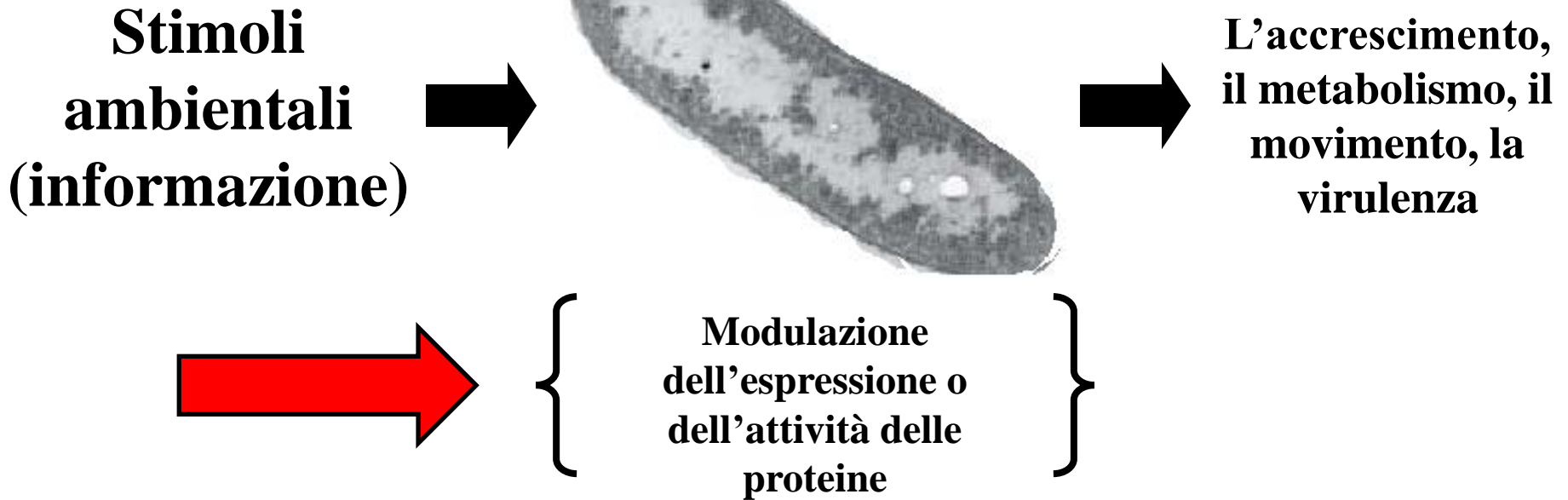


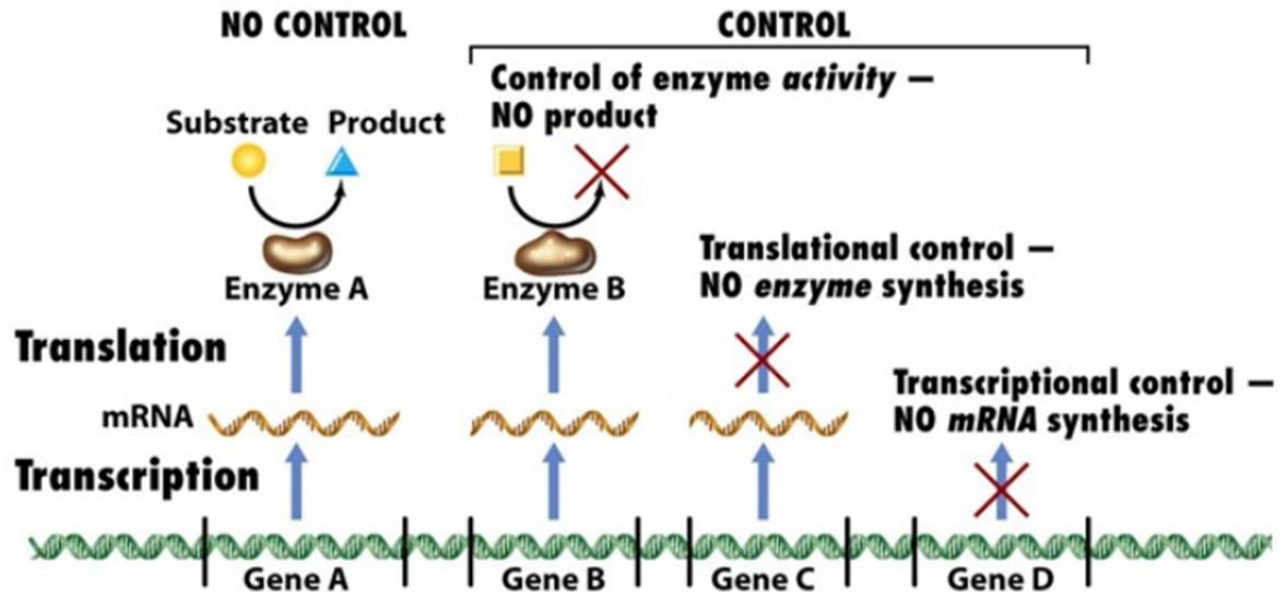
Un organismo vivente si comporta come un sistema termodinamicamente aperto, ovvero, interagisce con l'ambiente scambiando materia ma anche "informazioni"



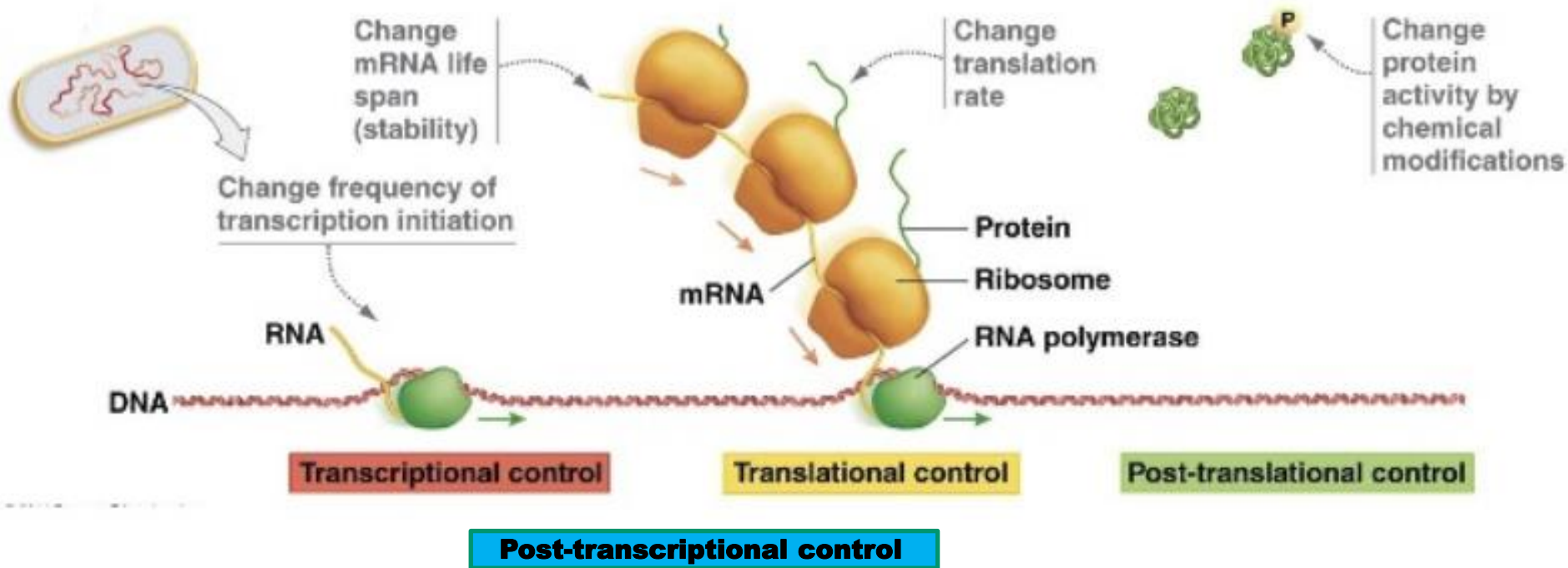
Overview sulla regolazione genica

Alcune proteine e molecole di RNA sono necessarie nella cellula più o meno allo stesso livello in tutte le condizioni di crescita; l'espressione di queste molecole è detta costitutiva. Tuttavia, particolari proteine o RNA sono necessari in alcune condizioni ma non in altre. L'espressione di questi geni deve essere regolata.

La regolazione ha luogo a differenti livelli.....



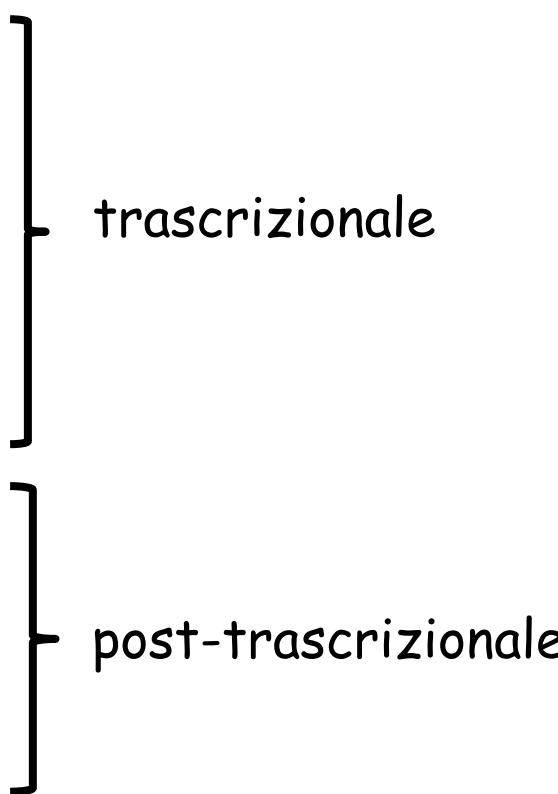
Livelli della regolazione genica nei procarioti



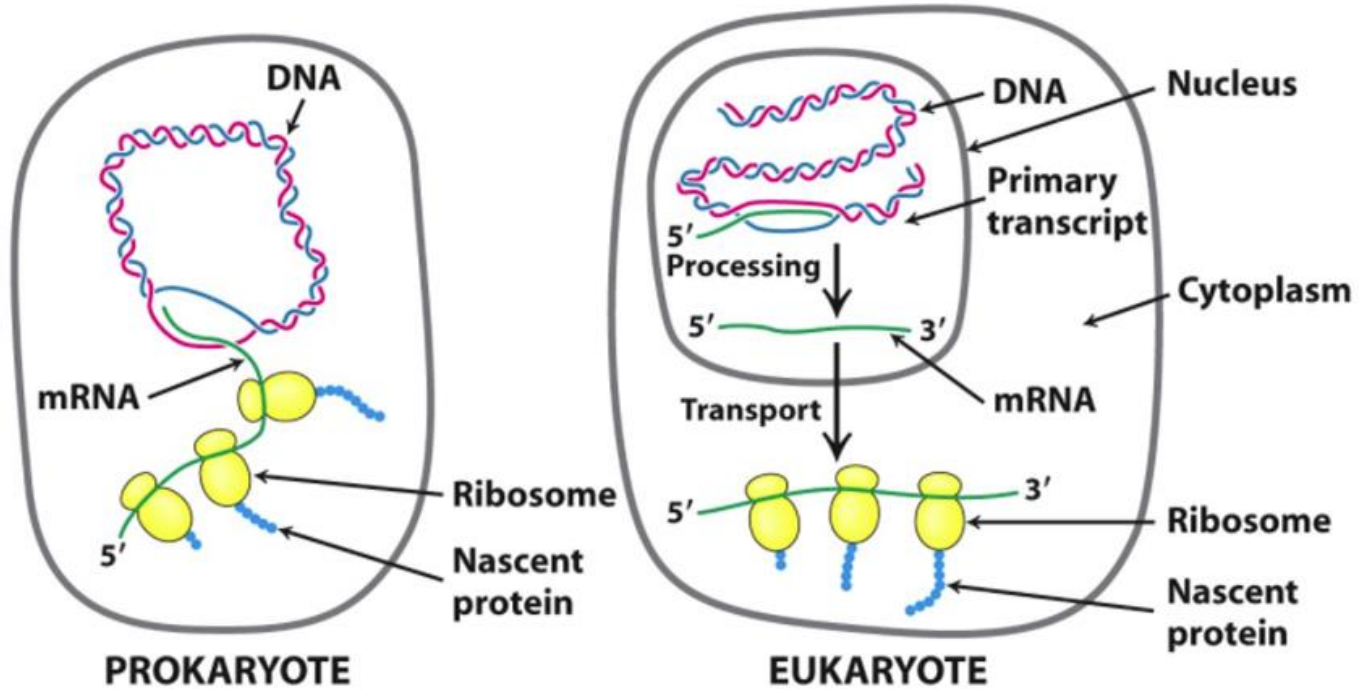
Regolazione genica nei batteri

Lo scopo è: adattarsi rapidamente alle
cambiamento delle condizioni ambientali

Livelli regolativi (lista parziale)

- Uso di fattori sigma alternativi
 - Regolazione trascrizionale mediate da proteine regolative
 - Regolazione negativa
 - Regolazione positiva
 - small regulatory RNAs
 - Riboswitches
 - attenuazione
- trascrizionale
- post-trascrizionale
- 

Processi di espressione genica: procarioti vs eucarioti



L'espressione genica nei procarioti ha luogo in un singolo compartimento, mentre l'espressione genica negli eucarioti ha luogo in più compartimenti e coinvolge fasi di controllo aggiuntive

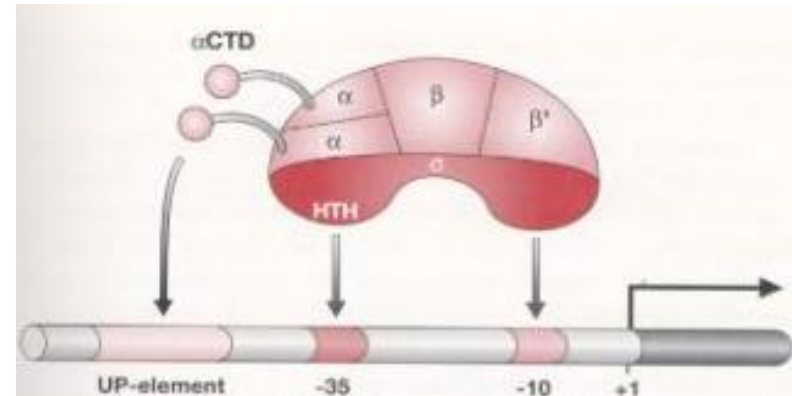
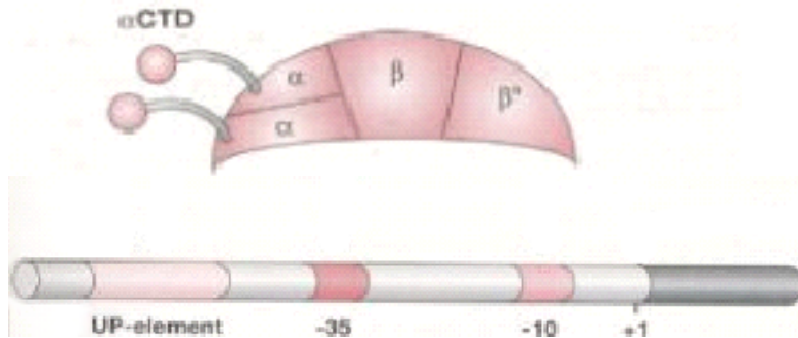
RNA polimerasi (Batteri)

La RNA polimerasi (RNAP) è l'enzima responsabile del processo trascrizionale

La RNAP è presente nei batteri in due forme:

La **RNAP core** (che consiste di 2 subunità α , una subunità β e una β') **che possiede l'attività polimerasica** (una subunità aggiuntiva, la ω , è implicata nell'assemblaggio del complesso trascrizionale in alcuni batteri)

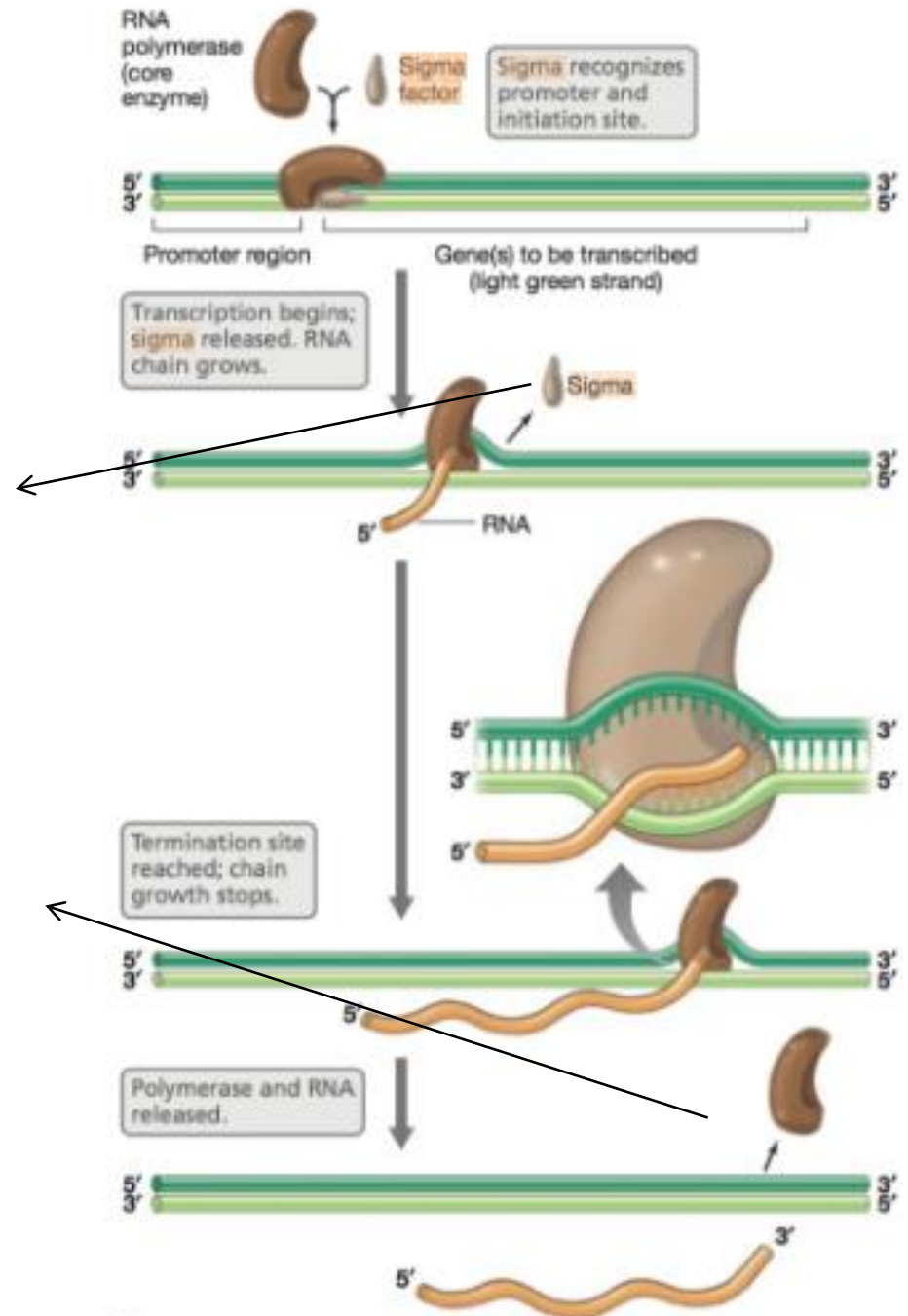
La **RNAP oloenzima** (è formata dalla RNAP core e da una subunità aggiuntiva, il **fattore sigma**). Il fattore sigma conferisce alla RNAP la capacità di riconoscere in maniera specifica e legare la regione promotore di un gene



Fasi della trascrizione

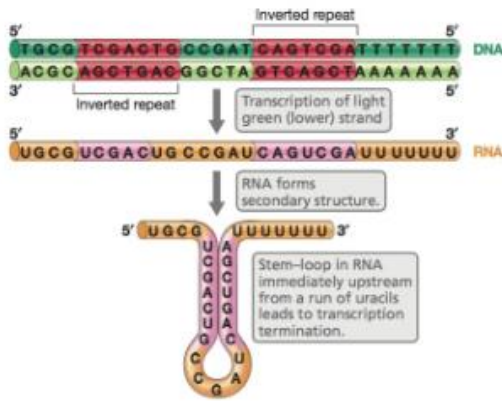
Il fattore sigma è essenziale per il legame della RNA polimerasi al promotore ma non è necessaria nella fase della polimerizzazione

La trascrizione termina in corrispondenza di specifiche regioni/sequenze dette "terminatori trascrizionali"

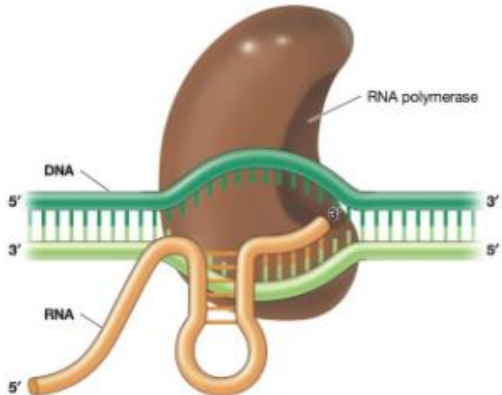


Terminatori trascrizionali

Terminatori intrinseci

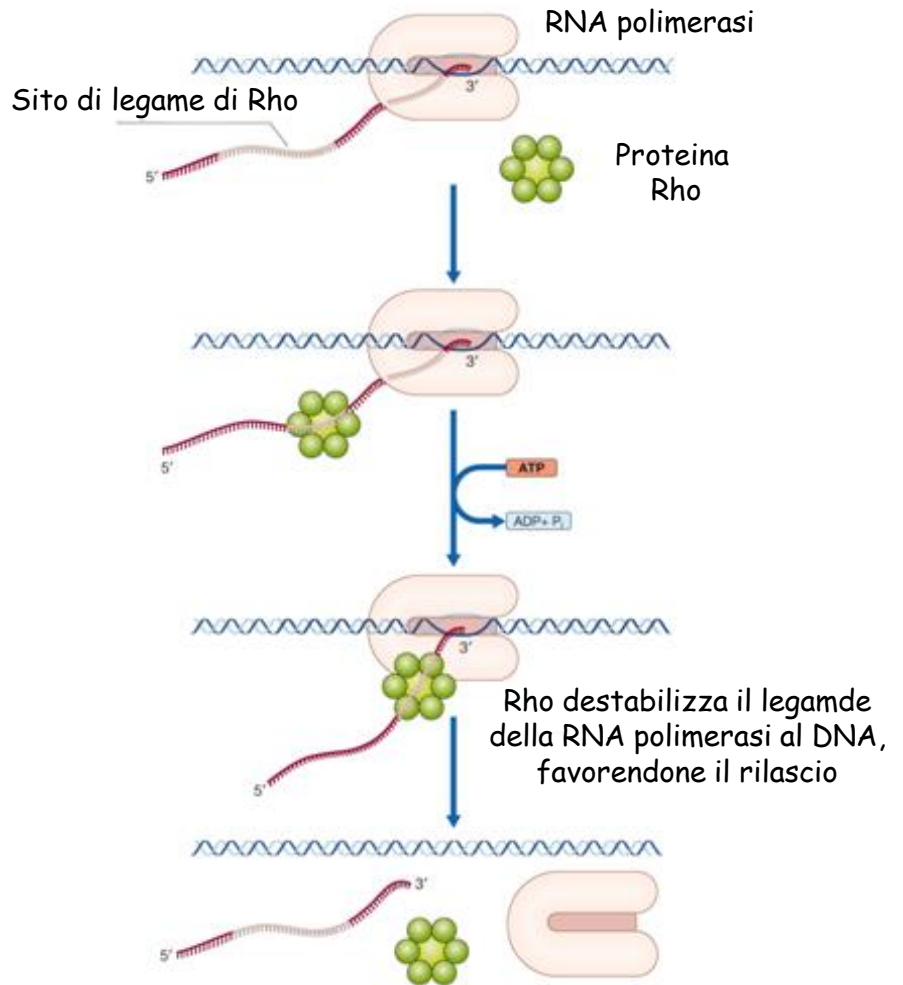


L'mRNA nascente forma una struttura detta stem-loop seguita da una sequenza ricca di uracili



La struttura stem-loop induce il rilascio della RNA polimerasi, favorito anche dalla regione di poli-U

Terminatori Rho-dipendenti (o dipendenti da proteine simili)

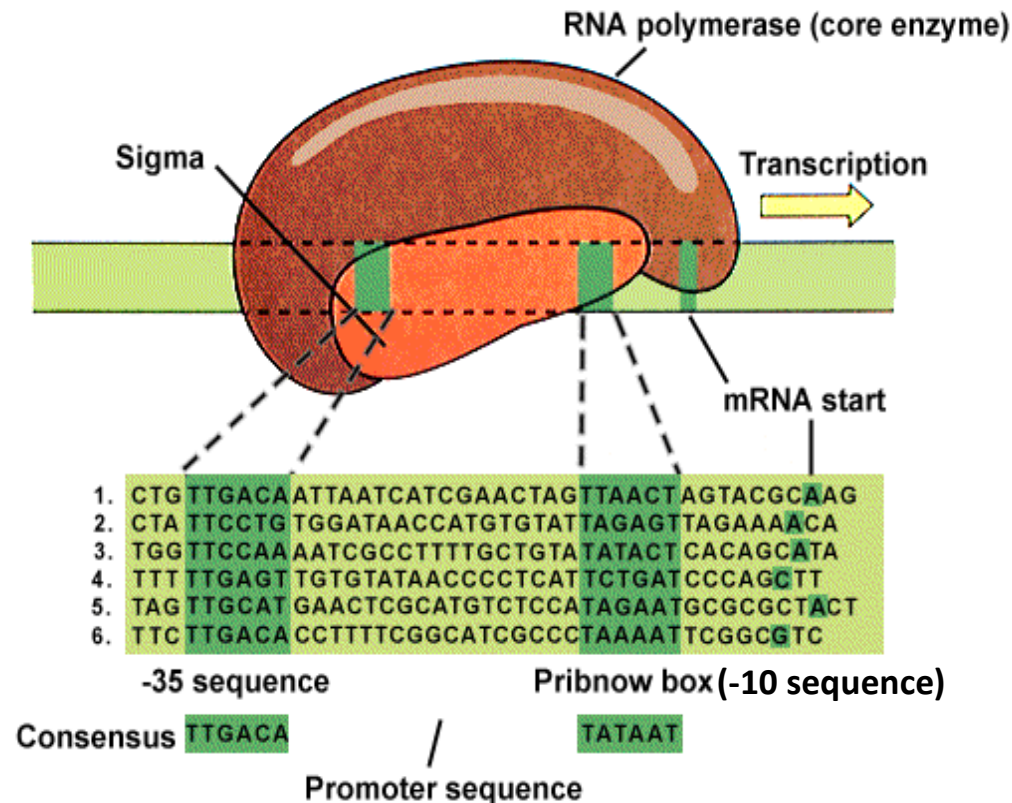


Fattori Sigma

I fattori sigma promuovono il legame specifico della RNAP alla regione promotrice.

Il fattore sigma 70 (RpoD, noto anche come sigma vegetativo) è responsabile della trascrizione della maggior parte dei geni (compresi tutti i geni essenziali e di mantenimento).

Altri fattori sigma (sigma alternativi) consentono la trascrizione di gruppi specifici di geni in risposta a specifici stimoli o segnali ambientali.



Repertorio dei fattori sigma

La maggior parte dei batteri possiede diversi fattori sigma (oltre al sigma vegetativo), ognuno dei quali è responsabile della trascrizione di uno specifico gruppo di geni.

Nell'*Escherichia coli* esistono sette fattori sigma (altri batteri possono averne anche di più).

Sigma subunit	Genes under the control of each sigma
RpoD (613 aa)	Growth-related genes (~1,000)
RpoN (477 aa)	Nitrogen-regulated/stress response genes (~15)
RpoS (330 aa)	Stationary phase/stress response genes (~100)
RpoH (284 aa)	Heat shock/stress response genes (~40)
RpoF (239 aa)	Flagella-chemotaxis genes (~40)
RpoE (202 aa)	Extreme heat shock/extracytoplasmic genes (~5)
FecI (173 aa)	Ferric citrate transport/extracytoplasmic genes (~5)

Quando vengono espressi, i fattori sigma alternativi devono competere con il sigma vegetativo (che è espresso in modo costitutivo) per il legame al nucleo della RNAP.

Due parametri influenzano questa competizione:

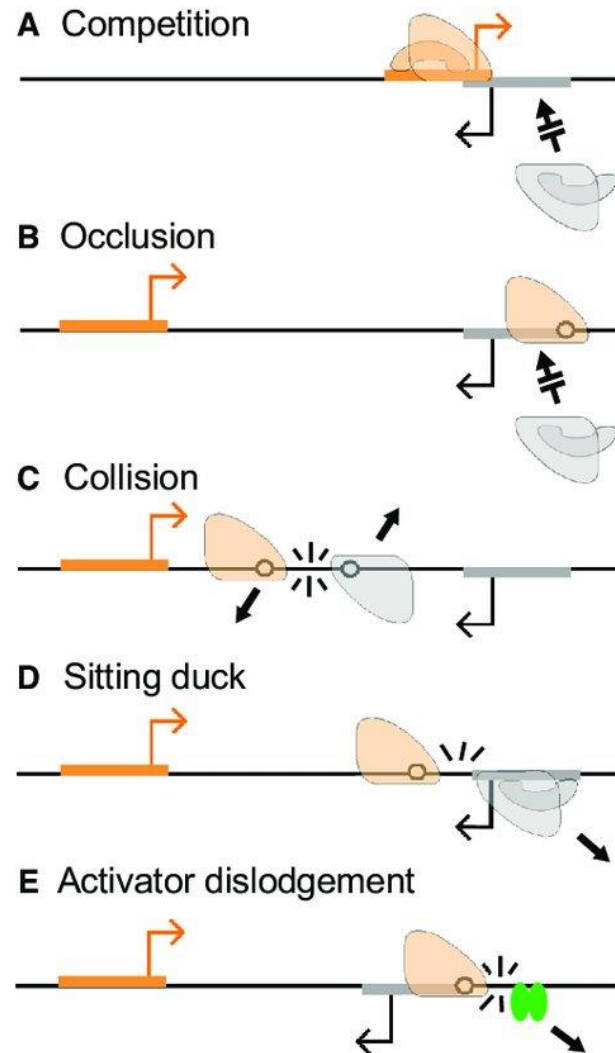
1. il numero di subunità di ciascun sigma (livello di espressione)
2. L'attività di ciascun sigma (affinità per il nucleo della RNAP).

Specificità dei promotori

I fattori sigma riconoscono e legano promotori con differenti sequenze regolative

Sigma factors recognize promoters by consensus sequences				
Gene	Factor	-35 Sequence	Separation	-10 Sequence
<i>rpoD</i>	σ^{70}	TTGACA	16-18 bp	TATAAT
<i>rpoH</i>	σ^{32}	CCCTTGAA	13-15 bp	CCCGATNT
<i>rpoN</i>	σ^{54}	CTGGNA	6 bp	TTGCA
<i>fliA</i>	σ^{28} (σ^F)	CTAAA	15 bp	GCCGATAA
<i>sigH</i>	σ^H	AGGANPuPu	11-12 bp	GCTGAATCA

Regolazione mediata dalla competizione tra promotori

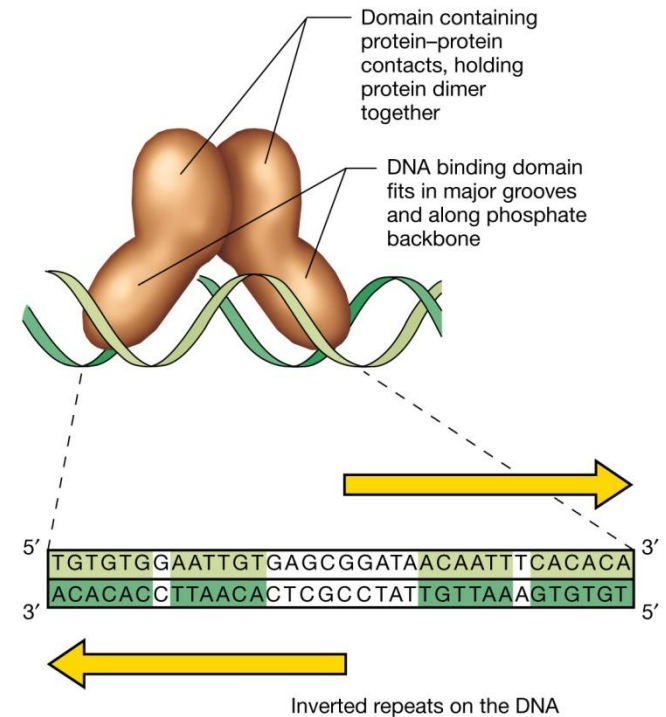
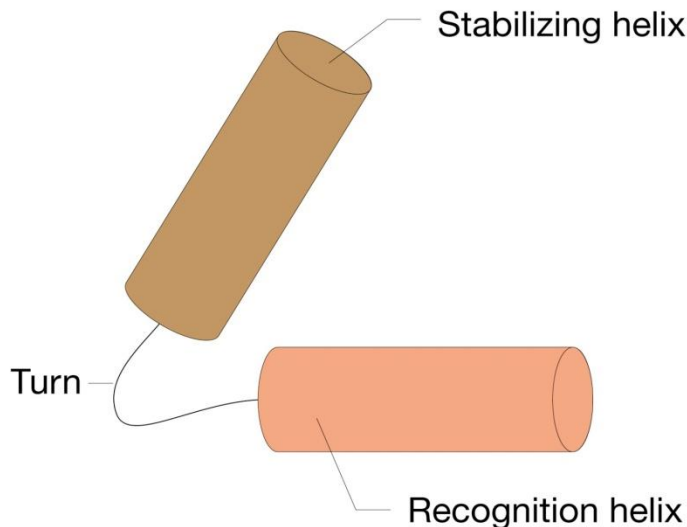


Regolazione trascrizionale mediate da proteine regolative

I regolatori trascrizionali riconoscono e legano sequenze specifiche nel DNA.

Spesso sono proteine omodimeriche che si legano a sequenze palindromiche.

Queste proteine contengono (almeno) un dominio per il legame al DNA e un dominio per l'interazione proteina-proteina.



Nei procarioti, la maggior parte dei fattori trascrizionali presenta un tipico modulo a elica-giro-elica.

Regolazione trascrizionale mediate da proteine regolative

Controllo negativo

Mediata da **repressori** trascrizionali

1. Repressione
2. Induzione

Controllo positivo

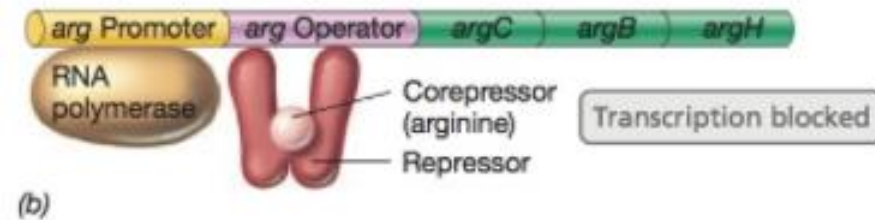
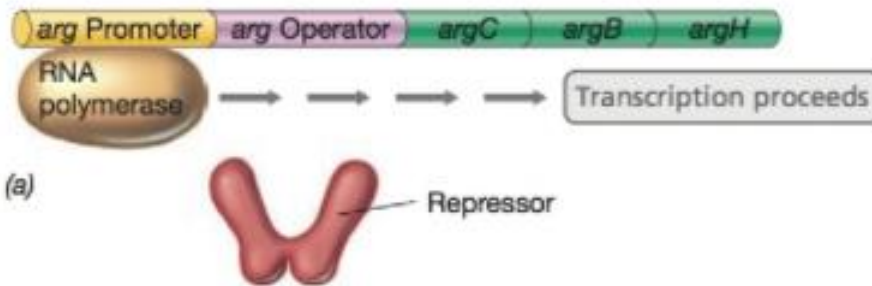
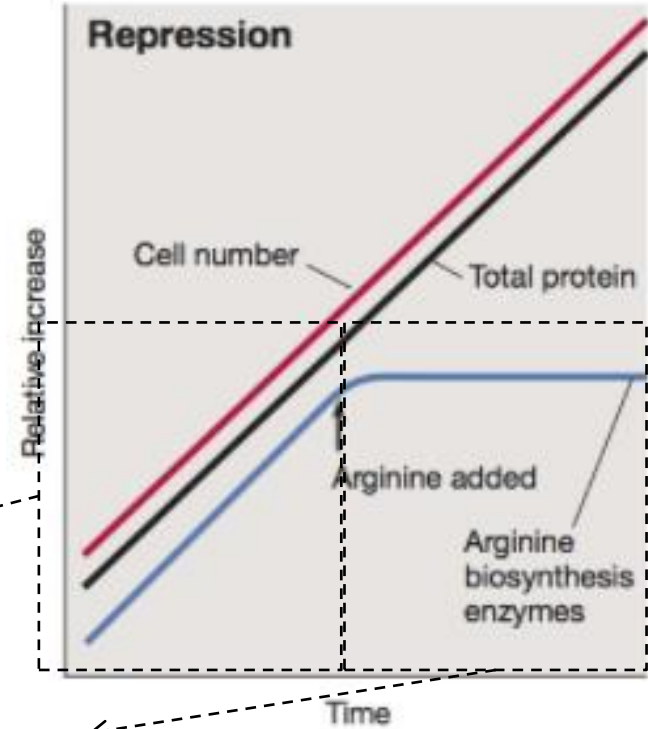
Mediata da **attivatori** trascrizionali

Controllo negativo

Repressione

In genere si verifica su geni o operoni coinvolti in vie **ANABOLICHE** che sono normalmente attive (i geni vengono espressi), ma che possono essere inattivate (i geni vengono **REPRESSI**) dai prodotti degli stessi processi anabolici (che agiscono come **CO-REPRESSORI**).

Il co-repressore si lega al repressore e induce un cambiamento conformazionale che aumenta la sua affinità per il DNA bersaglio.

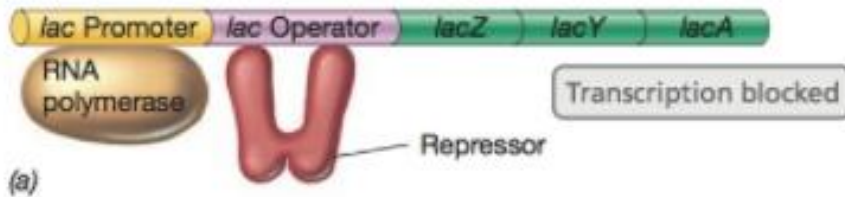
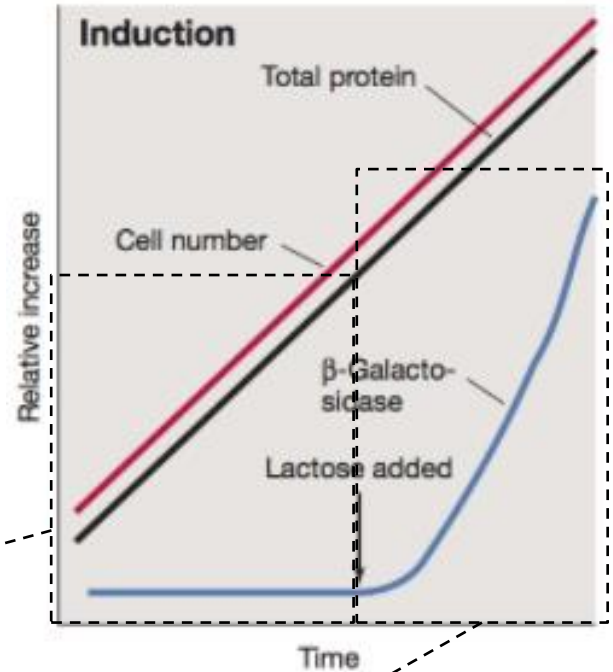


Controllo negativo

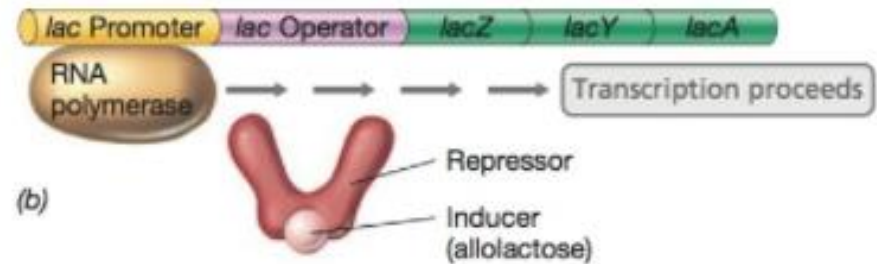
Induzione

In genere si verifica su geni o operoni coinvolti in vie **CATABOLICHE** che normalmente sono inattivi (i geni sono repressi), ma che possono essere attivati (i geni sono **INDOTTI**) dalla presenza di cataboliti specifici (che agiscono come **INDUTTORI**).

L'induttore si lega al repressore e induce un cambiamento conformazionale che ne diminuisce l'affinità per il DNA bersaglio.



(a)



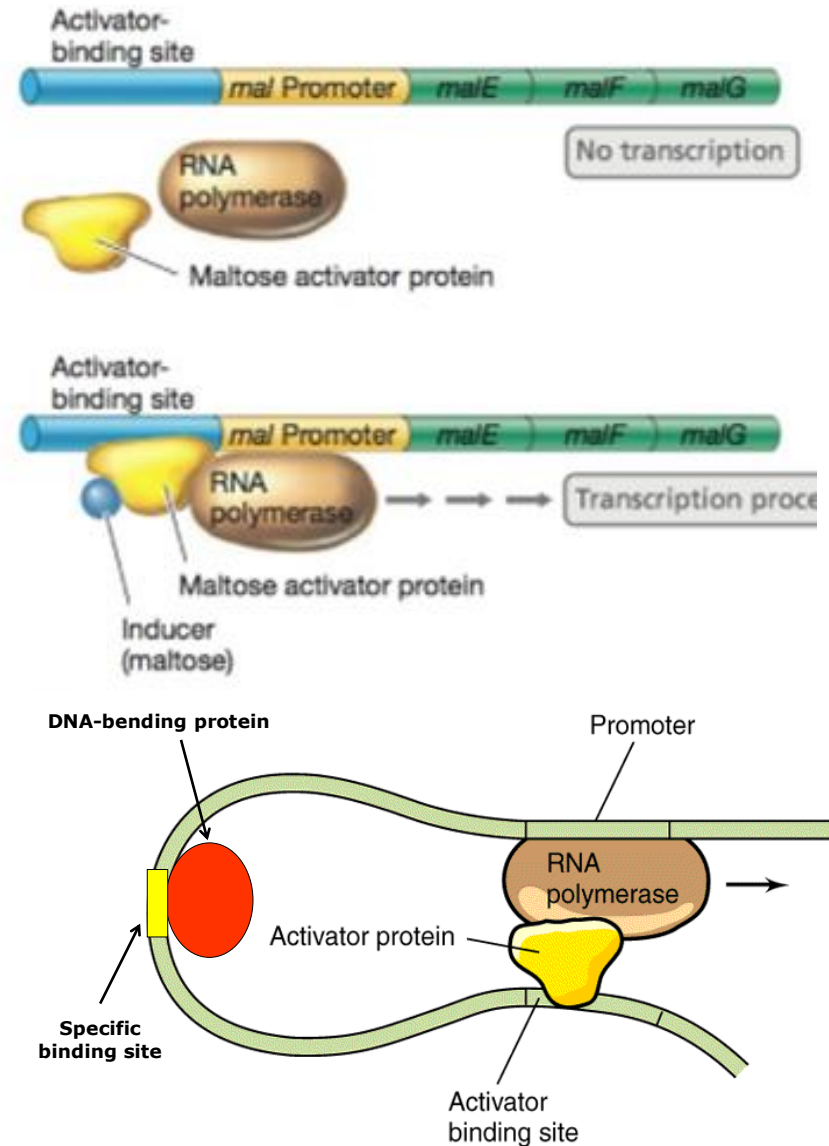
(b)

Controllo positivo

In genere si verifica su geni o operoni coinvolti in vie **CATABOLICHE** che normalmente sono inattivi (i geni sono repressi), ma che possono essere attivati (i geni sono **INDOTTI**) dalla presenza di cataboliti specifici (che agiscono come **INDUTTORI**).

L'induttore si lega all'attivatore trascrizionale e induce un cambiamento conformazionale che aumenta la sua affinità per il DNA bersaglio.

I siti di legame degli attivatori trascrizionali possono trovarsi anche molto lontani dalla regione del promotore (a volte il ripiegamento del DNA richiede proteine di legame specifiche)

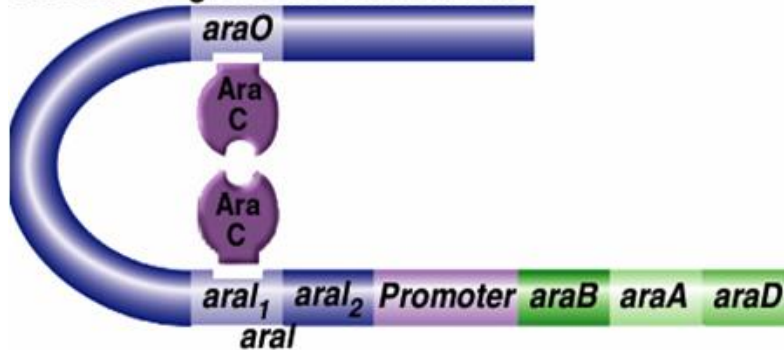


Regolatori trascrizionali "Dual function"

Alcuni regolatori trascrizionali sono coinvolti sia nella regolazione negativa sia in quella positiva (ad esempio il regolatore trascrizionale AraC per il catabolismo dell'arabinosio)

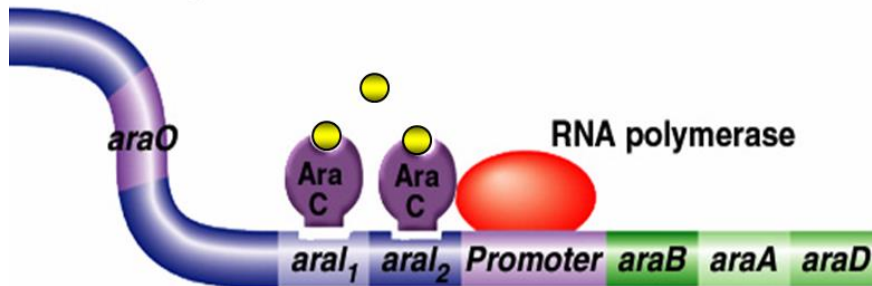
No arabinose present

AraC dimer binding at both *araO* and *araI* sites.
No *araBAD* genes are transcribed.



Il legame di AraC ai siti *araO* e *araI1* impedisce la trascrizione dal promotore P_{BAD} .

Arabinose present

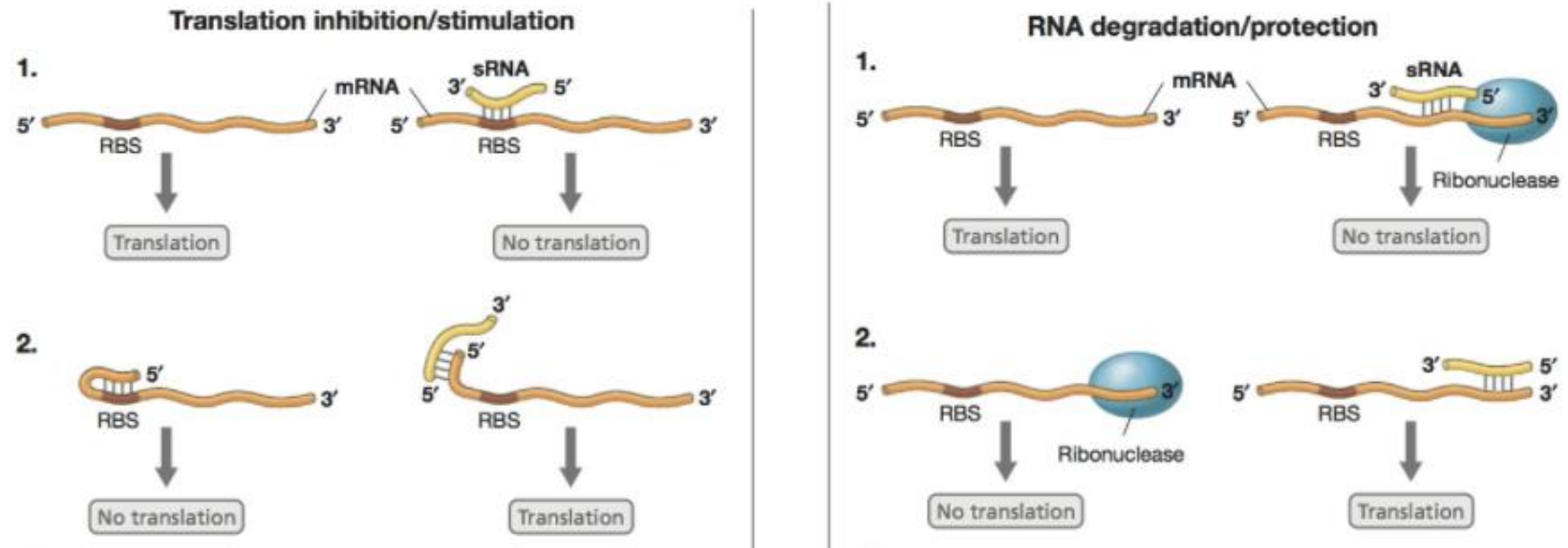


L'arabinosio (l'induttore) si lega all'AraC e provoca un cambiamento conformazionale. AraC ha ora una maggiore affinità per *araI1* e *araI2* ed è in grado di interagire direttamente con l'RNA polimerasi, inducendo infine la trascrizione dal promotore P_{BAD} .

Regolazione post trascrizionale mediate da RNA antisenso (sRNAs)

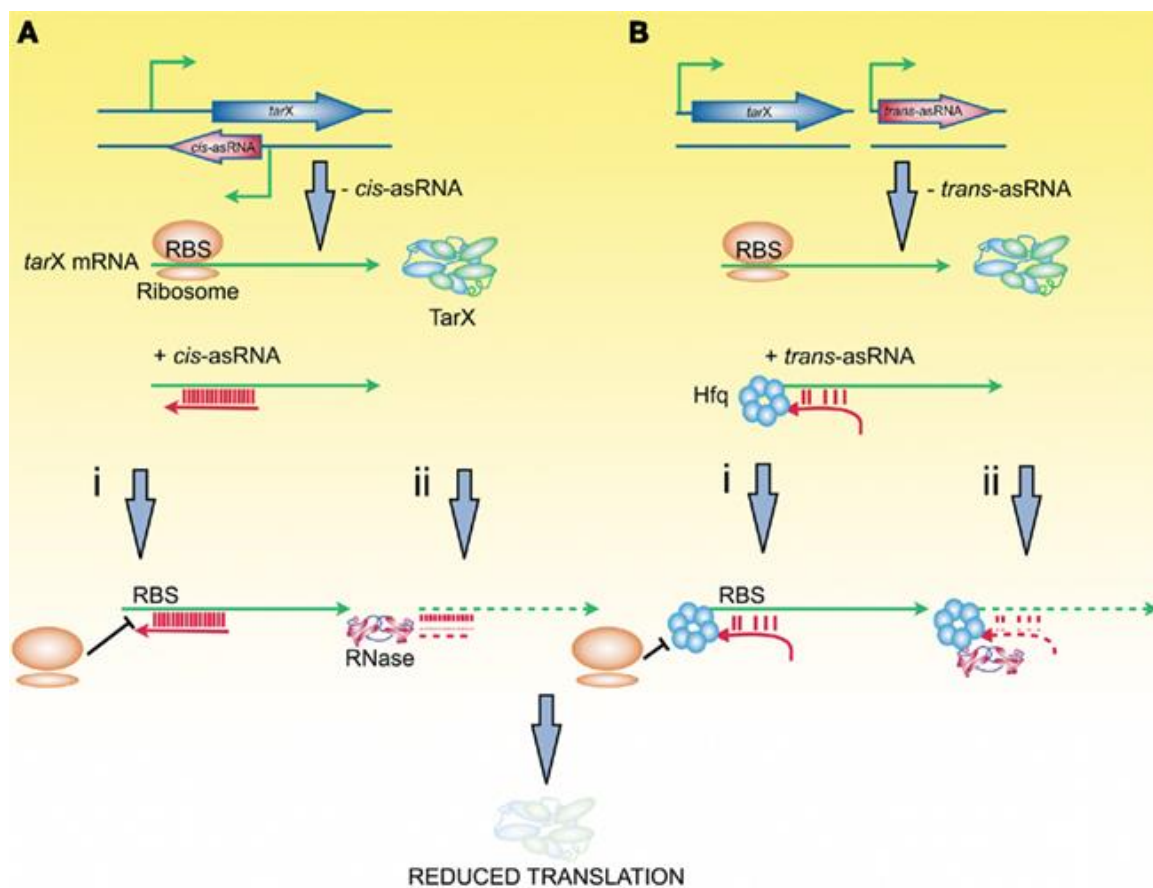
Gli RNA antisenso sono piccole molecole di RNA non tradotto complementari (almeno in parte) ai loro RNA messaggeri bersaglio. Il legame dell'sRNA provoca un cambiamento nella stabilità e/o nella traducibilità dell'mRNA bersaglio.

Sono coinvolti nella regolazione di molte funzioni diverse nei procarioti.



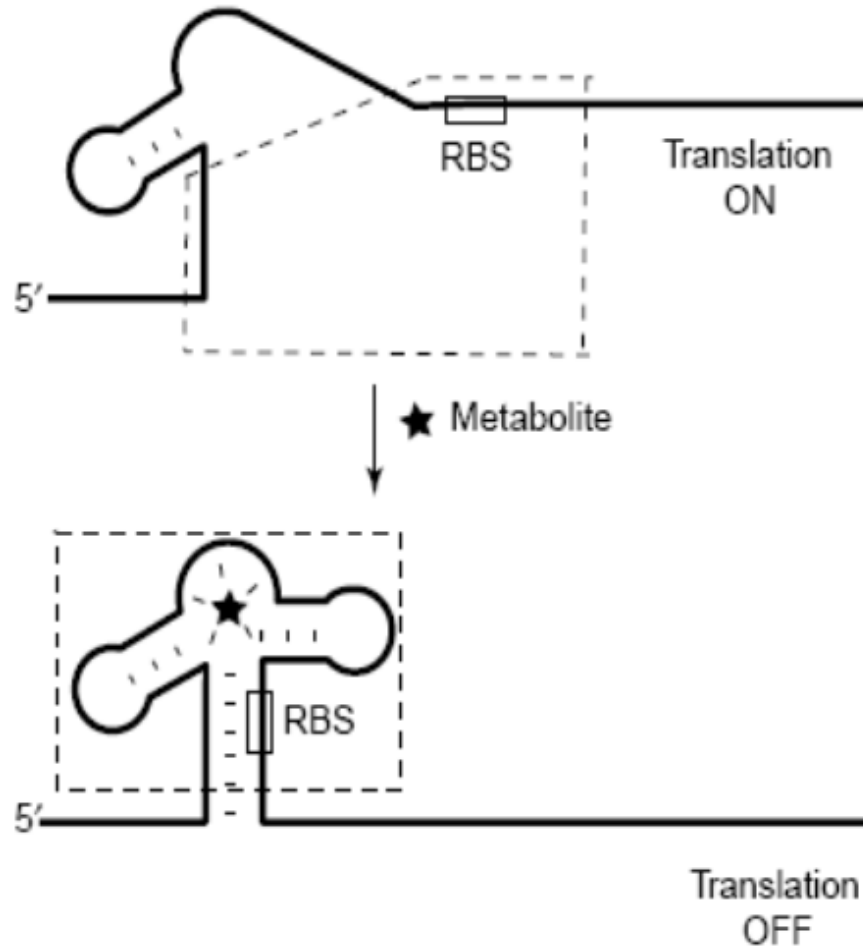
L'RNA antisenso può essere sintetizzato:

- 1) trascrivendo il filamento non senso (complementare) dello stesso gene bersaglio (complementarità del 100%, specificità molto elevata)
- 2) trascrivendo regioni intergeniche che possono essere spazialmente separate dal loro gene bersaglio (minore complementarità, più ampio range di attività, interazione mediata da fattori proteici)



Regolazione post-trascrizionale mediate da riboswitch

Esempio di prevenzione della della traduzione mediante riboswith

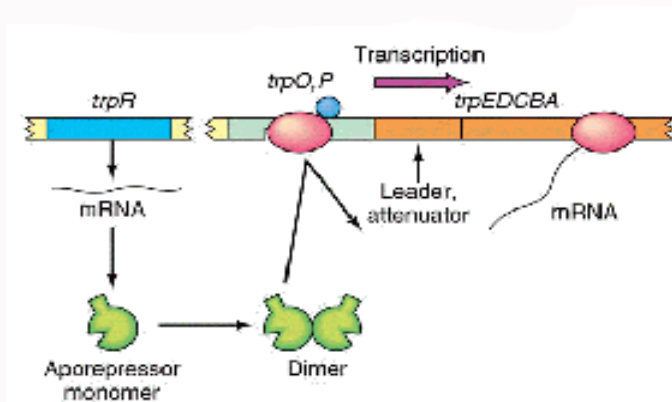


Operone triptofano

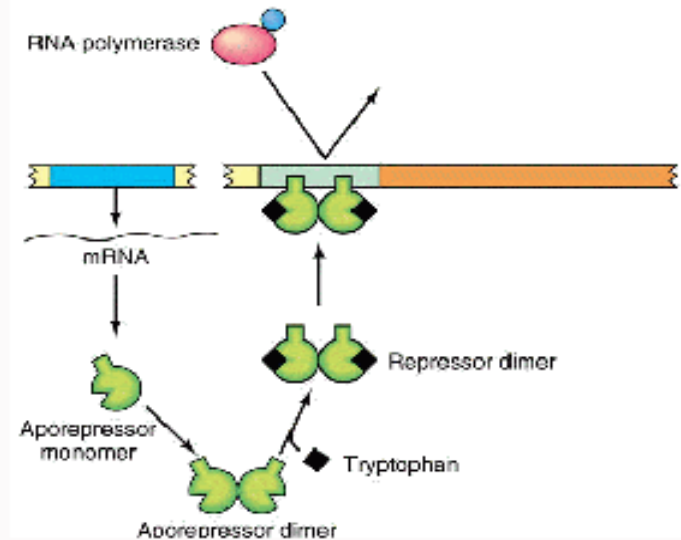
L'operone triptofano utilizza due livelli di regolazione che cooperano nella espressione dei geni per la biosintesi di questo aminoacido.

Il primo livello è costituito da una regolazione negativa con co-repressore

Bassa concentrazione triptofano:
Assenza di repressione



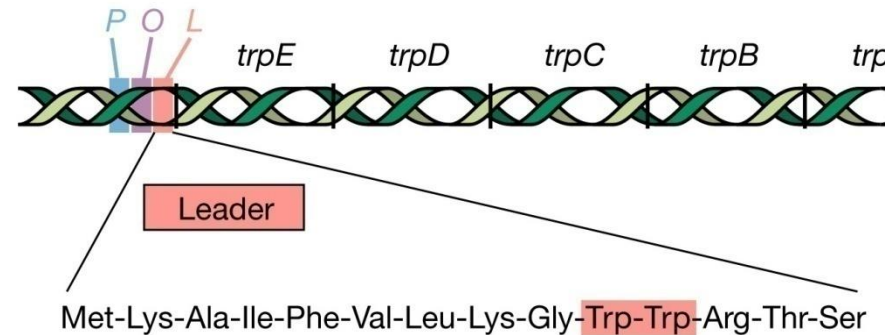
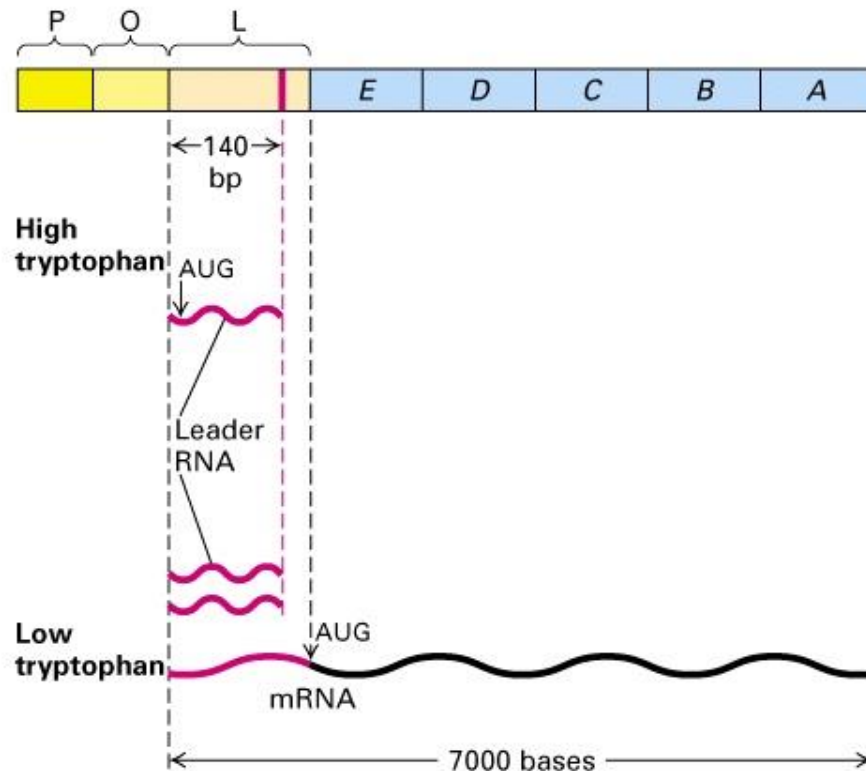
Alta concentrazione di triptofano:
repressione



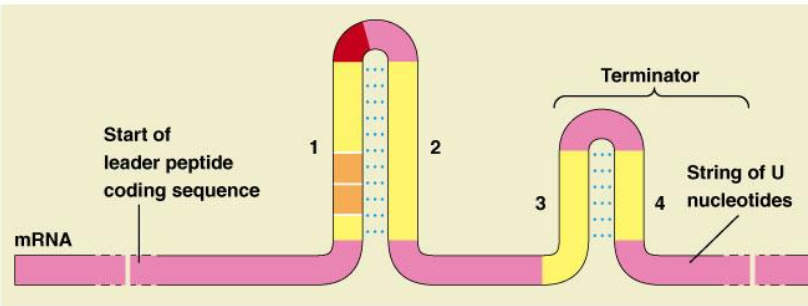
Il secondo livello utilizza il fenomeno dell'ATTENUAZIONE

La sequenza leader (L), o peptide leader, codifica per un polipeptide che funge da ATTENUATORE.

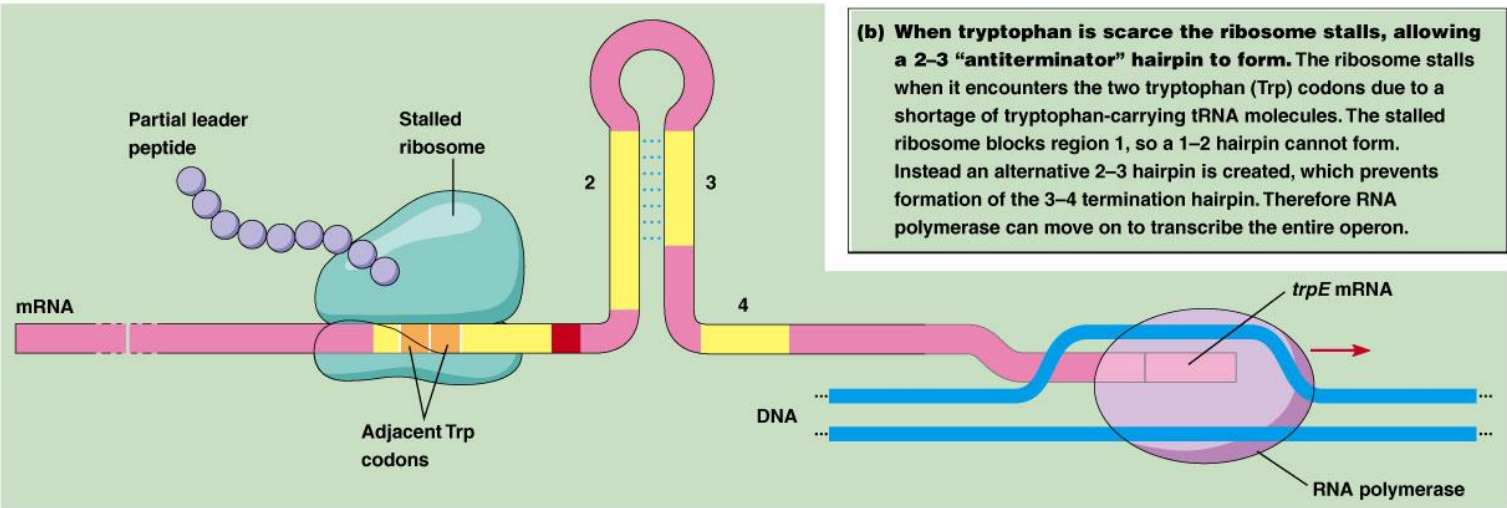
Viene tradotta in modo efficiente solo quando il triptofano è disponibile e ciò comporta la TERMINAZIONE della trascrizione dei seguenti geni dell'operone



Il peptide leader è arricchito in residui di triptofano e può quindi essere sintetizzato solo quando il triptofano è abbondante nel citoplasma.

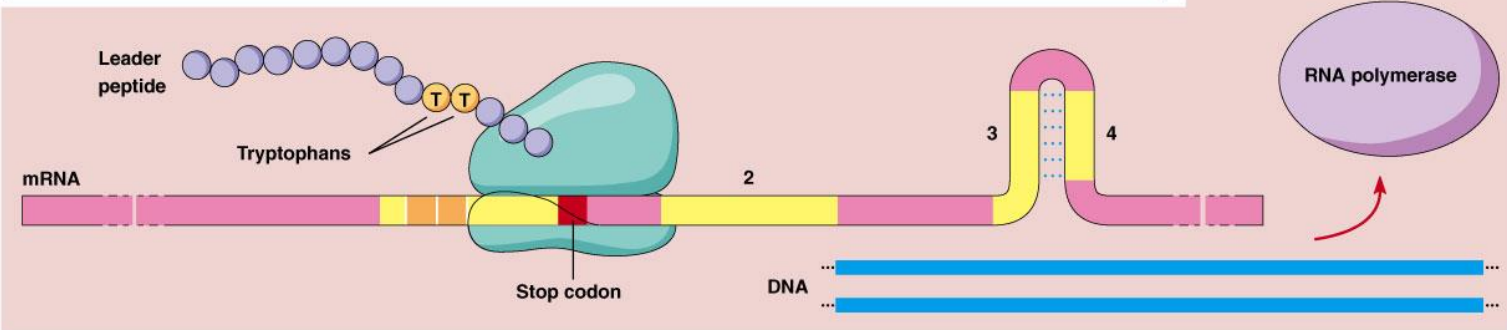


(a) The most stable secondary structure for *trp* leader mRNA. Attenuation depends on the ability of regions 1 and 2 and regions 3 and 4 of the *trp* leader sequence to base-pair, forming hairpin secondary structures. The 3–4 hairpin structure acts as a transcription termination signal.

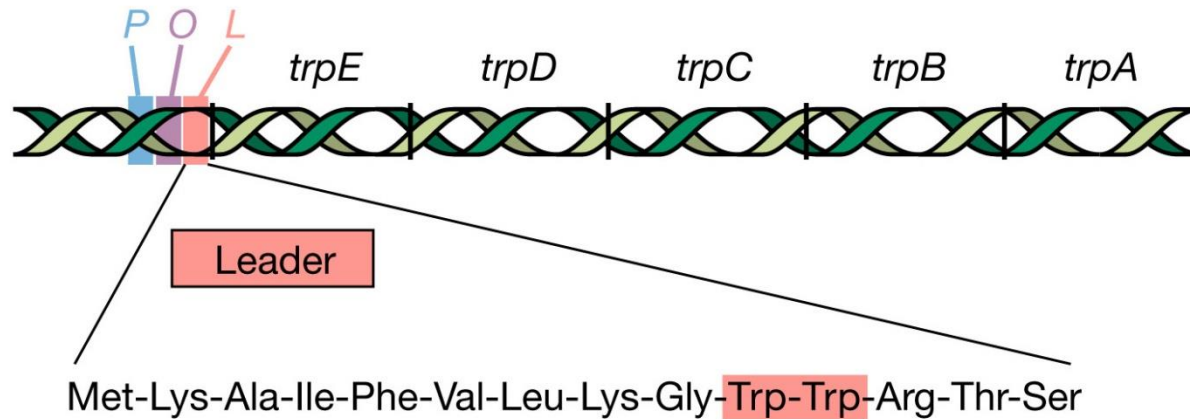


(b) When tryptophan is scarce the ribosome stalls, allowing a 2–3 “antiterminator” hairpin to form. The ribosome stalls when it encounters the two tryptophan (Trp) codons due to a shortage of tryptophan-carrying tRNA molecules. The stalled ribosome blocks region 1, so a 1–2 hairpin cannot form. Instead an alternative 2–3 hairpin is created, which prevents formation of the 3–4 termination hairpin. Therefore RNA polymerase can move on to transcribe the entire operon.

(c) When tryptophan is plentiful the ribosome continues, allowing the 3–4 transcription termination signal to form. The moving ribosome completes translation of the leader peptide and pauses at the stop codon, blocking region 2. As a result, the 3–4 structure forms and terminates transcription near the end of the leader sequence.



Il processo di attenuazione è molto diffuso tra gli operoni metabolici



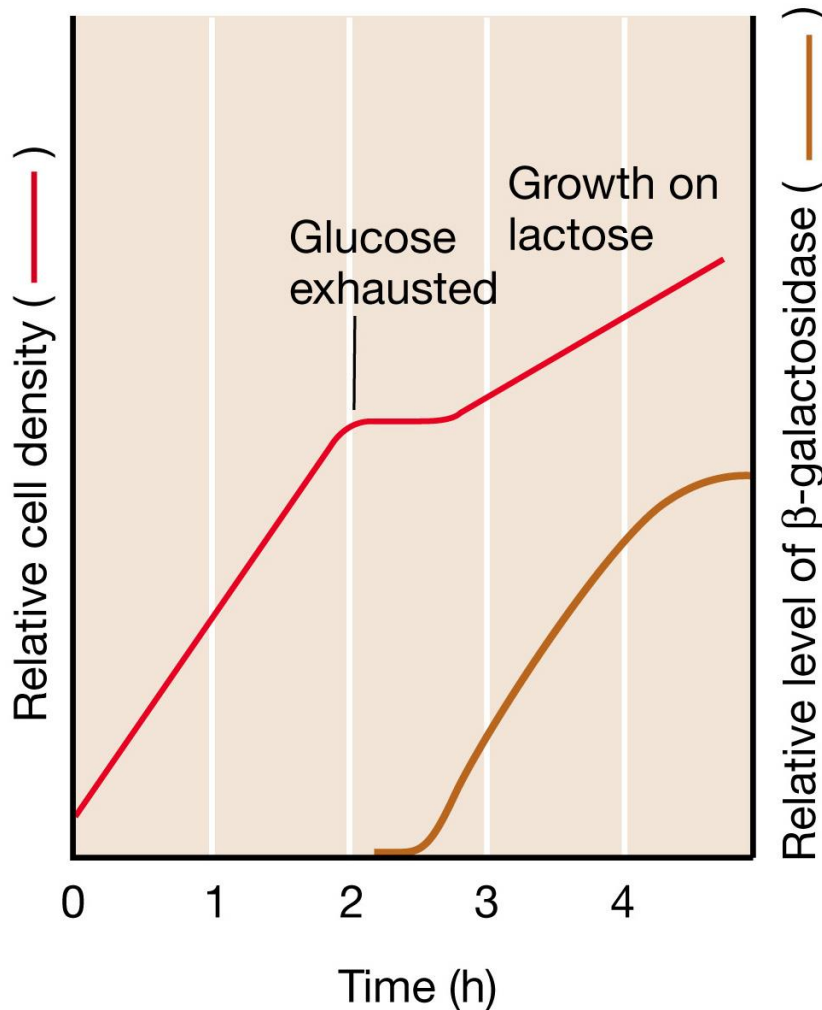
(a)

Threonine Met-Lys-Arg-Ile-Ser-Thr-Thr-Ile-Thr-Thr-Thr-Ile-Thr-Ile-Thr-Thr-Gly-Asn-Gly-Ala-Gly

Histidine Met-Thr-Arg-Val-Gln-Phe-Lys-His-His-His-His-His-His-His-Pro-Asp

Phenylalanine Met-Lys-His-Ile-Pro-Phe-Phe-Phe-Ala-Phe-Phe-Phe-Thr-Phe-Pro

Curva di crescita diauxica

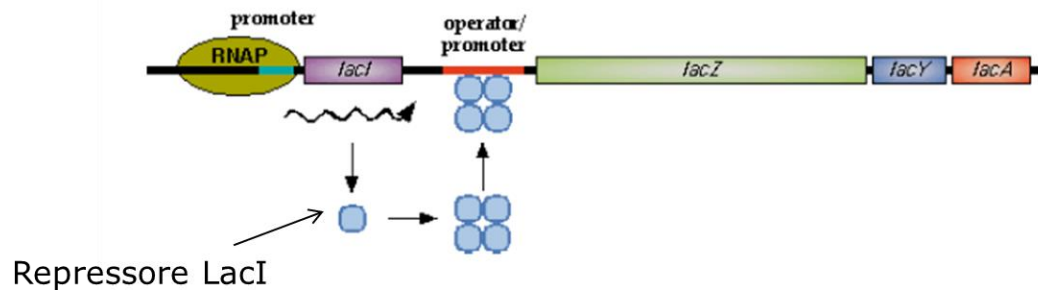


***E. coli* cresce in un mezzo contenente sia glucosio sia lattosio, ma**

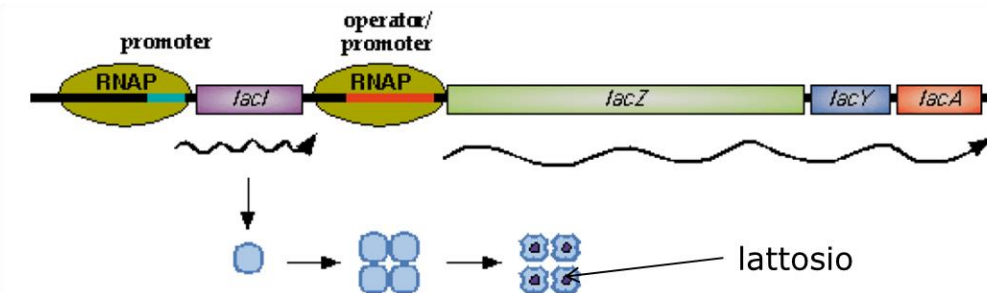
- Il glucosio inibisce l'espressione dell'operone *lac*
- Durante la seconda fase di crescita log, l'operone *lac* è espresso
- Il tasso di crescita può essere più basso durante la seconda crescita esponenziale

L'operone lattosio ha un classico controllo da repressore/induttore

Assenza di lattosio –



Presenza di lattosio

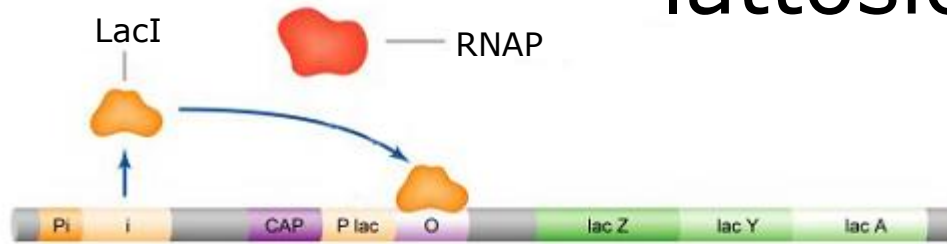


Ma la curva di crescita diauxica dimostra che la presenza del lattosio non è sufficiente ad indurre l'espressione dei geni lac
La spiegazione la si trova considerando che **l'operone lac è sotto il controllo della REPRESSIONE da CATABOLITA**

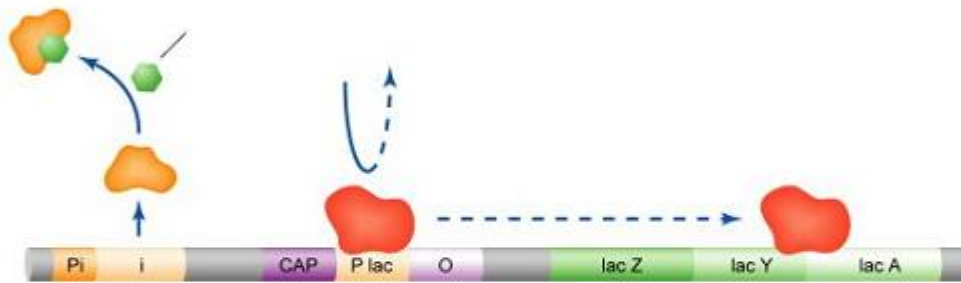
Repressione da catabolita

- Quando *E. coli* cresce in un terreno contenente glucosio, l'espressione degli operoni catabolici coinvolti nell'utilizzo di altre fonti energetiche viene repressa.
- In presenza di fonti energetiche multiple, i (molti) batteri sono in grado di "scegliere" quella più favorevole
- In *E. coli* i geni per il catabolismo del glucosio sono espressi in modo costitutivo, mentre altri geni catabolici (circa 300) sono sotto il controllo della repressione dei cataboliti.

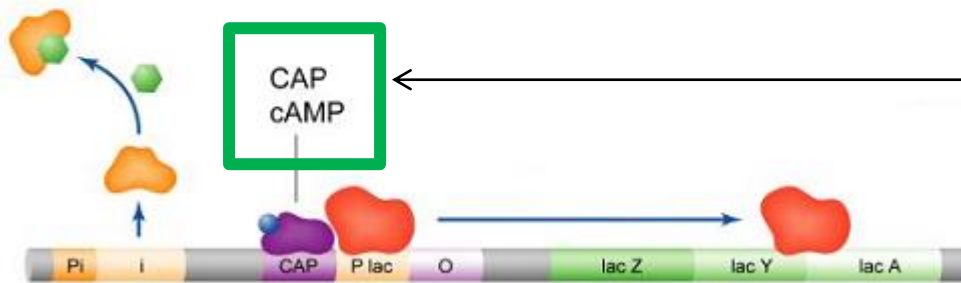
Regolazione positiva dell'operone lattosio



- lattosio



+ lattosio



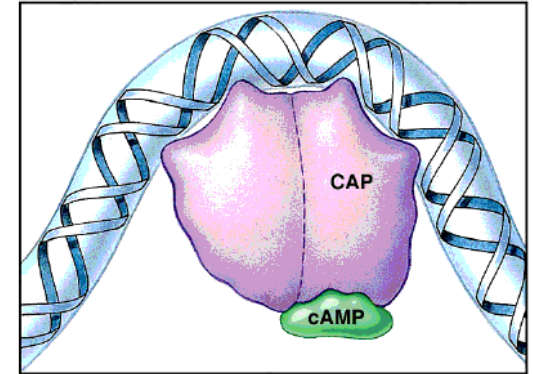
Attivatore trascrizionale CAP
(catabolite activator protein)

+ lattosio
- glucosio

CAP binding site

CAP e l'AMP ciclico

- L'AMP ciclico (cAMP) è il co-induttore del regolatore CAP.
- L'AMP ciclico è sintetizzato da un enzima che è (indirettamente) inibito dal glucosio

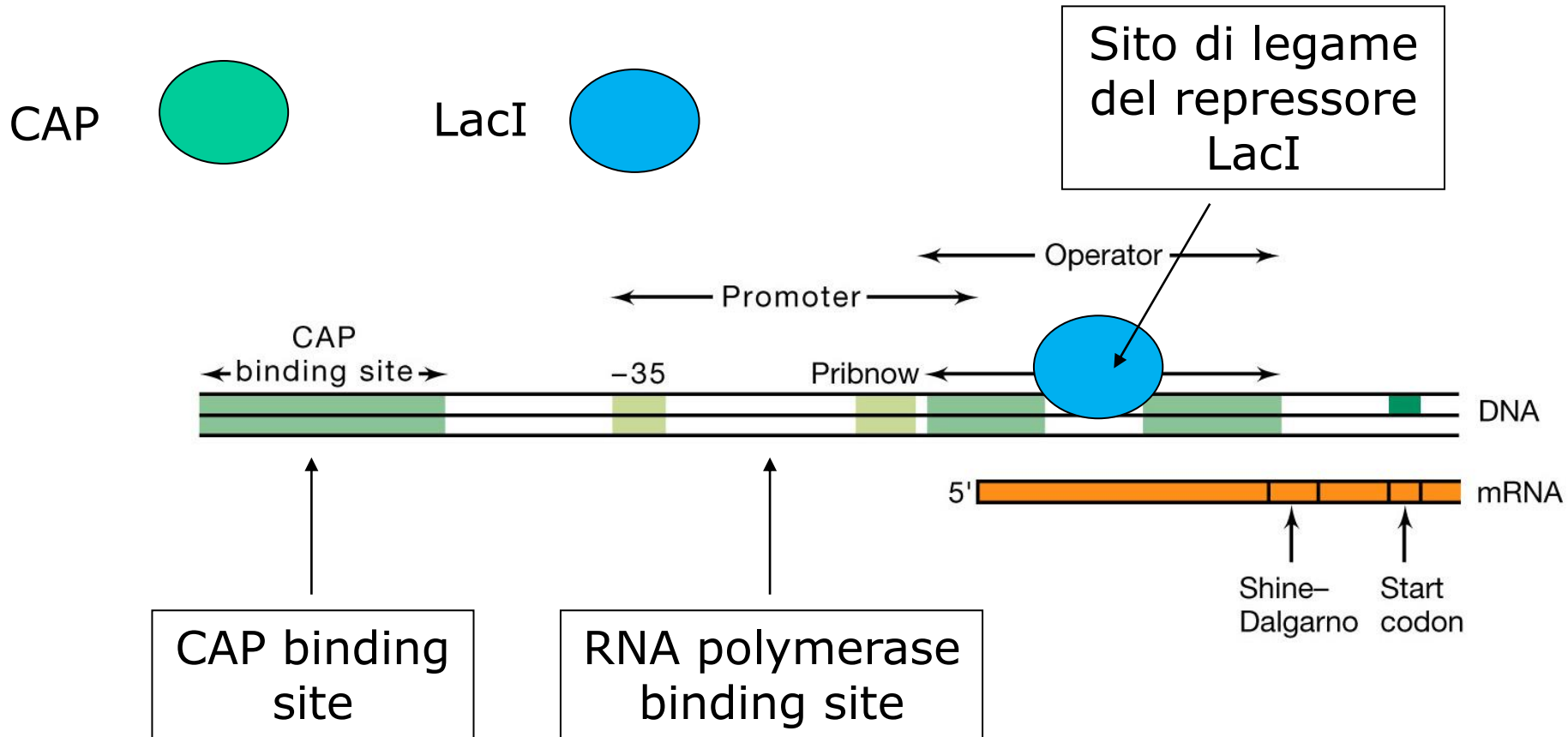


- In assenza di glucosio, i livelli intracellulari di cAMP aumentano (la CAP diventa attiva).
- In presenza di glucosio i livelli intracellulari di cAMP sono molto bassi (la CAP è inattiva) e quindi i geni lac non vengono indotti

In presenza di solo glucosio



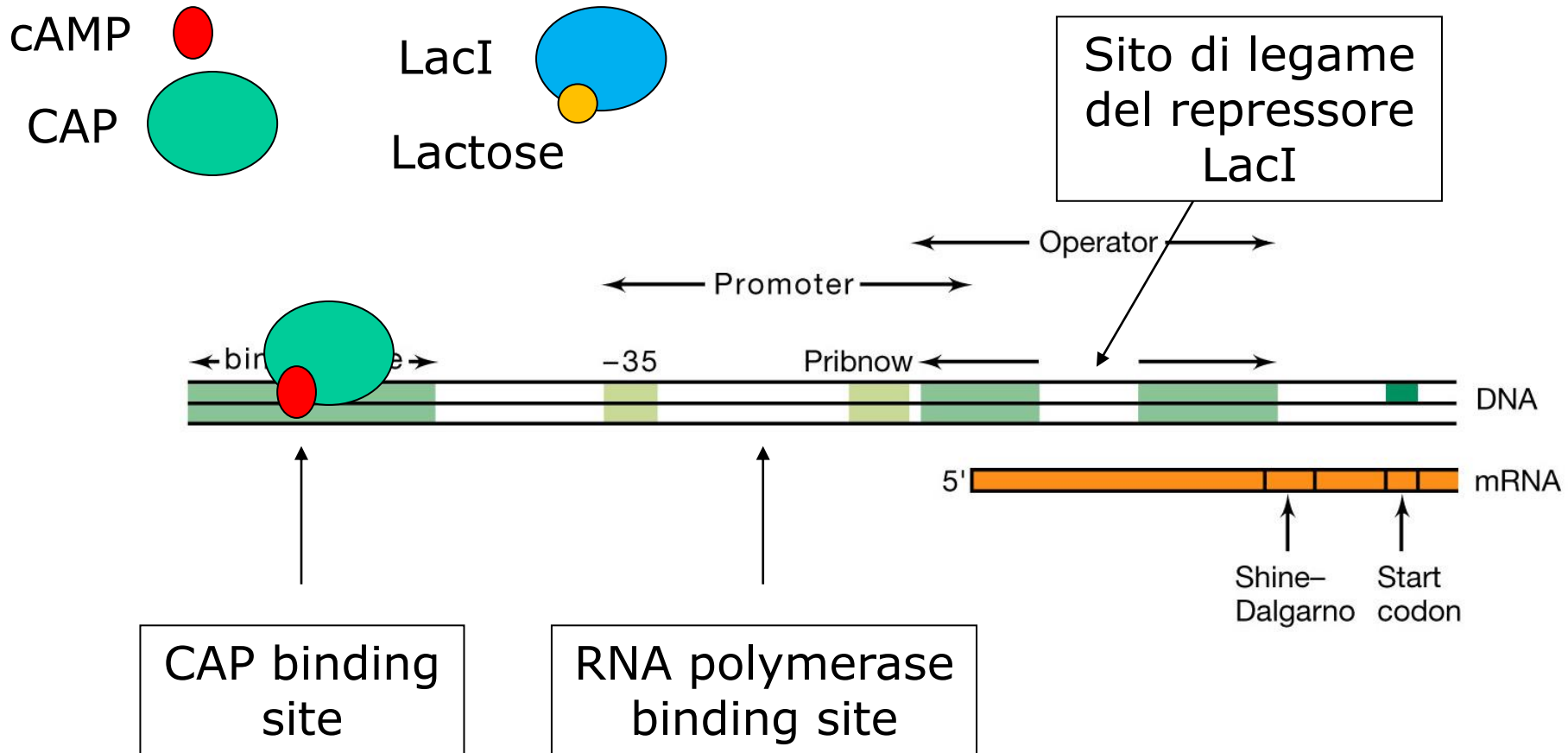
REPRESSIONE



Presenza di **solo lattosio**



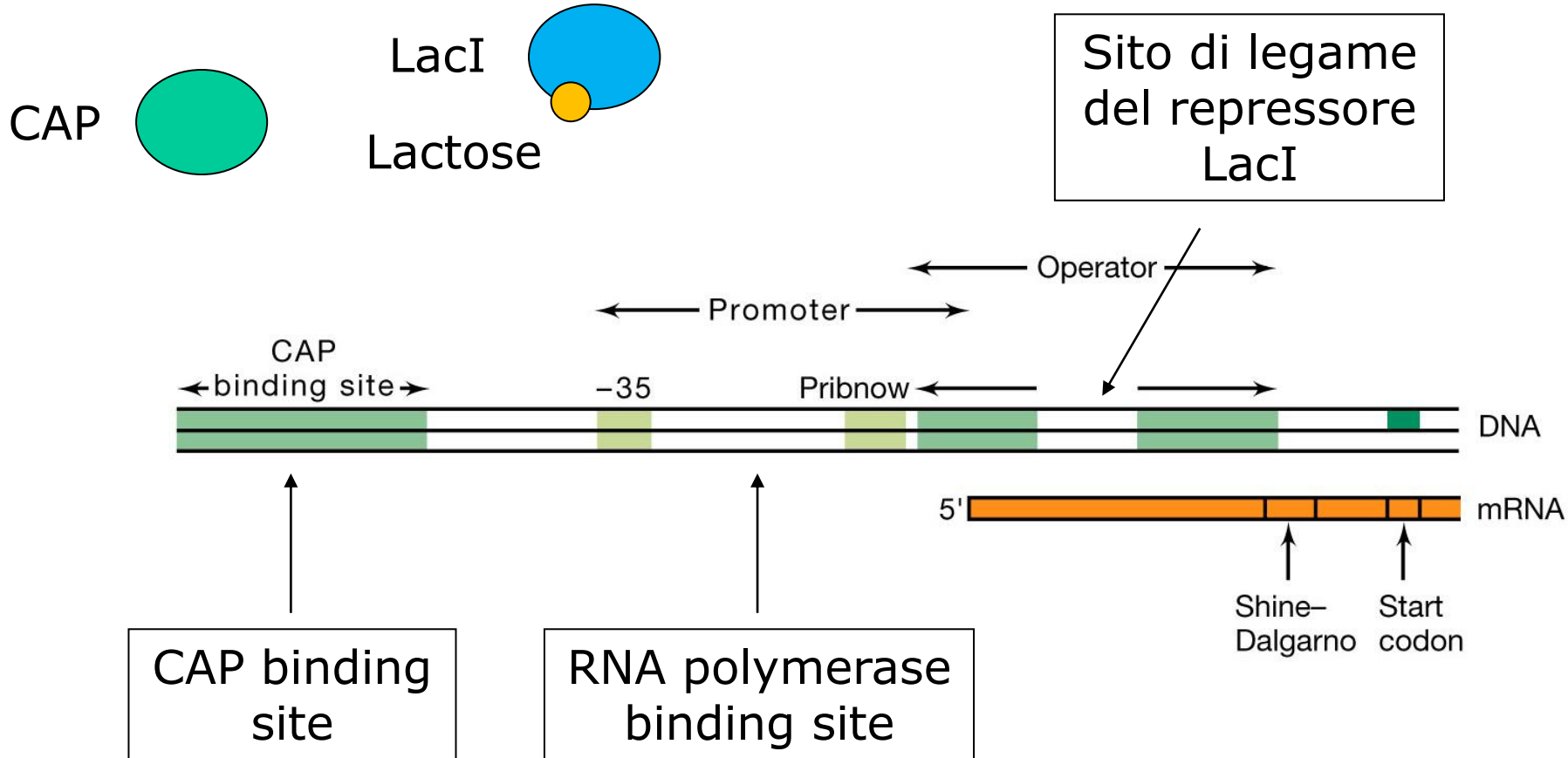
INDUZIONE



Presenza **sia di lattosio sia di glucosio**



MANCATA INDUZIONE



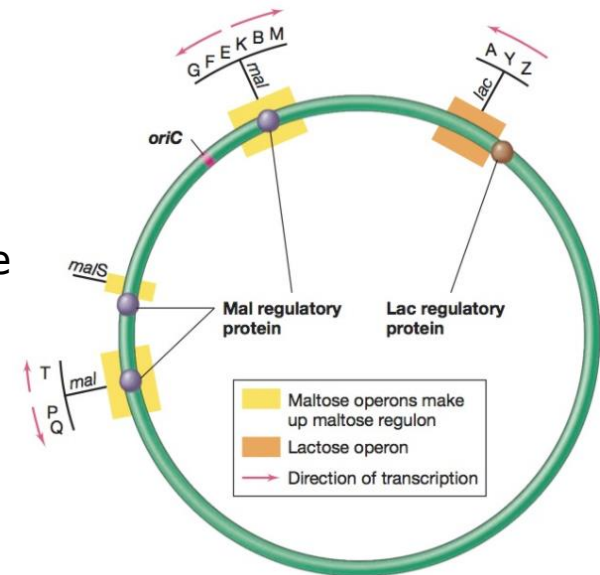
Sistemi di regolazione "Globali"

I batteri possono regolare in modo coordinato molti geni diversi in risposta a uno specifico segnale ambientale o fisiologico.

Quando più di un gene/operone è sotto il controllo di una singola proteina regolatrice, questi geni/operoni sono chiamati collettivamente **regolone**. I geni appartenenti allo stesso regolatore sono generalmente (ma non sempre) coinvolti in funzioni cellulari correlate.

Esempio: regolone maltosio

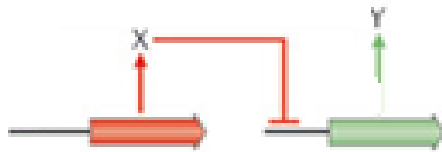
Il regolone del maltosio di *E. coli* comprende una serie di operoni che codificano per enzimi coinvolti nel catabolismo del maltosio e sono tutti regolati da un attivatore trascrizionale che necessita del maltosio come coinduttore.



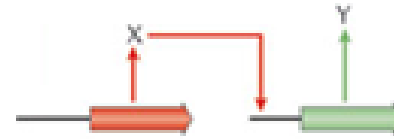
Altri esempi: regolazione mediata da fattori sigma alternativi
repressione dei cataboliti
comunicazione cellula-cellula (quorum sensing)

Modelli di regolazione semplici

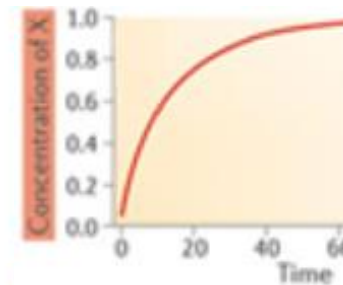
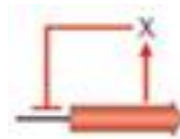
Regolazione negativa



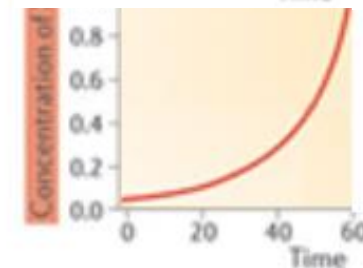
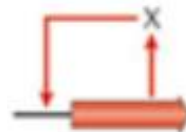
Regolazione positiva



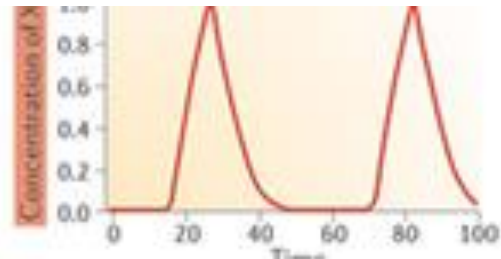
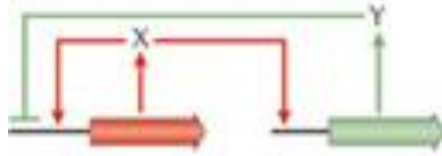
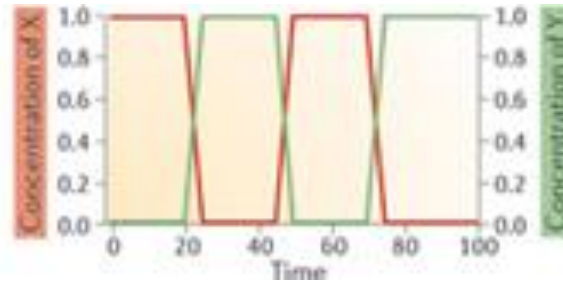
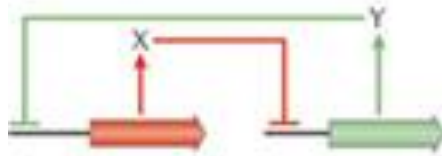
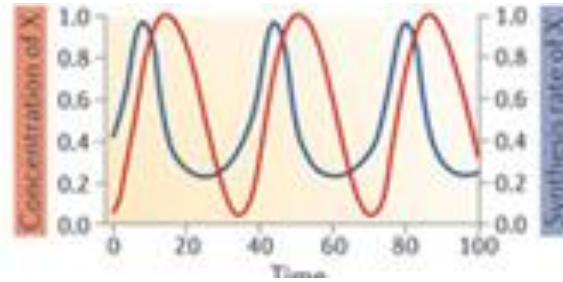
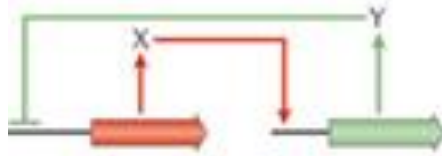
Feedback negativo



Feedback positivo

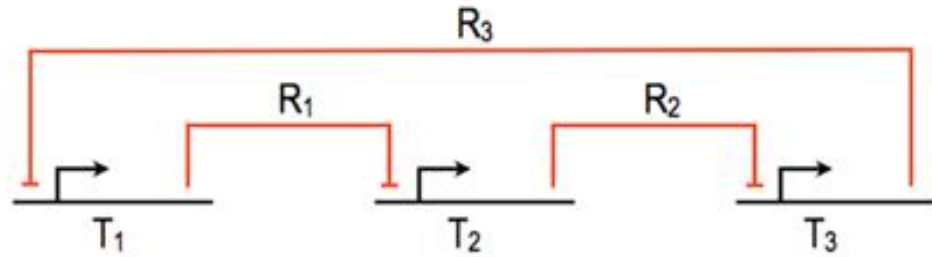


Circuiti genetici oscillanti

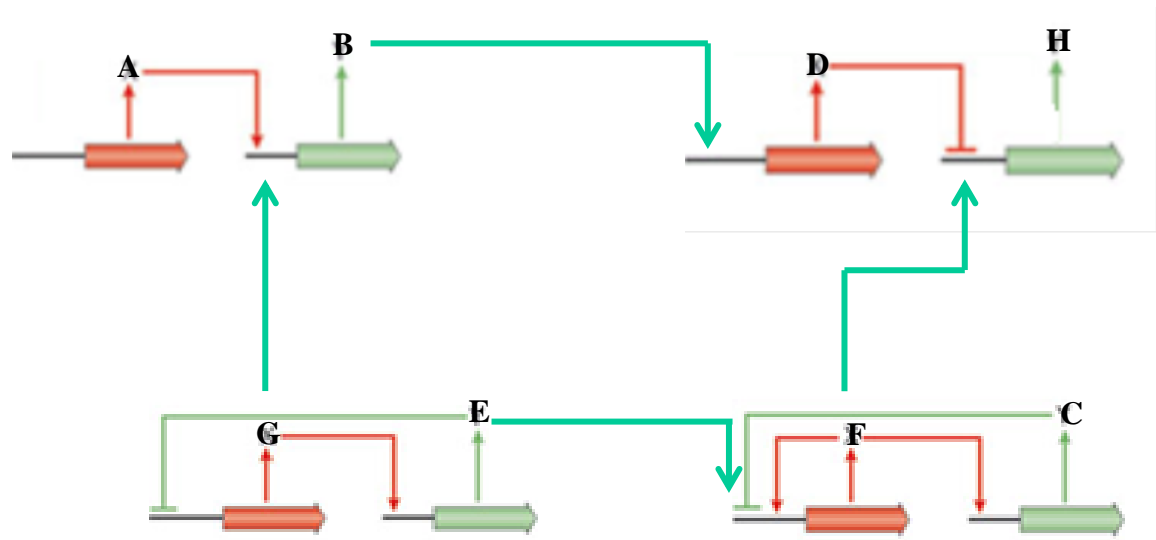


Circuiti genetici complessi

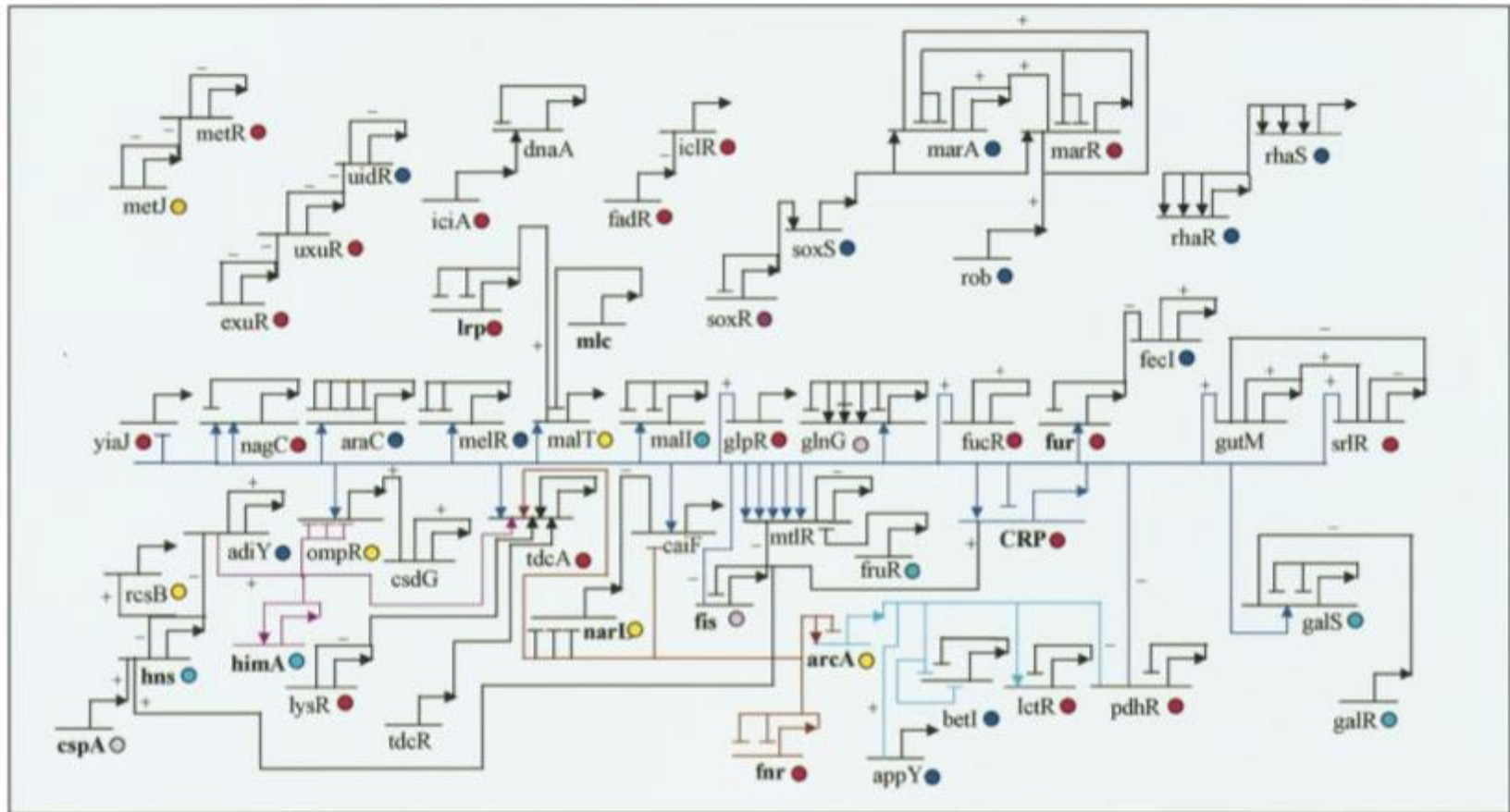
Aumento del numero dei componenti



Interconnessione tra circuiti



Regulation of transcription factors in E. coli



- | | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|--|
| ● Homeodomain-like | ⊙ FIS-like | ⊙ Nucleic acid-binding proteins |
| ● winged helix DNA binding domain | ● Putative DNA-binding domain | ● C-terminal effector domain of the Bipartite response regulator |
| ● Met repressor-like | ● IHF like DNA-binding domain | ● Lambda repressor-like DNA binding domain |