

Paolo Landini

2.5.2005

**Regolazione della trascrizione in procarioti:  
da meccanismi semplici a eventi regolativi  
complessi**

**I: Processi generali di regolazione  
trascrizionale**

[paolo.landini@unimi.it](mailto:paolo.landini@unimi.it)

**I “segreti del successo” dei  
microorganismi procarioti**

- Semplicità dell'organizzazione cellulare
- Flessibilità metabolica: utilizzo di una grande varietà di substrati metabolici, biosintesi di macromolecole
- **Adattamento alle diverse condizioni ambientali**

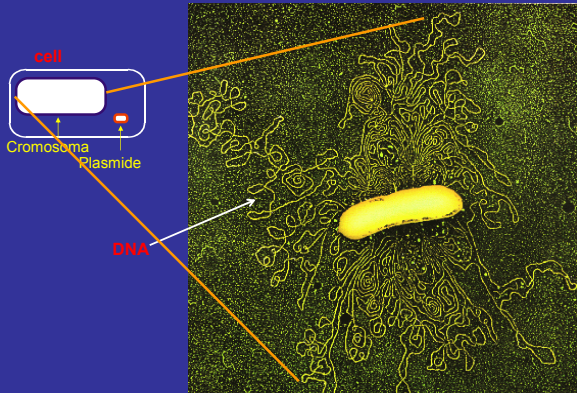
**Condizioni di crescita batterica nell'ambiente naturale**



**Dimension and structure of chromosomes  
in different microorganisms**

Organism	Dimension (Mbp)	Number	Structure
<b>Bacteria</b>			
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0.58	1	circular
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0.91	1	linear
<i>Haemophilus influenzae</i>	1.83	1	circular
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	4.00	2	circular
<i>Bacillus subtilis</i>	4.21	1	circular
<i>Escherichia coli</i>	4.64	1	circular
<i>Streptomyces coelicolor</i>	8.66	1	linear
<b>Archaea</b>			
<i>Methanococcus jannaschii</i>	1.66	1	circular
<i>Halobacterium</i> sp.	2.57	3	circular
<i>Sulfolobus sulfataricus</i>	2.99	1	circular
<b>Eukarya</b>			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12.06	16	linear
<i>Tetrahymena thermophyla</i>	210	5	linear

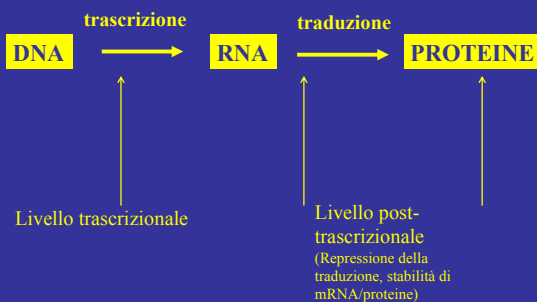
Anche in un genoma semplice c'è un bel po' di DNA...



## Regolazione dell'espressione genica

- L'adattamento alle differenti condizioni ambientali e fisiologiche si realizza tramite *la regolazione dell'espressione genica*
- Geni soggetti a regolazione vengono espressi esclusivamente per specifiche necessità della cellula ed in risposta a segnali specifici, evitando così "sprechi energetici"
- Tra i geni soggetti a regolazione: geni per l'utilizzazione di particolari fonti di carbonio, riparazione del DNA, geni coinvolti nella risposta a stress ambientali

## Regolazione dell'espressione genica

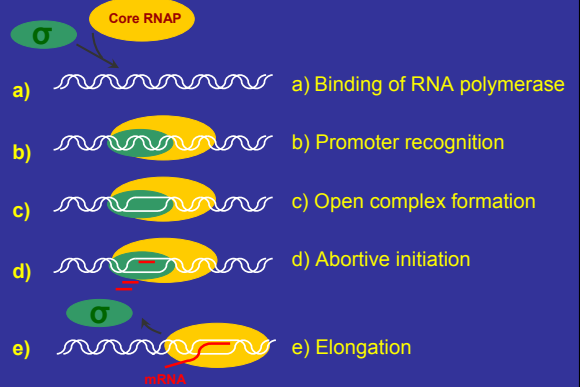


## Regolazione a livello trascrizionale: La forma "preferita" di regolazione genica

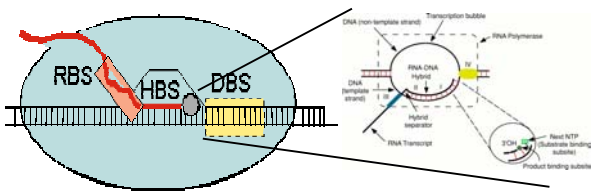
- La regolazione a livello trascrizionale interessa la **grandissima maggioranza** dei geni espressi in modo non costitutivo
- **Vantaggio:** massimo "risparmio energetico" (nessuna produzione di mRNA/proteina)
- **Regolazione possibile a diversi livelli:** **iniziazione, elongazione, terminazione e stabilità del messaggero**
- **Possibilità di regolazione "positiva" o "negativa" della trascrizione (Attivazione o Repressione)**

L' inizio della trascrizione rappresenta un bersaglio "privilegiato" per la regolazione dell'espressione genica

### Transcription Initiation

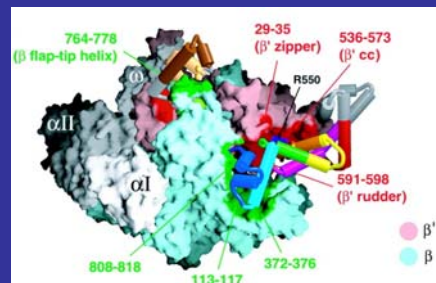


### RNA Polymerase is a multi-subunit and multifaceted enzyme



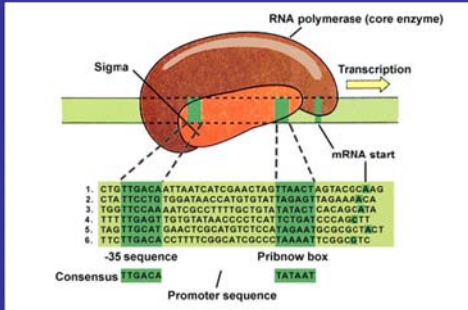
Stable DNA-, RNA- and hybrid DNA/RNA complexes must be kept at all times during the process of RNA synthesis

### Rappresentazione strutturale di un complesso RNA polimerasi/DNA



Katsuhiko S. Murakami, Shoko Masuda, and Seth A. Darst (2002) Structural Basis of Transcription Initiation: RNA Polymerase Holoenzyme at 4 Å Resolution Science 296: 1280-1284

## I fattori $\sigma$ dell'RNA polimerasi sono responsabili del riconoscimento di sequenze specifiche



## Identificazione di promotori $\sigma^{70}$ -dipendenti tramite confronto di sequenze

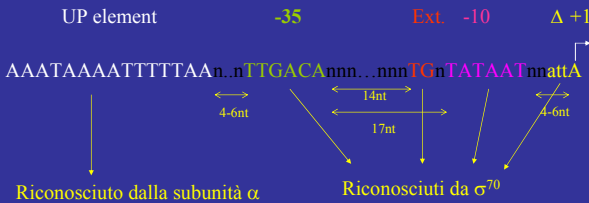
(a) Strong *E. coli* promoters

tyr IRNA	TCTCAACGTAACAC <b>TTTACAG</b> CGGGCG • CGTCATTTGATATGATGC • GCCCCGCTTCCCGATAAGGG
rm D1	GATCAAAAAAATAC <b>TTTGCA</b> AAAA • TTGGATCCCTATAATGGCCCTCCGTTGAGACGACAACG
rm X1	ATGCATTTTTCGC <b>TTGCT</b> CTCTGA • CGCGACTCCCTATAATGGCCCTCCCTCGACACGGCGGAT
rm (DXE) <sub>2</sub>	CCTGAATTCAGGG <b>TTGACT</b> CTGAAA • GAGGAAGGCTAATATAC • GCCACCTCGGACAGTGAGC
rm E1	CTGCATTTTTCTAT <b>TCGGC</b> CTGGC • GAGAACTCCCTATAATGGCCCTCCATCGACACGGCGGAT
rm A1	TTTTAAATTTCC <b>CTTGT</b> AGGGCGG • AATAACTCCCTATAATGGCCCTCCCTCGACACGGGAACA
rm A2	GCAAAAAATAAT <b>GTGACT</b> CTGTAG • CGGGAAGCGGTATTATGC • ACACCCCGCGCCCTGAGAA
$\lambda$ Pr	TAACACCGTGGCT <b>GTGACT</b> TATTTA • CCTCTGGGGGTGATATGG • TTGCATGTACTAAGGAGGT
$\lambda$ P1	TATCTCTGGCGGT <b>TTGACAT</b> AAATA • CCACCTGGCGGTGATCTGA • GACATCAGGAGGACGAC
T7 A3	GTGAAACAACCG <b>TTGACAC</b> ATGA • AGTAACACGGTACGATGT • ACCACATGAACGACAGTGA
T7 A1	TATCAAAAAGAGTA <b>TGACT</b> TAAAGT • CTAACCTATAGGATACTTA • CAGCCATCGAGAGGGAGACG
T7 A2	ACGAAAAACAG <b>TTGACAC</b> ATGAAGTAACATGCAGTAAGATAC • AAATCGCTAGGTAACACTAG
td VIII	GATACAAATCTCC <b>GTACT</b> TTGTT • TCGGCTTGGT <b>TATA</b> TGC • CTGGGGTCAAAAGTGAAGT

(b) Consensus sequences of  $\sigma^{70}$  promoters

-35 region: **TTGACA** (15-17 bp)  
 -10 region: **TATAAT**  
 Promoter mutations: A, T, G, C mutations

## Il "perfetto" promotore $\sigma^{70}$ -dipendente



La conservazione delle sequenze consenso rappresenta un primo importante livello di regolazione dell'espressione trascrizionale

## I due livelli "funzionali" della regolazione trascrizionale

- RNA polimerasi  
Regolazione da fattori sigma "alternativi"  
(solo regolazione positiva)
- Regolazione da proteine (fattori) accessorie all'RNA polimerasi  
(regolazione sia positiva che negativa)

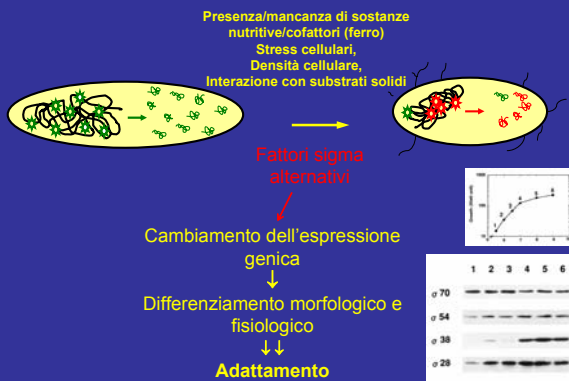
## I due livelli funzionali della regolazione trascrizionale

- *Regolazione da fattori sigma "alternativi"* (solo regolazione positiva)
- *Regolazione da proteine (fattori) accessorie all'RNA polimerasi* (regolazione sia positiva che negativa)

## Fattori sigma differenti sono specifici per la trascrizione di classi funzionali diverse

Fattore $\sigma$	Gene	Funzione
$\sigma^D$ ( $\sigma^{70}$ )	<i>rpoD</i>	Fattore $\sigma$ principale (housekeeping)
$\sigma^S$	<i>rpoS</i>	Adattamento a fase stazionaria
$\sigma^N$ ( $\sigma^{54}$ )	<i>rpoN</i>	Metabolismo/carenza di azoto/carbonio
$\sigma^H$	<i>rpoH</i>	Shock termico
$\sigma^E$	<i>rpoE</i>	Shock termico "estremo"
$\sigma^F$	<i>flaI</i>	Flagello e strutture extracellulari
FecI ( $\sigma^I$ )	<i>fecI</i>	Assimilazione ferro

## I fattori $\sigma$ alternativi entrano in gioco in risposta a stimoli ambientali e cellulari



## I due livelli funzionali della regolazione trascrizionale

- *Regolazione da fattori sigma "alternativi"* (solo regolazione positiva)
- *Regolazione da proteine (fattori) accessorie all'RNA polimerasi* (regolazione sia positiva che negativa)

## Attivazione o Repressione

- Attivazione (controllo positivo)

promotori "deboli" (=basso livello di trascrizione)  
non riconosciuti da RNA pol in assenza di una  
proteina regolatrice (attivatore)

- Repressione (controllo negativo)

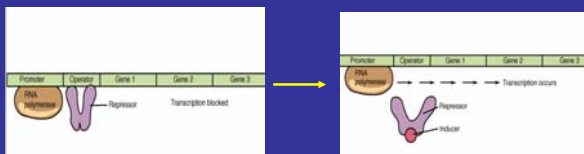
promotori "forti" (=+ alto livello di trascrizione)  
la proteina regolatrice blocca l'interazione  
RNA pol/promotore

## Sito di legame

- Le proteine regolatrici (sia attivatori che repressori) si legano a delle sequenze specifiche sul DNA (Sequenze di legame o sequenze bersaglio)
- Le sequenze di legame sono in genere parte integrante del promotore

### Regolazione dell'espressione genica tramite regolatori negativi

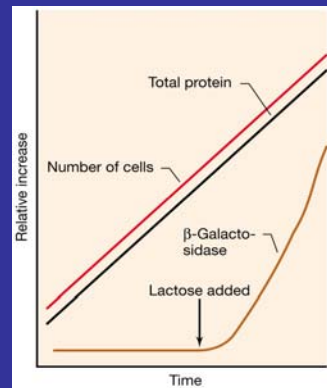
#### Caso 1: Repressione di promotori inducibili



L'inizio della trascrizione viene bloccata da un repressore quando i prodotti genici non sono "richiesti".

Una molecola induttrice lega il repressore e ne riduce l'affinità per la sua sequenza bersaglio sul DNA, consentendo la trascrizione.  
(es. operone *lac* in *E. coli*)

### Un esempio di induzione: l'operone lattosio



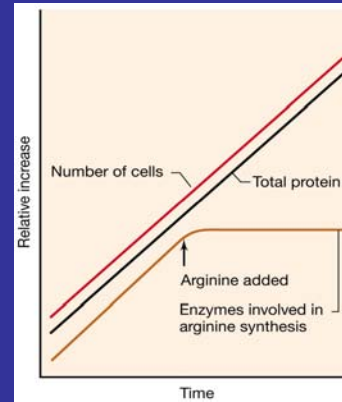
## Regolazione dell'espressione genica tramite regolatori negativi

### Caso 2: Co-repressori

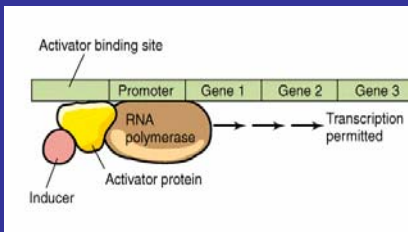


Molecole che fungono da *corepressori* legano la proteina regolatrice (aporepressore) stimolando il legame al DNA e bloccando la trascrizione  
Es. operoni *trp*, *arg* in *E. coli*

## Co-repressione dell'operone biosintetico dell'arginina



## Attivazione della trascrizione

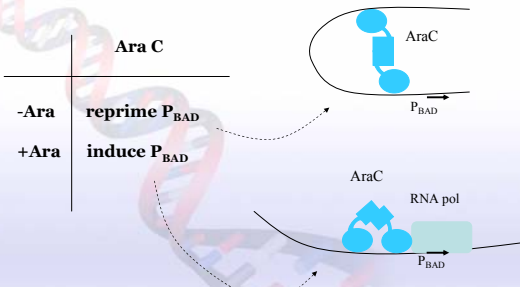


Così come per il controllo negativo, molecole induttrici sono coinvolte nella modulazione del legame al DNA di proteine attivatrici della trascrizione (es. geni *xyI*)

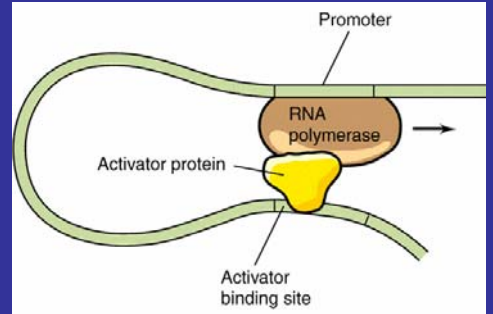
- Le proteine regolatrici (sia attivatori che regolatori della trascrizione) **NON** dipendono necessariamente da molecole induttrici
- la loro attività può essere "innescata" da modificazioni chimiche (es. ossidazione in OxyR, auto-metilazione in Ada, ecc.)

*Oppure.....*

### I molti talenti delle proteine regolatrici.....



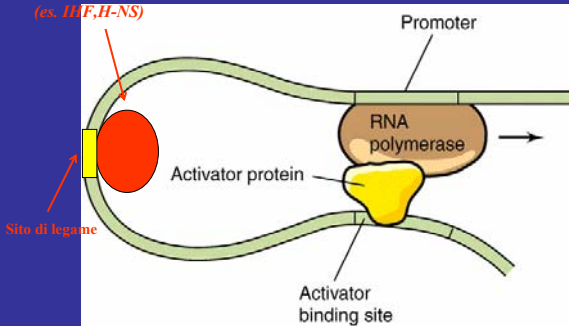
*I siti di legame per le proteine regolatrici possono trovarsi a considerevole distanza dal promotore*



**"With a little help from my friends...."**

Come gli attivatori distali interagiscono con l'RNA polimerasi

*Proteine organizzatrici del nucleoside (ex. IHF, H-NS)*



**Il legame di proteine regolatrici induce una curvatura (bending) nella struttura locale del DNA**

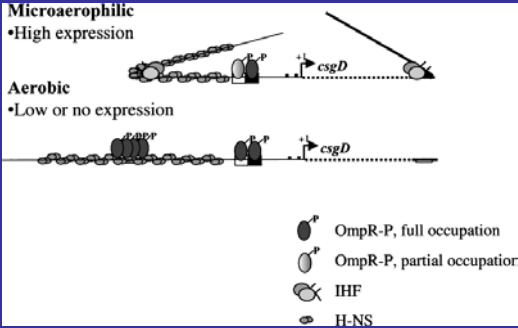




Sempre più difficile: numerosi promotori sono soggetti ad una complessa regolazione che coinvolge più fattori

**Microaerophilic**  
• High expression

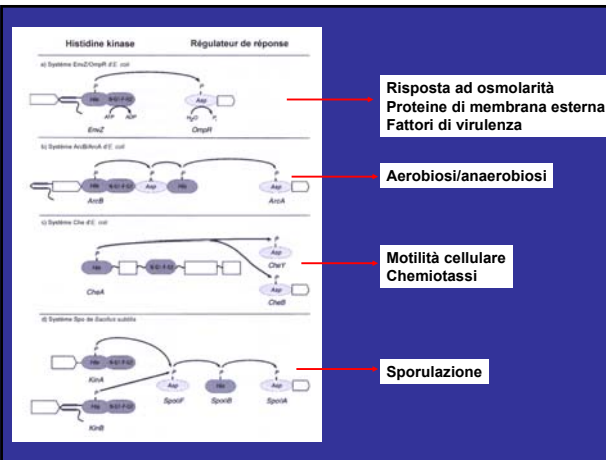
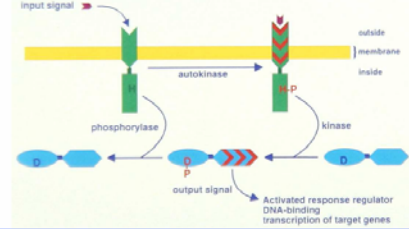
**Aerobic**  
• Low or no expression



Es.: Il promotore *csgD* è legato sia da repressori che da attivatori in risposta a diversi segnali ambientali

## Two-component regulatory systems

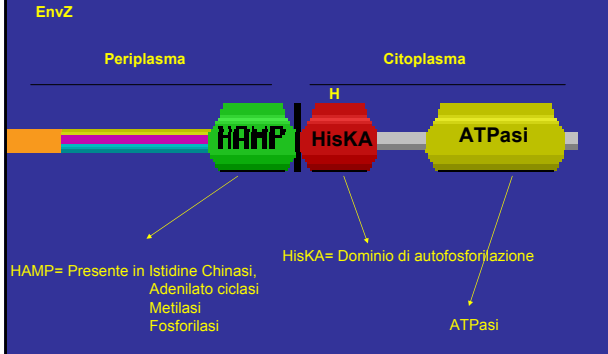
- > Histidine protein kinase & response regulator
- > Input-transmitter & receiver-output domain structure
- > Phosphotransfer signal transduction



## Processi biologici in cui sono coinvolti sistemi a due componenti

- Utilizzazione di elementi necessari alla crescita (azoto); NtrC
- Virulenza (BvgAS di *Bordetella pertussis*)
- Resistenza a metalli pesanti (*pco*)
- Resistenza ad antibiotici (*VanS/VanR* in Gram+)
- Degradazione di sostanze organiche (*XylS/XylR*)
- Adesione a substrati solidi (*AlgZ*)

## Motivi delle proteine sensori-I



## Motivi delle proteine regolatrici

La fosforilazione dell'aspartato determina un cambio conformazionale all'interno della proteina



Linker: trasmette il cambio conformazionale al dominio di DNA-binding

## La regolazione genica „complessa“ è spesso modulata da sistemi di regolazione a due componenti

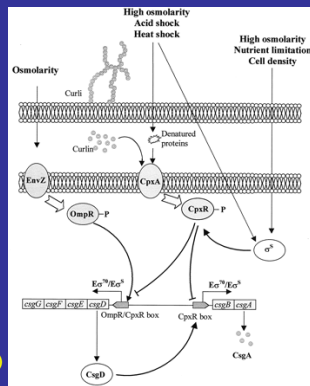
CurlI (fattori di adesione di Enterobatteri):

Espressi a:

osmolarità medio-bassa  
(regolatore positivo: OmpR  
regolatore negativo: CpxR)

Fase stazionaria/crescita lenta  
(regolatore:  $\sigma^S$ )

bassa temperatura  
(CrI, regolatori non identificati)



## Reference

- Ishihama (2000), *Ann. Rev. Microbiol.* 54, 499-518
- Lloyd et al. (2001), *Essays Biochem*, 37, 17-31
- Pratt and Silhavy. In: "Two-component signal transduction" (1995) pp. 105-126
- Ninfa et al., ibidem, pp.67-88.
- Nixon et al. (1986) *P.N.A.S.* 83, 7850-7854
- Aricò et al. (1991) *Mol Microbiol* 5, 2481-2491