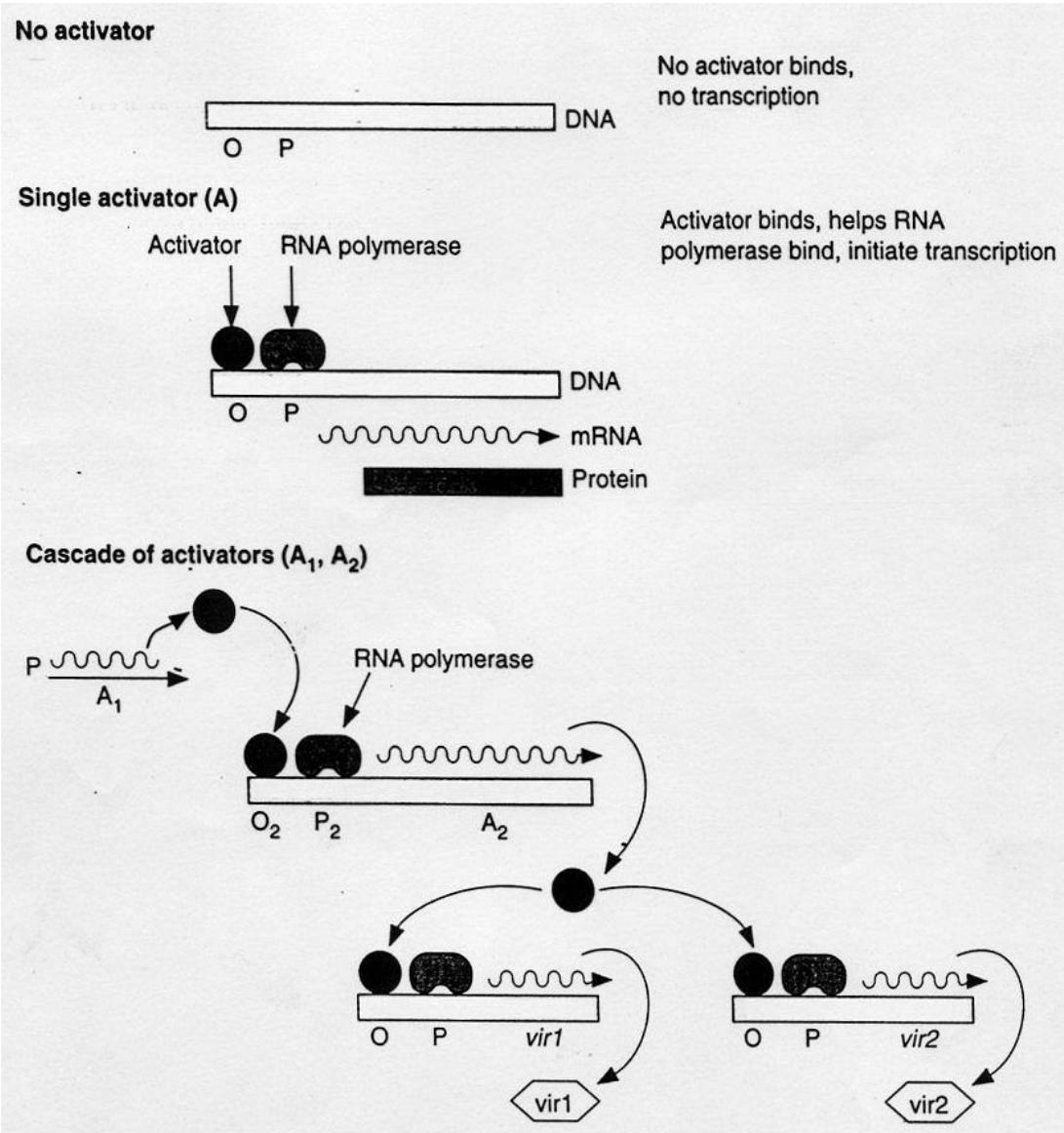
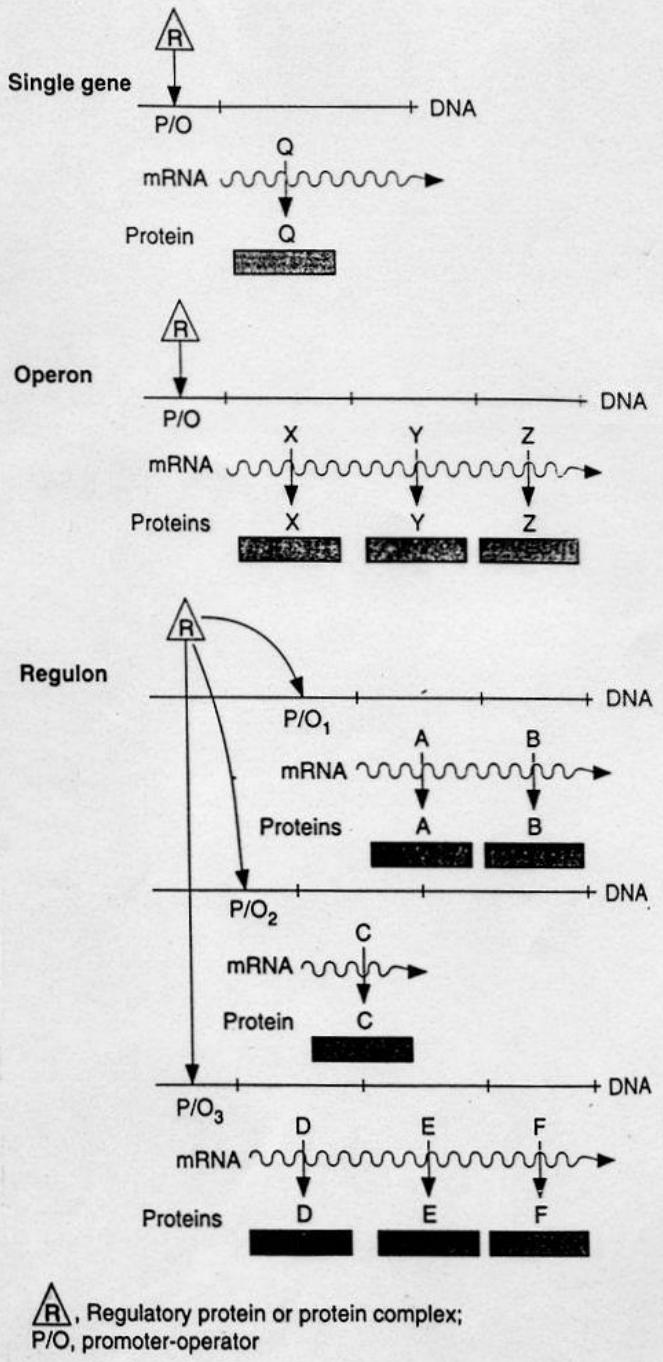


Sistemi di regolazione della trascrizione

Da un sistema semplice ad una cascata di attivazione



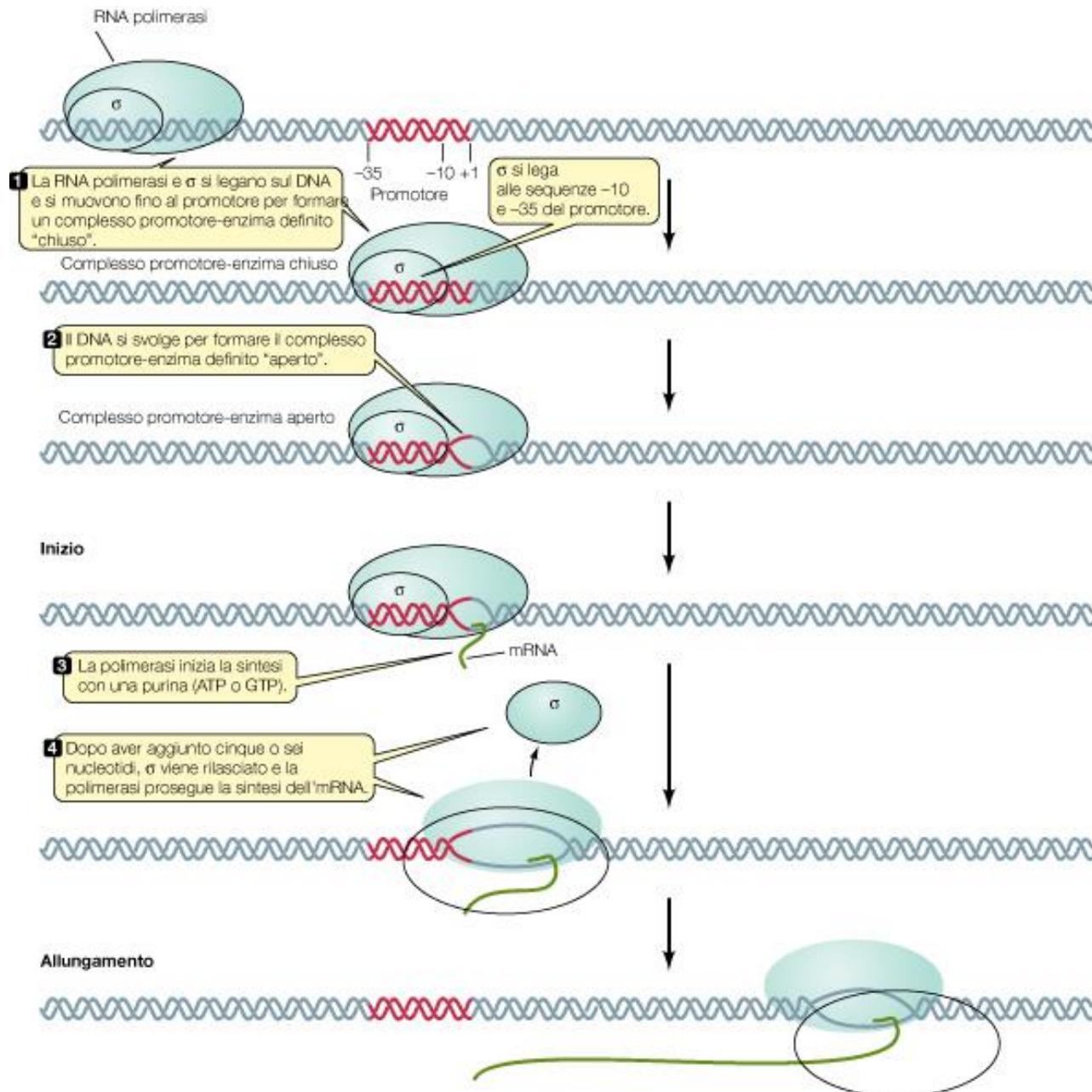
Organizzazione dei geni nei procarioti

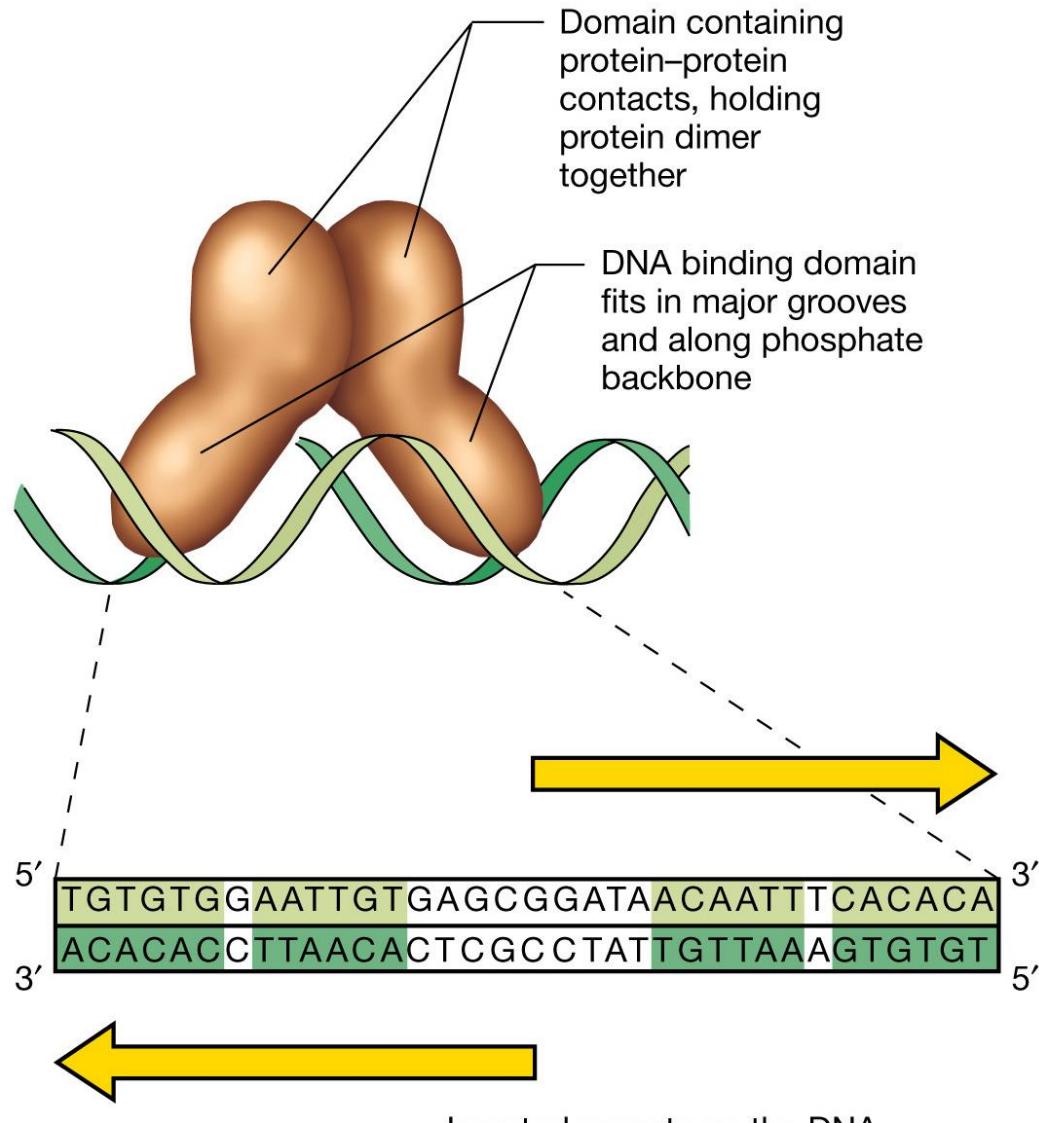


Proteine con funzione correlata sono generalmente codificate da geni contigui ed organizzate in operoni

Si distinguono vari livelli di organizzazione:

- OPERONI
- REGULONI
- STIMULONI





Repressore dell'operone lattosio, LacI

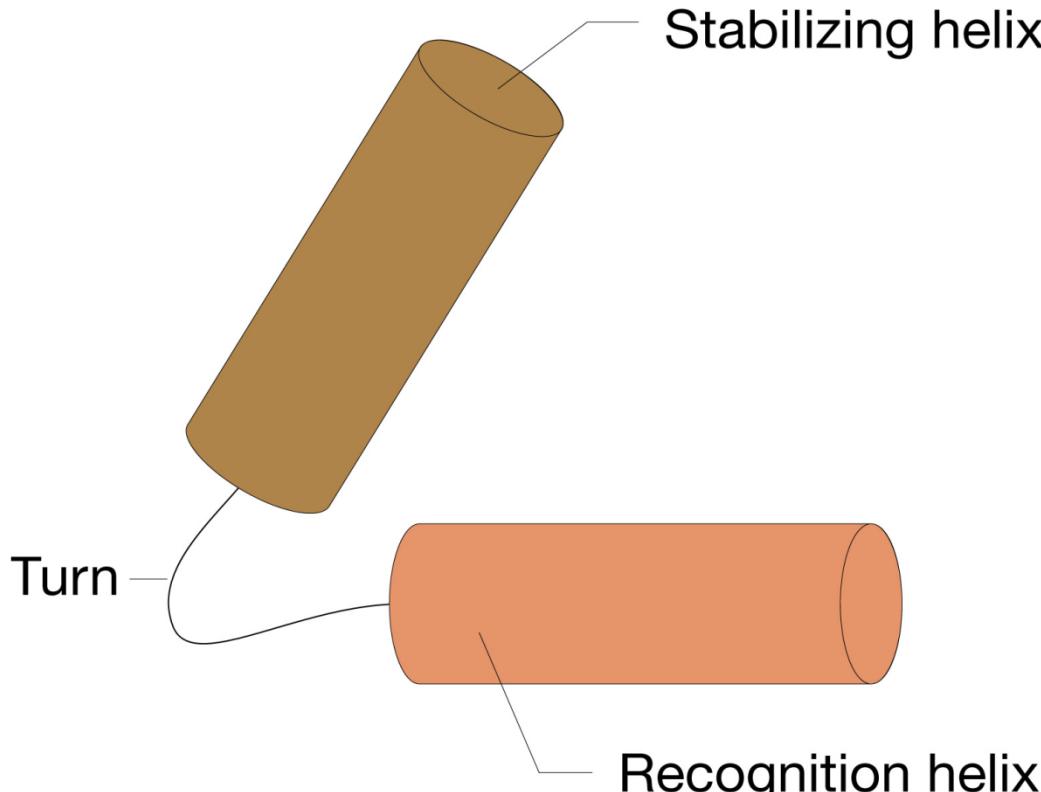
Molte proteine che legano il DNA sono dimeri e riconoscono due siti sul DNA.

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

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 :

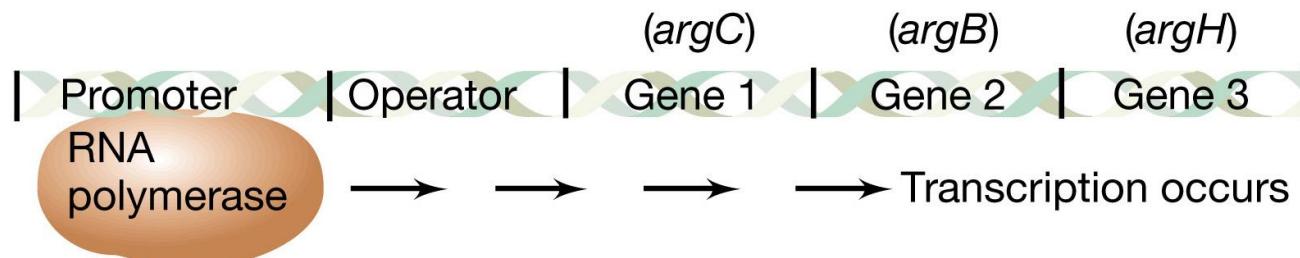


- da una sequenza in grado di formare una struttura ad α elica (elica di riconoscimento che interagisce con il DNA);
- breve sequenza (3 AA con frequentemente una glicina in 1 pos) in grado di girare la molecola ;
- da una seconda elica che stabilizza la prima e partecipa alla formazione del DIMERO

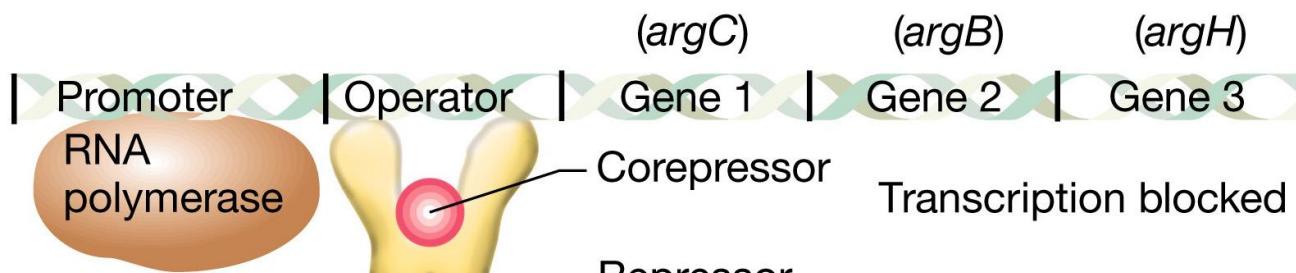
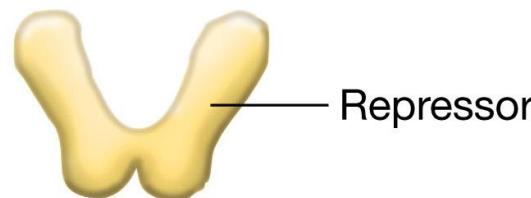
CONTROLLO NEGATIVO DELLA TRASCRIZIONE

Modello di REPRESSIONE della trascrizione

- attivazione del REPRESSORE da parte del corepressore



(a)

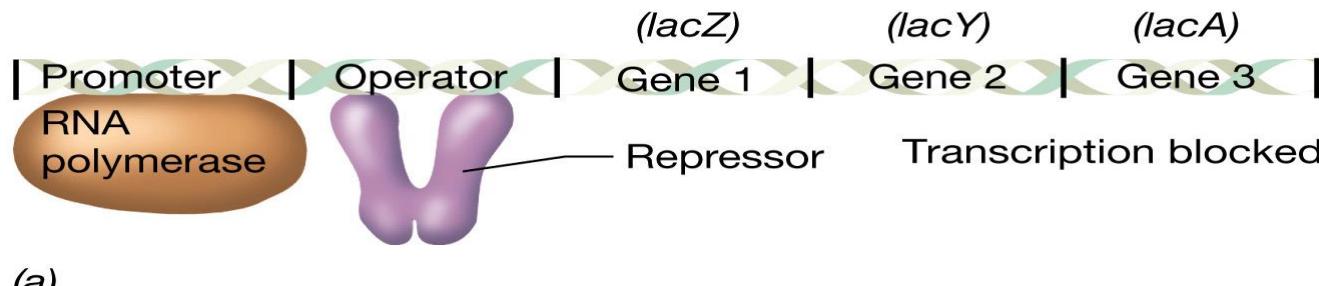


(b)

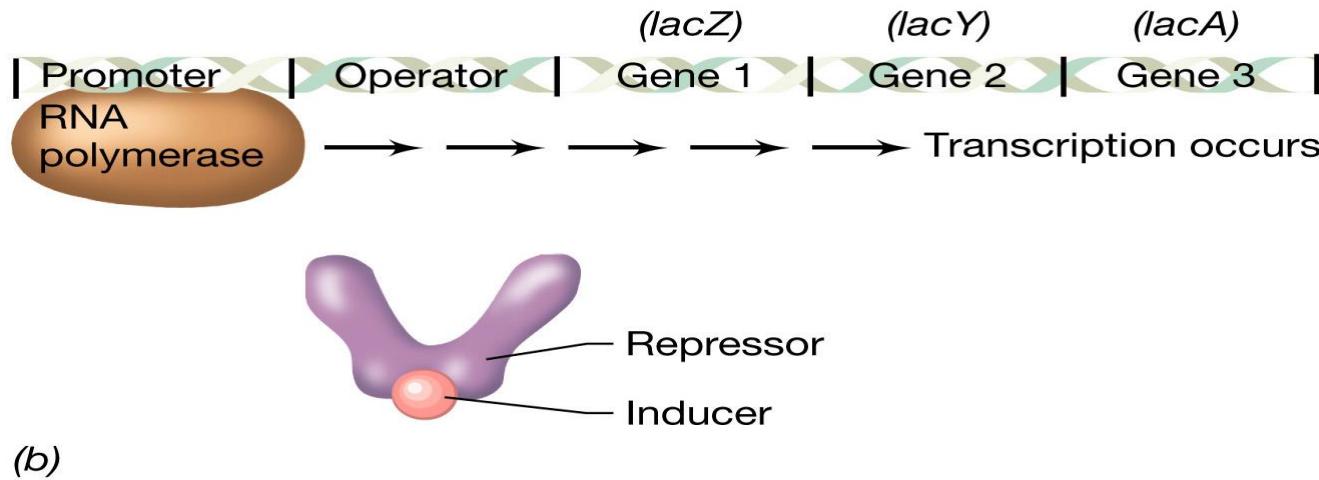
CONTROLLO NEGATIVO DELLA TRASCRIZIONE

2. Modello di INDUZIONE della trascrizione

- disattivazione del REPRESSORE da parte dell'induttore



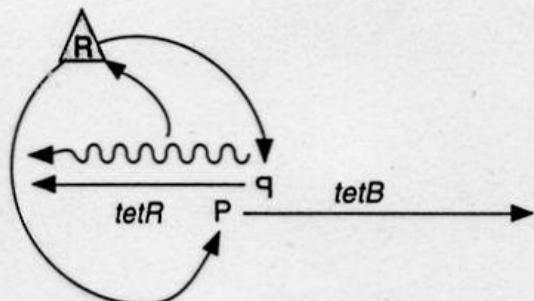
(a)



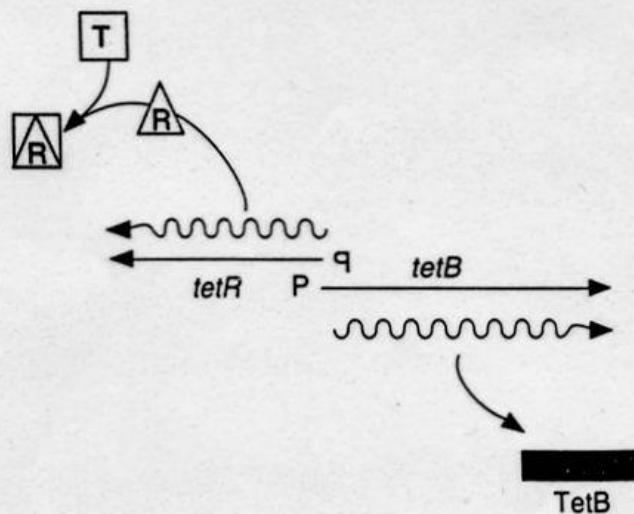
(b)

Regolazione dei geni per la resistenza alla tetraciclina

No tetracycline



Tetracycline



, repressor;

, tetracycline;



, repressor-tetracycline complex;

, TetB

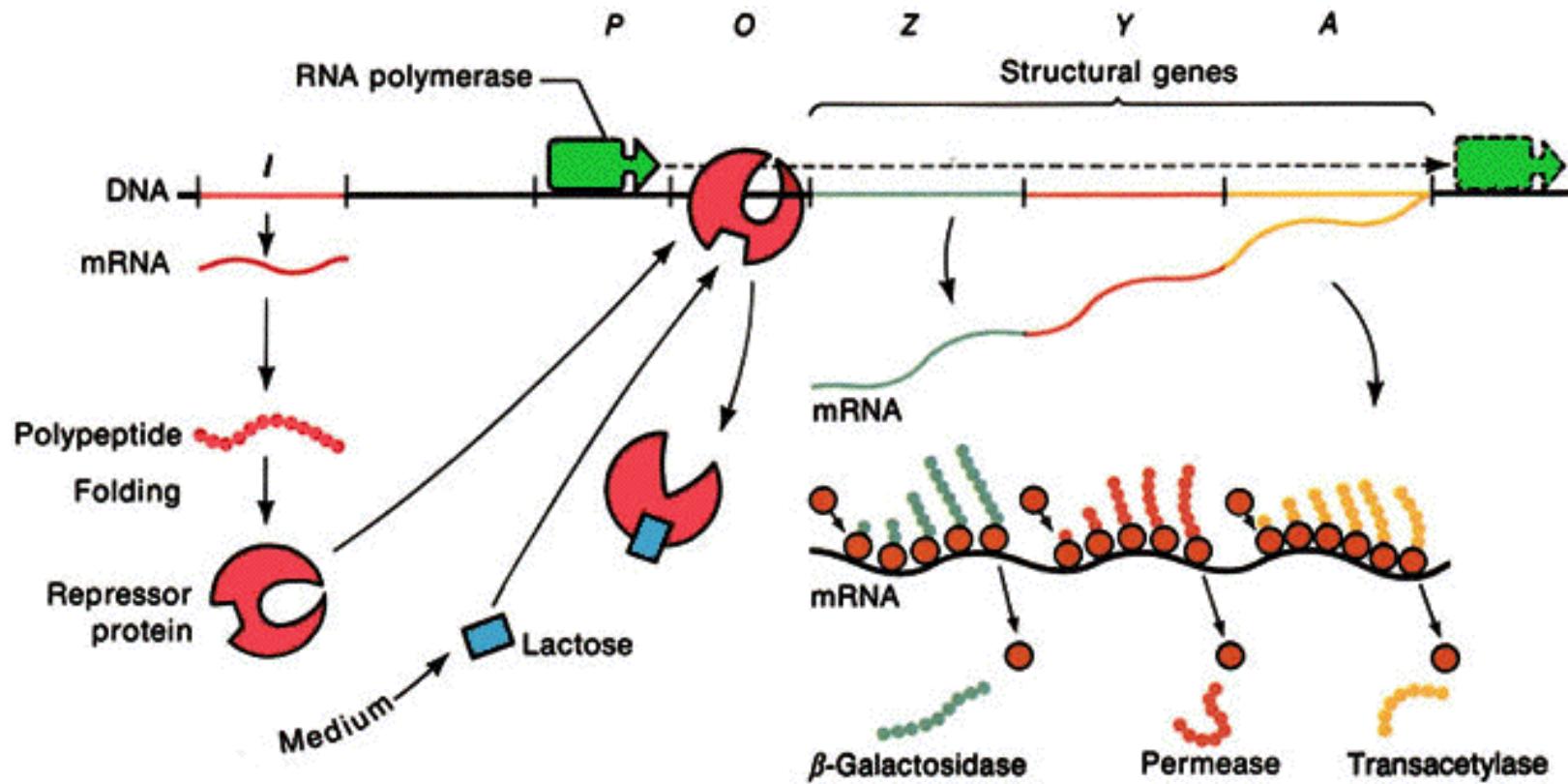
In assenza di tetraciclina, il repressore TetR reprime tetB il gene che codifica per una pompa ad efflusso per tetraciclina

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

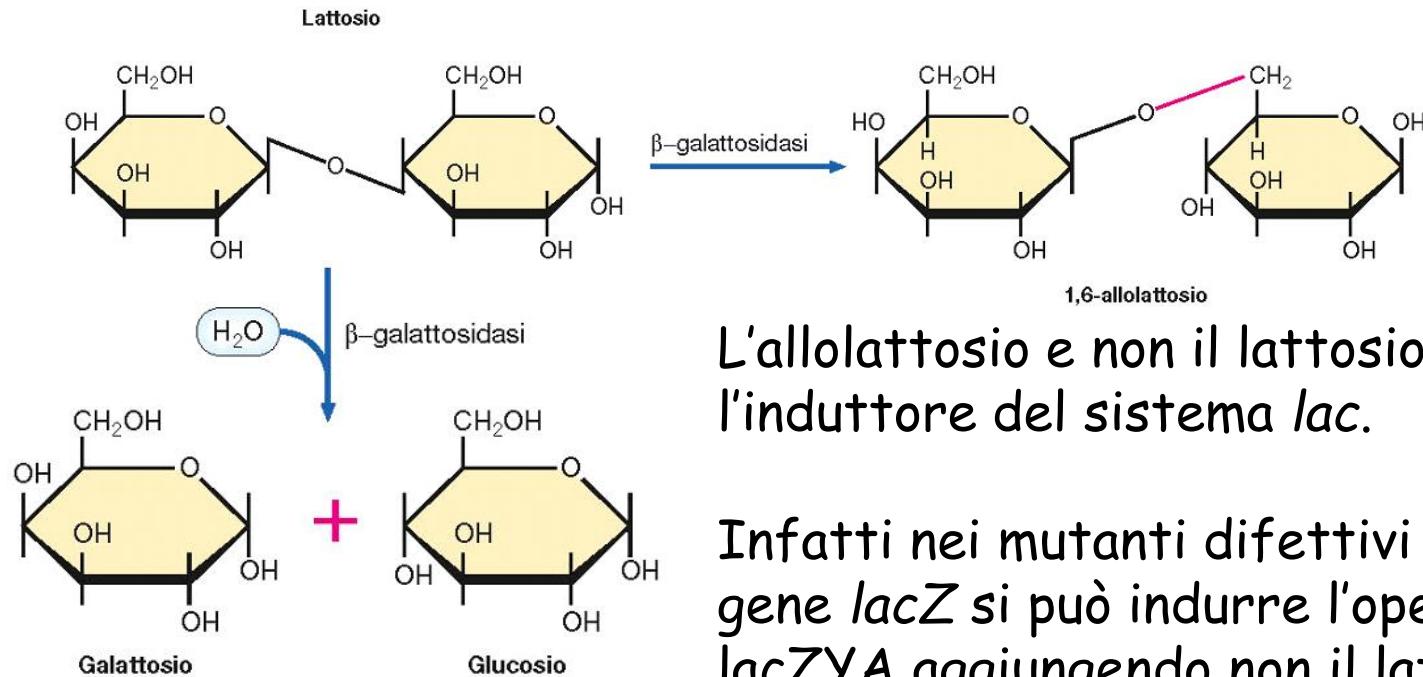
L'operone lac contiene:

- 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.

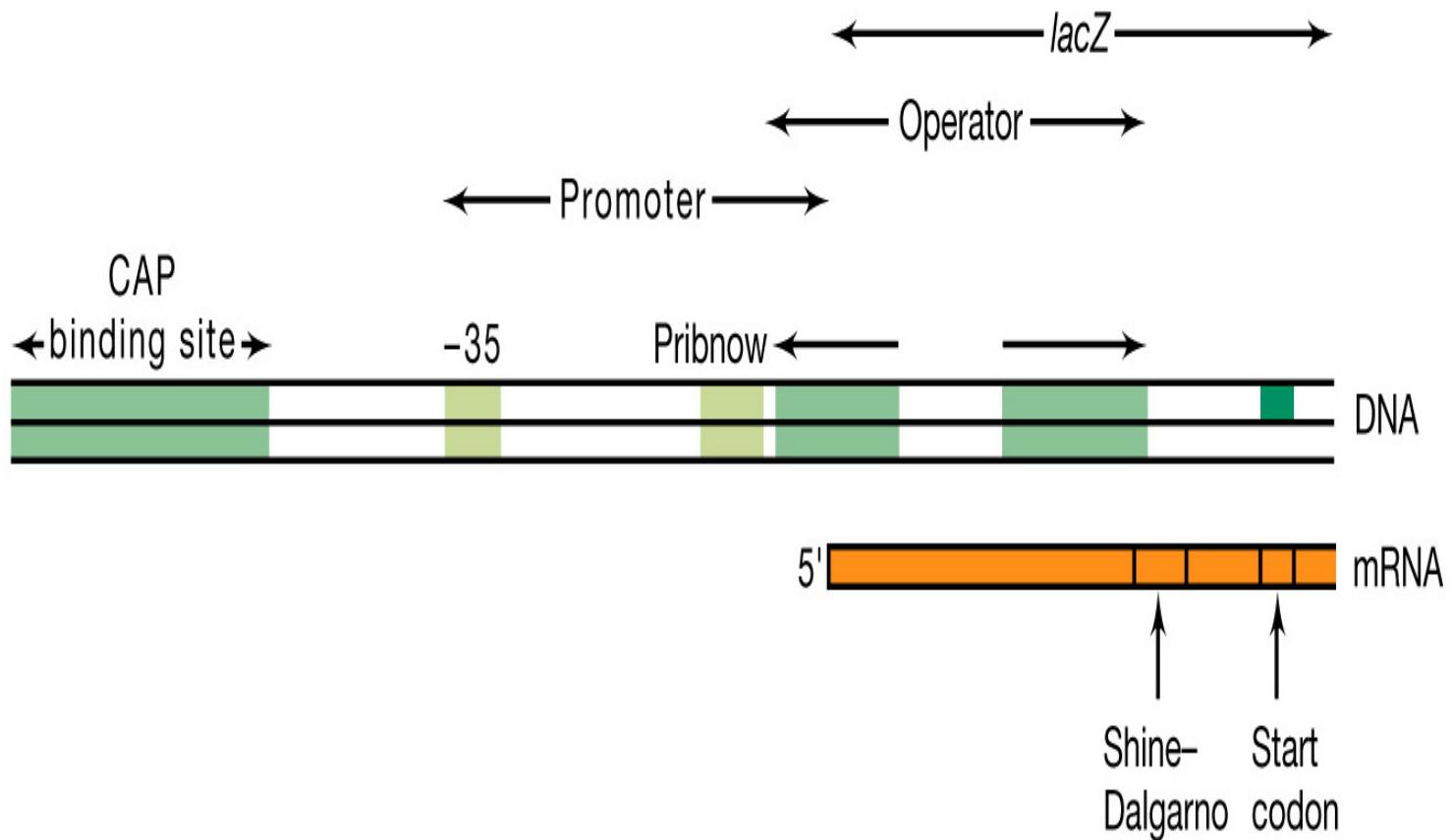


L'allolattosio e non il lattosio è l'induttore del sistema lac.

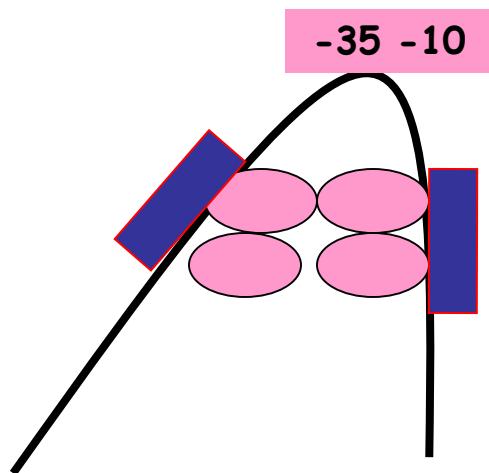
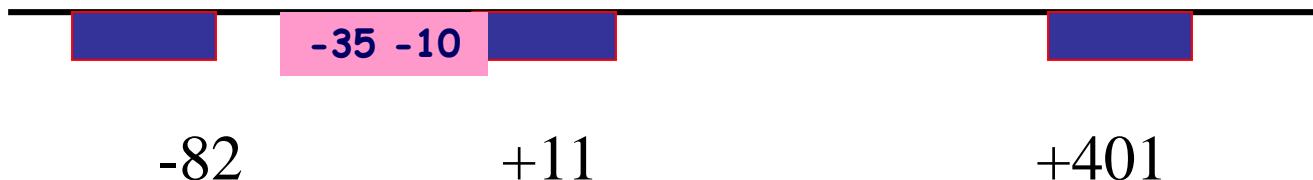
Infatti nei mutanti difettivi nel gene *lacZ* si può indurre l'operone *lacZYA* aggiungendo non il lattosio ma l'allolattosio

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

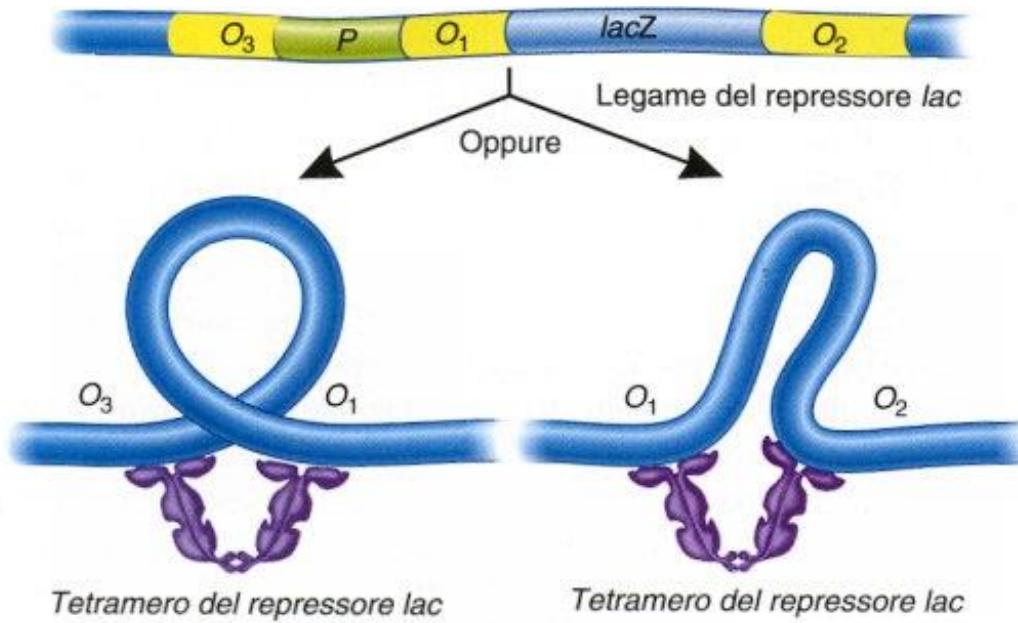
Gli elementi che caratterizzano la regione regolatrice dell'operone lac.



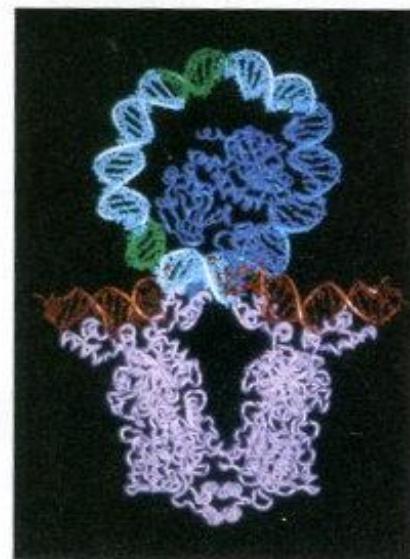
Localizzazione dei siti operatore nel promotore dell'operone lac



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



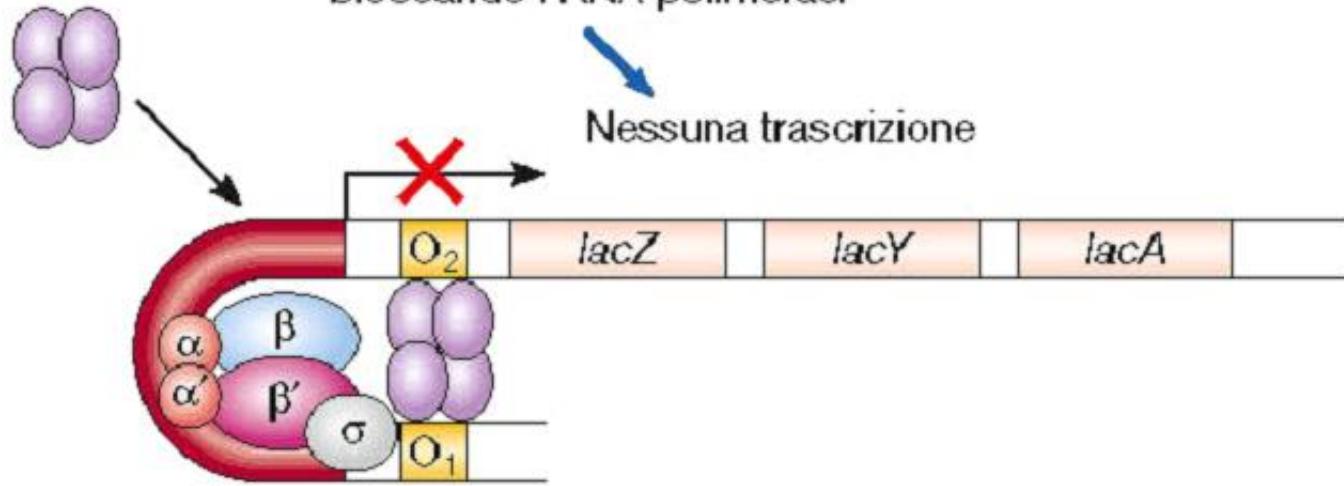
(a) Possibili anse di DNA causate dal legame del repressore *lac*



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

b) In assenza di lattosio:

Il repressore lega gli operatori,
bloccando l'RNA polimerasi



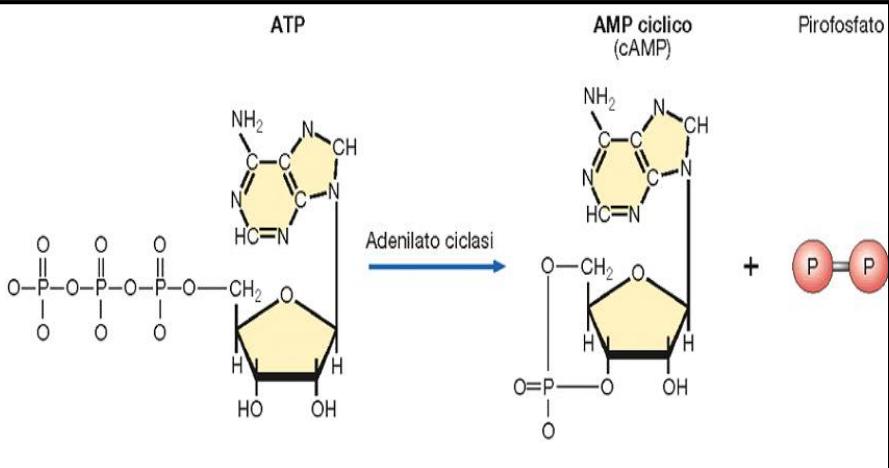
Attenzione nomenclatura cambiata in questa immagine
 $O_1 = O_3$ mentre $O_2 = O_1$

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

Basso livello di glucosio

ATP

Adenil-ciclasi



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.

RNA polimerasi

DNA

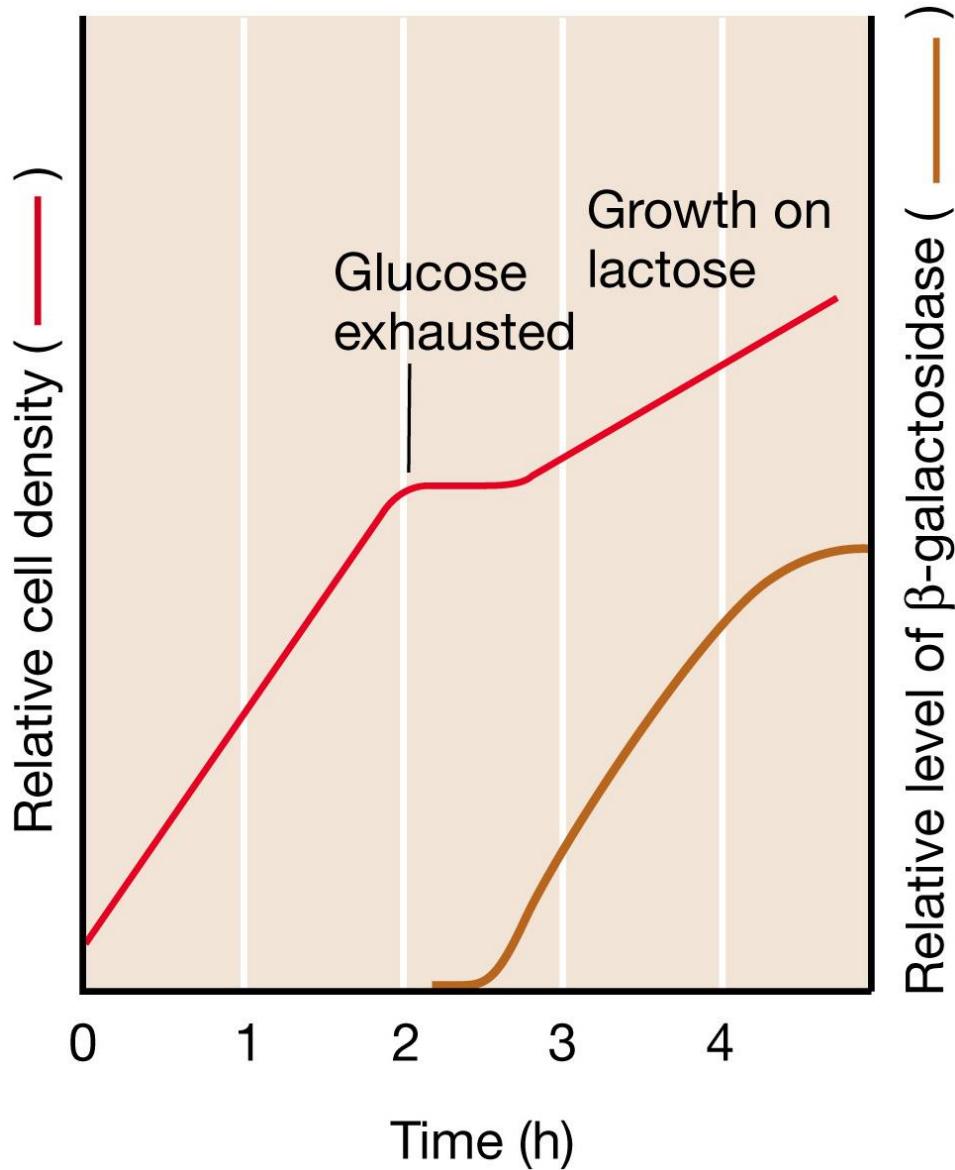
Promotore

O Z

cAMP
CAP

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

Sistemi controllo globale : lo stimulone cAMP_CAP



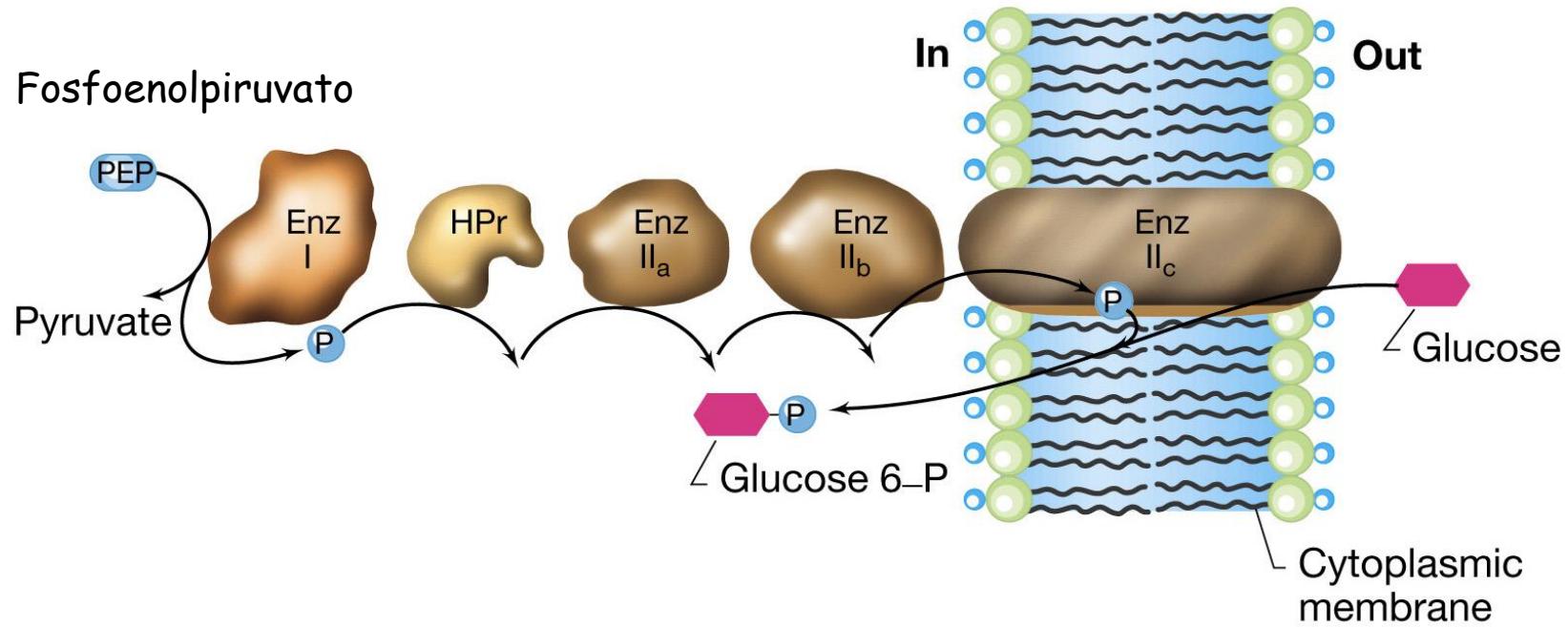
La curva diauxica

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

Traslocazione di gruppo.

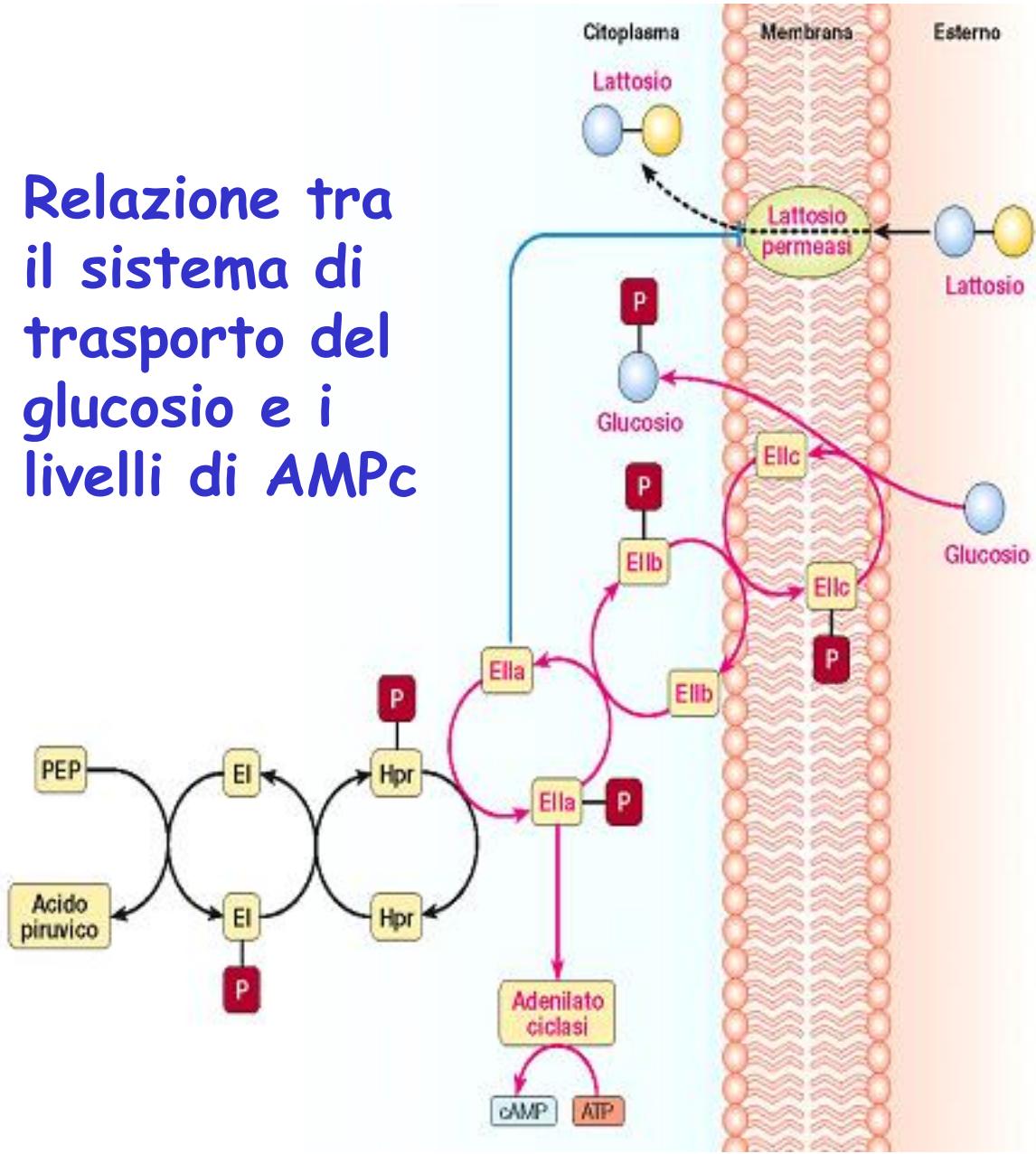
La sostanza viene modificata chimicamente durante l'attraversamento della membrana

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

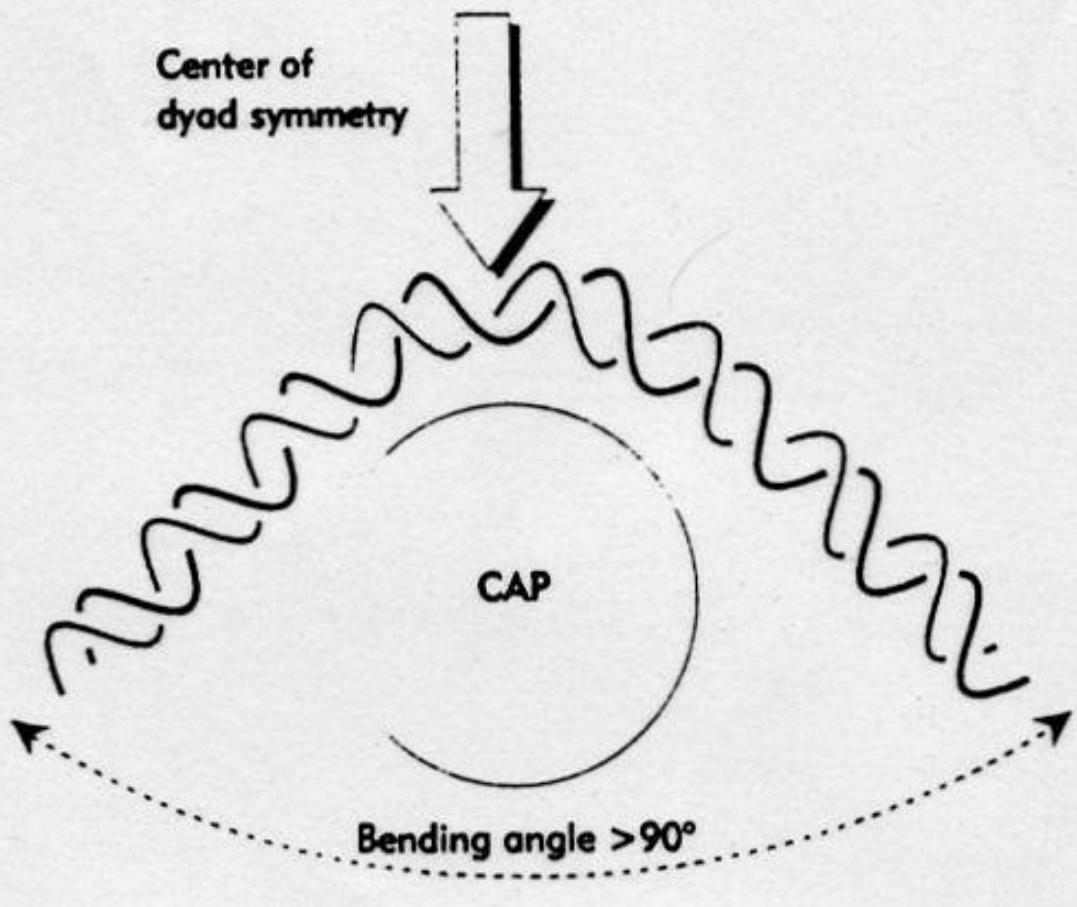
La proteina IIA-P è continuamente impegnata a fosforilare IIB e non fosforila la Adenilato-ciclaso
basso livello di AMPc

In assenza di glucosio

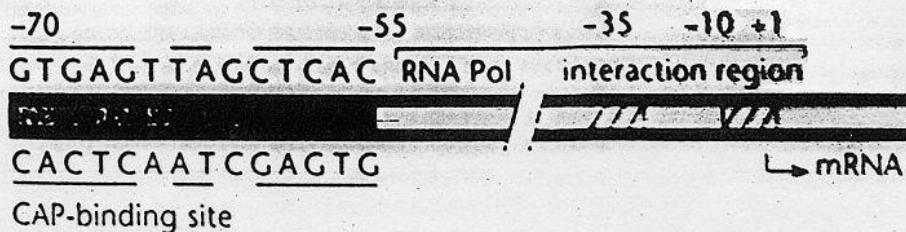
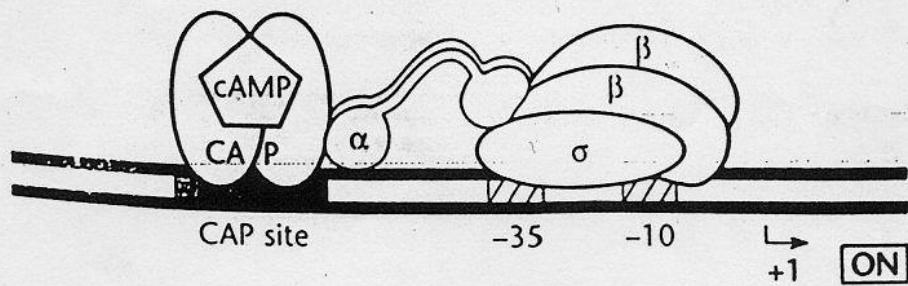
la proteina IIA-P non deve fosforilare continuamente IIB e può fosforilare Adenilato-ciclaso

alto livello di AMPc

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



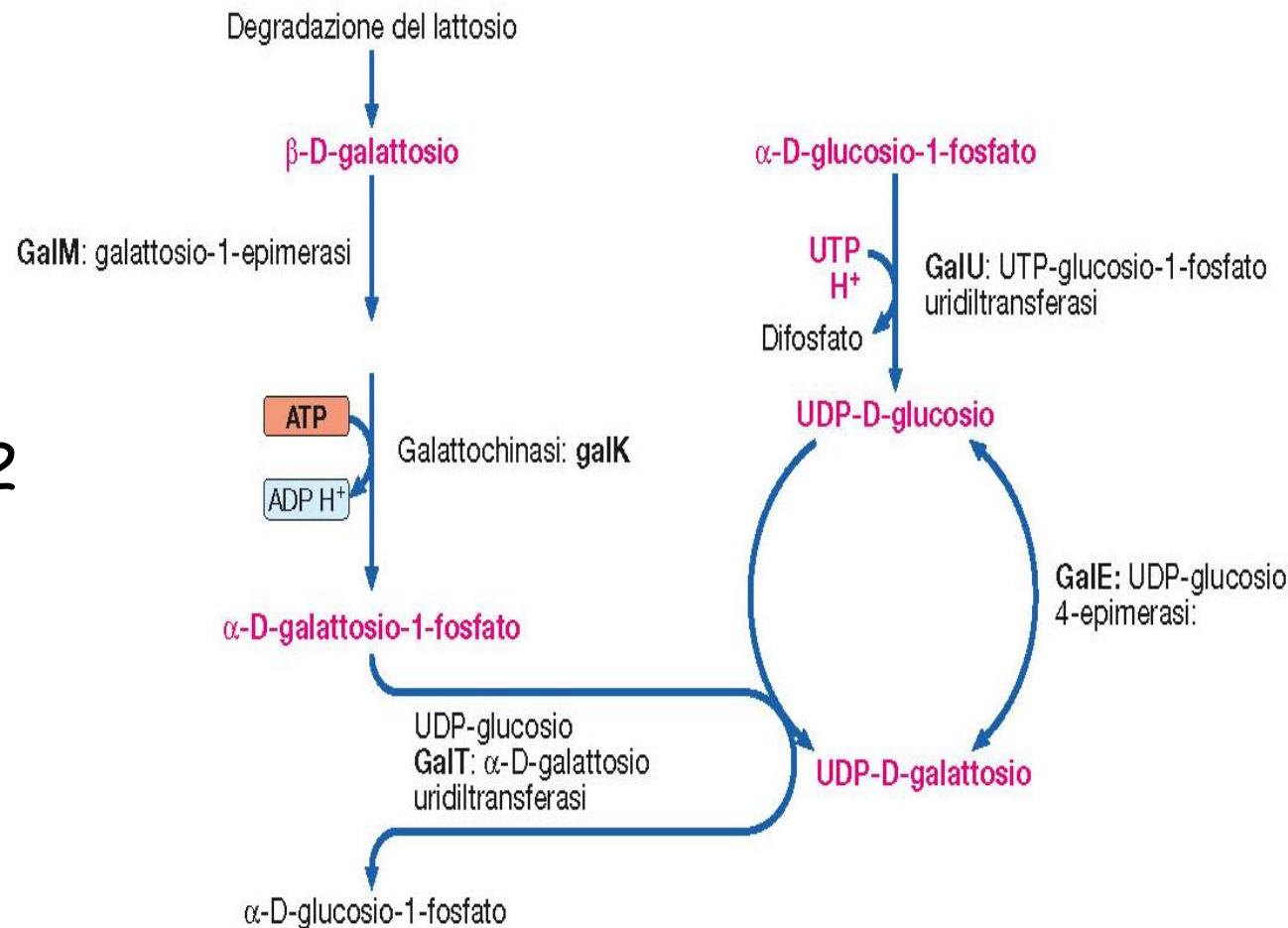
Il complesso CAP-AMPc riconosce una regione a monte del promotore ed induce curvatura

A**B** The CAP protein bends DNA**C**

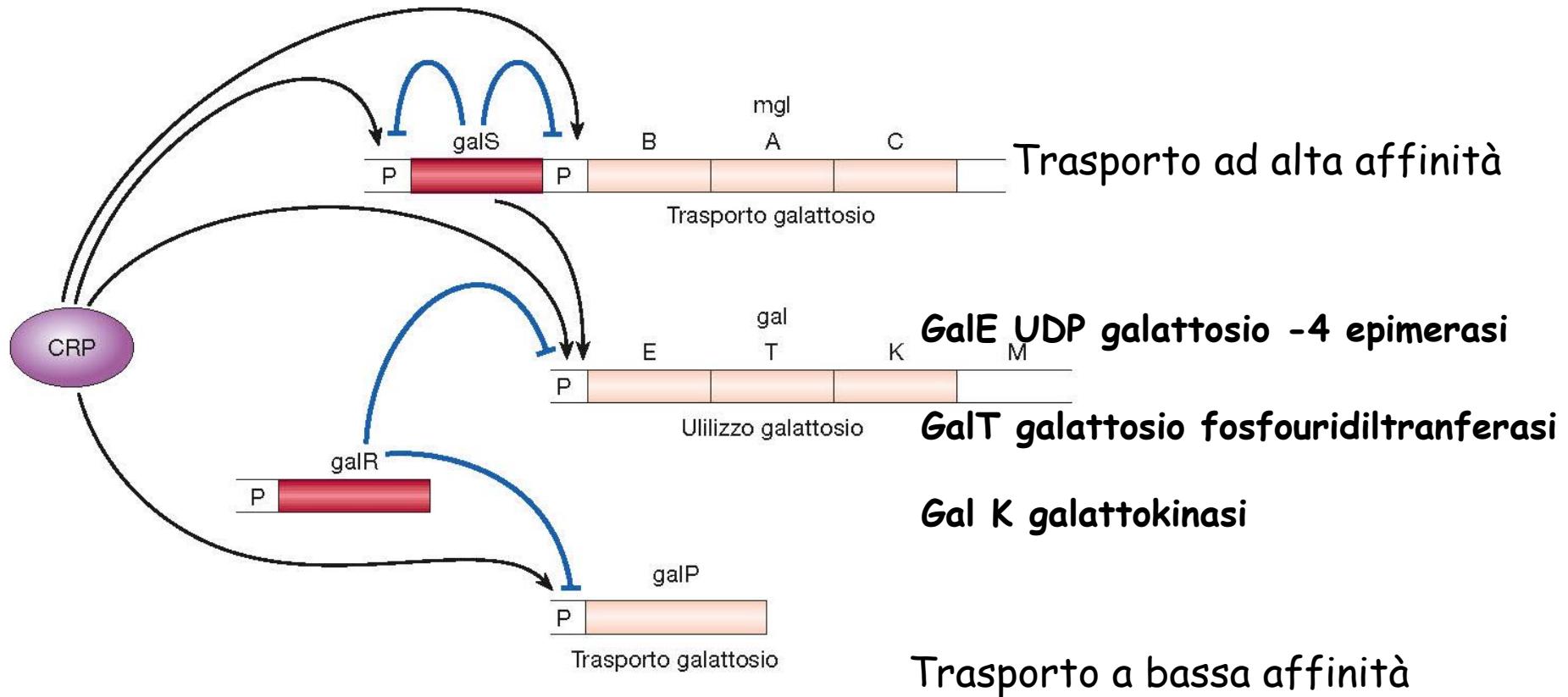
Il complesso CAP-
AMPC induce
curvatura nel DNA
facilitando così il
legame della RNA
polimerasi con il
DNA

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



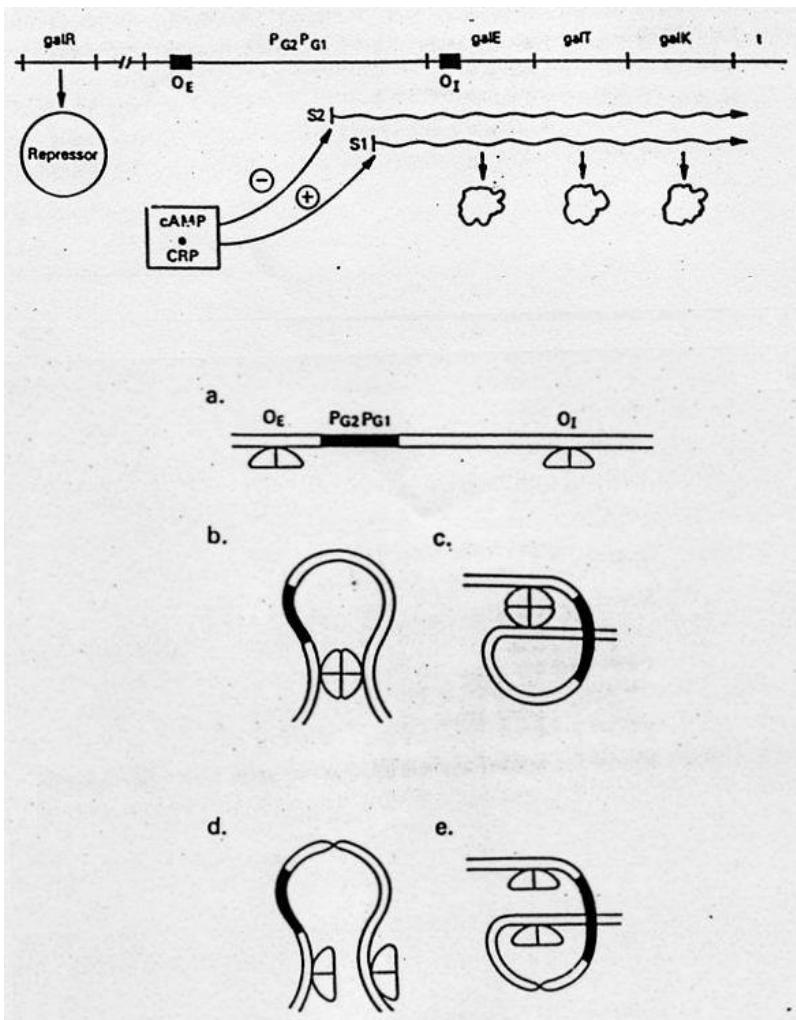
La complessità dell'operone galattosio



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

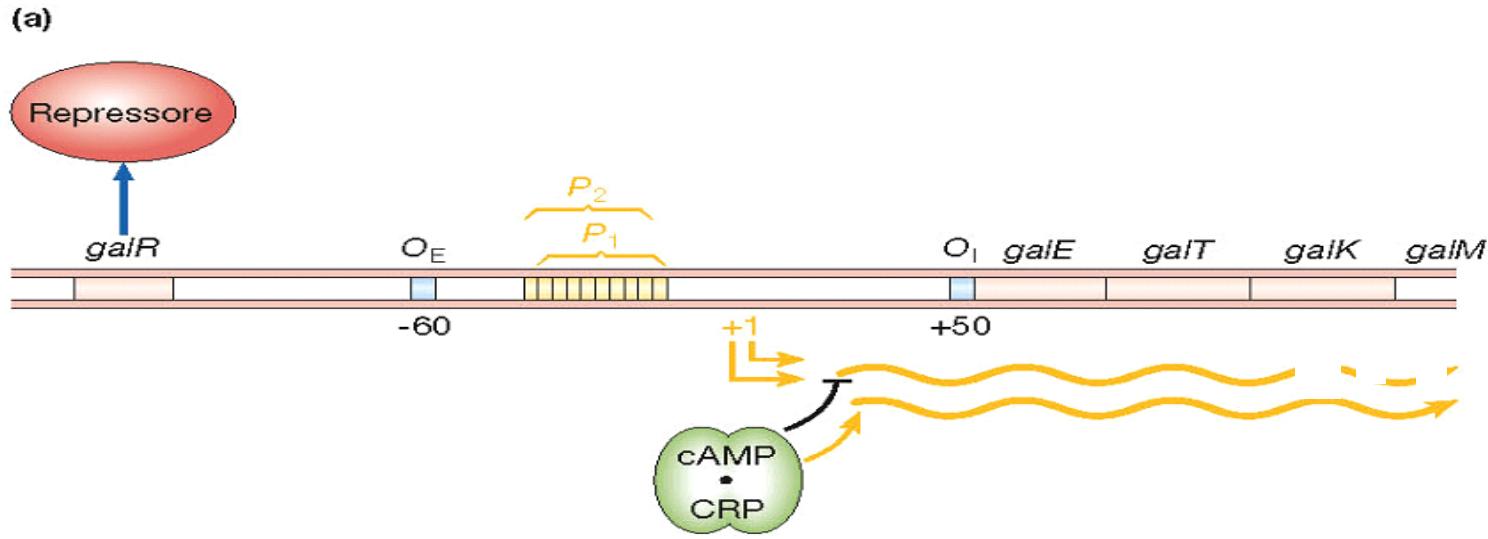


Il sistema gal è regolato negativamente in assenza di Galattosio dalla proteina GaLR che si lega a due siti OE e OI provocando la formazione di un'ansa che racchiude i promotori PG2 e PG1

Il promotore principale PG1 è attivato da cAMP-CAP che legandosi al PG1 blocca per impedimento sterico l'avanzamento della RNAPol da PG2

cAMP-CAP può avere un duplice effetto
attivatore sul P1
repressore sul P2

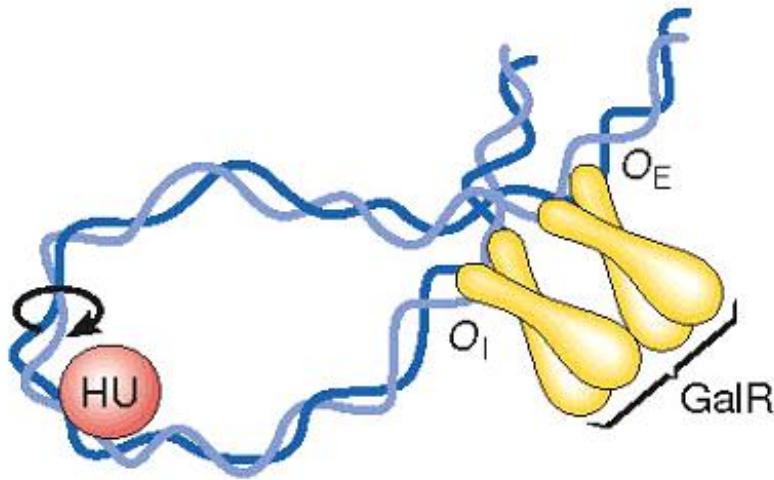
L'operone viene trascritto da 2 promotori sovrapposti P1 e P2 sfalsati di 4 nucleotidi e fiancheggiati da 2 siti operatore



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)



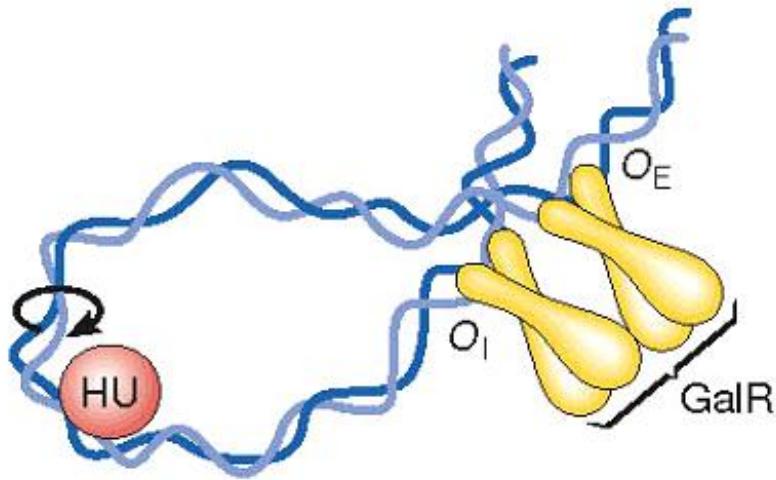
Il repressosoma

Per la repressione del promotore P1 è sufficiente il legame di un dimero di GalR all'operatore OE

La repressione di P2 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)



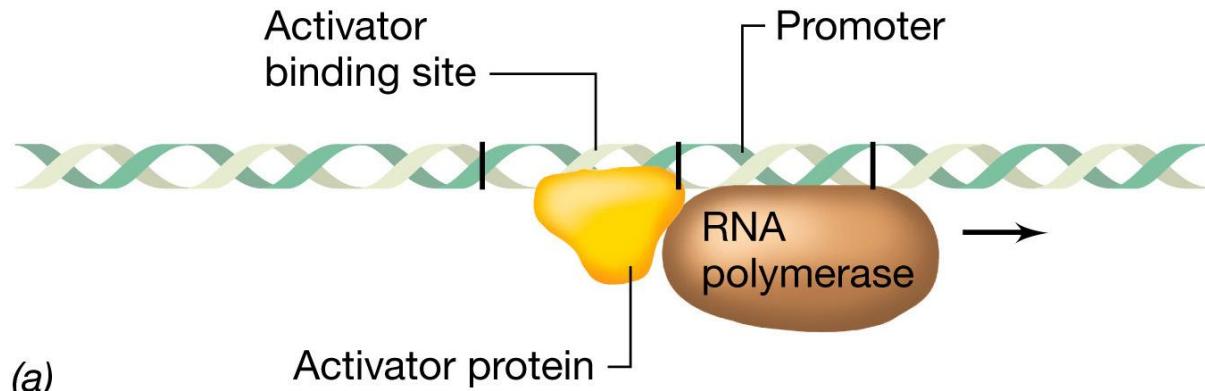
Il repressosoma

Per la repressione del promotore P1 è sufficiente il legame di un dimero di GalR all'operatore OE

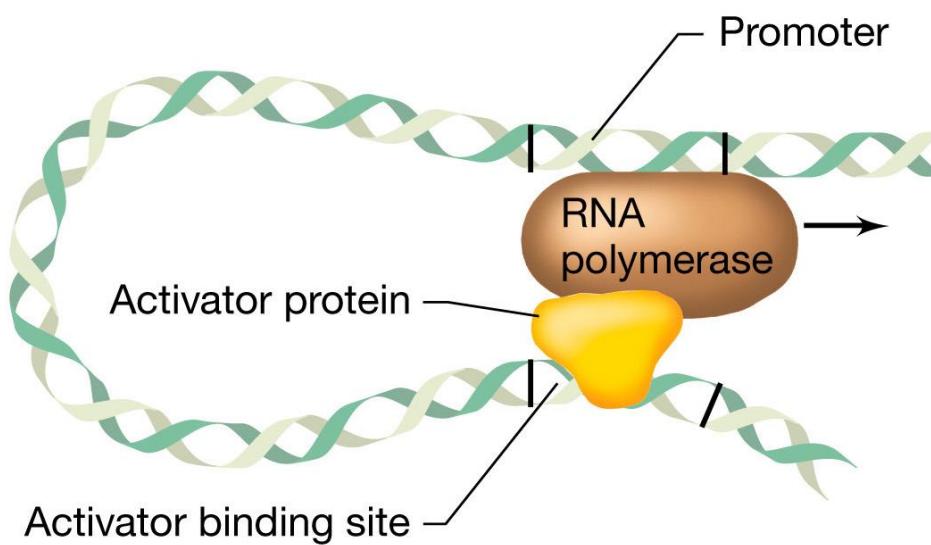
La repressione di P2 richiede che GalR si leghi ad entrambi i siti che interagendo tra loro delimitano un ansa. La curvatura del DNA viene facilitata dalla proteina HU

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**

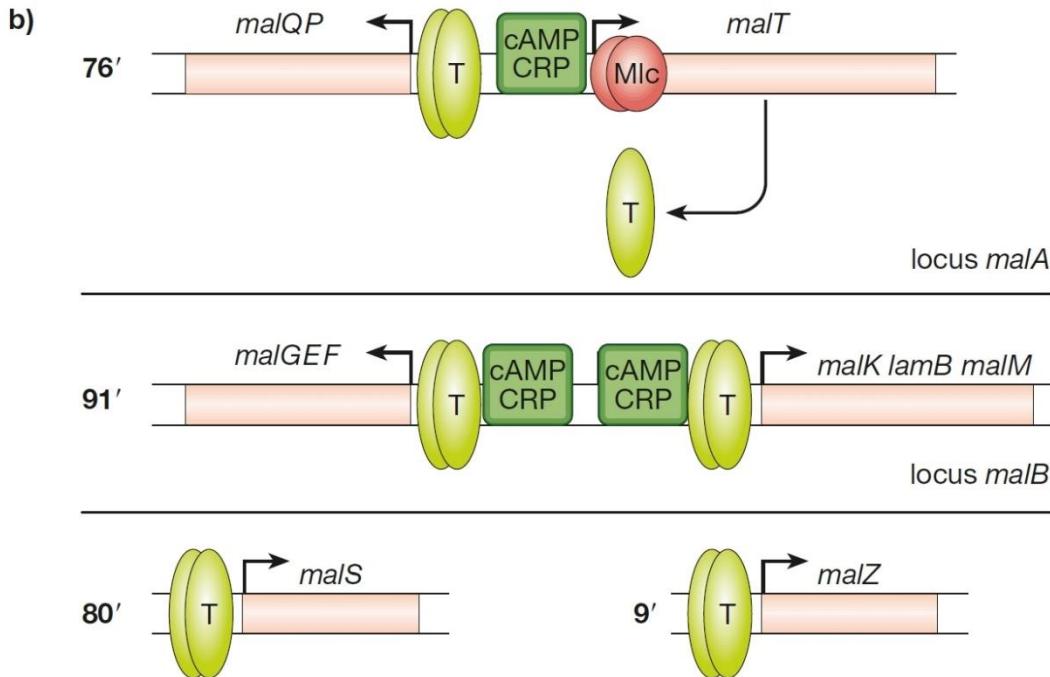
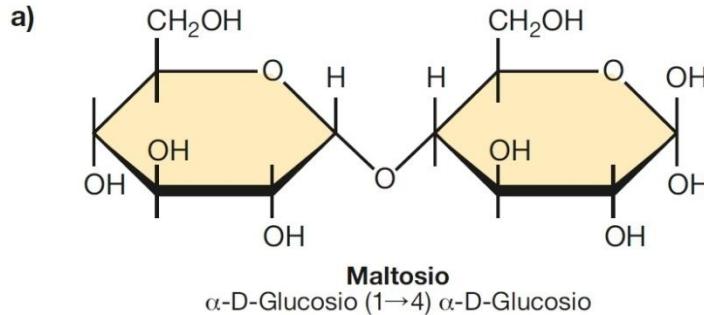
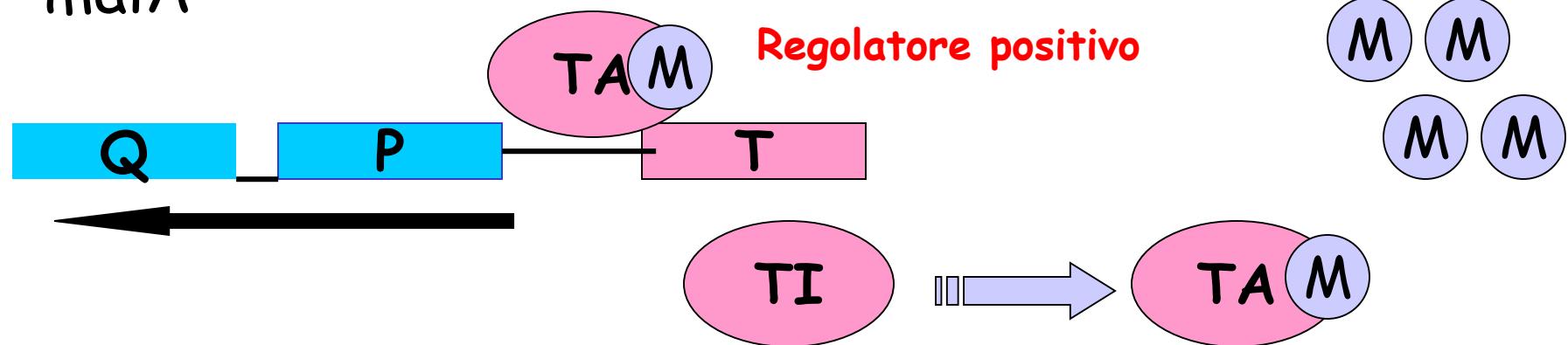


Figura 12.7 REGULONE MALTOSSIO. (a) Il disaccaride malto-
sio. (b) Organizzazione genetica del regulone *mal*. I numeri
a sinistra di ogni locus ne indicano la posizione, in unità di
mappa, sul cromosoma di *Escherichia coli*. Le frecce indicano
la direzione e il sito d'inizio trascrizione. In verde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

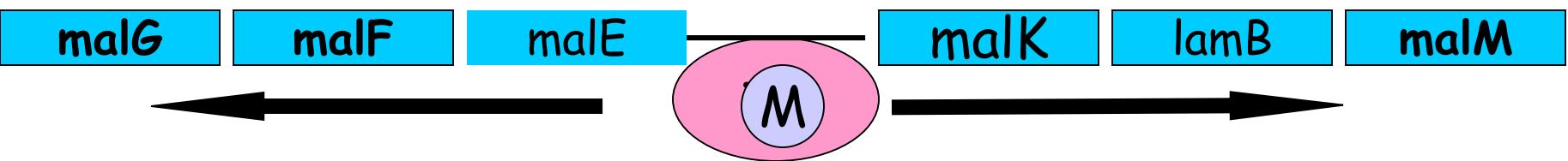
**Il sistema Malto-
sio: è un regulone. Più operoni controllati dalla medesima
proteina**

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

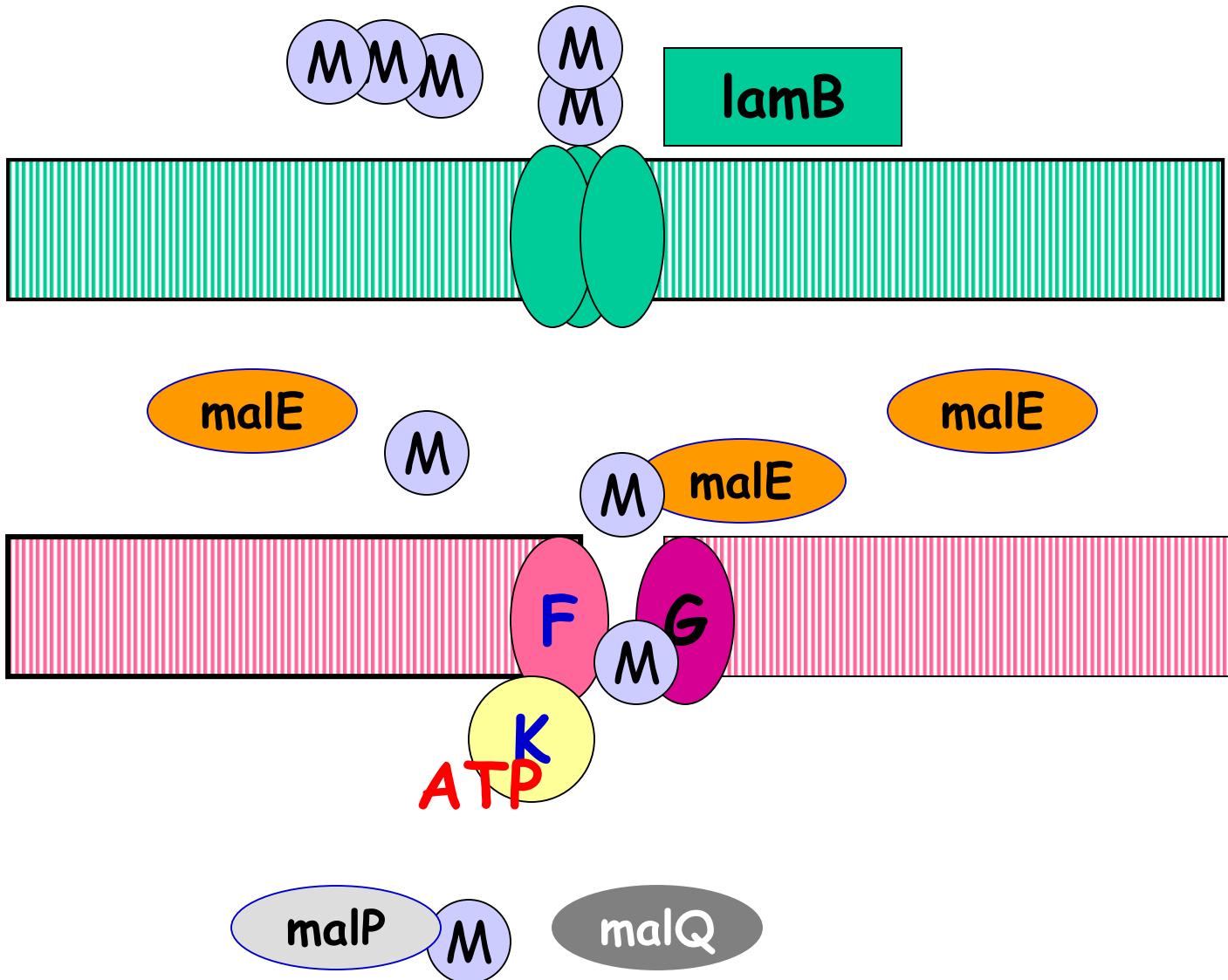
malA

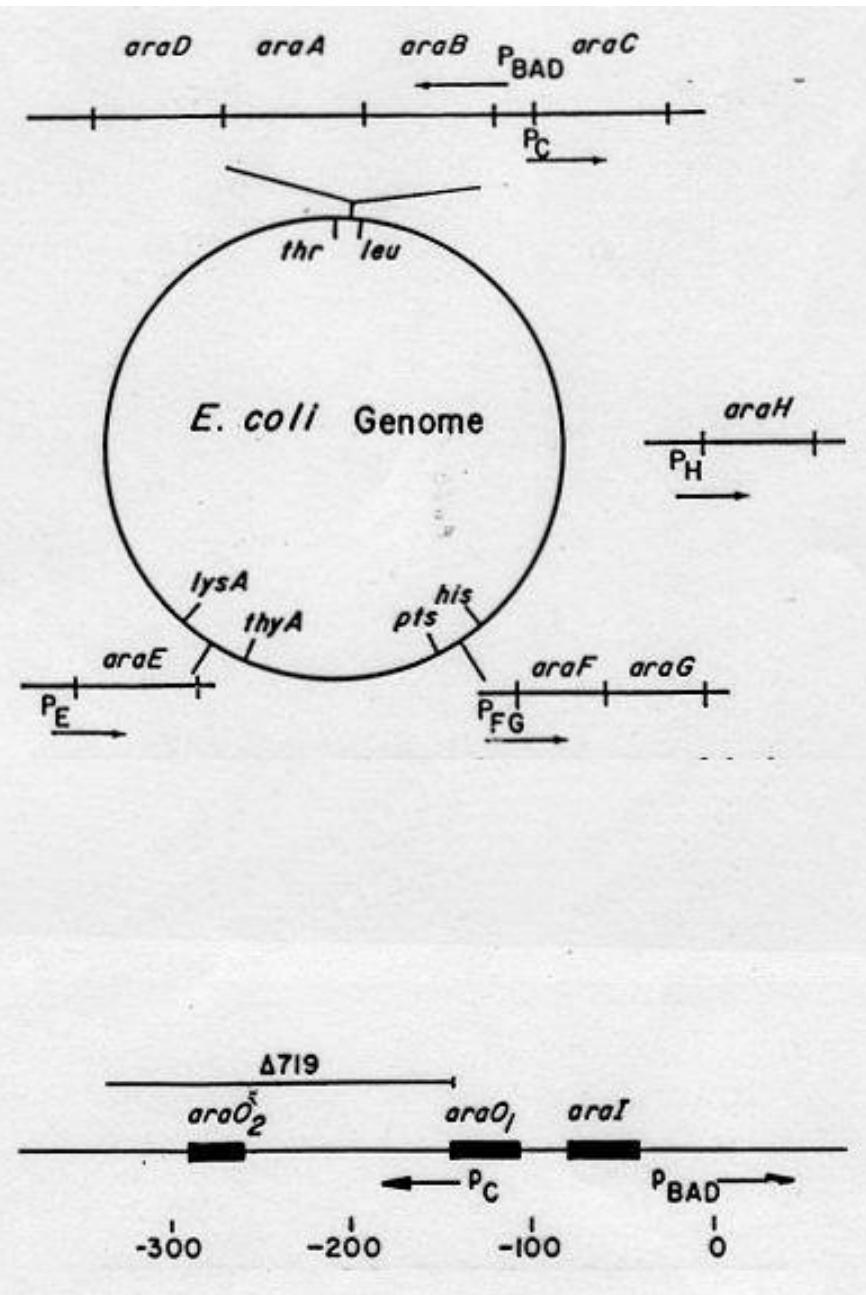


malB



Il sistema maltosio come sistema modello

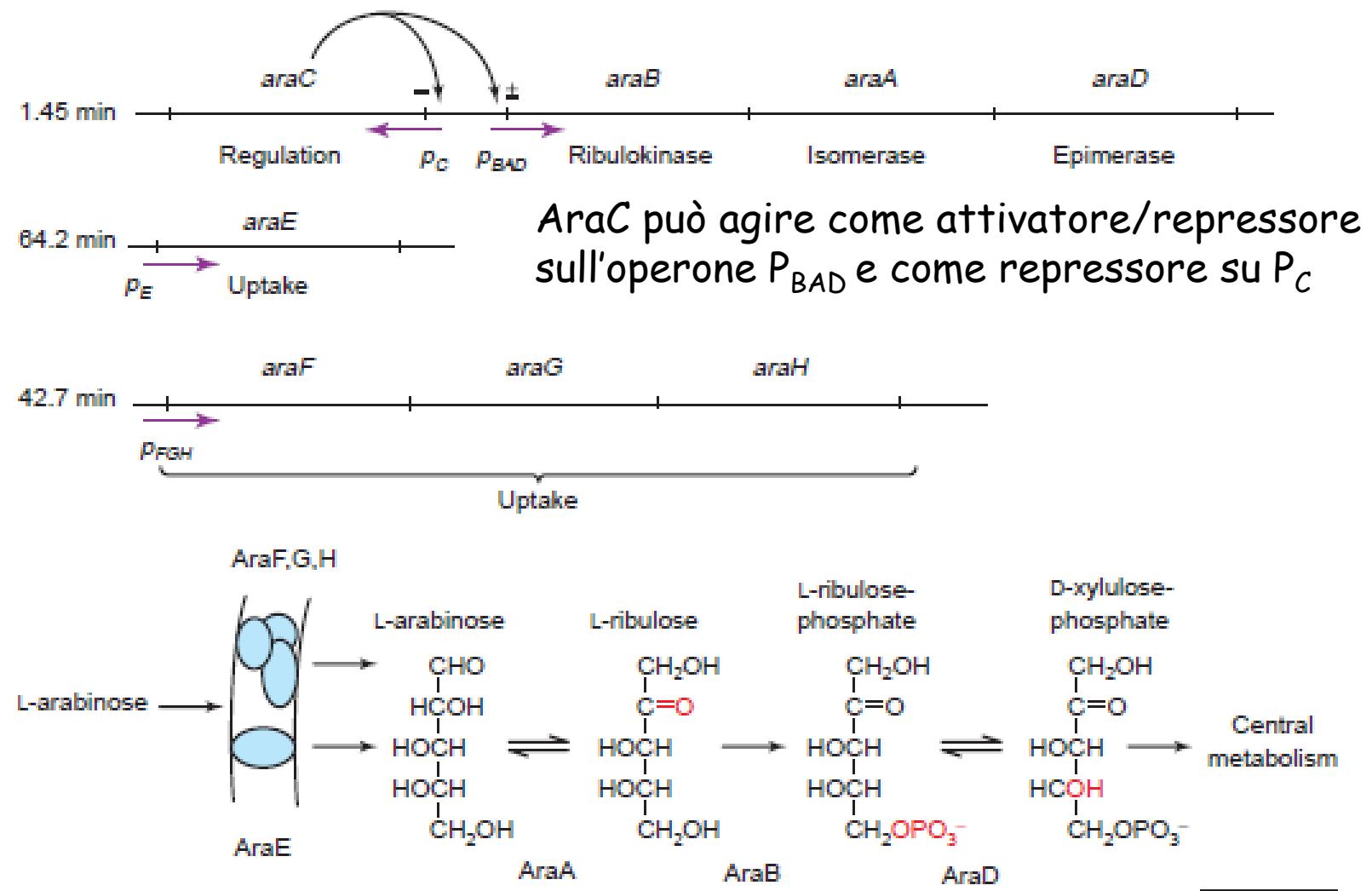


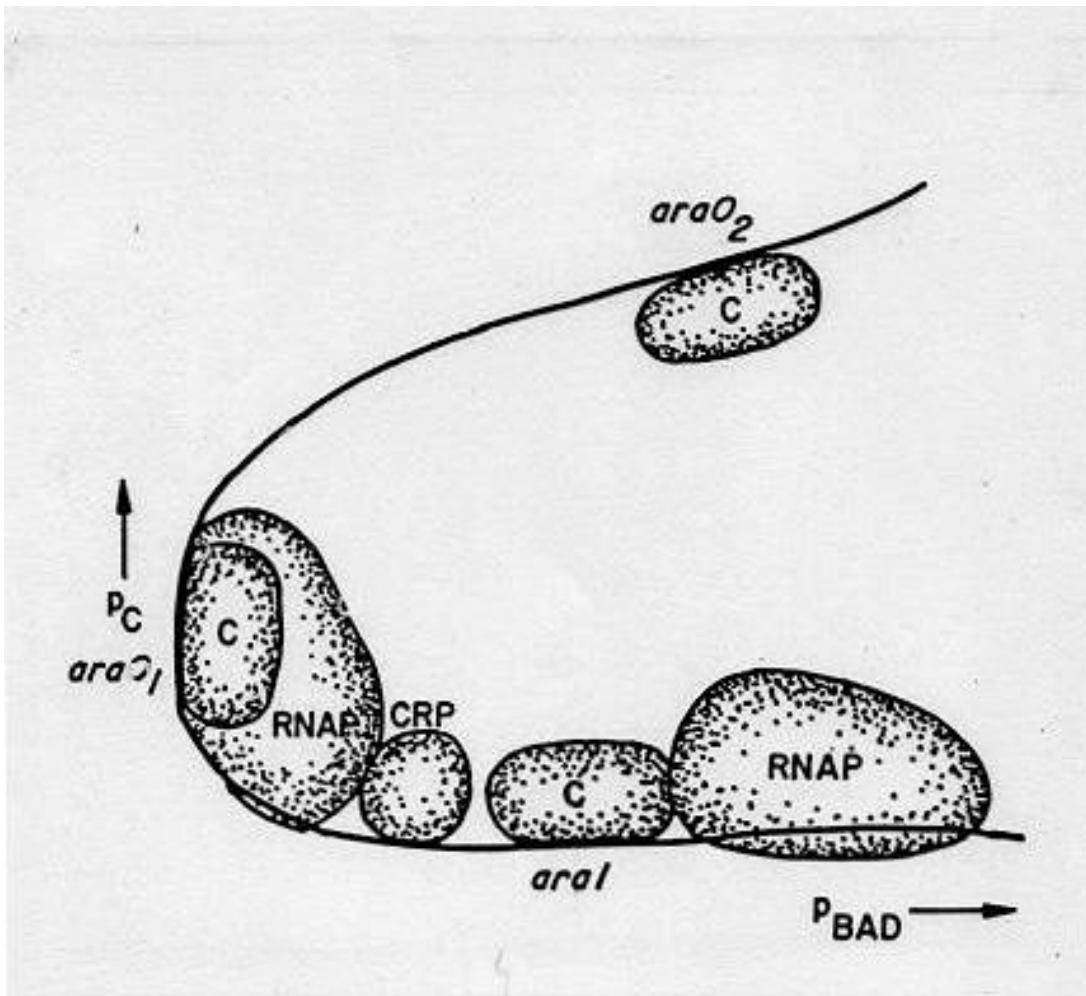


Il sistema arabinosio è dotato di un sistema di regolazione molto complesso

Controllo sia negativo che positivo effettuato dalla medesima proteina AraC

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



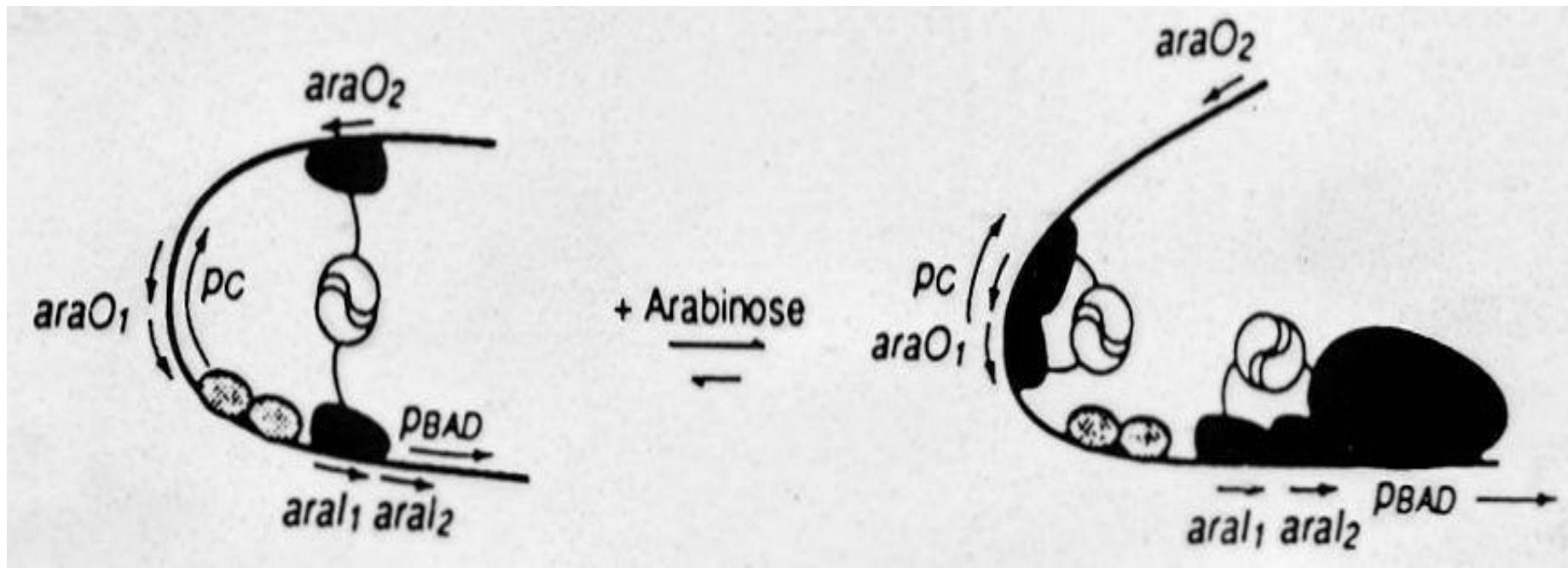


La regione a monte del promotore P_{BAD} contiene 3 siti di legame per la proteina regolatrice AraC

araI
araO1
araO2

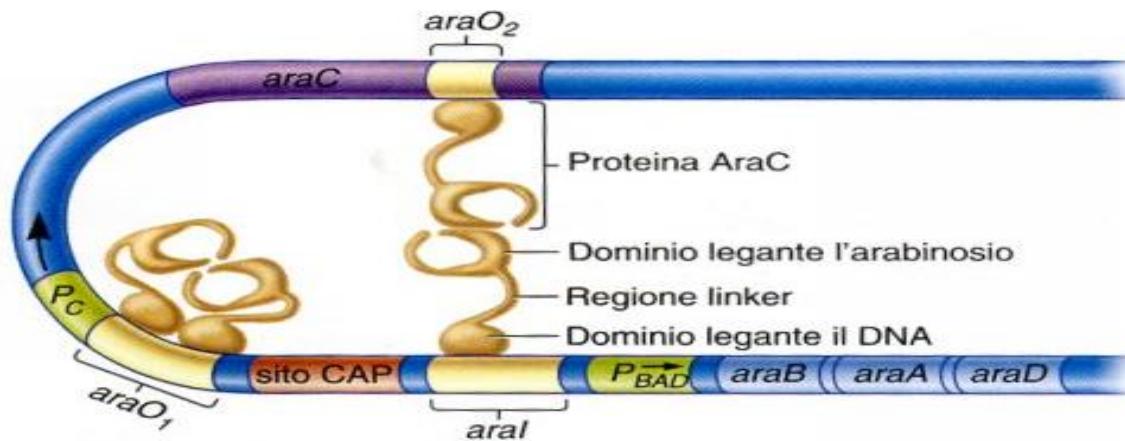
A monte dell' operone *araBAD* è presente il gene *araC* trascritto in direzione opposta

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}

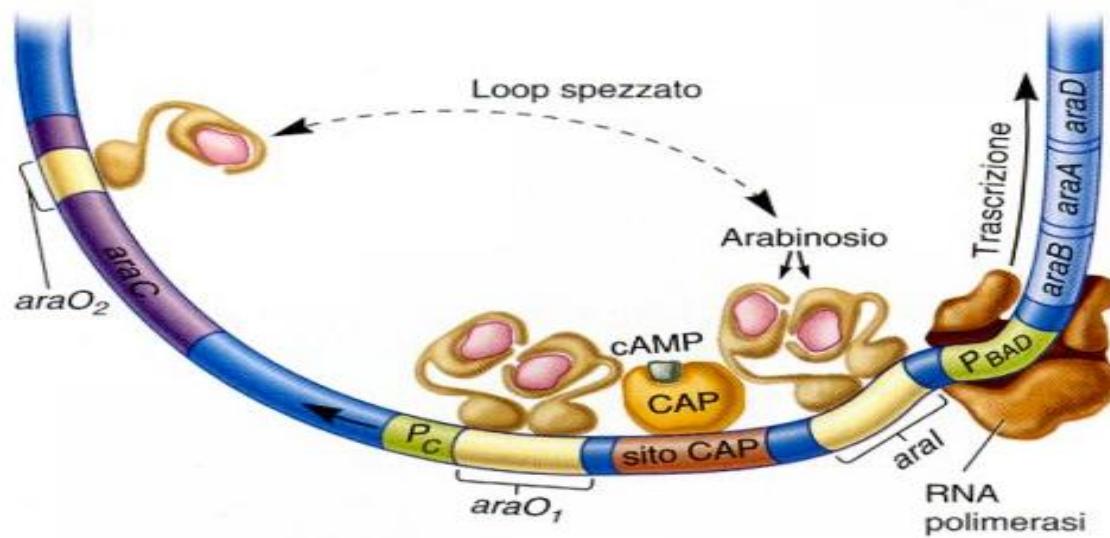


In presenza di arabinosio si ha un cambio conformazionale di AraC che riconoscerà come attivatore i siti araI1 e araI2 adiacenti al promotore P_{BAD} attivandone la trascrizione

La proteina AraC da repressore ad attivatore

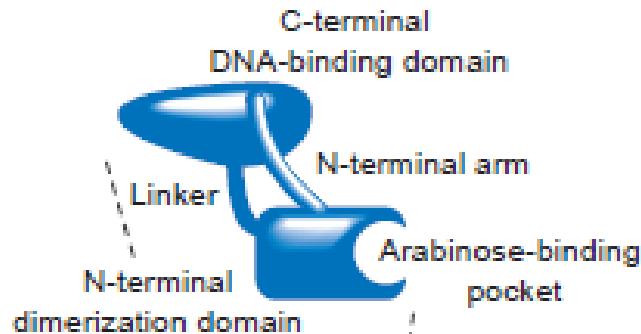


(a) Operone inibito in assenza di arabinosio

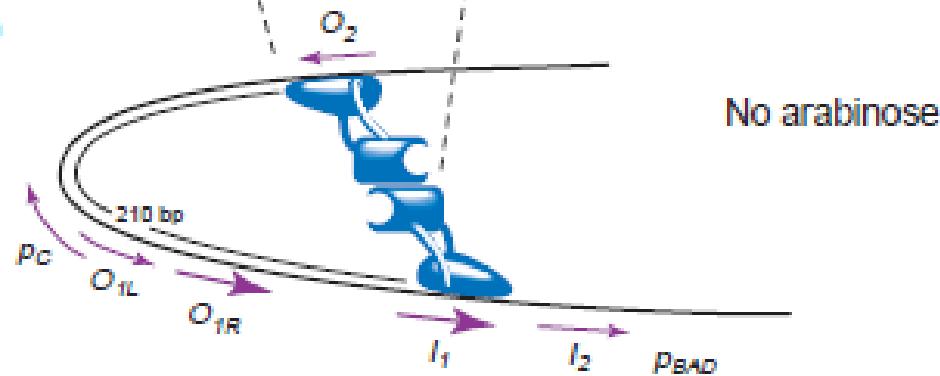


(b) Operone attivato in presenza di arabinosio

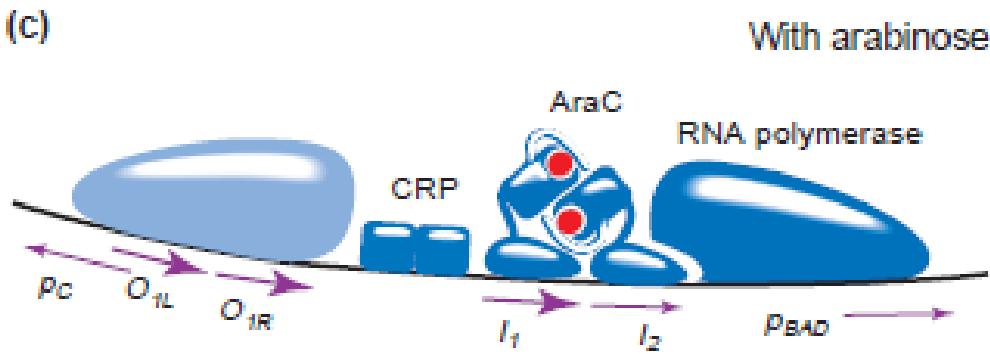
(a)



(b)



(c)



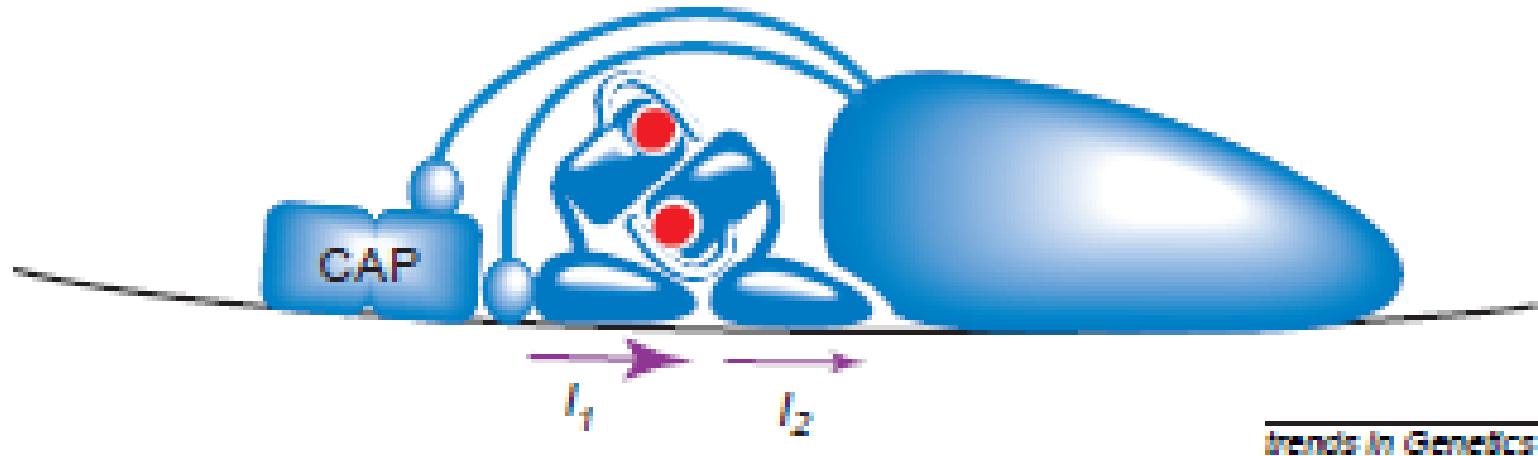
The domain structure of one subunit of the dimeric AraC protein (a) and the pC and pBAD regulatory regions in the absence (b) and presence (c) of arabinose.

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.

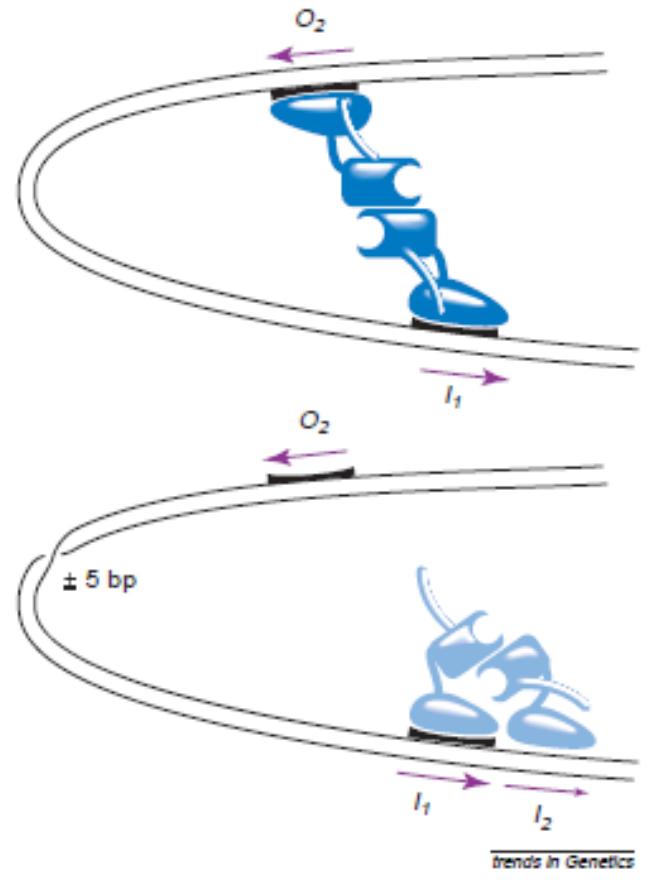
In the absence of arabinose, RNA polymerase is hindered from binding to pBAD and to pC. The cyclic AMP receptor protein, CRP, is probably similarly hindered from binding to its DNA site.

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}?



Il dominio C terminale della subunità a 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

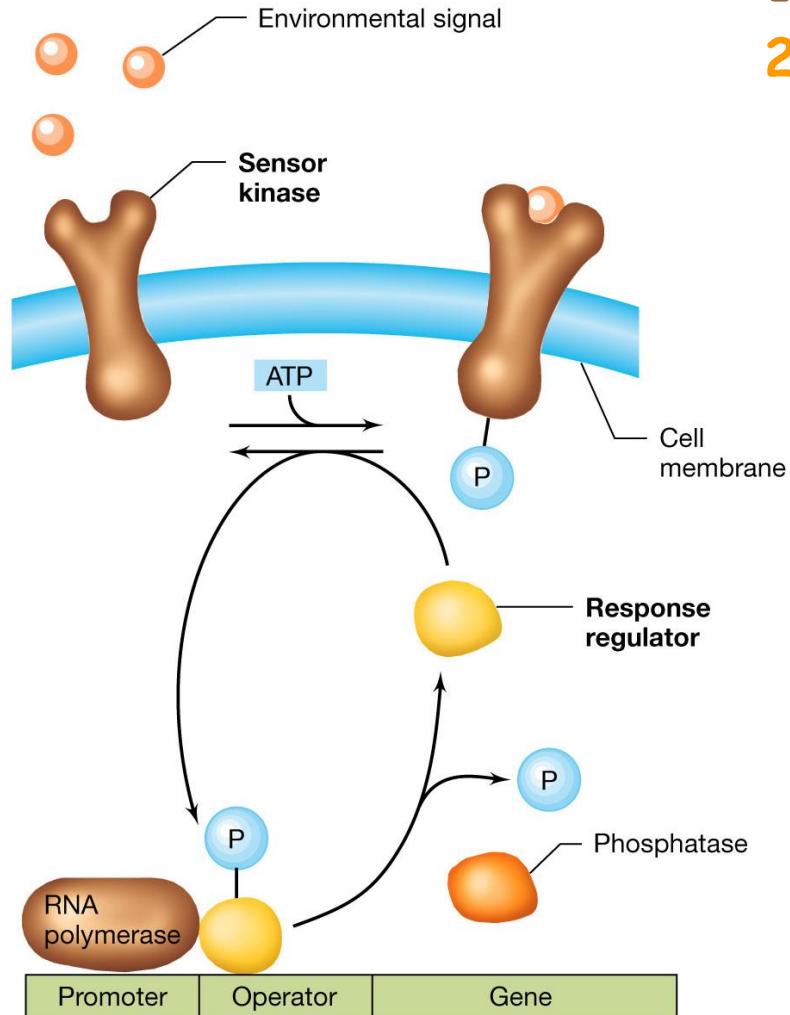


Dimostrazione sperimentale che la formazione dell'ansa tra i siti I1 e O2 è essenziale per la repressione AraC mediata in assenza di arabinosio.
 L'introduzione di $\frac{1}{2}$ giro di elica (± 5 nucleotidi) altera la formazione dell'ansa

I sistemi di trasduzione del segnale a 2 componenti

Costituiti da :

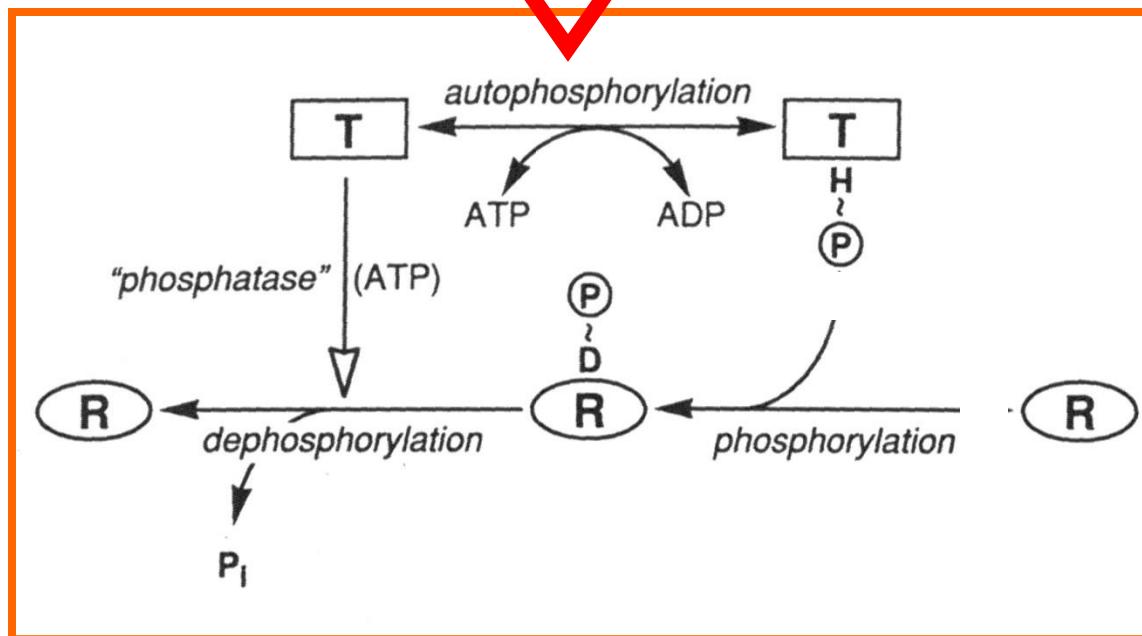
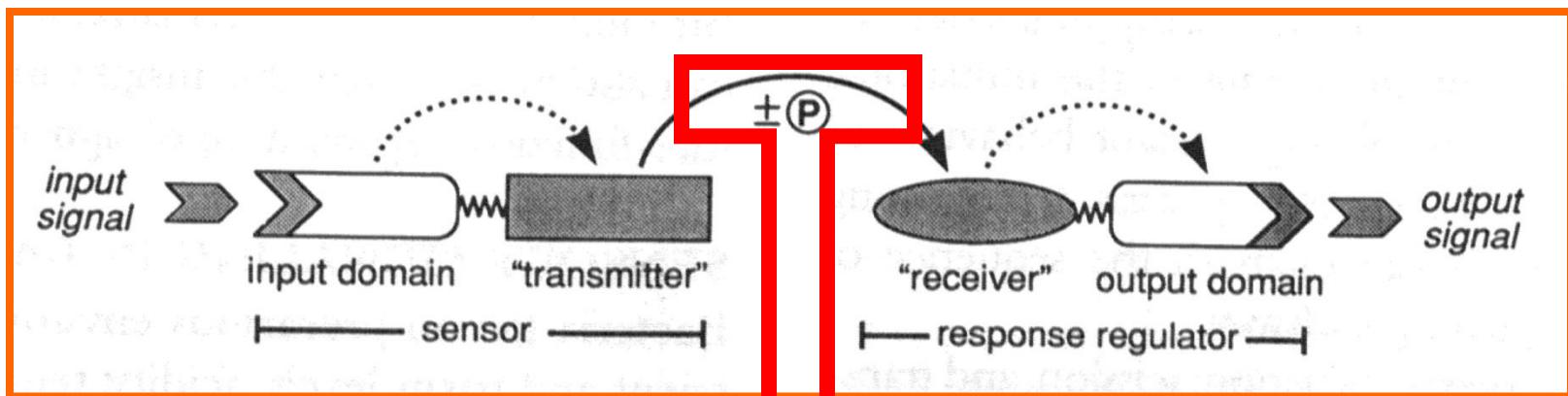
1. Sensore con funzione di chinasi
2. Regolatore trascrizionale



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

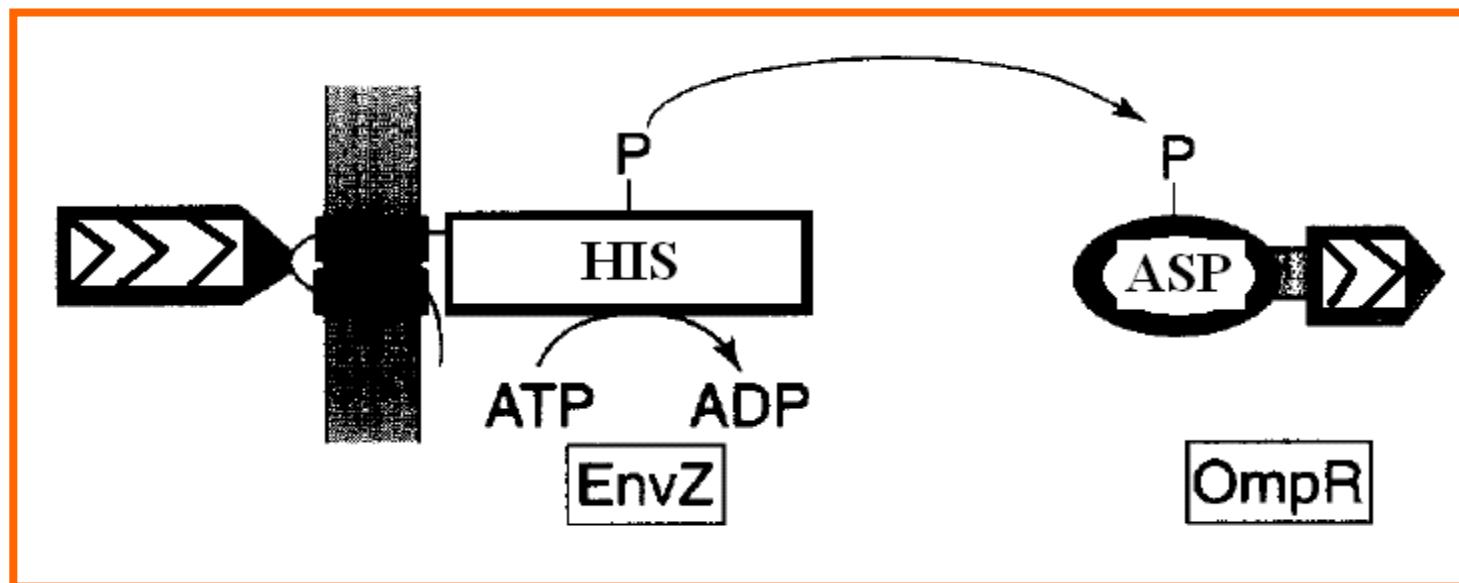
Il segnale, sottoforma di fosforilazione, viene trasferito al regolatore che, modificato strutturalmente esercita il suo ruolo

ORGANIZZAZIONE STRUTURALE 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



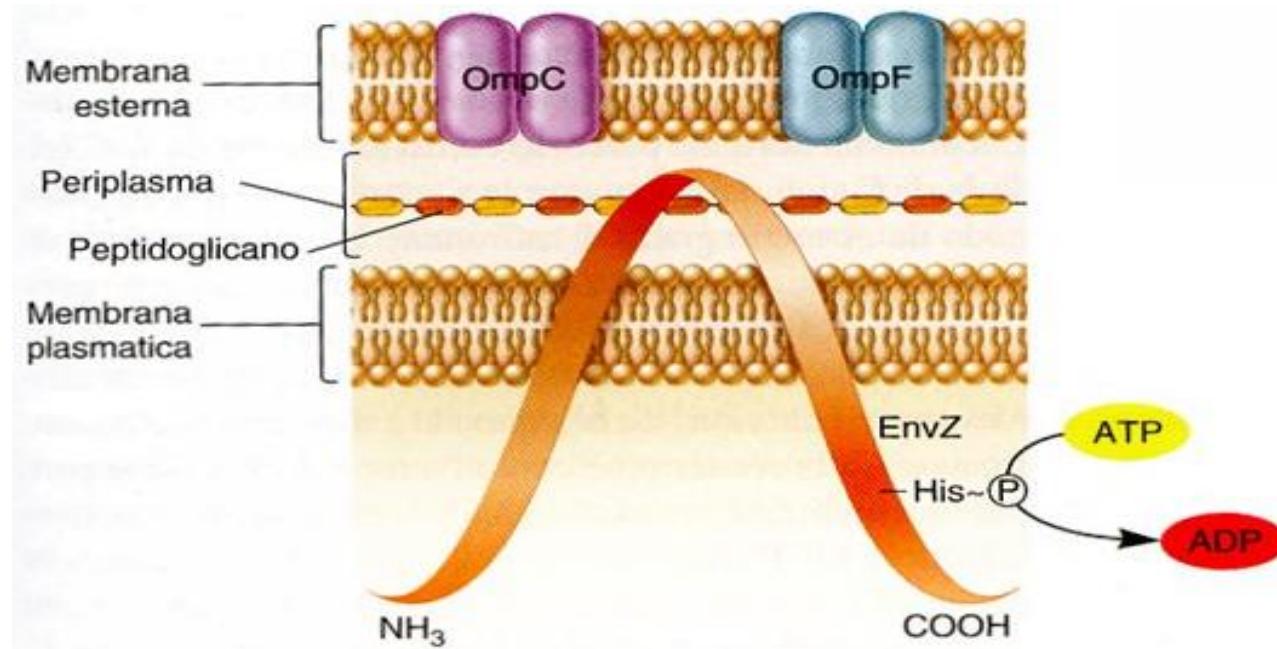
La porina OmpC è caratterizzata da pori di piccole dimensioni e si esprime quando il batterio si trova ad elevati valori di pressione osmotica :

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:

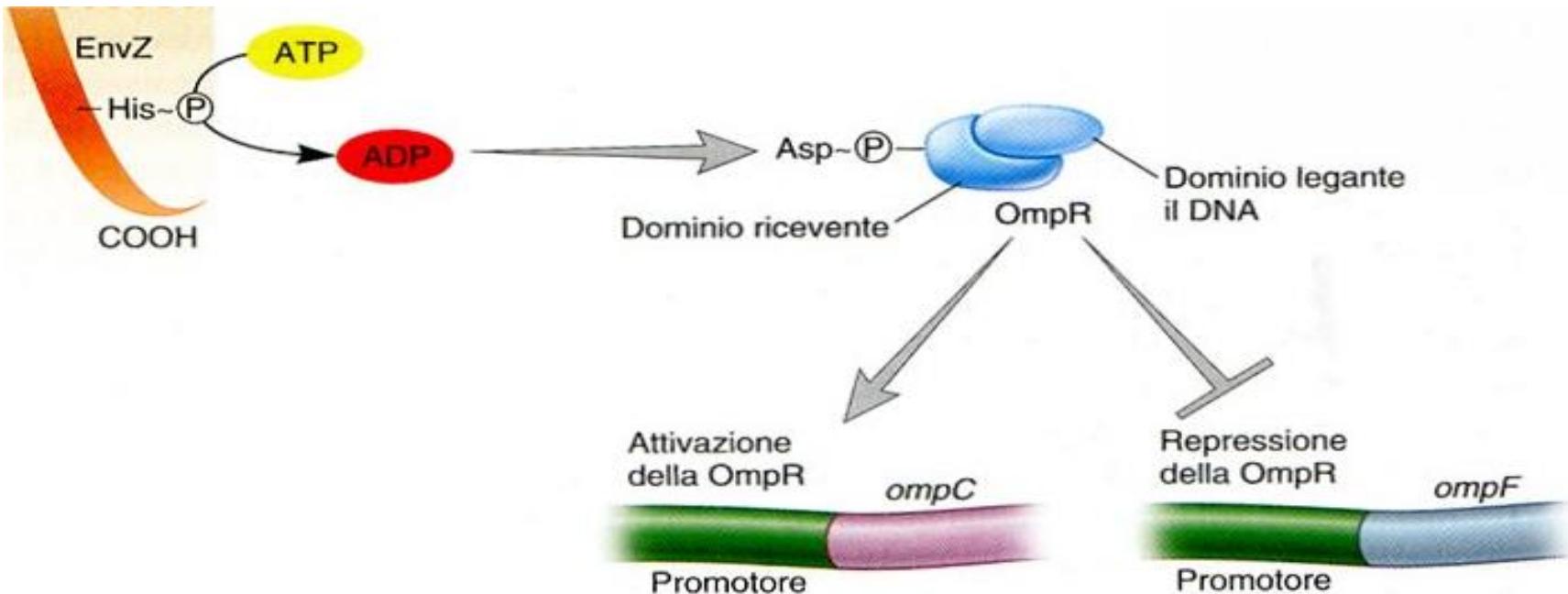
i pori di OmpF sono più grandi quindi i soluti possono diffondere più rapidamente

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.

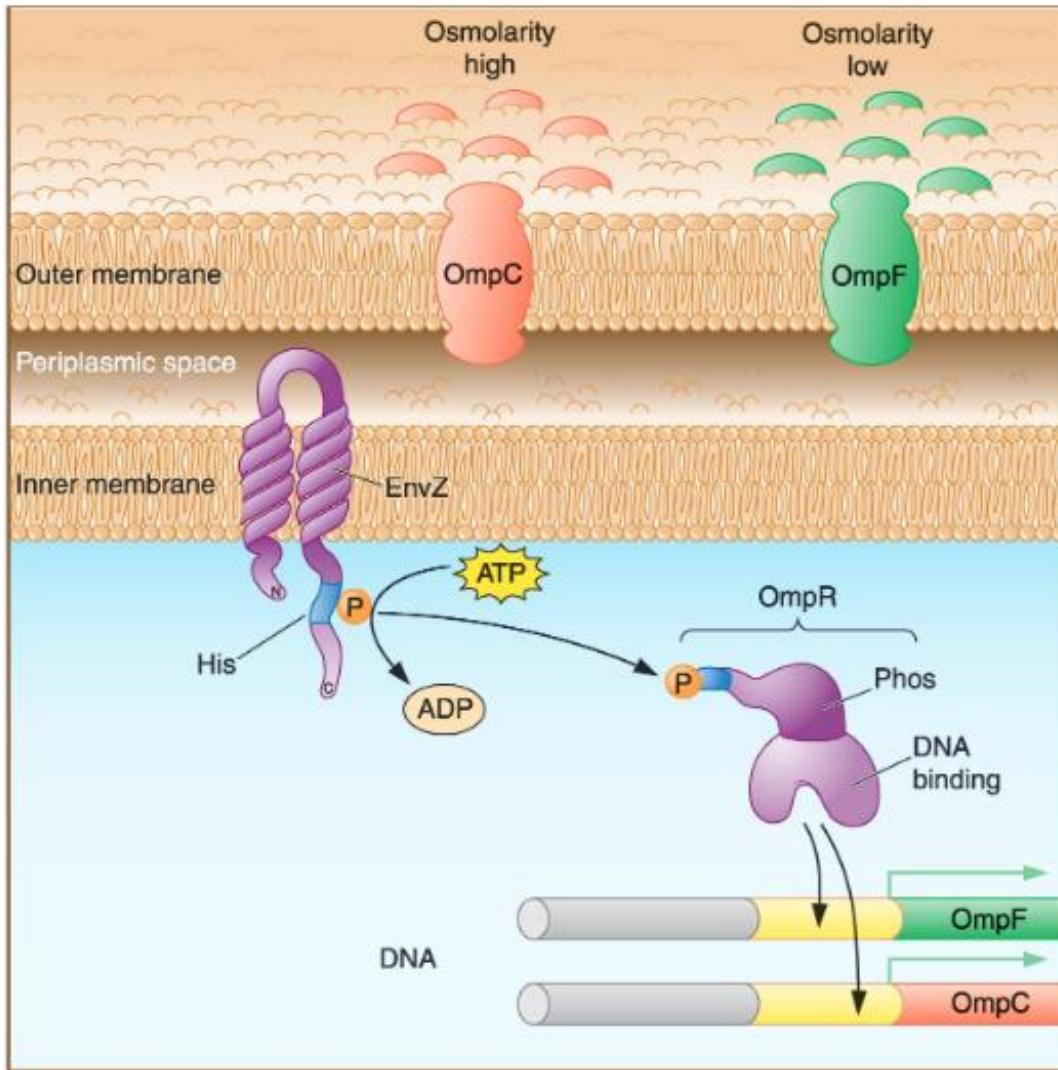
- A bassi livelli di osmolarità EnvZ è inattiva
- Ad alti livelli di osmolarità EnvZ si autofosforila su un residuo di istidina
- EnvZ-P (hist-P) fosforila OmpR
- OmpR-P (asp-P) regola la trascrizione inibendo la trascrizione di *ompF* e attivando la trascrizione di *ompC*

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:

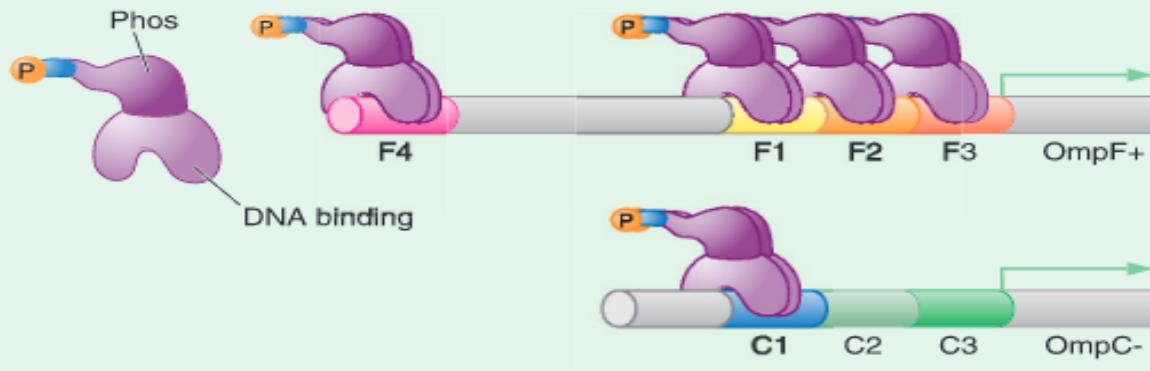
In condizioni di elevata osmolarità (elevata presenza di sali) prevale l'attività autochinasica e si ha un aumento di OmpR-fosforilato

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

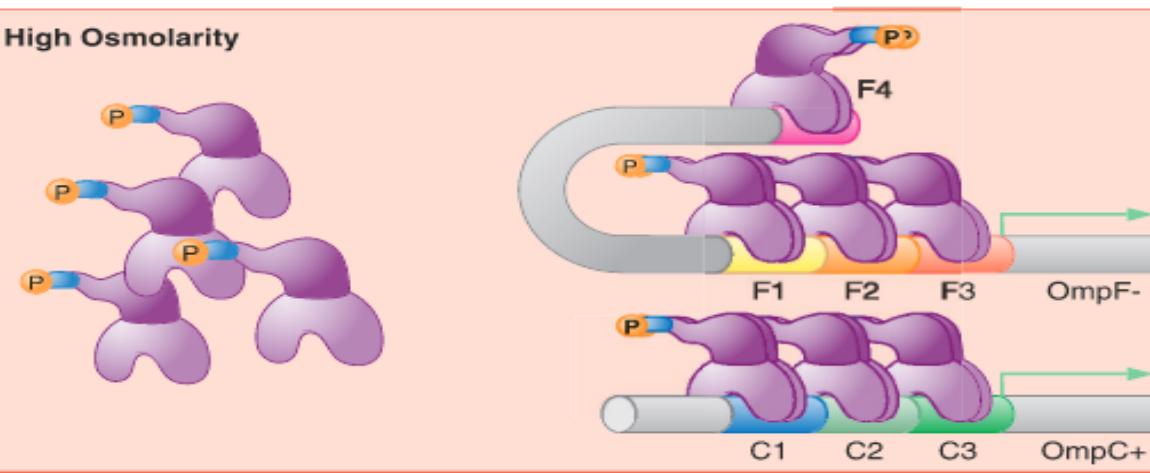


Regulation of the porin genes by the EnvZ/OmpR system. When the osmolarity of the external medium is low, the major porin in the outer membrane is OmpF. At high osmolarity, *ompF* is repressed and OmpC is the predominant porin in the outer membrane. This process is regulated by the two-component regulatory 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.

Low Osmolarity



High Osmolarity



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 dimensione 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 diffente 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)

