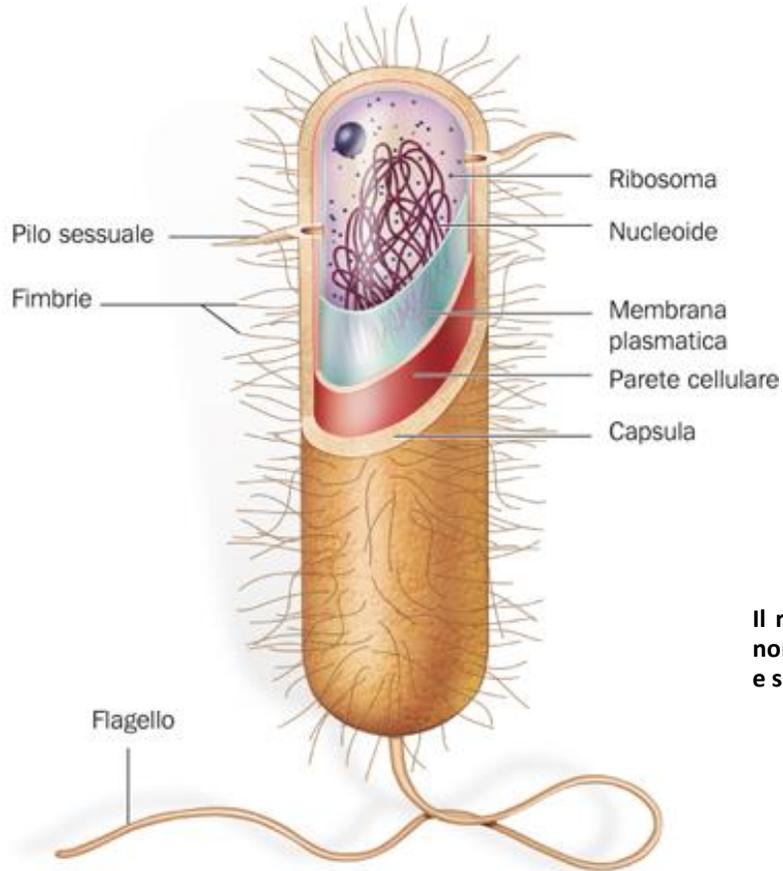
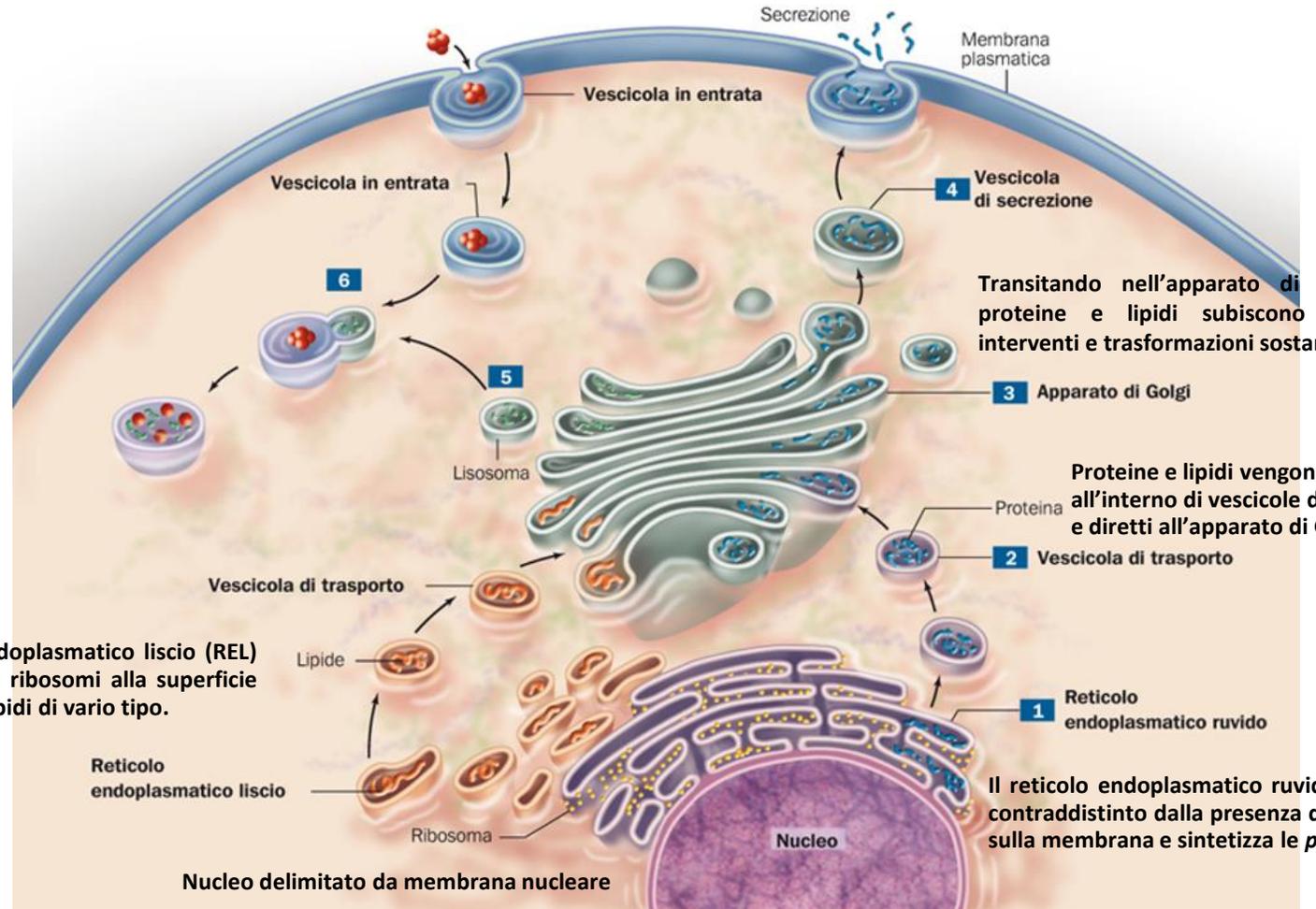


CELLULA PROCARIOTICA



Il reticolo endoplasmatico liscio (REL) non presenta ribosomi alla superficie e sintetizza lipidi di vario tipo.

CELLULA EUCARIOTICA



Transitando nell'apparato di Golgi, proteine e lipidi subiscono degli interventi e trasformazioni sostanziali.

Proteine e lipidi vengono inglobati all'interno di vescicole di trasporto e diretti all'apparato di Golgi.

Il reticolo endoplasmatico ruvido (RER) è contraddistinto dalla presenza di *ribosomi* sulla membrana e sintetizza le *proteine*.

COMPARTIMENTALIZZAZIONE della cellula eucariotica



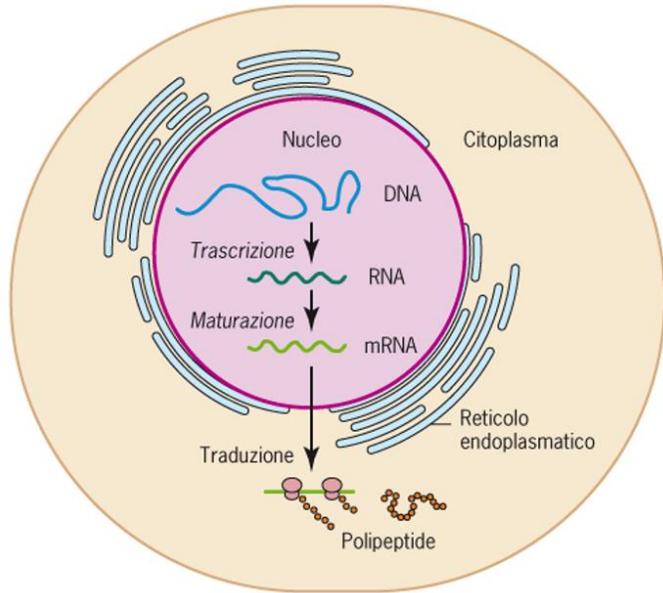
COMPLESSITÀ ANATOMICA E FISIOLÓGICA degli organismi multicellulari



complessa regolazione dell'espressione genica

La compartimentalizzazione della cellula consente una separazione fisica della regolazione dell'espressione genica a diversi livelli:

- a livello del nucleo (DNA, RNA);
- a livello del citoplasma (RNA, polipeptidi).

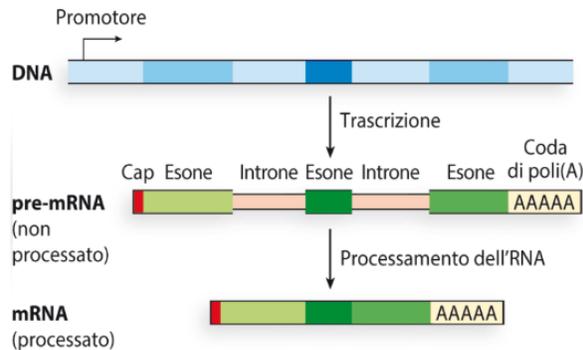


Maturazione mRNA nelle cellule eucariotiche:

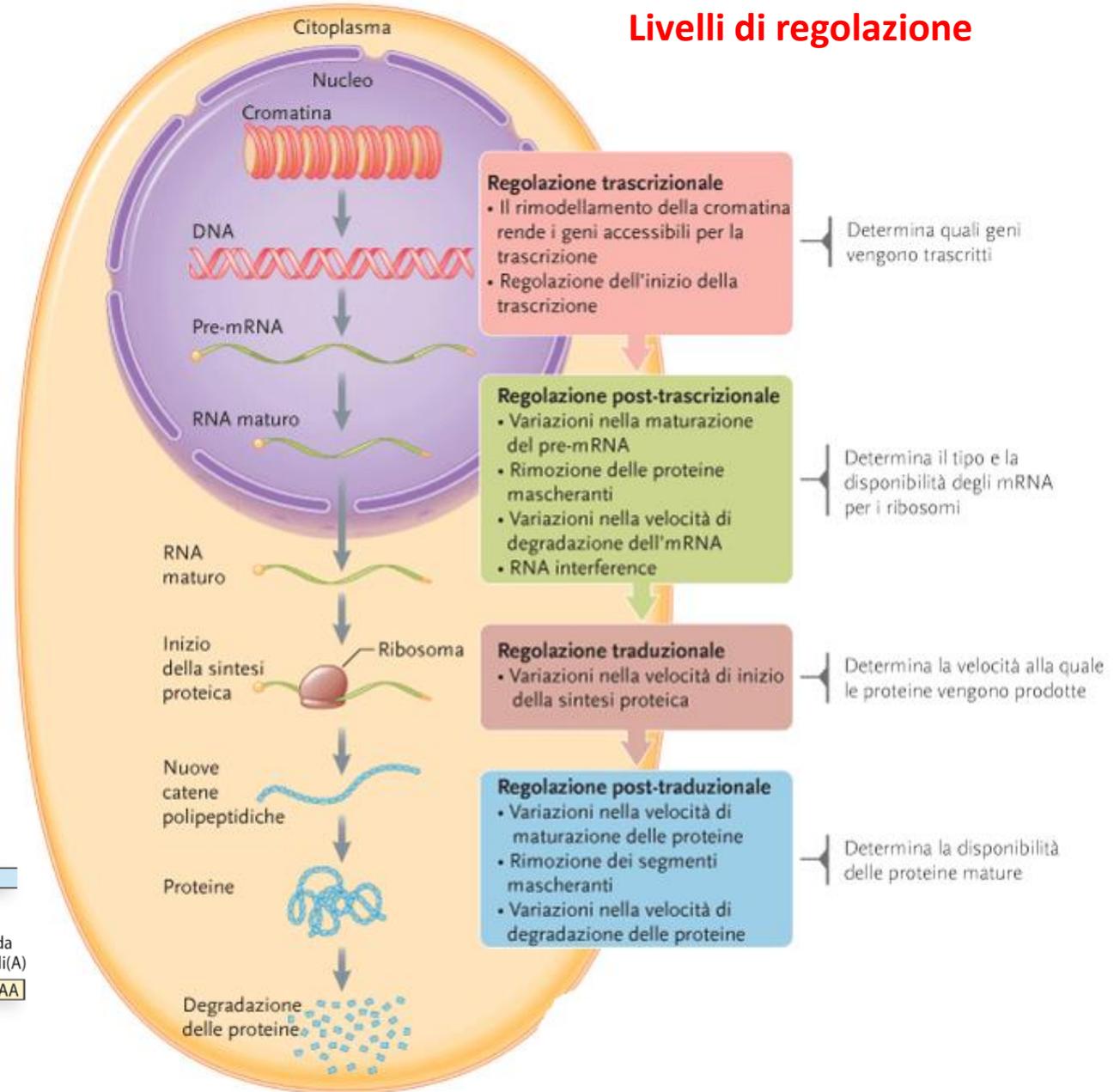
- Capping (5')
- Poliadenilazione (3')
- Rimozione introni

Capping

Aggiunta di un "cappuccio" di 7-metilguanosa al residuo 5-terminale della catena: splicing e trasporto, protezione attacco delle esonucleasi 5'-3', riconoscimento ed aggancio dell'mRNA al ribosoma.



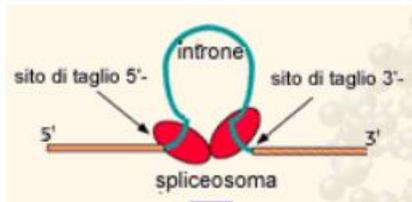
Livelli di regolazione



Nelle **cellule eucariotiche**, la **TRASCRIZIONE** di alcuni tratti di DNA può essere influenzata dall'azione di **proteine regolative** (**positive** o **negative**) definite **FATTORI DI TRASCRIZIONE**.

SPLICING (→ maturazione dell'mRNA)

Dopo la trascrizione, **spliceosomi**, piccoli organelli nucleari (**ribonucleoproteine**), intervengono nella **formazione dell'mRNA**.



Maturazione mRNA

↓
rimozione introni

Gli introni, a seconda del tipo di splicing, possono essere rimossi singolarmente oppure secondo combinazioni diverse, generando polipeptidi diversi (ma correlati).

STABILITA' DELL'mRNA

Giunto nel citoplasma, l'mRNA viene tradotto per intervento dei ribosomi (fino a che non viene degradato).

L'**EMIVITA** dell'mRNA (degradazione) rappresenta un ulteriore livello di controllo dell'espressione genica.

siRNA (*small interfering RNA*) e **miRNA** (*micro RNA*) si appaiano con sequenze specifiche dell'mRNA, inducendo tagli e degradazione o inibendo la traduzione.

SPLICING ALTERNATIVO

Nello splicing anche alcuni **esoni** possono essere rimossi

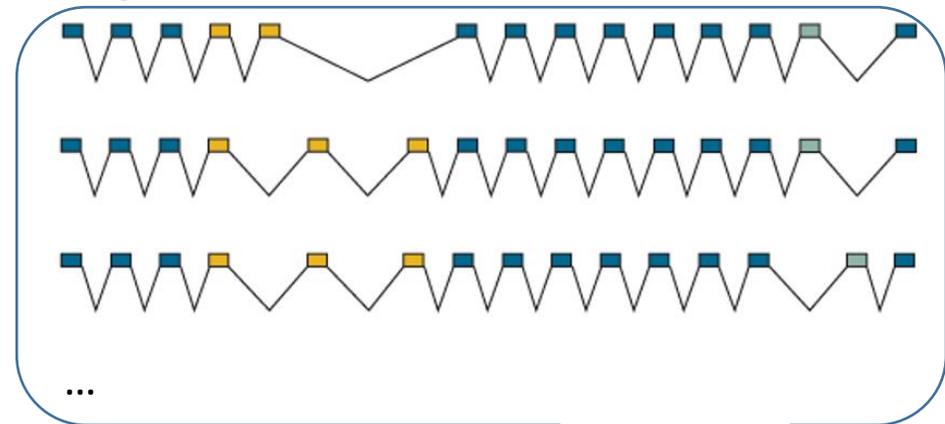
18 Esoni del gene per la troponina T di ratto

5' 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 3'

Lo splicing alternativo degli esoni produce 64 differenti mRNA.

- Esoni 1-3, 9-15 e 18 presenti in tutti gli mRNA.
- Esoni 4-8 presenti in varie combinazioni.
- Esoni 16 e 17, presenti in tutti gli mRNA, ma mai insieme.

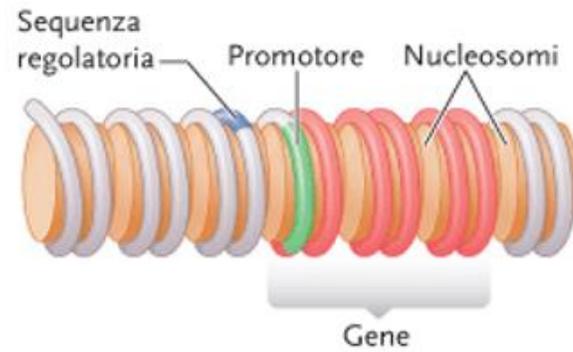
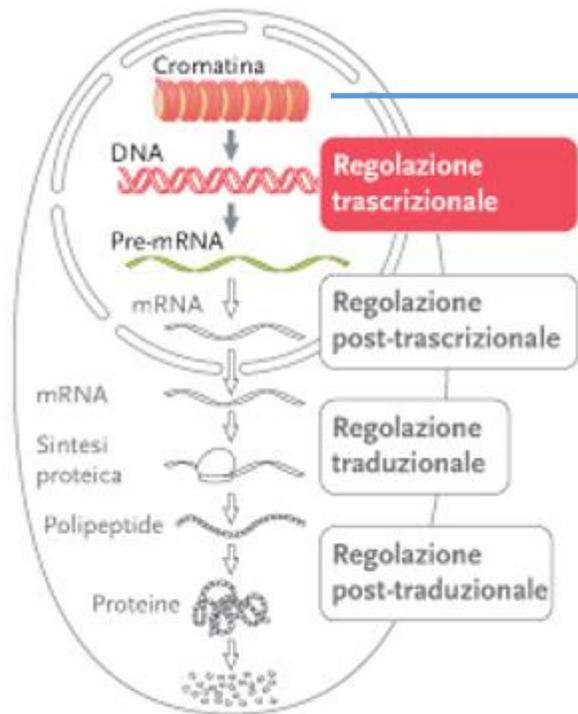
Esempi di mRNA



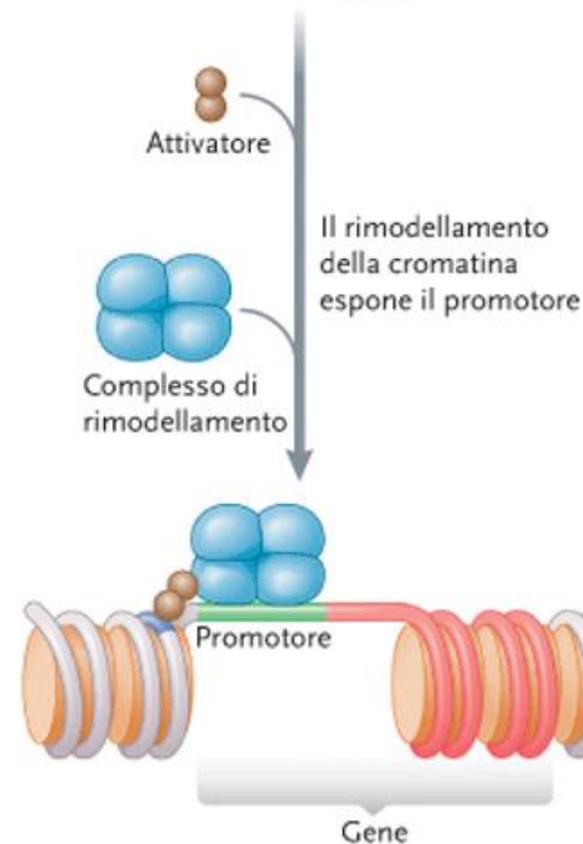
→ **Modulazione stabilità dell'mRNA**

- ↑ **Coda poli-A**
- ↑ **Ormoni**
- ↓ **Sequenza non tradotta 3' UTR** (untranslated region: **AUUUA**)
- ↓ **piccoli RNA non codificanti regolativi** (**siRNA, miRNA**)
- ...

I diversi tipi di troponina T possono indurre variabilità nell'attività muscolare.



Promotore non accessibile alle proteine per l'inizio della trascrizione



Promotore accessibile alle proteine per l'inizio della trascrizione

FATTORI AMBIENTALI e BIOLOGICI influenzano l'attività trascrizionale (in modo più accentuato nei procarioti)

Esempi di induzione espressione genica

FATTORI AMBIENTALI



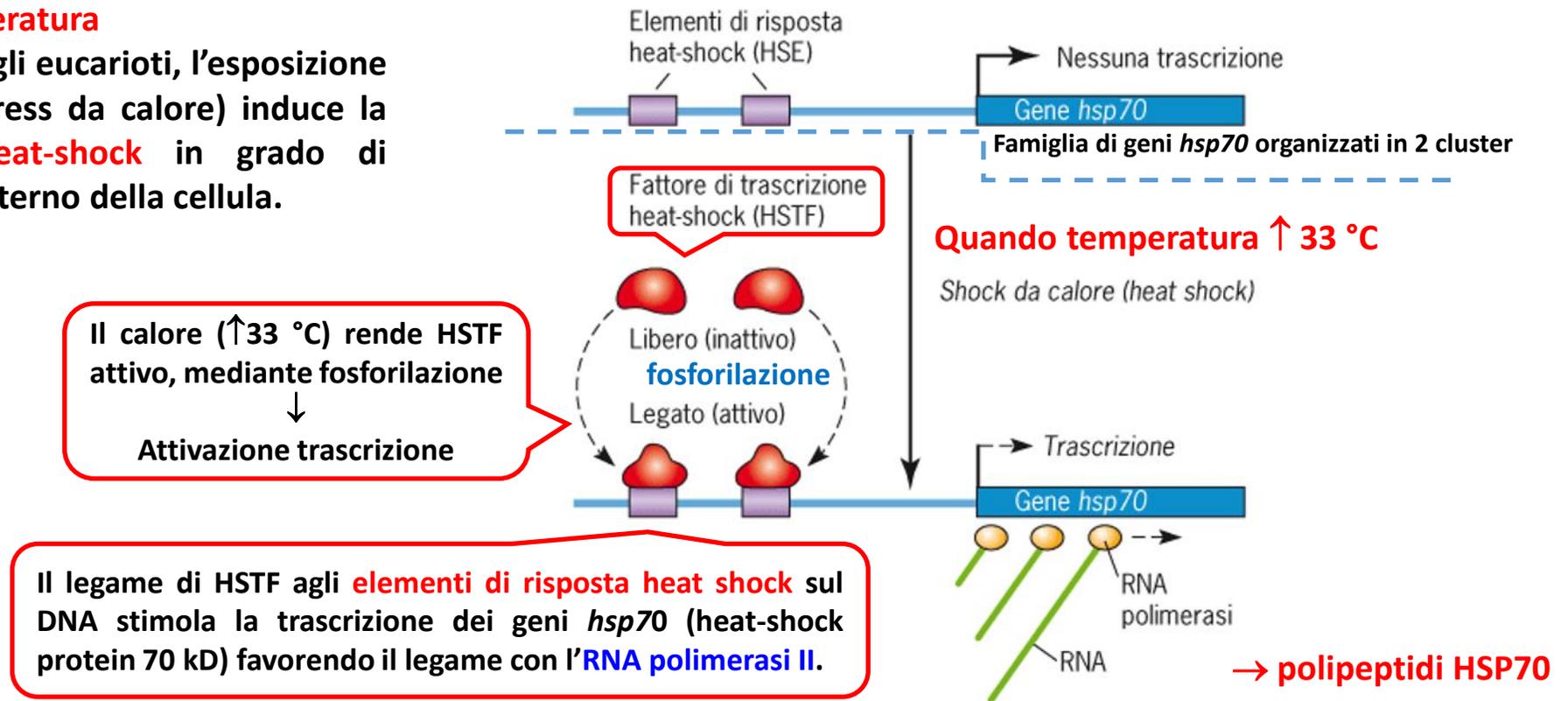
Induzione trascrizione negli eucarioti

Temperatura

Sia nei procarioti che negli eucarioti, l'esposizione ad alte temperature (stress da calore) induce la sintesi di **proteine heat-shock** in grado di stabilizzare l'ambiente interno della cellula.

Induzione della trascrizione di proteine
heat-shock (HSP70) in *Drosophila*

Controllo a livello della trascrizione



I polipeptidi **Hsp70** intervengono nel ripiegamento delle proteine, svolgono funzioni di chaperoning e aiutano a proteggere le cellule dagli effetti negativi degli stress fisiologici.

FATTORI BIOLOGICI

Induzione trascrizione da fattori biologici negli eucarioti pluricellulari

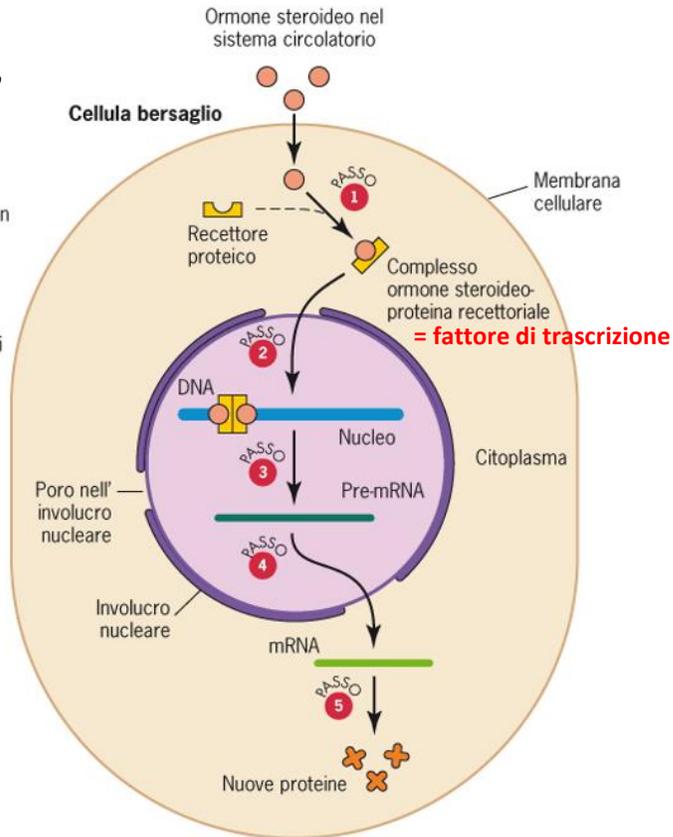
Ormoni steroidei

(molecole liposolubili colesterolo-derivati)

estrogeni,
progesterone,
testosterone,
glucocorticoidi,

...

- PASSO 1** L'ormone steroideo entra nella cellula bersaglio e si combina con una proteina recettoriale
- PASSO 2** Il complesso ormone-recettore si lega a un elemento di risposta all'ormone sul DNA
- PASSO 3** Il complesso legato stimola la trascrizione
- PASSO 4** Il trascritto è maturato e trasportato nel citoplasma
- PASSO 5** L'mRNA è tradotto in proteine



Le cellule possono produrre ormoni (steroidi e peptidici) per trasmettere segnali coinvolti nella regolazione dell'espressione genica ad altre cellule, anche appartenenti ad altri distretti organici.

Ormoni peptidici

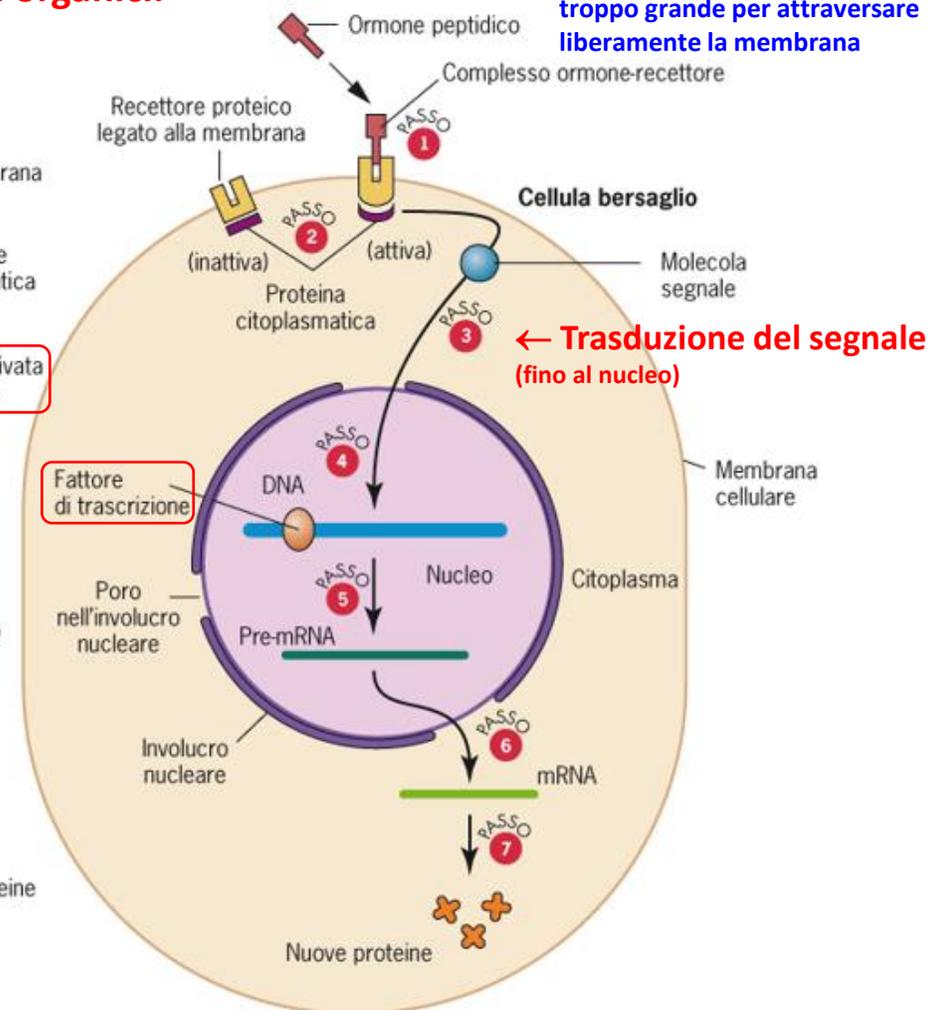
(catene lineari di aa)

insulina,
somatotropina,
prolattina,

...

troppo grande per attraversare liberamente la membrana

- PASSO 1** L'ormone si lega al recettore proteico presente sulla membrana della cellula bersaglio
- PASSO 2** Il complesso ormone-recettore attiva una proteina citoplasmatica
- PASSO 3** La proteina citoplasmatica attivata trasduce un segnale al nucleo
- PASSO 4** Il segnale induce un fattore di trascrizione a legarsi al DNA
- PASSO 5** Il fattore di trascrizione legato stimola la trascrizione
- PASSO 6** Il trascritto viene maturato e trasportato nel citoplasma
- PASSO 7** L'mRNA viene tradotto in proteine



L'espressione genica controllata da ormoni è mediata da «elementi di risposta all'ormone» (HRE), localizzati sul DNA in prossimità dei geni da trascrivere.

Favoriscono il legame di proteine che fungono da **fattori di trascrizione**.

Anche alcune **proteine non ormonali** possono influenzare l'attività trascrizionale con un meccanismo simile.

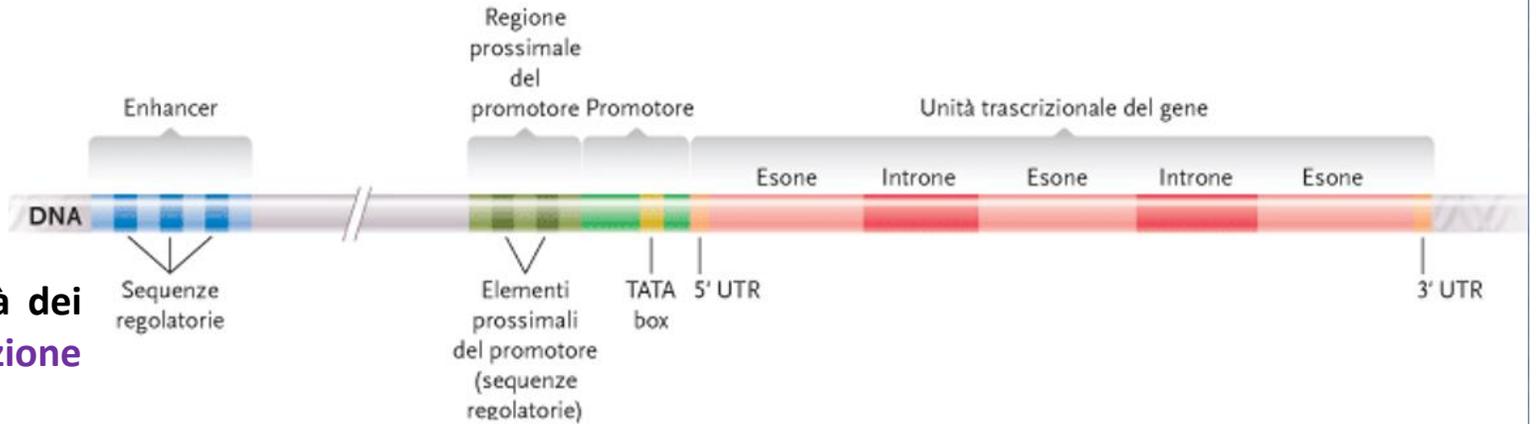
SEQUENZE DI DNA che controllano espressione genica a livello della trascrizione

La trascrizione inizia con il legame della RNA polimerasi al promotore del gene.

Fattori di trascrizione speciali, legati all'enhancer, interagiscono con i fattori trascrizionali basali e l'RNA-polimerasi legati al promotore.

L'inizio della trascrizione è modulato da

- **Fattori di trascrizione basali** (proteine accessorie) → legano il promotore (TATA box)
- **Fattori di trascrizione speciali** → legano elementi di risposta (enhancer)



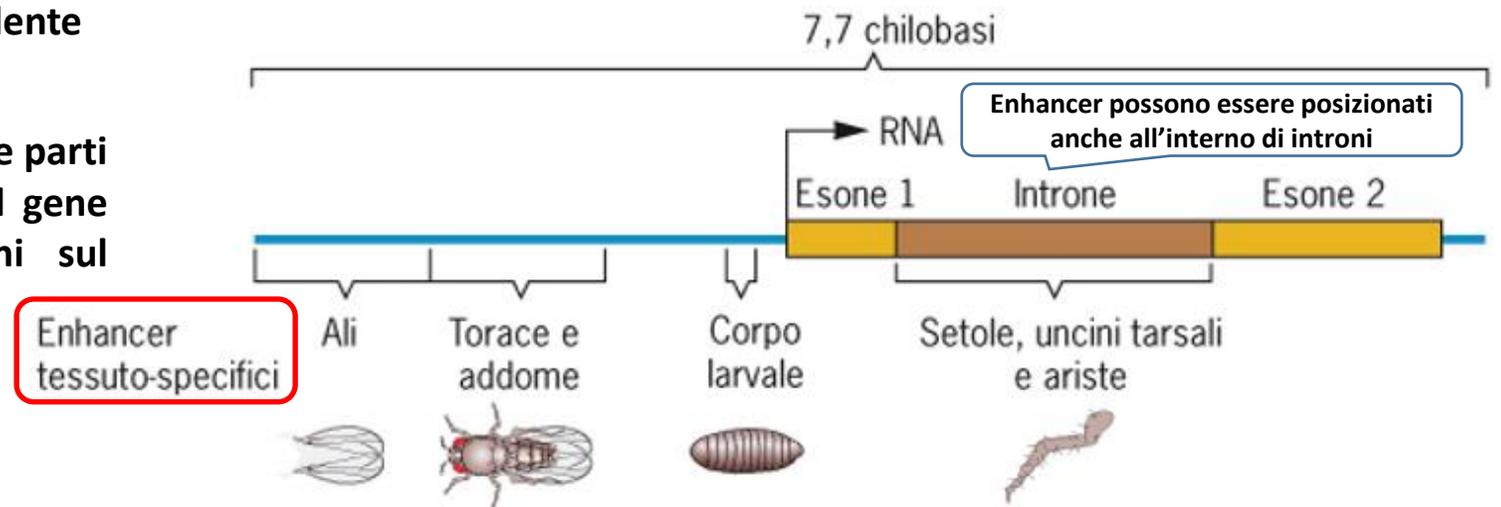
L'enhancer, di solito localizzato in prossimità dei geni che controlla, è alla base della **regolazione tessuto-specifica**.

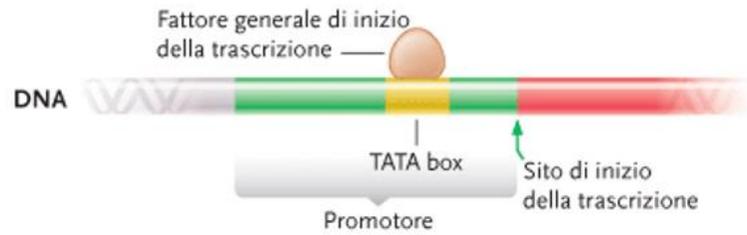
- La sua attività è indipendente dalla posizione;
- Può agire a distanza dai geni regolati;
- La sua attività è indipendente dall'orientamento.

Batteria di enhancer per il colore di alcune parti del corpo di *Drosophila*, che controlla il gene *yellow*, distribuita in diverse posizioni sul cromosoma.

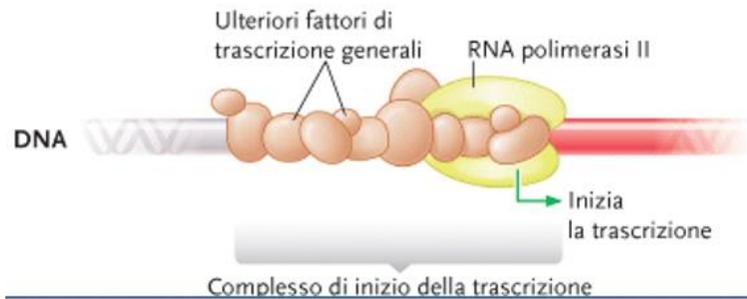
Una mutazione in un enhancer in un particolare tessuto porta alla colorazione gialla.

Il gene *yellow* di *Drosophila* più le sequenze regolative a monte



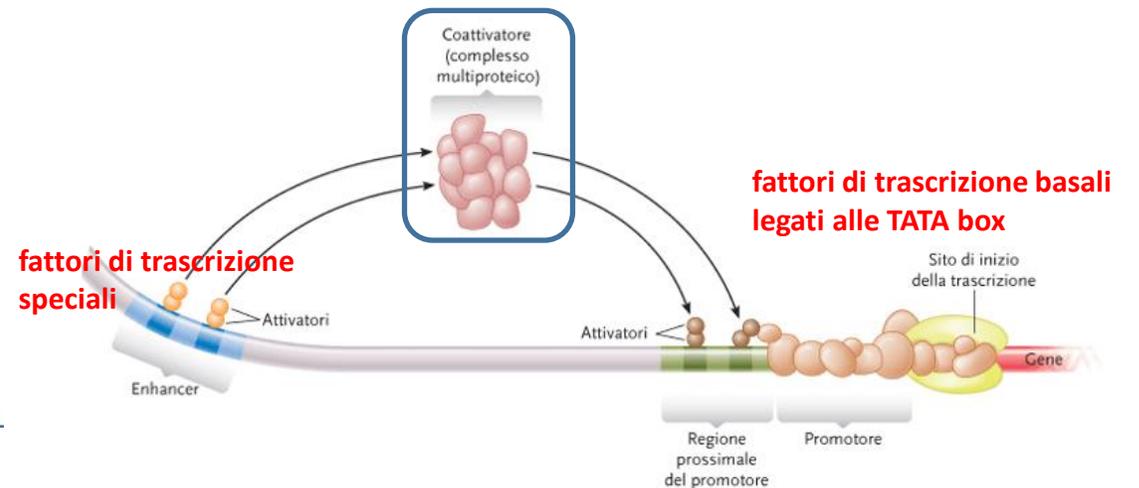


1 Il primo fattore di trascrizione generale riconosce e lega la TATA box di un promotore di un gene che codifica per una proteina.



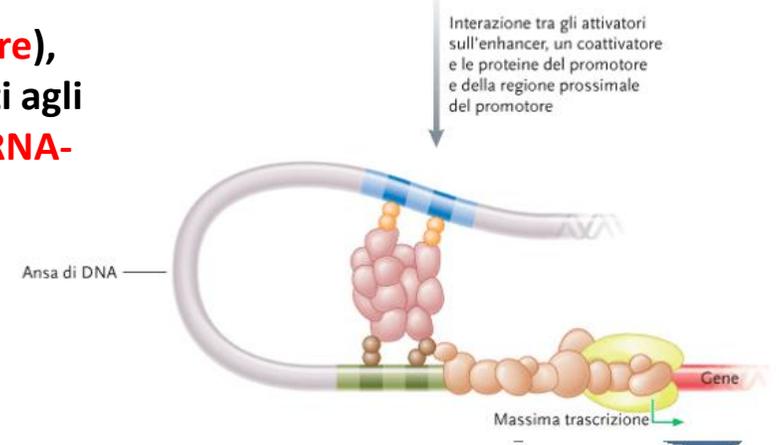
2 Ulteriori fattori di trascrizione generali e poi la RNA polimerasi si aggiungono al complesso, e quindi la trascrizione inizia.

Azione dell'enhancer



Un **complesso multiproteico mediatore (coattivatore)**, interagendo con i **fattori di trascrizione speciali** legati agli **enhancer**, con i **fattori di trascrizione basali** e con l'**RNA-polimerasi**, induce un ripiegamento del DNA.

↓
Controllo a livello della trascrizione



PROTEINE che controllano l'espressione genica a livello della trascrizione

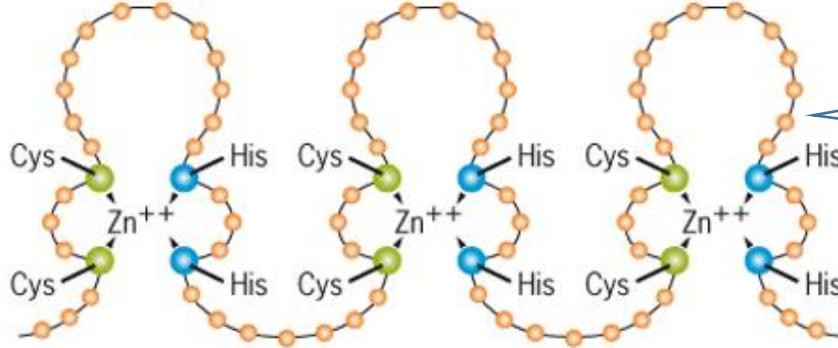
Agiscono da fattori di trascrizione

Attivatori trascrizionali proteici

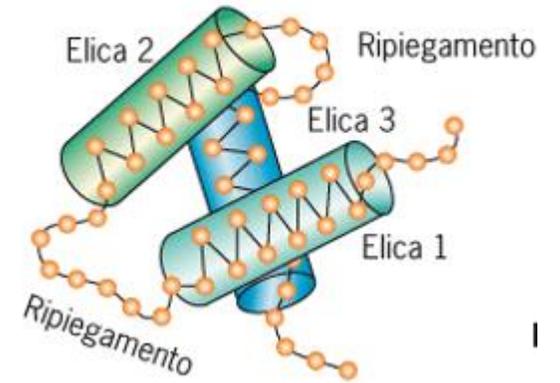
di solito, presentano due distinti domini:

- Dominio di legame al DNA (DNA-binding domain)
- Dominio di attivazione della trascrizione.

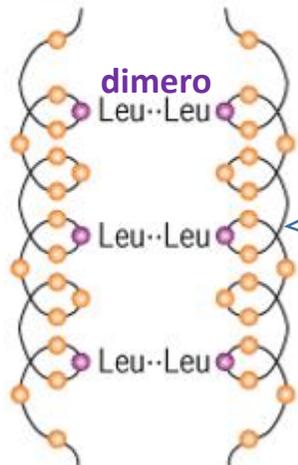
Motivo zinc finger



Motivo helix-turn-helix



Motivo leucine zipper



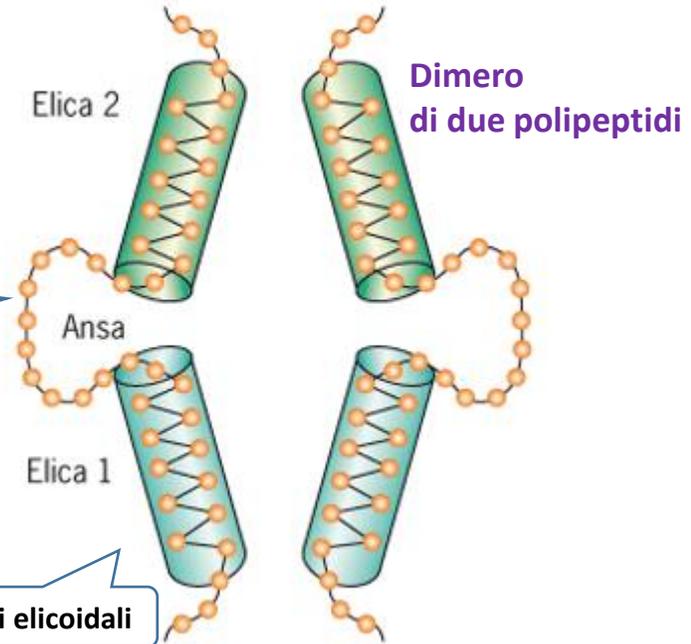
Interazione di due catene polipeptidiche con leucine in ogni settima posizione (formazione di dimeri di Leucina)

Sono stati riconosciuti **diversi motivi strutturali** (conformazioni) delle proteine (fattori di trascrizione) che consentono il legame con specifiche sequenze della catena di DNA.

- **Dito di zinco**
- **Elica-giro-elica**
- **Dominio a cerniera di leucina**
- **Elica-ansa-elica (dimero)**

Queste diverse conformazioni influenzano a vario modo l'espressione genica a livello della trascrizione

Motivo helix-loop-helix



CONTROLLO ESPRESSIONE GENICA POST-TRASCRIZIONALE

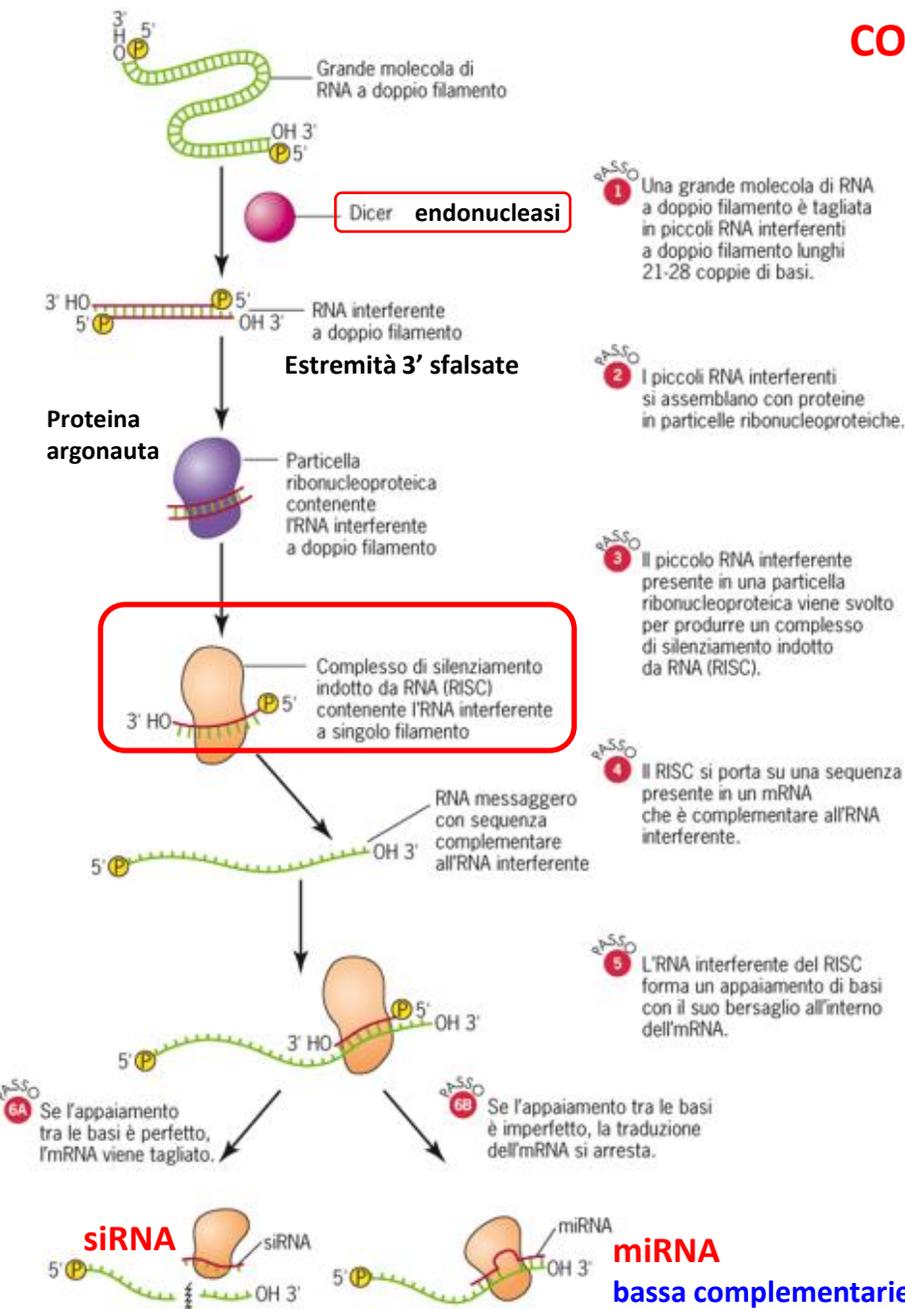
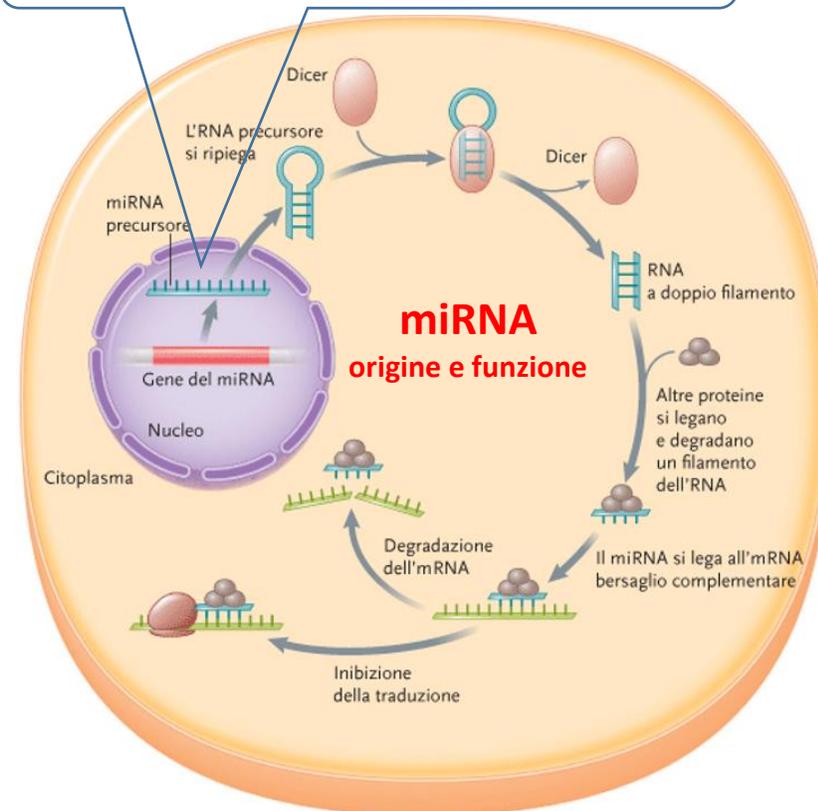
Nel silenziamento di un gene, oltre a fattori proteici, possono essere coinvolte anche piccole molecole di RNA non codificante (21-28 pb) nell'ambito di un meccanismo definito **RNA interference (RNAi)**.

← **RNA INTERFERENCE** ← *short interfering RNA (siRNA)*, *microRNA (miRNA)*

miRNA ← derivano da RNA codificato dal genoma cellulare (geni mir)

siRNA ← derivano da trasposoni, transgeni o RNA virali???

Sequenze nucleotidiche ripetute in orientamento opposto fiancheggiando un breve segmento intermedio (→ **stem-loop**). **Drosha** riconosce ed escinde la struttura stem-loop nel nucleo.



Più frequente nei vegetali

Più frequente negli animali

Il **complesso ribonucleoproteico (proteine-siRNA/miRNA)** si lega a sequenze complementari specifiche di mRNA bloccandone l'espressione.

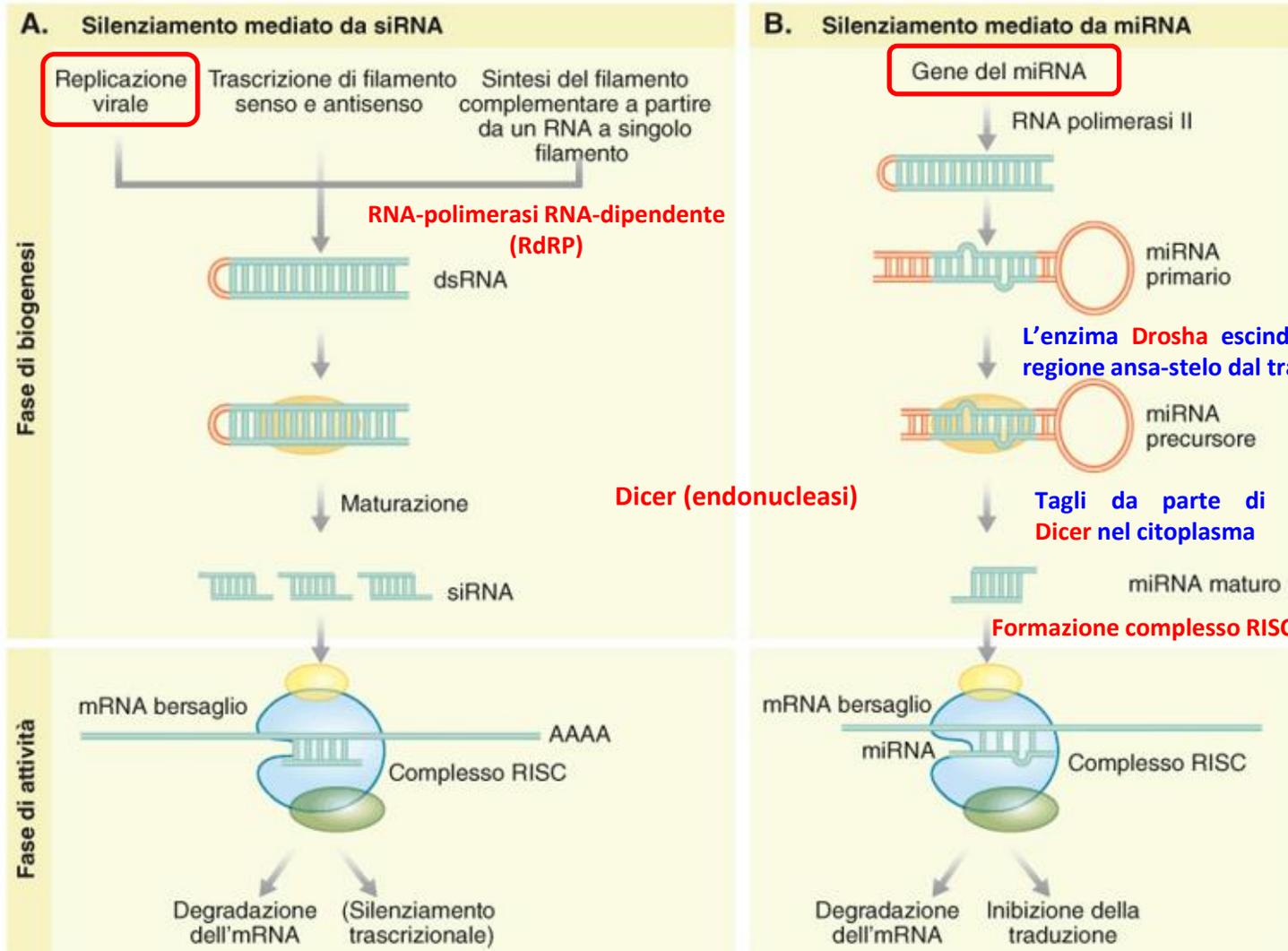
Il **complesso proteine-siRNA/miRNA** previene l'espressione del gene da cui ha avuto origine l'mRNA

Complesso di silenziamento indotto da RNA (RISC)
RNA-induced Silencing Complex

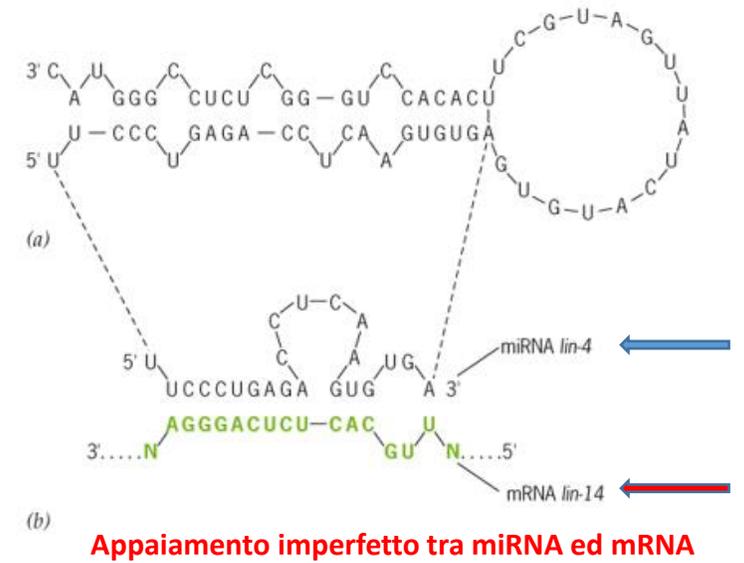
Origine **small interfering RNA (siRNA)** e **micro RNA (miRNA)**

Principali funzioni dei siRNA

difesa contro le infezioni da parte di virus e di regolazione degli elementi trasponibili. I siRNA in seguito all'appaiamento con geni virali causa la degradazione dell'RNA complementare.



Struttura ansa-stelo del trascritto di un gene *mir*



Caratteristiche	miRNA	siRNA
Filamento di RNA	Singolo	Doppio
Origine	Endogeno	Esogeno
Complementarietà con mRNA	Imperfetta	Perfetta
Varietà dei target	Notevole	Scarsa
Effetto	Blocco traduzionale	Degradazione mRNA

Espressione genica influenzata dalla CROMATINA

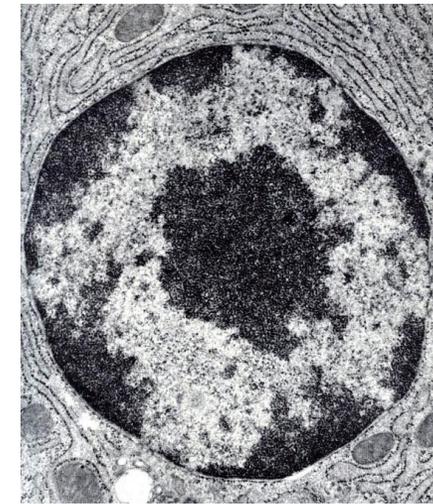
Cromatina ← proteine + DNA

Eterocromatina

- più condensata,
- si colora intensamente,
- DNA non codificante.

Eucromatina

- meno condensata,
- si colora finemente,
- DNA codificante (contiene la maggior parte dei geni).



La maggior parte dei geni è localizzata nell'eucromatina.

Trasponendo un gene eucromatico in una regione eterocromatica viene alterata/inibita la sua espressione.

Variegazione per effetto di posizione

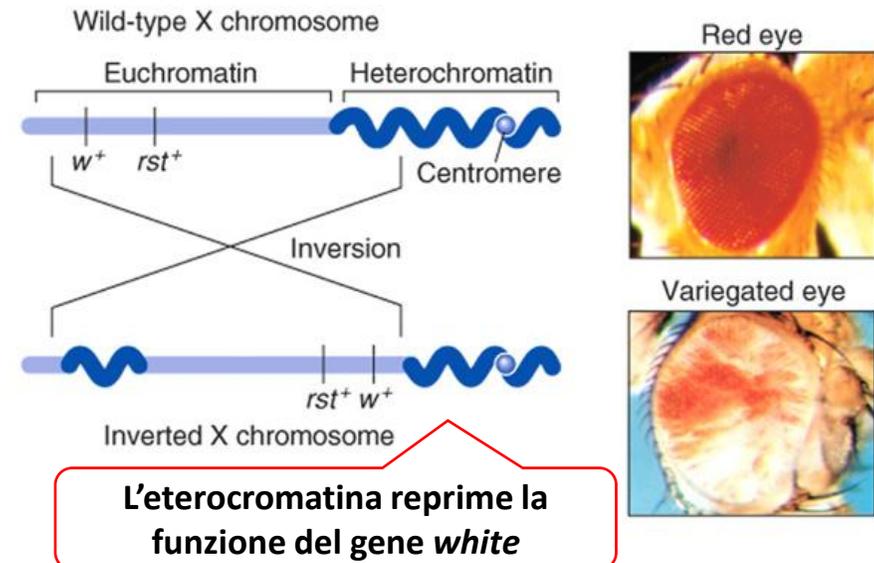
Eterocromatina reprime la normale funzione genica

- **Variegazione per effetto di posizione**
- **Metilazione del DNA**
- **Acetilazione degli istoni**

esempi di espressione genica non correlata ad una alterata sequenza nucleotidica del gene.

CONTROLLO EPIGENETICO

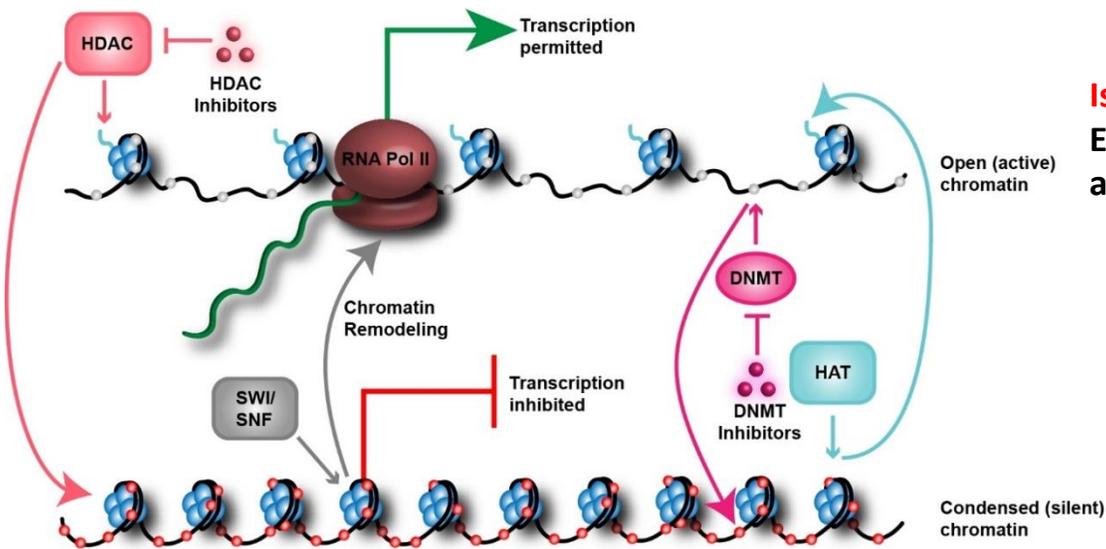
Position-effect variegation



Organizzazione del DNA TRASCRIZIONALMENTE ATTIVO

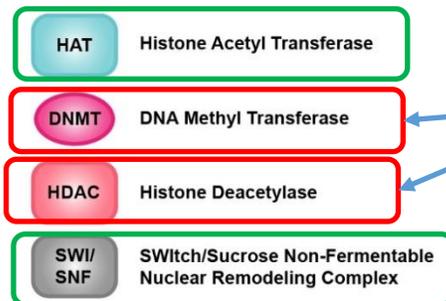
Il DNA trascrizionalmente attivo risulta più sensibile all'attacco della DNasi I pancreatica.

Il trattamento con basse concentrazioni di DNasi I individua siti specifici definiti siti ipersensibili alla DNasi I (regioni promotore, regioni enhancer, ... → regioni di DNA più svolto o pre-attivato per attività trascrizionale?).



KEY

- Unmethylated Cytosine Bases
- Acetylated Histone
- ~ RNA
- Methylated Cytosine Bases
- Deacetylated Histone
- Nucleosome



© 2016 MyCancerGenome.org

HMT: histone methylases → metilazione a livello istonico

RIMODELLAMENTO DELLA CROMATINA (chromatin remodeling)

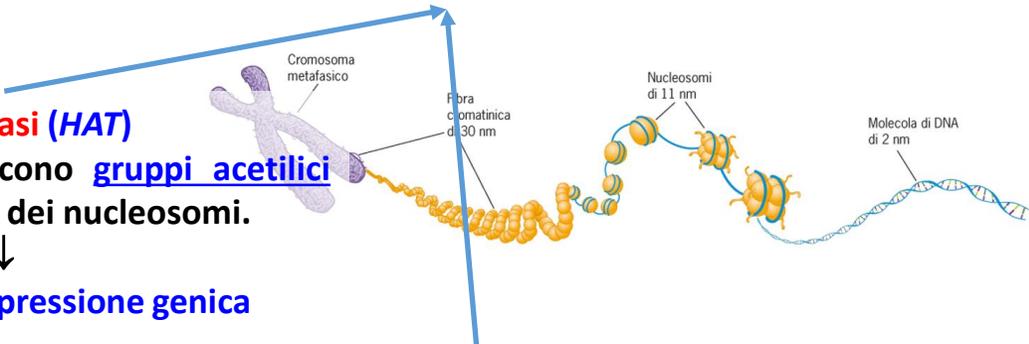
Rimodellamento cromatina mediante ATTIVAZIONE

Durante la trascrizione il DNA resta avvolto sotto forma di nucleosomi, che risultano leggermente modificati da complessi multiproteici per facilitare l'attività dell'RNA polimerasi.

Istone acetil-transferasi (HAT)

Enzimi che trasferiscono gruppi acetilici alla lisina degli istoni dei nucleosomi.

stimolazione espressione genica



Complessi che alterano la struttura del nucleosoma

Tra questi, il complesso multiproteico **SWI/SNF**, inducendo lo scorrimento dell'ottamero istonico lungo la molecola di DNA, consente il legame di fattori di trascrizione.

stimolazione espressione genica

Rimodellamento cromatina mediante INATTIVAZIONE

Enzimi possono indurre modifiche biochimiche a livello istonico (**HDAC, HMT**) e nucleotidico (**DNMT** → **5'-metilcitosina**) in grado di silenziare la trascrizione del DNA.

5' mCpG 3' ← **Metilazione della citosina del dinucleotide CpG**

Alcune proteine, tra cui **MeCP2**, formano complessi con il DNA metilato inibendone la trascrizione.

Effetto IMPRINTING nell'espressione genica

L'espressione genica può essere influenzata dall'**origine parentale del gene** (materna o paterna).

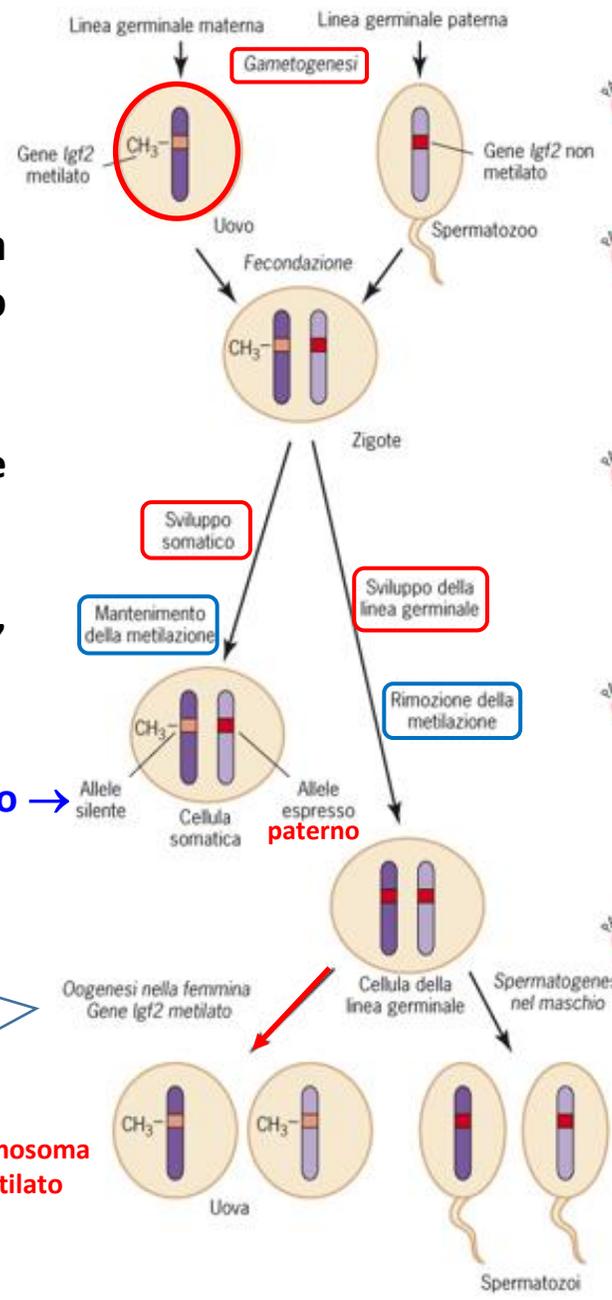
↑
Metilazione di dinucleotidi CpG (mCpG) nelle vicinanze del gene.

Sono stati identificati diversi geni imprinted, anche nell'uomo.

Metilazione → gene non espresso →

Metilazione di dinucleotidi CpG nelle vicinanze del gene *Igf2* nella linea germinale femminile

Nelle cellule uovo, anche il cromosoma di derivazione paterna viene metilato



Metilazione e imprinting del gene *Igf2* (fattore di crescita insulino-simile) nei topi

- 1 Gli alleli del gene *Igf2* sono "imprinted" nella linea germinale parentale – metilati nella linea femminile e non metilati in quella maschile.
- 2 Gli alleli "imprinted" del gene *Igf2* di ciascun genitore si uniscono nello zigote durante la fecondazione.
- 3 Durante lo sviluppo dei tessuti somatici, l'allele materno rimane metilato e quello paterno non metilato. Nelle cellule somatiche, solo l'allele paterno non metilato è espresso, mentre quello materno metilato è silente.
- 4 Durante lo sviluppo della linea germinale, la metilazione è rimossa.
- 5 La metilazione viene ristabilita durante l'oogenesi, ma non durante la spermatogenesi. Quindi, se l'animale è femmina, tutti i geni *Igf2* saranno metilati, anche se sono copie dell'allele *Igf2* non metilato derivato dal padre. Se l'animale è maschio, nessuno dei geni *Igf2* sarà metilato, anche se sono copie dell'allele *Igf2* metilato derivato dalla madre.

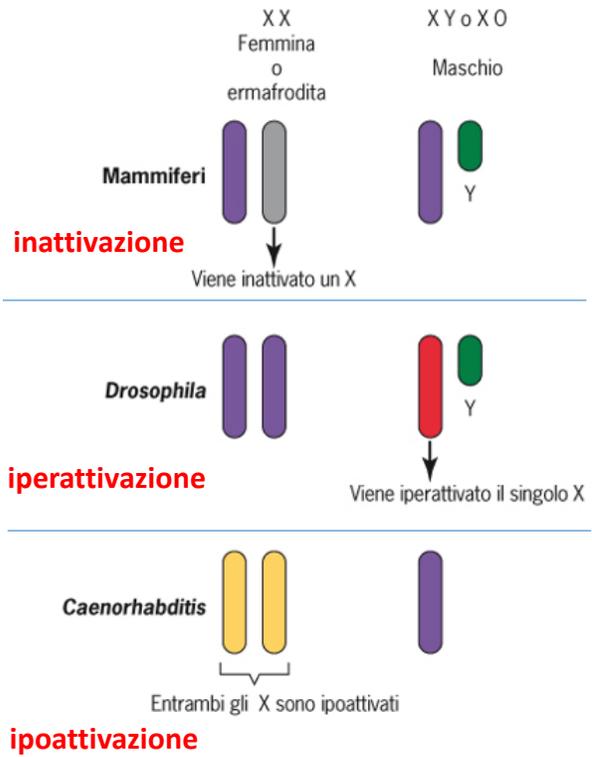
Negli spermatozoi, anche il cromosoma di derivazione materna non viene metilato

Esistenza di un sistema di metilazione dipendente da **fattori sesso-specifici**.

Diversi meccanismi di compensazione del dosaggio



eguagliare l'attività dei geni x-linked nei due sessi



I 3 diversi meccanismi agiscono su geni diversi che, risiedendo sullo stesso cromosoma, vengono regolati in modo coordinato. Esistenza di **fattori** che si legano al cromosoma X e condizionano l'attività trascrizionale.

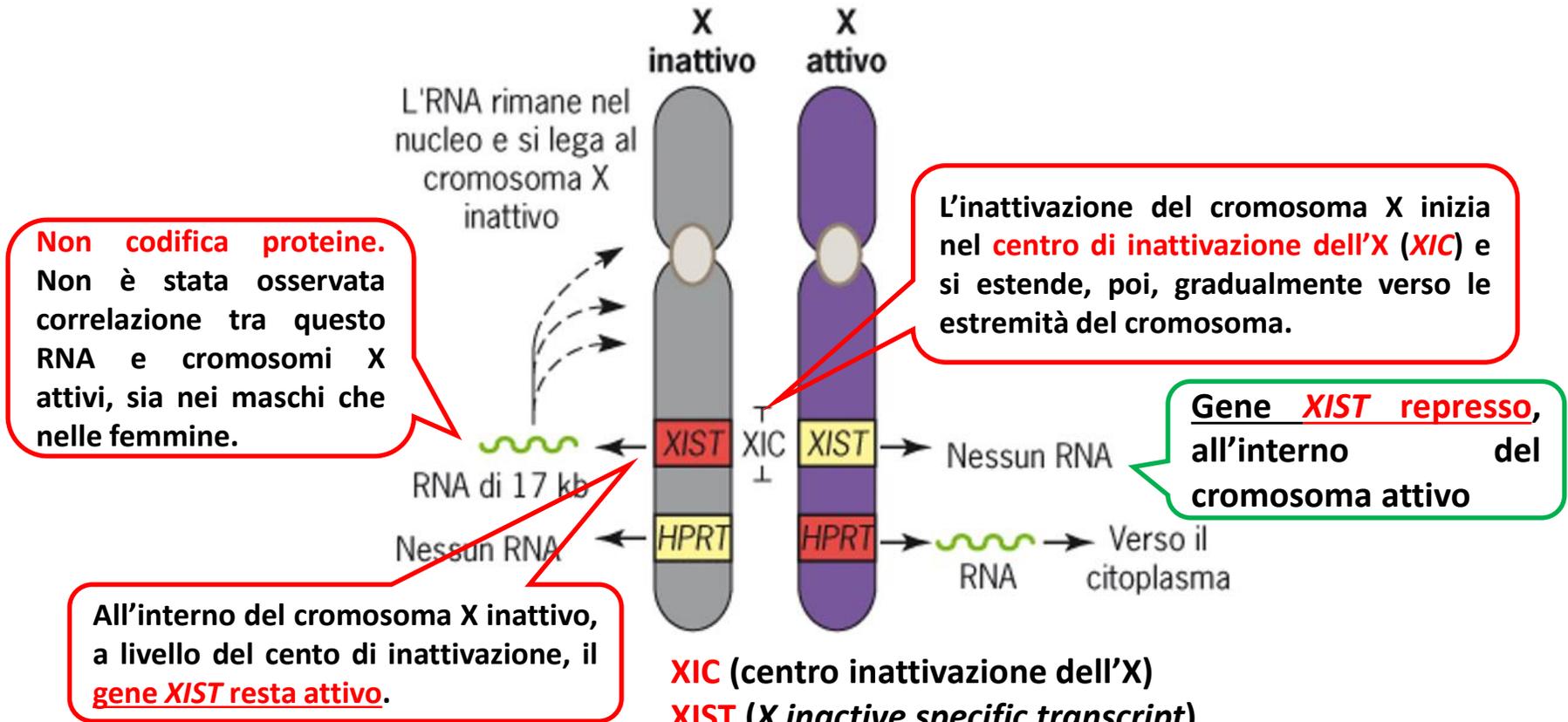


Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
EdiSES

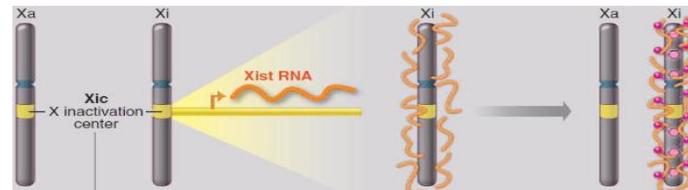
INATTIVAZIONE CROMOSOMA X nei mammiferi

Nei mammiferi l'inattivazione del cromosoma X inizia dal **centro di inattivazione (XIC)**.

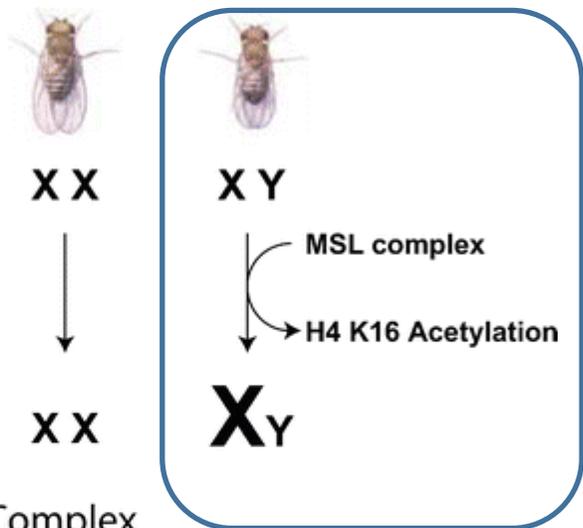
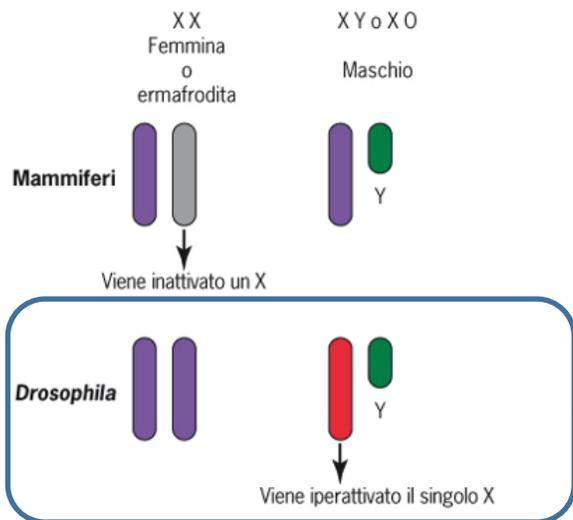
Uomo → **femmina** (il maschio possiede un solo x)



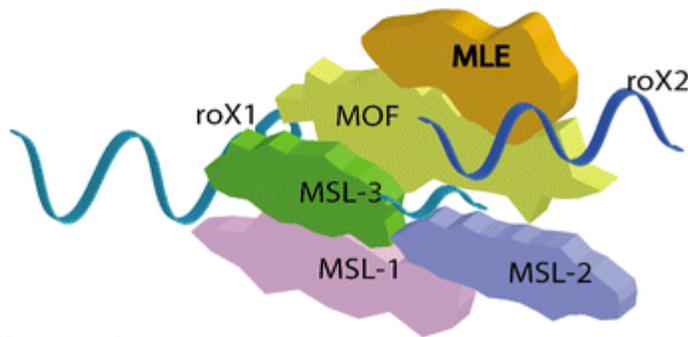
Il cromosoma X inattivato non presenta istoni H4 acetilati.



a Dosage Compensation in Drosophila



b The MSL Complex



Rimodellamento della cromatina

DROSOPHILA

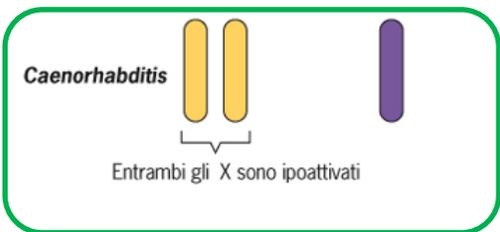
Nel processo di iperattivazione del cromosoma X dei maschi sono coinvolte proteine MSL codificate da almeno 5 geni *male-specific lethal (msl)*.

Mutazioni in questi geni inducono la morte degli embrioni maschi in via di sviluppo (mutazioni letali).

Le **proteine *msl*** formano un complesso che si lega in alcuni siti del cromosoma X del maschio, con l'**ausilio di molecole di RNA** (*roX1* e *roX2*) prodotte da geni presenti sullo stesso cromosoma.

Il **complesso MSL/*roX***, poi, si estende a tutto il cromosoma X rendendolo **iperattivo**.

Una proteina MSL (**acetil-trasferasi istonica**) potrebbe indurre l'acetilazione dell'istone H4.



Negli ermafroditi (XX) di *Caenorhabditis*

l'ipoattivazione dei cromosomi X è mediata da **proteine** che legandosi ad essi ne **riducono la trascrizione genica**.

Le **proteine coinvolte** si legano solo ai cromosomi X e solo quando questi sono **presenti in coppia** (ermafroditi); non sono attive verso i cromosomi X presenti in copia singola (maschi).