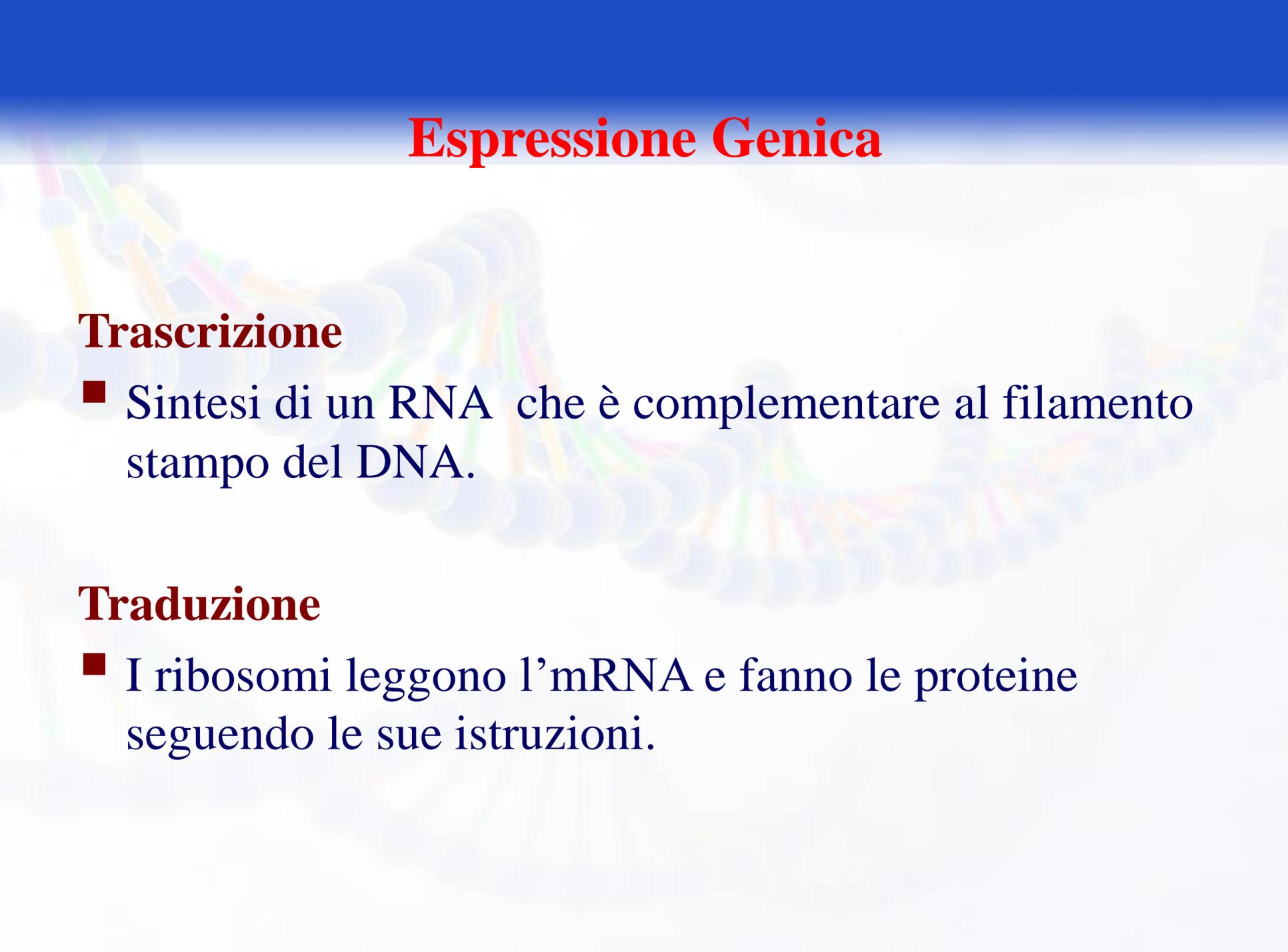




Regolazione dell'espressione genica

Espressione Genica



Trascrizione

- Sintesi di un RNA che è complementare al filamento stampo del DNA.

Traduzione

- I ribosomi leggono l'mRNA e fanno le proteine seguendo le sue istruzioni.

Espressione Genica delle cellule eucariotiche

Ogni cellula mantiene il suo specifico programma.

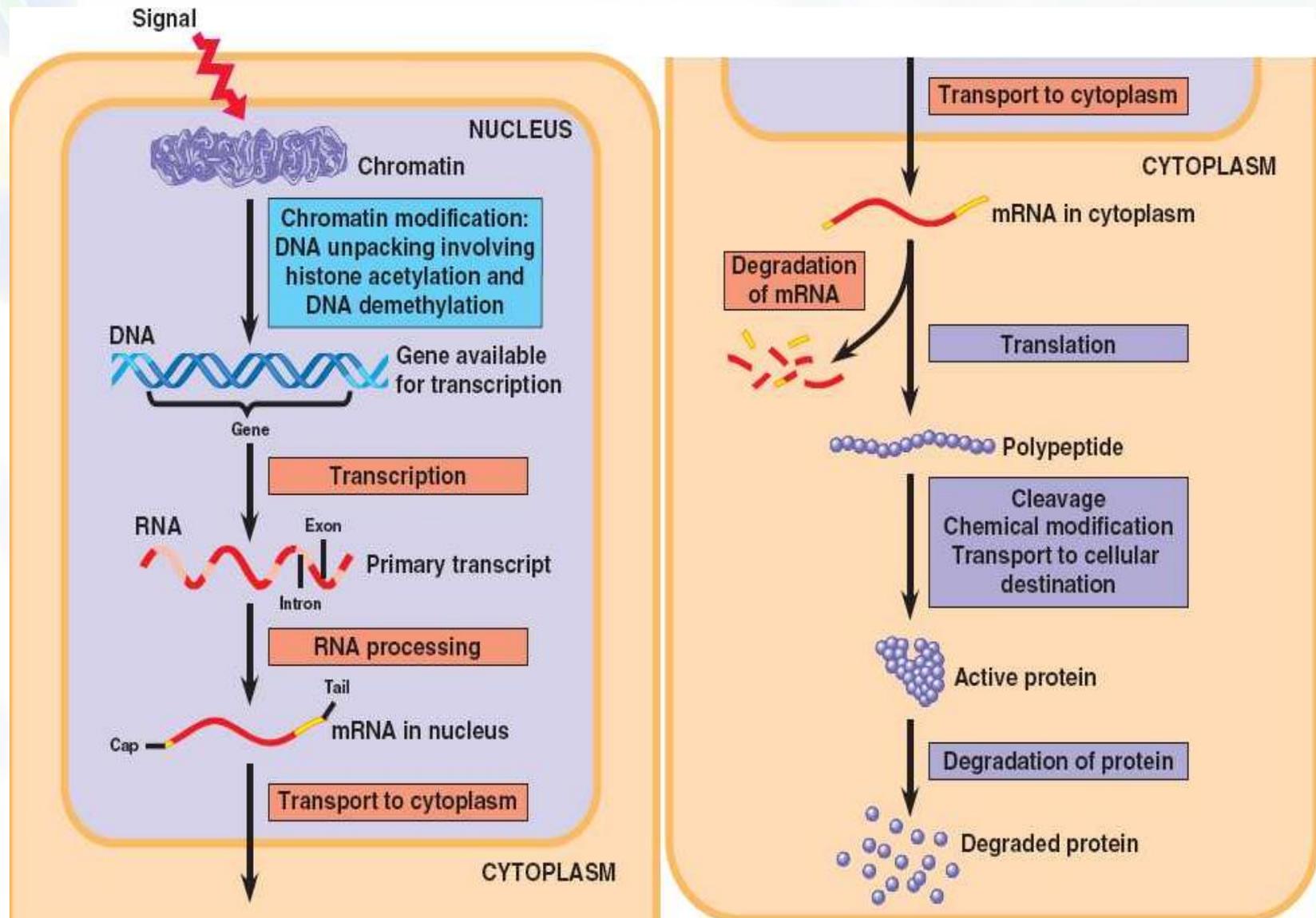
(espressione genica differenziale)

Il sistema di regolazione è complicato, avviene a diversi livelli (trascrizione, traduzione, post-traduzione).

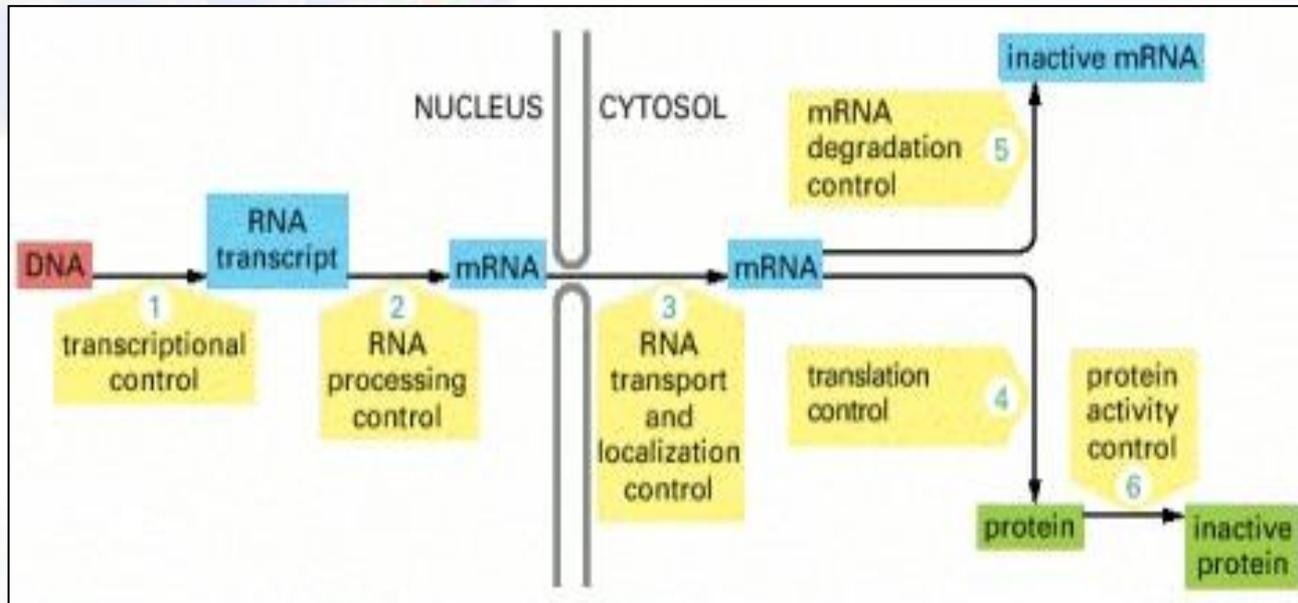
Regolazione dell'espressione genica

1. Cambiamenti della cromatina
2. Trascrizione
3. Processamento dell'RNA
4. Trasporto dell'RNA al citoplasma
5. Regolazione post trascrizionale (microRNA)
6. Traduzione
7. Taglio proteolitico e modificazioni chimiche delle proteine
8. Degradazione delle proteine

Steps dell'espressione genica nelle cellule eucariotiche



Sei steps attraverso i quali l'espressione genica eucariotica viene controllata



1. Cambiamenti della cromatina

- L'eterocromatina è altamente condensata (i siti per la trascrizione non sono accessibili sul DNA)
- **Acetilazione/deacetilazione** degli istoni
- **Metilazione del DNA** [citosina]. Il DNA trascrizionalmente inattivo è altamente metilato

La metilazione del DNA e la deacetilazione degli istoni reprimono la trascrizione

1. Cambiamenti della cromatina

- La metilazione del DNA **5 metil citosina (CG islands)** è essenziale per l'inattivazione di gene per lunghi periodi durante il differenziamento cellulare.
- Eucromatina: demetilazione del DNA ed acetilazione degli istoni; Gene accessibile per la trascrizione.
- **Imprinting genetico nei mammiferi.**
La metilazione del DNA spegne i geni degli alleli materni o paterni negli stadi precoci dello sviluppo.
- **Ereditarietà epigenetica.**

2. Trascrizione

I fattori di trascrizione sono proteine che si legano al DNA e promuovono (**enhancers**) o inibiscono (**silencers**) il legame dell'RNA polimerasi al DNA.

I fattori di trascrizione possono essere:

- **Fattori di trascrizione generali**

presenti in tutti i geni che codificano per proteine costitutive.

- Fattori di trascrizione specifici**

trascrizione di particolari geni in posti e tempi precisi

Promotori Eucariotici

I Promotori degli eucarioti sono posizionati in particolare a monte del gene. Ci sono diversi tipi di promotori nei geni umani, che presentano differente struttura e differenti proprietà regolatorie

Elementi promotori conservati negli eucarioti	Sequenza consenso
CAAT box	GGCCAATCT
TATA box	TATAA
GC box	GGGCGG
CAP site	TAC

Fattori di trascrizione

- I fattori di trascrizione sono proteine che si legano ai promotori sul DNA vicino al punto di inizio della trascrizione di un gene.
- I fattori di trascrizione possono favorire o inibire la trascrizione di un gene.

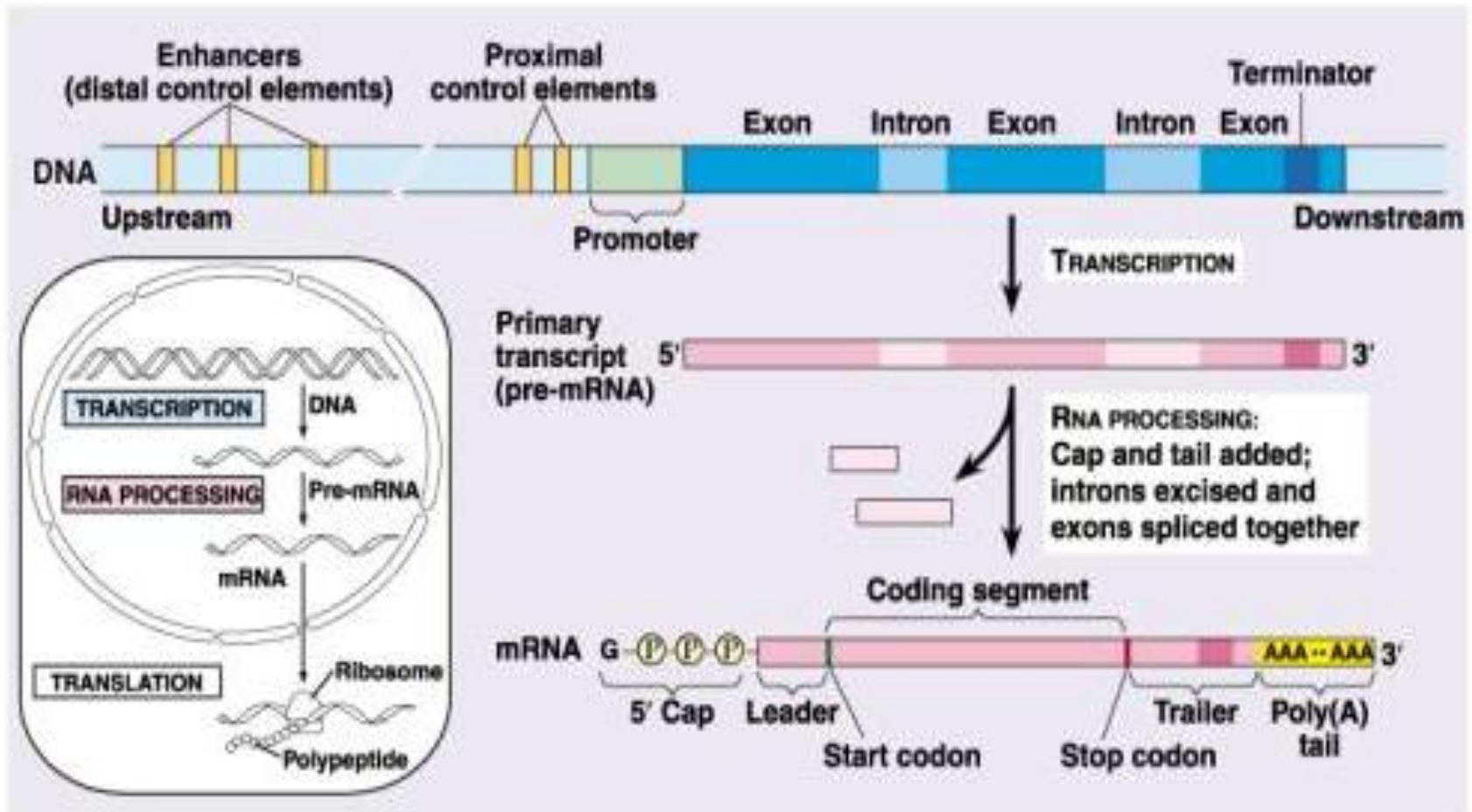
Fattori di inizio della trascrizione generali

Table 11.3

General Transcription Initiation Factors

Factor	Subunits	Size (kDa)	Function
TFIID-TBP	1	27	TATA box recognition, positioning of TATA box DNA around TFIIB and Pol II
TFIID-TAF _{II} ^s	14	15–250	Core promoter recognition (non-TATA elements), positive and negative regulation
TFIIA	3	12, 19, 35	Stabilization of TBP binding; stabilization of TAF–DNA binding
TFIIB	1	38	Recruitment of Pol II and TFIIF; start-site recognition for Pol II
TFIIF	3	156 total	Promoter targeting of Pol II
TFIIE	2	92 total	TFIIH recruitment; modulation of TFIIH helicase ATPase, and kinase activities; promoter melting
TFIIH	9	525 total	Promoter melting; promoter clearance via phosphorylation of CTD

Trascrizione di un Gene eucariotico



Fattori di trascrizione

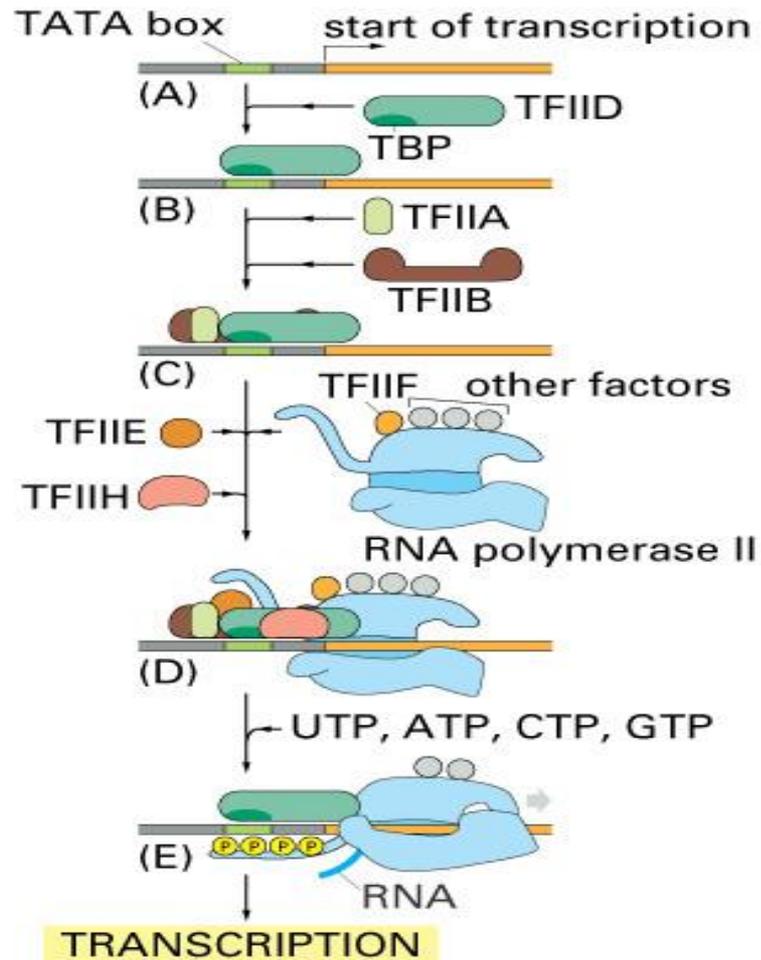
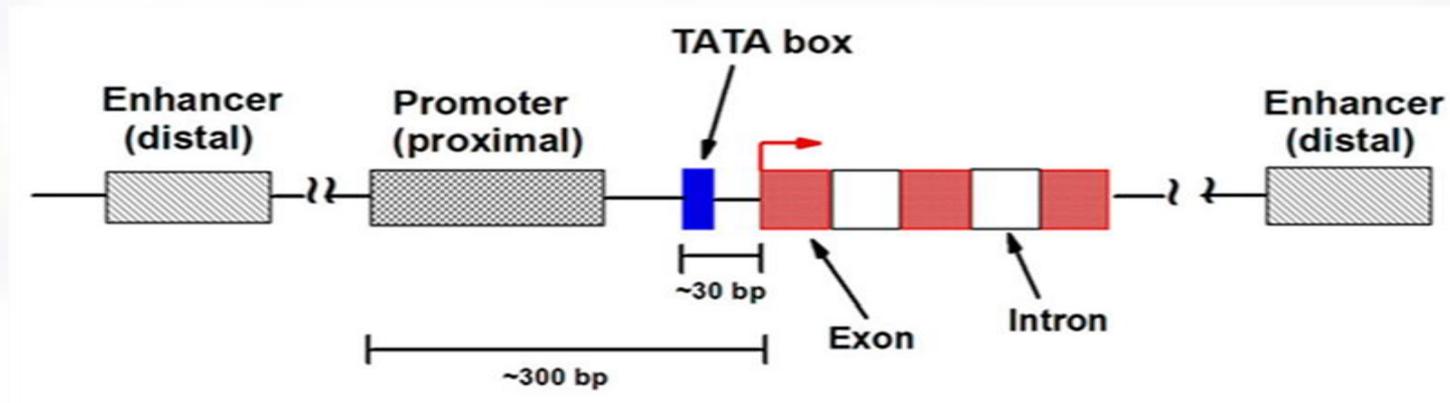


Figure 8-10 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

Enhancers (Stimolatori)

Gli enhancers sono delle sequenze promotrici del DNA, lunghe circa 50-150 nucleotidi; Gli enhancers incrementano l'attività trascrizionale di un gene e possono svolgere la loro attività a distanza di diverse migliaia di basi dal gene.



Complesso di Pre-inizio

- Il fattore di trascrizione generale si lega all'RNA polimerasi per formare il complesso di pre-inizio che è in grado di iniziare la trascrizione.
- L'assemblaggio del complesso di pre-inizio da parte di ogni tipo di promotore eucariotico (**promotori di classe II, riconosciuti dall'RNA polymerase II**) inizia con il legame di un fattore di assemblaggio alla sequenza promotrice.

Trascrizione tessuto specifica

I geni che codificano per enzimi di una tappa metabolica sono attivi su differenti cromosomi

- **Controllo coordinato in risposta a segnali chimici** dall'esterno della cellula

- Recettori che fanno parte di vie del segnale

Le quali attivano fattori di trascrizione attivatori o repressori

3. Processamento dell'mRNA

Modificazioni Post-trascrizionali

Alternative splicing

Lo stesso trascritto primario, ma diversi mRNA composti da alternativo taglio di esoni e introni (diverse isoforme della stessa proteina in tessuti diversi)

4. trasporto dell'mRNA

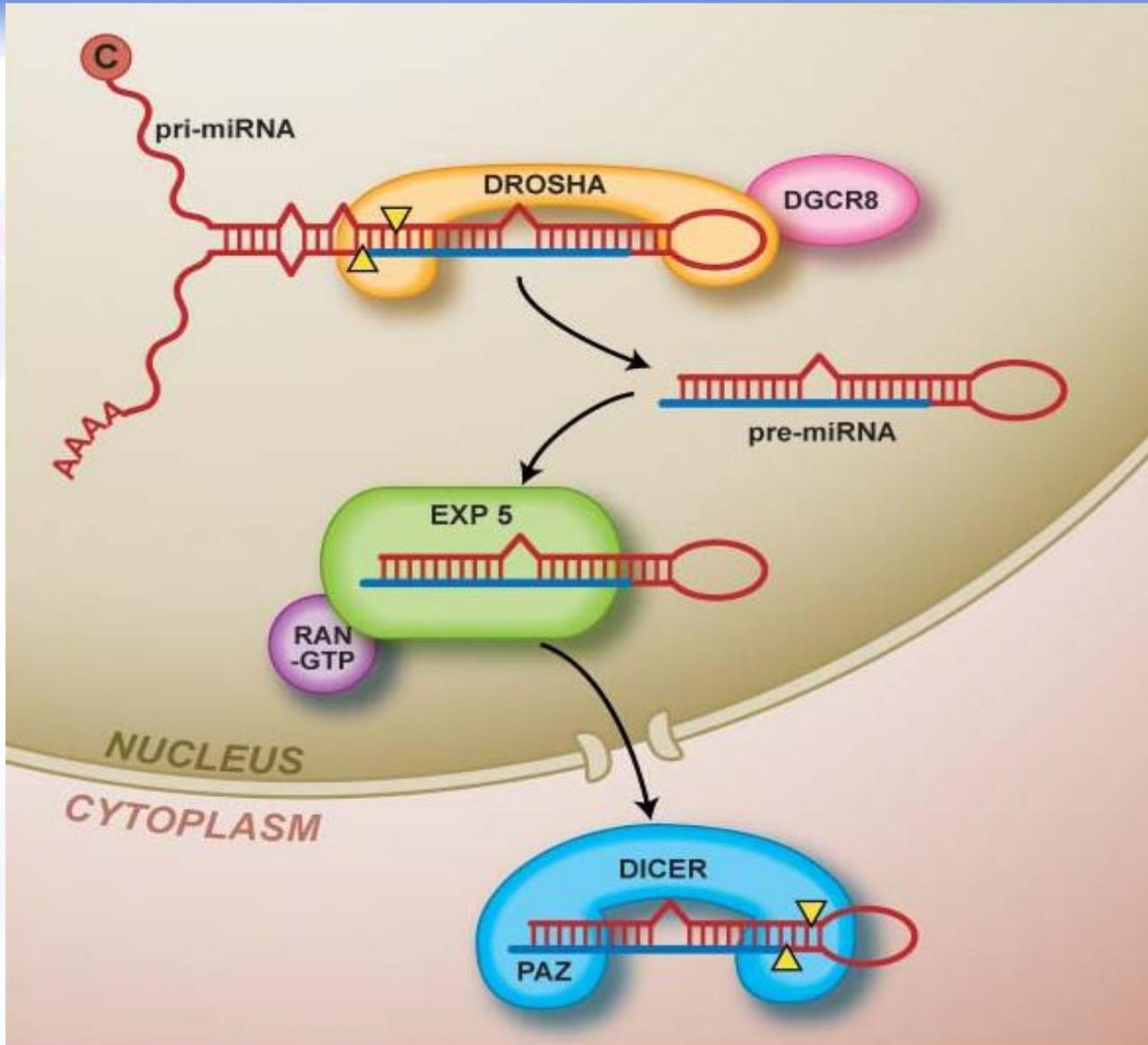
La stabilità dell'mRNA è importante per la sintesi
Proteica.

Quantità di proteina prodotta

5. Regulation dell'espressione genica mediata dai microRNA

- Originati da RNA capped e poliadenilati sottoforma di precursori (pri-miRNA)
- Precursori a forma di forcina (hairpin) di circa 70 nt (pre-miRNA)
- I miRNA maturi sono di circa 22 nt (miRNA)
- Scoperti nel 1993 (*lin-4*)

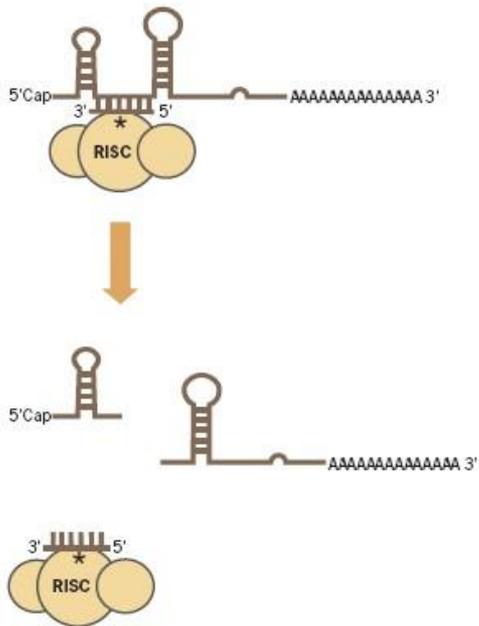
Processamento dei miRNA



Meccanismo di azione dei miRNA

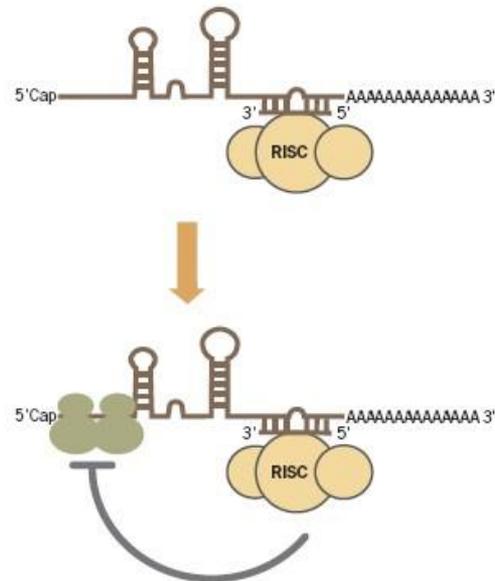
Common in plants

mRNA degradation



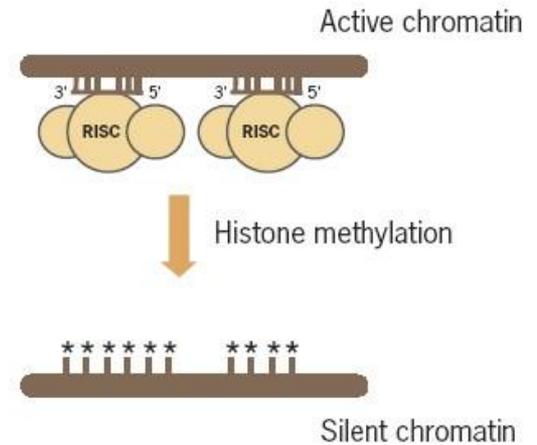
Common in animals

Translational regulation



Common in yeast and plants, and possibly animals.

Transcriptional regulation



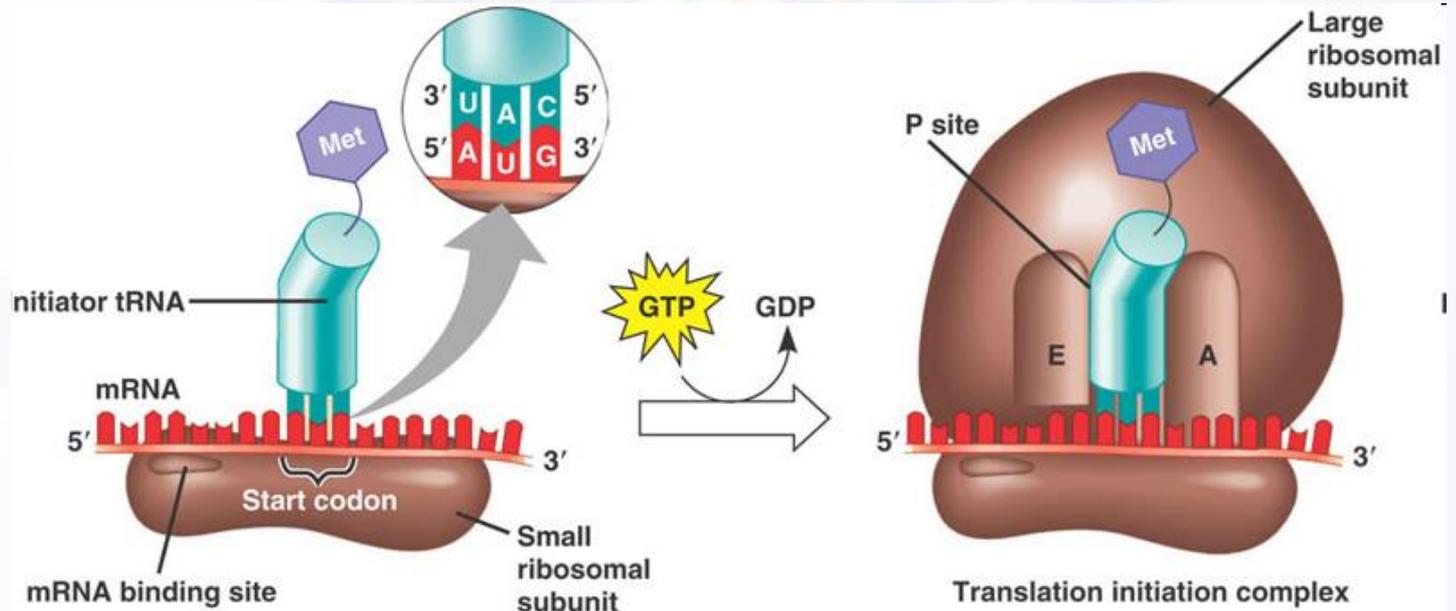
Qual'è la funzione dei miRNA?

- Regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale
- Importanti nello sviluppo
- Importanti nella regolazione delle vie metaboliche (Il miR-375 regola la secrezione dell'insulina)
- La loro deregolazione può essere associata ad importanti patologie tra le quali il cancro

6. Traduzione

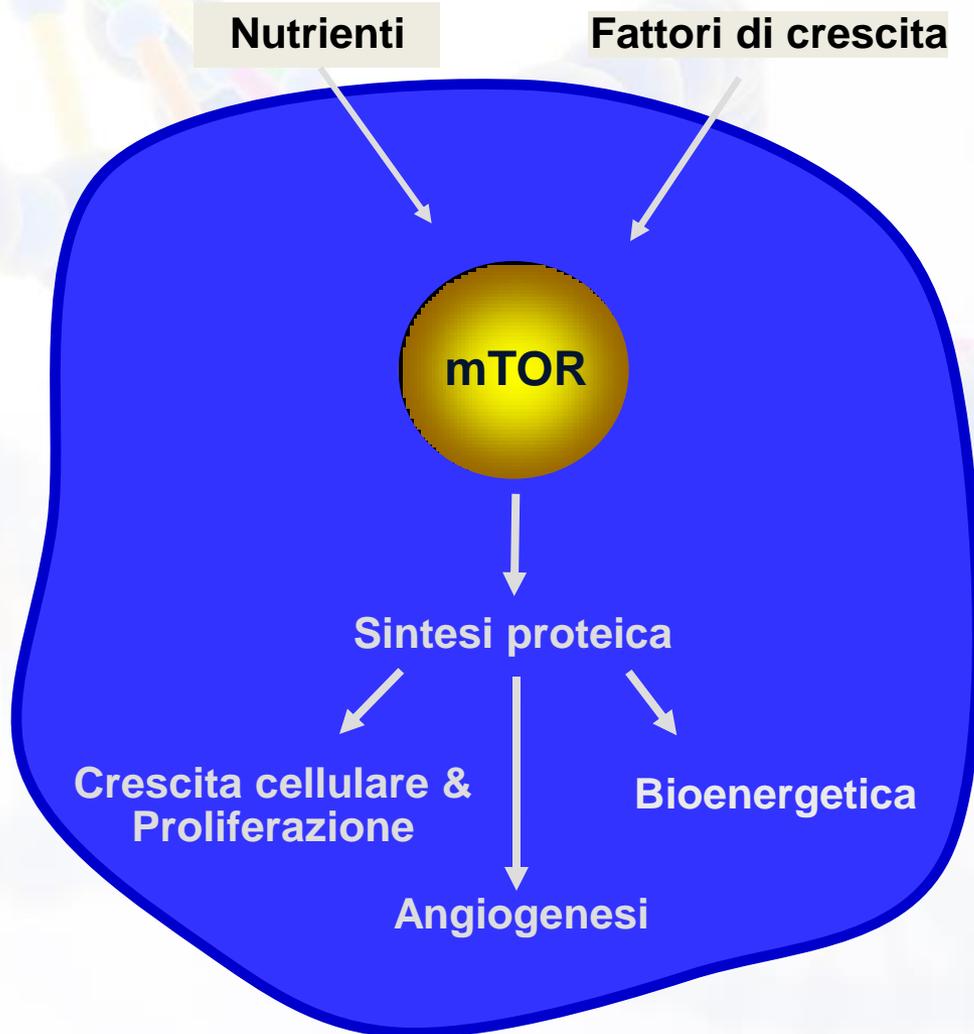
Allo stadio iniziale

- Vi sono proteine regolatorie che si legano all'estremità 5' dell'mRNA
- Attivazione o inattivazione di proteine associate all'inizio della traduzione



Esempio: Sintesi proteica mediata da mTOR

mTOR è un regolatore centrale della crescita e del metabolismo



- mTOR è una serina/treonina chinasi intracellulare

- mTOR è un regolatore centrale che riconosce cambiamenti in

Disponibilità di fattori di crescita

Disponibilità di nutrienti
Disponibilità di energia

- La regolazione di mTOR può influenzare:

Angiogenesi

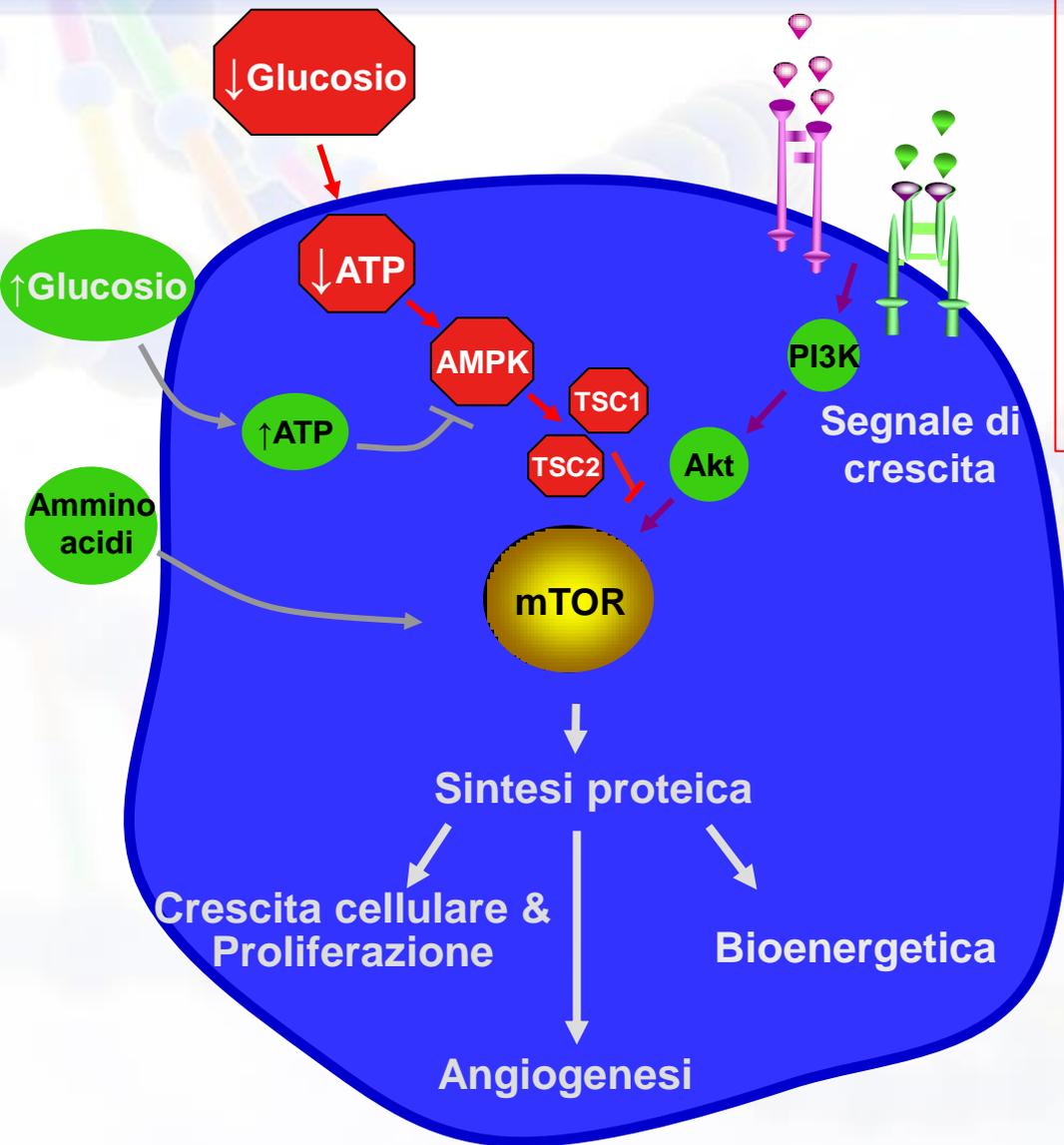
Crescita cellulare

Apporto, utilizzo e metabolismo dei nutrienti

La via di mTOR regola la sintesi proteica

- La via di mTOR è la principale via per l'inizio della sintesi proteica
- mTOR può essere regolato da una varietà di fattori
 - Positivamente
 - Nutrienti (es. leucina e metaboliti)
 - Insulina
 - Fattori di crescita (es. IGF-1)
 - Negativamente
 - Messaggeri dell'infiammazione (es. tumor necrosis factor- α)
 - Lipopolysaccharide (tossina batterica)

mTOR Integra fattori di crescita e segnale dei nutrienti



- La via di mTOR, PI3K-AKT-mTOR, è un componente a valle di diversi fattori di crescita.
- L'attivazione di mTOR attiva la sintesi proteica coinvolta nella crescita cellulare.
- mTOR è un integratore critico del segnale che coordina il controllo della crescita cellulare.

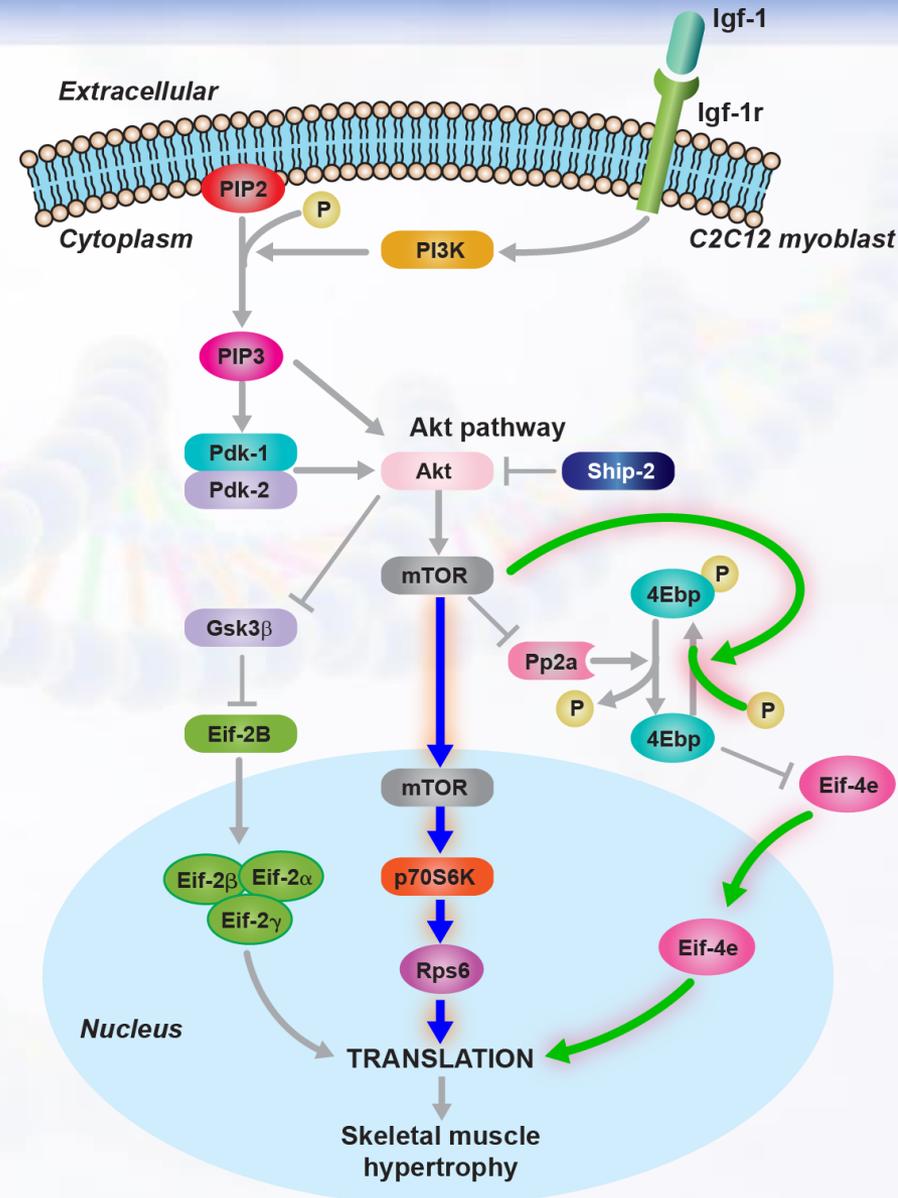
mTOR è un sensore per la disponibilità di amminoacidi, carburante metabolico, e disponibilità energetica

I depositi di nutrienti ed energia sono essenziali per la sintesi proteica, crescita cellulare, proliferazione e sopravvivenza della cellula

L'attivazione di mTOR stimola crescita e sopravvivenza migliorando l'assorbimento di nutrienti e prodotti metabolici.

Eventi chiave della via di mTOR

- Insulina e fattori di crescita possono attivare la chinasi PI3, la quale attiva Akt
 - Akt è un'altra chinasi, che promuove l'attivazione di mTOR
- mTOR attivato induce:
 - La fosforilazione di 4EBP-1, libera il fattore di inizio della traduzione **eIF4E**
 - eIF4E libero può legarsi con altri fattori di inizio (es. eIF4G) e favorire la traduzione
 - Attivazione della proteina p70S6K
 - Responsabile della partenza della traduzione



In conclusione mTOR Regola la Bioenergetica

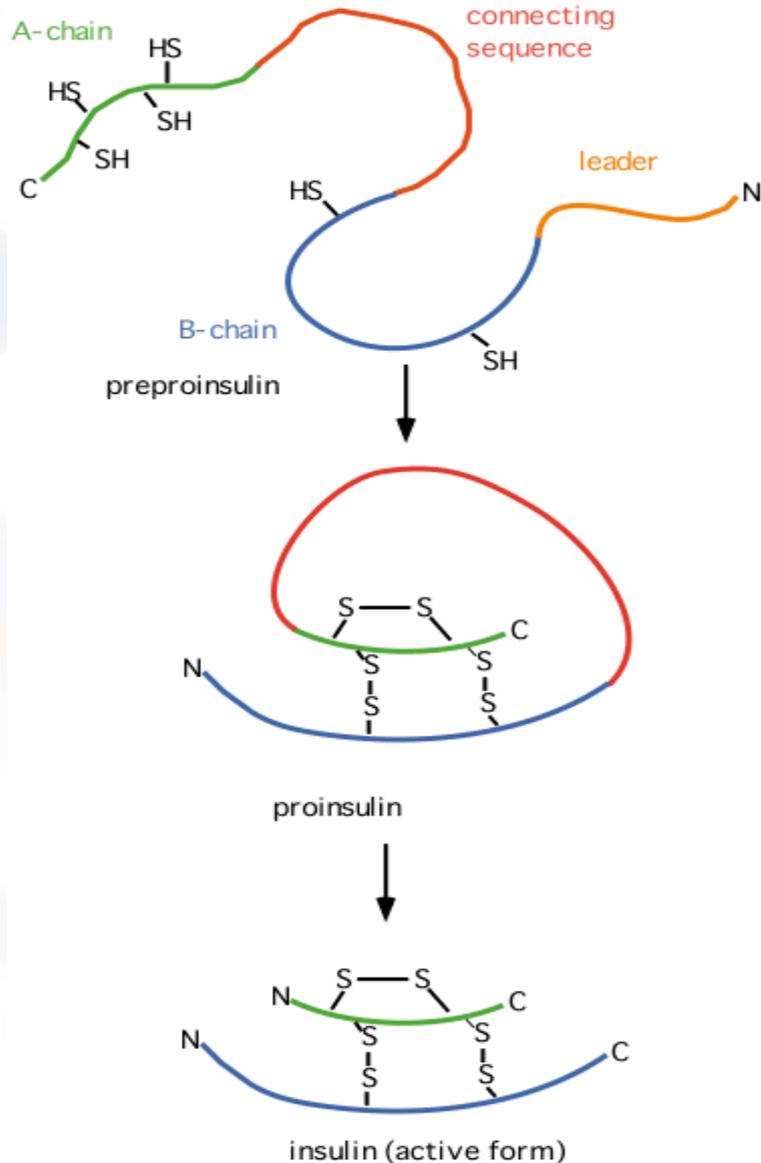
- Come Bioenergetica si intende l'utilizzo dei nutrienti ed il loro metabolismo
- mTOR è un sensore della disponibilità di nutrienti ed energia nella cellula
- L'attivazione di mTOR controlla la bioenergetica aumentando l'espressione dei trasportatori dei nutrienti e la produzione di fattori di crescita angiogenici
- L'attivazione di mTOR controlla la bioenergetica consentendo l'importo di glucosio, amminoacidi e altre importanti molecole che rappresentano il carburante metabolico usato per produrre ATP
- L'inibizione della via di mTOR può influenzare la bioenergetica della cellula

7. Taglio enzimatico e modificazioni chimiche delle proteine (I)

Modificazioni Post-traduzionali

- Alcune proteine sono attivate o inattivate dall'aggiunta reversibile di un gruppo fosfato (fosforilazione)
- Altre sono stabilizzate dall'aggiunta di zuccheri sulla superficie cellulare della proteina (Glicosilazione)

7. Taglio enzimatico e modificazioni chimiche delle proteine (II)



Una catena polipeptidica può essere tagliata in più pezzi

Es. La Preproinsulina viene tagliata in proinsulina la quale viene assemblata mediante ponti disolfuro. Un ulteriore taglio converte la proinsulina nell'insulina (forma secreta)

Altre modificazioni post-traduzionali

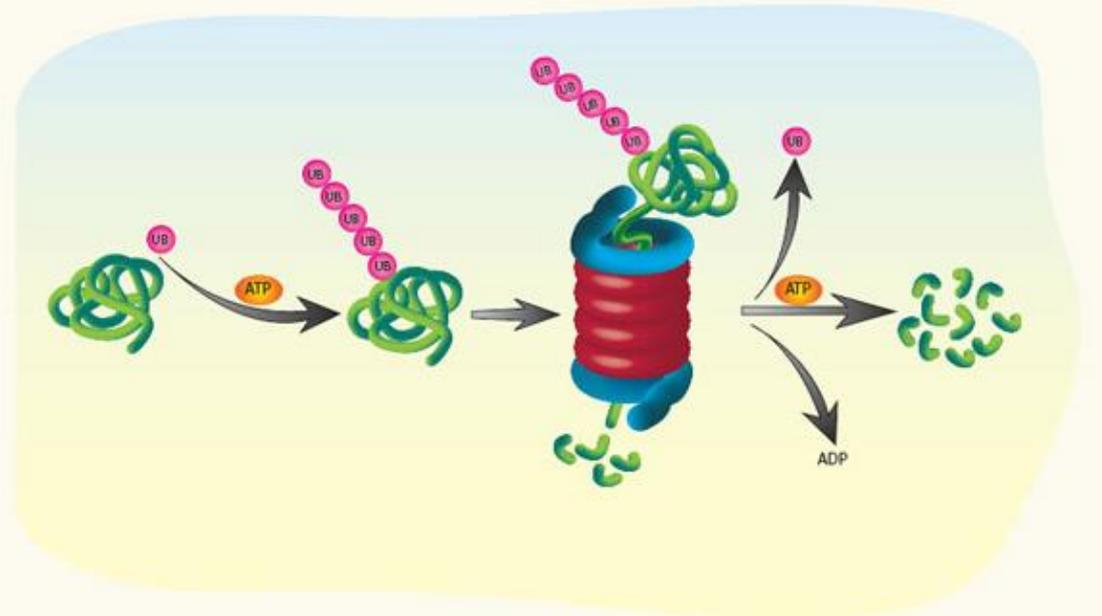
- Acido/base; attivazione/inattivazione
- Idrolisi; localizzazione, attivazione/inattivazione
- Acetilazione; attivazione/inattivazione
- Idrossilazione; collagene

8. Degradazione delle proteine

L'emivita delle proteine è strettamente regolata

La degradazione delle proteine avviene nel

proteosoma dopo che le stesse sono state legate alla piccola proteina **ubiquitina**



Miogenesi

La formazione del muscolo inizia dalla fertilizzazione

Si sviluppa dal mesoderma (somiti)

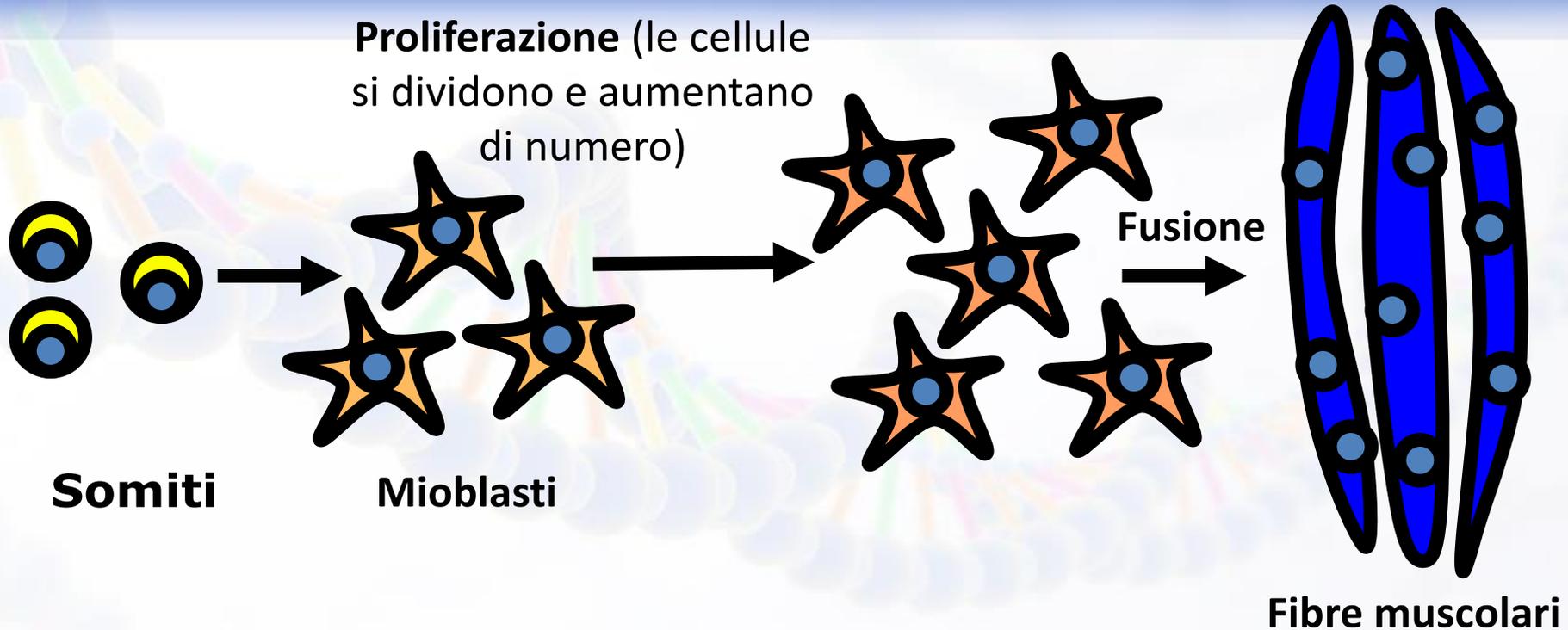
Avviene secondo un programma (DNA responsibility)

Il muscolo è continuamente modificato durante crescita e sviluppo

Miogenesi

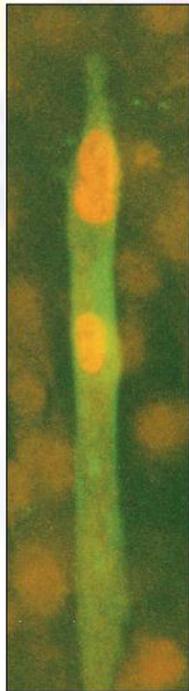
- Le cellule migrano dai somiti (cellule mesodermiche mature)
- I somiti sono programmati per diventare muscoli trasformandosi in mioblasti (precursori delle fibre muscolari)
- Il processo è regolato dai geni per i fattori regolatori miogenici (MRFs)
 - Questi attivano l'espressione di uno o più geni associati con la miogenesi

Miogenesi

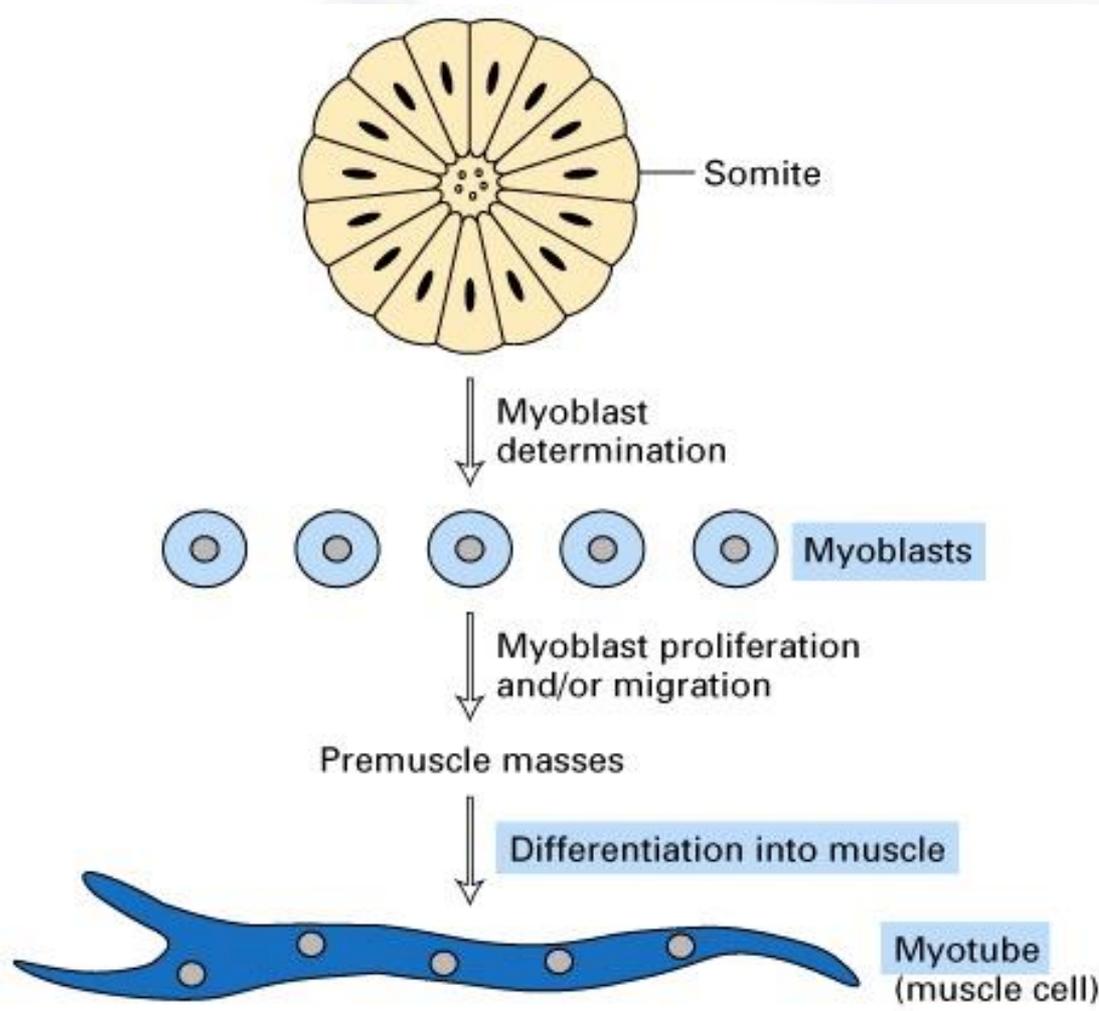


Durante la miogenesi, cellule indifferenziate differenziano in cellule precursori muscolari (mioblasti) e poi si fondono e diventano miotubi e successivamente fibre muscolari.

Miogenesi del muscolo scheletrico



(A) 20 μm



I fattori di trascrizione MRFs regolano la miogenesi

Davis et al. (1987) notarono che il trattamento con 5-azacitidina convertiva i fibroblasti in cellule muscolari. Quindi la 5-azacitidina induceva l'espressione di fattori associati con la miogenesi.

Davis et al. hanno identificato diversi mRNA per fattori miogenici chiamati MyoA, MyoD e MyoH.

Trattando i fibroblasti con questi mRNA hanno osservato che solo con MyoD tali cellule producevano la proteina muscolare miosina.

Quindi **MyoD** dovrebbe essere specifico per lo sviluppo del muscolo. Esso è considerato un fattore regolatorio miogenico (**MRF**).

Altri MRF sono stati identificati e sono stati nominati MRF4, myogenin e myf-5.

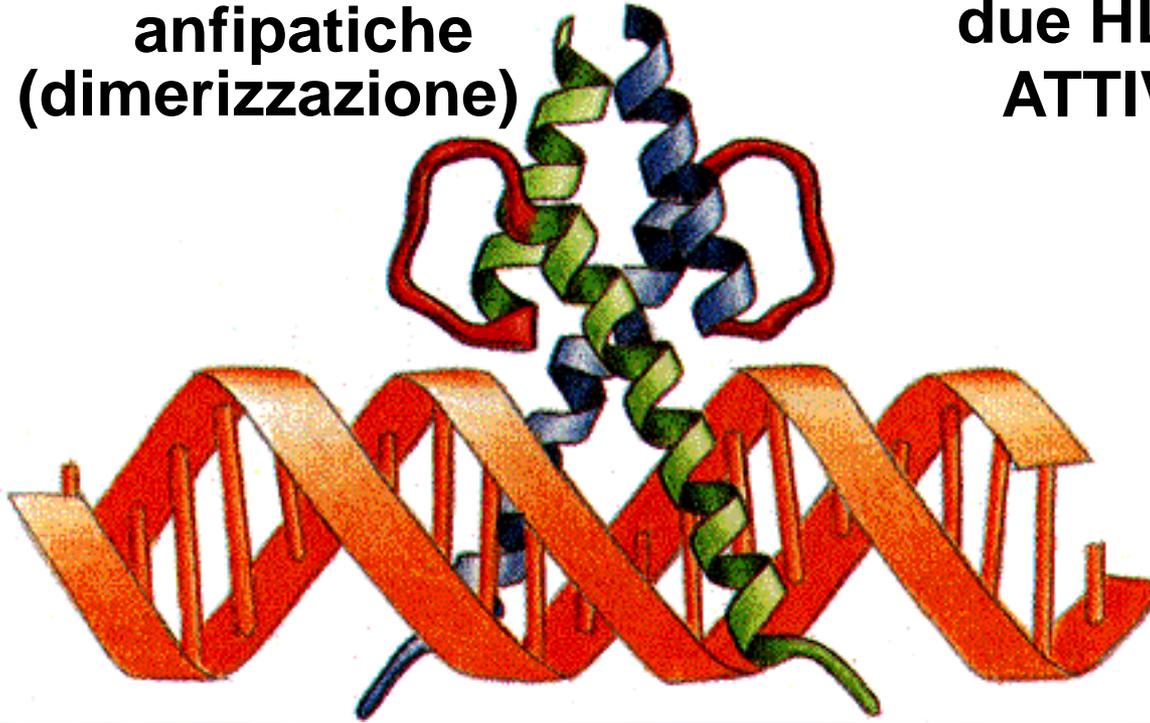
Miogenesi

I fattori di trascrizione MRFs contengono dei domini elica-ansa-elica (helix-loop-helix) e sono in grado di accendere geni associati con la miogenesi

I MRFs sono i responsabili della miogenesi

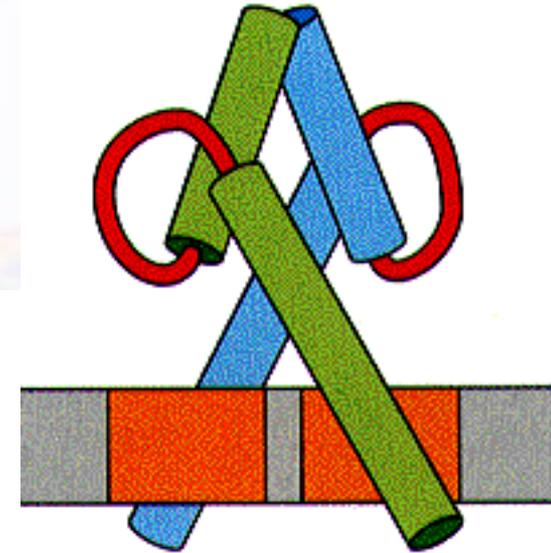
Il motivo elica-ansa-elica (HLH)

α -eliche
anfipatiche
(dimerizzazione)



regione basica
(legame al DNA)

il dimero tra
due HLH é
ATTIVO



Miogenesi

Le proteine con struttura Helix-loop-helix (HLH) sono:

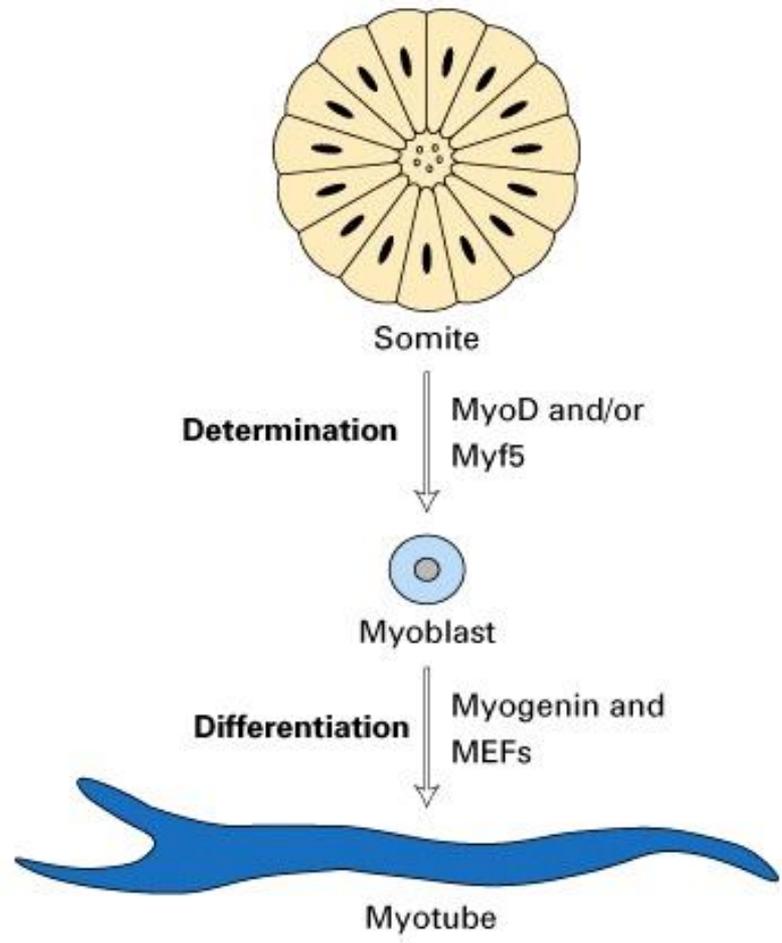
- Miogenina
- MRF-4
- Myo-D
- Myf-5

Effetti del knockout di MRFs sulla miogenesi

I MRFs sono stati eliminati in topi in modo da capire la loro funzione nella miogenesi. Sorprendentemente, il knockout di MyoD o Myf5 non ha alcun effetto. Solo il knocking out di entrambi inibisce la miogenesi, suggerendo che le funzioni di MyoD e Myf5 siano simili.

Gene knocked out	Phenotype		Role of myogenic protein
	Myoblasts	Myotubes	
MyoD	+	+	?
Myf5	+	+	?
MyoD& Myf5	-	-	Required for myoblast formation
Myogenin	+	-	Required for myoblast differentiation into muscle

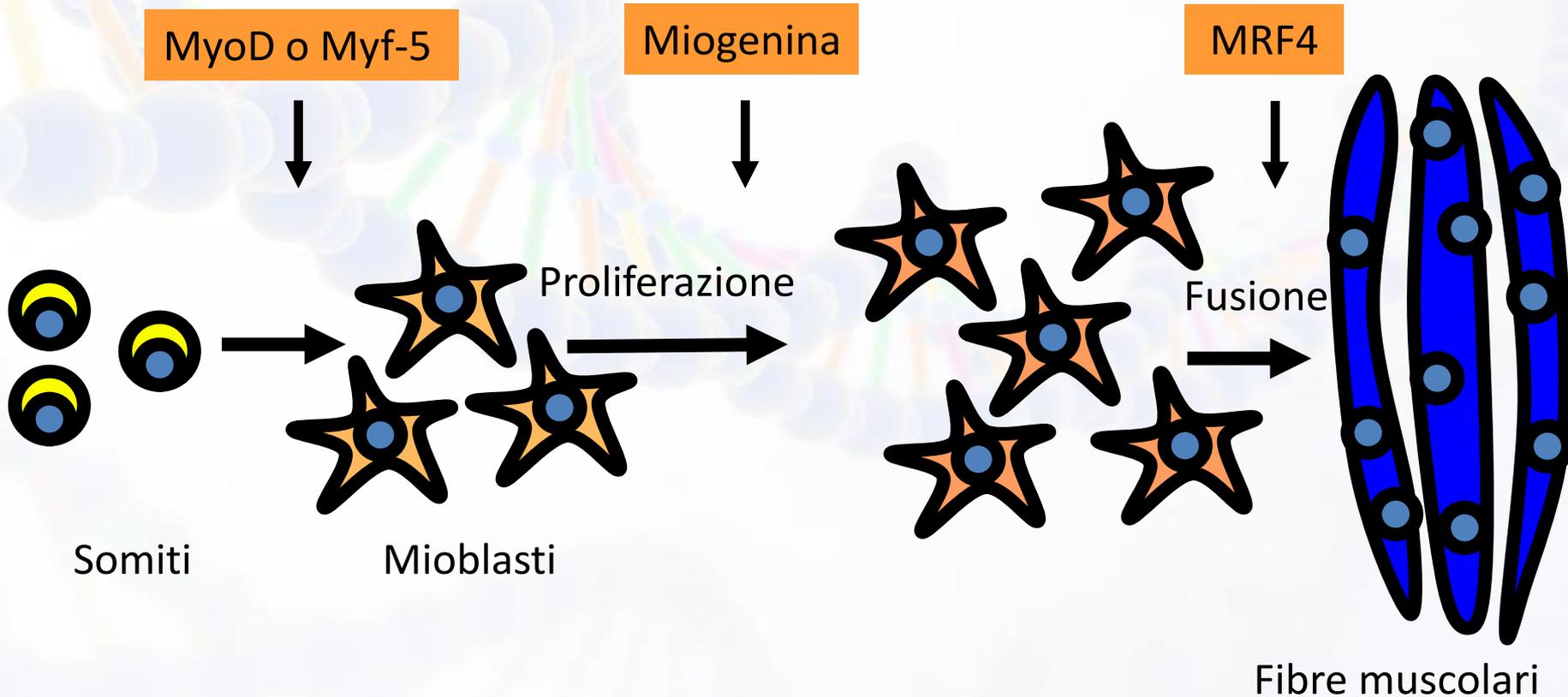
MyoD e Myf5 sono richiesti per la miogenesi



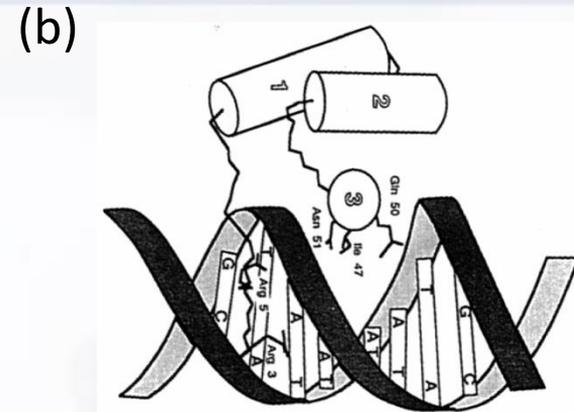
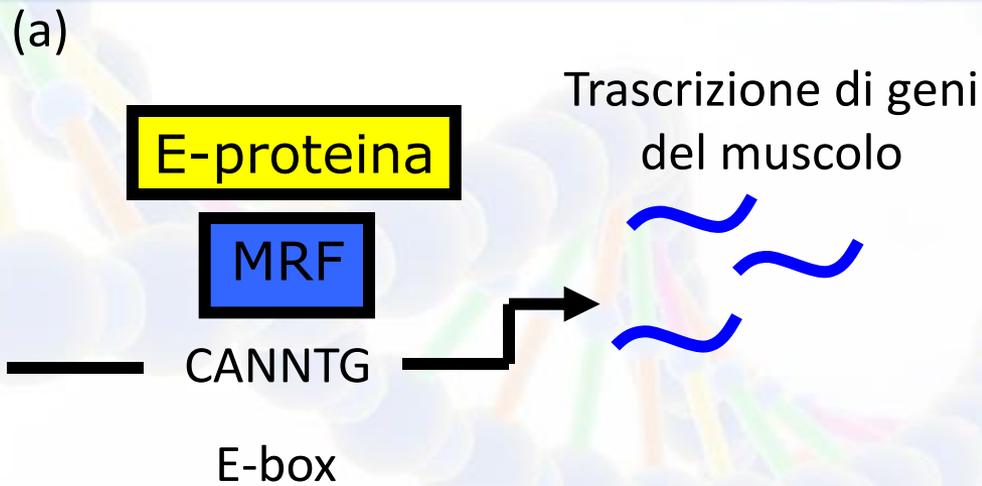
Miogenesi

Primo step: MyoD e Myf-5 convertono i somiti in mioblasti

Secondo step: Miogenina e MRF4 regolano la fusione dei miociti in fibre muscolari

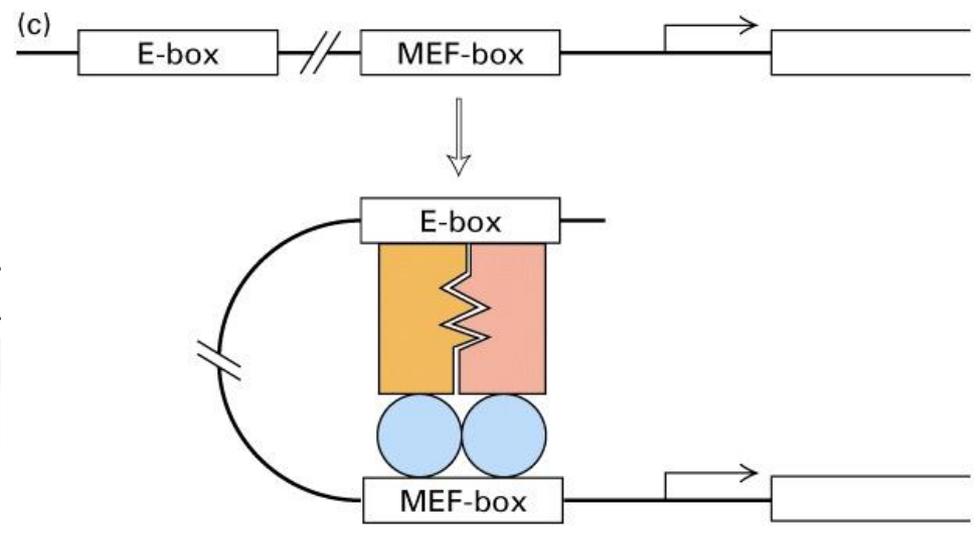
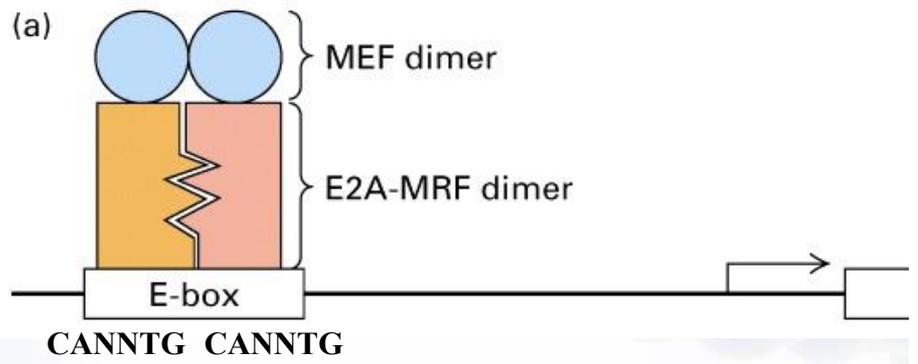


I fattori di regolazione miogenica (MRFs) regolano la miogenesi.



(a) I MRF dimerizzano con le E-proteine e si legano alle sequenze CANNTG sul DNA, le quali sono definite “E-box”. Il legame delle MRF al DNA è essenziale per l’espressione dei geni del muscolo. (b) Struttura a helix-loop-helix (HLH) dei fattori MRF.

I miogenic enhancing factors (MEFs) si legano ai MRFs e conferiscono la specificità miogenica



Miogenesi

I **Mioblasti** producono proteine muscolo-specifiche e formano le cellule del muscolo scheletrico

MyoD è uno dei geni detti “master regulatory genes” che producono proteine che differenziano la cellula per diventare muscolo scheletrico

La proteina MyoD è un **Fattore di trascrizione** che si lega a degli **enhancers** (attivatori) di vari geni bersaglio per l'espressione di proteine muscolari

Miogenesi

