

# Il controllo dell'espressione genica

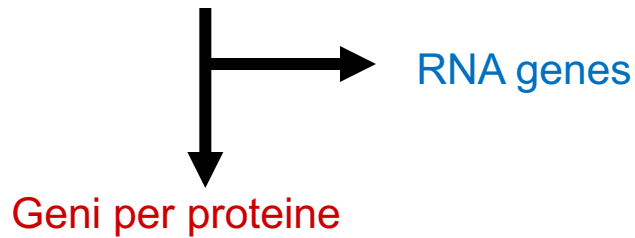
# Controllo dell'espressione genica

- Le cellule procariote regolano l'espressione genica in funzione delle condizioni ambientali.
- Le cellule eucariote regolano l'espressione genica in modo tale da mantenere l'omeostasi dell'organismo.

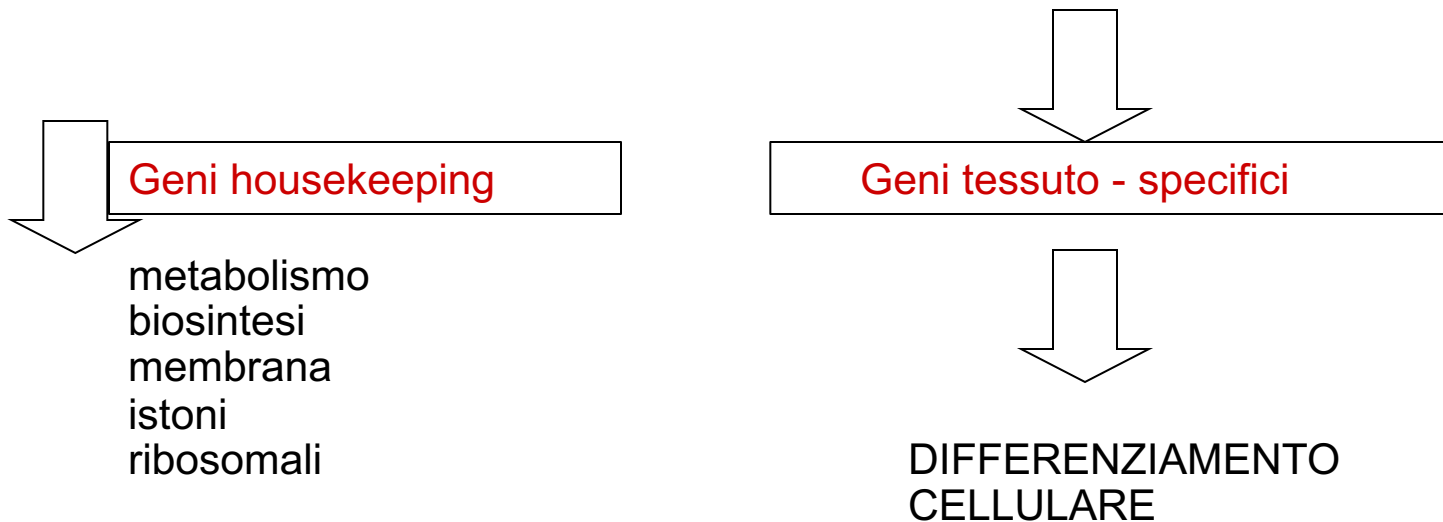
# Regolazione dell'espressione genica

- Negli eucarioti tutte le cellule contengono il materiale genetico necessario alla crescita e allo sviluppo dell'organismo.
- Alcuni geni dovranno essere sempre espressi . Come ad esempio i geni coinvolti in processi biochimici vitali
- Altri geni non sono sempre espressi e vengono accesi o spenti a seconda del bisogno.

Cellula umana contiene circa 30000 geni



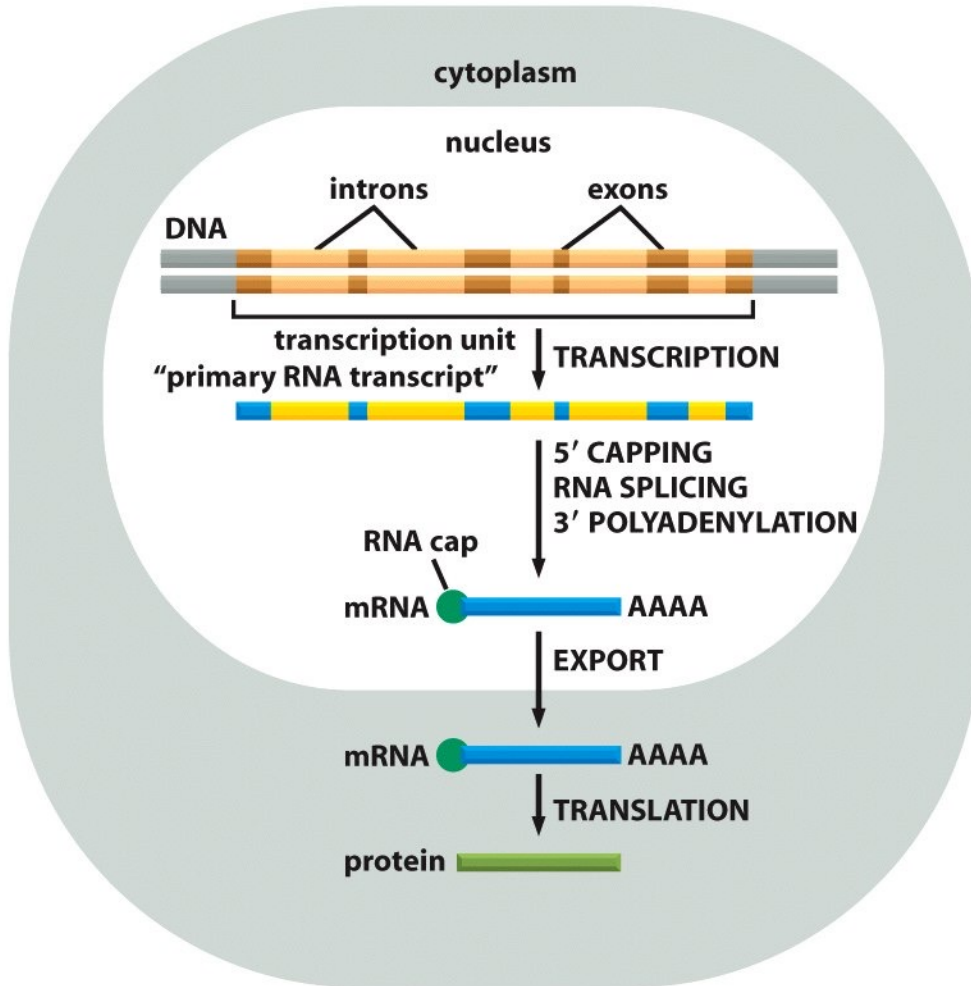
Ogni cellula in un determinato momento esprime solo una piccola parte di questo potenziale (~ 5000 geni)



A QUESTA ESPRESSIONE SELETTIVA NON CORRISPONDE (IN GENERE) UNA VARIAZIONE DEL CONTENUTO DI DNA

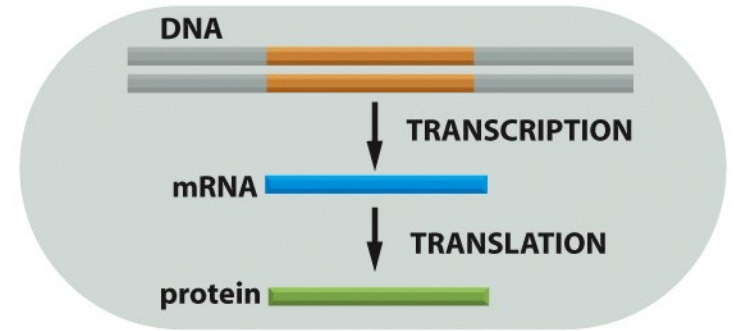
(A)

**EUCARYOTES**



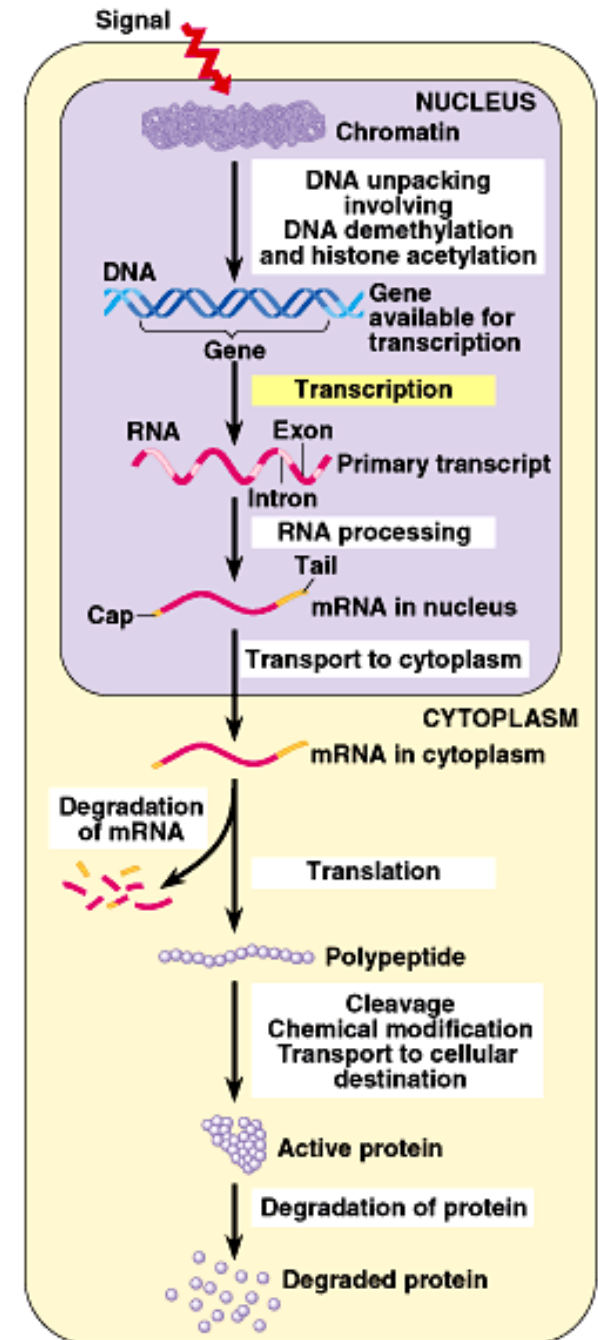
(B)

**PROCARYOTES**



# Points of control

- The control of gene expression can occur at any step in the pathway from gene to functional protein
  - unpacking DNA
  - transcription
  - mRNA processing
  - mRNA transport
    - out of nucleus
    - through cytoplasm
    - protection from degradation
  - translation
  - protein processing
  - protein degradation



Nei procarioti esiste solo controllo  
trascrizionale regolato dai fattori di  
trascrizione

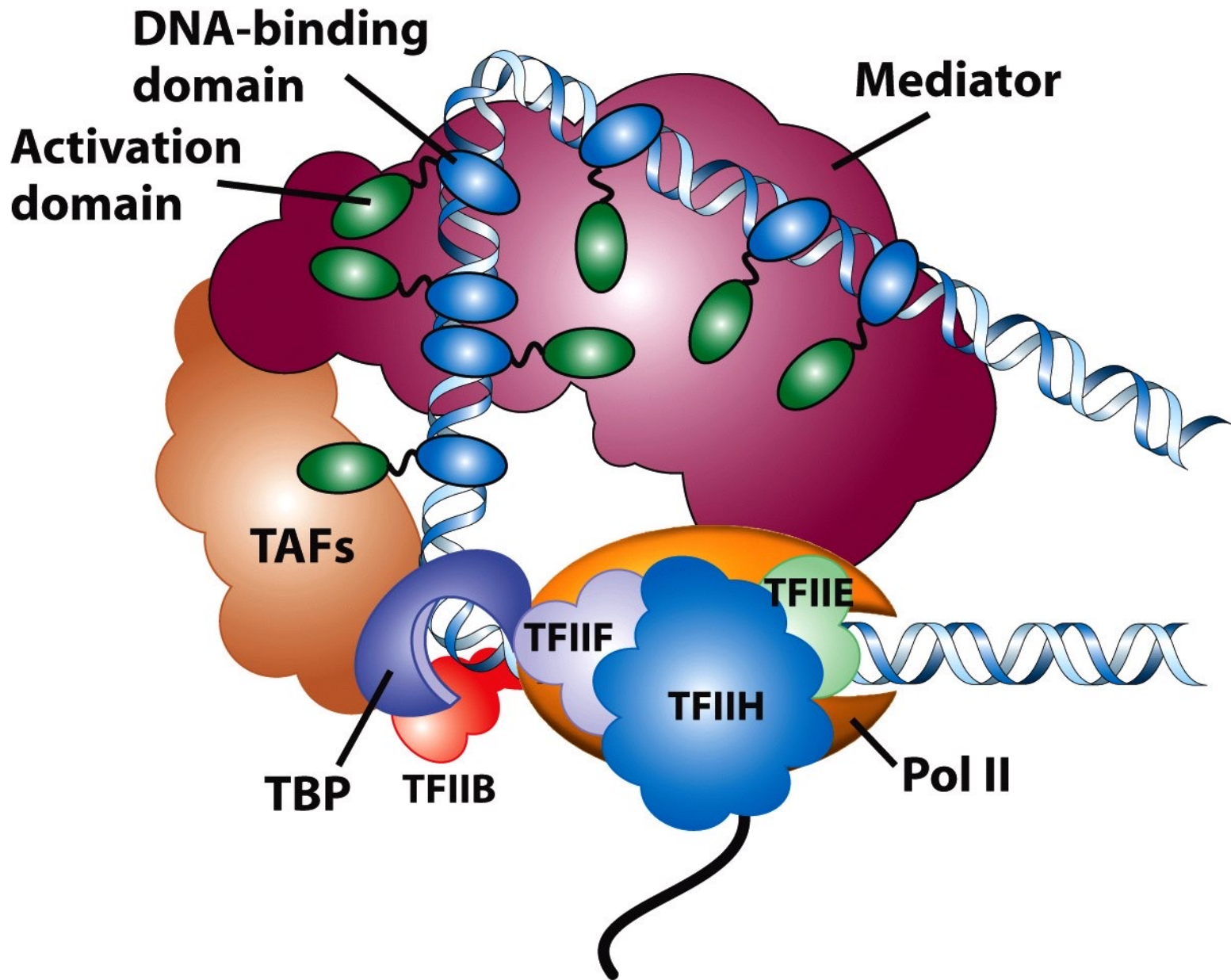
# Controllo dell'espressione genica

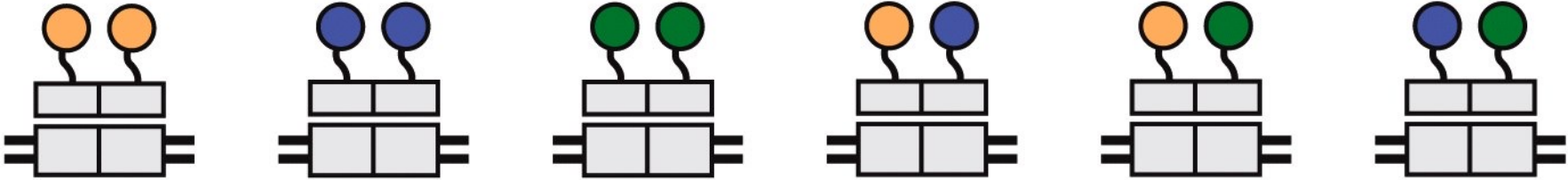
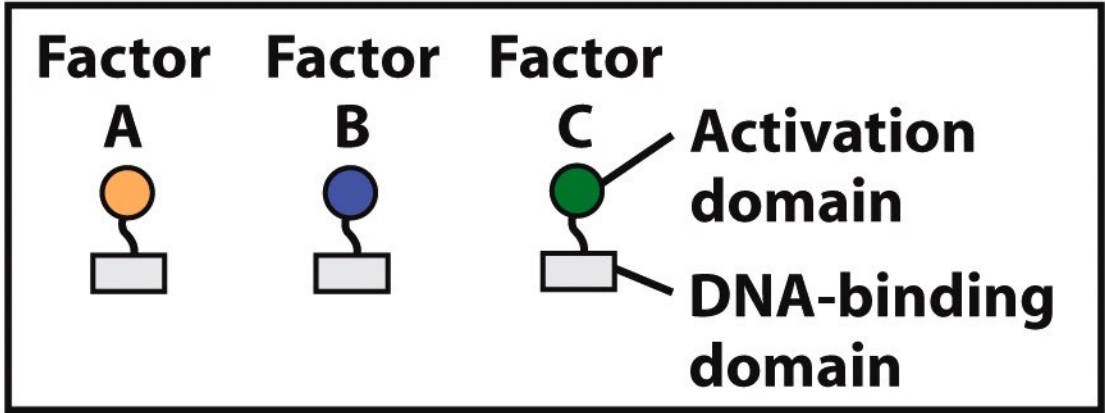
- Il controllo dell'espressione genica e' spesso avviene tramite il controllo dell'inizio della trascrizione.
- **Proteine regolatorie** legano il DNA sia per bloccare che per stimolare la trascrizione, in funzione della loro interazione con la RNA polimerasi.



# Proteine regolatorie

- L'espressione genica e' spesso controllata da proteine regolatorie che legano specifiche sequenze di DNA.
  - Proteine regolatorie hanno accesso alle basi del DNA con maggiore **affinita'**.
  - Le proteine regolatorie hanno **dei motivi di legame al DNA**





**Figure 7-28a**  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
 © 2008 W. H. Freeman and Company

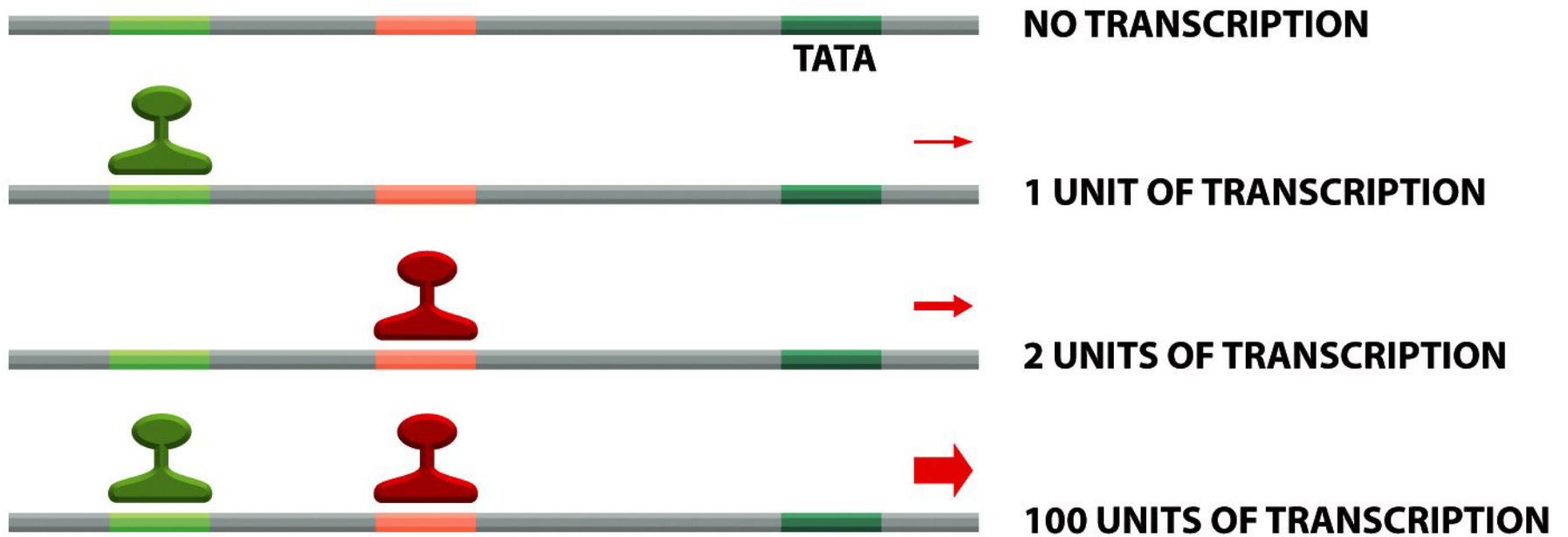


Figure 7-48 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

**competitive  
DNA  
binding**

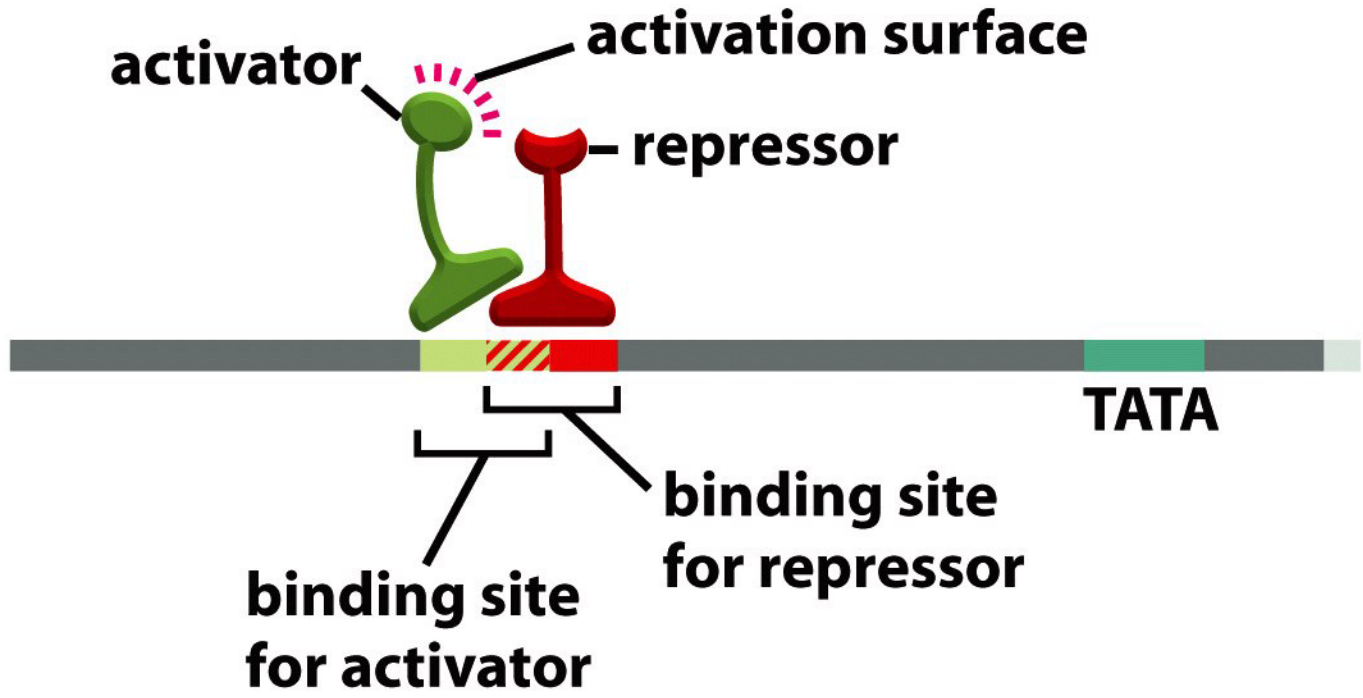
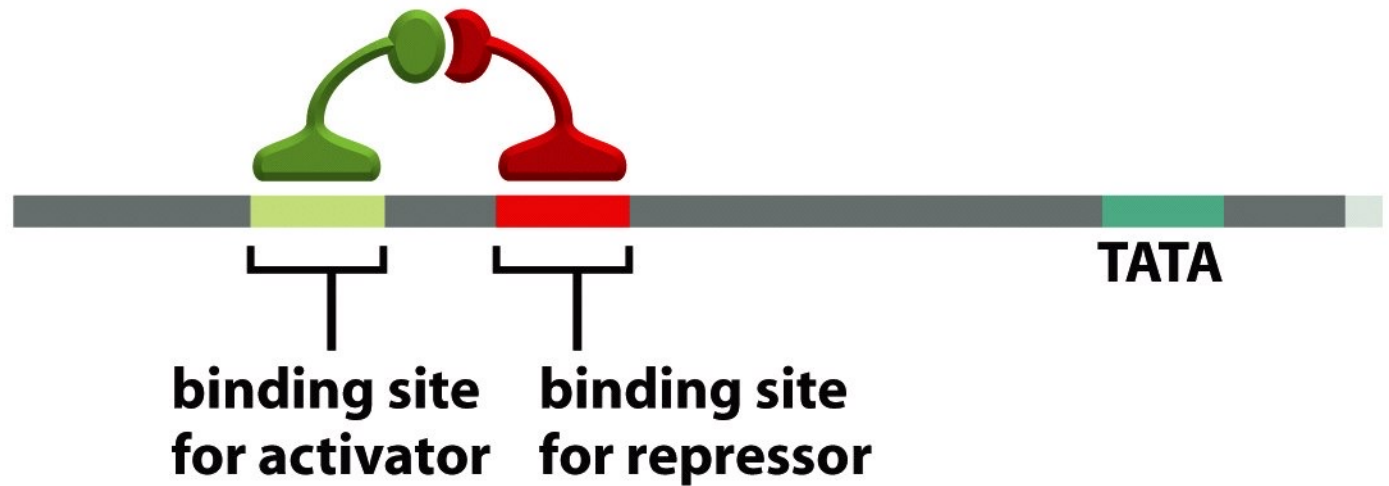


Figure 7-50a *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

**masking the  
activation  
surface**



# Regolazione dell'espressione genica nei procarioti

Nei procarioti la maggior parte dei geni è espressa con modalità costitutiva.

Alcuni geni sono espressi ad alti livelli, altri a bassi livelli grazie alla presenza nel loro promotore di sequenze -35 e -10 più o meno varianti rispetto alle sequenze canoniche consenso. Ciò permette alla RNA pol di legarsi al promotore con maggiore o minore affinità.

Solo alcuni geni batterici sono espressi con modalità regolata.

Si tratta normalmente di geni codificanti per prodotti che consentono l'adattamento dei batteri a modificazioni dell'ambiente esterno (solitamente di tipo metabolico).

La regolazione trascrizionale nei batteri può avvenire tramite:

- utilizzo di varianti delle subunità  $\sigma$
- operoni



La subunità sigma è la regione della DNA polimerasi procariotica deputata al riconoscimento e al legame al promotore

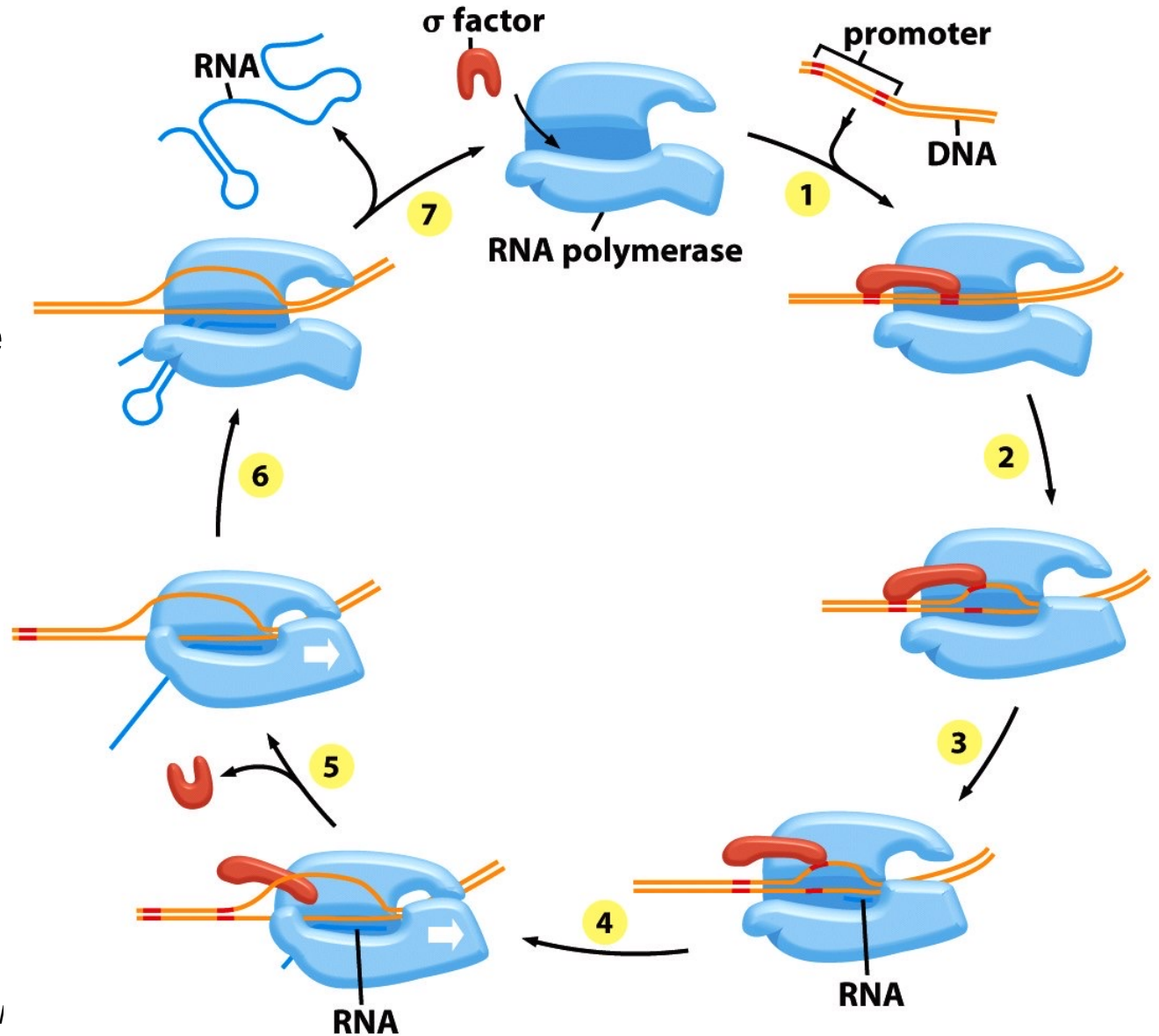


Figure 6-11 *Molecular Biology of the Cell*  
(© Garland Science 2008)

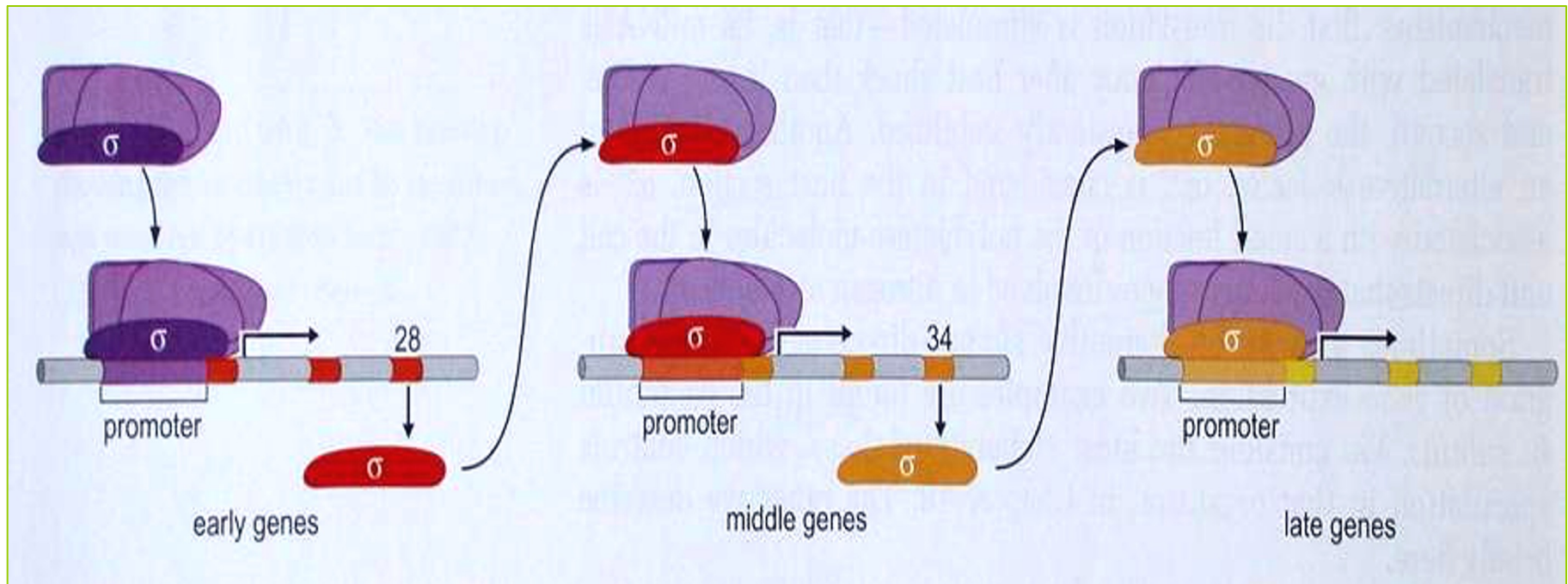
I batteri possono utilizzare diversi fattori  $\sigma$  per attivare l'espressione di specifici set di geni

**Table 7–2 Sigma Factors of *E. coli***

SIGMA FACTOR	PROMOTERS RECOGNIZED
$\sigma^{70}$	most genes
$\sigma^{32}$	genes induced by heat shock
$\sigma^{28}$	genes for stationary phase and stress response
$\sigma^{28}$	genes involved in motility and chemotaxis
$\sigma^{54}$	genes for nitrogen metabolism
$\sigma^{24}$	genes dealing with misfolded proteins in the periplasm

The sigma factor designations refer to their approximate molecular weights, in kilodaltons.

I batteriofagi possono produrre i propri fattori  $\sigma$  ed obbligare l'RNA polimerasi dell'ospite a trascrivere in maniera esclusiva i geni fagici.



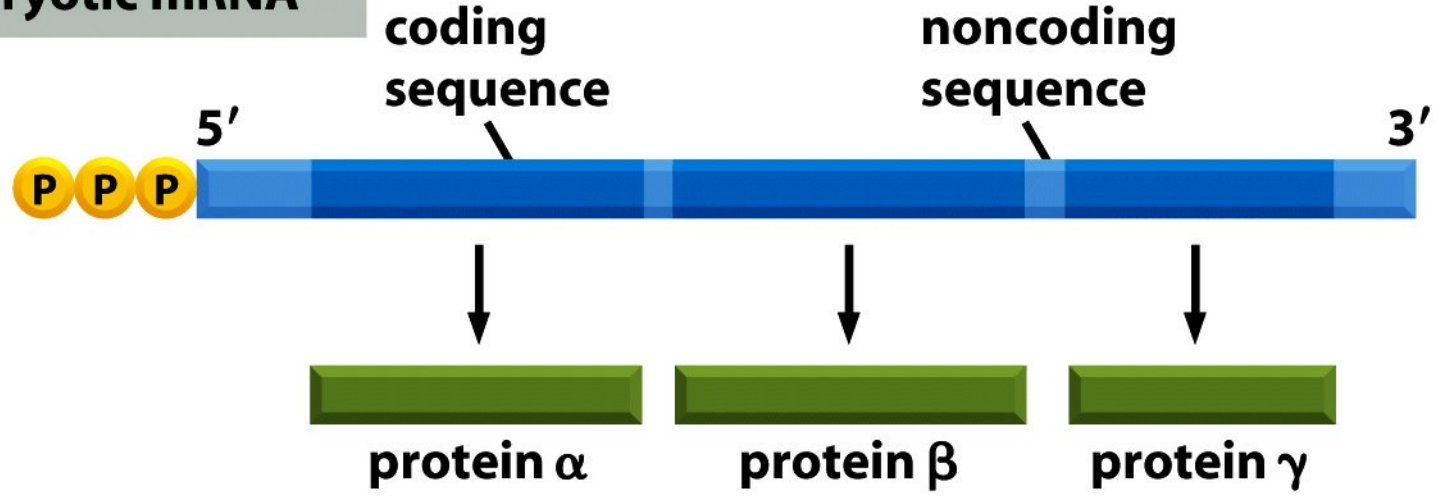
# Operoni

- Un operone è un'unità di espressione e regolazione genica, comprendente geni strutturali, elementi di controllo e un gene regolatore
- Un operone e' dunque costituito da un gruppo di geni che vengono trascritti in maniera coordinata e sono in genere coinvolti nella stessa catena metabolica.
- Sono presenti solo nei procarioti (??? osservati in *C. Elegans*...)



Jacob, Monod & Lwoff  
Nobel Prize in Physiology  
or Medicine 1965

**procaryotic mRNA**



**eucaryotic mRNA**

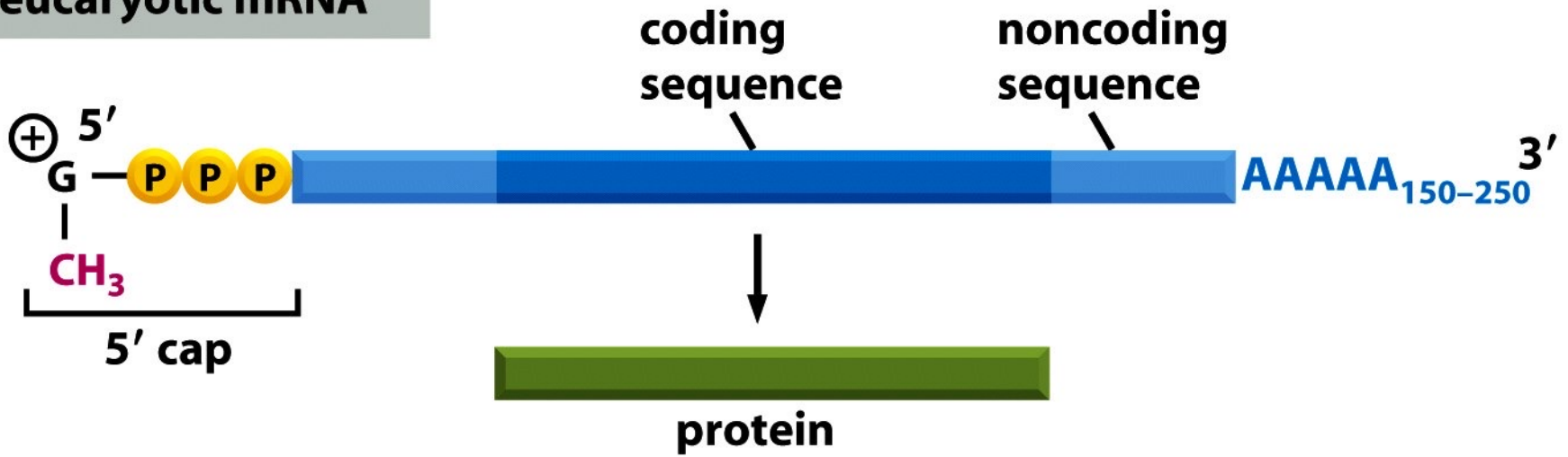
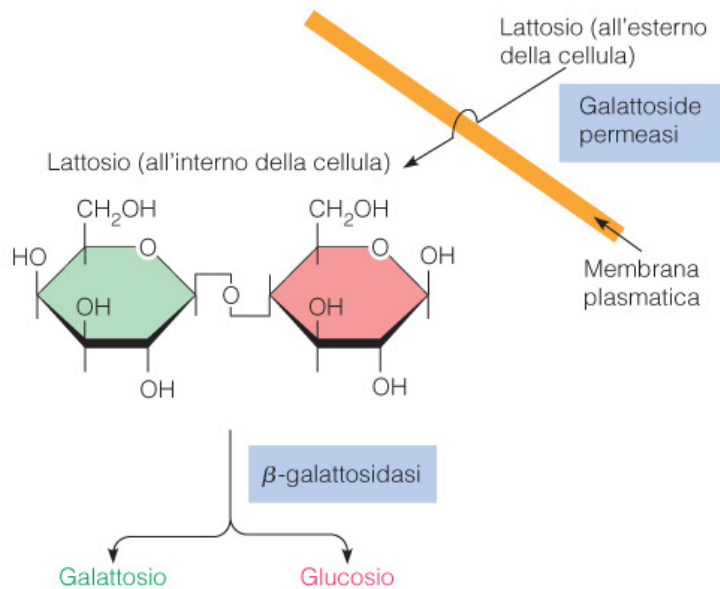


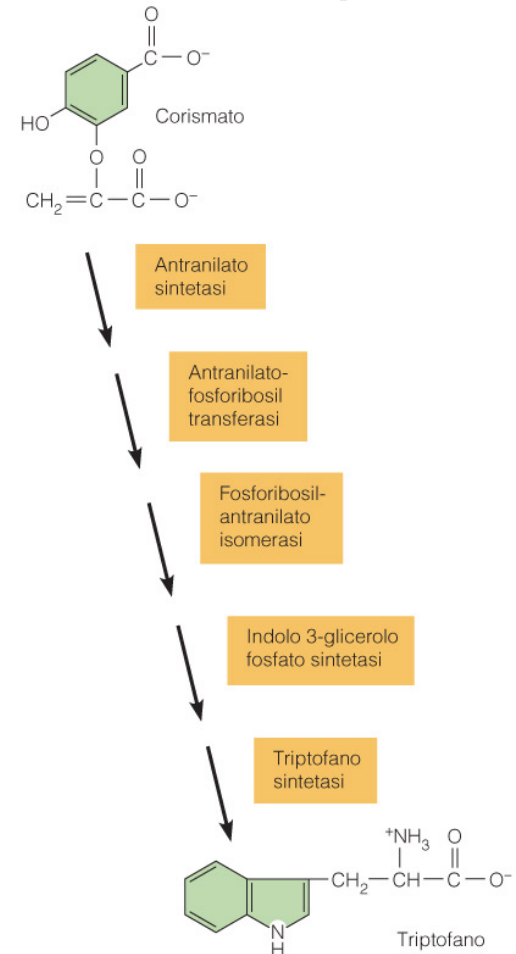
Figure 6-22a *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

I batteri utilizzano modalità di regolazione positive o negative a seconda che gli enzimi siano coinvolti in una via catabolica o anabolica.

## Via catabolica Induzione da substrato



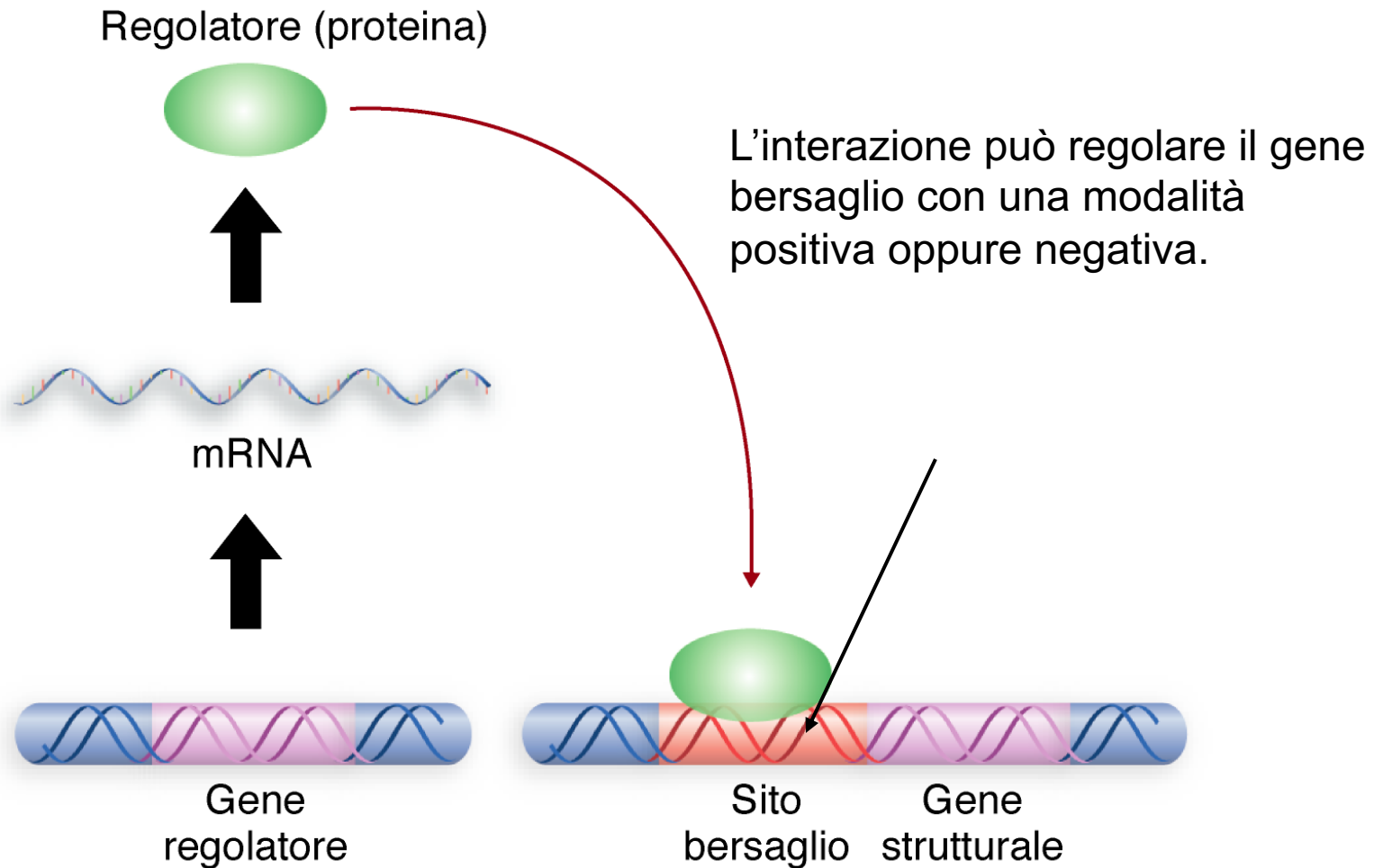
## Via anabolica Repressione da prodotto





# Il modello di regolazione più semplice

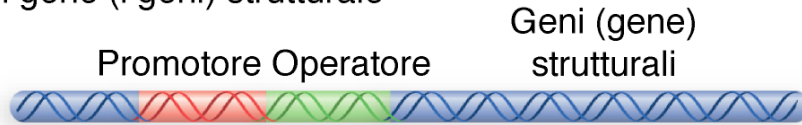
**Un regolatore si lega a un sito bersaglio nel DNA**



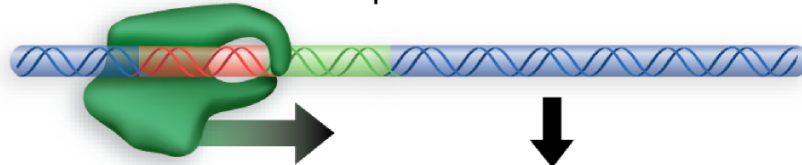
Si può avere un controllo **negativo**, in cui un **repressore** proteico impedisce l'espressione genica.

### Un repressore blocca la RNA polimerasi

Un operatore/promotore *cis*-agente precede il gene (i geni) strutturale



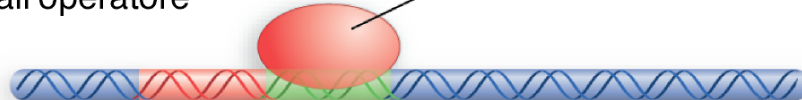
Il gene è acceso: la RNA polimerasi inizia la trascrizione dal promotore



RNA

Proteina

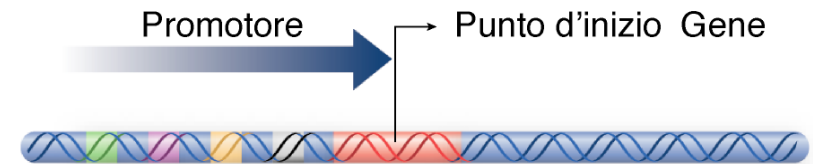
Il gene viene spento quando il repressore si lega all'operatore



Si può avere un controllo **positivo**, in cui un **attivatore** proteico attiva l'espressione genica.

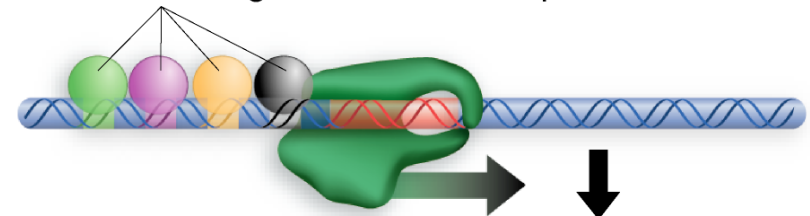
### I fattori di trascrizione assistono la RNA polimerasi

Nella condizione di default il gene è spento



Il gene è acceso da attivatori

I fattori interagiscono con l'RNA polimerasi



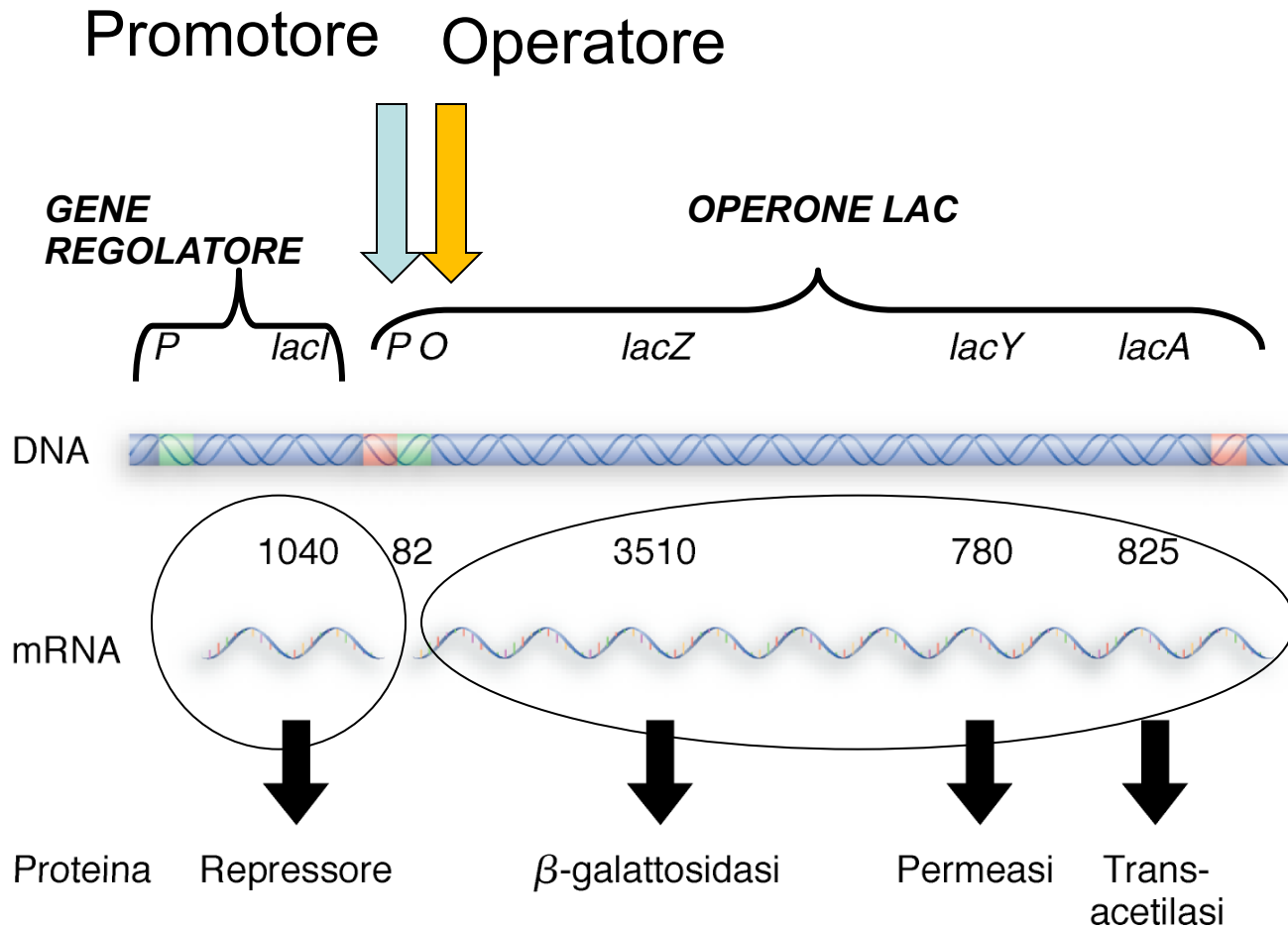
RNA

Proteina



# Operone *lac*

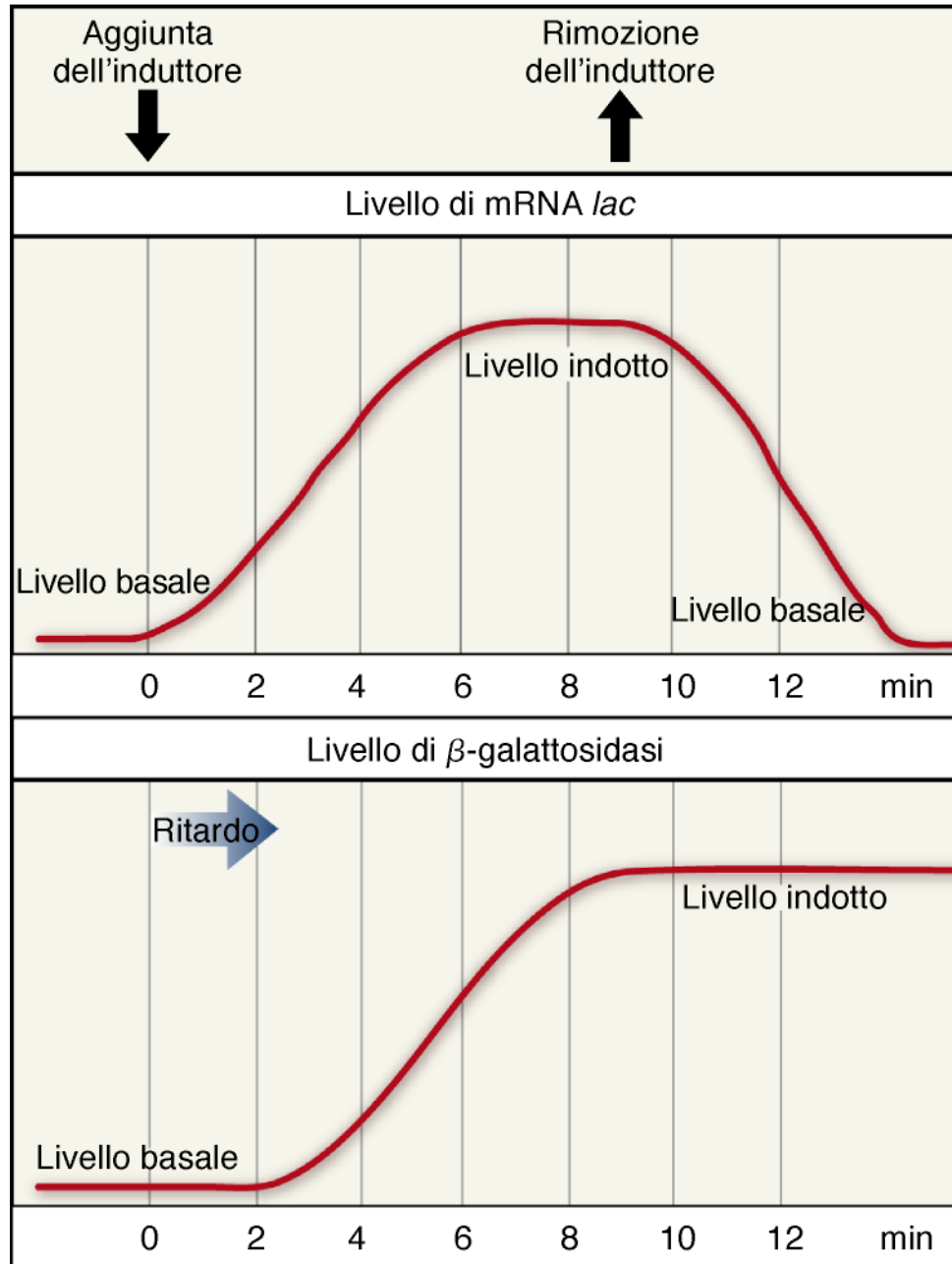
- L'operone *lac* e' costituito da tre geni che codificano per proteine coinvolte nel catabolismo del lattosio
  - **Lac Z** codifica per  $\beta$ -galattosidasi che idrolizza il lattosio in glucosio e galattosio
  - **Lac Y** codifica per il trasportatore di membrana lattosio permeasi
  - **Lac A** codifica per tiogalattoside transacetilasi (elimina i tiogalattosidi tossici)



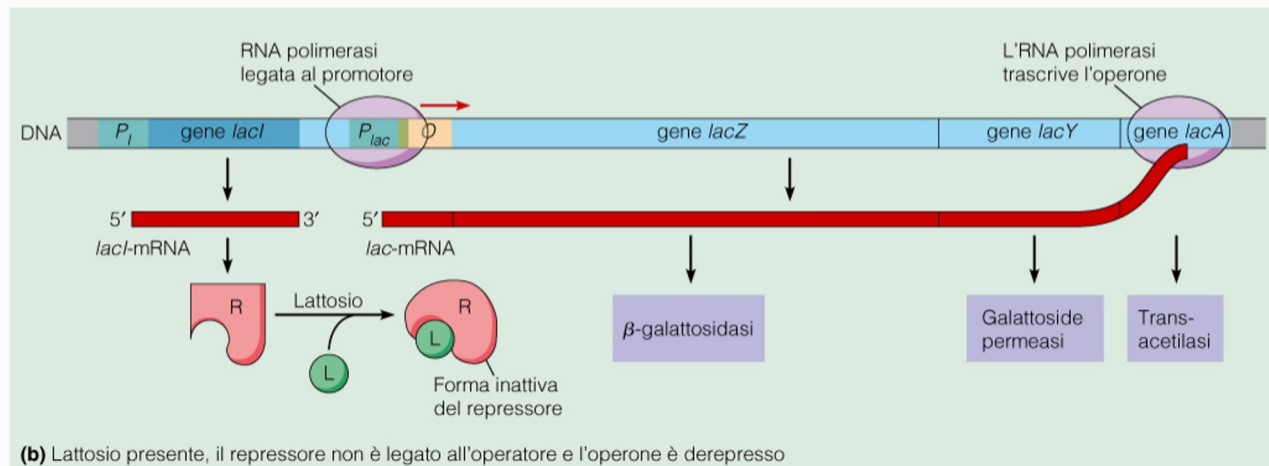
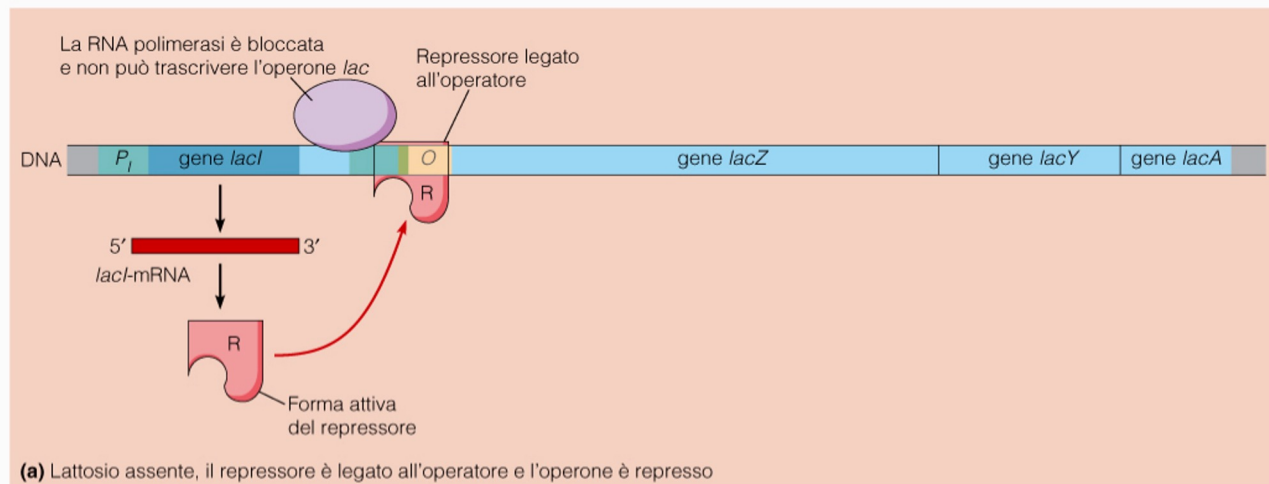
L'operone Lac è inducibile

La sua espressione viene attivata in presenza di lattosio

## L'espressione di *lac* risponde all'induttore



# Lo stato normale di un operone inducibile è "off"



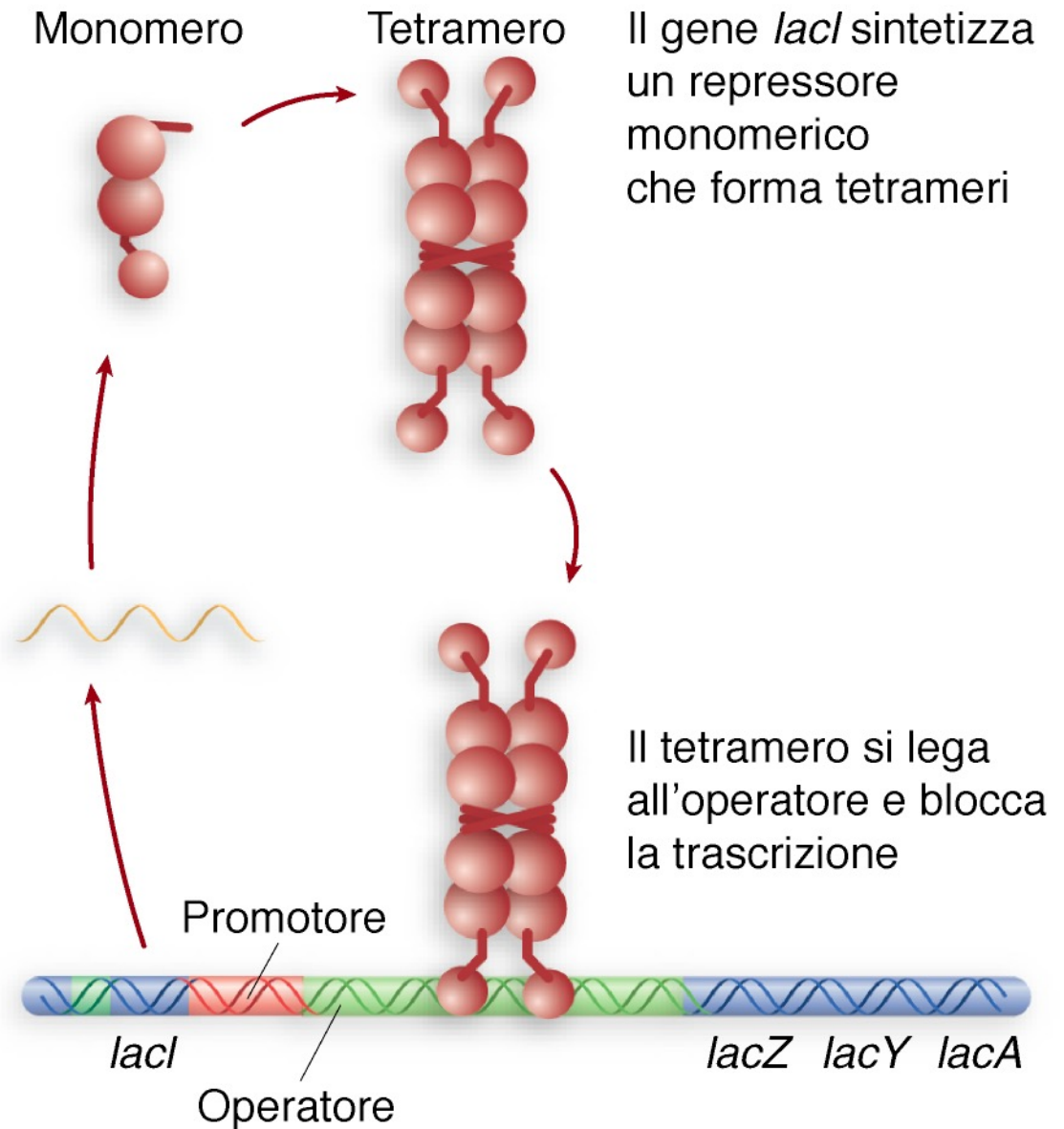
**Figura 23-4 Regolazione dell'operone *lac*.** La trascrizione dell'operone *lac* è regolata dal legame del repressore (R) all'operatore. (a) In assenza di lattosio, il repressore rimane legato all'operatore e la RNA polime-

ra non può muoversi lungo l'operone e trascriverne i geni. (b) In presenza di lattosio, il repressore viene convertito nella forma inattiva, che non si può legare all'operatore. Quindi, la RNA polimerasi può muo-

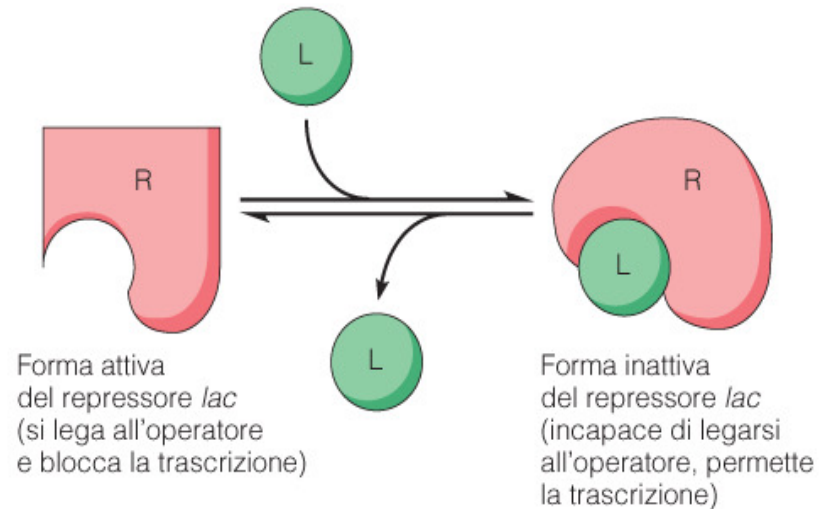
versi oltre l'operatore e trascrivere i geni strutturali *lacZ*, *lacY* e *lacA* in un singolo mRNA policistronico. La forma del lattosio che si lega al repressore è un isomero chiamato allolattosio (L).

## Un tetramero di repressore si lega all'operatore

In assenza del substrato (lattosio) l'operone non è trascritto perché il repressore si lega all'operatore

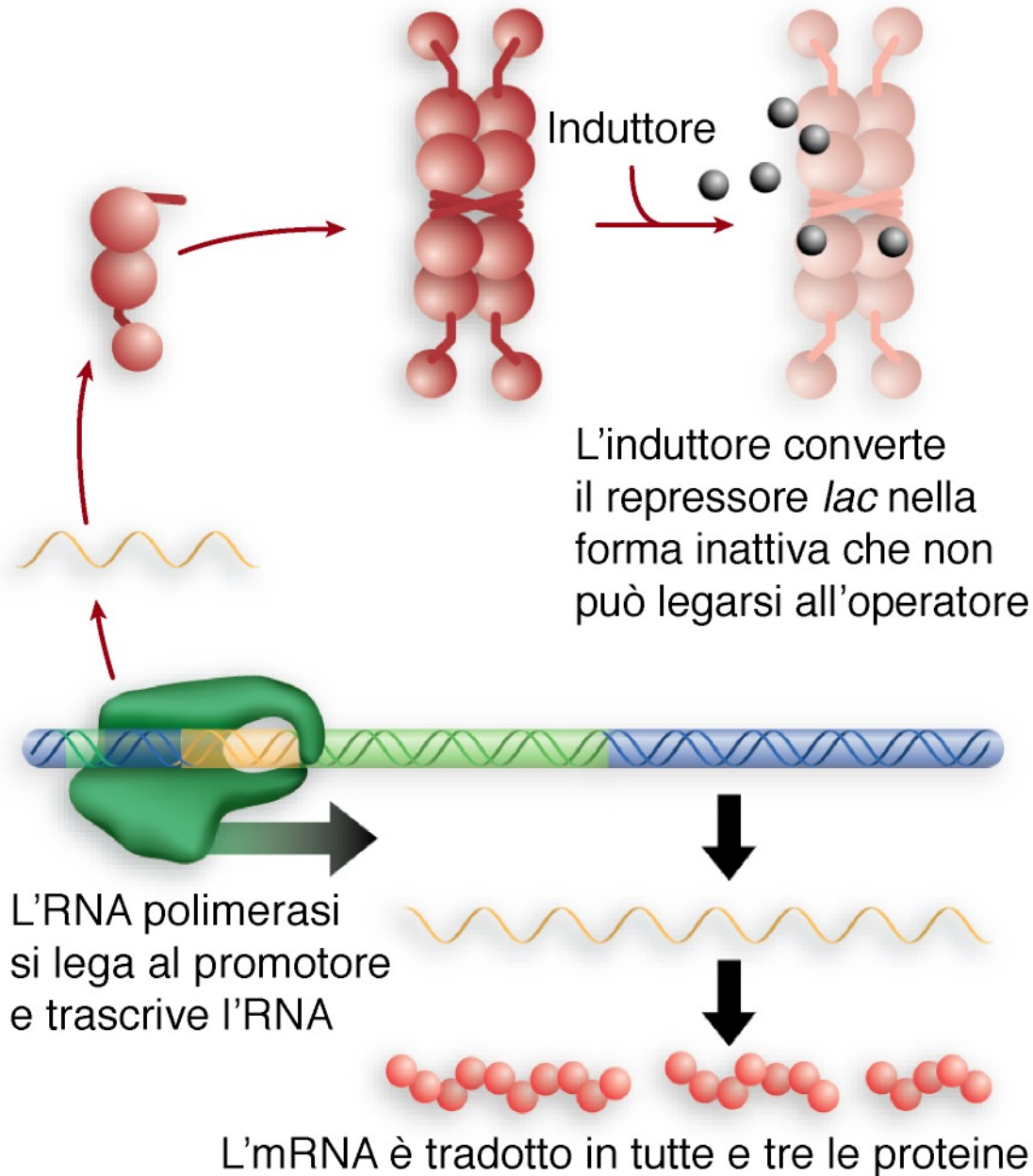


# Il repressore è un enzima allosterico



**Figura 23-5** **Regolazione allosterica del repressore *lac*.** Il repressore *lac* (R) è una proteina allosterica, capace di conversione reversibile fra due forme alternative. In assenza dell'effettore allolattosio (L), la proteina assume la forma che è in grado di legare l'operatore. In presenza dell'effettore, la proteina è preferenzialmente nello stato conformazionale alternativo, che non è in grado di legare l'operatore e di conseguenza è inattiva come repressore della trascrizione.

## L'induttore inattiva il repressore



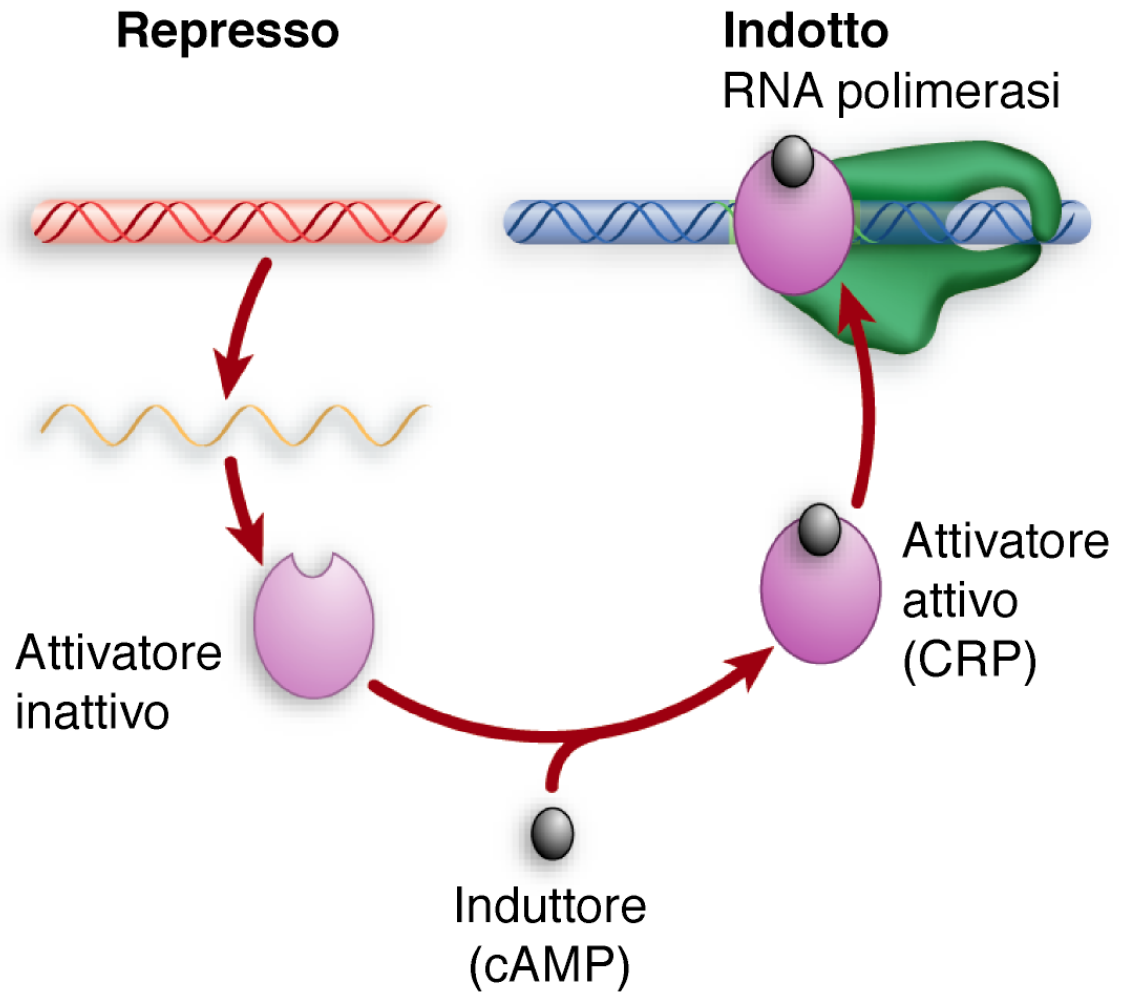
In presenza di lattosio  
la trascrizione  
dell'operone viene  
attivata

- La regolazione dell'operone lac ha poi altri livelli di complessità, in quanto la sua espressione è regolata da condizioni ambientali che non comprendono solo la presenza del lattosio
- E. coli può utilizzare sia il glucosio (monosaccaride) che il lattosio (disaccaride)
- In presenza di entrambi gli zuccheri viene utilizzato in maniera preferenziale il glucosio

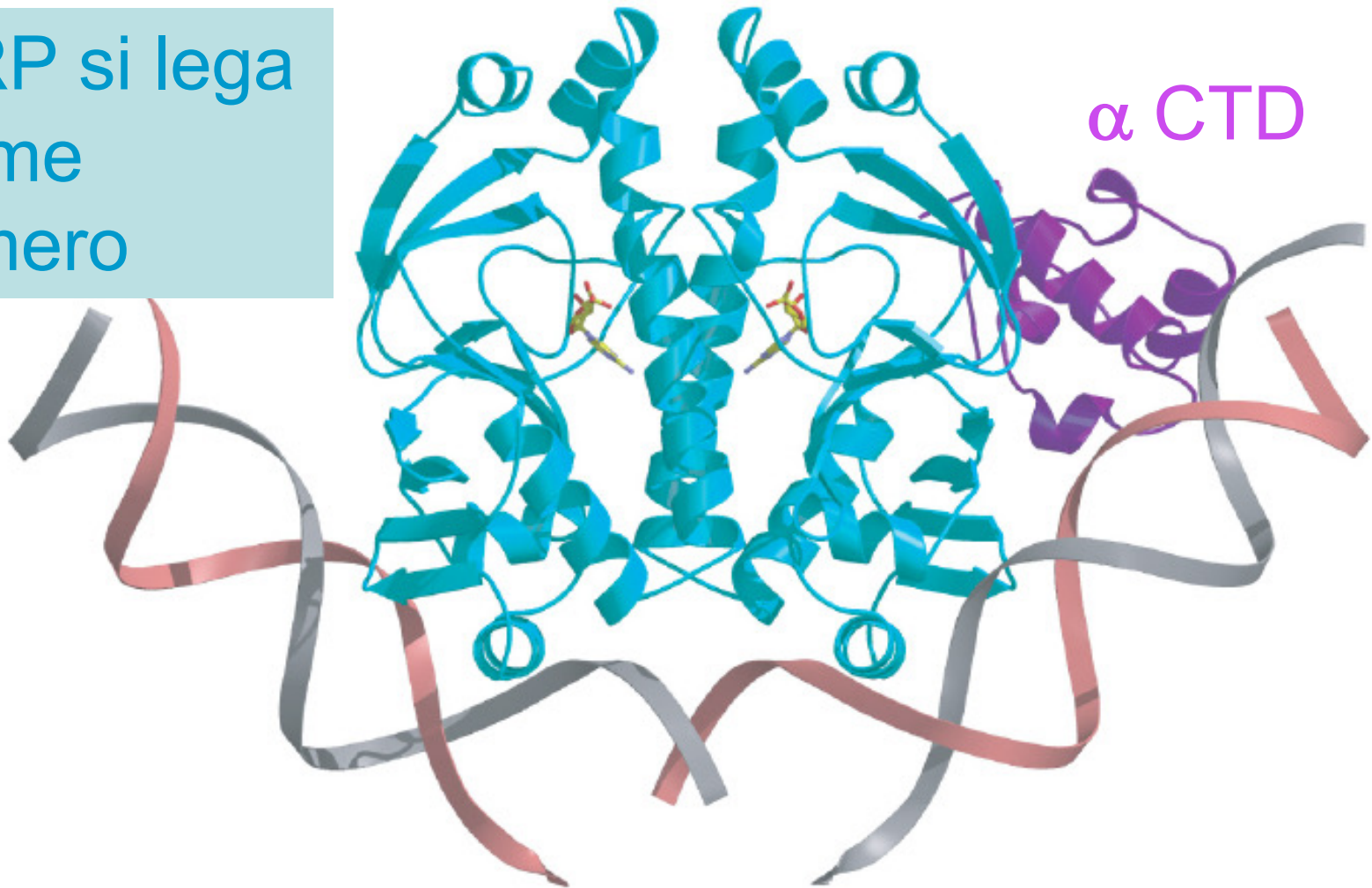


La regolazione dell'operone Lac da parte del glucosio avviene mediante una proteina (cAMP Receptor Protein, CRP o catabolite activator protein, CAP) che viene attivata dal cAMP

**Il cAMP è un induttore che attiva CRP**

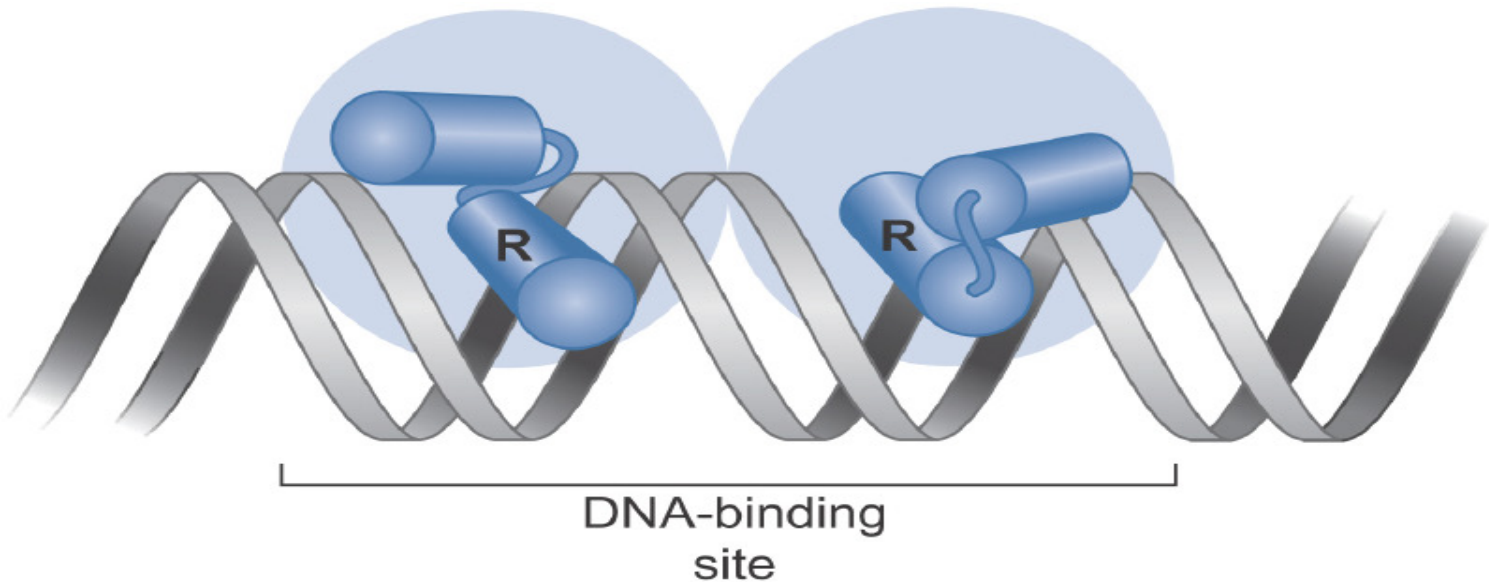


CRP si lega  
come  
dimero



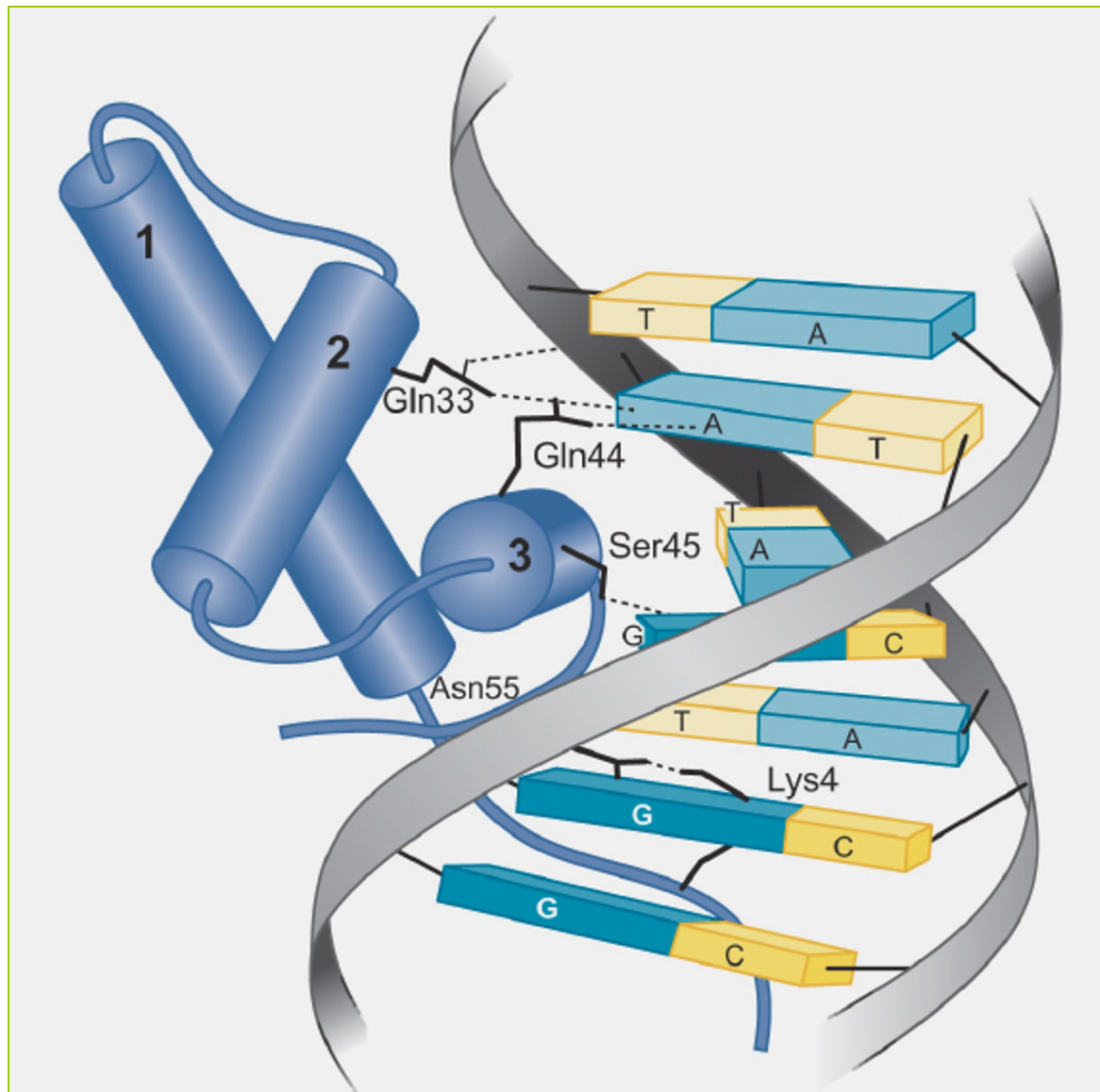
CRP presenta un sito attivatorio ed un sito di legame al DNA

## 6. CAP and Lac repressor bind DNA using a common structural motif: **helix-turn-helix motif**



One is **the recognition helix** that can fit into the major groove of the DNA. Another one sits across the major groove and makes contact with the DNA backbone.

# DNA binding by a helix-turn-helix motif



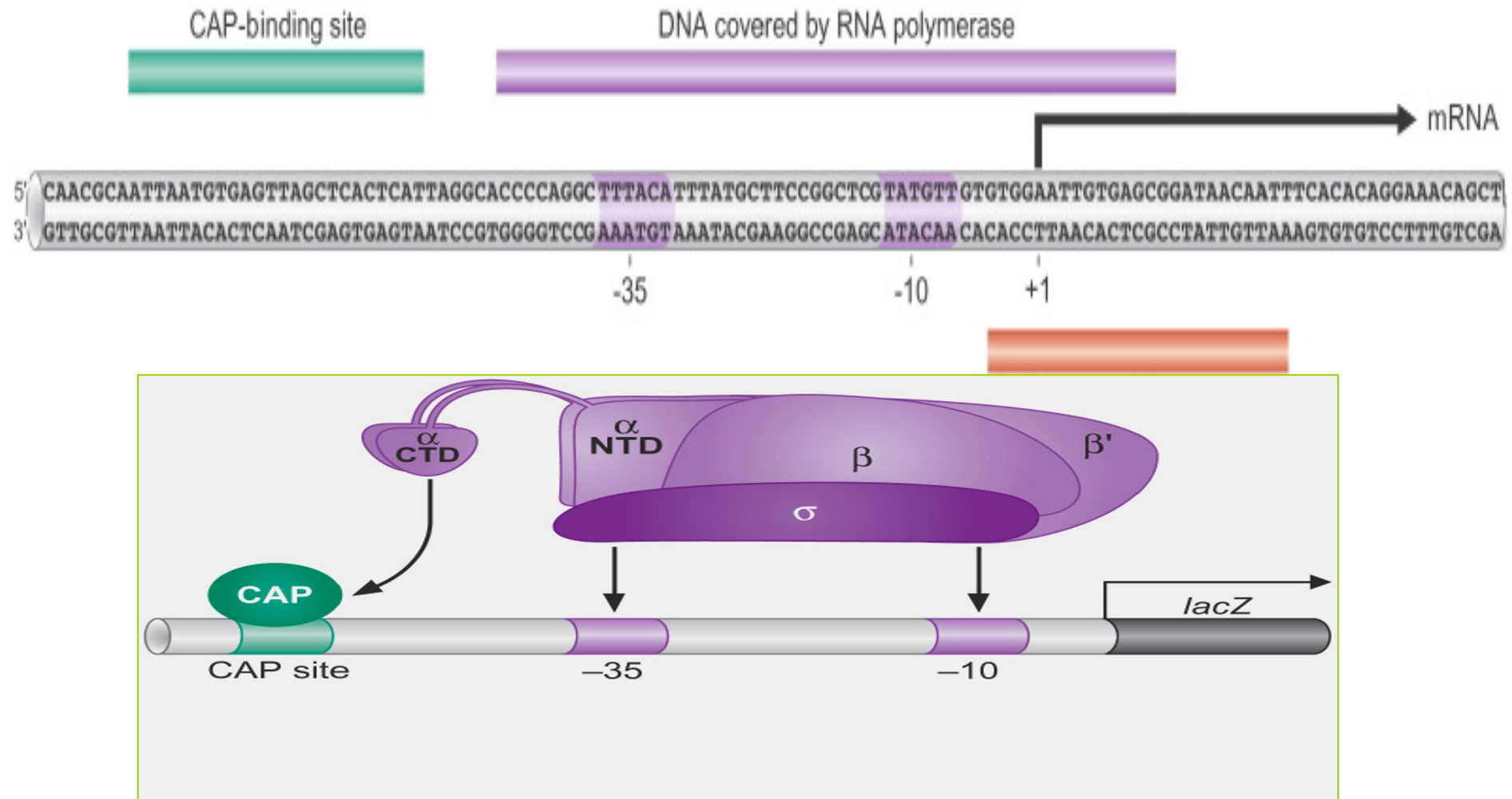
Hydrogen Bonds  
between  $\lambda$  repressor  
and the major  
groove of the  
operator.

**Lac operon** contains three operators: the primary operator and two other operators located 400 bp downstream and 90 bp upstream.

**Lac repressor** binds as a tetramer, with each operator is contacted by a repressor dimer respectively.



**CRP** interagisce con il dominio carbossi-terminale della subunità  $\alpha$  della RNAPol e favorisce il legame al **promotore**



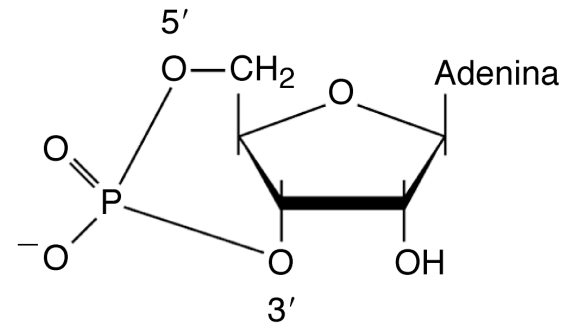
La concentrazione di cAMP dipende dal glucosio. Il glucosio infatti inibisce l'adenilato ciclasi, l'enzima che converte l'ATP in cAMP.



Glucosio



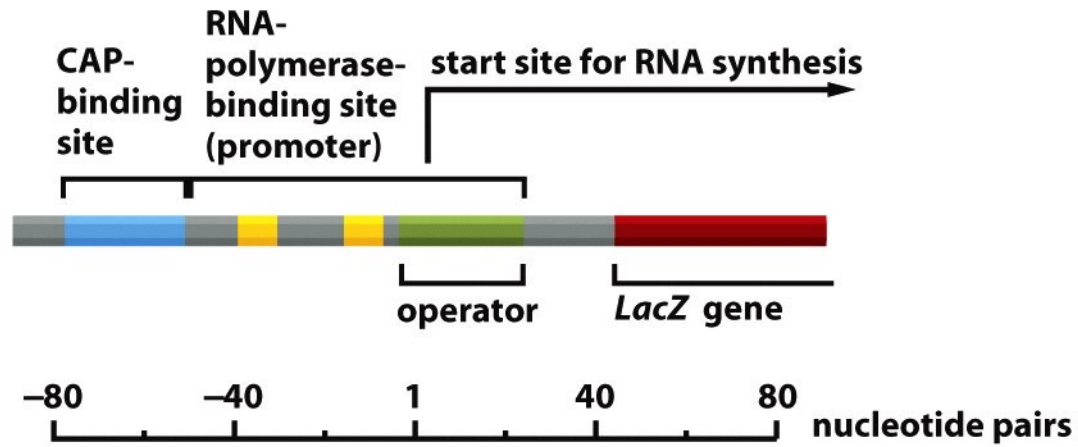
L'AMP ciclico ha legami 5'-P-3'



Ridotta attivazione  
operone *Lac*





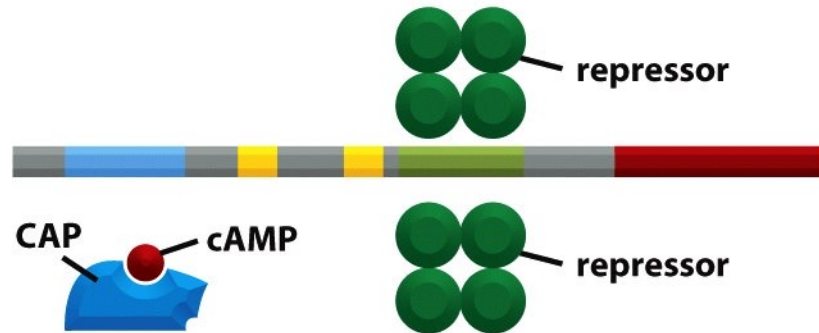


+ GLUCOSE  
+ LACTOSE



**OPERON OFF**  
because CAP not bound

+ GLUCOSE  
- LACTOSE



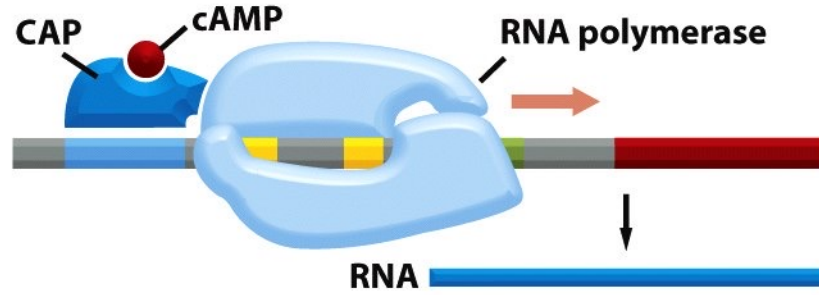
**OPERON OFF** both because  
Lac repressor bound and  
because CAP not bound

- GLUCOSE  
- LACTOSE



**OPERON OFF** because  
Lac repressor bound

- GLUCOSE  
+ LACTOSE



**OPERON ON**



# Sommario

Carboidrati	CRP	Repressore	RNA polimerasi	lac Operon
+ GLUCOSIO + LATTOSIO	Non legata al DNA	Non presente sull'operatore	si lega poco al promotore	Nessuna (o minima) trascrizione
+ GLUCOSIO - LATTOSIO	Non legata al DNA	Legato all'operatore	Bloccata dal repressore	Nessuna trascrizione
- GLUCOSIO - LATTOSIO	Legata al DNA	Legato all'operatore	Bloccata dal repressore	Nessuna trascrizione
- GLUCOSIO + LATTOSIO	Legata DNA	Non presente sull'operatore	Legata al promotore	<b>Trascrizione</b>

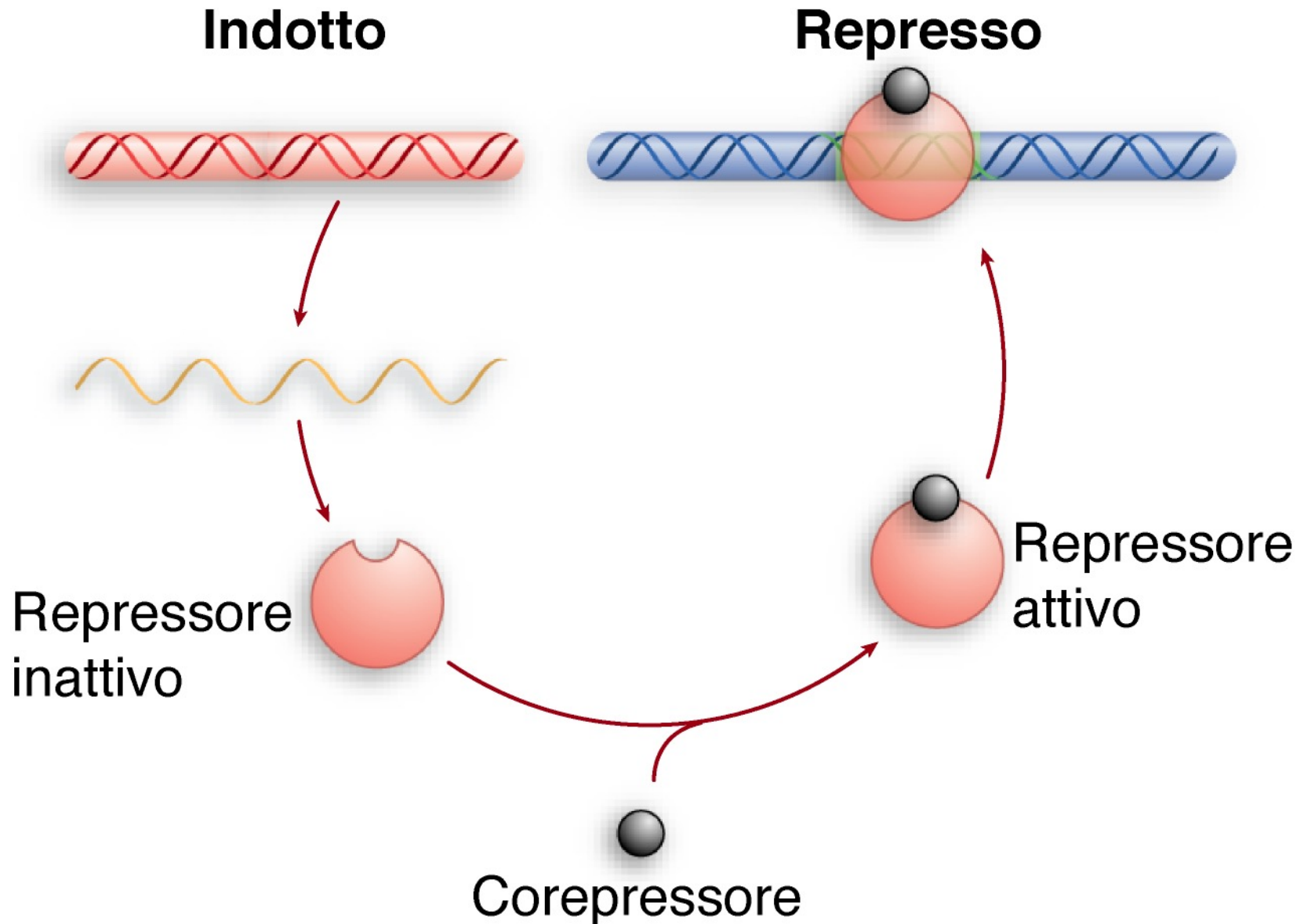
# Combinatorial Control: CAP controls other genes as well.

- A regulator (CAP) works together with different repressors at different genes, this is an example of **Combinatorial Control**.
- In fact, CAP acts at more than 100 genes in E.coli, working with an array of partners.

# Regolazione degli Operoni anabolici

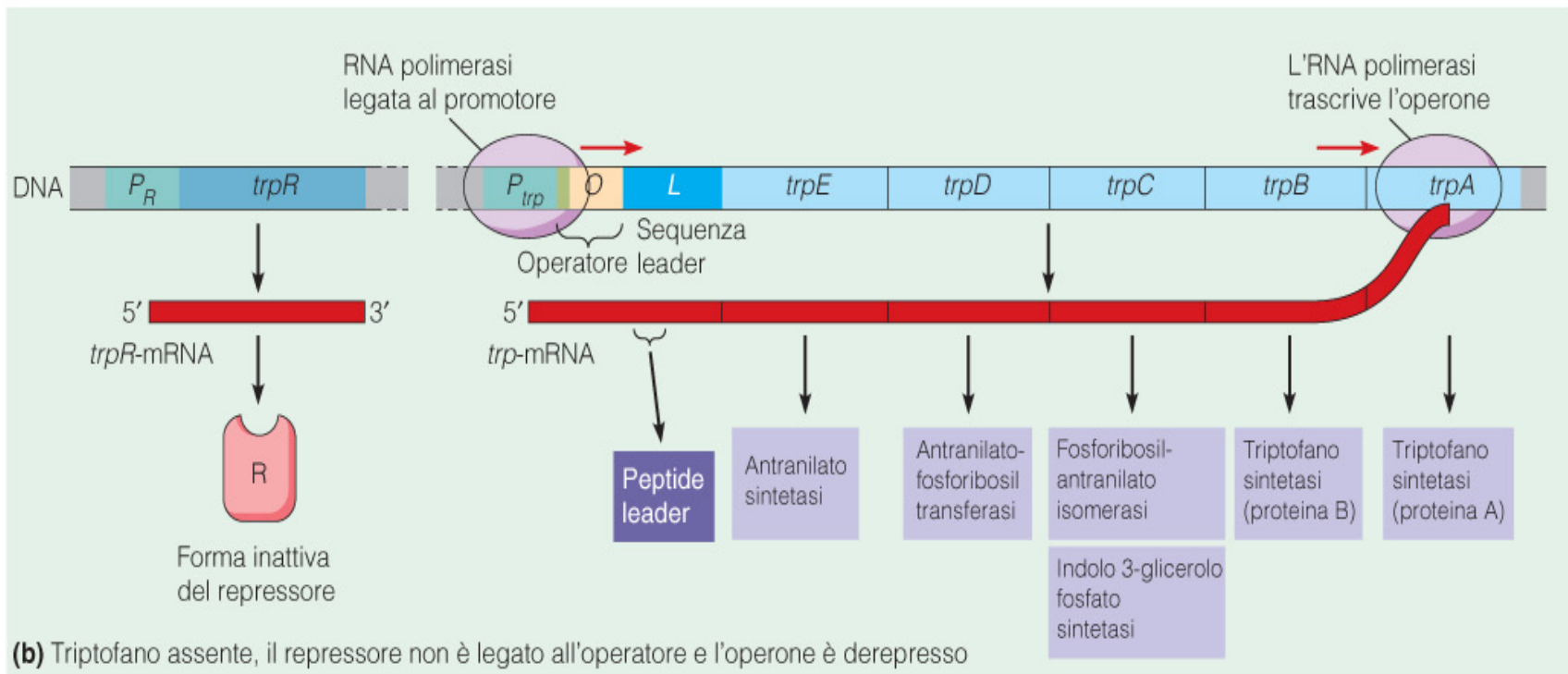
- La regolazione degli operoni anabolici è opposta a quella degli operoni catabolici (es. *lac*).
- Gli enzimi non devono essere prodotti quando è presente il prodotto finale.
- Sistema modello è l'operone triptofano (*trp* operon) di *E. coli*.
- Regolazione negativa; se il triptofano è presente interagisce con il repressore per bloccare il promotore

# Un corepressore attiva un repressore

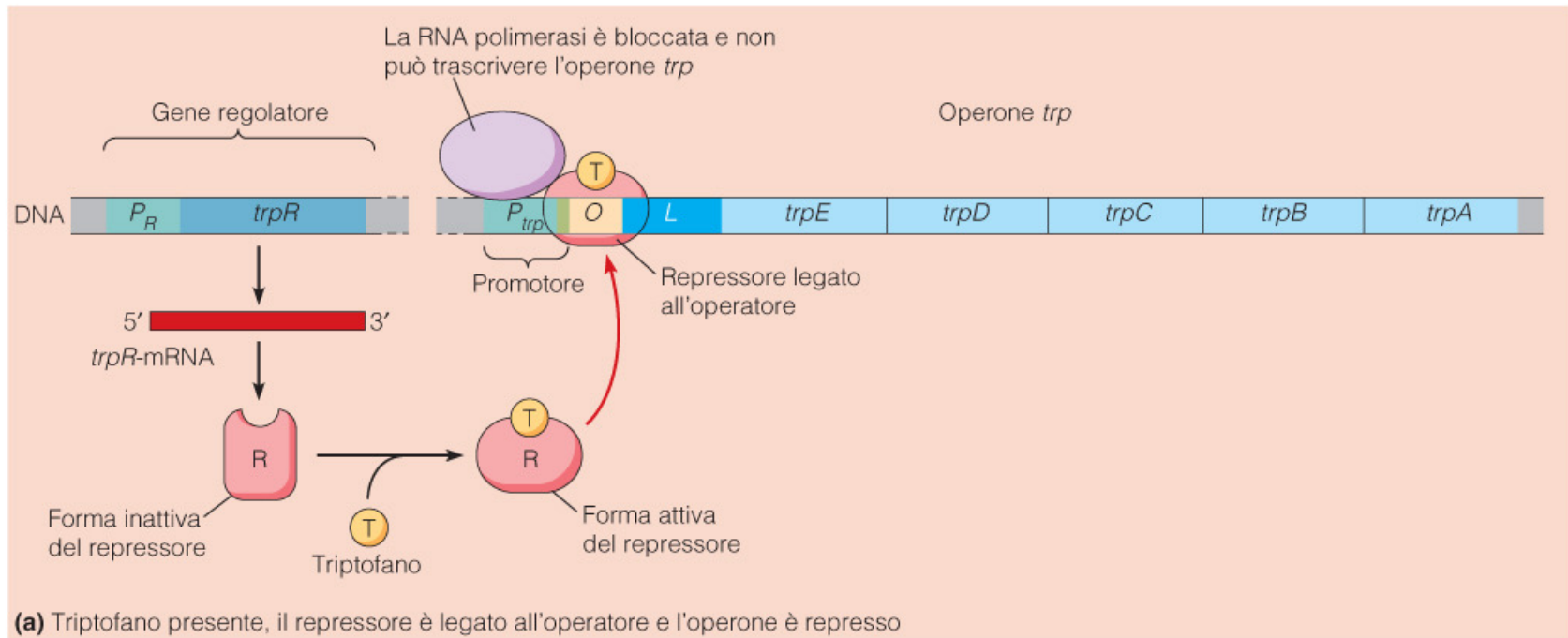


# I geni coinvolti nella sintesi del triptofano: un operone reprimibile.

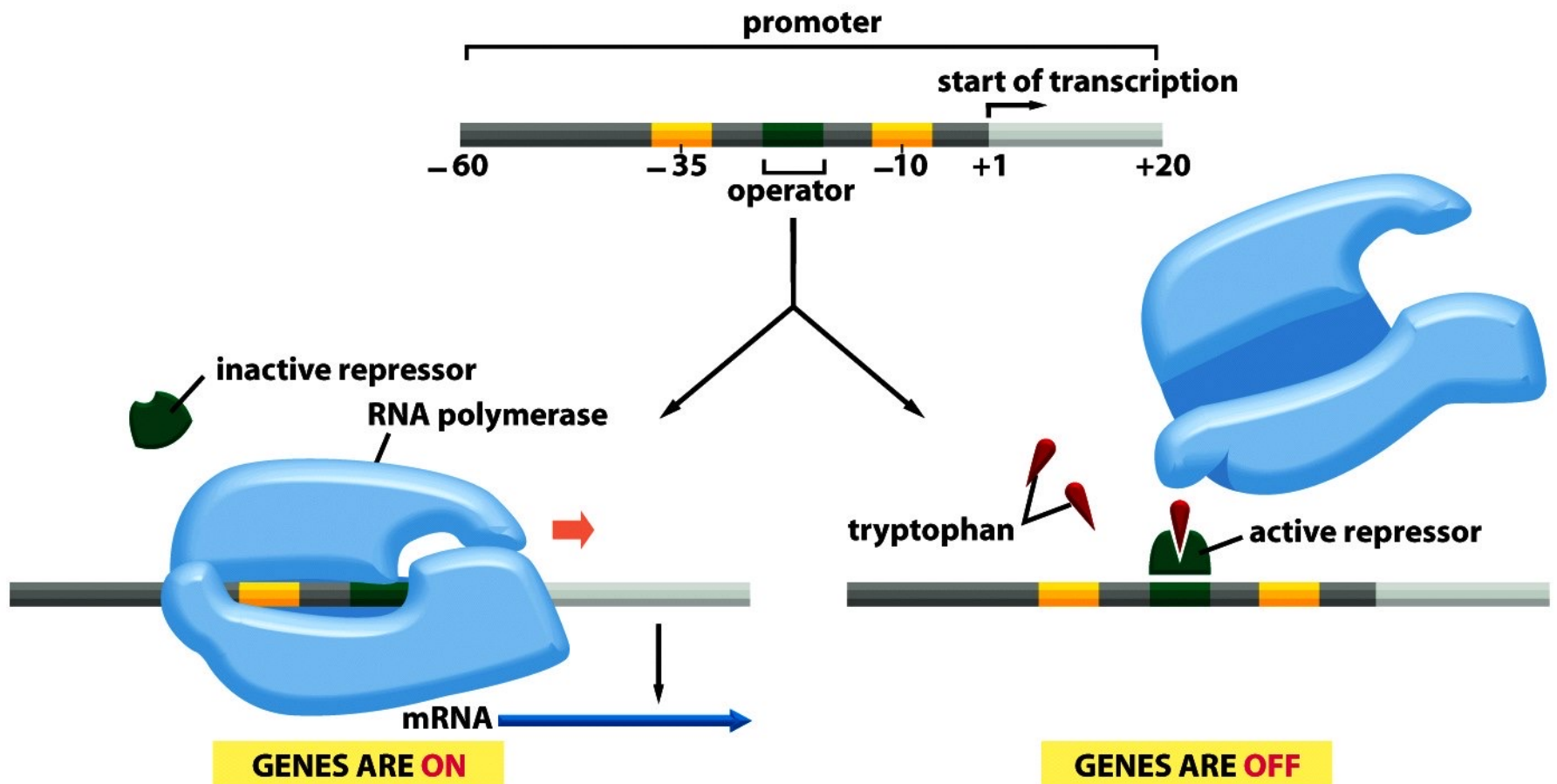
## In assenza di triptofano



# In presenza di triptofano l'operone è represso



Nell'operone triptofano il repressore va a legarsi nella regione del promotore essenziale per il legame RNAPol





Il triptofano provoca un cambiamento conformazionale del repressore che gli consente di legarsi al DNA

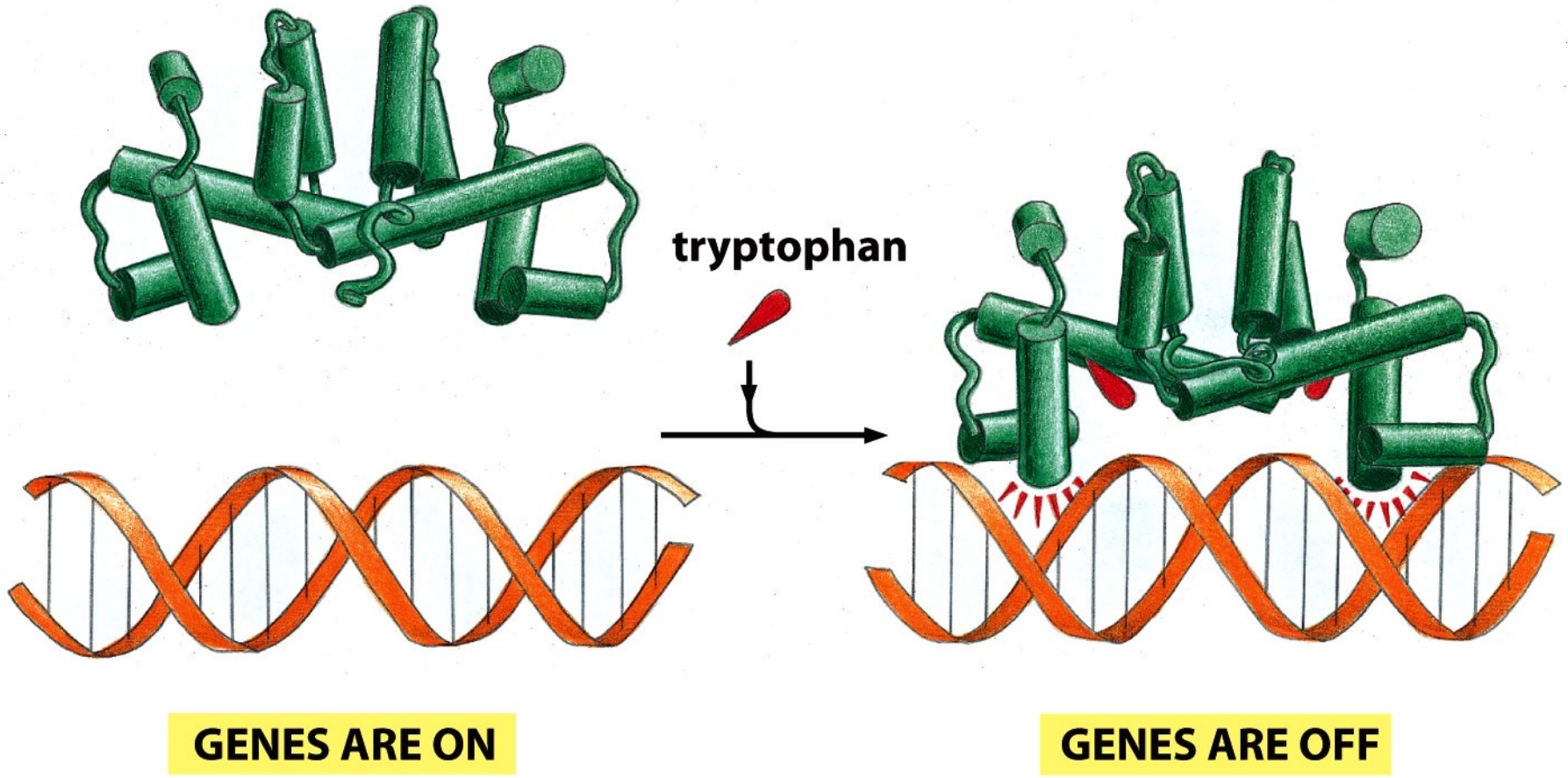


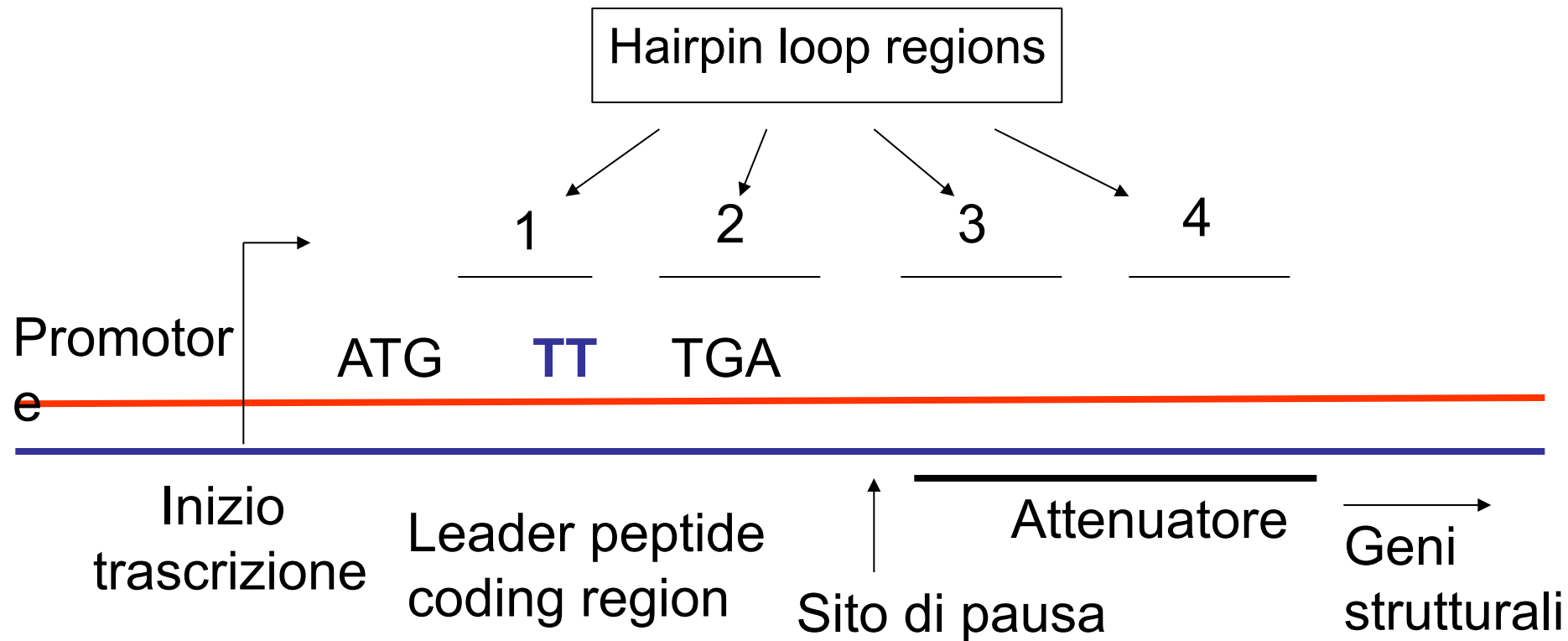
Figure 7-36 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



# Regolazione mediante attenuazione

- Meccanismo di controllo attuato dopo l'inizio della trascrizione dell'operone (primo gene strutturale).
- Accoppia trascrizione e traduzione
- Utilizza una sequenza leader (*trpL*) che include due codoni adiacenti per il triptofano
- Se il triptofano è scarso, anche il triptofano-tRNA<sup>trp</sup> è scarso
- Il ribosoma cerca di tradurre il peptide codificato dalla sequenza leader ma si ferma per carenza di triptofano-tRNA<sup>trp</sup>
- Questo fa continuare la trascrizione

# Struttura del Leader peptide (*trpL*)

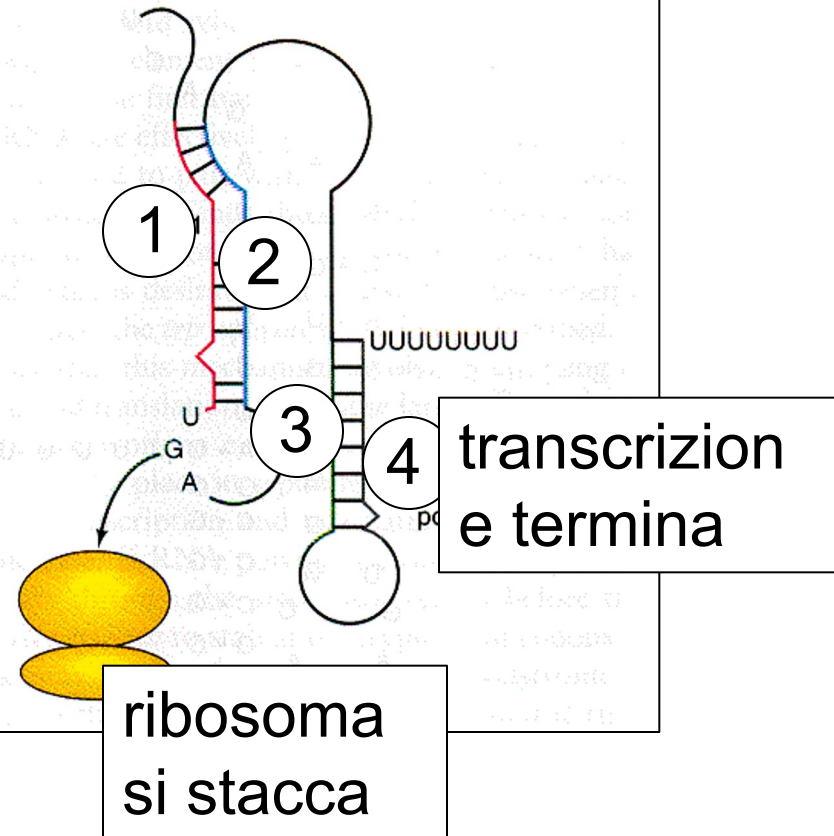
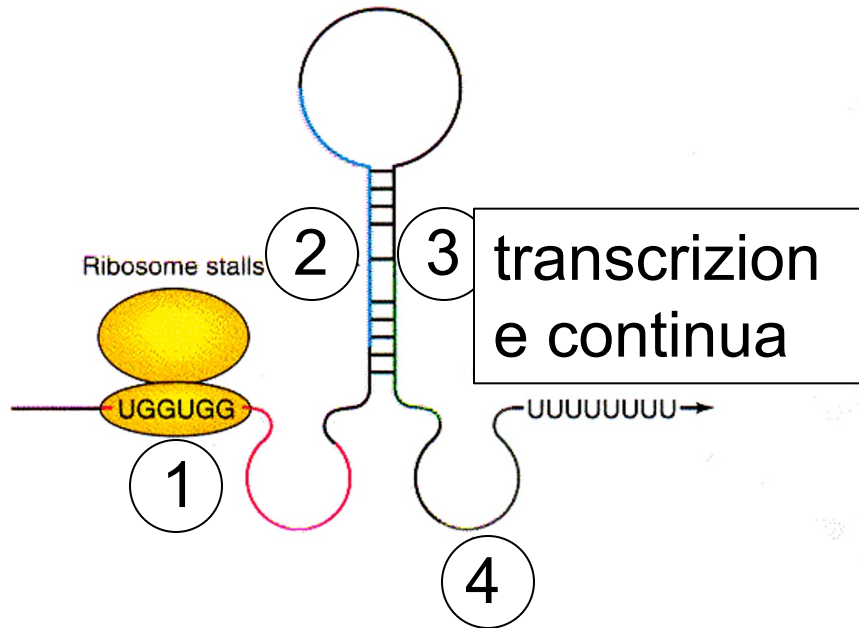


**TT** = 2 codoni trp

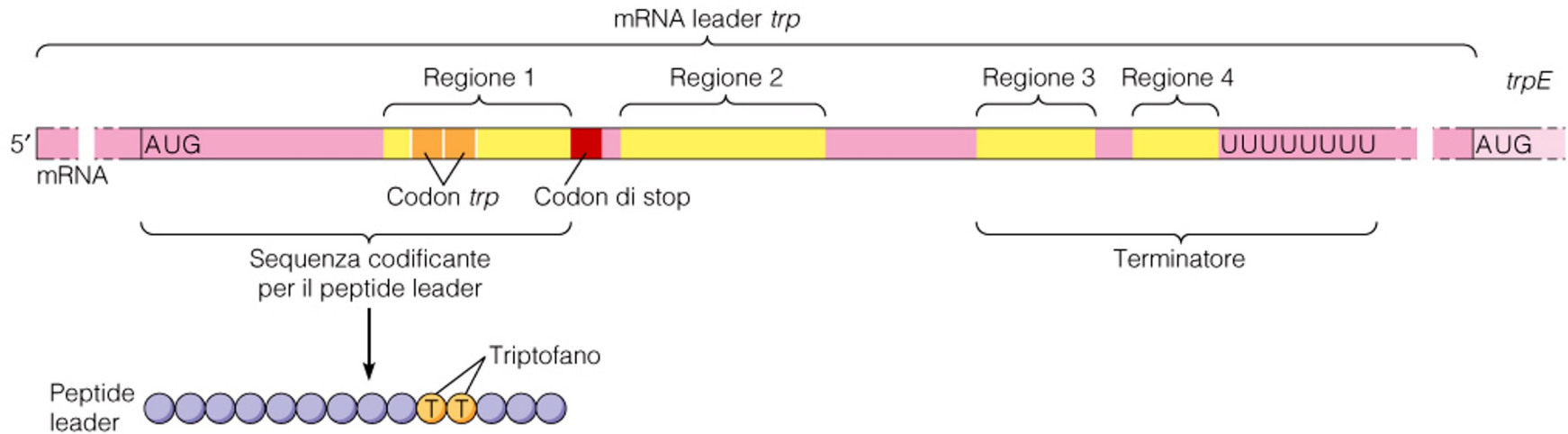
# Attenuazione: usa la traduzione per verificare il livello del prodotto finale

Mancanza di triptofano

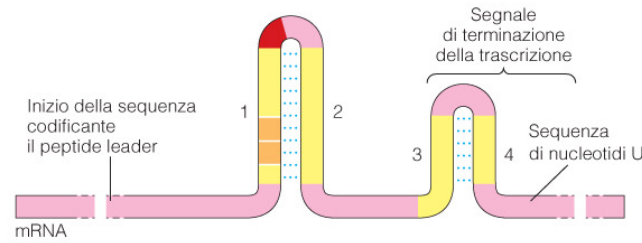
Abbondanza di triptofano



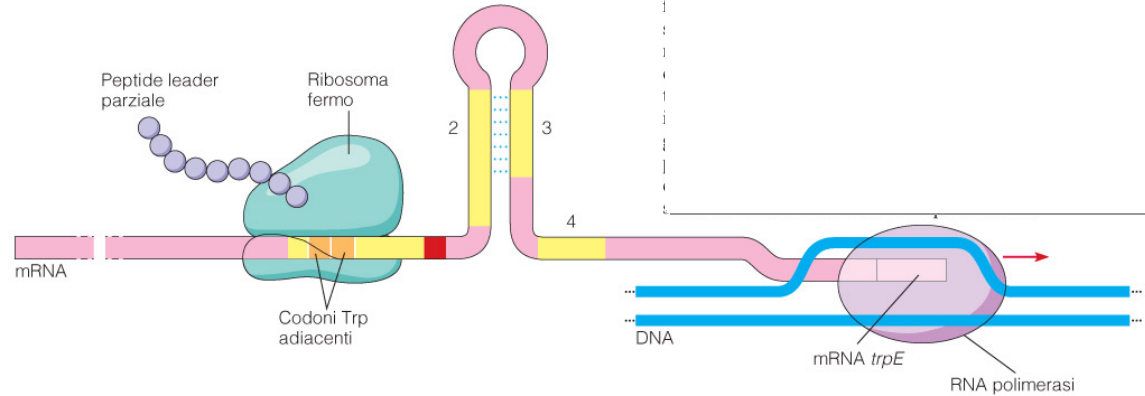
# Regione coinvolta nel processo di attenuazione



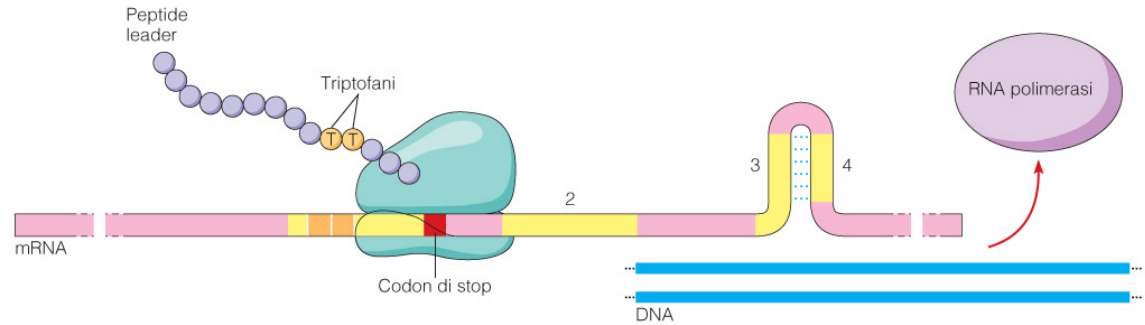
# L'attenuazione



(a) La struttura secondaria più stabile per la regione leader dell'mRNA di *trp*.



(b) Quando il triptofano è scarso, il ribosoma rallenta permettendo la formazione della forcina 2-3; l'RNA polimerasi continua la trascrizione.



(c) Quando il triptofano è abbondante, il ribosoma continua e la RNA polimerasi non trascrive.

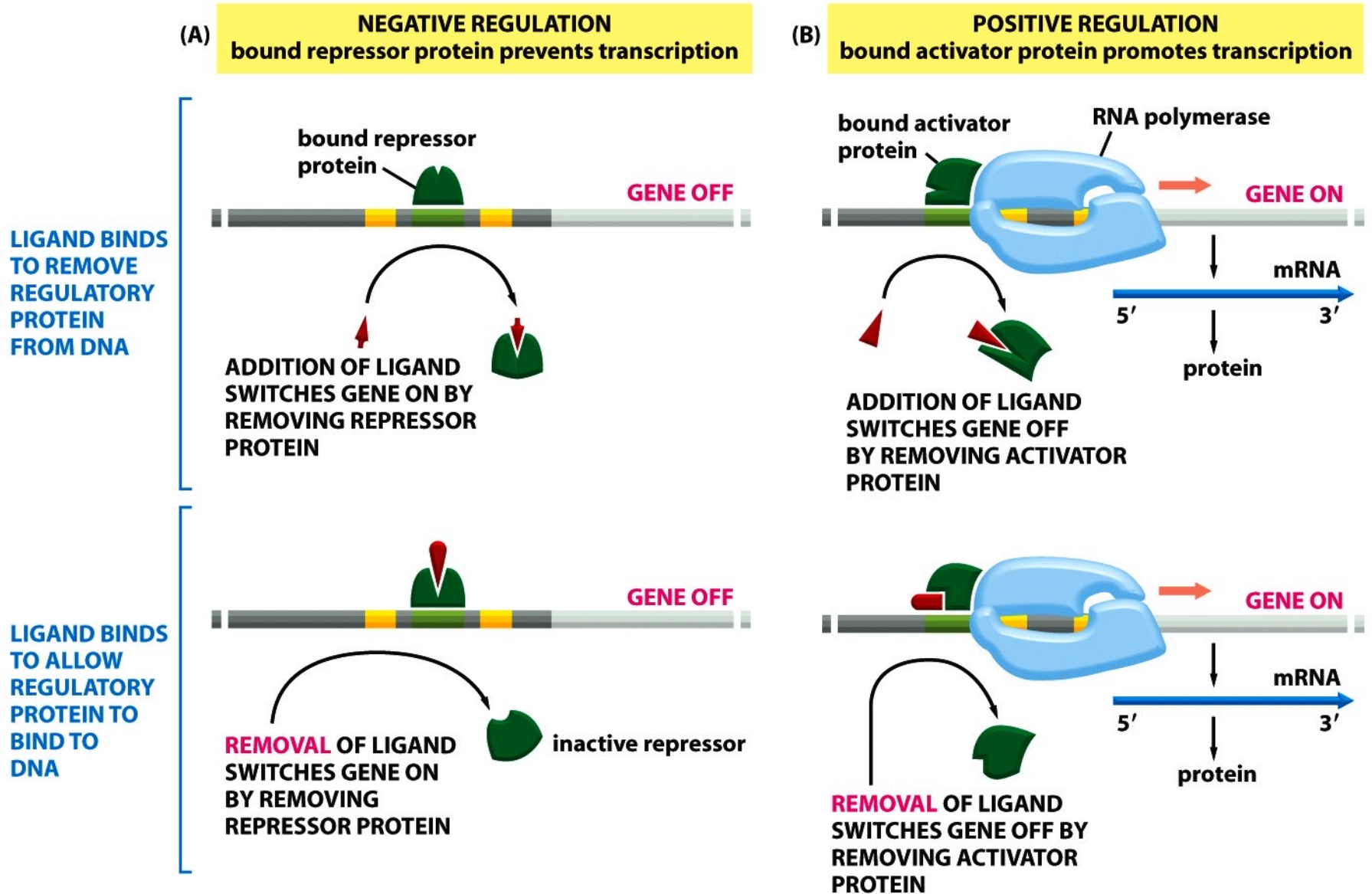


Figure 7-37 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

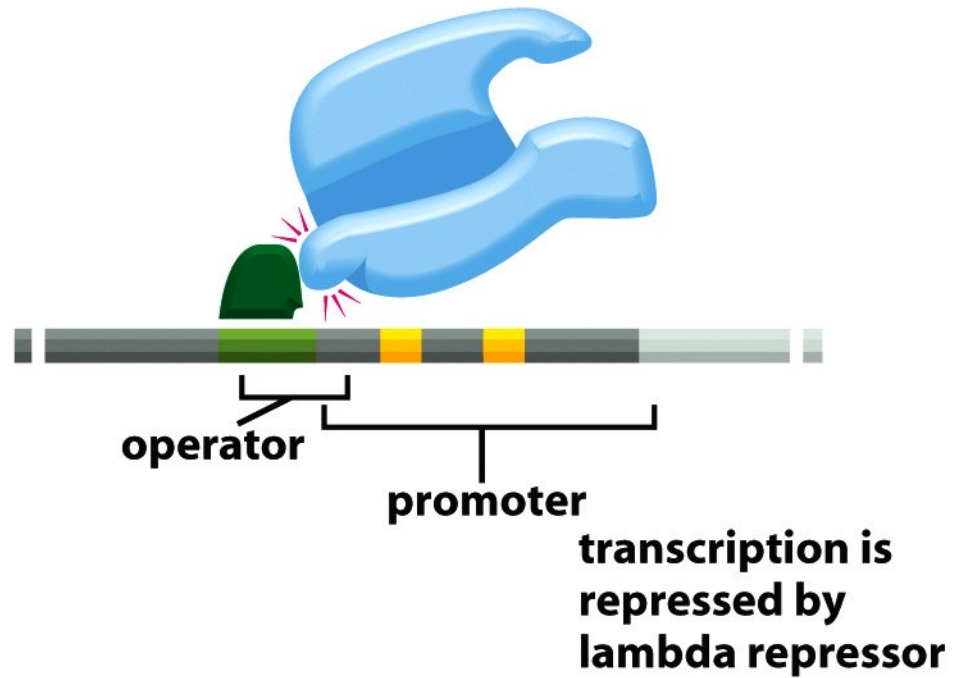
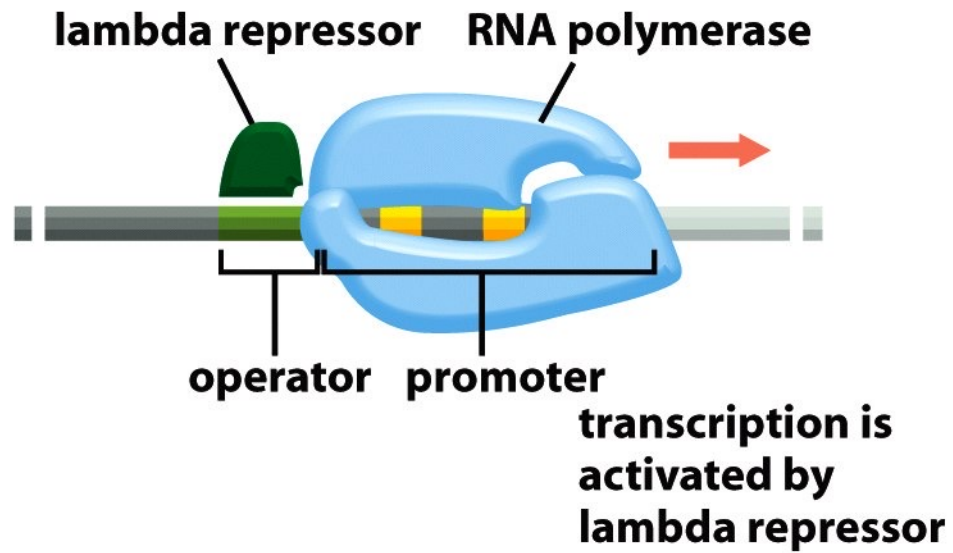
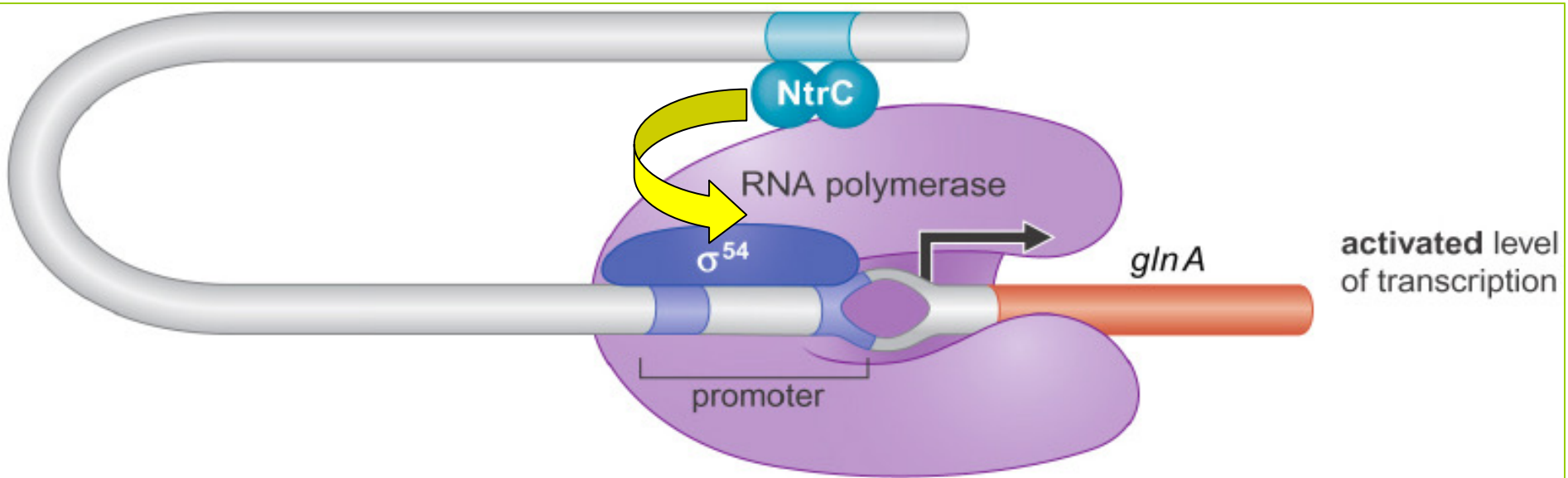


Figure 7-38 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

- La maggior parte dei meccanismi interviene sull'attacco della RNA polimerasi al promotore.
- Esiste un altro meccanismo: attivazione allosterica es. NtrC.
- In questo caso RNAPol si lega al promotore come complesso inattivo; l'attivatore scatena un cambiamento allosterico che attiva la trascrizione.



Low nitrogen levels->NtrC phosphorylation and conformational change-> NtrC binds DNA sites at ~-150 bp position as a dimer ->NtrC interacts  $\sigma^{54}$  in RNAP bound to the *glnA* promoter ->NtrC ATPase activity provides energy needed to induce a conformation change in RNAP-> transcription STARTs



- NtrC controlla l'espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dell'azoto, come ad esempio il gene glnA.
- NtrC presenta domini separati di attivazione e di binding al DNA
- NtrC si al DNA solo quando i livelli di azoto sono bassi.