

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI INGEGNERIA
Corso di Laurea in Ingegneria dell'Informazione

**REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE
DEGLI ORGANISMI UNICELLULARI
MODULATA IN FREQUENZA**

Tesi di laurea triennale

Relatore:
Barbara Di Camillo

Laureando:
Eleonora Gnocco

Sessione
Anno Accademico 2012/2013

Indice

1	INTRODUZIONE	5
1.1	Cenni sul signaling e sulla trascrizione genetica	5
1.2	Tre sistemi biologici a confronto	6
2	Rinvio della differenziazione in <i>Bacillus subtilis</i>	9
2.1	Impulsi di attività di Spo0A regolano la sporulazione	9
2.1.1	La sporulazione	9
2.1.2	Sopravvivenza della popolazione cellulare	10
2.1.3	Ipotesi sul rinvio della sporulazione	10
2.1.4	Il circuito genetico	11
2.2	Implementazione in Matlab del modello della sporulazione	12
2.2.1	Le equazioni del modello	12
2.2.2	Grafici con gli andamenti delle componenti di sistema	14
2.3	Vantaggi della modulazione in frequenza in <i>B. subtilis</i>	15
3	Risposta allo stress nei batteri regolata da impulsi	19
3.1	Ciclo impulsi attivato da fluttuazioni rumorose	19
3.1.1	Fluttuazioni rumorose attivano il ciclo	19
3.1.2	Feedback positivo e negativo	20
3.2	Modello del ciclo pulsato di σ_B	21
4	Impulsi di localizzazione nucleare regolano i geni	23
4.1	Reazione del lievito al calcio extracellulare	23
4.2	Compito essenziale della modulazione in frequenza in <i>S. cerevisiae</i>	25
4.3	Funzione di controllo necessaria alla sopravvivenza in <i>B. subtilis</i>	27
4.4	Regolazione contemporanea di più siti promotori	28

Capitolo 1

INTRODUZIONE

I molteplici sistemi cellulari utilizzano diversi approcci per regolare la trascrizione degli organismi unicellulari. Il modo probabilmente più intuitivo per rispondere a segnali provenienti dall'ambiente esterno è quello di utilizzare una risposta in ampiezza, ovvero quella secondo cui incrementando un fattore di stress esterno potrebbe esser ad esempio incrementata la concentrazione di una determinata sostanza per ottenere una risposta tempestiva. Vedremo che in realtà esiste un altro tipo di risposta che in alcuni casi si rivela più strategica e conveniente, stiamo parlando della risposta modulata in frequenza.

1.1 Cenni sul signaling e sulla trascrizione genetica

Vengono analizzate brevemente in questo paragrafo cenni sulla segnalazione cellulare e le fasi della trascrizione poiché saranno oggetto di studio per tre diversi sistemi biologici.

Tutte le cellule si servono di un certo numero di segnali provenienti dall'esterno o da altre cellule utili ad esempio la sopravvivenza, per la differenziazione o divisione cellulare. Il meccanismo che svolge questo compito è detto signaling. In questo processo sono coinvolte cellule extracellulari detti ligandi che portano il segnale da cellula a cellula; esse si legano a dei recettori i quali trasferiscono l'informazione attraverso la membrana plasmatica verso cellule bersaglio, le quali azionano la risposta finale ovvero la trascrizione genica in risposta ad un determinato tipo di segnalazione.

La trascrizione è un processo secondo cui viene trascritta una porzione dell'informazione genetica presente nel DNA grazie alla sintesi dell'RNA. La trascrizione ha inizio da un sito detto promotore, ovvero una sequenza di DNA riconosciuta da un gruppo di proteine (fattori di trascrizione), che

risulta vicino al gene da trascrivere. L'RNA polimerasi si attacca al DNA ed inizia, con l'aiuto dei fattori di trascrizione, a dividerne l'elica dando inizio alla fase di elongazione: inizia la sintesi di RNA secondo cui ciascun nucleotide complementare si attacca alla catena di DNA e man mano che essa si forma si stacca da esso (figura 1.1).

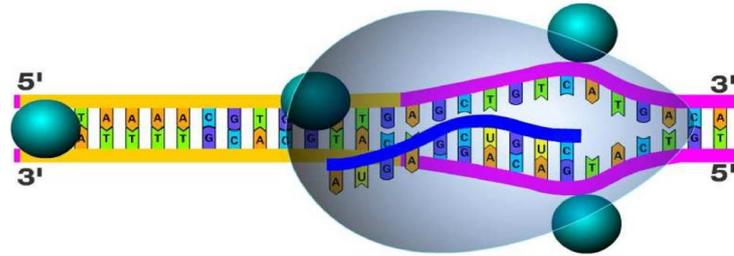


Figura 1.1: formazione di RNA durante la trascrizione

Questa fase termina quando gli enzimi trovano una sequenza in codice e l'RNA può finalmente staccarsi dall'elica; a questo punto dopo una serie di trasformazioni utili affinché la sequenza non venga degradata e la sua funzione venga riconosciuta dalla cellula, l'RNA può lasciare il nucleo ed esser trasportato nel citoplasma dove può realizzare la sua funzione, ad esempio esser tradotto in proteina.

L'RNA può avere molteplici ruoli ma ciò che qui ci interessa è quello dell'espressione genico proteica che permette alla cellula di controllare le proprie funzioni interne ed esterne.

1.2 Tre sistemi biologici a confronto

In questa tesi vengono analizzati tre diversi tipi di fenomeni biologici. Nel primo caso analizzeremo come un batterio rinvia la differenziazione per avere il tempo di riprodursi, nel secondo caso vedremo come lo stesso batterio risponde più in generale allo stress esterno attivando il suo fattore sigma e infine nel terzo caso esamineremo la risposta al calcio di un lievito.

In tutti e tre i casi viene analizzata la risposta cellulare causata da uno stress esterno, dovuto ad esempio alla necessità di differenziarsi, ad un pericolo di sopravvivenza o più in generale alla presenza di una determinata sostanza extracellulare. Son stati presi in considerazione questi sistemi poichè vi è un fenomeno che li accomuna: la regolazione è modulata in frequenza. In generale sarebbe più intuitivo pensare che una modulazione in ampiezza sia la scelta più semplice da realizzare per la regolazione di un organismo

unicellulare: ad esempio in risposta ad un aumento di una sostanza pericolosa per l'organismo si potrebbe ottenere un conseguente aumento dei siti di trascrizione. Ciò non avviene in questi organismi dove viene preferito un incremento della frequenza della trascrizione piuttosto che della quantità. Vengono successivamente riportate le motivazioni di questa scelta e i vantaggi che da essa ne vengono tratti.

Capitolo 2

Rinvio della differenziazione in *Bacillus subtilis*

In questa sezione viene descritto in modo in cui il batterio *Bacillus subtilis* riesce a rimandare la sporulazione dopo vari cicli cellulari attraverso un ciclo di impulsi di trascrizione dopo esser stato messo nello stato di allarme grazie al meccanismo di signaling. Verrà illustrata l'implementazione del modello delle dinamiche di sistema e spiegata la funzione vantaggiosa degli impulsi coinvolti nel ciclo.

2.1 Impulsi di attività di Spo0A regolano la sporulazione

2.1.1 La sporulazione

La sporulazione è un processo di differenziamento cellulare causato dalla presenza di condizioni ambientali inadatte alla sua sopravvivenza. Il processo consiste nella formazione di spore a partire da una cellula vegetativa madre. Le spore son molto differenti dalla loro forma vegetativa per quanto riguarda la loro conformazione, le loro attività fisiologiche e dalla loro composizione chimica. Le spore risultano molto resistenti e permettono al microrganismo di sopravvivere in condizioni svavorevoli quali la scasta presenza di nutrienti e condizioni climatiche avverse. Ciò che le caratterizza e che le rende molto adattabili è soprattutto la presenza di vari strati e membrane che le proteggono. In questo modo risultano termoresistenti, inattaccabili rispetto ad agenti chimici, resistenti ad agenti chimici, congelamento e radiazioni. Son inoltre metabolicamente inattive fino al momento in cui le condizioni esterne risultano nuovamente favorevoli e i nutrimenti sufficienti per raggiungere lo

stadio di germinazione, ovvero il ritorno allo stato vegetativo in grado di portare alla moltiplicazione cellulare.

2.1.2 Sopravvivenza della popolazione cellulare

I batteri hanno svariati modi per rispondere ai segnali extracellulari. Uno di questi, la sporulazione, è un meccanismo di difesa cellulare nel quale vengono prodotte spore molto più resistenti ad attacchi esterni, rispetto allo stadio normale di vita del batterio. Queste spore come abbiamo visto rappresentano l'unica via per la sopravvivenza dell'organismo ma impediscono la moltiplicazione cellulare. Per la sopravvivenza dell'intera popolazione sarebbe opportuno incrementare il numero di cellule già presenti per aumentare la probabilità che almeno una parte riesca a salvarsi prima di raggiungere lo stato di quiescenza. Proprio per questo in *Bacillus subtilis* prima di giungere alla sporulazione si attendono molti cicli cellulari per permettere alle cellule di moltiplicarsi. Questo ha però uno svantaggio: la cellula, attendendo parecchio tempo prima di proteggersi diventando spora, potrebbe esser attaccata e non differenziarsi in tempo. In ogni caso quest'attesa risulta favorevole alla popolazione di batteri anche se può esser un danno per la singola cellula, infatti incrementa il numero della popolazione attendendo vari cicli cellulari anche a costo di non riuscire a differenziarsi e di sopravvivere.

2.1.3 Ipotesi sul rinvio della sporulazione

Prima di comprendere e scoprire tutte le parti del circuito genetico presente nel batterio sono state fatte alcune ipotesi. Come prima possibilità si sosteneva l'esistenza di un 'meccanismo di diluizione', ovvero esaurimento di fattori di nutrizione per la cellula che procedeva con grande lentezza per far in modo che la cellula non giungesse subito alla differenziazione con conseguenti lunghi tempi d'attesa prima della sua attuazione.

In secondo luogo è stata avvalorata la tesi di un *Quorum Sensing*: un meccanismo non autonomo della cellula secondo cui dei segnali extracellulari modulano l'incremento di Spo0AP. Infine si ipotizza la presenza di un circuito interno alla cellula che regola l'intero congegno. Attraverso analisi sperimentali si verifica che l'ipotesi esatta è proprio quest'ultima. Un meccanismo di feedback positivo pulsato regola il lento accumulo di Spo0AP che ora verrà spiegato nel dettaglio.

2.1.4 Il circuito genetico

La sporulazione viene controllata da uno specifico circuito genetico e ha luogo soltanto quando viene raggiunto un livello di concentrazione critico della proteina Spo0A 'fosforilata' ($Spo0A^P$). La fosforilazione di una proteina è una reazione chimica secondo cui viene addizionato un gruppo fosfato alla stessa, questo processo viene catalizzato dagli enzimi detti chinasi. Il livello critico di $spo0A^P$ grazie al quale ha inizio la sporulazione viene raggiunto in modo graduale su una media di 5.5 cicli cellulari.

Il controllo dell'attivazione della Spo0A è affidato ad un sistema di regolazione genica che coinvolge diverse proteine: le chinasi KinA e KinB che dapprima si autofosforilano e poi trasferiscono i fosfati, tramite la Spo0F e Spo0B, alla proteina Spo0A che risulta dunque fosforilata. Al contrario le fosfatasi riducono la quantità di Spo0A fosforilata (ad opera di Spo0E e della fosfatasi rap) come si può vedere nella figura 2.1¹. L'azione combinata delle chinasi, che apportano fosfati, e delle fosfatasi, che li allontanano, aiuta nella regolazione del livello della proteina fosforilata; ma il controllo principale è affidato ad un ingegnoso meccanismo pulsatile.

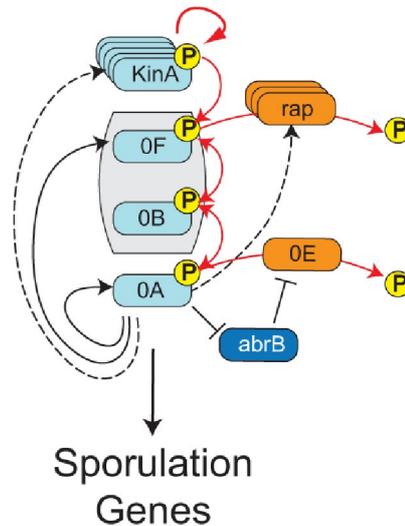


Figura 2.1: ciclo chinasi e spo0A

È stato constatato in molti esperimenti che il tempo di rinvio della sporulazione è controllato da un solido meccanismo basato su un ciclo a feedback

¹Levine, Fontes, Dworkin, Elowitz, 2012. Pulsed Feedback Defers Cellular Differentiation. PlosBiology, Volume 10.

positivo. L'attività della proteina Spo0A si manifesta tramite impulsi di fosforilazione i quali incrementano gradualmente ciclo dopo ciclo. La Spo0A, come si può vedere dalla figura 2.1, attiva se stessa tramite i suoi impulsi ma soprattutto attiva la trascrizione della chinasi. Quest'ultima, come abbiamo già visto, fosforila il fattore di trascrizione dando a sua volta l'avvio agli impulsi. Si è venuto dunque a formare un ciclo in cui gli impulsi di Spo0A attivano le chinasi che incrementano l'ampiezza degli impulsi aumentando così i livelli di chinasi di ciclo in ciclo. Nel ciclo però vi è un piccolo tempo di ritardo tra l'impulso di fosforilazione e la sovraregolazione della chinasi; questo fa in modo che la chinasi non venga attivata prima della fine degli impulsi, ovvero non si ha una sovraespressione della chinasi contemporanea agli impulsi che accrescerebbe a sua volta la loro frequenza diminuendo il tempo di differenziazione. Il ciclo è dunque formato da distinte porzioni in ciascuna delle quali vi è un determinato evento che non si interseca e non interagisce con altri: in una fase soltanto gli impulsi di spo0A oppure la trascrizione della chinasi sono attive, non entrambe. Per questo motivo il tipo di retroazione viene chiamata feedback polifasico. Con questo feedback positivo di impulsi, quindi grazie ad una regolazione in frequenza, viene raggiunto l'obiettivo di accumulare gradualmente $Spo0A^P$ ed estendere il tempo di rinvio alla differenziazione fatto che, come vedremo in seguito, non sarebbe stato raggiunto con un ciclo aperto.

2.2 Implementazione in Matlab del modello della sporulazione

In questa sezione viene presentata l'implementazione del modello del meccanismo che regola la sporulazione del batterio *Bacillus subtilis*, ne vengono descritte le dinamiche attraverso un sistema di equazioni differenziali ed infine vengono riportati grafici illustrativi derivati dall'implementazione in MATLAB.

Nel modello intervengono cinque elementi: la chinasi (K) che fosforila il fattore di trascrizione Spo0A (A) diventando $Spo0A_P(A^P)$, quest'ultimo attiva la trascrizione sua e della chinasi attraverso il regolatore intermedio D. Ciò che riproduce il compito delle fosfatasi e della Spo0E di drenaggio di fosfati dalla proteina è la costante k_P .

2.2.1 Le equazioni del modello

Vengono riportate di seguito e spiegate nel dettaglio tutte le reazioni che prendono parte nel sistema biologico, tutte quelle presenti nel sistema di

2.2. IMPLEMENTAZIONE IN MATLAB DEL MODELLO DELLA SPORULAZIONE 13

equazioni differenziali rappresentanti il modello.

- $K \xrightarrow{\alpha_A s(t)} K^P$ autofosforilazione della chinasi tramite la costante α_A e l'impulso $s(t)$ della Spo0A
- $K^P \xrightarrow{\alpha_D} K$ autodefosforilazione della chinasi tramite la costante α_D
- $K^P + A \xrightarrow{k_F} K + A^P$ trasferimento di fosfati dalla chinasi alla fosfatasi tramite k_F
- $K + A^P \xrightarrow{k_R} K^P + A$ drenaggio di fosfati della Spo0A e autofosforilazione della chinasi tramite k_R
- $A^P \xrightarrow{k_P} A$ defosforilazione grazie alle fosfatasi attraverso la costante k_P
- $K \xrightarrow{\gamma} \emptyset$ degradazione della chinasi secondo la costante γ
- $A \xrightarrow{\gamma} \emptyset$ degradazione della Spo0A secondo la costante γ
- $A^P \xrightarrow{\gamma} \emptyset$ degradazione della Spo0A fosfolitata secondo la costante γ
- $D \xrightarrow{\gamma_D} \emptyset$ degradazione di D tramite γ_D
- $\xrightarrow{f_A(A^P)} A$ produzione di Spo0A secondo la funzione di Hill $f_A(A^P) = \beta \frac{A^P}{K_D + A^P}$. La funzione di Hill rappresenta il livello di cooperatività di una proteina e quindi la sua trascrizione.
- $\xrightarrow{f_D(A^P)} D$ produzione di D secondo la funzione di Hill $f_D(A^P) = \beta_D A^P$
- $\xrightarrow{f_K(D)} K$ produzione di chinasi secondo la funzione di Hill $f_K(D) = \beta_K \frac{D}{K_D + D}$

Ciò che riproduce gli impulsi di fosforilazione di Spo0A è l'onda quadra $s(t)$ che ha valore 1 soltanto in prossimità dell'ultimo quarto di ogni ciclo cellulare e 0 altrimenti.

Le seguenti equazioni differenziali rappresentano gli andamenti della chinasi e della Spo0A includendo tutte le dinamiche delle reazioni descritte sopra. Per riportare un esempio, nell'ultima equazione si può notare che l'andamento della Spo0A fosforilata dipende dal suo fattore di diluizione γ , dal fosfotransfer inverso e dalla defosforilazione da parte delle fosfatasi che ne decrementano la concentrazione ($-k_R K A^P - k_P A^P$) e dal fosfotransfer diretto che invece ne incrementa la quantità ($+k_F K^P A$).

$$\begin{aligned}\frac{dK}{dt} &= -\gamma K + f_K(D) - \alpha_A s(t)K + \alpha_D K^P + k_f K^P A - k_R K A^P \\ \frac{dK^P}{dt} &= -\gamma K^P + \alpha_A s(t)K - \alpha_D K^P - k_f K^P A + k_R K A^P \\ \frac{dD}{dt} &= -\gamma_D D + f_D(A^P) \\ \frac{dA}{dt} &= -\gamma A + f_A(A^P) - k_F K^P A + k_R K A^P + k_P A^P \\ \frac{dA^P}{dt} &= -\gamma A^P + k_F K^P A - k_R K A^P - k_P A^P\end{aligned}$$

2.2.2 Grafici con gli andamenti delle componenti di sistema

Queste equazioni sono state implementate in Matlab grazie alla function per la risoluzione di equazioni differenziali ode15s ed il loro andamento viene illustrato nei grafici sottostanti (figure 2.2 , 2.3 , 2.4 e 2.5).

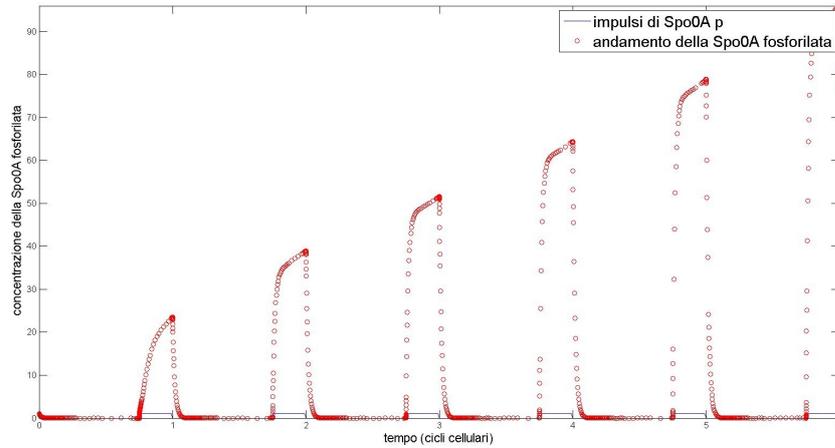


Figura 2.2: Andamento della Spo0A P

Osservando il secondo grafico notiamo che con l'aumentare dei cicli cellulari, mentre aumenta l'ampiezza degli impulsi, aumenta anche la concentrazione di chinasi come previsto; infatti la proteina attiva con la sua attività pulsatile la trascrizione della chinasi. Concentrandoci sul primo grafico osserviamo come l'ampiezza degli impulsi del fattore di trascrizione cresca molto lentamente in corrispondenza degli impulsi su vari cicli cellulari, in questo caso nel grafico ne son raffigurati sei.

2.3. VANTAGGI DELLA MODULAZIONE IN FREQUENZA IN *B. SUBTILIS*15

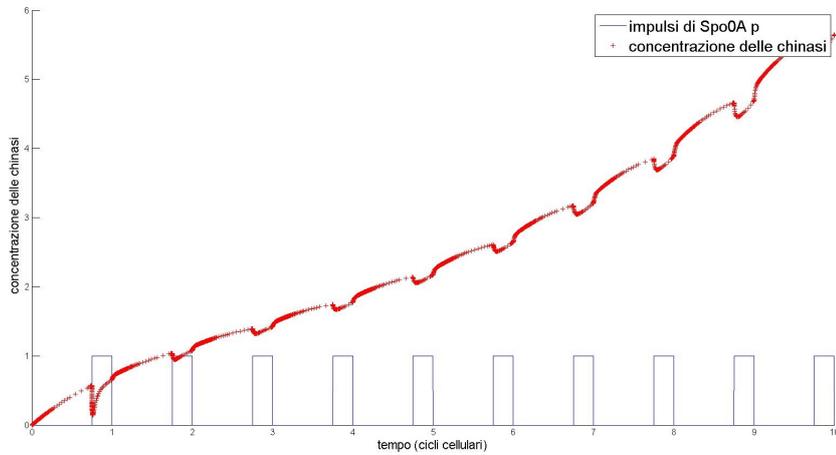


Figura 2.3: Andamento delle chinasi

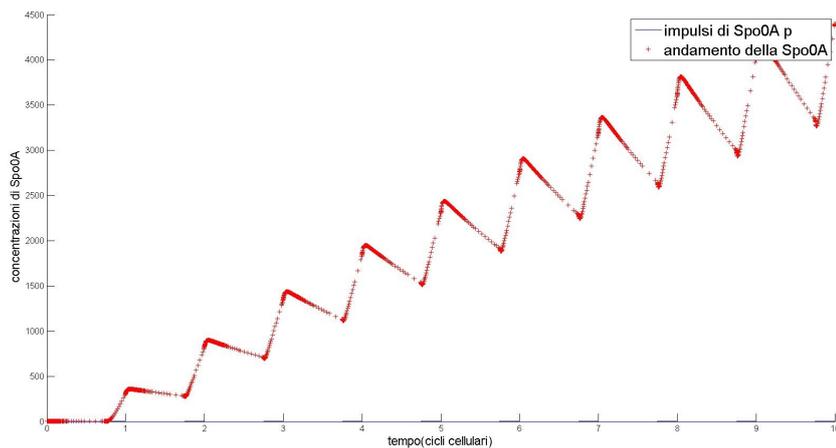


Figura 2.4: Andamento della Spo0A

2.3 Vantaggi della modulazione in frequenza in *B. subtilis*

Per fare in modo che le popolazioni di cellule riescano a riprodursi prima di differenziarsi in spore è necessaria la presenza di un certo tempo di ritardo. Questa proroga, come già detto, viene settata dalla concentrazione del fattore di trascrizione di Spo0A fosforilato la cui attività si manifesta attraverso degli impulsi. I picchi di attività della proteina sono necessari perché tutto ciò avvenga; se questi non ci fossero e la Spo0A crescesse con continuità

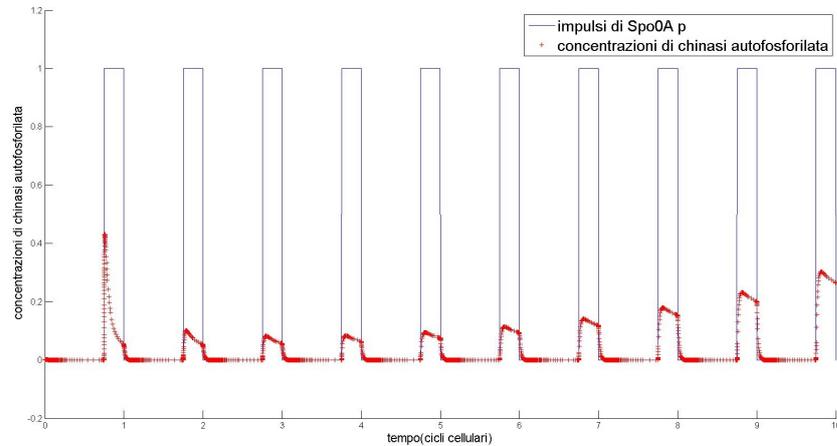


Figura 2.5: Andamento della chinasi autofosforilata

la sporulazione giungerebbe pressochè all'istante. Altro meccanismo necessario è il feedback dato dalla Spo0A che porta ad una sovraregolazione della chinasi, che a sua volta attiva la proteina. Il ciclo viene detto polifasico poichè tra l'impulso e la trascrizione della chinasi passa un tempo τ per far in modo che l'attività della Spo0A si concluda prima che inizi l'espressione della chinasi. In questo modo l'attività del fattore di trascrizione non attiva istantaneamente l'enzima ma attende il ciclo successivo per farlo, tutto ciò permette di aumentare il tempo di differimento e ridurre la sensibilità di quest'ultimo ai parametri di fosforilazione.

Vedremo ora nel dettaglio perchè questo feedback pulsato polifasico funziona bene per questo sistema biologico.

Prendiamo in considerazione un sistema a ciclo aperto in figura 2.6 in cui le chinasi vengono immesse nella struttura in modo continuo e immediatamente incrementano la concentrazione di $Spo0A^P$. In assenza di una retroazione positiva possono verificarsi tre fatti: il primo accade quando vi è una un'alta produzione di chinasi che provoca un incremento di $Spo0A^P$ troppo rapido, il secondo sopraggiunge quando, al contrario, ci son livelli molto bassi di chinasi e non si si arriva mai alla sporulazione dato che non c'è abbastanza concentrazione della proteina ed il terzo avviene ad un livello intermedio e minuziosamente regolato a tal modo da far avvenire la differenziazione dopo vari cicli cellulari; ma quest'ultimo anche se raggiunge lo scopo non è molto dinamico ed efficiente.

Analizziamo ora un secondo tipo di struttura costituita da un ciclo di feedback. In questo caso incrementi di $Spo0A^P$ portano ad incrementi istantanei di concentrazioni di chinasi che a loro volta fanno avviare gli impulsi. In

2.3. VANTAGGI DELLA MODULAZIONE IN FREQUENZA IN *B. SUBTILIS*17



Figura 2.6: circuito di pulsazioni a ciclo aperto

questo caso la chinasi è attivata direttamente dagli impulsi di Spo0A prima che essi finiscano come mostra la figura 2.7.

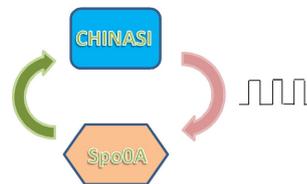


Figura 2.7: circuito di pulsazioni a feedback istantaneo

Il terzo caso, quello più idoneo, è il ciclo a feedback polifasico spiegato sopra ed illustrato nell'immagine sottostante(2.8).



Figura 2.8: circuito di pulsazioni a feedback polifasico

Nell'ultimo sistema il tempo di ritardo causa una ripartizione in fasi in cui in una c'è un'accumulazione di chinasi e nell'altra in cui avvengono gli impulsi; l'impulso della proteina dunque non incrementa istantaneamente la concentrazione delle chinasi. Per questo motivo un aumento dell'espressione della chinasi provoca solo un leggero aumento nella crescita degli impulsi rendendo il sistema meno sensibile ai suoi parametri. Questa struttura infatti, rispetto alle altre due, è la più robusta e quella che indipendentemente da variazioni nelle concentrazioni delle varie componenti non varia il suo comportamento ma raggiunge la sporulazione non prima di aver concluso un

certo numero di cicli cellulari. La figura 2.9 ² rappresenta i tre sistemi in successione e da essa si può vedere come cambiano gli impulsi nei tre sistemi al variare dell'espressione della chinasi. Proseguendo dal primo al terzo si vede come va a ridursi l'alterazione dell'impulso, in particolare la sensibilità S definita come $S = \frac{\partial \lg T_D}{\partial \lg \beta_K}$ dove T_D è il tempo di rinvio mentre β_K è l'attività del promoter della chinasi.

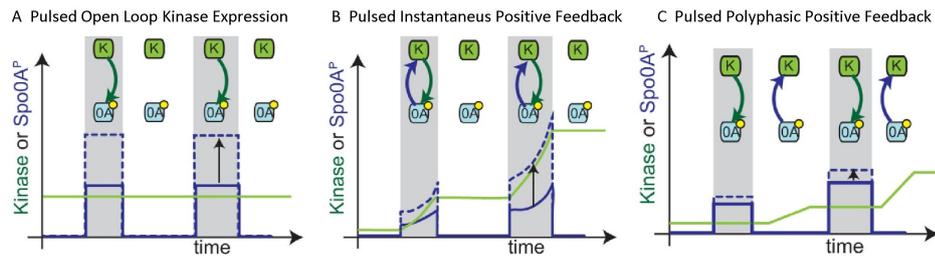


Figura 2.9: funzionamento dei tre sistemi e loro sensibilità

Il primo sistema non è adatto al nostro scopo perchè si rivela essere troppo sensibile e poco massiccio: l'aumento dell'espressione della chinasi provoca direttamente un aumento dell'ampiezza degli impulsi come si può vedere dalla figura. Cosa non troppo diversa accade per il 'ciclo istantaneo' in cui la variazione di ampiezza dell'impulso è minore ma comunque molto più evidente rispetto all'ultimo sistema.

²Levine, Fontes, Dworkin, Elowitz, 2012. Pulsed Feedback Defers Cellular Differentiation. PlosBiology, Volume 10.

Capitolo 3

Risposta allo stress nei batteri regolata da impulsi

Analizziamo in questo capitolo la risposta pulsatile attivata da un fattore di trascrizione di un organismo unicellulare procariote. Si tratta ancora una volta del batterio *Bacillus subtilis*; viene approfondito ora un altro aspetto interessante di risposta cellulare.

3.1 Ciclo impulsi attivato da fluttuazioni rumorose

Anche in questo sistema biologico vediamo che il meccanismo usato per rispondere allo stress extracellulare è controllato in frequenza. In questo caso osserviamo che σ_B , un fattore di trascrizione in *Bacillus subtilis*, riesce ad attivare più di 150 geni attraverso questo meccanismo di impulsi. Anche questo sistema si serve di un ciclo di impulsi i quali vengono attivati a partire da fluttuazione stocastiche successivamente amplificate. Il batterio utilizza questo processo per attivare una serie di geni in risposta ad attacchi esterni di vario tipo; in particolare alcuni esperimenti svolti studiano la risposta all'acido micofenolico.

3.1.1 Fluttuazioni rumorose attivano il ciclo

Descriviamo ora quali sono le componenti che entrano in gioco nel ciclo e le loro funzioni. Il fattore di trascrizione σ_B viene attivato dal suo operone RsbV e represso dal suo fattore anti-sigma RsbW(chinasi), in base alla maggiore o minore concentrazione delle due viene attivata o meno la proteina. L'attivazione di σ_B avviene grazie alla fosfatasi RsbQP privando RsbV del

suo gruppo fosfato, infatti la defosforilazione di RsbV ne comporta la sua attivazione che a sua volta mette in azione il fattore di trascrizione. Ciò che da l'avvio agli impulsi è una ultrasensibilità del fattore σ_B alla fosfatasi RsbQP, in presenza di questa la proteina si attiva immediatamente. Quest'ultima infatti si occupa della defosforilazione di RsbV quindi della sua attivazione. In presenza di una sovraespressione del fattore anti-sigma RsbW è necessaria una maggiore concentrazione di RsbQP per attivare gli impulsi della proteina, spostando la soglia di attivazione a livelli più alti. Questa sensibile spostamento della soglia fa sì che delle fluttuazioni stocastiche delle concentrazioni di chinasi e fosfatasi attivino gli impulsi di σ_B .

3.1.2 Feedback positivo e negativo

Il ciclo per la regolazione della risposta allo stress per il batterio abbiamo visto che ha inizio grazie al rumore ora descriviamo le dinamiche che avvengono all'interno. Una volta attivato il fattore di trascrizione ha dunque inizio il ciclo: esso attiva tutti i suoi operoni (anche se stesso) RsbV RsbQP ma in particolare attiva il suo fattore anti-sigma RsbW. Facendo ciò arriva il momento in cui questo fattore supera in concentrazione la fosfatasi. Essendo il fattore anti-sigma presente in maggiore quantità e avendo maggior peso sulla fosfatasi, ciò provoca l'interruzione degli impulsi e la terminazione del ciclo, come mostra la figura 3.1 ¹. Vediamo dunque che questo meccanismo è diviso in due fasi: vi è una parte di retroazione positiva in cui l'attività della fosfatasi eccede rispetto quella della chinasi (attivazione del fattore di trascrizione) e una parte di retroazione negativa in cui accade il contrario. Il ciclo si regola autonomamente attraverso questi due feedback e grazie alla serie di impulsi il cui picco massimo si ha subito prima che il livello di attività della chinasi superi quello della fosfatasi, a quel punto RsbV viene fosforilato e gli impulsi terminano.

Abbiamo descritto fin'ora i meccanismi principali presenti in questo ciclo e come grazie ad un'amplificazione di un processo stocastico esso ha inizio. Vediamo ora come avviene viene modulata la risposta dell'organismo in presenza di una concentrazione di acido micofenolico. All'aumentare di questa sostanza si nota un'incremento della frequenza degli impulsi (figura 3.2) Questo è provocato da un aumento nei livelli di espressione di RsbQP che attivano la fosfatasi responsabile dell'attuazione degli impulsi di σ_B . La frequenza risulta più alta poichè aumentando la fosfatasi aumenta la frequen-

¹Levine, Fontes, Dworkin, Elowitz, 2012. Pulsed Feedback Defers Cellular Differentiation. PlosBiology, Volume 10.

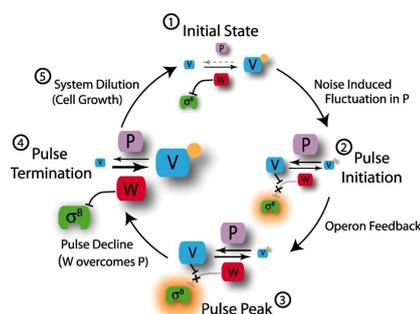


Figura 3.1: diagramma per il controllo degli impulsi

za con cui essa supera la soglia di concentrazione di RsbW. La regolazione dunque risulta essere in frequenza anche in questo caso.

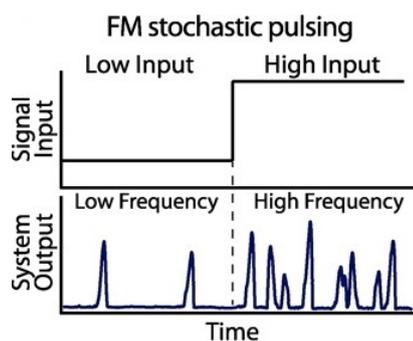


Figura 3.2: Risposta modulata in frequenza all'acido micofenolico

3.2 Modello del ciclo pulsato di σ_B

Il sistema di equazioni differenziali illustrato di seguito rappresenta il modello del meccanismo appena descritto. Esso è stato semplificato introducendo soltanto le componenti basilari e strettamente necessarie: σ_B defosforilata quindi attiva, denotata col simbolo A, σ_B fosforilata col simbolo A_P , la fosfatasi RsbQP con P e la chinasi RsbW con il simbolo K.

$$\frac{dA}{dt} = trans - phos + dephos - k_d A$$

22CAPITOLO 3. RISPOSTA ALLO STRESS NEI BATTERI REGOLATA DA IMPULSI

$$\frac{dA_P}{dt} = phos - dephos - k_D A_P$$

$$\frac{dK}{dt} = trans - k_d K$$

Dove $trans = t_a + t_i$ è il tasso di trascrizione sia di A che di K

$dephos = \frac{b_{dp} P A_p}{k_{dp} + A_p}$ è il tasso di defosforilazione e

$phos = \frac{b_p K A}{k_p + A}$ è il tasso di fosforilazione di A.

Nella prima equazione si vede subito l'incremento di sigma e del suo inibitore K dovuti alla sua stessa trascrizione (durante gli impulsi) ed un decremento dovuto alla sua fosforilazione (ricordiamo che σ_B quando si fosforila viene disattivata).

Capitolo 4

Impulsi di localizzazione nucleare regolano i geni

Abbiamo appena visto come un organismo procariote riesce a rispondere ad uno stress esterno attivando il suo fattore di trascrizione tramite impulsi. Sarebbe ora interessante studiare come avviene un fenomeno simile per un organismo eucariote, ovvero cosa accade in presenza di un nucleo.

4.1 Reazione del lievito al calcio extracellulare

Per rispondere ai segnali esterni le cellule devono essere in grado di codificarli e far in modo che i fattori di trascrizione attivino l'espressione dei geni, in questo caso presenti soltanto nel nucleo. Per comprendere come avviene ciò viene analizzata la risposta allo stress da calcio nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*. In particolare ci occupiamo del fattore di trascrizione Crz1 che viene trasportato all'interno del nucleo e all'esterno del nucleo per compiere la sua funzione. In questo caso però non siamo a conoscenza delle dinamiche interne dettagliate del sistema ma notiamo che in presenza di calcio extracellulare avviene qualcosa che può essere accomunato agli altri due sistemi. A causa di piccole concentrazioni di calcio il fattore di trascrizione viene defosforilato e traslocato all'interno del nucleo e successivamente fosforilato e spostato verso il citoplasma. Tutto ciò avviene ancora una volta attraverso degli impulsi di localizzazione, ed essi aumentano in frequenza con la concentrazione di calcio extracellulare. Possiamo vedere il comportamento di due cellule di lievito attraverso i grafici in figura 4.1.

Attraverso esperimenti si notano due tipi di impulsi: di gruppo e isolati. Aumentando la concentrazione di calcio somministrata prevalgono impulsi di

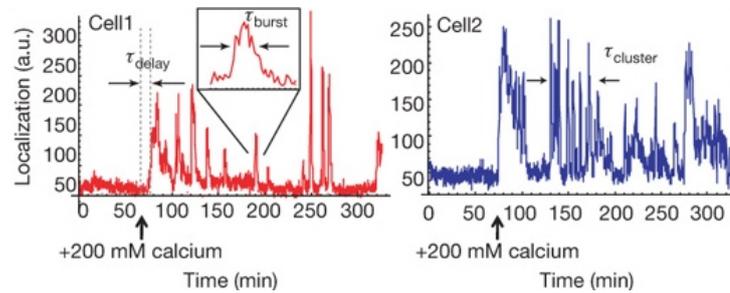


Figura 4.1: Andamento degli impulsi per due cellule di lievito

gruppo rispetto a quelli singoli, mentre prevalgono impulsi isolati al di sotto di una certa quantità. Si può notare anche che immediatamente dopo una ingente somministrazione di calcio le cellule esibiscono un primo picco di localizzazione di Crz1 sincrono seguito da impulsi sporadici e non sincronizzati, mentre una piccola quantità di calcio mostra soltanto picchi isolati. Questo significa che viene modulata soltanto la velocità di risposta piuttosto che l'ampiezza degli impulsi. Dunque anche in questo caso soltanto la frequenza degli impulsi viene regolata in risposta al calcio extracellulare. Molto incerta risulta la provenienza di questi picchi di localizzazione, ma possono esserne esclusi alcuni fattori che potrebbero generarli. Nella risposta al calcio nel lievito gli impulsi di localizzazione nucleare non sono sicuramente dovuti a fattori esterni poiché essendo non sincronizzati non possono essere guidati da un fattore extracellulare. Non sono nemmeno collegati al ciclo cellulare o alla cellula madre. Esaminando poi i picchi di calcio intracellulare si nota che alcuni di essi coincidono con gli impulsi di localizzazione di Crz1 ma altri non hanno alcuna corrispondenza facendo emergere che gli impulsi possono essere provocati da ciò ma non solo. La calcineurina invece controlla soltanto la frequenza degli impulsi iniziali di localizzazione. Confrontando infine le risposte da stress di due differenti proteine (Crz1 e Msn2) entrambe sensibili al calcio si notano molti impulsi incorrelati e pochi simultanei tra loro suggerendo che le cellule guidano il meccanismo degli impulsi in maniera diversificata e molto indipendente.

Non si conosce nemmeno il vero meccanismo di regolazione che permette al lievito di rispondere efficacemente alla presenza del calcio extracellulare. Si può supporre che questi impulsi vengano trasmessi fino ai geni sotto forma di impulsi di trascrizione genica dando vita alla risposta del lievito al calcio. Più in generale questa viene vista come un meccanismo generale usato a livello di trascrizione genica per molteplici organismi unicellulari.

4.2 Compito essenziale della modulazione in frequenza in *S. cerevisiae*

Uno tra i problemi fondamentali nella regolazione cellulare è quello di esser in grado di coordinare più funzioni biologiche e quindi attivare più geni nello stesso istante. Il fattore di trascrizione Crz1, come anche σ_B in *B.subtilis*, riescono ad attivare più di 100 diversi geni (target) che si diversificano per la loro funzione di input definita come la dipendenza del tasso di trascrizione dalla concentrazione del fattore di trascrizione nel nucleo. Viene mostrato ora come il sistema di modulazione in frequenza sia preferibile a quello in ampiezza che non è in grado di gestire numerosi geni in modo indipendente dalle loro funzioni di input. Prendiamo in esame due geni (promoter A e B) i cui siti promotori hanno due diverse funzioni di input e ne analizziamo il comportamento sia in ampiezza che in frequenza.

In un sistema di modulazione regolato in ampiezza i livelli di localizzazione di Crz1 nel nucleo son costanti nel tempo e proporzionali alla quantità di calcio extracellulare. In figura 4.2-b ¹ si notano dei picchi di uguale altezza in una posizione dipendente dal calcio e di ampiezza rappresentante la frazione di tempo in cui la proteina rimane nel nucleo. Il livello di espressione è proporzionale alla funzione di input corrispondente ad un gene valutata nel picco ma dato che le due variano molto nella forma allora anche l'andamento del rate normalizzato dei due geni varierà molto con diverse concentraioni di Crz1 nucleare (4.2-c).

Nella modulazione in frequenza per la stessa coppia di geni compaiono picchi che son frequenti per elevate quantità di calcio, mentre più sporadici con bassi livelli di calcio; tutti i picchi però hanno la stessa altezza ovvero stessa quantità di Crz1 al variare del calcio. Nel grafico in figura 4.2-e vediamo che per una stessa quantità di Crz1 abbiamo picchi di varie altezze (dipendenti dal calcio) rappresentanti la frazione di tempo in cui la proteina rimane nel nucleo. Soltanto l'altezza ma non la posizione è dipendente dal calcio per cui il livello di espressione dei due geni son proporzionali tra loro e alla frequenza degli impulsi. L'espressione normalizzata dunque risulta proporzionale al calcio e dipenderà soltanto da esso e non dal diverso gene target. In questo modo si può ottenere un controllo simultaneo dato che i due geni posson essere controllati insieme indipendentemente dalla loro funzione di input .

¹Cai, Dalal, Elowitz, 2008. Frequency-modulated nuclear localization burst coordinate gene regulation. Nature, vol 455.

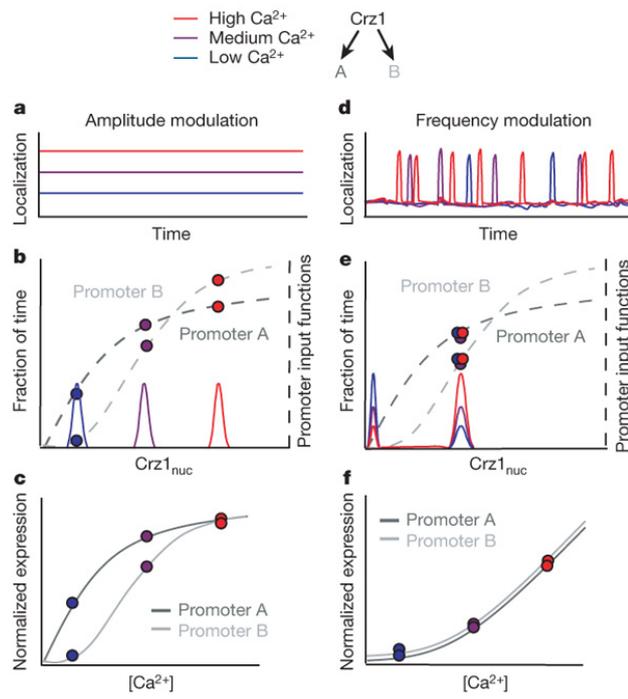


Figura 4.2: confronto tra modulazione in ampiezza e in frequenza

Conclusioni

I fenomeni biologici trattati in questa tesi come abbiamo visto hanno in comune una regolazione effettuata in frequenza. In tutti e tre i casi gli impulsi di attività trascrizionale fan da protagonisti per diverse funzioni regolatorie.

4.3 Funzione di controllo necessaria alla sopravvivenza in *B. subtilis*

Nel primo caso si è parlato della modulazione in frequenza come un mezzo di regolazione. Nel sistema compaiono impulsi di fosforilazione fortemente necessari al rinvio della sporulazione. Essi costituiscono una retroazione positiva nella trascrizione della chinasi la quale da nuovamente l'avvio ai picchi di attività. Grazie ad essi la sporulazione viene ritardata in modo che la cellula possa moltiplicarsi ed aumentare la popolazione cellulare a rischio di sopravvivenza. Senza la presenza degli impulsi non solo il sistema può risultare inefficiente ma addirittura non funzionante: senza la presenza di una regolazione pulsata e di un ciclo il sistema non non raggiungerebbe lo scopo prefissato utile per la sopravvivenza della specie. Come abbiamo già visto una produzione continua di chinasi può dare soltanto due alternative: la cellula non si convertirebbe in spora oppure lo diventerebbe regolando in modo troppo accurato il circuito tanto da renderlo intrattabile e poco dinamico ai cambiamenti di parametri della fosforilazione. Abbiamo visto da simulazioni che mettono a confronto una regolazione in ampiezza con una in frequenza che un vantaggio di quest'ultima è inoltre quello di ottenere un sistema meno sensibile ai parametri quindi più solido e dinamico.

4.4 Regolazione contemporanea di più siti promotori

Nel secondo e terzo sistema invece la funzione del meccanismo in frequenza riguarda proprio la modulazione della trascrizione. L'aumento dello stress sulla cellula provoca un incremento nella frequenza degli impulsi in tutti e due i casi. In *B. subtilis* all'aumentare della somministrazione di acido micofenolico aumenta l'espressione della fosfatasi che comporta una maggiore frequenza degli impulsi; infatti vi è una maggiore probabilità di superare la sogli di concentrazione della chinasi inibitrice di questi. Nel lievito invece, essendo un organismo dotato di nucleo, all'aumentare di concentrazioni di calcio extracellulare vi è un incremento di impulsi di localizzazione nucleare. Come è stato appena analizzato, questo comportamento risulta vincente in quanto la l'espressione del gene, come visto da simulazioni, dipende dalla sola quantità della sostanza provocante lo stress e non dal gene stesso. Questo ha il vantaggio di aver un controllo su più geni anche se molto diversi allo stesso tempo.

Abbiamo visto finora tutti i motivi per cui la modulazione in frequenza è più vantaggiosa: riesce a creare un circuito sufficientemente robusto con lo scopo di rallentare il tempo di sporulazione e quindi ha un forte compito regolatorio e di controllo, inoltre risolve il problema di regolare in cooperativa uno svariato numero di geni con funzioni di input differenti. Tutto ciò però ha sicuramente un prezzo, quello di esser fornito di un circuito che riesca a svolgere questi compiti. Nel primo e secondo sistema in *B. Subtilis* bisogna garantire la presenza di un ciclo quindi di un circuito più complesso che produce impulsi ma in questi casi la scelta rispetto ad una modulazione in ampiezza più agevole da implementare, vanno a favore di una regolazione in frequenza più efficace e indispensabile.

Bibliografia

- [1] Joe H. Levine, Michelle E. Fontes, Jonathan Dwtokin, Michael B. Elowitz, 2012. Pulsed Feedback Defers Cellular Differentiation. PlosBiology, Vol 10.;
- [2] Long Cai, Chiraj K. Dalal, Michael B. Elowitz, 2008. Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation. Nature, Vol 455.;
- [3] James C. W. Locke, Jonathan W. Young, Michelle Fontes, Maria Jesus Hernandez Jimenez, Michael B. Elowitz, 2011. Stochastic Pulse Regulation in arterial Stress Response. Science, Vol 334.