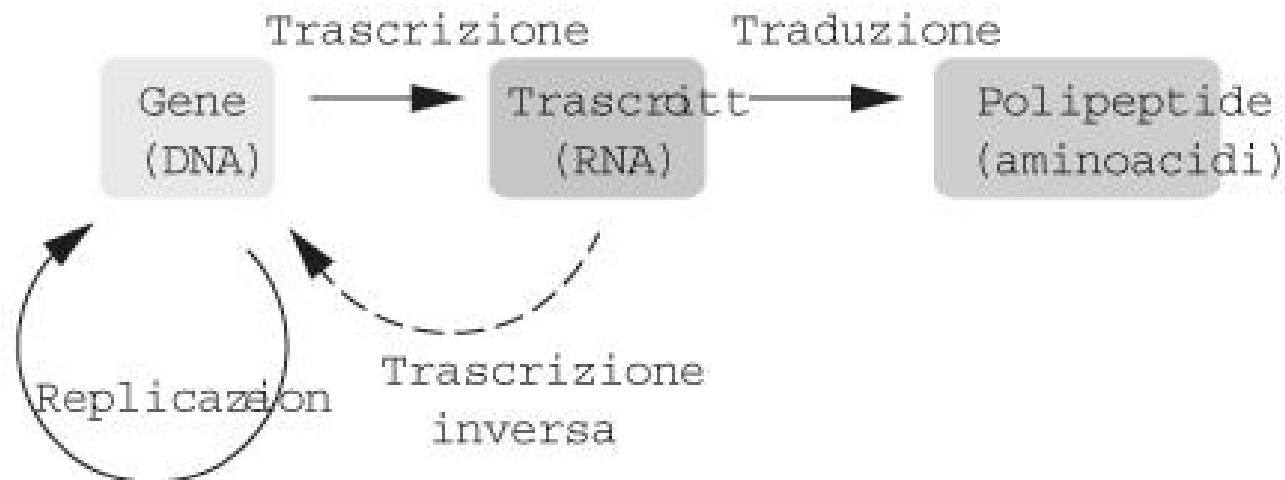


# **Regolazione dell'espressione genica**

meccanismi che determinano  
**l'accensione o lo spegnimento**  
di un gene



**Figura 1.8 ■** Il dogma centrale della biologia molecolare, che mostra come l'informazione genetica sia propagata (attraverso la replicazione del DNA) ed espressa (attraverso la trascrizione e la traduzione). Nella trascrizione inversa, l'RNA è usato come stampo per la sintesi di DNA.



Snustad, Simmons  
Principi di Genetica  
EdiSES

**L'evoluzione ha selezionato e premiato sistemi che accendono/spengono certe funzioni cellulari in base ad effettivo bisogno**

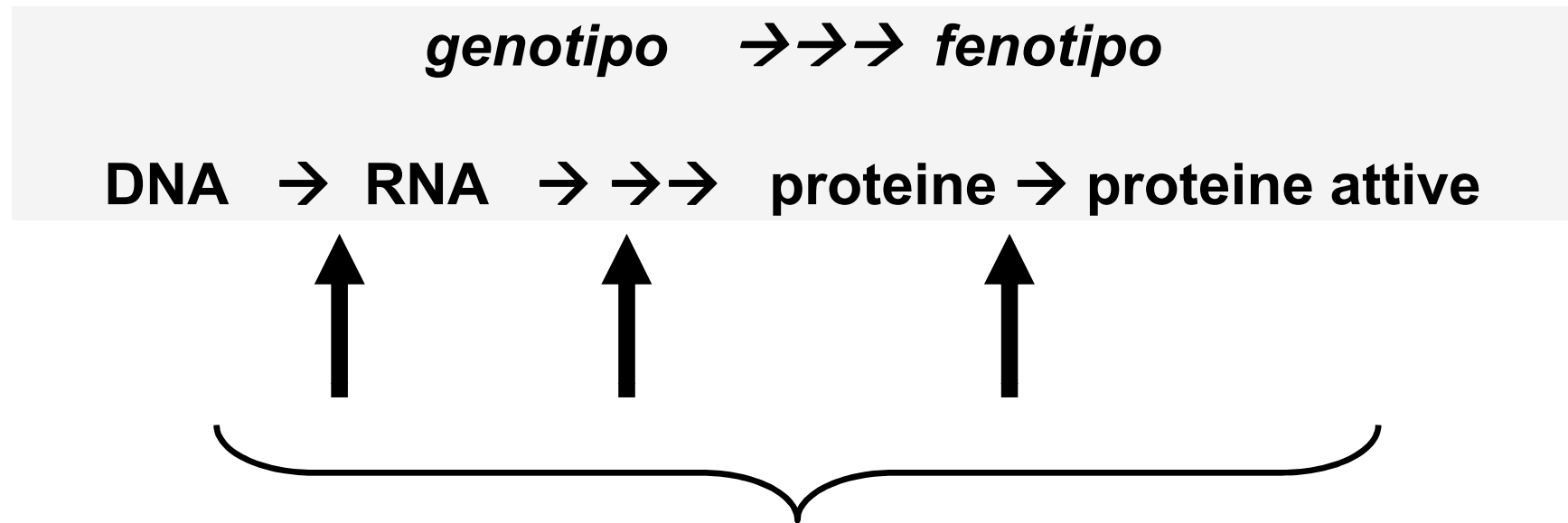
### **Nei procarioti:**

- un'espressione genica selettiva permette di **risparmiare energia**
- La regolazione avviene soprattutto a **livello trascrizionale**

### **Negli eucarioti:**

- l'espressione genica selettiva permette alle cellule di risparmiare energia e di svolgere **ruoli specializzati (differenziamento cellulare)**
- La regolazione avviene a **vari livelli**

**Il flusso dell'informazione genetica o  
espressione genica:**



**Il controllo sull'espressione genica puo' avvenire a diversi livelli**

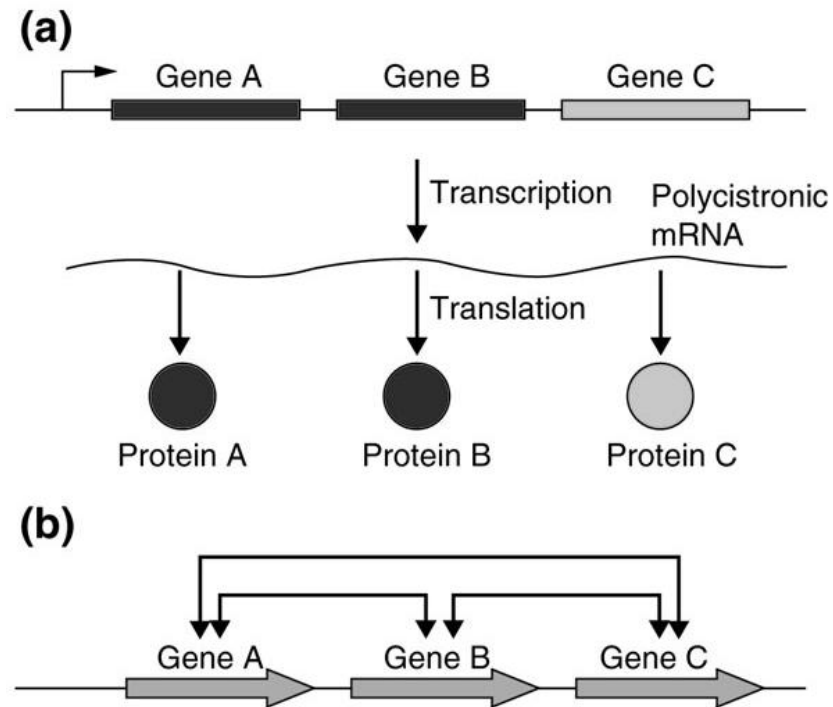
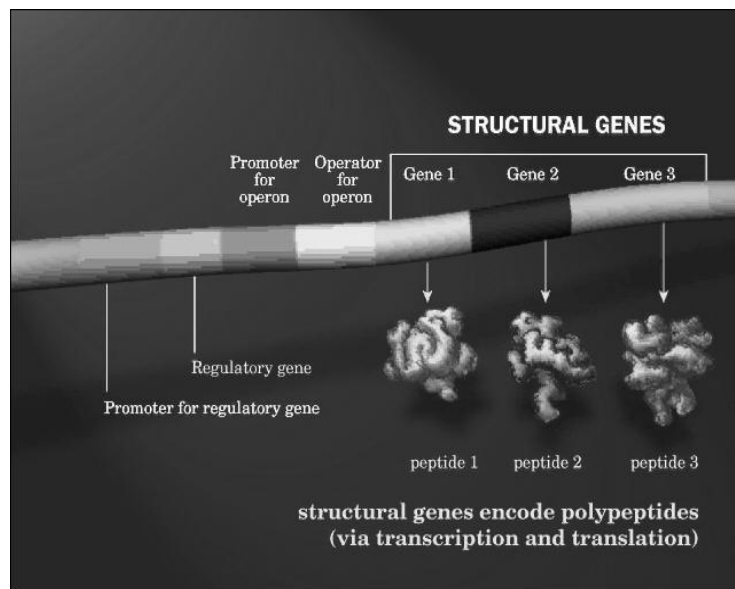
**Principale controllo a liv. Trascrizionale!**

- **Geni costitutivi:** sono costantemente attivi (es. geni che codificano per gli enzimi della glicolisi o altri processi di base)
- **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) e/o alla **sua specializzazione.**

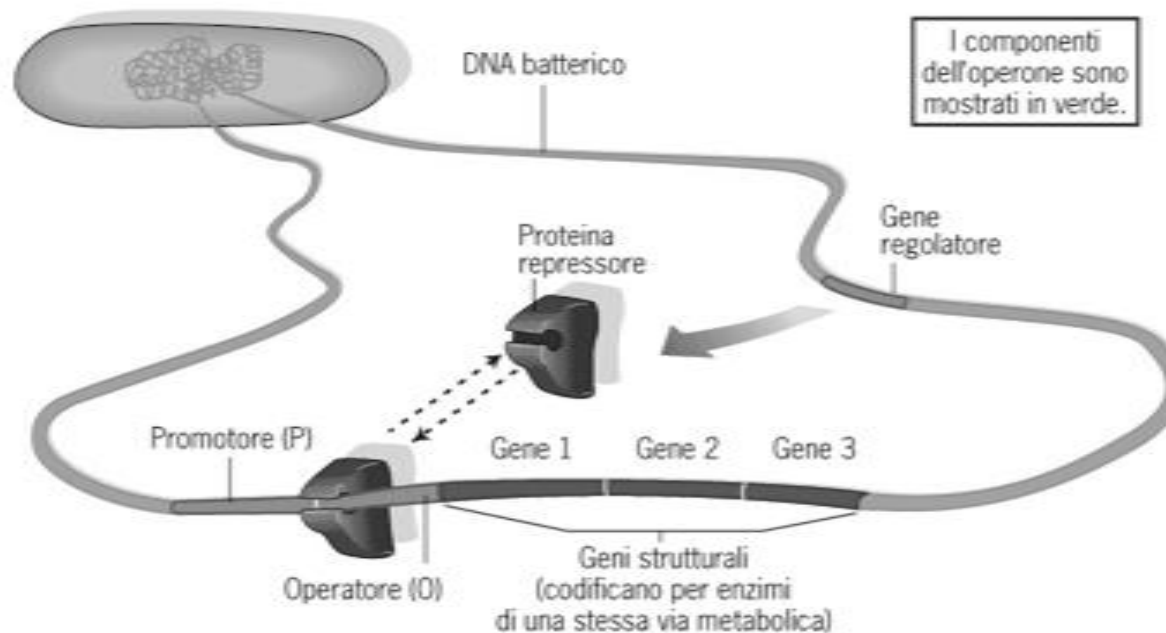
Spesso, nei procarioti, i geni con funzioni correlate sono sottoforma di **operoni**

**OPERONE** = tratto di DNA comprendente zone regolative e più geni trascritti in un unico mRNA (policistronico)

**Vantaggio** → l'espressione di questi geni può essere facilmente **coordinata**.



Un operone è un'associazione di geni, la cui espressione è regolata contemporaneamente dalla stessa regione regolatrice (operatore e promotore) a dall'interazione dell'operatore-con una proteina regolatrice.



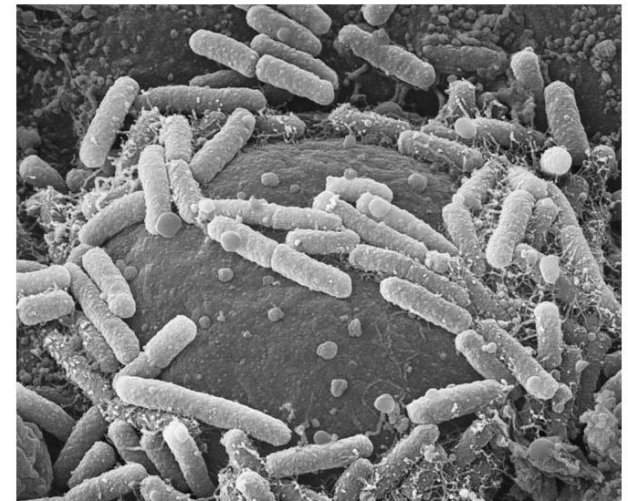
**FIGURA 12.28 Organizzazione di un operone batterico.** Gli enzimi che fanno parte di una stessa via metabolica sono codificati da una serie di geni strutturali localizzati uno di seguito all'altro nel cromosoma batterico. Tutti i geni strutturali di un operone batterico sono trascritti in un mRNA continuo, il quale viene tradotto in polipeptidi separati. La trascrizione dei geni strutturali è controllata da una proteina repressore che si lega al sito operatore del DNA, bloccando il movimento della RNA polimerasi dal promotore verso i geni strutturali.

**La regolazione a livello trascrizionale si basa su proteine regolatrici (attivatori o repressori) che interagiscono con il DNA attivando e disattivando i geni in risposta ai cambiamenti ambientali**

**La proteina si lega al DNA a livello di seq regolative come il promotore e la seq. operatore**

- I primi risultati nel campo del controllo genico furono ottenuti grazie a esperimenti condotti sul batterio *Escherichia coli* (Jacob e Monod negli anni '60)

Colorizzata SEM 7000×





I batteri usano strategie diverse per regolare la sintesi degli enzimi a seconda che siano coinvolti in vie cataboliche o anaboliche

- **Vie cataboliche** (degradazione)→ **induzione da substrato**
- **Vie anaboliche** (biosintesi)→**repressione da prodotto finale**

**Operoni inducibili**→ geni che possono essere accesi in risposta ad uno stimolo specifico, in genere sono inducibili gli operoni catabolici Indotti dalla presenza del substrato catabolizzabile (cioè degradato da quella via catabolica)

**Operoni reprimibili**→ geni che possono essere spenti in risposta ad un preciso stimolo

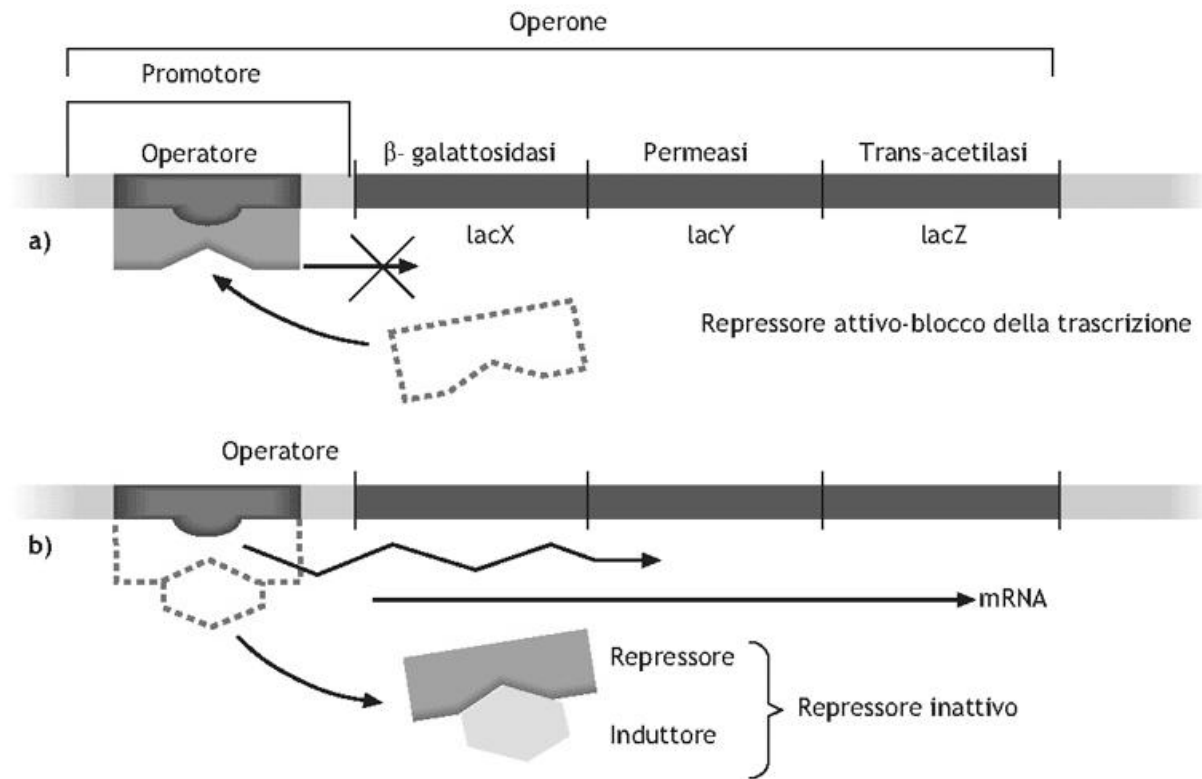
In genere operoni anabolici, che sono repressi dalla molecola prodotto finale di quella biosintesi

## Esempio di operone catabolico inducibile: l'operone Lac

I geni dell'operone codificano per enzimi che servono al batterio per captare e degradare il lattosio (che funziona da induttore)

-Assenza di lattosio → proteina repressore impedisce trascrizione

-Presenza di lattosio → si lega al repressore inattivandolo → trascrizione (meccanismo di controllo negativo)



■ **Figura 4.71 L'operone lac: un esempio di operone inducibile (catabolico).** (a) In assenza di lattosio, il repressore è legato all'operatore e l'operone è represso; (b) in presenza di lattosio, il repressore è inattivato dal legame con l'induttore (lo stesso lattosio, o più precisamente l'allolattosio), l'operone è attivo e si ha la trascrizione.

## Vie cataboliche e induzione da substrato

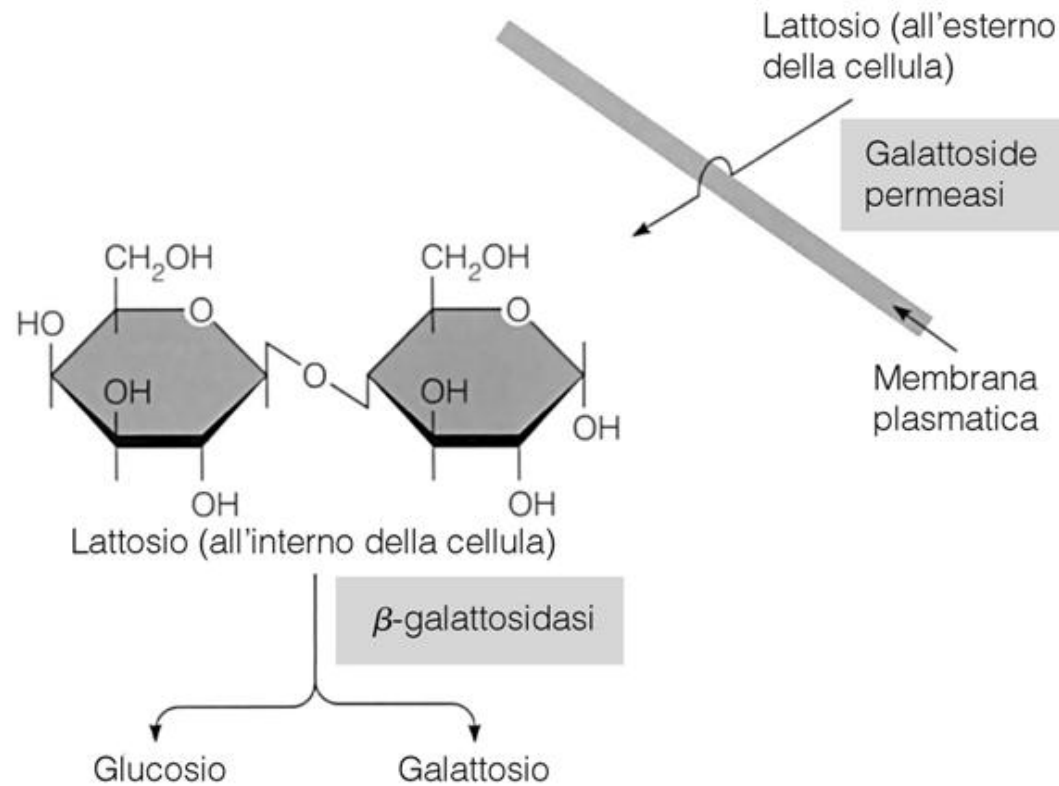
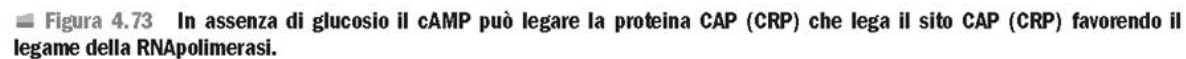


Figura 21-1

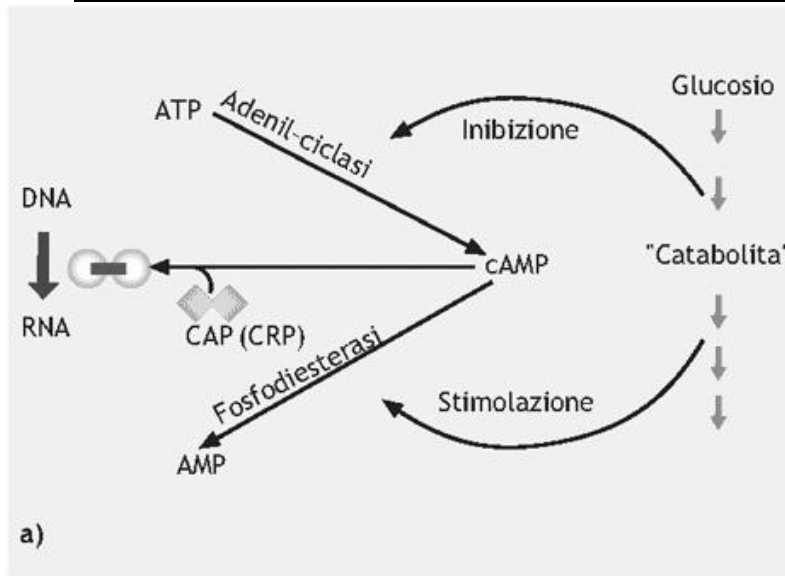
**Risultato:** il batterio produce enzimi necessari all'uso del lattosio solo quando lattosio è presente!

**Assenza di Glu → CAP lega promotore → trascrizione elevata**  
**Presenza di Glu → CAP si lega poco al promotore → trascrizione bassa**

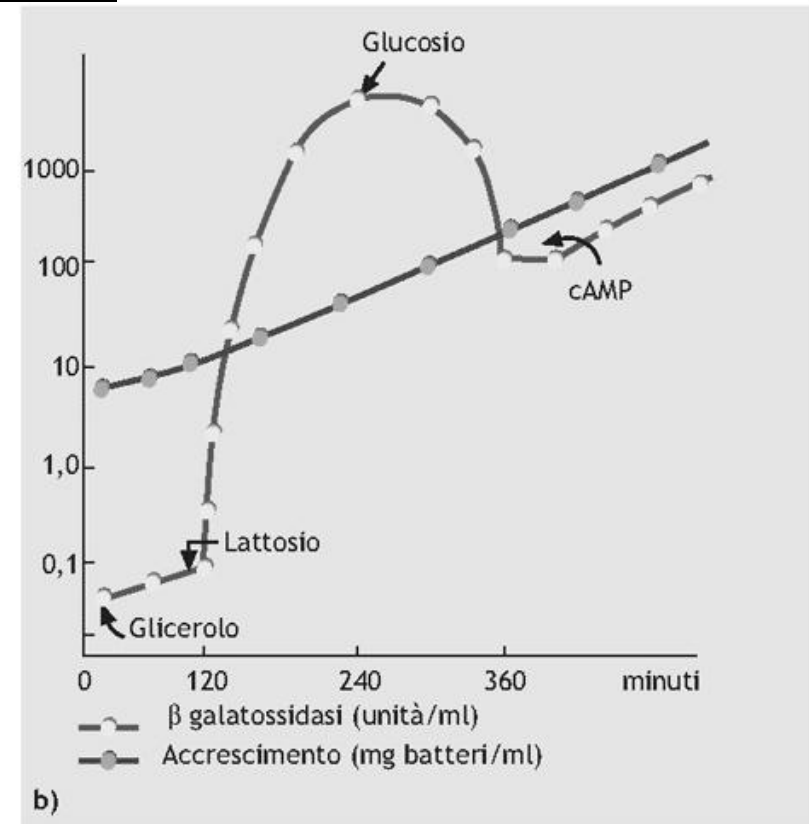


**Quindi operone Lac sotto doppio controllo (negativo e positivo) con trascrizione dipendente dai livelli sia di lattosio che di Glucosio**

lattosio	glucosio	trascrizione
+	+	--/+
+	--	+
--	+	--
--	--	--



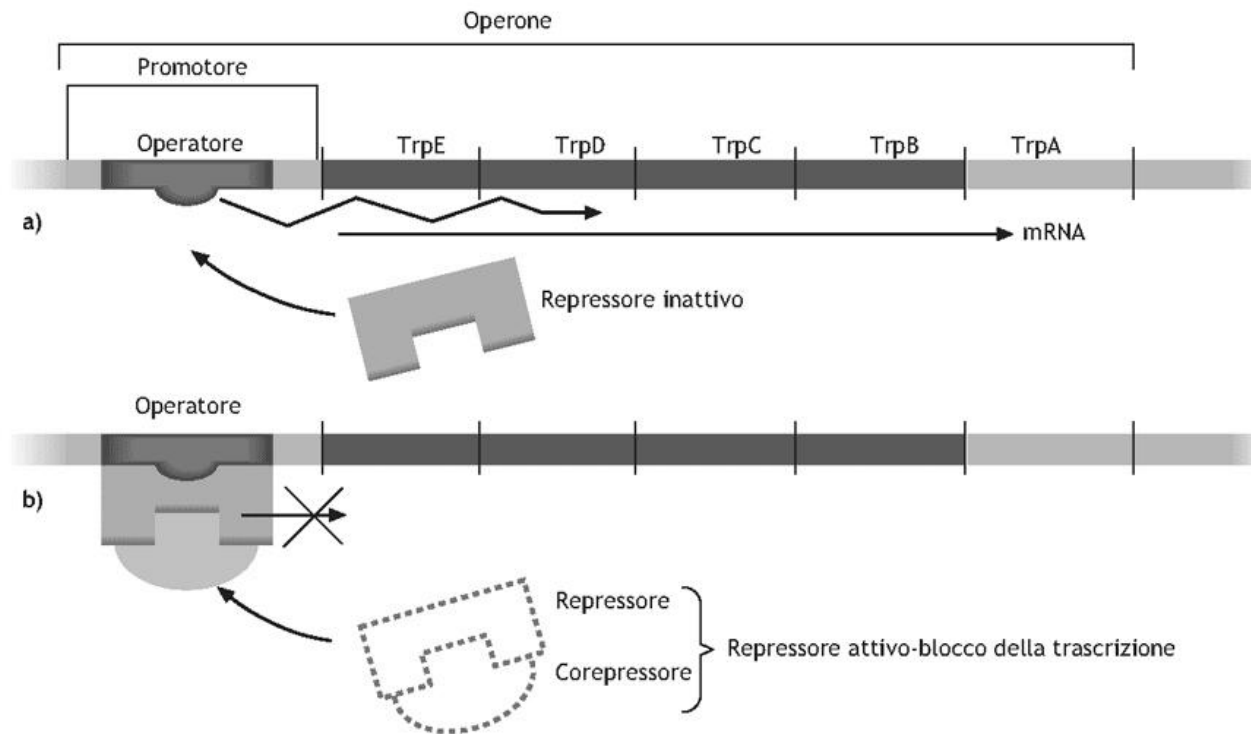
**Figura 4.72** Se nel mezzo di coltura sono contemporaneamente presenti glucosio e lattosio, l'operone è represso (la spiegazione è nel testo).



**Esempio di operone anabolico reprimibile (controllo negativo): l'operone Trp**  
I geni dell'operone codificano per enzimi che servono al batterio per biosintetizzare l'aa triptofano (che funziona da corepressore)

**-Assenza di triptofano → repressore inattivo → trascrizione elevata**

**-Presenza di triptofano → si lega al repressore attivandolo → trascrizione bassa**



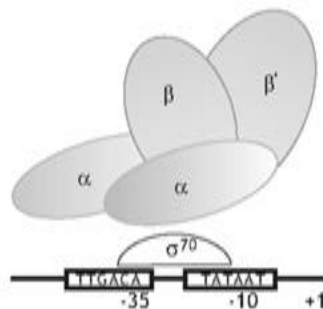
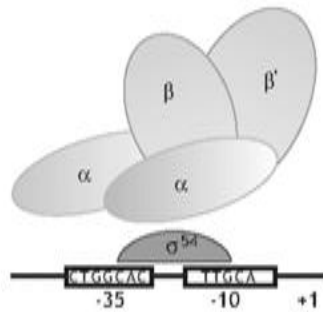
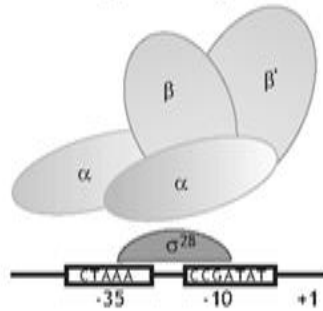
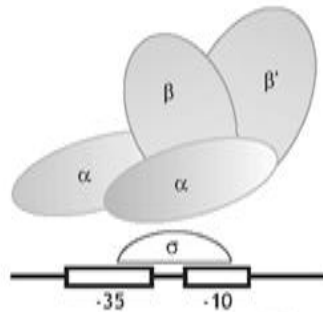
■ **Figura 4.74 L'operone *trp*: un esempio di operone reprimibile (anabolico).** (a) In assenza di Trp il repressore è inattivo e non legato all'operatore, quindi l'operone è attivo; (b) in presenza di Trp il repressore è attivato dal legame con il corepressore (lo stesso Trp), si lega all'operatore e si ha il blocco della trascrizione.

# **Caratteristiche comuni ai due processi**

- 1. Il controllo è effettuato sul DNA (prima di trascrizione)**
- 2. Il controllo dipende da piccole molecole (effettori es lattosio, glucosio, triptofano) che modificano per effetto allosterico la conformazione di proteine regolatrici**

**Per le vie cataboliche i substrati (lattosio)**

**Per le vie anaboliche i prodotti finali (triptofano)**



## Regolazione dell'inizio di trascrizione mediante fattori $\sigma$ alternativi

L'enzima RNA polimerasi puo' iniziare la trascrizione solo dopo che la subnità sigma ha mediato il riconoscimento del promotore

Fattori  $\sigma$  alternativi mediano il riconoscimento di diverse classi di promotori

Es fattore sigma che permette di trascrivere geni di risposta allo shock termico riconosce particolari promotori

Figura 4.26 Riconoscimento di promotori diversi da parte di alcune subunità  $\sigma$ .  $\sigma^{28}$  da *Bacillus subtilis*,  $\sigma^{54}$  e  $\sigma^{70}$  da *Escherichia coli*



## **Regolazione a livello co- e post-trascrizionale dipendente dalla conformazione dell'mRNA**

- **Meccanismo attenuatori**
- **Attività ribozimatiche**
- **Riboswitch**

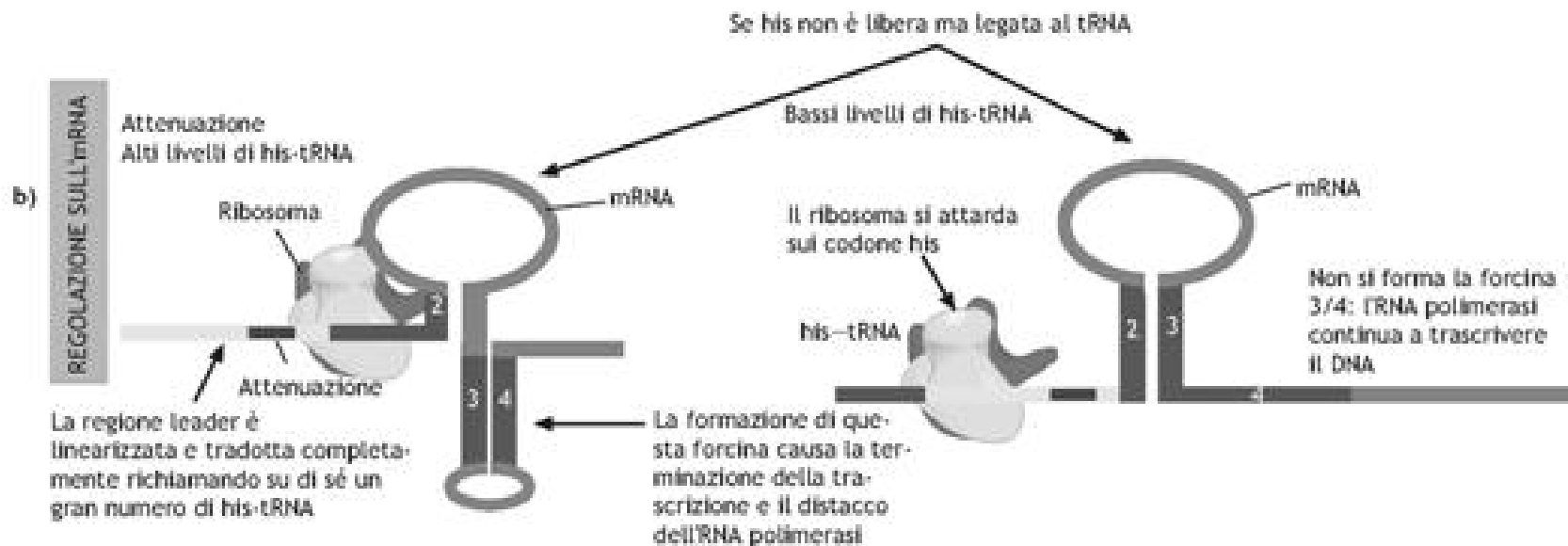


Figura 4.75 L'efficienza di traduzione è un fattore di regolazione: l'attenuazione è determinata dalla quantità di tRNA carichi di His che influenzano la forma della sequenza leader sul messaggero.

**Meccanismo attenuazione tipico di operoni anabolici, in genere si aggiunge a controllo negativo sulla trascrizione.**

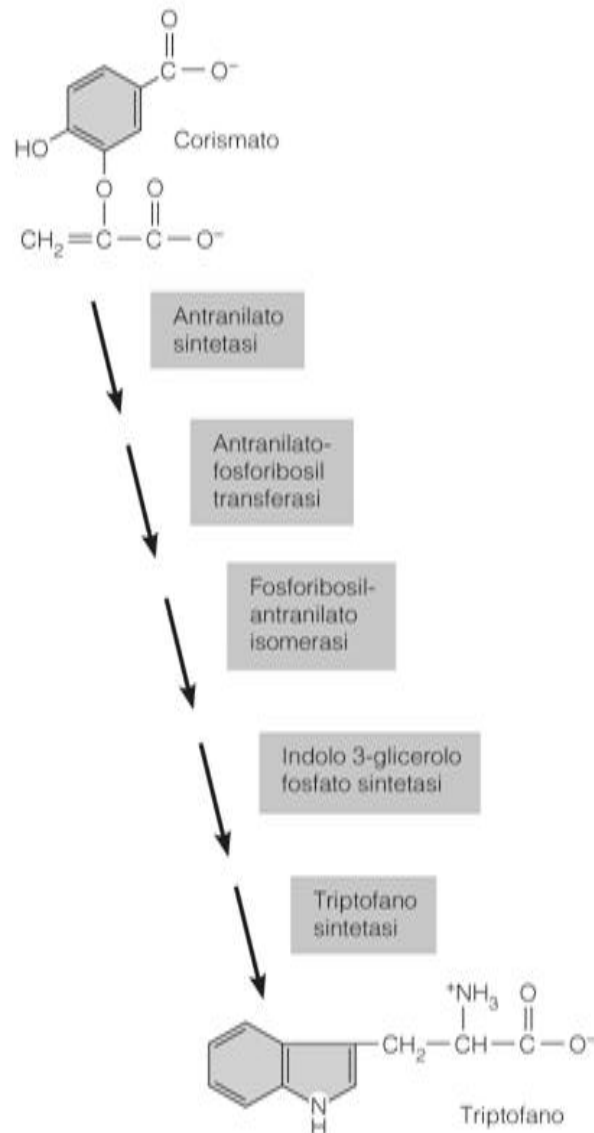
**Si basa su strutture a forcina alternative che si formano su tratto iniziale (5') dell'mRNA a seconda della velocità di traduzione.**

Il primo tratto dell'mRNA (leader) è ricco di codoni per l'aa prodotto finale →

a) Affollamento di ribosomi (alti livelli di aa) → struttura a forcina che termina prematuramente trascrizione

b) Carenza di ribosomi (bassi livelli di aa) → forcina alternativa che lascia proseguire trascrizione

NB attenuazione è peculiare dei batteri in cui trascrizione e traduzione sono contemporanee e avvengono nello stesso ambiente cellulare (impossibile in eucarioti)



**Figura 23-2 Una tipica via anabolica.** La sintesi dell'amminoacido triptofano dal composto di partenza corismato coinvolge una serie di enzimi (riquadri dorati) la cui sintesi è regolata in modo coordinato. Per l'organizzazione e la regolazione dei geni che codificano per questi enzimi, si veda la Figura 23-6.

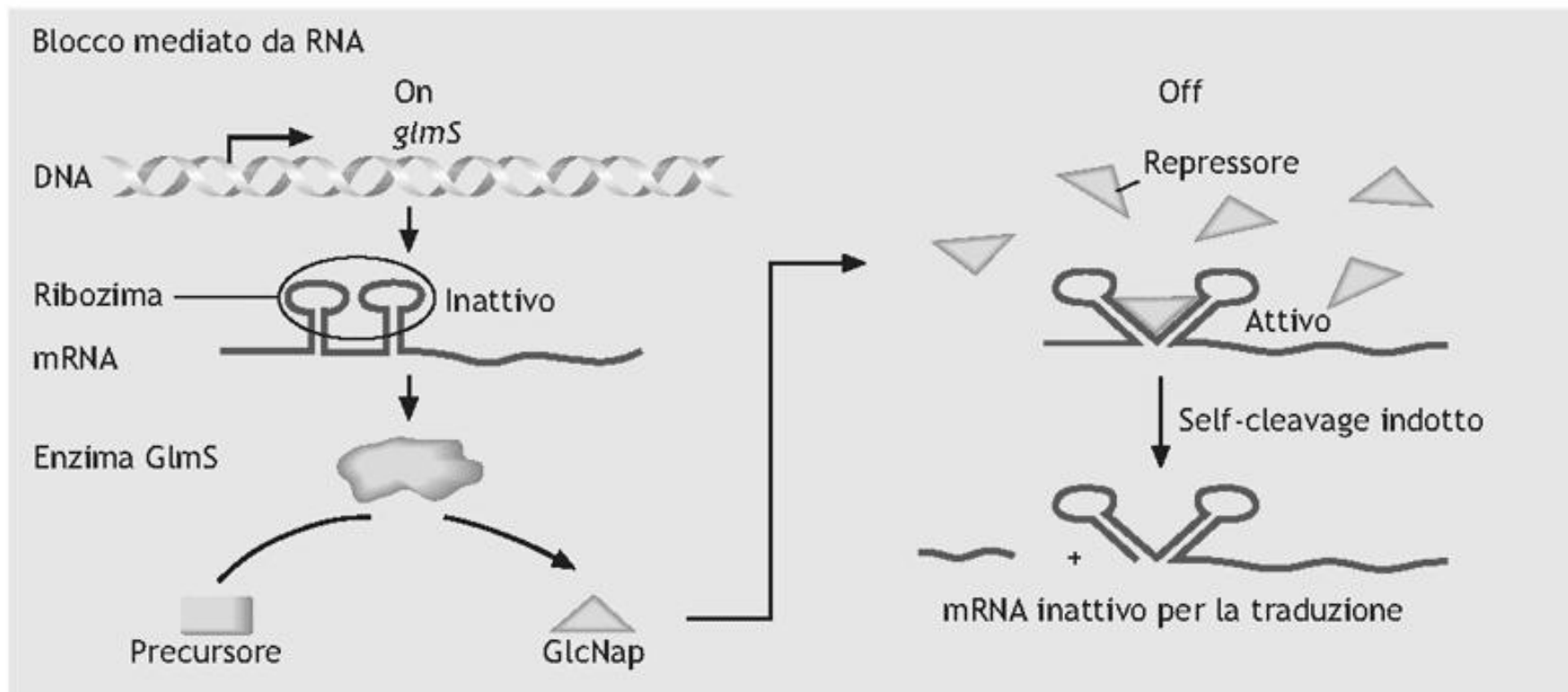
**In generale gli operoni delle vie anaboliche sono repressi quando il prodotto finale è disponibile.**

**Meccanismi di repressione trascrizionale e di attenuazione**

## Sistemi a ribozima

L'mRNA si ripiega in modo da catalizzare la sua degradazione

Il ripiegamento può essere indotto dal legame con molecola prodotto finale della reazione catalizzata dall'enzima codificato (feedback negativo)

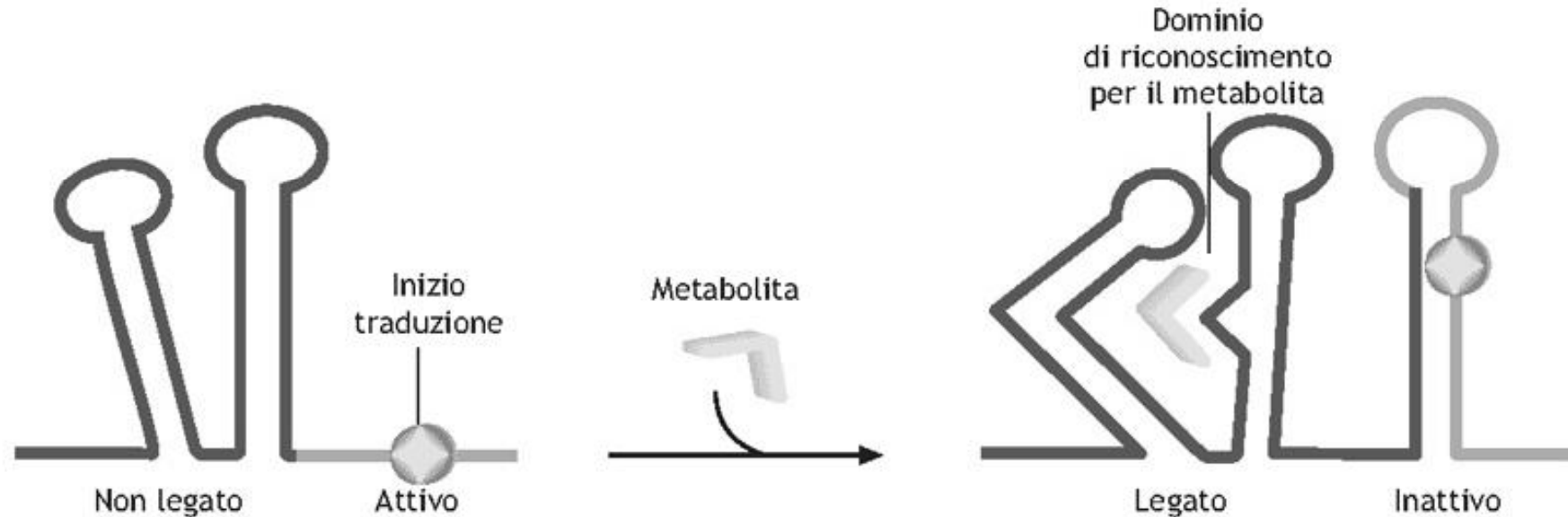


■ Figura 4.76 Il messaggero può formare strutture catalitiche (ribozimi).

# Riboswitch

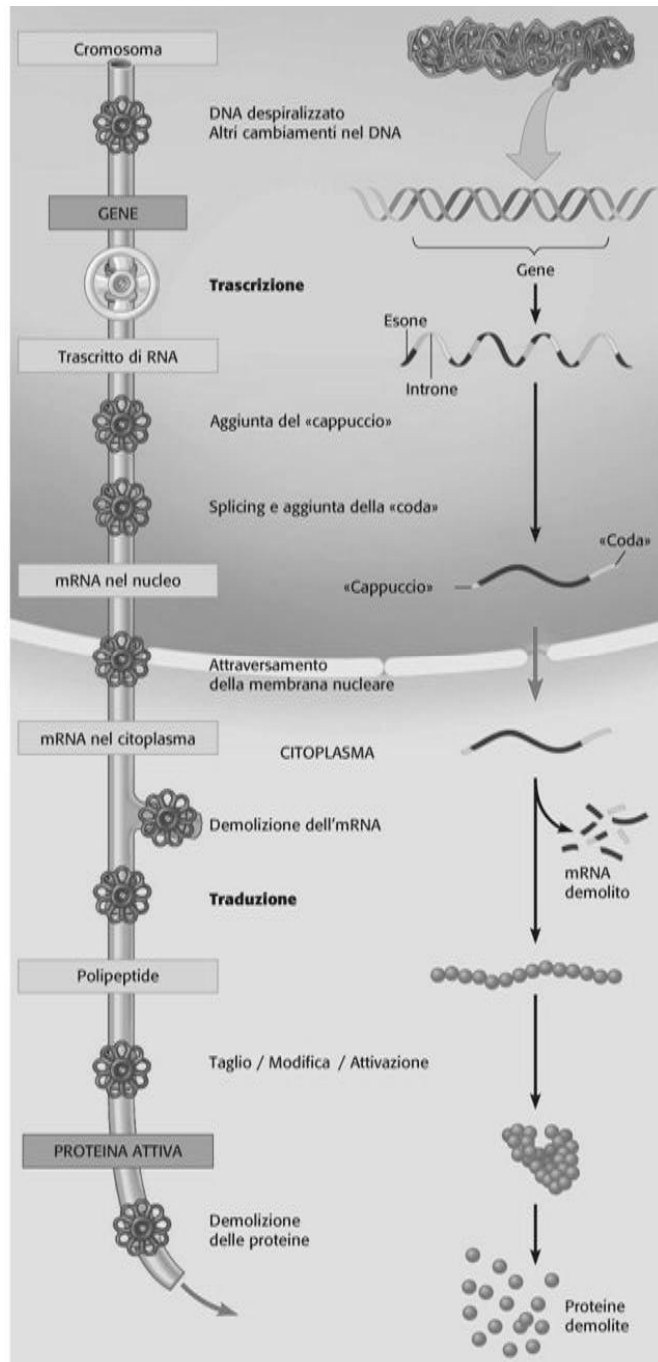
L'mRNA forma forcine che impediscono la traduzione perché ad esempio mascherano la seq Shine Dalgarno o il codone di inizio (cioè sequenze segnale necessarie ad iniziare la traduzione)  
(NB alcuni riboswitch stimolano la traduzione)

Il ripiegamento può essere modulato dal legame con metaboliti



■ **Figura 4.77 I riboswitch:** in presenza di metaboliti il messaggero può ripiegarsi in modo da mascherare il segnale che innesca la traduzione. Esistono anche riboswitch che attivano la traduzione.





in eucarioti controllo + complesso,  
e a molteplici livelli

Impaccamento del DNA

Inizio trascrizione

Modificazioni e  
maturazione dell'RNA

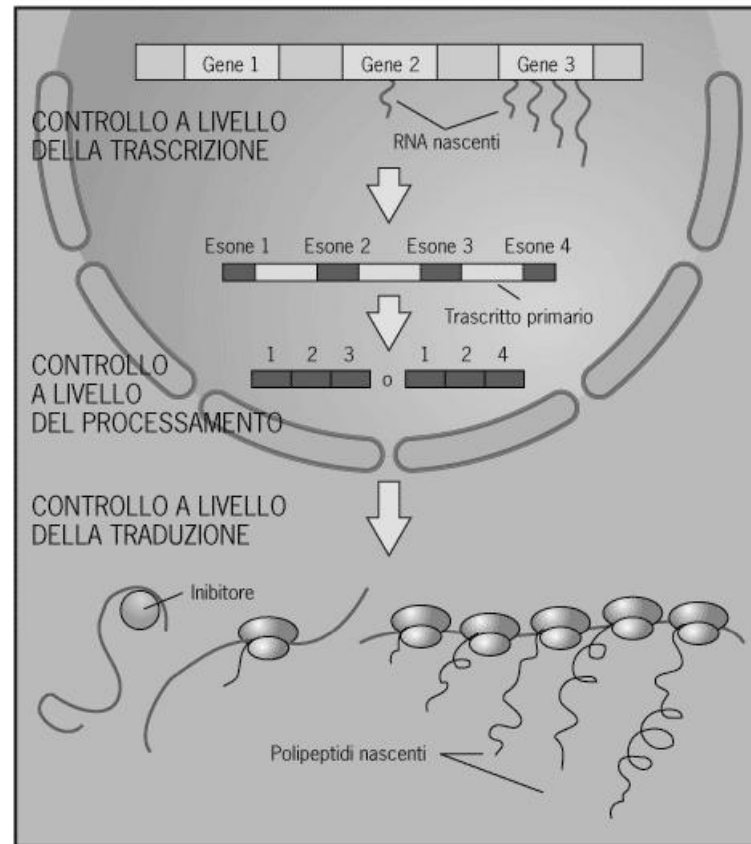
Degradazione dell' mRNA

Inizio di traduzione

Modificazione e degradazione  
delle proteine

nucleo

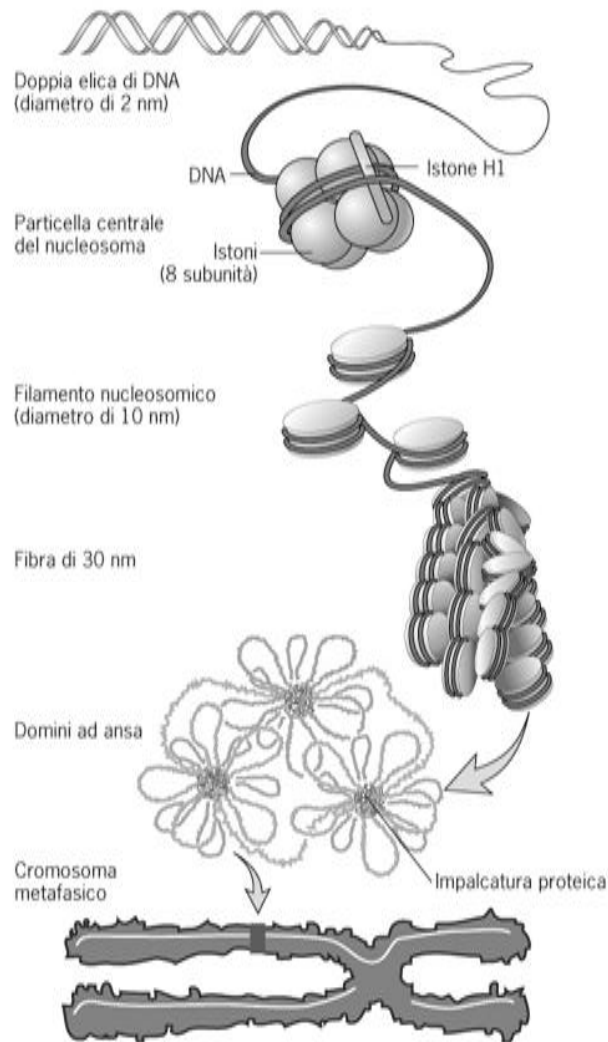
citoplasma



**FIGURA 12.32 L'espressione genica è controllata principalmente a tre livelli.** I controlli a livello della trascrizione operano per determinare quali geni vengono trascritti e per quanto tempo. I controlli a livello della maturazione agiscono determinando quali parti dei trascritti primari entrano a far parte degli mRNA cellulari. I controlli a livello della traduzione determinano se un mRNA deve essere tradotto, per quanto tempo e quanto frequentemente.

# Compattamento del DNA

## Spiralizzazione del DNA in un cromosoma



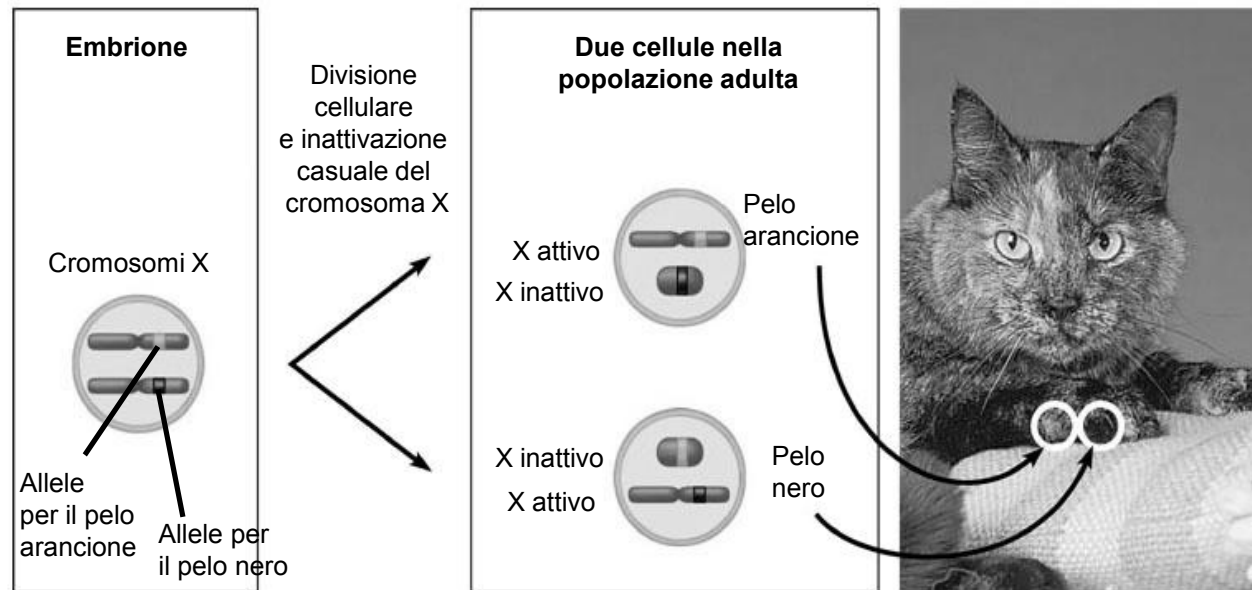
**L'impaccamento "stretto" del DNA impedisce l'espressione dei geni in quanto non consente all'enzima RNA-polimerasi (e ad altre proteine che contribuiscono alla trascrizione) di prendere contatto con il DNA.**

**FIGURA 12.13 I diversi livelli di organizzazione della cromatina.** Il DNA nudo a doppia elica è avvolto intorno agli istoni a formare i nucleosomi, che rappresentano il primo livello di organizzazione della cromatina. I nucleosomi sono organizzati in fibre da 30 nm, che a loro volta si organizzano in domini ad anse. Quando le cellule si preparano alla mitosi, le anse si compattano ulteriormente nei cromosomi mitotici (vedi anche Figura 14.13).

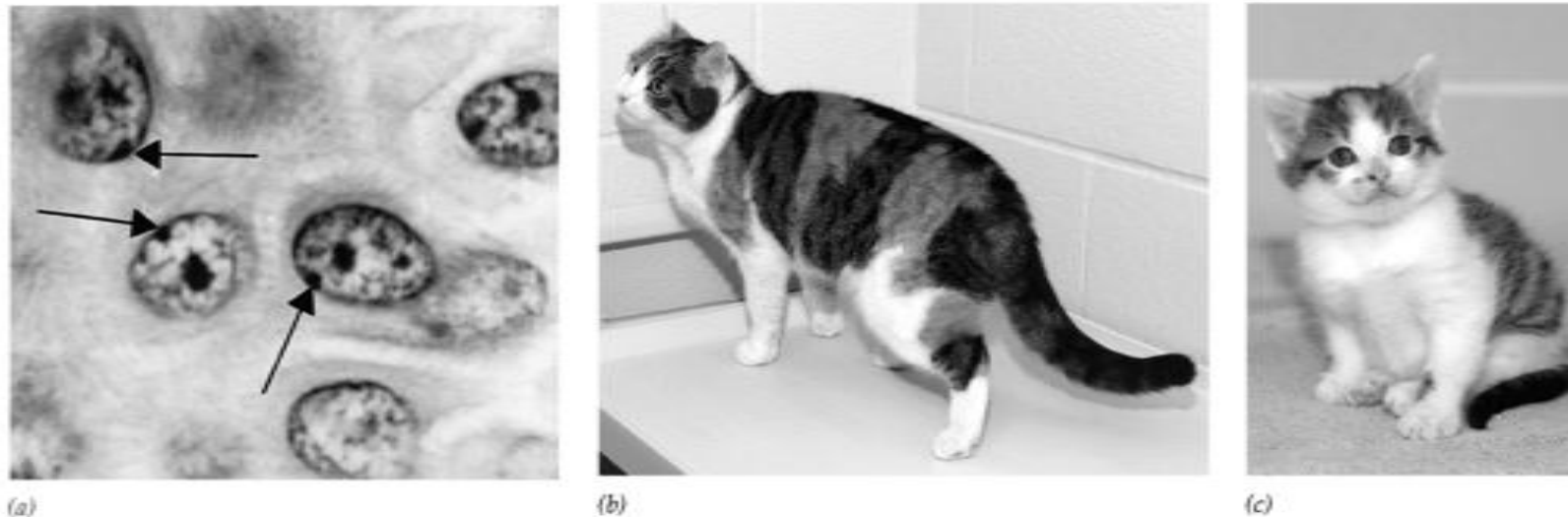


## Inattivazione del cromosoma X → manto variegato

Nelle femmine di mammifero uno dei 2 cromosomi X si presenta fortemente condensato in tutte le cellule somatiche e quasi del tutto inattivo → inattivazione è casuale nelle cellule delle prime fasi embrionali → adulto femmina è mosaico genetico



## Il cromosoma X inattivo è un esempio di eterocromatina facoltativa, viene chiamato “corpo di Barr”

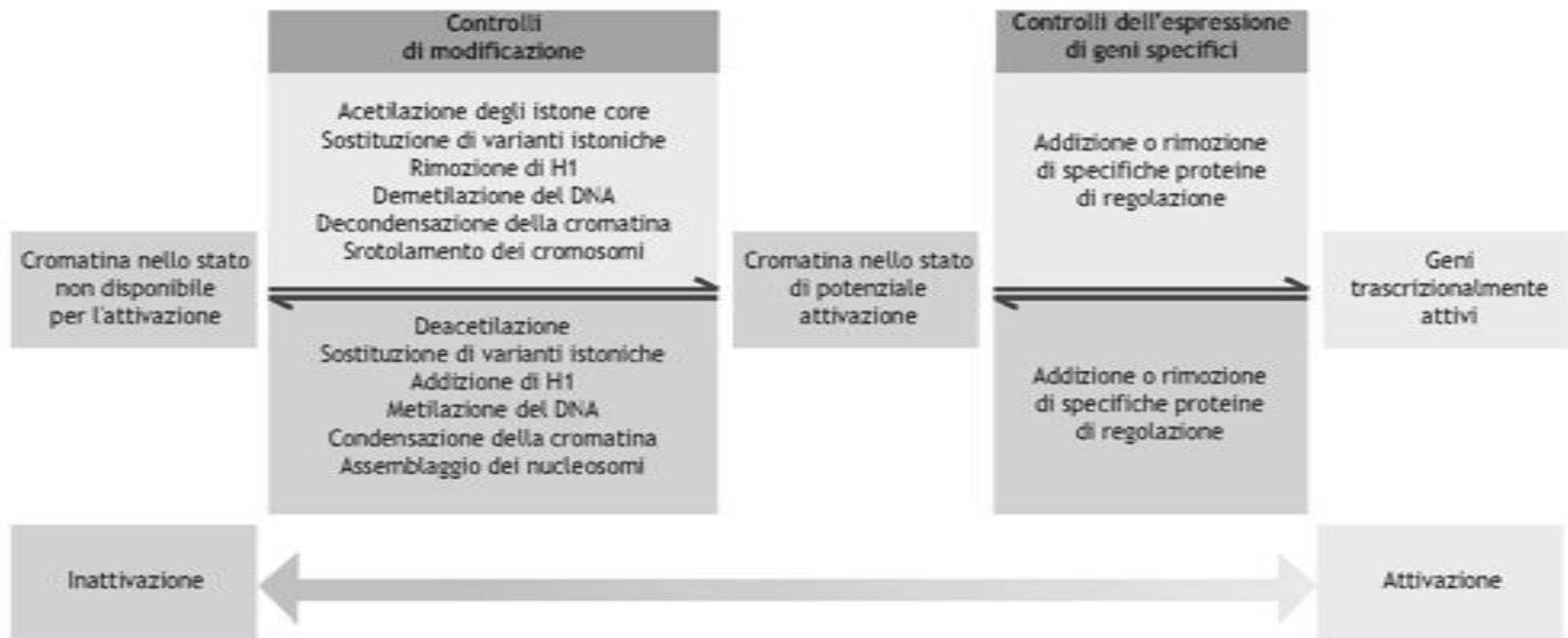


**FIGURA 12.14 Il cromosoma X inattivo: un esempio di eterocromatina facoltativa.** (a) Il cromosoma X inattivato nel nucleo di una cellula femminile appare come una struttura eterocromatinica di colore scuro, chiamata corpo di Barr (freccie). (b) Un gatto calico. L'inattivazione casuale di uno dei due cromosomi X in cellule diverse durante lo sviluppo embrionale precoce genera un mosaico di aree nei tessuti. Ciascuna area comprende le cellule discendenti da una cellula che era presente nell'embrione al momento dell'inattivazione. Queste aree sono visualizzabili nei gatti tartaruga, che sono dei gatti eterozigoti con un allele per il colore nero del pelo su un cromosoma X ed un allele per il colore arancione del pelo nell'altro cromosoma X. Questo

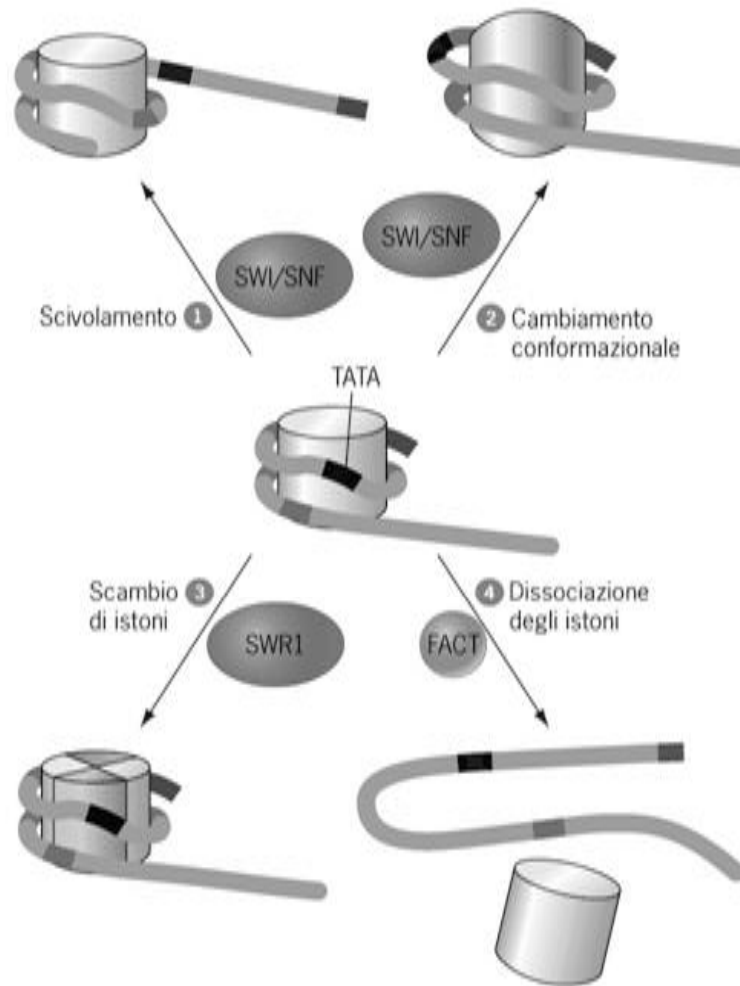
spiega perché i gatti tartaruga maschi sono praticamente inesistenti: tutte le cellule nel maschio hanno o l'allele per il colore nero o quello per il colore arancione. (Le macchie bianche in questo gatto sono dovute ad un gene autosomico differente per il colore del pelo). (c) Questo gattino è stato clonato dal gatto mostrato in b. I due animali sono geneticamente identici, ma differiscono nel disegno di colorazione del pelo, un riflesso della natura casuale del processo di inattivazione dell'X (e probabilmente di altri eventi casuali dello sviluppo). (A: PER GENT. CONC. DI MURRAY L. BARR; B,C: PER GENT. CONC. DEL COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE AND BIOMEDICAL SCIENCES, TEXAS A&M UNIVERSITY).

**Il rimodellamento della cromatina dipende da modifiche chimiche a carico sia di istoni che di DNA**

**Queste modifiche rendono DNA “potenzialmente” trascrivibile o no → sono poi fattori trascrizionali specifici a determinare attivazione o inibizione**



■ Figura 4.79 Regolazione della trascrizione negli eucarioti.



**FIGURA 12.47** Varie azioni alternative dei complessi di rimodellamento della cromatina. Nella via 1, un nucleosoma chiave è stato indotto a scivolare lungo il DNA, esponendo in tal modo il sito di legame TATA, dove può essere assemblato il complesso di pre-inizio. Nella via 2, l'ottamero istonico di un nucleosoma è stato riorganizzato. Benché il TATA box non sia completamente libero dagli istoni associati, adesso è capace di legare le proteine del complesso di pre-inizio. Nella via 3, i dimeri standard H2A/H2B di un nucleo-

**Esistono complessi enzimatici che rimodellano la cromatina agendo sugli istoni e sul loro livello di associazione col DNA**

- **Scivolamento ed esposizione sito regolativo**
- **Cambio conformazionale**
- **Sostituzione/spiazzamento istoni**

Tabella 12.2

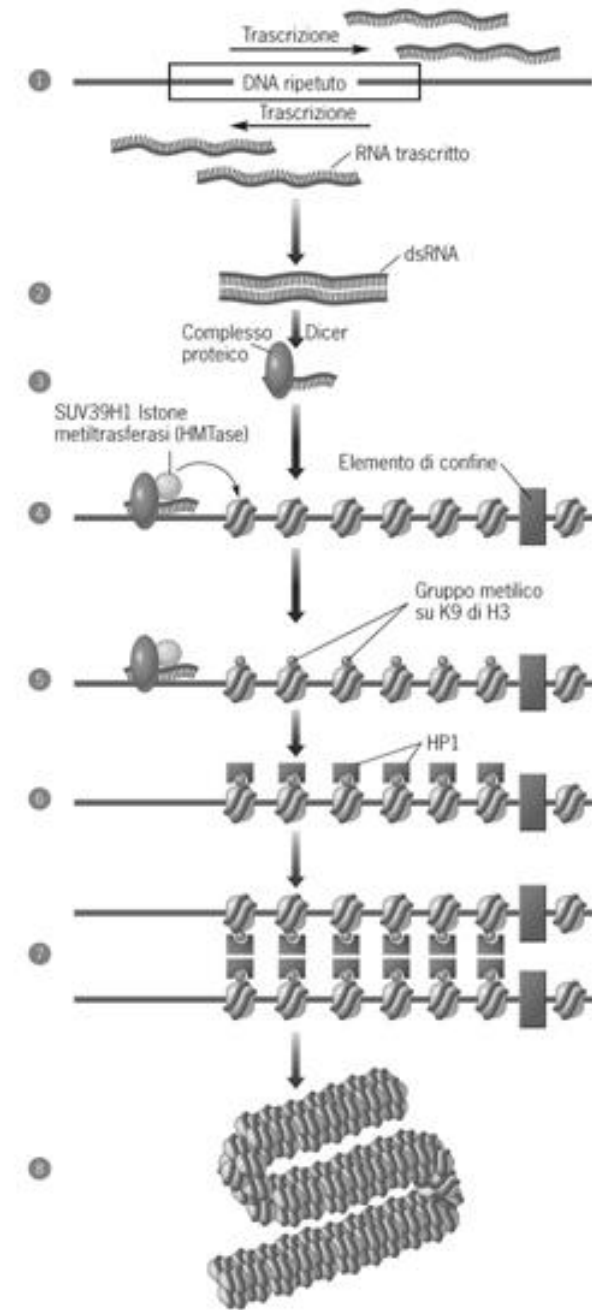
Varianti istoniche

Tipo	Variante	Localizzazione	Funzione presunta
H2A	H2AX	In tutta la cromatina	Riparazione del DNA
	H2AZ	Eucromatina	Trascrizione
	macroH2A	Cromosoma X inattivo	Silenziamento trascrizionale
H3	CENP-A	Centromero	Assemblaggio del cinetocore
	H3.3	Regioni trascritte	Trascrizione



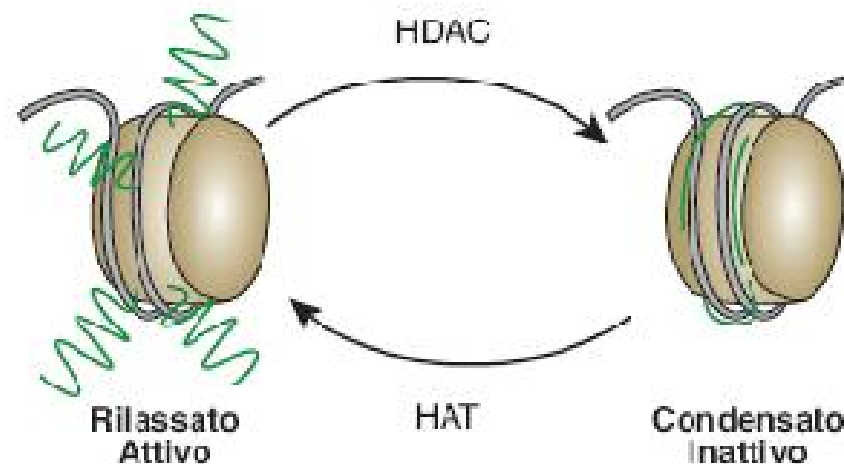
**La formazione di eterocromatina è favorita dalla metilazione di alcuni istoni e dall'associazione con specifiche proteine**

**A volte RNA non codificanti inducono la condensazione cromatinica**



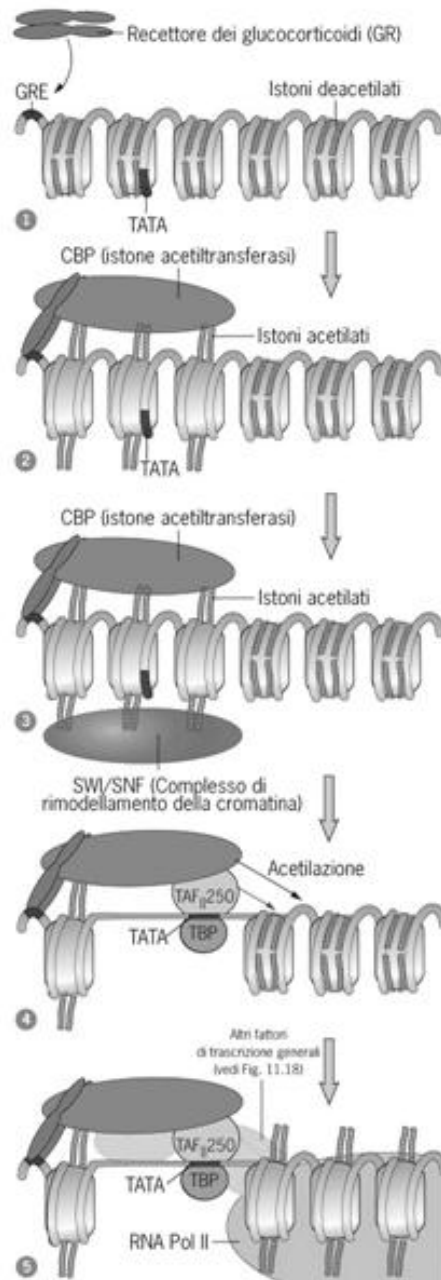
**FIGURA 12.17** Un modello che riassume i possibili eventi durante la formazione di eterocromatina. Studi recenti suggeriscono che gli RNA non codificanti giocano un ruolo nel dirigere la formazione di eterocromatina. In questo modello, gli RNA vengono trascritti da entrambi i filamenti di sequenze di DNA ripetute (passaggio 1). Gli RNA formano molecole a doppio filamento (passaggio 2) che vengono elaborate dalla endonucleasi Dicer e da altri componenti dell'apparato per RNAi, formando RNA a singolo filamento. In questo caso, gli RNA sono legati all'enzima SUV39H1 HMTasi (passaggio 3). L'enzima viene guidato ad una porzione della cromatina che è in uno stato eucromatico (passaggio 4). Una volta legata, la HMTasi catalizza l'aggiunta di gruppi metile ai residui K9 degli istoni H3 del core (passaggio 5), che servono da siti di legame per la proteina HP1 (passaggio 6). L'elemento di confine nel DNA protegge le regioni adiacenti della cromatina dalla diffusione della formazione di etero-

**Anche la deacetilazione degli istoni H3 e H4 porta alla formazione di eterocromatina**



◆ **FIGURA 6.9**

**Effetto svolto sulla struttura cromatinica dalla acetilazione degli Istoni.** La figura evidenzia come l'acetilazione degli istoni ad opera degli enzimi HAT determini una conformazione cromatinica "aperta" e permissiva per la trascrizione, mentre la deacetilazione degli stessi promossa dagli enzimi HDAC induce al contrario una conformazione cromatinica "chiusa" e repressiva per il processo trascrizionale.



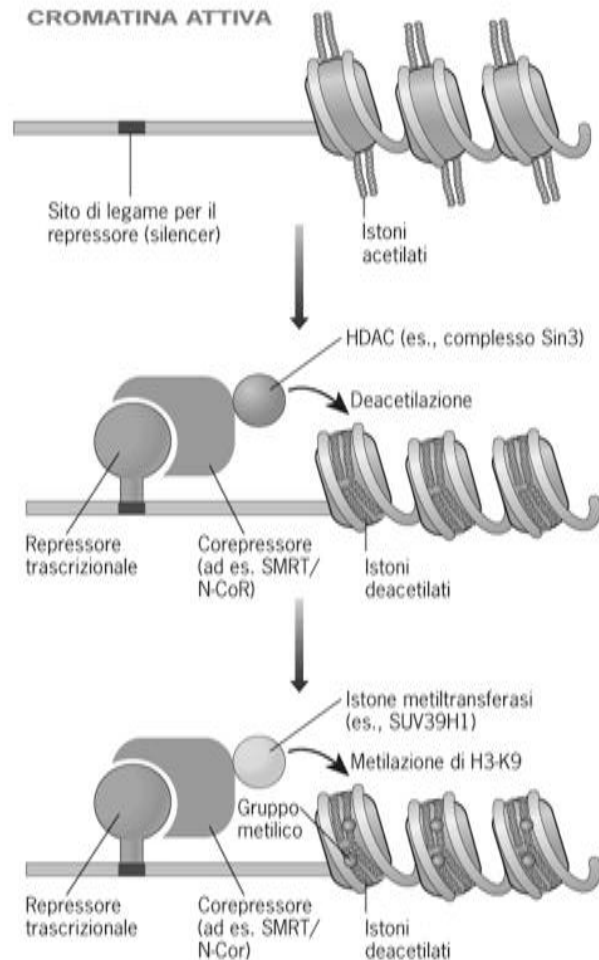
**FIGURA 12.46 Un modello degli eventi che avvengono a livello del promotore in seguito al legame di un attivatore della trascrizione.** I fattori di trascrizione, come il recettore dei glucocorticoidi (GR), si legano al DNA e reclutano i coattivatori, che facilitano l'assemblaggio del complesso di pre-inizio della trascrizione. Il passaggio 1 del disegno illustra una regione di un cromosoma che è in uno stato represso a causa dell'associazione del DNA con istoni deacetilati. Nel passaggio 2, il recettore dei glucocorticoidi si è legato all'elemento di risposta ai glucocorticoidi (GRE), reclutando sul DNA il coattivatore CBP. Il CBP contiene una subunità con attività di istone acetiltransferasi (HAT); questi enzimi trasferiscono gruppi acetile da un donatore (acetil CoA) al gruppo amminico di specifici residui di lisina. Di conseguenza, gli istoni delle particelle core dei nucleosomi situati nelle regioni a monte e a valle del TATA box vengono acetilati. Nel passaggio 3, gli istoni acetilati hanno reclutato un complesso di rimodellamento della cromatina, chiamato SWI/SNF. Nell'insieme, i due coattivatori CBP e SWI/SNF hanno modificato la struttura della cromatina in uno stato più aperto ed accessibile. Sebbene non sia menzionato nel testo, anche una delle subunità di TFIID (chiamata TAF<sub>250</sub>) possiede attività acetiltransferasica, come indicato dalla freccia rossa. Insieme, CBP e TAF<sub>250</sub> destabilizzano ulteriori nucleosomi per permettere l'avvio della trascrizione. Nel passaggio 5, i rimanenti nucleosomi del promotore sono stati acetilati, la RNA polimerasi è legata al promotore e la trascrizione sta per iniziare.

**Il legame di attivatori trascrizionali a seq di DNA regolativo induce l'acetilazione degli istoni adiacenti e quindi lo srotolamento del DNA**

**→ Favorendo accesso ad enzimi di trascrizione**

**Es: recettore GR**



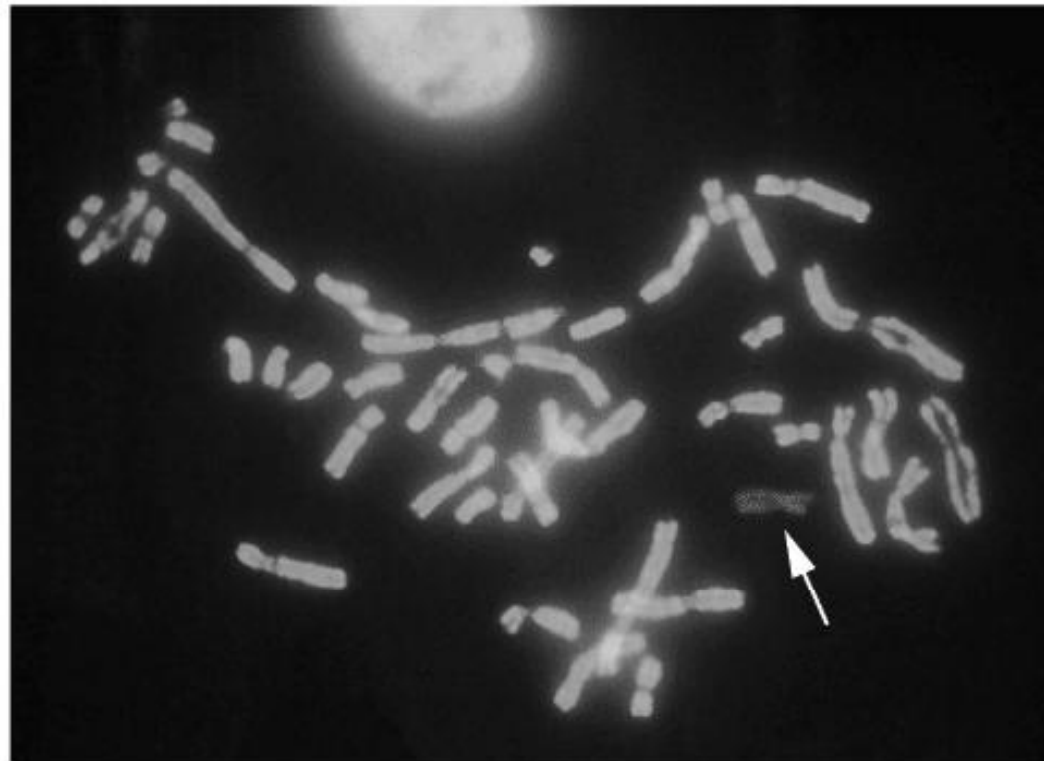


**FIGURA 12.48 Un modello della repressione della trascrizione.** Le code istoniche della cromatina attiva sono acetilate. Quando un repressore trascrizionale si lega al suo sito di legame nel DNA, esso recluta un complesso corepressore (ad es. SMRT/N-Co-R) ed una attività HDAC associata. HDAC rimuove i gruppi acetile dalle code istoniche. Una proteina distinta (SUV39H1), contenente un'attività di istone metiltransferasi, aggiunge gruppi metile al residuo K9 della coda dell'istone H3. Nel complesso, la perdita dei gruppi acetile e l'aggiunta di gruppi metile portano all'inattivazione della cromatina e al silenziamento genico.

**Il legame di repressori a siti regolativi “silencer” provoca: deacetilazione e metilazione degli istoni**

**→ inattivazione della cromatina e silenziamento genico**

## Il corpo di Barr (X inattivo) è deacetilato

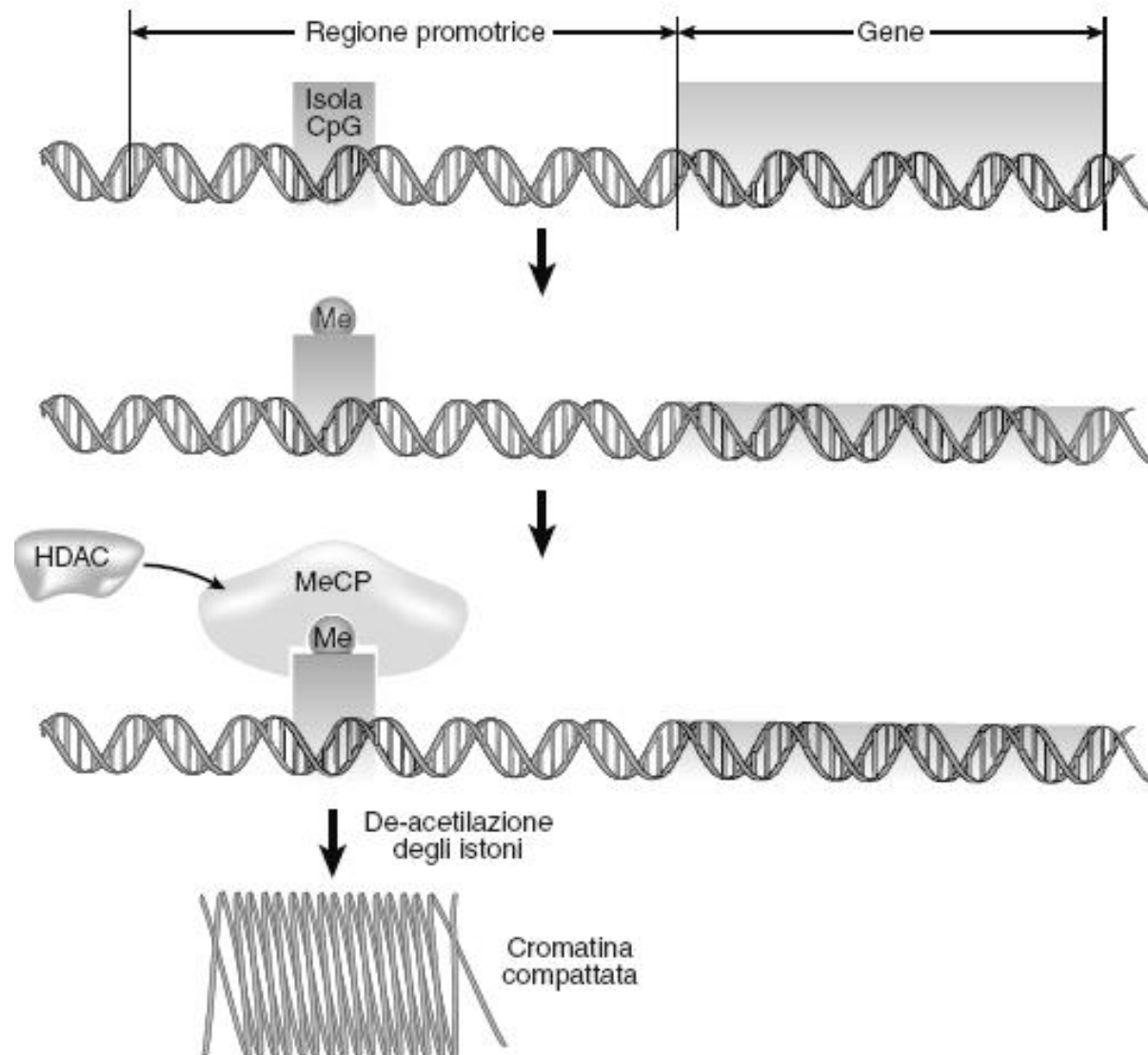


**FIGURA 12.16** Dimostrazione sperimentale della correlazione tra attività trascrizionale ed acetilazione istonica. Questi cromosomi metafasici sono stati marcati con anticorpi fluorescenti diretti contro l'istone H4 acetilato, che in tal modo emette fluorescenza verde. È evidente come tutti i cromosomi, tranne l'X inattivato, siano intensamente colorati per interazione con l'anticorpo diretto contro l'istone acetilato. (DA P. JEPPESEN AND B. M. TURNER, COVER OF CELL VOL. 74, NO. 2, 1993; CON IL PERMESSO DI CELL PRESS).

**Anche la metilazione del DNA (isole CpG) induce eterocromatizzazione**

**Aggiunta di metile (CH<sub>3</sub>) su citosina**

**Il cromosoma X inattivo oltre che deacetilato è anche ipermetilato**



**Il pattern di metilazione del DNA viene trasmesso da cellula a cellula durante tutta la vita di un individuo con un meccanismo di “imprinting” genetico**  
**Un’ereditarietà di questo tipo è definita “epigenetica”**

**Le modificazioni su DNA e istoni sono un modo per trasmettere informazioni epigenetiche**  
**cioè dipendenti da modifiche chimiche che non alterano la sequenza nucleotidica (genotipo)**

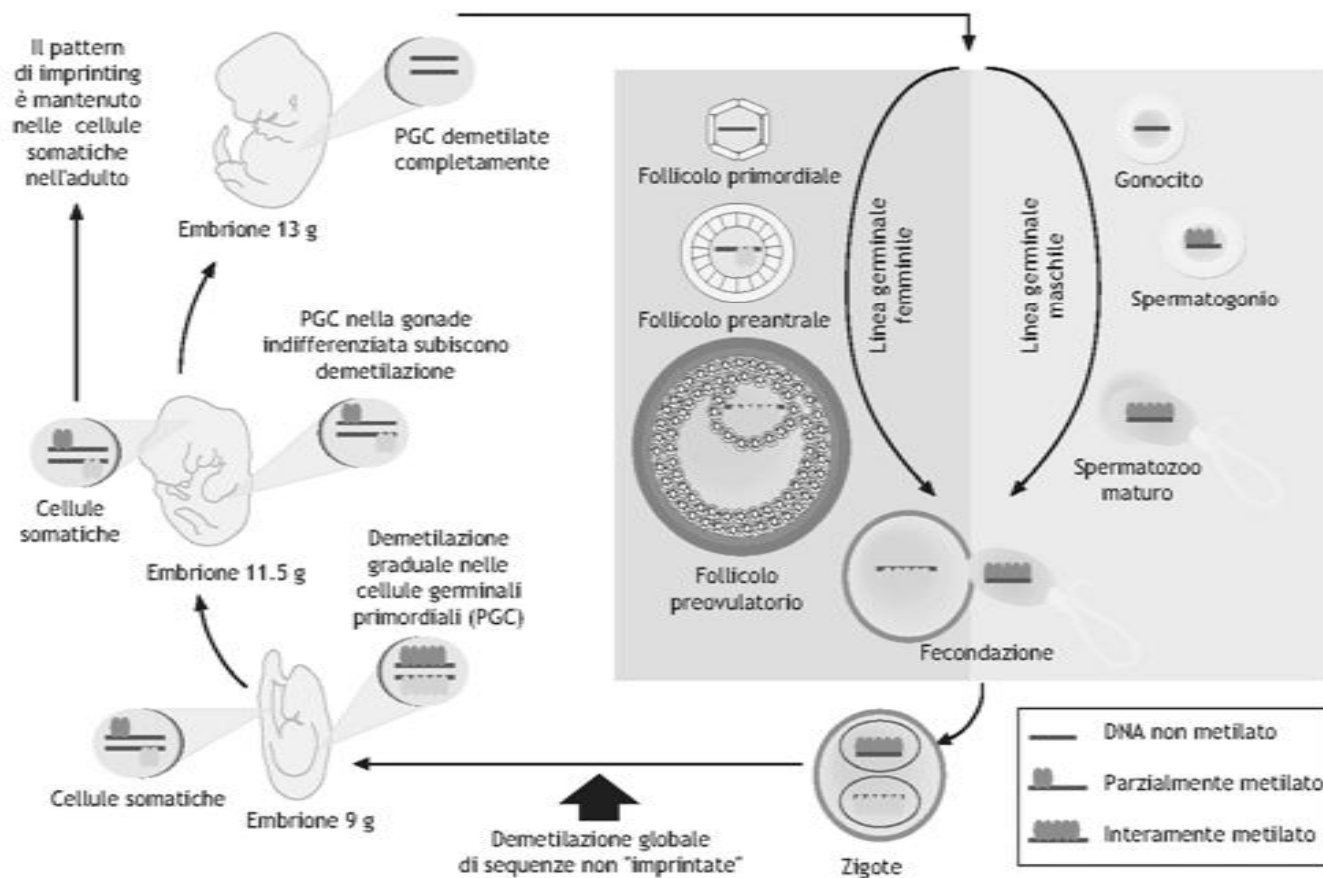
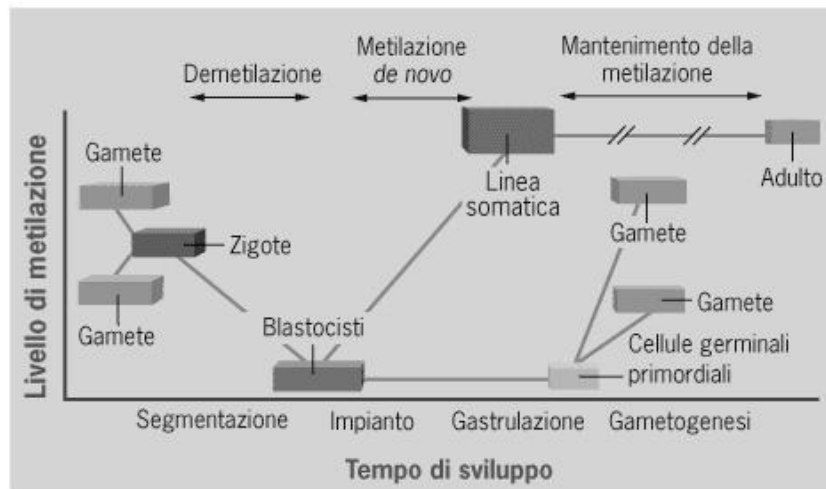


Figura 4.80 **Imprinting: pattern di metilazione durante lo sviluppo.** Il DNA metilato è trascrizionalmente represso. Il mancato rispetto dell'imprinting provoca aborto o gravi malattie.

## pattern di metilazione cambia secondo le varie fasi di sviluppo e i vari tipi cellulari

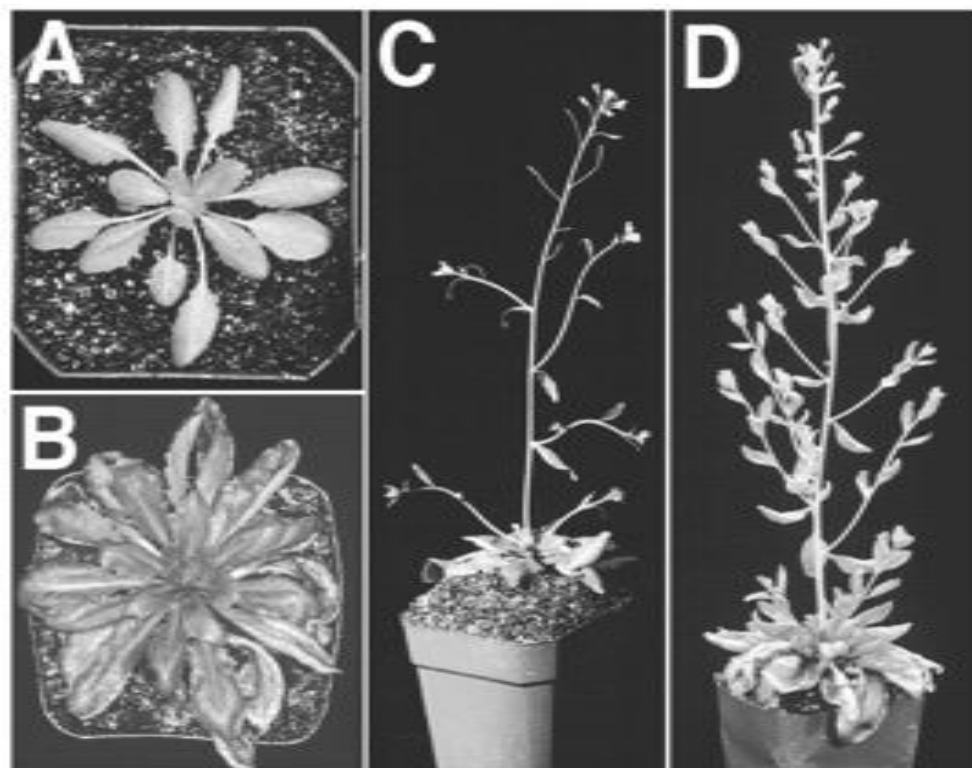


**FIGURA 12.49 Cambiamenti nella metilazione del DNA durante lo sviluppo dei mammiferi.** Il DNA di uno zigote è notevolmente metilato. Durante le prime divisioni, il genoma va incontro ad una demetilazione globale. È interessante notare che il DNA ereditato dal padre viene demetilato più precocemente del DNA ereditato dalla madre. Dopo l'impianto nell'utero, il DNA è sottoposto a nuova metilazione nelle cellule che origineranno i tessuti embrionali, mentre il DNA delle cellule germinali primordiali, che darà origine ai gameti nell'adulto, rimane non metilato. Il DNA delle cellule germinali verrà metilato negli stadi tardivi della formazione dei gameti. Il livello di metilazione generale viene mantenuto elevato nelle cellule somatiche (non germinali) durante tutto lo sviluppo successivo e nell'adulto. (DA R. JAENISCH, TRENDS GENET. 13:325, 1997; COPYRIGHT 1997, PER GENT. CONC. DI ELSEVIER SCIENCE).

**Per alcuni geni i gameti maschile e femminile hanno pattern di metilazione divergenti**

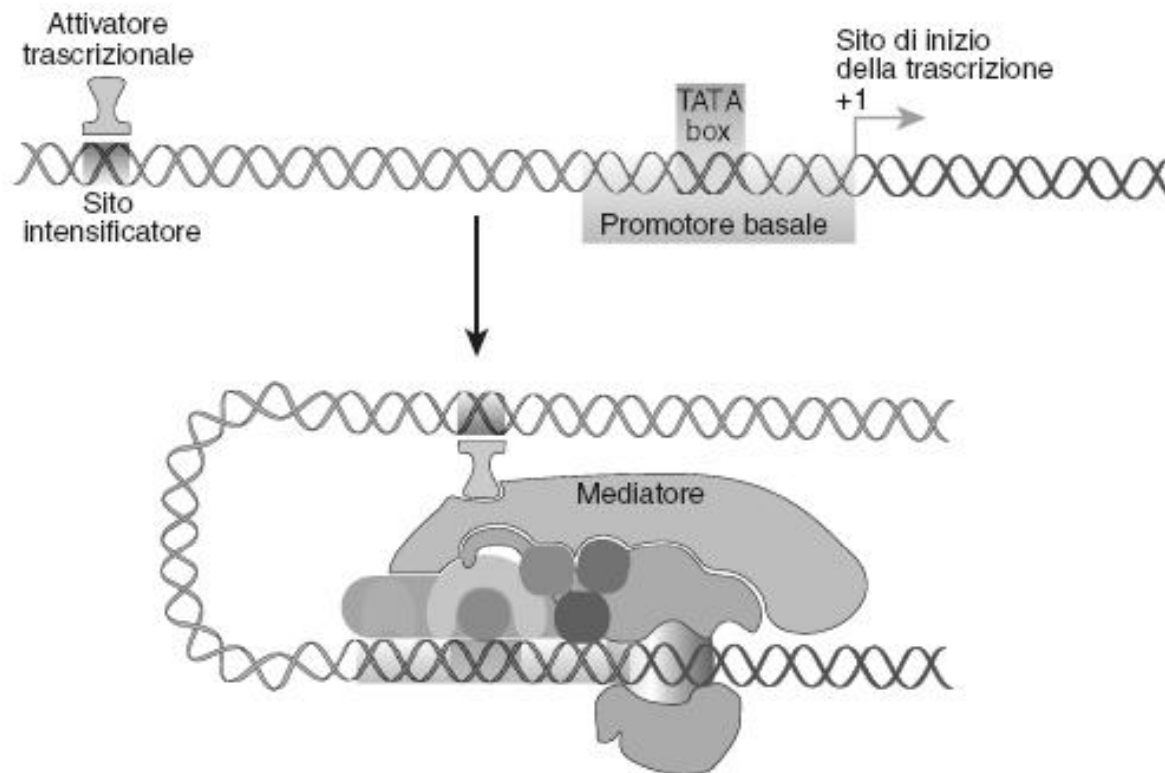
→nell'embrione (fase sviluppo precoce) si esprimerà solo l'allele (copia alternativa) non metilata (materna o paterna)

→Questi geni sono definiti “imprinted” (nei mammiferi circa 80) e sono esempio di eredità epigenetica



**FIGURA 12.50** Dimostrazione sperimentale dell'importanza della metilazione del DNA nello sviluppo delle piante. Nell'esperimento, alcune piante della specie *Arabidopsis thaliana* sono state ingegnerizzate geneticamente in modo da contenere un gene per un RNA antisenso che interferisce con la sintesi di un enzima coinvolto nella metilazione del DNA (una metiltransferasi). Le immagini illustrano l'effetto di questo trattamento in un ceppo in cui i livelli di metilazione del DNA sono stati ridotti del 71%. In *a* e *c* sono mostrate piante di controllo, mentre in *b* e *d* sono mostrate le piante trattate con antisenso. Un confronto fra *a* e *b* mostra che le piante trattate producono un numero molto maggiore di foglie; il confronto fra *c* e *d* mostra che le piante trattate producono circa cinque volte più steli floreali. Inoltre, i fiori delle piante trattate contengono molti più stami dei controlli. (RISTAMPATO CON L'AUTORIZZAZIONE DI MICHAEL J. RONEMUS ET AL., SCIENCE 273:655, 1996, PER GENT. CONC. DI STEPHEN L. DELLAPORTA; © COPYRIGHT 1996, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE).

## Regolazione dell'inizio di trascrizione negli eucarioti



◆ FIGURA 8.18

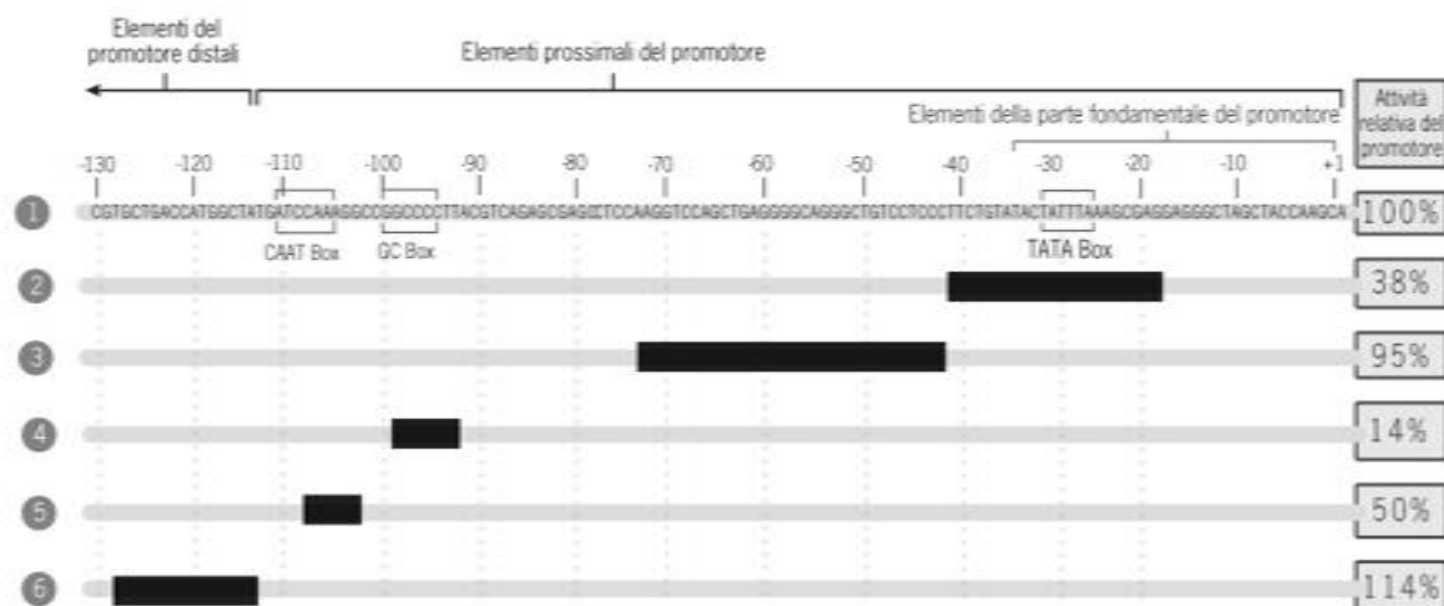
Ruolo svolto dagli attivatori trascrizionali nel potenziamento della trascrizione basale promossa dal complesso di inizio dell'RNA polimerasi II eucariotica. Ogni attivatore lega un elemento "enhancer" (intensificatore) a monte del promotore, ripiega il DNA interposto e si lega al complesso di inizio aumentando l'affinità per il promotore ed esaltando quindi l'attività trascrizionale dell'RNA polimerasi II. Questo effetto può essere svolto indirettamente per interposizione di un complesso multi-proteico denominato "mediatore". L'effetto dell'attivatore dipende anche in parte dal reclutamento di complessi di modificazione e rimodellamento della cromatina che ne inducono il rilassamento necessario a consentire l'accesso dei fattori proteici al DNA (non mostrati nella figura).

In generale l'efficienza di trascrizione è regolata in un range di sfumature tra i 2 estremi (ON –OFF)→ regolazione più raffinata rispetto ai batteri

A monte del promotore anche a distanza di decine di kbasi si trovano siti regolativi enhancer o silencer

Vi si legano attivatori o repressori che mediante ripiegamento del DNA interagiscono con fattori trascrizionali "basali" o generali legati sul promotore insieme alla RNA polimerasi

→ Aumenta /diminuisce efficienza di trascrizione



**FIGURA 12.41 Identificazione delle sequenze del promotore necessarie per la trascrizione.** La riga 1 mostra la sequenza nucleotidica di un filamento del promotore del gene *PEPCK*; sono indicati il TATA box, il CAAT box ed il GC box. Le altre cinque righe illustrano i risultati di esperimenti in cui particolari regioni del promotore sono state rimosse (come indicato dai rettangoli neri) prima di transfettare le cellule con il DNA. Il livello di trascrizione del gene *PEPCK* osservato nell'esperimento in ciascuno di questi casi è indicato a destra. Le delezioni che rimuovono completa-

mente o in parte uno dei tre box causano un marcato decremento del livello di trascrizione, mentre delezioni in altre regioni hanno effetto scarso o nullo. [Va notato che molti promotori di mammifero mancano di uno o più di questi elementi, incluso perfino il TATA box. I promotori privi di TATA box hanno spesso un elemento conservato a valle del sito di inizio, chiamato "elemento promotore a valle" (*downstream promoter element* o *DPE*)]. (DATI DERIVATI DA STUDI DI RICHARD W. HANSON E DARYL K. GRANNER E LORO COLLABORATORI).

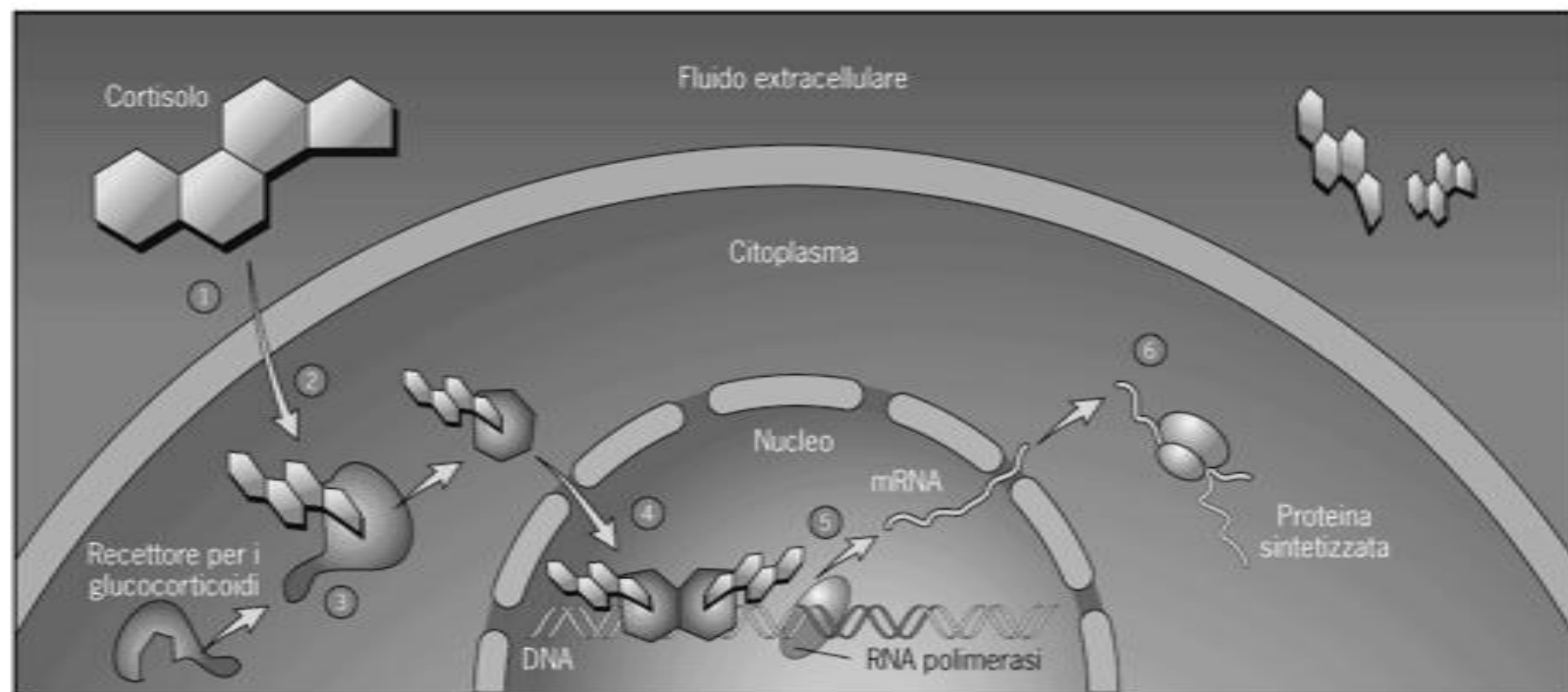


## Coordinazione dell'espressione genica negli eucarioti

- Negli eucarioti la coordinazione dell'espressione genica sembra dipendere dalla presenza di una specifica sequenza *enhancer* (o di diversi *enhancer*) in **tutti i geni appartenenti allo stesso «gruppo di lavoro»**.
- Diverse copie di fattori di trascrizione che riconoscono queste sequenze di DNA si legano a esse promuovendo la trascrizione simultanea dei geni.
- I fattori trascrizionali possono legarsi a seq di controllo prossimali e distali rispetto al promotore

**Il recettore di un ormone steroideo agisce come fattore trascrizionale andandosi a legare ad elementi di risposta ai glucocorticoidi (GRE)**

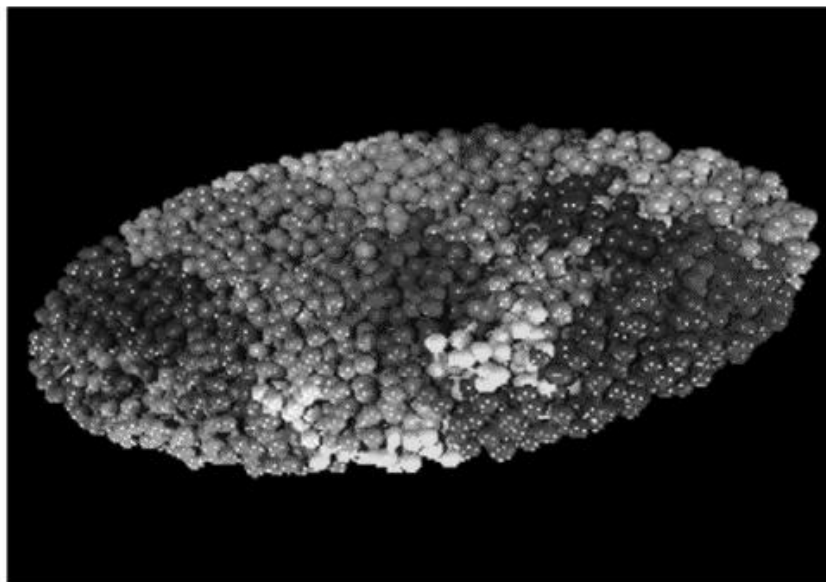
**I GRE sono presenti a monte di vari geni correlati → regolazione coordinata**



**FIGURA 12.44 Attivazione di un gene da parte di un ormone steroideo, come il glucocorticoide cortisolo.** L'ormone entra nella cellula dal fluido extracellulare (passaggio 1), diffonde attraverso il doppio strato lipidico (passaggio 2) ed entra nel citoplasma, dove si lega ad un recettore per i glucocorticoidi (passaggio 3). Il legame dell'ormone cambia la conformazione del recettore e ne determina la

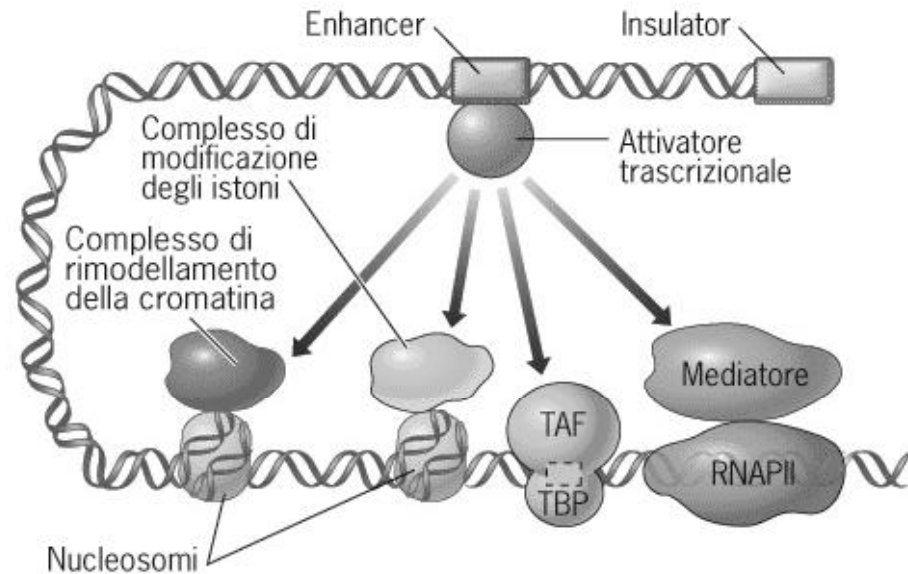
traslocazione nel nucleo, dove agisce da fattore di trascrizione legandosi ad un elemento di risposta ai glucocorticoidi (GRE) del DNA (passaggio 4). Il legame di due molecole adiacenti di recettore porta alla formazione di un dimero che attiva la trascrizione del DNA (passaggio 5), portando così alla sintesi di specifiche proteine nel citoplasma (passaggio 6).

**Uno stesso fattore trascrizionale può agire su tratti genomici  
distanti e/o su cromosomi diversi avvicinandoli  
→ rimodellamento dei domini cromatinici/territori nucleari**



**FIGURA 12.23** Mappa tridimensionale di tutti i cromosomi presenti nel nucleo di un fibroblasto umano. Questa immagine elaborata al computer è basata su un'analisi per ibridazione *in situ* fluorescente, analoga a quella descritta nella Figura 12.18*b*, con la quale ciascun cromosoma umano può essere distinto dagli altri ed identificato in base ad un colore specifico. Ogni cromosoma occupa un diverso territorio all'interno del nucleo. (DA ANDREAS BOLZER, ET AL., PLOS BIOL. 3:E157, 2005, PER GENT. CONC. DI THOMAS CREMER).

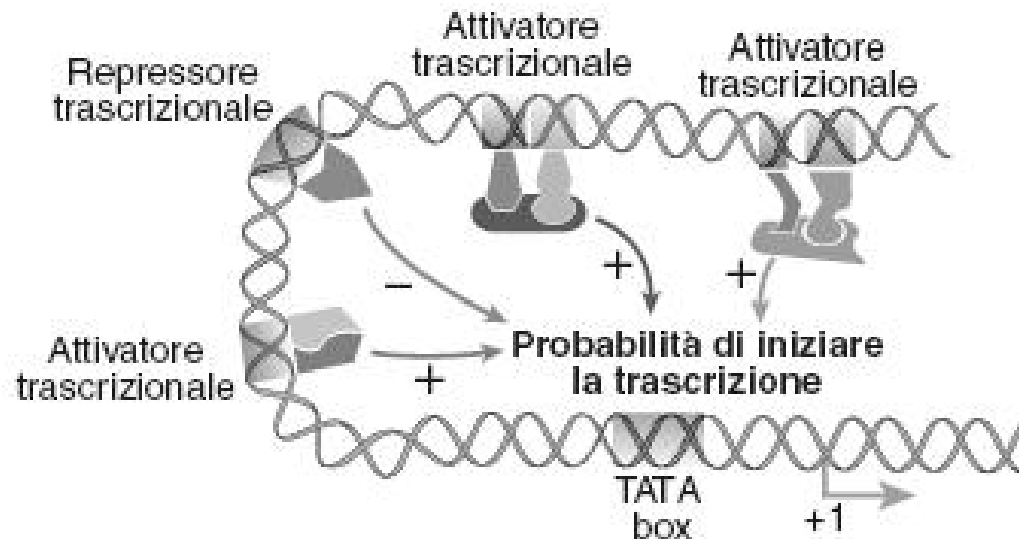
**Gli attivatori/repressori trascrizionali:  
interagiscono con i fattori basali di trascrizione  
ma modulano anche meccanismi di rimodellamento cromatinico**



**FIGURA 12.45** Una panoramica dei meccanismi con cui attivatori trascrizionali situati su siti distanti possono influenzare l'espressione genica. Gli attivatori trascrizionali legati a regioni enhancer a monte influenzano l'espressione genica mediante l'interazione con coattivatori. Sono illustrati quattro diversi tipi di coattivatori; due di questi, chiamati "complesso di modificazione degli istoni" e "complesso di rimodellamento della cromatina", agiscono alterando la struttura della cromatina. Gli altri due tipi, chiamati "TAF" e "mediatore", agiscono su componenti dell'apparato basale della trascrizione che si assemblano sul core del promotore. Questi vari tipi di coattivatori sono descritti nei paragrafi seguenti.

## sinergia

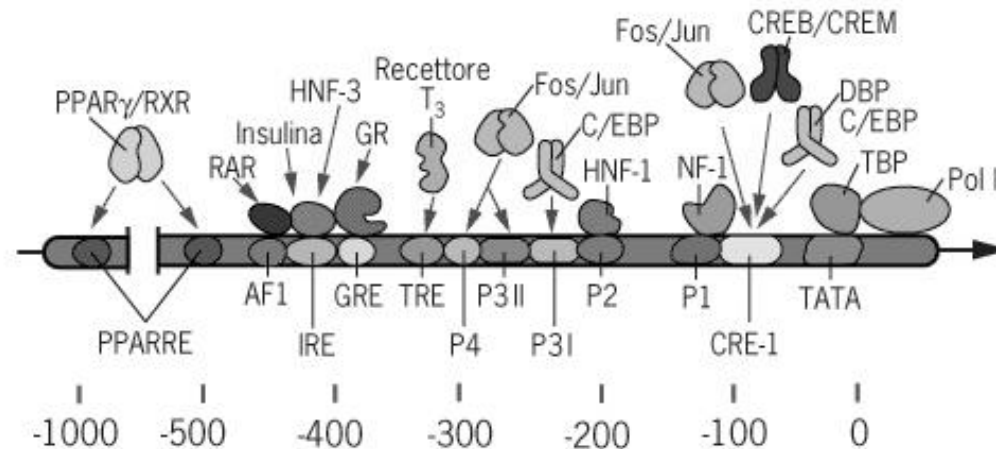
**L'azione di diversi repressori ed attivatori puo' combinarsi insieme permettendo sistemi di controllo trascrizionale fine**



### ◆ FIGURA 8.19

**Effetto svolto da una combinazione di elementi di controllo a monte sul livello trascrizionale di un gene eucariotico trascritto dall'RNA polimerasi II. Il livello trascrizionale di ogni gene è il risultato della combinazione di elementi di controllo a monte posizionati nella sua regione promotrice e della presenza e grado di attivazione funzionale dei fattori trascrizionali specifici (attivatori e repressori) che si legano ad essi.**

## Complessità del controllo trascrizionale eucariotico



**FIGURA 12.43 Regolazione della trascrizione del gene *PEPCK* di ratto.** La trascrizione di questo gene, come negli altri casi, è controllata da una serie di fattori di trascrizione che interagiscono con specifiche sequenze di DNA localizzate in una regione regolatoria del gene, situata a monte della regione codificante. In questa regione è incluso un elemento di risposta ai glucocorticoidi (GRE) il quale, una volta legato al recettore dei glucocorticoidi, stimola la trascrizione dal promotore. In questa regione sono anche inclusi siti di legame per un recettore per l'ormone tiroideo (sito TRE), per una proteina che lega AMP ciclico prodotto in risposta all'ormone glucagone (sito CRE-1), e per l'ormone insulina (sito IRE). Inoltre, come si può osservare, questa regione lega anche numerosi altri fattori di trascrizione. (Da S.E. NIZIELSKI ET AL., J. NUTRITION 126: 2699, 1996; © AMERICAN SOCIETY FOR NUTRITIONAL SCIENCES).

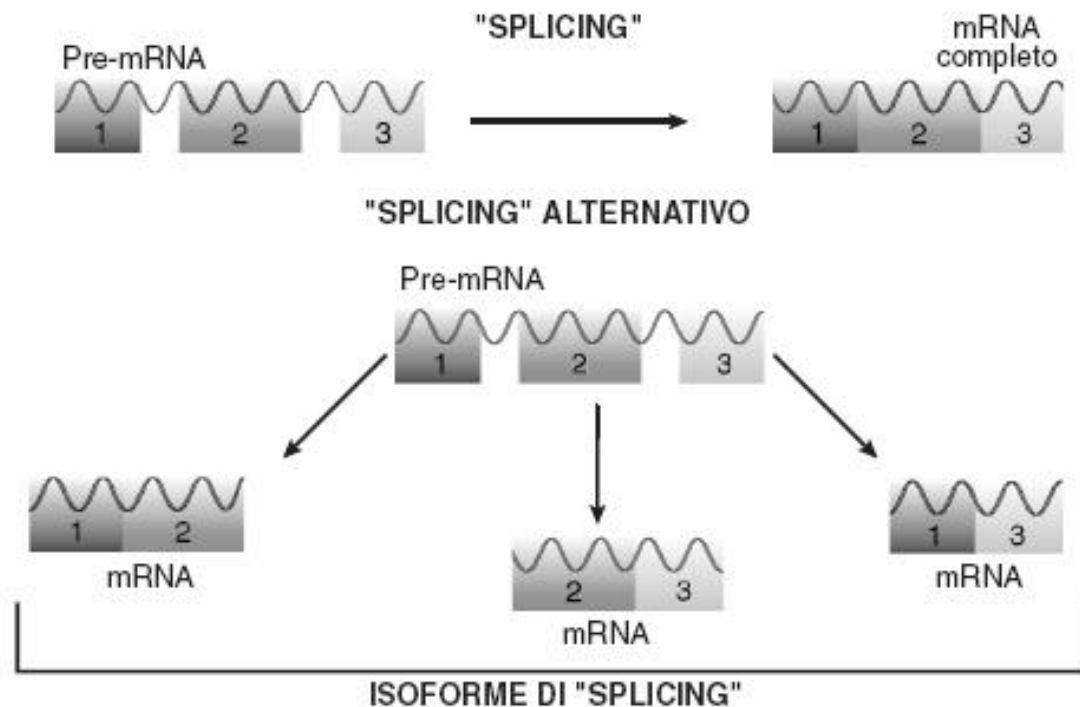
## Regolazione post-trascrizionale a livello di maturazione dell'RNA

Lo *splicing alternativo* ricombina gli esoni in versioni alternative

→ Si producono mRNA maturi diversi → proteine diverse

Possibilità di generare più prodotti a partire da un solo gene → aumenta capacità codificante dell'intero genoma

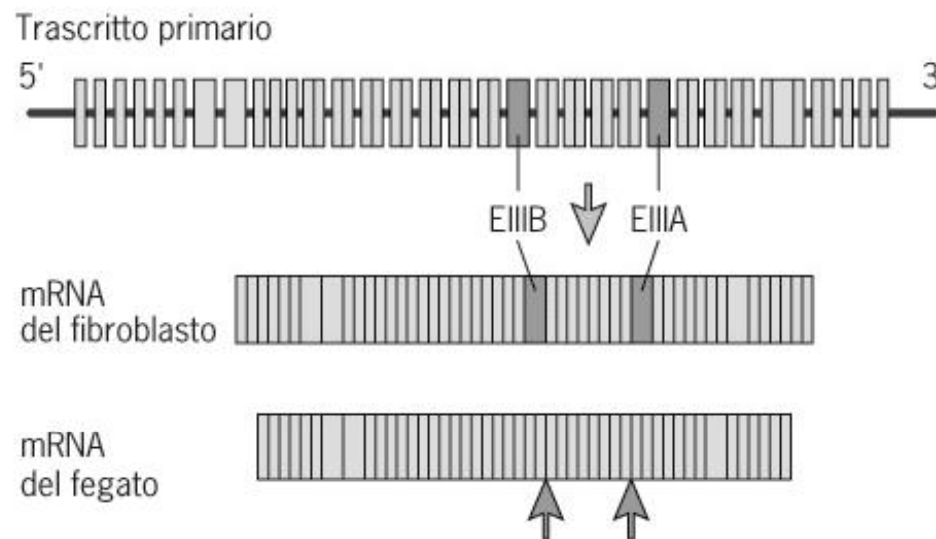
Splicing tessuto-specifici



### ◆ FIGURA 8.25

**Conseguenze dello "splicing" alternativo sulla sequenza codificante dell'mRNA.** Il processo di "splicing" alternativo può combinare in diversi modi gli esoni contenuti nel trascritto primario in modo da generare diversi mRNA, definiti isoforme di "splicing". Queste codificano spesso per proteine funzionalmente distinte. Nel complesso lo "splicing" alternativo consente di diversificare i prodotti dell'espressione genica.

## Esempio di splicing alternativo: fibronectina del connettivo e del fegato

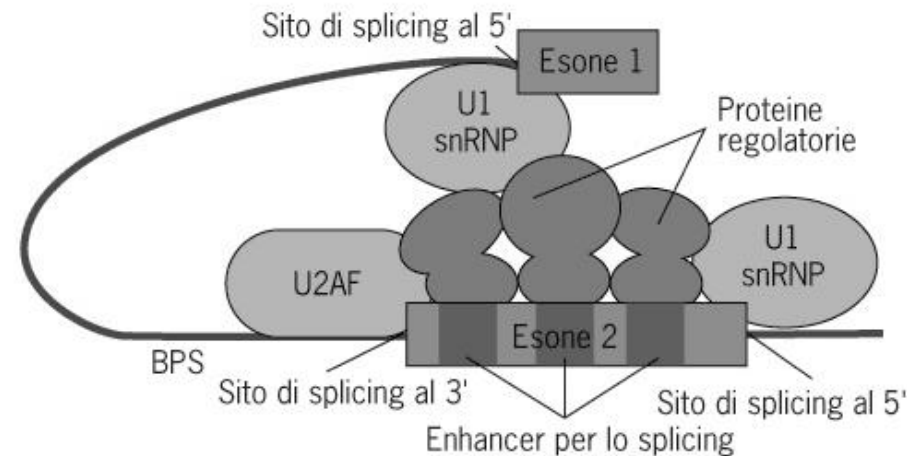


**FIGURA 12.51 Splicing alternativo dell'mRNA per la fibronectina.**

Il gene per la fibronectina consiste di una serie di esoni, indicati nel disegno in alto (gli introni, in nero, non sono in scala). Due di questi esoni codificano per porzioni della proteina chiamate EIIIA e EIIIB, che sono incluse nella proteina prodotta dai fibroblasti ma assenti in quella prodotta dal fegato. Tale differenza è dovuta a splicing alternativo: le porzioni del pre-mRNA codificanti per questi due esoni vengono rimosse dal trascritto nelle cellule del fegato. I siti corrispondenti agli esoni mancanti sono indicati dalle frecce nell'mRNA di fegato.



**Lo splicing alternativo dipende dal fatto che una giunzione di splicing venga riconosciuta o meno dall'apparato di splicing**

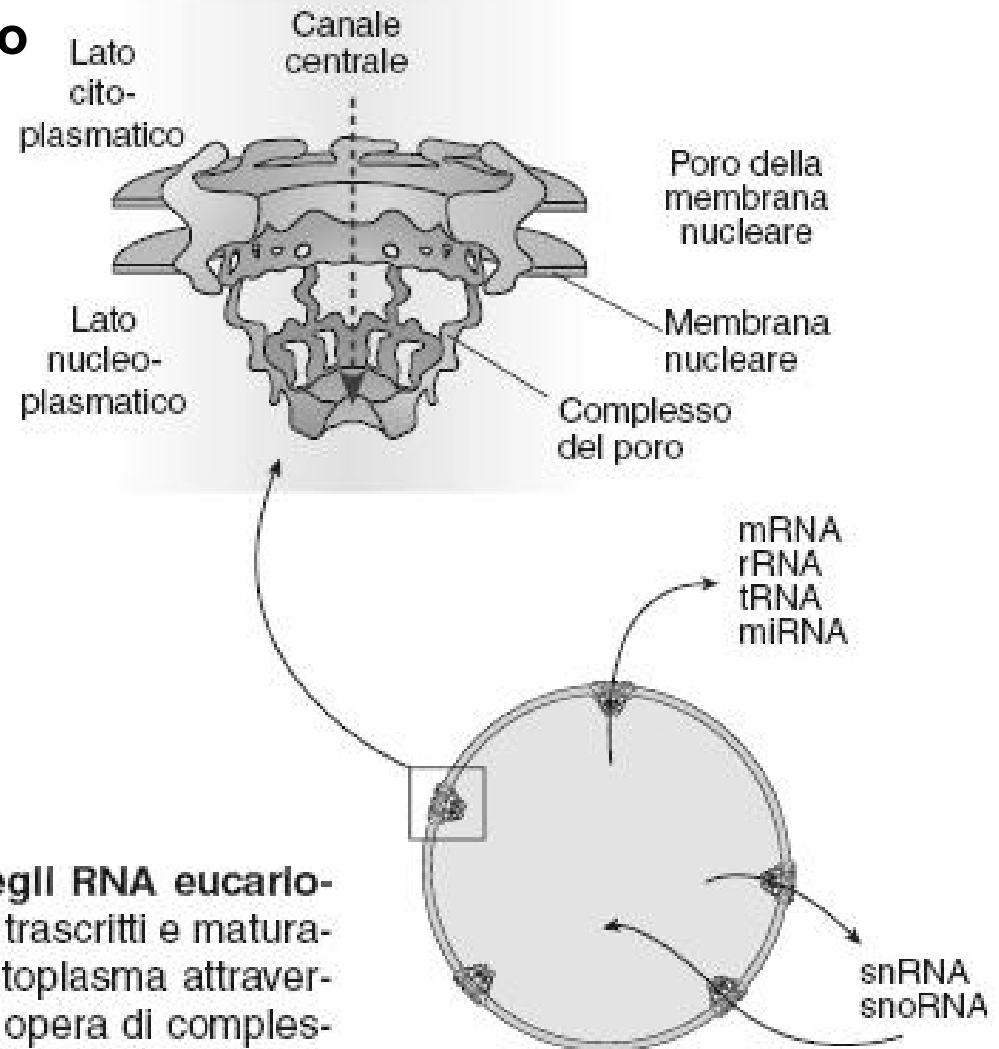


**FIGURA 12.52 Modello del ruolo degli enhancer esonici per lo splicing nella regolazione dello splicing alternativo.** In questo caso, l'esone 2 contiene diversi enhancer per lo splicing, lunghi circa 6-8 nucleotidi ciascuno, che legano specifiche proteine regolatorie. Queste proteine regolatorie legate reclutano fattori chiave per lo splicing (U2AF) e U1 snRNP ai vicini siti di splicing al 3' e al 5'. [U2AF svolge un ruolo diretto nel reclutare U2 snRNP a livello del sito di ramificazione (BPS) ed è richiesto per la formazione del capio]. Se U2AF e U1 snRNP non sono reclutate a livello dei siti di splicing ad entrambe le estremità dell'esone 2, tale esone non viene riconosciuto e viene invece rimosso come parte dell'introne. (DA K. J. HERTEL ET AL., CURR. OPIN. CELL BIOL. 9:351, 1997).

## Regolazione a livello di trasporto

**Il trasporto nucleo→citoplasma rappresenta un ulteriore punto di controllo**

**Alcuni mRNA bloccati nel nucleo non saranno tradotti**



### ◆ FIGURA 8.31

**Trasporto nucleo-citoplasmatico degli RNA eucariotici.** Tutti gli RNA eucariotici, una volta trascritti e maturati, vengono trasportati dal nucleo al citoplasma attraverso i pori della membrana nucleare ad opera di complessi proteici noti come “esportine”. Gli RNA coinvolti nella maturazione del pre-mRNA (snRNA) o del pre-rRNA (snoRNA) si associano con proteine a formare rispettivamente le snRNP e snoRNP le quali vengono successivamente trasportate al nucleo grazie a complessi analoghi ai precedenti e noti come “importine”.

**Dopo che l'RNA è stato modificato e trasferito dal nucleo al citoplasma, avvengono altre forme di controllo dell'espressione genica:**

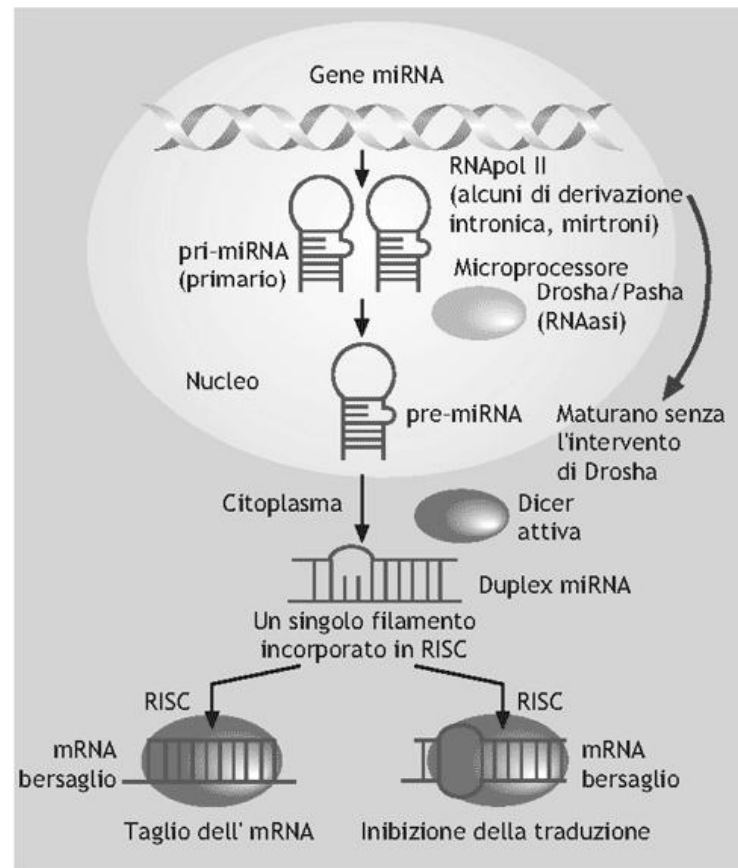
- demolizione più o meno rapida dell'mRNA; Il tempo di sopravvivenza delle molecole di mRNA è un fattore importante che regola la quantità di proteine assemblate dalla cellula.**
- Attivazione/inibizione della traduzione; vi sono numerose proteine che hanno la funzione di regolare l'inizio della sintesi proteica.**

# Regolazione post-trascrizionale

## Meccanismi di interferenza da RNA

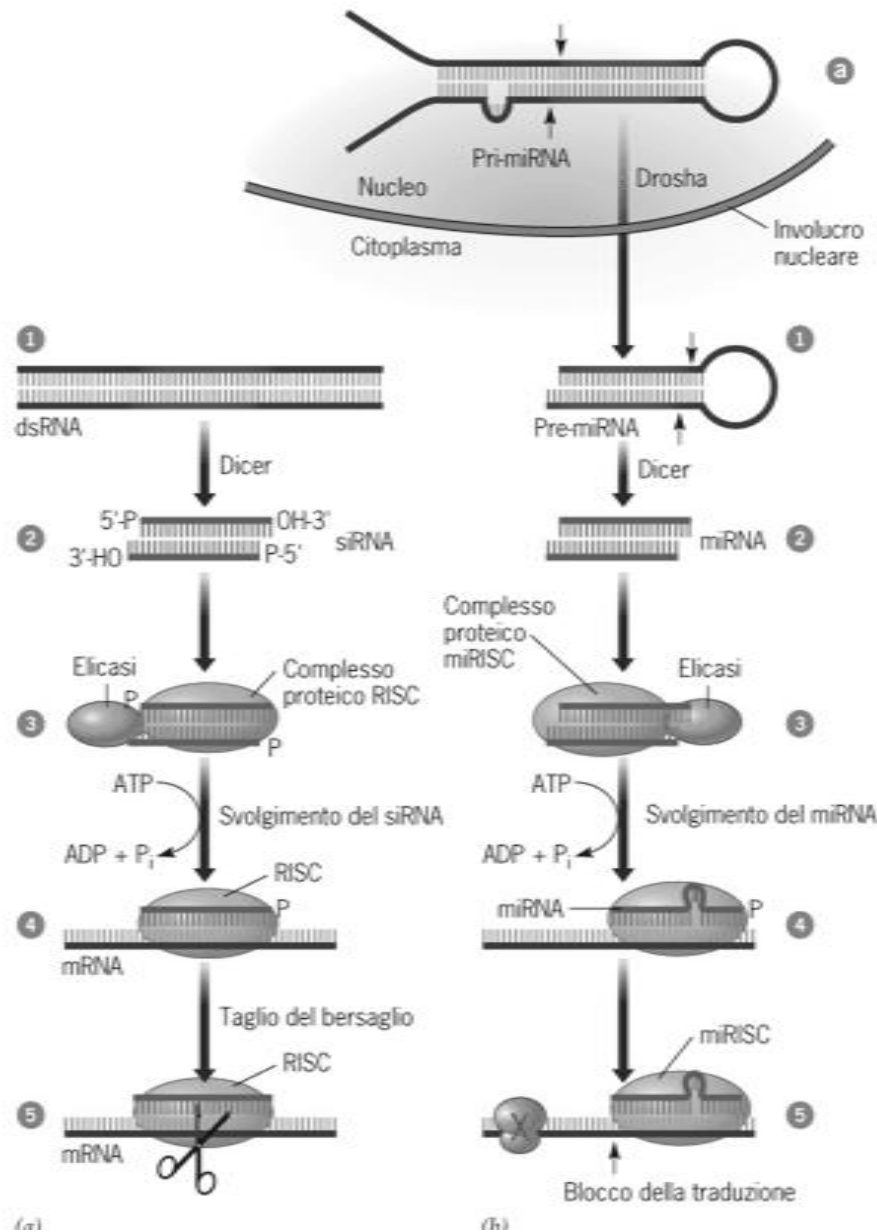
**microRNA (miRNA):** corti RNA (20-25 nt) presenti in vegetali ed animali con funzione regolativa

maturano nel nucleo e agiscono nel citoplasma andando a riconoscere specifici mRNA → inducono degradazione dell'mRNA complementare o ne inibiscono traduzione

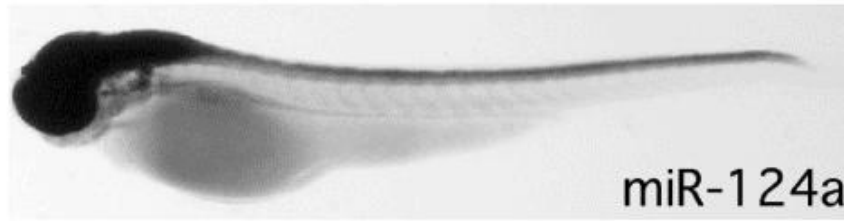


■ **Figura 4.81** Micro(mi)RNA e silenziamento genico.

In realtà esistono i miRNA (origine genomica) e i siRNA (da virus, trasposoni, o artificiali) ma hanno lo stesso effetto: silenziamento genico.



**FIGURA 11.38 La formazione ed il meccanismo di azione dei siRNA e dei miRNA.** (a) Nel passaggio 1, un RNA a doppio filamento viene tagliato dall'endonucleasi Dicer, formando un piccolo (21-23 nucleotidi) siRNA con estremità sporgenti (passaggio 2). Nel passaggio 3, il siRNA si associa con un complesso proteico (RISC) contenente una elicasi che svolge i due filamenti dell'RNA. Nel passaggio 4, il siRNA attivo, a singolo filamento, associato alle proteine del complesso RISC, si lega ad un mRNA bersaglio che ha una sequenza complementare. Nel passaggio 5, l'mRNA viene tagliato a livello di un sito specifico e poi degradato. (b) I microRNA sono derivati da RNA precursori a singolo filamento contenenti sequenze complementari che permettono loro di ripiegarsi su se stessi formando un RNA a doppio filamento con un'ansa ad una estremità (passaggio 1). Questo pseudo-dsRNA (o pri-miRNA) è tagliato da un complesso proteico contenente un'endonucleasi chiamata Drosha, per generare un pre-miRNA con un 3' sporgente ad un'estremità. Il pre-miRNA è esportato nel citoplasma, dove è tagliato da Dicer in un piccolo miRNA a doppio filamento (passaggio 2) con un 3' sporgente ad entrambe le estremità. L'RNA a doppio filamento si associa a proteine (passaggio 3) che lo svolgono, separando i due filamenti singoli. Uno di questi RNA a filamento singolo (il miRNA) entra a far parte di un complesso proteico simile a RISC (passaggio 4). Il miRNA poi si lega ad una regione complementare di un mRNA ed inibisce la traduzione del messaggio (passaggio 5). A differenza dei siRNA, i miRNA che inibiscono la traduzione tendono a essere non perfettamente complementari all'mRNA bersaglio, da cui la formazione della piccola ansa.



(a)



(b)



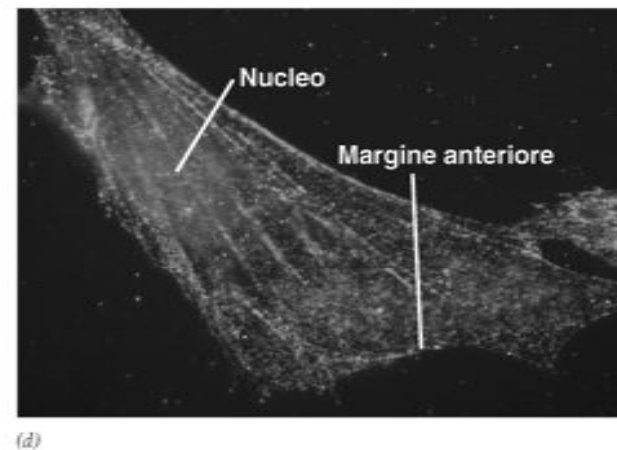
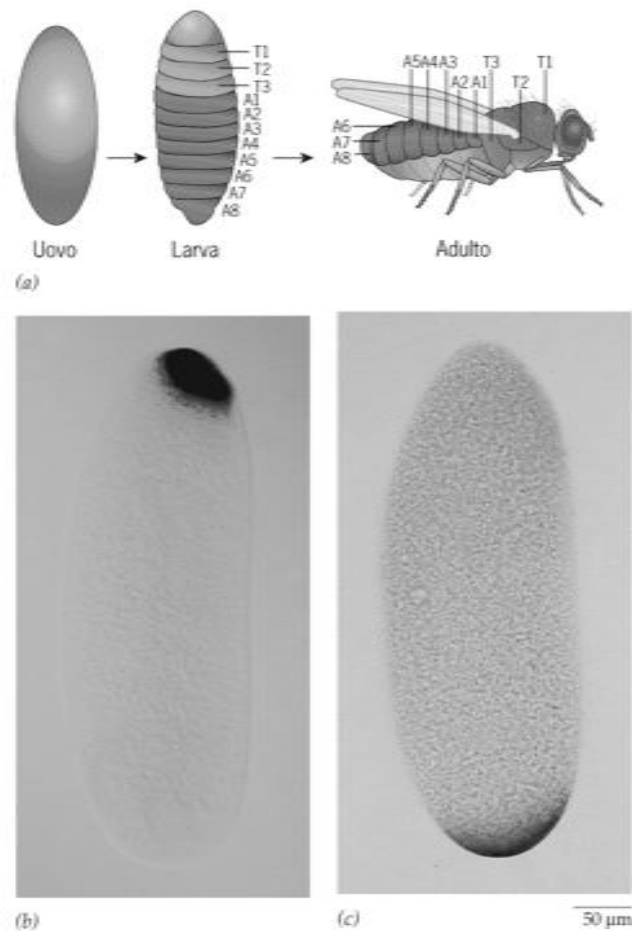
(c)

**I mi-RNA regolano vari processi tra cui sviluppo embrionale, morte cellulare, sviluppo sistema nervoso...**

**FIGURA 11.39 I microRNA sono sintetizzati in tessuti specifici durante lo sviluppo embrionale.** Queste micrografie di embrioni di pesce zebra mostrano l'espressione specifica di tre diversi miRNA, la cui localizzazione è indicata dalla colorazione blu. *miR-124a* è espresso specificamente nel sistema nervoso (a), *miR-206* nel muscolo scheletrico (b) e *miR-122a* nel fegato (c). (DA ERNO WIENHOLDS, WIGARD KLOOSTERMAN, ET AL., SCIENCE 309:311, 2005, PER GENT. CONC. DI RONALD H. A. PLASTERK; © COPYRIGHT 2005, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE).

## Controllo a livello traduzionale

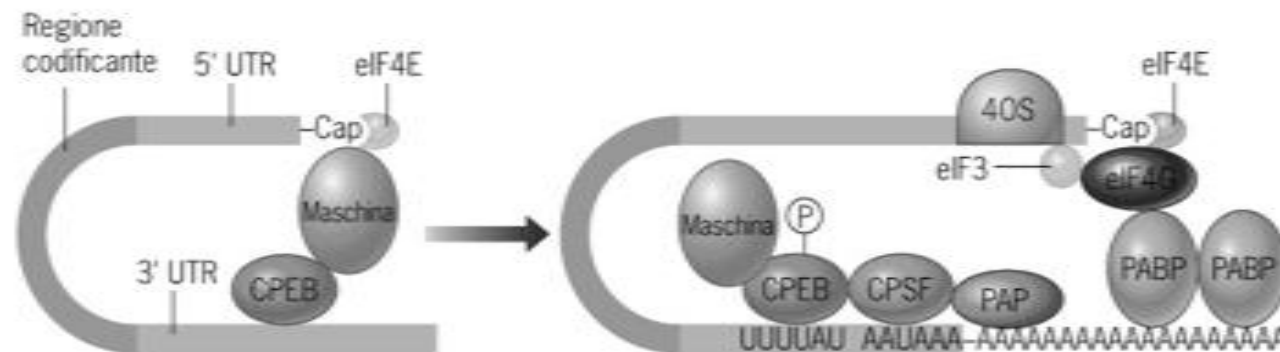
Controllo sulla localizzazione degli mRNA → le regioni 3'UTR dell'mRNA determinano la sua posizione nella cellula → polarità nello sviluppo dell'embrione



**FIGURA 12.53 Localizzazione citoplasmatica degli mRNA.** (a) Schema dei tre stadi nella vita di un moscerino della frutta (*Drosophila*): uovo, larva e adulto; sono indicati i segmenti del torace e dell'addome. (b) Localizzazione dell'mRNA di *bicoid* al polo anteriore di un embrione precoce di *Drosophila*, mediante ibridazione *in situ*. (c) Localizzazione dell'mRNA di *oskar* al polo posteriore di un embrione ad uno stadio di sviluppo analogo a quello mostrato in b. Entrambi questi mRNA localizzati hanno un ruolo importante nello sviluppo dell'asse antero-posteriore di *Drosophila*. (d) Localizzazione dell'mRNA (in rosso) vicino al margine anteriore di un fibroblasto migrante. Questa è la regione della cellula dove viene utilizzata l'actina durante la locomozione (Figura 9.71). (B: PER GENT. CONC. DI DANIEL ST JOHNSTON; C: PER GENT. CONC. DI ANTOINE GUICHET E ANNE EPHRUSSE; D: DA V. M. LATHAM, ET AL., PER GENT. CONC. DI ROBERT H. SINGER, CURR. BIOL. 11:1010, 2001).

## Mascheramento dell'mRNA

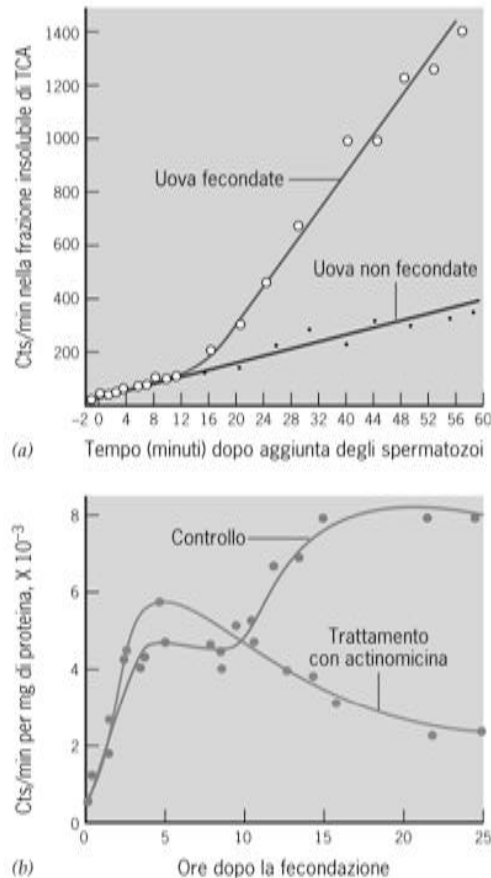
**Alcune proteine associandosi al mRNA ne impediscono traduzione  
Fenomeno associato a prime fasi dello sviluppo embrionale**



**FIGURA 12.55** Un modello del meccanismo di attivazione della traduzione in seguito a fecondazione di un ovocita di *Xenopus*. Secondo questo modello, gli RNA messaggeri sono mantenuti nel citoplasma in uno stato inattivo mediante una proteina chiamata Maschina (da 'to mask': mascherare). Dopo la fecondazione, una proteina associata (CPEB) viene fosforilata: ciò causa lo spostamento della Maschina, portando a due cambiamenti principali nell'mRNP. La versione fosforilata di CPEB recluta un'altra proteina

(CPSF), che a sua volta recluta la poli(A) polimerasi (PAP), un enzima che aggiunge residui di adenosina alla coda poli(A). La fosforilazione di CPEB causa anche la dissociazione della Maschina da eIF4E e il legame di eIF4G, un fattore di inizio necessario per la traduzione. Per effetto di questi cambiamenti, l'mRNA può finalmente essere tradotto. (RISTAMPATO PER GENT. CONC. DI R.D. MENDEZ & J.D. RICHTER, NATURE REVIEWS MOL. CELL BIOL. 2:524, 2001, © COPYRIGHT 2001, BY MACMILLAN MAGAZINES LIMITED).



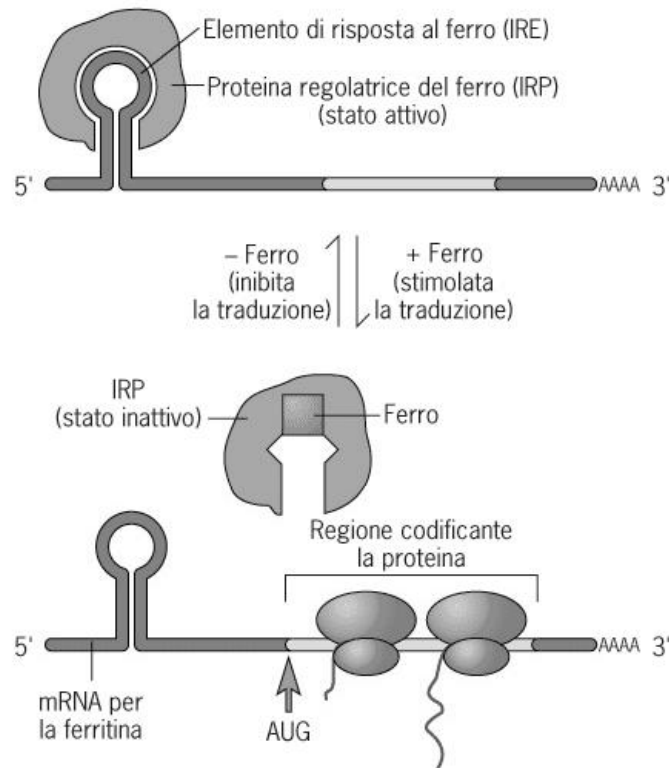


**FIGURA 12.54 Dimostrazione sperimentale dell'attivazione di mRNA "mascherati" in seguito alla fecondazione nelle uova di riccio di mare.** (a) Incorporazione totale di leucina-<sup>14</sup>C in uova non fecondate ed in uova fecondate di riccio di mare. Il tempo 0 segna il momento della fecondazione, seguito dopo un breve ritardo da un marcato aumento della sintesi proteica. (b) Livelli di incorporazione di valina-<sup>14</sup>C in uova non fecondate di riccio di mare in presenza o in assenza di actinomicina D, un inibitore della sintesi di RNA. L'aumento iniziale della sintesi proteica che segue la fecondazione (a) non viene inibito dalla actinomicina D. Questi risultati indicano che la sintesi proteica nel periodo che segue la fecondazione non dipende dalla sintesi di nuovi stampi di mRNA, ma invece avviene utilizzando gli mRNA già presenti nell'uovo al momento della fecondazione. Al contrario, il secondo aumento della sintesi proteica, che inizia circa 10 ore dopo la fecondazione, richiede nuovi stampi di mRNA, essendo inibito da actinomicina D. (A: DA D. EPEL, PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA 57:901, 1967; B: DA P.R. GROSS ET AL., PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA 51:409, 1964).

**La sintesi proteica delle prime fasi di sviluppo embrionale dipende da mRNA precedentemente sintetizzati (cell uovo), mascherati e accumulati**

**Infatti pur usando un farmaco che blocca trascrizione c'è comunque sintesi proteica**

## Sistemi che modulano frequenza di traduzione degli mRNA



**Es: mRNA per ferritina è tradotto attivamente solo se Fe intracellulare abbondante**

**FIGURA 12.56 Il controllo della traduzione dell'mRNA della ferritina.** Quando la concentrazione di ferro è bassa, una proteina repressore che lega ferro, chiamata IRP (proteina regolatrice del ferro), si lega ad una sequenza specifica nel 5'-UTR dell'mRNA per la ferritina, chiamata IRE (elemento di risposta al ferro), che è ripiegata a formare un'ansa a forcina (hairpin). Quando il ferro è disponibile, esso si lega a IRP modificandone la conformazione e causando la sua dissociazione dall'IRE; in tal modo, l'mRNA può essere tradotto in ferritina. Alcune evidenze suggeriscono che il ferro legato sia presente come un gruppo ferro-zolfo.

## Controllo della stabilità degli mRNA

Più lunga è l'emivita di mRNA più cicli di traduzione (+espressione)

La longevità degli mRNA dipende dalla lunghezza della coda poliA e dalle sequenze presenti al 3' UTR

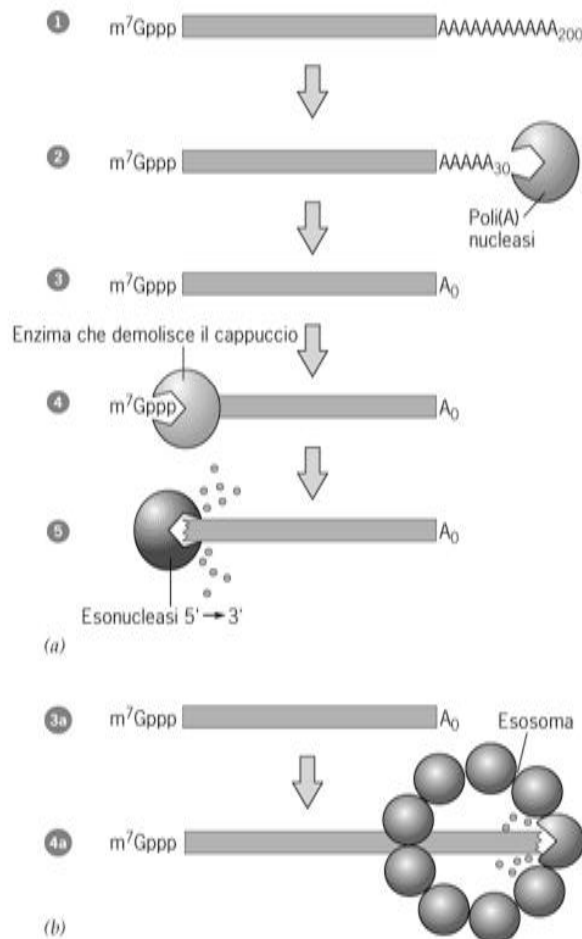


FIGURA 12.57 Degradazione dell'mRNA nelle cellule di mammifero. I passaggi illustrati in figura sono descritti nel testo.

Una volta eliminata/accorciata coda poliA

→ l'mRNA è degradato dal 5'→3'  
oppure dal 3'→5'

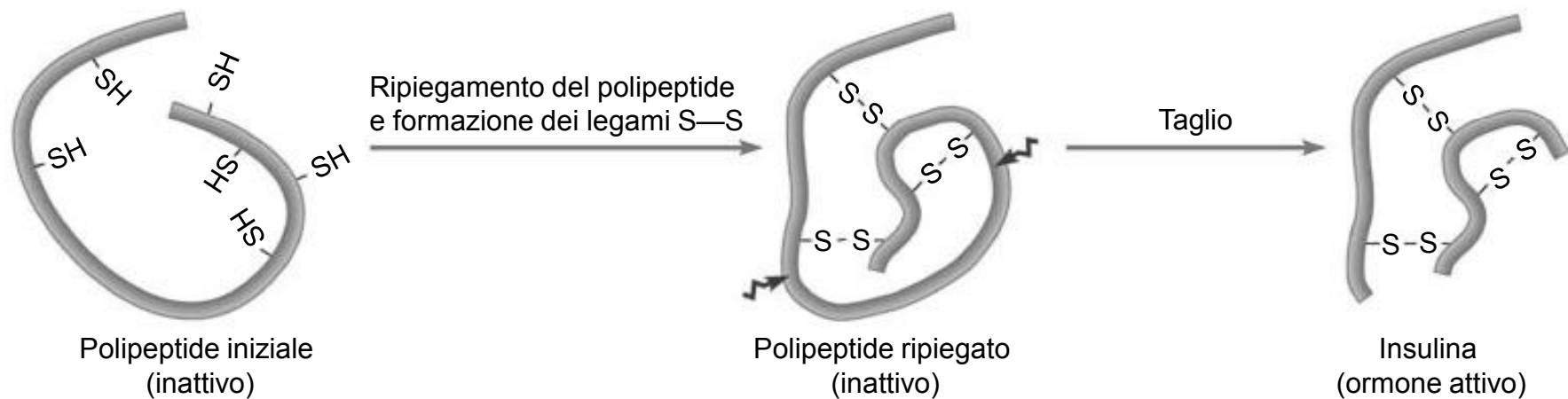
## **l'espressione genica è soggetta a regolazione anche a livello post-traduzionale**

- modificazione dei polipeptidi tradotti: in seguito a modifiche chimiche la proteina acquista funzionalità**
- demolizione delle proteine: le proteine possono “vivere” ed essere attive per pochi minuti o diversi giorni.**

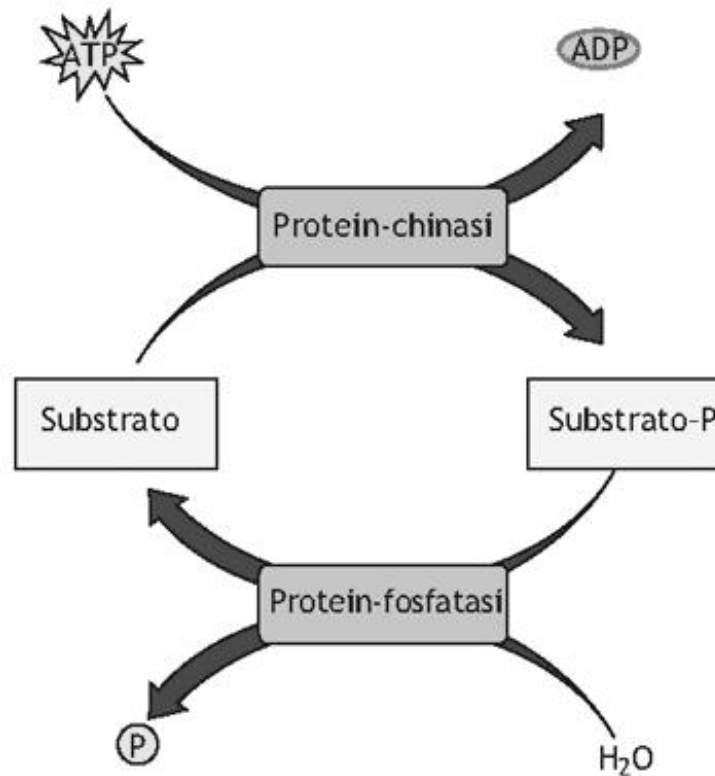
## Attivazione delle proteine mediante modificazione chimica

I polipeptidi che si formano dopo la traduzione non sempre sono già pronti ad agire: spesso devono essere modificati per diventare funzionali.

**Es: formazione di una molecola attiva di insulina**



**L'attività biologica di varie proteine è regolata mediante modifiche covalenti come la fosforilazione**

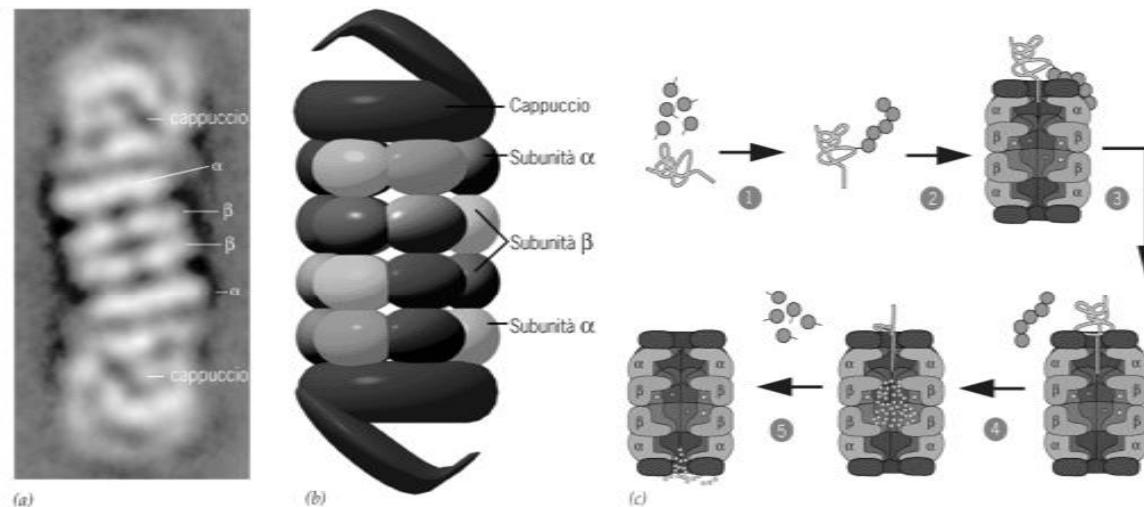


■ **Figura 1.42** Regolazione dell'attività di una proteina per modificazione covalente.



**L'emivita di una proteina è controllata dal sistema ubiquitina-proteasoma ed è correlata alla sua funzione**

**Alcune proteine sono molto longeve (es enzimi glicolisi, istoni, emoglobina) altre durano solo pochi minuti (es fattori trascrizionali, enzimi duplicazione DNA, ecc)**



**FIGURA 12.58 Struttura e funzione del proteasoma.** (a) Immagine al microscopio elettronico ad alta risoluzione di un proteasoma di *Drosophila*. (b) Modello del proteasoma basato sulla microscopia elettronica ad alta risoluzione e sulla cristallografia ai raggi X. Ciascun proteasoma consiste di due grandi cappucci alle due estremità e di una porzione centrale a forma di imbuto costituita da quattro anelli sovrapposti. Ciascun anello consiste di sette subunità suddivise in due classi: tipo α e tipo β. I due anelli centrali sono formati da subunità β che circondano una camera centrale; nello schema, le subunità sono indicate con colori diversi, in quanto esse sono polipeptidi simili ma non identici. Tre delle 7 subunità β in ciascun anello possiedono attività proteolitica, le altre quattro sono inattive nelle cellule eucariotiche. (Anche i procarioti possiedono proteasomi, ma essi hanno una struttura più semplice e tutte le subunità β sono attive). I due anelli più periferici sono formati da subunità α enzimati-

camente inattive; queste formano una stretta apertura (circa 13 Å) attraverso la quale vengono infilati i substrati polipeptidici denaturati, in modo da raggiungere la camera centrale dove sono degradati. (c) I passaggi nella degradazione delle proteine mediante il proteasoma. Nel passaggio 1, la proteina che deve essere degradata viene legata covalentemente ad una serie di molecole di ubiquitina. L'attacco della catena di ubiquitina richiede la partecipazione di tre enzimi distinti (E1, E2 ed E3) con un processo che non viene qui descritto. Nel passaggio 2, la proteina poli-ubiquitinata si lega al cappuccio del proteasoma. La catena di ubiquitina viene quindi rimossa ed il polipeptide denaturato viene infilato nella camera centrale del proteasoma (passaggio 3), dove viene degradato grazie all'attività catalitica delle subunità β (passaggi 4 e 5). (A: DA H. HÖLZL ET AL., PER GENT. CONC. DI WOLFGANG BAUMEISTER, J. CELL BIOL. 150:126, 2000; COPYRIGHT DI ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS).

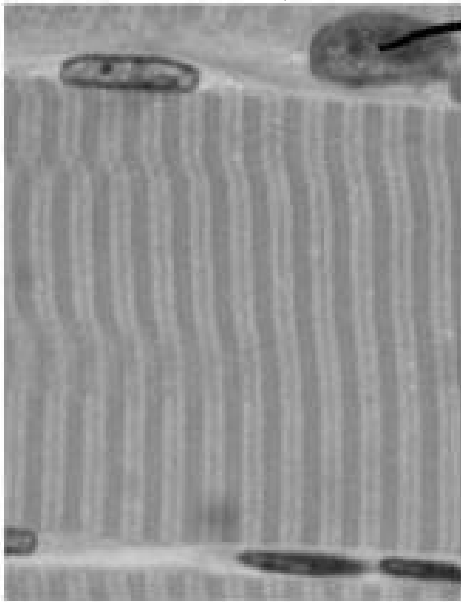
**Il processo di differenziamento dà origine a una grande varietà di cellule specializzate**

- La regolazione dell'espressione genica negli organismi eucariotici, soprattutto nei pluricellulari, è più complicata che nei batteri.**
- Durante le ripetute divisioni cellulari che portano uno zigote a diventare un organismo pluricellulare adulto, le singole cellule vanno incontro al differenziamento e diventano cellule specializzate nella struttura e nelle funzioni.**

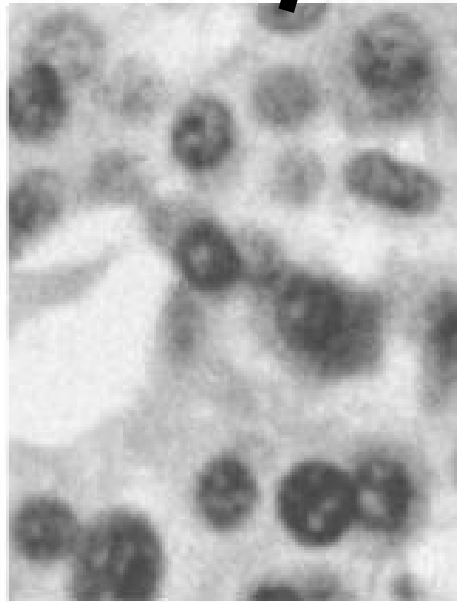


- **Differenti tipi di cellule umane producono differenti tipi di proteine a seconda delle combinazioni di geni che sono attivi in ciascuna di esse.**
- **A seconda dei geni attivi, ciascuna cellula assume una specifica struttura e funzione.**

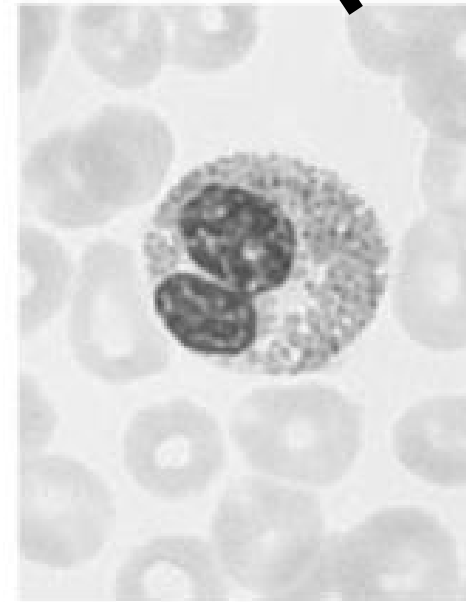
**Fenotipi diversi  $\leftrightarrow$  Espressione di geni specifici**



**Cellule muscolari**



**Cellule del pancreas**



**Cellule del sangue**

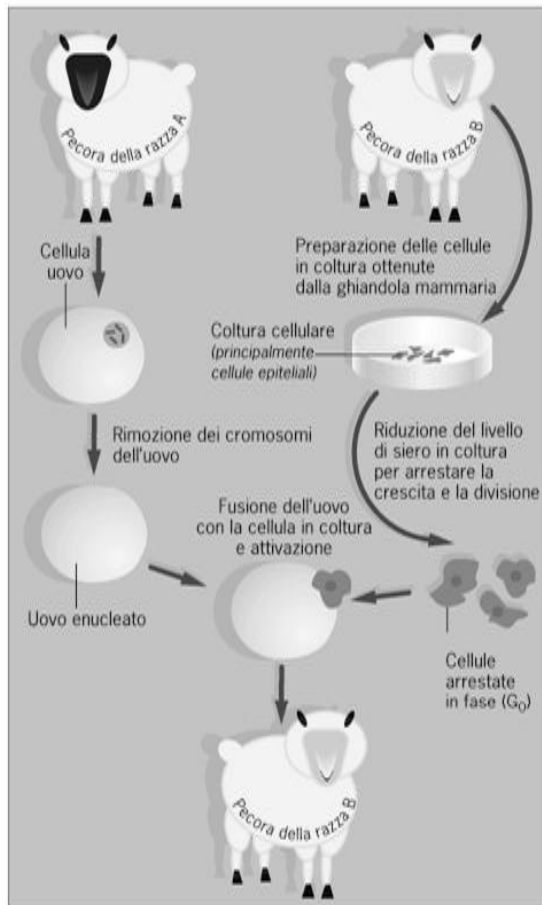


**FIGURA 12.33 Dimostrazione sperimentale dell'espressione tessuto-specifica di un gene coinvolto nel differenziamento cellulare del muscolo.** In questo embrione di topo a 11 giorni di sviluppo, la trascrizione del gene per la miogenina è attivata specificamente nelle regioni (i miotomi dei somiti) che daranno origine al tessuto muscolare. La fotografia mostra un embrione di topo transgenico contenente la regione regolatoria del gene per la miogenina localizzata a monte del gene per la  $\beta$ -galattosidasi batterica, che agisce da marcatore (*reporter*). Il gene della  $\beta$ -galattosidasi è comunemente utilizzato per analizzare l'espressione tessuto-specifica di un gene di interesse, in quanto la presenza dell'enzima  $\beta$ -galattosidasi può essere facilmente individuata mediante il colore blu prodotto da una semplice reazione istochimica. L'attivazione della trascrizione, dovuta a fattori di trascrizione che si legano alle regioni regolatorie del gene per la miogenina, è indicata dalle cellule di colore blu. (Da T.C. CHENG ET AL., PER GENT. CONC. DI ERIC N. OLSON, J. CELL BIOL. 119:1652, 1992; COPYRIGHT DI ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS).

**Le cellule differenziate esprimono solo una piccola percentuale dei loro geni, ma conservano tutto il loro potenziale genetico, perché comunque tutte hanno un genoma completo**

**Cambia il fenotipo ma non il genotipo! Cioè cambia l'espressione genica ma non l'insieme dei geni**



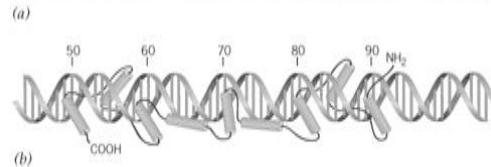
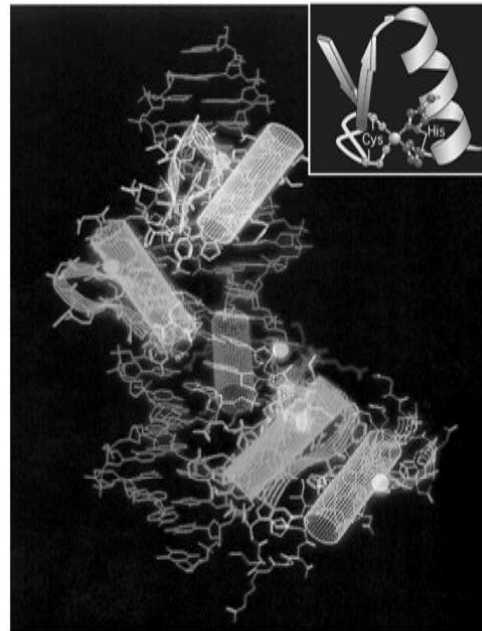


**FIGURA 12.31 La clonazione degli animali dimostra che i nuclei mantengono un corredo completo di informazioni genetiche.** In questo esperimento, un uovo enucleato di una pecora di una razza è stato fuso con una cellula di ghiandola mammaria di una femmina di un'altra razza. L'uovo attivato si è sviluppato in un agnello normale. Poiché tutti i geni dell'agnello nato dovevano essere derivati dal nucleo trapiantato (come dimostrato anche dall'uso di marcatori genetici), questo esperimento conferma l'opinione ampiamente diffusa che le cellule differenziate mantengono tutte le informazioni genetiche originalmente presenti nello zigote. [La difficoltà principale degli esperimenti di trapianto nucleare si incontra generalmente quando il nucleo di una cellula somatica (non germinale) attiva viene improvvisamente immerso nel citoplasma di una cellula uovo relativamente inattiva. Allo scopo di evitare il danneggiamento del nucleo donatore, le cellule in coltura sono state forzate in uno stato quiescente (chiamato  $G_0$ ) abbassando drasticamente il contenuto di siero nel terreno di coltura].

**La clonazione degli animali dimostra che i nuclei delle varie cellule differenziate di un organismo adulto mantengono un corredo completo di informazioni genetiche**

# I fattori trascrizionali legano il DNA grazie a motivi strutturali caratteristici: questi domini riconoscono seq nucleotidiche specifiche

## Zinc-finger



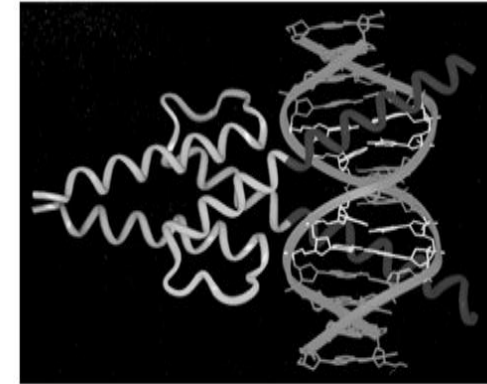
**FIGURA 12.37 Fattori di trascrizione che si legano mediante un motivo "zinc finger".** (a) Un modello del complesso fra una proteina con cinque zinc finger (chiamata GLI) ed il DNA. Ciascun zinc finger è colorato diversamente; il DNA è in blu scuro. I cilindri ed i nastri rappresentano, rispettivamente, le  $\alpha$ -eliche ed i foglietti  $\beta$ . Il riquadro mostra la struttura di un singolo zinc finger. (b) Un modello del TFIIIA legato al DNA del gene per l'rRNA 5S. Il TFIIIA è necessario per la trascrizione del gene per l'rRNA 5S da parte della RNA polimerasi III. (A: RISTAMPATO PER GENT. CONC. DI NIKOLA PAVLETICH E CARL O. PABO, SCIENCE 261:1702, 1993; © COPYRIGHT 1993, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE; B: DA K.R. CLEMENS ET AL., PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA 89:10825, 1992).

## leucine-zipper

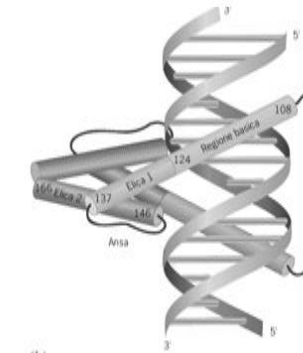


**FIGURA 12.35 Interazioni fra fattori di trascrizione legati a siti differenti nella regione regolatoria di un gene.** Questo disegno illustra la struttura terziaria di due diversi fattori di trascrizione, NFAT-1 (in verde) e AP-1 (le cui due subunità sono colorate in rosso e in blu), legati al DNA a monte di un gene per una citochina coinvolta nella risposta immunitaria. L'interazione cooperativa fra queste due proteine altera l'espressione del gene per la citochina. Come si può osservare, la doppia elica del DNA (la cui direzione è indicata dalla linea grigia) risulta incurvata per effetto di tale interazione proteina-proteina. (DA TOM K. KERPPOLA, STRUCTURE 6:550, 1998).

## elica giro elica



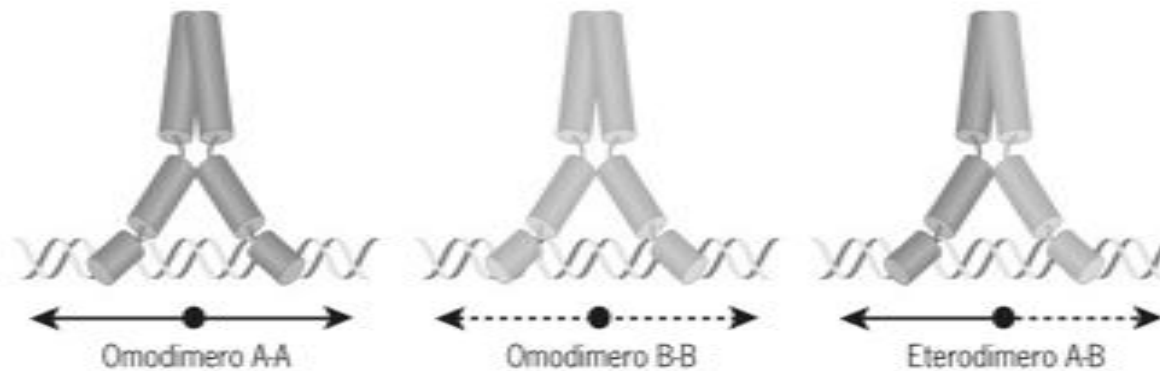
(a)



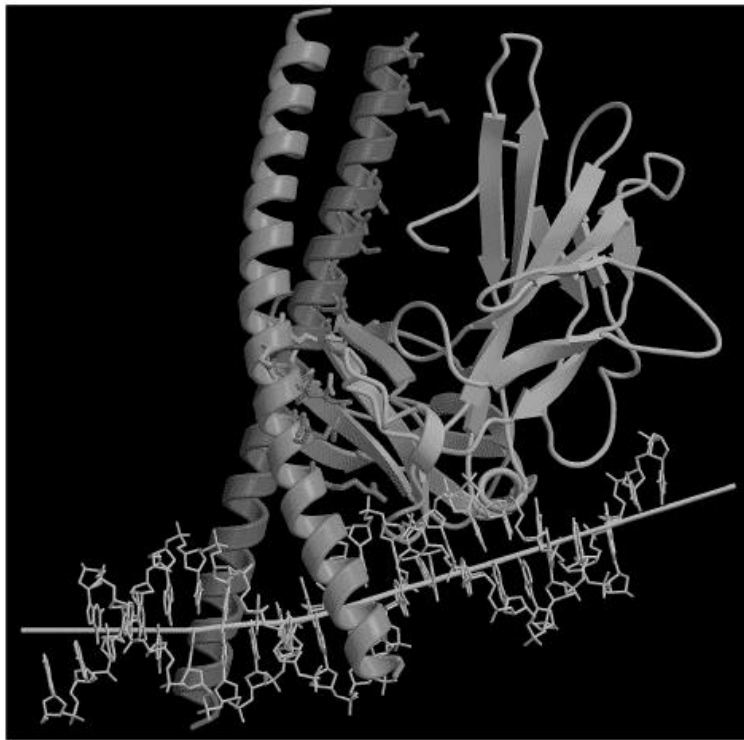
(b)

**FIGURA 12.38 Un fattore di trascrizione con un motivo "helix-loop-helix" (bHLH).** (a) MyoD, un fattore di trascrizione dimerico che avvia il differenziamento delle cellule muscolari, è una proteina bHLH che si lega al DNA mediante una regione basica. Il sito di legame del DNA, lungo 14 paia di basi, è indicato in azzurro. La regione basica di ciascun monomero di MyoD è colorata in rosso, mentre la regione helix-loop-helix di ciascun monomero è colorata in marrone. Le basi del DNA legate dal fattore di trascrizione sono indicate in giallo. (b) Disegno schematico del complesso dimerico fra MyoD e DNA, rappresentato nello stesso orientamento di a. Le  $\alpha$ -eliche sono rappresentate dai cilindri. (DA P.C. M. MA ET AL., PER GENT. CONC. DI CARL O. PABO, CELL 77:453, 1994; COPYRIGHT DI CELL PRESS).

Oltre al dominio di legame sul DNA i fattori trascrizionali possiedono:  
dominio di attivazione (interazione con altri fattori trascrizionali e/o RNA pol)  
dominio di dimerizzazione (Infatti spesso legame al DNA sotto forma di dimero)

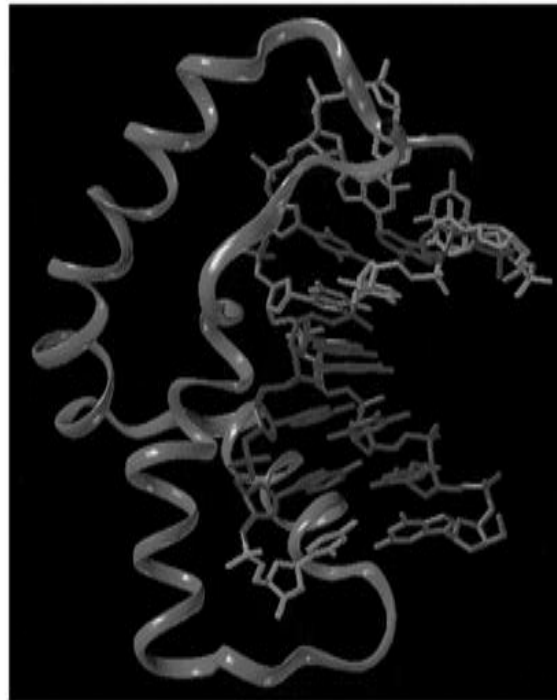


**FIGURA 12.39** La dimerizzazione dei fattori di trascrizione aumenta la specificità di legame al DNA. In questo modello di una proteina HLH, l'associazione di due subunità in varie combinazioni forma tre diversi fattori di trascrizione dimerici che riconoscono differenti siti di legame nel DNA.

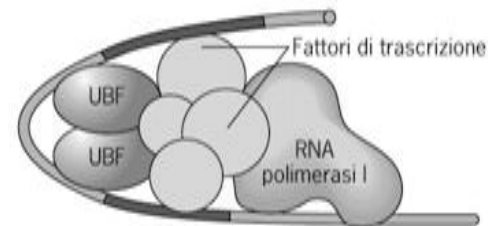


## L'interazione tra diversi fattori trascrizionali induce ripiegamento nel DNA

**FIGURA 12.35** Interazioni fra fattori di trascrizione legati a siti differenti nella regione regolatoria di un gene. Questo disegno illustra la struttura terziaria di due diversi fattori di trascrizione, NFAT-1 (in verde) e AP-1 (le cui due subunità sono colorate in rosso e in blu), legati al DNA a monte di un gene per una citochina coinvolta nella risposta immunitaria. L'interazione cooperativa fra queste due proteine altera l'espressione del gene per la citochina. Come si può osservare, la doppia elica del DNA (la cui direzione è indicata dalla linea grigia) risulta incurvata per effetto di tale interazione proteina-proteina. (DA TOM K. KERPPOLA, STRUCTURE 6:550, 1998).



(a)



(b)

**FIGURA 12.40 Le proteine HMG piegano il DNA.** (a) Un modello che illustra una porzione della proteina HMG umana SRY (in verde) legata al DNA (in blu e rosso). Il legame della proteina induce un'ampia piegatura nel DNA, che segue precisamente la superficie di legame concava dell'"HMG box". Si ha la piegatura quando la proteina contatta il solco minore del DNA e inserisce la catena laterale di un residuo di isoleucina fra una specifica coppia di basi. (b) UBF è un fattore di trascrizione dimerico che piega il DNA, rendendolo uno stampo adatto per la RNA polimerasi I. Il legame della RNA polimerasi I richiede una serie di fattori di trascrizione generali, simili a quelli richiesti per il legame della RNA polimerasi II al TATA box del promotore. (A: DA MILTON H. WERNER ET AL., PER