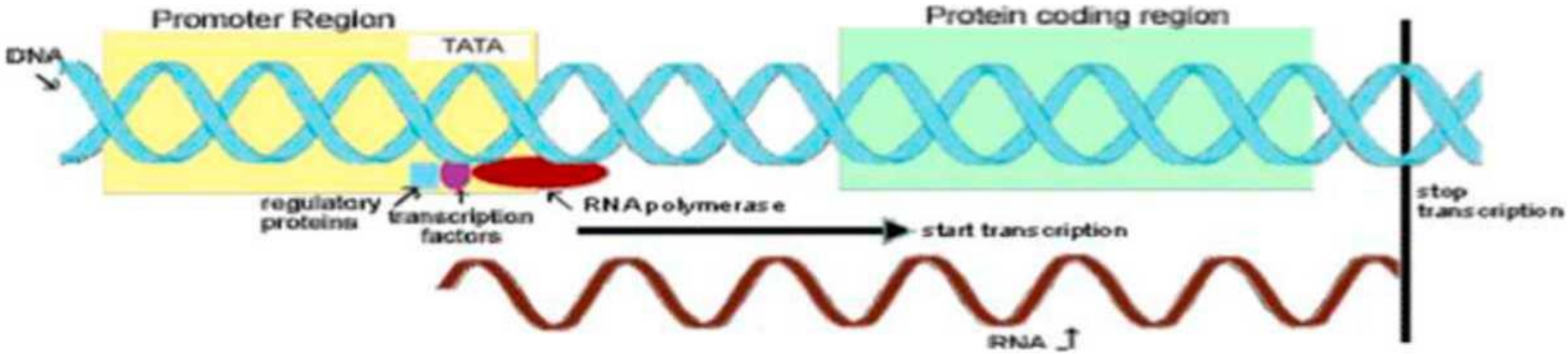
16.
CONTROLLO DELL'ESPRESSIONE GENICA

GENI

- **Geni sono segmenti di DNA**, ovvero il database di informazioni contenuto entro il genoma di una cellula

- Questo DNA porta il **blueprint genetico** che è impiegato per la biosintesi di tutte proteine che sono necessarie alla cellula.
- Ogni gene contiene un particolare set di istruzioni che codificano per una specifica proteina



Tipica organizzazione del gene

- **No. totale:** geni:
  - procarioti: 500-600 a 4000-5000
  - eucarioti: 6.300-35.000

- **Espressione genica**
  - Processo a stadi multipli che risulta nella **produzione di prodotti genici funzionali**

- **Importanza**
  - ✓ Differenziazione cellulare
  - ✓ Morfogenesi
  - ✓ Adattabilità di un organismo

Espressione genica

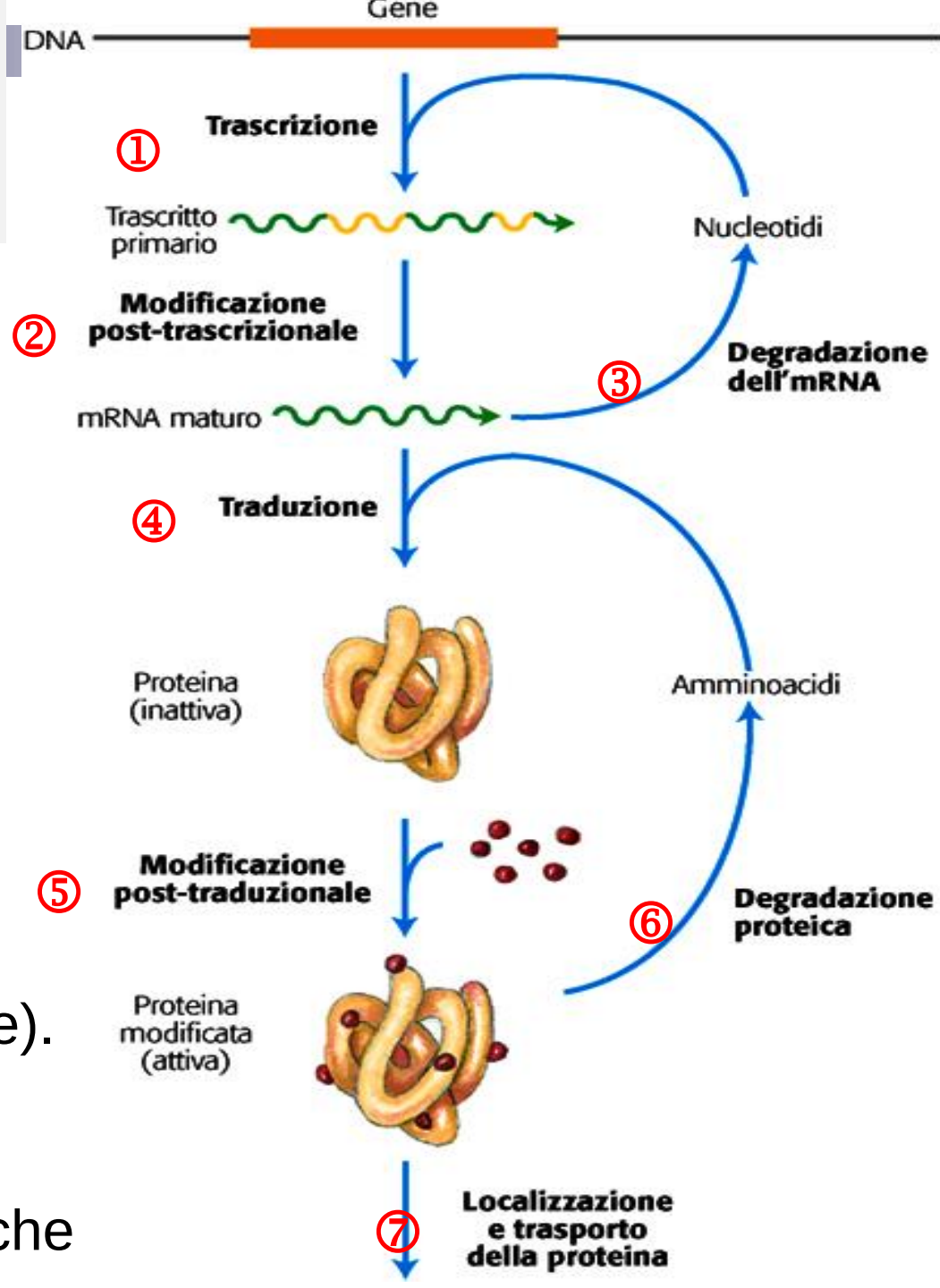
- E' il **processo attraverso il quale l'informazione codificata** in un gene è **utilizzata per dirigere la formazione di una molecola proteica.**

- L' espressione genica è stata analizzata tramite lo studio della struttura e funzione della proteina, trascrizione e traduzione, differenziamento e cellule staminali.

- É il processo per cui **l'informazione di un gene** è utilizzata per la **sintesi di un prodotto genico funzionale.**
- I prodotti genici sono spesso proteine:
  - tuttavia sono presenti geni che **non codificano proteine;**
  - per esempio: quelli che codificano per RNA ribosomali (rRNA), RNA di trasporto (tRNA) o piccoli RNA nucleari (snRNA);
  - quindi in questo caso il prodotto genico si riflette in **un RNA funzionale**.
- Sebbene un prodotto genico funzionale possa essere un RNA o una proteina, la maggioranza dei meccanismi noti sono quelli che regolano geni che codificano proteine.
- Il processo di espressione genica è impiegato da tutte le forme di vita sia per: eucarioti (inclusi gli organismi multicellulari) sia per procarioti (batteri e archea).

Regolazione dell'espressione genica

- Ogni processo che porta
- dal DNA ad una proteina funzionale è soggetto a regolazione.
- Il **primo processo di regolazio- ne relativo alla trascrizione** è il più i**mportante punto di rego- lazione dell' espressione genica** (principio della massima economia cellulare).
- Una situazione analoga è presente nella regolazione delle principali vie metaboliche



REGOLAZIONE GENICA NEI PROCARIOTI

- Non tutti i geni vengono utilizzati nello stesso momento e non tutti con la stessa “intensità”

Regolazione genica:

la modalità con cui viene REGOLATA la tipologia e la quantità dei prodotti genici

Classificazione dei geni in funzione della loro espressione

- **Geni costitutivi (*house keeping*):**
  - Sono espressi a velocità costante, senza considerare le condizioni cellulari.
  - Non sono soggetti a regolazione: *e.g*. enzimi della glicolisi
  - La loro struttura è semplice.
- **Geni regolati*:***
  - Sono espressi solo in certe condizioni.
  - La loro quantità può aumentare o diminuire rispetto al livello di base in condizioni differenti.
  - Espressi in tutte le cellule/subset di cellule, *e.g*. espressione gene dell'insulina nel pancreas (parte apparato digerente).
  - La loro struttura è relativamente complessa con alcuni elementi di risposta.

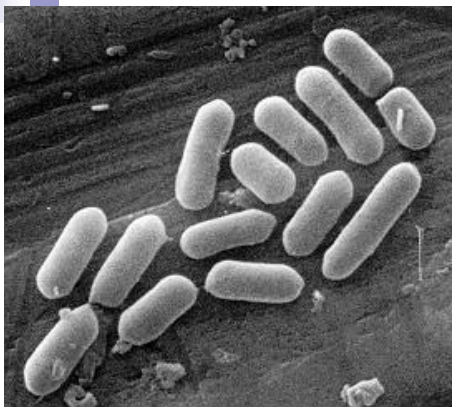
Tipi di regolazione genica

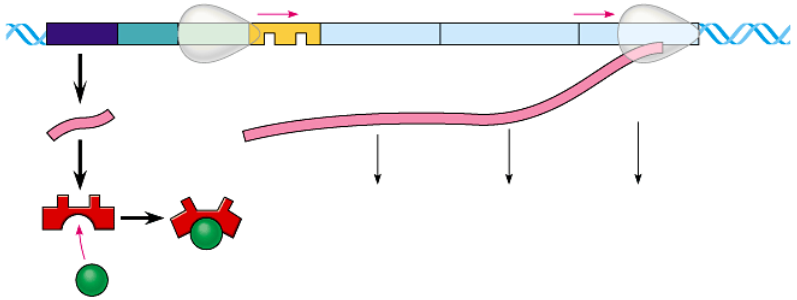
❑ Regolazione negativa:

- Quando l'espressione dell'informazione genica è **ridotta quantitativamente** dalla presenza di specifici elementi di regolazione si ha **regolazione negativa**.
- Gli elementi o molecole che mediano la **regolazione negativa** sono detti **repressori**

❑ Regolazione positiva:

- Quando l'espressione dell'informazione genica è aumentata quantitativamente dalla presenza di specifici elementi di regolazione si ha **regolazione positiva**.
- Gli elementi che modulano la regolazione positiva sono detti **attivatori o regolatori positivi**.





Controllo di geni procariotici (Batterici)

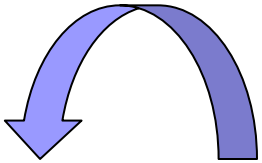




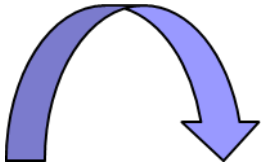


Regolazione genica nei procarioti

- Molti prodotti genici codificati dal cromosoma di *E. Coli* sono necessari solo in alcune condizioni ambientali e nutrizionali
- I **geni costitutivi**, sono trascritti sempre, ma non necessariamente alla stessa velocità, --> sono costantemente attivi (es. geni che codificano per gli enzimi della glicolisi)



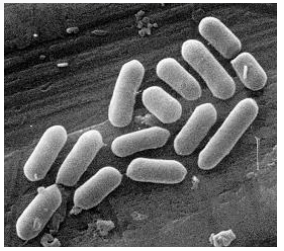
Geni costitutivi codificanti per proteine richieste in grandi quantità, sono trascritti molto **rapidamente**



Geni costitutivi codificanti per proteine richieste in minori quantità, sono trascritti più **lentamente**

- **Geni regolati:** la loro espressione è regolata in modo tale che
  - la **quantità del corrispondente prodotto (proteina o RNA) è controllata in relazione al fabbisogno cellulare** (es. sintesi adattativa di enzimi)

Controllo genico nei Procarioti



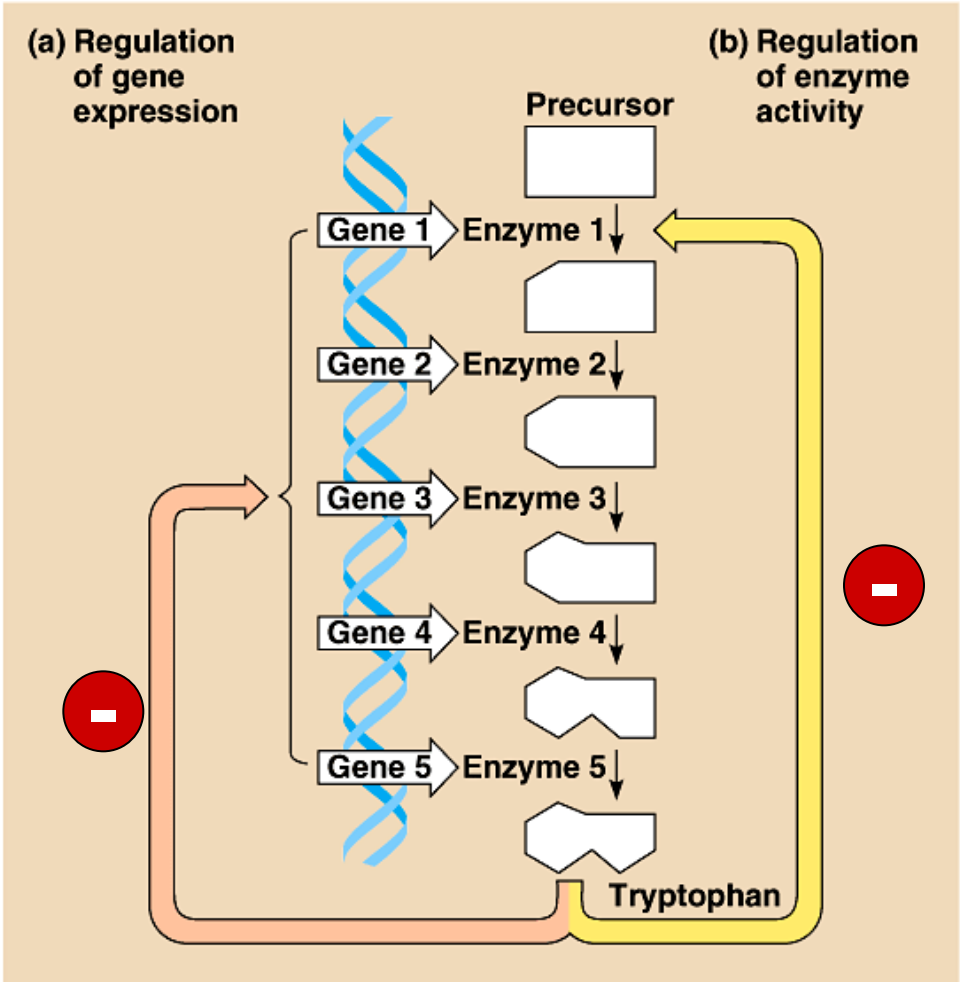
- Selezione naturale ha favorito i batteri che producono solo prodotti genici necessari alla cellula
- Una cellula può regolare la produzione di enzimi tramite inibizione da feedback o tramite regolazione genica
- I batteri necessitano di rispondere rapidamente a variazioni che avvengono nel loro ambiente
- **Trascrizione e traduzione** avvengono simultaneamente esse sono **"accoppiate!"**
- La trascrizione è il processo regolato.
- L'assenza di nucleo rende questo processo molto efficiente!
- L'espressione genica nei batteri è controllata da un meccanismo descritto come modello dell'operone

Procarioti: Controllo del Metabolismo

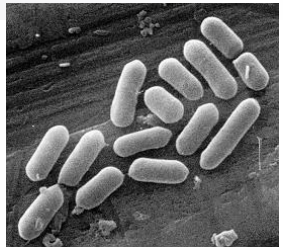
- **Regolazione genica**
  - Invece di bloccare la funzione di enzimi,

    si ha il blocco della trascrizione per tutti i geni implicati nella via biosintetica del triptofano
    - Quindi risparmio di energia evitando lo spreco di essa nella sintesi di proteine non necessarie.





Regolazione genica in batteri



- Le cellule variano l'ammontare di enzimi specifici **regolando la trascrizione genica**
- turn **genes on** or turn **genes off**



turn genes OFF example

Se il batterio ha abbastanza triptofano non è quindi necessaria la sintesi di enzimi implicati nella sintesi di triptofano



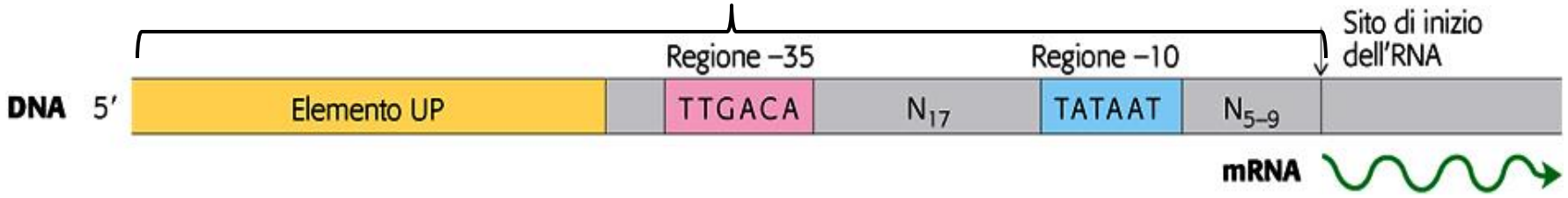
turn genes ON example

Se il batterio incontra nuovi zuccheri (fonte energetica), quali il lattosio, esso necessita di produrre enzimi per digerire il lattosio.

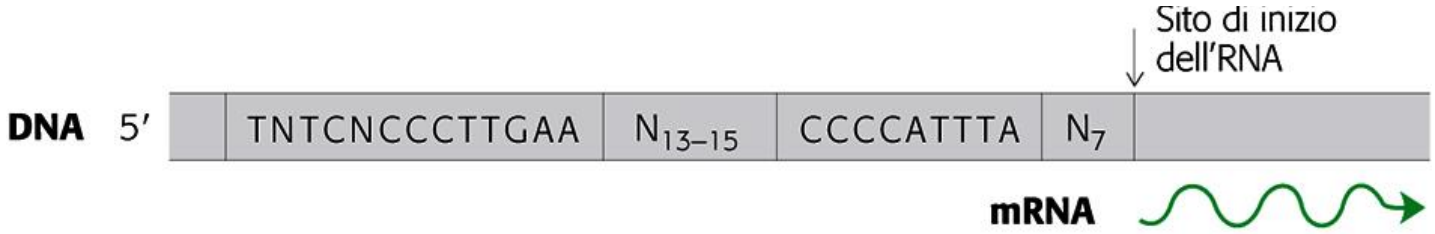
Promotore & Fattori di specificità

- La **regolazione della trascrizione** è **localizzata in una zona a monte del sito di trascrizione** del DNA e prende il nome di "**promotore**".
  Alcuni promotori comprendono, oltre alle sequenze di consenso, l'elemento UP (*upstream promoter*)

Promotore

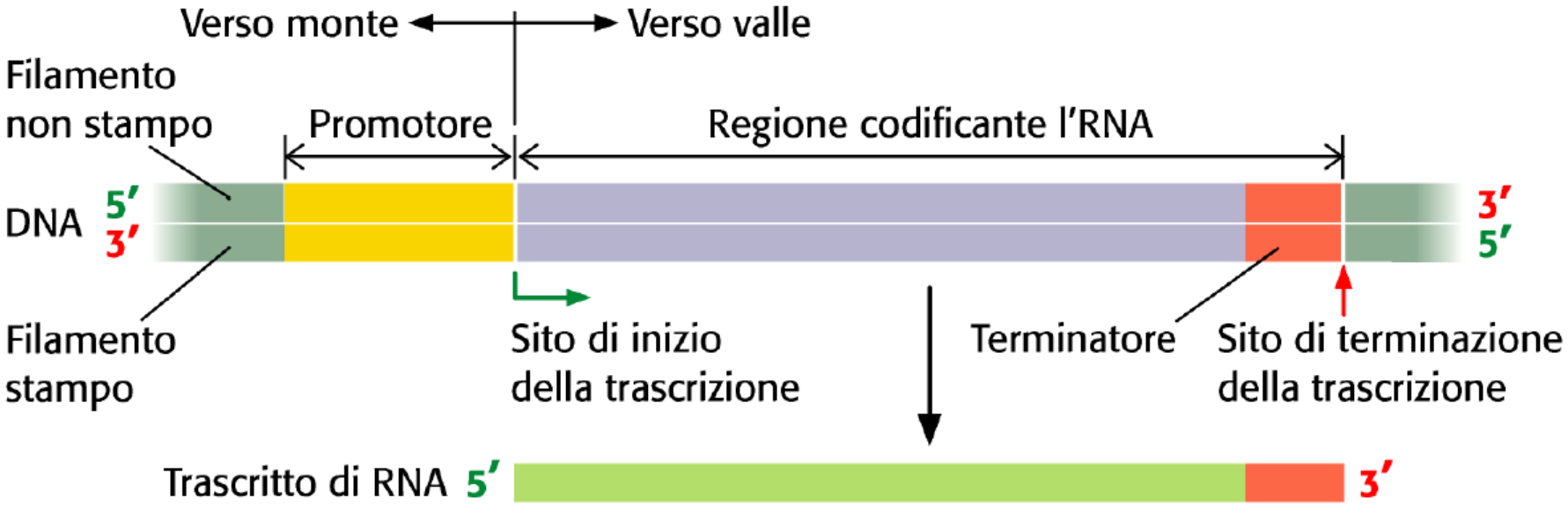


- Un esempio di regolazione dell'espressione genica da fattori di specificità è la risposta allo shock da calore in *E.coli*.
- Quando l'*E.coli* è sottoposto a stress termico e/o ambientale,
- un **fattore di specificità σ^{32}**, presente sulla subunità σ dell'RNA polimerasi, interagisce con un promotore specifico inducendo la sintesi di un gruppo di proteine che permettono l'adattamento allo stress



L' unità di trascrizione

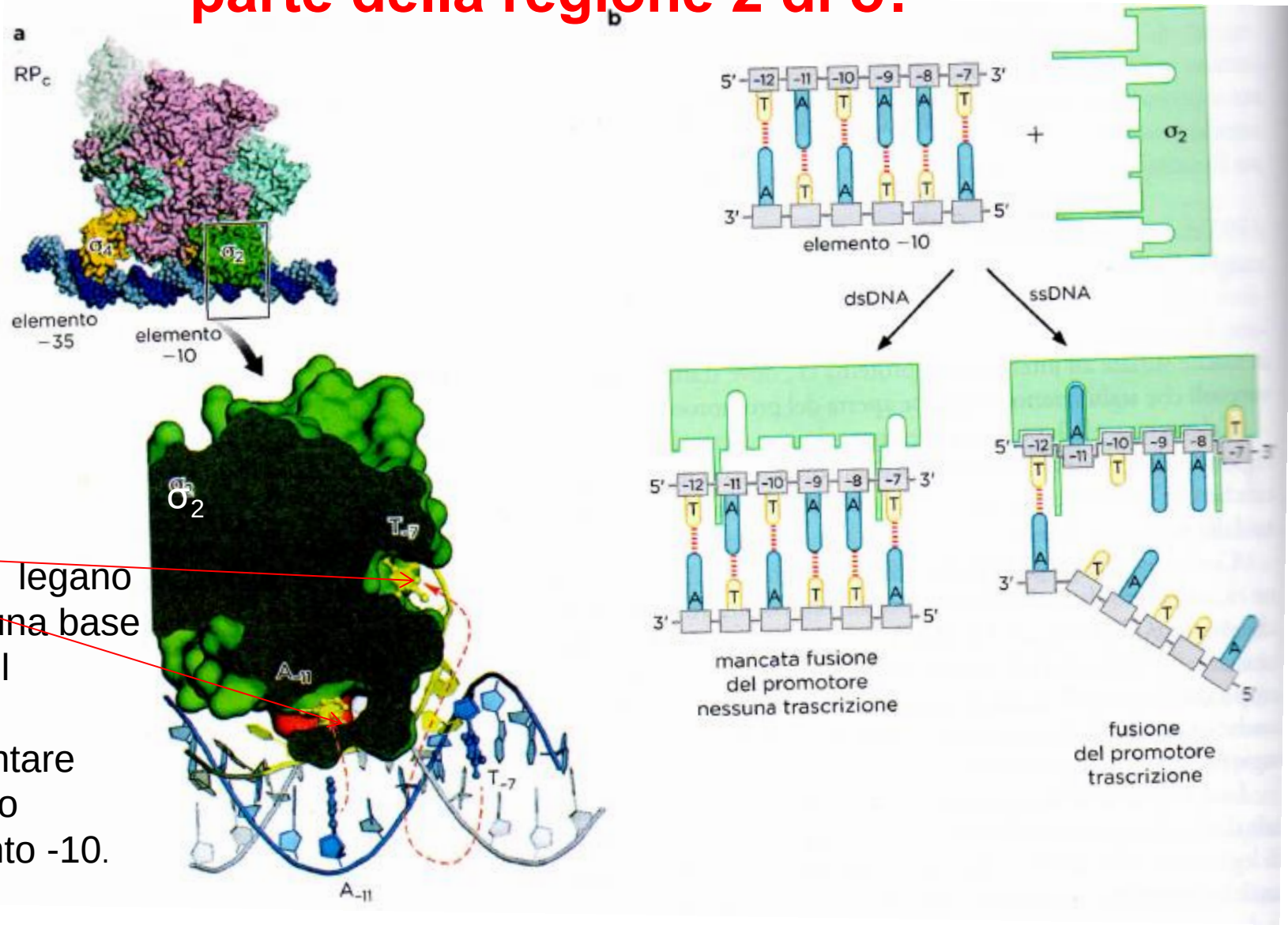
- **Segmento di DNA compreso** tra una sequenza chiamata **promotore e** una sequenza chiamata **terminatore.**
- Codifica per una molecola di RNA.
- Include 3 regioni: **promotore, regione codificante e terminatore**



- Il **promotore è la regione del DNA che segnala**:

1. Quale dei due **filamenti di DNA deve essere trascritto**
2. Qual è il **sito di inizio della trascrizione**

Riconoscimento e fusione dell'elemento -10 da parte della regione 2 di σ.



tasche che legano ciascuna una base ribaltata del filamento complementare allo stampo dell'elemento -10.

Sistemi di regolazione:
inducibile e reprimibile

Sistemi inducibili (negativo) **Sistemi reprimibile (positivo)**

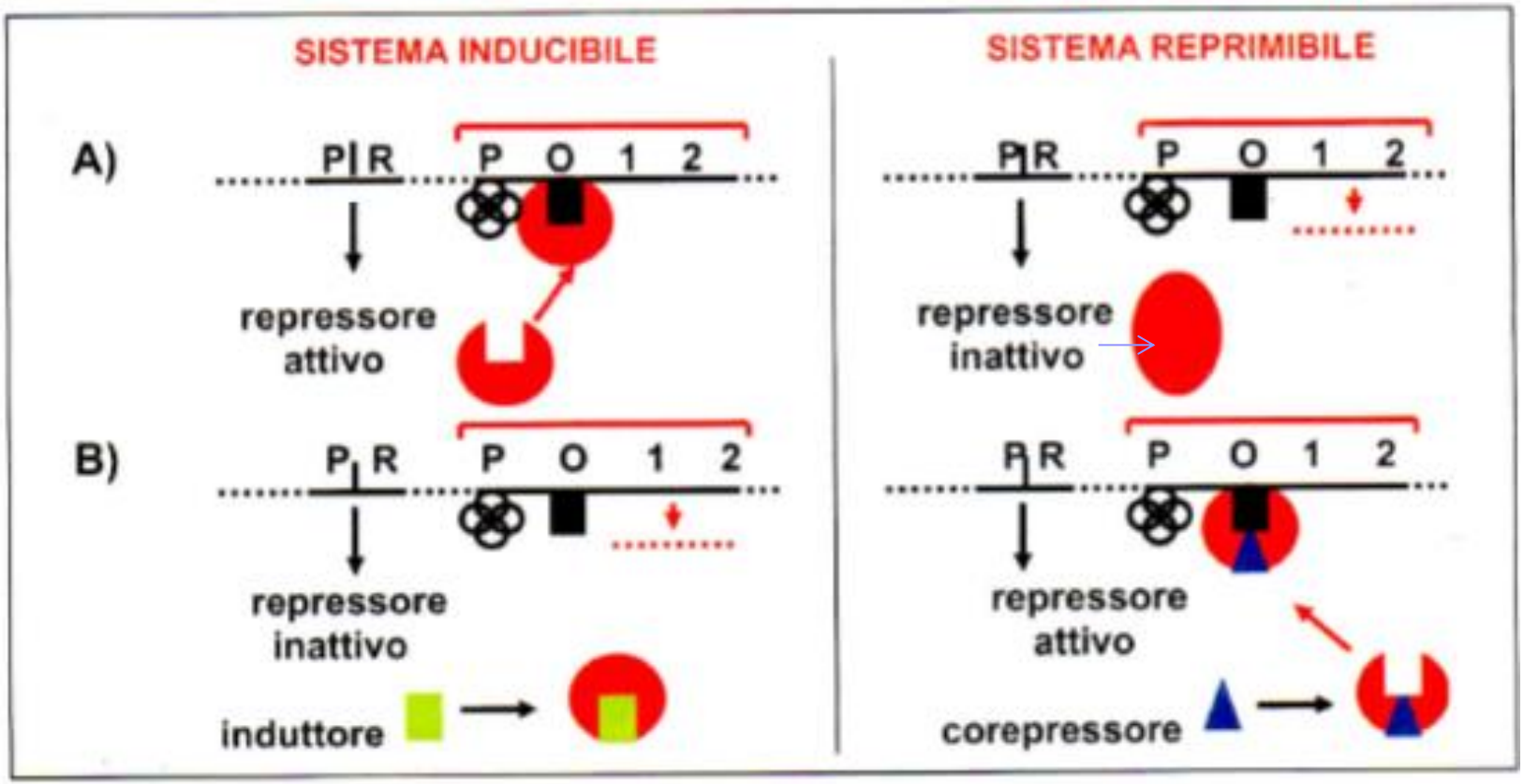


Fig. 13.1 *Sistemi di regolazione inducibile e reprimibile*

P = promotore
R = gene regolatore
O = operatore
1, 2, ... = geni strutturali

RNA polimerasi
= mRNA
Operone

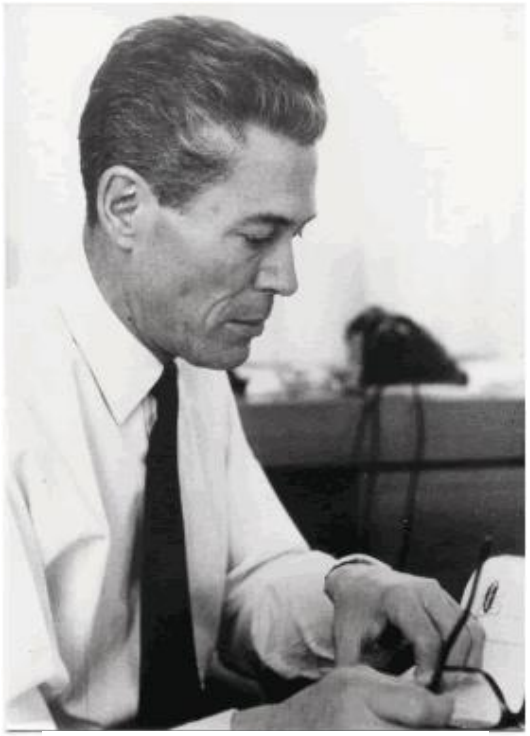
Operoni: Inducibili & reprimibili

- Definito dal tipo di risposta dell'operone a metabolita (piccole molecole)

Tipo di operone	Presenza del metabolita	Effetto su operone	Esempio
Inducibile	**Lattosio**		***Lac* operon**
Reprimibile	**Triptofano**		***Trp* operon**

L’espressione genica nei batteri è controllata da un meccanismo descritto come modello dell’operone

- **Francois Jacob & Jacques Monod** **1961 | 1965**
  - Hanno descrittp per primi il sistema dell’operone l*ac*
  - coniato la frase “operon”



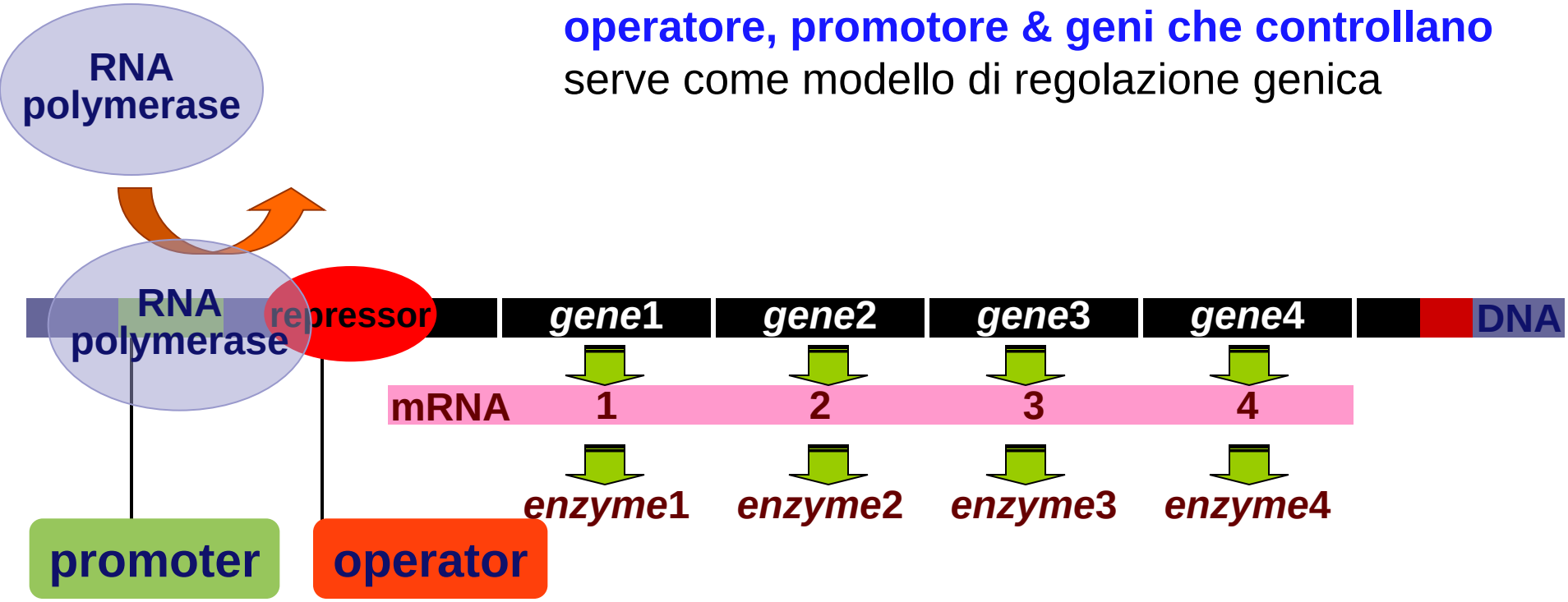
Jacques Monod



Francois Jacob

Modello dell'Operone

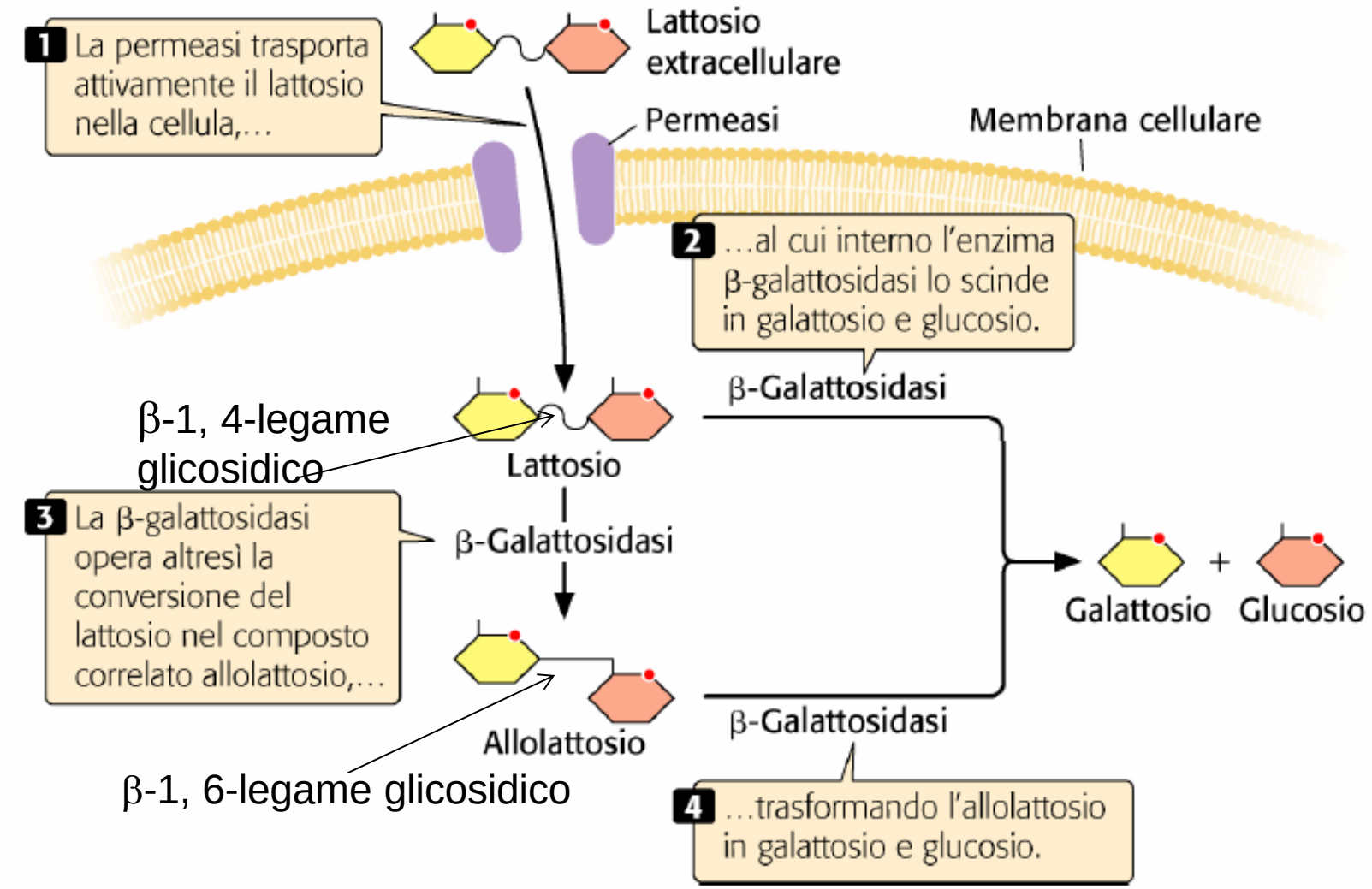
Operone:
operatore, promotore & geni che controllano
serve come modello di regolazione genica



Repressore (proteina): spegne il gene bloccando il sito di legame della RNA polimerase

repressor = repressor protein

Il metabolismo del lattosio



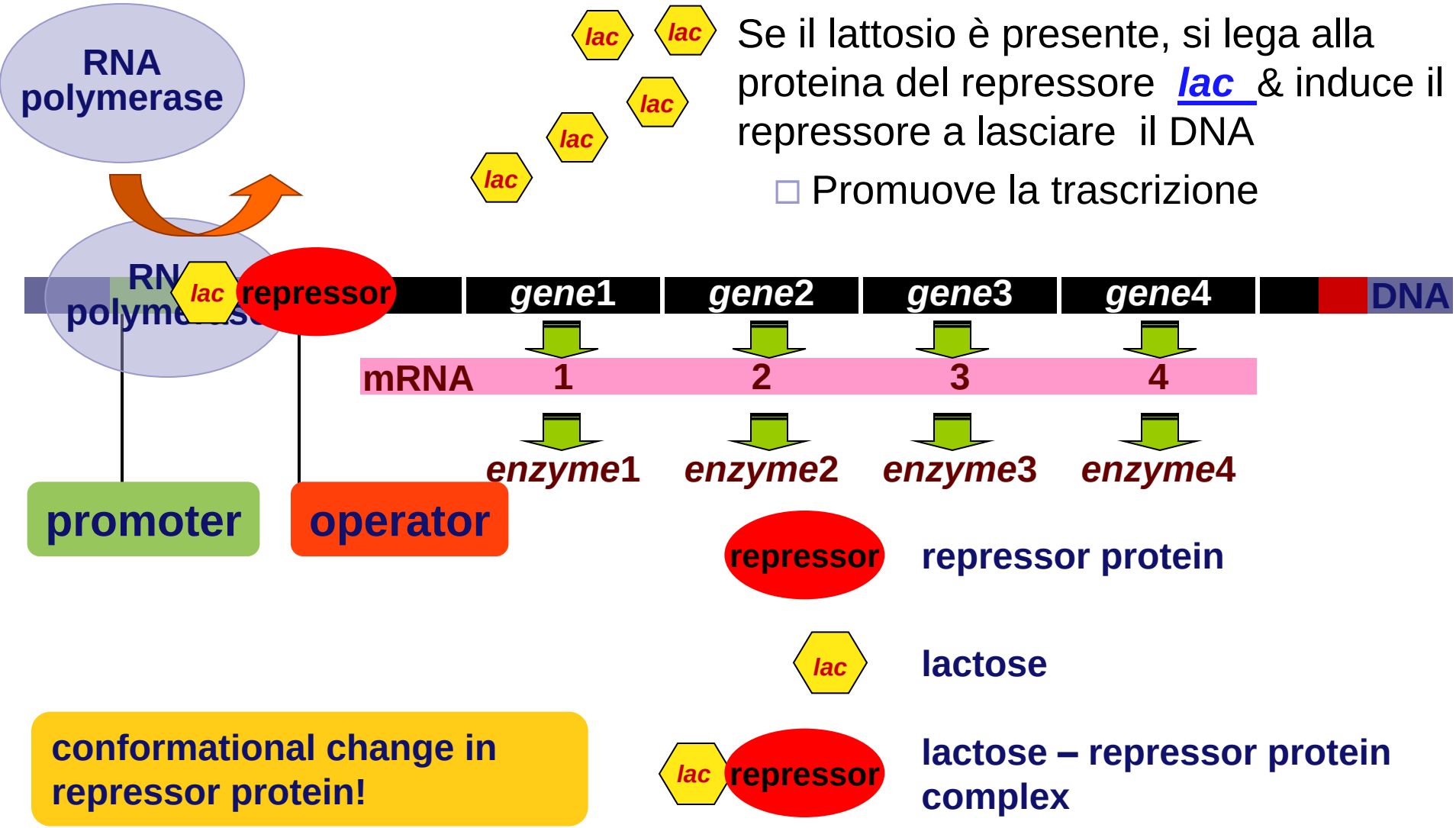
il lattosio è scisso in due monosaccaridi

Operone inducibile: lattosio

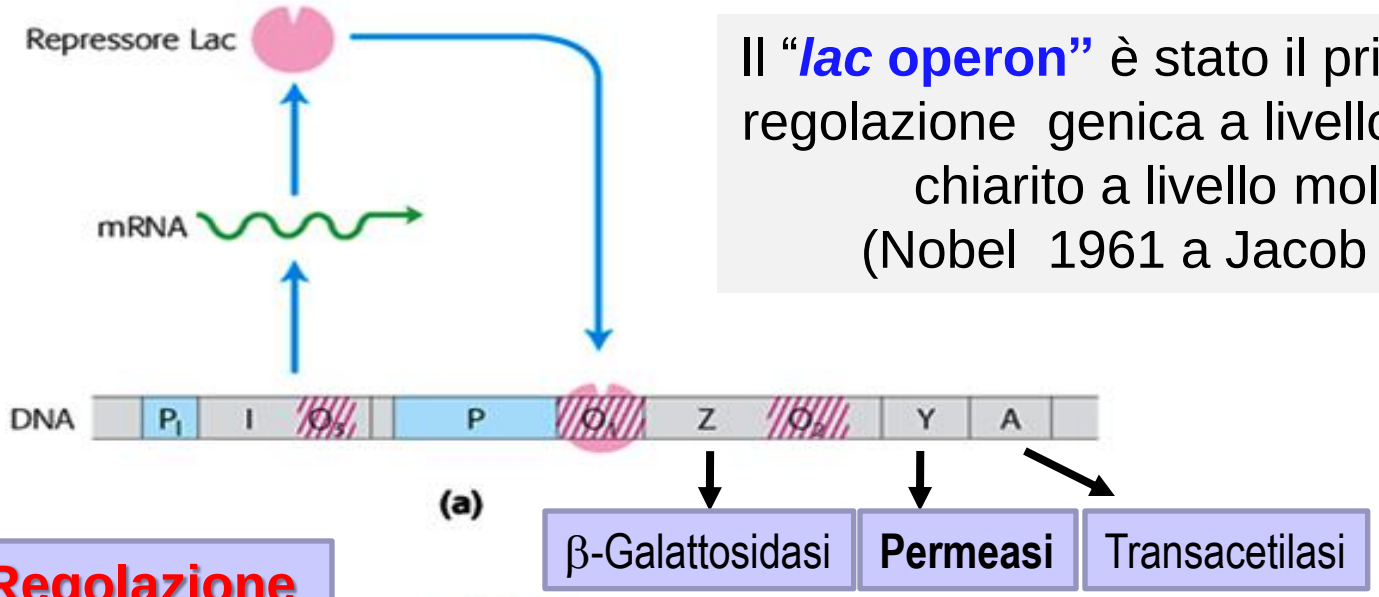
- **Modello della via biosintetica digestiva**

Se il lattosio è presente, si lega alla proteina del repressore ***lac*** & induce il repressore a lasciare il DNA

- Promuove la trascrizione

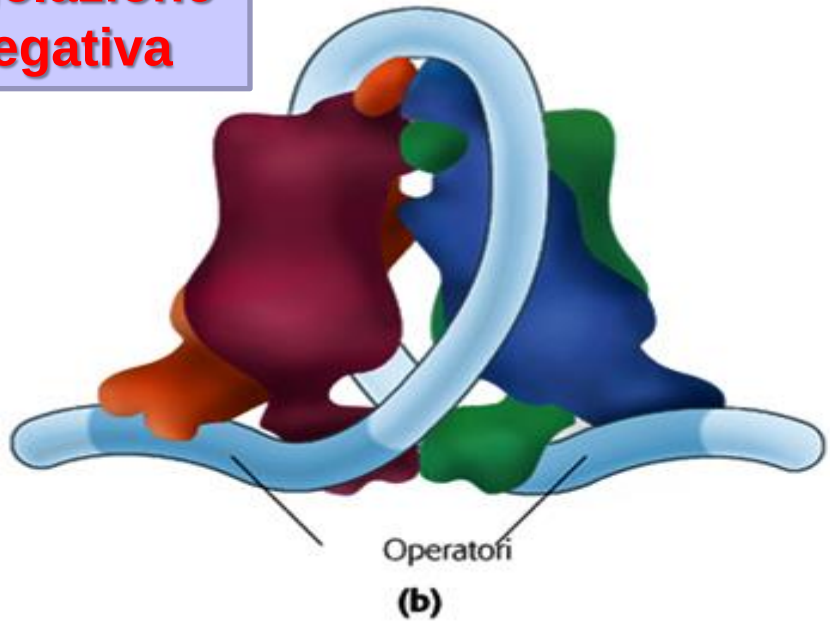


Regolazione dell'operone del lattosio (1)



Il "***lac* operon"** è stato il primo esempio di regolazione genica a livello trascrizionale chiarito a livello molecolare (Nobel 1961 a Jacob e Monod)

Regolazione negativa

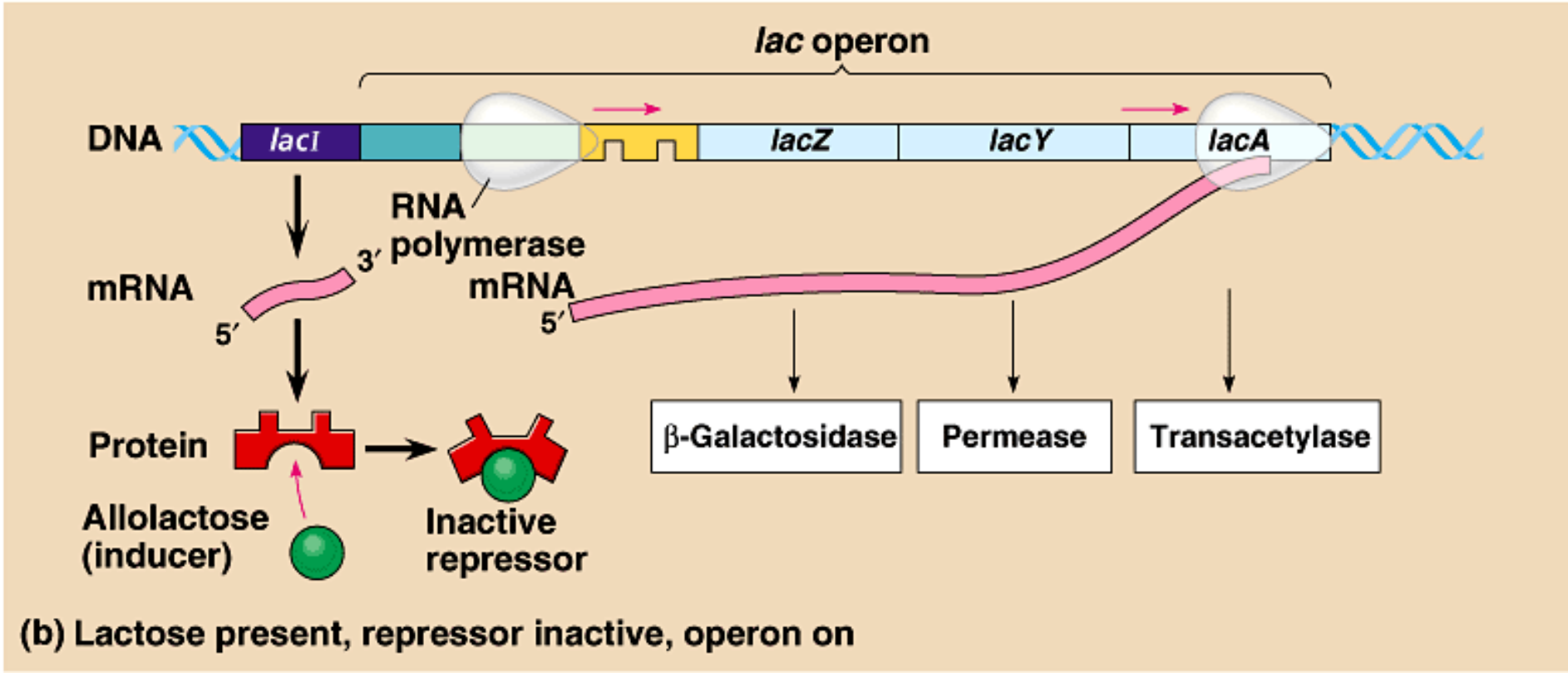


- Il repressore *lac* si lega all'operatore principale (O_1) e ai siti pseudo-operatori (O_2 e O_3),
- Si forma nel DNA un **"cappio"** che si avvolge intorno alla molecola del repressore,
- ciò impedisce all'RNA polimerasi di trascrivere

Operone Lattosio

- **Cosa succede quando il lattosio è presente?**

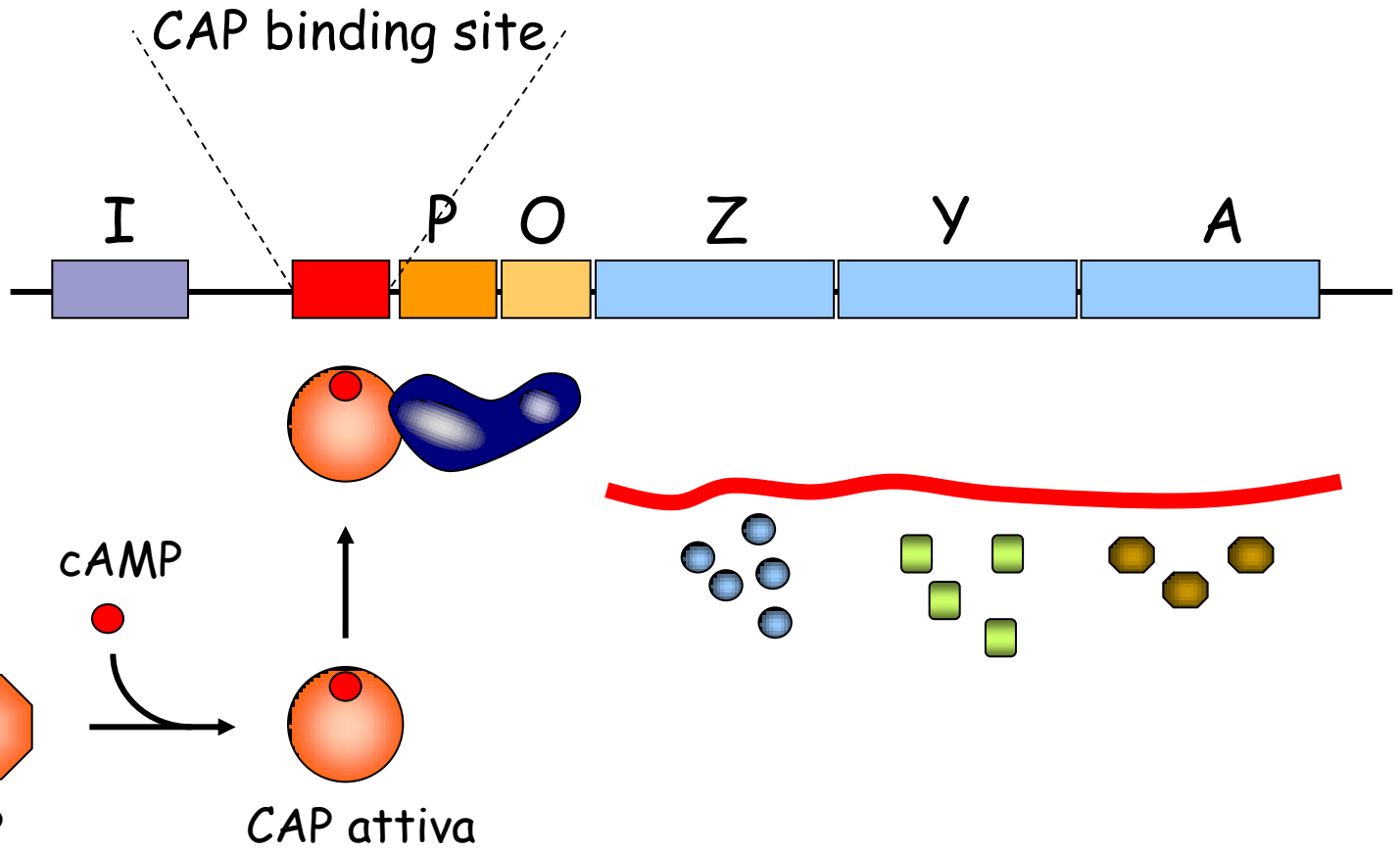
Il batterio ha la necessità di produrre gli enzimi che digeriscono il lattosio



(b) Lactose present, repressor inactive, operon on

- **Il lattosio è regolatore allosterico della proteina che funziona da repressore**

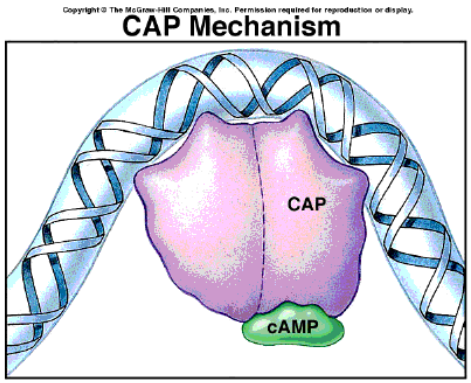
REGOLAZIONE POSITIVA dell'operone lac da CAP

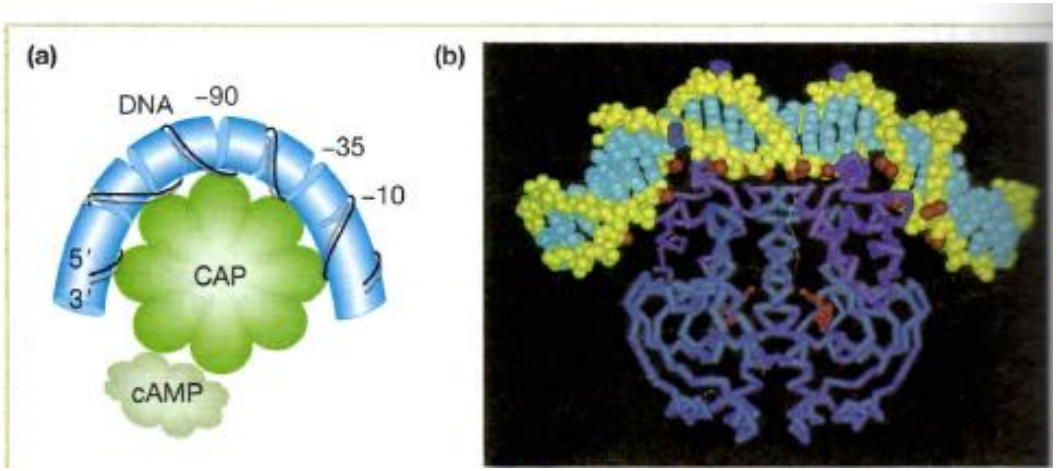


: (**proteina attivatore da catabolici**)

- Ognuno degli operoni che CAP (**proteina attivatore da catabolici**) **controlla** è anche sotto il controllo di una proteina regolatrice specifica

La proteina CAP "sforza" l'elica, ripiegandola. In tal modo favorisce l'inizio della trascrizione a partire dal vicino promotore





(a) Quando **CAP** (Proteina Attivatore da Cataboliti) si lega al promotore, provoca una curvatura nel DNA che forma un angolo maggiore di 90°.
(b) Immagine costruita via analisi della struttura del complesso CAP-DNA.

Cap aumenta la forza del promotore

REGOLAZIONE POSITIVA dell'operone *lac* da CAP

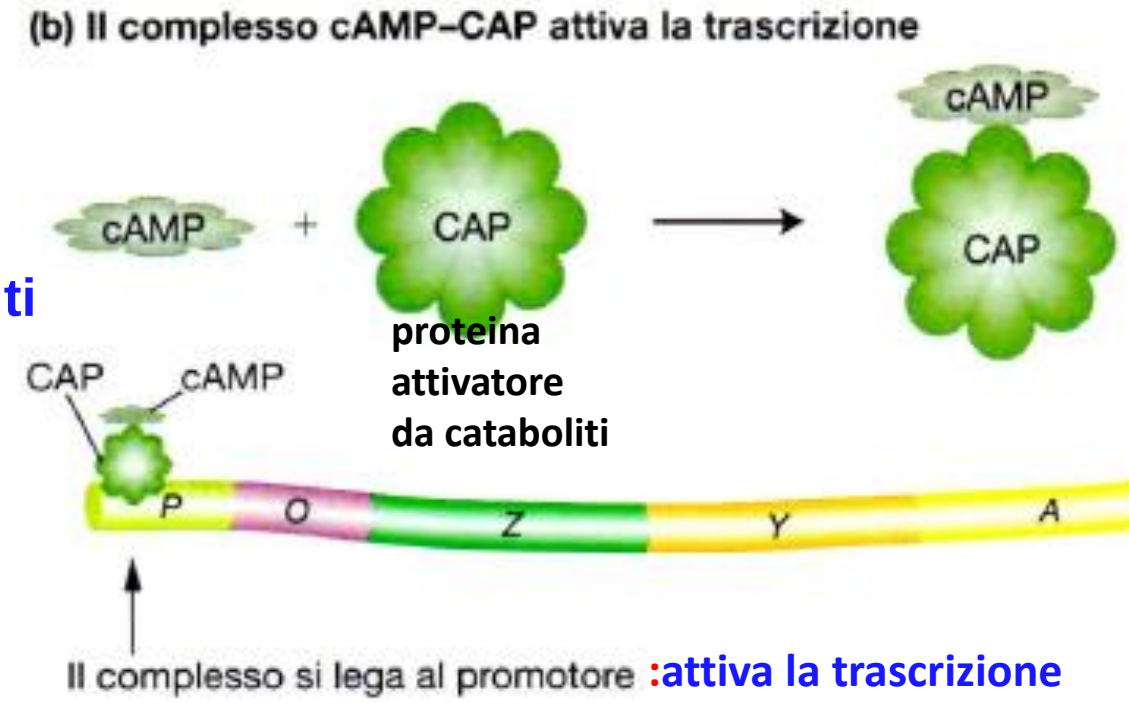
➢ I **livelli di glucosio control-lano l'operone *lac*.**

Repressione da catabolita dell'operone *lac*.

(a) Il **cAMP (**adenosin monofosfato ciclico) viene **prodotto solo a basse concentrazioni di glucosio**.



(b) Quando è presente, **il cAMP forma** un complesso con la proteina **CAP (proteina attivatore da cataboliti** che, legandosi a una regione all'interno del promotore *lac*, **attiva la trascrizione.**



CAP: proteina attivatore da cataboliti

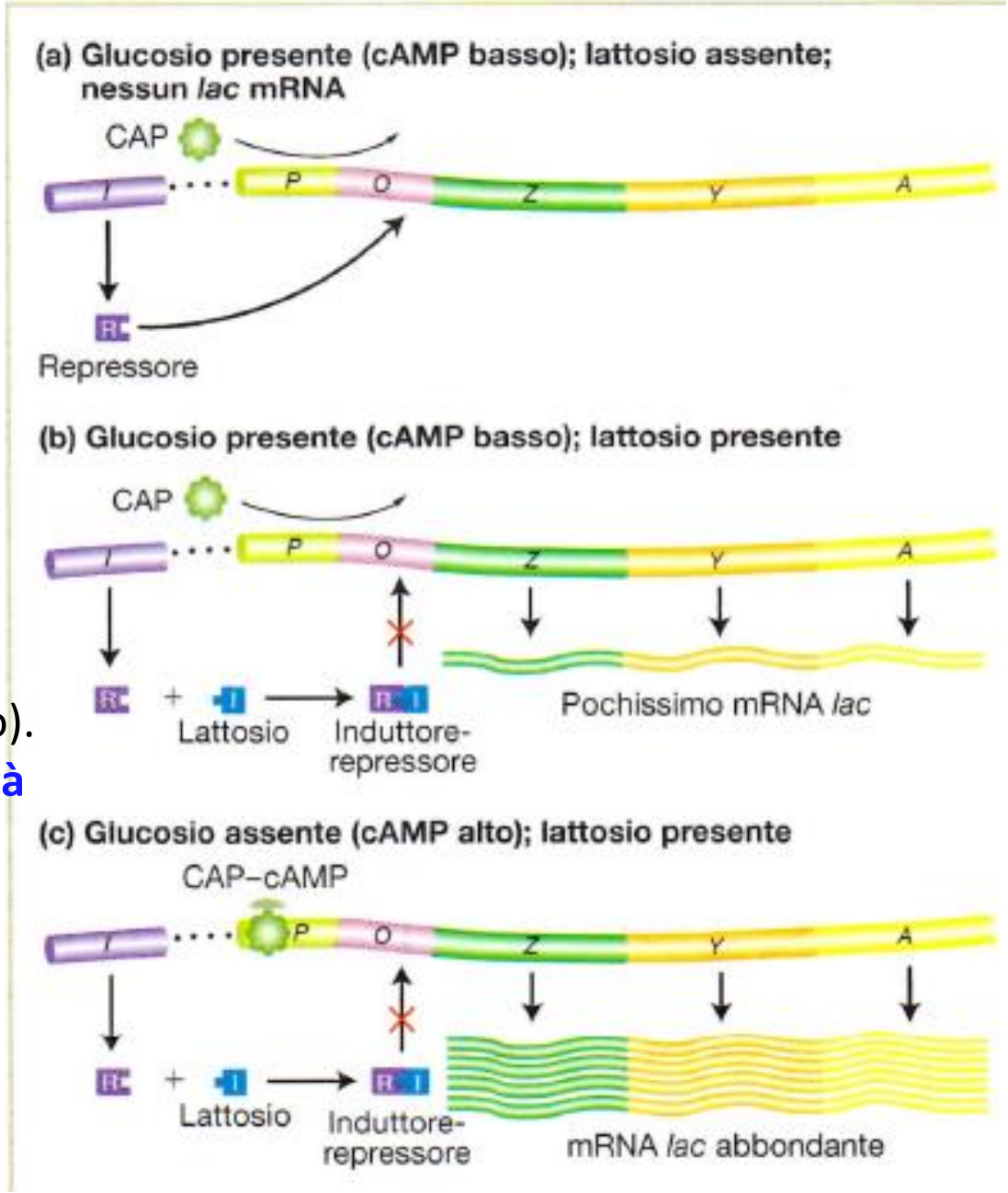
Quadro riassuntivo dell'operone *lac*

Controllo positivo e negativo operone *lac.*

-L'operone lac è controllato

- **dal repressore Lac** (attraverso un controllo negativo)
- **O dalla proteina attivatore** dei cataboliti (CAP) (controllo positivo).

- Vengono **prodotte grosse quantità di mRNA quando è presente il lattosio, che inattiva il repressore;**
- **bassi livelli di glucosio promuovono la formazione del complesso CAP-cAMP**,
  - questo **regola positivamente la trascrizione.**



Summary of *lac* operon

Glucose	cAMP	Lactose	Expression of *lac* operon
+	↓	-	No mRNA
+	↓	+	Slow mRNA synthesis
-	↑	-	No mRNA
-	↑	+	Rapid mRNA synthesis

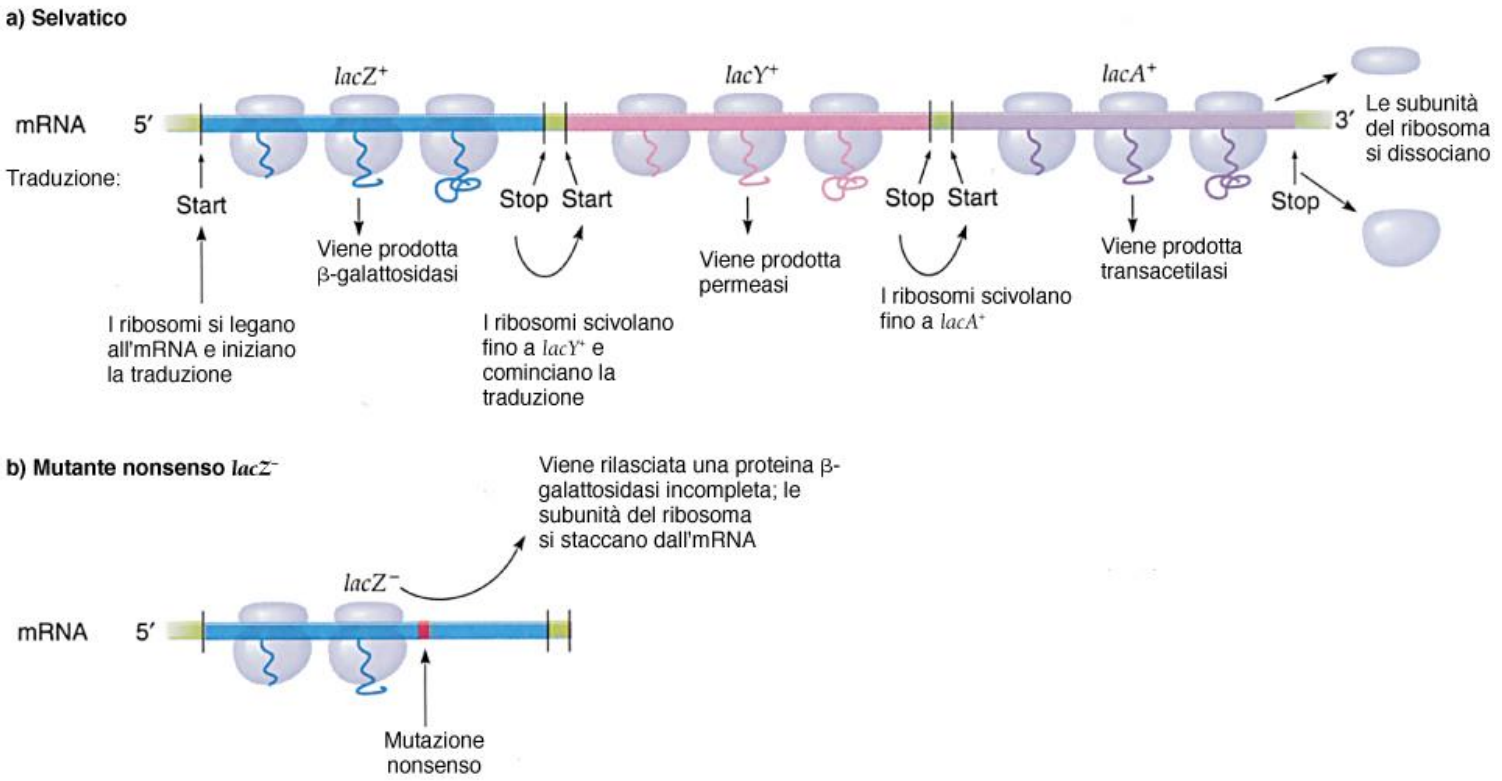
- **Negative regulation: *lac* repressor**
- **Positive regulation: CAP-cAMP**
- **↑glucose →↓cAMP**

Mutazioni polari

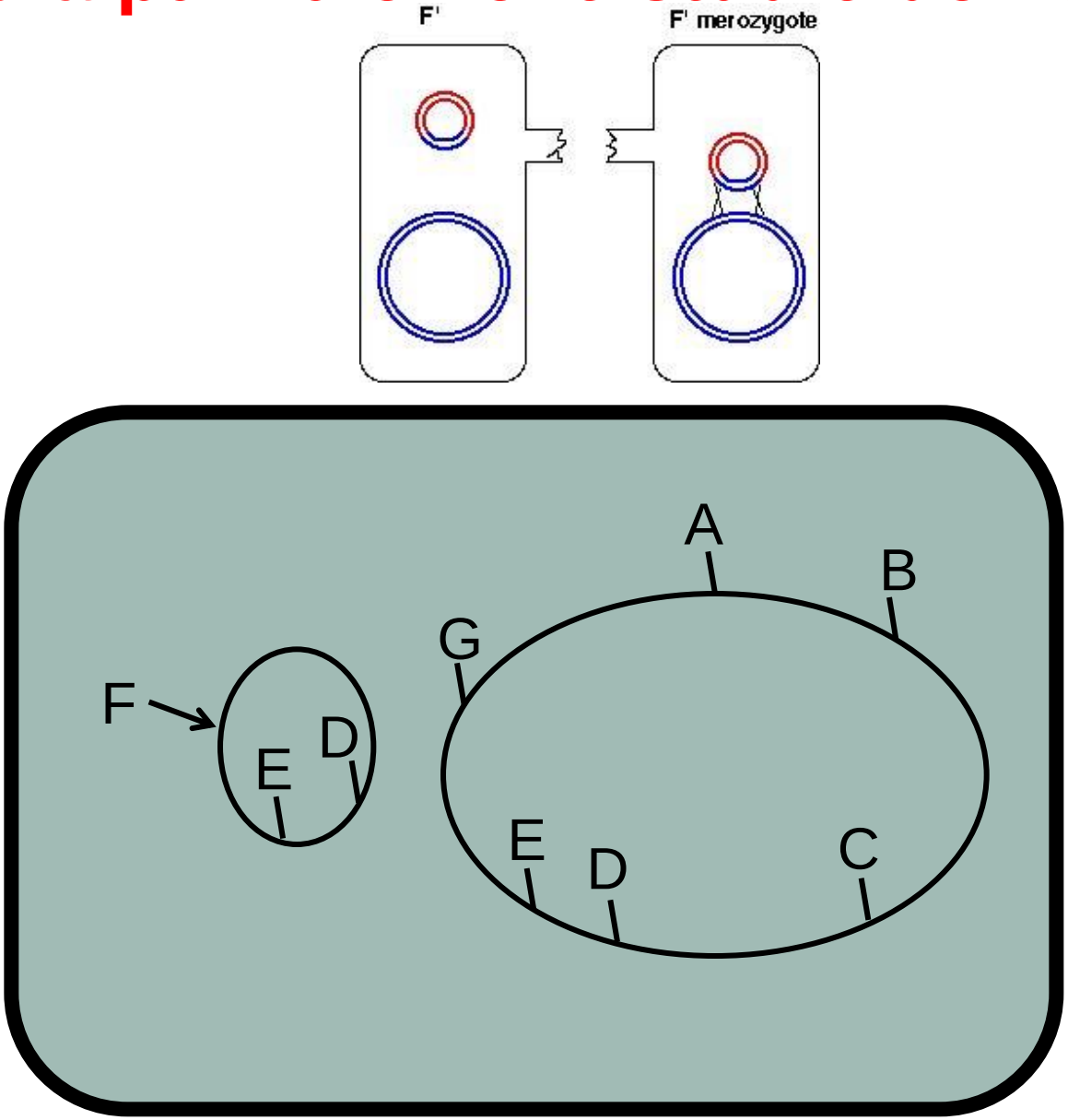
- **Mutazione in Z:** galattosidasi alterata, né permeasi né transacetilasi
- **Mutazione in Y:** permeasi alterata, manca la transacetilasi
- **Mutazione in A:** transacetilasi alterata

Figura 16.3

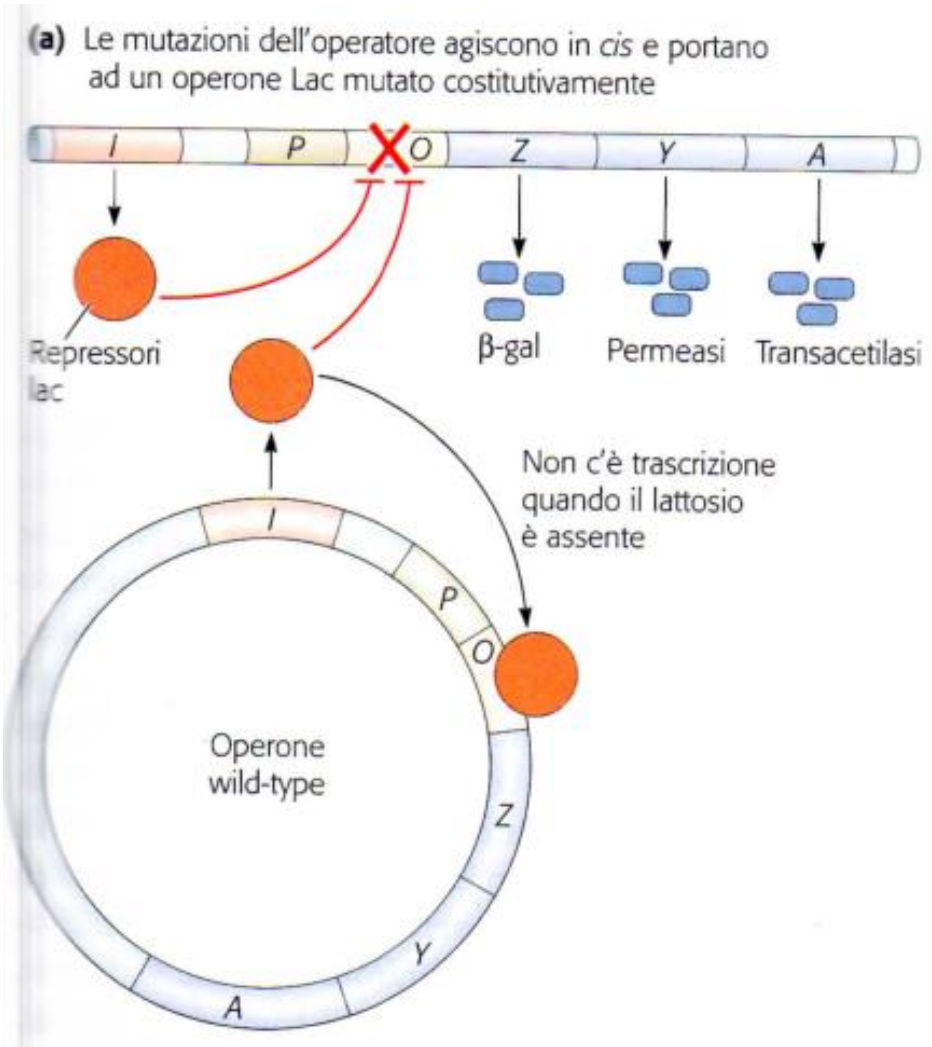
Traduzione dell'mRNA policistronico dei geni per l'utilizzazione del lattosio in (a) *E. coli* selvatico e (b) in un ceppo con una mutazione nonsenso nel gene per la β–galattosidasi (*lacZ*).

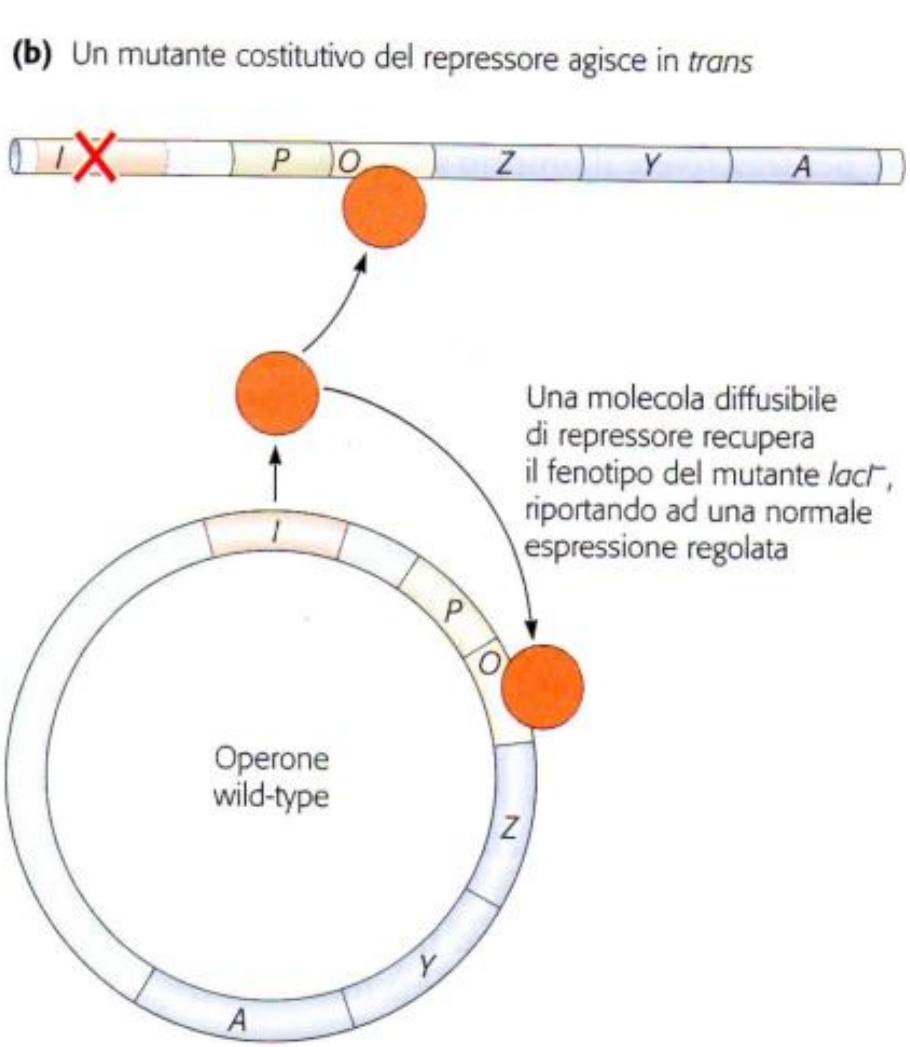


Diploidia parziale nello studio dell'operone

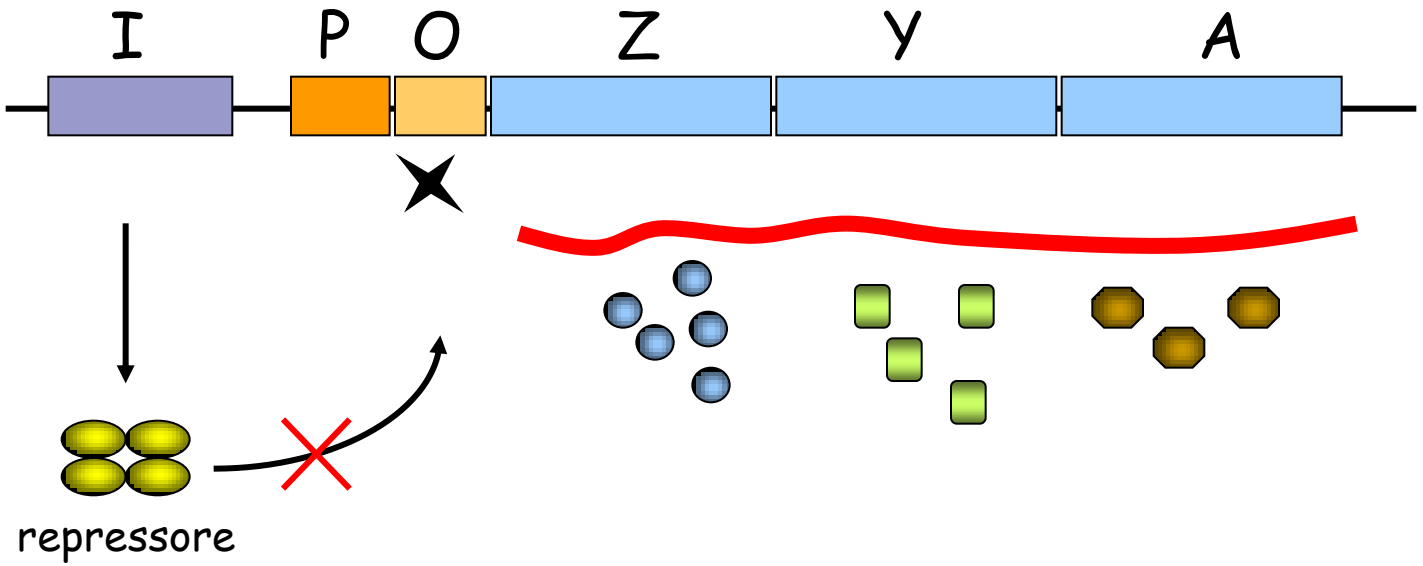


Le mutazioni possono essere classificate come agenti in *cis* o in *trans.*





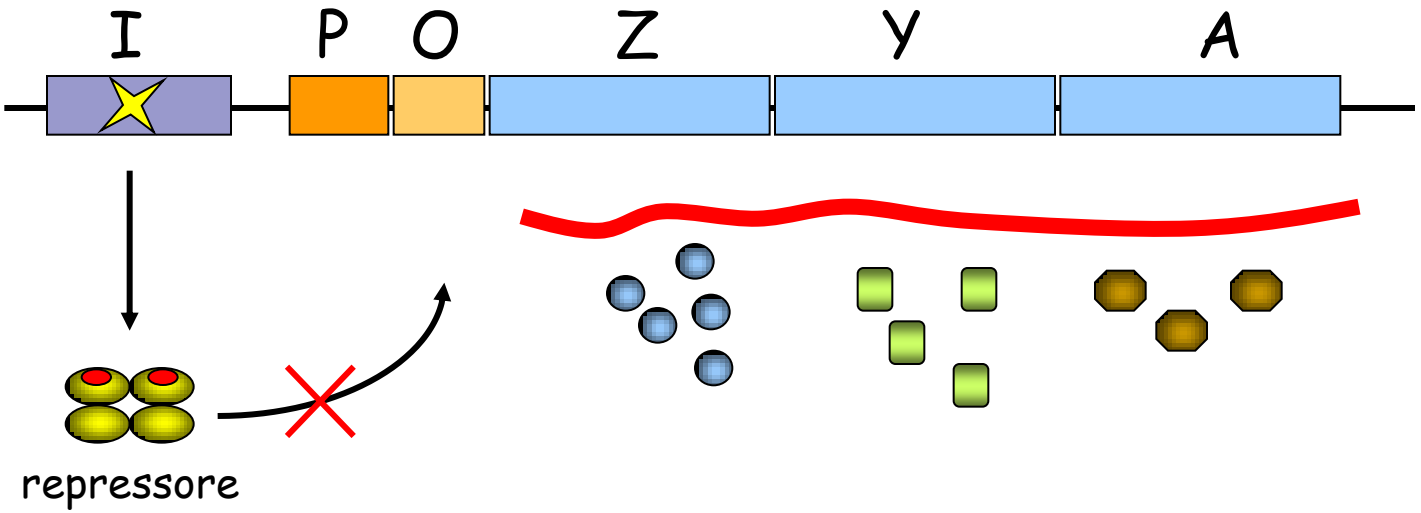
Mutazioni a carico dell'operatore



- **Mutazioni nel gene O (O^c) portano all'espressione costitutiva dei geni strutturali: vengono trascritti in assenza dell'induttore**

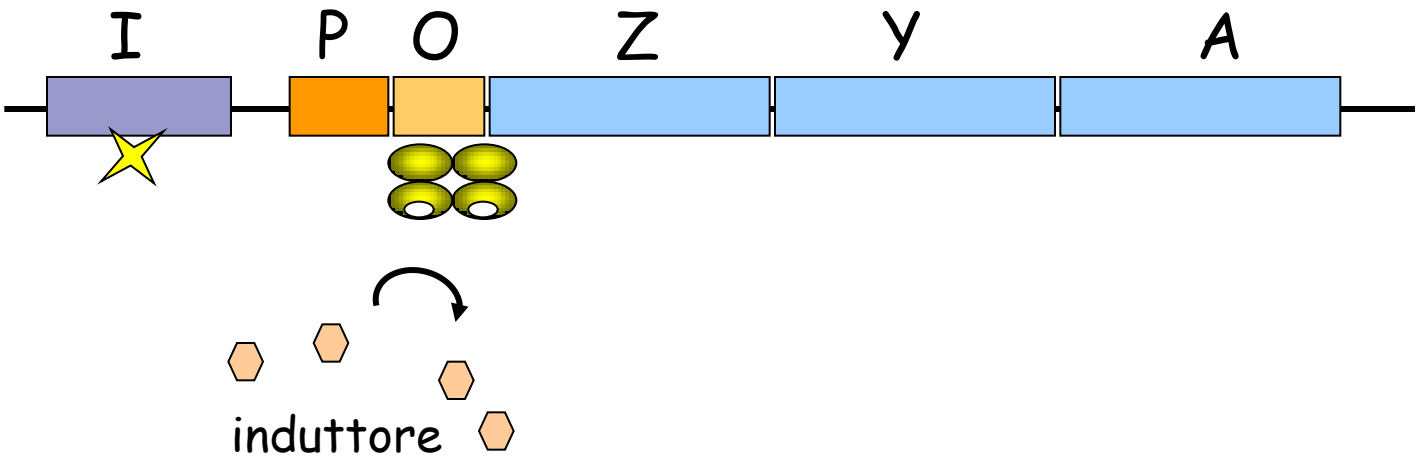
  Costitutivi sono gli enzimi il cui livello è costante in tutte le condizioni di crescita

Mutazioni a carico del repressore



- Mutazioni nel gene *I* (***I^c***), a carico del sito di riconoscimento dell'operatore, portano **all'espressione costitutiva** dei geni strutturali

Mutazioni a carico del repressore

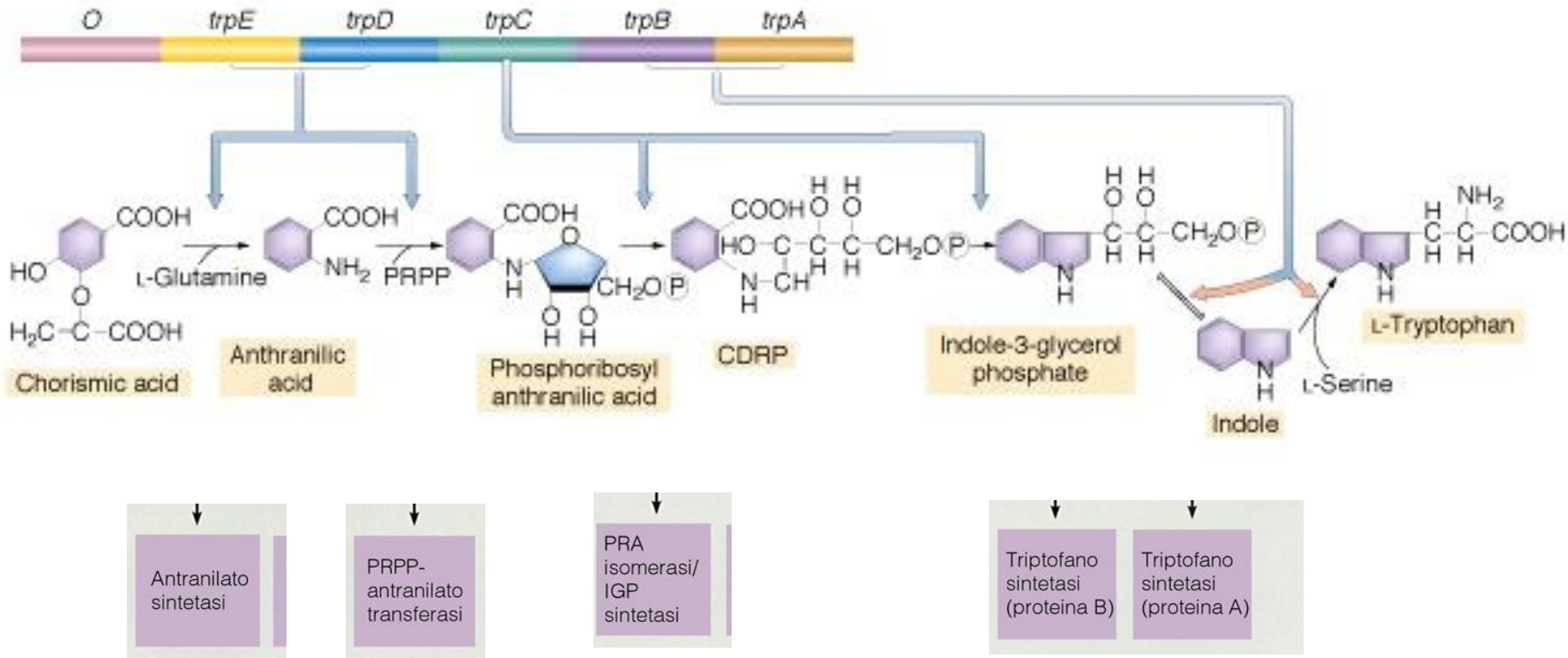


- Mutazioni nel gene I (I^S), a carico del sito di riconoscimento dell'induttore, sono responsabili della **super-repressione:**
- i geni strutturali non vengono più indotti in presenza dell'induttore

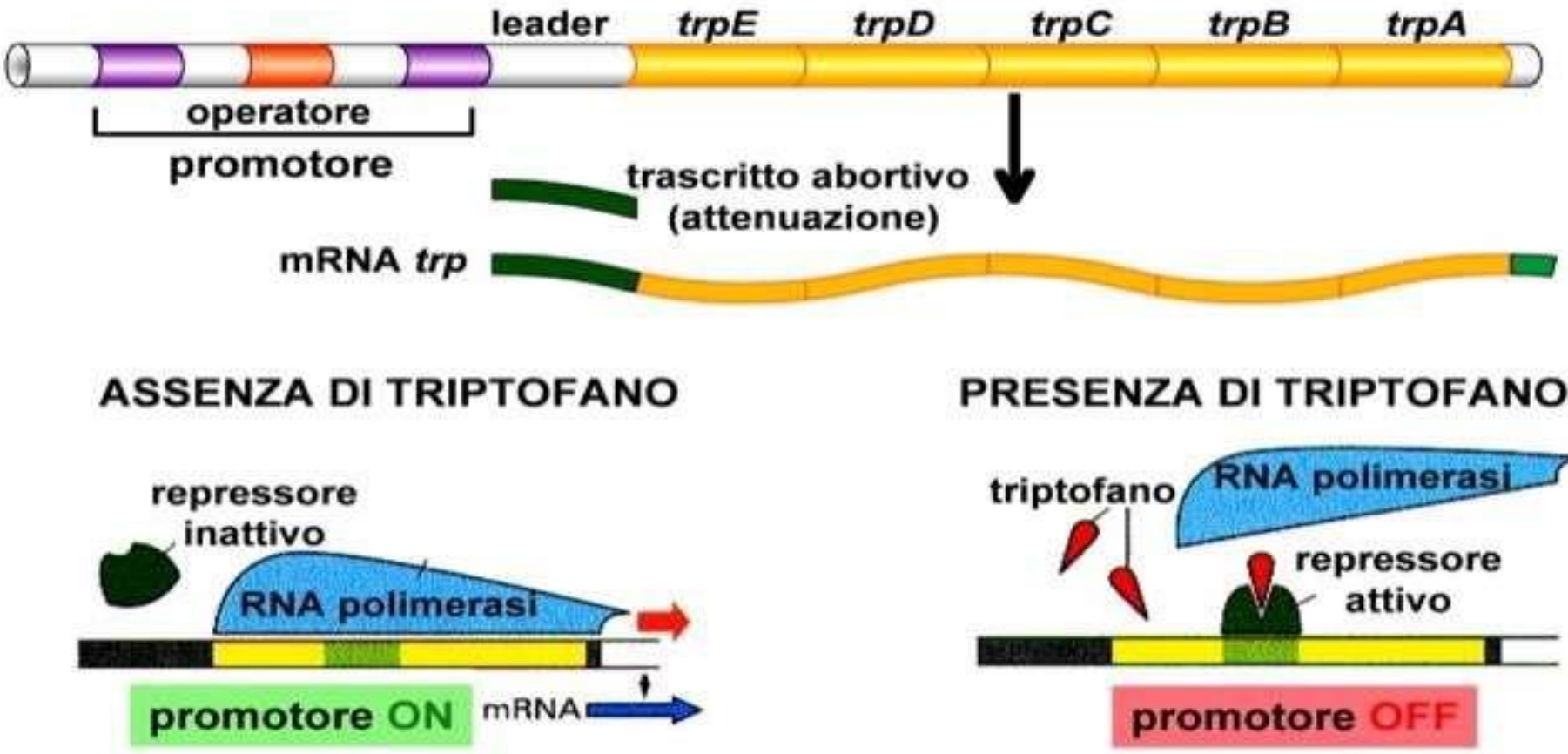
- **Nei mutanti I^S non si esprimono i geni per il lattosio, né in presenza né in assenza di lattosio**

Biosintesi degli amminoacidi in *E. coli*

- Quando un amminoacido **non è presente sul terreno**, *E. coli* **attiva i geni per la sua biosintesi**;
- quando l'aa è **presente sul terreno**, *E. coli* **disattiva i geni per la** sua biosintesi

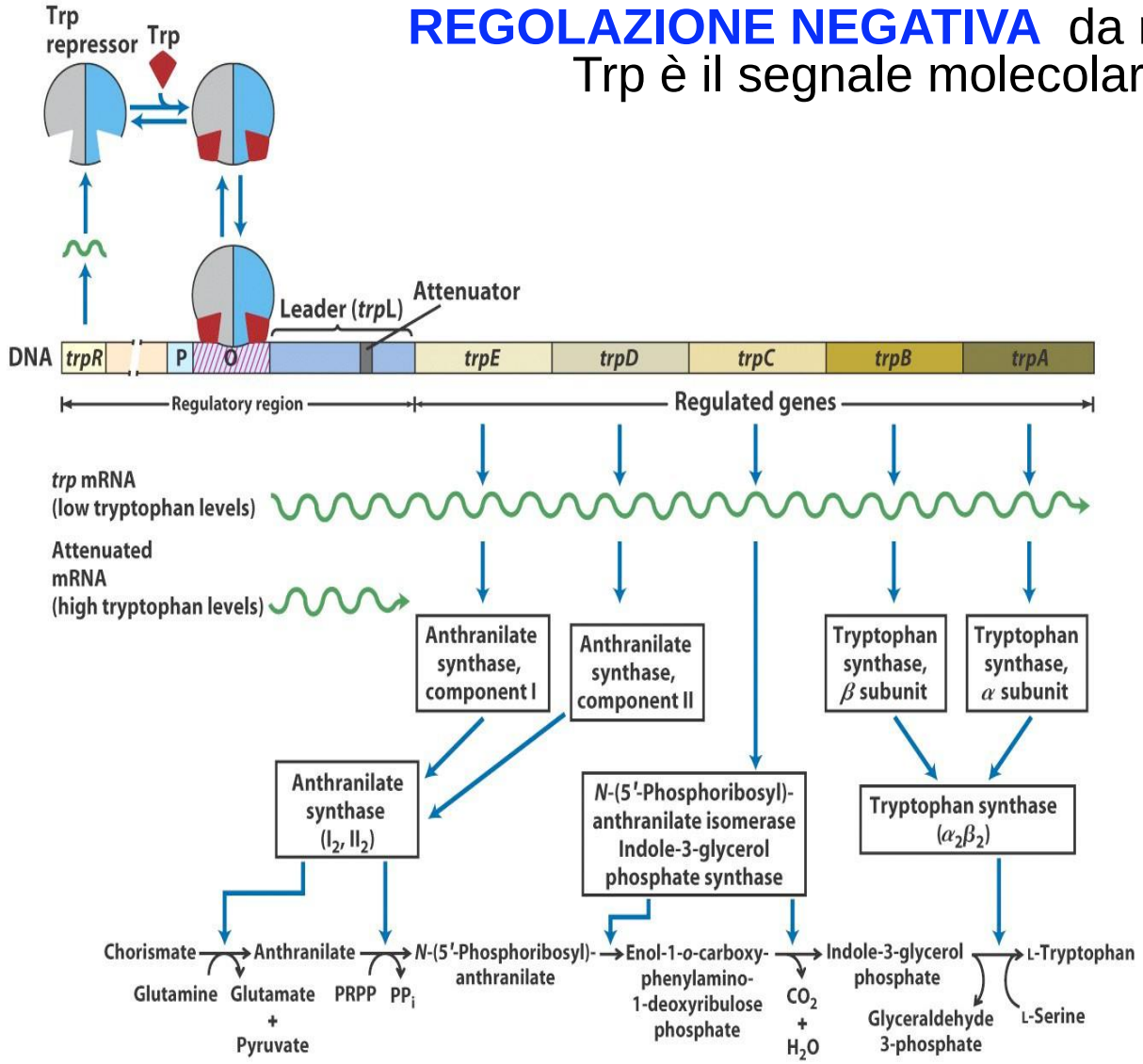


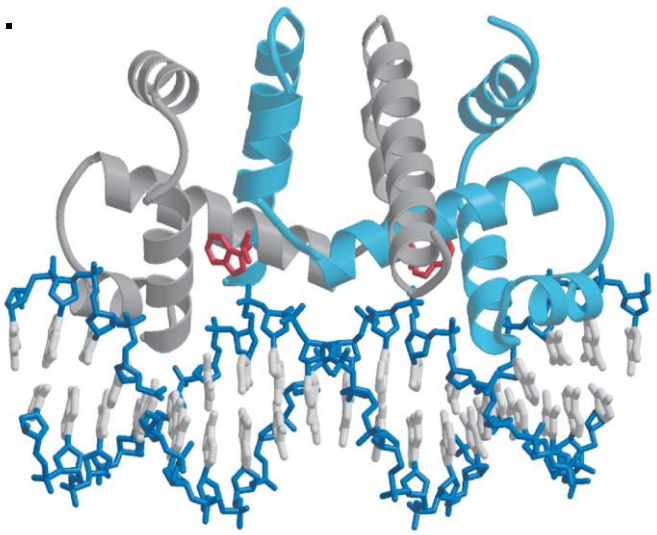
Operone del triptofano



L'operone Trp è sottoposto a 2 sistemi di regolazione:

- Per alte concentrazioni intracellulari di Trp:
  REGOLAZIONE NEGATIVA da repressore.
  Trp è il segnale molecolare.



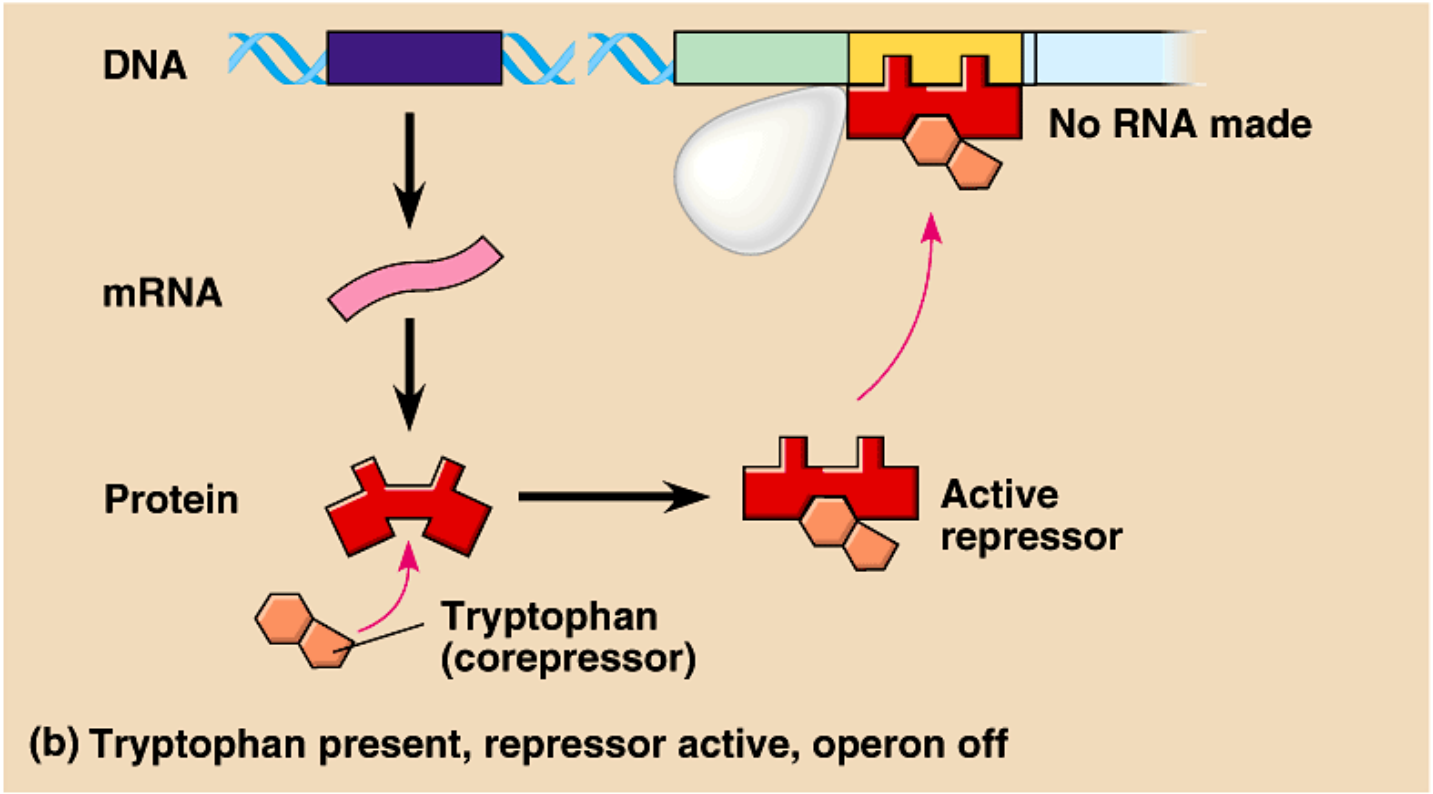


- Il **repressore è un omodimero** (2 subunità di 107 aa)
- **Questo sistema on/off risponde alle variazioni di** [Trp]
- aumenta o diminuisce la velocità di sintesi degli enzimi di circa 700 volte

Tryptophan operon

- **Cosa succede quando il triptofano è presente?**

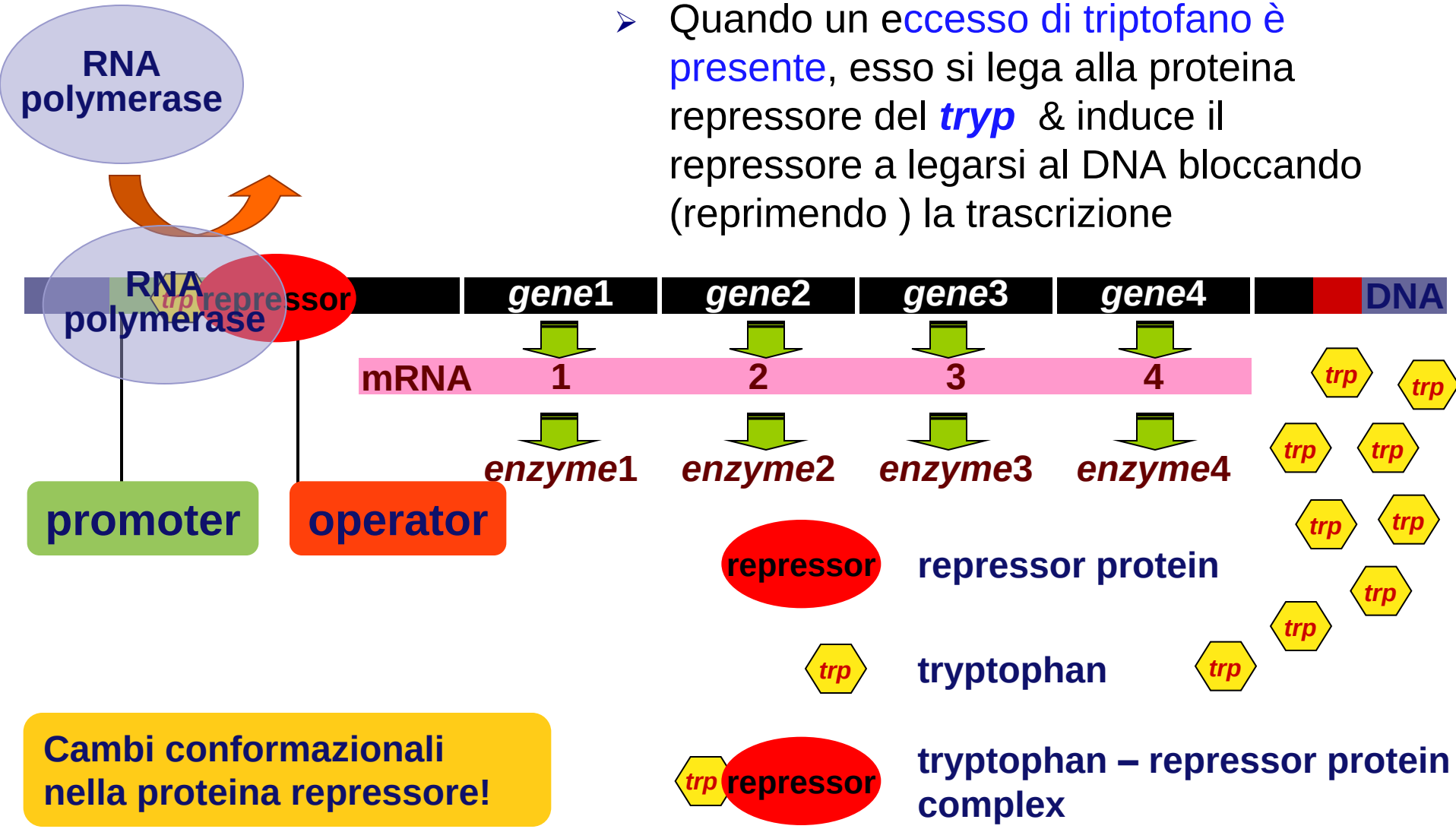
  Non è necessario fare enzimi che producono triptofano



Triptofano è un regolatore allosterico della proteina repressore

Repressible operon: tryptophan

- **Modello percorso di sintesi**
  - Quando un eccesso di triptofano è presente, esso si lega alla proteina repressore del ***tryp*** & induce il repressore a legarsi al DNA bloccando (reprimendo) la trascrizione



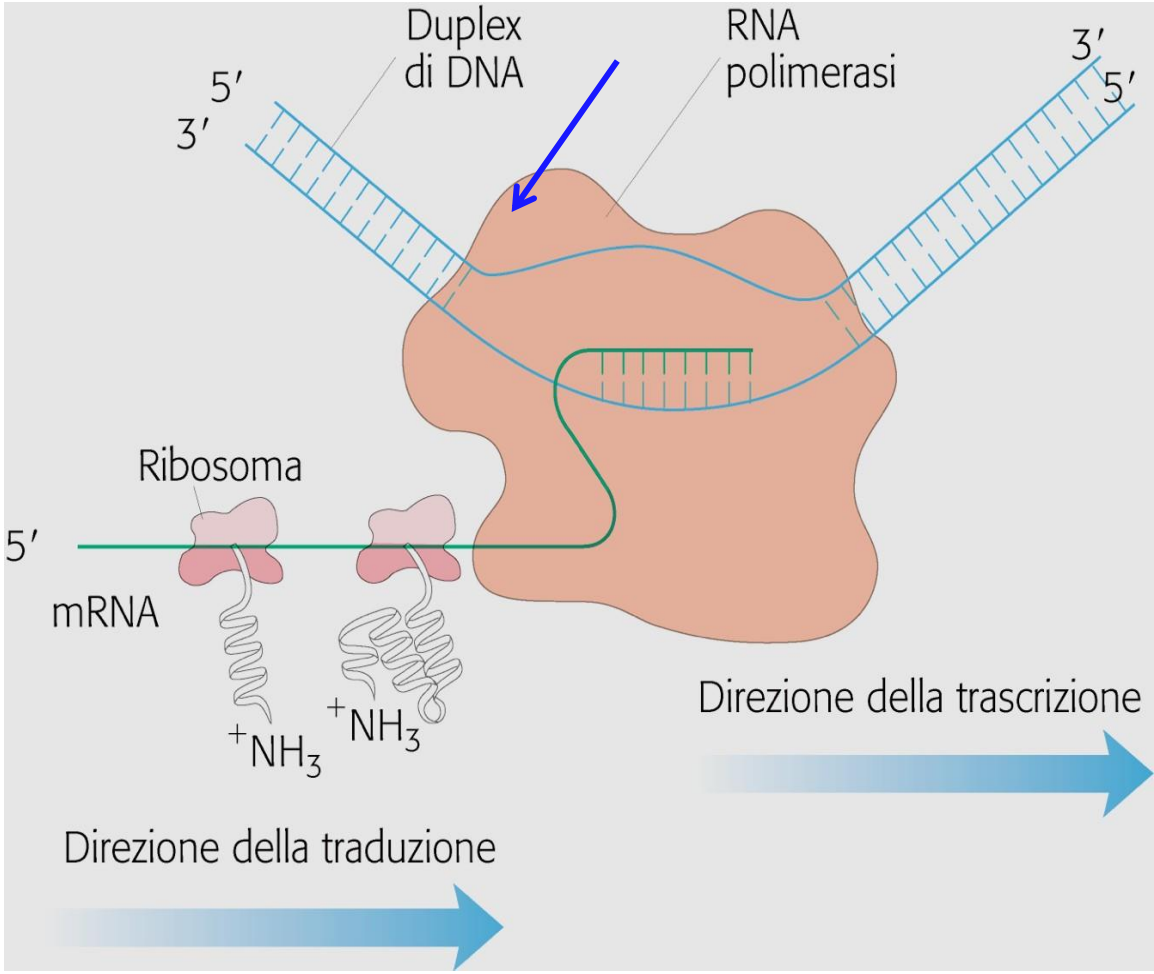
Cambi conformazionali nella proteina repressore!

ATTENUAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

- **Quando la repressione è rimossa e la trascrizione riprende, la velocità del processo viene finemente regolata da un secondo meccanismo di regolazione detto**

ATTENUAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

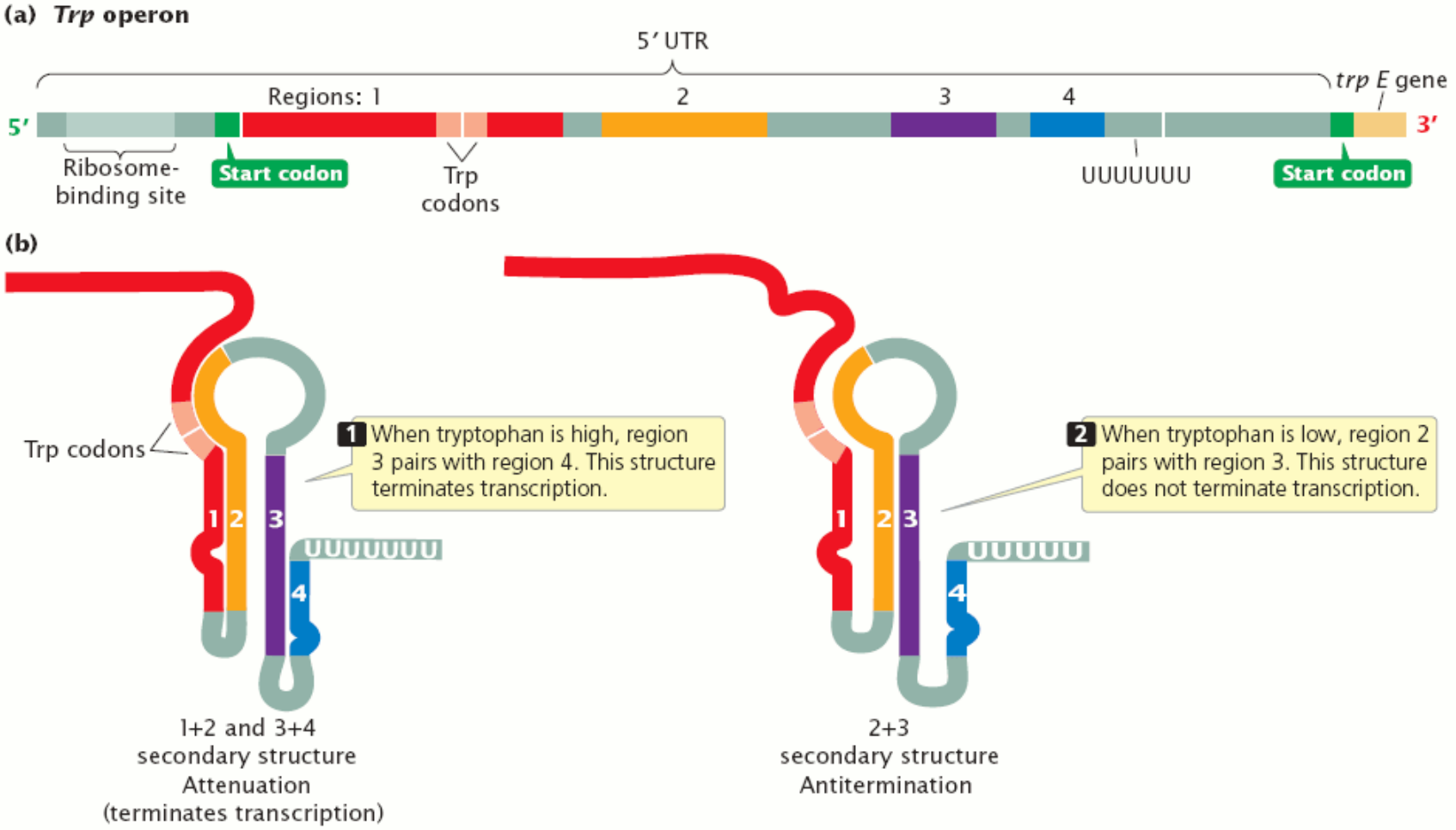
- La frequenza di trascrizione dipende da:
  - **[Trp]**
  - stretto **ACCOPPIAMENTO tra trascrizione e traduzione**
- Questo è tipico dei sistemi procariotici



Attenuation mechanism

➢ Meccanismo per il controllo della sintesi del triptofano

- **Sequenza attenuatore**: regione leader vicino alle sequenze trpL, 162 bp (5'UTR) --> 4 domini
- **Leader peptide:** 2 molecole trp pos. 10 &11 --> controllo attenuatore
- Altri aminoacidi: istidina, fenilalanina e treonina



Attenuazione

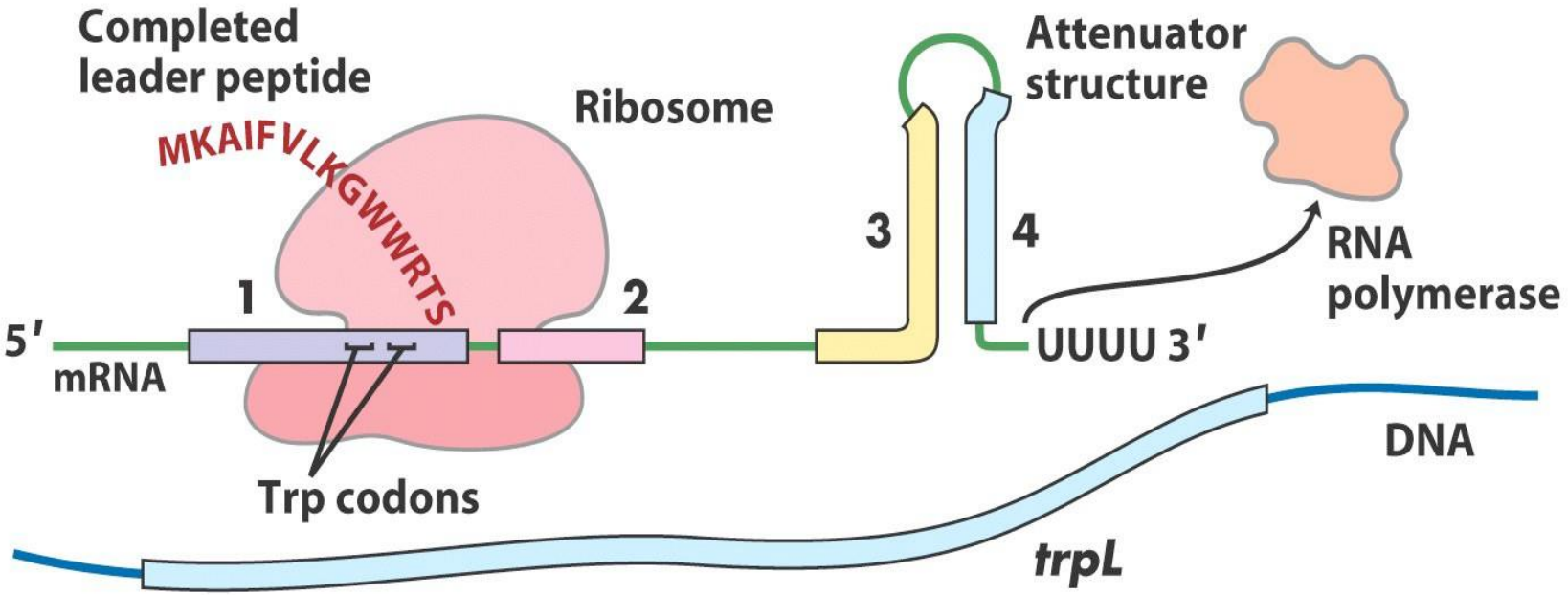


- **Attenuazione: meccanismo presente nei geni degli AA**
- **La trascrizione degli enzimi biosintetici è rallentata se è presente il corrispondente aminoacido**

Attenuazione

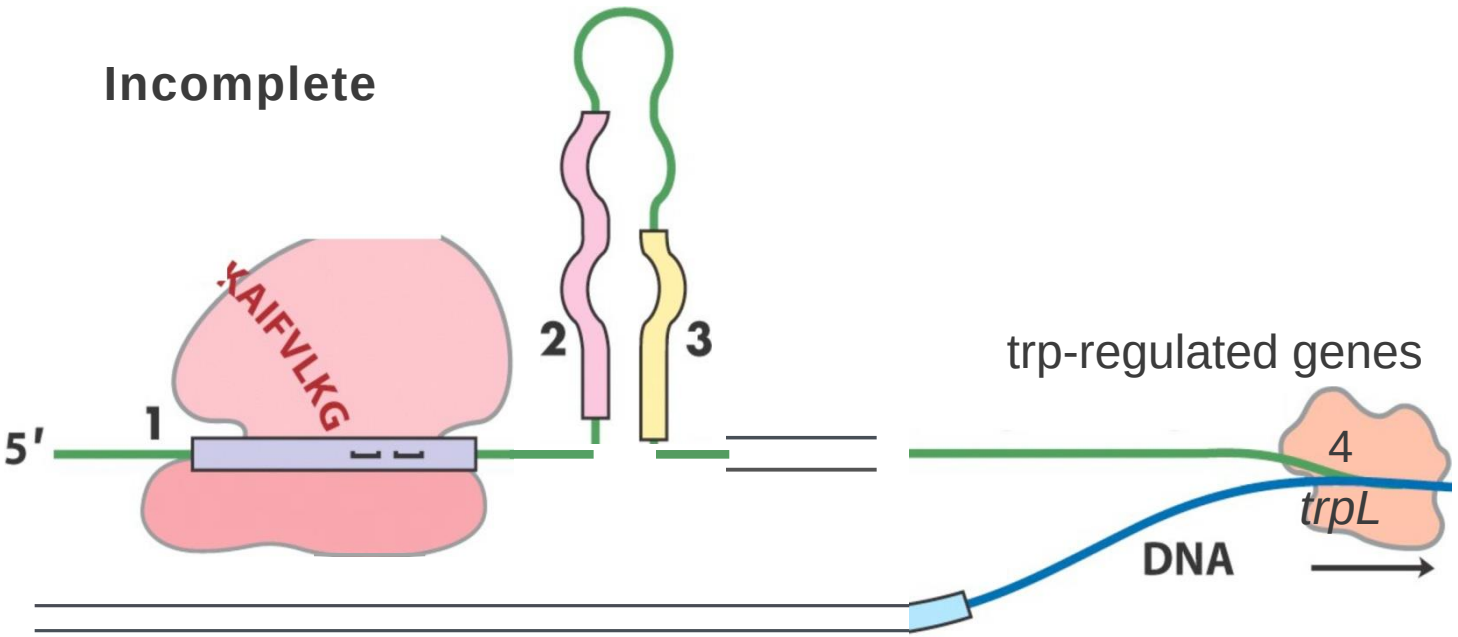
- "**Attenuazione**": perché la **trascrizione inizia normalmente**
- ma si arresta prima della trascrizione dei geni strutturali dell'operon

In presenza di triptofano



- **Quando i livelli di triptofano sono alti**,
- il ribosoma traduce la sequenza 1 (open reading frame del peptide leader)
- e blocca la sequenza 2 prima che la 3 è trascritta.
- La trascrizione continuata porta ad attenuazione con una struttura simile al terminatore formata dalle sequenze 3 e 4.

In assenza di triptofano

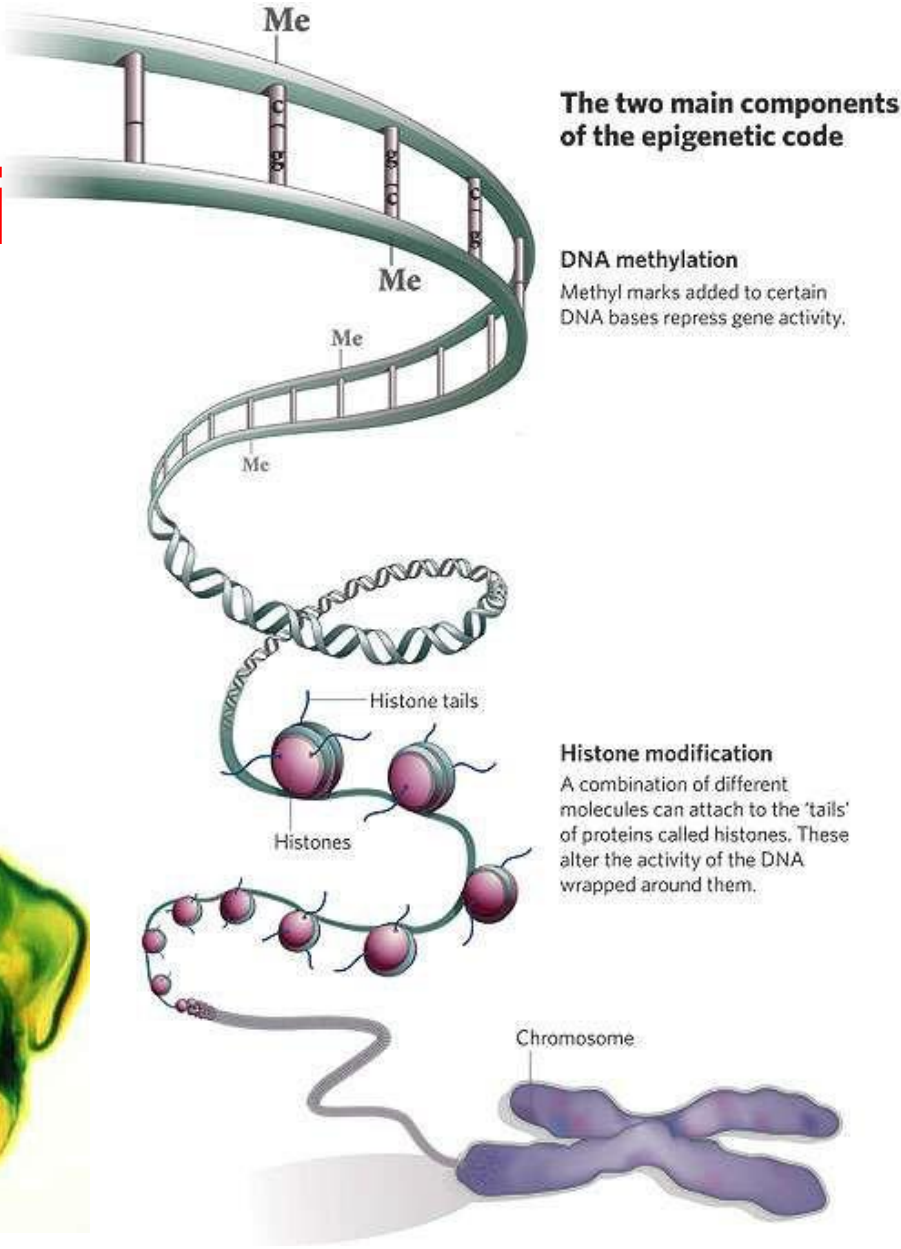


- **Se i livelli di triptofano sono bassi**, il ribosoma fa una pausa ai codoni del Trp in sequenza 1
- La formazione di strutture appaiate tra le sequenze 2 e 3 previene l'attuazione: la sequenza 3 non è più disponibile per formare struttura con la sequenza 4
- Le strutture 2 e 3, diversamente da attenuatore 3,4, non prevengono la trascrizione

Controllo dei geni negli eucarioti







The BIG Questions…



- How are genes turned on & off in eukaryotes?
- How do cells with the same genes differentiate to perform completely different, specialized functions?



(a) 5 weeks. Limb buds, eyes, the heart, the



(b) 14 weeks. Growth and development of



(c) 20 weeks. By the end of the second

Evolution of gene regulation

Prokaryotes

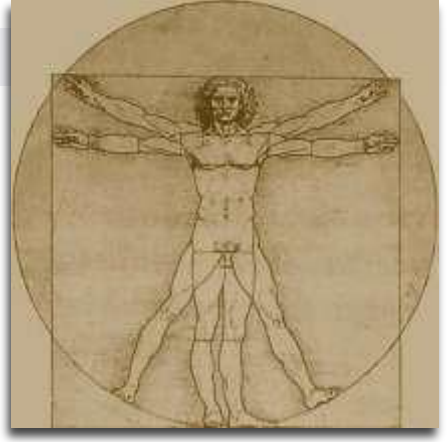
- single-celled
- evolved to grow & divide rapidly
- must respond quickly to changes in external environment
  - exploit transient resources

Gene regulation

- **turn genes on & off rapidly**
  - **flexibility & reversibility**
- **adjust levels of enzymes for synthesis & digestion**



Evolution of gene regulation

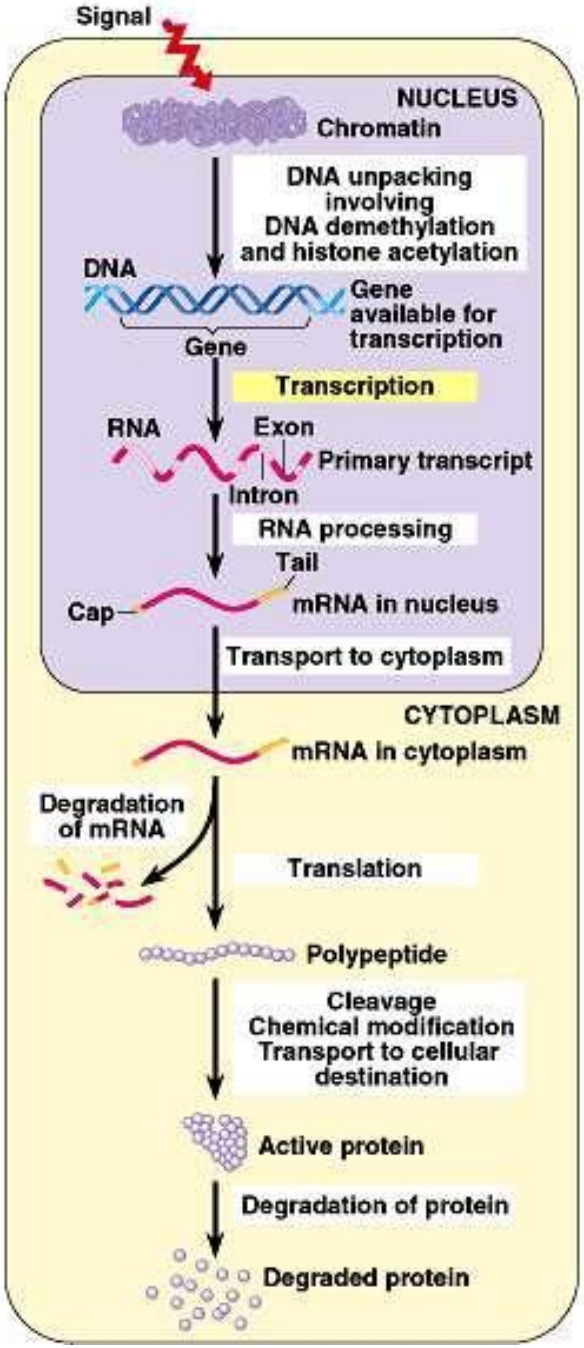


- **Eukaryotes**
  - **multicellular**
  - **evolved to maintain constant internal conditions while facing changing external conditions**
    - **homeostasis**
  - **regulate body as a whole**
    - **growth & development**
      - **long term processes**
    - **specialization**
      - **turn on & off large number of genes**
    - **must coordinate the body as a whole rather than serve the needs of individual cells**

Points of control

- **The control of gene** expression can occur at any step in the pathway from gene to functional protein

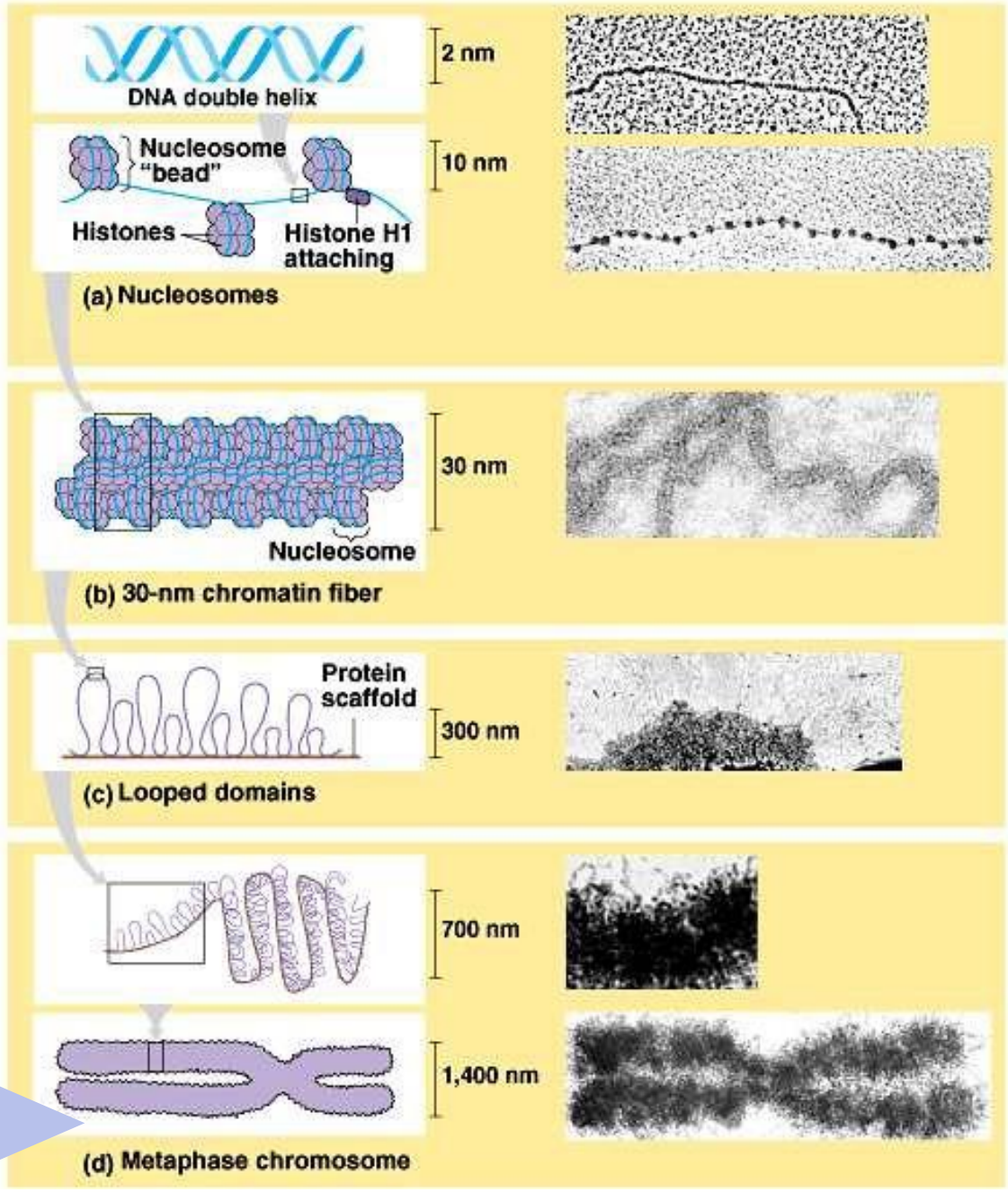
1. **packing/unpacking DNA**
2. **transcription**
3. **mRNA processing**
4. **mRNA transport**
5. **translation**
6. **protein processing**
7. **protein degradation**



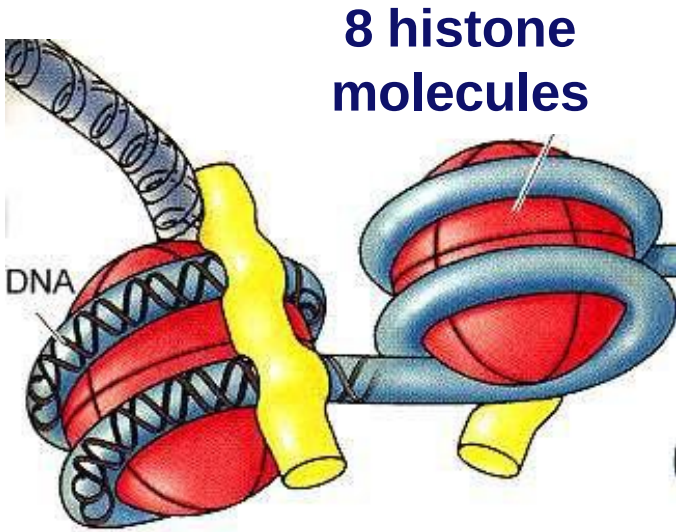
1. DNA packing

- How do you fit all that DNA into nucleus?
  - DNA coiling & folding
    - double helix
    - nucleosomes
    - chromatin fiber
    - looped domains
    - chromosome

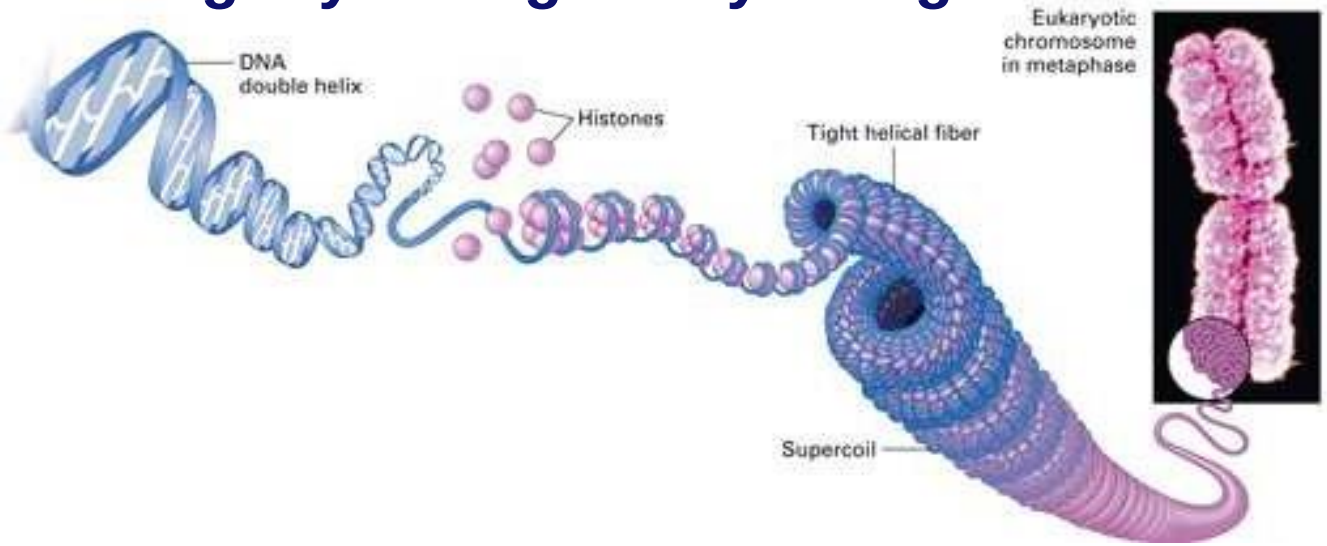
from DNA double helix to condensed chromosome



Nucleosomes



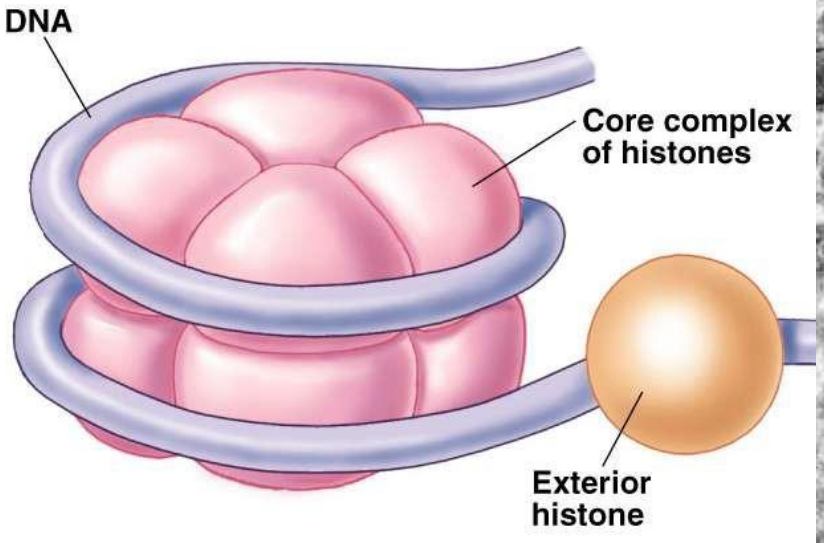
- **Beads on a string !!!**
  - **1st level of DNA packing**
  - **histone proteins**
    - **8 protein molecules**
    - **positively charged amino acids**
    - **bind tightly to negatively charged DNA**

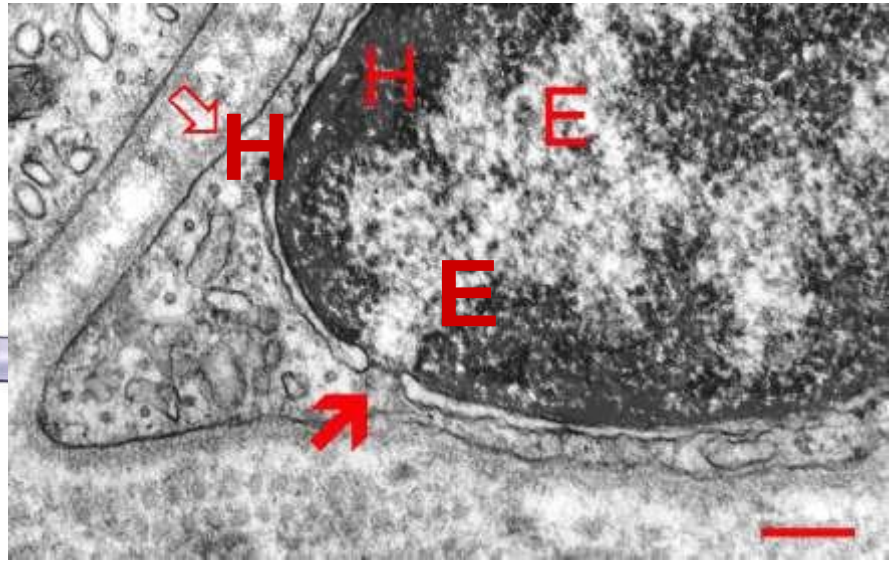


DNA packing as gene control

- **Degree of packing of DNA regulates transcription**
  - **tightly wrapped around histones**
    - **no transcription**
      - **genes turned off**

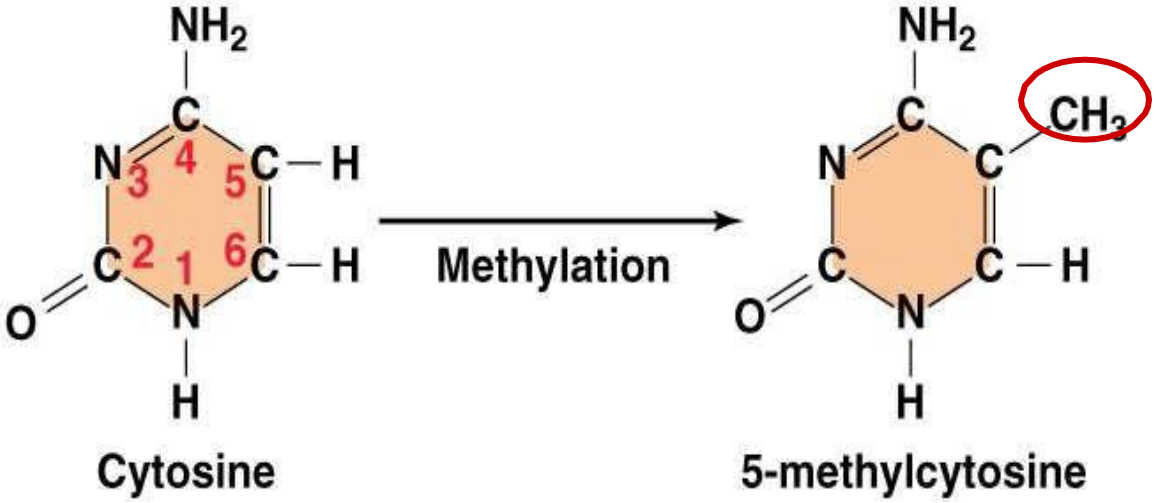
- **heterochromatin**
  darker DNA (H) = tightly packed
- **euchromatin**
  lighter DNA (E) = loosely packed





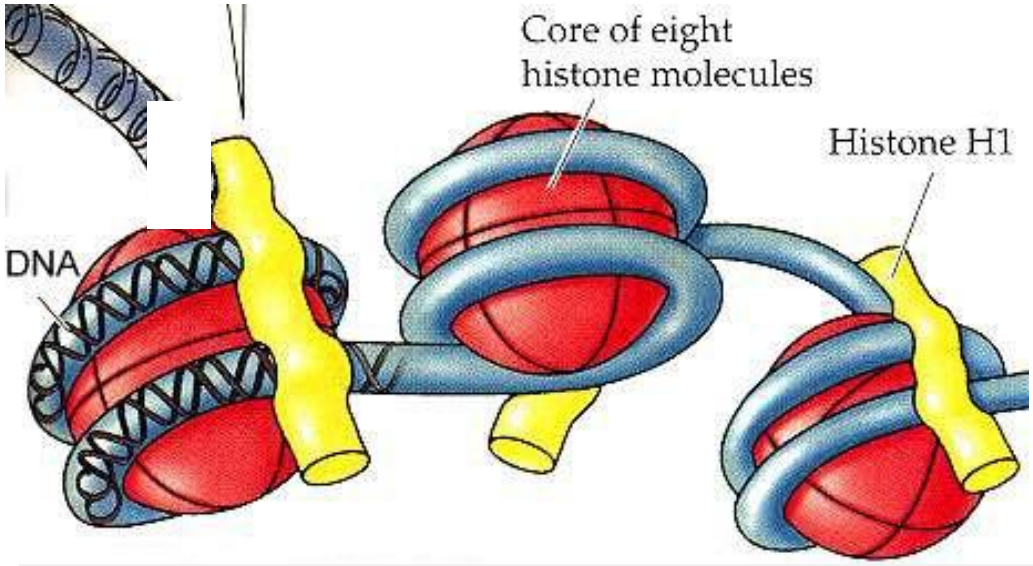
DNA methylation

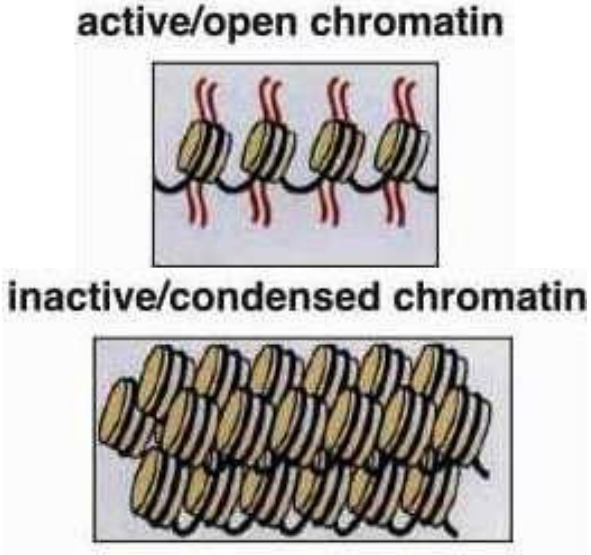
- **Methylation of DNA blocks transcription factors**
  - no transcription
    → **genes turned off**
  - **attachment of methyl groups ($-CH_3$) to cytosine**
    - **C = cytosine**
  - **nearly permanent inactivation of genes**
    - ex. inactivated mammalian X chromosome = Barr body



Histone acetylation

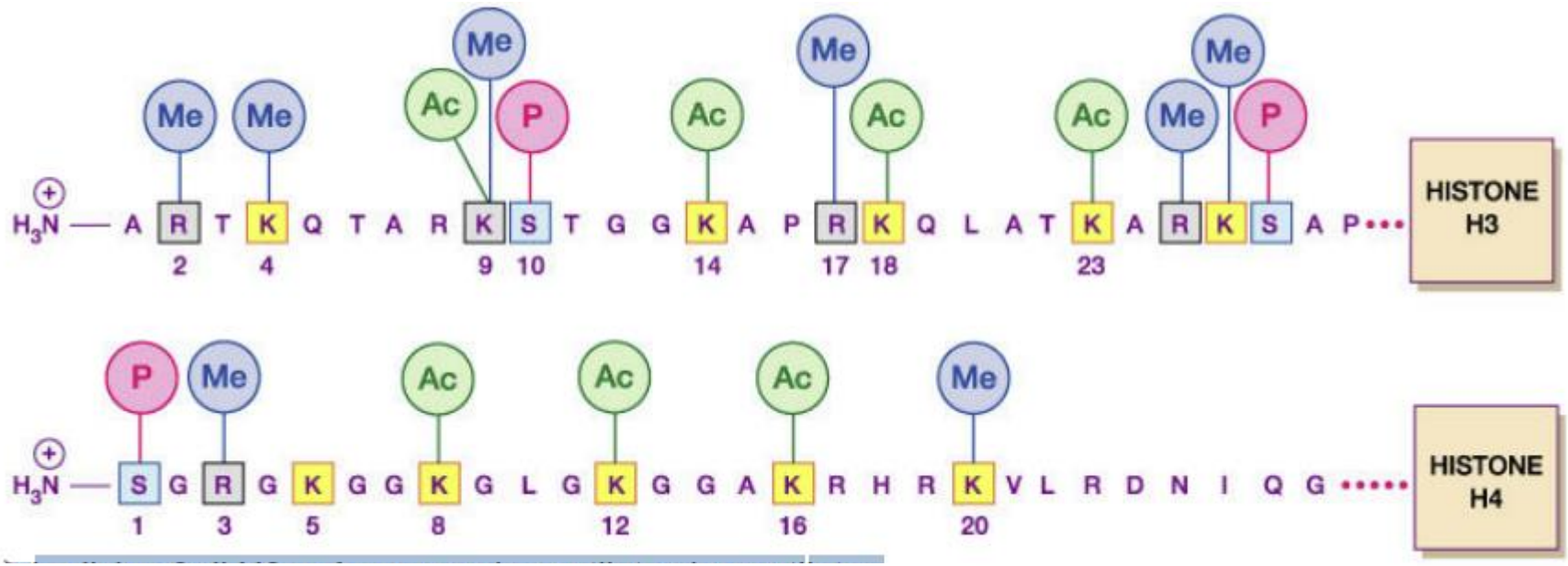
- **Acetylation of histones unwinds DNA**
  - **loosely wrapped around histones**
    - **enables transcription**
    - **genes turned on**
  - **attachment of acetyl groups (–$COCH_3$) to histones**
    - **conformational change in histone proteins**
    - **transcription factors have easier access to genes**



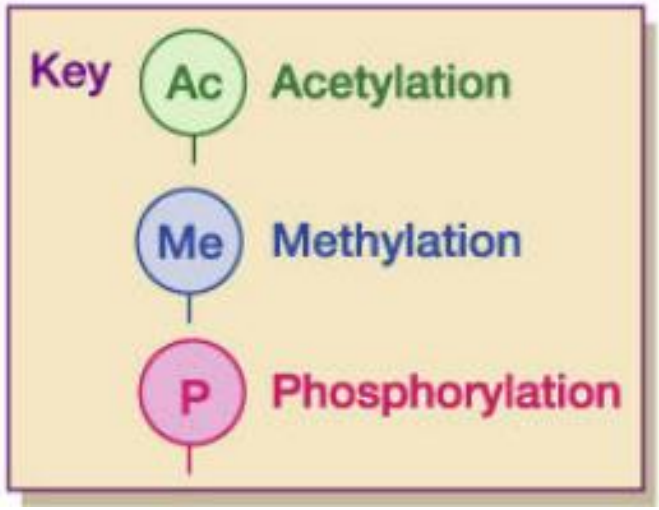


Histone acetylation is associated with control of gene expression

Modificazioni degli istoni H3 e H4

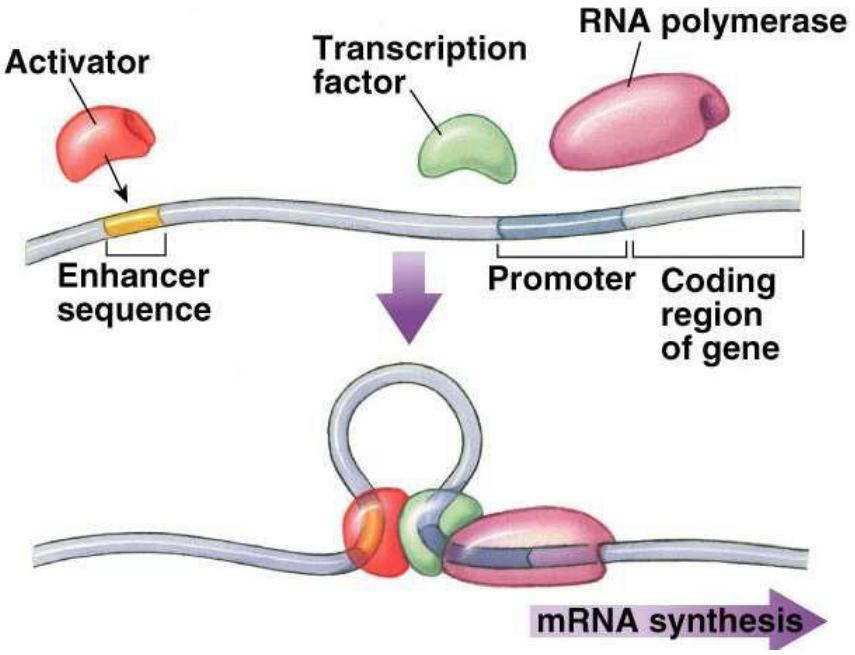


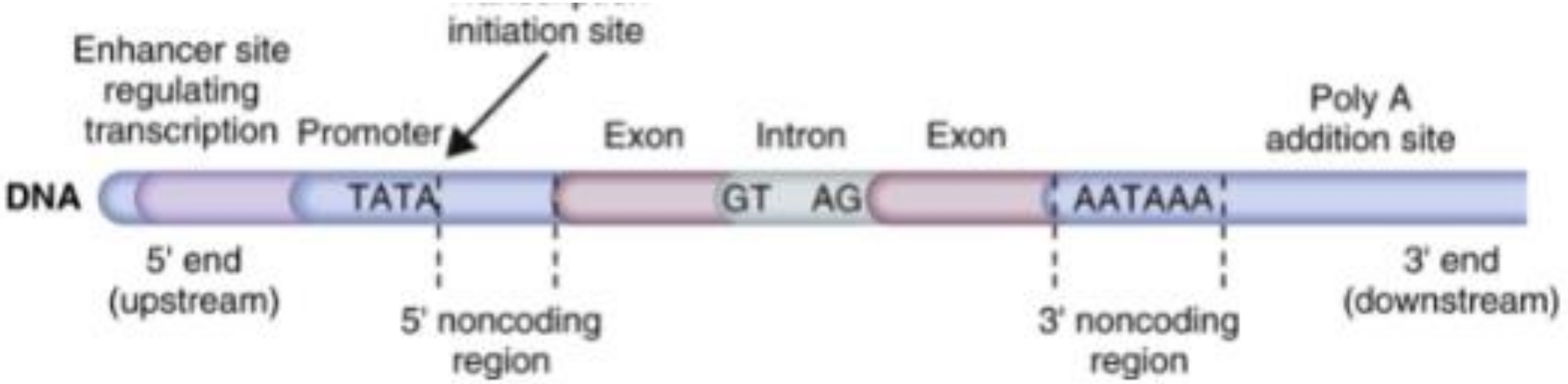
- La lisina 9 di H3 può essere sia acetilata che metilata.
- L'acetilazione è associata alla cromatina trascrizionalmente attiva, ma se la regione cromatinica viene metilata a livello del DNA (CpG).
- Le proteine che si legano al DNA metilato richiamano le deacetilasi istoniche, che rimuovono i gruppi acetile e le metil transferasi istoniche, legate alle CpG binding protein, metilano gli istoni.
  - Il risultato è la condensazione della cromatina.



2. Transcription initiation

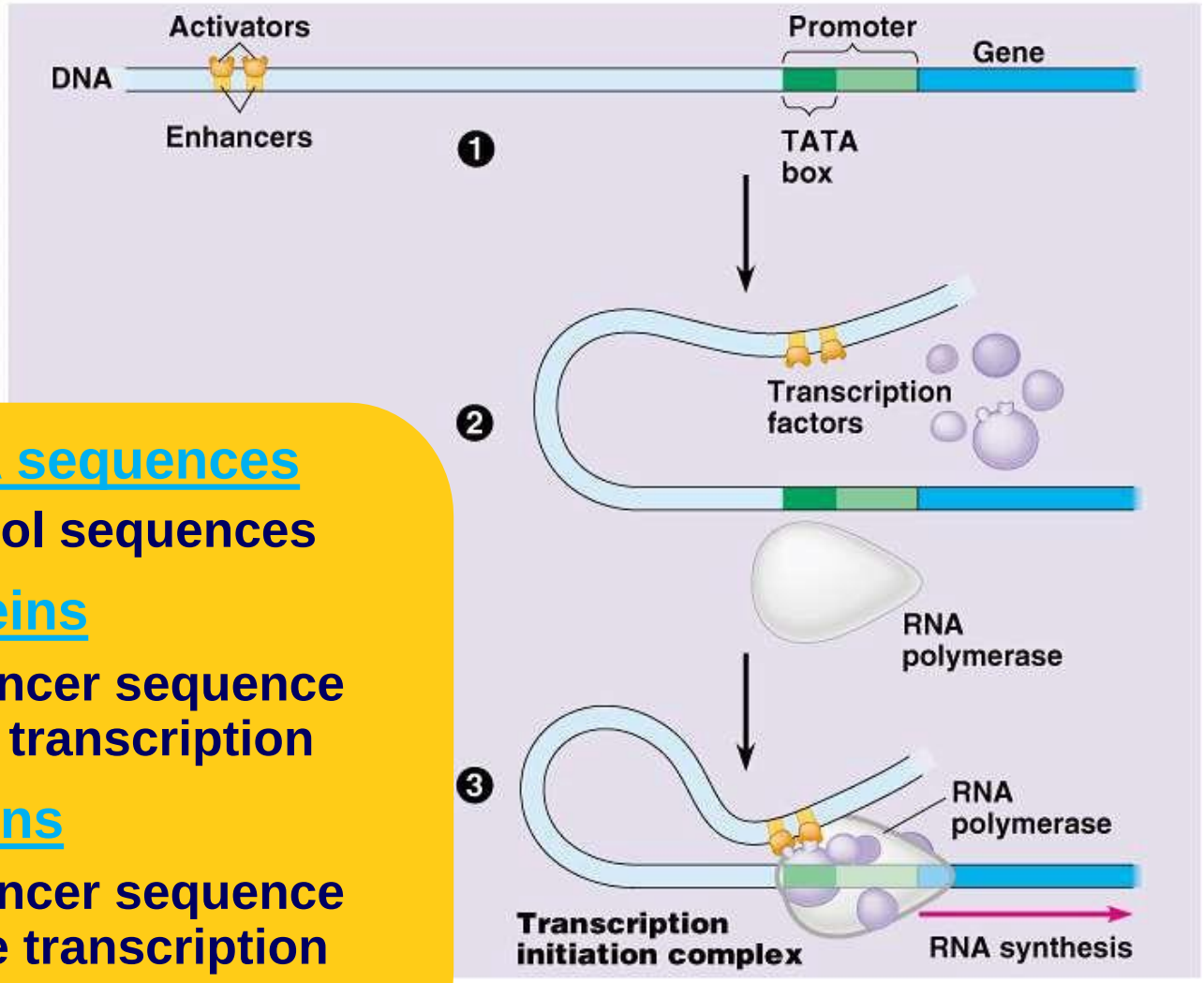
- **Control regions on DNA**
  - **promoter**
    - nearby control sequence on DNA
    - binding of RNA polymerase & transcription factors
    - base rate of transcription
  - **enhancer**
    - distant control sequences on DNA binding of activator proteins
    - enhanced rate
    - (high level) of transcription





Dettagli della struttura del gene che mostra le sequenze sia di regolazione sia quelle a monte ed i siti di addizione del coda poli A

Model for Enhancer action



- Enhancer DNA sequences
  - distant control sequences
- Activator proteins
  - bind to enhancer sequence & stimulates transcription
- Silencer proteins
  - bind to enhancer sequence & block gene transcription

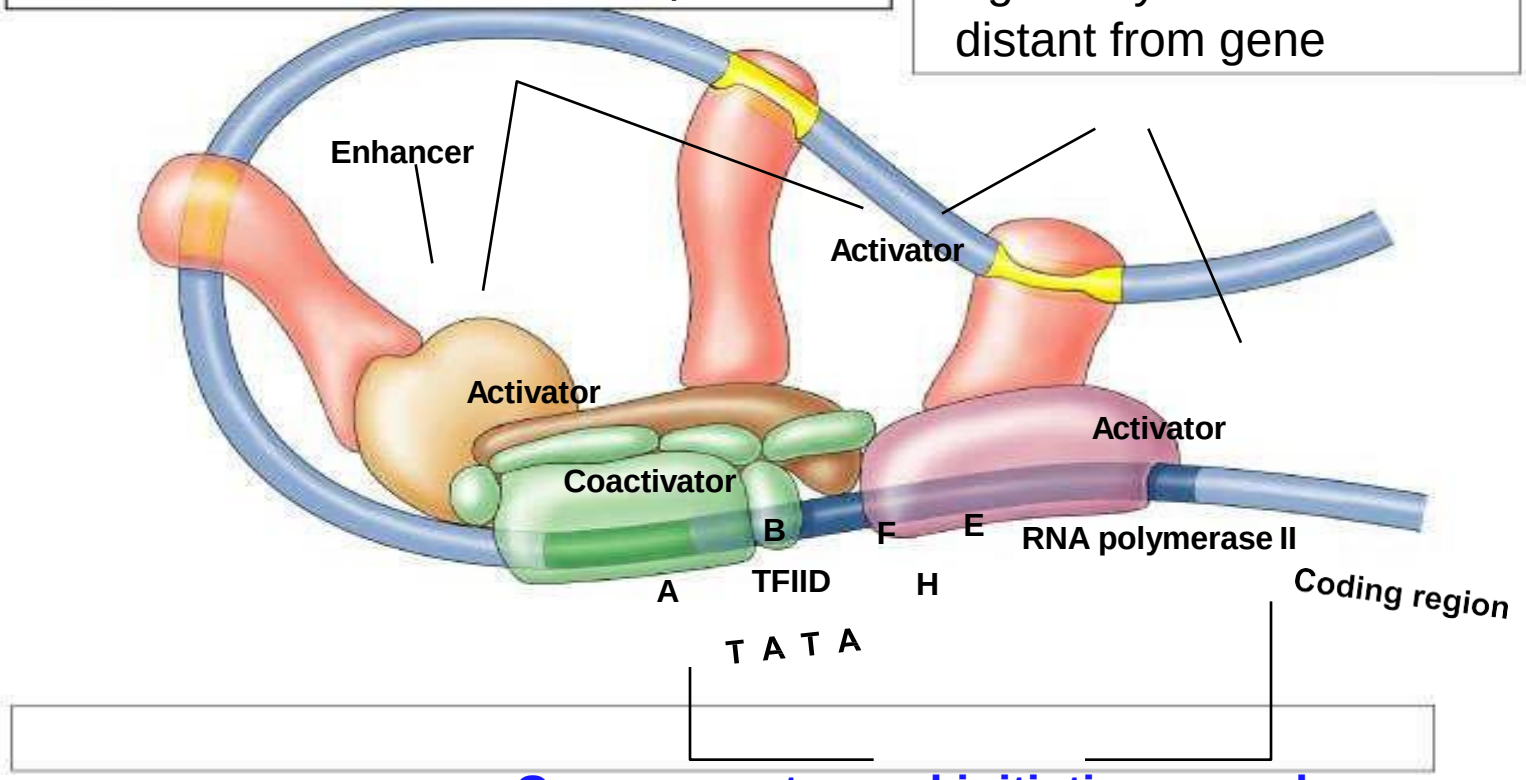
Transcription complex

Activator Proteins

- regulatory proteins bind to DNA at distant enhancer sites
- increase the rate of transcription

Enhancer Sites.

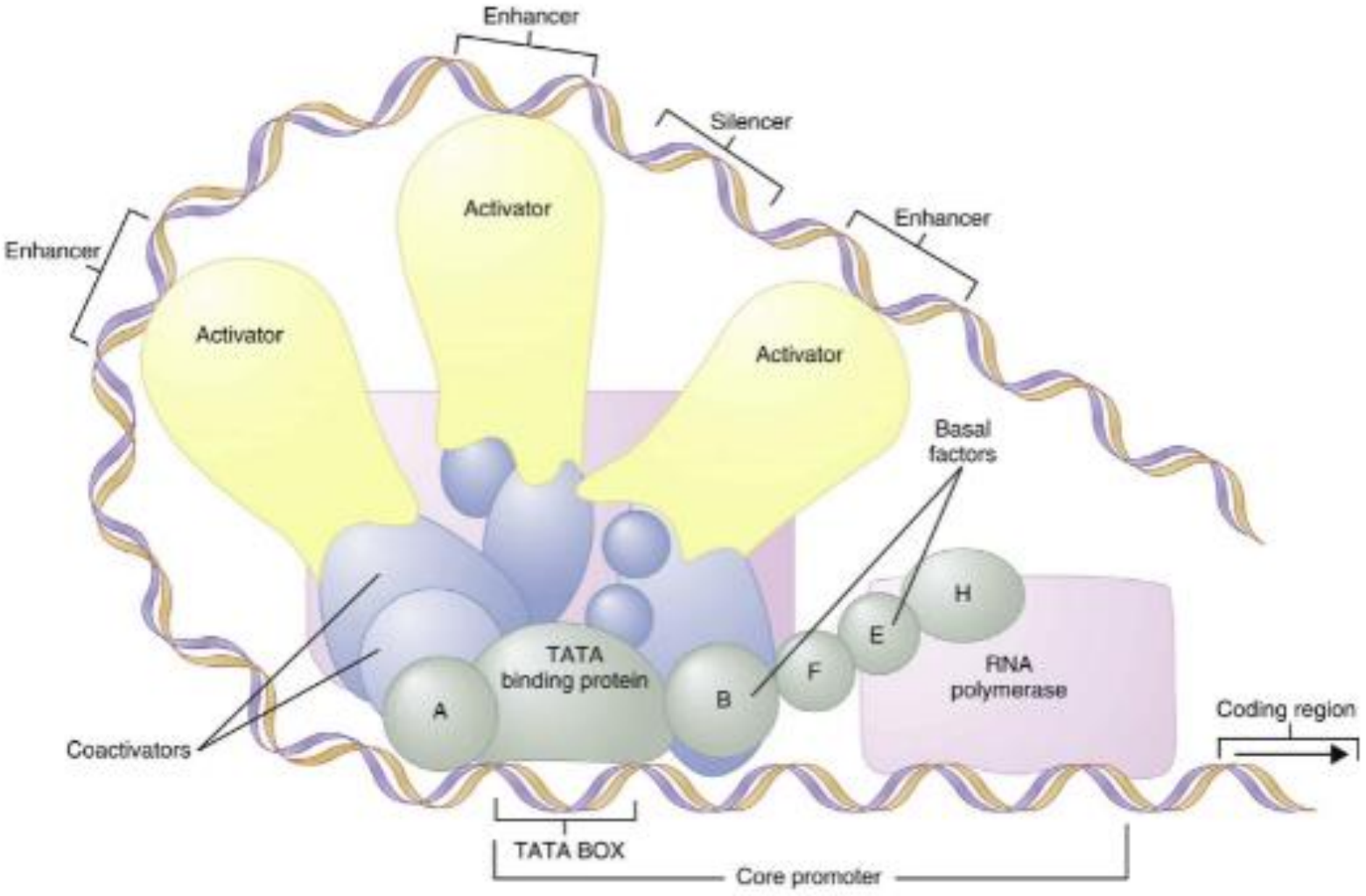
regulatory sites on DNA distant from gene



Core promoter and initiation complex

Initiation Complex at Promoter Site binding site of RNA polymerase

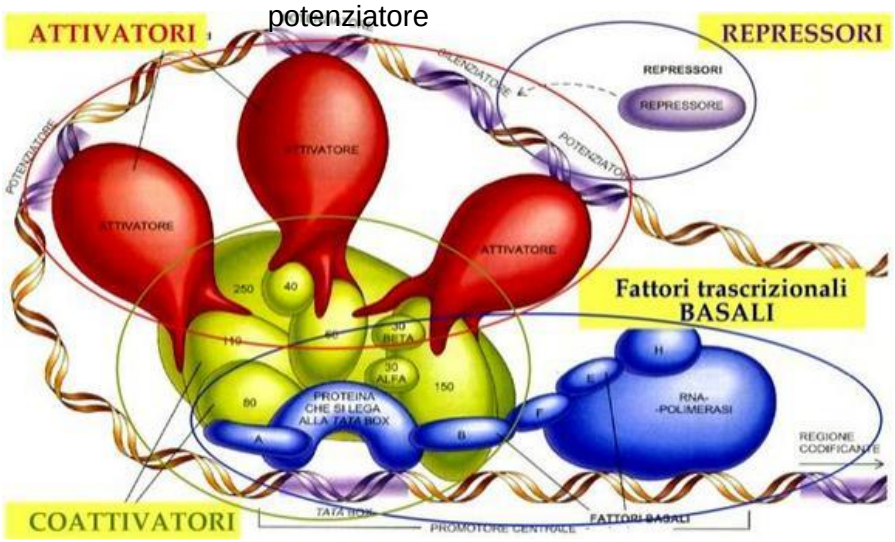
Key elements of transcription control



- They include (general (basal) transciption factors and specific enhancers and silencers:
- The acitivity of enhancers is mediated by activators and coactivators, which are specific transcription factors

Oltre a promotore e RNA P, ci sono:

1. **Enhancers:** regioni del DNA in 5’ che attivano la trascrizione
2. **Silencers:** regioni del DNA in 5’ che reprimono la trascrizione
3 **Insulators**: elementi che agiscono da isolanti, delimitando e separando le zone di competenza degli elementi.
4. **Repressori:** proteine che, stabilendo contatti con i silencers, reprimono la trascrizione
5. **Attivatori**: proteine che, stabilendo contatti con gli enhancers, attivano la trascrizione
6. **Fattori di trascrizione:** proteine che si legano al promotore, favorendone il contatto con la RNA Pol
7. **Mediatori:** aiutano a connettere attivatori con pol II e FT generali



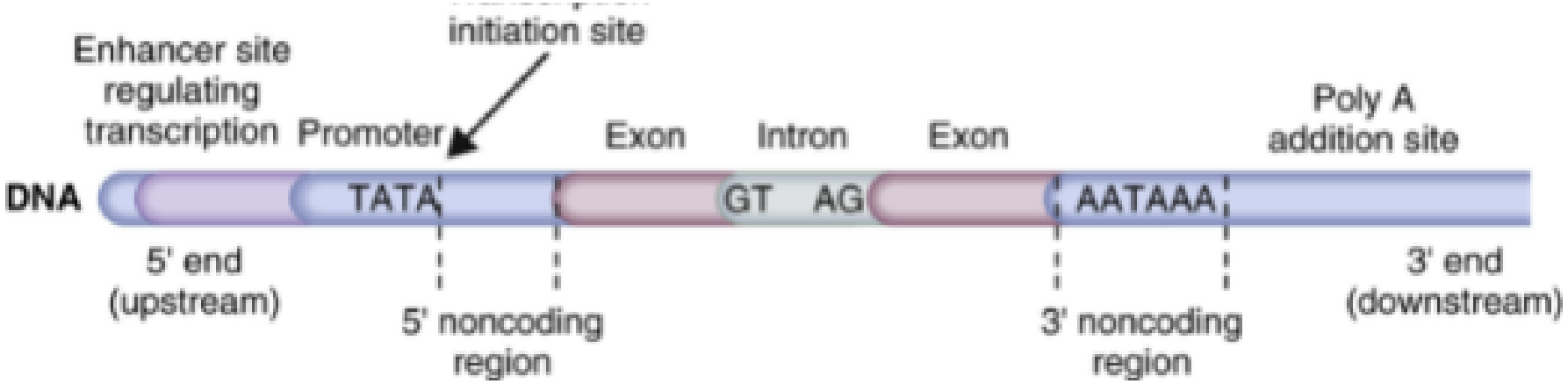
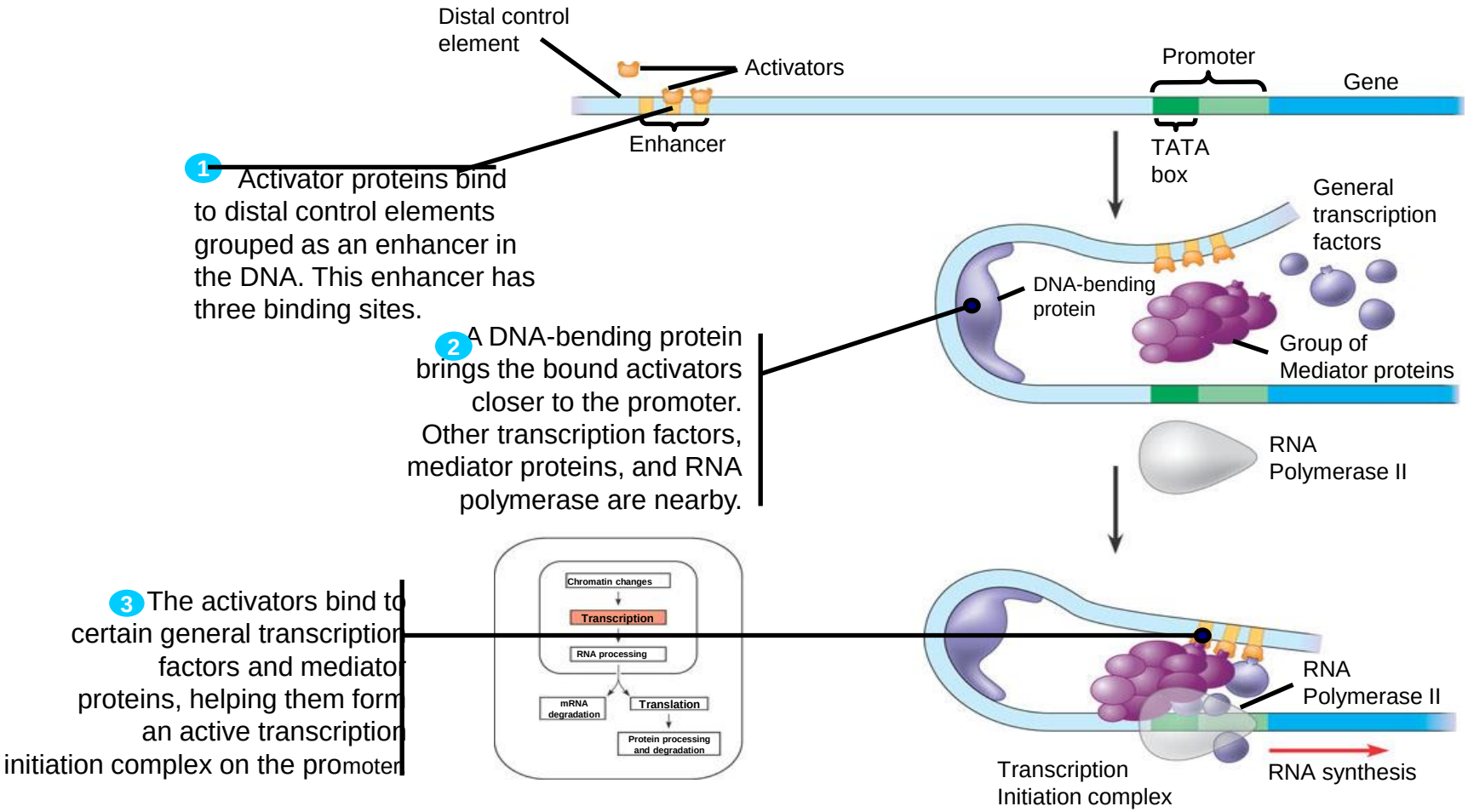


FIG. 2.16 Details of gene structure, showing promoter and upstream regulation (enhancer) sequences and a poly A addition site.

An activator

- It is a **protein that binds to an enhancer** and stimulates transcription of a gene



- **Some specific transcription factors function as repressors**
  - To inhibit expression of a particular gene
- **Some activators and repressors**
  - Act indirectly by influencing chromatin structure

A) Fattori generali della trascrizione

TFIID

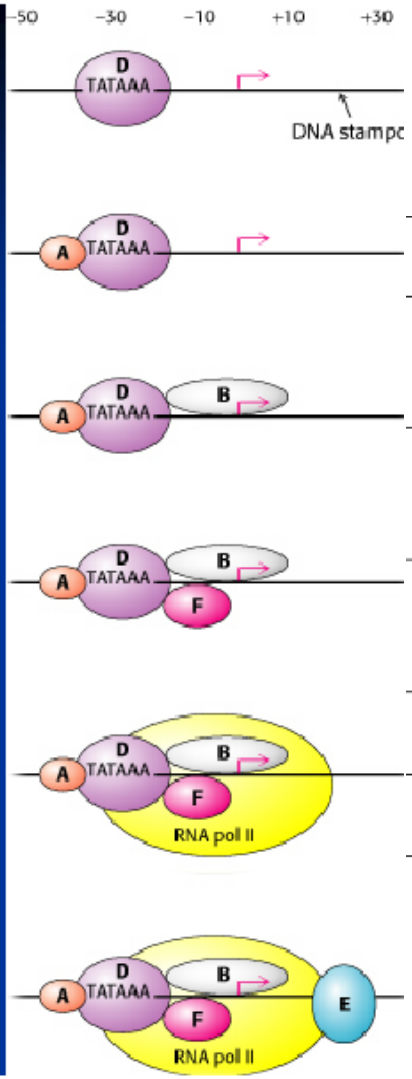
TFIIA

TFIIB

TFIIF

RNA polimerasi II

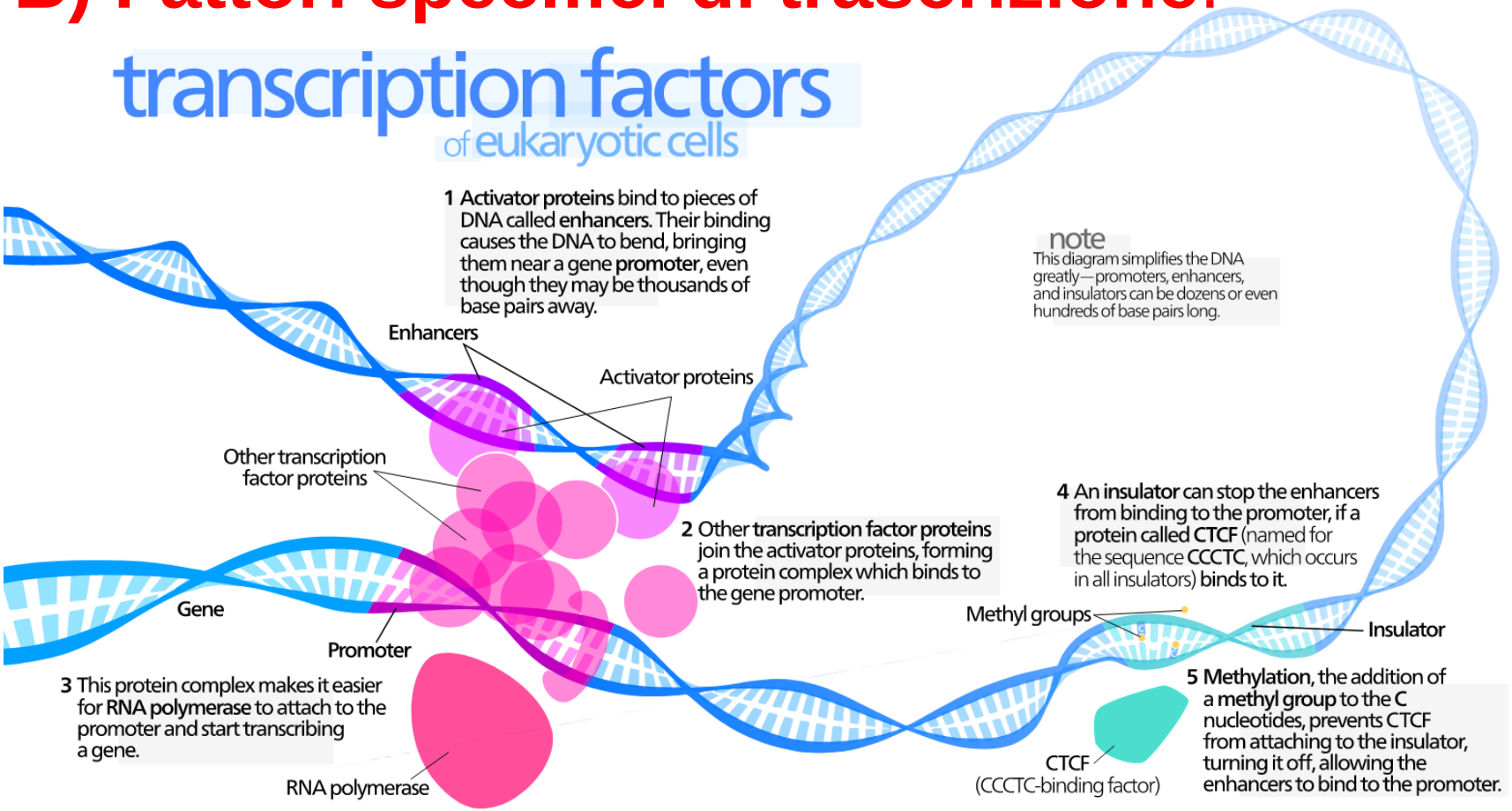
TFIIE



necessari per inizio della trascrizione da parte di RNA Pol II

Fattore	Funzione
TFIID (TBP, TAF)	riconoscimento TATA box; aiuta legame TFIIB
TFIIA	stabilizza legame complesso TFIID
TFIIB	selezione inizio trascrizione
TFIIF	legame RNA polimerasi II
TFIIE	legame TFIIF
TFIIH	elicasi

B) Fattori specifici di trascrizione:



- Un **fattore di trascrizione (TF)** (o fattore di legame alla sequenza specifica di DNA) è una **proteina che controlla la velocità di trascrizione dell'informazione genetica** dal DNA all'RNA messaggero, legandosi a una specifica sequenza di DNA.
- La **funzione dei TF** è quella di **regolare, accendere** e **spegnere**, i geni
  - ciò al fine di assicurarsi che siano espressi nelle cellule desiderate

B)Fattori specifici di Trascrizione

❑ Fattori di Trascrizioni

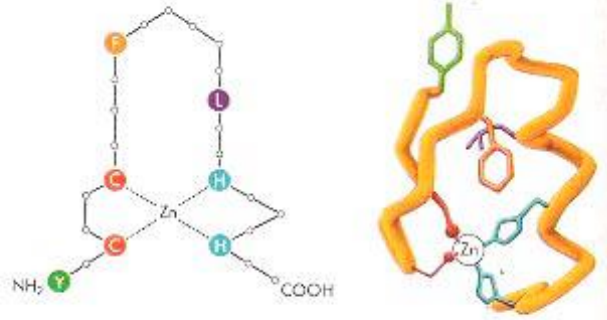
Hanno

- **Dominio di legame al DNA**
- **Dominio di Attivazione**
- **Diverse classi di domini di legame al DNA**
- **Facilitano la formazione del complesso di inizio della trascrizione**

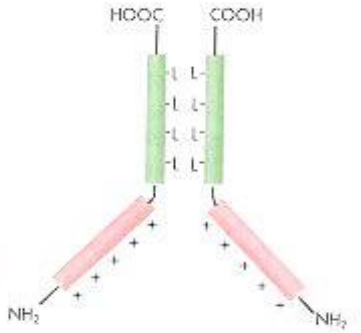
La parte (dominio) del FT che lega il DNA è detta dominio di legame al DNA.



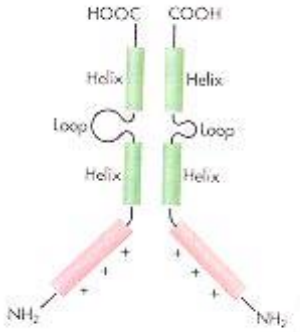
(a) **Helix-turn-helix Homeodomain**



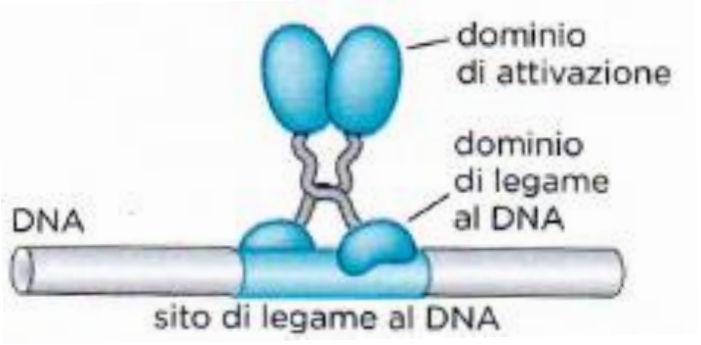
(b) **C_2H_2 zinc finger**



(c) **Leucin zipper**



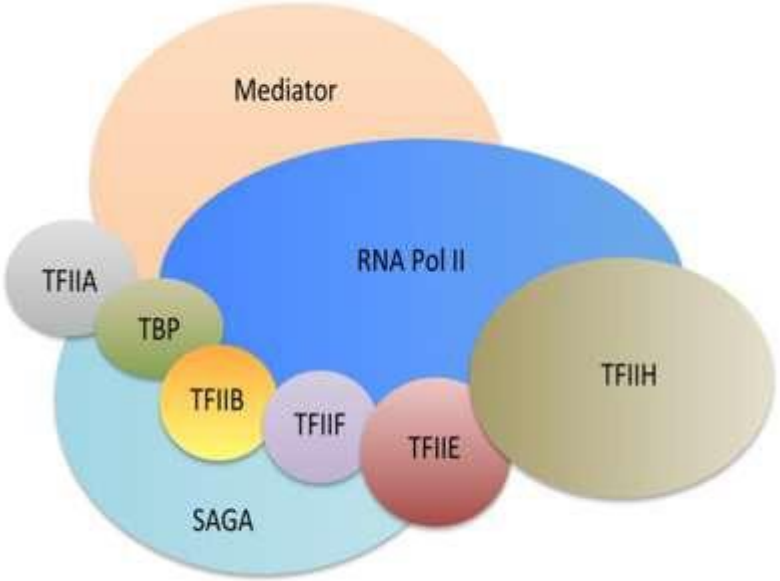
(d) **Helix-loop-helix**

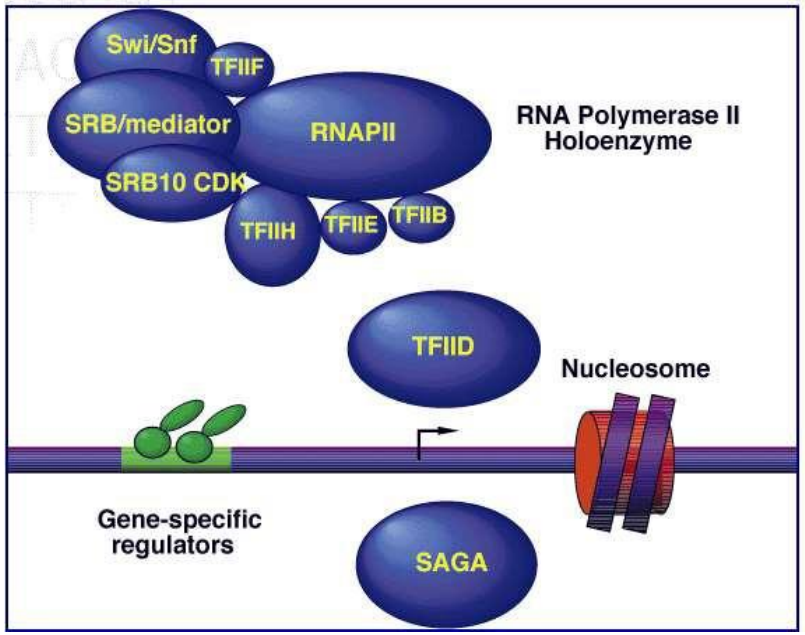


Family	InterPro	Pfam	SCOP
basic helix-loop-helix[53]	InterPro: IPR001092	Pfam PF00010	SCOP 47460
basic-leucine zipper (bZIP)[54]	InterPro: IPR004827	Pfam PF00170	SCOP 57959
C-terminal effector domain of the bipartite response regulators	InterPro: IPR001789	Pfam PF00072	SCOP 46894
AP2/ERF/GCC box	InterPro: IPR001471	Pfam PF00847	SCOP 54176
helix-turn-helix[55]			
homeodomain proteins, which are encoded by homeobox genes, are transcription factors. Homeodomain proteins play critical roles in the regulation of development.[56][57]	InterPro: IPR009057	Pfam PF00046	SCOP 46689
lambda repressor-like	InterPro: IPR010982		SCOP 47413
srf-like (serum response factor)	InterPro: IPR002100	Pfam PF00319	SCOP 55455
paired box[58]			
winged helix	InterPro: IPR013196	Pfam PF08279	SCOP 46785
zinc fingers[59]			
* multi-domain Cys_2His_2 zinc fingers[60]	InterPro: IPR007087	Pfam PF00096	SCOP 57667
* Zn_2/Cys_6			SCOP 57701
* Zn_2/Cys_8 nuclear receptor zinc finger	InterPro: IPR001628	Pfam PF00105	SCOP 57716

Partial list of some of the major families of DNA-binding domains / TF

Modello di trscrizione della RNA Polymerase II
Macchinario per inizio



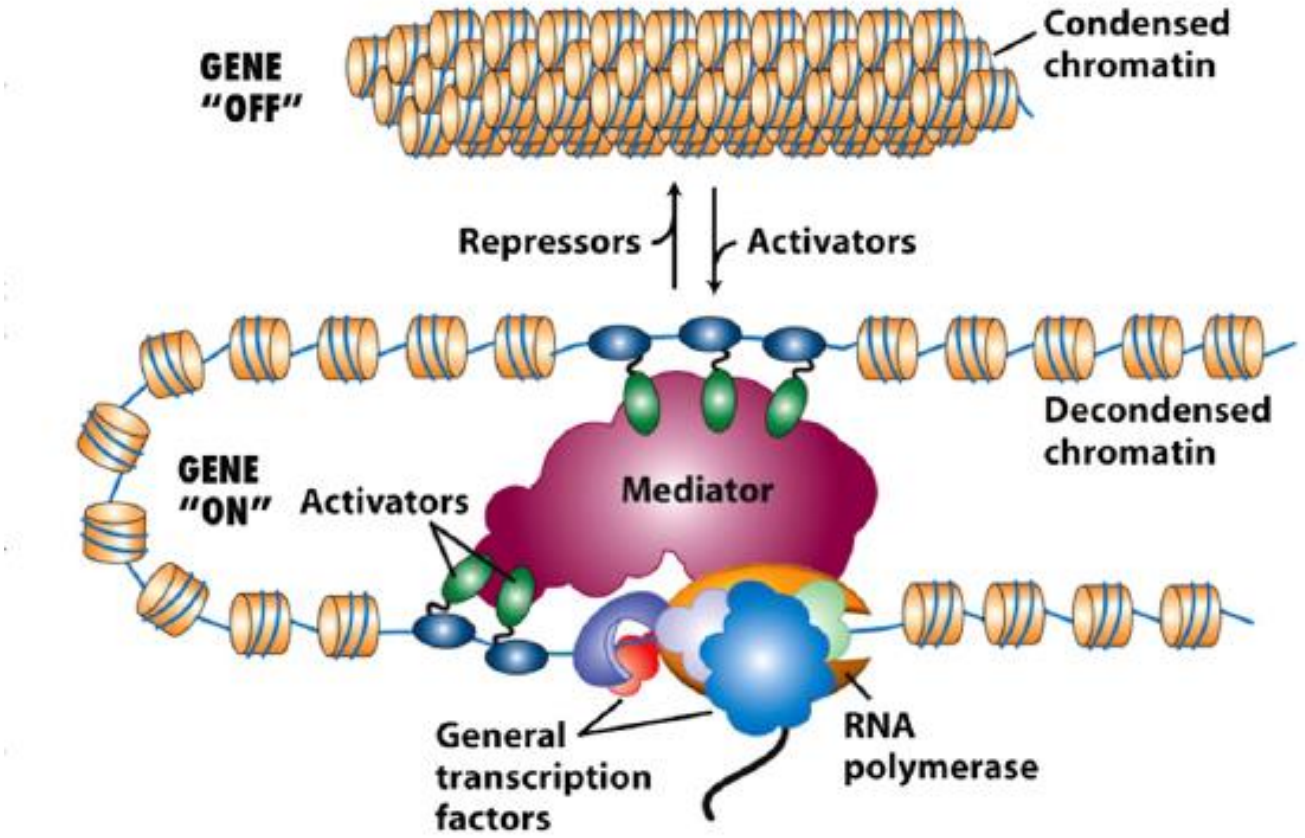


Source: https://labs.fhcrc.org/hahn/Research/polii_res.html

Il macchinario descritto qui comprende oltre 85 polipeptidi in 10 (sub) complessi:

core RNA polymerase II (RNAPII) consiste di12 subunità; TFIIH, 9 subunità; TFIIE, 2 subunità; TFIIF, 3 subunità; TFIIB, 1 subunità, TFIID, 14 subunità; core SRB/mediator, più di 16 subunità; Swi/Snf complesso, 11 subunità; Srb10 kinasi complesso, 4

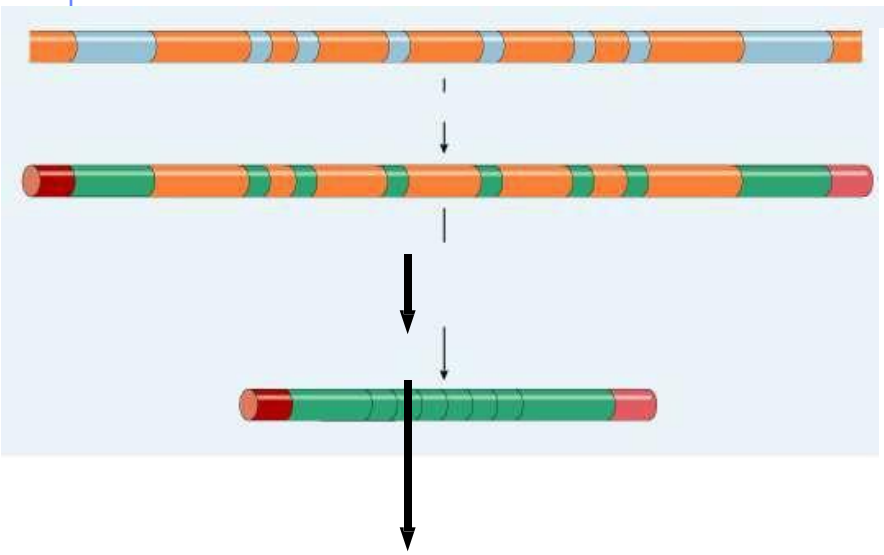
Diagram representing simultaneous binding of several regulatory TF activation domains to different surfaces of the Mediator

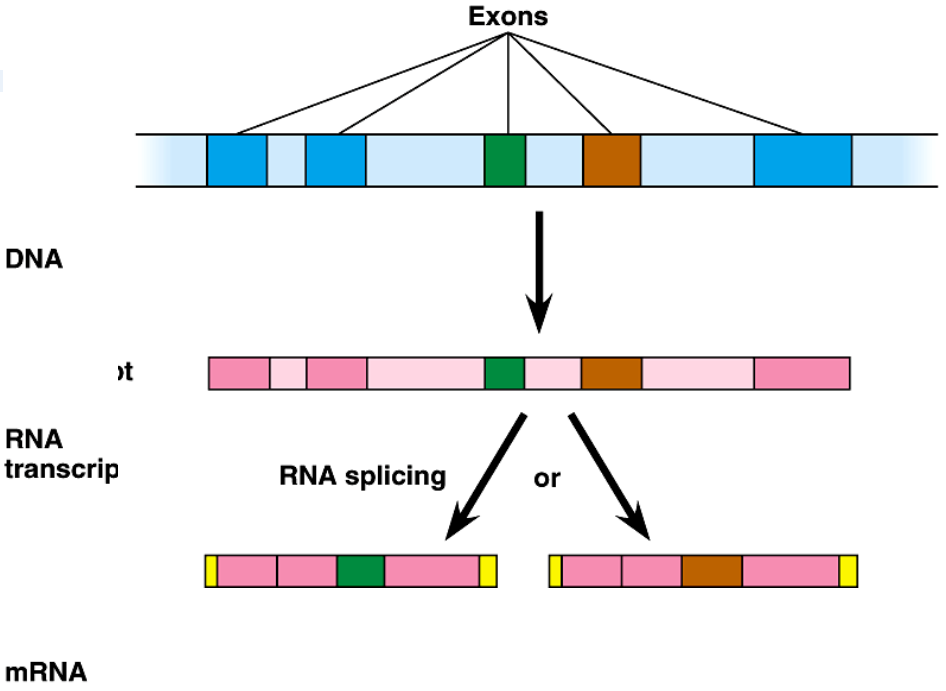


- dsDNA is represented by a thin blue line and histone octamers by orange discs.
- Regulatory TFs bind to specific DNA sequences at promoter proximal regions (bottom left of Mediator) and distal enhancers (top of Mediator) via their DNA-binding domains (blue), which are linked through flexible regions of polypeptide to activation domains (green).
- In response to interactions with activation domains, Mediator binds to RNA Pol II and promotes binding of the polymerase and its general TFs to the TSS.

3. Post-transcriptional control

- **Alternative RNA splicing**
  - variable processing of exons creates a family of proteins





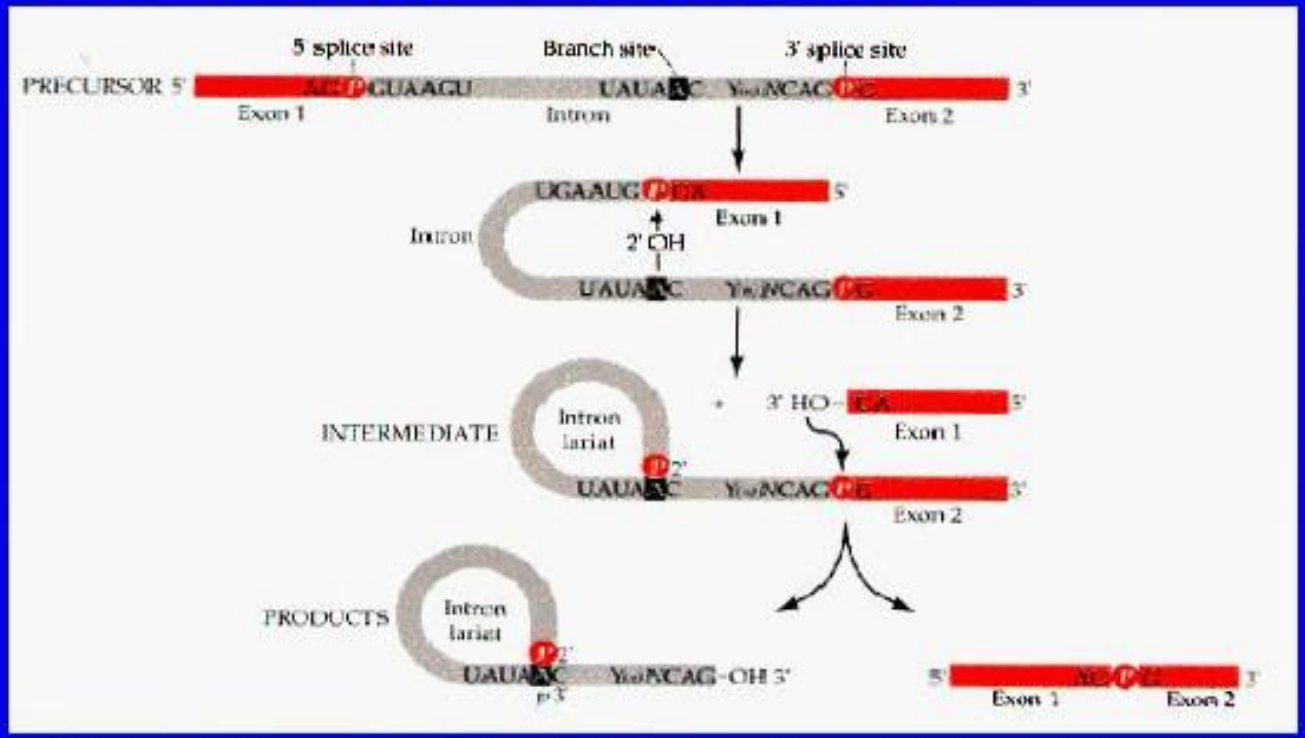
RNA Processing - Introns

However, hnRNA does have a 5' cap and poly(A) tail.

- **The shorter mRNAs must reflect the removal of internal sequences!**

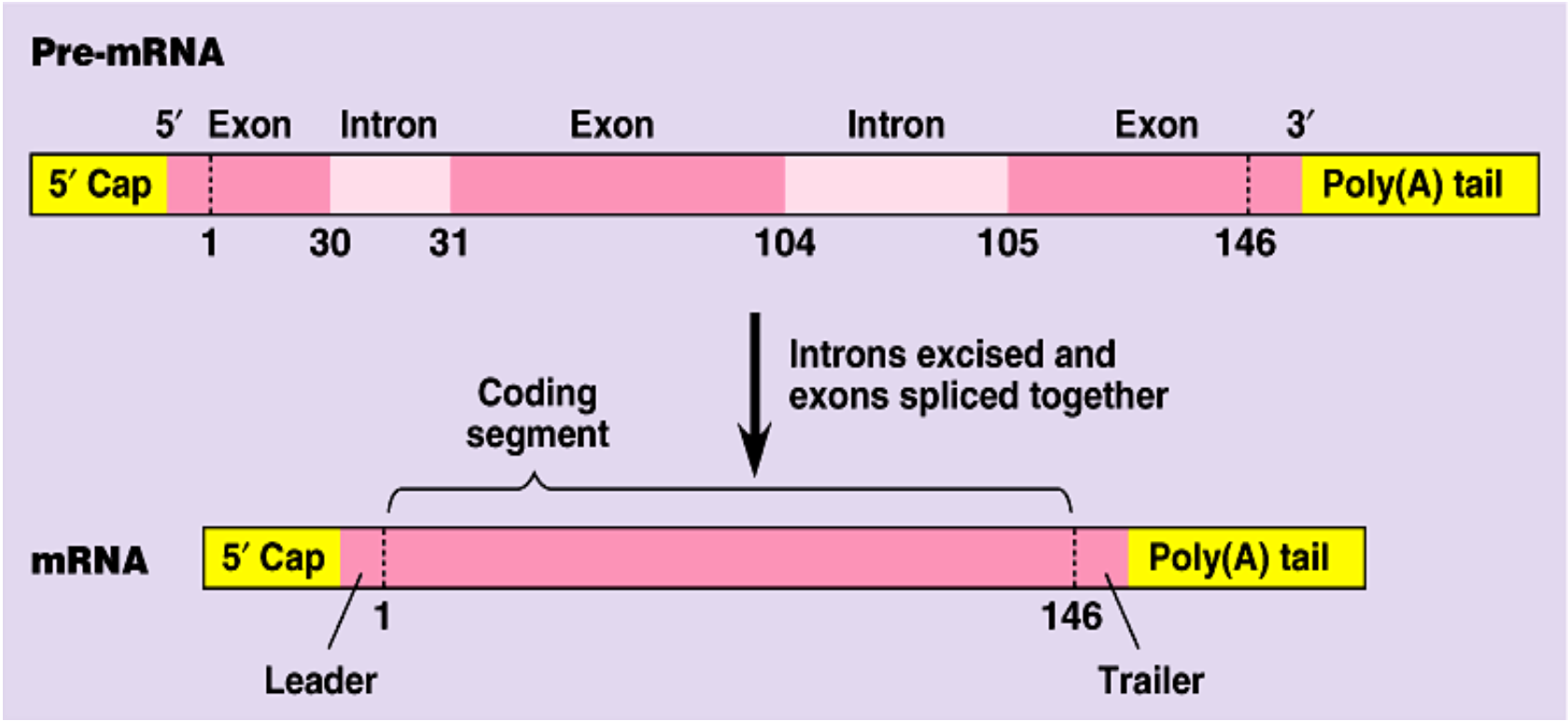
The segments of RNA that are removed are called introns or intervening sequences

- **Introns are removed through a splicing process that involves of RNA - protein complexes known as snRNPs.**



4. Regulation of mRNA degradation

- Life span of mRNA determines amount of protein synthesis
  - mRNA can last from hours to weeks



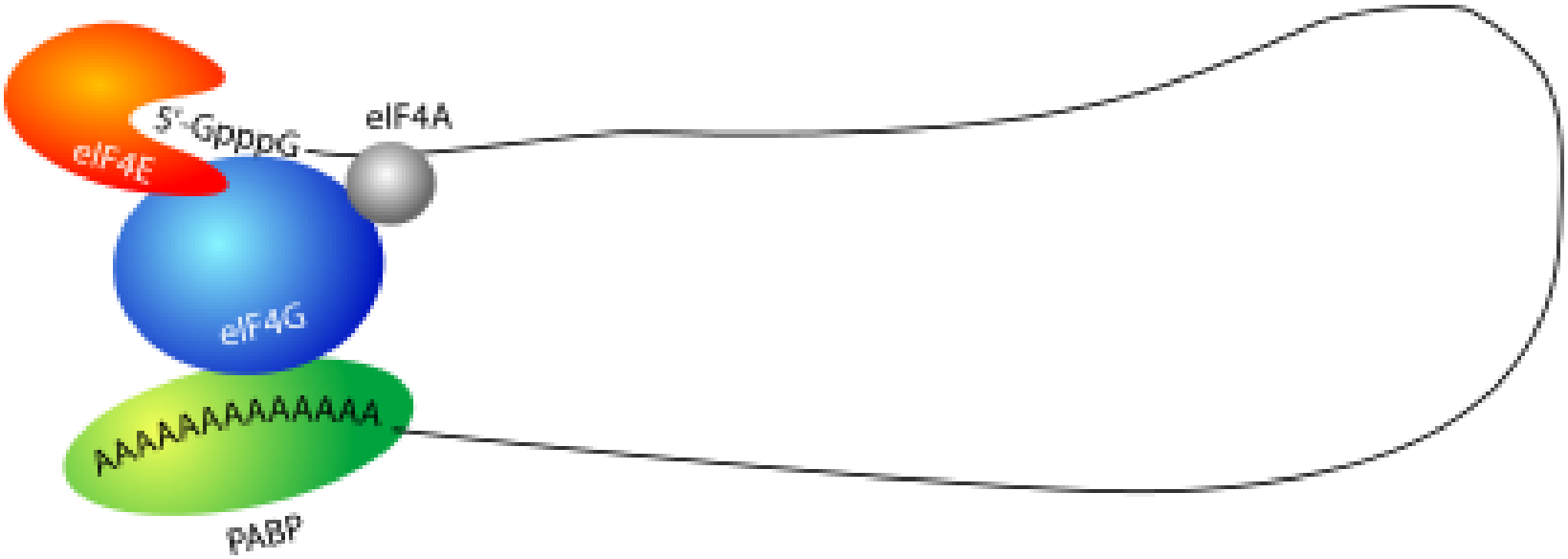
RNA processing movie

La regione 3′ non tradotta svolge un ruolo cruciale nell'espressione genica

- Ha influenza su
  - **localizzazione,**
  - **stabilità,**
  - **esportazione**
  - **efficienza di traduzione di un mRNA.**

- Contiene varie sequenze coinvolte nell'espressione genica, inclusi
  - **elementi di risposta di microRNA (MRE),**
  - **elementi ricchi di AU (ARE)**
  - **coda di poli(A).**
- Inoltre, le caratteristiche strutturali del 3′-UTR e il suo uso di poliadenilazione alternativa giocano un ruolo nell'espressione genica.

Circolarità del trascritto dell'mRNA



è mediata da proteine che interagiscono con

- il cappuccio 5'

- la coda di poli(A).

mRNA Degradation

- The life span of mRNA molecules in the cytoplasm
  - Is an important factor in determining the protein synthesis in a cell
  - **Is determined in part by sequences in the leader and trailer regions**

Noncoding RNAs play multiple roles in controlling gene expression

- genome sequencing has shown that protein-coding DNA only accounts for **1.5% of the human genome**

  (& other eukaryotes)
- a small fraction of the non-protein coding DNA consists of genes for rRNAs and tRNAs

Noncoding RNAs play multiple roles in controlling gene expression

- until recently, researchers assumed that most of the remaining DNA was untranscribed…"junk" DNA
- however, new research suggests that a significant amount of the genome may be transcribed into non-protein-coding RNAs that are involved in regulation of gene expression!!
  - **noncoding RNAs** (ncRNAs)
  - **microRNAs** (miRNAs)
  - **RNA interference** (RNAi)
  - **small interfering RNAs** (siRNAs)

Difference between micro RNA(miRNA) and small interferingRNA (siRNA)

- Function of both species is **regulation of gene expression.**
- Difference is in where they originate.

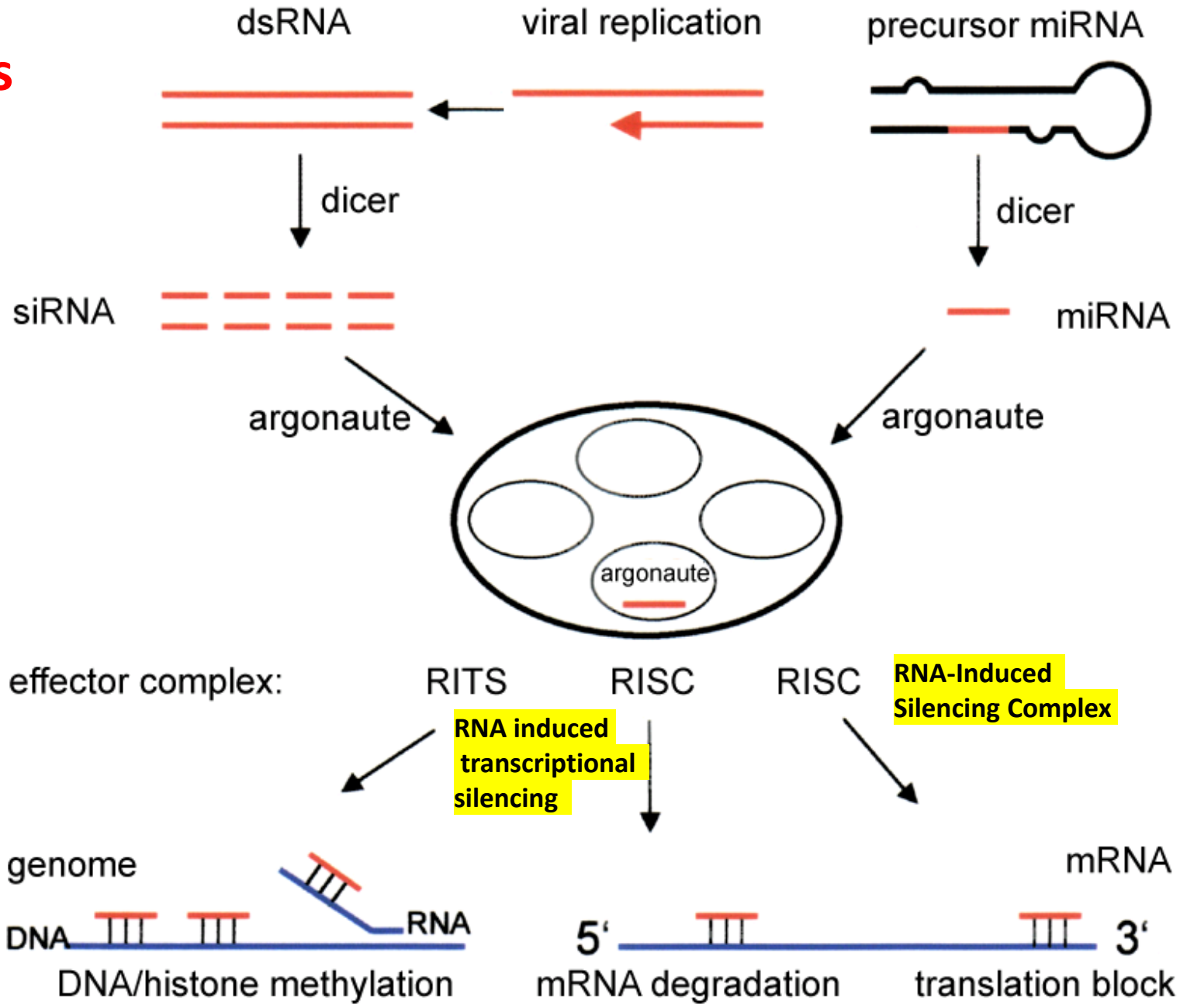
✓ **siRNA originates with dsRNA.**

siRNA is **most commonly a response to foreign RNA** (usually viral) and is often 100% complementary to the target.

✓ **miRNA originates with ssRNA** that forms a hairpin secondary structure.

- **miRNA regulates post-transcriptional gene expression**
- It is **often not 100% complementary** to the target.
- also miRNA help to regulate gene expression,
- particularly during induction of heterochromatin formation serves **to downregulate genes pre-transcriptionally** (RNA Induced transcriptional silencing or **RITS)**

Differences between miRNA & siRNA



a. microRNA

- I **microRNA** (miRNA) sono **piccole molecole di RNA** in grado di **regolare negativamente l'espressione** di geni target a **livello post-trascrizionale.**
- Sono dei piccoli **RNA antisenso** che mostrano
  - **complementarità parziale** (quasi sempre)
  - o **totale** (più raramente)

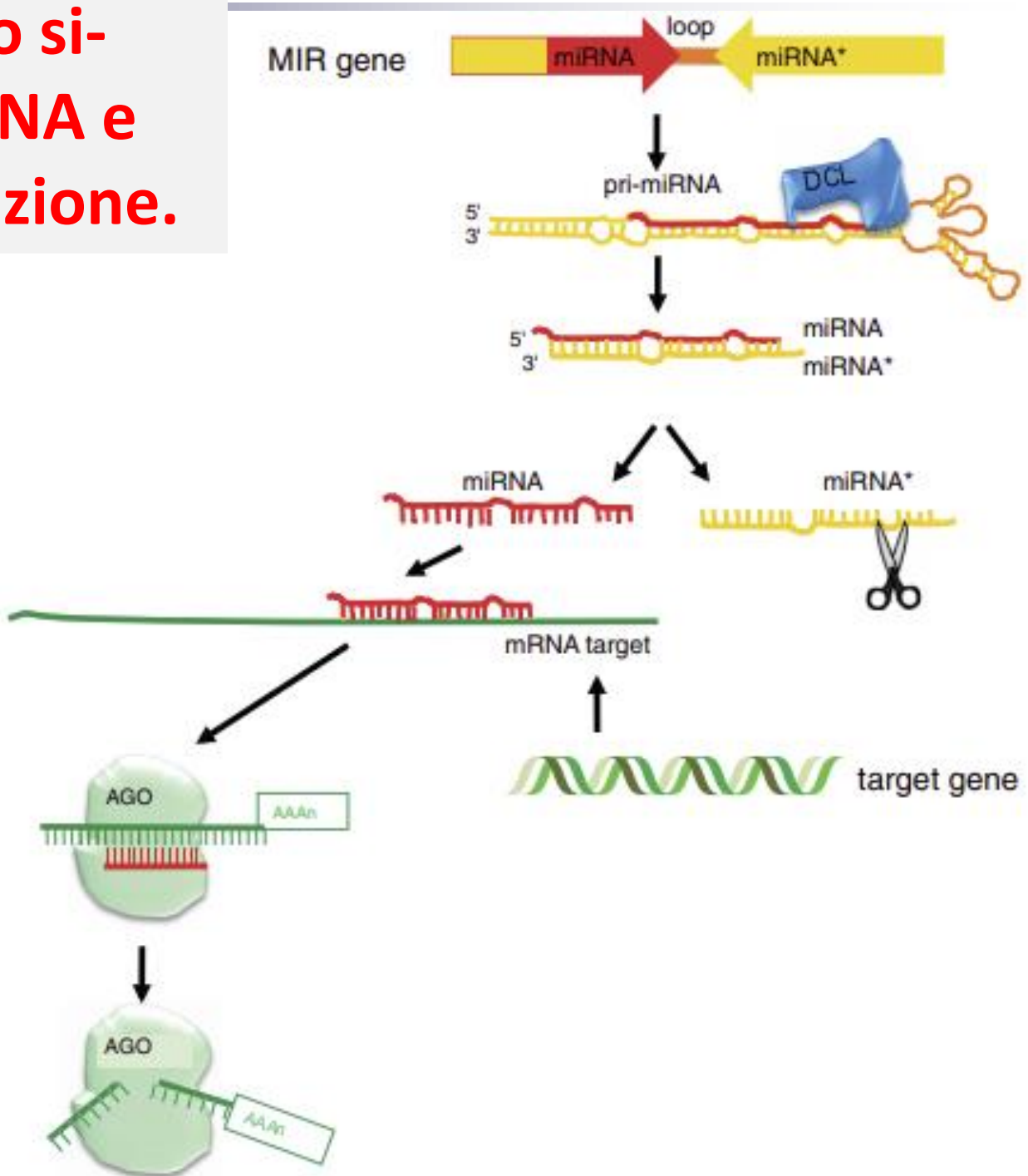
  delle loro basi rispetto a quelle dei loro mRNA bersaglio.

- I miRNA **sono in grado di impedire la traduzione dei loro target** preservandone la stabilità o provocandone la distruzione.
  - Un miRNA **può avere più target**
  - uno **stesso mRNA** può essere **target di diversi miRNA**.

MicroRNA mediano si-lenziamento di mRNA e reprimono la traduzione.

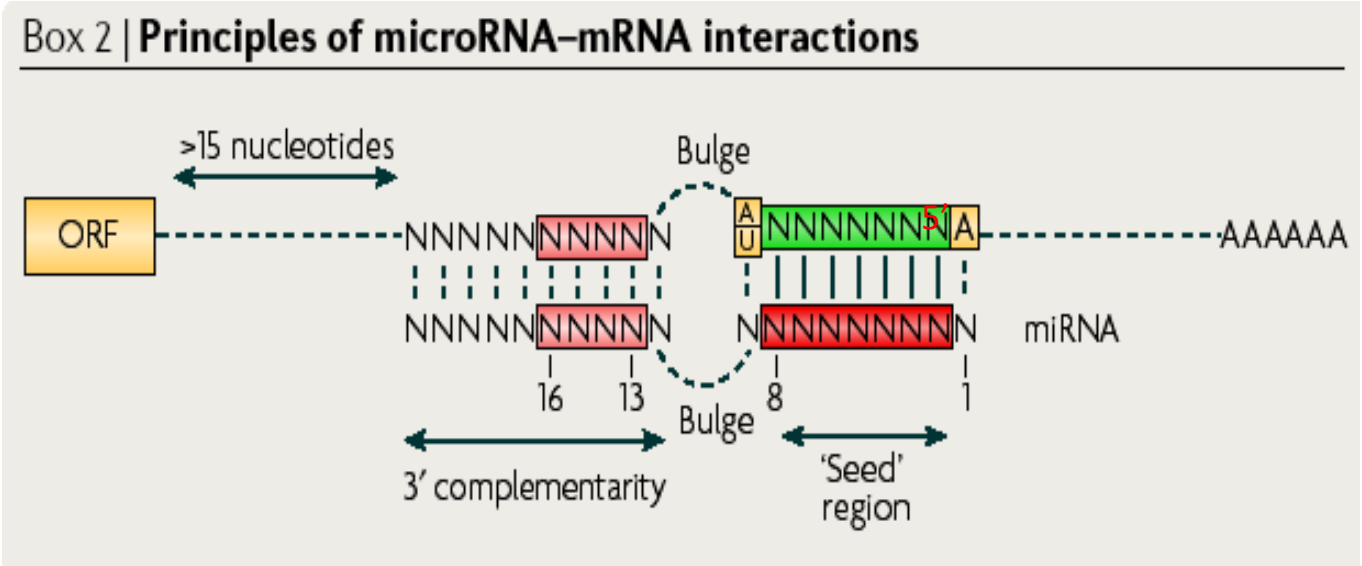
- I miRNA sono **codificati dai geni MIR**.
- Il trascritto primario di miRNA (pri-miRNA) si ripiega in una struttura a doppio filamento,
- Questo è **processato da dicer (DCL1).**
- Il filamento di miRNA **è frammentato**

- i filamenti di miRNA si legano al gene bersaglio (in verde).



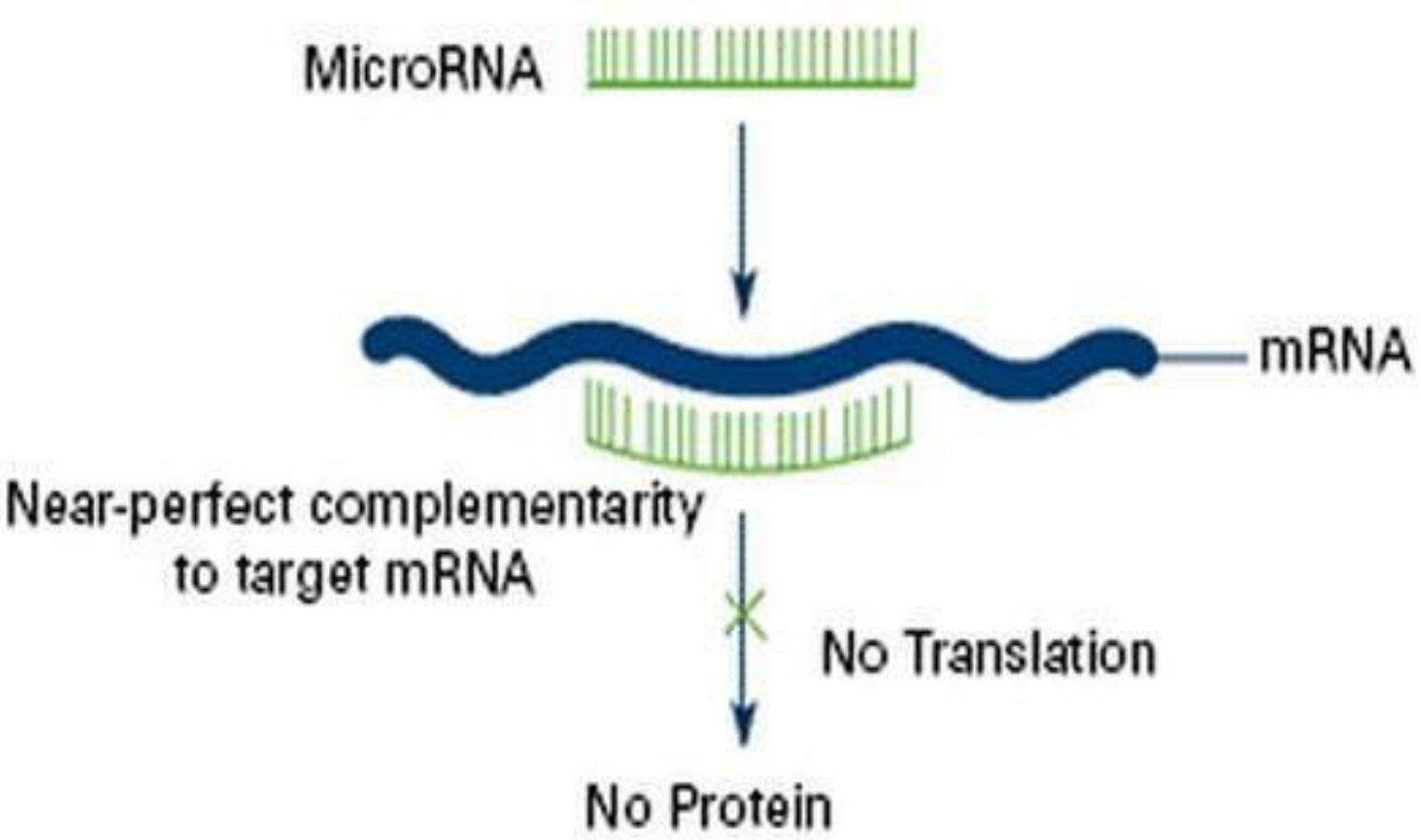
microRNA (miRNA) sono piccoli RNA silenziatori

- **I miRNA sono ncRNA, lunghi 19-24 nt, a singolo filamento.**
  - Attualmente nell'uomo sono stati identificati 1881 miRNA diversi (www.mirbase. org/)
    - **si pensa regolino l'espressione dei 2/3 dei geni cellulari.**



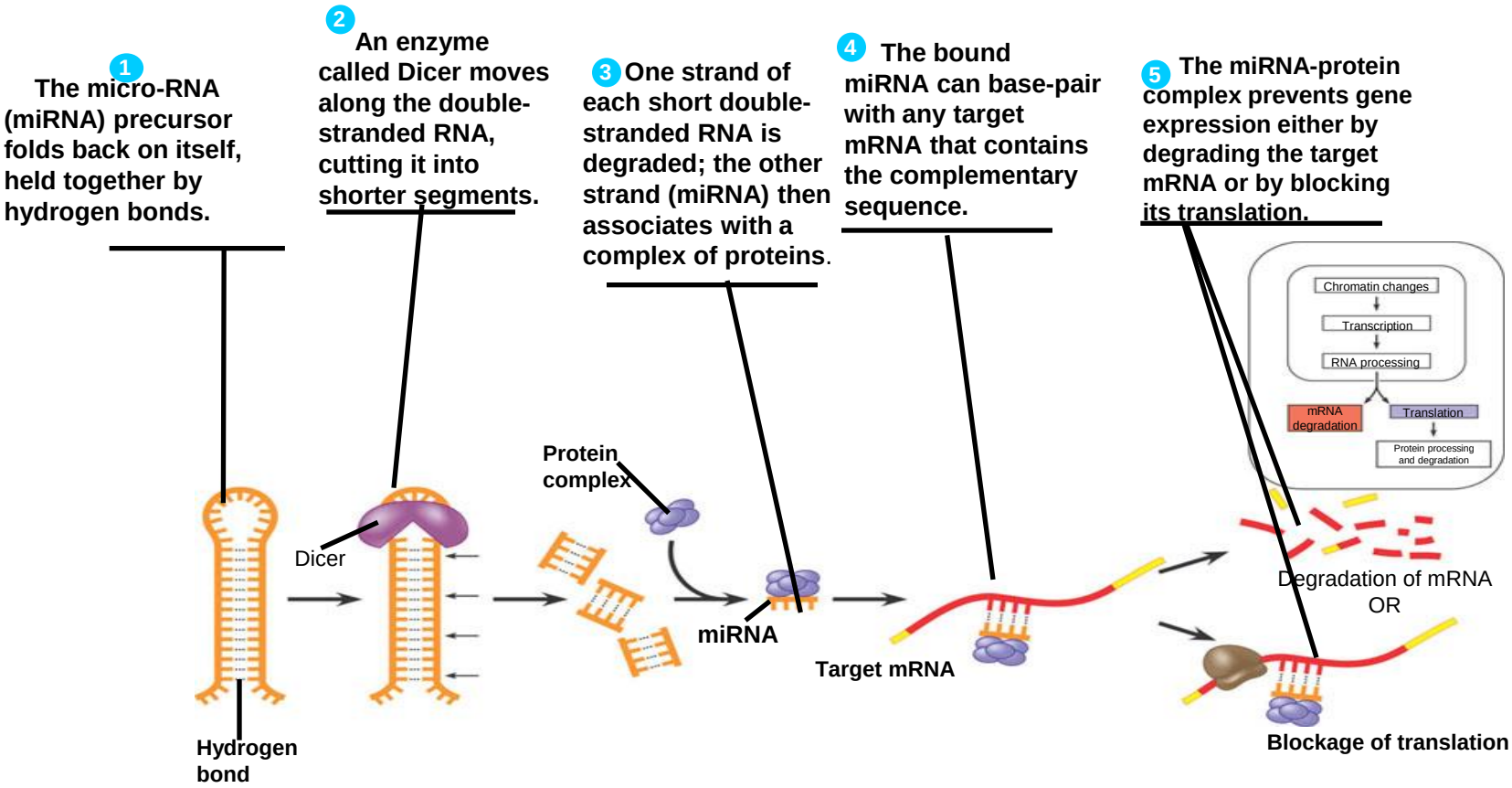
- I miRNA interagiscono con un mRNA bersaglio (target) mediante appaiamento imperfetto.
- L'espressione **dell'mRNA target è inibita.**
- I **miRNA interagiscono con un mRNA**

I miRNA sono inibitori dell'espressione genica



RNA interference by single-stranded microRNAs (miRNAs)

- Can lead to degradation of an mRNA or block its translation

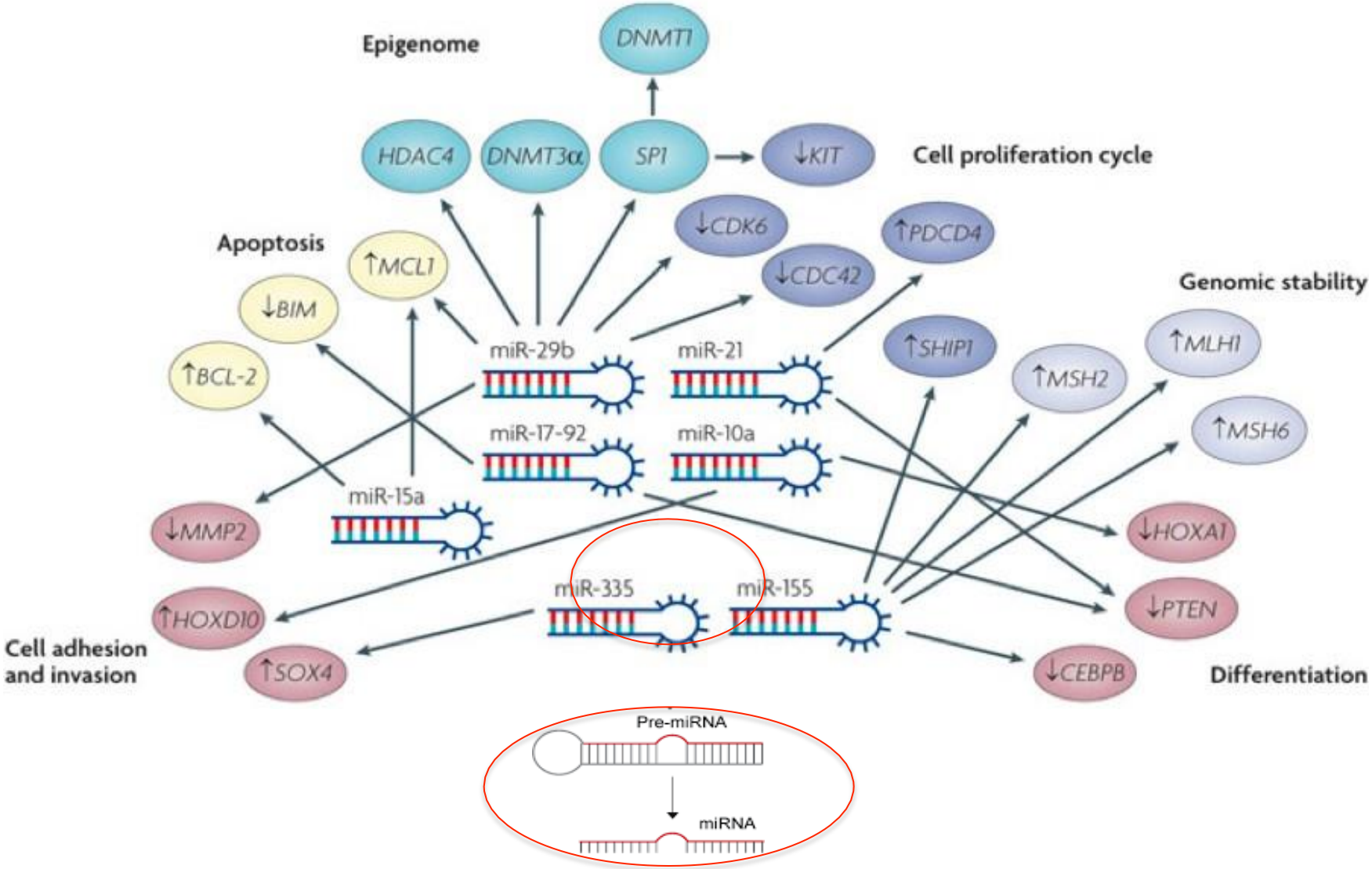


Funzioni dei miRNA

- **I miRNA svolgono un ruolo centrale nel controllo di numerosi processi fisiologici**:
  - Sviluppo
  - Differenziamento cellulare
  - Apoptosi
- **Aberrazioni nella loro espressione (mancanza, sotto o sovra espressione) sono correlate a diversi tipi di patologie**:
  - Cancro
  - Malattie neurodegenerative
  - Malattie cardiache

- Si tratta dunque di **molecole molto importanti**,
- Lo studio è **fondamentale nella comprensione dei processi biologici**, dei fenotipi patologici e, di conseguenza, nel design di terapie innovative.

Un miRNA puo' controllare l'espressione di centinaia di mRNA target



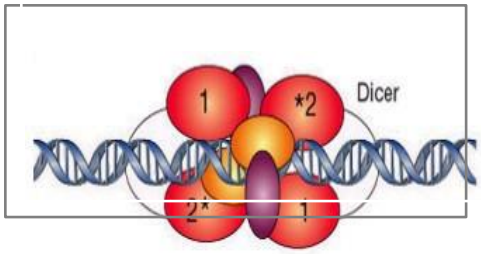
Dicer



- **Ribonucleasi specifica del dsRNA simile alla RNasi III**
- Enzima coinvolto nell'inizio dell'RNAi.
- È in grado di frammentare il dsRNA in piccoli RNA di dimensioni uniformi (siRNA)
- Le proteine della **famiglia Dicer sono nucleasi ATP-dipendenti.**
- L'enzima Rnasi III agisce come un dimero

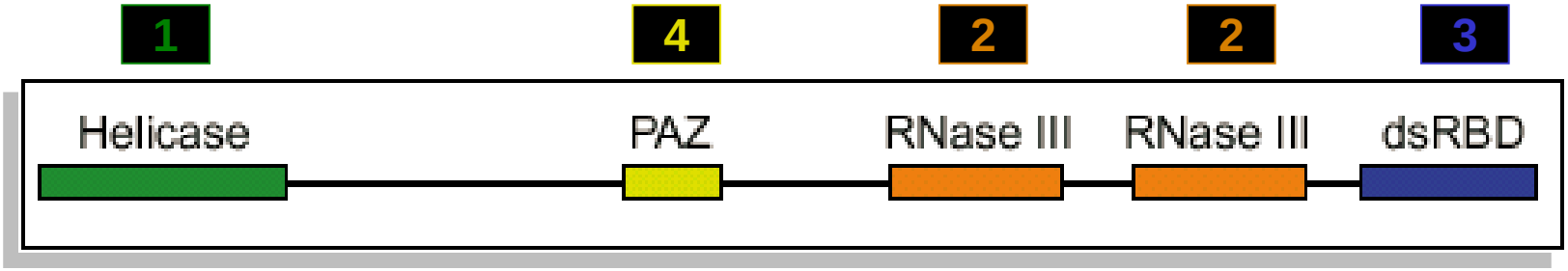


- Perdita di dicer→ perdita dell'elaborazione del silenziamento *in vitro*
- Gli omologhi dicer esistono in molti organismi tra cui C.*elegans, Drosphila,* lievito e uomo (**Dicer è una proteina conservata)**



Dicer's domains

- **Dicer is a ribonuclease (Rnase III family) with 4 distinct domains:**



1. Amino-terminal helicase domain

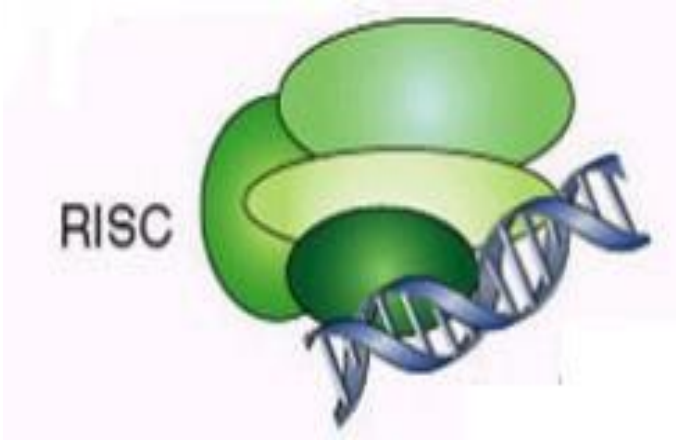
2. Dual RNase III motifs in the carboxy terminal segment

3. dsRNA binding domain

4. **PAZ domain** (110-130 amino-acid domain present in protein like Argo, Piwi..); it is thought to be **important for protein-protein interaction**

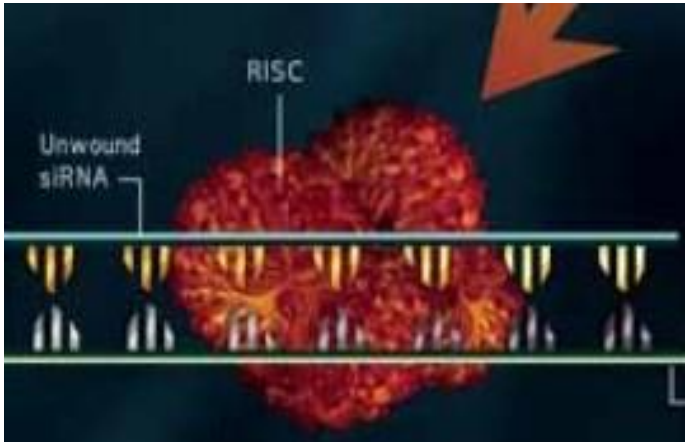
RISC (RNA-Induced Silencing Complex)

- **RISC is a large** (~500-kDa) **RNA-multi-protein complex,** which triggers mRNA degradation in response to siRNA

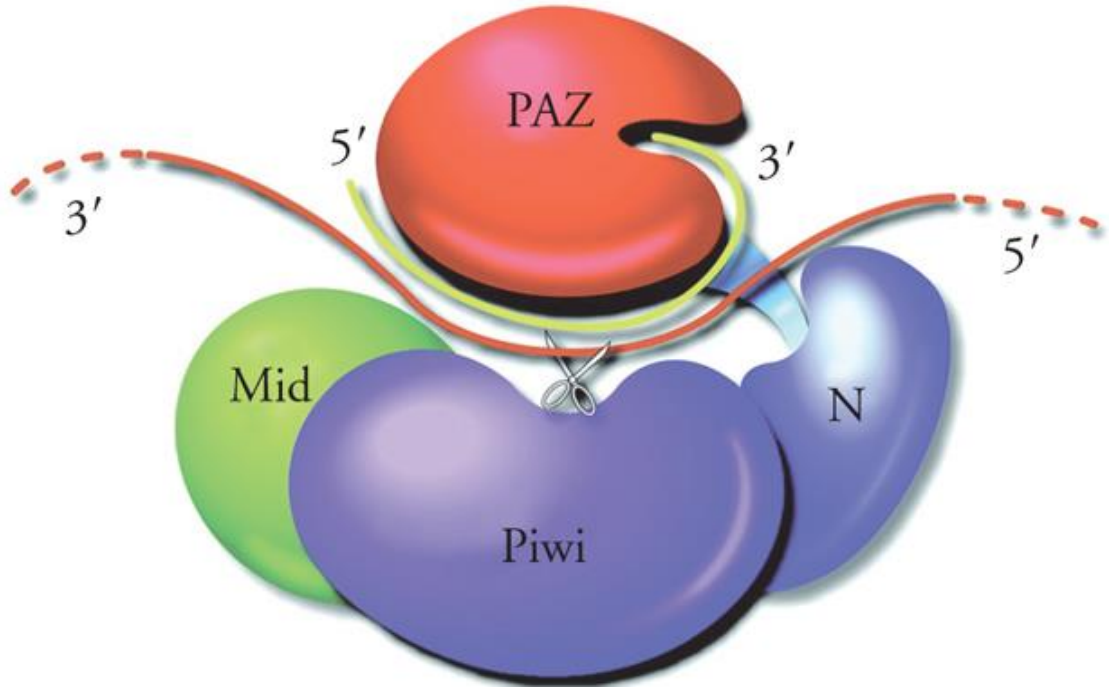


- Unwinding of double stranded siRNA by ATP independent helicase.

- **The active components of an RISC are**
  - **endonucleases** called **argonaute proteins**
- which cleave the target mRNA strand.



Complesso RISC (RNA-Induced Silencing Complex



- **Il disegno mostra l'RNA antisenso (il filo giallo nel diagramma) legato al dominio PAZ, mentre in arancione si ha l'mRNA ad esso complementare**

➢ **L'attività endonucleolitica risiede nel dominio Piwi**

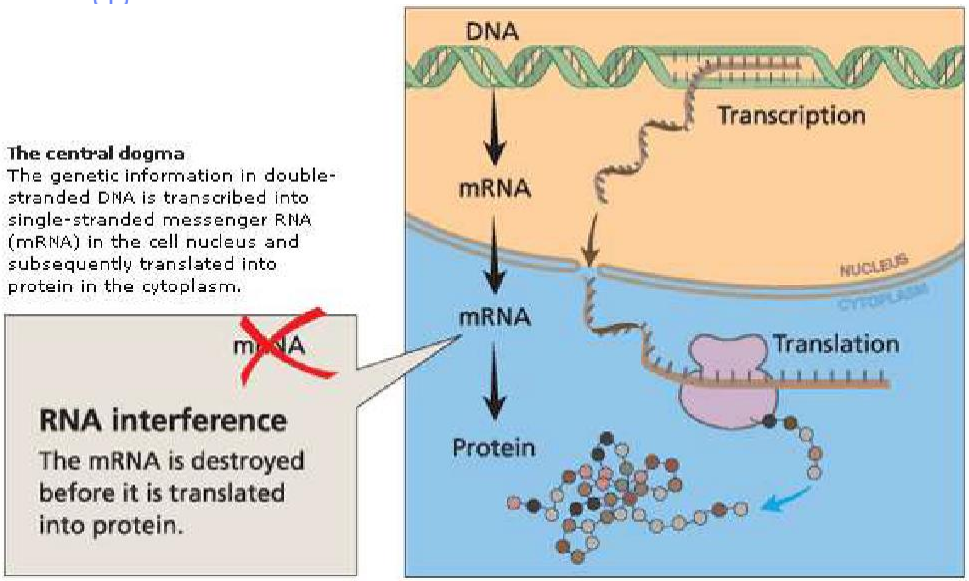
- in particolare, in **una regione di Piwi che ha omologia strutturale con gli enzimi della famiglia delle RNasi H, endonucleasi**
- **queste classicamente digeriscono il filamento di RNA in un ibrido DNA/RNA.**

Riassunto della differenze dei miRNA in piante e animali

	Plants	Animals
miRNA genes:	100-200	100-500
Location in genome:	intergenic regions	Intergenic regions, introns
Clusters of miRNAs:	Uncommon	Common
MiRNA biosynthesis:	*Dicer*-like	*Drosha*, *Dicer*
Mechanism of repression	mRNA cleavage	Translational repression
Location of miRNA target in a gene:	Predominantly the open-reading frame	Predominantly the 3′-UTR
miRNA binding sites in a target gene:	Generally one	Generally multiple
Functions of known target genes:	Regulatory genes crucial for development, enzymes	Regulatory genes—crucial for development, structural proteins, enzymes

b. RNA interference

1990s | 2006



- **for their discovery of RNA interference gene silencing by double-stranded RNA**ll

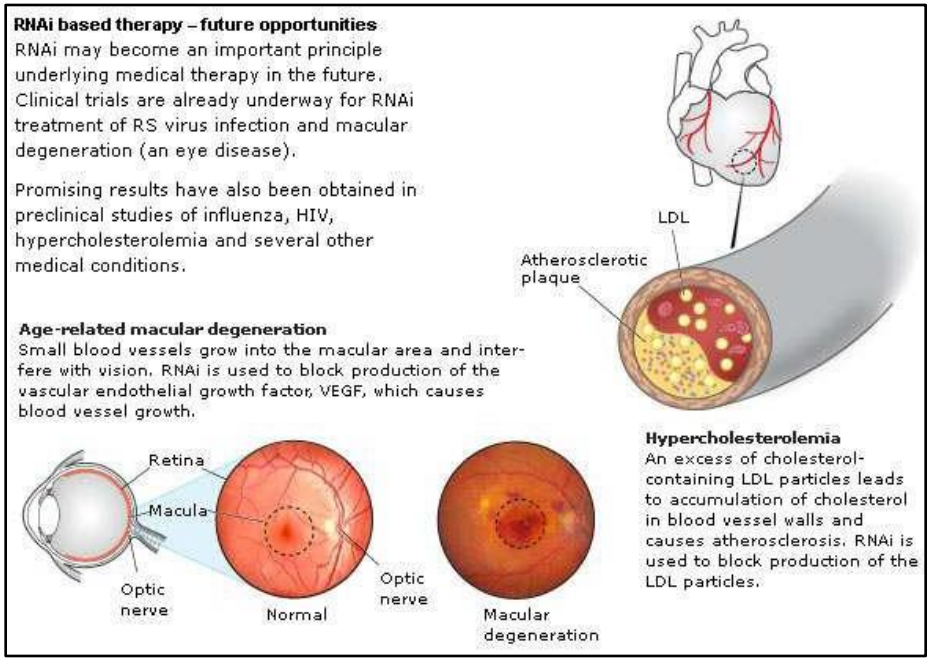
Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006



Andrew Fire
Stanford



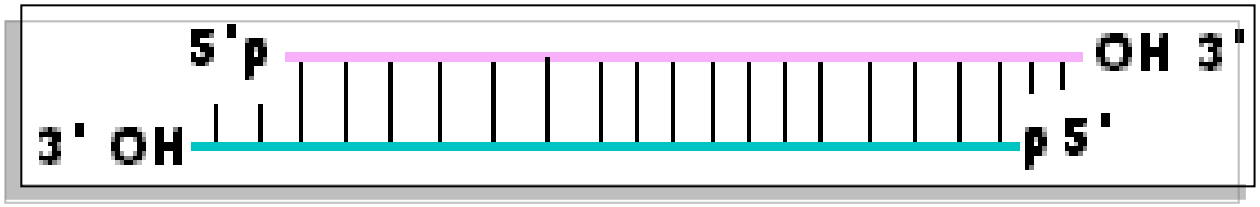
Craig Mello
U Mass



siRNA: Small Interfering RNA

- siRNA sta per small interefering RNA
- Si tratta di **piccole molecole di RNA la cui funzione è quella di impedire l'espressione genica o proteica,**
- I siRNA **reprimono l'espressione di un gene**
  - **si legano** al messaggero (mRNA)
  - e ne **inducono la degradazione**.
- Questo meccanismo è detto di **RNA interference (RNAi)**
  - anche se è bene ricordare che quello mediato da siRNA non è l'unico tipo di RNAi
- L' RNAi è una delle promesse nel campo delia terapia genica.
- L'idea è quella di
  - **bloccare l'espressione dei geni mut**ati (cioè danneggiati),
  - lo scopo è prevenire la sintesi della proteina dannosa.

siRNAs



- **Small interfering RNA**s (siRNA) that have an integral role in the phenomenon of RNA interference (RNAi), **a form of post-transcriptional gene silencing**

- **RNAi:** 21-25 nt fragments, which bind to the complementary portion of the target mRNA and tag it for degradation

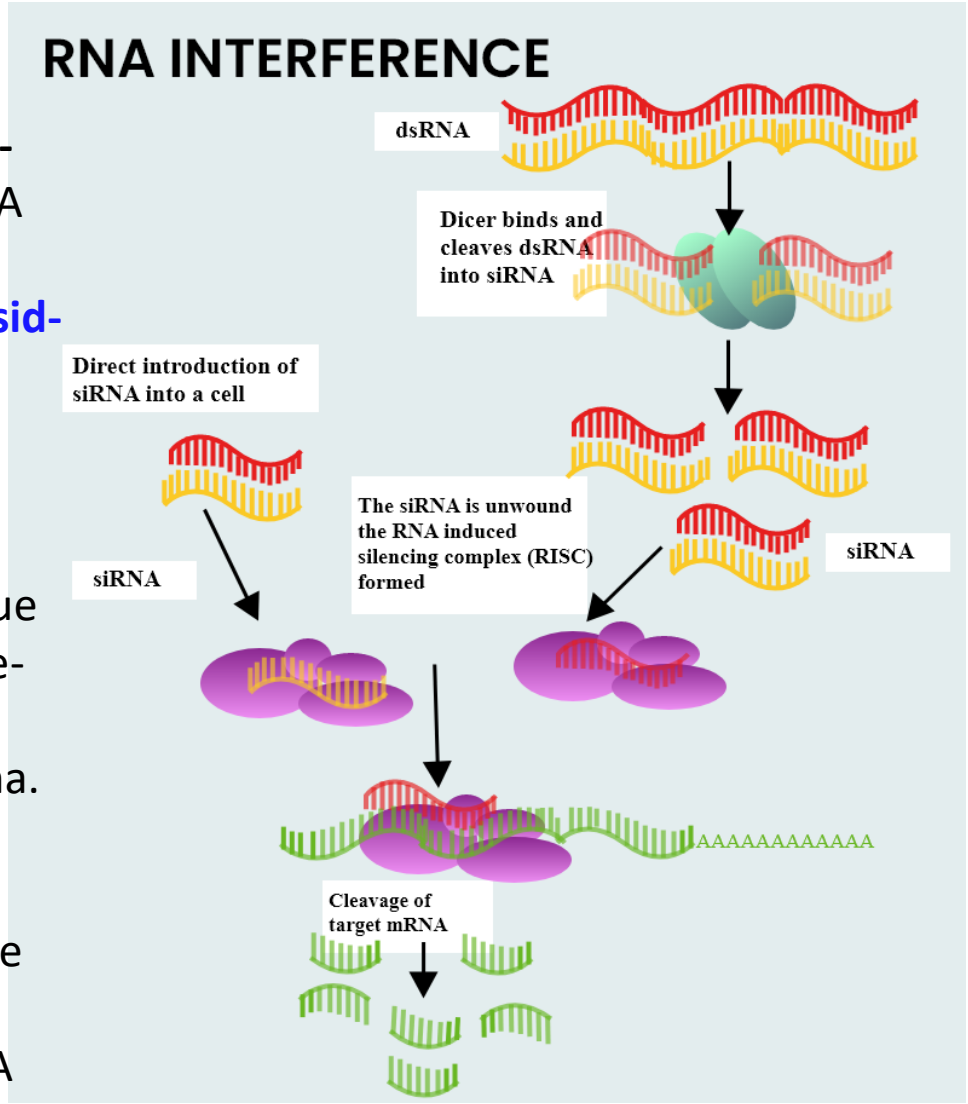
- A single base pair difference between the siRNA template and the target mRNA is enough to block the process.

- Each strand of siRNA has:
  a. 5’-phosphate termini
  b. 3’-hydroxyl termini
  c. 2/3-nucleotide 3’ overhangs

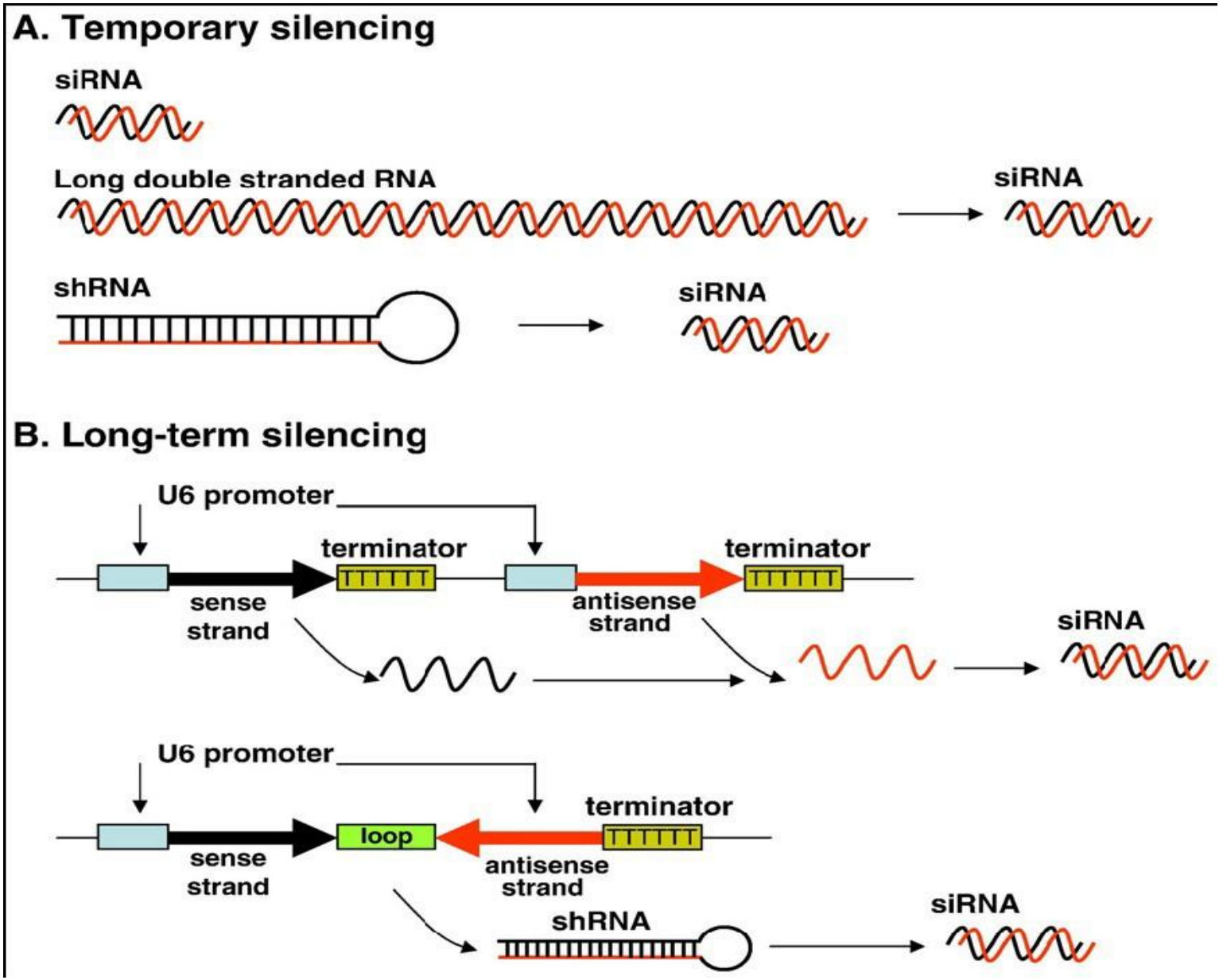


Processo di RNAi mediato da siRNA

- I siRNA si **ottendono a partire da una lunga molecola di RNA a doppio filamento** (double stranded RNA; dsRNA),
- Questo viene tagliato ad opera di **endo-ribo-nucieasi Dicer** in tanti piccoli frammenti (i siRNA appunto).
- I siRNA cosi ottenuti vengono a**ggiunti ai cosid-detto complesso RISC (RNA induced** silencing complex) ad ottenere il complesso RISC-siRNA.
- Ne! complesso RISC-siRNA iniziale, ancora inattivo, i siRNA sono ancora double-stranded.
- Una volta attivato, il ssRNA perde uno dei due filamenti e diventa dunque libero di andare a le-garsi ai messaggeri target ovvero l'mRNA del quale si vuole impedire la traduzione in proteina.
- Legandosi all'mRNA target il complesso RISC-siRNA ne induce la degradazione.
- Questo processo di inattivazione è altamente specifico poiché anche una sola base di diffe-renza fra la sequenza dello mRNA e del siRNA impedisce il legame fra i due.



Generazione di piccoli RNAi



siRNA e RNAi

- **I siRNA sono le principali molecole utilizzate nell'RNA Interference (RNAi) artificiale**.
- I siRNA vengono disegnati *ad hoc* sulla base del sito di legame scelto sul trascritto da silenziare ed hanno generalmente complementarità totale al loro target.
- Le molecole di siRNA vengono solitamente introdotte nelle cellule mediante vettori virali, virus ingegnerizzati che trasportano l'informazione per la codifica dei siRNA nel loro genoma.
- Un **uso tipico dell'R**NAi è il knock-out artificiale dei geni, ovvero

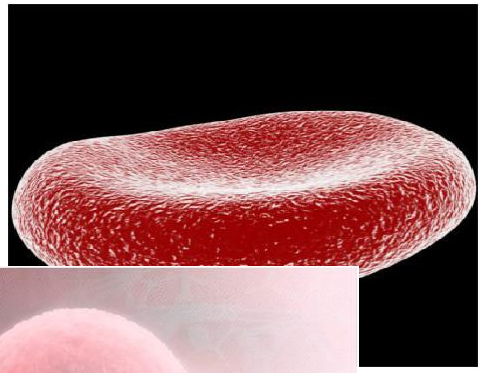
• silenziamento dell'espressione di uno più geni

- ciò al fine di studiarne gli effetti e le conseguenze:
- **quindi le funzioni svolte.**

Applications of RNAi

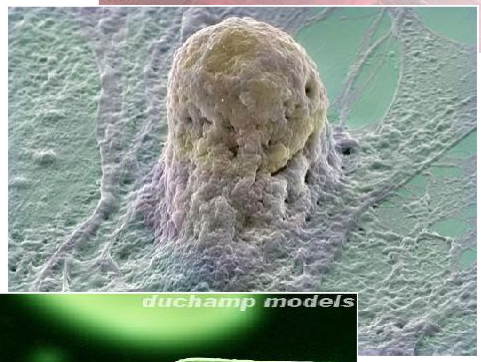
❑ Therapeutic uses of RNAi

- Hematology (blood)

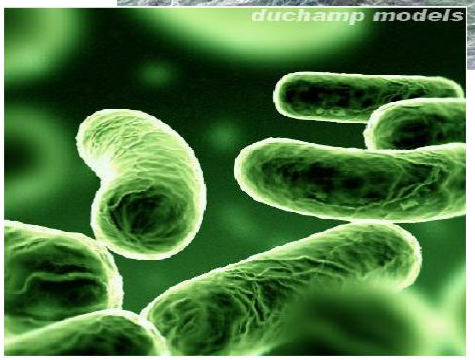




- Oncology (cancer



- Stem cell biology

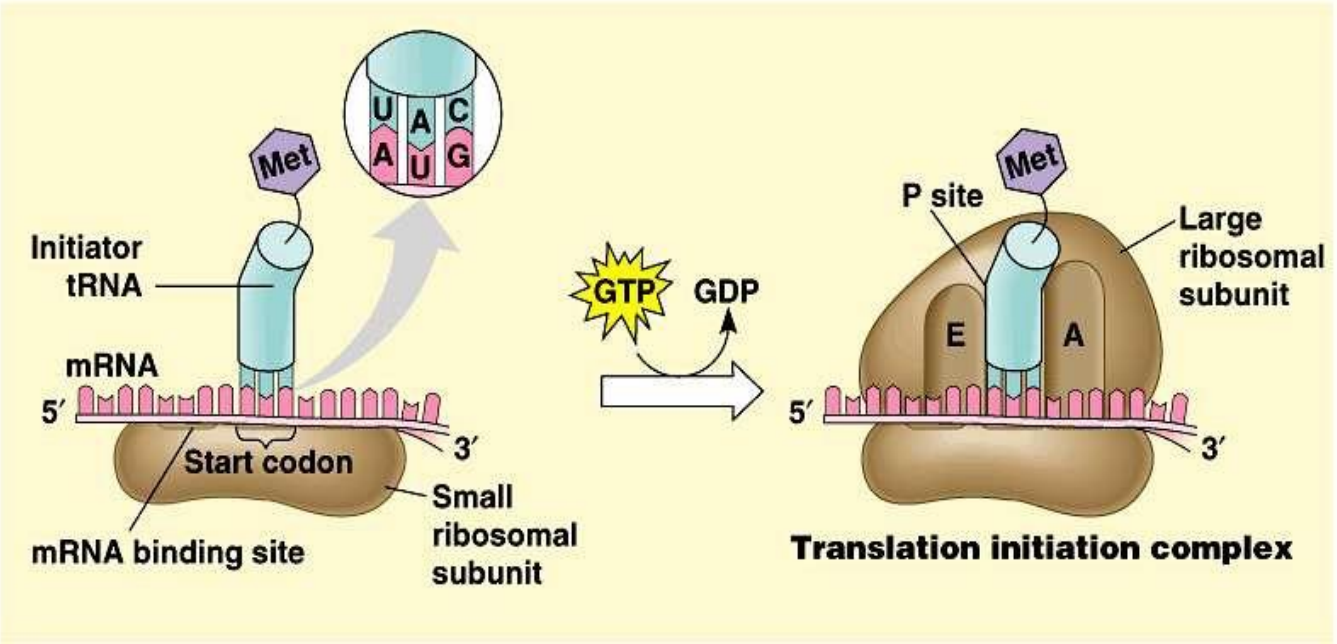


- Infectious diseases

5. Control of translation

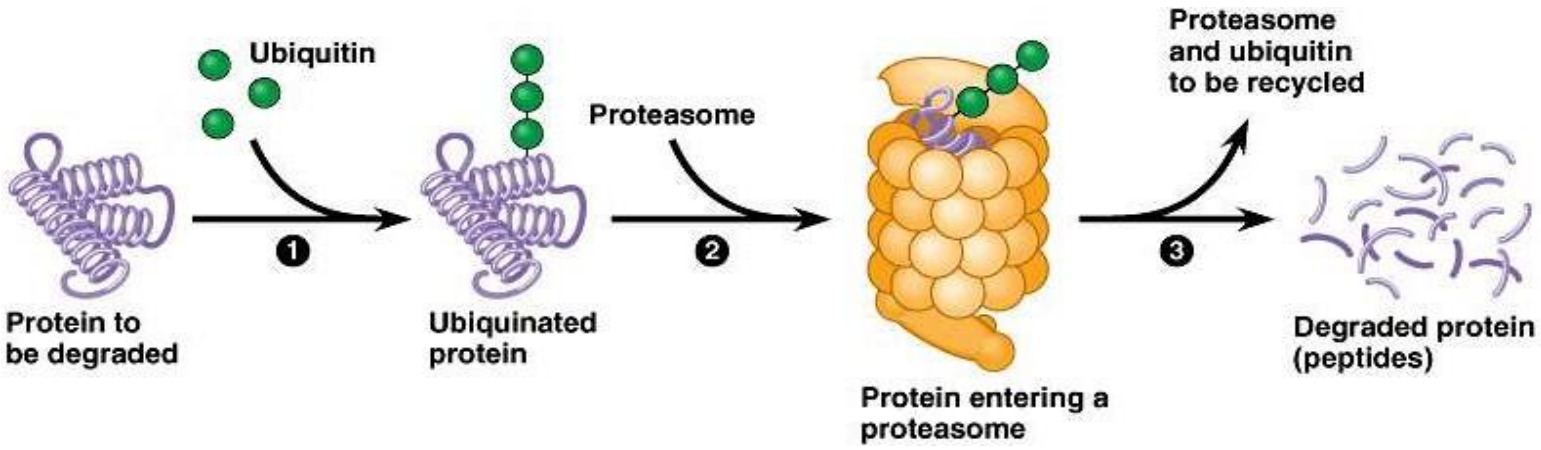
Block initiation of translation stage

- regulatory proteins attach to 5' end of mRNA
  - prevent attachment of ribosomal subunits & initiator tRNA
  - block translation of mRNA to protein



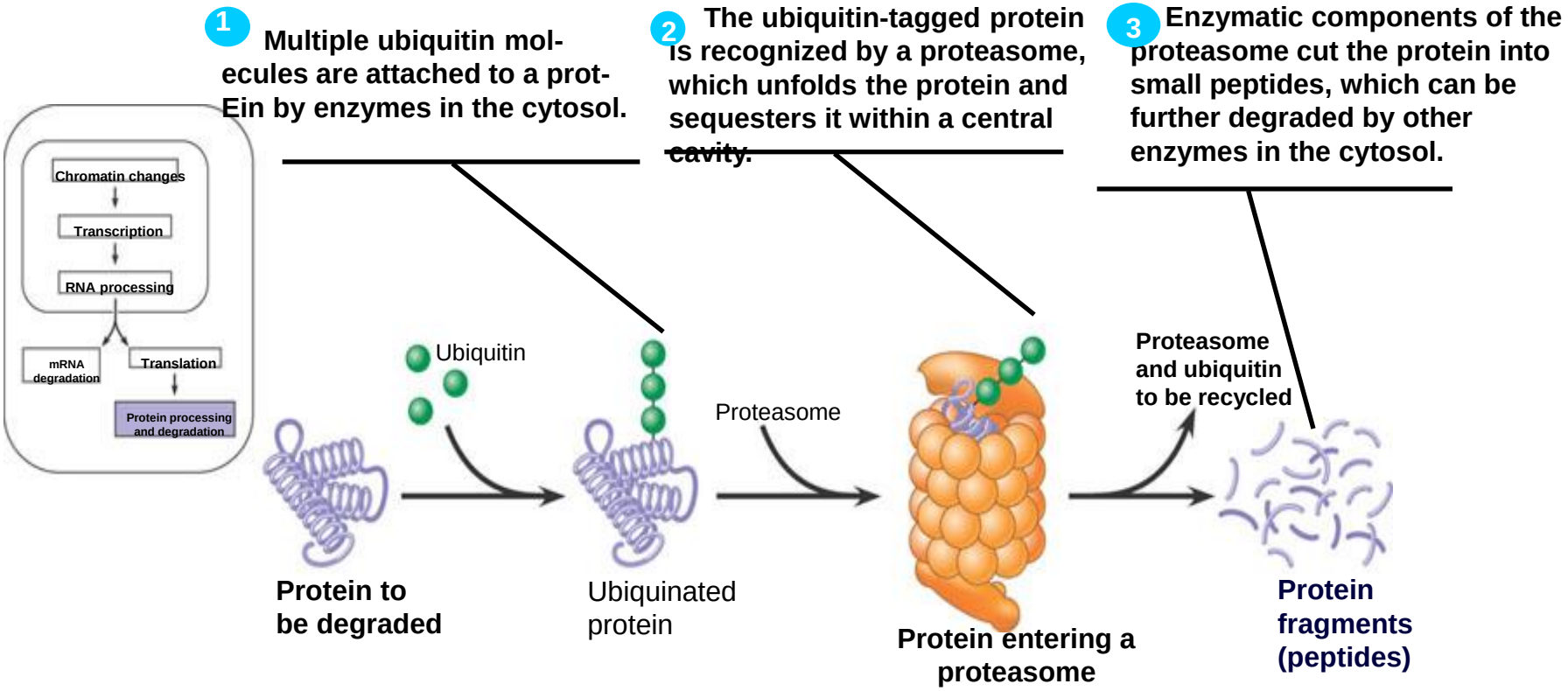
6-7. Protein processing & degradation

- **Protein processing**
  - folding, cleaving, adding sugar groups, targeting for transport
- **Protein degradation**
  - ubiquitin tagging
  - proteasome degradation



Proteasomes

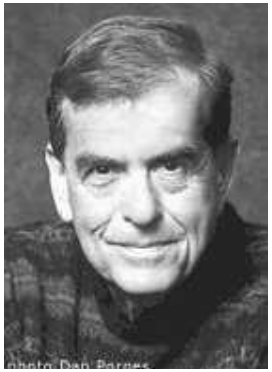
- Are giant protein complexes that bind protein molecules and degrade them



1980s | 2004

Ubiquitin

- **Death tag**
  - mark unwanted proteins with a label
  - 76 amino acid polypeptide, ubiquitin
  - labeled proteins are broken down rapidly in "waste disposers"
- **proteasomes**



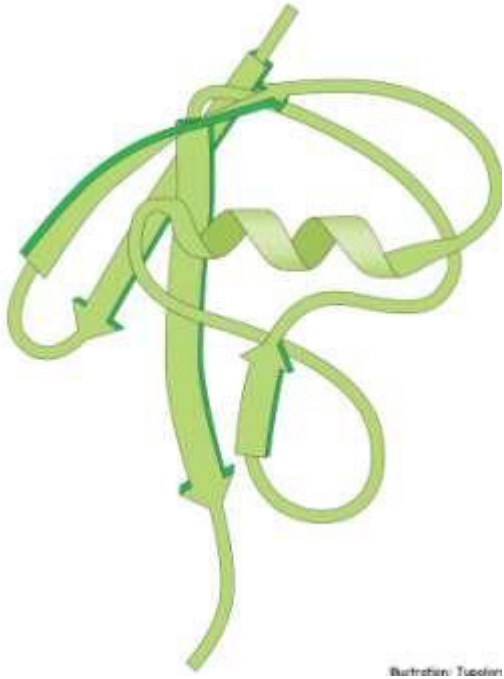
Aaron Ciechanover
Israel



Avram Hershko
Israel



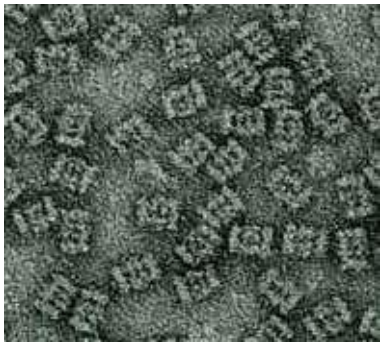
Irwin Rose
UC Riverside

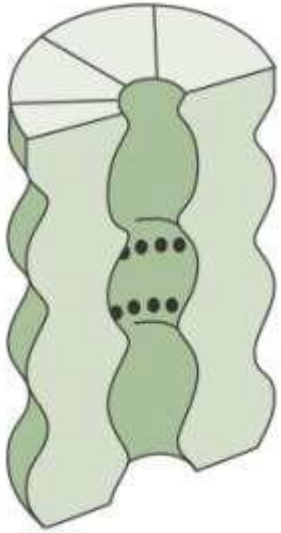


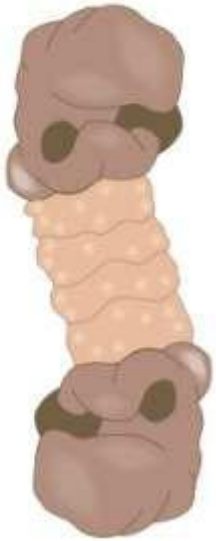
Proteasome

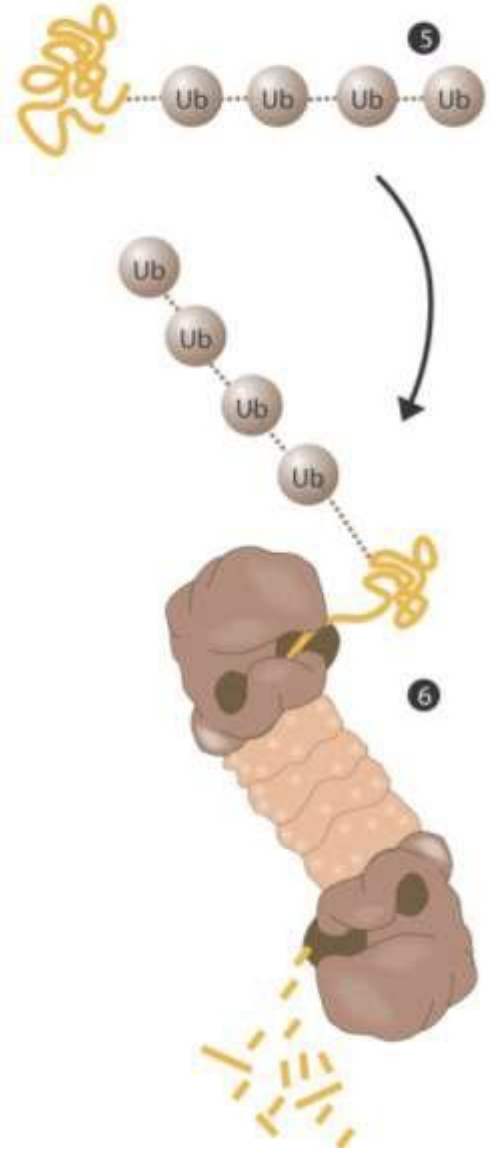
- **Protein-degrading —machine**
  - **cell's waste disposer**
  - **breaks down any proteins into 7-9 amino acid fragments**

➢ **cellular recycling**

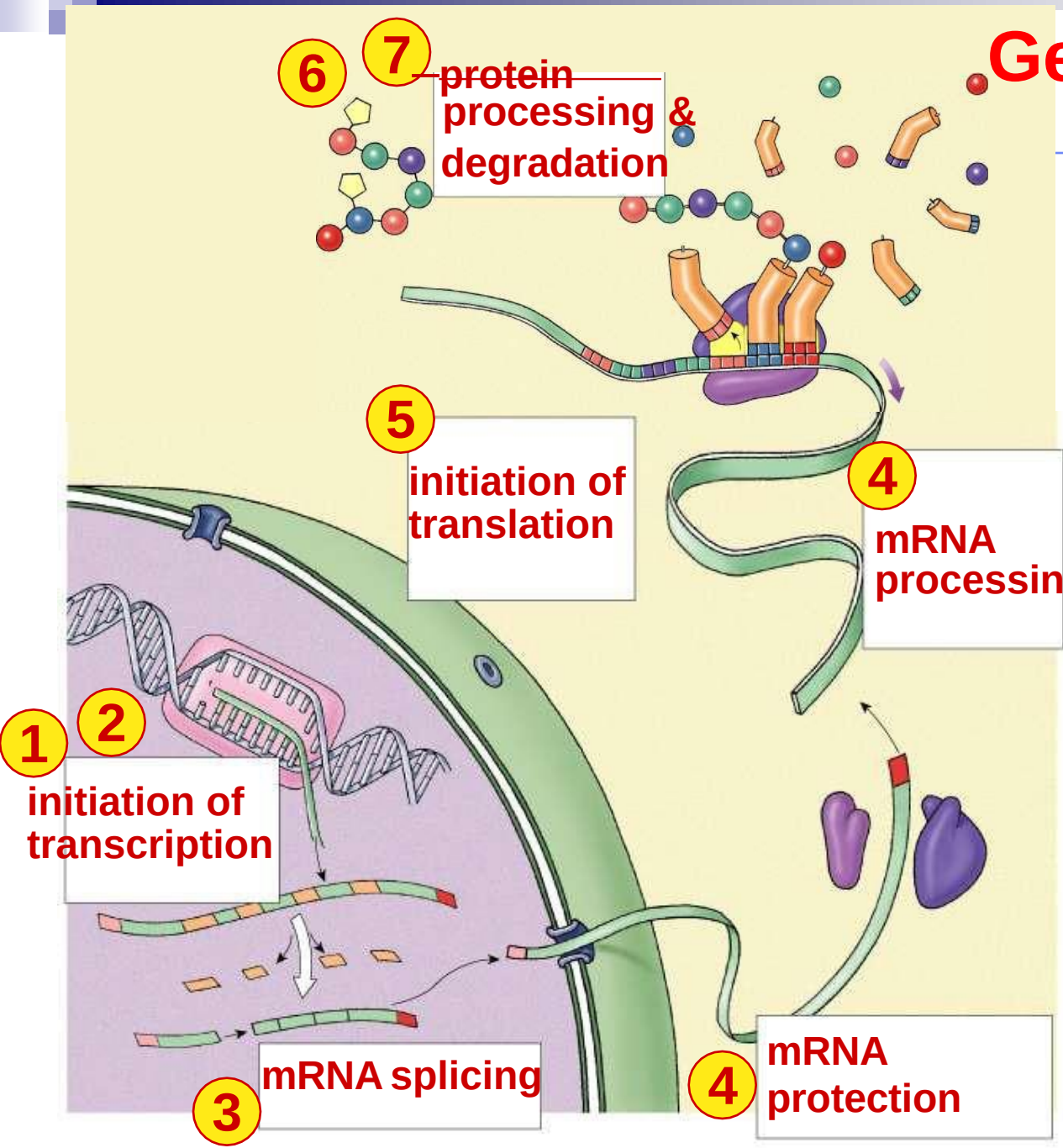








Gene Regulation



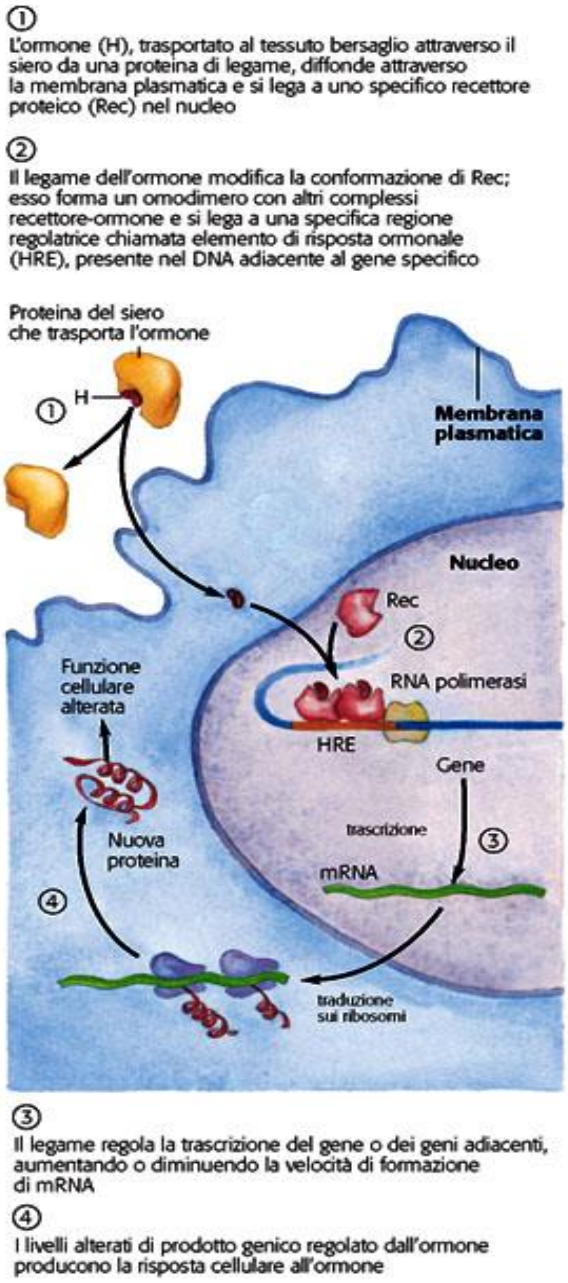
1 & 2. transcription
- DNA packing
- transcription factors

3 & 4. post-transcription
- mRNA processing
- splicing
- 5’ cap & poly-A tail
- breakdown by siRNA

5. translation
- block start of translation

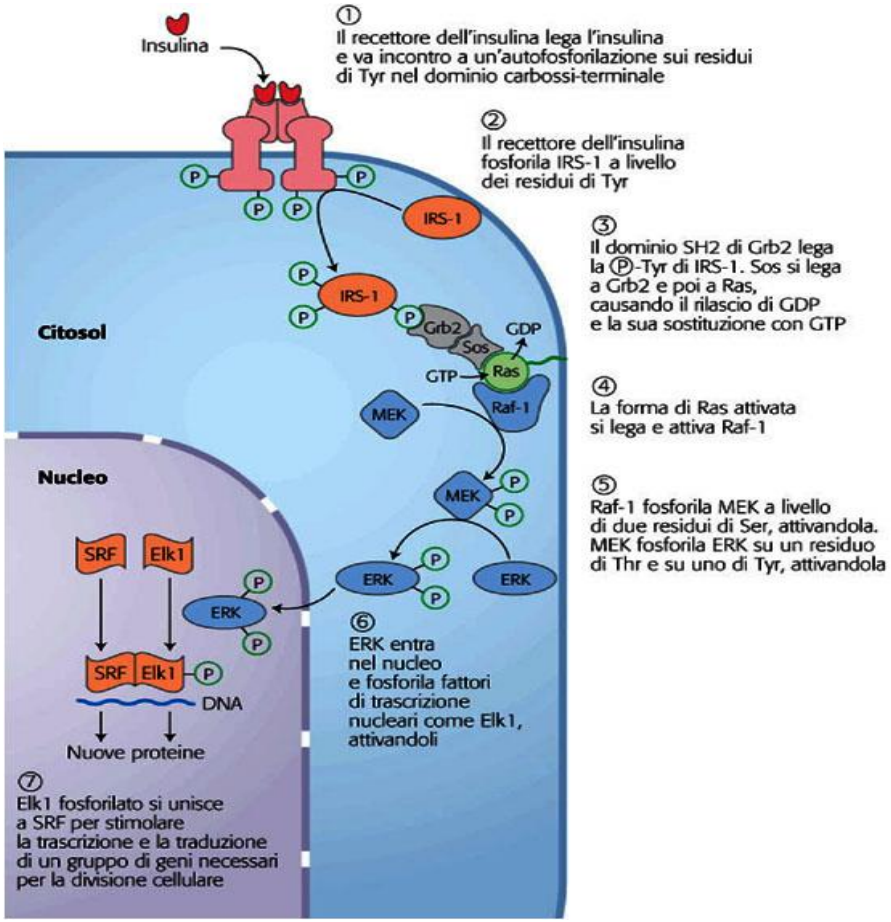
6 & 7. post-translation
- protein processing
- protein degradation

Regolazione ormonale



❑ Ormoni stereoidei

Interagiscono direttamente con le proteine regolatrici che si **legano al DNA** (recettori intracellulari) con effetti positivi o negativi sulla trascrizione dei geni bersaglio dell'ormone



❑ Gli ormoni non stereoidei

- Si **legano ai recettori della superficie cellulare,**
- **qui** innescano un meccanismo di segnalazione che stimola la trascrizione

Il mondo degli RNA non codificanti

la componente degli RNA non deputata alla codifica di proteine prodotta dal genoma umano e di altri vertebrati è molto più significativa e complessa rispetto a quanto ipotizzato solo fino a pochi anni fa.

diversi tipi di RNA non codificanti sono presenti in gran numero nel genoma umano e di altri mammiferi e svolgono un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica e praticamente di tutti i processi biologici.

Classificazione di RNA non codificanti

RNA non codificanti (ncRNA) possono innanzitutto essere suddivisi in due grosse categorie:

- housekeeping o infrastrutturali: A questo gruppo appartengono gli rRNA, i tRNA, i snRNA e i snoRNA;
- **regolatori**: sono coinvolti nella regolazione dell'espressione genica mediante diversi meccanismi.

- non sono in genere espressi in modo costitutivo in tutte le cellule e tessuti

- ma presentano sostanziali differenze spazio-temporali nei loro profili di espressione.

- Suddivisi in due principali categorie sulla base delle loro dimensioni:

- **piccoli:** sono molecole di RNA non codificante per proteine di lunghezza inferiore alle 200 basi;
- **lunghi**: sono molecole di RNA non codificante per proteine di lunghezza superiore alle 200 basi.

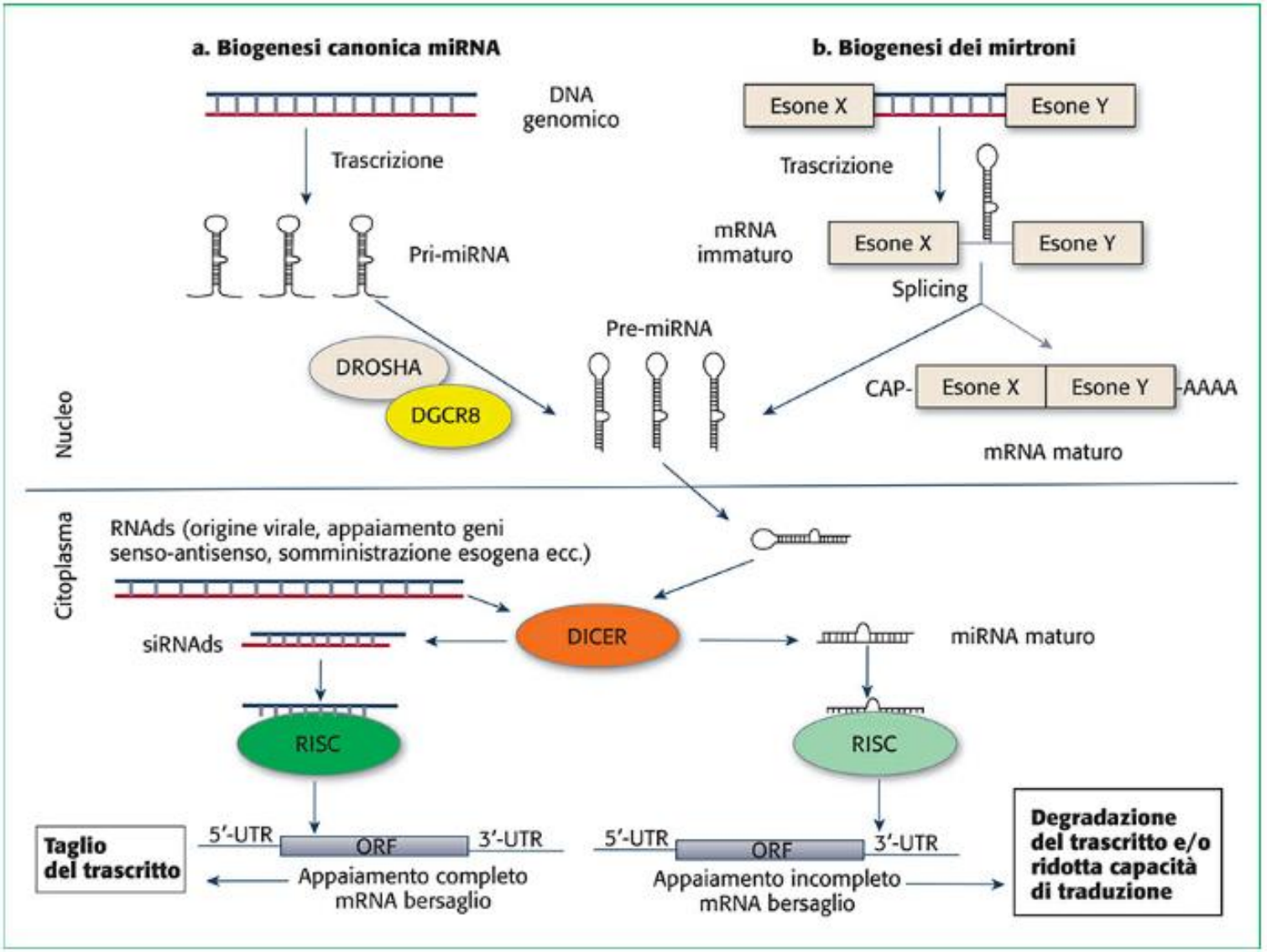
Principali classi di RNA non codificanti a funzione regolatoria

Nome	Abbreviazione	Descrizione
Piccoli		
microRNA	miRNA	Controllo post-trascrizionale dell'espressione genica mediante il complesso RISC

Nome	Abbreviazione	Descrizione
RNA interagenti con la proteina Piwi	piRNA	Silenziamento post-trascrizionale di trasposoni mediante un complesso RISC formato dalla proteina Piwi
RNA associati a inizio della trascrizione	tiRNA	Associati a geni con alti livelli di espressione
Piccoli RNA interferenti endogeni (*small interfering RNA*)	Endo-siRNA	Possono originare da processamento di trascritti antisenso e trasposoni
Lunghi RNA non codificanti intergenici	lincRNA	Localizzati in regioni intergeniche Modalità di azione probabilmente eterogenee
Trascritti antisenso naturali (*Natural Antisense Transcripts*)	NAT	Presentano complementarità di sequenza con i corrispettivi geni senso a livello o di mRNA o di RNA eterogeneo nucleare
Competing endogenous RNA	ceRNA	Coinvolti nella modulazione dell'espres-

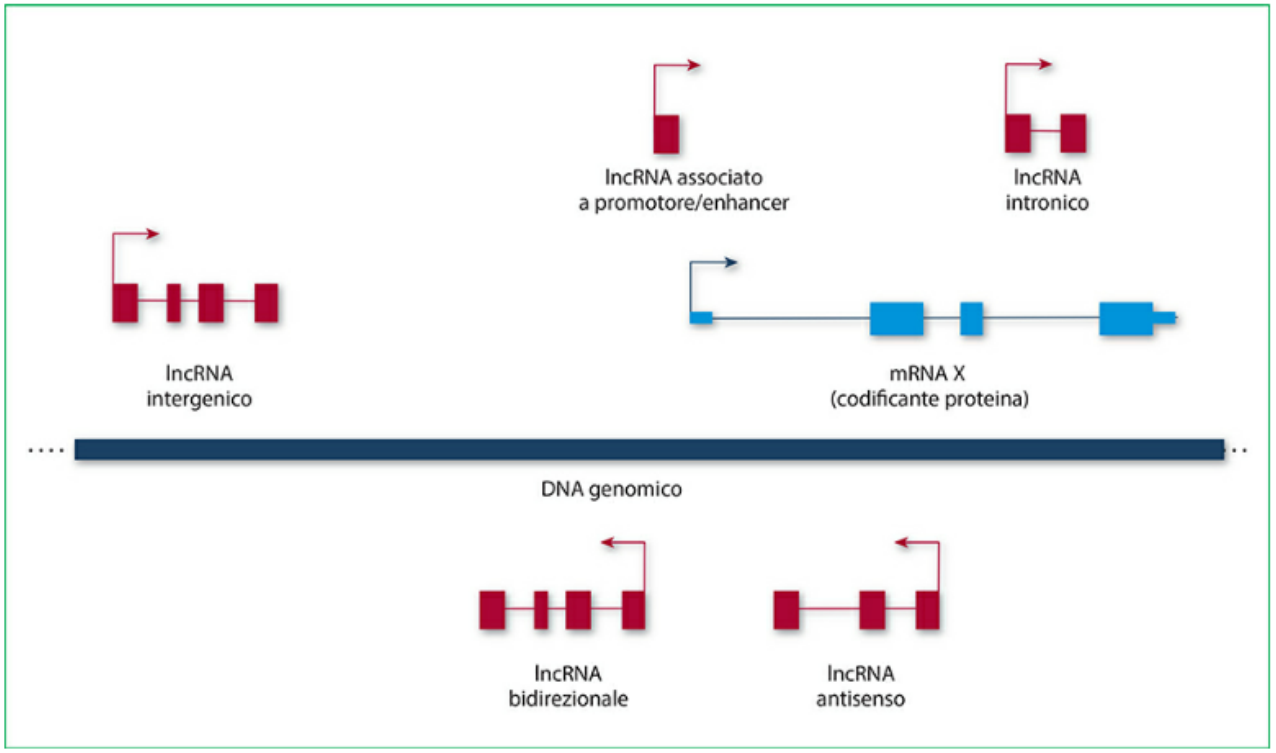
Nome	Abbreviazione	Descrizione
Piccoli RNA interferenti endogeni (*small interfering RNA*)	Endo-siRNA	Possono originare da processamento di trascritti antisenso e trasposoni
Lunghi		
Lunghi RNA non codificanti intergenici	lincRNA	Localizzati in regioni intergeniche Modalità di azione probabilmente eterogenee
Trascritti antisenso naturali (*Natural Antisense Transcripts*)	NAT	Presentano complementarità di sequenza con i corrispettivi geni senso a livello o di mRNA o di RNA eterogeneo nucleare
Competing endogenous RNA	ceRNA	Coinvolti nella modulazione dell'espressione di mRNA mediante competizione di legame con miRNA
RNA circolari	circRNA	Probabilmente stessa funzione dei ceRNA, ma maggiore stabilità a causa della loro struttura circolare

BIOGENESI E ORGANIZZAZIONE GENOMICA DEI miRNA



. LUNGHI ncRNA AD ATTIVITÀ REGOLATiVA

Un modo di classificare i lncRNA si basa sulla loro relazione genomica con altri trascritti, in genere codificanti per proteine. Si possono infatti individuare le seguenti sottoclassi .



Schema raffigurante l'organizzazione genomica dei lncRNA. Sono illustrate le varie modalità di relazione che i lncRNA (indicati in rosso) possono stabilire rispetto a trascritti codificanti proteine (in questo caso l'ipotetico mRNA X, indicato in azzurro) all'interno di una data regione genomica (rettangolo blu). Sono raffigurati lncRNA intergenici, intragenici/intronici, bidirezionali e associati a promotori/enhancer (ulteriori dettagli nel testo). Le frecce indicano la direzione di trascrizione di ciascun elemento rappresentato; i rettangoli corrispondono a esoni.

. LUNGHI ncRNA AD ATTIVITÀ REGOLATORIA
Classificazione

- **lncRNA intergenici** (anche indicati con l'abbreviazione lincRNA) allorché localizzati in regioni genomiche in cui non vi siano altri trascritti;
- **associati ad altri trascritti**: in questo caso, si possono ulteriormente suddividere in intronici/intragenici e antisenso. I lncRNA antisenso si sovrappongono ad altri trascritti ma in direzione opposta di trascrizione.

Si distinguono diversi gradi di sovrapposizione: si può andare dalla sovrapposizione diretta di uno o più esoni (antisenso propriamente detti) alla sovrapposizione delle regioni terminali (più frequentemente di quelle premotoriali); nel qual caso vengono denominati bidirezionali (si veda Fig. 3.2).

Funzione dei lncRNA

- REGOLAZIONE DELLA STRUTTURA CROMATINICA
- REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE
- REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE

Diagramma schematico del principio di funzionamento dei competing endogenous RNA (ceRNA).

