

LA REGOLAZIONE GENICA DEGLI EUCARIOTI

parte I

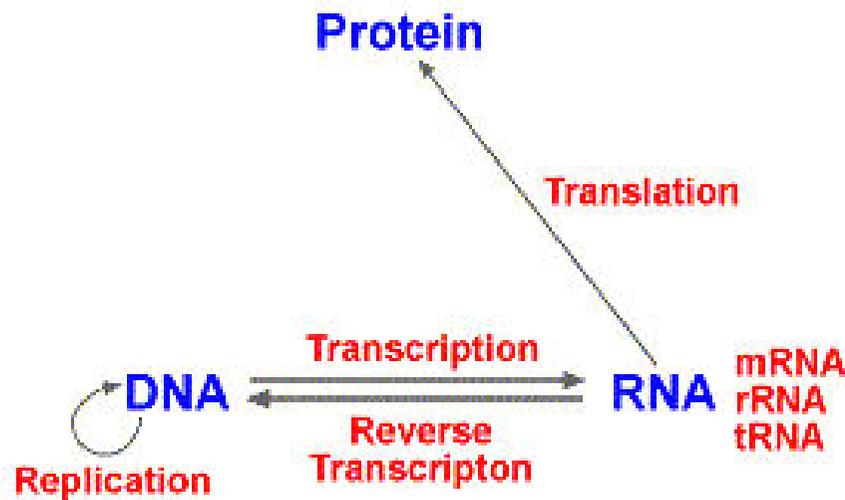
www.fisiokinesiterapia.biz

NON TUTTI I GENI VENGONO UTILIZZATI NELLO STESSO MOMENTO E NON TUTTI CON LA STESSA “INTENSITÀ”

Regolazione genica = la modalità con cui viene **REGOLATA** qualità (tipo) e quantità dei prodotti genici

Prodotto genico = RNA e/o proteina (in ultima analisi)

RICORDIAMO IL DOGMA CENTRALE DELL'INFORMAZIONE GENETICA:



Esistono più tipi di RNA, tutti trascritti nel nucleo:

- RNA ribosomiali
- RNA transfer
- RNA messaggeri
- Piccoli RNA nucleari
- Piccoli RNA citoplasmatici

Regolazione Genica negli Eucarioti

Finalità:

- Specializzazione (differenziamento)
- Risposta ai cambiamenti ambientali
- Variazioni funzionali

Logica:

- Flessibilità di risposta

Base fisiologica:

- La maggior parte dei geni è repressa e viene espressa “a scalini”
- I geni regolati sono soggetti a controllo positivo e negativo

COMBINATORIO

- Vi è una barriera tra nucleo e citoplasma
- Gli mRNA possono avere anche vita lunga

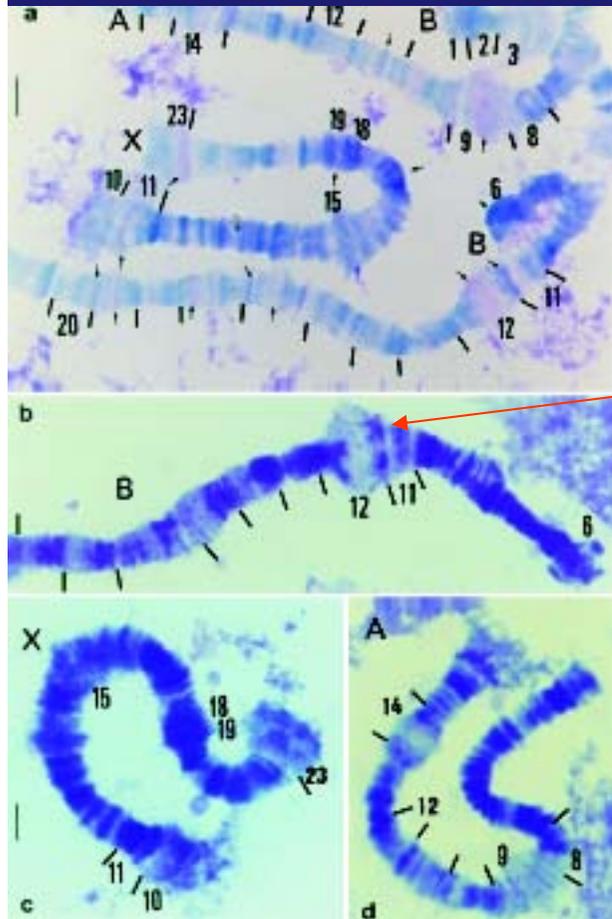
Livelli di regolazione genica degli Eucarioti

- Modificazioni del DNA in cellule somatiche
- Controllo pre-trascrizionale
- Controllo trascrizionale
- Controllo della maturazione dell'mRNA (in particolare dello splicing)
- Controllo del trasporto nel citoplasma
- Controllo della localizzazione dell'mRNA
- Controllo della stabilità (ossia della vita media) dell'mRNA
- Controllo della traduzione (utilizzo, inizio, allungamento, terminazione)
- Controllo co- e post-traduzionale: sede, stabilità del prodotto proteico e sua degradazione

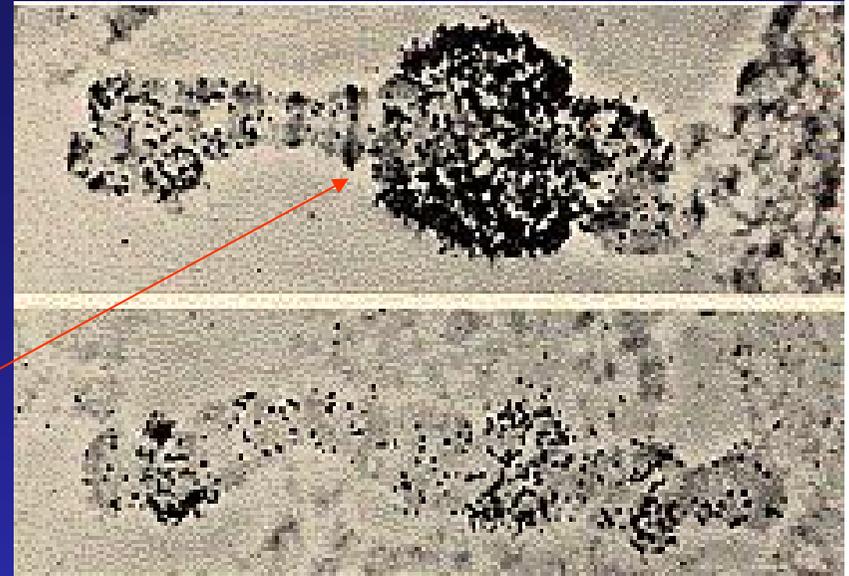
Livelli di regolazione genica degli Eucarioti

- Modificazioni del DNA in cellule somatiche
 - amplificazione genica
 - ricombinazione genica
 - delezioni specifiche nei pre-linfociti
 - inserzioni di genomi virali

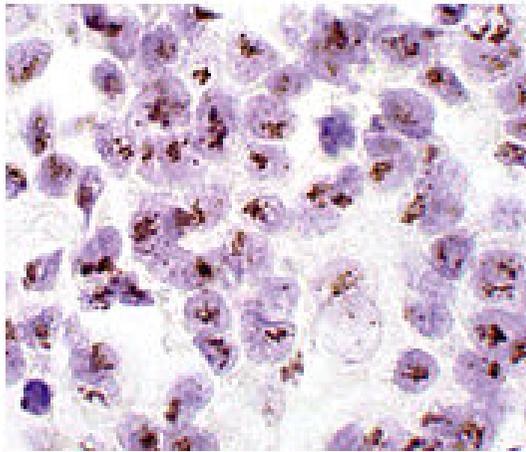
Amplificazione genica nei cromosomi politenici di *Drosophila*



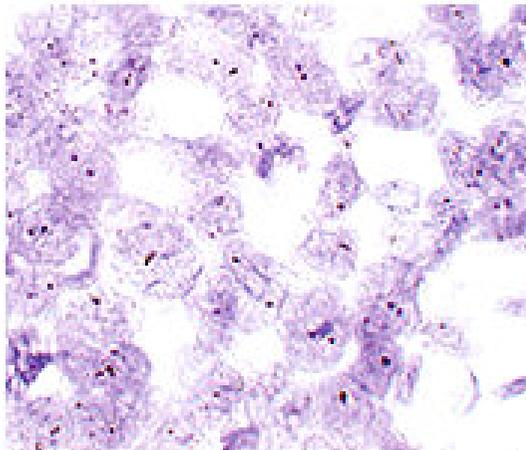
“puff”



ESEMPIO DI AMPLIFICAZIONE GENICA DI ONCOGENI



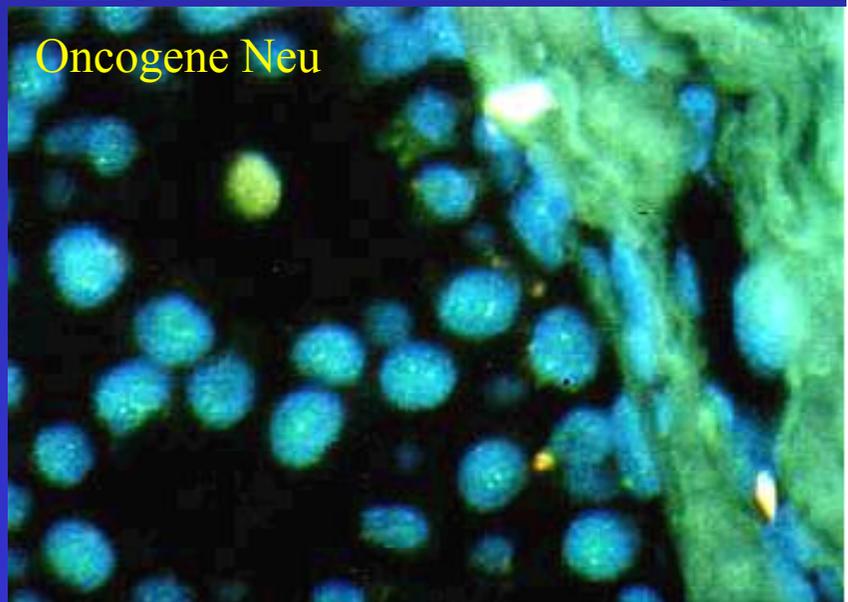
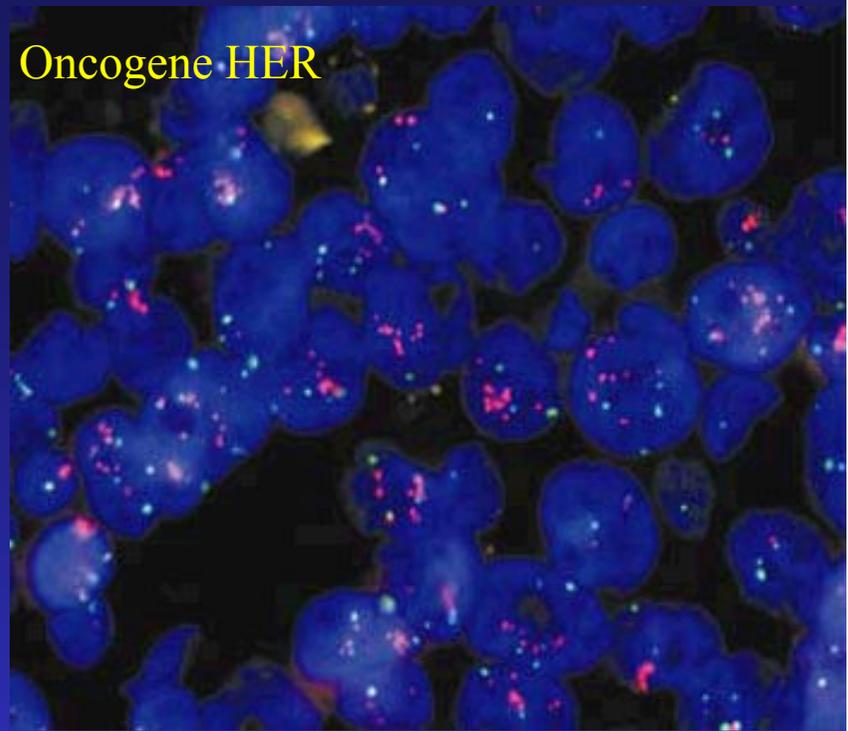
HER2 gene amplification: clusters or >10 signals per nucleus, formalin-fixed paraffin-embedded tissue. No confirmation with Chromosome 17 necessary.



No HER2 gene amplification: 2 signals per nucleus. No confirmation with Chromosome 17 necessary. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.

Cellule tumorali
Oncogene HER2

Cellule normali
Oncogene HER2



Eventi di ricombinazione e di delezione si verificano nei geni codificanti gli anticorpi

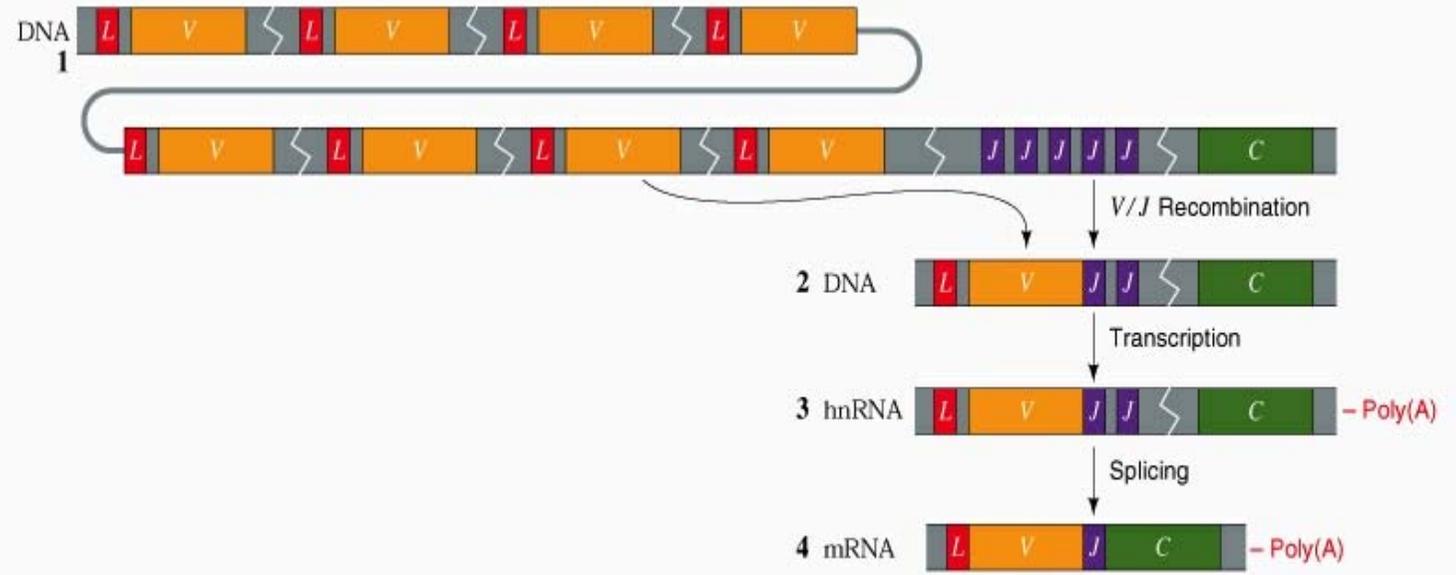
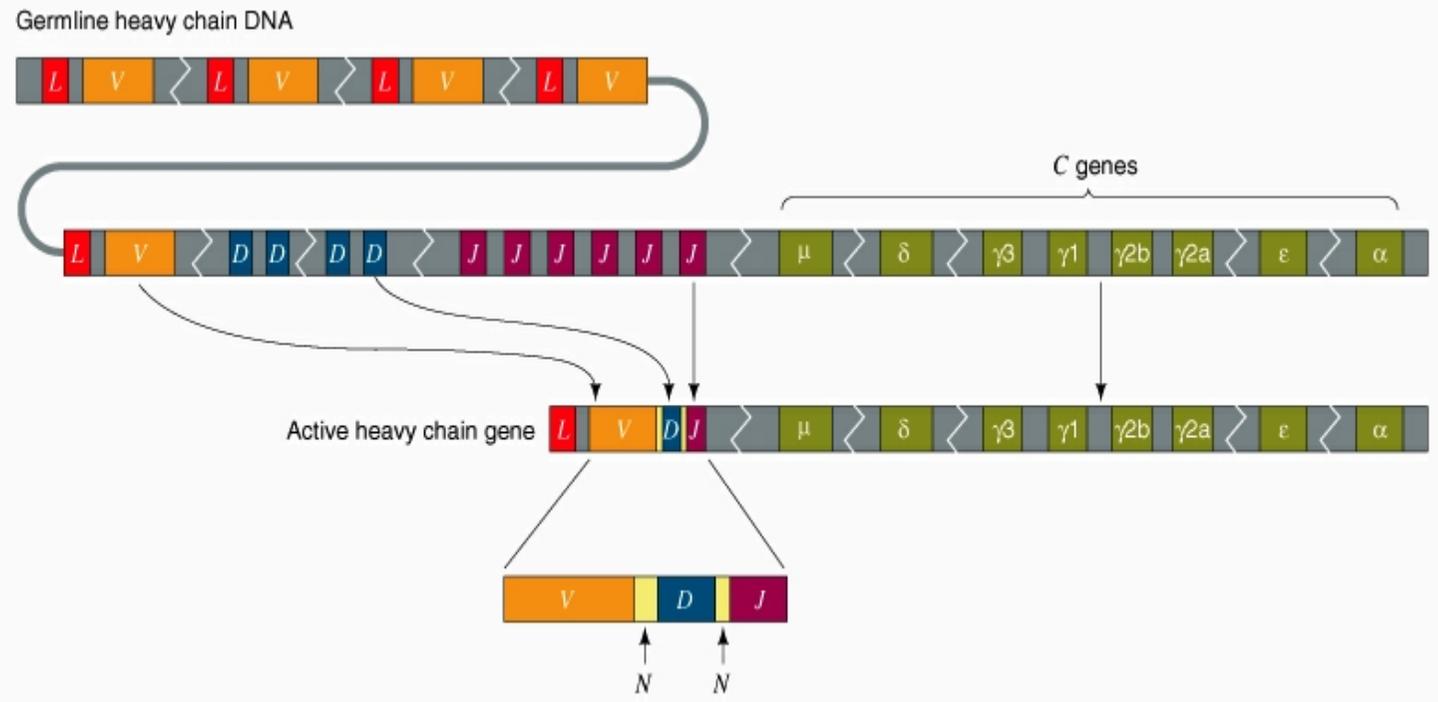
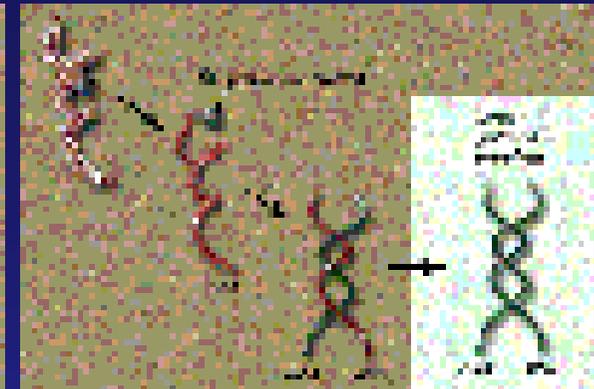
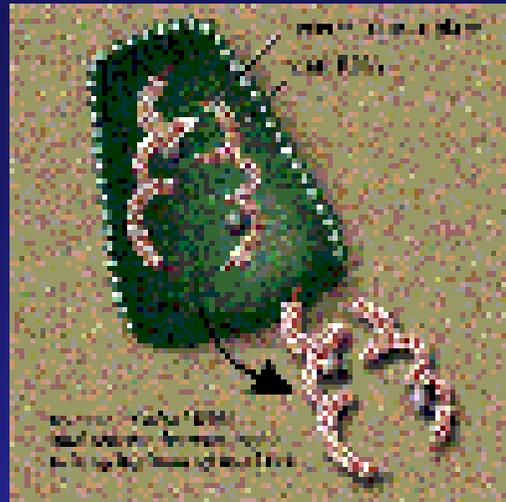
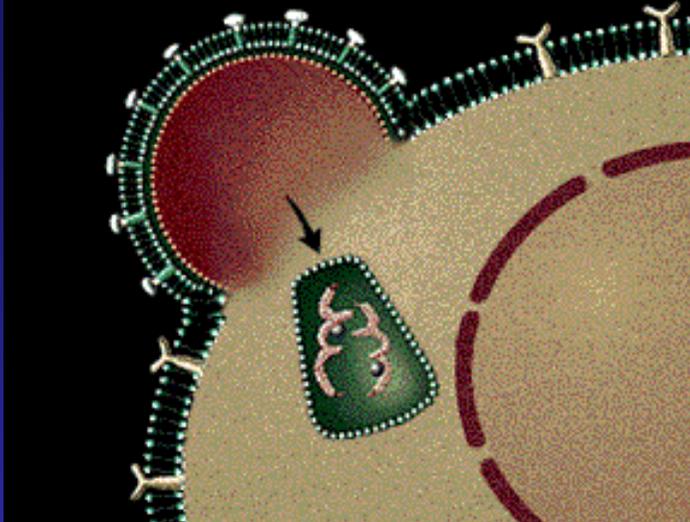


Figure 27-37. The organization and rearrangement of the κ chain gene family in mice.



HIV releases genetic material contained in a protein core into target CD4 cell cytoplasm



1

2

3

L'integrazione del genoma di HIV

- 1- penetration
- 2- uncoating
- 3- reverse transcription
- 4- integration in the host genome



4

Livelli di regolazione genica degli Eucarioti

-Controllo pre-trascrizionale

-Accessibilità della cromatina (controllo epigenetico)

-eterocromatina ed eucromatina

-regioni eterocromatiche costitutive (es. telomeri)

-silenziatori

-isolatori

-modificazioni degli istoni

-metilazione delle isole CpG

-”geografia” specifica del nucleo

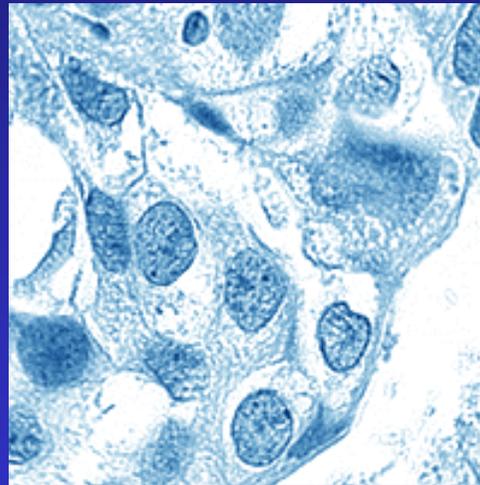
-localizzazione dei singoli cromosomi e loro rapporti

-aree di trascrizione e di maturazione

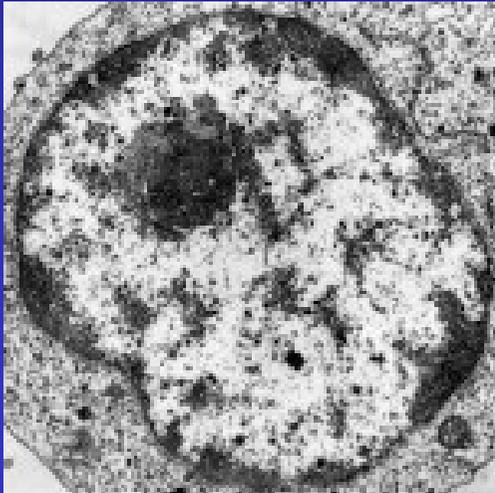
Eucromatina ed eterocromatina

A: Immagine al microscopio ottico di cellule con nuclei a cromatina finemente dispersa

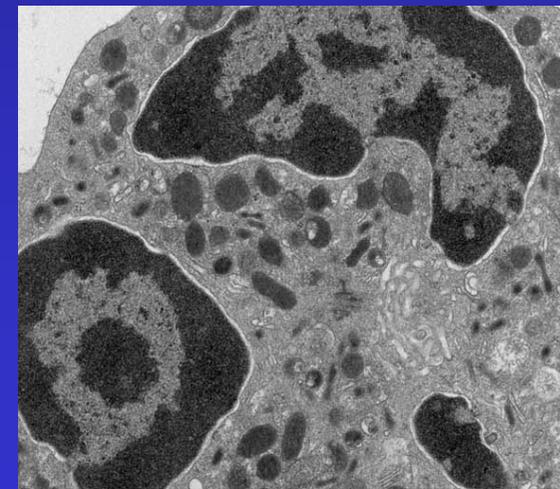
B e C: Immagini al microscopio elettronico a trasmissione di un nucleo rotondeggiante e poco eterocromatico di un linfocita (B) e di un nucleo segmentato e molto eterocromatico di un granulocita (C)



A



B



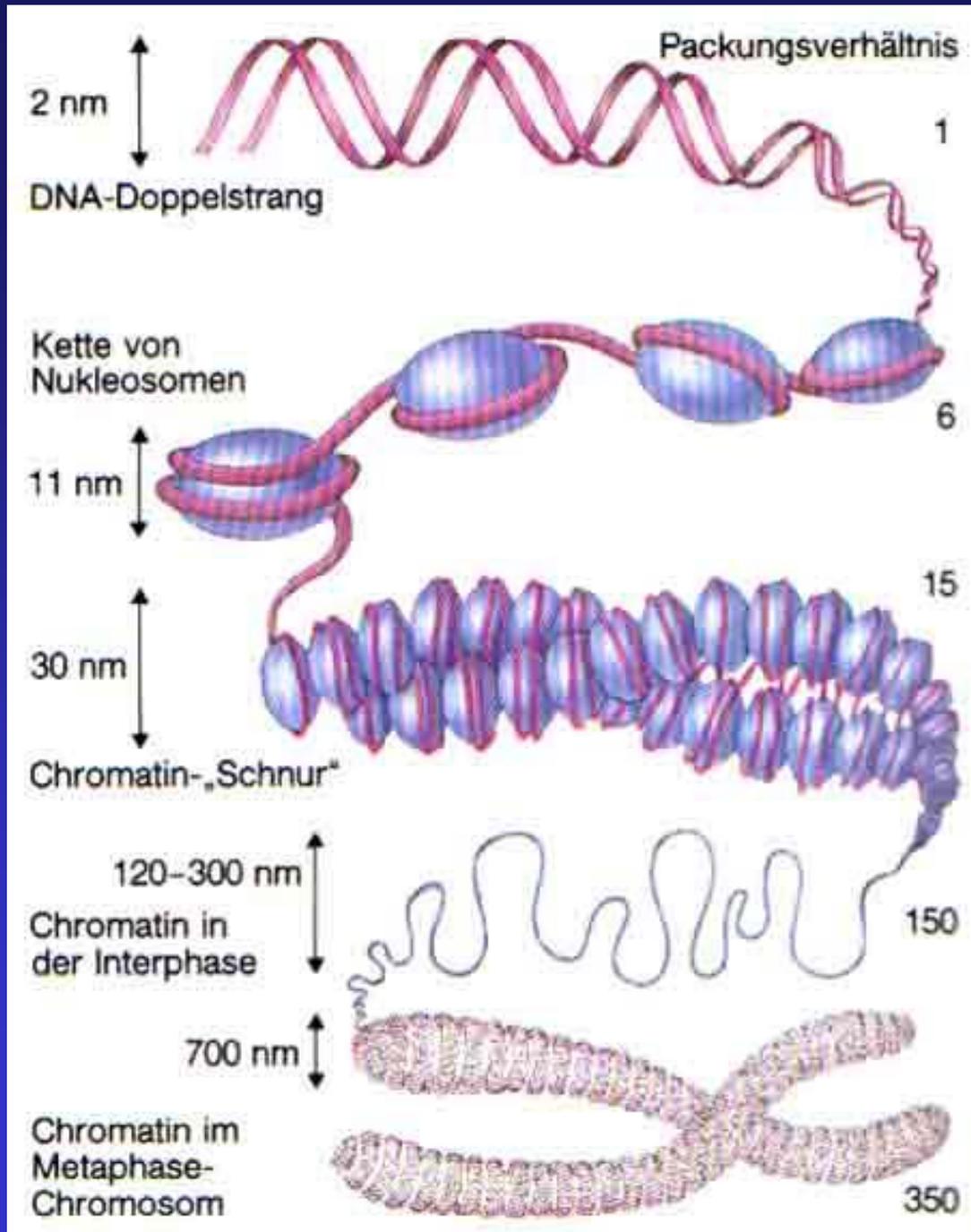
C

struttura della cromatina - interazione proteine-DNA

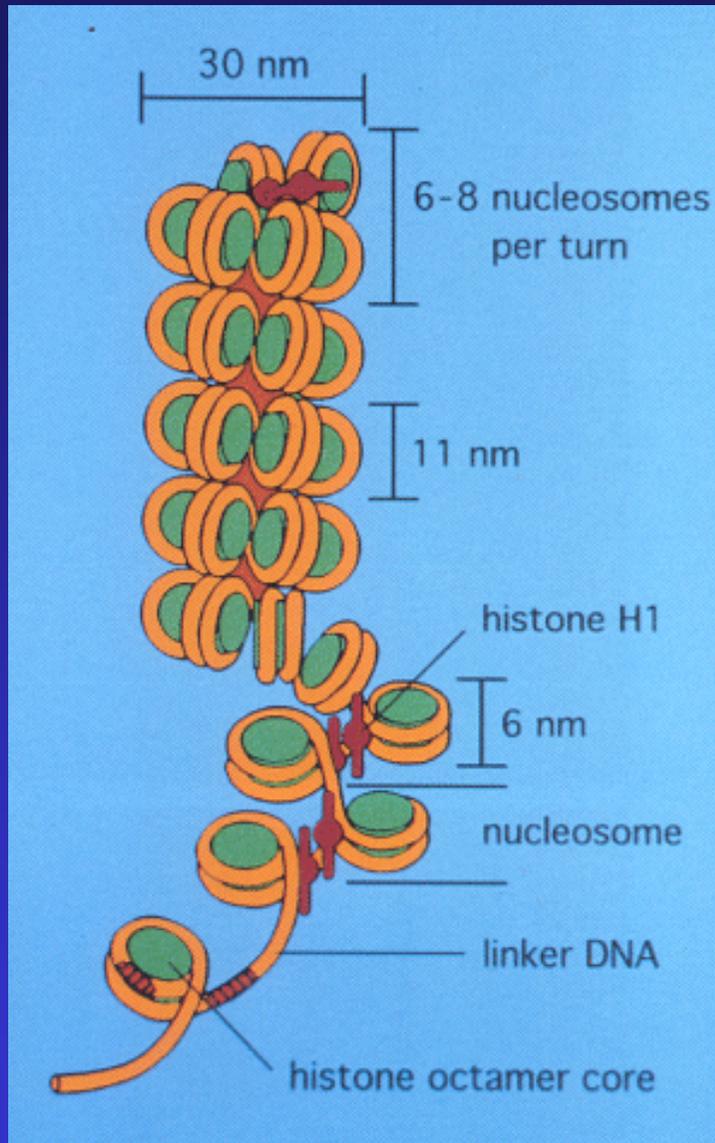
http://www.bmb.psu.edu/faculty/tan/lab/gallery_protdna.html

I livelli di condensazione della cromatina

La cromatina dei cromosomi interfascici forma delle anse di alcune migliaia di nucleotidi, organizzate intorno ad un asse proteico di impalcatura



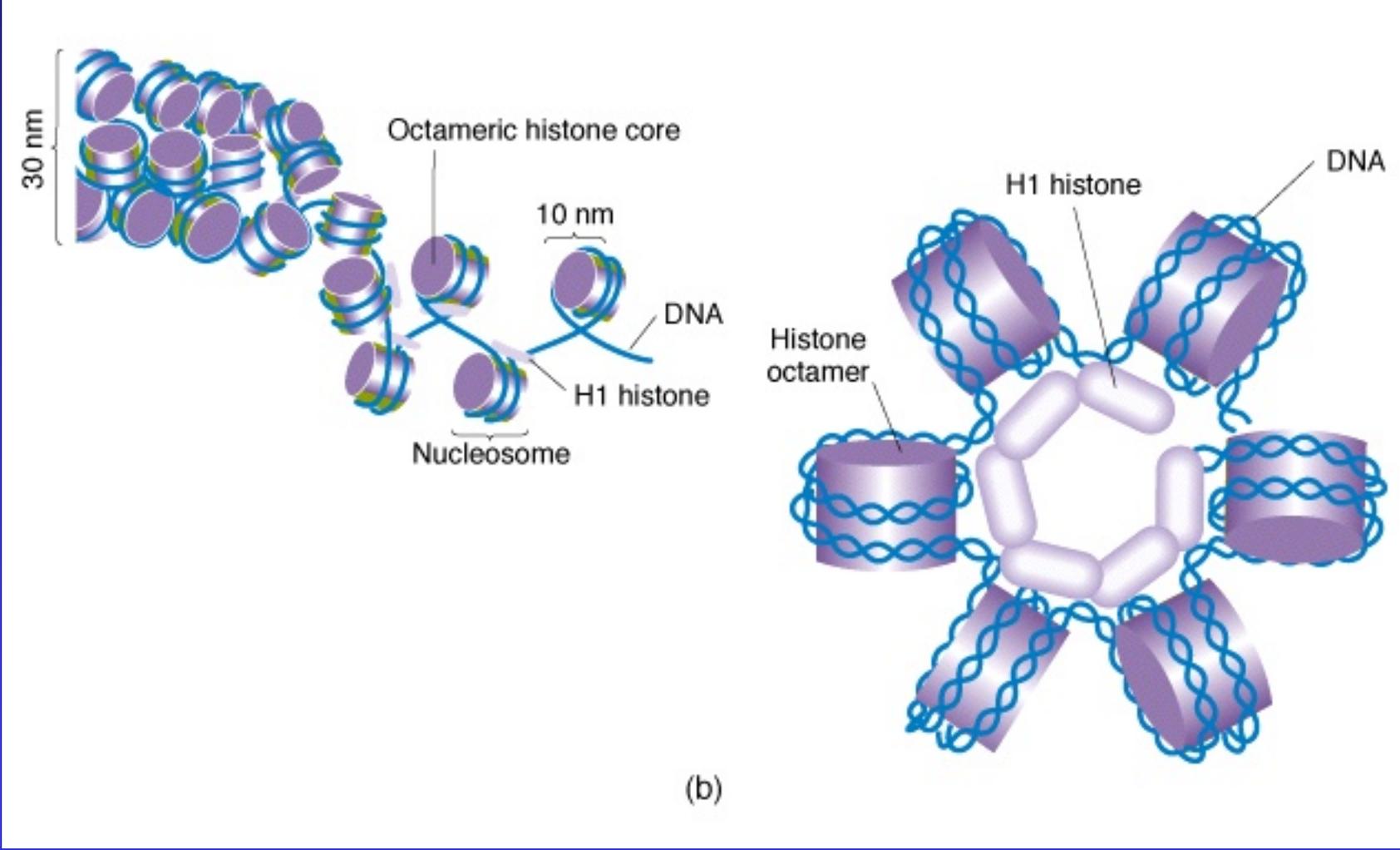
Caratteristiche degli istoni



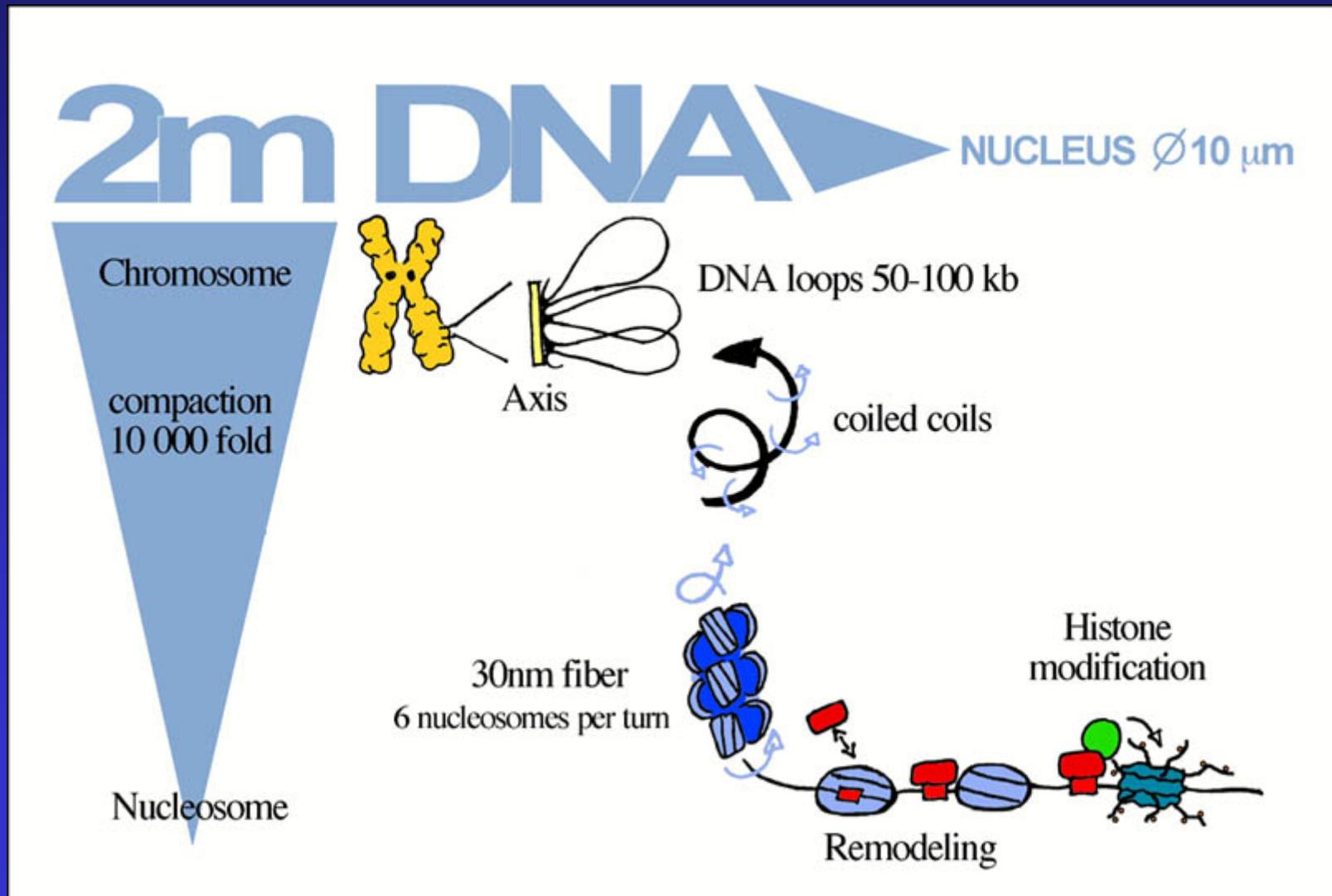
	MW	n.aa	% Lys + Arg
H1 *	22500	244	30.8
H2A	13360	129	20.2
H2B	13774	125	22.4
H3	15273	135	22.9
H4	11236	102	24.5

* vi sono più tipi di H1 in una cellula

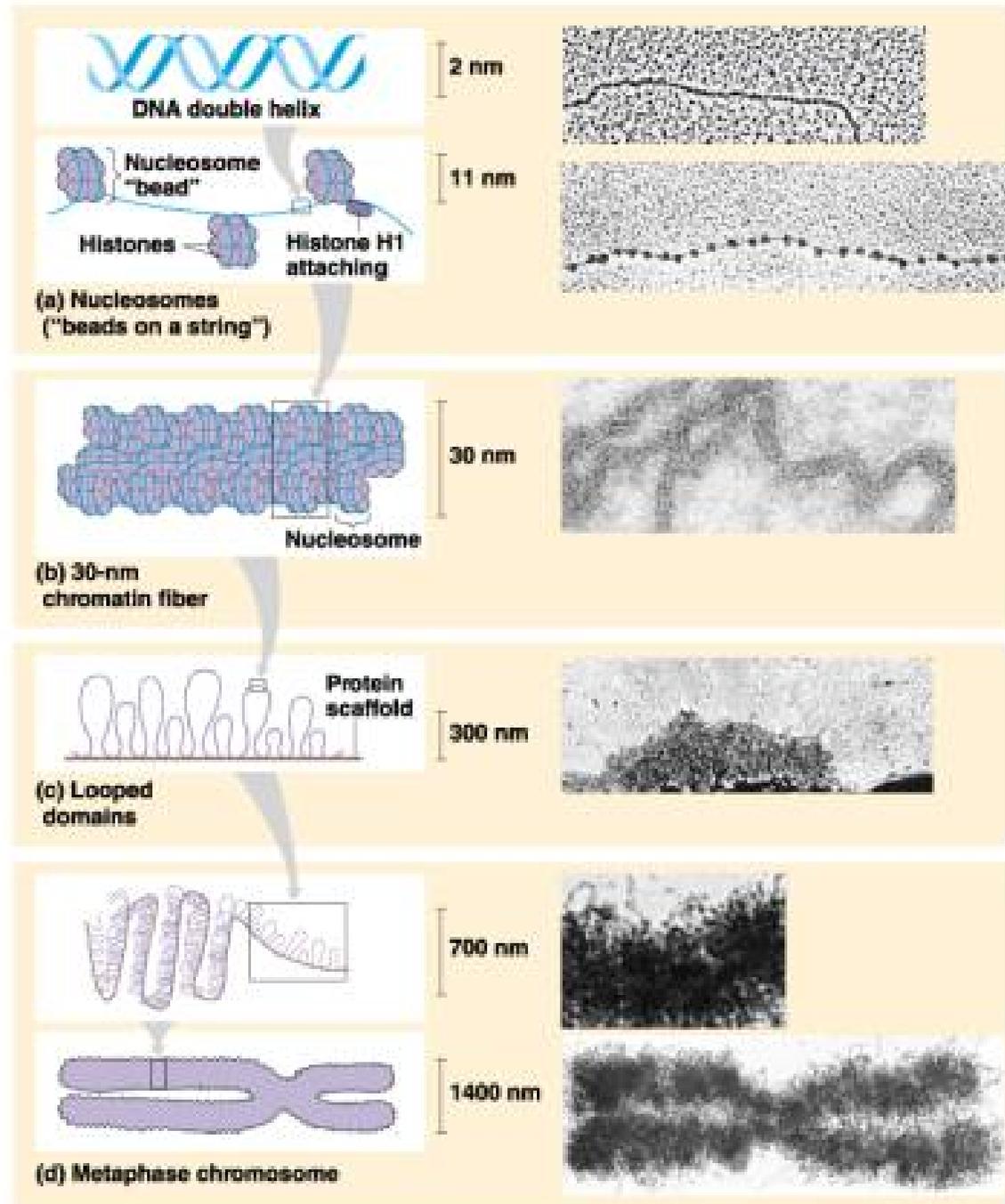
Come i nucleosomi si avvolgono a formare il solenoide



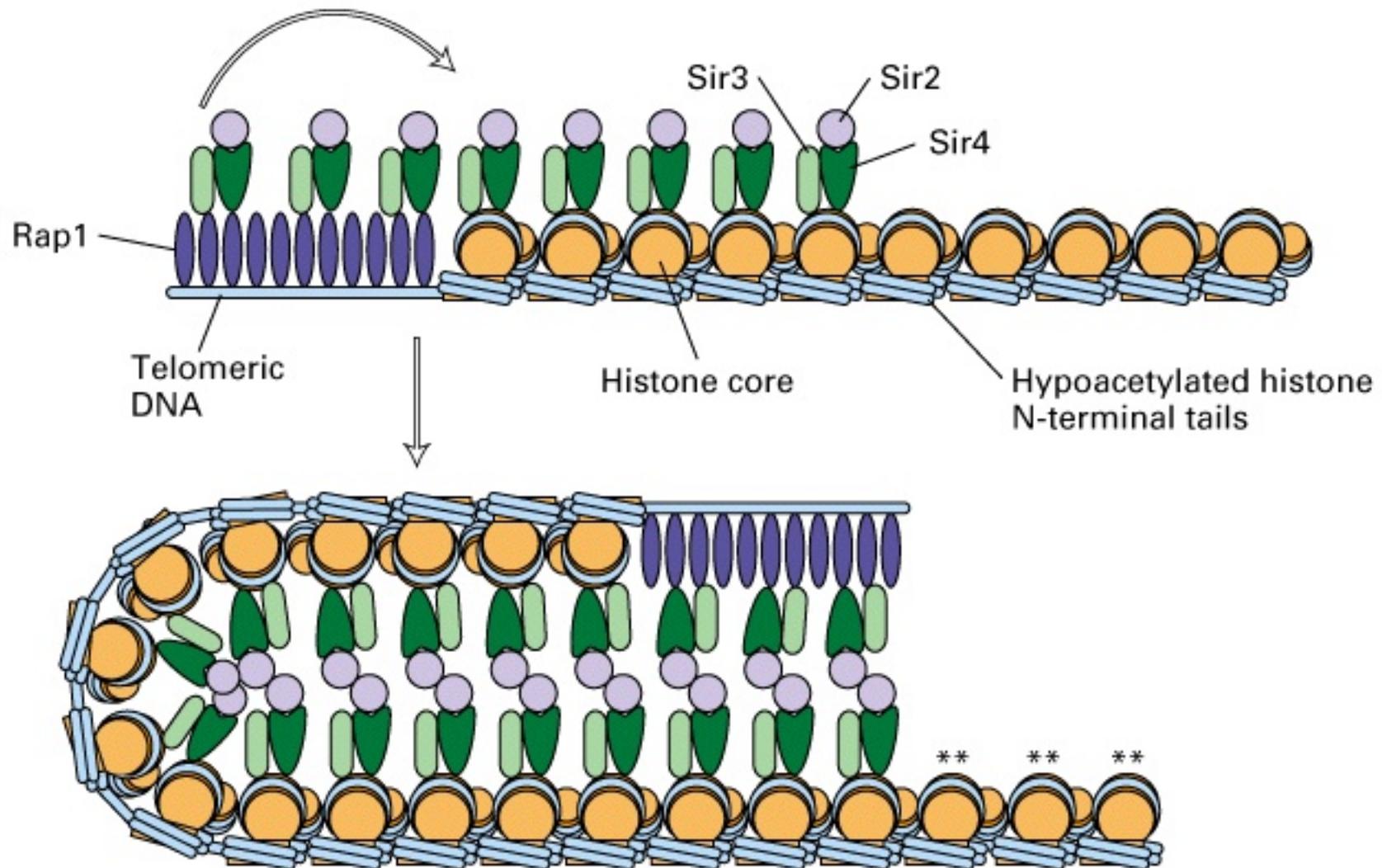
L'avvolgimento del DNA intorno agli istoni e l'ulteriore avvolgimento del solenoide e delle anse intorno allo scaffold consente l'impacchettamento di 176 cm di DNA in un nucleo del diametro di pochi μm



I livelli di condensazione della cromatina: schema che illustra le immagini al microscopio elettronico a trasmissione. Il DNA della cellula interfase forma delle anse su proteine. Impalcatura.

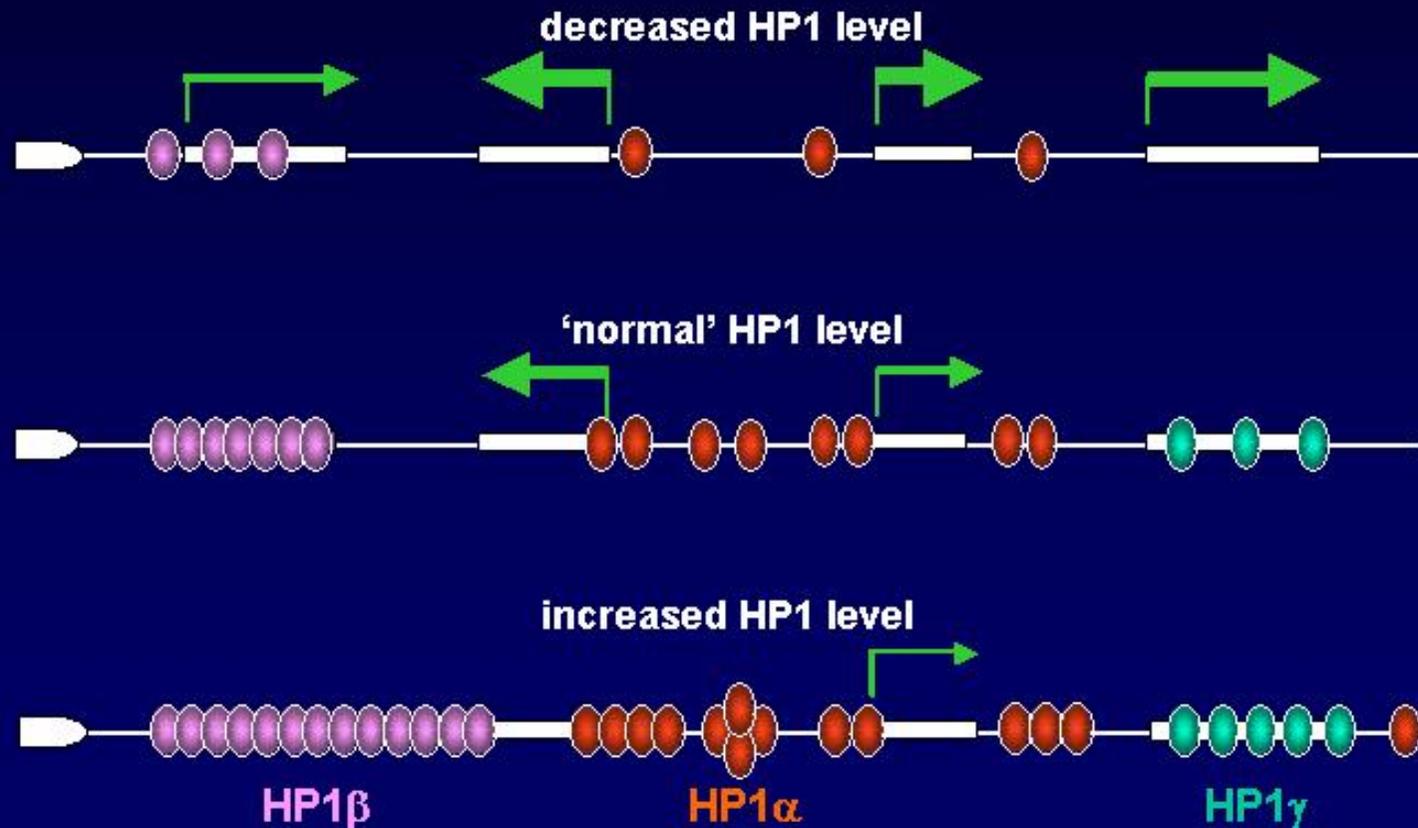


L'eterocromatina, ossia la cromatina più condensata dei nuclei interfasci, deriva dalla complessazione con proteine non istoniche. Ad esempio, a livello dei telomeri si legano alcune proteine che “silenziano” una regione più ampia di DNA

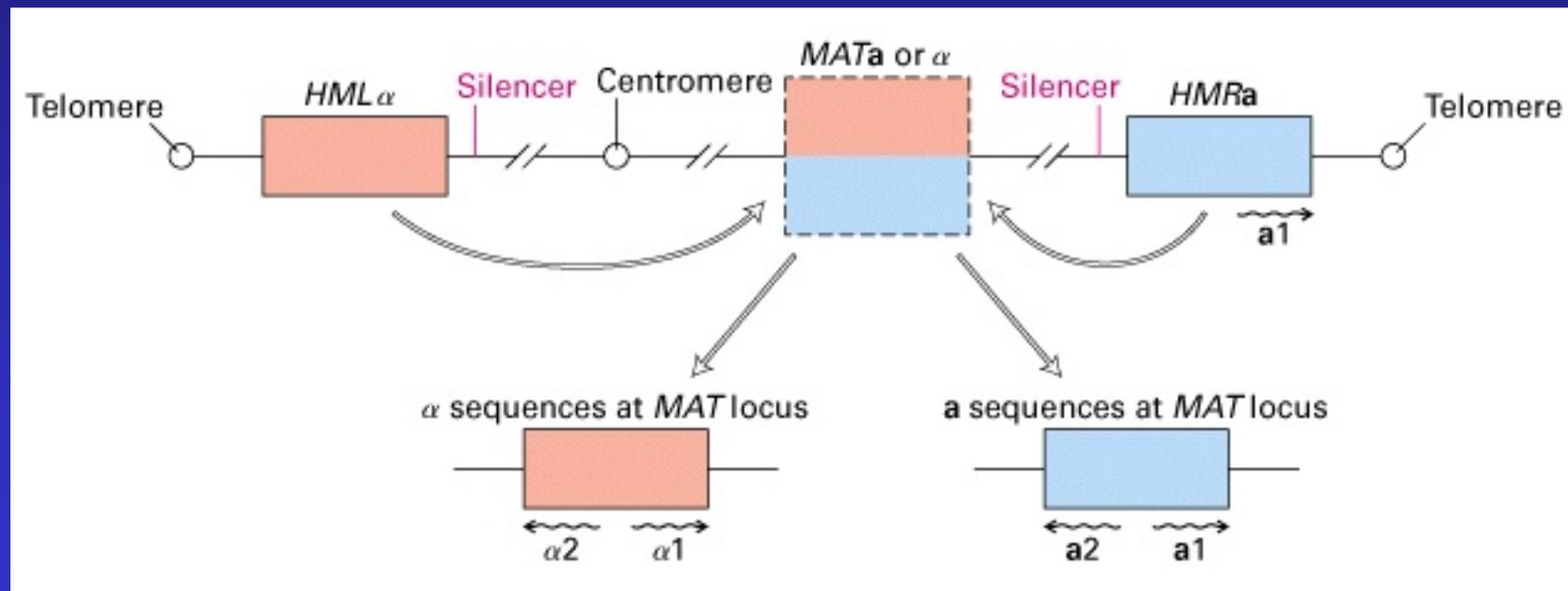


HP1, una delle proteine che modificano il grado di condensazione della cromatina e la sua accessibilità

How HP1 dosage could affect gene expression levels and patterns

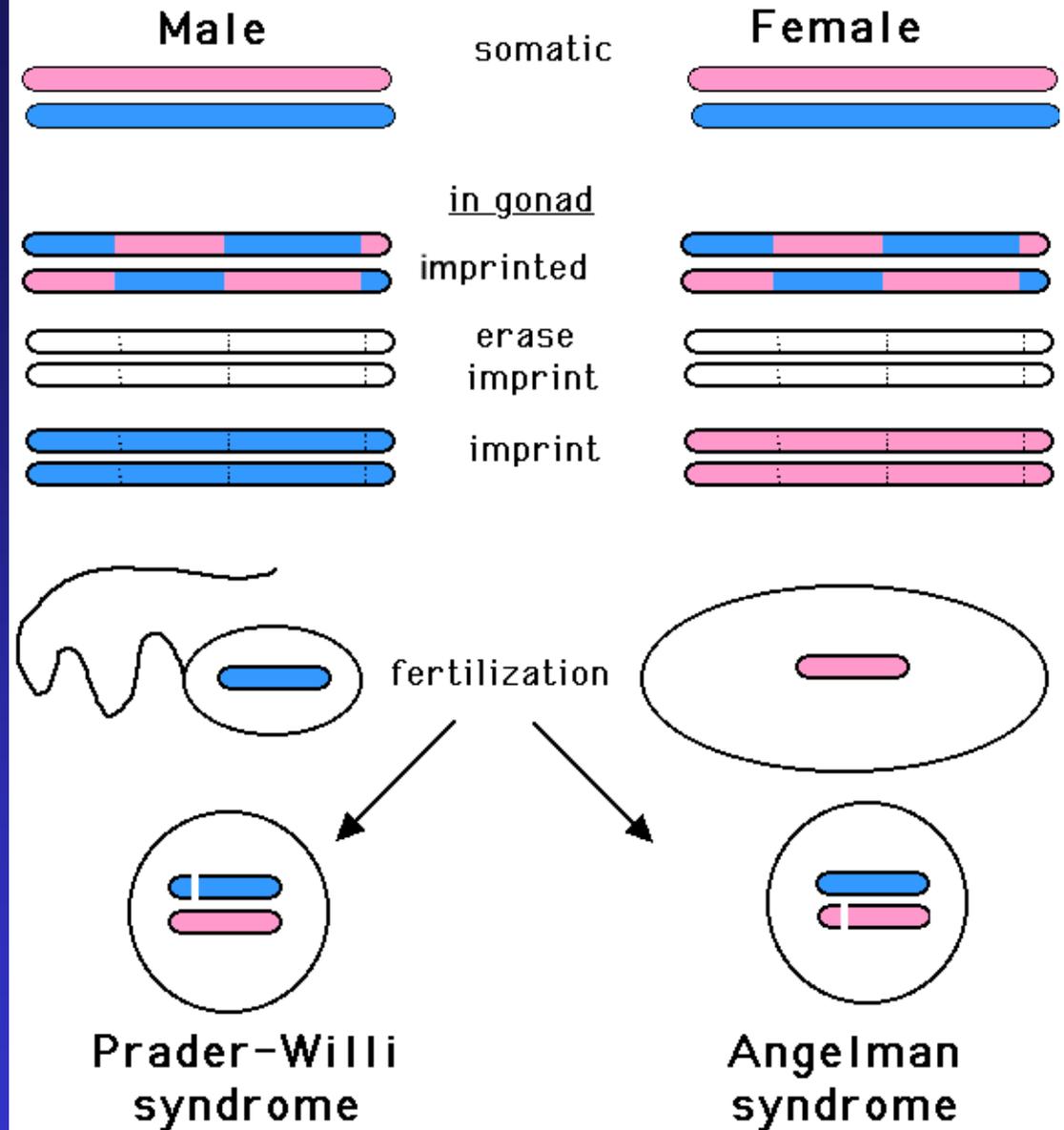


Nel genoma del lievito, i loci $HML\alpha$ e $HMRa$ sono trasposti e “silenziati” a turno; se nel locus MAT si localizza, ad esempio, il gene a , esso viene trascritto, mentre il gene α , che resta nel sito HML , viene “silenziato”.



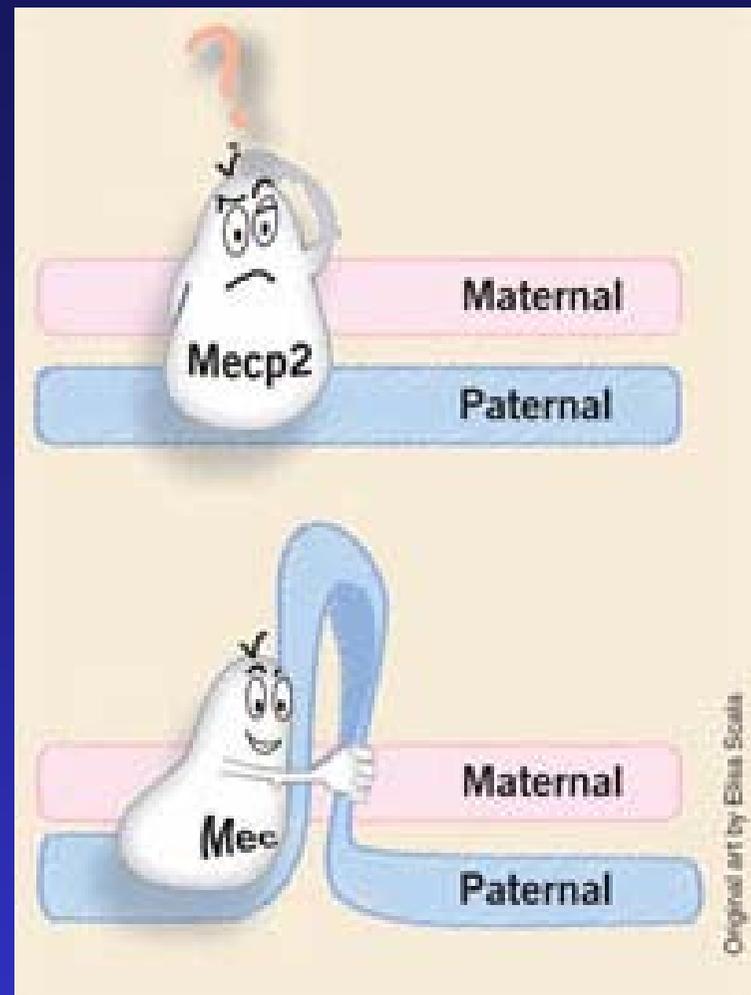
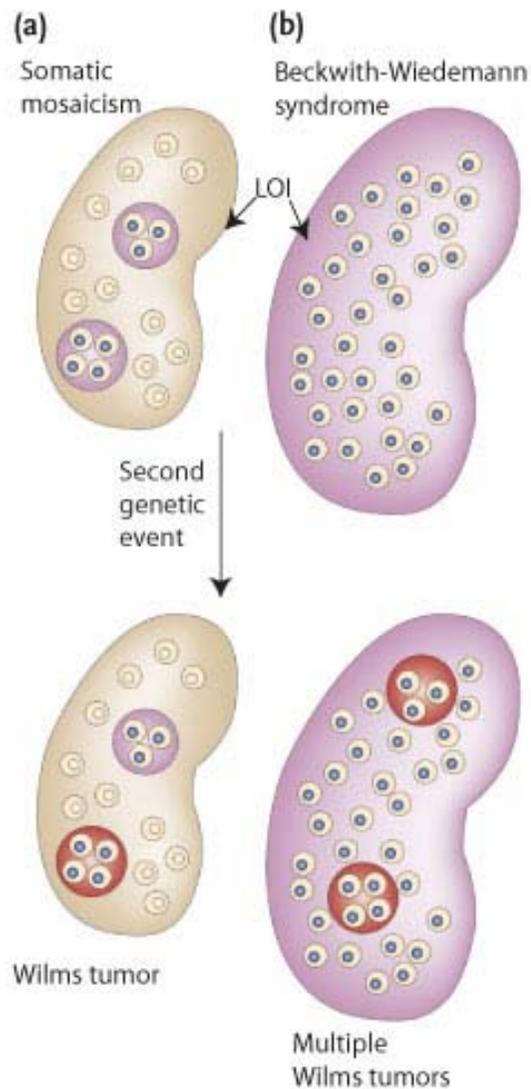
Il livello di condensazione della cromatina si ripercuote sul fenomeno dell' **IMPRINTING** = alcuni geni vengono inattivati o attivati in modo diverso nel maschio e nella femmina

Una mutazione sul cromosoma 15 umano porta a sindromi diverse se tale mutazione è stata ereditata dal padre o dalla madre.



Cromosoma 15 umano

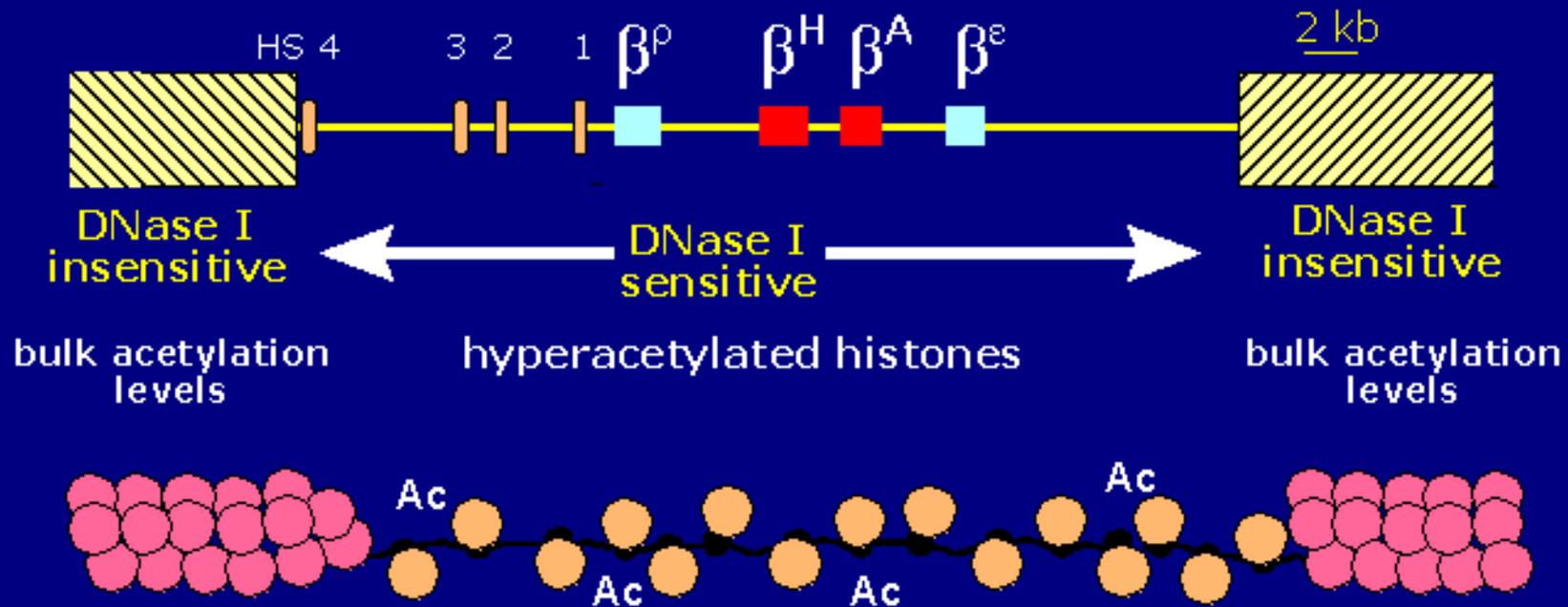
La perdita di imprinting (Loss of Imprinting, LOI) può essere alla base di alcune patologie come la sindrome di Rett....



.... o costituire il primo passo verso la trasformazione tumorale, come nel tumore di Wilms.

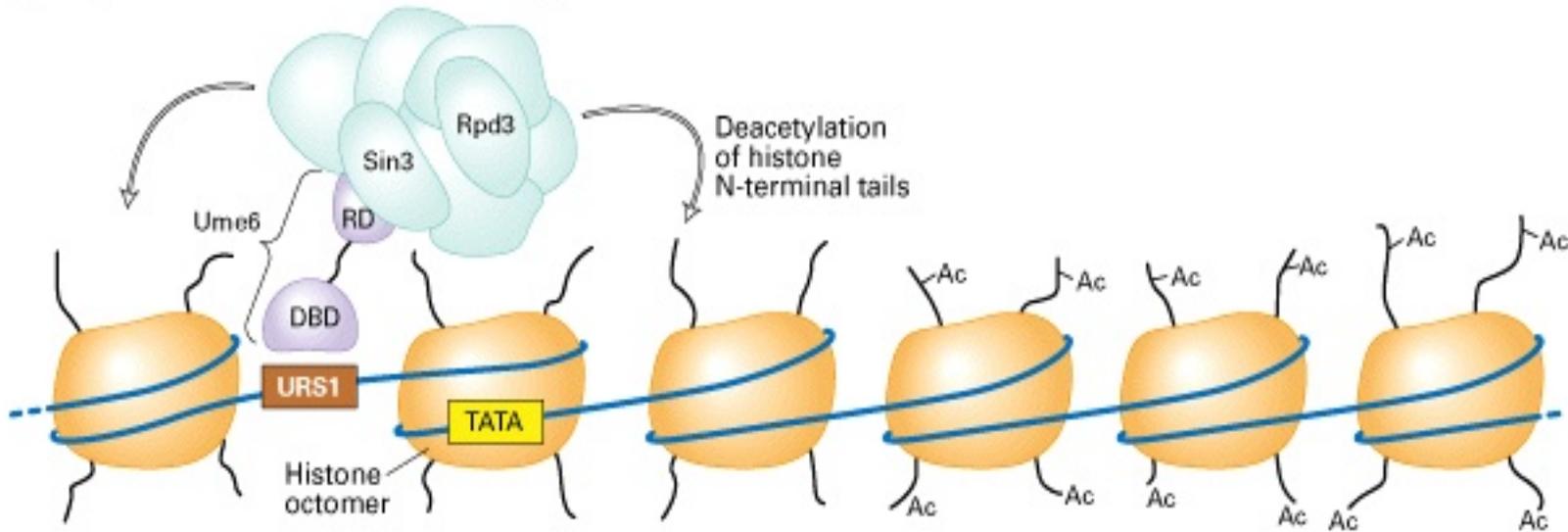
Le regioni trascrivibili hanno istoni iperacetilati;
tali regioni sono anche sensibili alla DNasi

chicken β -globin domain

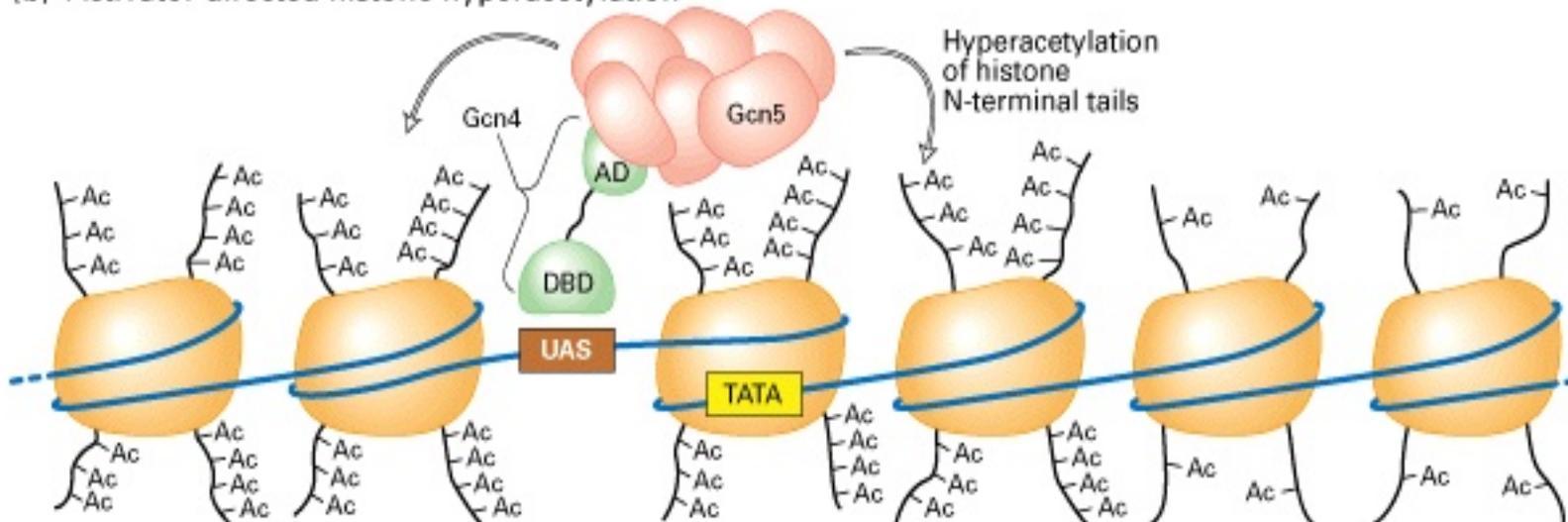


I complessi che de-acetilano o acetilano le “code” N-terminali degli istoni e ne modificano il livello di affinità con il DNA

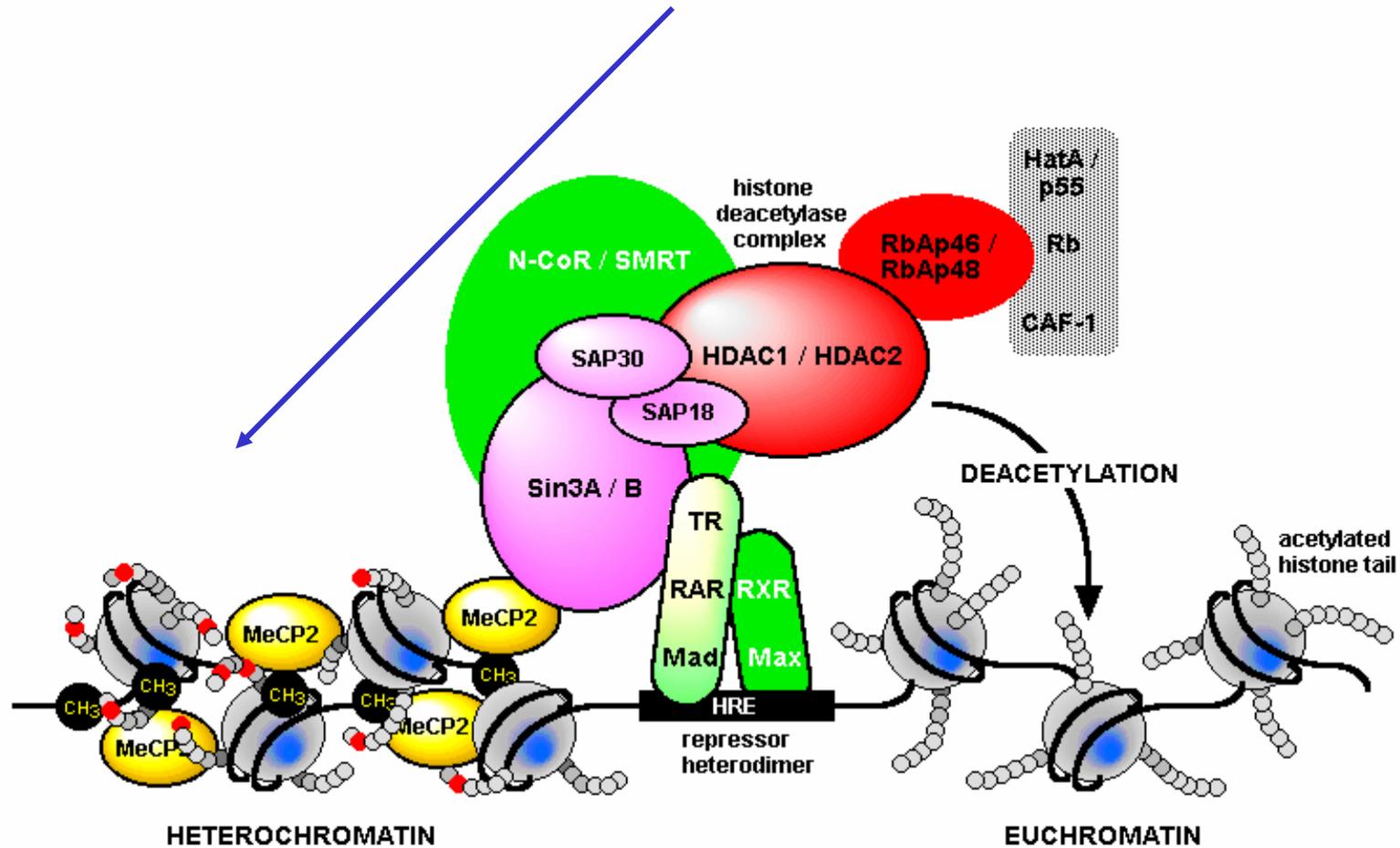
(a) Repressor-directed histone deacetylation



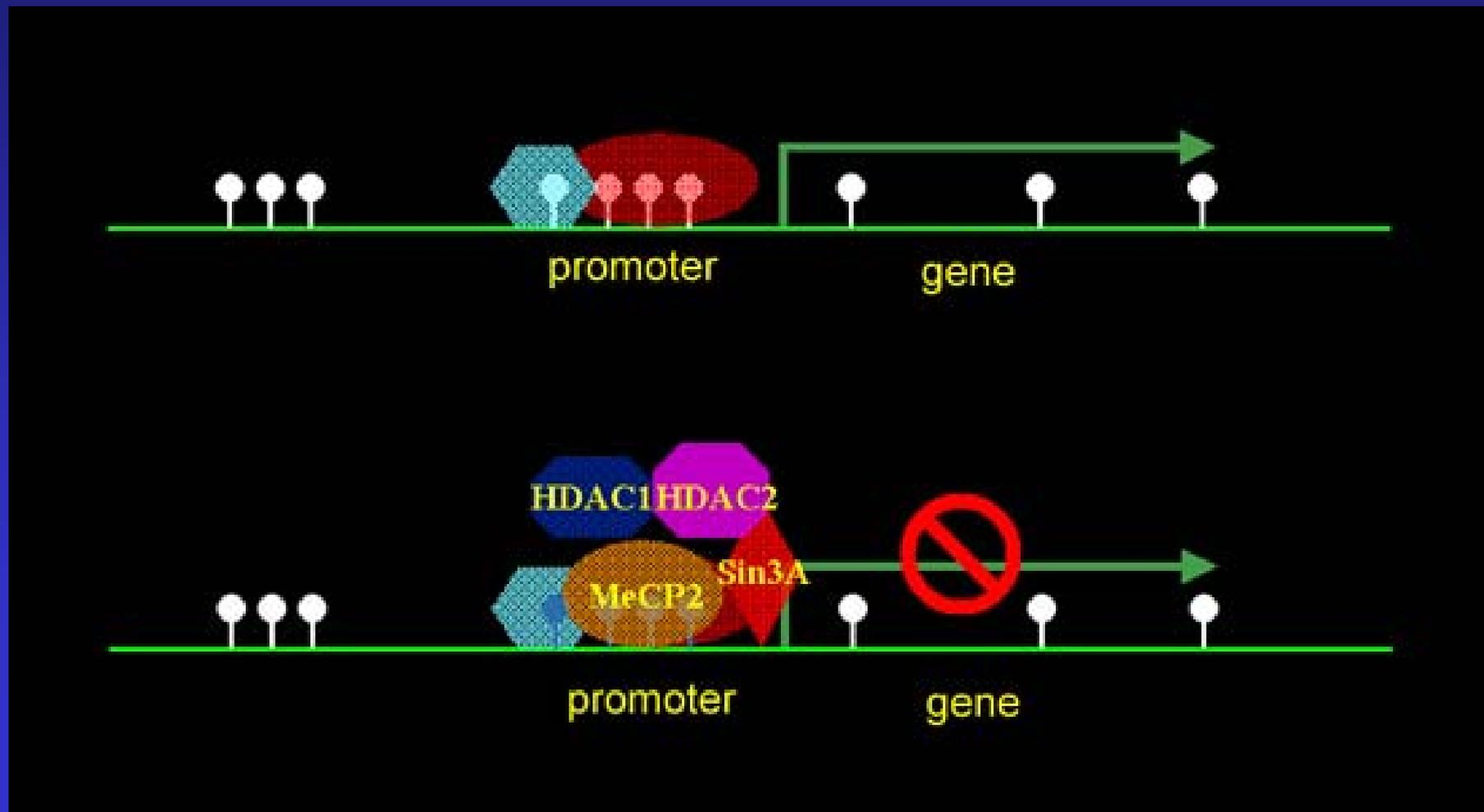
(b) Activator-directed histone hyperacetylation



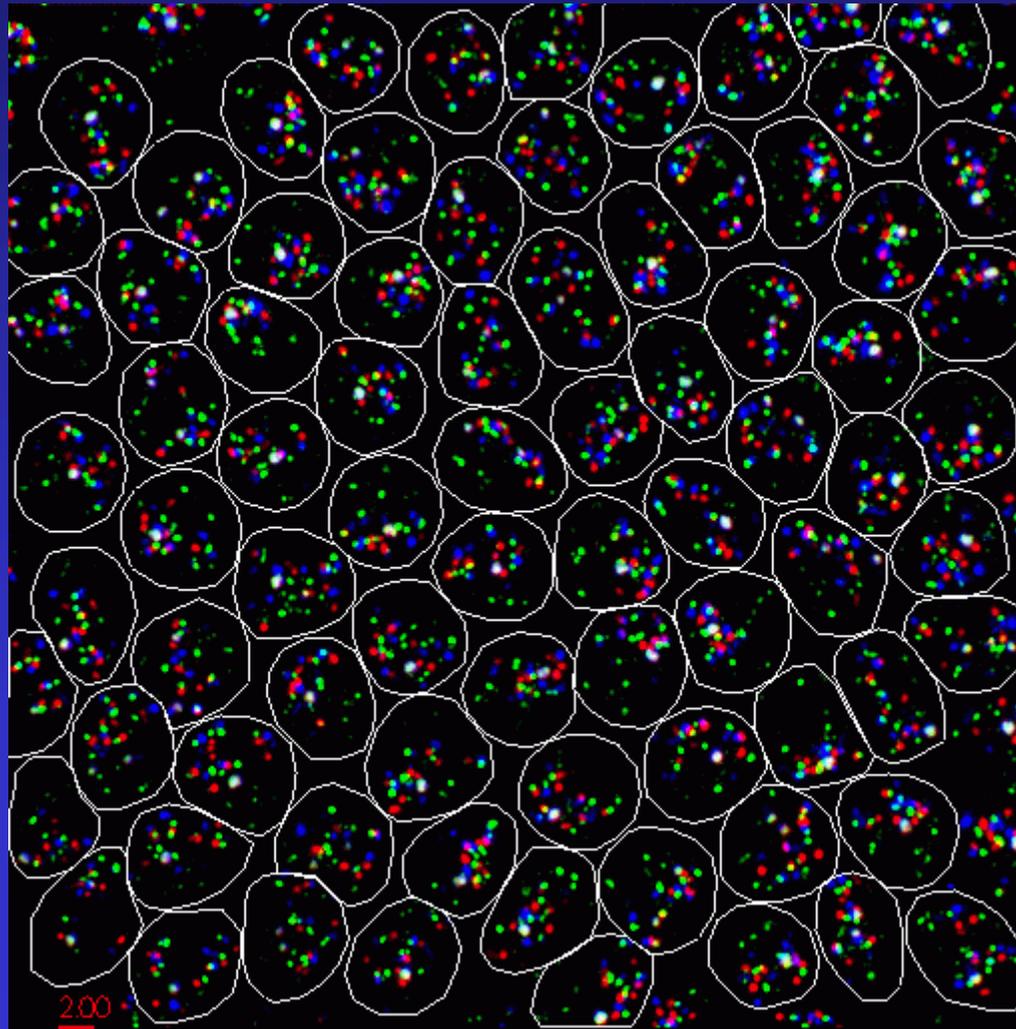
In particolare, i complessi che de-acetilano il DNA in alcune localizzazioni, rendono tali siti non trascrivibili



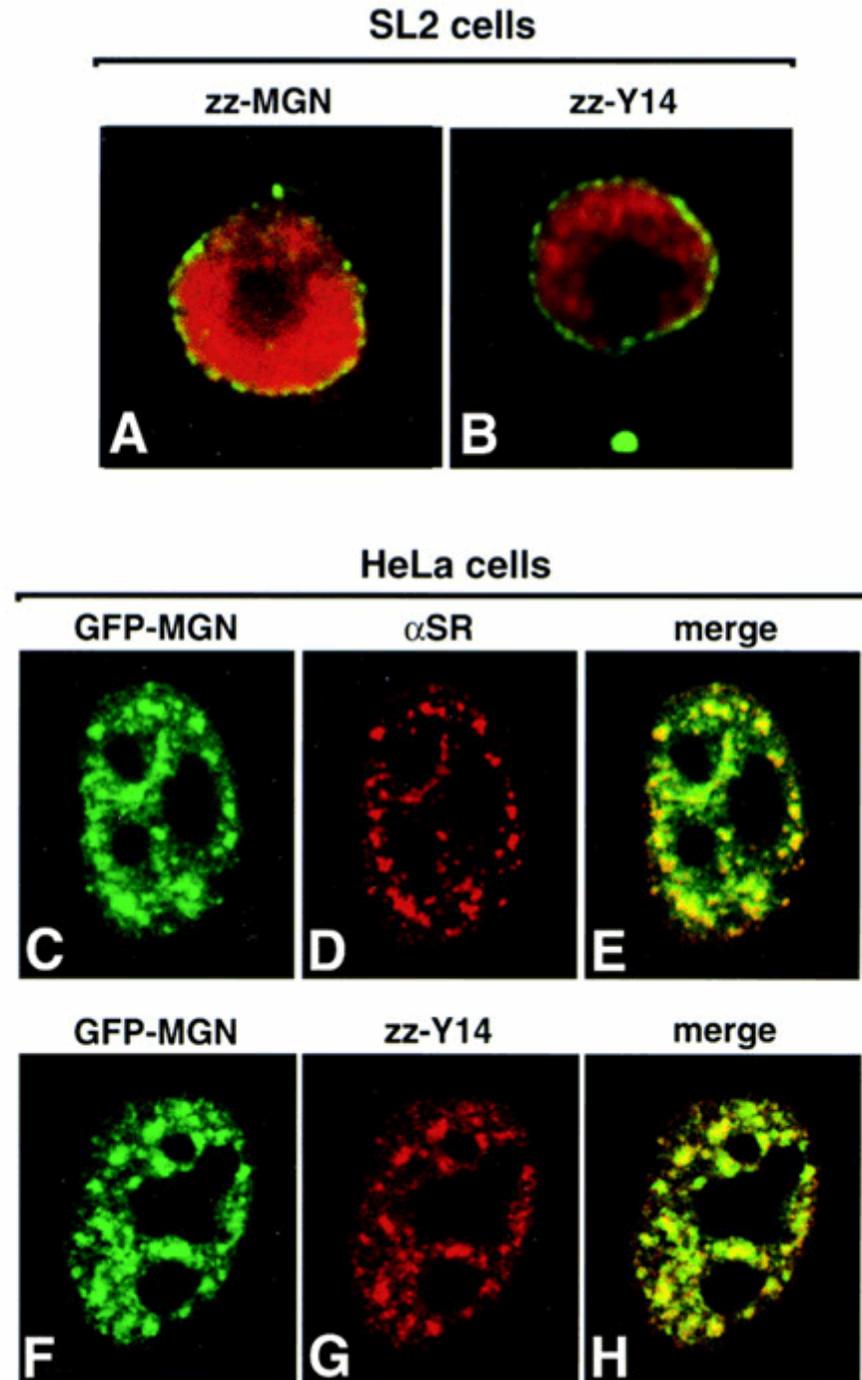
I complessi di deacetilazione possono essere richiamati in prossimità di un promotore dalla presenza di sequenze *CpG.
La metilazione delle C *silenzia* il gene in prossimità di tale regione.



Si sta studiando l'associazione tra i cromosomi e le lamine dell'involucro nucleare per capire se singoli segmenti dei cromosomi si localizzano in regioni nucleari precise e se intercorrono precisi contatti spaziali tra segmenti di cromosomi.



Sembra che alcune funzioni, come lo splicing, siano localizzate in regioni specifiche del nucleo

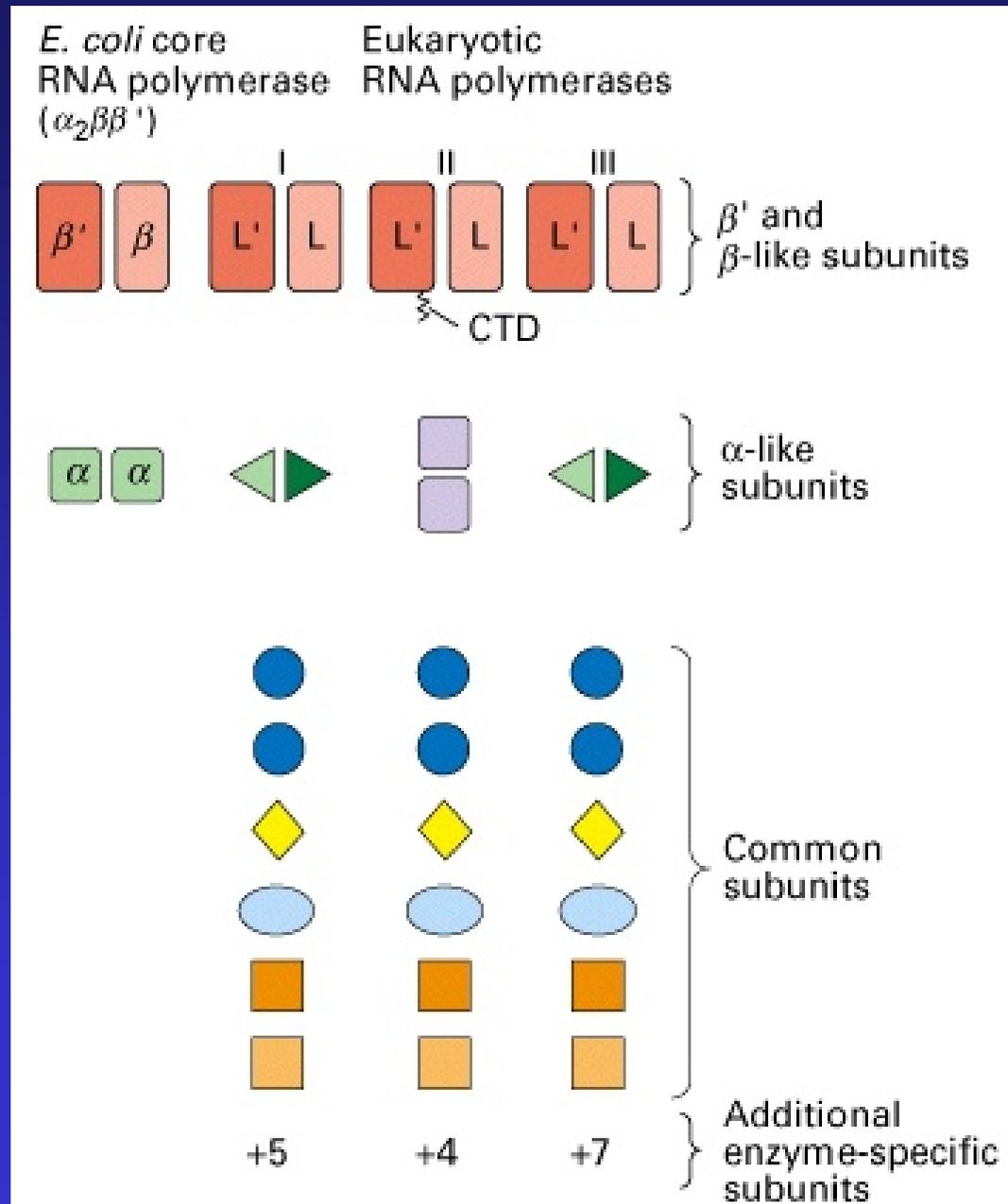


Livelli di regolazione genica degli Eucarioti

-Controllo trascrizionale

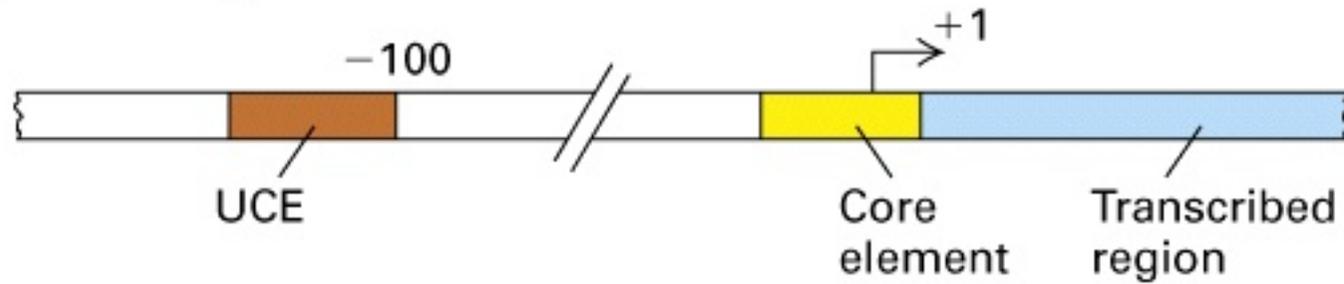
- fattori di trascrizione specifici per tipo di polimerasi
 - geni house keeping (sito Inr)
 - altri geni (con TATA box)
- fattori di trascrizione specifici per gene
 - specifici in base al differenziamento
 - specifici in base alla funzione
- scelta del promotore, ossia del sito di inizio
- scelta del sito di terminazione

Confronto tra le RNA polimerasi dei procarioti e degli eucarioti

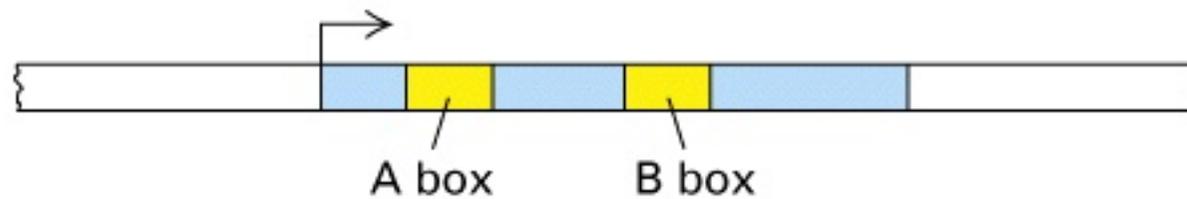


I geni eucariotici non trascritti dalla Pol II

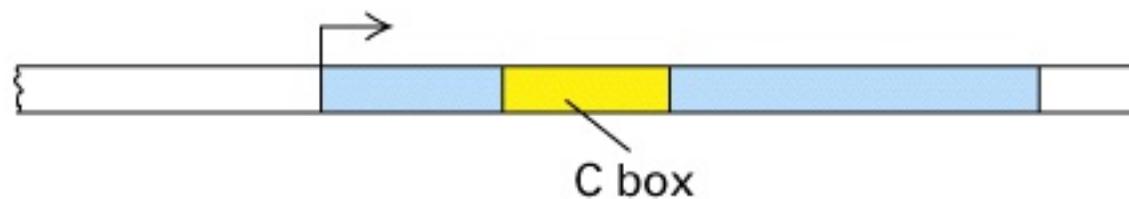
(a) Pre-rRNA gene

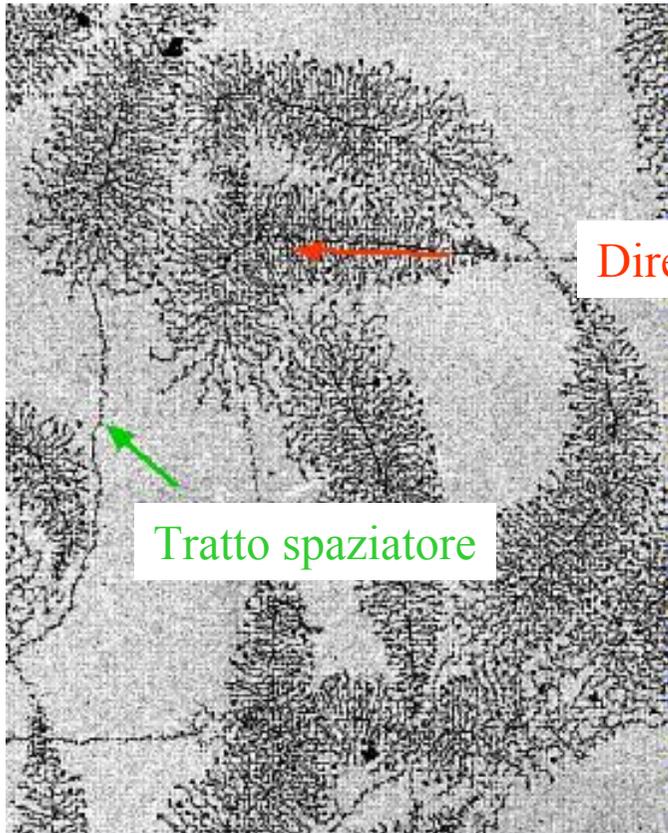


(b) tRNA gene



(c) 5S-rRNA





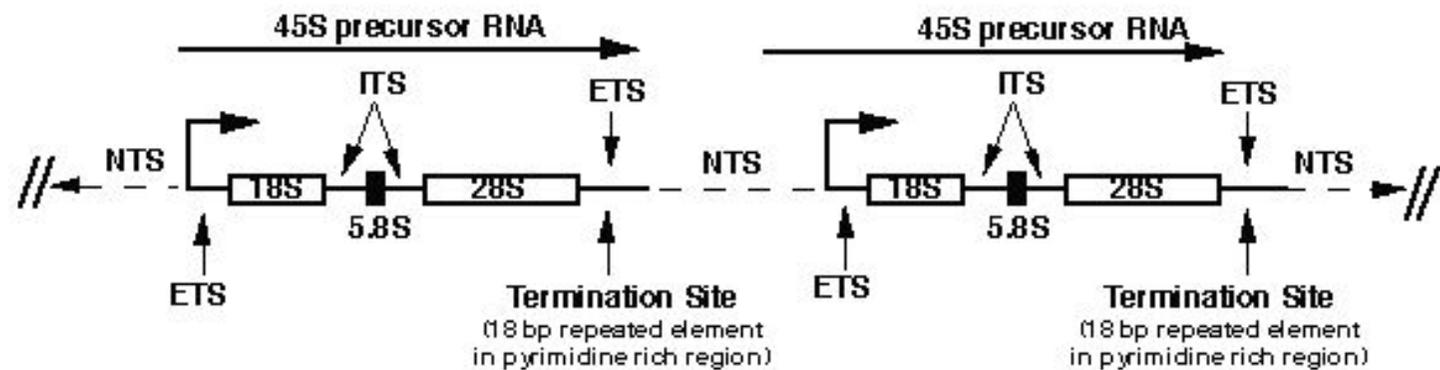
Direzione della trascrizione

Tratto spaziatore

I geni che codificano per l'RNA ribosomiale (rDNA) sono ripetuti in tandem e trascritti come precursore 45S dalla Pol I

POL I TRANSCRIPTION UNIT AND rRNA REPEAT

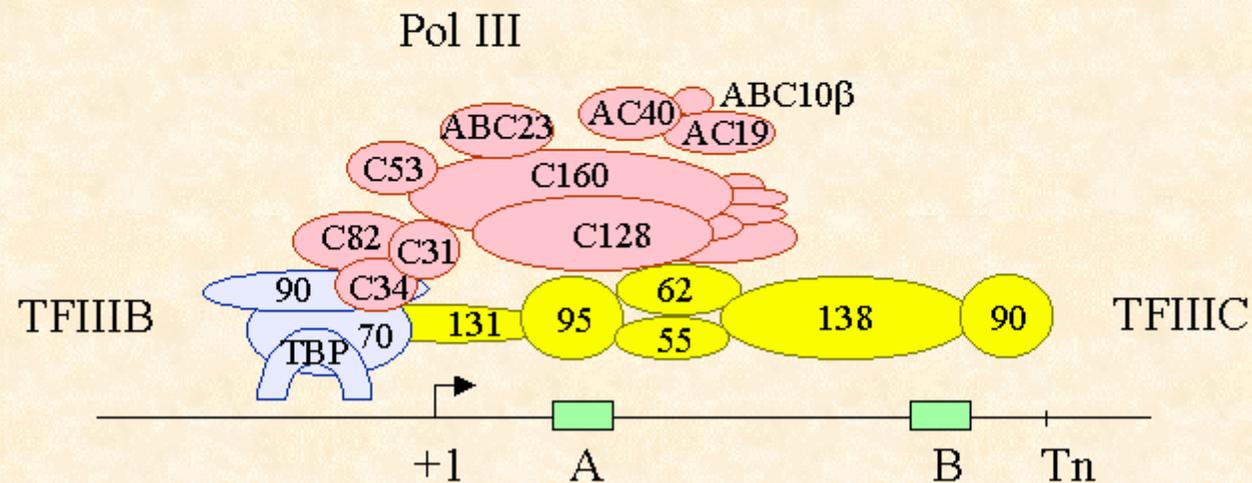
11/2/95



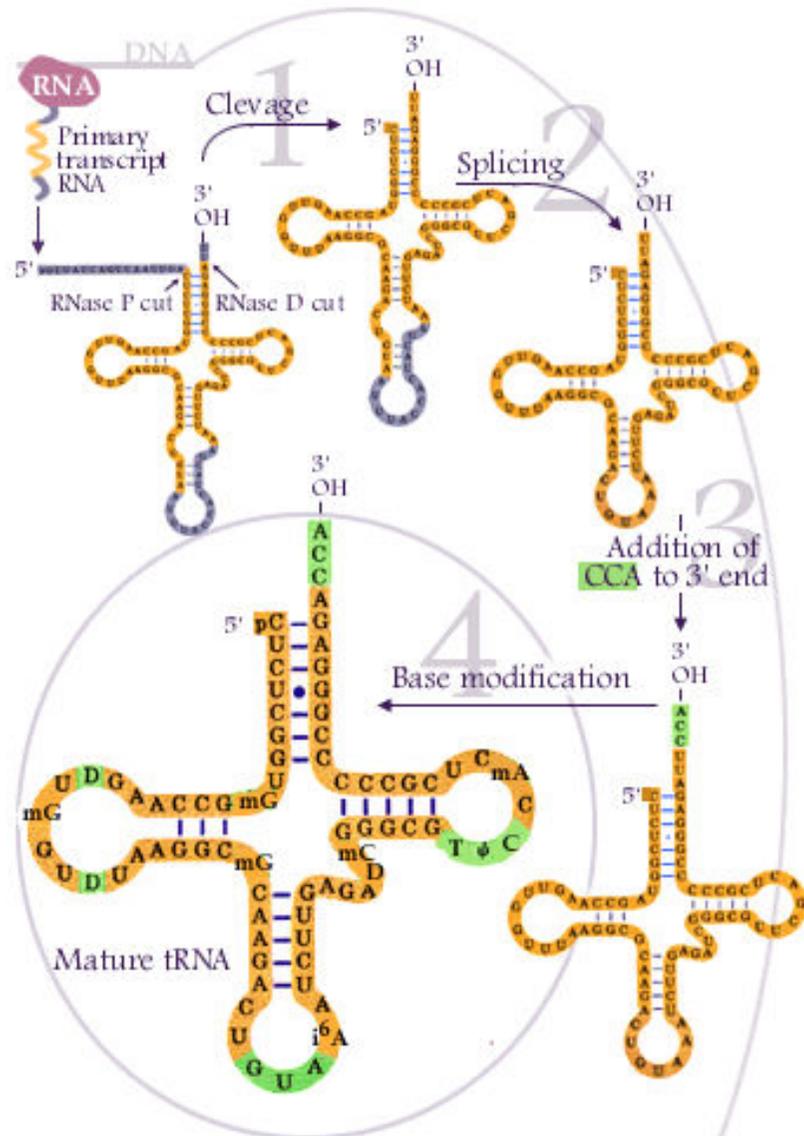
NTS = non-transcribed spacer ITS = internal transcribed spacer ETS = external transcribed spacer

La Pol III trascrive tRNA, 5S rRNA e altri piccoli RNA; il complesso di trascrizione si assembla legandosi ai fattori basali in una regione a valle del promotore.

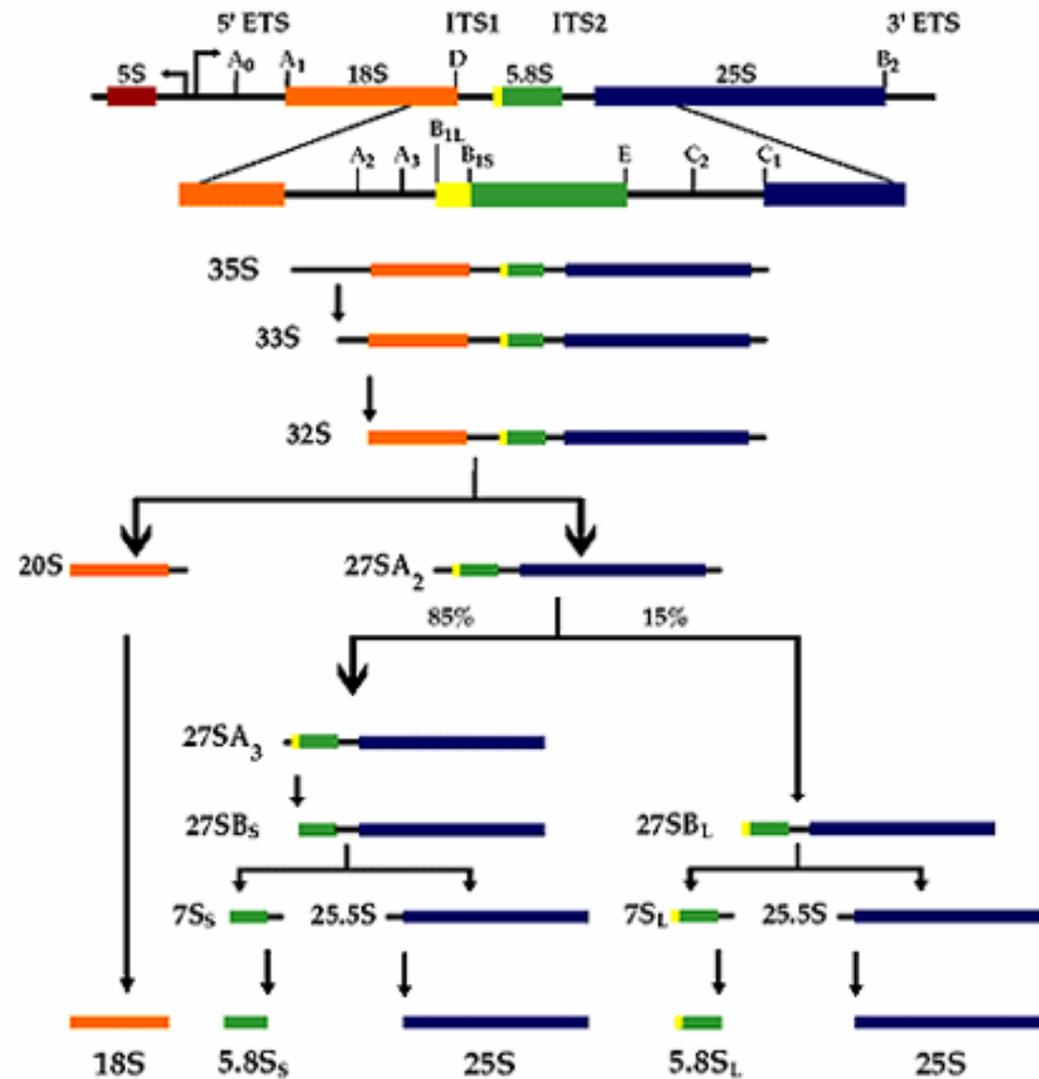
The Pol III Transcription Machinery in *S. cerevisiae*



Dopo la trascrizione sia il tRNA (a sin.) sia il pre-rRNA (a destra) vengono modificati prima dell'esportazione dal nucleo.



Pre-rRNA Processing Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*



FATTORI DI TRASCRIZIONE = proteine necessarie per l'inizio della trascrizione, ma che non fanno parte della struttura dell'RNA polimerasi

Riconoscono la regione del promotore, facilitano l'assemblaggio del complesso di inizio e il suo giusto posizionamento

Richiamano altre proteine nel sito di inizio

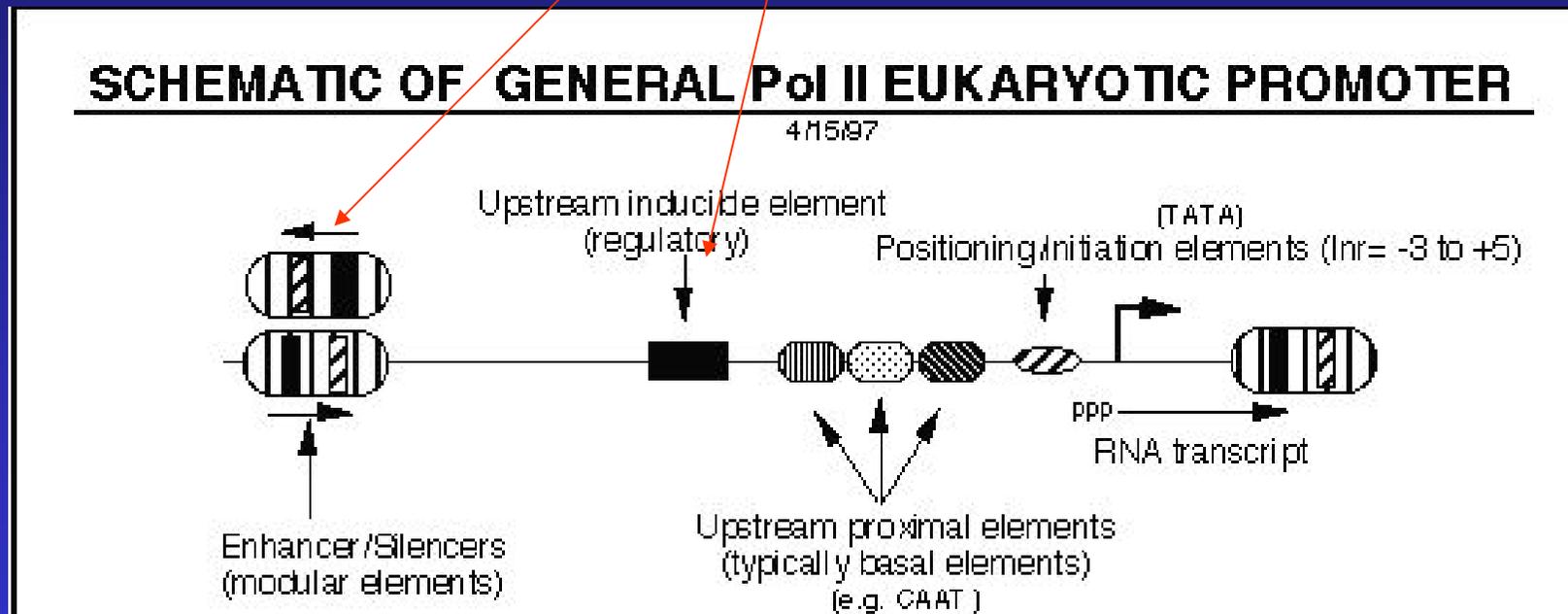
Non tutti i fattori di trascrizione si legano a sequenze del DNA, alcuni si legano ai complessi proteici già formati

Si distinguono in

FATTORI DI TRASCRIZIONE BASALI: riconoscono il promotore e gli elementi di inizio (TATA box, Inr) e le regioni più prossimali; sono specifici per tipo di promotore

FATTORI DI TRASCRIZIONE SPECIFICI: riconoscono le regioni prossimali e distali di geni specifici; sono in genere tessuto-specifici o comunque soggetti a regolazione

Attivatori specifici; legano recettori per ormoni steroidei, glucagone, ecc. Possono stimolare o inibire i promotori; possono legare gli stessi fattori di trascrizione sia in regioni prossimali (entro 200 nt) sia distali (anche alcune Kb); possono facilitare l'assemblaggio dei fattori di trascrizione basali



6-20 nucleotidi; spesso legano fattori specifici; influenzano l'efficienza della trascrizione; es. CCAAT, SP1, CRE, AP2, octamer

La struttura dei promotori trascritti dalla Pol II

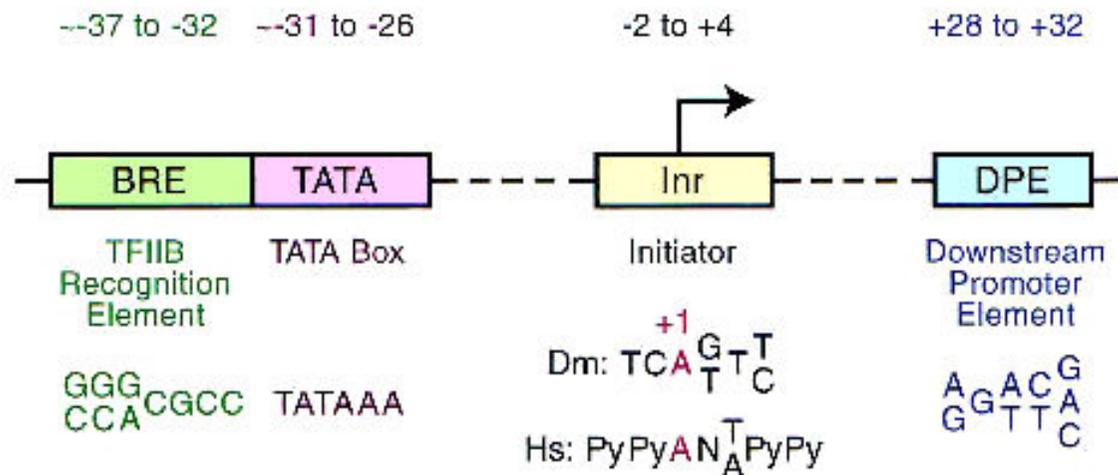
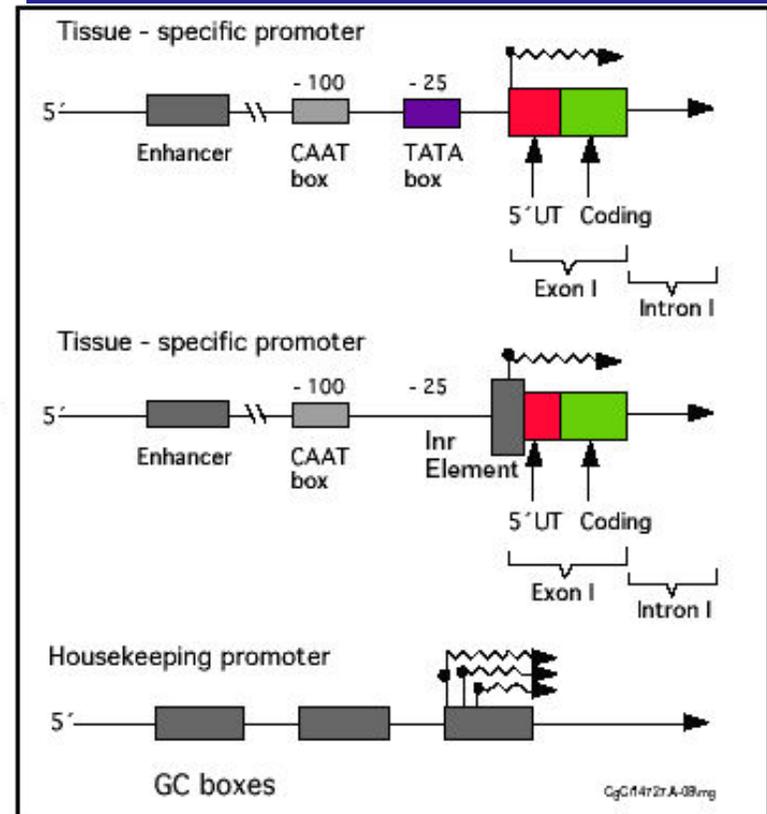
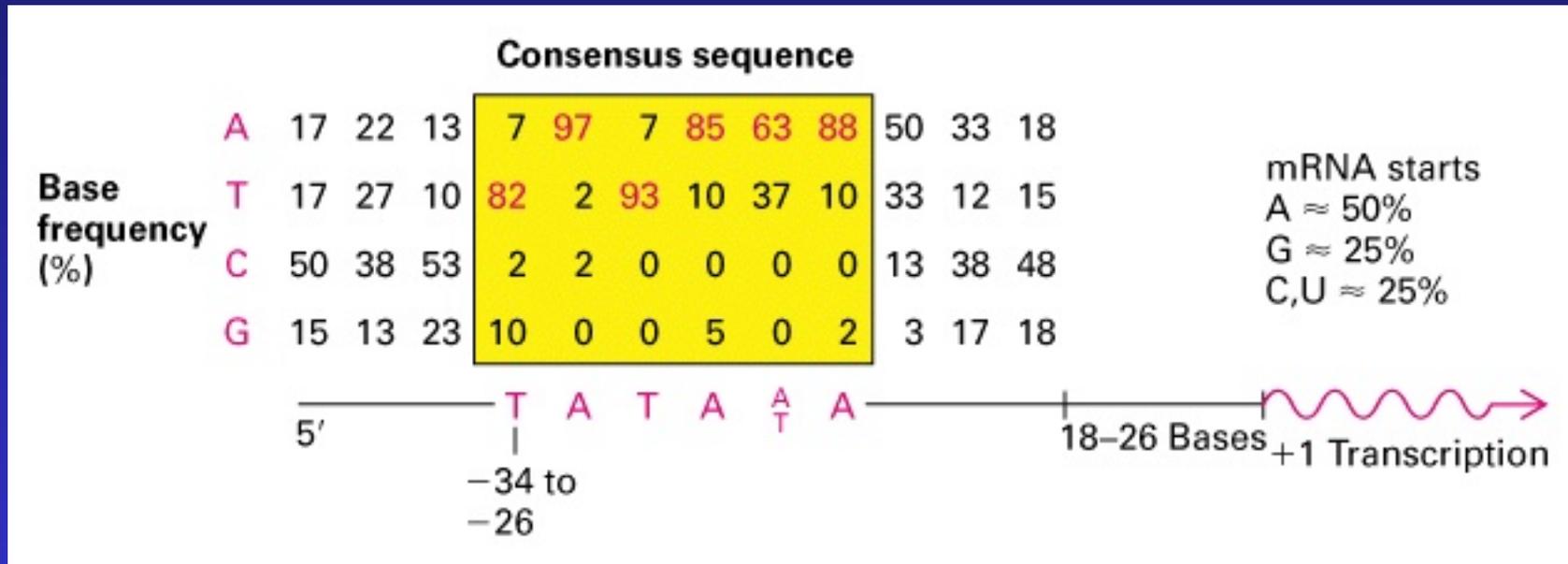


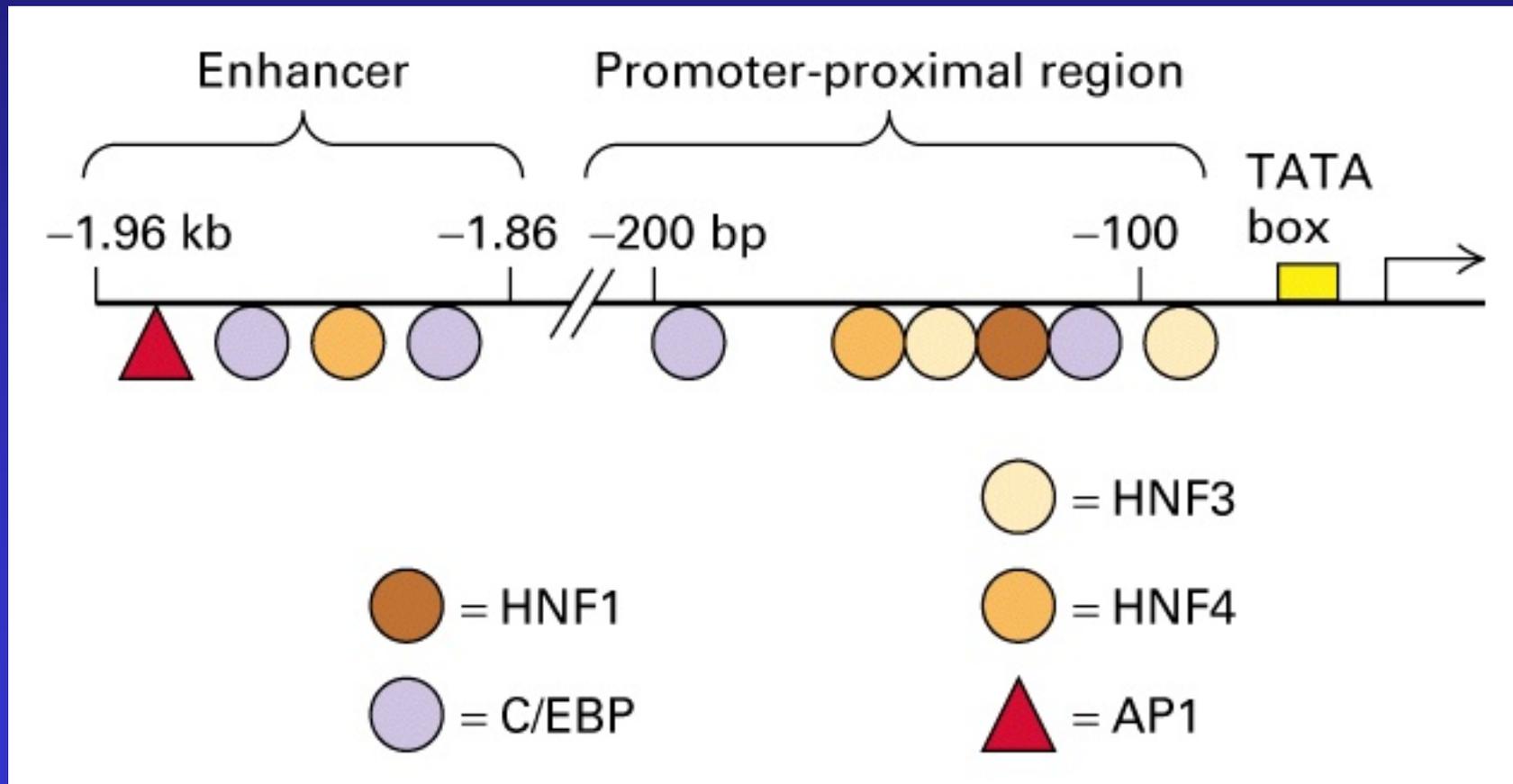
Figure 1. Core promoter elements. Some core promoter motifs that can participate in transcription by RNA polymerase II are depicted. Each of these elements is found in only a subset of core promoters. Any specific core promoter may contain some, all, or none of these motifs. The BRE is an upstream extension of a subset of TATA boxes. The DPE requires an Inr, and is located precisely at +28 to +32 relative to the A₊₁ nucleotide in the Inr. The DPE consensus was determined with *Drosophila* transcription factors and core promoters. The Inr consensus sequence is shown for both *Drosophila* (Dm) and humans (Hs).



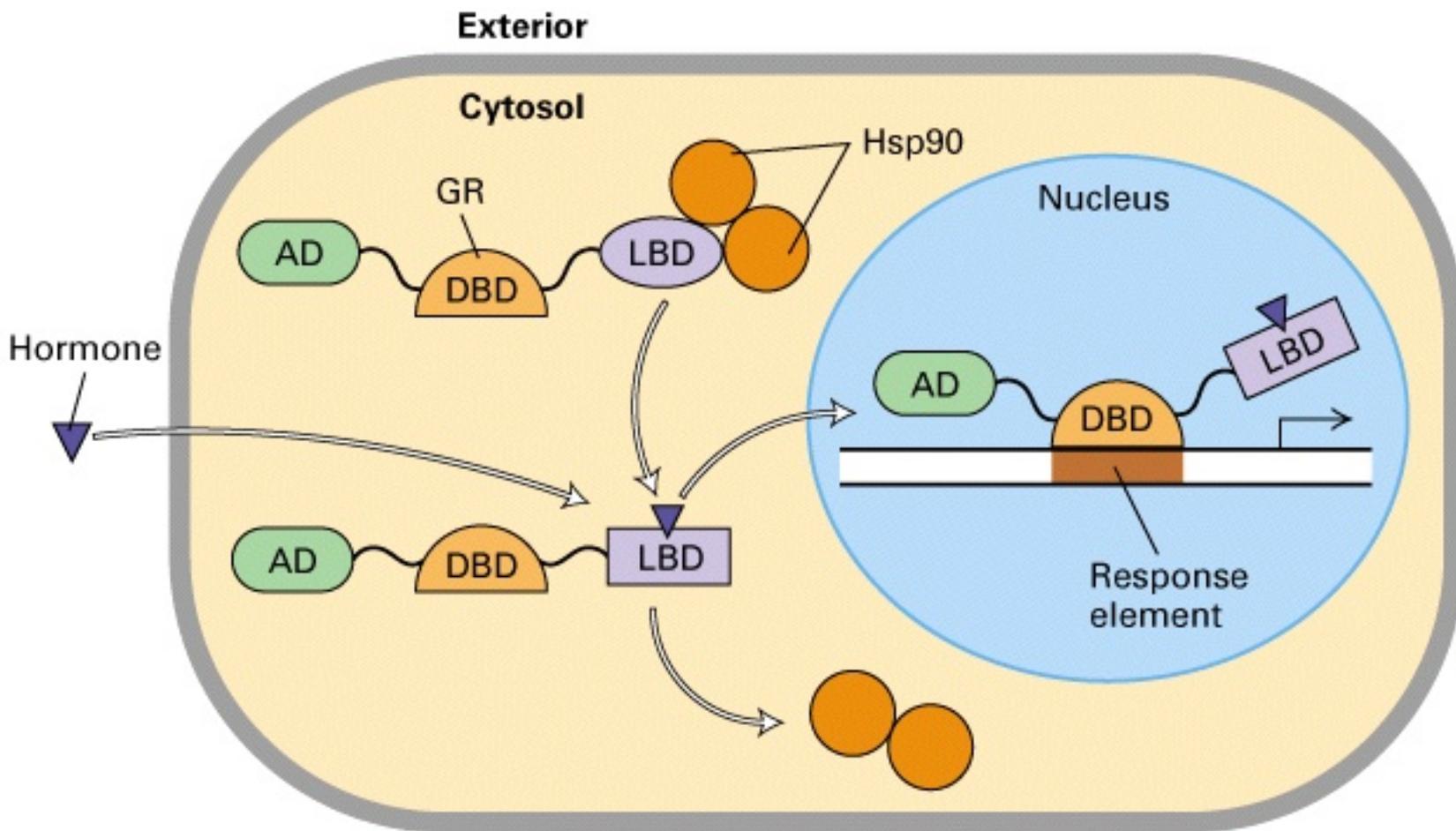
La “TATA box”, nel promotore di molti geni trascritti dalla Pol II



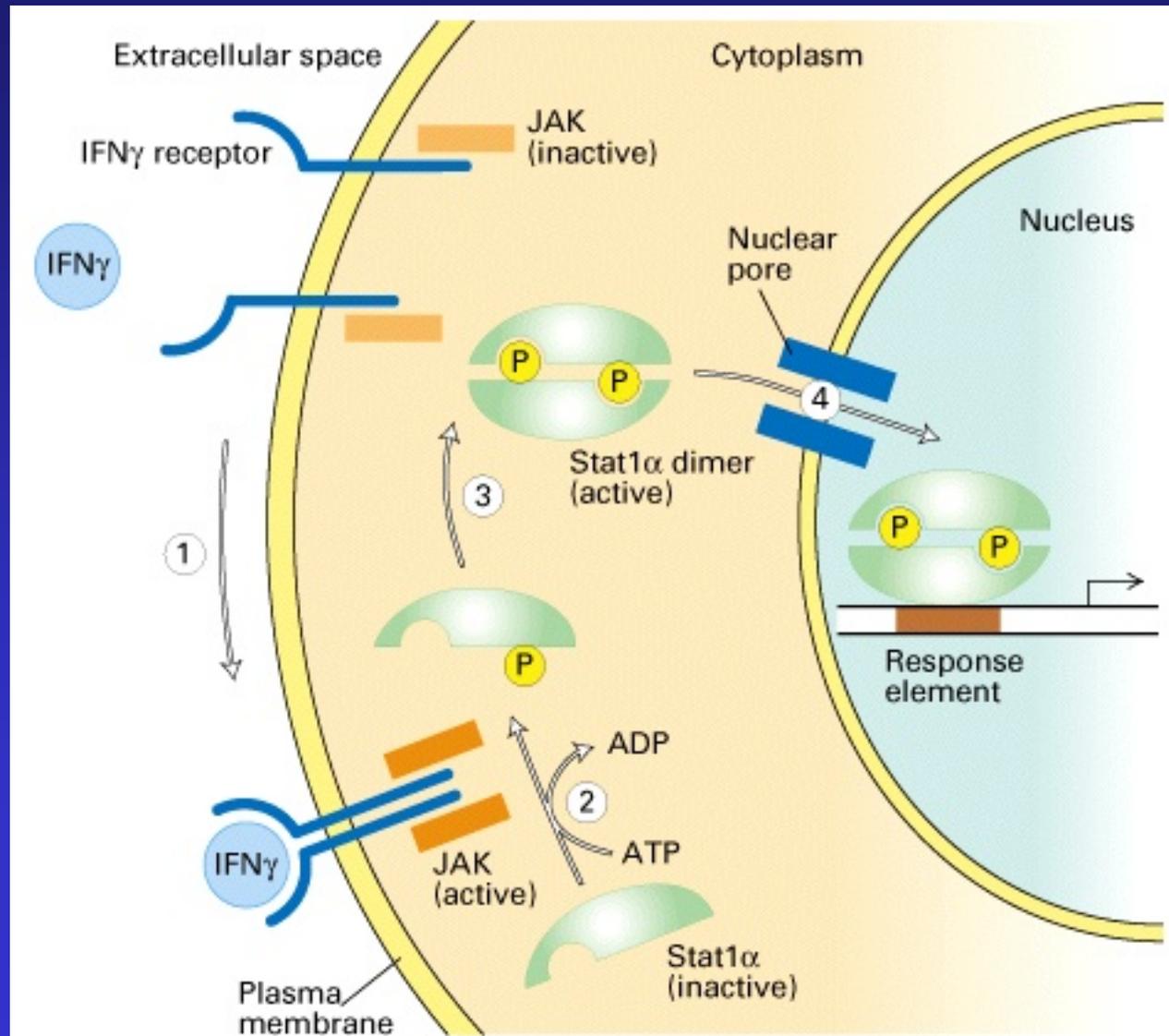
Il controllo dei geni trascritti dalla Pol II dipende dalla **COMBINAZIONE** di un numero **LIMITATO** di Fattori di Trascrizione (TF) specifici, che si legano a siti prossimali e distali al promotore



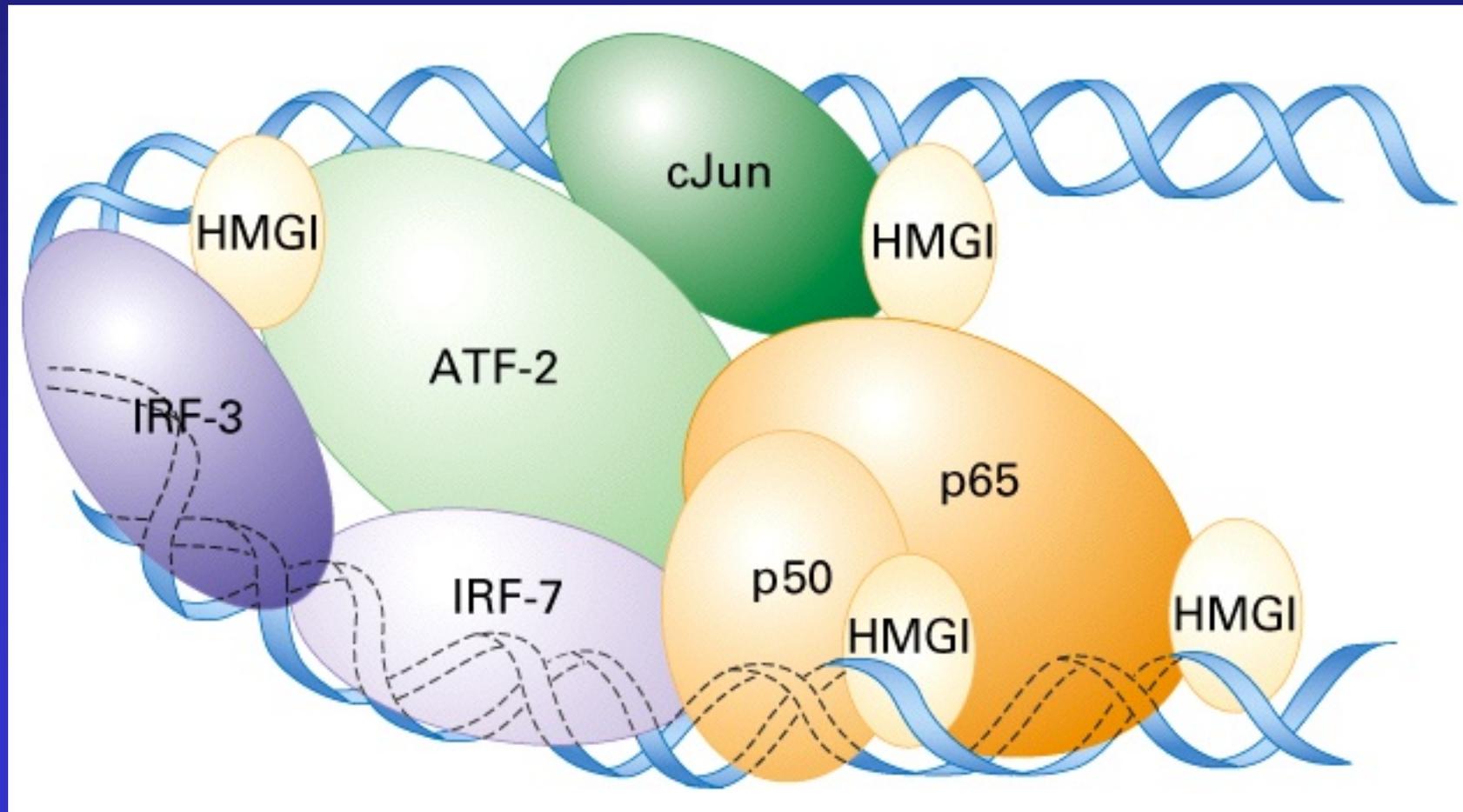
Attivazione di un fattore di trascrizione in seguito a un segnale extracellulare: in questo esempio, un ormone (un glucocorticoide) si lega a un recettore citoplasmatico, che migra nel nucleo e funge da attivatore della trascrizione



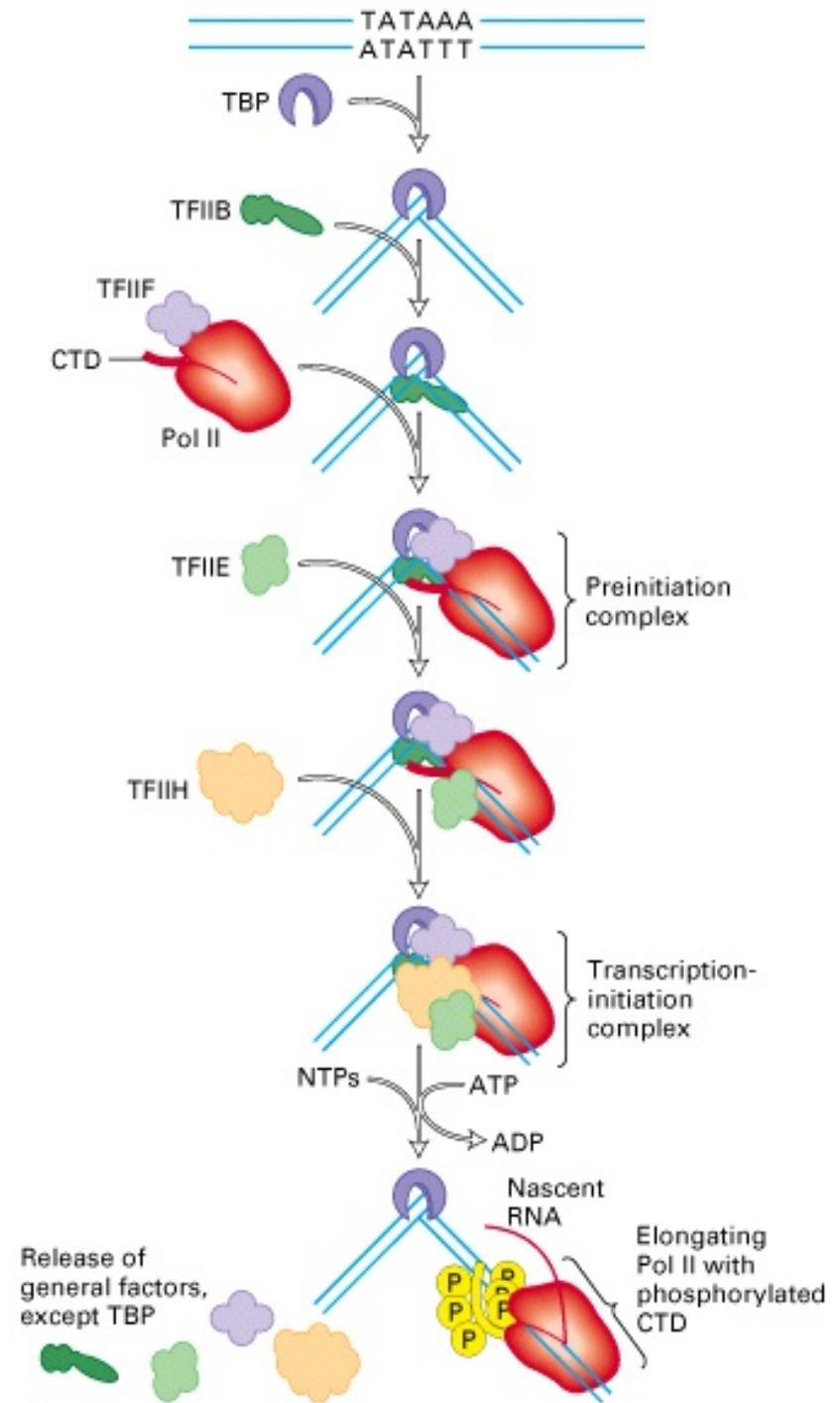
Un altro esempio di regolazione genica in seguito a un segnale:
l'interferone dà inizio a una breve catena di trasduzione del segnale,
che attiva un fattore di trascrizione



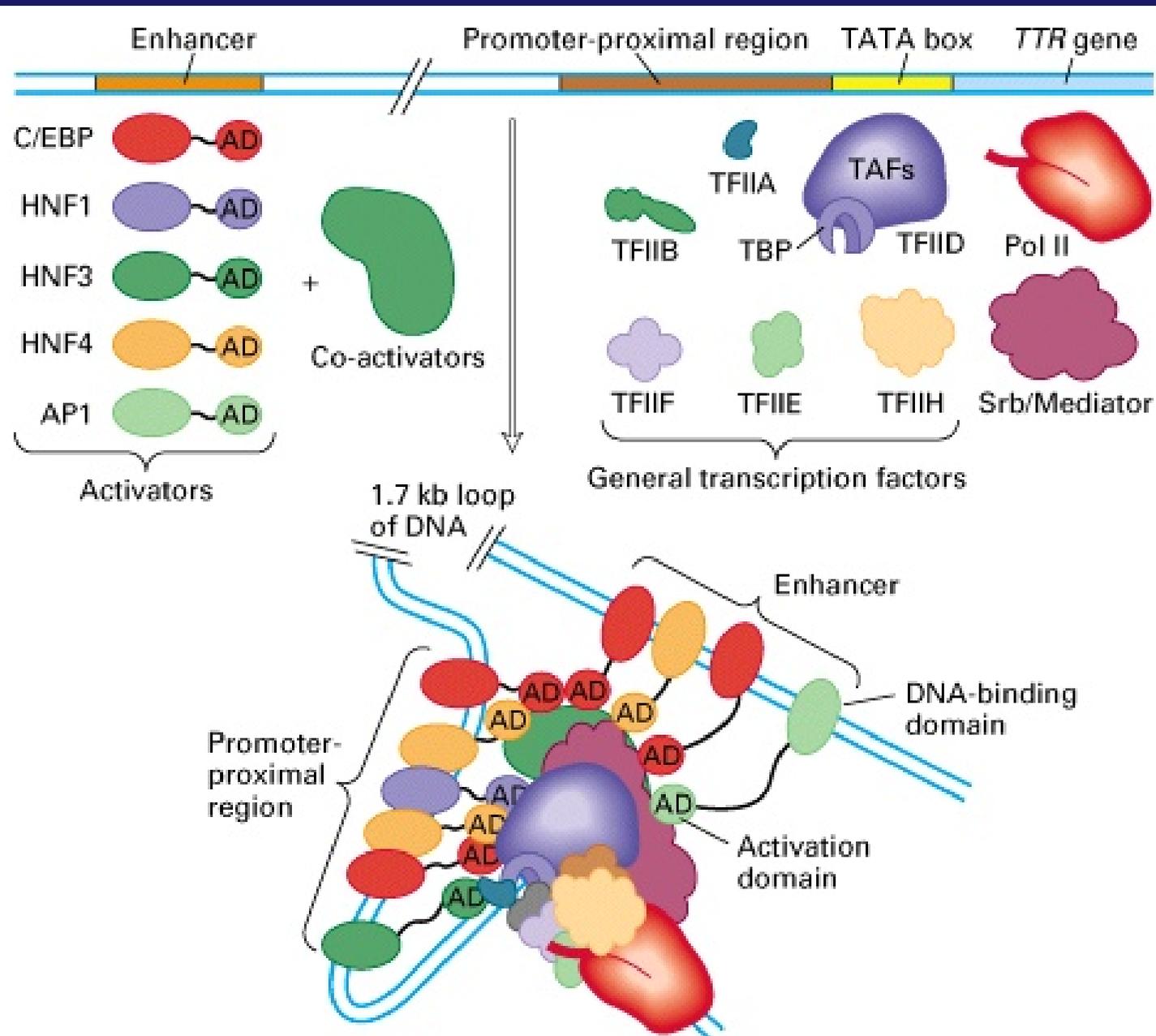
I fattori di trascrizione che si legano alle regioni regolatrici possono indurre un ripiegamento dell'elica che "sforza" il DNA, favorendone la trascrizione. Il contributo delle proteine HMGI è in questo caso essenziale.



La sequenza con cui i fattori di trascrizione basali e gli altri elementi si associano alla TATA box; la Pol II si lega ai fattori basali; la sua fosforilazione a livello del CTD della subunità L1 segna l'inizio della trascrizione. In tutto, il complesso comprende circa 80 polipeptidi e ha una massa di circa 3 Mda.



Gli elementi del complesso di inizio trascrizione



Livelli di regolazione genica degli Eucarioti

- Controllo della maturazione dell'mRNA

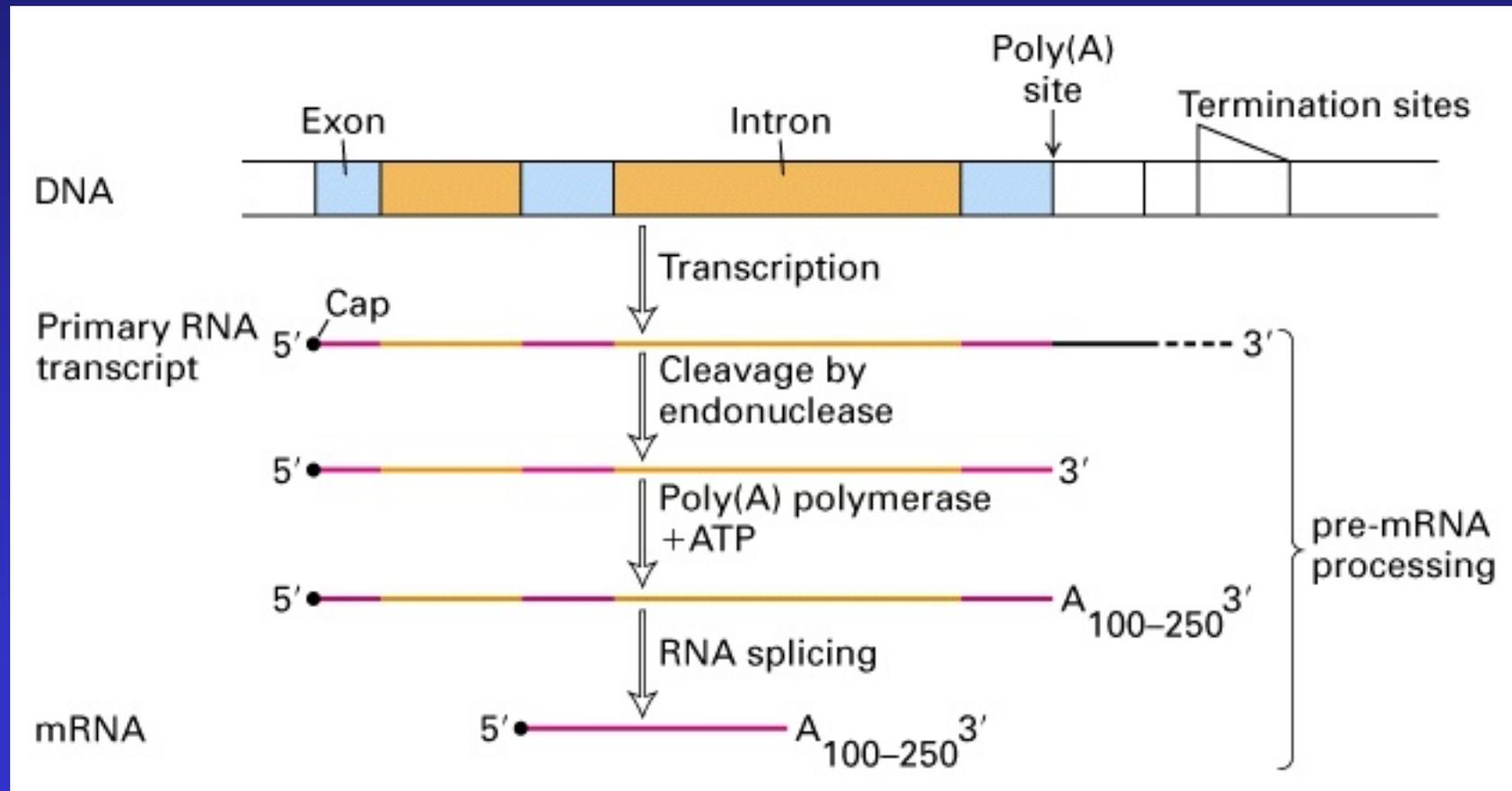
 - controllo dello splicing alternativo

 - controllo dello splicing alternativo associato

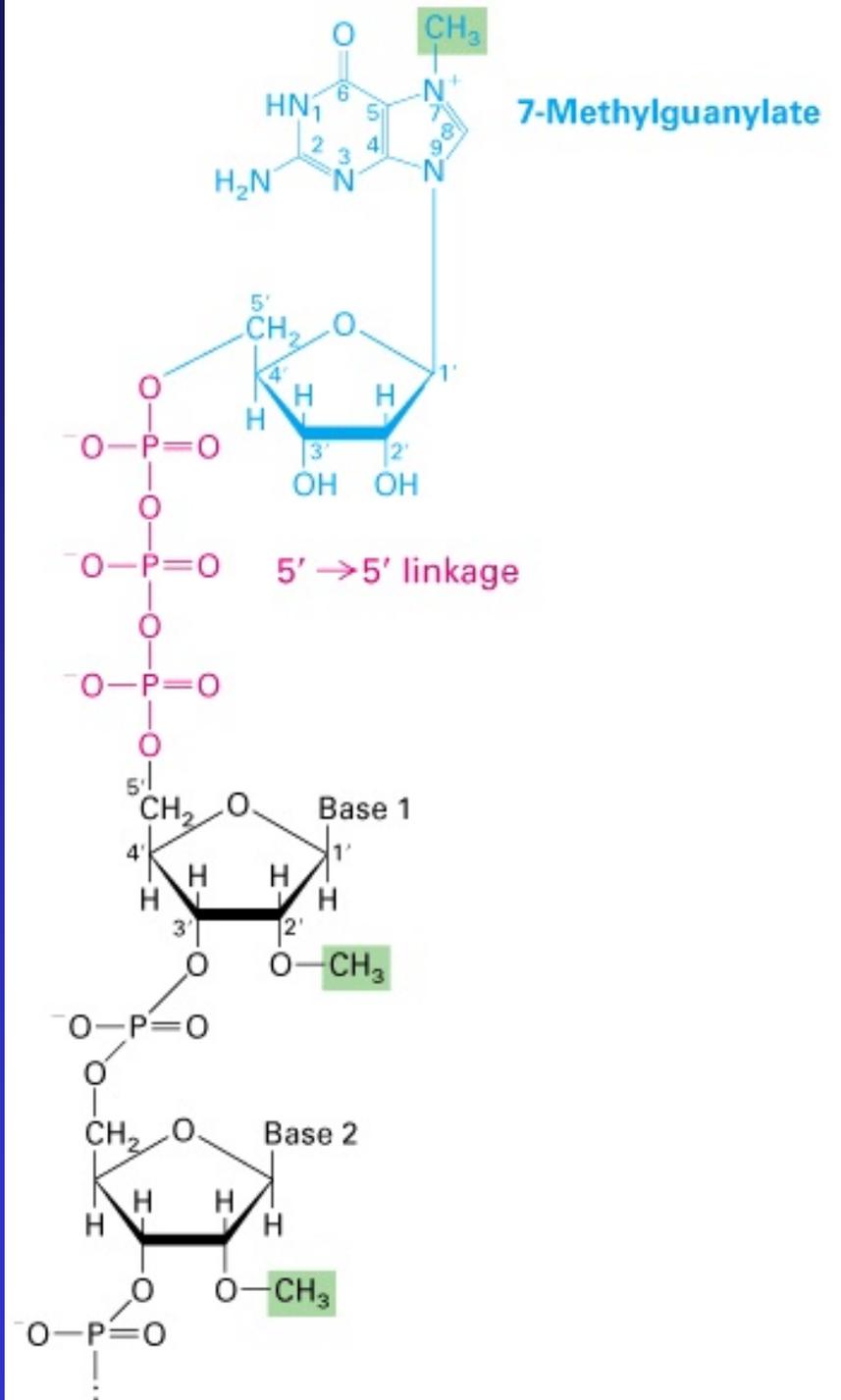
 - al controllo del sito di inizio o di terminazione

- Editing dell'RNA

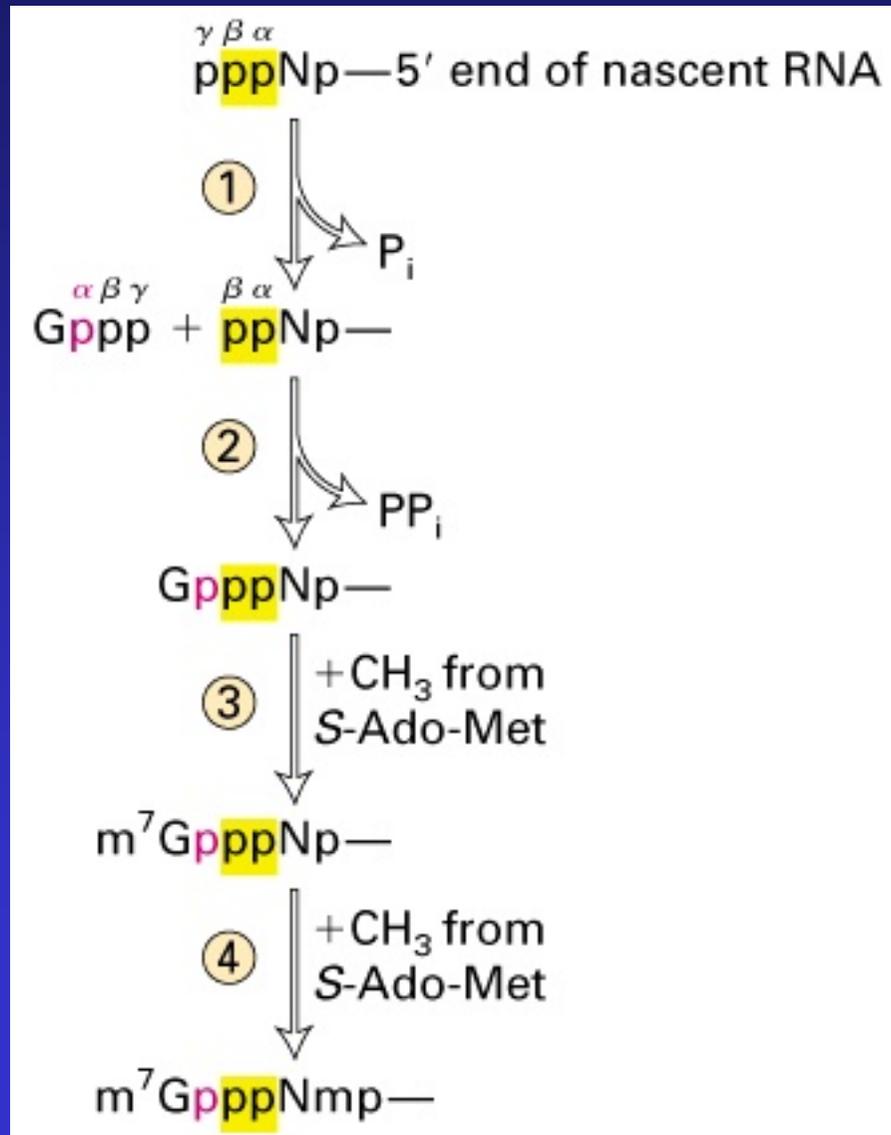
Le tappe della maturazione del pre-mRNA negli eucarioti



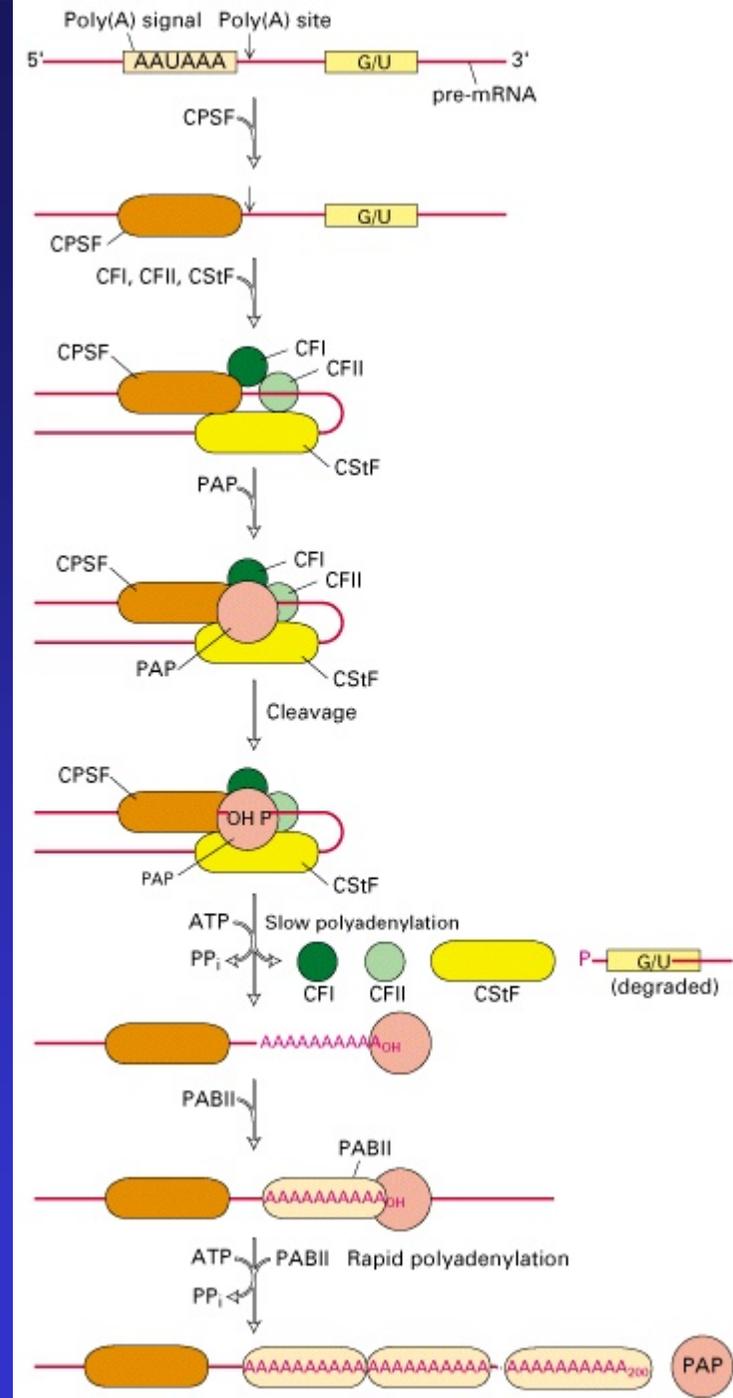
Il Cap all'estremità 5' dell'mRNA è costituito dall'aggiunta di una 7-metil-guanina, che forma un legame 5' → 5' e dalla metilazione delle prime due basi dell'mRNA



Dettaglio della reazione che forma il Cap all'estremità 5'



All'estremità 3' dell'mRNA un complesso proteico riconosce il sito di poliadenilazione, taglia la sequenza a valle e, al suo posto, polimerizza circa 200 unità di Adenina. Una proteina (PAB) lega la coda poly-A.



TERMINAZIONE DELLA TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI

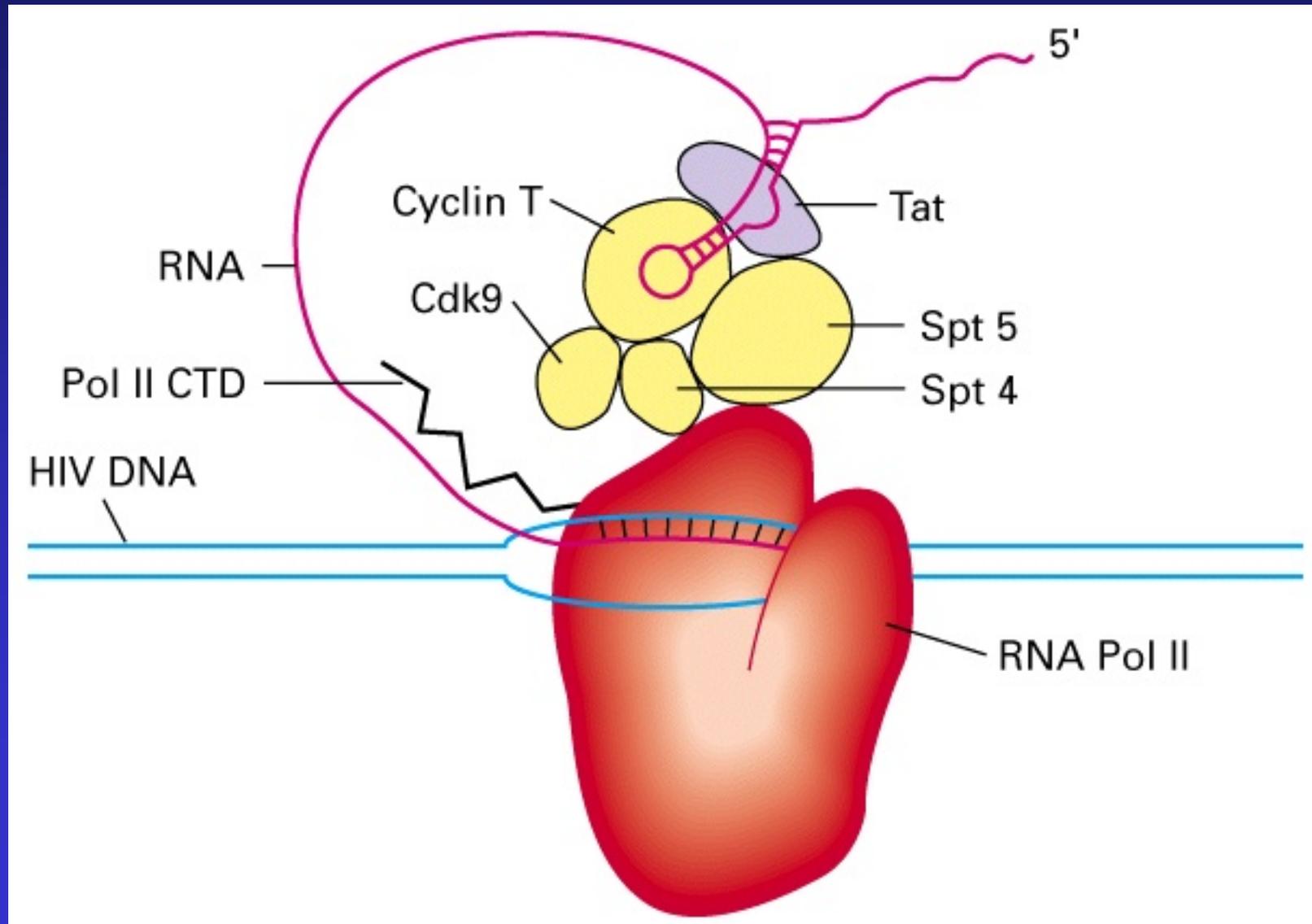
La terminazione della trascrizione dei geni trascritti dalla Pol I e dalla Pol III dipende da sequenze specifiche che legano fattori di terminazione

La terminazione della trascrizione dei geni trascritti dalla Pol II è meno compresa; la trascrizione generalmente prosegue oltre la regione che troveremo a formare l'mRNA maturo; complessi proteici e ribo-proteici, richiamati da sequenze dell'RNA, attuano un taglio e, quasi sempre, aggiungono una “coda poli-A”.

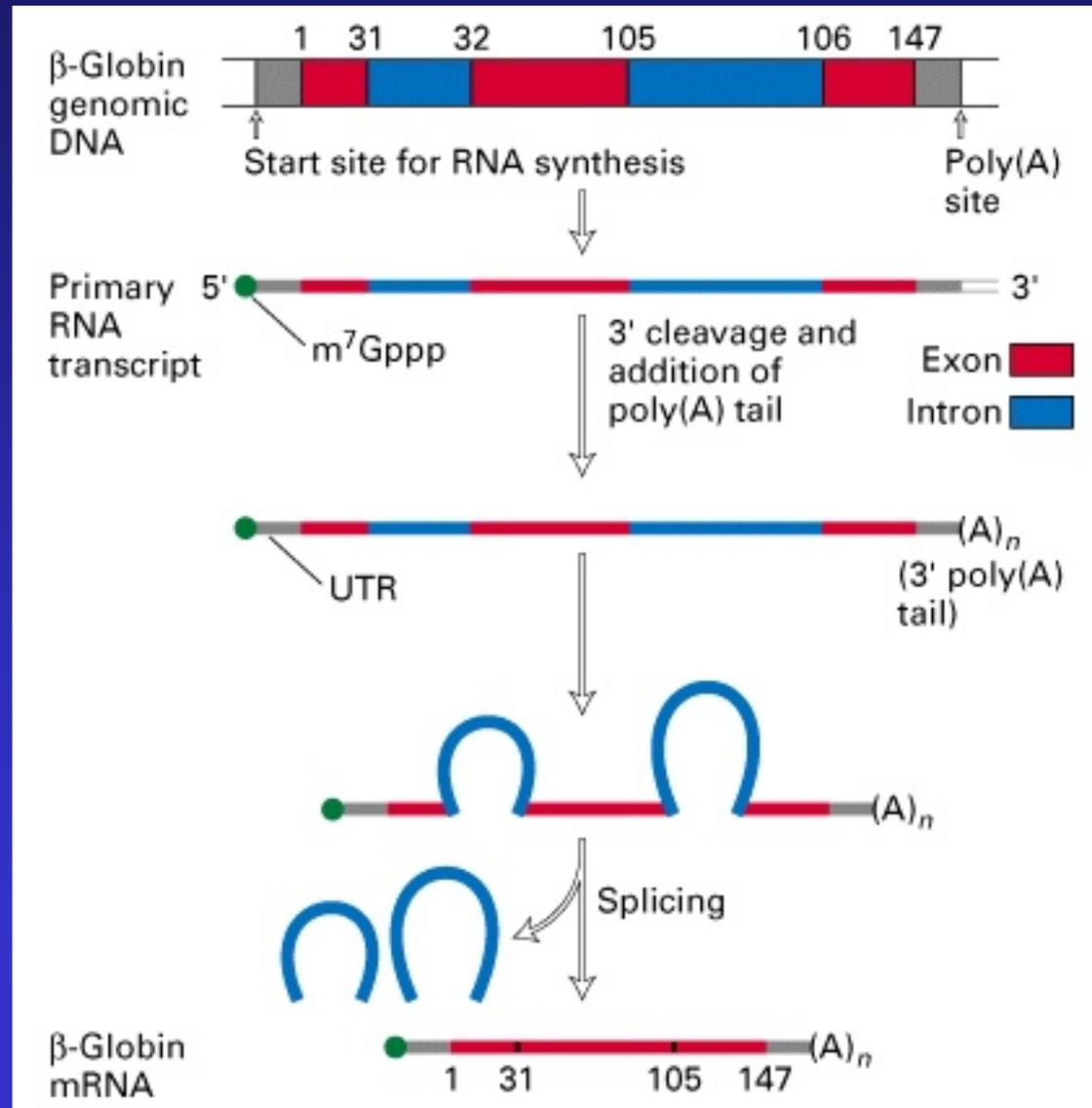
Quando non si ha la poliadenilazione (es. RNA per gli istoni) le riboproteine che intervengono nella terminazione e nel taglio sono diverse.

Il sito di terminazione può essere “scelto”; spesso tale scelta si accoppia alla scelta dello splicing differenziale.

La proteina Tat di HIV inibisce la terminazione della trascrizione

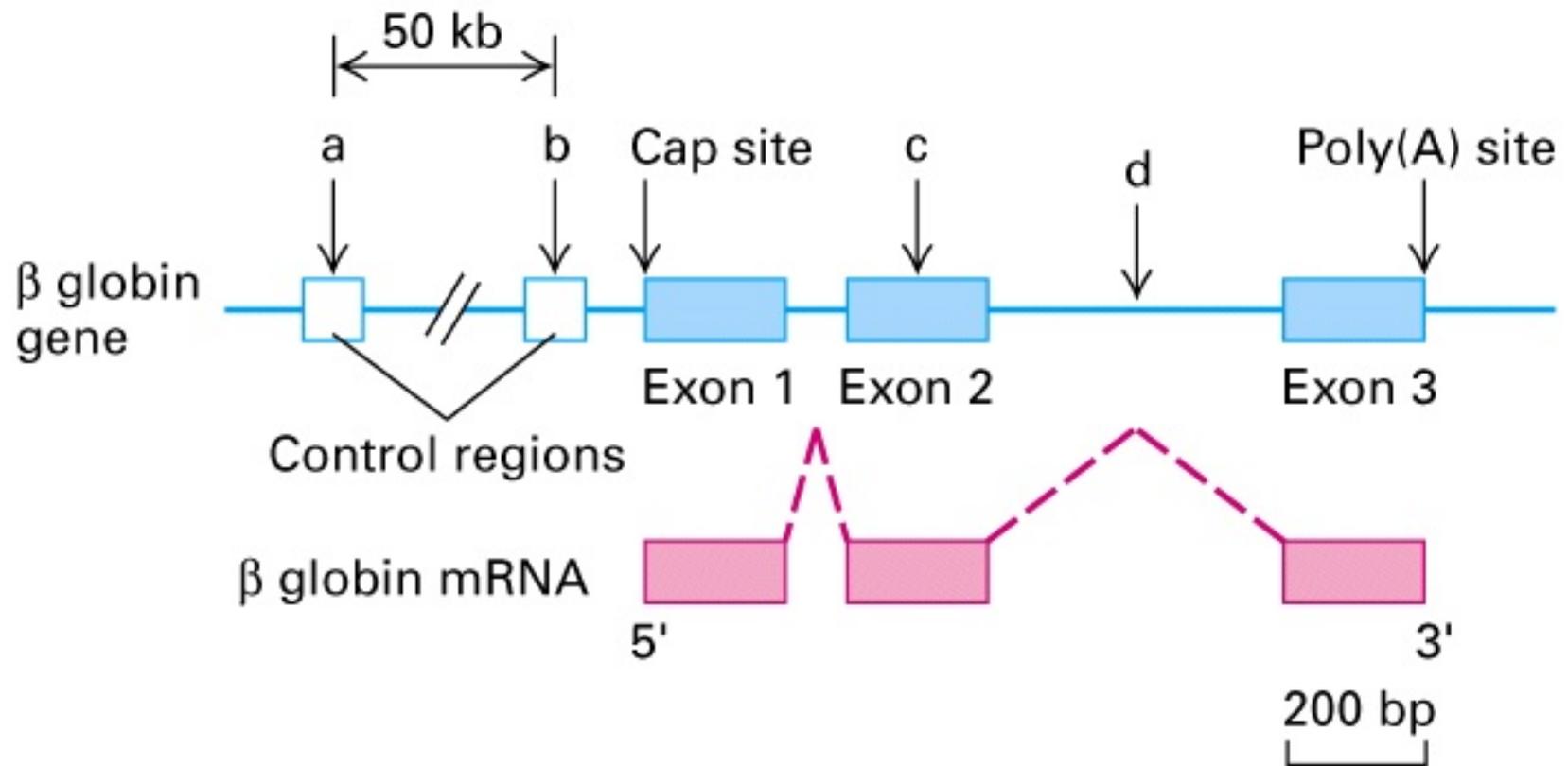


Schema dello splicing

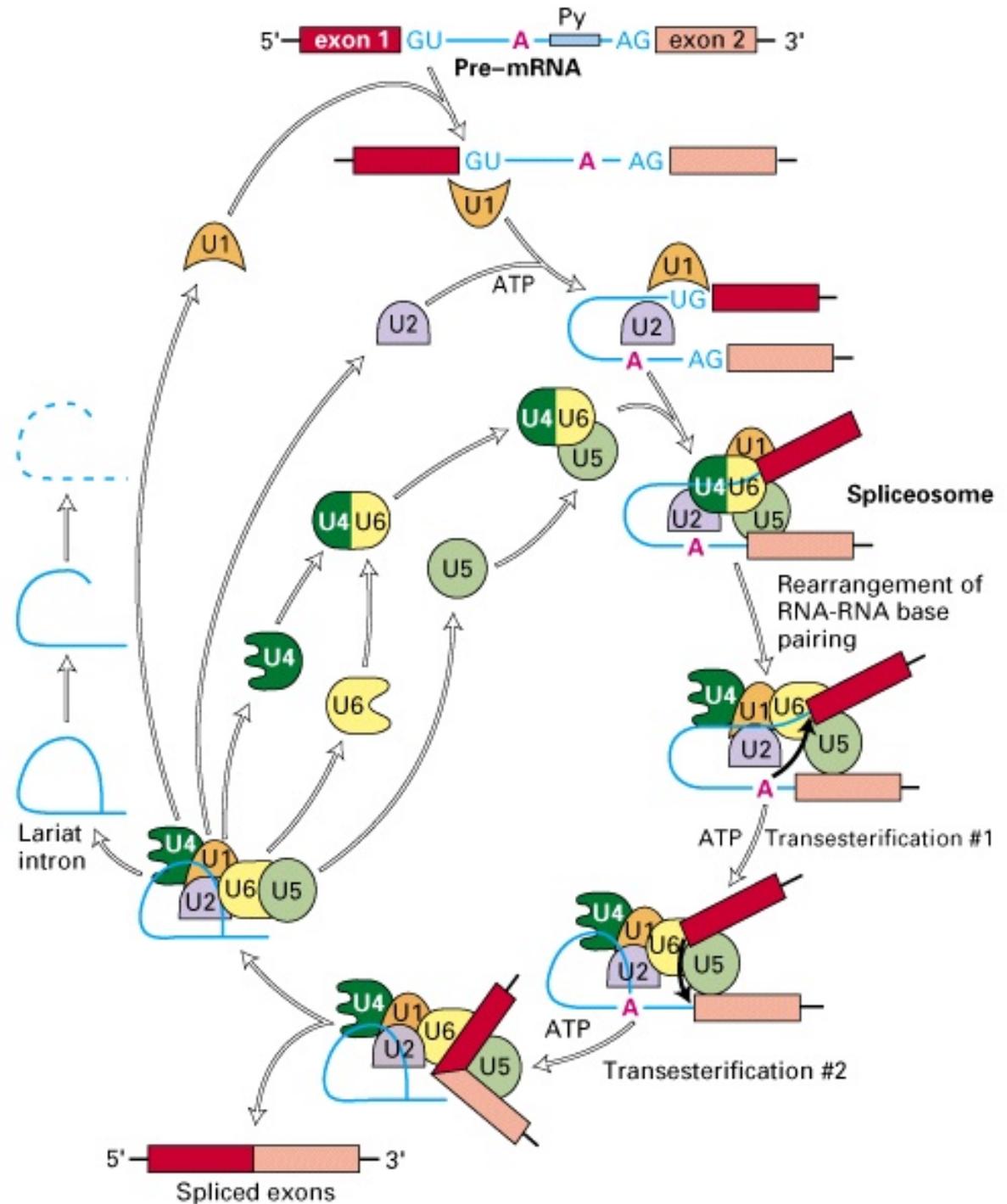


Schema dello splicing

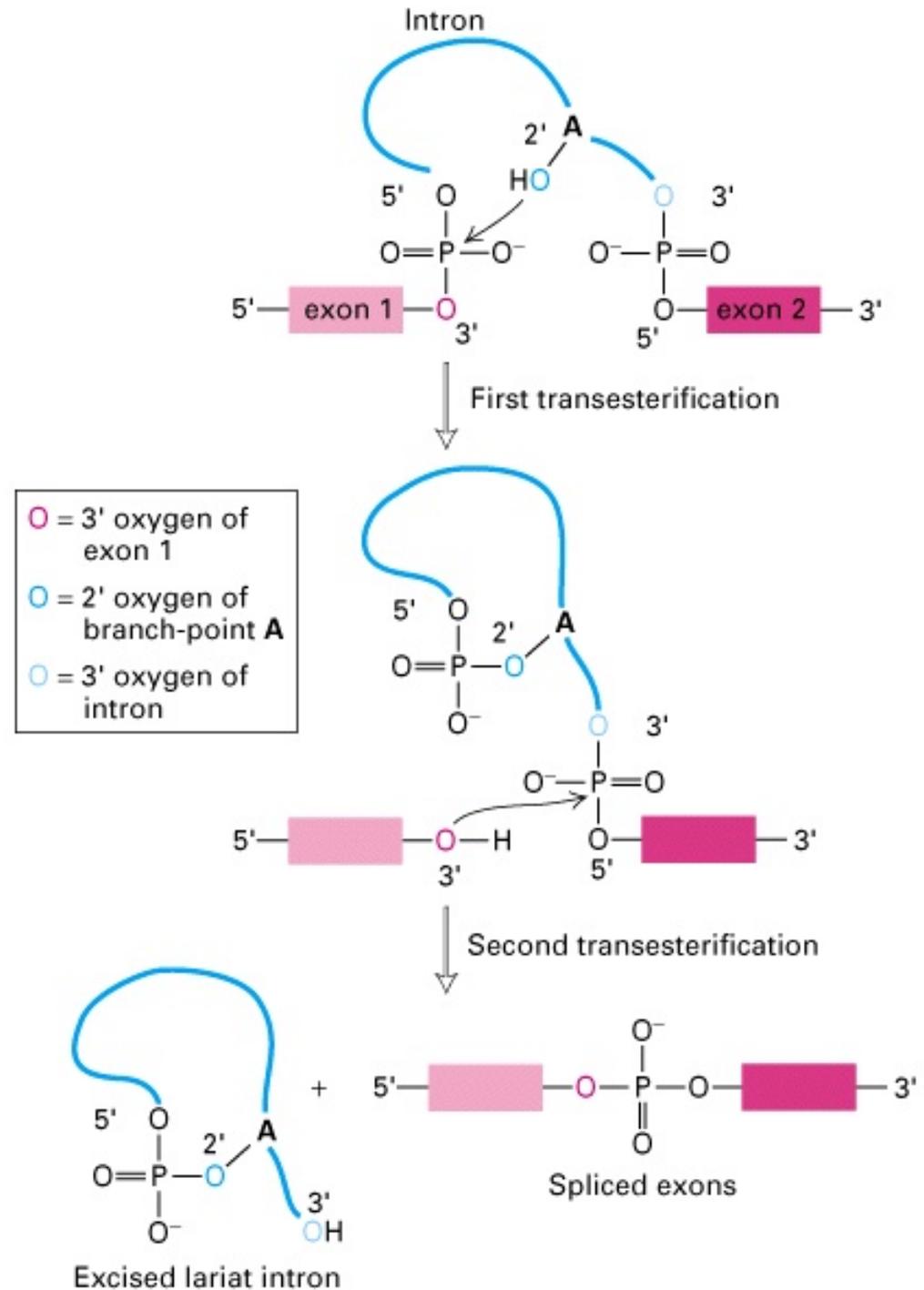
(b) Eukaryotic simple transcription unit



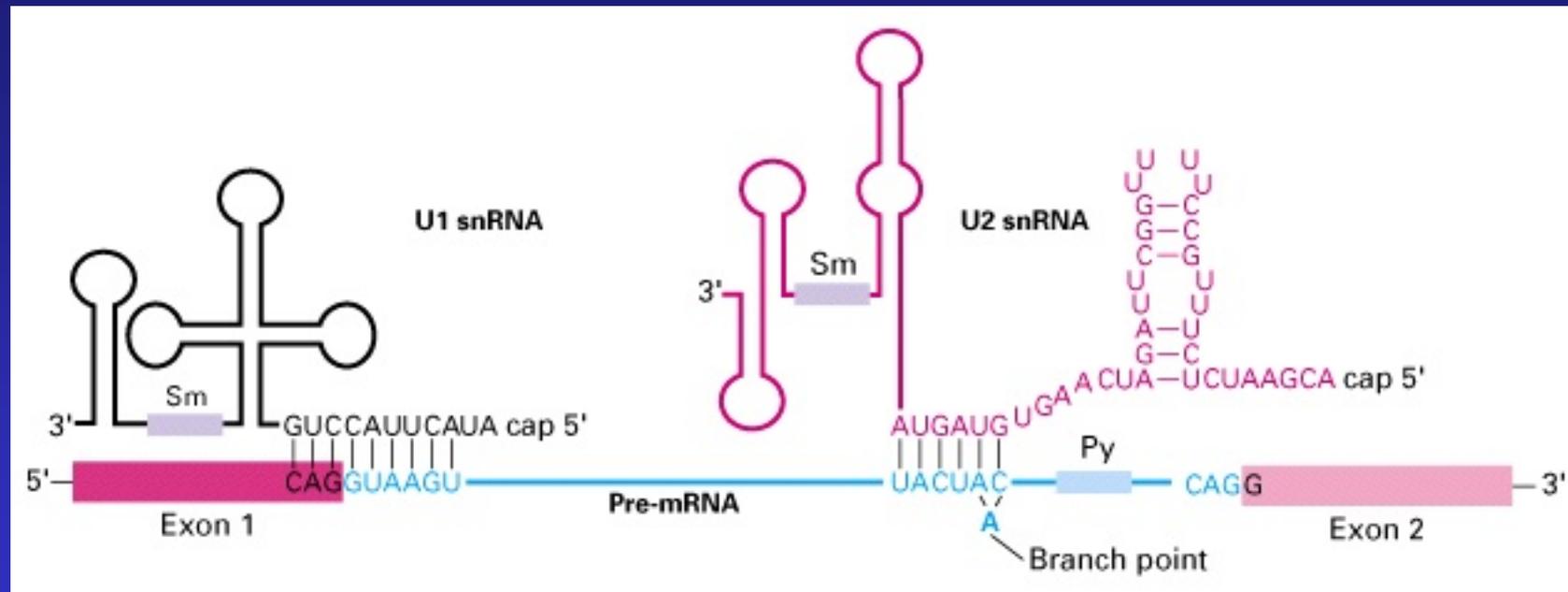
L'azione delle ribonucleoproteine (snRP) che compiono lo splicing del pre-mRNA



Dettaglio del cappio e della reazione di transesterificazione

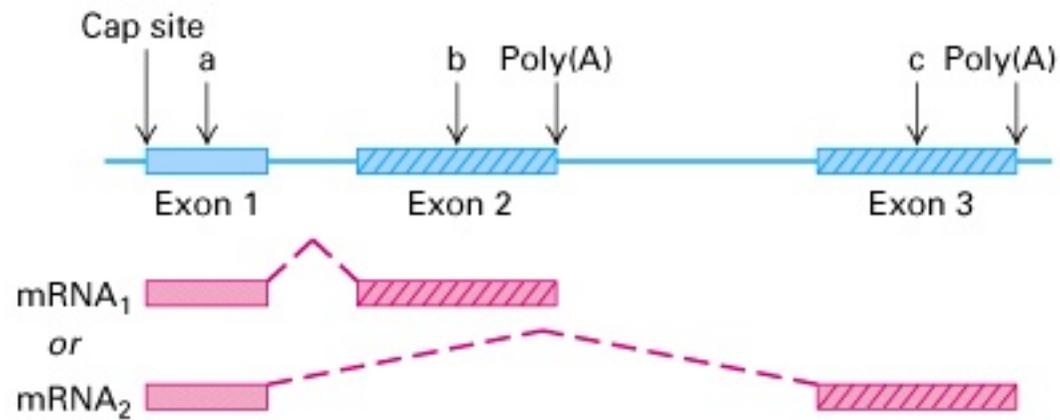


Dettaglio dell'azione delle snRNP nello splicing

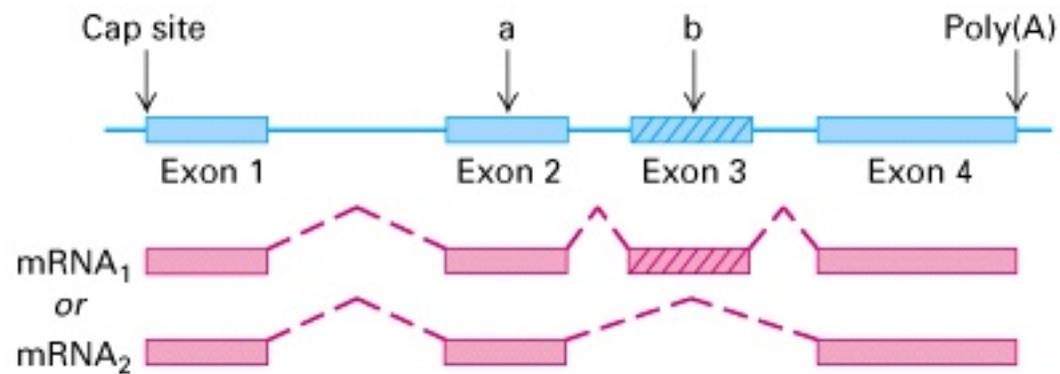


Splicing alternativo: schema

(a) Alternative 3' exons

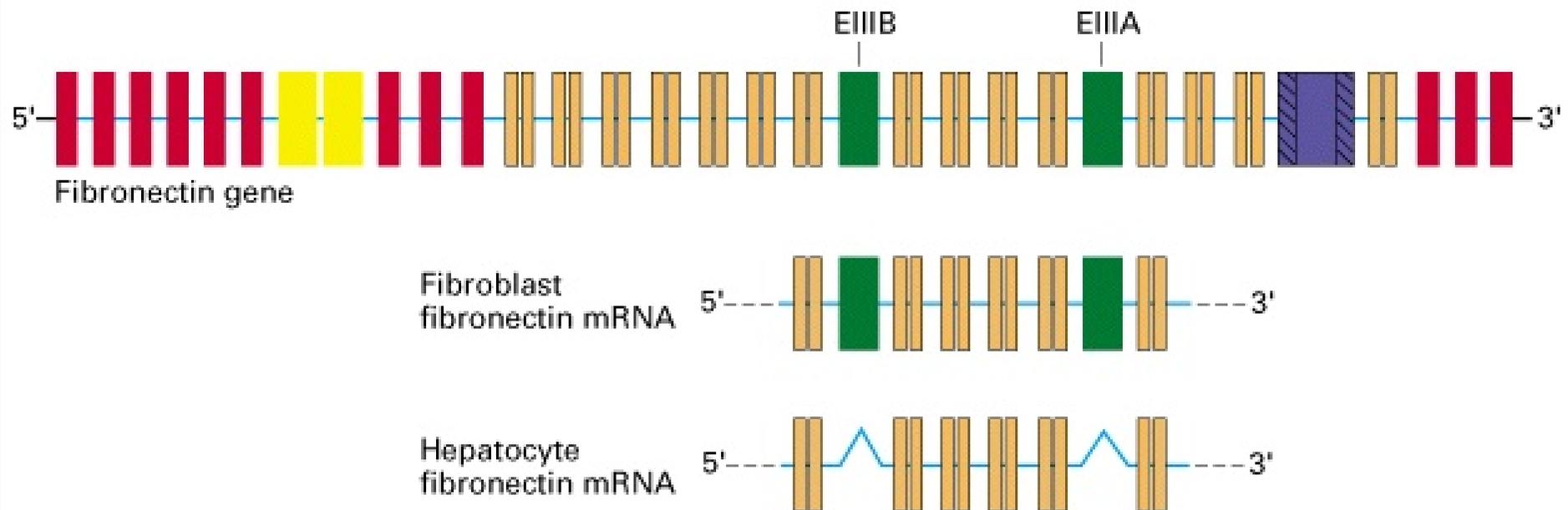


(b) Alternative internal exons

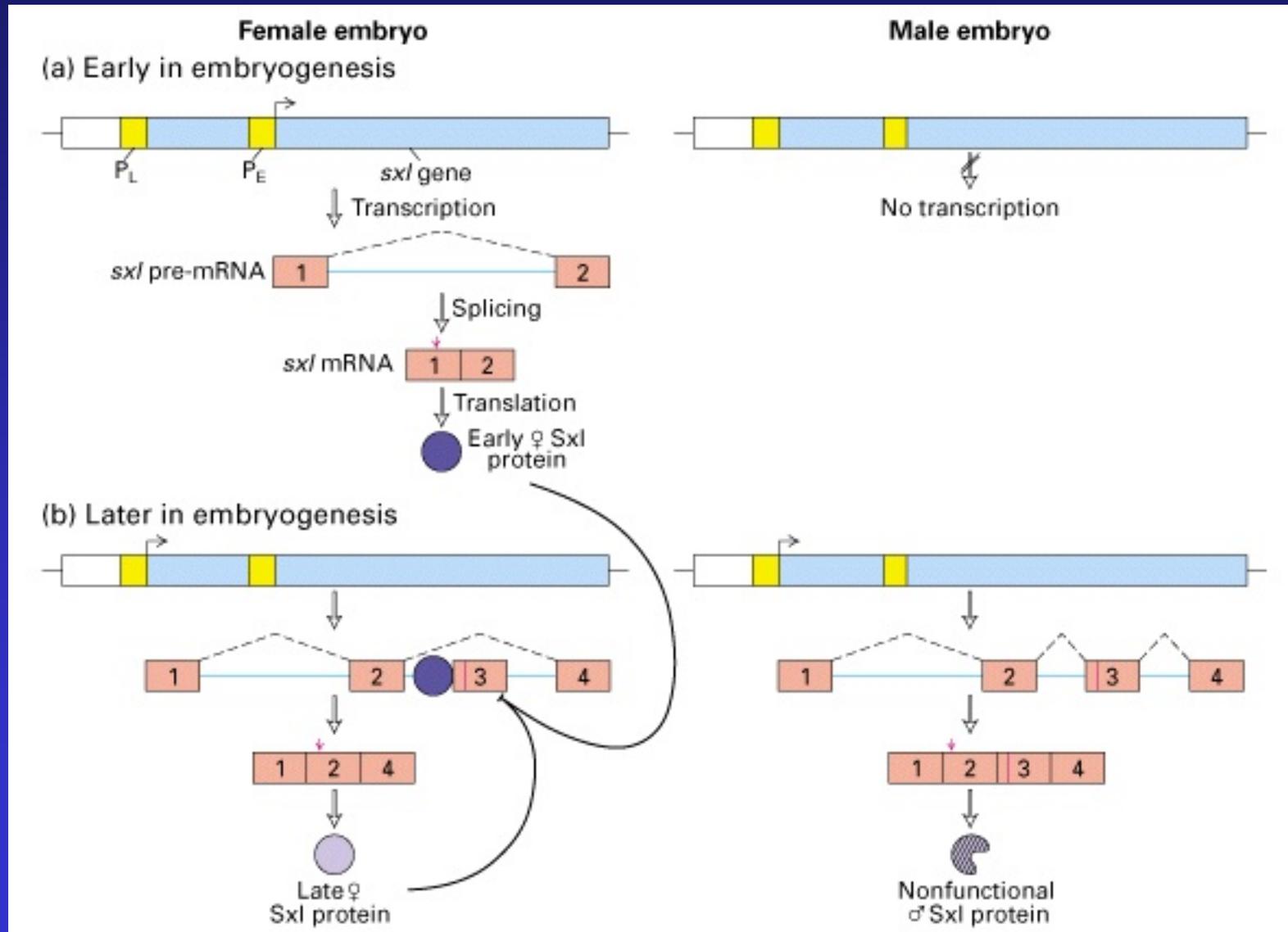


Splicing alternativo tessuto-specifico del gene della fibronectina

L'eliminazione degli esoni EIIIB ed EIIIA rende la fibronectina secreta dagli epatociti non aderente alla superficie cellulare e, quindi, solubile; essa tuttavia è in grado di legare la fibrina dei coaguli e, in tale stato, le integrine sulla superficie delle piastrine attivate, bloccandole nel loro flusso e contribuendo all'ingrandimento del coagulo.



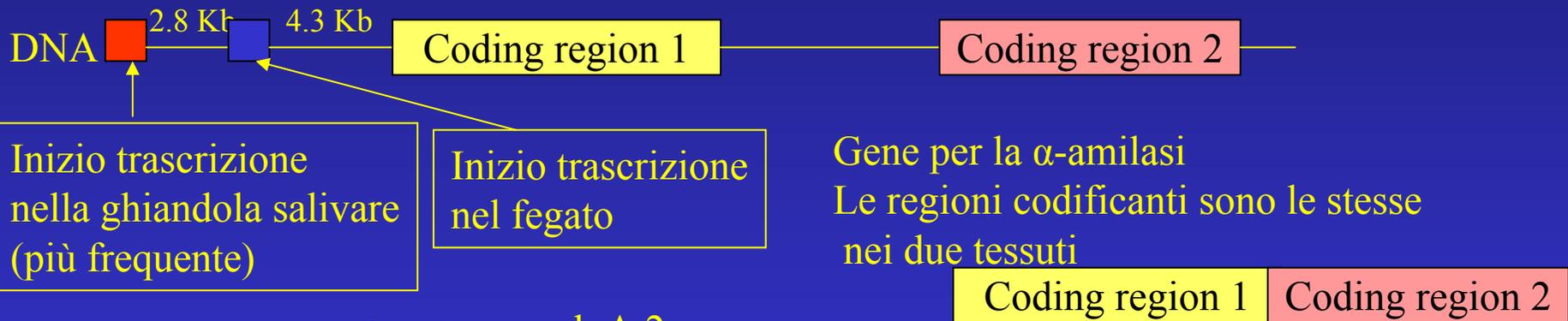
Lo splicing alternativo determina il sesso nella *Drosophila*



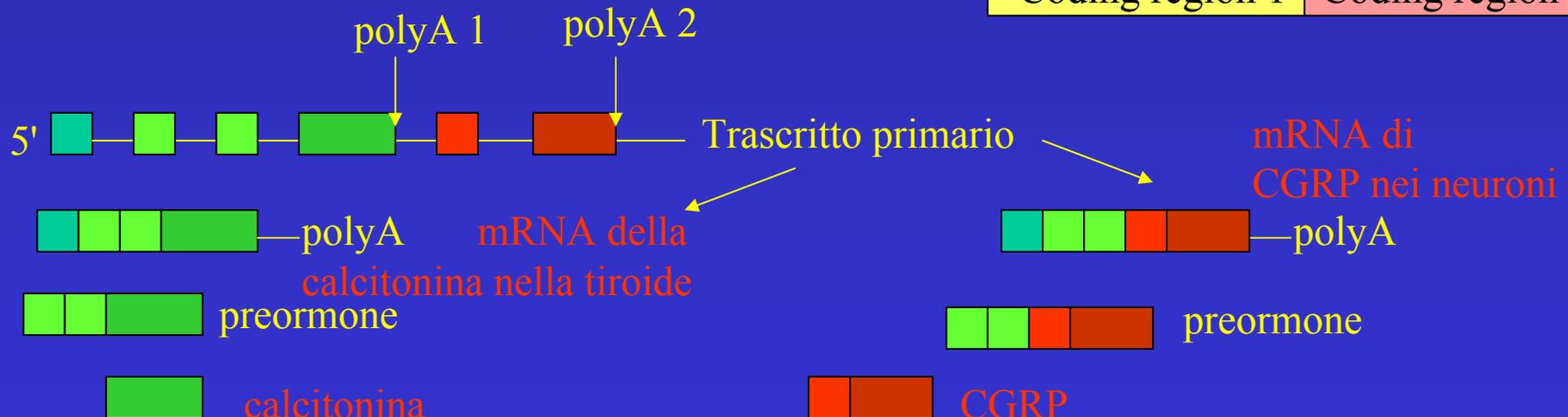
Tre esempi di splicing differenziale



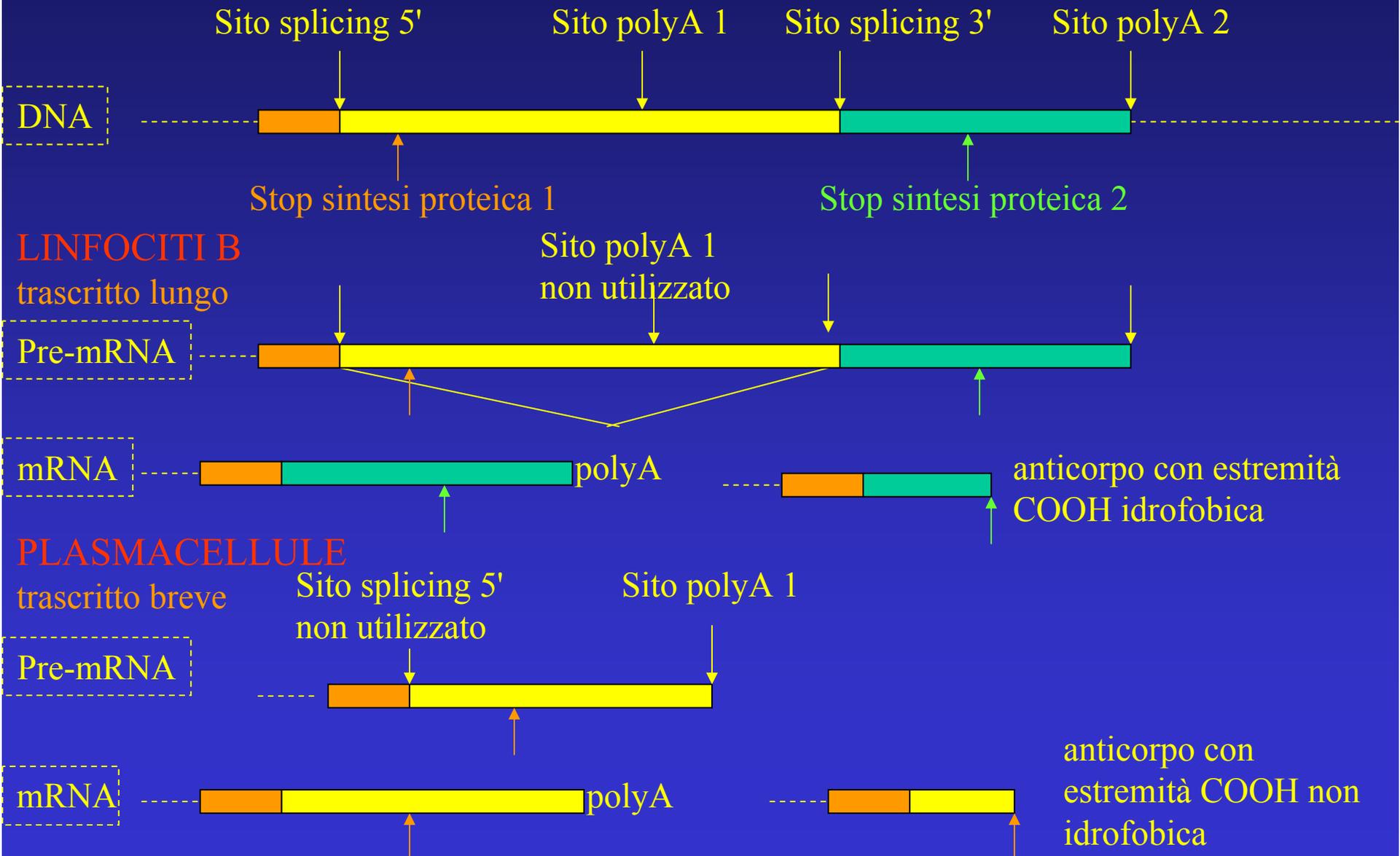
Troponina T del muscolo scheletrico; gli esoni in verde possono essere presenti o no, dando luogo a 32 combinazioni; gli esoni rosso e arancio si escludono a vicenda; in totale possiamo avere 64 isoforme diverse per effetto dello splicing alternativo



Gene per la α -amilasi
Le regioni codificanti sono le stesse nei due tessuti

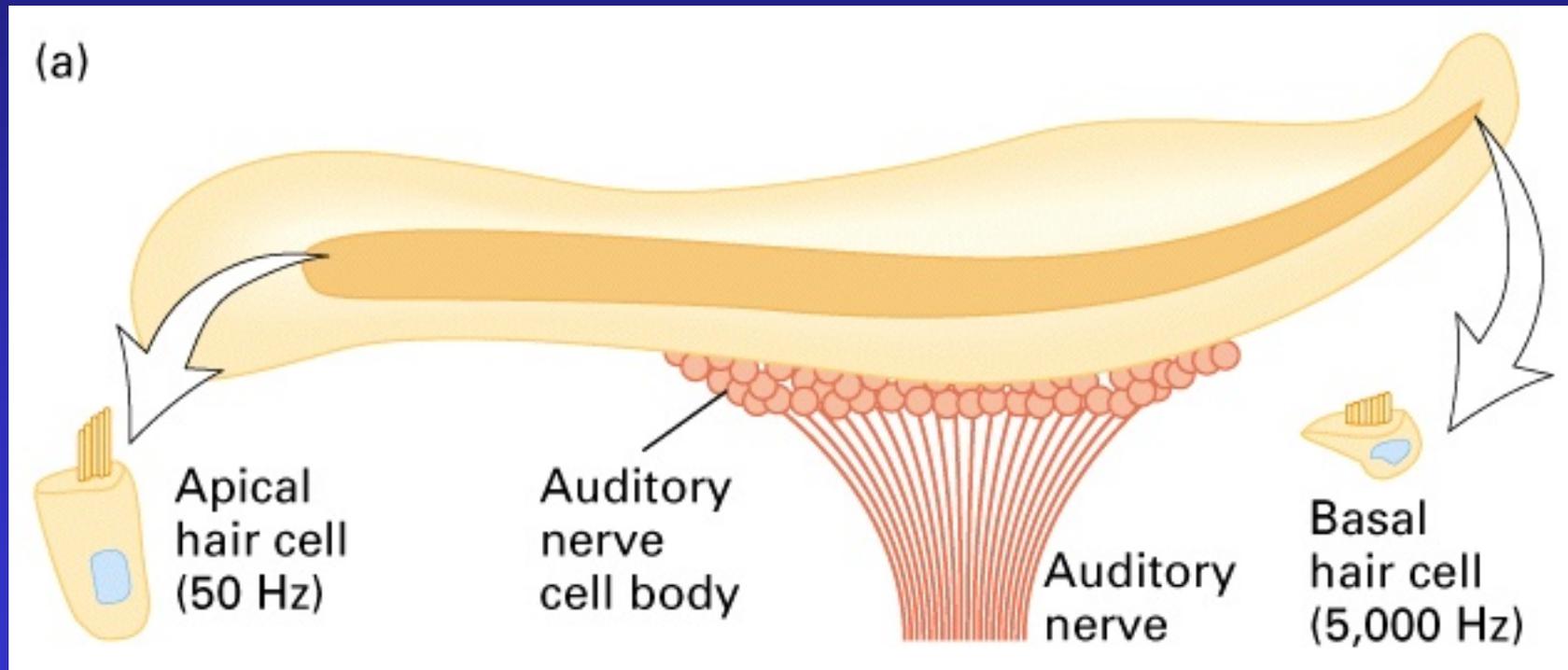


Lo splicing differenziale nella formazione degli anticorpi

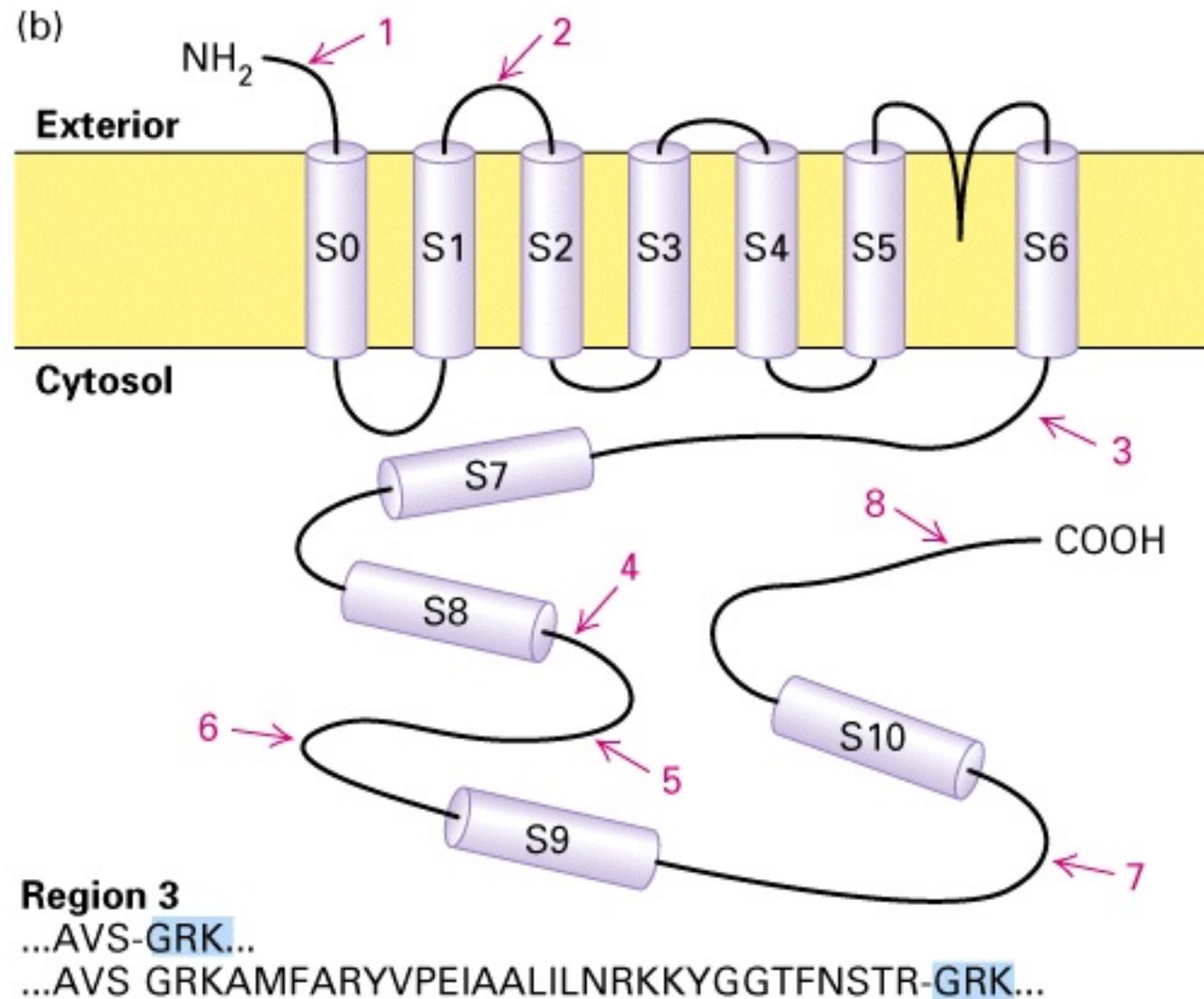


L'organo del Corti, nelle cui cellule è espressa la proteina *Slo*.

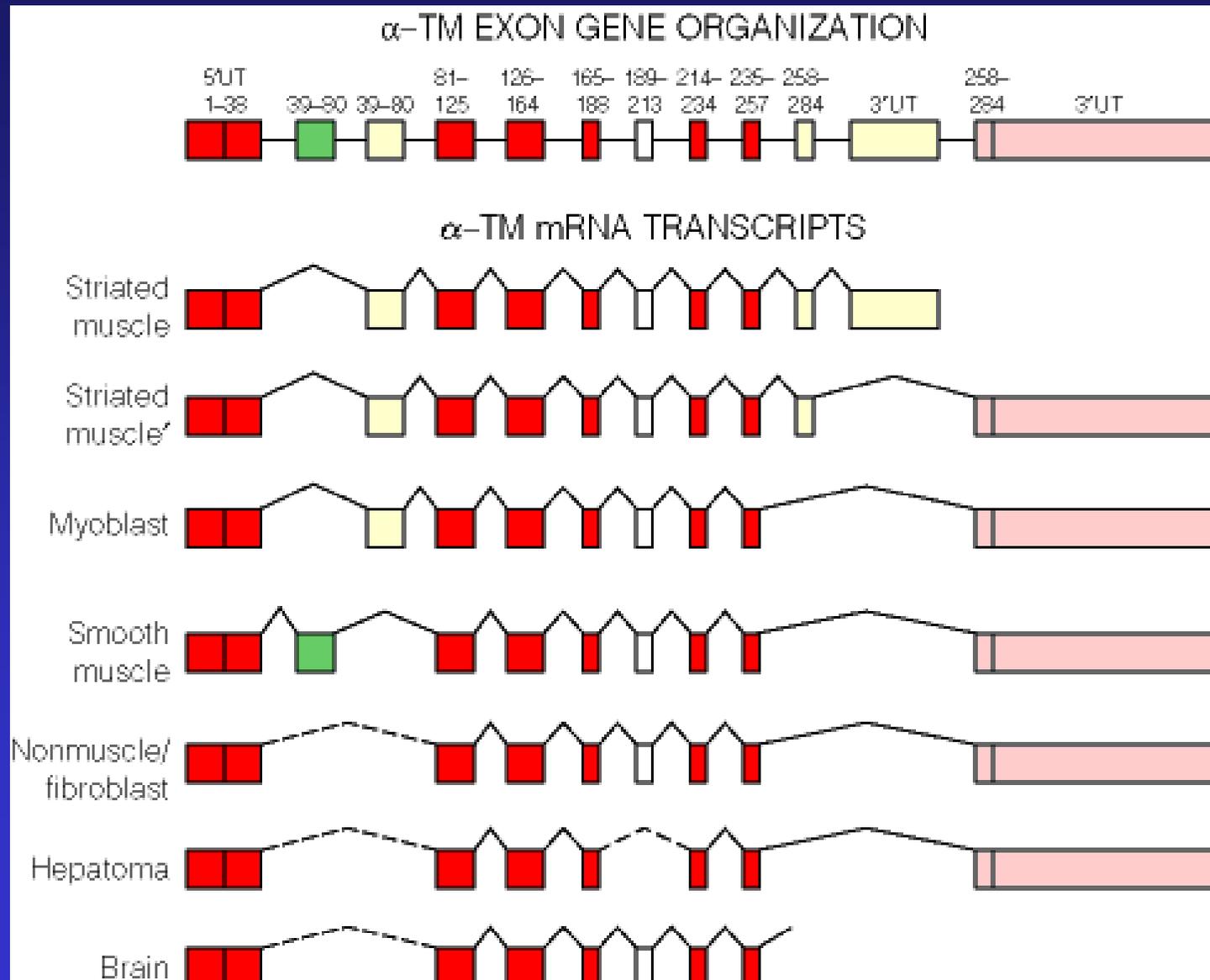
Slo presenta >500 isoforme, per effetto dello splicing alternativo; le cellule dotate di stereociglia, distribuite lungo tale organo, reagiscono a suoni di diversa lunghezza d'onda



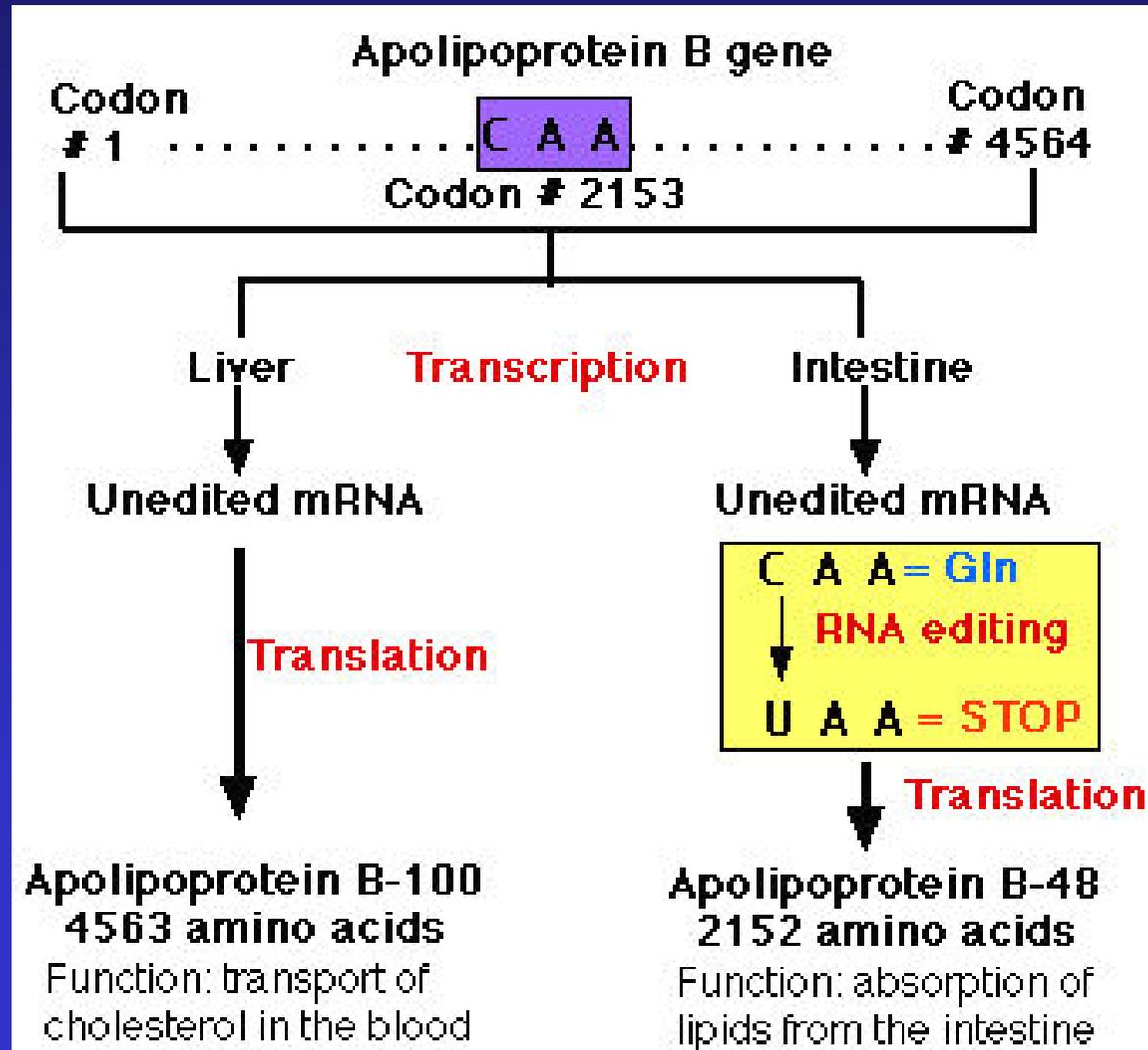
La proteina *Slo* codifica un canale del calcio; le sue forme alternative reagiscono a segnali leggermente diversi, determinando la diversa sensibilità delle cellule della coclea a suoni di diversa ampiezza



Alfa-tropomiosina: splicing alternativo specifico per tessuto



L'unico esempio di RNA editing noto nei mammiferi riguarda la proteina ApoB, che lega il colesterolo. Nell'intestino, l'mRNA viene modificato in maniera estremamente specifica dall'enzima citidina deaminasi. La C deaminata diventa U e il codon UAA è un codon di stop.

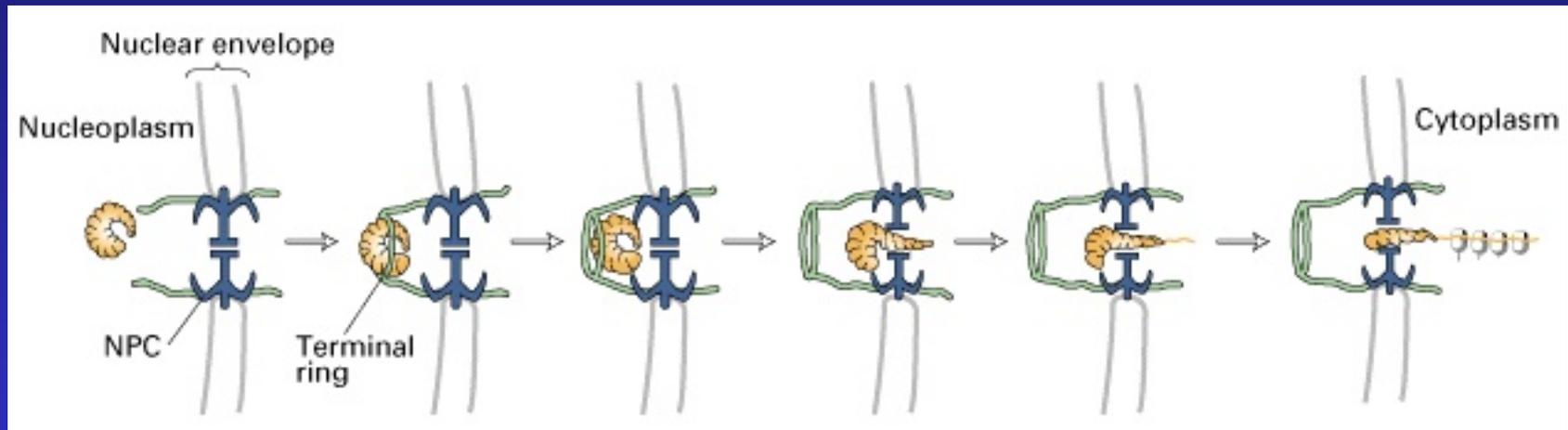


Livelli di regolazione genica degli Eucarioti

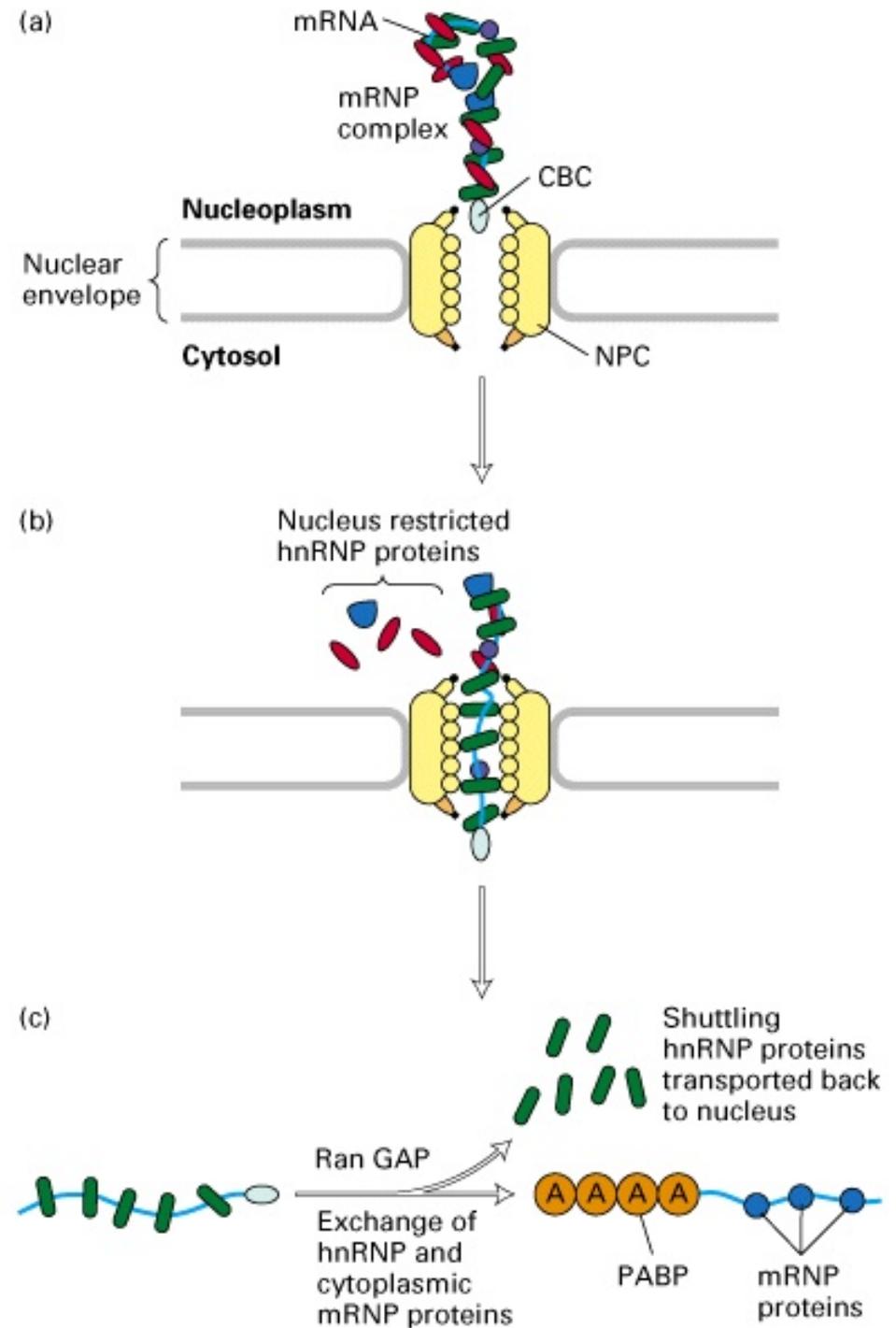
- Controllo del trasporto nel citoplasma
 - legame a proteine di trasporto
 - degradazione intra-nucleare
- Controllo della localizzazione citoplasmatica dell'mRNA
 - ruolo del citoscheletro
- Controllo della stabilità (ossia della vita media) dell'mRNA
 - regioni ricche di AU, come (AUUA) sono associate a breve emivita dell'mRNA
 - presenza coda polyA, stabilizzazione con PAB, formazione di un complesso ad anello, ruolo di fattori accessori
 - degradazione mediata dal prodotto
- Small Interfering RNAs e micro-RNAs

Trasporto dell'mRNA attraverso il complesso del poro nucleare

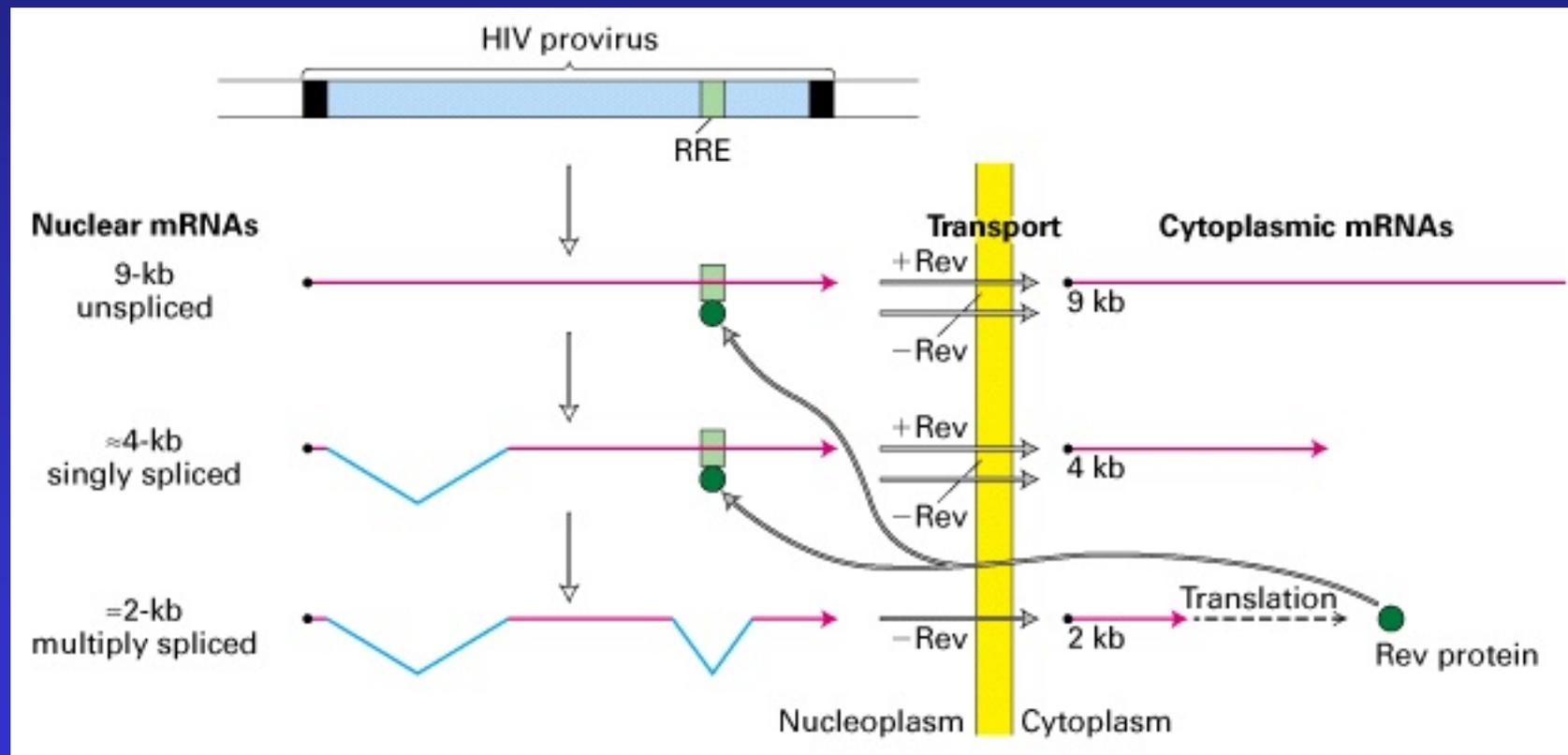
Le proteine del complesso del poro modificano la loro conformazione al passaggio dell'mRNA



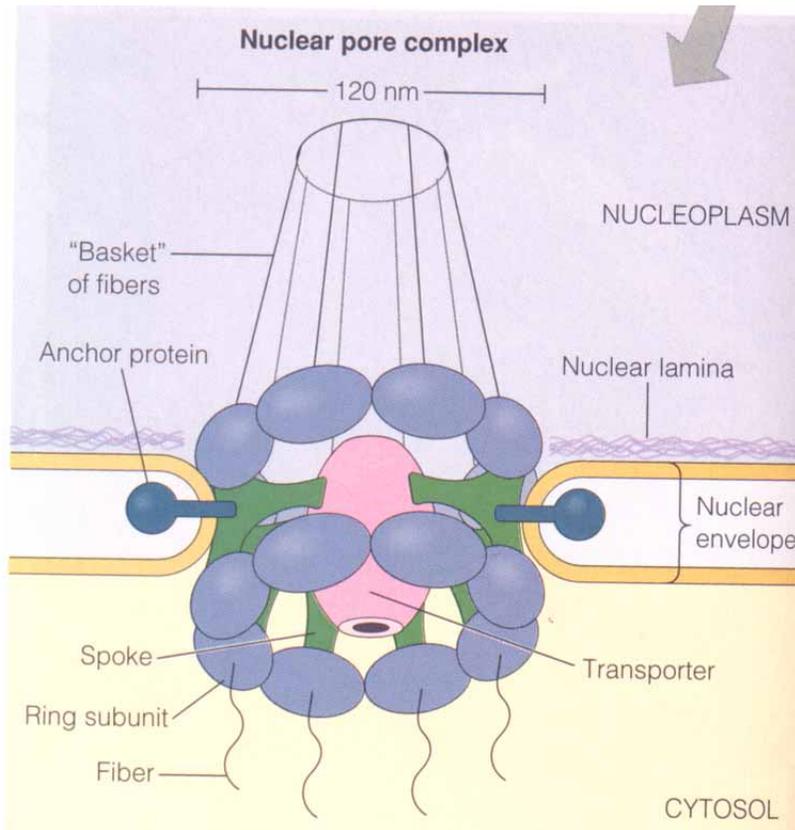
Trasporto dell'mRNA
attraverso il complesso del
poro nucleare
Alcune proteine accompagnano
l'mRNA nel citoplasma, ma
rientrano nel nucleo allorché
sono sostituite da proteine
citoplasmatiche



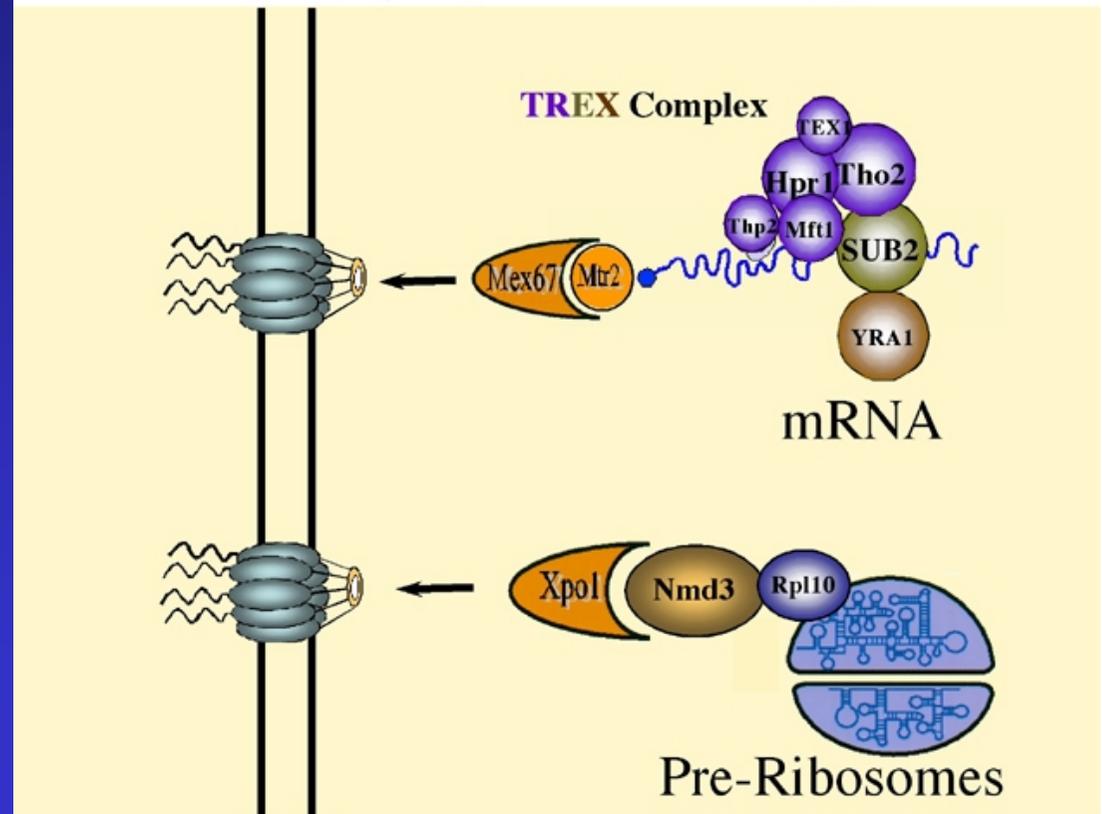
La proteina Rev di HIV consente l'esportazione dal nucleo dei pre-mRNA di HIV che non hanno subito splicing o con splicing incompleto. In tal modo viene aggirato il meccanismo che normalmente impedisce a mRNA con splicing incompleto di lasciare il nucleo



Struttura del poro nucleare

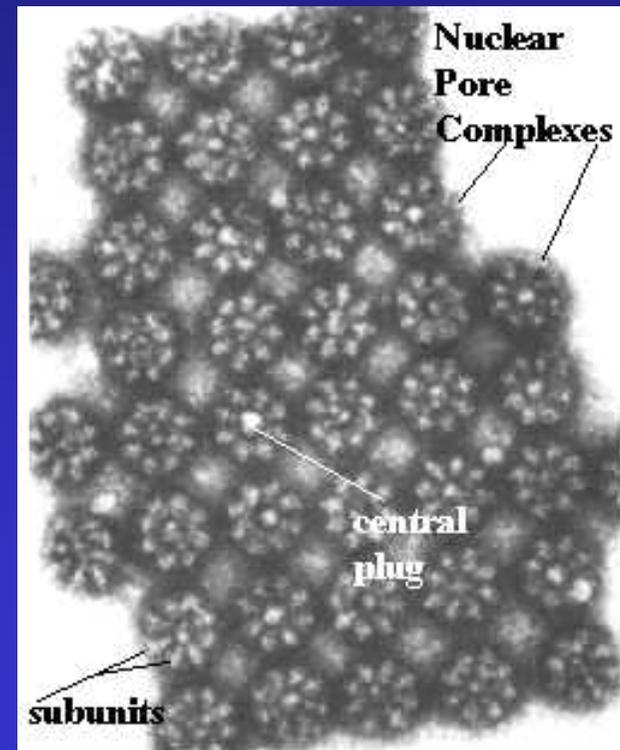
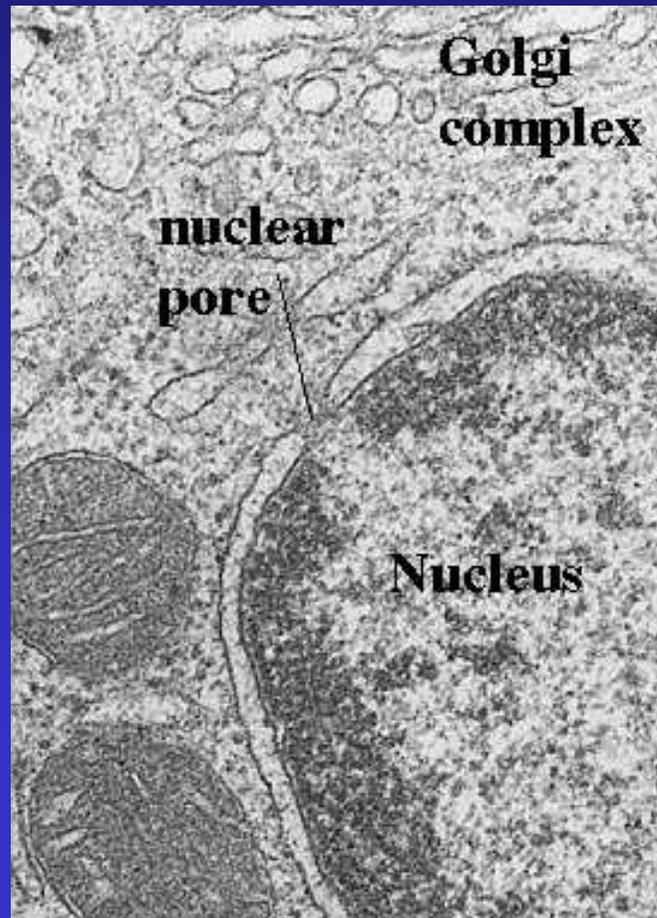


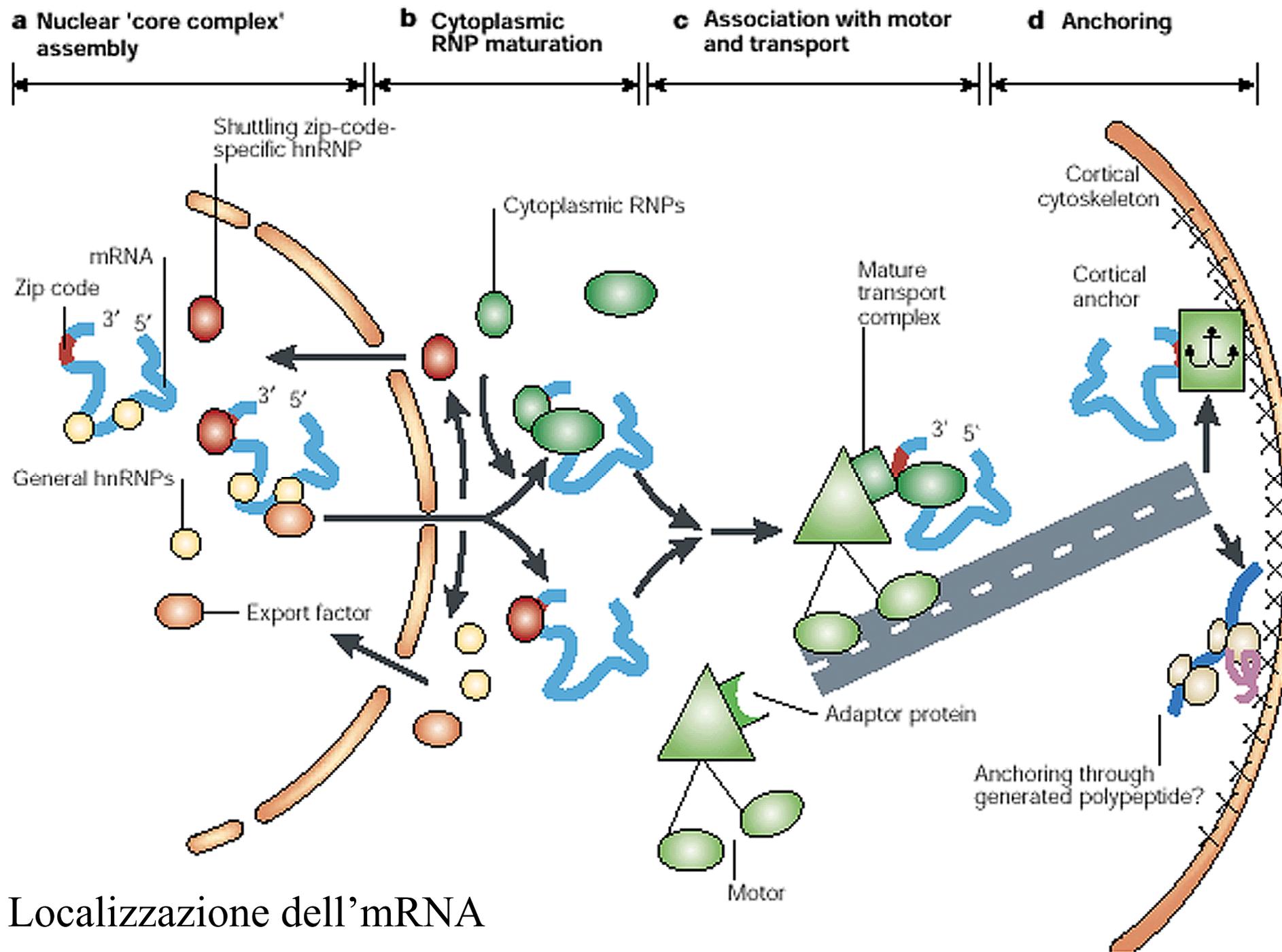
Nucleo-Cytoplasmic Transport



Il complesso di trasporto dell'mRNA e dei ribosomi a livello del poro nucleare

Il poro nucleare al microscopio elettronico a trasmissione

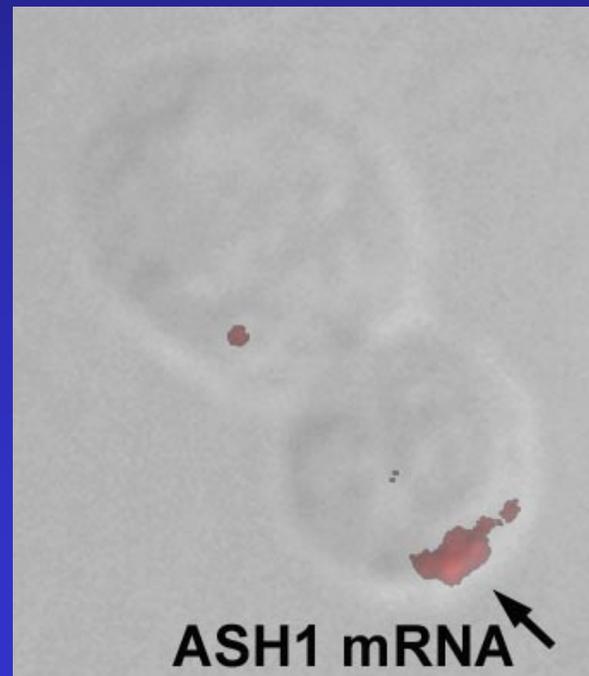




Localizzazione dell'mRNA

Esempio di localizzazione specifica di un mRNA

Nel lievito gemmante, l'mRNA ASH1, trascritto nella cellula "madre", si colloca nella gemma, dove verrà tradotto. La relativa proteina reprime la trascrizione del gene HO nella cellula "figlia".

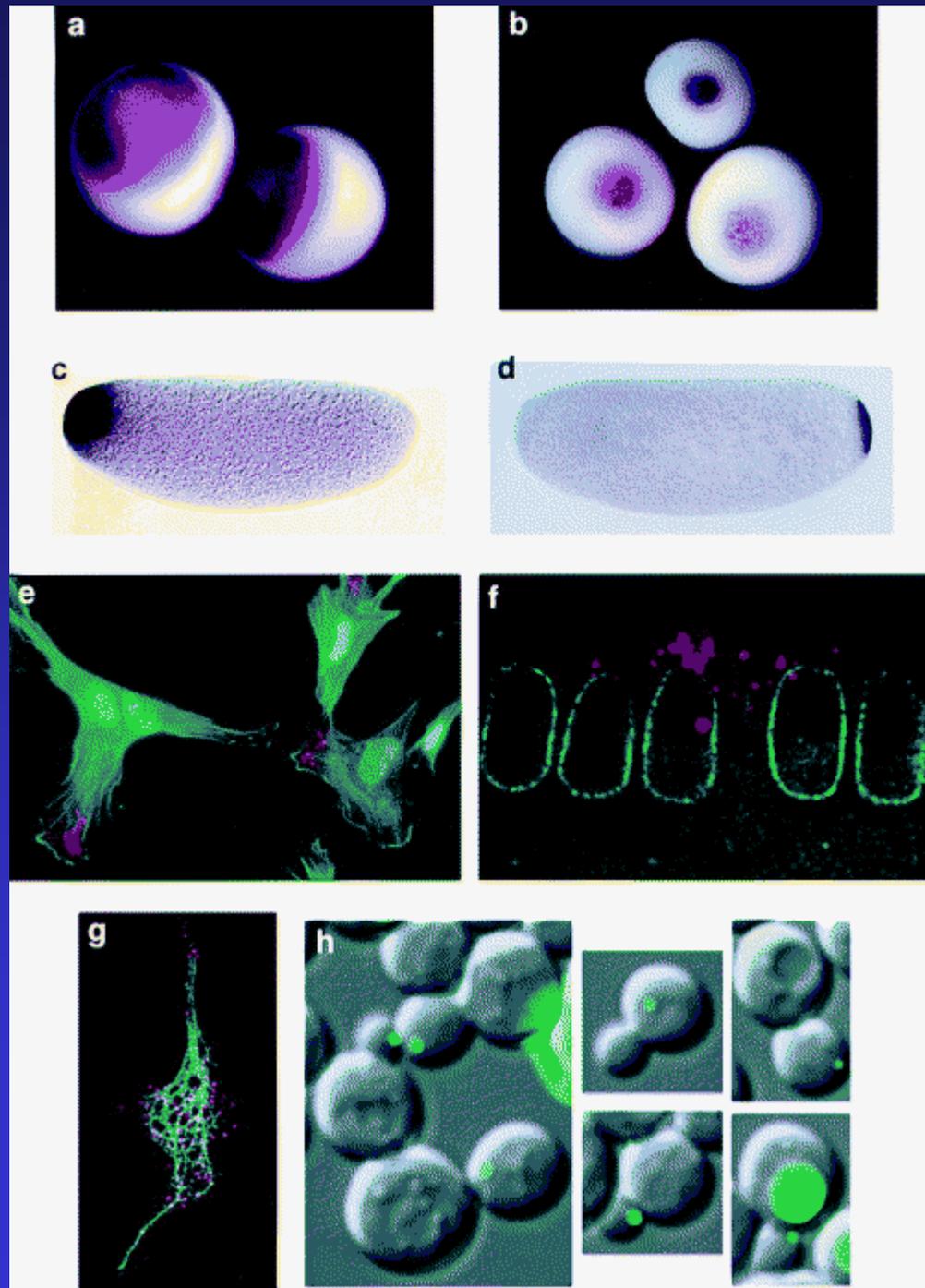


Altri esempi di localizzazione specifica degli mRNA.

Per quanto riguarda l'mRNA dell'actina che si localizza a livello dei lamellipodi, si è visto che una proteina accompagna l'mRNA a destinazione, impedendone la trascrizione finché non viene inattivata da una fosforilazione



mRNA per l'actina



Livelli di regolazione genica degli Eucarioti

-Controllo della traduzione

- legame del ribosoma all'estremità 5'
- disponibilità di fattori della sintesi proteica
- disponibilità di aa-tRNA
- degradazione dell'mRNA

NOTE:

La traduzione può essere inibita temporaneamente da diversi fattori, tra cui, ad esempio, la proteina di localizzazione (es. actina), un microRNA o una proteina di stabilizzazione che si associa a 5' UTS (es. ferritina).

L'inizio e il proseguimento della traduzione sono funzione della disponibilità di fattori di inizio e di allungamento, oltre che di aa-tRNA.

La stabilità (ossia l'emivita) dell'mRNA dipende da fattori di stabilizzazione, alcuni specifici (es. recettore per la transferrina), altri aspecifici (presenza della coda polyA e fattori che vi si associano).

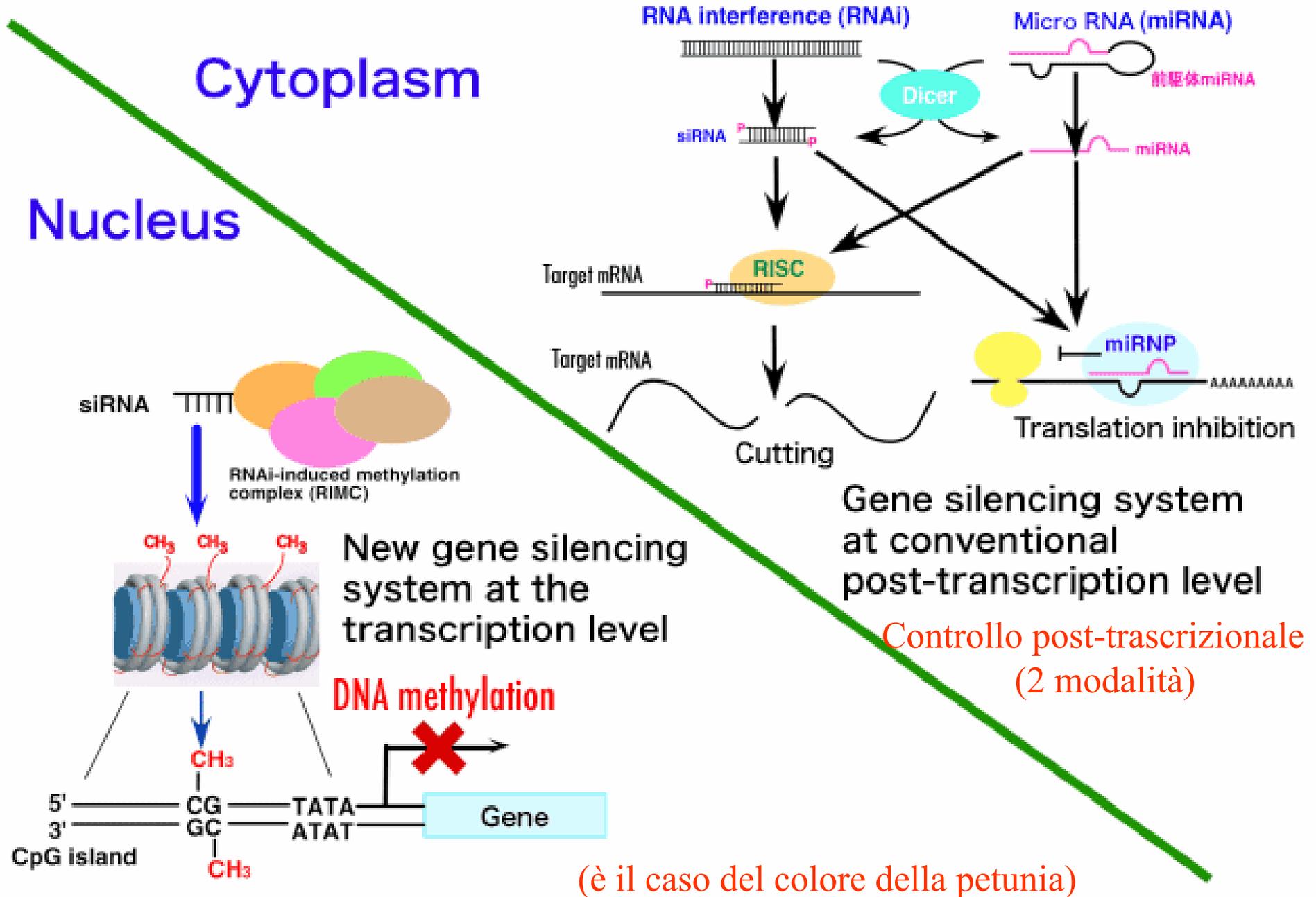
Ulteriori fattori possono interrompere una traduzione in atto, ad es. la presenza di un eccesso di prodotto (es. tubulina).

Inoltre, l'mRNA potrebbe non essere mai tradotto, in quanto degradato da un siRNA!

Il silenziamento genico è stato scoperto da botanici che cercavano di rendere più intenso il colore dei petali della petunia: con grande sorpresa, disattivarono invece dei geni che conferivano colore. Senza volere, avevano scoperto uno dei meccanismi con cui le cellule cercano di eliminare i genomi virali....

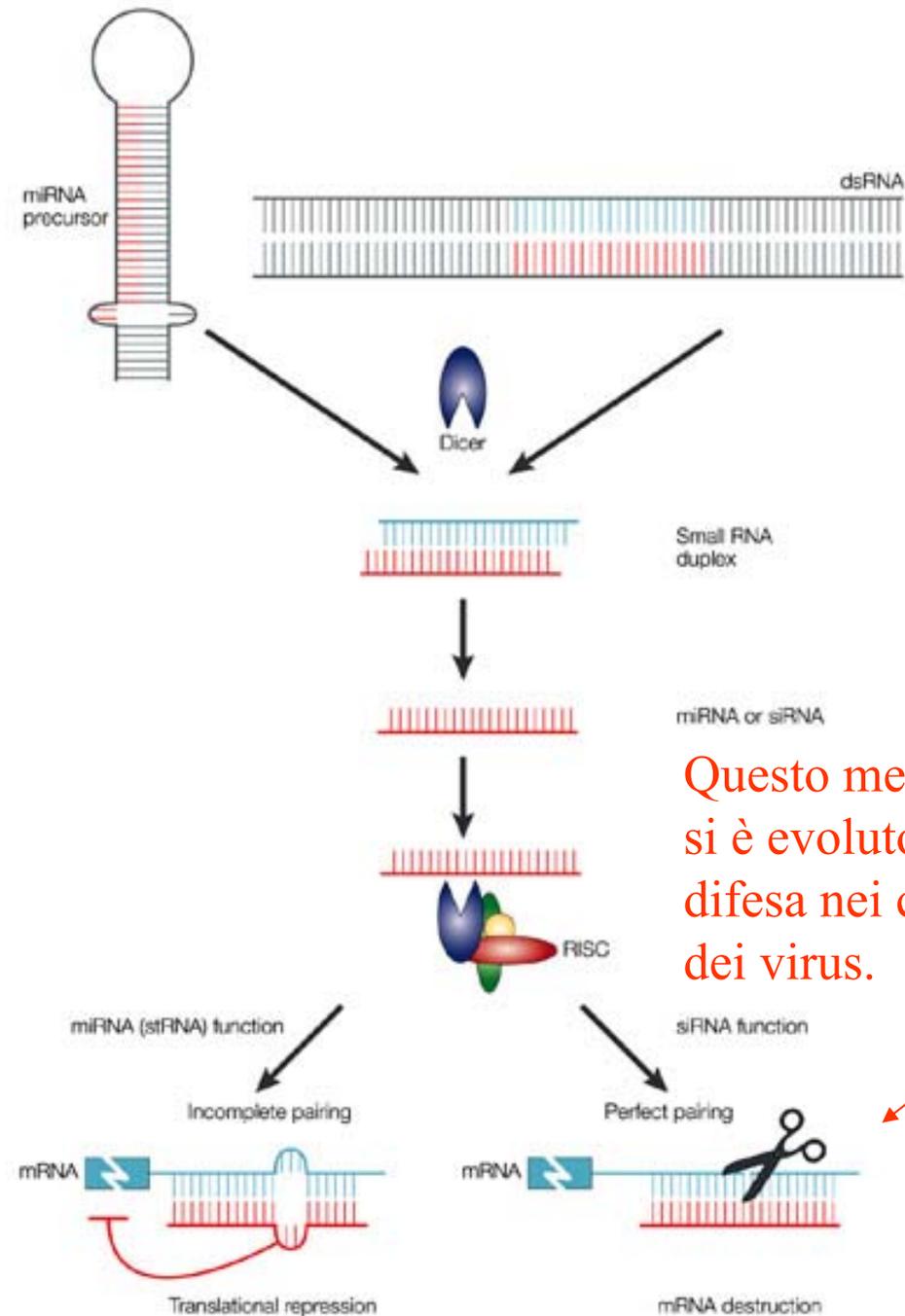


I MECCANISMI DEL SILENZIAMENTO GENICO



Small-interfering RNAs e Micro-RNAs reprimono la traduzione di mRNA bersaglio.

I microRNA inibiscono in maniera reversibile la traduzione; gli interfering RNA causano la degradazione dell'mRNA complementare.



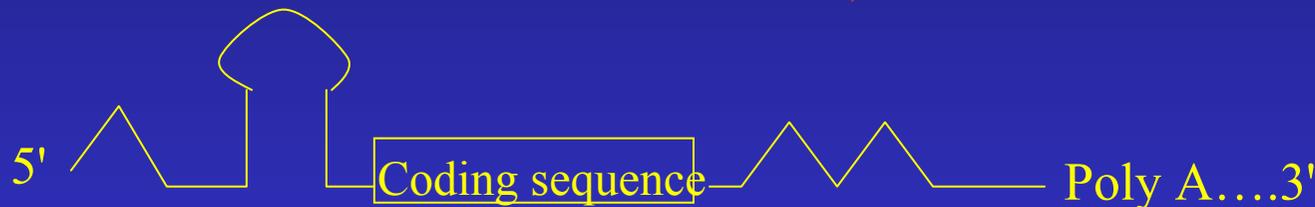
Questo meccanismo si è evoluto come difesa nei confronti dei virus.

Il Ferro regola la traduzione del recettore per la transferrina e della ferritina

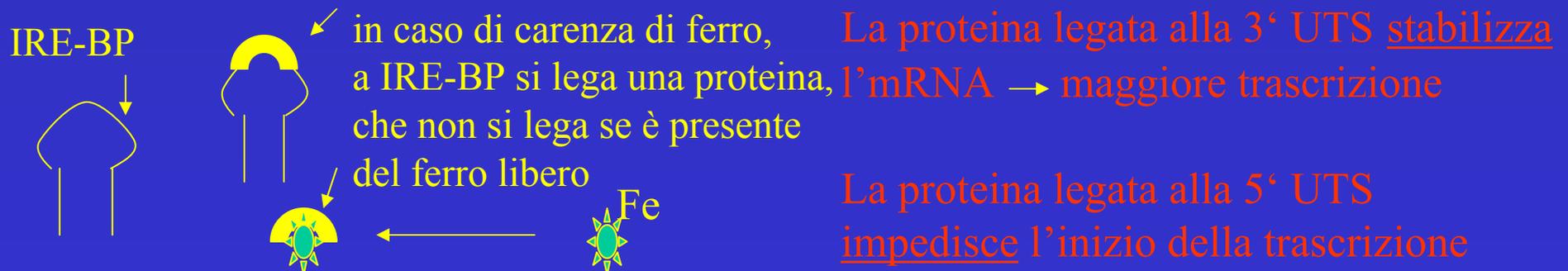
Finalità: regolare finemente la quantità di ferro intracellulare e tenerlo legato



Transferrin-receptor mRNA La transferrina trasporta il ferro dall'esterno
(Necessaria se manca il ferro nella cellula)



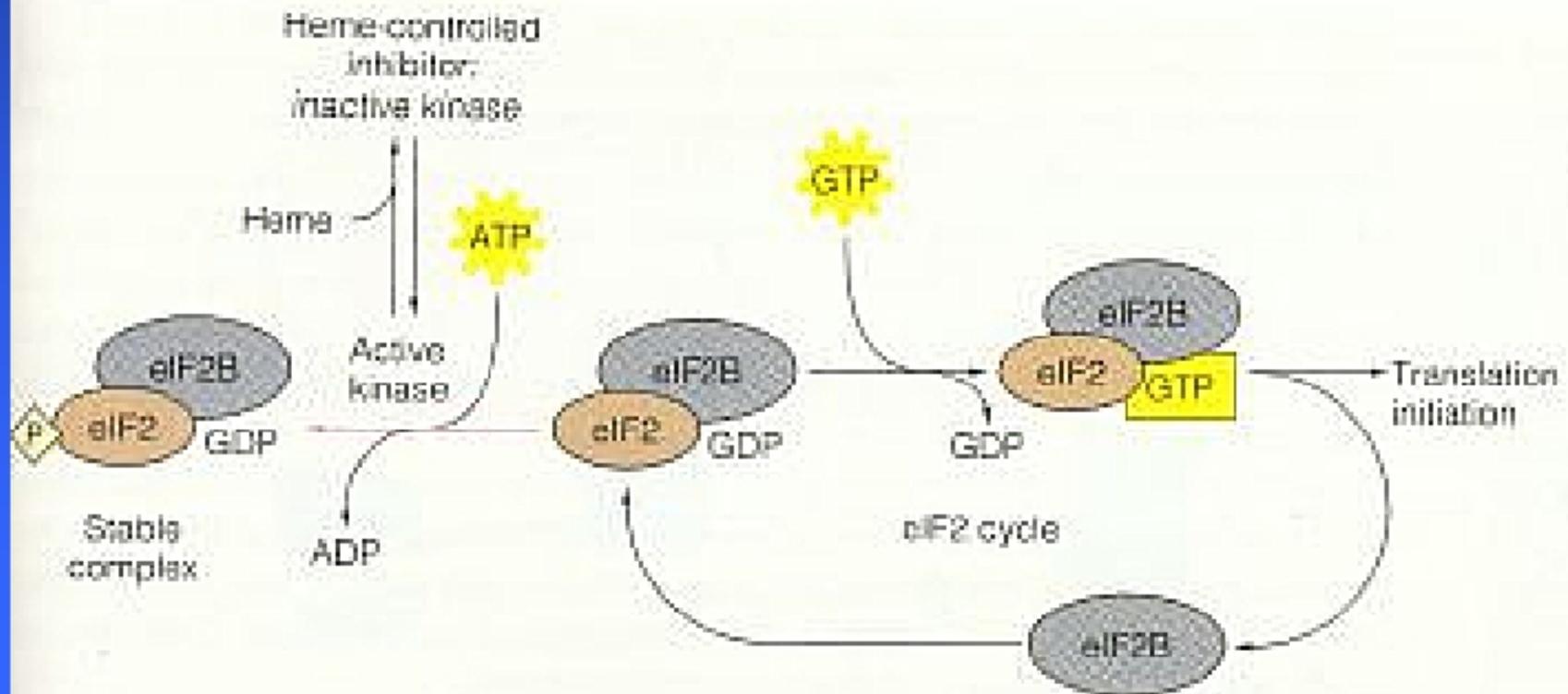
Ferritin mRNA La ferritina complessa il ferro all'interno della cellula
(Necessaria se il ferro intracellulare è presente in forma libera)



La disponibilità di fattori della traduzione regola l'espressione genica

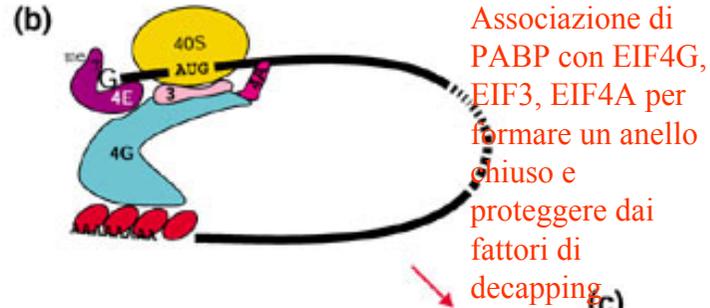
Translational regulation in Reticulocytes

- If heme cofactor is high, globin mRNA is translated
- If heme is low, HCl is activated which phosphorylates eIF-2 and inhibits translation initiation M&V 28.15



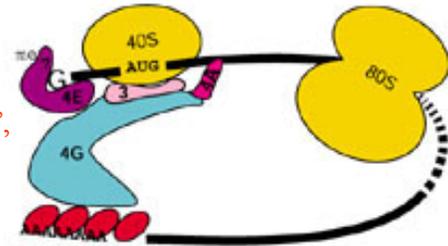
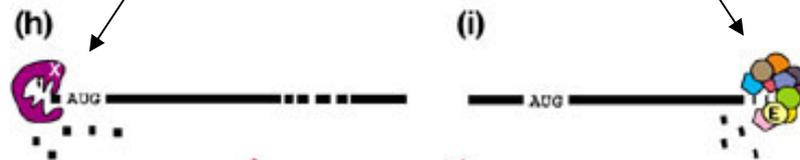
Associazione di PABP con la coda polyA

EIF4E

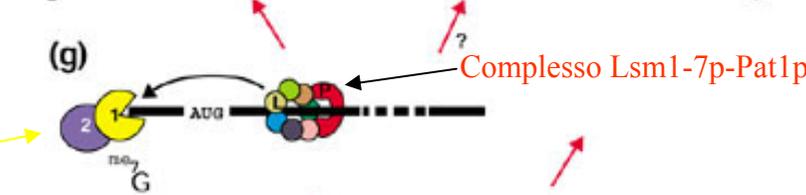


Associazione di PABP con EIF4G, EIF3, EIF4A per formare un anello chiuso e proteggere dai fattori di decapping

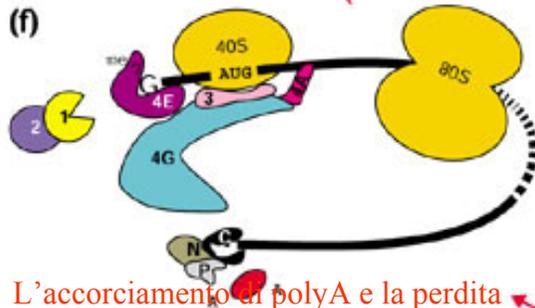
Degradaz. da parte dell'esonucleasi 5'-3' Xrn1p o dell'exosoma, un'esonucleasi 3'-5'



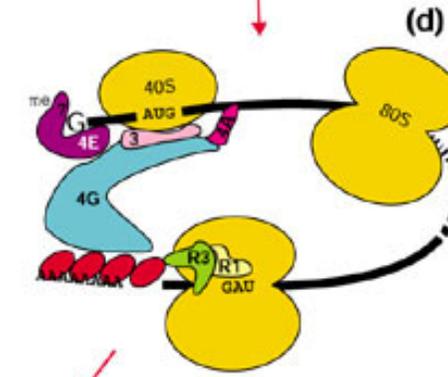
complesso di eliminazione del cap Dcp1p and Dcp2p



Complesso Lsm1-7p-Pat1p

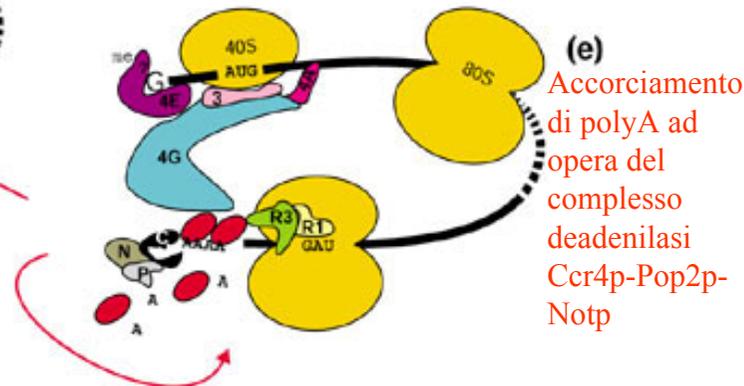


L'accorciamento di polyA e la perdita di PABP facilitano la dissociazione delle mRNP, l'associazione del complesso Lsm1-7p-Pat1p e del complesso di eliminazione del cap Dcp1p and Dcp2p



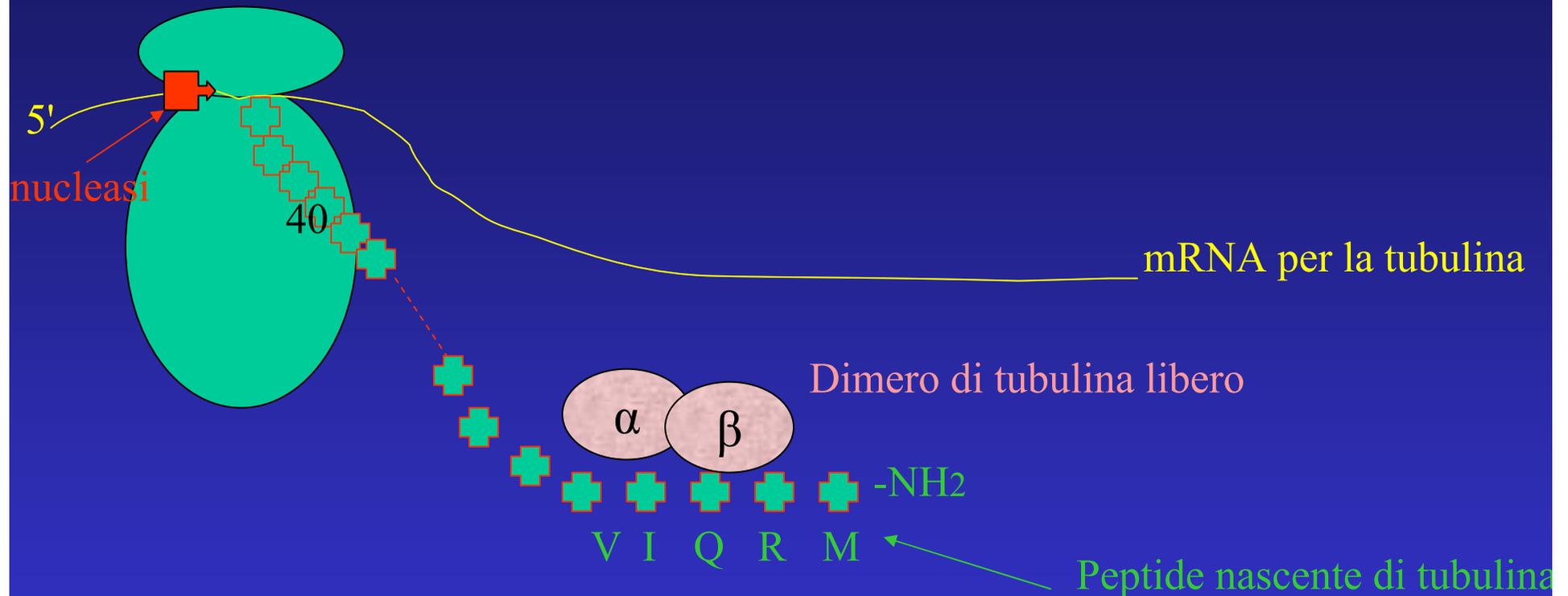
Inizio traduzione

Interazione con i fattori di terminazione ERF1, ERF3 e riciclo dello stesso ribosoma all'estremità 5'



Accorciamento di polyA ad opera del complesso deadenilasi Ccr4p-Pop2p-Notp

Regolazione co-traduzionale nella sintesi della tubulina



I dimeri di tubulina liberi si legano ai primi amminoacidi all'estremità amminica del peptide di tubulina in corso di sintesi, attivando una nucleasi associata al ribosoma, che distrugge l'mRNA.

In questo modo si evita l'eccesso di tubulina libera (ossia non polimerizzata).