

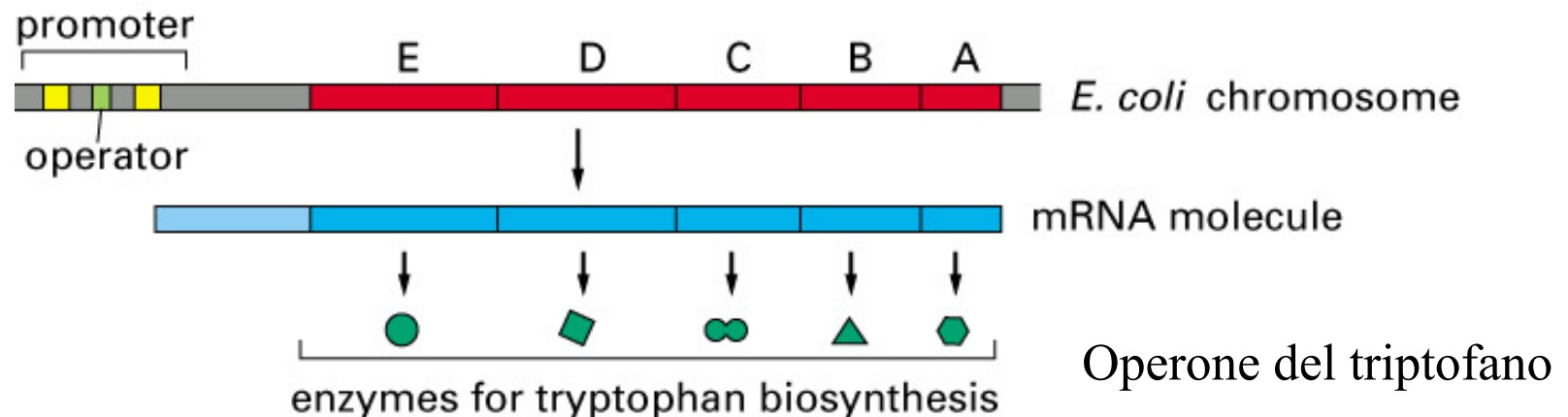
Controllo dell'espressione genica: procarioti

Regolazione dell'espressione nei procarioti

Quello più frequente è a livello trascrizionale.

Vantaggi: risparmio di energia, accoppiamento trascrizione/traduzione, 1 gene molte copie di RNA, ecc.

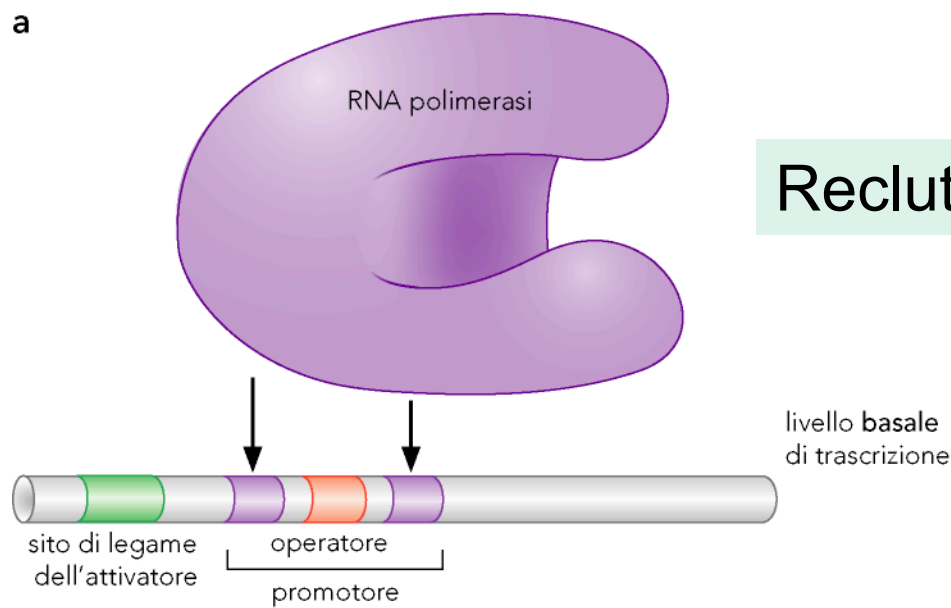
Svantaggi: successivamente può avvenire in più punti e può essere più efficiente, successivamente può ridurre i tempi di risposta, ecc.



I principi della regolazione trascrizionale

- Nei batteri i geni sono controllati principalmente da molecole dell'ambiente, che agiscono su proteine regolatrici: **attivatori** o **repressori**.
- Il repressore si lega **all'operatore** sul DNA
- L'attivatore si lega ad un sito vicino al promotore ed aiuta il **reclutamento** della RNA polimerasi.
- Alcuni attivatori agiscono con meccanismo **allosterico**, inducendo il passaggio da complesso chiuso ad aperto

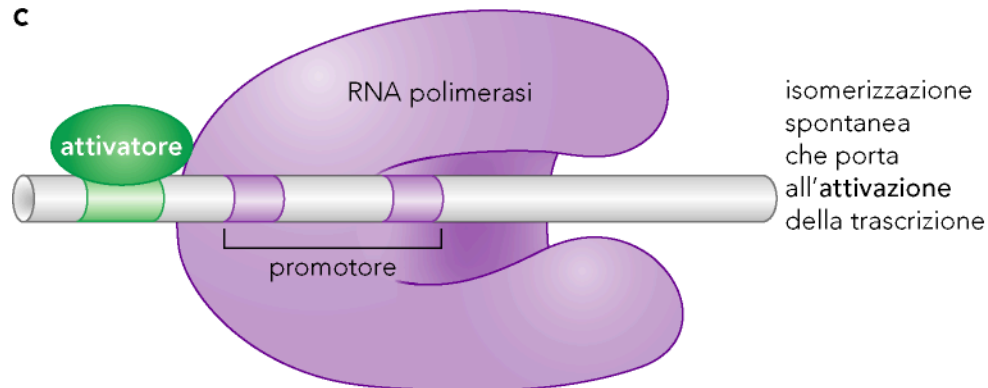
a



b



c

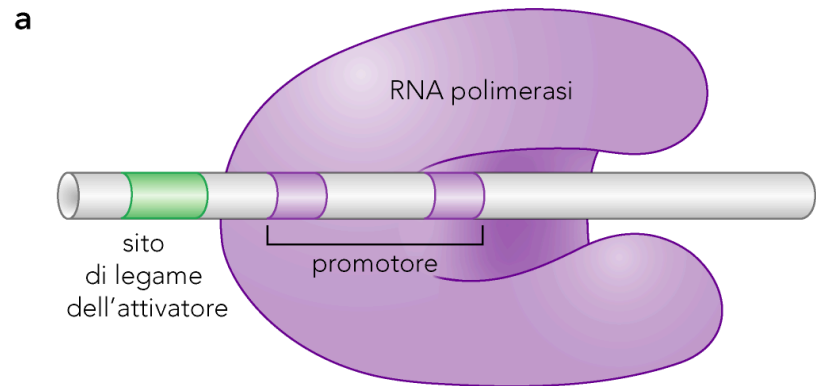


Reclutamento della RNA polimerasi

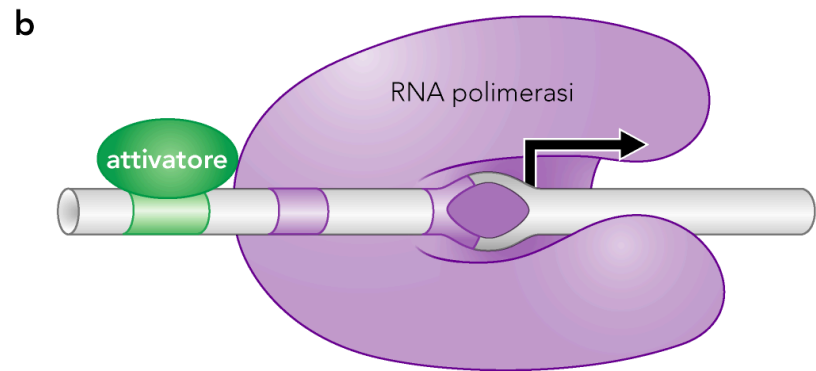
In assenza di attivazione e di repressione la RNA polimerasi si lega occasionalmente al promotore ed inizia un basso livello di espressione, livello **basale**.

Il legame del **repressore** alla sequenza dell'operatore blocca il legame delle RNA polimerasi e quindi inibisce la trascrizione.

Il legame dell'**attivatore** porta ad elevati livelli di trascrizione (attivazione per **reclutamento** o per attivazione **allosterica**).



non si ha isomerizzazione spontanea e quindi non c'è trascrizione



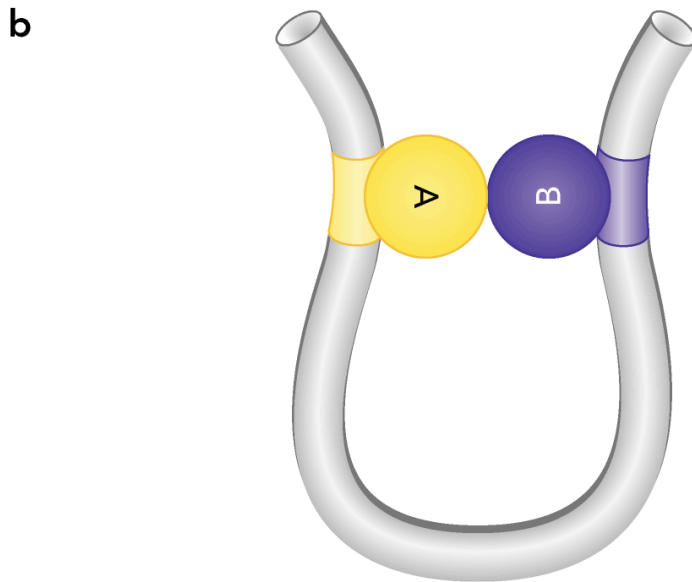
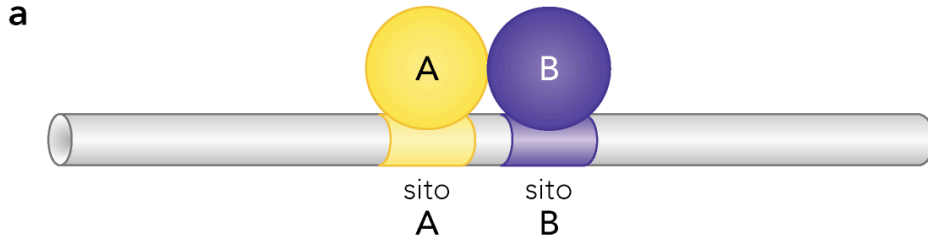
attivazione della trascrizione

Il **reclutamento** delle RNA polimerasi da parte dell'attivatore porta ad un aumento della trascrizione.

Attivazione **allosterica** della RNA polimerasi.

La RNA polimerasi è legata al promotore in un complesso chiuso stabile.

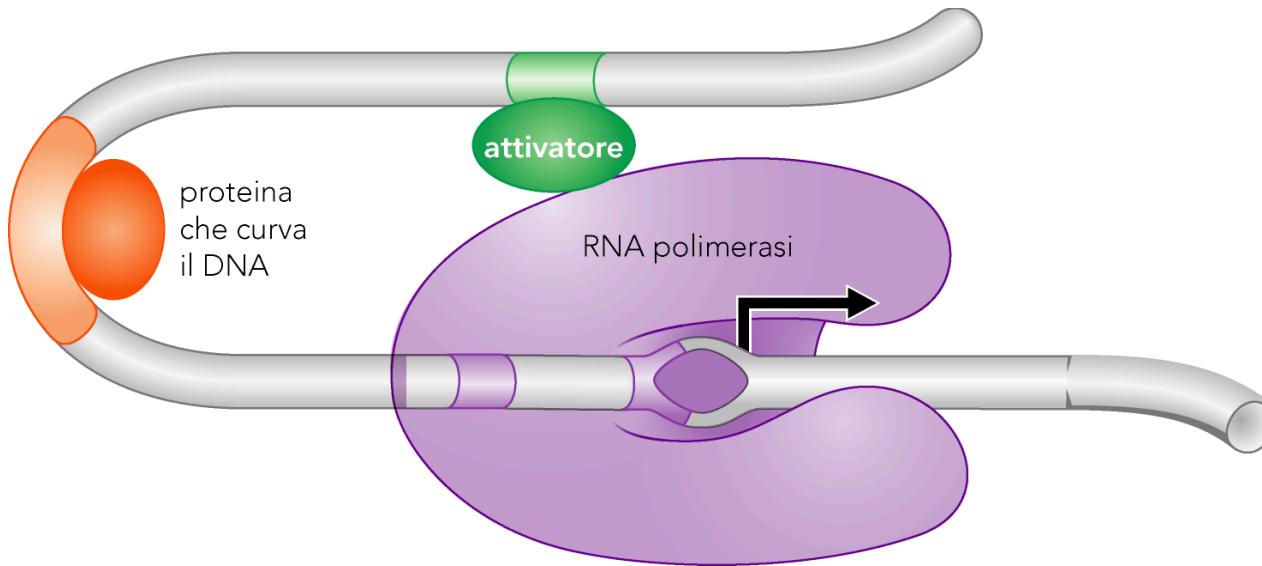
L'attivatore interagisce con la polimerasi promuovendo la transizione a complesso aperto ed elevati livelli di trascrizione.



L'interazione tra
proteine legate al
DNA.

Il legame cooperativo
tra proteine legate a
siti adiacenti.

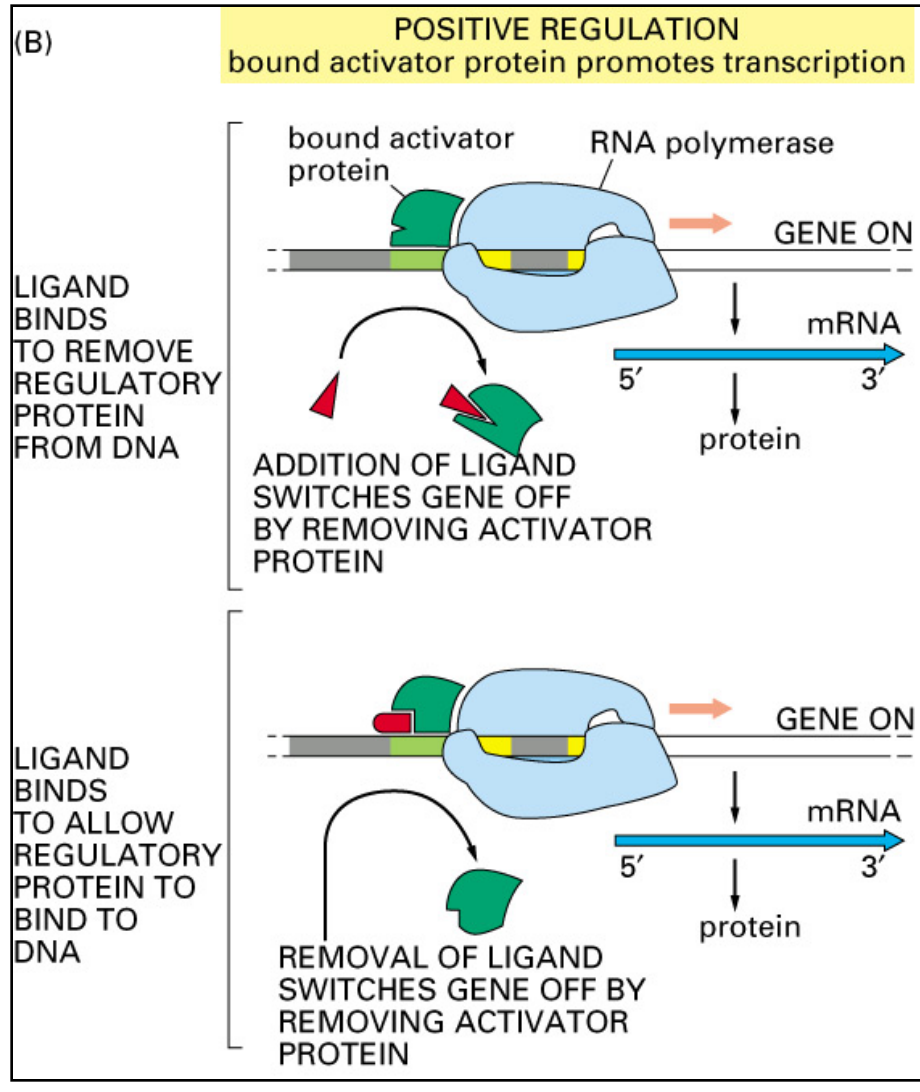
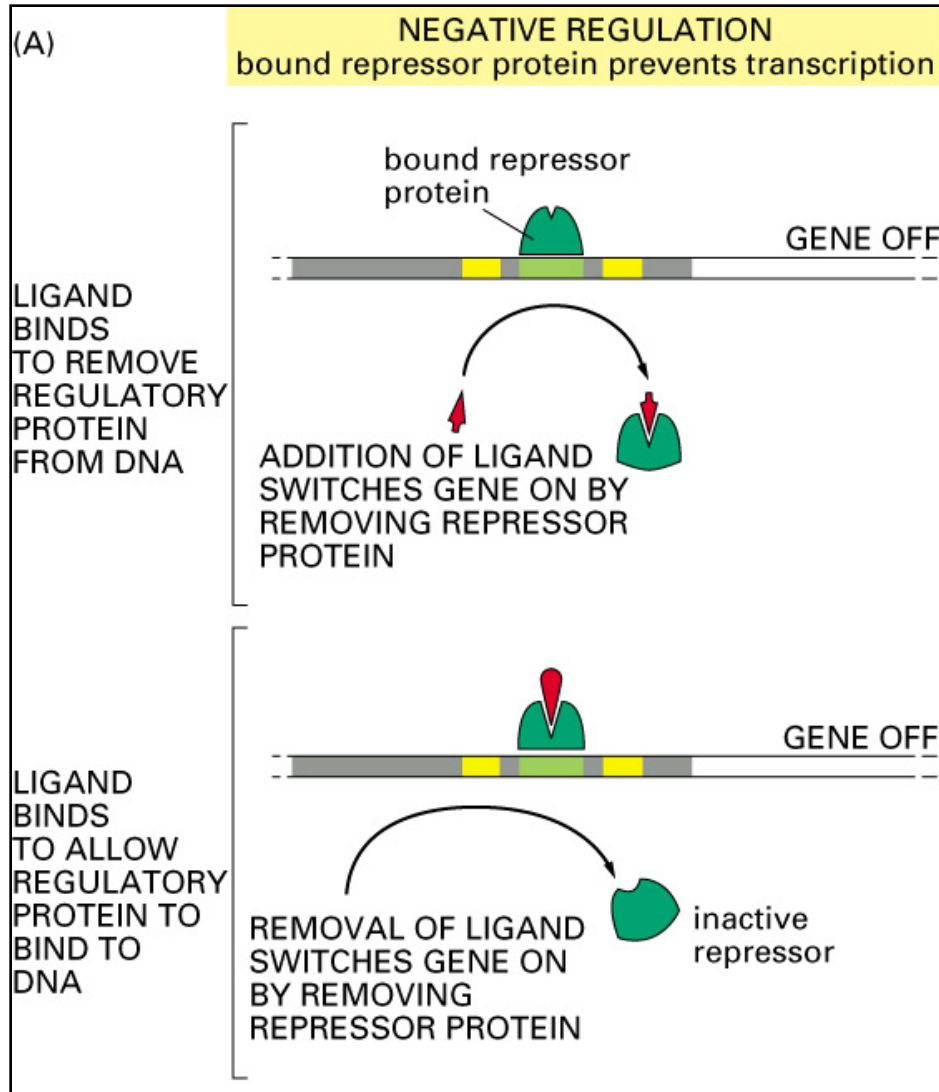
Legame cooperativo
tra proteine
posizionate su siti
distanti.



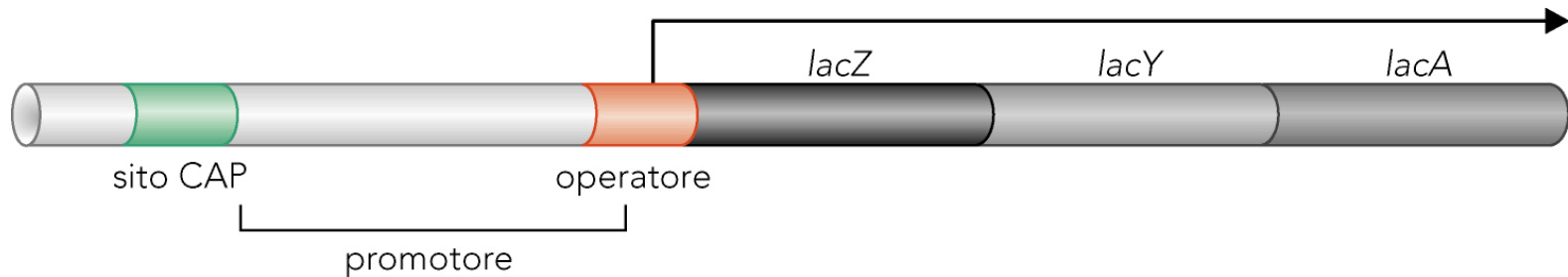
Una proteina che curva il DNA (architettónica) può facilitare l'interazione tra due proteine che legano il DNA.

Una proteina che curva il DNA si lega su di un sito collocato tra il sito di legame dell'attivatore ed il promotore. Questo legame avvicina nello spazio due siti e quindi favorisce l'interazione tra l'attivatore legato al DNA e la polimerasi.

Procarioti: meccanismi di controllo

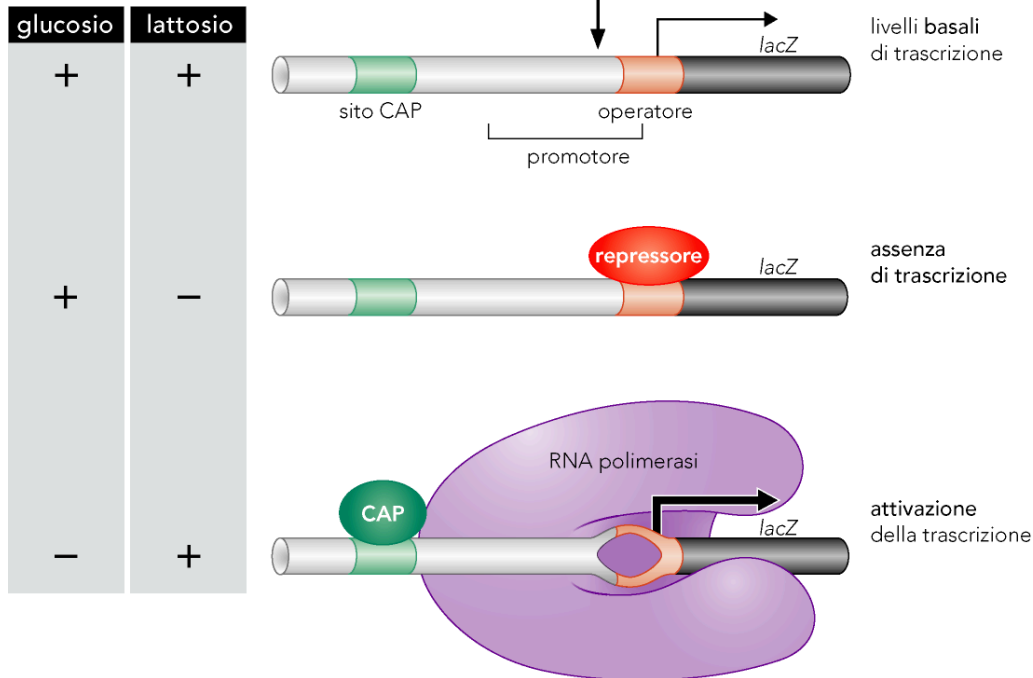


Operone Lac



- L'operone di Lac contiene tre geni: ***lacZ***: β -galattosidasi, ***lacY***: permeasi del lattosio, ***lacA***: trigalattoside transacetilasi. Servono per incorporare il lattosio e scinderlo in galattosio e glucosio che vengono usati come fonti di energia. La loro espressione è regolata.
- ***lacI*** (un altro gene presente vicino agli altri) è regolato costitutivamente e codifica per il **repressore Lac** che lega il DNA in assenza di **lattosio**.
- Anche **CAP (Catabolite Activator Protein)** regola l'operone. È un recettore di cAMP, un attivatore che lega il DNA solo in assenza di **glucosio**, quando cAMP è alto.

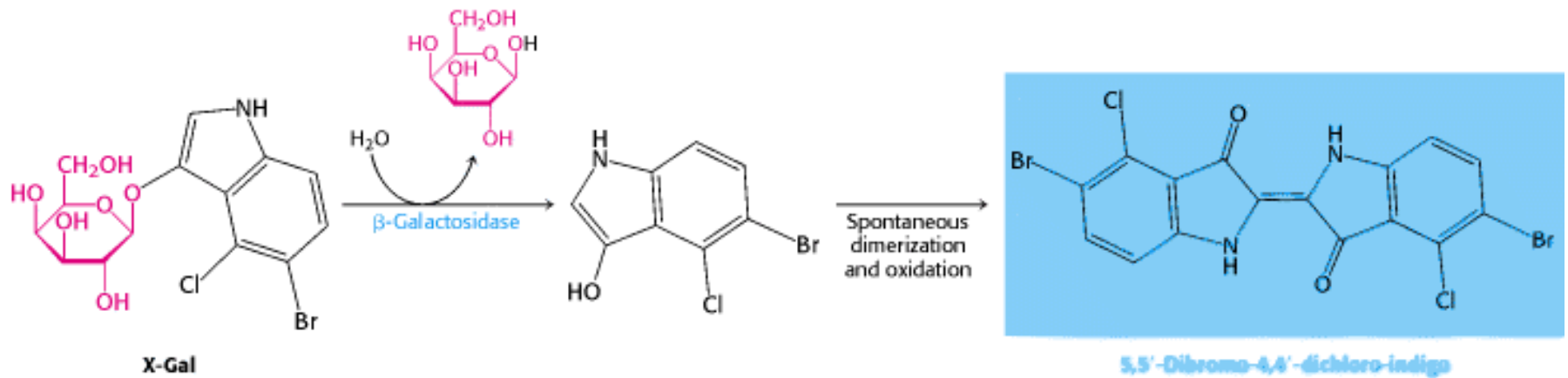
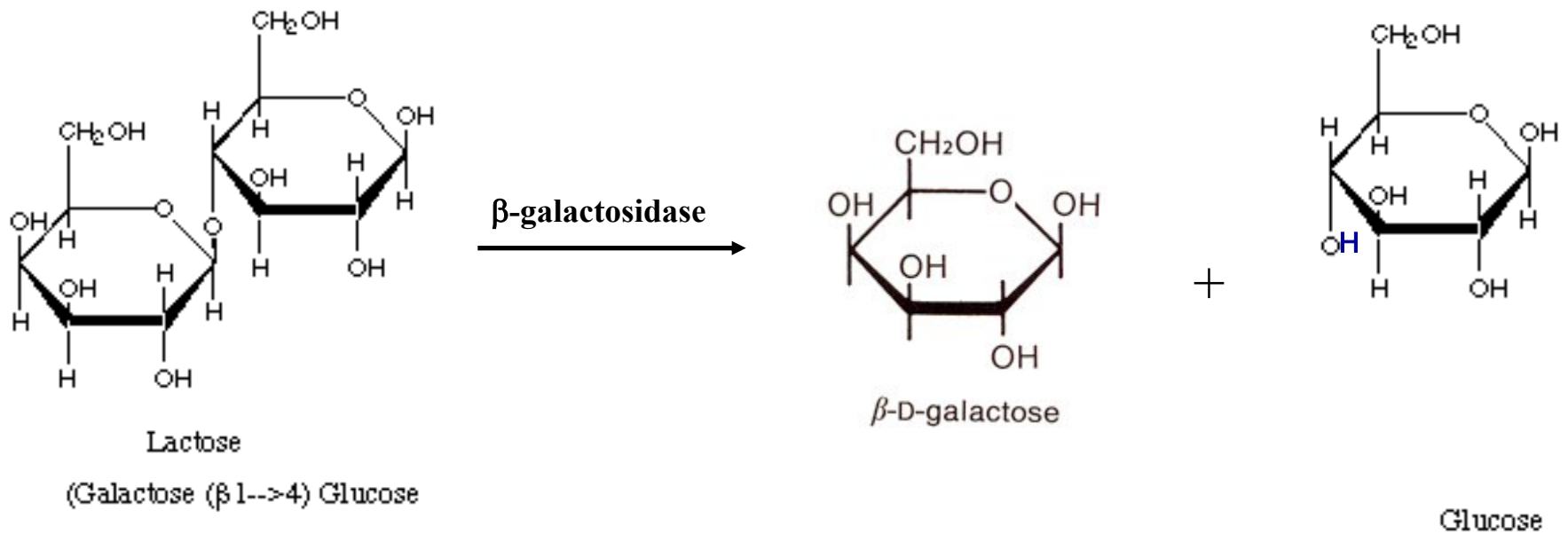
L'espressione dei geni lac



La presenza o l'assenza degli zuccheri **lattosio** e di **glucosio** controlla il livello di espressione dei geni lac. La presenza del lattosio e l'assenza della preferenziale forma di energia, il glucosio, determina elevati livelli di espressione.

Quando è legato all'operatore il **repressore Lac** esclude la **polimerasi**, indipendentemente dalla presenza di CAP attivo.

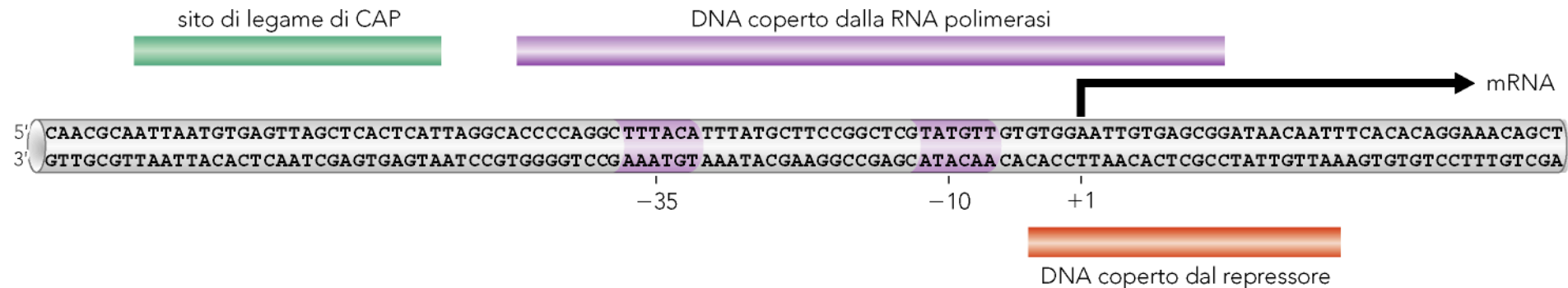
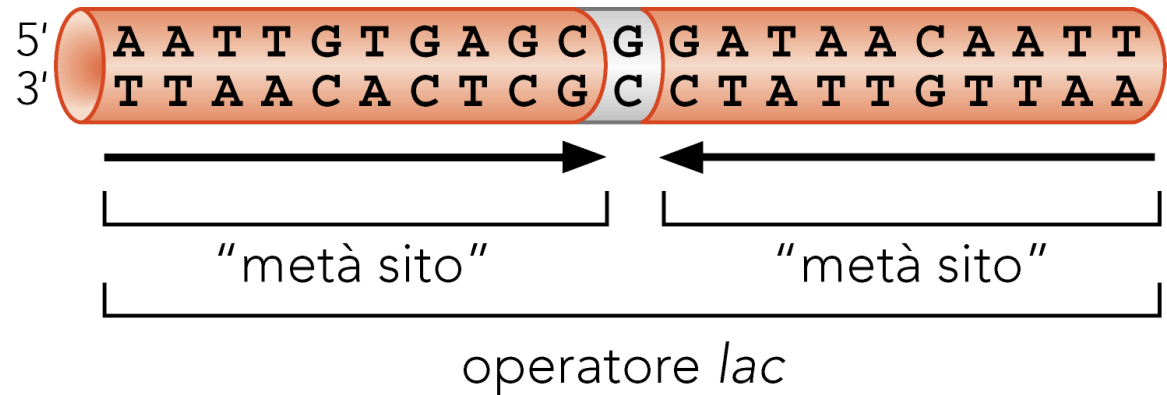
CAP porta la **polimerasi** sul promotore lac dove va incontro ad una isomerizzazione spontanea a complesso aperto.



Following the β -Galactosidase Reaction. The galactoside substrate X-Gal produces a colored product on cleavage by β -galactosidase. The appearance of this colored product provides a convenient means for monitoring the amount of the enzyme both in vitro and in vivo.

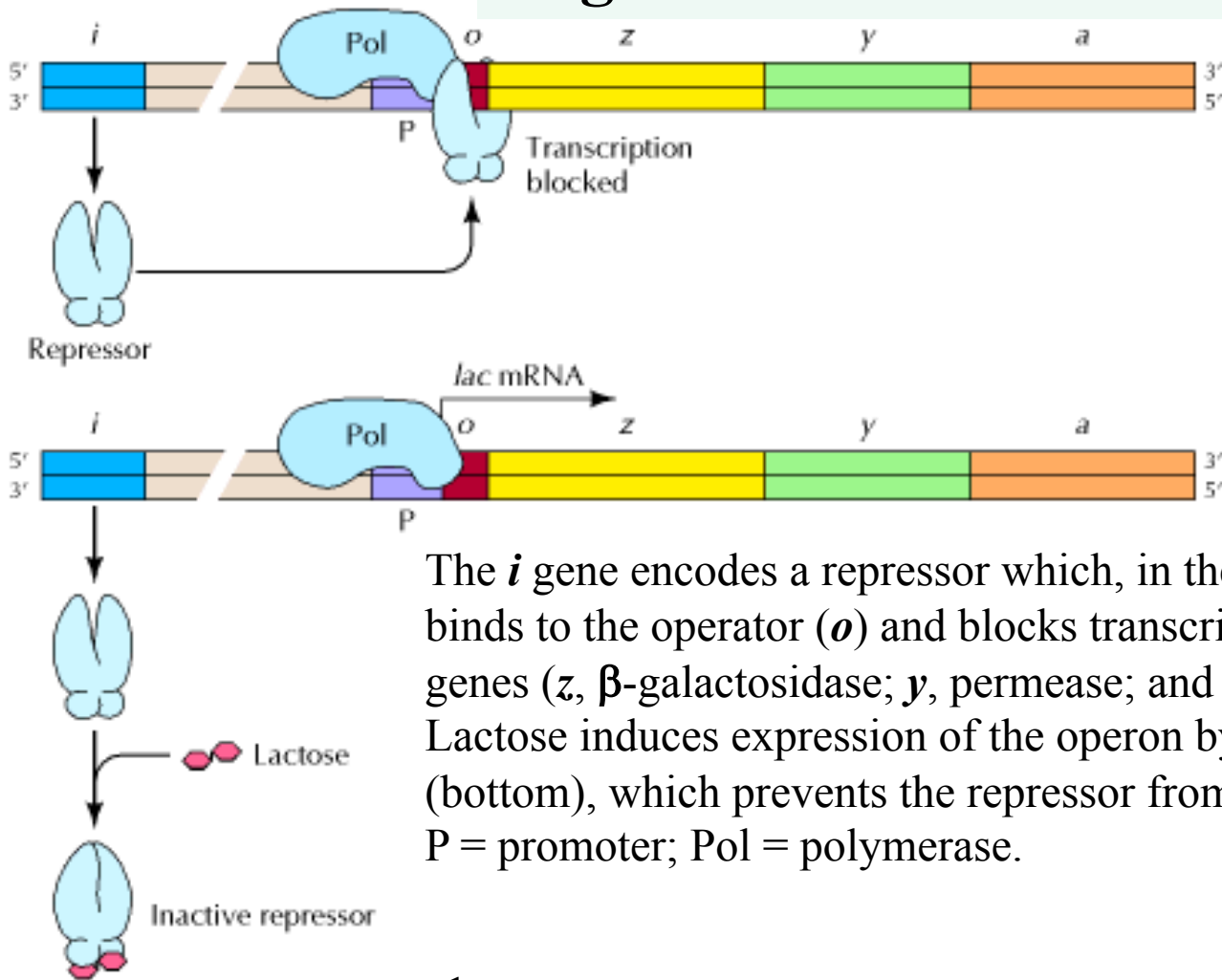
La regione di controllo dell'operone lac

Le due metà
simmetriche
dell'operatore lac



Sono mostrate le sequenze nucleotidiche e l'organizzazione della regione di controllo dell'operone lac. Le barre colorate sotto e sopra indicano le regioni coperte dalla RNA polimerasi e dalle proteine regolatrici. Il **repressore lac** copre più DNA della sequenza definita come il minimo sito di legame dell'operatore, e la RNA polimerasi copre più DNA di quello definito dalle sequenze che formano il promotore.

Negative control of the *lac* operon

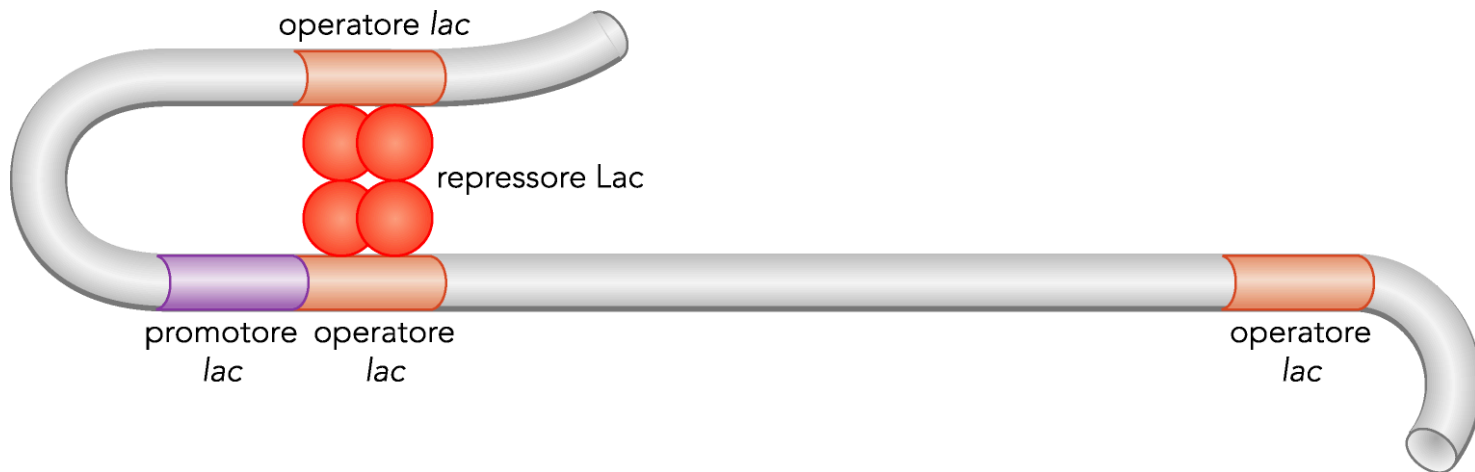


The *i* gene encodes a repressor which, in the absence of lactose (top), binds to the operator (*o*) and blocks transcription of the three structural genes (*z*, β -galactosidase; *y*, permease; and *a*, transacetylase). Lactose induces expression of the operon by binding to the repressor (bottom), which prevents the repressor from binding to the operator. P = promoter; Pol = polymerase.



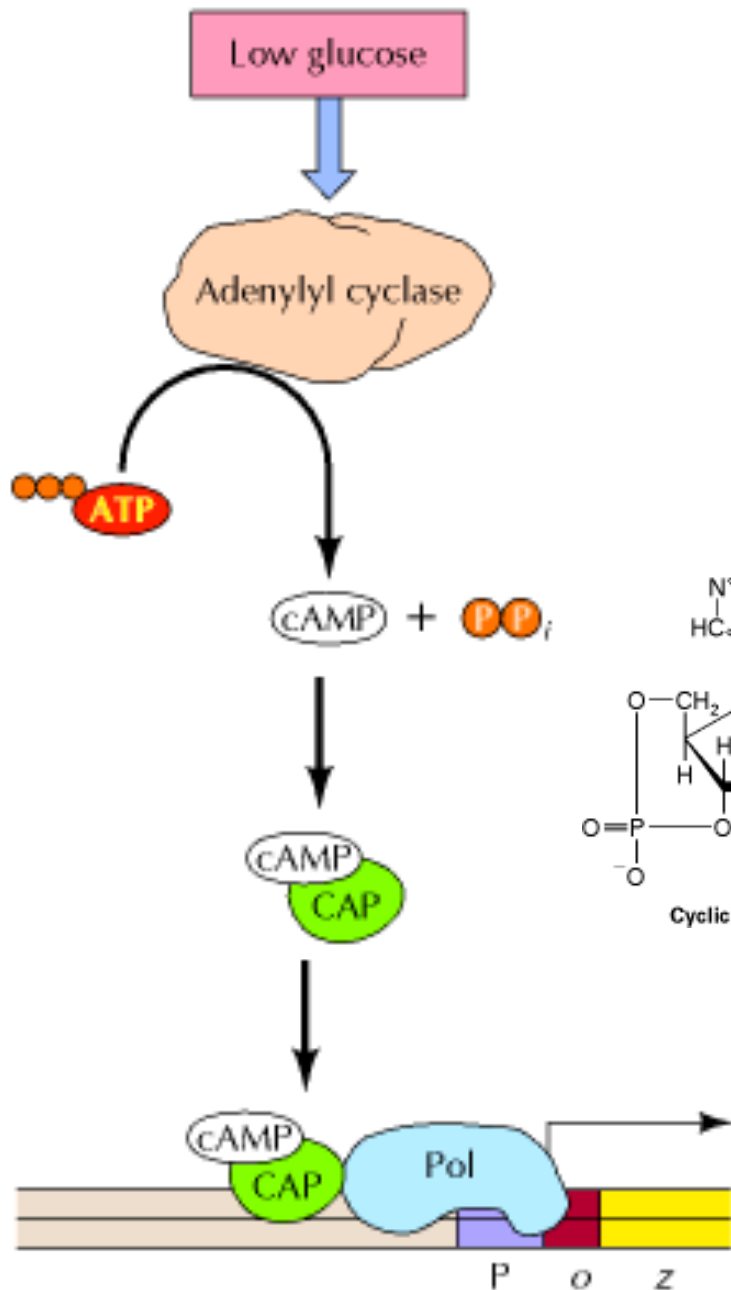
The nearly palindromic operator sequence

Il repressore lac si lega ai due operatori come tetramero

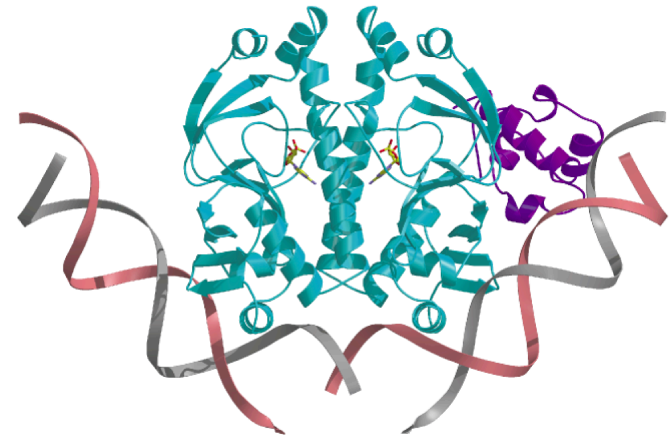
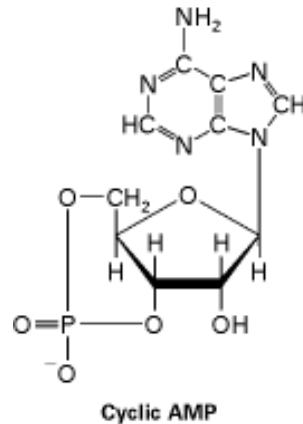


L'ansa si forma tra il repressore legato all'operatore principale e quello a monte, ausiliario a 90 bp.
Un'ansa del tutto simile si può formare in alternativa con un operatore a valle, a 400 bp

Positive control of the *lac* operon by glucose



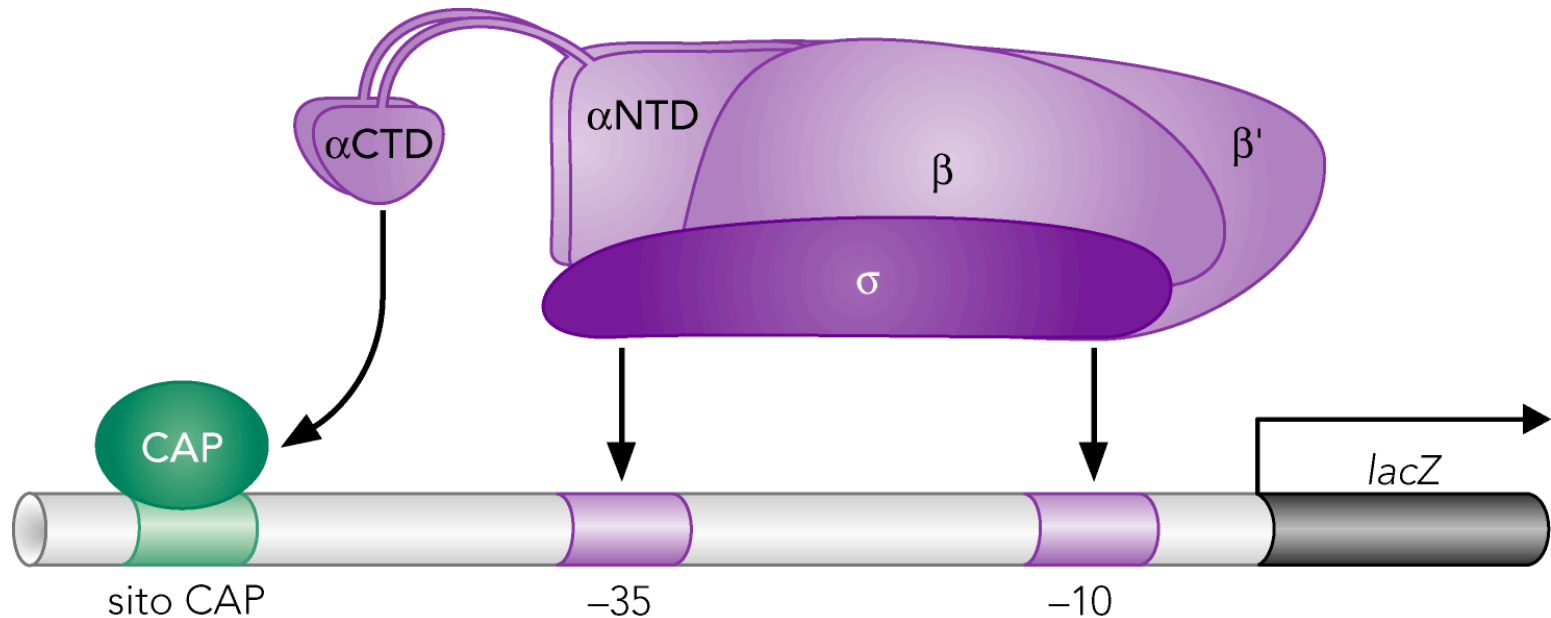
Low levels of glucose activate adenylyl cyclase, which converts ATP to cyclic AMP (cAMP). Cyclic AMP then binds to the catabolite activator protein (CAP) and stimulates its binding to regulatory sequences of various operons concerned with the metabolism of alternative sugars, such as lactose. CAP interacts with the α subunit of RNA polymerase to activate transcription.



Struttura del complesso CAP-alfa CTD-DNA

CAP è mostrato legato al suo sito sotto forma di dimero. Inoltre viene mostrato l'alfa-CTD della RNA polimerasi legata ad un pezzo di DNA adiacente e mentre interagisce con il CAP. CAP è in turchese, alfa-CTD in viola. Ad ogni molecola di CAP è legata una molecola di ATP.

L'attivazione del promotore lac da parte di CAP



Il legame dell'RNA polimerasi al promotore lac con l'aiuto di **CAP**. Il CAP è riconosciuto dalla CTD della subunità alfa. Quando interagisce con il CAP l'alfa-CTD contatta anche il DNA adiacente al sito CAP.

L'attività di Lac repressor e CAP sono regolate **allostericamente**

- Il lattosio si trasforma in allolattosio e si lega al lac repressor.
- **In assenza di allolattosio il repressore è attivo**, e si lega al DNA
- Il legame con allolattosio ne fa cambiare la conformazione, che non è più competente a legare il DNA. Il sito di legame è diverso da quello del DNA.
- La presenza di glucosio mantiene bassa la concentrazione di cAMP.
- **A basse conc. di glucosio il cAMP aumenta, si lega a CAP** e lo rende competente a legare il DNA, e ad agire da attivatore.
- CAP regola vari altri geni, tra cui quelli dell'operone Galattosio.

Duplicate controllo dell'operon di lac

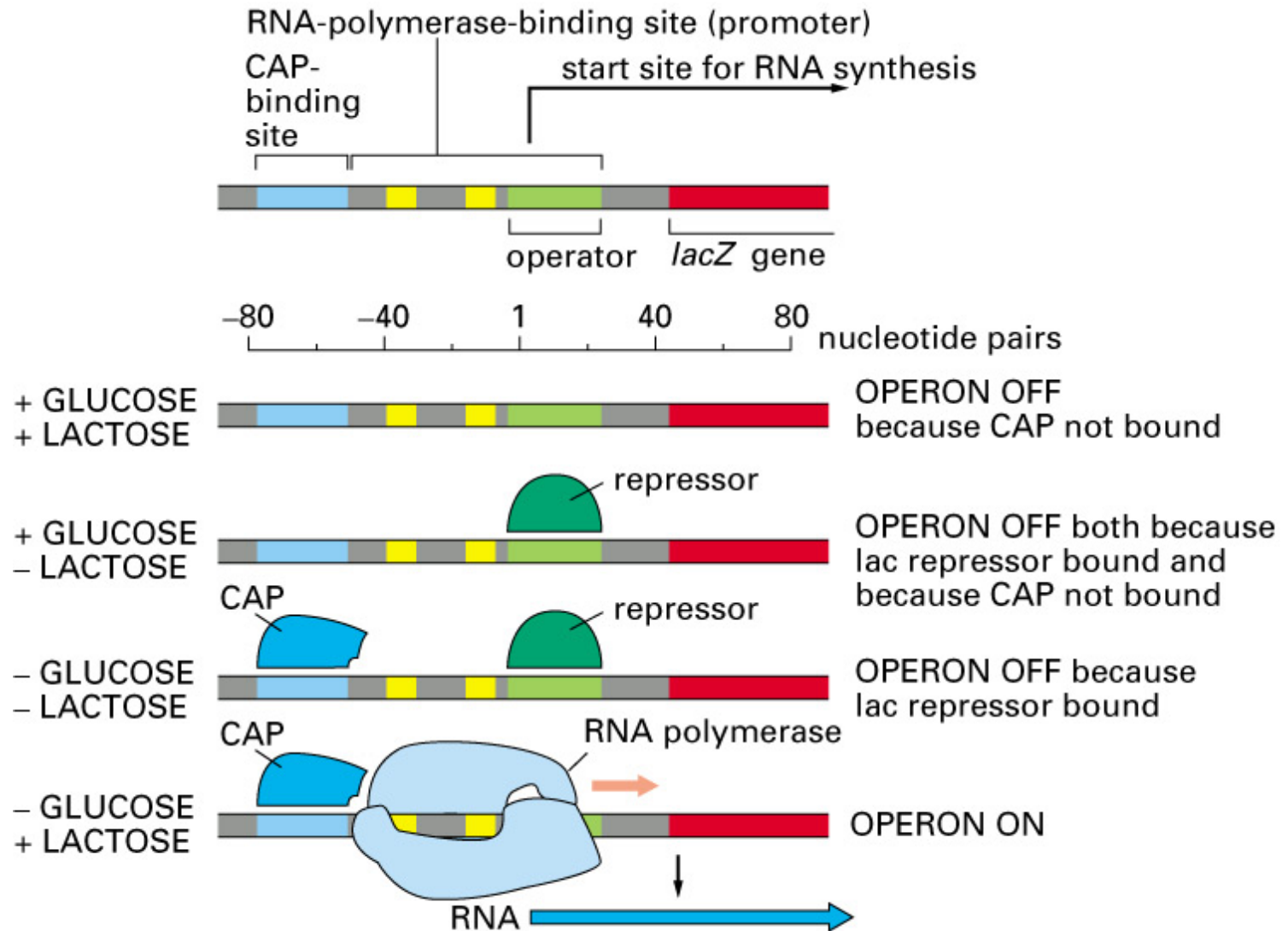


Figure 7-38. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1965



Photo from the Nobel Foundation archive.

François Jacob

Prize share: 1/3



Photo from the Nobel Foundation archive.

André Lwoff

Prize share: 1/3



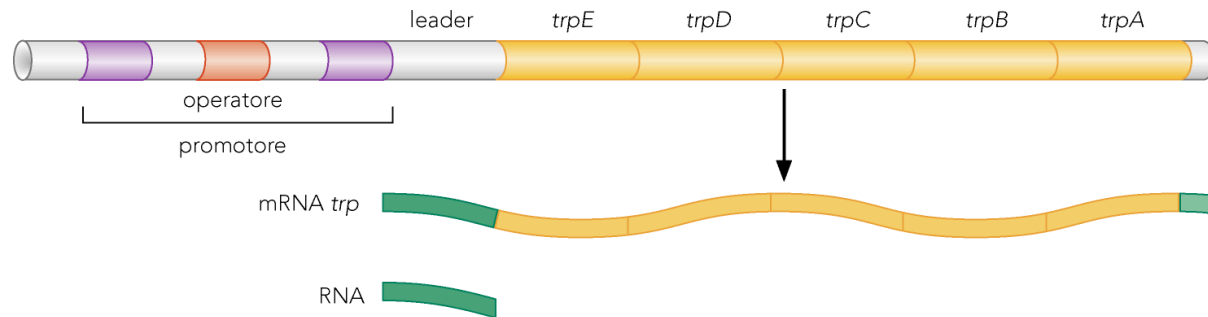
Photo from the Nobel Foundation archive.

Jacques Monod

Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1965 was awarded jointly to François Jacob, André Lwoff and Jacques Monod "for their discoveries concerning genetic control of enzyme and virus synthesis."

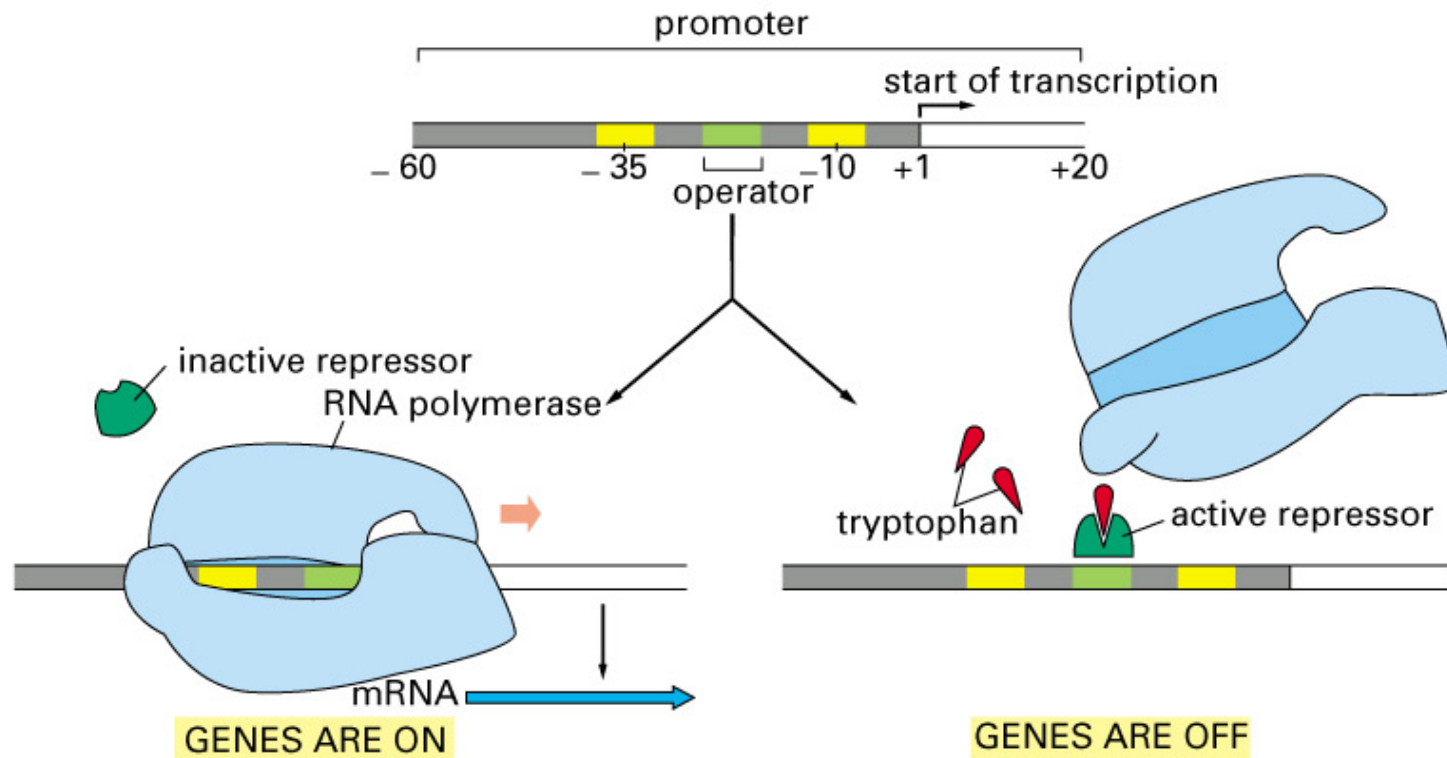
L' operone del triptofano



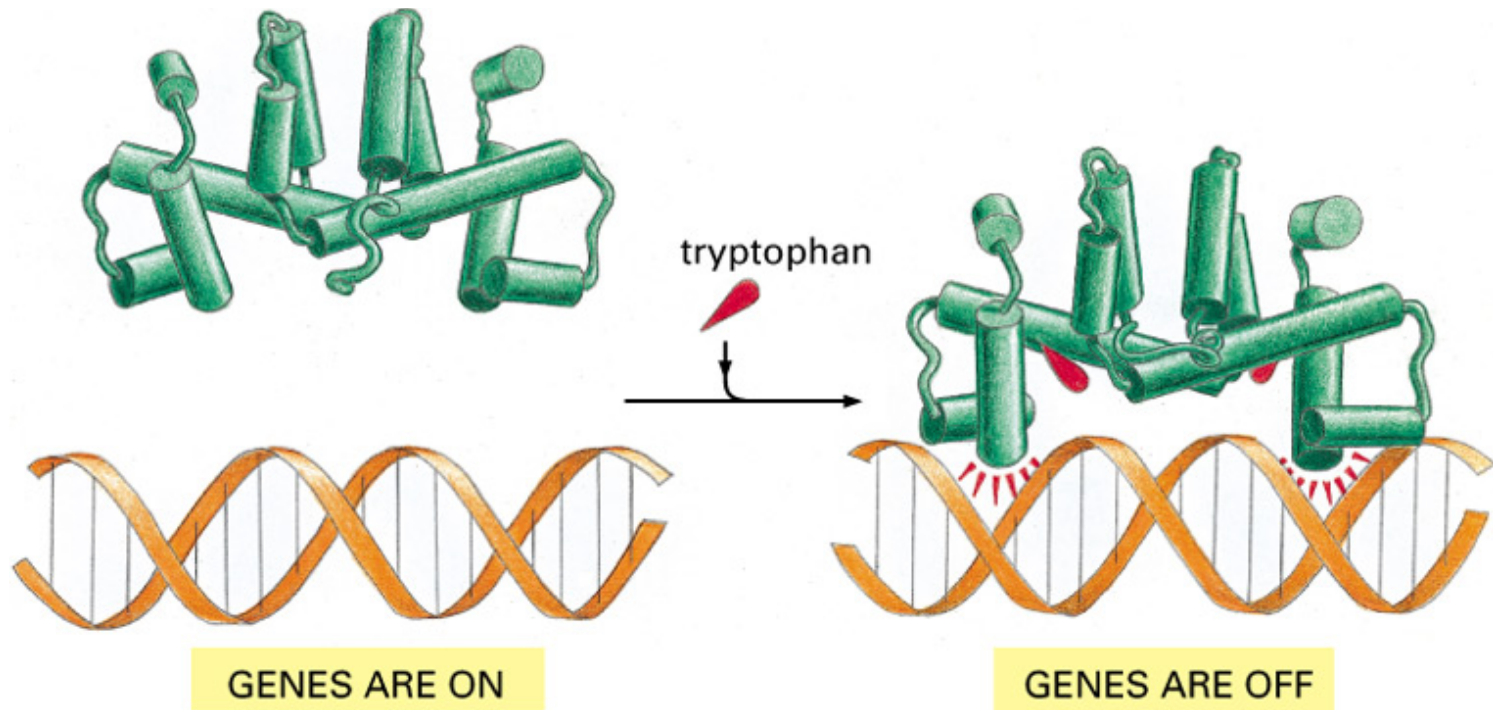
La regolazione dell' operone del triptofano (che contiene i geni per cinque enzimi necessari alla biosintesi di questo amminoacido + sequenza leader) è basata su 2 meccanismi:

- 1) **Repressione:** una proteina repressore che viene attivata solo dalla presenza di triptofano, con cui interagisce in modo utile a legarsi alla sequenza bersaglio sul promotore dell' operone bloccando la trascrizione,
- 2) **Attenuazione:** è esclusivo dei procarioti in quanto opera in modo concertato tra trascrizione e traduzione.

L' operone del triptofano: repressione



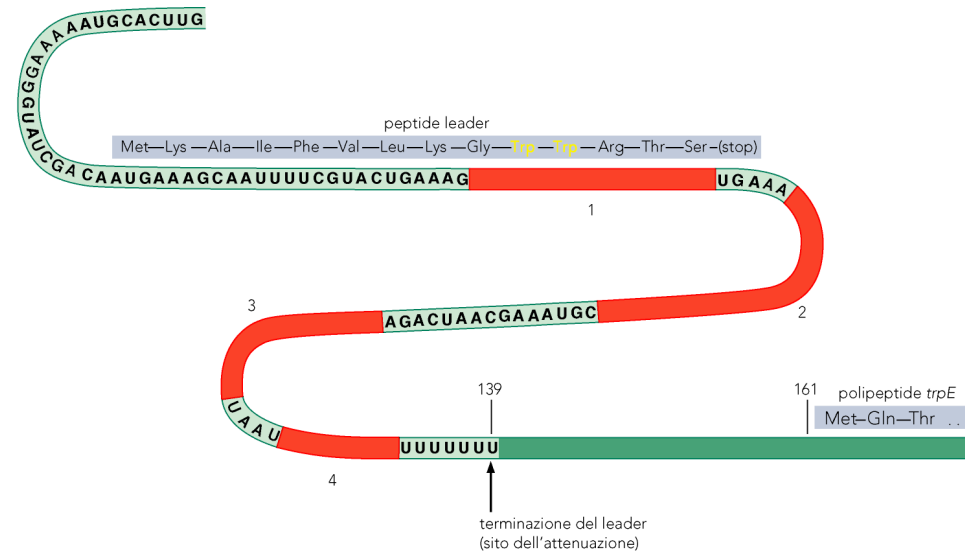
Trp si lega al Trp-repressor



Il legame con Trp determina un cambiamento conformazionale

La attenuazione

- Esiste una regolazione più fine
- Molti trascritti terminano prematuramente, prima del gene *trpE*. Solo la **sequenza leader** viene tradotta. Essa è seguita da un **terminatore della trascrizione**
- Ci sono 4 sequenze complementari nel mRNA 1, 2, 3 e 4. Esse si possono appaiare diversamente
- L'RNA ha una ORF di 14 amino acidi, con una forte RBS e che codifica per 2 *trp*.

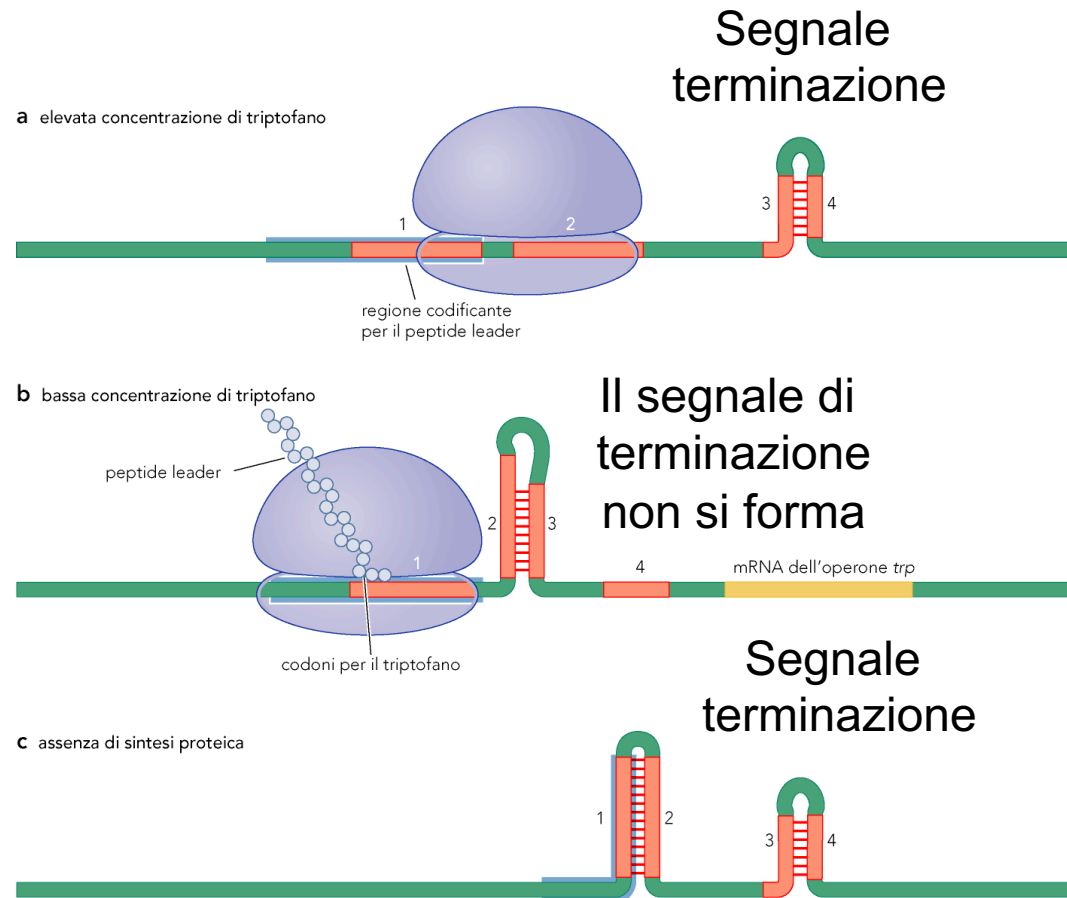


La attenuazione

In condizioni di **elevata concentrazione** di triptofano la sequenza 3 si appaia con la sequenza 4 costituendo la hairpin di **terminazione della trascrizione**.

In condizioni di **bassa concentrazione** di triptofano il ribosoma si blocca sugli adiacenti codoni per il triptofano permettendo alla sequenza 2 di appaiarsi con la 3 e quindi impedendo la formazione della forcine di terminazione 3 e 4. Quindi la trascrizione può continuare.

In **assenza di sintesi proteica** poiché il ribosoma non inizia la traduzione della AUG del peptide leader si forma una forcina appaiando le sequenze 1 e 2 e quindi non si forma quella data dalle sequenze 2 e 3 ne consegue che si forma una **forcina con le sequenza 3 4** e gli enzimi per trp non sono espressi .





Leader peptide for attenuation of Trp operon



Figure 31-35
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

Leader peptides for attenuation of Thr, Phe and His operons

Il batteriofago λ

E' un batteriofago che infetta *Escherichia coli*.

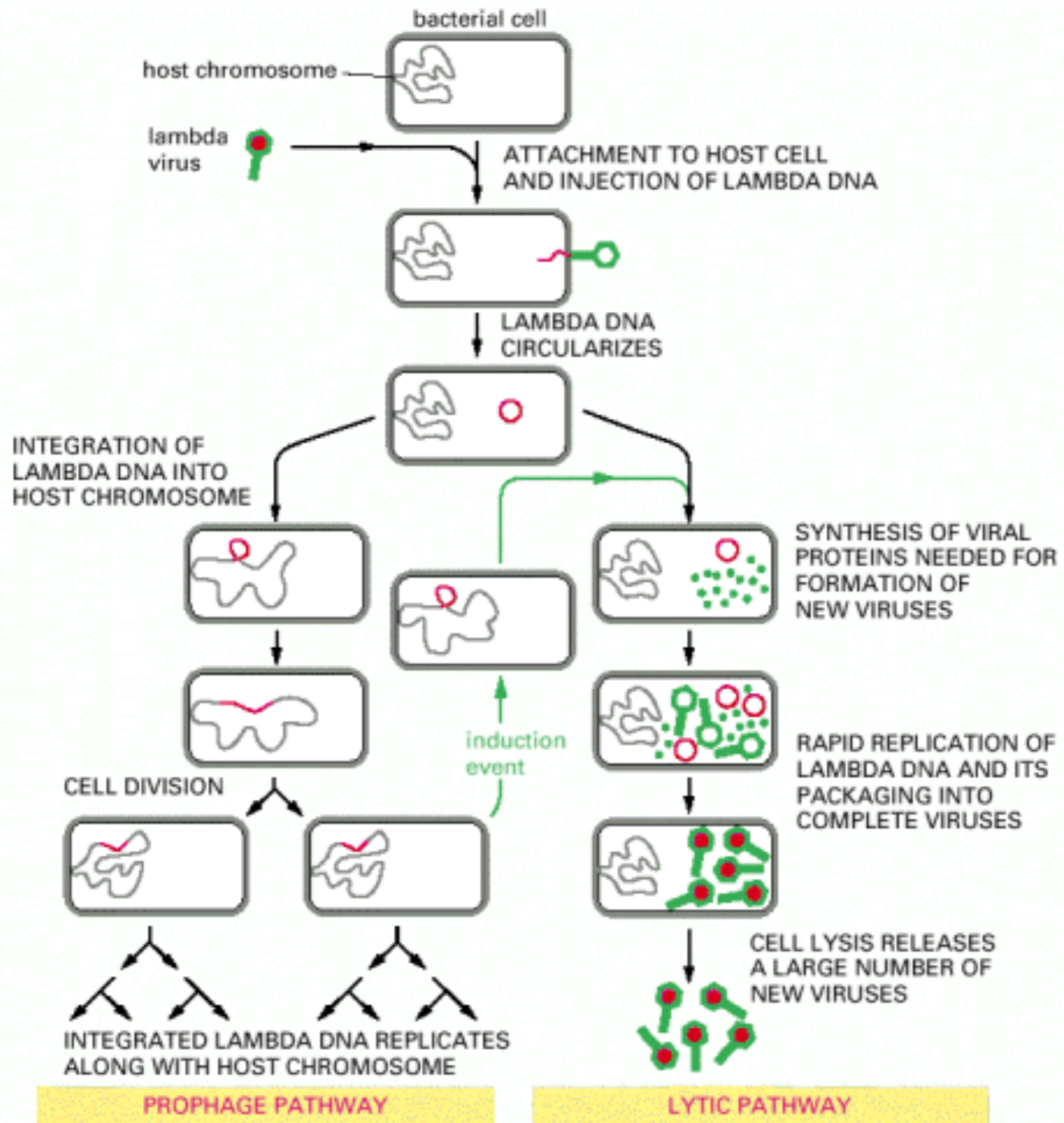
E' costituito dal **genoma di DNA lineare a doppio filamento** lungo circa 48500 paia di basi avvolto dentro un **capside** proteico su cui è innestata una **coda**, le cui proteine terminali servono a riconoscere la membrana della cellula infettabile al cui interno inietta il suo DNA, che subito dopo assume la forma **circolare covalentemente chiusa**.

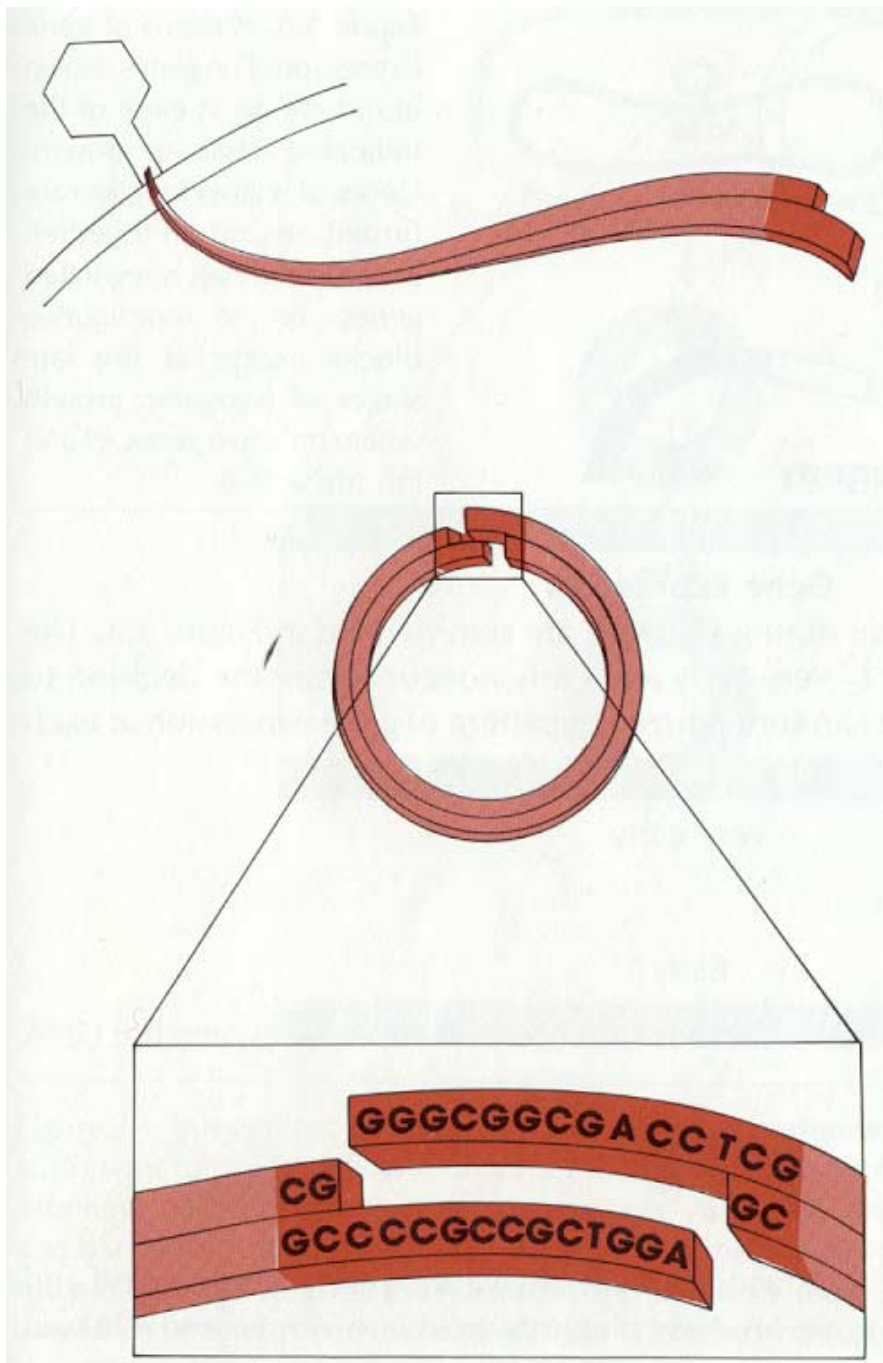
Successivamente, a seconda delle condizioni della cellula infetta può adire al **ciclo litico**, che porta alla produzione di numerose particelle fagiche figlie che si liberano all' esterno provocando la lisi del batterio, oppure può adire al **ciclo lisogenico**, in cui il suo genoma si integra in quello del batterio e rimane quiescente per un numero indefinito di repliche batteriche, per poi essere exciso in risposta a determinate condizioni ambientali e riprendere il ciclo litico.

La doppia vita del batteriofago λ

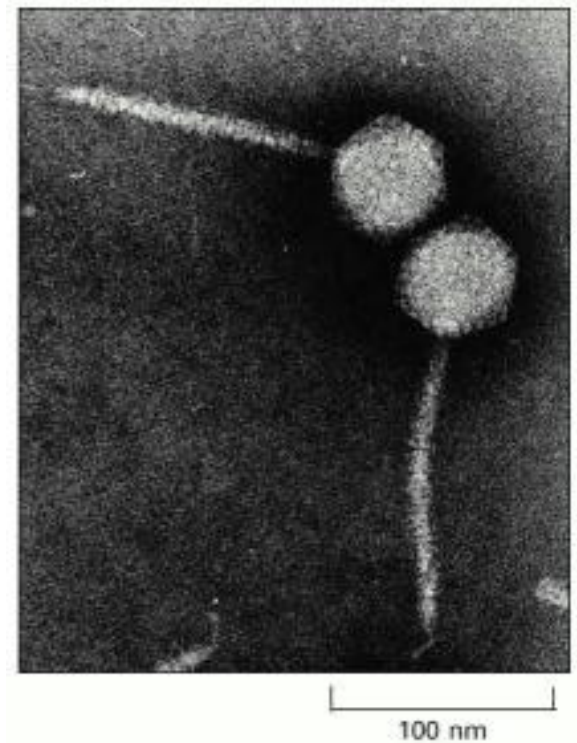
La scelta fra ciclo Litico o lisogenico Dipende dalla Diponibilità di Nutrienti.

Danno al DNA Può anche portare Alla induzione litica

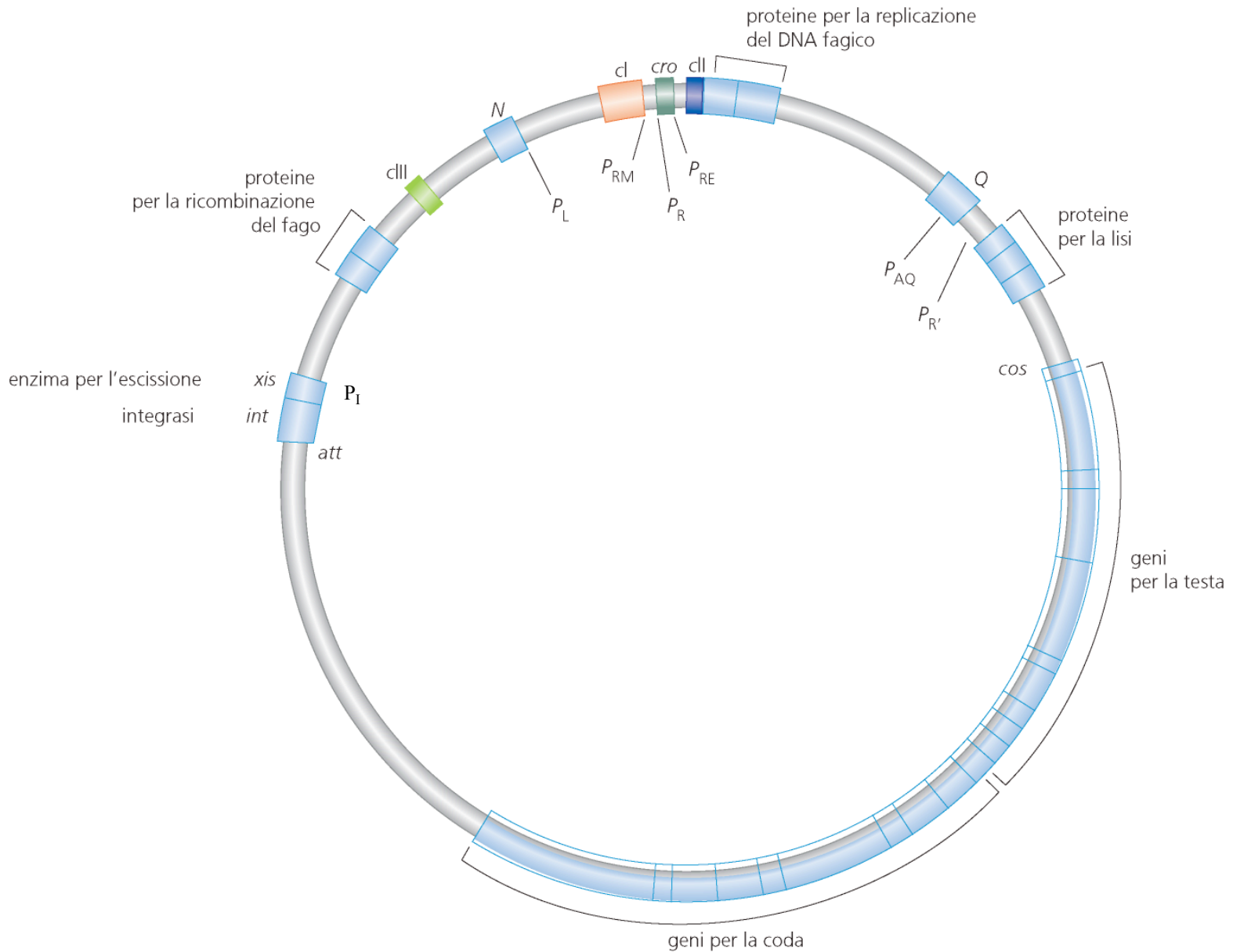




Il primo evento dopo l'infezione, ovvero l'iniezione del DNA fagico nella cellula di *E. coli*, è la circularizzazione del genoma mediante i terminali *cos* (*cohesive ends*).



Mappa circolare del batteriofago λ

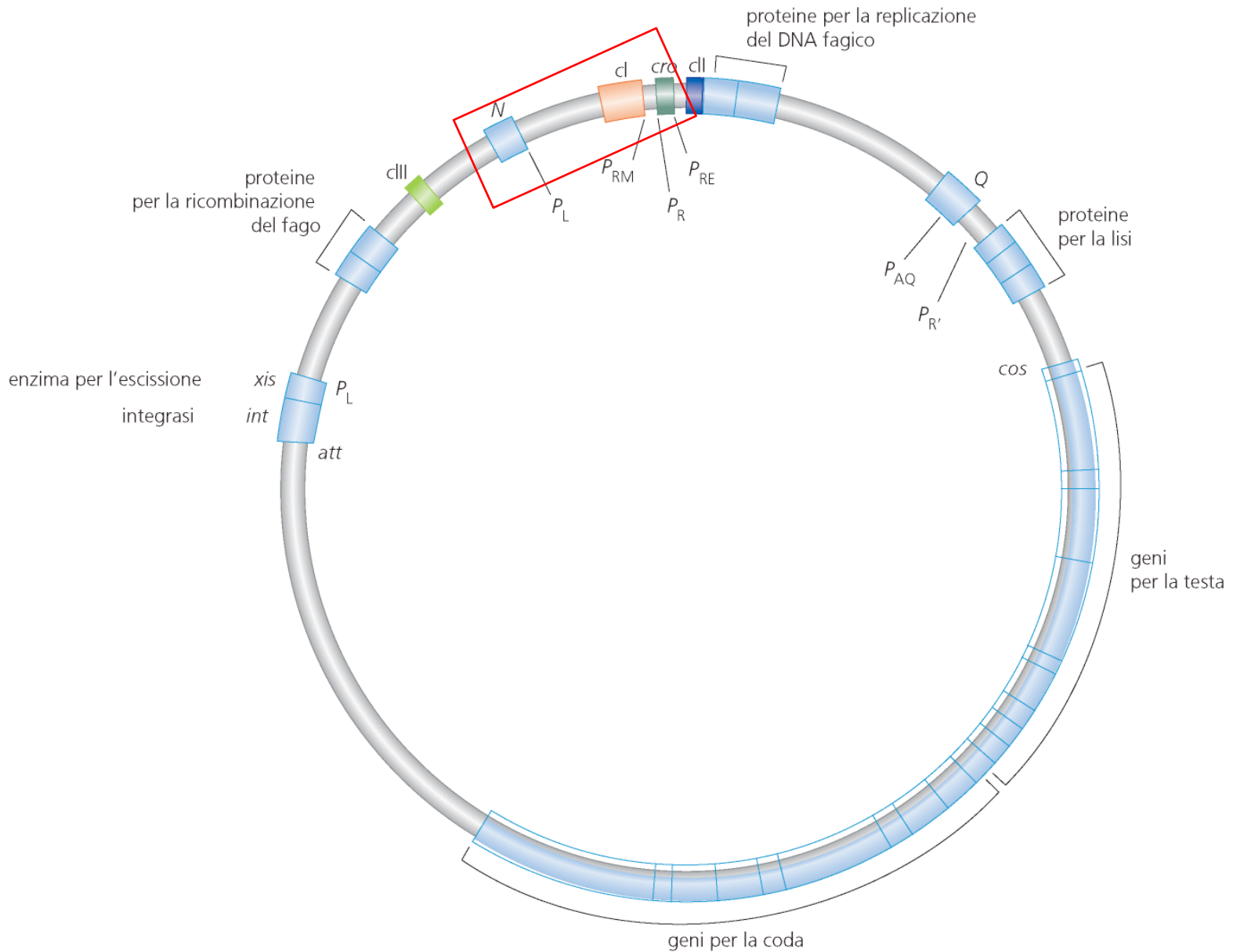


Regolazione dell'espressione genica nel batteriofago λ

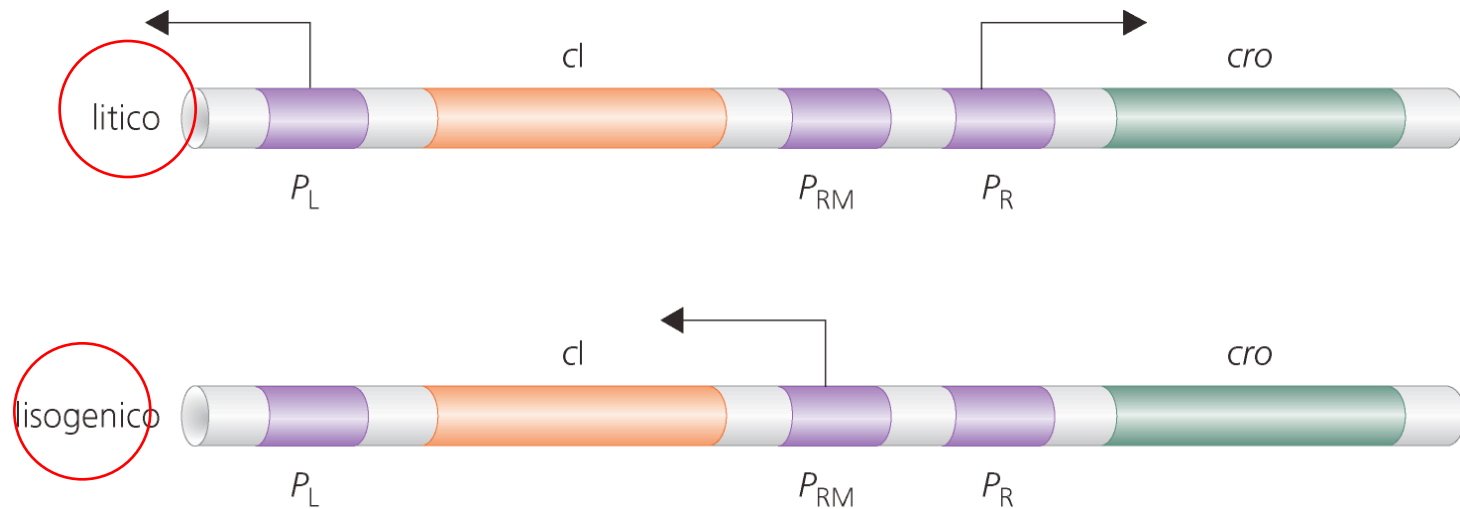
Prenderemo in considerazione i meccanismi di regolazione dell'espressione genica che stanno alla base di queste scelte:

1. Mantenimento della fase litica e lisogenica;
2. Induzione della fase litica (da quella lisogena) in seguito alla risposta di *E. coli* al danno al DNA;
3. Intraprendere la fase litica o lisogenica in funzione della numerosità dei fagi e disponibilità di nutrienti

Mappa circolare del batteriofago λ



1) la trascrizione durante la crescita litica e lisogenica

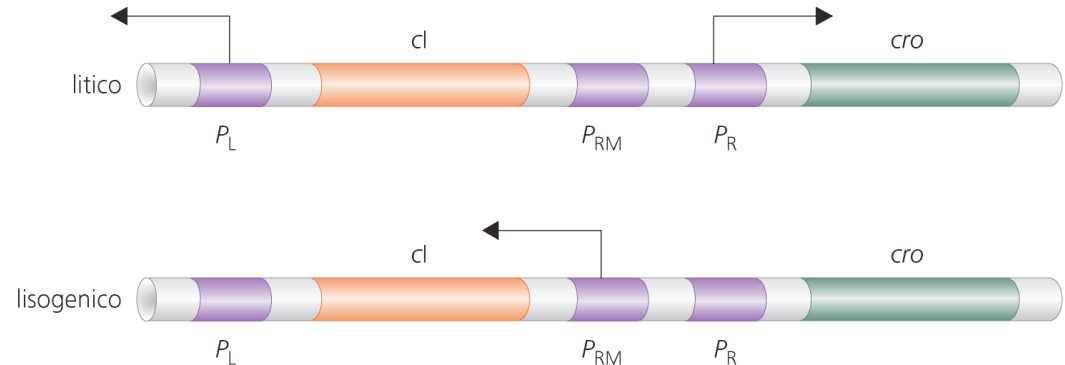
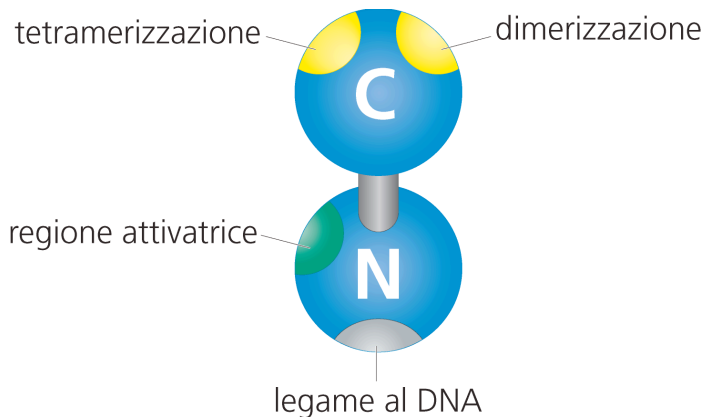


P_R e P_L sono forti e costitutivi;

P_{RM} (*promoter for the repressor maintenance*) è un promotore debole trascrive solo il gene cI , ha bisogno di un attivatore.

Come sono regolati questi promotori?

Il gene *cI* codifica per il repressore di λ

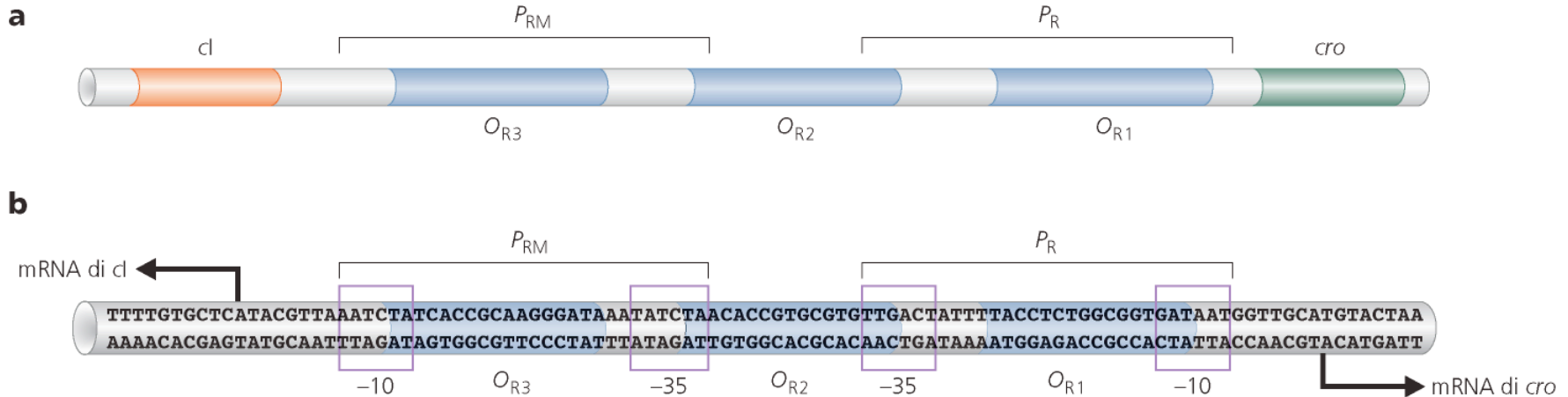


Il repressore di lambda è costituito da due domini uniti da una regione flessibile.

Si lega come **dimero**. Può funzionare sia da **repressore**, legandosi a regioni che si sovrappongono al promotore, che da **attivatore** (come CAP).

Cro (*control of repressor and other things*) funziona solo come **repressore**.

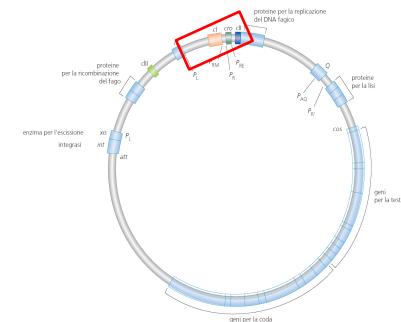
Promotori e operatori su O_R



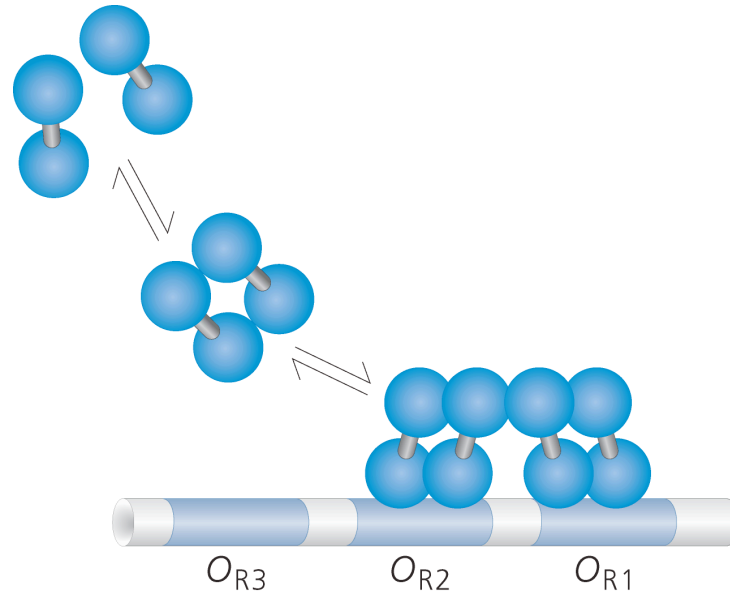
Sia il **repressore** di lambda che **Cro** possono legarsi a uno dei sei diversi operatori (tre nella regione di destra e tre a sinistra), ma con affinità diversa.

Repressore di lambda lega $OR1 > OR2 > OR3$ (considerati separatamente)

Cro lega $OR3 > OR2 > OR1$

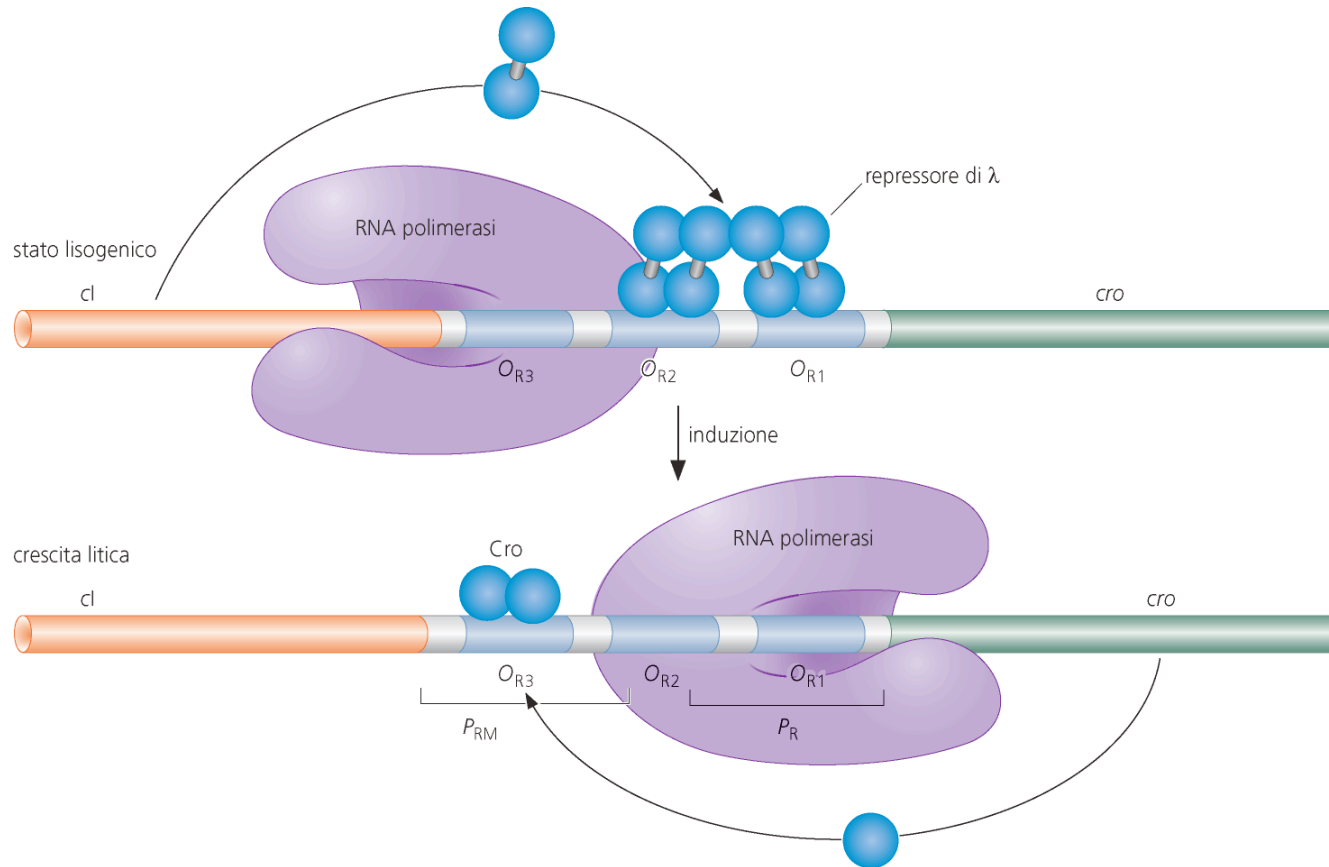


Il repressore di lambda lega l'operatore in modo cooperativo



Il legame del repressore ad O_{R1} aiuta il legame su O_{R2} . In questo modo il repressore lega entrambi i siti contemporaneamente (ma non su O_{R3}).

Azione del repressore di λ (cI) e di Cro



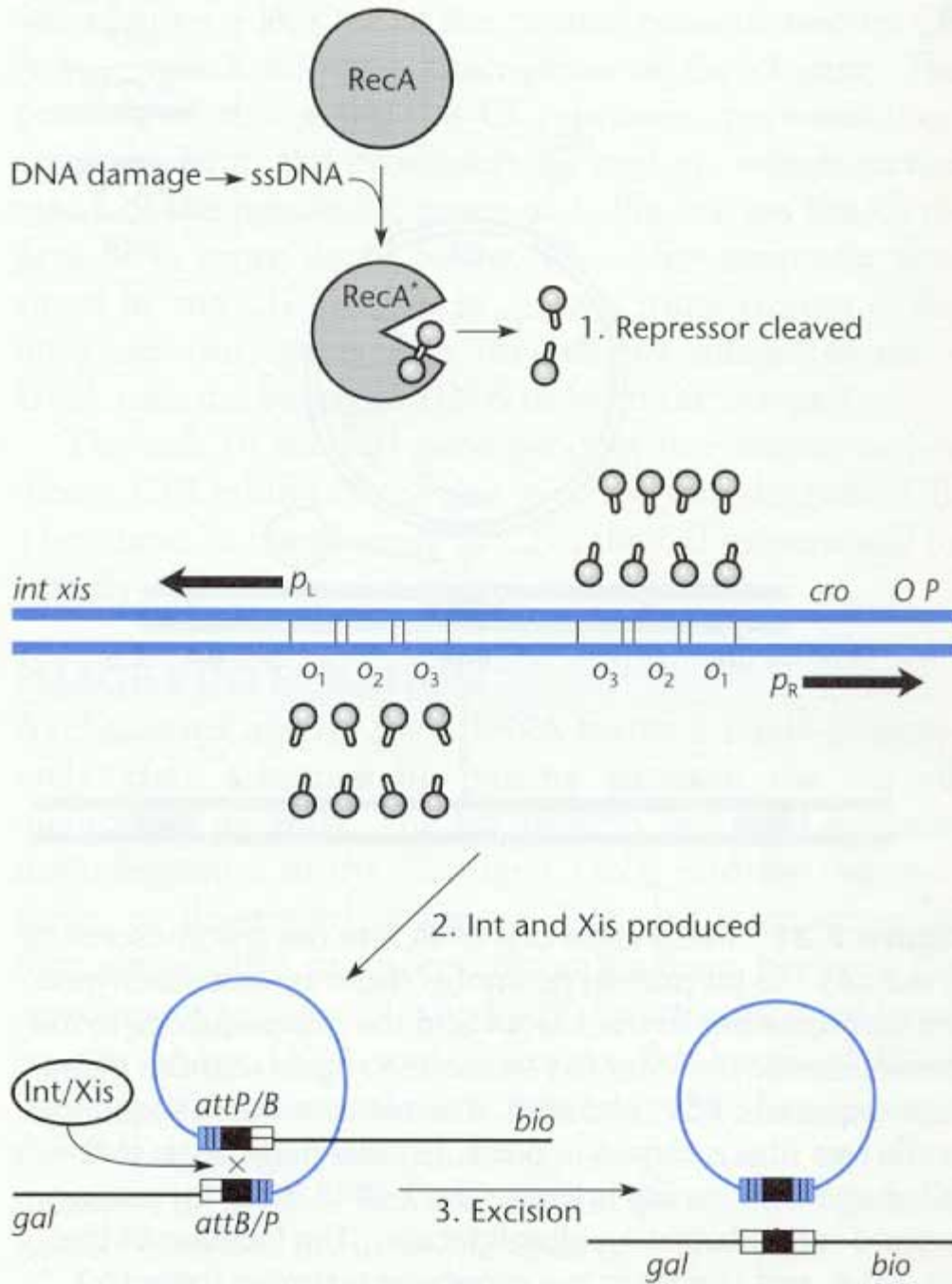
Il repressore di λ legato a O_{R1} e O_{R2} spegne la trascrizione da P_R e contatta la RNA pol su P_{RM} attivando l'espressione di se stesso (**autoregolazione positiva**), ma c'è anche una **negativa**: se i livelli di repressore sono alti si lega anche a O_{R3} reprimendo P_{RM} .

Cro legato a O_{R3} reprime la trascrizione di *cI*.

2) l' induzione litica richiede il taglio proteolitico del repressore di lambda

E. coli rileva e risponde al danno al DNA attivando la proteina RecA che stimola **attività autoproteolitica** di alcuni substrati, fra cui **LexA** (repressore) -> **riparazione DNA**.

Se la cellula è lisogenica il **repressore** di lambda (che assomiglia a LexA) viene **degradato** da RecA (rimozione dominio C-ter) eliminando dimerizzazione e cooperatività -> perdita della repressione -> **induzione trascrizione** da **P_L** e **P_R** -> **ciclo litico** (il fago sfugge ad una situazione potenzialmente pericolosa).



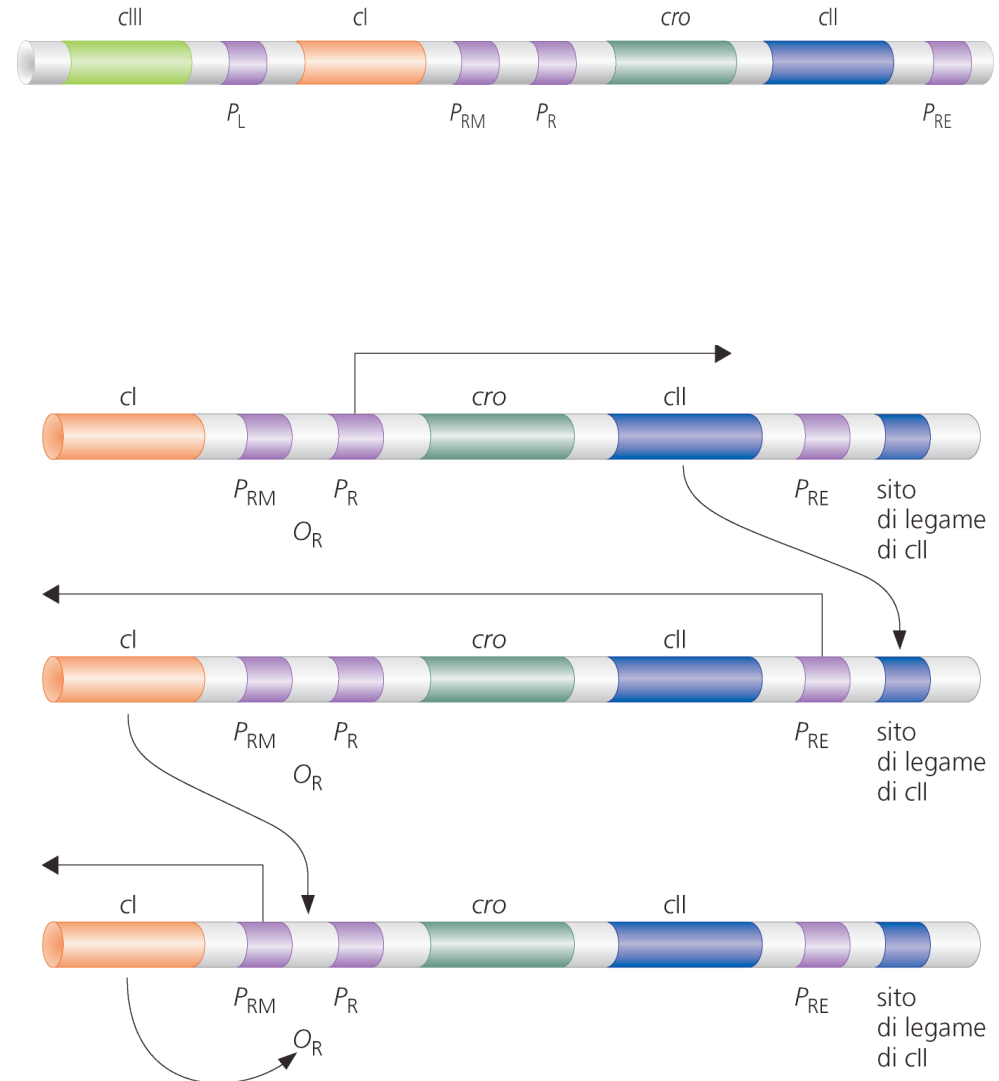
Induction of excision as a consequence of DNA damage: Activation of **RecA** promotes CI degradation so that P_L and P_R are derepressed and the proteins **Int** and **Xis** are expressed and excise the prophage, as well as *cro* is expressed and starts the lytic cycle.

3) cII è critico per la scelta ciclo litico o lisogenico

L'espressione di **cII** (attivatore) favorisce la crescita lisogenica legandosi a **P_{RE}** e promuovendo la trascrizione del gene **cI**.

Quando si forma una quantità sufficiente di repressore di λ si legherà a **O_{R1}** e **O_{R2}** e promuove la trascrizione di **cI** dal promotore **P_{RM}**

Che cosa determina ad ogni infezione l'efficienza del funzionamento di **cII** (e quindi la scelta fra ciclo litico e lisogenico)???



Nota: cI può quindi essere trascritto da 2 promotori **P_{RE}** e **P_{RM}**

cII è critico per la scelta ciclo litico o lisogenico

Che cosa determina ad ogni infezione l'efficienza con cui cII funziona???

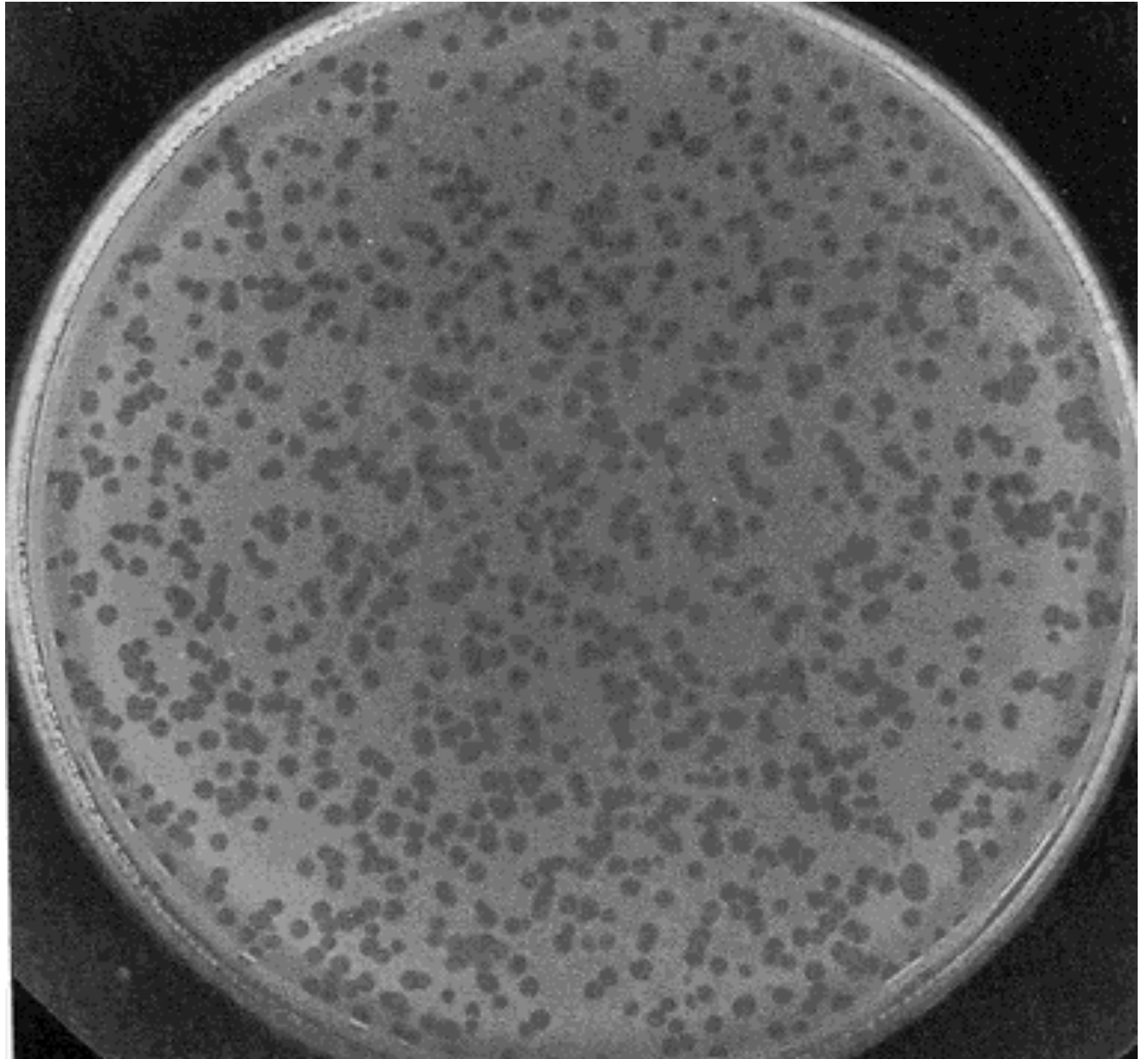
1) Rapporto fra fagi e batteri (*moi*):

- se molti fagi infettano la stessa cellula batterica ($moi > 1$) viene prodotto parecchio cII -> **ciclo lisogenico**;
- se pochi fagi infettano la stessa cellula batterica ($moi < 1$) viene prodotto poco cII -> **ciclo litico**).

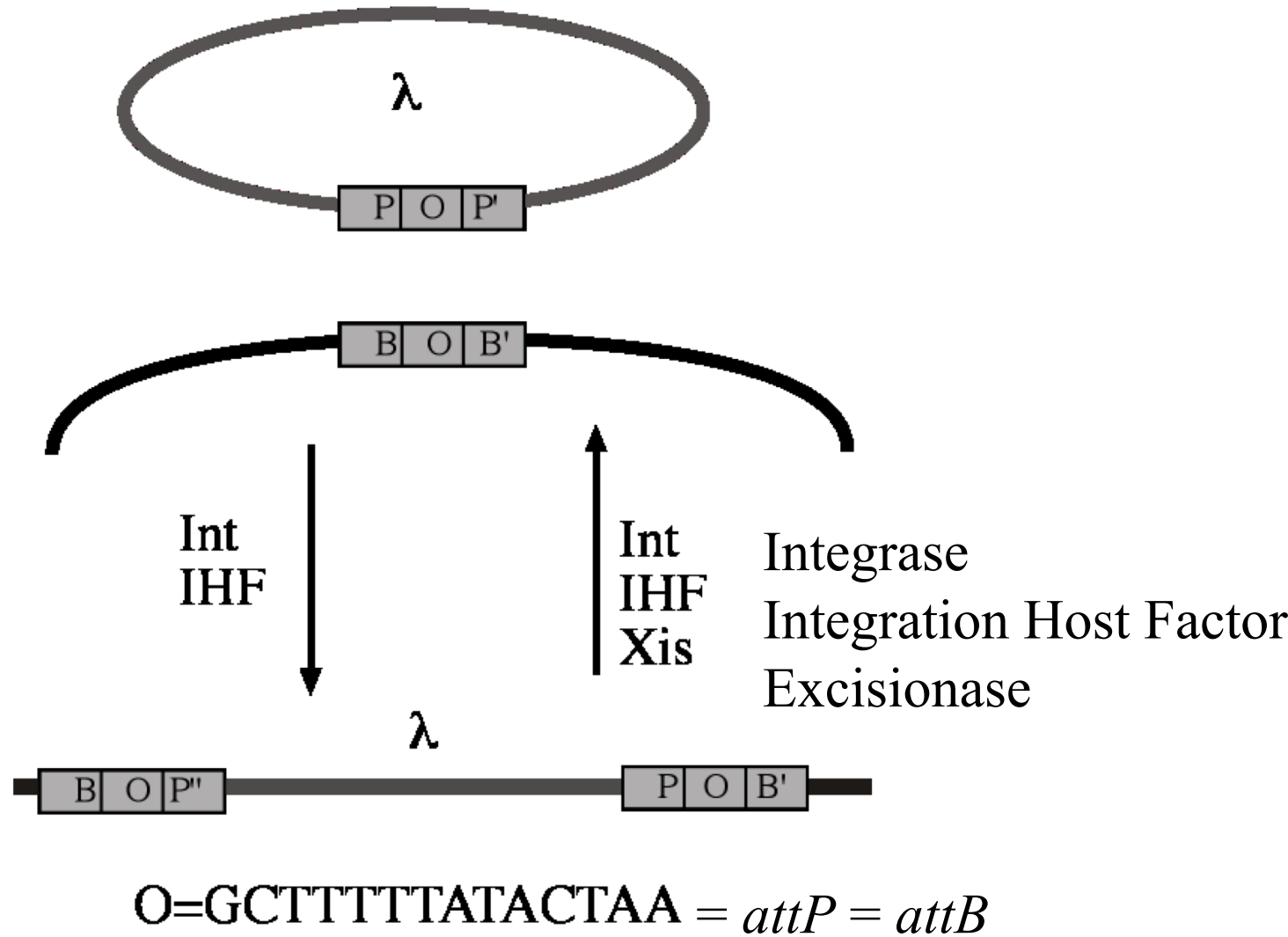
2) Disponibilità di nutrienti. cII è molto instabile e viene degradato da una proteasi (FtsH). FtsH è regolato:

- se la crescita batterica è buona -> FtsH è attiva -> cII degradato -> **ciclo litico**;
- se la crescita batterica è scarsa -> FtsH non è attiva -> cII stabile -> **ciclo lisogenico**

Placche di lisi
da
batteriofago
 λ su una
piastra petri



Site Specific Recombination



Video regolazione trascrizione

<http://online.universita.zanichelli.it/watson-7e/xstudx-animazioni/xstudx-regulation-of-transcription-initiation/>

Lac operon

https://www.youtube.com/watch?v=ldxL_KmF4ko

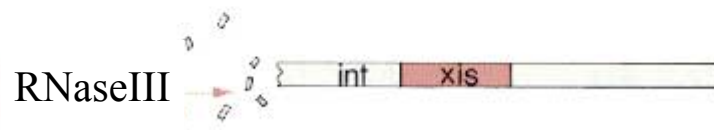
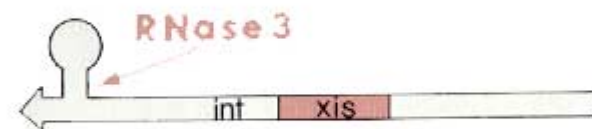
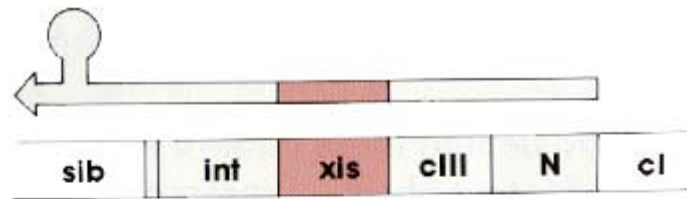
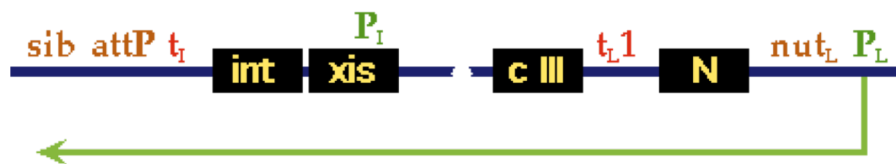
Trp attenuazione

<https://www.youtube.com/watch?v=CeE83RyQFRo>

Nel ciclo litico

La retroregolazione

Quando l'attività di cII è bassa -> favorito sviluppo litico -> non c'è bisogno di int (e viceversa)



Nell'induzione dal ciclo lisogeno

