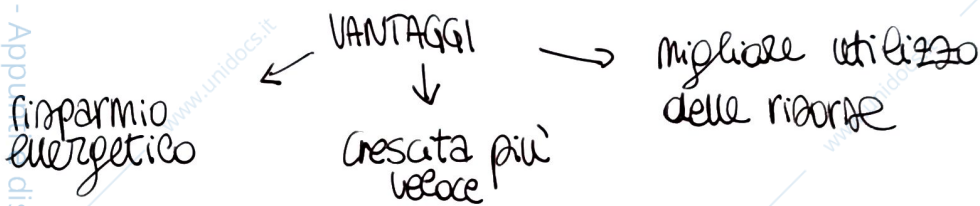


# Regolazione della trascrizione procarionica

Geni  $\rightarrow$  COSTRUTTI  $\parallel \rightarrow$  Sempre espressi kke' an  
essenziali per la cellula  
 $\hookrightarrow$  REGOLATI  $\parallel \rightarrow$  attivita' regolata in base  
alle necessita'.

MICROORGANISMI  $\rightarrow$  buonissima capacita' d'adattamento

possibile grazie alla capacita' di esprimere  
velocemente i geni necessari a far fronte a  
stimoli ambientali specifici



E. COLI  $\rightarrow$  fonte energetica } Glucosio  
 $\downarrow$   
se non c'e' ?

Il batterio si ADATTA attivando  
uno o piu' operoni che gli permettono  
di utilizzare altri zuccheri

## Geni controllati da SEGNALI EXTRACELLULARI



Senza proteine regolatrici RNA polimerasi lega debolmente diversi promotori



Occasionalmente abbiamo il passaggio da COMPLESSO CHIUSO a COMPLESSO APERTO.



LIVELLO DI ESPRESSIONE BASALE

• **REPRESSORE** : si lega all' operatore } sito sovrapposto al promotore



L' RNA polimerasi NON può legarsi xciò NON AVVIENE la trascrizione.

• **ATTIVATORE** : RNA polimerasi può legarsi al promotore e avviene, perciò, la trascrizione.

Nel genoma dei procarioti i geni sono organizzati in OPERONI



▶ gruppi di geni trascritti **INSIEME** in una singola molecola di mRNA perciò viene chiamato **POLICISTRONICO**.



Negli eucarioti i geni vengono trascritti **INSOLARMENTE**

- ▶ costituito da :
    - ▶ geni strutturali adiacenti
    - ▶ sequenza promotore
    - ▶ sequenza operatore
    - ▶ gene regolatore → non è parte integrante
- ↗ può essere dislocato

# OPERONE LAC 6000 pb

## 2 meccanismi di REGOLAZIONE

### REGOLAZIONE SPECIFICA

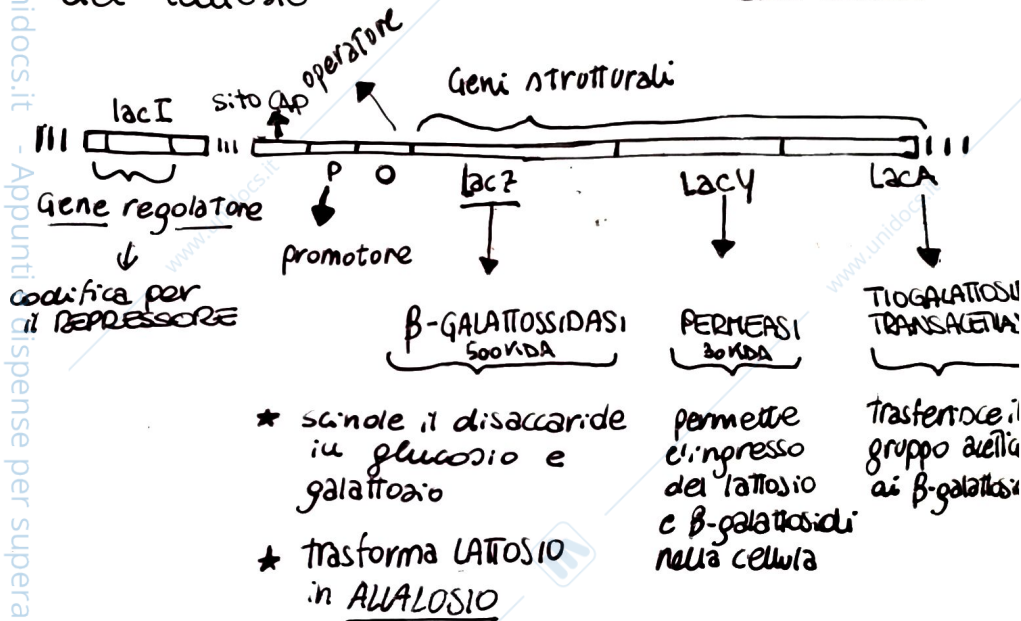
Controllo negativo da parte del repressore

risponde alla disponibilità del lattosio

### REGOLAZIONE GLOBALE

Controllo positivo da parte di una proteina attivatrice

risponde a cambiamenti ambientali



\* scinde il disaccaride in glucosio e galattosio

\* trasforma LATTOSIO in ALLALOSIO

permette l'ingresso del lattosio e β-galattosidi nella cellula

trasferisce il gruppo acilico ai β-galattosidi

il repressore, prodotto da LacI quando è assente l'induttore allallosio si lega all'operatore perciò la trascrizione dei geni strutturali non avviene.

invece, quando è presente allallosio, il repressore si lega all'induttore subendo una TRANSIZIONE

ALL'INSTERICA → non si lega all'operatore → SI TRASCRIZIONE

Presenza di ALLALOSIO = aumento di  $\beta$ -galattosidasi  
un migliaio di volte

induttore gratuito => IPTG  $\rightarrow$  lega il repressore ma non  $\hat{e}$  riconosciuto da  $\beta$ -galattosidasi.

### MAPPATURA DEI MUTANTI COSTITUTIVI

$\downarrow$   
 $Lac^c$

producono una  $\beta$ -galattosidasi funzionale MA non  $\hat{e}$  regolata dalla presenza/assenza dell'induttore

MUTANTI  $O^c$   $\leftarrow$   $\rightarrow$  MUTANTI  $I^c$

I mutanti presentano lo stesso fenotipo che  $\hat{e}$  inibito il legame del repressore all'operatore

MA

in PARZIALE DIPLOIDIA hanno fenotipi diversi

$\swarrow$   
costitutivo per  $O^c$

$\searrow$   
wild-type per  $I^c$

Mutazioni  $O^c$  interessano la sequenza nucleotidica dell'operatore che si trova adiacente ai geni strutturali.

$\rightarrow$  il repressore NON puo' legarsi percuo' i geni verranno espressi costitutivamente (ossia sempre.)

L'operatore controlla solo i geni adiacenti ed a valle

$\rightarrow$  DOMINANTE IN CIS

Solo sul plasmide la sintesi della  $\beta$ -galattosidasi  $\hat{e}$  regolata

# Mutazioni I<sup>c</sup>

sull'operone mutato non avviene la produzione del repressore.

Tuttavia, la copia wild-type del gene lacI produce un repressore che può legarsi all'operatore dell'operone cromosomico inibendo la trascrizione.



**DOMINANTE IN TRANS:** il gene regolatore controlla tramite il repressore i geni strutturali anche distanti sul cromosoma o su un altro cromosoma.

Perciò la sintesi delle  $\beta$ -galattosidasi qui è regolata

**Lac I<sup>s</sup>:** mutazione del gene regolatore non inducibile.



- > Non viene espressa la  $\beta$ -galattosidasi anche se c'è l'induttore.
- > Modifica del dominio di legame dell'induttore

Il repressore non si lega MAI all'induttore perciò la trascrizione è SEMPRE inibita.

il repressore  $\rightarrow$  proteina attiva = **TETRAMERO** } dipende dalle varie combinazioni alleliche

**Dominanza Negativa**  $\rightarrow$  tetramero incapace di legare l'operatore sebbene la subunità difettosa sia solo una delle quattro.

## ESPERIMENTI DI PARTIALE DIPLOIDIA

# IL REPRESSORE LAC

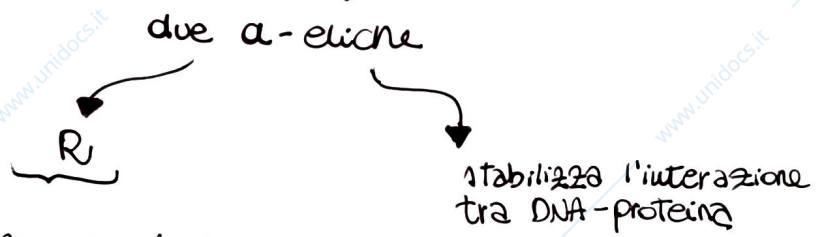


lega il promotore in forma di DIMERO  
(sito operatore)

2 monomeri (38kDa)

- ① DOMINIO N-TERMINALE (o Testa) lega il DNA
- ② DOMINIO CENTRALE "CORE" contiene sito di legame per l'induttore
- ③ DOMINIO C-TERMINALE :  $\alpha$ -elica per la formazione del tetramero

Il repressore lega il DNA con un motivo elica-giro-elica

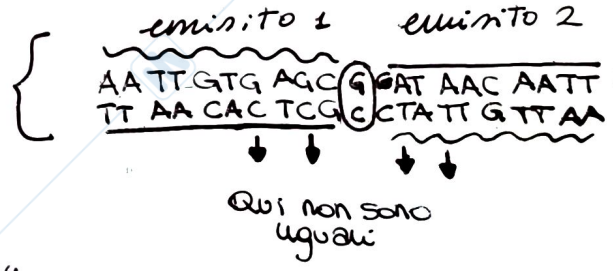


Riconosce/lega specificatamente una Regione di DNA nel solo modo

Sito operatore



- 21 pb
- Sequenza diviso in due parti ripetute ed invertite.



EMISTITI quasi palindromici:  $\rightarrow$  ciascuno è riconosciuto da un monomero del \*repressore\*

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

IL REPRESSORE PUO' AVERE DELLE MUTAZIONI:

LacI<sup>S</sup>: no interazione tra repressore e induttore

↓  
NO TRASCRIZIONE  
GENI STRUTURALI

mappate: Nella tasca dove si lega l'induttore  
superficie all'interfaccia tra i  
due dimeri.

LacI<sup>-</sup>: influenza l'interazione tra i due dimeri  
e il raggiungimento della conformazione  
tetramerica.

mappate: dominio centrale  
α-elica di oligomerizzazione

↓  
NO TETRAMERO

LacI<sup>-d</sup>: mancata attività repressiva

mappate: sito legame per il DNA

\* testa del monomero



lega in modo indipendente mezzo sito del  
promotore → interazione di bassa affinità

STRUTTURA DIMERICA → due monomeri si legano  
simultaneamente



ALTA AFFINITA'

tra le teste e il solco maggiore

# OPERATORE e REPRESSORE LAC IN DETTAGLIO

Il repressore lac funziona in forma tetramericca



legare contemporaneamente più siti operatore



L'operatore Lac è costituito da 3 sequenze :

O1, O2, O3.

a monte di LacZ

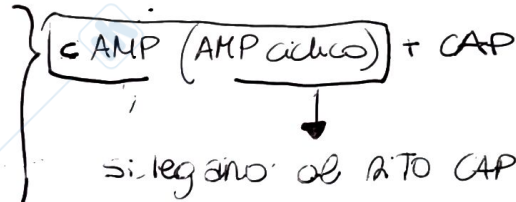
Il repressore si lega a O1 ed a O2 o O3 } 83 ntd a monte O1  
483 ntd a valle O1

curvatura del DNA

## CONTROLLO POSITIVO OPERONE LAC

Lontano dall'operone Lac c'è il gene che codifica per la proteina regolatrice CAP  
• dimerico  
• dominio per il riconoscimento della sequenza OSE DNA  
• dominio di ATTIVAZIONE

• sintetizzato dall'enzima ADENILATO CICLASI che si attiva quando il livello di glucosio è basso  
• attiva la trascrizione dell'operone permettendo la divisione del lattosio



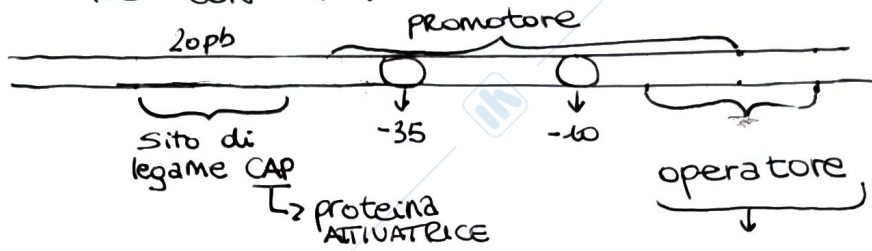
Il legame CAP + CAP aumenta la capacità dell'RNA pol di trascrivere l'operone LAC

CAP si lega al solco maggiore del DNA attraverso il motivo elica-giro-elica che provoca un ripiegamento della doppia elica di 90°

facilita l'interazione tra CAP e c-Terminale sub. a RNA pol

CAP attiva la trascrizione reclutando la polimerasi su promotori privi dell'UP-element MA con il sito CAP.

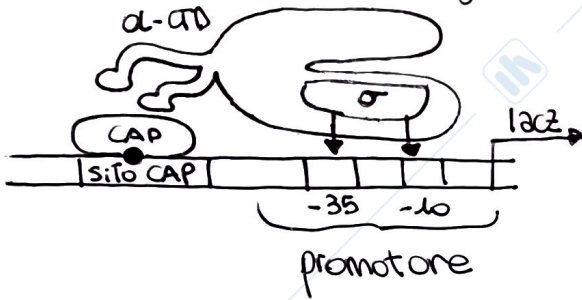
### INTERAZIONE DELLA REGIONE PROMOTORE/OPERATORE CON CAP



Il repressore occupa fisicamente il promotore per cui l'RNA polimerasi non può legarsi.

**α-CTD** protrude dalla struttura enzimatica e può interagire con CAP (che è legata al sito CAP)

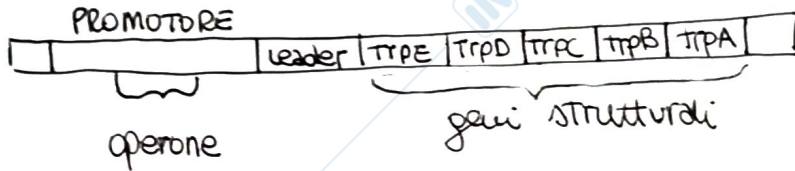
**fattore sigma** lega la sequenza nucleotidica a livello degli elementi -35 e -10



# OPERONE TRIPTOFANO

2 meccanismi di controllo:

- ↳ CONTROLLO NEGATIVO DI UN SISTEMA REPRIMIBILE  
↳ all'inizio
- ↳ CONTROLLO A LIVELLO DELLA TRASCRIZIONE  
↳ attenuazione, modula la terminazione della trascrizione.



L'operone è regolato da un REPRESSORE

normalmente è inattivo MA viene attivato dal legame con una molecola di TRIPTOFANO

↓  
corepressore

Quindi: ALTE CONCENTRAZIONI di TRIPTOFANO  
NO! TRASCRIZIONE DELL'OPERONE

BASSE CONCENTRAZIONI di TRIPTOFANO  
SI! TRASCRIZIONE DELL'OPERONE

## CONTROLLO a LIVELLO della TERMINAZIONE

ATTENUAZIONE: meccanismo che interrompe la sintesi dell' mRNA in presenza di triptofano quando è sufficiente per le attività metaboliche cellulari.

In presenza di basse concentrazioni di triptofano la trascrizione inizia ma termina dopo 160 nt.

Se la quantità di triptofano è LIMITANTE la trascrizione continua.



prodotti gli enzimi x la sintesi dell'amminoacido

Sequenza Leader (161 nt) contiene una

ORF

↳ Codone d'inizio seguito da 13 codoni per amminoacidi.

↳ 2 x triptofano

1 x terminazione

Sovrapposte ed a valle della seq. Cod. Sono presenti SEQUENZE COMPLEMENTARI (1-2-3-4) che possono appaiarsi x formare strutture alternative.

3-4 = Terminatore di trascrizione: Forcina seguita da 7 U<sub>3</sub> case artice

3-2 = forcina → No terminatore

# FAGO LAMBDA

I fagi esprimono GENI con una precisa SEQUENZA TEMPORALE:

- ① geni precoci
- ② geni intermedi
- ③ geni tardivi

Fago Lambda ( $\lambda$ ) → 50 geni (50pb di DNA)  
→ può compiere:  
→ ciclo LITICO  
→ ciclo LISOGENO

la scelta dipende da:  
a) eventi  
b) proteine regolatrici che agiscono in trans su una regione di controllo.

Il genoma è formato da:

- ① REGIONE DI CONTROLLO: contiene i geni che codificano le PROTEINE REGOLATRICI
- ② A SINISTRA: geni che codificano per enzimi implicati in:
  - RICOMBINAZIONE
  - INTEGRAZIONE
  - ESCISSIONE DNA
- ③ A DESTRA: geni codificanti per PROTEINE REPLICATIVE
- ④ 20 GENI → PROTEINE STRUTURALI → testa  
→ coda del fago
- ⑤ 2 GENI → LISI BATTERICA



N produce pN (proteina), ossia un ANTI-TERMINATORE

↓ (una certa concentrazione)

inibisce la terminazione della trascrizione alla fine di N stesso e CRQ.

↓

TRASCRIZIONE DEI GENI PRECOCI RITARDATI

↙

↘

A VALE DI N

- CIII
- XIS } permettono al cromosoma di X di integrarsi / excidersi dal cromosoma di E. coli
- INT

A VALE DI CRQ

- CII } switch ciclo litico e ciclo lisogenico
- O } geni implicati nella replicazione
- P
- Q

GRAZIE AL GENE N

↳ TRASCRITTO E TRADOTTO

FUNZIONE DI ANTI-TERMINAZIONE

↓

INTEGRAZIONE DEI GENI PRECOCI RITARDATI NEL MESSAGGERO POLIESTRONICO.

IL GENE Q produce pQ, ossia un ANTI-TERMINATORE

↓

PROSEGUIMENTO DELLA TRASCRIZIONE CHE PORTA ALLA SINTESI DELLE PROTEINE TARDIVE ED È ZIM, PER LA VITA DELLA CELLULA E RILASCO PROGENIE FIGLIA

### OPERONE SINISTRA

(PN) si lega agli 8' di una sequenza di mRNA  
chiamata Nut con i fattori batterici del  
complesso NUT → 60 nt dopo l'inizio della  
trascrizione

↓  
PN + NusA + NusB + NusE + NusG

A questo punto PN interagisce con l'RNA polimerasi impedendole di riconoscere il terminatore

↓ Rho-dipendente

### OPERONE DESTRA

PN + Nut → proseguimento della trascrizione

QBE riconosce una sequenza sul DNA NON sull'RNA.

QBE è situata tra -10 e -35  
del promotore dei geni  
tardivi

Questa interagisce con il fattore 64 in vicinanza  
del canale di uscita di RNA pol

↓  
permette la trascrizione  
dei geni TARDIVI

IL CICLO LITICO È SUPPORTATO DA:

- presenza di nutrienti e buono stato della cellula
- presenza del repressore del ciclo lisogenico
- assenza del repressore del ciclo litico

Q

## CICLO LISOGENICO

Il genoma fagico viene integrato nel genoma della cellula ospite.

Poi viene replicato e propagato come un tratto del DNA batterico.

L'esposizione del batterio lisogenico a radiazioni o altri agenti che danneggiano il DNA può attivare e INDUZIONE LISOGENICA

escissione del genoma fagico dal cromosoma di E. coli

↓

CICLO LITICO

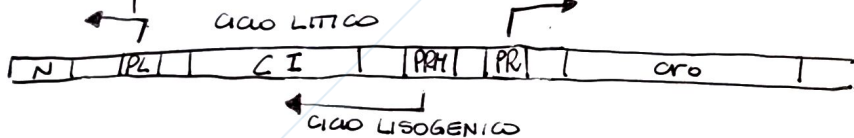
La scelta dei due cicli avviene tramite il controllo dell'espressione dei geni di regolazione

REGIONE di CONTROLLO

↳ CI : repressore ciclo litico

↳ CRO repressore ciclo lisogenico

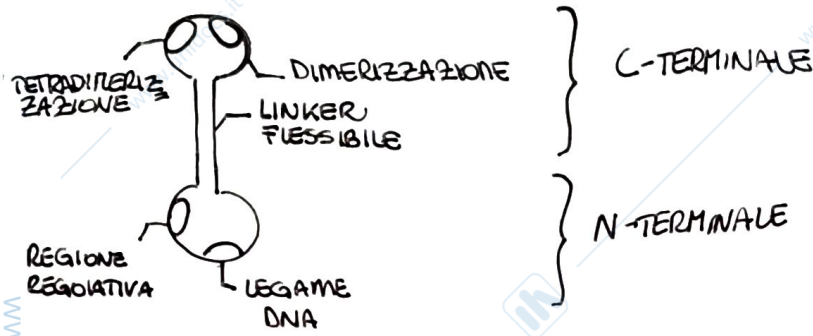
↳ 3 promotori = PR PL PRM



PR e PL = promotori FORTI e COSTITUTIVI che legano l'RNA polimerasi senza fattori di trascrizione

# STRUTTURA DEL REPRESSORE CI

Gene CI struttura:



## DOMINIO N-TERMINALE

- ▶ Contiene il motivo strutturale ELICA-GIRO-ELICA per legarsi al DNA in modo specifico  
↳  $\alpha$ -elica  $\beta$  interagisce con il solco maggiore
- ▶ Regione ATTIVATRICE  $\Rightarrow$  permette la funzionalità di PAM

## DOMINIO C-TERMINALE

- ▶ regione che gli permette di DIMERIZZARE
- ▶ " " " " " TETRAMERIZZARE e LEGARSI in modo COOPERATIVO al DNA.

IL REPRESSORE  $\lambda$  SI LEGA AL DNA COME DIMERO



duplice funzione

reprime i geni  $\lambda$  con un meccanismo di controllo negativo

attiva la sua stessa espressione con un meccanismo di controllo positivo

## STRUTTURA DI ORO : solo funzione di repressore

> si lega al DNA come dimeri e impedisce il legame del repressore nella regione di controllo

con un motivo elica-giro-elica }  $\alpha$ -elica R riconosce il solco maggiore del DNA dei 3 operatori

### PER CI :

Il repressore ha un' affinità 10 volte superiore per OR1 rispetto a OR2 e OR3.

> bassa concentrazione  $\rightarrow$  dimeri  $\rightarrow$  OR1

> conc. piú alte  $\rightarrow$  tetrameri } grazie alla flessibilità del linker

> conc. elevatissime  $\rightarrow$  OR1, OR2 e OR3

### \*PER ORO :

Il repressore ha un' affinità 10 volte superiore per OR3 rispetto a OR1 e OR2.

Il promotore PRM e' DEBOLE necessita' della funzione di un ATTIVATORE per essere trascritto

CI  $\rightarrow$  dominio N-terminale che interagisce con  $\sigma$  della polimerasi per reclutarla sul promotore

$\rightarrow$  repressore MA attivatore della sua stessa sintesi

Quando e' legato a OR1 e OR2  $\rightarrow$  molecol in OR2 che ha la funz. di ATTIVATORE

Se i livelli del repressore si alzano di molto



AUTOREGOLAZIONE NEGATIVA

me

OR3 sarà occupato da CI

Reprime il promotore PRM

In conclusione:

-OR1 NIENTE

-OR1 - OR2 ATTIVAZIONE di CI

-OR1 - OR2 - OR3 REPRESSORE di CI

① PR non viene legato

↳ da RNA pol

② No trascrizione CRO e geni regolati da CRO

\*CRO → controllo negativo

λ infetta E. coli e PR viene legato dalle RNA polimerasi e trascrive il messaggero di CRO



prodotto una proteina che si lega a OR3 impedendo alla polimerasi di trascrivere dal promotore PRM inibendo la produzione del repressore CI

Livelli di CRO troppo elevati si lega a OR1 spegnendo il promotore PR



SISTEMA DI AUTOREGOLAZIONE NEG.

## RecA attivato dagli UU DEGRADA il REPRESSORE

Il ciclo lisogenico passa a ciclo litico quando viene DEGRADATO CI da parte delle proteine che rispondono a danni al DNA  $\rightarrow$  raggi UV

↓  
RISPOSTA SOS

RecA : ① ruolo nella ricombinazione  
② attività proteolitica su CI

# TRASCRIZIONE EUKARIOTI

RNA pol I → geni rRNA → nucleo

RNA pol II → precursori mRNA → nucleoplasma

piccoli RNA implicati nella regolazione post-Transcrizionale

RNA pol III → i x . rRNA SS → nucleoplasma  
• tRNA  
• RNA per alcune molecole di mRNA mature.

Nelle piante → PolVa e PolVb } silenziamento dei geni

TATA-box

TFII D → formata da più subunità  
↳ TBP (attiva la tr. basale)    ↳ TAF (legge gli attivatori)

TFII A → mantiene il complesso TFII D-DNA

TFII B → recluta la pol II

Pol II + TFII F → si lega alla pol II prima degli altri fattori x fare il complesso di pre-initiaz. solo al promotore

TFII E + TFII H → due subunità funzionali:  
① apre il DNA  
② fosforila CTD → allungamento

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

ATTIVATORE trova una seq. specifica e si lega

recruta SAGA } complesso di rimodellamento della cromatina =



Complesso con attività ACETILTRANSFERASICA

acetila le CODE ISTONICHE

recrutano SWI e SNF

↳ rimodellano le regioni acetilate

↳ allontanano tra loro i nucleosomi



a volte vengono TOC1

Regione così modellata è accessibile a fattori poli-basali

e la TATA-box è disponibile e recruta tutto il complesso di trascrizione basale



RNA sul promotore