

I procarioti controllano l'espressione genica

Nei procarioti certe proteine legate al DNA «accendono» e «spengono» i geni.

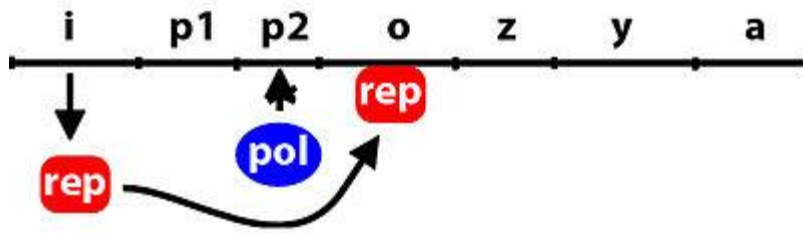
La regolazione genica nei procarioti è spiegata dal modello dell'**operone**, formato dai seguenti componenti:

- un gene regolatore;
- un promotore;
- un operatore;
- alcuni geni strutturali.

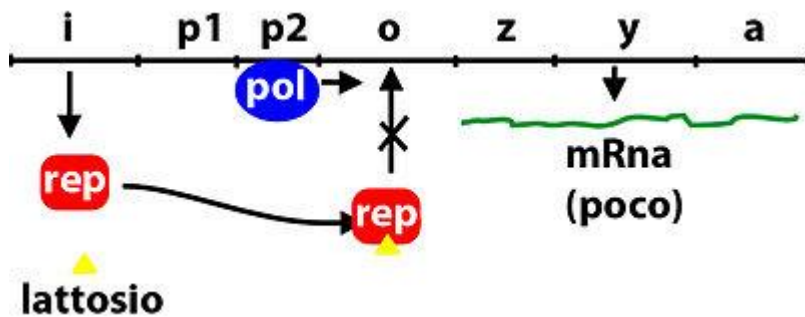
La regolazione nei procarioti

I geni batterici sono tipicamente raggruppati in operoni, in cui più geni si susseguono l'un l'altro preceduti da un unico promotore e trascritti insieme in un unico **RNA policistronico**.

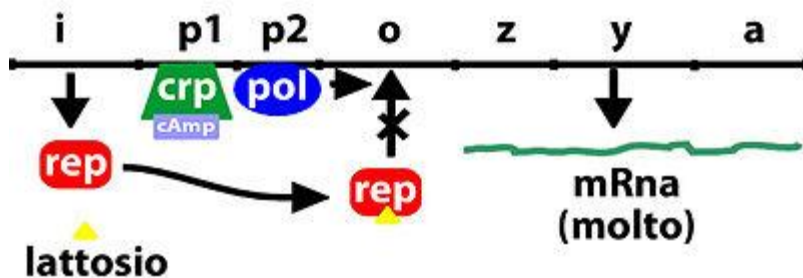
Il primo operone di cui è stata studiata la regolazione a livello molecolare è **l'operone del lattosio** di *Escherichia coli*. Esso consiste di tre geni (*LacZ*, *LacY*, *LacA*) posti di seguito, sotto il controllo di un unico promotore, i quali codificano tre proteine coinvolte nel metabolismo del lattosio: la **β -galattosidasi**, una **permeasi** e una **transacetilasi**. La permeasi facilita l'ingresso del lattosio nella cellula, la β -galattosidasi catalizza la scissione del lattosio in galattosio e glucosio, che poi intraprendono la loro via metabolica, la transacetilasi ha una funzione a tutt'oggi non del tutto chiara, aggiunge gruppi acetili al lattosio non appena entrato nella cellula. I tre geni sono preceduti da un promotore inducibile (che cioè permette la trascrizione dell'operone soltanto in risposta ad opportuni stimoli ambientali – in questo caso la presenza del lattosio). Nella regolazione della trascrizione di questo operone sono implicate due proteine regolatrici, il lac-repressor (codificato dal gene ***LacI***) e la cAMP-receptor-protein CRP (codificata dal gene *crp*) detta anche **CAP** (catabolite activator protein).



La proteina repressore si lega all'operatore o, impedendo l'espressione dei geni dell'operone



Il lattosio inibisce, tramite l'induttore allolattosio, l'azione della proteina repressore, consentendo l'espressione



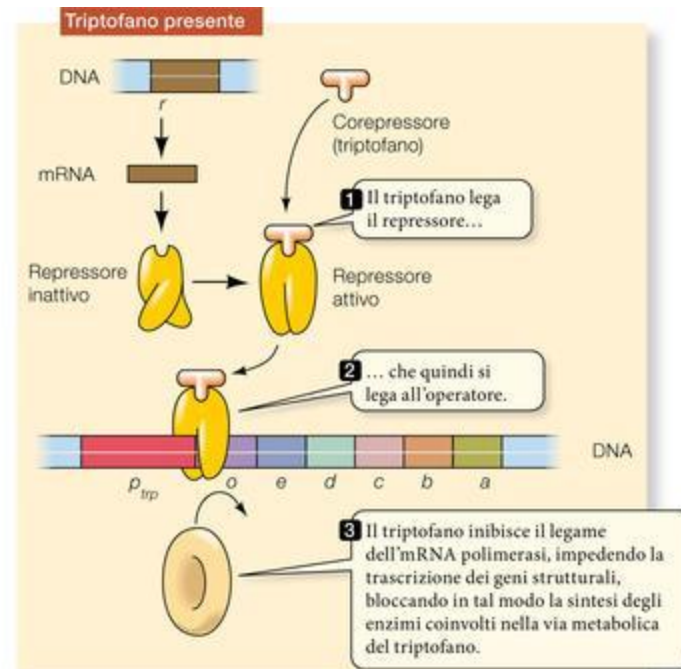
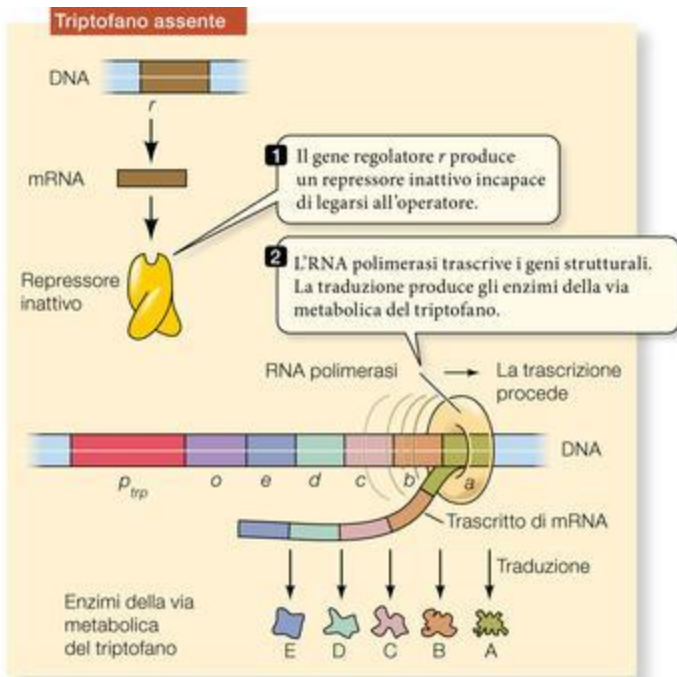
Mancando il glucosio, il complesso CAP-cAMP si lega alla sequenza p1, stimolando la trascrizione

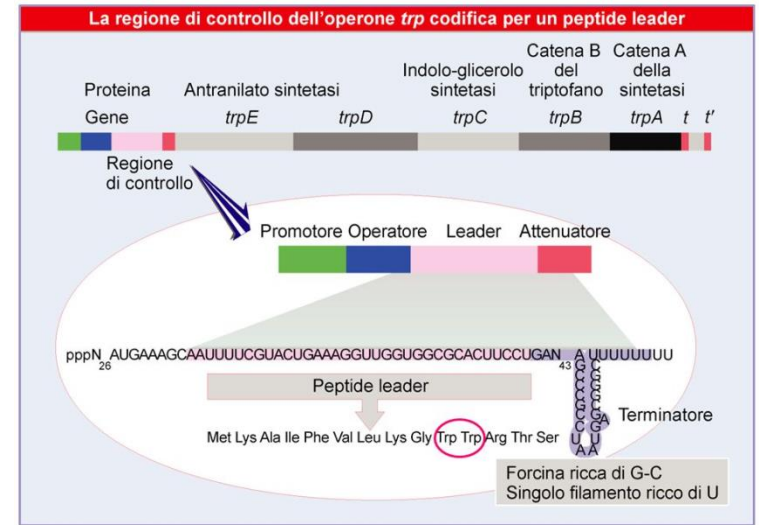
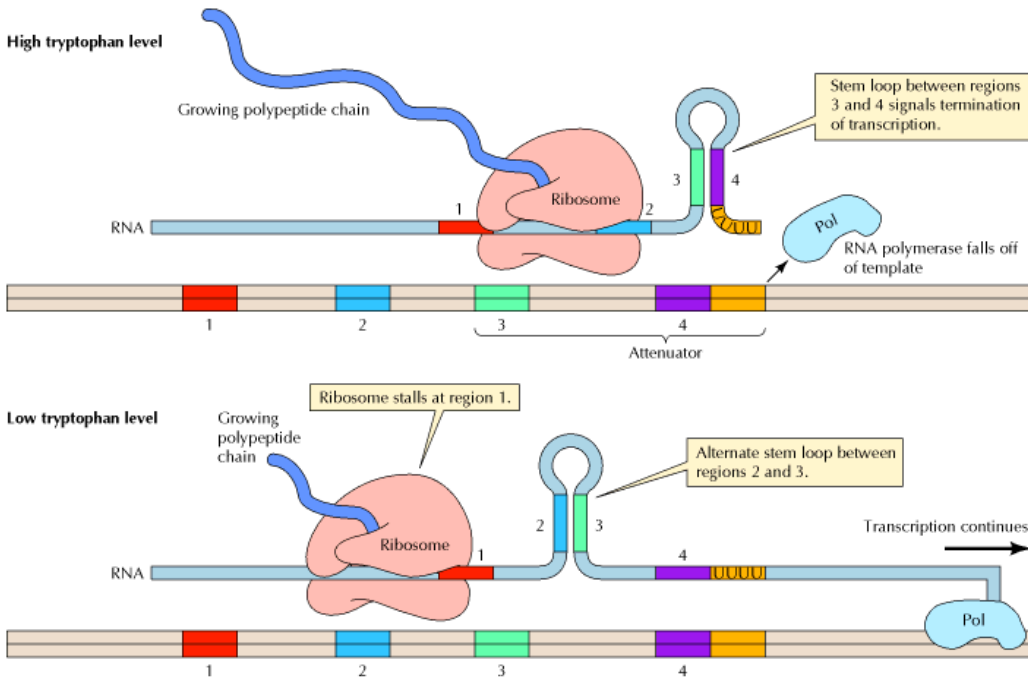
REGOLAZIONE GENICA DELL'OPERONE DEL LATTOSIO

- In **presenza di glucosio e lattosio**, il repressore è inattivo ma lo è anche la CRP, per cui vi è una trascrizione ridotta - è una **repressione da catabolita**(il glucosio).
- In **presenza di glucosio ma non di lattosio**, il repressore è attivo e la CRP inattiva, per cui non vi è trascrizione.
- In **assenza di glucosio e di lattosio**, il repressore e la CRP sono entrambi attivi e non vi è trascrizione.
- In **presenza di lattosio e assenza di glucosio**, il repressore è inattivo e la CRP è attiva, per cui l'operone viene espresso al massimo.

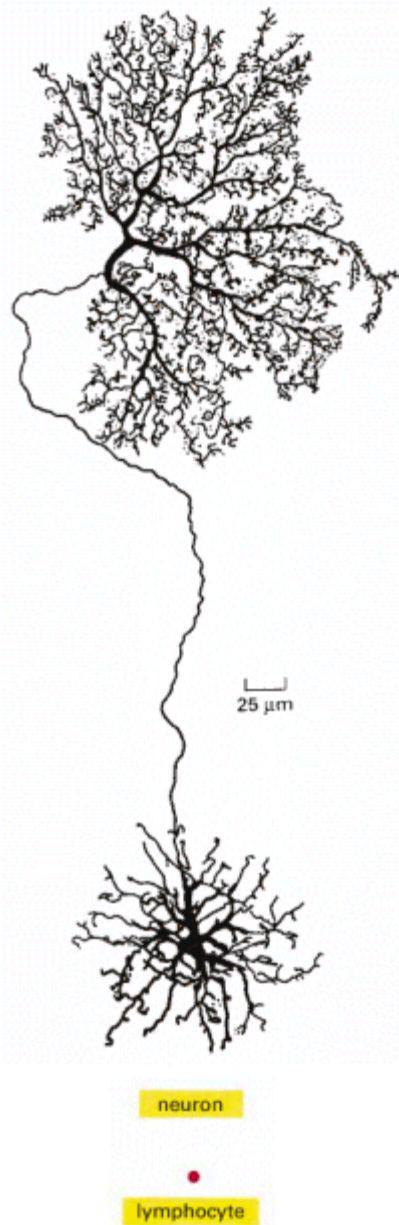
L'operone del triptofano

La regolazione dell'operone del triptofano (che contiene i geni per cinque enzimi necessari alla biosintesi di questo amminoacido) è basata su due meccanismi: il primo implica la presenza di una **proteina repressore** che viene attivata solo dalla presenza di triptofano, con cui interagisce in modo utile a legarsi alla sequenza bersaglio sul promotore dell'operone bloccando la trascrizione, Il secondo meccanismo (l'**attenuazione**) è **esclusivo dei procarioti** in quanto opera in modo concertato tra trascrizione e traduzione.





Mechanism of transcriptional attenuation The *trp* mRNA is translated while still being synthesized. In the presence of high levels of tryptophan, the ribosomes proceed along the message slightly behind the site of transcription. Under these conditions, the mRNA regions designated 3 and 4 hybridize to form a stem-loop structure that signals the termination of transcription. In the presence of low levels of tryptophan, however, the ribosomes stall at region 1 of the mRNA, which contains two adjacent codons for tryptophan. In this case, since region 2 is not bound to a ribosome, it is free to form an alternative stem-loop structure by hybridizing to region 3. This hybridization prevents formation of the 3 4 stem loop, and transcription is able to continue past the attenuator sequence.


















La regolazione dell'espressione genica negli eucarioti è alquanto più complessa che nei procarioti, sia per il maggior numero di geni (da circa 6000 in un eucariote unicellulare molto semplice come il lievito a 20.000-30.000 negli eucarioti pluricellulari, contro 500-5000 nei procarioti), sia soprattutto nei pluricellulari per le esigenze del differenziamento cellulare durante lo sviluppo dell'organismo.

Un neurone e un linfocita di mammifero.

Nonostante le estreme differenze di morfologia, dimensione e funzione, queste due cellule contengono essenzialmente lo stesso patrimonio genetico, e derivano (a seguito di ripetute mitosi accompagnate da differenziamento) da una cellula zigote iniziale.

Negli eucarioti l'espressione genica specializza le cellule

Le cellule eucariotiche sono specializzate grazie all'attivazione di certi geni.

Tipo di cellula	Globulo rosso	Muscolare	Pancreatica
			
Tipo di geni			
Costitutivo			
Per l'emoglobina			
Per l'insulina			
Per la miosina			

Esempi di espressione genica in cellule specializzate: i geni «accesi» sono quelli contrassegnati in colore.

Livelli di modulazione dell'espressione genica in eucarioti

1. pre-trascrizionale cromatinico

2. trascrizionale

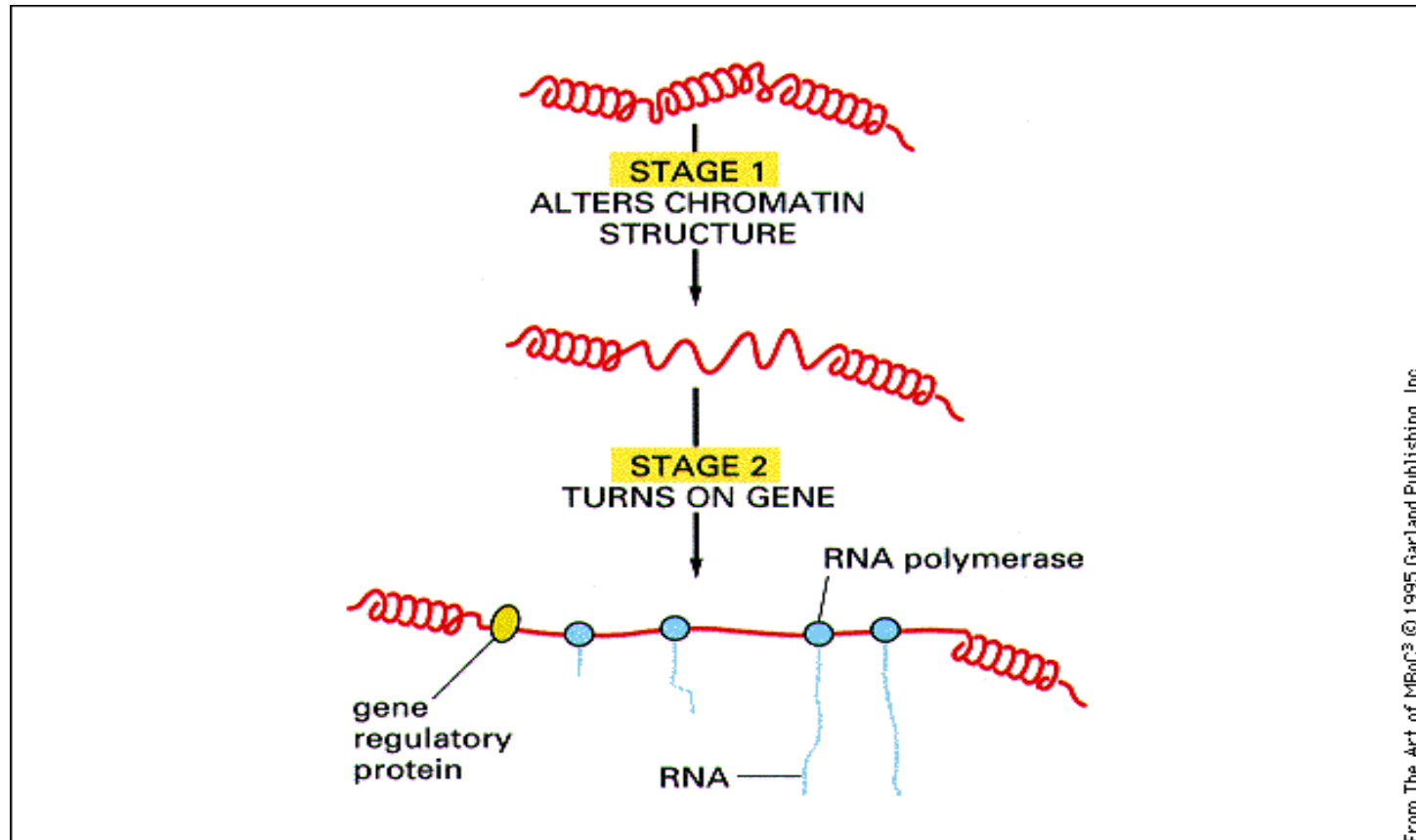
3. post-trascrizionale

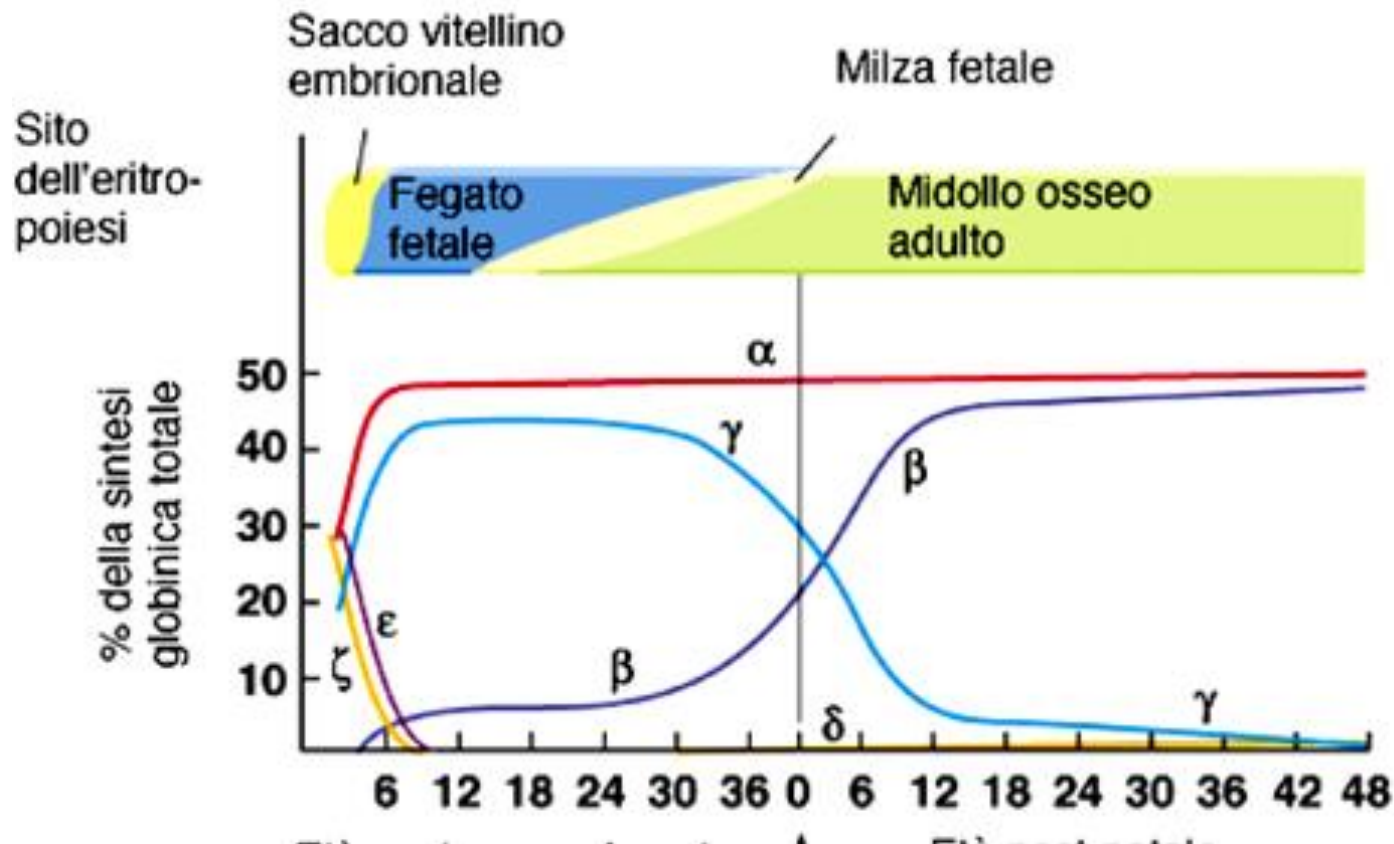
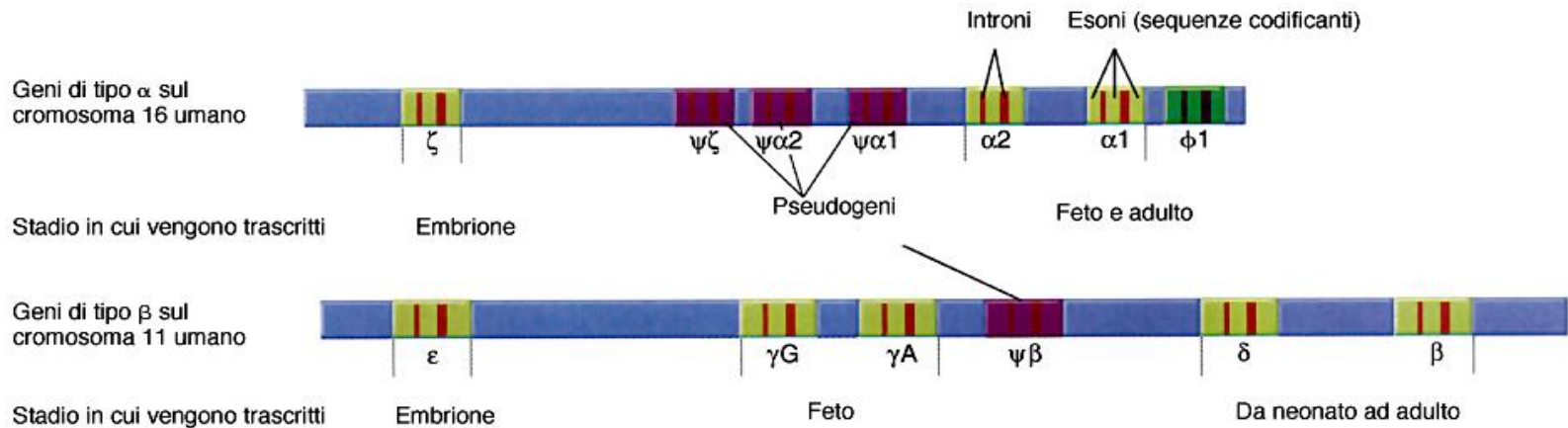
4. traduzionale

5. post-traduzionale, controllo sull'attività della proteina

Il primo livello di regolazione riguarda lo stato di condensazione della cromatina nel nucleo

La decondensazione locale “scopre” il DNA: dissociazione (temporanea) dagli istoni e accessibilità al macchinario della trascrizione





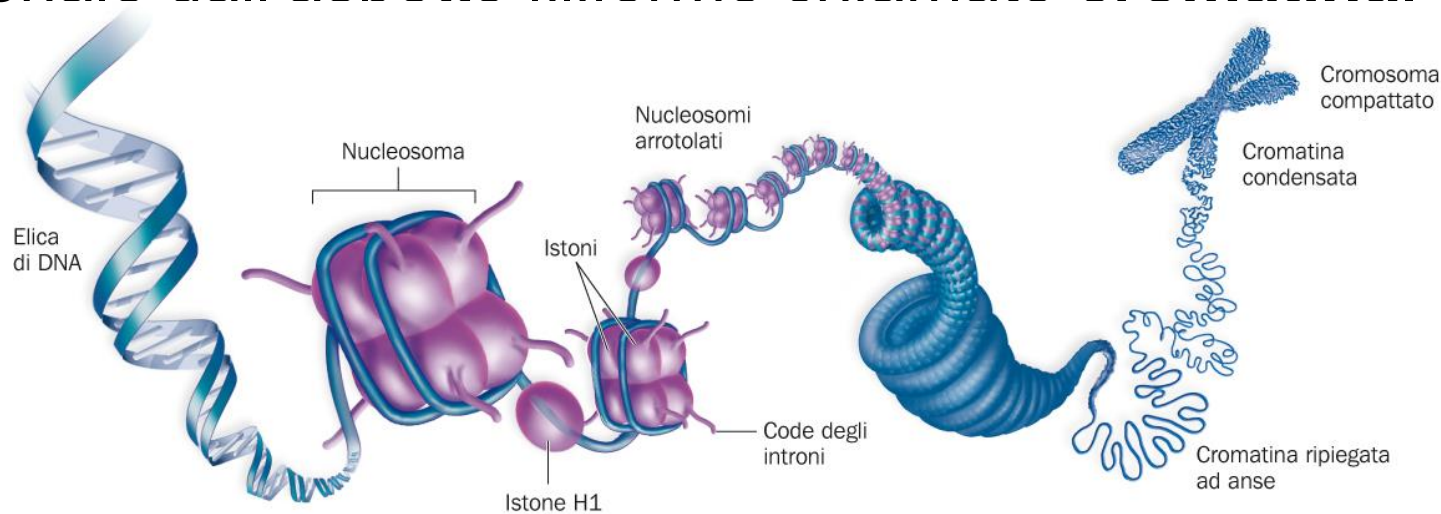
Il controllo trascrizionale è molto importante

Esistono molte proteine di regolazione che legano il DNA (fattori trascrizionali)

Appartengono a famiglie e presentano MOTIVI STRUTTURALI COMUNI molto conservati
MOTIVI conservati••HELIX—TURN--HELIX••ZINC FINGER
••LEUCINE ZIPPER

Negli eucarioti l'espressione genica è controllata a vari livelli

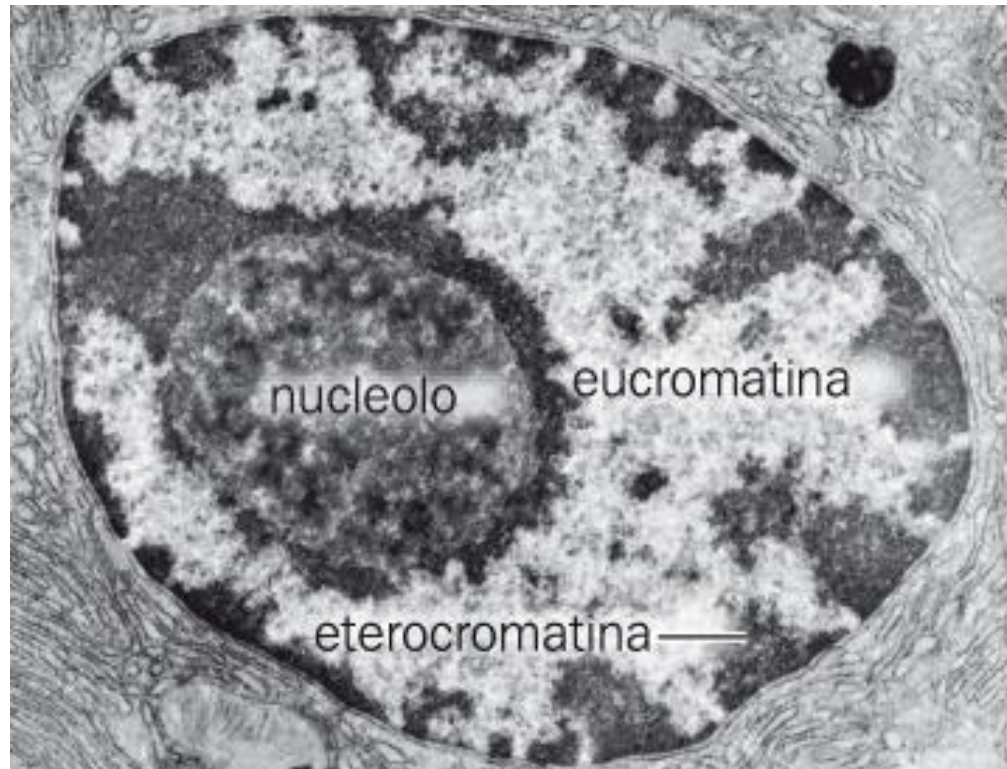
Negli eucarioti il DNA è sempre associato con abbondanti proteine. L'acido nucleico e le proteine formano un materiale dall'aspetto filiforme chiamato **cromatina**.



Durante la divisione cellulare, la cromatina si condensa notevolmente formando i **cromosomi**.

I geni fortemente condensati nella cromatina non vengono espressi

Nell'interfase la maggior parte della cromatina si trova in uno stato poco condensato, lasso, chiamato **euromatina**. I geni posti nell'euromatina possono venire espressi.



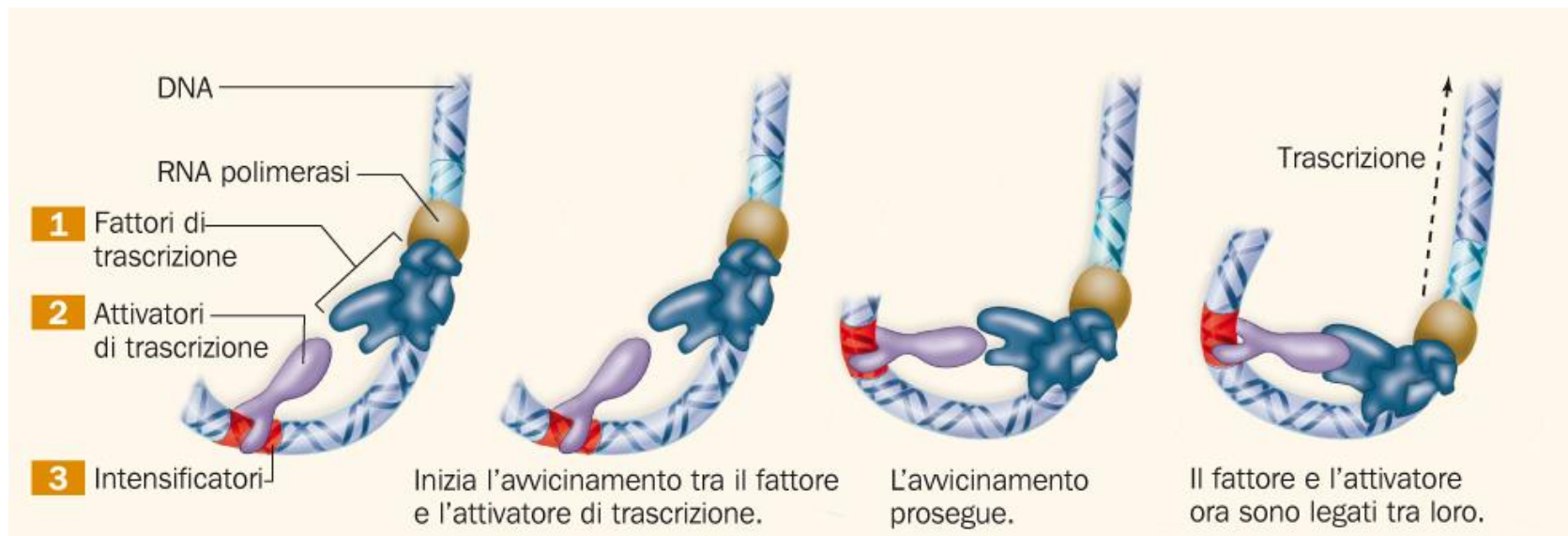
Ogni gene ha diverse sequenze regolatrici
Le sequenze di regolazione a cui si legano
i fattori trascrizionali sono:

- **Promotori**
- **Intensificatori (Enhancer)**
- **Silenziatori**

Diversi fattori trascrizionali specifici devono
essere presenti per accendere completamente
un gene “accendere”

Negli eucarioti le proteine legate al DNA regolano la trascrizione

I **fattori di trascrizione** sono proteine che regolano la trascrizione del DNA. Gli **attivatori di trascrizione** sono coinvolti nella promozione della trascrizione; essi si legano a regioni di DNA chiamate **intensificatori** (o *enhancers*).



Il controllo post post-trascrizionale:

- **splicing alternativo**
- **stabilità del mRNA**

Nell uomo, il numero di geni molto inferiore all'atteso

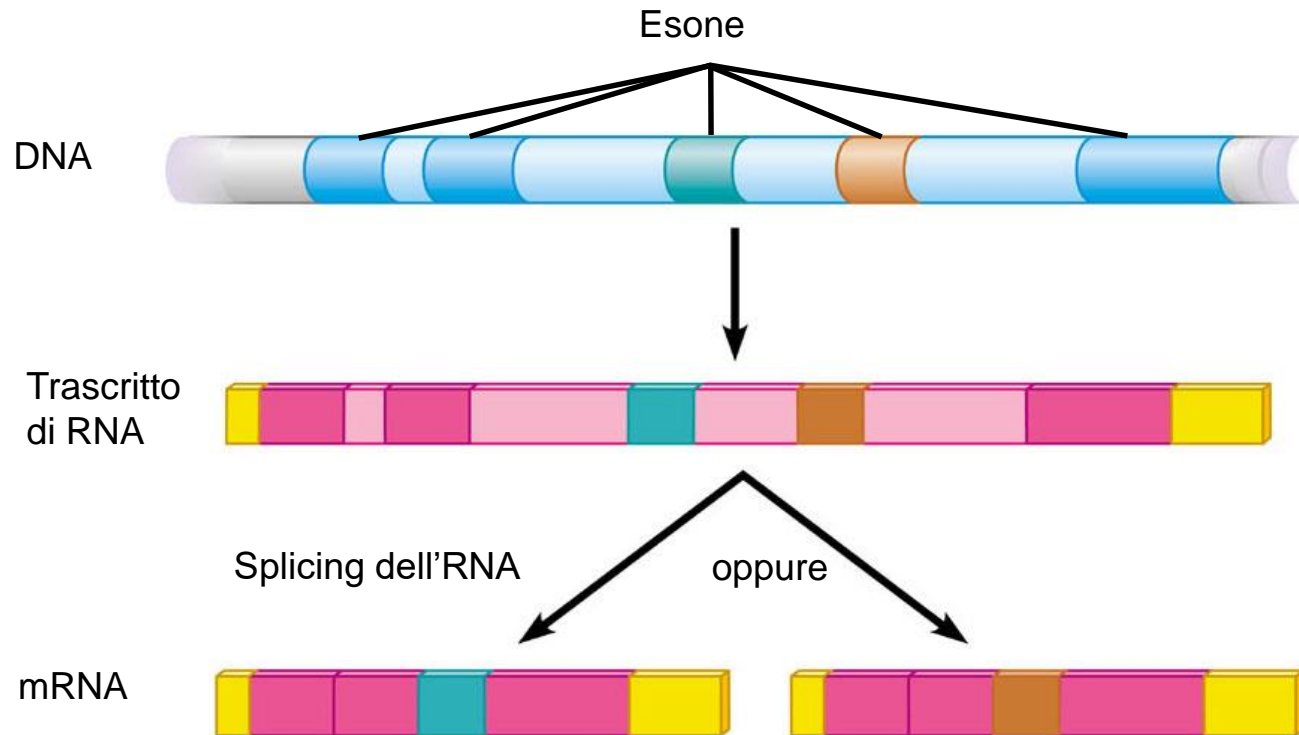
Il genoma umano contiene circa 23,000 geni

Il trascrittoma : almeno il 75% dei geni hanno splicing
alternativo :

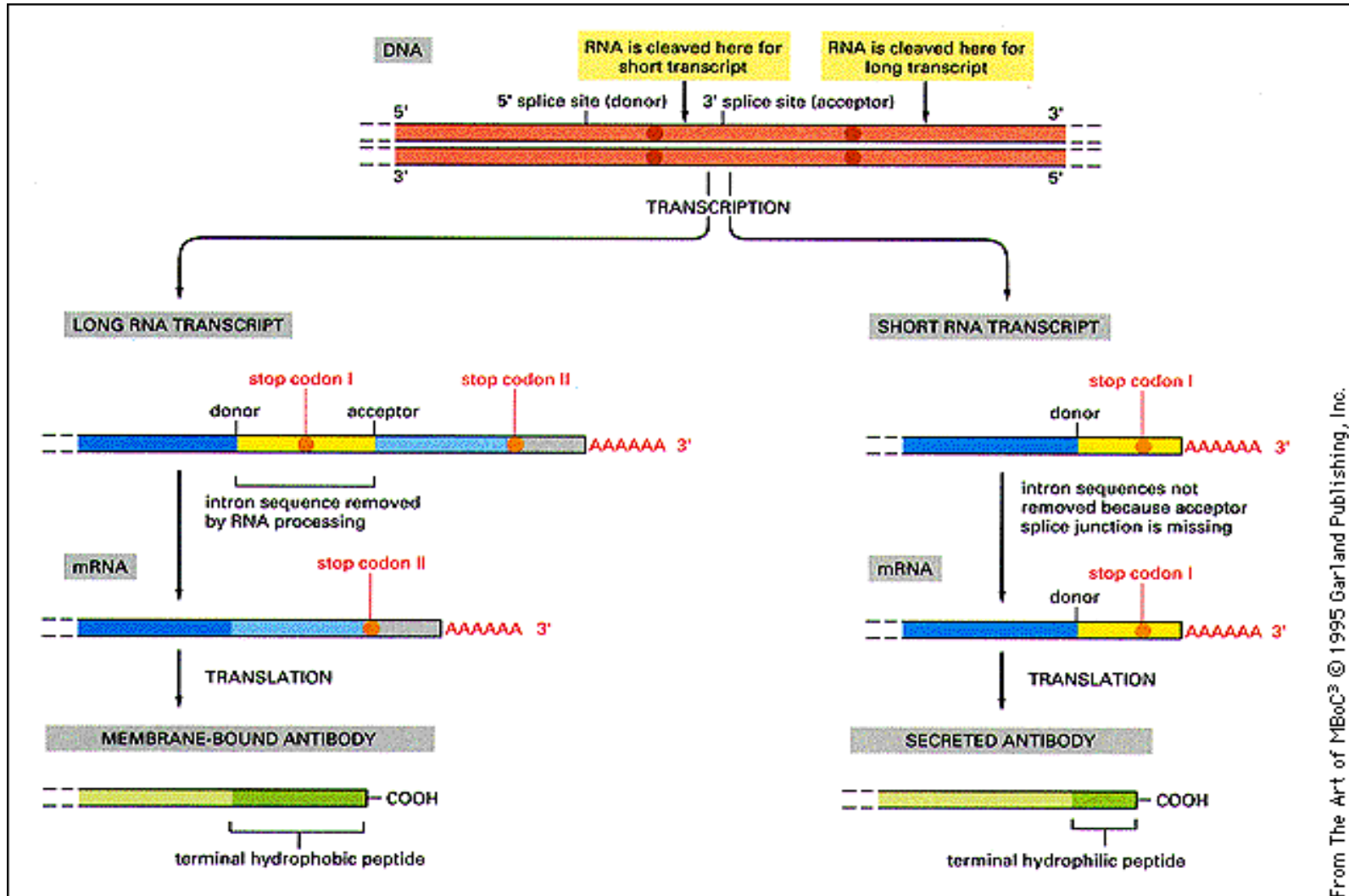
Il proteoma : nel ~70% dei casi, lo splicing genera
sequenze aa diverse, quindi il proteoma costituito da
50.000- 60.000 membri

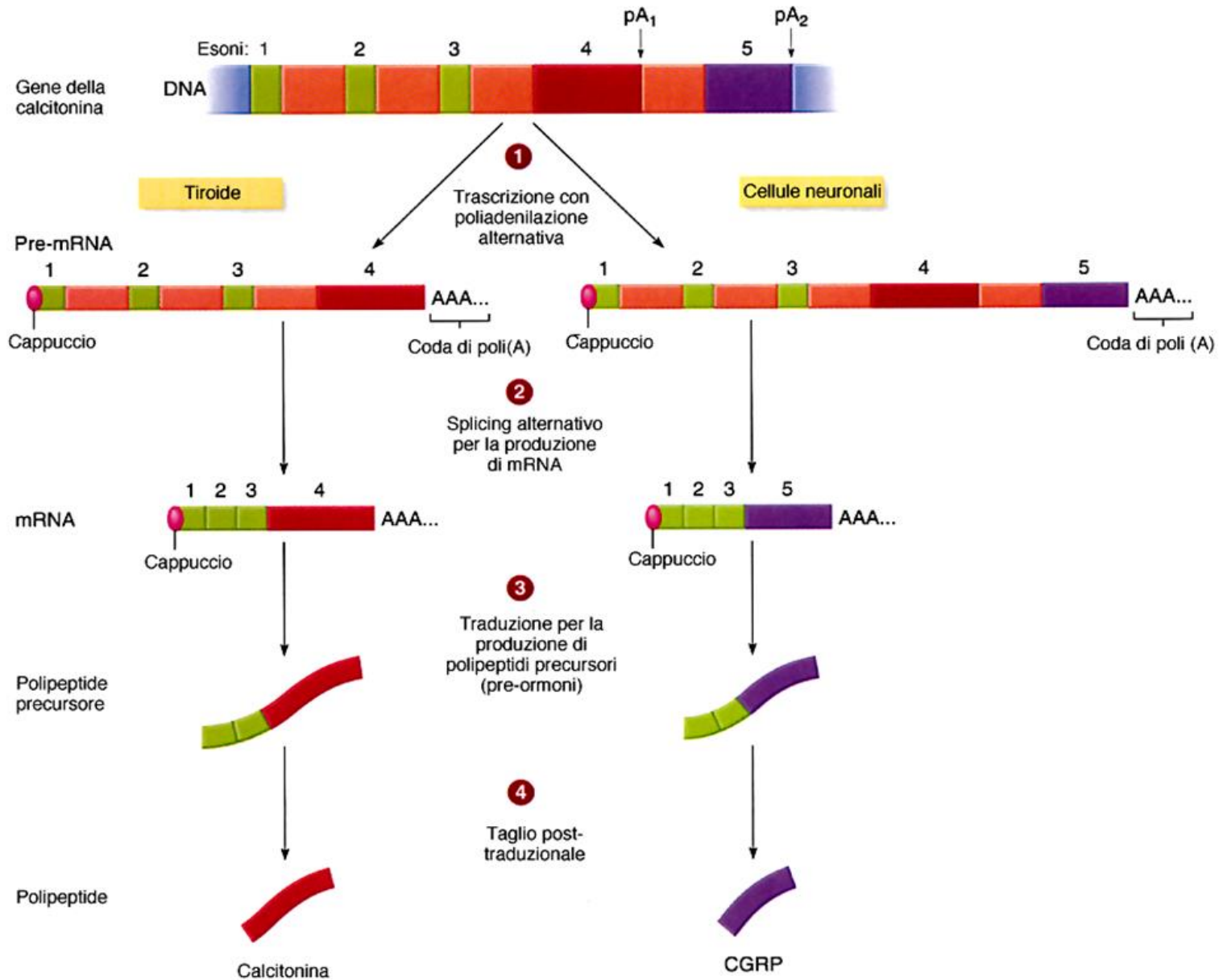
Controllo dopo la trascrizione

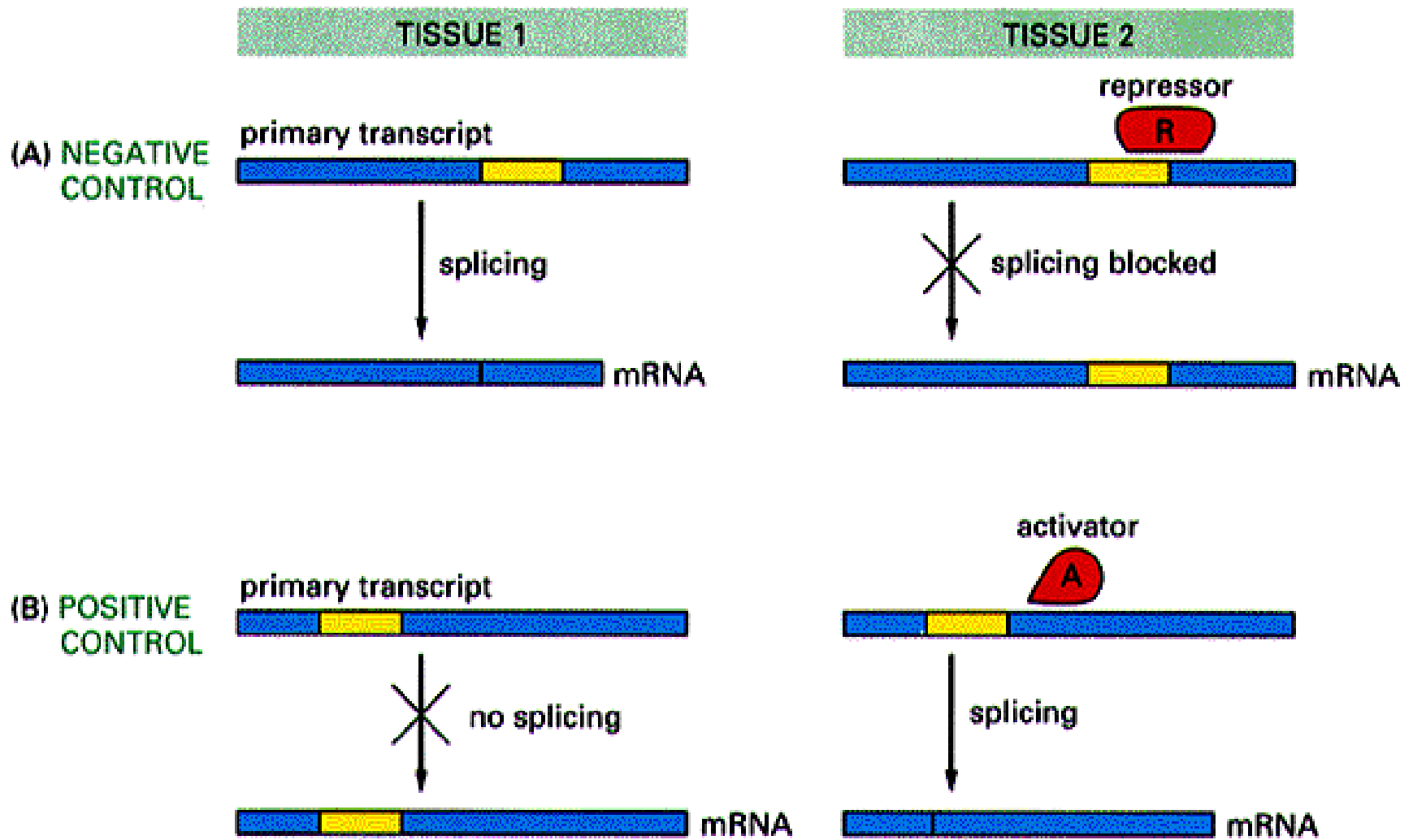
- i segmenti non codificanti (introni) vengono rimossi grazie al processo di **splicing**. In alcuni casi la cellula svolge lo splicing in maniera differente (**splicing alternativo**) e genera diverse molecole di mRNA a partire dallo stesso trascritto di RNA.



Poliadenilazione e splicing alternativi: anticorpi di membrana e di secrezione nei linfociti







Editing dell'RNA

Possibilità di modificare la sequenza nucleotidica di un RNA dopo che è stato trascritto.

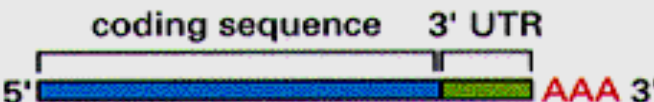

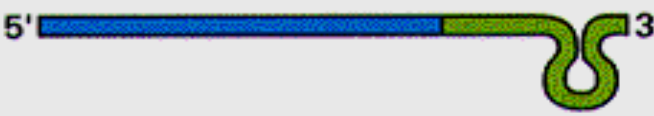
Un ulteriore modo per produrre da un unico gene una varietà di proteine correlate.

Un ulteriore livello di regolazione post-trascrizionale: la stabilità dell' mRNA

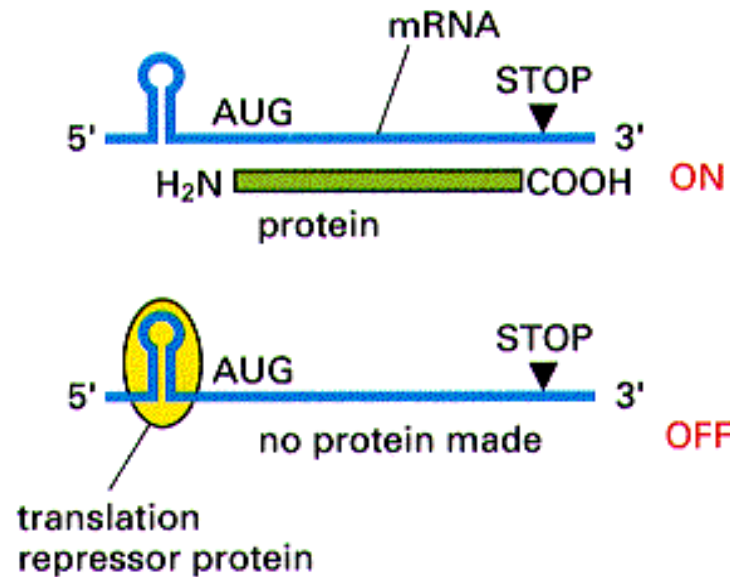
Meccanismi che regolano la degradazione del mRNA:

- Accorciamento o distacco della coda di poli-A
- Perdita del 3'UTR ad opera di endonucleasi specifiche

THE STABILITY OF NATURAL mRNAs

				HALF-LIFE
	5' coding sequence 3' UTR AAA 3'	β -globin mRNA	STABLE	> 10 hours
	5' coding sequence 3' UTR AAA 3'	growth factor mRNA	UNSTABLE	30 minutes
	5' coding sequence 3' UTR	histone mRNA	DNA SYNTHESIS MODULATES STABILITY	1 hour when cell is synthesizing DNA, but 12 minutes when cell is not synthesizing DNA

Regolazione dell'espressione genica a livello della traduzione



Controllo durante la traduzione

- Dopo che l'mRNA è stato modificato e trasferito dal nucleo al citoplasma, avvengono altre forme di controllo dell'espressione genica:
 - demolizione più o meno rapida dell'mRNA;
 - attivazione della traduzione;
 - modificazione dei polipeptidi tradotti;
 - demolizione delle proteine.

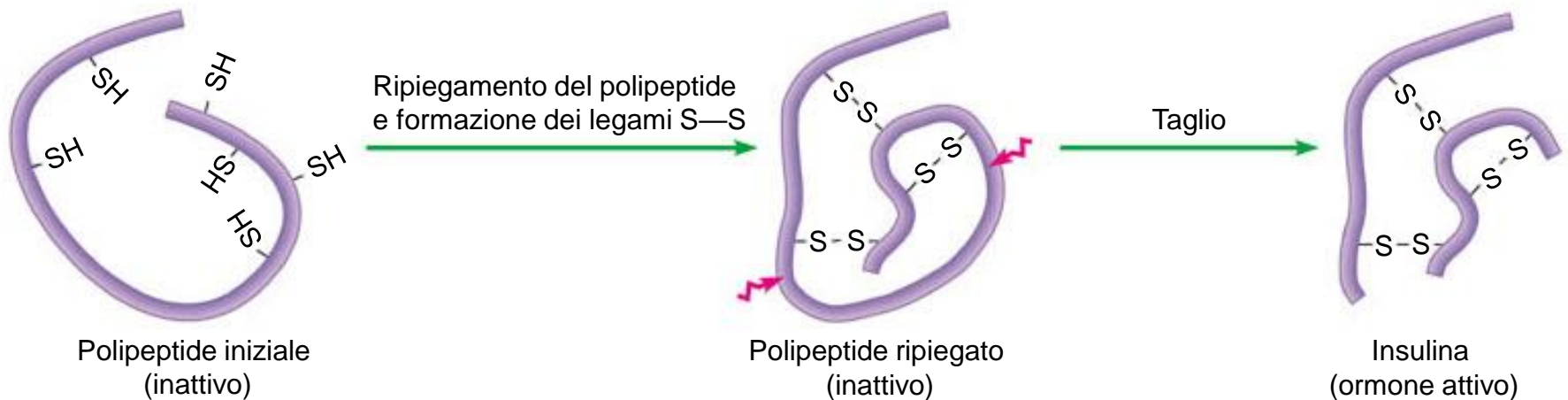
Controllo post—traduzionale dell'attività delle proteine

- Modificazioni allosteriche**
- Modificazioni covalenti: Livello di fosforilazione**
- Attivazione con tagli proteolitici della proteina precursore**
- Presenza/assenza inibitore**
- Localizzazione/Compartimentalizzazione**
- Ubiquitinazione e direzionamento al proteasoma**

Controllo dopo la traduzione

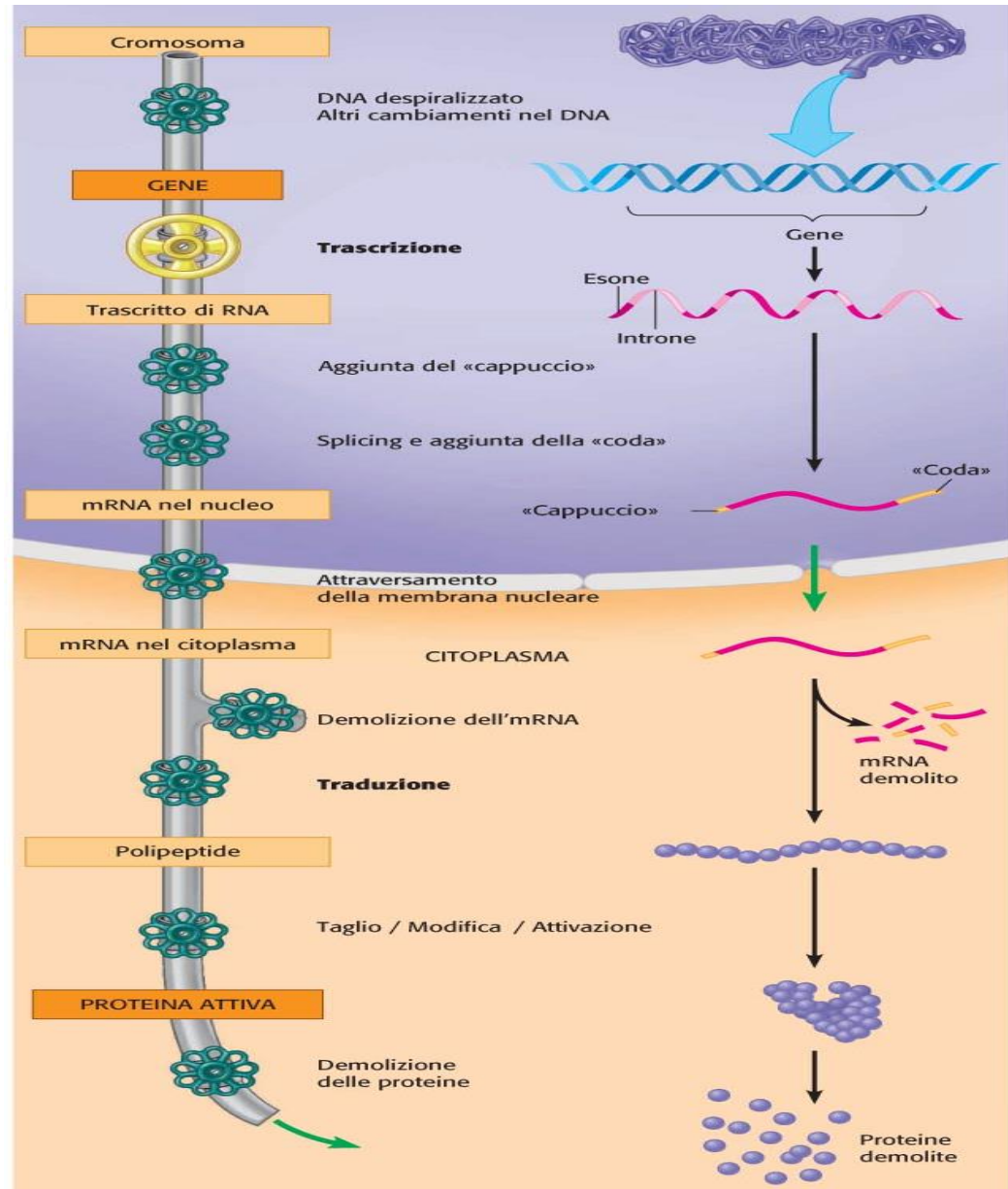
- *L'attivazione delle proteine*

I polipeptidi che si formano dopo la traduzione non sempre sono già pronti ad agire: spesso devono essere modificati per diventare funzionali.

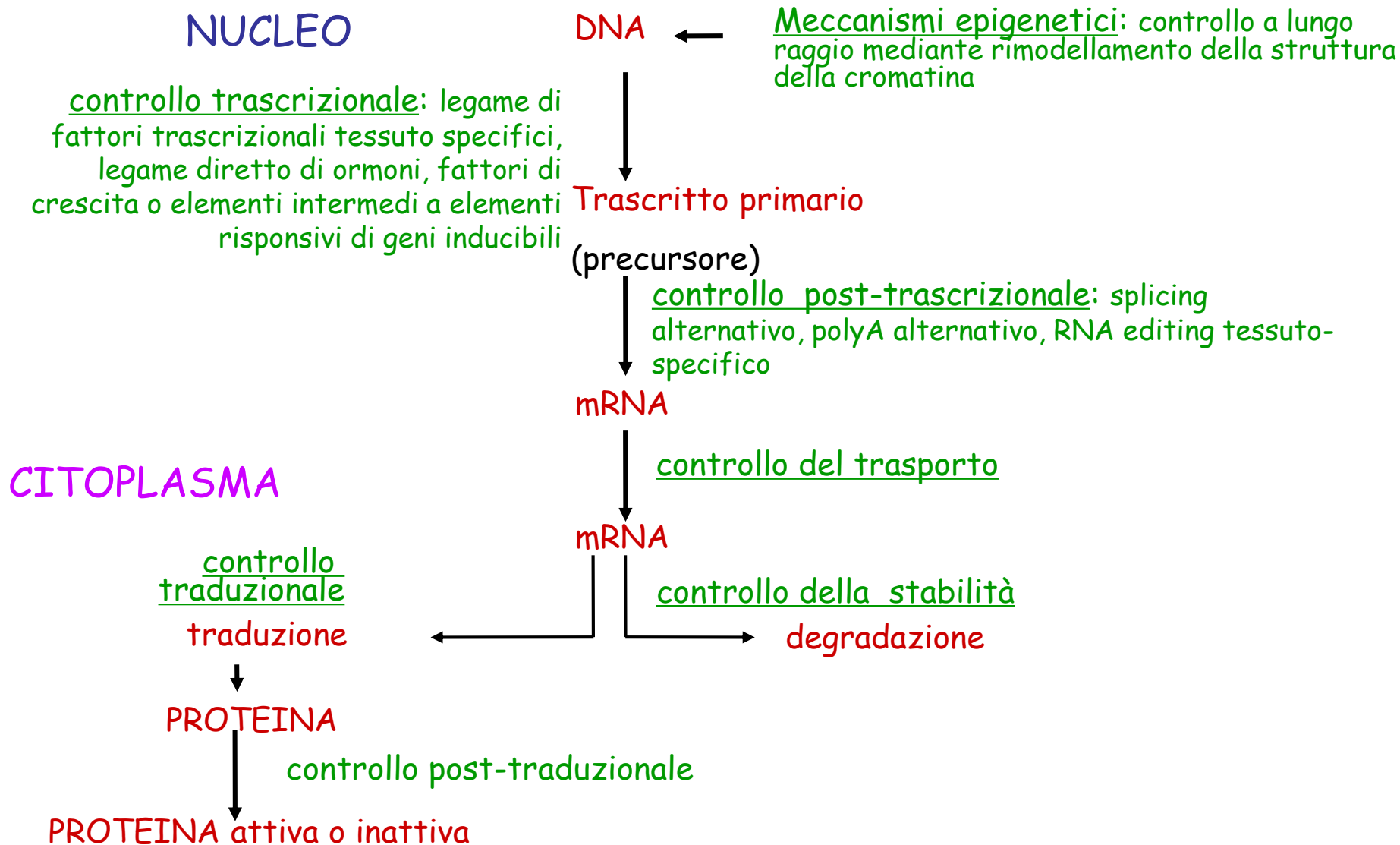


La regolazione dell'espressione genica

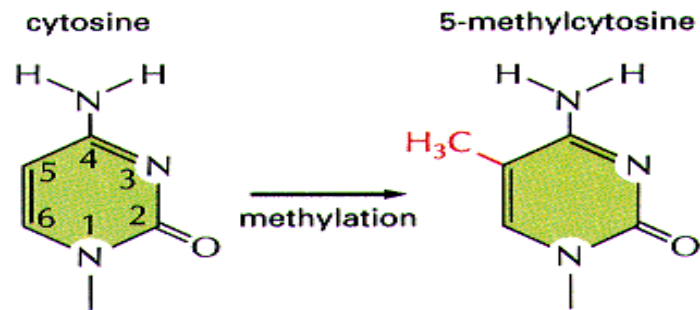
- Una visione d'insieme dell'espressione genica negli eucarioti
- I molteplici meccanismi che controllano l'espressione genica sono analoghi alle valvole di controllo delle tubazioni.



I livelli di regolazione dell'espressione genica

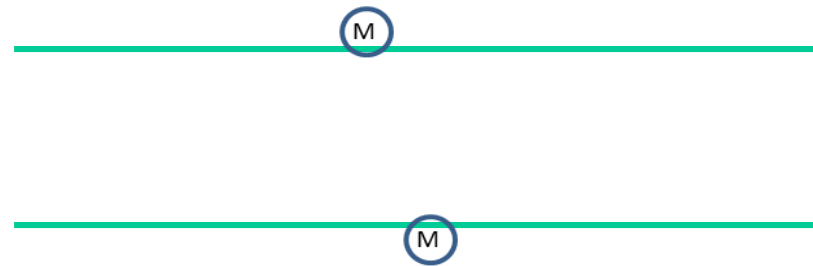
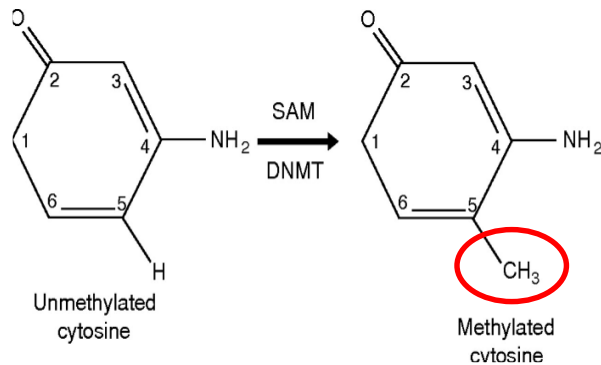


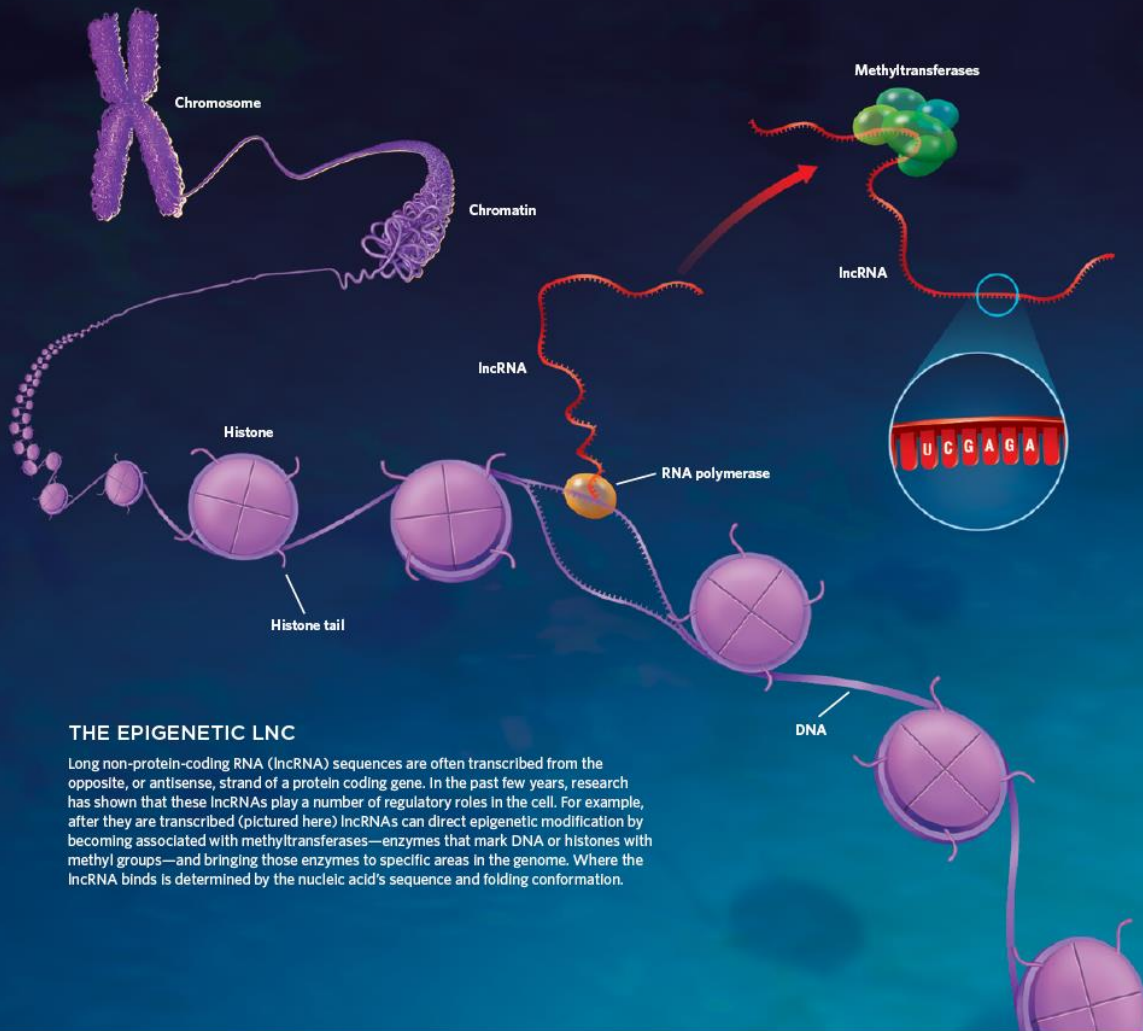
I geni trascrizionalmente attivi hanno promotori ipometilati



DNA methylation

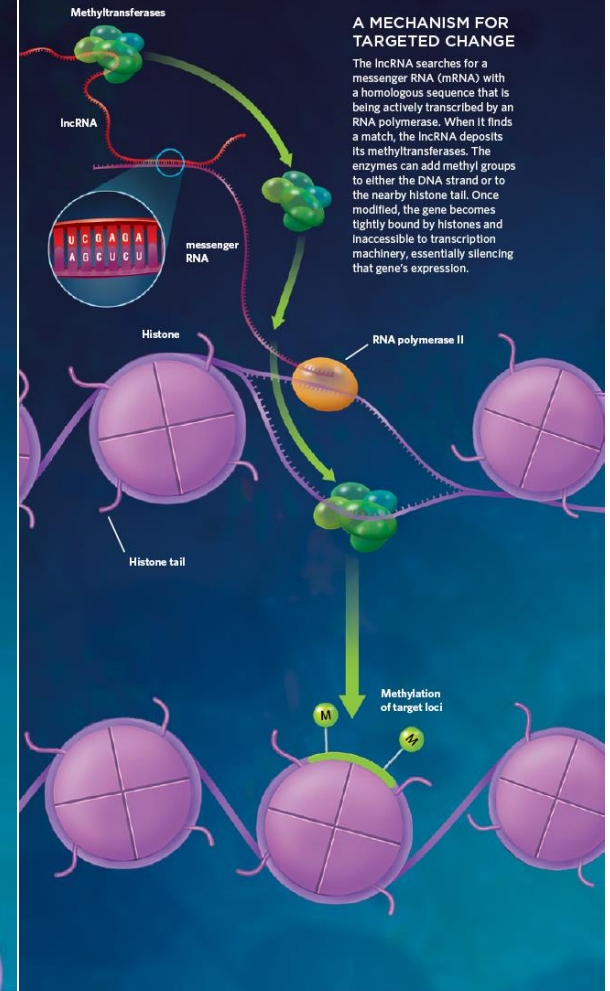
The addition of methyl groups to DNA, mostly at CpG sites, to convert cytosine to 5-methylcytosine.





THE EPIGENETIC LNC

Long non-protein-coding RNA (lncRNA) sequences are often transcribed from the opposite, or antisense, strand of a protein coding gene. In the past few years, research has shown that these lncRNAs play a number of regulatory roles in the cell. For example, after they are transcribed (pictured here) lncRNAs can direct epigenetic modification by becoming associated with methyltransferases—enzymes that mark DNA or histones with methyl groups—and bringing those enzymes to specific areas in the genome. Where the lncRNA binds is determined by the nucleic acid's sequence and folding conformation.



Epigenetic Mechanisms

Post-transcriptional
RNAi

Transcriptional
Histone modifications
DNA methylation

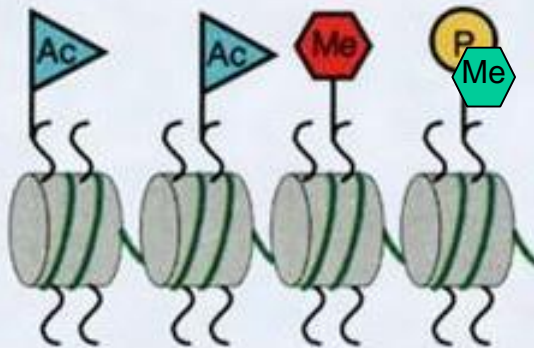
Enables a cell/organism to respond to its dynamic external environment during development and throughout life.

Epigenetic changes to the genome can be inherited if these changes occur in cells giving rise to gametes

Structure & Epigenetics of Euchromatin versus Heterochromatin

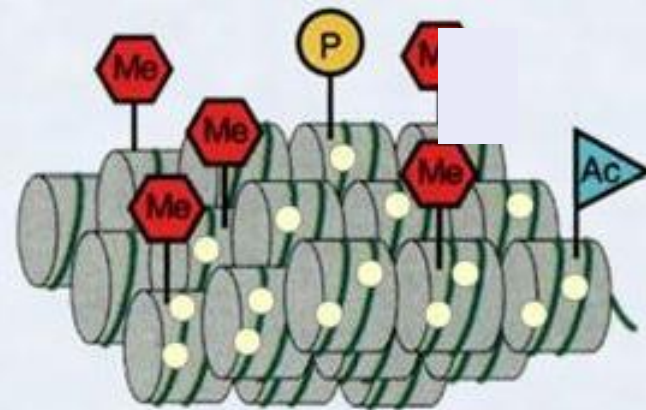
DNA methylation and histone modifications help to compartmentalize the genome into domains of different transcriptional potentials

Euchromatin



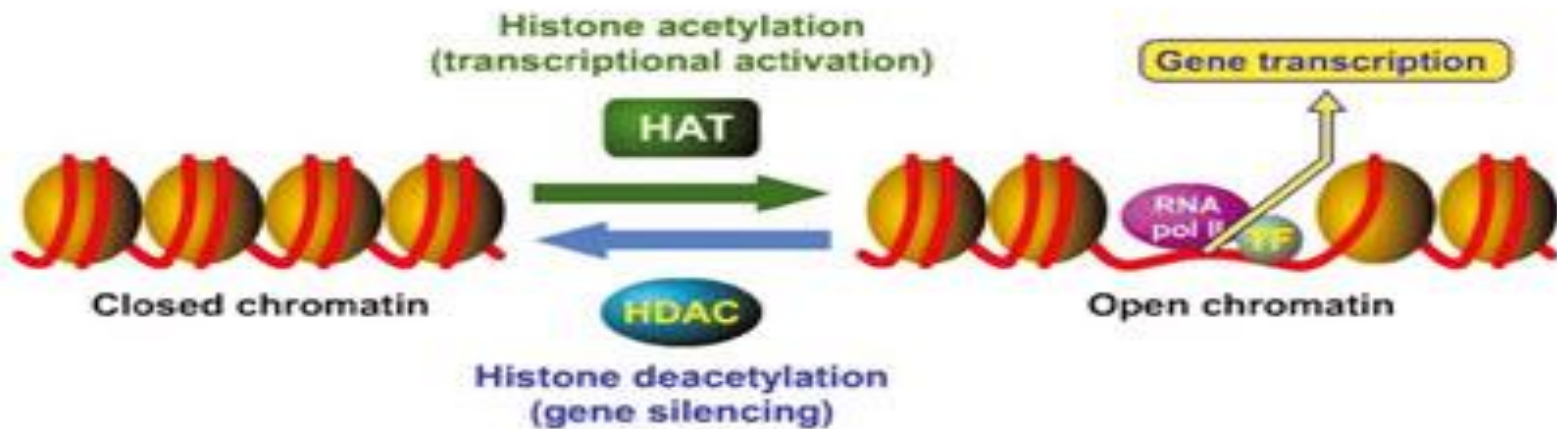
- High histone acetylation
- Low DNA methylation
- H3-K4 methylation

Heterochromatin



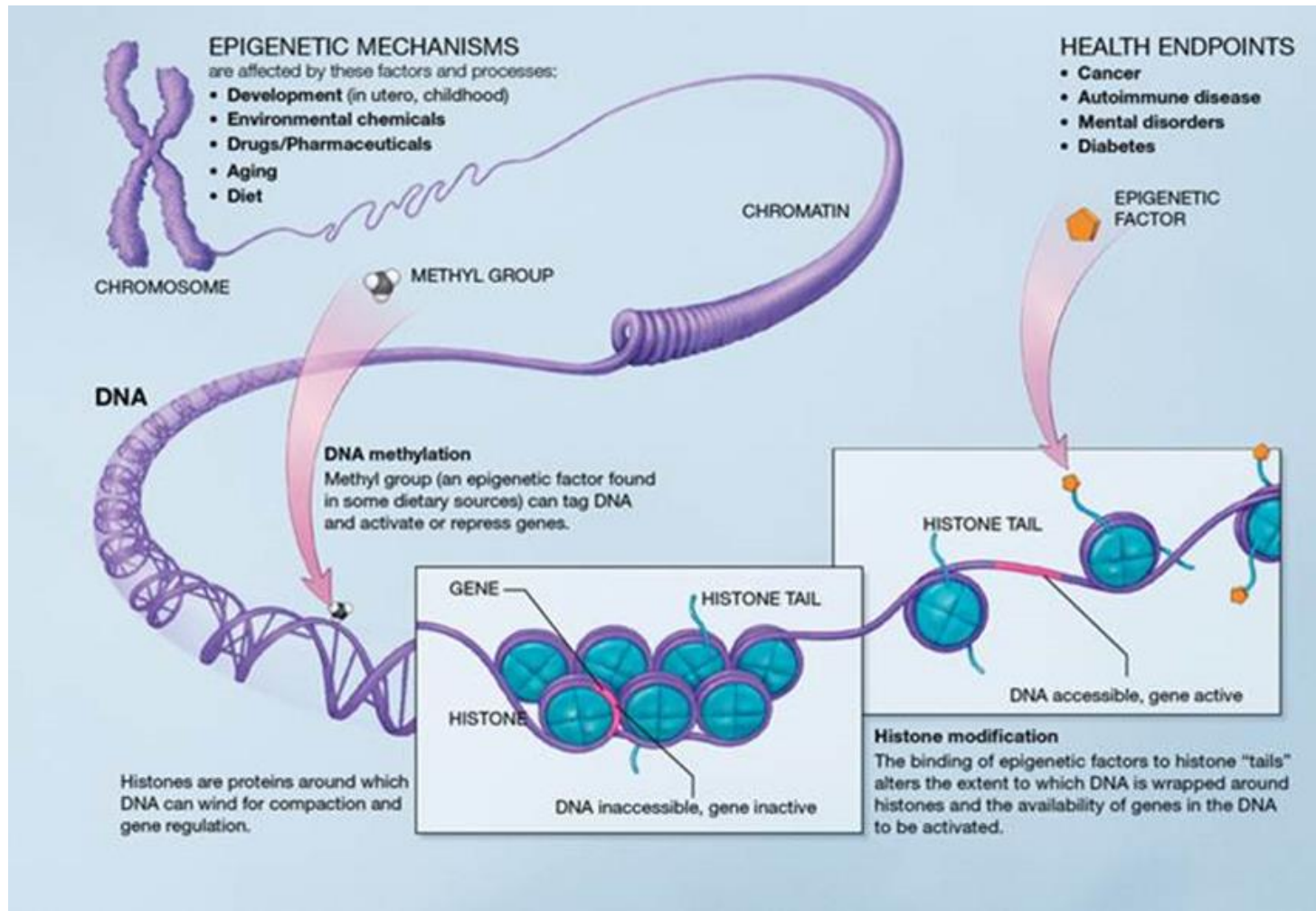
- Low histone acetylation
- Dense DNA methylation
- H3-K9 methylation

Acetylation is the most highly studied



Two epigenetic mechanisms:

1. DNA Methylation
2. Histone Modifications



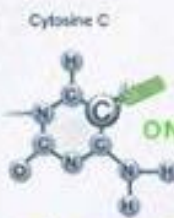

Epigenetic Gene Regulation

- ❖ Patterns of DNA methylation in adult cells parallels cell fate, chromatin structure and gene activation.
- ❖ Most DNA methylation is removed at fertilization and re-established during embryogenesis.
- ❖ Imprinted genes keep their parental pattern of methylation giving rise to parental patterns of expression.
- ❖ Patterns of histone modifications parallel DNA methylation.
- ❖ Methylated gene regions are genetically inactive, highly condensed and special histone modifications.
- ❖ Active gene regions have little DNA methylation and distinctive histone modifications (acetyl groups and H3K4methyl).
- ❖ X chromosome inactivation in females is correlated with extensive CG island methylation on one chromosome, condensation, inactivation and Barr body formation.
- ❖ Alterations in gene and CG island methylation patterns are seen in aging and in cancer.
- ❖ Most CG islands are not methylated except for X chromosome inactivation and tumor suppressors in cancer.

DNA Methylation Differentiates Totipotent Embryonic Stem Cells from Unipotent Adult Stem Cells



DNA methylation

Pluripotent cell

Unipotent cell

Methyl-Cytosine 5mC

≠

ctggagggtgcaatggctgtcttgtcctggcctt
 ggacatgggctgaaatactgggttcacccatat
 ctaggactctagaggggtgggtaagcaagaact
 gaggagtggcccagaaataattggcacacgaa
 cattcaatggatgttttaggctctccagaggat
 ggctgagtgggctgtaaggacaggcagagagg
 tgcagtgccaacaggctttgtggtggatggg
 catccagcaactggtttgtgaggtgtccggtg
 acccaaggcaggggtgagaggaccttgaaggtt
 gaaaatgaaggcctcctgggggtccctcctaag
 ggttgtcctgtccagagctccccaacctccgtc
 tggaaagacacaggcagatagagctcagctcagt
 ttctcccacccccacagctctgctcctccacc
 acccagggggcggggccagagggtcaaggctaga
 ggggtgggattggggaggagagggtgaaacct
 cctaggtgagcctctttccaccaggccccgg
 ctgggggtgccaccttccc**atgggtggacac**

Ctggagggtgcaatggctgtcttgtcctggcctt
 ggacatgggctgaaatactgggttcacccatat
 ctaggactctagaggggtgggtaagcaagaact
 gaggagtggcccagaaataattggcacacgaa
 cattcaatggatgttttaggctctccagaggat
 ggctgagtgggctgtaaggacaggcagagagg
 tgcagtgccaacaggctttgtggtggatggg
 catccagcaactggtttgtgaggtgtccggtg
 acccaaggcaggggtgagaggaccttgaaggtt
 gaaaatgaaggcctcctgggggtccctcctaag
 ggttgtcctgtccagagctccccaacctccgtc
 tggaaagacacaggcagatagagctcagctcagt
 ttctcccacccccacagctctgctcctccacc
 acccagggggcggggccagagggtcaaggctaga
 ggggtgggattggggaggagagggtgaaacct
 cctaggtgagcctctttccaccaggccccgg
 ctgggggtgccaccttccc**atgggtggacac**

For What is Epigenetics Useful?

C.H. Waddington coined the term epigenetics to mean above or in addition to genetics to explain differentiation.

How do different adult stem cells know their fate?

Myoblasts can only form muscle cells

Keratinocytes only form skin cells

Hematopoietic cells only become blood cells

But all have identical DNA sequences.

Modern definition is non-sequence dependent inheritance.

How can identical twins have different natural hair colors?

How can a single individual have two different eye colors?

How can identical twin litter mates show different coat colors?

How can just paternal or maternal traits be expressed in offspring?

This is called genetic imprinting.

How can females express only one X chromosome per cell?

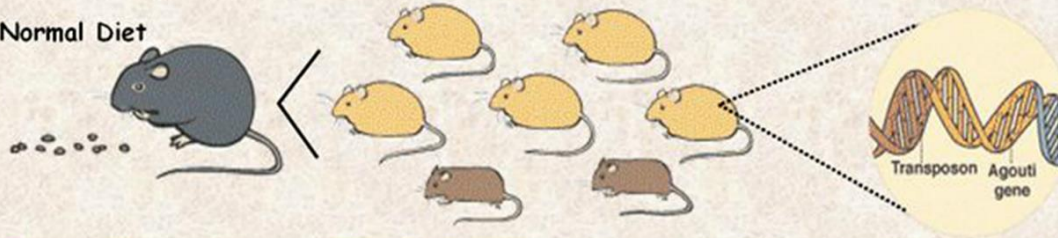
How can acquired traits be passed on to offspring?

Some changes in gene expression that are, in fact, heritable!

Can environment influence these processes?

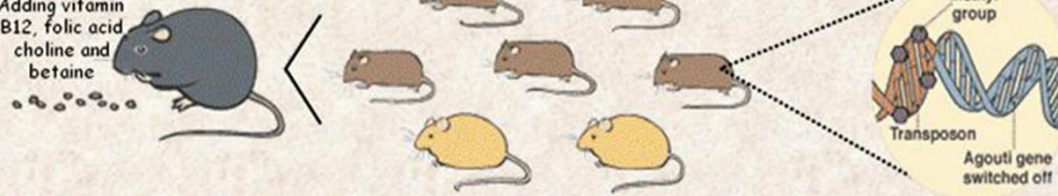
They are what she ate...

Normal Diet



Modified Diet

Adding vitamin B12, folic acid, choline and betaine



Source: Waterland & Jirtle, Mol Cell Biol (2003)
Also Wolff & Cooney, FASEB J (1998)



Calico Cats



Dolly (1996-2003)

The first cloned mammal

Inefficient reprogramming of epigenetic marks is the main reason for the poor health of cloned animals.

