

CONTROLLO DELL'ESPRESSIONE GENICA NEGLI EUCARIOTI

Controllo trascrizionale

Eucarioti-Procarioti

- Il genoma dei mammiferi è **più grande** di quello di E.coli di circa 1000 volte
- La maggior parte del genoma delle cellule di mammifero **non codifica** per proteine
- **Vari tipi di cellule** sono presenti negli eucarioti: essi sintetizzano e accumulano insiemi differenti di RNA e di proteine
- Gli **organismi** attraversano diversi **stadi di sviluppo**

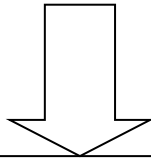
Regolazione espressione genica

Geni in una cellula umana



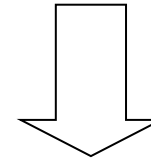
Geni per proteine (circa 20000-22000)

Ogni cellula in un determinato momento esprime solo una piccola parte di questo potenziale

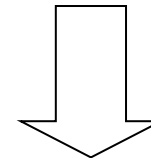


Geni housekeeping

metabolismo
biosintesi membrana
istoni
Proteine ribosomali



Geni tessuto-specifici



differenziamento cellulare

Quanti sono i geni espressi in una cellula?
Sono espressi tutti allo stesso livello ?

Popolazioni di molecole di mRNA in una tipica cellula di mammifero

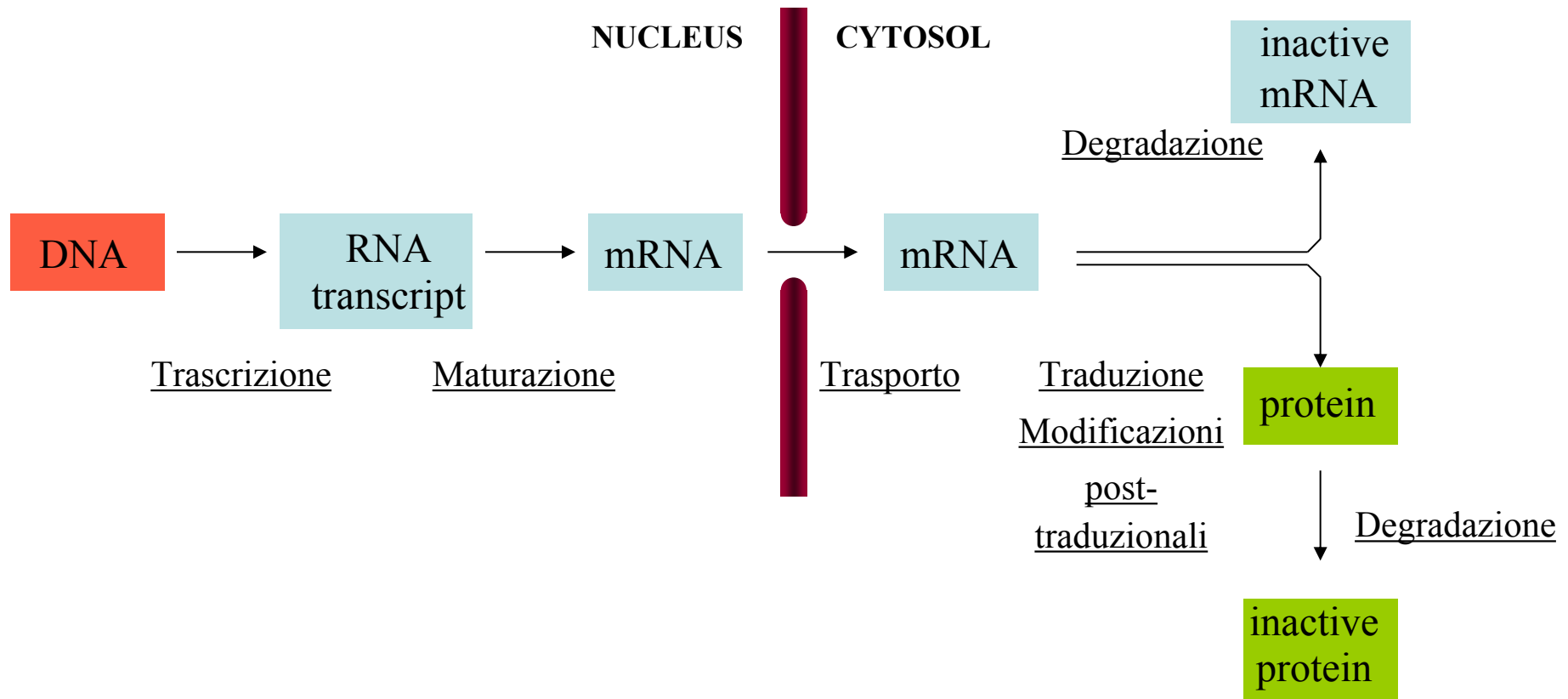
Classe	copie/cell di ogni mRNA	N° $\neq$ mRNA	N° totale di molecole di mRNA
Abbondante	12000	4	48000
Intermedio	300	500	150000
Scarso	15	11000	165000

Differenze Eucarioti-Procarioni

- L'accessibilità ai promotori eucariotici è limitata dalla **struttura della cromatina**: la maggior parte dei promotori sono **inaccessibili** e l'attivazione della trascrizione è associata a molte **modificazioni nella struttura della cromatina nella regione trascritta**.
- Le RNA polimerasi eucariotiche hanno poca o nessuna affinità per i loro promotori. **Lo stato trascrizionale di base è restrittivo** (i geni sono silenti). Praticamente ogni gene eucariotico richiede un'attivazione per essere trascritto efficientemente.
- I meccanismi di **regolazione positiva** predominano negli eucarioti.
- Maggior complessità delle **proteine regolatrici multimeriche** presenti negli eucarioti rispetto ai procarioti.
- Negli eucarioti la **trascrizione è temporale e fisicamente separata dalla traduzione citoplasmatica**.

Regolazione dell'Espressione Genica

L'Espressione genica può essere regolata in ognuna delle seguenti fasi:



PROTEINE

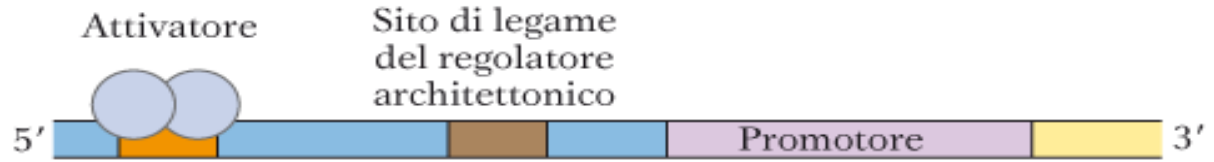
diverse concentrazioni

- Albumina 5 g/dl
 - Fibrinogeno 0,3 g/dl
 - Emoglobina 15 g/dl
 - Recettori di superficie 0.001%
- (proteine intracellulari)

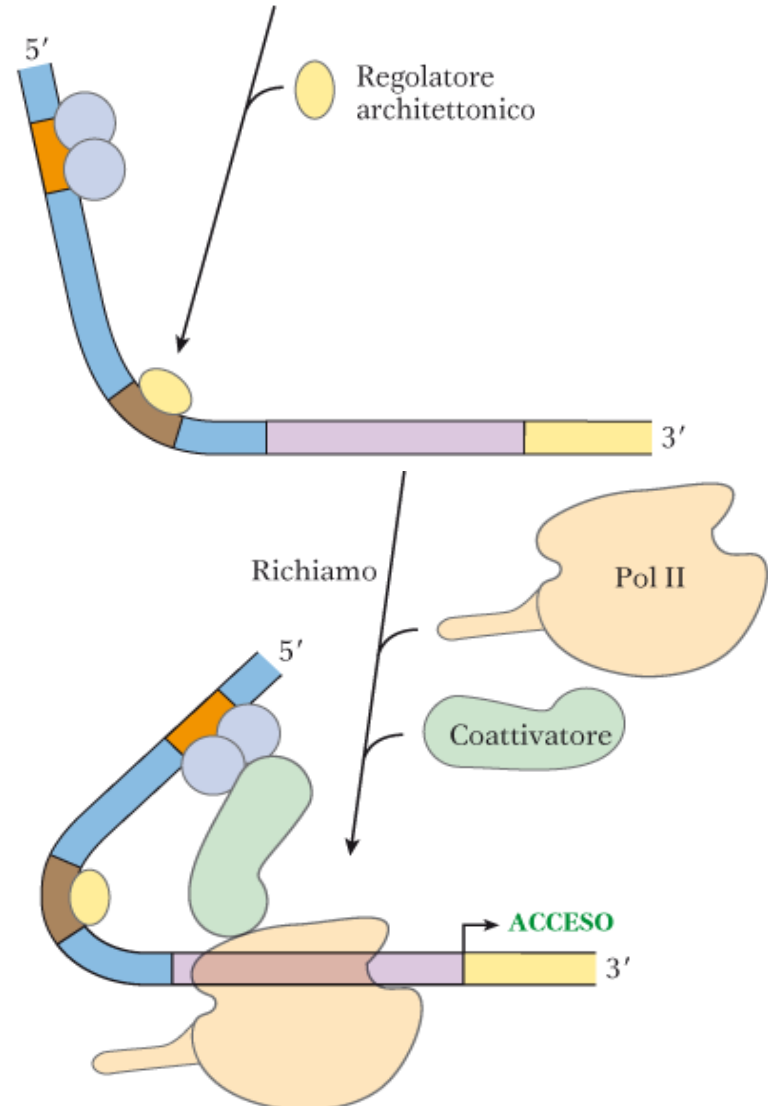
Proteine Regolatrici della Trascrizione negli Eucarioti

- **FATTORI DI TRASCRIZIONE GENERALI (BASALI)** riconoscono elementi "core promoter", supportano un **livello di trascrizione basale**
- **ATTIVATORI**: si legano a sequenze enhancer
- **REGOLATORI ARCHITETTONICI**: facilitano il ripiegamento ad ansa del DNA
- **PROTEINE DI RIMODELLAMENTO DELLA CROMATINA**: rendono la cromatina piu' accessibile
- **COATTIVATORI**: non si legano direttamente al DNA, ma mediano interazioni proteina-proteina. Il principale **coattivatore eucariotico** e' il complesso proteico chiamato "**Mediatore**"
- **REPRESSORI**

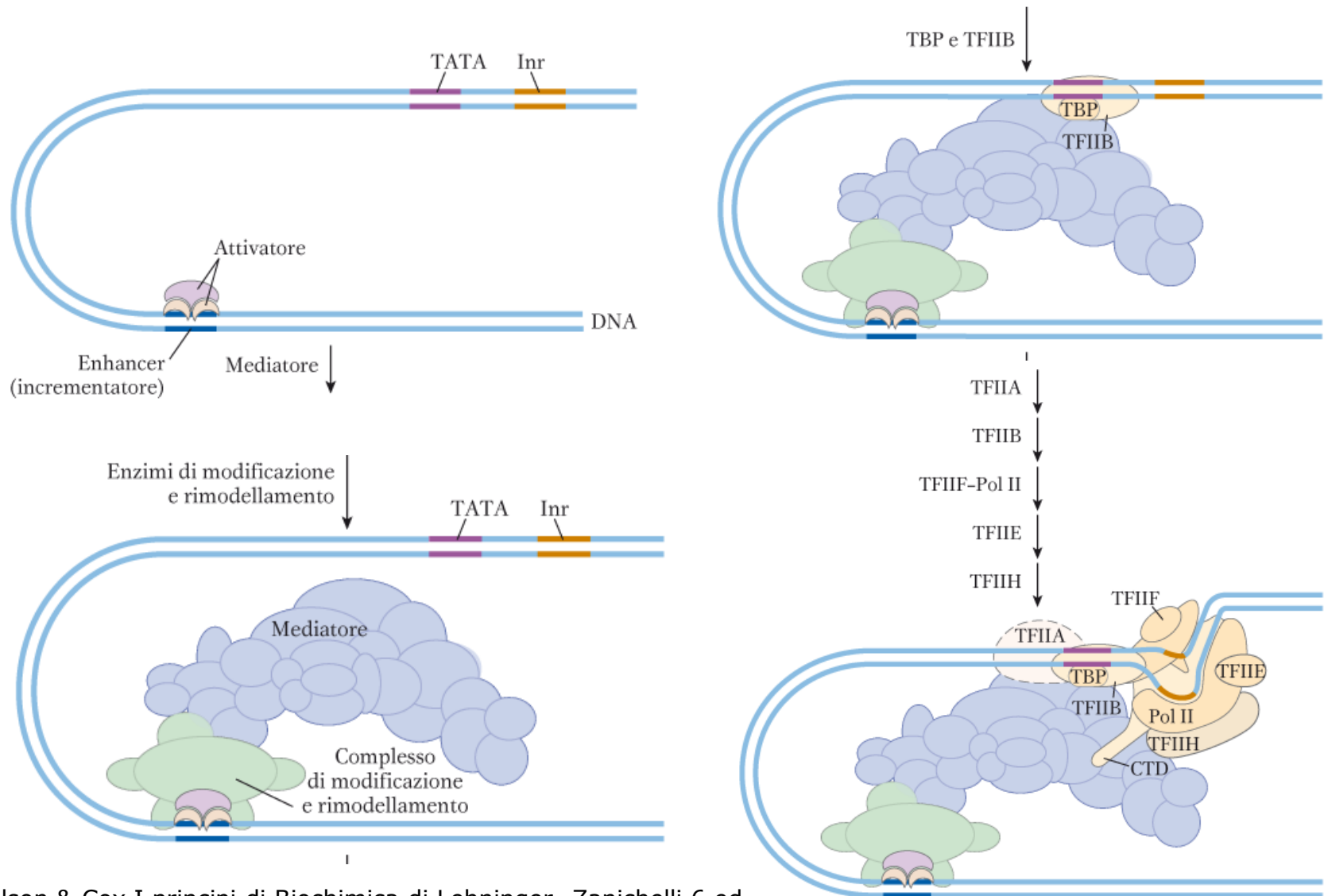
Interazione tra attivatori/repressori e RNA polimerasi II



- ✓ Alcune sequenze enhancer, cui si legano gli attivatori, sono molto distanti dalle sequenze promotrici.
- ✓ Come possono questi attivatori funzionare a distanza?
- ✓ Ruolo del **regolatore architetonico**

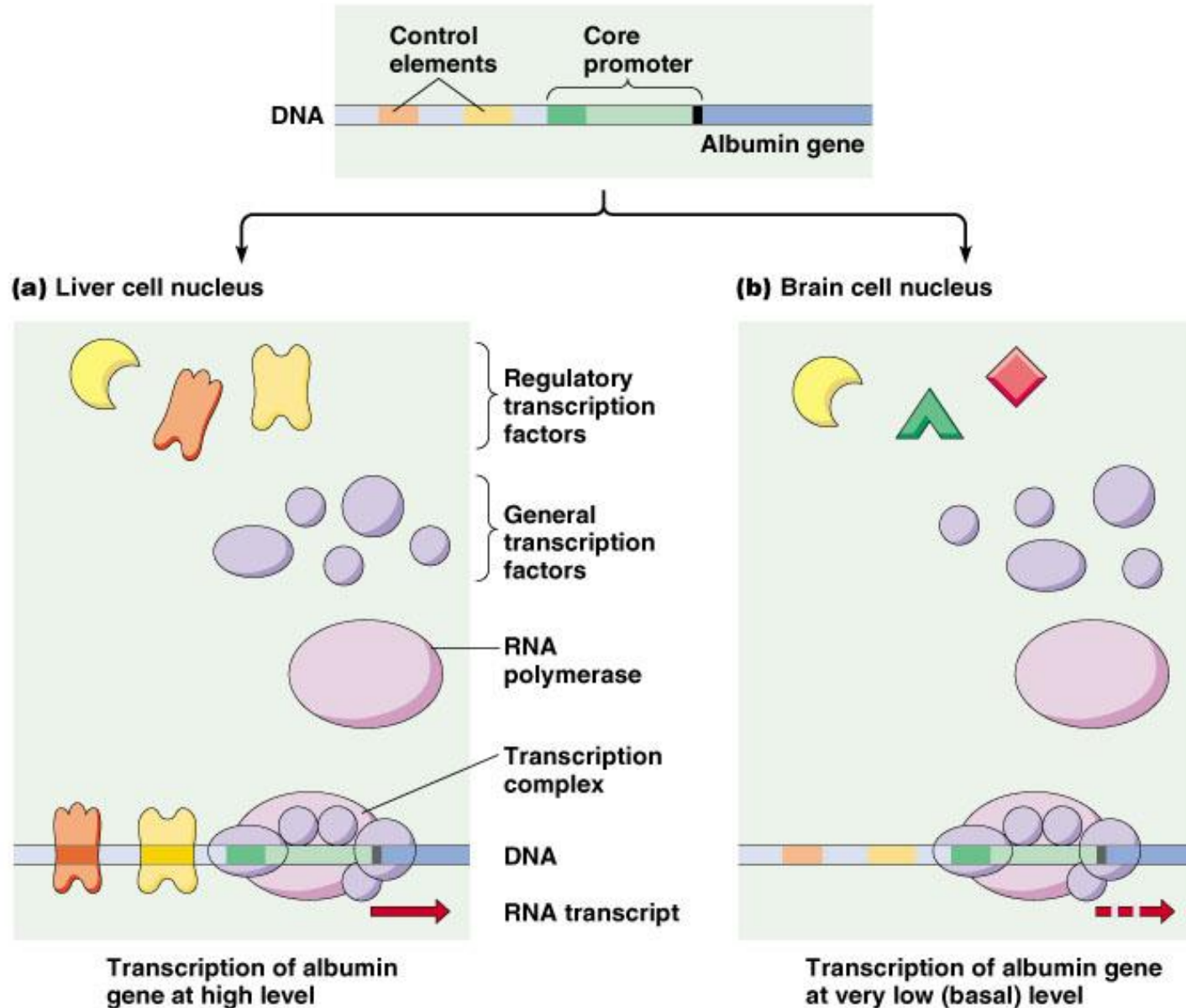


I componenti dell'attivazione della trascrizione



CONTROLLO TRASCRIZIONALE NEGLI EUCARIOTI

CONTROLLO COMBINATORIALE



I vantaggi del controllo combinatoriale

- Negli eucarioti i geni non sono organizzati in operoni
- Con pochi fattori trascrizionali (alcune centinaia) in combinazioni diverse, si può controllare l'espressione di tutti i geni (osservazioni nel lievito)
- Geni che devono essere «accesi» insieme condividono elementi di regolazione e proteine di regolazione.
- Possibilità di una fine regolazione del livello di trascrizione.

Proteine "attivatori" della trascrizione

- hanno una struttura modulare
- contengono un dominio che lega il DNA (DBD)
- contengono uno o piu' domini di attivazione trascrizionale
- qualche volta contengono uno o piu' domini di repressione
- qualche volta contengono un dominio di dimerizzazione

Motivi strutturali in fattori di trascrizione cellule eucariotiche

Motivi strutturali nei domini di legame al DNA

a "dito di zinco"

omeodominio

elica-ripiegamento- elica

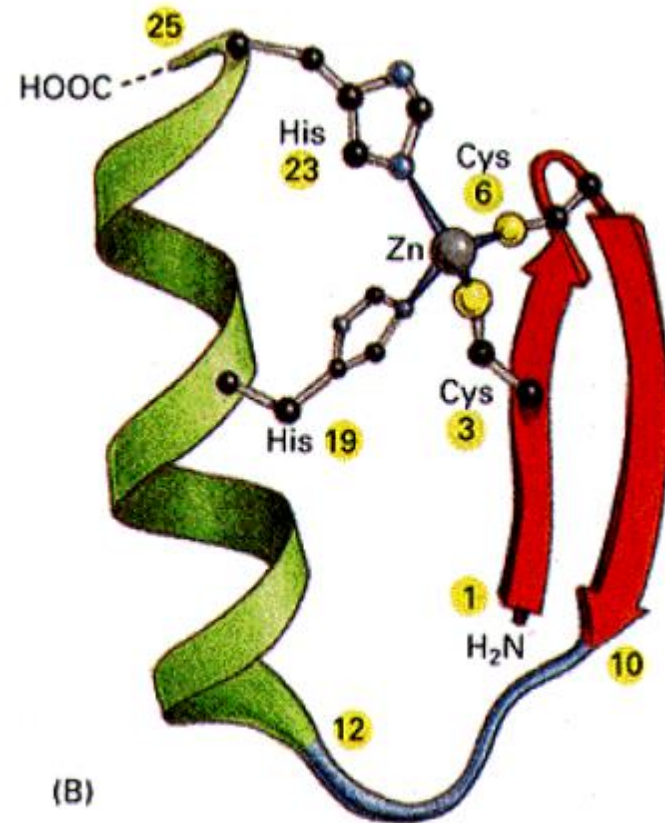
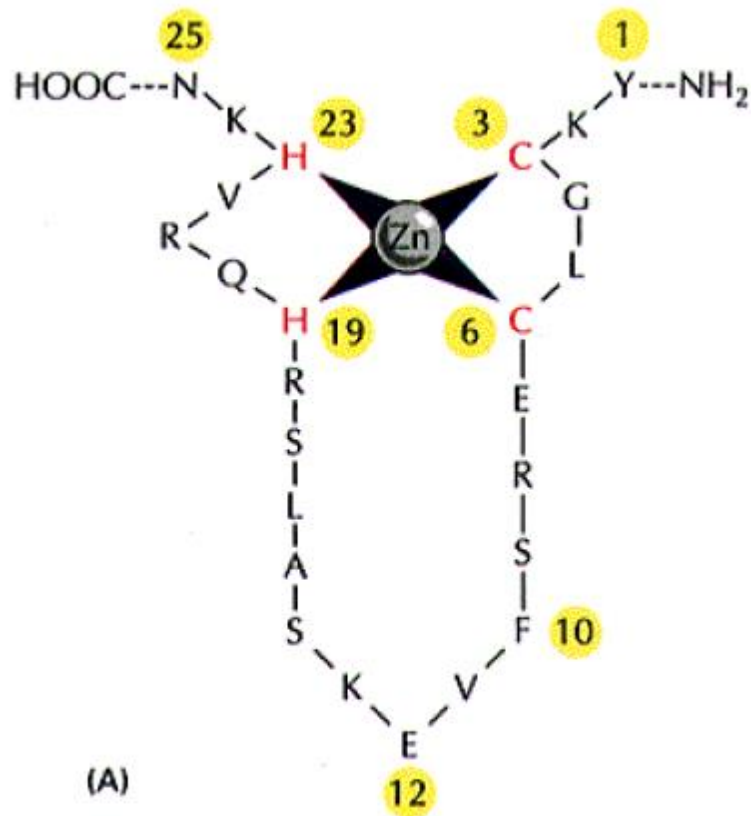
Motivi strutturali nei domini di interazione proteina-proteina

"cerniera di leucina"

elica basica-ansa-elica

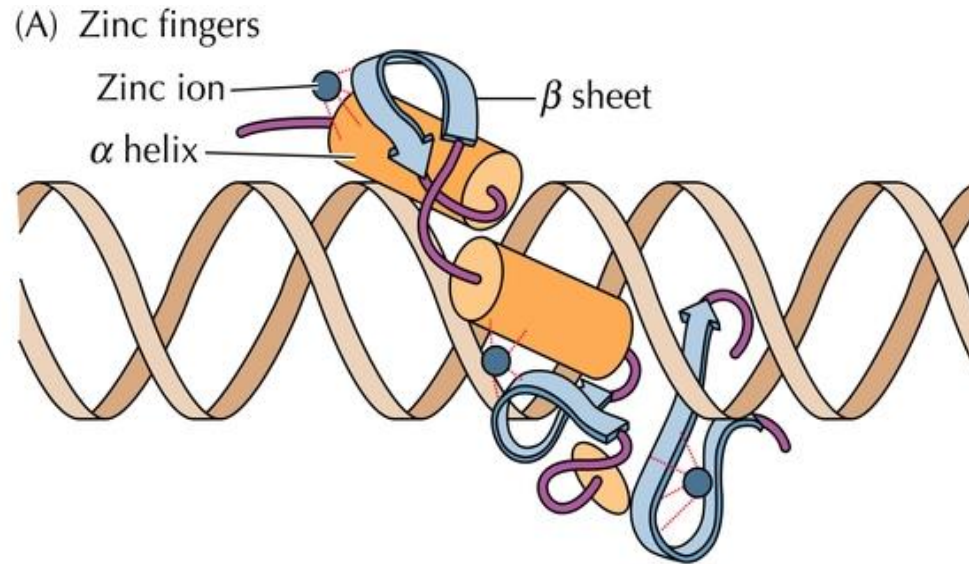
Motivi strutturali nei domini di legame al DNA

motivo a «dita di zinco»



Motivi strutturali nei domini di legame al DNA

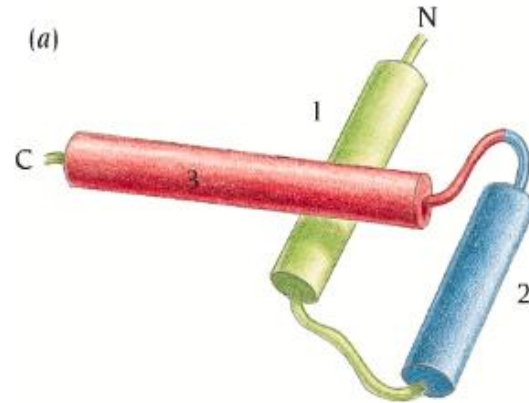
motivo a «dita di zinco»



- Zn ion coordinated to two cysteines and two histidines
- Each factor contains multiple zinc finger domains

Motivi strutturali nei domini di legame al DNA

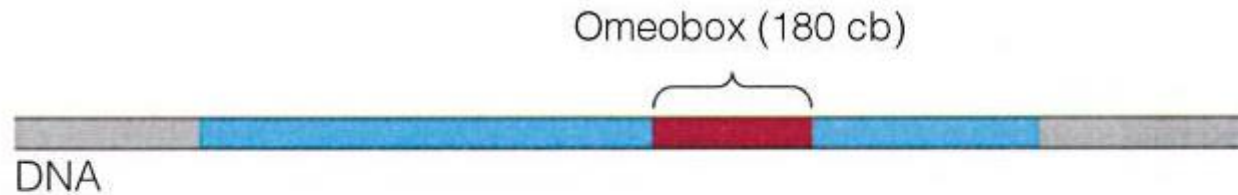
motivo "omeodominio"



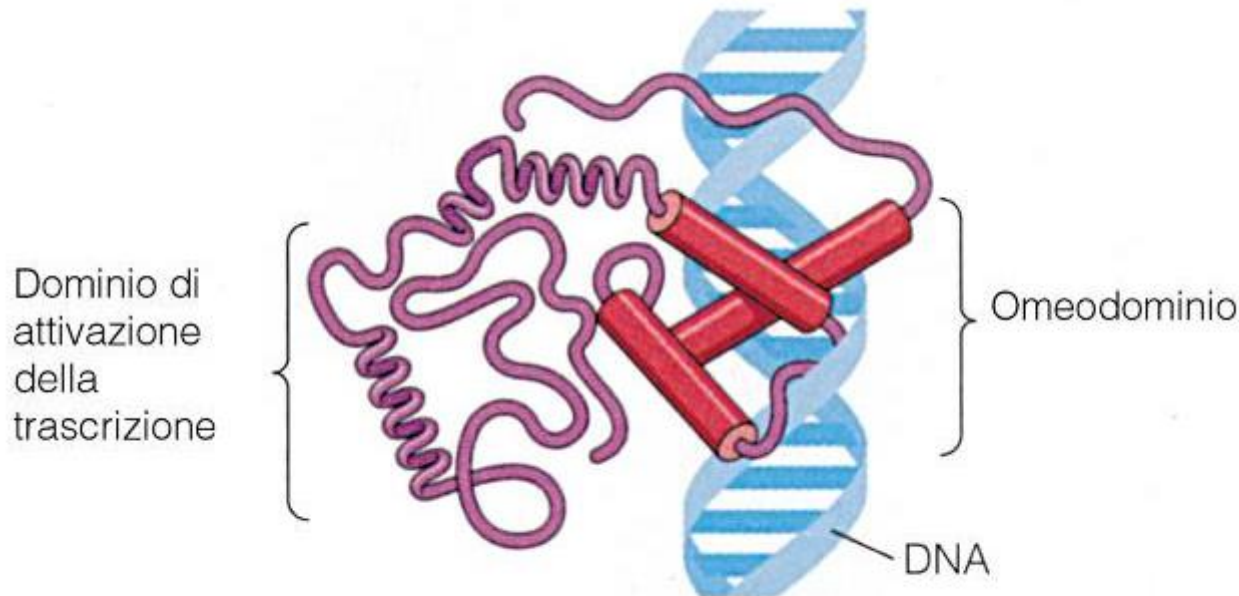
- Sequences of **60 residues** that function as DNA binding domains of transcription factors
- Built up **from 3 helices**, where helices 2 and 3 form helix-turn-helix motif similar to those in prokaryotic DNA binding proteins

Geni omeotici-geni Hox

codificano per fattori di trascrizione che dirigono lo sviluppo di particolari strutture anatomiche con localizzazioni specifiche nel corpo



(a) Gene omeotico



(b) Proteina omeotica legata al DNA

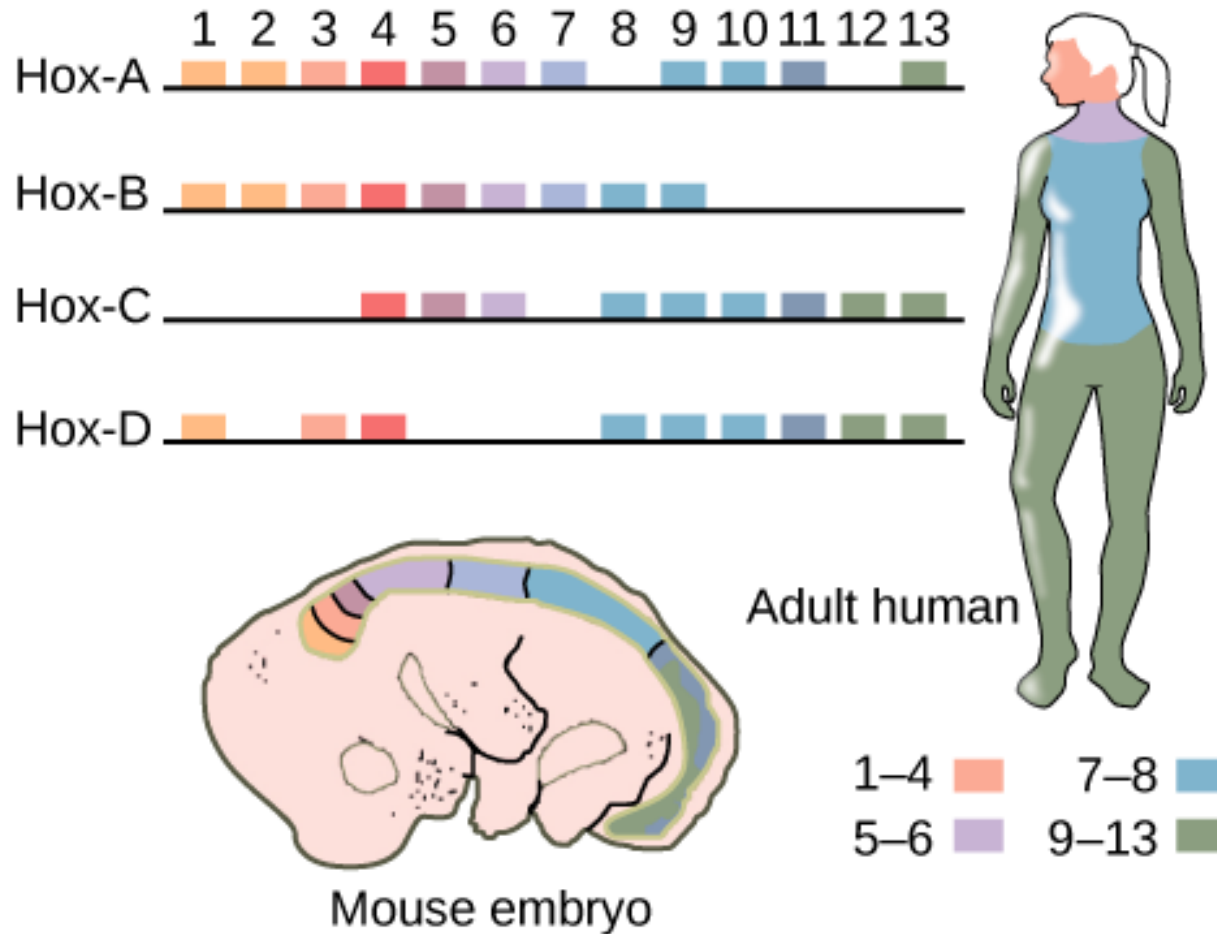
Mutazioni in geni Hox dello sviluppo

First identified in *Drosophila*, where mutant homeodomains cause so-called **homeotic transformations**. Those are bizarre **developmental anomalies** – like legs growing from head in place of antennae.



Flies with 4 wings (left) or legs on the head (right)-- Homeotic transformations that alter the identities of body segments

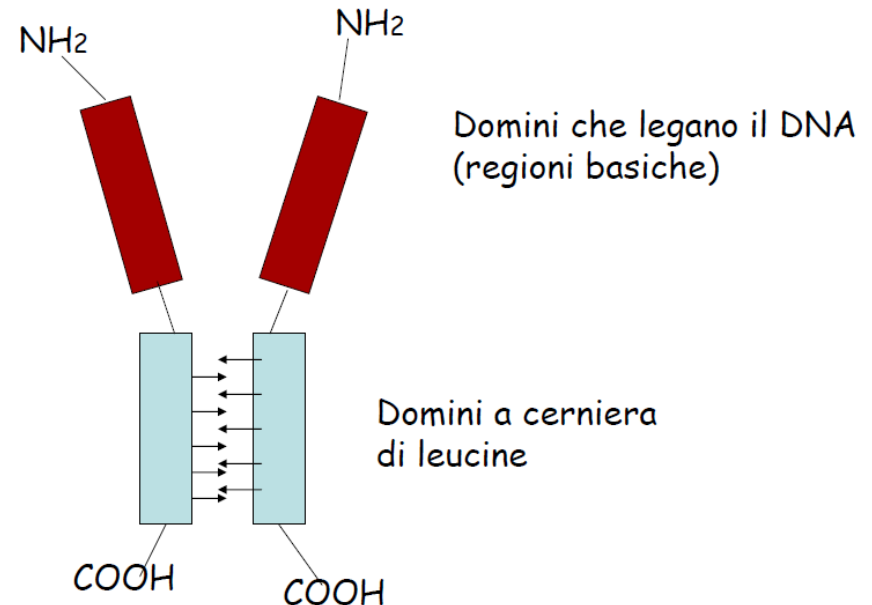
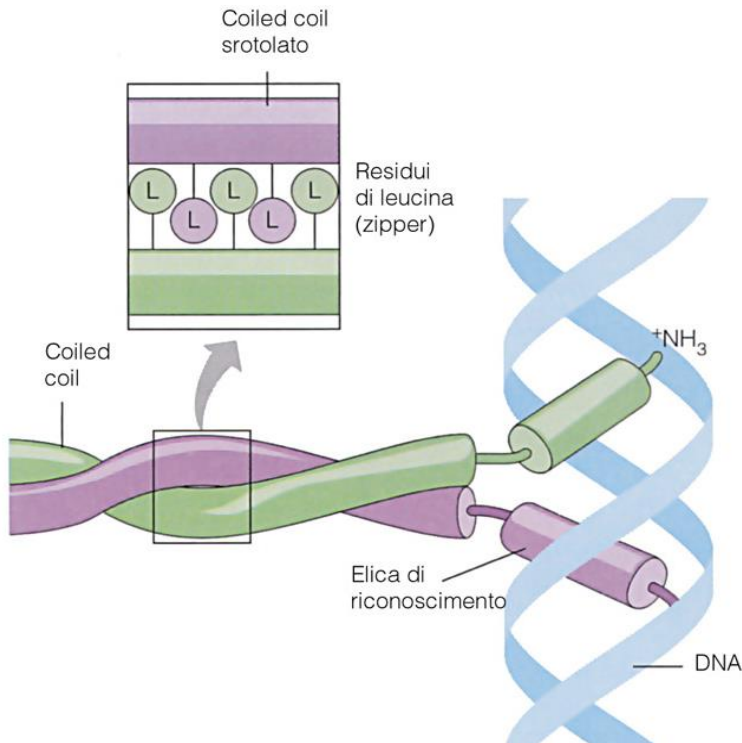
Geni omeotici



L'ordine dei geni Hox sul cromosoma e' lo stesso ordine dell'espressione dei geni nell'embrione durante lo sviluppo: i primi geni si esprimono nella parte anteriore dell'organismo.

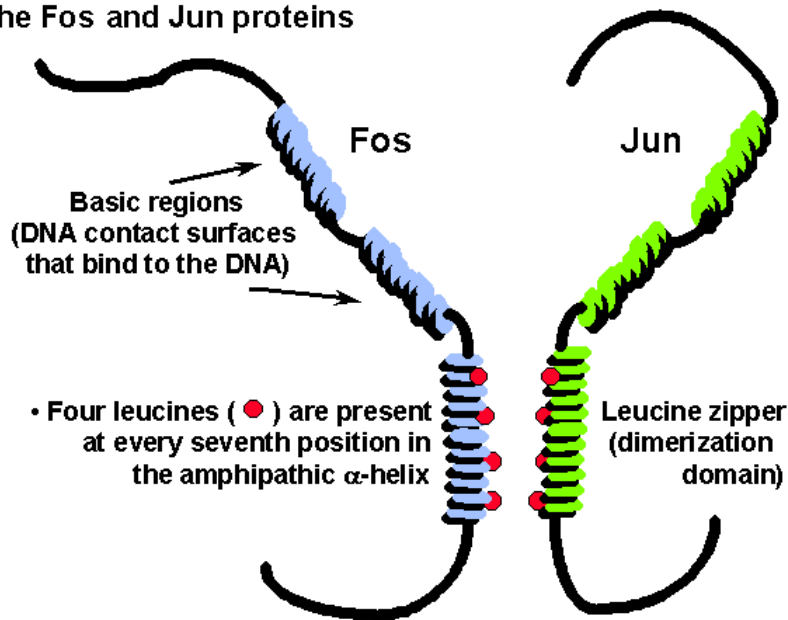
Motivo leucine zipper (a cerniera di leucine):

è formato dall'interazione di due catene polipeptidiche, ognuna contenente una α elica con **residui di leucina (a.a. idrofobico) regolarmente spazati**. Le leucine, interagendo tra di loro, provocano un attorcigliamento delle due eliche. **Il motivo è utilizzato per unire due polipeptidi** uguali o diversi. Il legame al DNA è reso possibile dalla presenza di due ulteriori regioni ad α elica che interagiscono con le sequenze del solco maggiore.

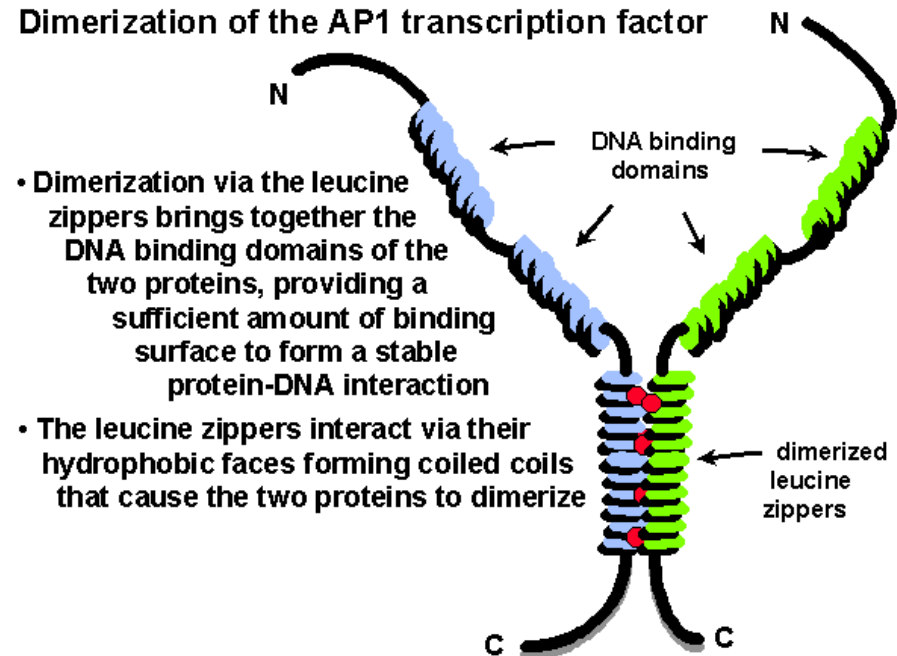


Motivi a «leucine zipper» nel fattore di trascrizione AP1

The Fos and Jun proteins

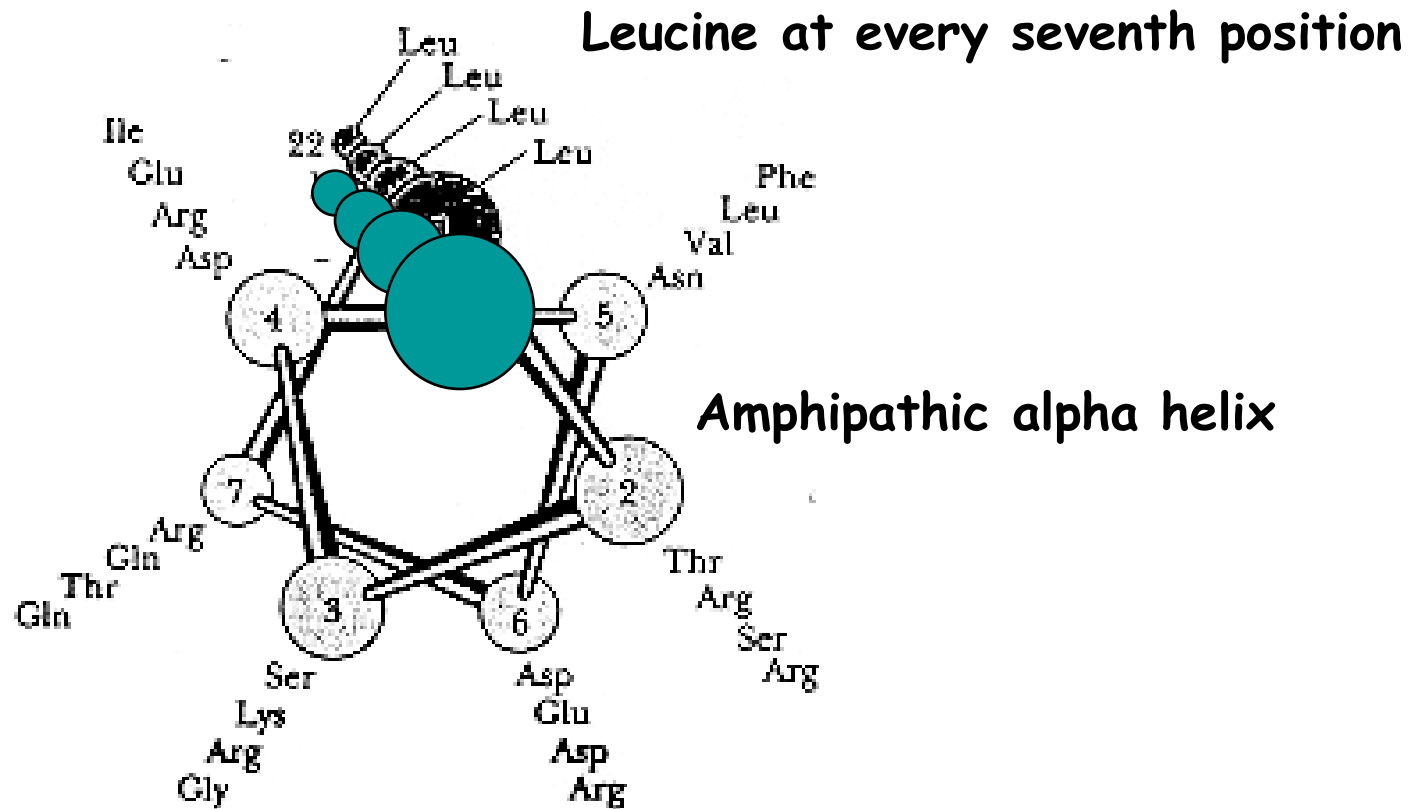


Dimerization of the AP1 transcription factor



The hydrophobic faces of the leucine zippers of Fos and Jun interact with each other, causing dimerization of the two proteins and forming the AP1 (activator protein-1) transcription factor.

Helical wheel analysis of a leucine half-zipper

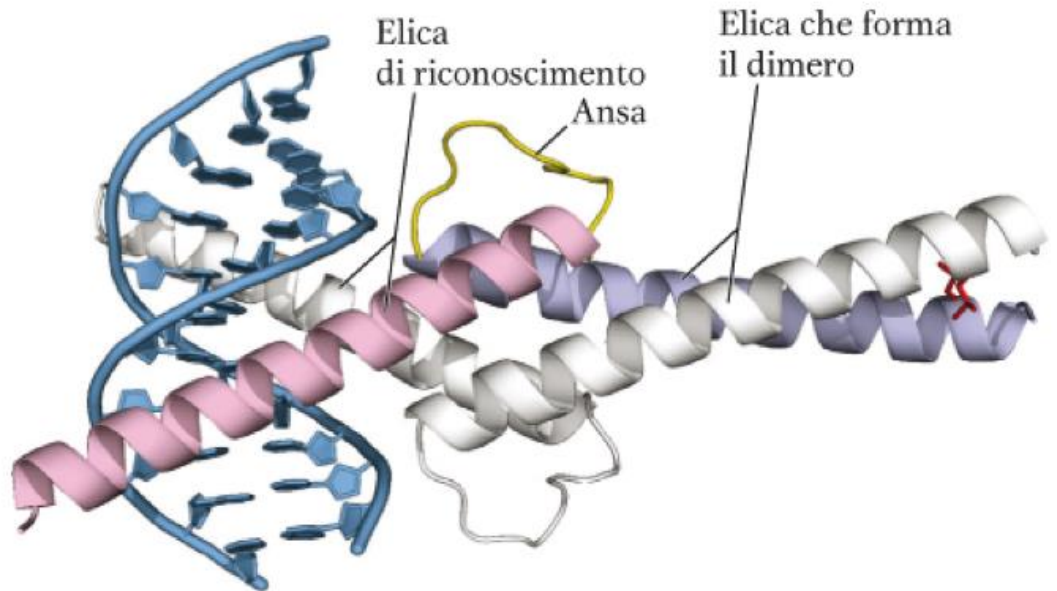


the leucines form a face along one surface and that other hydrophobic amino acids align along that surface, while hydrophilic residues lie on the opposite side

Motivi strutturali nei domini di interazione proteina-proteina

Helix-loop-helix (HLH)

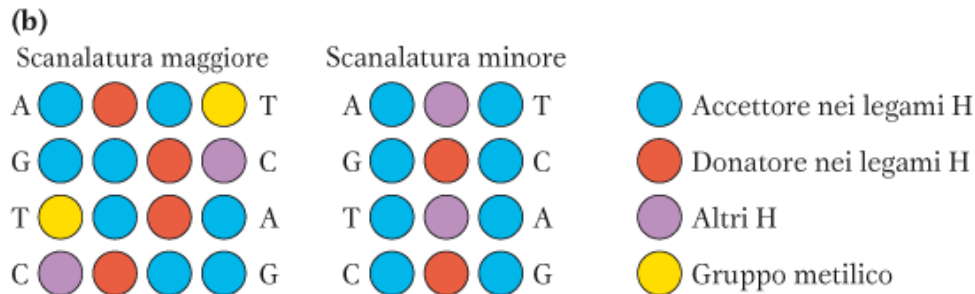
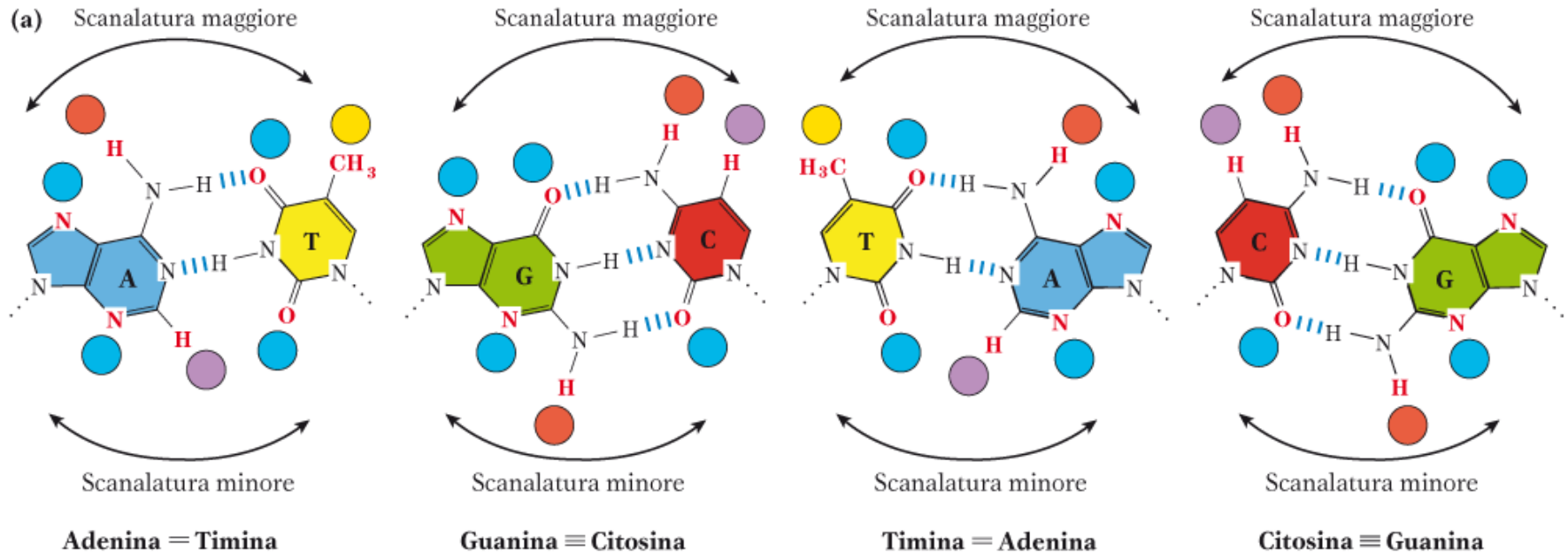
- Il fattore di trascrizione è dimerico.
- Ciascun monomero è formato da 2 a eliche separate da un'ansa.
- Un' a elica serve per la dimerizzazione , l'altra per il riconoscimento di sequenze di DNA.



Nella figura: un monomero è in grigio
l'altro è colorato (rosa e azzurro).

Le proteine regolatrici riconoscono caratteristiche della superficie del DNA: **riconoscimento sequenza-specifico**

gruppi disponibili nel DNA per il legame alle proteine



gruppi chimici che consentono di discriminare le basi

Regolazione della trascrizione

Regolazione dell'attività dei fattori di trascrizione

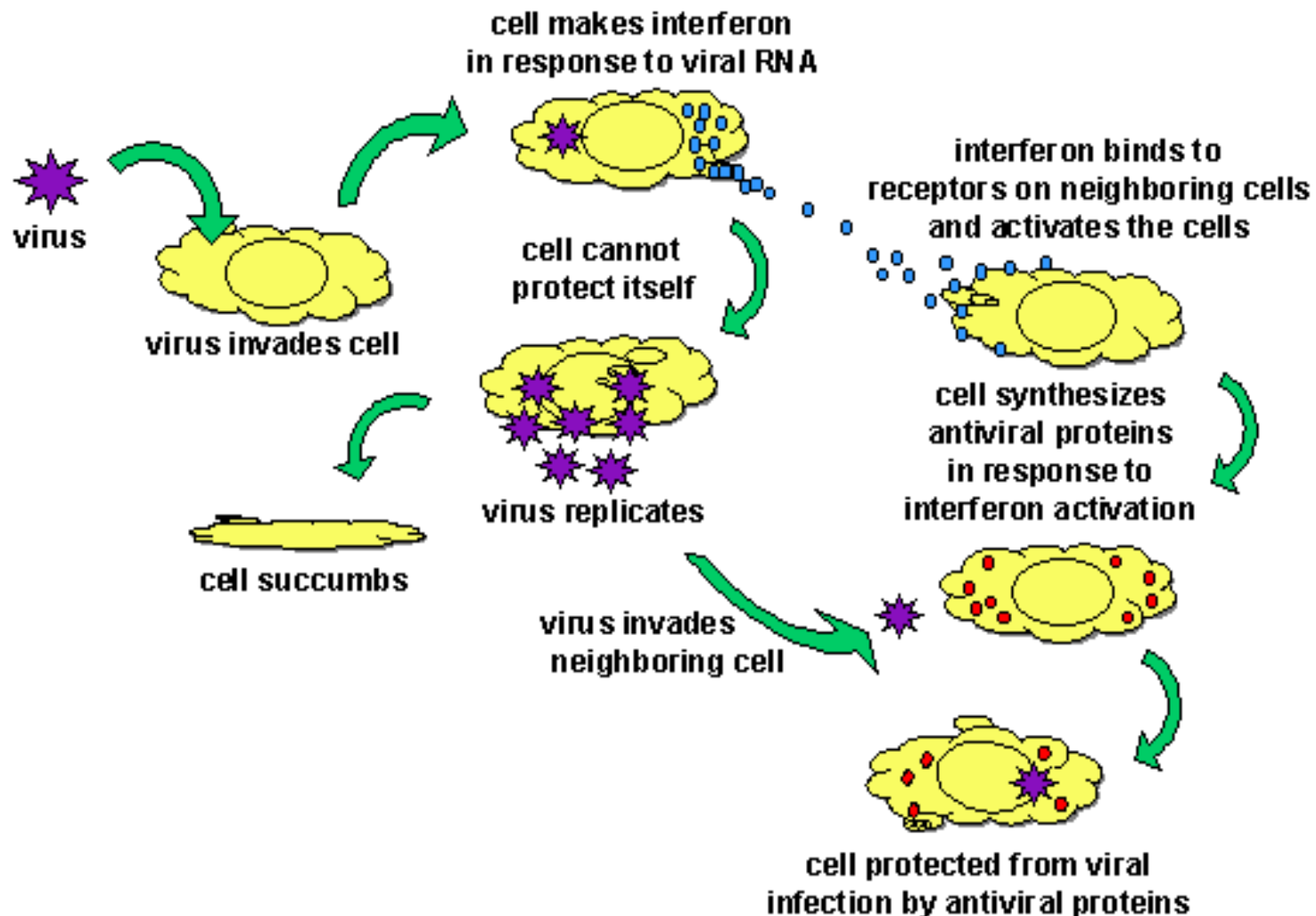
L'attività dei fattori di trascrizione può essere regolata tramite:

- (1) **Modificazione covalente** (fosforilazione, acetilazione, ubiquitinazione)
- (2) **Mediante legame a ligandi** (recettori nucleari)
- (3) **Mediante taglio proteolitico**

(1) Regolazione mediante fosforilazione

es. Geni attivati indirettamente dall'interferone

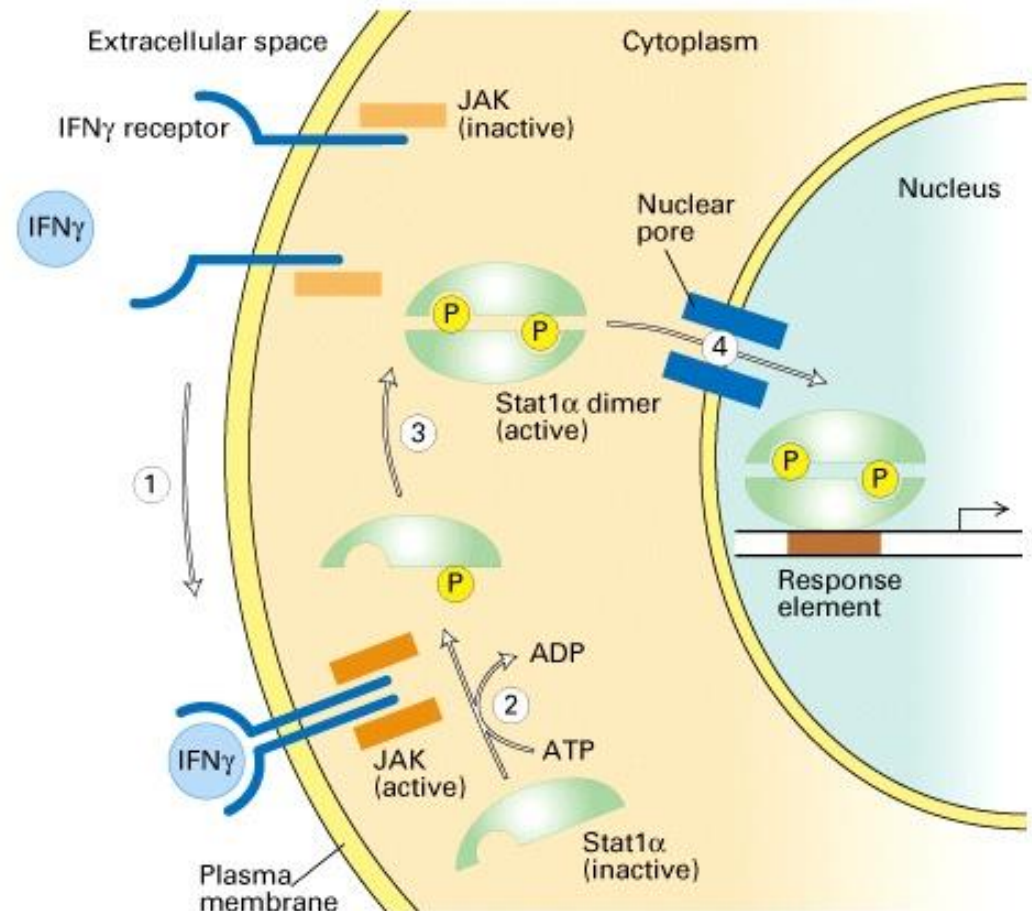
L'interferone stimola una risposta antivirale



(1) Regolazione mediante fosforilazione

Es. Geni attivati indirettamente dall'interferone

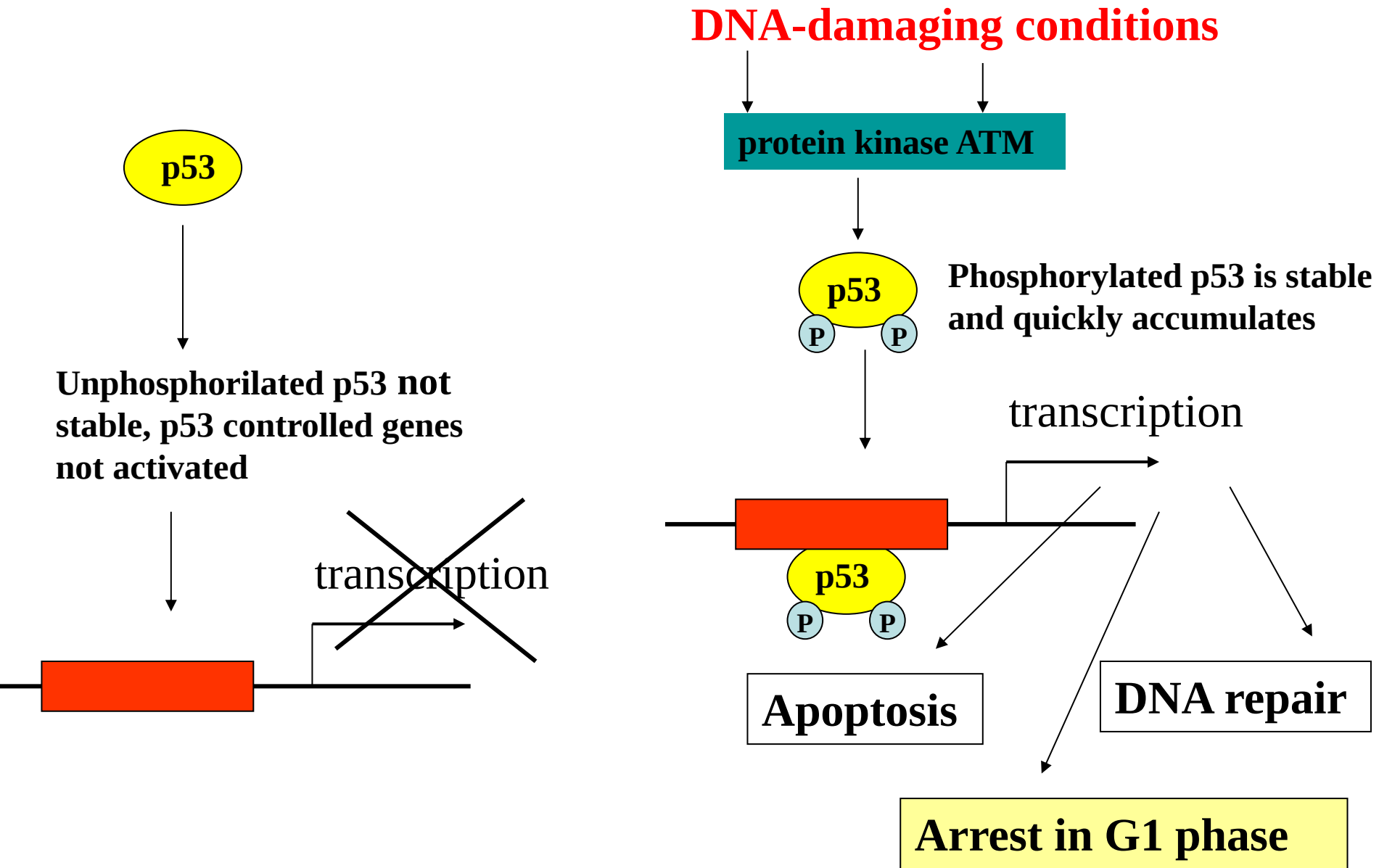
- Il recettore di IFN attiva una chinasi
- La chinasi fosforila un fattore di trascrizione (STAT1/STAT91)
- Il fattore e' attivato



Regolazione per fosforilazione es. proteina p53

- **p53** (protein 53 kDa) is one of the most frequently cited biomolecules in Science Citation index
- One of p53 functions is to act as a **tumor suppressor**, which prevents cell division under DNA damaging conditions as exposure to UV light, etc
- **Knockout mice** lacking p53 show normal development, but show **predisposition to develop multiple tumors**
- About half of people, annually diagnosed for various forms of cancer, have **mutations in p53 gene**

p53-fosforilazione



Regolazione per fosforilazione

Es. fosforilazione del fattore trascrizionale
CREB

attivazione di geni specifici
responsivi all'AMP ciclico

CREB= proteina che lega la sequenza CRE
CRE= elemento (sequenza) di risposta
all'AMP ciclico

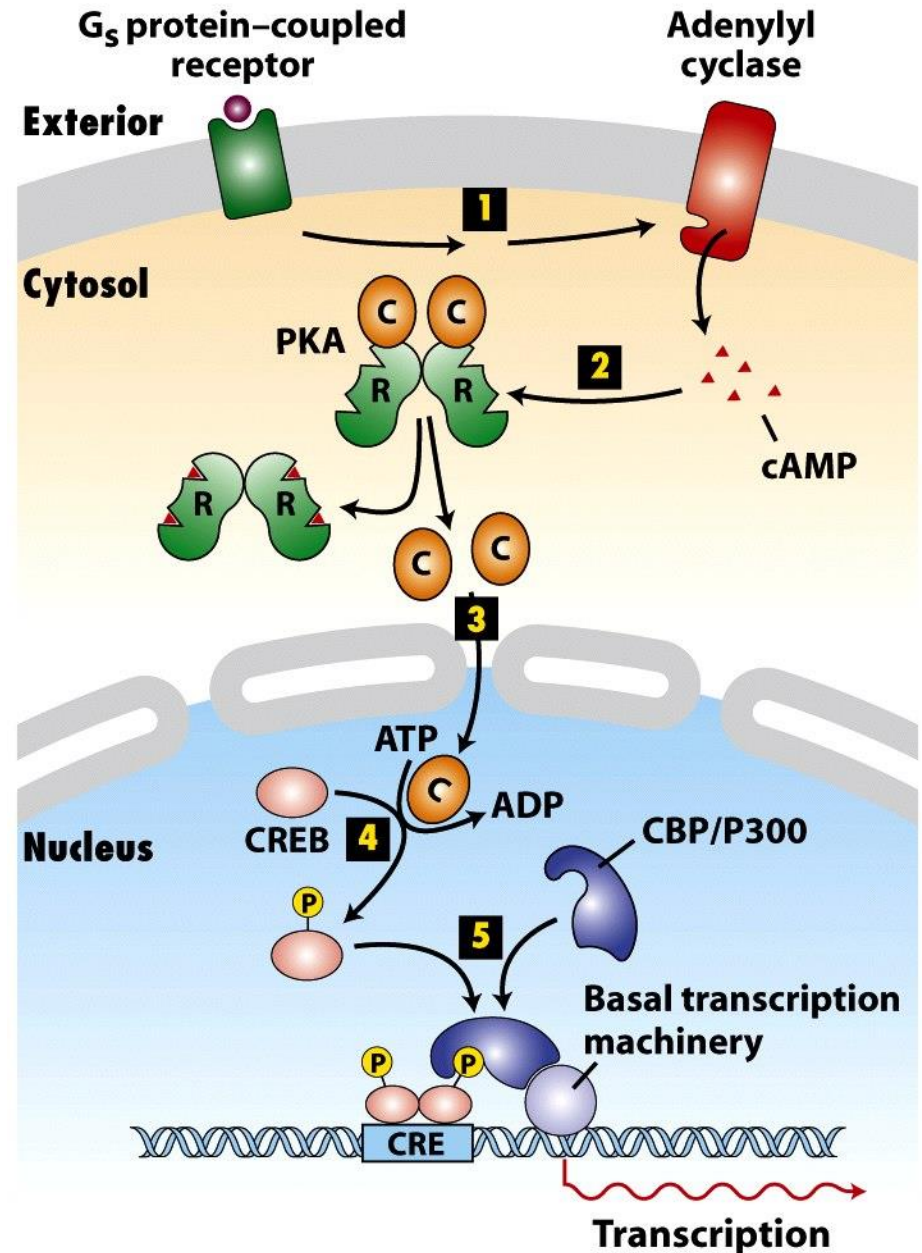


Figure 16-31
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

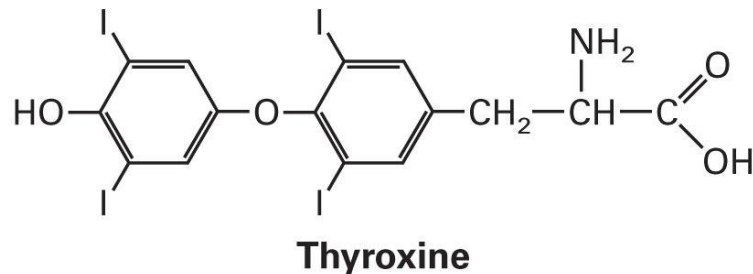
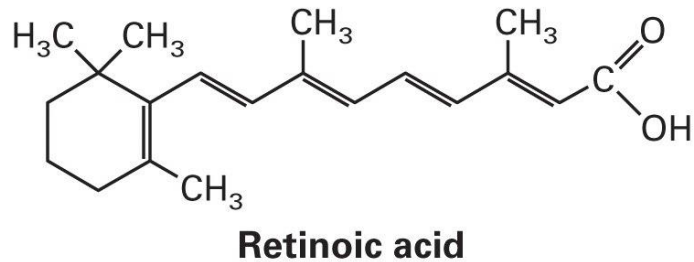
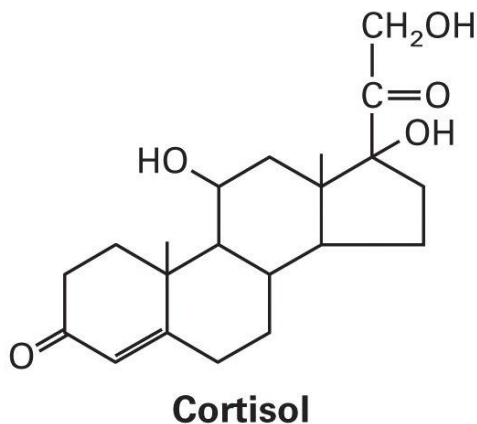
(2) Regolazione mediante legame ad un ligando es fattori di trascrizione = Recettori nucleari

Fattori di trascrizione regolati da ligandi, molecole di natura lipidica (idrofobiche). Il ligando determina:

- cambio dell'attività
- cambio della localizzazione cellulare

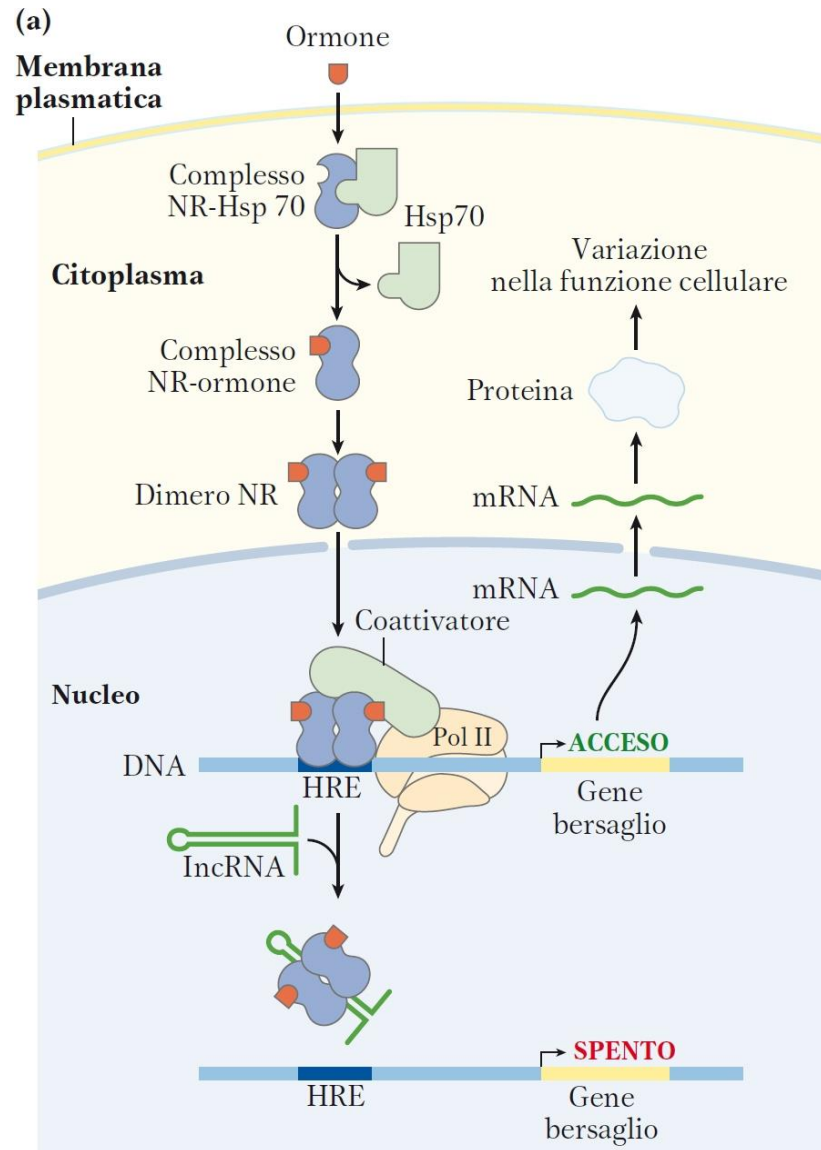
NUCLEAR RECEPTORS

- **Transcription factors** which get activated by lipid-soluble hormones
- Lipid-soluble hormones - small hydrophobic molecules capable to diffuse freely through plasma and nuclear membranes



RECETTORI NUCLEARI OMODIMERICI

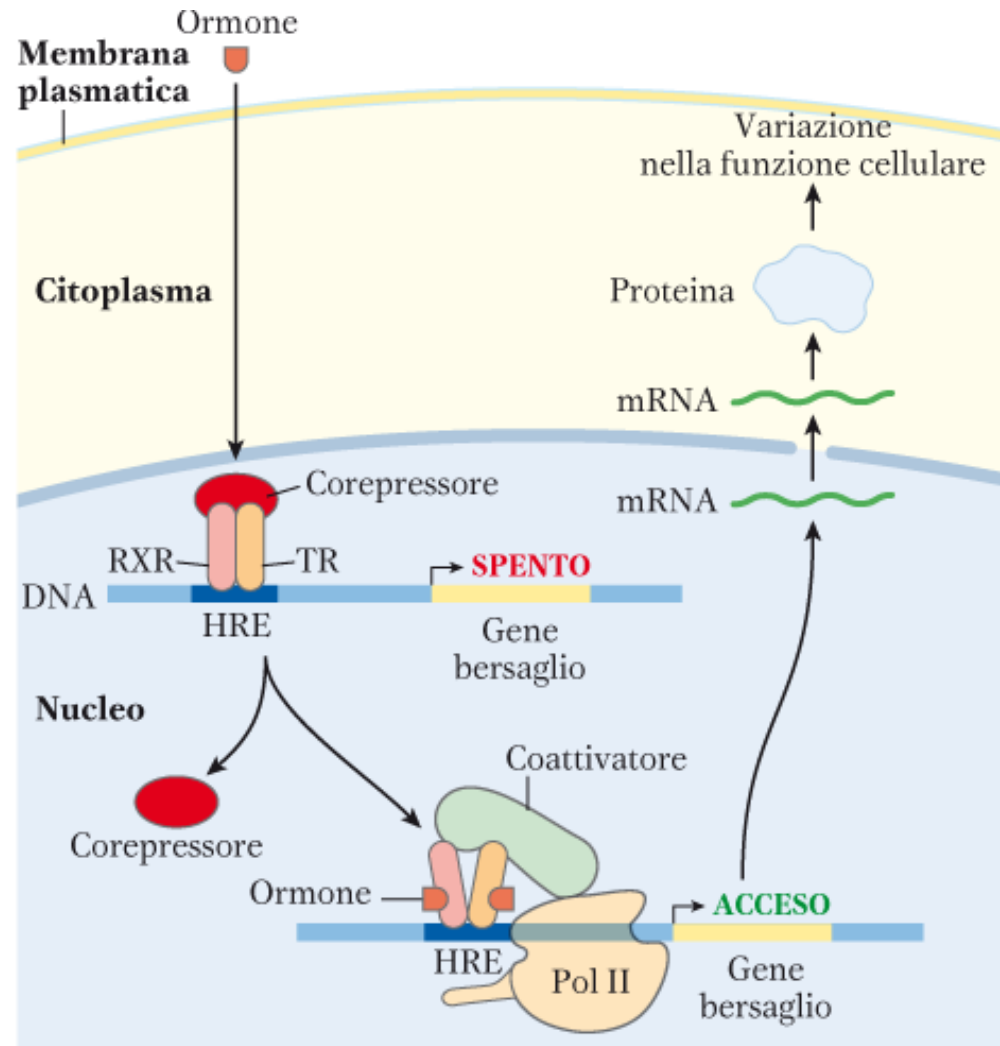
Es recettore glucocorticoidi, estrogeni, progesterone, androgeni



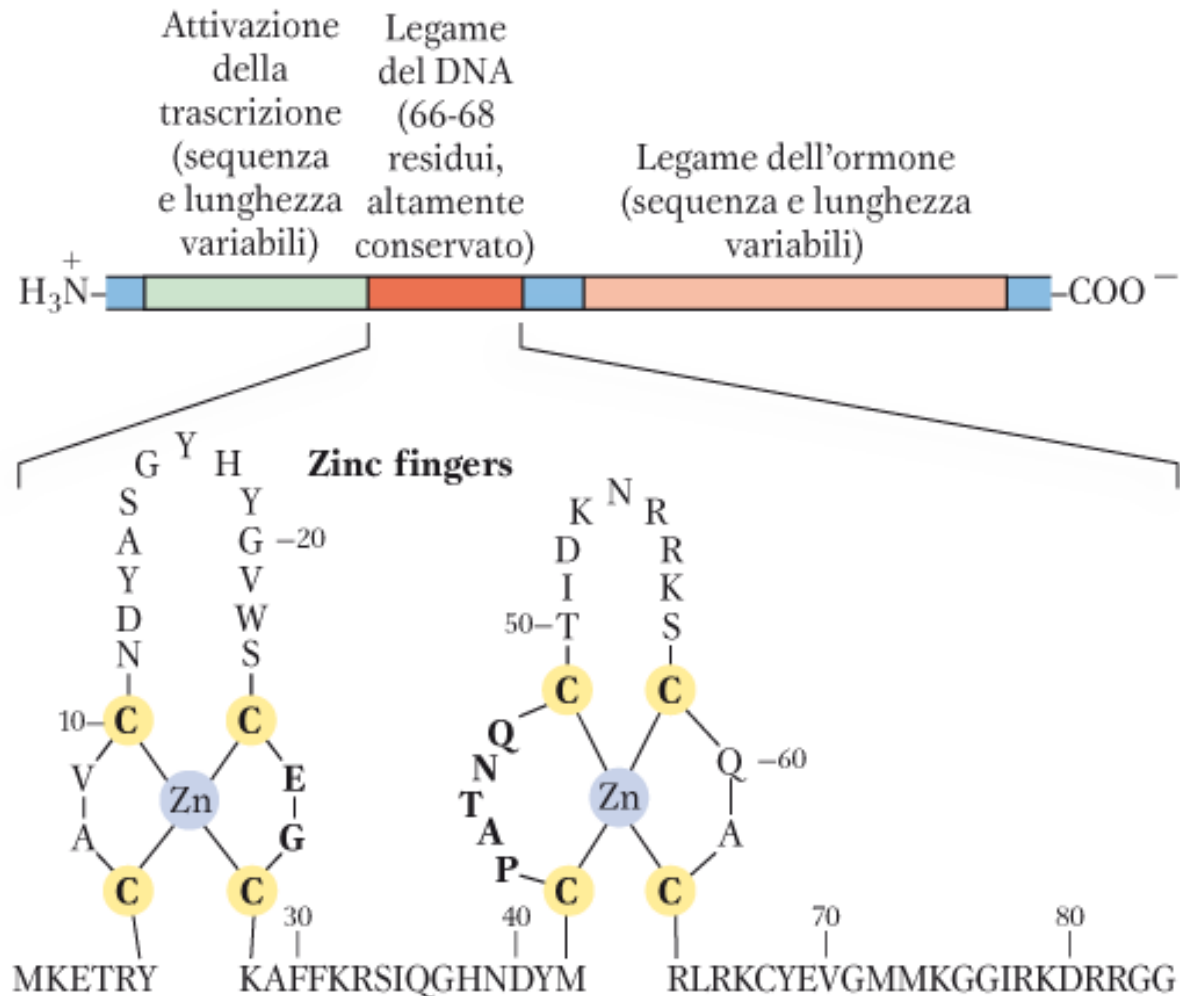
RECETTORI NUCLEARI ETERODIMERICI

Es recettore ormoni tiroidei, acido retinoico, vitamina D

Es. ormone
tiroideo

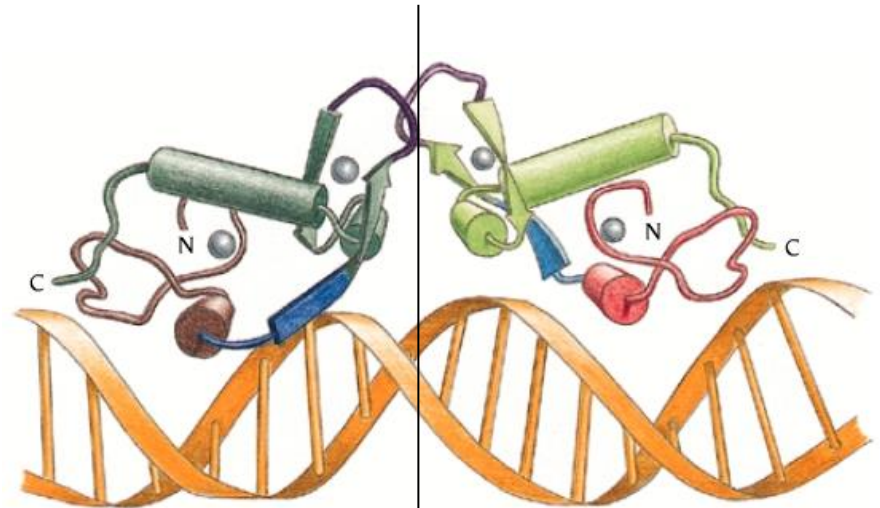
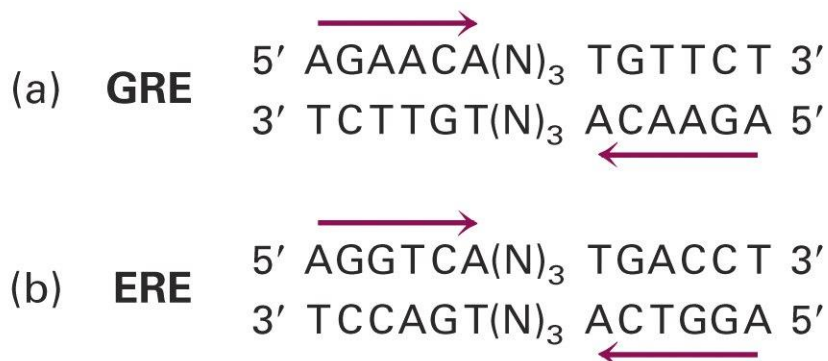


Un tipico recettore nucleare degli ormoni lipofilici proteina multidominio



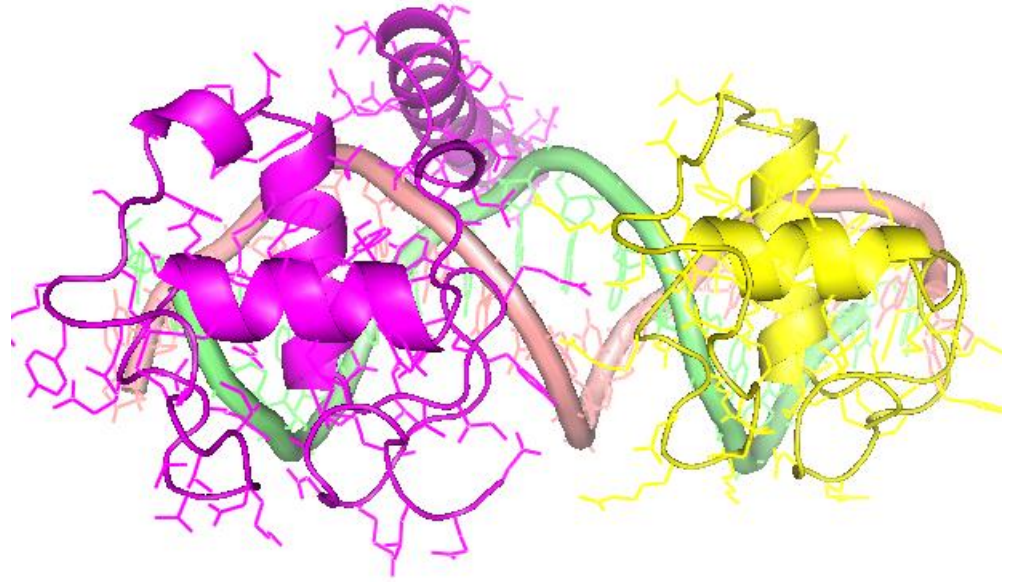
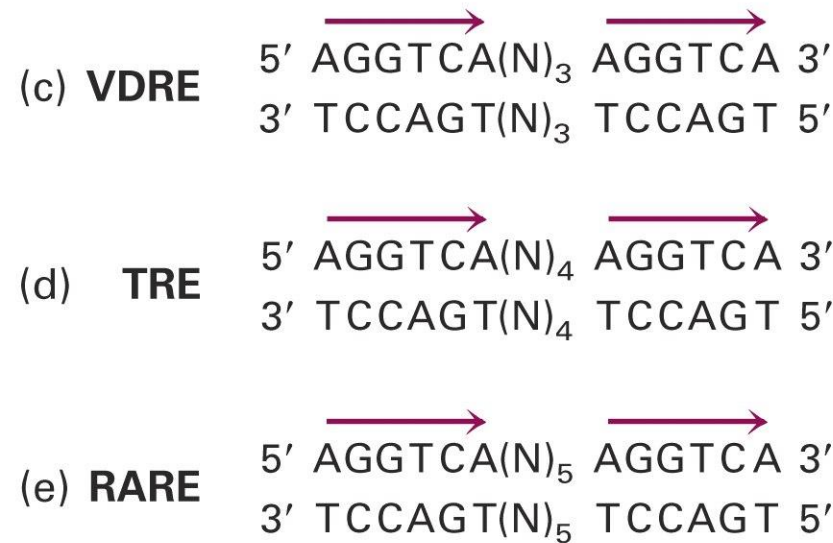
Homodimeric nuclear receptors are made of two identical subunits and bind to inverted DNA repeats

HRE sequences



2-fold symmetry

Direct repeat binding sites of heterodimeric nuclear receptors



Heterodimeric nuclear receptors are made of two different subunits

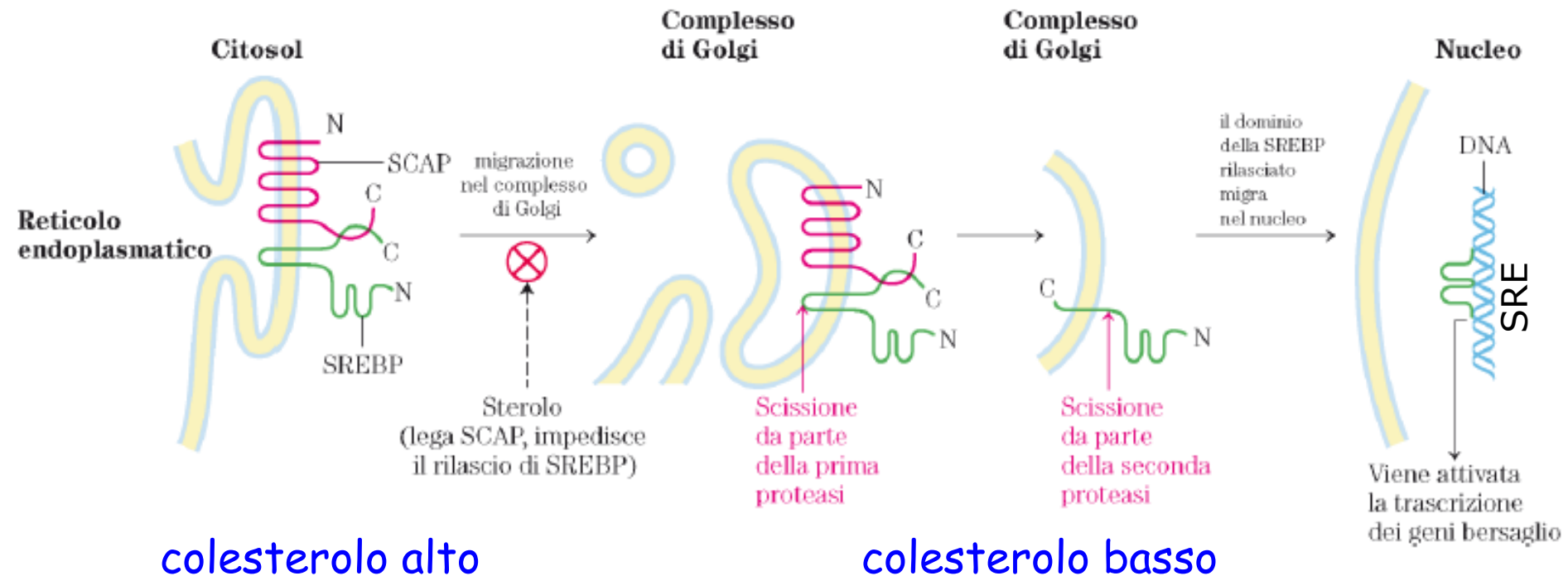
Binding specificity of heterodimeric nuclear receptors is achieved solely by variable length of spacer nucleotide sequence

Modificazione di fattori di trascrizione

maturazione per taglio proteolitico

es. proteina legante l'elemento di risposta agli steroli (SREBP)

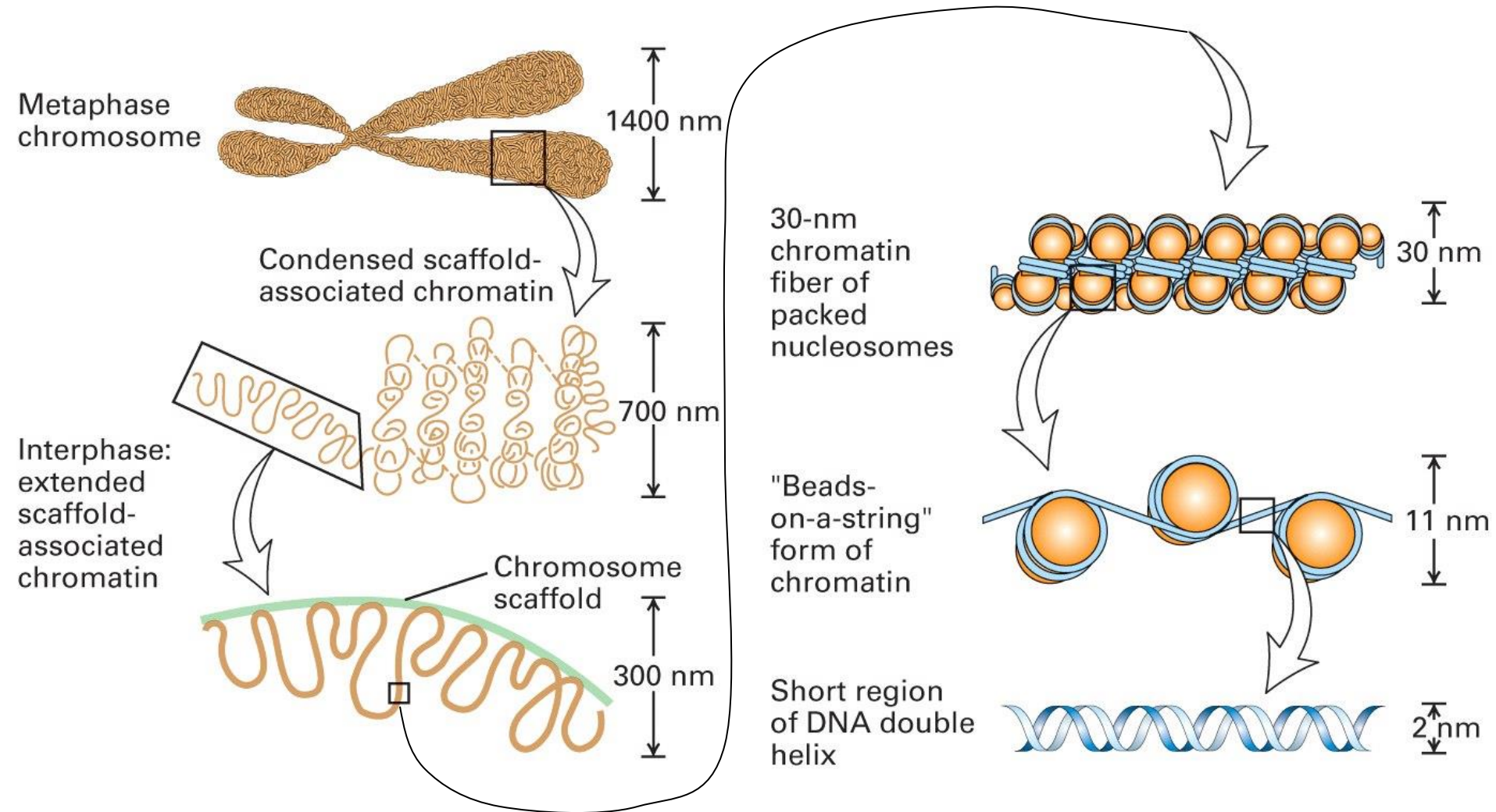
famiglia di **fattori di trascrizione SREBP**, che controllano la trascrizione di geni coinvolti nella sintesi degli steroli, acidi grassi, trigliceridi, fosfolipidi. Questi fattori di trascrizione sono sintetizzati come **precursori inattivi di proteine della membrana** del reticolo endoplasmatico, per poi essere rilasciati/attivati attraverso proteolisi.



Eukaryotic Chromatin Structure and gene expression

- Eukaryotic DNA is packaged into **chromatin**.
- **Chromatin structure** is directly related to the **control of gene expression**.
- Chromatin structure begins with the organization of the DNA into nucleosomes.
- Nucleosomes may block RNA polymerase II from gaining access to promoters.

Background: chromatine structure



Controllo dell'espressione genica- rimodellamento della cromatina

- Il controllo dell'espressione genica richiede il rimodellamento della cromatina
- Il rimodellamento della cromatina è necessario per rendere il DNA accessibile ai fattori di trascrizione

Trascrizione e struttura della cromatina

- Il DNA nella cromatina condensata non e' accessibile
- La cromatina condensata (eterocromatina) e' trascrizionalmente **silente**
- La condensazione della cromatina dipende:
posizionamento nucleosomi, varianti istoniche, modificazioni covalenti degli istoni

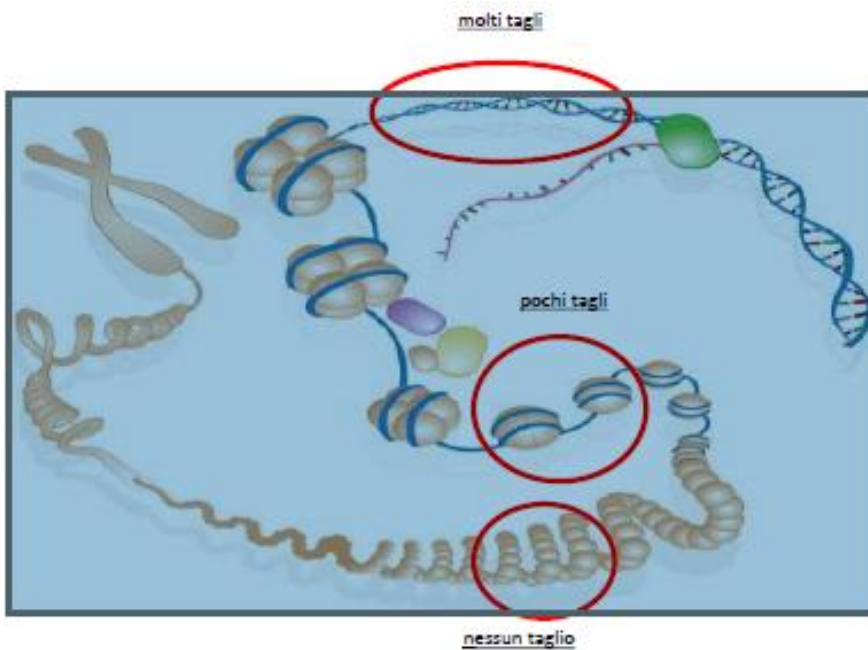
Controllo dell'espressione genica-rimodellamento della cromatina

Il DNA densamente compattato nella cromatina e' meno suscettibile all'idrolisi enzimatica non specifica da parte della DNasi

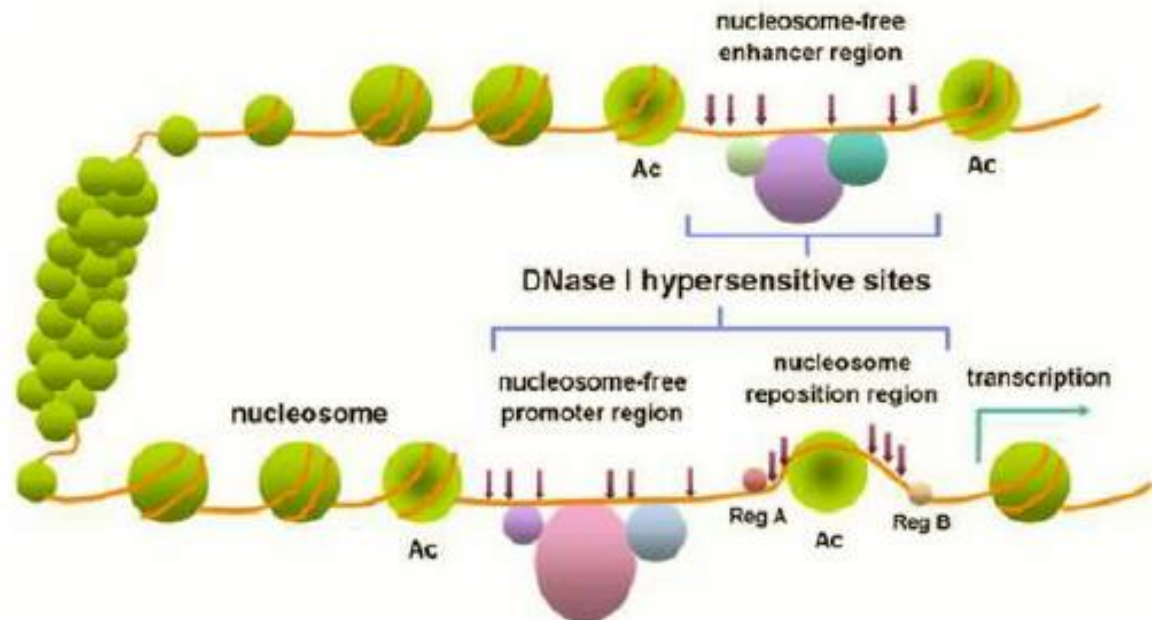
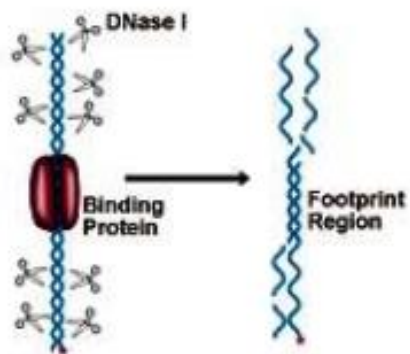
Le regioni adiacenti ai geni trascritti sono **piu' sensibili alla** scissione mediante **DNAsi**

L'aumentata sensibilità e ipersensibilità sono **tessuto-specifiche e regolate durante lo sviluppo**

esempio: nel cervello i geni delle globine sono resistenti alla DNAsi attraverso tutte le fasi dello sviluppo e la vita adulta



DHS, DNase I Hypersensitivity Sites



Acetilazione degli Istoni

- E' una modificazione **post-traduzionale**
- Gruppi acetilici ($\text{CH}_3 - \text{C}=\text{O}$) legati covalentemente a aminoacidi **basici (Lys)** **ne determinano la perdita della carica positiva**
- Effetti: **modificazione delle interazioni DNA-istoni, istoni-istoni, istoni-nucleosomi, istoni-fattori di trascrizione)**
- **Diminuiscono la condensazione della cromatina**

Acetylation of the N-terminal sequence of histone H3

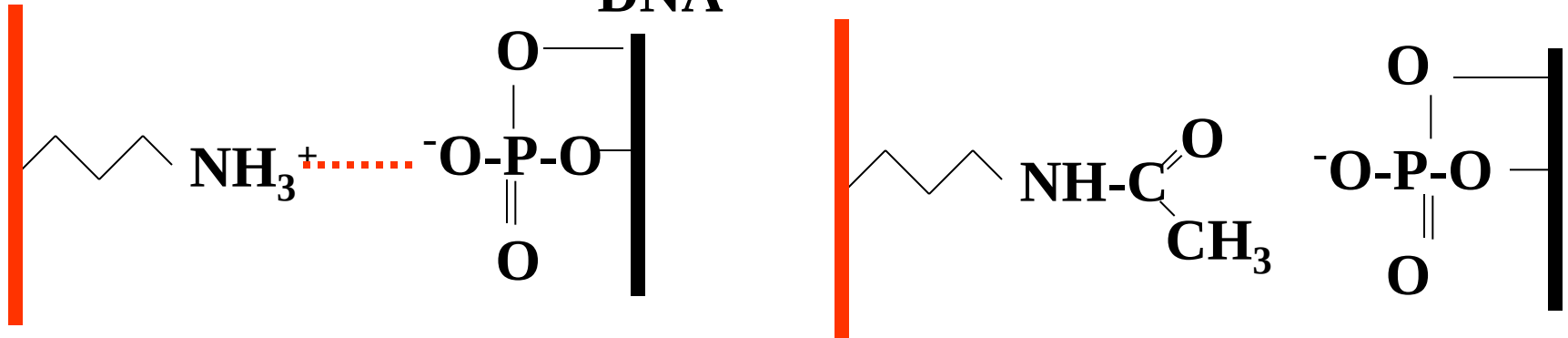
- ART**K**QTAR**K**STGG**K**APRKQL

HAT (histone acetyltransferase)



Histone

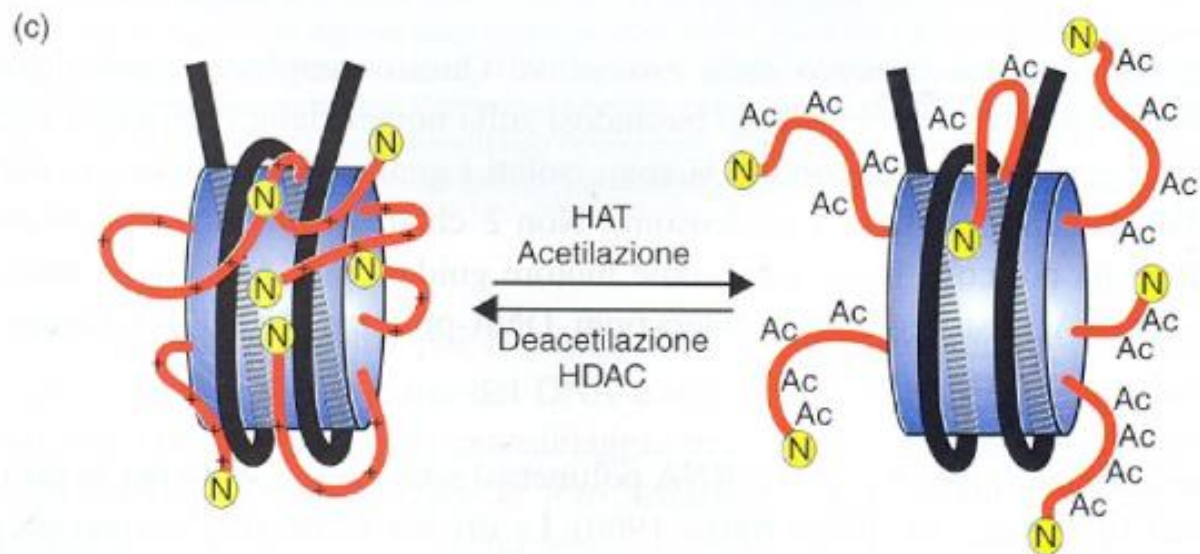
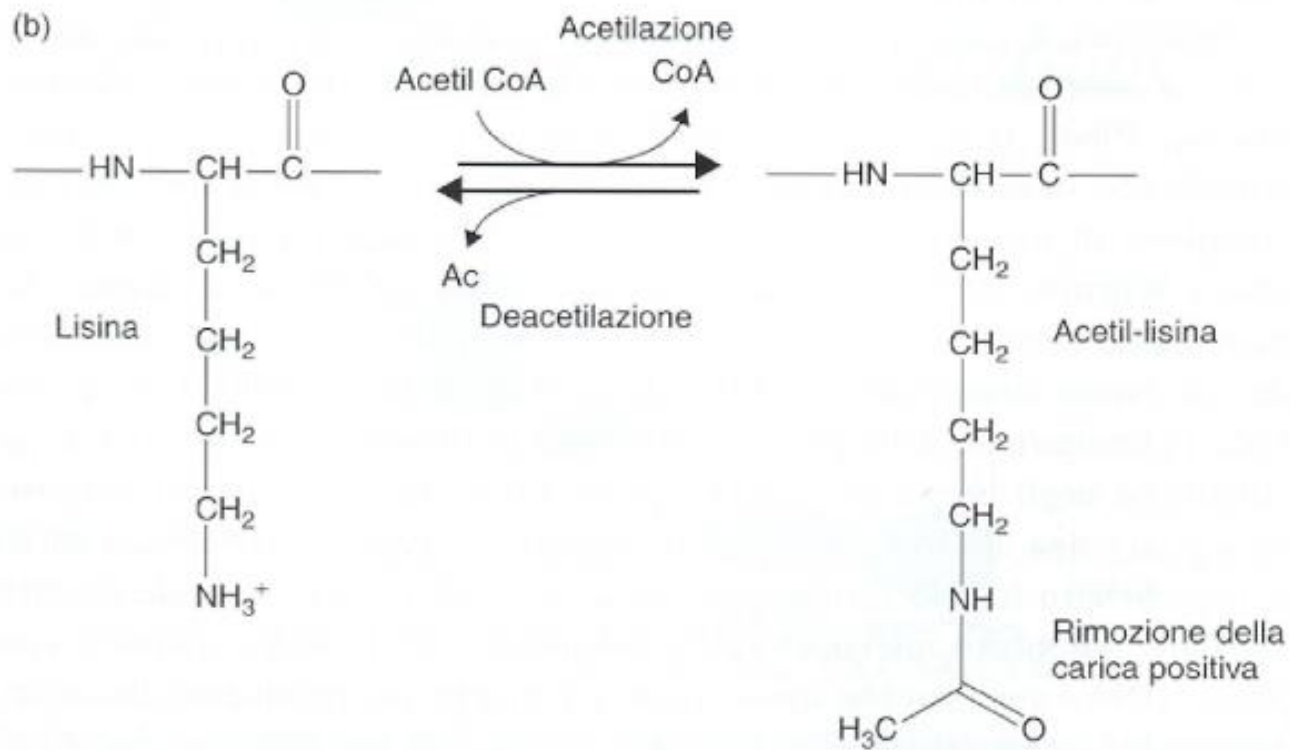
DNA



Acetylated

HDAC (histone deacetylase)





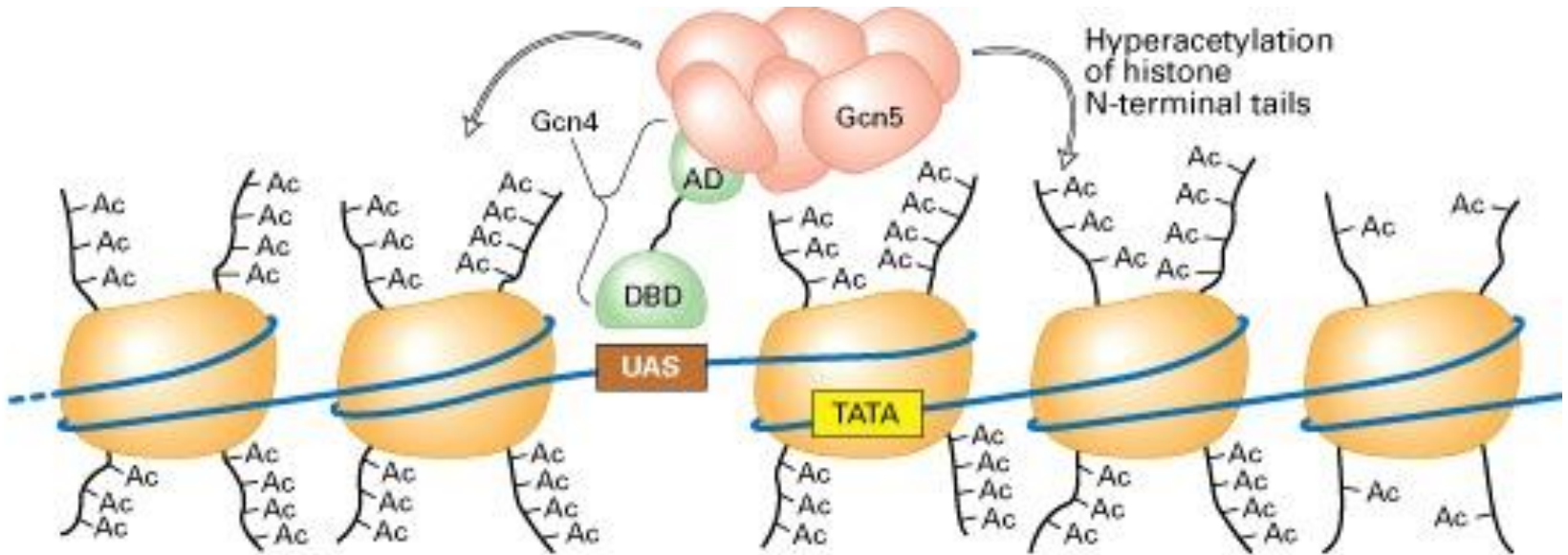
Acetilazione degli Istoni

I residui acetilati di lisina interagiscono con un dominio specifico detto **bromodominio**.

Proteine che contengono un bromodominio:

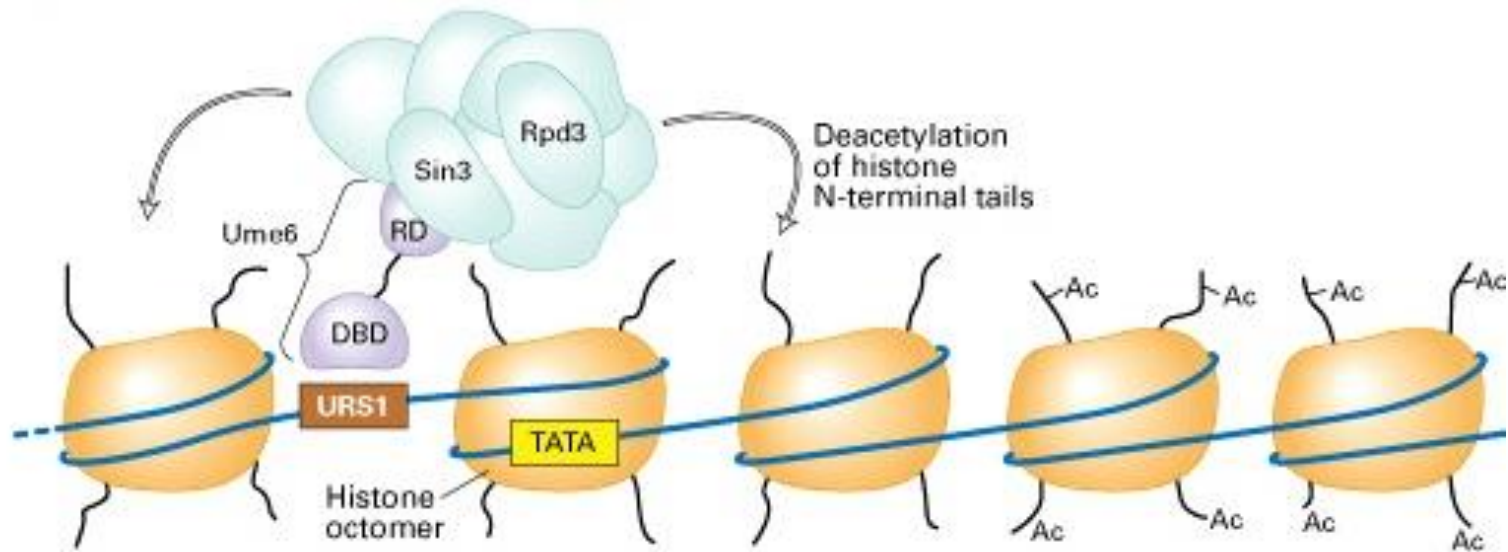
- complesso di trascrizione, proteine che legano il TBP (TAFs)
- complessi proteici *motori di rimodellamento della cromatina*

Attivatori: acetilazione degli Istoni



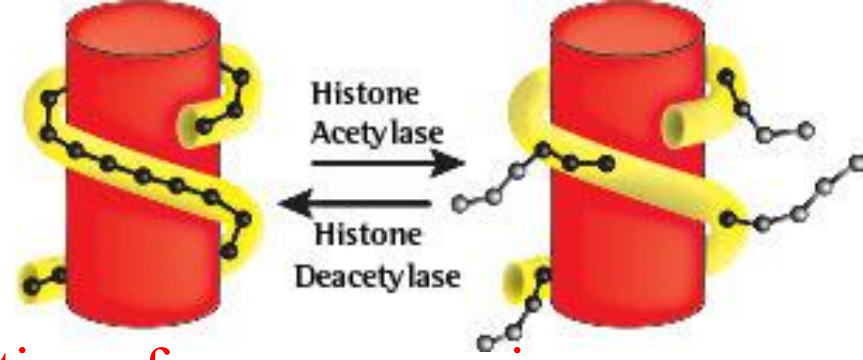
- Alcuni attivatori attirano delle acetilasi
- Il macchinario di trascrizione puo' accedere al DNA meno condensato

Repressori: deacetilazione degli Istoni



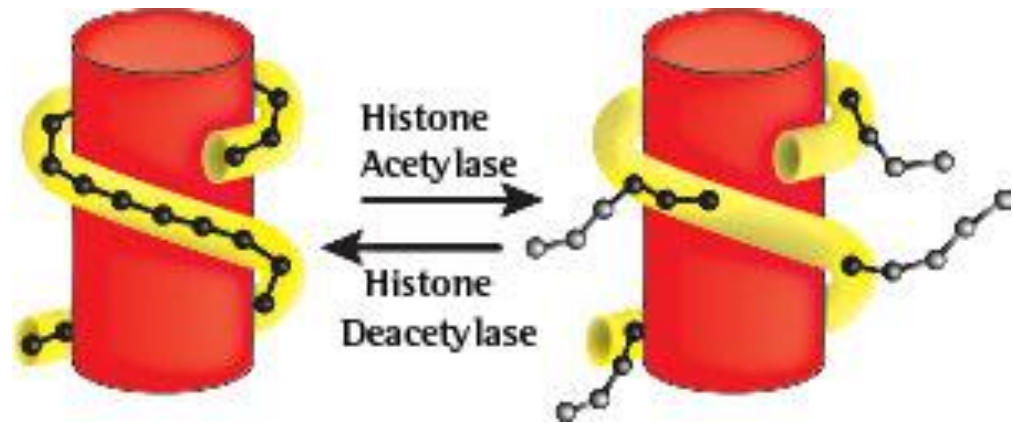
- **Alcuni repressori attirano delle deacetilasi**
- **Prevencono l'accesso del macchinario di trascrizione al DNA**

Histone Deacetylases/ Histone Acetyltransferase



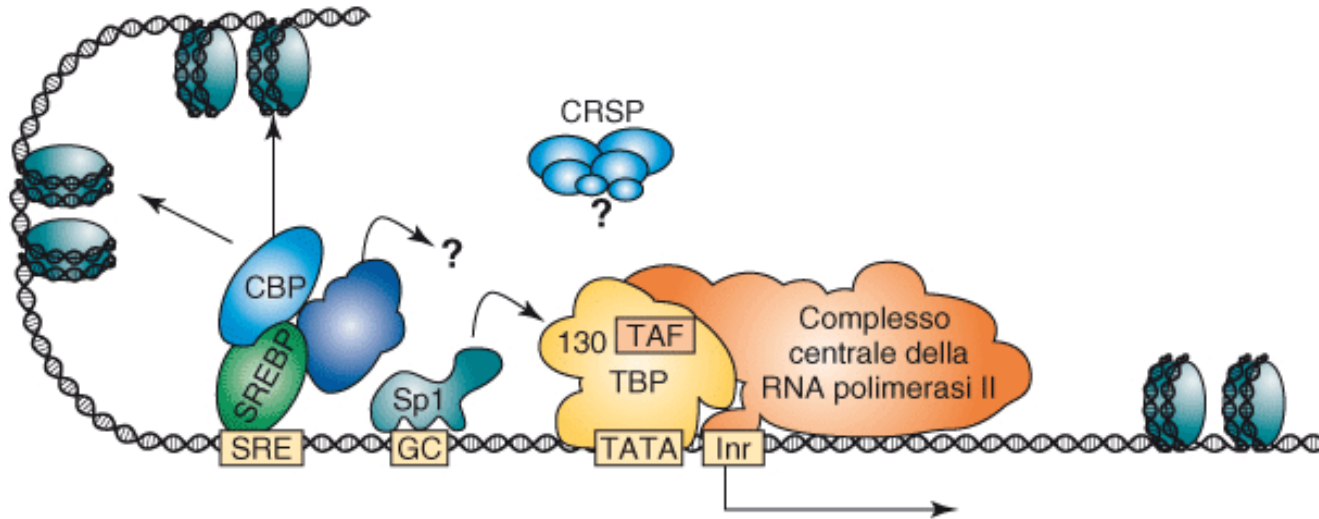
- Plays an important role in the regulation of gene expression
- **Histone acetyl transferases (HATs):** Acetylate Histones, enhance transcription; acetylation neutralizes positive charges on the histone by changing amines into amides and decreases the ability of the histones to bind to DNA, allowing gene expression
- **Histone Deacetylases (HDACs):** Deactylate Histones, repress transcription; remove acetyl groups from an ϵ -N-acetyl lysine amino acid on a histone
- Different classes have **different effects depending on which histones they are affecting** (and which genes are expressed or repressed)

Istone Deacetilasi



- Una classe di Istone Deacetilasi: **Sirtuine** sono una famiglia di **NAD⁺ dipendenti istone deacetilasi** che giocano ruoli importanti nel "gene silencing", riparazione del DNA ed invecchiamento.
- L'attivazione delle sirtuine dipende dal **rapporto NAD⁺ /NADH** ed è quindi legata allo stato energetico della cellula.
- Scarsa energia metabolica, cioè **alte** concentrazioni di **NAD⁺**, attivano Sirt1

Gene per il recettore delle LDL esempio di controllo combinatoriale



- ✓ Il gene è trascritto in risposta alla mancanza di colesterolo nelle cellule
- ✓ Il gene per il recettore LDL è attivato mediante un effetto coordinato di diversi fattori di trascrizione

CRSP cofattore

CBP acetilasi degli istoni

Controllo dell'espressione. Meccanismi epigenetici

Meccanismi non direttamente attribuibili alla sequenza del DNA.

• Modificazioni degli istoni

Acetilazioni, fosforilazioni, metilazioni, ADP-ribosilazione responsabili di cambiamenti conformazionali della cromatina. (Interazioni DNA-istoni, istoni-istoni, istoni-nucleosomi, istoni-fattori di trascrizione)

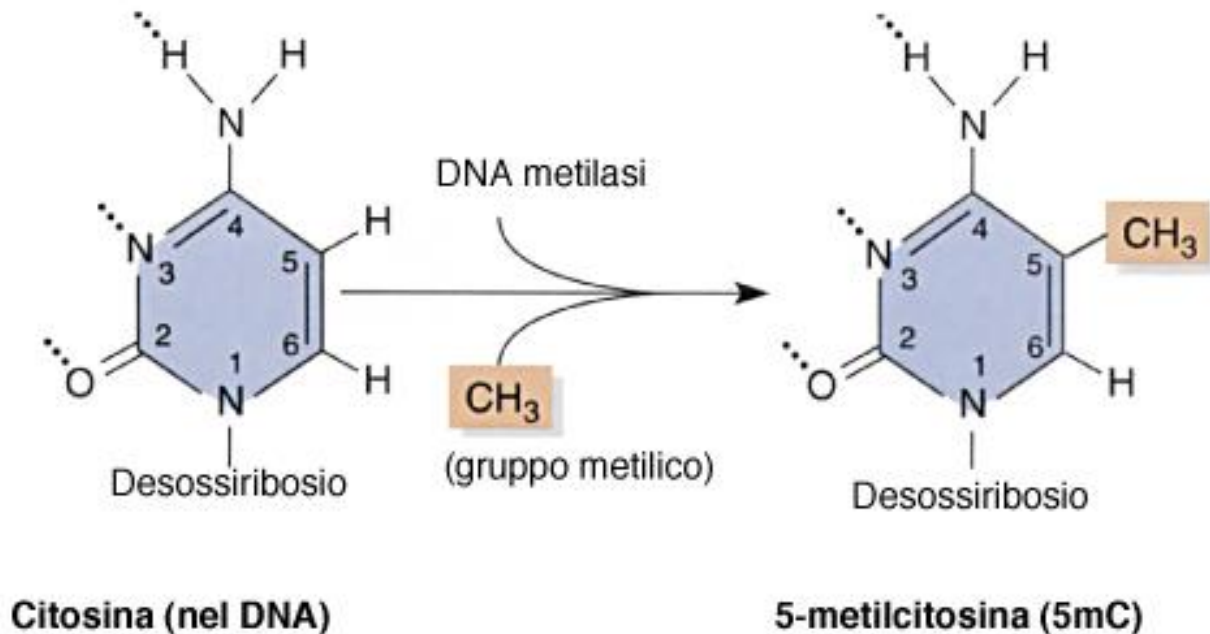
• Metilazione del DNA

Metilazione della C presente nel dinucleotide 5'CpG

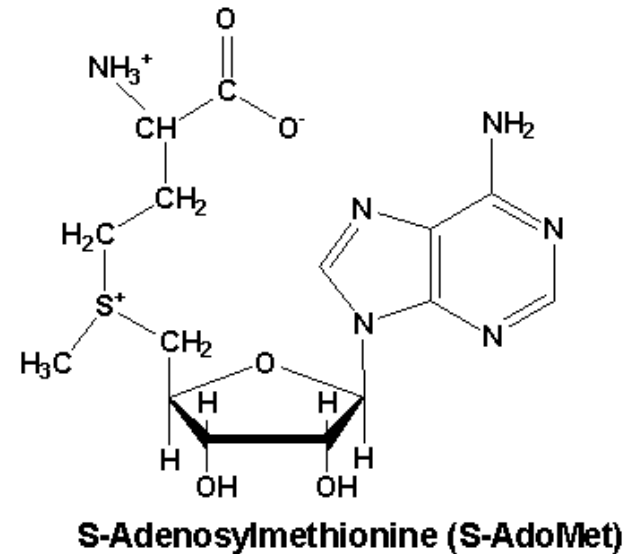
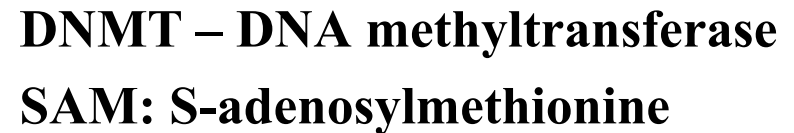
Influenza reciproca tra metilazione del DNA e modificazioni della cromatina

MECCANISMI EPIGENETICI: metilazione del DNA

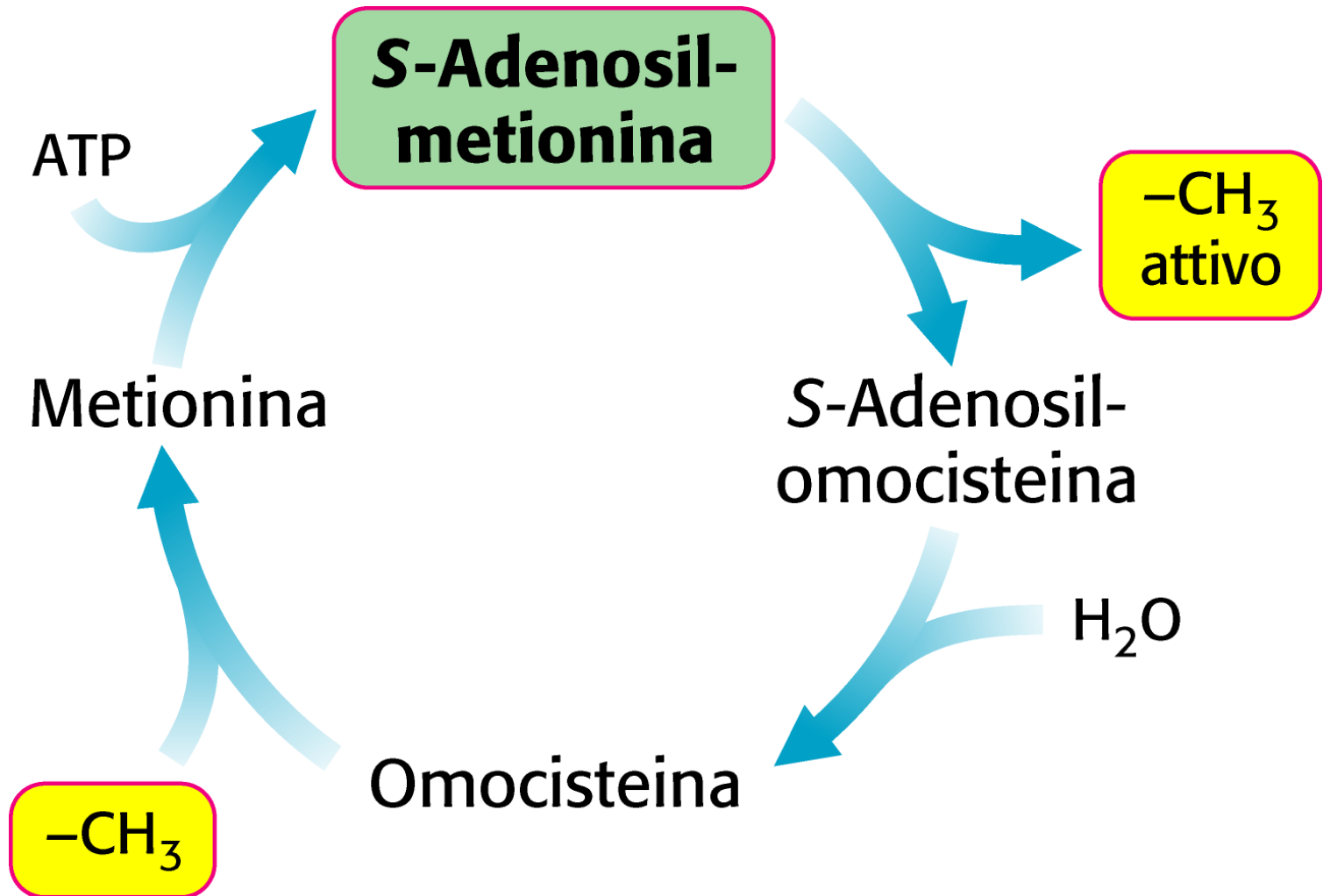
La metilazione del DNA è un processo post-replicativo.
Effetto inibitorio sull'espressione genica a livello trascrizionale.



A



Donatore del -CH₃

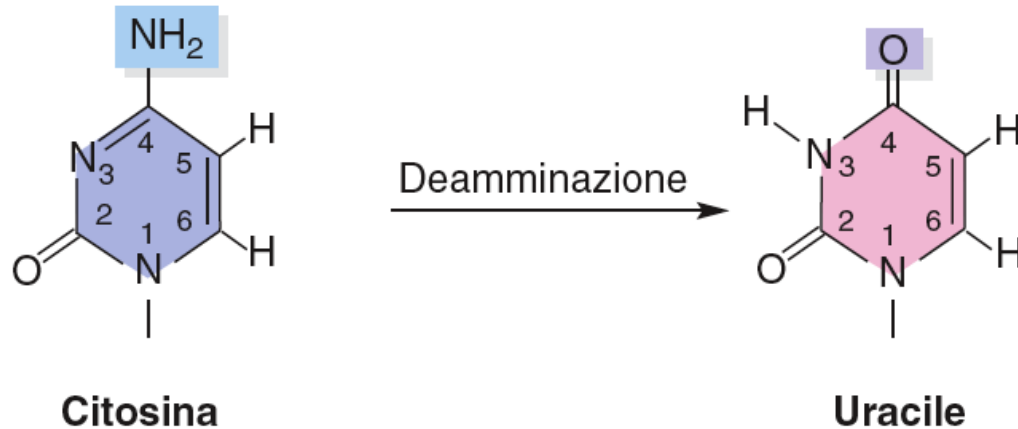


Metilazione del DNA

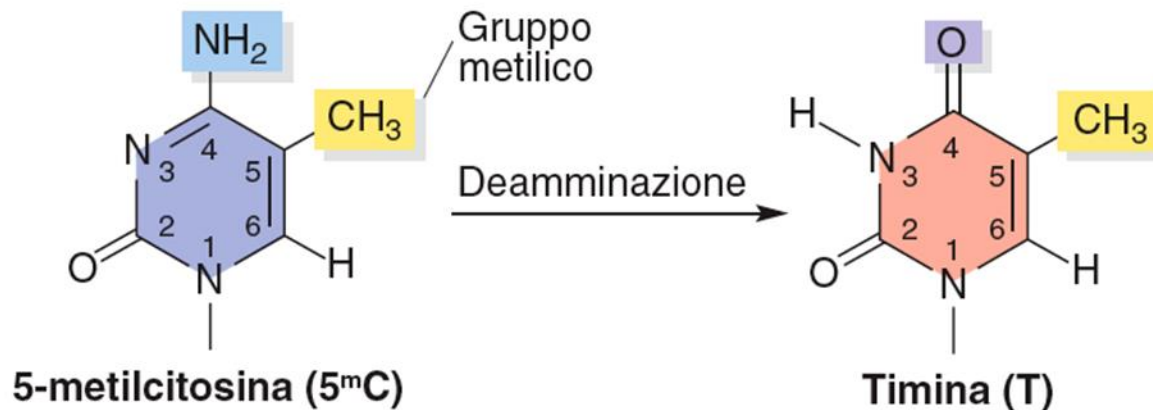
- La metilazione è a carico della **C** nel dinucleotide 5'**C**pG
- per deaminazione della 5' metil-citosina molti 5'**C_m**pG tendono a mutare in 5'TpG: nel genoma umano la frequenza della sequenza 5'CpG è inferiore del 20% rispetto all'atteso.
- Le sequenze 5'CpG sono distribuite in modo non omogeneo
- I geni dei vertebrati attivamente trascritti sono “marcati” al 5' da “**isole CpG**” (1000-2000pb) che sono **non-metilate**.
ipotesi: sono mantenute demetilate perché “ricoperte” da fattori di trascrizione, che impediscono l'accesso alla metilasi
- Nel genoma umano le **isole CpG** sono associate a tutti i geni **housekeeping** ed a circa il 40% dei geni con espressione tessuto-specifica
- I geni tessuto-specifici sono metilati in CpG nei tessuti dove non sono espressi

Deaminazione della citosina

a) Deaminazione della citosina a uracile

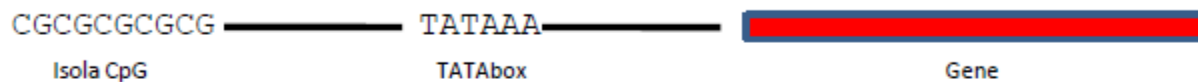


b) Deaminazione della 5-metilcitosina (5^{m}C) a timina



Piu' del 30% delle mutazioni per sostituzione di basi causative di malattie genetiche sono a livello di 5'- $\text{C}^{\text{m}}\text{G}$ -3'

METILAZIONE DEL DNA



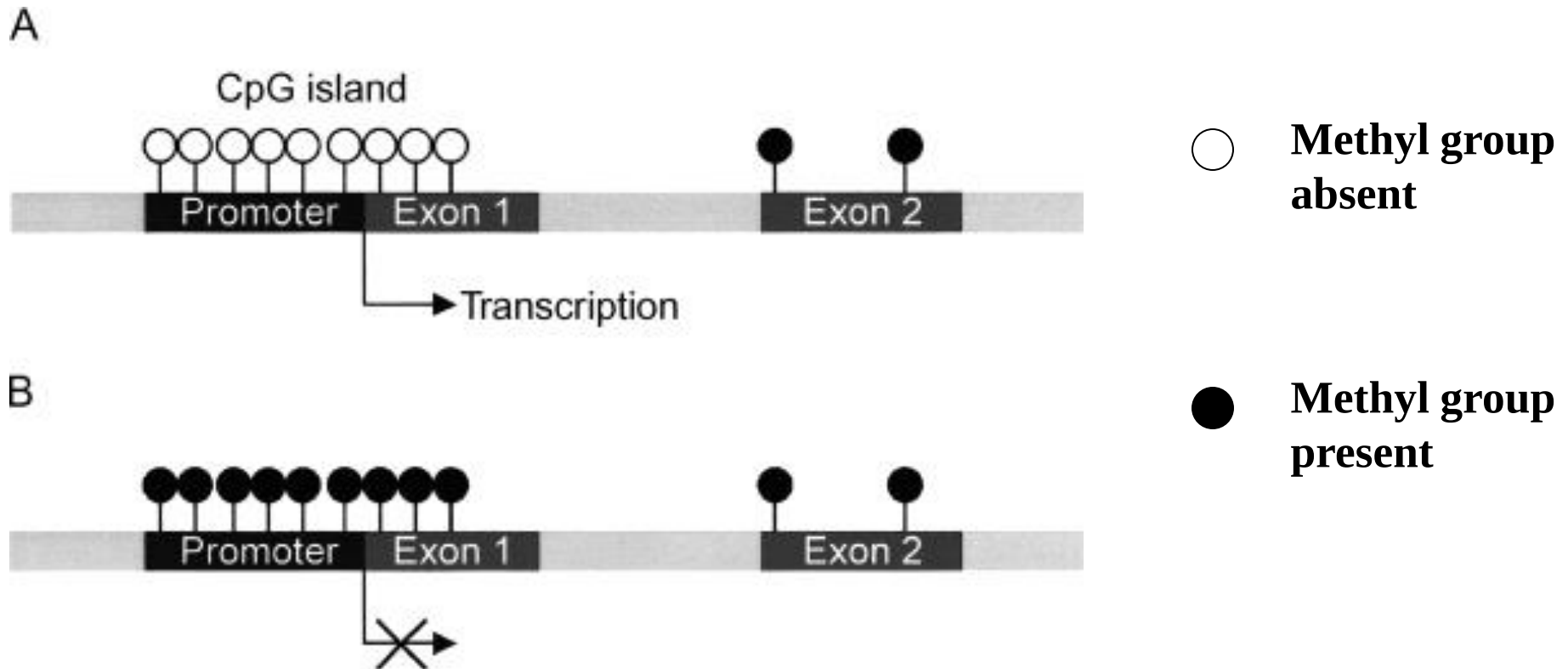
Metilazione isola CpG



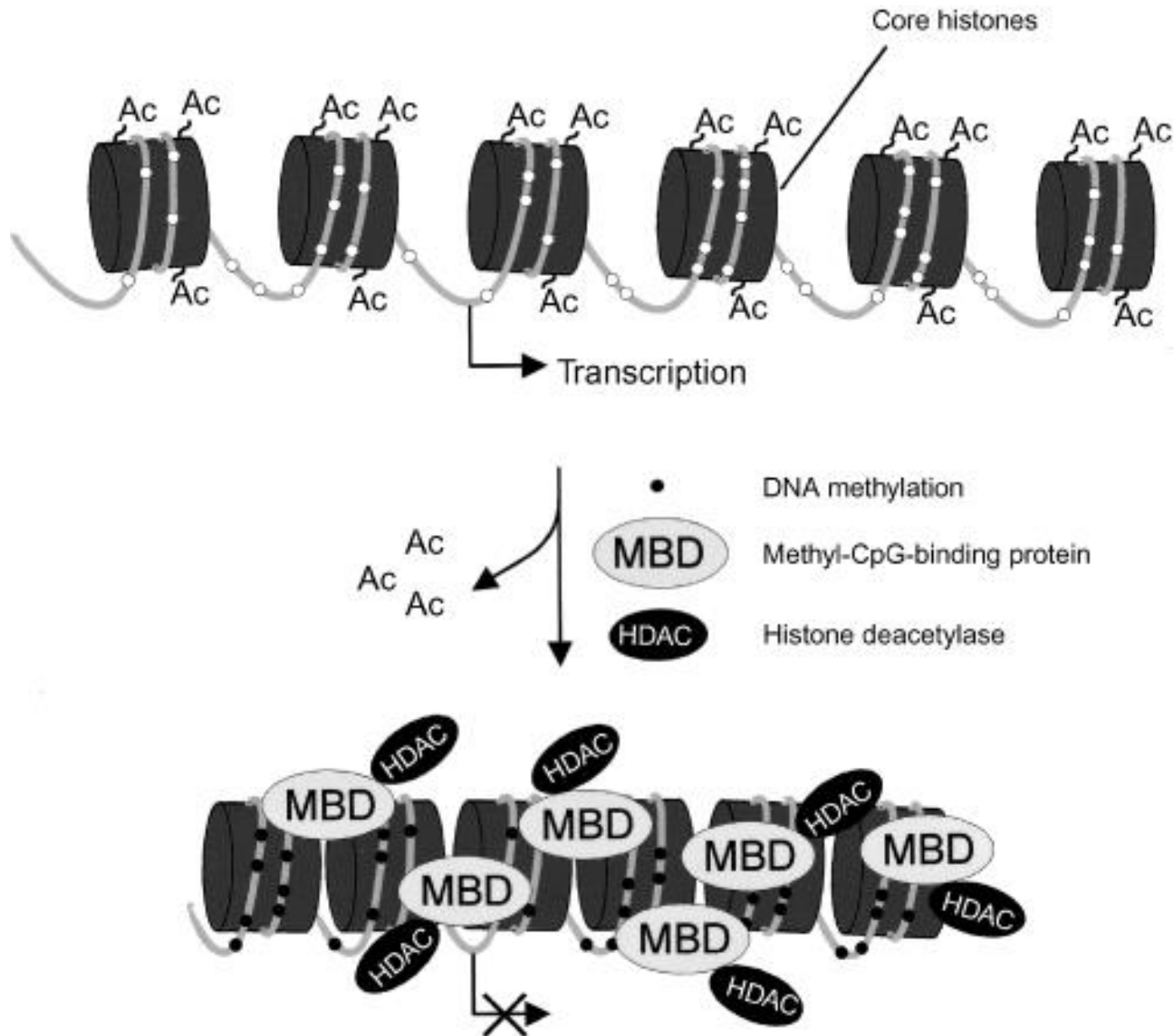
Silenziamento del gene

Methylation of CpG islands can block transcription by two distinct pathways:

- 1. **Direct blocking of TFIID (TBP) binding**



2. Recruitment of histone deacetylases

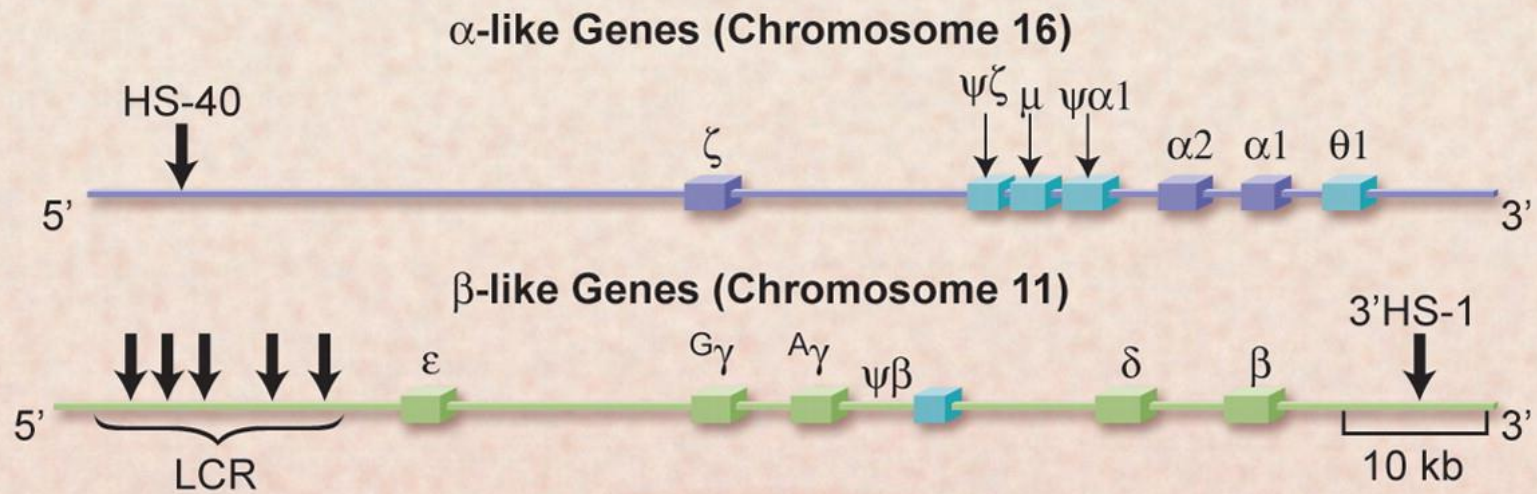


Metilazione del DNA ed espressione genica

Esempi:

- geni globinici: i geni delle globine sono estesamente metilati in cellule non eritroidi
- Il DNA delle cellule tumorali e' ipometilato
- Il cromosoma X inattivo e' ipermetilato

The genomic structure of the clusters of α -like and β -like globin genes, on chromosomes 16 and 11



Hemoglobin Proteins

Embryonic	Fetal	Adult
Hb Gower 1 	HbF 	HbA
Hb Gower 2 		HbA2
Hb Portland 		

Control of Globin Gene Expression by DNA Methylation

