

# I procarioti controllano l'espressione genica

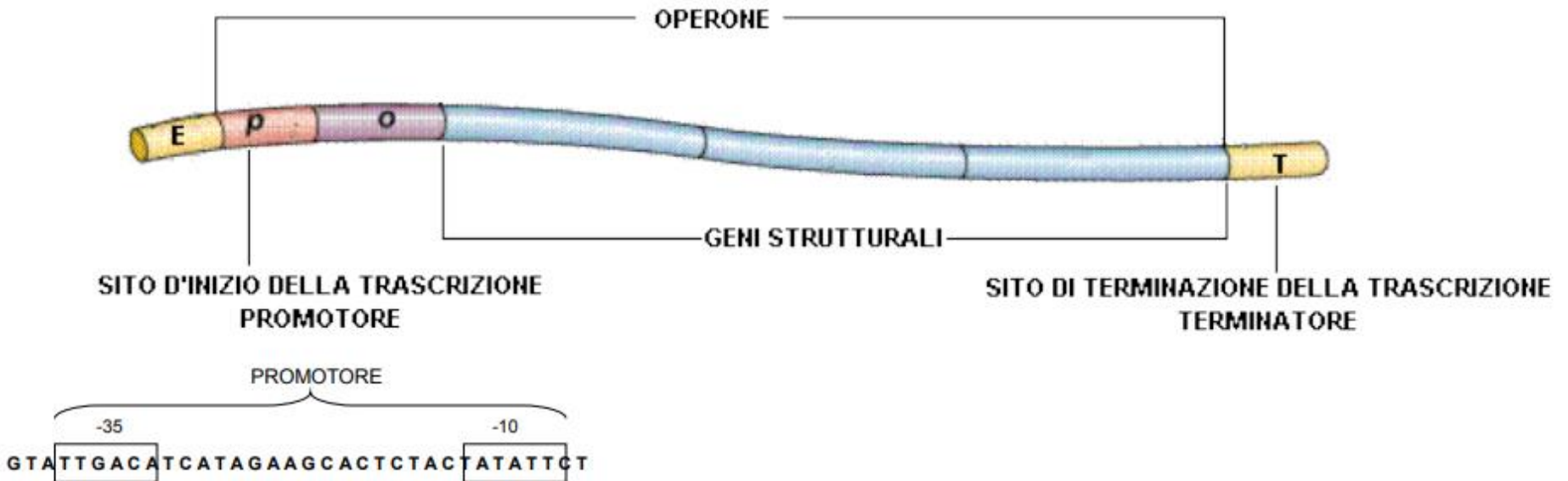
Nei procarioti certe proteine legate al DNA «accendono» e «spengono» i geni.

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 DELL'ESPRESSIONE GENICA HA LUOGO A LIVELLO DELLA TRASCRIZIONE

**OPERONE:** insieme di geni che vengono trascritti contemporaneamente a partire da un unico promotore



# L'INIZIO DELLA TRASCRIZIONE E' CONTROLLATO DA SPECIALI PROTEINE REGOLATORIE CHE POSSONO:

## REPRIMERE L'INIZIO DELLA TRASCRIZIONE



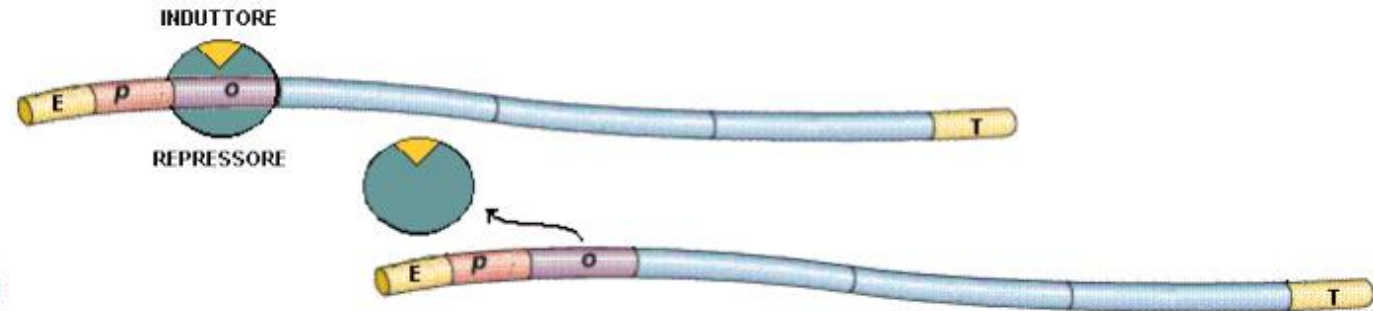
## ATTIVARE L'INIZIO DELLA TRASCRIZIONE



L'AZIONE DI ATTIVATORI E REPRESSORI E' SPESSO INFLUENZATA DA MOLECOLE NOTE COME

# LIGANDI

**INDUTTORI:  
STACCANO IL  
REPRESSORE  
DALL'OPERATORE**



**COREPRESSORI:  
FACILITANO IL LEGAME  
DEL REPRESSORE**



**COATTIVATORI:  
FACILITANO IL  
LEGAME  
DELL'ATTIVATORE**



# La regolazione nei procarioti

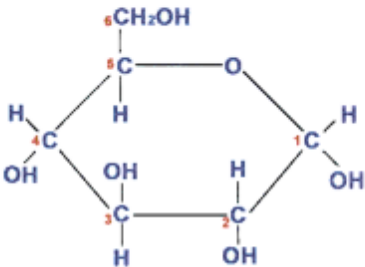
I geni batterici sono tipicamente raggruppati in operoni, in cui più geni si susseguono l'un l'altro preceduti da un unico promotore e trascritti insieme in un unico **RNA policistronico**.

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  **$\beta$ -galattosidasi**, una **permeasi** e una **transacetilasi**. La permeasi facilita l'ingresso del lattosio nella cellula, la  $\beta$ -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).

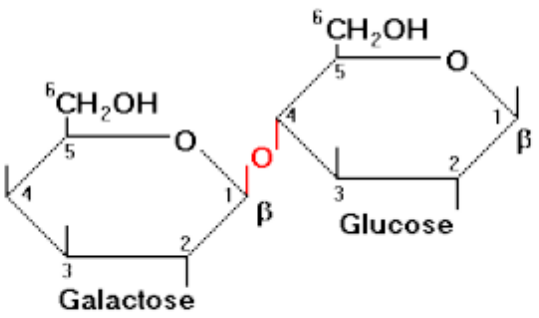
# I BATTERI OTTENGONO IL CARBONIO DI CUI NECESSITANO PER LA CRESCITA ED IL CATABOLISMO DA ZUCCHERI A CINQUE E SEI ATOMI DI CARBONIO

## PREFERIBILMENTE GLUCOSIO

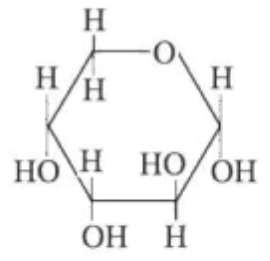


## IN ASSEZA DI GLUCOSIO

### LATTOSIO



### ARABINOSIO



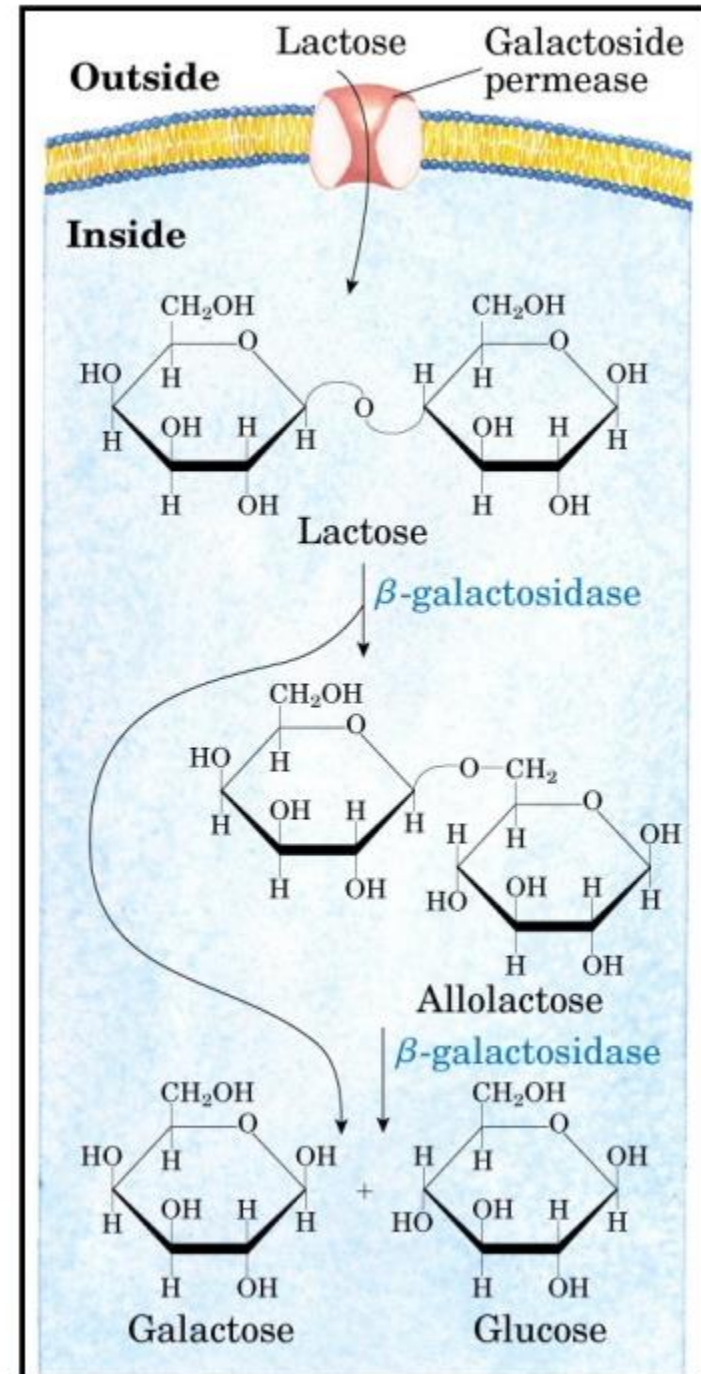
# Operone lattosio

La captazione e l'utilizzazione del lattosio da parte della cellula batterica, richiede la presenza di tre proteine:

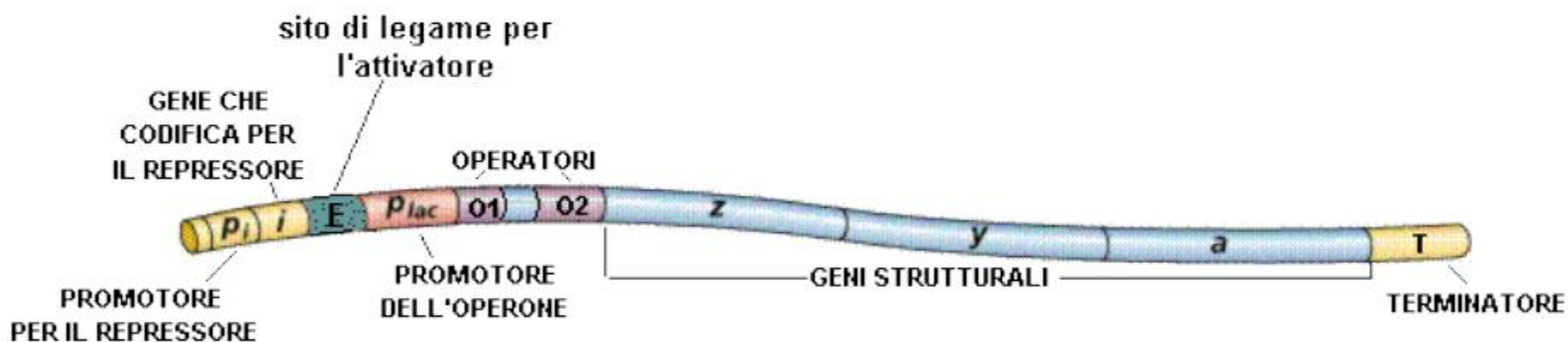
lattosio permeasi → gene *lacZ*

β-galattosidasi → gene *lacY*

tiogalattoside transacetilasi → gene *lacA*



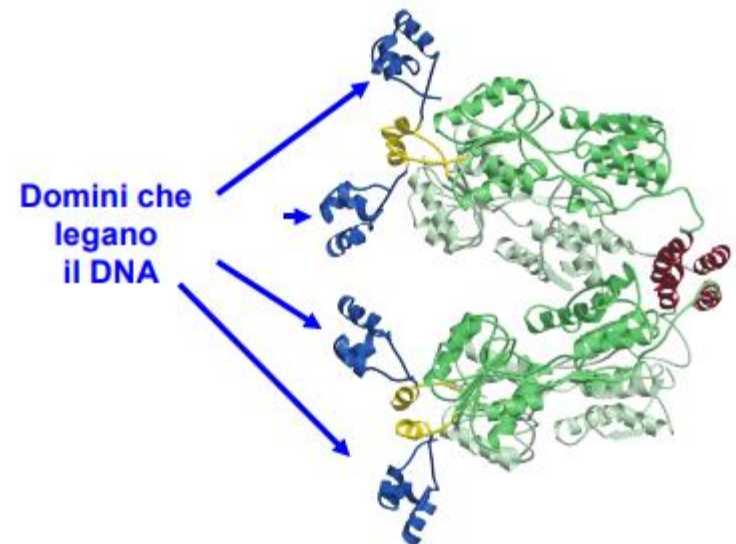
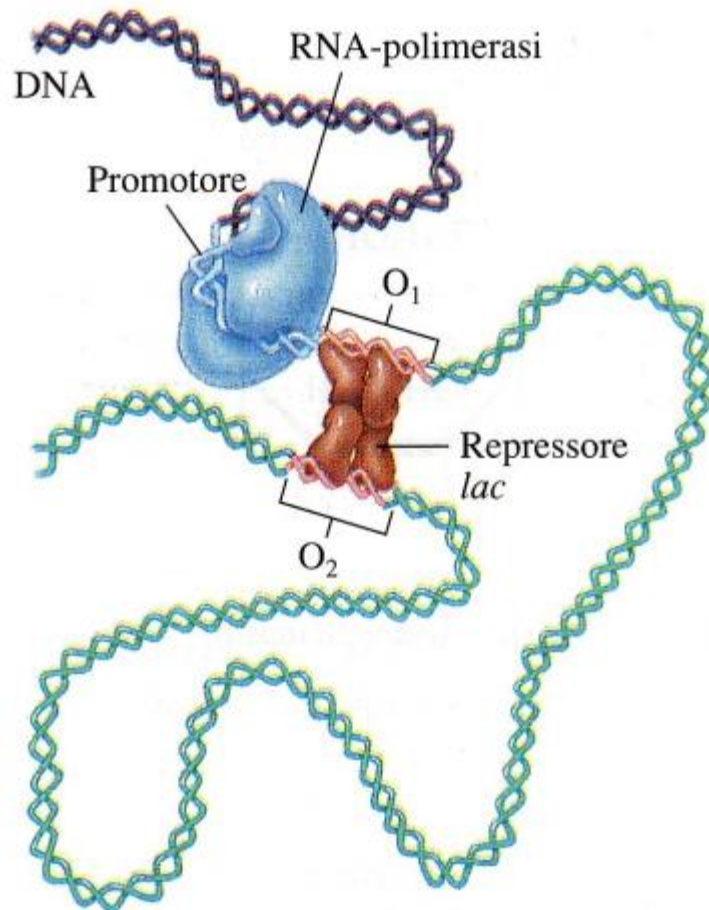
# Struttura dell'operone lac



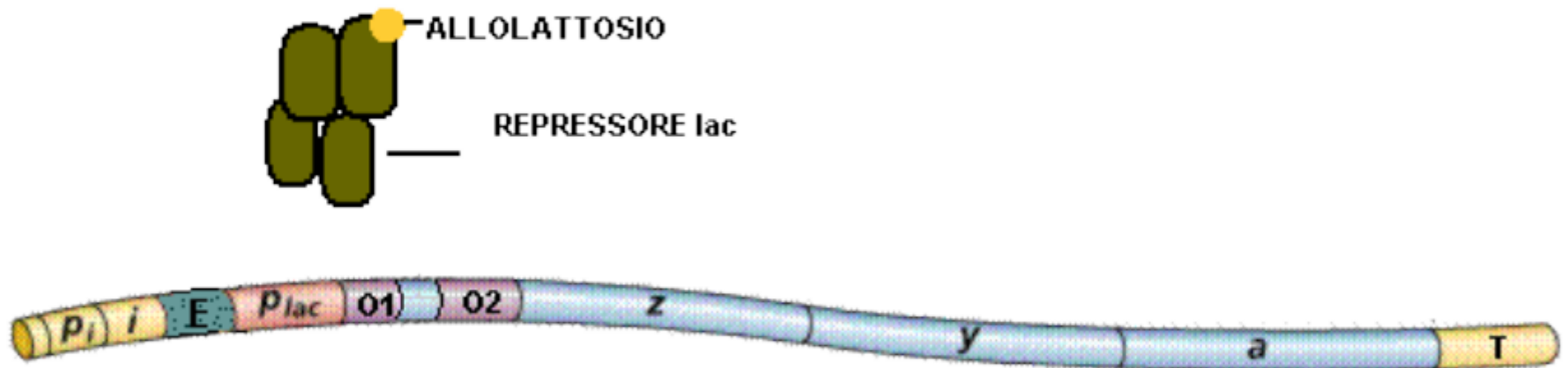


## In presenza di glucosio ed in assenza di lattosio

**Il repressore lac, si lega contemporaneamente ad O1 e O2 causando la formazione di un'ansa nel DNA ed impedendo l'espressione dell'operone lac**



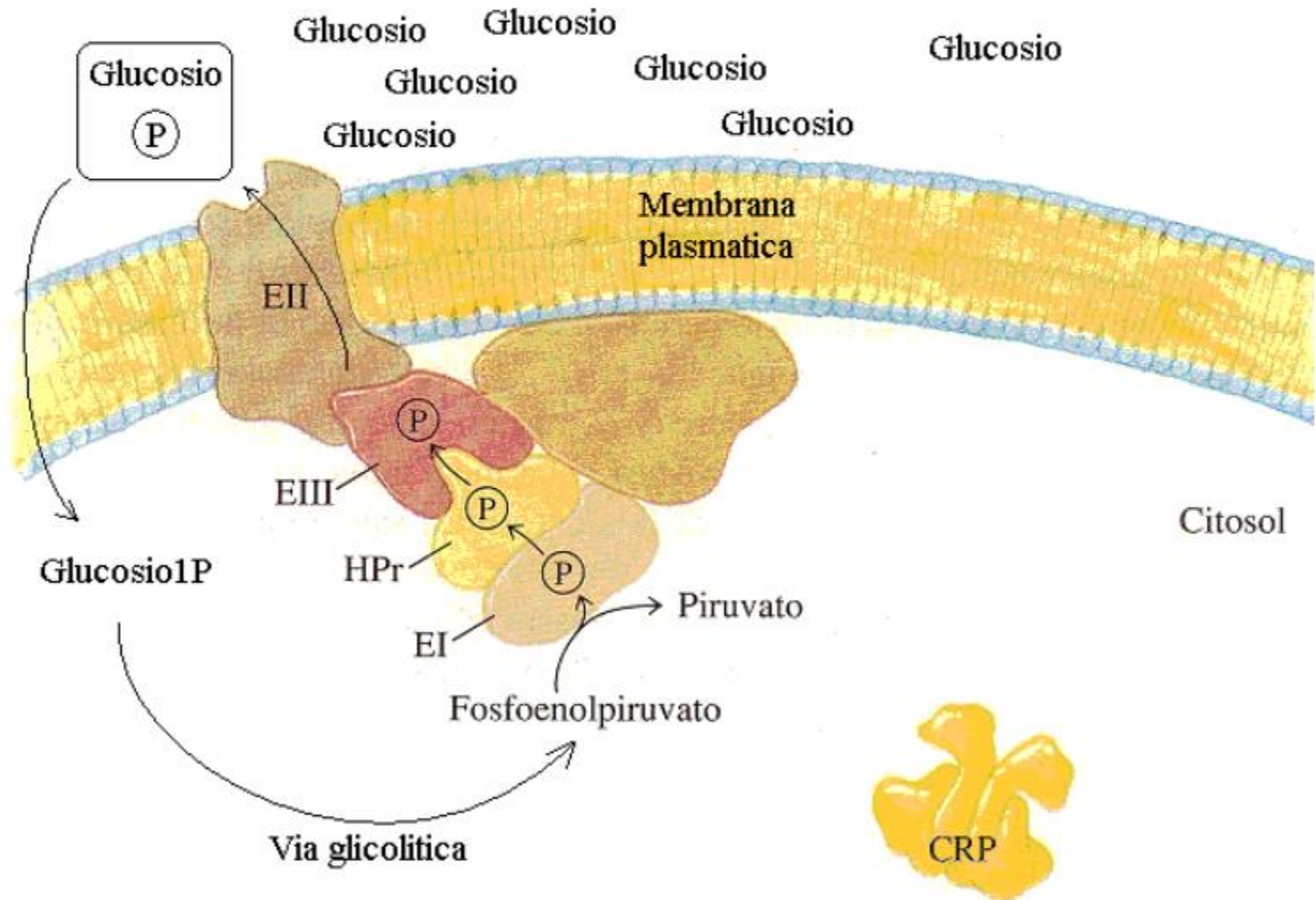
**In assenza di glucosio ed in presenza di lattosio**  
una piccola quantità di lattosio viene convertita in allolattosio



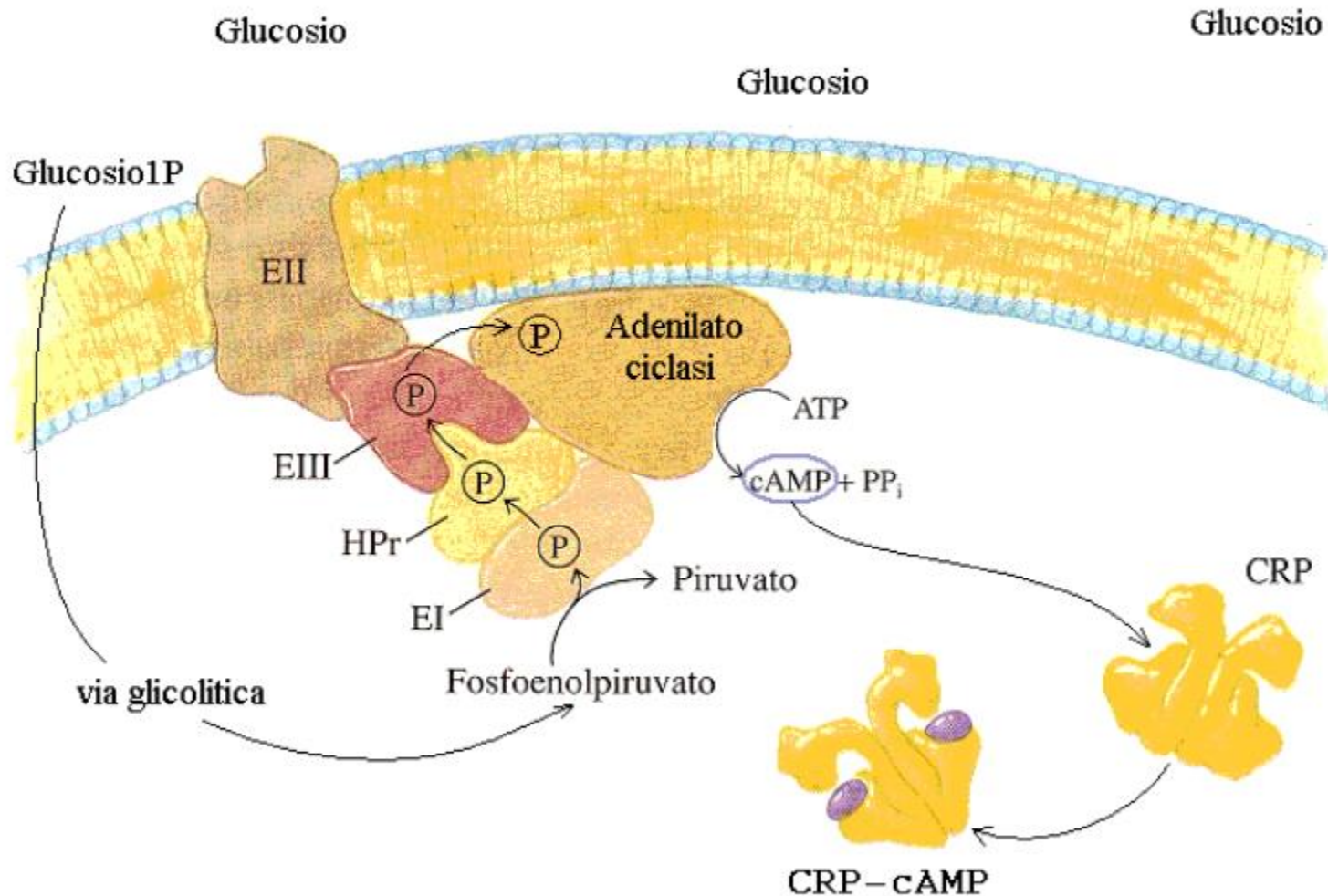
**L'allolattosio è un induttore dell'operone *lac***

L'operone lattosio possiede un ulteriore sistema di controllo della trascrizione definito repressione da cataboliti

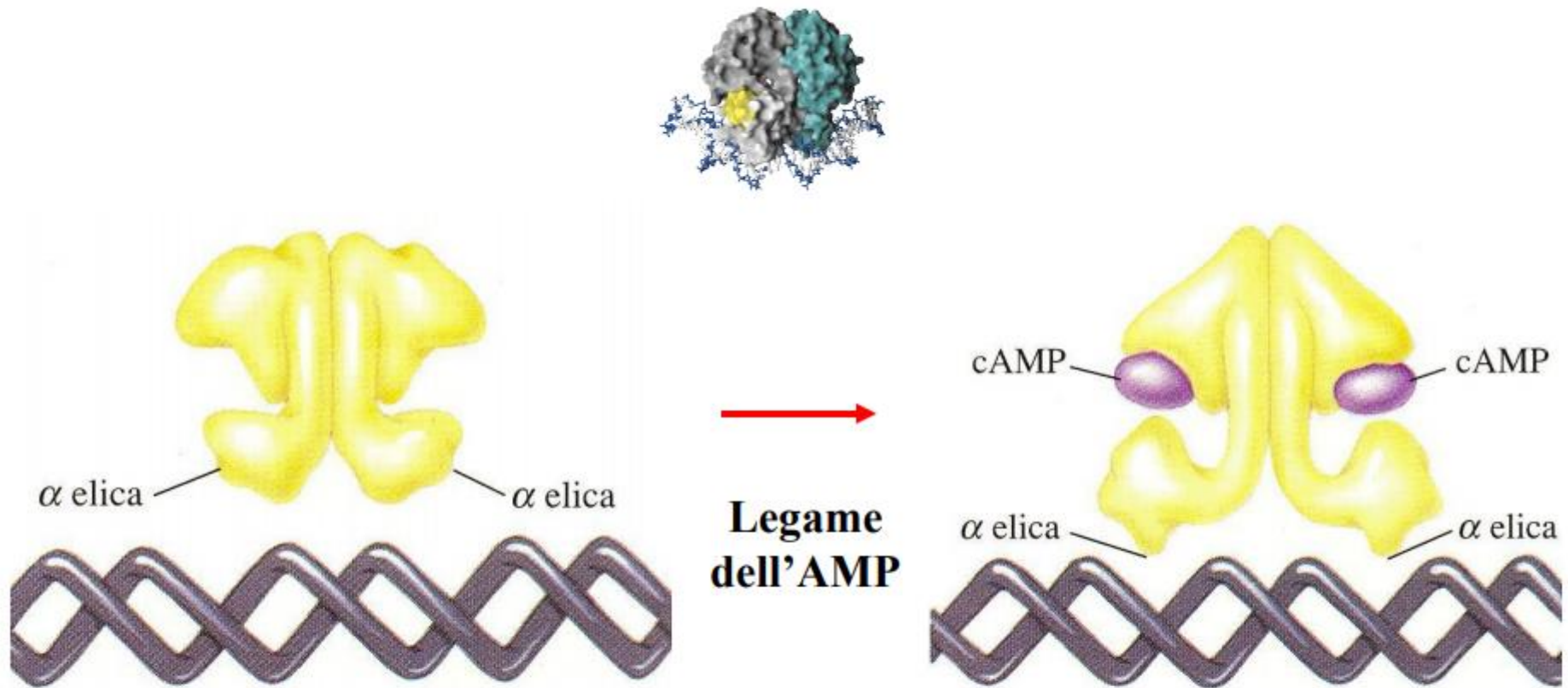
### Concentrazione di glucosio nel mezzo esterno elevata



# Quando la concentrazione del glucosio diminuisce

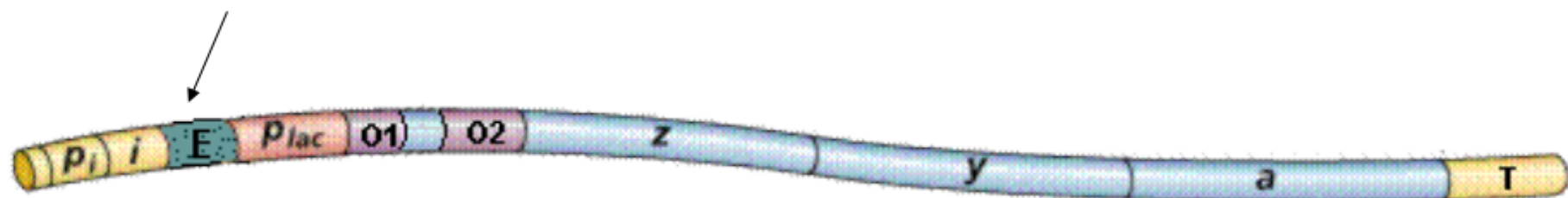


**La proteina CRP, è un omodimero contenente siti di legame per il DNA e per l'AMPc**

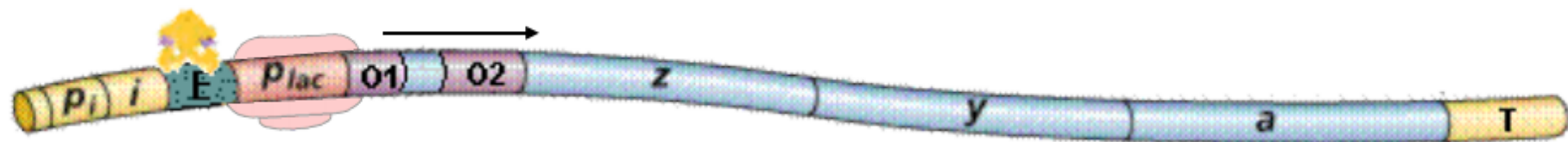


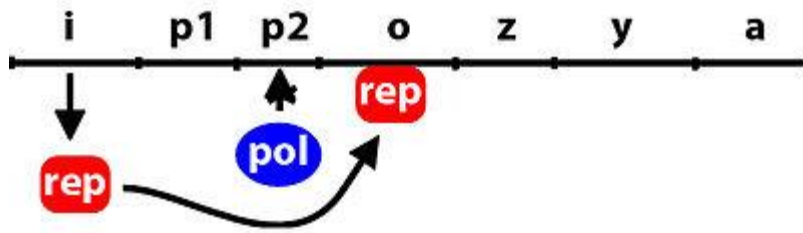
**Essa possiede, in ognuna delle sue subunità, un dominio ad  $\alpha$ -elica**

**Il sito di legame del complesso CRP-AMPciclico, è posizionato immediatamente prima del promotore  $P_{LAC}$**

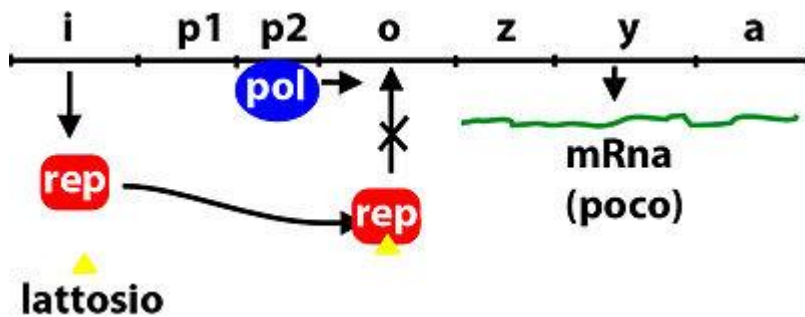


**Quando il glucosio scarseggia, il complesso CRP-AMP ciclico si lega al suo specifico sito di legame sul DNA ed incrementa di 50 volte la trascrizione dell'RNA**

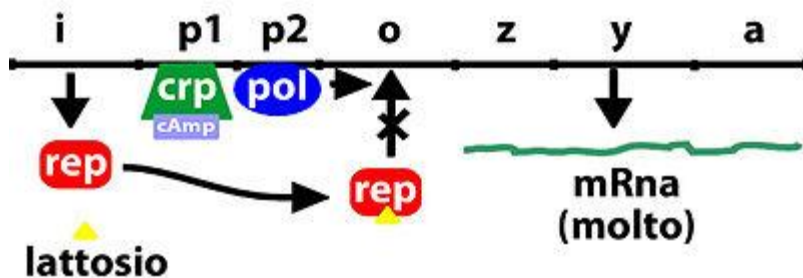




La proteina repressore si lega all'operatore o, impedendo l'espressione dei geni dell'operone



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

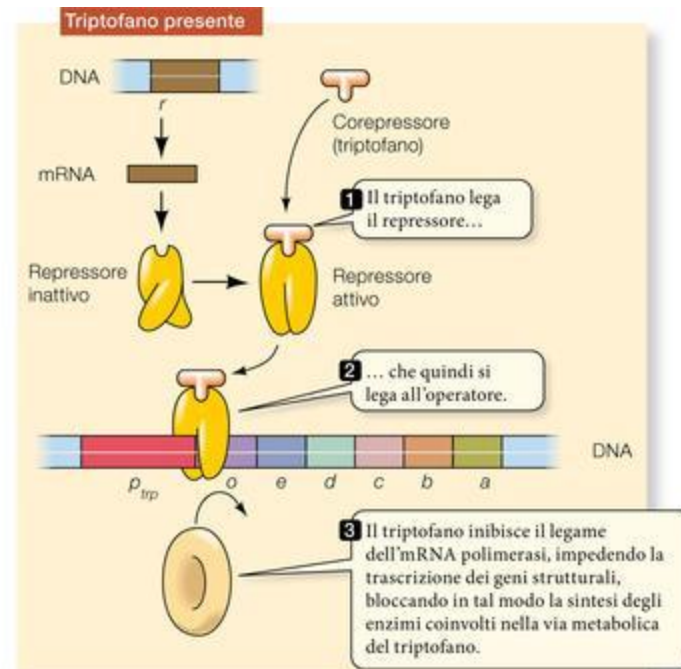
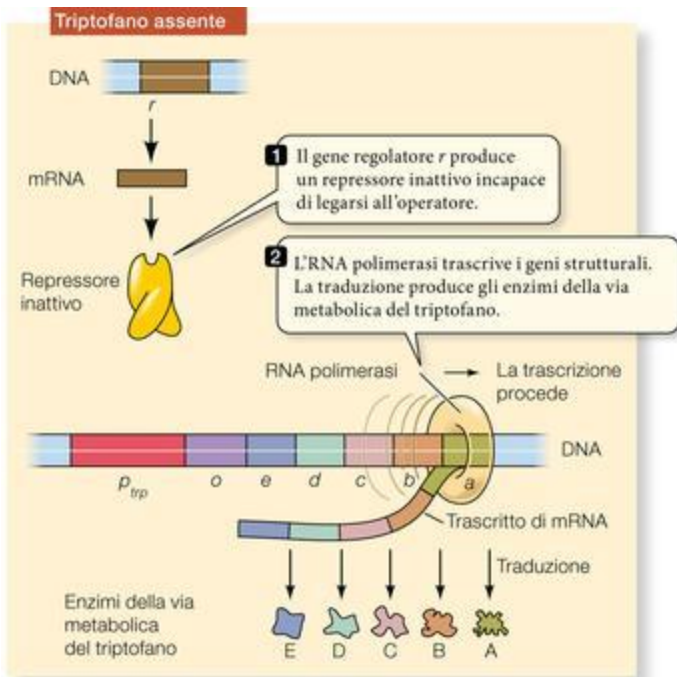
## REGOLAZIONE GENICA DELL'OPERONE DEL LATTOSIO

- 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.



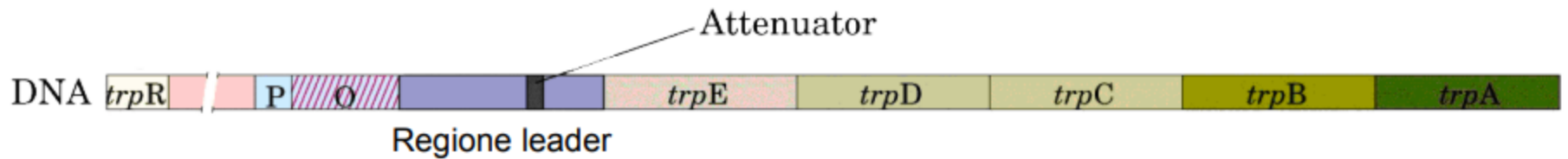
# L'operone del triptofano

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.



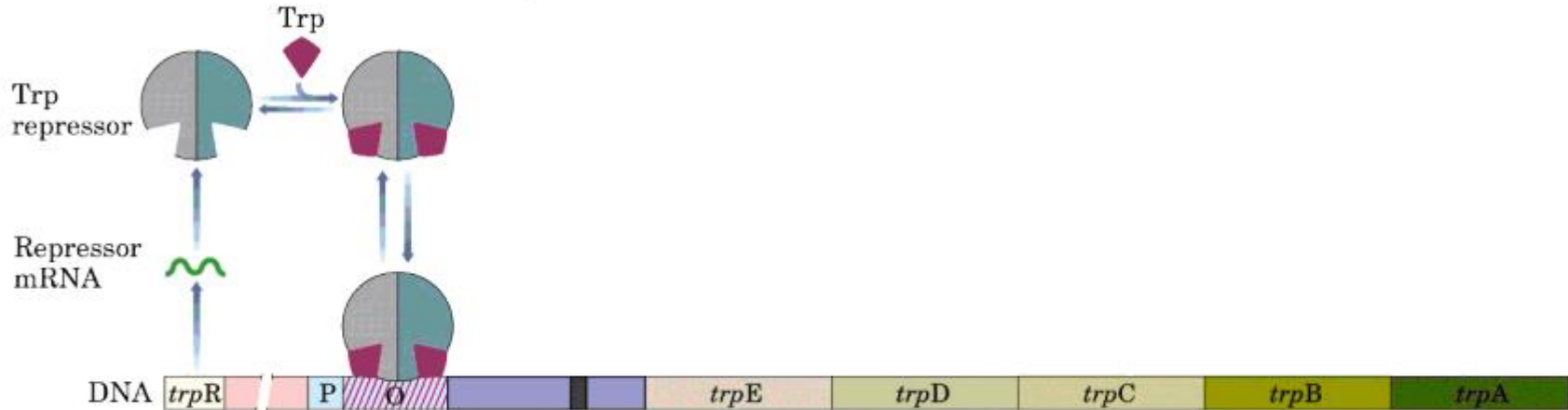
# Operone triptofano

Gli enzimi preposti alla biosintesi del triptofano, sono codificati dai geni *trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB* e *trpA*

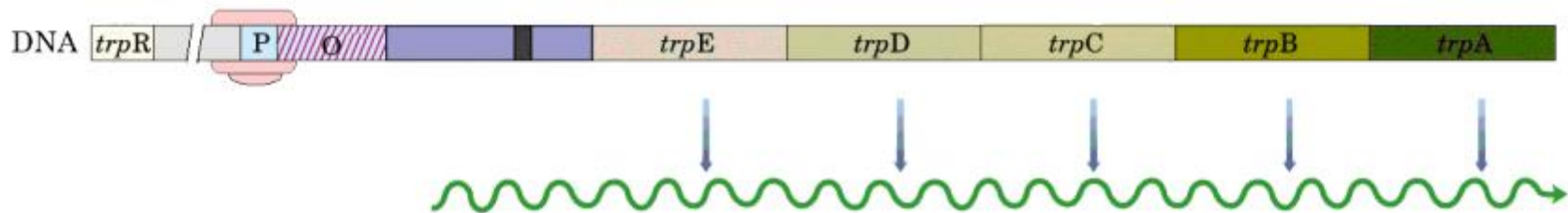


# L'operone *trp* è regolato da 2 meccanismi: uno ha come protagonista il consueto repressore

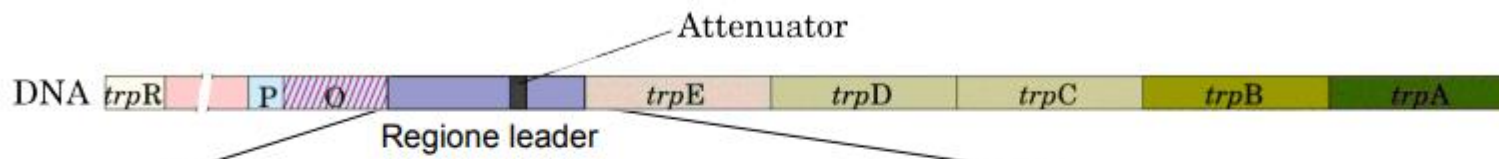
## Alte concentrazioni di triptofano



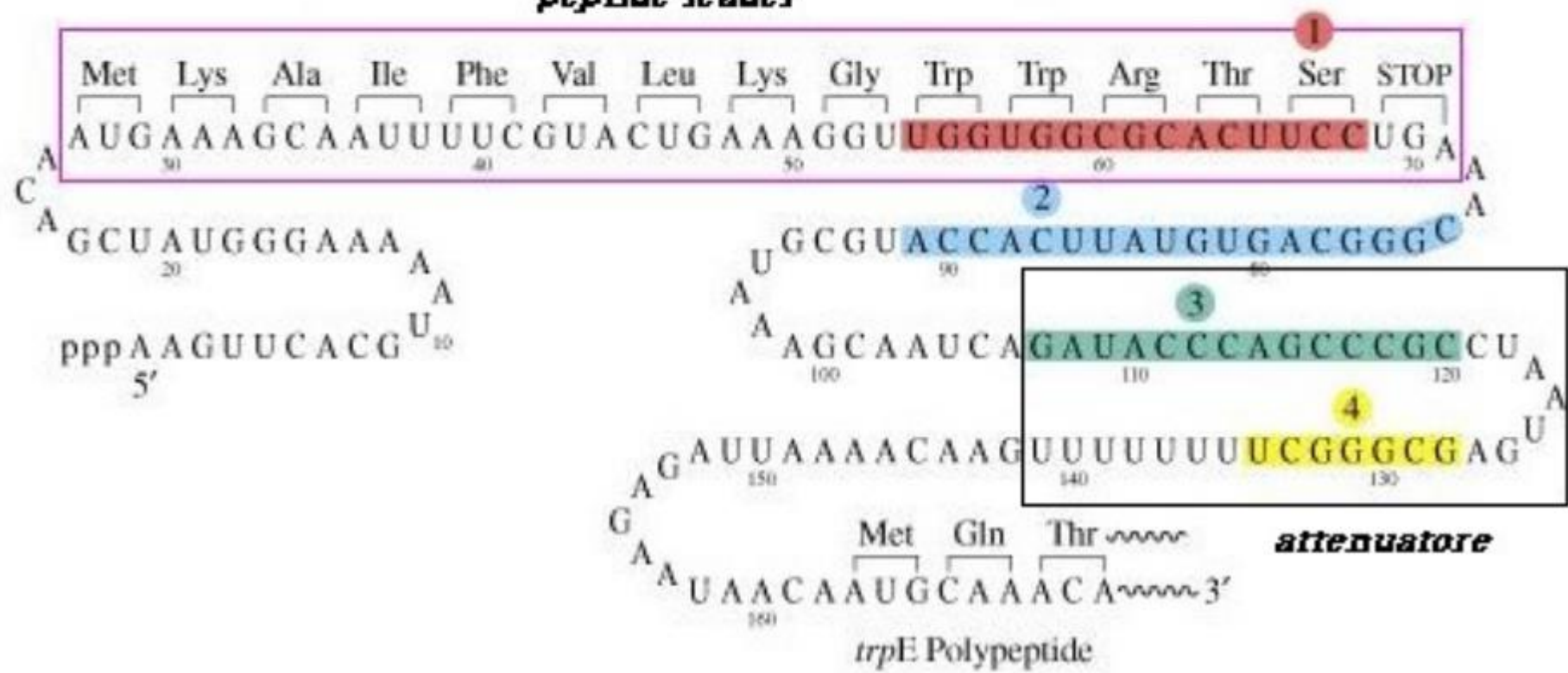
## Basse concentrazioni di triptofano



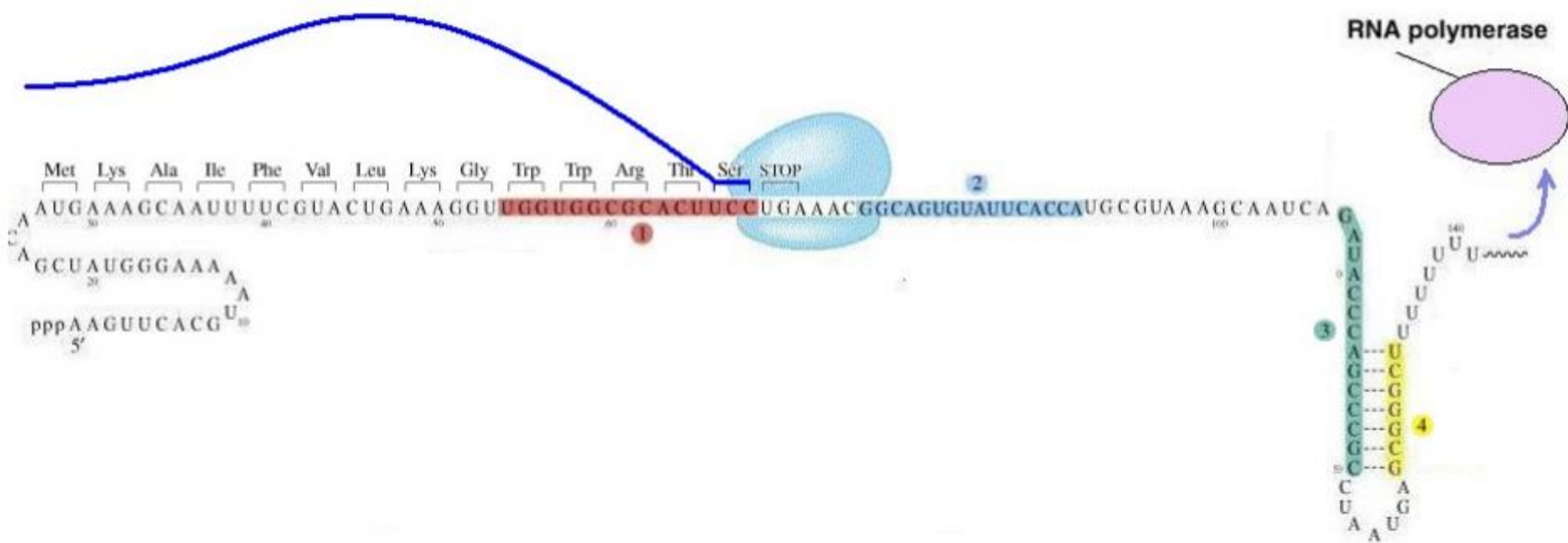
# L'altro meccanismo ha come protagonista il così detto attenuatore



## *peptide leader*

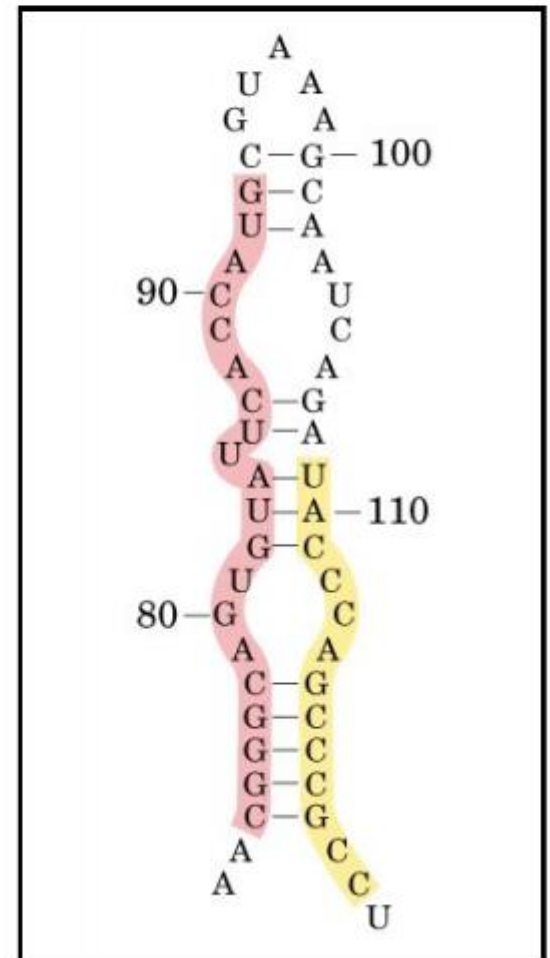
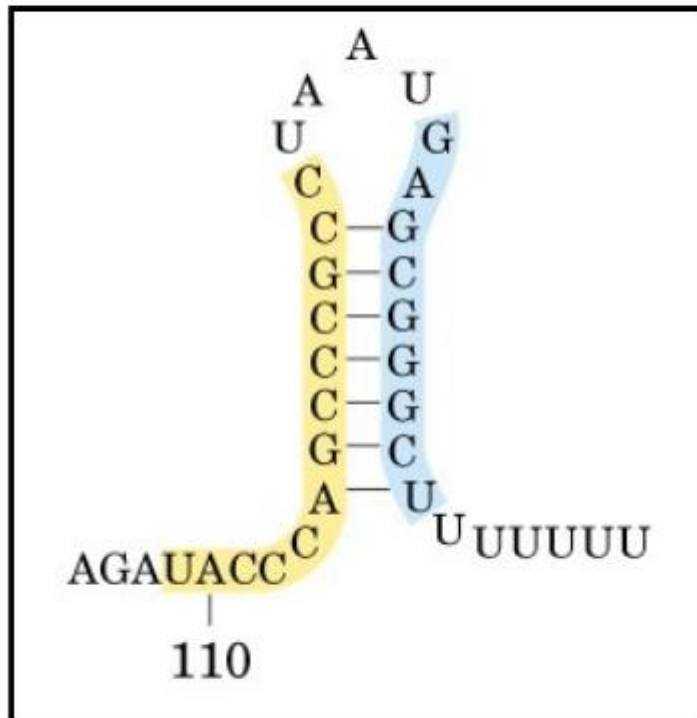


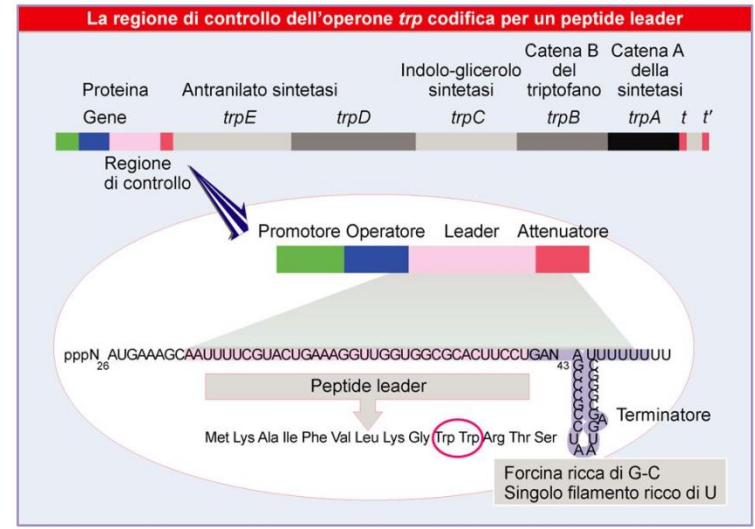
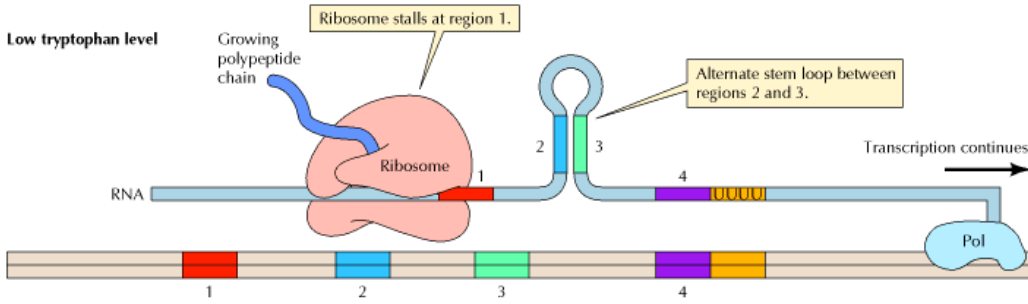
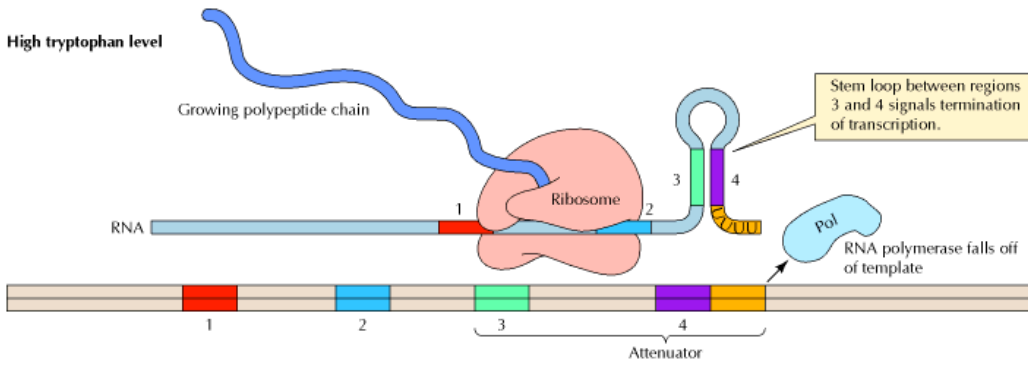
# Quando la concentrazione di triptofano all'interno della cellula è elevata





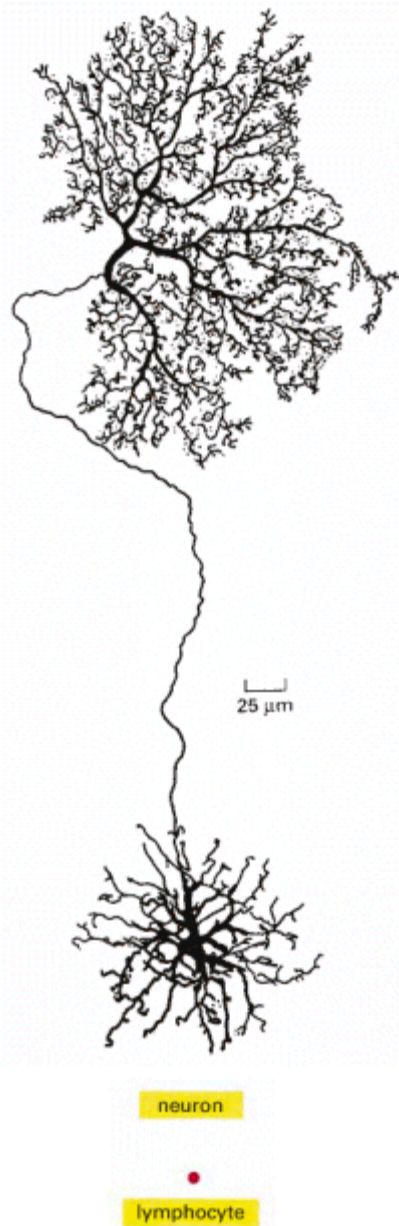
## Appaiamento tra le sequenze 3-4 e 2-3





**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
			
<b>Tipo di geni</b>			
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**

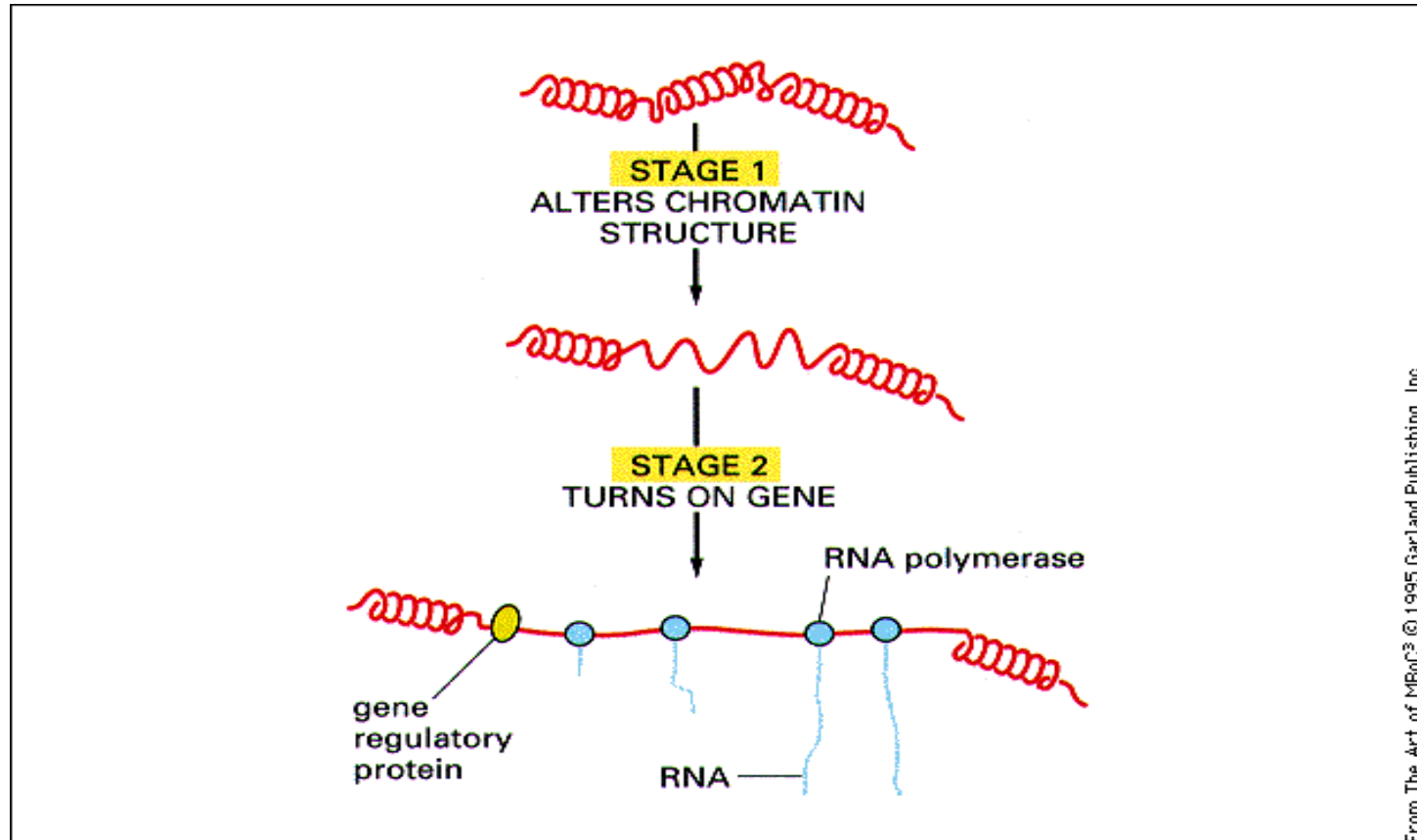
**3. post-trascrizionale**

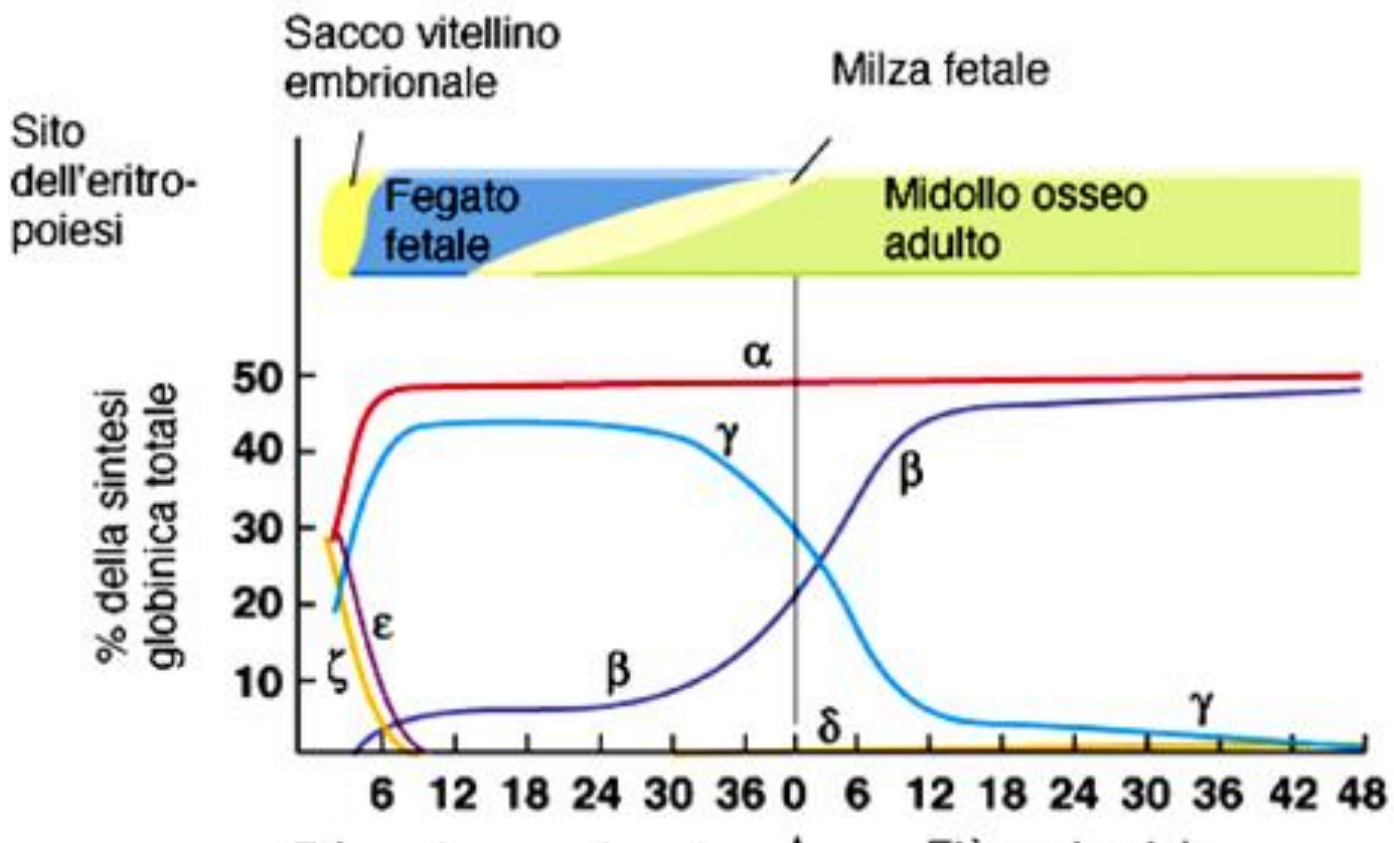
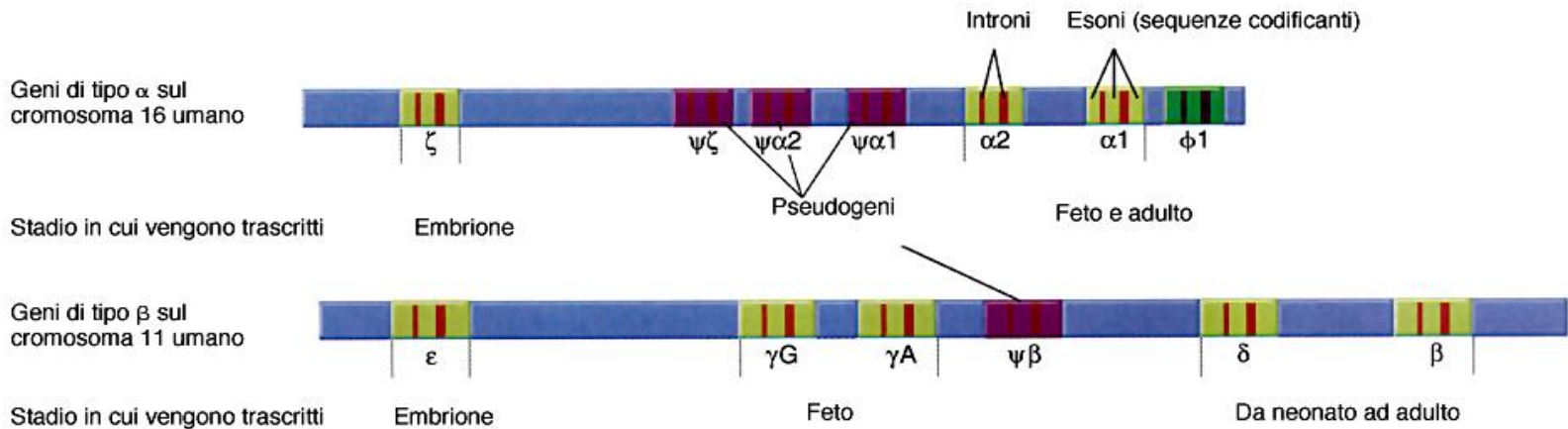
**4. traduzionale**

**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**

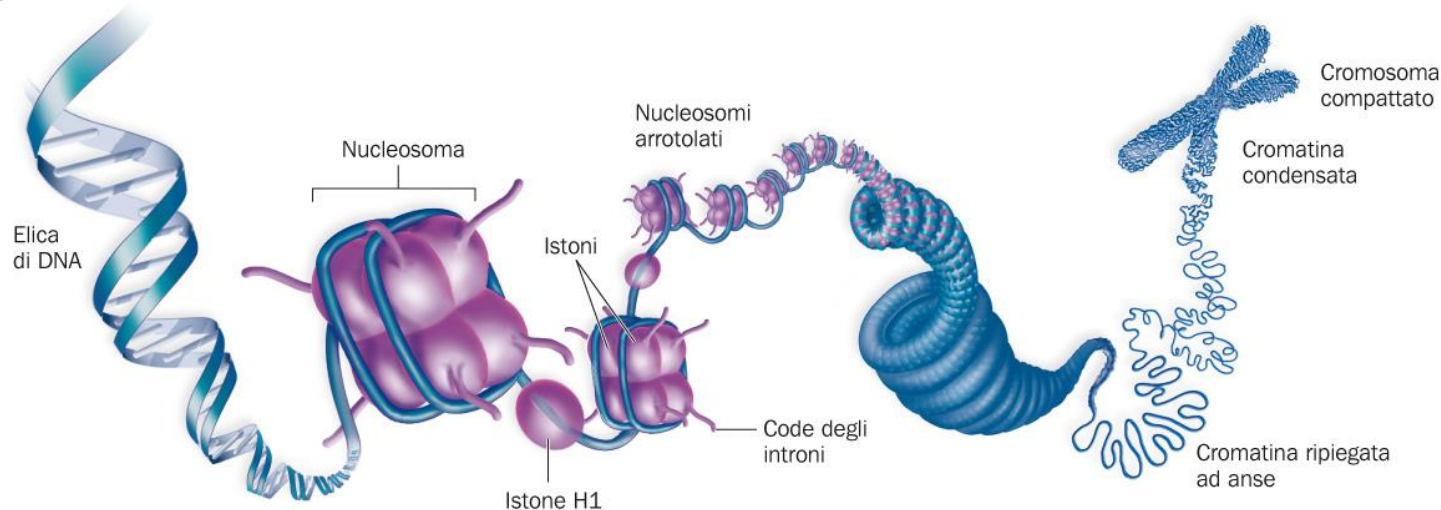
**Esistono molte proteine di regolazione che legano il DNA (fattori trascrizionali)**

**Appartengono a famiglie e presentano MOTIVI STRUTTURALI COMUNI molto conservati:**

- HELIX—TURN—HELIX**
- ZINC FINGER**
- LEUCINE ZIPPER**

# Negli eucarioti l'espressione genica è controllata a vari livelli

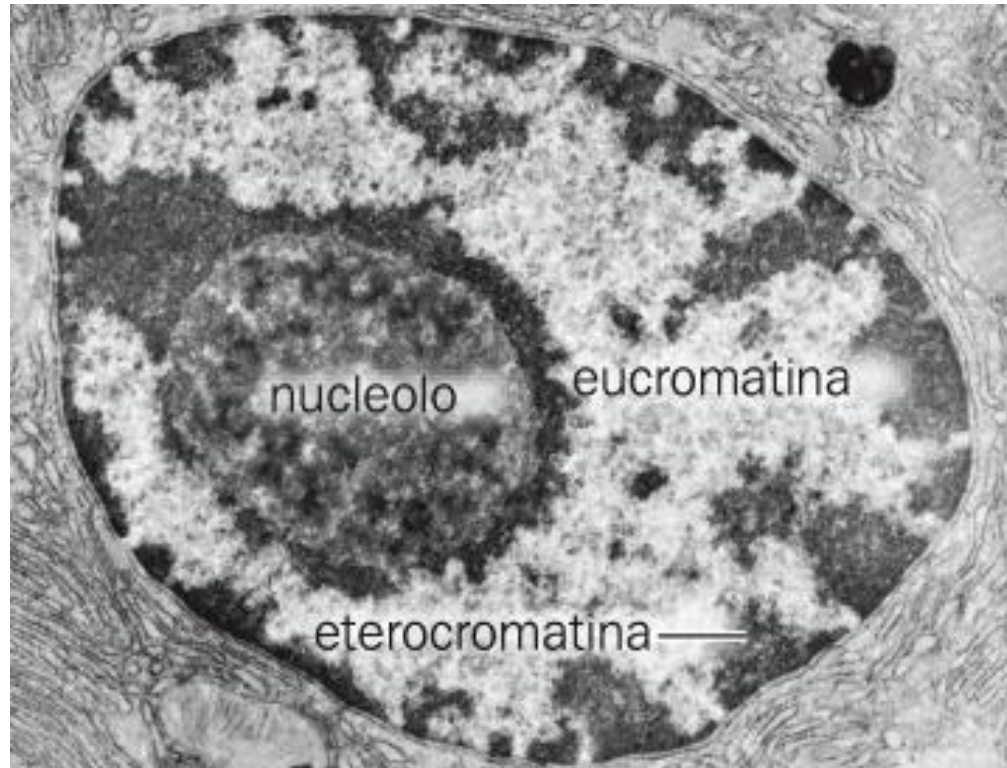
Negli eucarioti il DNA è sempre associato con abbondanti proteine. L'acido nucleico e le proteine formano un materiale dall'aspetto filiforme chiamato **cromatina**.



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**

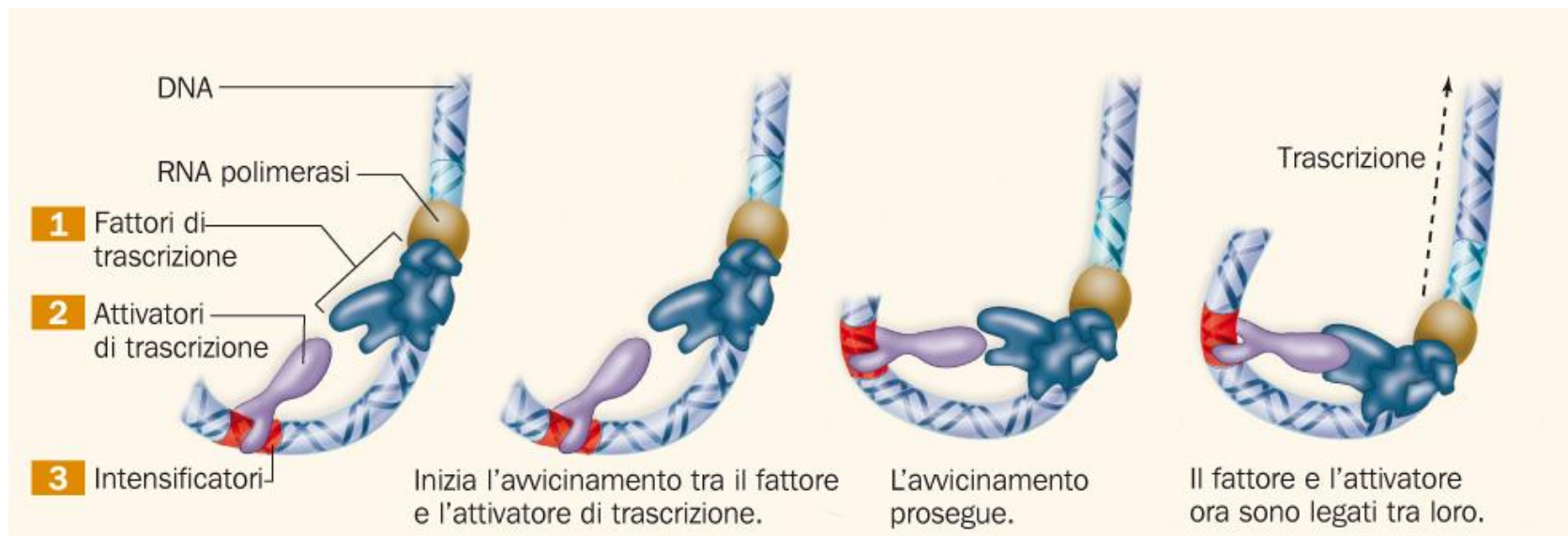
**i fattori trascrizionali sono:**

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

**Diversi fattori trascrizionali specifici devono essere presenti per  
«accendere» completamente un gene**

# 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**

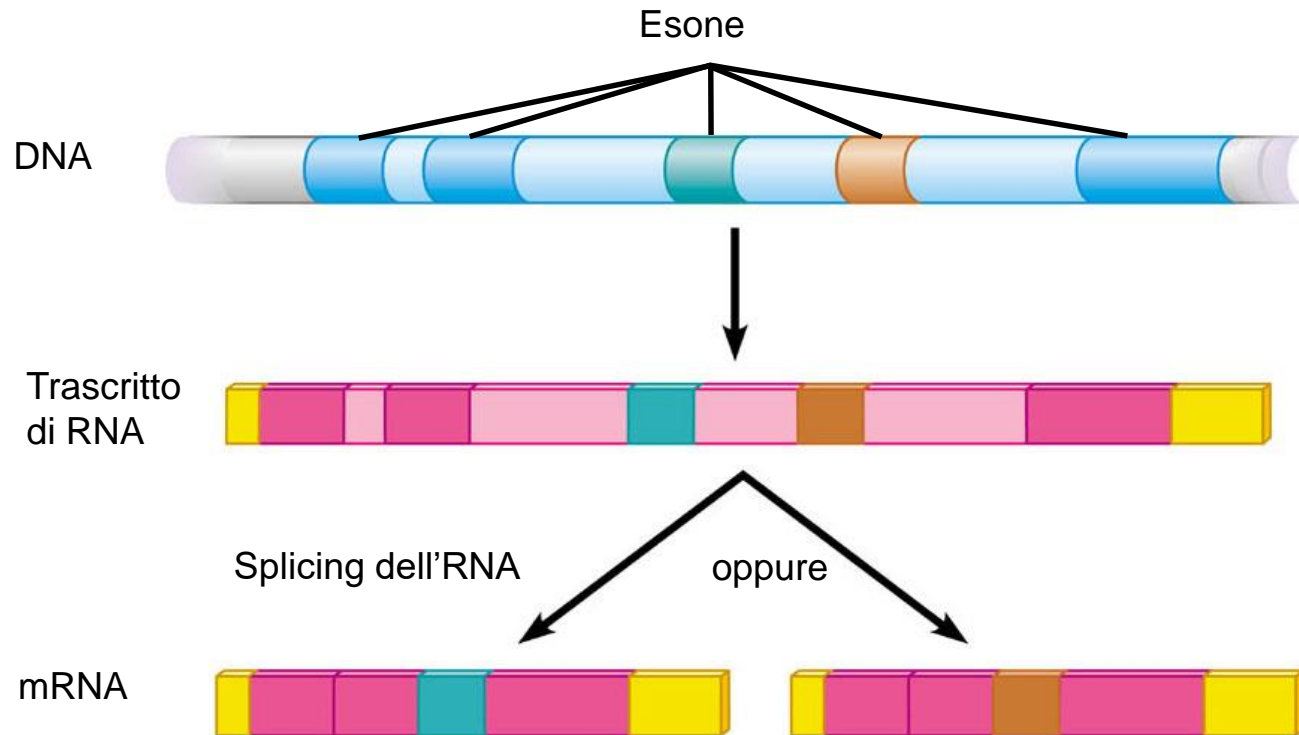
Nell uomo, il numero di geni molto inferiore rispetto al numero di prodotti polipeptidici

- Il **genoma** umano contiene circa 21,000 geni.
- Il **trascrittoma** : almeno il 75% dei geni hanno splicing alternative.
- Il **proteoma** : nel ~70% dei casi, lo splicing genera sequenze aa diverse, quindi il proteoma costituito da 50.000- 60.000 membri.

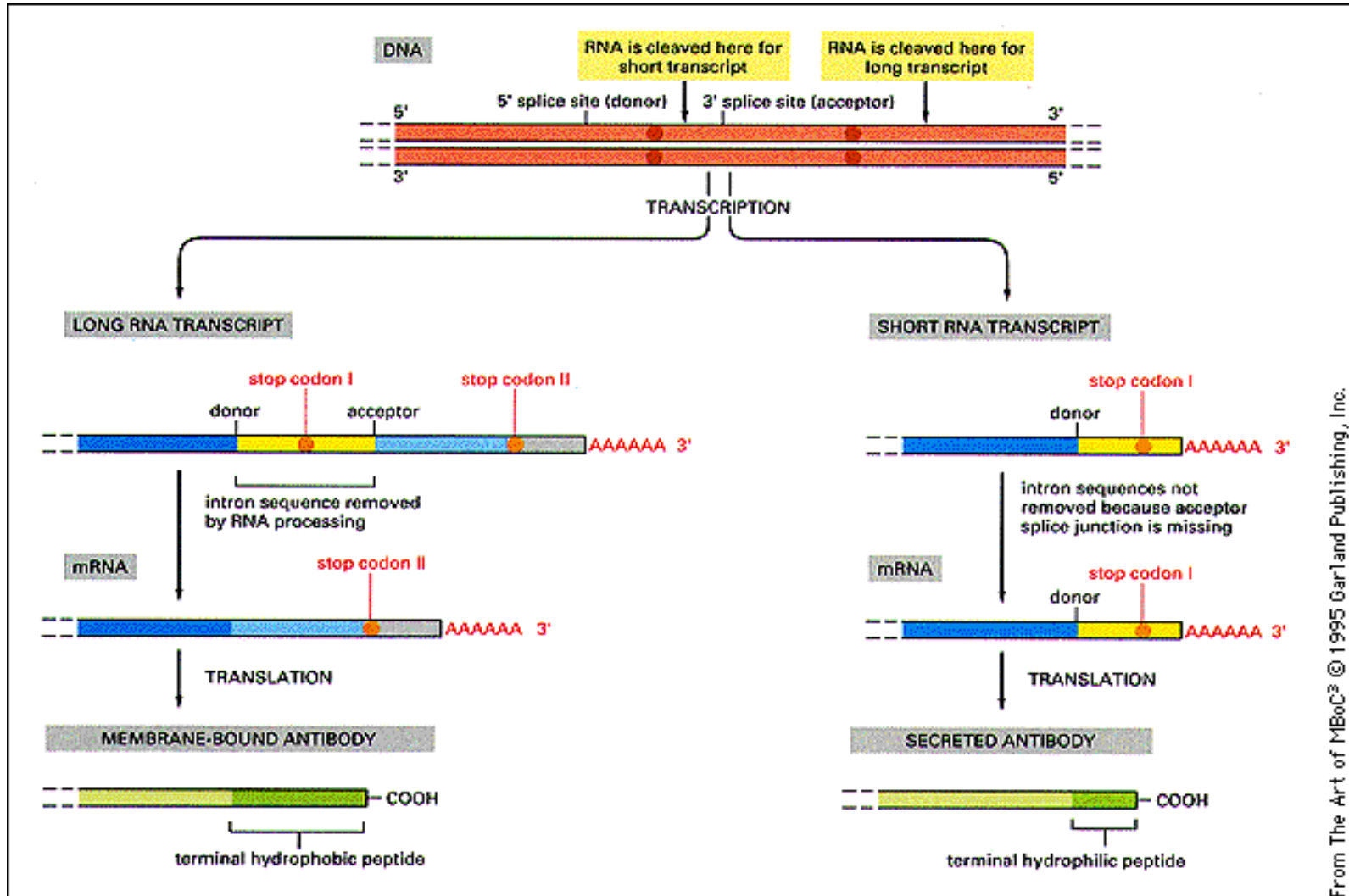


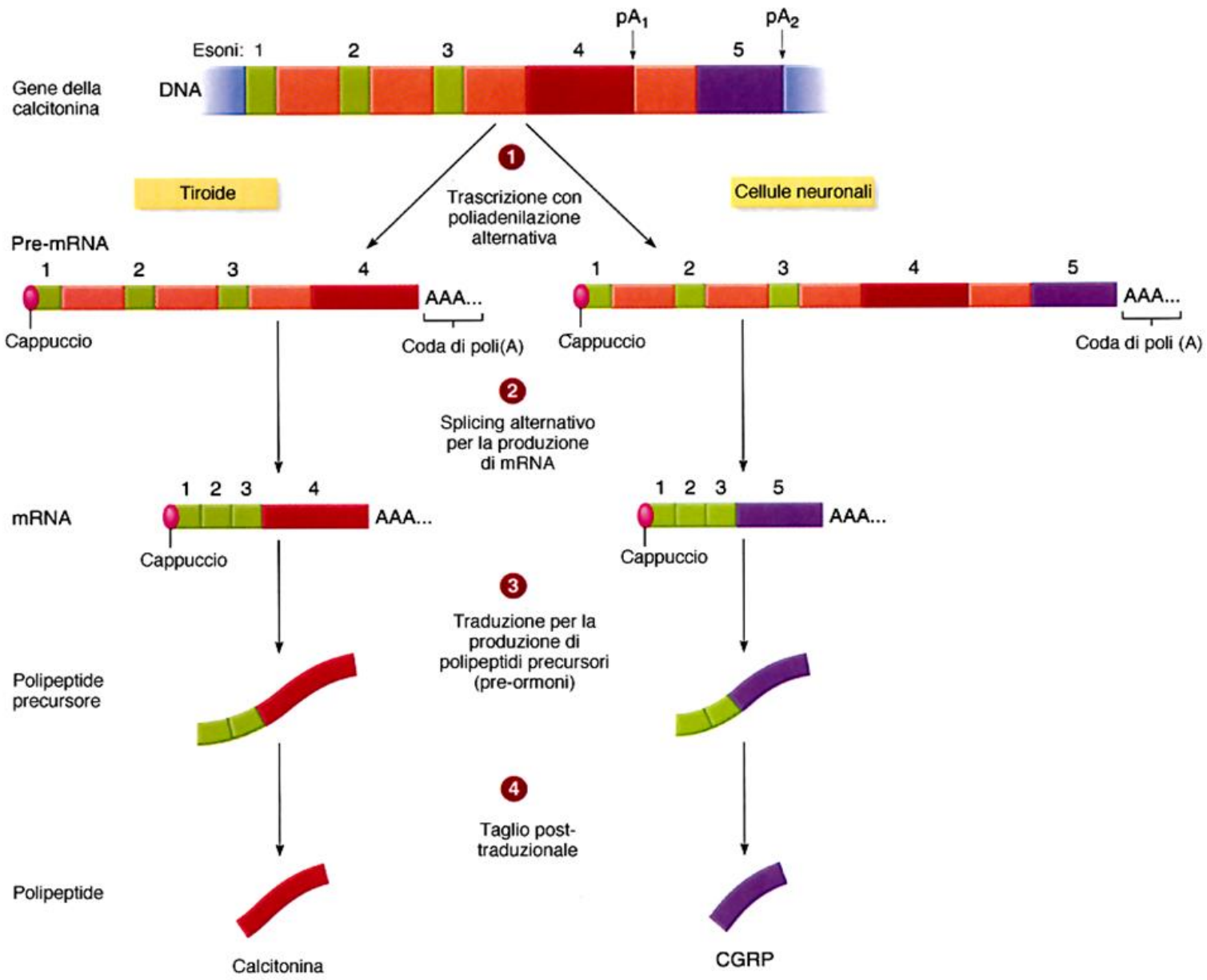
# Controllo dopo la trascrizione

I segmenti non codificanti (introni) vengono rimossi grazie al processo di **splicing**. La cellula può svolgere lo **splicing alternativo** e generare 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

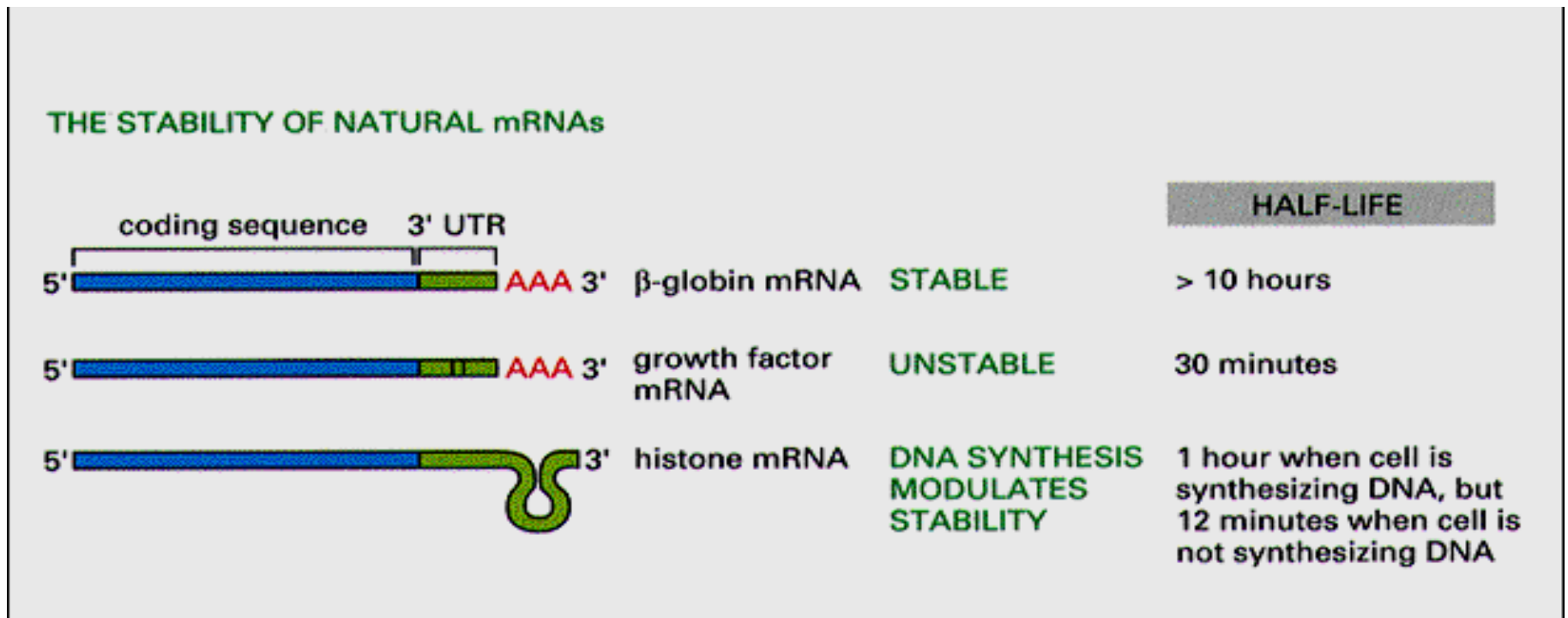
- Possibilità di di modificare la sequenza nucleotidica di un RNA dopo che è stato trascritto.
- Un ulteriore modo per produrre da un unico gene una varietà di proteine correlate.



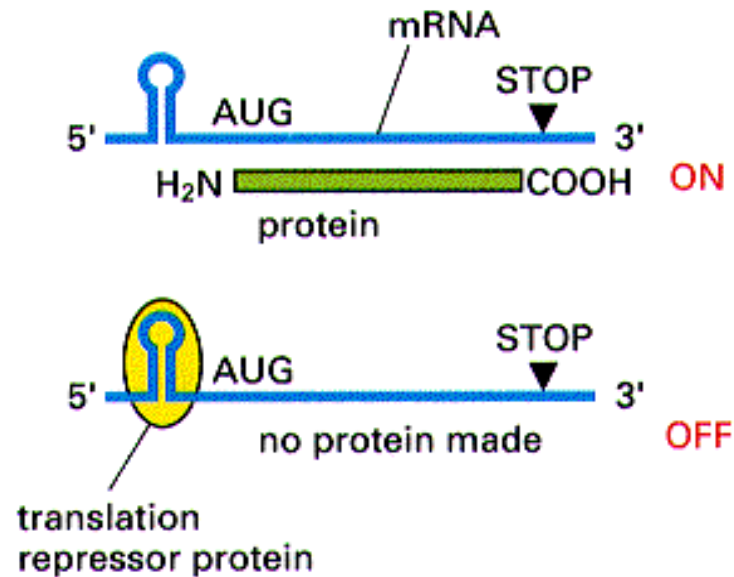
# Un ulteriore livello di regolazione post-trascrizionale: la stabilità dell' mRNA

Meccanismi che regolano la degradazione del mRNA:

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



# Regolazione dell'espressione genica a livello della traduzione



## Controllo durante la traduzione

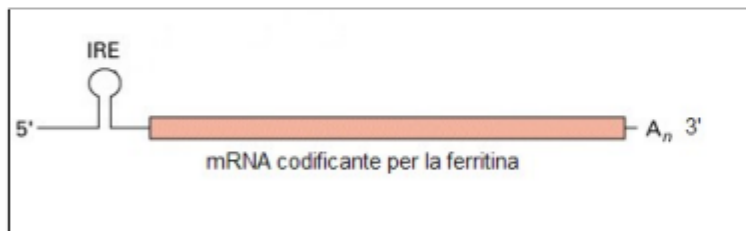
Dopo che l'mRNA è stato modificato e trasferito dal nucleo al citoplasma, avvengono altre forme di controllo dell'espressione genica:

- demolizione più o meno rapida dell'mRNA;
- attivazione della traduzione;
- modificazione dei polipeptidi tradotti;
- demolizione delle proteine.

## REPRESSIONE DELLA TRADUZIONE

Esempio:

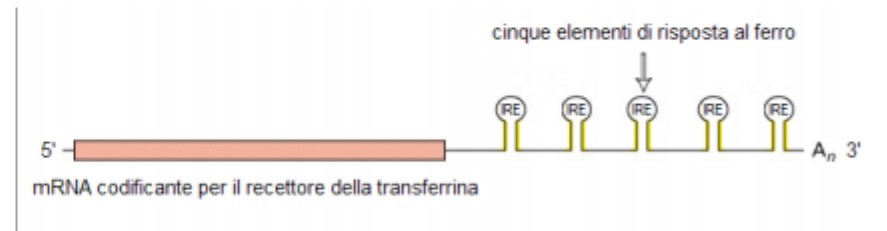
Gene che codifica per la ferritina



## CONTROLLO DELL'EMIVITA DEL mRNA

Esempio:

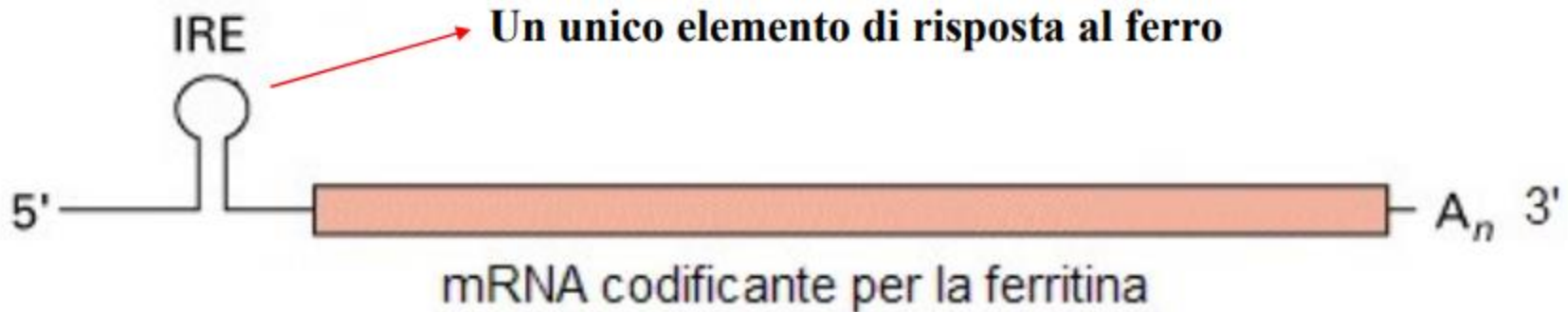
Gene che codifica per il recettore  
della transferrina



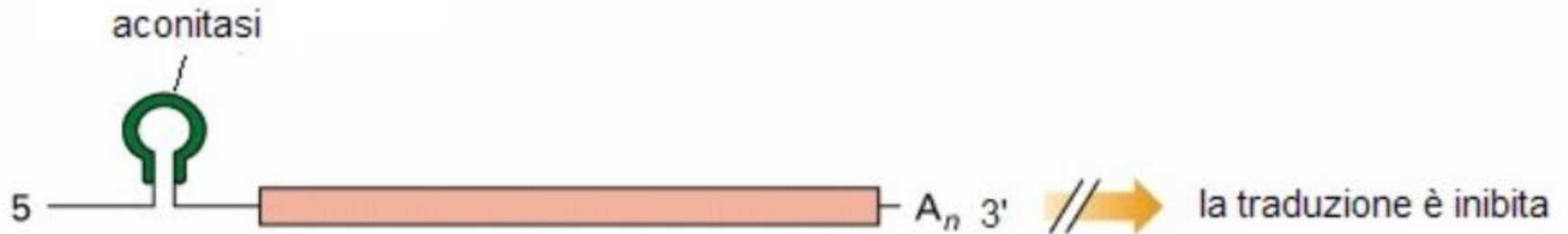
**Ai siti IRE si legano proteine che consentono l'auto-regolazione del Ferro intracellulare note come IRP (Iron Regulatory Proteins)**

## REPRESSIONE DELLA TRADUZIONE

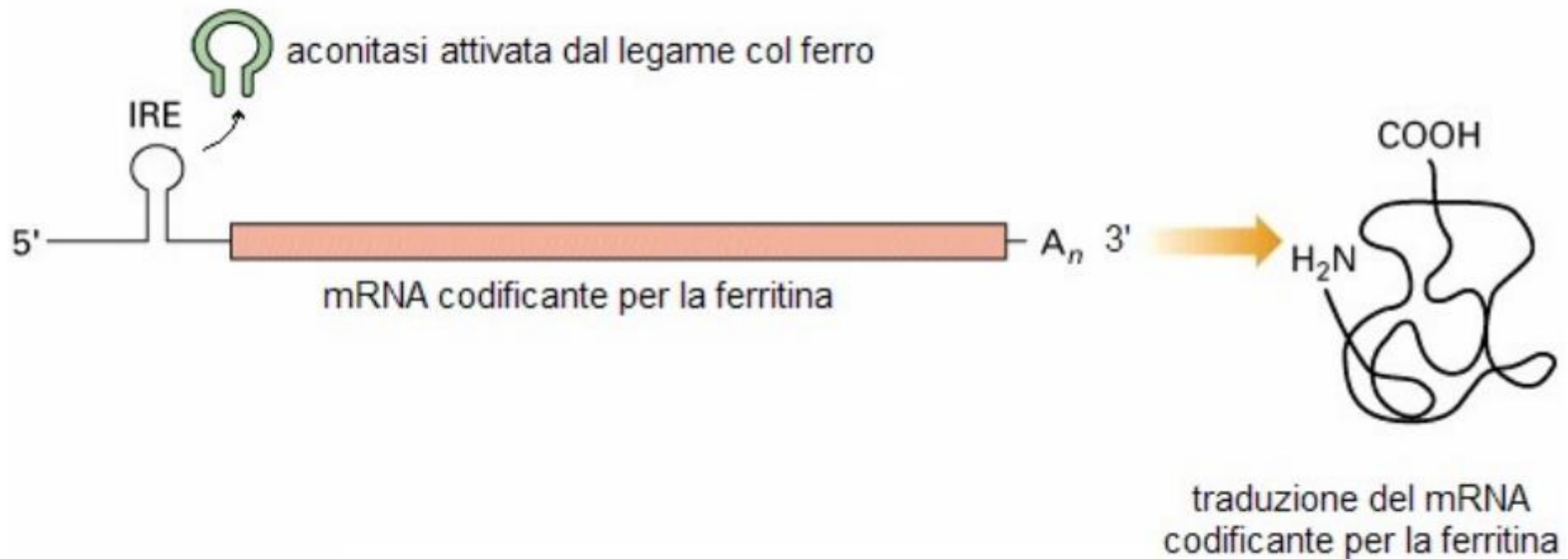
**FERRITINA:** proteina deputata all'accumulo di ferro  
la cui sintesi viene stimolata dalla presenza del ferro



**A basse** concentrazioni di ferro **l'aconitasi** enzimaticamente inattiva, ha maggiore affinità per i siti IRE e vi si lega. La traduzione non ha luogo

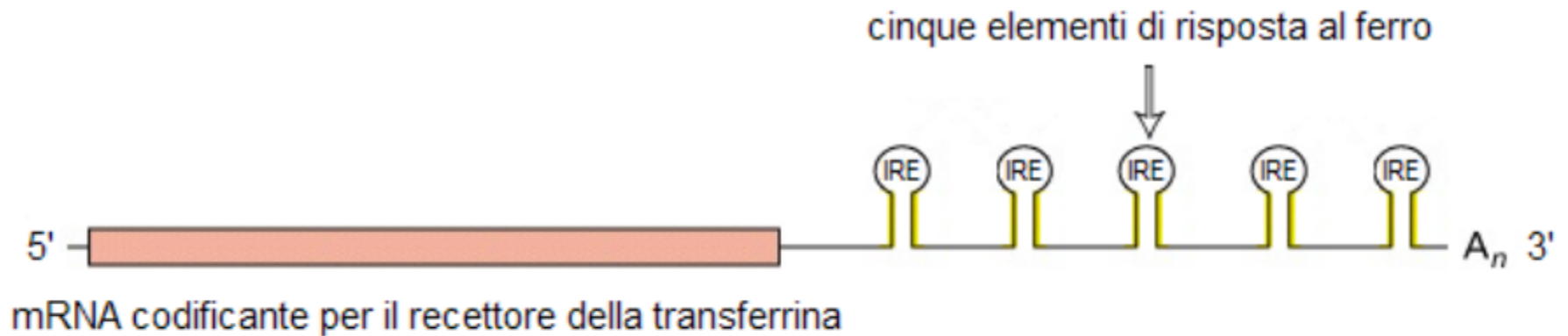


**Ad alte** concentrazioni di ferro **l'aconitasi** si trova nella sua forma enzimatica attiva che possiede una bassa affinità per RNA. Essa pertanto non lega i siti IRE e la traduzione dell'mRNA codificante per la ferritina avviene regolarmente



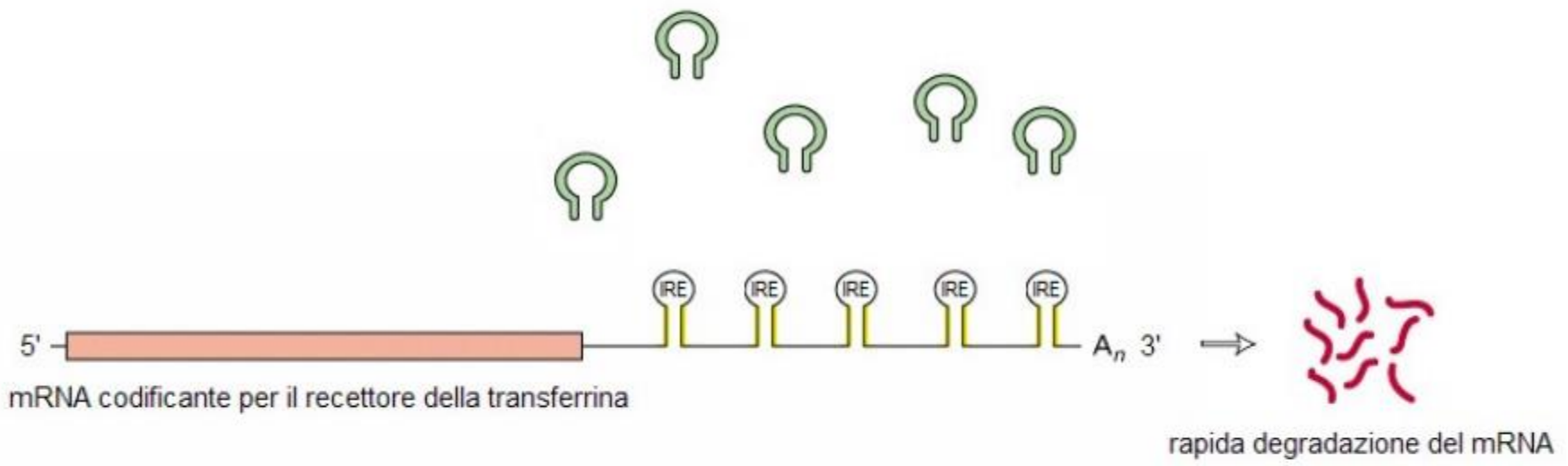
# CONTROLLO DELL'EMIVITA DEL mRNA

**RECETTORE PER LA TRANSFERRINA:** proteina che media l'assunzione di ferro da parte della cellula eucariotica  
la cui sintesi viene stimolata dalla carenza di ferro





**Ad alte** concentrazioni di ferro l'**aconitasi** attiva non lega i siti IRE esponendo l'mRNA del recettore per la transferrina a rapida degradazione ed inibendo in questo modo la traduzione



**A *basse* concentrazioni di ferro l'*aconitasi*, inattiva, si lega ai siti IRE proteggendo l'mRNA del recettore per la transferrina dalla degradazione e consentendo che la sua traduzione avvenga più volte**



## 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

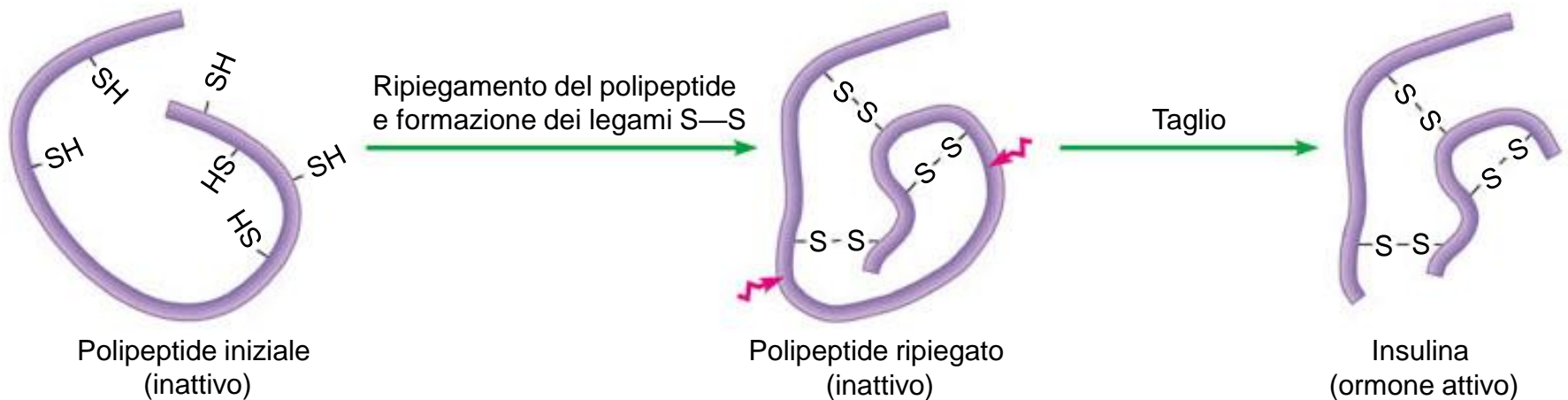


•Ubiquitinazione e direccionamento al proteasoma

# Controllo dopo la traduzione

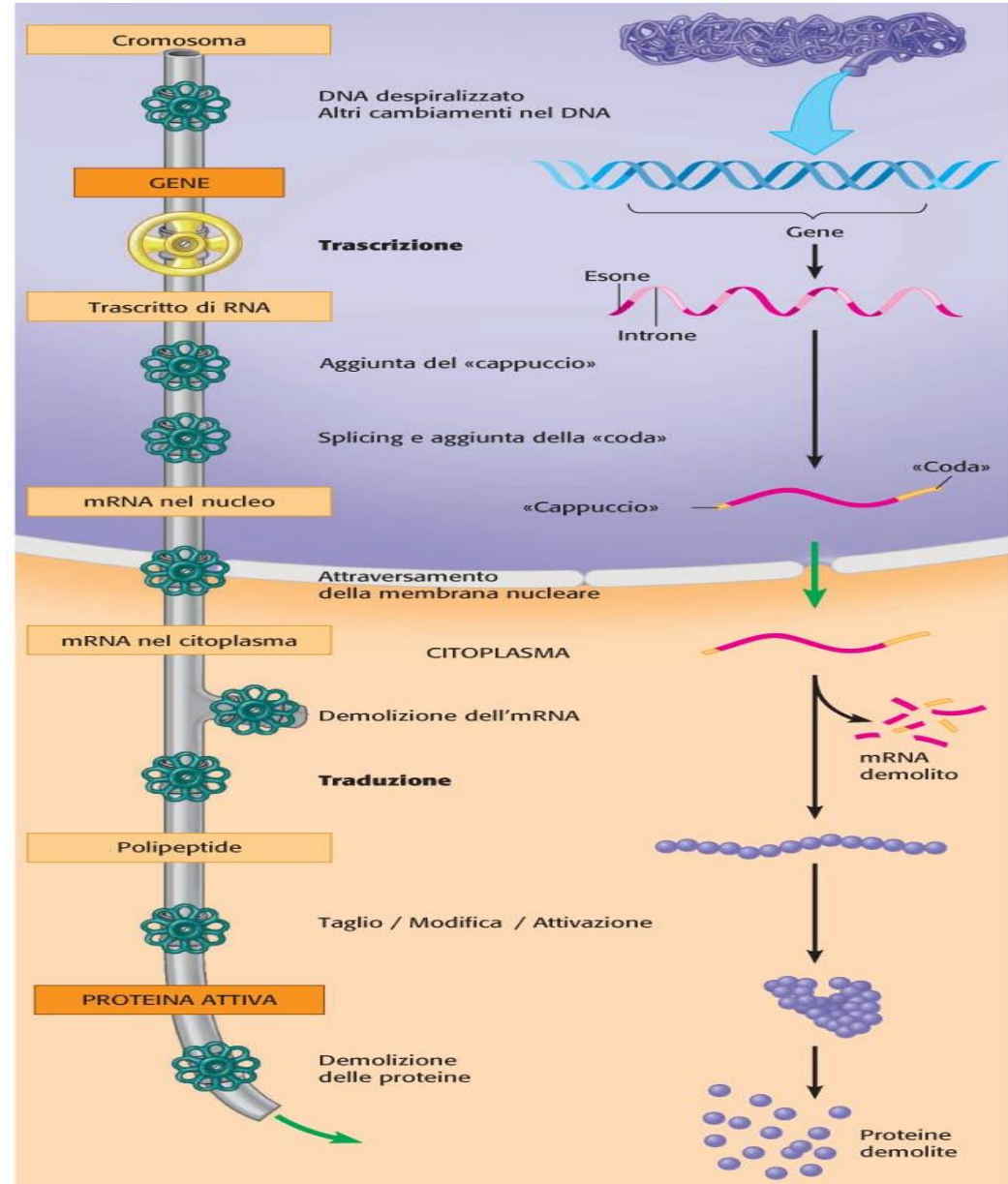
## *L'attivazione delle proteine*

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

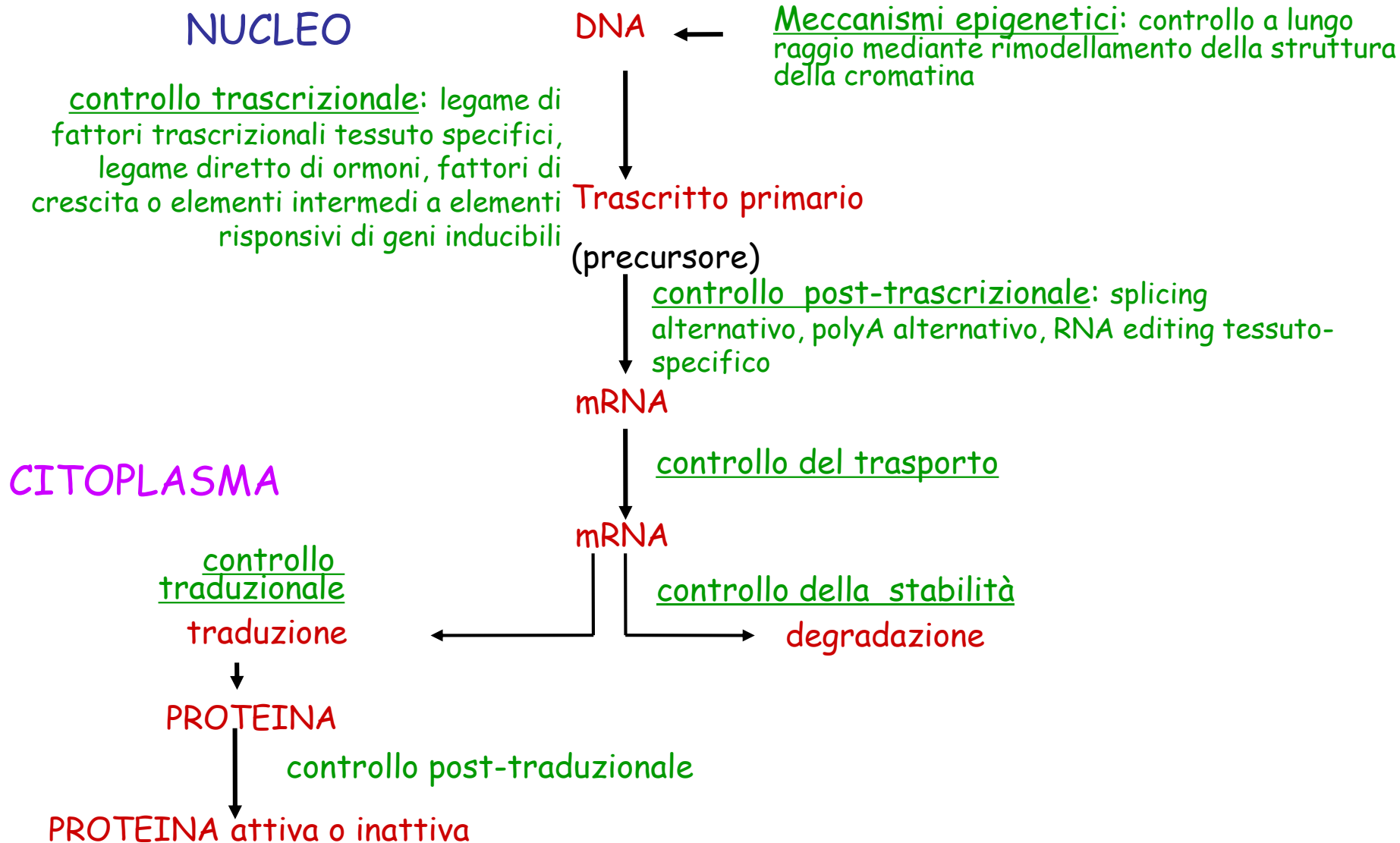


# La regolazione dell'espressione genica

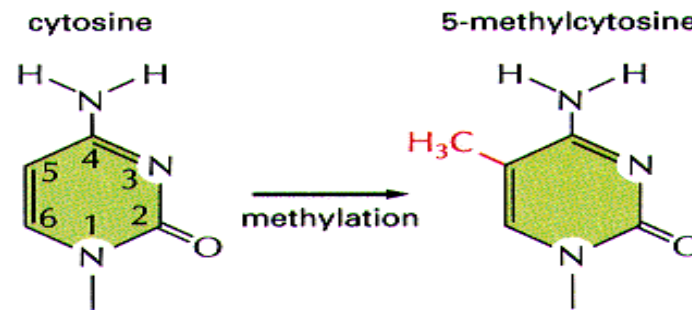
- Una visione d'insieme dell'espressione genica negli eucarioti
- I molteplici meccanismi che controllano l'espressione genica sono analoghi alle valvole di controllo delle tubazioni.



# I livelli di regolazione dell'espressione genica

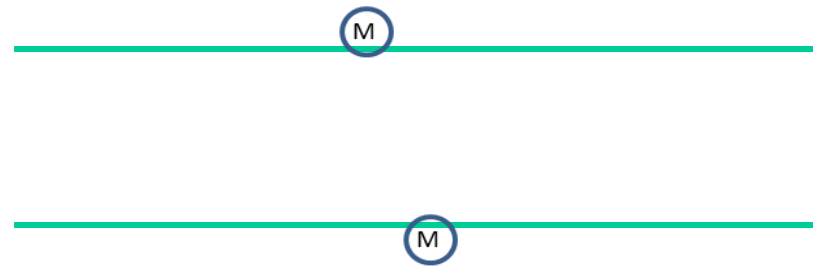
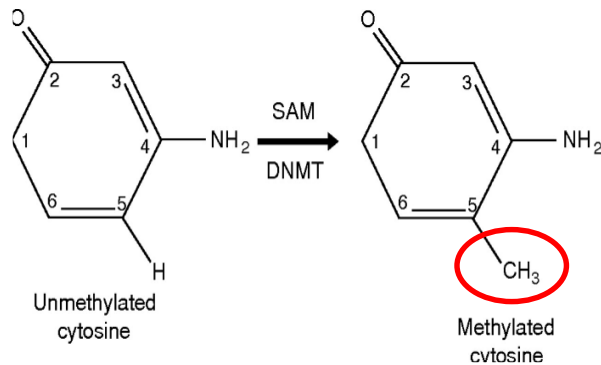


# I geni trascrizionalmente attivi hanno promotori ipometilati

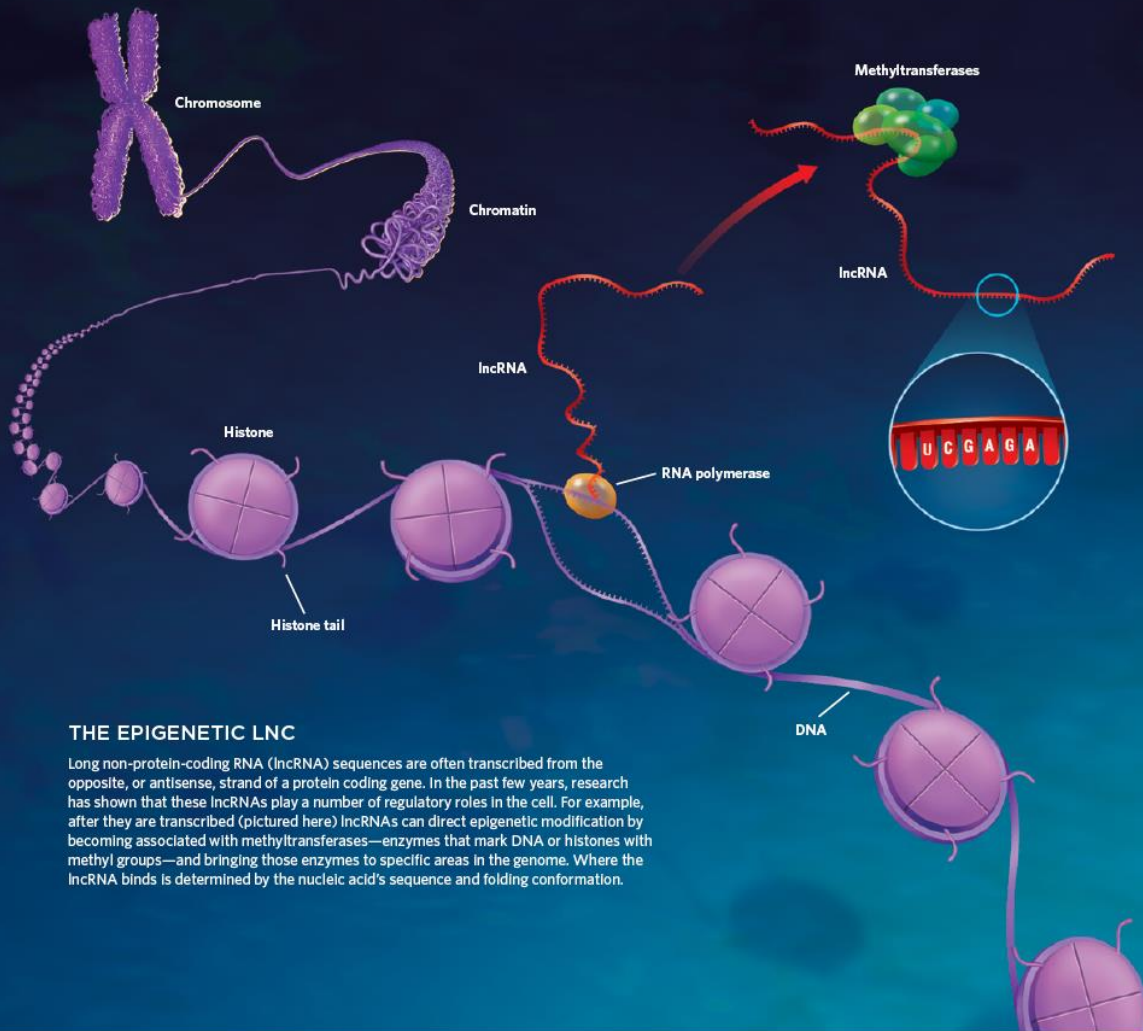


# DNA methylation

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

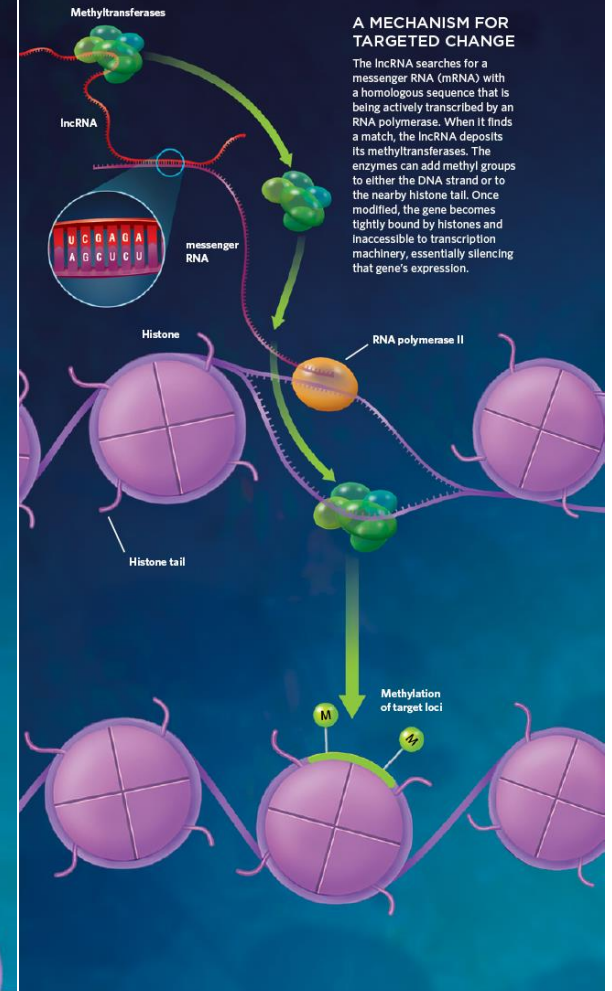






### THE EPIGENETIC LNC

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.



### A MECHANISM FOR TARGETED CHANGE

The lncRNA searches for a messenger RNA (mRNA) with a homologous sequence that is being actively transcribed by an RNA polymerase. When it finds a match, the lncRNA deposits its methyltransferases. The enzymes can add methyl groups to either the DNA strand or to the nearby histone tail. Once modified, the gene becomes tightly bound by histones and inaccessible to transcription machinery, essentially silencing that gene's expression.

# Epigenetic Mechanisms

Post-transcriptional  
RNAi

Transcriptional  
Histone modifications  
DNA methylation

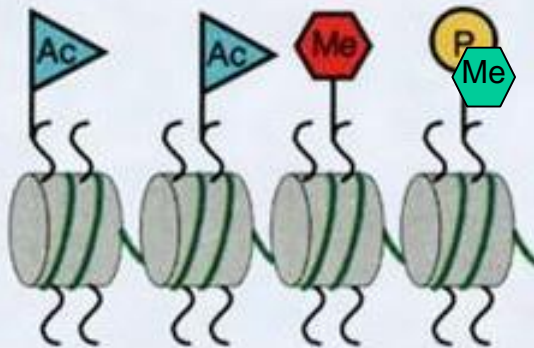
Enables a cell/organism to respond to its dynamic external environment during development and throughout life.

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

# Structure & Epigenetics of Euchromatin versus Heterochromatin

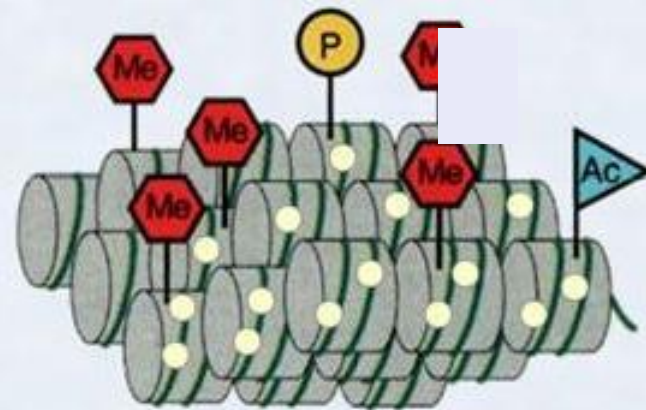
DNA methylation and histone modifications help to compartmentalize the genome into domains of different transcriptional potentials

**Euchromatin**



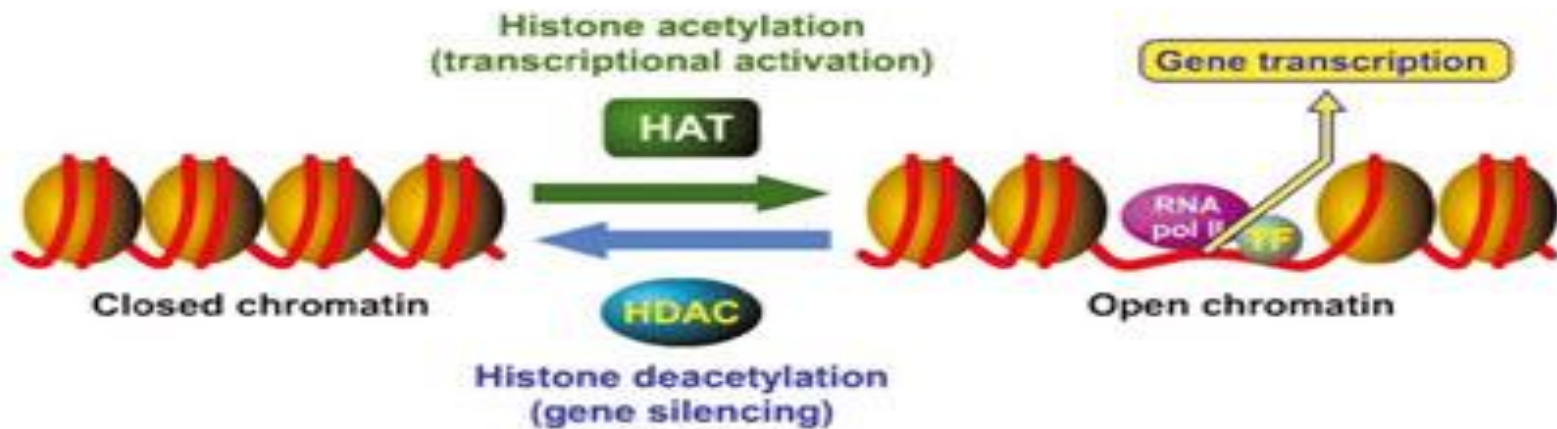
- High histone acetylation
- Low DNA methylation
- H3-K4 methylation

**Heterochromatin**



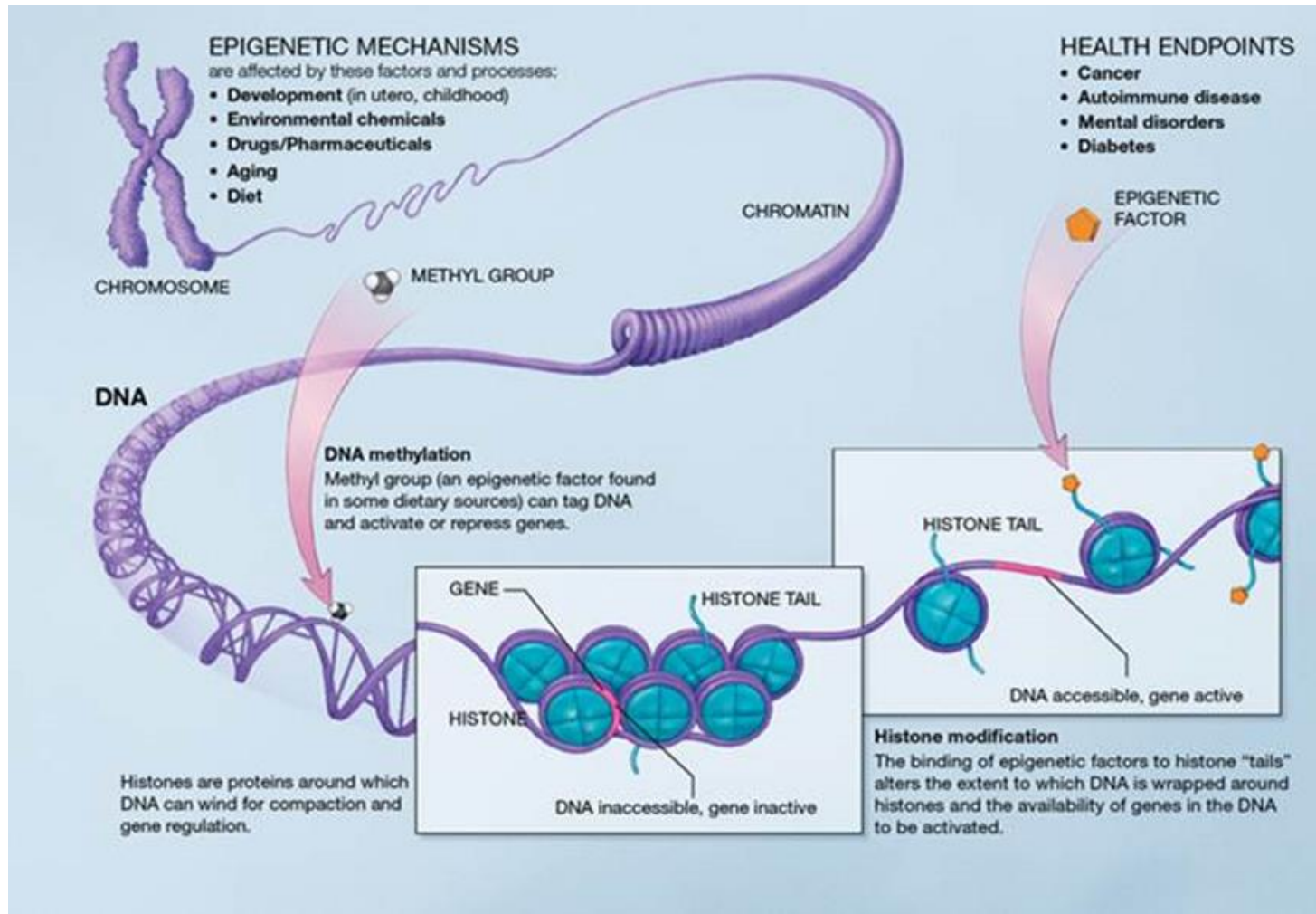
- Low histone acetylation
- Dense DNA methylation
- H3-K9 methylation

# Acetylation is the most highly studied



# Two epigenetic mechanisms:

1. DNA Methylation
2. Histone Modifications



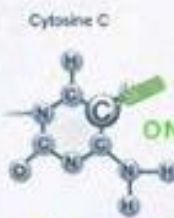
# Epigenetic Gene Regulation

- ❖ 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

**Cytosine C**




**Pluripotent cell**




**≠**

**Methyl-Cytosine 5mC**



**Unipotent cell**



ctggagggtgcaatggctgtcttgtcctggcctt  
 ggacatgggctgaaatactgggttcacccatat  
 ctaggactctagaggggtgggtaagcaagaact  
 gaggagtggcccagaaataattggcacacgaa  
 cattcaatggatgttttaggctctccagaggat  
 ggctgagtgggctgtaaggacaggcagagagg  
 tgcagtgccaacaggctttgtggtgagatggg  
 catccagcaactggtttgtgaggtgtccggtg  
 acccaaggcaggggtgagaggaccttgaaggtt  
 gaaaatgaaggcctcctgggggtccctcctaag  
 ggttgtcctgtccagagctccccaacctccctc  
 tggaaagacacaggcagatagagctccctcagt  
 ttctcccacccccacagctctgctcctccacc  
 acccagggggcggggccagagggtcaaggctaga  
 ggggtgggattggggaggagagggtgaaacct  
 cctaggtgagcctctttccaccaggccccgg  
 ctgggggtgccaccttccc**atgggtggacac**

Ctggagggtgcaatggctgtcttgtcctggcctt  
 ggacatgggctgaaatactgggttcacccatat  
 ctaggactctagaggggtgggtaagcaagaact  
 gaggagtggcccagaaataattggcacacgaa  
 cattcaatggatgttttaggctctccagaggat  
 ggctgagtgggctgtaaggacaggcagagagg  
 tgcagtgccaacaggctttgtggtgagatggg  
 catccagcaactggtttgtgaggtgtccggtg  
 acccaaggcaggggtgagaggaccttgaaggtt  
 gaaaatgaaggcctcctgggggtccctcctaag  
 ggttgtcctgtccagagctccccaacctccctc  
 tggaaagacacaggcagatagagctccctcagt  
 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 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?

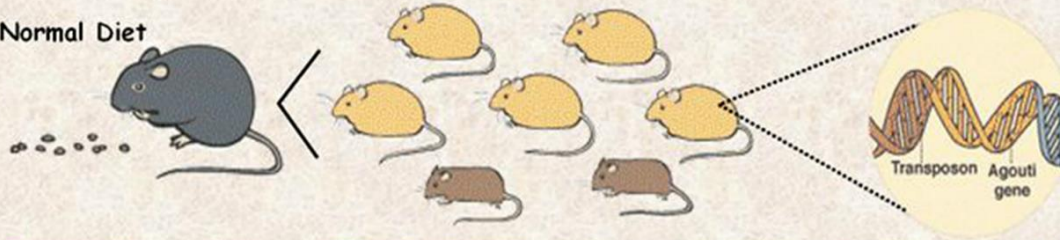
Some changes in gene expression that are, in fact, heritable!



# Can environment influence these processes?

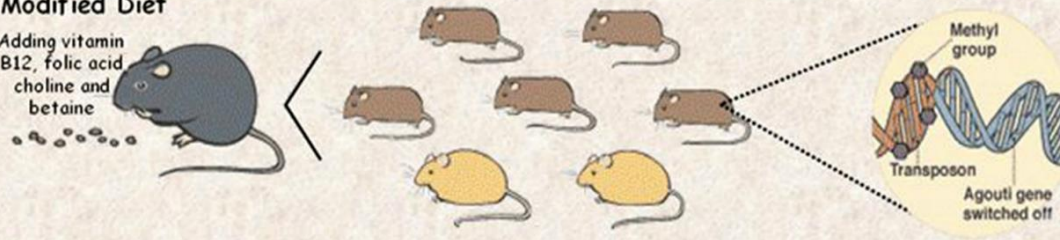
They are what she ate...

Normal Diet

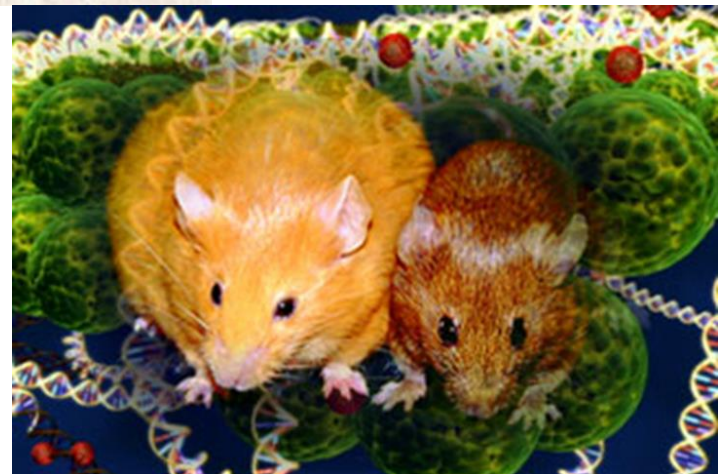


Modified Diet

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.



Dolly was the single success from 277 tries at somatic cell nuclear transfer

Dolly: The Cloning of a Sheep, 1996

