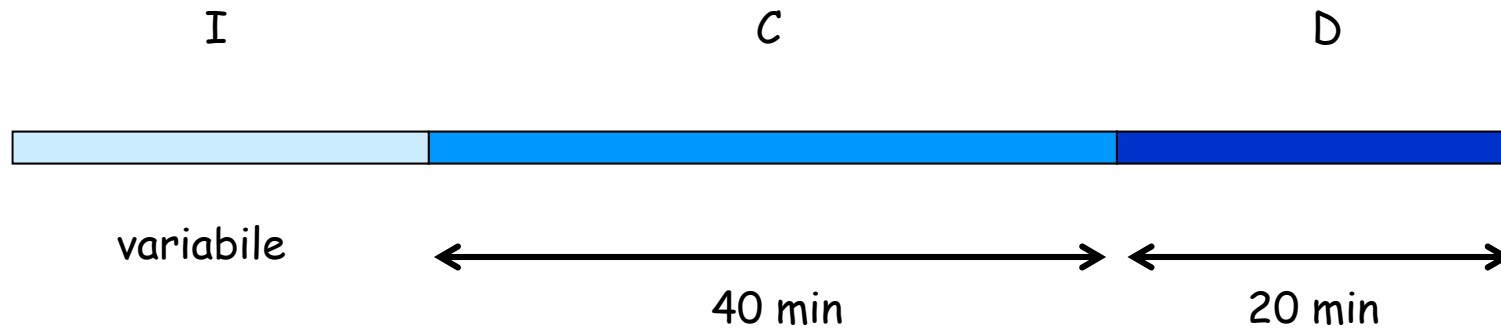
un solo gene
mRNA=monocistronico



Più di un gene
(operone)
mRNA=policistronico



Nel ciclo cellulare di *E. coli* si possono distinguere diversi momenti

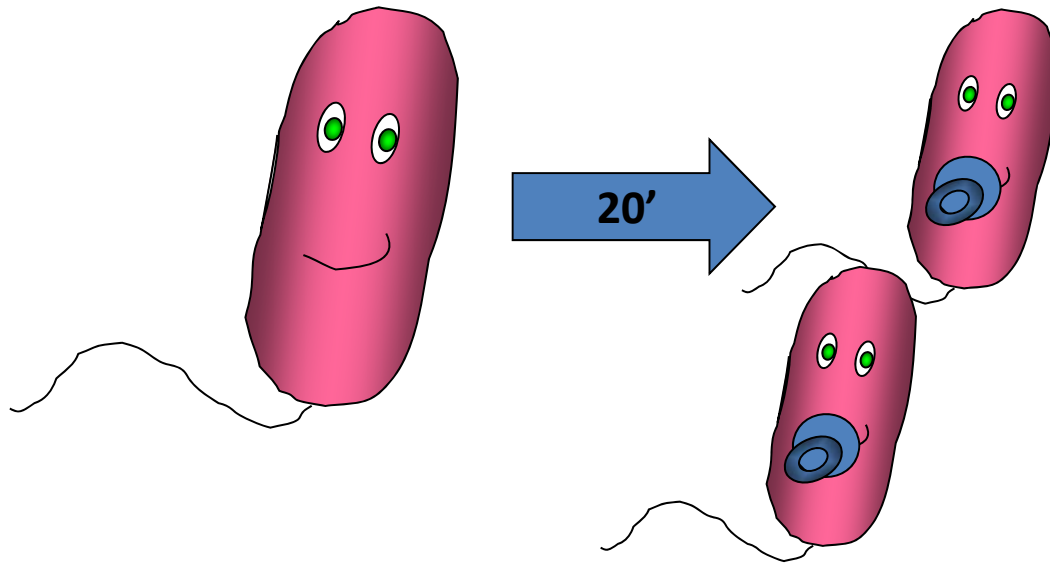


Fase I (interinizio) la cellula si prepara alla replicazione del DNA
Si osserva in cellule che si dividono lentamente ($T > 60'$);

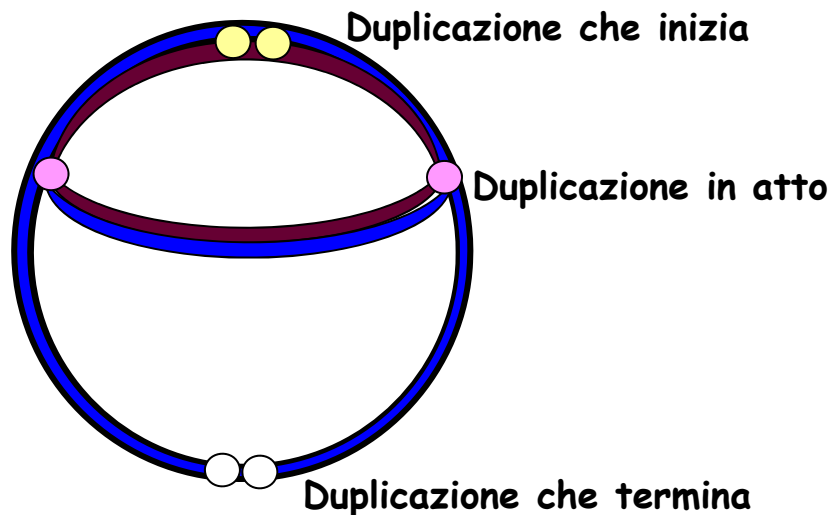
Fase C (copia) periodo necessario a replicare il DNA. Il limite è rappresentato dalla velocità di sintesi della DNA polimerasi

Fase D (divisione): tra il completamento della replicazione del cromosoma e la divisione delle cellule figlie

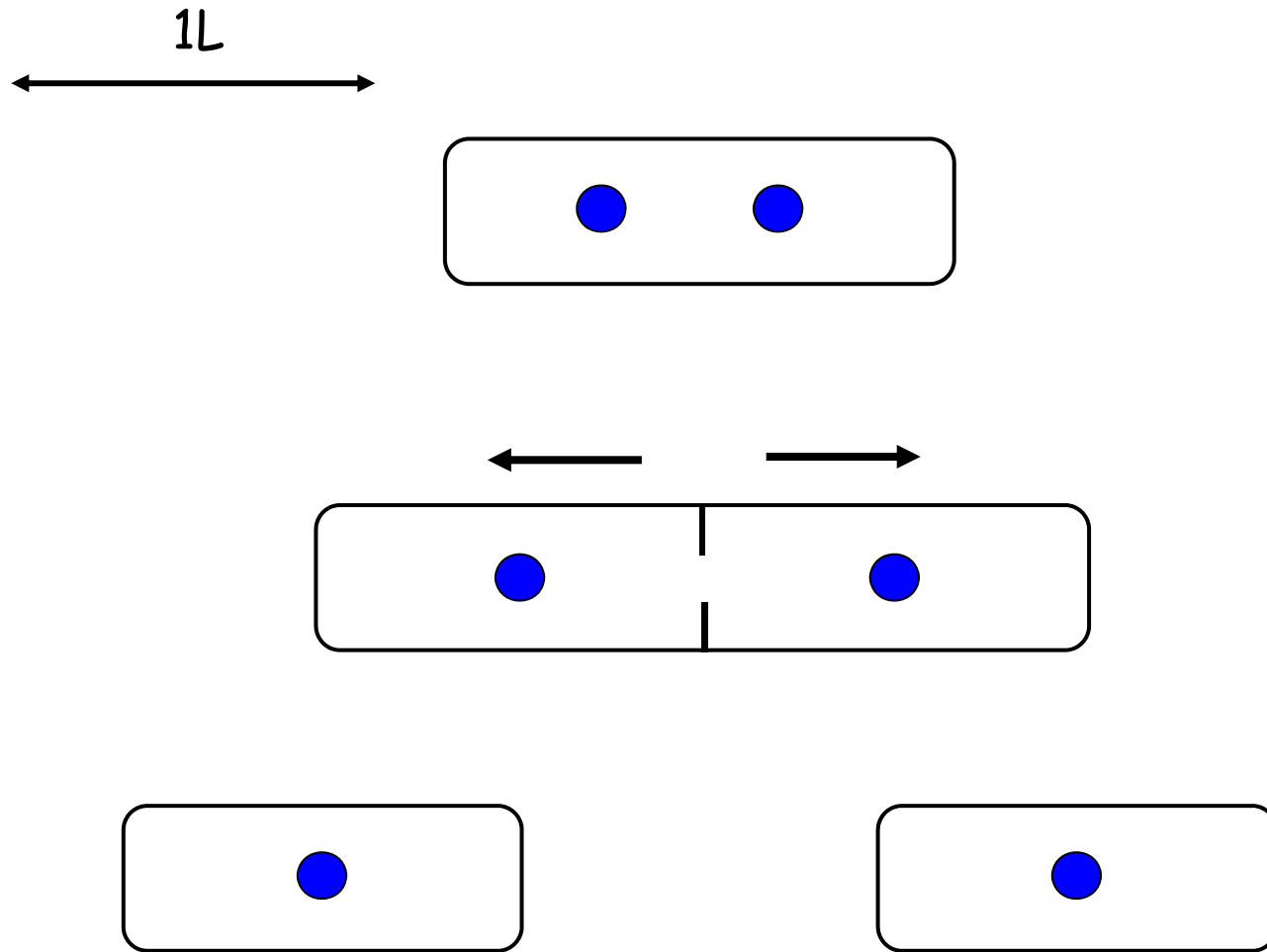
La velocità di divisione può essere inferiore ai 40 minuti necessari per la duplicazione del cromosoma



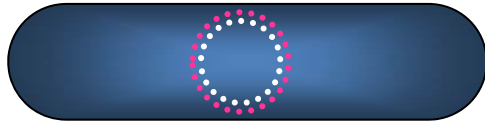
infatti diverse repliche si avviano in sequenza rapida, e il cromosoma che entra in una cellula figlia ha già intrapreso una nuova duplicazione



La divisione di una cellula comporta la formazione di un setto, che avviene quando la distanza tra il centro dei due nucleoidi è pari a una "lunghezza cellulare"



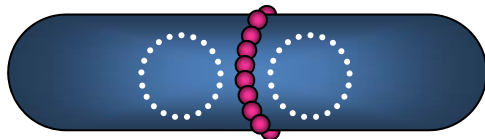
La forma della cellula batterica si mantiene durante la divisione



La cellula si allunga; il cromosoma si duplica, restando attaccato alla membrana

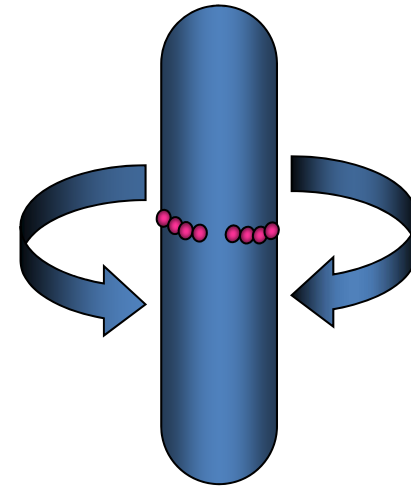
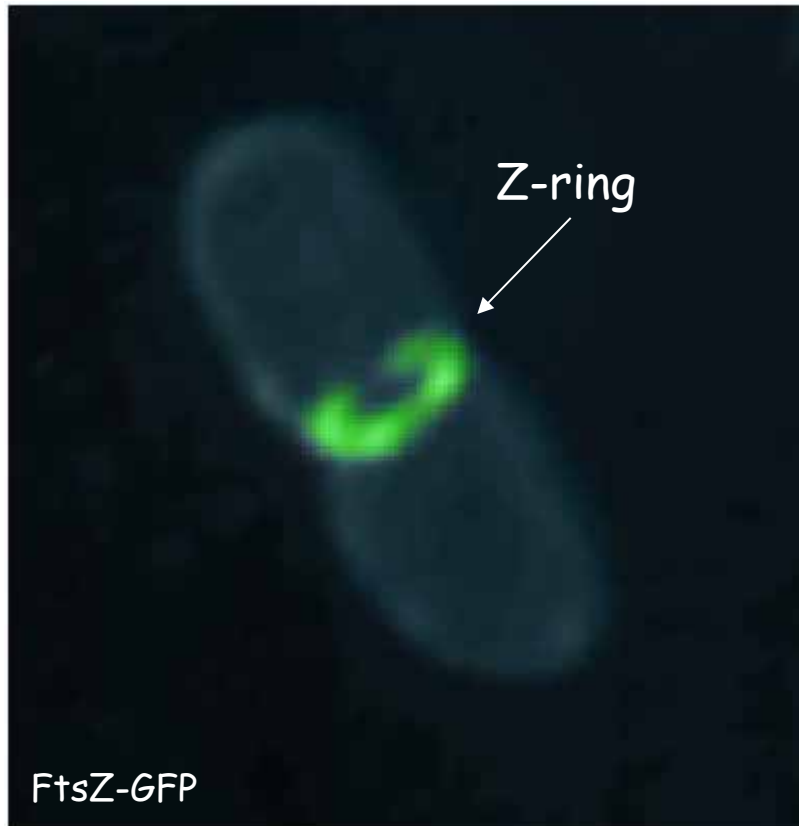


I nucleoidi si separano

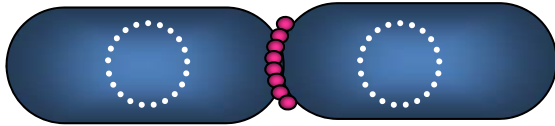


la proteina FtsZ forma un anello (Z-ring) nello spazio tra i nucleoidi, e recluta altre proteine che partecipano alla formazione del setto

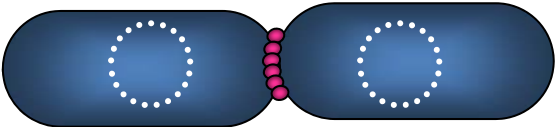
La formazione dello Z-ring è dovuta alla capacità della proteina FtsZ di polimerizzare



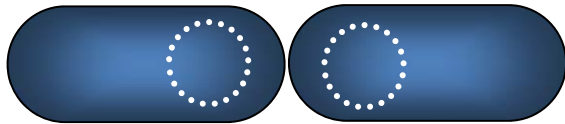
La sintesi parte da un "sito del setto" a livello della membrana citoplasmatica e prosegue nelle due direzioni, a formare l'anello



L'anello si stringe progressivamente



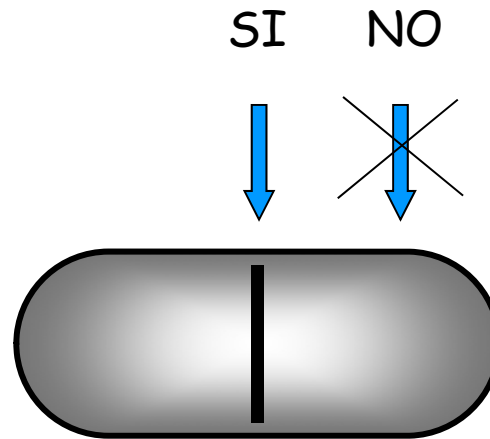
Forzando la membrana
citoplasmatica verso l'interno



il setto si completa, si formano due pareti
distinte e le cellule figlie si separano

la divisione avviene sempre e solo dopo la duplicazione del DNA
(un blocco nella sintesi del DNA non sarà seguito dalla divisione)

nei batteri bastoncellari il setto si localizza
esattamente al centro della cellula



Il corretto posizionamento del setto è dovuto a :

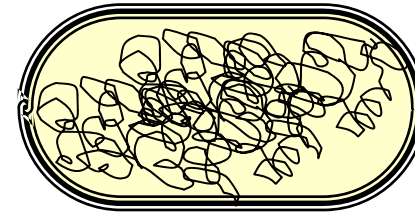
OCCLUSIONE
DEL NUCLEOIDE

SISTEMA Min

OCCLUSIONE DEL NUCLEOIDE

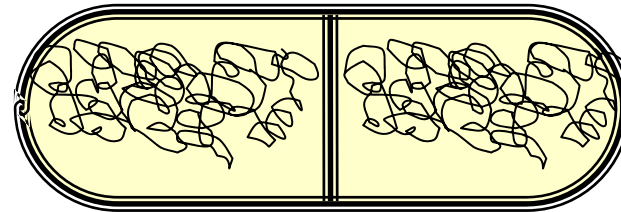
La presenza del nucleoide in una regione
inibisce la formazione del setto

La formazione dello Z-ring è inibita in E.
coli da una DNA-binding protein (SimA)

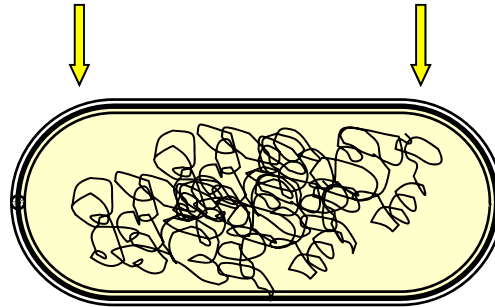


SimA si lega al cromosoma = dove è presente in
nucleoide non si forma il setto

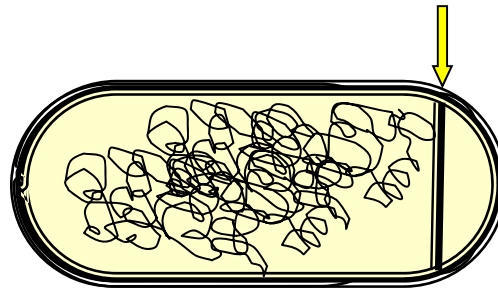
Nella regione mediana la concentrazione
del DNA è diminuita per la separazione del
nucleoidi: il setto è libero di formarsi



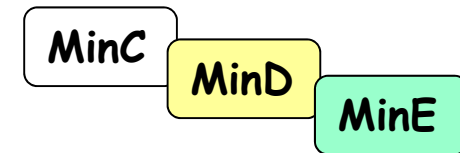
**Le estremità della cellula (poli) sono libere dal
nucleoide e potenziali siti di formazione del setto**



**Ma la formazione di un setto in corrispondenza di un polo provoca
la formazione di "minicellule" (piccole e prive di cromosoma)**

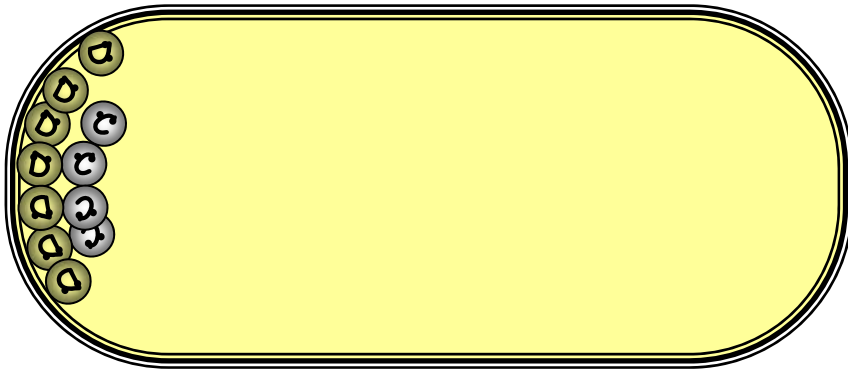


SISTEMA Min:
impedisce che il setto si formi alle estremità della cellula

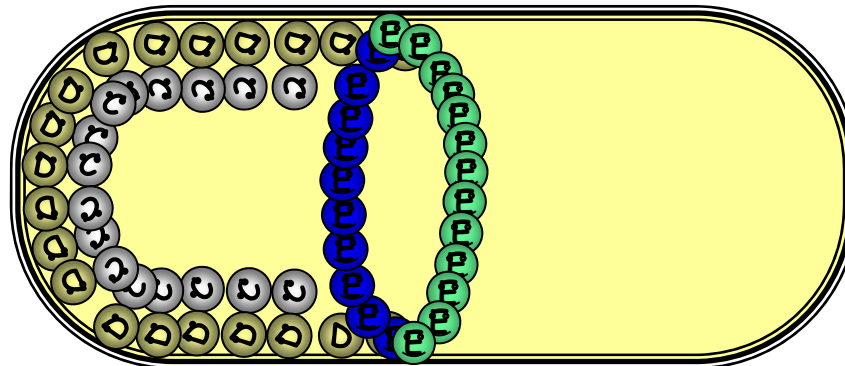


MinC inibisce FtsZ; non è in grado di spostarsi all'interno della cellula

MinD è una ATPasi che si associa a uno dei poli della cellula, lega MinC e la attiva (complesso MinCD)

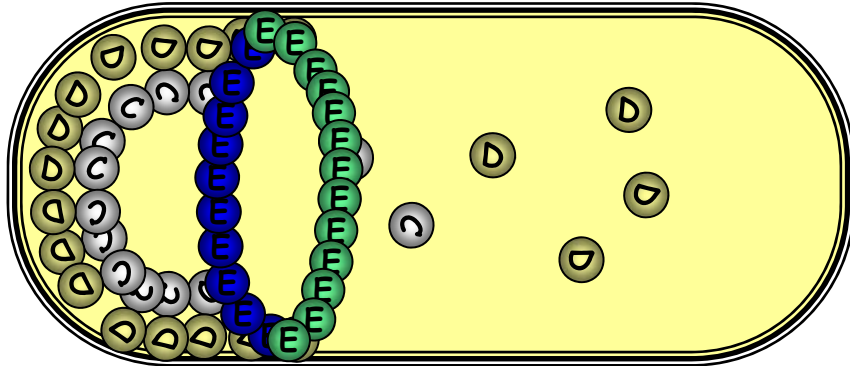


MinE forma un anello all'estremità della zona occupata da MinD



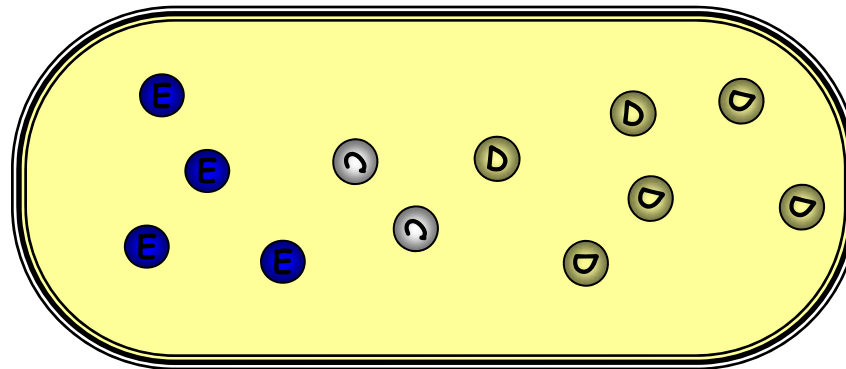
L'interazione MinE/MinD provoca il distacco di quest'ultima dalla membrana

Di conseguenza, anche MinC si stacca

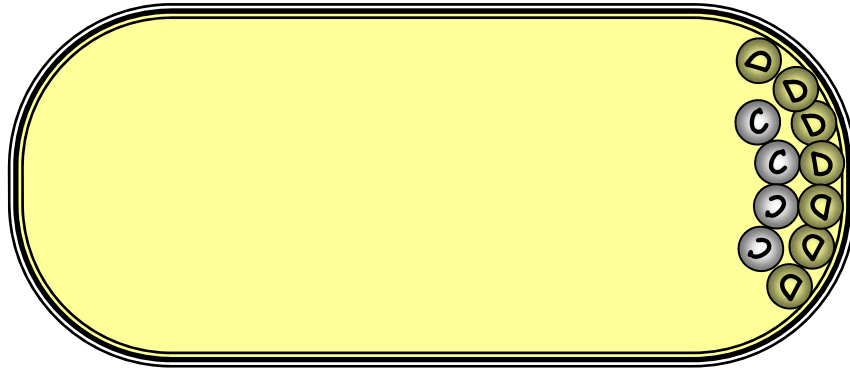


Man mano che le unità di MinD si staccano dalla membrana, l'anello di MinE si sposta verso il polo

quando l'anello raggiunge il polo, si disgrega

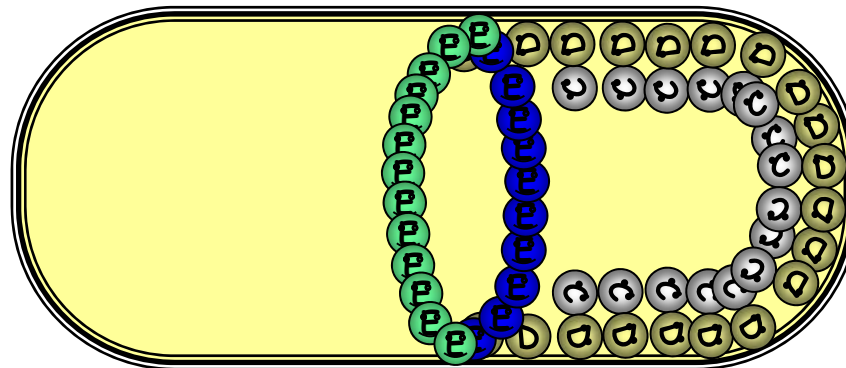


MinD, liberata da un polo, raggiunge l'altro spostandosi a spirale lungo la membrana e si lega, legando e attivando MinC

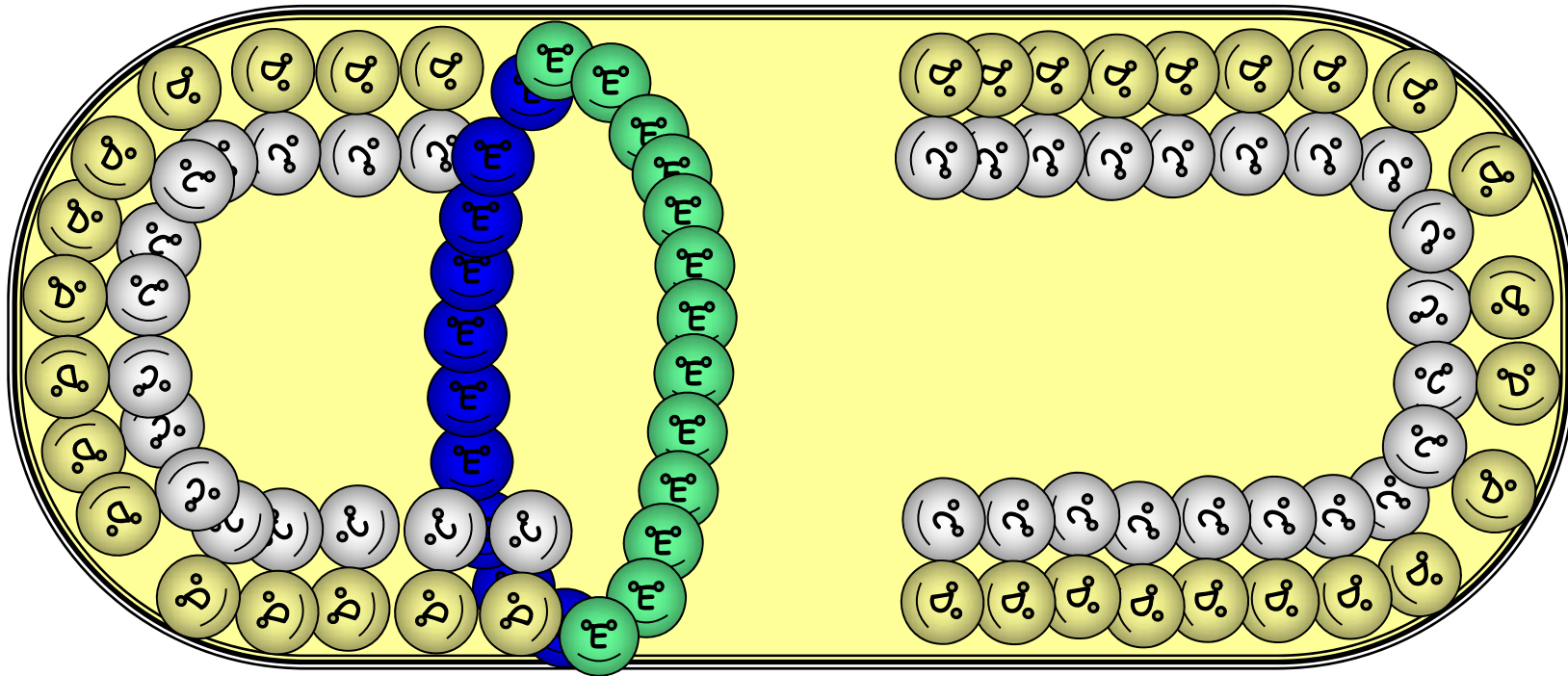


MinE torna a formare l'anello all'estremità della zona di legame di MinD

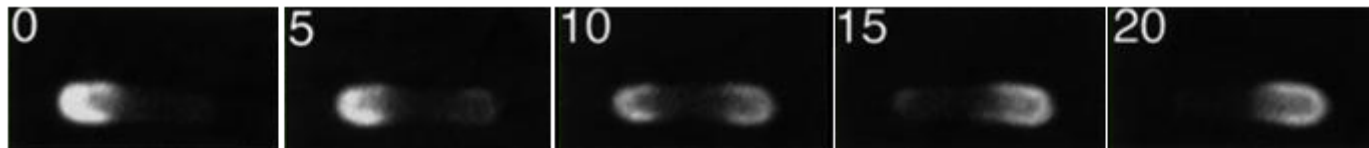
L'oscillazione si sussegue con un periodo di circa 30", durante un ciclo cellulare, quindi, la presenza di MinC attivata è statisticamente maggiore ai due poli e inibisce lì la formazione dello Z-ring, impedendo a FtsZ di reclutare le altre proteine necessarie



durante un ciclo cellulare, quindi, la presenza di MinC attivata è statisticamente maggiore ai due poli

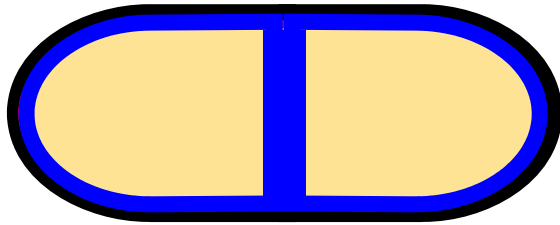


La presenza di MinCD ai poli impedisce a FtsZ di reclutare le altre proteine per formare il setto



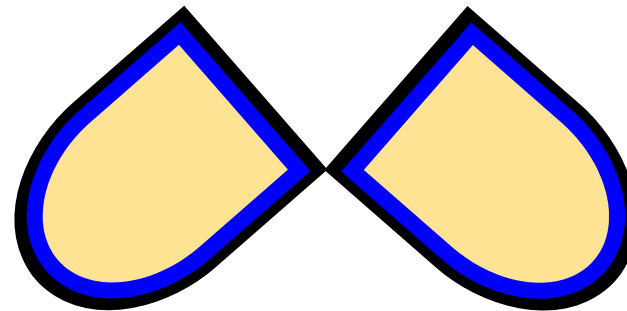
In alcuni casi la parete è formata da due strati e solo quello interno partecipa alla formazione del setto

Quando il setto si ispessisce rompe la parte esterna della parete su un solo lato



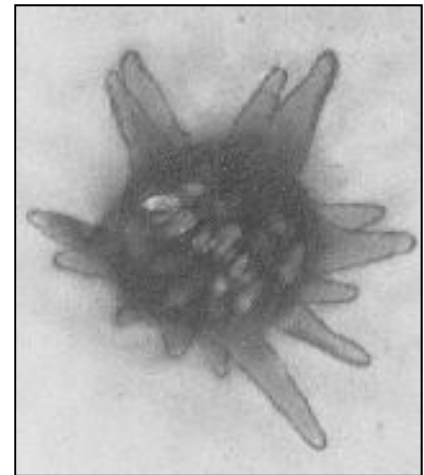
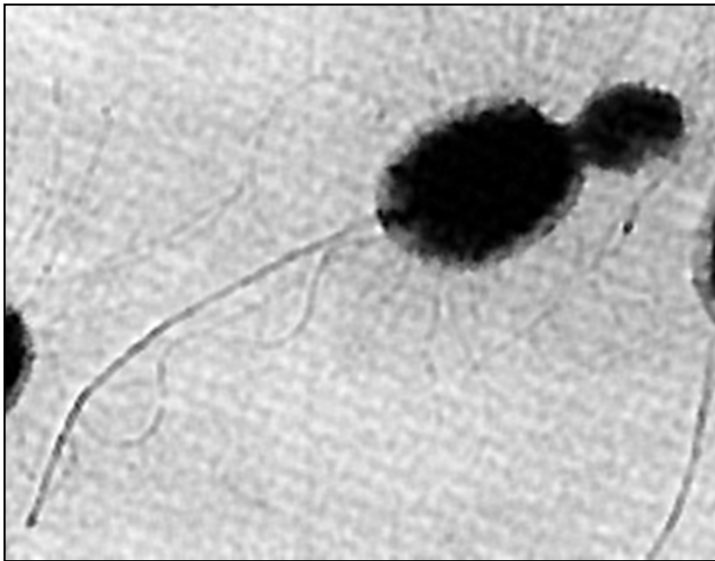
le due cellule figlie si allontanano facendo perno sul lato opposto a quello della rottura

Questo meccanismo è detto
divisione a scatto



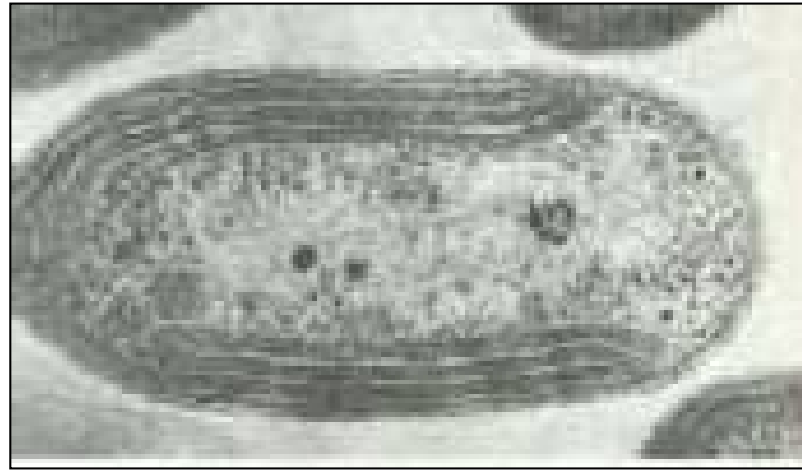
DIVISIONE POLARE

- A volte la crescita e la divisione della cellule batteriche sono polari

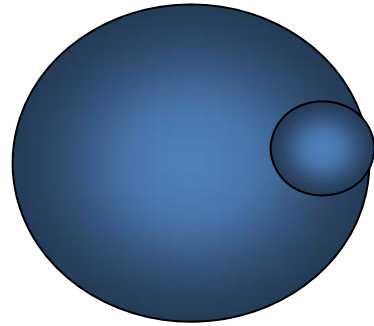


- La divisione per gemmazione è uno di questi casi

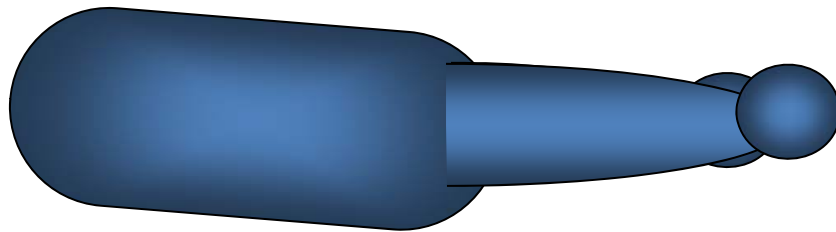
- LA DIVISIONE INEGUALE PERMETTE L'EVOLUZIONE DI UNA DIVERSA COMPLESSITÀ STRUTTURALE



Nitrobacter: le lamelle di invaginazioni della membrana non sono presenti al polo della cellula da cui si origina la gemma

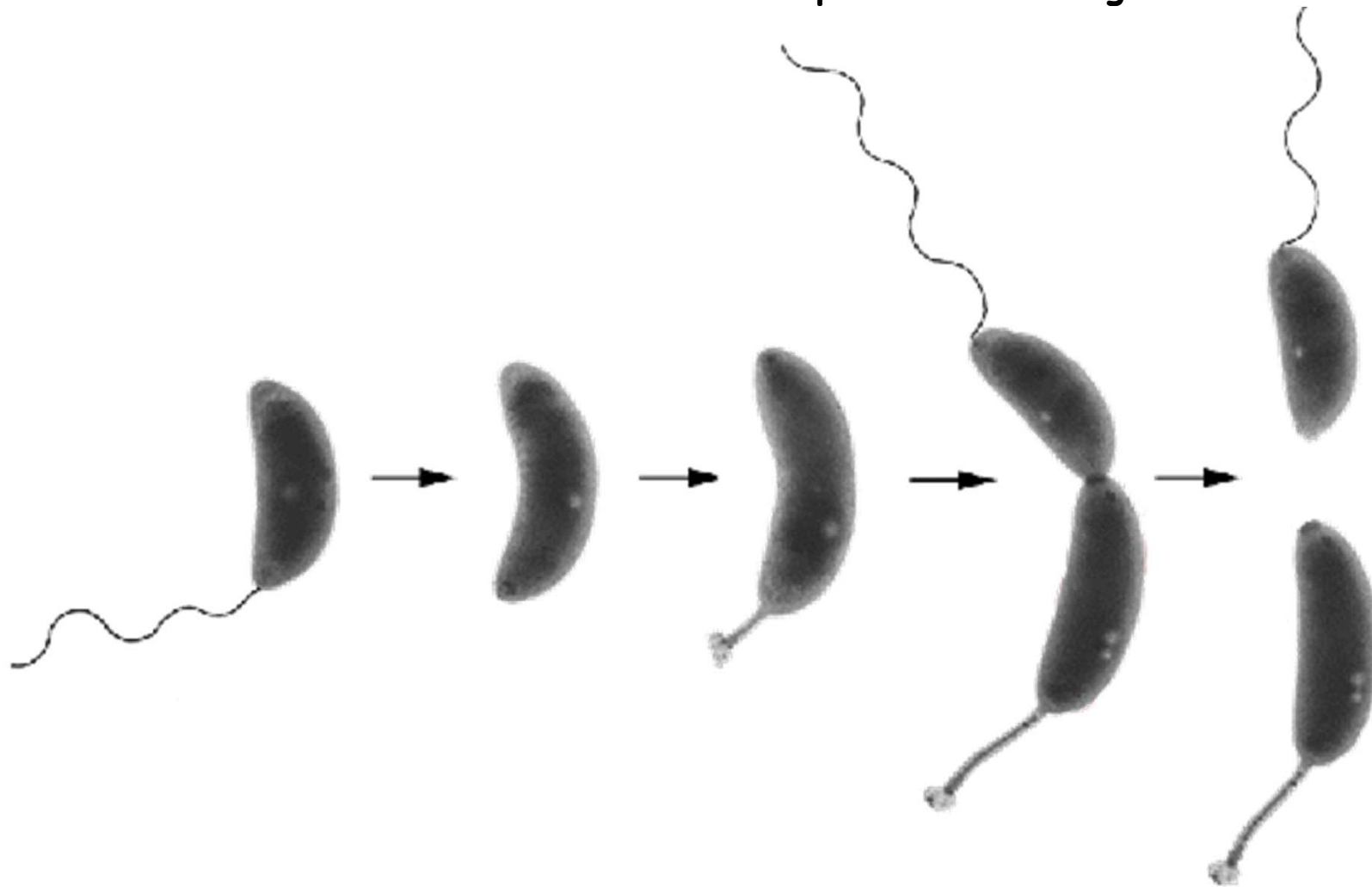


•**gemmazione**



•**Gemmazione con ifa**

**Ciclo cellulare di *Caulobacter crescentus*:
alternanza delle forme prostecata e flagellata**

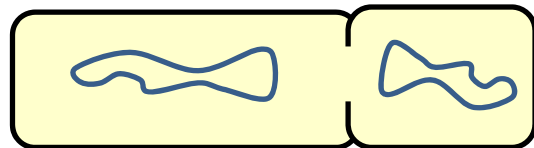
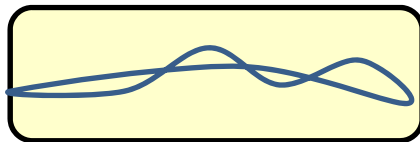


Anche il processo di sporificazione è una
divisione ineguale

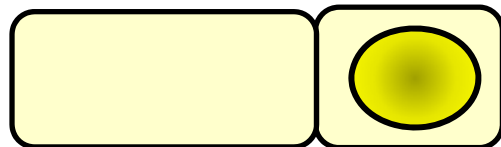
Come tutti i batteri, gli sporigeni si
dividono solitamente per schizogonia

Ma in condizioni di carenza di nutrienti
o di altri tipi di stress ambientali

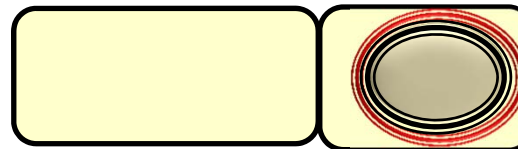
O in colture molto affollate, si innesca
il processo di sporulazione



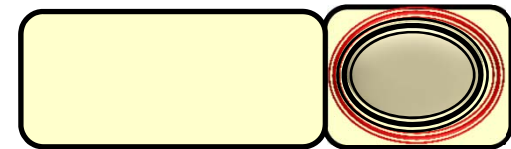
II- Divisione asimmetrica



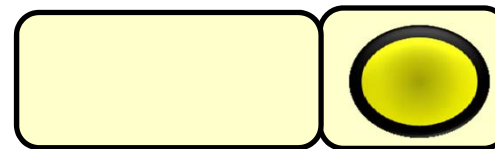
III- Protoplasto prespora



VI- maturazione

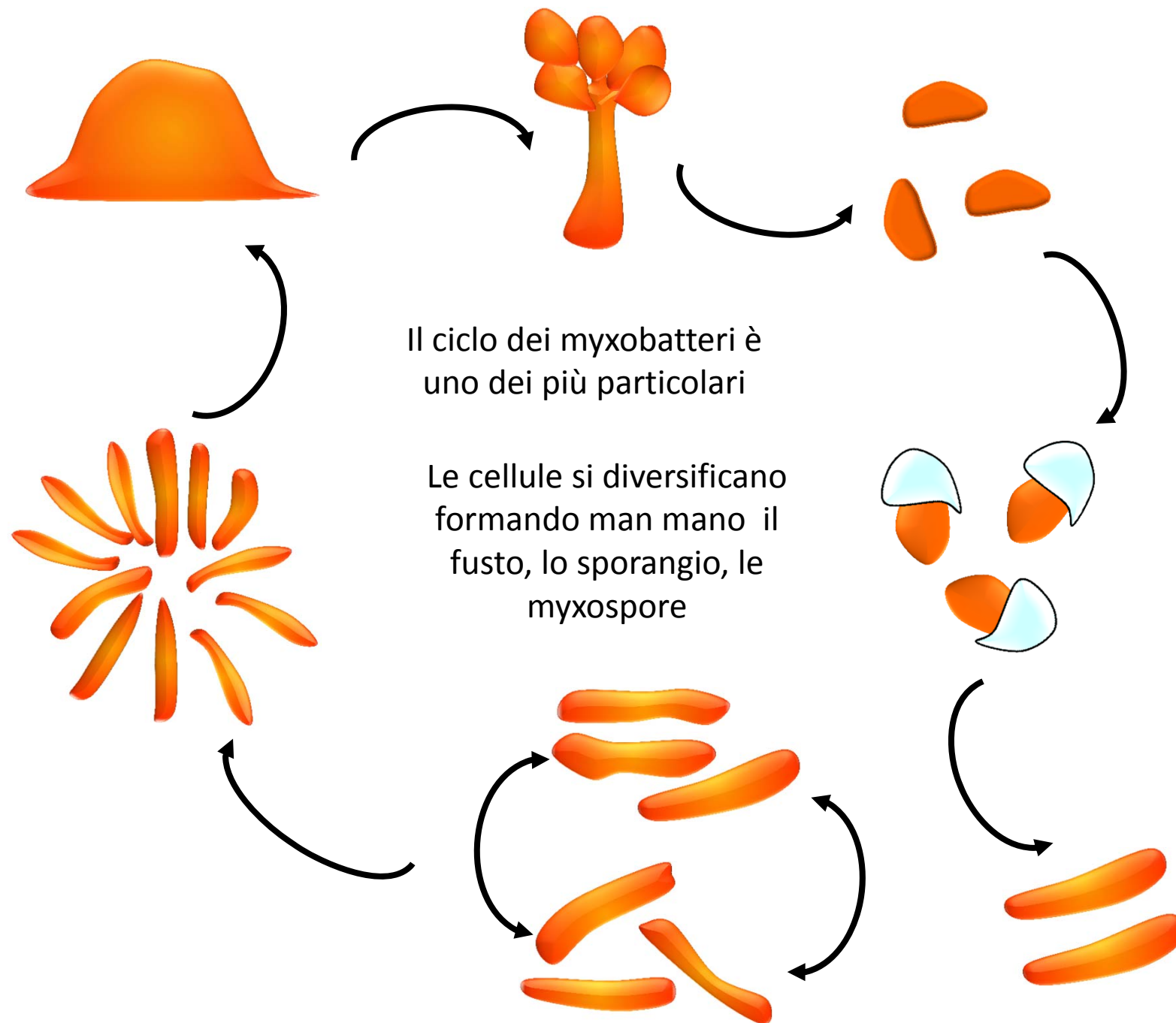


V- tuniche



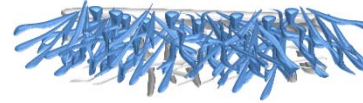
IV- Parete e cortex

VII- rilascio



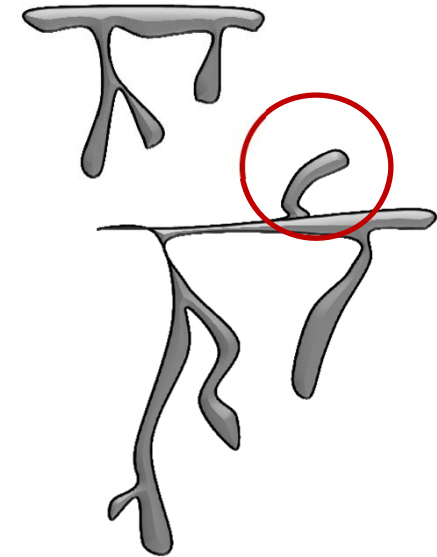
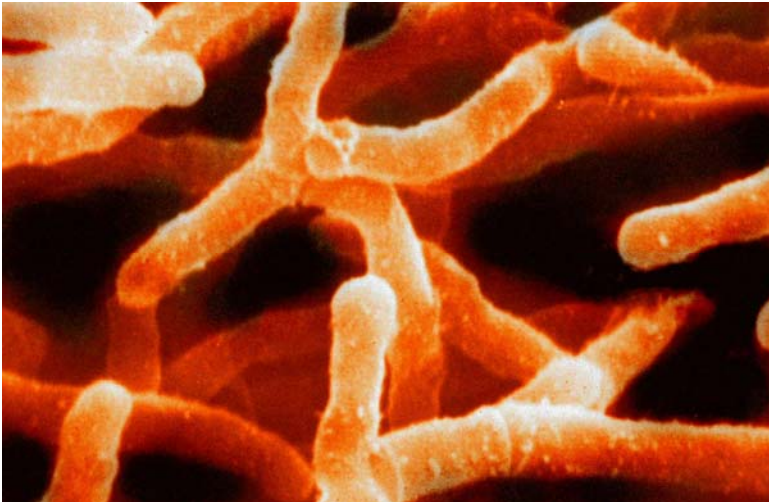
**Il ciclo vitale di *Streptomyces*
uno dei cicli più complessi tra i procarioti**

1) Micelio del substrato



Un micelio vegetativo (Micelio del substrato)
formato da ife intrecciate, dà luogo a una colonia

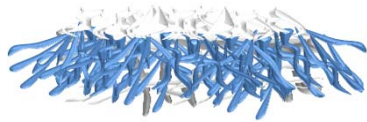
Le ife si affondano nel terreno,
traendone i necessari nutrienti



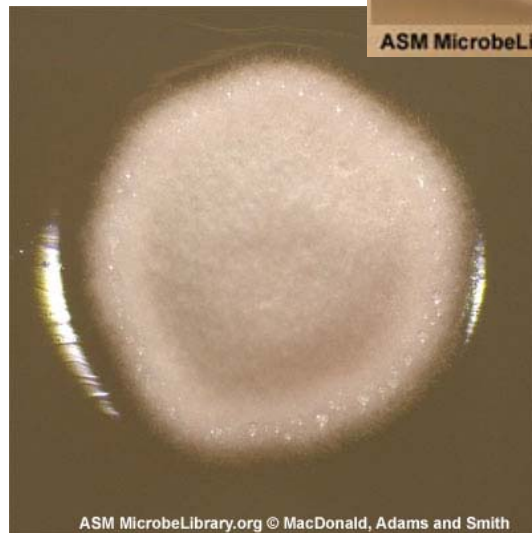
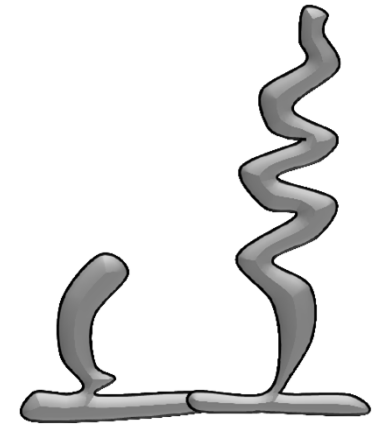
Nel micelio del substrato i filamenti non
sono settati e intrecciandosi danno alla
colonia una consistenza compatta

lo sviluppo coordinato multicellulare porta alla produzione di antibiotici e,
contemporaneamente, inizia a comparire un micelio aereo specializzato

2) MICELIO AEREO

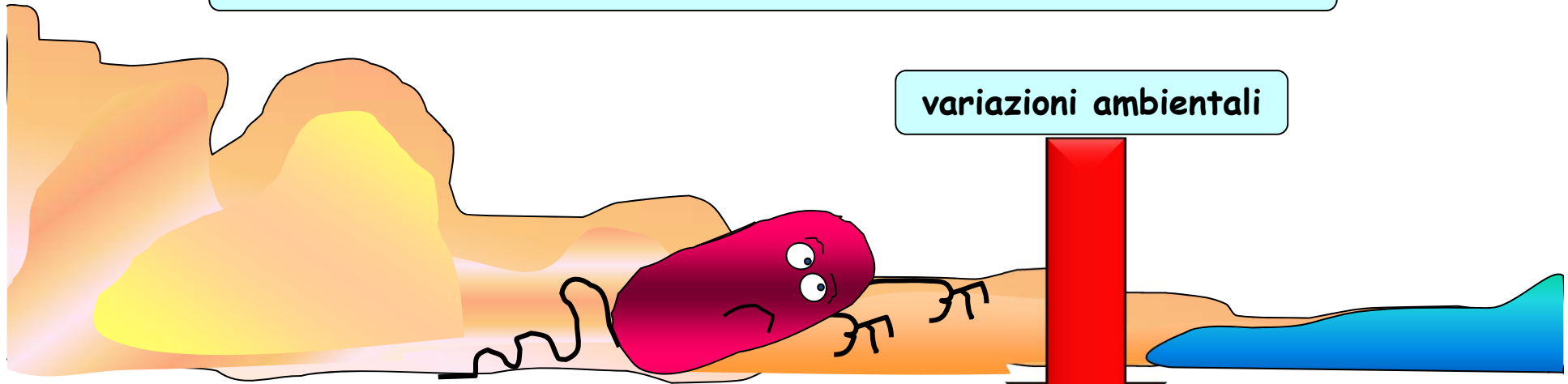


Quando le ife aeree sono cresciute, inizia un secondo momento di sviluppo che porta a una nuova e articolata regolazione della crescita, del ciclo cellulare e dei processi di morfogenesi



Quando si formano gli sporofori (e poi le spore)
la colonia assume un aspetto polveroso

Il ciclo vitale dipende dalle possibilità che l'ambiente offre



variazioni ambientali

**Necessità di modulare le
attività cellulari**

QUALITATIVA

**Modulazione dell'attività
enzimatica**

**Scelta del set di enzimi utili
a seconda delle situazioni**

QUANTITATIVA

**Modulazione della
quantità di enzima**

MODULAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA

le proteine possono cambiare conformazione

ESSERE ATTIVATE

ESSERE INIBITE

ACQUISIRE CAPACITÀ
NUOVE (LATENTI)

ATTRAVERSO IL LEGAME
CON EFFETTORI
ALLOSTERICI (LIGANDI)

positivi

negativi

Il sito di legame per l'effettore non
coincide con il sito catalitico dell'enzima

Il legame con
l'effettore modifica

Velocità di reazione
(V_{max})

Affinità per il substrato
(K_m)

Inibizione a
FEED BACK

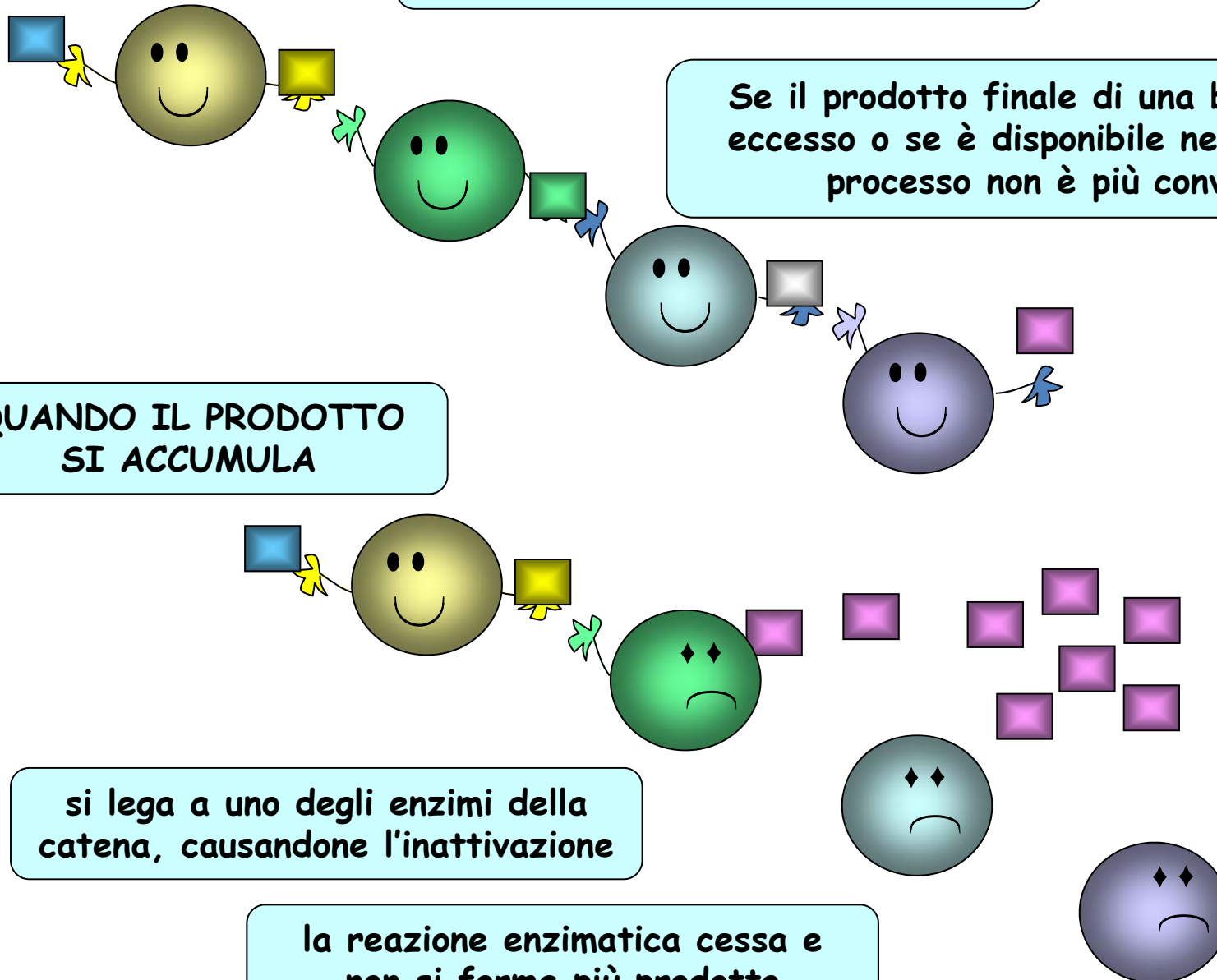
REGOLAZIONE DELL'ATTIVITA'
ENZIMATICA

Se il prodotto finale di una biosintesi è in
eccesso o se è disponibile nell'ambiente, il
processo non è più conveniente

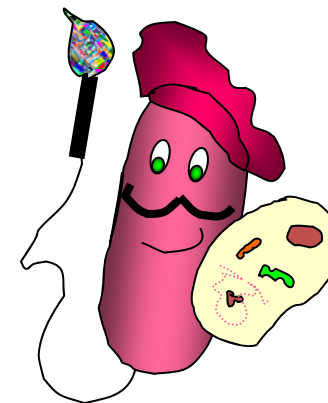
QUANDO IL PRODOTTO
SI ACCUMULA

si lega a uno degli enzimi della
catena, causandone l'inattivazione

la reazione enzimatica cessa e
non si forma più prodotto

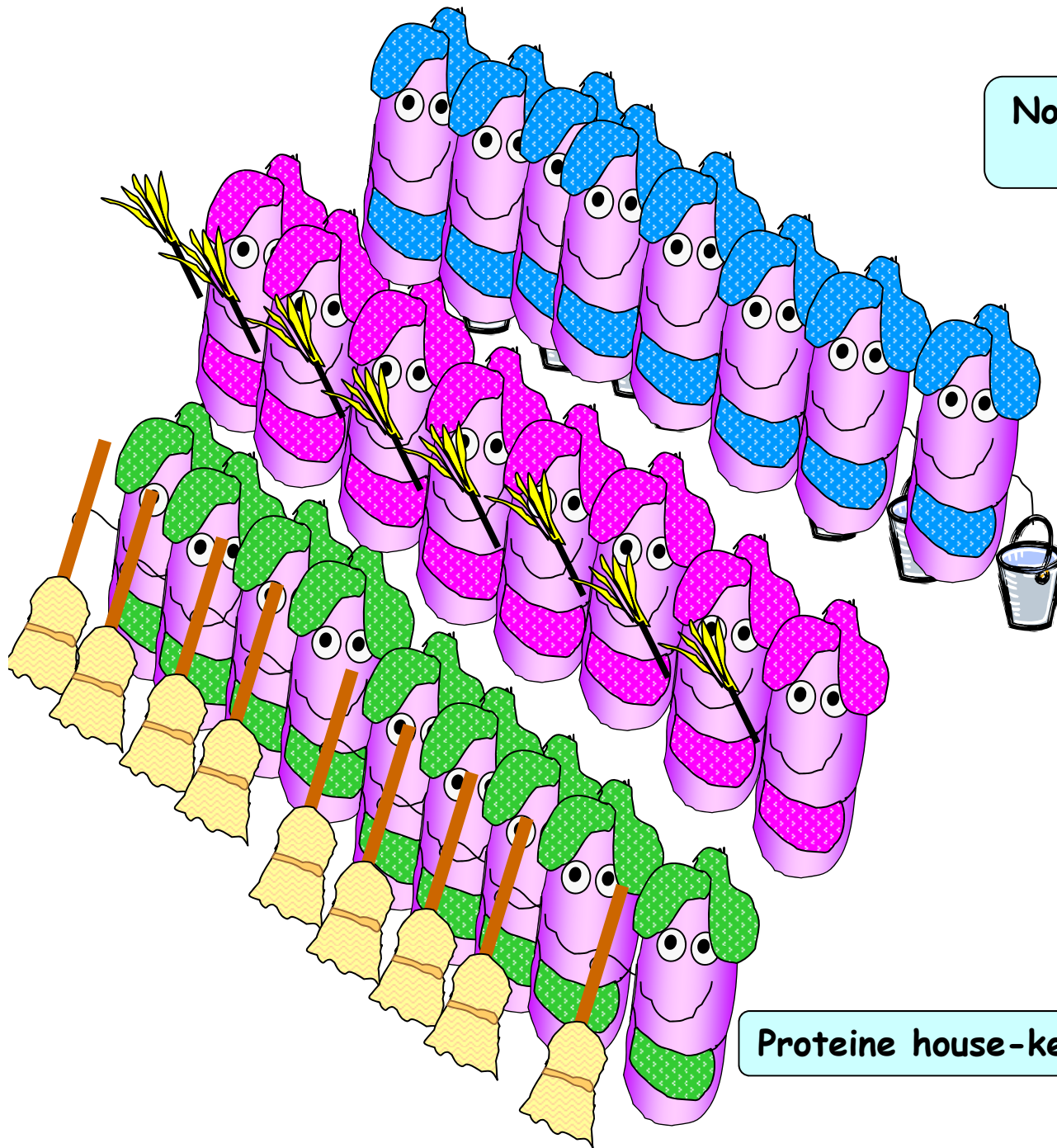


Non tutti i geni sono espressi
nello stesso modo



Enzimi particolari
Poco espressi

Proteine house-keeping: molto espresse



Regolazione dell'espressione genica

★ regolazione della trascrizione

Facilitarla (regolazione positiva)

Ostacolarla (regolazione negativa)

Adattarsi variando la quantità di mRNA disponibile per la traduzione in proteine significa risparmio energetico

Evita sintesi inutili di nucleotidi e proteine

Regolazione positiva



Attivatore: se promuove il legame della RNA-polimerasi la trascrizione avviene

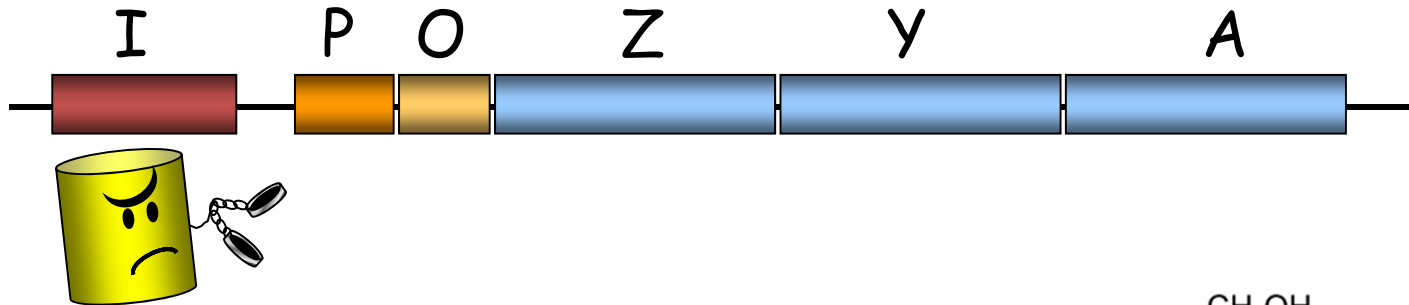
Regolazione negativa



Repressore: se si lega al promotore la trascrizione non avviene

REPRESSIONE DELLA TRASCRIZIONE

Regolazione negativa
Es. Operone "lac"

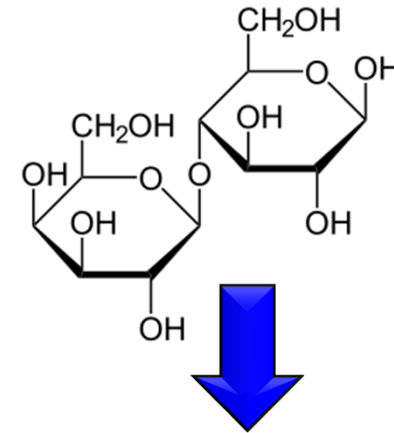


lacZ (β -galattosidasi) scinde il lattosio

lacY (permeasi) ingresso del lattosio nella cellula batterica

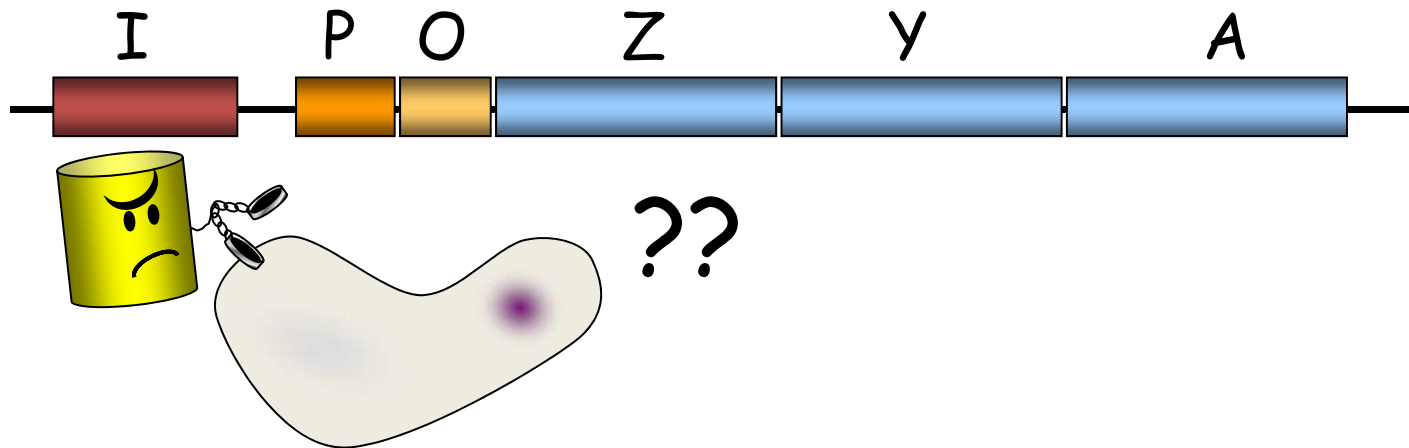
lacA (transacetilasi) funzione non pienamente compresa

lacI (repressore) è a monte del promotore pLac ed è trascritto in modo costitutivo



Glucosio + galattosio

Tra il promotore e l'inizio del primo gene dell'operone
c'è una particolare sequenza l'OPERATORE



Il repressore riconosce
l'OPERATORE e vi si lega

la RNA polimerasi non può legarsi
alla sequenza da trascrivere

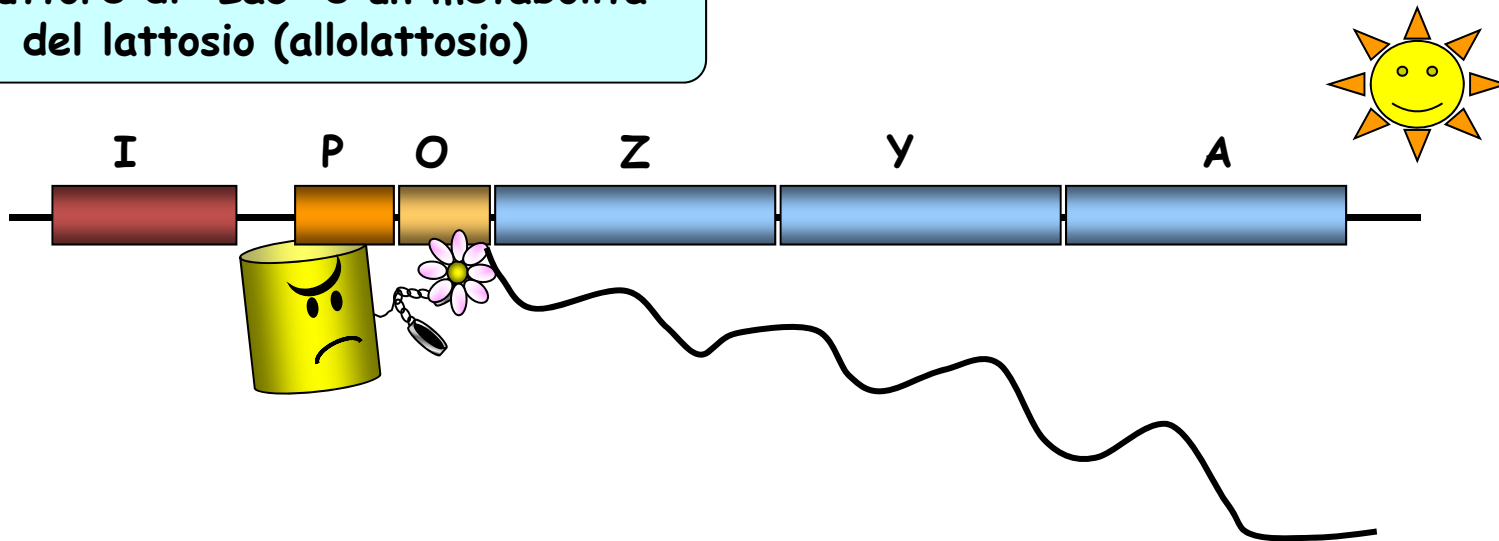


La trascrizione non avviene

La trascrizione dei geni repressi si attiva a seguito di INDUZIONE

INDUTTORE: molecola che avvia la produzione dell'enzima deputato a metabolizzarla

L'induttore di "Lac" è un metabolita del lattosio (allolattosio)



Il repressore ha due siti di legame: quando l'induttore si lega a uno di questi, modifica l'altro impedendo l'interazione con l'operatore

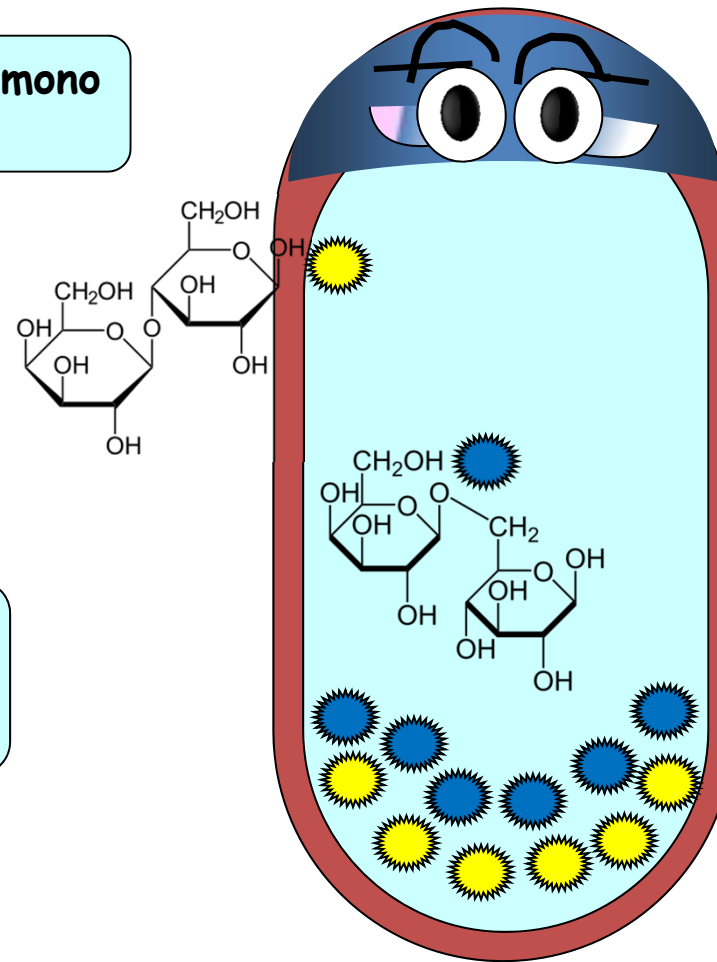
Il repressore si stacca e permette che avvenga la trascrizione

LIVELLO BASALE

Molti geni regolati negativamente si esprimono a basso livello nella cellula batterica

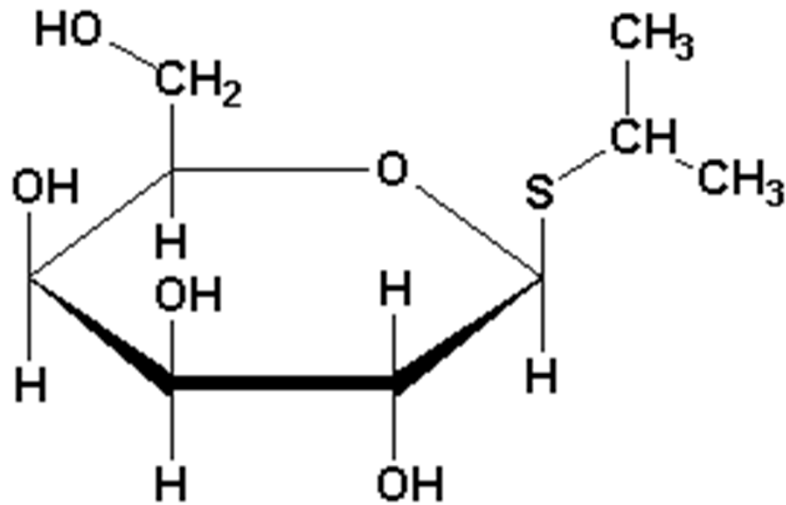
Grazie all'espressione basale qualche molecola di LacY e LacZ è presente quando il lattosio si rende disponibile

La loro azione permette di ottenere l'induttore necessario per la piena espressione



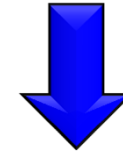
Molecole che agiscono da induttori ma non sono metabolizzate dai geni indotti, sono chiamate induttori gratuiti

Nel caso del promotore P_{lac} l'induttore è



Isopropyl Thiogalactoside (IPTG)

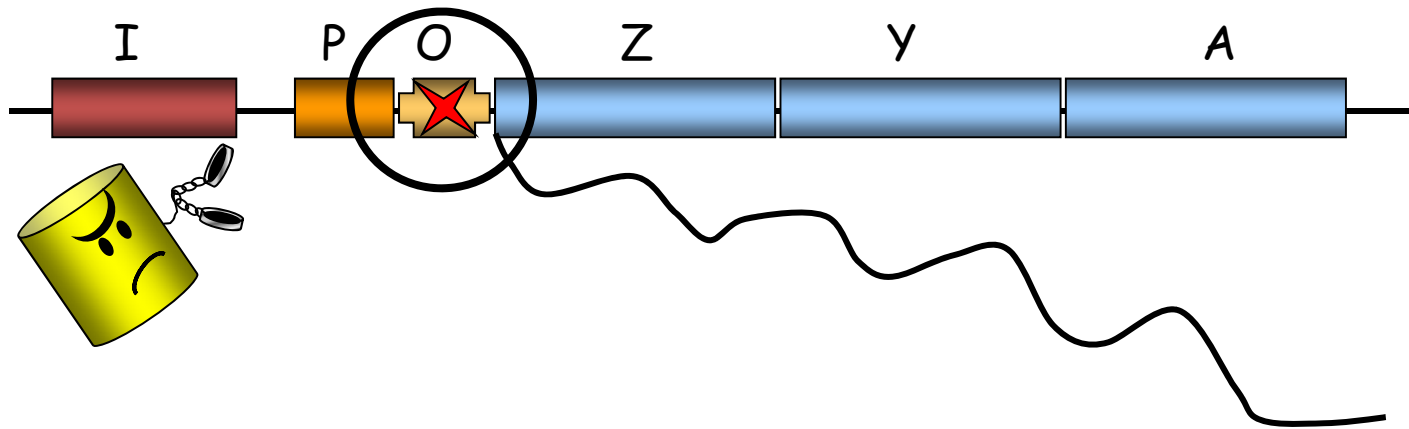
Non è metabolizzato



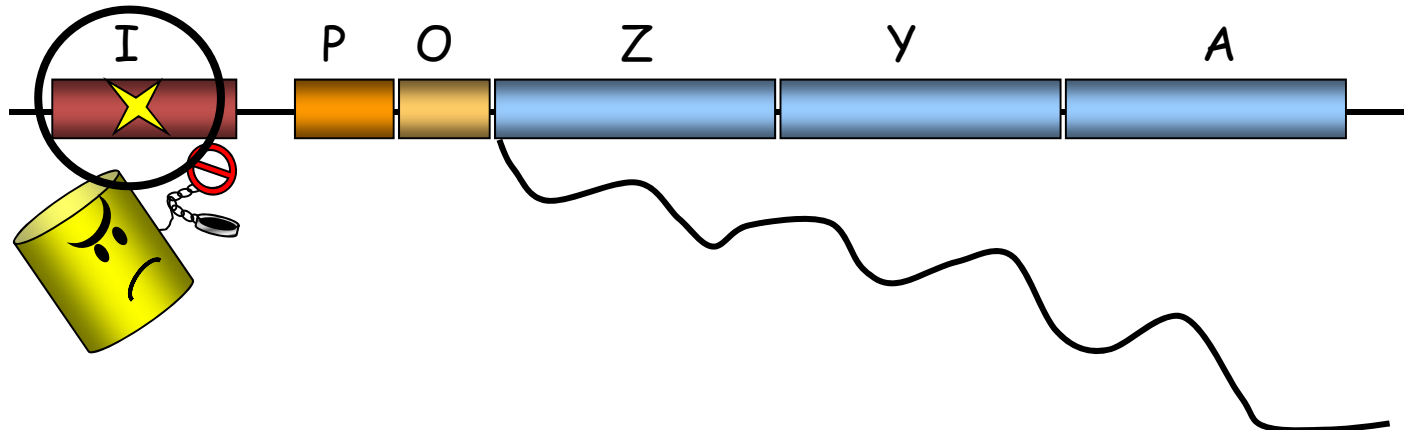
la sua concentrazione può essere tenuta sotto controllo

ESPRESSIONE COSTITUTIVA (anche in assenza dell'induttore)

Mutazioni nell'operatore possono impedire il legame del repressore, causando una espressione **COSTITUTIVA**

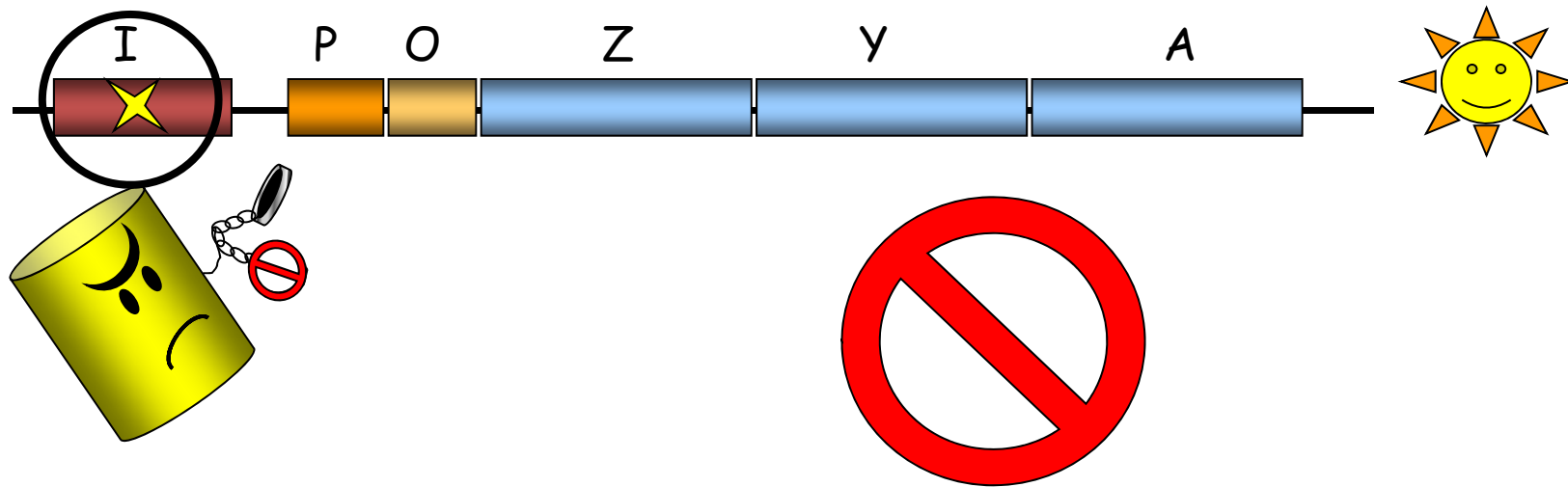


Anche Mutazioni del repressore, nel sito di legame all'operatore (I^c)
causano una espressione costitutiva



SUPER REPRESSIONE

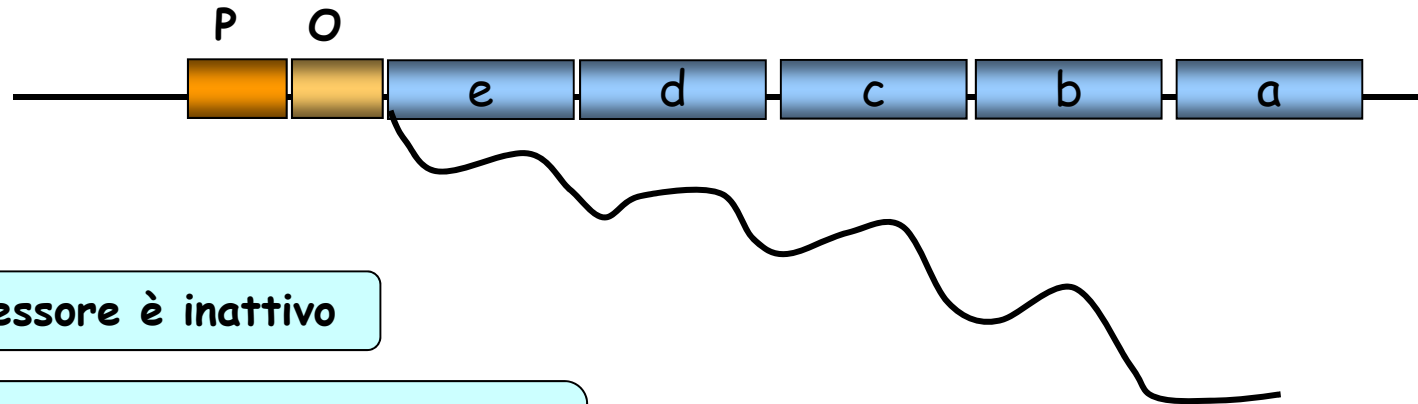
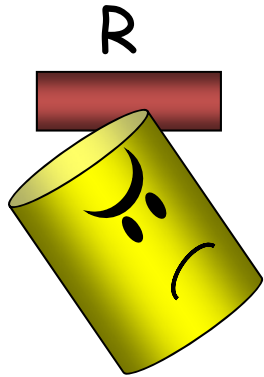
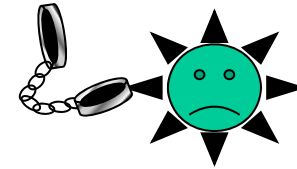
Se una Mutazione del repressore (I^s), modifica il sito di legame all'induttore ne consegue una super repressione



Il legame del repressore non può essere impedito e la trascrizione non avviene

CO-REPRESSORE
Operone trp

In altri casi, la molecola
effettrice è un "co-repressore"



Da solo, il repressore è inattivo

diventa capace di impedire la trascrizione
solo quando si lega al triptofano



REGOLAZIONE POSITIVA

La trascrizione parte solo dopo
il legame di un attivatore

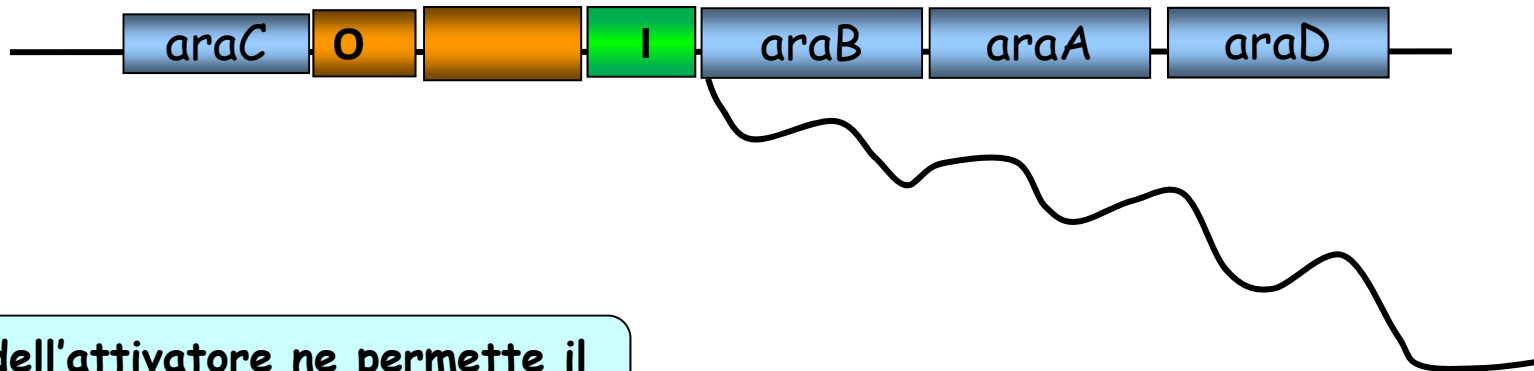


AraC* interagisce con la regione I
(inziatore) e attiva l'espressione

se è presente, l'arabinosio
si lega a AraC e l'attiva



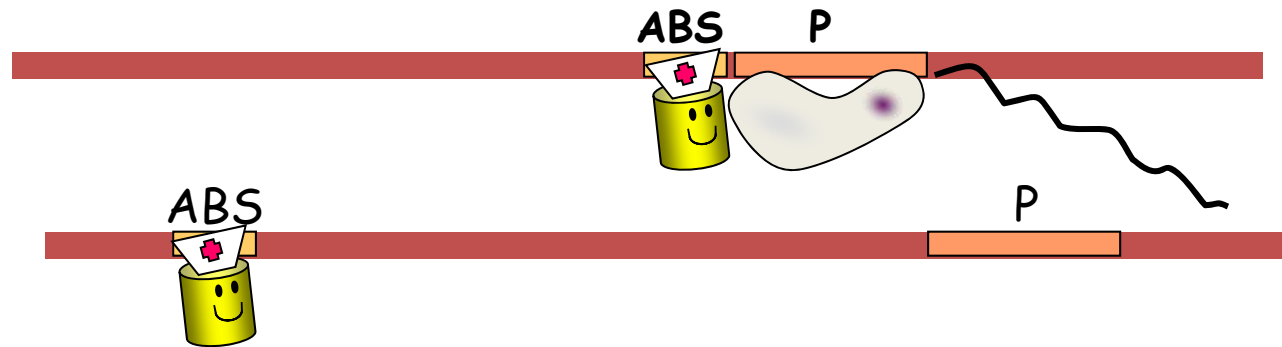
La struttura dei promotori regolati positivamente
è spesso poco aderente al consensus



Il legame dell'attivatore ne permette il
riconoscimento da parte della RP

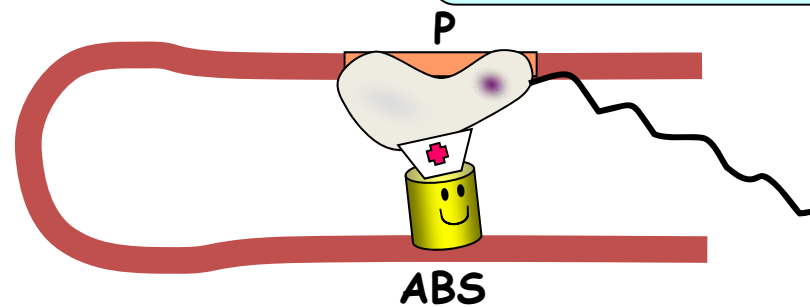
Nella regolazione positiva

Il sito di legame dell'attivatore (ABS) può essere vicino al promotore



Ma anche molto lontano

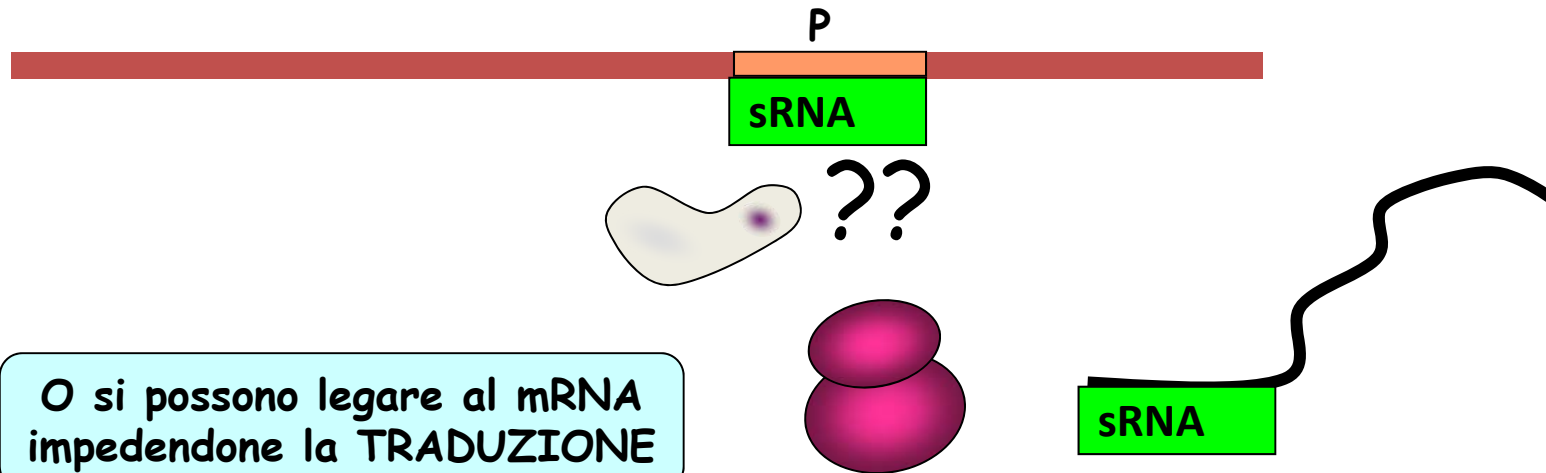
in questi casi si suppone che si formi un'ansa



REGOLAZIONE PER SMALL RNA (sRNA)

sRNA complementari alla regione del promotore

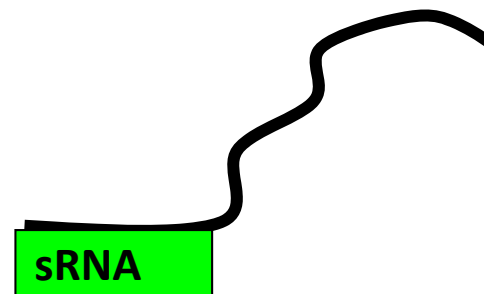
Possono legarsi impedendo la trascrizione



O si possono legare al mRNA impedendone la TRADUZIONE

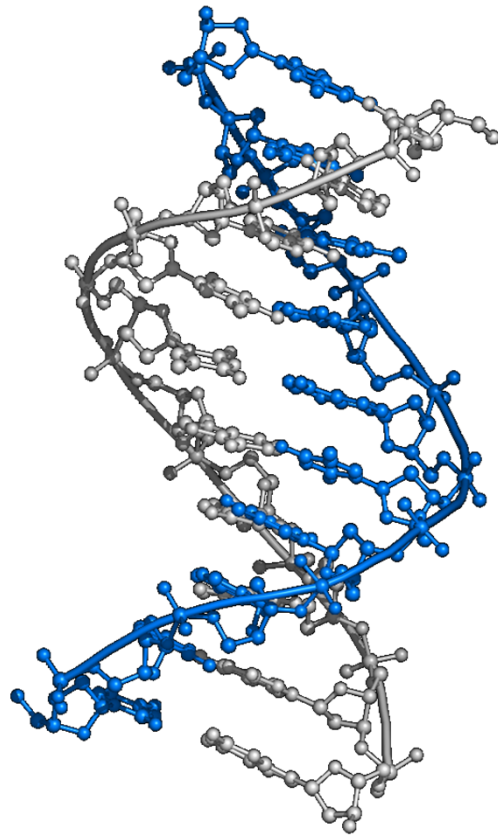
Un meccanismo di questo tipo regola la produzione di alcune proteine ribosomali

Gli sRNA possono anche legarsi agli mRNA scatenandone la degradazione precoce

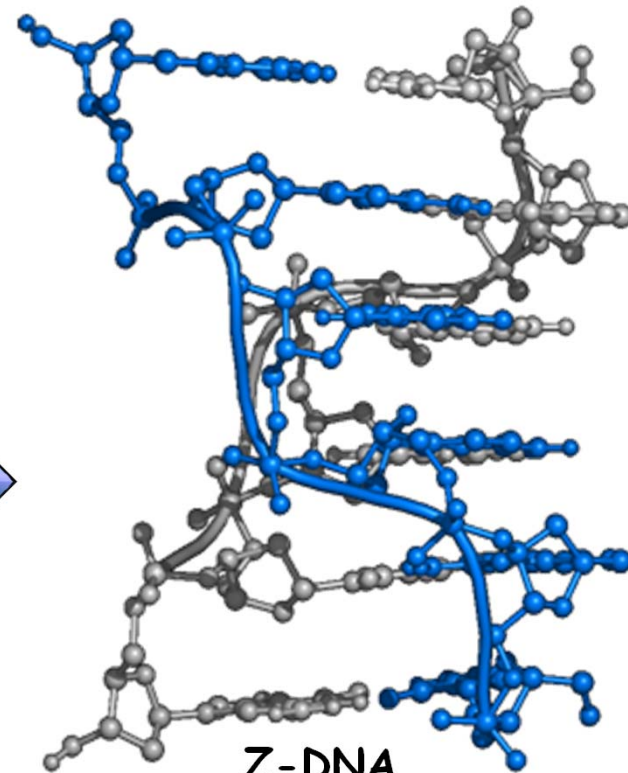


CONFORMAZIONE DEL DNA

Lo stato di avvolgimento del DNA nella regione del promotore influenza il grado di trascrizione



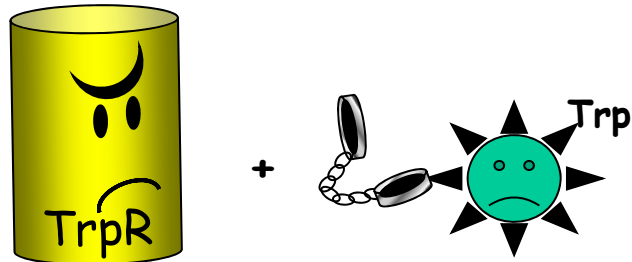
B-DNA
"standard"



Z-DNA
regioni ricche di GC
e/o metilate

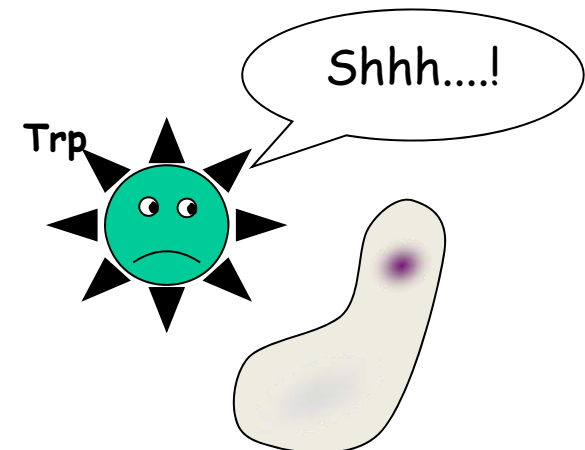
REGOLAZIONE PER ATTENUAZIONE DELLA TRASCRIZIONE (TERMINAZIONE PRECOCE es: operone triptofano)

L'operone Trp è regolato negativamente da TrpR, il co-repressore è il triptofano

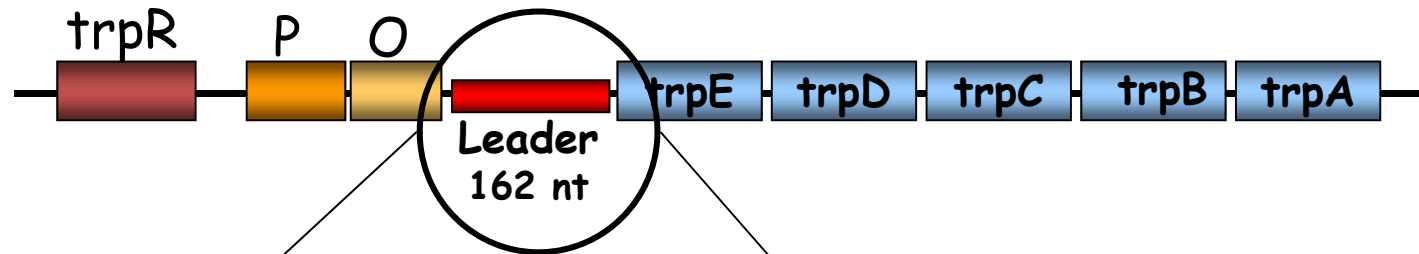


La repressione riduce l'espressione della via biosintetica di circa 70 volte

Il triptofano innesca anche un altro meccanismo, che contribuisce a inibire ulteriormente la biosintesi

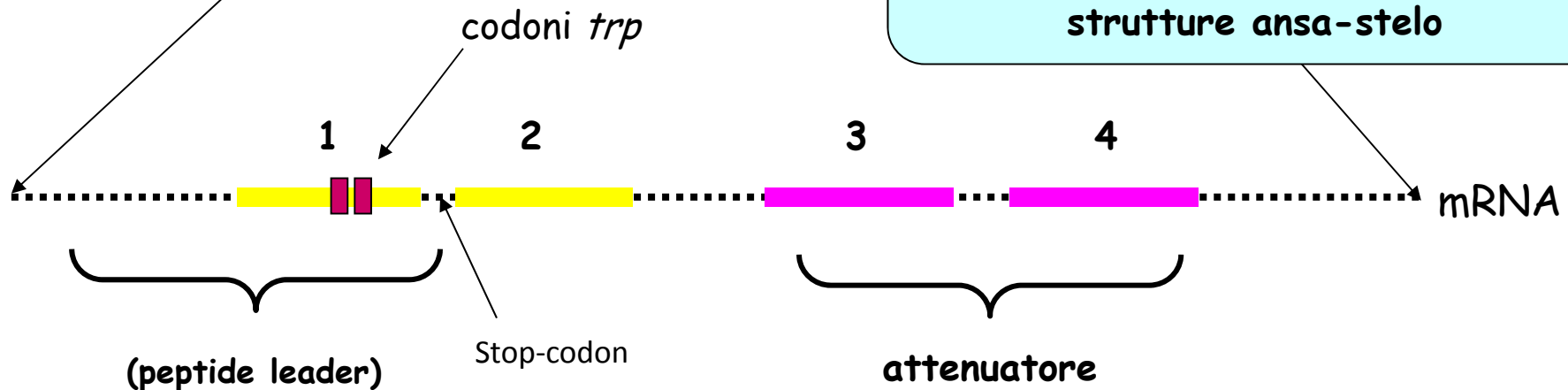


All'inizio dell'operon c'è una sequenza che codifica un piccolo peptide (leader-14 AA)

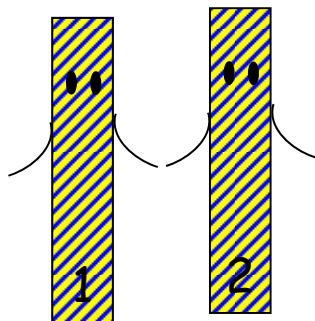


Nella sequenza leader (1) si trovano due codoni "Trp" consecutivi

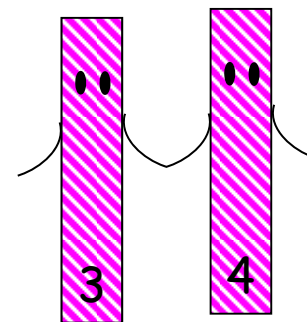
Nel mRNA sono presenti altre sequenze nucleotidiche ("2"- "3"- "4") complementari, in grado di formare strutture ansa-stelo



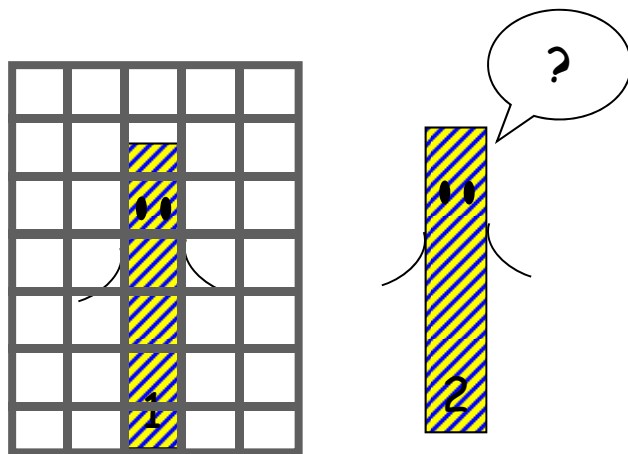
La regione "1" si appaia con la "2"



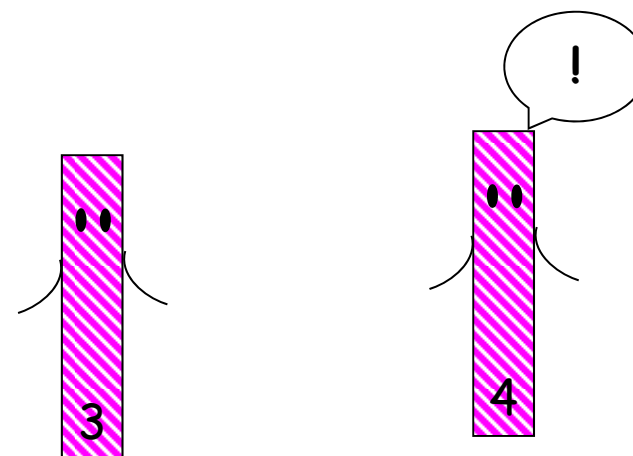
la regione "3" si appaia con la "4"



Ma nel caso in cui la regione
"1" non sia disponibile,

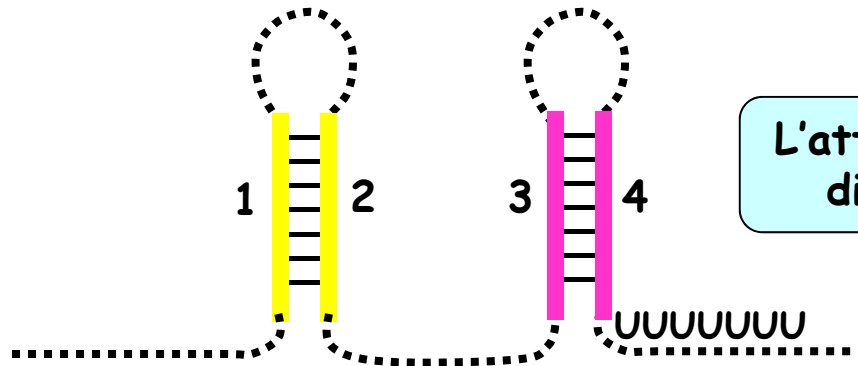


la "2" si appaia con la "3"

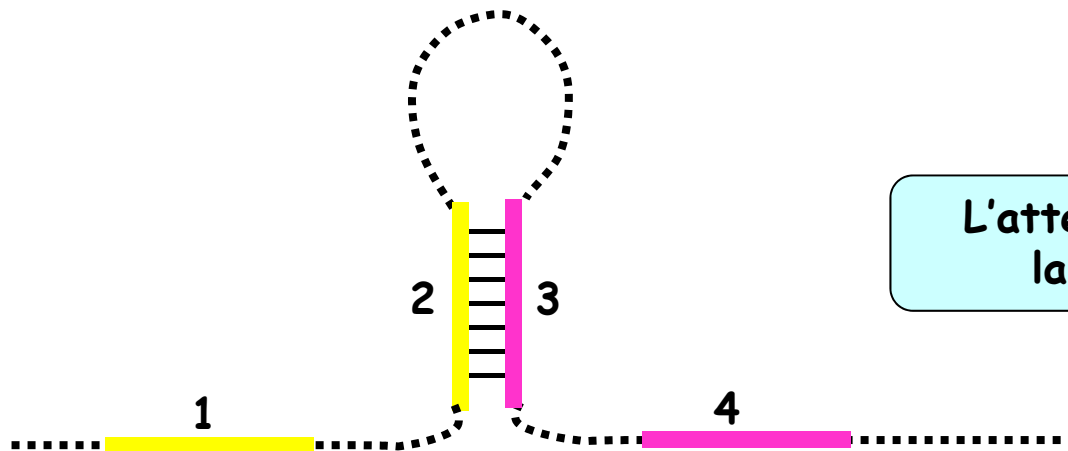


Lasciando la "4" non
appaiata

Si possono dunque verificare due diverse conformazioni



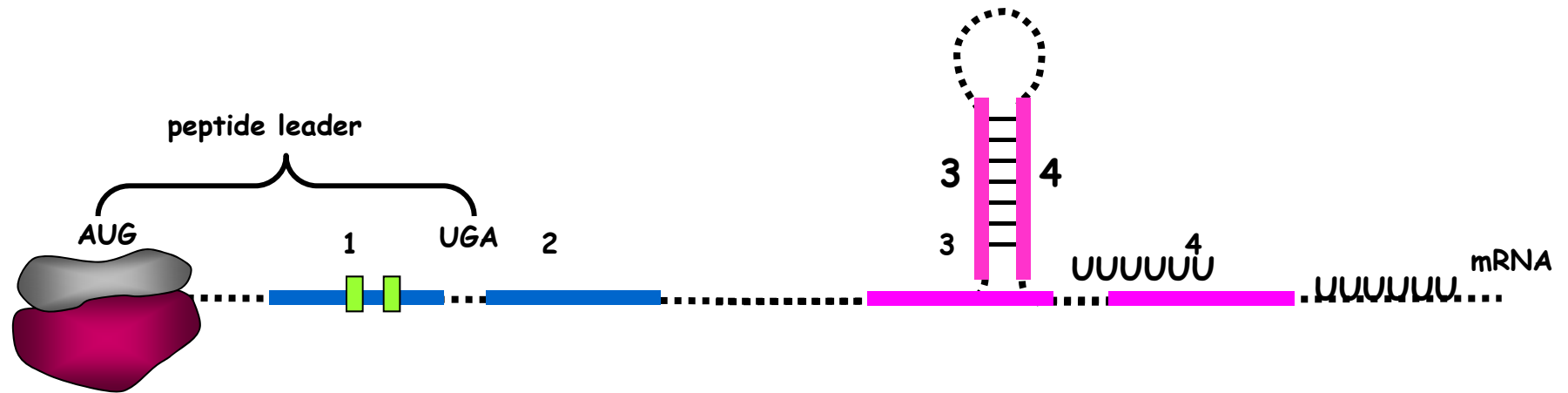
L'attenuatore si forma (ansa stelo seguita da diversi uracile) → la trascrizione termina



L'attenuatore NON si forma → la trascrizione prosegue

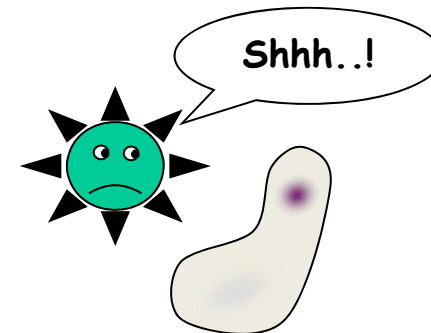
La disposizione degli appaiamenti tra le regioni dipende dalla posizione del ribosoma.. che dipende dalla disponibilità di Trp

Se è disponibile Trp, il ribosoma sintetizza il peptide leader, fino al codone di stop

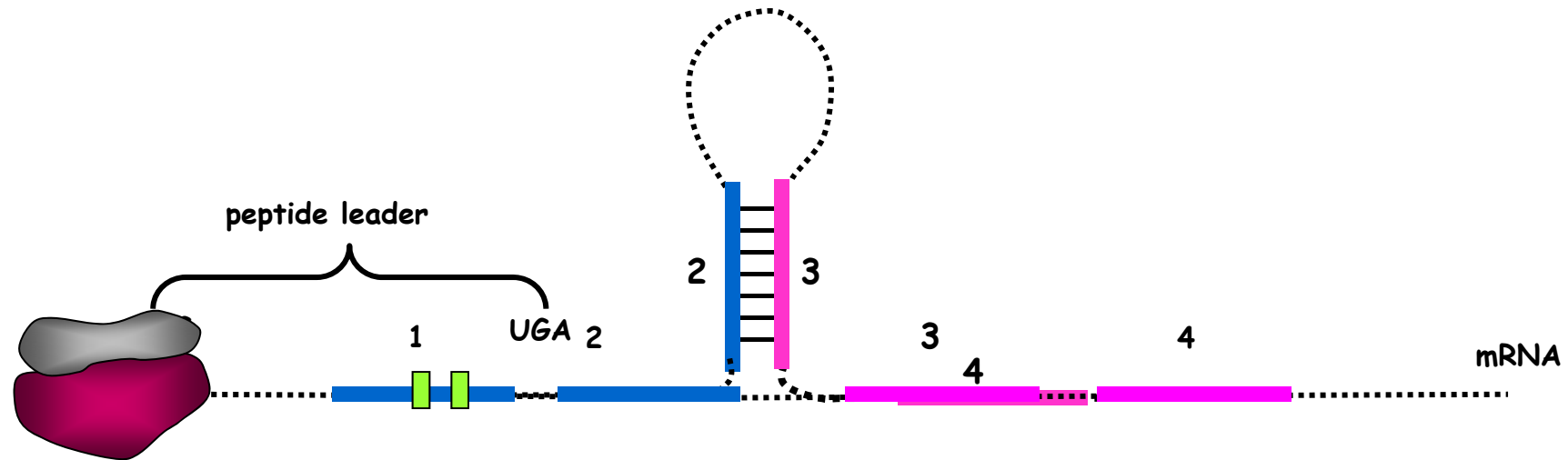
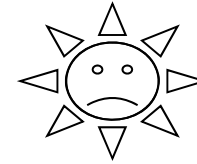


il ribosoma occupa il segmento "1" ma sporge sul segmento "2" che non si può appaiare a "3"

"3" e "4" formano l'attenuatore e la trascrizione termina



Se Trp manca, il ribosoma si ferma in corrispondenza dei due successivi codoni "trp"



il segmento "2" è libero di appaiarsi con "3"

"3" e "4" non formano l'attenuatore e la trascrizione prosegue

I determinanti di resistenza all'Eritromicina (geni *erm*)
Sono stati scoperti in *Enterococcus*

Il gene usato sui vettori per *Bacillus* è
ermC, che conferisce il fenotipo *MLS^R*

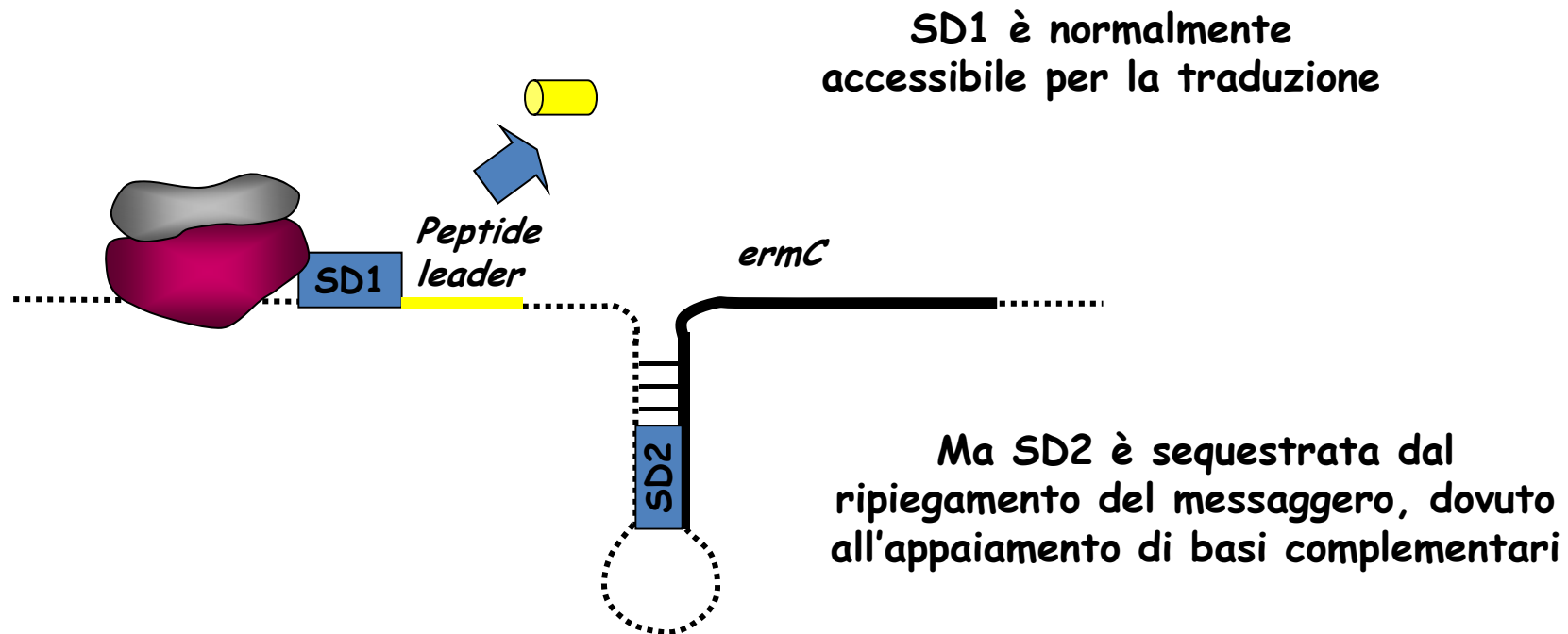
Il meccanismo con cui i geni *erm* conferiscono la
resistenza a questo gruppo di antibiotici è detto

ATTENUAZIONE TRADUZIONALE

ATTENUAZIONE TRADUZIONALE

Es. *ermC*- resistenza ai Macrolidi

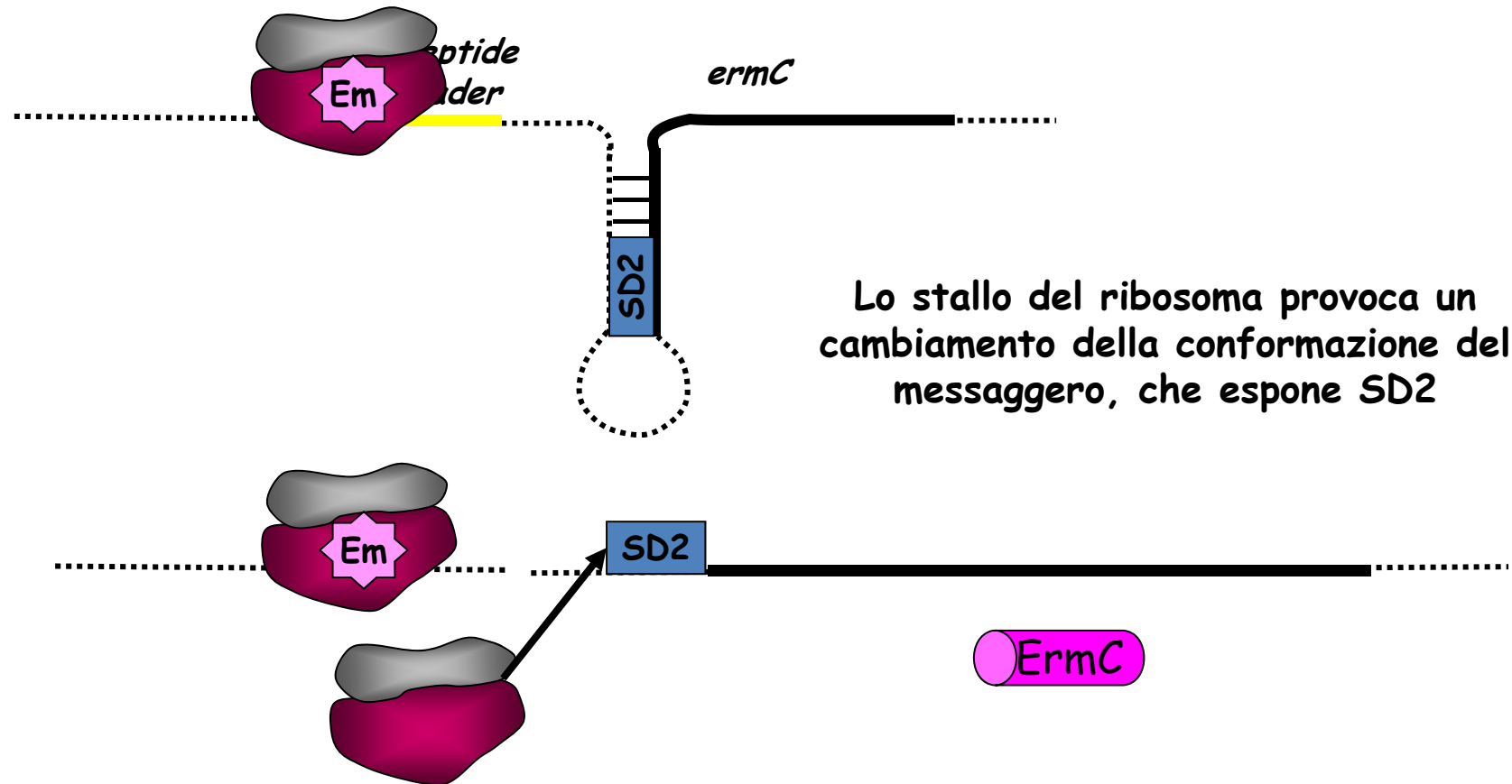
Nel messaggero sono presenti
due sequenze SD



In assenza di induzione quindi il solo
prodotto è il piccolo peptide

Quando l'eritromicina si lega al
ribosoma (il suo bersaglio)

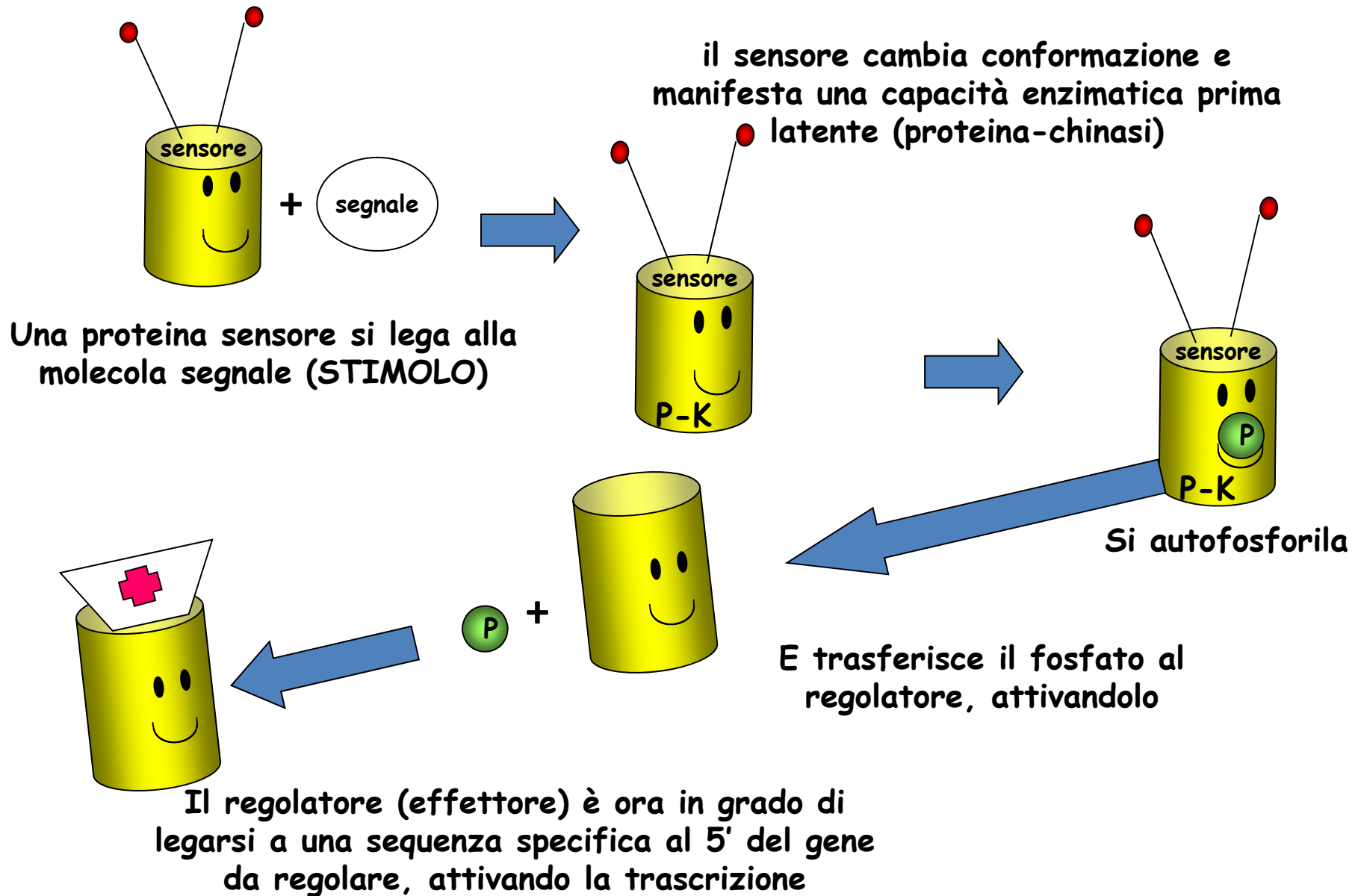
Ne provoca lo stallo prima che la
traduzione del peptide sia terminata



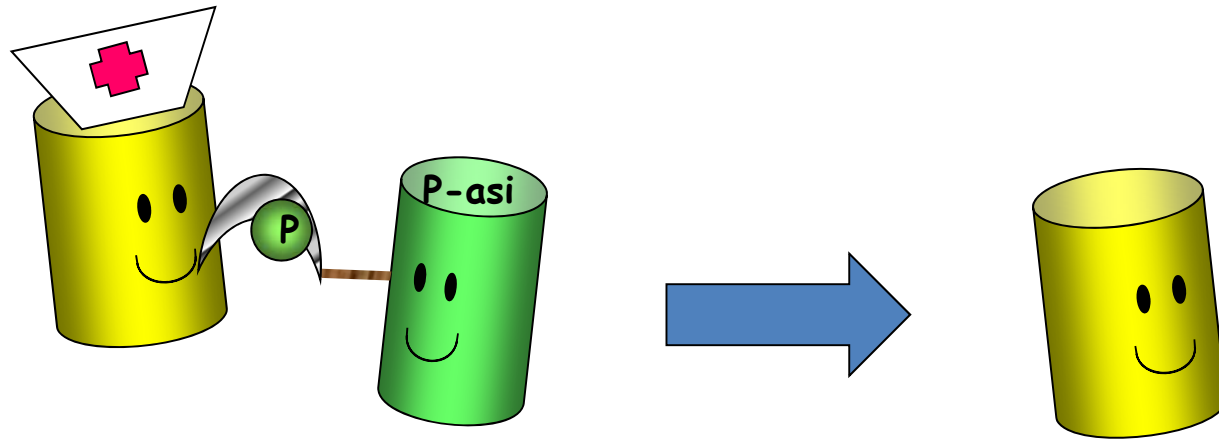
Lo stallo del ribosoma provoca un
cambiamento della conformazione del
messenger, che espone SD2

La traduzione di *ermC* può essere portata a compimento da
un altro ribosoma non legato dall'eritromicina o già metilato

Stimoli ambientali possono modificare l'attivatore, ottenendo una forma attiva, attraverso un SISTEMA A DUE COMPONENTI



**L'attivatore viene poi
disattivato da una fosfatasi**



**In questo modo la cellula può rispondere a nuovi stimoli e
cessa di rispondere quando lo stimolo viene a mancare**

**Nella maggior parte dei casi questo
tipo di regolazione è positiva**