

Il controllo dell'espressione genica

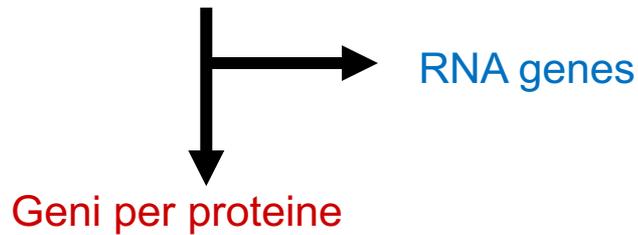
Controllo dell'espressione genica

- 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



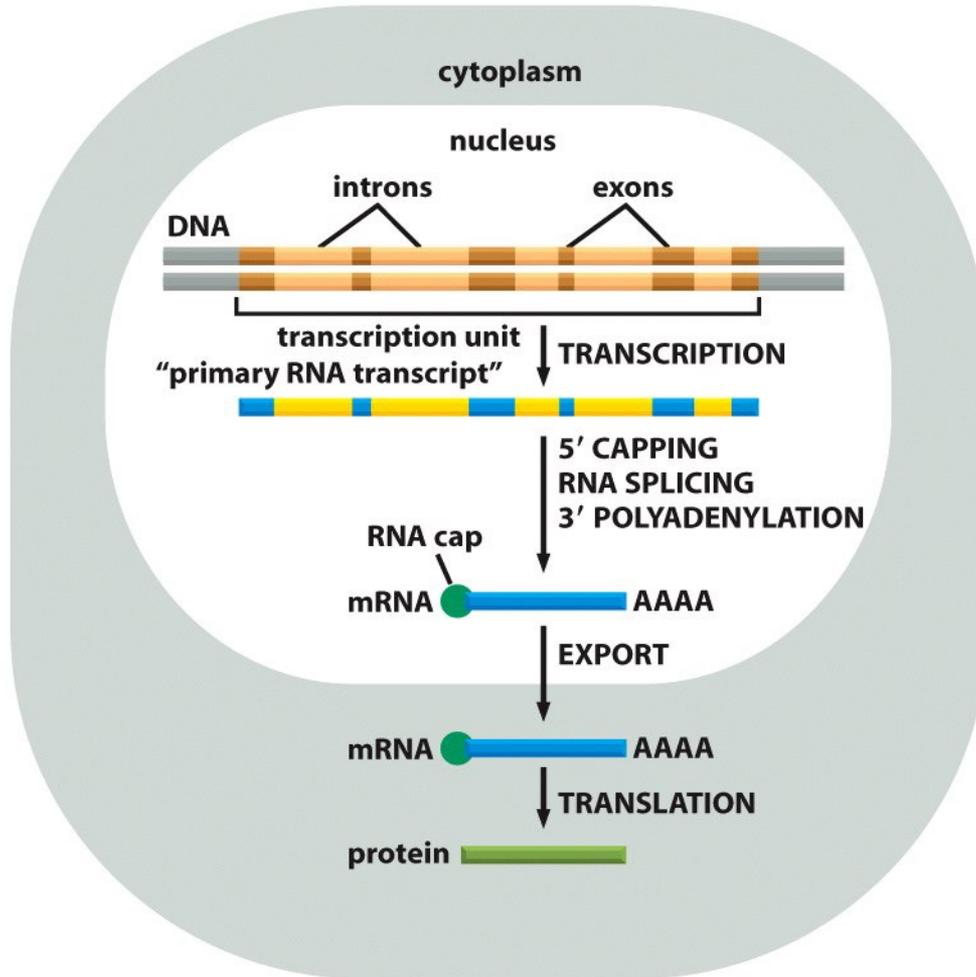
Ogni cellula in un determinato momento esprime solo una piccola parte di questo potenziale (~ 5000 geni)



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

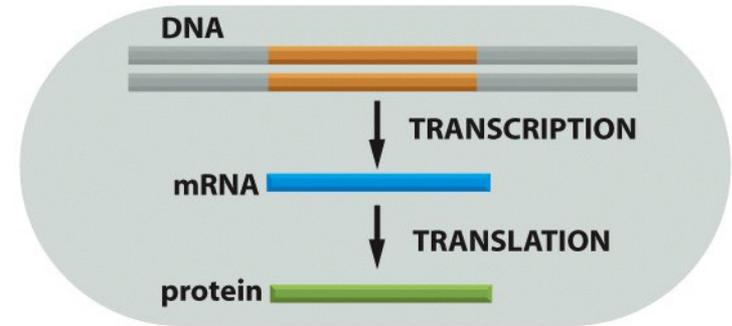
(A)

EUCARYOTES



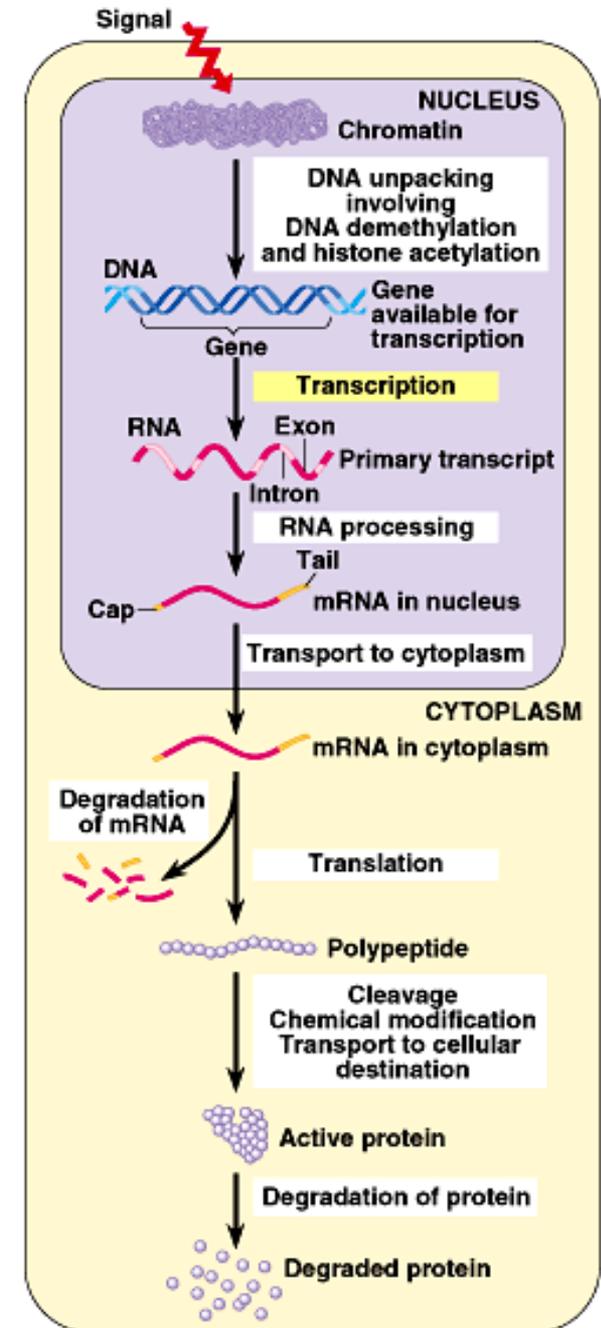
(B)

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



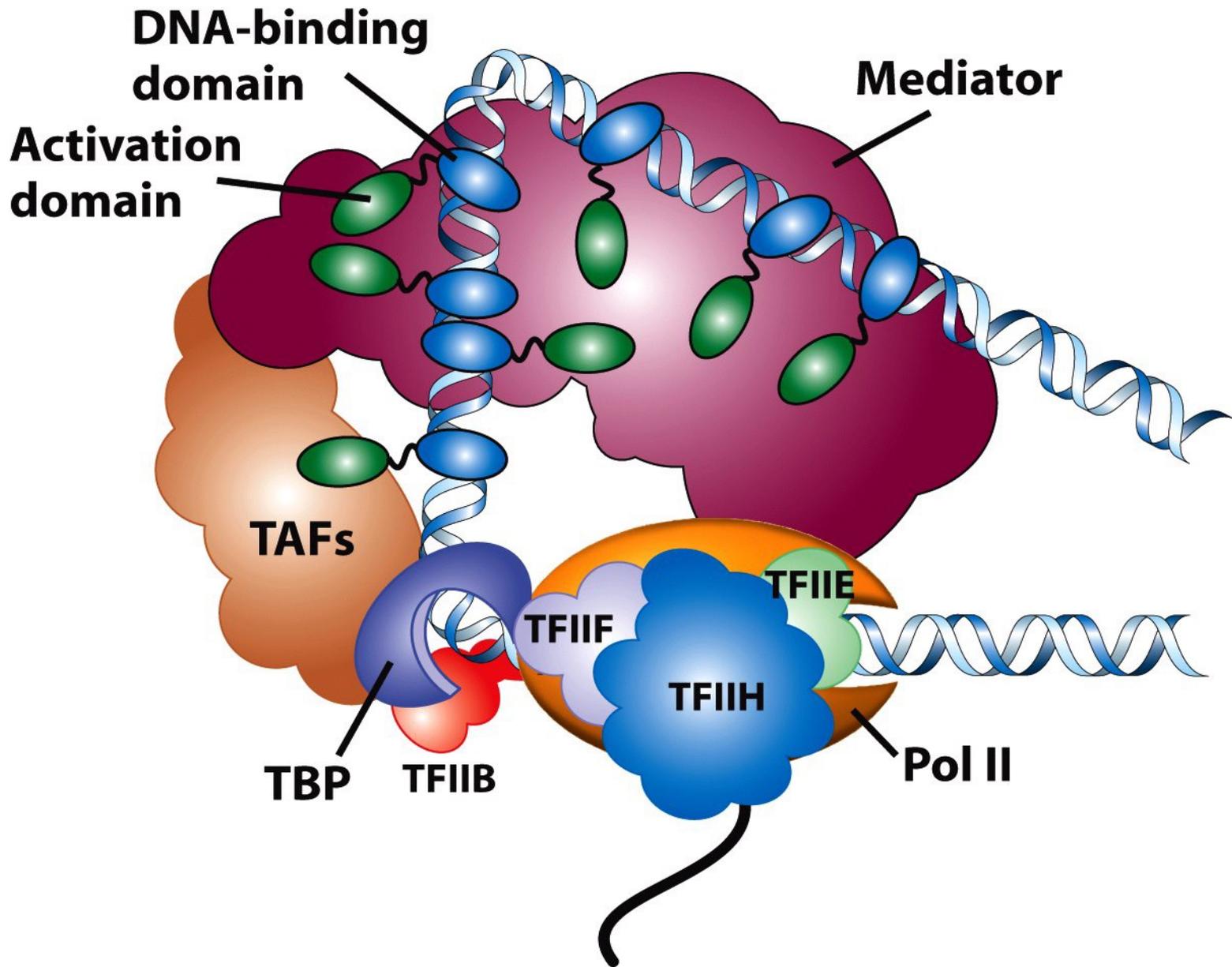
Nei procarioti esiste solo controllo
trascrizionale regolato dai fattori di
trascrizione

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**

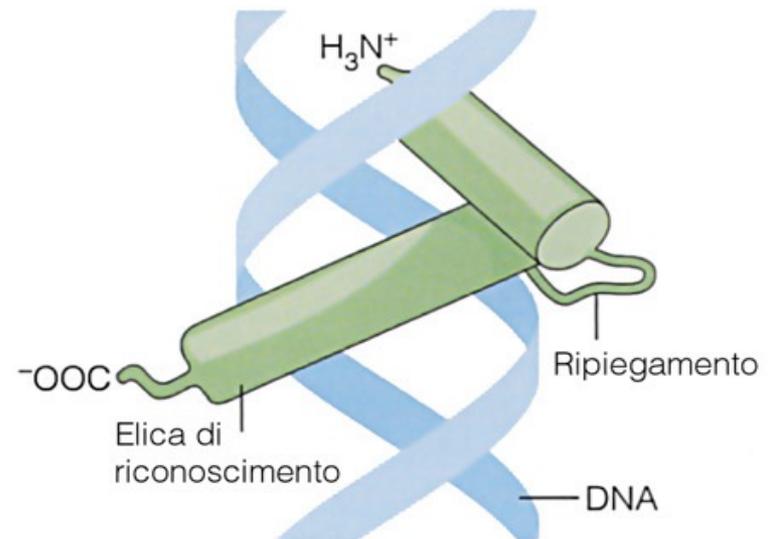


Come avviene l'interazione DNA- proteine?

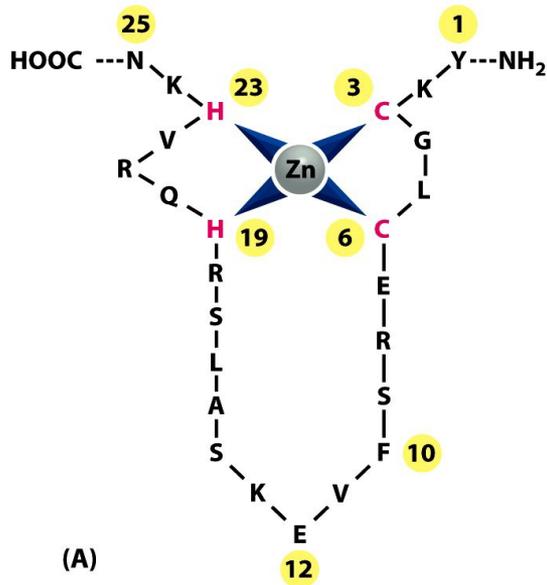
Le proteine con DNA binding domains hanno dei motivi particolari:

A) Motivo helix-turn-helix (elica-giro-elica), consiste di due α eliche separate da un ripiegamento della catena polipeptidica.

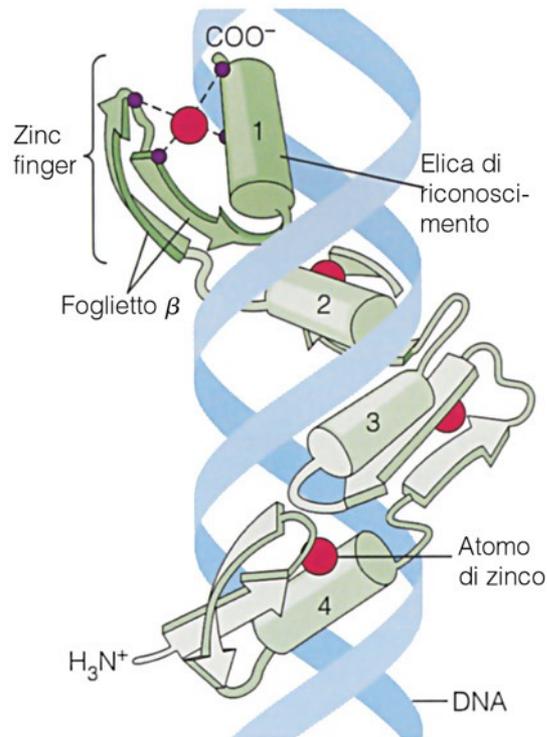
una α elica di riconoscimento, che con le catene laterali dei suoi residui amminoacidici riconosce specifiche sequenze di DNA (posizionate nel solco maggiore) alle quali si lega (leg. idrogeno). La seconda α elica stabilizza la conformazione



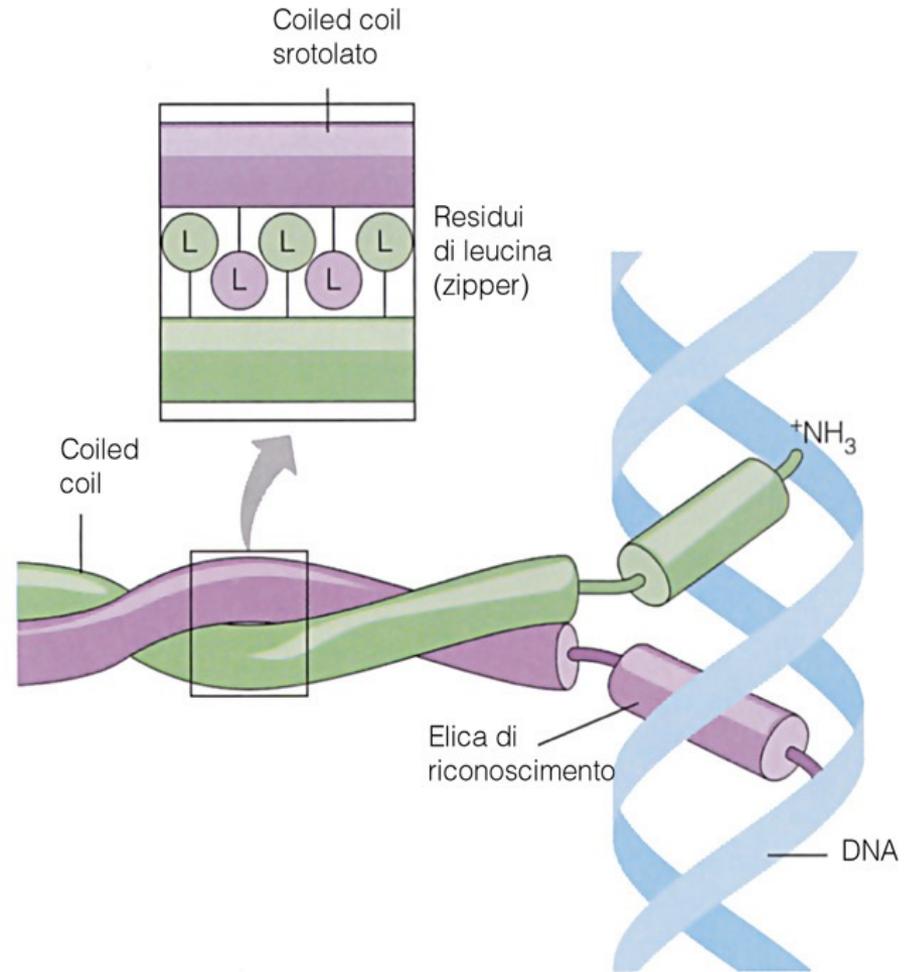
(a) Motivo helix-turn-helix



C) Motivo Zinc finger (a dita di zinco), è costituito da una α elica e da due segmenti a foglietti β , tenuti insieme da residui di cisteina o istidina, posti in modo preciso, con un atomo di zinco. Il numero di zinc finger varia tra un fattore di trascrizione e un altro. Le strutture zinc finger protrudono dalla superficie della proteina e servono da punto di contatto con specifiche sequenze di DNA posizionate nel solco maggiore della doppia elica.

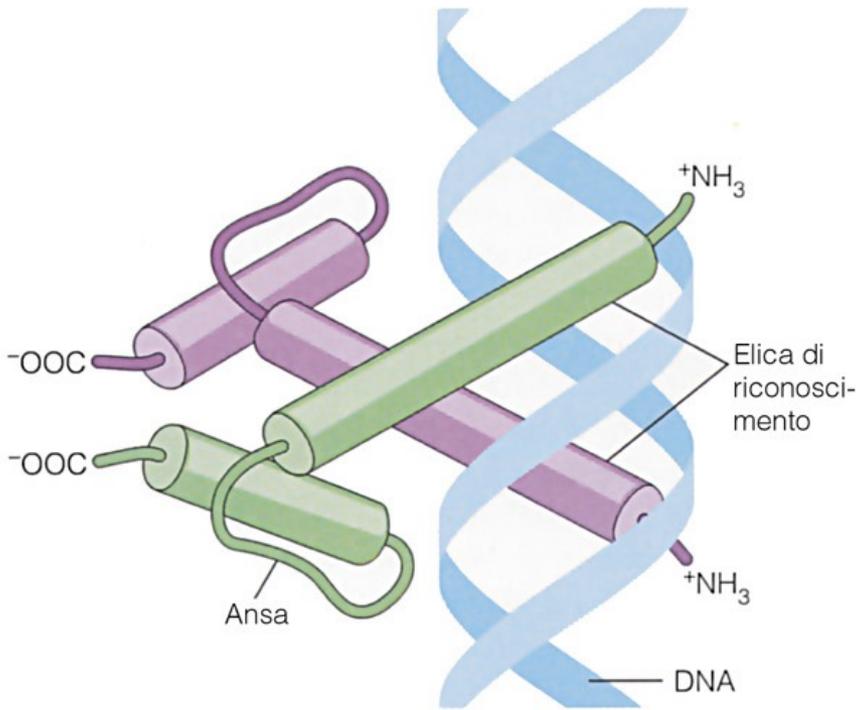


D) Motivo leucine zipper (a cerniera di leucine), è formato dall'interazione di due catene polipeptidiche, ognuna contenente una α elica con residui di leucina (a.a. idrofobico) regolarmente spazati. Le leucine, interagendo tra di loro, provocano un attorcigliamento delle due eliche. Il motivo è utilizzato per unire due polipeptidi uguali o diversi. Il legame al DNA è reso possibile dalla presenza di due ulteriori regioni ad α elica che interagiscono con le sequenze del solco maggiore.



(d) Motivo leucine zipper

Figura 21-25



(e) Motivo helix-loop-helix

E) Motivo helix-loop-helix (elica-ansa-elica), consiste di due α eliche una piú piccola e una piú grande, separate da un'ansa. I motivi helix-loop-helix contengono regioni idrofobiche che permettono di connettere due polipeptidi uguali o diversi. La formazione di un fascio di 4 α eliche provoca la giustapposizione dell'elica di riconoscimento di un polipeptide con quella dell'altro, creando cosí un dominio di legame al DNA bipartito.

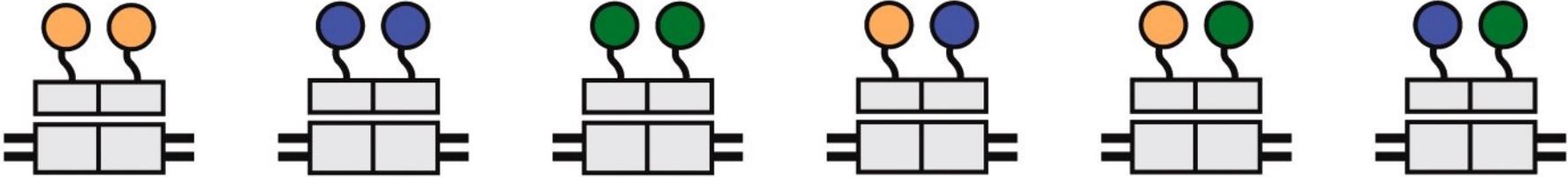
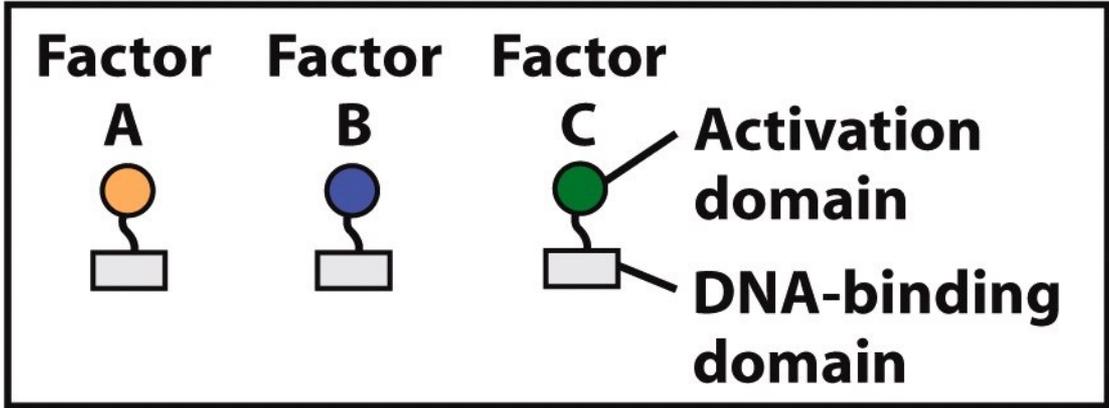


Figure 7-28a
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

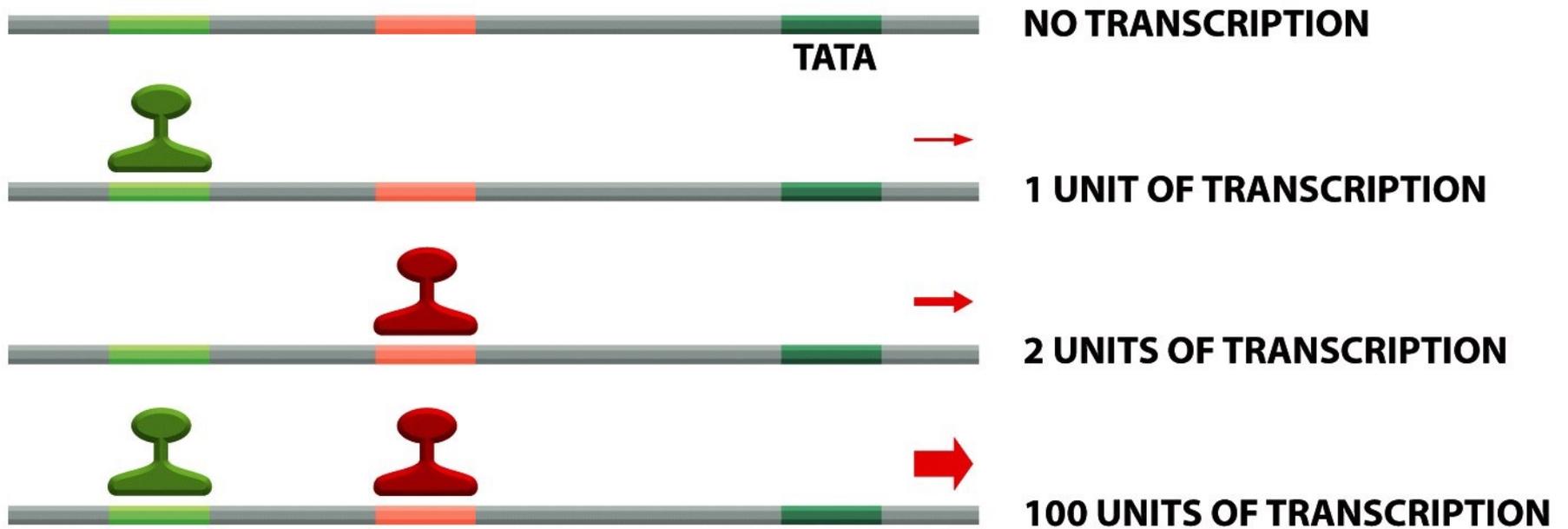


Figure 7-48 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

**competitive
DNA
binding**

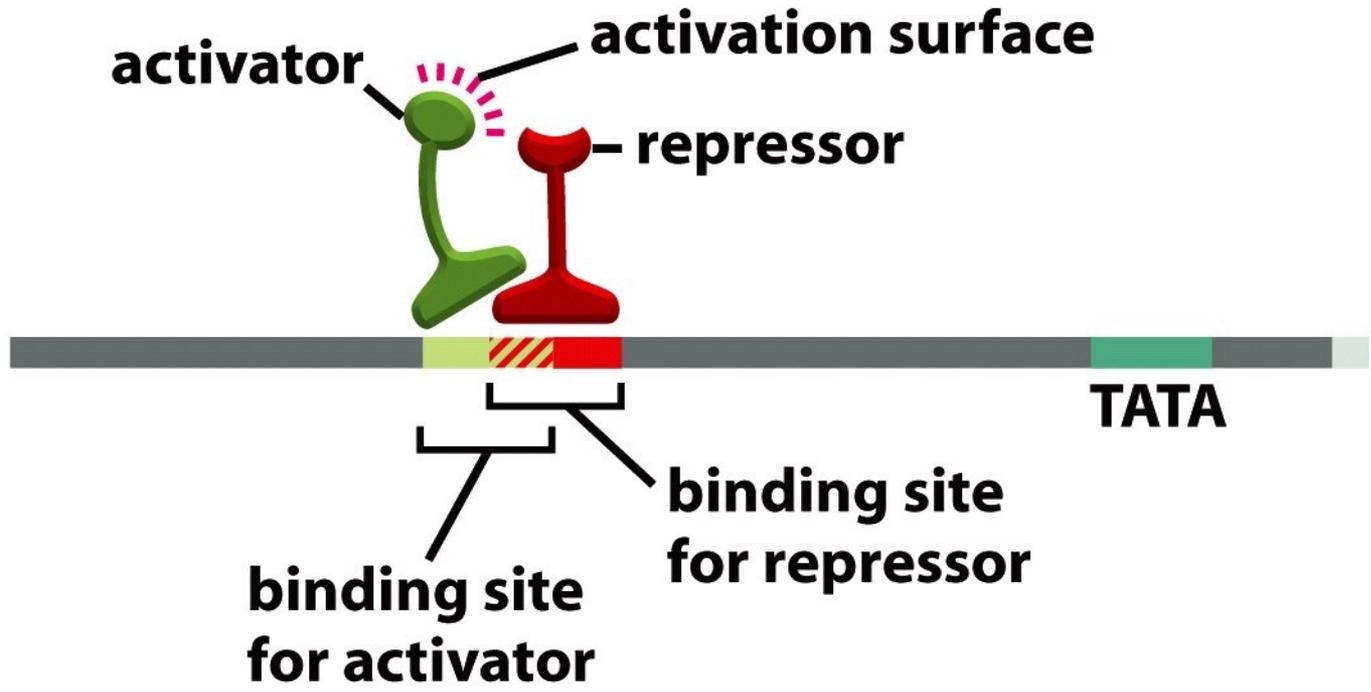
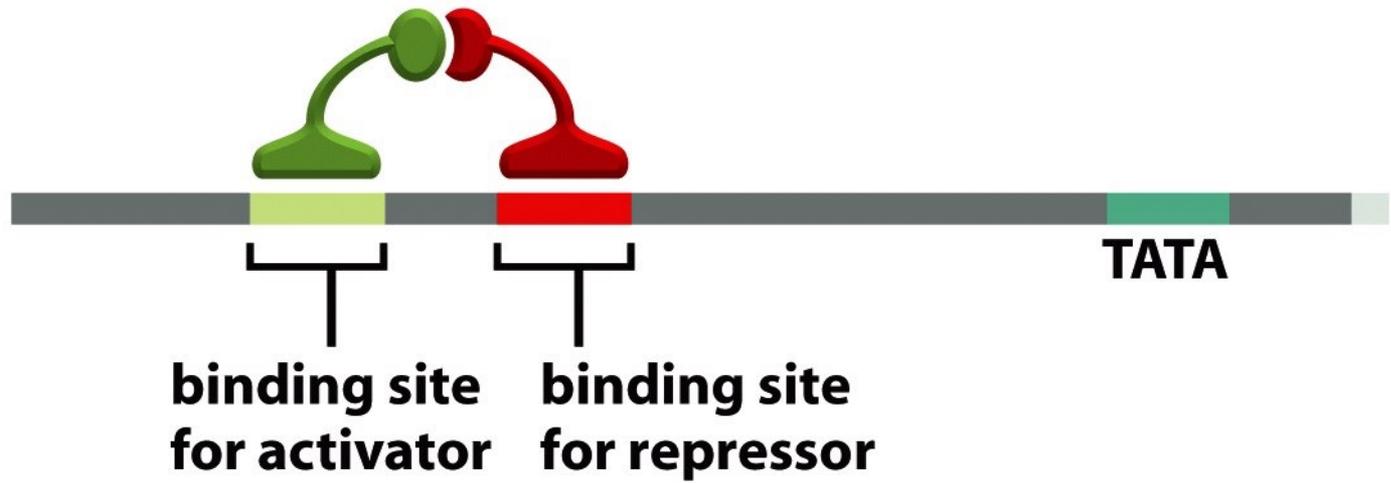


Figure 7-50a *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

**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 σ
- operoni

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

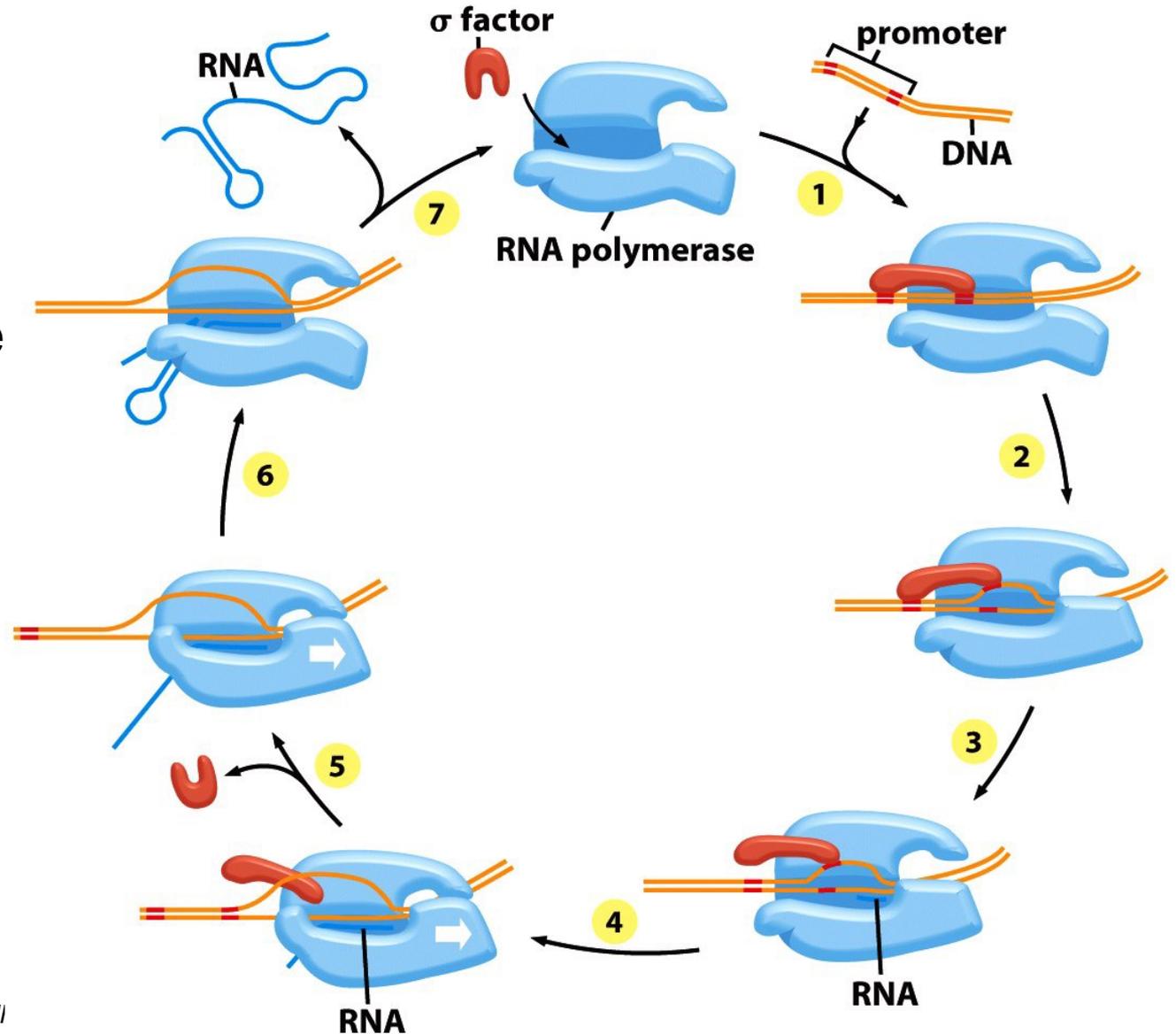


Figure 6-11 *Molecular Biology of the Cell*
(© Garland Science 2008)

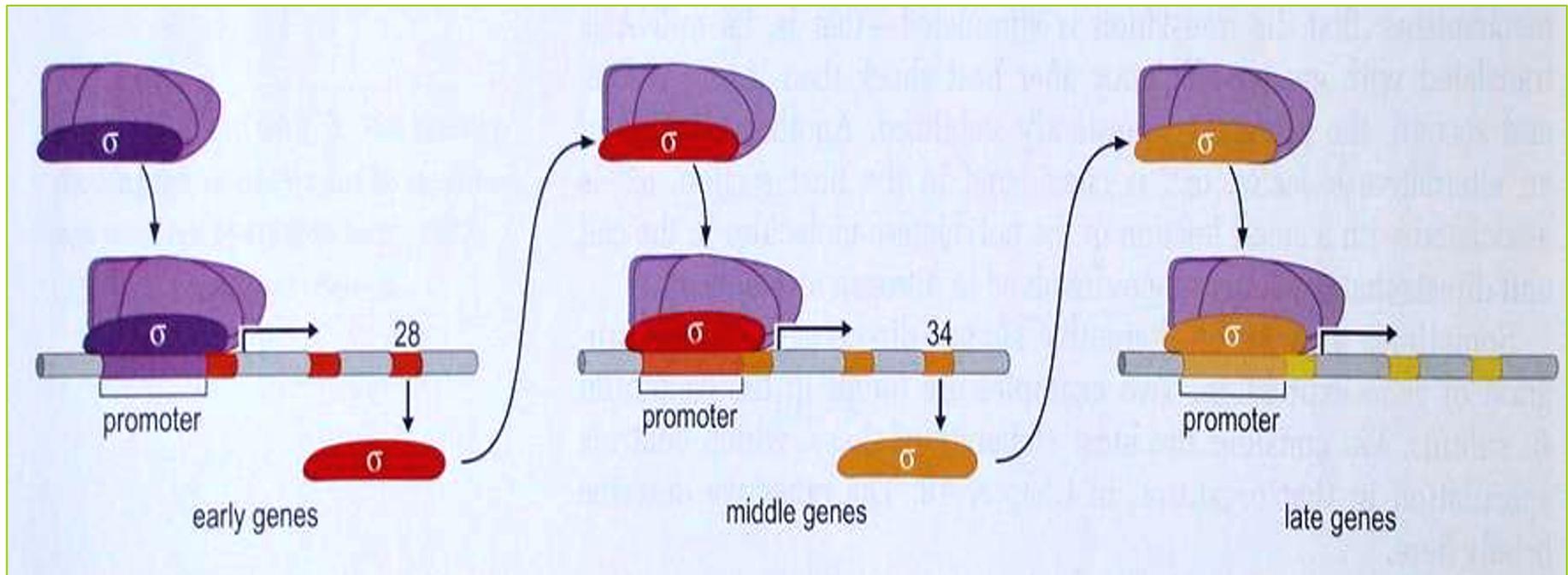
I batteri possono utilizzare diversi fattori σ per attivare l'espressione di specifici set di geni

Table 7–2 Sigma Factors of *E. coli*

SIGMA FACTOR	PROMOTERS RECOGNIZED
σ^{70}	most genes
σ^{32}	genes induced by heat shock
σ^{28}	genes for stationary phase and stress response
σ^{28}	genes involved in motility and chemotaxis
σ^{54}	genes for nitrogen metabolism
σ^{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 σ ed obbligare l'RNA polimerasi dell'ospite a trascrivere in maniera esclusiva i geni fagici.



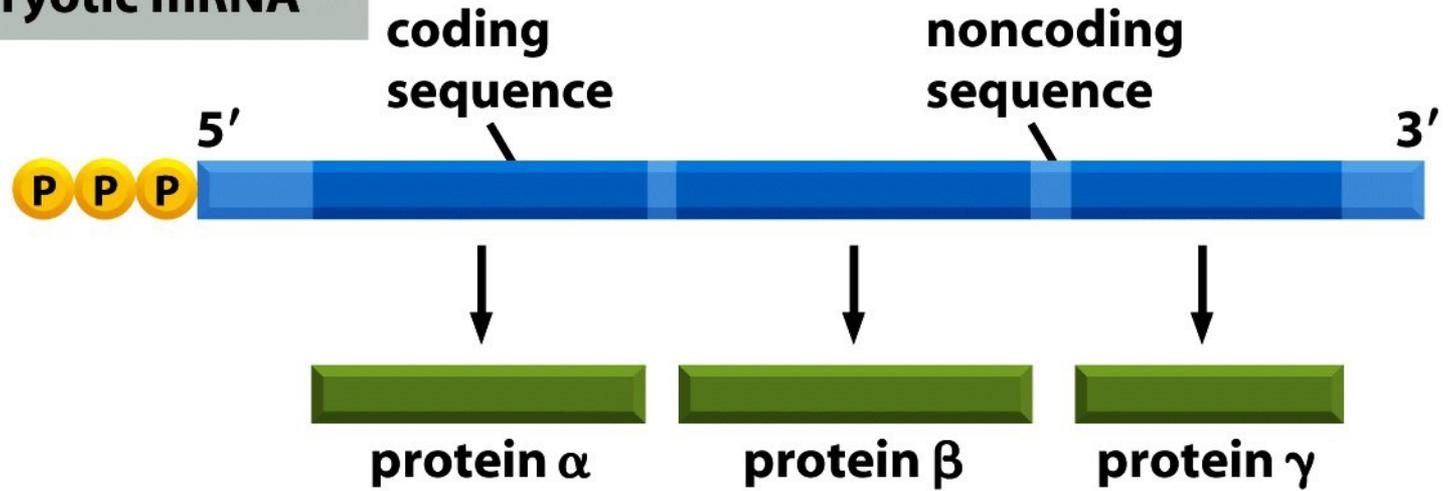
Operoni

- 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

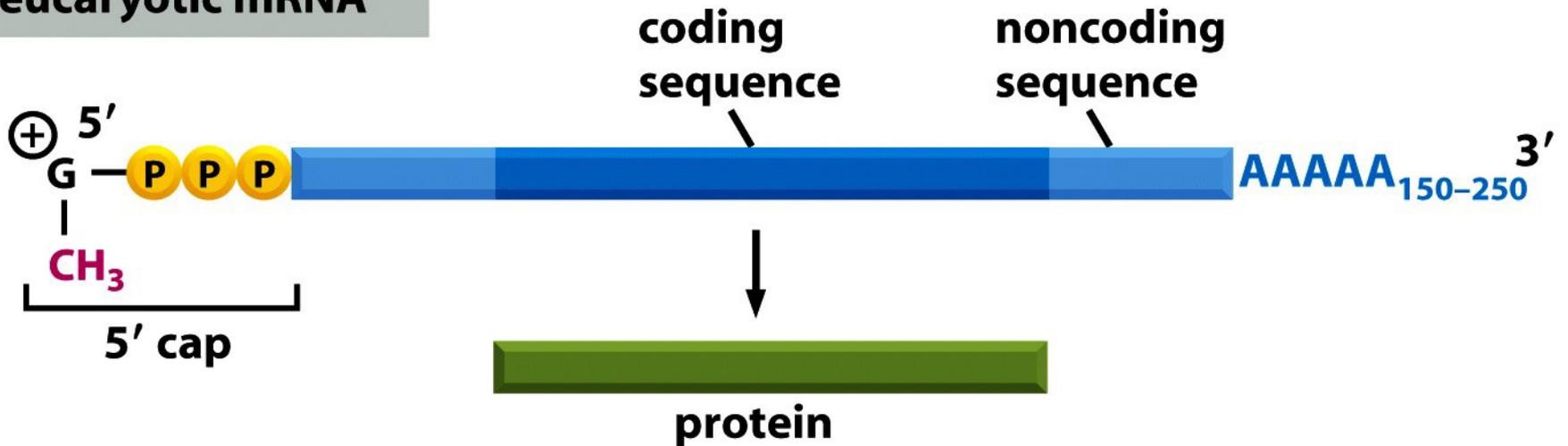
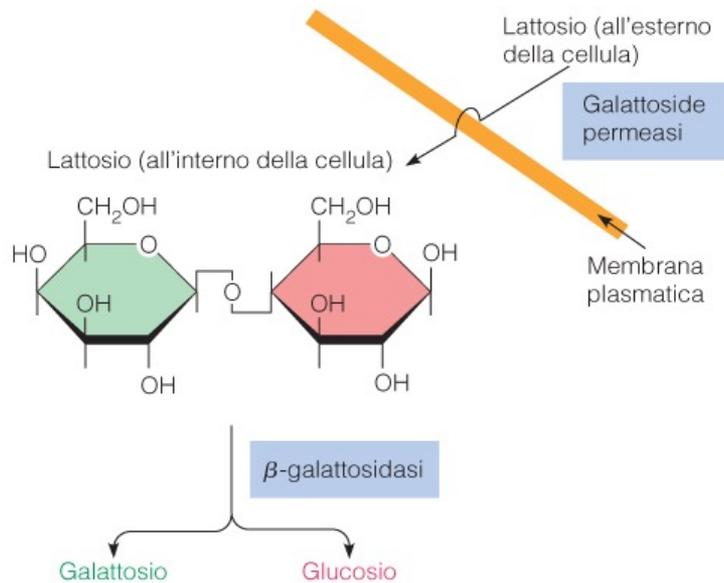


Figure 6-22a *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

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

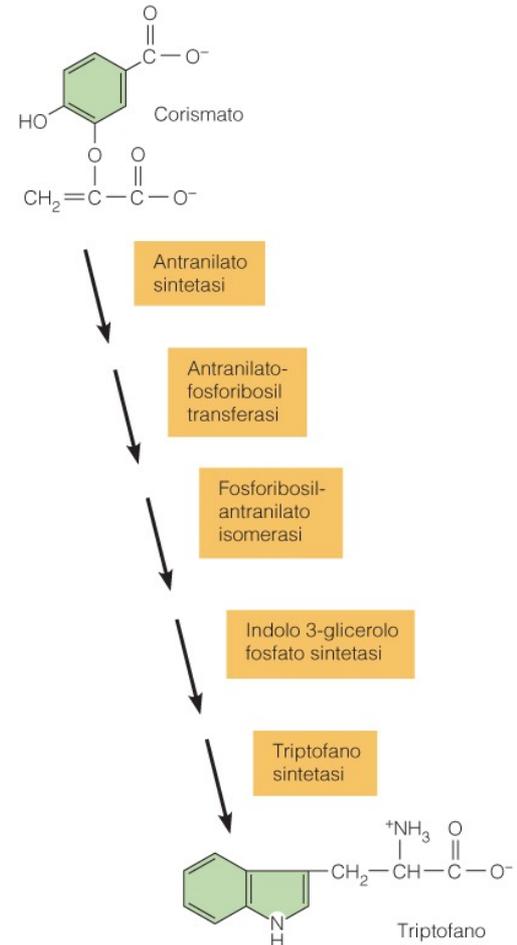
Via catabolica

Induzione da substrato



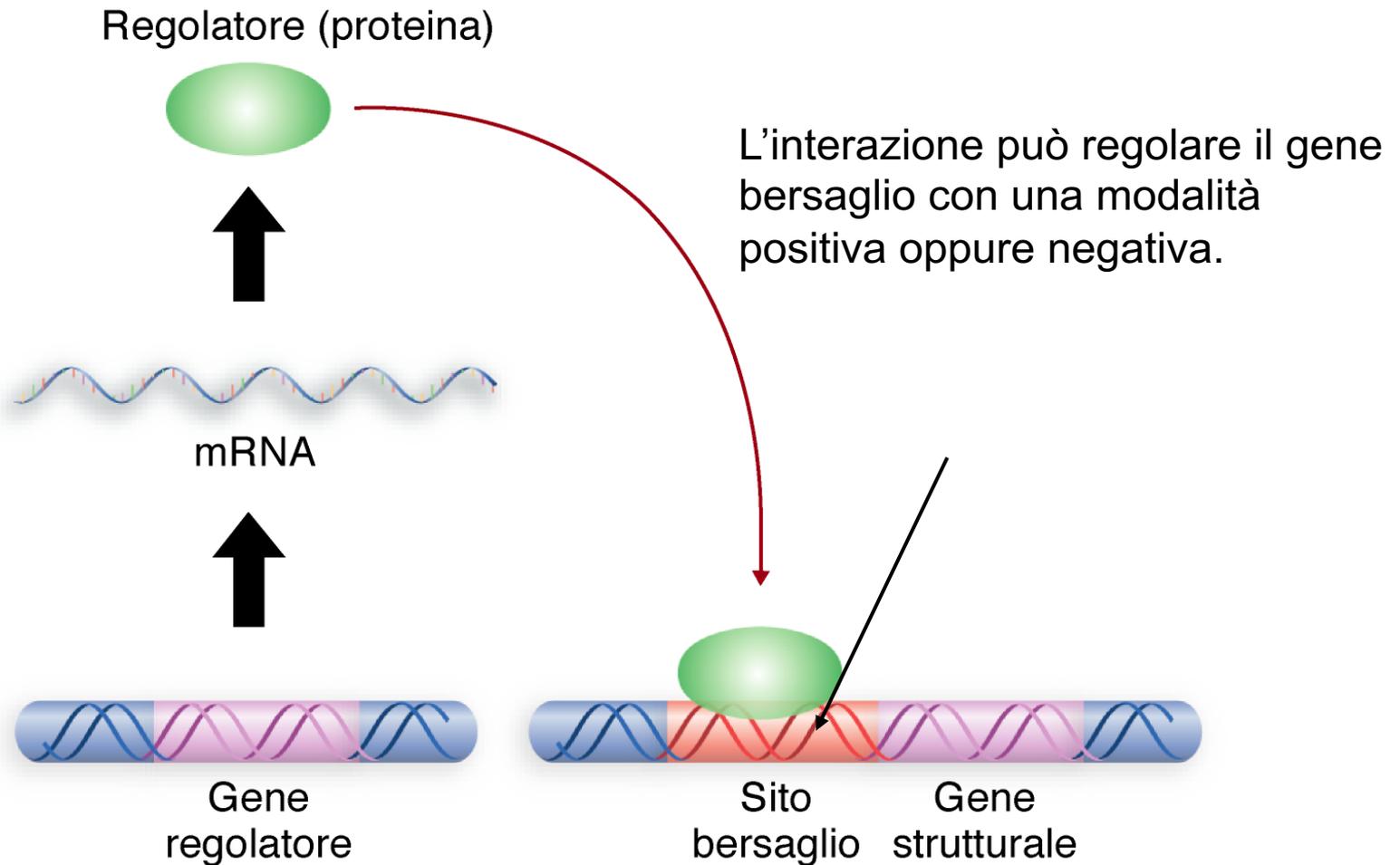
Via anabolica

Repressione da prodotto



Il modello di regolazione più semplice

Un regolatore si lega a un sito bersaglio nel DNA



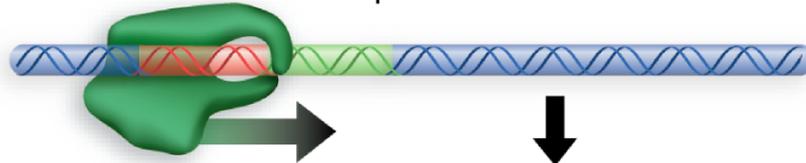
Si può avere un controllo **negativo**, in cui un **repressore** proteico impedisce l'espressione genica.

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

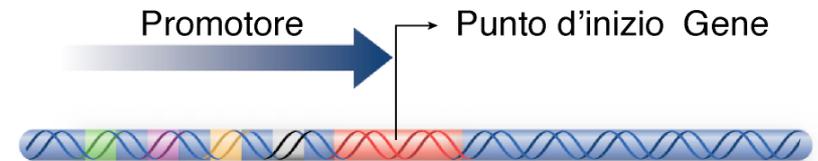
Il gene viene spento quando il repressore si lega all'operatore



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

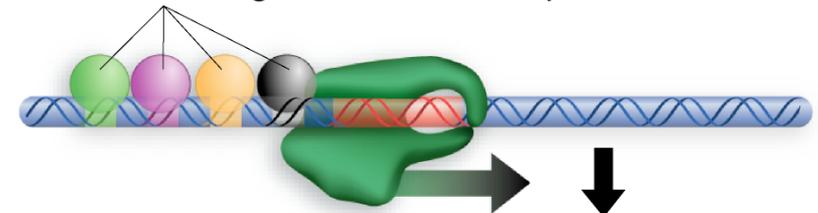
I fattori di trascrizione assistono la RNA polimerasi

Nella condizione di default il gene è spento



Il gene è acceso da attivatori

I fattori interagiscono con l'RNA polimerasi

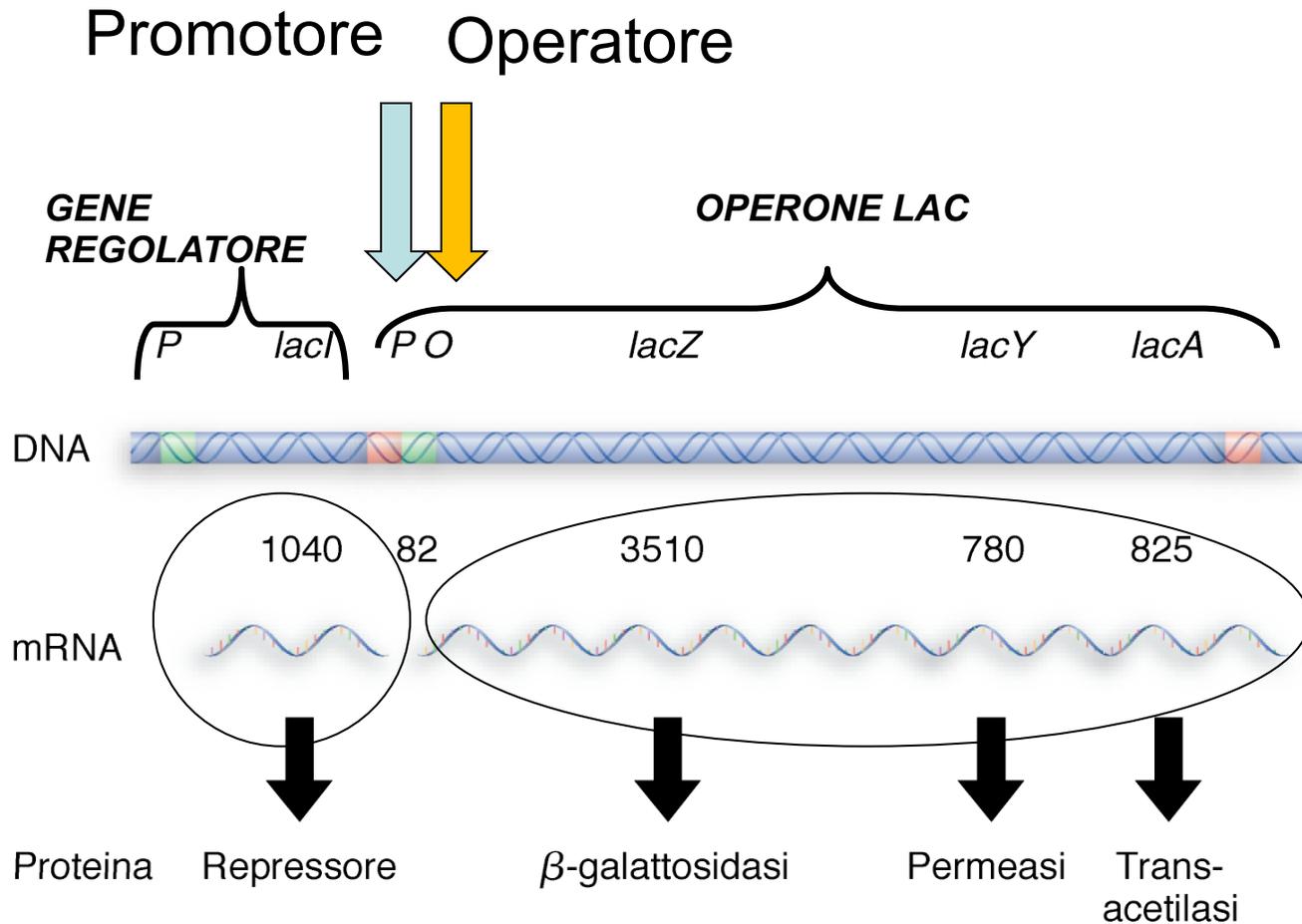


RNA

Proteina

Operone *lac*

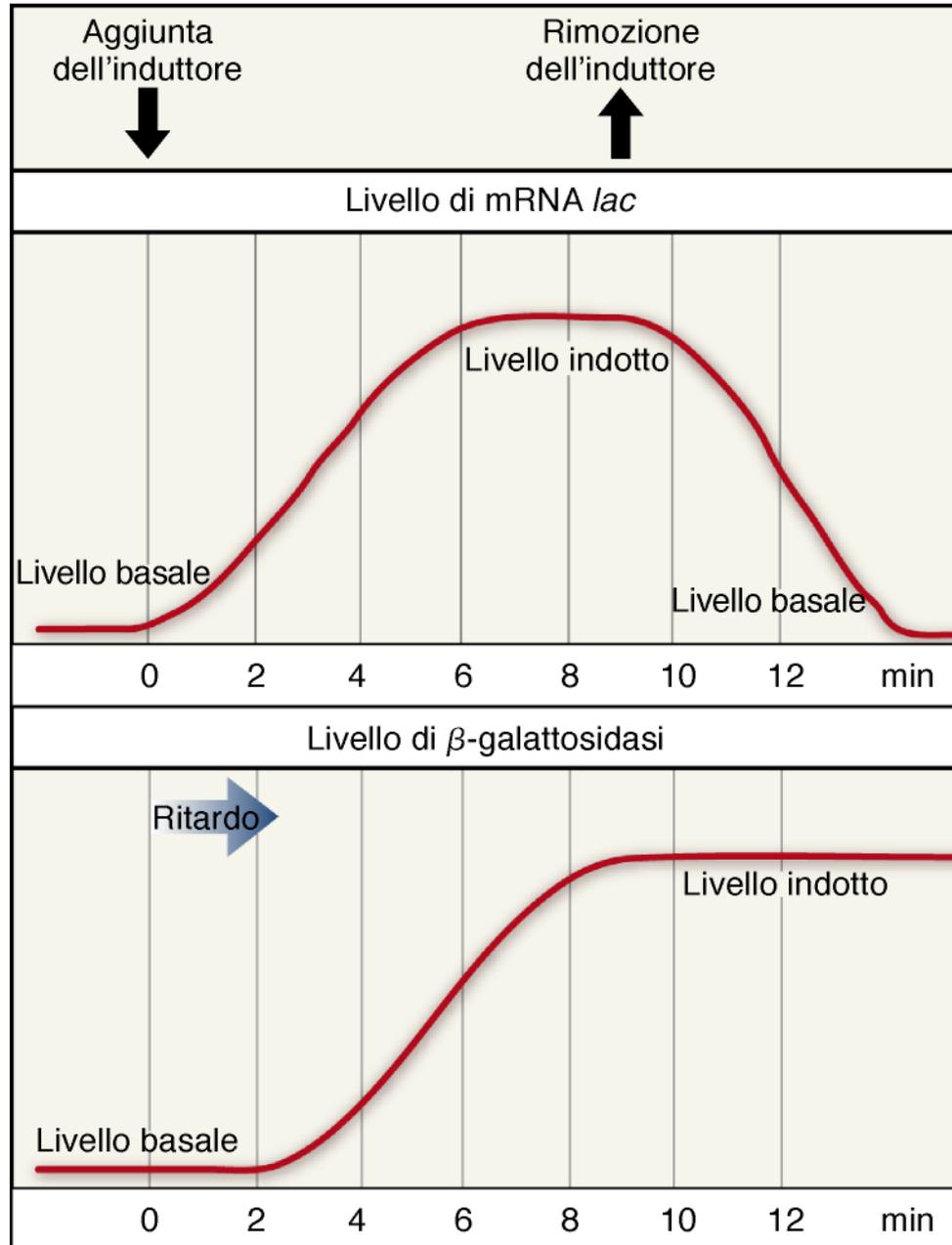
- L'operone *lac* e' costituito da tre geni che codificano per proteine coinvolte nel catabolismo del lattosio
 - **Lac Z** codifica per β -galattosidasi che idrolizza il lattosio in glucosio e galattosio
 - **Lac Y** codifica per il trasportatore di membrana lattosio permeasi
 - **Lac A** codifica per 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”

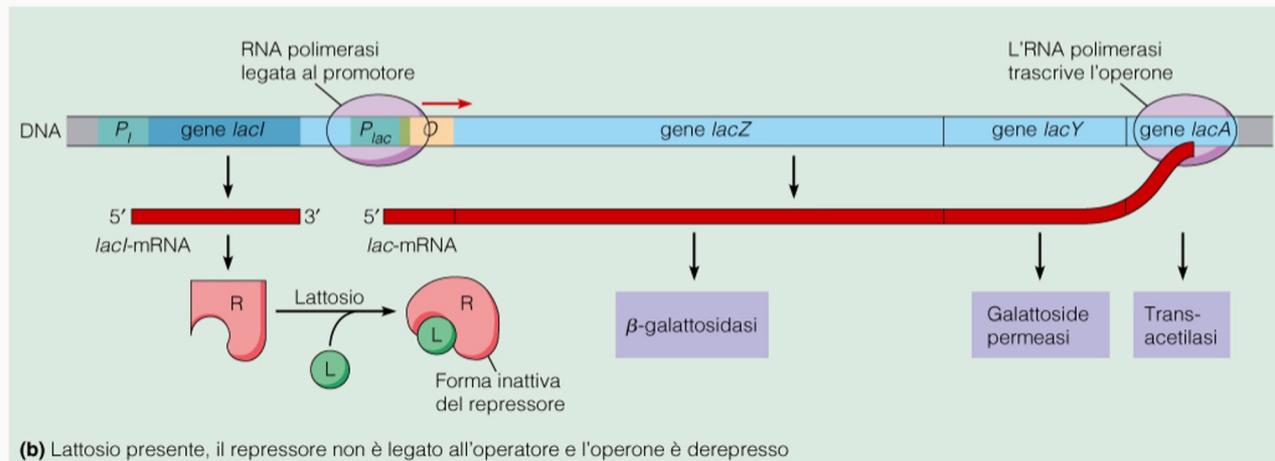
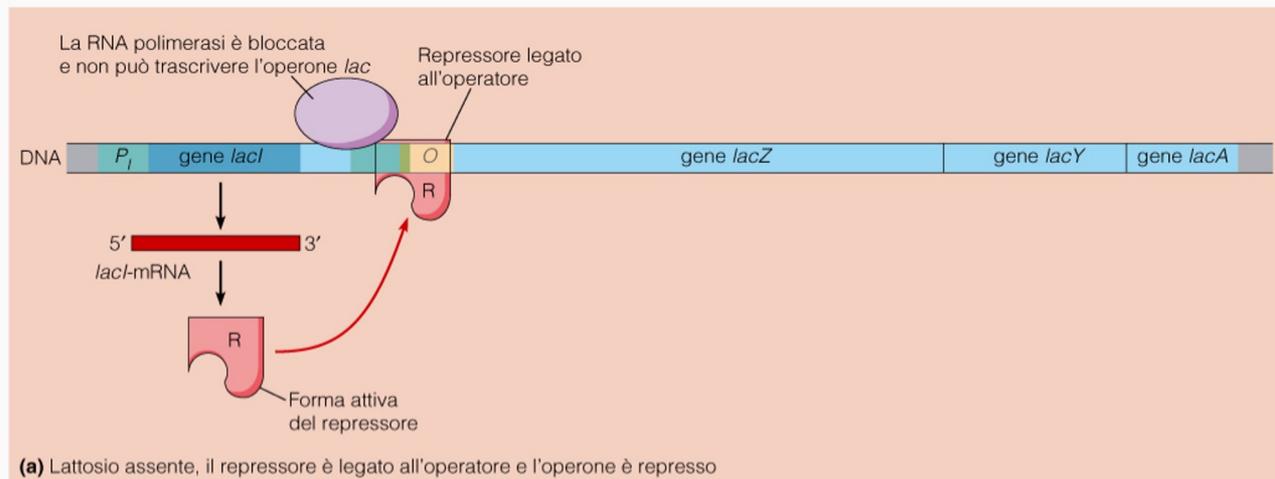


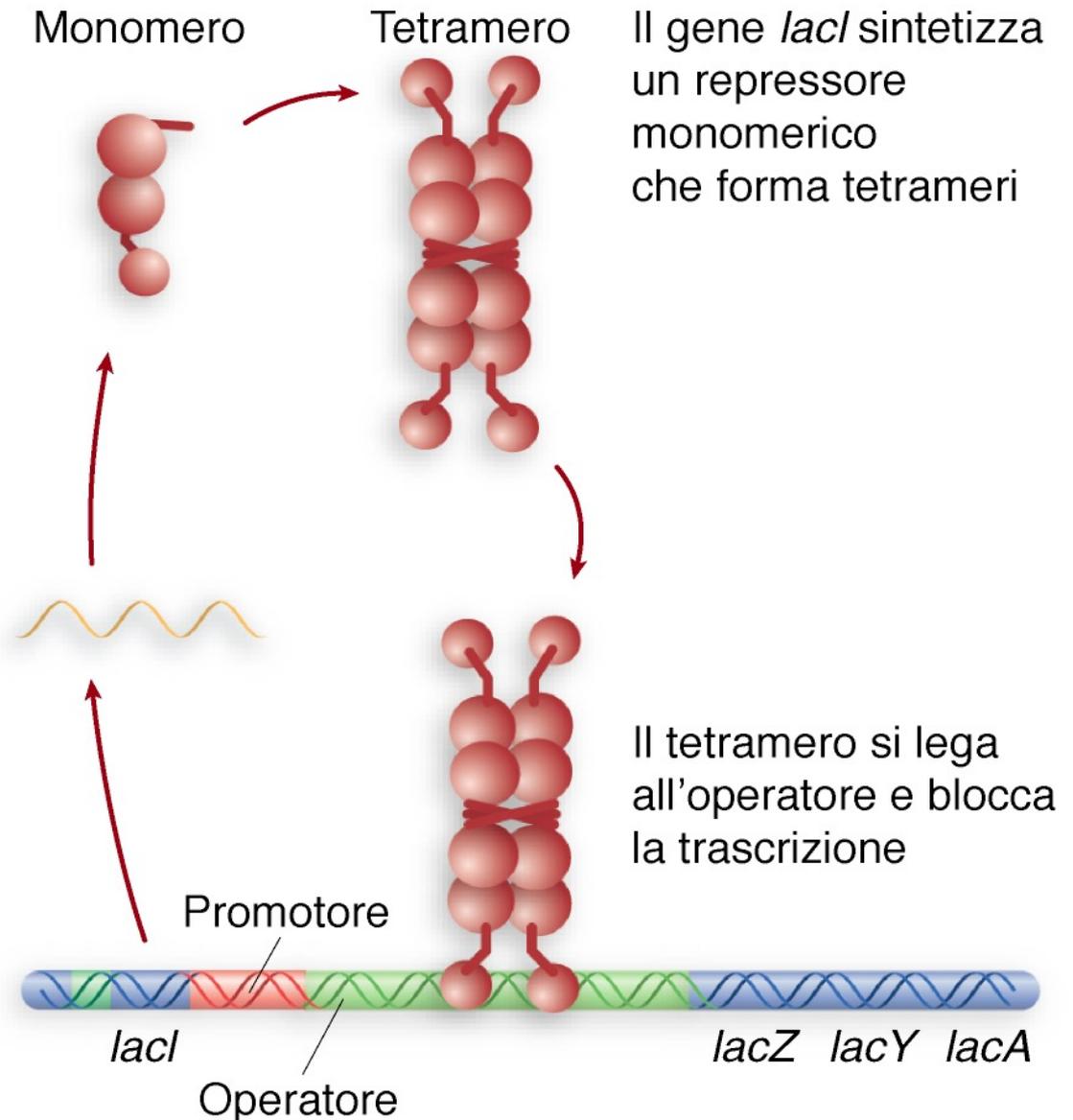
Figura 23-4 Regolazione dell'operone *lac*. La trascrizione dell'operone *lac* è regolata dal legame del repressore (R) all'operatore. (a) In assenza di lattosio, il repressore rimane legato all'operatore e la RNA polime-

rasi 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

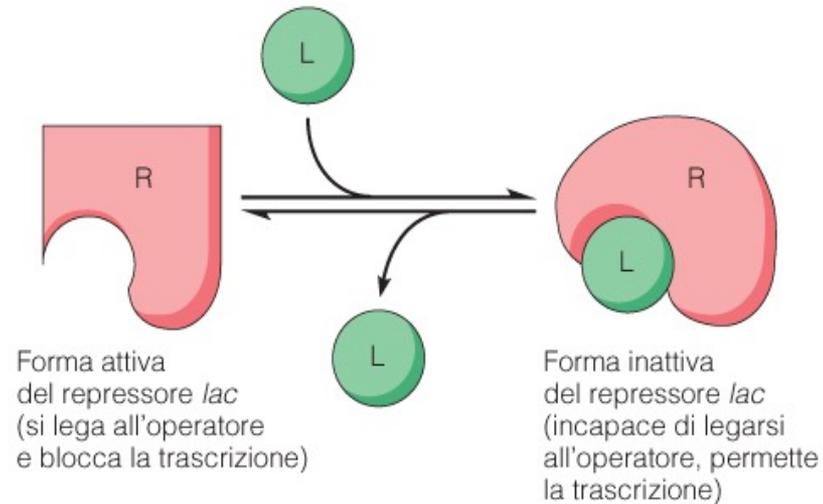
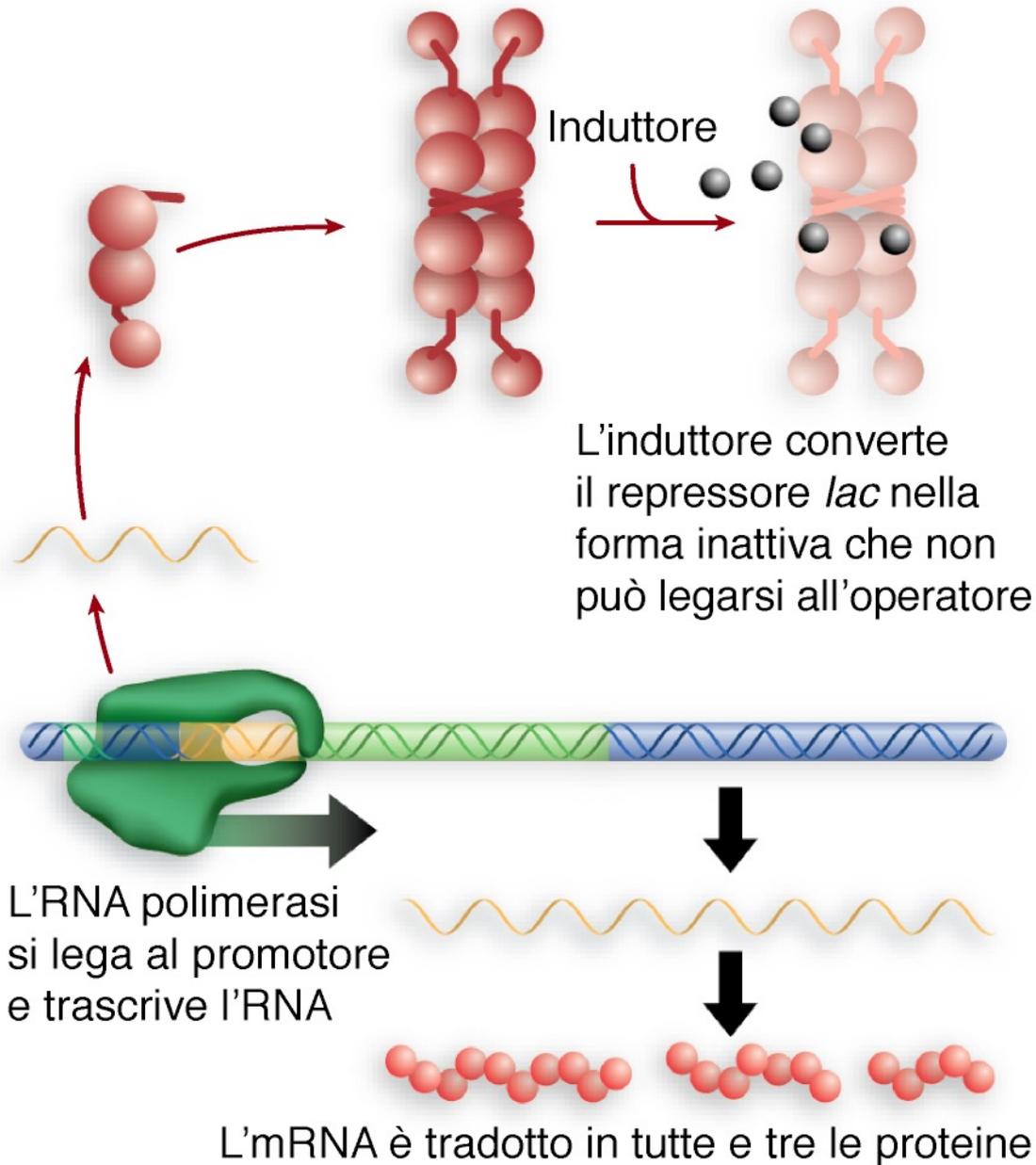


Figura 23-5 **Regolazione allosterica del repressore *lac*.** Il repressore *lac* (R) è una proteina allosterica, capace di conversione reversibile fra due forme alternative. In assenza dell'effettore allolattosio (L), la proteina assume la forma che è in grado di legare l'operatore. In presenza dell'effettore, 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

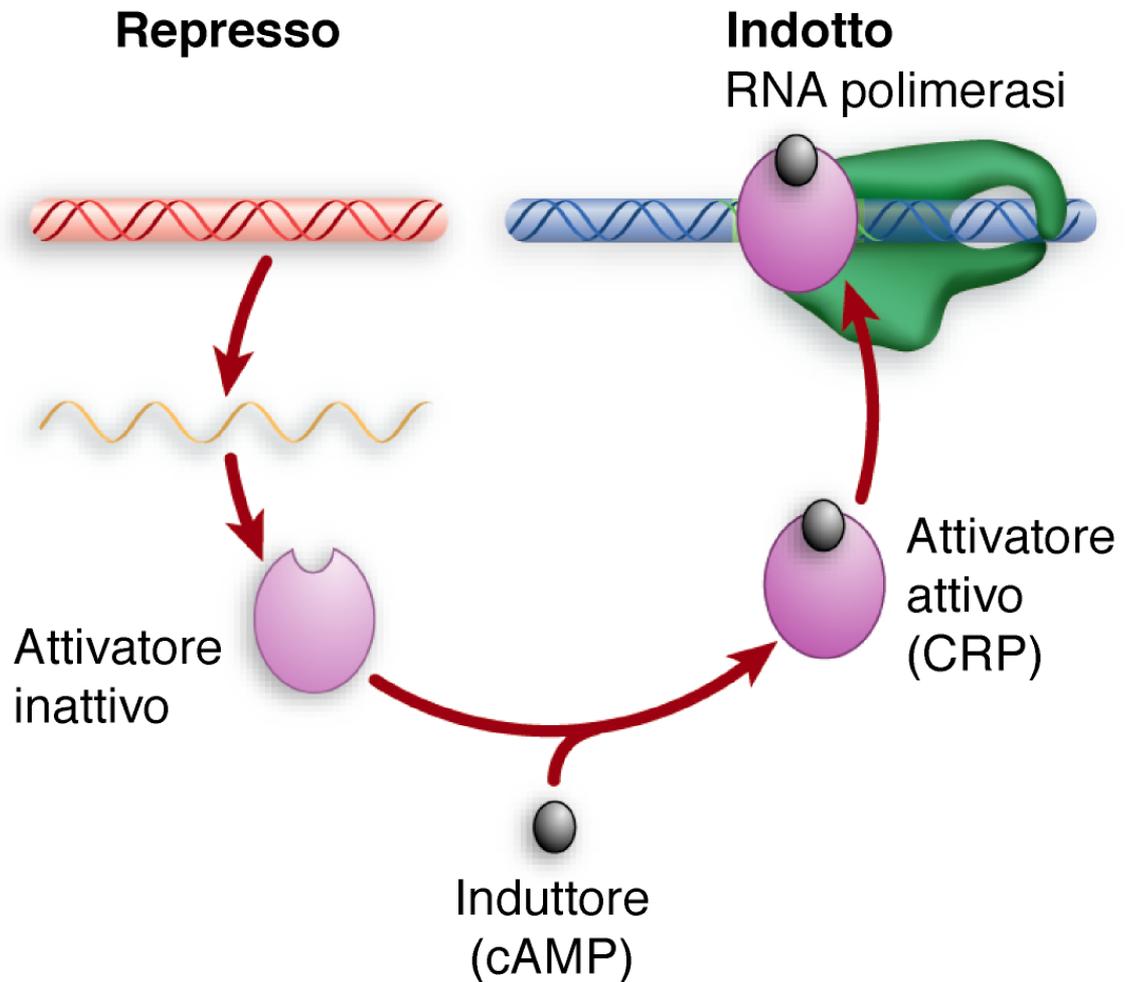
In presenza di lattosio la trascrizione dell'operone viene attivata



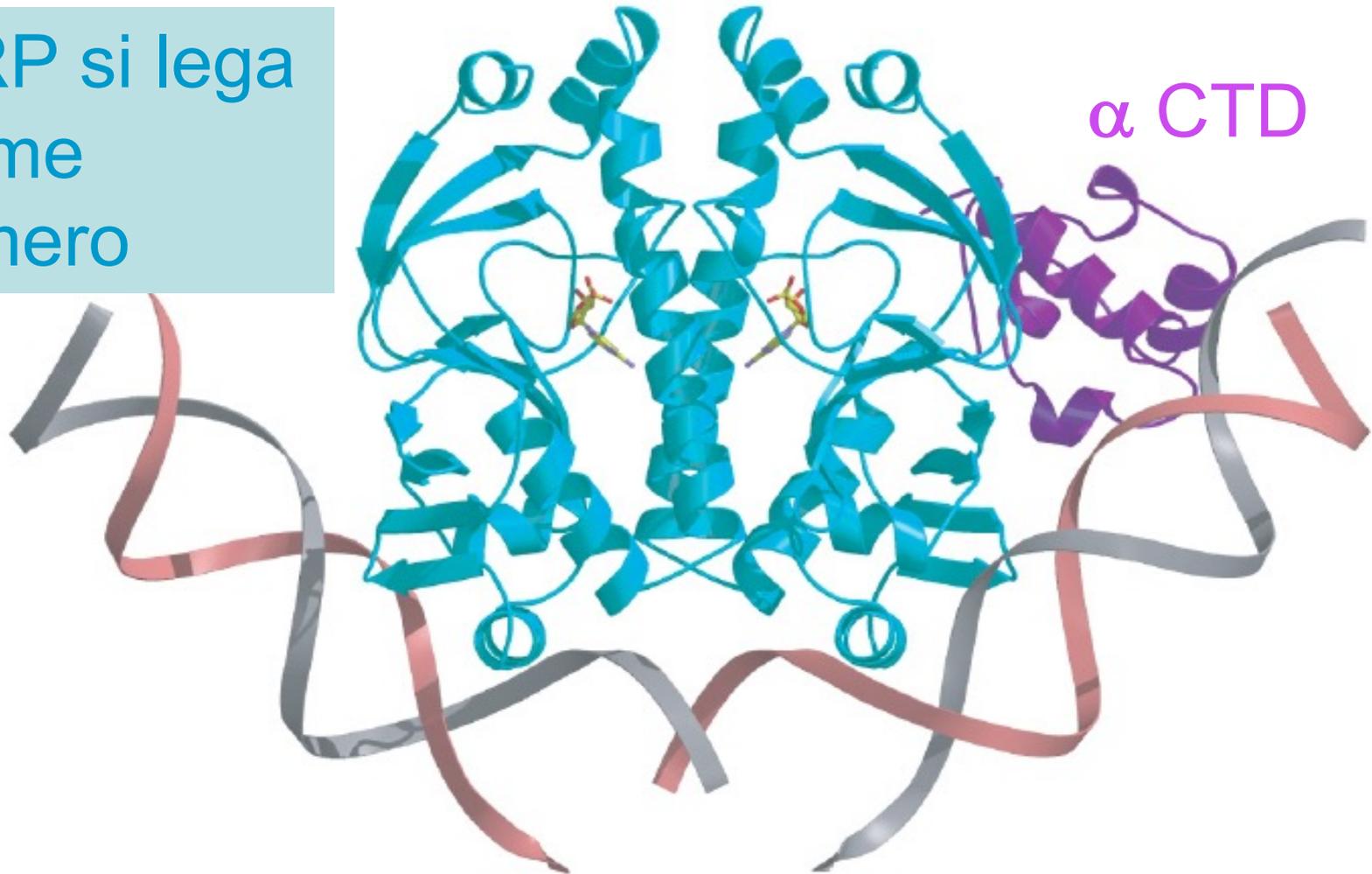
- La regolazione dell'operone lac ha poi altri livelli di complessità, in quanto la sua espressione è regolata da condizioni ambientali che non comprendono solo la presenza del lattosio
- E. coli può utilizzare sia il glucosio (monosaccaride) che il lattosio (disaccaride)
- In presenza di entrambi gli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

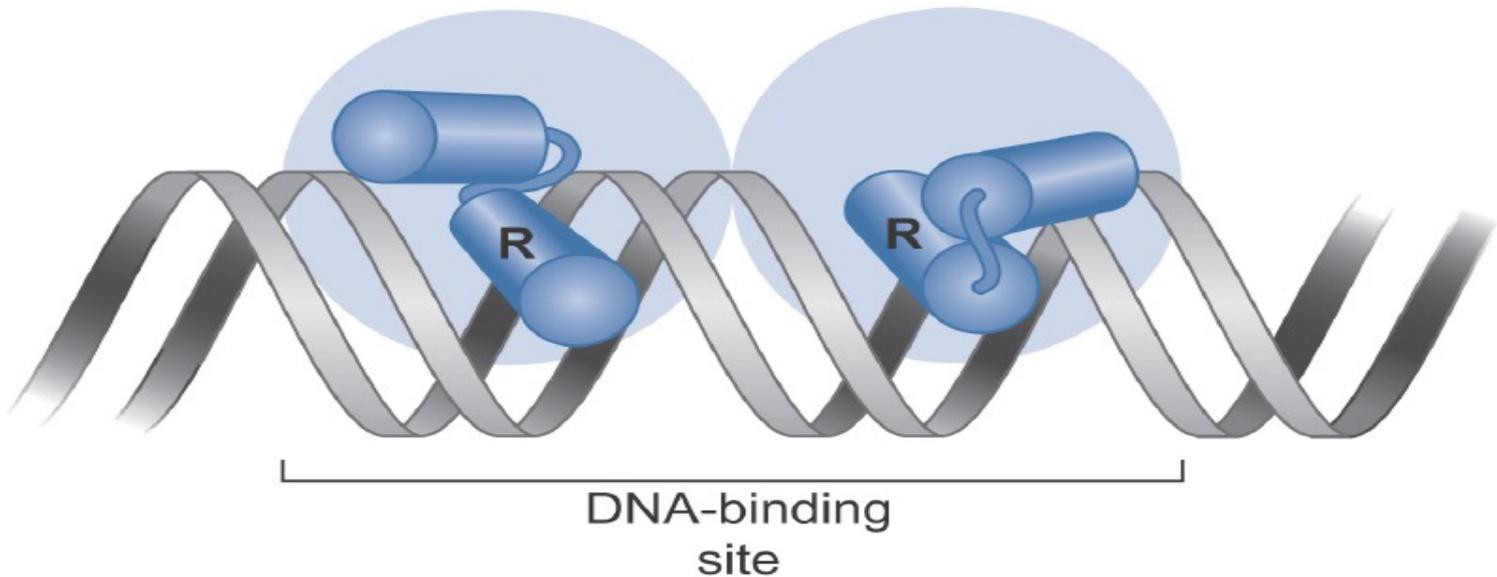


CRP si lega
come
dimero



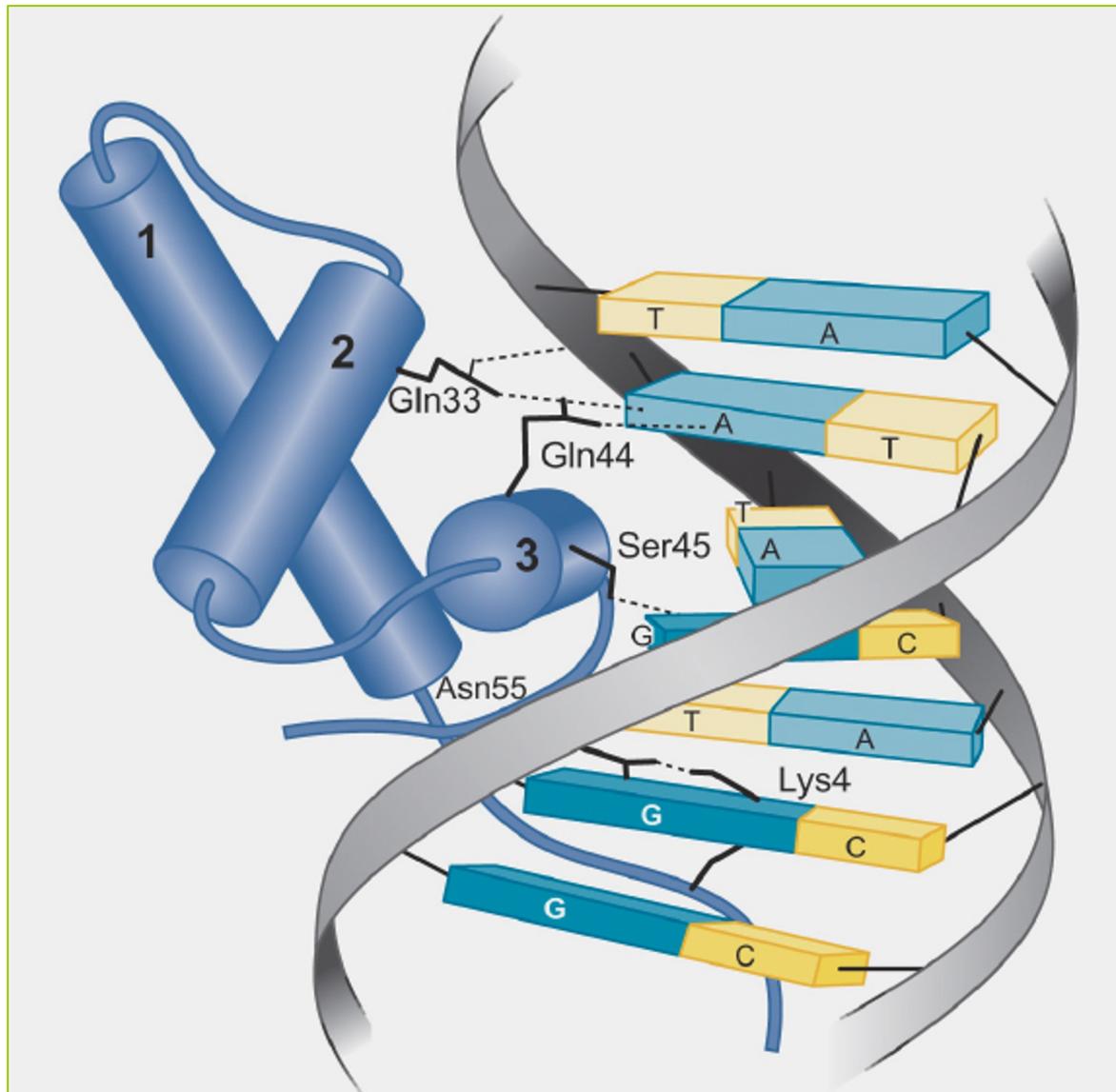
CRP presenta un sito attivatorio ed un sito di legame al DNA

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.

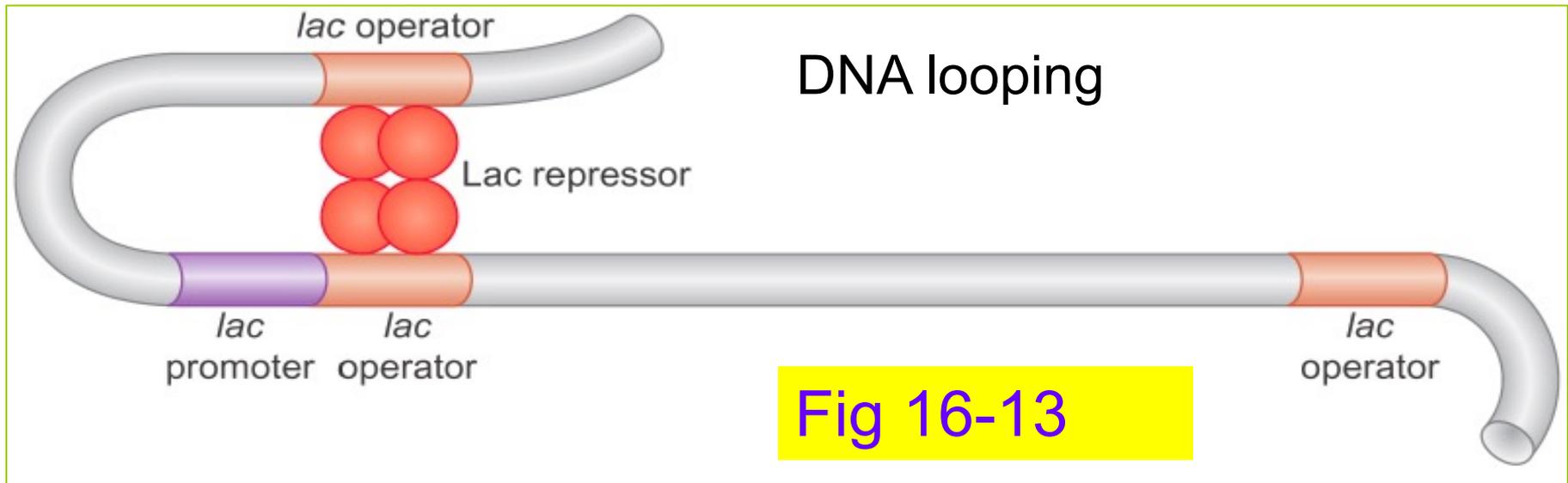
DNA binding by a helix-turn-helix motif



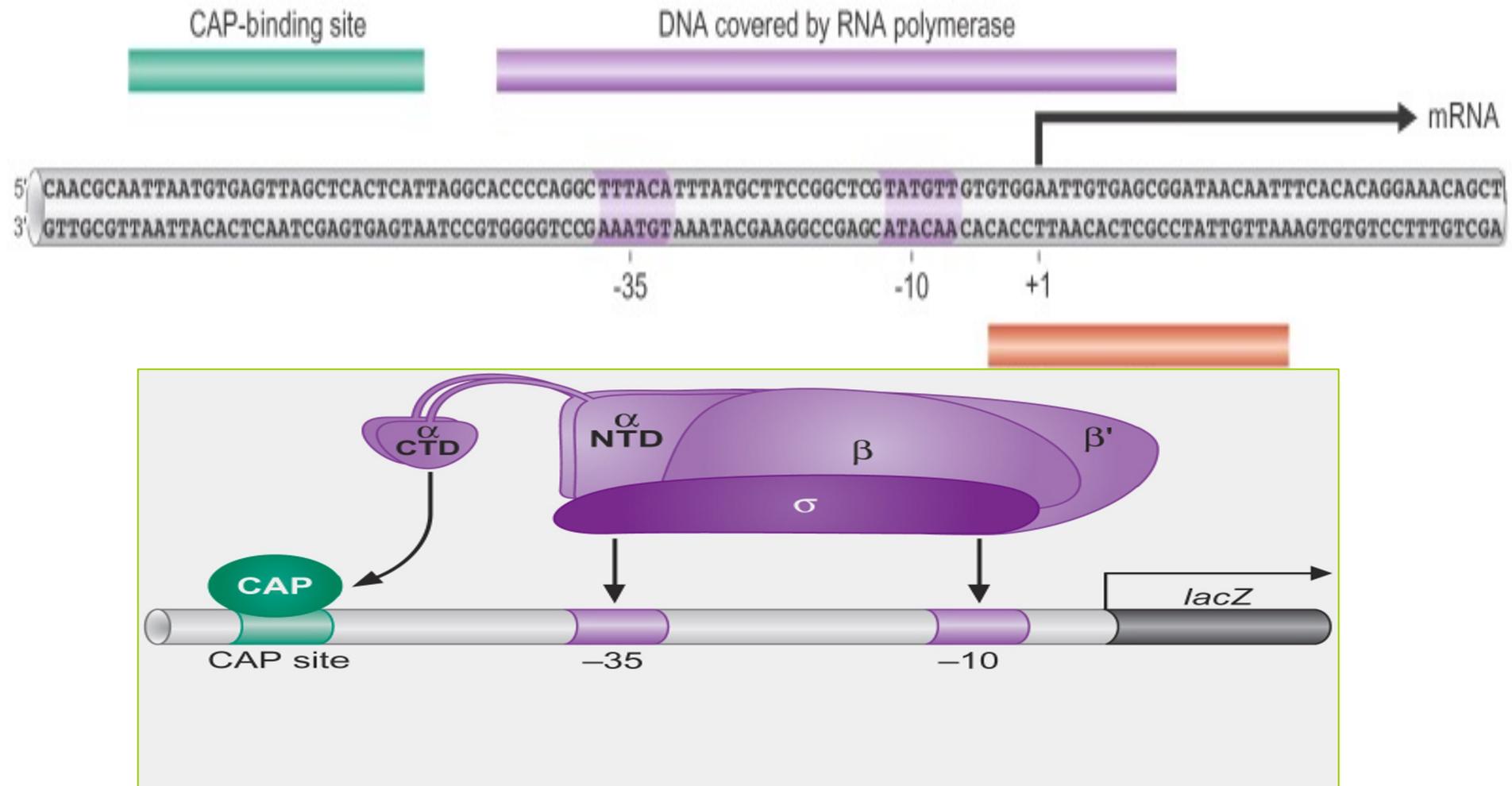
Hydrogen Bonds
between λ repressor
and the major
groove of the
operator.

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

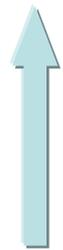
Lac repressor binds as a tetramer, with each operator is contacted by a repressor dimer respectively.



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



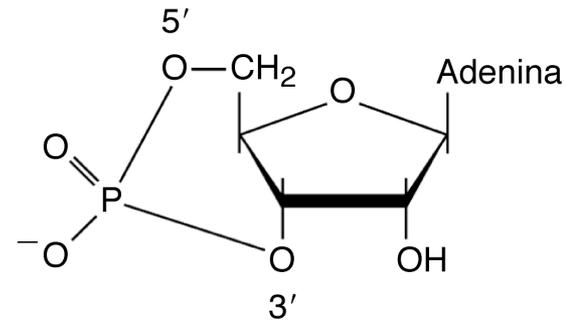
La concentrazione di cAMP dipende dal glucosio. Il glucosio infatti inibisce l'adenilato ciclasi, l'enzima che converte l'ATP in cAMP.



Glucosio



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



Ridotta attivazione
operone *Lac*



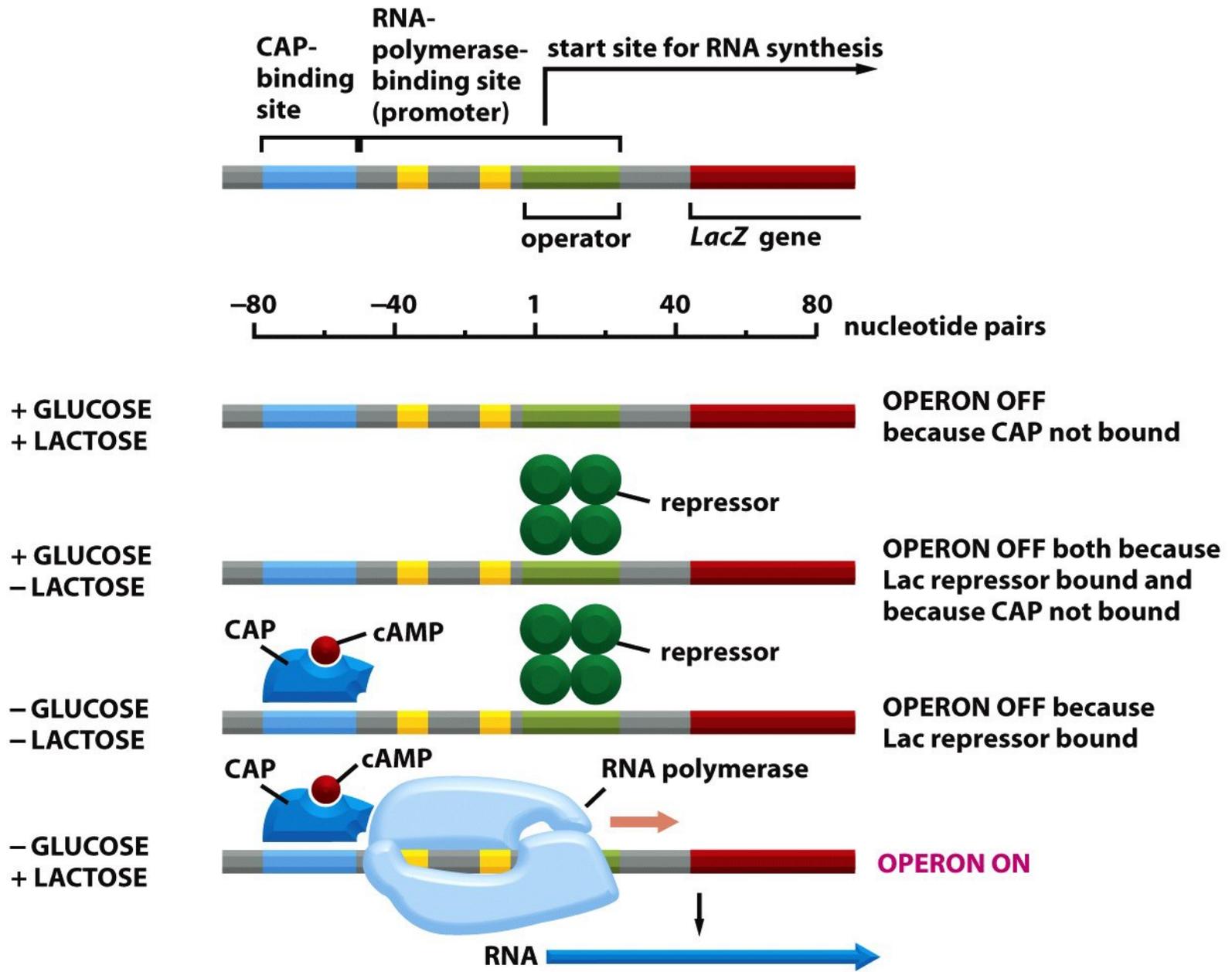


Figure 7-39 Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)

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	Trascrizione

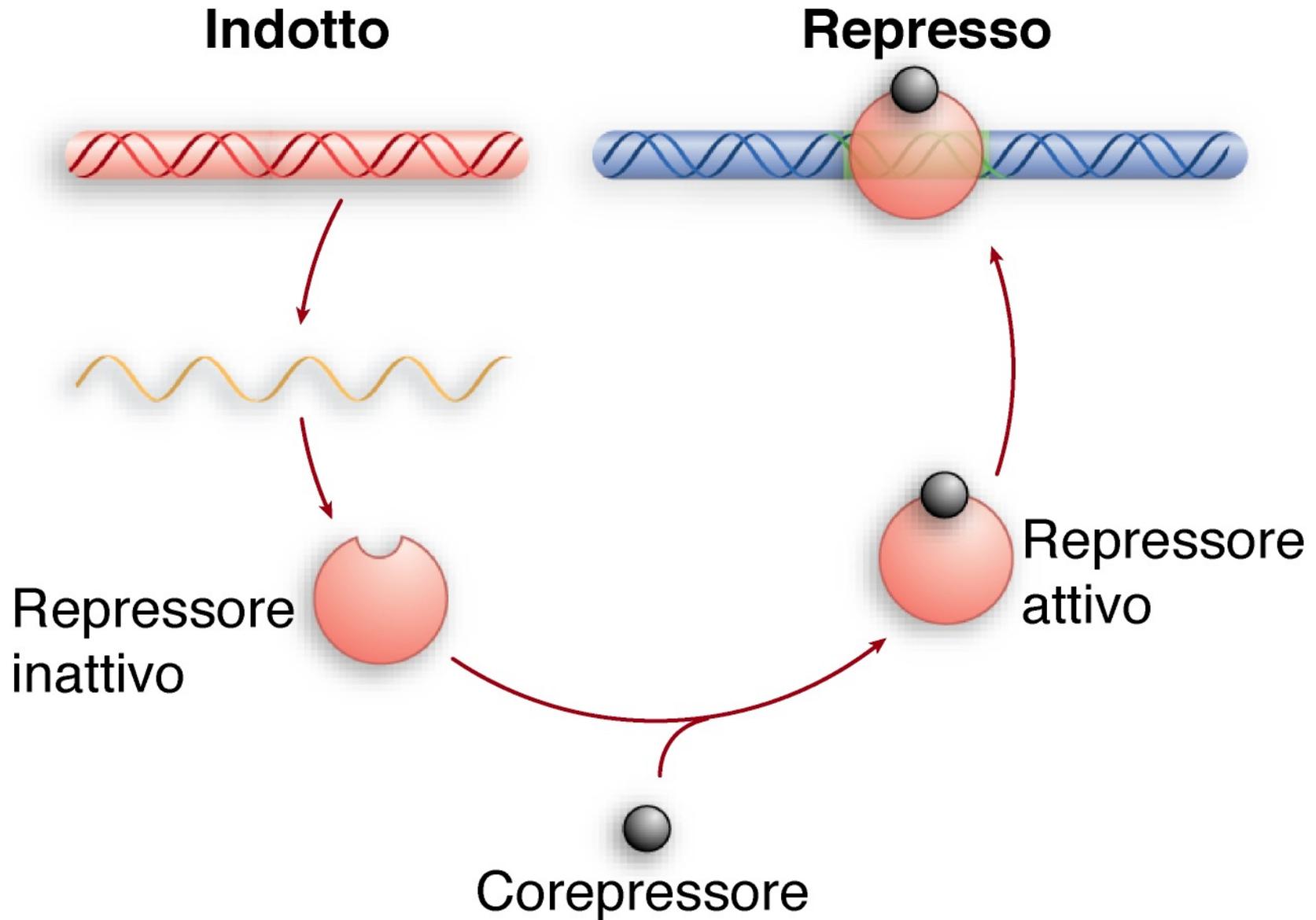
Combinatorial Control: CAP controls other genes as well.

- 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

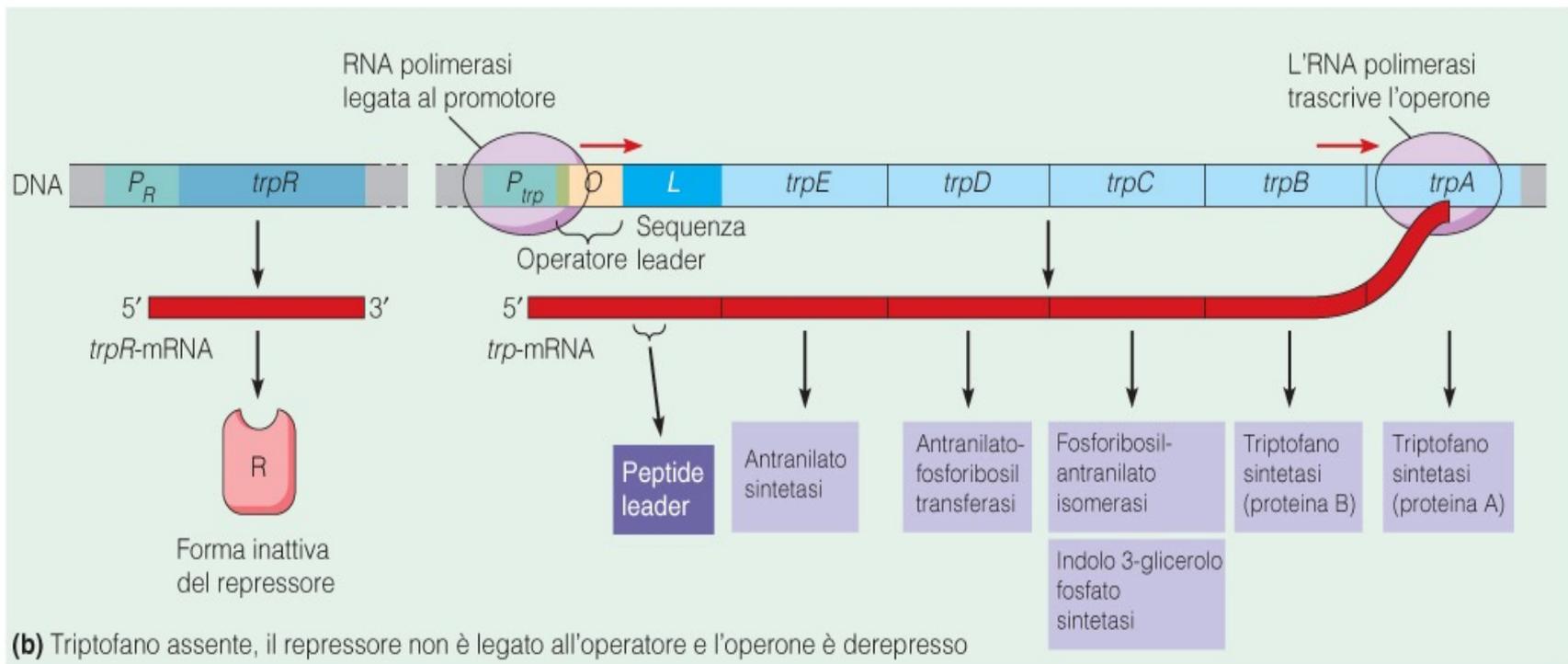
- La regolazione degli operoni anabolici è opposta a quella degli operoni catabolici (es. *lac*).
- Gli enzimi non devono essere prodotti quando è presente il prodotto finale.
- Sistema modello è l'operone triptofano (*trp* operon) di *E. coli*.
- Regolazione negativa; se il triptofano è presente interagisce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

Un corepressore attiva un repressore

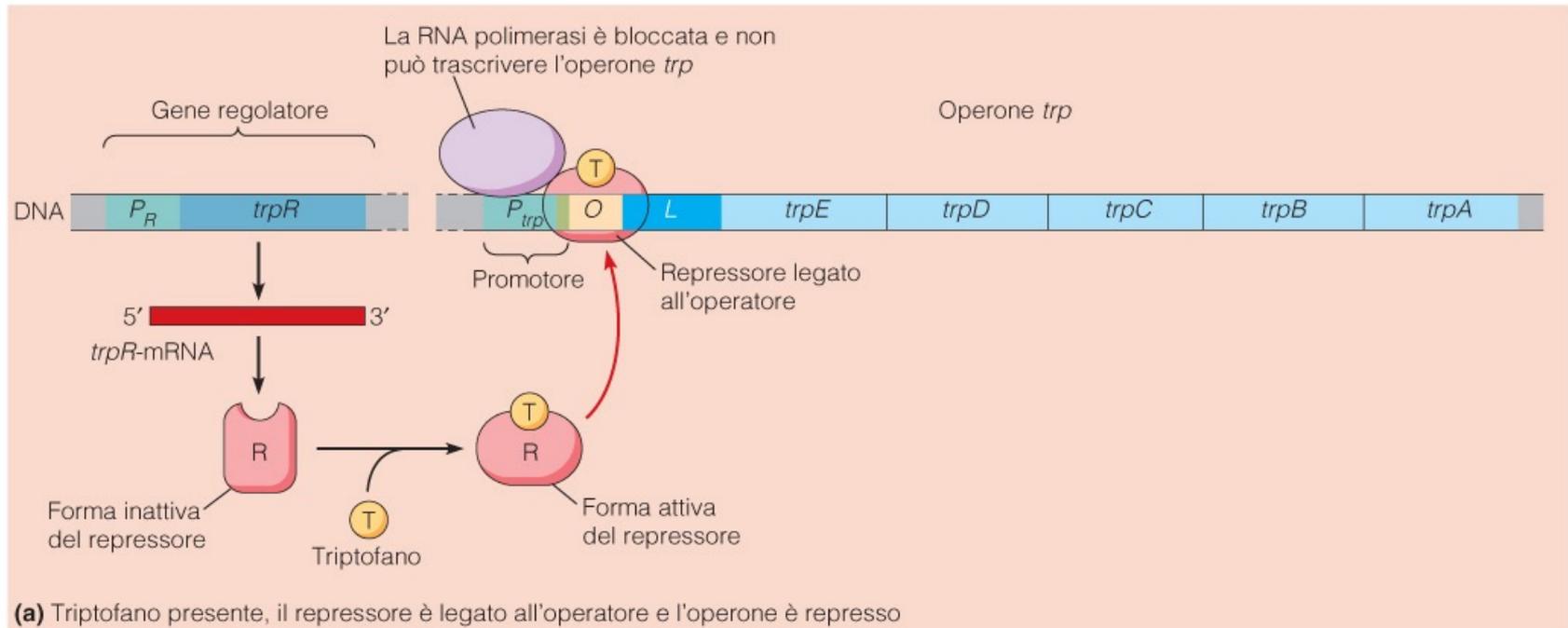


I geni coinvolti nella sintesi del triptofano: un operone reprimibile.

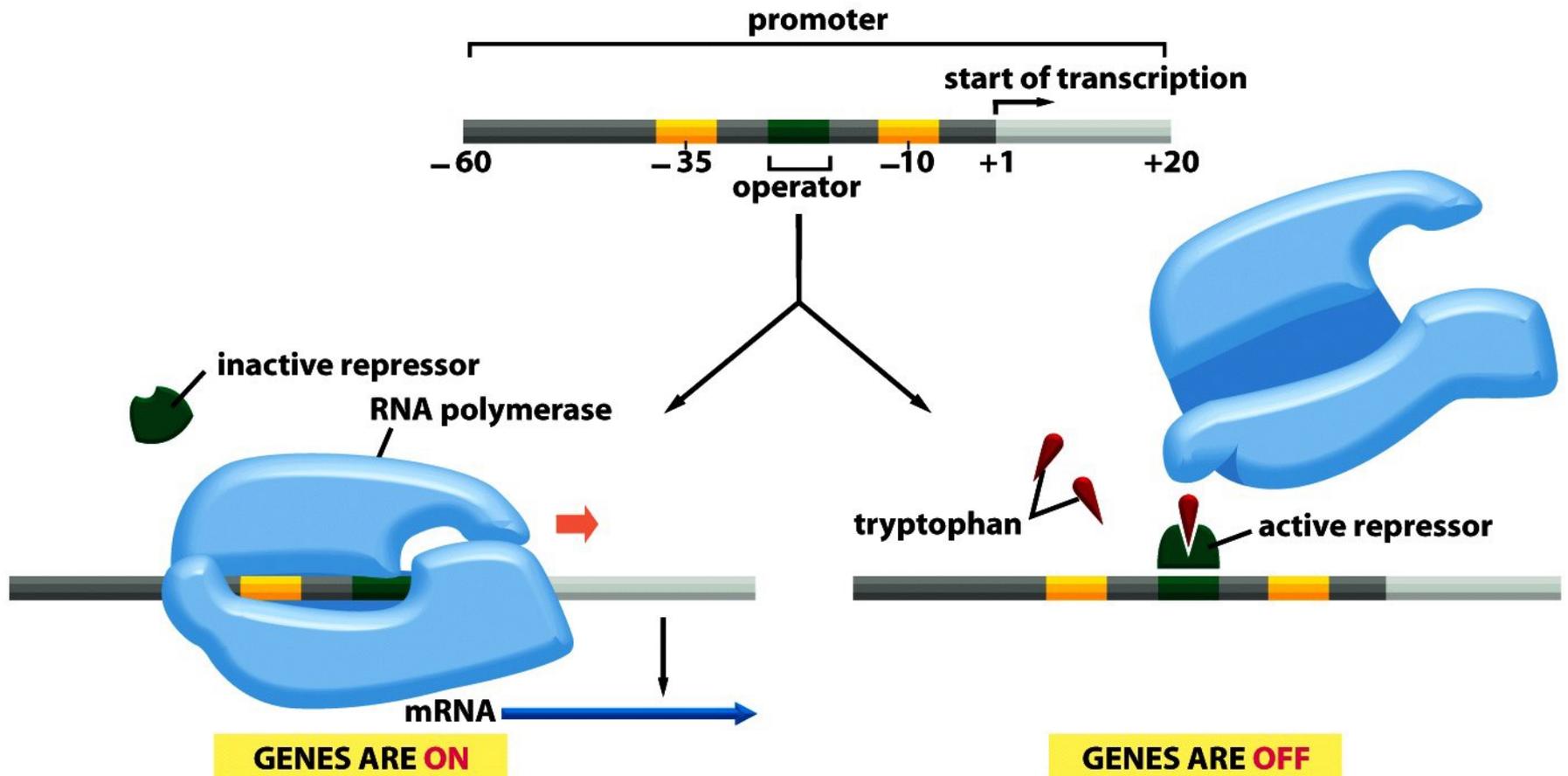
In assenza di triptofano



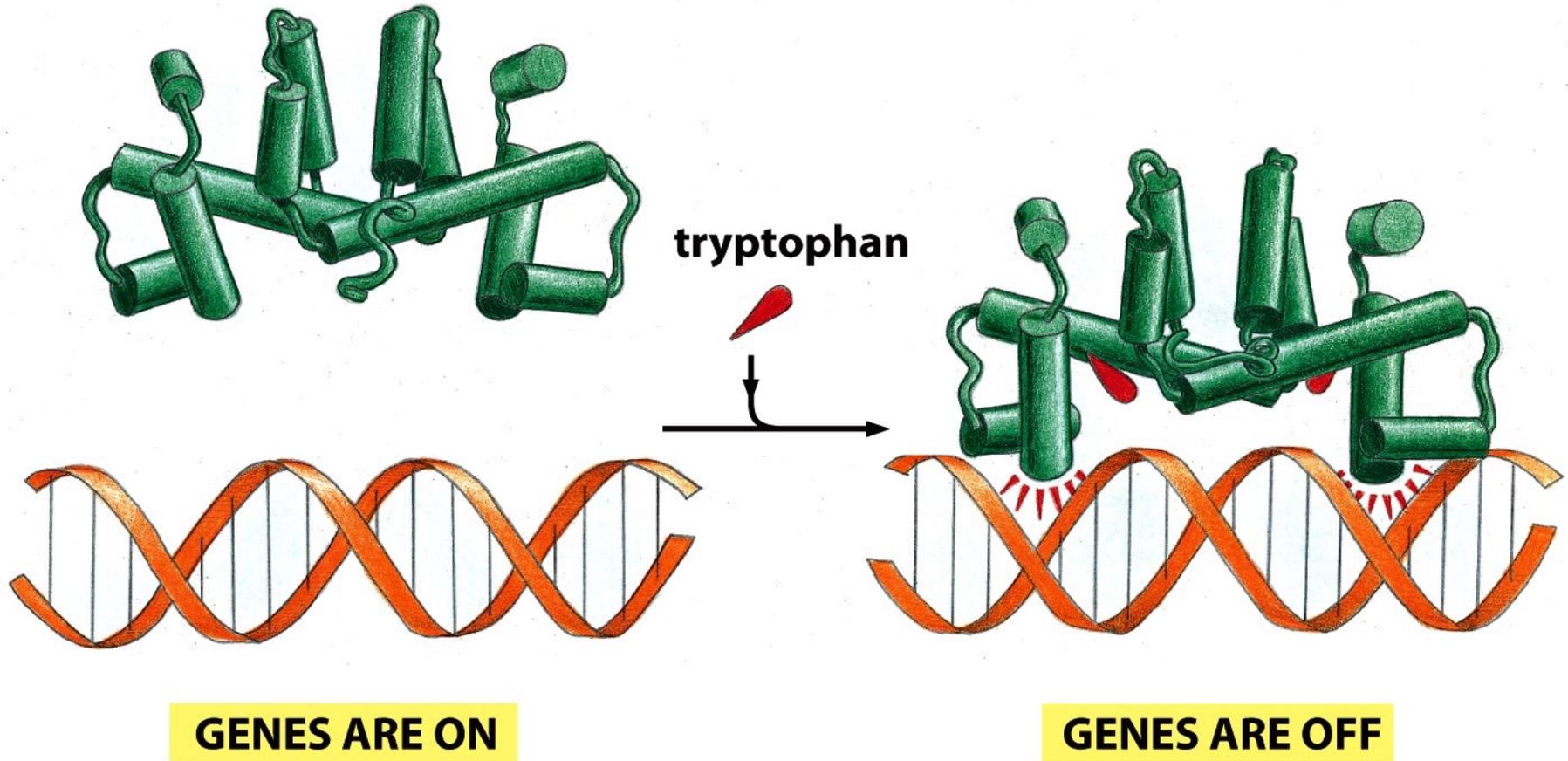
In presenza di triptofano l'operone è represso



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



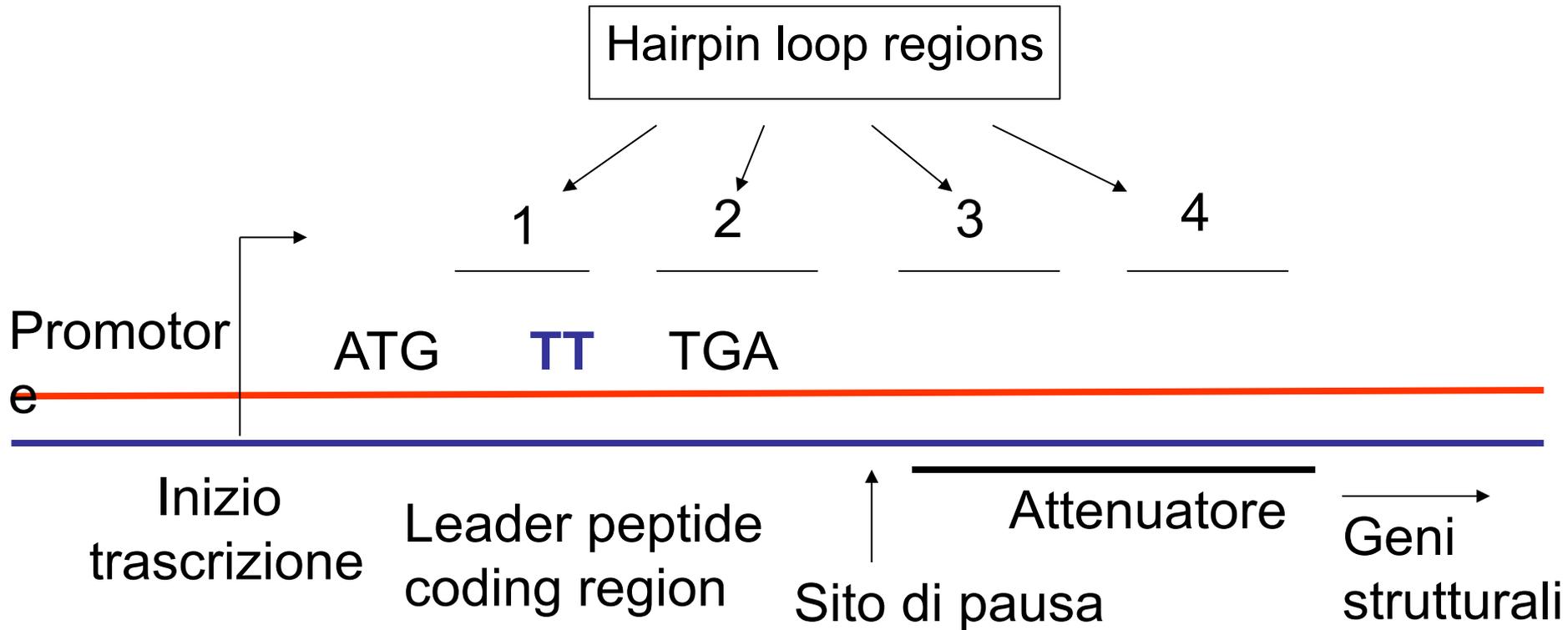
Il triptofano provoca un cambiamento conformazionale del repressore che gli consente di legarsi al DNA



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^{trp} è scarso
- Il ribosoma cerca di tradurre il peptide codificato dalla sequenza leader ma si ferma per carenza di triptofano-tRNA^{trp}
- Questo fa continuare la trascrizione

Struttura del Leader peptide (*trpL*)

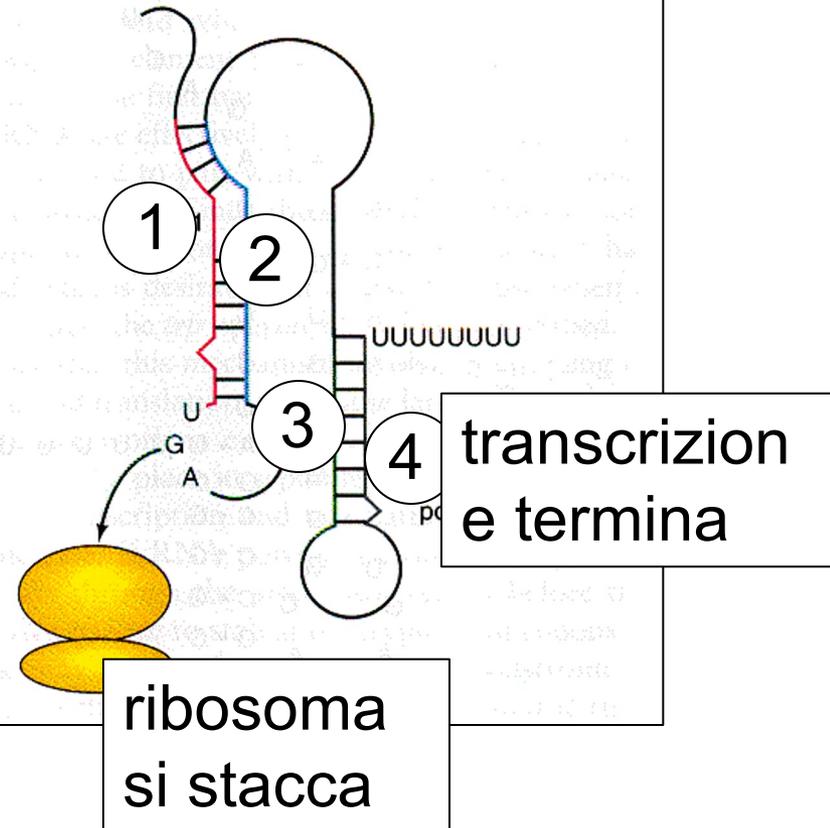
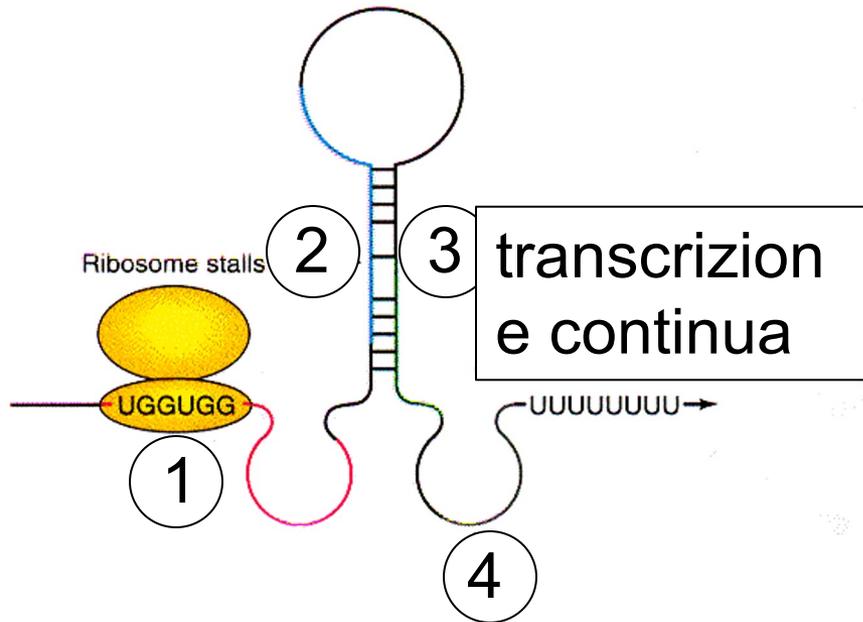


TT = 2 codoni trp

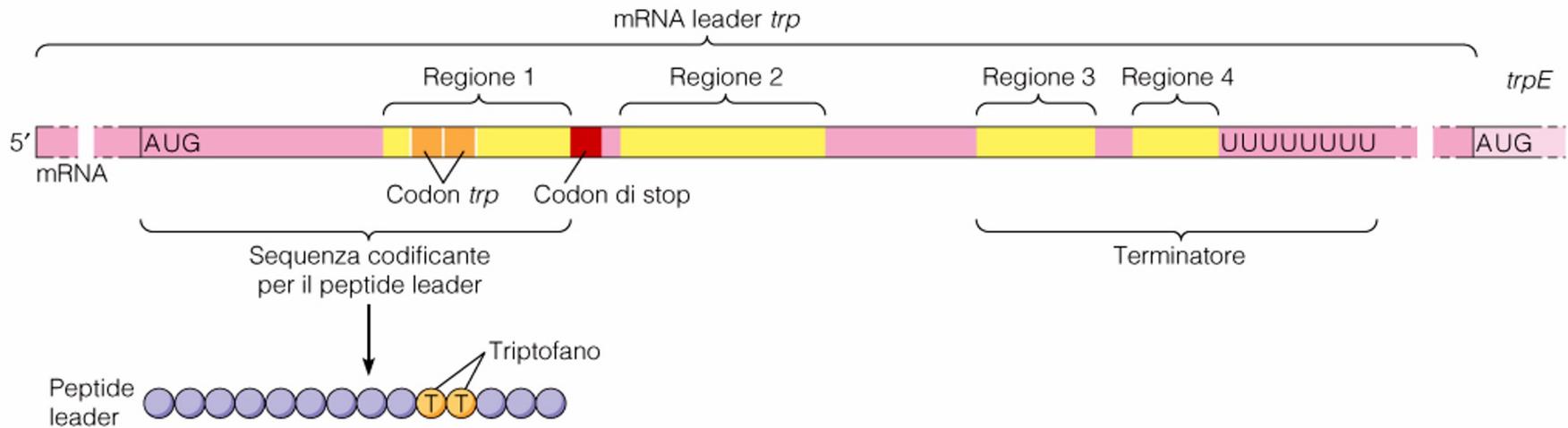
Attenuazione: usa la traduzione per verificare il livello del prodotto finale

Mancanza di triptofano

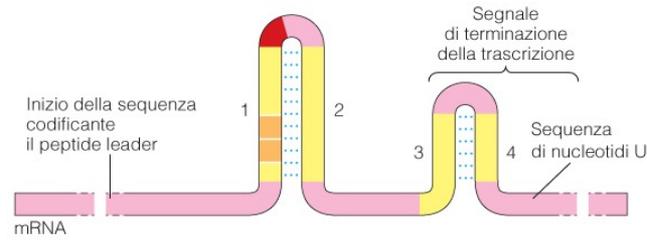
Abbondanza di triptofano



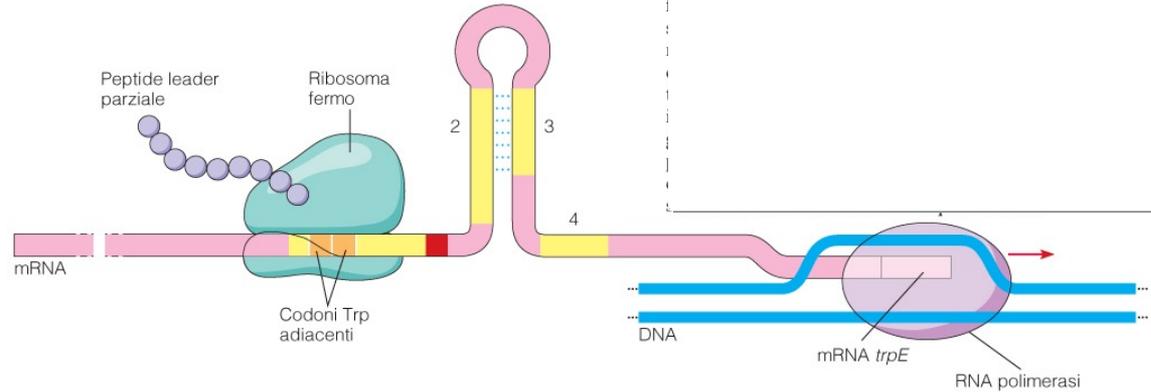
Regione coinvolta nel processo di attenuazione



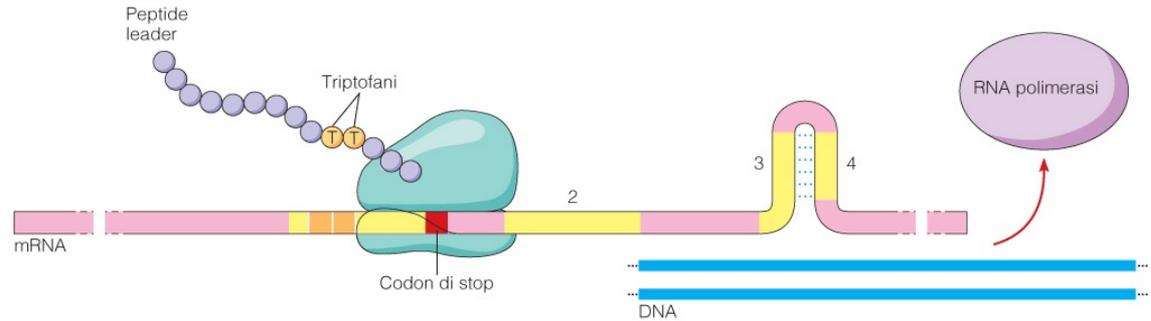
L'attenuazione



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

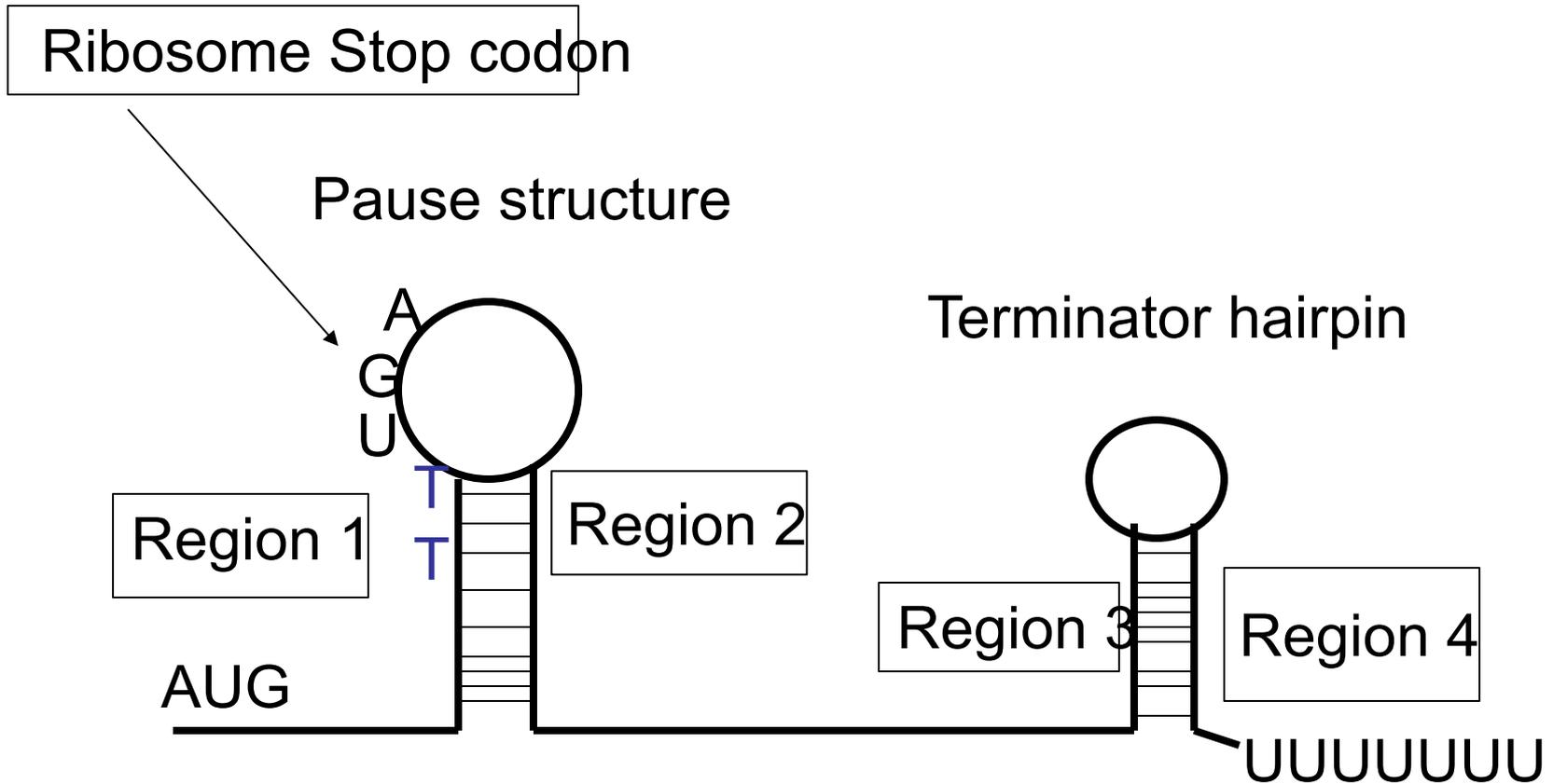


(b) Quando il triptofano è scarso, il ribosoma rallenta permettendo la formazione della forcina 2-3; l'RNA polimerasi continua la trascrizione.



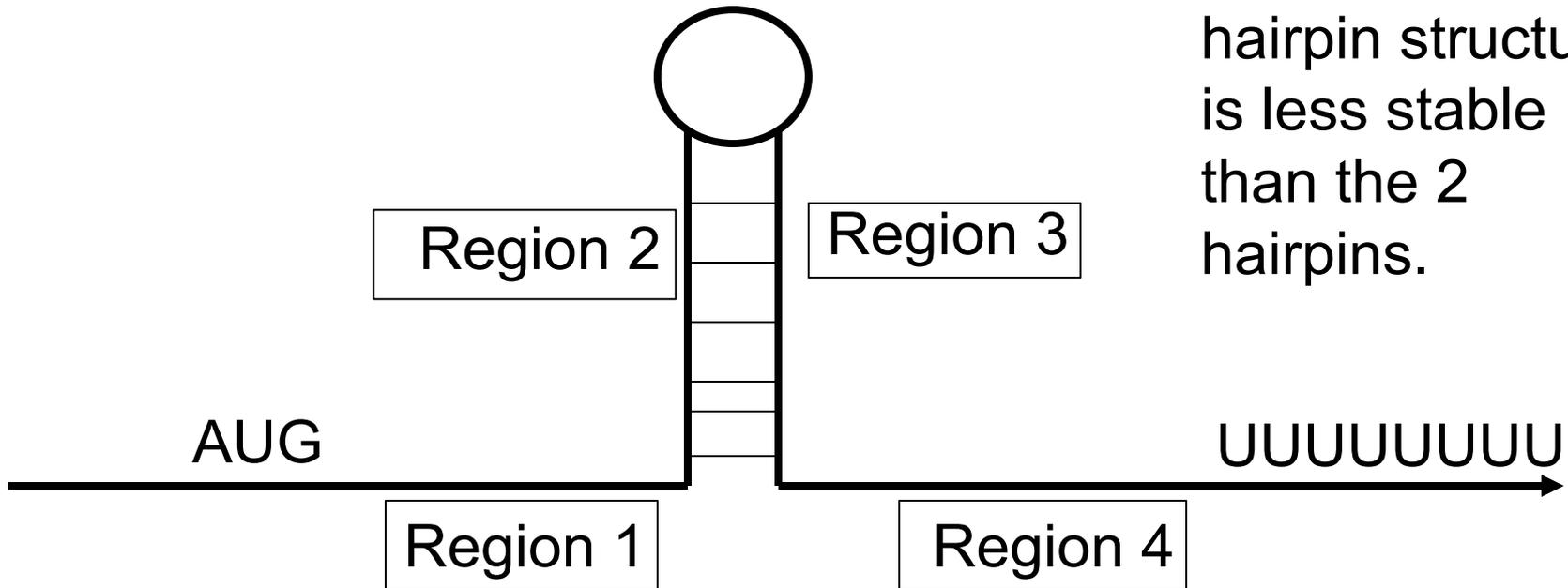
(c) Quando il triptofano è abbondante, il ribosoma continua e la RNA polimerasi non trascrive.

Termination Conformation



Readthrough Conformation

Antiterminator Structure



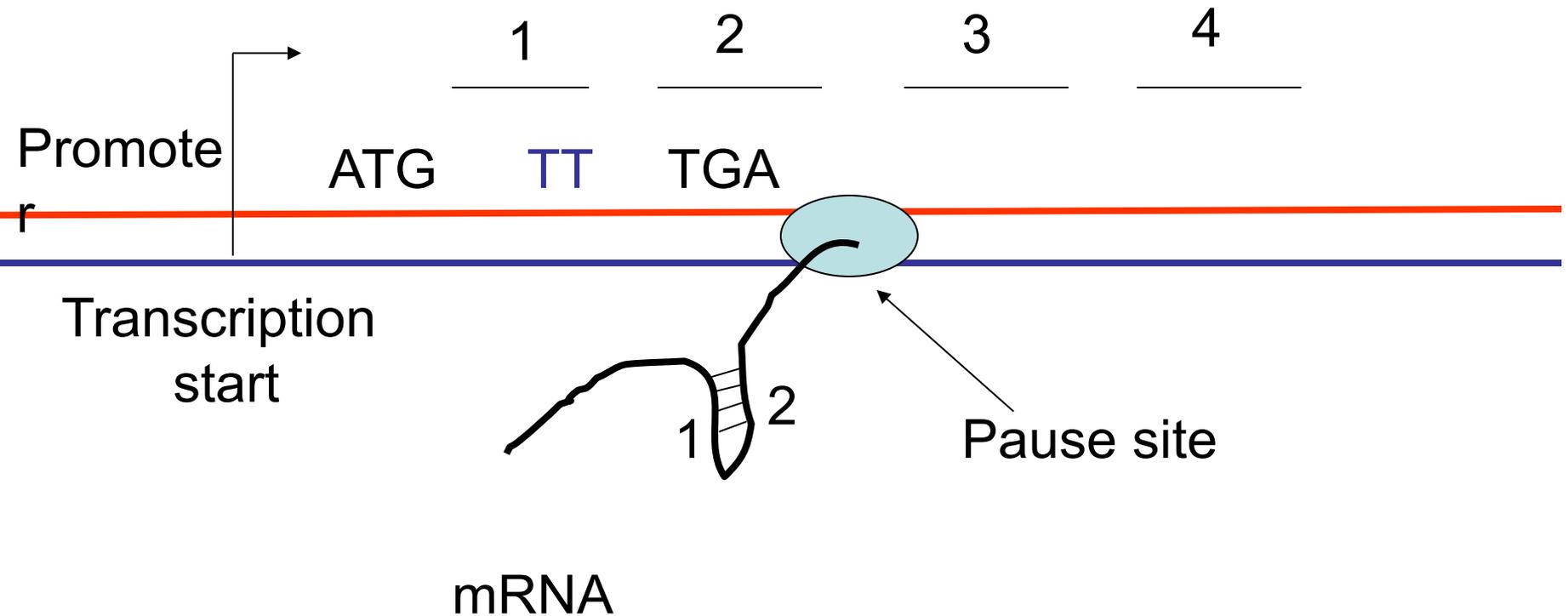
Note: the single hairpin structure is less stable than the 2 hairpins.

If Regions 2 and 3 form hairpin loop, 1:2 and 3:4 can not form hairpins.

Polymerase Pauses at Pause Site

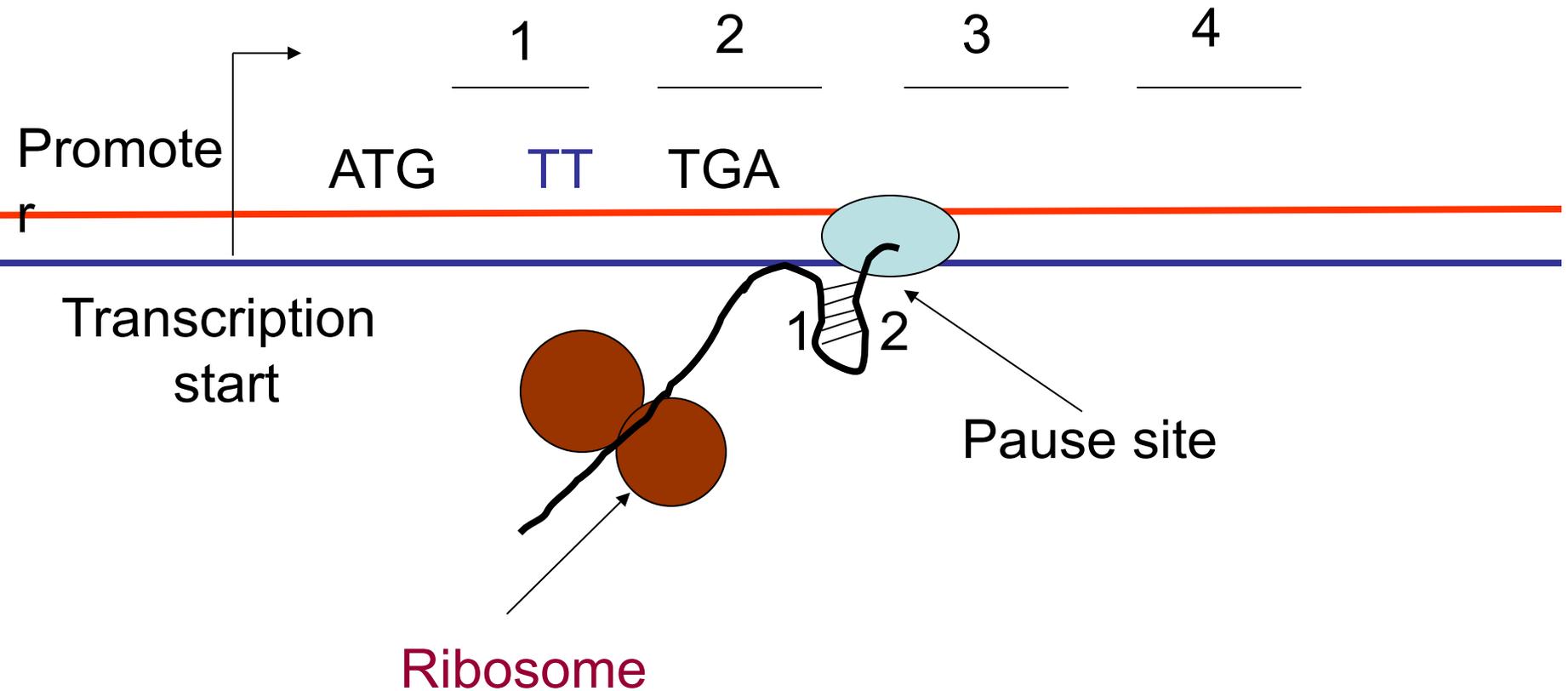
(allows ribosome to attach)

TT = 2 trp codons

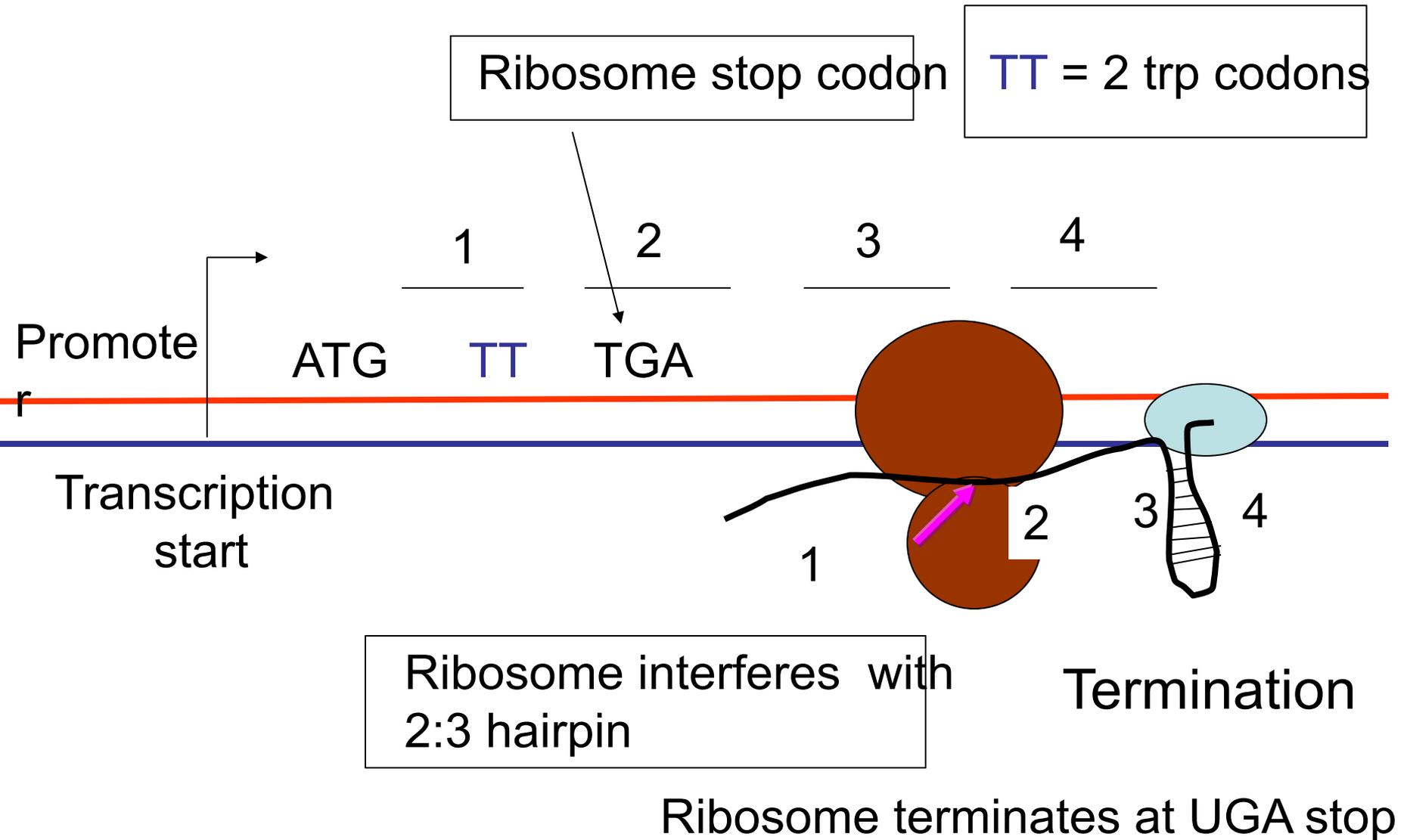


Pause Allows Ribosomes to Load

TT = 2 trp codons

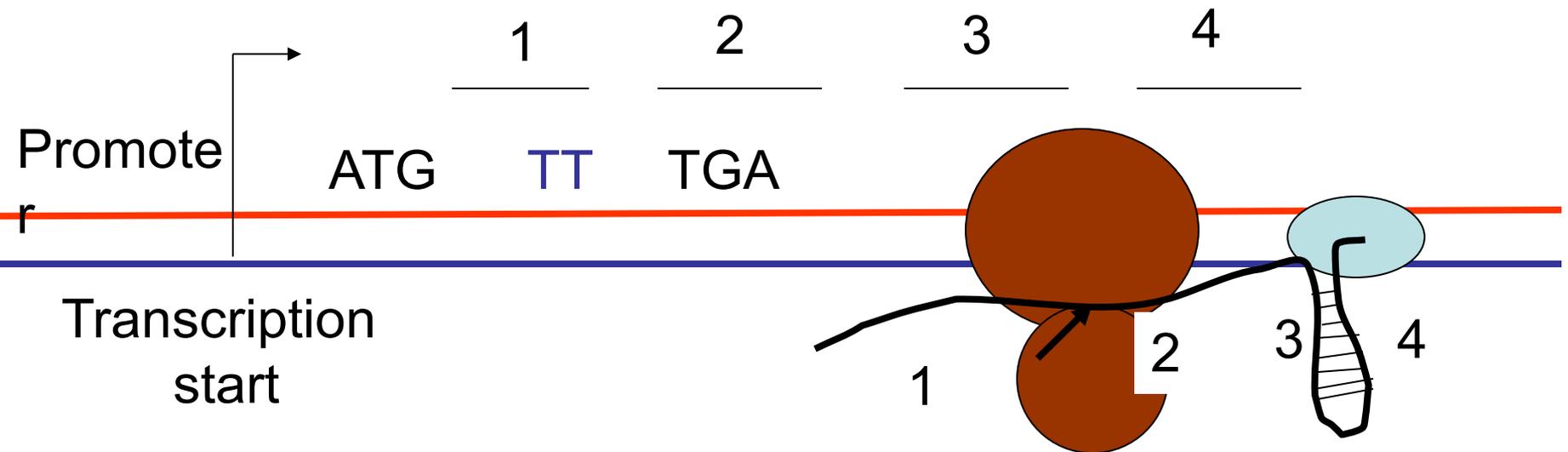


If sufficient trp-tRNA^{trp}, ribosome doesn't stall.



If sufficient $\text{trp-tRNA}^{\text{trp}}$, Ribosomes Don't Stall.

TT = 2 trp codons



Promoter
Transcription start

ATG

1

TT

2

TGA

3

4

1

2

3

4

Ribosome interferes with
2:3 hairpin

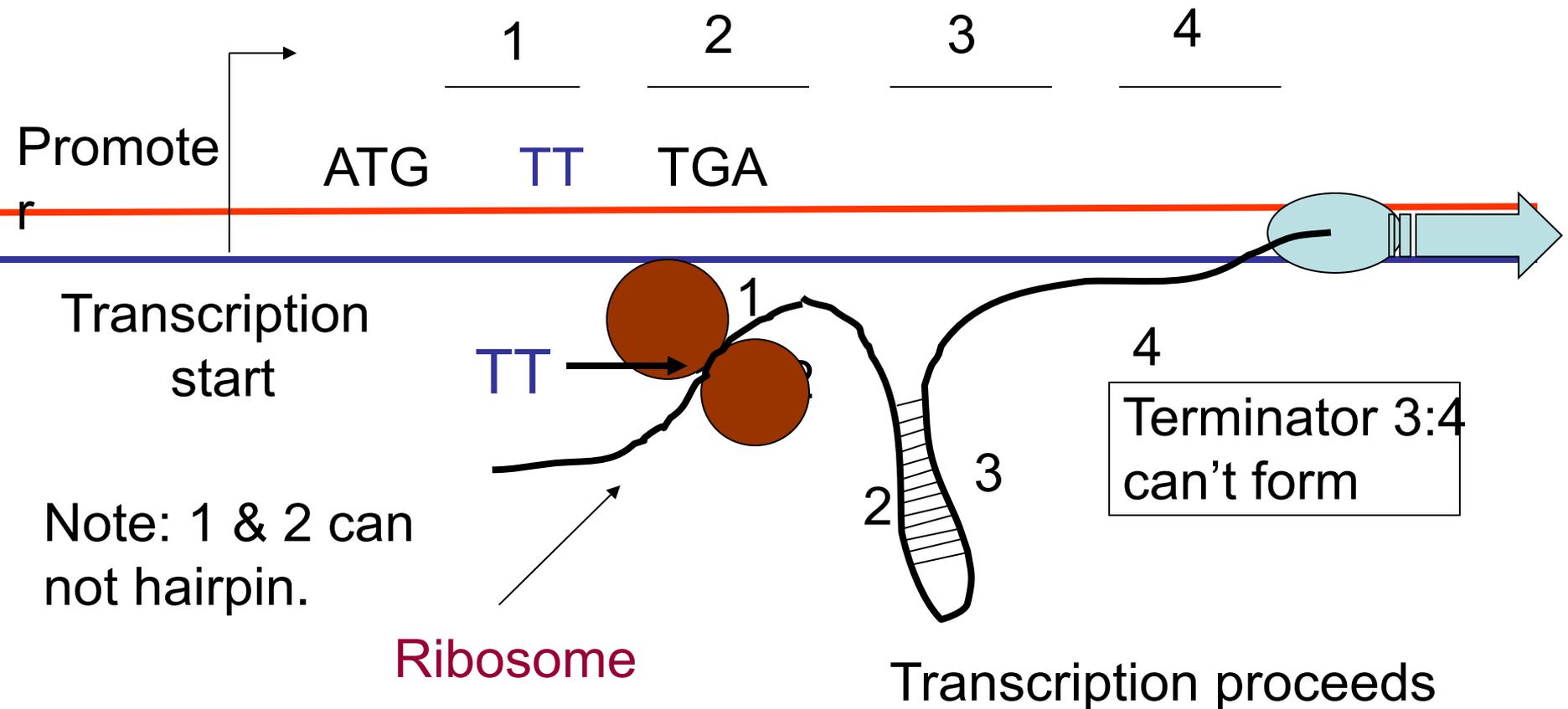
Termination

May even knock RNA pol off

If Insufficient $\text{trp-tRNA}^{\text{trp}}$, Ribosomes Stall at TT.

Ribosome can't find $\text{trp-tRNA}^{\text{trp}}$

TT = 2 trp codons



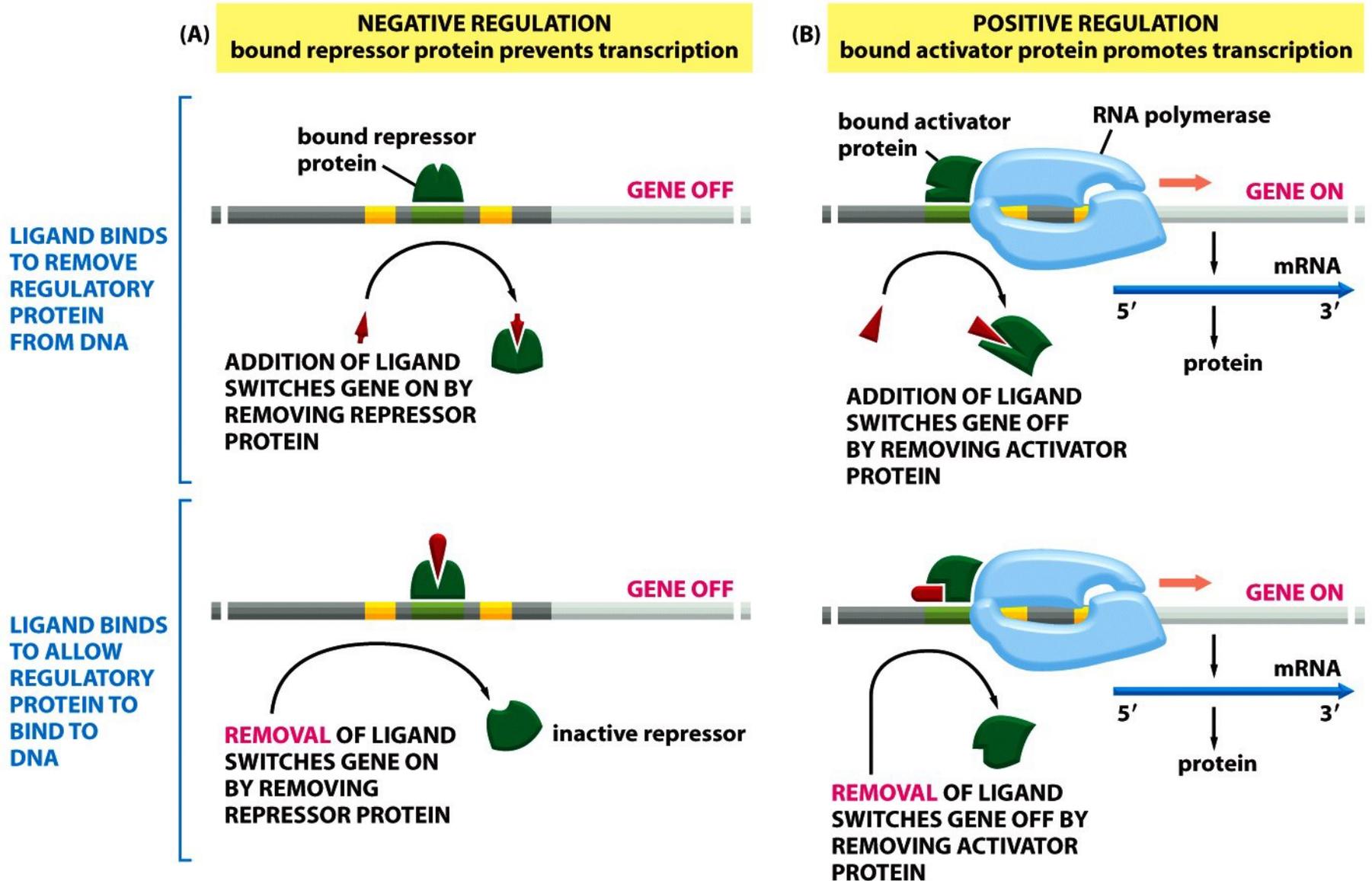


Figure 7-37 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

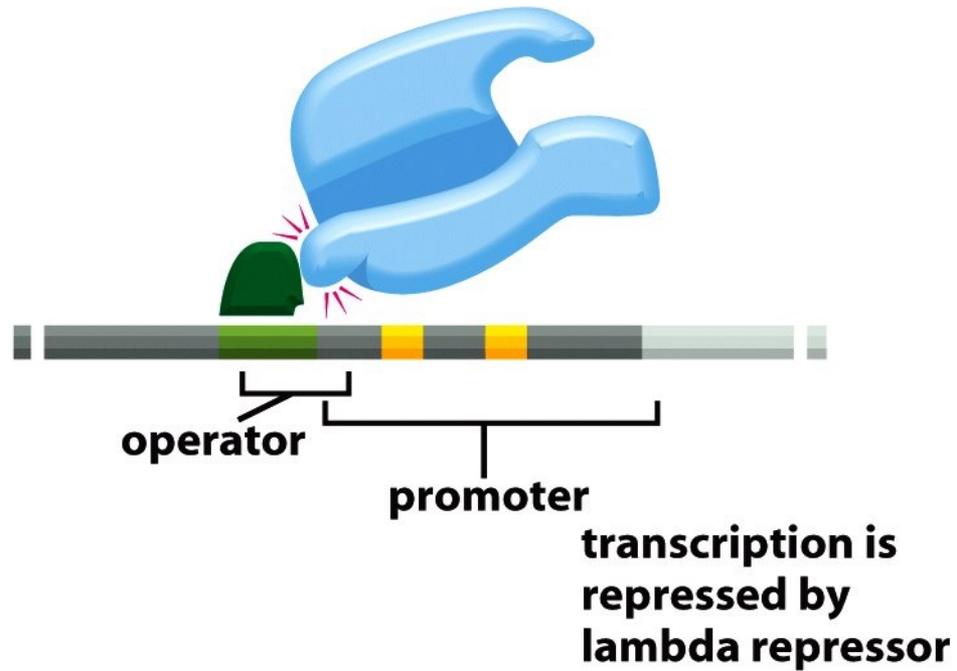
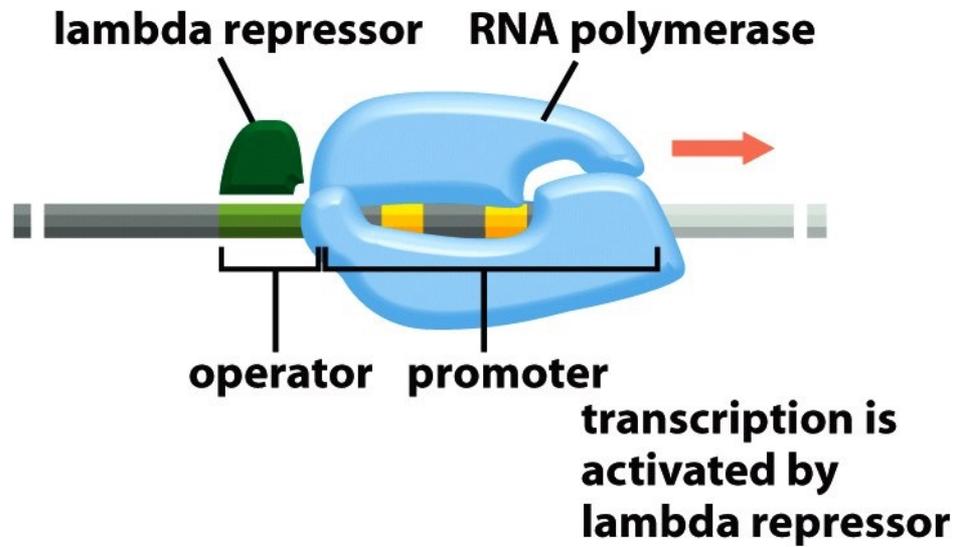
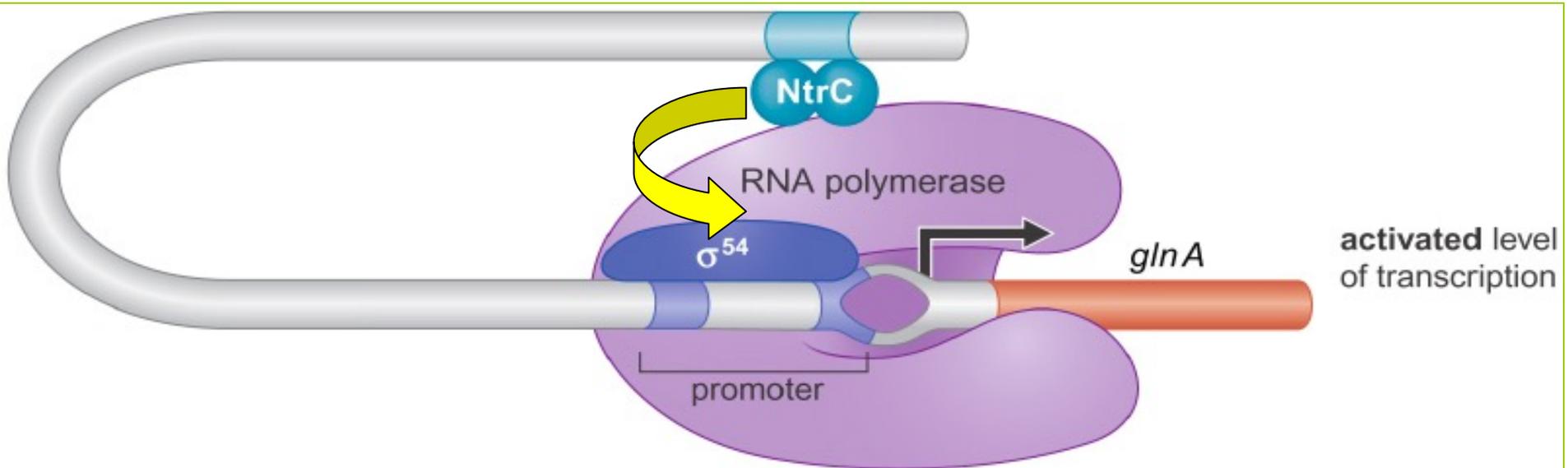


Figure 7-38 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

- 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 σ^{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.

SOS inducible system

