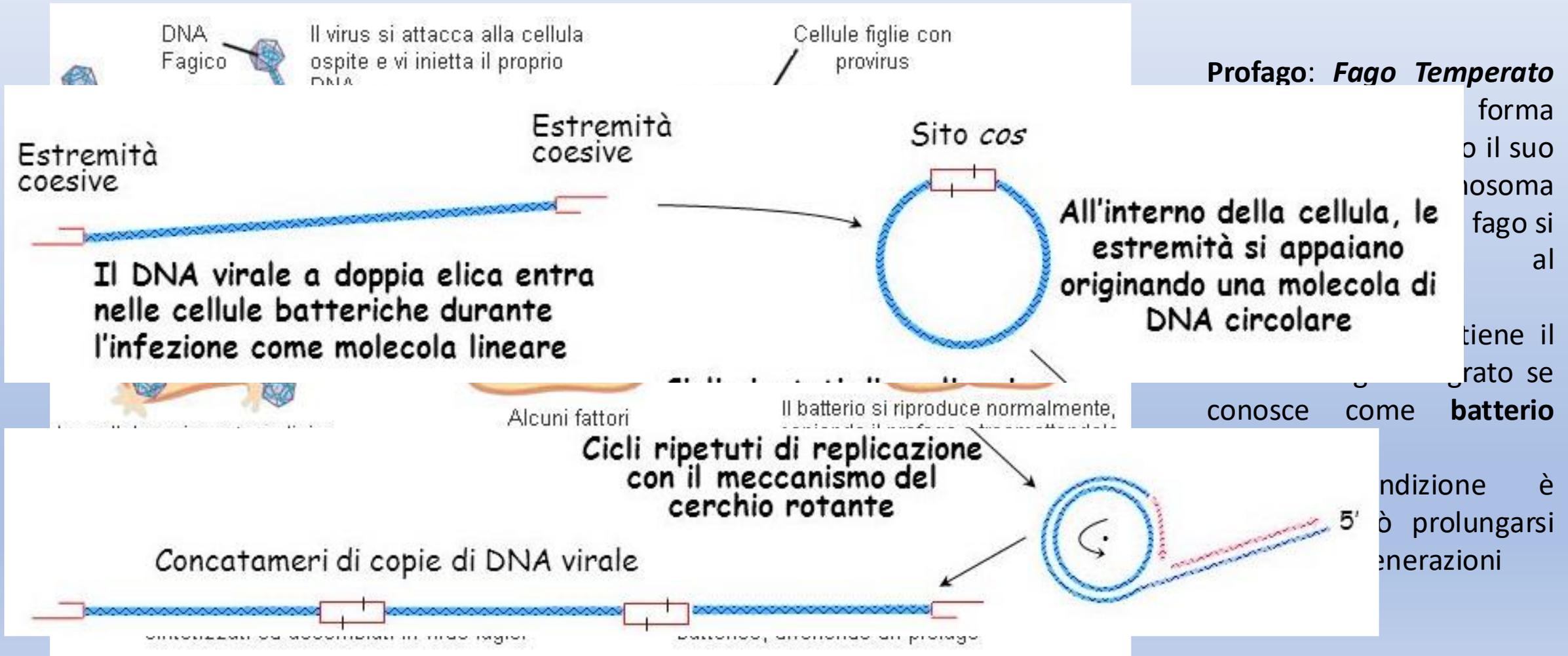


Espressione genica nel  
Fago  $\lambda$

# Ciclo vitale fago Lambda $\lambda$

Quando il fago lambda infetta una cellula batterica può scegliere di seguire un **ciclo litico** o un **ciclo lisogenico**



# Ciclo vitale fago Lambda



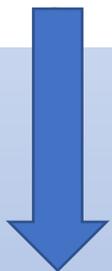
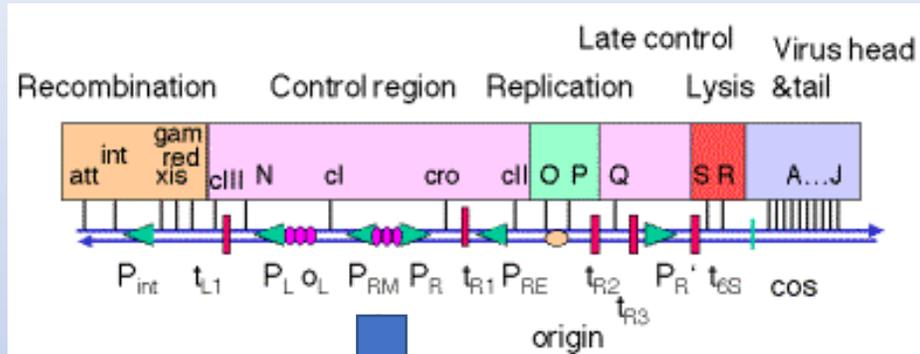
Ciclo LITICO



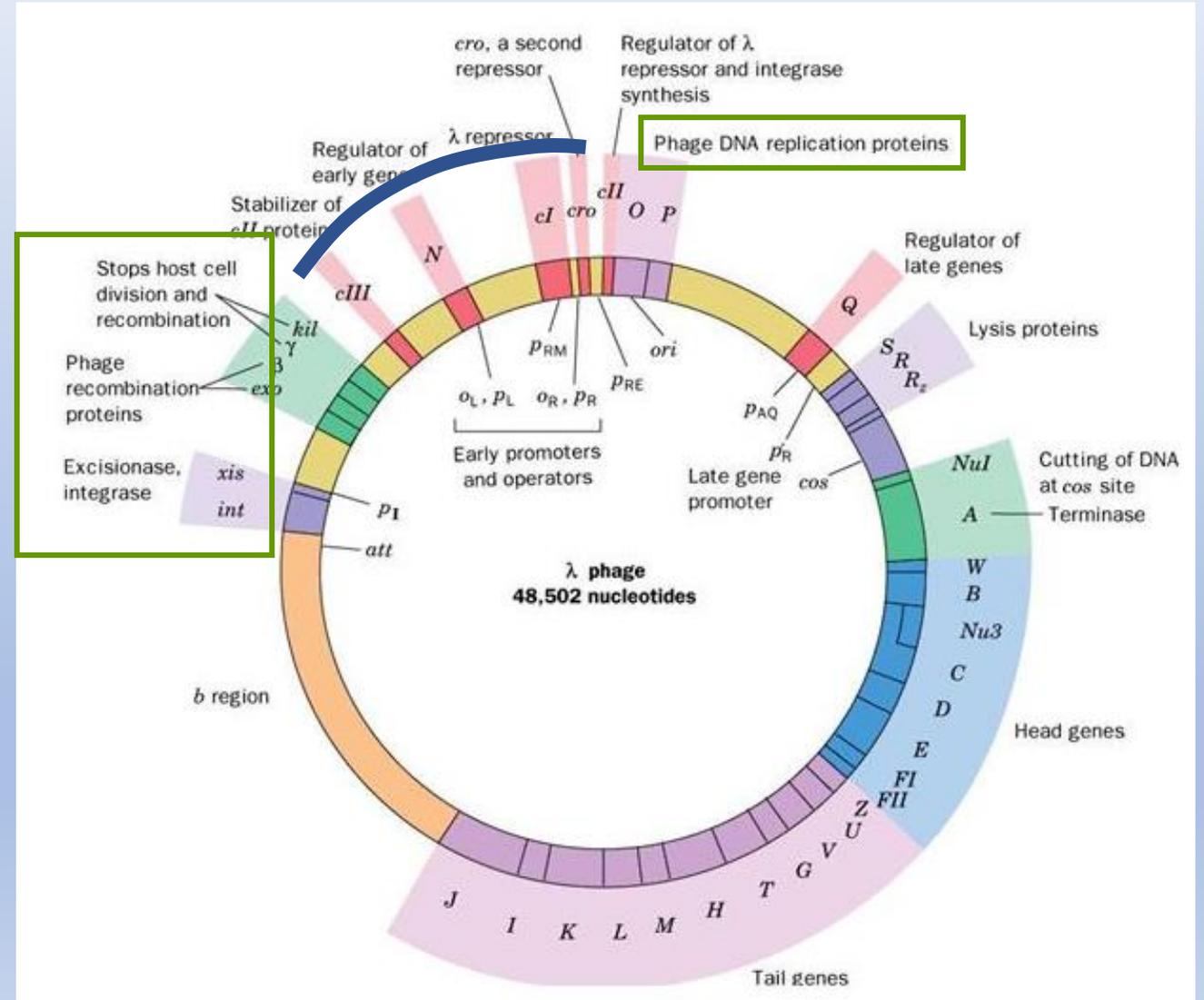
Ciclo LISOGENICO

La scelta è regolata da una serie di eventi e da **proteine regolatrici che agiscono *in trans*** su una regione del genoma del fago lambda chiamata **regione di controllo**

# Genoma Fago Lambda



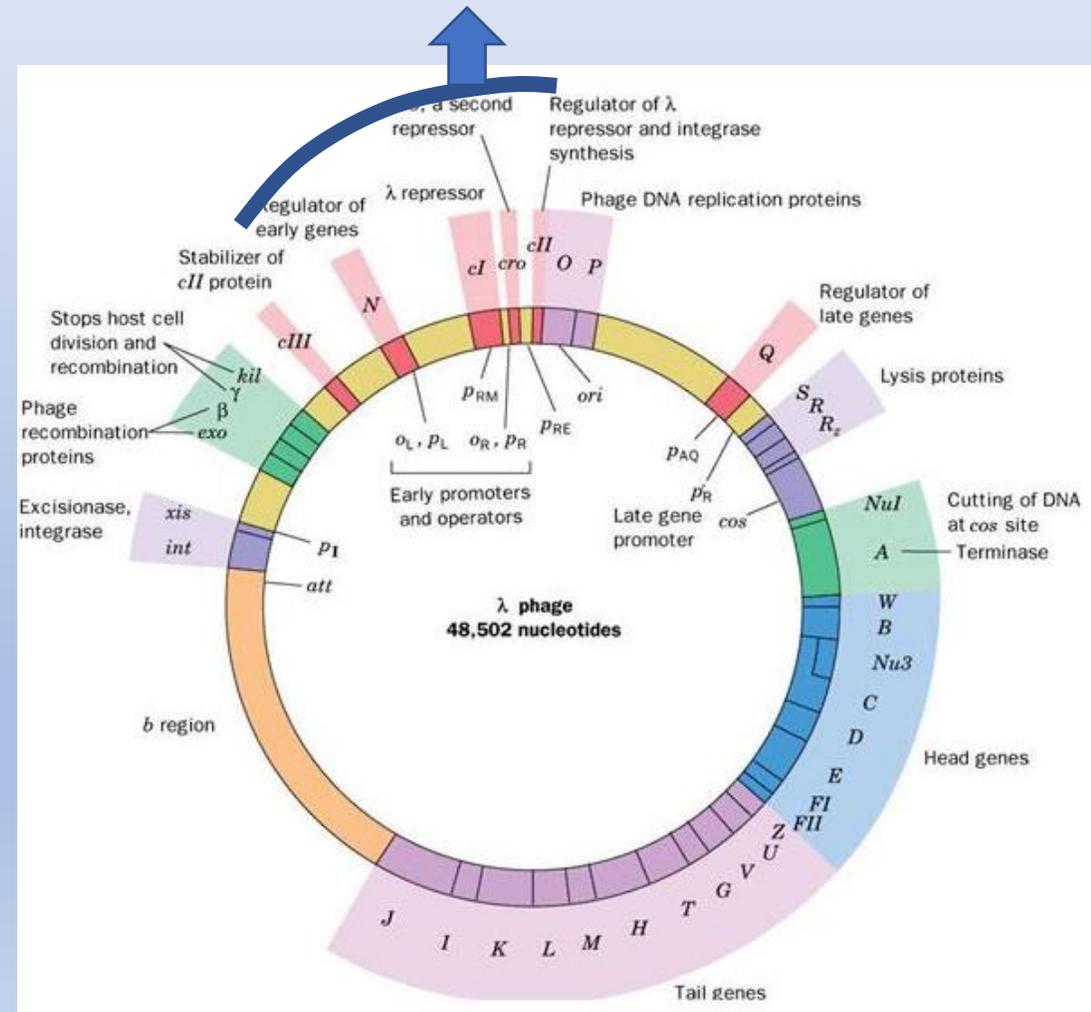
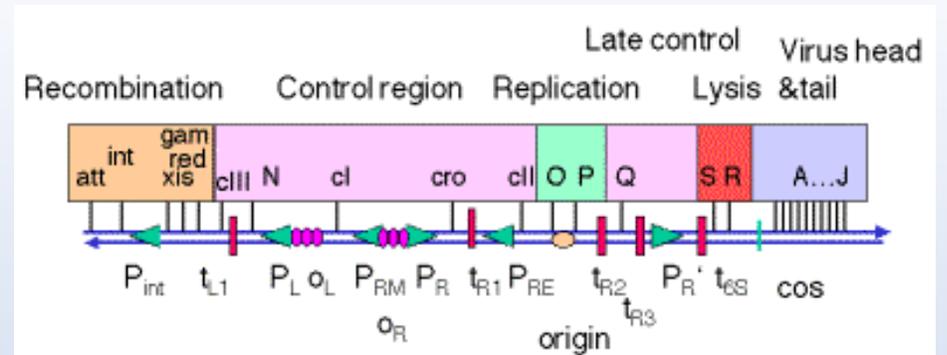
La regione di controllo ( o regione di immunità) contiene i geni che codificano per le proteine che regolano l'entrata nei due cicli: litico e lisogenico



# Ciclo Litico

- Si esprimono in successione temporale tre gruppi di geni:
  - Geni precoci immediati (geni *N* e *cro*)
  - Geni precoci ritardati (*cII*, *O*, *P* e *Q*), (*cIII*, *Xis* e *Int*)
  - Geni tardivi

La regolazione della loro espressione temporale avviene attraverso un **meccanismo di anti-terminazione** (a livello della terminazione della trascrizione)



# Regione controllo o di immunità

2 geni:

- **cl** (repressore di lambda)
- **cro** (*control of repressor and other things*)

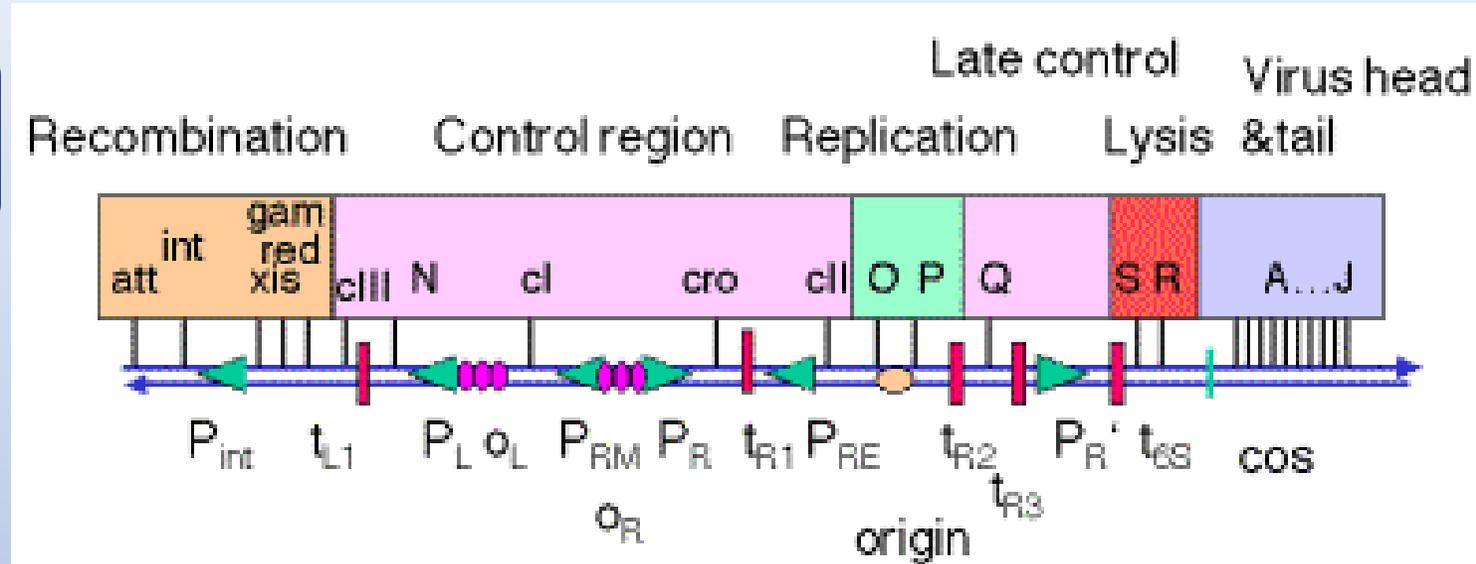
Questi due geni controllano in modo mutuamente esclusivo la trascrizione nella regione controllo.

3 promotori:  $P_R$ ,  $P_L$ ,  $P_{RM}$

$P_R$ : Responsabile della trascrizione verso destra del gene precoce immediato **cro**

$P_L$ : Responsabile della trascrizione verso sinistra del gene precoce immediato **N**

$P_R$  e  $P_L$  sono dei **promotori forti** e costitutivi che legano la RNA pol e non hanno bisogno di altri fattori di trans-attivazione



$P_{RM}$ : E' un **promotore debole** che ha bisogno di un attivatore per reclutare la RNA pol e trascrivere la molecola repressore codificata nel gene **cl**.

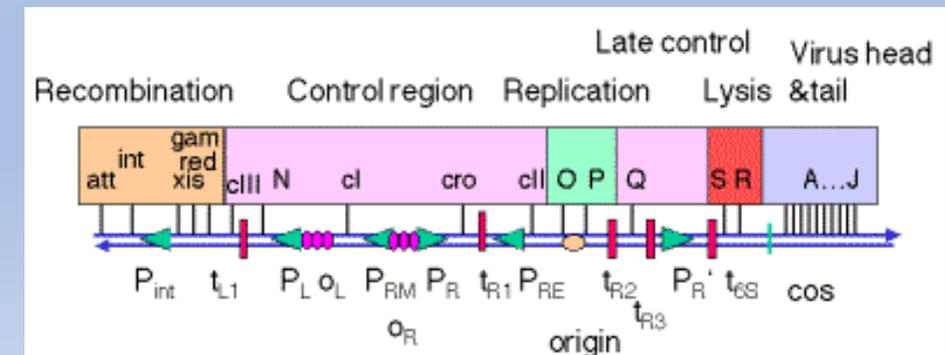
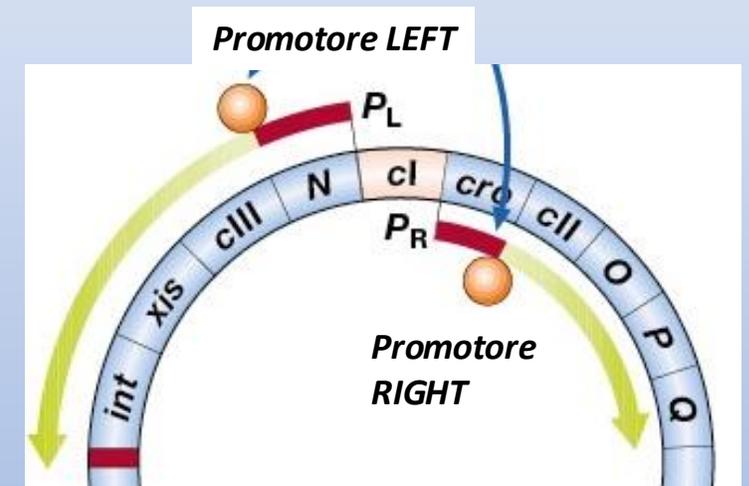
Quando questo promotore è attivo nel ciclo lisogenico esclude la funzione di ogni altro promotore del fago.

# Inizio ciclo Litico dopo l'infezione: geni precoci immediati

- Dopo l'infezione si attivano  $P_R$  e  $P_L$ , che iniziano subito la trascrizione dei **geni precoci immediati**  $N$  e  $cro$  dando inizio al ciclo litico

Geni  $N$  e  $cro$  codificano per regolatori della trascrizione che operano sulla terminazione ( $N$ ) o inizio ( $cro$ ) della trascrizione. Questi sono orientati in modo divergenti e per questo trascritti sui 2 diversi filamenti della doppia elica.

Dopo i geni  $N$  e  $cro$  ci sono 2 terminatori della trascrizione che sono attivi i primi minuti del ciclo litico e causano la terminazione della trascrizione di questi trascritti.



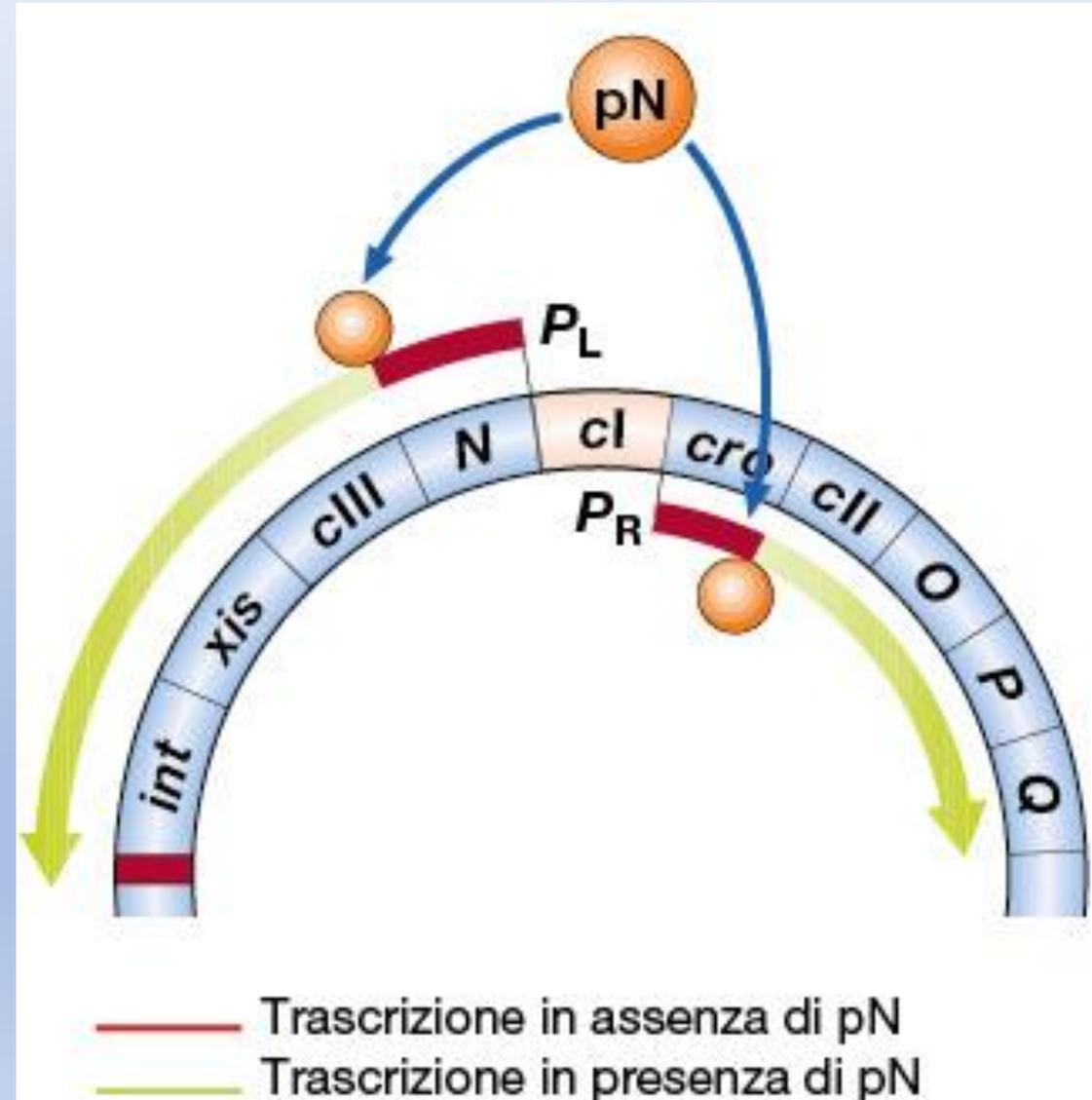
# Inizio ciclo Litico dopo l'infezione: geni precoci immediati

- Il gene *N* codifica per la **proteina pN**.
- **pN** è un **antiterminatore** che evita (inibisce) la terminazione della trascrizione dello stesso operone e anche del operone contenente il gene *cro*



Anti-terminatori = Specifiche proteine che consentono alla RNA polimerasi di continuare la trascrizione attraverso il sito di terminazione

Può continuare l'espressione dei **geni precoci ritardati *a valle*** in ambedue direzioni



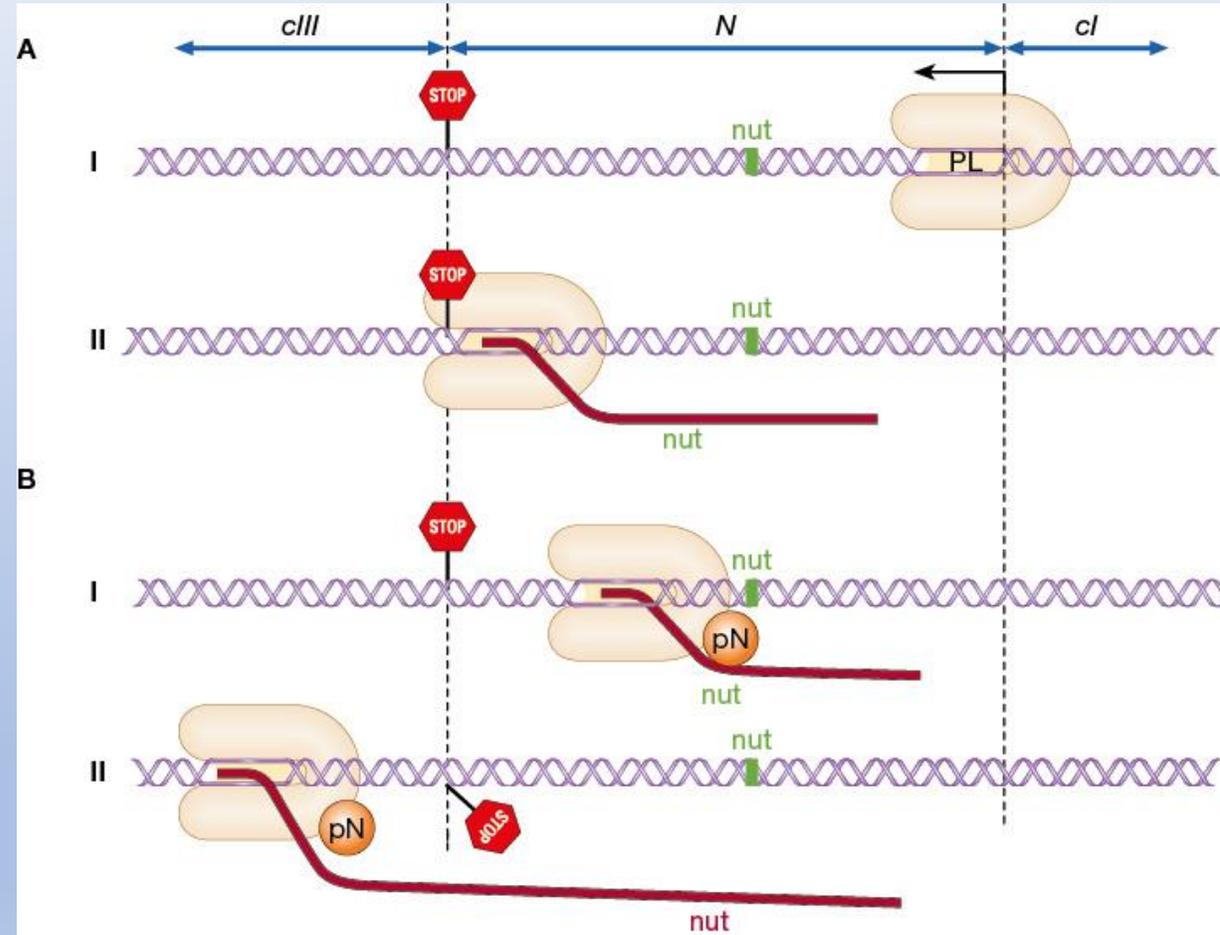
# Modo di azione degli antiterminatori

## Antiterminatore pN

La pN forma un **complesso ribonucleico** sulla RNA pol evitando il riconoscimento del terminatore

La proteina N utilizza ***nut sites* (N-utilization sites)** che si trovano all'interno della unità di trascrizione e che precedono il terminatore sul quale la proteina N deve agire evitando la terminazione della trascrizione

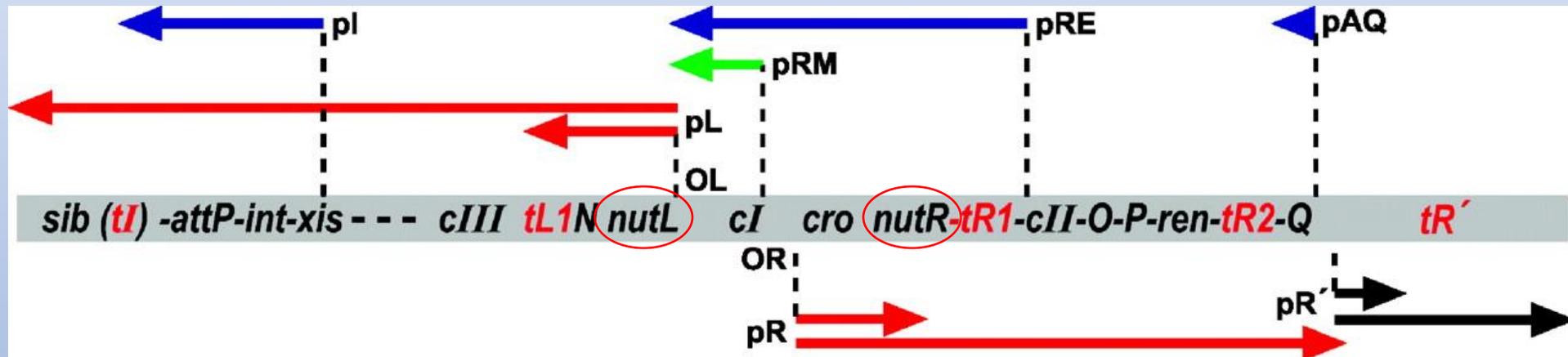
La proteina pN già trascritta e tradotta interagisce con la sequenza nut del RNA e si lega alla RNA pol insieme ai fattori batterici del «complesso Nus». Questa associazione porta al non riconoscimento del terminatore e la trascrizione può continuare



# Sequenze *nut*

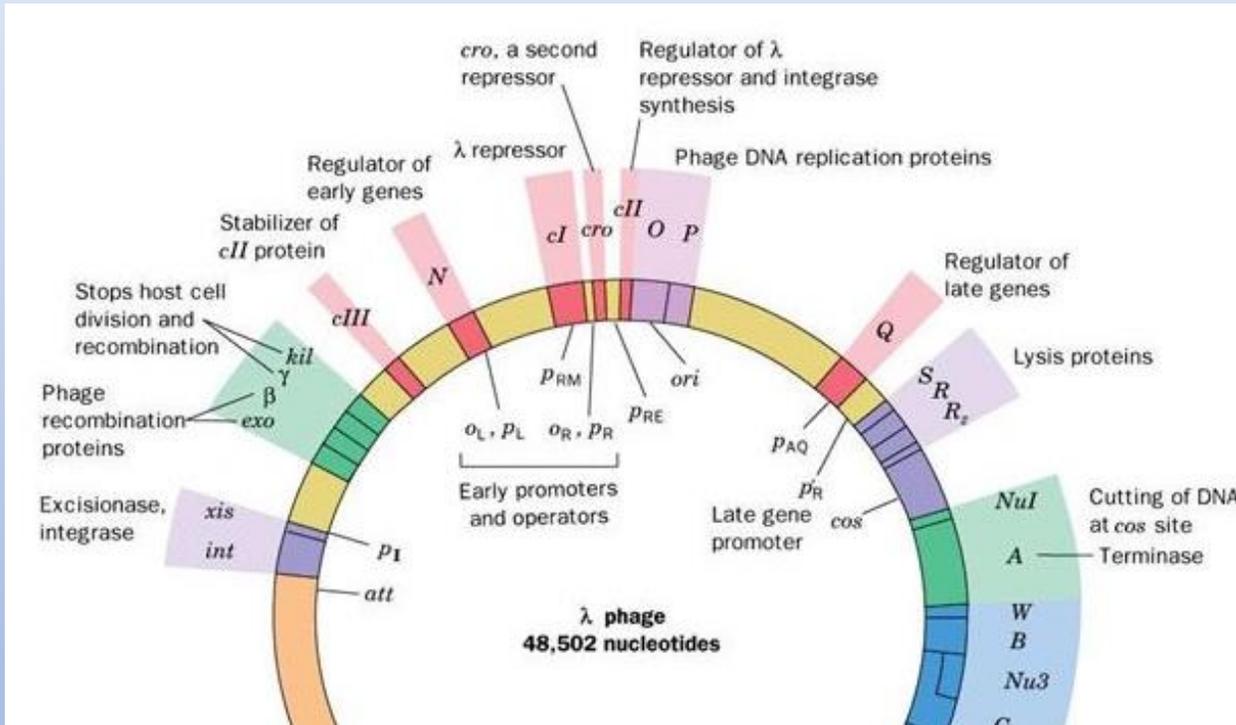
Le sequenze *nutL* e *nutR* sono sequenze palindromiche lunghe 17 bp

```
5' AGCCCTGAARAAGGGCA
   TCGGGACTTYTTCCCGT 5'
```



Il sito *nut* si trova sia nel operone di sinistra (sul gene *N*, *nutL*) che su quello di destra sul gene *cro* (*nutR*)

# Inizio ciclo Litico dopo l'infezione: geni precoci ritardati e geni tardivi



A valle di *cro* troviamo i geni precoci ritardati : *cII* (attivatore promotori deboli) e *O*, *P* e *Q*.

**La proteina Q** è un anti-terminatore che permetterà la prosecuzione della trascrizione dei geni tardivi che sono quelli strutturali della testa e coda, e quelli che codificano per l'enzimi responsabili della lisi della cellula.



# Regione controllo o di immunità

2 geni:

- **cl** (repressore di lambda)
- **cro** (*control of repressor and other things*)

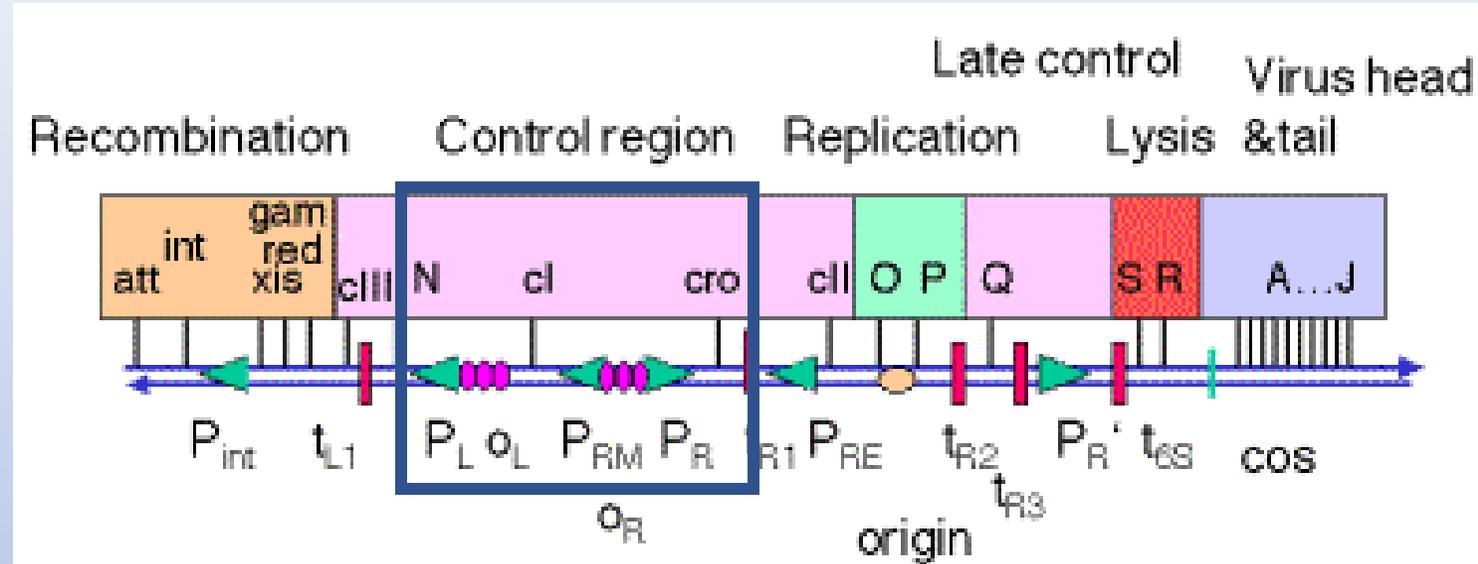
Questi due geni controllano in modo mutuamente esclusivo la trascrizione nella regione controllo

3 promotori:  $P_R$ ,  $P_L$ ,  $P_{RM}$

$P_R$ : Responsabile della trascrizione verso destra del gene precoce immediato **cro**

$P_L$ : Responsabile della trascrizione verso sinistra del gene precoce immediato **N**

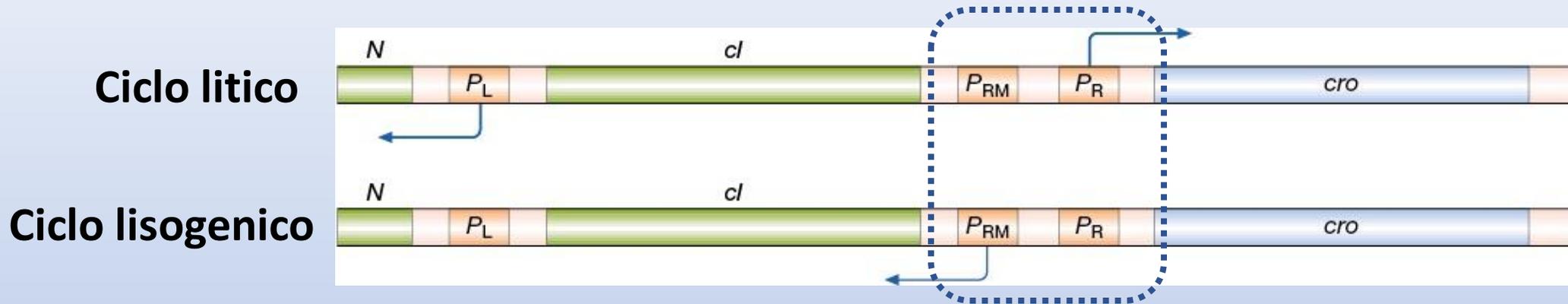
$P_R$  e  $P_L$  sono dei **promotori forti** e costitutivi che legano la RNA pol e non hanno bisogno di altri fattori di trans-attivazione



$P_{RM}$ : E' un **promotore debole** che ha bisogno di un attivatore per reclutare la RNA pol e trascrivere la molecola repressore codificato nel gene **cl**.

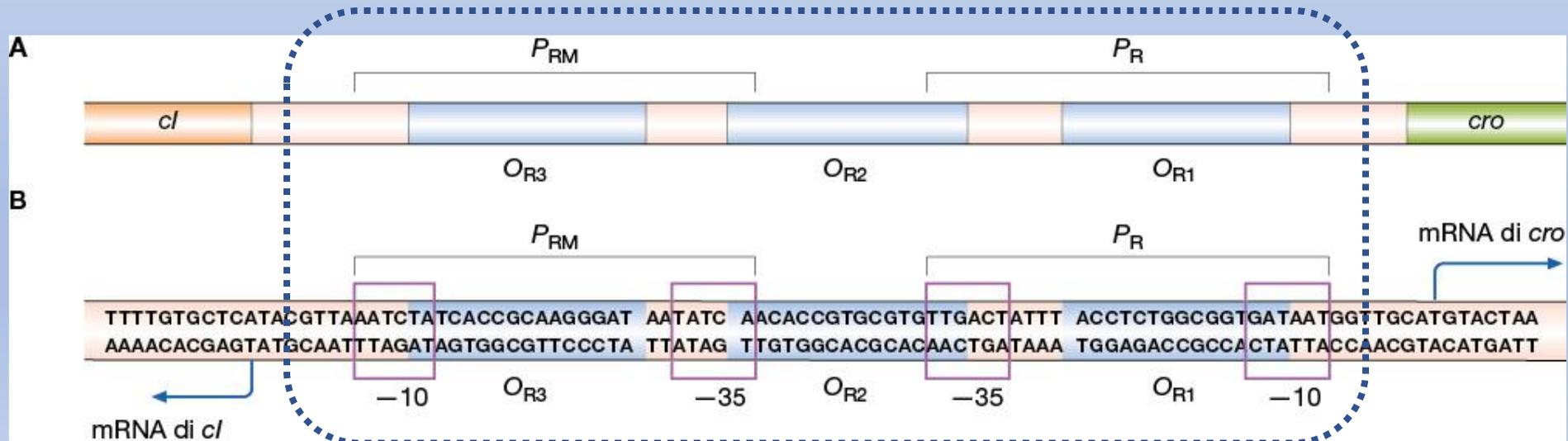
Quando questo promotore è attivo nel ciclo lisogenico esclude la funzione di ogni altro promotore del fago.

# Promotori ed Operatori Fago $\lambda$

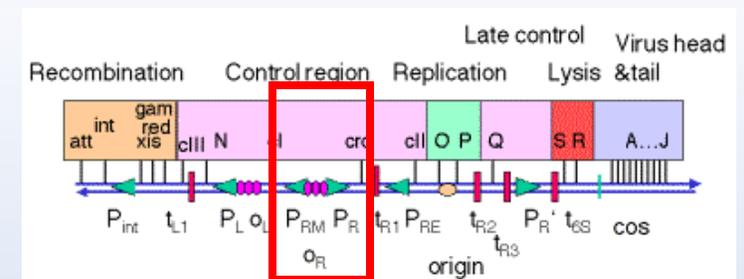


Ci sono tre **siti Operatori** sovrapposti ai Promotori:

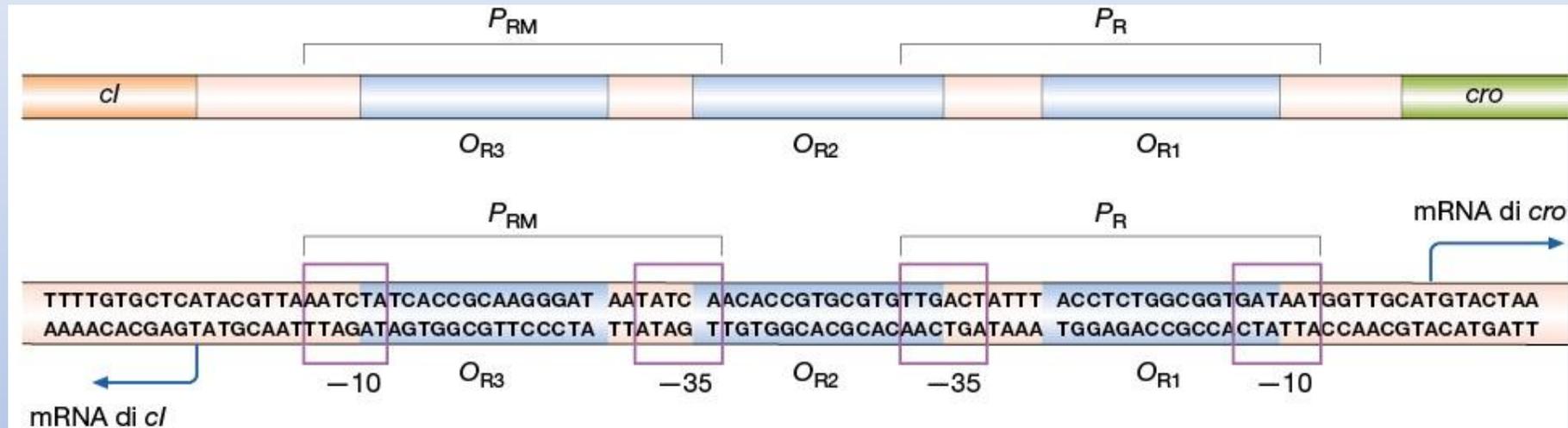
$O_{R1}$ ,  $O_{R2}$ ,  $O_{R3}$



# Promotori ed Operatori Fago $\lambda$



Ci sono tre siti Operatori sovrapposti ai Promotori:  $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$ ,  $O_{R3}$



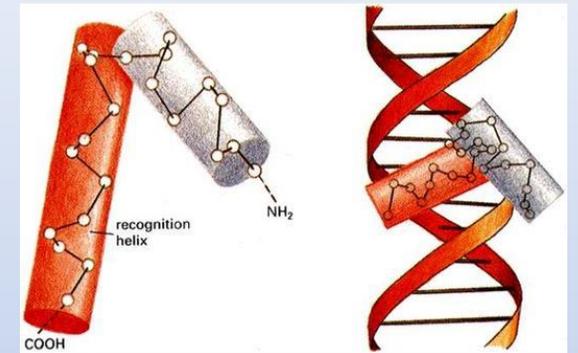
Ogni  $O_R$  è lungo 17 pb.

Vengono legati dalle proteine *cl* e CRO

- Ogni promotore ha la sequenza canonica con i siti -10 e -35.
- Gli operatori  $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$  e  $O_{R3}$  hanno sequenze simili ma non identiche
- Ogni Operatore ha una **diversa affinità per il repressore Cl e per Cro.**
- L'operatore  $O_{R2}$  si sovrappone alle regioni -35 dei 2 promotori  $P_{RM}$  e  $P_R$ .

# Legame della Proteina Cro negli operatori

- **Cro** è un **repressore del ciclo lisogenico** regolando anche lui la regione di controllo.
- Si lega in forma di **dimero** alla regione di controllo del DNA attraverso una **regione HTH**, riconoscendo la regione  $\alpha$ -elica R (di riconoscimento) il solco maggiore del DNA.



Regione HTH

**Affinità: OR3>OR2=OR1**

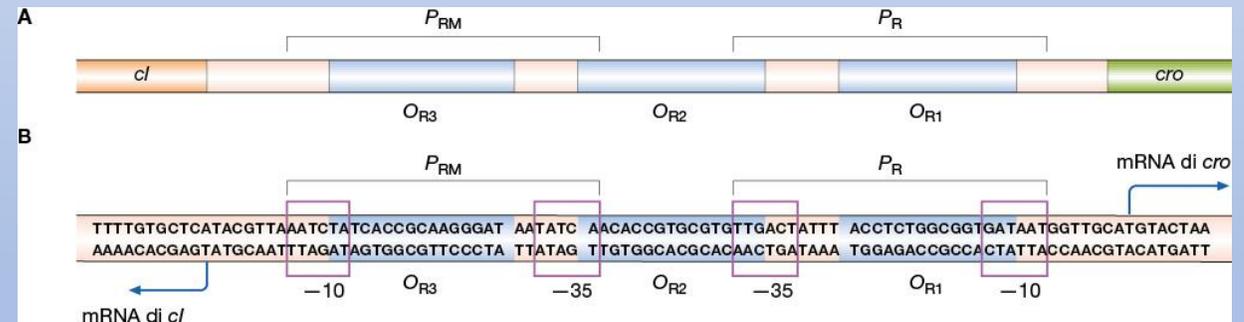
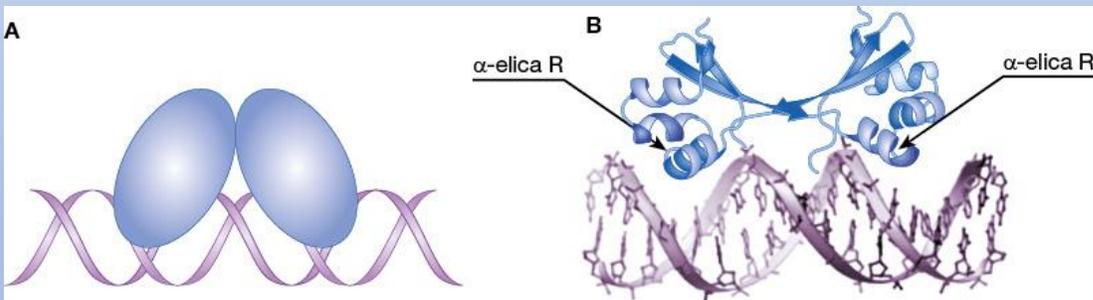


Fig.10.31

# Affinità del repressore $\lambda$ e Cro per gli operatori

Gli operatori  $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$  e  $O_{R3}$  hanno sequenze simili ma non identiche che determinano che il repressore **Cl** e **Cro** si leghino con diversa affinità.

- Il repressore Cro ha una **affinità 10 volte maggiore per  $O_{R3}$**  che per gli altri OR.
- A differenza del repressore  $\lambda$ , **Cro non crea legami cooperativi**. Questo è dovuto alla sua struttura che non induce tetramerizzazione
- Il legame di Cro al  $O_{R1}$  o  $O_{R2}$  avviene in modo aleatorio non dipendente della affinità.
- Aumentando la concentrazione di Cro ci sarà il legame con tutti gli operatori: **AUTOREGOLAZIONE NEGATIVA**.

## Cro Affinità: $O_{R3} > O_{R2}, O_{R1}$

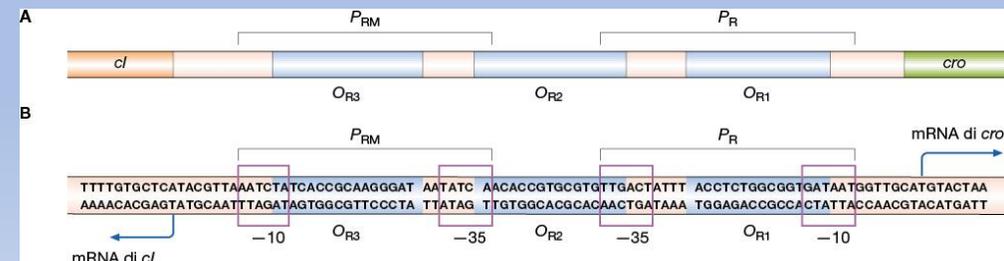
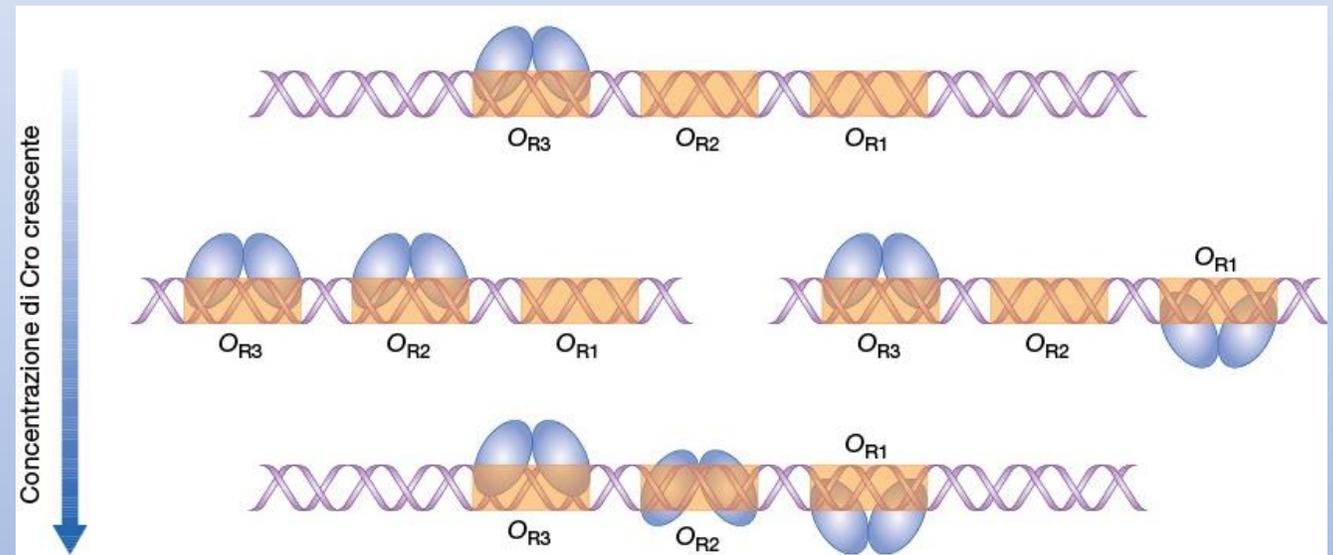
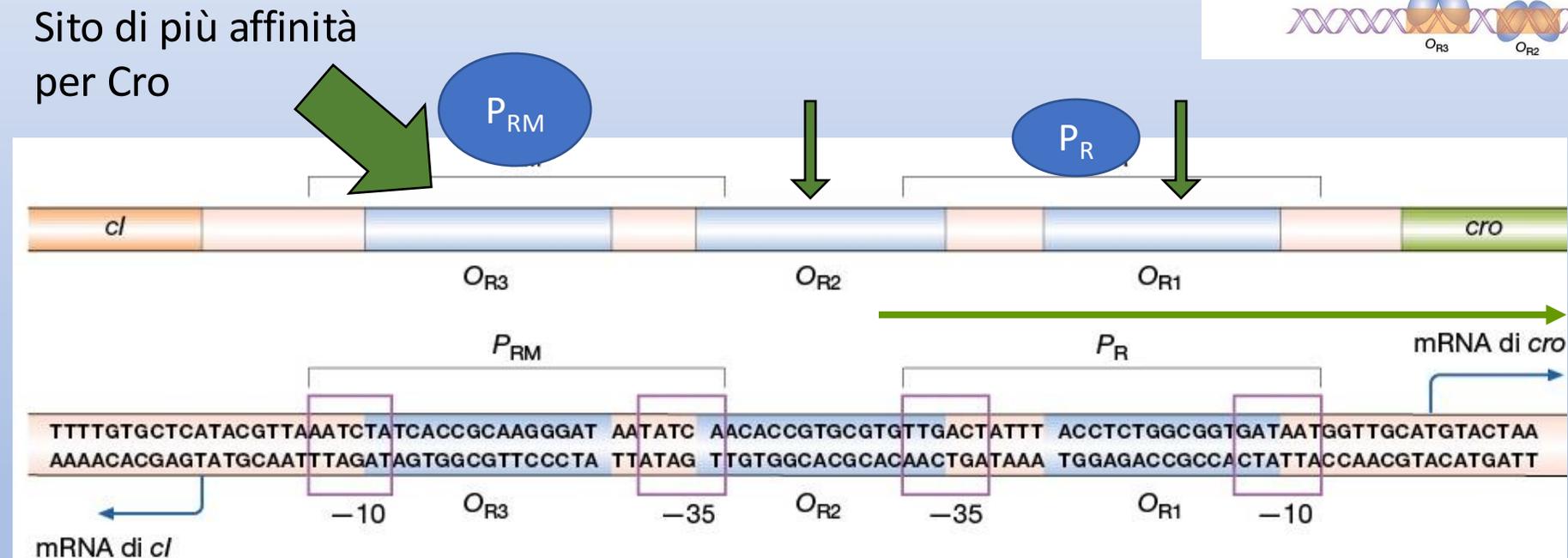
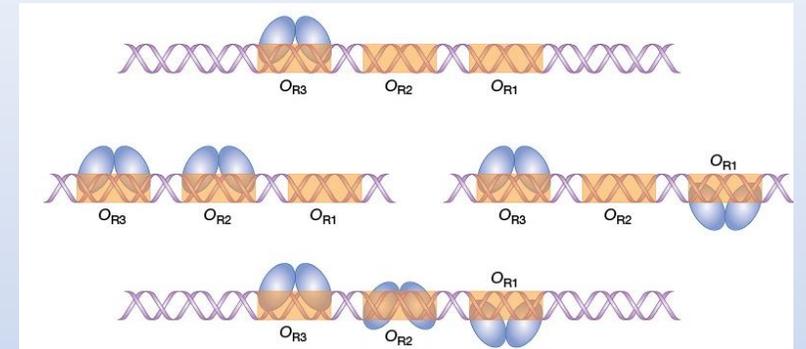


Fig.10.33

# Trascrizione di *cro* dalla regione di controllo

- Dopo l'infezione il promotore  $P_R$  è libero e per tanto può essere attivato trascrivendo *cro*



*cro* si trascrive legandosi al  $O_{R3}$  ed inibendo così la trascrizione da  $P_{RM}$  (e per tanto inibisce la sintesi del repressore  $\text{Cl}$  o  $\lambda$ )

# Legame del repressore $\lambda$ (CI) negli operatori

Il repressore CI o  $\lambda$ , codificato dal gene *cl*, è il repressore del ciclo litico.

E' costituito da 2 domini:

**N-terminale** e **C-terminale** uniti da una regione **linker flessibile**

## ***N-terminale:***

- **Regione Helix-Turn-Helix** (elica-giro-elica) che permette l'interazione con il solco maggiore del DNA a livello del operatore.
- **Regione attivatrice** che interagisce con il dominio  $\sigma 4$  della RNA pol. Questa regione è importante perché PRM è debole e la presenza di questa regione aumenta la efficienza della RNA pol.

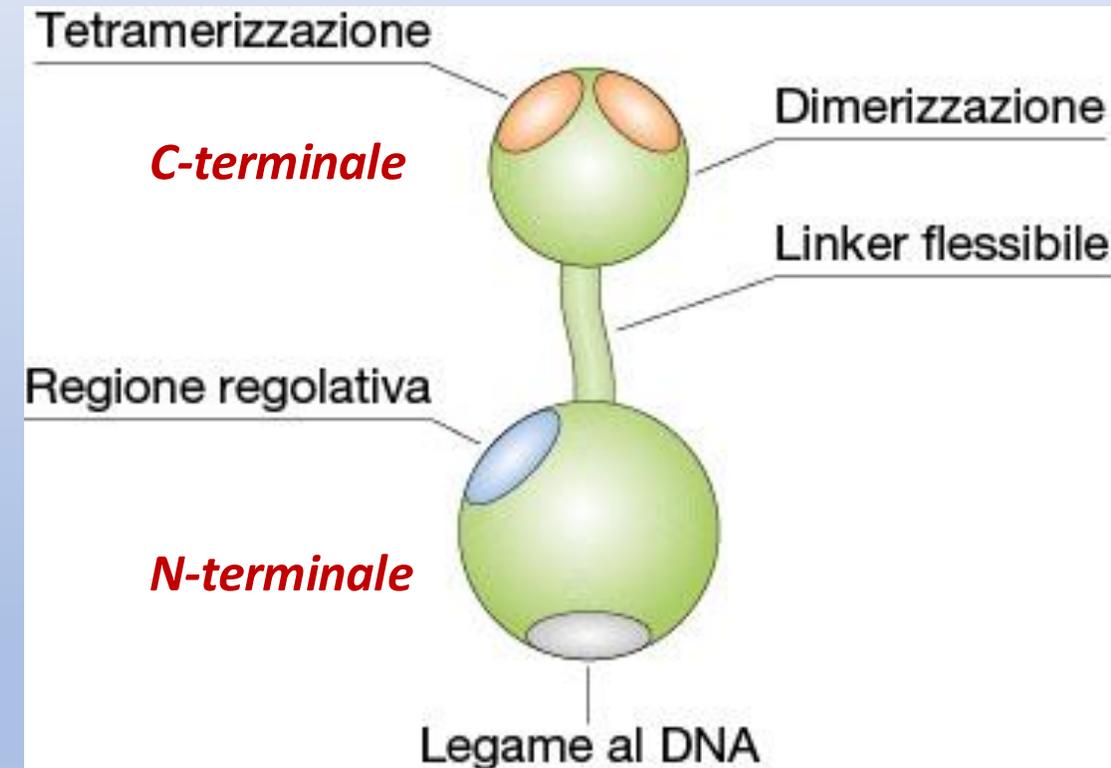
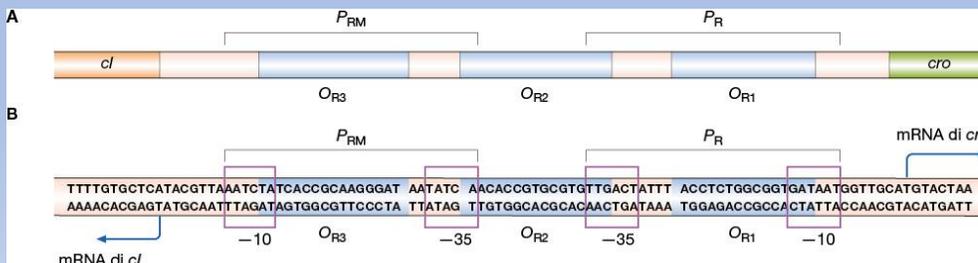


Fig.10.29

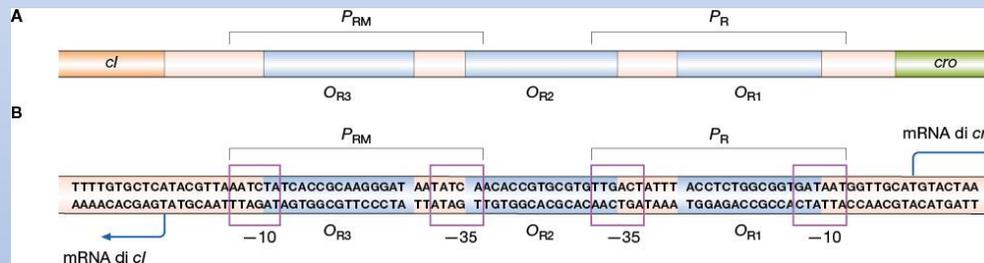
Amaldi et al. *Biologia Molecolare* 2° edizione 2014

# Legame del repressore $\lambda$ negli operatori

## *C-terminale:*

- **Regione di dimerizzazione**, condizione nella quale si lega al DNA.
- **Regione di tetramerizzazione**, condizione che permette il legame cooperativo del repressore con il DNA.

**Affinità: OR1>OR2>OR3**



Il repressore ha una doppia funzione:

- Controllo NEGATIVO: Reprime la trascrizione degli altri geni di lambda, e lo fa occupando i promotori.
- Controllo POSITIVO: Attiva la sua espressione.

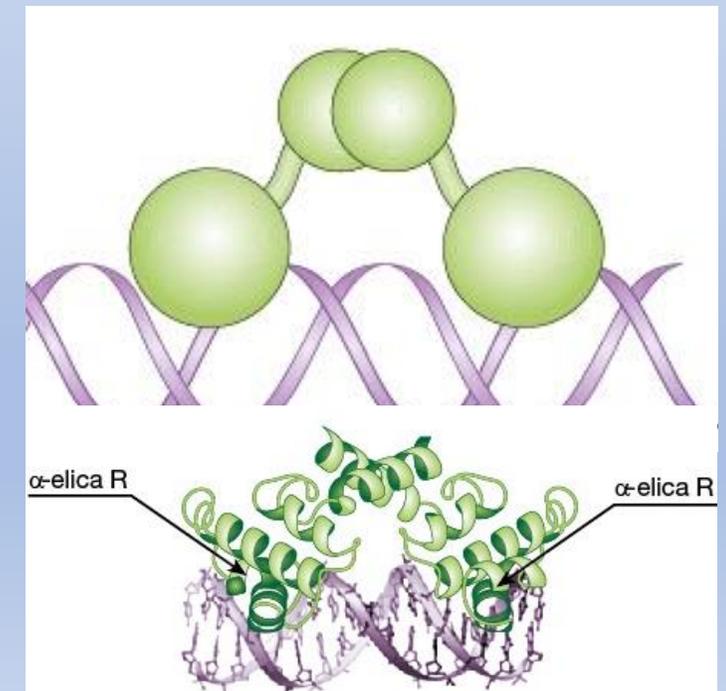
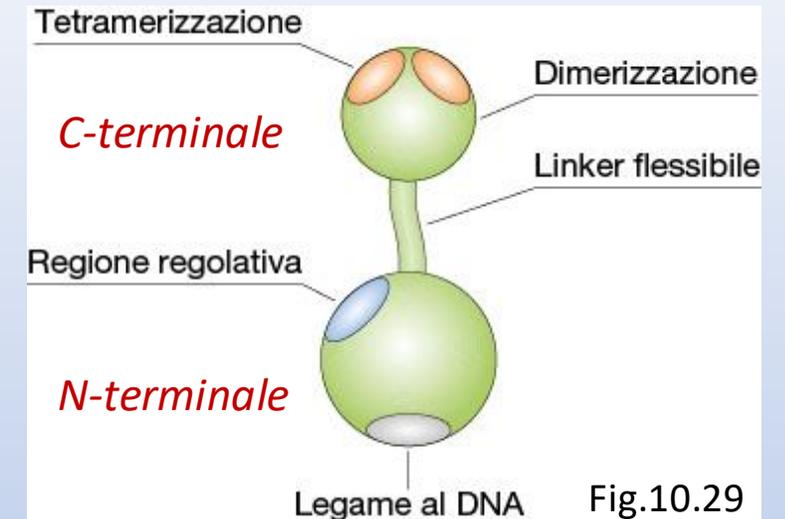


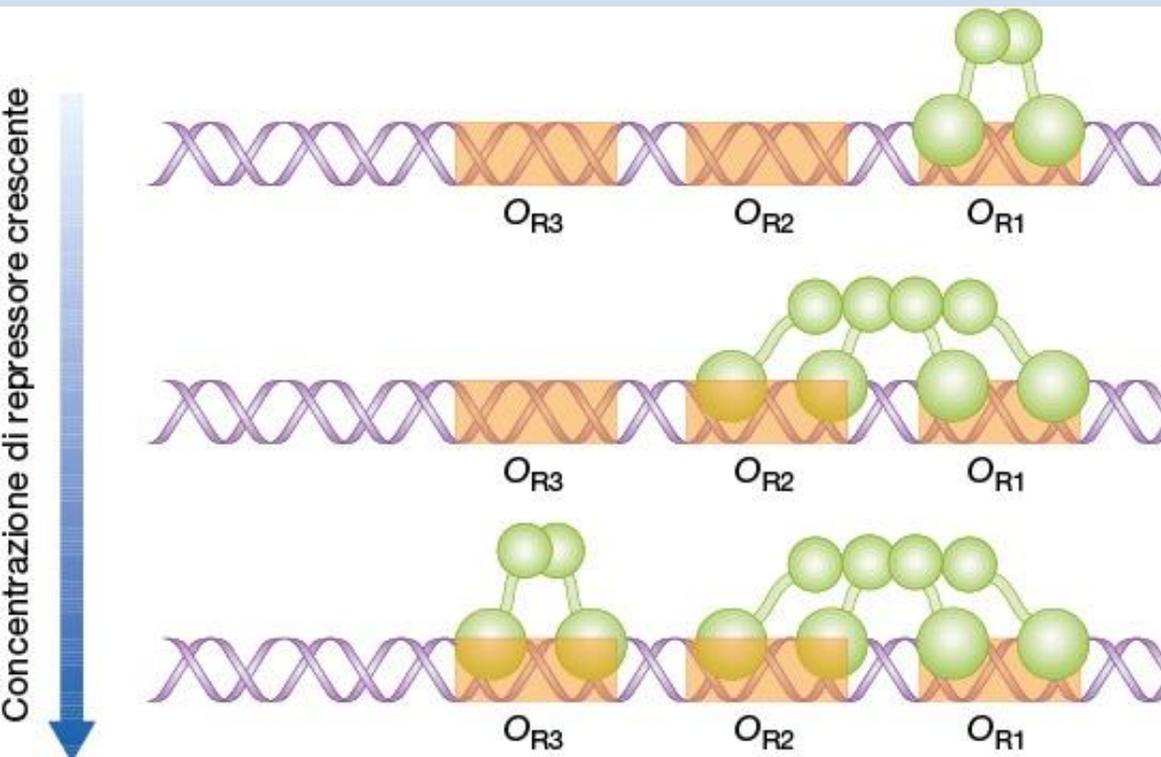
Fig.10.30

Amaldi et al. Biologia Molecolare 2° edizione 2014

# Affinità del repressore $\lambda$ (cI) per gli operatori

Gli operatori  $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$  e  $O_{R3}$  hanno **sequenze simili** ma non identiche che determinano che il repressore CI (e Cro) si leghi con **diversa affinità**.

cI (repressore  $\lambda$ )



- Il repressore  $\lambda$  ha una **affinità 10 volte maggiore per  $O_{R1}$**  che per gli altri OR.
- **A bassa concentrazione** il dimerico di repressore  $\lambda$  **lega  $O_{R1}$** .
- Un leggero **aumento in concentrazione** del repressore fanno che un dimerico possa **legarsi anche al  $O_{R2}$** , evento che è favorito della presenza del primo dimerico nel  $O_{R1}$  e della flessibilità della regione linker che facilita la formazione di tetrameri mediante la regione N-terminale. Questa dinamica ha portato a definire il **legame a  $O_{R2}$  di tipo COOPERATIVO** ( alle stesse concentrazioni il repressore non lega  $O_{R2}$  se non è già legato ad  $O_{R1}$  )
- **A concentrazioni più elevate** il repressore cI si può **legare anche al  $O_{R3}$**

Fig.10.32

# Trascrizione di *cl* dalla regione di controllo: autoregolazione positiva

Repressore  $\lambda$

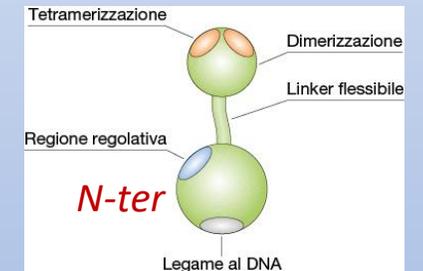
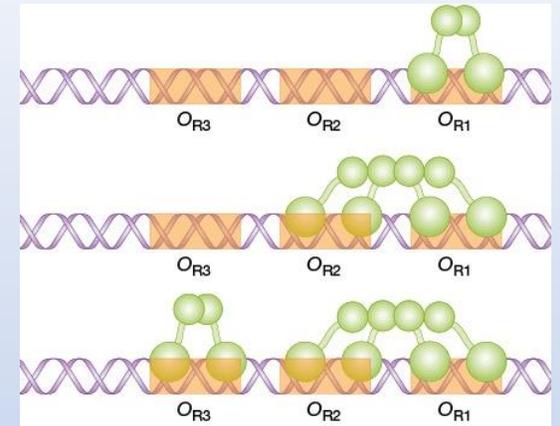
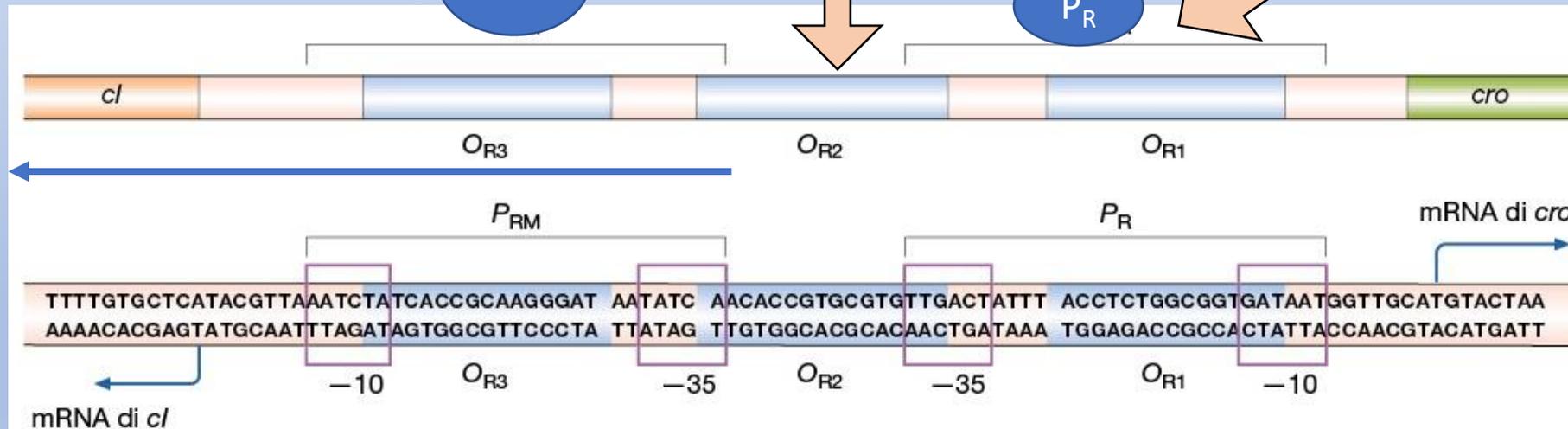
Legame cooperativo dopo  $O_{R1}$

si lega tramite il N-ter al dominio  $\sigma 4$  della RNA pol e la recluta sul suo promotore. In questo modo attiva la propria sintesi:

Repressore  $\lambda$   
Più alta affinità

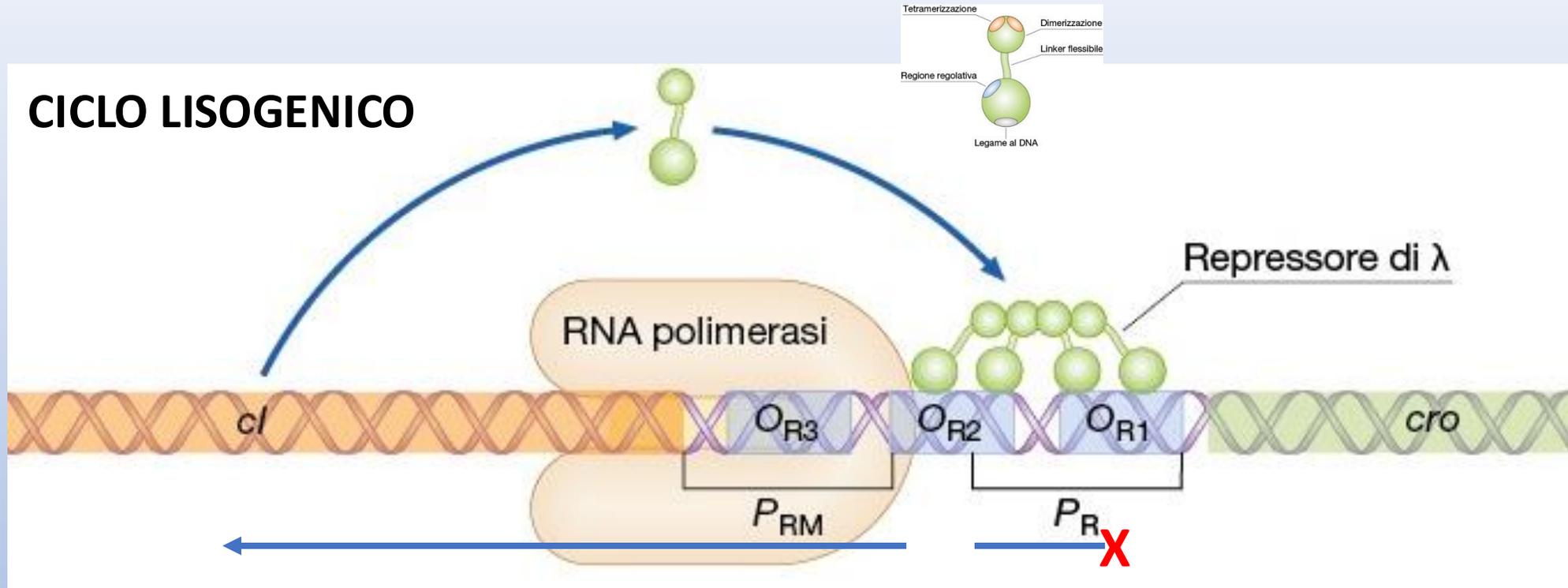
Repressore  $\lambda$  ha  
bassa affinità

Autoregolazione positiva



Il legame cooperativo provoca che il repressore occupi tutti e due operatori  $O_{R1}$  e  $O_{R2}$  a concentrazioni relativamente basse

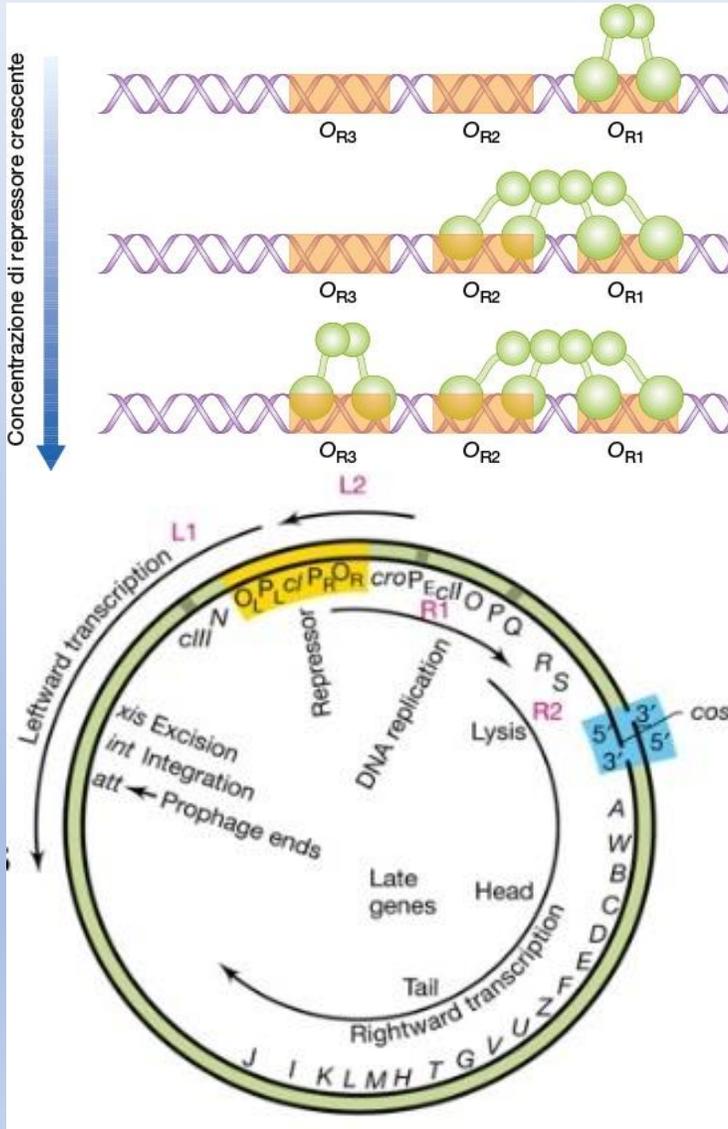
# Trascrizione di *cI* dalla regione di controllo:



A livelli più alti di repressore  $C_I$  interviene *l'autoregolazione negativa*

- Quando il repressore  $\lambda$  occupa  $O_{R1}$  e  $O_{R2}$  blocca la trascrizione dal promotore  $P_R$  e in conseguenza la sintesi di Cro e la espressione dei geni *a valle*
- Il repressore  $C_I$  si lega al operatore di più bassa affinità  $O_{R3}$  impedendo alla RNA pol di trascrivere dal promotore  $P_{RM}$  e impedendo così la sintesi d'altro repressore  $\lambda$

# Legame cooperativo del Repressore $\lambda$

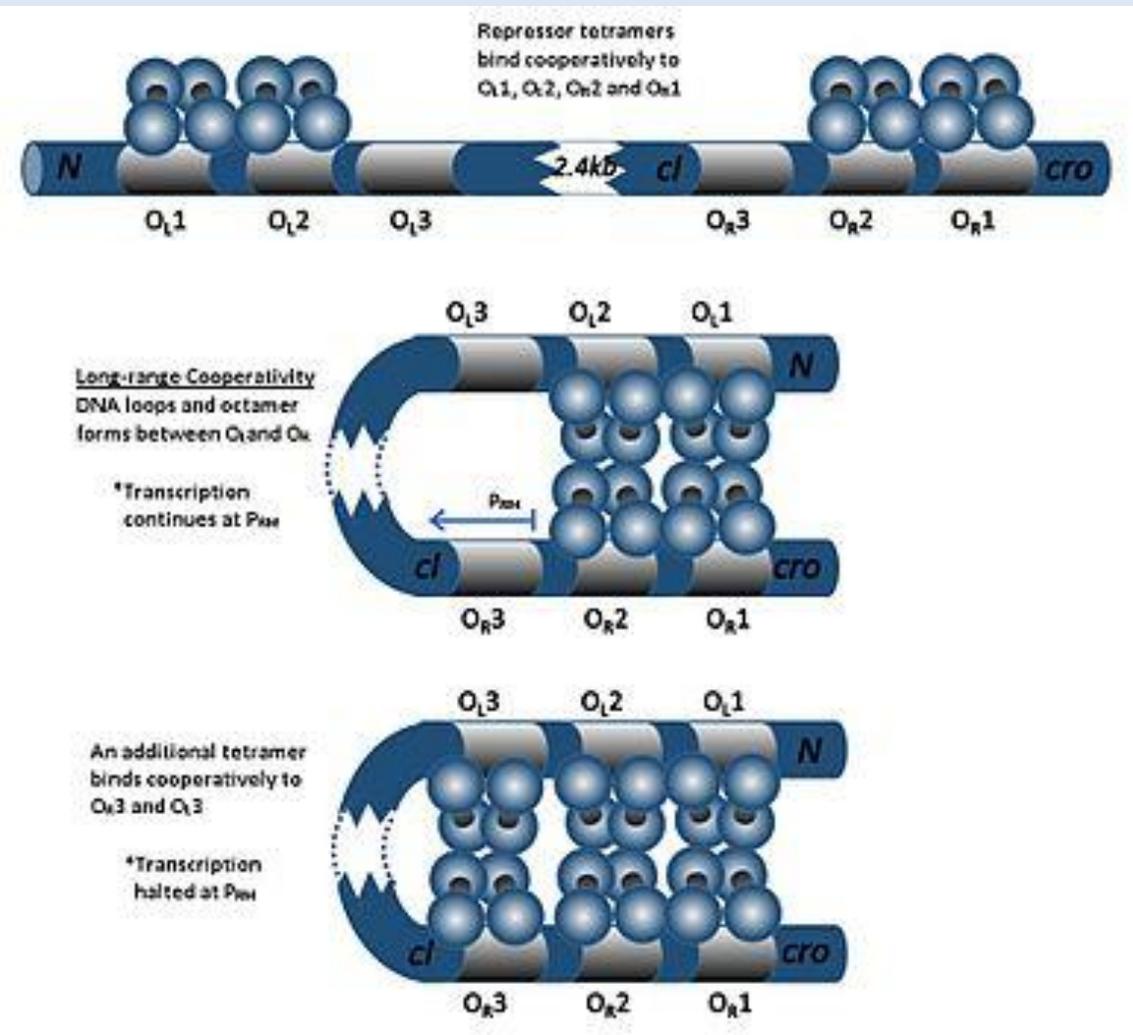


Il legame del repressore  $\text{Cl}$  con  $O_{R1}$  e  $O_{R2}$  è di tipo cooperativo, mentre il legame con  $O_{R3}$  richiede una concentrazione proteica molto maggiore.

A valle del gene  $cl$  (sulla sinistra, nel senso della trascrizione) esistono altri 3 regioni operatori:  $O_{L1}$ ,  $O_{L2}$  e  $O_{L3}$  che sono uguali ma invertite a  $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$  e  $O_{R3}$  e permettono il legame del repressore con la stessa modalità (dimero e cooperativo)



# Legame cooperativo del Repressore $\lambda$



I **dimeri** che interagiscono con  $O_{R1}$  e  $O_{R2}$  interagiscono con i **dimeri** che hanno legato  $O_{L1}$  e  $O_{L2}$  formando degli **ottameri che stabilizzano l'ansa** formata conseguenza della interazione.

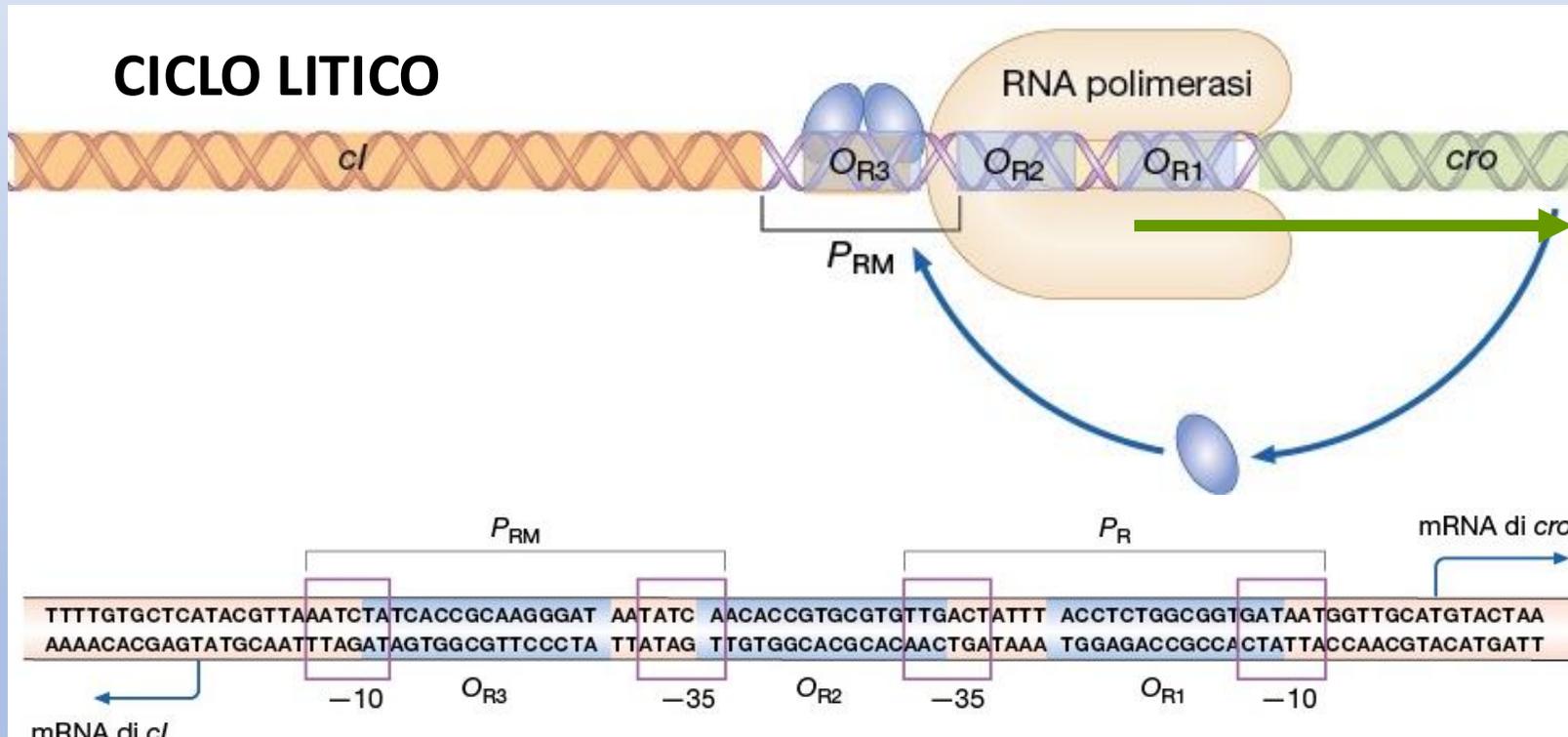
Questa conformazione porta ad una **vicinanza tra i siti deboli  $O_{R3}$  e  $O_{L3}$**  che possono **legare in modo cooperativo altri 2 dimeri** del repressore. Questa conformazione provoca che si **blocchi la sintesi di CI ad una concentrazione ancora più bassa** (di circa tre volte l'autoregolazione negativa) grazie al legame cooperativo. Importante per l'induzione del ciclo litico in un batterio lisogenico per lambda

# Trascrizione di *cro* dalla regione di controllo: autoregolazione negativa

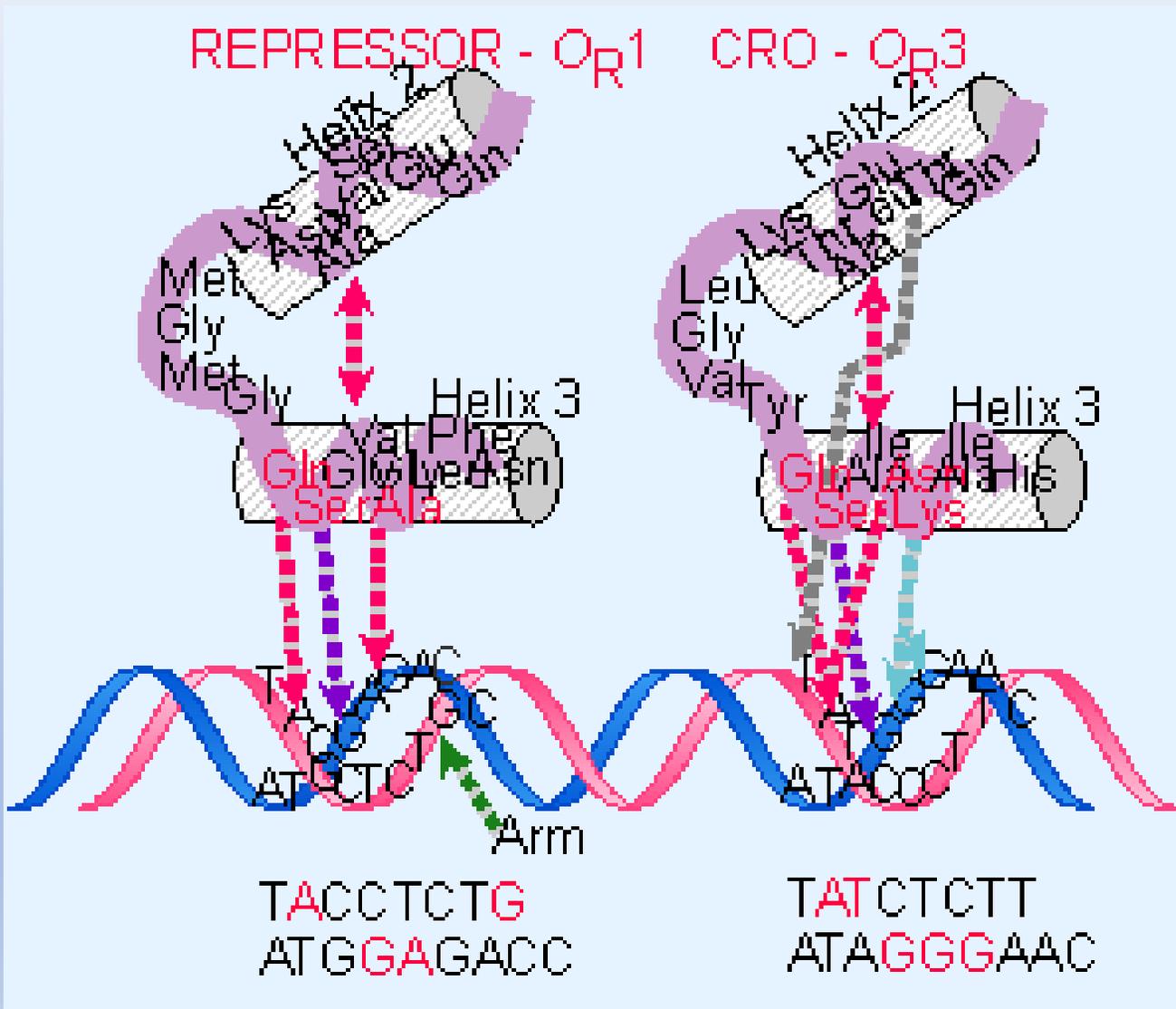
Aumentando la concentrazione di Cro questa potrà legarsi indistintamente a  $O_{R2}$  u  $O_{R1}$ .

Il legame con  $O_{R1}$  blocca la trascrizione dal  $P_R$  e in conseguenza impedisce la nuova sintesi di Cro.

Quando i livelli di Cro si abbassano lasciano libero e accessibile il  $O_{R1}$  per il legame del repressore  $\lambda$



# Basi strutturali della differente affinità



I repressori CI e Cro hanno una affinità opposta per le regioni  $O_R$

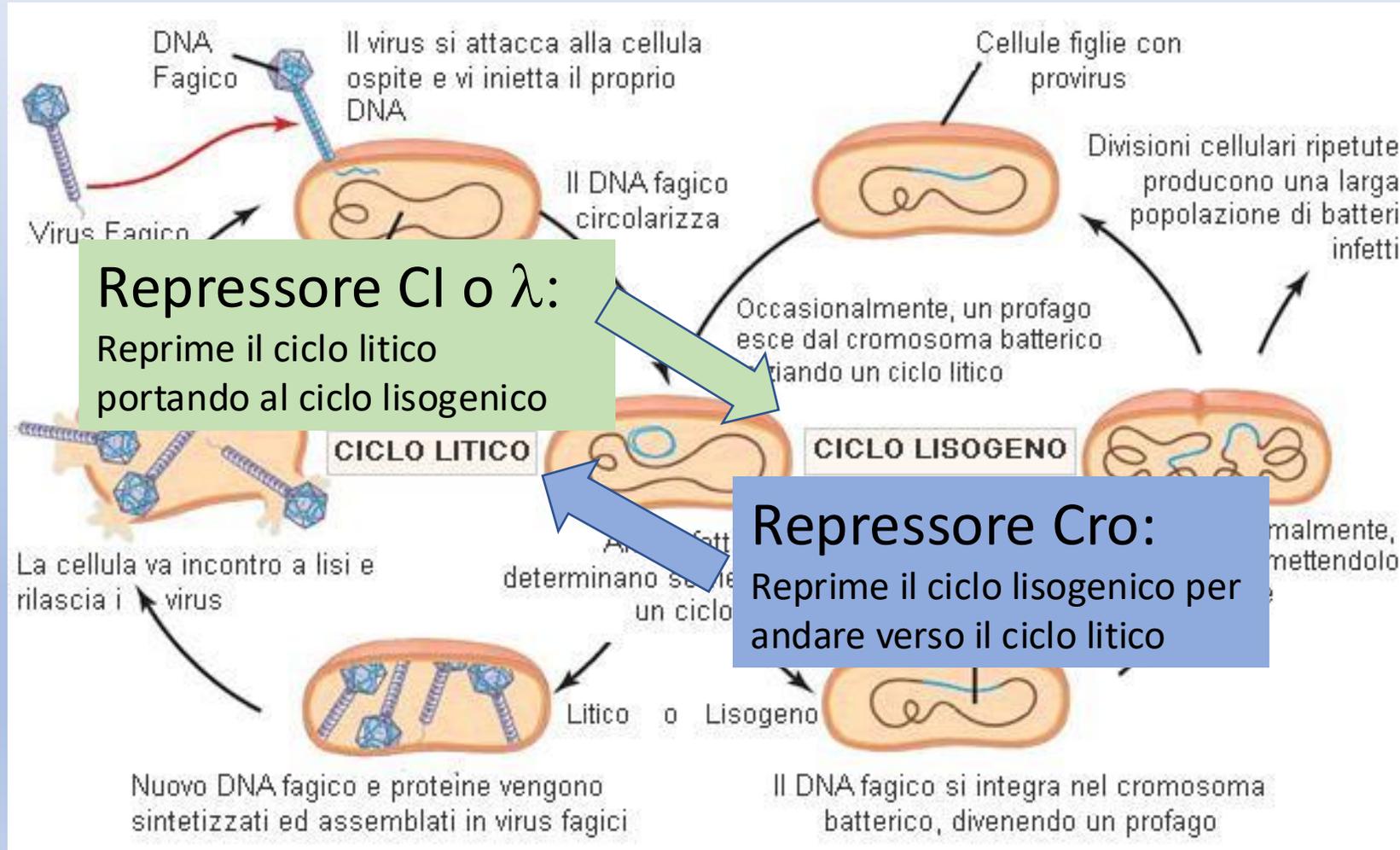
Gli  $O_R$  mostrano delle sequenze molto conservate.

Le loro sequenze iniziano per **A-T** in posizione 2 e **C-G** in posizione 4. Saranno queste sequenze le responsabili di legare tutte e due proteine a tutti e 3 operatori.

Esistono però delle differenze all'interno della  $\alpha$ -elica R e sequenza di riconoscimento che possono aumentare la specificità e forza di interazione.

# Ciclo vitale fago Lambda $\lambda$

La scelta di seguire un **ciclo litico** o un **ciclo lisogenico** viene inizialmente regolata da **ci** e **Cro**





# Promotore $P_{RE}$

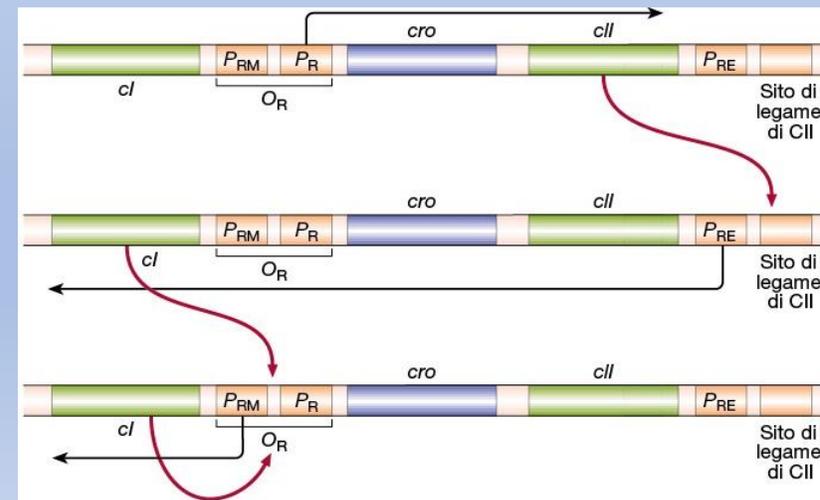
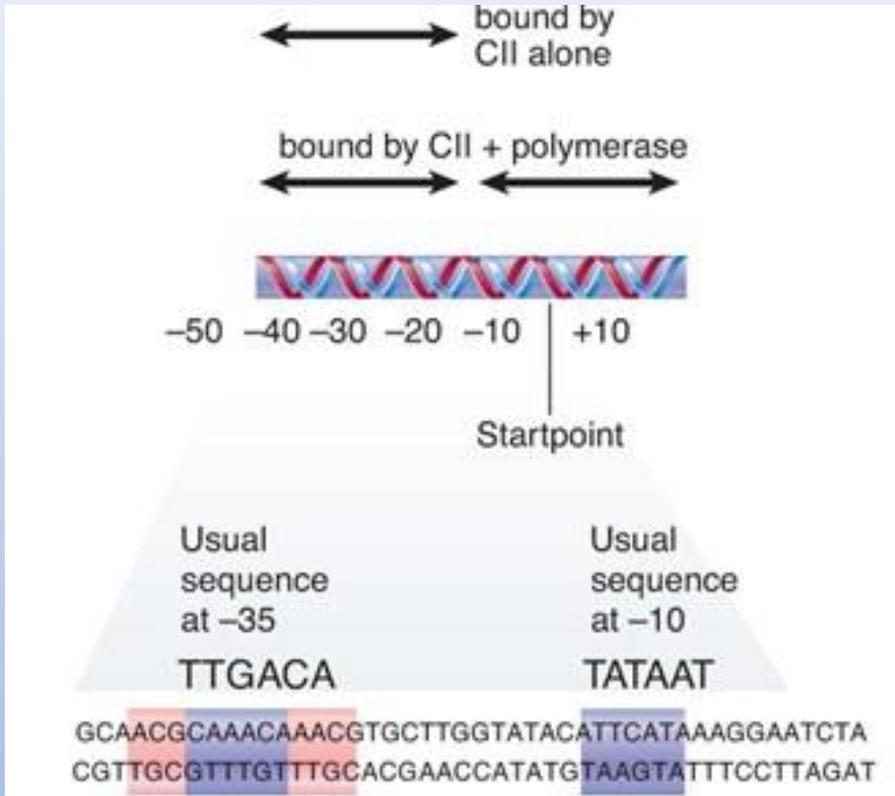
Ha una sequenza **-10 molto diversa** della sequenza canonica

La sequenza **-35 manca** (non identificata)

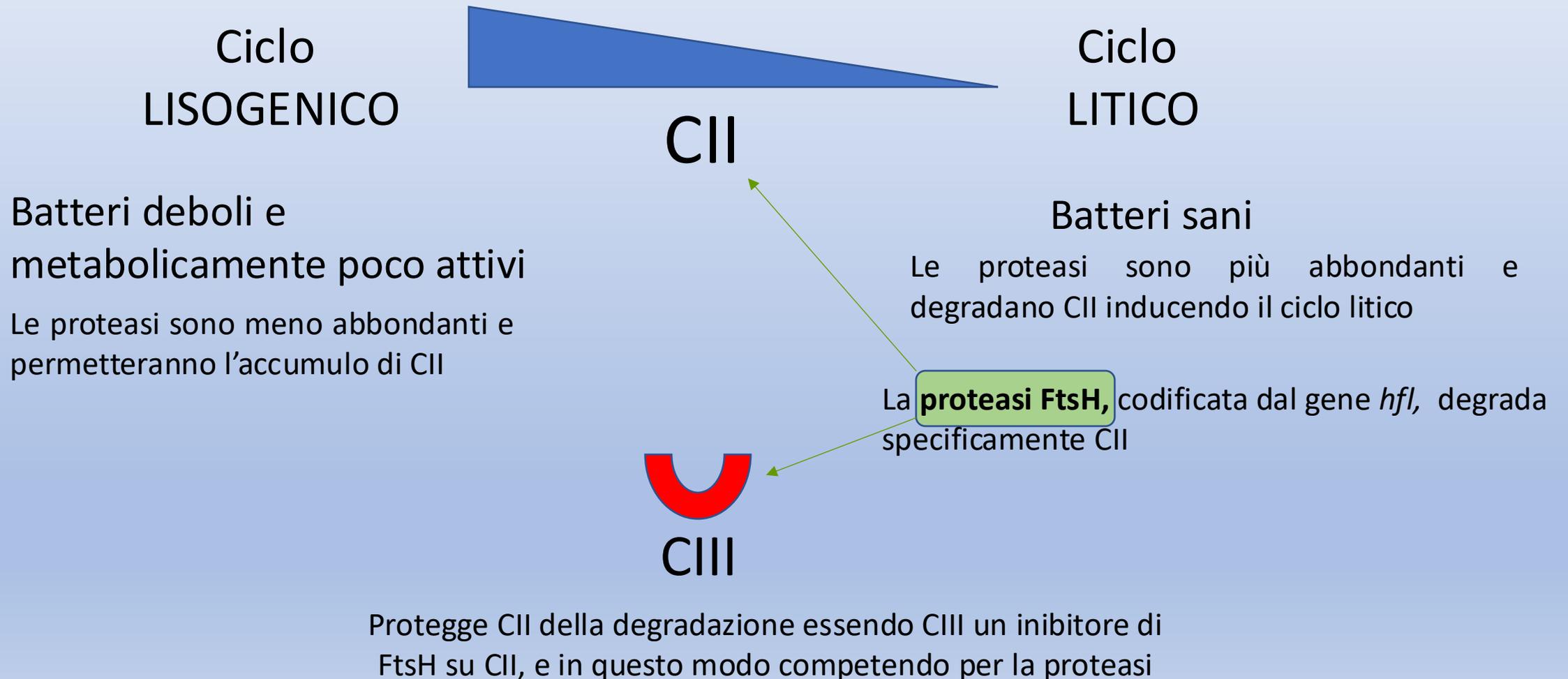
Questa struttura non ottimale del promotore richiede la presenza di CII come trans-attivatore positivo.

➤ L'efficienza di **trascrizione di CI** da  $P_{RE}$  è molto più alta della efficienza ottenuta da  $P_{RM}$ , evidenziando la necessità primaria di sintetizzare molecole di repressore CI per competere con la proteina Cro per i siti di controllo.

• Esiste la necessità di esprimere con moderazione il repressore da  $P_{RM}$  in modo da permettere una eventuale ripresa del ciclo litico se necessario

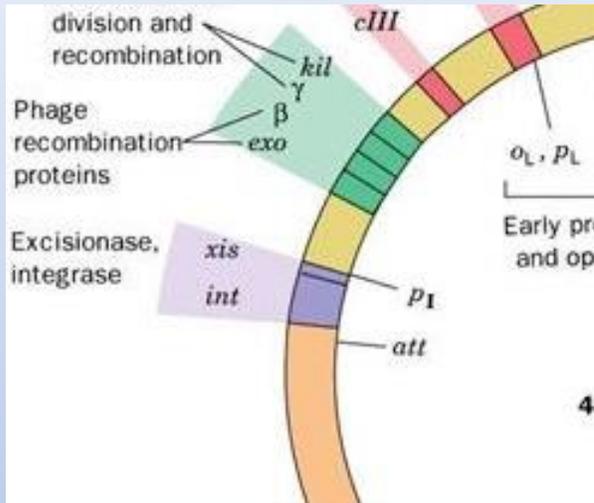


# Regolazione ciclo litico-Lisogenico : CII





# Controllo dell'integrazione e dell'escissione del fago



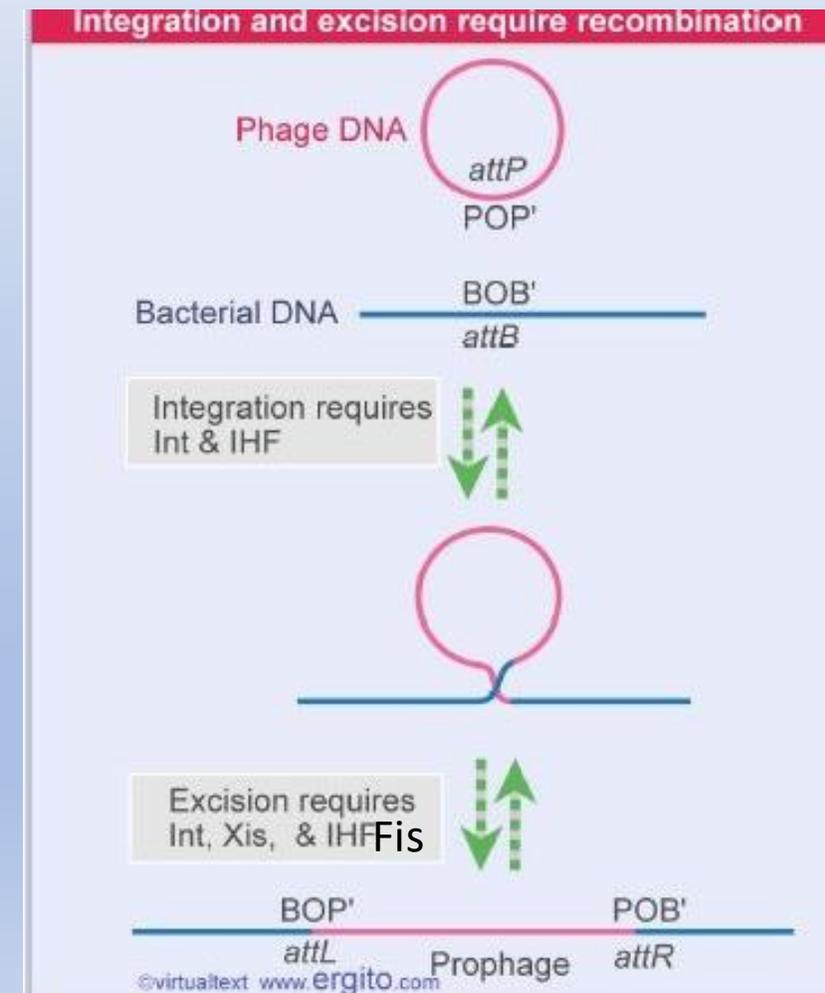
L'integrazione ed escissione del fago nel cromosoma batterico è regolato da:

- proteina Integrasi (codificata da *int*)
- proteina escissionasi (codificata da *xis*)

La **integrasi** è la ricombinasi implicata nel processo d'integrazione del DNA del batteriofago (sono coinvolte altre proteine batteriche e fagiche)

I siti di ricombinazione sono chiamati **siti att**: **attP** si trova sul DNA del fago; **attB** sul genoma batterico (di 15 nt)

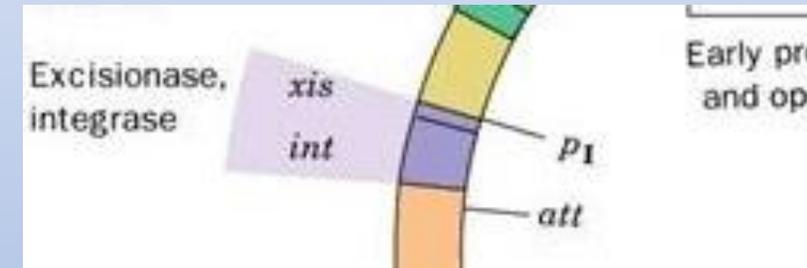
Dopo l'integrazione si formano altri 2 siti che fiancheggiano il DNA del profago chiamati **attL** e **attR**



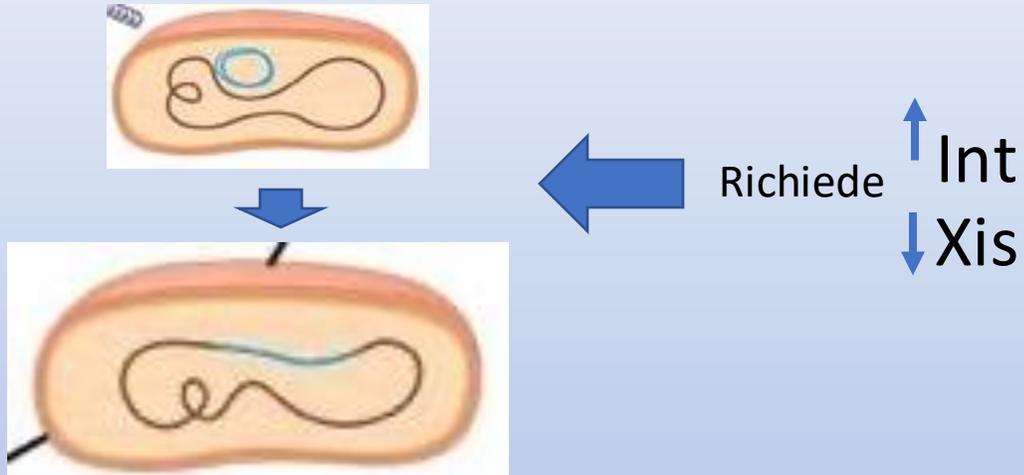
# Controllo dell'integrazione e dell'escissione del fago

La espressione di queste geni devono essere regolati :

1. Andando **verso il ciclo lisogenico**
2. Andando **verso il ciclo litico**
3. **Dopo irradiazione** con raggi UV durante il **ciclo lisogenico**

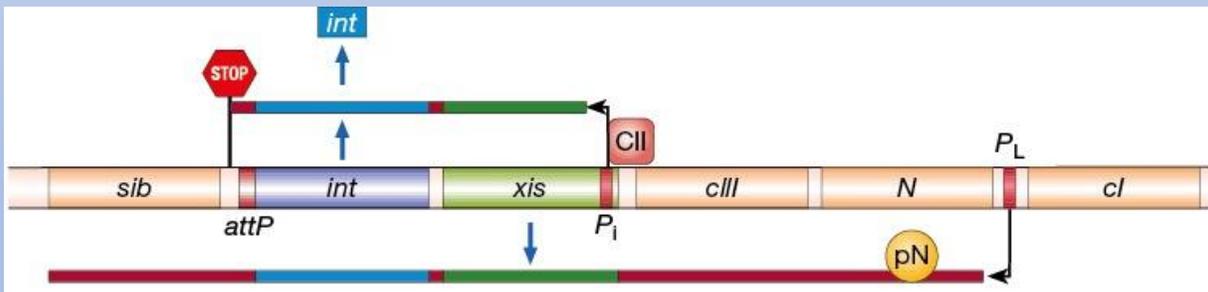


# Controllo dell'integrazione e dell'escissione del fago: verso ciclo lisogenico



Il  $P_i$  viene attivato da CII inducendo la trascrizione di una parte di *xis* e della intera sequenza di *int* che si ferma in un sito di terminazione *a valle* di *int*. Il risultato è **alta produzione di Int che permette l'integrazione**

Dal promotore  $P_L$  si può indurre l'espressione di Xis e Int, ma il  $P_i$  ha una **maggiore efficienza** che porta a **livelli molto più alti di Int favorendo l'integrazione**



# Controllo dell'integrazione e dell'escissione del fago: ciclo litico



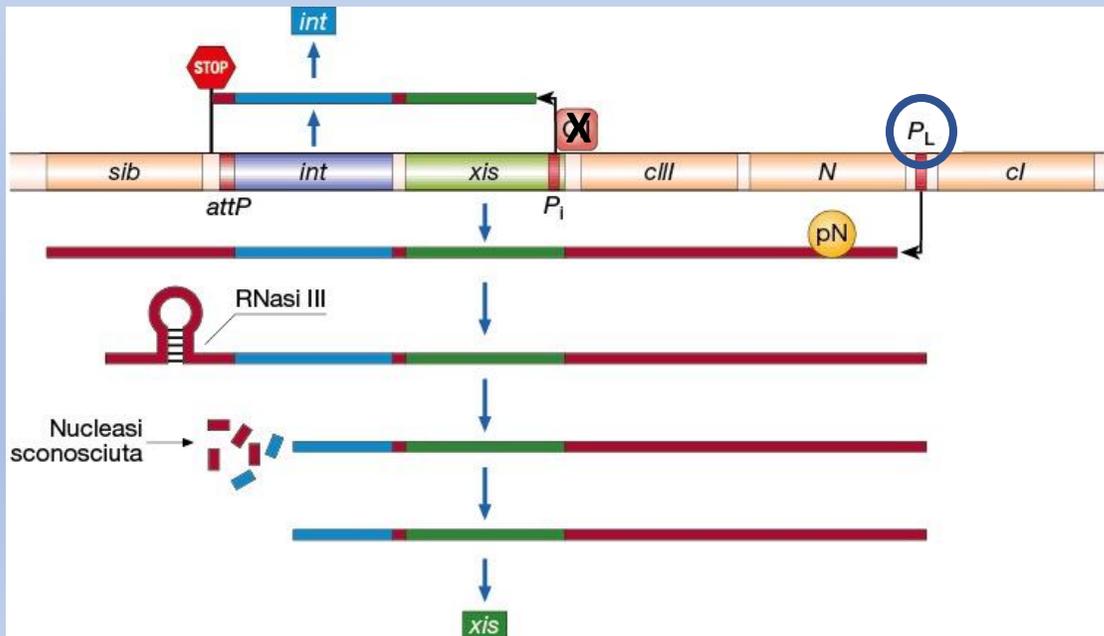
Richiede ↓ Int  
↑ Xis

Presuppone che **CII non è molto attivo** rimanendo il **P<sub>L</sub>** principale promotore attivo.

Il trascritto induce la sintesi di **N** che agendo come anti-terminatore permette la trascrizione di *xis* e *int*, e anche la regione *sib*. Nel **mRNA di *sib*** si forma una **forcina** che va incontro ad una **degradazione sequenziale** da parte della Rnasi III.

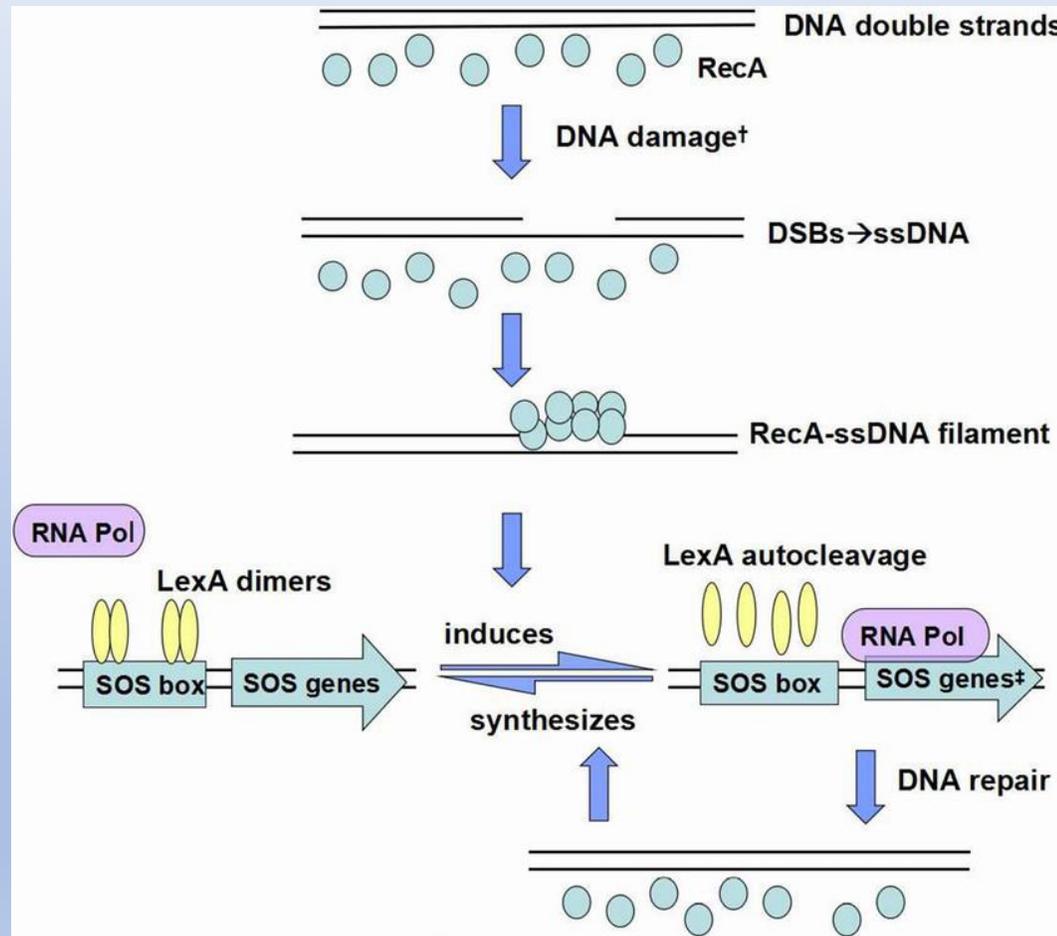
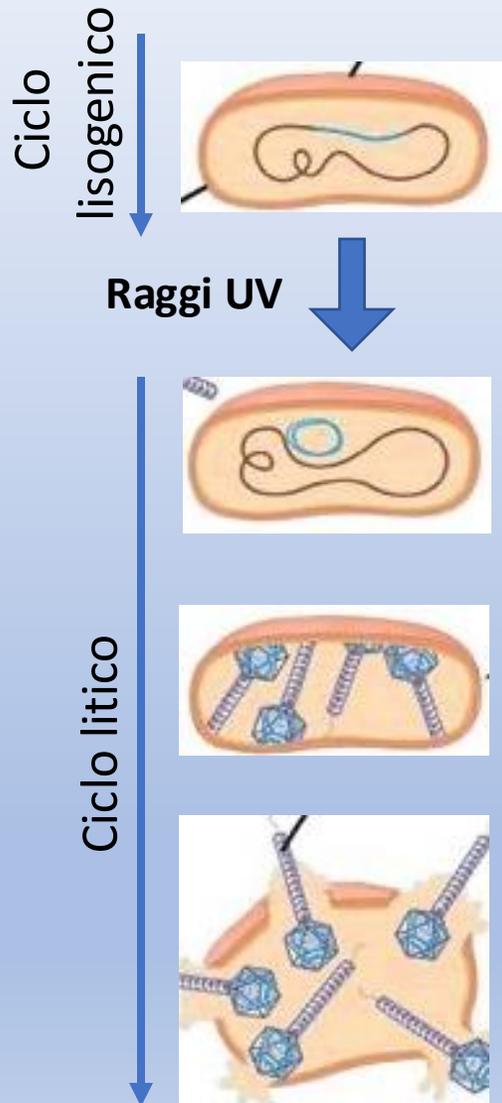
La degradazione comincia nella regione più vicina ad *int* essendo per questo **degradata prima di *xis***. Come risultato c'è più *xis* che *int*, favorendo la escissione.

Questo fenomeno si chiama **RETROREGOLAZIONE** ed è un **controllo post-trascrizionale**



# Induzione del ciclo litico dopo raggi UV

## Risposta al danno *SOS* (*Post-replication Repair PRR*)



Dopo irradiazione il DNA soffre dei danni che lasciano regioni di ssDNA e aumentano la concentrazione della proteina RecA

La **proteina batterica RecA** ha una alta affinità per il DNA a singolo filamento, **ricoprendo le estremità 3'** e determinando la sua attivazione (di RecA).

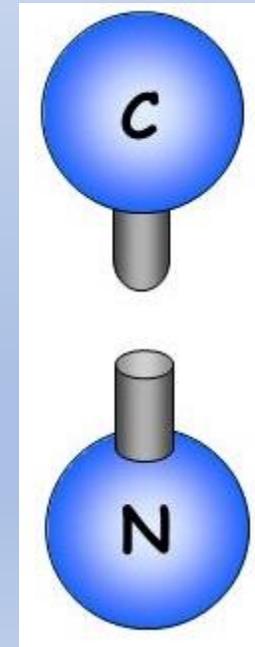
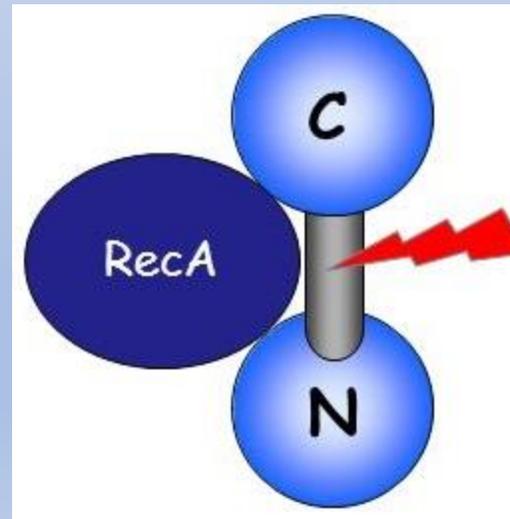
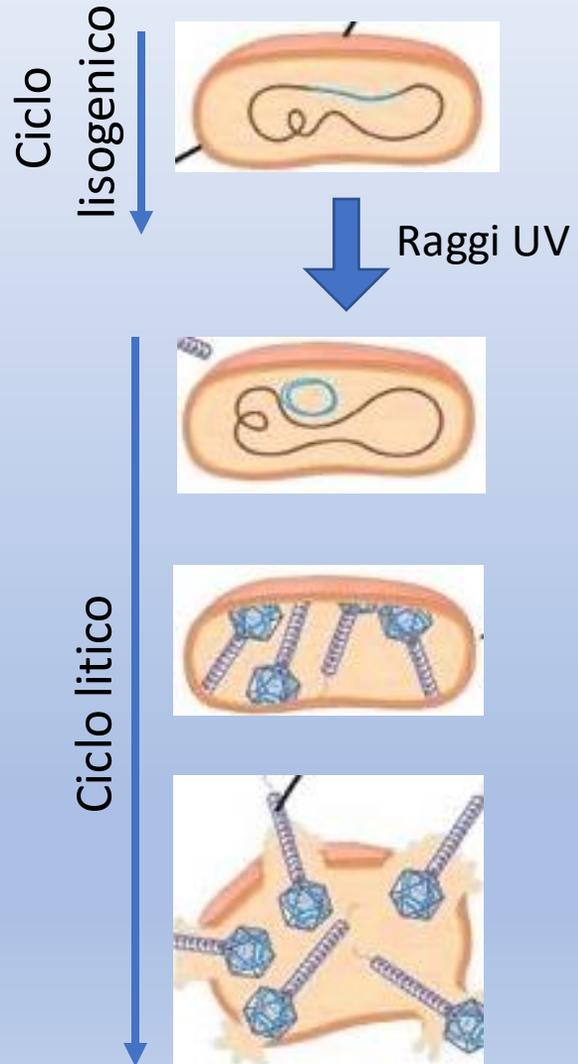
In su forma attiva RecA **si lega alla proteina LexA**, la quale normalmente agisce come repressore sul operatore dei geni SOS nella regione «SOS box».

**Il legame RecA-LexA induce l'attivazione di LexA** che si **auto-degrada** mediante la sua attività proteolitica. In questo modo si **libera la SOS box** e si **trascrivono i geni SOS** che servono a **riparare il DNA**

# Induzione del ciclo litico dal lisogenico

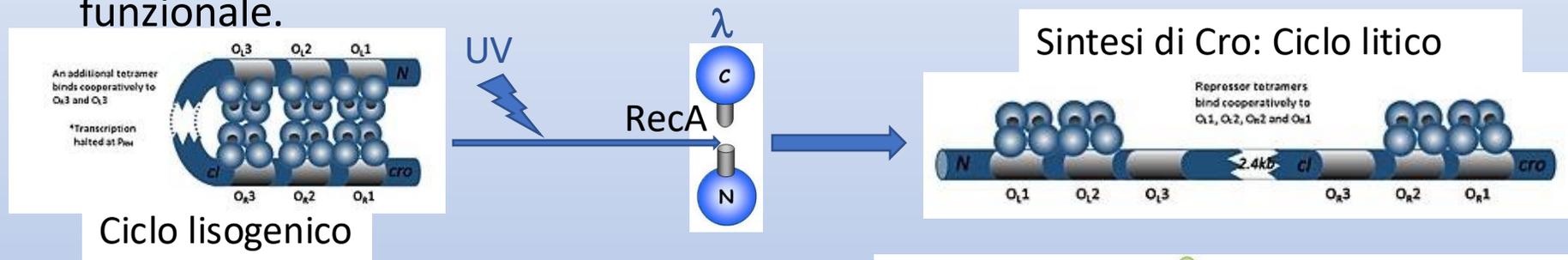
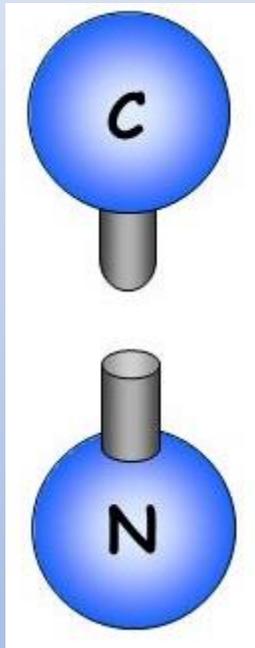
Risposta al danno **SOS** (*Post-replication Repair PRR*)  
e inizio ciclo litico

Il **repressore di lambda** ( codificato da *cI*) si è evoluto per **assomigliarsi a LexA** diventando un **bersaglio di RecA**, che induce l'attività endoproteolitica dell'estremità C-terminale del repressore inducendo il **taglio** il repressore nella regione **linker**

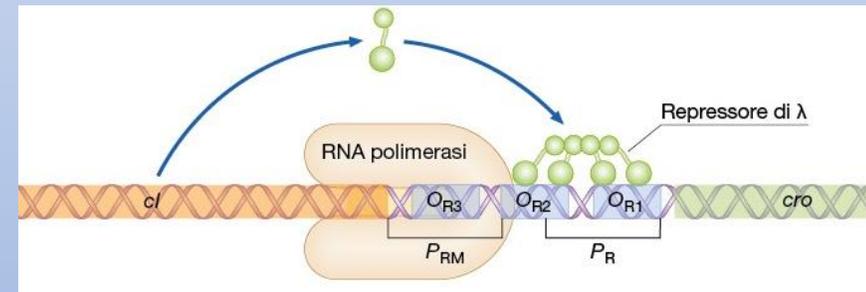


# Induzione del ciclo litico dal lisogenico

La **separazione dei domini N- e C-terminali abolisce la dimerizzazione e il legame cooperativo**. I soli domini N-terminali non sono capaci di legarsi agli operatori in modo efficace e nel giro di poco tempo non sarà più presente repressore funzionale.



Come conseguenza **libera il  $P_R$**  e si può riprendere la **sintesi di Cro** che a sua volta inibisce la sintesi del repressore (CI)



Il legame cooperativo e la bassa concentrazione di repressore permettono una **rapida transizione dal ciclo lisogenico al ciclo litico** permettendo al fago l'uscita veloce da un batterio danneggiato.

# Controllo dell'integrazione e dell'escissione del fago: dopo raggi UV

- Va indotta la fase litica, e **richiede molto Xis e Int**.
- **CII** è **poco presente** ed è il  $P_L$  che trascrive *int* e *xis*, ma la *sib* è stata rimossa e spostata durante l'integrazione e per questo non sarà trascritta.
- In questo modo il trascritto di Xis e Int è stabile e produce alti livelli di tutti e due proteine, potendo lasciare la molecola fagica la cellula danneggiata.

L'effetto di Xis prevale su Int a concentrazioni paragonabili

