

1° LIVELLO DI REGOLAZIONE: IL GENOMA

Un certo grado di **decondensazione della cromatina** è necessario perché il promotore di un gene sia accessibile alla RNA polimerasi. Ciò è stato dimostrato osservando:

- **Puff cromosomici** nelle ghiandole salivari di *Drosophila*: zone in cui la cromatina attivamente trascritta è meno condensata. Che i puff siano siti di attività trascrizionale è confermato dal fatto che essi sono il luogo dove si accumula l'RNA polimerasi II. (l'enzima chiave che effettua la polimerizzazione degli RNA che codificano le proteine).
- **Sensibilità della DNasi I** (un'endonucleasi isolata dal pancreas): basse concentrazioni di DNasi I degradano, nella cromatina, preferenzialmente il DNA trascrizionale attivo. L'aumento della sensibilità alla degradazione di queste regioni fornisce un'ulteriore evidenza che il DNA è decondensato. I geni sono più suscettibili all'azione della DNasi I nei tessuti in cui sono attivamente trascritti.

Le modificazioni chimiche al DNA hanno un ruolo importante come per es. l'aggiunta di gruppi CH₃ (gruppi metile) in corrispondenza della base citosina. Questa reazione eseguita dal **DNA metiltransferasi** (enzima che trasferisce questo gruppo metilico). Questa metilazione del DNA è responsabile di una forzatura della cromatina, verso una forma più condensata cioè verso la struttura **eterocromatina**.

Il grado di metilazione del DNA è direttamente proporzionale alla condensazione della cromatina, quindi, alla riduzione dell'espressione dei geni, contenuti in quella regione di cromatina.

La metilazione del DNA rappresenta anche un marchio **epigenetico** (l'epigenetica è una branca della genetica, che studia le mutazioni della cromatina).

Questa metilazione può essere replicata nelle cellule figlie, in modo tale che certe regioni della cromatina siano più metilate rispetto ad altre.

Isole CpG, (citosine legate in prossimità delle guanine), sono associate a molti promotori eucarioti. L'effetto è un silenziamento localizzato o regionale dell'espressione genica.

In genere le isole CpG sono metilate nei tessuti in cui un gene è attivo.

Inattivazione dell'X= il DNA del cromosoma X viene estensivamente metilato, le fibre di cromatina si condensano in una massa compatta di eterocromatina il cui DNA è meno accessibile ai fattori di trascrizione e alla RNA polimerasi, e la trascrizione genetica cessa quasi del tutto.

Quando un cromosoma X è stato inattivato in una particolare cellula, lo stesso cromosoma X rimane inattivato in quasi tutte le cellule che ne derivano a seguito delle successive divisioni cellulari.

Il meccanismo di inattivazione dell'X coinvolge un RNA prodotto dal cromosoma destinato all'inattivazione, chiamato Xist.

L'RNAXist è un esempio di lungo RNA non codificante (lncRNA); cioè, una volta prodotto, il trascritto non è tradotto in una proteina.

È chiaro che vengono ereditate anche le modificazioni chimiche del DNA che differiscono tra l'ocita e lo spermatozoo.

La metilazione del DNA fornisce uno strumento per creare cambi epigenetici, ovvero cambiamenti stabili nell'espressione genica che vengono trasmessi da una generazione cellulare alla successiva senza richiedere variazioni nella sequenza di basi di un gene.

Altre modificazioni del genoma possono invece essere a carico delle proteine istoniche.

Questi istoni hanno delle code (amminoterminali) che escono dall'ottamero e al termine di queste code sono presenti degli amminoacidi, che possono essere modificati chimicamente, come dei residui di arginina o di lisina.

Queste modificazioni chimiche sono eseguite da enzimi specifici (Es. istone cetiltrasferasi).

L'acetilazione dei residui di lisina degli istoni, rappresenta un ingombro osterico che modifica la conformazione della proteina e provoca un'apertura della cromatina.

La deacetilazione invece ha un effetto opposto quindi un ricompattamento della cromatina.

La metilazione (aggiunta di gruppi metilici a determinare citosine presenti nel DNA) invece può avere repressione o attivazione trascrizionale a seconda di quale residuo amminoacidico viene metilato.

ALCUNE MODIFICHE COVALENTI A CARICO DEGLI ISTONI

modifiche reversibili:

- ✓ **L'acetilazione dei residui di lisina degli istoni (HAT, Histone Acetyl Transferase)** impedisce alle fibre di cromatina di ripiegarsi in strutture compatte → **MAGGIORE ACCESSIBILITA'** → aumento dell'attività trascrizionale
- ✓ **La deacetilazione degli istoni (HDAC, Histone Deacetylase)** compatta la cromatina → **MINORE ACCESSIBILITA'** → diminuzione dell'attività trascrizionale

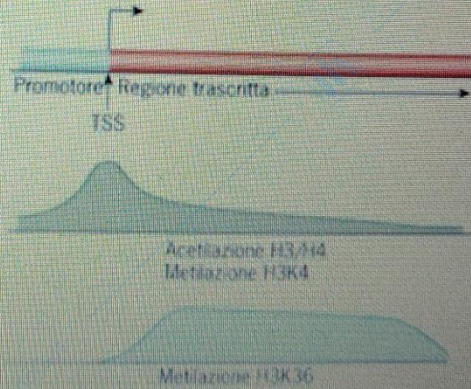


Figura 12.49 Le modificazioni degli istoni possono funzionare da marcatori delle regioni trascritte della cromatina. La figura illustra la localizzazione selettiva delle modificazioni istoniche all'interno della cromatina dei geni trascritti, sulla base di analisi a livello genomico ottenute nel lievito. L'acetilazione istonica e la metilazione H3K4 sono localizzate principalmente nella regione del promotore dei geni attivi. Al contrario, la metilazione H3K36 mostra una localizzazione opposta, TSS, sito di inizio della trascrizione.

modifiche parzialmente reversibili:

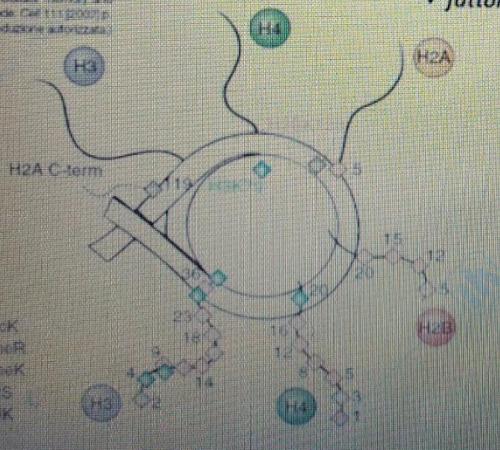
Diverso effetto della **metilazione** degli istoni

- Metilazione della lisina (H3K9, H3K27, H4K20) → repressione trascrizionale
- Metilazione della lisina H3K4, H3K36 → attivazione trascrizionale

Figura 11.33 Riassunto delle modificazioni degli istoni. Le modificazioni istoniche sono rappresentate come indicato in basso a destra: giallo, lisina acetilata (acK); tigio, arginina metilata (meR); blu, lisina metilata (meK); rosa, serina fosforilata (PS); verde, lisina ubiquitinata (UK). Le modificazioni sono mostrate su una sola delle code degli istoni H3 e H4. Allo stesso modo, è mostrata solo una delle code degli istoni H2A e H2B. Le due code terminali degli istoni H3A e H2B sono indicate con delle ali tratteggiate. È mostrata la posizione della lisina 97 dell'istone H3 (K97), sebbene questo residuo è assente sulla code istonica. (Da: Strahl, B.M., Cellular memory and histone code. Cell 111 (2002) p. 291, 292. Riproduzione autorizzata.)

1° LIVELLO DI REGOLAZIONE: IL GENOMA

- Le differenze strutturali dei due stati della cromatina (*euromatina* meno condensata e contenente DNA trascrizionalmente attivo; *eterocromatina* più condensata e contenente DNA trascrizionalmente inattivo) possono dipendere da
 - ✓ metilazione del DNA
 - ✓ modifiche covalenti a carico degli istoni
 - ✓ fattori di rimodellamento della cromatina



CODICE ISTONICO

La combinazione delle marcature di specifici amminoacidi istonici crea un **codice istonico** letto da alcune proteine per modificare la struttura della cromatina e l'attività genica.

2° LIVELLO DI REGOLAZIONE: LA TRASCRIZIONE

Per la trascrizione la regolazione è molto fine, e viene eseguita grazie alla presenza di fattori di trascrizione.

L'espressione genica viene regolata a livello trascrizionale, ovvero diversi tipi di cellule trascrivono diversi corredi di geni permettendo quindi a ogni tipo cellulare di produrre le proteine necessarie per effettuare le specifiche funzioni di quella cellula.

In che modo viene regolata la trascrizione per far sì che solo determinati tipi di cellule trascrivano determinati geni?

La specificità della trascrizione è determinata da proteine chiamate fattori di trascrizione, essenziali per la trascrizione di tutti i geni trascritti da un determinato tipo di RNA polimerasi.

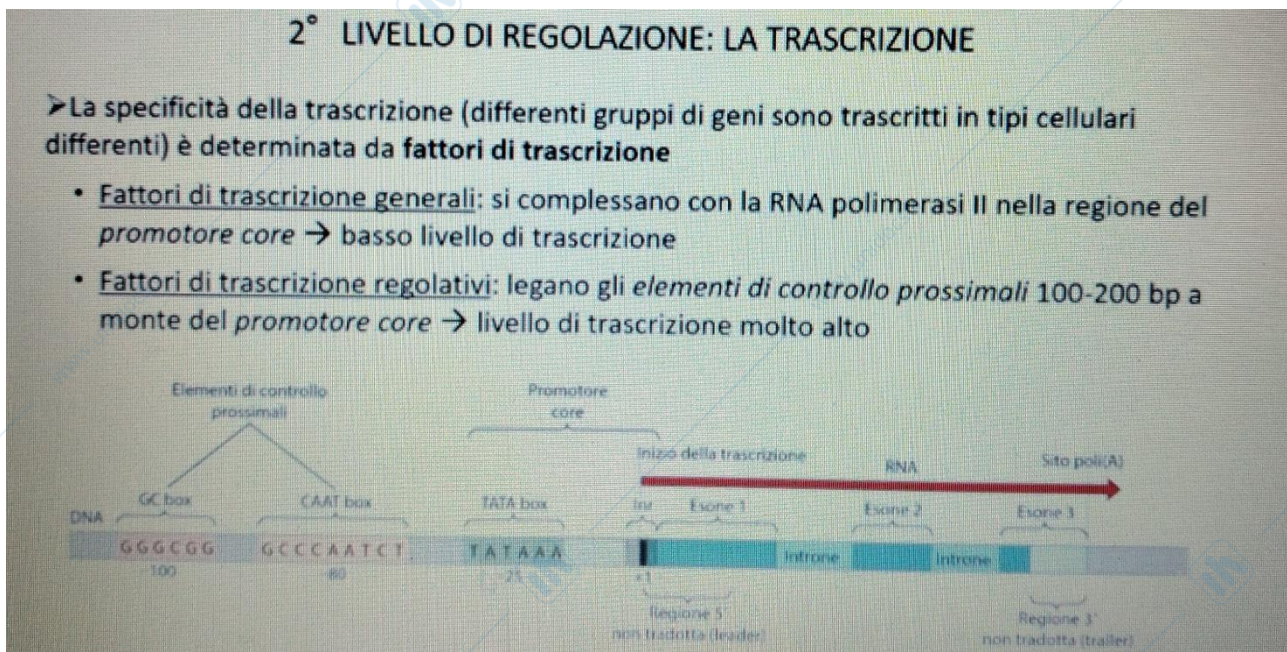
Per i geni trascritti dalla RNA polimerasi II, i fattori di trascrizione generali si complessano con la RNA polimerasi nella regione del promotore core, una regione di DNA localizzata nelle immediate vicinanze del punto d'inizio della trascrizione.

L'inizio della trascrizione avviene con una velocità molto bassa (basale), cosicché sono prodotti solo pochi trascritti. Però oltre al promotore core la maggior parte dei geni codificanti per proteine possiede più a monte, corte sequenze di DNA a cui si legano altri fattori di trascrizione, aumentando così l'efficienza del promotore core.

Per queste sequenze d'ora in poi sarà usato il termine di **elementi di controllo prossimali**.

3 tipi sono particolarmente comuni: la CAAT box, la GC box e l'ottamero.

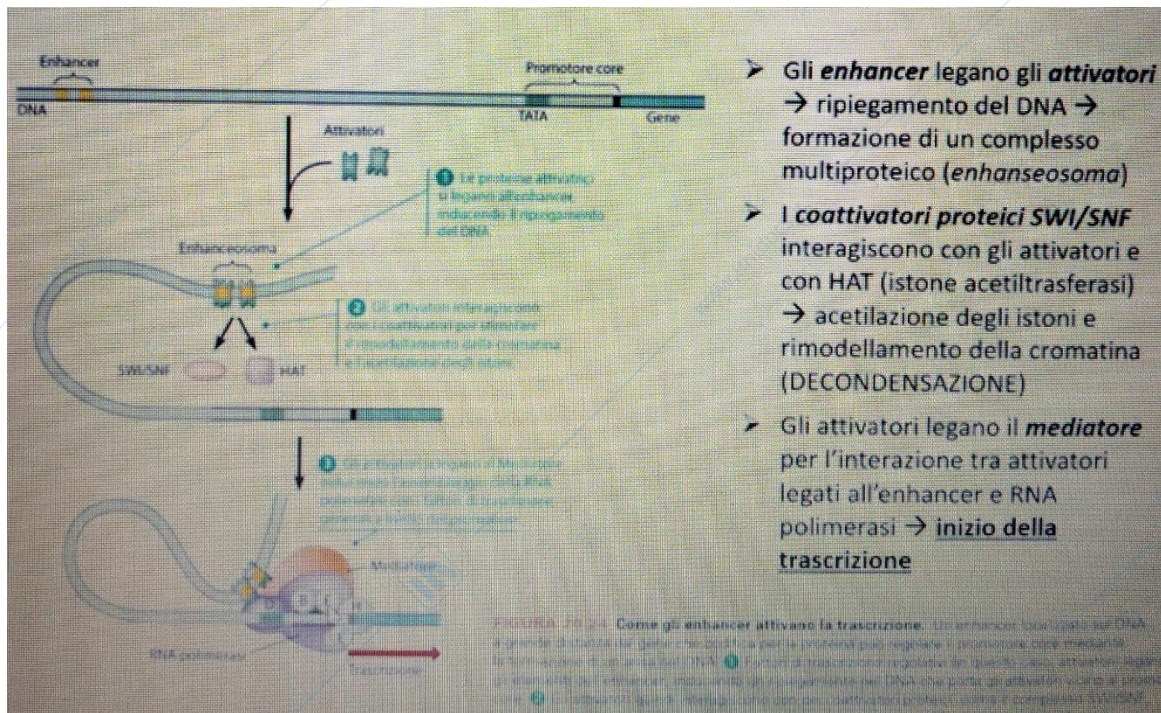
I fattori di trascrizione localizzati al di fuori del promotore core sono definiti **fattori di trascrizione regolativi**: che aumentano il ritmo di trascrizione.



Non esiste una sola sequenza promotore, ma anche delle sequenze che possono aumentare (stimolare) la trascrizione, le **enhancer** o diminuire (inibire) la trascrizione le **silencer**, e dipende dal loro legame con le proteine attivatori per gli enhancer e i repressori per i silencer.

Queste 2 sono le sequenze di DNA che in coppia possono determinare la regolazione dell'espressione genica.

Una complicazione però che si incontra con i silencer e gli enhancer deriva dalla loro capacità di influenzare la trascrizione di geni molto distanti, fatto che potrebbe essere problematico se geni con funzioni opposte risiedono in regioni vicine. In queste situazioni, a volte, per impedire a un enhancer (o silencer) di agire inavvertitamente in modo simultaneo su entrambi i gruppi di geni sono presenti sequenze di DNA dette **insulator**, che creano una barriera fisica tra regioni confinanti di DNA che impediscono all'enhancer o al silencer di esercitare la loro influenza.



Sono quindi molecole proteiche che derivano dalla attivazione di vie di trascrizione. Consideriamo che esistano delle proteine che arrivano al nucleo, in esito ad un messaggio che sono gli attivatori e si trovano la sequenza da legare al livello del DNA in corrispondenza di quelli che abbiamo definito enhancer.

Il legame degli attivatori con gli enhancer determina un ripiegamento del DNA, in modo tale che si possa formare un complesso con l'istone HT e le proteine di rimodellamento della cromatina (SWI/SNF) questo fa sì che la cromatina venga acetilata si decondensi e risulti più accessibile alla RNA polimerasi.

Se è un repressore che si lega ad una sequenza DNA silencer allora avverrà il reclutamento dell'istone deacetilasi, ovvero quell'enzima che deacetila le code istoniche precedentemente acetilate. Questo enzima quindi provoca la chiusura della condensazione della cromatina.

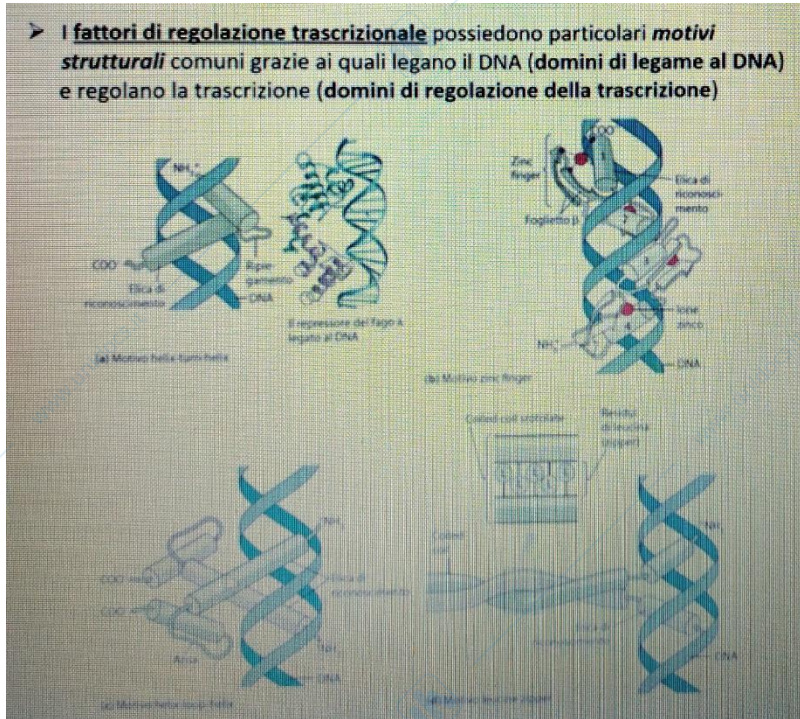
Questi attivatori e repressori sono proteine che legano il DNA.

Può avvenire al livello del solco maggiore del DNA con un'interazione di tipo Helix turn helix che interagisce col solco maggiore, quindi una proteina che ha 2 domini ad a elica unita da un'ansa.

Oppure helix loop helix, in questo caso saranno 2 a eliche di 2 polipeptidi distinti.

Oppure 2 polipeptidi che si avvolgono in questo motivo leucine zipper che ha le estremità capaci di interagire con il DNA.

Dominio a "dita di zinco" presente in una porzione del recettore per gli ormoni steroidei.



Questo dominio è presente in una porzione della recettore per gli ormoni steroidei, che mediano le funzioni più varie. Per ogni ormone c'è un recettore diverso ma non tantissimo, la cui struttura è comune e contempla la presenza di un dominio a dita di zinco, una porzione che lega il ligando e un altro dominio di trans-attivazione genica.

La sequenza del DNA capace di legare il dominio a dita di zinco non è molto diversa da quello di diversi ormoni steroidei.

CREB= fattore di trascrizione che blocca la trascrizione di queste sequenze (CRE) e che può essere attivato solo dopo la fosforilazione.

RECETTORE PER LE CITOCHINE (proteine che mediano la segnalazione nel sistema immunitario) richiedono l'entrata in azione di alcuni componenti del sistema immunitario.

Queste citochine legano il loro recettore, che ha un'attività chinasi; la risposta a questo legame è la fosforilazione delle code citosoliche dei recettori e il legame da recettore fosforilato ai fattori di trascrizione STAT i quali possono essere fosforilati dal recettore stesso e diventano STAT fosforilato che dimerizzano e traslocano al nucleo, e là possono regolare l'espressione di gene.

3° LIVELLO DI REGOLAZIONE: CONTROLLO POST-TRASCRIZIONALE

Un altro livello di regolazione è quello post trascrizionale. Pur essendo stato tradotto l'mRNA non è detto che questa vada a buon fine o che venga tradotta tale e quale. Esso può andare incontro a splicing alternativo.

Splicing alternativo: permette alle cellule di creare una varietà di molecole di mRNA dallo stesso trascritto primario.

Splicing di alcuni esoni della catena pesante, essa ha degli esoni che codificano per domini trans membrana. Quando questi esoni vengono inclusi nel mRNA maturo, allora il polipeptide della catena pesante dell'immunoglobulina, conterrà i domini trans membrana e gli anticorpi che verranno prodotti sono anticorpi che si innestano nella membrana plasmatica e quindi rimangono legati alla cellula sporgenti nell'ambiente extracellulare.

Questo stesso tipo di immunoglobulina (codificate dallo stesso DNA) può, in fase post trascrizionale, subire non solo lo splicing degli introni, ma anche di quegli esoni che permettono l'ancoraggio trans membrana. In queste condizioni le immunoglobuline prodotte hanno una catena pesante monca, mancante della porzione di ancoraggio alla membrana e quindi sono delle immunoglobuline secrete che possono essere liberate dalla cellula, nell'ambiente extracellulare.

Altro livello è quello del **controllo dell'export** verso il citosol attraverso il poro nucleare.

4° LIVELLO DI REGOLAZIONE: CONTROLLO TRADUZIONALE

Questo livello riguarda la possibilità di produrre o no una proteina a seconda delle necessità, fermo restando che il suo mRNA sia tradotto e pronto. Questo non significa che venga prodotta subito anche la proteina, infatti con questo controllo traduzionale, ad esempio l'mRNA della ferritina può risultare bloccata da una proteina che lega una sequenza regolatrice.

La ferritina è una proteina che serve per immagazzinare il ferro. Il ferro è un elemento essenziale e non viene escreto, ma si perde attraverso lo sfaldamento dell'epitelio gastrointestinale.

Per questo dobbiamo sempre procurarcelo, ma non deve essere troppo abbondante se no produce delle specie chimiche, attraverso reazioni redox, che possono essere molto tossiche.

La giusta quantità di ferro è calibrata attraverso 2 proteine, la ferritina, che quando non c'è ferro o la sua concentrazione è bassa si ha una proteina che lega a questa rp1n che si chiama **IRE**. Se il ferro non c'è vuol dire che non è disponibile e quindi la ferritina può non essere tradotta.

Quando invece c'è ferro significa che c'è l'esigenza di produrre quella proteina che lo immagazzina, e allora il meccanismo di sblocco della traduzione del mRNA della ferritina è questo: il ferro lega la proteina che blocca l'IRE e il ribosoma può tradurre l'mRNA e la ferritina viene tradotta.

L'altra proteina critica per l'equilibrio di ferro nel nostro organismo è il recettore della trans-ferrina, essa trasporta il ferro e per entrare nella cellula ha bisogno di un recettore che la legghi e che quindi faccia entrare il ferro.

Nella cellula epatica, soprattutto, il ferro può entrare solo quando c'è disponibilità del recettore.

Anche qui la regolazione avviene a seconda della presenza del ferro,

quando la concentrazione di ferro è bassa, l'mRNA per il recettore della trans-ferrina può essere tradotto.

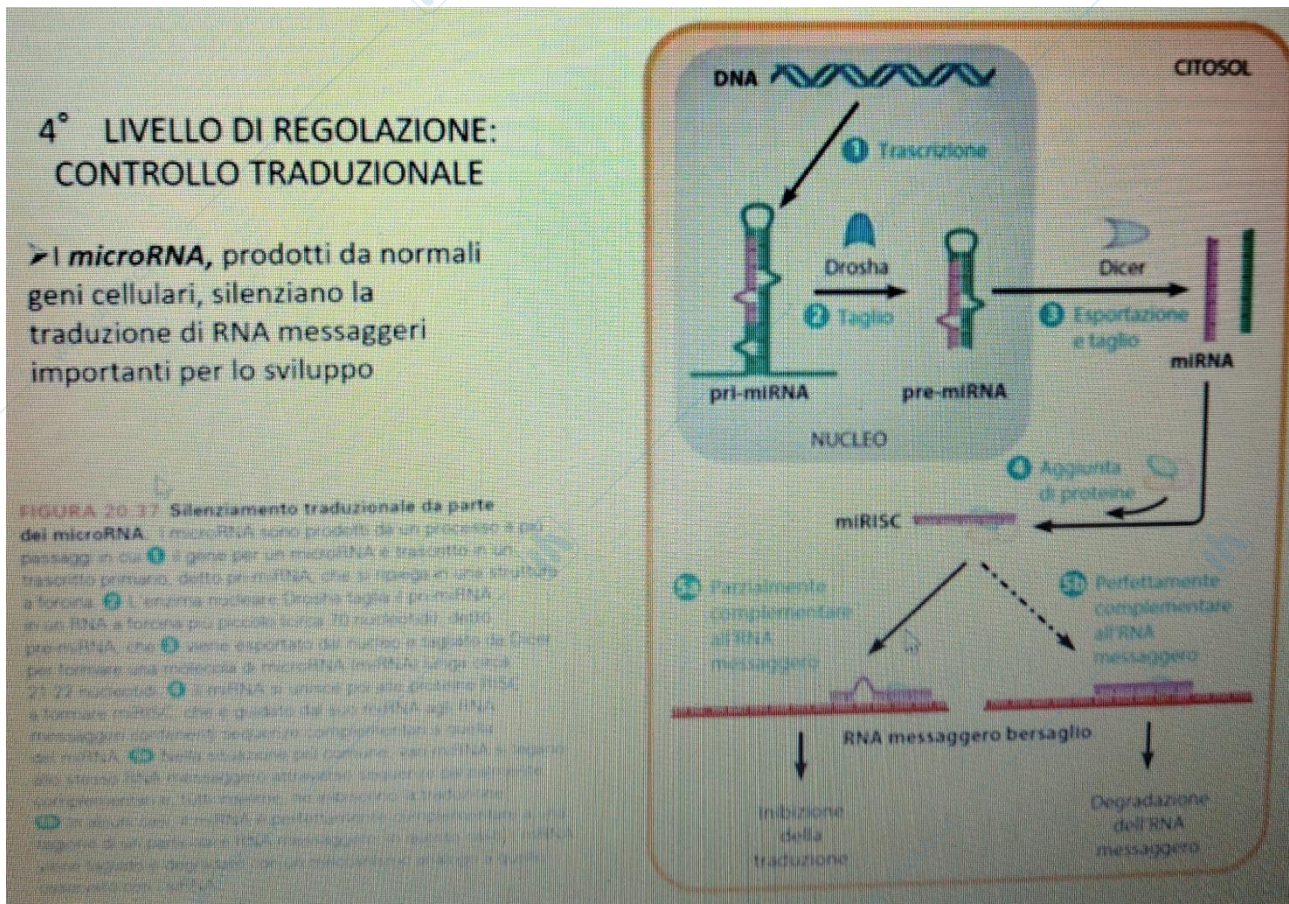
Quando invece il ferro è abbondante, questo, lega la proteina che lega l'IRE e il sistema di degradazione del mRNA può essere attivato. In queste condizioni, quindi, viene degradato il messaggero per il recettore.

Nelle 2 condizioni di carenza di ferro e di eccesso di ferro, le due proteine vengono tradotte in modo opposto.

Il 4° livello di regolazione, comprende anche un fenomeno che si chiama RNA interference, in cui l'mRNA già sintetizzato può essere degradato da un sistema di degradazione, contenuto nel complesso **risk**.

Questo è un sistema che le cellule eucariotiche hanno messo a punto nel corso dell'evoluzione come risposta antivirale: quando un virus RNA entra nella cellula, un enzima detto **dicer**, taglia l'RNA virale in frammenti di una ventina di nucleotidi. Questi piccoli RNA sono una "sonda" che fanno da guida all'enzima **risk**, per individuare degli RNA complementari target di degradazione.

Questi piccoli nucleotidi funzionano come "piccoli RNA" detti **microRNA (o mirna)**, sono dei veri e proprio modulatori dell'espressione genica post traduzionale. Questi mirna sono codificati da sequenze di DNA, vengono sintetizzati come **PRI-mirna** e poi tagliati ulteriormente da un enzima (drosha) nel nucleo. Questo RNA viene trasportato fuori dal nucleo e **dicer** taglia questi pre-mirna in mirna veri e proprio.



5° LIVELLO DI REGOLAZIONE: CONTROLLO POST TRADUZIONALE

Una volta che il prodotto genico ha superato tutti questi test di controllo, la proteina viene prodotta ed è disponibile, ma non è detto che essa debba funzionare per un tempo indefinito.

Ad esempio questa può essere una proteina enzimatica che ad un certo punto deve essere spenta perché la reazione che essa catalizza deve essere interrotta e uno dei meccanismi di regolazione dell'attività può essere addirittura la degradazione della proteina stessa. Questo può avvenire perché dei sistemi di **ubiquitinazione** delle proteine, che permettono la reazione di attacco di ubiquitine sotto forma di catene in corrispondenza di residui di lisina, marcano le proteine che devono essere degradate.

Infatti la poliubiquitazione rappresenta un'etichetta, perché la proteina ubiquitinata venga indirizzata al **proteasoma (centro di riciclaggio cellulare)**, complesso multiproteico, una specie di canale dove avvengono le reazioni protolitiche di idrolisi del legame peptidico a spesa d'energia, che trasformano la proteina in **corti peptidi** e permette la liberazione degli aminoacidi durante la degradazione delle proteine.

