

## Cenni al controllo dell'espressione genica

Biotechnologie\_2011

1

## Perchè è necessario regolare l'espressione genica?

- ✚ Le cellule possono impedire che le risorse siano sprecate "spegnendo" i geni quando non sono necessari.
- ✚ La selezione naturale dovrebbe favorire la capacità di "accendere" o "spegnere" i geni.

2

## I geni possono essere espressi con efficienza diversa

Vedi figura  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887/figure/A976/?report=objectonly>

Il gene A è trascritto e tradotto in modo molto più efficiente del gene B. Ciò fa sì che la quantità di proteina A nella cellula sia molto maggiore di quella della proteina B.

3

Vedi fig.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26829/figure/A1117/>

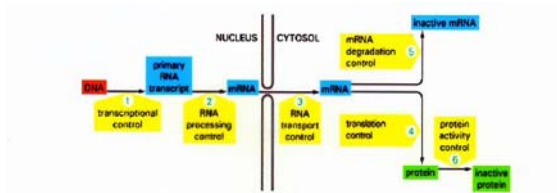
## La produzione di una proteina da parte di una cellula eucariotica.

- ✚ Il livello finale di ciascuna proteina in una cellula eucariotica dipende dall'efficienza di ciascun passaggio raffigurato.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26829/figure/A1117/>

4

### Controllo dell'espressione genica negli Eucarioti



Negli eucarioti l'espressione genica è regolata a diversi livelli. Sembrano infatti esistere sistemi per il controllo della trascrizione, della maturazione degli RNA precursori, del trasporto dell'RNA maturo fuori dal nucleo, della traduzione degli mRNA, della degradazione degli RNA maturi e della degradazione dei prodotti proteici.

5

### Controllo dell'espressione genica (1)

- Viene spesso svolto mediante controllo dell'inizio della trascrizione.
- Proteine regolatrici** si legano al DNA sia per bloccare oppure per stimolare la trascrizione, a seconda del modo con cui interagiscono con la RNA polimerasi.

6

### Controllo dell'espressione genica (2)

- Gli organismi procarioti regolano l'espressione genica in risposta al loro ambiente.
- Gli eucarioti regolano l'espressione genica per mantenere l'omeostasi dell'organismo.

7

### Proteine regolatrici (1)

- L'espressione genica è spesso controllata da proteine regolatrici che si legano a sequenze specifiche del DNA.
  - Le proteine regolatrici hanno accesso alle basi del DNA nel **solco maggiore**.
  - Le proteine regolatrici possiedono **motivi di legame al DNA**.

8

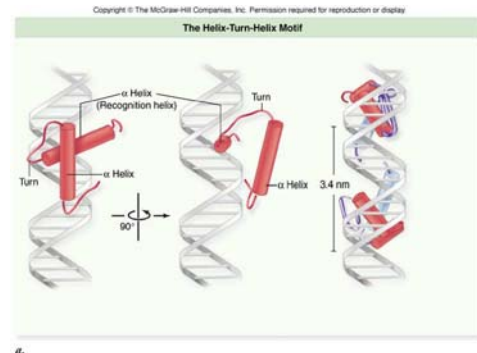
## Proteine regolatrici (2)

I motivi di legame al DNA sono sequenze amminoacidiche presenti nelle proteine regolatrici che si legano al DNA:

- Motivo "helix-turn-helix"
- Motivo "homeodomain"
- Motivo "zinc finger"
- Motivo "leucine zipper"

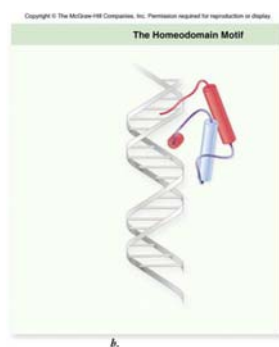
9

## Motivo "Helix-Turn-Helix"



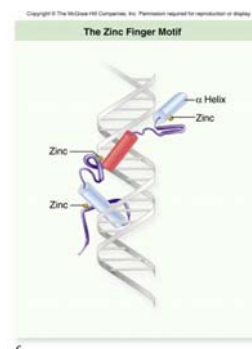
10

## Motivo "Homeodomain"



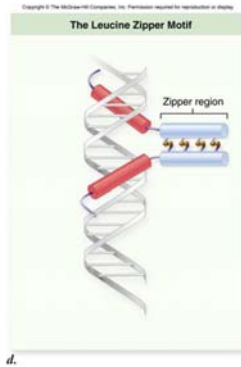
11

## Motivo "Zinc Finger"



12

## Motivo “Leucine Zipper”



13

## Regolazione nei Procarioti (1)

- I Procarioti hanno due livelli di controllo genico. I meccanismi trascrizionali controllano la sintesi del mRNA e i meccanismi traduzionali controllano la sintesi delle proteine dopo che il mRNA è stato prodotto.



- Il controllo della trascrizione può essere:

- controllo positivo** – aumenta la trascrizione quando degli attivatori si legano al DNA.
- controllo negativo** – riduce la trascrizione quando dei repressori si legano a regioni regolatrici del DNA chiamate operatori

14

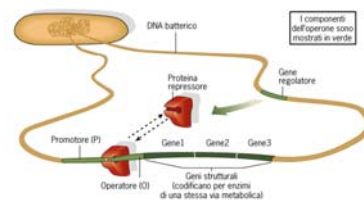
## Regolazione nei Procarioti (2)

- Le cellule procariotiche spesso rispondono al loro ambiente mediante alterazioni dell'espressione genica.
- I geni coinvolti nella stessa via metabolica sono organizzati in **operoni**.
- Alcuni operoni sono indotti quando tale via metabolica è richiesta.
- Alcuni operoni sono repressi quando la via metabolica non è più necessaria.
- Nella *E. coli* sono stati identificati 75 diversi operoni che controllano 250 geni strutturali.

15

## Operone batterico (1)

- Nei batteri i geni che codificano per una via metabolica sono di solito raggruppati insieme nel cromosoma, in un complesso funzionale detto **operone**.
- Tutti i geni di un operone sono **controllati in modo coordinato** (Jacob & Monod, 1961).
- Un tipico operone batterico è costituito da **geni strutturali**, da un **gene regolatore** e da due regioni con funzione di **promotore** e di **operatore**.



16

#### Operone batterico (2): geni strutturali

- ✚ **Geni strutturali:** codificano per proteine necessarie per le normali operazioni della cellula. Per esempio, possono essere enzimi necessarie per degradare gli zuccheri o sintetizzare amminoacidi.
- ✚ I geni strutturali di solito sono raggruppati e la RNA polimerasi si muove da un gene strutturale al successivo, **trascrivendoli tutti in un unico mRNA**.
- ✚ Questo lungo mRNA (**mRNA policistronico**) viene poi tradotto in **polipeptidi distinti corrispondenti ai diversi enzimi della via metabolica**.
- ✚ Perciò, l'attivazione di un gene attiva anche tutti i geni codificanti per gli enzimi di un dato operone.

17

#### Operone batterico (3): Promotore, operatore, gene regolatore

- ✚ **Promotore:** sequenza nucleotidica in cui la RNA polimerasi si lega al DNA prima di iniziare la trascrizione.
- ✚ **Operatore:** sequenza nucleotidica di solito localizzato in zona sovrapposta al promotore, serve di sito di legame per una proteina chiamata **repressore**.
  - Il repressore è un es. di **proteina regolatrice di geni**, che **riconosce una sequenza nucleotidica specifica del DNA e si lega ad essa con elevata affinità**.
    - ◆ Gioca un ruolo fondamentale per determinare se un particolare gene debba essere trascritto o meno.
- ✚ **Gene regolatore:** codifica per la proteina con funzione di repressore

18

#### Operone batterico (4)

- ✚ La chiave per il controllo dell'espressione dell'operone sta nel **repressore**.
- ✚ Quando il **repressore** (proteina) **si lega all'operatore** (sequenza nucleotidica) **il promotore non è più disponibile per il legame alla RNA polimerasi e la trascrizione dei geni strutturali viene soppressa**.
- ✚ La capacità del repressore di legarsi all'operatore e di **inibire la trascrizione dipende dalla conformazione della proteina**, regolata allostericamente dal composto chiave della via metabolica (es. lattosio, triptofano).
- ✚ E' la concentrazione di tale metabolita chiave che determina se l'operone è attivo o inattivo in un dato momento.

19

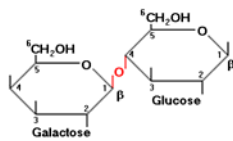
#### Due metaboliti fondamentali per la crescita batterica: Lattosio, triptofano

- ✚ **Lattosio:** disaccaride, composto di glucosio e galattosio, la cui degradazione ossidativa fornisce intermedi metabolici ed energia.
- ✚ Il primo passaggio del metabolismo (degradazione) è l'idrolisi del legame  $\beta$ -galattosidico fra i due zuccheri, catalizzata dall'enzima  **$\beta$ -galattosidasi**.
- ✚ Quando le cellule batteriche crescono in condizioni minime non hanno bisogno della  $\beta$ -galattosidasi:
  - Contiene circa < 5 copie di  $\beta$ -galattosidasi e 1 singola copia del corrispondente mRNA.
- ✚ Entro pochi minuti dall'aggiunta di lattosio al terreno di coltura, le cellule contengono approssimativamente un n° 1000 volte maggiore di molecole di  $\beta$ -galattosidasi:
  - La presenza di lattosio ha indotto la sintesi dell'enzima

20

## $\beta$ -galattosidasi

- Idrolizza il legame glicosidico fra il galattosio e il glucosio del disaccaride lattosio, che poi vengono utilizzati per fornire energia mediante la glicolisi:



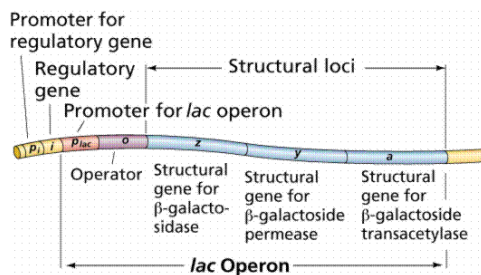
lattosio

21

## Operone *lac* (1)

- Gruppo di geni che regola la produzione degli enzimi necessari per metabolizzare il lattosio nelle cellule batteriche.
- Operone inducibile: operone in cui la presenza di un metabolita chiave (lattosio) induce la trascrizione dei geni strutturali.
- Contiene tre geni strutturali in tandem:
  - lacZ***, che codifica per la  $\beta$ -galattosidasi
  - lacY***, che codifica per la lattosio permeasi, proteine che permette l'ingresso del lattosio nella cellula
  - lacA***, che codifica per la tiogalattoside transacetilasi (ruolo poco chiaro)

22



<http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/biobookgenctrl.html>

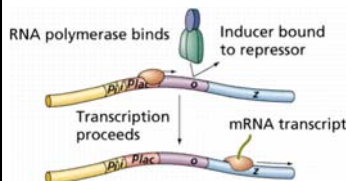
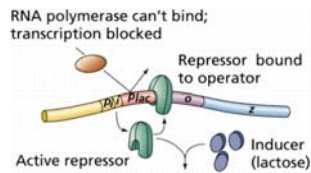
23

## Lattosio presente

- Lattosio entra nella cellula.
- Si lega al repressore (proteina)
- Cambia la conformazione del repressore
- Lo rende incapace di legarsi alle sequenze nucleotidiche dell'operatore nel DNA
- I geni strutturali vengono trascritti
- Gli enzimi vengono sintetizzati
- Le molecole di lattosio vengono catabolizzate

24

### Assenza di lattosio



### Presenza di lattosio

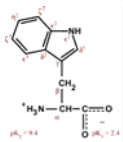
25

### Operone *lac* (2)

- In un operone inducibile come il *lac*, la **proteina repressore** è in grado di legarsi al DNA solo in assenza di lattosio, che agisce come **induttore**.
- Man mano che la concentrazione di lattosio nel terreno diminuisce il disaccaride si dissocia dal suo sito di legame sulla proteina repressore.
- Il rilascio del lattosio permette al repressore di legarsi all'operatore.
- Viene bloccata la polimerasi che non può più raggiungere i geni strutturali e la trascrizione dell'operone viene disattivata.

26

### Triptofano



- Amminoacido necessario per la sintesi delle proteine.
- La sua assenza richiede un investimento energetico per la sua sintesi.
- Le cellule che crescono in assenza di triptofano contengono gli mRNA e gli enzimi necessari per la sintesi del triptofano.
- Se l'amminoacido è **presente** nel mezzo le cellule non hanno più bisogno di sintetizzarlo.
- Entro pochi minuti si blocca la produzione degli **enzimi responsabili per la sua produzione**.
- Quindi, in presenza di triptofano, i geni che codificano per tali **enzimi** sono **repressi**.

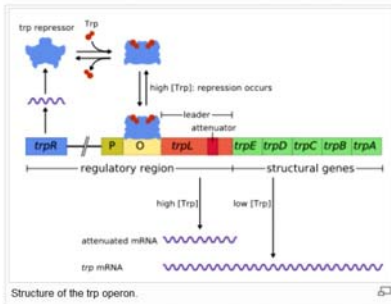
27

### Operone *trp* (1)

- Operone reprimibile**: il repressore non è in grado di legare il DNA operatore da solo.
- Il repressore è attivo come **proteina legante il DNA** soltanto quando è **complessato** con un fattore specifico, come il triptofano, che agisce da **corepressore**.

28

## Operone *trp* (1)



- Contiene 5 geni strutturali: *trp E*, *trp D*, *trp C*, *trp B*, e *trp A*, che codificano per la triptofano sintasi.
- Contiene inoltre un promotore che si lega alla RNA polimerasi e un operatore che blocca la trascrizione quando legato alla proteina sintetizzata dal gene repressore (*trp R*) che si lega all'operatore

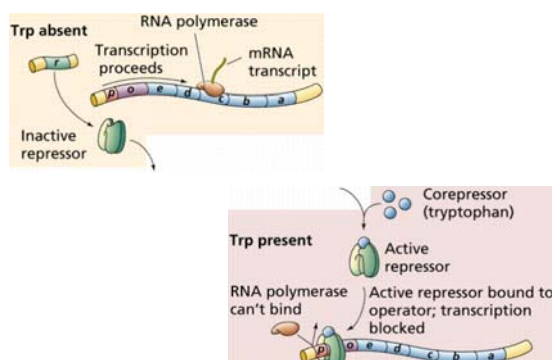
29

[http://en.wikipedia.org/wiki/Trp\\_operon](http://en.wikipedia.org/wiki/Trp_operon)

## Operone *trp* (2)

- Assenza di triptofano :**
  - il sito operatore è disponibile per legare la RNA polimerasi, che trascrive i geni strutturali dell'operone *trp* consentendo la produzione di enzimi che sintetizzano il triptofano.
- Presenza di triptofano:** gli enzimi della via biosintetica per questo AA non sono più necessari:
  - L'aumento della concentrazione di triptofano determina la formazione del complesso triptofano-repressore che blocca la trascrizione.

30



31

Controllo dell'espressione genica

**EUCARIOTI – NON PER ESAME**

32



### Controllo dell'espressione genica negli Eucarioti

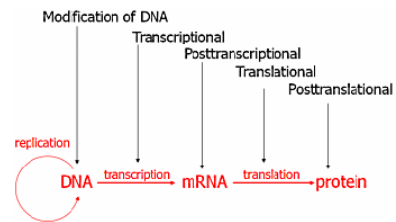
- Decine di migliaia di geni
- Molti tipi cellulari differenti
- Cellula batterica: quantità di DNA x codificare circa 3000 peptidi, 1/3 dei quali espresso in modo continuo.
- Cellula umana: molto + DNA (6 miliardi di coppie di basi), sufficienti x codificare diversi milioni di polipeptidi.
- Sebbene la maggior parte del DNA umano non codifichi x proteine, si stima che una tipica cell di mammifero codifichi x 5000 differenti polipeptidi in ogni momento.
- Molti di questi peptidi – prodotti da «housekeeping genes» – sono sintetizzati praticamente da tutte le cellule.
- Inoltre le cellule contengono proteine specifiche del loro stato differenziato.
- La regolazione dell'espressione genica negli eucarioti è quindi estremamente complessa e ancora poco nota.

33

### Tipi di controllo negli Eucarioti

L'espressione genica negli Eucarioti è controllata da una grande diversità di meccanismi che vanno da quelli che impediscono la trascrizione a quelli che impediscono l'espressione dopo che la proteina è stata prodotta.

Il diagramma illustra cinque tipi di meccanismi generali che possono essere utilizzati.



34

### Meccanismi di controllo dell'espressione genica negli Eucarioti

- Trascrizionali:** Impediscono la trascrizione.
- Post-trascrizionali:** Controllano o regolano il mRNA dopo che è stato prodotto.
- Traduzionali:** Impediscono la traduzione. Spesso coinvolgono fattori proteici necessari per la traduzione.
- Post-traduzionali:** Agiscono dopo che la proteina è stata prodotta.

35

### Regolazione negli Eucarioti (1)

- Il controllo dell'espressione dei geni degli eucarioti richiede la presenza di proteine dette dei **fattori di trascrizione**.
  - I **fattori di trascrizione generali** sono necessari per l'inizio della trascrizione.
    - Sono necessari per un giusto legame della RNA polimerasi al DNA.
  - I **fattori di trascrizione specifici** aumentano la trascrizione in alcune cellule o in risposta a segnali.

36

### Regolazione negli Eucarioti (2)

- ✚ I fattori di trascrizione generali si legano alla regione detta **promotore del gene**.
- ✚ Indi la RNA polimerasi II si lega al promotore per iniziare la trascrizione nel sito **start (+1)**.
- ✚ Gli “**Enhancers**” (intensificatori) sono sequenze di DNA a cui si legano fattori di trascrizione specifici (**attivatori**) per aumentare la velocità di trascrizione.

37

### Trascrizione negli Eucarioti

- ✚ Per il funzionamento dei fattori di trascrizione sono necessari inoltre **co-attivatori** e **mediatori**.
- ✚ I co-attivatori e i mediatori si legano ai fattori di trascrizione e ad altre parti dell'apparato di trascrizione.

38

### Struttura dei cromosomi degli Eucarioti (1)

- ✚ Il DNA degli eucarioti è impacchettato sotto forma di cromatina.
- ✚ La struttura della cromatina è direttamente correlata al controllo dell'espressione genica.
- ✚ La strutturazione della cromatina inizia con l'organizzazione del DNA in nucleosomi.
- ✚ I nucleosomi possono impedire alla RNA polimerasi II di avere accesso ai promotori.

39

### Struttura dei cromosomi degli Eucarioti (2)

- La **Metilazione** (aggiunta di  $-\text{CH}_3$ ) al DNA o alle proteine istoniche è associata al controllo dell'espressione genica:
  - Aggregati di citosine metilate si legano ad una proteina che impedisce agli attivatori di legarsi al DNA.
  - Le proteine istoniche metilate sono associate alle regioni inattive della cromatina.

40

## Regolazione post-traduzionale (1)

- ✦ Il controllo dell'espressione genica di solito coinvolge il controllo dell'inizio della trascrizione.
- ✦ Tuttavia l'espressione genica può essere controllata **dopo la trascrizione**, con meccanismi quali:
  - "RNA interference"
  - "Splicing" alternativo
  - "RNA editing"
  - Degradazione del mRNA

41

## Regolazione post-traduzionale (2)

- ✦ Il **"RNA interference"** coinvolge l'uso di piccole molecole di RNA .
- ✦ L'enzima **Dicer** frantuma un RNA a doppio filamento in piccoli frammenti di RNA:
  - I **micro-RNAs** si legano al RNA complementare per impedire al traduzione.
  - I **"small interfering RNAs"** degradano alcuni mRNA particolari prima della traduzione.

42

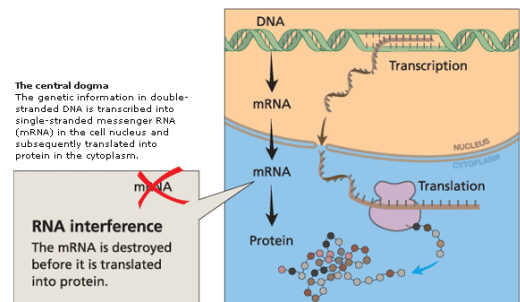
Controllo dell'espressione genica negli Eucarioti

## RNA INTERFERENCE

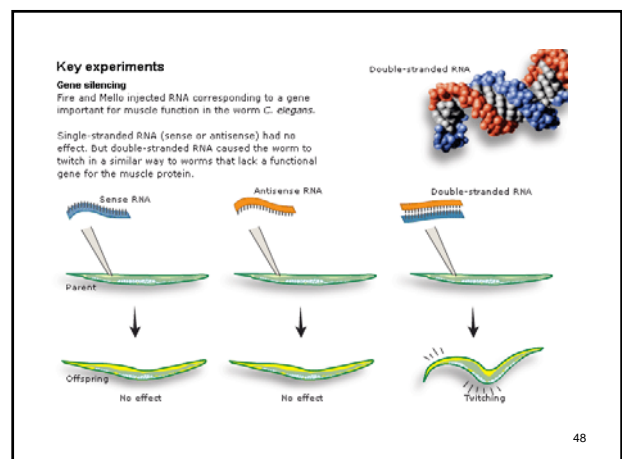
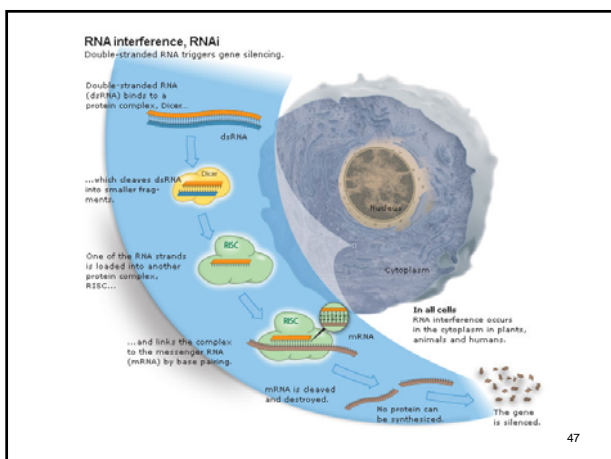
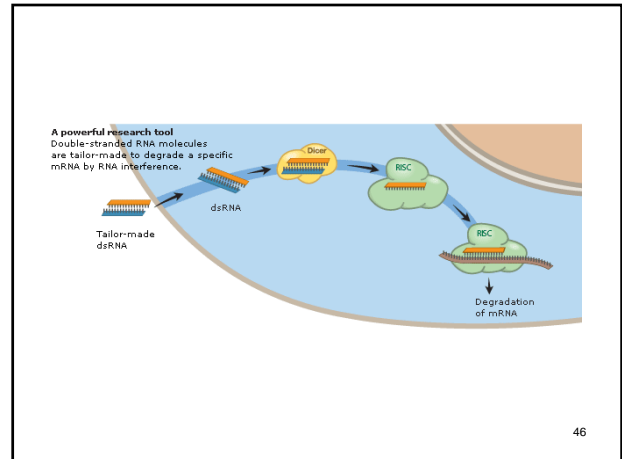
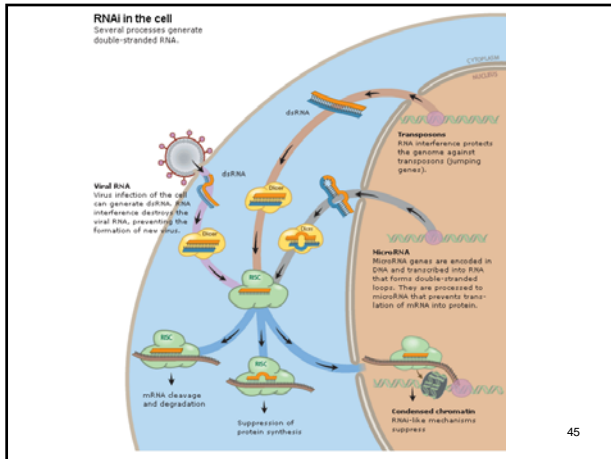
[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2006/illores/4\\_interference.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/illores/4_interference.html)

43

## RNA interference (1)



44



#### Loss of target mRNA

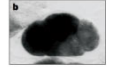
Fire and Mello injected RNA (*mex-3* RNA) into the gonads of the worm *C. elegans* and studied the effect on the corresponding mRNA.

They found that double-stranded RNA, but not single-stranded RNA, eliminated the target mRNA.

A four-cell embryo from *C. elegans*.



Uninjected



*mex-3* RNA (stained black) is abundant in the early embryo.

Antisense RNA



Injection of antisense RNA reduced the content of mRNA to some extent.

Double-stranded RNA



The target mRNA was eliminated after injection of double-stranded RNA.

49

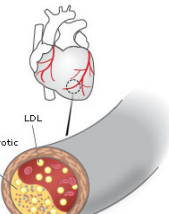
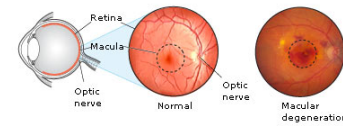
#### RNAi based therapy - future opportunities

RNAi may become an important principle underlying medical therapy in the future. Clinical trials are already underway for RNAi treatment of RS virus infection and macular degeneration (an eye disease).

Promising results have also been obtained in preclinical studies of influenza, HIV, hypercholesterolemia and several other medical conditions.

##### Age-related macular degeneration

Small blood vessels grow into the macular area and interfere with vision. RNAi is used to block production of the vascular endothelial growth factor, VEGF, which causes blood vessel growth.



##### Hypercholesterolemia

An excess of cholesterol-containing LDL particles leads to accumulation of cholesterol in blood vessel walls and causes atherosclerosis. RNAi is used to block production of the LDL particles.

50

## Regolazione post-traduzionale (4)

- ✚ Gli introni sono "spliced" dai pre-mRNAs per produrre il mRNA maturo che viene tradotto.
- ✚ Lo "splicing alternativo" riconosce diversi siti di "splicing" in diversi tipi tissutali.
- ✚ Gli mRNA maturi in ogni tessuto possiedono esoni diversi, dando origine a prodotti polipeptidici differenti a partire dallo stesso gene.

51

## Regolazione post-traduzionale (4)

- ✚ Il "RNA editing" crea degli mRNA maturi che non sono veramente codificati dal genoma.
- ✚ Ad esempio:
  - L'apolipoproteina B esiste in 2 isoforme
  - una isoforma è prodotta dall'"editing" del mRNA per creare un codone di stop
  - Questo "RNA editing" è tessuto-specifico

52

### Regolazione post-traduzionale (5)

- ✦ Le molecole mature di mRNA hanno tempi di emivita diversi a seconda del gene e della localizzazione tissutale dell'espressione.
- ✦ Le quantità di polipeptidi prodotti a partire da un gene particolare possono essere influenzate dall'emivita delle molecole di mRNA.

53

### Degradazione delle Proteine

- ✦ Le proteine sono prodotte e degradate continuamente nella cellula.
- ✦ Le proteine che devono essere degradate sono marcate con la proteina **ubiquitina**.
- ✦ La degradazione delle proteine marcata con l'ubiquitina ha luogo nel **proteasoma**.

54