

## Regolazione della trascrizione nei fagi

### Uso degli RNA antisenso

L'RNA antisenso è l'mRNA trascritto dal tratto di filamento del DNA che non fa da stampo (fil. codificante). La regione del genoma è la stessa: cambia solo il filamento.

I filamenti di DNA di una doppia elica non possono codificare entrambi esattamente nello stesso tratto, altrimenti i filamenti di mRNA risultanti si appaierebbero immediatamente e non potrebbero venire tradotti.

Così, se l'RNA antisenso si appaia e blocca il ribosome binding site dell'RNA di senso, la traduzione è bloccata.

Questo fenomeno è utilizzato nella regolazione della traduzione nei fagi e in vitro per bloccare la traduzione di alcuni geni (bisogna però inserire artificialmente un promotore sul fil. di DNA che codifica per l'RNA antisenso).

### Infezione di un batterio da parte di un batteriofago litico

Il fago si aggancia alla parete del batterio e il suo capsido inietta il genoma fagico nella cellula ospite. Il DNA fagico viene tradotto in proteine necessarie per la replicazione dello stesso. Avviene la replicazione del genoma del fago. Vengono in seguito trascritti i geni per le proteine del capsido, che sono quindi sintetizzate. A questo punto, vengono assemblate tutte le componenti dei nuovi fagi. Infine, i fagi inducono la lisi del batterio ed escono, per infettare altre cellule.

L'infezione si propaga simmetricamente. In una coltura batterica si possono osservare delle macchiette circolari ("placche di lisi"), in cui i fagi hanno agito e i batteri sono morti.

Ci sono 3 fasi nell'infezione:

1. Precoce: il fago fa trascrivere all'RNA polimerasi batterica i propri geni precoci.
2. Intermedia: vengono trascritti i geni intermedi, grazie ai prodotti dei geni precoci.
3. Tardiva: avviene la trascrizione dei geni tardivi, grazie ai prodotti dei geni intermedi.

I promotori dei geni precoci (es., gene per l'RNA polimerasi fagica, per fattore  $\sigma$ , per fattori di antiterminazione) sono identici a quelli dei geni del batterio infettato. In questo modo, l'RNA polimerasi batterica scambia quei geni per geni normali.

In ciascuna delle tre fasi, verranno trascritti geni i cui prodotti serviranno nella fase successiva. È fondamentale il controllo temporale nella trascrizione dei geni fagici.

### Infezione di *B. subtilis* da parte di SPO1

1. Fase precoce: viene trascritto un fattore  $\sigma$  (GP28) necessario per la trascrizione dei geni intermedi. In questo caso viene utilizzato il fattore  $\sigma$  del batterio.
2. Fase intermedia: vengono sequestrate alcune RNA polimerasi batteriche, che verranno usate con GP28. Vengono trascritti due nuovi fattori  $\sigma$  (GP33 e GP34).
3. Fase tardiva: vengono trascritte proteine strutturali del capsido, utilizzando i nuovi fattori  $\sigma$ .

### Infezione da parte del fago T7

1. Fase precoce: sfruttando l'RNA polimerasi batterica, viene trascritta una nuova RNA polimerasi fagica molto semplice (non utilizza il fattore  $\sigma$ ).
2. Fase tardiva: utilizzando l'RNA polimerasi fagica, vengono trascritti tutti i geni del fago necessari alla replicazione del fago.

## Il fago $\lambda$

È un fago temperato: può scegliere due vie diverse:

- via litica (sfrutta il batterio ospite per riprodursi e poi lo uccide; come i fagi SPO1 e T7)

- via lisogenica (fase latente in cui il fago si integra nel genoma batterico (diventa *profago*), senza danneggiare la cellula ospite).

Un evento di **induzione** (es., radiazione UV) è in grado di far passare in qualunque momento il fago  $\lambda$  dalla via lisogenica a quella litica. Una volta che la via litica è intrapresa, però, non è possibile tornare alla lisogenia.

Nel caso del fago  $\lambda$ , si distinguono tre fasi: precoce immediata, precoce ritardata, tardiva.

Siccome il DNA batterico è circolare e quello del fago  $\lambda$  è lineare, quest'ultimo deve circularizzare per ricombinare col primo. A questo proposito, il DNA del fago  $\lambda$  ha estremità coesive. Si distinguono due regioni importanti nel genoma del fago  $\lambda$ :

- regione *cos*: serve a circularizzare il genoma fagico per l'incorporazione in quello batterico;
- regione *att*: regione in cui il genoma del fago può ricombinare col genoma batterico.

Il genoma circularizzato del fago  $\lambda$  presenta varie parti funzionalmente distinte. Posto il gene *ci* in alto al centro, avremo:

- a sinistra, il promotore  $P_L$  e i gene *N* e *cIII* (per la lisogenia), seguiti dai 6 geni per la ricombinazione (tra cui *int*, per l'integrazione, e *xis*, per l'escissione del genoma fagico dal cromosoma batterico) e poi dai geni per la coda del fago.
- a destra, il promotore  $P_R$  e i geni *cro* e *cII* (per la lisogenia), seguiti dai 2 geni per la sintesi del DNA, dal gene *Q* (fattore di antiterminazione), dai geni per la lisi della parete batterica e dai geni per la testa del fago.

I primi geni a venir trascritti (geni precoci immediati) sono geni regolatori, che sono fondamentali per le fasi successive dell'infezione.

1. Fase precoce immediata: inizia la trascrizione dai due promotori  $P_R$  e  $P_L$  ai lati di *ci* (si usa l'RNA polimerasi batterica). Vengono trascritti i geni precoci immediati: *N* e *cro*.
2. Fase precoce ritardata: vengono trascritti i geni precoci ritardati.
3. Fase tardiva: parte la trascrizione da un nuovo promotore ( $P_R'$ ), la quale si blocca presto se non c'è la proteina regolatrice *Q* (fattore di antiterminazione).

Il gene precoce immediato *N* codifica per un fattore di antiterminazione, il quale, agendo a livello dei siti *nut*, consente alla trascrizione di continuare sui geni precoci ritardati.

Il gene precoce immediato *cro* inibisce la sintesi del repressore di  $\lambda$  (azione necessaria perché si sviluppi il ciclo litico) e disattiva l'espressione dei geni precoci immediati (non più necessari per la prosecuzione del ciclo litico).

I geni precoci ritardati comprendono due geni coinvolti nella replicazione, sei nella ricombinazione e tre geni regolatori.

I geni precoci ritardati regolatori *cII* e *cIII* avviano la sintesi del repressore.

Il gene precoce ritardato regolatore *Q* produce un fattore di antiterminazione, che consente all'RNA polimerasi batterica di proseguire la trascrizione dei geni tardivi.

Antiterminazione operata da *N*. Favorisce il passaggio dalla trascrizione dei geni precoci immediati a quella dei geni precoci ritardati. Prima di arrivare al terminatore rho-dipendente, l'RNA polimerasi incontra un sito detto *nutR* (o *nutL*, a seconda che si consideri l'antiterminazione per trascrivere i geni precoci ritardati a partire da  $P_R$  o  $P_L$ ), che prelude alla terminazione. *N* riconosce *nutR* e la trascrizione continua. In seguito, *N* si lega da un lato a *nusA* sull'RNA polimerasi e dall'altro al sito *nut* sull'RNA in fase di crescita, piegando il DNA in un'ansa. In questo modo, l'RNA polimerasi ne risulta modificata e non aspetta più il fattore rho che scorre lungo l'RNA in fase di crescita, così che esso non riesce più a raggiungere l'RNA polimerasi e a provocare la terminazione rho-dipendente. Si ha quindi l'antiterminazione e la trascrizione continua.

Antiterminazione operata da *Q*. Favorisce il passaggio dalla trascrizione dei geni precoci ritardati a quella dei geni tardivi. *Q* si lega al DNA, non all'RNA (come invece *N*). Il risultato

finale è comunque lo stesso: avviene l'antiterminazione e la trascrizione continua. Il meccanismo è diverso.

Il fago  $\lambda$  non sintetizza, per la trascrizione dei propri geni, né propri fattori  $\sigma$ , né proprie RNA polimerasi. Sfrutta, invece, l'antiterminazione, dopo aver inserito il proprio genoma in quello del batterio ospite. Fa uso del fattore  $\sigma$  e dell'RNA polimerasi dell'ospite.

Nel genoma del fago  $\lambda$  ci sono anche operoni. Esso può quindi sfruttare anche la regolazione della trascrizione basata sugli operoni.

Se il batterio ospite si sta riproducendo velocemente, il fago  $\lambda$  sceglie la via litica, perché può uscire e infettare velocemente molte altre cellule.

Se, invece, il batterio ospite si sta riproducendo lentamente perché il mezzo di coltura è povero di nutrienti, il fago  $\lambda$  sceglie la via lisogenica, aspettando il momento propizio per intraprendere la via litica e uscire.

Il fago  $\lambda$  sente se il batterio si sta riproducendo velocemente dalla quantità di proteasi presenti nel batterio (tante proteasi = veloce riproduzione). Entrano in gioco le proteine regolatorie (CII e CIII), che permettono la scelta tra via litica e lisogenia.

**Lisogenia.** CII è attivatore della trascrizione di  $cI$  a partire da  $P_{RE}$ . CIII protegge CII da eventuali proteasi, solo se non ce ne sono troppe. Se il medium di coltura è povero, ci sono poche proteasi (perché la riproduzione è lenta); quindi, CIII protegge CII dalla degradazione. CII può quindi attivare la trascrizione del gene  $cI$  (finora non trascritto, perché sta tra i due promotori  $P_R$  e  $P_L$ ).  $cI$  viene trascritto nello stesso senso in cui viene trascritto  $N$  (è sul filamento opposto a  $cro$ , sullo stesso filamento di  $N$ ).  $cI$  codifica per il **repressore di  $\lambda$**  e ha un promotore detto  $P_{RE}$ . Questo promotore permette la sintesi delle prime molecole di repressore di  $\lambda$ . Siccome  $P_{RE}$  è prima di  $cI$  e anche di  $cro$  (ma  $cro$  è sul filamento opposto), verrà sintetizzato un RNA antisenso di  $cro$ , sullo stesso mRNA di  $cI$ .

L'mRNA di  $cI$  è tradotto e dà origine al repressore di  $\lambda$ . L'RNA antisenso di  $cro$  blocca l'eventuale traduzione di  $cro$  (che è un antirepressore), appaiandosi all'RNA di senso di  $cro$ .

CII può bloccare anche la trascrizione dei geni dopo  $Q$ , perché stimola la trascrizione da un promotore ( $P_{anti-Q}$ ) sul filamento opposto a quello di  $Q$ . Così viene sintetizzato un RNA antisenso che inibisce la traduzione di  $Q$ . Quindi, la trascrizione dopo  $Q$  non avviene più, perché l'antiterminazione non può avvenire. CII fa trascrivere RNA antisenso sia di  $Q$ , che di  $cro$ , bloccandone la traduzione: così CII blocca in due modi diversi la via litica.

Il repressore di  $\lambda$  agisce su più operatori ( $O_R/P_R$  e  $O_L/P_L$ ).

$O_R$  e  $O_L$  sono più complessi degli operatori normali. Entrambi sono divisi in 3 sub-operatori:  $O_R^1$ ,  $O_R^2$ ,  $O_R^3$ ;  $O_L^1$ ,  $O_L^2$ ,  $O_L^3$  ( $O_R^1$  è più vicino a  $P_R$ , rispetto a  $O_R^2$  e a  $O_R^3$ ; lo stesso vale per  $O_L^1$  con  $P_L$ ). Sono sequenze palindromiche riconosciute da dimeri di proteine regolatrici. Il repressore di  $\lambda$  si lega dapprima su  $O_R^1$  e su  $O_L^1$ , per i quali ha maggior affinità (l'affinità del repressore di  $\lambda$  decresce da  $O_R^1$  a  $O_R^3$  e da  $O_L^1$  a  $O_L^3$ ). Siccome il legame è cooperativo, i successivi dimeri di repressore di  $\lambda$  si legano agli altri sub-operatori. In questo modo è bloccata la trascrizione sia da  $P_R$  che da  $P_L$ .

Dopo, quindi, che la lisogenia si è instaurata, il DNA fagico viene integrato in quello batterico. CII attiva la trascrizione anche del promotore di  $int$  (che integra il genoma del fago in quello del batterio), non solo a partire dal promotore  $P_{RE}$ .

Gli altri geni del fago  $\lambda$  non sono trascritti ed esso rimane quiescente, replicandosi quando si replica il batterio.

$O_R$  ha anche un'ulteriore via di regolazione. Il repressore di  $\lambda$  è capace di regolare la propria trascrizione (altrimenti, essendo bloccata la trascrizione sia da  $P_R$  che da  $P_L$ , neanche  $cI$  sarebbe più trascritto), come la proteina  $C$  dell'operone  $ara$  e  $trp-r$  dell'operone  $trp$ . Il repressore di  $\lambda$  sa regolare la propria sintesi in modo sia positivo, che negativo: può sia attivare che reprimere la sua sintesi.  $cI$  ha anche un altro promotore, detto  $P_{RM}$ , che entra in gioco quando la repressione è già attivata (all'inizio è utilizzabile solo  $P_{RE}$ ). Mentre il repressore di  $\lambda$  è legato a  $O_R^1$  e a  $O_R^2$ , attiva la trascrizione a partire da  $P_{RM}$  (che è più a valle di  $O_R^3$ ) (mentre la trascrizione da  $P_R$  è bloccata). Così  $cI$  è trascritto ulteriormente. Quando, però, il

repressore di  $\lambda$  è presente in quantità troppo elevata, si lega anche a  $O_R^3$  e ingombra  $P_{RM}$ . La trascrizione di  $cI$  (e quindi la sintesi del repressore di  $\lambda$ ) è bloccata.

**Via litica.** Se il medium di coltura è ricco di nutrienti, le proteasi sono abbondanti e CII non riesce più a proteggere CII dalla proteolisi. Così tutto il meccanismo appena esposto non funziona e i geni del fago  $\lambda$  sono trascritti.

Innanzitutto,  $cI$  non viene trascritto (perché  $cII$  viene degradato); viene, invece, trascritto  $cro$ .  $Cro$  si lega a  $O_L$  e a  $O_R$ . Esso ha un'affinità decrescente da  $O_R^3$  a  $O_R^1$  e da  $O_L^3$  a  $O_L^1$  (il contrario del repressore di  $\lambda$ ). Quando  $cro$  si lega a  $O_R^3$ , non blocca  $P_{R'}$ ; quando si lega a  $O_L^3$ , non blocca  $P_L$ . Quindi non blocca la sintesi dei geni del fago (neanche la sua). Blocca, però, la trascrizione da  $P_{RM}$  (quindi la sintesi del repressore di  $\lambda$  non può più continuare, se anche fosse iniziata). In questo modo, la via litica blocca a due livelli diversi la sintesi del repressore di  $\lambda$ .

Venendo trascritti tutti i geni da  $P_{R'}$ , viene trascritto anche  $Q$ , il fattore di antiterminazione. In questo modo vengono sintetizzati anche i geni seguenti.

A questo punto,  $cro$  è presente in concentrazione elevata. Può perciò piazzarsi anche su  $O_R^2$  e  $O_R^1$  e su  $O_L^2$  e  $O_L^1$ . In questo modo  $cro$  blocca la trascrizione da  $P_R$  e da  $P_L$  (ma tanto i geni di questa regione sono regolatori: ora non servono più proteine regolatrici, perché si è ormai in fase litica avanzata), e attiva la trascrizione da  $P_{R'}$ , facendo così trascrivere i geni per le proteine del capsido e per la lisi.

Alla fine, si ha la produzione, l'assemblaggio e la liberazione della progenie fagica, tramite la lisi del batterio ospite.

Il punto di svolta tra via litica e lisogenia è determinato dalla quantità di nutrienti, e quindi di proteasi, presente nel mezzo di coltura: se ci sono poche proteasi, CII riesce a proteggere CII ( $\Rightarrow$  lisogenia); se ce ne sono tante, CII non riesce a proteggere CII dalla degradazione ( $\Rightarrow$  via litica).

Un fago in lisogenia può in qualsiasi momento entrare nella fase litica, mediante un evento di **induzione** (es., radiazioni UV). Ciò avviene nel caso di danni al genoma batterico. In questa situazione, infatti, il fago non può più sfruttare il batterio, che sta morendo, e cerca di scappare.

L'induzione avviene tramite la risposta SOS del batterio. RecA, in caso di danni al DNA del batterio (in cui un tratto di DNA a singolo filamento rimane scoperto), induce l'autoproteolisi di varie proteine (tra cui LexA), per dare inizio alla riparazione del DNA. LexA, infatti, in condizioni normali, mantiene repressi i promotori dei geni codificanti per le proteine coinvolte nella risposta SOS. RecA agisce anche sul repressore di  $\lambda$ , inducendone l'autoproteolisi. Il repressore di  $\lambda$  viene attaccato da RecA sia libero in soluzione, che legato a  $O_R$  e a  $O_L$ . Il repressore  $\lambda$  tagliato perde la propria capacità di repressione e si stacca dagli operatori.

Quindi, l'RNA polimerasi può iniziare la trascrizione da  $P_R$  e da  $P_L$ , visto che il repressore  $\lambda$  è sparito. Vengono trascritti anche  $cro$  e  $xis$ : in questo modo può iniziare la via litica e l'escissione del DNA fagico dal genoma batterico.

Il repressore di  $\lambda$ , inoltre, non può più venir trascritto, perché  $cro$  blocca la trascrizione da  $P_{RM}$ . Siccome RecA taglia anche CII, la lisogenia non può in alcun modo venir riattuada.

Il fago  $\lambda$  può passare in qualunque momento dalla via lisogenica a quella litica. Una volta che la via litica è intrapresa, però, non è possibile tornare alla lisogenia.

Sia nella via litica, che in quella lisogenica, c'è una gerarchia nell'espressione genica: i geni della fase precedente hanno sempre potere su quelli della fase successiva (sono dei "master genes").

Un batterio infettato da un fago della famiglia del fago  $\lambda$ , è immune dall'infezione da parte di altri fagi della stessa famiglia, perché il repressore di  $\lambda$  è un elemento trans-attivo che si lega all'operatore del fago appena entrato, reprimendolo.

$P_{RE} \Rightarrow$  attivato da CII.

$P_{RM} \Rightarrow$  attivato o represso dal repressore di  $\lambda$ ; represso da  $cro$ .

$P_{RE}$  e  $P_{RM}$  sono promotori deboli: hanno bisogno di proteine attivatrici per far incominciare la trascrizione.

$P_R$  e  $P_L$ , invece, sono promotori forti: non hanno bisogno di proteine attivatrici per iniziare la trascrizione.

Cro  $\Rightarrow$  antirepressore, perché blocca  $P_{RM}$  e perché è necessario alla fase litica. Non agisce da attivatore della propria sintesi.

Repressore di  $\lambda \Rightarrow$  repressore. Agisce da attivatore/repressore della propria sintesi.

Cro e il repressore di  $\lambda$  legano in modo molto simile il DNA (hanno entrambi una sequenza elica-giro-elica).

Battaglia cro-cl:

- Vince cro  $\Rightarrow$  ciclo litico
- Vince cl  $\Rightarrow$  lisogenia