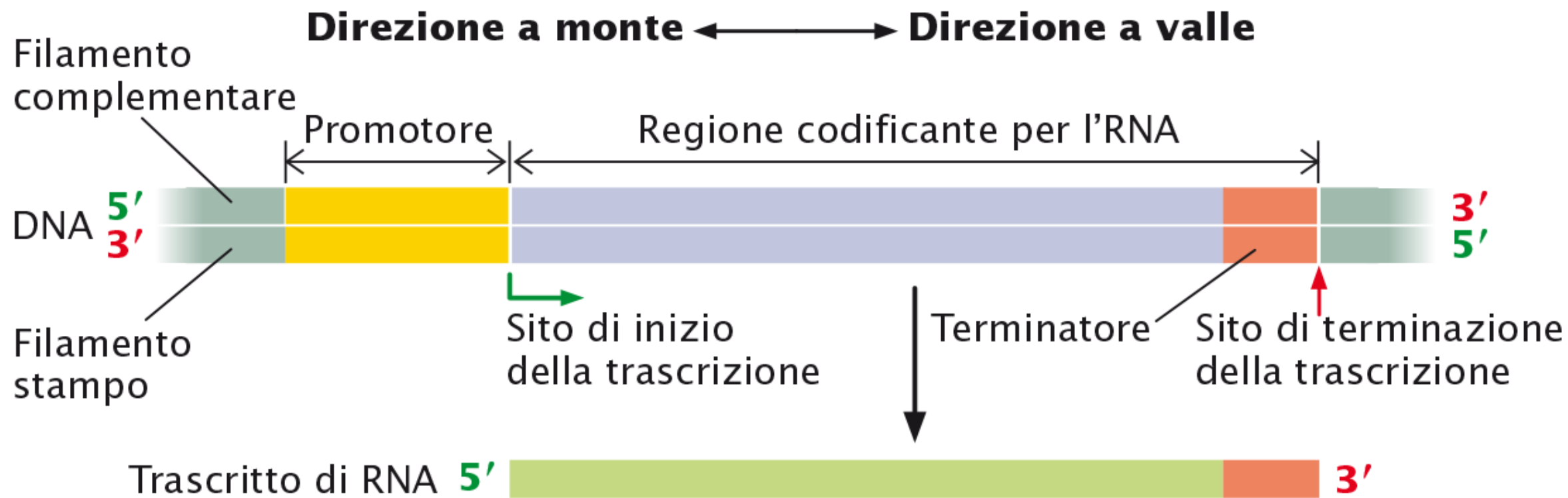


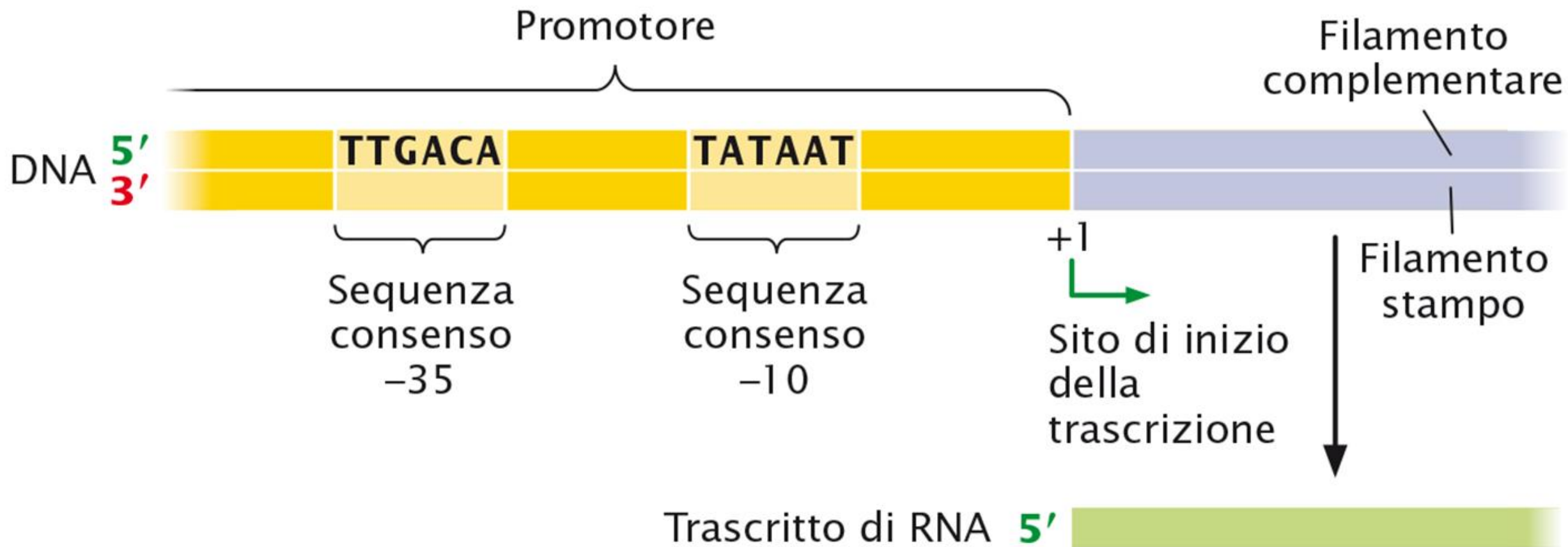
Il processo di regolazione dell'espressione genica è critico per tutti gli organismi.

Le abitudini alimentari di ciascun individuo determinano completamente i nutrienti a disposizione di E. coli: esso non può in alcun modo trovare delle risorse alimentari quando il cibo è scarso, né spostarsi quando viene a trovarsi in un ambiente sfavorevole. E. coli affronta la sua incapacità di modificare l'ambiente esterno diventando flessibile al proprio interno. Per esempio, in presenza di glucosio E. coli lo usa per produrre ATP; in mancanza di glucosio utilizza il lattosio, l'arabinosio, il maltosio, lo xilosio, o qualunque altro zucchero. Quando gli amminoacidi sono disponibili, l'E. coli li utilizza per sintetizzare le proteine; se uno specifico amminoacido è assente, l'E. coli produce gli enzimi necessari per sintetizzare quell'amminoacido. In tal modo l'E. coli risponde ai cambiamenti ambientali modificando rapidamente la propria biochimica. Tuttavia tale flessibilità biochimica presenta un conto salato. Produrre tutti gli enzimi necessari per ogni condizione ambientale sarebbe oneroso dal punto di vista energetico. E dunque, come fa l'E. coli a mantenere la sua flessibilità biochimica e a ottimizzare, al tempo stesso, l'efficienza energetica? La risposta è: attraverso la regolazione genica. Quando l'ambiente si modifica vengono espressi nuovi geni e vengono sintetizzate le proteine adatte al nuovo ambiente. Per esempio, se nell'ambiente compare una fonte di carbonio, i geni che codificano per gli enzimi che assorbono e metabolizzano tale fonte di carbonio vengono rapidamente trascritti e tradotti. Quando tale fonte di carbonio scompare, i geni che codificano per questi enzimi vengono spenti.

Il processo di regolazione dell'espressione genica è critico per tutti gli organismi.

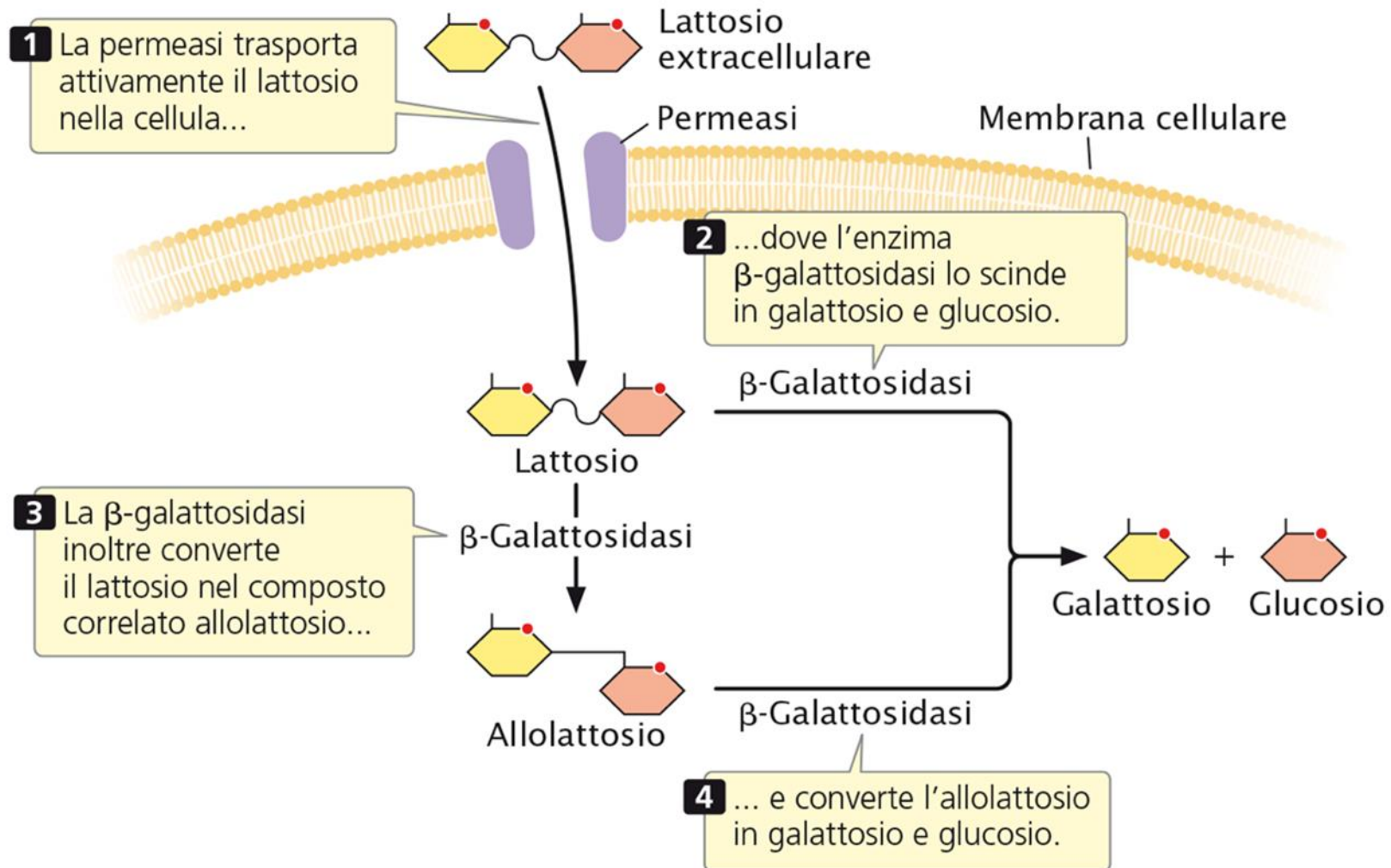
Gli organismi multicellulari eucarioti affrontano un dilemma differente. Le singole cellule di un organismo pluricellulare sono specializzate per svolgere compiti specifici. Per esempio, le proteine prodotte da una cellula nervosa sono decisamente diverse da quelle prodotte dai globuli bianchi. Benché diverse per forma e per funzioni, una cellula nervosa e una cellula del sangue contengono però le medesime istruzioni genetiche. Per un organismo multicellulare, la difficoltà consiste nel determinare la specializzazione di cellule dotate di un comune patrimonio di informazioni genetiche (il processo di sviluppo). La soluzione sta nella regolazione genica: tutte le cellule di un organismo portano la stessa informazione genetica, ma in ogni tipo di cellula viene espresso solo un sottoinsieme dei geni. I geni necessari per altri tipi di cellule non vengono espressi. Per questi motivi la regolazione genica è la chiave che spiega sia la flessibilità unicellulare sia la specializzazione multicellulare, e questo meccanismo è cruciale per il successo di tutti gli organismi viventi.

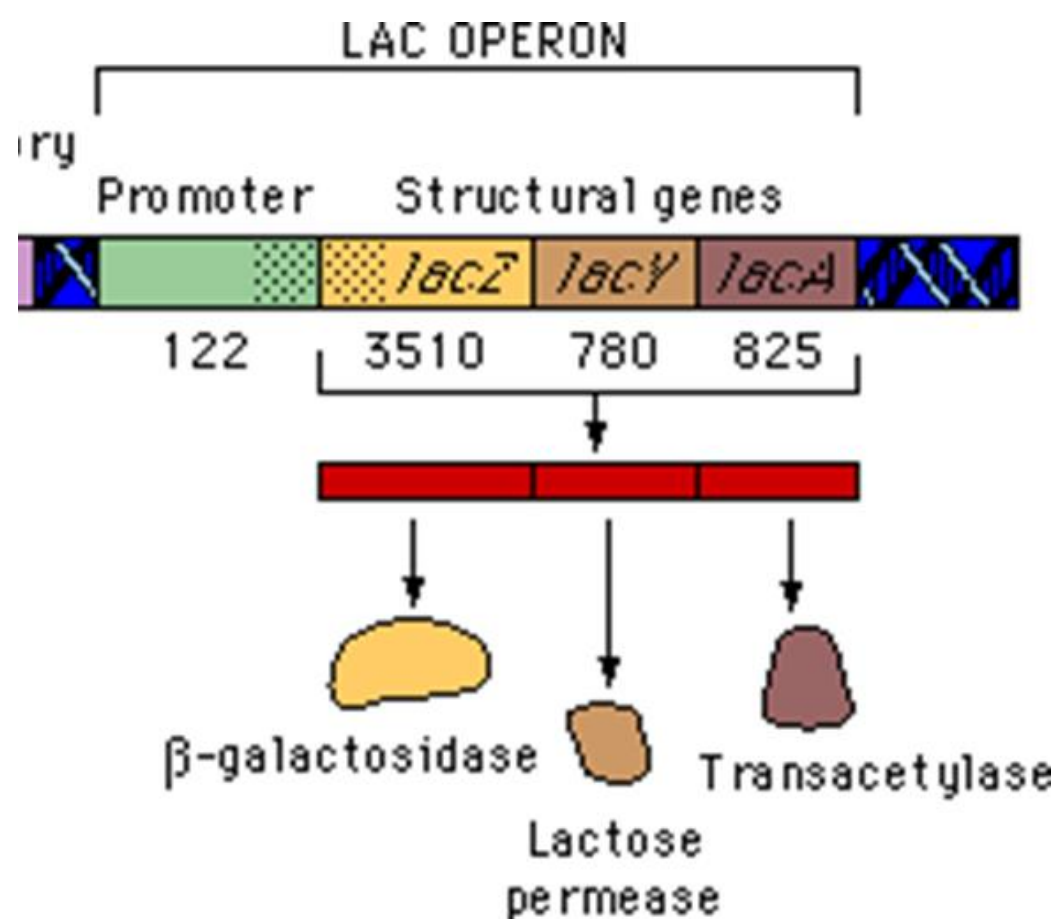




L'operone lac dell'E. coli

Nel 1961 François Jacob e Jacques Monod hanno descritto il «modello dell'operone» per il controllo genetico del metabolismo del lattosio nell'E. coli.





Breakdown of
lactose to glucose
and galactose

Transport
of lactose
into cell

Function
not yet
known

Le mutazioni di lac

Jacob e Monod hanno studiato la struttura e la funzione dell'operone lac analizzando le mutazioni che influenzavano il metabolismo del lattosio. Per capire che ruoli svolgessero le diverse componenti dell'operone hanno utilizzato ceppi diploidi parziali dell' E. coli. Le cellule di questi ceppi possiedono due diverse molecole di DNA: il cromosoma batterico completo e una porzione extra di DNA. Jacob e Monod hanno creato questi ceppi consentendo che avvenisse la coniugazione fra due batteri. Nella coniugazione il plasmide F utilizzato da Jacob e Monod conteneva l'operone lac e così il batterio ricevente diventava parzialmente diploide essendo in possesso di due copie dell'operone lac.

Le mutazioni nei geni strutturali

Jacob e Monod hanno in primo luogo scoperto dei ceppi mutanti che avevano perso la capacità di sintetizzare la β -galattosidasi o la permeasi. Le mutazioni nei ceppi mutanti mappavano sui geni strutturali lacZ o lacY e alteravano le sequenze delle proteine codificate da questi geni. Tali mutazioni influenzavano la struttura delle proteine ma non la regolazione della loro sintesi. Con l'utilizzo di diploidi parziali Jacob e Monod sono stati in grado di stabilire che le mutazioni a livello dei geni lacZ e lacY erano indipendenti e solitamente influenzavano solo il prodotto del gene in cui si erano verificate. I diploidi parziali con lacZ⁺ lacY⁻ sul cromosoma batterico e lacZ⁻ lacY⁺ posti sul plasmide (lacZ⁺ lacY⁻ / lacZ⁻ lacY⁺), funzionavano normalmente, producendo β -galattosidasi e permeasi in presenza di lattosio.

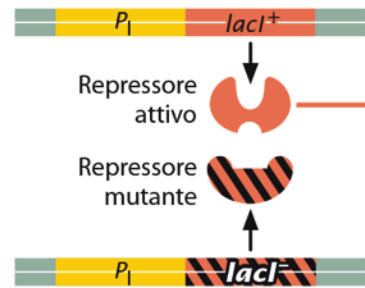
Le mutazioni nel gene regolatore

Jacob e Monod hanno anche isolato le mutazioni che influenzano la regolazione della produzione delle proteine. Le mutazioni nel gene *lacI* influenzano la produzione sia della β -galattosidasi sia della permeasi, poiché i geni di entrambe le proteine si trovano nello stesso operone e vengono regolati insieme.

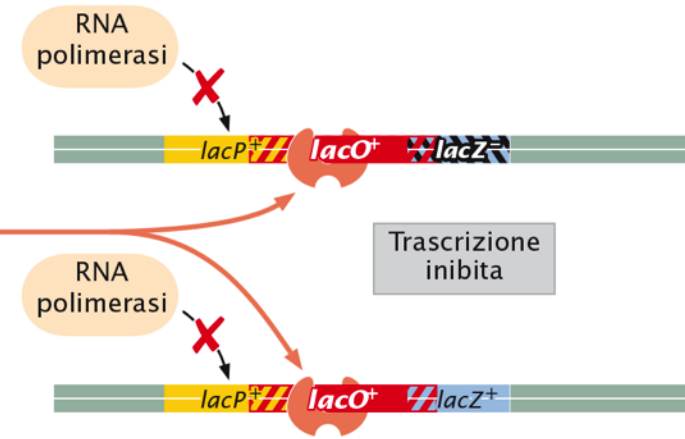
Alcune di queste mutazioni erano costitutive, cioè determinavano la produzione delle proteine in ogni momento, indipendentemente dalla presenza o meno del lattosio. Tali mutazioni nel gene regolatore erano chiamate *lacI⁻*. La costruzione dei diploidi parziali aveva dimostrato che il gene *lacI⁺* è dominante su *lacI⁻*; una singola copia di *lacI⁻* (genotipo *lacI⁺/lacI⁻*) era sufficiente per determinare una regolazione normale.

Inoltre *lacI⁺* riusciva a ristabilire il controllo anche se localizzato su una diversa molecola di DNA, dimostrando che *lacI⁺* è attivo in trans. Con ogni probabilità il prodotto di *lacI* era una proteina in grado di diffondere dal suo luogo di sintesi (cromosoma batterico o F') sino ad arrivare al sito d'azione. Un diploide parziale con il genotipo *lacI⁺ lacZ⁻/lacI⁻ lacZ⁺* funzionava normalmente, sintetizzando la β -galattosidasi solo in presenza di lattosio.

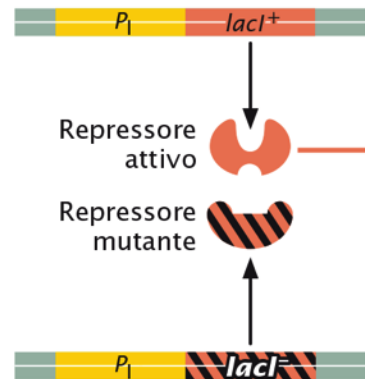
(a) Assenza di lattosio



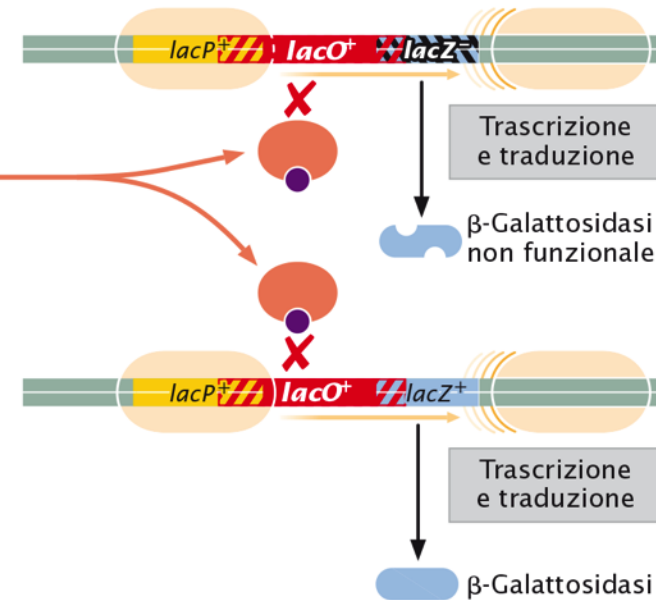
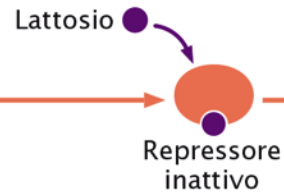
1 Il gene $lacI^+$ è trans dominante: produce un repressore che può legarsi a entrambi gli operatori e reprimere la trascrizione in assenza di lattosio.



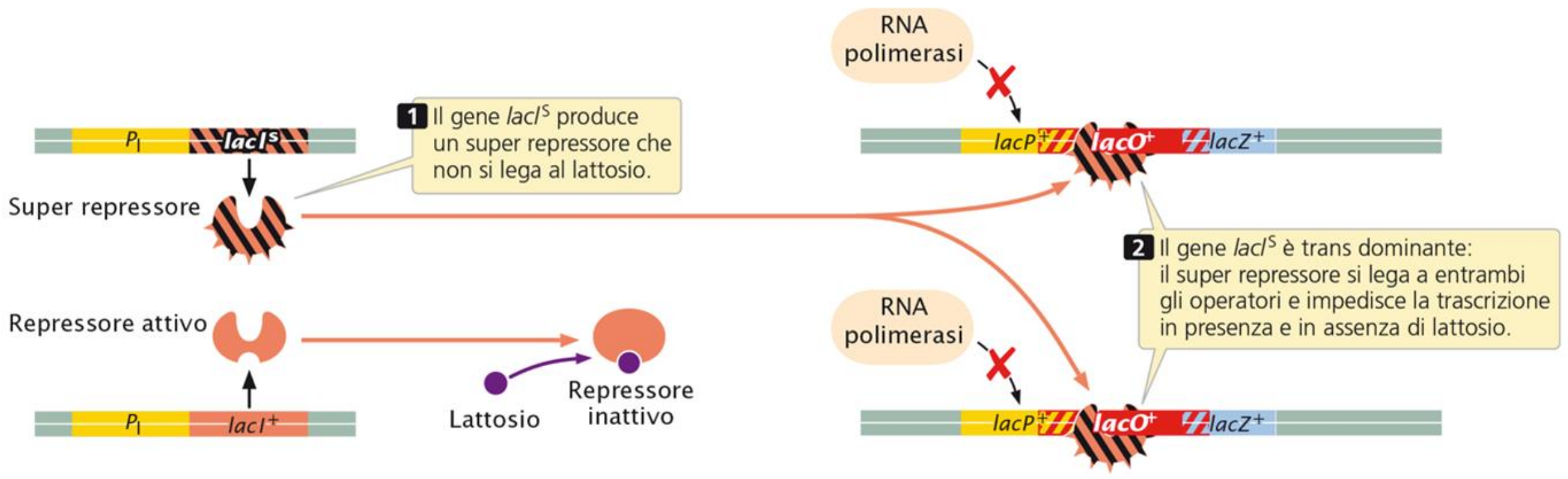
(b) Presenza di lattosio



2 Quando il lattosio è presente, disattiva il repressore e la β -galattosidasi è prodotta dal gene $lacZ^+$.



Altre mutazioni isolate da Jacob e Monod avevano invece impedito il compiersi della trascrizione perfino in presenza del lattosio. Queste mutazioni erano state identificate come super repressori ($lacI^S$), perché producevano dei repressori difettosi che non avrebbero potuto essere disattivati da un induttore. Le mutazioni $lacI^S$ avevano prodotto un repressore con un sito di legame all'induttore alterato che rendevano l'induttore incapace di legarsi al repressore; di conseguenza, il repressore era sempre in grado di agire sulla regolazione dei geni dell'operone lac, ma non era più in grado di rispondere all'induttore. Le mutazioni super repressori erano dominanti su $lacI^+$; i diploidi parziali con genotipo $lacI^S lacZ^+ / lacI^+ lacZ^+$ non erano in grado di sintetizzare la β -galattosidasi o la permeasi, in presenza del lattosio o meno.

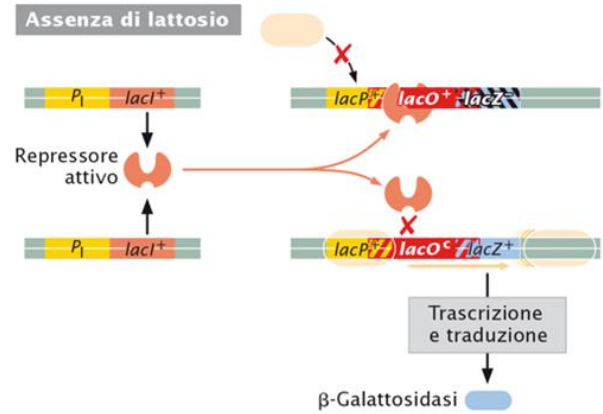


Le mutazioni dell'operatore

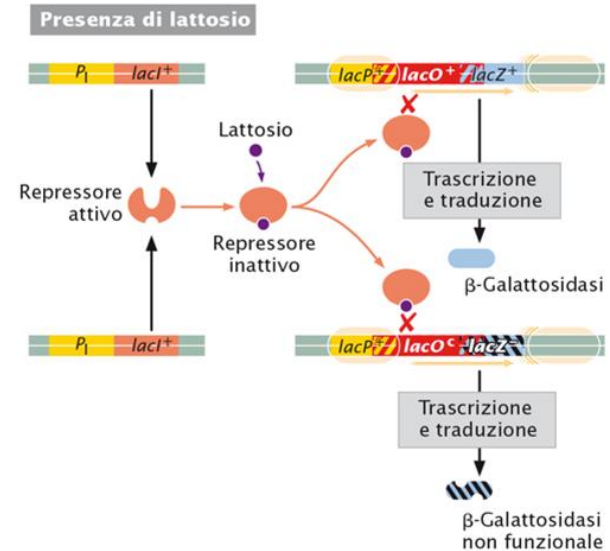
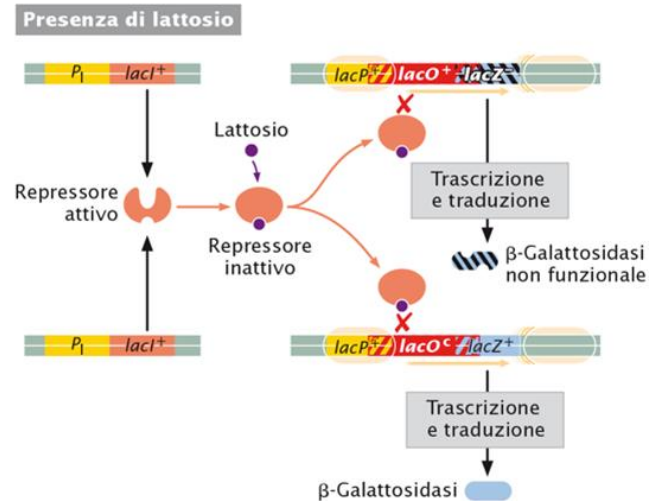
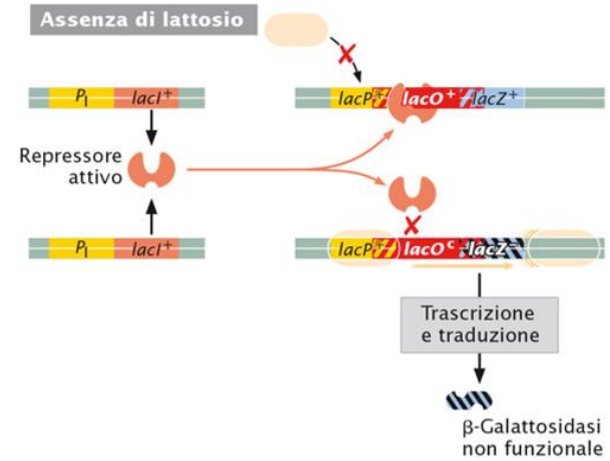
Jacob e Monod avevano mappato un altro tipo di mutanti costitutivi, in un sito adiacente, a monte di lacZ. Queste mutazioni erano state identificate come lacO^c (dove O sta per Operatore e c per costitutivo). Le mutazioni lacO^c avevano alterato la sequenza del DNA a livello di una sequenza posta tra il promotore e il gene lacZ, chiamata «operatore» in modo tale che la proteina repressore non era più in grado di legarsi. Un diploide parziale con il genotipo lacI⁺ lacO^c lacZ⁺ / lacI⁺ lacO⁺ lacZ⁺ aveva mostrato sintesi costitutiva di β-galattosidasi indicando quindi che lacO^c era dominante su lacO⁺. L'analisi di altri diploidi parziali che il gene lacO^c era attivo in cis. Per esempio, un diploide parziale con genotipo lacI⁺ lacO⁺ lacZ⁻ / lacI⁺ lacO^c lacZ⁺ era costitutivo e produceva β-galattosidasi, sia in presenza sia in assenza di lattosio, ma un diploide parziale con lacI⁺ lacO⁺ lacZ⁺ / lacI⁺ lacO^c lacZ⁻ produceva β-galattosidasi solo in presenza di lattosio. Nel diploide parziale costitutivo (lacI⁺ lacO⁺ lacZ⁻ / lacI⁺ lacO^c lacZ⁻) la mutazione lacO^c e il gene funzionale lacZ⁺ sono portati sulla stessa molecola, ma in lacI⁺ lacO⁺ lacZ⁺ / lacI⁺ lacO^c lacZ⁻ la mutazione lacO^c e il gene funzionale lacZ⁺ si trovano su molecole differenti. Perciò la mutazione lacO influenza solo i geni ai quali è fisicamente connessa.

Queste mutazioni impediscono il legame di una proteina repressore all'operatore e in questo modo consentono all'RNA polimerasi di trascrivere i geni sulla stessa molecola di DNA. Tuttavia queste mutazioni non possono impedire a un repressore di legarsi a operatori normali su altre molecole di DNA.

(a) Diploide parziale $lacI^+ lacO^+ lacZ^- / lacI^+ lacO^c lacZ^+$



(b) Diploide parziale $lacI^+ lacO^+ lacZ^+ / lacI^+ lacO^c lacZ^-$



Le mutazioni del promotore

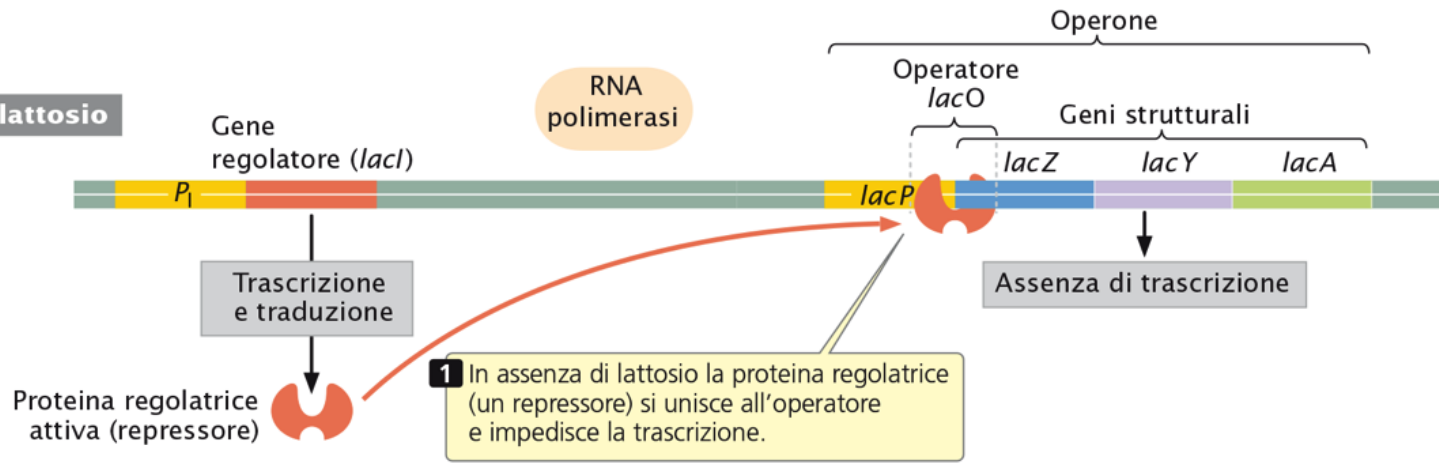
Altre mutazioni che influenzano il metabolismo del lattosio sono state isolate a livello del sito promotore; tali mutazioni vengono indicate come $lacP^-$ e interferiscono con il legame dell'RNA polimerasi al promotore. Dal momento che tale legame risulta essenziale per la trascrizione dei geni strutturali, i ceppi di E. coli con le mutazioni $lacP^-$ non producono le proteine lac né in presenza né in assenza di lattosio. Come le mutazioni dell'operatore anche le mutazioni $lacP^-$ sono attive in cis e influenzano solo i geni posti sulla stessa molecola di DNA. Il diploide parziale $lacI^+ lacP^+ lacZ^+ / lacI^+ lacP^- lacZ^+$ mostra una sintesi normale della β -galattosidasi, mentre $lacI^+ lacP^- lacZ^+ / lacI^+ lacP^+ lacZ^-$ non è in grado di produrre la β -galattosidasi, in presenza o meno di lattosio.

TABELLA 16.2 Caratteristiche delle mutazioni dell'operone *lac*

Tipo	Localizzazione	Cis/Trans	Effetto
Mutazioni del gene strutturale	<i>lacZ</i> , <i>lacY</i>	Influenzano solo <i>lacZ</i> o <i>lacY</i>	Alterano la sequenza amminoacidica della proteina codificata dal gene in cui si verifica la mutazione.
Mutazioni del gene regolatore	<i>lacI</i>	Trans	Influenzano la trascrizione dei geni strutturali
Mutazioni dell'operatore	<i>lacO</i>	Cis	Influenzano la trascrizione dei geni strutturali
Mutazioni del promotore	<i>lacP</i>	Cis	Influenzano la trascrizione dei geni strutturali

L'operone lac

(a) Assenza di lattosio



(b) Presenza di lattosio

