

# Controllo dell'espressione genica negli eucarioti

La regolazione dell'espressione genica negli **eucarioti** è alquanto più complessa che nei **procarioti**:

-per il **maggior numero di geni** (da circa 6.000 in un eucariote unicellulare molto semplice come il lievito a 20.000-30.000 negli eucarioti pluricellulari, contro 500-5000 nei procarioti);

-soprattutto nei pluricellulari per le esigenze del **differenziamento** cellulare durante lo **sviluppo** dell'organismo (differente regolazione spazio-temporale).

# 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**.

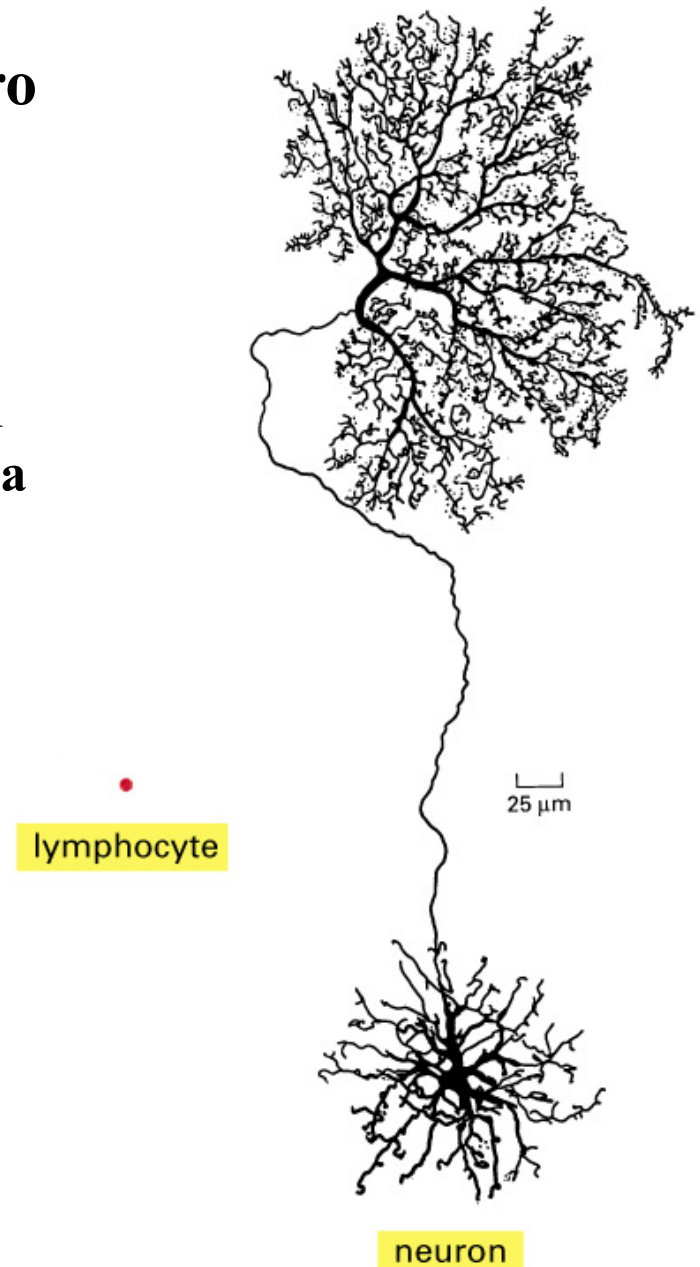
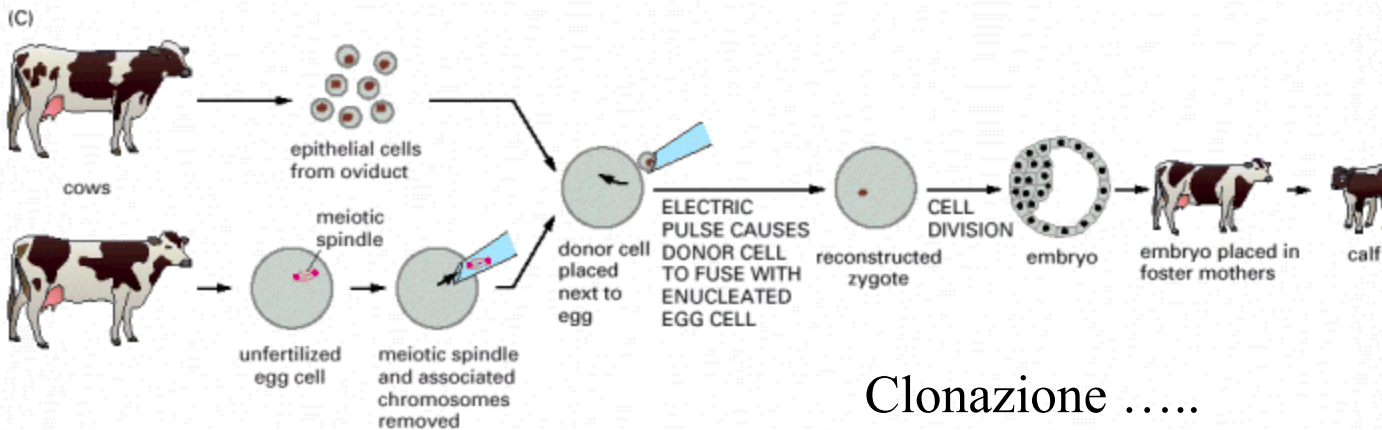
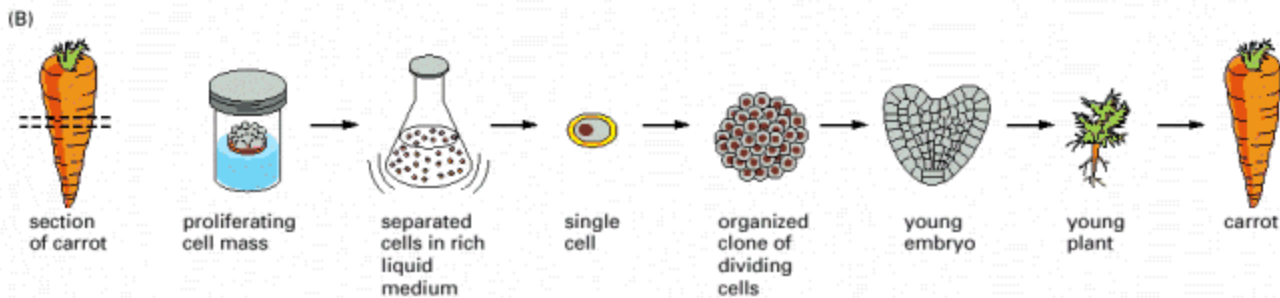
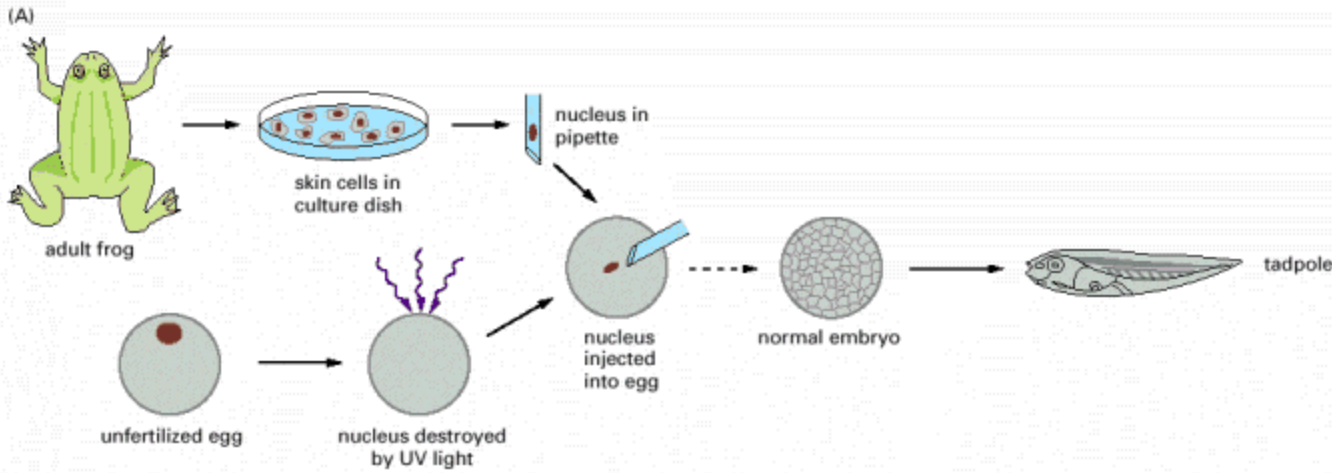


Figure 7-1. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



**Evidence that a differentiated cell contains all the genetic instructions necessary to direct the formation of a complete organism.**

(A) The nucleus of a skin cell from an adult frog transplanted into an enucleated egg can give rise to an entire tadpole. The *broken arrow* indicates that, to give the transplanted genome time to adjust to an embryonic environment, a further transfer step is required in which one of the nuclei is taken from the early embryo that begins to develop and is put back into a second enucleated egg (Gurdon 1966).

(B) In many types of plants, differentiated cells retain the ability to "dedifferentiate," so that a single cell can form a clone of progeny cells that later give rise to an entire plant.

(C) A differentiated cell from an adult cow introduced into an enucleated egg from a different cow can give rise to a calf. Different calves produced from the same differentiated cell donor are genetically identical and are therefore clones of one another.

Clonazione .....

# DNA microarrays

- Espressione di 1800 geni.
- Verde = espressione bassa, Rossa= alta

Con **RNA-Seq** si può analizzare l'intero trascrittoma

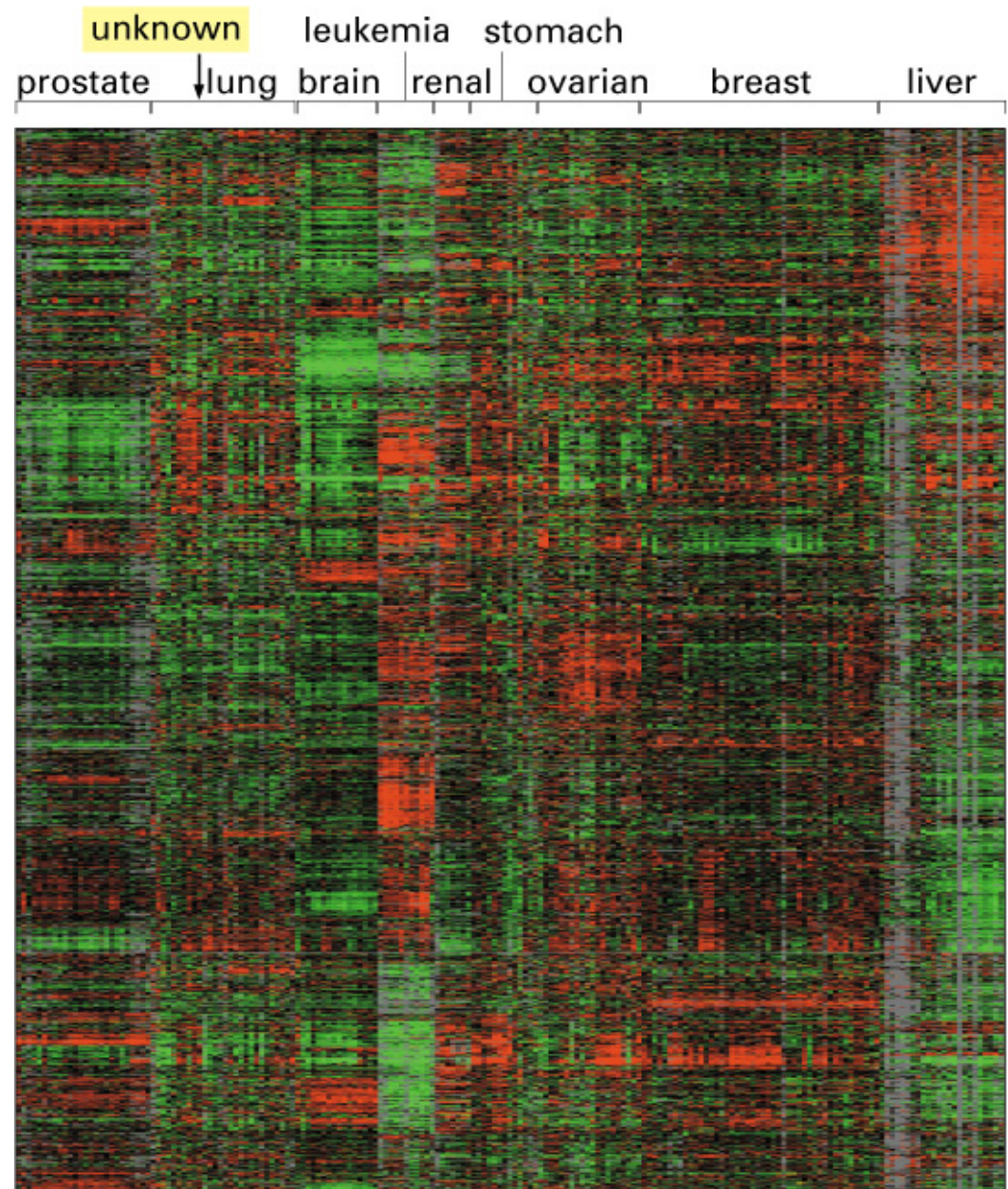
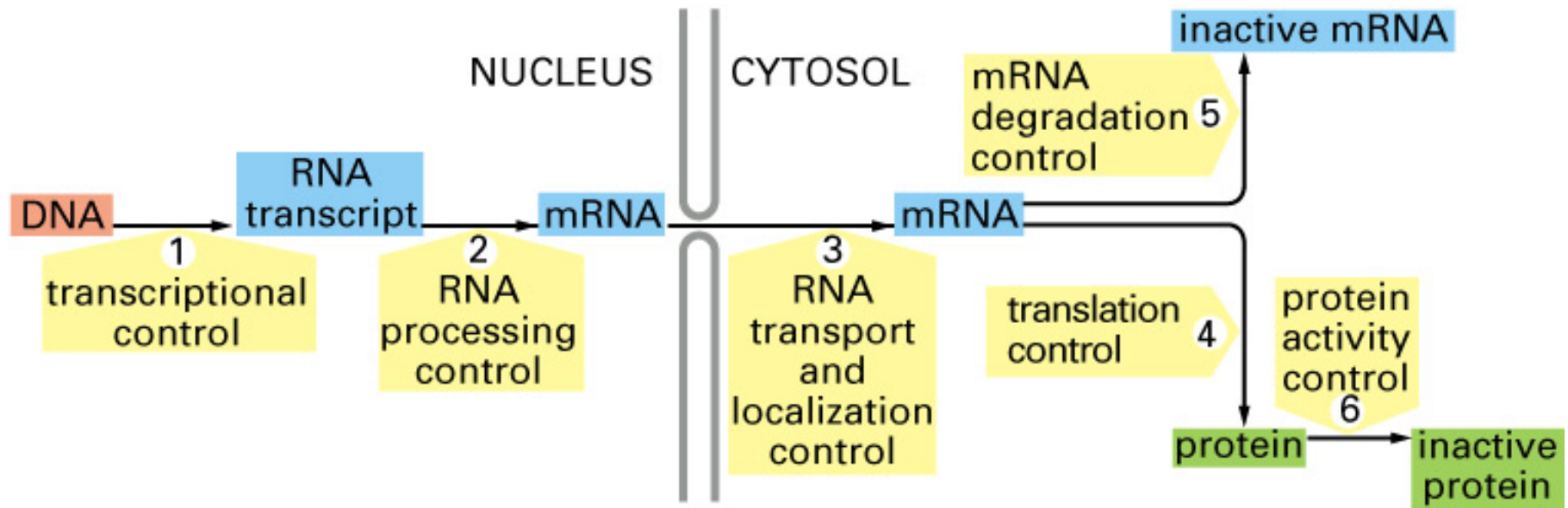


Figure 7-3. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Siti di controllo dell'espressione genica



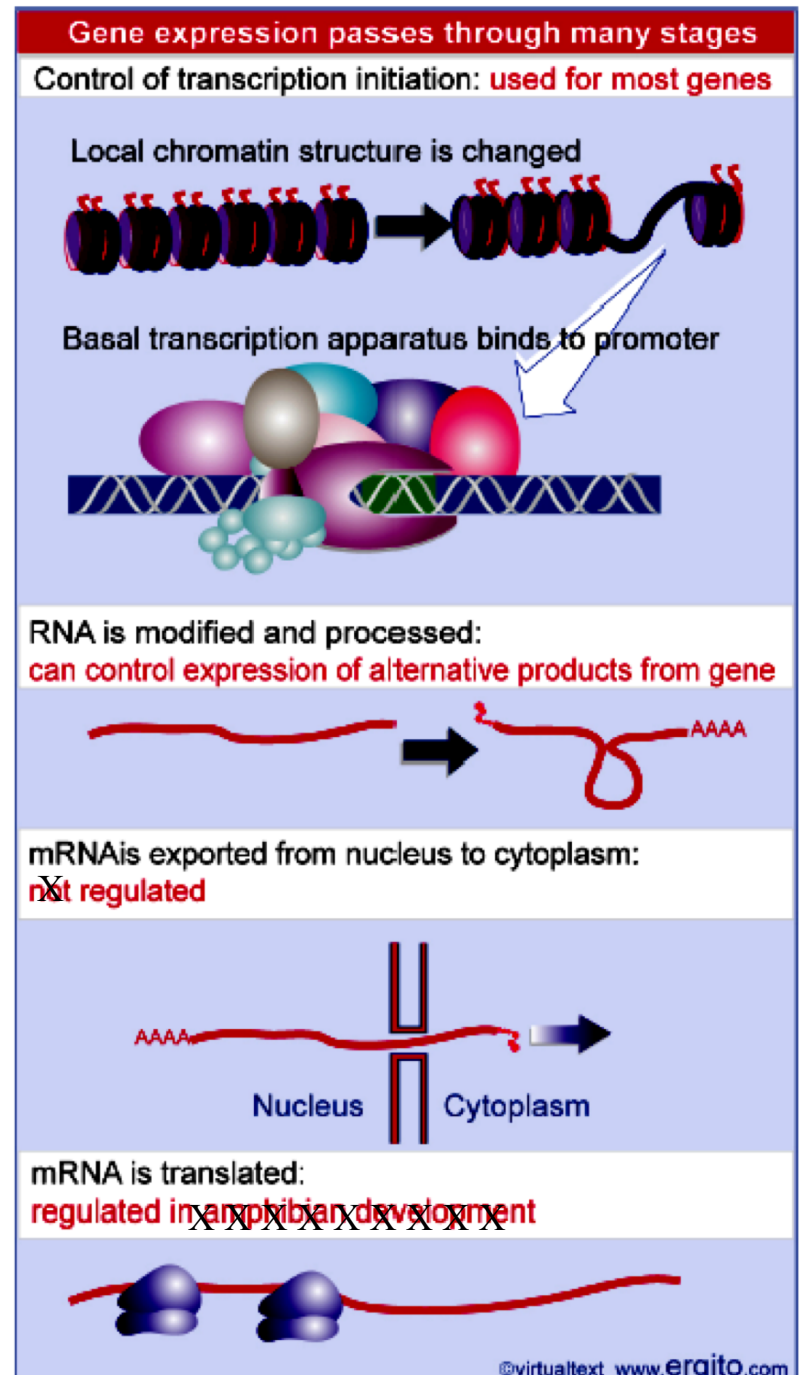
# Espressione Genica

La regolazione dell'espressione genica può avvenire ad ogni passaggio

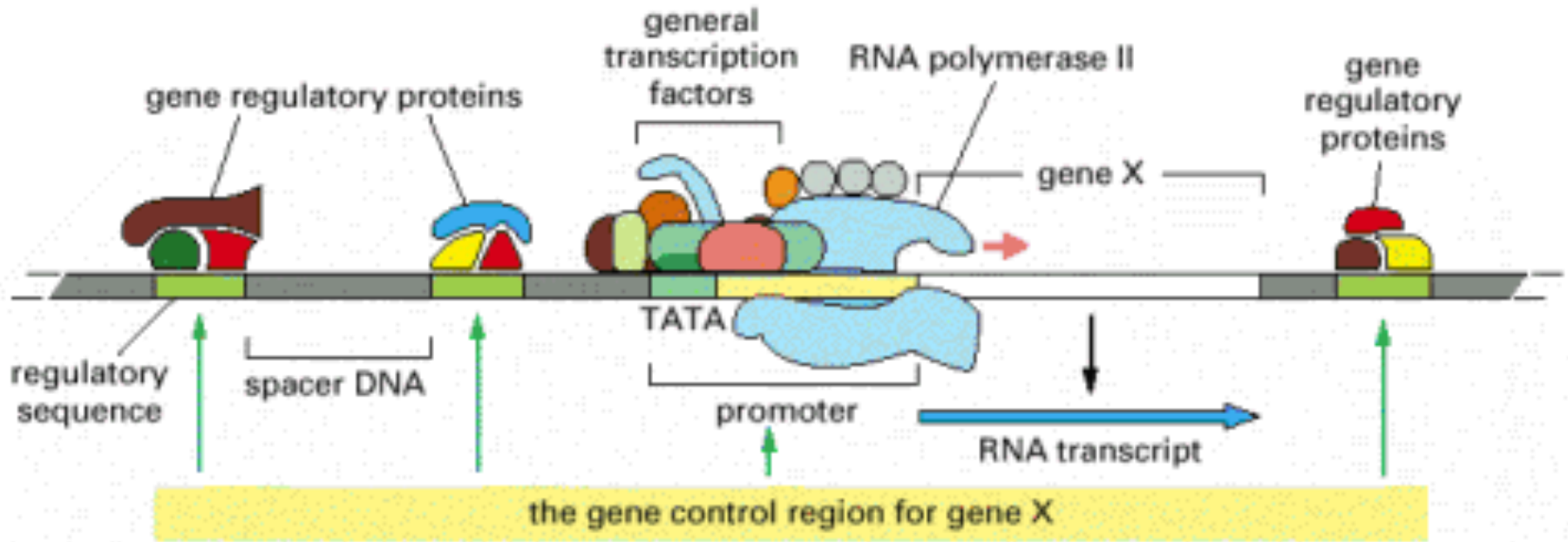
Per la **maggior parte** dei geni avviene a livello dell'inizio della **trascrizione**.

Esso coinvolge cambiamenti della **struttura della cromatina** al promotore, accompagnati dal **legame dell'apparato basale** di trascrizione (inclusa RNA polymerase II) al promotore.

Eventi **successivi** possono intervenire nella **regolazione dell'espressione**.

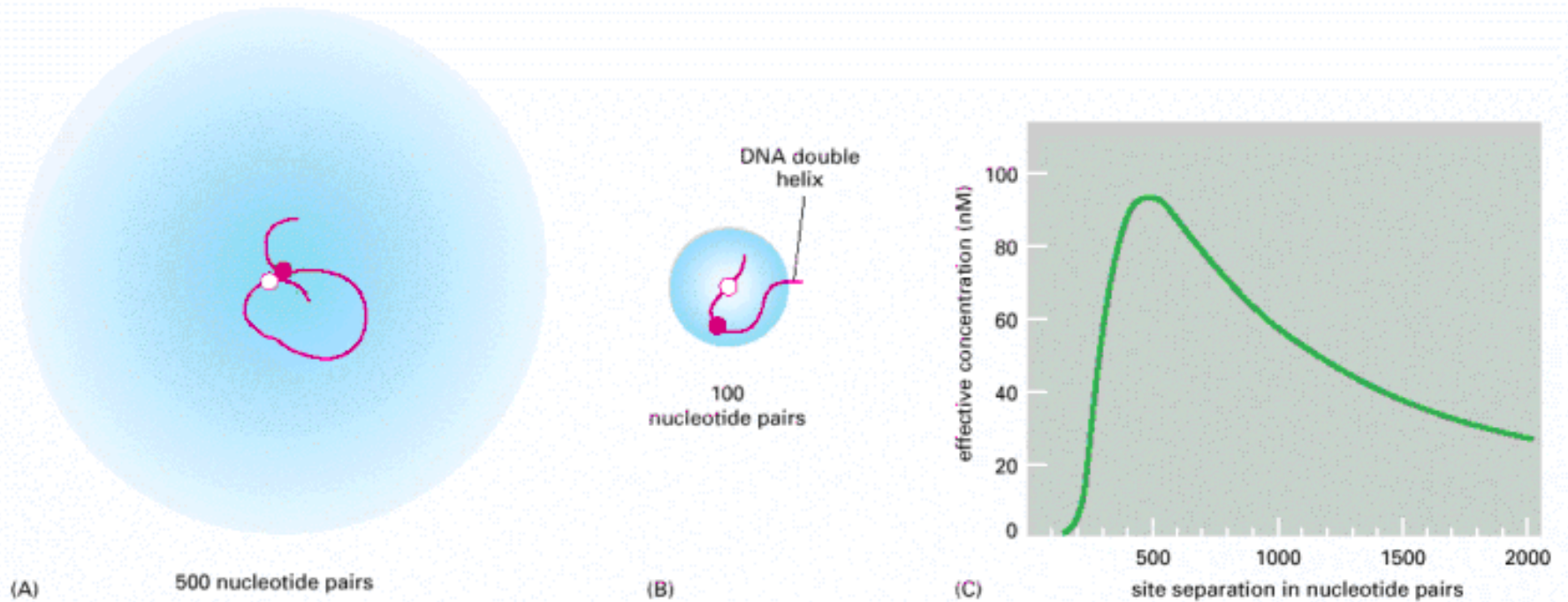


# The gene control region of a typical eucaryotic gene



The ***promoter*** is the DNA sequence where the general transcription factors and the polymerase assemble.

The ***regulatory sequences*** serve as **binding sites** for **gene regulatory proteins**, whose presence on the DNA affects the rate of transcription initiation. These sequences can be located **adjacent** to the promoter, far **upstream** of it, or even **within introns** or **downstream** of the gene. **DNA looping** is thought to allow gene regulatory proteins bound at any of these positions to interact with the proteins that assemble at the promoter. Whereas the **general transcription factors** that assemble at the promoter are **similar for all** polymerase II transcribed genes, the **gene regulatory proteins** and the **locations** of their binding sites relative to the promoter are **different for each gene**.

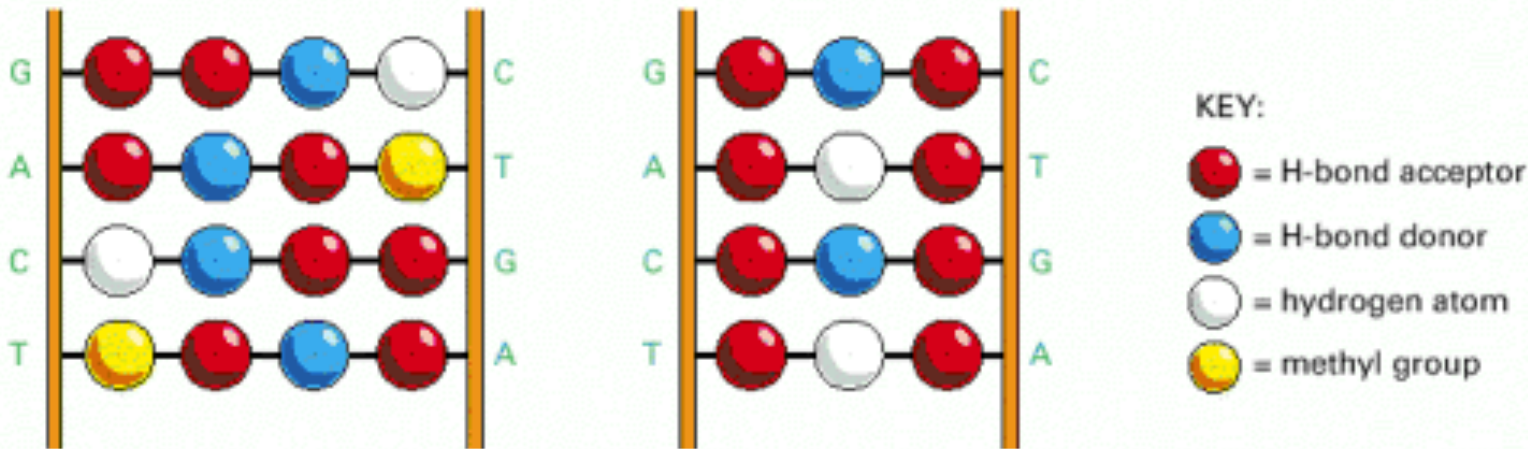
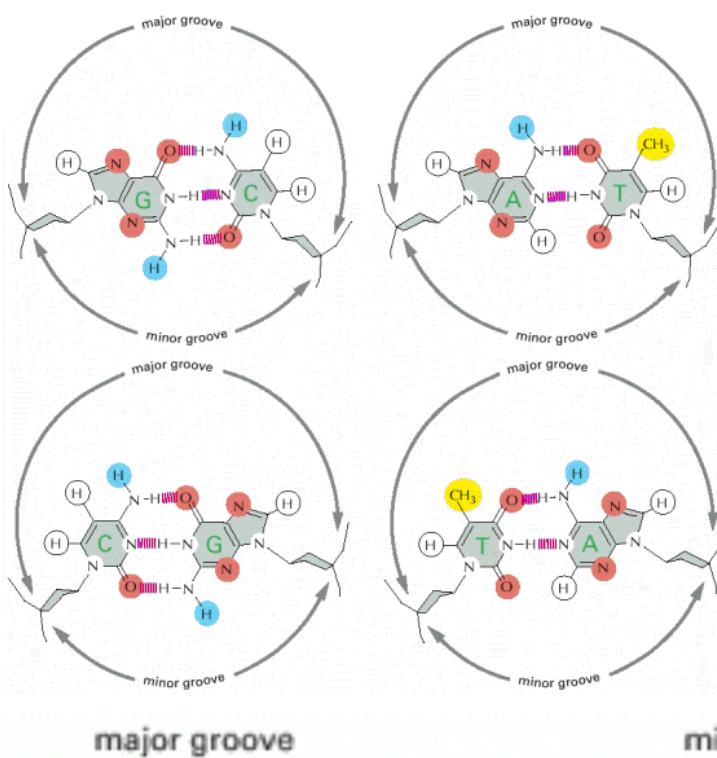


**Binding of two proteins to separate sites on the DNA double helix can greatly increase their probability of interacting.** (A) The tethering of one protein to the other via an intervening **DNA loop of 500 nucleotide** pairs increases their frequency of collision. The intensity of *blue* coloring reflects the probability that the *red* protein will be located at each position in space relative to the *white* protein. (B) The flexibility of DNA is such that an average sequence makes a smoothly graded  $90^\circ$  bend (a curved turn) about once every 200 nucleotide pairs. Thus, when two proteins are tethered by **only 100 nucleotide pairs**, their contact is relatively **restricted**. In such cases the protein interaction is facilitated when the two protein-binding sites are separated by a multiple of about 10 nucleotide pairs, which places both proteins on the same side of the DNA helix (which has about 10 nucleotides per turn) and thus on the inside of the DNA loop, where they can best reach each other. (C) The theoretical effective concentration of the *red* protein at the site where the *white* protein is bound, as a function of their separation.



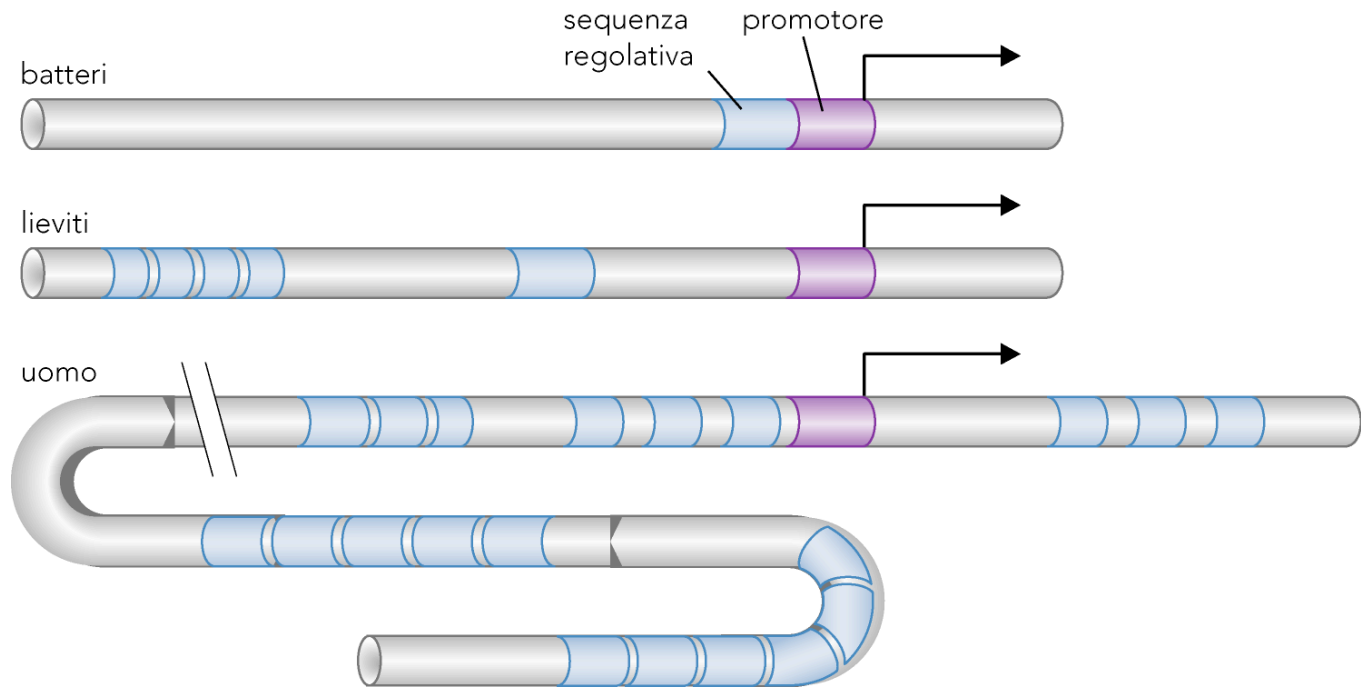
Come le **differenti paia di basi** del DNA possono essere **riconosciute** dai loro bordi **senza** la necessità di **aprire la doppia elica**.

Le **quattro** possibili configurazioni di paia di basi espongono nei solchi del duplex accettori (rossi) e donatori (azzurri) di legami idrogeno (nonché il metile idrofobico della timina – giallo) in modo specifico, presentando una sorta di **segnale di riconoscimento** alle proteine destinate all' **interazione** con determinate sequenze.



Da notare che soltanto l' **inversione** della coppia A:T con la T:A e della coppia G:C con la G:C non comporta rilevanti differenze nel lato del solco minore che risulta perciò meno **“informativo”** nei confronti delle proteine che vi interagiscono.

# Gli elementi regolatori

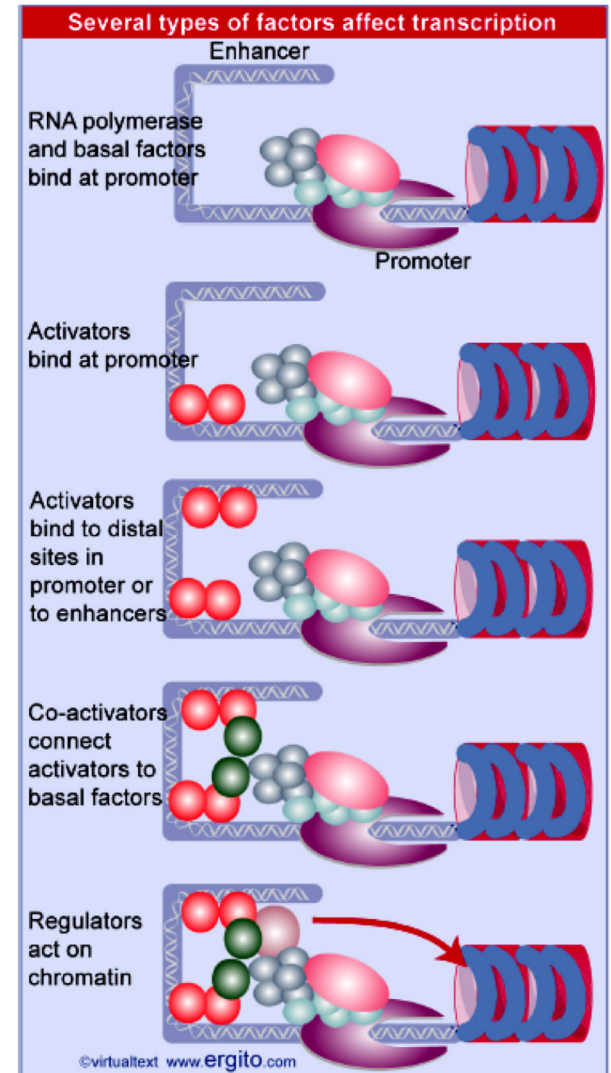


La complessità delle sequenze regolative aumenta con l'evoluzione

Negli organismi multicellulari ci sono **enhancers**, a monte o a valle del gene

# Fattori coinvolti nella regolazione dell'espressione genica

- I **fattori basali** insieme alla RNA polimerasi, si legano allo startpoint e TATA box
- Gli **Attivatori** sono fattori di trascrizione che riconoscono specifici elementi di corte **sequenze consenso**. Si legano a siti nel **promotore** o negli **enhancers**. Le sequenze che legano vengono chiamate **response elements**.
- I **Coattivatori** danno un **collegamento** tra gli **attivatori** e l'**apparato basale**. Non legano il DNA.
- Alcuni **regolatori** inducono cambiamenti nella **cromatina**.

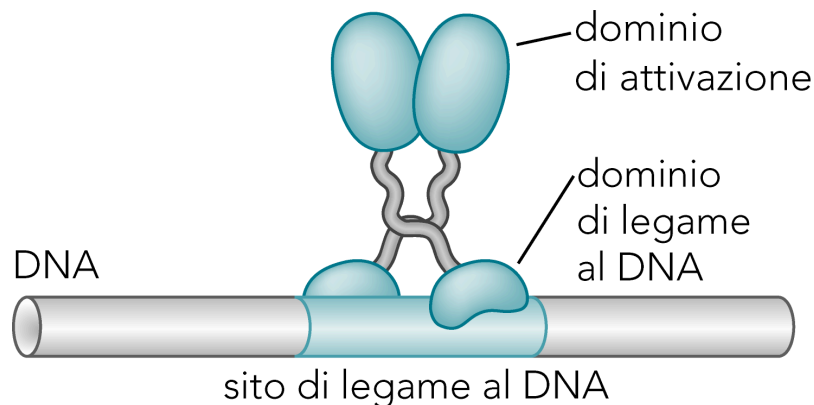


**Figure 22.2** Factors involved in gene expression include RNA polymerase and the basal apparatus, activators that bind directly to DNA at the promoter or at enhancers, co-activators that bind to both activators and the basal apparatus, and regulators that act on chromatin structure.

# Gli attivatori hanno domini di legame al DNA e di attivazione

**ATTIVATORE** = Dominio di **legame al DNA** + Dominio di **attivazione trascrizionale** (+ Dominio di dimerizzazione, tetramerizzazione, siti di legame per molecole effettrici)

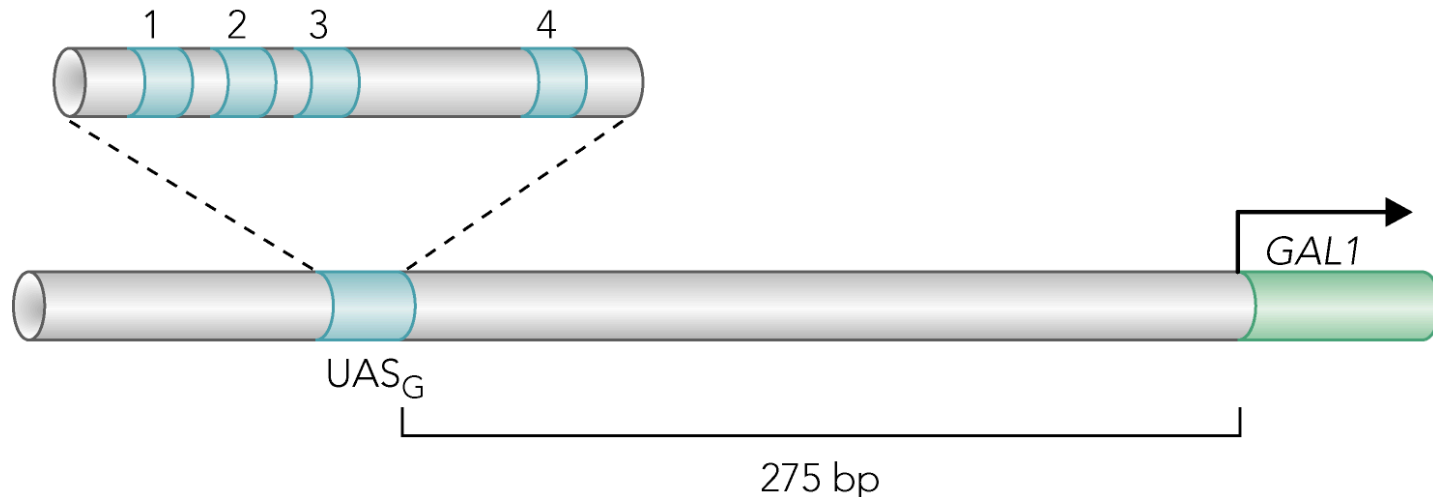
Le attività di **DNA-binding** e di **attivazione** della trascrizione sono in **domini indipendenti** di un attivatore. Il ruolo del dominio DNA-binding è di portare il dominio di attivazione della trascrizione vicino al promotore.

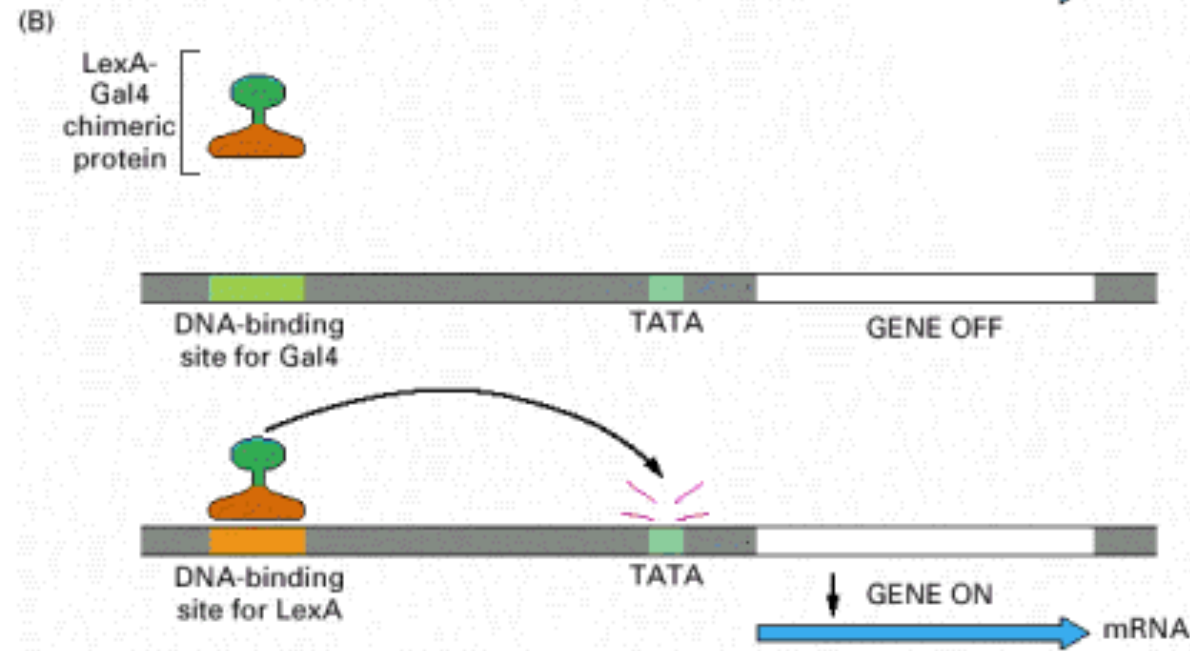
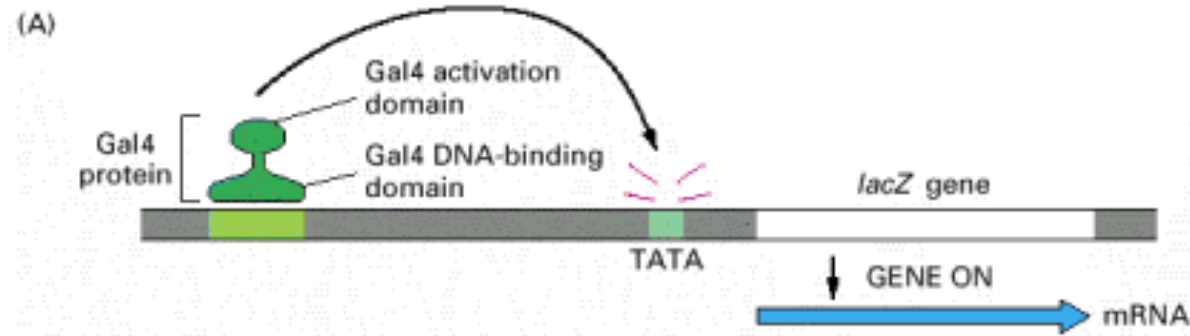


# Gli attivatori hanno domini di legame al DNA e di attivazione

**Gal4** regola la trascrizione del gene del galattosio in *S. cerevisiae*.  
Si lega a un sito di **17 bp**.

Ci sono 4 siti, ciascuno lega un dimero di Gal4, che formano la  
**UAS<sub>G</sub> (Upstream Activating Sequence di Gal)**

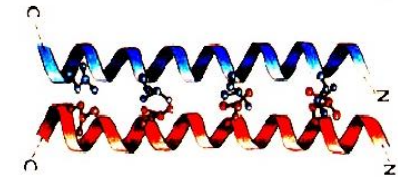
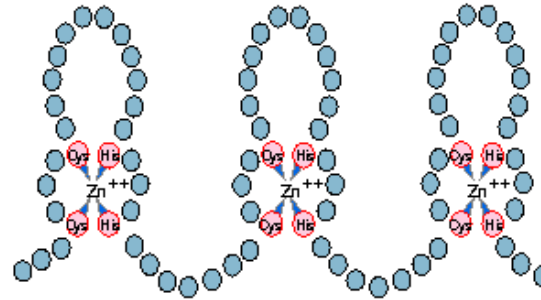
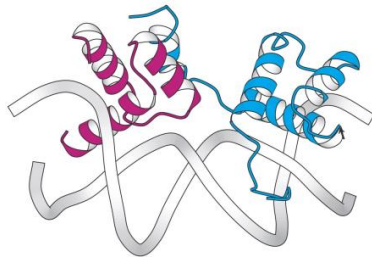
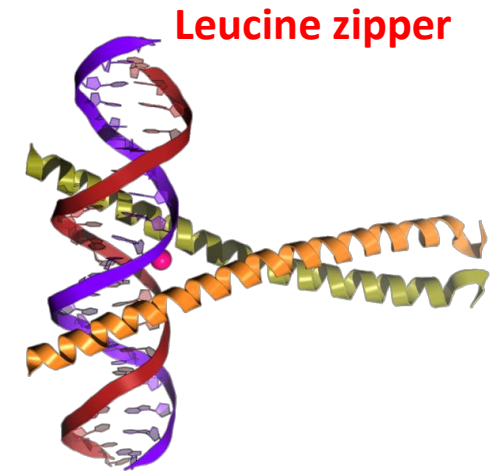
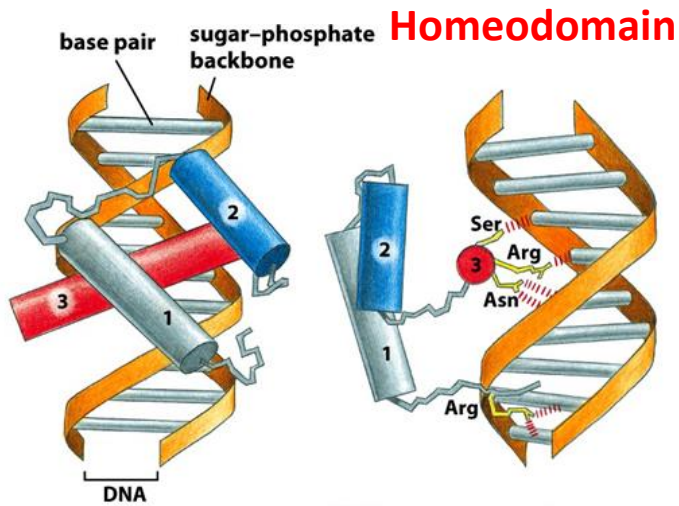




**The modular structure of a gene activator protein.** Outline of an experiment that reveals the presence of **independent DNA-binding and transcription-activating domains** in the yeast gene activator protein Gal4. A functional activator can be reconstituted from the C-terminal portion of the yeast Gal4 protein if it is attached to the DNA-binding domain of a bacterial gene regulatory protein (the LexA protein) by gene fusion techniques. When the resulting bacterial-yeast hybrid protein is produced in yeast cells, it will activate transcription from yeast genes provided that the specific DNA-binding site for the bacterial protein has been inserted next to them.

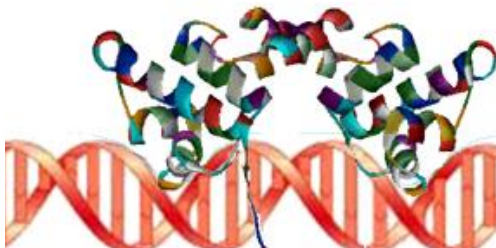
(A) The normal activation of gene transcription produced by the Gal4 protein. (B) The chimeric gene regulatory protein requires the LexA protein DNA-binding site for its activity. Gal4 is normally responsible for activating the transcription of yeast genes that code for the enzymes that convert galactose to glucose. In the experiments shown here, the control region for one of these genes was fused to the *E. coli lacZ* gene, which codes for the enzyme b-galactosidase. b-galactosidase is very simple to detect biochemically and thus provides a convenient way to monitor the expression level specified by a gene control region; *lacZ* thus serves as a *reporter gene* since it "reports" the activity of a gene control region.

# Domini di legame al DNA

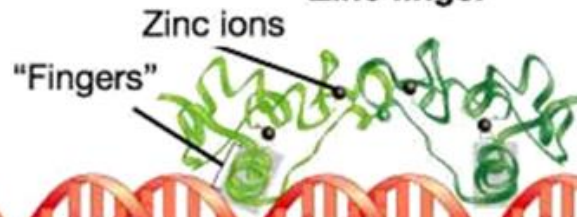


Hanno in comune strutture con 2 elementi di riconoscimento disposti in maniera simmetrica

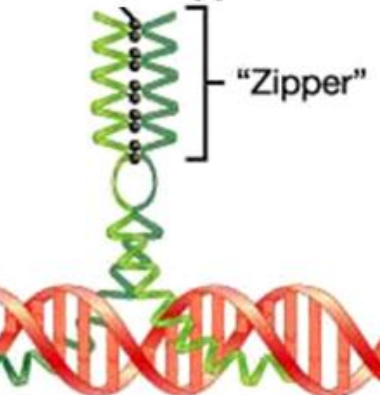
**Homeodomain**



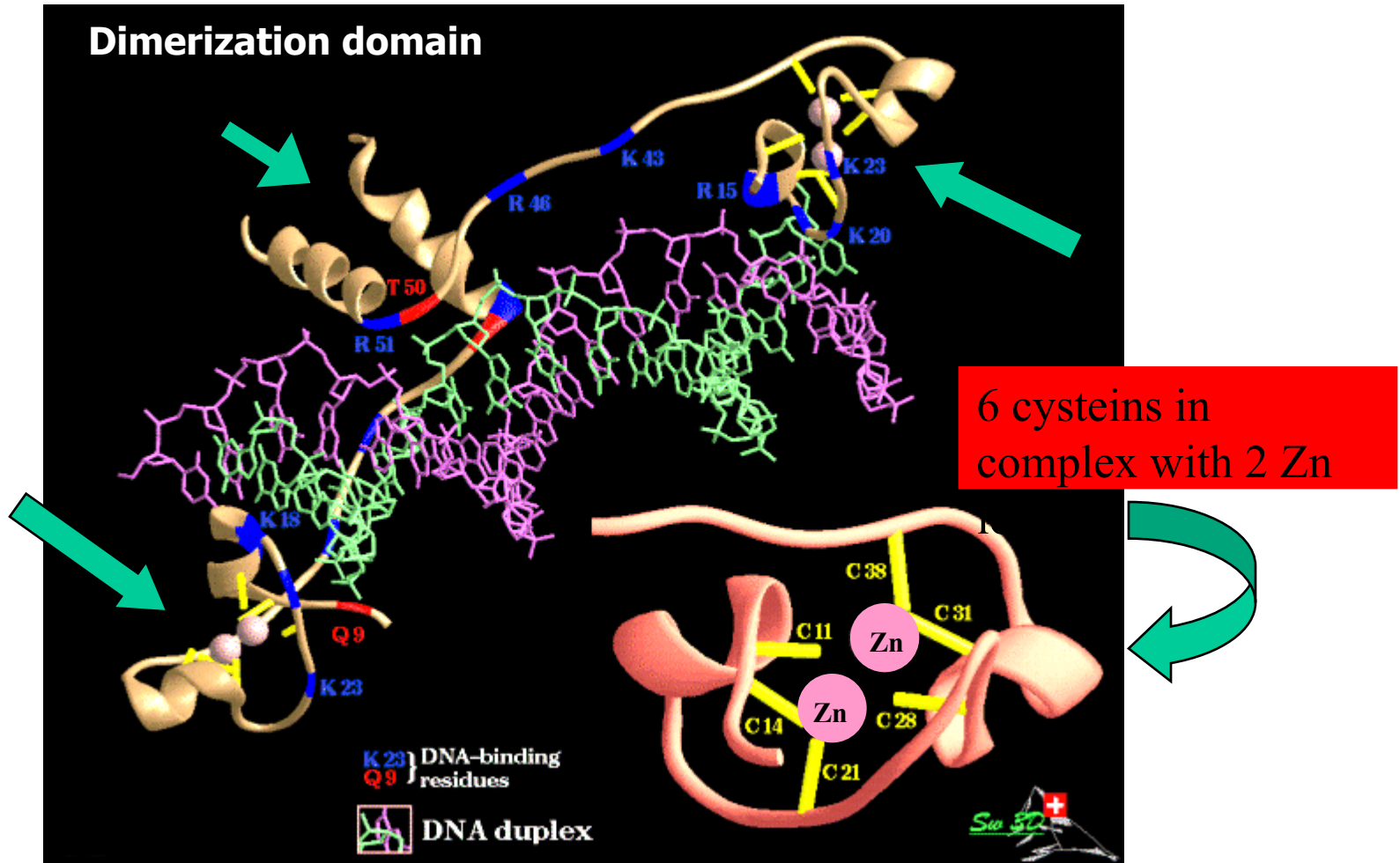
**Zinc finger**



**Leucine zipper**



# Zinc finger: GAL4



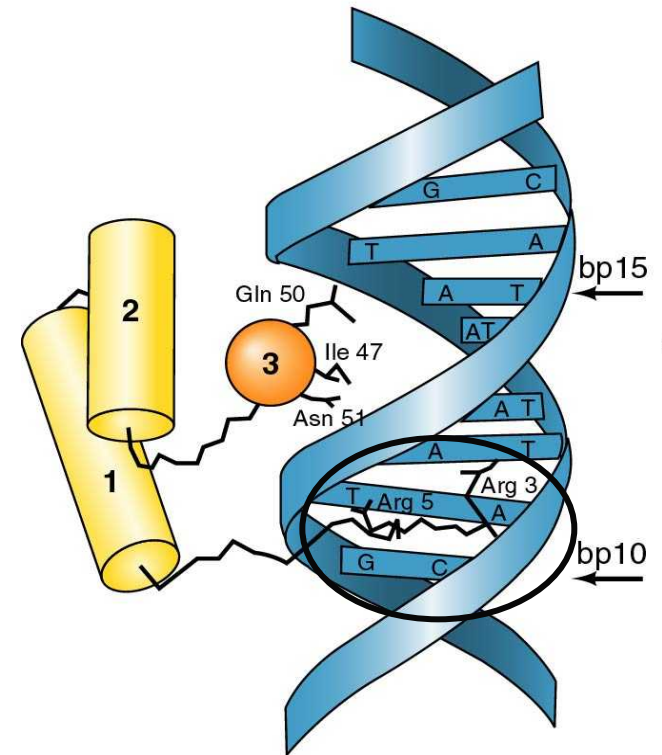


# Homeodomains

- Proteins encoded by **HOMEODOMAIN** genes;
- They are members of the helix-turn-helix family;
- Each homeodomain is constituted by 3  $\alpha$ -helix: 1 and 2 helix turn helix. Helix 3 is the recognition helix that contacts the major groove of DNA ;
- An N-terminal domain is present forming an arm that contacts the minor groove of DNA.

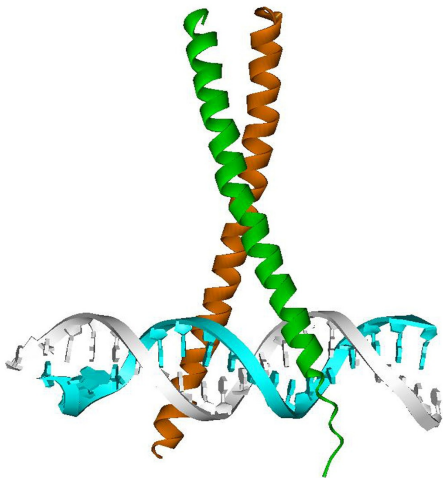


(Source: Courtesy Walter J. Gehring, University of Basel, Switzerland.)

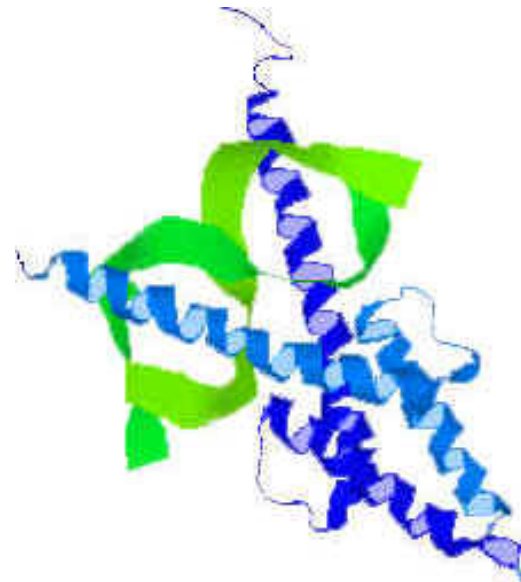


# bZip and bHLH motifs

- **ZIP** = leucine zipper ( $\alpha$ -helix with Leu every 7 residues, they are all on the same side);
- **HLH** = helix-loop-helix;
- **b** = basic region of the domain which interacts with DNA

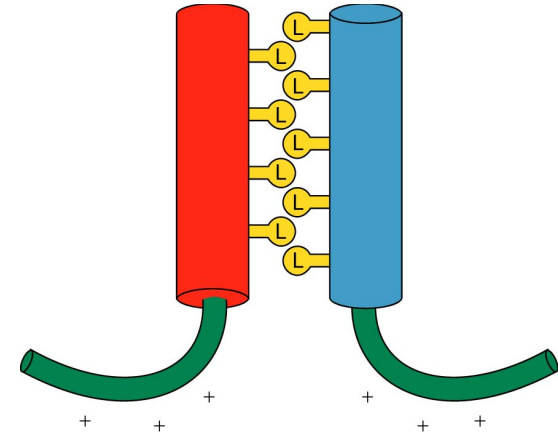
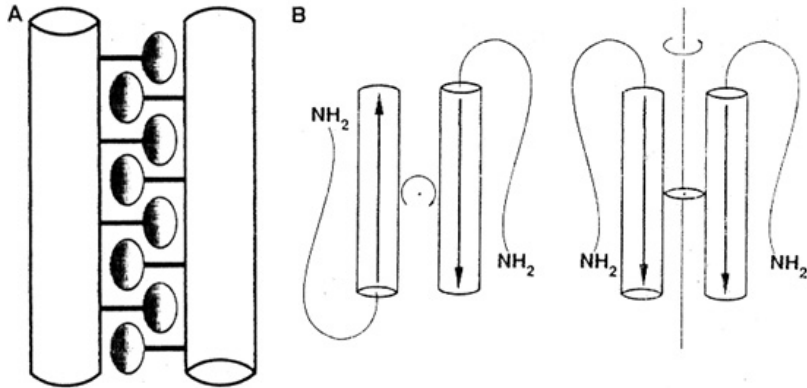


**bZIP motif structure of GCN4 bound to target DNA**



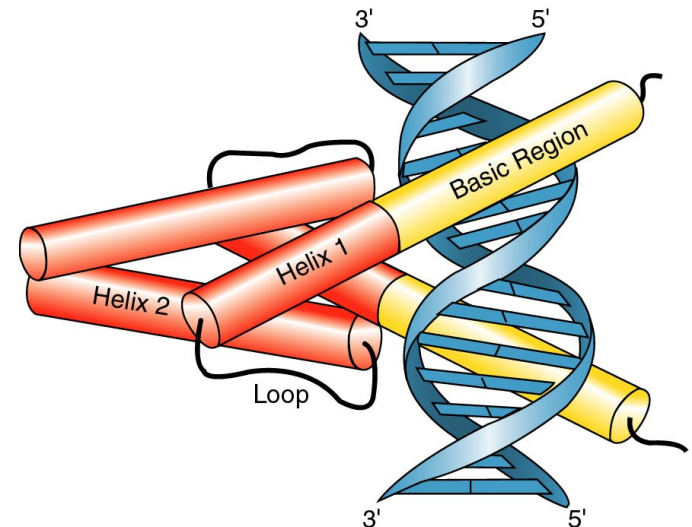
**Structure of the bHLH domain of MyoD and the DNA**

# bZip and bHLH motifs



**Leucine zipper structures (top).**

**Cristal structure of the bHLH domain of MyoD and its target DNA (right)**



Some proteins (eg Myc and Max) have bHLH-bZIP domains.

# Domini di attivazione trascrizionale

Non hanno una struttura ben definita (nativamente disordinata)

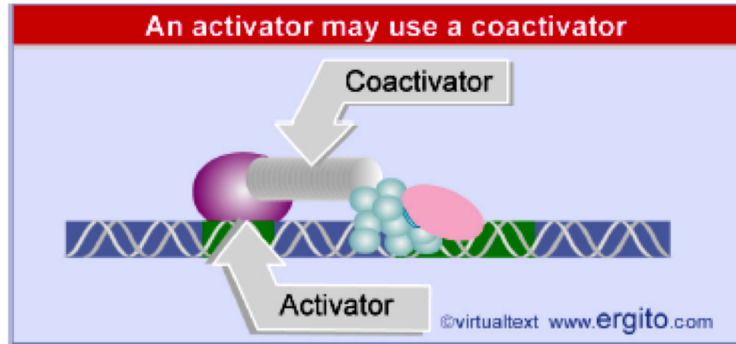
- Domini acidi;
- Domini ricchi di glutamine;
- Domini ricchi di proline.

# Come fa un **attivatore** a stimolare la trascrizione

In modo **simile** ai **procarioti** ma non contattano la RNA pol direttamente ma indirettamente interagendo/reclutando:

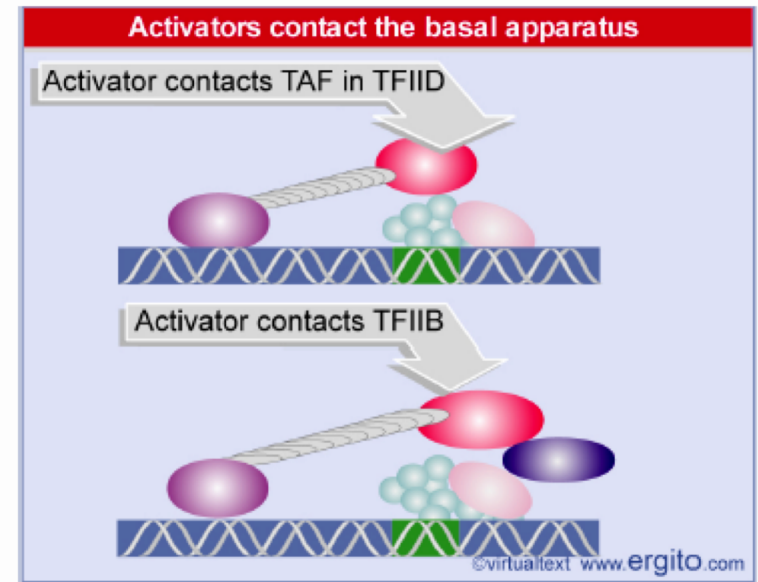
- 1) con **fattori del complesso trascrizionale** reclutando o aumentando il legame della RNA polimerasi al promotore.
- 2) con **fattori** che modificano i **nucleosomi** e alterano la struttura della **cromatina**.

# 1) con fattori del complesso trascrizionale



**Figure 22.7** An activator may bind a coactivator that contacts the basal apparatus.

- I **coattivatori** sono fattori di trascrizione la cui specificità è data dalla capacità di legare DNA-binding transcription factors invece di legare direttamente il DNA.
- Quando un attivatore funziona tramite un coattivatore l'interazione prevede legami non covalenti tra le due proteine

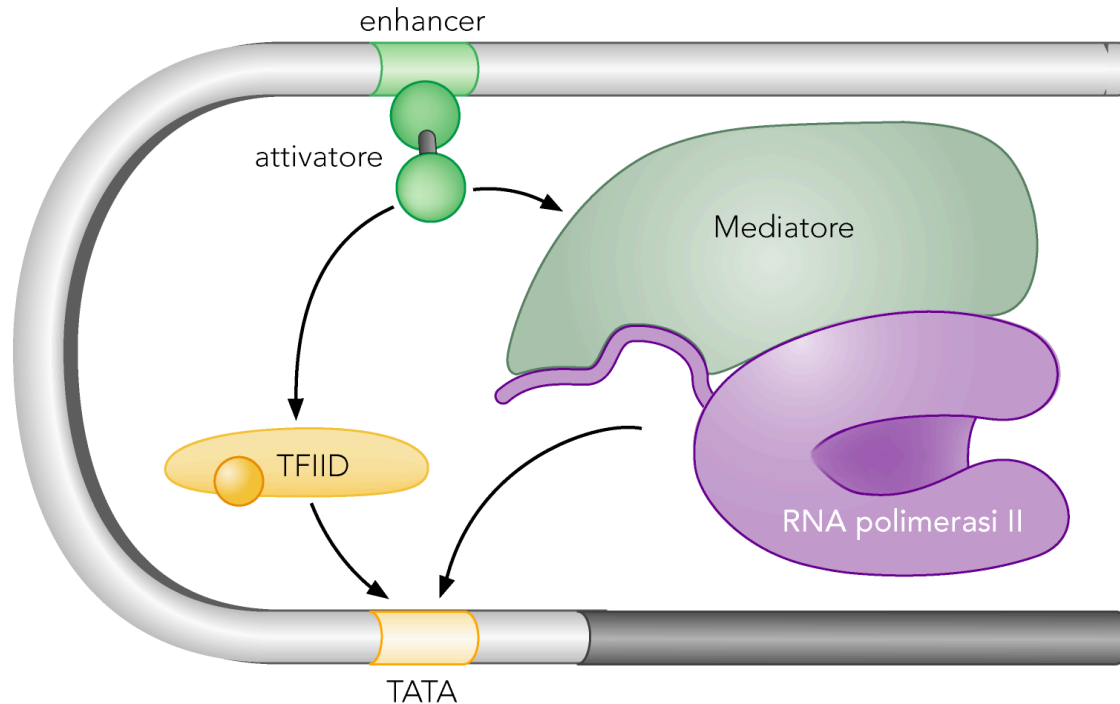


**Figure 22.8** Activators may work at different stages of initiation, by contacting the TAFs of TFIID or contacting TFIIB.

I contatti con l'apparato basale possono essere fatti con ognuno dei vari fattori basali, tipicamente  $TF_{II}D$ ,  $TF_{II}B$ , or  $TF_{II}A$ .

# Attivazione per reclutamento

L'attivatore può legare il **mediatore** che è associato alla RNAPolII o a **fattori generali** della trascrizione (TFIID).



## 2) Attivazione per alterazione della struttura della cromatina

L'attivatore può alterare la struttura della cromatina reclutando enzimi che modificano i nucleosomi (ad es. **istone acetilasi**) e creano siti di legame in grado di reclutare **complessi che rimodellano la cromatina** (ad es. SWI/SNF).

K acetilate permettono il reclutamento di proteine con **bromodomini** (es. TFIID).

Alcune modificazioni possono di per se contribuire ad alterare la struttura della cromatina (acetilazione).

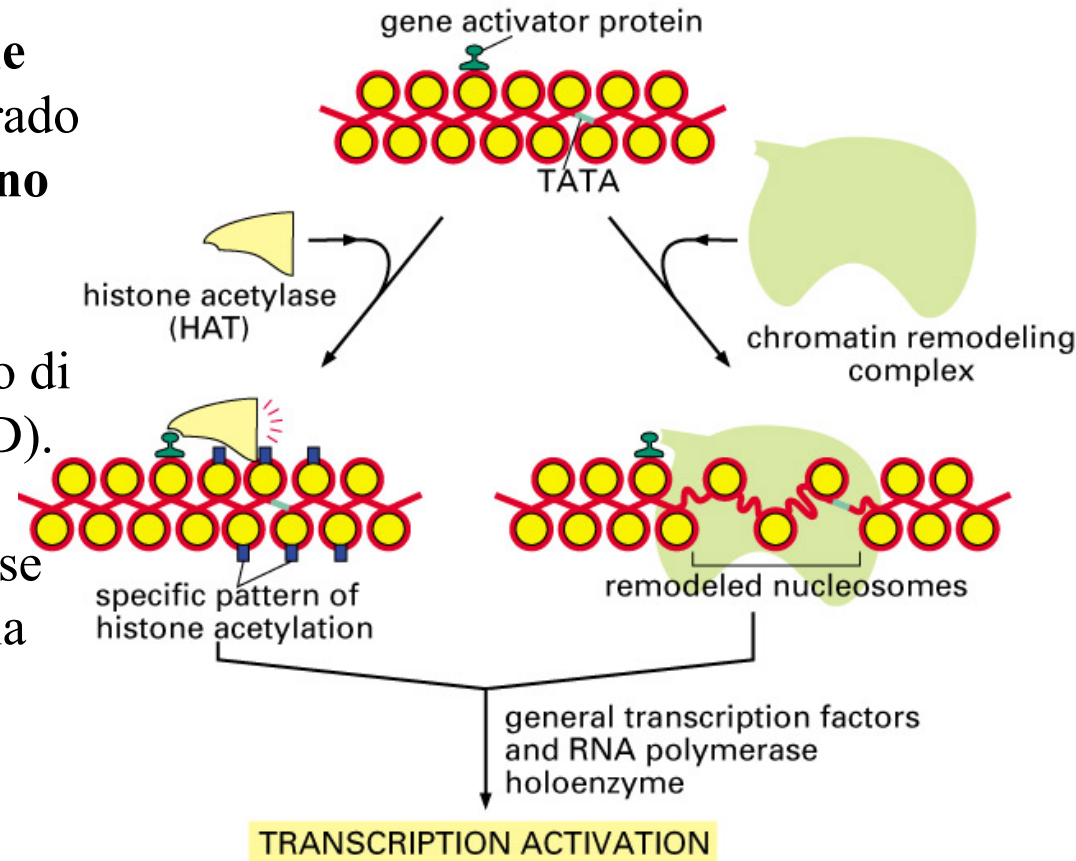
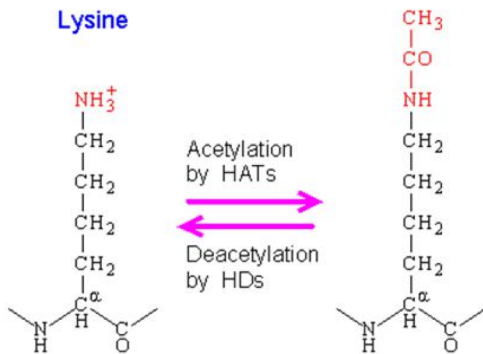
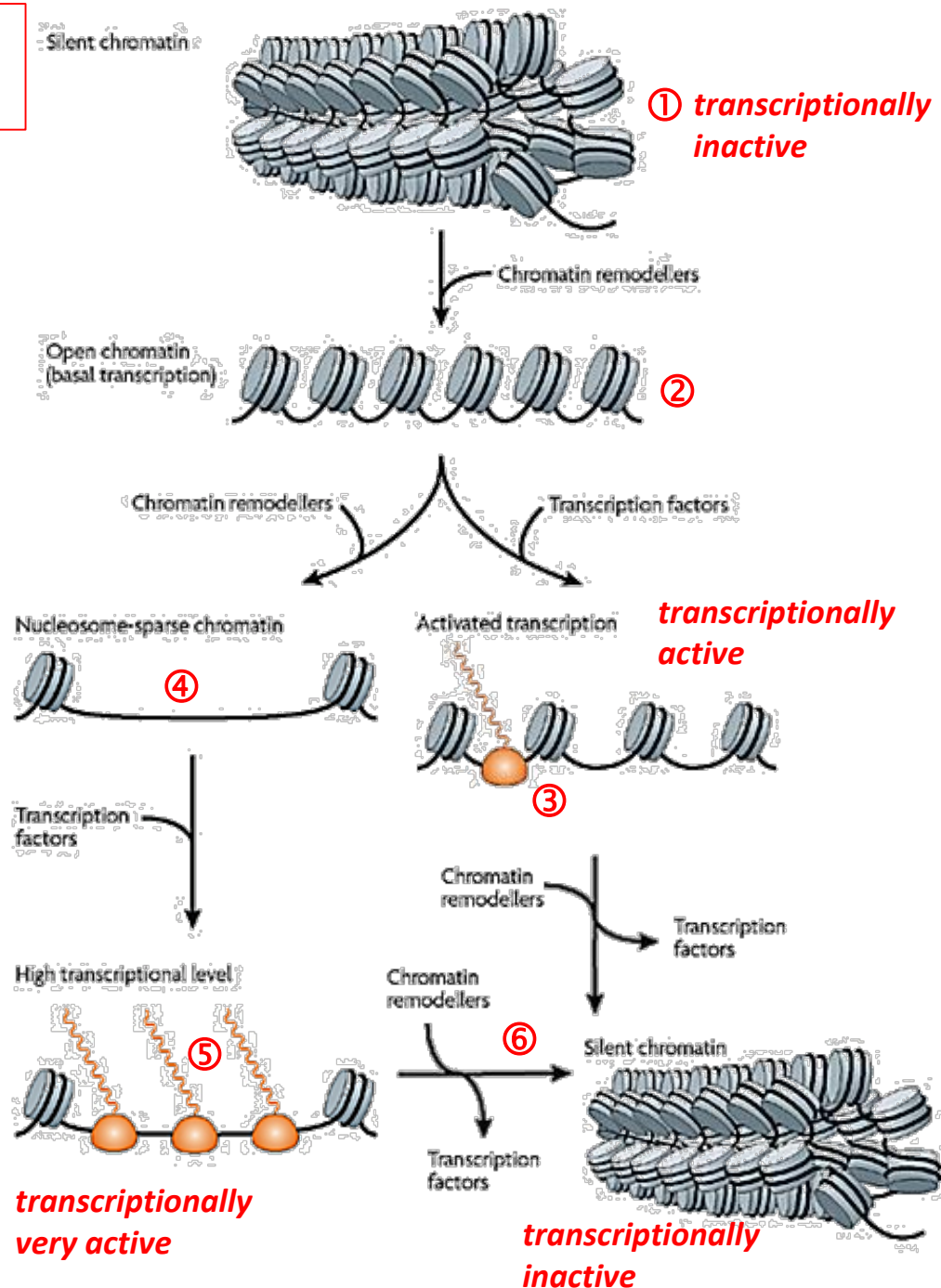


Figure 7-45. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



## Il 'remodelling' della cromatina è un processo dinamico

- I complessi che rimodellano la cromatina rendono quindi il DNA più o meno accessibile ai fattori di trascrizione, determinando la loro capacità di attivare la trascrizione
- La **cromatina 'silente'** ① è trascrizionalmente inattiva perché il gene è inaccessibile a questi fattori, mentre la **cromatina 'aperta'** ② è trascrizionalmente attiva ③ perché è accessibile.
- La ulteriore azione dei 'rimodellatori' porta a **cromatina "molto aperta"** ④ che permette elevati livelli di trascrizione ⑤. Si osserva questo fenomeno, per esempio, nei geni che codificano per proteine ribosomiali
- La **struttura della cromatina è dinamica e facilmente reversibile** ⑥, riportandola allo stato 'silente' e non trascrizionalmente attivo
- Lo 'switch' da silente ad attiva e poi ancora a silente avviene soprattutto nei **geni regolati durante lo sviluppo**.



# Modificazioni covalenti delle code degli istoni alterano l'accessibilità della cromatina.

**Lisine:** acetilate o metilate

**Serine:** fosforilate

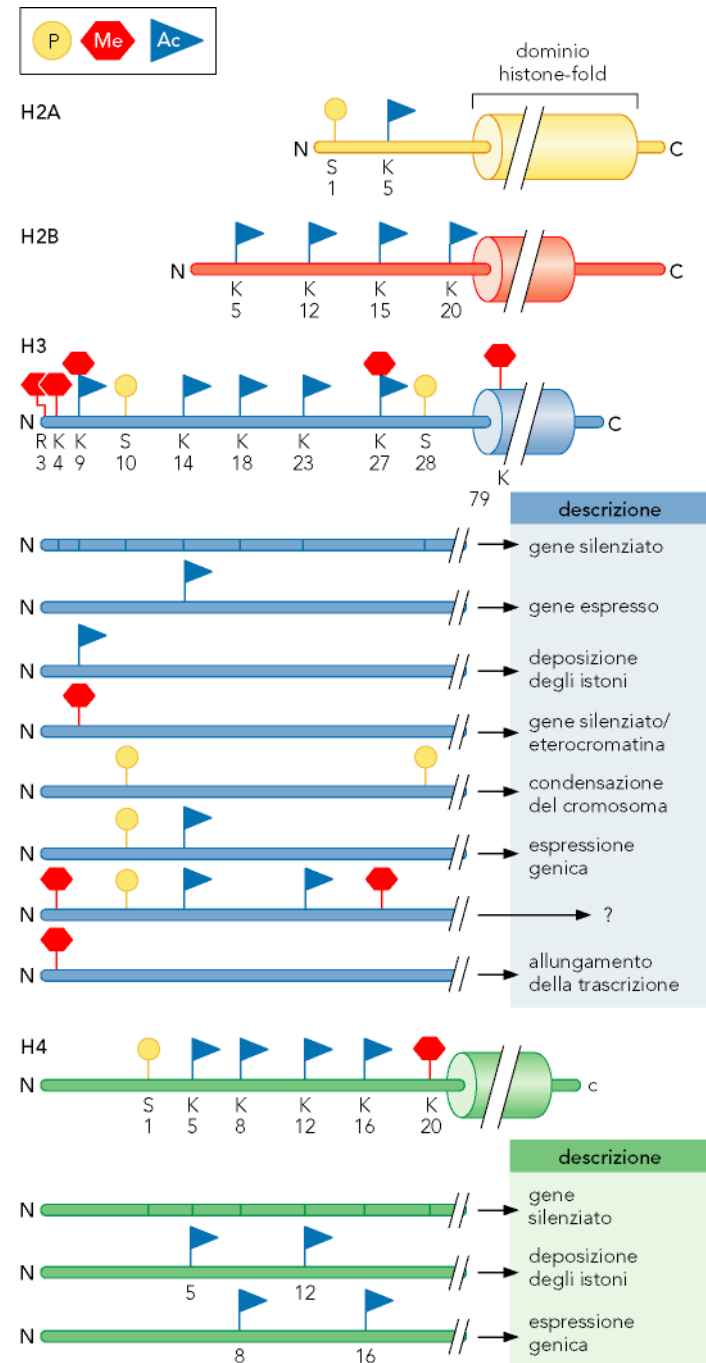
**Acetilazione:** trascrizione attiva

**Deacetilazione:** trascrizione repressa

**Metilazione:** sia attivazione che repressione

Proteine con **bromodominio** riconoscono code istoniche acetilate

Proteine con **cromodominio** riconoscono code istoniche metilate

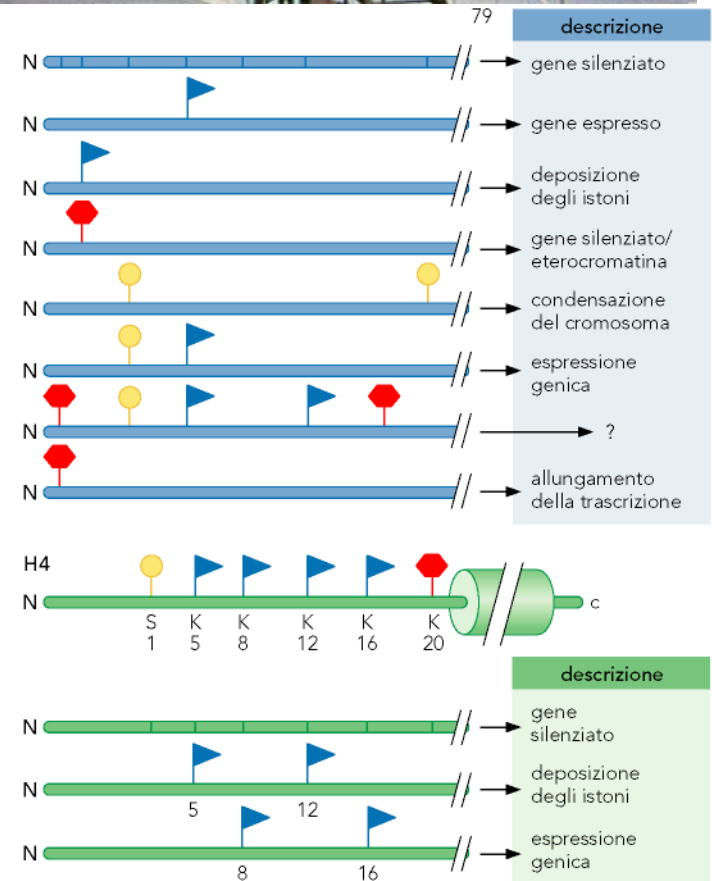


# Codice internazionale nautico

R	Romeo		. . .	<i>“Segnale di procedura. Con una o più bandiere numeriche, indica la distanza in miglia nautiche.”</i>
S	Sierra		. . .	<i>“Le mie macchine stanno andando indietro.”</i> Con una o più bandiere numeriche, indica la velocità in nodi.
T	Tango		-	<i>“Mantenetevi lontano da me, sono impegnato in operazioni di pesca a due battelli.”</i> Con quattro bandiere numeriche, indica l'orario locale (le prime due cifre per le ore e le altre per i minuti).
U	Uniform		. . -	<i>“State andando verso un pericolo.”</i>
V	Victor		. . . -	<i>“Richiedo assistenza.”</i> Con una o più bandiere numeriche, indica la velocità in chilometri all'ora (km/h).
W	Whiskey		. - -	<i>“Richiedo assistenza medica.”</i>
X	Xray		- - - -	<i>“Sospendete quello che state facendo e fate attenzione ai miei segnali.”</i>
Y	Yankee		- - - -	<i>“La mia ancora sta arando.”</i>
Z	Zulu		- - - -	<i>“Richiedo un rimorchiatore.”</i> Se usato da pescherecci che operano nelle vicinanze di una zona pescosa, significa: <i>“Sto calando le reti.”</i> Con una o più bandiere numeriche, indica l'orario UTC (le prime due cifre per le ore e le altre per i minuti).

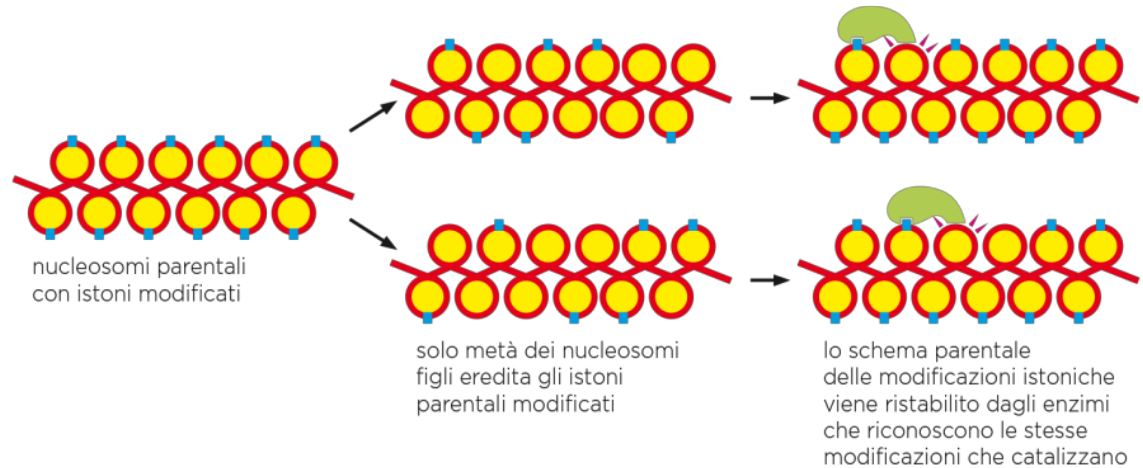


## Codice istonico

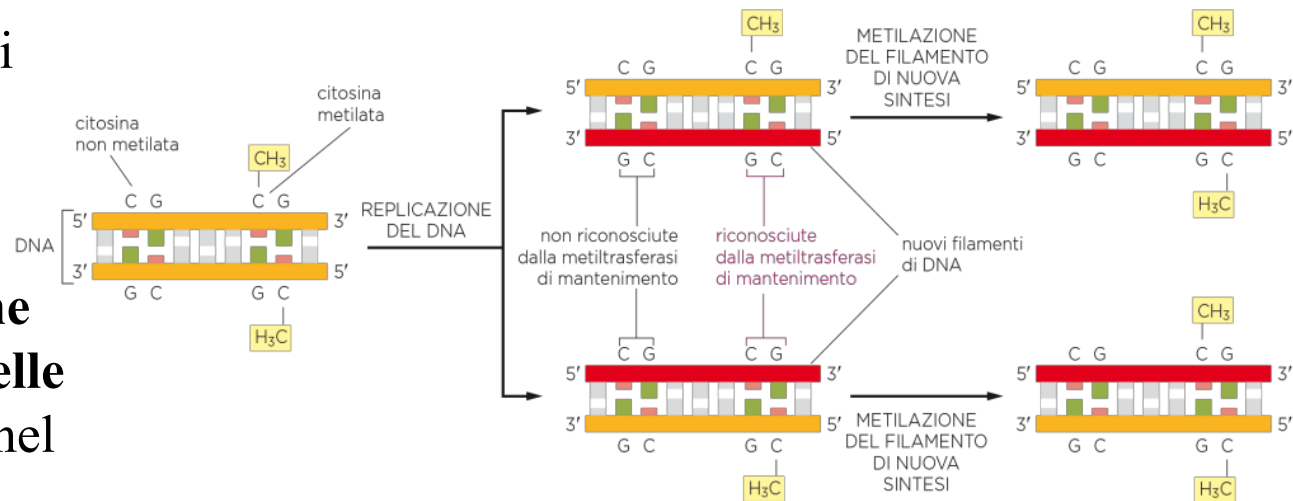


# Le cellule possono ereditare un “quadro di espressione” stabile

1) **Mediante trasmissione della struttura della cromatina—gli istoni modificati** in particolari zone del **cromosoma parentale**, durante la replicazione si ripartiscono nelle stesse zone nei cromosomi figli e richiamano enzimi che **ristabiliscono il pattern di modificazione del cromosoma parentale**.



2) **Mediante disattivazione di geni per metilazione delle citosine**, che è mantenuto nel DNA dopo la replicazione (imprinting).

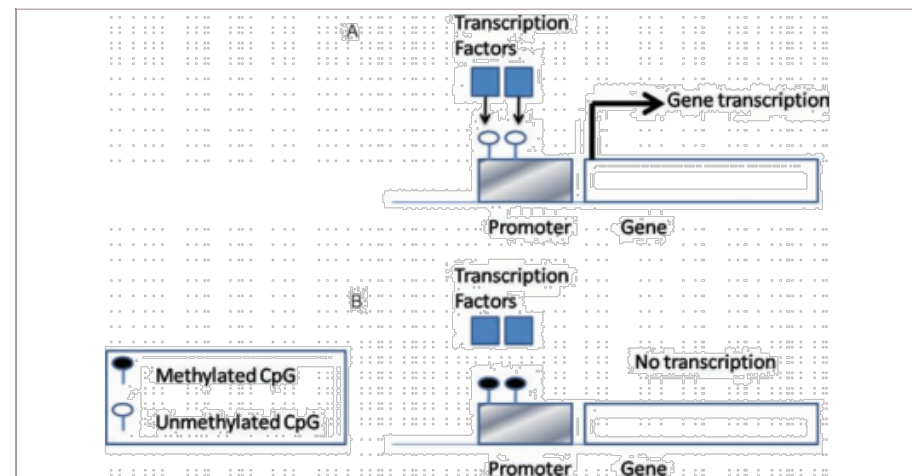
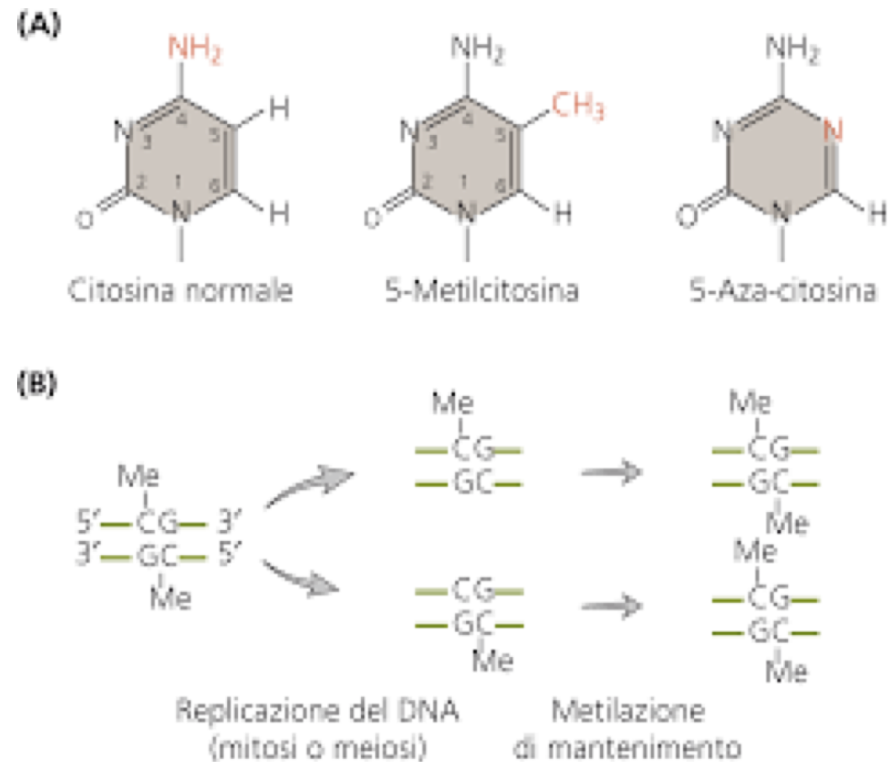


## Metilazione del DNA

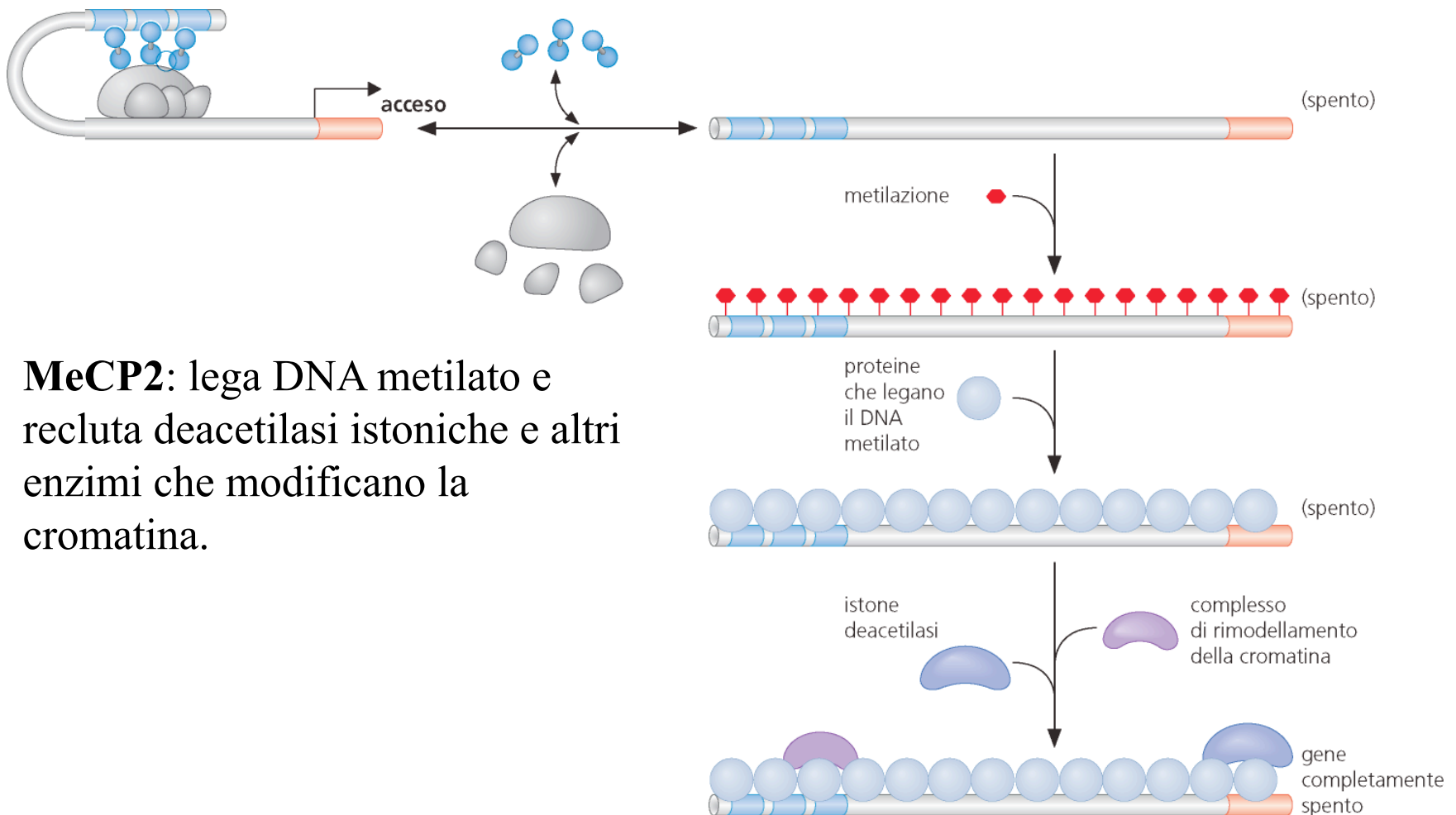
- Processo epigenetico per modificare geni
- Il tipo più diffuso è la metilazione di citosine nella doppietta CpG
- Questo processo è controllato a diversi livelli ed è effettuato da una famiglia di enzimi noti come DNA metiltrasferasi (DNMT)
- La metilazione riduce l'espressione del gene (OFF switch) – è una forma di regolazione «epigenetica» dell'espressione.
- Il pattern di metilazione è relativamente stabile nelle cellule somatiche
- Permane dopo la replicazione del DNA (modificazione a lungo termine ereditato dopo la divisione cellulare).
- La de-metilazione delle citosine permette la riprogrammazione epigenetica delle cellule se necessario.

ereditabili

L'**epigenetica** è lo studio di alterazioni nella funzione di un gene che non coinvolgono la sequenza stessa del gene. Si riferiscono quindi ai cambiamenti che influenzano il [fenotipo](#) senza alterare il [genotipo](#).

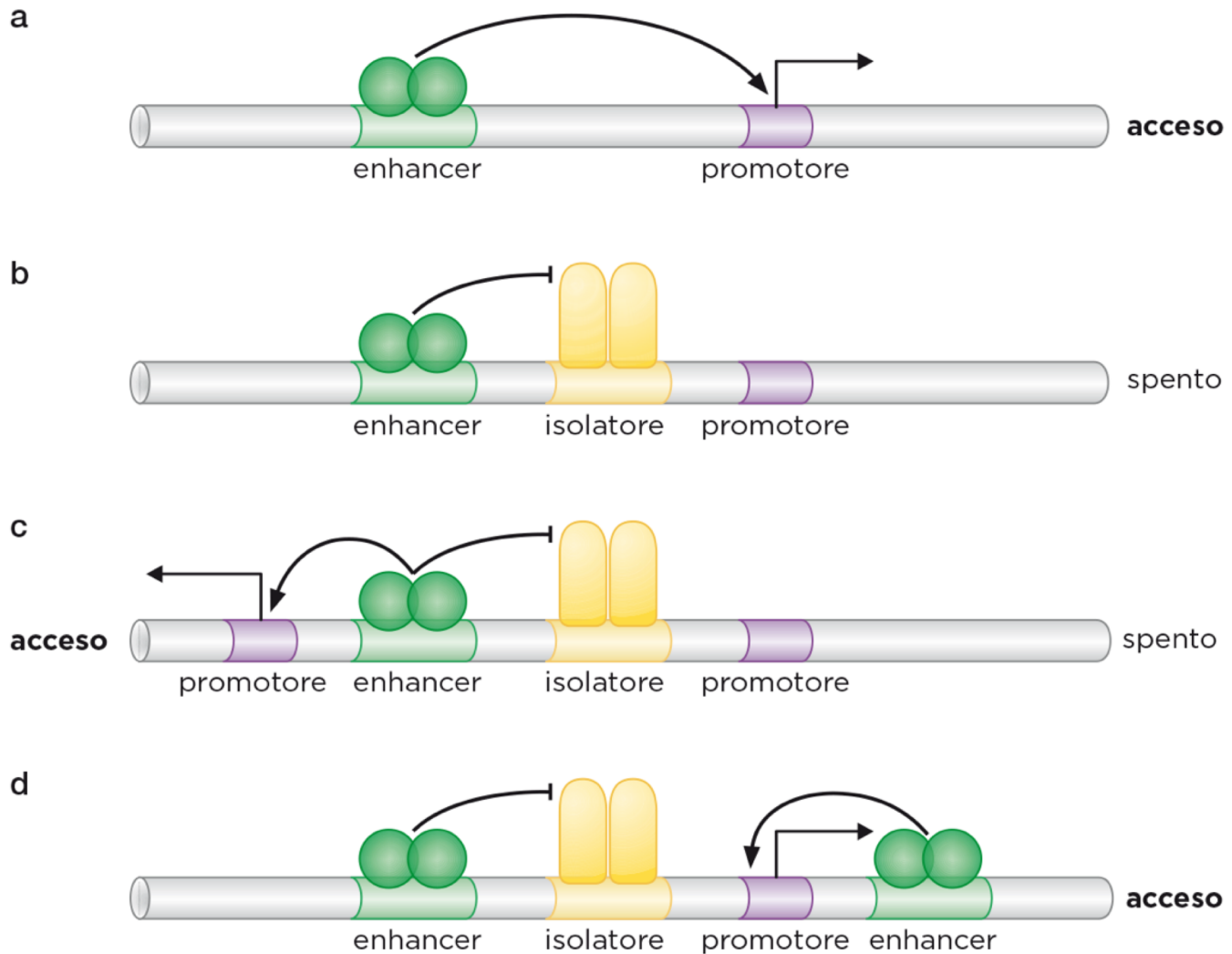


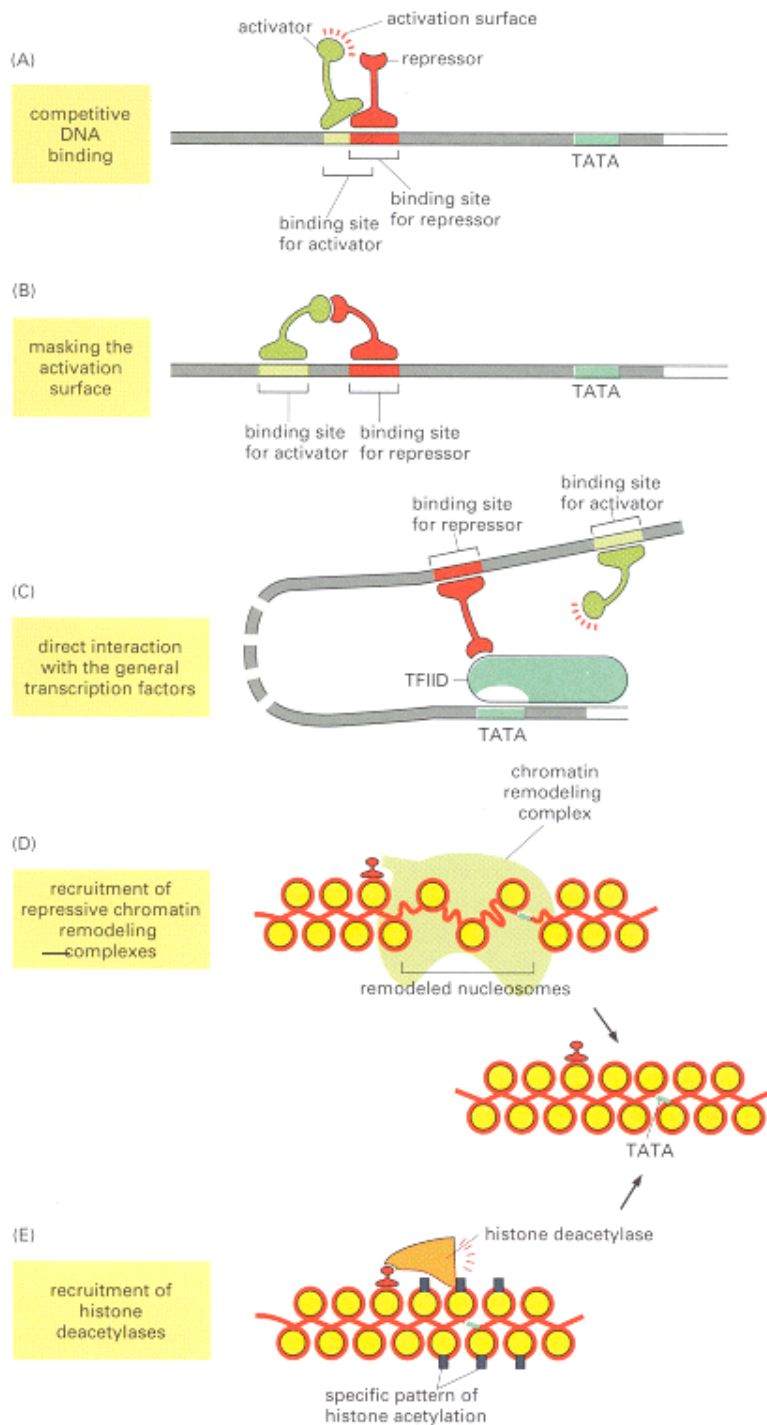
# Silenziamento di un gene attraverso la metilazione del DNA



**MeCP2:** lega DNA metilato e recluta deacetilasi istoniche e altri enzimi che modificano la cromatina.

# Gli isolatori bloccano l'attivazione promossa dagli enhancers

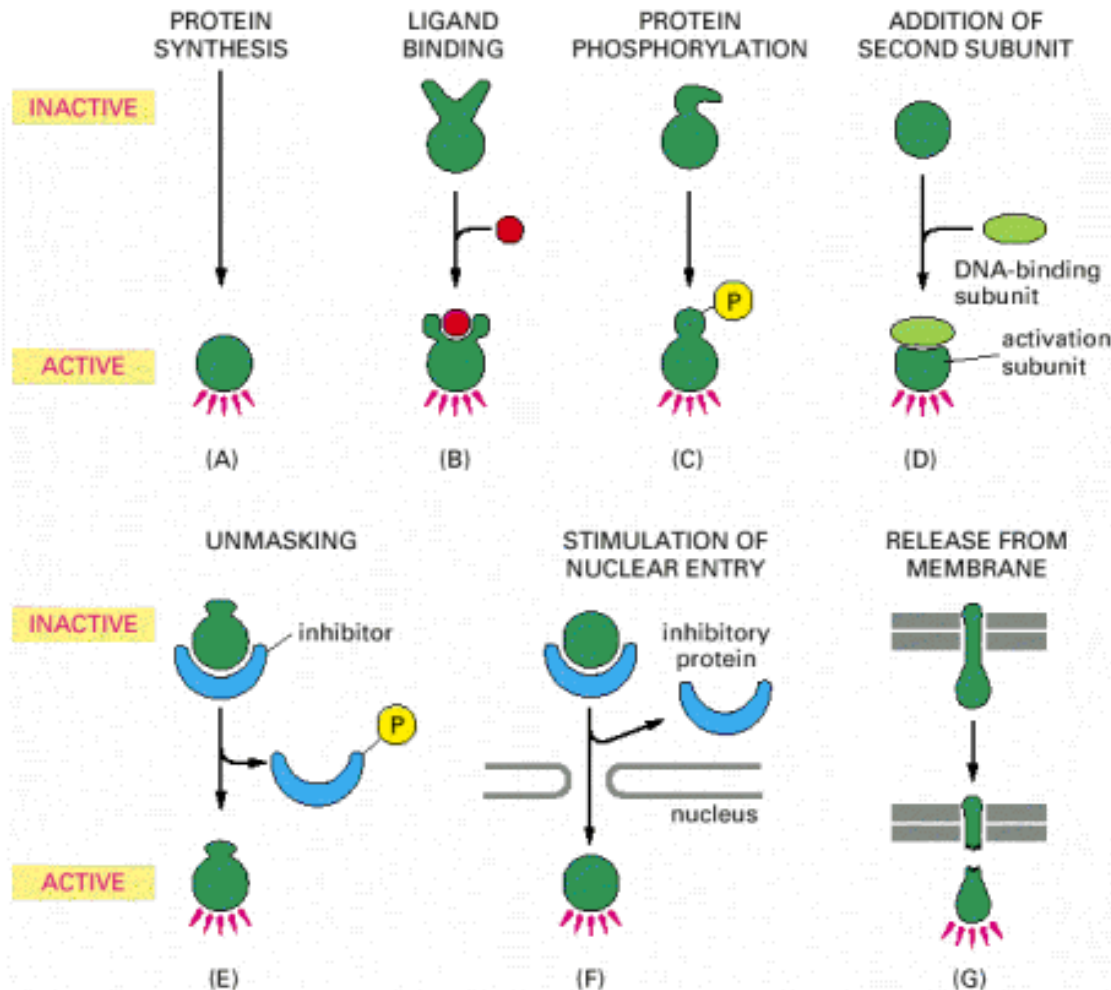




**Five ways in which eucaryotic gene repressor proteins can operate.** (A) Gene activator proteins and gene repressor proteins compete for binding to the same regulatory DNA sequence. (B) Both proteins can bind DNA, but the repressor binds to the activation domain of the activator protein thereby preventing it from carrying out its activation functions. In a variation of this strategy, the repressor binds tightly to the activator without having to be bound to DNA directly. (C) The repressor interacts with an early stage of the assembling complex of general transcription factors, blocking further assembly. Some repressors also act at late stages in transcription initiation, for example, by preventing the release of the RNA polymerase from the general transcription factors. (D) The repressor recruits a chromatin remodeling complex which returns the nucleosomal state of the promoter region to its pre-transcriptional form. Certain types of remodeling complexes appear dedicated to restoring the repressed nucleosomal state of a promoter, whereas others (for example, those recruited by activator proteins) render DNA packaged in nucleosomes more accessible. However the same remodeling complex could in principle be used either to activate or repress transcription: depending on the concentration of other proteins in the nucleus, either the remodeled state or the repressed state could be stabilized. According to this view, the remodeling complex simply allows chromatin structure to change. (E) The repressor attracts a histone deacetylase to the promoter. Local histone deacetylation reduces the affinity of TFIID for the promoter and decreases the accessibility of DNA in the affected chromatin. For simplicity, nucleosomes have been omitted from (A)-(C), and the scale of (D) and (E) has been reduced relative to (A)-(C).



# Some ways in which the activity of gene regulatory proteins is regulated in eucaryotic cells



(A) The protein is synthesized only when needed and is rapidly degraded by proteolysis so that it does not accumulate. (B) Activation by ligand binding. (C) Activation by phosphorylation. (D) Formation of a complex between a DNA-binding protein and a separate protein with a transcription-activating domain. (E) Unmasking of an activation domain by the phosphorylation of an inhibitor protein. (F) Stimulation of nuclear entry by removal of an inhibitory protein that otherwise keeps the regulatory protein from entering the nucleus. (G) Release of a gene regulatory protein from a membrane bilayer by regulated proteolysis. Each of these mechanisms is typically controlled by extracellular signals which are communicated across the plasma membrane to the gene regulatory proteins in the cell. Mechanisms (A)-(F) are readily reversible and therefore also provide the means to selectively inactivate gene regulatory proteins.

# Response element

- un elemento di DNA che causa la risposta del gene al fattore è chiamato **response element**; esempi sono **HSE** (heat shock response element), **GRE** (glucocorticoid response element), **SRE** (serum response element).
- I Response elements contengono **corte sequenze consensus**; copie dei response elements in diversi geni sono correlate, ma non necessariamente identiche.
  - I Response elements possono essere localizzati nei **promotori o negli enhancers**.
- Ogni response element è riconosciuto da un **attivatore specifico**.
- Un promotore può avere **molti response elements**, che possono attivare la trascrizione indipendentemente o in certe combinazioni.

# Sinergia nella trascrizione

- Gli attivatori agiscono su molti passaggi diversi e la loro azione è sinergica

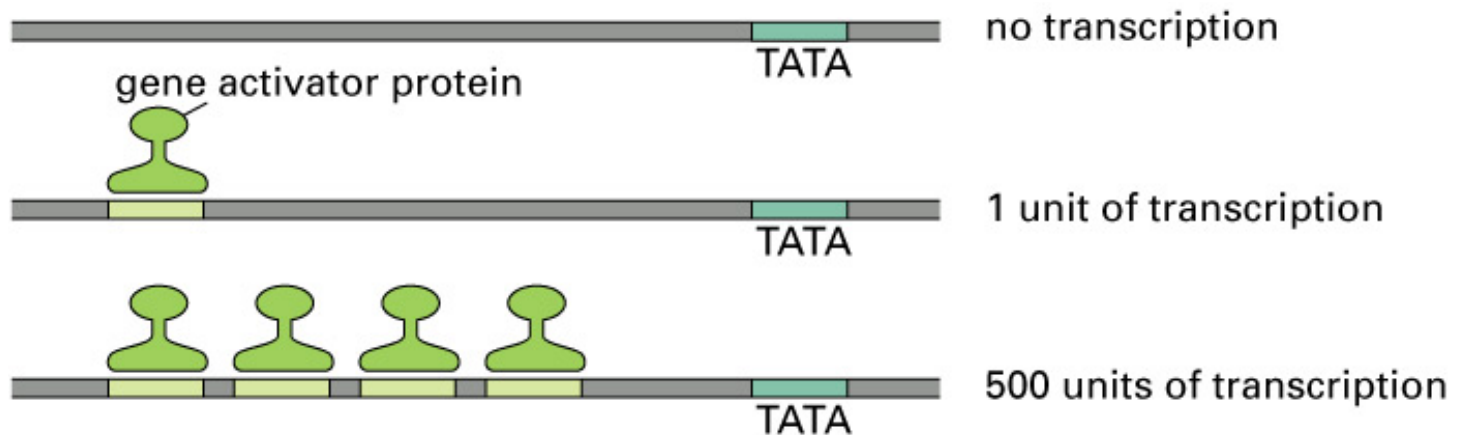
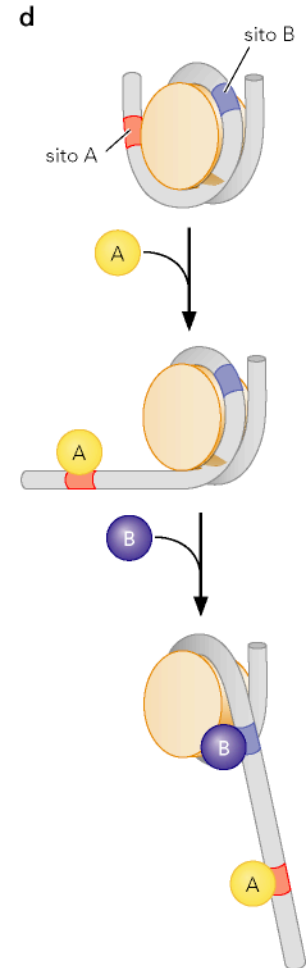
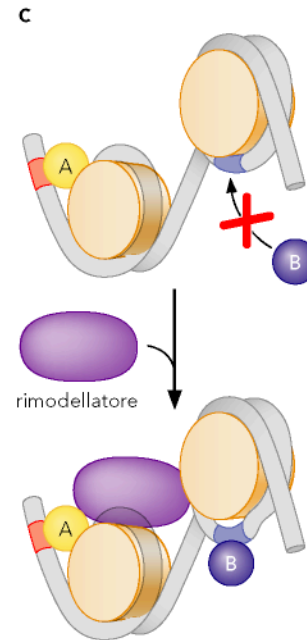
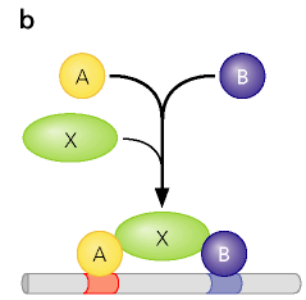
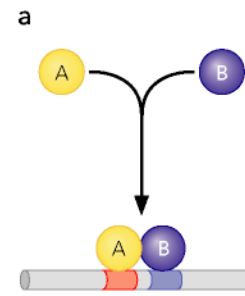


Figure 7-47. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Legame cooperativo degli attivatori

- Gli attivatori agiscono in modo **sinergico**.
- Ciò può avvenire in diversi modi, e con legami cooperativi



# Enhanceosome

- *Architectural proteins* **piegano** il **DNA** in un angolo definito e promuovono il legame di altre proteine
- Solo quando tutte le proteine sono presenti si ha attivazione: esempio di **regolazione combinatoriale**

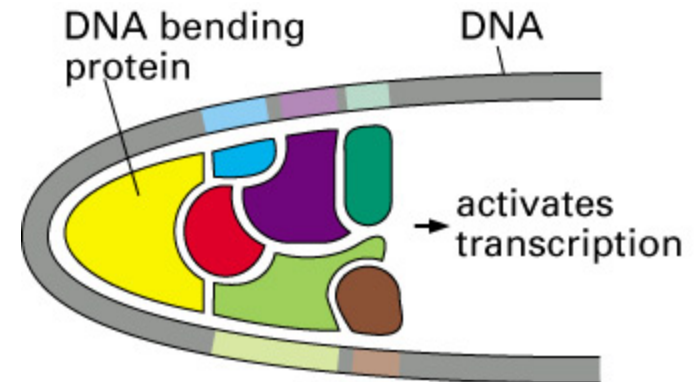
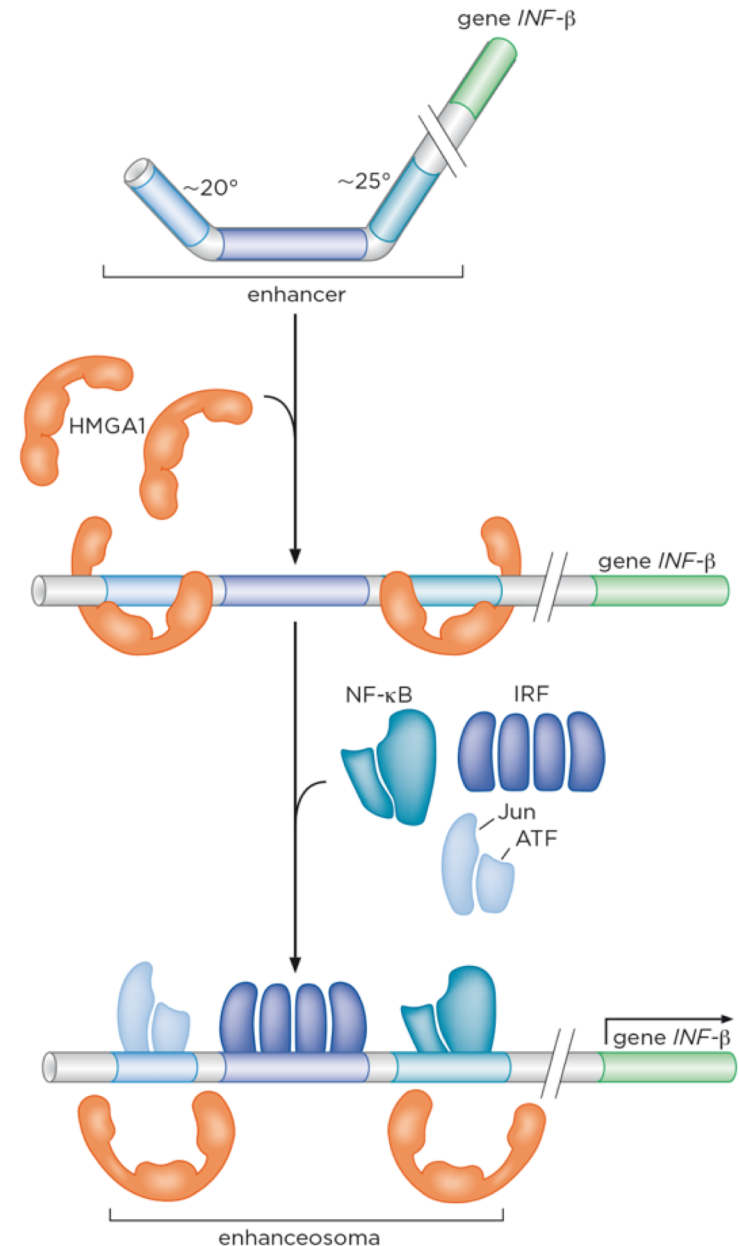
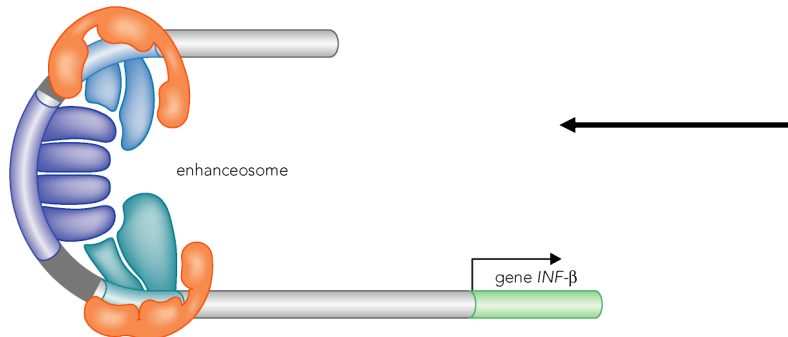


Figure 7-51. Molecular Biology of the Cell,

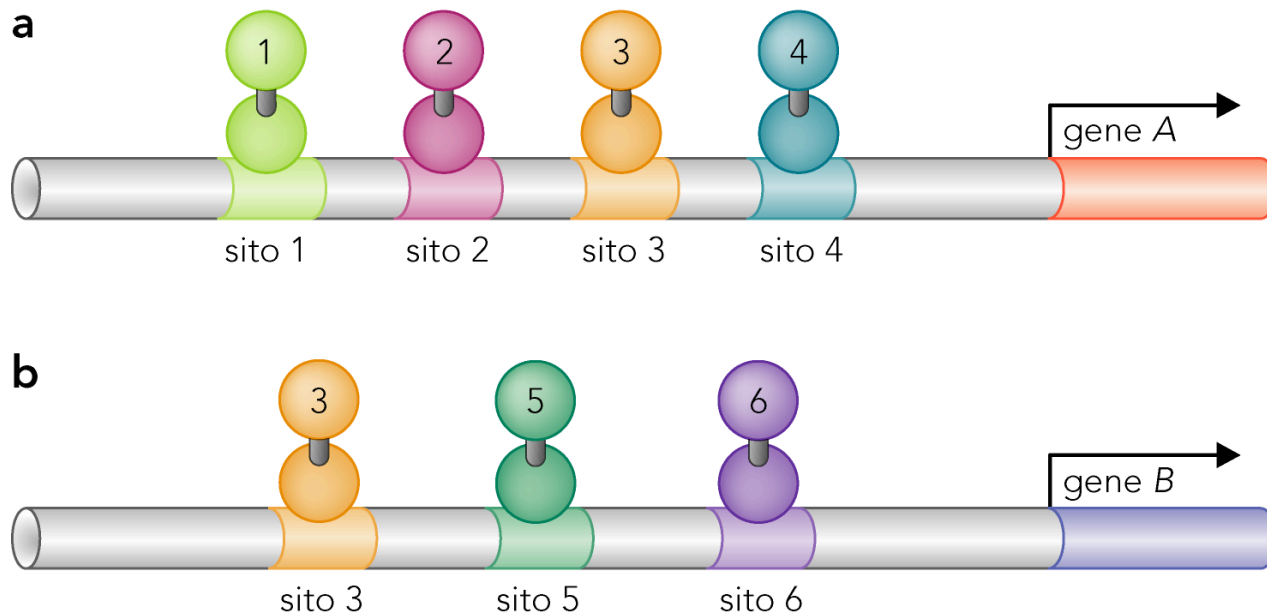
# L'enhanceosome dell'interferone beta

- **INF-beta** è indotto da infezione virale
- In seguito all'infezione c'è produzione di **NF- $\kappa$ B**, **IRF** e **Jun/ATF** (attivatori trascrizionali)
- Questi si legano ad un sito 1 kb upstream il promotore in un complesso cui partecipa HMGA, un **fattore architetturale** che lega il DNA attraverso il solco minore

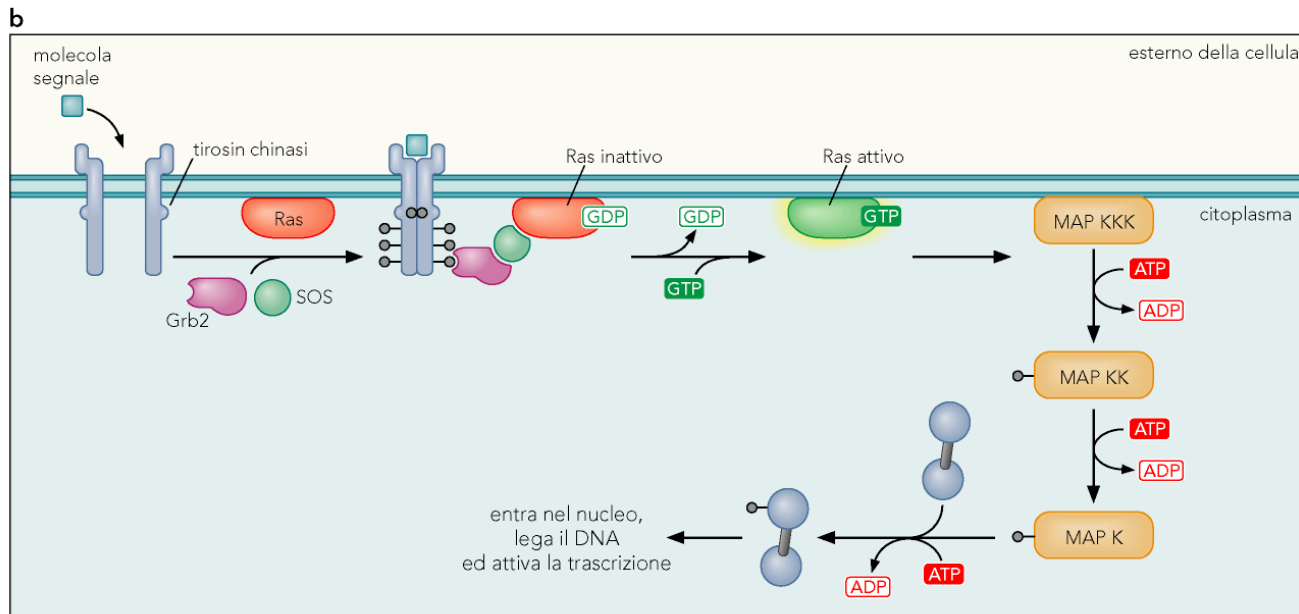
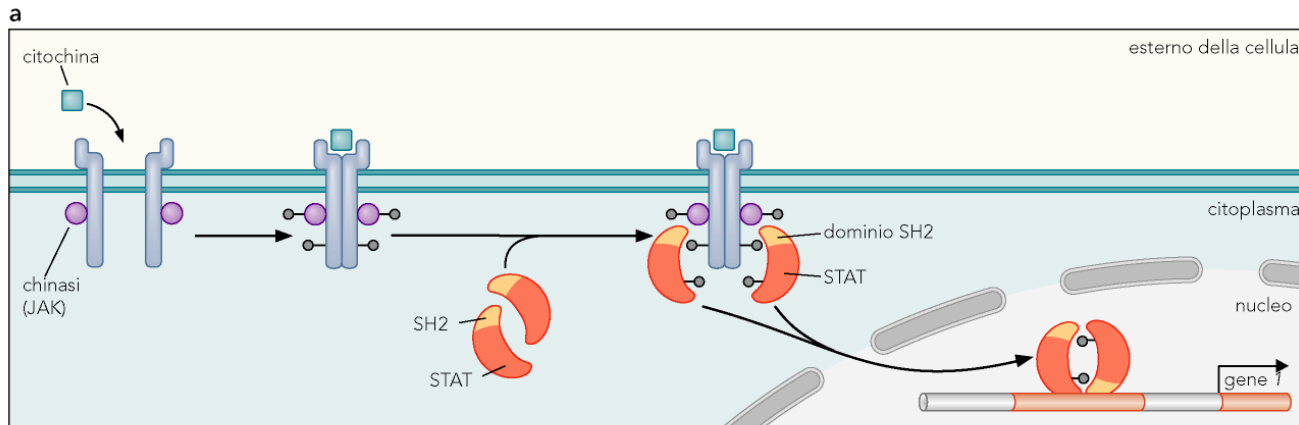


# Controllo combinatorio

- Il controllo combinatoriale è fondamentale per la diversità e complessità
- Nell'esempio il sito 3 è in comune nei due geni

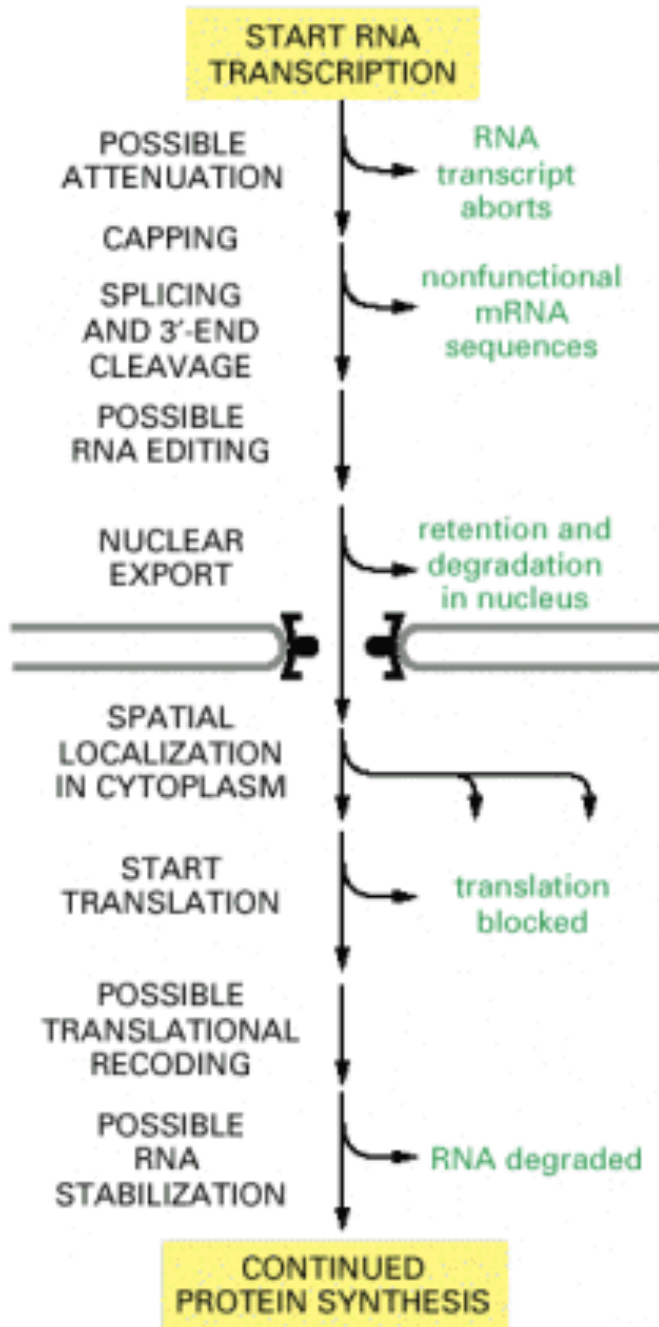


# Trasduzione del segnale e controllo dei regolatori trascrizionali

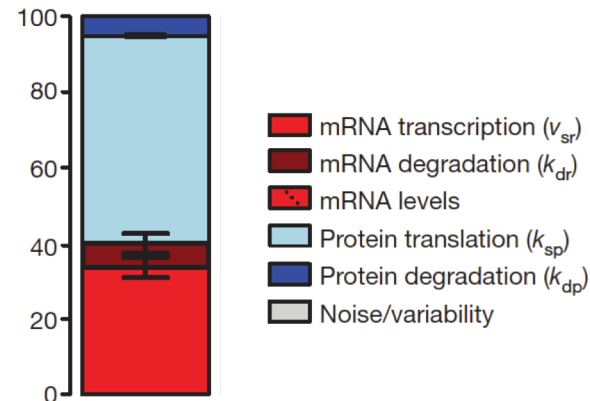




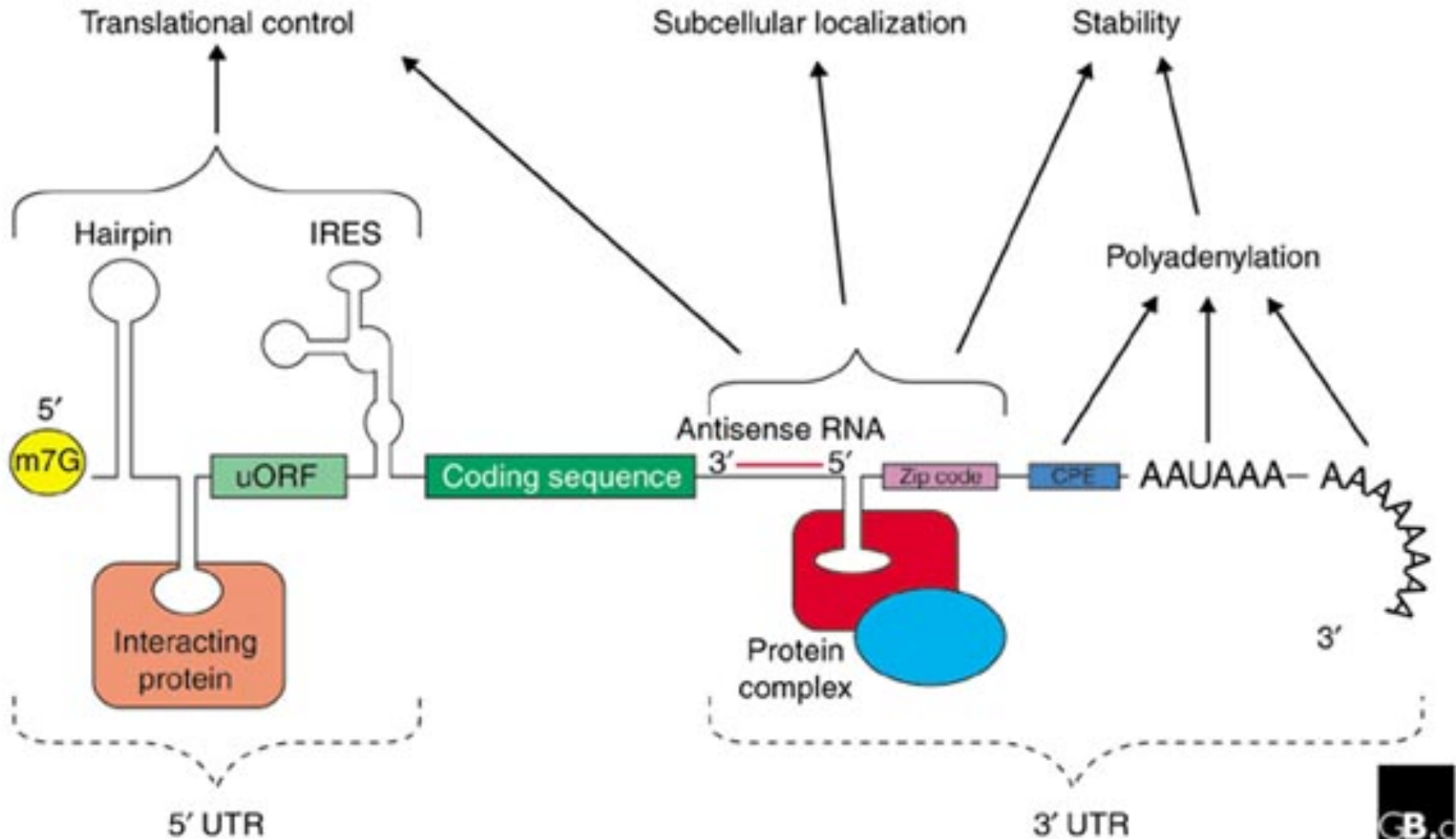
# Possible post-transcriptional controls on gene expression



Only a few of these controls are likely to be important for any one gene.

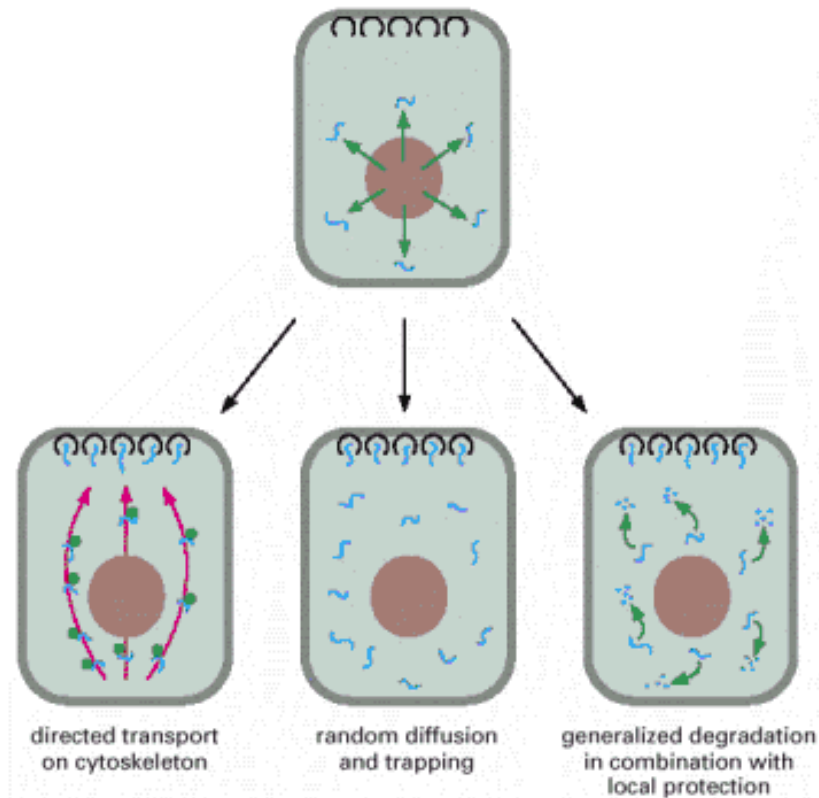


# mRNA structure



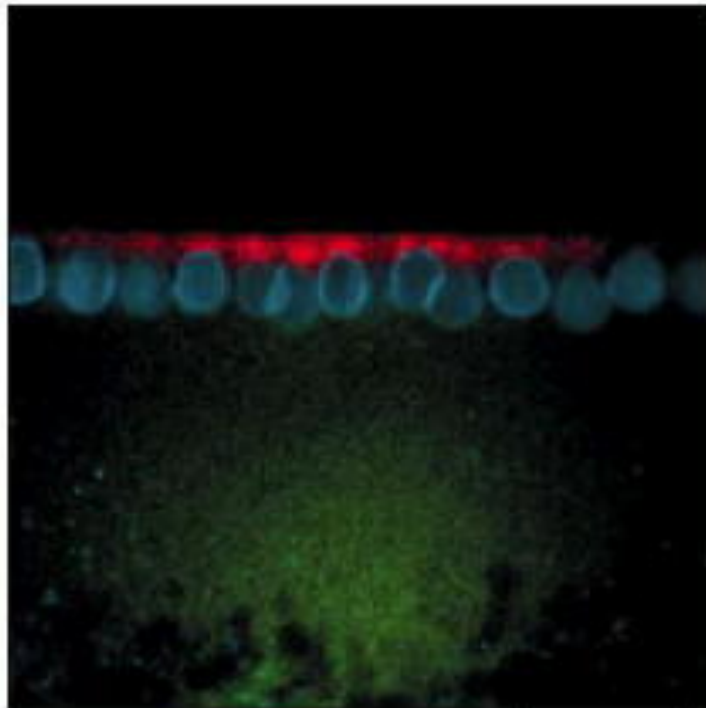
**IRES:** internal ribosomal entry site; **uORF:** upstream ORF

# Three mechanisms for the localization of mRNAs

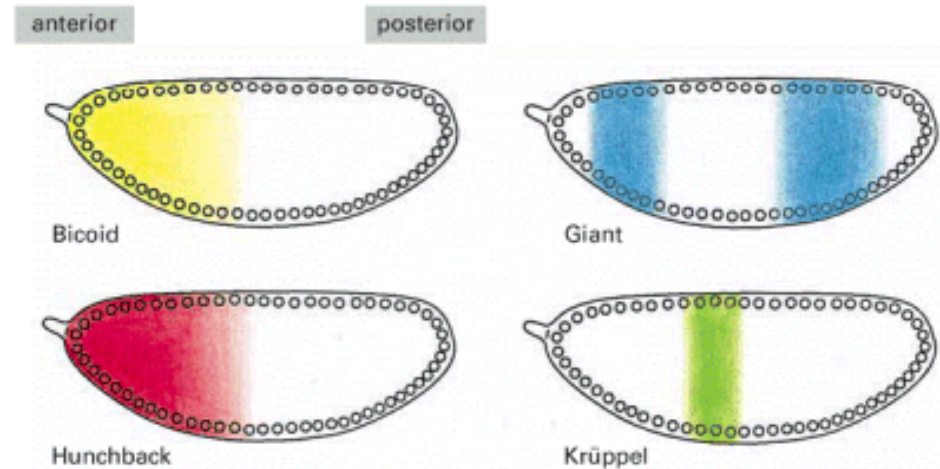


The mRNA to be localized leaves the nucleus through nuclear pores (*top*). Some localized mRNAs (*left diagram*) travel to their destination by **associating with cytoskeleton motors** (*green*). These motors use the energy of ATP hydrolysis to move unidirectionally along components of the cytoskeleton. At their destination, the mRNAs are held in place by anchor proteins (*black*). Other mRNAs **randomly diffuse through the cytosol** and are simply trapped and therefore concentrated at their sites of localization (*center diagram*). Still other mRNAs (*right diagram*) **are degraded in the cytosol unless they have bound**, through random diffusion, a localized protein complex that anchors and protects the mRNA from degradation (*black*). Each of these mechanisms requires **specific signals on the mRNA**, which are **typically located in the 3' UTR**. In many cases of mRNA localization, additional mechanisms block the translation of the mRNA until it is properly localized.

# The importance of the 3' UTR in localizing mRNAs to specific regions of the cytoplasm

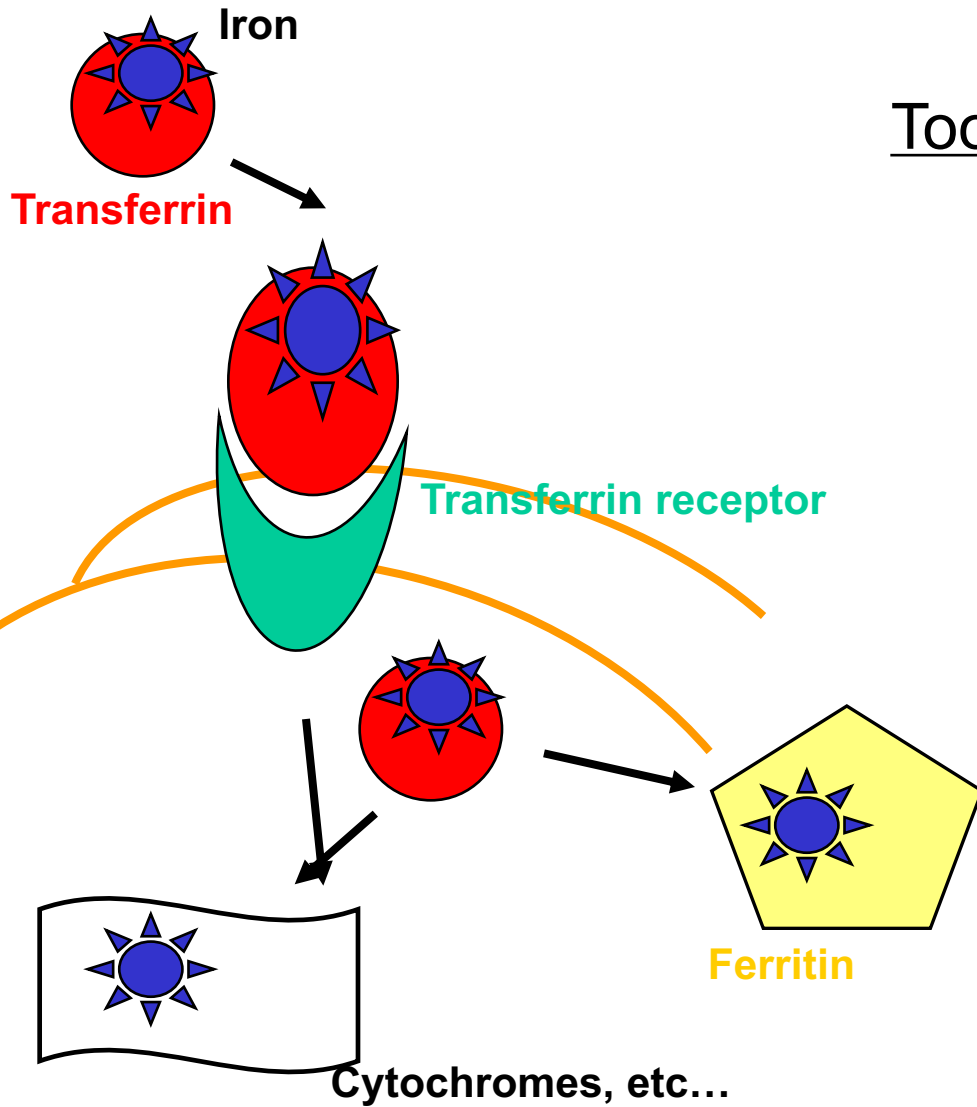


20  $\mu$ m



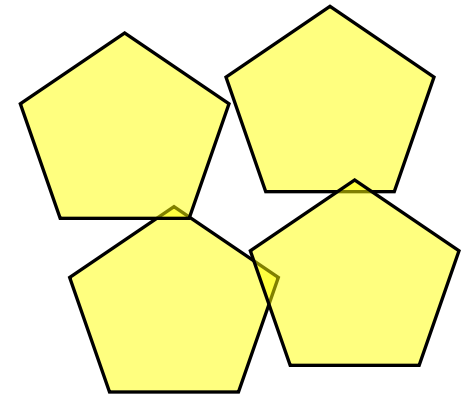
For this experiment, two different fluorescently-labeled RNAs were prepared by transcribing DNA *in vitro* in the presence of fluorescently-labeled derivatives of UTP. One RNA (labeled with a **red** fluorochrome) contains the **coding region** for the *Drosophila* **hairy protein** and includes the **adjacent 3' UTR**. The other RNA (labeled **green**) contains the hairy **coding region** but the **3' UTR has been deleted**. The two RNAs were mixed and injected into a *Drosophila* embryo at a stage of development when multiple nuclei reside in a common cytoplasm. When the fluorescent RNAs were visualized 10 minutes later, the full-length hairy RNA (**red**) was localized to the apical side of nuclei (**blue**) but the transcript missing the 3' UTR (**green**) failed to localize. **Hairy is one of many gene regulatory proteins that specifies positional information in the developing *Drosophila* embryo.** The **localization** of its mRNA is thought to be **critical for proper fly development**.

# IRON HOMEOSTASIS



Too much  $\text{Fe}^{2+}$  in the cell

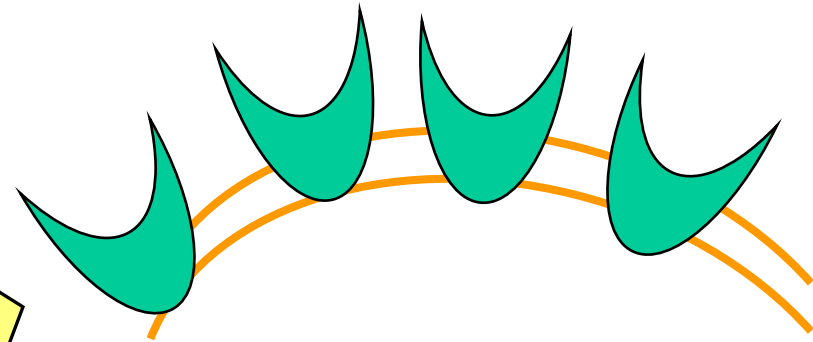
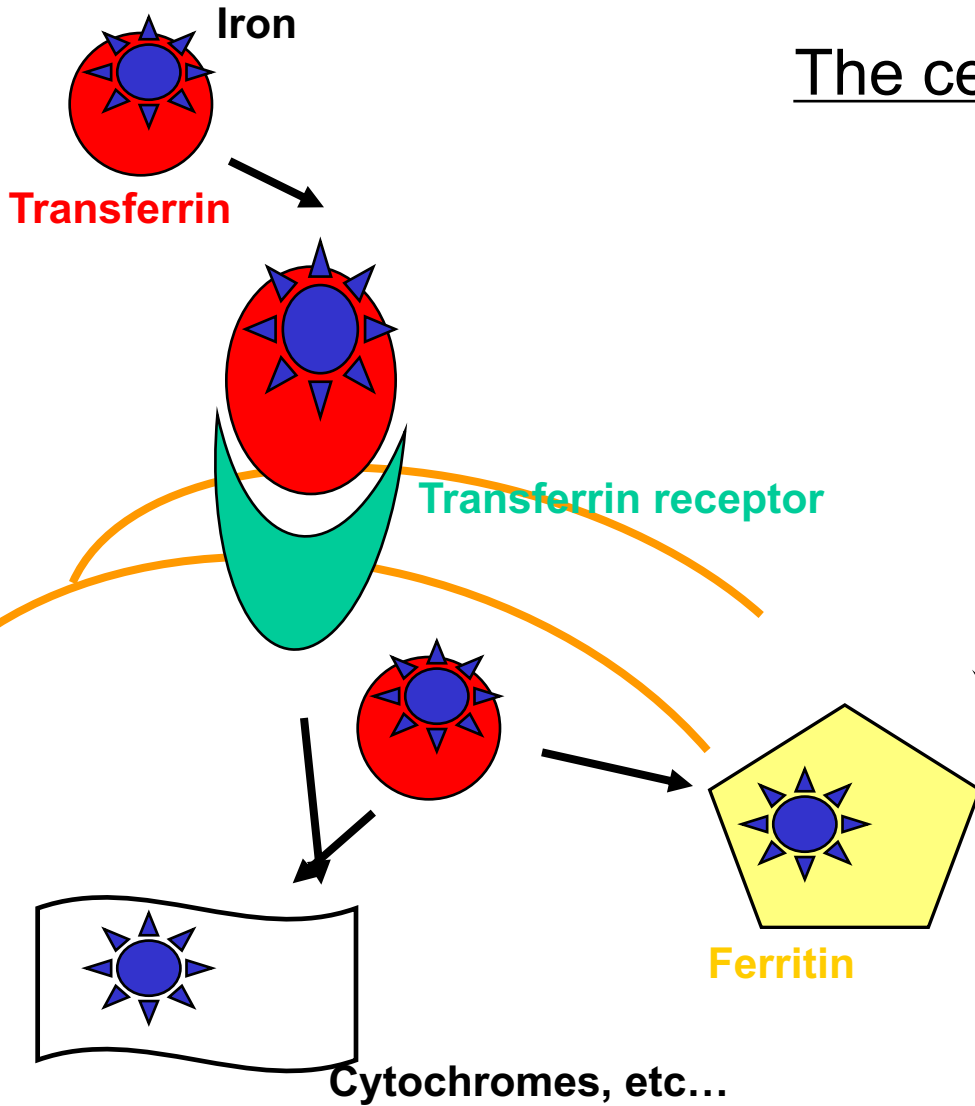
⇒ It increases  
ferritin  
concentration



# IRON HOMEOSTASIS

The cell needs Fe<sup>2+</sup>

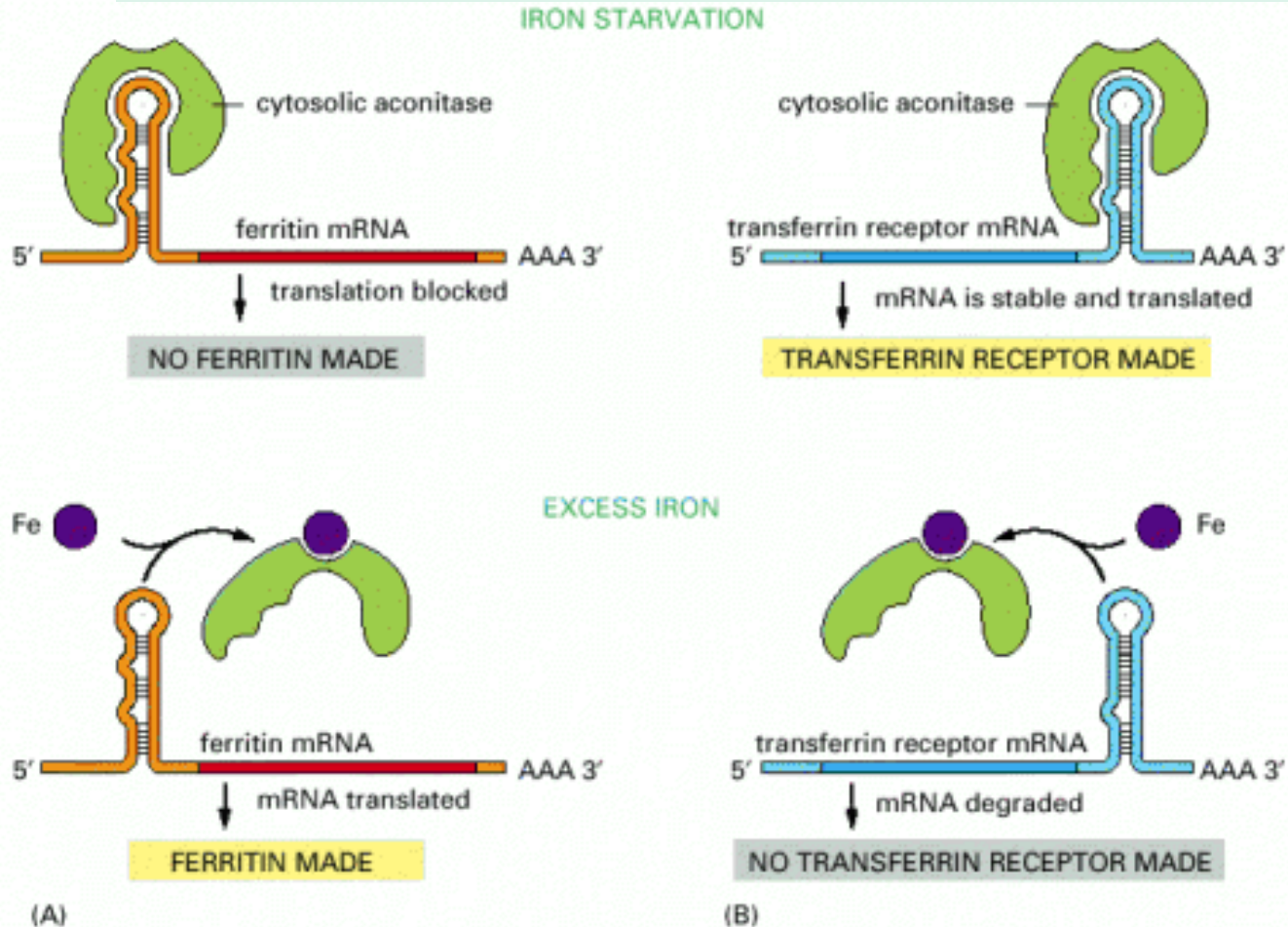
⇒ It increases the concentration of **transferrin receptors**



# Iron-mediated regulation of ferritin and of transferrin receptor

	Transf. Rec.	Transf. Rec.	Ferritin	Ferritin
Conditions	Protein	mRNA	Protein	mRNA
Iron- limited	↑	↑	↓	No change
Iron- sufficient	↓	↓	↑	No change

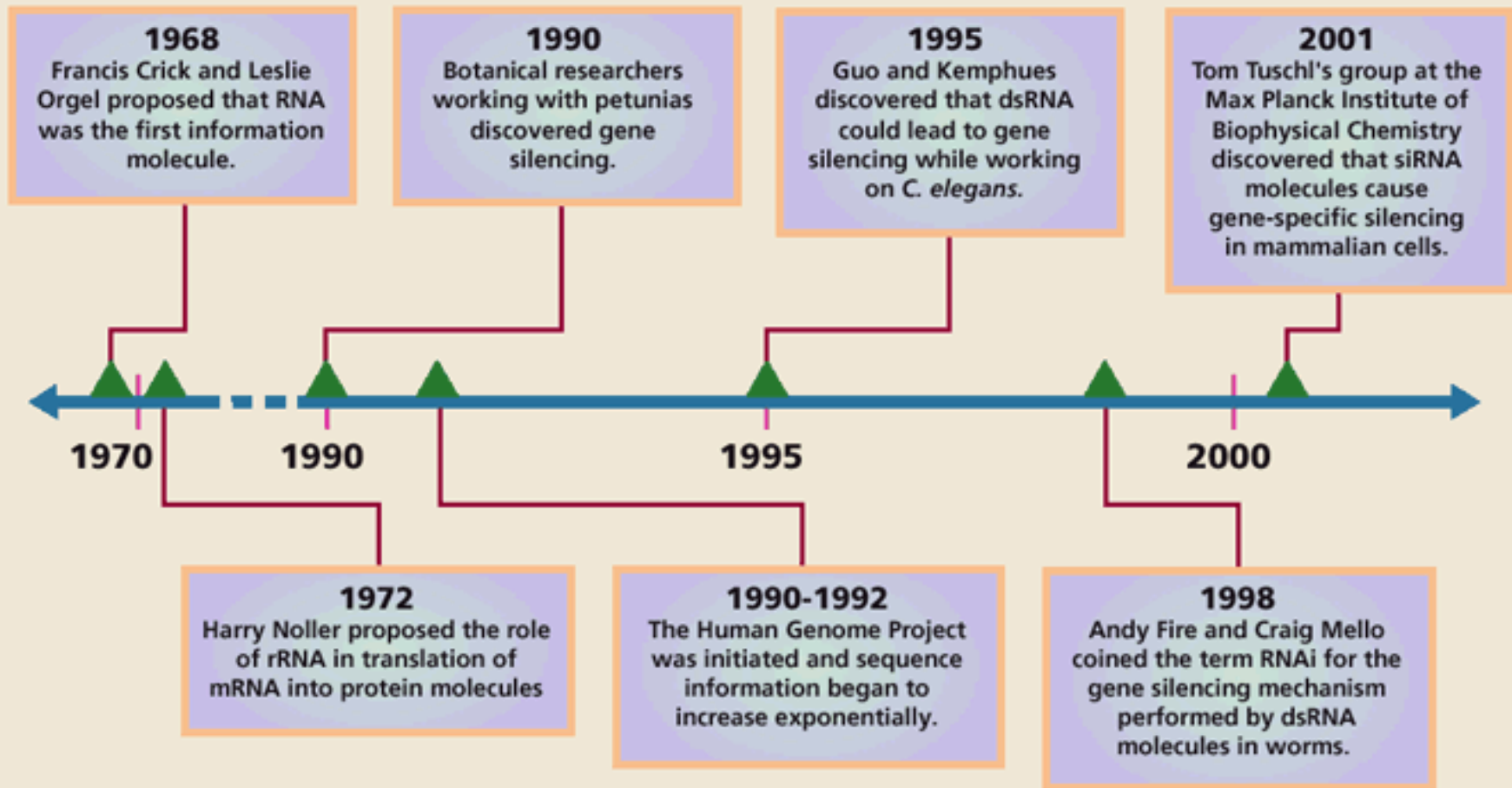
## Two post-transcriptional controls mediated by iron



In response to an increase in iron concentration in the cytosol, a cell increases its synthesis of ferritin in order to bind the extra iron (**A**) and decreases its synthesis of transferrin receptors in order to import less iron across the plasma membrane (**B**). Both responses are mediated by the same iron-responsive regulatory protein, aconitase, which recognizes common features in a stem-and-loop structure in the mRNAs encoding ferritin and transferrin receptor. Aconitase dissociates from the mRNA when it binds iron. But because the transferrin receptor and ferritin are regulated by different types of mechanisms, their levels respond oppositely to iron concentrations even though they are regulated by the same iron-responsive regulatory protein. The binding of aconitase to the 5' UTR of the ferritin receptor mRNA blocks translation initiation; its binding to the 3' UTR of the ferritin receptor mRNA blocks an endonuclease cleavage site and thereby stabilizes the mRNA.



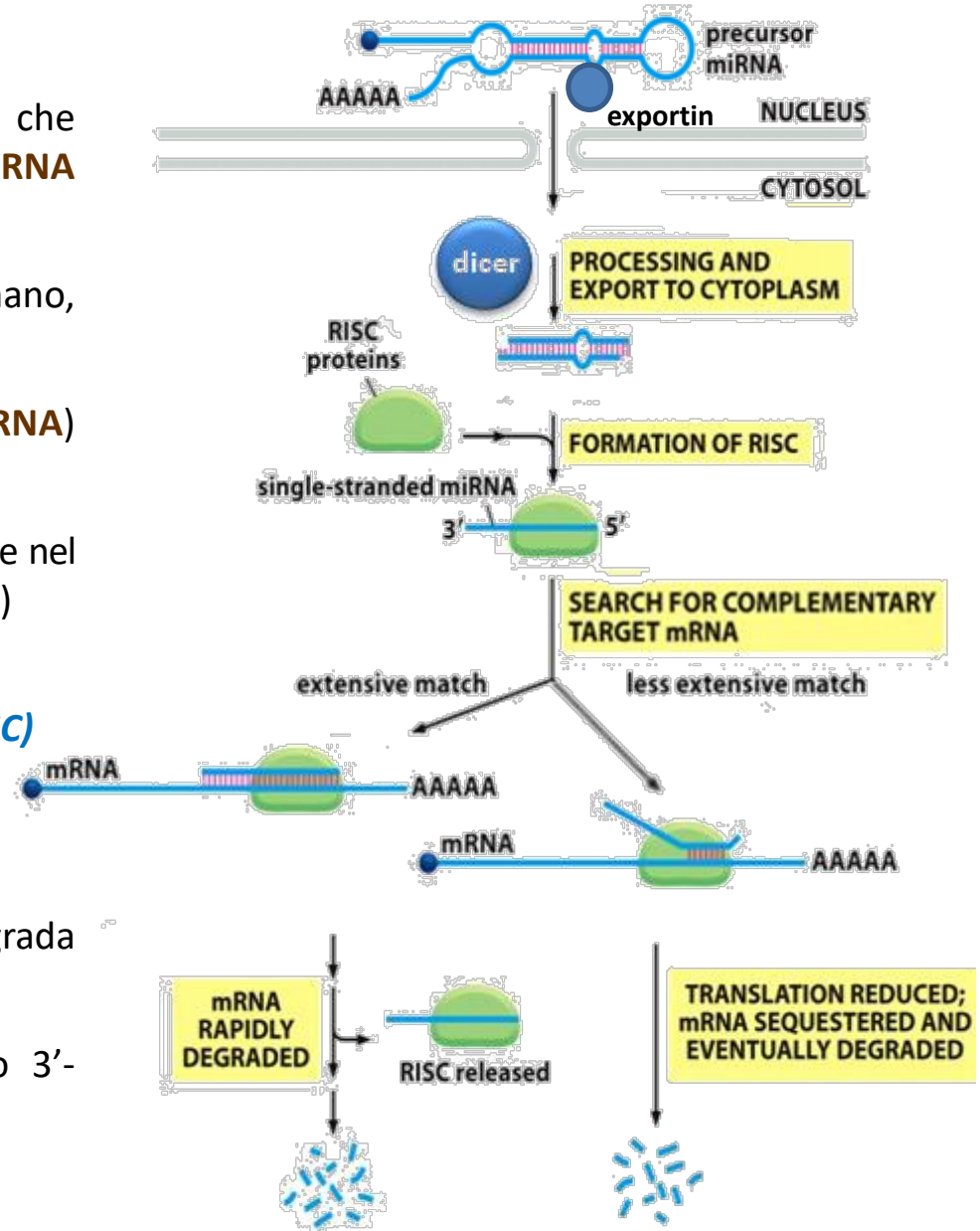
# Timeline for RNAi Discoveries



# RNA interference - RNAi

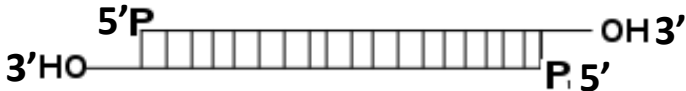
- **microRNA (miRNA)**

- Brevi sequenze di **RNA non-codificante**, che regolano la *traduzione* e *degradazione* dell'**mRNA** bersaglio.
- Si stima ce ne siano oltre 1000 nel genoma umano, e regolano dal 30-60% degli mRNA
- Prodotti come precursori di ca. 70 res. (**pre-miRNA**) e trasportate fuori dal nucleo dalla esportina
- Sono processati da una **endo-ribonucleasi**, presente nel complesso "**Dicer**", in piccoli frammenti ds (~22 res.)
- Questi si associano con subunità proteiche formando l'**RNA-induced silencing complex (RISC)**
- **RISC** si associa agli **mRNA** bersaglio (con tratti di sequenza complementare)
- In base al grado di complementarità, li degrada rapidamente, o impedisce la loro traduzione
- Spesso **miRNA** riconoscono le regioni 5'- UTR o 3'- UTR negli **mRNA** bersaglio



# miRNA e siRNA

## **Short o small interfering RNA (siRNA)** (silencing RNA)

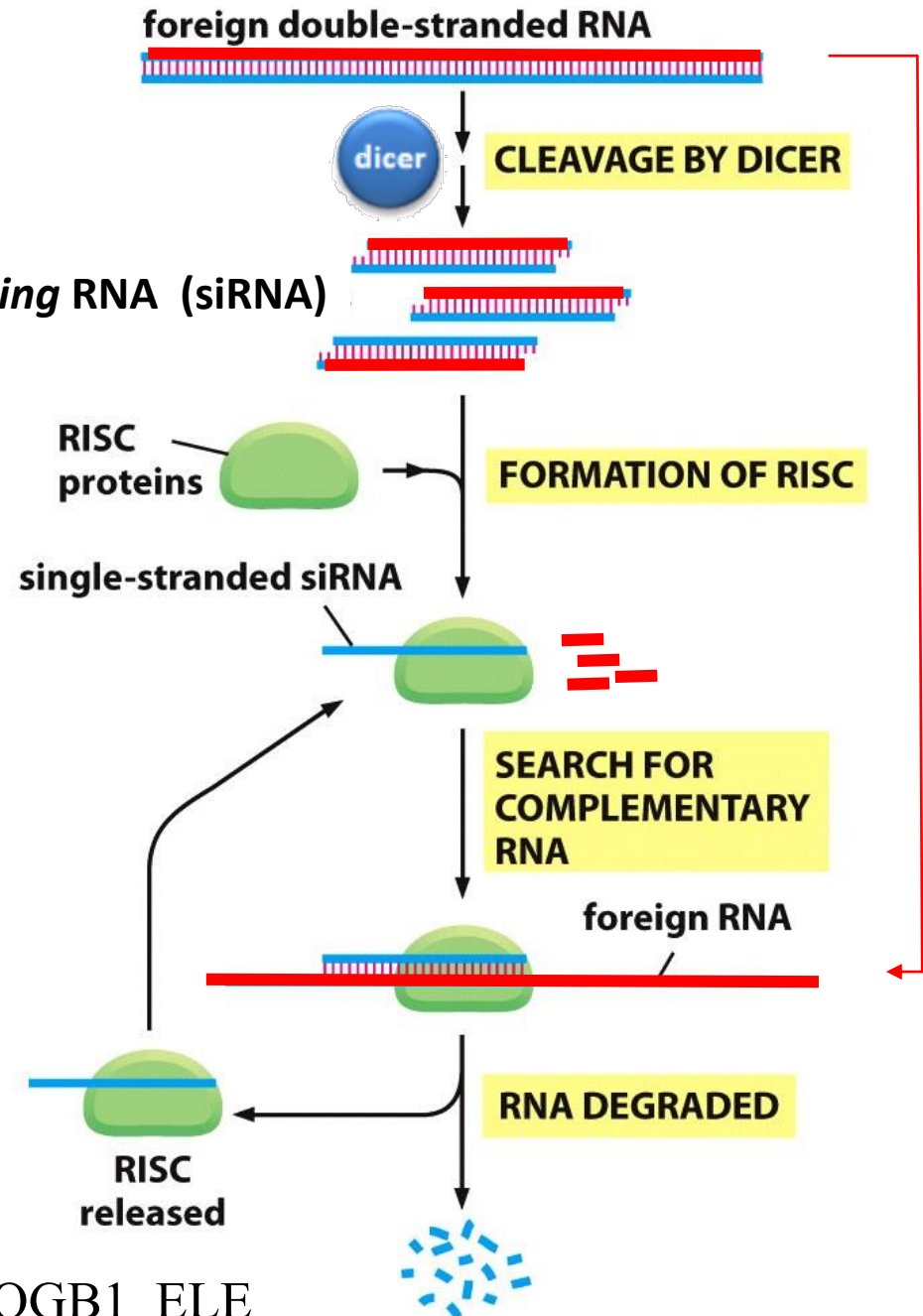
- Si riferisce a **RNA di origine esogeno** (in contrapposizione a **miRNA** di origine endogena)
- Anche l'RNA esogeno a doppia elica (**dsRNA**) può essere processato dalla **endo-ribonucleasi** in «**Dicer**» a piccoli frammenti *double-stranded* di attorno a 20 residui con terminali sfilacciati.
- Quindi, anche se di origine diversa usa un meccanismo simile ai **miRNA**
- I frammenti generati dal **Dicer** si associano a **RISC**, che è in grado di legare ed inattivare solo **mRNA** altamente complementare. A differenza del **miRNA**, che può interferire solo con mRNA simili tra loro, con sequenza altamente complementare.
- È anche un prezioso strumento che permette di inattivare praticamente qualsiasi gene, trasfettando la cellula con **dsRNA** esogeno artificiale. E' quindi un utile strumento per la ricerca ed è considerato avere un forte potenziale terapeutico.

## siRNA – gene silencing

- Meccanismo d'interferenza da **siRNA**

### *Small interfering RNA (siRNA)*

- Il **dsRNA** esogeno è processato da un complesso «*Dicer*» per produrre frammenti brevi di ca 20 residui.
- Questi si separano in frammenti a singola catena riconosciuti da **RISC**
- **RISC** usa questi frammenti per legare l'RNA esogeno a livello della sequenza a loro complementare, e degrada questo RNA
- Il RISC è rilasciato per poter processare altre molecole del RNA esogeno



# Video

## **Sito Zanichelli**

Struttura dei domini proteici – Il dominio a dita di zinco

Struttura dei domini proteici – La cerniera di leucine

Struttura dei domini proteici –  
L'omeodominio

# miRNA Details

- Originate from capped & polyadenylated full length precursors (pri-miRNA)
- Hairpin precursor ~70 nt (pre-miRNA)
- Mature miRNA ~22 nt (miRNA)
- First discovered in 1993 by Victor Ambros at Harvard (*lin-4*)
- *Let-7* discovered in 2000 by Frank Slack as a postdoc at Harvard (Ruvkun lab)

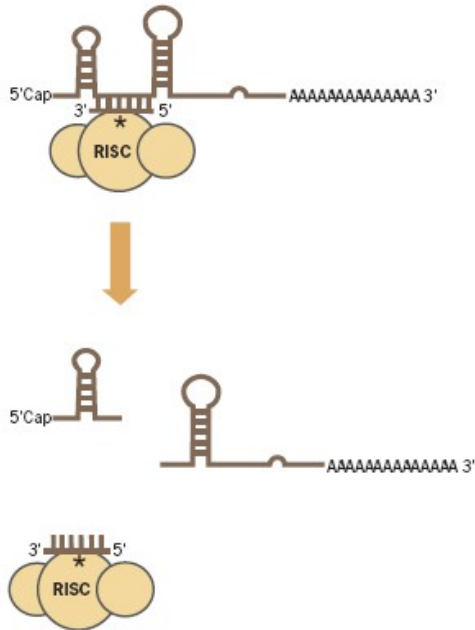
# What are the functions of miRNA?

- Involved in the post-transcriptional regulation of gene expression
- Important in development
- Metabolic regulation (miR-375 & insulin secretion)
- Multiple genomic loci (different expression patterns?)

# Differences in miRNA Mode of Action

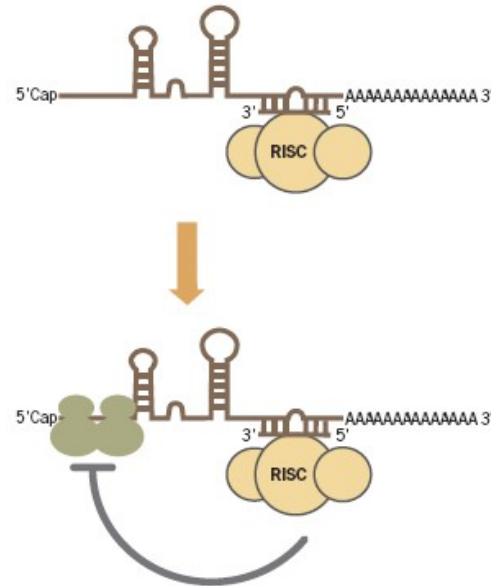
Common in plants

mRNA degradation



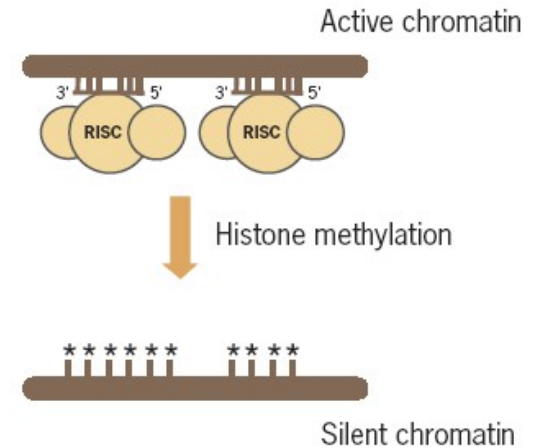
Common in animals

Translational regulation



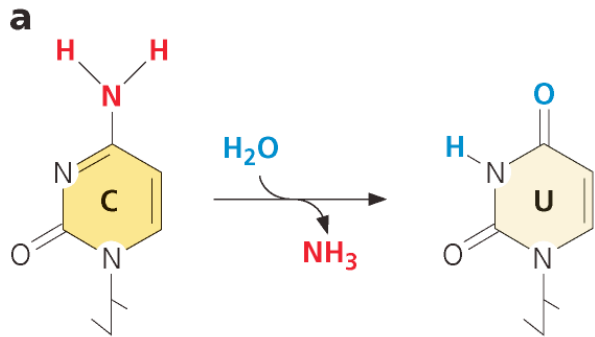
Common in yeast and plants, and possibly animals.

Transcriptional regulation

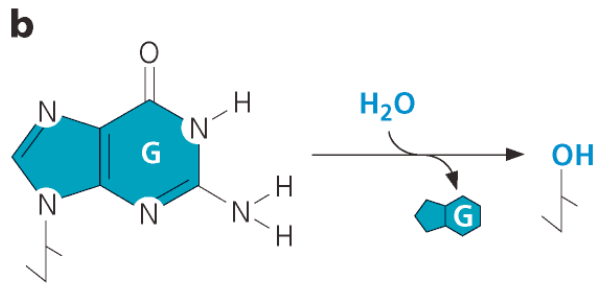




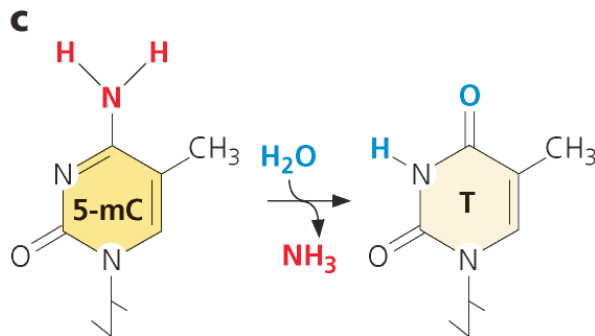
### 3. Agenti chimici: idrolisi



Danno da **idrolisi** del DNA:  
a) **Deamminazione** della C, ma anche di altre basi  
b) **Depurinazione** della G



Portano tutte (quasi) alla formazione di basi non naturali per il DNA.



# Distribuzione della cromatina

I domini ad ansa di eterocromatina trascrizionalmente **inattiva** sono generalmente associati alla lamina (LAD) o al nucleolo (NAD).

I domini trascrizionalmente **attivi** sono invece localizzati all'interno del nucleo.

