

I procarioti controllano l'espressione genica

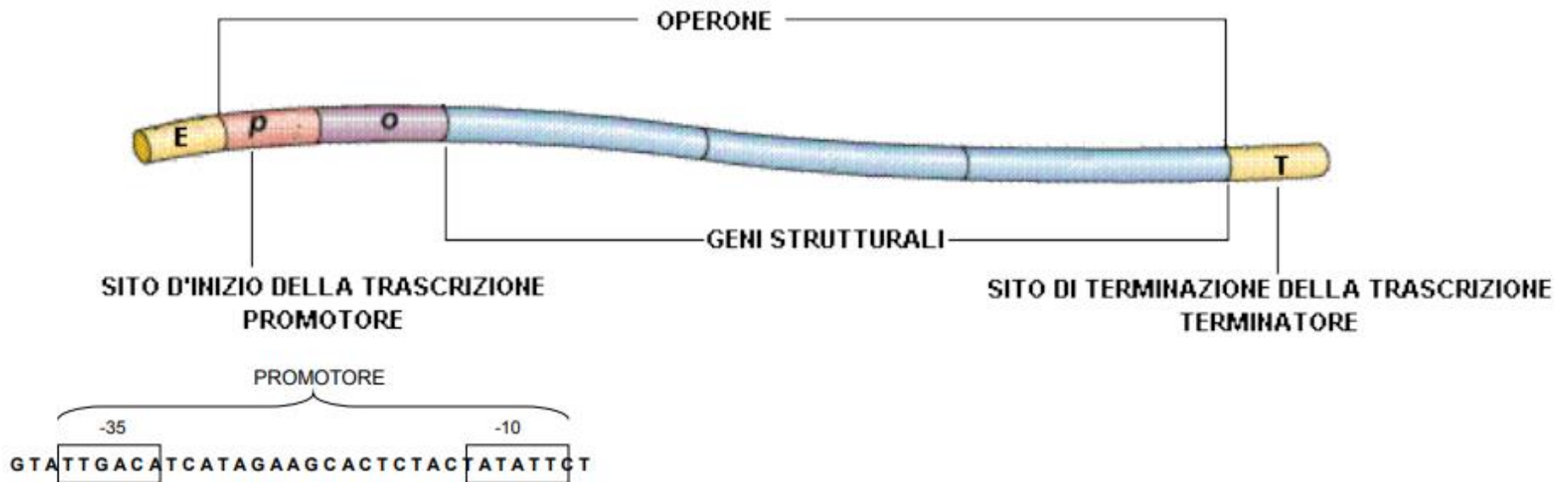
Nei procarioti certe proteine legate al DNA «accendono» e «spengono» i geni.

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



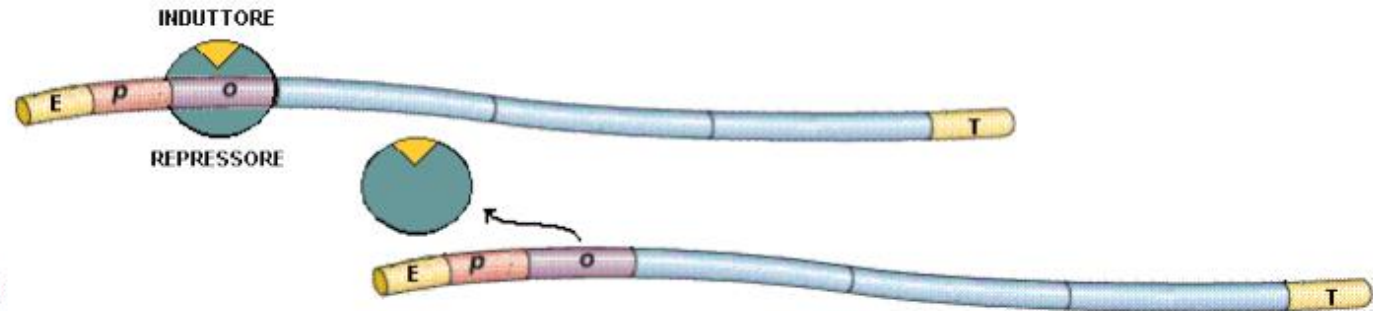
ATTIVARE L'INIZIO DELLA TRASCRIZIONE



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

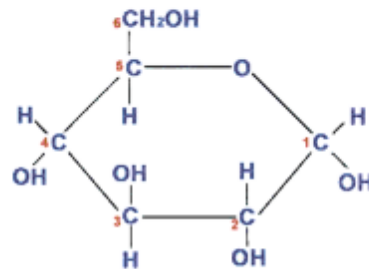
I geni batterici sono tipicamente raggruppati in operoni, in cui più geni si susseguono l'un l'altro preceduti da un unico promotore e trascritti insieme in un unico **RNA policistronico**.

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 **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).

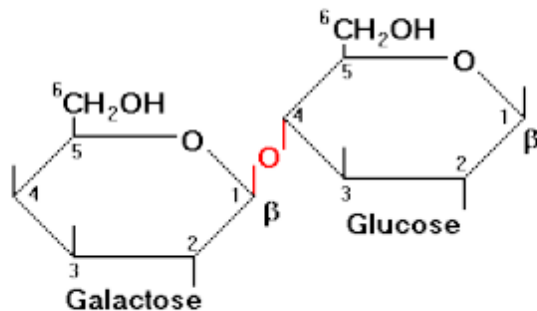
I BATTERI OTTENGONO IL CARBONIO DI CUI NECESSITANO PER LA CRESCITA ED IL CATABOLISMO DA ZUCCHERI A CINQUE E SEI ATOMI DI CARBONIO

PREFERIBILMENTE GLUCOSIO

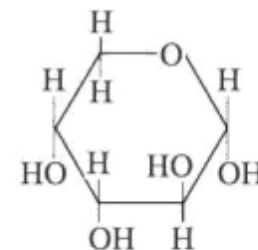


IN ASSENZA DI GLUCOSIO

LATTOSIO



ARABINOSIO



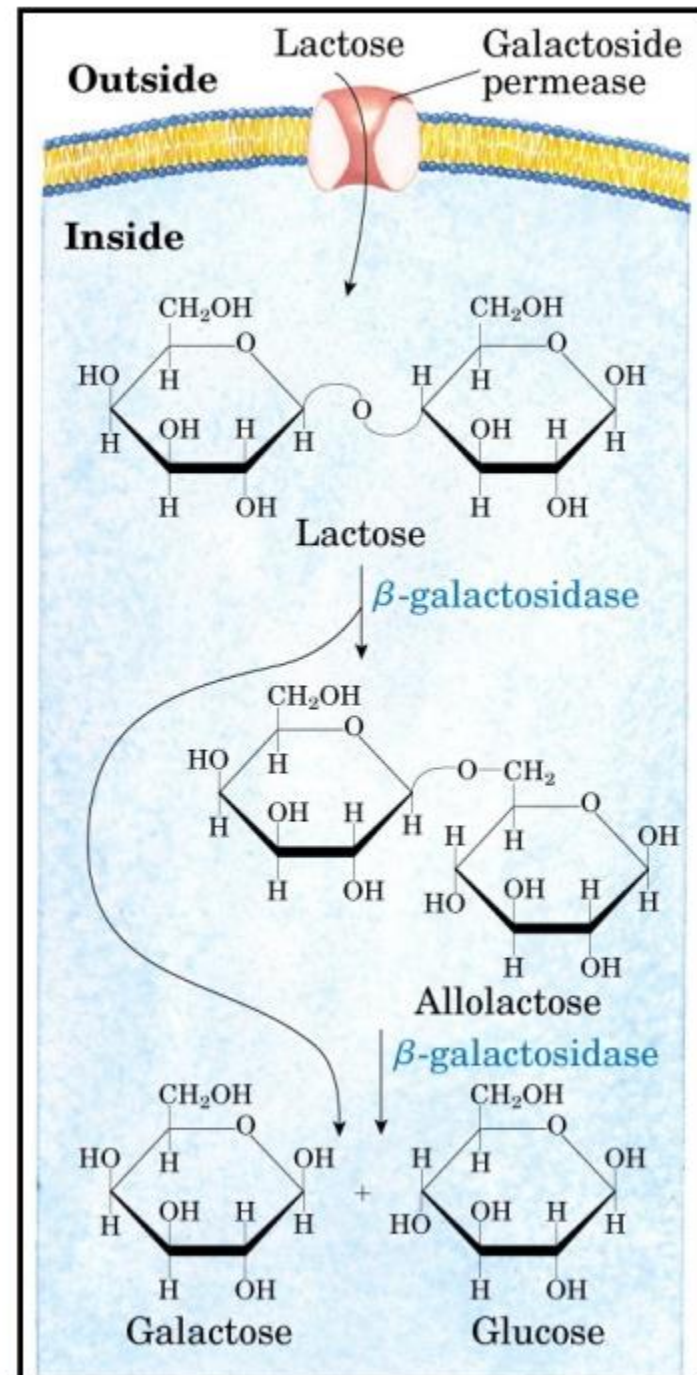
Operone lattosio

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

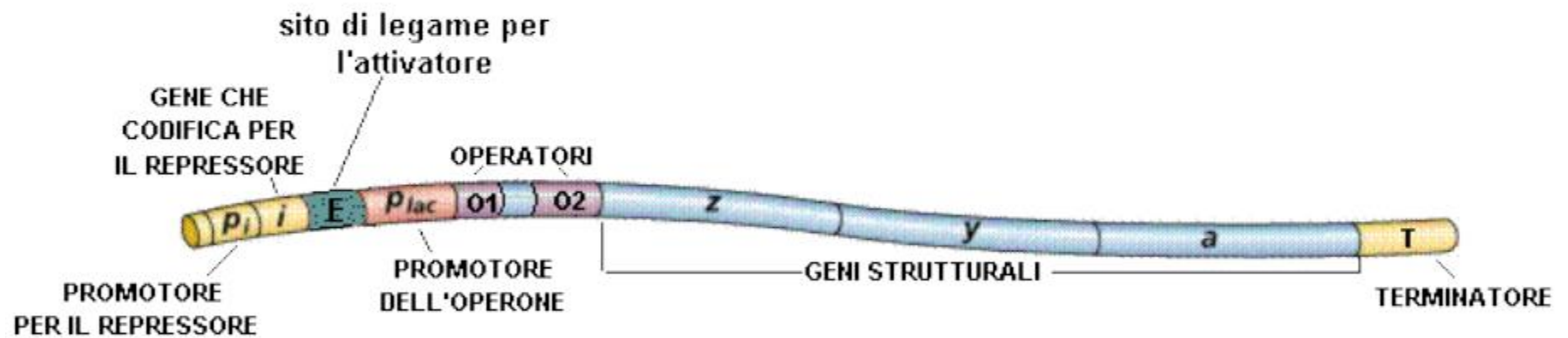
lattosio permeasi → gene *lacZ*

β-galattosidasi → gene *lacY*

tiogalattoside transacetilasi → gene *lacA*

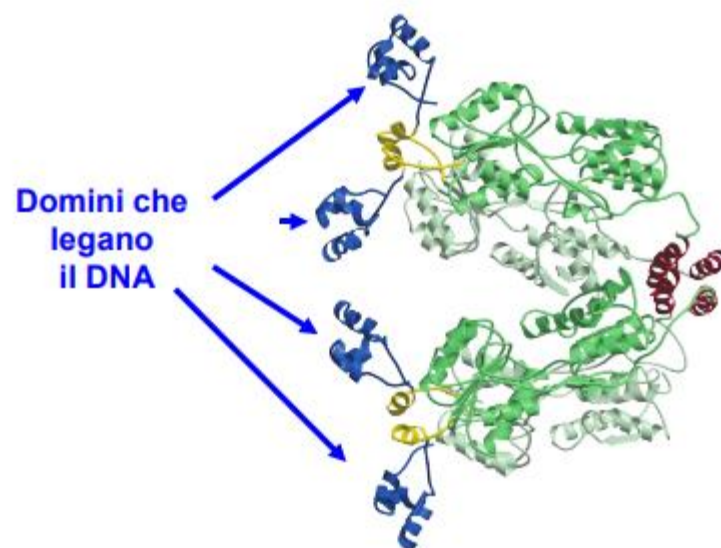
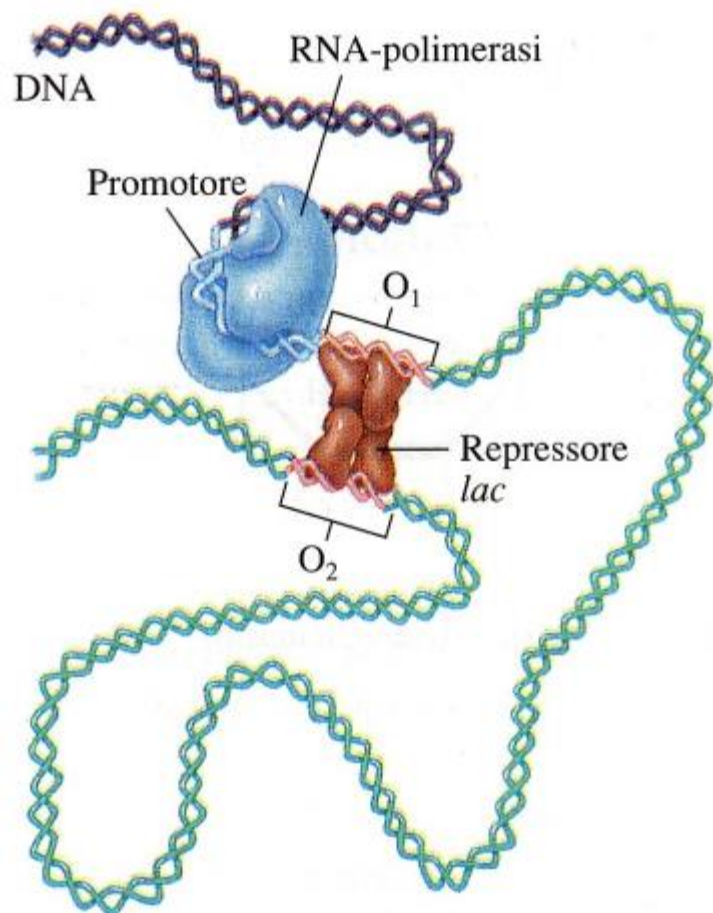


Struttura dell'operone lac

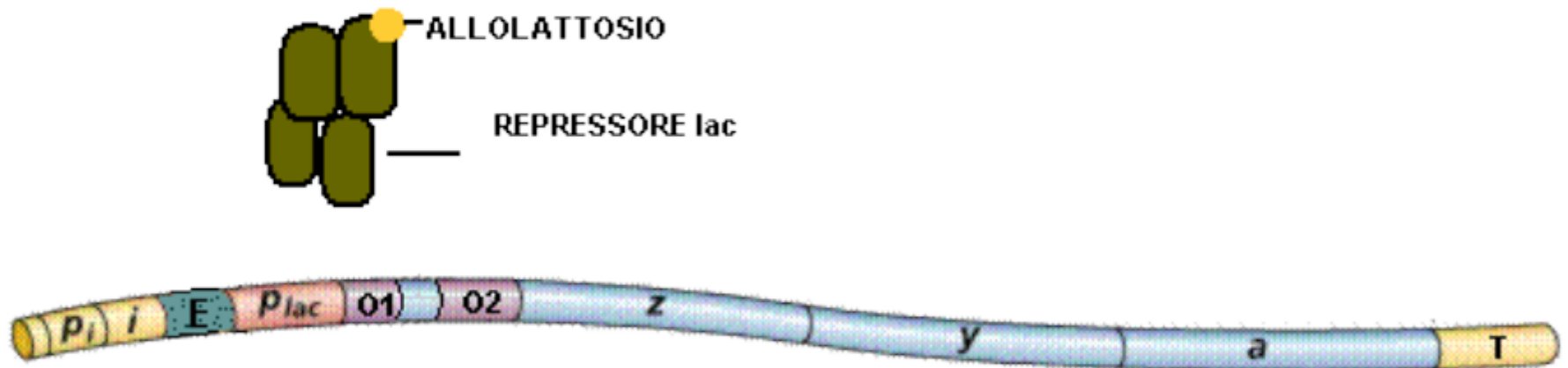


In presenza di glucosio ed in assenza di lattosio

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



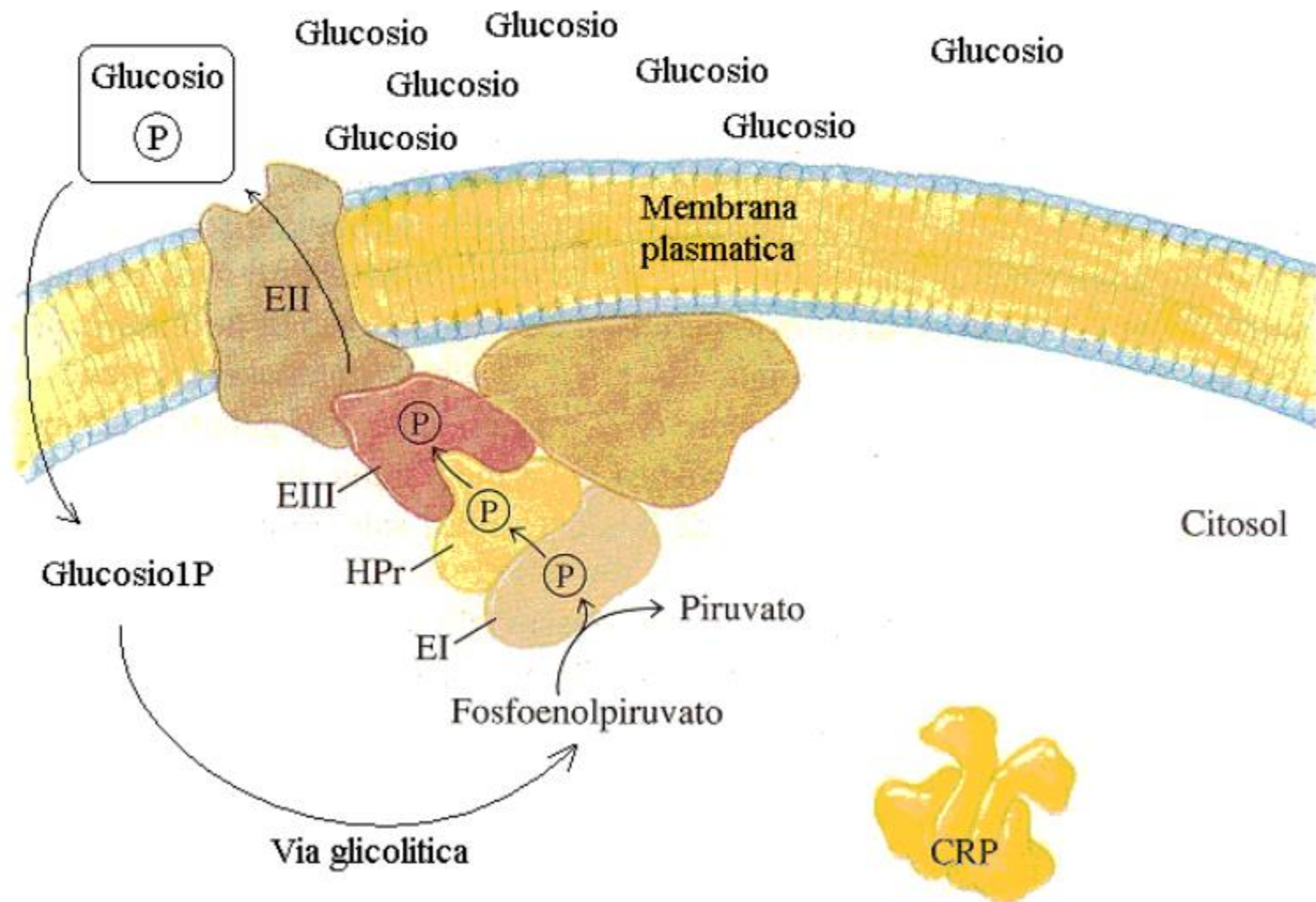
In assenza di glucosio ed in presenza di lattosio
una piccola quantità di lattosio viene convertita in allolattosio



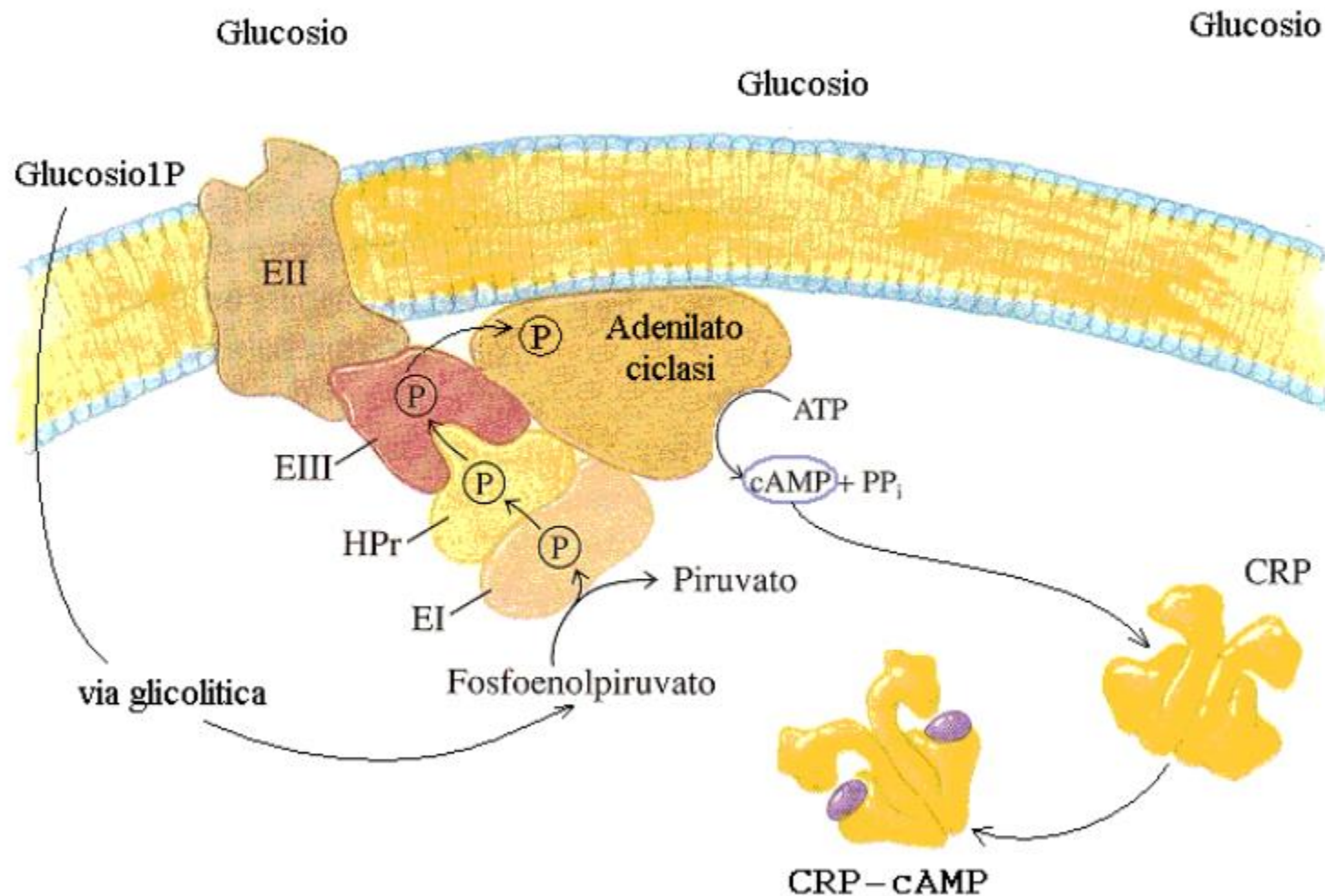
L'allolattosio è un induttore dell'operone *lac*

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

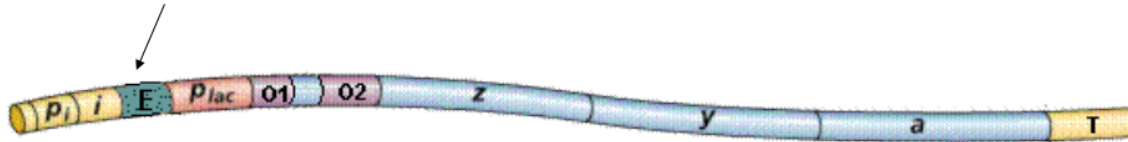
Concentrazione di glucosio nel mezzo esterno elevata



Quando la concentrazione del glucosio diminuisce



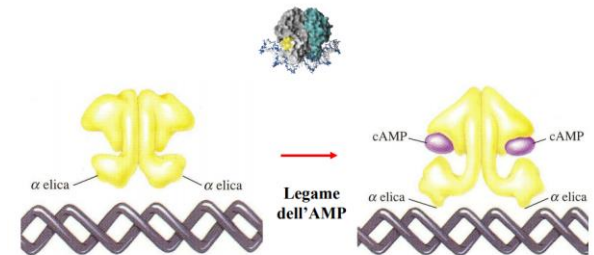
Il sito di legame del complesso CRP-AMPciclico, è posizionato immediatamente prima del promotore P_{LAC}



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

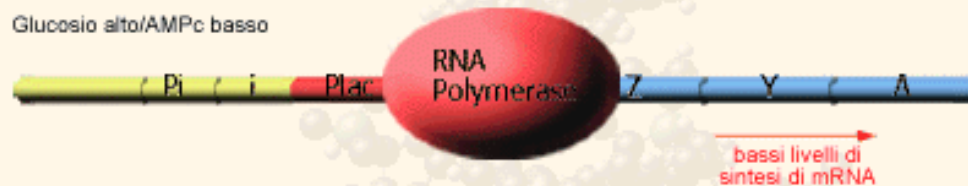


La proteina CRP, è un omodimero contenente siti di legame per il DNA e per l'AMPc

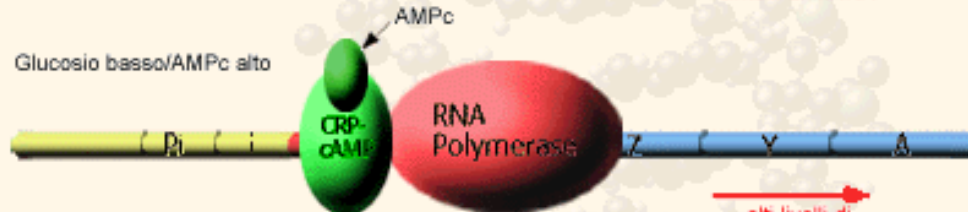


Essa possiede, in ognuna delle sue subunità, un dominio ad α -elica

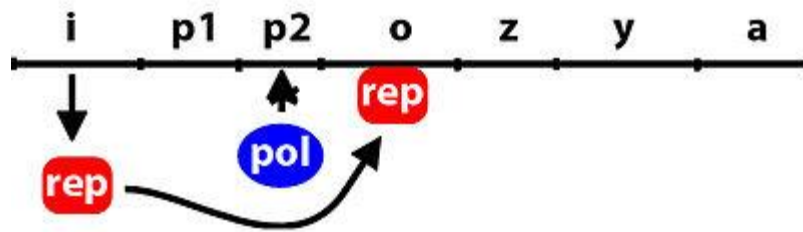
Glucosio alto/AMPc basso



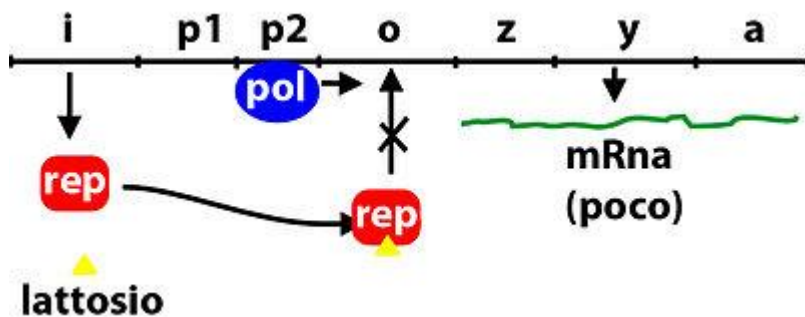
Glucosio basso/AMPc alto



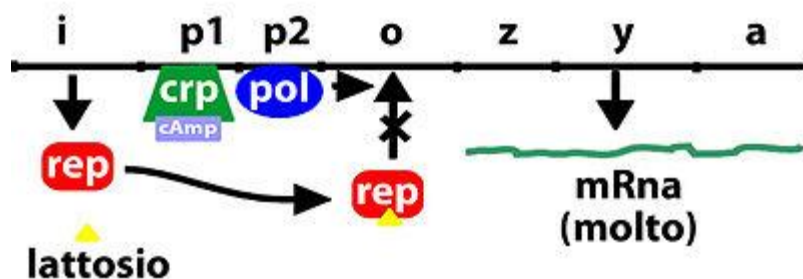
Il complesso CRP-AMPc si lega al promotore e stimola la sintesi di mRNA



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



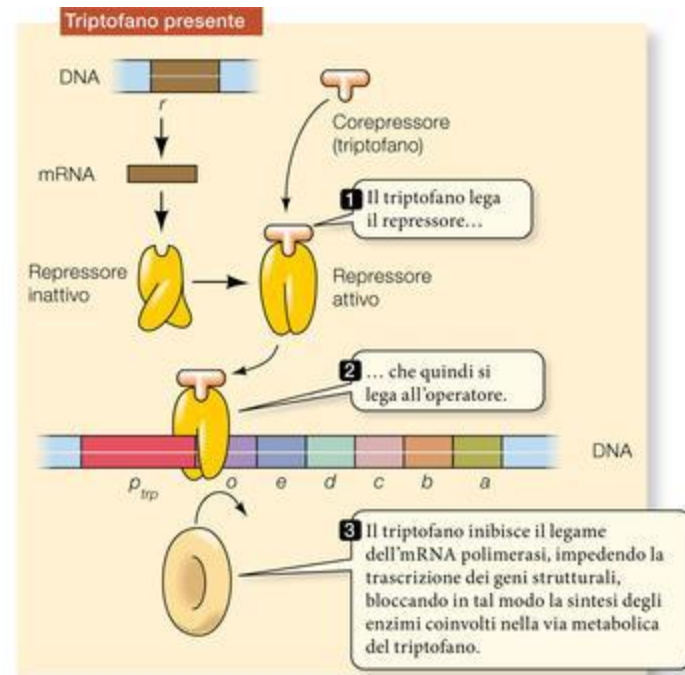
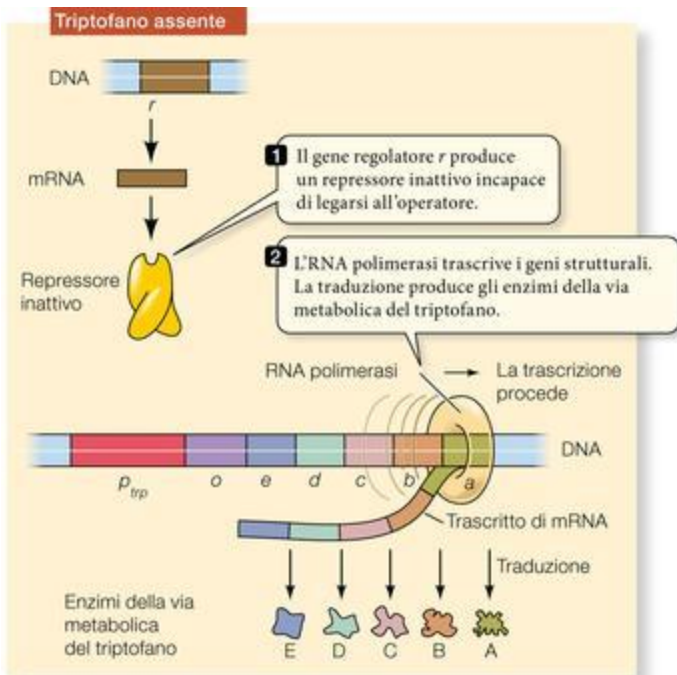
Mancando il glucosio, il complesso CAP-cAMP si lega alla sequenza p1, stimolando la trascrizione

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.

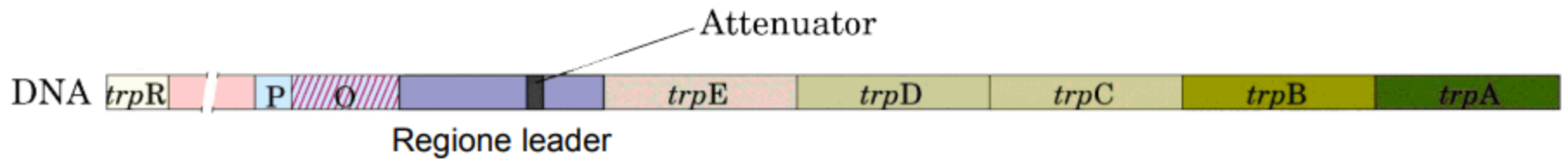
L'operone del triptofano

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.



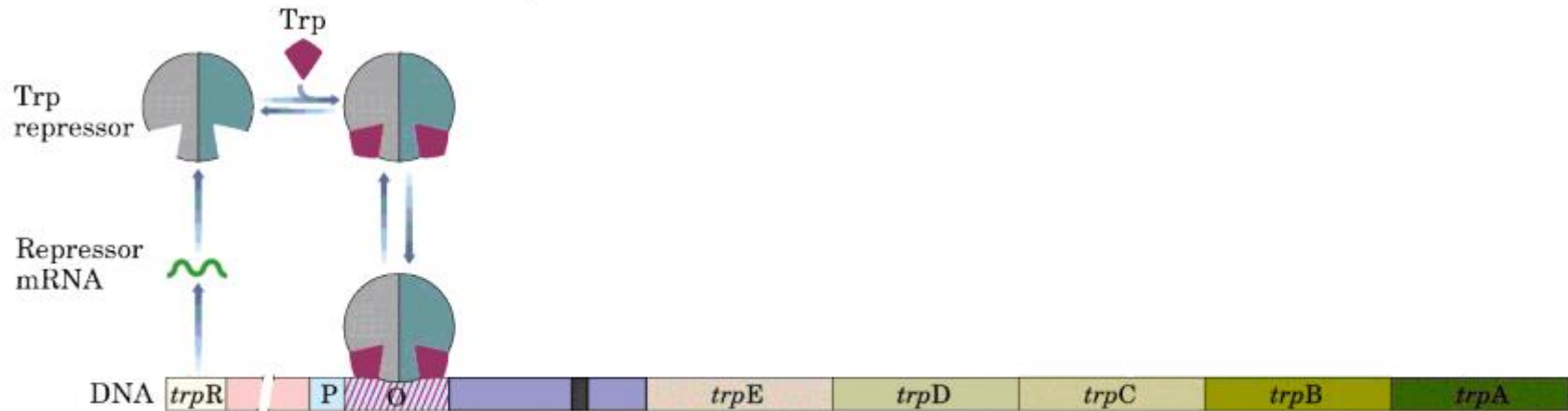
Operone triptofano

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

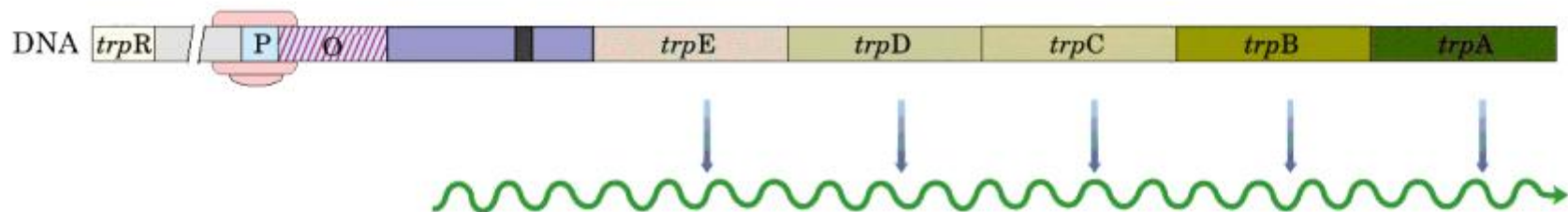


L'operone *trp* è regolato da 2 meccanismi: uno ha come protagonista il consueto repressore

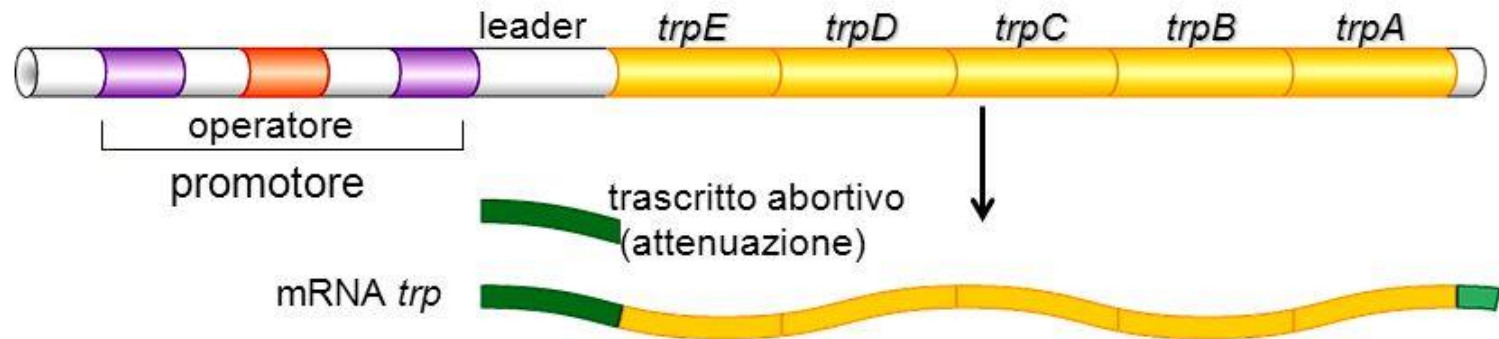
Alte concentrazioni di triptofano



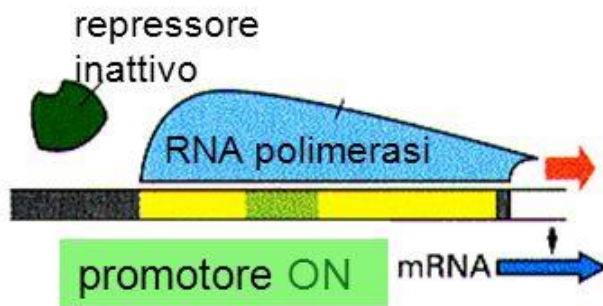
Basse concentrazioni di triptofano



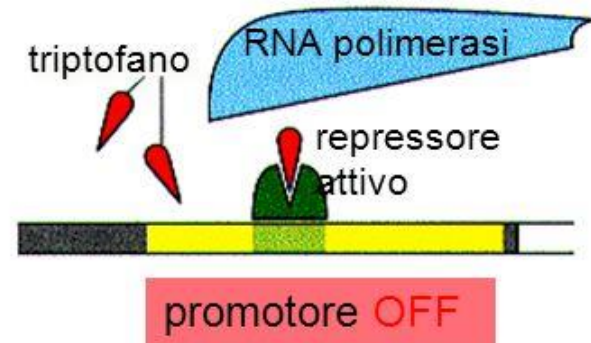
L' operone del triptofano

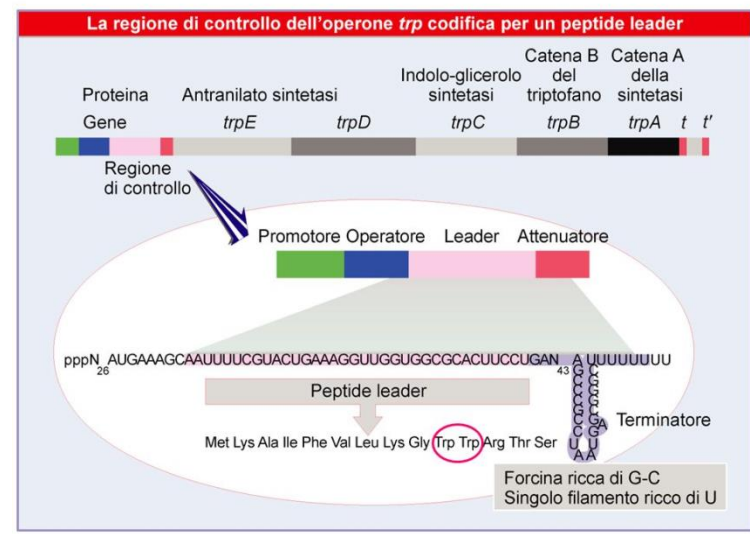
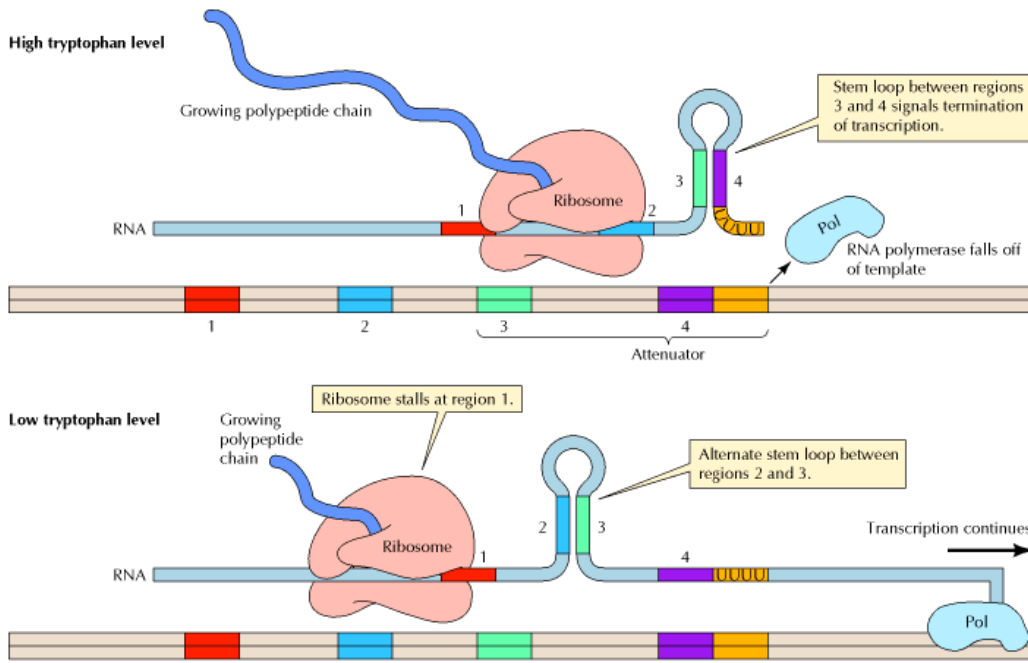


ASSENZA DI TRIPTOFANO



PRESENZA DI TRIPTOFANO





Regolazione dell'operone TRP per ATTENUAZIONE

L'attenuazione dell'operone triptofano in *E. coli*

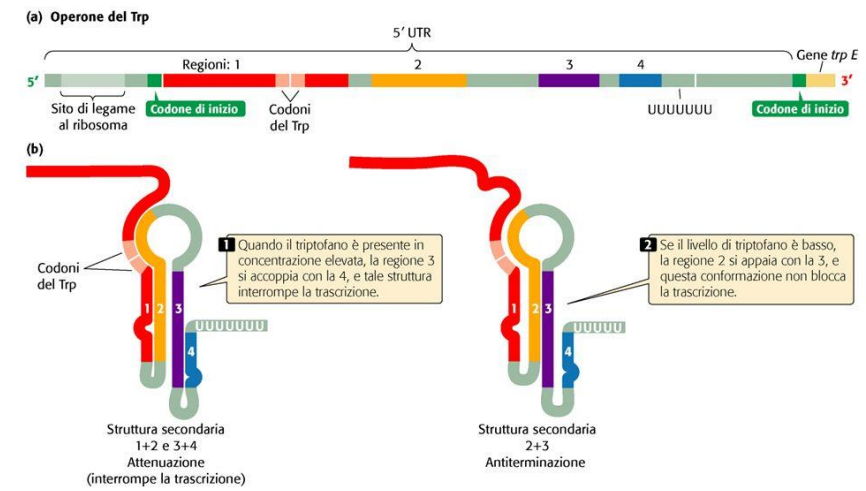
Questo operone è soggetto in realtà a diversi tipi di regolazione: il primo enzima della via, l'antranilato sintetasi è infatti, sottoposto all'inibizione da feedback da parte del triptofano, ed inoltre la trascrizione dell'operone è sotto il controllo del repressore del triptofano.

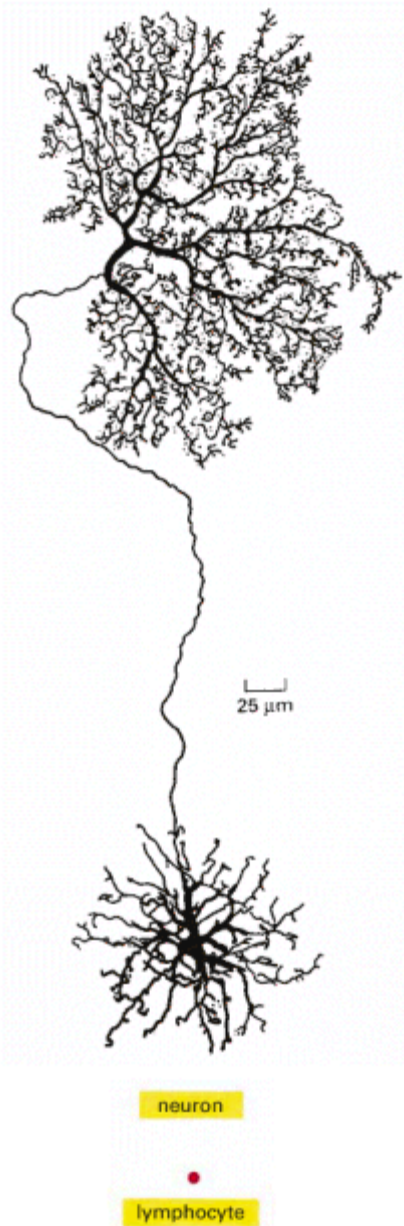
Oltre al promotore **P** e all'operatore **O** c'è una sequenza leader **L** che codifica un polipeptide contenente residui di triptofano ripetuti in tandem vicino alla sua estremità terminale e operante come attenuatore.

Se nella cellula è il triptofano è abbondante, il peptide leader verrà sintetizzato, determinando la terminazione della trascrizione del restante operone *trp*, che comprende i geni strutturali per gli enzimi biosintetici; se invece il triptofano è scarso, il peptide leader, che è ricco in triptofano, non sarà prodotto, e la trascrizione della restante parte dell'operone potrà aver luogo.

	Met-Lys-Ala-Ile-Phe-Val-Leu-Lys-Gly-Trp-Trp-Arg-Thr-Ser
Threonine	Met-Lys-Arg-Ile-Ser-Thr-Thr-Ile-Thr-Thr-Ile-Thr-Ile-Thr-Thr-Gly-Asn-Gly-Ala-Gly
Histidine	Met-Thr-Arg-Val-Gln-Phe-Lys-His-His-His-His-His-His-His-Pro-Asp
Phenylalanine	Met-Lys-His-Ile-Pro-Phe-Phe-Phe-Ala-Phe-Phe-Phe-Thr-Phe-Pro

L'operone triptofano contiene i geni strutturali per cinque proteine della via biosintetica del triptofano, oltre al promotore e alle sequenze regolatrici localizzate all'inizio dell'operone.





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			

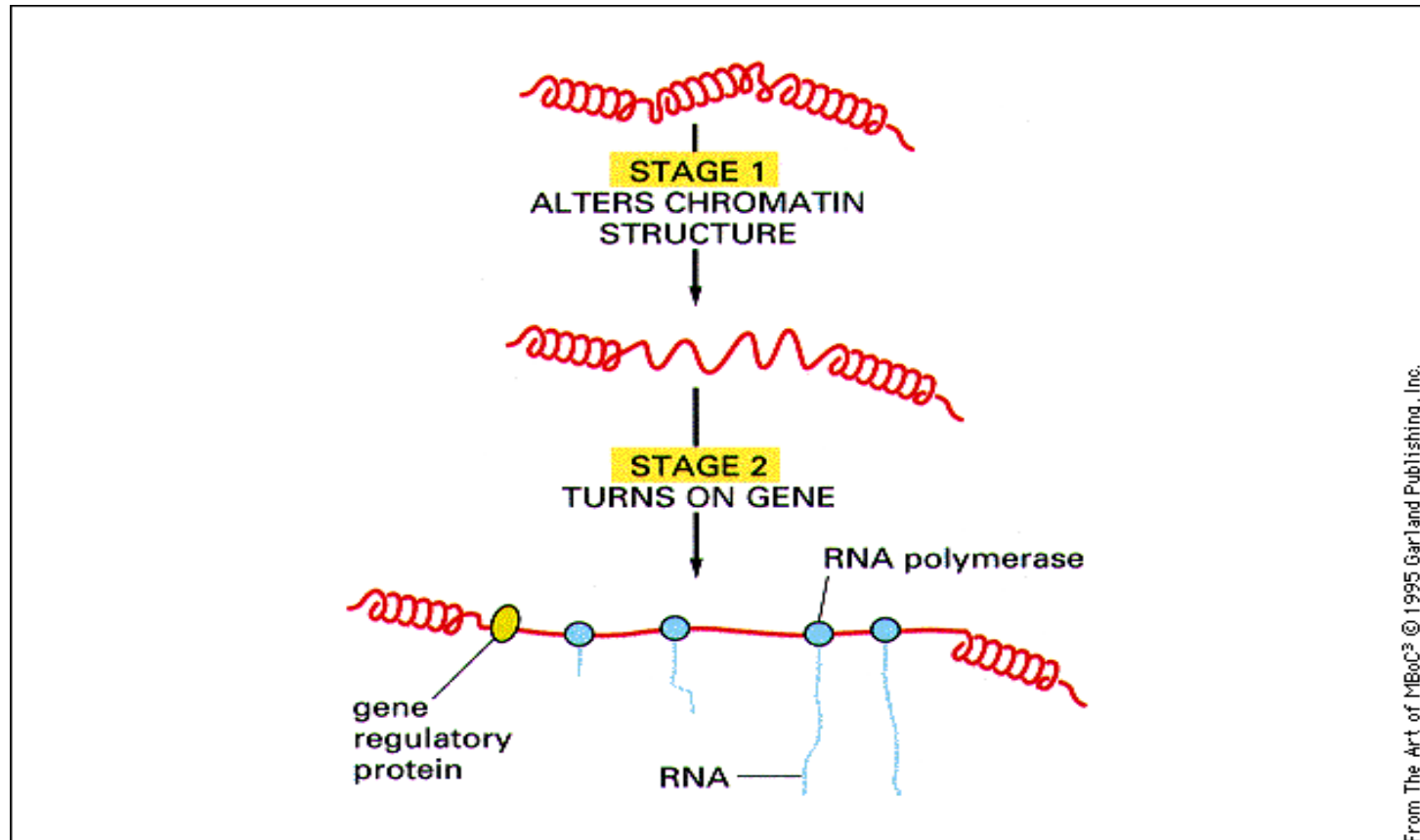
Esempi di espressione genica in cellule specializzate: i geni «accesi» sono quelli contrassegnati in colore.

Livelli di modulazione dell'espressione genica in eucarioti

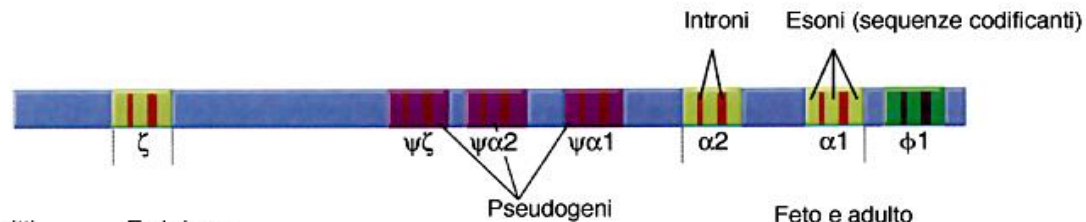
- 1. pre-trascrizionale cromatinico**
- 2. trascrizionale**
- 3. post-trascrizionale**
- 4. traduzionale**
- 5. post-traduzionale, controllo sull'attività della proteina**

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



Geni di tipo α sul cromosoma 16 umano



Stadio in cui vengono trascritti

Embrione

Feto e adulto

Geni di tipo β sul cromosoma 11 umano

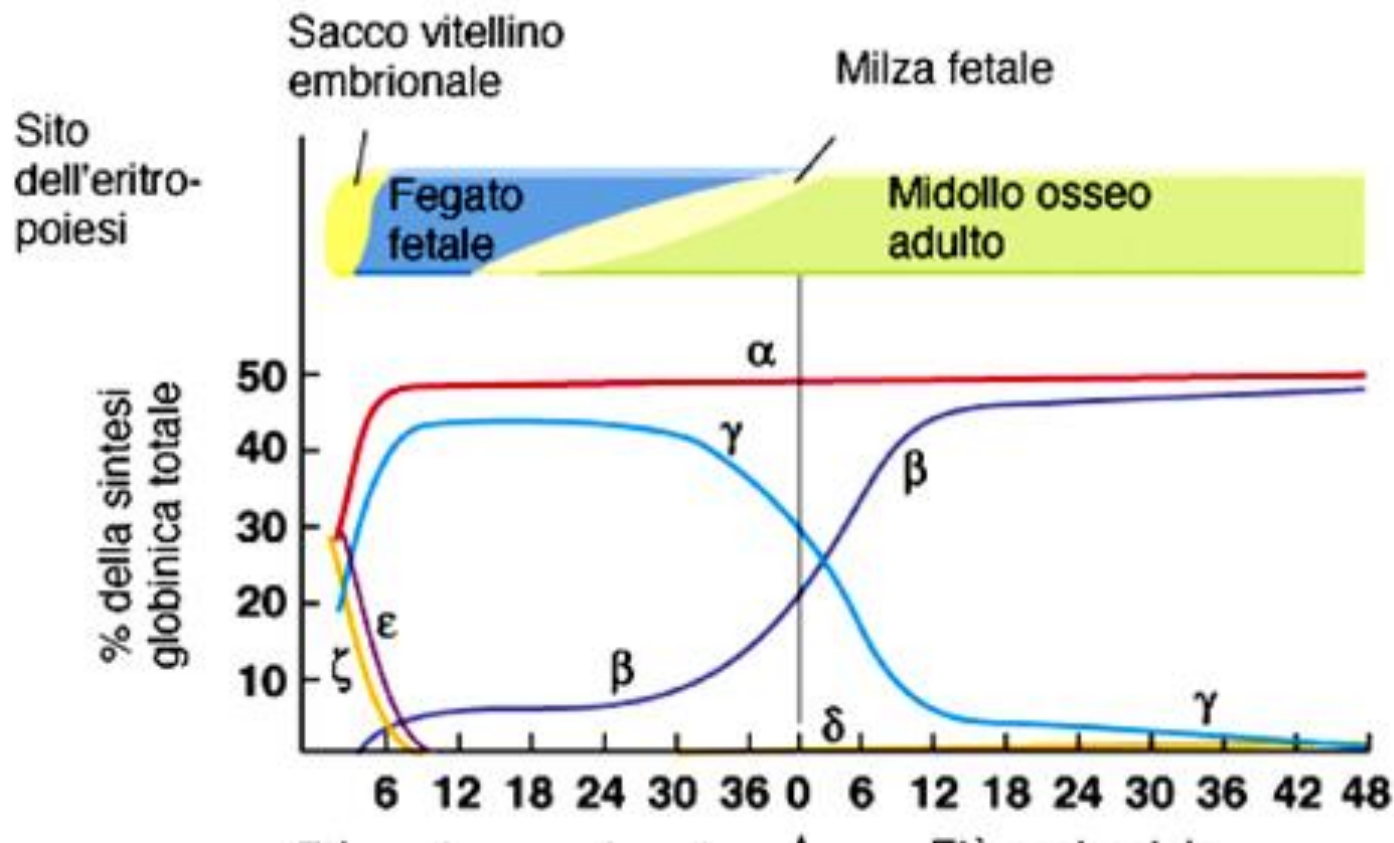


Stadio in cui vengono trascritti

Embrione

Feto

Da neonato ad adulto



Il controllo trascrizionale è molto importante

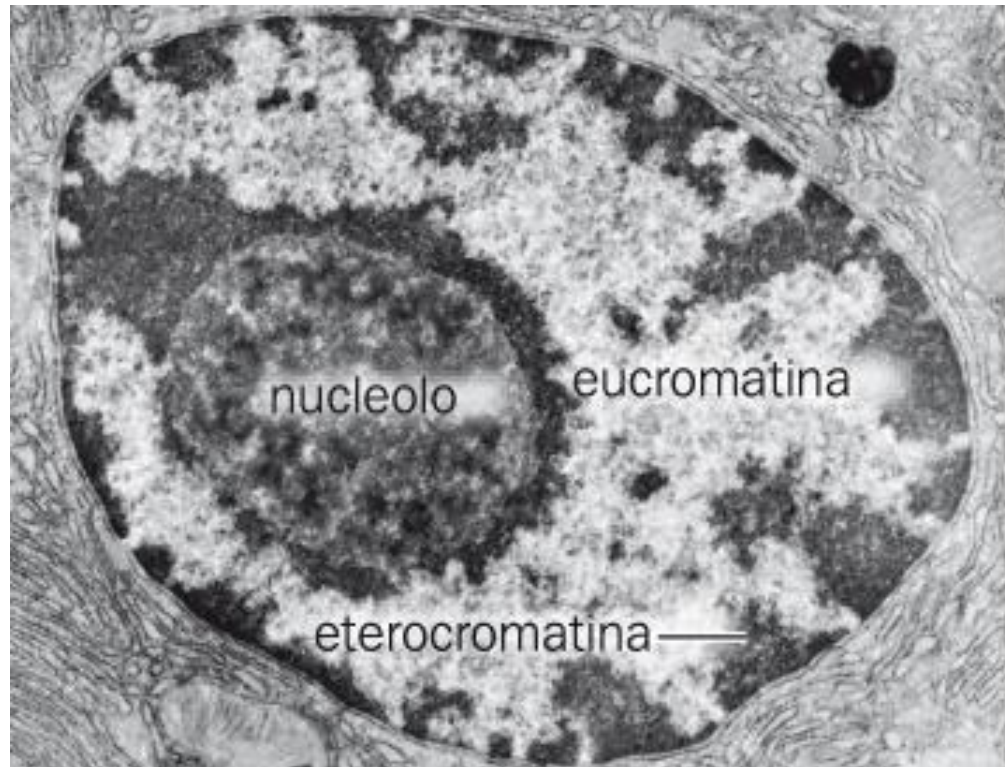
Esistono molte proteine di regolazione che legano il DNA (fattori trascrizionali)

Appartengono a famiglie e presentano MOTIVI STRUTTURALI COMUNI molto conservati:

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

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 **eucromatina**. I geni posti nell'eucromatina possono venire espressi.

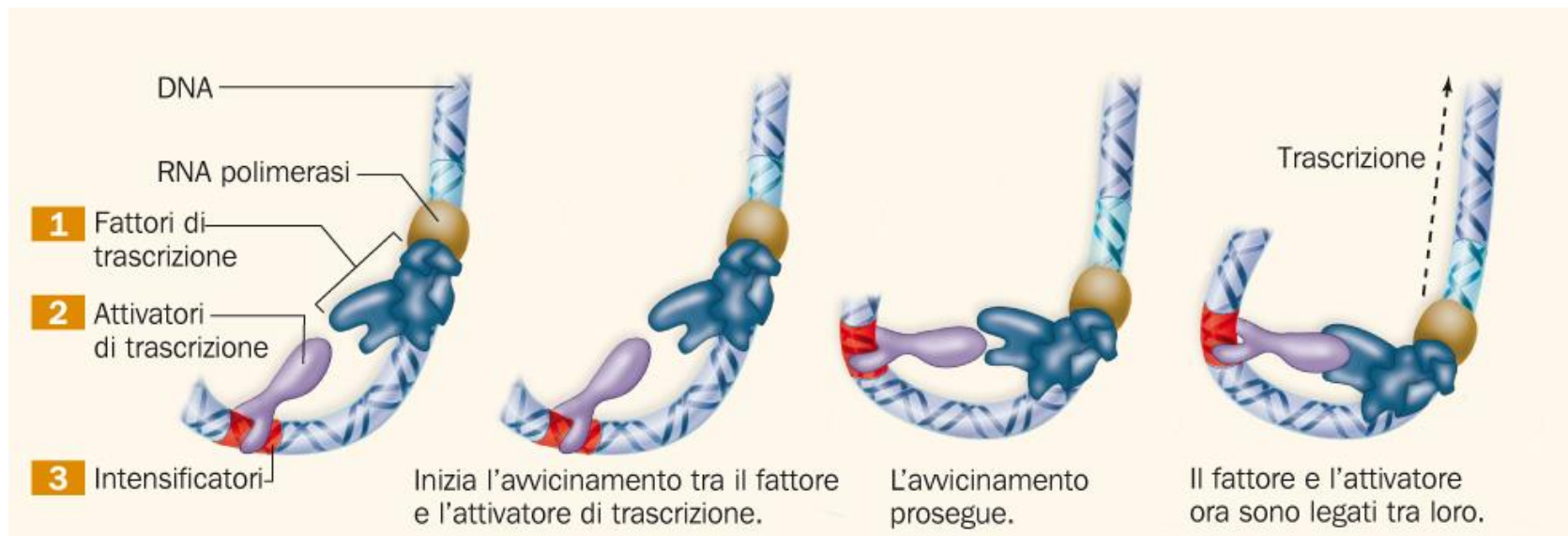


Ogni gene ha diverse sequenze regolatrici
Le sequenze di regolazione a cui si legano
i fattori trascrizionali sono:

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

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

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**

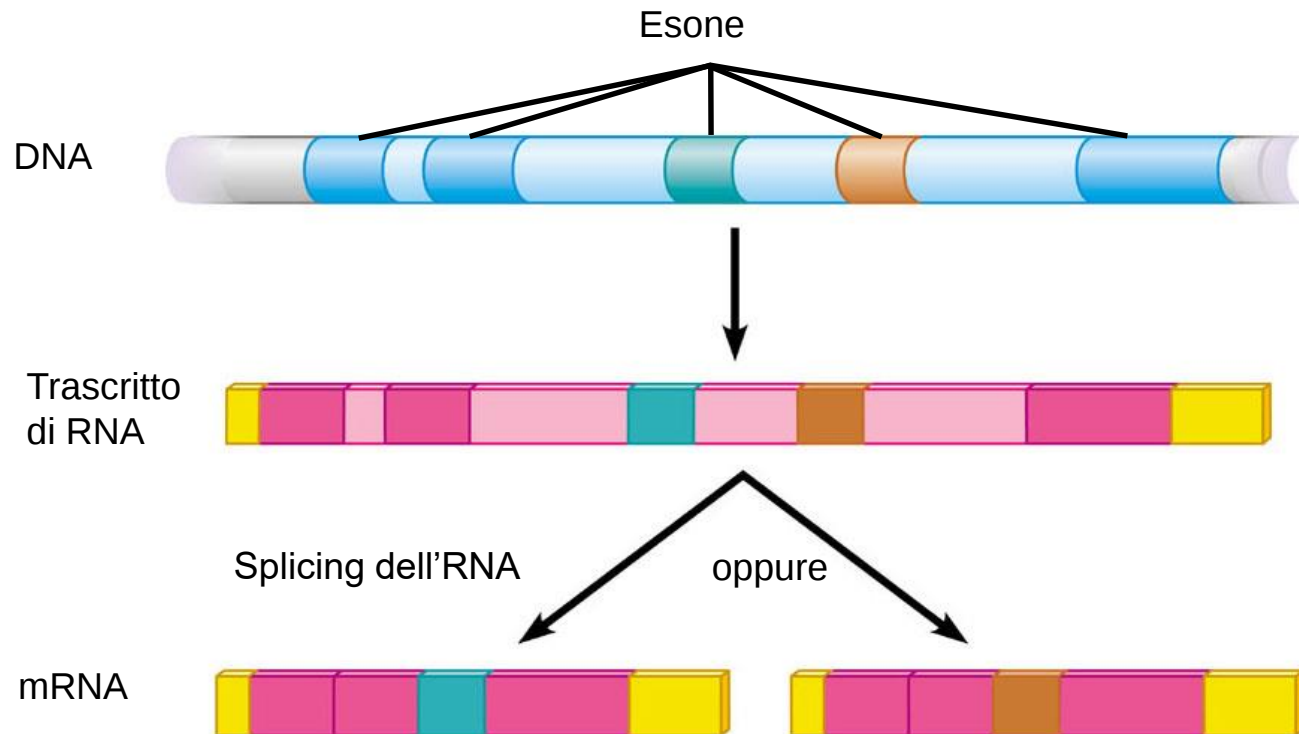
Nell'uomo, il numero di geni è molto inferiore rispetto al numero di prodotti polipeptidici

- 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.

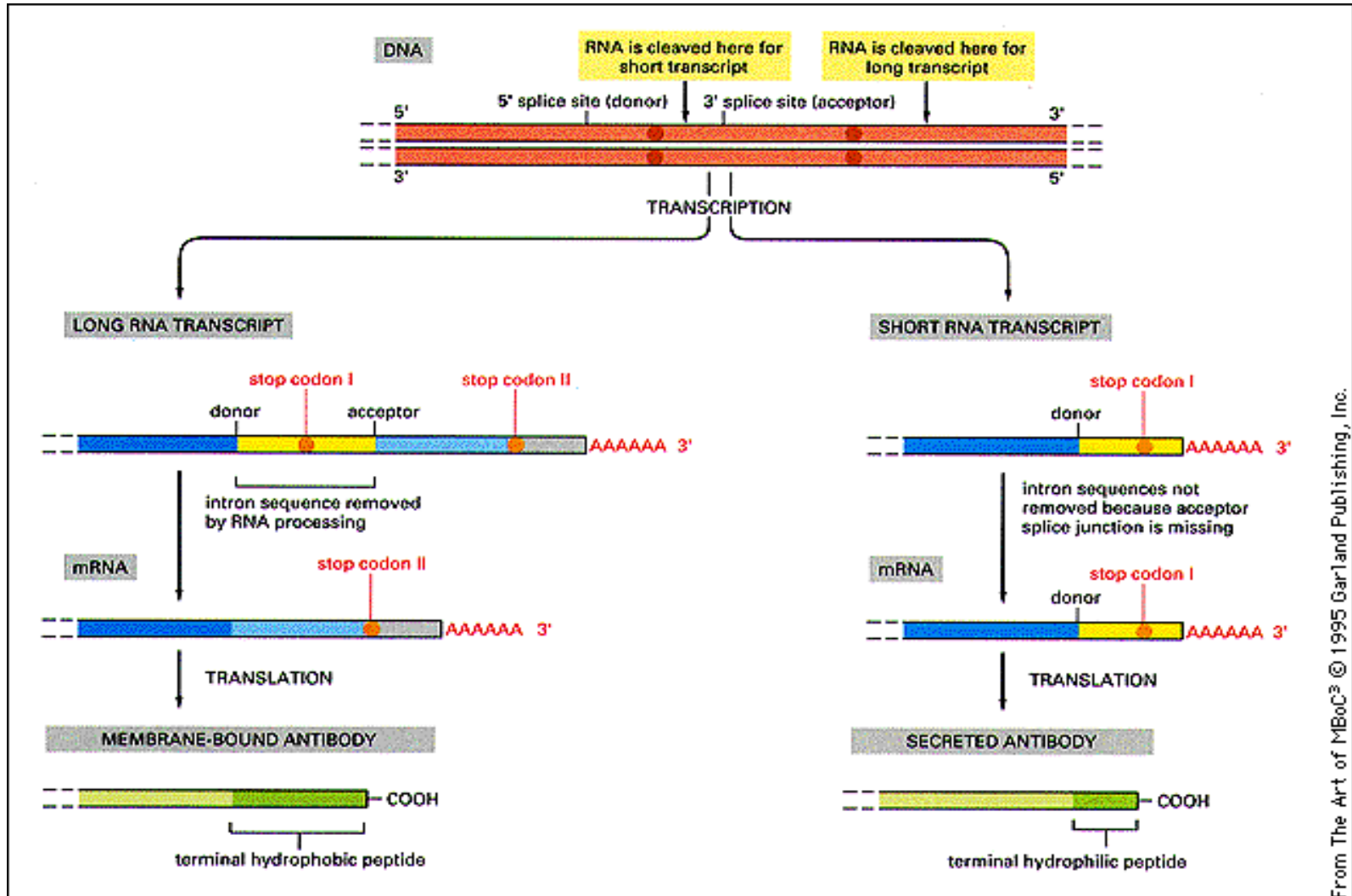


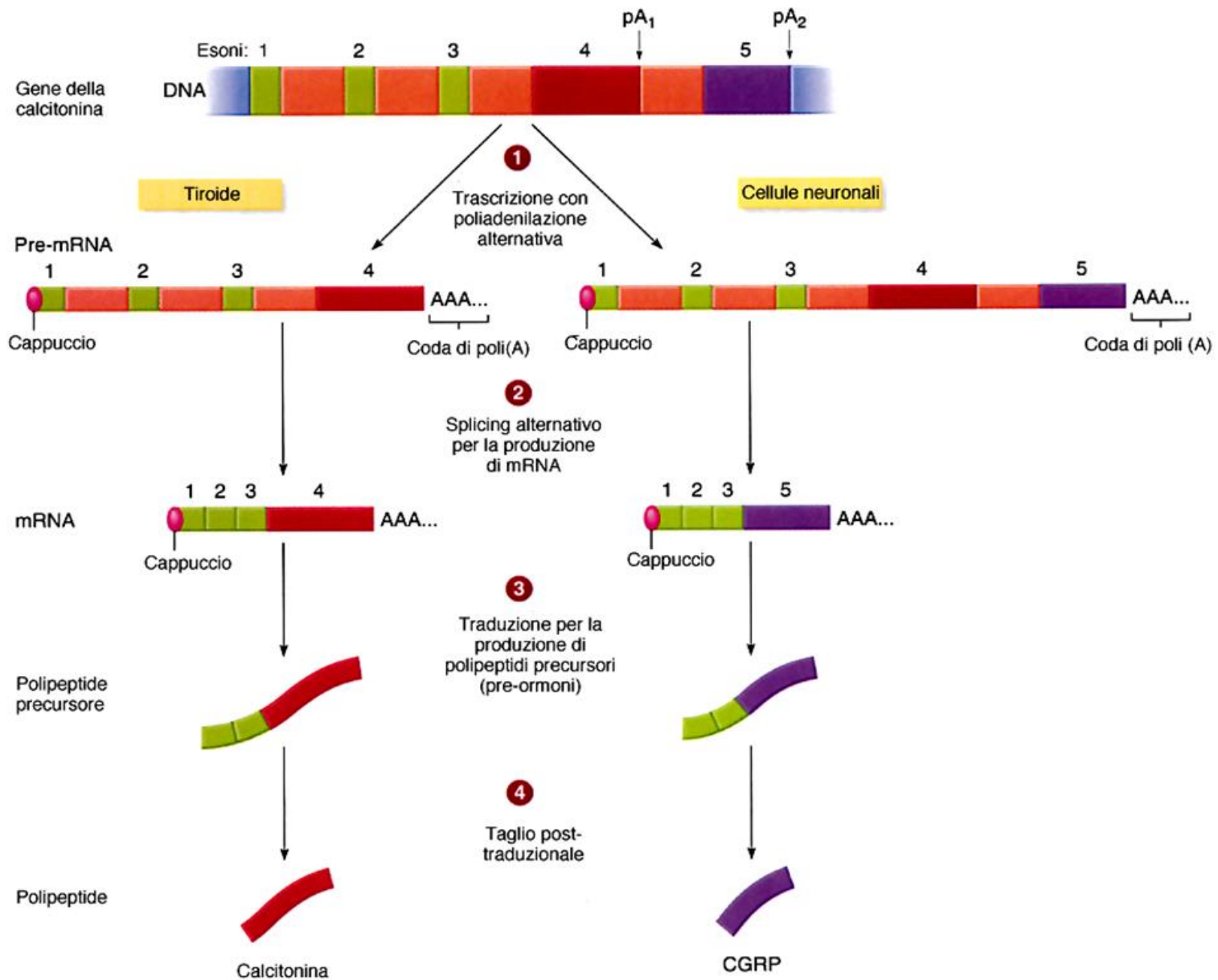
Controllo dopo la trascrizione

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

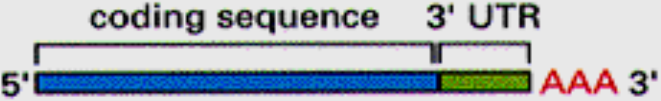
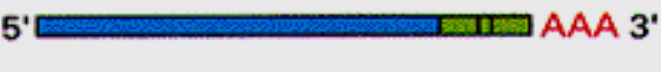
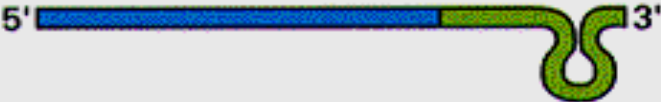
- Possibilità di modificare la sequenza nucleotidica di un RNA dopo che è stato trascritto.
- Un ulteriore modo per produrre da un unico gene una varietà di proteine correlate.

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
	β-globin mRNA	STABLE		> 10 hours
	growth factor mRNA	UNSTABLE		30 minutes
	histone mRNA	DNA SYNTHESIS MODULATES STABILITY		1 hour when cell is synthesizing DNA, but 12 minutes when cell is not synthesizing DNA

Controllo durante la traduzione

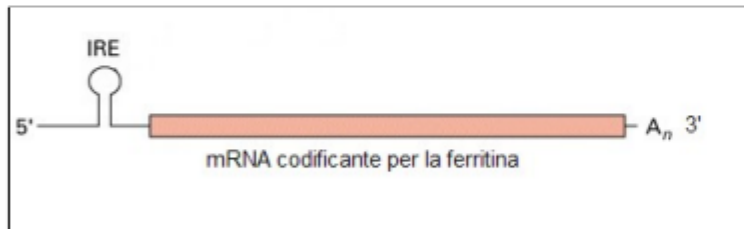
Dopo che l'mRNA è stato modificato e trasferito dal nucleo al citoplasma, avvengono altre forme di controllo dell'espressione genica:

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

REPRESSIONE DELLA TRADUZIONE

Esempio:

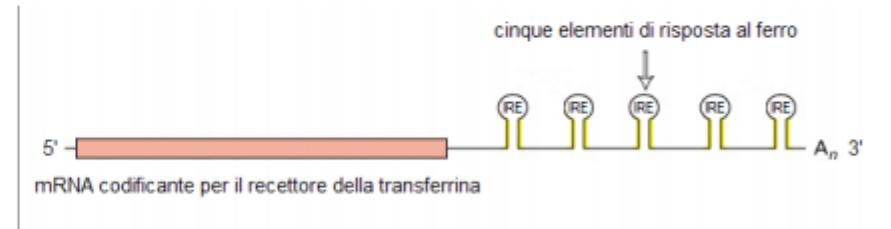
Gene che codifica per la ferritina



CONTROLLO DELL'EMIVITA DEL mRNA

Esempio:

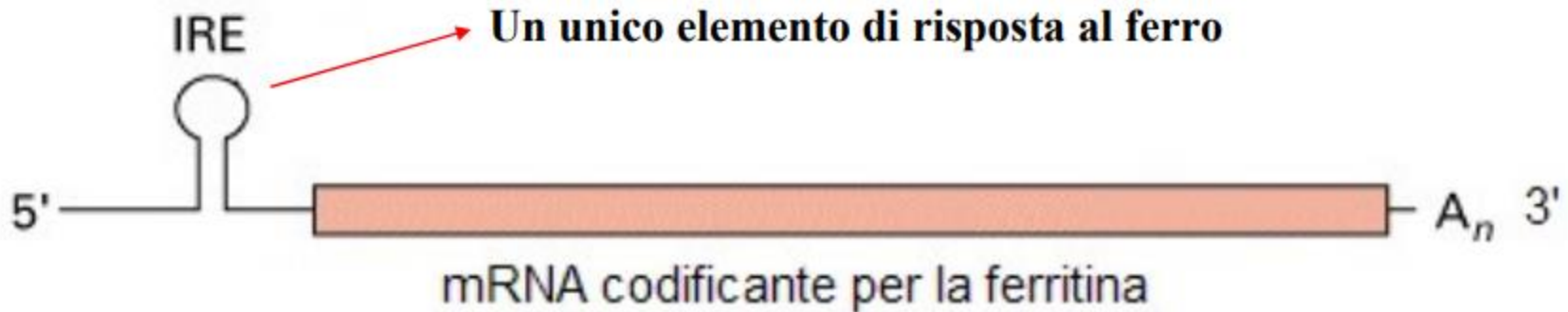
**Gene che codifica per il recettore
della transferrina**



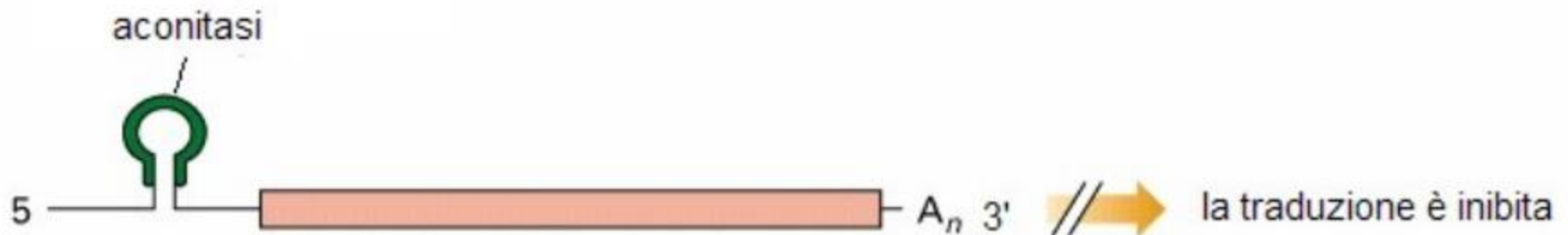
**Ai siti IRE si legano proteine che consentono l'auto-regolazione
del Ferro intracellulare note come IRP (Iron Regulatory
Proteins)**

REPRESSIONE DELLA TRADUZIONE

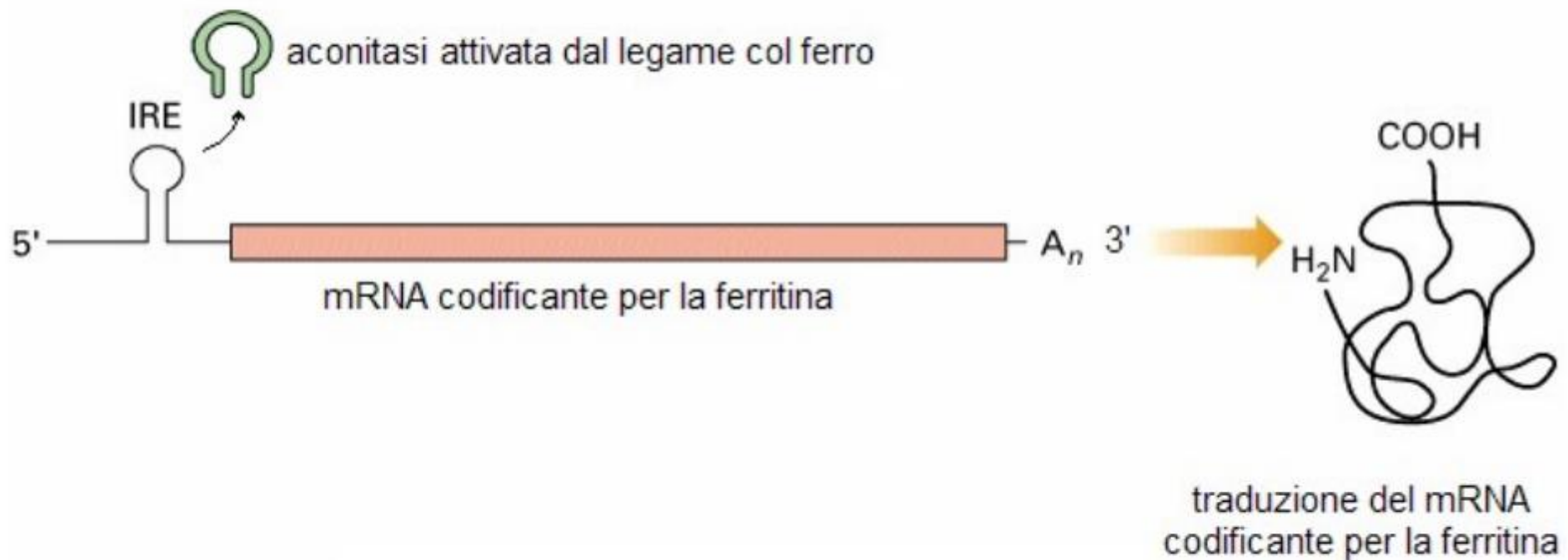
FERRITINA: proteina deputata all'accumulo di ferro
la cui sintesi viene stimolata dalla presenza del ferro



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

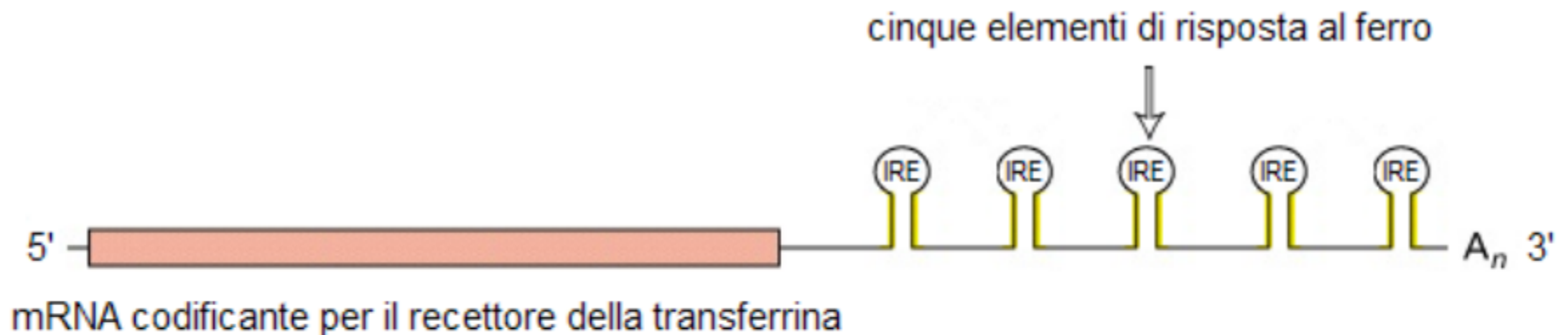


Ad alte concentrazioni di ferro **l'aconitasi** si trova nella sua forma enzimatica attiva che possiede una bassa affinità per RNA. Essa pertanto non lega i siti IRE e la traduzione dell'mRNA codificante per la ferritina avviene regolarmente

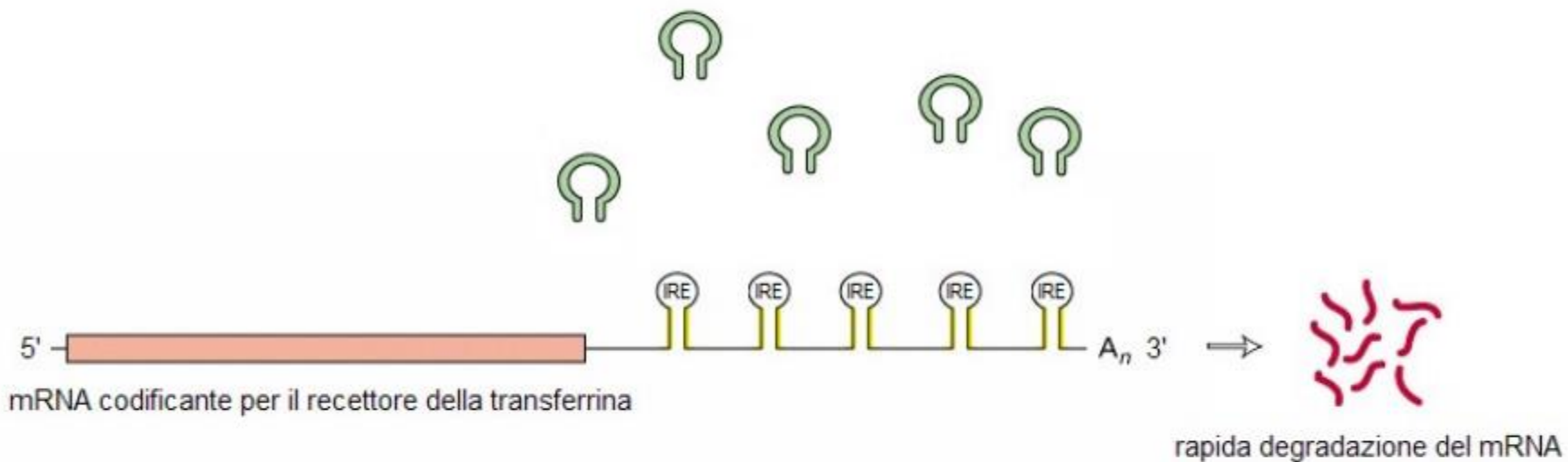


CONTROLLO DELL'EMIVITA DEL mRNA

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**

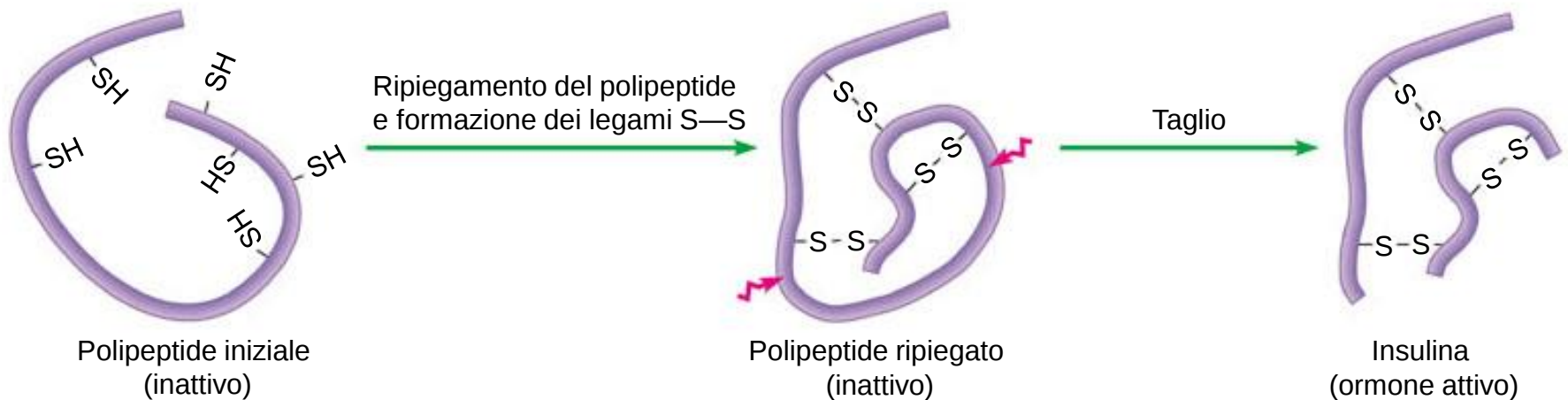


- **Ubiquitinazione e direccionamento al proteasoma**

Controllo dopo la traduzione

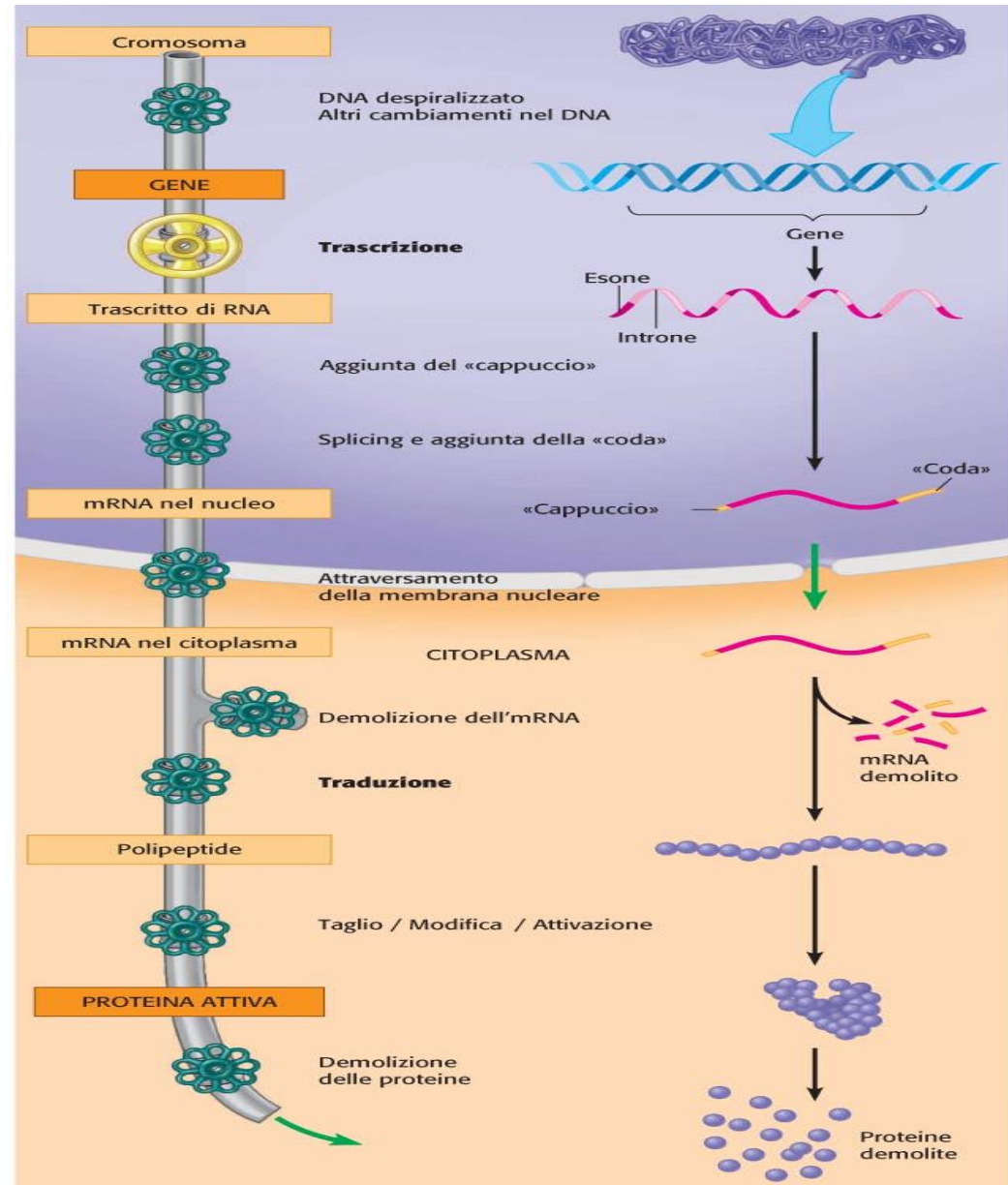
L'attivazione delle proteine

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

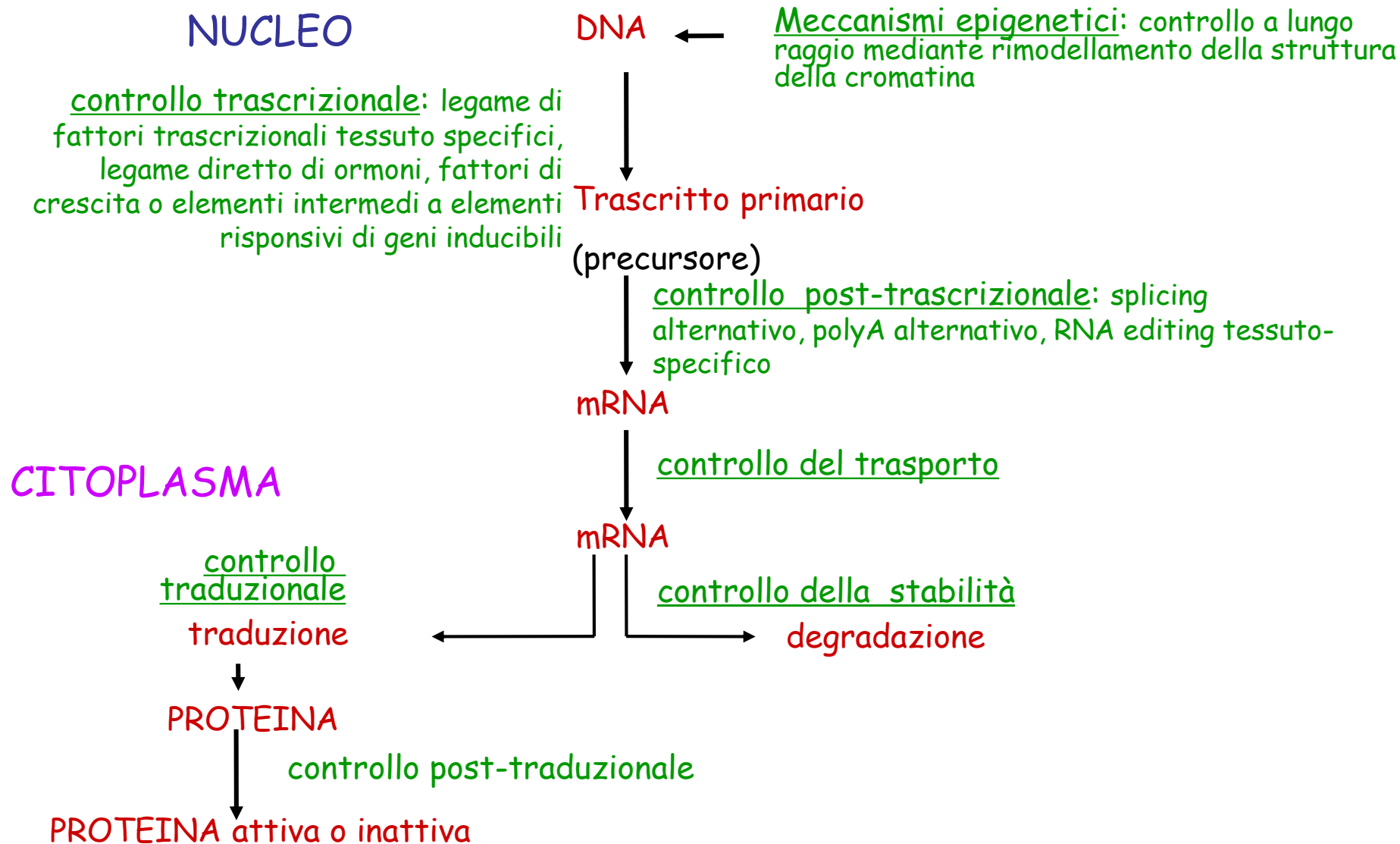


La regolazione dell'espressione genica

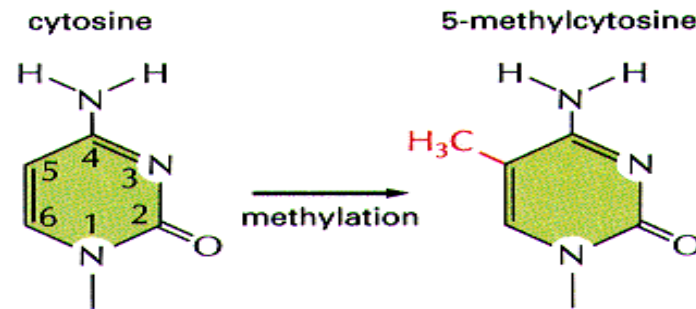
- Una visione d'insieme dell'espressione genica negli eucarioti
- I molteplici meccanismi che controllano l'espressione genica sono analoghi alle valvole di controllo delle tubazioni.



I livelli di regolazione dell'espressione genica

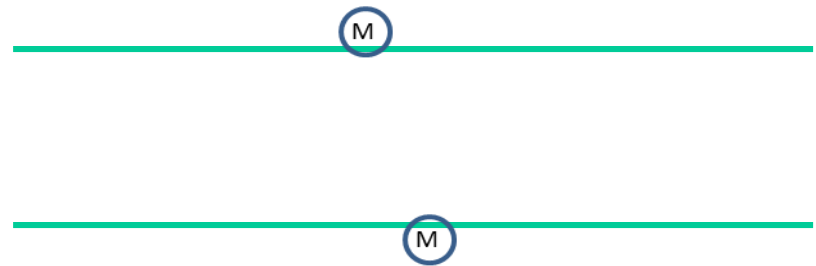
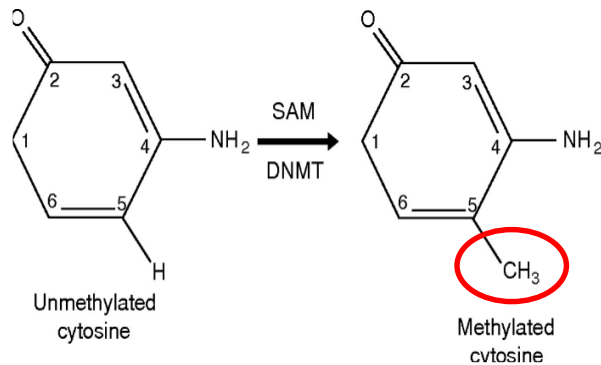


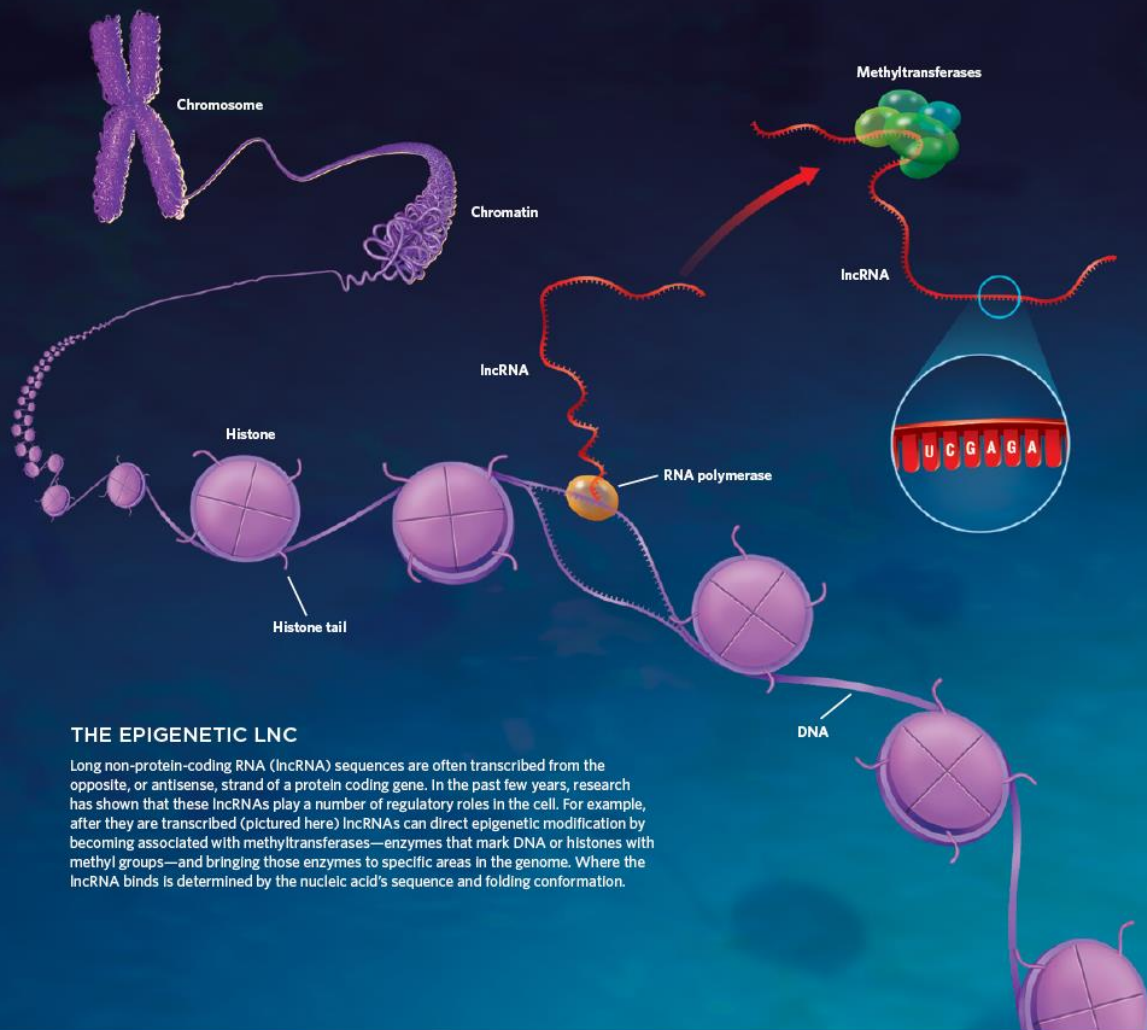
I geni trascrizionalmente attivi hanno promotori ipometilati



DNA methylation

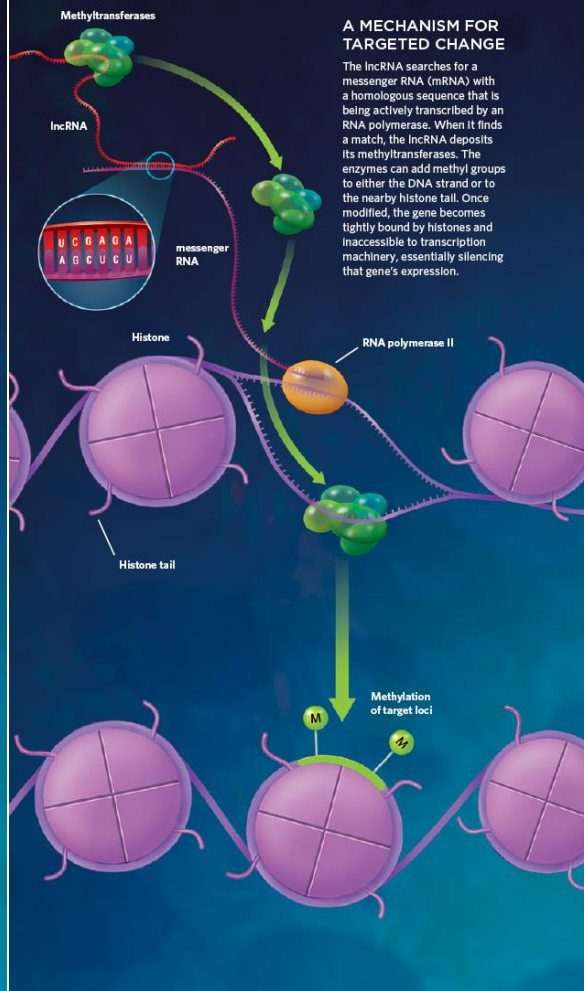
The addition of methyl groups to DNA, mostly at CpG sites, to convert cytosine to 5-methylcytosine.





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

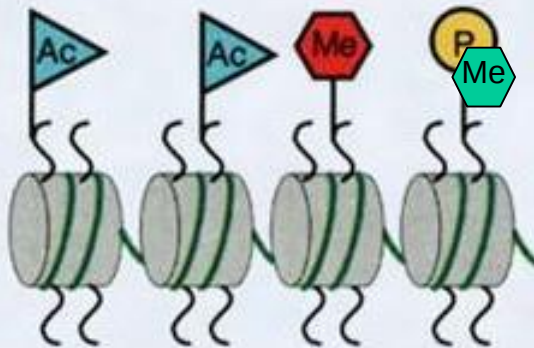
Enables a cell/organism to respond to its dynamic external environment during development and throughout life.

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

Structure & Epigenetics of Euchromatin versus Heterochromatin

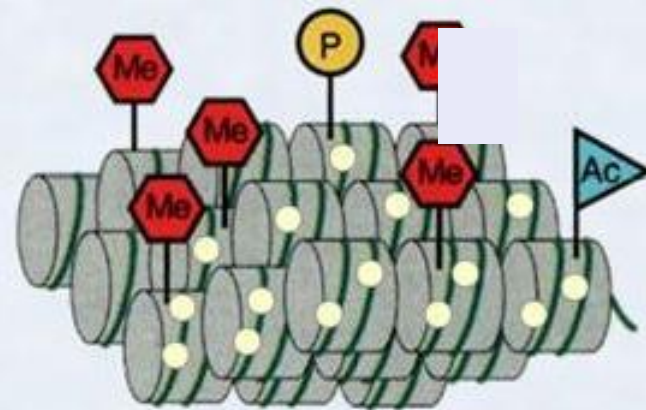
DNA methylation and histone modifications help to compartmentalize the genome into domains of different transcriptional potentials

Euchromatin



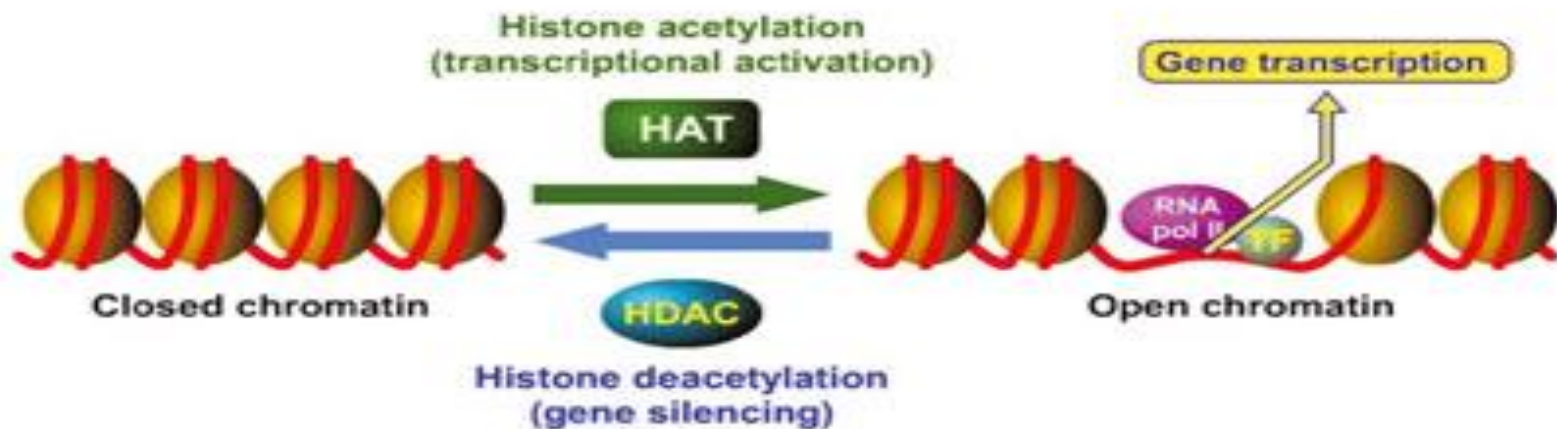
- High histone acetylation
- Low DNA methylation
- H3-K4 methylation

Heterochromatin



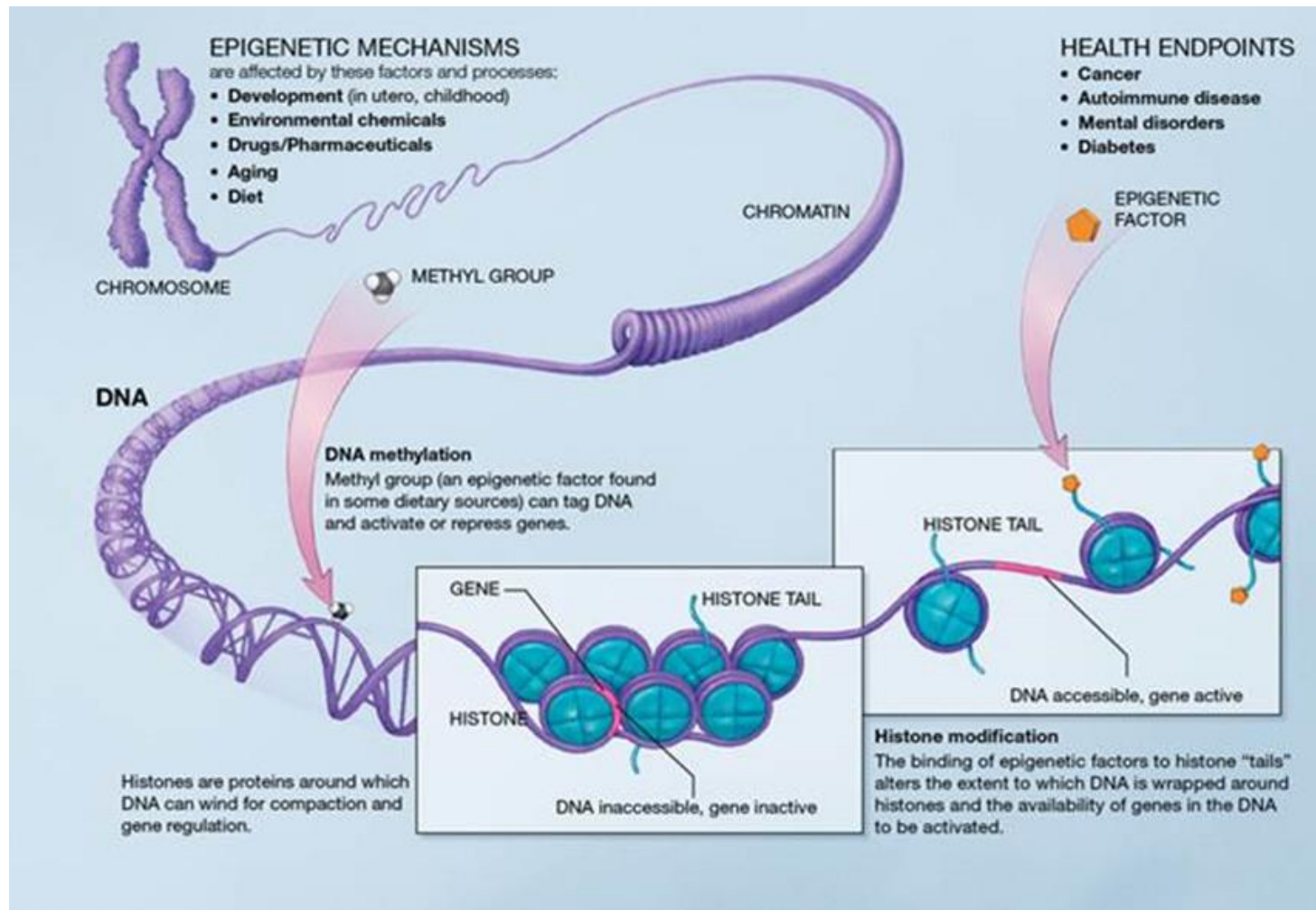
- Low histone acetylation
- Dense DNA methylation
- H3-K9 methylation

Acetylation is the most highly studied



Two epigenetic mechanisms:

1. DNA Methylation
2. Histone Modifications

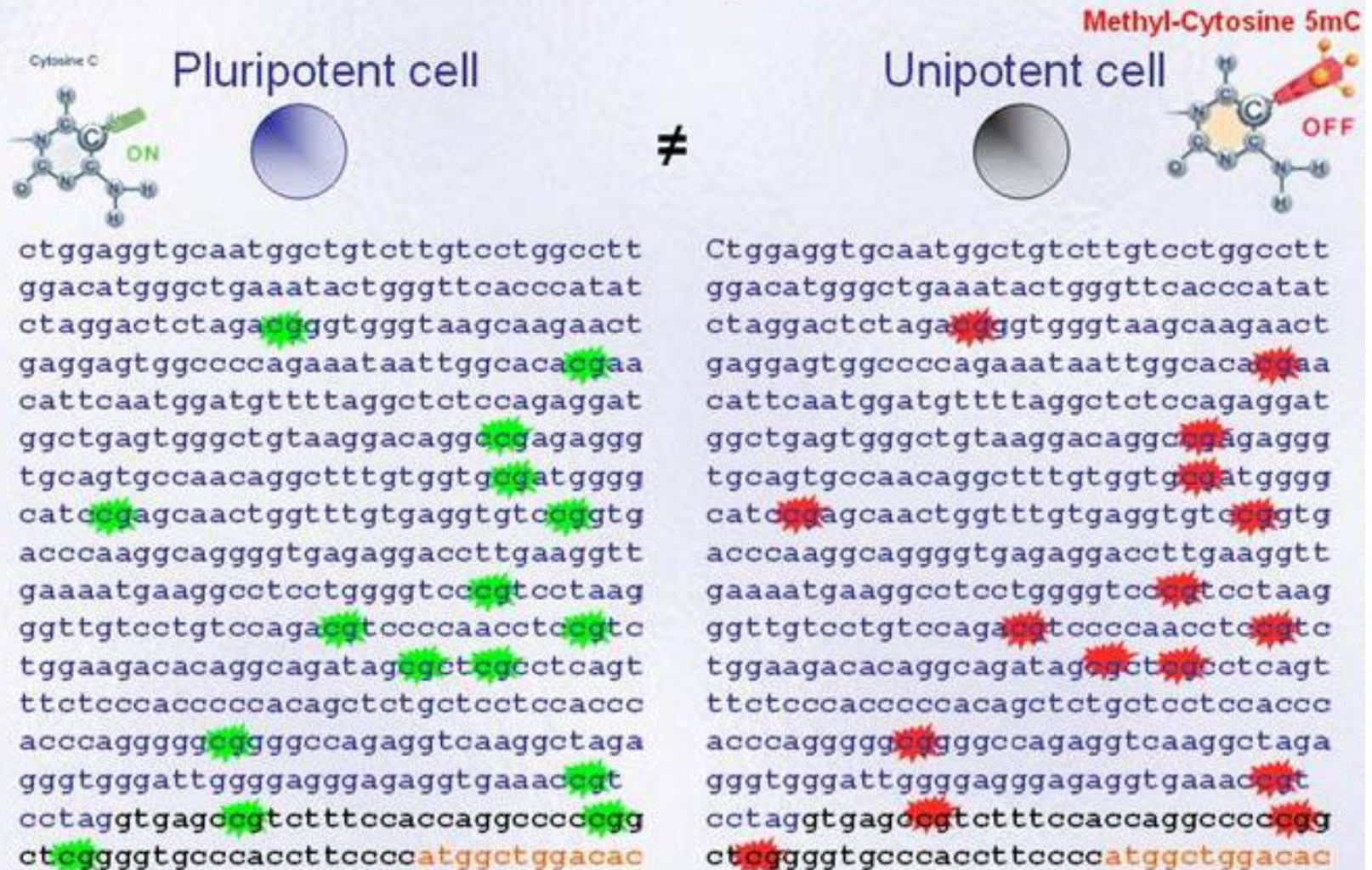


Epigenetic Gene Regulation

- ❖ 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



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?

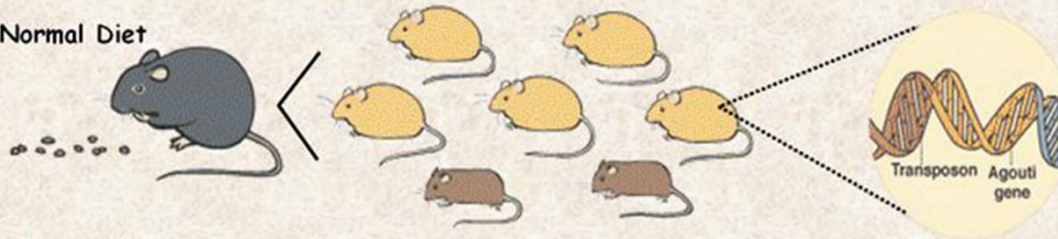
How can acquired traits be passed on to offspring?

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

Can environment influence these processes?

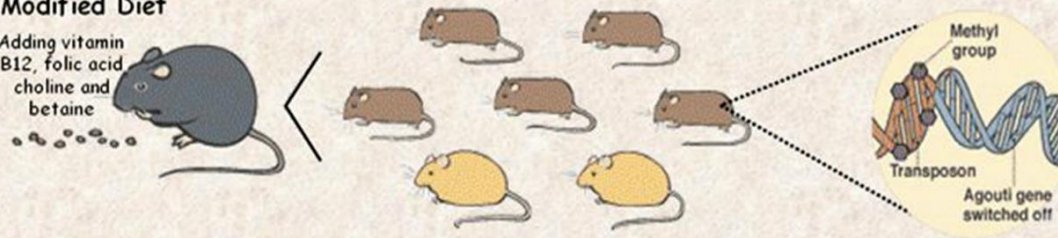
They are what she ate...

Normal Diet

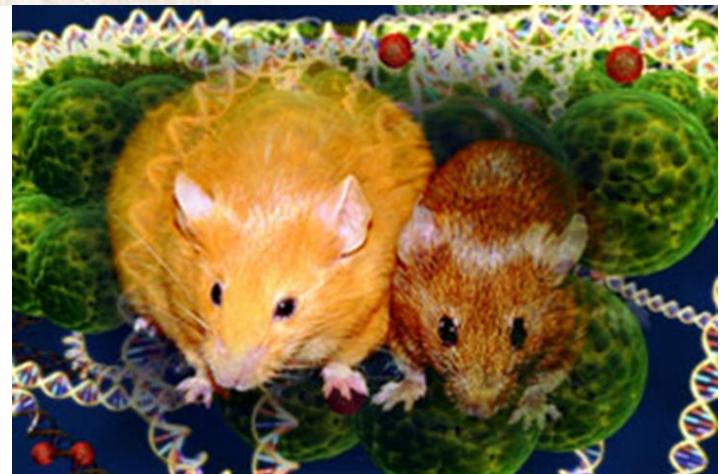


Modified Diet

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

