

CORSO DI GENETICA

CONTROLLO DELL'ATTIVITÀ
GENICA NEI PROCARIOTI

Trascrizione e traduzione

La **trascrizione** è il processo con cui l'informazione ereditaria viene trasferita dal DNA all'RNA. La **traduzione** è il processo con cui l'informazione viene trasferita dall'RNA alle proteine. La trascrizione viene effettuata dalla **RNA polimerasi**. Nei procarioti esiste solo una RNA polimerasi che trascrive tutti i geni, mentre negli eucarioti ci sono 3 diverse RNA polimerasi:

- **RNA polimerasi I per la sintesi dell'RNA ribosomale (rRNA)**
- **RNA polimerasi II per la sintesi dell'RNA messaggero (mRNA)**
- **RNA polimerasi III per la sintesi dell'RNA transfer (tRNA)**

Il messaggero

La struttura finale del mRNA, pronta per la traduzione, è uguale sia nei procarioti che negli eucarioti.



Riassunto della traduzione

Inizio della traduzione

Un ribosoma si attacca alla molecola di mRNA in corrispondenza della tripletta di inizio AUG. Su questo codone AUG si lega il tRNA con l'anticodone corrispondente che porta la metionina (N-formil metionina nei procarioti).

Sintesi della proteina

Entra il tRNA corrispondente al secondo codone e si forma il legame peptidico tra la metionina iniziale e il secondo amminoacido. Il ribosoma si sposta sull'mRNA permettendo che una sola tripletta alla volta sia disponibile all'attacco col tRNA specifico. Man mano che il ribosoma si sposta si ha l'allungamento della catena proteica.

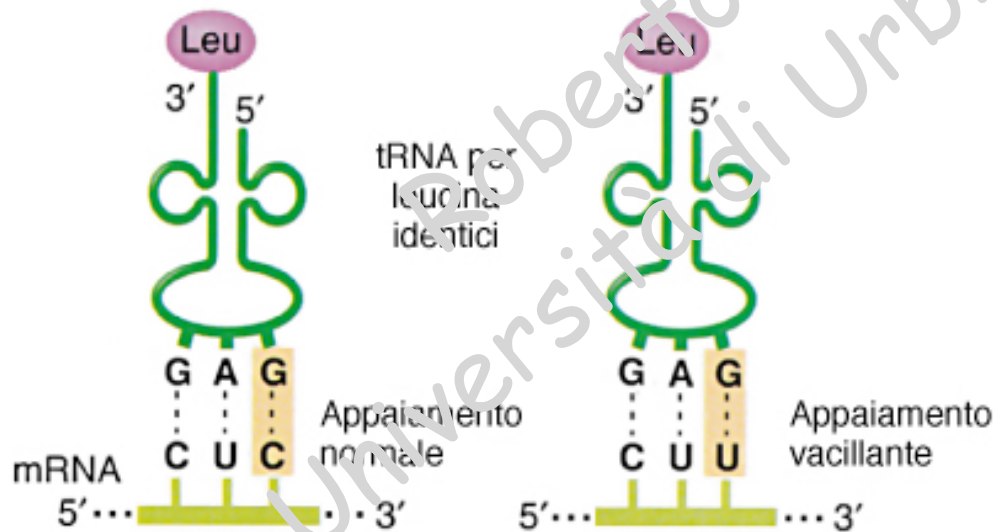
Termine della traduzione

Quando il ribosoma raggiunge le triplette di stop (UAG,UAA,UGA) si stacca dall'mRNA.

Il tRNA

Figura 6.9

Esempio di vacillamento nell'appaiamento tra basi. Due diversi codoni per leucina (CUC, CUU) possono essere letti dalla stessa molecola di tRNA per leucina, in contrasto con le normali regole di appaiamento tra le basi.



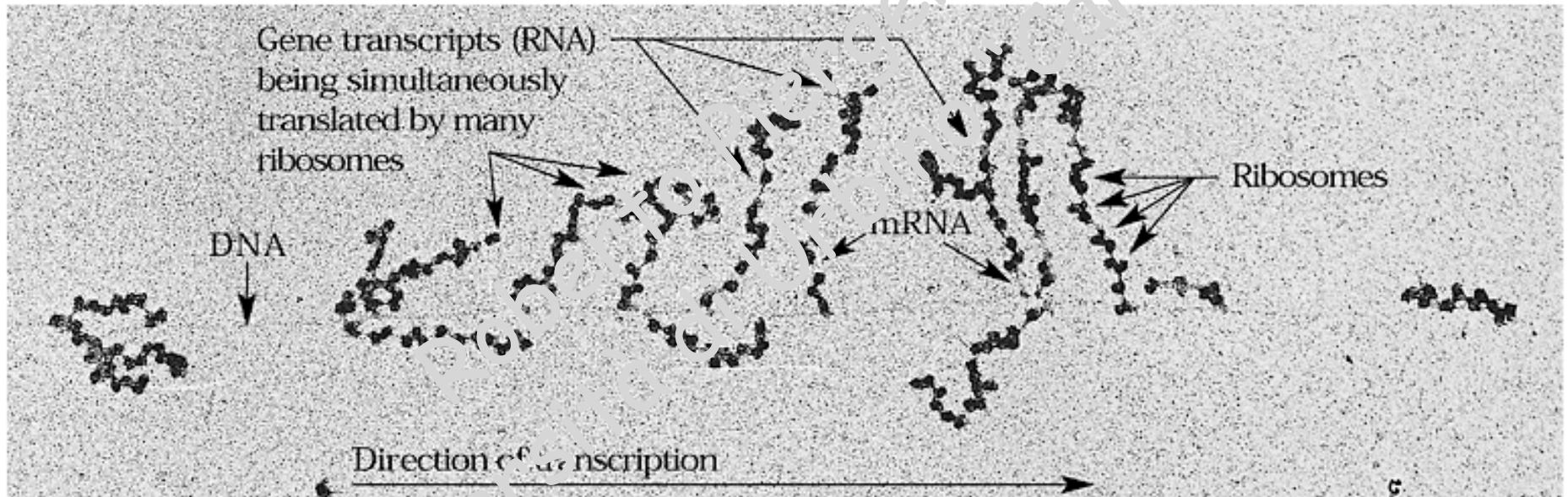
Esistono meno di 64 tRNA perché in alcuni casi lo stesso tRNA può leggere più di un codone che codifica per lo stesso aminoacido.

Ciò è possibile per il **vacillamento** (wobbling) o oscillazione della terza base dell'anticodone.

Tabella 6.1 Vacillamento del codice genetico

Nucleotide all'estremità 5' dell'anticodone		Nucleotide all'estremità 3' del codone
G	può appaiarsi con	U o C
C	può appaiarsi con	G
A	può appaiarsi con	U
U	può appaiarsi con	A o G
I (inosina)	può appaiarsi con	A, U o C

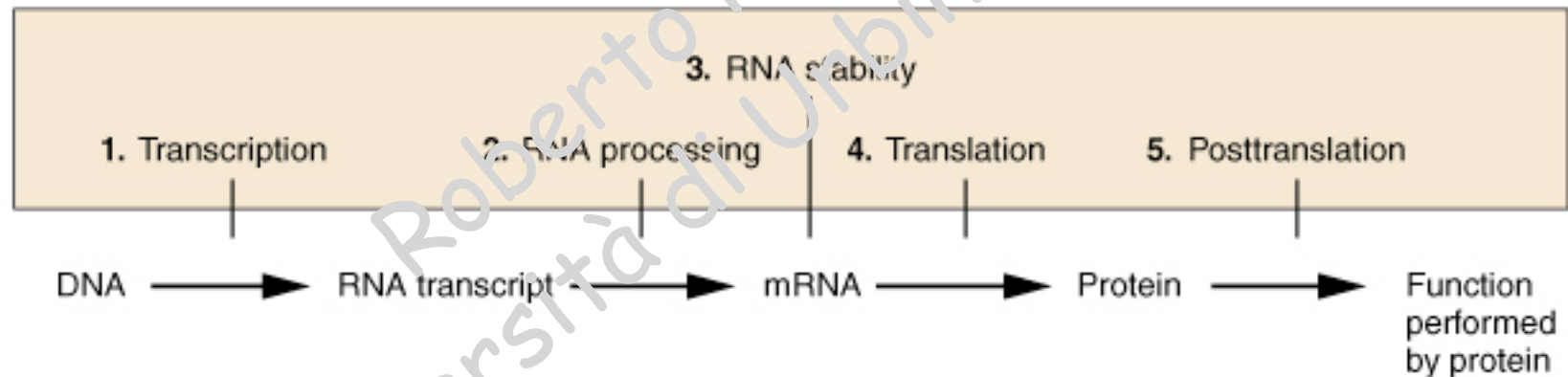
Accoppiamento della trascrizione e della traduzione nei procarioti



From O. L. Miller, Jr., B. A. Hamkalo, and C. A. Thomas, Jr., *Science* 169:392-395, 1970. Copyright © 1970

Regolazione genica nei procarioti

Levels at which gene expression is regulated in prokaryotes



Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

Il metabolismo del lattosio

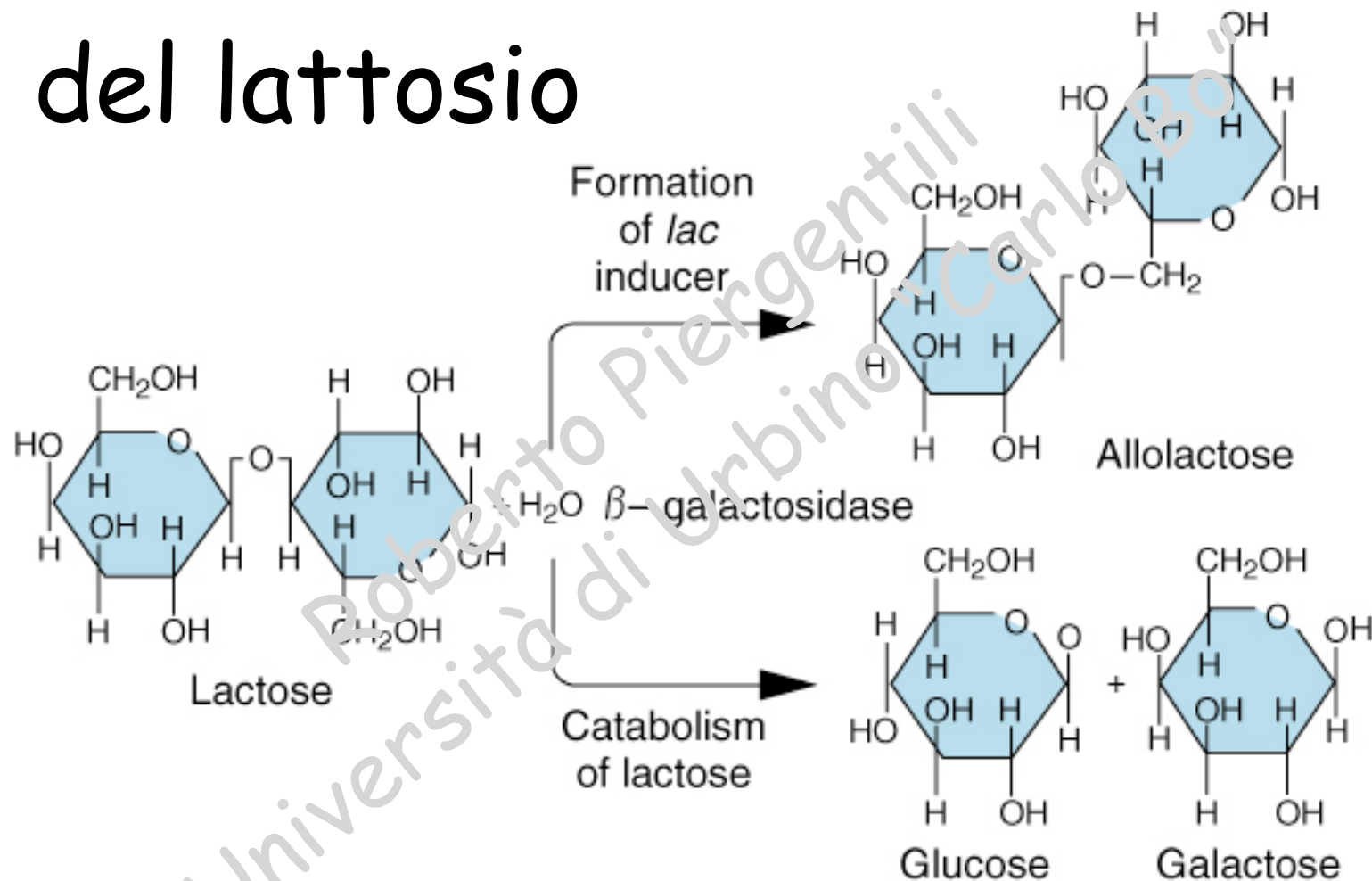
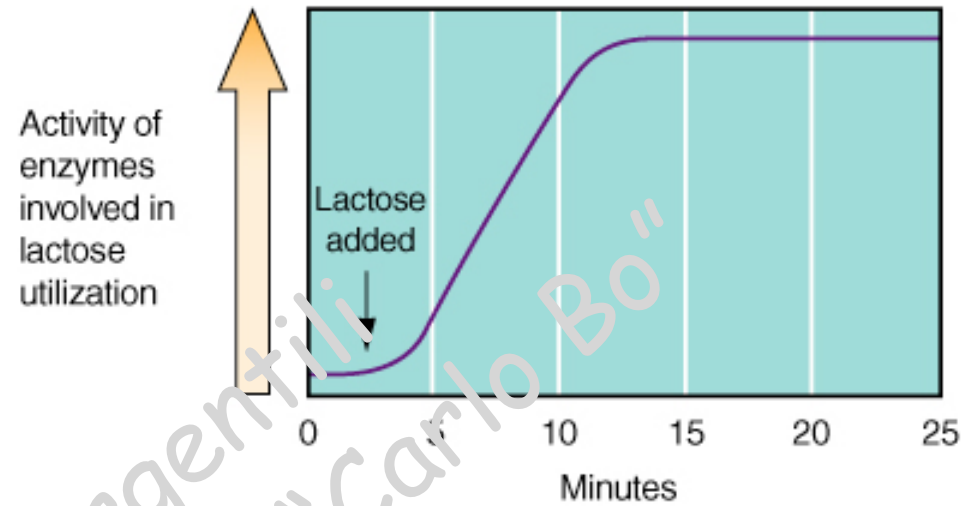


Figure 23.6 Two physiologically important reactions catalyzed by β -galactosidase: (1) conversion of lactose to the *lac* operon inducer allolactose, and (2) cleavage of lactose to produce the monosaccharides glucose and galactose.

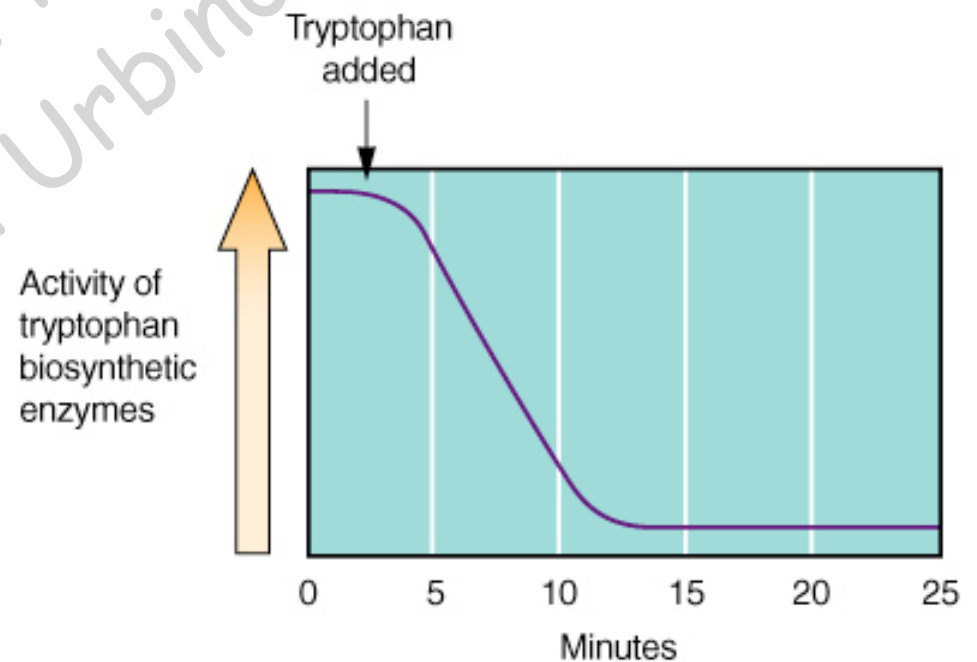
Il metabolismo del lattosio è inducibile in *E. coli*

Si parla di **induzione** se, aggiungendo il substrato, la sintesi enzimatica si **innalza**.

Si parla di **repressione** se, aggiungendo il substrato, la sintesi enzimatica si **abbassa**.



(a) Induction of enzyme synthesis.

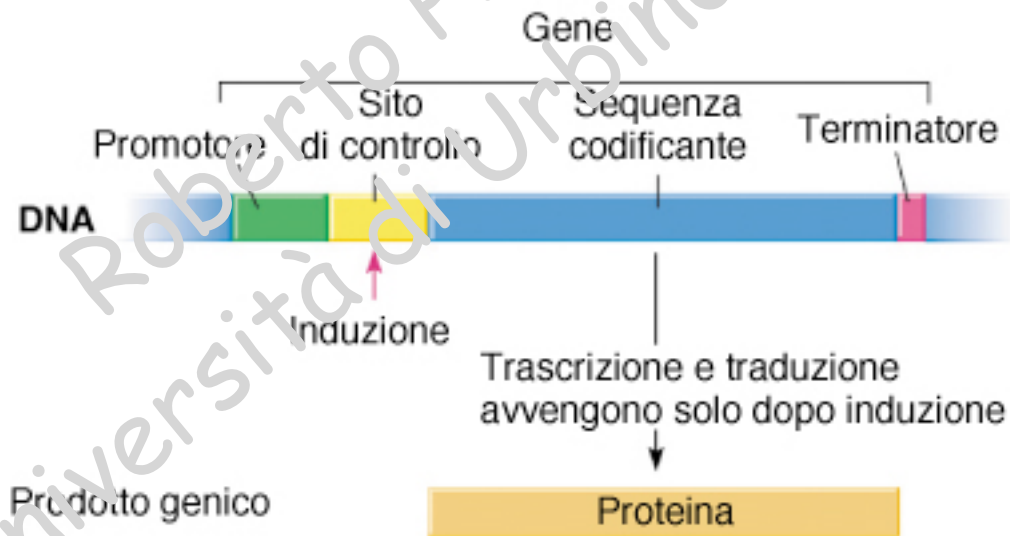


(b) Repression of enzyme synthesis.

I geni inducibili

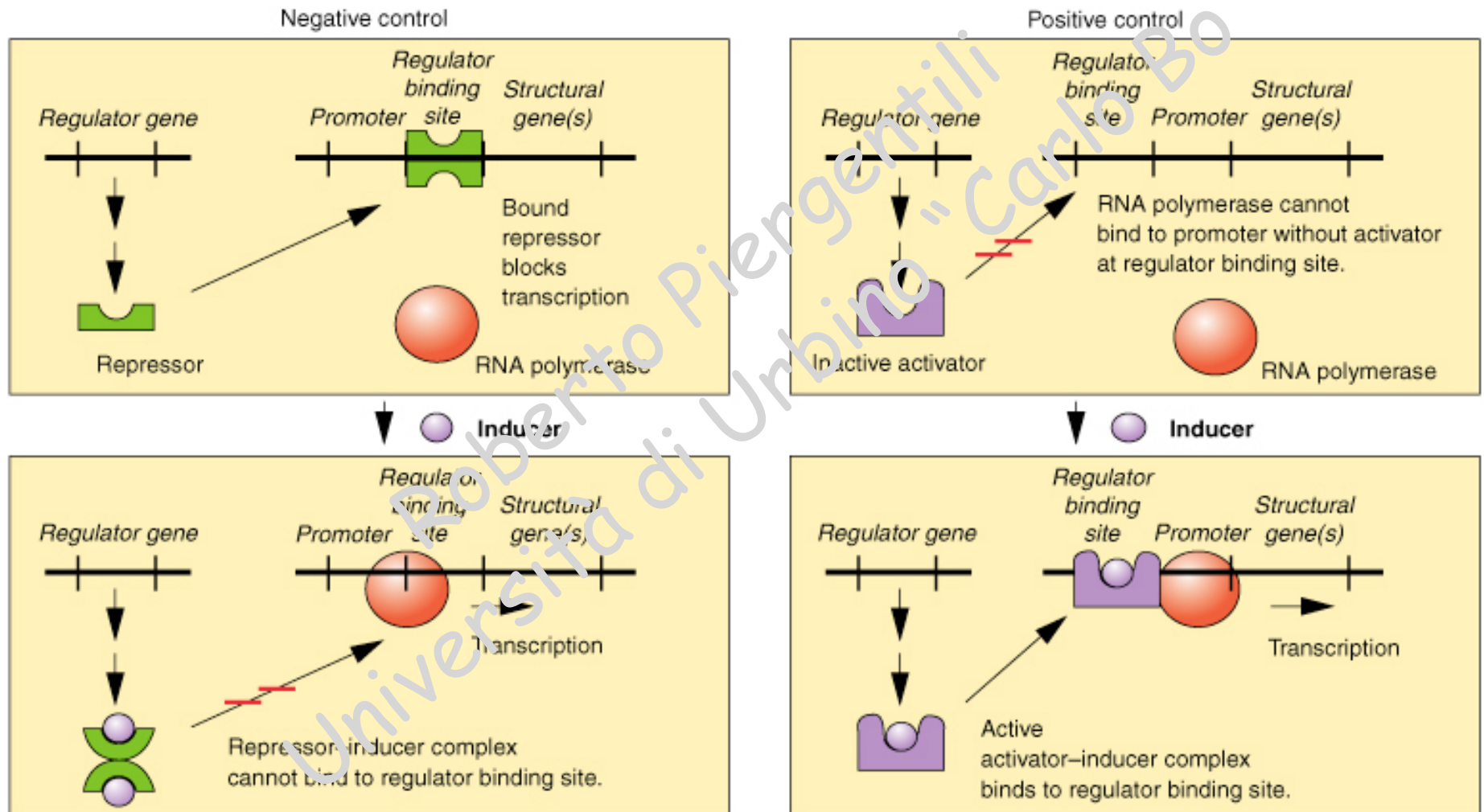
Figura 16.1

Organizzazione di un gene inducibile.



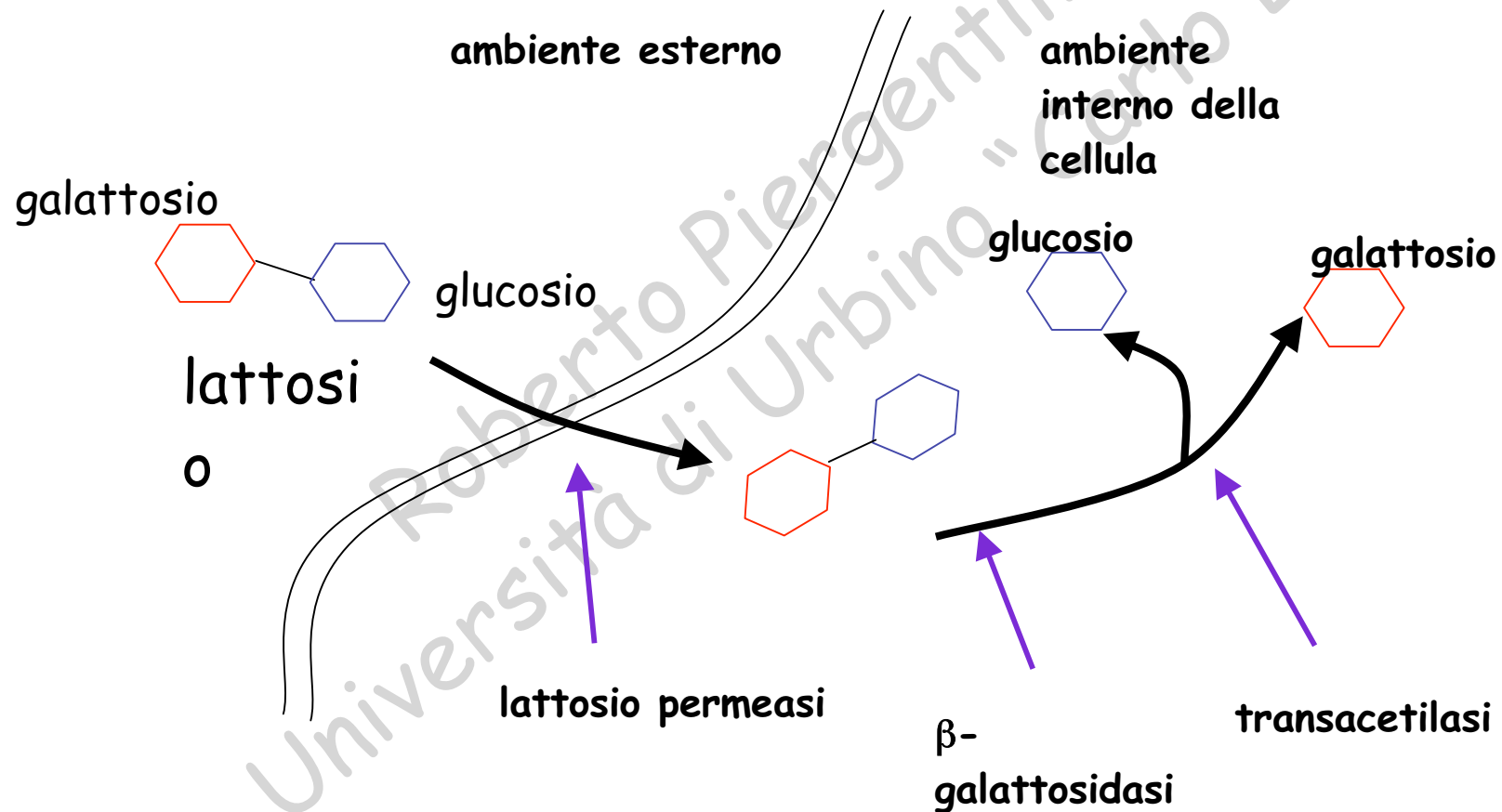
I geni inducibili sono espressi solo quando indotti

Controllo positivo e negativo



(a) Inducible system.

Ci sono tre enzimi che vengono coespressi in presenza di lattosio



In assenza di lattosio sono presenti circa 3 molecole di ciascun enzima nella cellula. In seguito all'aggiunta di lattosio il numero delle molecole dei tre enzimi arriva a circa 3000.

La scoperta dell'operone



From left to right: Francois Jacob (1920-), Jacques Monod (1910-1976) and André Lwoff (1902-1994), awarded the Nobel Prize for Physiology or Medicine in 1965. Jacques Monod was director of the Pasteur Institute in Paris from 1971 to 1976.

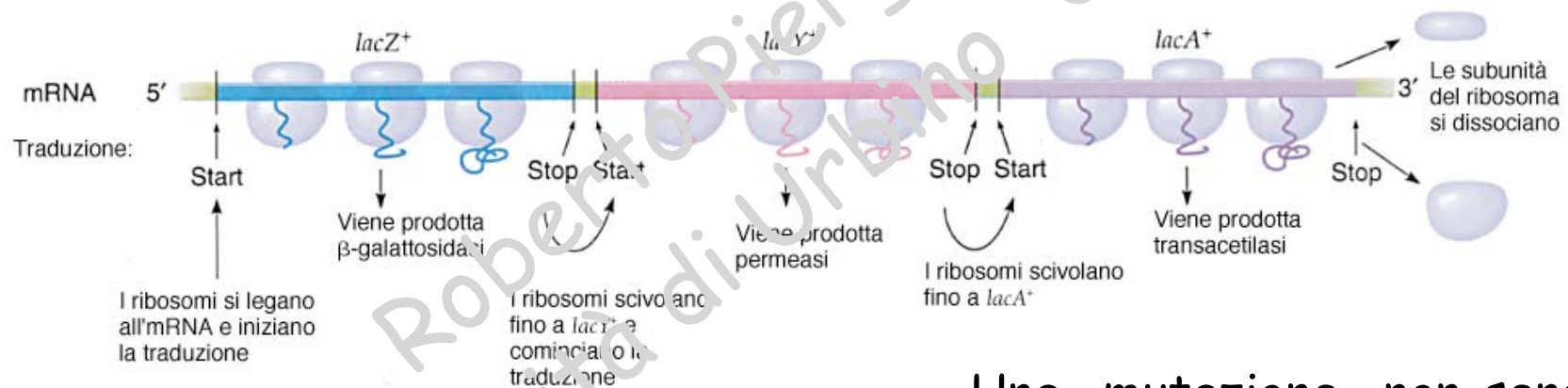
Grazie all'uso sistematico di mutanti incapaci di metabolizzare il lattosio e al loro studio tramite creazione di diploidi parziali (sfruttando le proprietà di ceppi F') tra il 1960 e il 1964 F. Jacob, J. Monod e A. Lwoff identificarono tre categorie di mutanti: o non producevano la β -gal, oppure la permeasi, oppure la transacetilasi. Esistevano inoltre due tipi di mutazioni: quelle missenso a carico di ciascun gene che non davano un prodotto funzionale del gene mutato, e quelle nonsense che compromettevano la sintesi delle proteine a valle (mostravano **effetti polari**), suggerendo che il mRNA fosse **policistronico**.

mRNA policistronici

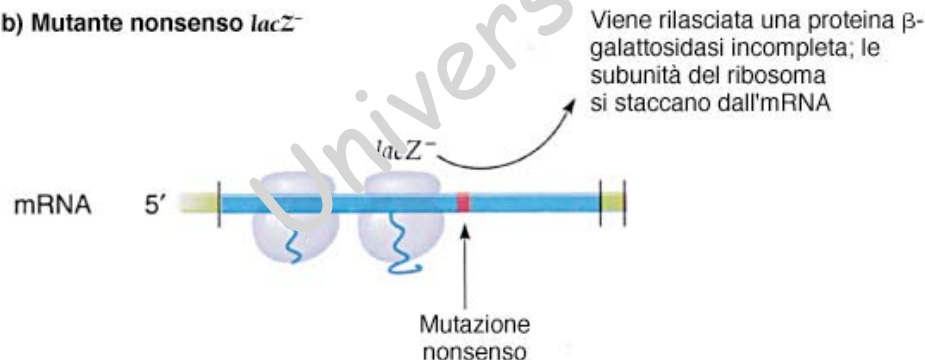
Figura 16.3

Traduzione dell'mRNA policistronico dei geni per l'utilizzazione del lattosio in (a) *E. coli* selvatico e (b) in un ceppo con una mutazione nonsense nel gene per la β -galattosidasi (*lacZ*).

a) Selvatico



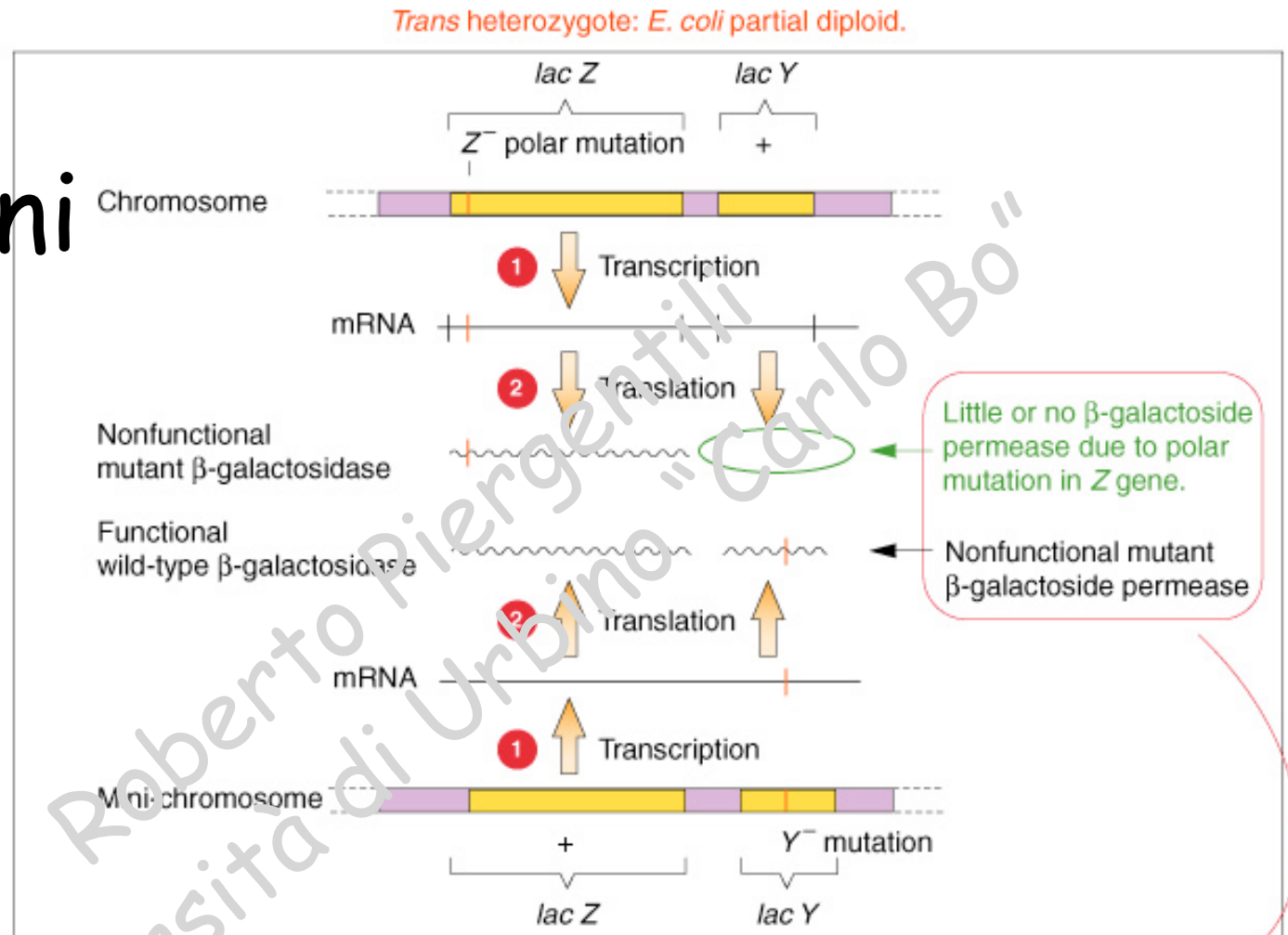
b) Mutante nonsense *lacZ*⁻



Una mutazione non-senso ha effetto polare perché giunto al primo codone di stop il ribosoma si stacca e non procede nella traduzione dei geni a valle.

Le mutazioni polari

Un individuo che sia eterozigote in trans viene anche detto trans-eterozigote. Una cellula batterica contenente un esogenote è un diploide parziale, o merozigote.



Little or no functional β -galactoside permease is produced. Therefore, the *trans* heterozygote has a mutant phenotype — that is, it is unable to utilize lactose as an energy source.

Figure 15.20 Lack of complementation between a polar mutation and a mutation in a downstream gene in the same transcription unit. The ability of *E. coli* cells to utilize lactose as an energy source depends on the products of two co-transcribed genes: *lacY*, which encodes β -galactoside permease, and *lacZ*, which encodes β -galactosidase. Transcription of the *lacY* and *lacZ* genes produces a multigenic mRNA, which is translated to provide the two proteins. A translation-termination mutation near the translation-start site in *lacZ* has a polar effect on translation of the *lacY* gene, reducing its translation efficiency to 1-2 percent of the normal level. Thus, the polar mutation in *lacZ* will not complement a null mutation in *lacY*, even though the two point mutations are in two different genes.

Altre mutazioni del metabolismo del lattosio

Furono trovate anche mutazioni in altri geni che influenzavano la sintesi delle proteine β -galattosidasi (gene *lacZ*), permeasi (gene *lacY*) e transacetilasi (gene *lacA*). Dato che queste mutazioni alteravano la modalità di sintesi dei tre enzimi, Jacob Monod e Lwoff supposero che fossero mutazioni in **geni regolativi** (i geni *lacZ*, *lacY* e *lacA* sono invece detti geni strutturali).

La caratteristica di questi geni regolativi consisteva nel fatto che, quando immessi nel ricevente tramite un F', alcuni erano in grado di agire anche in trans, mentre altri potevano esplicare la loro funzione soltanto in cis. Le mutazioni regolative furono mappate in due gruppi di complementazione che definiscono i geni **O** ed **I**.

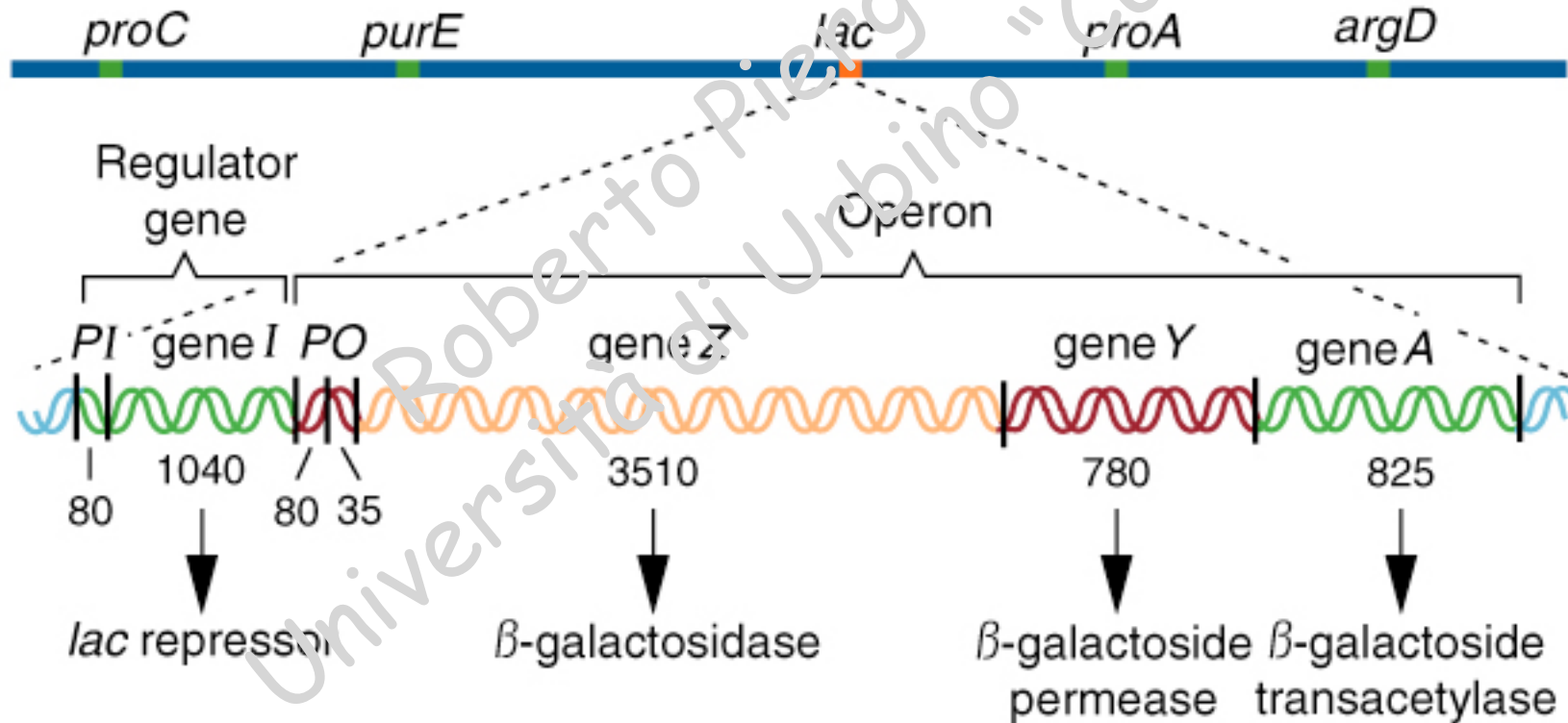
La genetica dei geni regolatori

Sintesi di β -galattosidasi, permeasi e transacetilasi		
mutante	induttore assente	induttore presente
O^c	+	+
I^-	+	+
I^s	-	-
I^{-d}	+	+
I^Q	-	+*
I^{SQ}	-	+*
P_{lac}^-	-	-

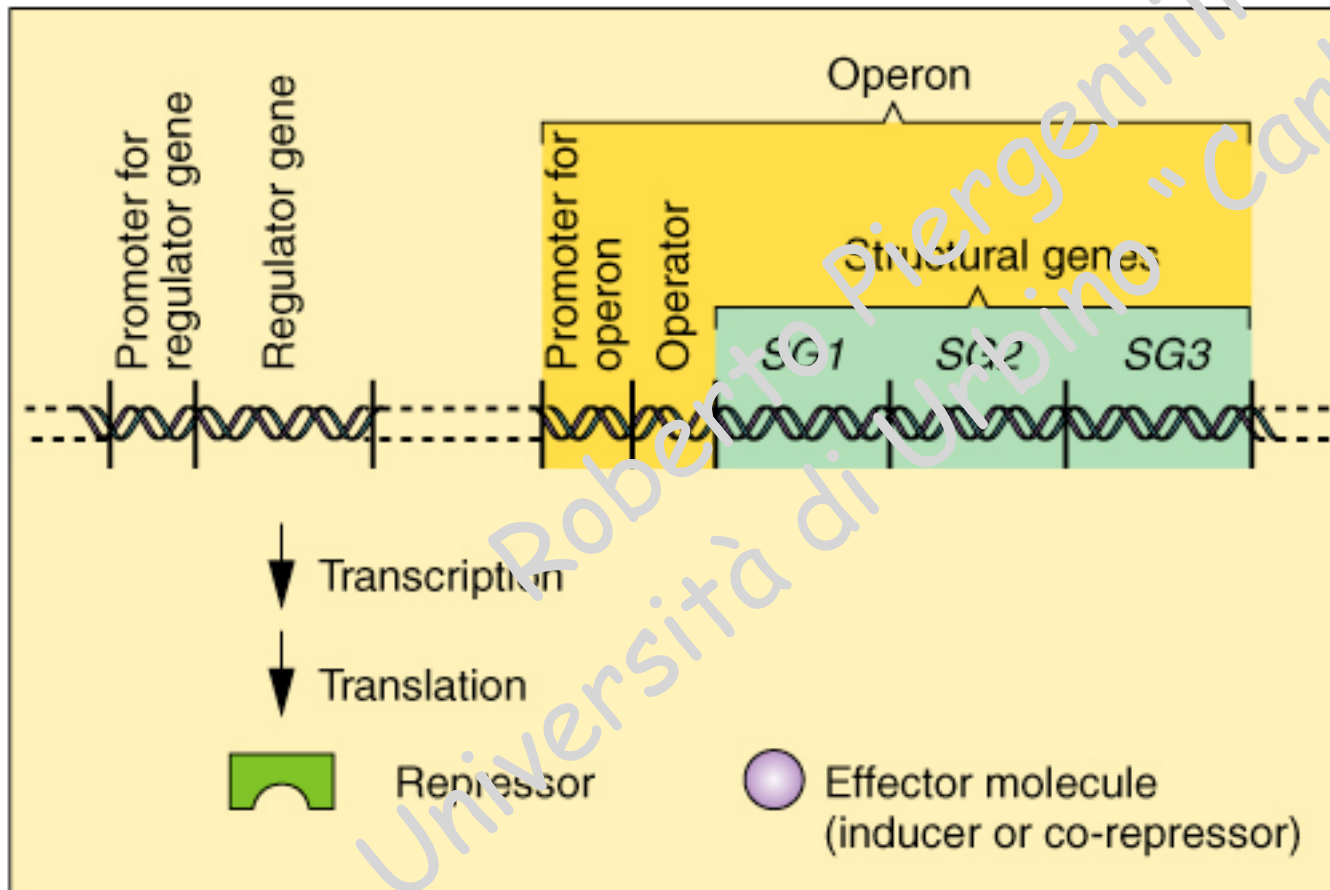
* indotti da alte concentrazioni di lattosio

Organizzazione dell'operone lac

E. coli chromosome:



La definizione di operone

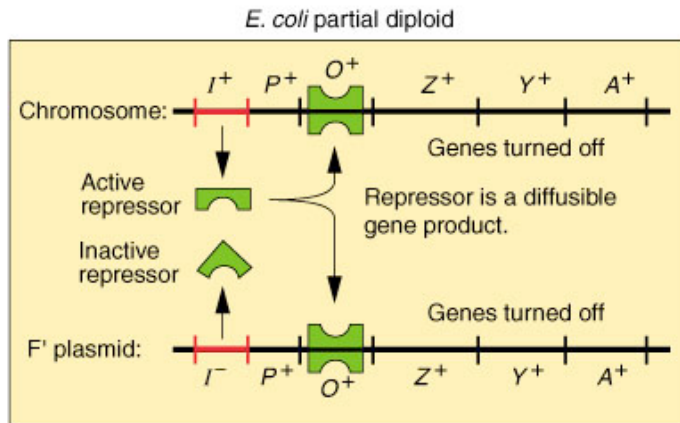


L'operone è un insieme di geni metabolicamente correlati che vengono coespressi e tradotti a partire da un unico mRNA policistronico; i geni regolatori non fanno parte dell'operone.

(a) The operon: components.

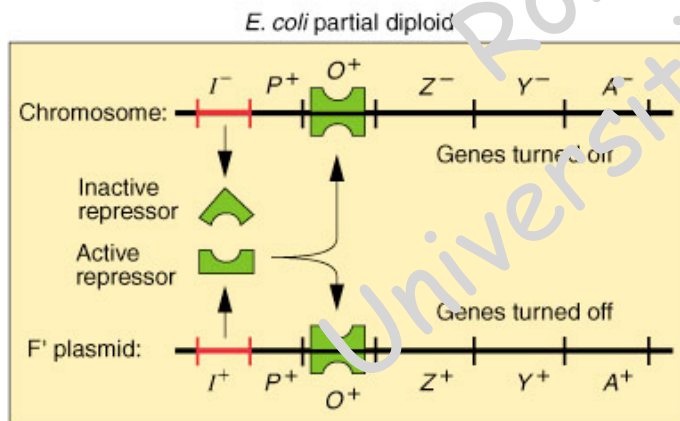
La regolazione dell'operone

lac: il gene *lacI*



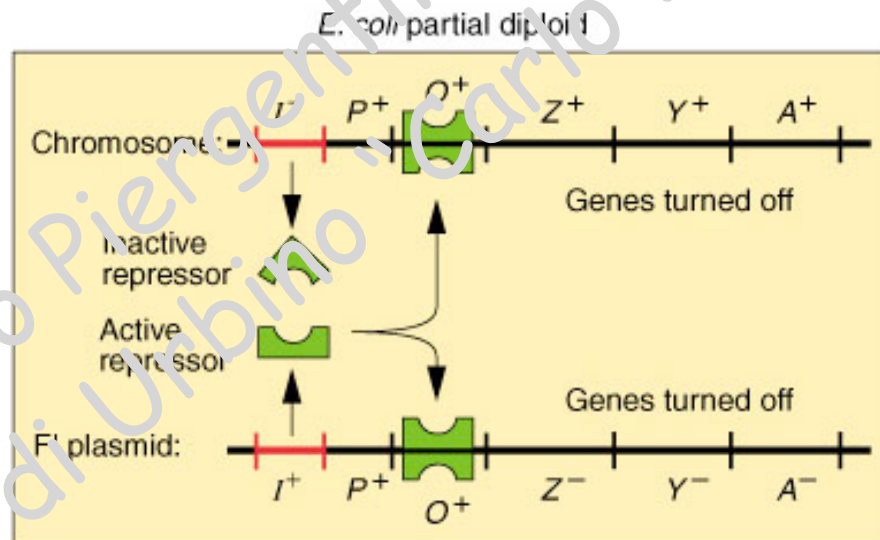
Inducible synthesis of *lac* operon gene products because the wild-type (*lacI*⁺) repressor binds to the *lac* operators on both chromosomes

(a) Dominance of *lacI*⁺ over *lacI*⁻.



Inducible synthesis of the *lac* operon gene products

(b) *Cis*-dominance of *lacI*⁺: *I*⁺ located *cis* to *Z*⁺, *Y*⁺ and *A*⁺.



Inducible synthesis of the *lac* operon gene products

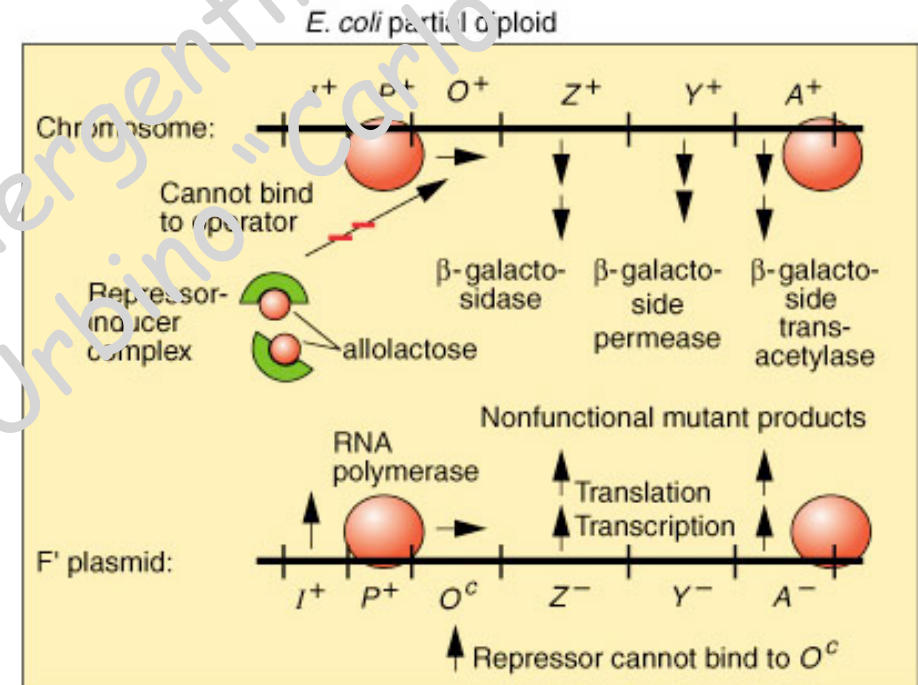
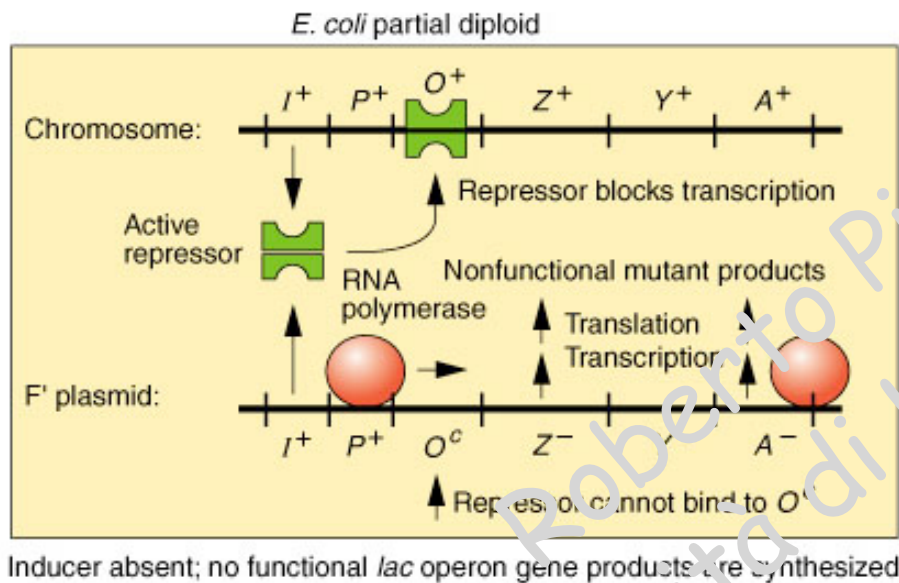
(c) *Trans*-dominance of *lacI*⁺: *I*⁺ located *trans* to *Z*⁺, *Y*⁺ and *A*⁺.

Figure 23.7 The *lacI*⁺ gene is dominant to *lacI*⁻ alleles (a) and controls *lac* operators located either *cis* (b) or *trans* (c) to itself. These effects demonstrate that the *lacI* gene product is diffusible.

Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

***lacI*⁺ è dominante su *lacI*⁻
sia in *cis* che in *trans*!**

La regolazione dell'operone lac: il gene $lacO^c$ - 1



Il gene $lacO^c$ è dominante sul gene $lacI^+$, ma solo in cis!

Nel caso a destra, il metabolismo del lattosio è ancora inducibile.

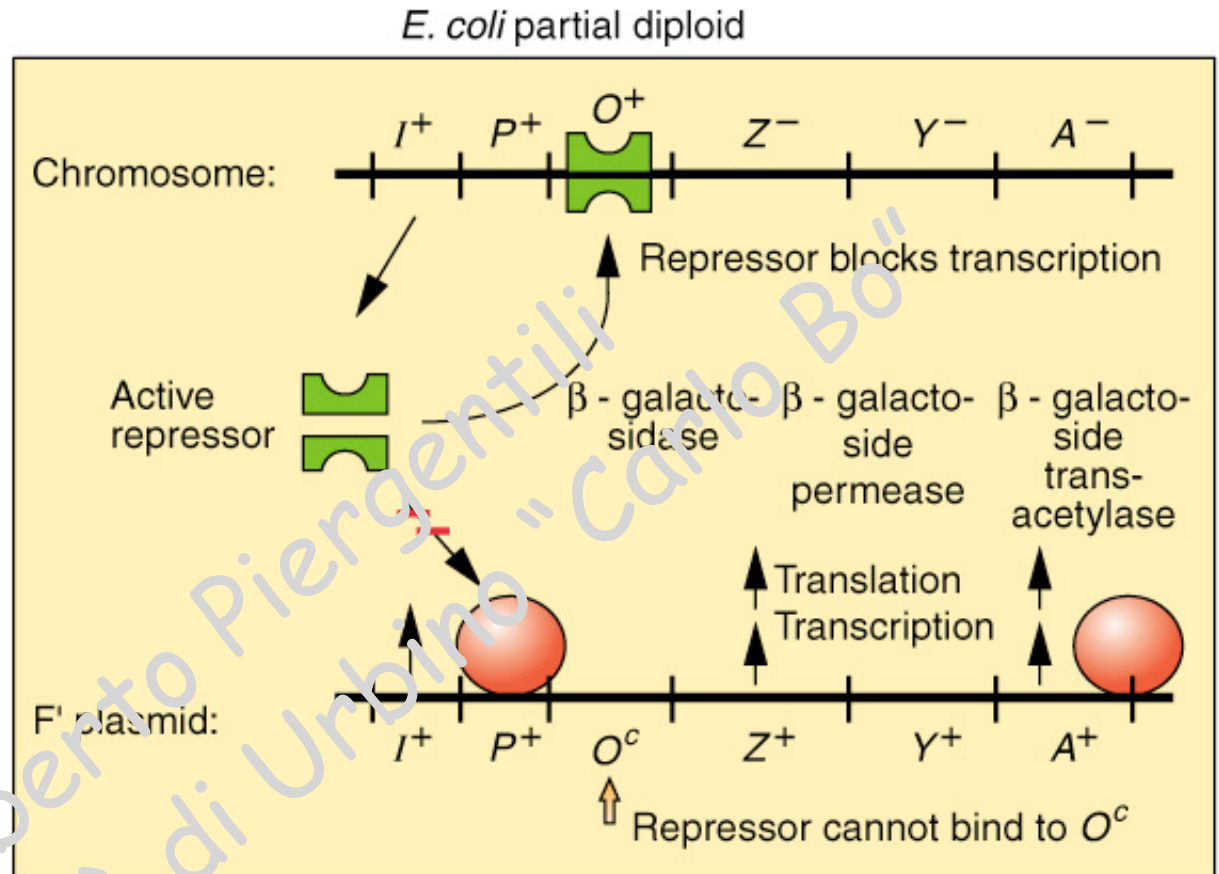
Inducer present; functional *lac* operon gene products are synthesized

(a) Inducible synthesis of the *lac* operon gene products in an $F' I^+ P^+ O^c Z^- Y^- A^- / I^+ P^+ O^+ Z^+ Y^+ A^+$ bacterium.

Figure 23.8a The operator acts only in the *cis* configuration. The synthesis of functional β -galactosidase, β -galactoside permease, and β -galactoside transacetylase is (a) inducible in an *E. coli* partial diploid of genotype $F' I^+ P^+ O^c Z^- Y^- A^- / I^+ P^+ O^+ Z^+ Y^+ A^+$.

Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

La
regolazione
dell'
operone lac:
il gene
 $lacO^c$ - 2



Inducer absent; functional *lac* operon gene products are synthesized

(b) Constitutive synthesis of the *lac* operon gene products in an $F' I^+ P^+ O^c Z^+ Y^+ A^+ / I^+ P^+ O^+ Z^- Y^- A^-$ bacterium.

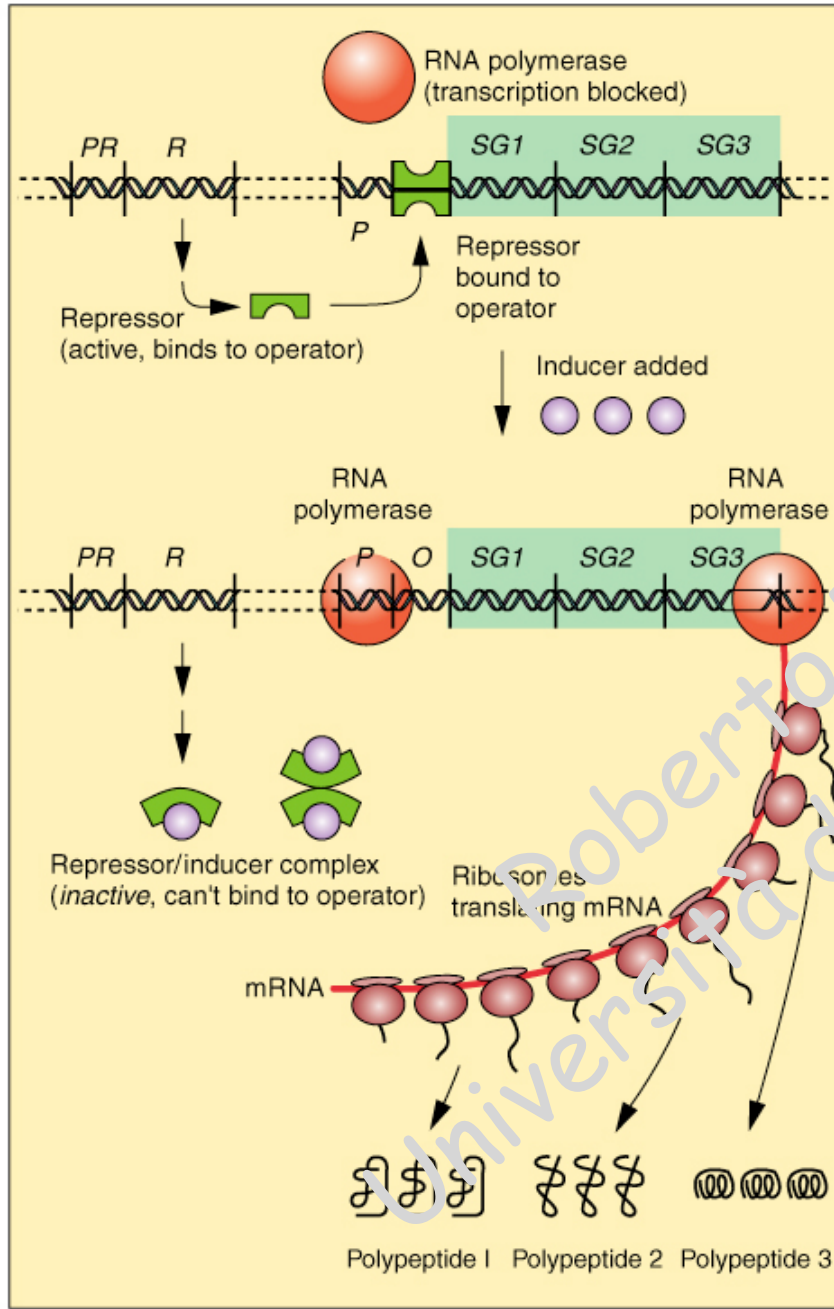
Figure 23.8b The operator acts only in the *cis* configuration. The synthesis of functional β -galactosidase, β -galactoside permease, and β -galactoside transacetylase is (b) constitutive in an *E. coli* partial diploid of genotype $F' I^+ P^+ O^c Z^+ Y^+ A^+ / I^+ P^+ O^+ Z^- Y^- A^-$. These results demonstrate that the operator (O) is *cis*-acting; that is, it regulates only those structural genes located on the same chromosome.

Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

Il metabolismo del lattosio questa volta NON è inducibile!

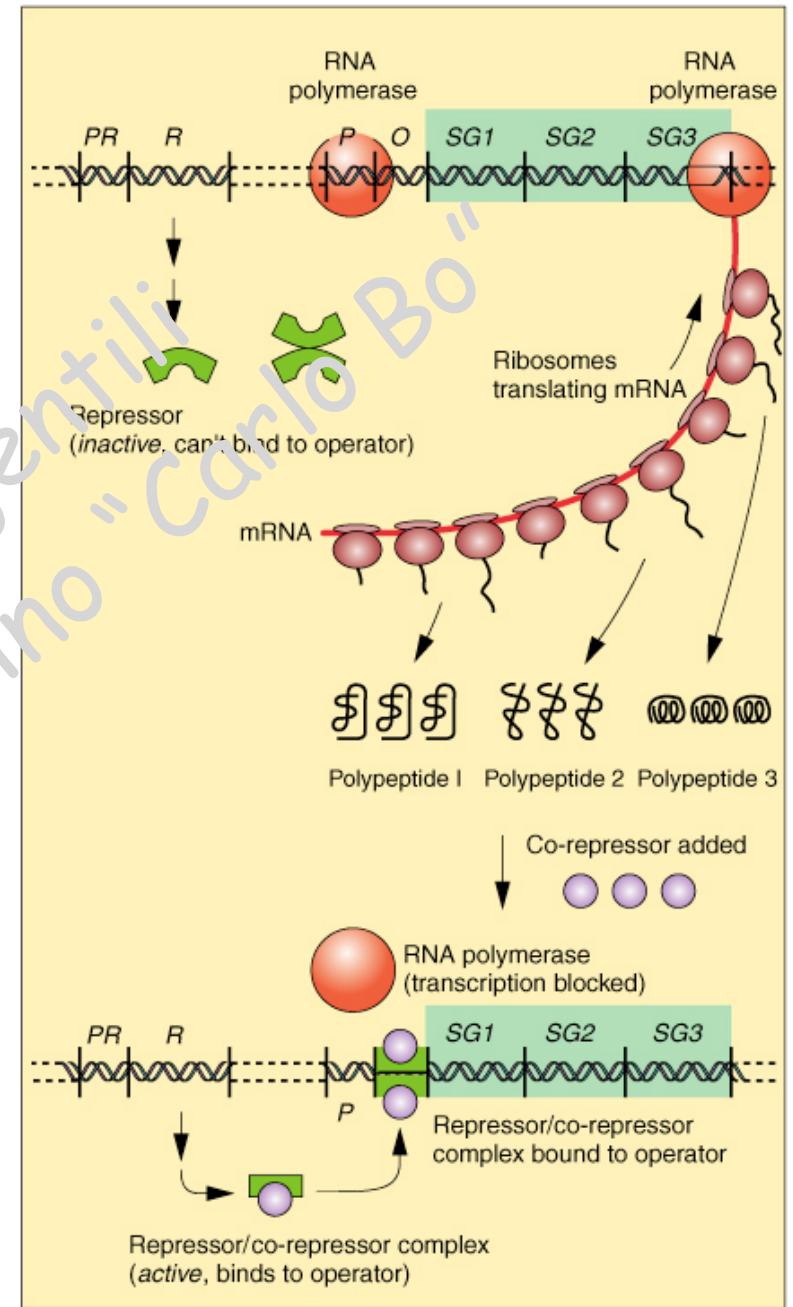
Conclusioni

Da tutti questi dati si dedusse che I^+ è trans dominante e si ipotizzò che codificasse per una proteina diffusibile nel citoplasma in grado di influenzare anche i geni in trans, mentre per O^c si dedusse che era una mutazione cis dominante (in grado di influenzare solo i geni in cis) e che il gene O non producesse una proteina diffusibile ma che fosse una sequenza di regolazione, che venne chiamata **operatore**. O^c è un **operatore costitutivo**. Jacob, Monod e Lwoff ipotizzarono anche che il gene O fosse una sequenza di DNA alla quale si lega il prodotto del gene I (la proteina **repressore**). Il lattosio, legandosi al repressore, favorisce il suo distacco dal gene O consentendo alla polimerasi di legarsi al promotore per iniziare la trascrizione dei geni a valle. L'operone lac è un modello di **controllo negativo**.



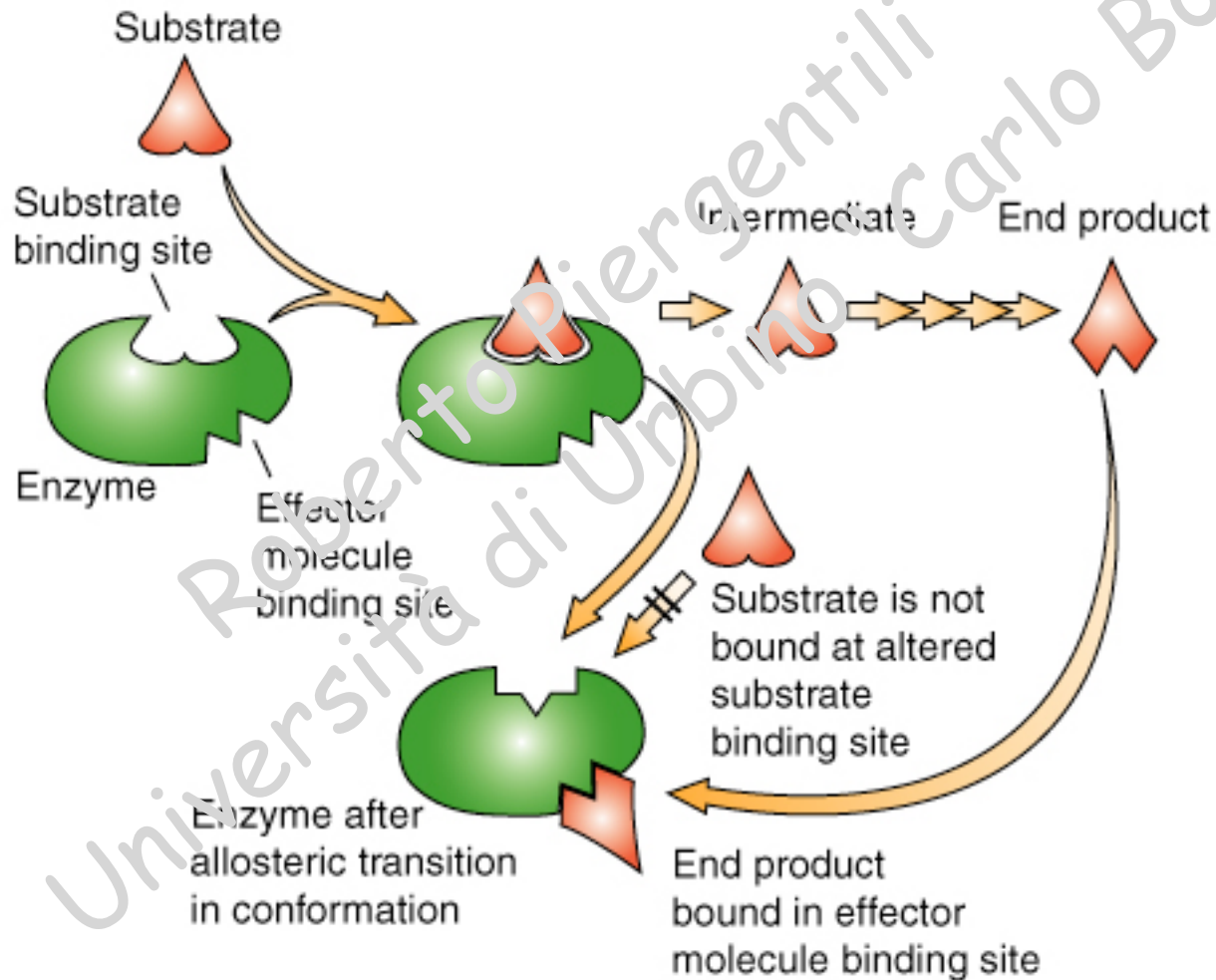
(b) The operon: induction.

Il m o d o



(c) The operon: repression.

lacI è una proteina allosterica



La mutazione $lacI^s$

È anche detta **super repressore**. In questo caso il repressore è mutato nel sito di legame con il lattosio, ma non nel sito di legame con l'operatore: il repressore è quindi insensibile al lattosio, per cui l'operone è sempre "spento". I^s è dominante su I^+ .

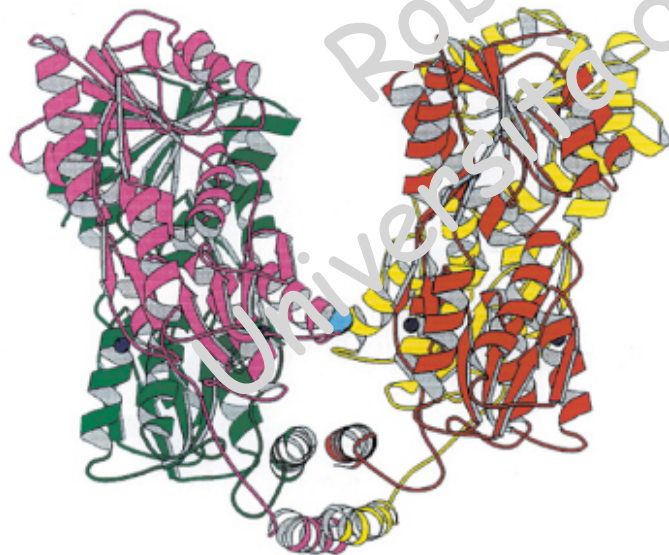
* indotti da alte concentrazioni di lattosio		Sintesi di β -galattosidasi, permeasi e transacetilasi	
mutante	induttore assente	induttore presente	
O^c	+	+	
I^-	+	+	
I^s	-	-	
I^{-d}	+	+	
I^Q	-	+*	
I^{SQ}	-	+*	
P_{lac}^-	-	-	

La mutazione $lacI^{-d}$

Nelle cellule aploidi le mutazioni I^{-d} hanno fenotipo costitutivo. Nei diploidi parziali I^{+}/I^{-d} le mutazioni I^{-d} sono trans dominanti su I^{+} . Il repressore selvatico è un tetramero. La mutazione I^{-d} produce una proteina alterata che nei diploidi parziali I^{+}/I^{-d} si lega alle molecole "buone" impedendone il legame all'operatore.

Figura 16.6

Modello molecolare di un tetramero di repressore lac . I quattro monomeri sono colorati in verde, viola, rosso e giallo.



mutante	* indotti da alte concentrazioni di lattosio	
	induttore assente	induttore presente
O^c	+	+
I^{-}	+	+
I^s	-	-
I^{-d}	+	+
I^Q	-	+*
I^{SQ}	-	+*
P_{lac}^{-}	-	-

Sintesi di β -galattosidasi, permeasi e transacetilasi

Le mutazioni I^Q e I^{SQ}

Sono mutazioni a carico del promotore del gene I e determinano la produzione di un gran numero di molecole di repressore. Riducono l'efficienza di induzione e sono indotti solo da alte concentrazioni di lattosio.

* indotti da alte concentrazioni di lattosio		Sintesi di β -galattosidasi, permeasi e transacetilasi	
mutante	induttore assente	induttore presente	
O^c	+	+	
I^-	+	+	
I^s	-	-	
I^{-d}	+	+	
I^Q	-	+*	
I^{SQ}	-	+*	
P_{lac}^-	-	-	

Le mutazioni P

Le mutazioni in P, sia nell'operone che nell'induttore, regolano il legame della RNA polimerasi. Quindi se un operone è P- comunque non funziona, anche se tutto il resto è a posto.

Figura 16.13

Sequenza del promotore (P_{lac^-}) del gene $lacI^+$ dell'operone lac e dell'estremità 59 dell'mRNA del repressore. Viene anche mostrata la sequenza aminoacidica della prima parte della proteina repressore. Notate che in questo caso il codone di inizio è GUG e codifica per metionina.

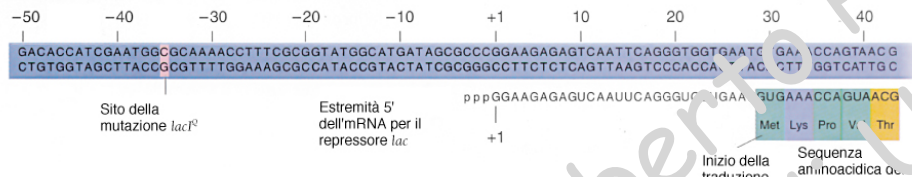
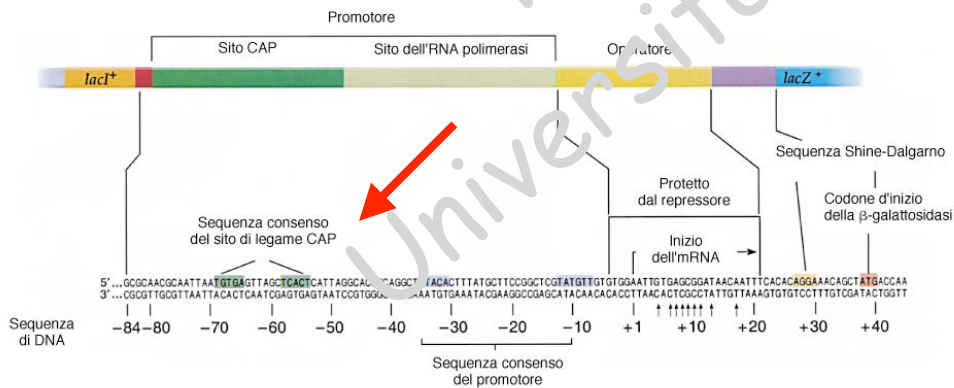


Figura 16.14

Sequenza dei siti di controllo, promotore e operatore, dell'operone lac di *E. coli*. Sono indicate le posizioni di alcune mutazioni $lacO^-$ note (indicate dalle frecce).



mutante	Sintesi di β -galattosidasi, permeasi e transacetilasi	
	induttore assente	induttore presente
O^c	+	+
I^-	+	+
I^s	-	-
I^{-d}	+	+
I^Q	-	+*
I^{SQ}	-	+*
P_{lac^-}	-	-

Controllo positivo dell'operone lac

I geni *lacZ*, *lacY* e *lacA* sono espressi solo se nel terreno non è presente il glucosio. Altrimenti questo zucchero viene usato preferenzialmente anche in presenza di lattosio. In presenza di glucosio si ha la repressione da catabolita: il glucosio mantiene basso il livello di cAMP (AMP ciclico) impedendo la formazione del complesso CAP-cAMP.

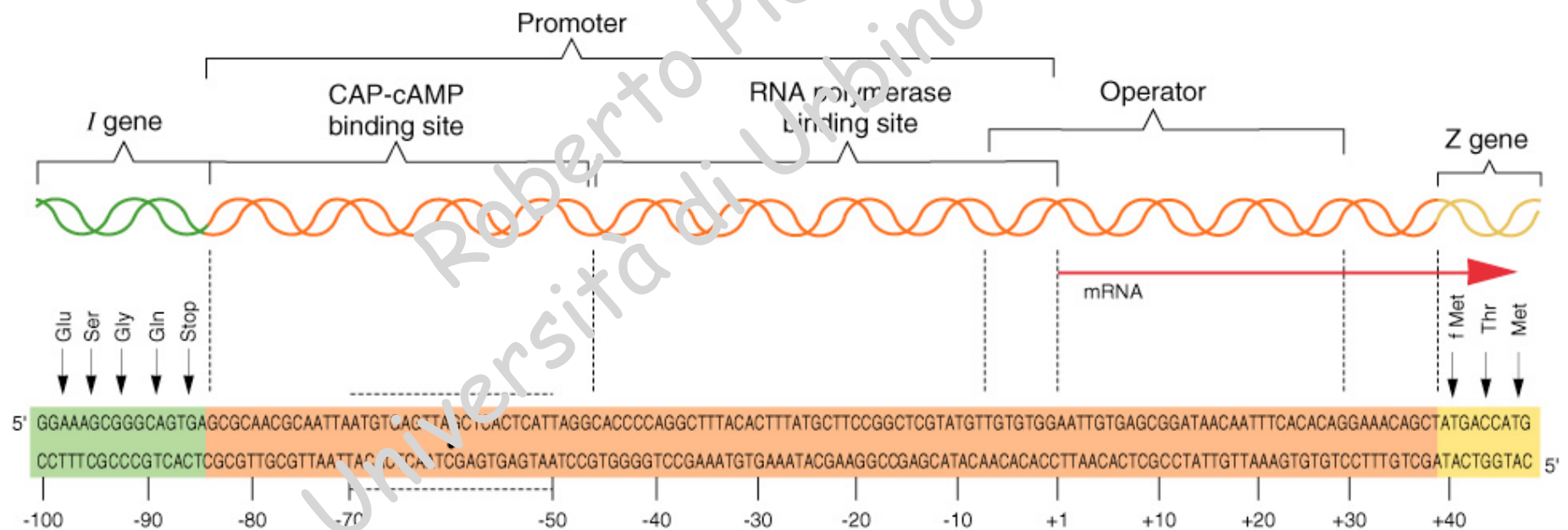
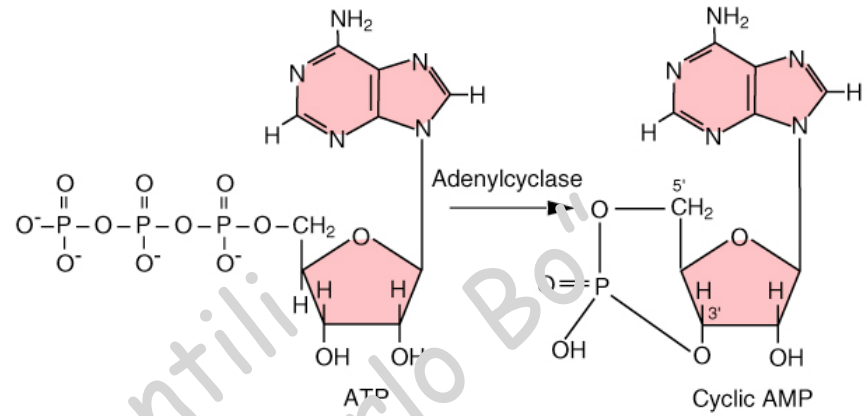
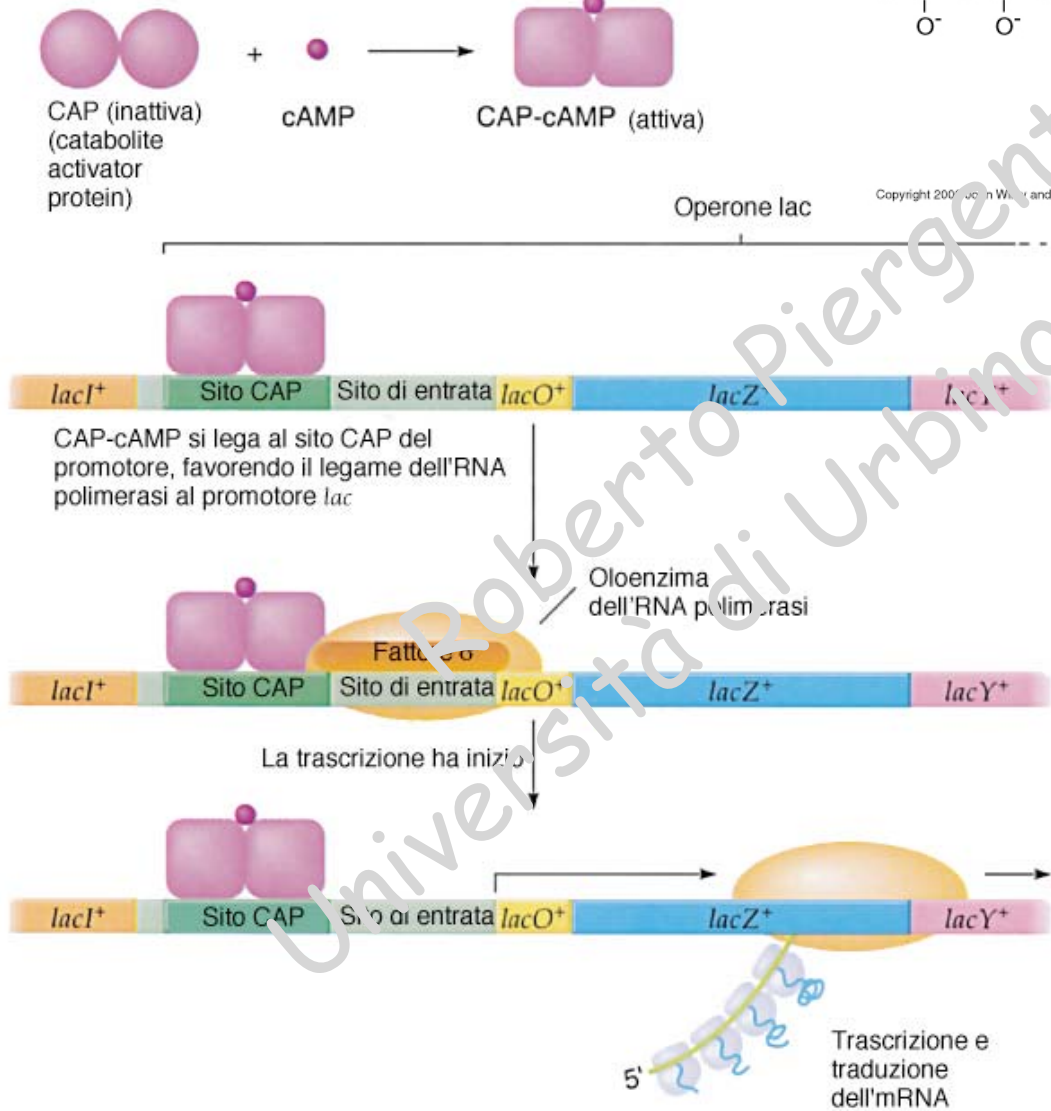


Figure 23.10 Organization of the promoter-operator region of the *lac* operon. The promoter consists of two components: (1) the site that binds the CAP-cAMP complex and (2) the RNA polymerase binding site. The adjacent segments of the *lacI* (repressor) and *lacZ* (β -galactosidase) structural genes are also shown. The horizontal line labeled mRNA shows the position at which transcription of the operon begins (the 5'-end of the *lac* mRNA). The numbers at the bottom give distances in nucleotide pairs from the site of transcript initiation (position +1). The dot between the two nucleotide strands indicates the center of symmetry of an imperfect palindrome.

Figura 16.11

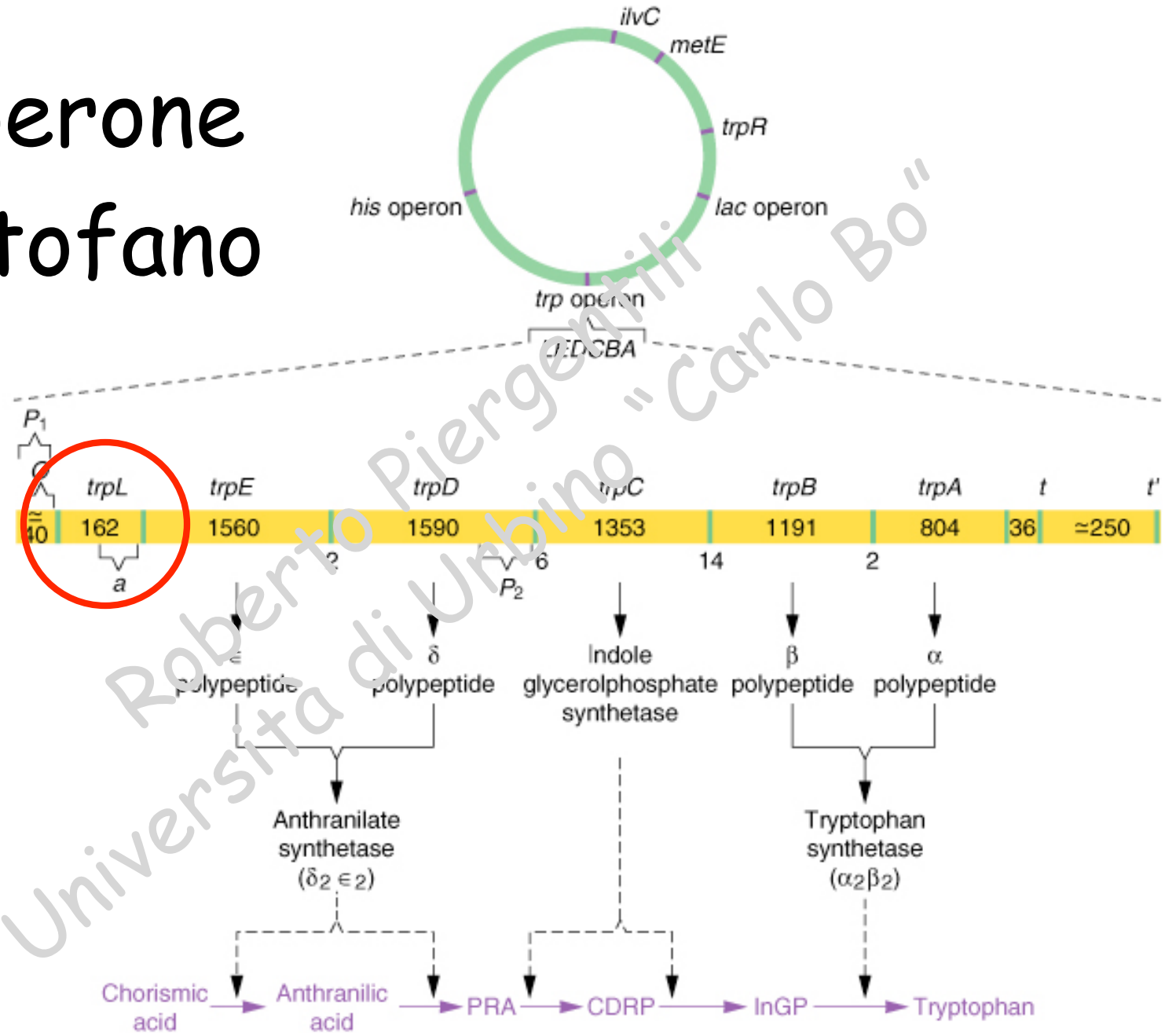
Ruolo dell'AMP ciclico (cAMP) sul funzionamento di operoni sensibili al glucosio, come l'operone *lac* di *E. coli*.



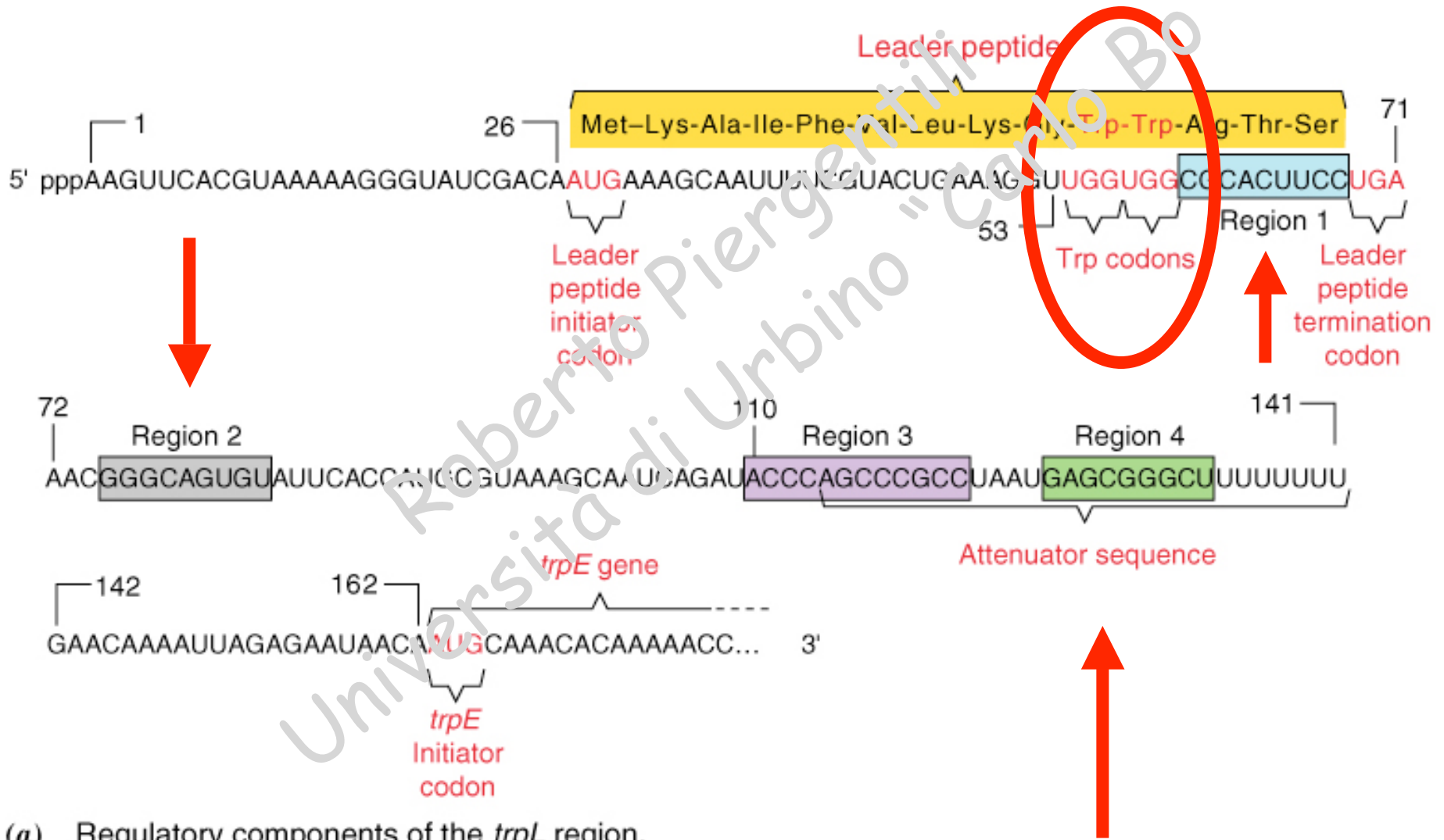
Il ruolo del cAMP

Zuccheri nel terreno di coltura	Quantità relativa di β-galattosidasi
glucosio	1
glucosio+lattosio	50
lattosio	2500

L'operone triptofano

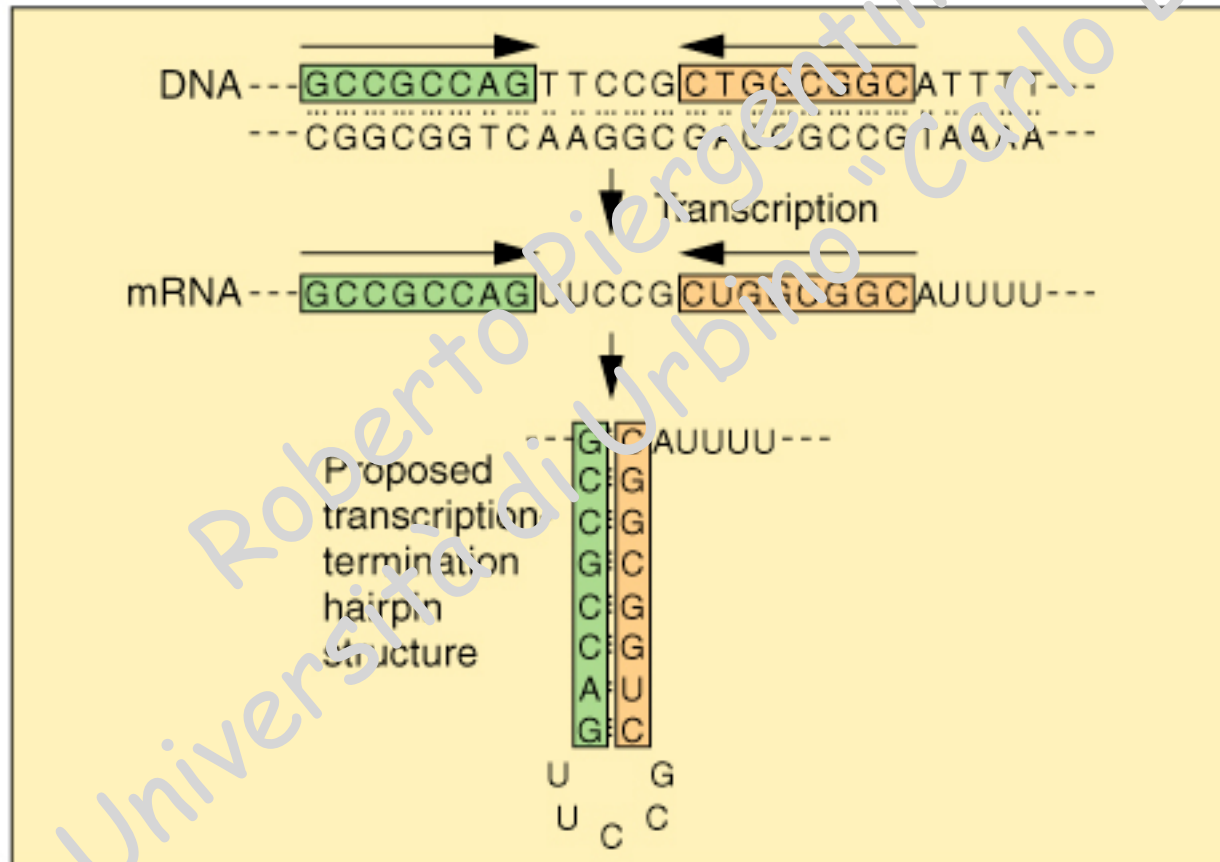


Il peptide leader



(a) Regulatory components of the *trpL* region.

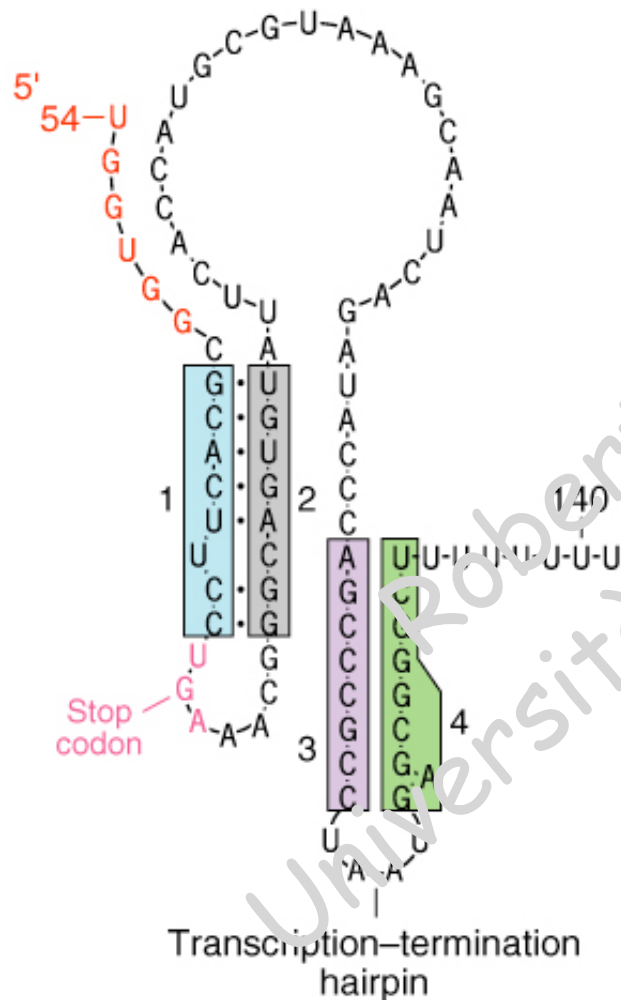
Gli appaiamenti del messaggero del gene *trpL*



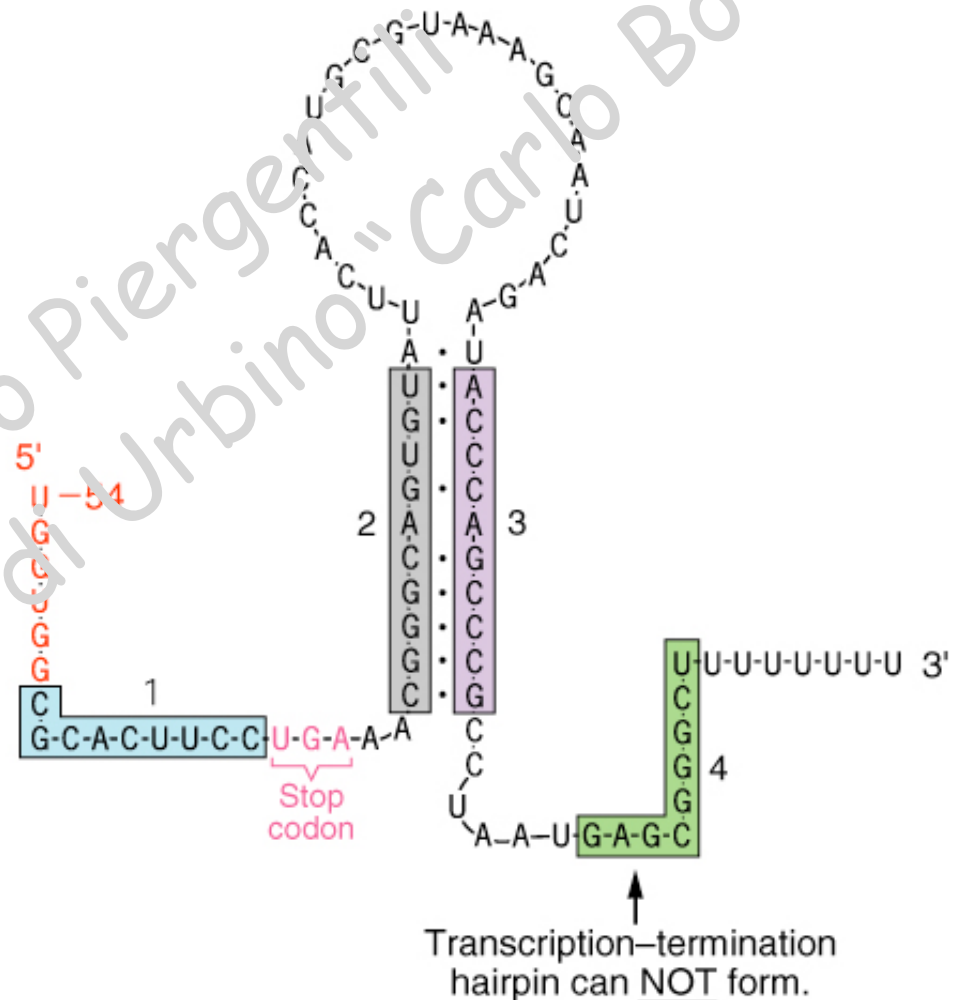
(a) Structure of *trp* operon transcription-termination sequence *t* and formation of the transcription-termination hairpin.

Le strutture a forcina

1. Regions 1 and 2 base-paired and regions 3 and 4 base-paired



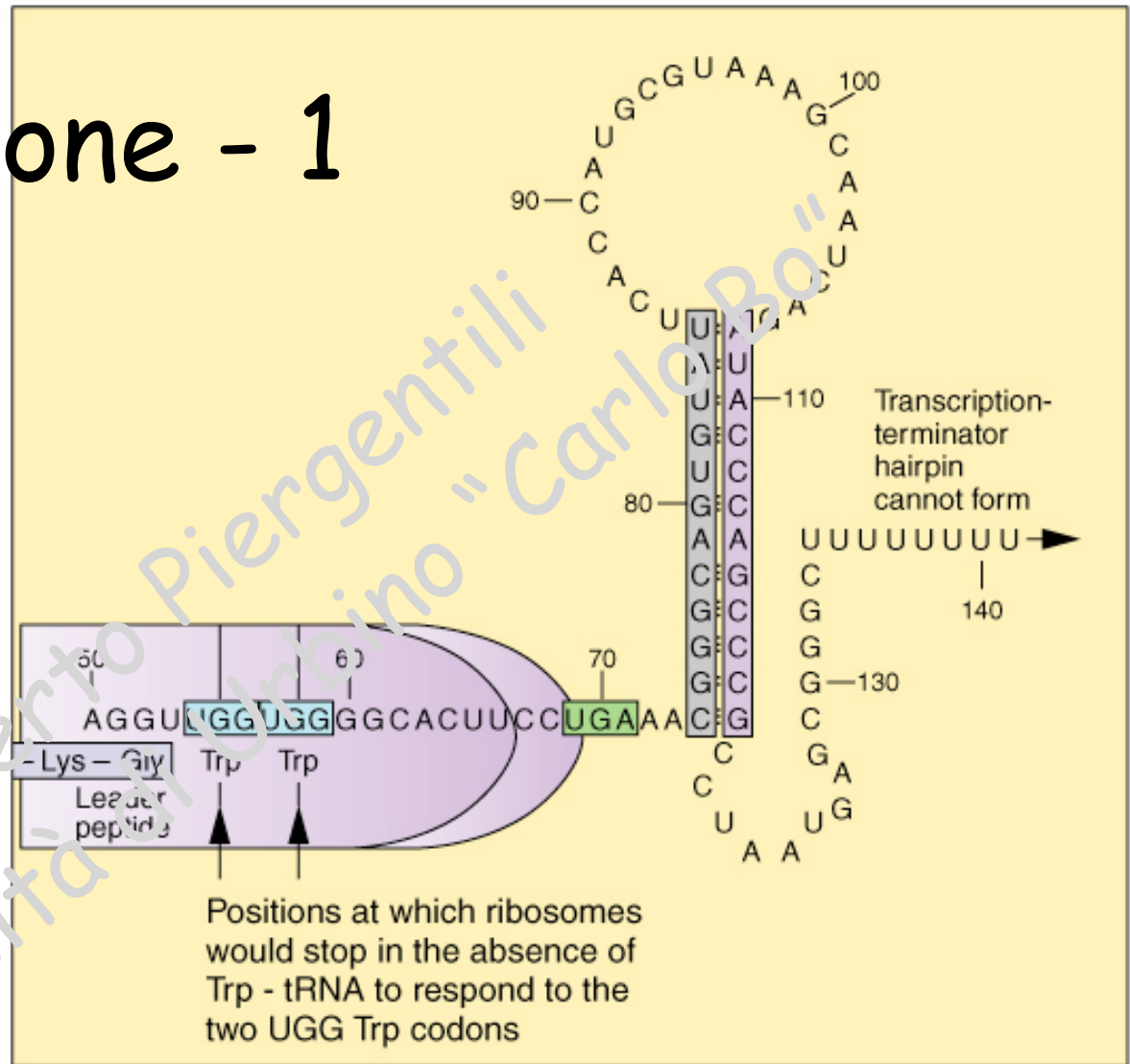
2. Regions 2 and 3 base-paired



(b) Alternate secondary structures formed by the *trpL* transcript.

L'attenuazione - 1

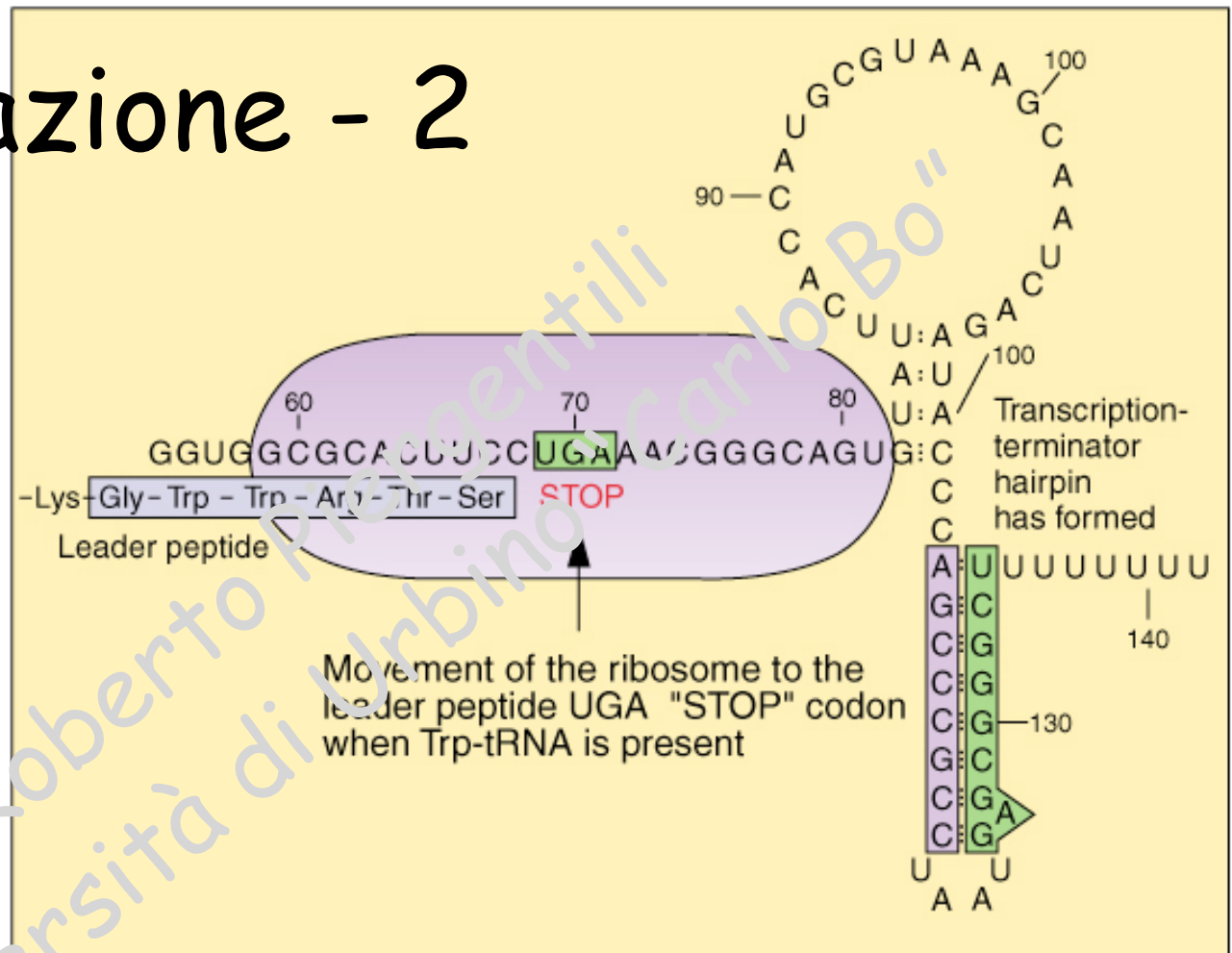
Il *cammino* del ribosoma può alterare la formazione delle forcine. In assenza di triptofano, il ribosoma *rallenta* (o si ferma) permettendo quindi l'appaiamento delle regioni 2 e 3 ed impedendo di fatto l'appaiamento 3-4 → la trascrizione procede.



(b) In the absence of tryptophan, translation of the leader sequence stalls at one of the Trp codons. This stalling allows leader regions 2 and 3 to pair, which prevents region 3 from pairing with region 4 to form the transcription-termination hairpin. Thus transcription proceeds through the entire *trp* operon.

L'attenuazione - 2

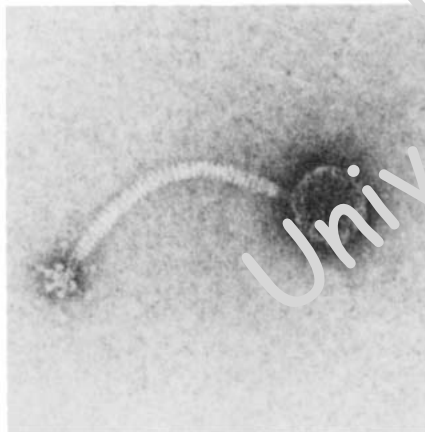
In presenza di triptofano, il ribosoma non si ferma e procede sulla zona 2 (da cui poi si stacca per la presenza di un codone di stop); in questo modo permette quindi l'appaiamento 3-4: questa forcina destabilizza la RNA polimerasi (ricordare che nei procarioti la trascrizione e la traduzione sono accoppiate!) e la trascrizione si ferma.



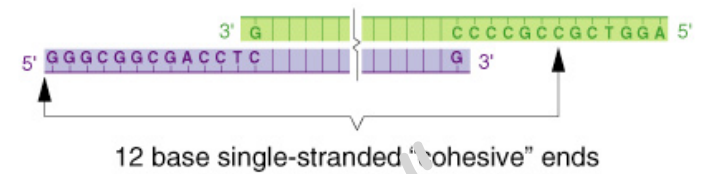
(c) In the presence of tryptophan, translation proceeds past the Trp codons to the termination codon and disrupts the base-pairing between leader regions 2 and 3. This process leaves region 3 free to pair with region 4 to form the transcription-termination hairpin, which stops transcription at the attenuator sequence.

Il fago λ

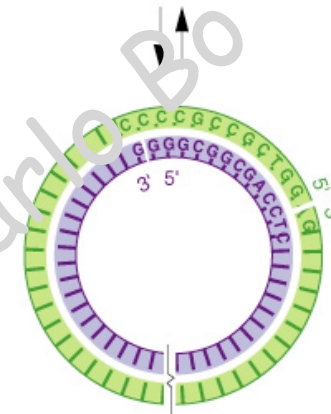
Il cromosoma di λ esiste sia nella forma lineare che circolare. La forma lineare (quella inattiva nel capsid) favorisce l'iniezione del DNA nell'ospite. Una volta iniettato, il DNA passa alla forma trascrizionalmente attiva, quella circolare.



Linear phage λ chromosome present in mature virions



Hydrogen bonded circular form



DNA ligase \uparrow Base sequence-specific endonuclease \downarrow

Covalently closed circular form

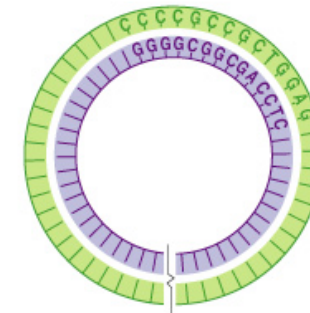
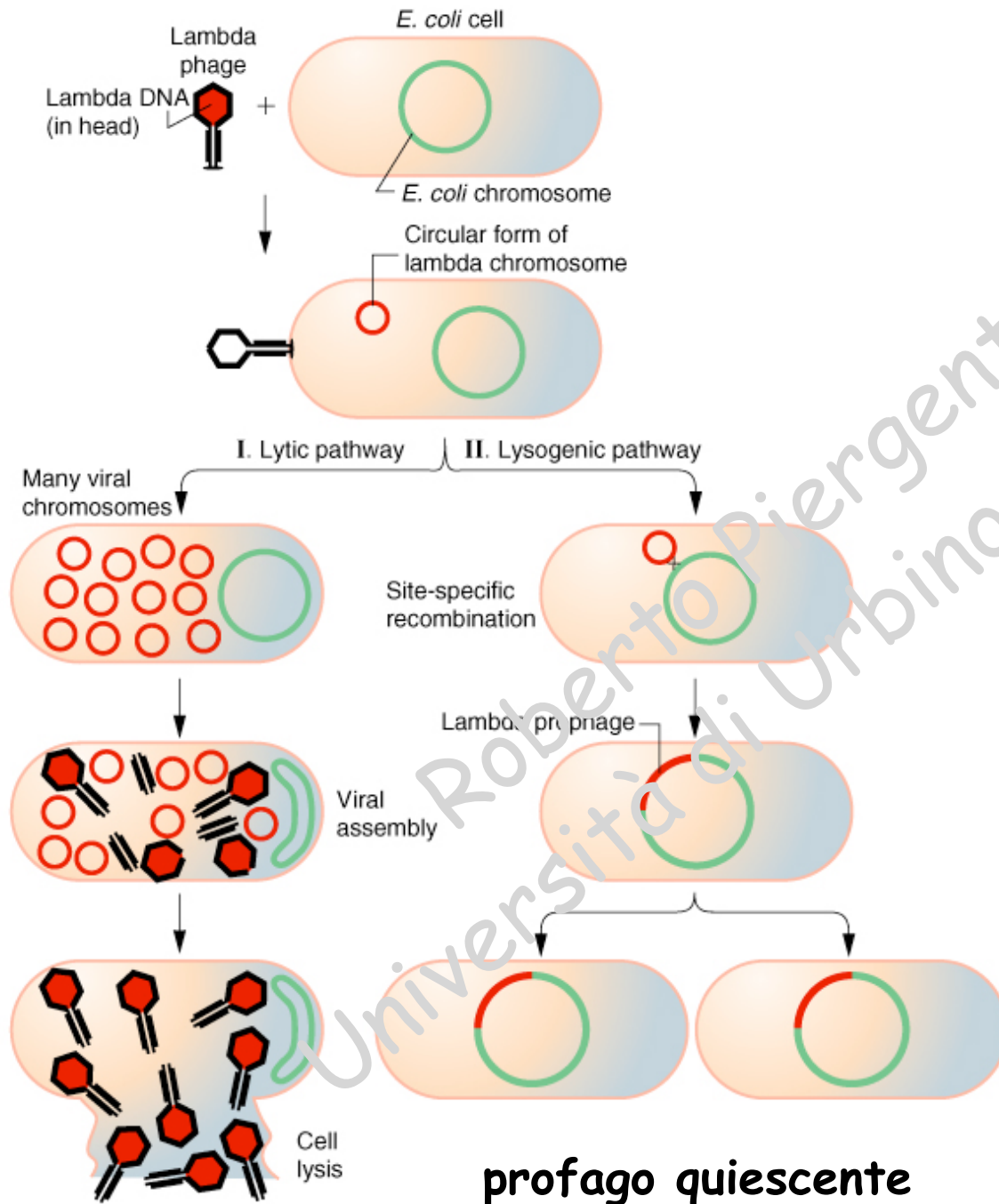


Figure 11.7 Interconversion of the linear lambda chromosome with its complementary cohesive ends, the hydrogen-bonded circular lambda chromosome, and the covalently closed circular lambda chromosome. The linear form of the chromosome appears to be an adaptation to facilitate its injection from the phage head through the small opening in the phage tail into the host cell during infection. Prior to replicating in the host cell, the chromosome is converted to the covalently closed circular form. Only the ends of the chromosome of the mature phage are shown; the jagged vertical line indicates that the central portion of the chromosome is not shown. The entire lambda chromosome is about 4.8×10^4 nucleotide pairs long.

Ciclo litico e lisogenico

Il fago λ può riprodursi sia attraverso il classico ciclo litico, sia passare al ciclo lisogenico. In questo caso l'anello di DNA del fago ricombina con il cromosoma batterico (un *crossing over*) sempre nello stesso punto (ricordare la trasduzione specializzata!)



La repressione del ciclo litico

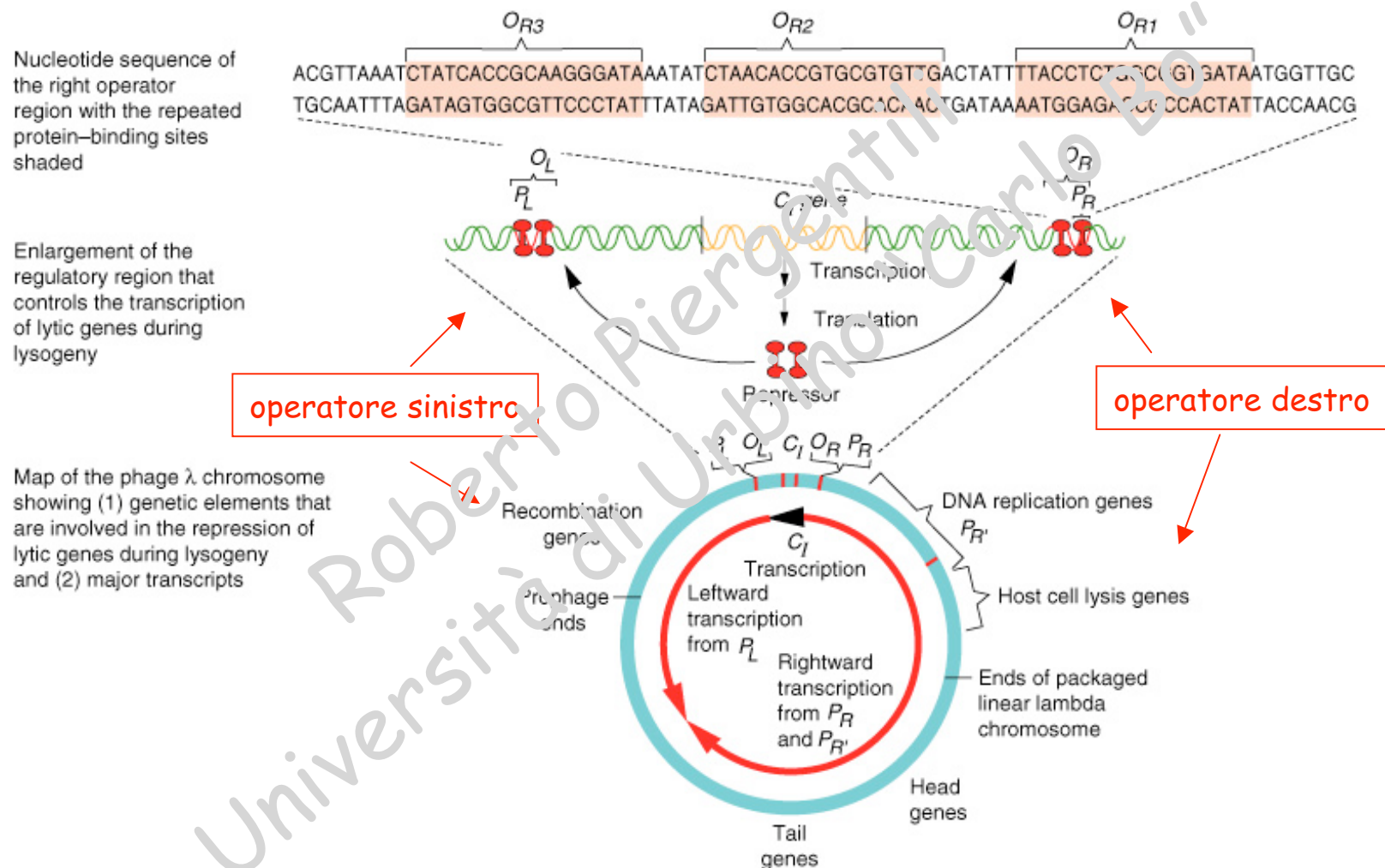


Figure 23.15 Repression of the lambda lytic genes in a lysogenic *E. coli* cell. Transcription of the lytic genes is repressed by the binding of the lambda repressor to two operator sequences (O_L and O_R), which regulate leftward and rightward transcription of the lambda chromosome (bottom). The lambda repressor is encoded by the C_I gene (center) and represses the synthesis of the major transcripts by binding to triplicate protein binding sites in O_L and O_R . The arrows show the relative sizes and directions of synthesis of the major lambda transcripts.

Il mantenimento del ciclo lisogenico

Il repressore agisce in trans e impedisce sia al fago di innescare il proprio ciclo litico, sia ad altri eventuali fagi λ di farlo (effetto **dominante**). Inoltre, come profago, un solo λ è presente nella cellula perché c'è un solo sito d'inserzione.

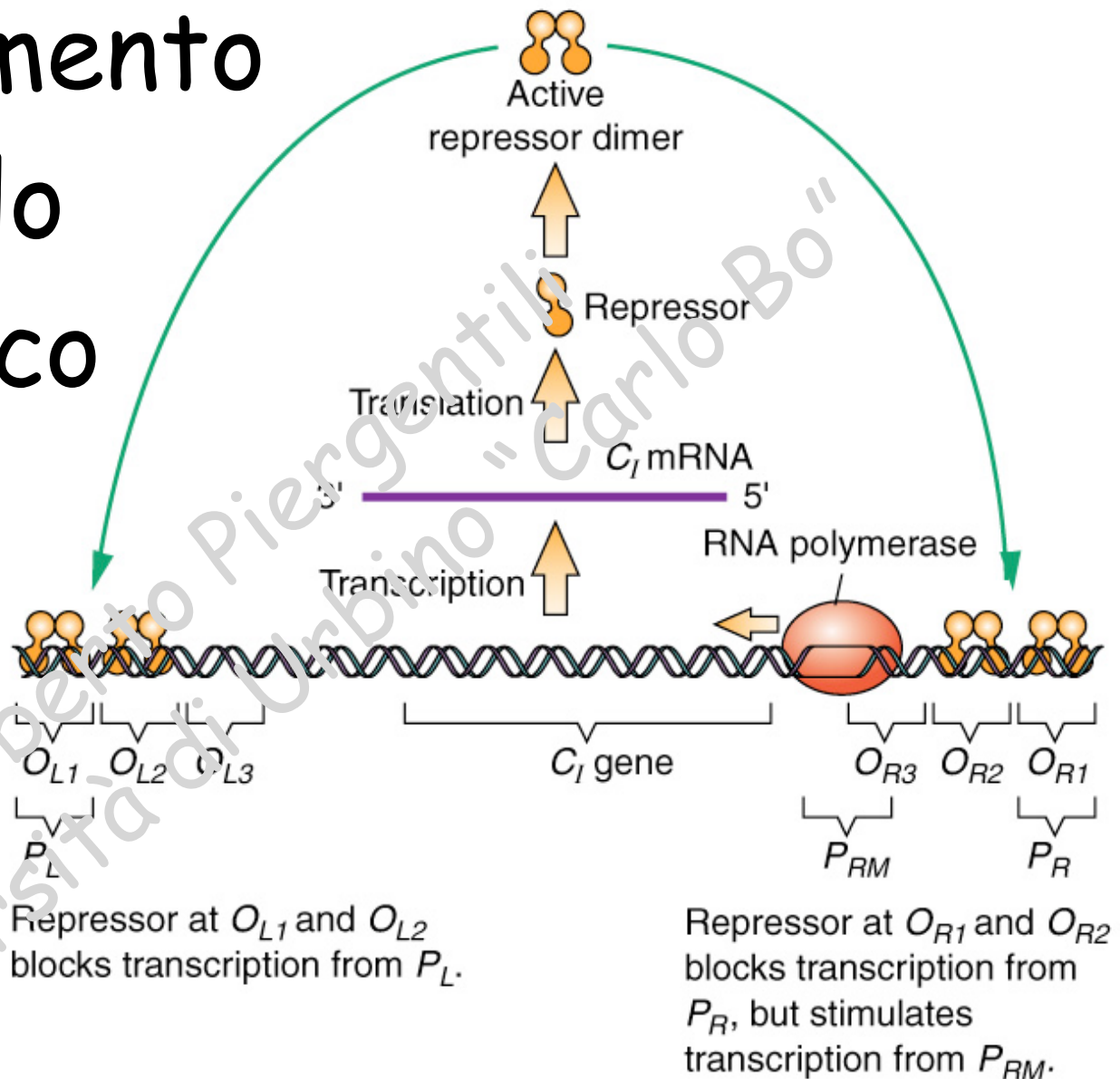


Figure 23.17 Autogenous regulation of phage lambda repressor synthesis. The presence of λ repressor stimulates the synthesis of more repressor by acting as a positive regulator of transcription of the C_I gene from promoter P_{RM} . At the same time, the repressor functions as a negative regulator of genes involved in lytic development. Repressor dimers bound at O_{L1} - O_{L2} and O_{R1} - O_{R2} prevent transcription of lytic function genes from promoters P_L and P_R , respectively.

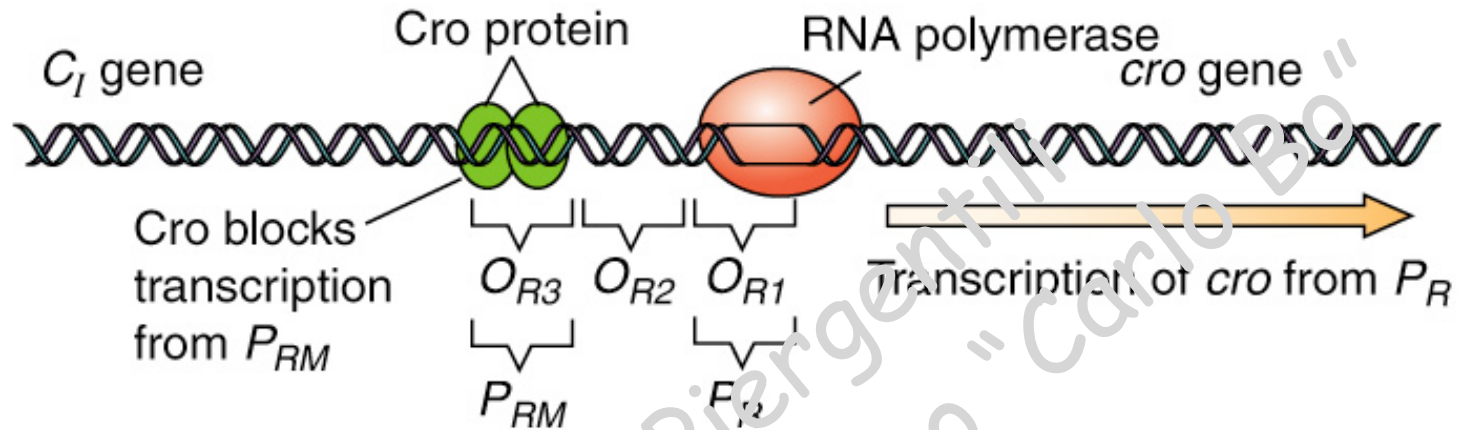
L'innescò del ciclo litico

Il repressore automantiene il sistema teoricamente all'infinito. L'unico modo per uscire dal ciclo lisogenico è l'eliminazione fisica del repressore. Questo può avvenire tramite taglio proteolitico.

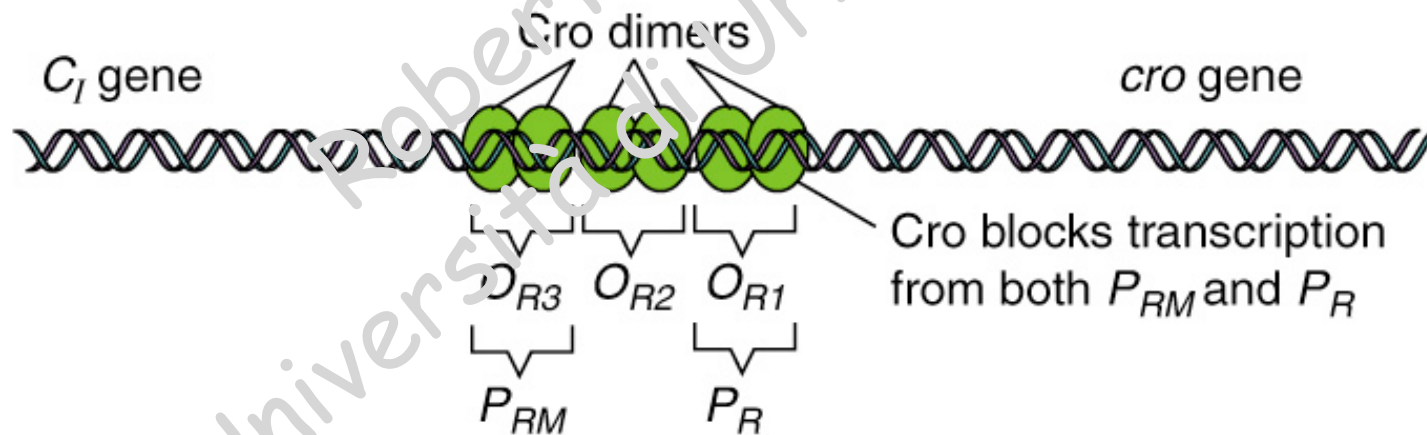
La proteina **RecA** è una proteina batterica che viene innescata dal **sistema SOS**: questo sistema monitorizza continuamente l'integrità del DNA batterico e se questo viene danneggiato promuove la sintesi di geni e l'attivazione di altri tramite tagli proteolitici. I geni attivati bloccano il ciclo cellulare e promuovono la riparazione del DNA tramite (anche) ricombinazione (da cui il nome di RecA).

Tra i bersagli degli enzimi proteolitici del sistema SOS c'è anche il repressore di λ : quando la nave affonda, i topi scappano...

L'innescio del ciclo litico



(a) Early: low concentration of Cro protein.



(b) Late: high concentration of Cro protein.

Figure 23.19 Functions of the cro gene product at early (a) and late (b) stages of lambda lytic growth. Cro protein has higher affinity for O_{R3} than O_{R1} or O_{R2} , resulting in its presence only at O_{R3} at low concentrations and at all three O_R sites (and O_L sites) at high concentrations.