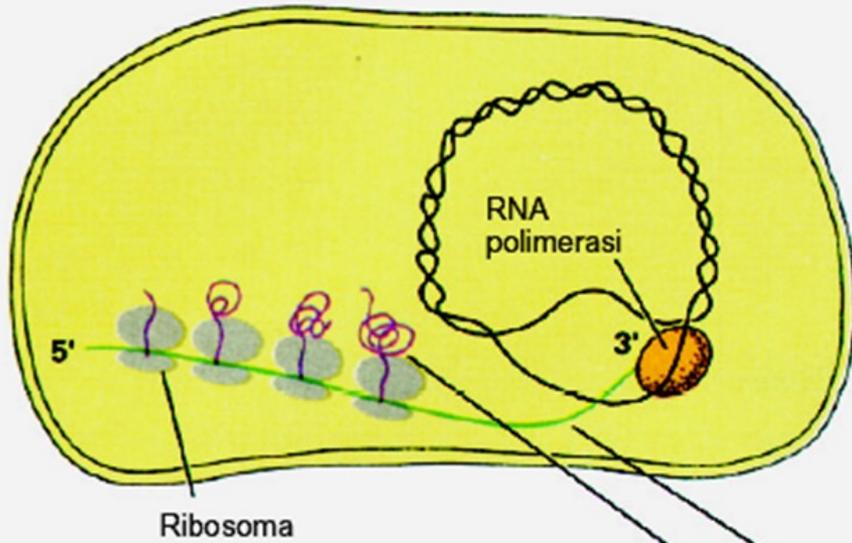


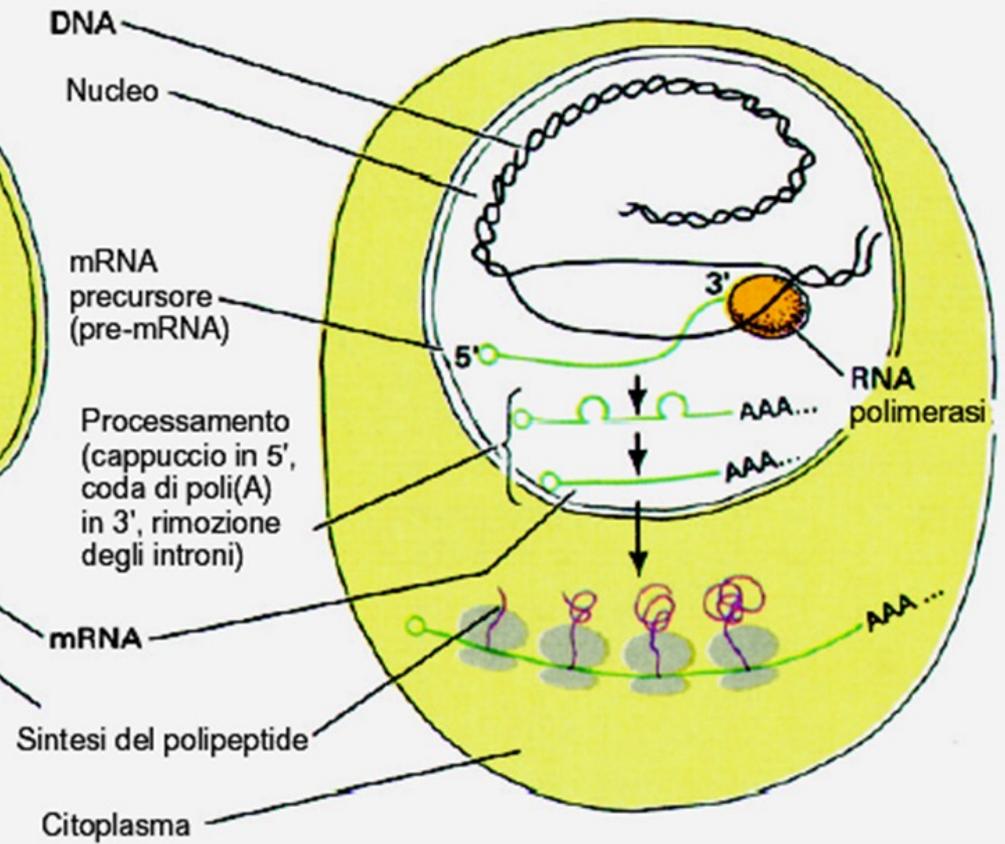
La regolazione dell'espressione genica

Espressione genica: comprende i passaggi di trascrizione e traduzione e riguarda la parte del genoma codificante per proteine ed enzimi.

a) Procariote



b) Eucariote



DNA

Nucleo

mRNA precursore (pre-mRNA)

Processamento (cappuccio in 5', coda di poli(A) in 3', rimozione degli introni)

mRNA

Sintesi del polipeptide

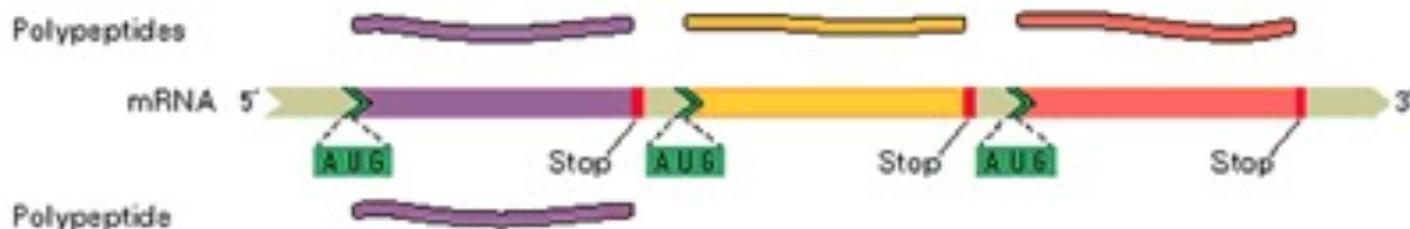
Citoplasma

RNA polimerasi

Ribosoma

I policistroni

With prokaryotic ribosomes, three polypeptides are made because the ribosomes can initiate translation within an mRNA.



With eukaryotic ribosomes, only one polypeptide is made because the ribosomes can initiate translation only at the 5' end.

La regolazione dell'espressione genica

Quali sono i meccanismi che determinano l'accensione o lo spegnimento dell'espressione di un gene?



In un organismo pluricellulare tutte le cellule hanno lo stesso genoma ma esprimono geni diversi (hanno diverso trascrittoma, proteoma e metaboloma); i meccanismi molecolari che controllano l'espressione dei geni sono detti meccanismi di regolazione genica.

La regolazione dell'espressione genica

- **Nei procarioti:**
 - un'espressione genica selettiva permette alle cellule di risparmiare energia
 - La regolazione avviene prevalentemente a **livello trascrizionale**
- **Negli eucarioti:**
 - l'espressione genica selettiva permette alle cellule di svolgere ruoli specializzati
 - La regolazione avviene a vari livelli

Regolazione genica nei procarioti

- **Geni costitutivi:** sono costantemente attivi (es. geni che codificano per gli enzimi della glicolisi)
- **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)

I batteri utilizzano strategie diverse per regolare la sintesi degli enzimi

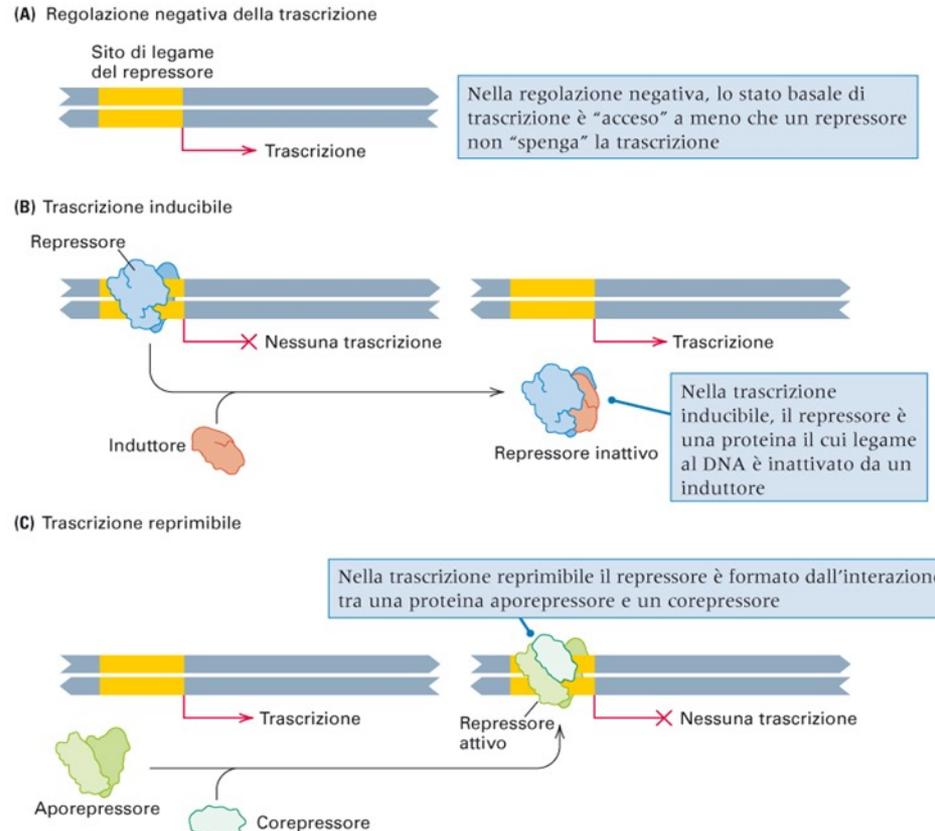


FIGURA 11.1 La regolazione negativa (A) comprende meccanismi di controllo della trascrizione inducibili (B) e reprimibili (C).

Regolazione positiva

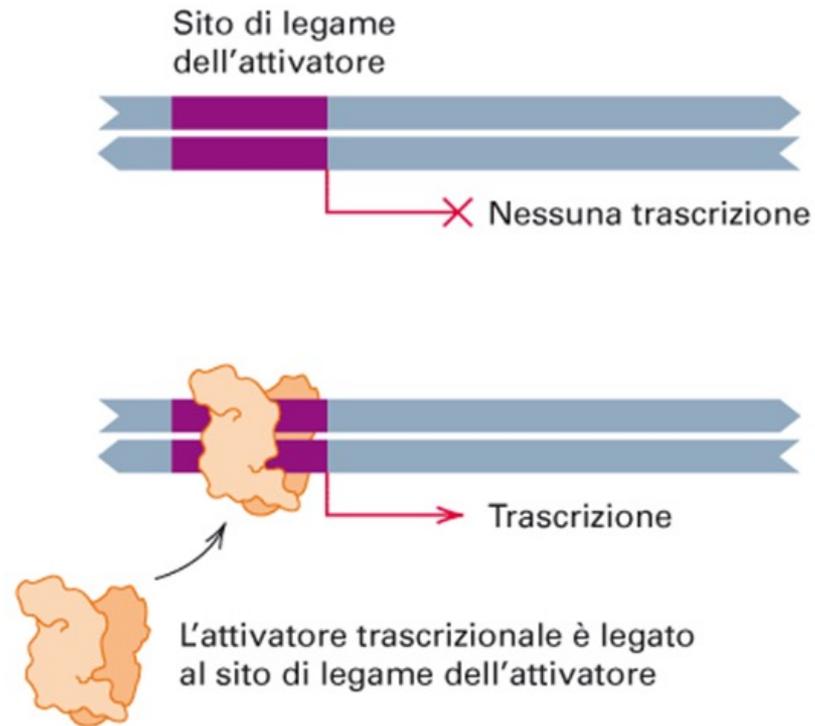


FIGURA 11.2 Nella regolazione positiva lo stato basale di trascrizione è "spento". La trascrizione è stimolata dal legame di una proteina attivatrice trascrizionale.

Operone del lattosio

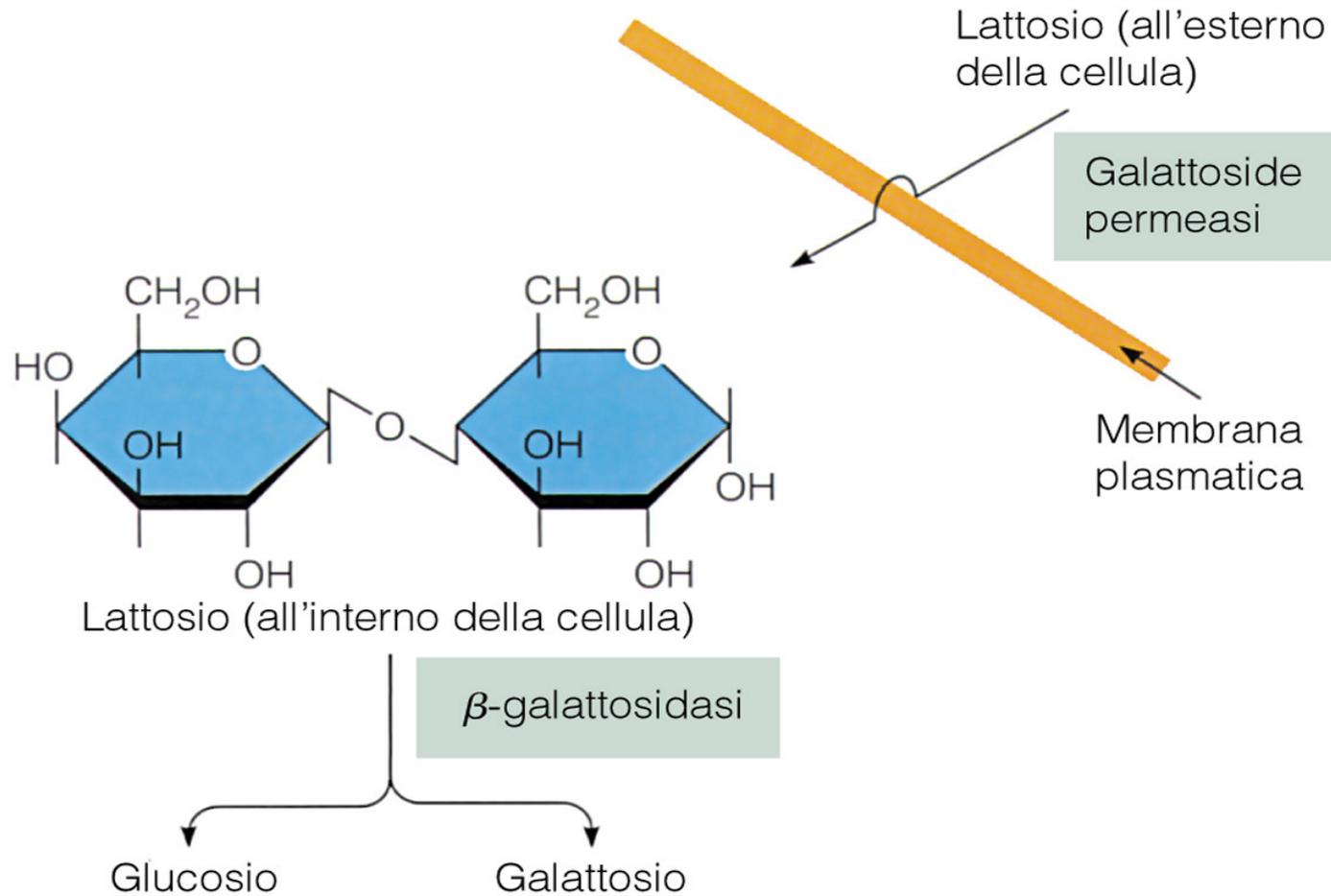


Figura 21-1

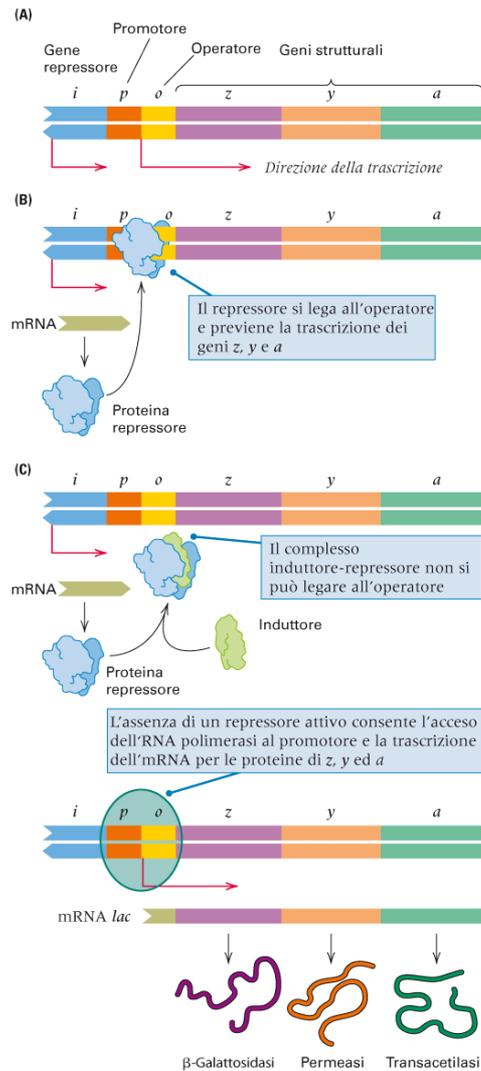


FIGURA 11.4 (A) Una mappa dell'operone *lac*, non disegnata in scala. I siti *p* e *o* sono in realtà molto più piccoli delle altre regioni e insieme comprendono solo 83 coppie di basi. (B) L'operone *lac* nello stato represso. (C) L'operone *lac* nello stato indotto. L'induttore modifica la forma del repressore in modo che il repressore non possa più legarsi all'operatore. Sono usate le abbreviazioni comuni *i*, *p*, *o*, *z*, *y* ed *a* al posto di *lacI*, *lacO* ed *a* ecc. Il gene *lacA* non è essenziale per l'utilizzazione del lattosio.

Regolazione dell'operone lac

F. Jacob e J. Monod

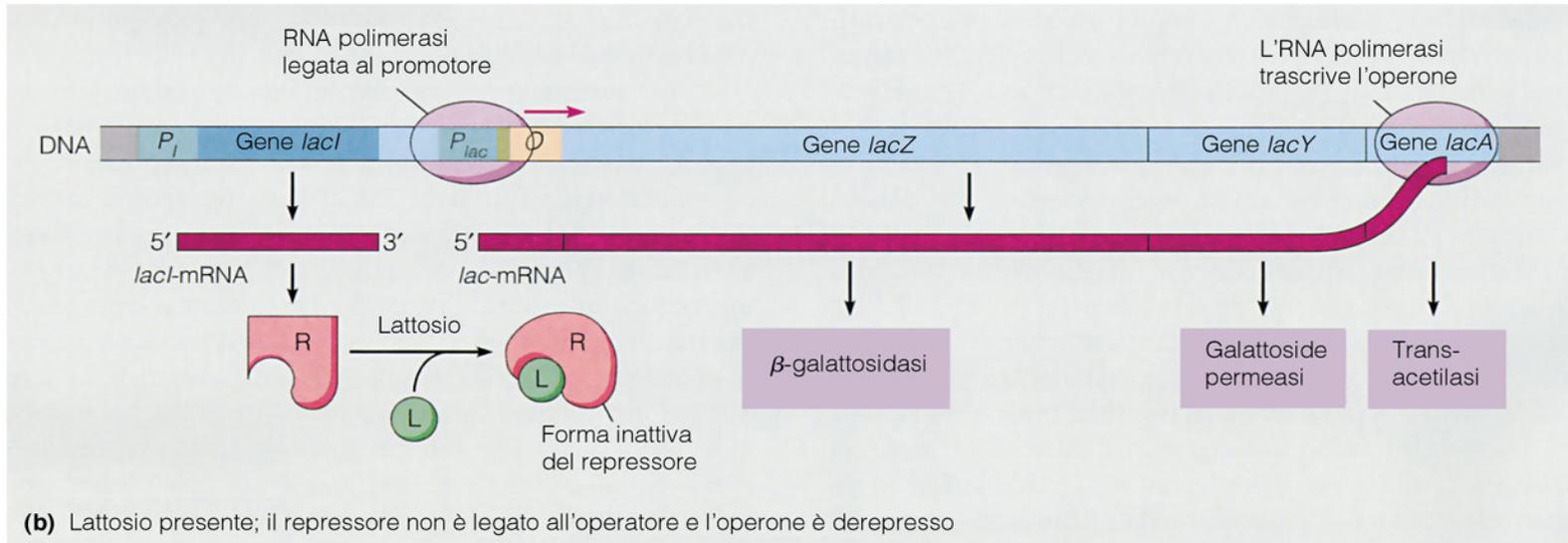
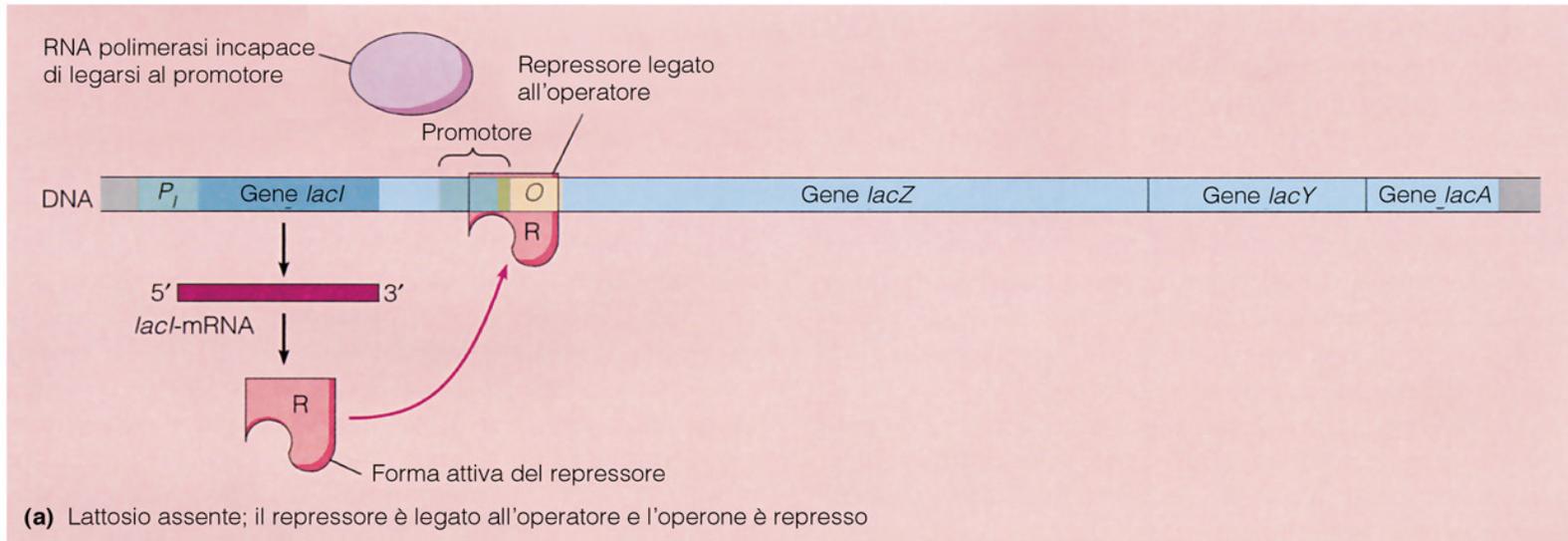
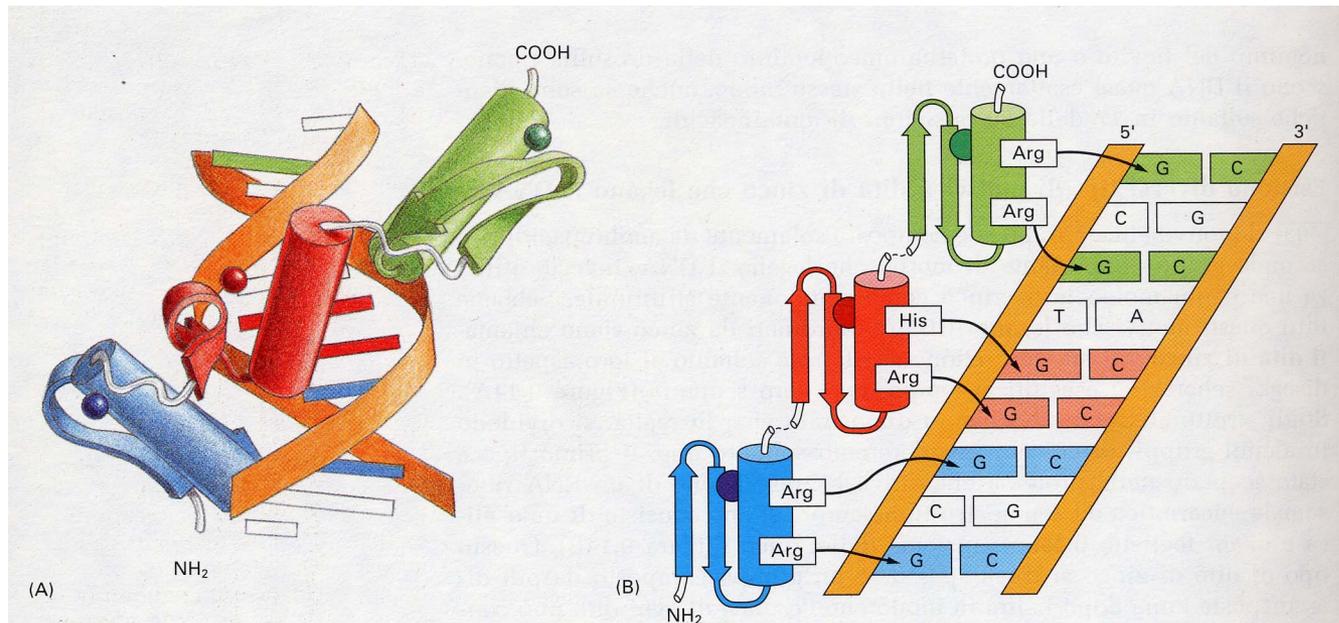
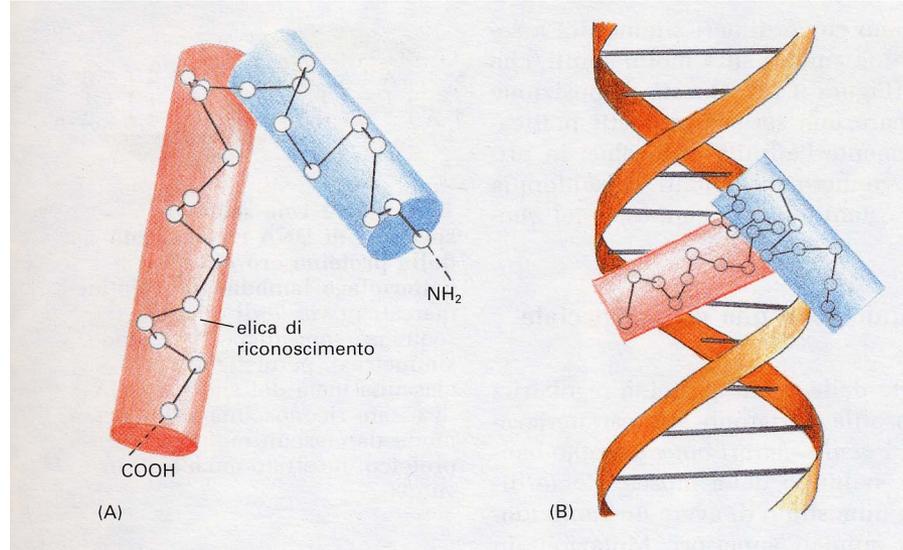


Figura 21-4

I repressori e gli attivatori sono molecole proteiche che legano il DNA



Differenze della regolazione genica fra procarioti ed eucarioti

- Dimensione e complessità del genoma
- Compartimentazione del genoma
- Organizzazione strutturale del genoma
- Stabilità dell'mRNA
- Modificazione post-traduzionale delle proteine
- Turnover delle proteine

Livelli multipli di regolazione dell'espressione genica degli eucarioti

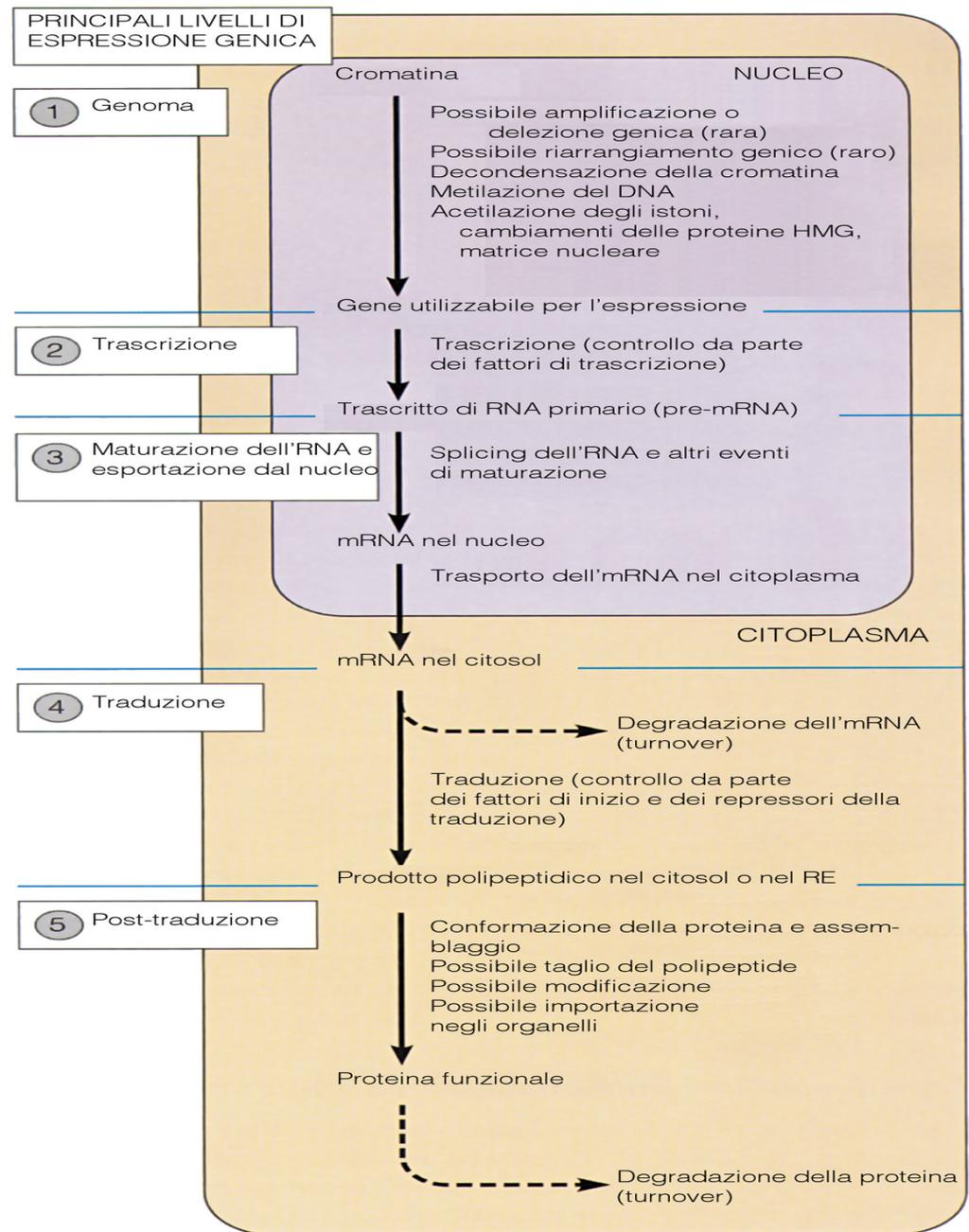
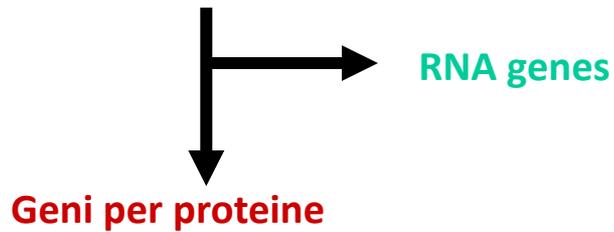


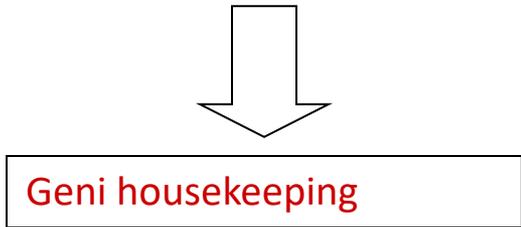
Figura 21-11

- **Regolazione trascrizionale**
- **Regolazione post-trascrizionale**
- **Meccanismi epigenetici e controllo dell'espressione genica a lunga distanza**

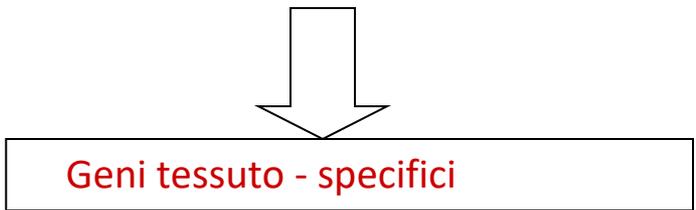
Cellula vegetale contiene circa 30000 geni



Ogni cellula in un determinato momento esprime solo una piccola parte di questo potenziale (~ 5000 geni)

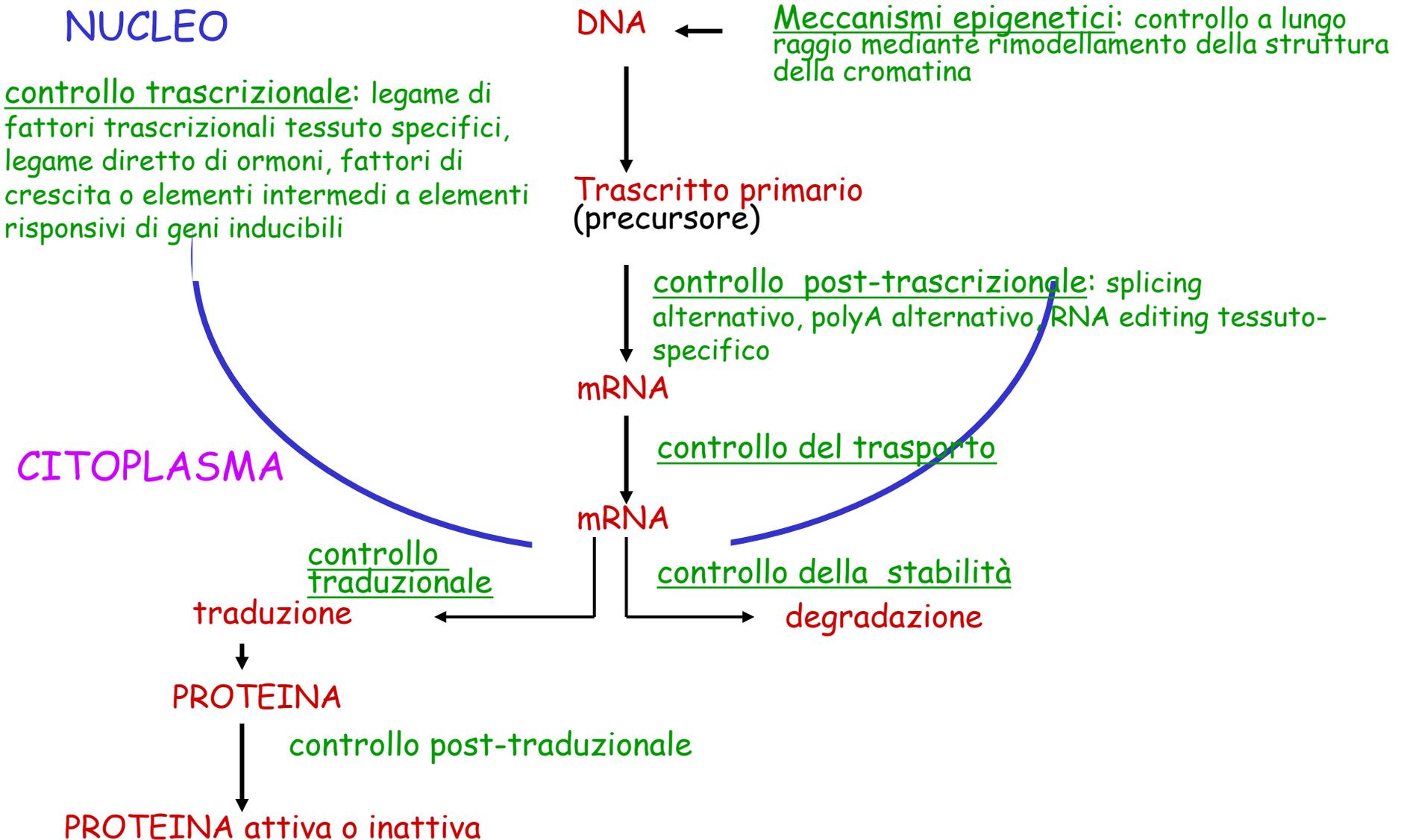


metabolismo
biosintesi
membrana
istoni
ribosomali



**DIFFERENZIAMENTO
CELLULARE**

Esistono molteplici livelli di regolazione dell'espressione genica negli eucarioti



CROMATINA

• **EUCROMATINA** -> TRASCRIZIONE POTENZIALE

a) geni housekeeping

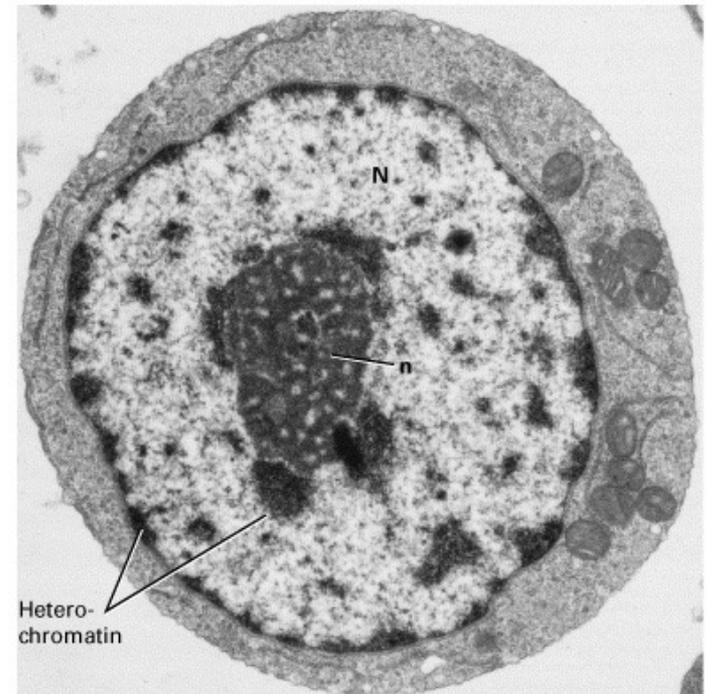
b) geni tessuto-specifici

• **ETEROCROMATINA FACOLTATIVA** -> inattiva quando condensata.

• **ETEROCROMATINA COSTITUTIVA** ->

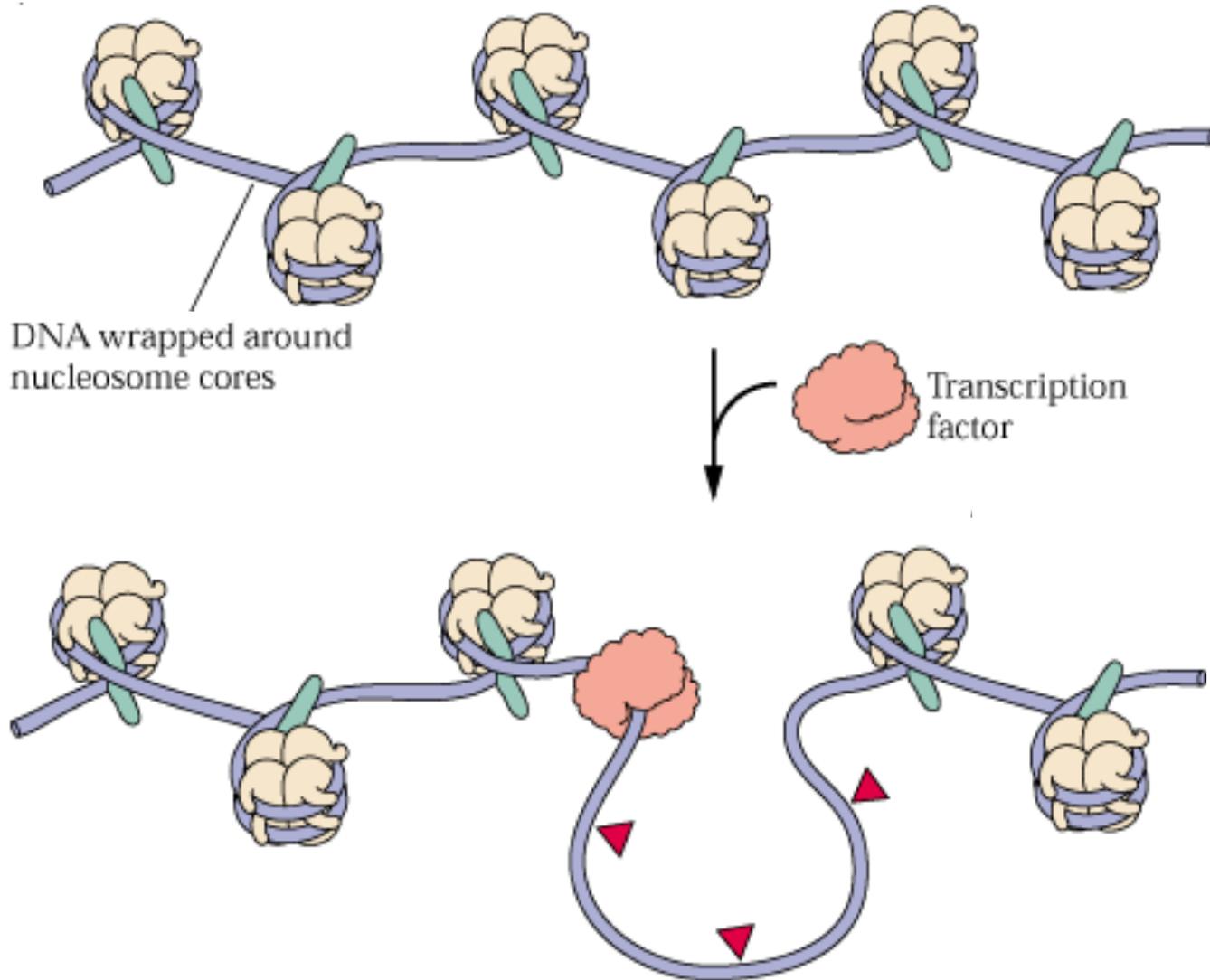
sempre inattiva; Localizzata nelle regioni

peri - e centromeriche

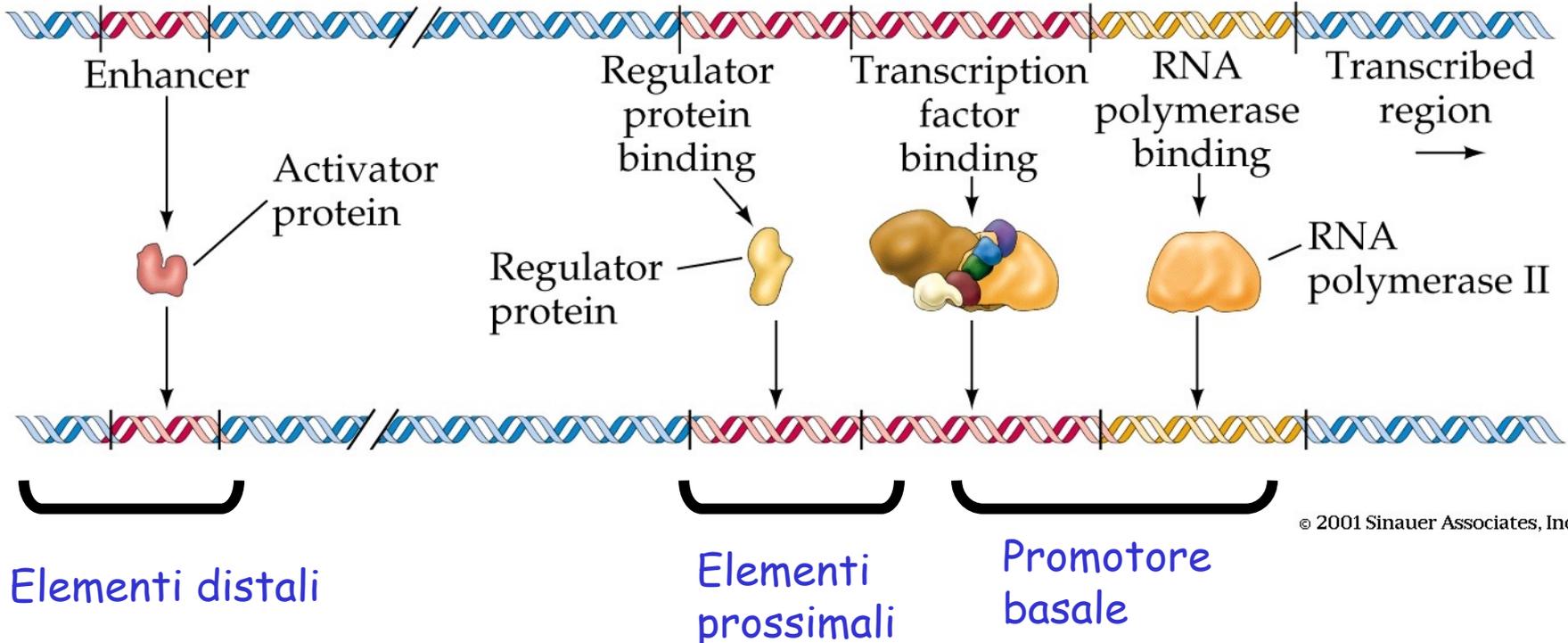


1 μm

Chromatin structure and gene transcription



- Una serie di fattori trascrizionali deve legarsi al promotore prima che possa farlo la RNA polimerasi. Quindi se la RNA polimerasi potrà iniziare la trascrizione dipenderà anche dal legame di proteine regolatorie, attivatori e repressori.



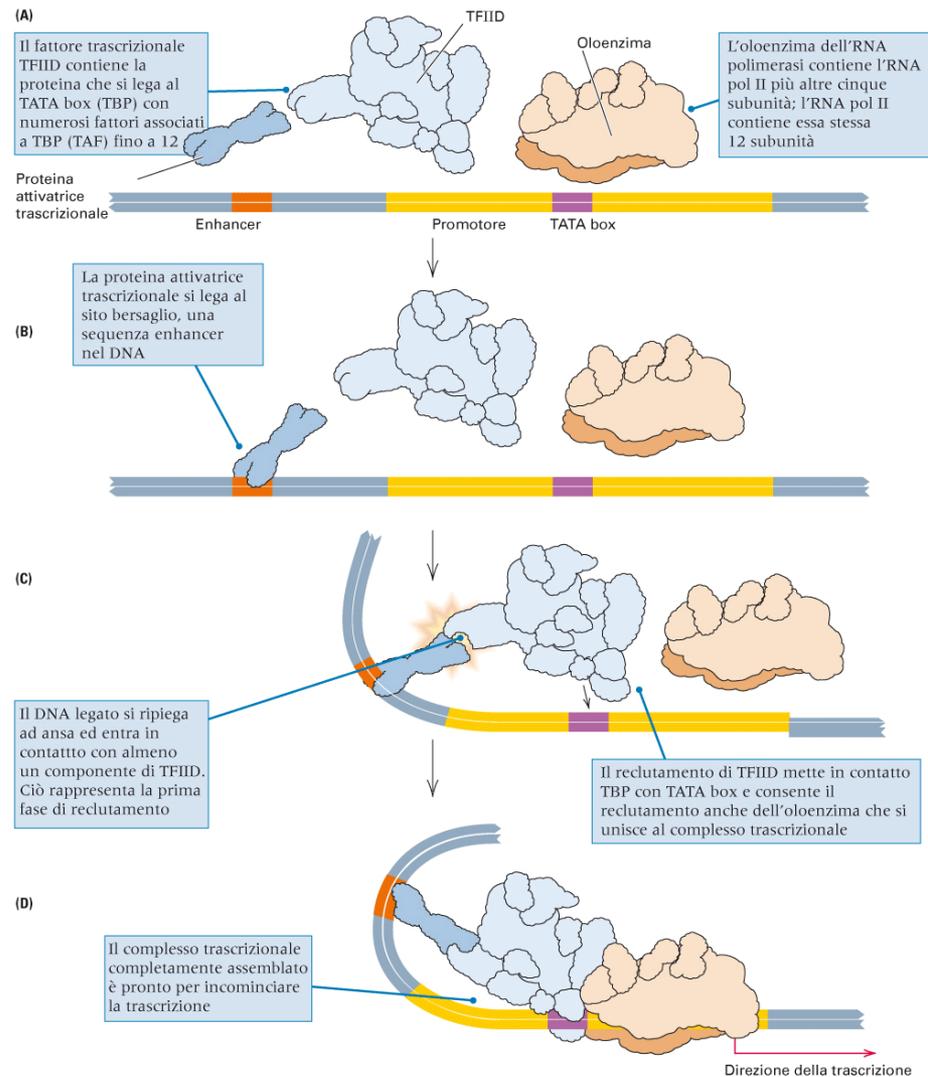
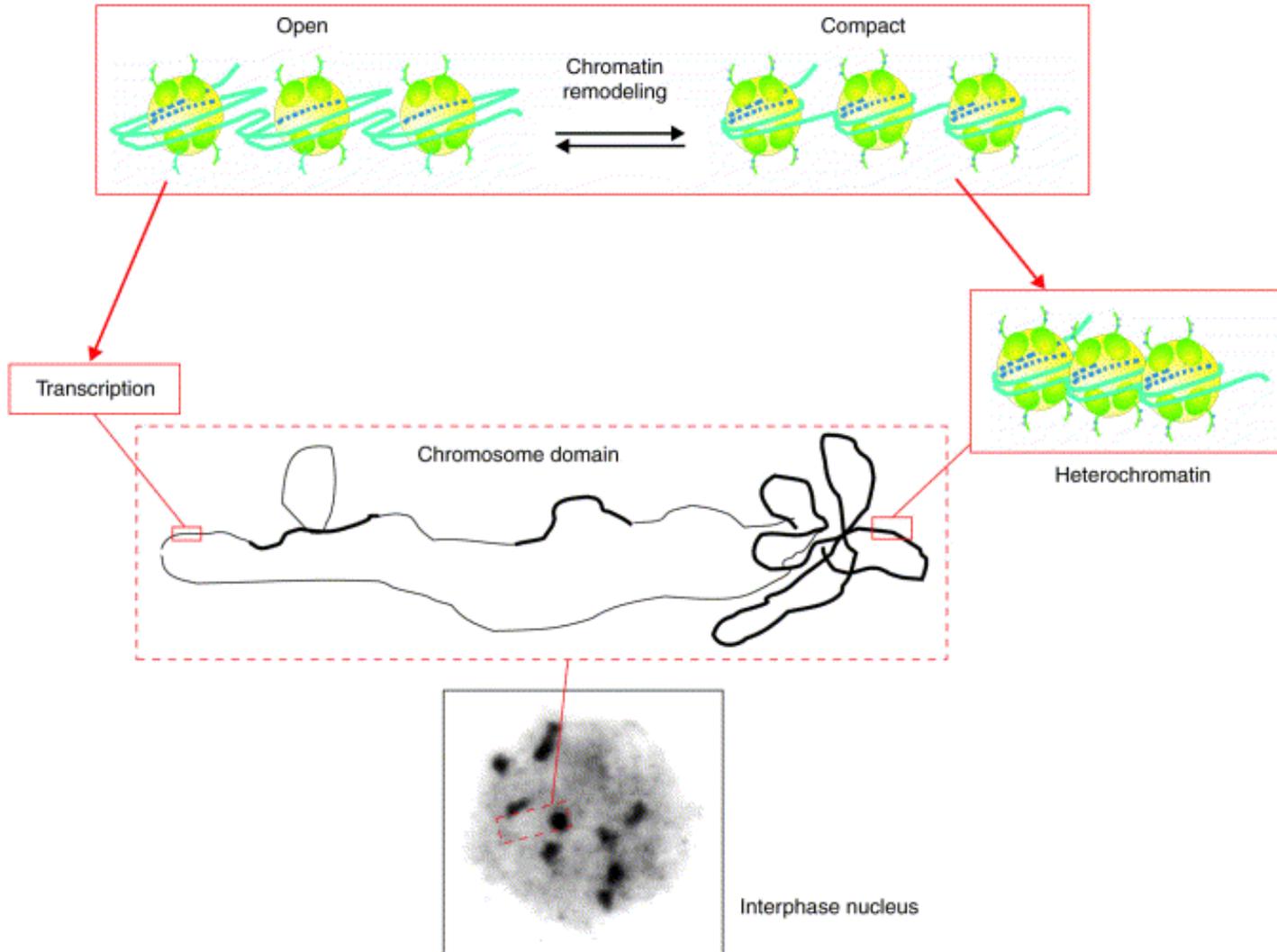


FIGURA 11.25 L'attivazione trascrizionale mediante reclutamento. (A) La relazione tra l'enhancer e il promotore e i fattori proteici che vi si legano. (B) Il legame della proteina attivatrice trascrizionale con l'enhancer. (C) La proteina attivatrice trascrizionale legata stabilisce un contatto fisico con una subunità del complesso TFIIID, che contiene la proteina che si lega al TATA box, e attrae ("recluta") il complesso sulla regione del promotore. (D) L'oloenzima dell'RNA Pol II, e ogni altro fattore trascrizionale rimanente, sono reclutati da TFIIID e il complesso trascrizionale è completamente assemblato e pronto per la trascrizione. Nella cellula non tutta l'RNA Pol II è presente come oloenzima e non tutta TBP è complessata in TFIIID. In questa figura non sono mostrati i fattori trascrizionali che sono associati a TFIIID e all'oloenzima.

Rimodellamento della Cromatina



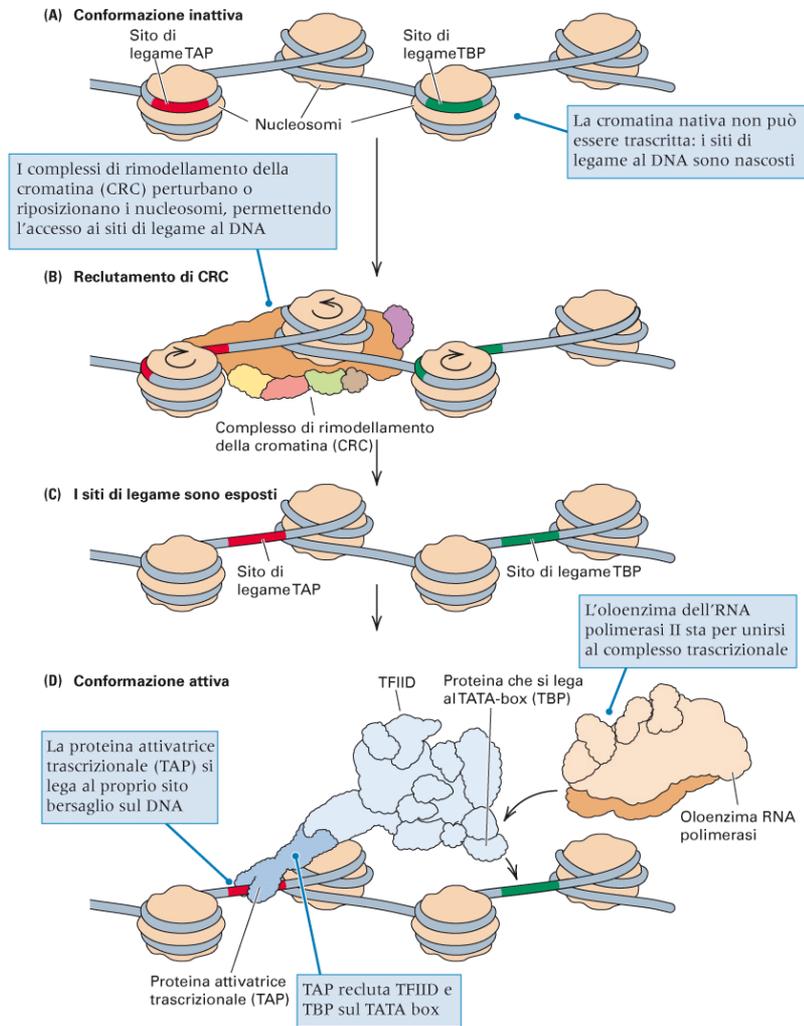
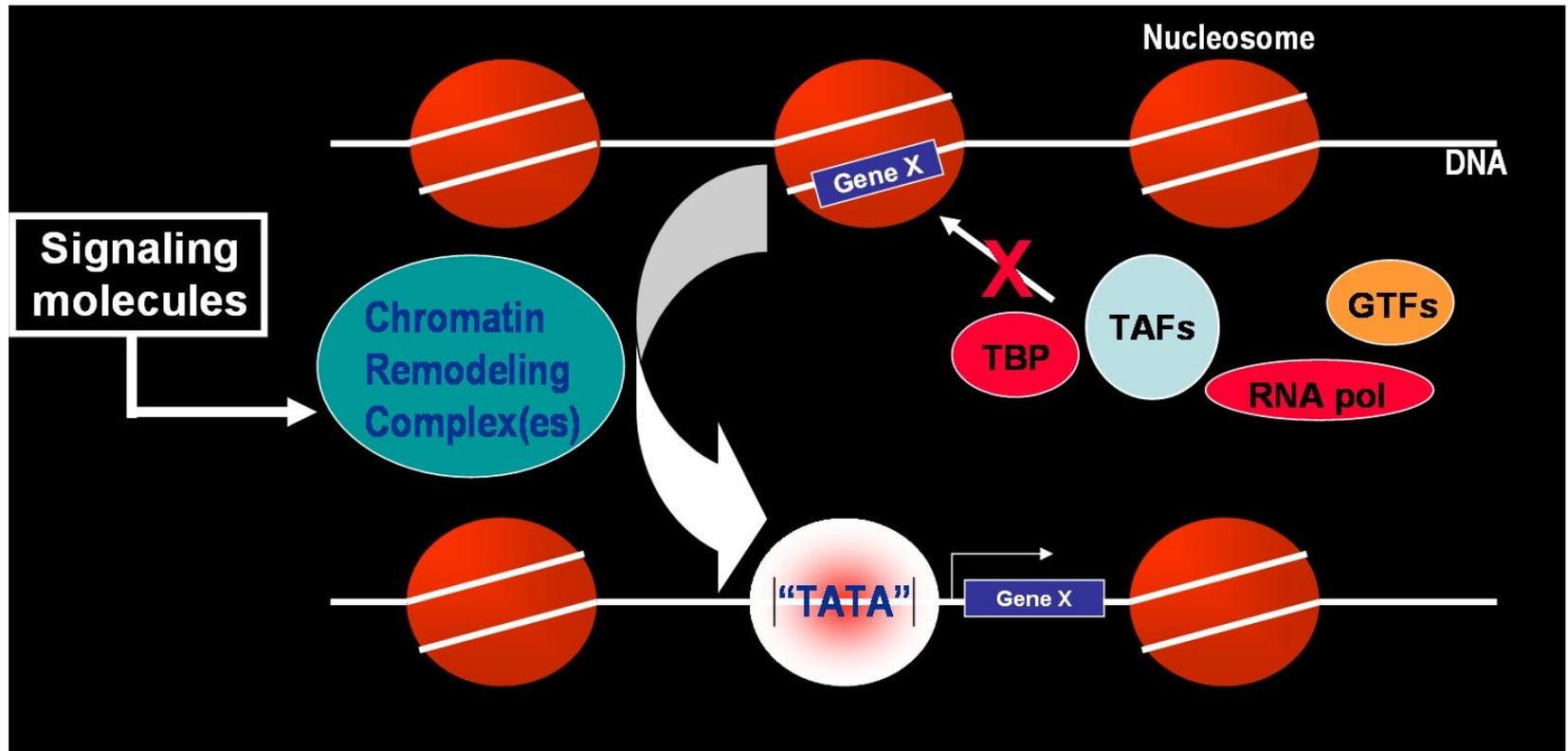


FIGURA 11.27 La funzione dei complessi di rimodellamento della cromatina. (A) La cromatina nativa può nascondere i siti di legame al DNA. (B) Il complesso di rimodellamento della cromatina o riposiziona i nucleosomi lungo il DNA oppure modifica chimicamente gli istoni. (C) I siti di legame del DNA diventano accessibili. (D) Il complesso trascrizionale è reclutato sul sito.

Rimodellamento della cromatina



I meccanismi epigenetici agiscono mediante:

Marchi epigenetici che non sono direttamente attribuibili alla sequenza del DNA.

Metilazione del DNA:

Nelle cellule eucariotiche la citosina può essere metilata: negli animali sono metilate le C in sequenze CG, nelle piante la metilazione delle C può avvenire in qualsiasi contesto

Modificazioni degli istoni:

Acetilazioni, fosforilazioni, metilazioni e altre modifiche covalenti sono responsabili di cambiamenti conformazionali della cromatina.

Varianti istoniche:

Istoni non canonici assemblati nel nucleosoma

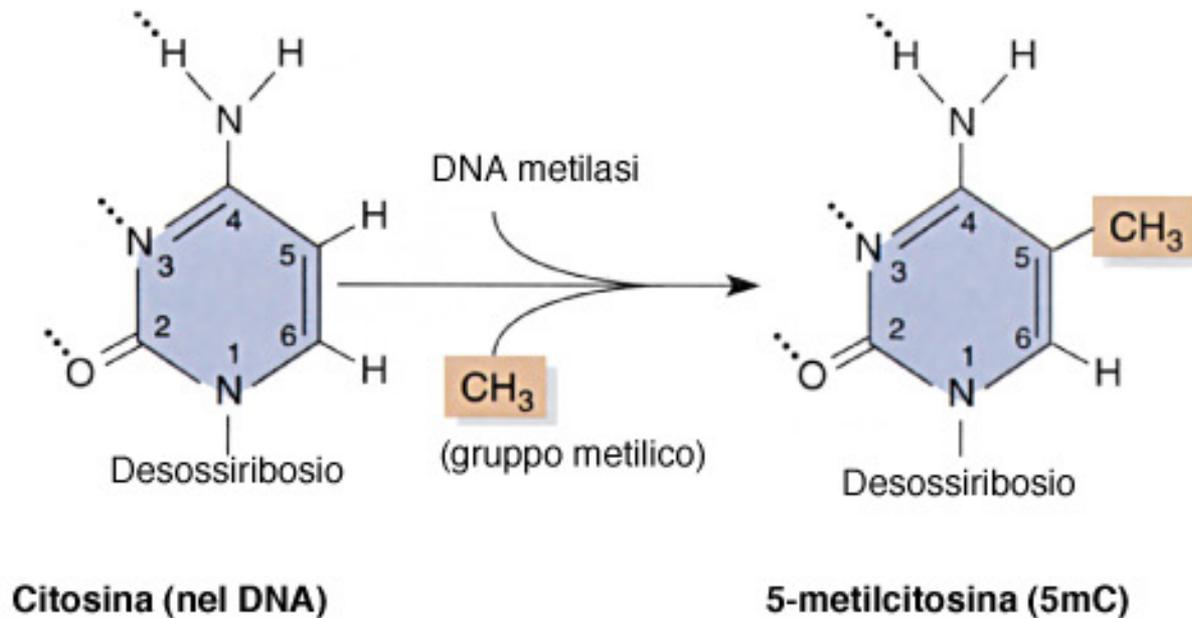
I marchi epigenetici possono essere:

- 1. TRANSIENTI:** agiscono limitatamente in risposta ad uno stimolo, regolano temporaneamente la trascrizione e poi rimosso lo stimolo si inattivano a loro volta.
- 2. EREDITATI ALLA MITOSI:** generalmente la loro azione persiste anche quando lo stimolo che li ha attivati è assente e le cellule figlie ereditano i marchi epigenetici dalla cellula madre alla mitosi.
- 3. EREDITATI ALLA MEIOSI:** il marchio epigenetico attivato da uno stimolo è persistente e trasmesso alla progenie attraverso i gameti.

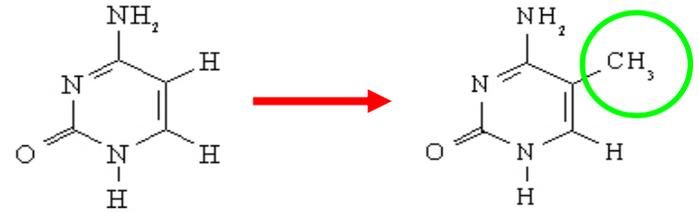
Marchi epigenetici: Metilazione del DNA

Figura 17.5

Produzione di 5-metilcitosina nel DNA per azione dell'enzima DNA metilasi.



Metilazione del DNA

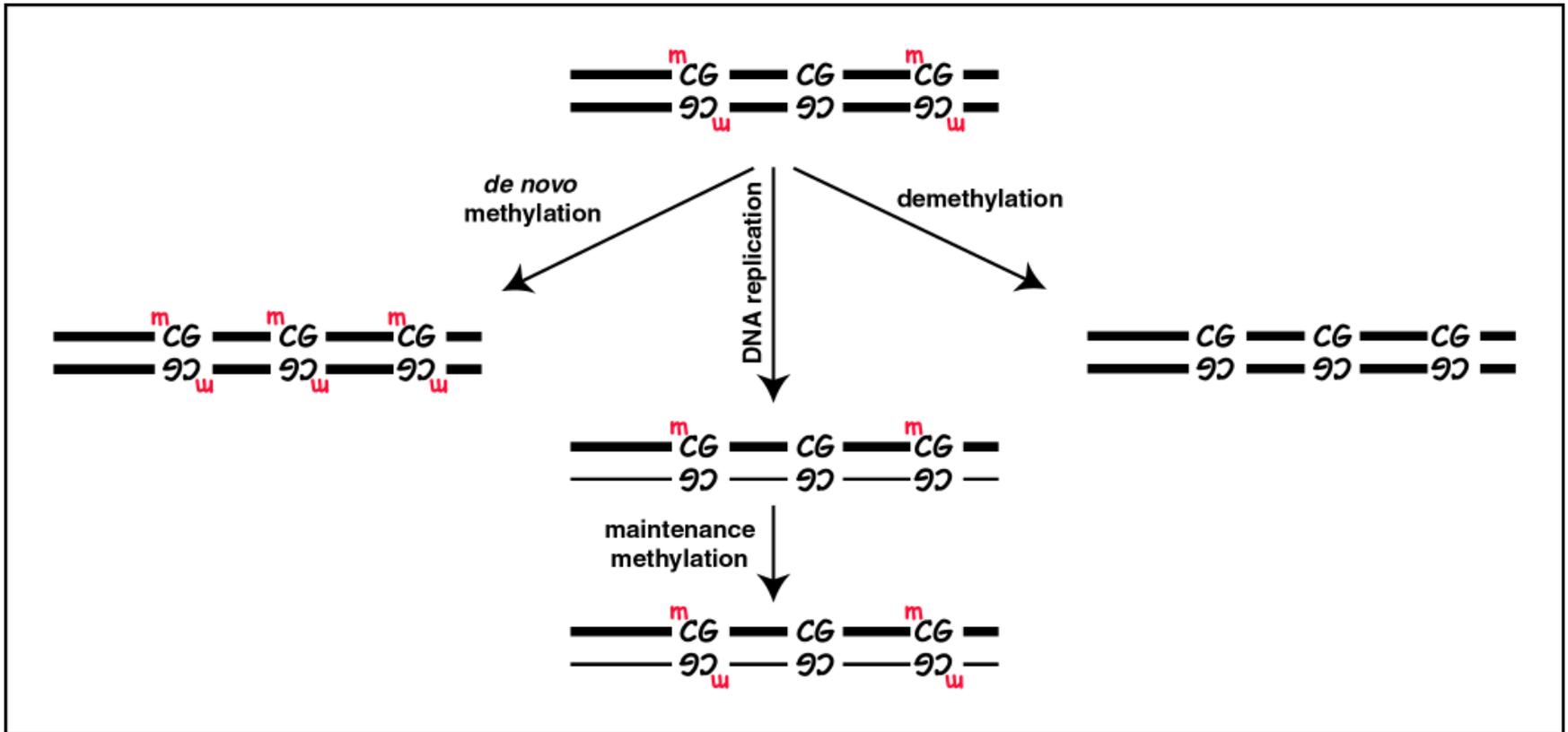


- Nelle piante, la metilazione del DNA è garantita dalle DNA metil transferasi che metilano le citosine (CG, CHG e le sequenze asimmetriche CHH, dove H rappresenta una A, T, or C)
- Sono di preferenza metilate le sequenze ripetute e i trasposoni.
- La metilazione del DNA nei promotori e al 5' dei geni è generalmente associata alla inibizione della trascrizione e al silenziamento genico.

*Difesa del genoma
(dal DNA mobile)*

*Silenziamento genico
(imprinting)*

Metilazione del DNA



Metilazione del DNA nelle piante

MET1 (METHYLTRANSFERASE1)

- 5'-CG-3'
- Silenziamento dei trasposoni, elementi ripetuti

CMT (CHROMOMETHYLASE) CMT2 and CMT3

- 5'-CHG-3' (H= A, C or T)

Interagisce con i marchi istonici

DRM1, DRM2 (DOMAINS REARRANGED 1/ 2)

- 5'-CHH-3' sites
- Sequenze ripetute
- Collegata al pathway siRNAs

La Metilazione del DNA

- ❖ Le piante sono gli organismi con il genoma maggiormente metilato (circa 30%).
- ❖ Una caratteristica peculiare delle piante è quella di possedere significativi livelli di metilazione ai siti **CpNpG** più comunemente ai siti CpA/TpG.
- ❖ Normalmente la metilazione è simmetrica e riguarda entrambe le emi-eliche; tuttavia si osserva anche metilazione asimmetrica operata da enzimi in grado di metilare “de novo”, spesso associata ad eventi di silenziamento genico.

Quando sono stabiliti i patterns di metilazione?

- ✓ Nei mammiferi i patterns di metilazione sono ereditati attraverso la meiosi **ma durante le prime fasi dell'embriogenesi si ha una quasi completa de-metilazione del DNA**, successivamente i patterns vengono ristabiliti quando l'embrione si impianta nell'ovario.
- ✓ Nelle piante esistono pochi dati relativi alla variazione di metilazione: è stato osservato che durante lo sviluppo del polline si ha riduzione di un 1/5 dei normali livelli di metilazione, ma non si hanno evidenze di eventi di de-metilazione massiccia.

Metilazione del DNA e blocco della trascrizione (promotori e 5' del gene)

- Mediante metilazione vengono modificate le sequenze bersaglio dei fattori di trascrizione.
- La struttura della cromatina viene alterata in corrispondenza del DNA metilato, il quale risulta trascrizionalmente inattivo.
- La metilazione nel corpo del gene non ostacola la trascrizione.

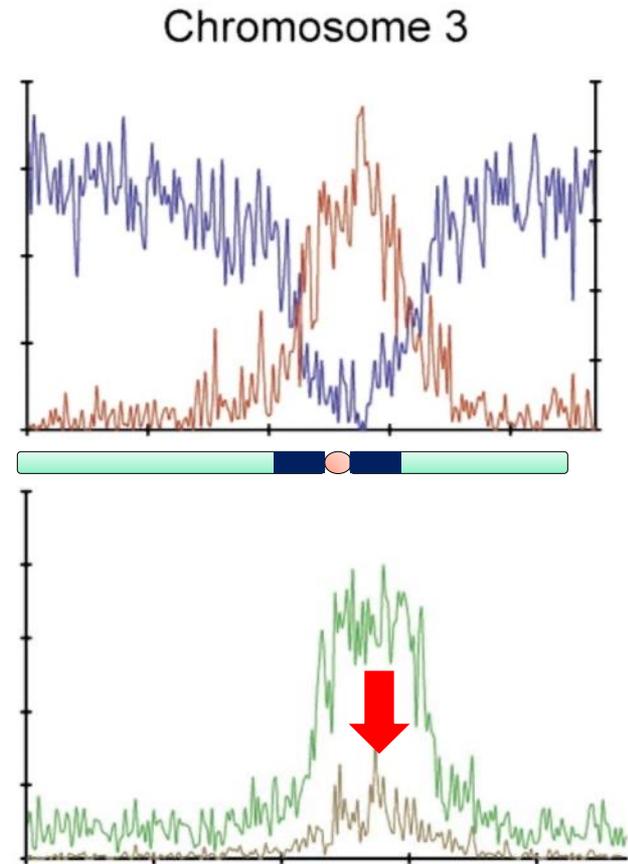
DNA methylation is necessary to silence transposons

Loss-of-function *met1* or *ddm1* (decrease in DNA methylation1) mutants have hypomethylated DNA

BLUE = Gene density
RED = Repetitive element density

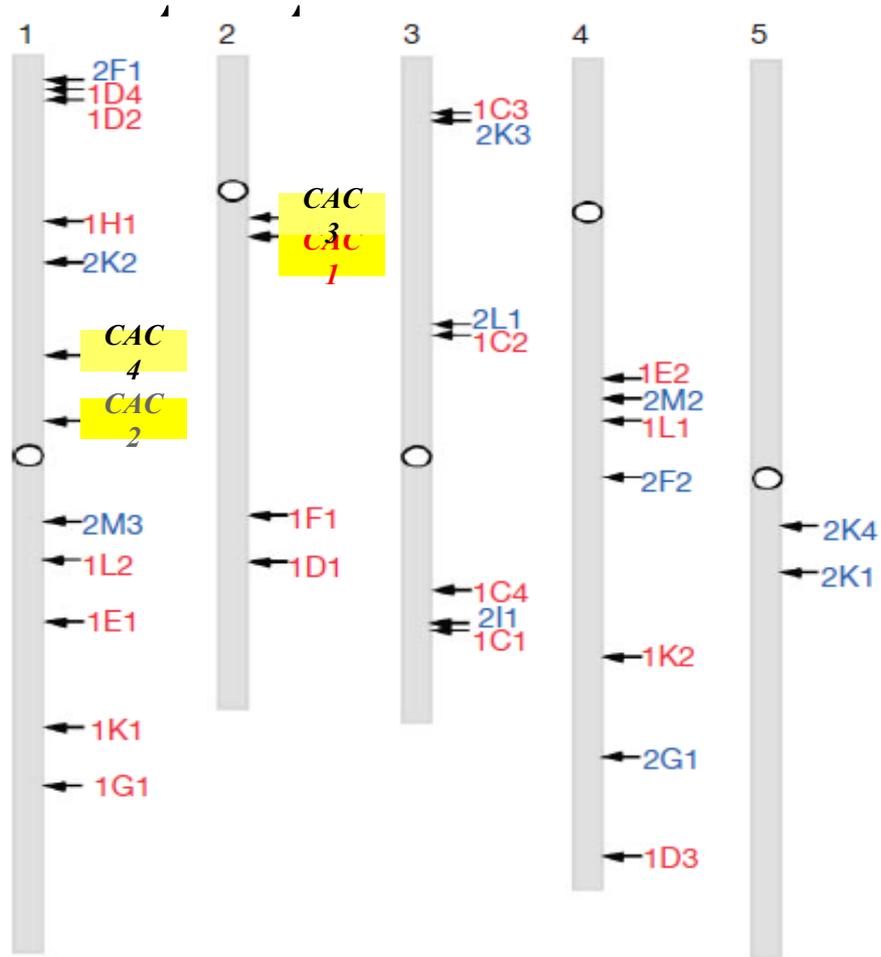
GREEN = Methylated DNA

BROWN = Methylated DNA in a *met1* mutant



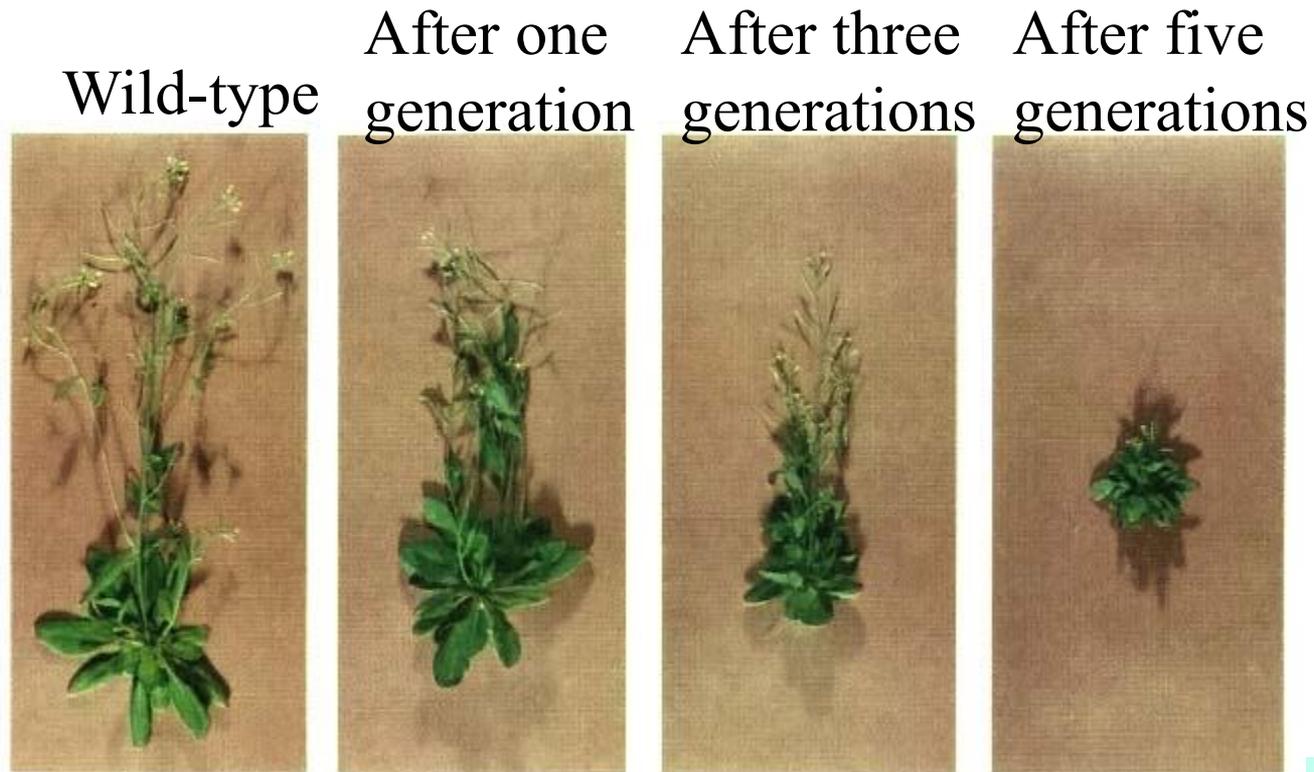
Transposons are activated in *ddm*

Six generations after DNA methylation was reduced by *DDM* inactivation, newly inserted transposons were distributed throughout the genome.



Yellow is site of original insertion, blue and red are new sites of insertion.

Activated transposons in *ddm* mutants induce mutations



After *DDM* inactivation, plants become more and more abnormal as they accumulate transposon-induced mutations.



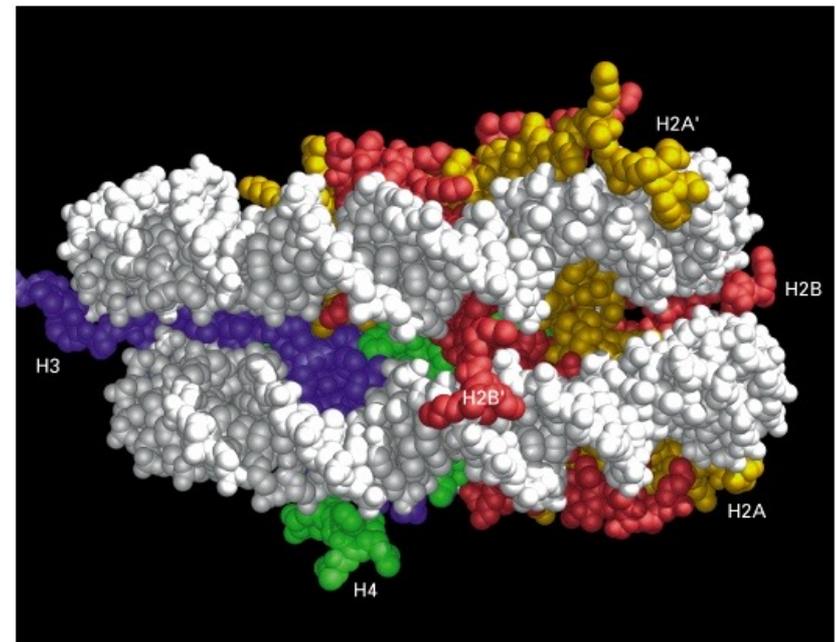
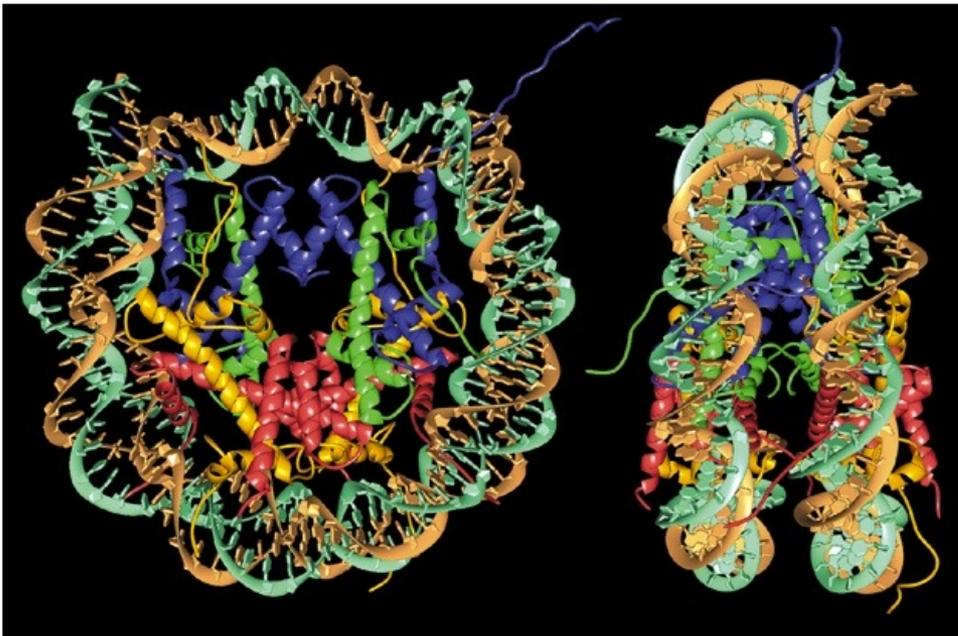
Epigenetic silencing of transposons by DNA methylation is necessary to maintain genomic integrity.

Kakutani, T., Jeddeloh, J.A., Flowers, S.K., Munakata, K., and Richards, E.J. (1996) Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. PNAS 93: [12406-12411](#). Copyright (1996) National Academy of Sciences, U.S.A.

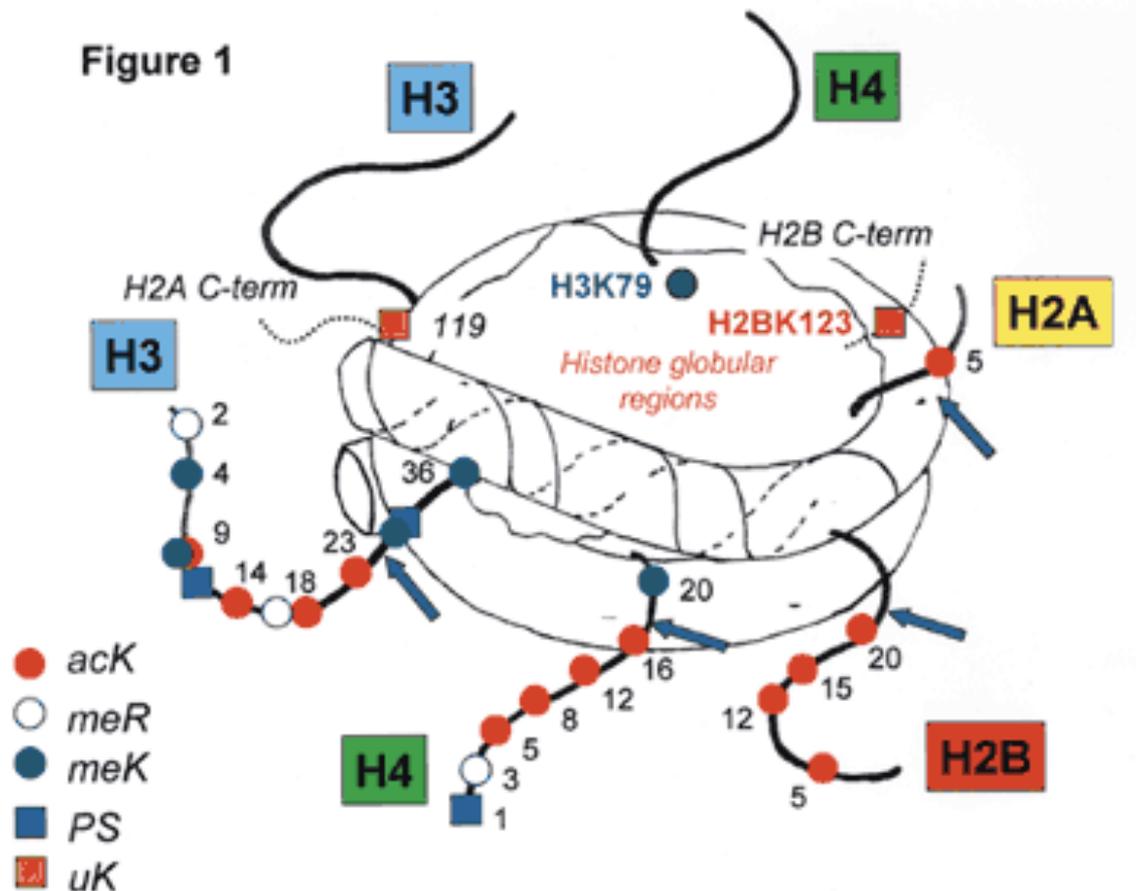
Meccanismi epigenetici: Modificazioni degli Istoni

I residui amminoacidici all'N-terminale di ciascun istone (20-60 residui) si estendono al di fuori della superficie del nucleosoma.

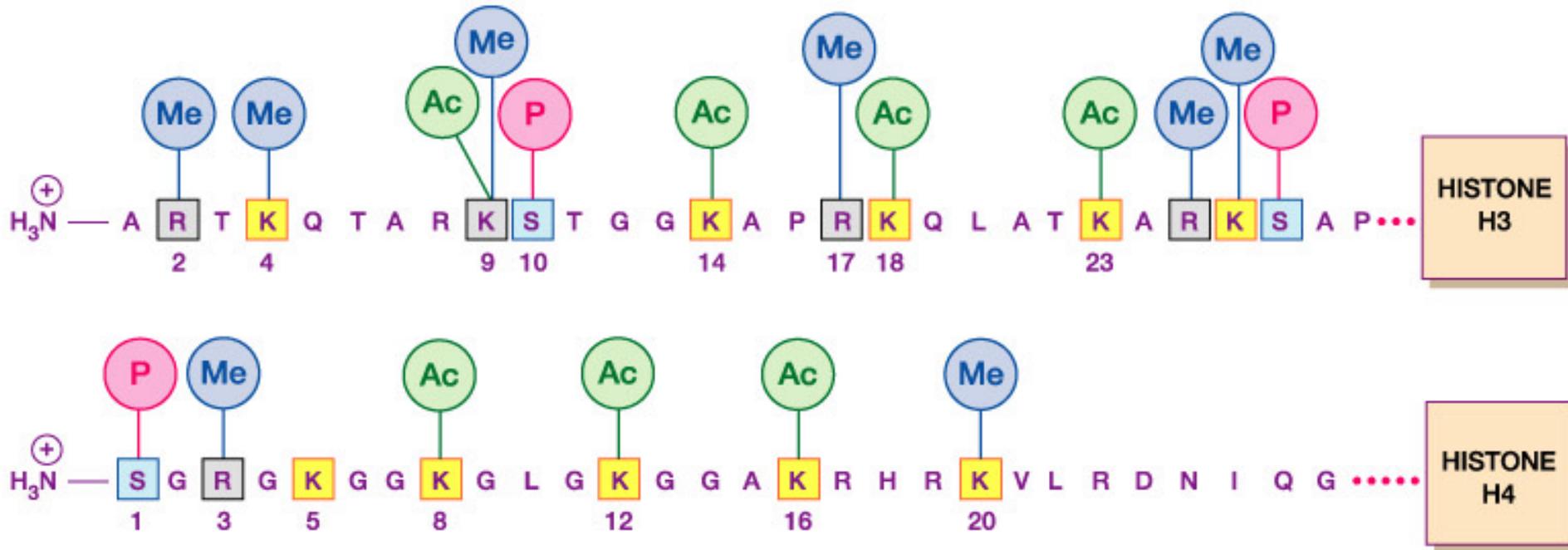
Queste regioni sono particolarmente ricche in lisina (K) che può essere reversibilmente modificata mediante acetilazione, fosforilazione e metilazione e altre modifiche.



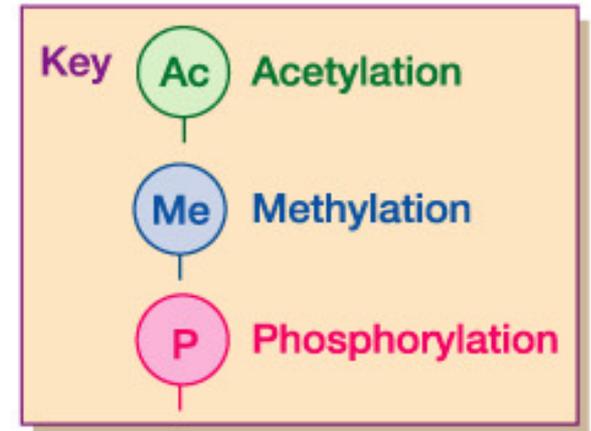
Modifiche post-trascrizionali degli istoni



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.



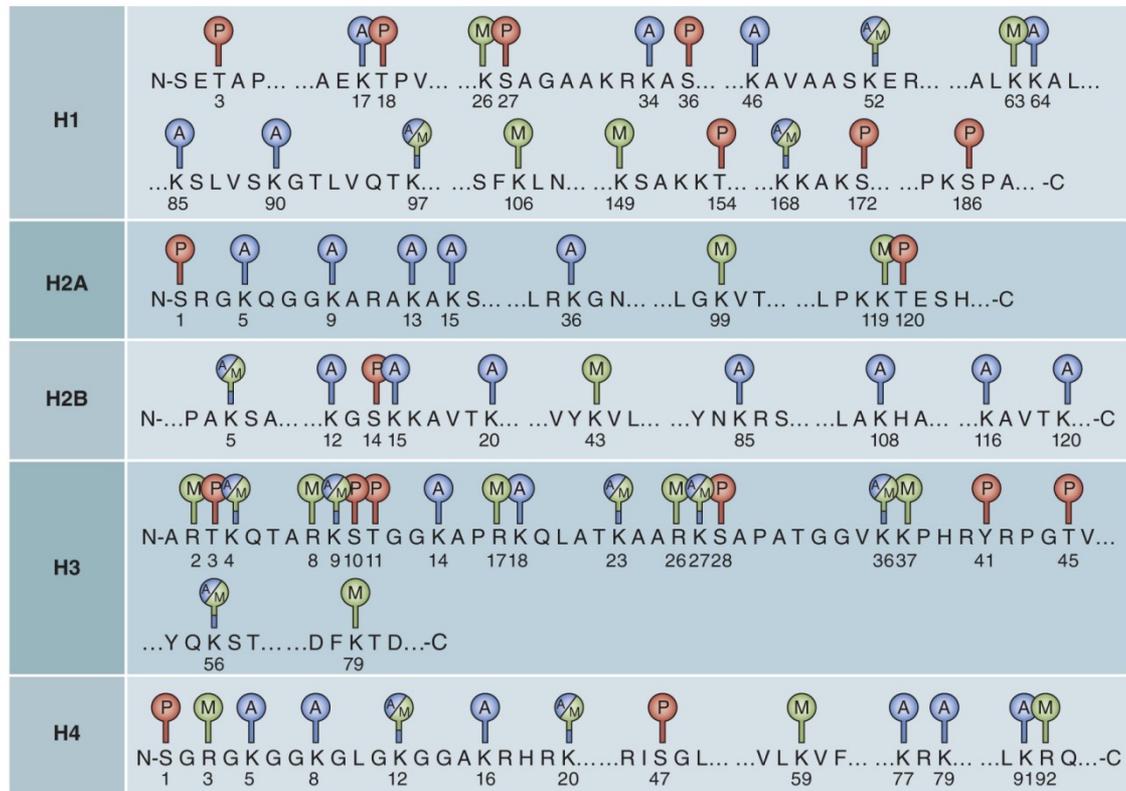
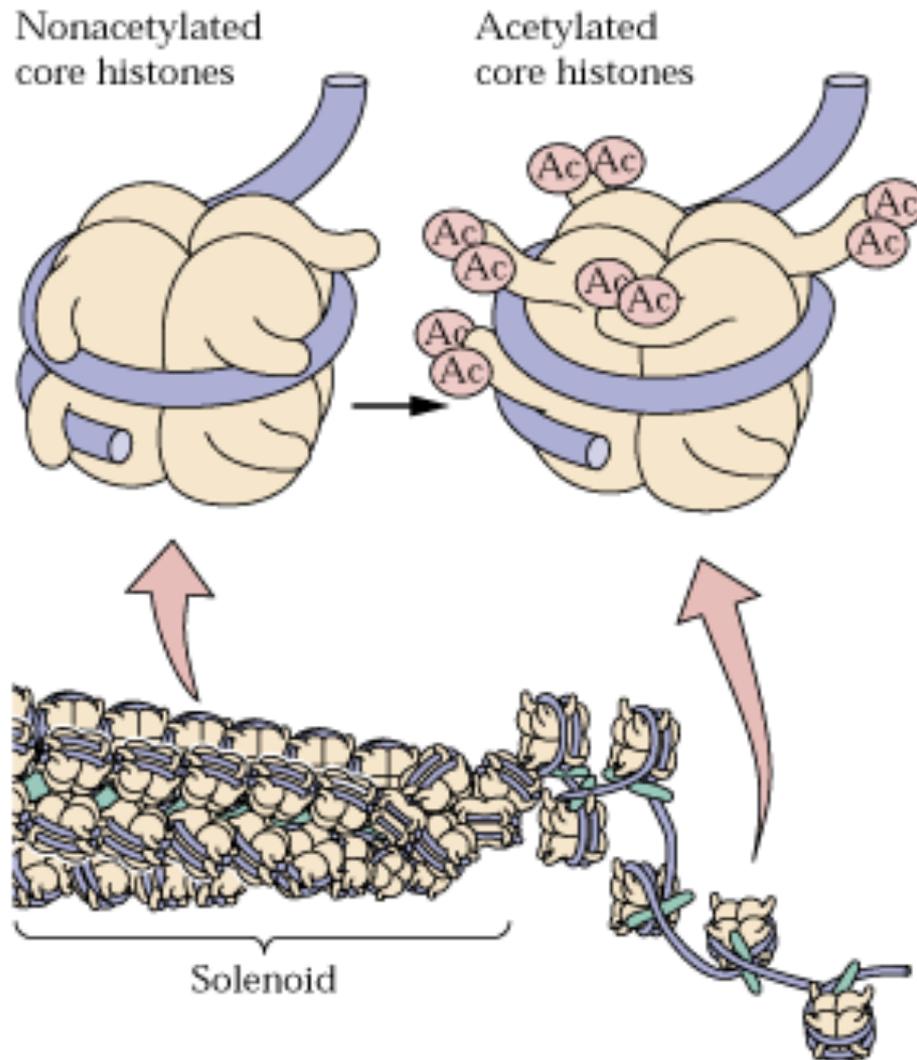


Figure 12.1 Histone post-translational modifications. The figure illustrates several of the major histone modifications so far described in each of the five core histones. The numbers under the amino acid sequence represent the position in the protein (the N-terminus corresponds to 1). The following is the code used for the modifications: A, acetylation; M, methylation; P, phosphorylation. Adapted from Portela and Estellar (2010). Reproduced with permission from Macmillan Publishers Ltd

Acetilazione degli istoni e trascrizione genica

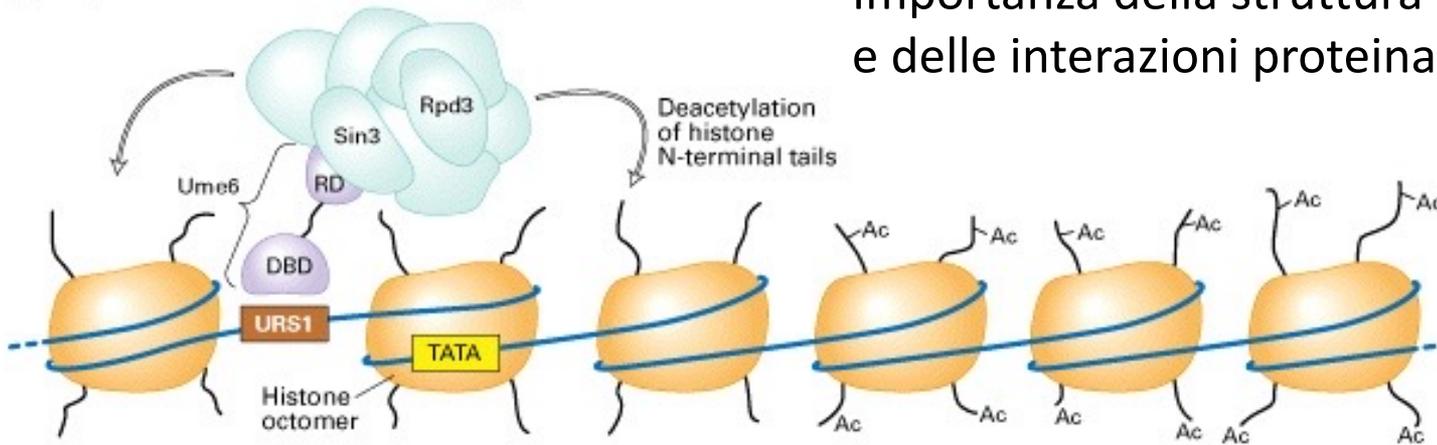


CARATTERISTICHE DELLA CROMATINA

Caratteristica	Cromatina attiva	Cromatina inattiva
Conformazione della cromatina	Estesa, aperta	Condensata
Metilazione del DNA	Poco metilata specialmente nelle regioni del promotore	Metilata
Acetilazione degli istoni	Istoni acetilati	Istoni non acetilati

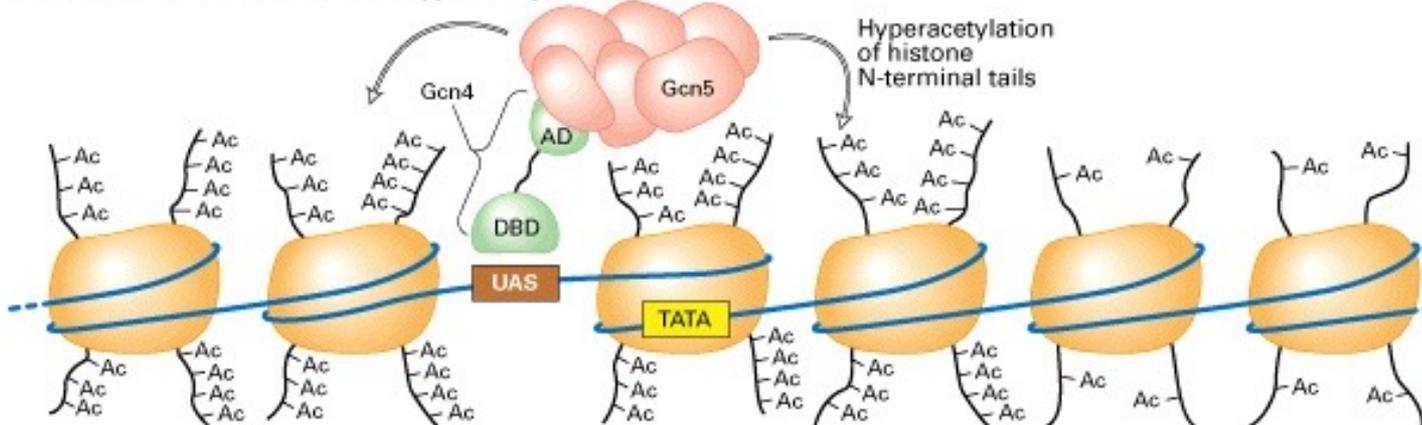
Repressori e attivatori possono dirigere la deacetilazione/acetilazione degli istoni a livello di specifici geni

(a) Repressor-directed histone deacetylation



Importanza della struttura modulare e delle interazioni proteina-proteina

(b) Activator-directed histone hyperacetylation

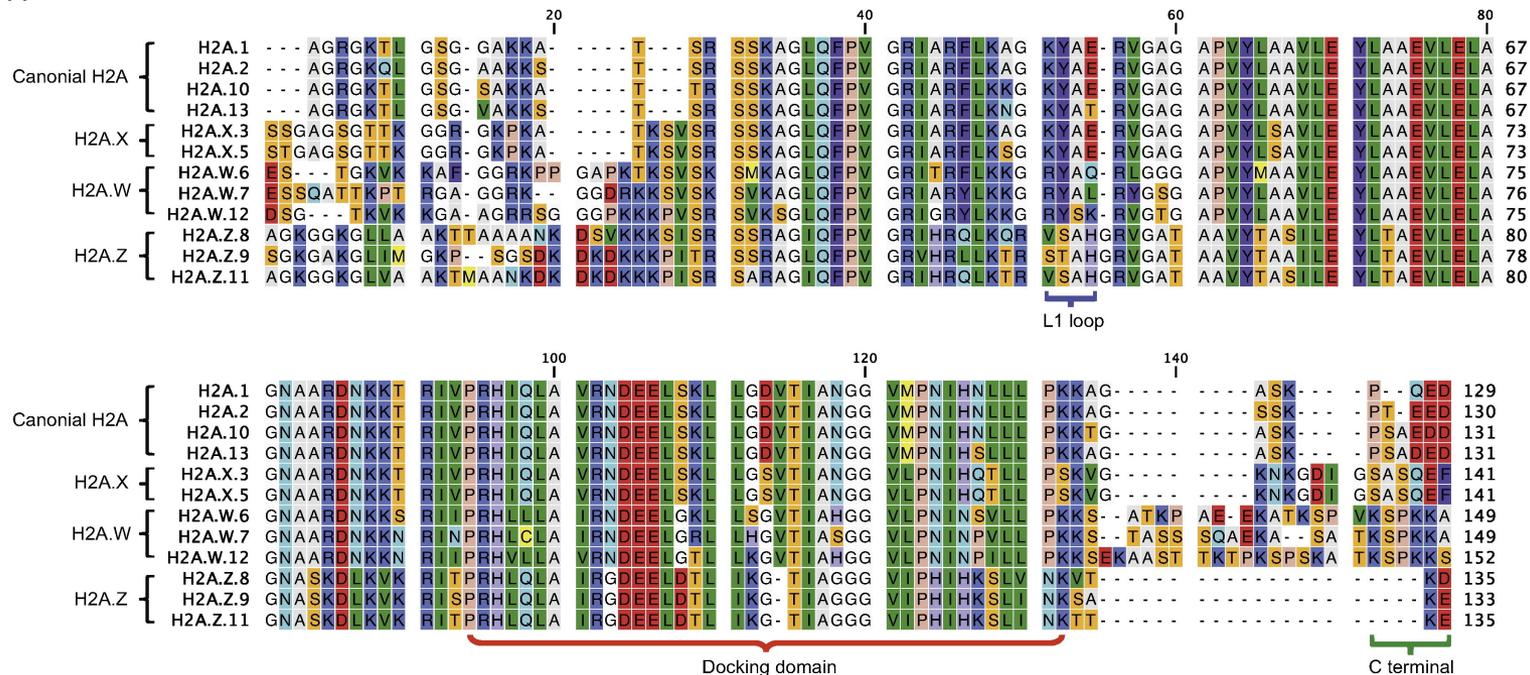


Varianti istoniche

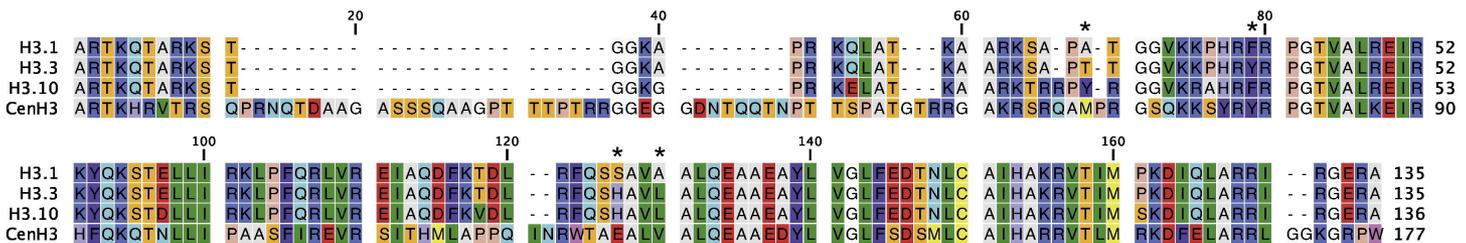
Il genoma degli organismi Eucarioti codifica per gli istoni che formano l'ottamero istonico (H2A, H2B, H3, H4 e l'istone H1).

Oltre ai geni che codificano per questi istoni definiti «canonici», ci sono geni che codificano per varianti istoniche, cioè istoni che entrano a far parte del nucleosoma in sostituzione degli istoni canonici, quando la cromatina assume conformazione diversa per regolare l'espressione genica o garantire processi importanti quali la ricombinazione e la corretta segregazione del DNA durante la divisione cellulare.

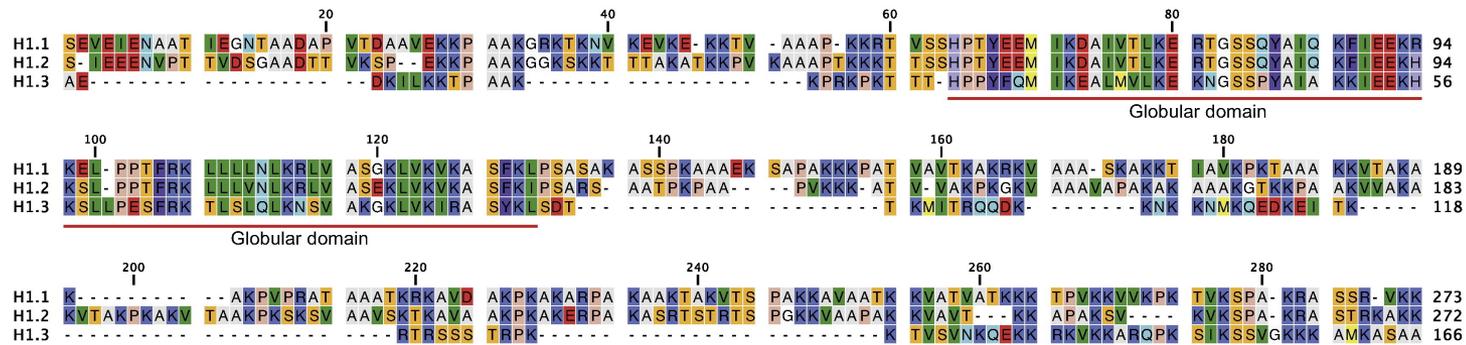
A



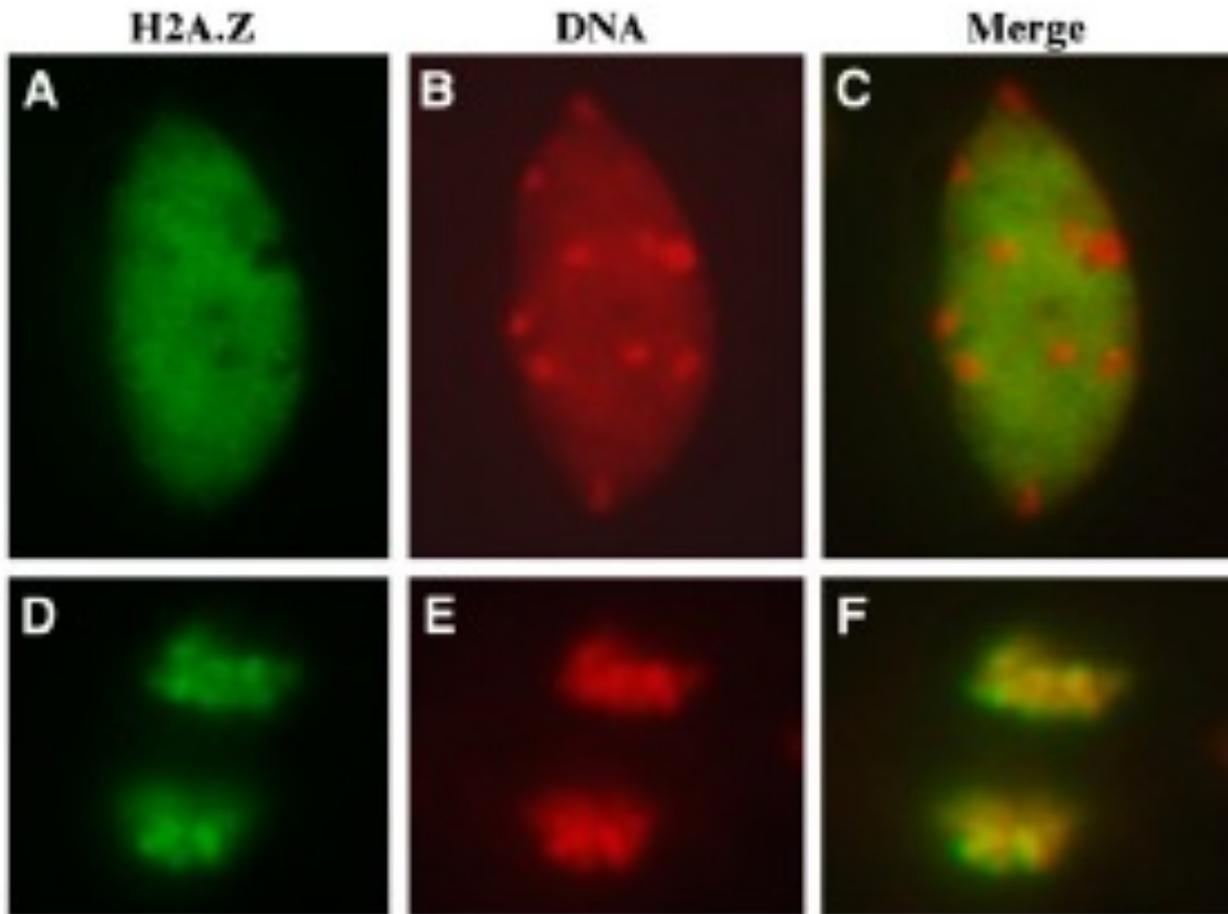
B



C



H2A.Z in Arabidopsis



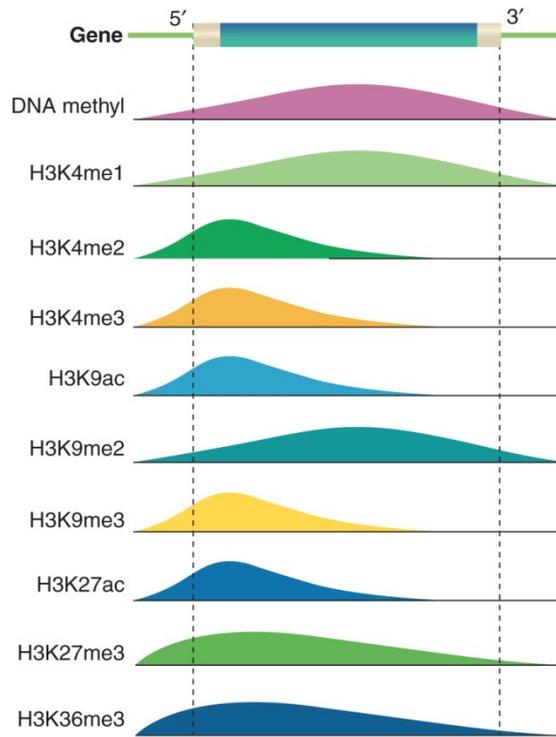
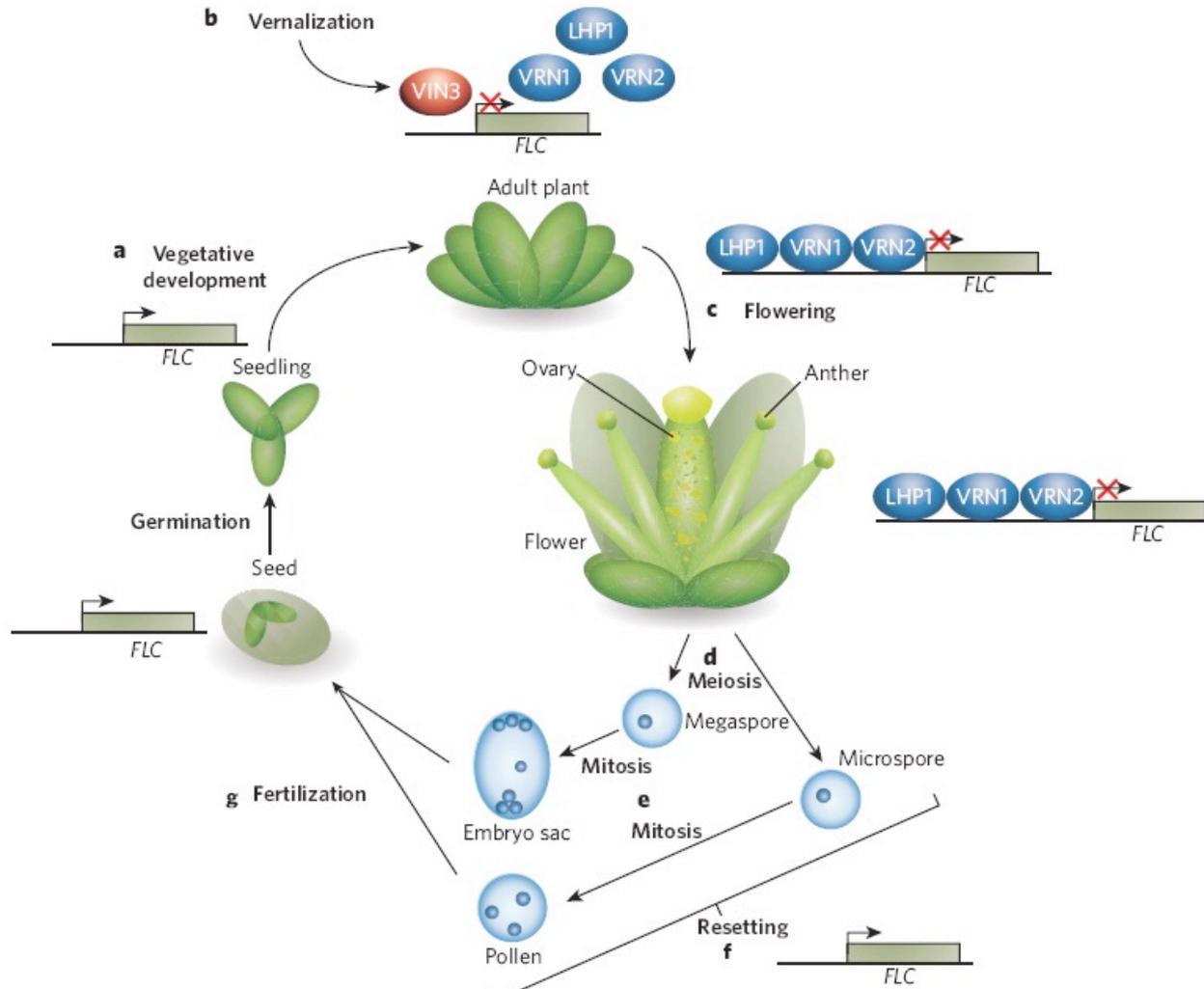


Figure 12.2 Distribution patterns of DNA and histone modifications in genes. Figure obtained from He *et al.* (2011)

FLC: i fattori ambientali regolano l'epigenoma delle piante epigenome



Il gene Flowering Locus C controlla la fioritura nelle dicotiledoni ed è sensibile alla vernalizzazione

- FLC è il principale repressore florale e la sua trascrizione è regolata principalmente da meccanismi di natura epigenetica per indurre la fioritura.
- In corrispondenza del gene FLC i nucleosomi contengono l'istone H2A.Z. La presenza di questa variante istonica nella cromatina al locus di FLC garantisce elevati livelli di trascrizione di FLC.

L'effetto della vernalizzazione sulla cromatina e trascrizione di FLC

- In assenza di vernalizzazione il promotore e il primo introne di FLC sono fortemente acetilati (**trascrizione attiva**).
- La vernalizzazione induce la deacetilazione degli istoni sulle medesime regioni regolatrici nelle quali aumenta anche la metilazione H3K9 e H3K27 (**trascrizione inattiva**).

I meccanismi di regolazione della trascrizione e l'RNA

Molecole di RNA prodotte dalla cellula

Tipi di RNAs

Funzione

mRNAs

messaggeri RNAs, codif. proteine

rRNAs

componente ribosomale

tRNAs

trasportatore aminoacidico

snRNAs

splicing of pre-mRNAs

sRNAs

regolazione dell'espressione

MicroRNAs

mRNA degradation

Altri non-codificanti
RNAs

funzioni varie

I piccoli RNA (small RNAs) e la regolazione della trascrizione e traduzione (Silenziamento post trascrizionale)

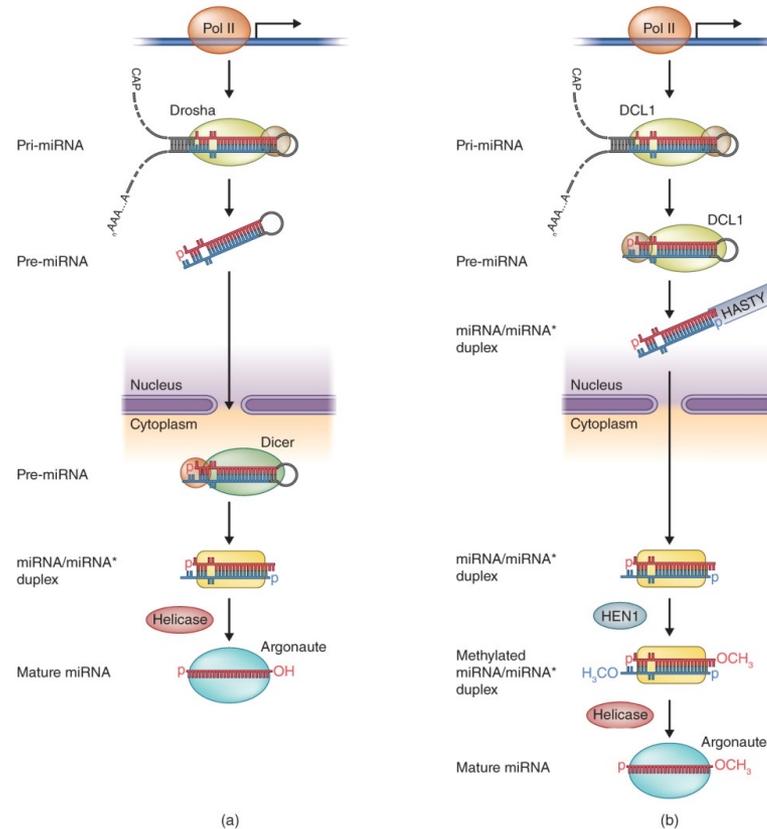


Figure 11.4 Processing of miRNA in animals (a) and plants (b). See text for more details

I microRNA regolano l'espressione di trascritti specifici con cui si appaiano aiutati dalle proteine AGO

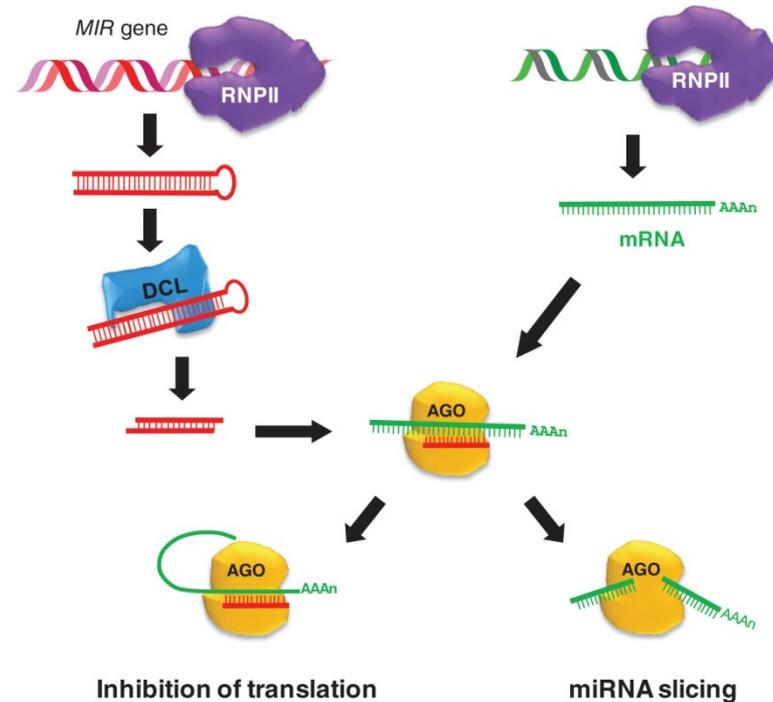


Figure 11.5 miRNAs slice mRNAs or interfere with mRNA translation. RNPII corresponds to DNA-dependent RNA polymerase II, DCL to a Dicer-like protein and AGO to an ARGONAUTE protein, which is most often AGO1 for plants. Adapted from Williams (2013). Copyright 2013 American Society of Plant Biologists. Used with permission

Gli small interfering RNAs vengono prodotti a partire da molecole di RNA a doppio filamento che derivano dalla trascrizione di regioni ripetute del genoma. Oltre ad inibire la traduzione degli mRNA, tornano nel nucleo e modificano la cromatina per impedire la trascrizione (**Silenziamento Trascrizionale**)

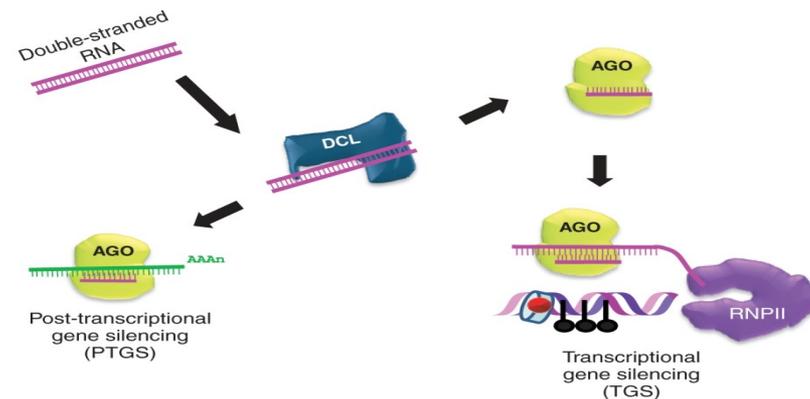


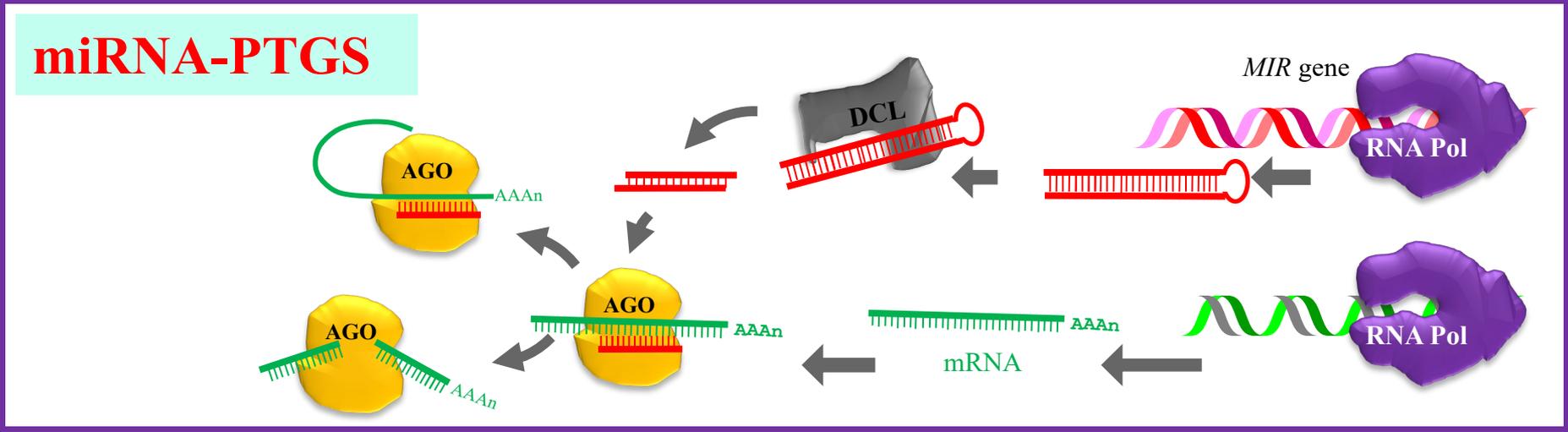
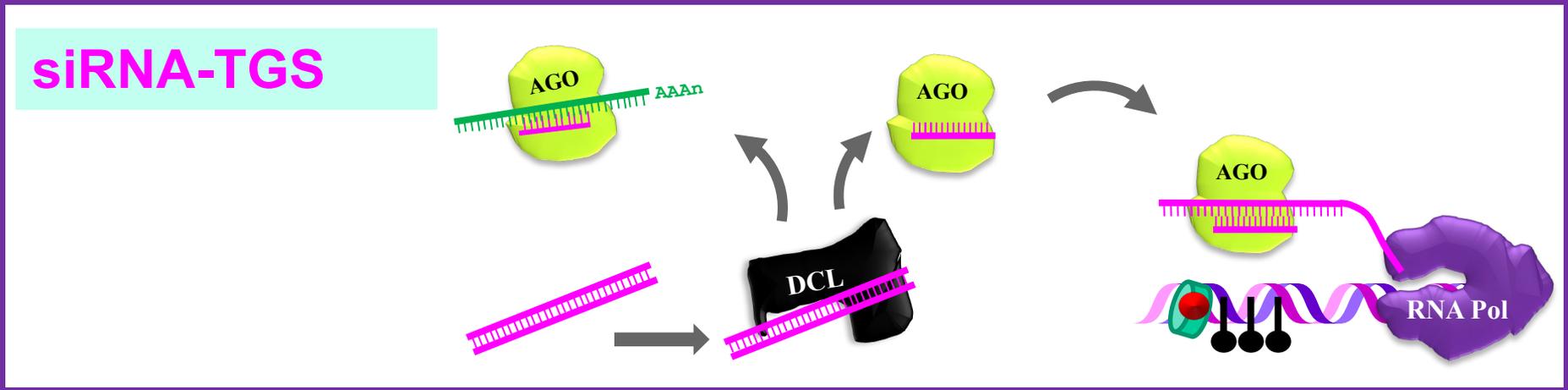
Figure 11.7 Mechanisms for siRNA function in plants. PTGS results in mRNA slicing, while the effects of PTGS on histone modifications and chromatin structure will be discussed in detail in Chapter 12. RNPII corresponds to DNA-dependent RNA polymerase II, DCL to a Dicer-like protein and AGO to an ARGONAUTE protein, which is most often AGO4 in plants. Adapted from Williams (2013). Copyright 2013 American Society of Plant Biologists. Used with permission

RNA interference (RNAi)

silenziamento genico

- trascrizionale (TGS)
(transcriptional gene silencing)
 - induce la metilazione del DNA
- post-trascrizionale (PTGS)
(posttranscriptional gene silencing)
 - frammentazione dei trascritti
 - blocco della traduzione

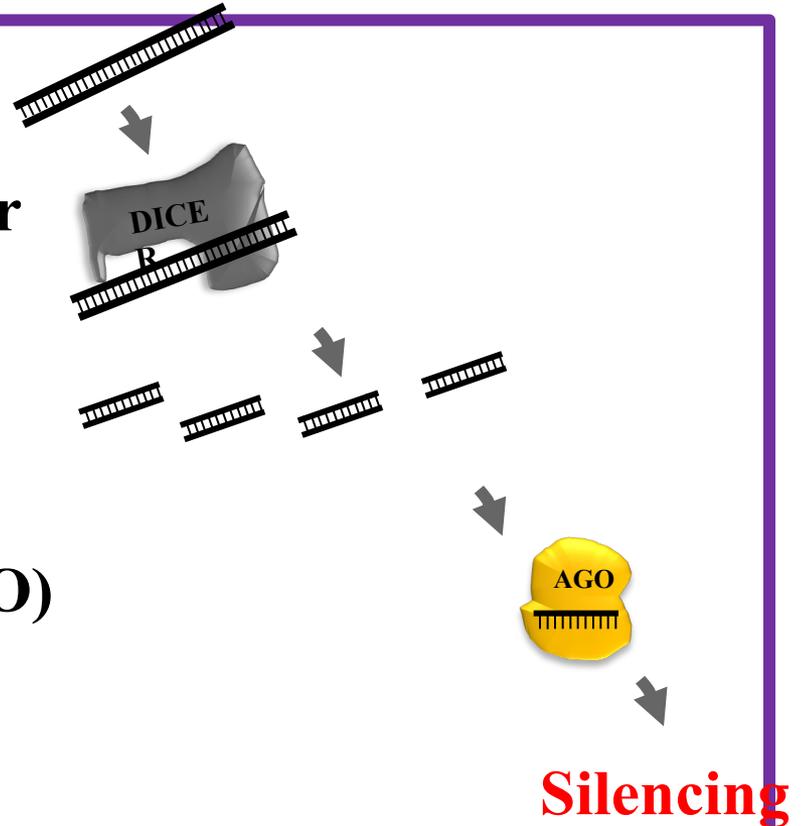
RNA interference - overview



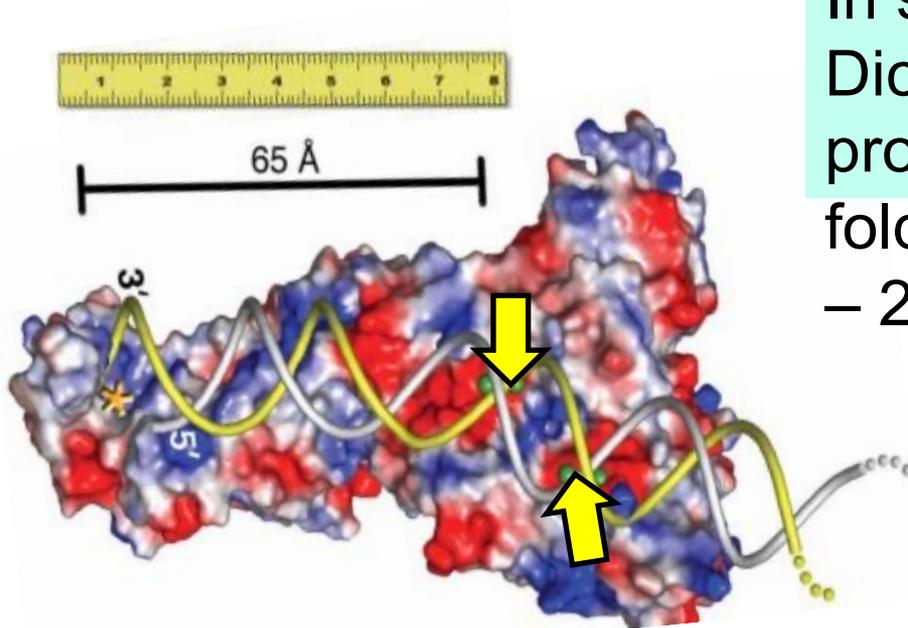
The core of RNA silencing: Dicers and Argonautes

RNA silencing uses a set of core reactions in which **double-stranded RNA (dsRNA)** is processed by **Dicer** or **Dicer-like (DCL)** proteins into **short RNA duplexes**.

These small RNAs subsequently associate with **ARGONAUTE (AGO)** proteins to confer silencing.



Dicer and Dicer-like proteins



In siRNA and miRNA biogenesis, Dicer or Dicer-like (DCL) proteins cleave long dsRNA or foldback (hairpin) RNA into 21 – 25 nt fragments.



Dicer's structure allows it to measure the RNA it is cleaving. Like a cook who “dices” a carrot, Dicer chops RNA into uniformly-sized pieces.

miRNAs and siRNAs are processed by related but different DCL proteins

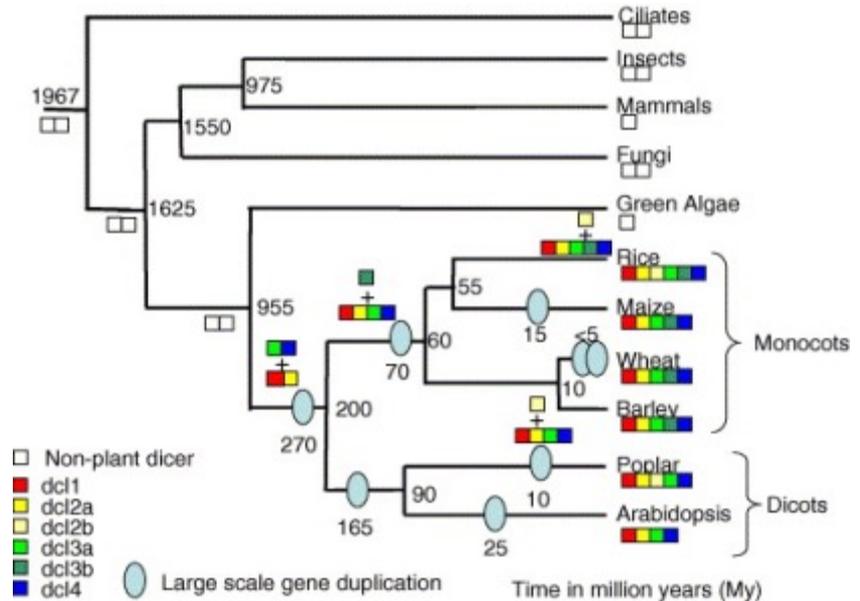
AtDCL1 produces

miRNA



AtDCL2 - 4 produce

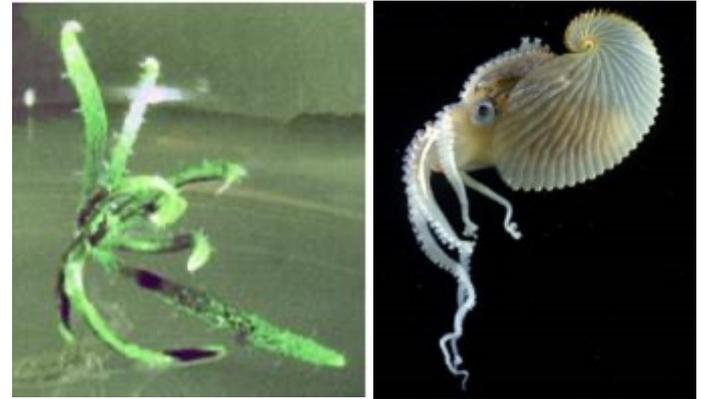
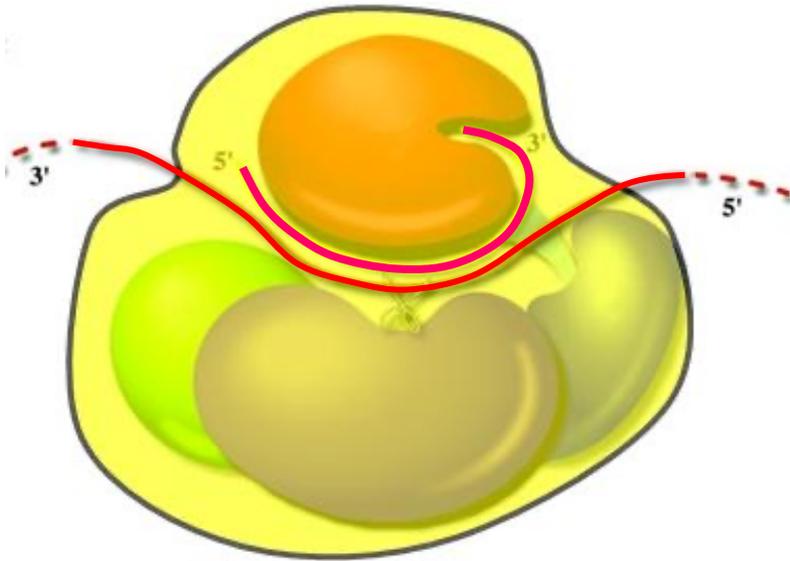
siRNA



Plants have at least 4 DCL proteins, more than found in other organisms. The amplification of DCL family may allow plants great flexibility in pathogen defense responses.

Argonaute proteins

ARGONAUTE
proteins bind small



The *Arabidopsis ago1* mutant and the octopus *Argonauta argo*

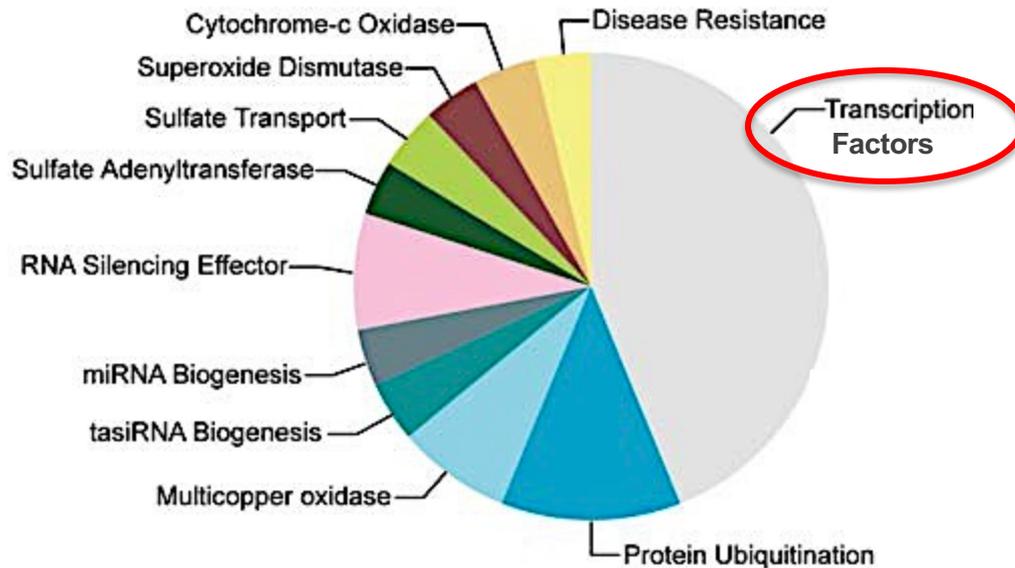
ARGONAUTE proteins are named after the *argonaute1* mutant of *Arabidopsis*; *ago1* has thin radial leaves and

was named for the octopus *Argonauta* which it resembles.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: EMBO J. Bohmert, K., Carlsbecker, A., Balmelli, C., Puchner, J., Gaboch, M., and Benfante, C. (1998) *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. EMBO J. 17: 170-180. Copyright 1998; Reprinted from Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science 305: 1434-1437. with permission of AAAS.

Some miRNAs are highly conserved and important gene regulators

Conserved miRNA target functions



Nearly half of the targets of conserved miRNAs are transcription factors.

Discovery of RNA interference (1998)



The Nobel Prize in Physiology or
Medicine 2006

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



Photo: L. Cicero

Andrew Z. Fire



Photo: J. Mottern

Craig C. Mello



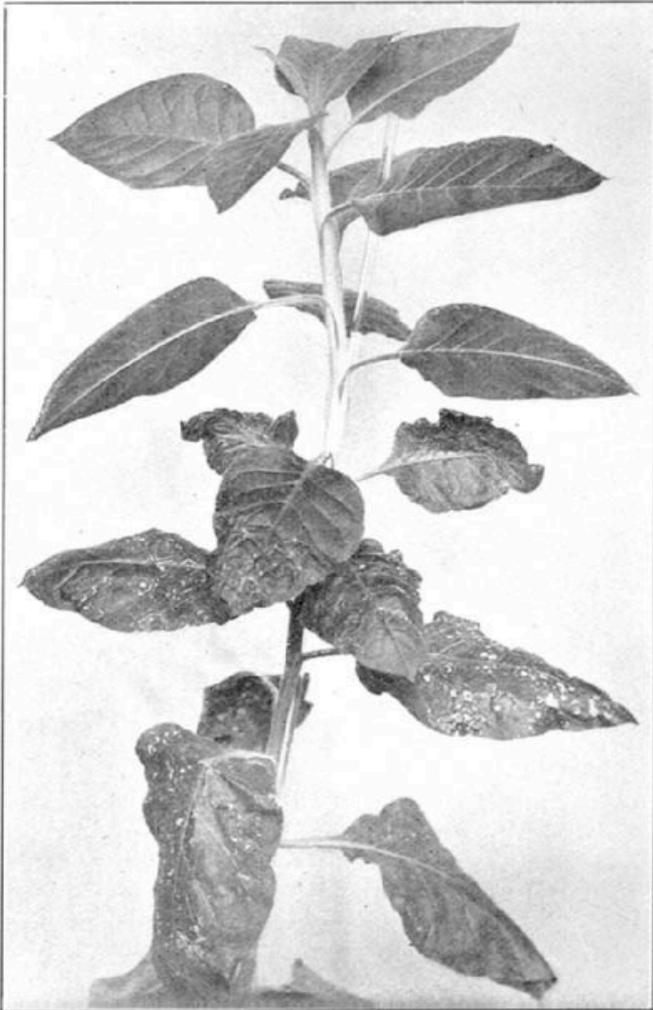
*Cenorhabditis
elegans*



By S. A. WINGARD²

Associate Plant Pathologist, Virginia Agricultural Experiment Station

INTRODUCTION



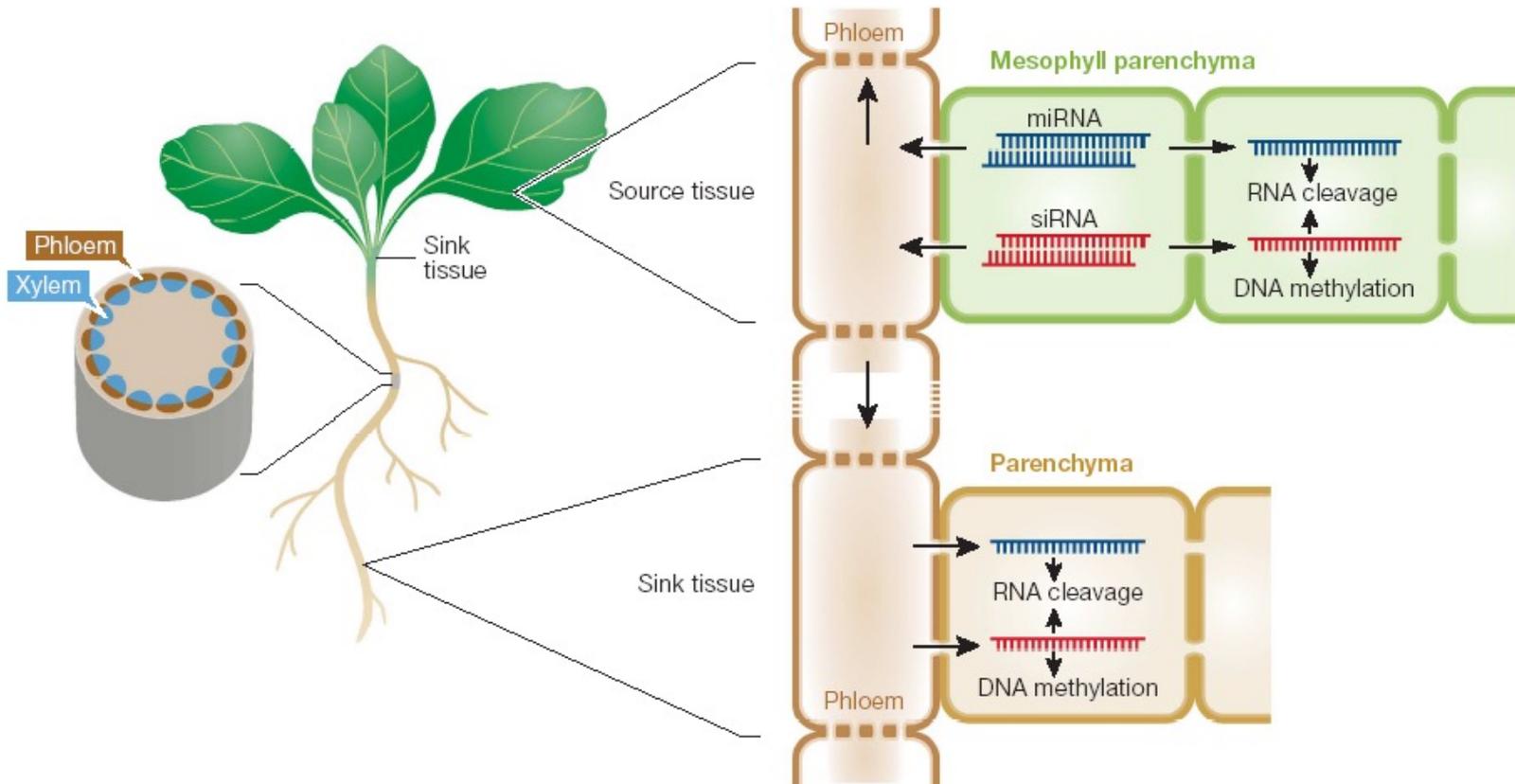
Resistenza ai virus

le foglie che si sviluppano
dopo l'attacco virale
non manifestano l'infezione
(1928)

Il meccanismo di
resistenza passa
attraverso la
formazione di
RNA a doppio
filamento e la
formazione di
siRNAs

siRNA viaggiano nei tessuti vegetali

- *via* plasmodesmata
- through phloem
- passive – diffusion or in direction of stream



Function of RNAi and systemic spreading of sRNA

- antiviral defense – preventing of spreading of infection and new infection
- TE defense – keeping genome integrity, heterochromatin structure
- regulation of development – practically all phases
- stress response (even heritable changes – see below)
- regulation of nutrient uptake – e.g. phosphorus
- epigenetic modulation of genetic information in meristems (heritable changes) - environmental adaptations

Splicing alternativo

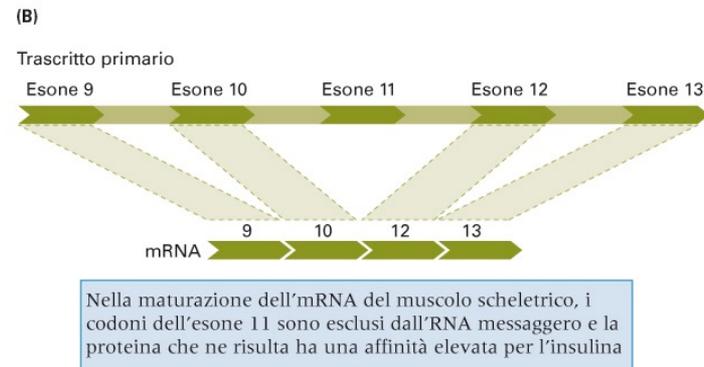
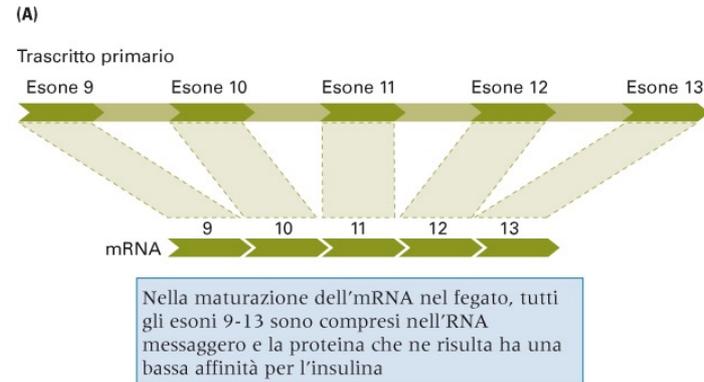


FIGURA 11.33 Lo splicing alternativo del trascritto primario del gene che codifica la catena α del recettore dell'insulina negli esseri umani e in altri mammiferi. (A) Lo splicing nel fegato determina una forma piú lunga a bassa affinità. (B) Lo splicing nel muscolo scheletrico determina una forma breve a maggiore affinità.