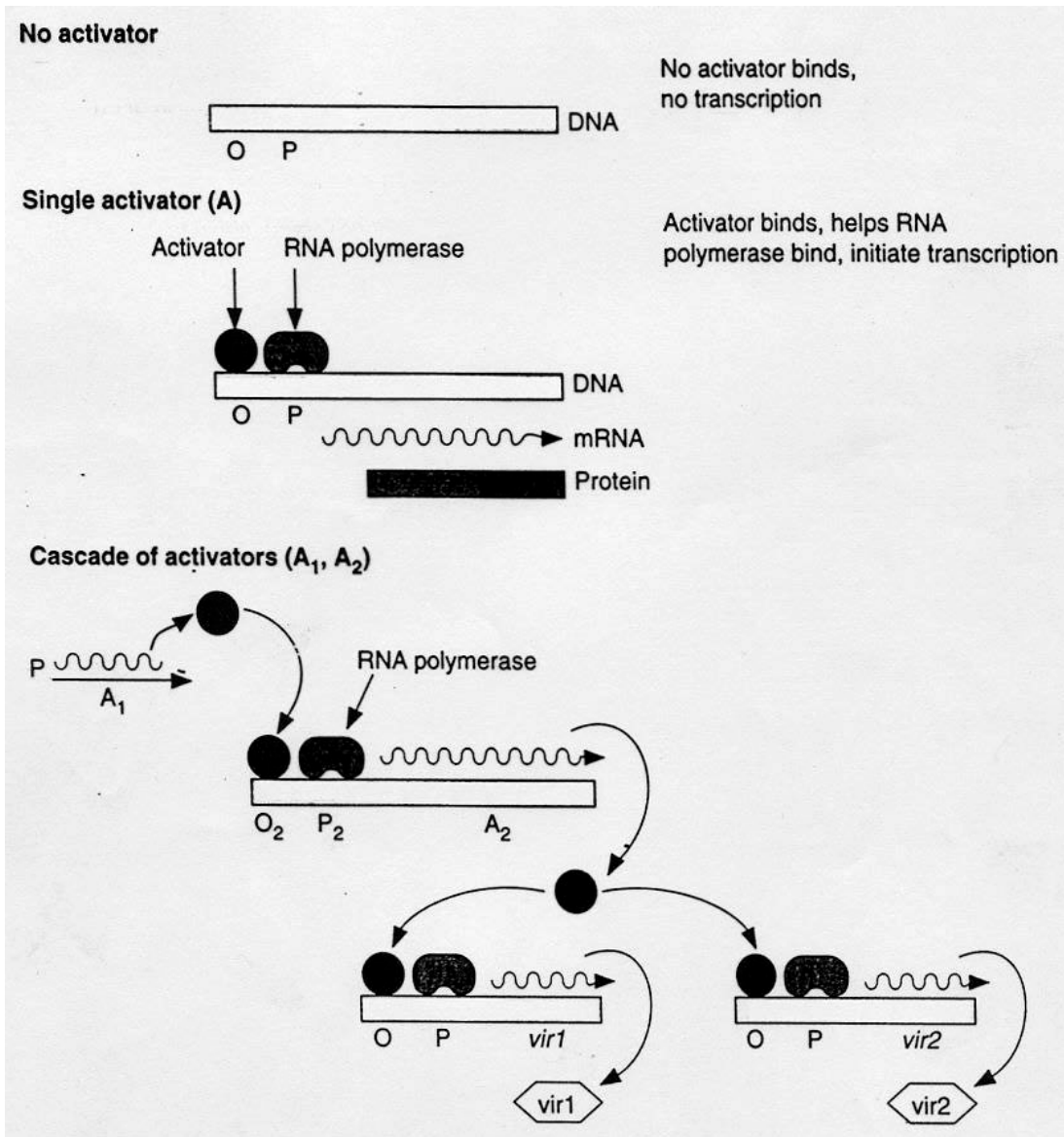
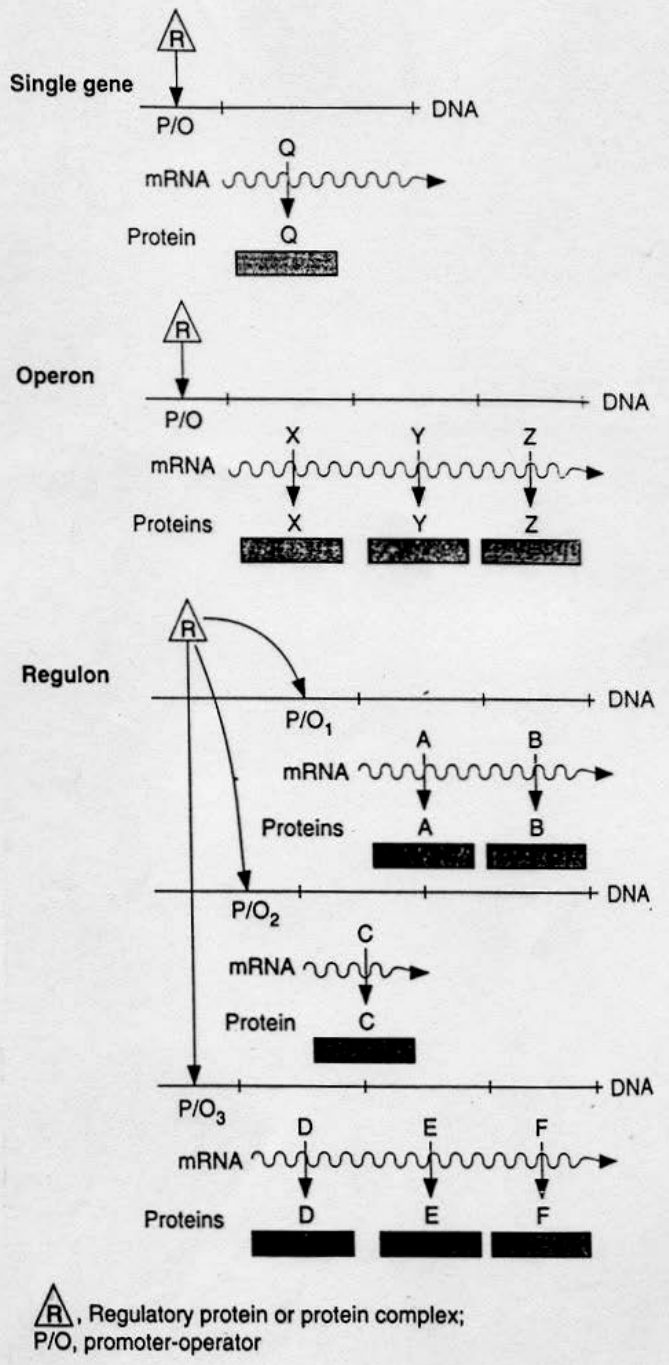


Sistemi di regolazione della trascrizione

Da un sistema semplice ad una cascata di attivazione



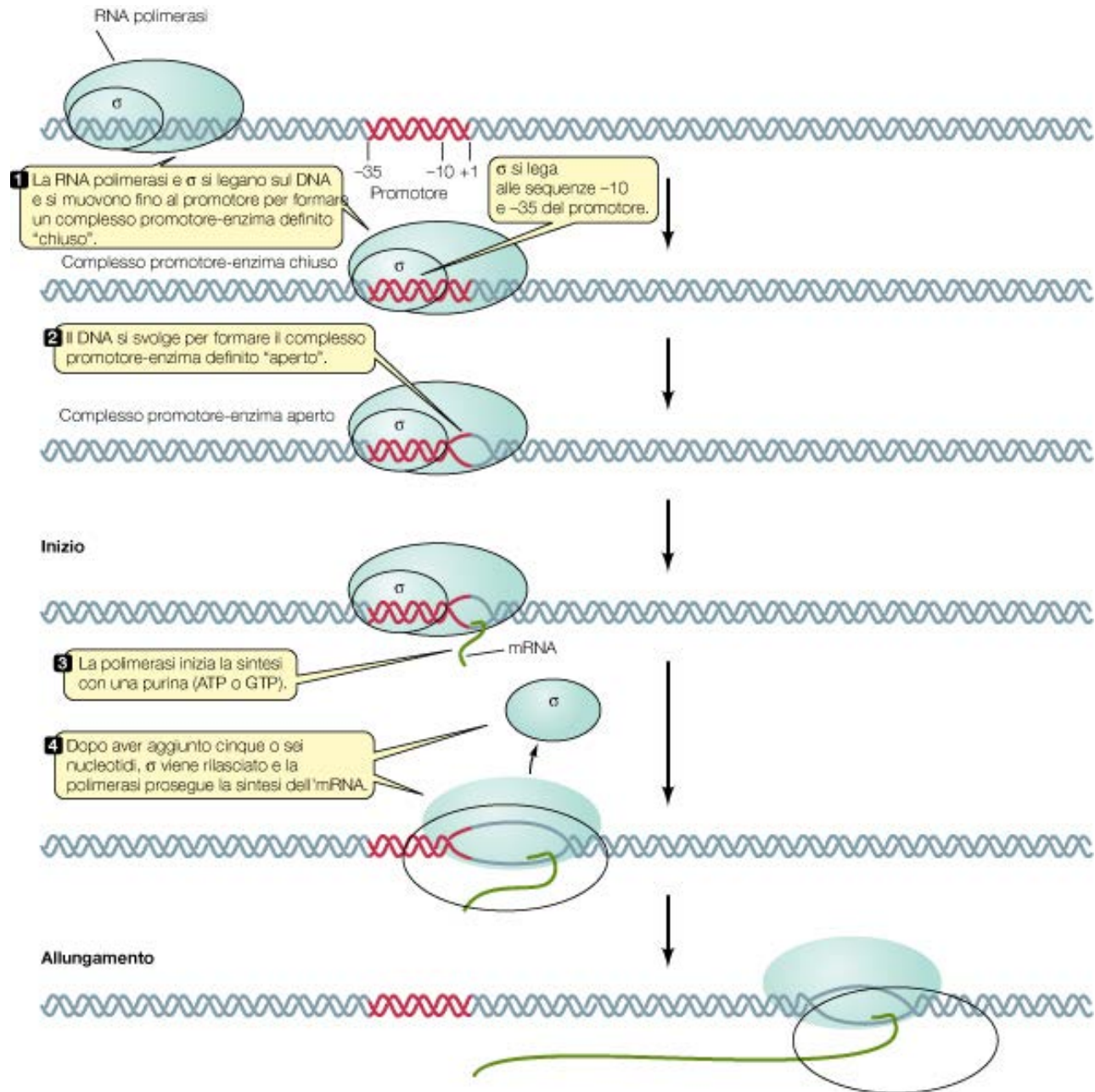
Organizzazione dei geni nei procarioti

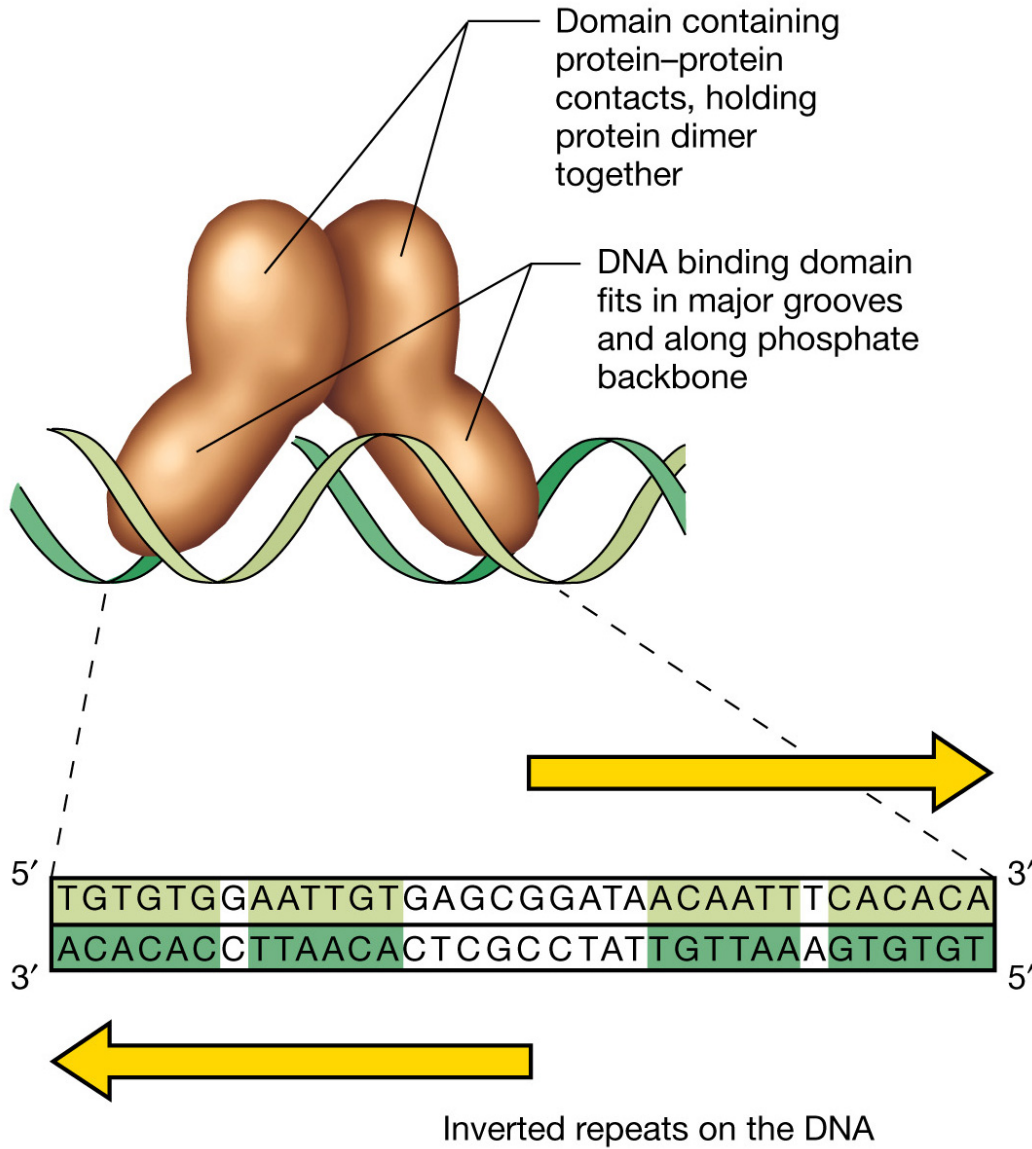


Proteine con funzione correlata sono generalmente codificate da geni contigui ed organizzate in operoni

Si distinguono vari livelli di organizzazione:

- OPERONI
- REGULONI
- STIMULONI





Molte proteine che legano il DNA sono dimeri e riconoscono due siti sul DNA.

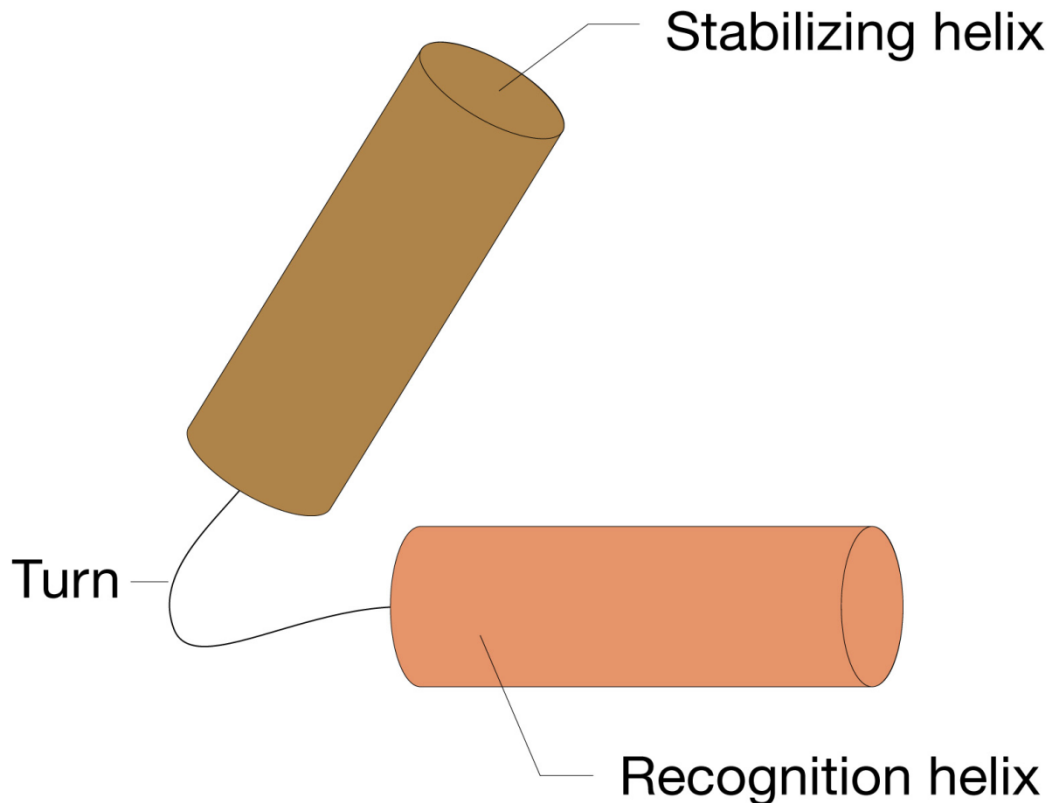
Queste proteine contengono un dominio per il legame al DNA ed un dominio per l'interazione proteina-proteina.

Il legame avviene nel solco maggiore dell'elica di DNA

Repressore dell'operone lattosio, LacI

Analisi di varie proteine di legame al DNA ha rivelato la presenza di substrutture comuni importanti per la formazione del corretto legame al DNA.

ELICA-GIRO-ELICA (helix-turn-helix) caratterizzata :



- da una sequenza in grado di formare una struttura ad α elica (elica di riconoscimento che interagisce con il DNA);

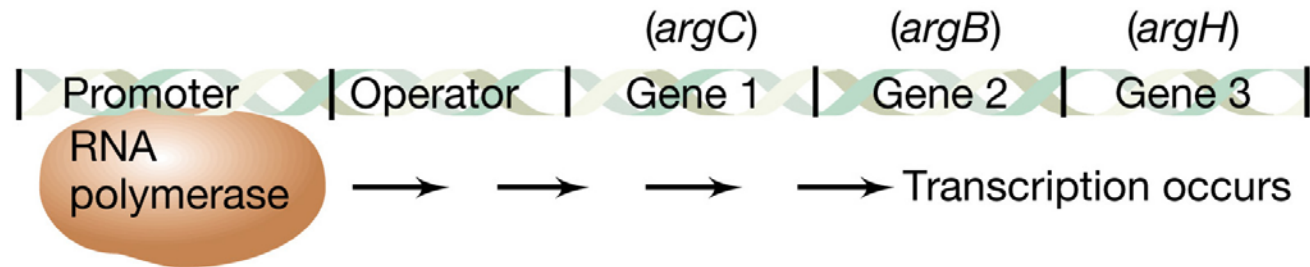
- breve sequenza (3 AA con frequentemente una glicina in 1 pos) in grado di girare la molecola ;

- da una seconda elica che stabilizza la prima e partecipa alla formazione del DIMERO

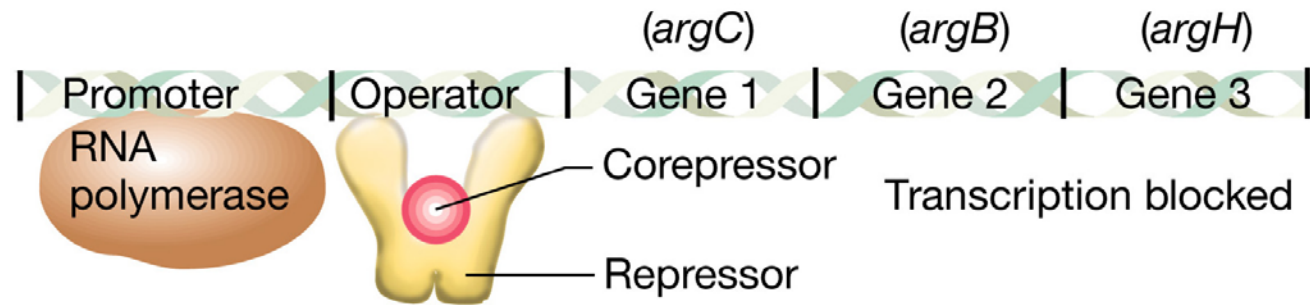
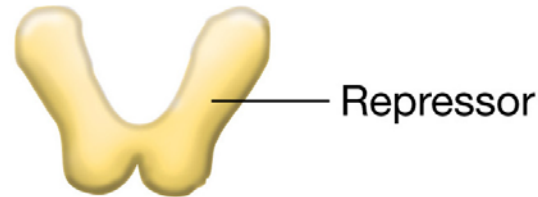
CONTROLLO NEGATIVO DELLA TRASCRIZIONE

Modello di REPRESSIONE della trascrizione

- attivazione del REPRESSORE da parte del corepressore



(a)

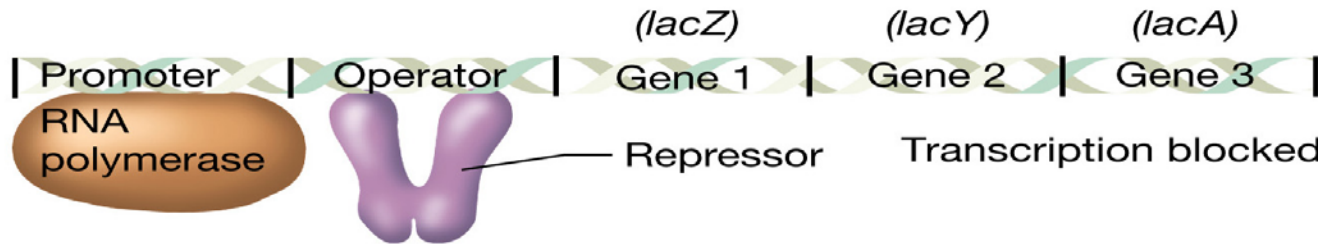


(b)

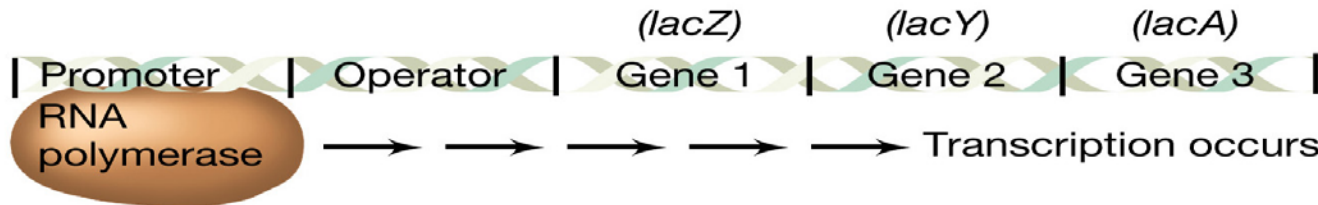
CONTROLLO NEGATIVO DELLA TRASCRIZIONE

2. Modello di INDUZIONE della trascrizione

- disattivazione del REPRESSORE da parte dell'induttore

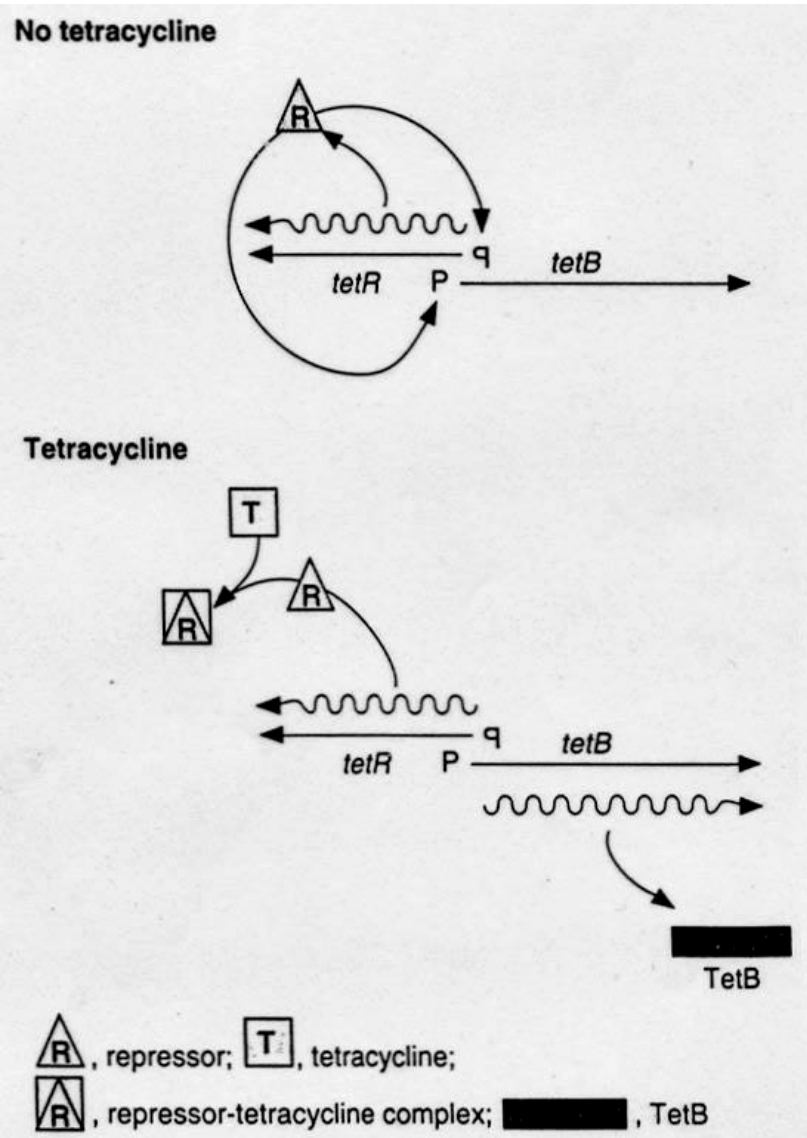


(a)



(b)

Regolazione dei geni per la resistenza alla tetraciclina



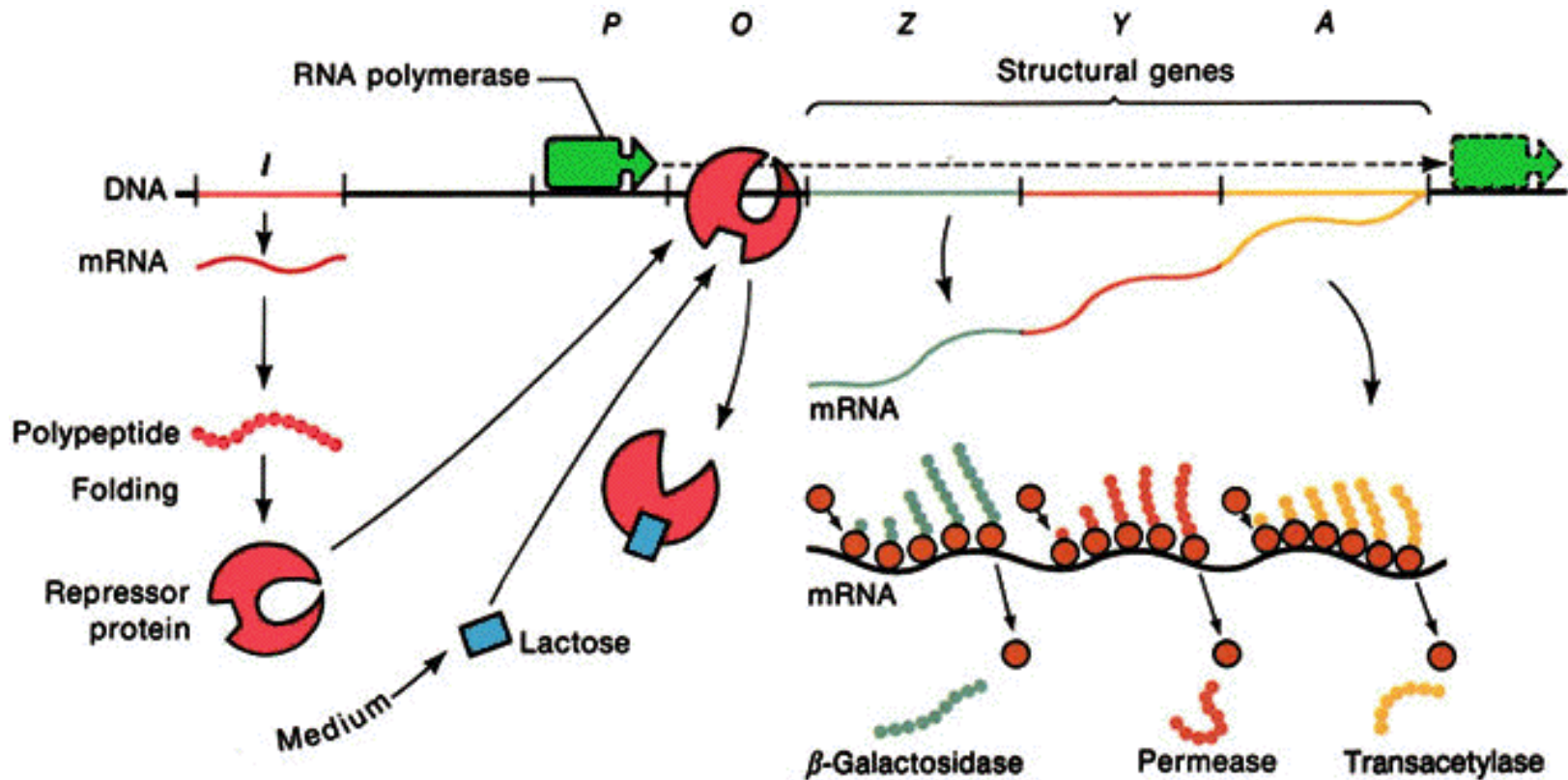
In assenza di tetraciclina, il repressore TetR reprime *tetB* il gene che codifica per una pompa ad efflusso per tetraciclina

In presenza di tetraciclina, la tetraciclina si lega al repressore TetR inattivandolo. Il gene *tetB* viene quindi espresso

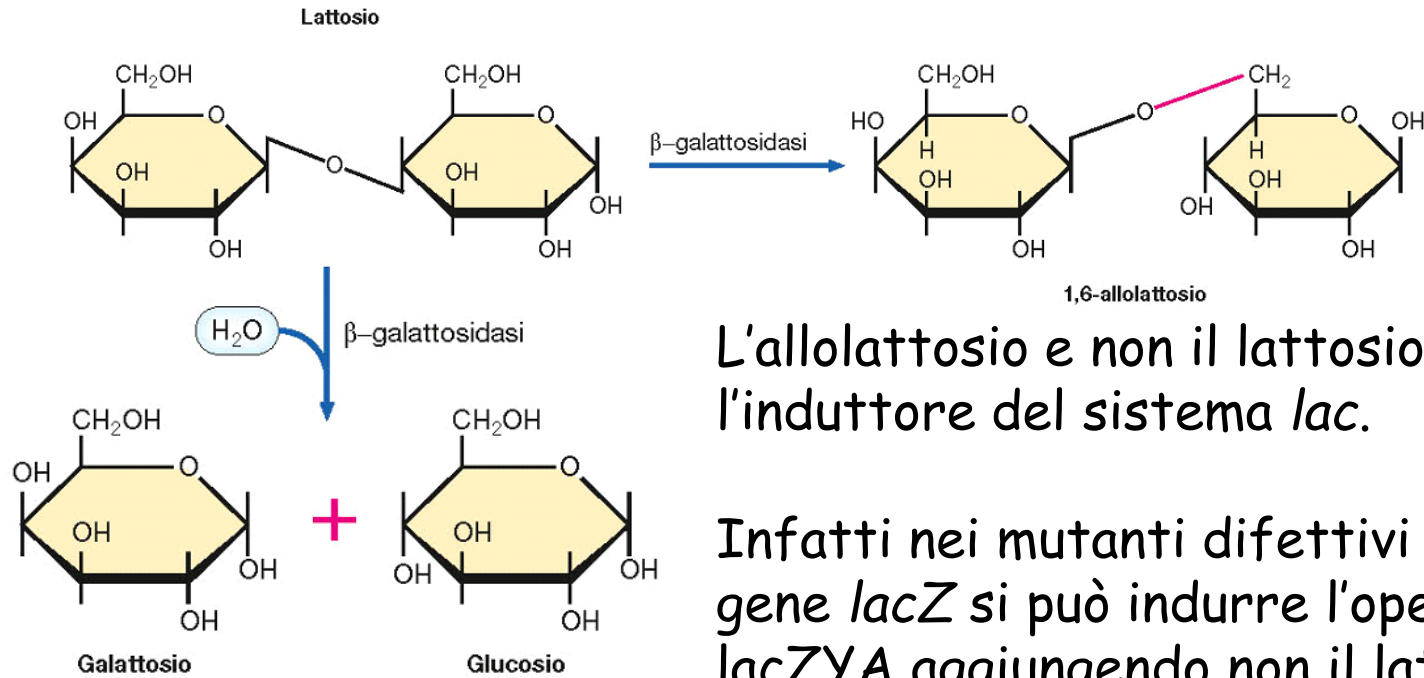
L'operone *lac* contiene:

- il gene *lacZ* che codifica la β -galattosidasi
- il gene *lacY* che codifica la lattosio- permeasi
- il gene *lacA* che codifica una tiogalattoside -transacetilasi che trasferisce un gruppo acetile dal coenzima A al galattoside

L'operone *lac* è sotto controllo del repressore LacI



L'allolattosio come induttore dell'operone lac.

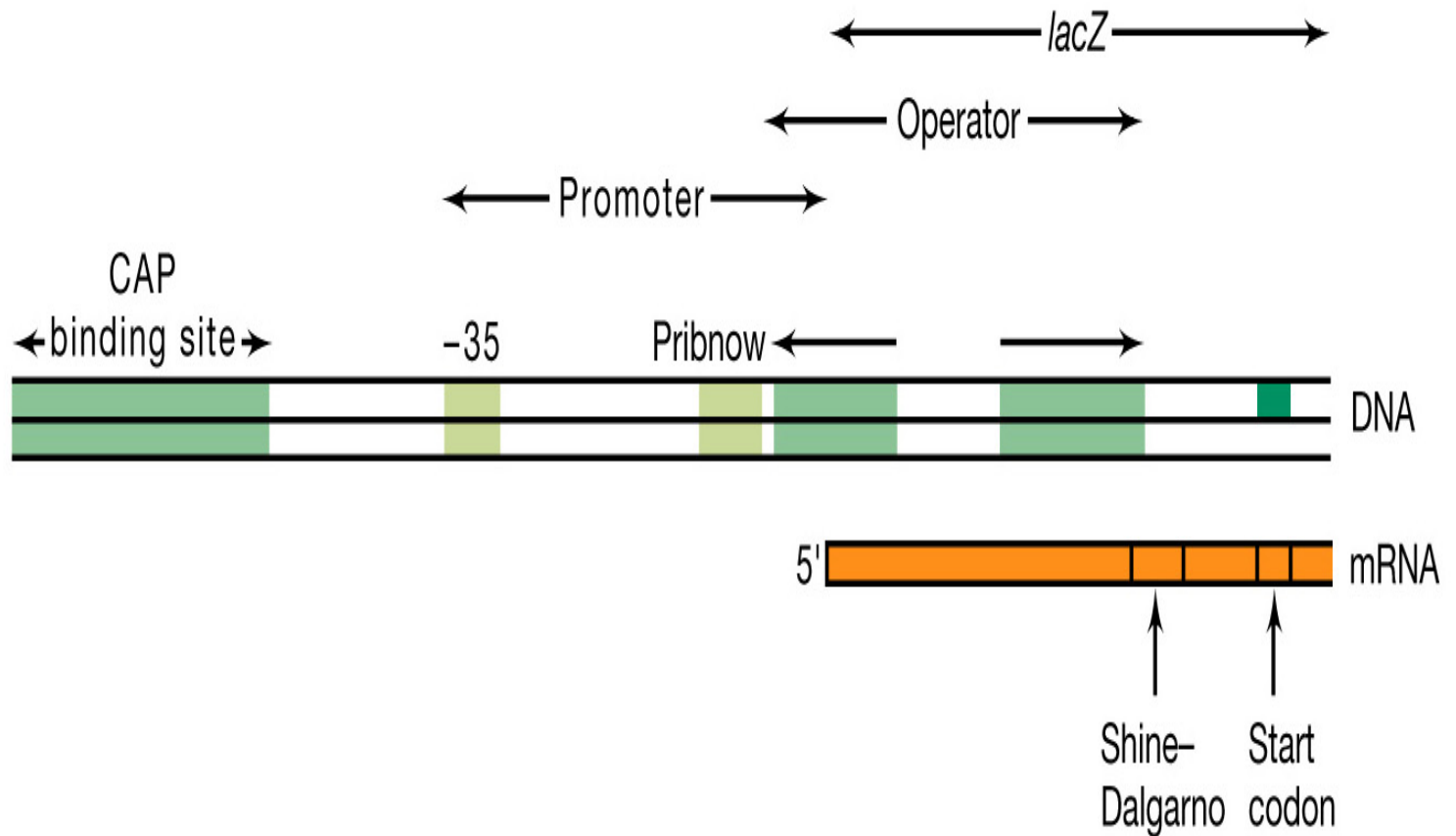


L'allolattosio e non il lattosio è l'induttore del sistema *lac*.

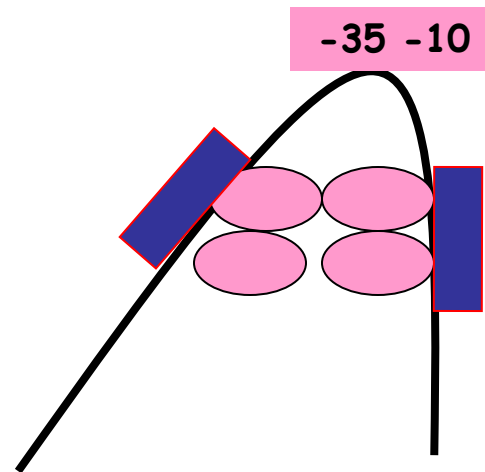
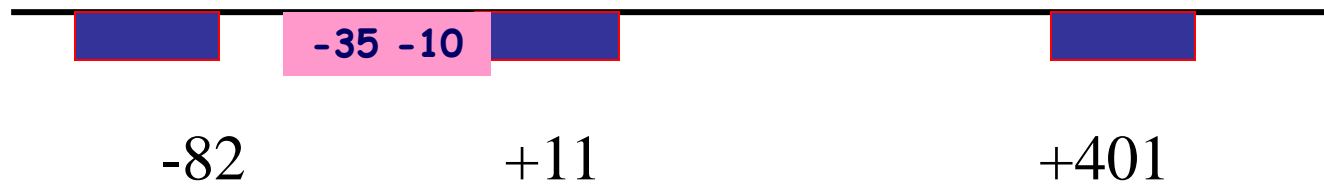
Infatti nei mutanti difettivi nel gene *lacZ* si può indurre l'operone *lacZYA* aggiungendo non il lattosio ma l'allolattosio

La β galattosidasi è in grado di idrolizzare le molecole di lattosio in galattosio e glucosio che di produrre allolattosio da lattosio

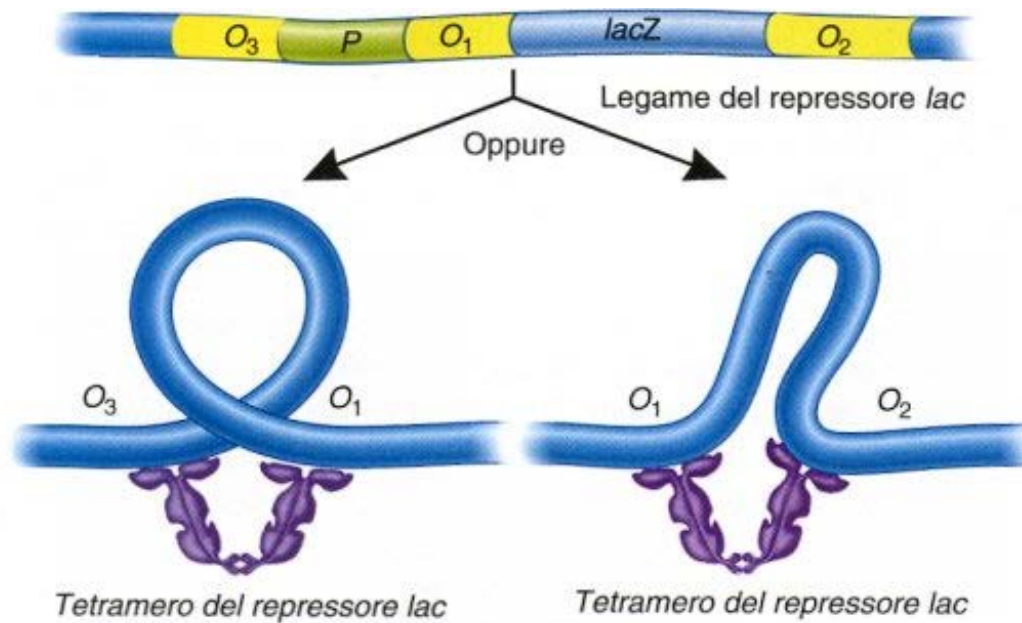
Gli elementi che caratterizzano la regione regolatrice dell'operone lac.



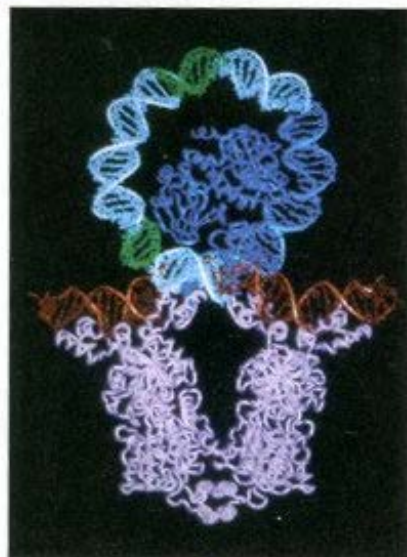
Localizzazione dei siti operatore nel promotore dell'operone lac



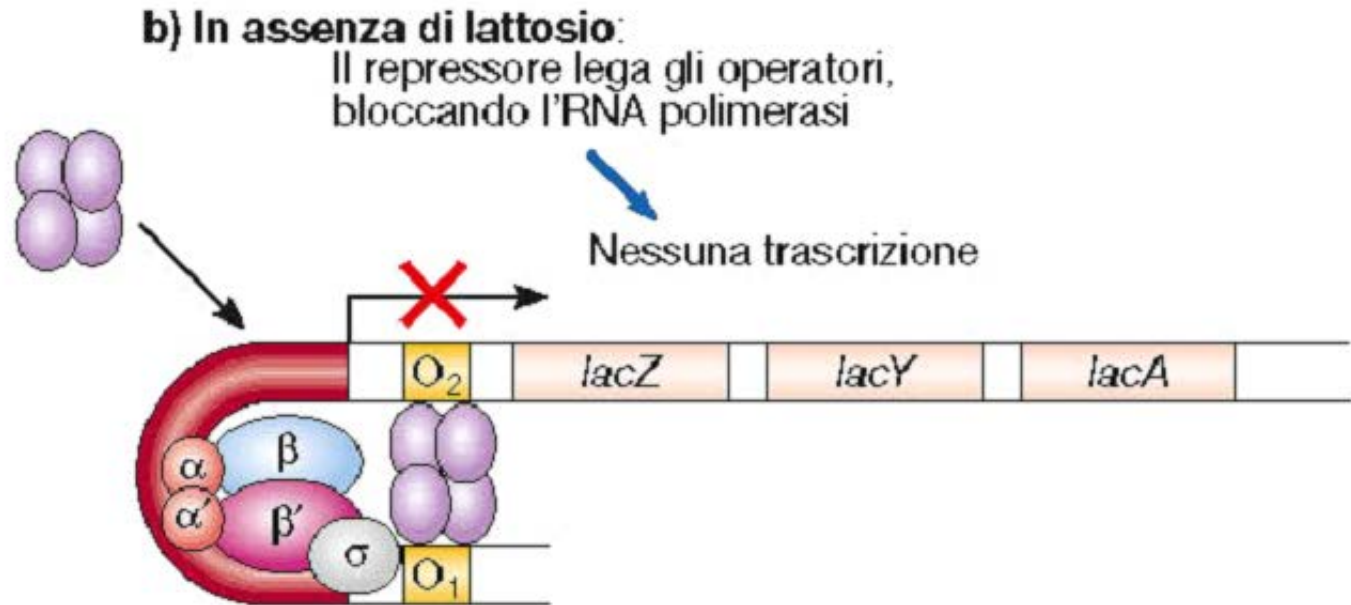
Il legame del repressore ad O1 e O3 (oppure O1 e O3) provoca un ripiegamento del DNA che impedisce il legame della RNA polimerasi



(a) Possibili anse di DNA causate dal legame del repressore *lac*



(b) Modello proposto per il legame del repressore *lac* a O_1 e O_3 sulla base di studi cristallografici



Attenzione nomenclatura cambiata in questa immagine
 $O_1=O_3$ mentre $O_2=O_1$

Importante osservare la formazione dell'ansa che blocca la RNA polimerasi impedendo la trascrizione

Basso livello di glucosio

ATP

Adenil-ciclasasi

1 Quando la concentrazione di glucosio è bassa, c'è un'aumentata sintesi di AMP ciclico.

cAMP + 2 P_i

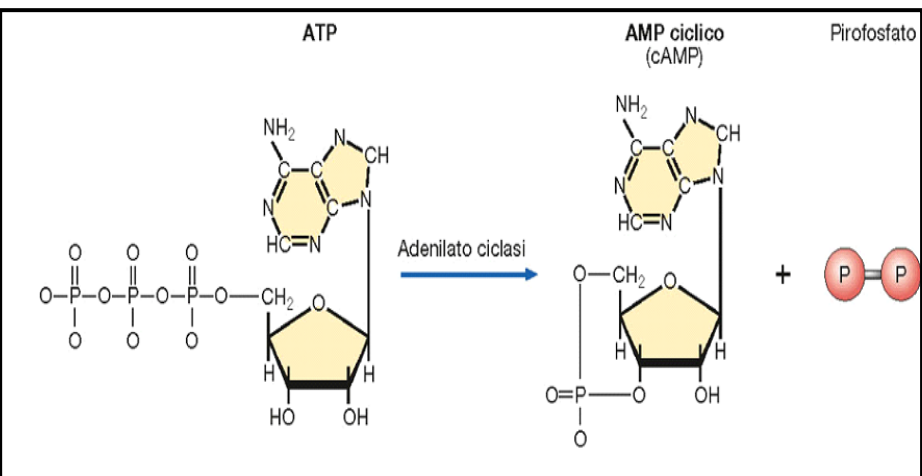
2 L'AMP ciclico forma un complesso con la proteina attivatrice del gene da catabolita.

cAMP
CAP

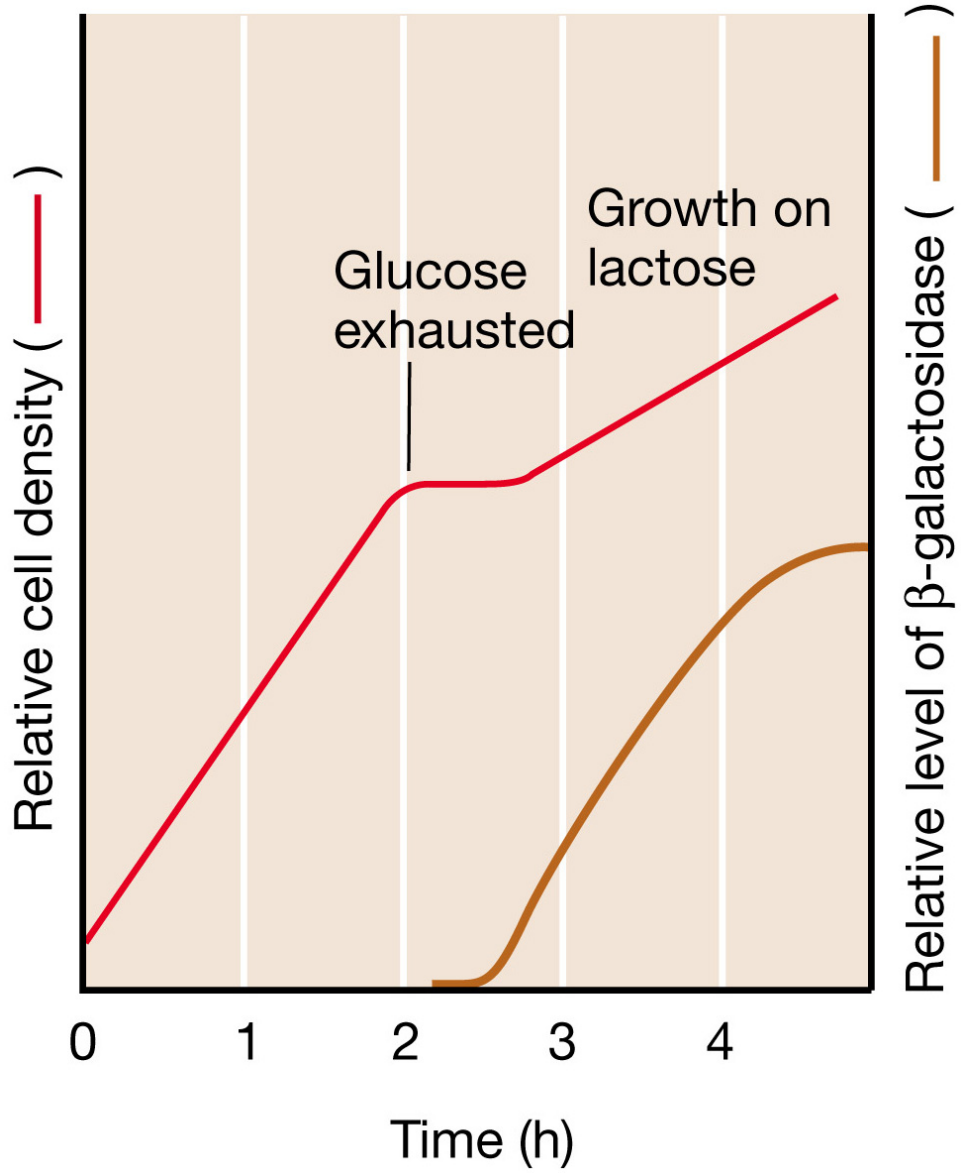
RNA polimerasi



3 Il complesso CAP-cAMP si lega vicino al promotore e aumenta il livello di trascrizione dei geni dell'operone.



Sistemi controllo globale : lo stimolone cAMP_CAP



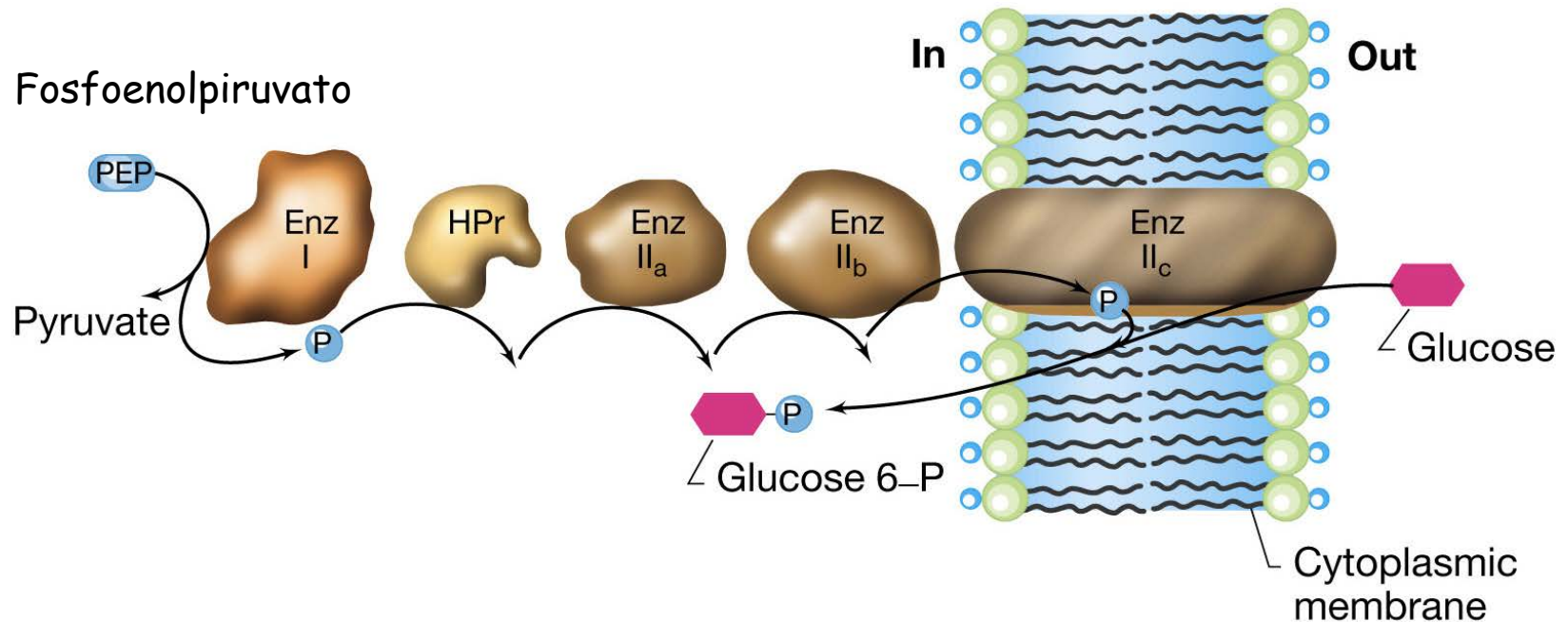
La curva diauxica

In presenza di glucosio e lattosio l'operone lac viene espresso soltanto quando il glucosio si è esaurito.

Traslocazione di gruppo.

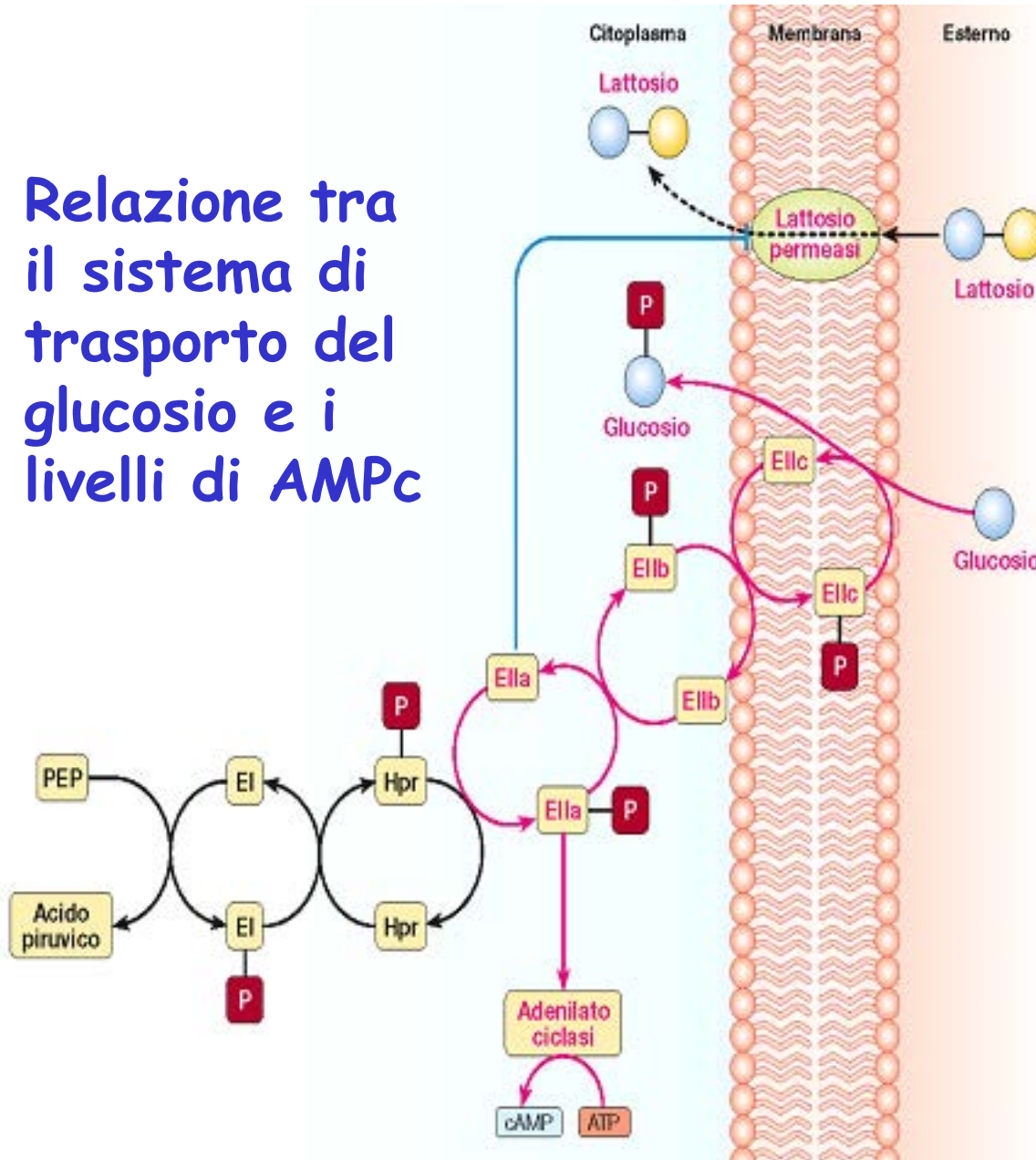
La sostanza viene modificata chimicamente durante l'attraversamento della membrana

Il sistema delle fosfotransferasi fosforila alcuni zuccheri quali glucosio, mannosio, fruttosio



HPr e EI sono composti non specifici per lo zucchero
EII specifico per ogni zucchero

Relazione tra il sistema di trasporto del glucosio e i livelli di AMPc



In presenza di glucosio

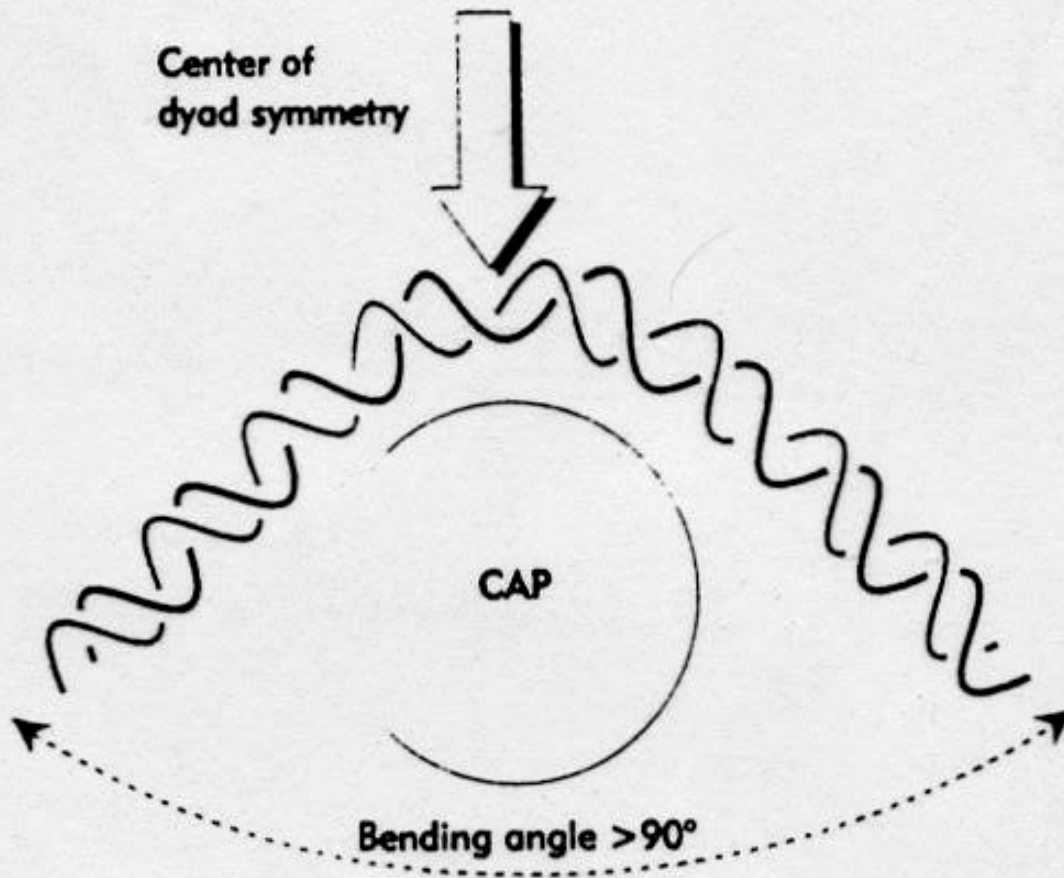
La proteina IIA-P è continuamente impegnata a fosforilare IIB e non fosforila la Adenilato-ciclasti
basso livello di AMPc

In assenza di glucosio

la proteina IIA-P non deve fosforilare contunamente IIB e può fosforilare Adenilato-ciclasti

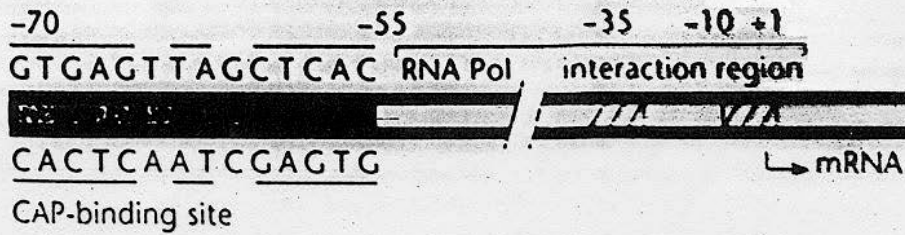
alto livello di AMPc

CAP bends DNA $>90^\circ$ around the center of symmetry.



Il complesso
CAP-AMPc
riconosce una
regione a monte
del promotore ed
induce curvatura

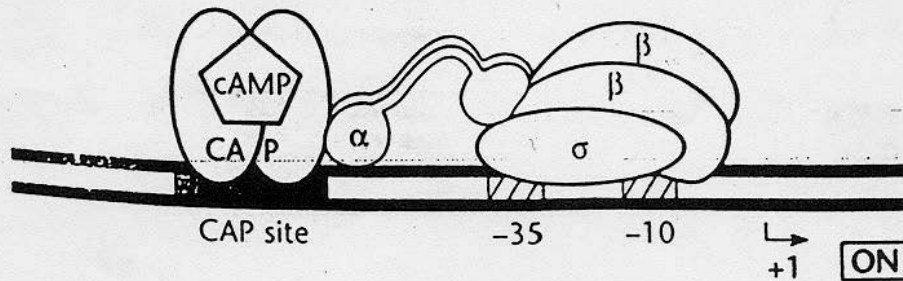
A



B The CAP protein bends DNA



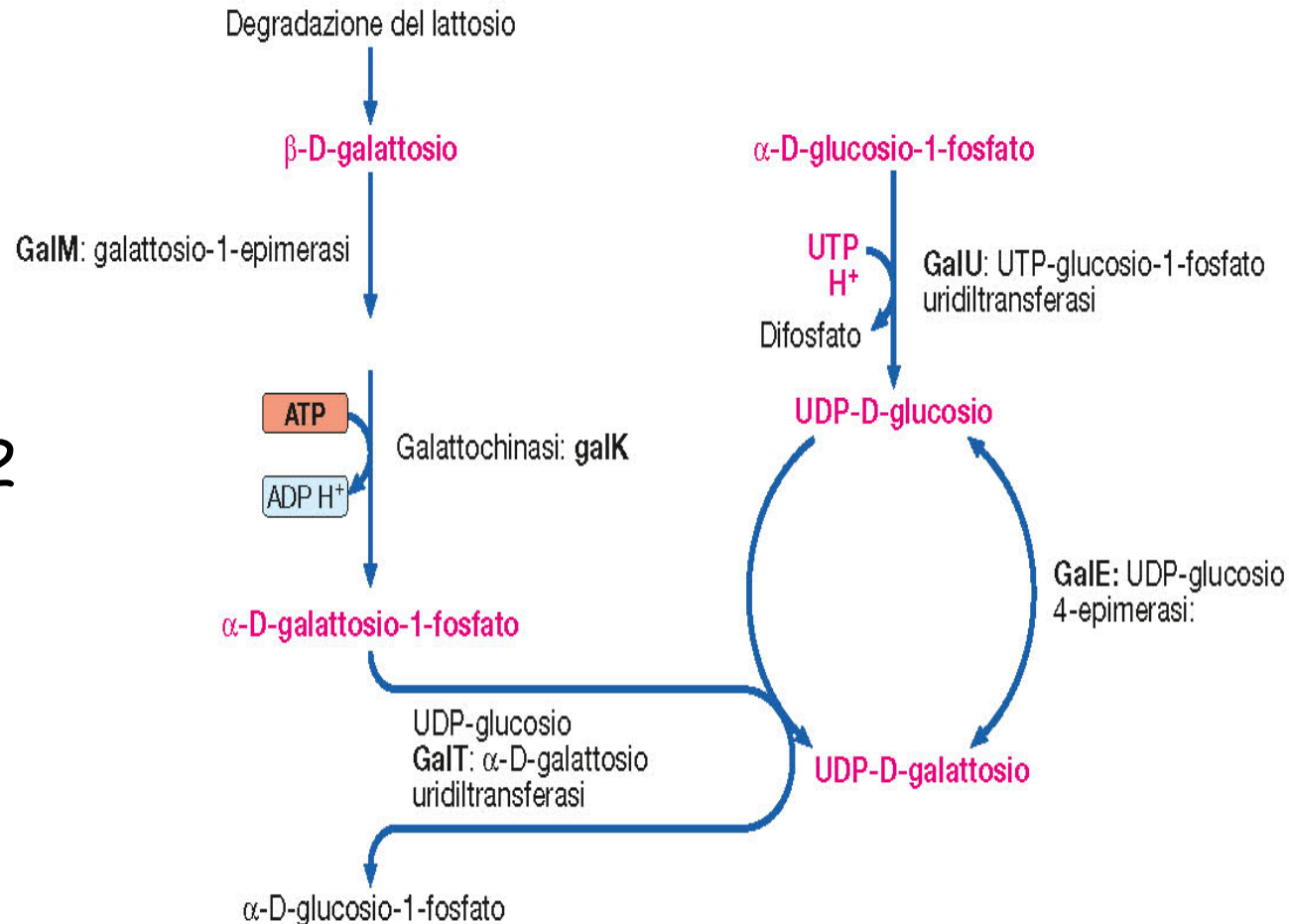
C



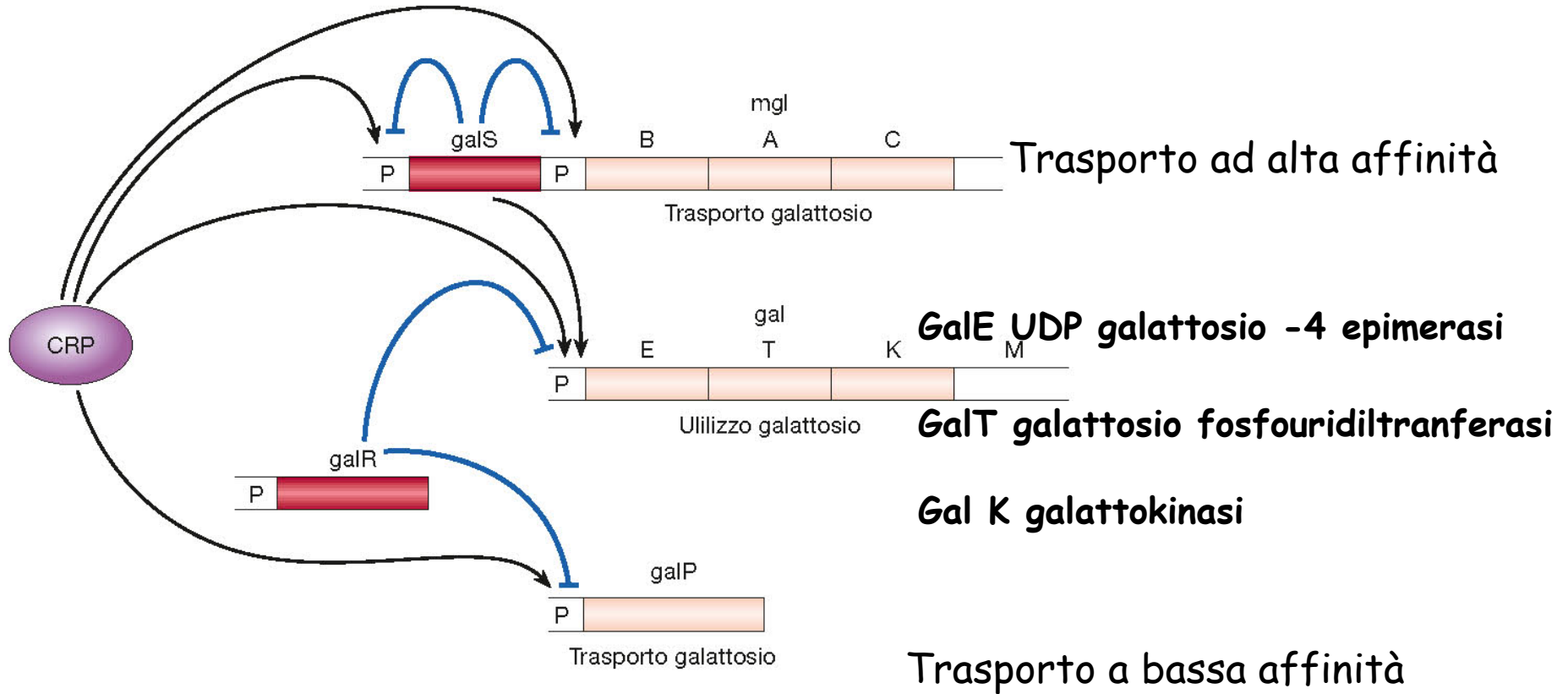
Il complesso CAP-AMPc induce curvatura nel DNA facilitando così il legame della RNA polimerasi con il DNA

Gli enzimi necessari per il metabolismo del galattosio sono codificati da diversi operoni. Il galattosio è necessario per la vita della cellula e quando non è presente viene sintetizzato a partire dal glucosio

Oltre a produrre glucosio 1 fosfato vengono prodotti 2 intermedi importanti
 UDP-D glucosio
 UDP-D-galattosio



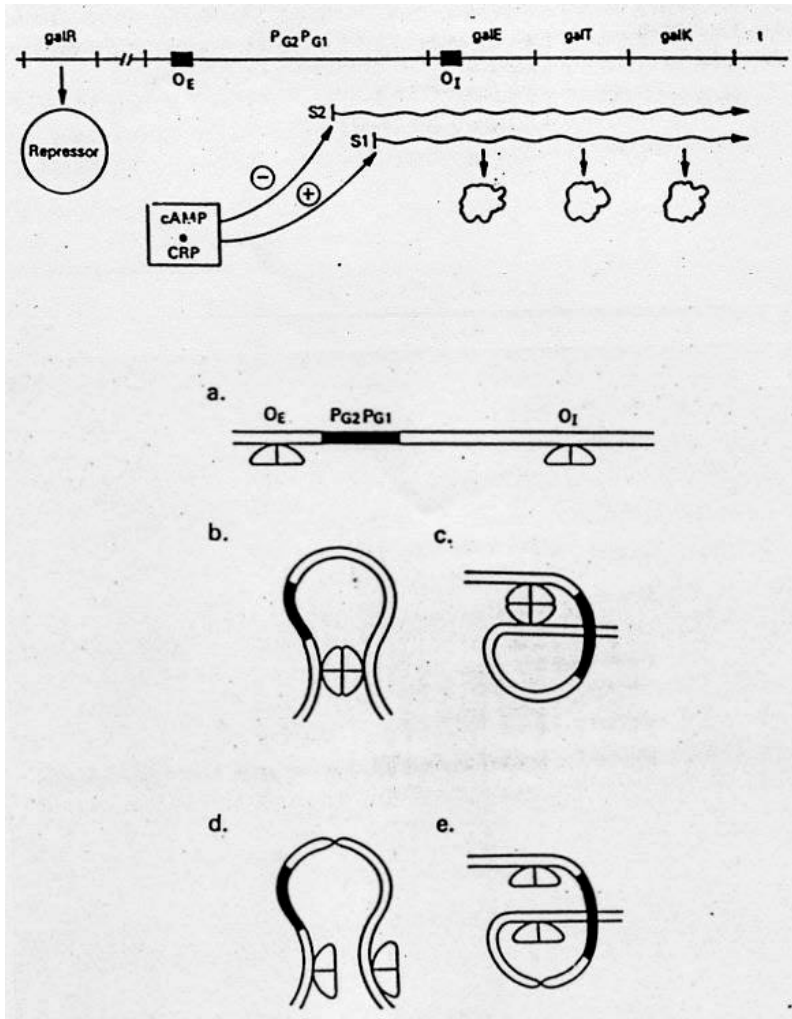
La complessità dell'operone galattosio



Controllo negativo da parte del repressore GalR Repressore principale, e dall'isorepressore GalS.

Complesso cAMP-CRP svolge un duplice ruolo.

Regolazione dei geni dell'operone GALATTOSIO

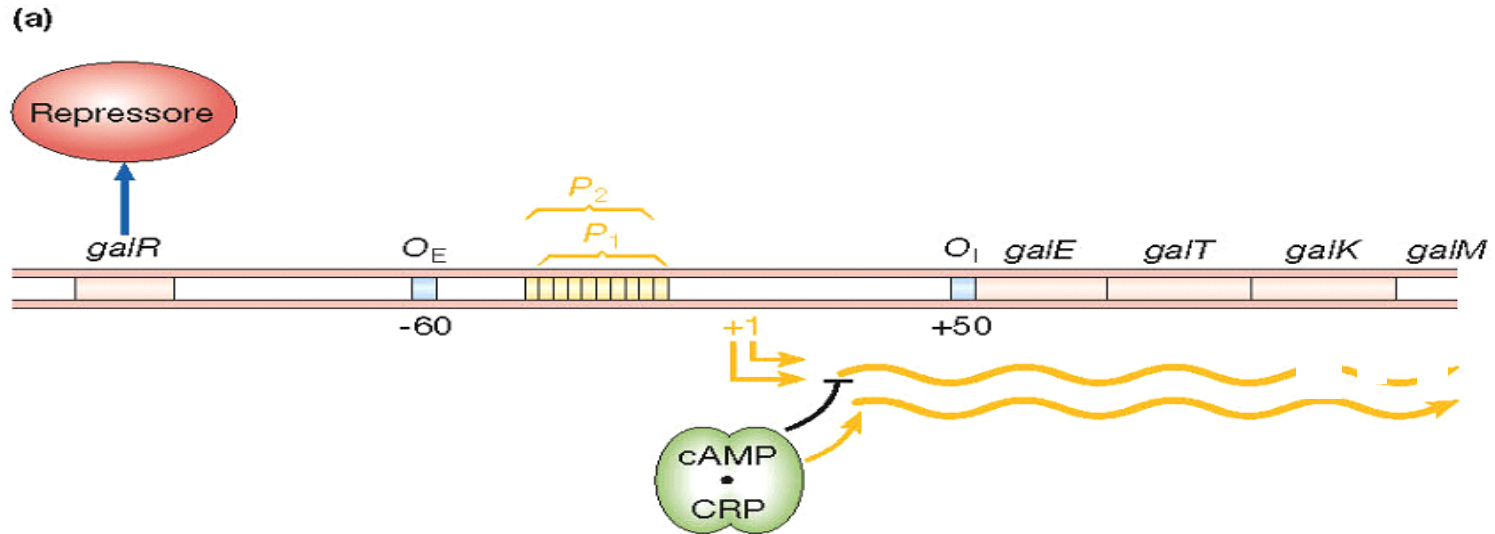


Il sistema gal è regolato negativamente in assenza di Galattosio dalla proteina GalR che si lega a due siti O_E e O_I provocando la formazione di un'ansa che racchiude i promotori P_{G2} e P_{G1}

Il promotore principale P_{G1} è attivato da cAMP-CAP che legandosi al P_{G1} blocca per impedimento sterico l'avanzamento della RNAPol da P_{G2}

cAMP-CAP può avere un duplice effetto
attivatore sul P_1
repressore sul P_2

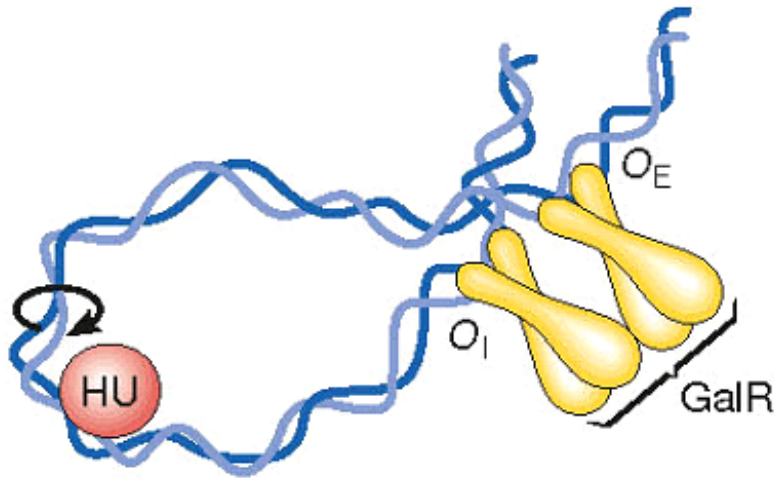
L'operone viene trascritto da 2 promotori sovrapposti P1 e P2 sfalsati di 4 nucleotidi e fiancheggiati da 2 siti operatore



Il complesso cAMP CAP stimola la trascrizione da P1 e reprime quella da P2.

In assenza di cAMP-CRP P2 è attivo ma il trascritto è instabile consentendo l'espressione del solo gene *galE* l'epimerasi che permette la trasformazione di UDP glucosio in UDP galattosio precursori essenziali per la sintesi della parete cellulare.

(b)



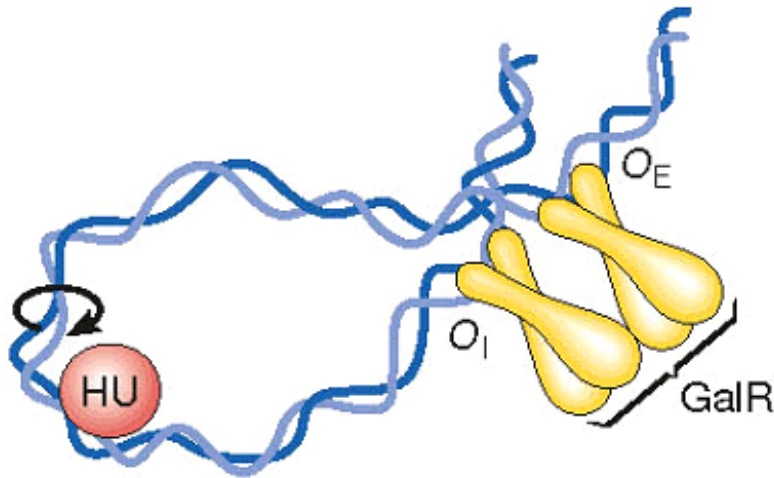
Il repressosoma

Per la repressione del promotore P_1 è sufficiente il legame di un dimero di GalR all'operatore O_E

La repressione di P_2 richiede che GalR si leghi ad entrambi i siti che interagendo tra loro delimitano un'ansa. La curvatura del DNA viene facilitata dalla proteina HU

I livelli basali di espressione dell'operone gal sono molto più alti rispetto all'operone lac. In presenza di galattosio, i livelli di induzione sono più bassi.

(b)



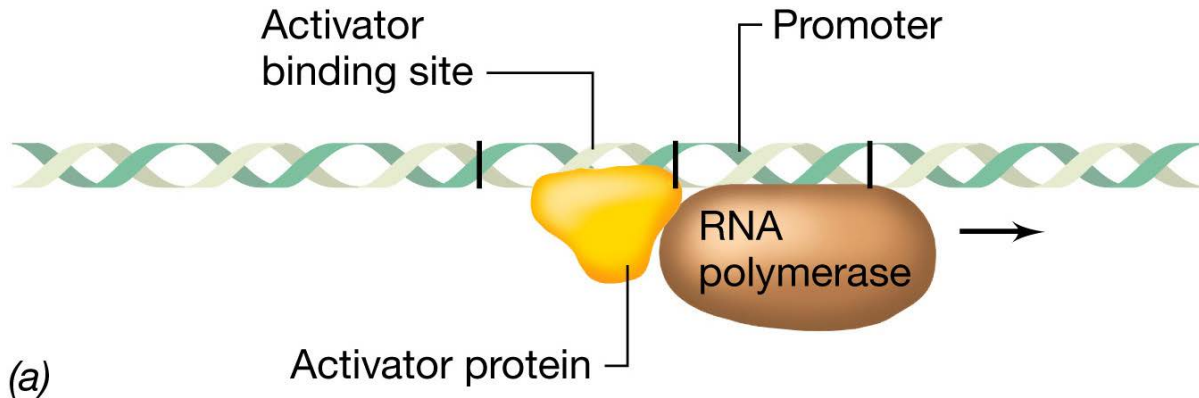
Il repressosoma

Per la repressione del promotore P_1 è sufficiente il legame di un dimero di GalR all'operatore O_E

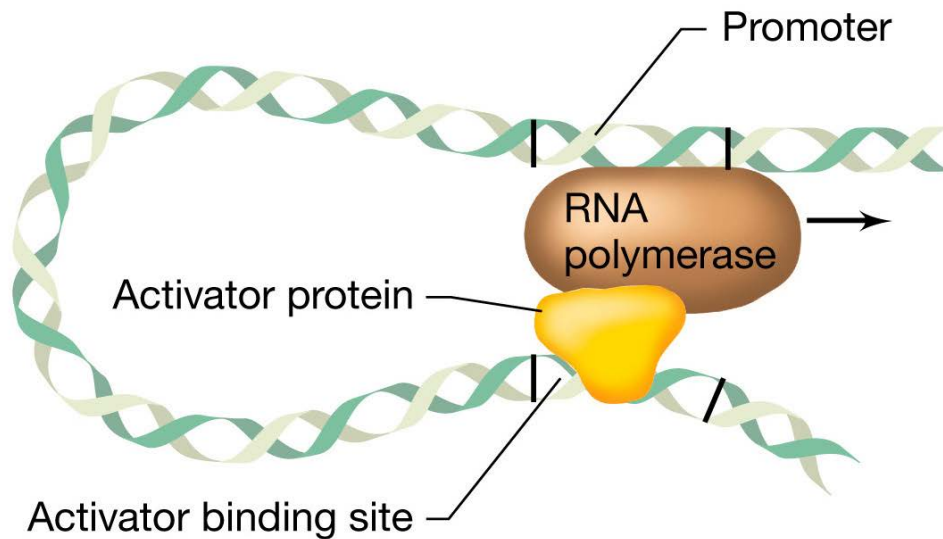
La repressione di P_2 richiede che GalR si leghi ad entrambi i siti che interagendo tra loro delimitano un'ansa. La curvatura del DNA viene facilitata dalla proteina HU

I livelli basali di espressione dell'operone gal sono molto più alti rispetto all'operone lac. In presenza di galattosio, i livelli di induzione sono più bassi.

La regolazione positiva



(a)



(b)

**Interazione tra
Proteina
Attivatrice - RNA
polimerasi -
promotore
Promuove l'inizio
della trascrizione**

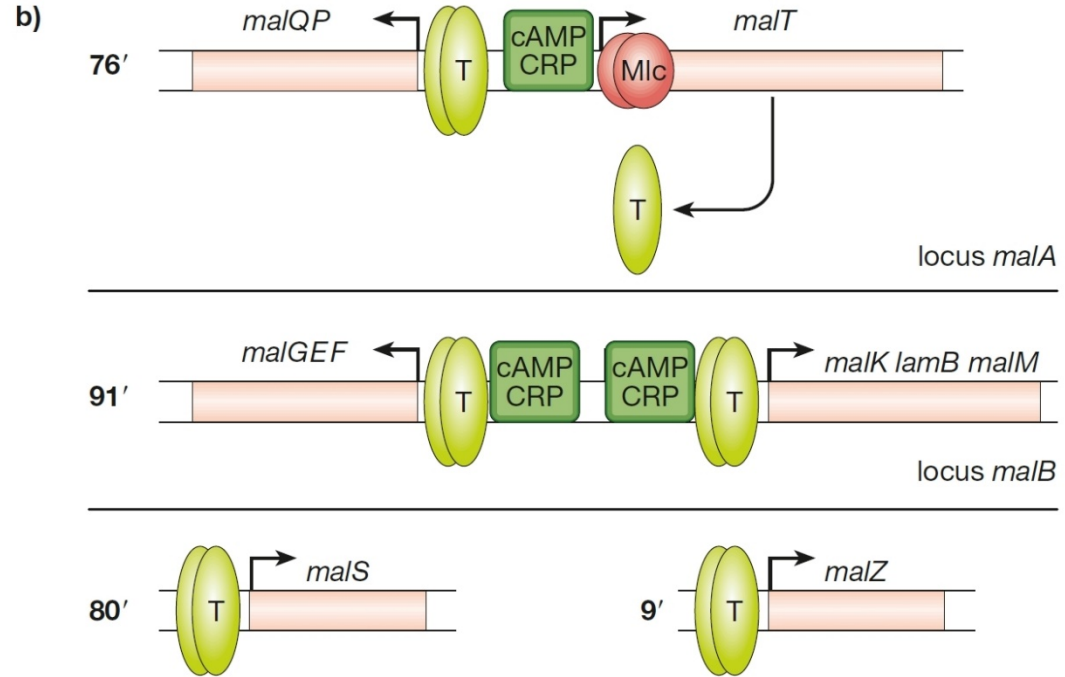
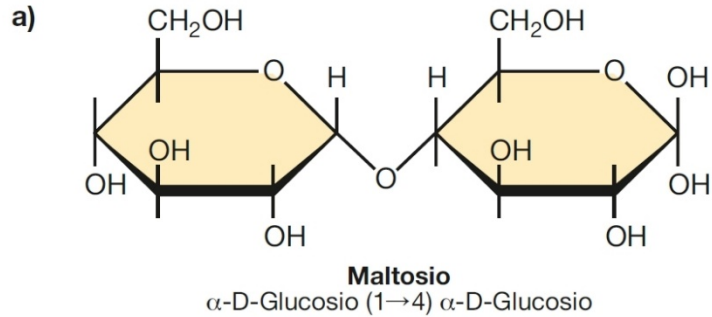
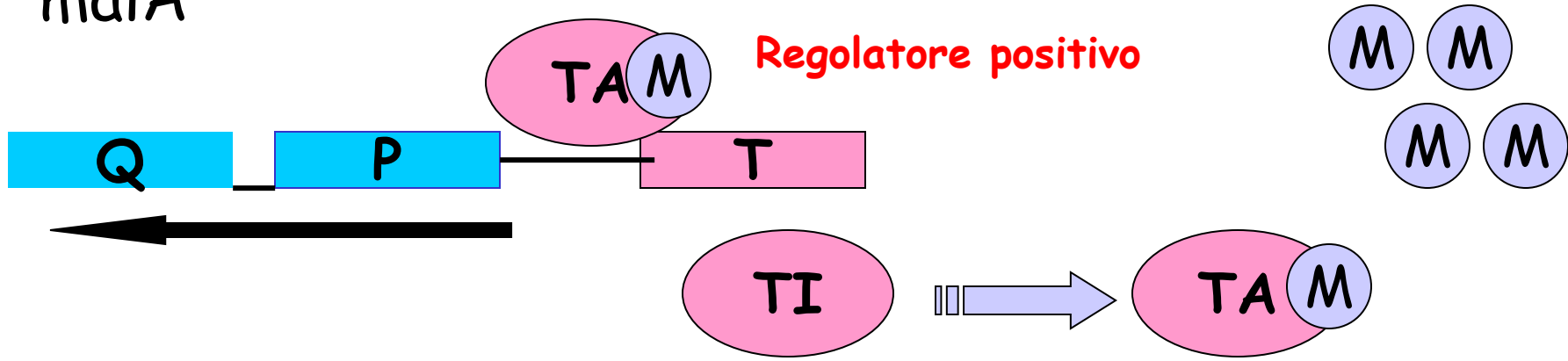


Figura 12.7 REGULONE MALTOSIO. (a) Il disaccaride maltosio. (b) Organizzazione genetica del regulone *mal*. I numeri a sinistra di ogni locus ne indicano la posizione, in unità di mappa, sul cromosoma di *Escherichia coli*. Le frecce indicano la direzione e il sito d'inizio trascrizione. In verde sono rappresentati gli attivatori trascrizionali (MalT e cAMP-CRP), in rosso il repressore Mlc, che è a sua volta regolato dal PTS.

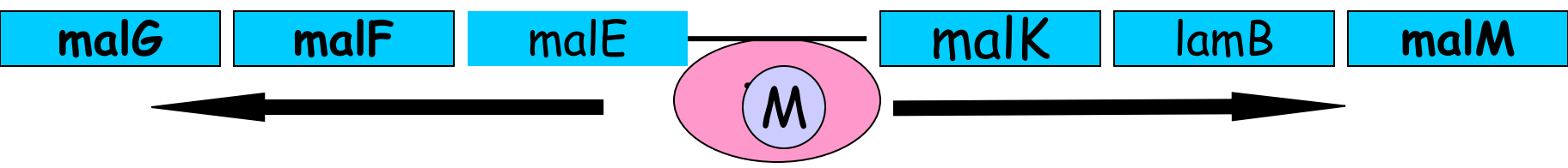
Il sistema Maltosio: è un regulone. Più operoni controllati dalla medesima proteina

1. Controllo positivo da parte della proteina MalT (attivata in presenza di Maltosio)
2. Controllo positivo da parte del complesso cAMP-CRP(CAP)
3. Recentemente si è visto gene *malT* è controllato negativamente dalla proteina Mlc

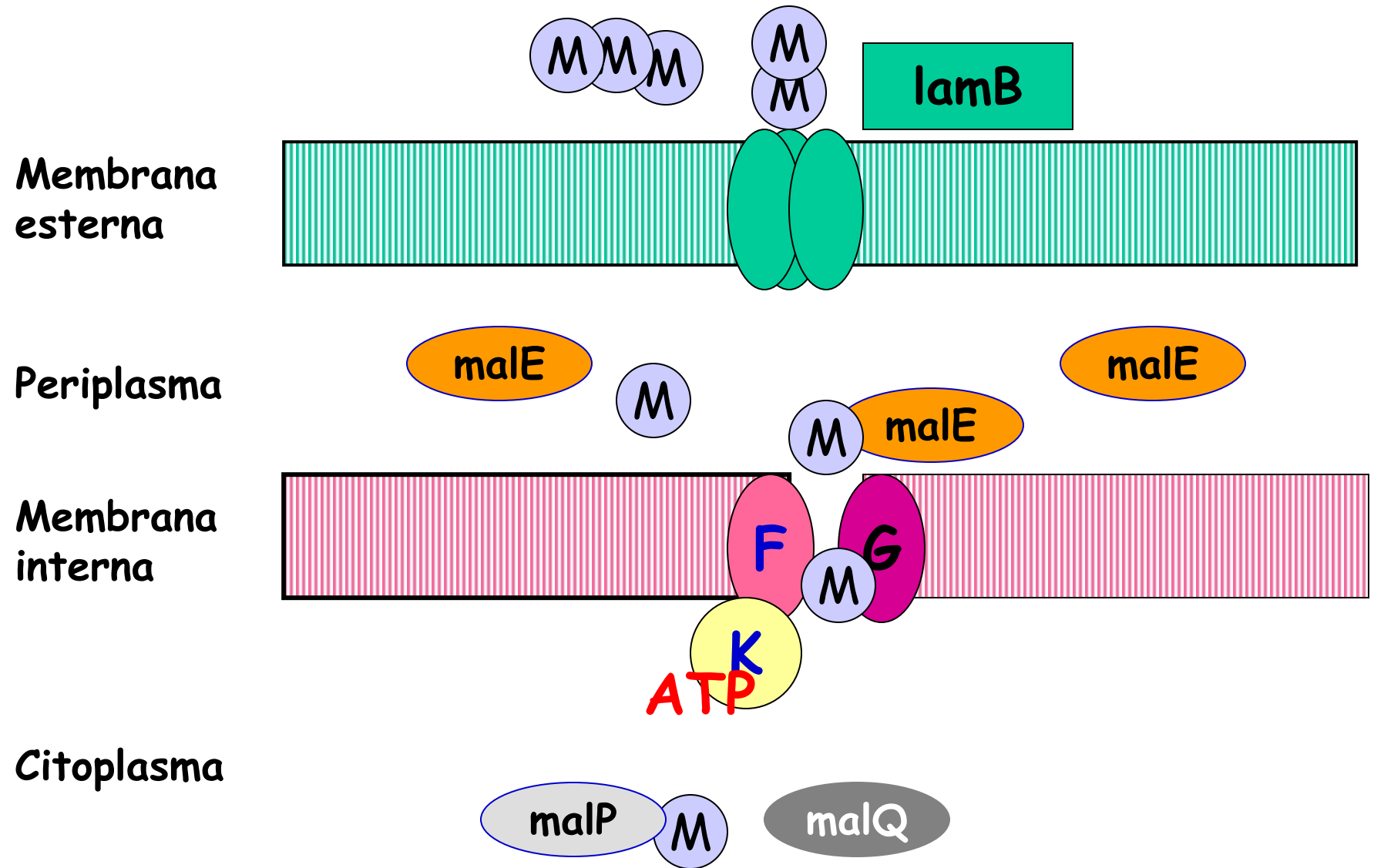
malA

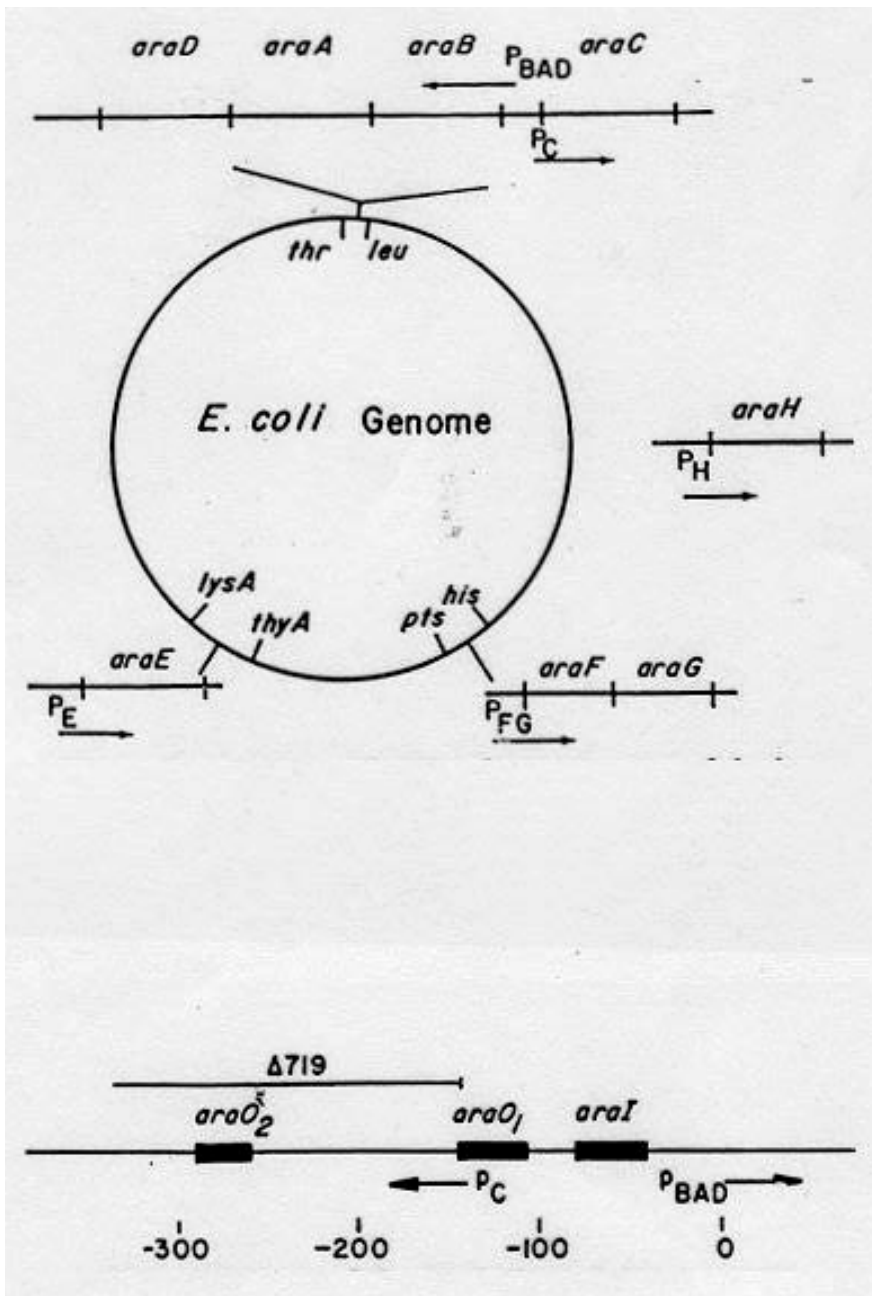


malB



Il sistema maltosio come sistema modello

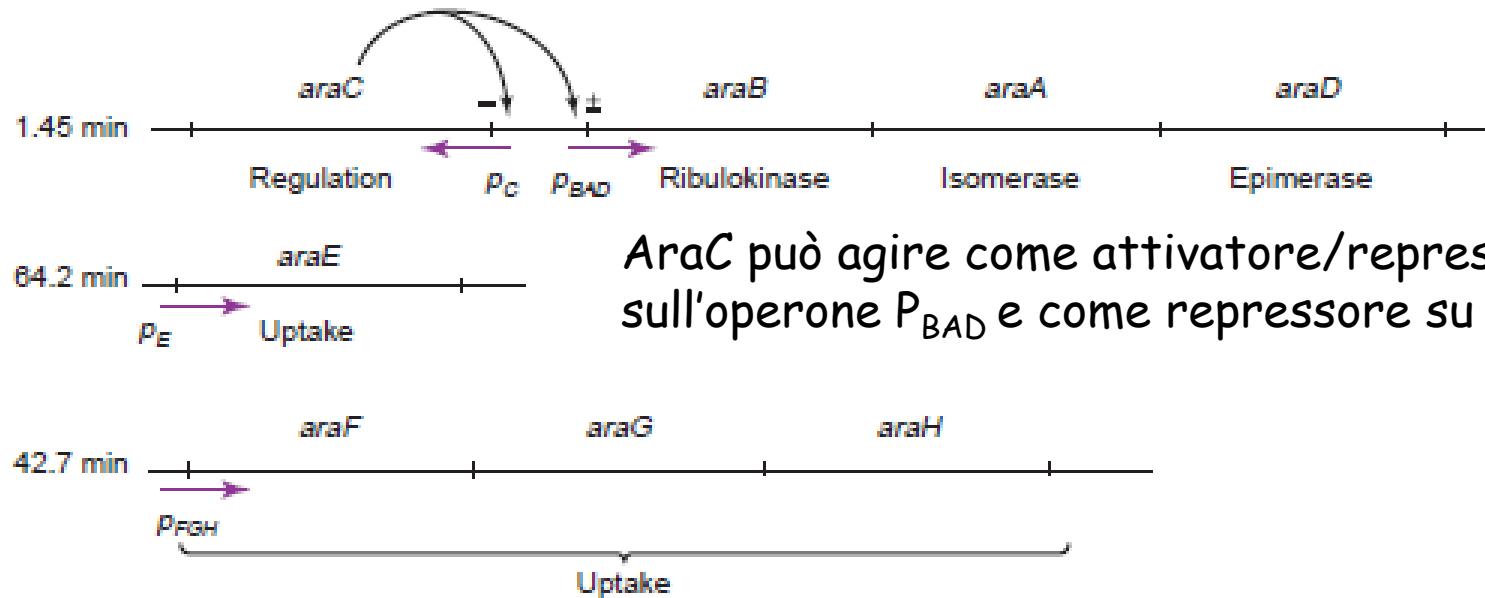




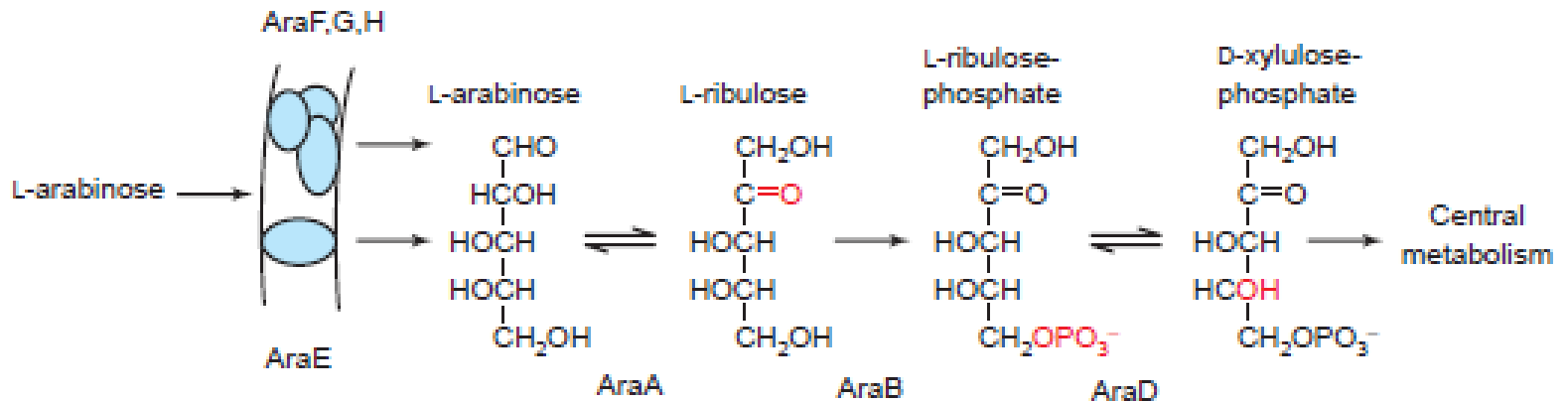
Il sistema arabinosio è dotato di un sistema di regolazione molto complesso

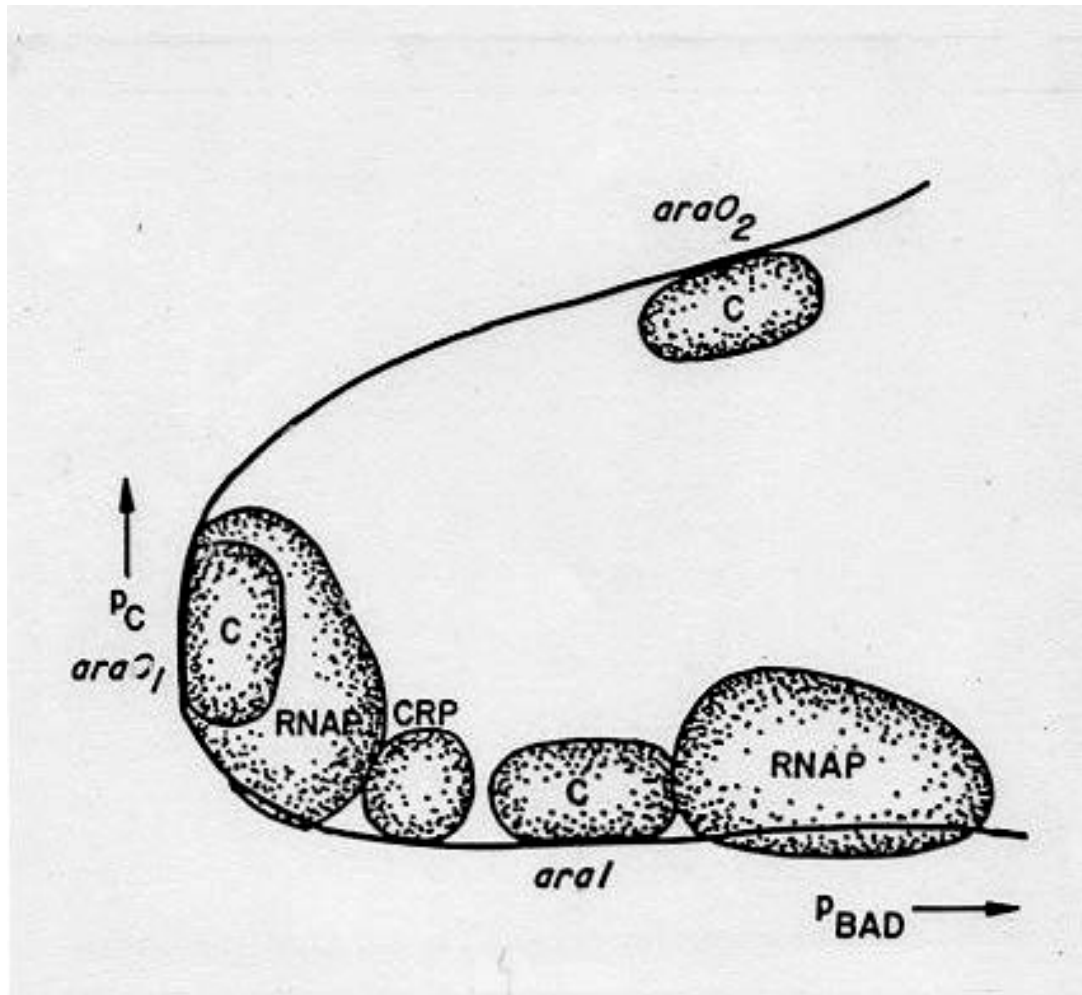
Controllo sia negativo che positivo effettuato dalla medesima proteina AraC

Organizzazione dei geni per il trasporto ed il metabolismo dell'arabinosio



AraC può agire come attivatore/repressore sull'operone P_{BAD} e come repressore su P_C



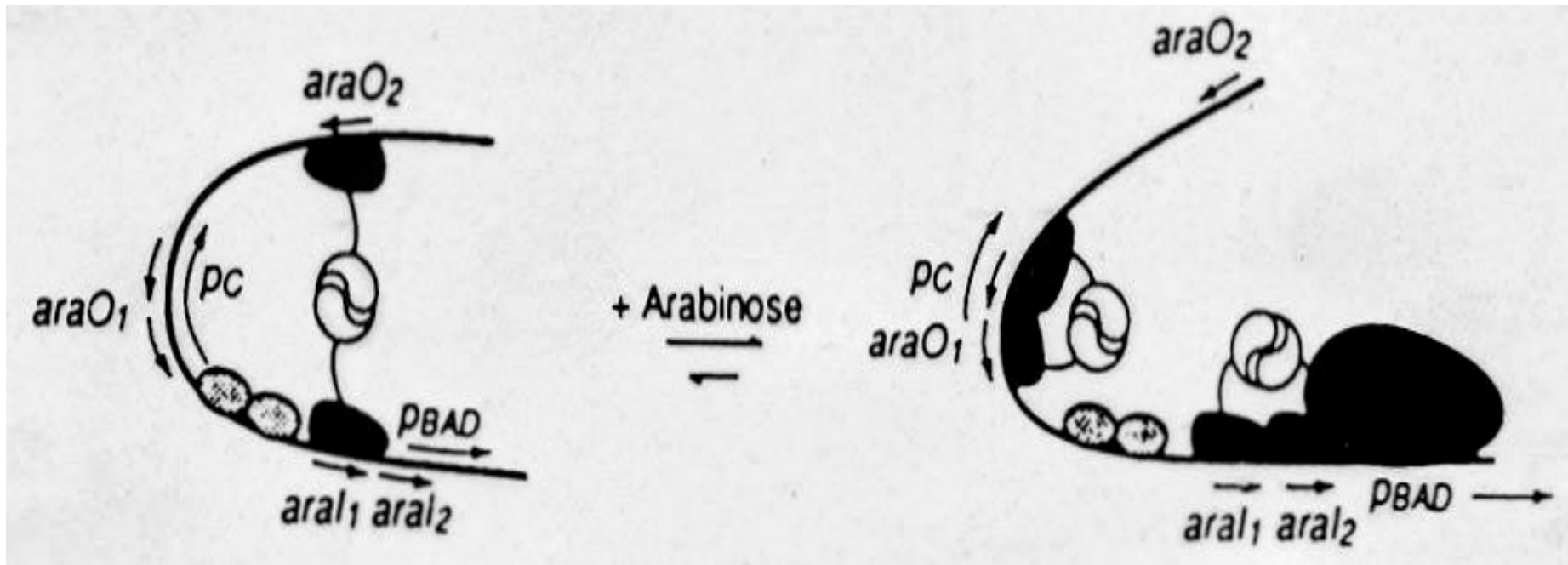


La regione a monte del promotore P_{BAD} contiene 3 siti di legame per la proteina regolatrice AraC

araI
araO1
araO2

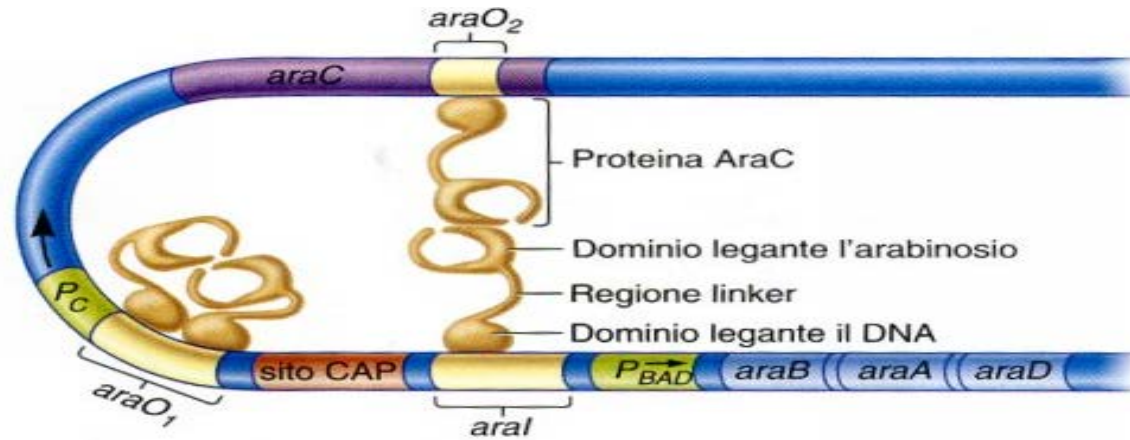
A monte dell' operone *araBAD* è presente il gene *araC* trascritto in direzione opposta

In assenza di arabinosio la proteina AraC si lega ai siti araI1(araI ha due siti 1 e 2) e araO2 impedendo l'accesso alla RNA polimerasi al promotore P_{BAD}

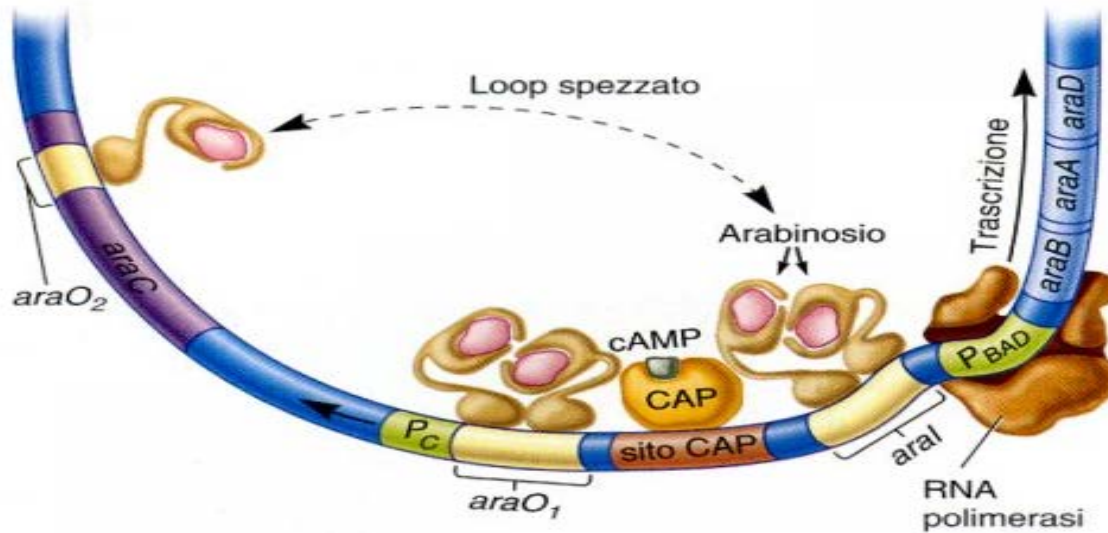


In presenza di arabinosio si ha un cambio conformazionale di AraC che riconoscerà come attivatore i siti araI1 e araI2 adiacenti al promotore P_{BAD} attivandone la trascrizione

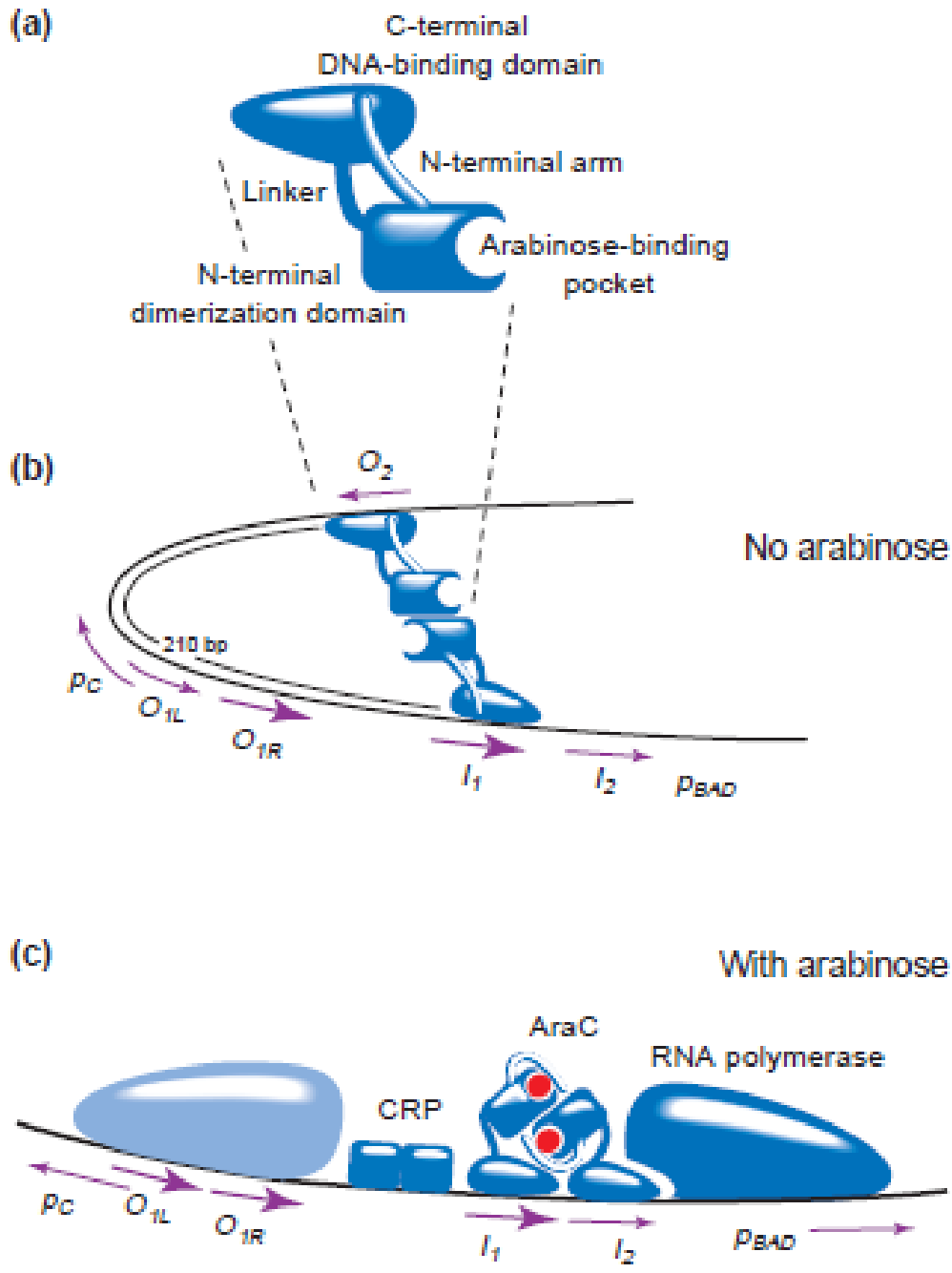
La proteina AraC da repressore ad attivatore



(a) Operone inibito in assenza di arabinosio



(b) Operone attivato in presenza di arabinosio



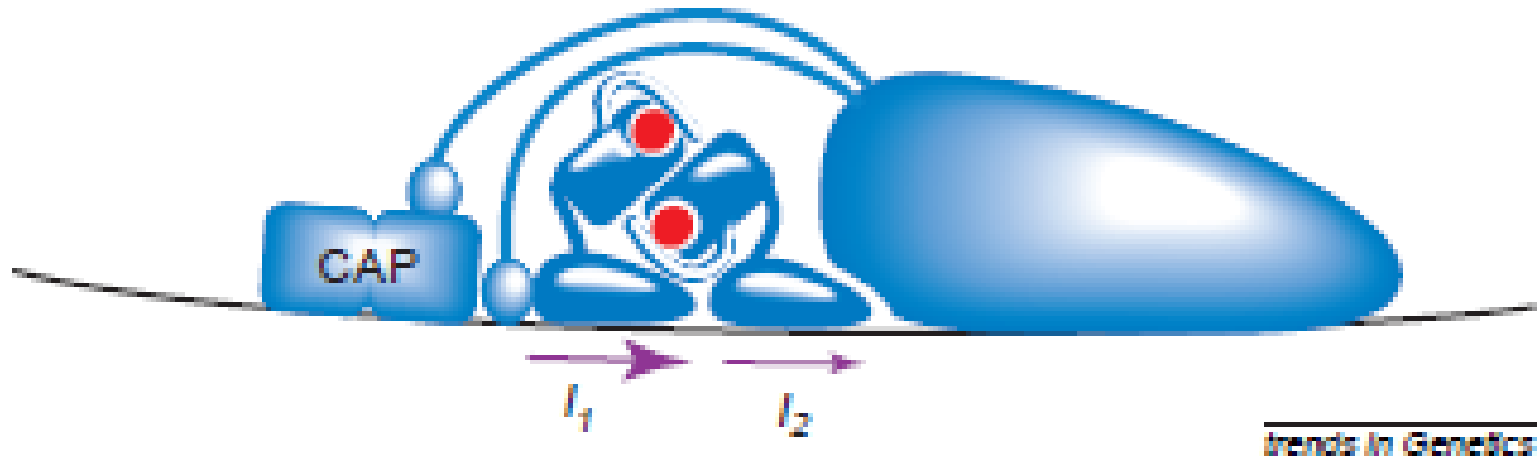
The domain structure of one subunit of the dimeric AraC protein (a) and the pC and pBAD regulatory regions in the absence (b) and presence (c) of arabinose.

The regulatory elements O₂, I₁ and I₂ are 17-bp half-sites of similar sequence that each bind to one subunit of AraC, and O₁ is formed of two half-sites, O_{1L} and O_{1R}, that bind two subunits.

In the absence of arabinose, RNA polymerase is hindered from binding to pBAD and to pC. The cyclic AMP receptor protein, CRP, is probably similarly hindered from binding to its DNA site.

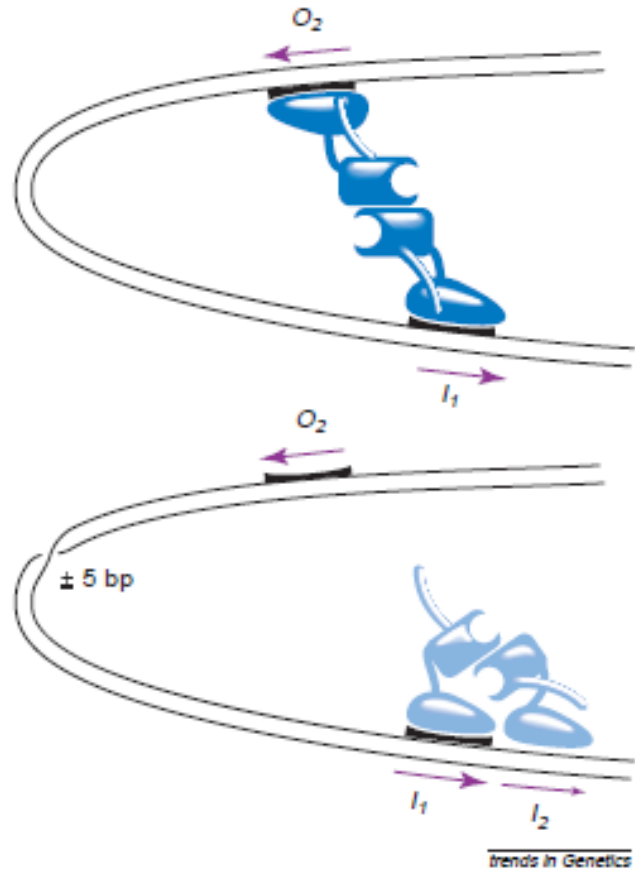
In the presence of arabinose, AraC binds primarily to the adjacent I₁ and I₂ halfsites instead of looping. Consequently, RNA polymerase has free access to pBAD and CRP is free to bind as well. At pC and O₁ RNA polymerase and AraC compete for binding.

Come interagisce la Rna Polimerasi con il promotore P_{BAD} ?



trends in Genetics

Il dominio C terminale della subunità σ della RNA polimerasi prende contatto sia con la regione promotore localizzata tra i siti di legame della proteina CAP e quelli di AraC. Inoltre si verificano altri contatti tra la RNA Polimerasi e la proteina AraC localizzata in prossimità della Rna Polimerasi

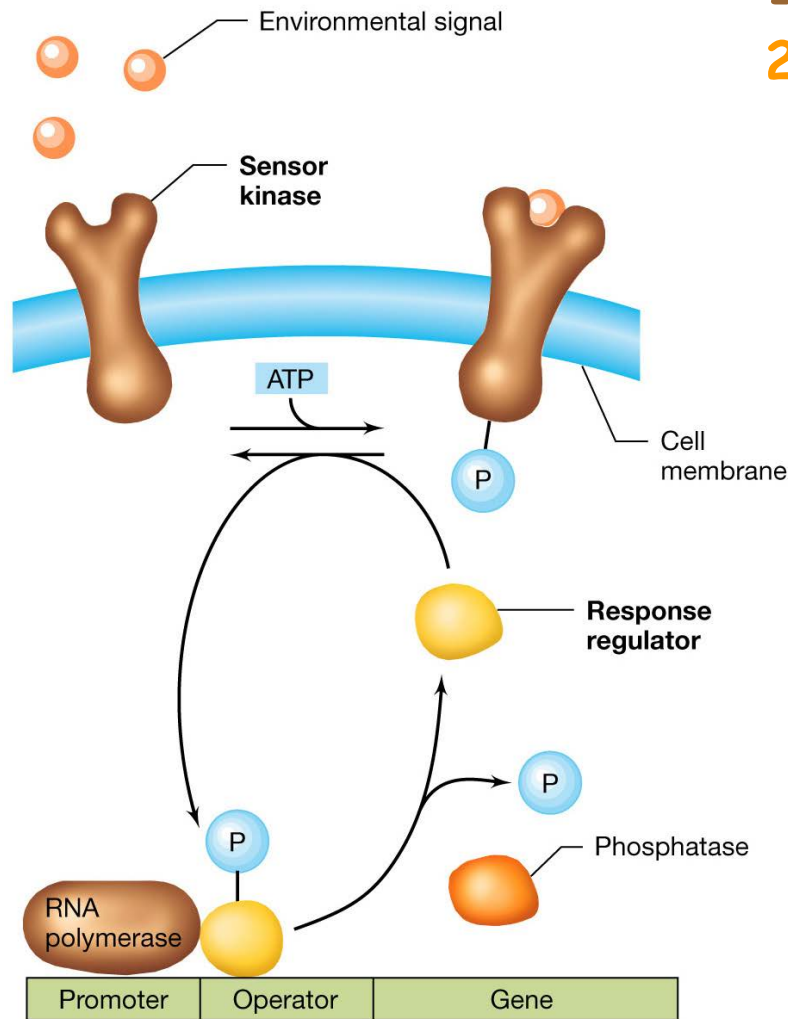


Dimostrazione sperimentale che la formazione dell'ansa tra i siti I_1 e O_2 è essenziale per la repressione AraC mediata in assenza di arabinosio. L'introduzione di $\frac{1}{2}$ giro di elica (± 5 nucleotidi) altera la formazione dell'ansa

I sistemi di trasduzione del segnale a 2 componenti

Costituiti da :

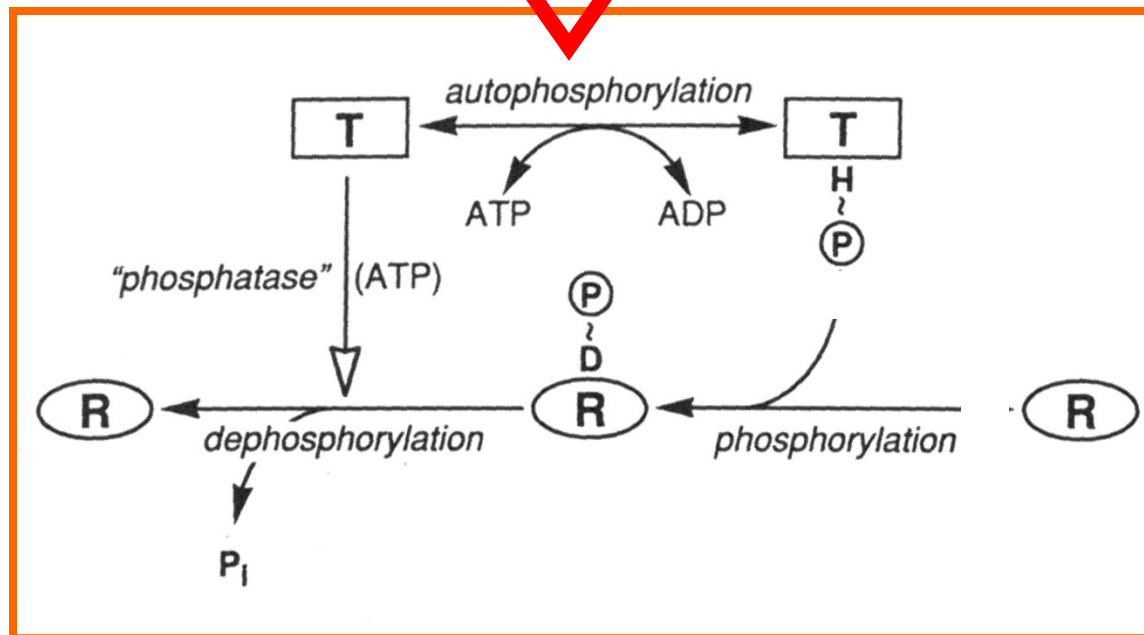
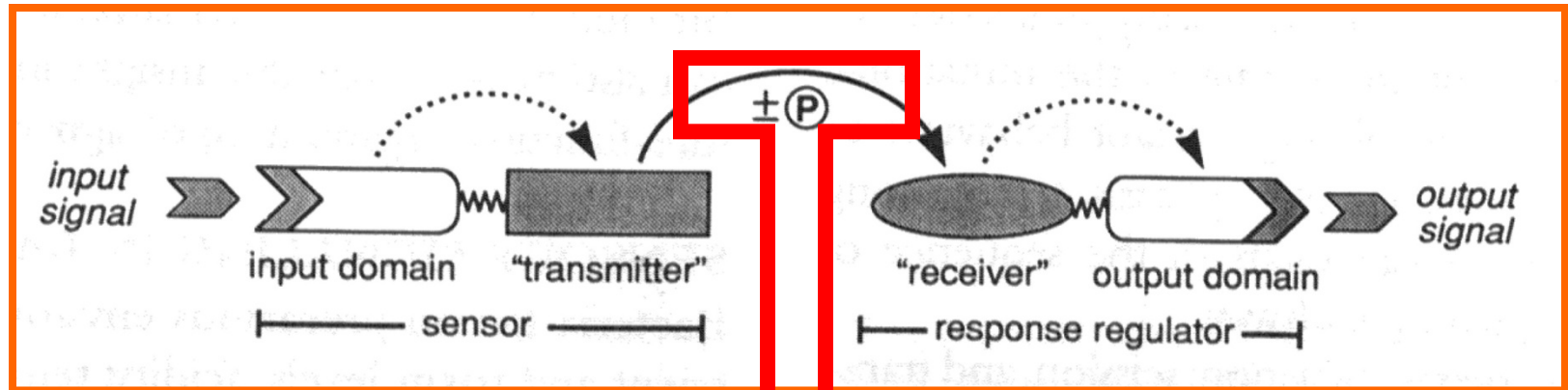
1. Sensore con funzione di chinasi
2. Regolatore trascrizionale



Il segnale, di tipo chimico, viene trasdotto attraverso la membrana, dal sensore e tradotto in segnale chimico come fosforilazione

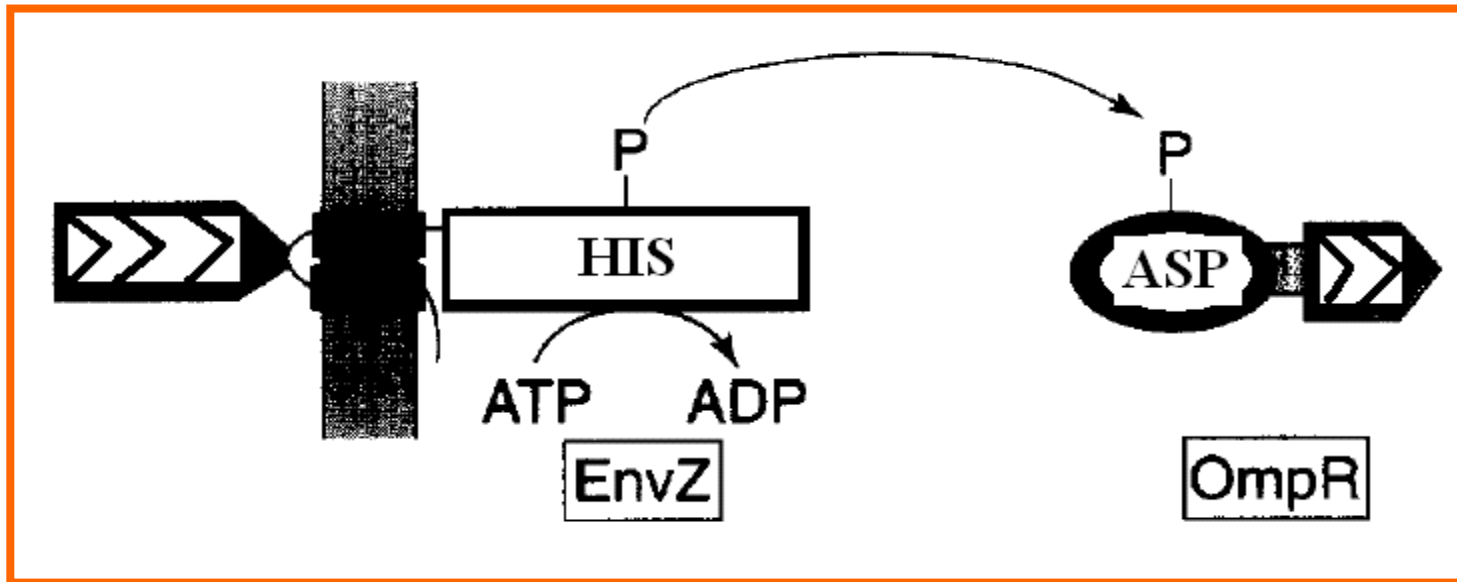
Il segnale, sottoforma di fosforilazione, viene trasferito al regolatore che, modificato strutturalmente esercita il suo ruolo

ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE DEL SISTEMA A DUE COMPONENTI



Un esempio classico di sistema a due componenti è quello denominato EnvZ/OmpR. Questo sistema esercita il controllo sull'espressione di due differenti porine in risposta alle condizioni osmotiche.

EnvZ è proteina integrale di membrana ancorata alla IM
OmpR è il regolatore della risposta localizzato nel citoplasma



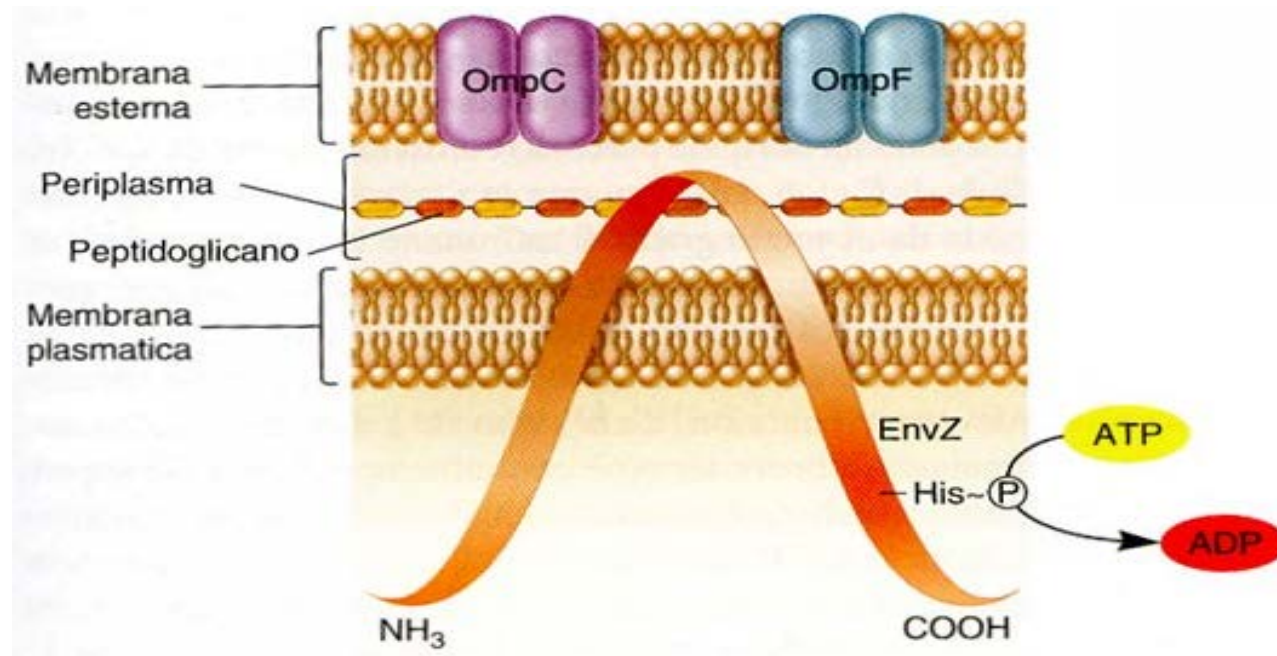
La porina OmpC è caratterizzata da pori di piccole dimensioni e si esprime quando il batterio si trova ad elevati valori di pressione osmotica :

OmpC è la porina principale quando E.coli si trova nell'intestino dell'ospite

La porina OmpF viene espressa quando il batterio E.coli si trova nell'ambiente:

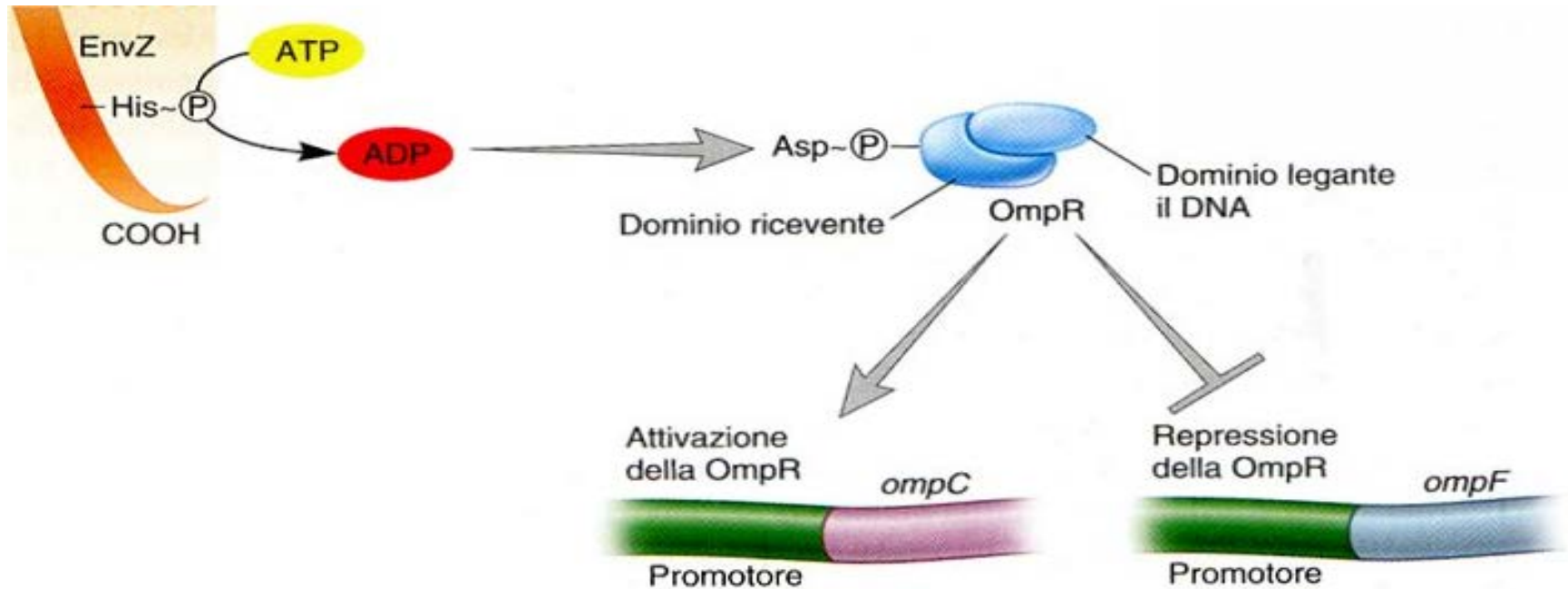
i pori di OmpF sono più grandi quindi i soluti possono diffondere più rapidamente

Sistema a 2 componenti : struttura del sensore EnvZ



EnvZ è una proteina transmembrana della IM. Assume una forma ad ansa all'interno della membrana in modo tale che il dominio centrale sporga nello spazio periplasmatico mentre le estremità N e C sono rivolte verso il citoplasma.

Sistema a 2 componenti : il regolatore OmpR



L'estremità N di OmpR è il dominio ricevente poiché possiede un residuo di acido aspartico che può essere fosforilato da EnvZ.

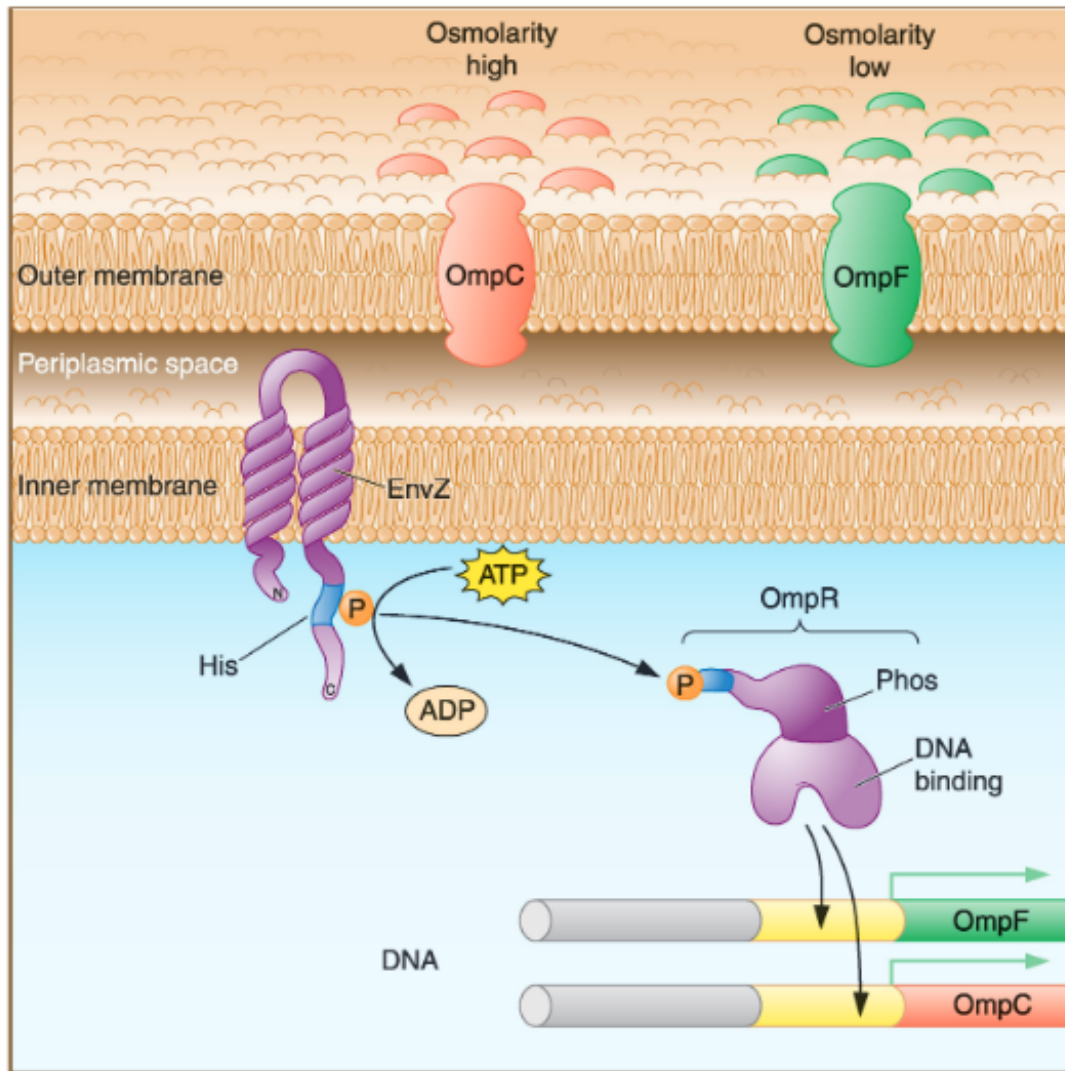
- A bassi livelli di osmolarità EnvZ è inattiva
- Ad alti livelli di osmolarità EnvZ si autofosforila su un residuo di istidina
- **EnvZ-P (hist-P) fosforila OmpR**
- **OmpR-P (asp-P) regola la trascrizione inibendo la trascrizione di *ompF* e attivando la trascrizione di *OmpC***

La proteina EnvZ è dotata di attività autochinasica e di attività fosfatasica a carico di OmpR.

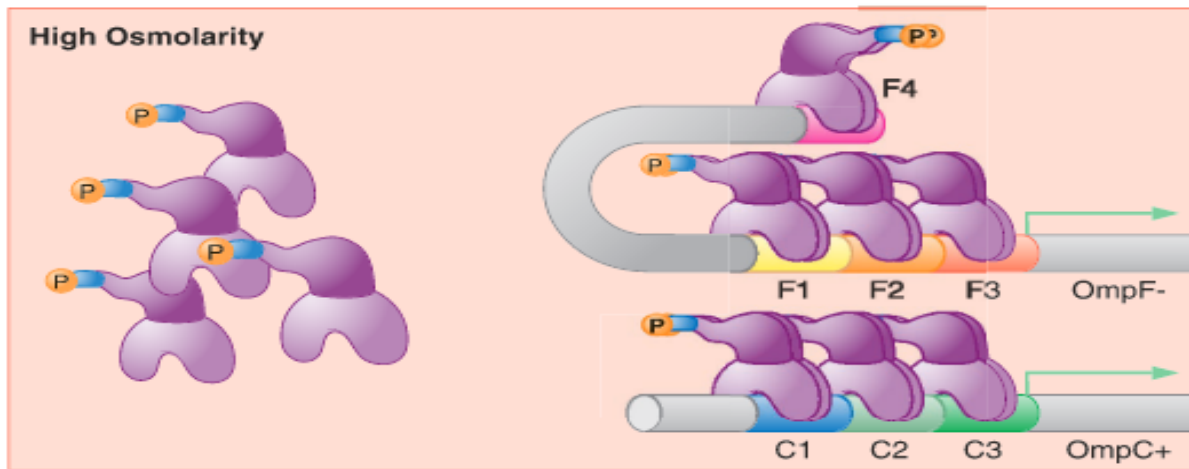
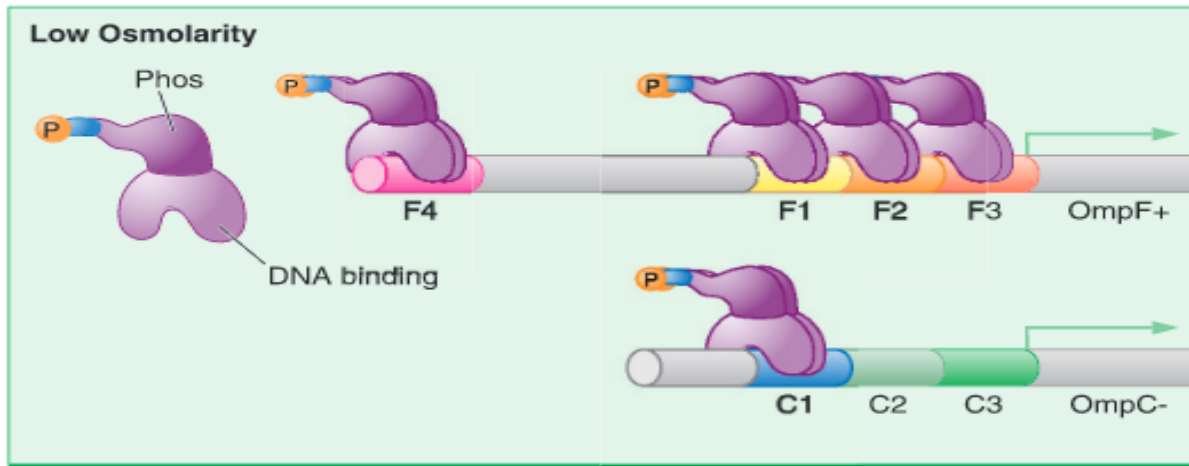
Queste due attività prevalgono l'una sull'altra in risposta alle condizioni di osmolarità dell'ambiente:

In condizioni di elevata osmolarità (elevata presenza di sali) prevale l'attività autochinasica e si ha un aumento di OmpR-fosforilato

In condizioni di bassa osmolarità (bassa presenza di sali) prevale l'attività fosfatasica che riduce OmpR-fosforilato a favore di OmpR



Regulation of the porin genes by the EnvZ/OmpR system. When the osmolarity of the external medium is low, the major porin in the outer membrane is OmpF. At high osmolarity, *ompF* is repressed and OmpC is the predominant porin in the outer membrane. This process is regulated by the two-component regulatory system that consists of the two proteins EnvZ and OmpR. EnvZ is an inner membrane sensor kinase. It is phosphorylated on a conserved histidine residue by cytoplasmic ATP. It transfers the phosphoryl group to the response regulator OmpR on a conserved aspartic acid residue in its N-terminal receiver domain. Phospho-OmpR binds to the regulatory regions of the porin genes and alters their expression.



Osmoregulatory scheme for porin gene expression. At low osmolarity, there is a low concentration of OmpR-P. Based on our previous studies, we think it likely that OmpR is phosphorylated by EnvZ while it is bound to the regulatory regions. OmpR-P bound to the *ompF* regulatory region activates *ompF*. OmpR-P is also bound to C1. Because OmpR-P has similar affinity for the low affinity sites C2 and C3 as it does for low affinity sites F2 and F3, the observation that *ompC* is not expressed at low osmolarity suggests that OmpR-P may be prevented from binding at these sites at low osmolarity. At high osmolarity, the concentration of OmpR-P increases, a loop forms (facilitated by Integration Host Factor binding) and OmpR-P molecules bound at the upstream site F4 interact with OmpR-P molecules bound at the low affinity sites F2 or F3. The result is to repress *ompF* expression. At the *ompC* regulatory region, a change in accessibility of the low affinity sites C2 and C3 enables OmpR-P to bind, activating *ompC*.

Le porine sono proteine che formano dei canali che permettono il passaggio di piccole molecole idrofiliche attraverso il rivestimento cellulare.

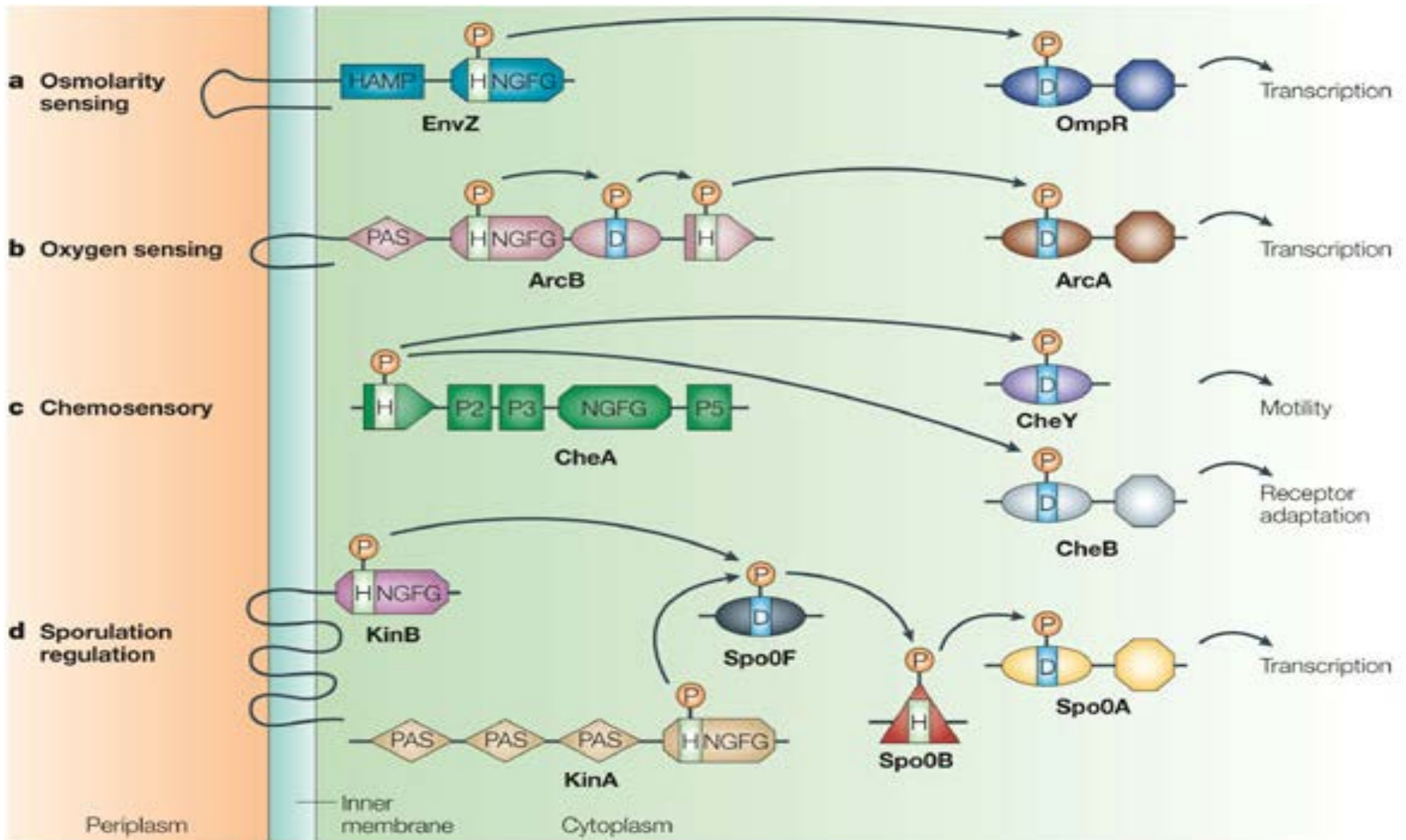
E.coli ne possiede due tipi che si distinguono per le dimensioni del poro e, quindi, per la selettività nella permeabilità.

Le porine di tipo OmpC hanno un canale di 1.08 nm mentre quelle di tipo OmpF ne presentano uno di 1.16 nm

In condizioni di differenti osmolarità, anche se la quantità totale di porine resta invariata, cambia la loro composizione qualitativa

In condizioni di alta osmolarità prevale la forma OmpC, mentre in condizioni di bassa osmolarità prevale la forma OmpF.

Ruolo delle istidin protein chinasi (HPK) e dei regolatori della risposta con dominio aspartato (RR) nel sistema di trasduzione del segnale basato sul fosforilazione istidina aspartato (HAP)



QUORUM SENSING

Quorum sensing svolge un ruolo importanti in molti fenomeni

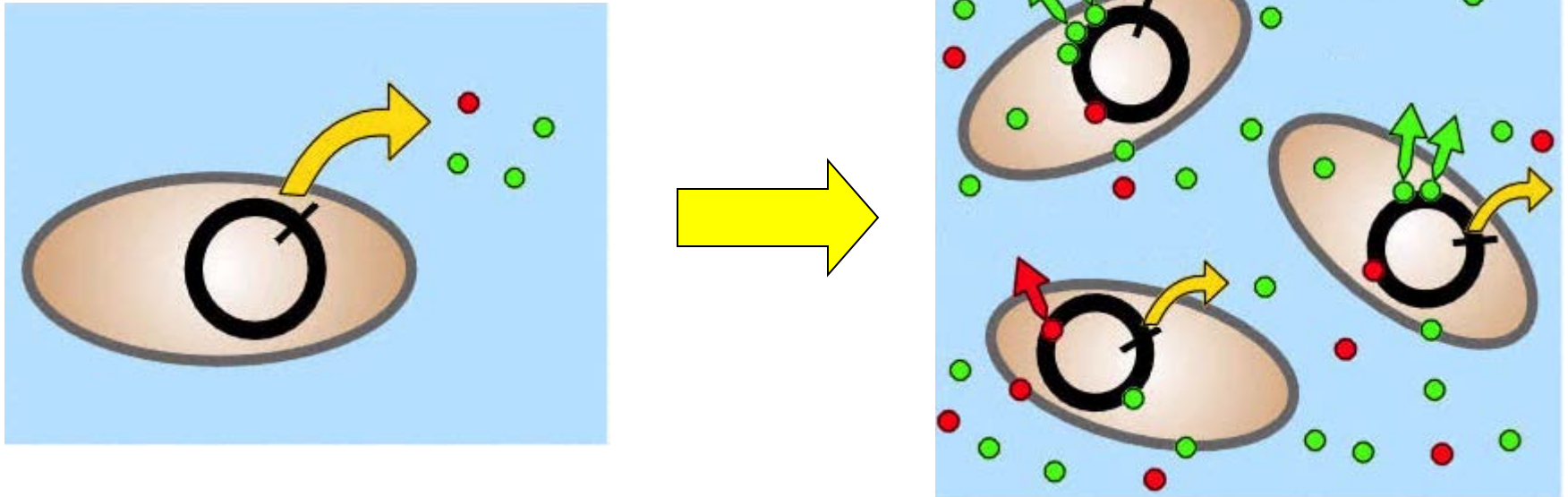
- Espressione della virulenza
- Simbiosi
- Produzione di biofilm
- Coniugazione
- Sporulazione
- Trasformazione

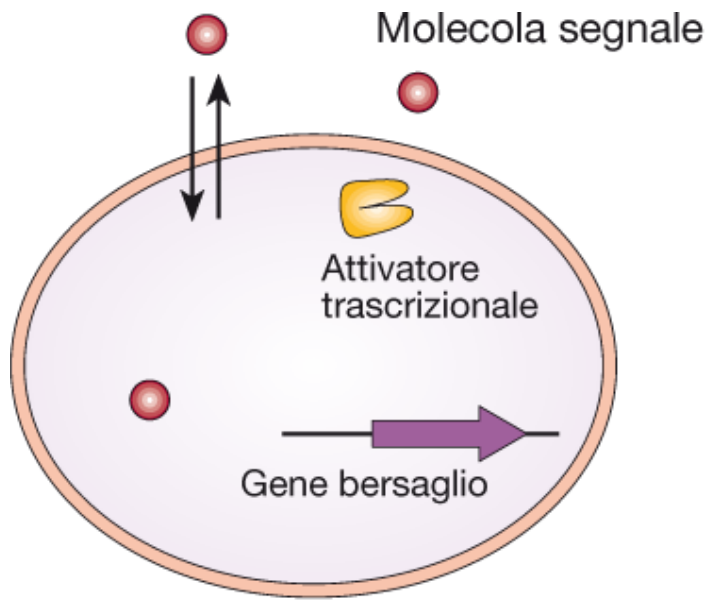
Il sistema del quorum sensing è stato molto studiato in *Vibrio fischeri* un batterio in grado di emettere luminosità ad alta densità cellulare.

QUORUM SENSING

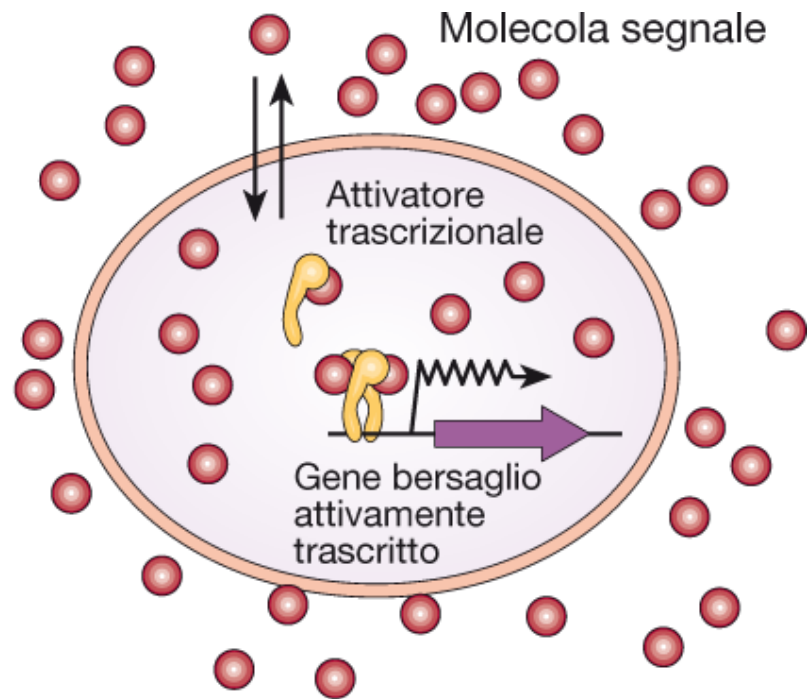
Nel quorum sensing la molecola segnale viene sintetizzata dal batterio stesso che dispone anche del sensore

La secrezione della molecola segnale fa sì che questa raggiunga una concentrazione funzionale solo quando la densità cellulare raggiunge elevati livelli.

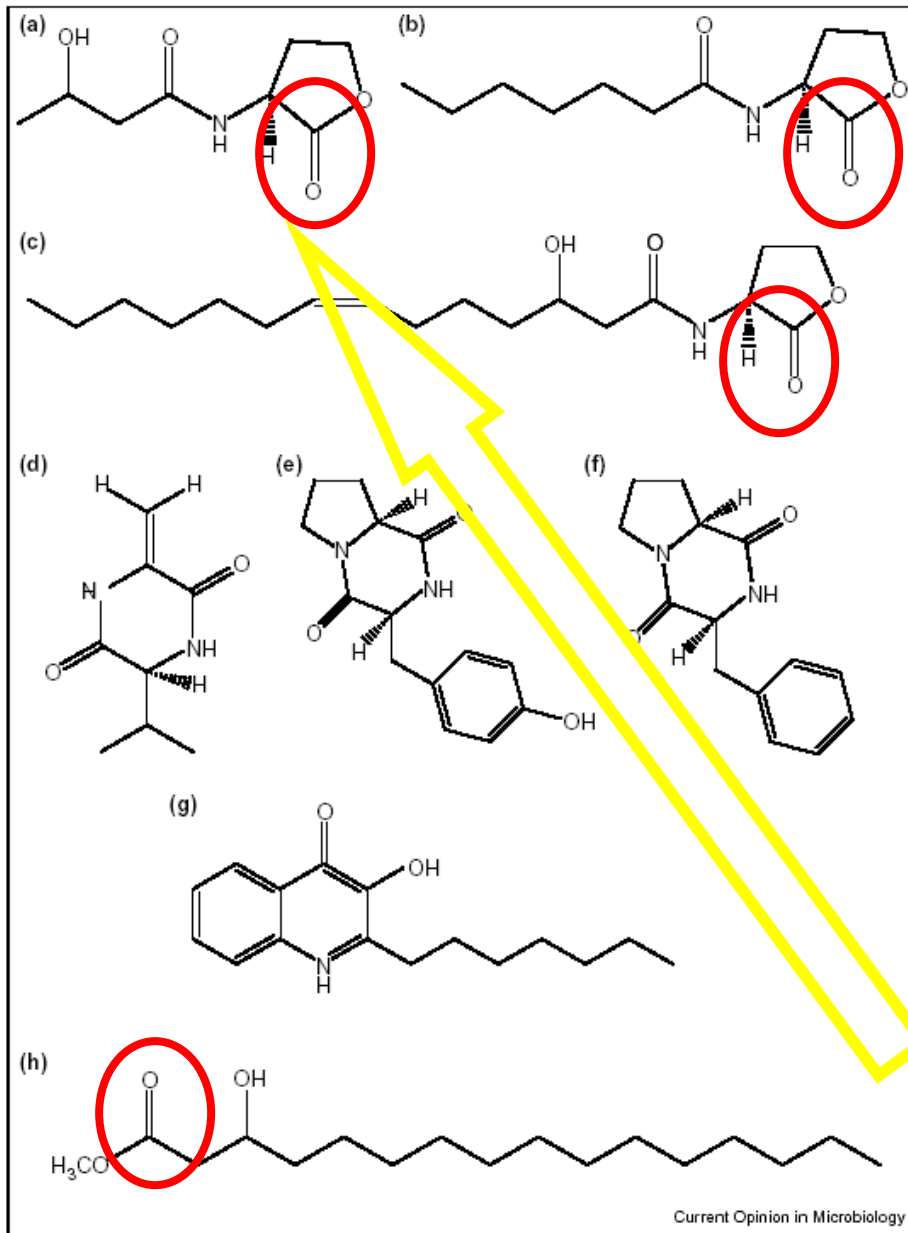




Bassa concentrazione
cellulare



Alta concentrazione
cellulare



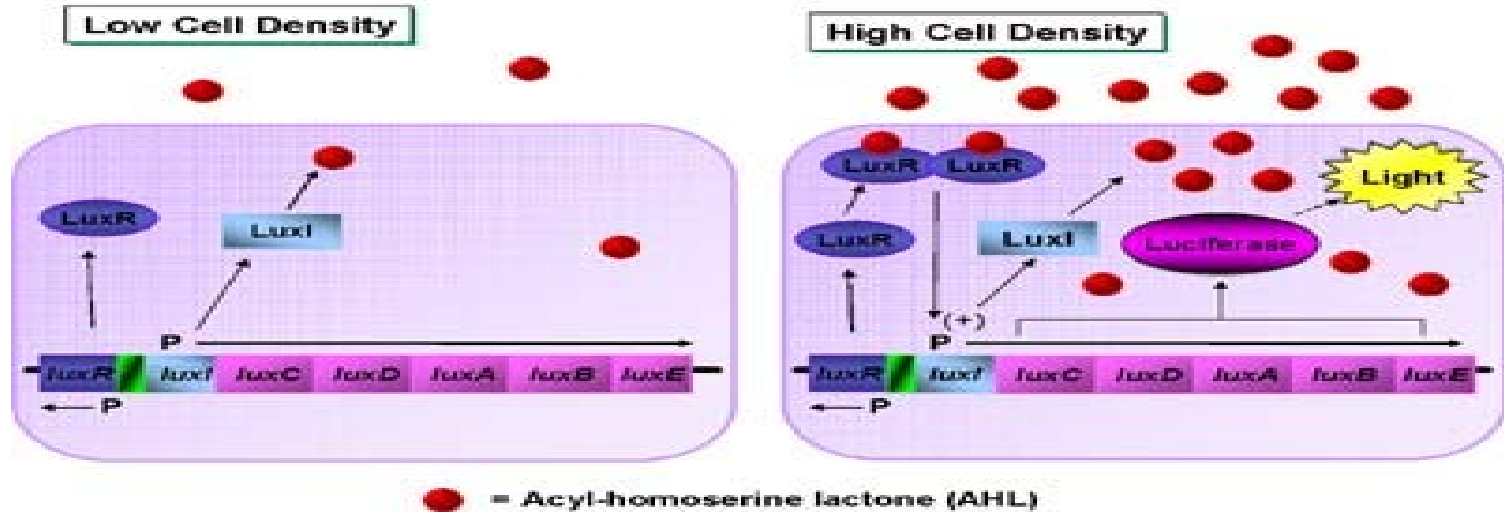
Le molecole segnale tipiche dei gram negativi (*Vibrio fischeri* e *harveyi*) sono molecole organiche caratterizzate spesso da uno o più gruppi lattonici.

La più famosa è la AHL (omoserina-lattone acilato)

Questa molecola diffonde all'esterno della cellula.
La concentrazione diventa elevata solo quando ci sono
altri batteri che la producono nelle vicinanze.
AHL sono induttori che si combinano con un
attivatore.

Operone lux è sotto il controllo di LuxR che è indotto
quando la concentrazione di AHL (sintetizzato dal
gene luxI)diventa elevata.

Quorum Sensing



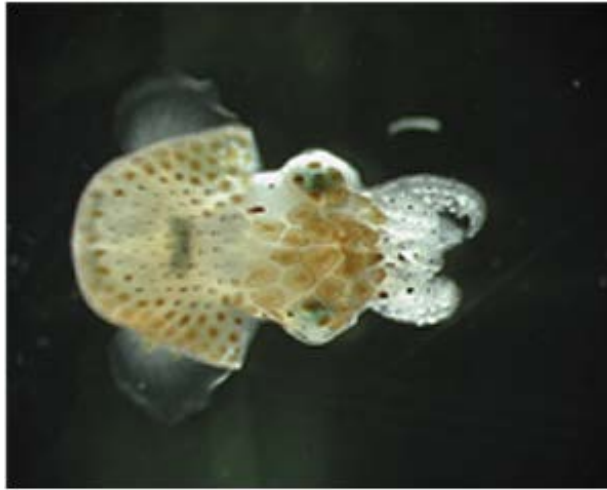
La sintesi di AHL è catalizzata dalla AHL sintetasi prodotta dal gene luxI.

LuxI è regolato positivamente da LuxR, un attivatore trascrizionale attivo in presenza di AHL

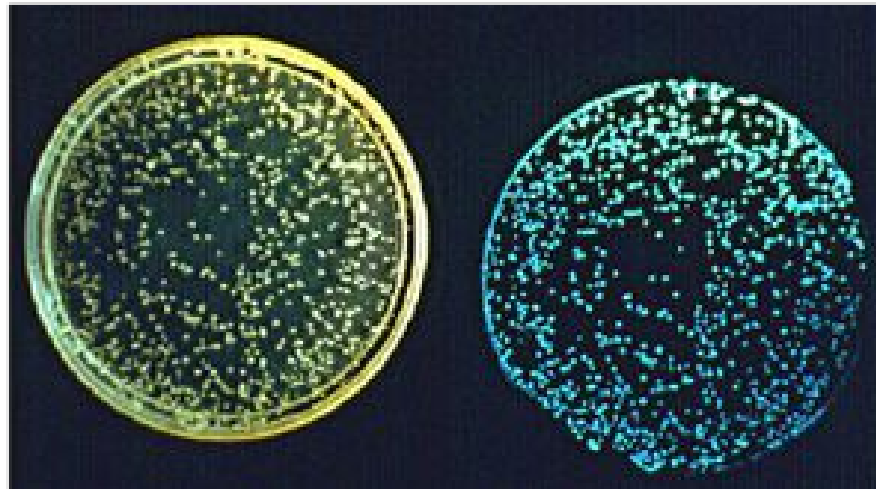
In assenza di LuxR-AHL luxI è trascritto a basso livello
AHL diffonde al di fuori della cellula.

Man mano che la densità cellulare aumenta la concentrazione di AHL prodotta dalla popolazione batterica aumenta.

Se la concentrazione di AHL esterna è superiore a quella interna AHL fluisce verso l'interno della cellula e attiva LuxR provocandone la dimerizzazione. Il dimero di LuxR-AHL riconosce una sequenza di 20 nucleotidi sul promotore dei geni lux che contiene, oltre a luxI i geni coinvolti nella bioluminescenza, attivandone così la trascrizione da parte della RNA polimerasi

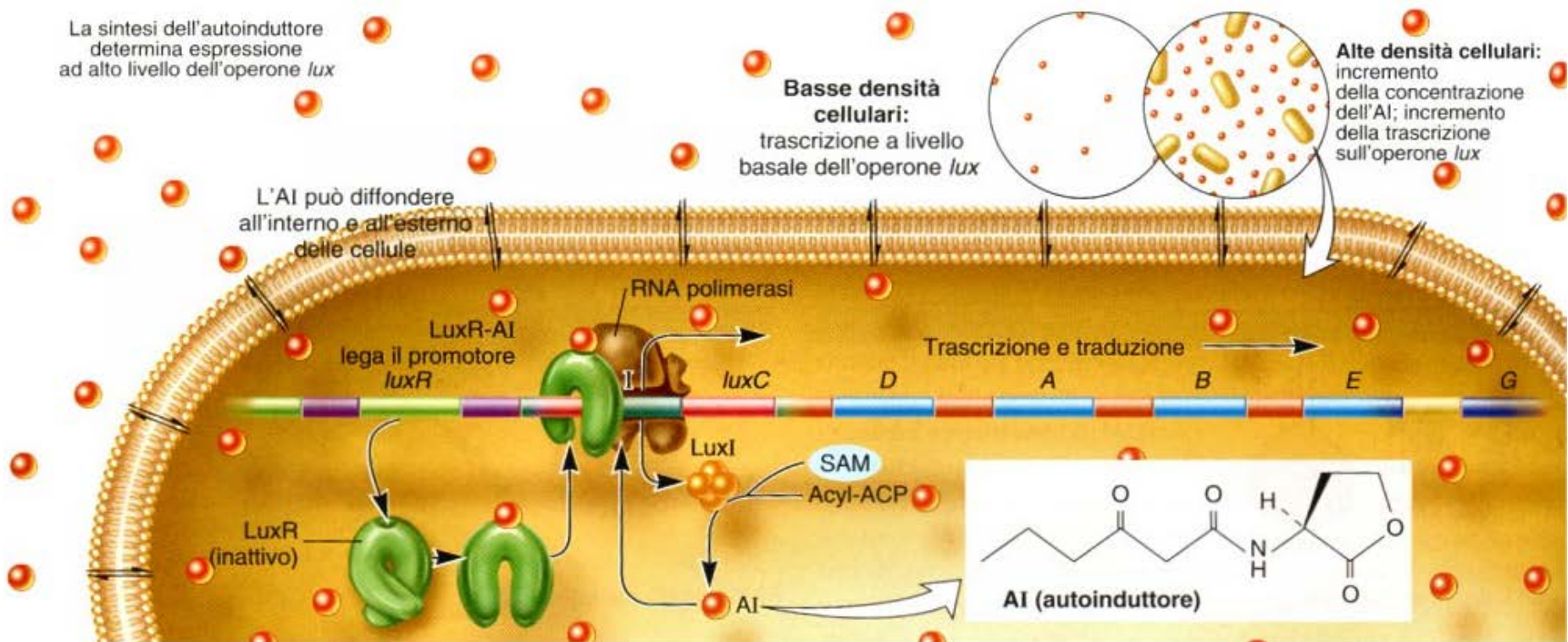


La seppia, *Euprymna scolopes*, è un piccolo invertebrato marino notturno che caccia le sue prede durante la notte in acque torbide.



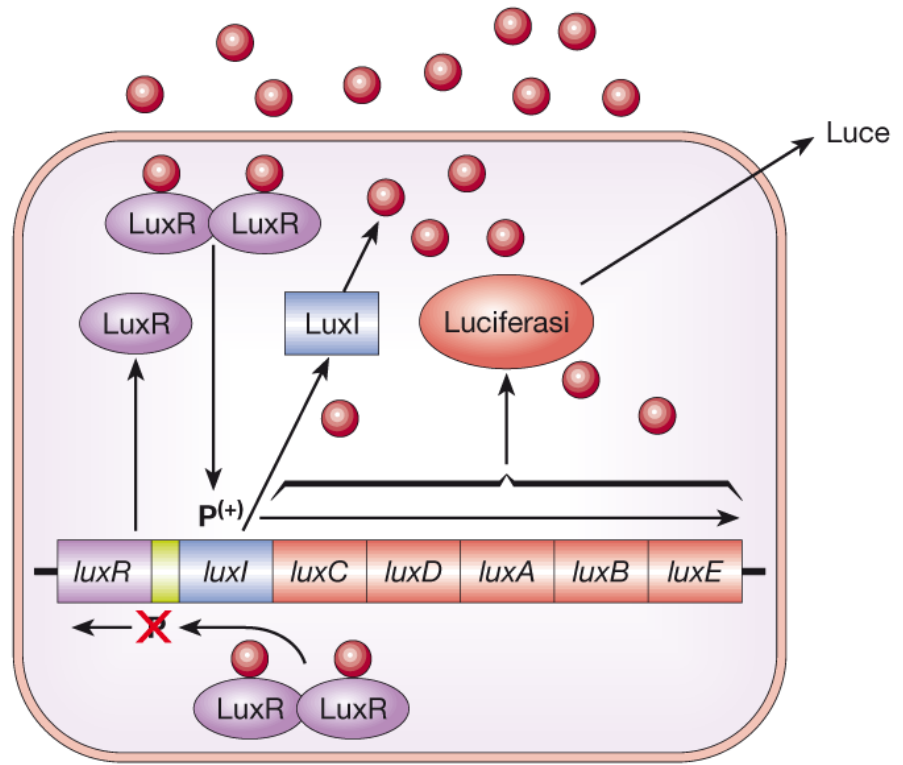
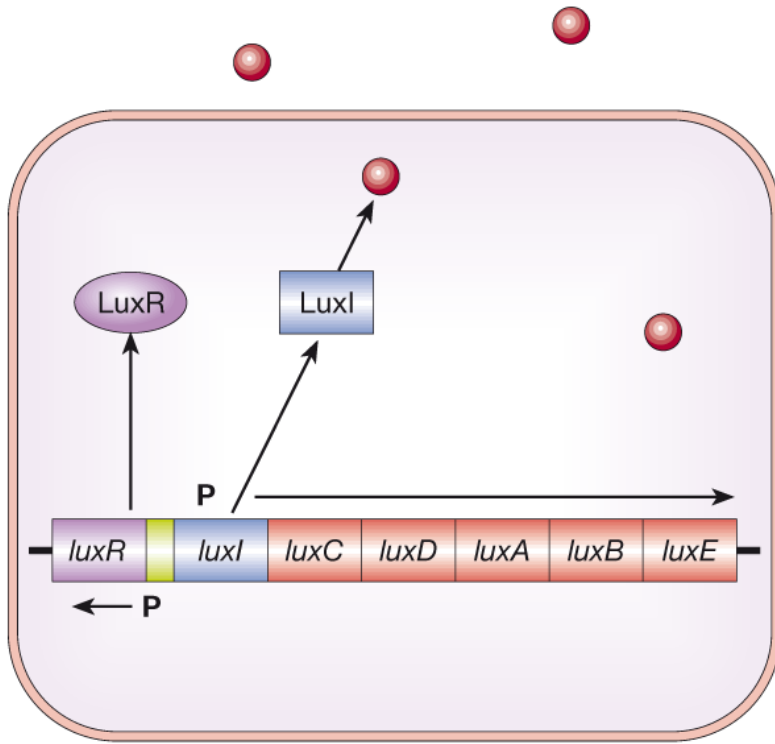
Vibrio fischeri colonies on an agar plate under normal light (left) and in the dark (right), demonstrating bioluminescence. Credit: J. W. Hastings, Harvard University, through E. G. Ruby, University of Hawaii. [1] [↗](#) [↗](#) [↗](#)

Il sistema del quorum sensing visione complessiva



Bassa densità cellulare

Alta densità cellulare



● = acil-omoserin-lattone