

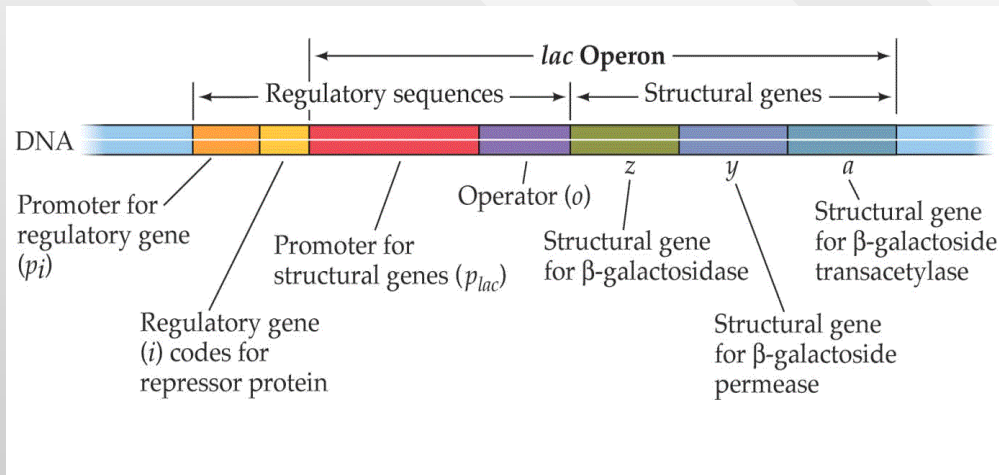
Controllo dell'espressione genica pre- e post-trascrizionale
ed eventi post-traduzionali

Controllo dell'espressione genica nei Procarioti e negli Eucarioti

- **Controllo della trascrizione**
- Modificazioni post-trascrizionali
- Splicing
- Controllo della traduzione
- Ripiegamento corretto della proteina (“folding”)
- Modificazioni post-traduzionali
- “Etichettatura” e “spedizione” delle proteine alla loro corretta destinazione
- Identificazione delle proteine difettose e loro eliminazione nel proteasoma

Il primo esempio di controllo della trascrizione è stato scoperto nei Procarioti: l' "operon" del lattosio in *E. coli*

- Il batterio *Escherichia coli* utilizza normalmente glucosio come fonte di energia, ma quando il glucosio scarseggia può usare anche il **lattosio**
- Per usare il lattosio come fonte di energia il batterio deve produrre tre enzimi necessari alla sua trasformazione in glucosio, la β -galattosidasi (Z) la permeasi (Y) e l'acetilasi (A)
- Gli enzimi sono prodotti solo quando vi è lattosio nel mezzo di coltura (e manca il glucosio)
- L'insieme dei geni strutturali che producono questi enzimi, controllato da geni regolatori ("operatore" e "promotore"), è detto "**lac operon**" ("operon" del lattosio)
- I geni la cui espressione, normalmente repressa, può essere **indotta in determinate circostanze** sono detti "**geni inducibili**", mentre quelli che sono normalmente espressi si dicono "**geni costitutivi**"



Fonte: Sadava et al., Life: The Science of Biology,
Sinauer Associates, 2004

Premio Nobel per la Medicina 1965
"for their discoveries concerning genetic control
of enzyme and virus synthesis"

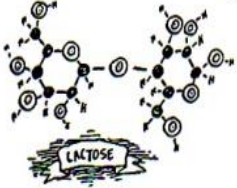


Jacques Monod
(1910-1976)



Francois Jacob
(1920-2013)

THE FIRST TO FIND A FORM OF GENE REGULATION WERE THE FRENCH SCIENTISTS JACQUES MONOD AND FRANÇOIS JACOB, IN THE LATE 1950'S. THEY EXAMINED *E. COLI*'S ABILITY TO DIGEST THE SUGAR LACTOSE.



IN THE PRESENCE OF LACTOSE, *E. COLI* PRODUCES TWO ENZYMES, CALL THEM Y AND Z. Y OPENS THE CELL WALL TO LACTOSE, AND Z BREAKS THE SUGAR IN HALF.



3 REAL NAMES: BETA-GALACTOSIDASE AND PERMEASE, RESPECTIVELY

WITHOUT GOING INTO THE DETAILS OF THEIR EXPERIMENTS, WHICH WERE QUITE INVOLVED, HERE ARE SOME OF MONOD AND JACOB'S MAIN RESULTS:

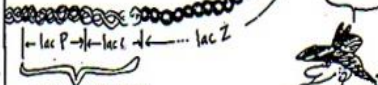


THIS EXPERIMENT WAS MORE DIFFICULT THAN A CHEESE SOUFFLÉ!

FIRST, THEY FOUND THAT THE GENES FOR Y AND Z, CALLED "lac Y" AND "lac Z" LAY TOGETHER, SIDE-BY-SIDE, ON THE CHROMOSOME. SUCH A CLUSTER OF GENES, ENCODING RELATED ENZYMES AND REGULATED TOGETHER, IS CALLED AN

OPERON:

THIS IS THE "lac operon":



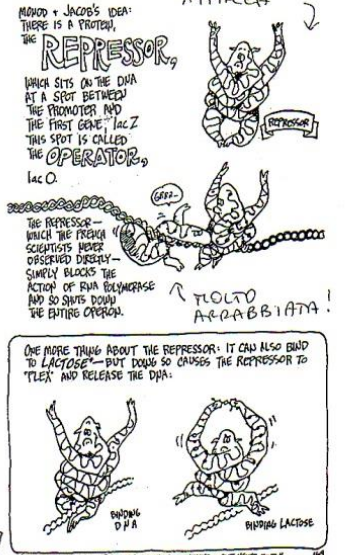
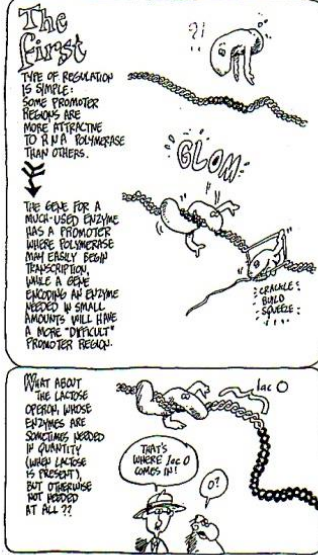
NO LAC TV GRAND OLE OPERA!

AT THE START OF THIS (AND EVERY) OPERON IS A PROMOTER REGION, HERE CALLED lac P. THIS IS THE SITE WHERE THE ENZYME RNA POLYMERASE BINDS ONTO THE DNA TO BEGIN TRANSCRIBING THE MESSAGE INTO mRNA. (SEE P.138.)

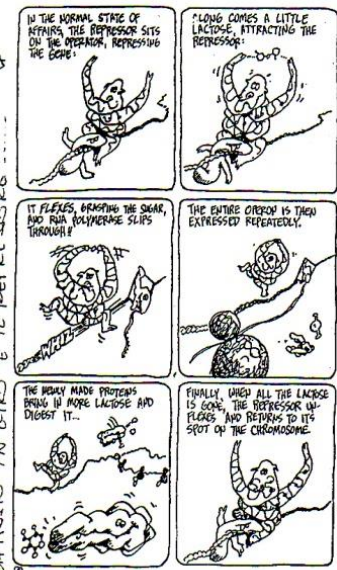


LA RNA POLITERASI SI ATTACCA AL SITO PROMOTORE

E TRASCRIVE L'MRNA ... MA SE IL REPRESSORE "SIEDE" SUL DNA LA RNA POLITERASI NON SI ATTACCA



SE IL REPRESSORE LEGA (AFFERRA!) IL LATTOSIO, SI SGANCIA DAL DNA E LA POLITERASI VA AVANTI!



TRASCRITTO IL GENE, SI FA LA PROTEINA CHE UTILIZZA IL LATTOSIO PER CUI, NOPO UN POI NON CE' PIU' LATTOSIO IN GIRO E IL REPRESSORE...

...SI RISIEME" SUL DNA!

Divertente rappresentazione a fumetti del funzionamento dell' "operon" del lattosio

Fonte: Gonick e Wheelis, 2005

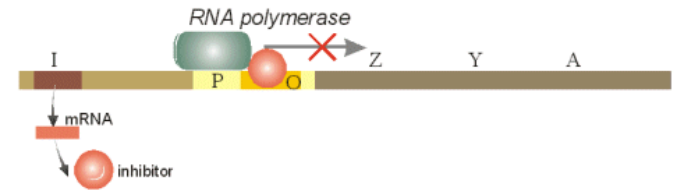
L'unità operativa che utilizza il lattosio ("lac operon") è costituita dal promotore (P), dall' operatore (O) e da tre geni strutturali: **Z** (che codifica una β -galattosidasi), **Y** (che codifica una permeasi) e **A** (che codifica una transacetilasi)

Quando non vi è lattosio nel mezzo di coltura, una **proteina repressore**, legata al sito operatore, impedisce l'attacco della RNA polimerasi e quindi la trascrizione dei geni strutturali

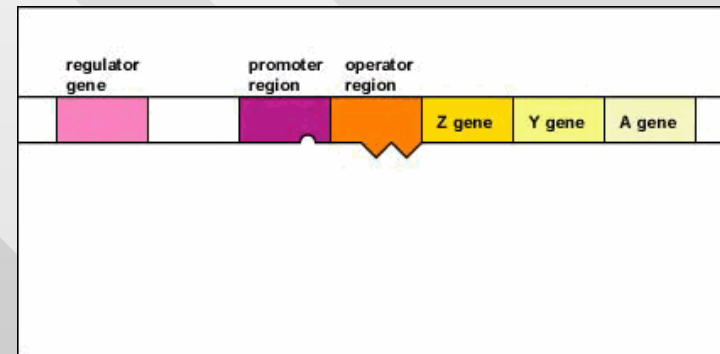
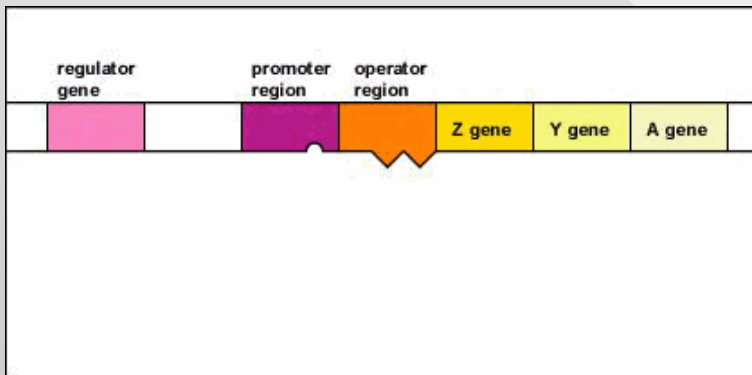
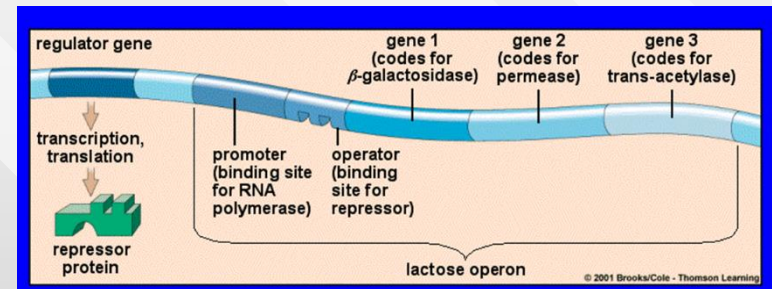
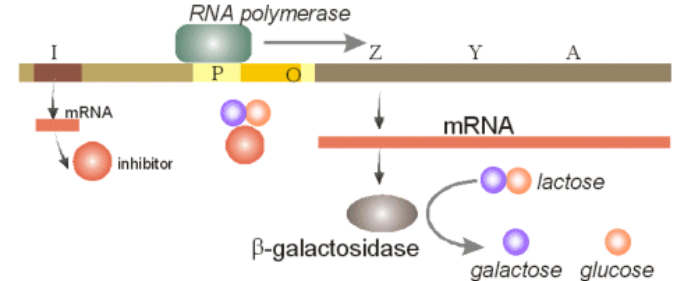
Se si aggiunge lattosio al mezzo di coltura, il **lattosio si lega al repressore**, modificandone la forma e costringendolo a staccarsi dal sito operatore

La RNA polimerasi è quindi libera di **trascrivere i tre geni strutturali che producono le tre proteine indispensabili all'utilizzo del lattosio**

No lactose : Lac operon turn off

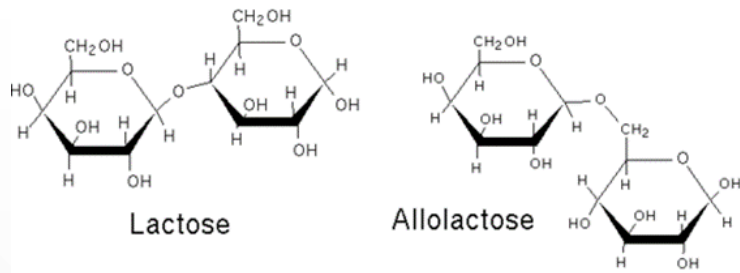


Lactose in the media : Lac operon turn on

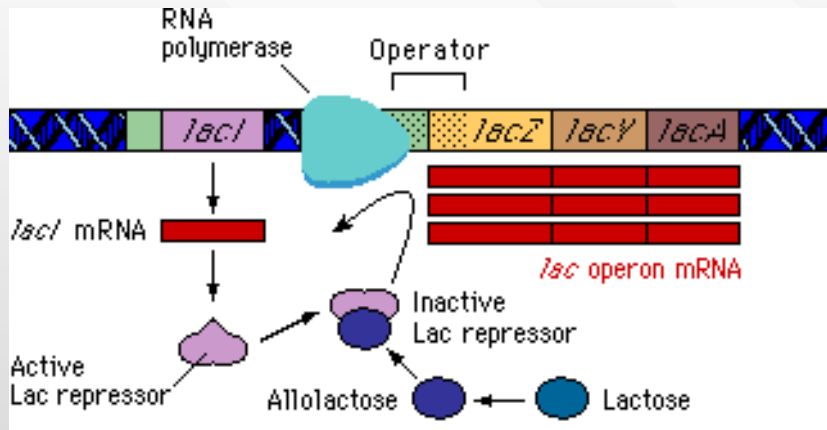


Filmato

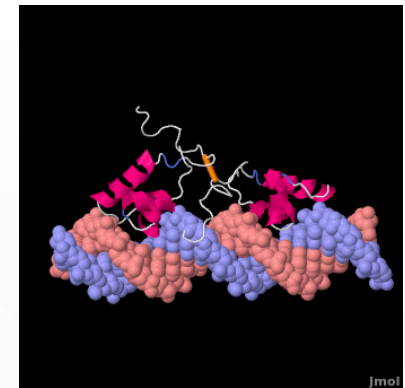
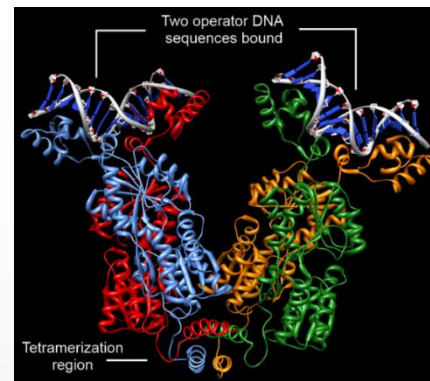
Fonti: Sadava et al., 2014, 2019



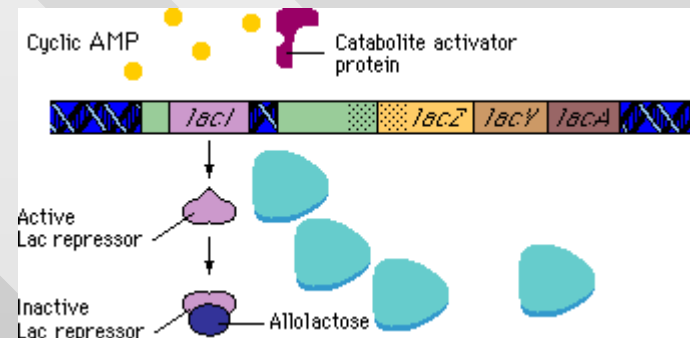
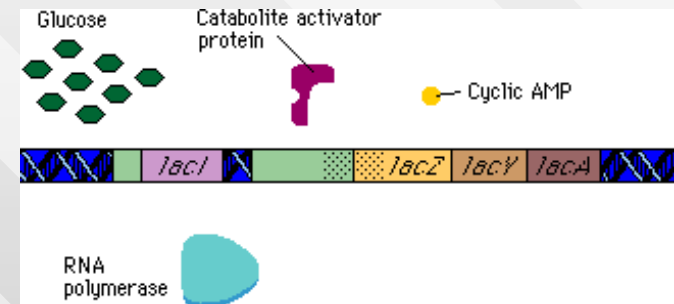
L'induttore del lac operon in realtà non è il lattosio, ma un suo isomero, l'**allolattosio**



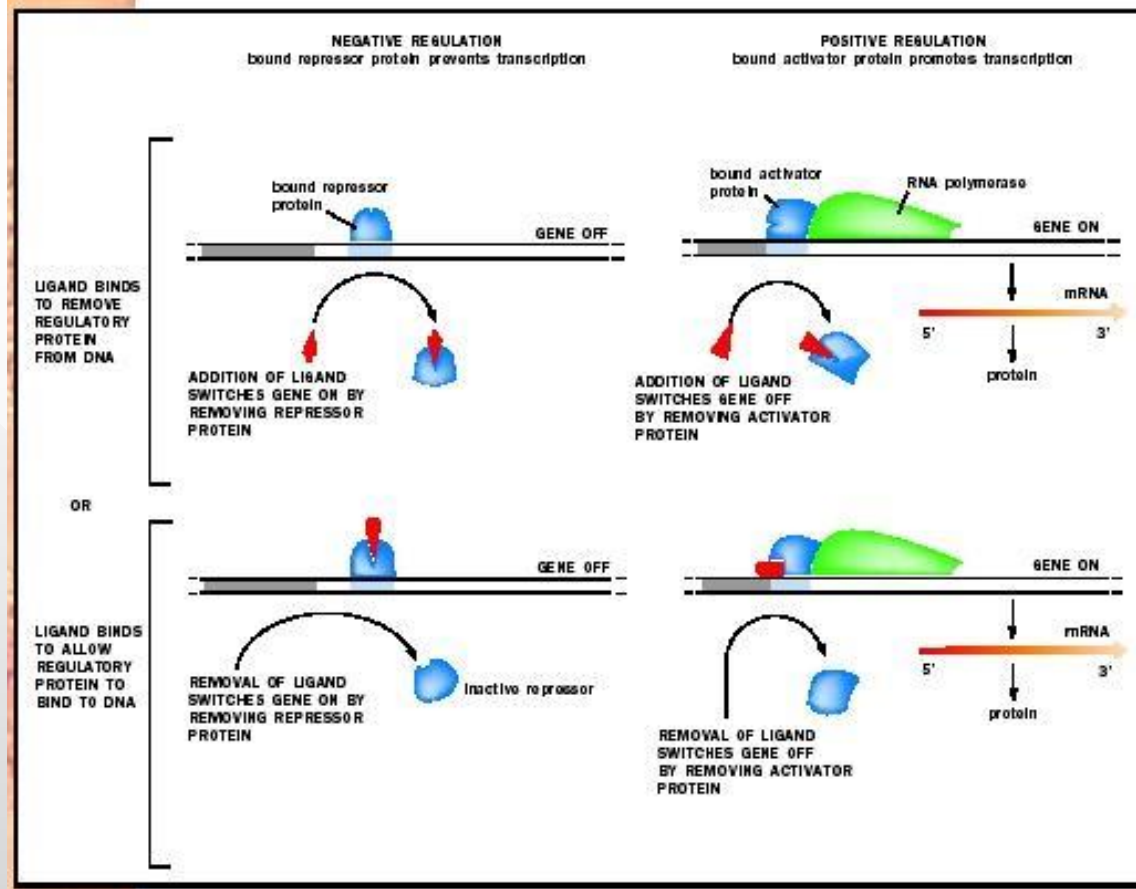
La trascrizione dell'operon del lattosio può essere inoltre **intensificata**: in condizioni di carenza energetica (assenza di glucosio), da ATP si **forma AMP ciclico** ("segnale di fame"): questa "molecola segnale" si lega ad un'altra proteina, formando un complesso che facilita l'aggancio della RNA polimerasi, intensificando la trascrizione



Struttura della proteina repressore tetrameric Lac, che si lega al sito operatore deformando il DNA ed impedendo alla RNA polimerasi di trascrivere i geni



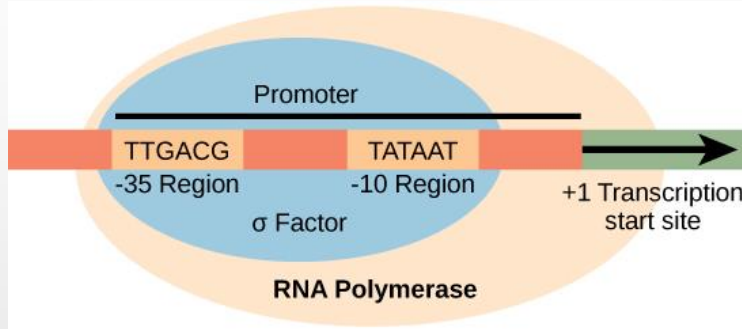
Regolazione negativa e positiva dell'espressione genica



- L'operon del lattosio rappresenta un caso di **regolazione negativa** della trascrizione
- Esistono anche meccanismi di **regolazione positiva**, nei quali una **proteina attivatrice** si lega alla RNA polimerasi, intensificando la trascrizione
- In questo caso il **ligando** agisce staccando la proteina attivatrice e **rallentando** (o **bloccando**) la trascrizione del gene

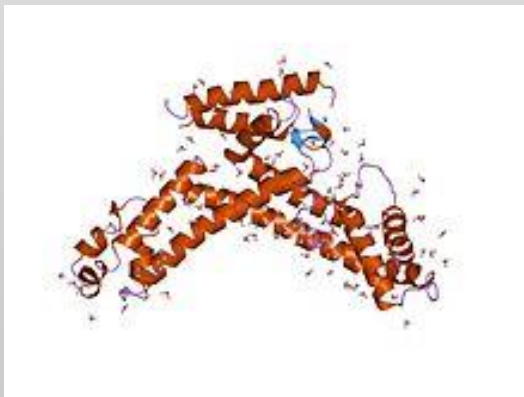
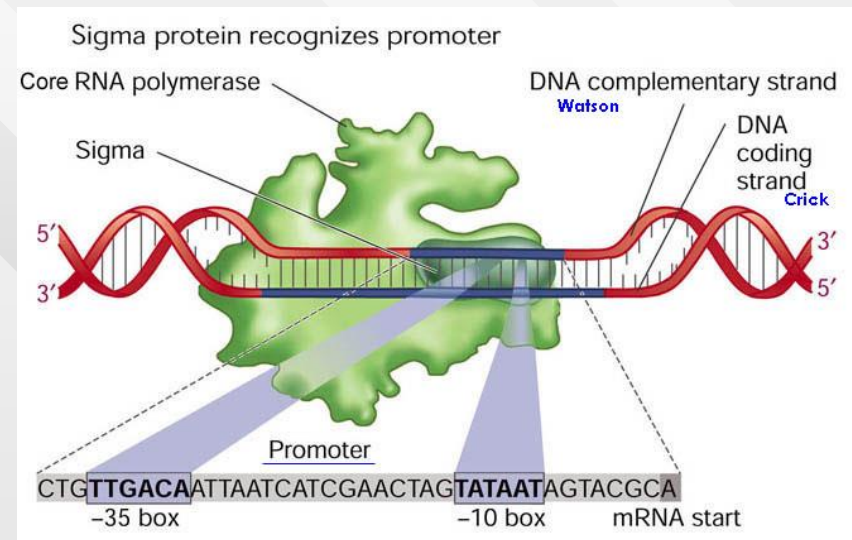
Struttura dei promotori nei Procarioti: le “**sequenze consenso**”

I promotori contengono specifiche sequenze di DNA (“**sequenze consenso**”) che possono essere riconosciute dall’RNA polimerasi: queste sequenze sono generalmente conservate nel corso dell’evoluzione



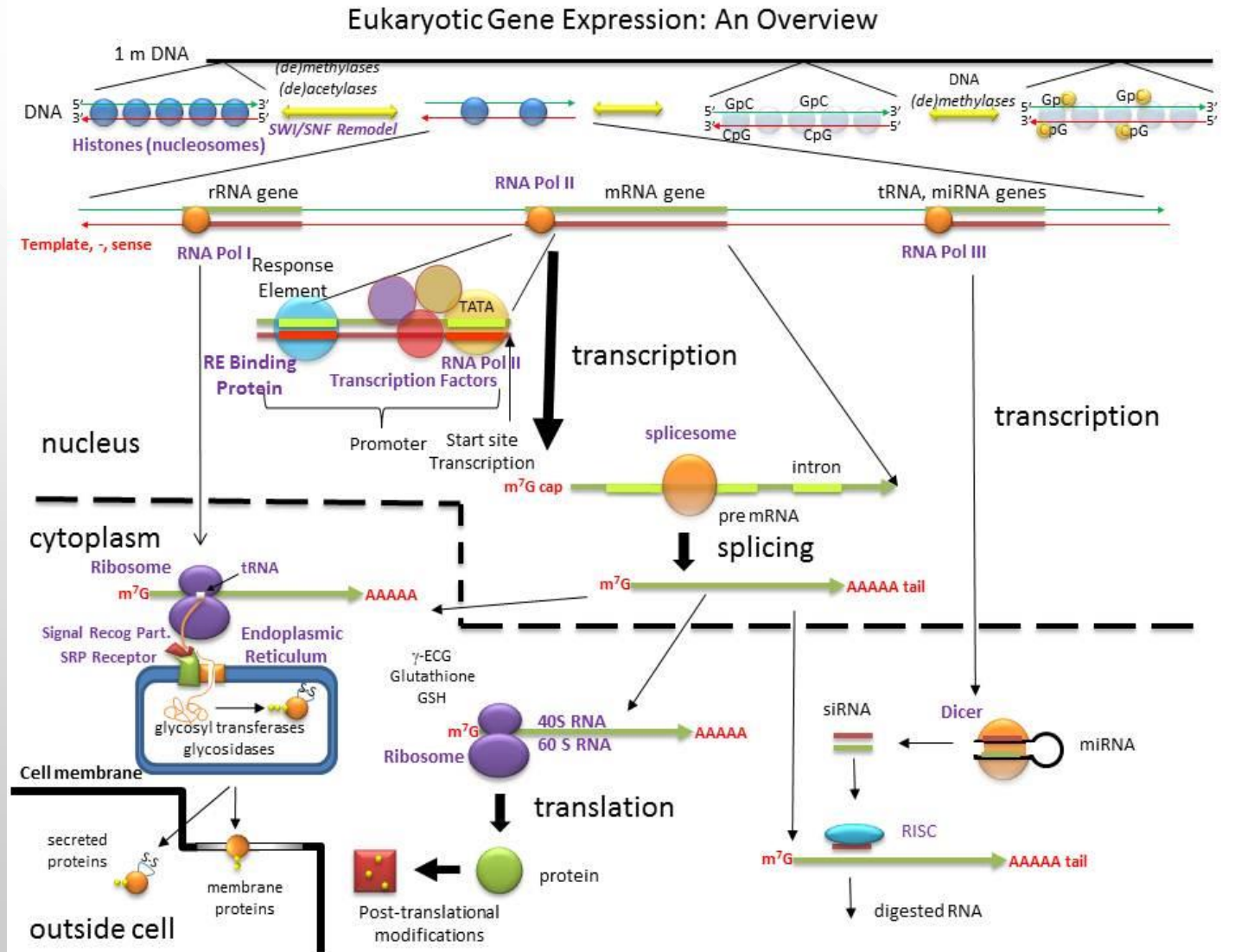
I promotori dei Procarioti contengono due principali sequenze consenso (“**Pribnow-Schaller box**”) in corrispondenza dei siti a -35 e -10 basi (cioè “a monte”) del sito di inizio della trascrizione

La RNA polimerasi è “guidata” verso i promotori da una serie di proteine dette “**fattori sigma**” (“ σ factors”): il più importante è $\sigma 70$ (peso molecolare 70 kDa), detto fattore “**housekeeping**” o “**primary**”



La proteina ha una struttura a quattro regioni, di cui la seconda riconosce la sequenza a -10 e la quarta la sequenza a -35

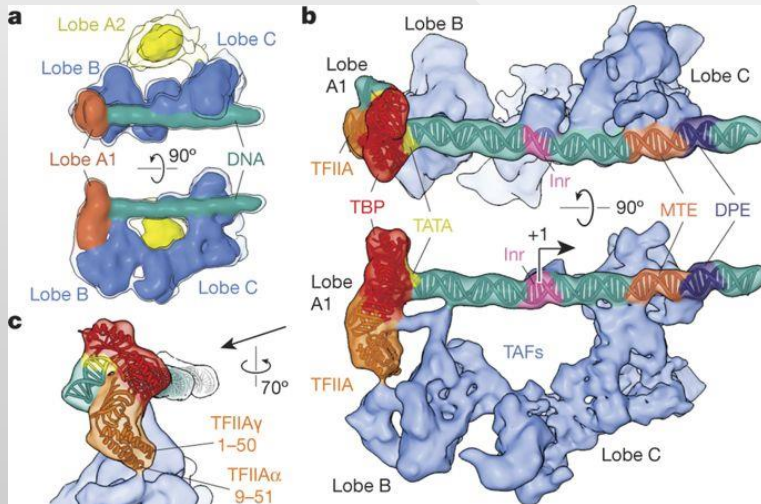
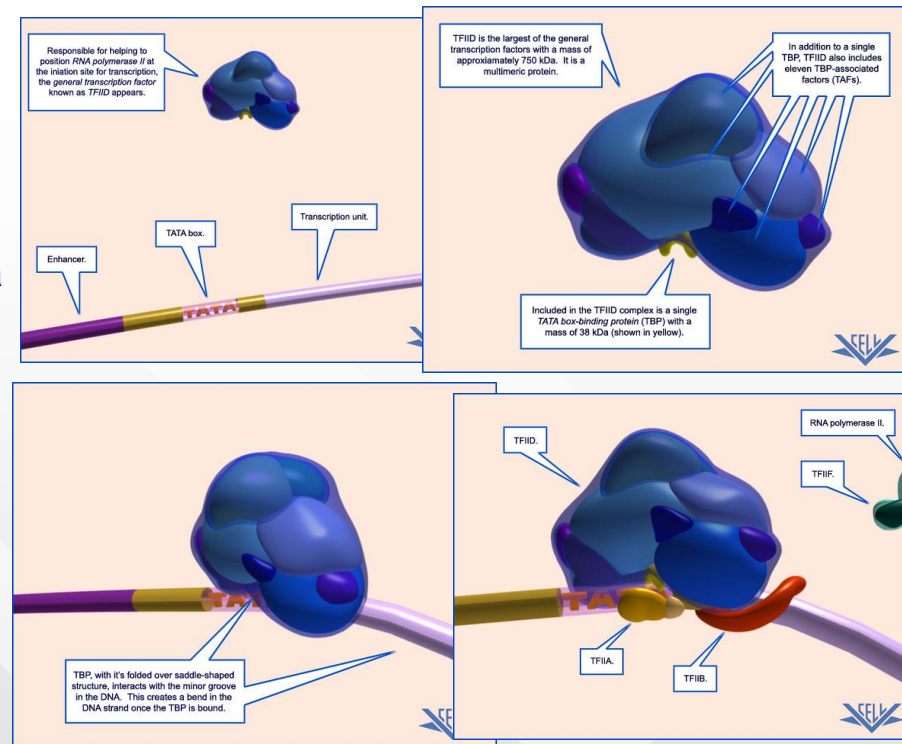
Negli Eucarioti la regolazione dell'espressione genica è basata su processi simili a quelli dei Procarioti, ma è molto più complicata...



Struttura dei promotori negli Eucarioti: le “TATA box” e i fattori di trascrizione

L' RNA polimerasi degli Eucarioti si lega al DNA in presenza di **proteine regolatrici** (“**fattori di trascrizione**”) che si legano ad una **TATA box**, situata generalmente circa 25 nucleotidi a monte del sito di inizio della trascrizione

Tra i fattori di trascrizione più importanti negli Eucarioti vi è la **proteina TFIID** (“**T**ranscription **F**actor **II D**”), costituita da varie subunità chiamate **TBP** (“**T**ATA box **B**inding **P**roteins”) e **TAF** (“**T**ATA box **A**ssociated **F**actors”)



Nel 2016 è stata ricostruita in ogni dettaglio (tramite microscopia crio-elettronica) la struttura di TFIID, TFIIA e altre proteine associate ad un promotore umano estratto dalle cellule HeLa (Louder et al., Nature 531: 604-609, 2016)

L' espressione genica degli Eucarioti è inoltre finemente controllata da specifici **attivatori e inibitori** e dal **rimodellamento della cromatina** effettuato dagli istoni (proteine basiche che formano il nucleosoma)

Controllo dell'espressione genica

- Controllo della trascrizione
- **Modificazioni post-trascrizionali**
- **Splicing**
- Controllo della traduzione
- Ripiegamento corretto della proteina (“folding”)
- Modificazioni post-traduzionali
- “Etichettatura” e “spedizione” delle proteine alla loro corretta destinazione
- Identificazione delle proteine difettose e loro eliminazione nel proteasoma

Negli Eucarioti le modificazioni post-trascrizionali comprendono lo **splicing alternativo** e la **maturazione dell'RNA trascritto** (aggiunta del "cappuccio" e della "coda" di poli-A)

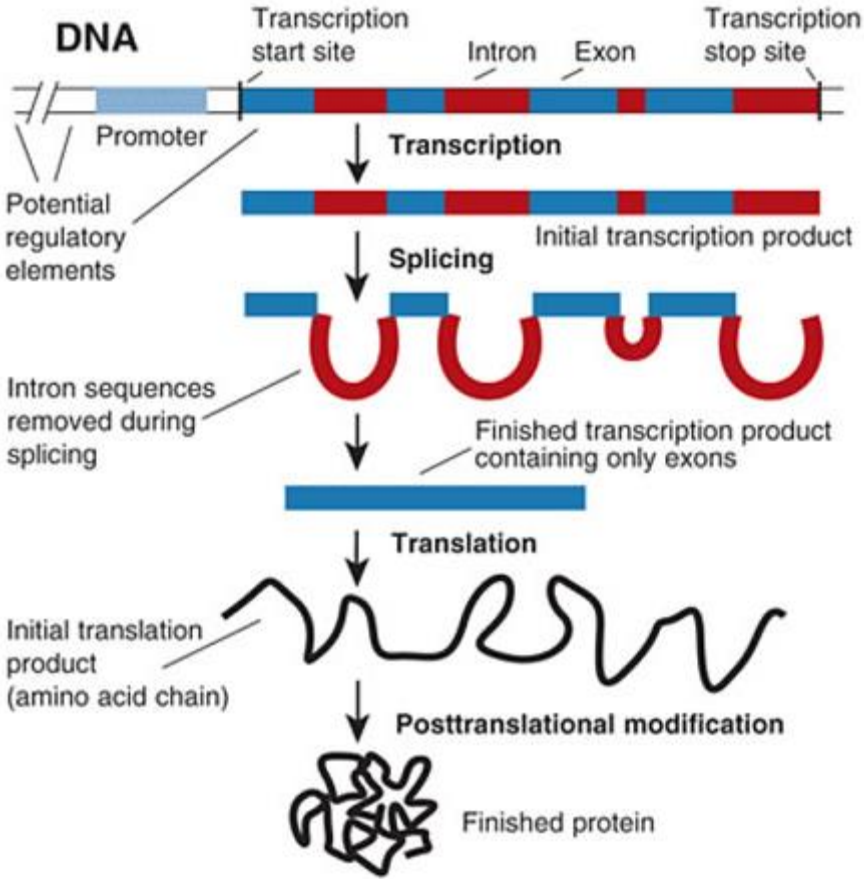
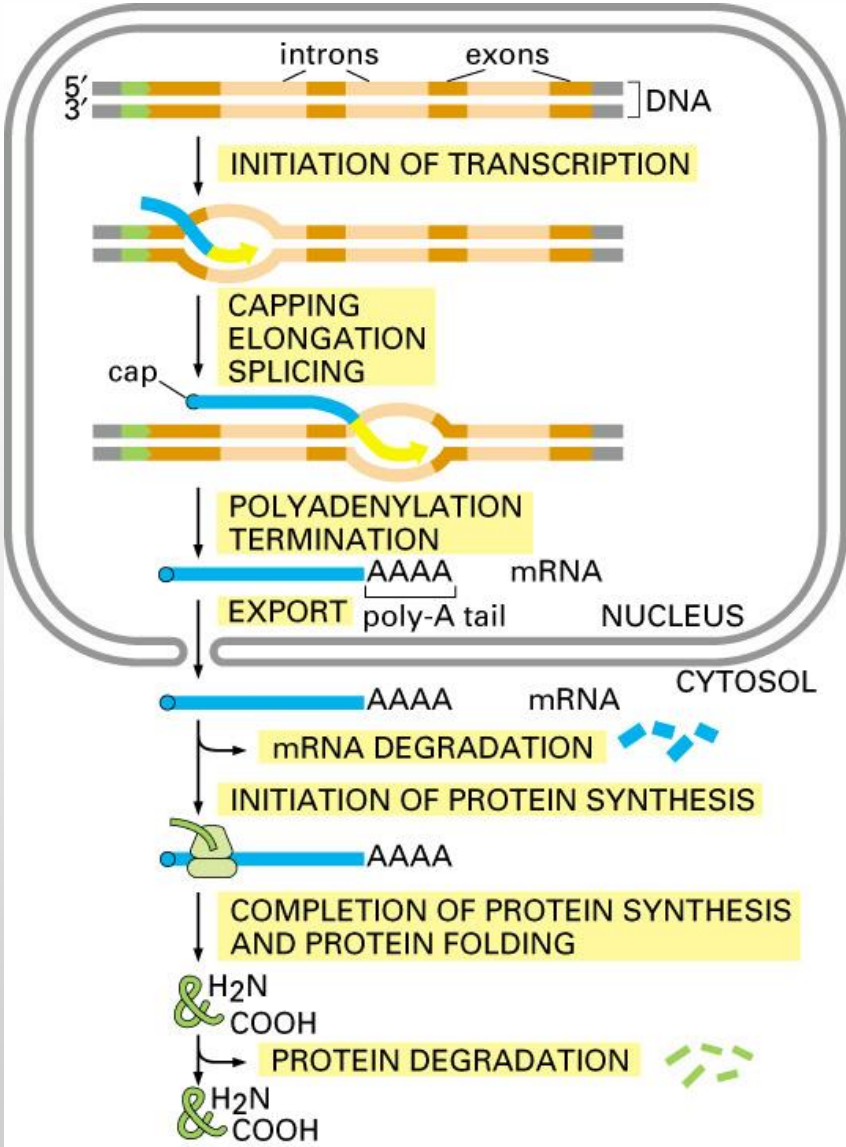
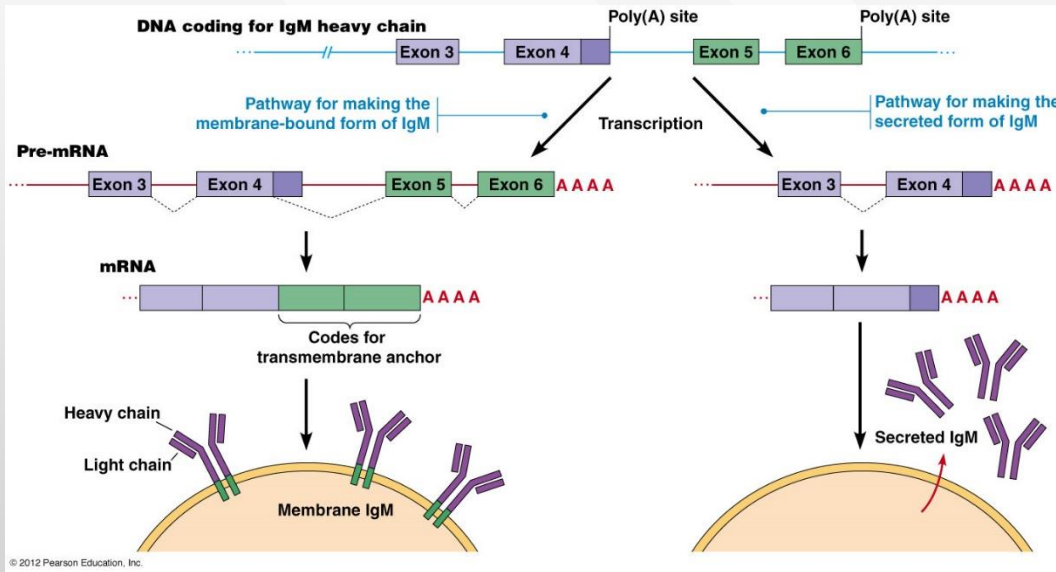
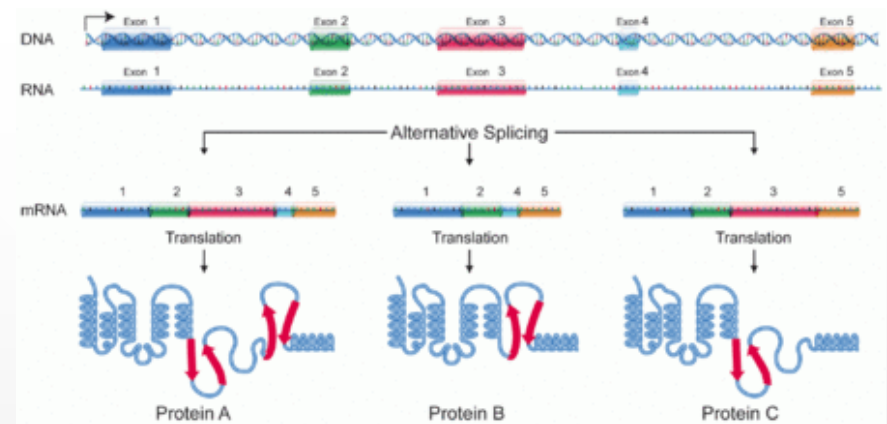


Figure 6-90. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Lo **splicing alternativo** è un fondamentale metodo di controllo post-trascrizionale negli Eucarioti



Lo “splicing alternativo” permette di ottenere da una stessa sequenza di DNA proteine con ruoli diversi, come è stato scoperto per la prima volta in una categoria di anticorpi, le **immunoglobuline M (IgM)**

Se nel gene che codifica per una IgM tutti gli introni sono rimossi, l’ mRNA produce **una proteina lunga**, con una regione terminale idrofoba **adatta per ancorare l’ anticorpo alla membrana della plasmacellula**

Se l’introne successivo all’ esone 4 **non è rimosso**, il codon di terminazione precoce contenuto nell’ introne determina **una proteina più corta**, cioè **un anticorpo che non si legherà alla membrana, ma entrerà in circolo**

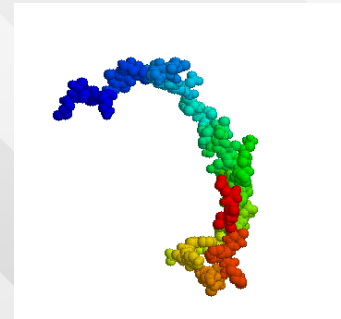
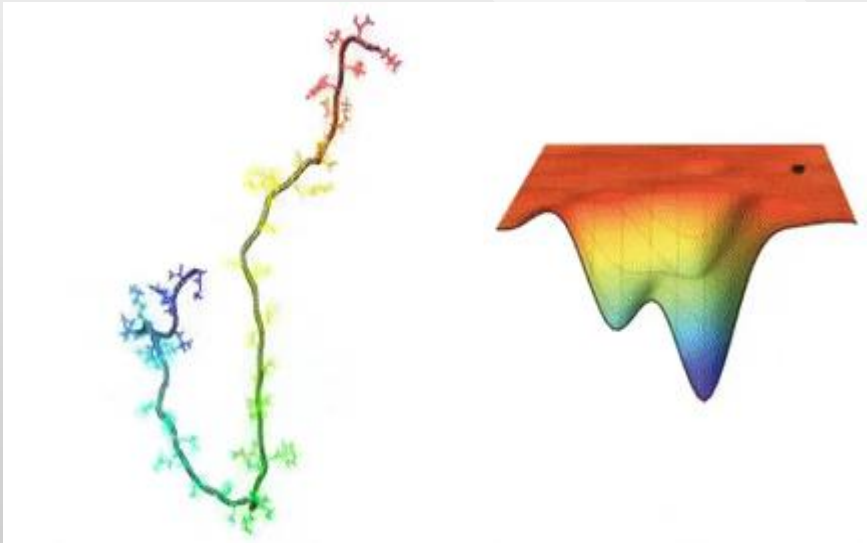
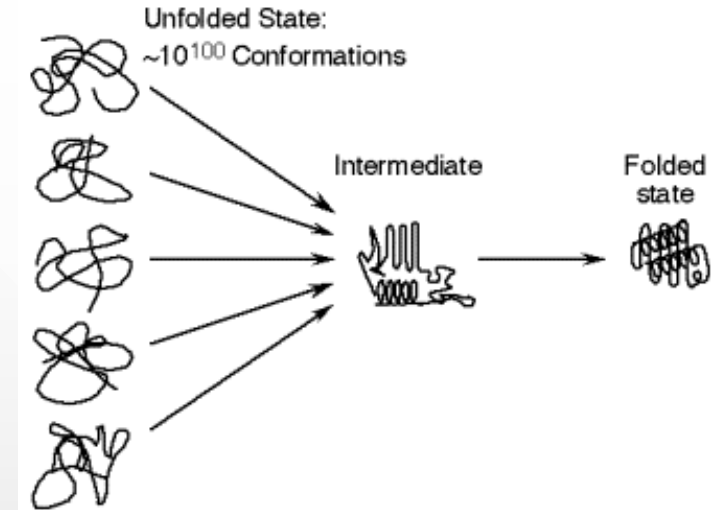
Controllo dell'espressione genica

- Controllo della trascrizione
- Modificazioni post-trascrizionali
- Splicing
- **Controllo della traduzione**
- **Ripiegamento corretto della proteina (“folding”)**
- **Modificazioni post-traduzionali**
- “Etichettatura” e “spedizione” delle proteine alla loro corretta destinazione
- Identificazione delle proteine difettose e loro eliminazione nel proteasoma

Una prima modificazione post-traduzionale delle proteine:

Il **ripiegamento corretto** dopo la sintesi

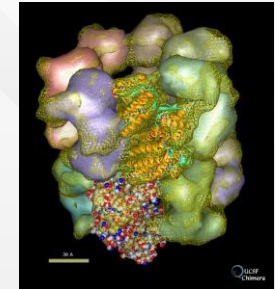
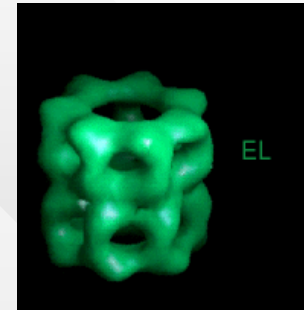
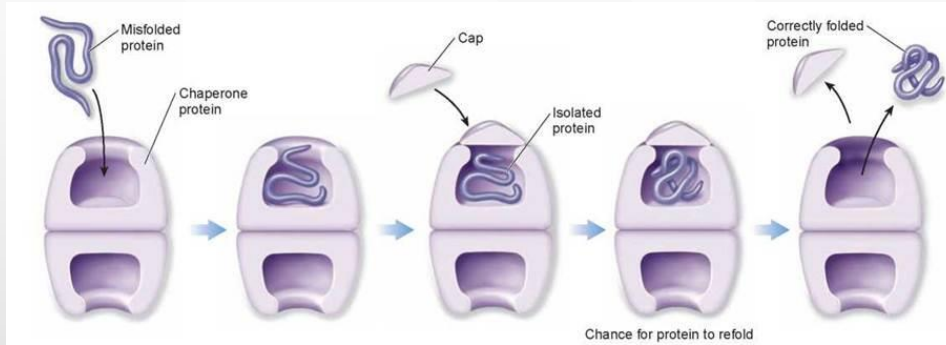
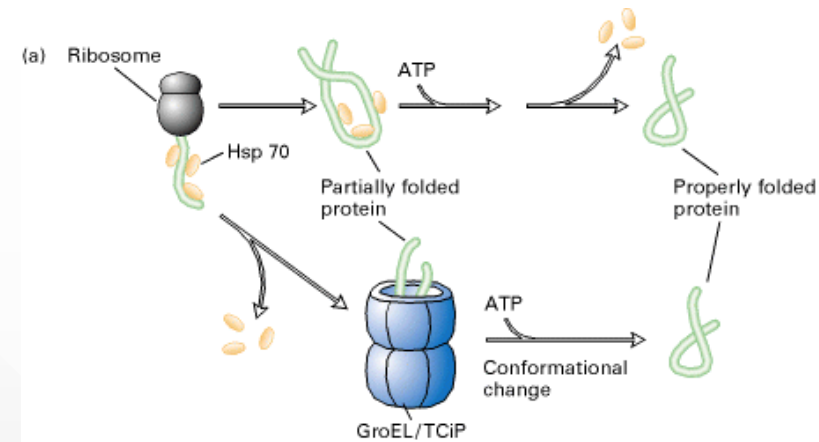
La sequenza degli amminoacidi può determinare varie strutture, ma **una sola permette il corretto funzionamento della proteina**



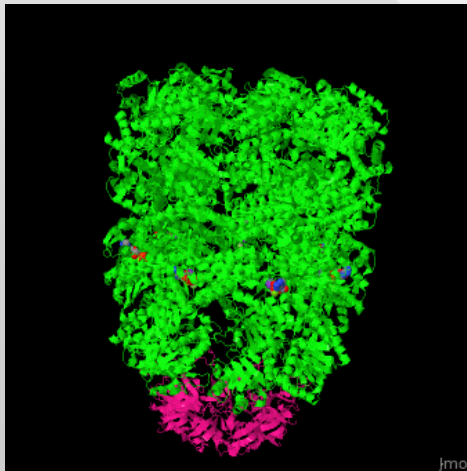
Tramite modelli matematici e ricostruzione probabilistica al computer, è possibile prevedere quale sarà la migliore struttura finale della proteina

Sia nei Procarioti sia negli Eucarioti, il ripiegamento corretto della proteina è aiutato da altre proteine dette “**chaperonine**”

Molte chaperonine sono “**heat shock proteins**” (**hsp**) cioè proteine prodotte dall’organismo in risposta a stress da calore, freddo o radiazioni UV



La chaperonina più nota è **HSP60**, detta GroEL in *E. coli*



Chaperonin
(GroEL-GroES Complex- *E.coli*/ Hsp 60 Mitochondria)

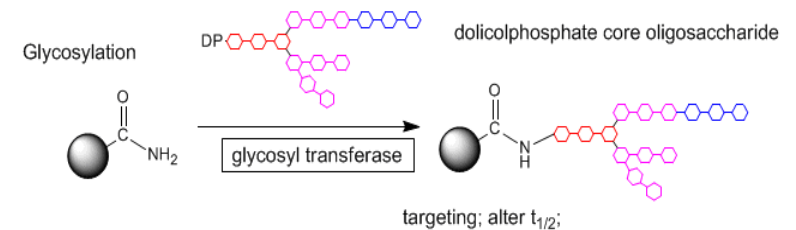
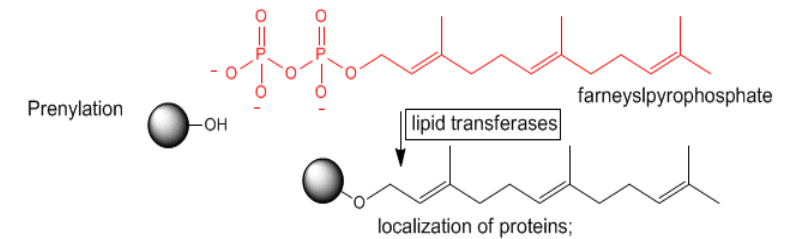
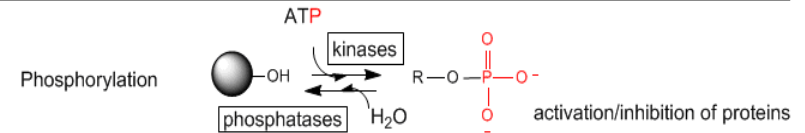
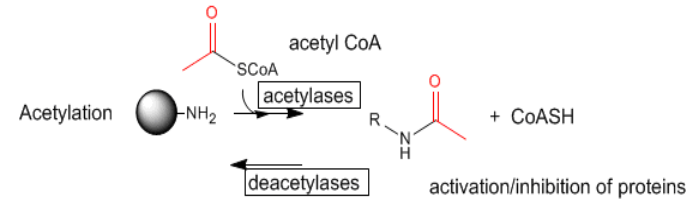
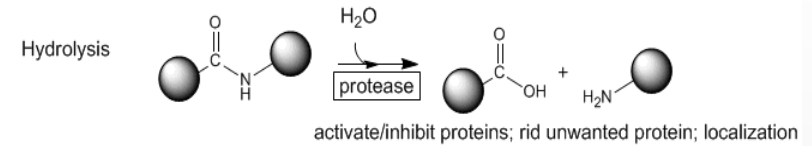
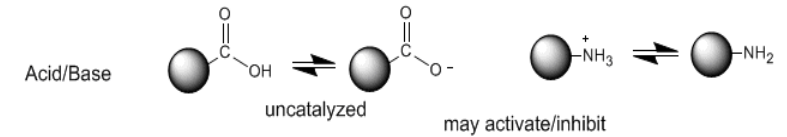
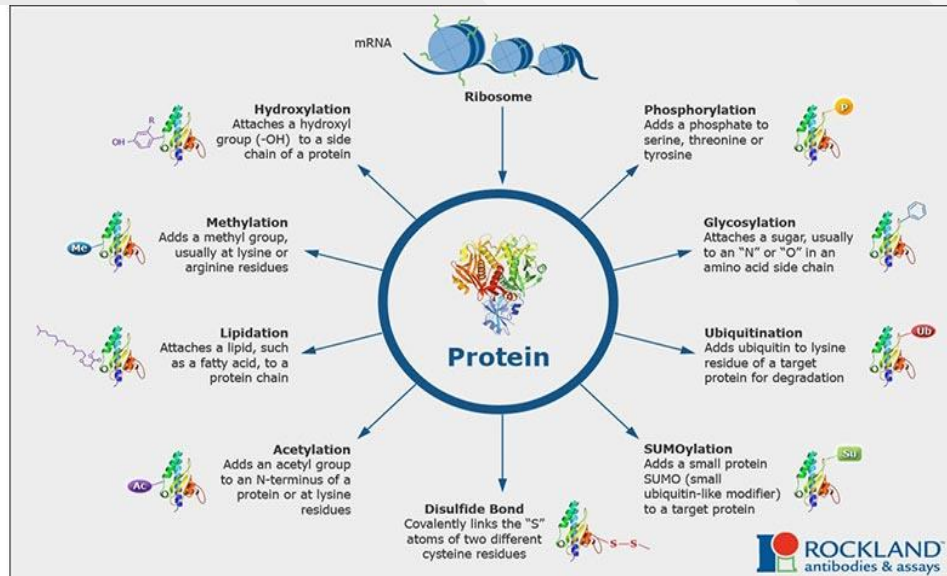
- Chaperone/ HSP (Heat Shock) Protein (Aids the folding of other proteins)
- Internal Partly Hydrophobic Cavity for Isolated Folding
- Binds & Hydrolyses ATP to facilitate folding process

GroEL Rings
GroES Cap

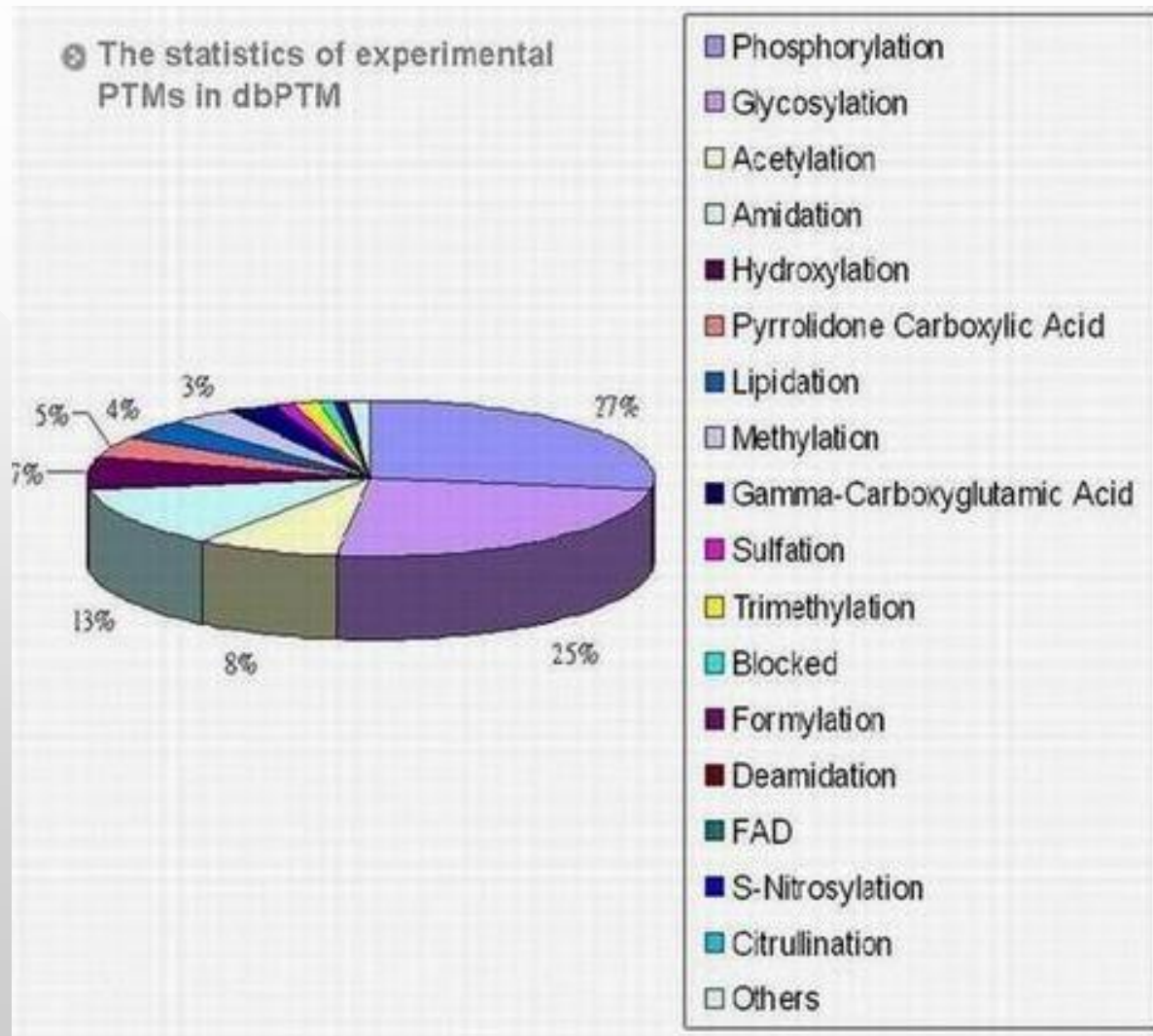
Modificazioni post-traduzionali delle proteine (PTM)

Le principali modificazioni delle proteine dopo la sintesi proteica sono:

- **Fosforilazione** (aggiunta di gruppi fosfato)
- **Glicosilazione** (aggiunta di gruppi glucidici)
- **Acetilazione** (aggiunta di gruppi acetile)



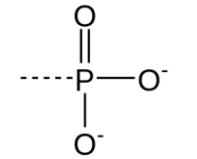
Frequenza delle modificazioni post-traduzionali (PTM) delle proteine



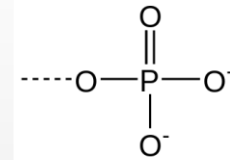
Fosforilazione

La **fosforilazione** consiste nell'**aggiunta di un gruppo fosforico** ad alcuni amminoacidi nella catena proteica

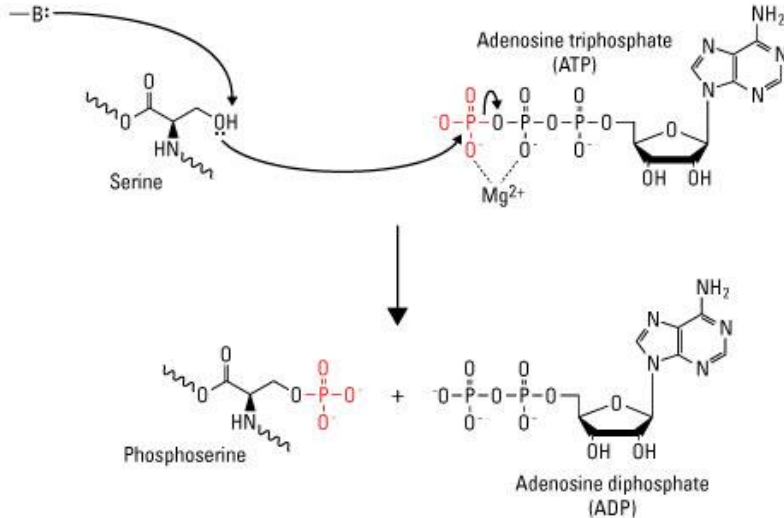
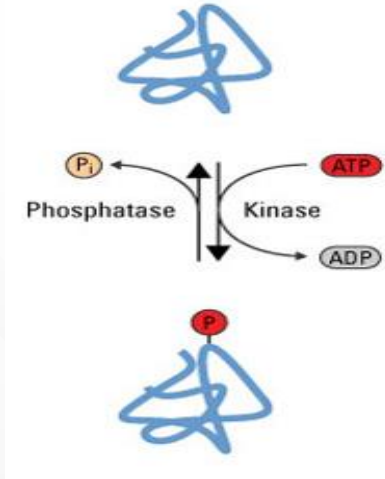
E' effettuata da enzimi specifici, le **chinasi** ("kinases"), che fosforilano soprattutto gli amminoacidi **serina, tirosina ed istidina**



phosphoryl group



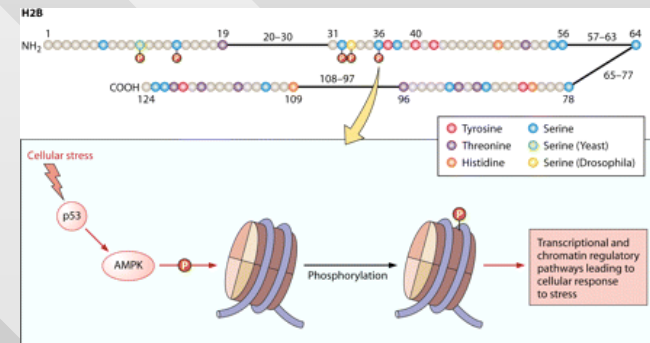
phosphate group



La fosforilazione determina un **cambiamento conformazionale** nella proteina, **attivandola** per compiere una determinata funzione

Negli Eucarioti **anche gli istoni** (le proteine basiche che formano il nucleosoma) **possono essere fosforilati** per controllare l'espressione del DNA

L'opposto della fosforilazione è la **defosforilazione**, in cui il gruppo fosforico è asportato da enzimi detti **fosfatasi**, disattivando la proteina



Glicosilazione (aggiunta di gruppi glucidici) e acilazione (aggiunta di acidi grassi)

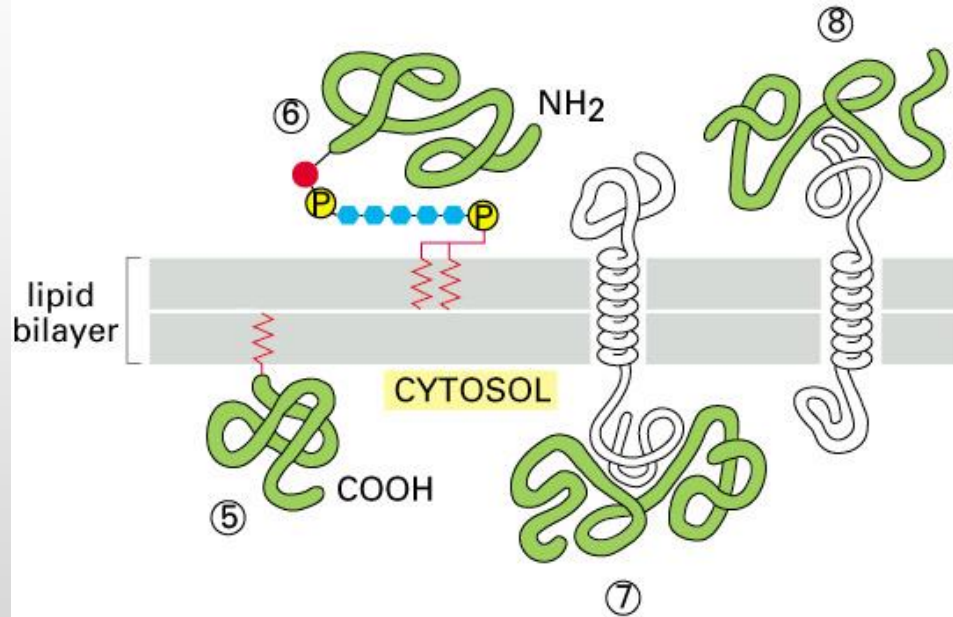


Figure 10-17 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Fonte: Alberts et al., 2002

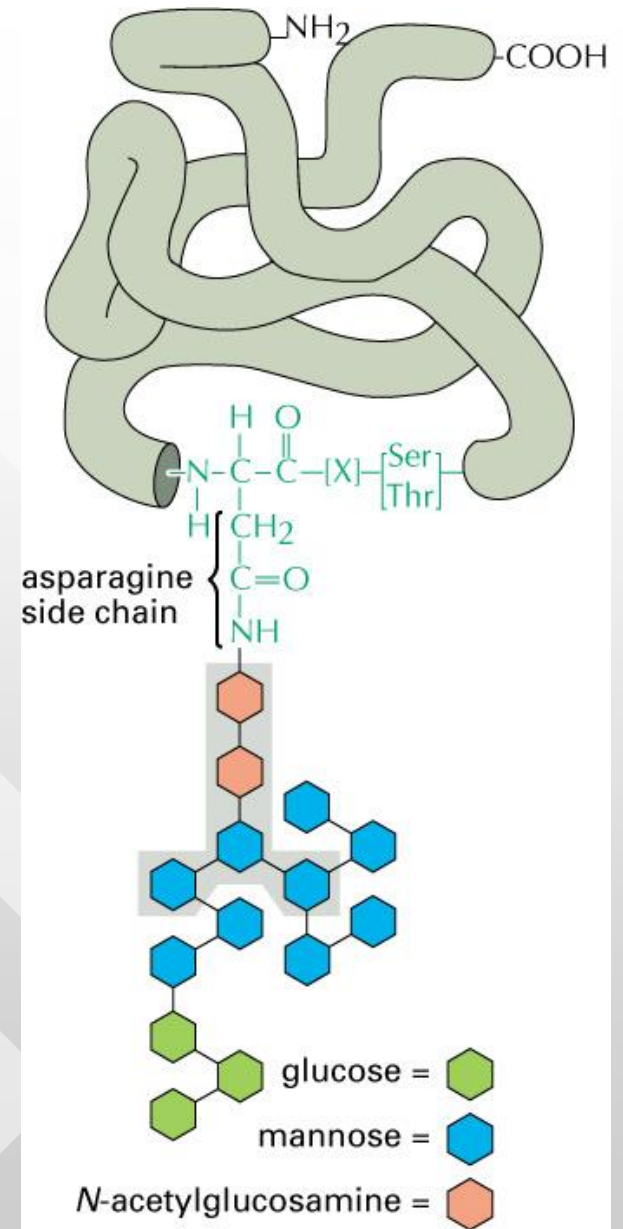
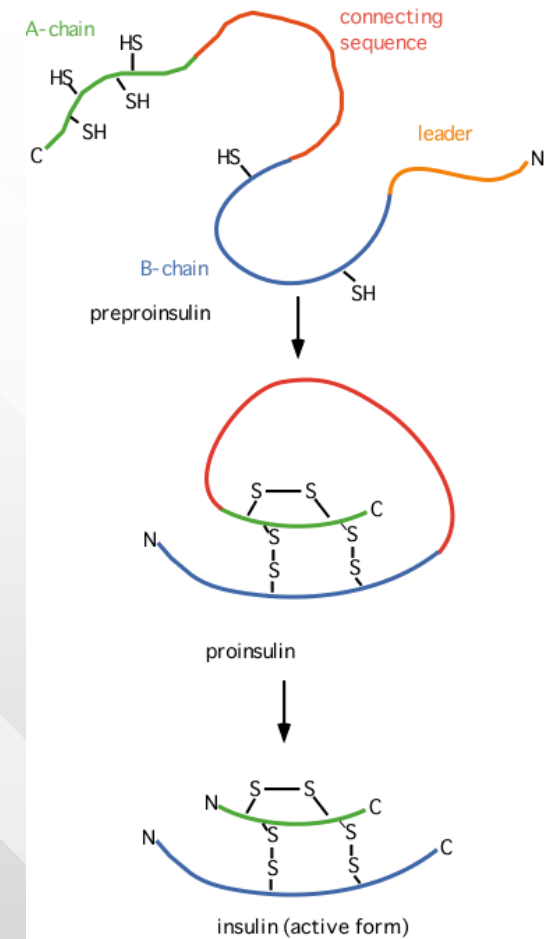
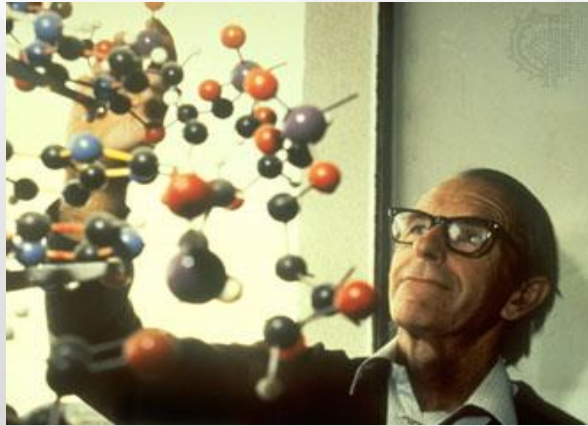


Figure 12-51. Molecular Biology of the Cell

Modificazioni post-traduzionali dell'insulina: ponti disolfuro e taglio proteolitico

L'**insulina attiva** è formata da **due catene** tenute insieme da ponti disolfuro, entrambe **originate dalla stessa proteina precursore**



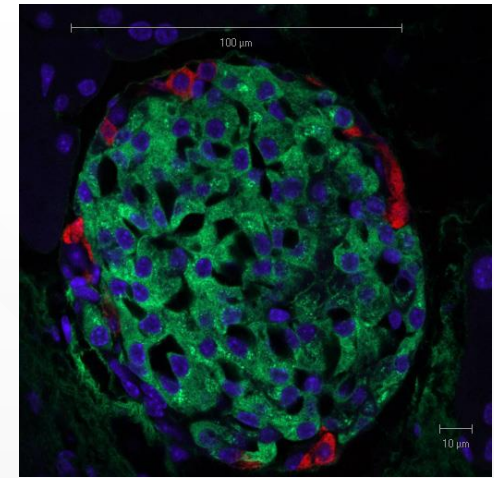
Nel 1958 **Frederick Sanger** ottenne il suo primo **Premio Nobel per la Chimica** per avere identificato la **sequenza completa degli amminoacidi dell'insulina** (prima proteina interamente sequenziata)

Insulina

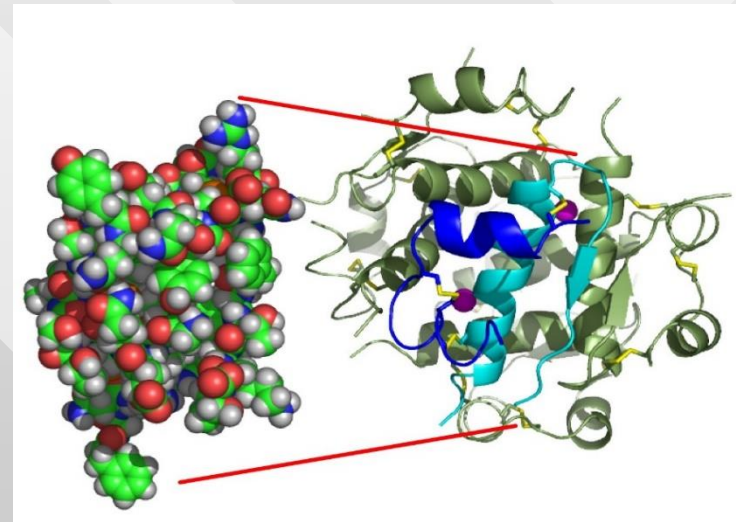
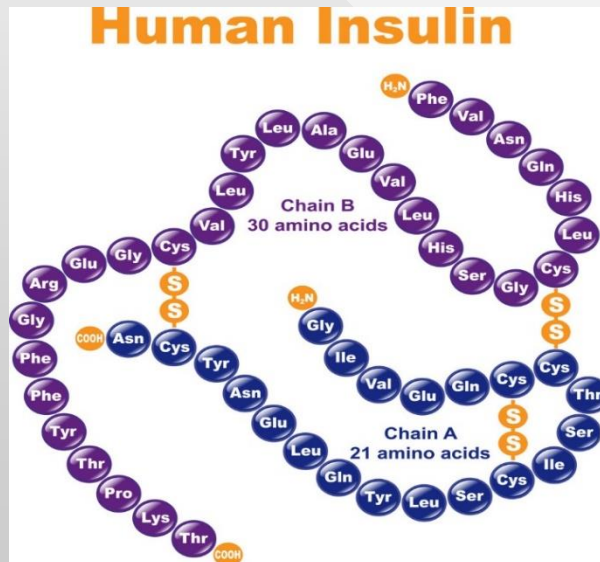
- E' un **ormone peptidico** prodotto dalle cellule beta degli “isolotti di Langerhans”, tessuto endocrino del pancreas
- Come regolatore del metabolismo dei carboidrati, l'insulina favorisce l'asportazione del glucosio dal sangue

E' una **proteina estremamente conservata** e di origini antichissime: molecole con funzioni simili all'insulina sono state trovate nei Protisti (*Amoeba proteus* e *Tetrahymena pyriformis*) e nei Funghi (*Neurospora crassa* e *Aspergillus* sp.)

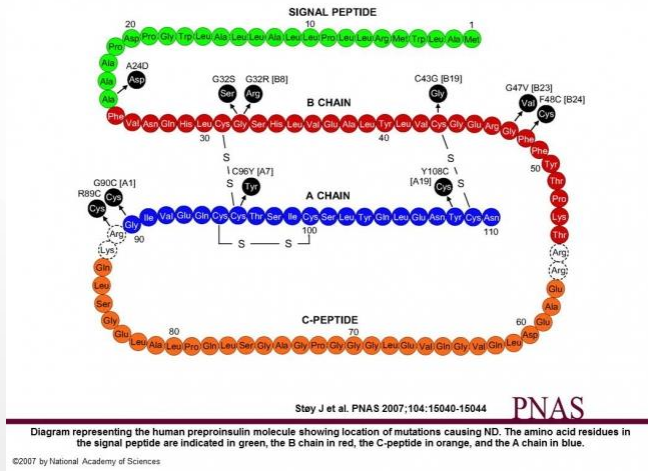
L'insulina umana è un dimero costituito da due catene, A e B (in totale 51 amminoacidi, peso molecolare 5808 Da), tenute insieme da **ponti disolfuro**



Isolotto di Langerhans in pancreas di topo, con cellule beta la cui insulina è colorata in blu

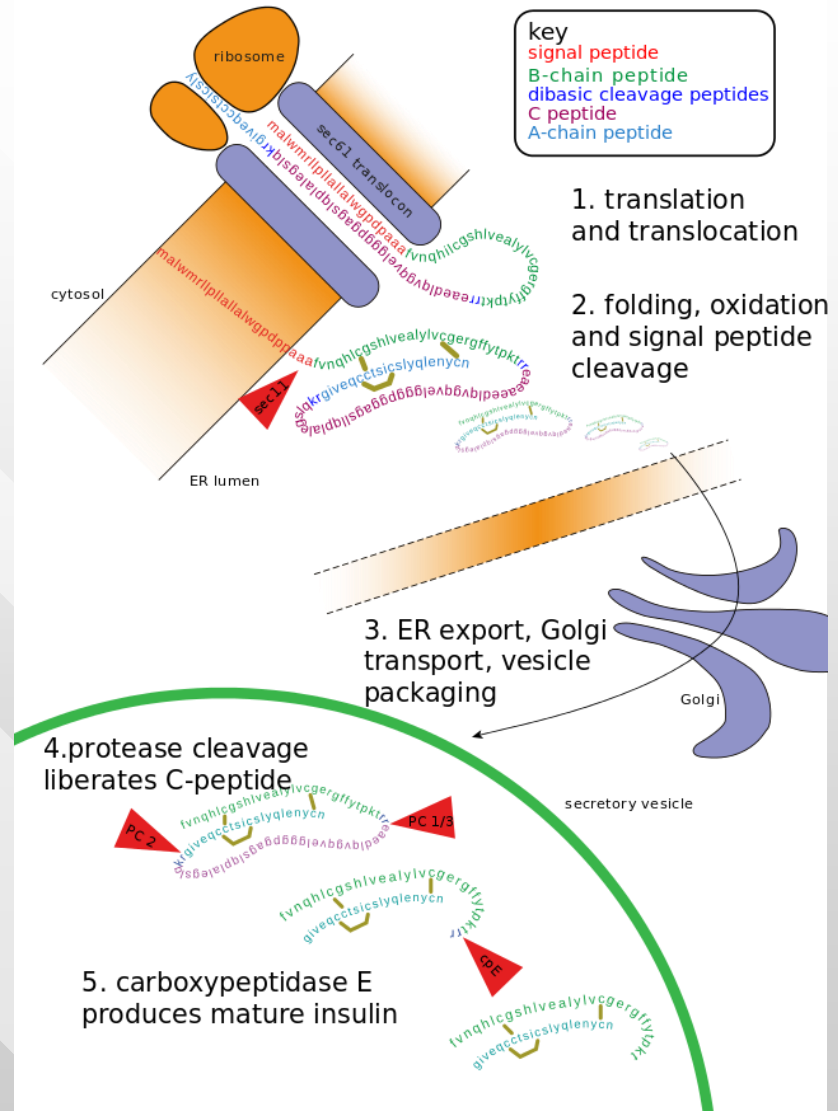


Come è prodotta l'insulina



Le cellule beta producono inizialmente un unico polipeptide (preproinsulina) lungo 110 amminoacidi e contenente un **peptide segnale** di 24 amminoacidi all'estremità N-terminale

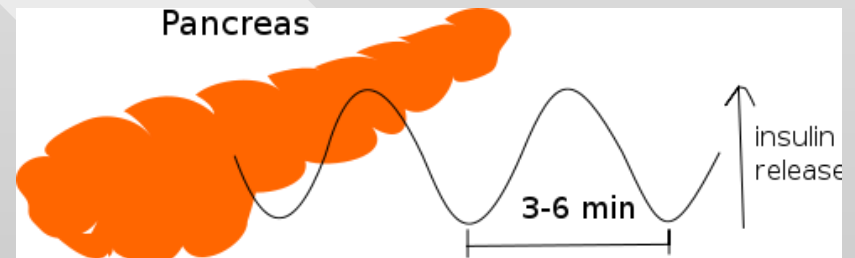
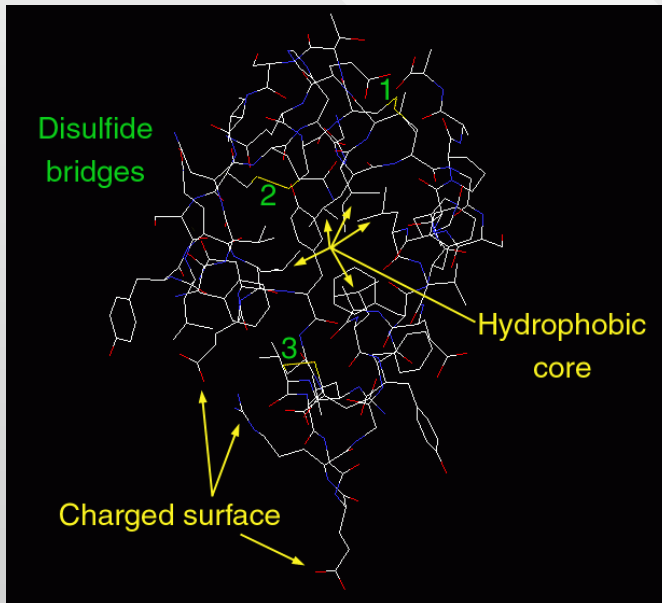
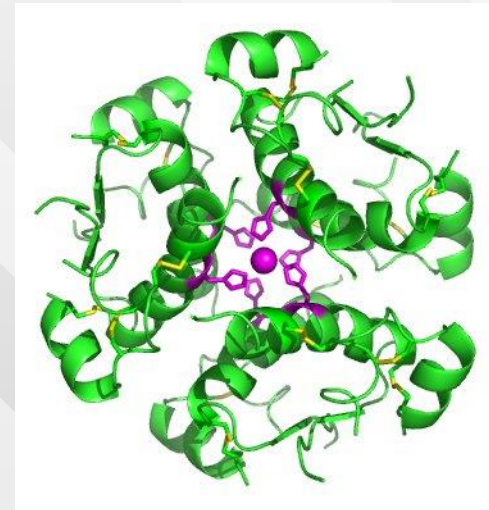
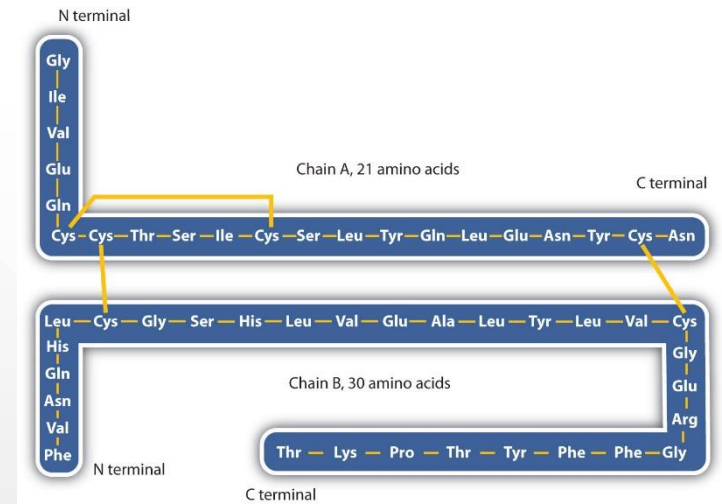
- Il peptide segnale indirizza la proteina verso il lume del reticolo endoplasmatico ed è in seguito tagliato, producendo la **proinsulina**, lunga 86 amminoacidi
- Nel reticolo endoplasmatico la proinsulina è ripiegata correttamente e si formano i ponti disolfuro: subito dopo **la proteina è trasportata nell'apparato di Golgi** tramite vescicole secretorie

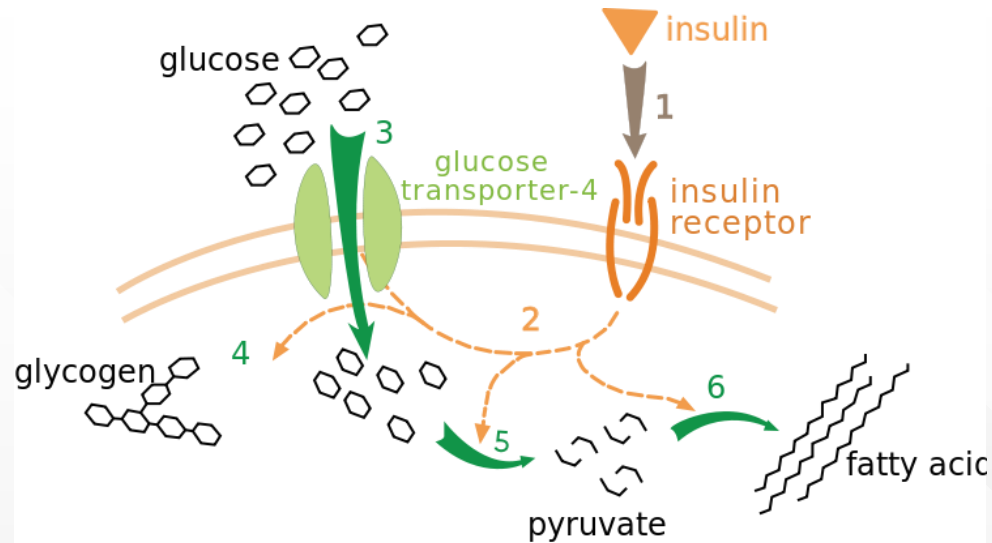


Nell'apparato di Golgi la proinsulina subisce l'asportazione di un frammento (**peptide C**) da parte di una endopeptidasi che taglia in corrispondenza di residui basici (arginina-31 e -32, lisina-64 e arginina-65)

Una carbossipeptidasi asporta infine i residui basici, rendendo matura e attiva l'insulina (**catena A, 21 amminoacidi; catena B, 30 amminoacidi**)

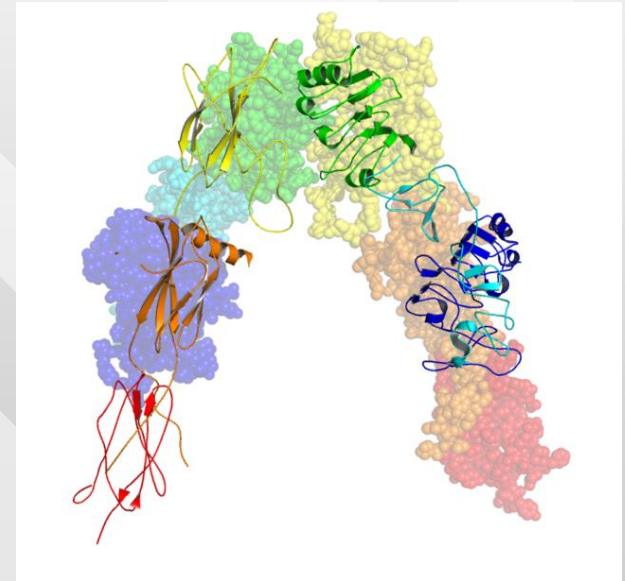
L'insulina è accumulata come esamero e rilasciata dal pancreas dopo un pasto non in modo continuo, ma ad oscillazioni di 3-6 minuti



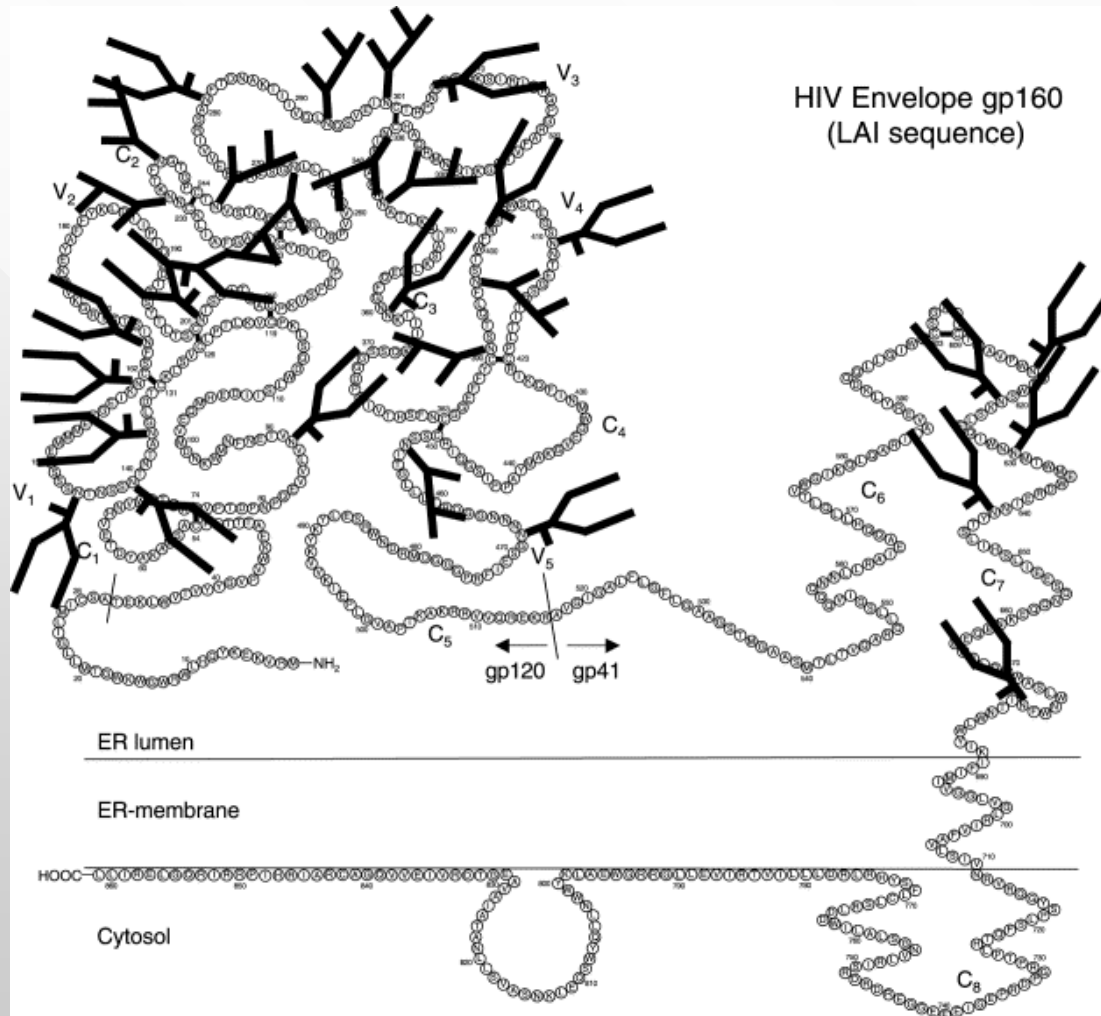


- L'insulina regola il metabolismo **aumentando la sintesi di glicogeno a partire da glucosio** nei muscoli e di lipidi nel tessuto adiposo
- Aumenta anche la sintesi proteica e la replicazione del DNA, ed ha altre **numerose funzioni metaboliche fondamentali**

Il recettore dell'insulina è una **tirosina chinasi transmembrana** che, all'arrivo dell'ormone, attiva una serie di eventi intracellulari a cascata



Modificazioni post-traduzionali (taglio proteolitico e glicosilazione)
in una **proteina del retrovirus HIV** (“glycosylated protein”, 160 KDa, **gp160**)



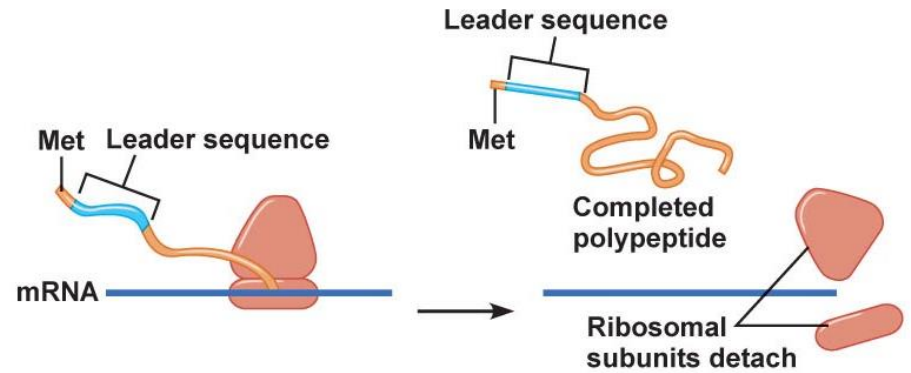
Controllo dell'espressione genica

- Controllo della trascrizione
- Modificazioni post-trascrizionali
- Splicing
- Controllo della traduzione
- Ripiegamento corretto della proteina (“folding”)
- Modificazioni post-traduzionali
- “Etichettatura” e “spedizione” delle proteine alla loro corretta destinazione
- Identificazione delle proteine difettose e loro eliminazione nel proteasoma

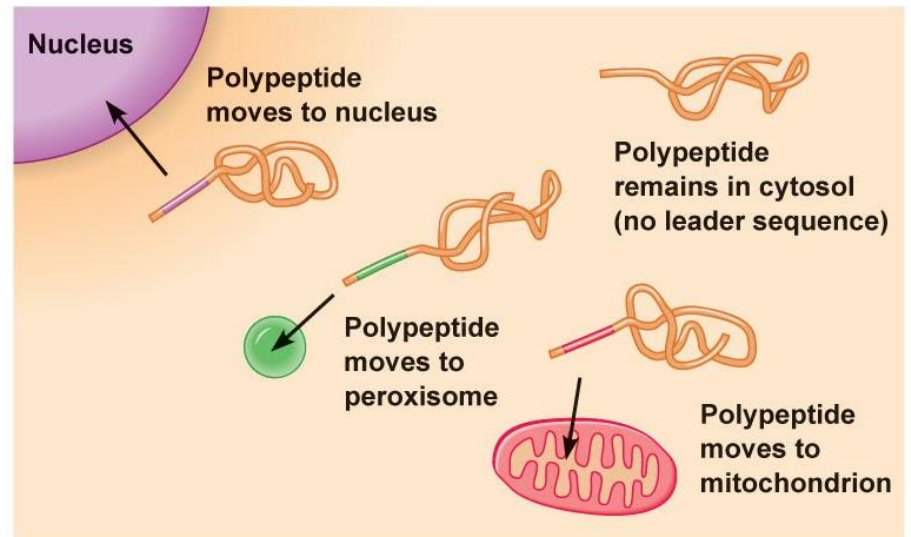
Destinazione delle proteine neosintetizzate

La destinazione dipende dalla **sequenza iniziale di amminoacidi** (detta “**leader**”) che indirizza la proteina verso il citosol oppure verso le membrane e gli organelli

Fonti: Reece et al., 2011



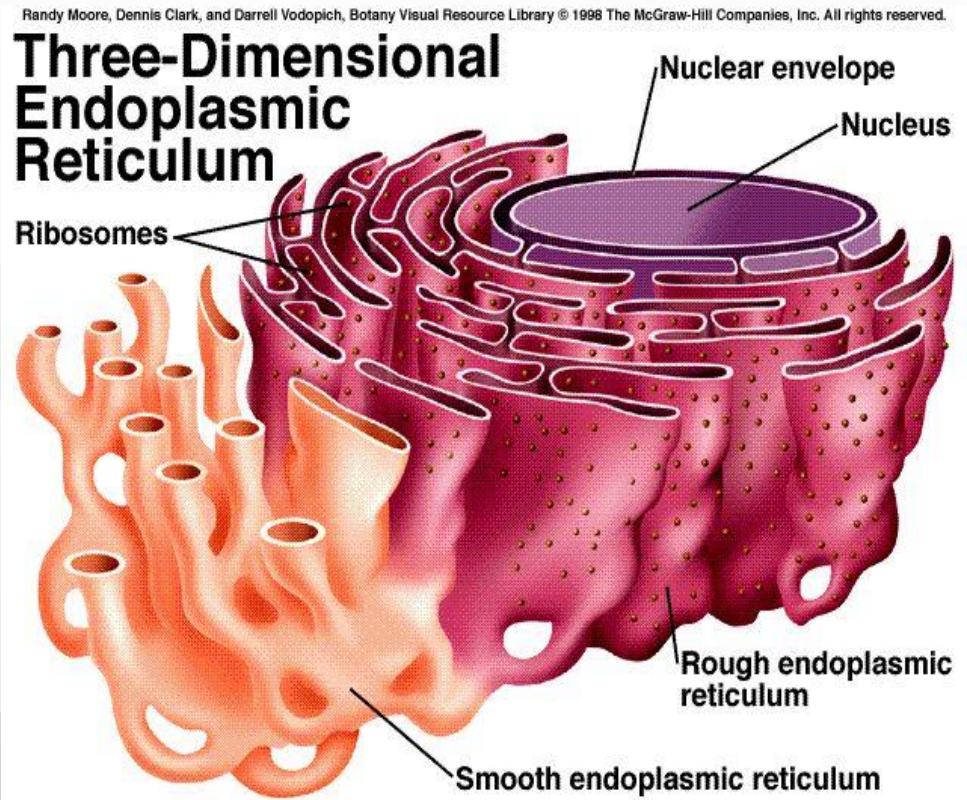
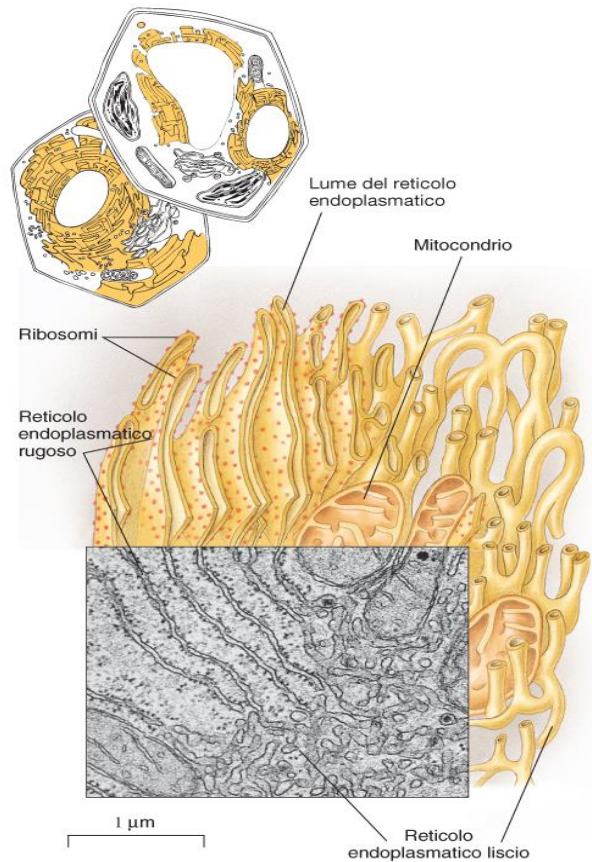
(a) Translation of leader sequence and polypeptide in cytosol



(b) Destination of polypeptides translated in cytosol

© 2011 Pearson Education, Inc.

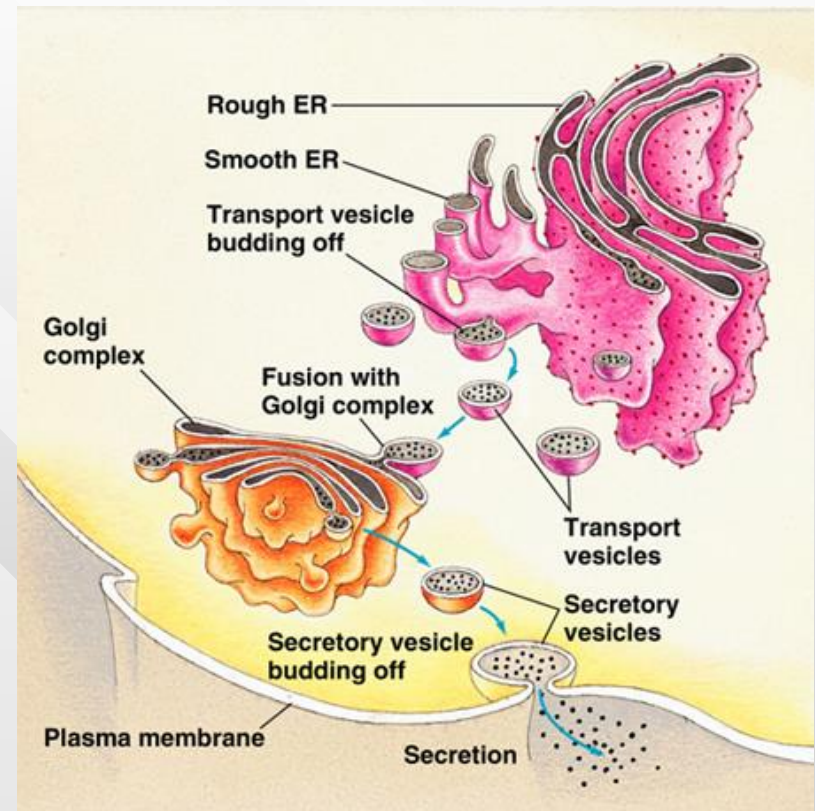
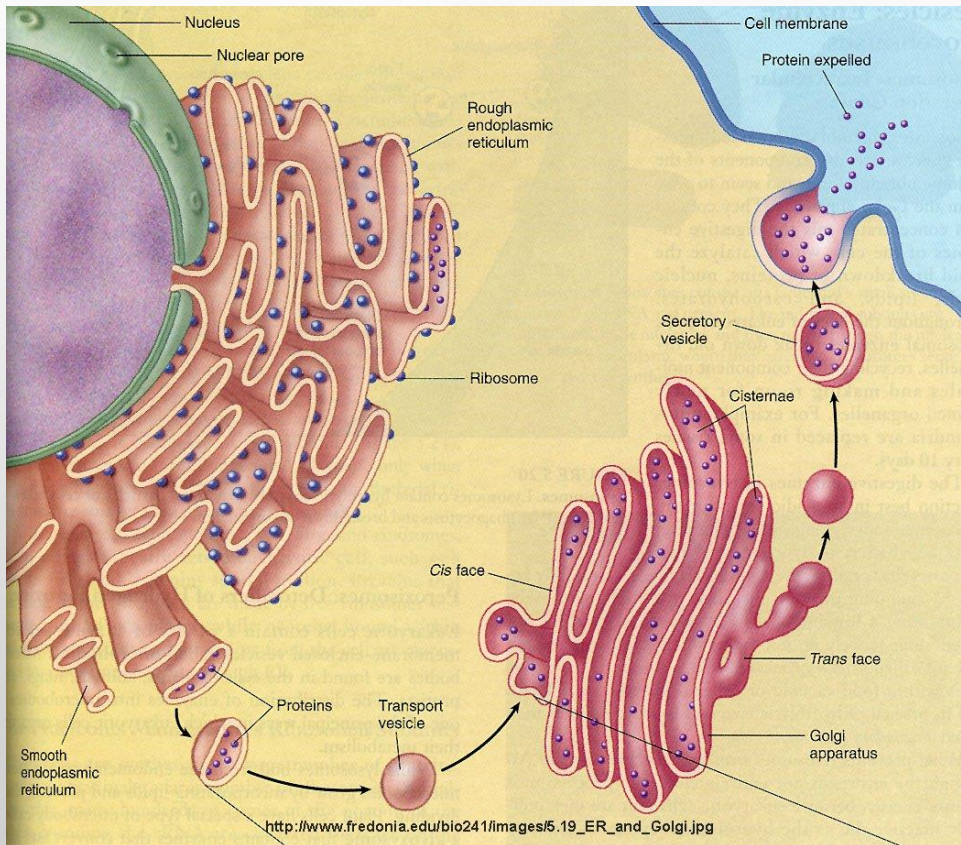
Il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi hanno un ruolo fondamentale nelle modificazioni post-traduzionali e nella destinazione finale delle proteine



Reticolo endoplasmatico rugoso (**RER**)

Reticolo endoplasmatico liscio (**SER**)

Relazioni tra reticolo endoplasmatico e apparato di Golgi



Fonte: <https://www.fredonia.edu/>

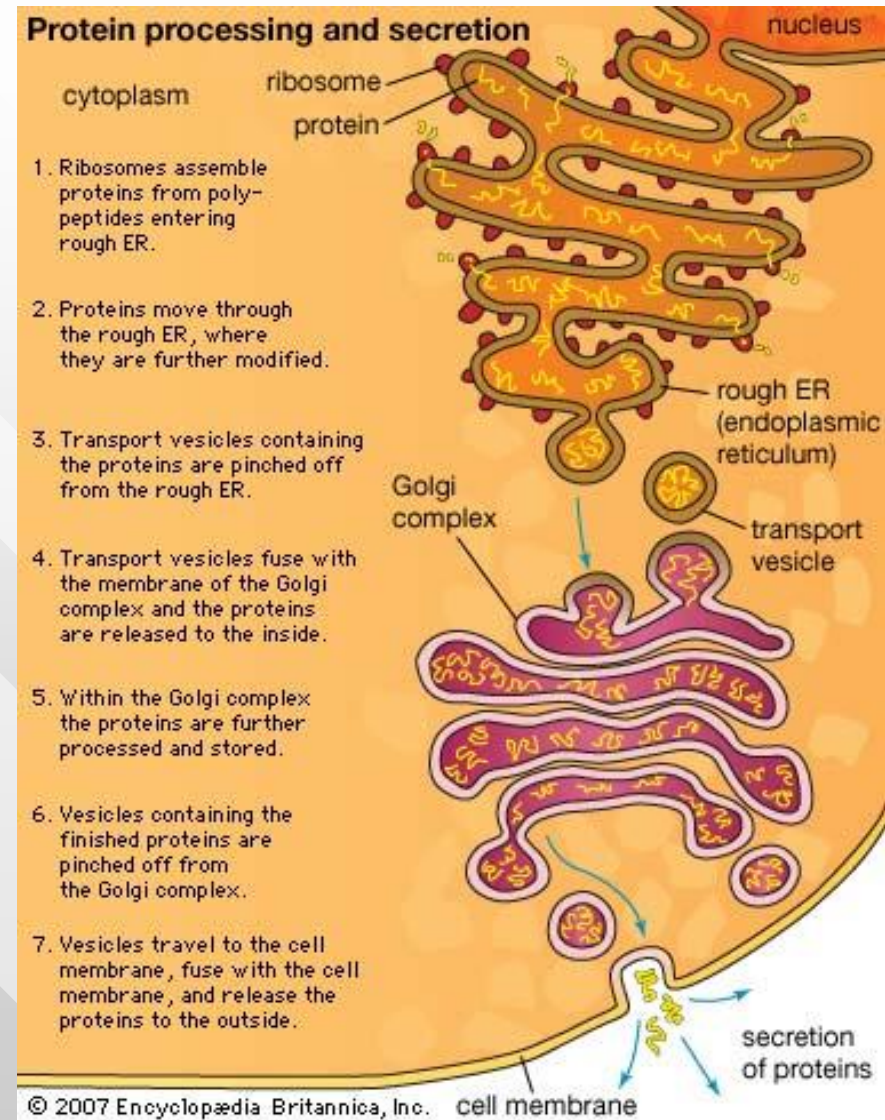
Elaborazione, trasporto e secrezione di proteine

Le proteine neosintetizzate sono trasportate tramite vescicole dal RER all'apparato di Golgi, dove subiscono **modificazioni post-traduzionali**

Se le proteine sono destinate ad essere **secrete**, **l'apparato di Golgi le "impacchetta" in vescicole** che si fondono con la membrana plasmatica

Se le proteine sono **destinate agli organelli o al citoplasma**, la sequenza iniziale di amminoacidi ("**leader**") ne determina la destinazione

Fonte: <https://www.britannica.com/>

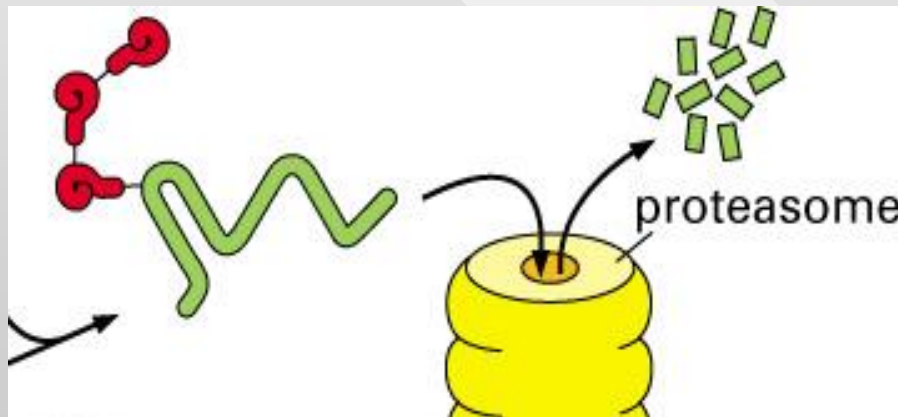


Il **proteasoma**,

luogo di distruzione delle proteine difettose o che hanno esaurito il loro compito

Il **proteasoma** è un **grande complesso proteico citoplasmatico** a forma di barile, in grado di **distruggere le proteine** tramite **enzimi proteolitici** e quindi di **regolare l'intera attività cellulare**

- Il proteasoma degli Eucarioti è formato da una regione centrale (“**core**”) costituita da due anelli di 7 subunità proteiche
- Le proteine entrano da ciascuna estremità tramite un ingresso (“**gate**”) e sono disgregate in piccoli peptidi nella regione proteolitica centrale
- Le proteine destinate alla distruzione devono essere “**etichettate**” con una o più molecole di una piccola proteina detta **ubiquitina** (“segnale di morte”)



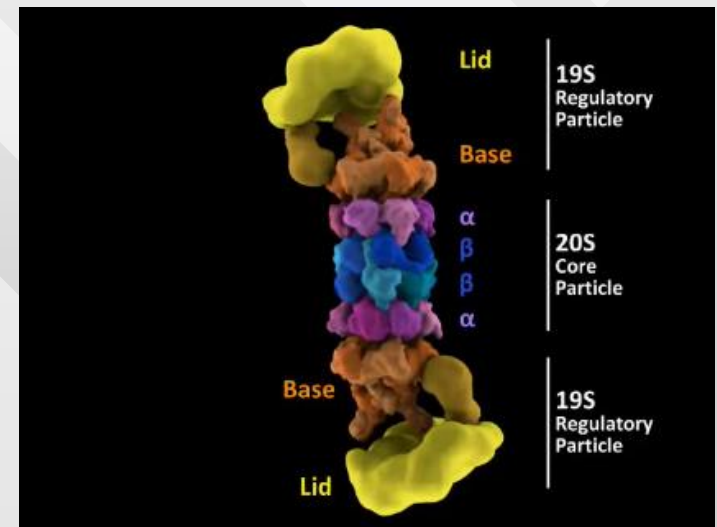
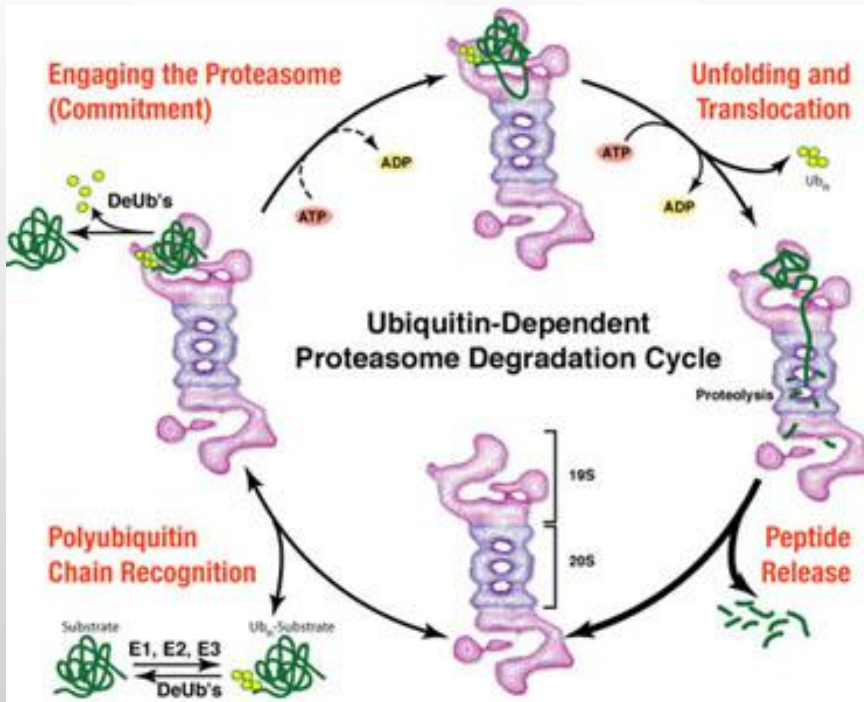
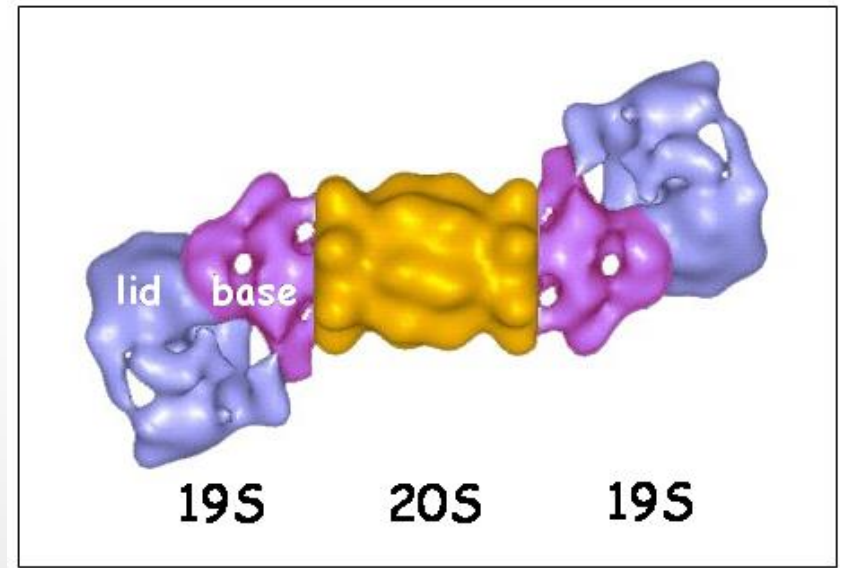
Premio Nobel 2004 per la
Chimica per la scoperta
del proteasoma



Avram Hershko, Aaron
Ciechanover e Irwin Rose

Struttura del proteasoma

La regione centrale 20 S (“**core**”) è fiancheggiata da due regioni regolatorie 19 S, che hanno la funzione di “cancelli” (“**gate**”)

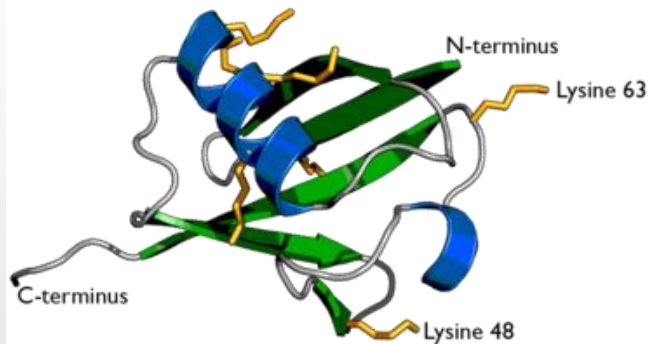


La proteina destinata alla distruzione, **complessata con alcune molecole di ubiquitina**, entra da uno dei “cancelli” ed esce suddivisa in piccoli peptidi dall’altro

Filmato

Ubiquitina

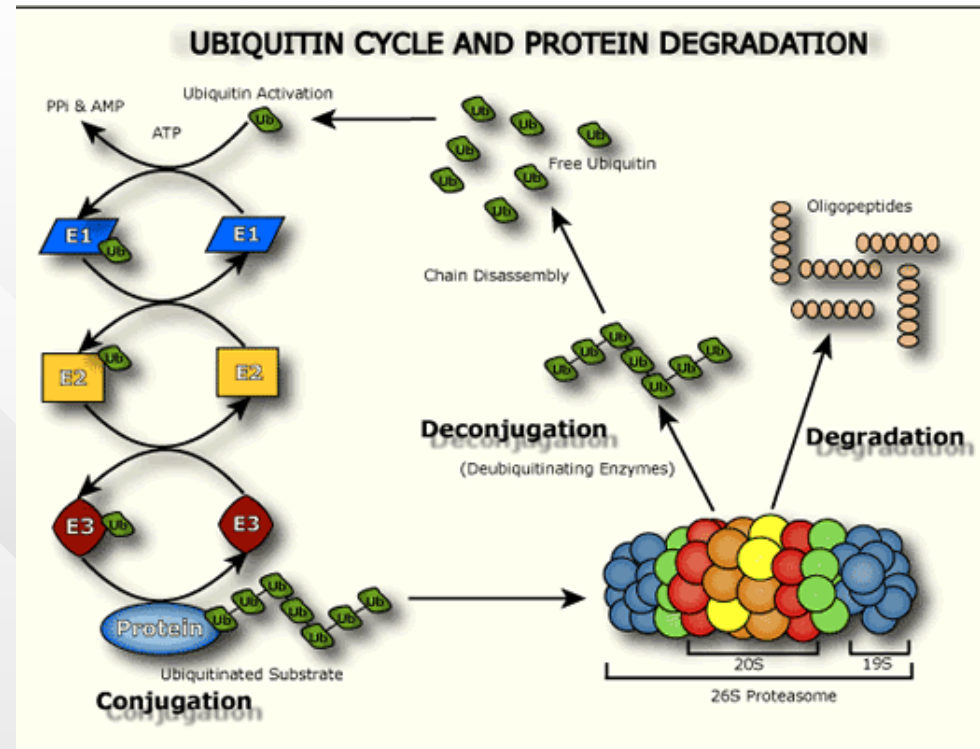
piccola proteina che rappresenta un segnale molecolare di distruzione negli Eucarioti



76 amminoacidi, 8.5 kDa

Oltre a contrassegnare le proteine destinate alla distruzione nel proteasoma, l'ubiquitina ha un ruolo fondamentale in numerosi processi cellulari, tra i quali l'apoptosi, il ciclo cellulare, il differenziamento, le patologie neurali come il morbo di Parkinson e la malattia di Alzheimer, il cancro e la risposta immunitaria

Filmati



L'ubiquitina è una proteina altamente conservata tra gli Eucarioti: la percentuale di identità di sequenza tra l'ubiquitina umana e quella del lievito modello *Saccharomyces cerevisiae* è 96%

Fonte: <http://www.bmrw.wisc.edu>