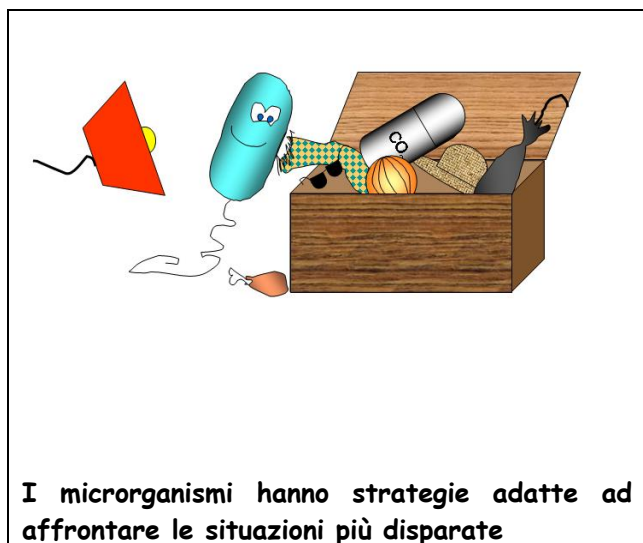


IL METABOLISMO

Abbiamo visto quali siano gli elementi di cui i microrganismi hanno bisogno per crescere, e

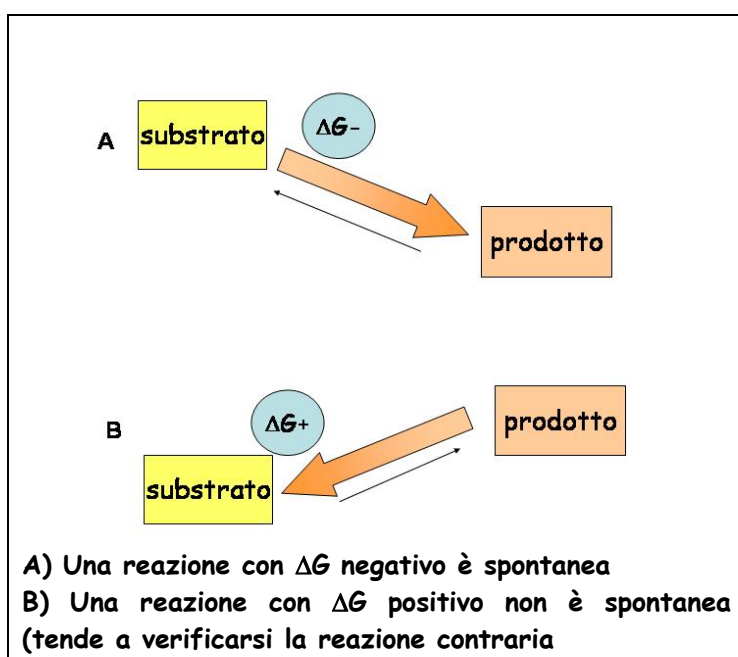


come queste molecole siano assunte dalla cellula. Abbiamo analizzato la crescita, planctonica e sessile, compreso quale sia l'influenza dei fattori abiotici su di essa, quali le strategie di sopravvivenza in ambienti sfavorevoli, come le potenzialità racchiuse nella informazione genetica siano regolate in modo da poter essere espresse per adattarsi all'ambiente circostante nel migliore dei modi.

Tutto quello di cui si è discusso finora è

l'insieme dei modi in cui un microrganismo può assicurarsi la sopravvivenza e la possibilità di replicarsi. Alla base di tutto questo c'è la necessità di avere a disposizione energia da spendere e carbonio per costruire. Vediamo quindi in che modo i nutrienti acquisiti vengano trasformati per ottemperare a queste richieste basilari.

I microrganismi, considerati globalmente, sono in grado di utilizzare quasi tutti i composti naturali e anche qualche composto artificiale (xenobiotico), in quasi tutte le condizioni.



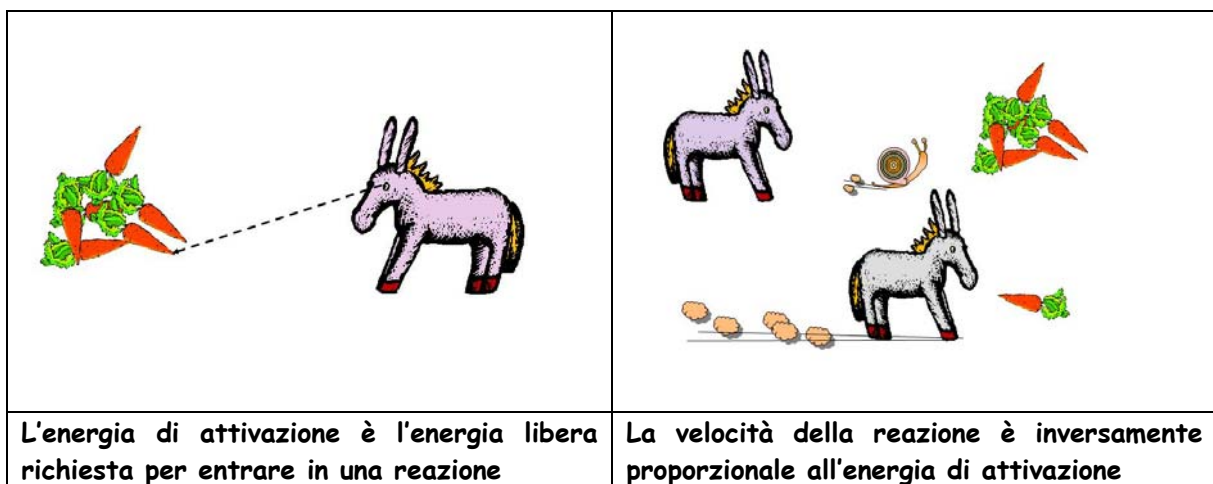
L'energia, quale che sia la sua fonte, viene trasformata, immagazzinata, spesa solo quando è necessario. L'insieme dei processi di produzione, conservazione e impiego dell'energia va sotto il nome di metabolismo; di conseguenza, in tutti i processi che fanno parte del metabolismo microbico l'energia libera è un fattore determinante.

Definiamo "energia libera" l'energia,

liberata in una reazione, che è disponibile per svolgere un lavoro utile alla cellula batterica.

La variazione di energia libera (ΔG) in una reazione, è influenzata dalle concentrazioni di substrato e prodotto e dal pH. Una reazione in cui è rilasciata energia libera, in cui quindi il ΔG è negativo, si verifica spontaneamente e si definisce esoergonica; se invece il ΔG di una reazione è positivo, la reazione è endoergonica e non si verifica spontaneamente (tenderà a verificarsi invece la reazione contraria).

Il metabolismo è facilitato dall'intervento degli enzimi che, accoppiano una reazione esoergonica a una reazione endoergonica e abbassano l'energia di attivazione di una reazione. L'energia di attivazione corrisponde alla quantità di l'energia libera che deve essere disponibile perché una molecola entri in una determinata reazione.



Quanto maggiore l'energia di attivazione, tanto più lenta sarà la reazione stessa (la molecola non reagisce con facilità) e viceversa: la velocità della reazione è quindi inversamente proporzionale all'energia di attivazione richiesta. L'utilizzazione dell'energia negli organismi viventi avviene attraverso l'accoppiamento di reazioni esoergoniche e endoergoniche.

Normalmente, nelle reazioni che avvengono in natura il bilancio globale dell'energia libera è negativo. In qualche raro caso, tuttavia, è possibile che alcune specie batteriche portino avanti reazioni non convenienti, con ΔG positivo (reazioni di sintrofismo, crf: ciclo del Carbonio). L'accoppiamento di reazioni eso- e endo-ergoniche viene ottenuto sfruttando molecole con un alto contenuto di energia, per ottenere un bilancio netto negativo dell'energia libera. Il composto più comune è l'ATP, con un $\Delta G = -12 / -15$ kcal/mole; altre molecole di questo tipo sono GTP, UTP, CTP e fosfoenolpiruvato (PEP). L'energia in questo tipo di molecole è immagazzinata in legami fosfato altamente energetici. I processi di conservazione

dell'energia che portano alla sintesi dei composti ad alta energia, si svolgono attraverso una serie di reazioni redox.

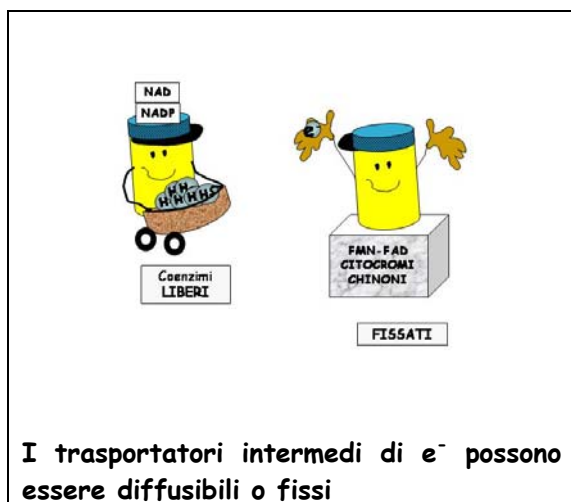
SI OSSIDA (è un riducente)	SI RIDUCE (è un ossidante)
cede idrogeno	acquista idrogeno
acquista ossigeno	cede ossigeno
cede elettroni	acquista elettroni
Libera energia	Assorbe energia
La reazione è esotermica (libera calore)	La reazione è endotermica (assorbe calore)

I composti coinvolti nelle reazioni redox subiscono determinate modificazioni, a seconda del loro ruolo nella reazione (se si ossidano, e sono quindi riducenti - o se si riducono, e sono quindi ossidanti).

L'entità dell'energia che può essere liberata da una reazione (disponibile per la sintesi di composti ad alta energia) dipende dalla differenza di potenziale redox tra le molecole che entrano nella reazione. Il potenziale di ossido-riduzione (E_0) definisce la tendenza di un composto a cedere elettroni, ossidandosi (potenziale redox basso, riducenti) o ad accettarli riducendosi (potenziale redox alto, ossidanti). Il potenziale redox è funzione anche del pH ma, per convenzione, i valori di potenziale sono considerati alla neutralità, cioè al pH che caratterizza di norma il citoplasma di una cellula batterica.

Nella cellula batterica, il trasferimento di elettroni che avviene nelle reazioni di ossido-riduzione, coinvolge molte molecole che donano e accettano elettroni in sequenza.

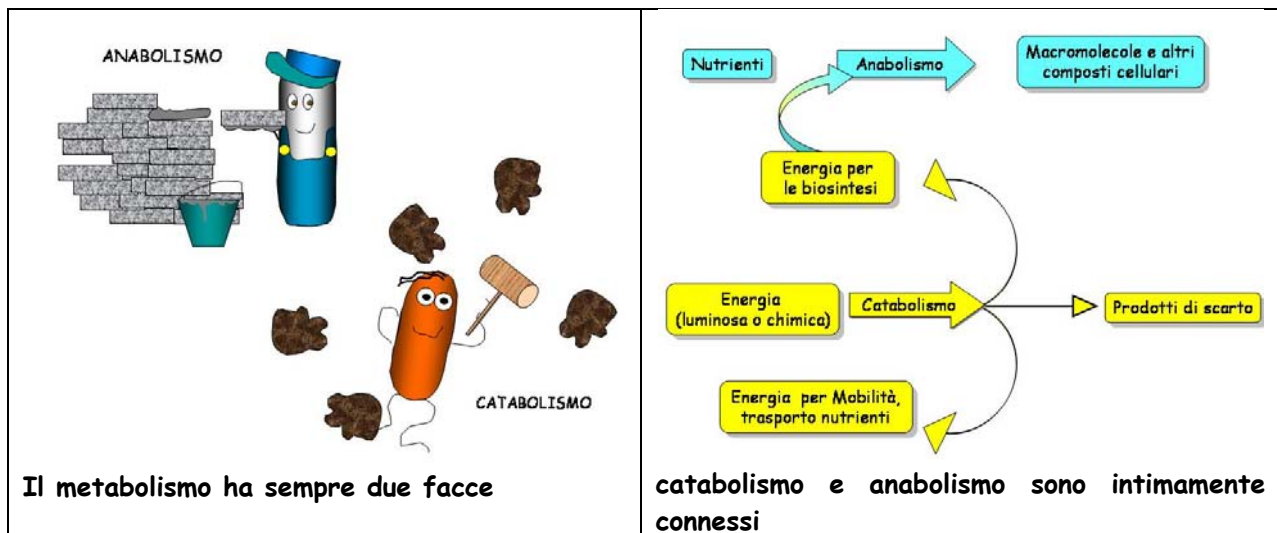
Il donatore di elettroni da cui inizia il trasferimento viene detto "DONATORE PRIMARIO" l'ultimo accettore viene detto ACCETTORE TERMINALE.



Il trasferimento di elettroni da un donatore primario a un accettore terminale richiede, nella maggior parte dei casi, che intervengano dei composti intermedi, che garantiscono il trasporto degli elettroni tra i due estremi della catena. I trasportatori intermedi di elettroni, nei microrganismi, possono essere cofattori diffusibili ($NAD/NADH$, $NADP/NADPH$, $FAD/FADH_2$), oppure trasportatori di elettroni legati alla

membrana citoplasmica, l'unica struttura, in un microrganismo, che possa garantire una precisa disposizione spaziale, lungo un gradiente di potenziale redox.

Il metabolismo nei batteri come negli altri esseri viventi, comprende processi catabolici, in cui si passa da strutture ordinate a strutture meno ordinate, e si produce energia, e processi di anabolismo in cui l'energia prodotta viene spesa per le sintesi, per aumentare cioè la complessità strutturale.

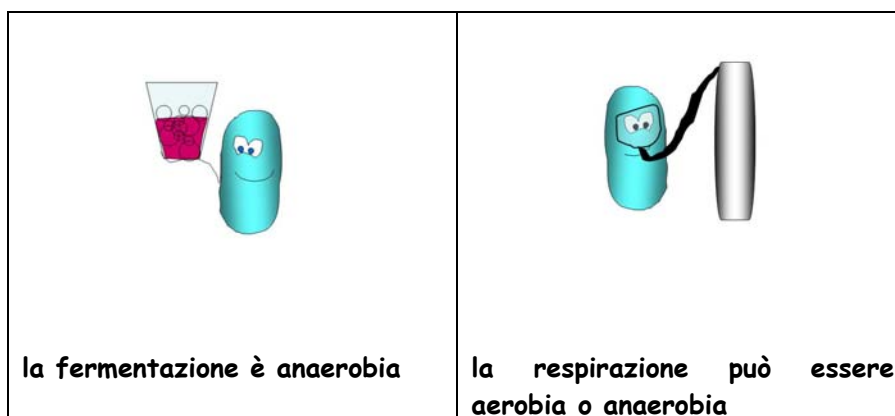


La maggiore diversità, tra i microrganismi, è a carico delle reazioni cataboliche.

CATABOLISMO

Il catabolismo produce e alla conserva energia e può avvenire attraverso reazioni redox, o reazioni guidate dai fotoni. I meccanismi mediati da reazioni redox si possono dividere in FOSFORILAZIONE A LIVELLO DEL SUBSTRATO (fermentazione) e FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA, accoppiata al trasporto di elettroni (respirazione)

FERMENTAZIONE



La fermentazione è una reazione redox che avviene tra molecole organiche, in cui il substrato funge da donatore di elettroni, ossidandosi e il prodotto da accettore, riducendosi. Sia il donatore che l'accettore

sono interni alla cellula e l'ossidazione del substrato è sempre incompleta: l'energia presente nel substrato non viene quindi liberata completamente, e la resa energetica è bassa. La fermentazione è un processo anaerobico per definizione, sia che si svolga in un contesto

anossico sia che si svolga in presenza di ossigeno, e procede in due passi principali: GLICOLISI e RIDUZIONE DEL PIRUVATO.

Analizziamo, come esempio, la fermentazione del glucosio:

GLICOLISI:

I microrganismi possono utilizzare vie differenti per effettuare la glicolisi:

- 1) Via di Embden-Meyerhoff (E-M), presente nei batteri enterici e negli eucarioti; ottiene due molecole di ATP per molecola di glucosio ossidata.
- 2) Via di Entner - Douderoff (ED), usata da alcuni batteri Gram-negativi (*Pseudomonas*) e da Archibatteri; ottiene una molecola di ATP per ogni molecola di glucosio ossidata.
- 3) Via dei pentoso-fosfati, tipica dei batteri acidolattici - Utilizza zuccheri a 5 atomi di carbonio come intermedi, ma può anche sfruttare direttamente zuccheri a 5 atomi di carbonio. Se il substrato è glucosio, si ottiene una molecola di ATP per molecola di substrato.

RIOSSIDAZIONE DEI COENZIMI RIDOTTI

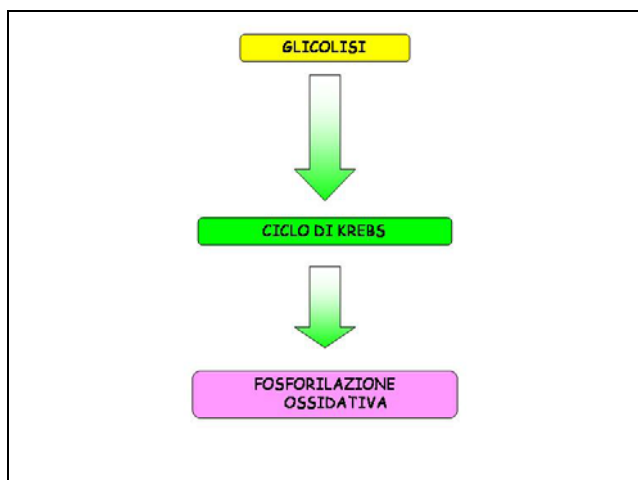
Con la glicolisi viene sintetizzato ATP, prodotto piruvato, si riducono i trasportatori intermedi di elettroni, che dovranno necessariamente essere re-ossidati per un nuovo uso. La riossidazione dei coenzimi ridotti si ottiene attraverso la riduzione del piruvato (ottenuto dall'ossidazione del glucosio nel corso del primo passo) che può essere effettuata secondo diverse vie fermentative, che portano a prodotti terminali diversi. Le vie fermentative sono differenti da specie a specie, possono essere usate come criterio di identificazione e molte di esse hanno un interesse alimentare o industriale.

RIDUZIONE DEL PIRUVATO NEI PROCESSI DI FERMENTAZIONE		
Tipo di fermentazione	prodotti finali	
Alcolica	etanolo	tipica dei lieviti, i batteri che la svolgono sono una minoranza.
acidolattica/omolattica	acido lattico.	batteri acidolattici (produzione di formaggio, yogurt...)
acidolattica/eterolattica	acido lattico, etanolo e CO ₂ .	batteri acidolattici (produzione di crauti).
Propionica	acido propionico (parte da acido lattico)	<i>Propionobacterium</i> (produzione di Emmenthaler)
acidi misti	acido acetico, acido lattico, etanolo (il tipo dei prodotti è specie-specifico).	caratteristica della famiglia delle <i>Enterobacteriaceae</i> , per cui può avere valore diagnostico
Butanolica	acido butirrico, n- butanolo, acetone	alcune specie di <i>Clostridium</i> (importanti prodotti industriali)

Alcune specie di *Clostridium* (anaerobi) fermentano una grande varietà di substrati e possono fermentare anche aminoacidi, ossidandone uno e riducendo l'altro. Questa reazione è conosciuta come reazione di Stickland.

RESPIRAZIONE

La principale differenza tra respirazione e fermentazione è nella natura dell'accettore, che è inorganico e nell'ossidazione del substrato che è completa e libera di conseguenza molta più energia. ($\Delta G_{\text{RESP}} = -686$ kcal/mole contro $\Delta G_{\text{FERM}} = -58$ kcal/mole). L'accettore più comune è l'ossigeno (respirazione aerobia) ma può anche essere un altro composto come nitrato, Fe^{3+} , o solfato (respirazione anaerobia). Alcune specie batteriche sono in grado di utilizzare composti inorganici anche come donatori di elettroni. La respirazione del glucosio avviene attraverso: 1) Glicolisi (come la fermentazione) 2) Ciclo di Krebs o dell'acido tricarbossilico (TCA) - ottiene la completa ossidazione del piruvato a CO_2 riducendo i coenzimi a NADH e FADH_2 . 3) Fosforilazione ossidativa- riossidazione dei coenzimi ridotti e riduzione di un accettore terminale di elettroni si accoppiano per formare ATP da ADP e fosforo.



L' ATP viene generato durante la riossidazione dei coenzimi ridotti (NADH , FADH_2) attraverso una catena di trasporto di elettroni. La respirazione aerobia e quella anaerobia usano alcuni componenti del sistema di trasporto in comune, ma adoperano accettori terminali diversi.

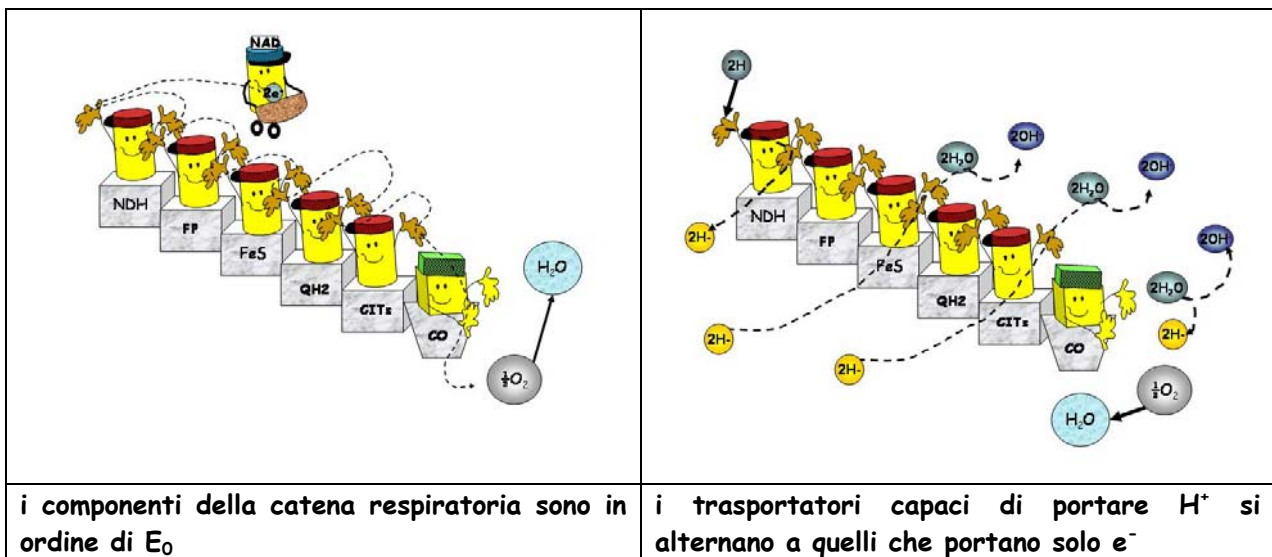
Nella catena di trasporto degli elettroni i componenti sono disposti a seconda del

potenziale redox, dai riducenti più forti agli ossidanti più forti.

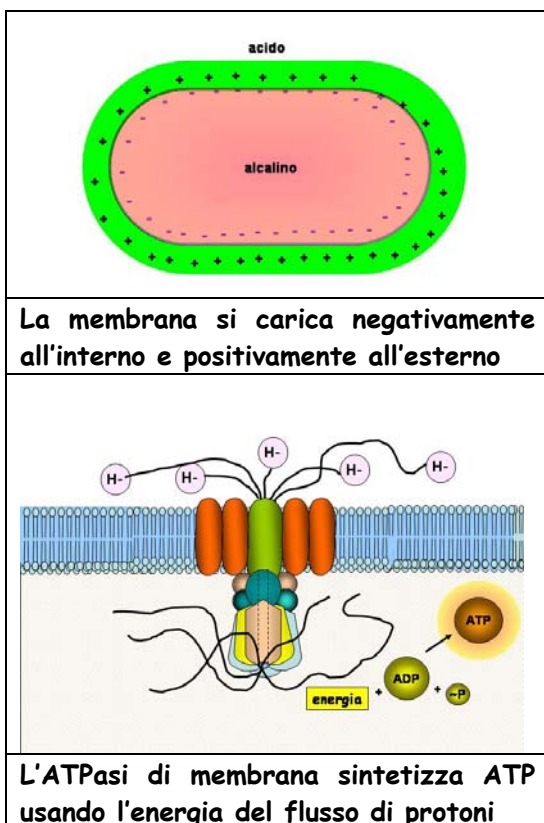
NADH viene ossidato a NAD attraverso la NADH - deidrogenasi (NDH) e trasferisce un protone e 2 elettroni a una flavoproteina. Le flavine sono in grado di trasportare 2 protoni e 2 elettroni e assumono quindi un protone dal citoplasma.

I due elettroni vengono trasferiti al trasportatore successivo, una proteina contenente ferro e zolfo, che non è in grado di accettare i protoni, che vengono quindi espulsi verso l'esterno.

La proteina FeS trasferisce gli elettroni a un chinone che, dopo averli accettati, assume 2 protoni dal citoplasma e, dal momento che il trasportatore che segue (un citocromo) è



incapace di accettare protoni, li espelle all'esterno della cellula e trasferisce solo gli elettroni ai citocromi. La composizione delle catene di trasporto varia in diversi gruppi di



microorganismi, soprattutto per quanto riguarda il tipo di citocromi presenti. In alcuni microrganismi (es. *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae*) l'ultimo citocromo (citocromo c) cede elettroni alla citocromo-ossidasi, un enzima la cui presenza è utile nell'identificazione dei microrganismi, e che può poi espellere protoni e convertire l'ossigeno in acqua.

L'ossigeno che viene ridotto richiede l'intervento di H^+ per formare acqua. Gli ioni H^+ necessari provengono dal citoplasma, dalla dissociazione dell'acqua in H^+ e OH^- . L'uso di H^+ per la riduzione di O_2 e l'espulsione dei protoni provocano l'accumulo di OH^- all'interno e di H^+ all'esterno della membrana. Sia H^+ che OH^- non diffondono liberamente attraverso la membrana lungo

la quale quindi si crea un gradiente protonico, con il lato interno negativo e alcalino e il lato esterno acido e positivo.

Il gradiente provoca l'energizzazione della membrana e l'energia elettrica può essere usata per la mobilità o per il trasporto attivo e anche per generare ATP. La formazione di ATP avviene attraverso una proteina, l'ATPasi di membrana che ha una "coda" transmembrana attraverso cui il flusso di protoni rientra nella cellula, e una testa, sul lato interno della membrana, che spende l'energia che viene rilasciata in modo controllato, sintetizzando ATP.

La reazione netta della respirazione aerobia è: $\text{Glucosio} + 6\text{O}_2 + 38\text{ADP} + 38\text{Pi} \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + 38\text{ATP}$; la resa energetica è quindi molto elevata. La respirazione anaerobia (con accettore diverso dall'ossigeno) non è altrettanto efficiente e spesso rappresenta un meccanismo alternativo. Alcune specie tuttavia (es. i metanogeni che usano CO_2 come accettore terminale e i batteri come *Desulfovibrio* che riducono SO_4) impiegano esclusivamente questo procedimento e sono anaerobi obbligati.

FOTOTROFIA

Alcuni microrganismi sintetizzano ATP attraverso reazioni innescate dalla luce: i cianobatteri, come le piante, attraverso un processo di fotosintesi ossigenica (che produce ossigeno come prodotto collaterale) mentre i batteri "rossi" e i batteri "verdi" svolgono una fotosintesi anossigenica, in condizioni di anaerobiosi.

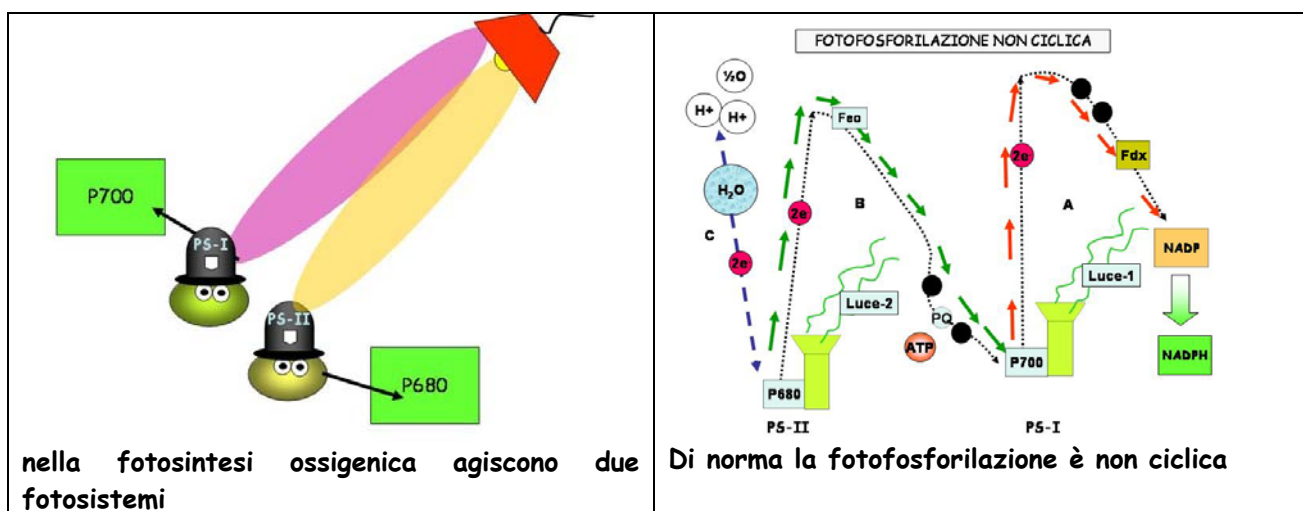
Batteri verdi	Un fotosistema (fotofosforilazione ciclica)
Batteri rossi	Un fotosistema (fotofosforilazione ciclica)
Cianobatteri	Due fotosistemi (formazione di ATP/formazione e riduzione di NADPH, con susseguente rilascio di O_2) Nelle eterocisti è presente solo PS-I e non si produce O_2
Cloroplasti (nelle piante verdi e nelle alghe)	Due fotosistemi (come i cianobatteri)

L'ATP viene generato attraverso un meccanismo chemiosmotico (fotofosforilazione); l'energia per la sintesi deriva dall'assorbimento della luce da parte della clorofilla che si trova nel centro di reazione. I pigmenti accessori (carotenoidi, ficobiliproteine; ficoeritrina e ficocianina) si trovano nelle cosiddette "antenne" dove svolgono la doppia funzione di 1) catturare la luce giallo verde (470 a 630nm) e 2) trasferirne l'energia alla clorofilla del centro di reazione (ampliando lo spettro di lunghezza d'onda utilizzabile) oltre a proteggere la cellula batterica da lunghezze d'onda potenzialmente dannose. I batteri variano per il tipo ed il numero di sistemi di fotofosforilazione che possiedono. Nel processo intervengono proteine che trasportano elettroni e sono legate alle membrana, raccolte in uno o più fotosistemi. A

differenza di quanto accade nella respirazione, durante la fotosforilazione non vengono assunti o ceduti elettroni: gli eccitoni (stato elettronico a singoletto) si limitano a spostarsi lungo la catena, cedendo l'energia acquisita dalla luce e ritornando poi al punto di partenza.

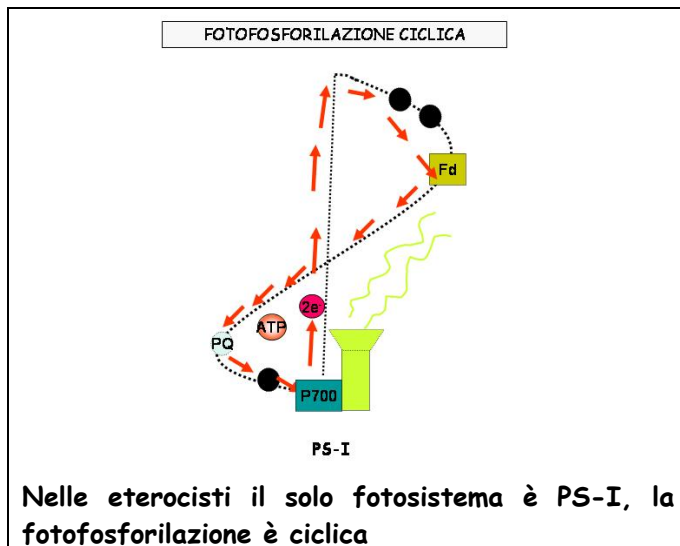
FOTOSINTESI OSSIGENICA

É tipica dei cianobatteri e degli eucarioti fotosintetici; il pigmento fotosintetico è la clorofilla a (assorbe la luce nel visibile, 400-700 nm). Nella fotosintesi ossigenica sono utilizzati due diversi fotosistemi (PS-I e PS-II). PS-I assorbe luce in uno spettro ampio (> 680) e la dirige verso una particolare clorofilla "a" (P700); PS-II fissa luce a lunghezza d'onda inferiore e la dirige verso la clorofilla "a" p680.



Il principale donatore di elettroni è l'acqua; l'accettore è NADP.

La fotofosforilazione è in genere non ciclica (coinvolge entrambi i fotosistemi I e II) e ottiene non solo ATP ma anche potere riducente, sotto forma di NADPH. Nella fotofosforilazione non ciclica, la luce incidente eccita la clorofilla (P700) che assume un potenziale negativo e trasferisce 2 e⁻ alla ferredossina, che li cede al cofattore NADP, che si riduce a NADPH. La clorofilla P700 viene poi ridotta dal secondo fotosistema (PS-II) e della clorofilla P680 che, eccitata a sua volta dalla luce, le cede elettroni attraverso un accettore non meglio identificato e la catena di trasportatori (chinone-citocromi). A concludere il processo, P680 viene ridotta grazie alla cessione di elettroni da molecole di acqua (fotolisi dell'acqua) con formazione di $\frac{1}{2} O_2$, che rappresenta un prodotto secondario di questo tipo di reazione fotosintetica.



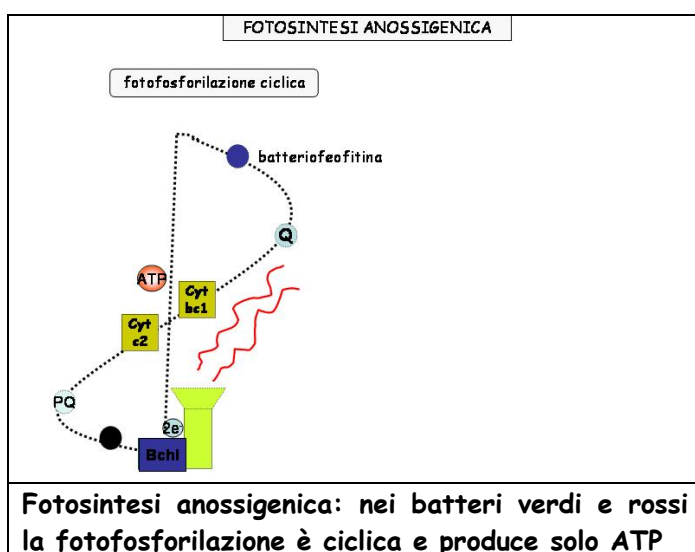
In alcuni casi la fotofosforilazione può essere ciclica e coinvolgere un solo fotosistema, come avviene, per esempio, all'interno delle eterocisti, con l'intervento del solo sistema PS-I e il passaggio della coppia di elettroni dalla ferredossina ai citocromi da cui ritorna a P700. Lungo questo passaggio viene prodotto ATP grazie all'attività dell'ATPasi che sfrutta l'energia prodotta dal gradiente protonico.

FOTOSINTESI ANOSSIGENICA

Caratteristica dei batteri fotosintetici verdi e rossi; coinvolge solo un fotosistema e impiega batterioclorofille che utilizzano lunghezze d'onda nel visibile e nell'infrarosso vicino: (700-900 nm). Il tipo di batterioclorofilla coinvolto è una caratteristica specie specifica. Nei batteri rossi sulfurei, per esempio, è comune la batterioclorofilla "a", con spettro di assorbimento 800-925 (a seconda delle specie). Nel corso della fotosintesi anossigenica viene prodotto solo ATP per mezzo di una fotofosforilazione ciclica che dalla batteriofeofitina, attraverso chinone e citocromi, torna a ridurre la batterioclorofilla.

POTERE RIDUCENTE NELLA FOTOFOSFORILAZIONE CICLICA

La maggior parte dei microrganismi che traggono energia dalla luce è in grado di usarla



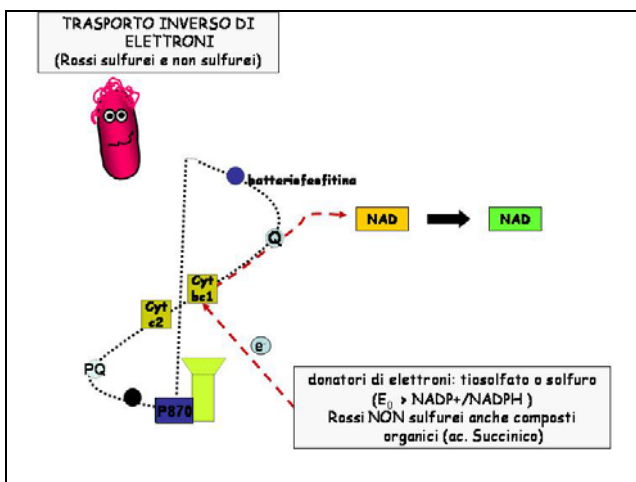
per organizzare CO_2 (autotrofia). Per incorporare CO_2 è indispensabile che la cellula disponga di un adeguato potere riducente sotto forma di NADH o NADPH. Nel corso della fotofosforilazione non ciclica il primo sistema PS-I produce potere riducente e il secondo genera il gradiente protonico necessario a produrre ATP, ma nei sistemi ciclici viene prodotto ATP e il potere riducente deve essere

ricavato da fonti esterne. Considerando che NAD o NADP sono tra i migliori donatori di

elettroni, ridurli direttamente non è facile. Le strategie possibili per ottenere potere riducente in queste condizioni sono tre:

1) **TRASFERIMENTO DIRETTO DI ELETTRONI:** NAD e NADP hanno un potenziale redox fortemente negativo: è molto difficile quindi che siano ridotti direttamente. L'idrogeno gassoso è una delle poche sostanze dotate di potenziale redox tanto basso (-0,42 volt) da poter ridurre direttamente NADP (-0,32 volt). Per ossidare l'idrogeno gassoso, tuttavia, è necessario un enzima specifico (idrogenasi). Le specie che possiedono idrogenasi possono ricorrere a questa strategia per ottenere il potere riducente.

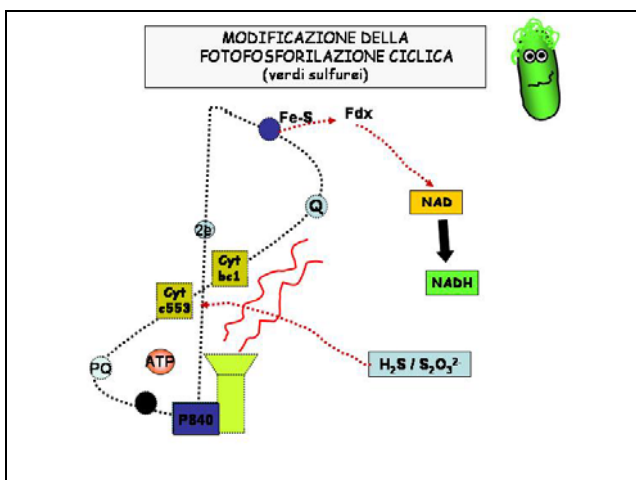
2) **TRASPORTO INVERSO DI ELETTRONI** (Rossi solfurei e non solfurei)



Molti fototrofi anossigenici impiegano come donatori di elettroni composti come tiosolfato o solfuro, con un potenziale più alto di quello della coppia $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Per poter ridurre NADP gli elettroni entrano nella catena di trasporto e vengono trasportati in una direzione sfavorevole, consumando energia tratta dal potenziale di membrana. I

batteri rossi non solfurei possono ricevere elettroni per il trasporto inverso anche da composti organici, come l'acido succinico.

3) **MODIFICAZIONE DELLA CICLICITÀ** (batteri verdi). I batteri verdi impiegano una terza



strategia, che prevede una "deviazione" lungo la fotosintesi ciclica dalla clorofilla eccitata gli elettroni vengono trasferiti alla feofitina e da qui al chinone, che li trasferisce a NAD, riducendolo per completare il ciclo e produrre ATP, gli. elettroni donati da fonti esterne ridotte, come acido solfidrico e tiosolfati, entrano nella catena di

trasportatori a livello dei citocromi e vengono trasferiti fino alla batterioclorofilla, riducendola nuovamente e generando l'energia di membrana per la sintesi di ATP.

TIPI DI NUTRIZIONE

La combinazione tra la sorgente di energia e la fonte di carbonio utilizzata, permette di suddividere i microrganismi in categorie: quelli che utilizzano l'energia luminosa sono definiti "fototrofi" e quelli che traggono energia dall'ossidazione di composti chimici sono detti "chemiotrofi". Per i microrganismi chemiotrofi che ricavano energia dall'ossidazione di sostanze inorganiche si aggiunge il termine "lito" mentre per quelli che la ricavano dall'ossidazione di sostanze organiche il termine "organo". I termini "auto" e "etero" invece sono riferiti alla fonte di carbonio (CO_2 o materiale organico, rispettivamente). Microrganismi che associano processi metabolici autotrofici e processi metabolici eterotrofici vengono a volte definiti mixotrofi. Per quanto esistano in natura esempi di tutte le combinazioni possibili, i gruppi principali sono quattro:

CHEMOETEROTROFI (anche detti eterotrofi chemo-organotrofi; o semplicemente eterotrofi) - I microrganismi che richiedono una fonte di carbonio organica hanno la tendenza a impiegare un donatore di elettroni organico anche nei processi di produzione di energia, se la fonte dell'energia è chimica. In questo gruppo si trovano microrganismi saprofiti e patogeni.

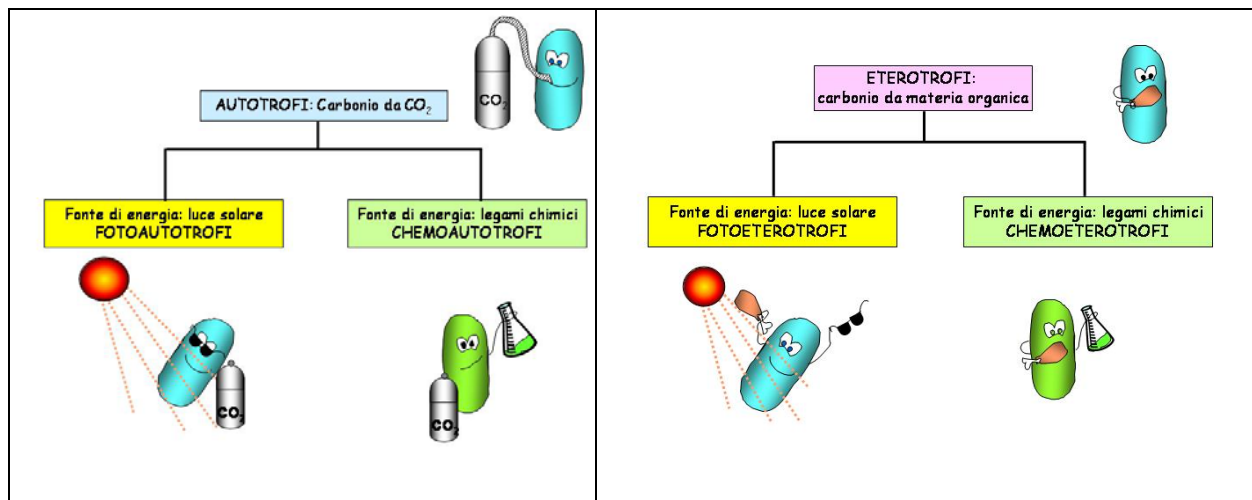
CHEMOAUTOTROFI (autotrofi chemiolitotrofi): il carbonio cellulare viene ricavato fissando CO_2 , e l'energia in genere da fonti inorganiche come composti dello zolfo o dell'azoto, ferro, idrogeno etc.. La produzione di ATP avviene per mezzo della respirazione (aerobia o anaerobia) e i donatori di elettroni possono essere:

1) H_2 - L'idrogeno viene ossidato dalle idrogenasi (enzimi contenenti nickel) e riduce NAD a NADH che in parte viene ossidato attraverso la catena respiratoria per produrre ATP; in parte viene convertito a NADPH dall'azione della trans-idrogenasi. I microrganismi che possono ossidare idrogeno possono comportarsi da litotrofi ma non sono obbligati a farlo, a differenza dei batteri nitrificanti e solfo-ossidanti.

2) Fe^{+2} , H_2S , NH_4^+ : gli elettroni sono donati direttamente alla catena di citocromi, con un potenziale redox maggiore a quello di NADH, per cui l'energia disponibile per la sintesi di ATP è limitata. La formazione di NADPH richiede l'intervento di un trasferimento inverso di elettroni. Questi microrganismi non hanno bisogno di composti organici per ricavare energia o carbonio. Di questo gruppo fanno parte i batteri che ossidano lo zolfo e gli archibatteri metanogeni.

FOTOETEROTROFI - Il carbonio cellulare viene ricavato da composti organici, ma l'energia deriva dalla luce. Di questo gruppo fanno parte gli archibatteri alofili e i batteri rossi e verdi non sulfurei.

FOTOAUTOTROFI (Fotolitotrofi) - Il carbonio cellulare deriva dalla fissazione della CO_2 e l'energia dalla luce. Questi organismi non necessitano di composti organici. La maggior parte dei cianobatteri, i batteri rossi fotosintetici e le piante usano questo meccanismo.



ORGANICAZIONE DI ANIDRIDE CARBONICA (AUTOTROFIA)

Per la maggior parte, i microrganismi fototrofi e litotrofi possono organizzare carbonio inorganico (CO_2) per il proprio anabolismo riducendolo a carboidrati, attraverso il ciclo di Calvin, comune anche alle piante, che spende 18 molecole di ATP per ottenere una molecola di glucosio. In alcuni procarioti che utilizzano il Ciclo di Calvin si possono distinguere i carbossisomi costituiti da depositi di RuBisCo cristallina.

Il Ciclo di Calvin è una delle vie più diffuse per l'organizzazione della CO_2 ma non è l'unica: Nei batteri verdi (sulfurei e non sulfurei) la fissazione dell'anidride carbonica avviene attraverso il ciclo riduttivo degli acidi tricarbossilici (inverso del ciclo di Krebs) e in un particolare batterio verde non sulfureo (*Chloroflexus*) esiste una via peculiare: la via dell'idrossipropionato, in cui due molecole di CO_2 vengono convertite a gliossalato, e di cui l'idrossipropionato rappresenta l'intermedio chiave.

ELEMENTI DI GENETICA

DUPLICAZIONE DEL CROMOSOMA

Per garantire il funzionamento della cellula batterica, è necessario che l'informazione genetica sia conservata e trasmessa da una cellula alle cellule figlie. Il cromosoma batterico deve quindi essere duplicato e il materiale genetico deve essere distribuito in modo omogeneo alla progenie.

In una cellula batterica, la replicazione del DNA prosegue durante tutto il ciclo di divisione; il suo inizio richiede l'intervento specifico di un gruppo di proteine che sono : DnaA; DnaB, DnaC, Hu; Girasi e SSB. Sul cromosoma esiste una regione (OriC- Origine del cromosoma) da cui inizia la replicazione, e in cui sono presenti due gruppi di sequenze ripetute, di 9 e 13 basi. Le sequenze dei due gruppi sono diverse tra loro ma hanno in comune una notevole ricchezza in "A" e "T".

All'inizio del processo di duplicazione, la proteina Dna-A si lega alle sequenze di 9bp, fino a formare un nucleo di 20-40 monomeri attorno al quale si avvolge il DNA di oriC.

Il legame con DNA-A favorisce la separazione dei filamenti, in corrispondenza delle sequenze di 13 bp. Alle estremità dell'apertura che si è formata, si va a legare la proteina DnaB, che recluta altri enzimi (primasi e altre proteine) che si legano alle forche replicative, formando un complesso che prende il nome di "primosoma" e sintetizzando primer(inneschi) di RNA per avviare il processo di copia del filamento guida e di quello "copia". Le DNA-polimerasi, infatti, possono aggiungere nucleotidi all'estremità 3' di un frammento, ma non sono in grado di iniziarne la sintesi: è necessario quindi che sia presente un innesco su cui le DNA-polimerasi possano svolgere la propria funzione, innesco che è formato da RNA e sintetizzato dalla Primasi. Le elicasi svolgono il DNA alle estremità delle forche replicative e le proteine SSB (Single Strand Binding) si legano ai filamenti e impediscono che possano tornare ad appaiarsi nuovamente; il DNA legato a Dna-A si svolge e la proteina è gradatamente rimossa da oriC, permettendo alla sintesi di procedere nelle due direzioni. Al processo di duplicazione partecipano diversi enzimi; il principale è la DNA-polimerasi III, che aggiunge i nucleotidi all'estremità 3' (-OH) del filamento che sta crescendo. Il "filamento guida" (leading-veloce) può essere quindi sintetizzato in modo continuo ma il "filamento copia" (lagging-lento) non può essere sintetizzato allo stesso modo perché il gruppo -OH su questo filamento, è situato all'estremità opposta rispetto a quella che si trova a livello della forca di replicazione. Il

filamento copia, quindi è ottenuto attraverso un processo di sintesi discontinuo a cui partecipano molti enzimi.

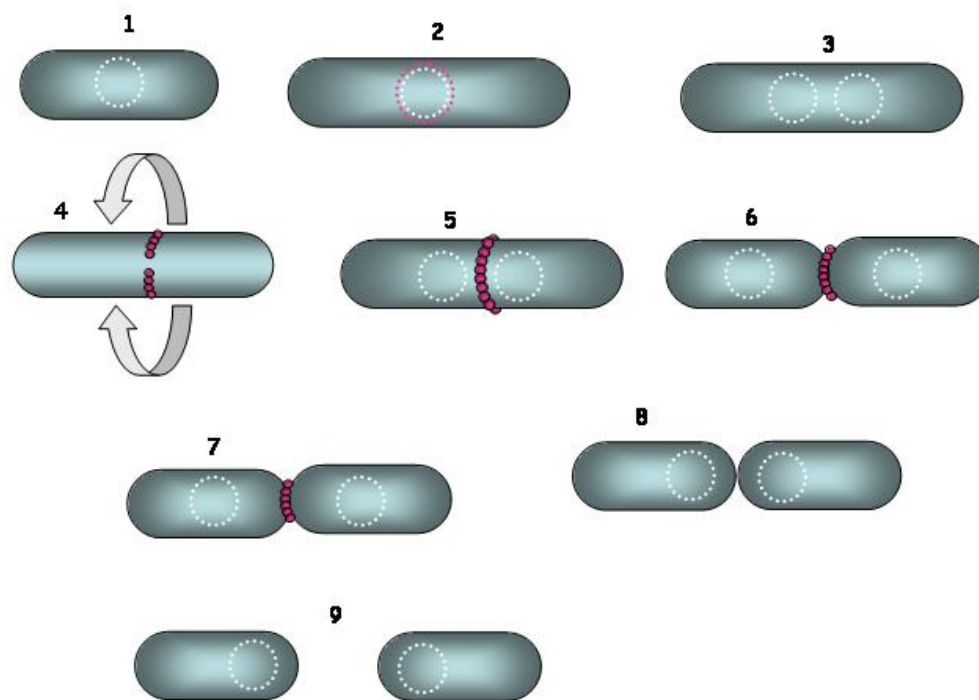
La Primasi sintetizza un breve innesco di RNA (11 basi) che rende disponibile un gruppo -OH per la DNA polimerasi III, che aggiunge nucleotidi a questa estremità, fino a raggiungere l'innesco di RNA del frammento precedente, dove si ferma e si stacca per essere sostituita dalla DNA-polimerasi I che è in grado di eliminare l'RNA (grazie a un'attività di esonucleasi 5'→3') e sostituirlo con DNA, congiungendo il nuovo frammento di DNA a quello già esistente. Le estremità sono infine saldate da una DNA-ligasi. I frammenti che sono via via sintetizzati per formare il filamento "copia" prendono il nome di frammenti di Okazaki, dal nome dello scienziato che ha scoperto questo meccanismo. La replicazione termina in corrispondenza di "ter C" (sito di terminazione) dove le forche si incontrano in corrispondenza di due sequenze di 23 bp. L'intero processo dura circa 40' e, osservandone le fasi al ME, è possibile distinguere una struttura a "occhio" seguita da una struttura a "Theta" (θ).

RIPRODUZIONE

SCHIZOGONIA

I batteri si replicano in modo asessuato (schizogonia) e il meccanismo più frequente è quello della scissione binaria. Qualunque sia la sua forma, la cellula batterica si allunga fino a raggiungere una dimensione longitudinale pari a circa il doppio di quella iniziale e inizia poi a dividersi in due cellule figlie, grazie alla formazione di un setto trasversale. Il setto deriva dall'introflessione di membrana e parete che si accrescono verso l'interno in corrispondenza del "sito del setto". La posizione del piano di divisione è determinata dall'azione delle proteine Fts (Filamentous Temperature Sensitive) che porta alla formazione di un anello di unità FtsZ intorno alla cellula, nel punto in cui si formerà il setto. La replicazione del nucleotide avviene prima che si formi il setto di divisione, e i cromosomi si dividono nelle cellule figlie trascinati dall'accrescimento della membrana, cui sono attaccati.

Al termine della replicazione del cromosoma i cromosomi si separano e si dispongono alle estremità della cellula, che si prepara alla divisione. Il processo, che va sotto il nome di segregazione del nucleotide, è guidato dalle proteine MuK F, B, E, codificate dai corrispondenti geni, raggruppati nell'operone MukFEB. Mutanti in cui mukB sia stato disattivato non sono in grado di eseguire correttamente la segregazione dei nucleoidi e danno origine a cellule prive di cromosoma.



Ciclo cellulare (*E. coli*)

- 1-2) La cellula si allunga, il cromosoma si duplica
- 3) i nucleoidi si separano
- 4) FtsZ polimerizza a partire formando lo Z-ring
- 5-7) Lo Z-ring si stringe progressivamente strozzando la membrana e invaginandola
- 8) si forma il setto per apposizione di parete dalle due parti
- 9) le cellule figlie si separano

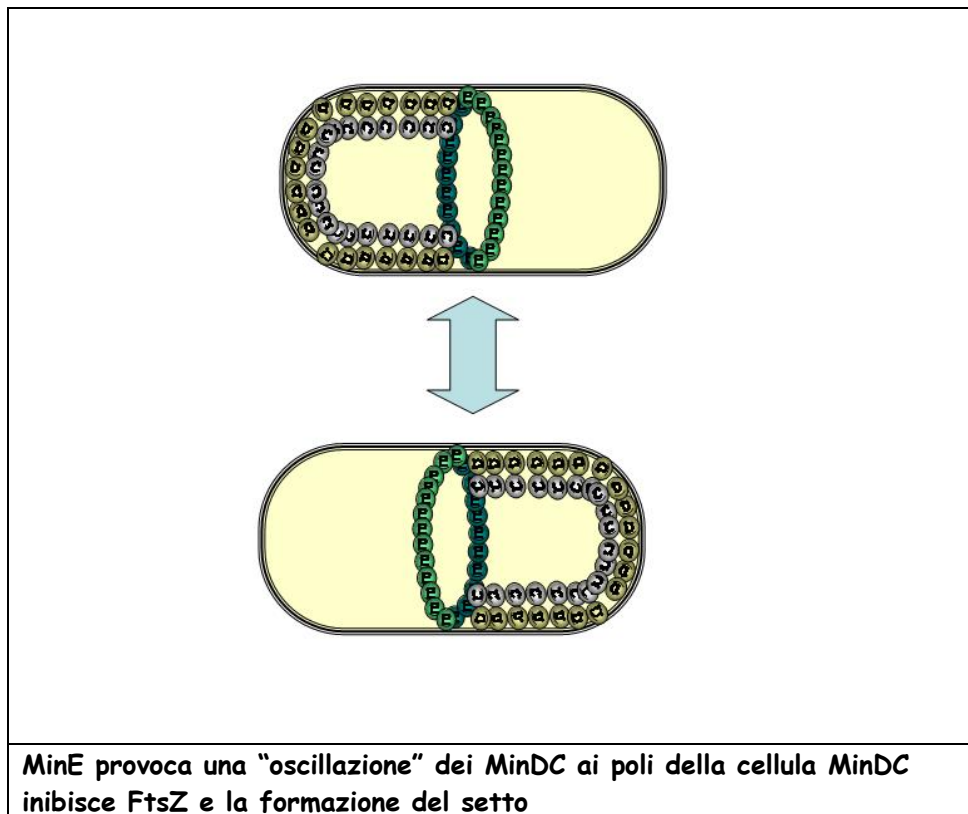
Nel ciclo cellulare di *E. coli* si possono distinguere: una fase di interiniziazione (di durata variabile) una fase di duplicazione del cromosoma (circa 40') e una fase di divisione (tra la fine della replicazione e il completamento della separazione delle cellule figlie) che dura circa 20'. La divisione si verifica solo se ha prima avuto luogo la duplicazione del cromosoma: antibiotici che bloccano la duplicazione impediscono l'accrescimento della coltura. Nelle fasi di crescita attiva di una coltura, la velocità di divisione delle cellule può essere inferiore ai 40 minuti necessari per la duplicazione del cromosoma: diverse repliche, infatti, si avviano in sequenza rapida e il cromosoma che entra in una cellula figlia ha già intrapreso una nuova duplicazione.

La divisione di una cellula comporta la formazione di un setto, che avviene quando la distanza tra il centro dei due nucleoidi è pari a una "lunghezza cellulare". La forma della cellula batterica si mantiene anche nel corso della divisione: la cellula si allunga; il cromosoma si

duplica, restando attaccato alla membrana, poi i nucleoidi si separano, la proteina FtsZ forma un anello (Z-ring) nello spazio tra i nucleoidi, e recluta altre proteine che partecipano alla formazione del setto.

La formazione dello Z-ring è dovuta alle capacità di polimerizzazione della proteina FtsZ. La sintesi parte da un "sito del setto a livello della membrana citoplasmatica e prosegue nelle due direzioni, a formare l'anello, che si stringe progressivamente forzando la membrana citoplasmatica verso l'interno; poi il setto si completa, si formano due pareti distinte e le cellule figlie si separano. La divisione avviene sempre e solo dopo la duplicazione del DNA (un blocco nella sintesi del DNA non sarà seguito dalla divisione).

Nei batteri di forma bastoncellare, il setto si localizza esattamente al centro della cellula; il posizionamento corretto del setto è dovuto alla concomitante azione svolta dal nucleotide che



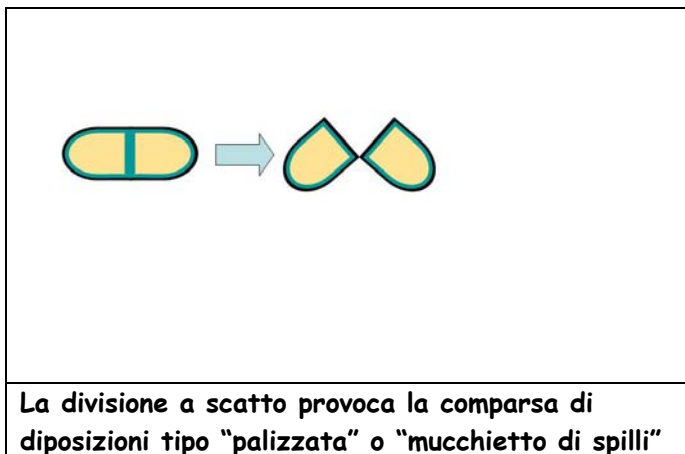
con la sua presenza inibisce la formazione del setto (occlusione del nucleotide) e all'azione delle proteine MinC; MinD e MinE. L'effetto dell'occlusione del nucleotide impedisce che il setto si formi nelle zone in cui il DNA del nucleotide è addensato. Durante la divisione della cellula,

la segregazione dei nucleoidi lascia una zona in cui il DNA è rarefatto, in posizione centrale. Anche alle estremità, tuttavia il nucleotide è assente e il setto sarebbe libero di formarsi, dando luogo a cellule figlie prive di nucleotide.

La funzione delle proteine Min (DCE) è quella di impedire che il setto si formi alle estremità della cellula, permettendone la sintesi solo al centro della cellula. MinC agisce come inibitore nei confronti di FtsZ e le impedisce di polimerizzare e di reclutare le altre proteine coinvolte

nella formazione del setto; per poter svolgere questa funzione, però, deve essere attivata da MinD, con cui forma un complesso. La funzione di MinE è quella di garantire una presenza "statistica" dei complessi attivi MinCD ai poli della cellula, attraverso un meccanismo di "oscillazione". I complessi MinCD polimerizzano da una estremità della cellula, fino a raggiungere MinE che forma un cerchio in posizione centrale. Il contatto con MinE provoca la depolimerizzazione dei complessi che, liberati nel citoplasma, vanno a localizzarsi all'altro capo della cellula e iniziano nuovamente a polimerizzare, fino a raggiungere MinE e ricominciare il ciclo. Questa oscillazione ha un periodo di pochi secondi e quindi, durante la divisione, il complesso MinCD è statisticamente presente ai poli, dove impedisce l'azione di FtsZ.

DIVISIONE A SCATTO



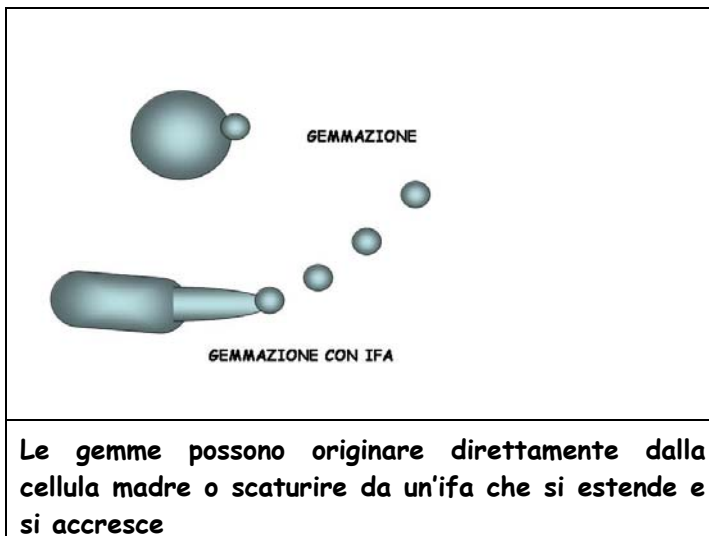
Una variante, nella divisione per schizogonia, è quella che viene definita divisione a scatto, osservata in alcuni microrganismi monodermi. In questo caso, la parete è formata da due strati sovrapposti, di cui solo il più interno è interessato dall'accrescimento che precede la divisione. La pressione provocata

dall'aumento delle dimensioni dello strato interno provoca la rottura dello strato esterno, che si apre di scatto facendo perno sul lato opposto a quello in cui si è verificata la rottura.

DIVISIONE INEGUALE

Una forma meno comune di divisione è la "gemmazione" in cui una gemma si forma e si accresce da una cellula madre. Una delle specie gemmanti più studiate è *Hyphomicrobium*: dalla cellula madre si forma una sottile escrescenza (ifa); il nucleoide si divide e una copia si trasferisce nella gemma che si ingrandisce, forma un flagello e si allontana. La cellula figlia, in seguito, perde il flagello e forma gemme a sua volta.

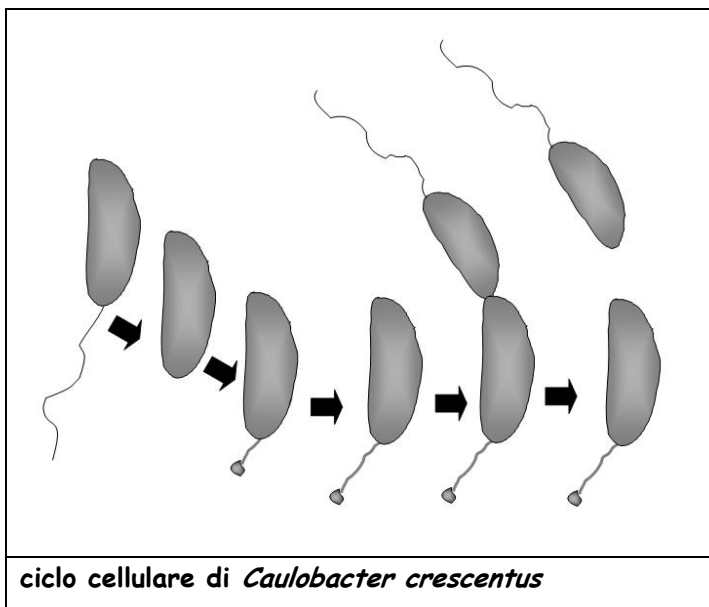
Esistono molte varianti di questo tipo di ciclo: in alcuni casi dall'ifa si forma una nuova gemma dopo il distacco della prima accresce fino a liberarsi dalla cellula madre.



Le differenze più evidenti, rispetto alla scissione binaria, sono il mantenimento dell'identità della cellula madre, le diverse dimensioni della cellula figlia e della cellula madre, e la perdita della simmetria: si tratta infatti di una divisione polare (la divisione avviene a un polo della cellula).

Nei batteri che vanno incontro a divisione

binaria, la cellula si accresce in diversi punti contemporaneamente; questa strategia di divisione si concilia male con la possibilità di stabilire e mantenere strutture più complesse. La divisione polare, che vede l'accrescimento e la divisione concentrati ad un solo polo della cellula, permette invece di mantenere eventuali strutture. Un esempio di questo è *Nitrobacter* in cui le lamelle di invaginazioni della membrana sono assenti in corrispondenza del polo della cellula da cui si origina la gemma.



La maggior parte dei batteri dotati di prosteca o di peduncolo ha un ciclo cellulare complesso in cui forme flagellate e forme prostecate si alternano, attraverso una divisione binaria ineguale (es. *Caulobacter crescentus*) in cui la cellula si allunga e forma un flagello al polo opposto al peduncolo. La cellula flagellata (sciamante) si allontana e inizia un nuovo

ciclo, perdendo il flagello e attaccandosi a una superficie con la prosteca che si origina dallo stesso polo in cui si trovava precedentemente il flagello. Nella cellula prostecata come in quella sciamante, è evidente la presenza di un differenziamento polare; la struttura della cellula madre, durante il ciclo cellulare, è diversa da quella della cellula figlia.

TRASCRIZIONE DEL DNA

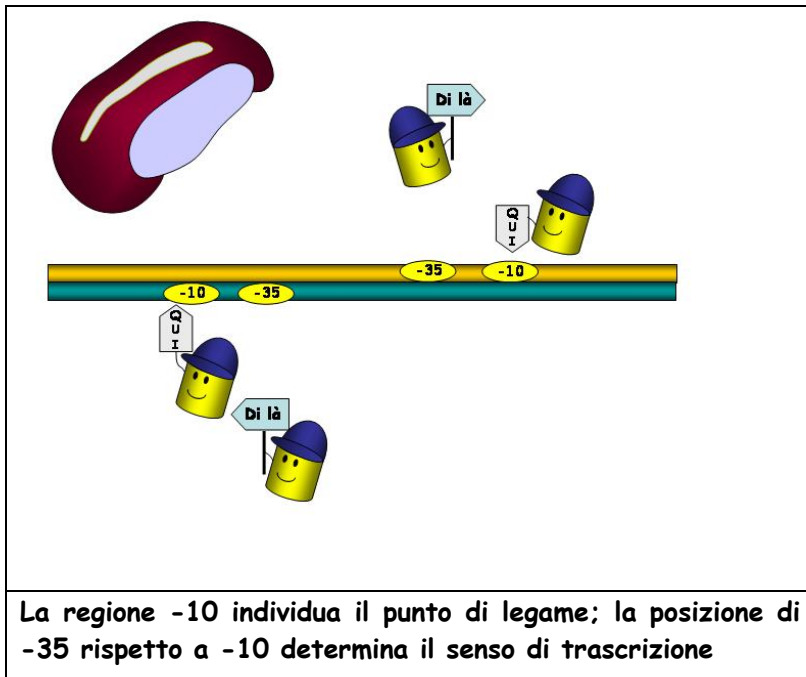
Nel corso della duplicazione del cromosoma e della replicazione della cellula batterica, l'informazione genetica è copiata (DNA→DNA) per essere conservata e perpetuata ma in ogni istante della vita della cellula l'informazione genetica deve poter essere usata: questo è il compito della trascrizione dei geni (DNA→RNA) e della traduzione del mRNA (RNA→proteine). Oltre all'RNA messaggero, nella cellula batterica sono presenti altri tipi di RNA, che partecipano alla traduzione del messaggero: i tRNA e gli RNA ribosomiali (rRNA, piccoli RNA).

I tipi di RNA sono presenti in una cellula procariotica sono gli stessi che si osservano in una cellula eucariotica: tRNA, rRNA, mRNA. Il ribosoma procariotico è leggermente diverso da quello eucariotico, ma svolge le stesse funzioni. La mancanza di una membrana nucleare permette che il mRNA sia immediatamente disponibile per l'attacco al ribosoma, in modo che la traduzione inizia immediatamente, durante la trascrizione, man mano che il messaggero viene sintetizzato dalla RNA-polimerasi.

Le RNA polimerasi batteriche sono complessi enzimatici formati da cinque subunità (2 subunità α , una β β' e una subunità " σ ") che formano l'oloenzima; quando il complesso è privo della subunità sigma si definisce nucleoenzima. La subunità sigma non partecipa alla trascrizione del DNA propriamente detta (la sintesi del messaggero) ma ricopre un ruolo essenziale nell'iniziare il processo di trascrizione: è deputata, infatti al riconoscimento del "promotore": una particolare sequenza che segnala l'inizio del gene o del gruppo di geni che devono essere trascritti. la regione "-10" (Pribnow box) situata circa 10 basi a monte dell'inizio della trascrizione, guida l'oloenzima, identificando il sito di legame.

La RNA-polimerasi si lega alla doppia elica di DNA in corrispondenza del promotore, formando quello che viene definito un complesso "chiuso", apre la doppia elica, separandone i filamenti e inizia il processo di trascrizione. Dopo che 5-6 basi sono state trascritte, la subunità sigma si stacca e il processo di elongazione è portato avanti dall'oloenzima.

La direzione in cui procedere (il filamento su cui si trova il gene da trascrivere) è determinata dalle posizioni relative della regione -10 e di una seconda regione (-35) situata a monte di essa.



La sequenza delle regioni -10 e -35 è molto conservata, anche se ammette una certa variabilità: la sequenza "ottimale" per la maggior parte dei promotori, è **TATAAT** per la Pribnow box e **TTGACA** per la regione -35.

Questi motivi sono state individuati confrontando tra loro il maggior numero possibile di sequenze e stabilendo il

"consensus" (i nucleotidi più rappresentati per ogni posizione) ; all'interno dei consensus esiste una certa variabilità, che si indica con un numero che esprime la frequenza percentuale con cui un nucleotide è presente in una determinata posizione.

Esaminando i consensus per le due regioni ($-35 = T_{82}T_{84}G_{78}A_{65}C_{54}A_{45} / -10 = T_{80}A_{95}T_{45}A_{60}A_{50}T_{96}$) si può notare, per esempio, come le prime due T della regione -35 siano più conservate (sono presenti, rispettivamente, in 82 e 84 casi su 100 mentre le ultime due posizioni sono caratterizzate da una maggiore variabilità. La maggiore o minore coerenza delle sequenze con il consensus, determina la forza del promotore, cioè l'efficienza con cui questo riesce a farsi riconoscere e a legare la RNA-polimerasi. Quanto maggiore è la coerenza al consensus, tanto più frequente sarà l'associazione con l'oloenzima e di conseguenza la trascrizione e l'espressione del gene: la maggiore o minore forza di un promotore, quindi, è il primo parametro che influenza la quantità di messaggero che può essere ottenuta per un determinato gene.

Al passaggio della RNA polimerasi le eliche di DNA si svolgono (complesso "aperto") per tornare a riassociarsi immediatamente dopo.

Il messaggero può essere monocistronico (un solo gene) ma spesso, nei batteri, è policistronico e più di un gene viene trascritto nel medesimo messaggero. Questo permette di sintetizzare simultaneamente, per esempio, gli enzimi che appartengono a una particolare via biosintetica o metabolica, assicurandone la presenza contemporanea, in risposta al medesimo

ripetute si appaiano tra loro dando luogo a una "forcina" (struttura ansa-stelo) seguita dai residui uridinici. Questa struttura si chiama "terminatore" e causa il distacco della RNA-polimerasi. In entrambi i casi, il nucleoenzima che si libera può associarsi a una subunità sigma presente nel citoplasma e iniziare un altro processo di trascrizione.

CONTROLLO DELL'ESPRESSIONE GENICA NEI PROCARIOTI

Non tutte le proteine sono necessarie, in una cellula, nelle stesse quantità o nello stesso momento: accanto a proteine "house-keeping" molto espresse, si trovano enzimi deputati a reazioni particolari, che sono espressi solo saltuariamente, quando la loro azione si rende necessaria. La qualità e la quantità relativa delle proteine presenti è determinata dalla modulazione dell'espressione dei geni che le codificano, ottenuta attraverso diverse strategie di controllo dell'espressione genica.

REGOLAZIONE ATTRAVERSO IL CONTROLLO DELLA TRASCRIZIONE

Proteine regolatrici (che legano il DNA)	
Attivatore 	Repressore 
quando lega al sito di legame dell'attivatore, la trascrizione avviene	quando si lega all'operatore la trascrizione non avviene

E' la strategia di controllo più efficace dal punto di vista energetico: variare la quantità di mRNA disponibile per la traduzione, infatti,

permette di risparmiare l'energia necessaria a sintetizzare nucleotidi e proteine quando essi non siano realmente necessari. In questo modo una cellula batterica può adattarsi rapidamente a differenti condizioni ambientali. Il controllo della trascrizione può avvenire secondo due strategie principali: il controllo negativo e il controllo positivo; in molti casi tuttavia le due strategie possono essere combinate per aumentare l'efficacia della regolazione stessa. Nel controllo negativo come in quello positivo intervengono proteine in grado di legarsi a siti specifici sul cromosoma, e piccole molecole (segnali) che si definiscono effettori e che possono indurre la trascrizione con la loro presenza (bloccando un repressore o attivando un attivatore) , oppure bloccarla attivando un repressore.

CONTROLLO NEGATIVO: una proteina regolatrice (repressore) si lega a un sito specifico (operatore) sul DNA. L'operatore è usualmente collocato tra il promotore e l'inizio del gene e il repressore, legandosi, maschera spesso la regione -10.

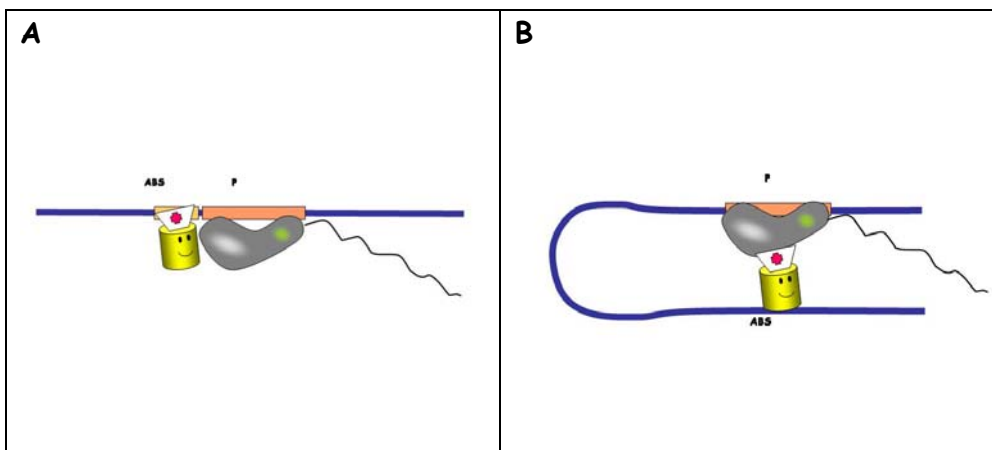
Uno degli esempi più conosciuti di regolazione negativa è quello dell' Operone "lac" (utilizzo del lattosio). L'operone è costituito da tre geni metabolici (lacZ, lacY e lacA) che codificano, rispettivamente, la β -galattosidasi, la permeasi e la transacetilasi. Il regolatore è il prodotto di *lacI*; si lega all'operatore e impedisce il legame della RNA polimerasi. Perché la trascrizione possa avvenire, è necessario che sia indotta: una molecola (induttore) si lega al repressore e ne impedisce il legame all'operatore o, nel caso sia già legato, ne causa il distacco. Come avviene in genere per gli operoni e i geni deputati all'utilizzazione di nutrienti, l'induttore è rappresentato dal substrato della via metabolica (a presenza degli enzimi metabolici è necessaria quando c'è il composto da metabolizzare) e quindi è il lattosio. Anche piccole molecole affini al lattosio ma che non vengono metabolizzate da questa via, possono indurre la trascrizione: sono definite induttori gratuiti (es. IPTG - IsoPropil- β -TioGalattoside). Il repressore ha due siti di legame, uno per l'operatore e uno per l'induttore: il legame dell'induttore modifica il sito destinato a legare l'operatore. Il repressore non può legarsi e la trascrizione si avvia. Modificazioni (mutazioni) nel repressore o nell'operatore possono comportare un'espressione costitutiva o una super-repressione. Se l'operatore si modifica in modo che il repressore non si possa legare, o se il repressore perde la capacità di legarlo (I^c) la trascrizione avverrà comunque, anche in assenza di induttore (costitutiva); se invece il repressore subisce modificazioni che interferiscono con la sua capacità di legare l'induttore, la trascrizione non potrà avvenire in alcun caso (super repressione). La regolazione negativa, che prevede che la trascrizione sia bloccata finché il substrato non sia disponibile e possa fungere da induttore, è comune a molti altri gruppi di geni metabolici. Altre vie, in particolare quelle biosintetiche, sono sottoposte ugualmente a controllo negativo, ma con un modello differente: la maggiore o minore necessità di una biosintesi, infatti, non è determinata dalla disponibilità di un substrato ma dalla quantità di prodotto che è già stato ottenuto. La trascrizione quindi deve essere possibile, a meno che un eccesso di prodotto non renda conveniente bloccarla: la molecola effettrice è quindi il prodotto della reazione, che si definisce "co-repressore" perché la sua presenza non induce la reazione, ma permette al repressore di impedirla.

Un modello di questa strategia è quello che si osserva in molte vie biosintetiche di aminoacidi (triptofano, arginina). Il repressore della via biosintetica, da solo, non è in grado di legarsi all'operatore ma, quando l'aminoacido è disponibile nella cellula (e quindi non è necessario

sintetizzarne ancora) repressore e aminoacido si legano e il repressore cambia conformazione e acquisisce la capacità di legarsi all'operatore e di bloccare la trascrizione.

CONTROLLO POSITIVO:

A differenza di quanto accade nel controllo negativo, in cui la proteina di regolazione ha la funzione di limitare trascrizione, nel controllo positivo la proteina regolatrice favorisce la trascrizione e si definisce quindi "attivatore". Anche un attivatore si lega al DNA, in corrispondenza di un sito specifico, che si definisce "sito di legame dell'attivatore" per distinguerlo dall'operatore (sito di legame di un repressore e tipico della regolazione negativa). Un attivatore, per svolgere la sua funzione, deve però legarsi a una piccola molecola effettrice, che rappresenta il segnale ambientale della necessità che quella particolare trascrizione abbia luogo. Un sistema controllato positivamente è il regulone del maltosio (regulone: insieme di geni e/o di operoni localizzati in punti differenti del cromosoma ma implicati in una stessa via metabolica e regolati simultaneamente dallo stesso sistema di controllo) in cui l'attivatore (MalT) si lega al maltosio, si attiva e si lega al "sito di legame per l'attivatore" (maltosio box) permettendo alla RNA-polimerasi di legarsi a sua volta. Una caratteristica dei sistemi regolati in modo positivo è la scarsa riconoscibilità del promotore, in cui la regione -35 si discosta, anche notevolmente, dalle sequenze "consensus".



Il legame dell'attivatore modifica la struttura del DNA, facilitandone il riconoscimento e stabilizzando la RNA-polimerasi; è

anche possibile che l'attivatore faciliti la separazione delle emi-eliche all'inizio della trascrizione. Il sito di legame dell'attivatore può essere vicino al promotore (A) ma può anche essere localizzato molto lontano: in questi casi si suppone che si formi un'ansa (B).

CONTROLLO GLOBALE

Anche sistemi regolati da un controllo specifico possono cadere sotto controlli "superiori" che agiscono in modo "globale" in risposta a stimoli ambientali di varia natura. Geni o gruppi di geni

soggetti alla stessa regolazione globale ma appartenenti a vie metaboliche differenti sono definiti "moduloni" . In qualche caso si dicono "stimuloni" i gruppi di geni attivati dal medesimo stimolo ambientale.

REPRESSIONE DA CATABOLITA

Molti geni e operoni controllati, positivamente o negativamente, in modo specifico, possono essere attivati simultaneamente da un altro sistema: nella repressione da catabolita (detta anche effetto glucosio) molti sistemi non correlati, deputati allo svolgimento di attività cataboliche e regolati anche da un proprio sistema specifico, sono repressi in presenza di glucosio. Il glucosio, infatti, è una fonte di energia ottimale e gli enzimi necessari per la sua utilizzazione sono sempre disponibili nella cellula (sono costitutivi). Oltre al glucosio altre sostanze possono innescare la repressione da catabolita, che permette ai microrganismi di utilizzare inizialmente la miglior fonte di carbonio, finché questa è disponibile.

La repressione da catabolita è mediata da un attivatore e da una molecola effettrice: è quindi una regolazione positiva. Uno degli operoni soggetti a questo controllo è "lac" (regolato anche negativamente da LacI). L'attivatore è la proteina "CAP" (detta anche CRP: recettrice dell'AMP-ciclico) e la molecola effettrice è il cAMP (AMP ciclico), sintetizzato dall'enzima adenil-ciclasi. Quando il glucosio entra nella cellula, inibisce la sintesi di cAMP e ne induce la fuoriscita dalla cellula; di conseguenza il livello di cAMP nella cellula scende, CRP non è più attivata da cAMP e non può a sua volta legarsi al promotore e renderlo riconoscibile dalla RNA polimerasi. Quando il glucosio manca, il livello di cAMP cresce e CRP si attiva: la trascrizione diventa possibile ma parte effettivamente in modo efficace solo se è presente lattosio a fare da induttore impedendo il legame di LacI.

Quando la fonte migliore viene a mancare, la repressione da catabolita cessa e gli operoni catabolici restano dipendenti solo dalla propria regolazione: la qualità delle fonti alternative disponibili determinerà quali trascrizioni vadano iniziate. (Es: finché è presente glucosio, lattosio e arabinosio non saranno utilizzati dalla cellula. Nel momento in cui il glucosio viene a mancare, inizierà la trascrizione di "lac" se sarà presente lattosio; di "ara" se sarà presente arabinosio; di entrambi se entrambi gli zuccheri saranno presenti, e di nessuno dei due se lattosio e arabinosio non saranno disponibili).

CONTROLLO IN ASSENZA DI PROTEINE CHE LEGANO IL DNA

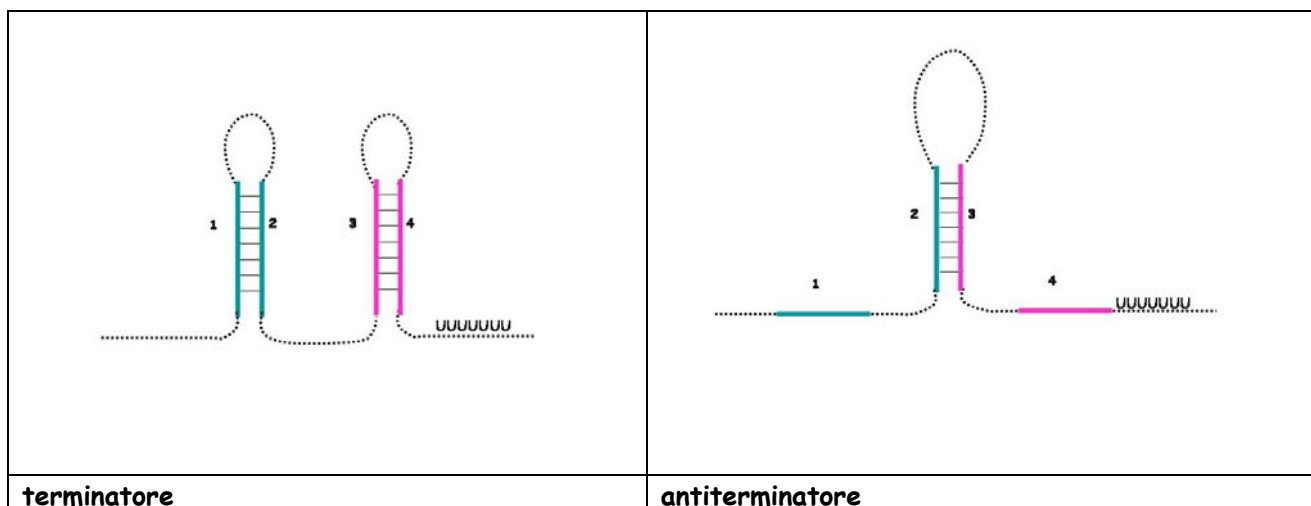
In alcuni casi il controllo della trascrizione non dipende da proteine capaci di legare il DNA, ma si attua con strategie differenti. Un esempio di questo è il controllo per

ATTENUAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

Questo meccanismo è reso possibile dalla contemporaneità dei processi di trascrizione e traduzione nei procarioti: il ribosoma si attacca alla sequenza di riconoscimento (Shine Dalgarno-RBS) presente sul messaggero, e inizia a tradurlo man mano che la RNA-polimerasi lo sintetizza. Uno degli esempi più noti di attenuazione della trascrizione è quello dell'operone in cui si trovano i geni che codificano gli enzimi deputati alla biosintesi del triptofano. L'operone trp è già regolato negativamente (repressore TrpR- corepressore triptofano) ma la regolazione globale per attenuazione della trascrizione moltiplica l'effetto della repressione (circa 70 volte) per ulteriori 8-10 volte. In questo modo l'effetto congiunto dei due sistemi di regolazione garantisce una diminuzione della biosintesi di circa 600 volte.

All'inizio dell'operone trp è presente una sequenza che codifica un piccolo peptide (leader) di circa 14 aminoacidi. In questa sequenza sono presenti due codoni trp, consecutivi.

L'attenuazione dipende dalla presenza di sequenze nucleotidiche complementari sul messaggero, che possono appaiarsi in modi differenti a seconda del comportamento del ribosoma. Se il triptofano è abbondante, la traduzione del peptide leader potrà procedere senza problemi fino al codone di stop. Il ribosoma, in questo caso, si troverà ad essere situato su parte della seconda delle sequenze nucleotidiche complementari, impedendole di appaiarsi a formare una struttura ansa-stelo con la terza sequenza che è quindi libera di appaiarsi con la quarta, seguita da una serie di uracili.



La presenza di una struttura ansa-stelo provoca un rallentamento della trascrizione; se la struttura è seguita da un tratto ricco di uracili, rappresenta un segnale di terminazione e la RNA-polimerasi si staccherà, interrompendo precocemente la sintesi del messaggero.

In assenza di triptofano, invece, i t-RNA non potranno legare l'aminoacido giusto e la traduzione dovrà fermarsi in corrispondenza dei codoni trp consecutivi. Il ribosoma si fermerà precocemente, lasciando libera la sequenza "2" di appaiarsi a formare una struttura ansa-stelo con la "3"; questa struttura tuttavia non è un terminatore (antiterminatore) perché non è immediatamente seguita da un tratto ricco in uracile: la RNA-polimerasi quindi proseguirà la sintesi del messaggero, permettendo l'espressione dei geni per la biosintesi del triptofano. Sistemi analoghi regolano anche la biosintesi di altri aminoacidi (es. Treonina, Leucina, Istidina), affiancando la regolazione specifica dei singoli operoni.

ATTENUAZIONE TRADUZIONALE

In alcuni casi l'attenuazione non riguarda la trascrizione, ma piuttosto la traduzione del messaggero. Un esempio può essere quello della regolazione di *ermC* (Eritromicina rRNA Metilasi) il cui prodotto conferisce resistenza agli antibiotici macrolidi. Il mRNA può assumere due conformazioni diverse e, nella regione leader, sono presenti due sequenze di legame al ribosoma. La prima (SD1) è normalmente accessibile e permette la traduzione di un piccolo peptide; la seconda (SD2, necessaria per la traduzione di *ermC*) è resa inaccessibile dall'appaiamento delle basi del messaggero, che ne provocano il ripiegamento. In presenza di Eritromicina, che agisce da induttore, la traduzione del peptide si blocca, il ribosoma entra in stallo e altera la conformazione del mRNA esponendo SD2. In questo modo la traduzione di *ermC* si rende possibile, e viene prodotta la rRNA metilasi che protegge il ribosoma dall'azione dell'antibiotico, rendendo il ceppo resistente.

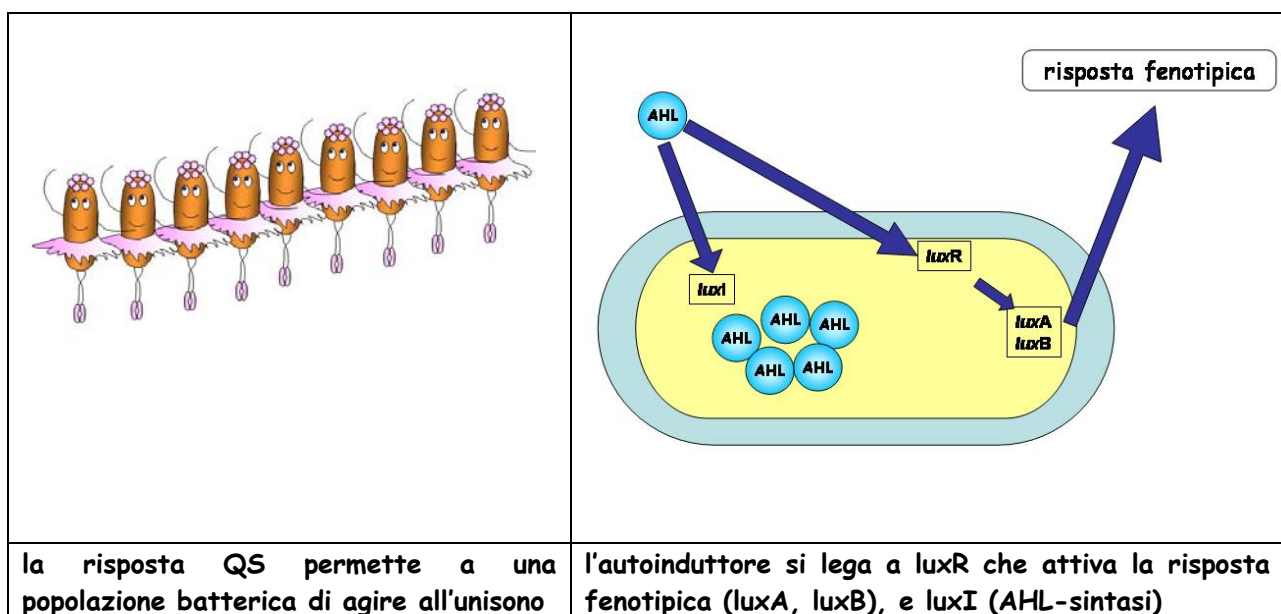
FATTORI SIGMA ALTERNATIVI

La maggior parte dei promotori in *Escherichia coli* è riconosciuta da una unità sigma che si chiama $\sigma 70$ (massa di 70 kDa), questi promotori hanno una regione -35 e una regione -10 coerenti con i consensus descritti (pag. 55). Esistono però promotori diversi, che sono riconosciuti da subunità sigma differenti, e che sono tipici di geni destinati a essere espressi in condizioni particolari. La subunità $\sigma 55$, per esempio, riconosce i geni che sono necessari in condizioni di carenza di azoto; la $\sigma 38$ quelli che si rendono necessari per fronteggiare uno stress ossidativo; $\sigma 32$ riconosce i geni necessari per rispondere allo shock termico. La

regolazione è affidata alla quantità relativa di subunità sigma, di un tipo o dell'altro, che sono disponibili nella cellula. La quantità delle subunità sigma non è sempre determinata dalla trascrizione, ma può essere dovuta alla stabilità intrinseca della subunità stessa.

REGOLAZIONE DA DENSITÀ

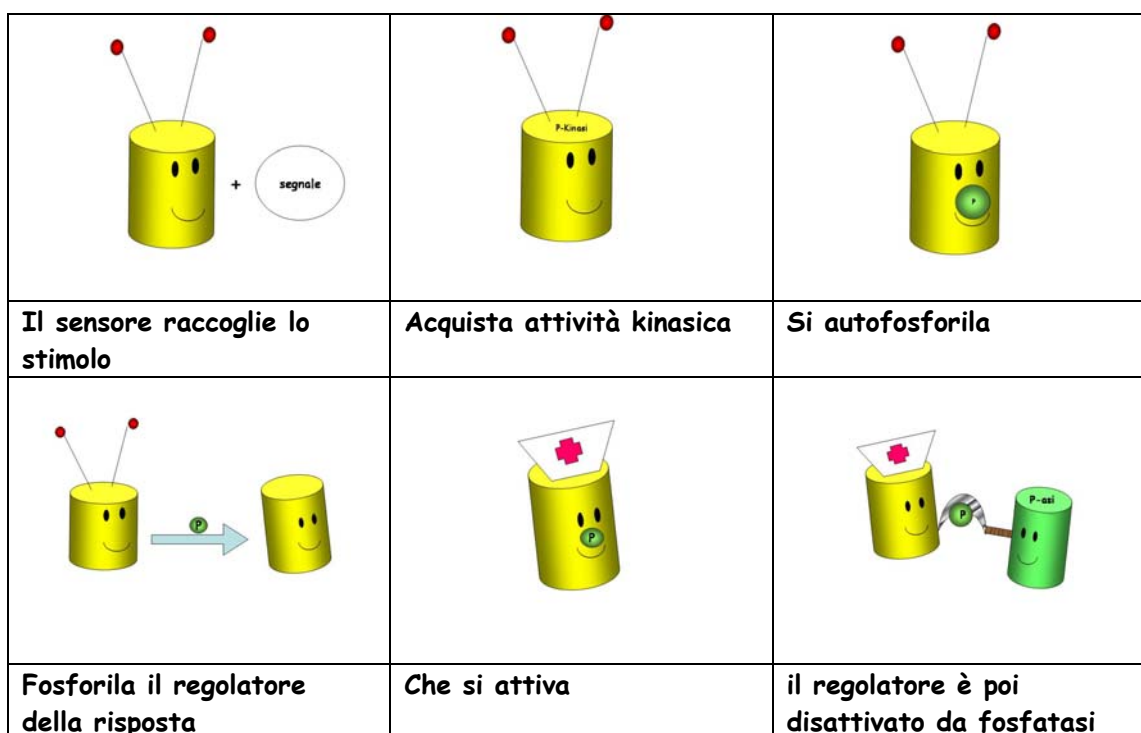
Nella risposta "Quorum Sensing", le cellule batteriche segnalano la loro presenza secernendo una sostanza chimica, in genere un N-acil-omoserina-lattone (AHL), che scatena una risposta nel momento in cui raggiunge una soglia, interpretata come segnale di "affollamento". Le molecole segnale si comportano da effettori e si legano a *luxR* (un attivatore trascrizionale) che regola la risposta fenotipica (*luxA*,*luxB*) ma regola anche *luxI*, il gene responsabile della sintesi dell'induttore stesso. Quando la densità batterica è bassa, l'operon è trascritto con



bassa efficienza, ma quando la densità e la concentrazione degli AHL aumentano, aumenta anche la risposta e la produzione di autoinduttore. L'uscita dalla risposta è dovuta alla limitata stabilità degli AHL. Nella maggior parte dei casi la risposta è dovuta al riconoscimento dei propri mediatori (quindi all'affollamento di individui della stessa specie o di specie che impieghino il medesimo mediatore). In alcuni casi, tuttavia, la risposta è specifica per mediatori secreti da altre specie; ne è un esempio la produzione di antibatterici da parte di alcuni batteri marini, che avviene solo in risposta alla presenza massiccia di altri microrganismi, probabilmente "concorrenti" per gli stessi nutrienti.

TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Il segnale rappresentato da una variazione delle condizioni ambientali può giungere direttamente alla proteina regolatrice (induttori nelle regolazioni positive e negative, co-repressori), ma spesso deve essere trasmesso da proteine sensore, situate all'esterno della cellula, che raccolgono il segnale, a proteine effettrici che direttamente o indirettamente, inducono (o reprimono) i geni che possono dare la risposta adatta al segnale ricevuto. A questo tipo di risposta ci si riferisce con il termine "sistemi a due componenti" nonostante non tutti questi sistemi siano formati da due soli componenti, o con il termine sistemi sensore-effettore. Nella forma più semplice, la proteina sensore, dotata di un'attività chinastica latente, è situata nella membrana citoplasmatica, con un dominio esterno, che raccoglie il segnale, e un dominio citoplasmatico che interagisce con la proteina effettore che regola la risposta. Quando il sensore riceve lo stimolo ambientale, cambia conformazione e si manifesta l'attività chinastica, che determina la fosforilazione di un residuo di istidina sul sensore stesso (autofosforilazione); il gruppo fosfato viene poi trasferito dal sensore al regolatore della risposta che passa alla forma attiva, fosforilata, e acquisisce la capacità di legarsi al DNA e attivare la trascrizione dei geni deputati alla risposta specifica. Il regolatore fosforilato (attivo) è poi costantemente disattivato da fosfatasi, perché la risposta possa sempre essere modulata.



REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA

La risposta di regolazione può anche non essere a livello genico, ma piuttosto agire su una proteina. E' il caso della inibizione da feed-back, in cui il prodotto finale di una via biosintetica, accumulandosi, interagisce con uno degli enzimi della via stessa, legandosi ad esso e modificandone la conformazione in modo da inattivarlo.