

LA REGOLAZIONE GENICA DEI PROCARIOTI

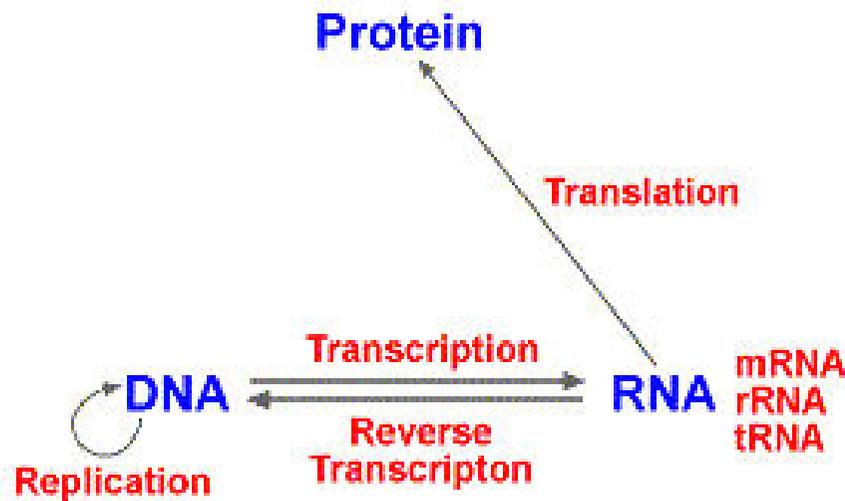
www.fisiokinesiterapia.biz

NON TUTTI I GENI VENGONO UTILIZZATI NELLO STESSO MOMENTO E NON TUTTI CON LA STESSA “INTENSITÀ”

Regolazione genica = la modalità con cui viene **REGOLATA** qualità (tipo) e quantità dei prodotti genici

Prodotto genico = RNA e/o proteina (in ultima analisi)

RICORDIAMO IL DOGMA CENTRALE DELL'INFORMAZIONE GENETICA:

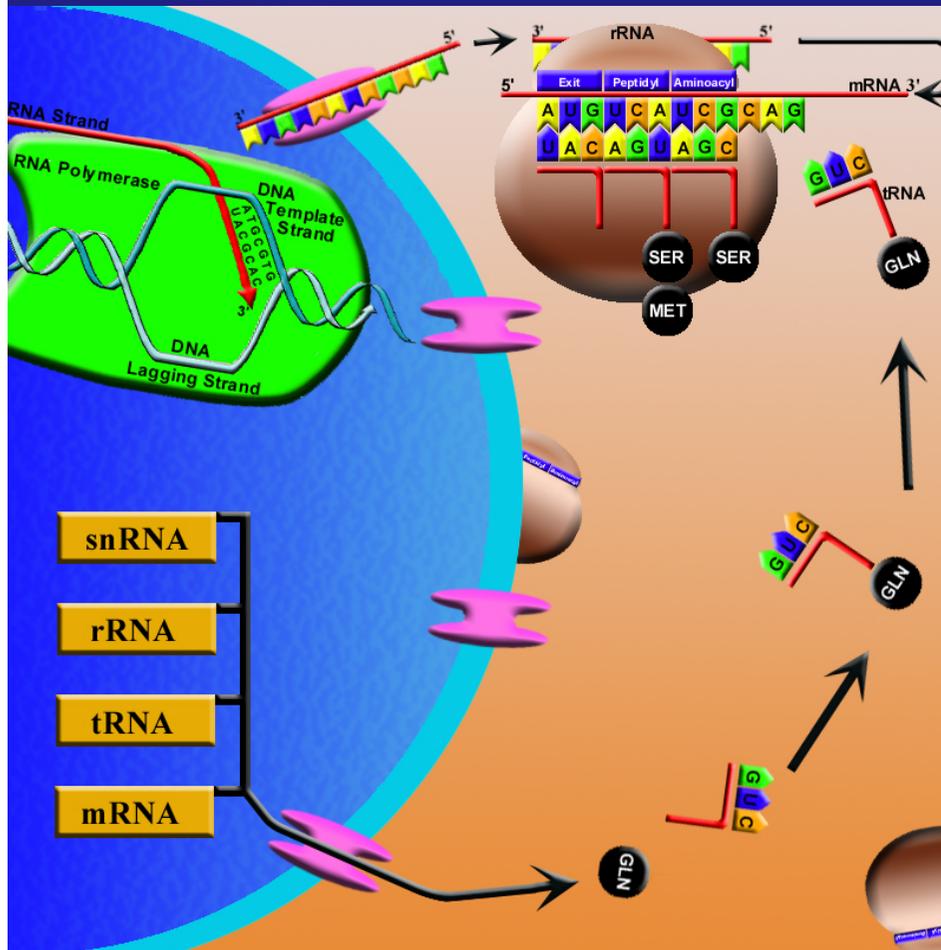


Esistono più tipi di RNA, tutti trascritti nel nucleo:

- RNA ribosomiali
- RNA transfer
- RNA messaggeri
- Piccoli RNA nucleari
- Piccoli RNA citoplasmatici

Per ripassare questi processi:

- <http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/BactGenetics/TOC.html>
- <http://bioweb.wku.edu/courses/Biol22000/>
- <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_biology



- <http://www.web-books.com/MoBio/>
- <http://bcs.whfreeman.com/lodish5e/>

Regolazione Genica nei Procarioti

Finalità:

-Rispondere rapidamente ai cambiamenti ambientali

Logica:

-Risparmiare il più possibile energia, quindi niente mRNA o proteine che non servano subito

Base fisiologica:

-la maggior parte dei geni è espressa costitutivamente

-pochi geni sono regolati, ognuno con il suo meccanismo individuale, di induzione o di repressione

-la traduzione è subito successiva alla trascrizione

-gli mRNA hanno vita breve

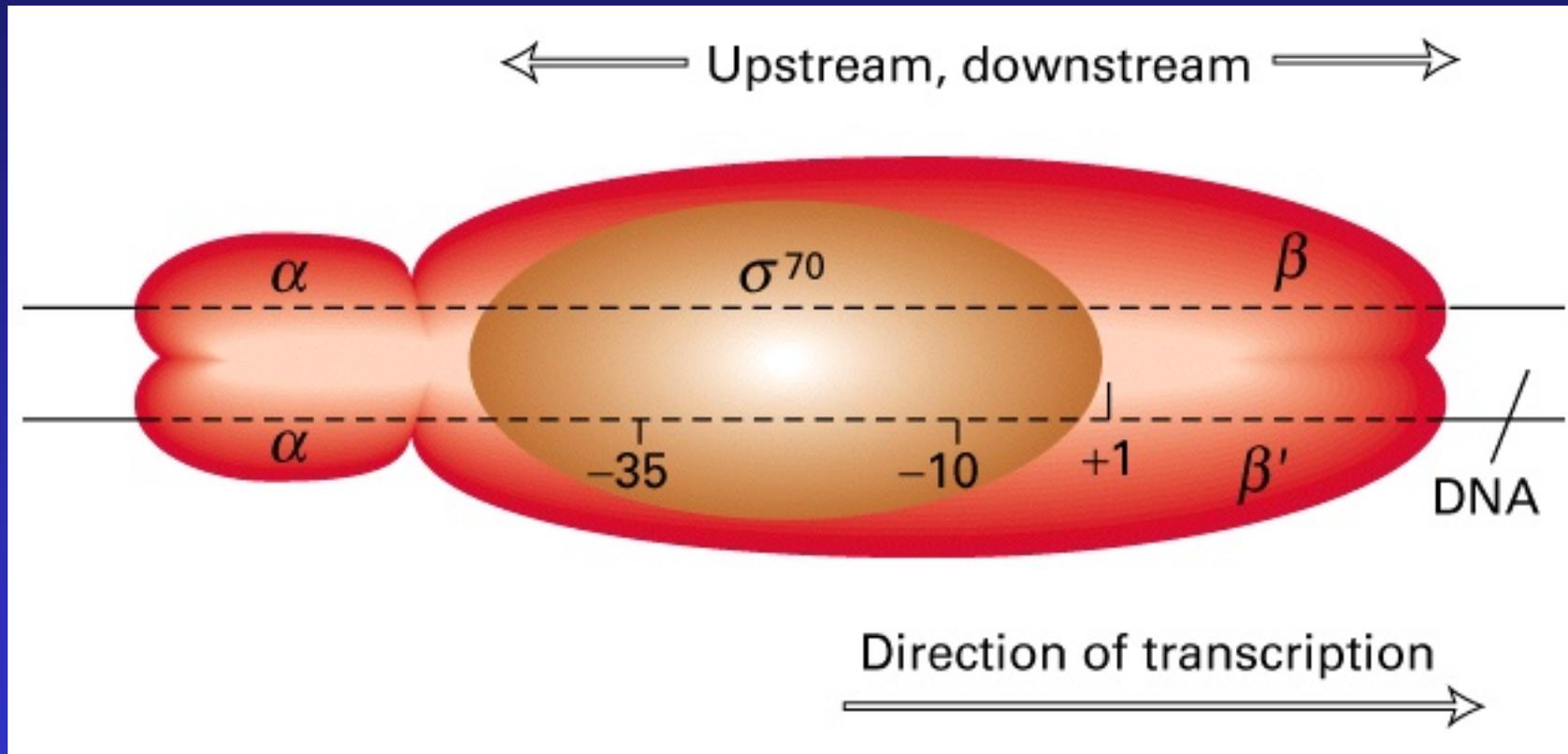
Livelli di regolazione:

1. -scelta della subunità sigma
2. -regolazione della trascrizione di primo livello (inizio della trascrizione)
3. -regolazione della trascrizione di secondo livello
4. -regolazione co-trascrizionale (attenuazione)

1- Scelta della subunità sigma

Una subunità dell'RNA polimerasi batterica, detta sigma, ha il compito di riconoscere determinate sequenze “consenso” in una regione di controllo della trascrizione, detta PROMOTORE. Le altre subunità dell'RNA polimerasi si associano al promotore grazie all'intervento della subunità sigma, e danno inizio alla trascrizione. La subunità sigma si dissocia dal complesso dopo che sono state trascritte circa 10 basi.

L'RNA polimerasi dei procarioti 1

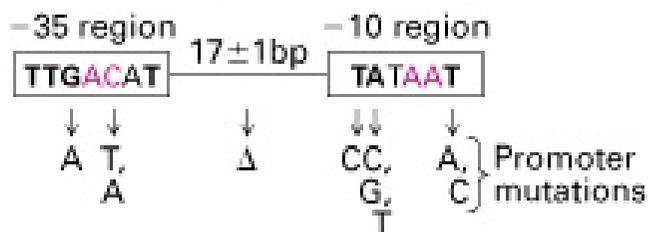


I promotori dei procarioti

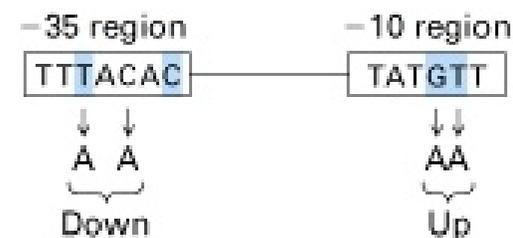
(a) Strong *E. coli* promoters

tyr tRNA	TCTCAACGTAACAC	TTTACA	GCGGCG	CGTCATTTGA	TATGAT	GCGCCCC	GCTTCCCGATAAAGGG
rmn D1	GATCAAAAAAATAC	TTGTG	CAAAAAA	TTGGGATCCC	TATAAT	GCGCCTCC	GTTGAGACGACAACG
rmn X1	ATGCATTTTTCCGC	TTGTCT	TCCTGA	GCCGACTCCC	TATAAT	GCGCCTCC	ATCGACACGGCGGAT
rmn (DXE) ₂	CCTGAAATTCAGGG	TTGACT	CTGAAA	GAGGAAAGCG	TAATATAC	GCCACC	CTCGACACAGTGAGC
rmn E1	CTGCAATTTTTCTA	TTGCGGC	CTGCG	GAGAACTCCC	TATAAT	GCGCCTCC	ATCGACACGGCGGAT
rmn A1	TTTTAAATTTTCTC	TTGTCA	GGCCGG	AATAACTCCC	TATAAT	GCGCCACC	ACTGACACGGGAACAA
rmn A2	GCAAAAAATAAAATGC	TTGACT	CTGTAG	CGGGAAGGCG	TATTAT	GCACACC	CGCGCCGCTGAGAA
λ PR	TAACACCGTGCGTG	TTGACT	ATTTTA	CCTCTGGCGGTG	GATAAT	GGTTG	GCATGTACTAAGGAGGT
λ PL	TATCTCTGGCGGTG	TTGACAT	AAATA	CCACTGGCGGTG	GATACT	GA	GCACATCAGCAGGACGCAC
T7 A3	GTGAAACAAAACGG	TTGACA	ACATGA	AGTAAACACGG	TACGAT	TG	ACCACATGAAACGACAGTGA
T7 A1	TATCAAAAAGAGTA	TTGACT	TAAAGT	CTAACCTATAGG	GATACT	T	CAGCCATCGAGAGGGACACG
T7 A2	ACGAAAAACAGGTA	TTGACA	ACATGA	AAGTAACATGCAG	TAAGAT	TAC	AAATCGCTAGGTAACTAG
fd VIII	GATACAAATCTCCG	TTGTAC	TTTGTT	TCGCGCTTGG	TATAAT	CG	CTGGGGGTCAAAGATGAGTG
		-35			-10		+1 

(b) Consensus sequences of σ^{70} promoters



(c) *Lac* promoter sequence



Alle diverse regioni consenso dei promotori si legano diverse subunità sigma, ciascuna “specializzata” nella trascrizione di specifiche classi di geni

TABLE 10-1 Sigma Factors of *E. coli*

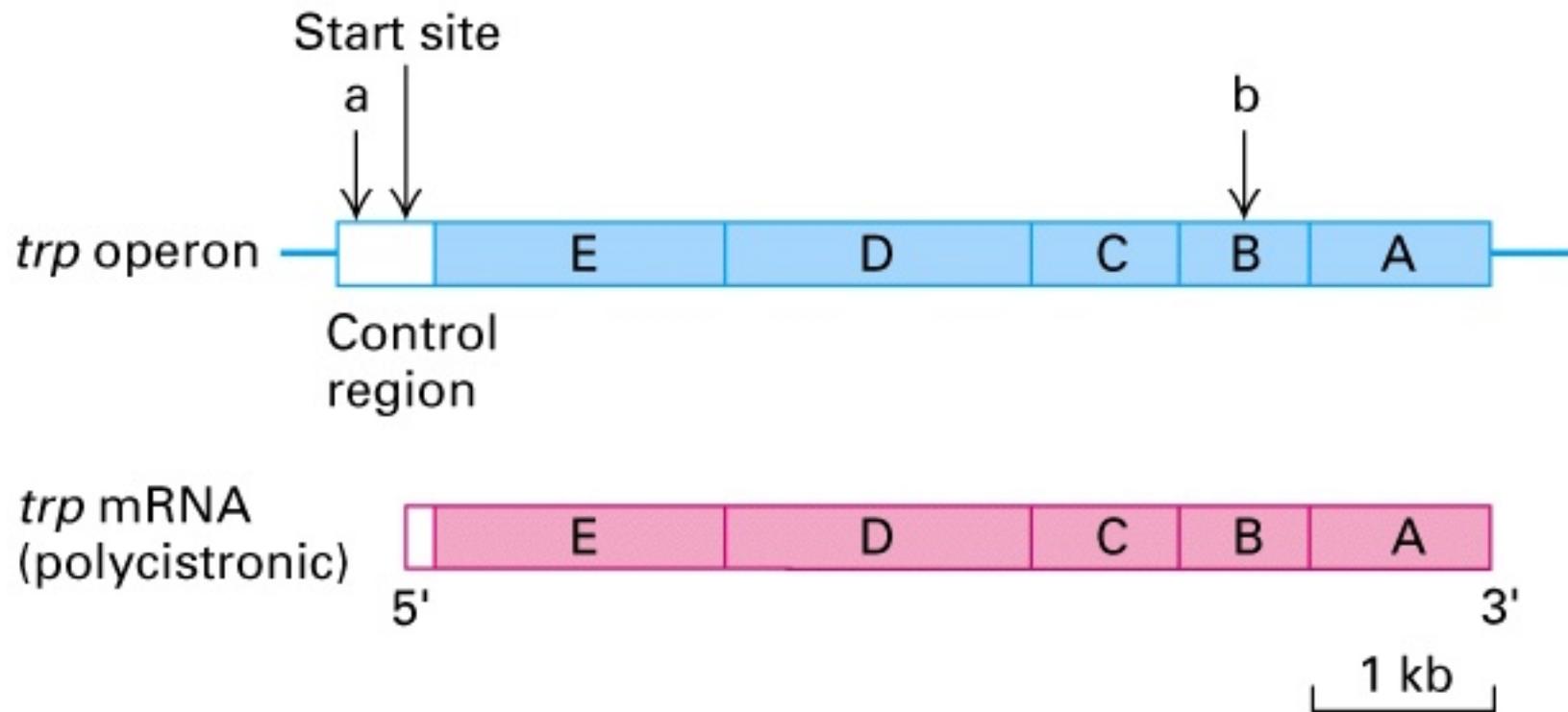
Sigma Factor	Promoters Recognized	Promoter Consensus	
σ^{70}	Most genes	-35 Region TTGACAT	-10 Region TATAAT
σ^{32}	Genes induced by heat shock	TCTCNCCCTTGAA	CCCCATNTA
σ^{28}	Genes for motility and chemotaxis	CTAAA	CCGATAT
σ^{38}	Genes for stationary phase and stress response	?	?
σ^{54}	Genes for nitrogen metabolism and other functions	-24 Region CTGGNA	-12 Region TTGCA

SOURCES: C. A. Gross, M. Lonetto, and R. Losick, 1992, in S. L. McKnight and K. R. Yamamoto, eds., *Transcriptional Regulation*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; D. N. Arnosti and M. J. Chamberlin, 1989, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **86**:830; R. Hengge-Aronsis, 1996, *Mol. Microbiol.* **21**:887.

I geni strutturali dei batteri sono organizzati in “cluster” : gruppi di geni codificanti per proteine con funzioni correlate, (es. enzimi di una stessa via metabolica, proteine deputate al trasporto intracellulare ecc), che si trovano sotto il dominio di un unico promotore.

Schema di un'unità di trascrizione dei procarioti

(a) Prokaryotic polycistronic transcription unit



2- Regolazione della trascrizione di primo livello

La capacità dell'RNA polimerasi di iniziare la trascrizione dipende dall'assenza di impedimenti a livello del promotore; in sua vicinanza, infatti, possono essere presenti dei repressori che impediscono l'inizio della trascrizione. Si parla quindi di **regolazione negativa**.

2- Regolazione della trascrizione di secondo livello

In genere per una buona attivazione del gene non è sufficiente che l'RNA polimerasi non abbia impedimenti a iniziare la trascrizione, perché spesso il promotore è poco efficiente (la sua sequenza non è quella "ideale"). È necessario anche che una o più proteine "attivino" la trascrizione. Si parla quindi di **regolazione positiva**.

OPERONE

Unità di trascrizione descritta nel 1961 da François Jacob e Jacques Monod, che per questo furono insigniti del premio Nobel.

L'unità completa include:

- Geni strutturali: codificano per le proteine di interesse
- Gene/i regolatore/i: codificano per repressori e/o attivatori
- Operatore: Sito sul DNA riconosciuto dalla proteina repressore.
- Promotore: Sito sul DNA cui si lega l'RNA polimerasi per iniziare la trascrizione dei geni situati a valle.
- Attivatore: Sito sul DNA cui si lega una proteina che favorisce la trascrizione

Come abbiamo detto, spesso l'operone è soggetto sia a regolazione negativa, sia a regolazione positiva

Nella regolazione negativa, un repressore, legandosi al sito operatore in prossimità del promotore, impedisce la trascrizione dei geni strutturali

Nella regolazione positiva, una o più proteine, legandosi nel sito attivatore a diversa distanza dal promotore, favoriscono la trascrizione dei geni strutturali in vario modo (es. distorcendo l'elica de DNA, favorendo l'attacco della polimerasi, ecc.)

Sia nel caso di regolazione negativa, sia nel caso di regolazione positiva, il gene può essere quindi regolato:

un gene è *indotto* se la sua trascrizione (assente) viene promossa;

un gene è *represso* se la sua trascrizione (presente) viene inibita

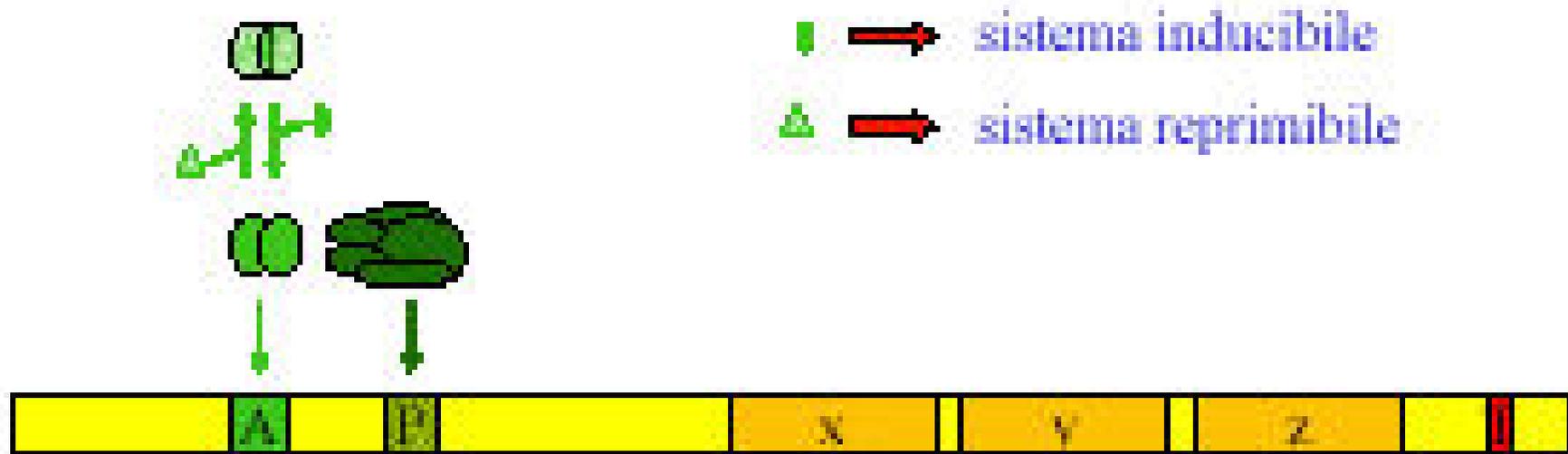
Regolazione **NEGATIVA** - **REPRESSORE**



-In condizioni basali il repressore è libero, ma, in presenza di un co-repressore, si posiziona sull'operatore; questo inibisce la trascrizione dei geni strutturali: il sistema si dice **reprimibile**

-In condizioni basali il repressore è posizionato nel sito operatore e viene rimosso da un induttore; questo consente la trascrizione dei geni strutturali: il sistema si dice **inducibile**

Regolazione POSITIVA - ATTIVATORE



-In condizioni basali la trascrizione non è presente; il legame con una o più proteine nel sito attivatore favorisce la trascrizione: il sistema si dice **inducibile**

-In condizioni basali la trascrizione è attiva grazie alla presenza di una o più proteine nel sito attivatore, la cui rimozione inibisce la trascrizione: il sistema si dice **reprimibile**

Regolazione dell'inizio della trascrizione

FATTORI "TRANS"
(PROTEINE)



ELEMENTI IN CIS
(DNA)

RNA POLIMERASI



PROMOTORE

REPRESSORE

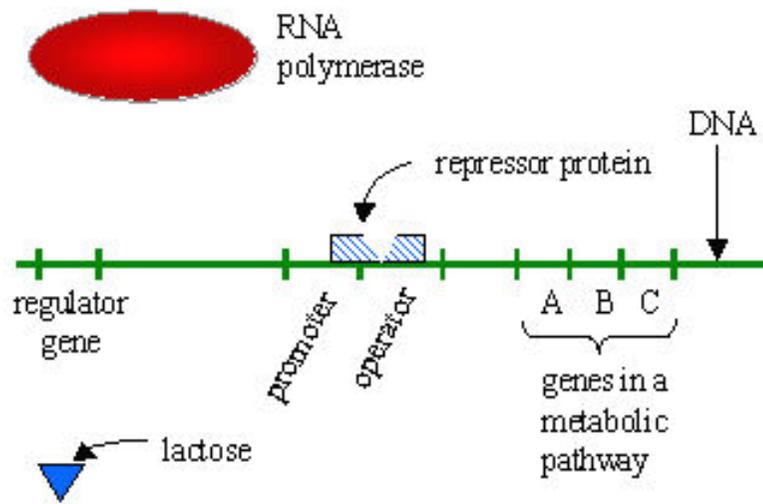


OPERATORE

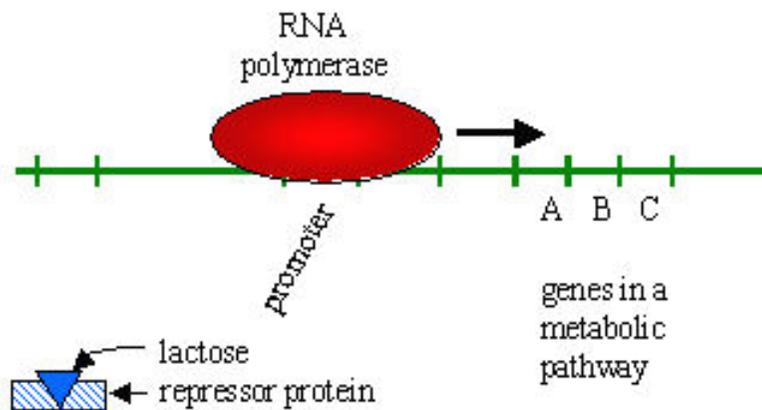
ATTIVATORE



SITO ATTIVATORE



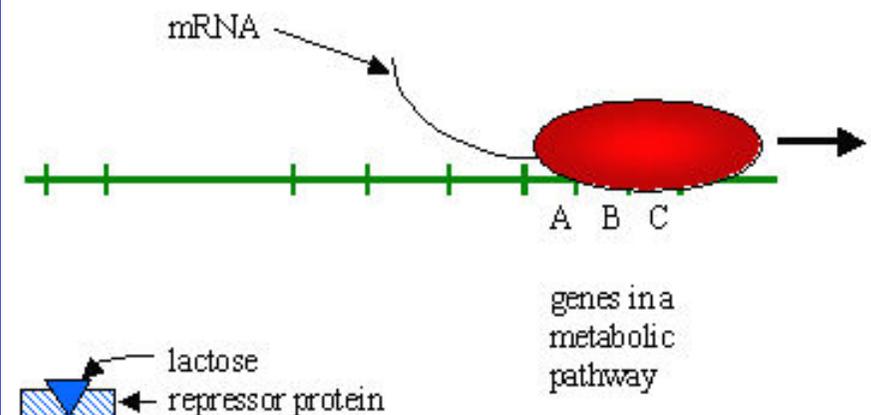
Below: Lactose binds with the repressor protein inactivating it.

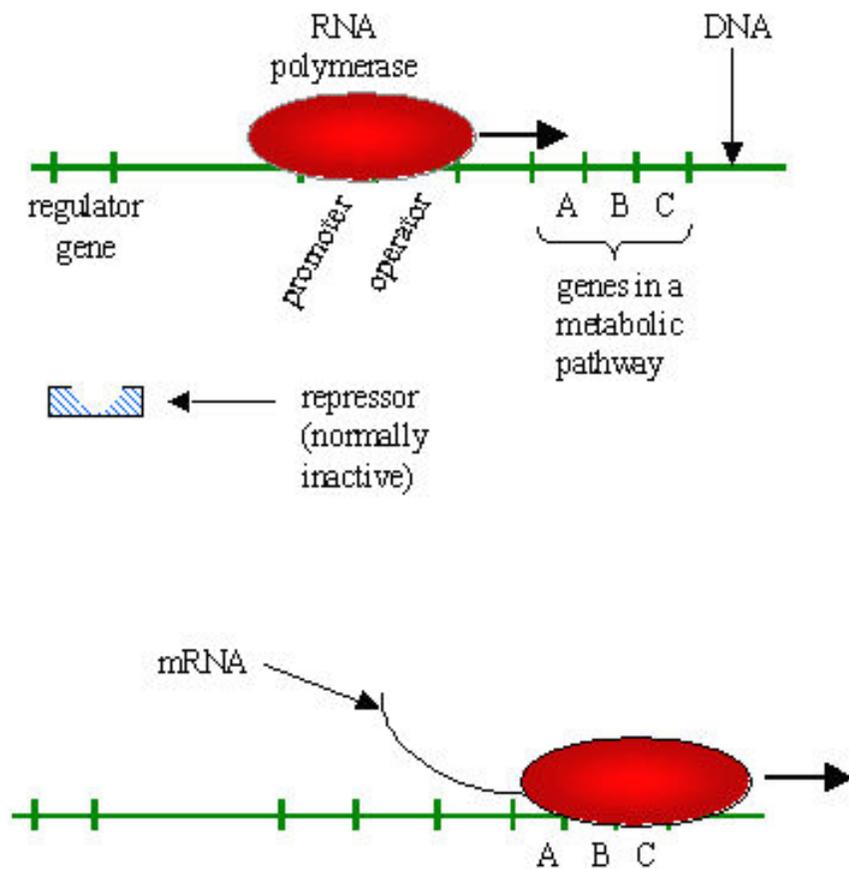


Qui è evidenziata la regolazione a livello del sito operatore (regolazione negativa)

Come funziona un gene inducibile in un procariota (schema elementare).

Si tratta di una VIA CATABOLICA, normalmente inattiva (non espressa), che viene attivata (INDOTTA) dalla presenza della molecola da degradare (il lattosio)

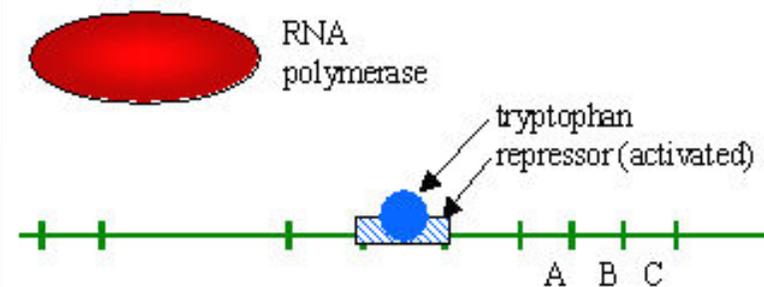




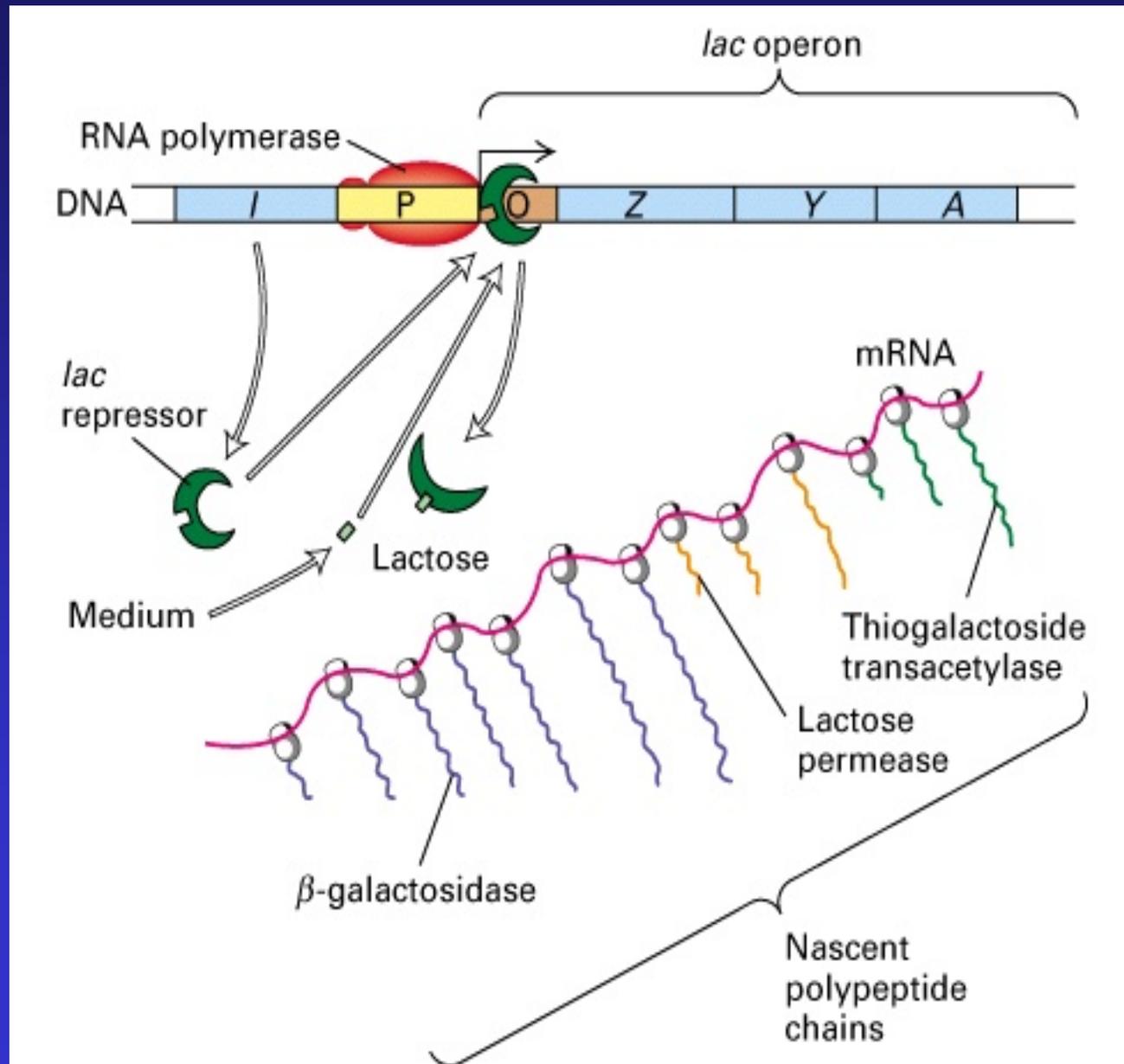
Come funziona un gene reprimibile in un procariota (schema elementare).

Si tratta di una VIA ANABOLICA, normalmente attiva (espressa), che viene inattivata (REPRESSA) dalla presenza della molecola che si forma per effetto delle attività enzimatiche ivi codificate (il triptofano)

Qui è evidenziata la regolazione a livello del sito operatore (regolazione negativa)

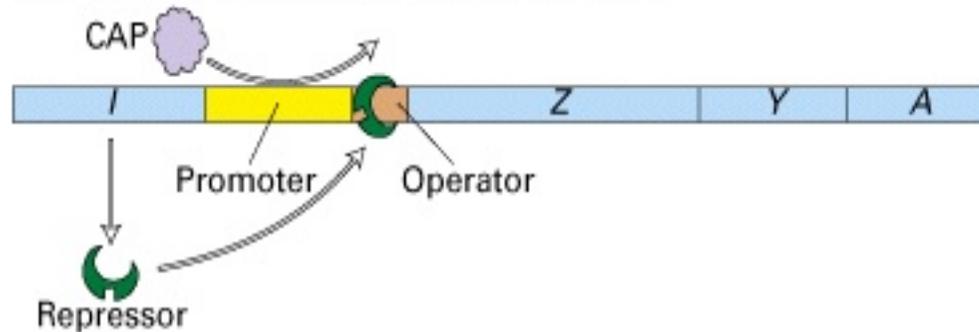


Schema più completo della regolazione di un operone inducibile, il *lac*-operon

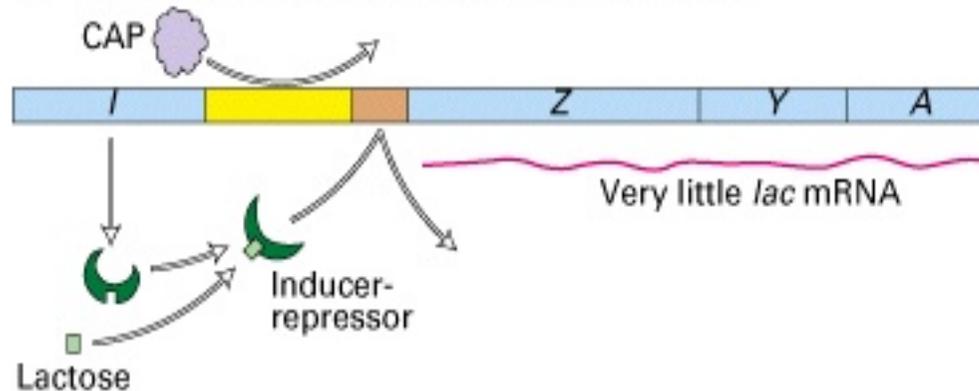


La regolazione del *lac*-operon avviene a due livelli la carenza di glucosio induce la sintesi di cAMP e l'attivazione di CAP

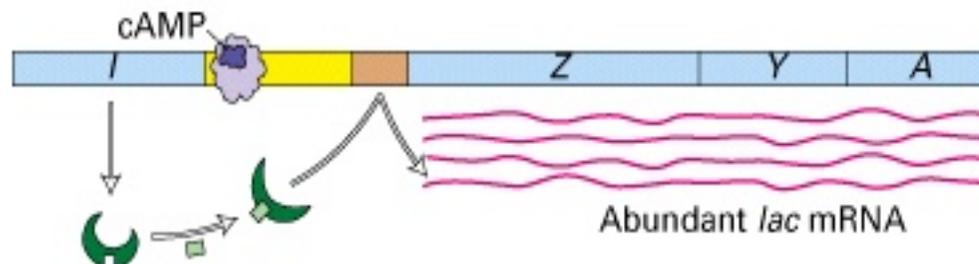
(a) Glucose present (cAMP low); no lactose



(b) Glucose present (cAMP low); lactose present



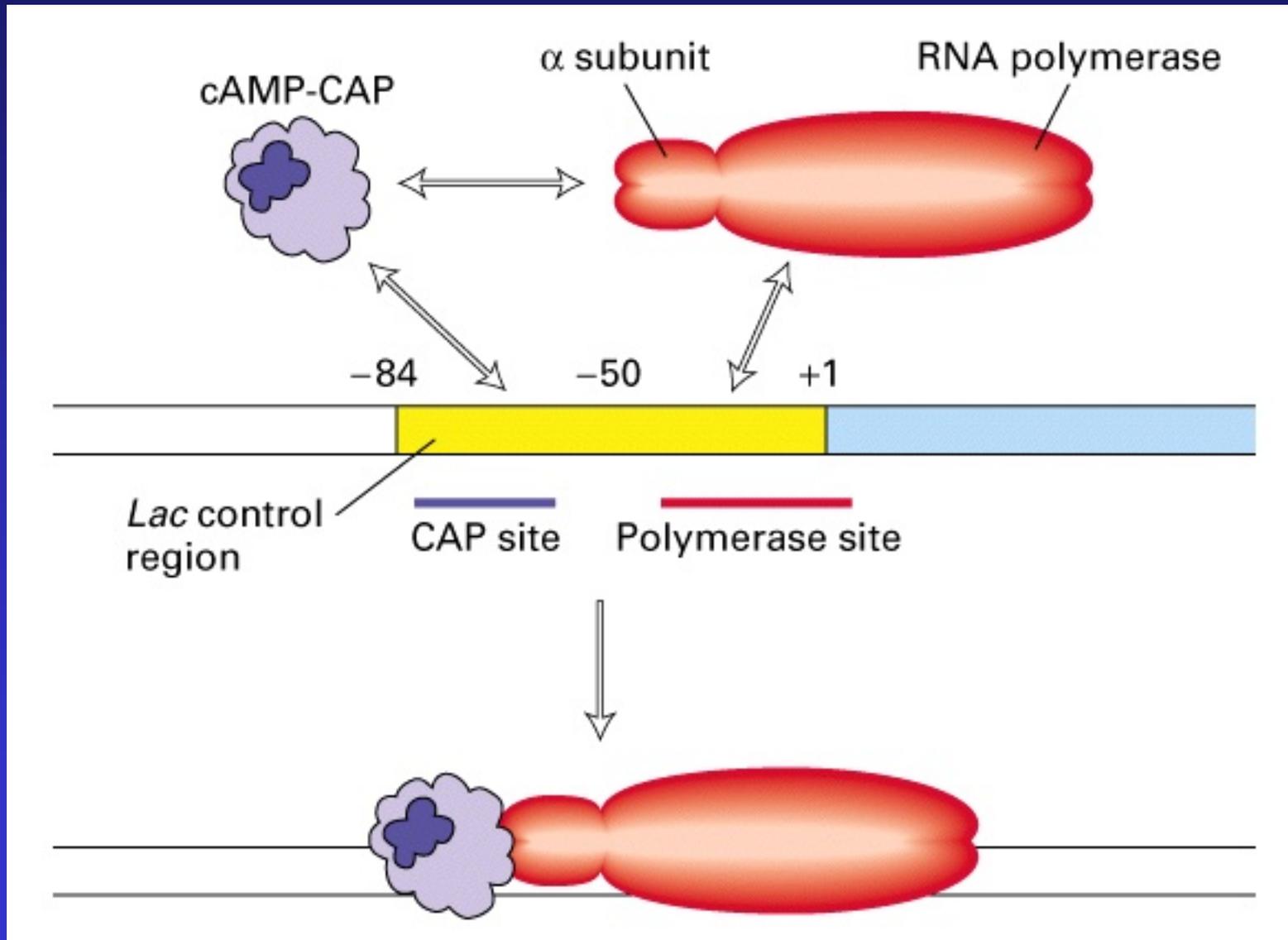
(c) No glucose present (cAMP high); lactose present



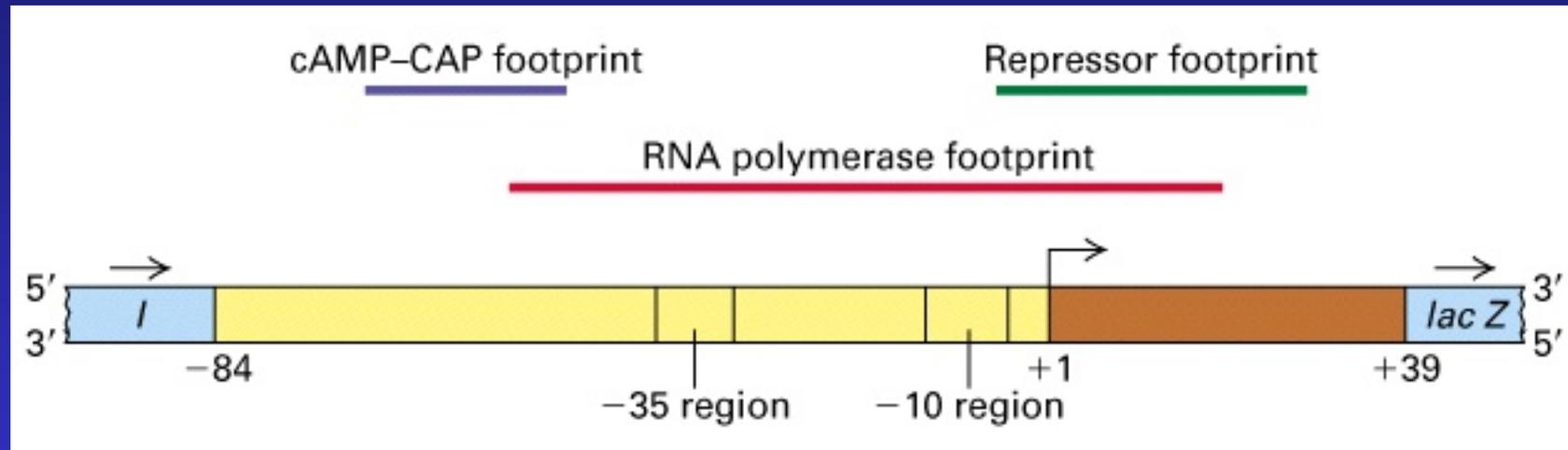
1° livello: Il repressore *Lac* opera una regolazione negativa; l'operone è inducibile, in quanto il repressore viene staccato dall'induttore, il lattosio (ossia il substrato che deve essere degradato da uno dei prodotti genici).

2° livello: Il complesso cAMP-CAP opera una regolazione positiva, inducendo livelli di trascrizione più alti.

La regolazione positiva favorisce la trascrizione.
La regione del promotore cui si lega cAMP-CAP è diversa
da quella cui si lega la polimerasi



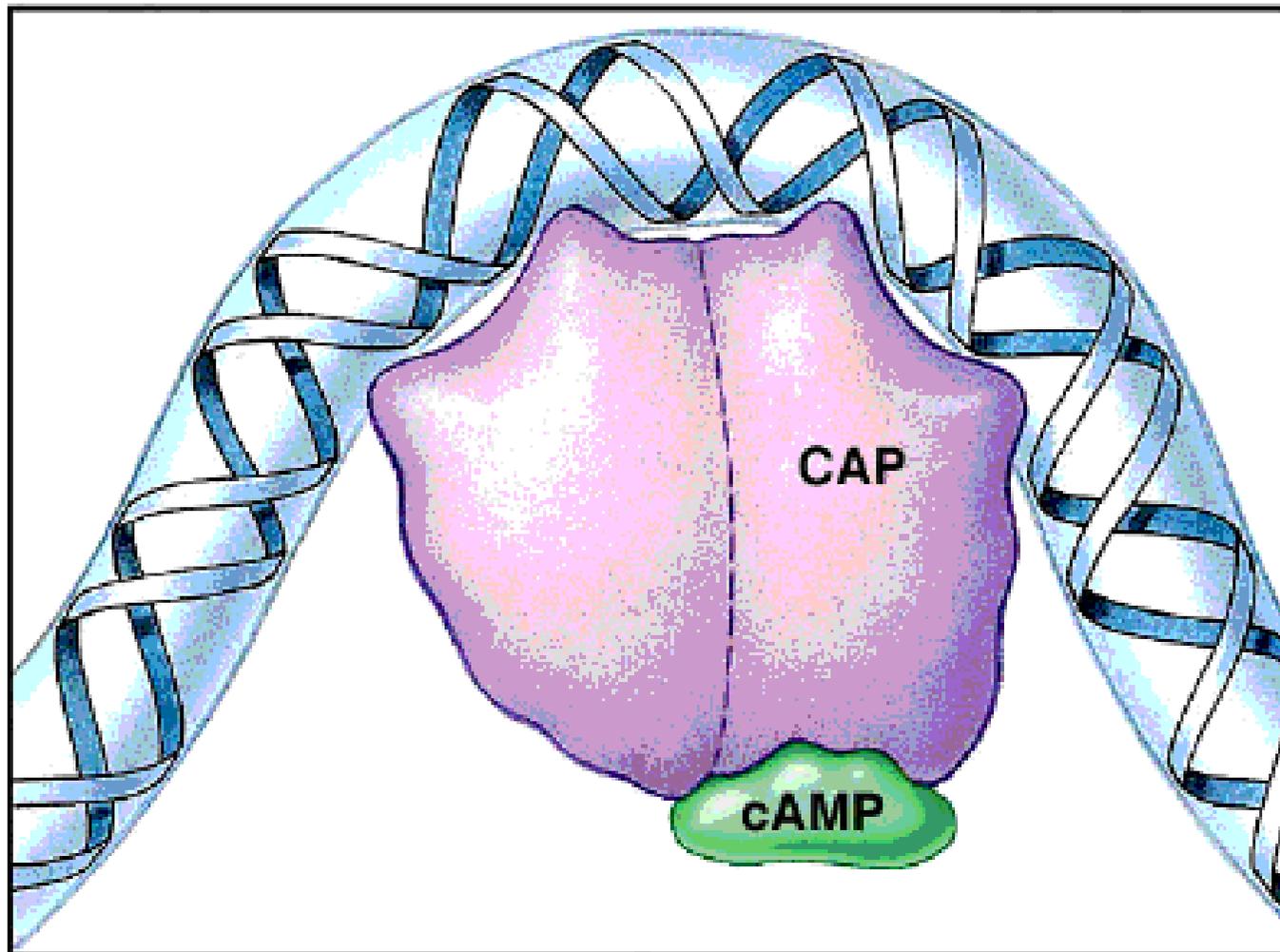
Le regioni del *lac* operon che legano le proteine di regolazione



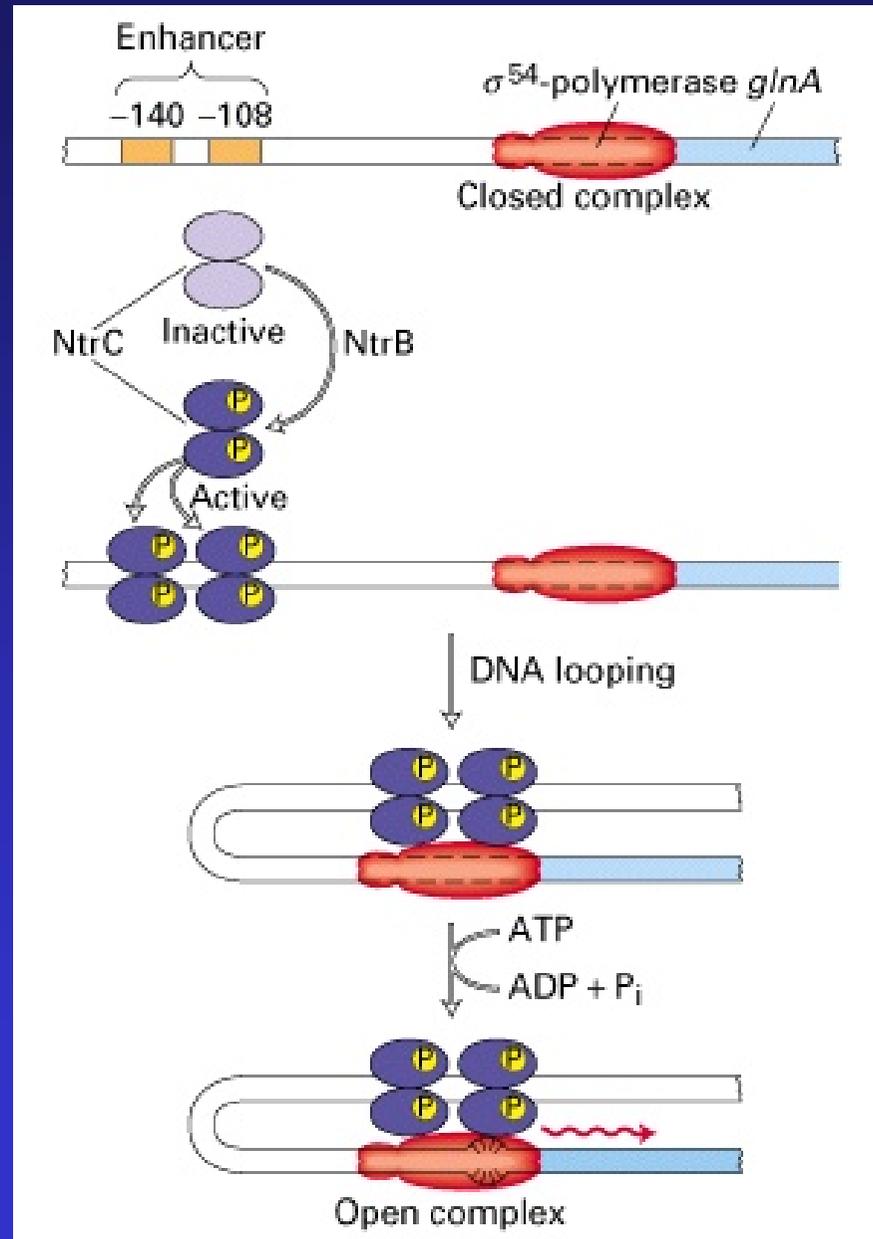
La proteina CAP “sforza” l’elica, ripiegandola. In tal modo favorisce l’inizio della trascrizione a partire dal vicino promotore

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

CAP Mechanism



A volte i regolatori si legano a sequenze poste ad una certa distanza dal promotore; in tal caso, esse interagiscono con la polimerasi grazie alla formazione di un'ansa del DNA. Qui è schematizzata una regolazione positiva.

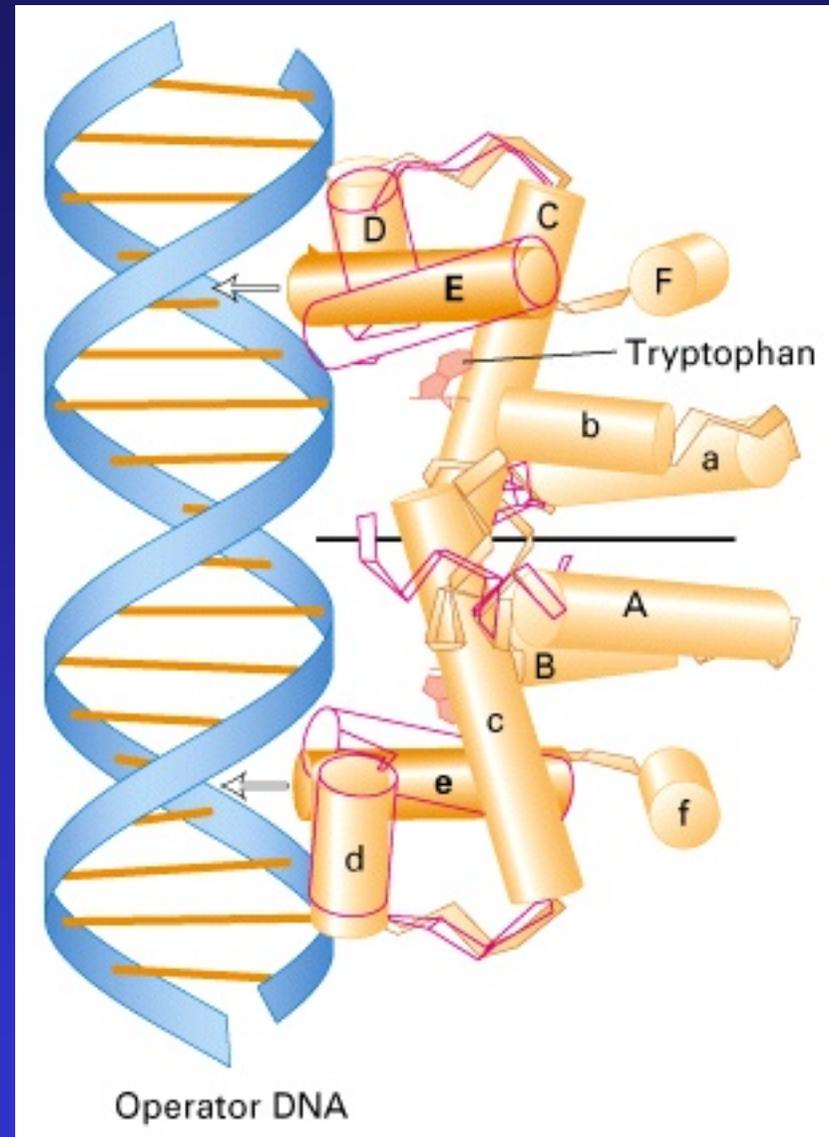


La regolazione “di secondo livello” può utilizzare lo stesso attivatore per regolare più operoni.

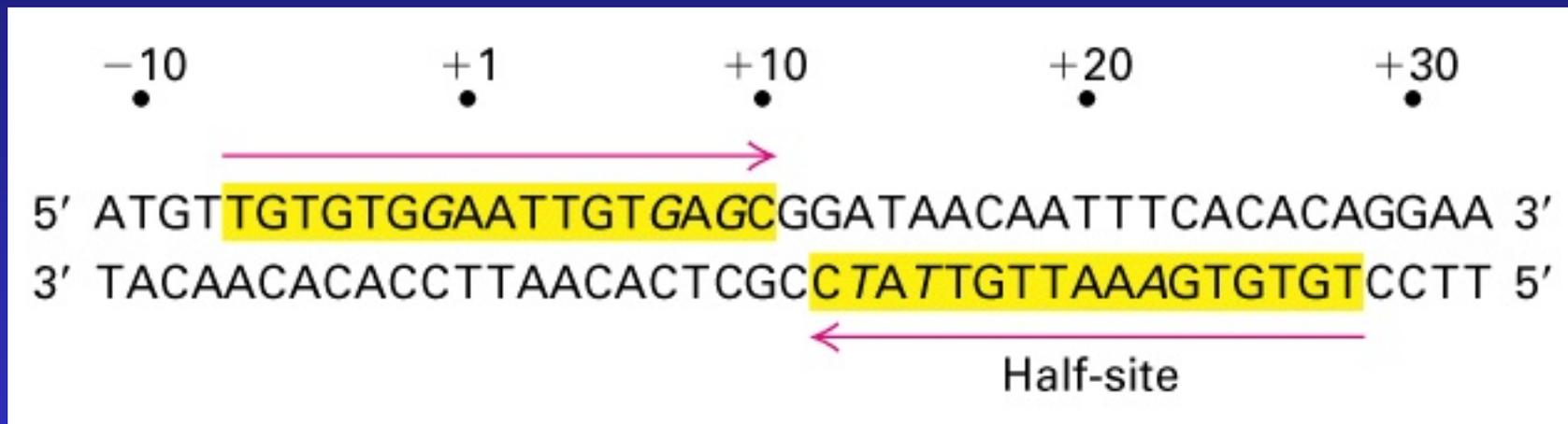
Ad esempio, gli operoni che controllano l'utilizzo di zuccheri diversi dal glucosio sono controllati dai singoli zuccheri per quanto riguarda la regolazione negativa (gli zuccheri *inducono* la trascrizione rimuovendo il repressore), ma sono regolati tutti dal complesso cAMP-CAP per quanto riguarda la regolazione positiva.

CAP si lega al sito attivatore solo se complessata a cAMP, che, a sua volta, viene sintetizzato in caso di carenza di glucosio.

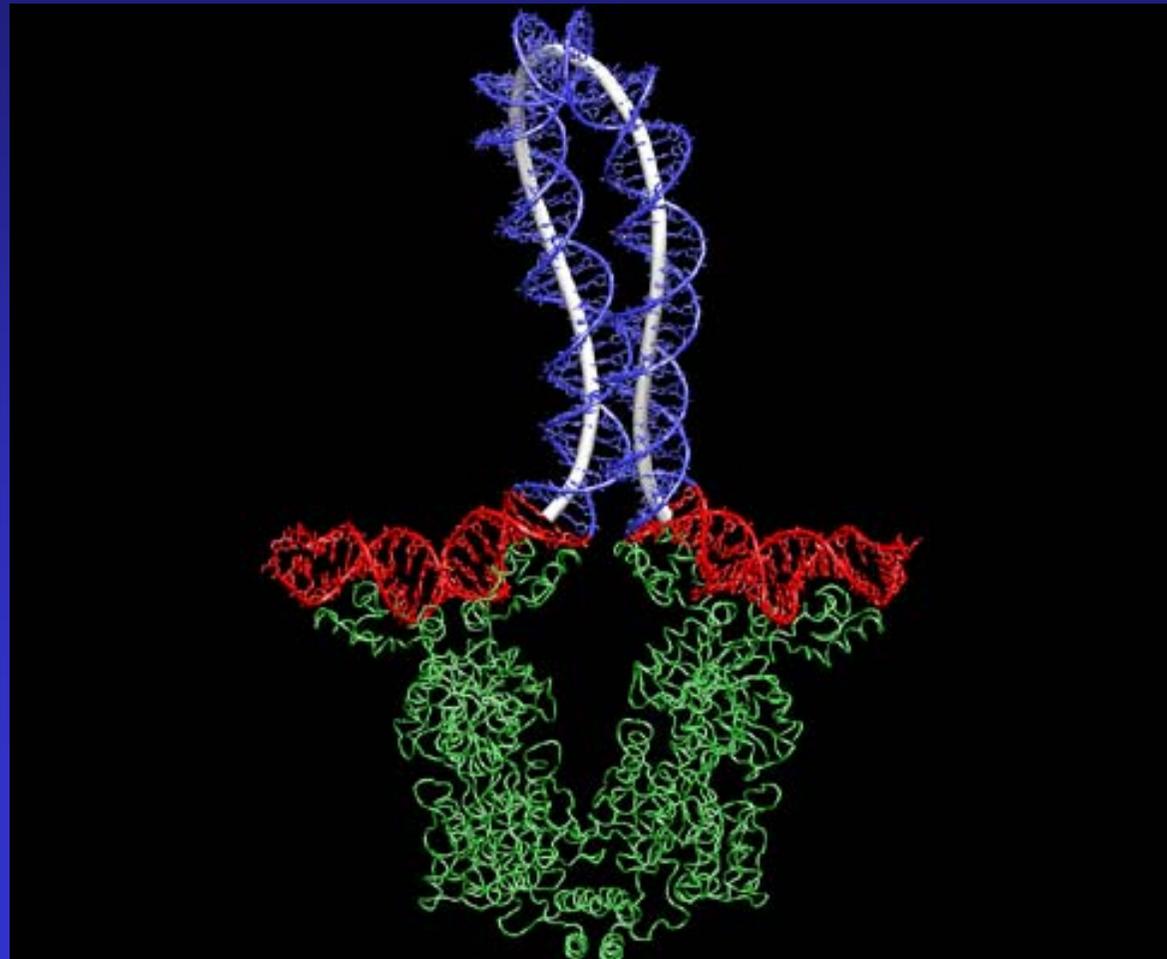
Il repressore *Trp* è un omodimero con simmetria speculare; le due subunità riconoscono tratti quasi identici posti su eliche complementari (palindrome)



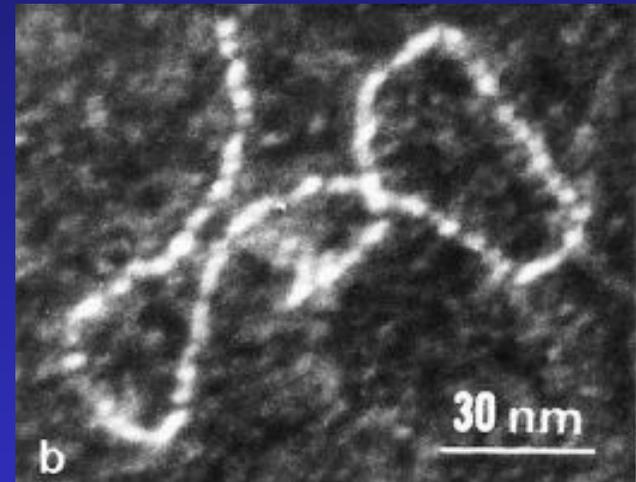
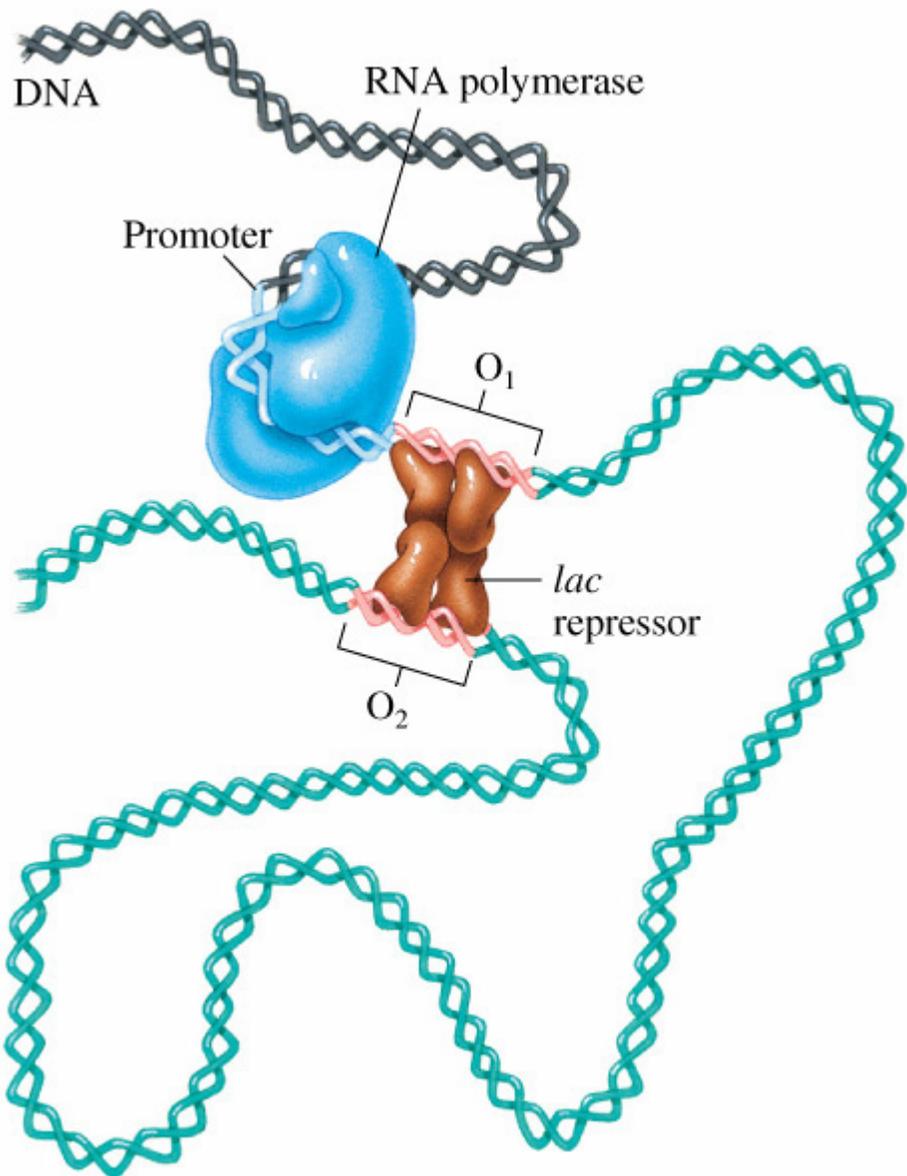
Il sito di legame di un regolatore omodimerico, come il repressore *Trp*, è una sequenza palindromica; le due subunità del regolatore dovranno quindi disporsi con una simmetria speculare



Il repressore *lac* è anch'esso un dimerico; si lega a due siti distanti tra loro, distorcendo l'elica in modo tale da impedire il legame con l'RNA polimerasi



L'ansa formata dal repressore *lac*



4- Regolazione co-trascrizionale

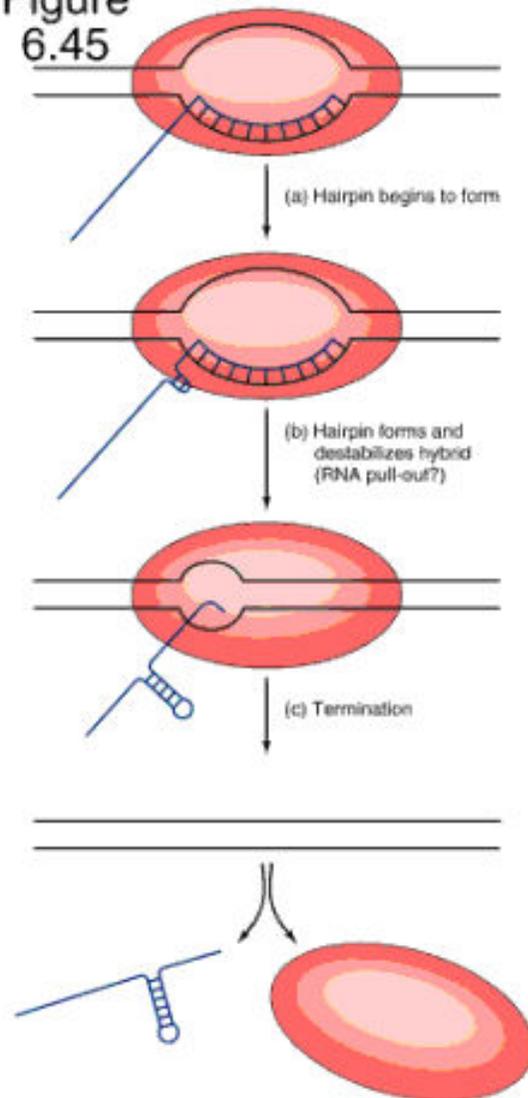
Si tratta di una modalità di regolazione per la quale la trascrizione di un gene, già iniziata, viene terminata precocemente, dando luogo ad un breve RNA, il cui prodotto non sarà funzionale.

Per comprendere questa modalità di regolazione, è necessario comprendere come viene attuata la **TERMINAZIONE DELLA TRASCRIZIONE**.

Infatti, questa modalità di regolazione sfrutta gli stessi meccanismi della terminazione “rho-indipendente”.

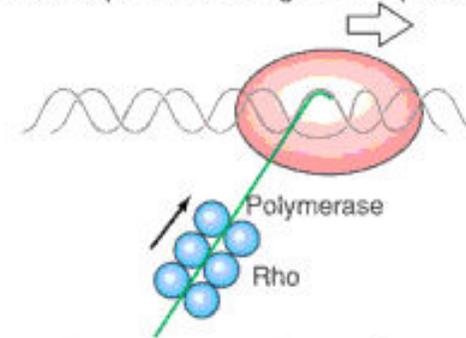
Due modalità per la terminazione della trascrizione nei procarioti

Figure 6.45

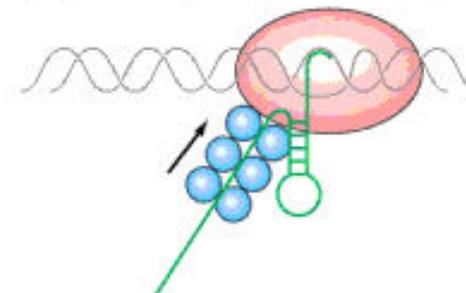


Rho Independent Transcription Termination

(a) Rho binds to transcript at rho loading site and pursues polymerase.



(b) Hairpin forms; polymerase pauses; rho catches up.



(c) Rho helicase releases transcript and causes termination.

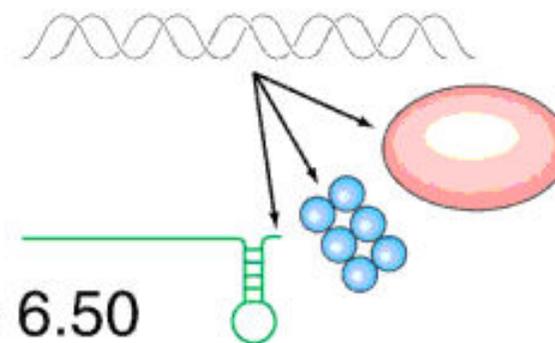
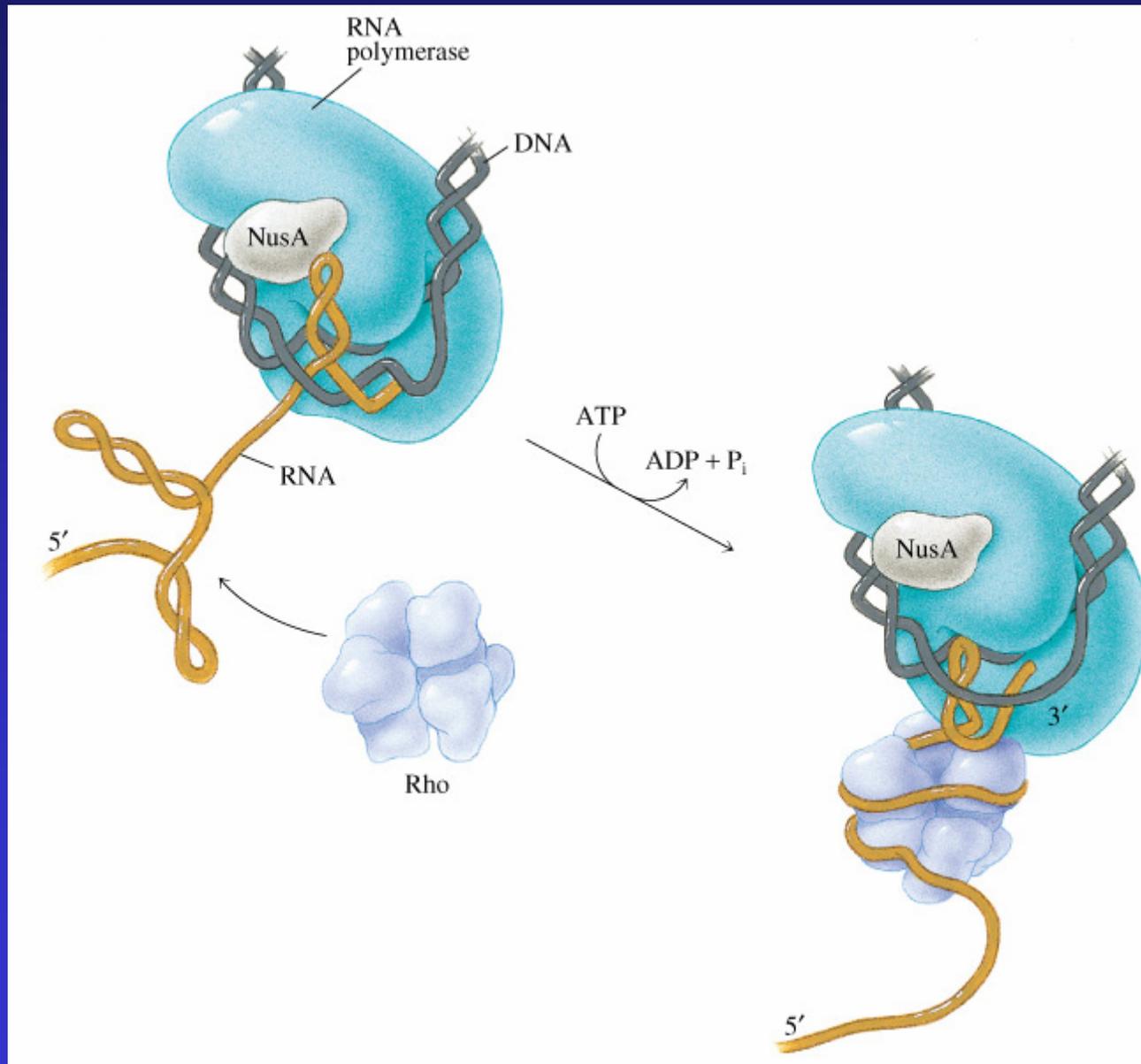


Figure 6.50

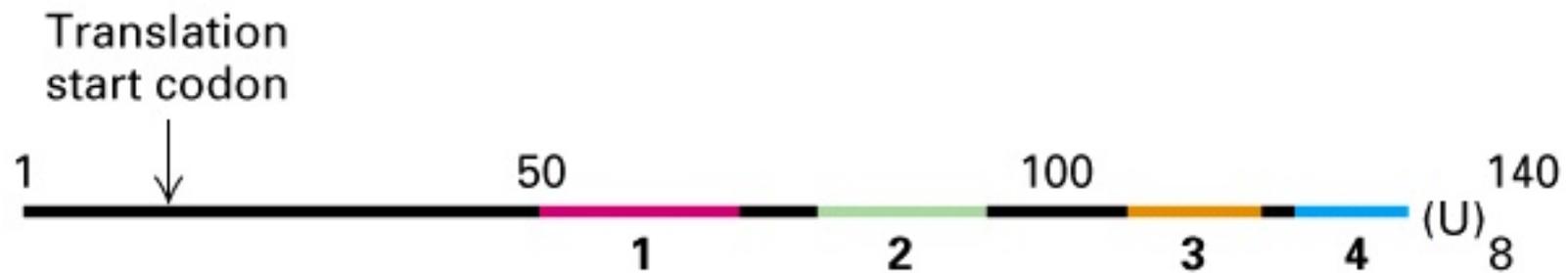
Rho Dependent Transcription Termination

Dettaglio della terminazione rho-dipendente

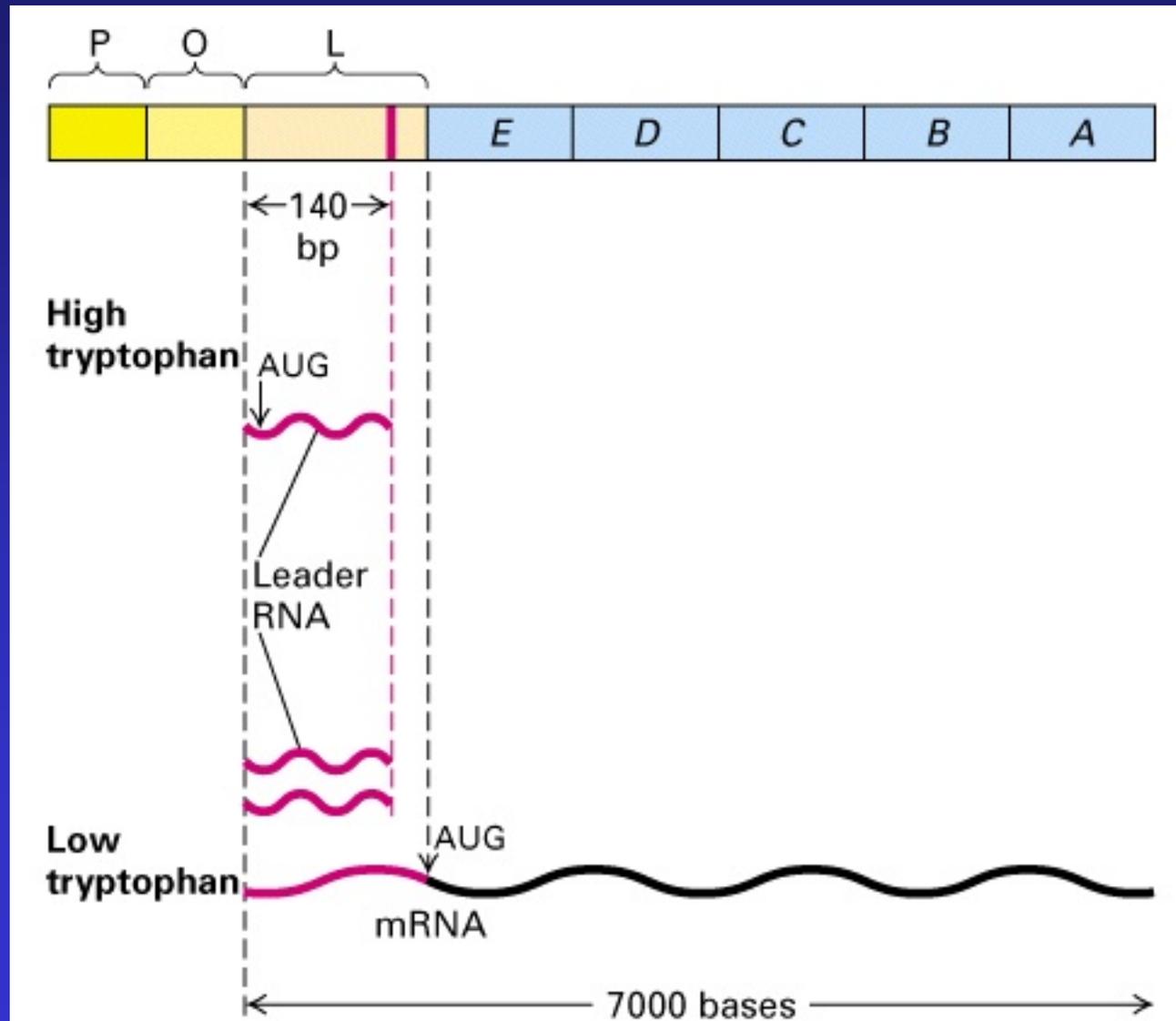


L'operone *Trp* e la regolazione genica cotraduzionale per attenuazione

(a) *trp* leader RNA



Solo se il livello intracellulare di triptofano è scarso si ha la trascrizione completa dell'mRNA

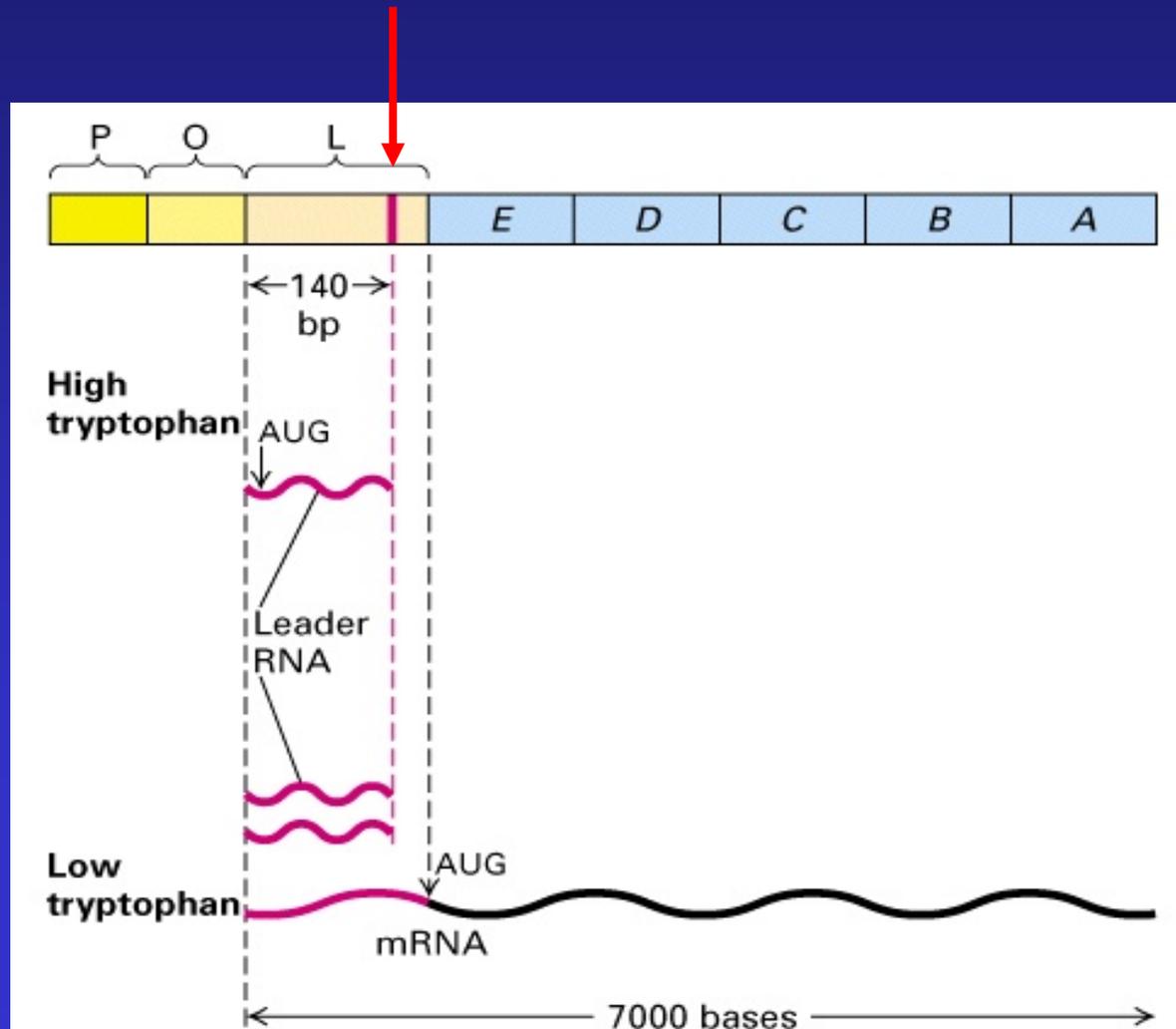


Per comprendere il meccanismo della regolazione co-traduzionale mediato da **attenuazione** è necessario ricordare che nei procarioti la traduzione (= sintesi proteica, operata dai ribosomi) ha inizio mentre l'mRNA è ancora in corso di trascrizione.

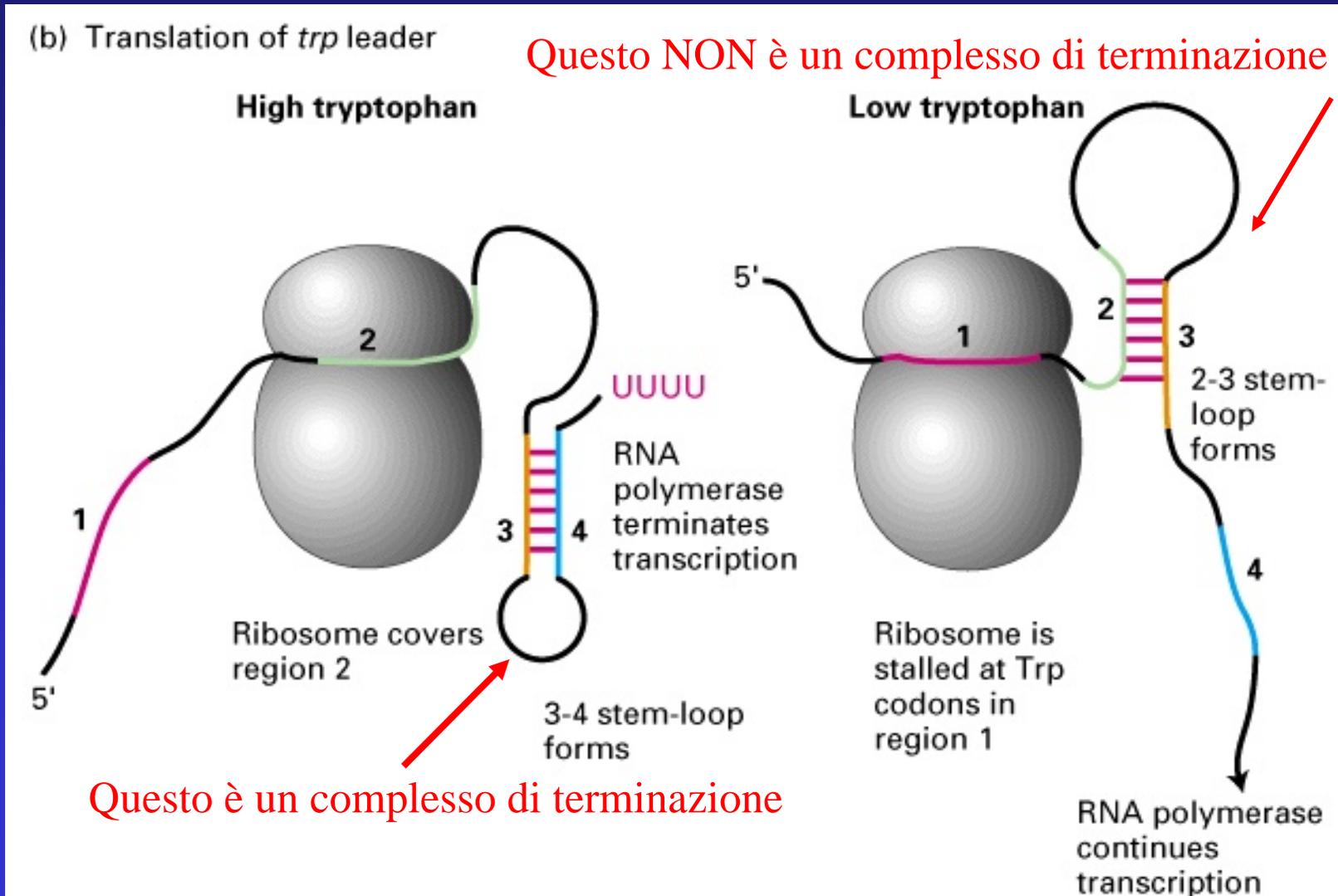
La velocità della sintesi proteica, inoltre, può essere influenzata dalla scarsità di un determinato amminoacil-tRNA.

—————> Il meccanismo dell'attenuazione fa sì la sintesi dell'mRNA dell'operone Trp venga completata solo se il Trp-tRNA è scarso.

Questa regione “leader” dell’ mRNA del I gene strutturale dell’ operone Trp è ricca di triplette codificanti per Trp; il ribosoma, che inizia a tradurre dalla tripletta AUG, si troverà in stallo se non ha a disposizione sufficiente Trp-tRNA.

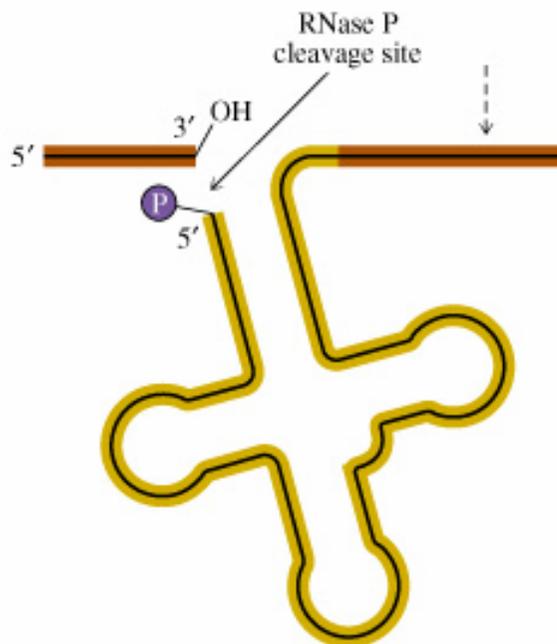


Se il livello di triptofano è basso, il ribosoma rallenta e non copre la regione 2 dell'mRNA in tempo per evitare che essa interagisca con la regione 3 che nel frattempo viene sintetizzata; le regioni 2 e 3, accoppiate, formano un complesso di terminazione.

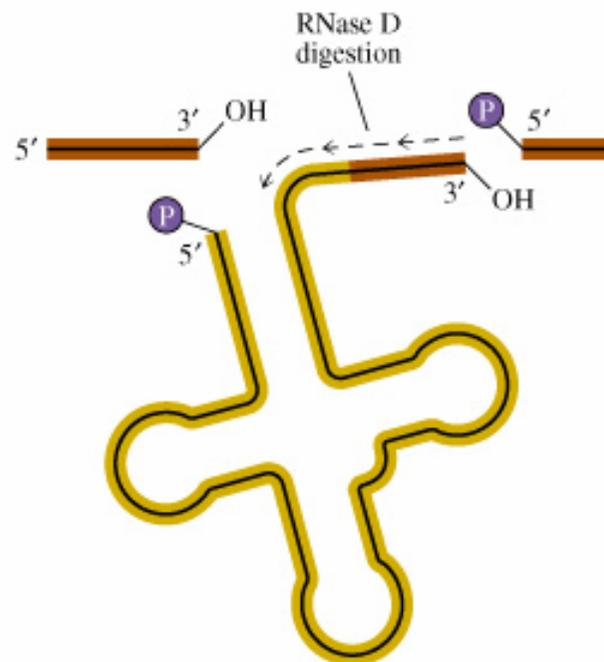


Il tRNA procariotico viene modificato dopo la sua sintesi, che genera un precursore di grandi dimensioni. I procarioti hanno un'unica DNA polimerasi per la sintesi di tutte le classi di RNA.

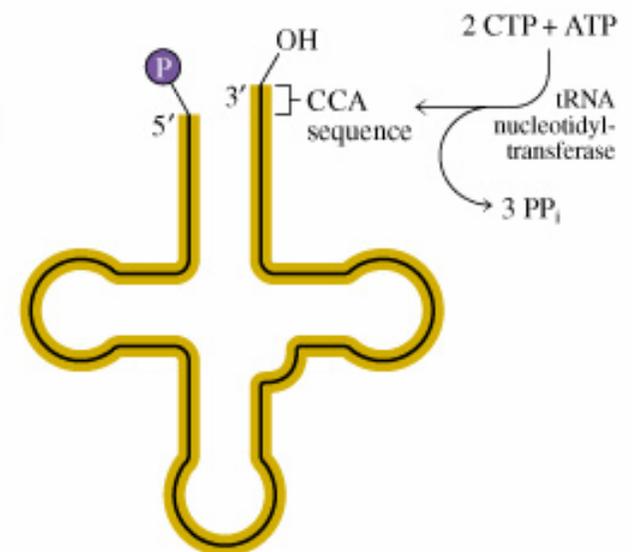
(a) RNase P and other endonucleases cleave the primary transcript.



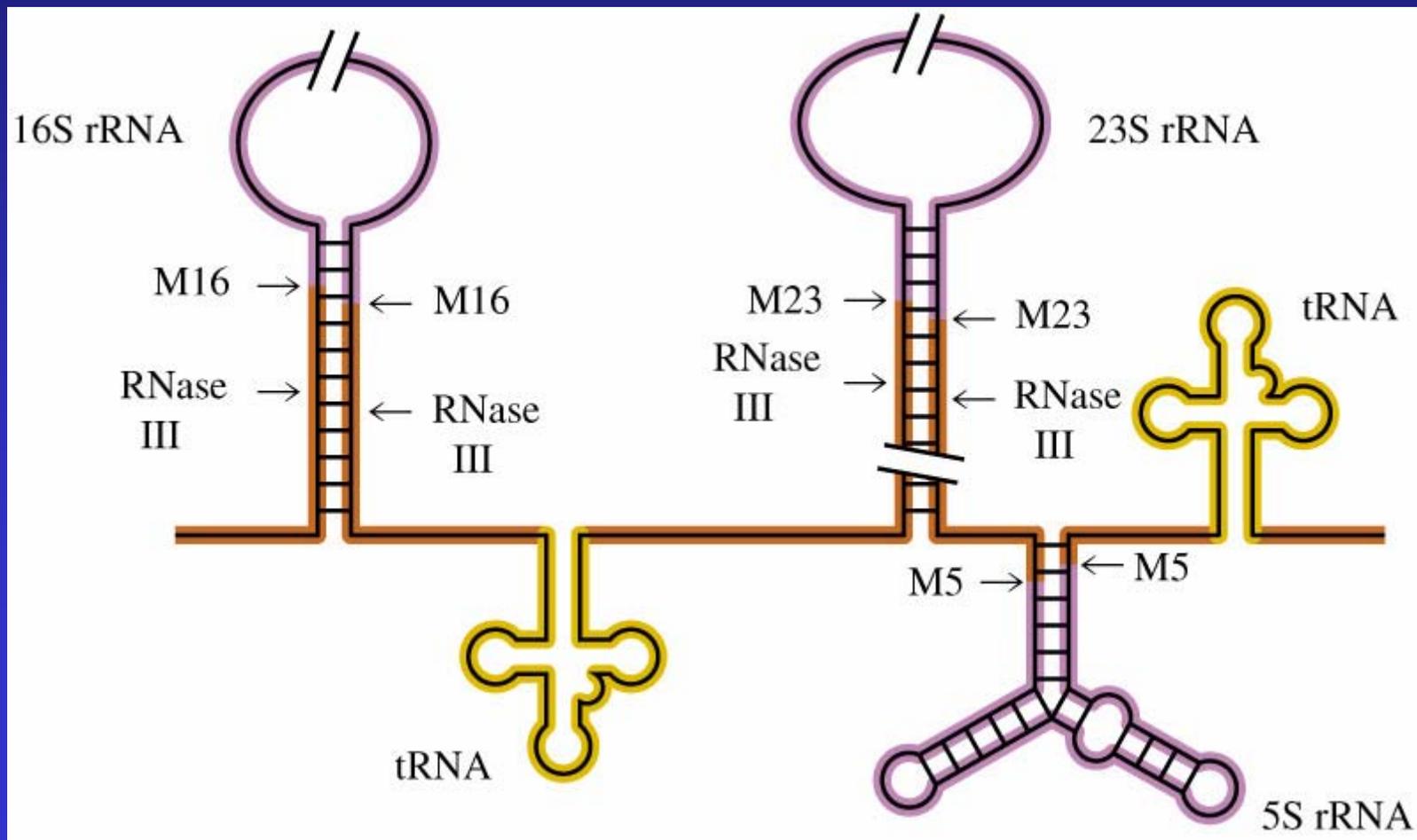
(b) RNase D trims the 5' end.



(c) tRNA nucleotidyl transferase adds CCA to the 3' end.



L'RNA ribosomiale dei procarioti viene sintetizzato come un'unica molecola; il precursore viene tagliato e metilato per originare i tre rRNA maturi



Un semplice sistema di trasduzione del segnale nei procarioti regola i geni che rispondono alla carenza di fosfati

