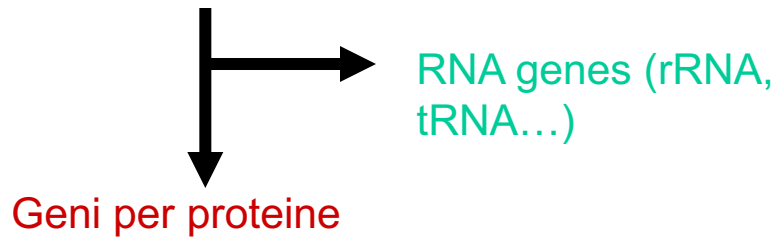
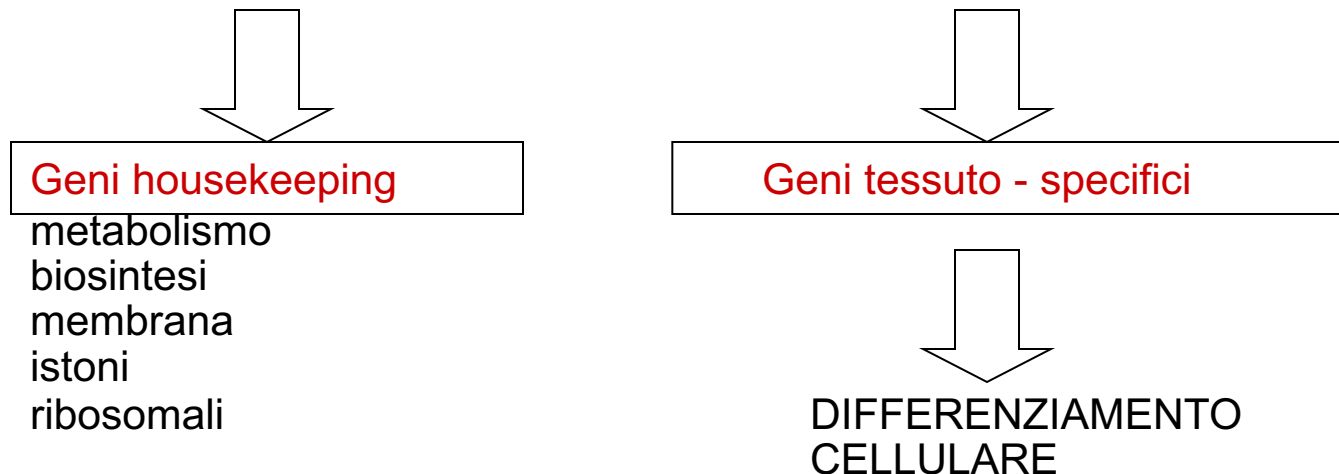


# Il controllo dell'espressione genica negli Eucarioti

Cellula umana contiene circa 30000 geni



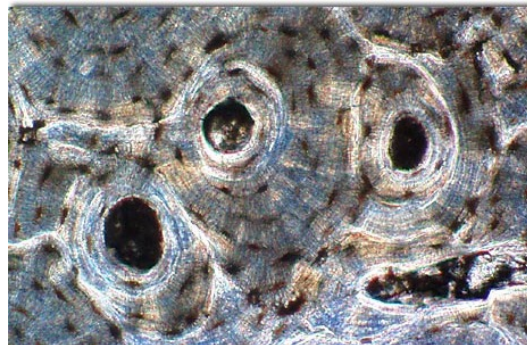
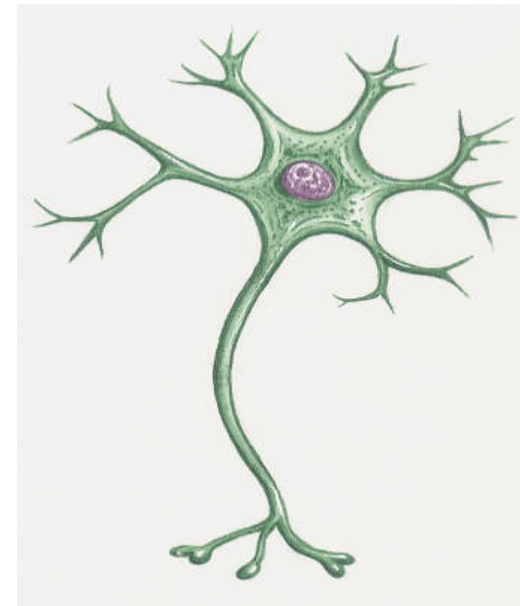
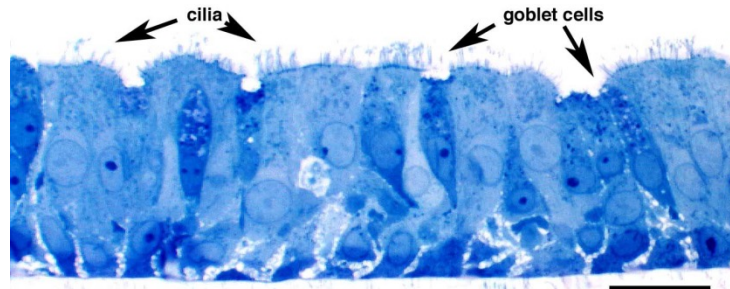
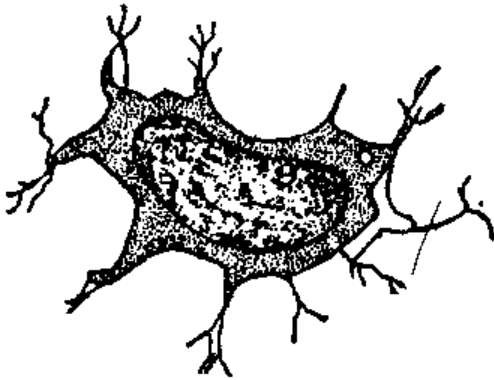
Ogni cellula in un determinato momento esprime solo una piccola parte di questo potenziale (~ 5000 geni)



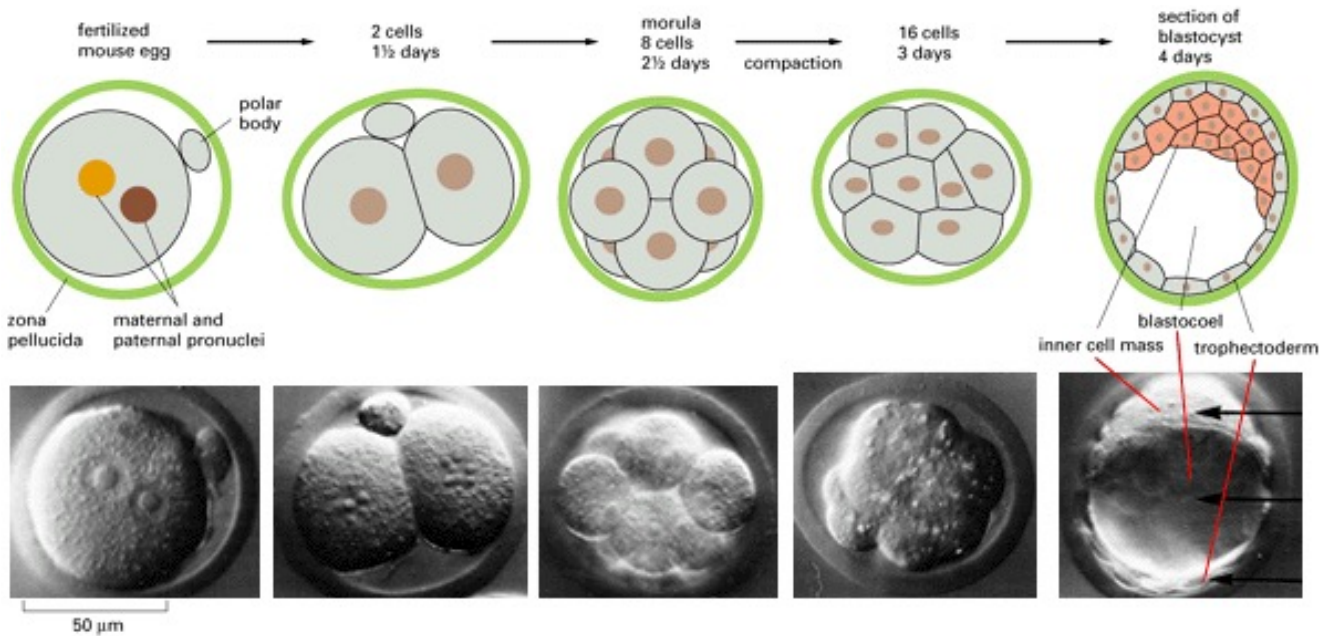
A QUESTA ESPRESSIONE SELETTIVA NON CORRISPONDE (IN GENERE)  
UNA VARIAZIONE DEL CONTENUTO DI DNA

# Sviluppo Eucariotico

- La differenziazione cellulare e' la specializzazione cellulare durante lo sviluppo.
- Visto che tutte le cellule hanno lo stesso DNA come avviene la differenziazione?
- Regolazione genica



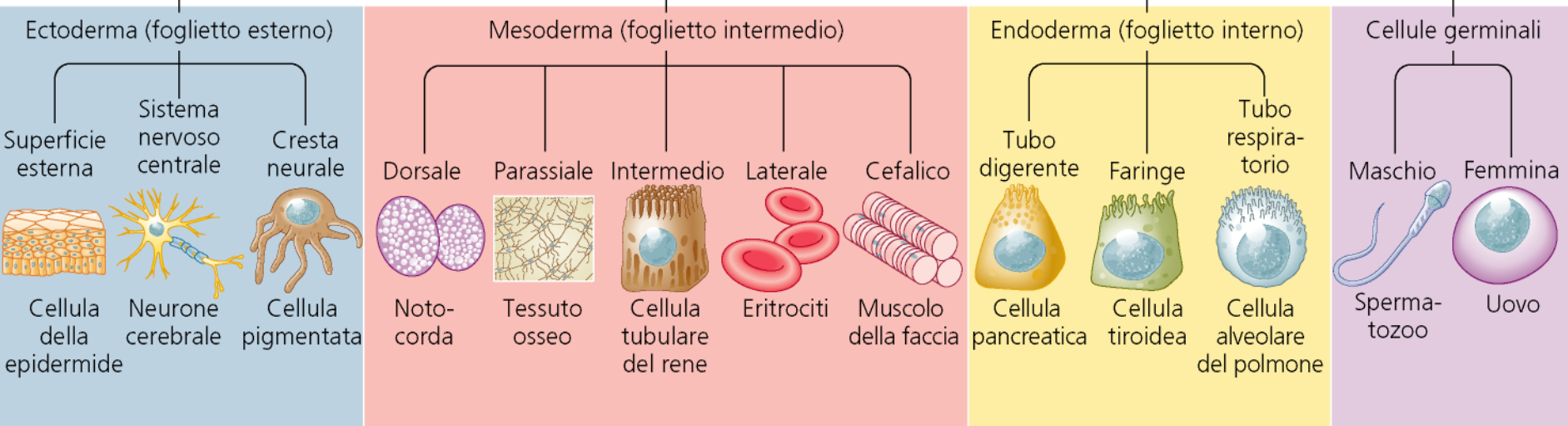
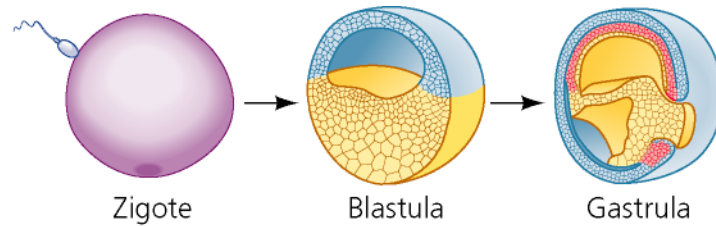
# Il differenziamento durante lo sviluppo embrionale....



Da una cellula uovo fecondata derivano tutte le diverse cellule che compongono l'organismo

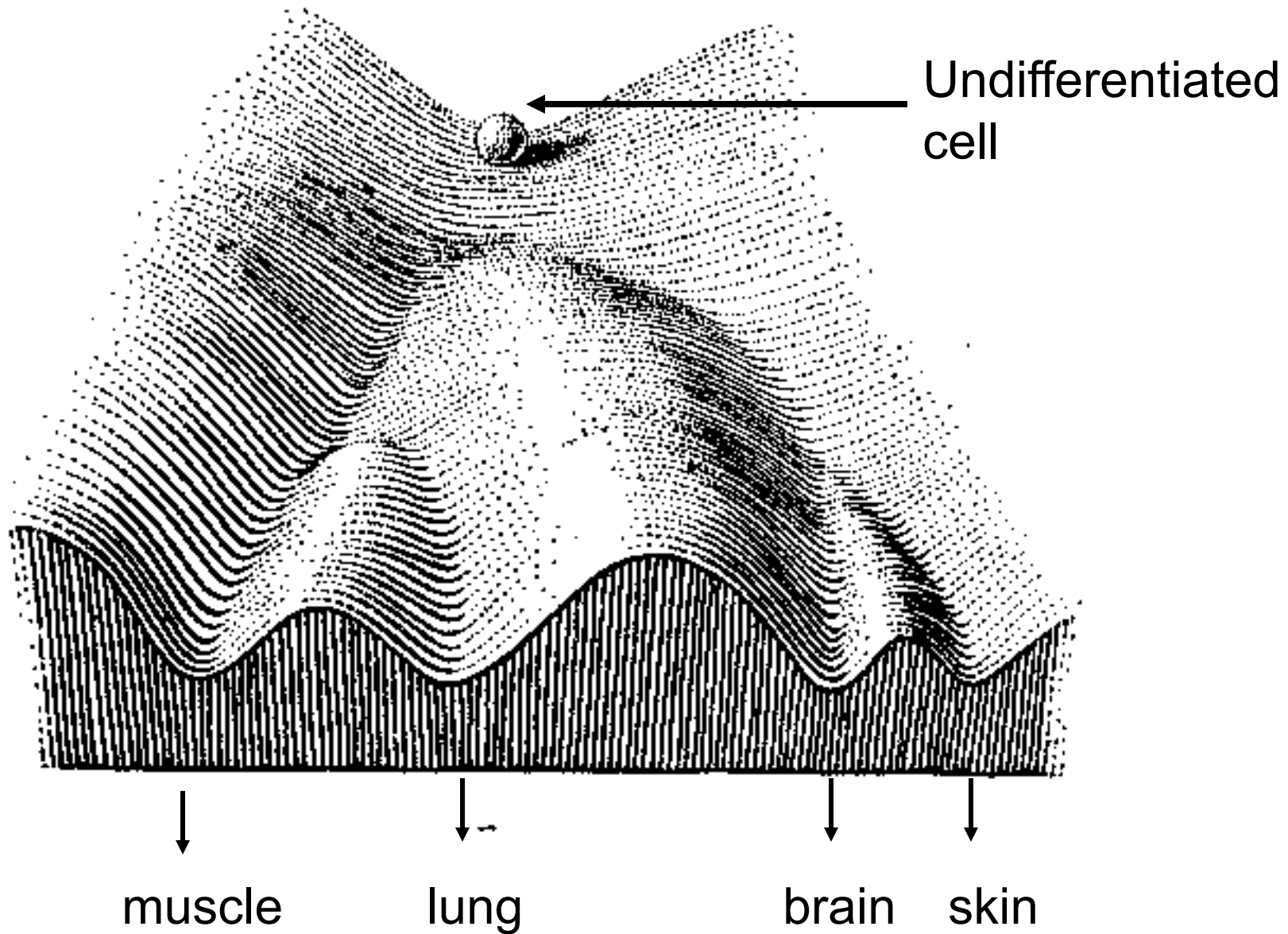


# Il differenziamento durante lo sviluppo embrionale



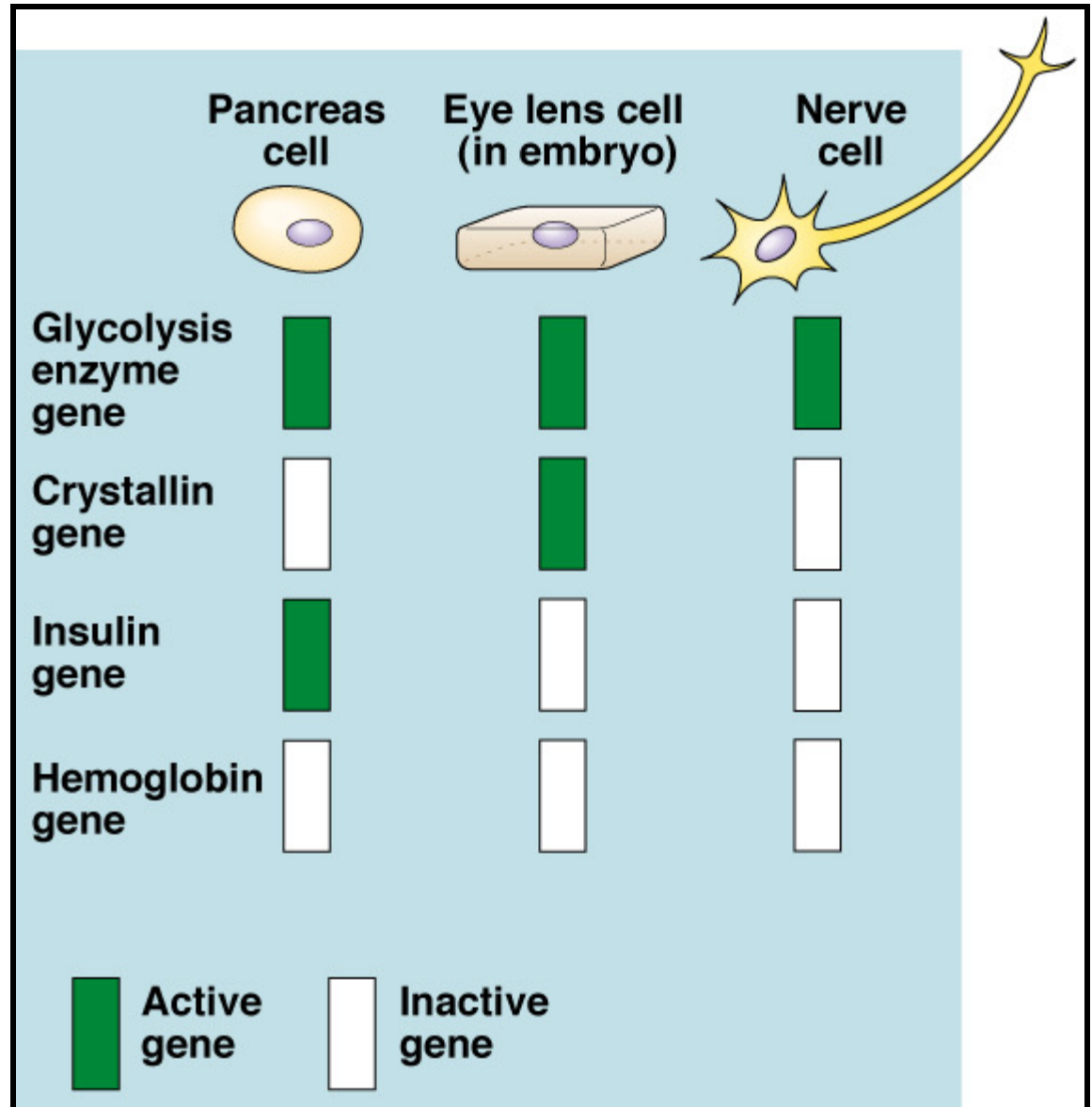
Durante lo sviluppo embrionale avviene l'accrescimento (proliferazione e crescita) e la generazione di tutti tipi cellulari

# Waddington's Developmental Landscape



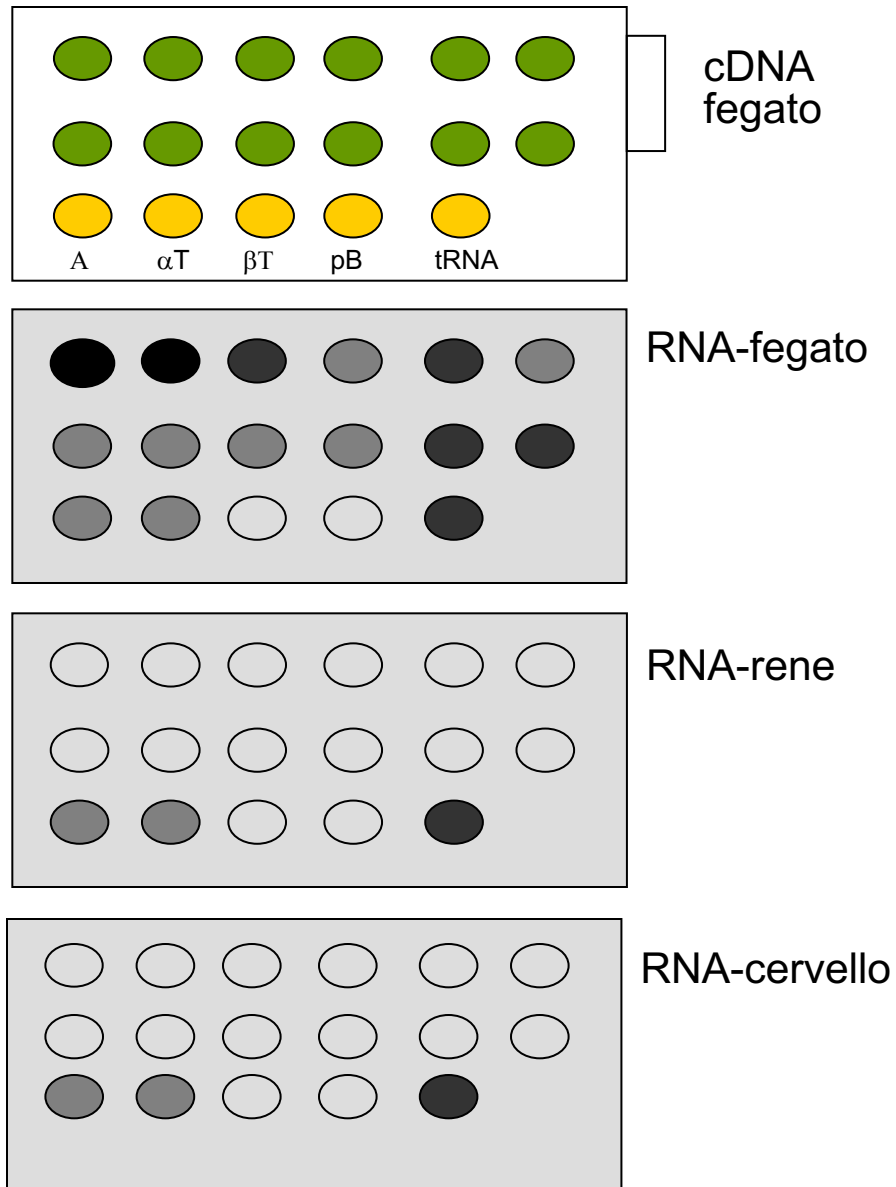
# Espressione genica selettiva

- Come si specializzano le cellule?
- Geni differenti sono attivati in tempi diversi durante lo sviluppo

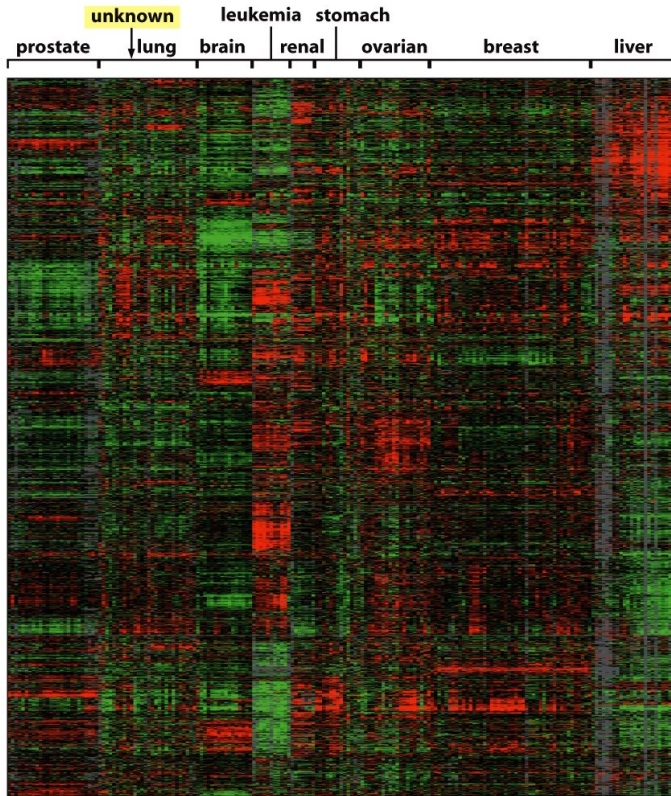


# ESPRESSIONE TESSUTO-SPECIFICA

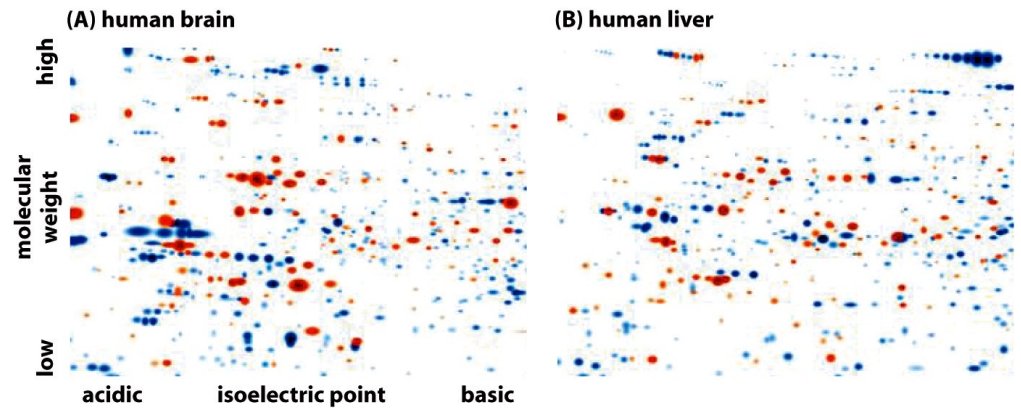
Controllo trascrizionale di una serie di geni all'interno dello stesso tessuto



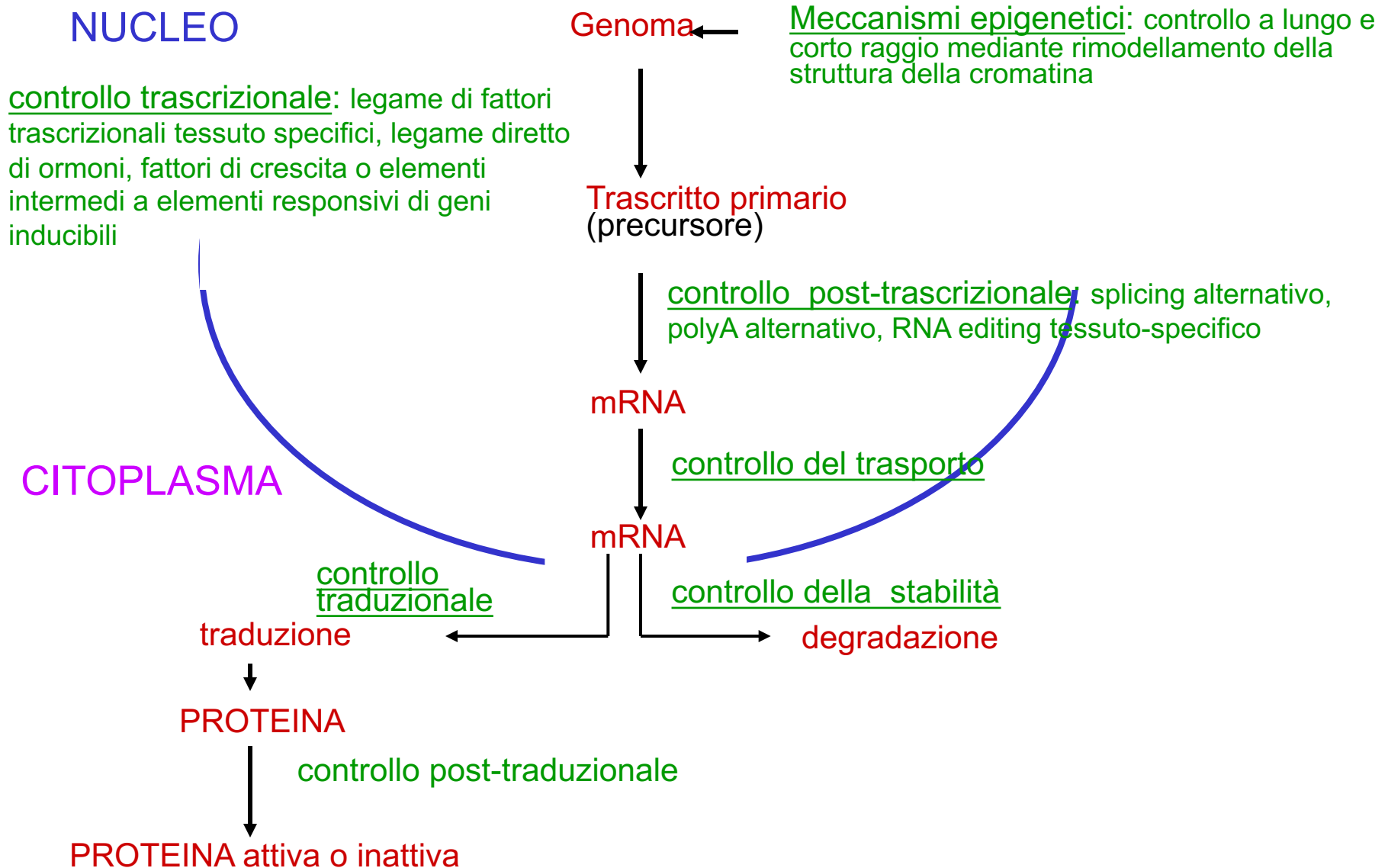
# mRNA differenzialmente espressi



# Proteine differenzialmente espresse



# Esistono molteplici livelli di regolazione dell'espressione genica negli eucarioti





# Controllo Genomico

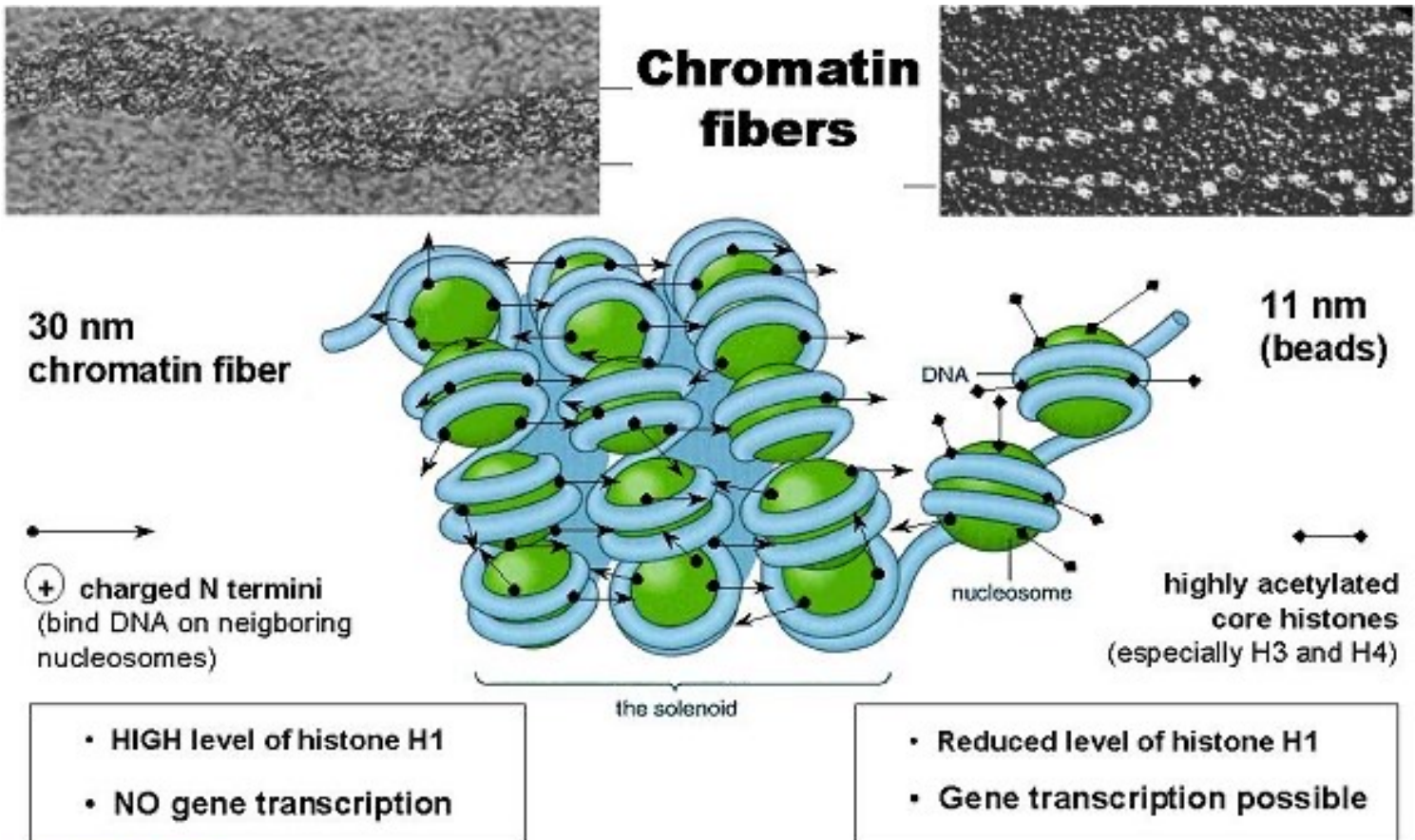
Decondensazione della cromatina e  
espressione genica

# Transcription and Chromatin Remodeling

- DNA in interphase cells still highly condensed by association with nucleosomes
- Inaccessibility to proteins can be demonstrated by nuclease sensitivity experiments
  - Inactive genes resistant to DNase
  - Active genes much more sensitive to DNase treatment
- Chromatin remodeling required to make the DNA accessible to transcription factors

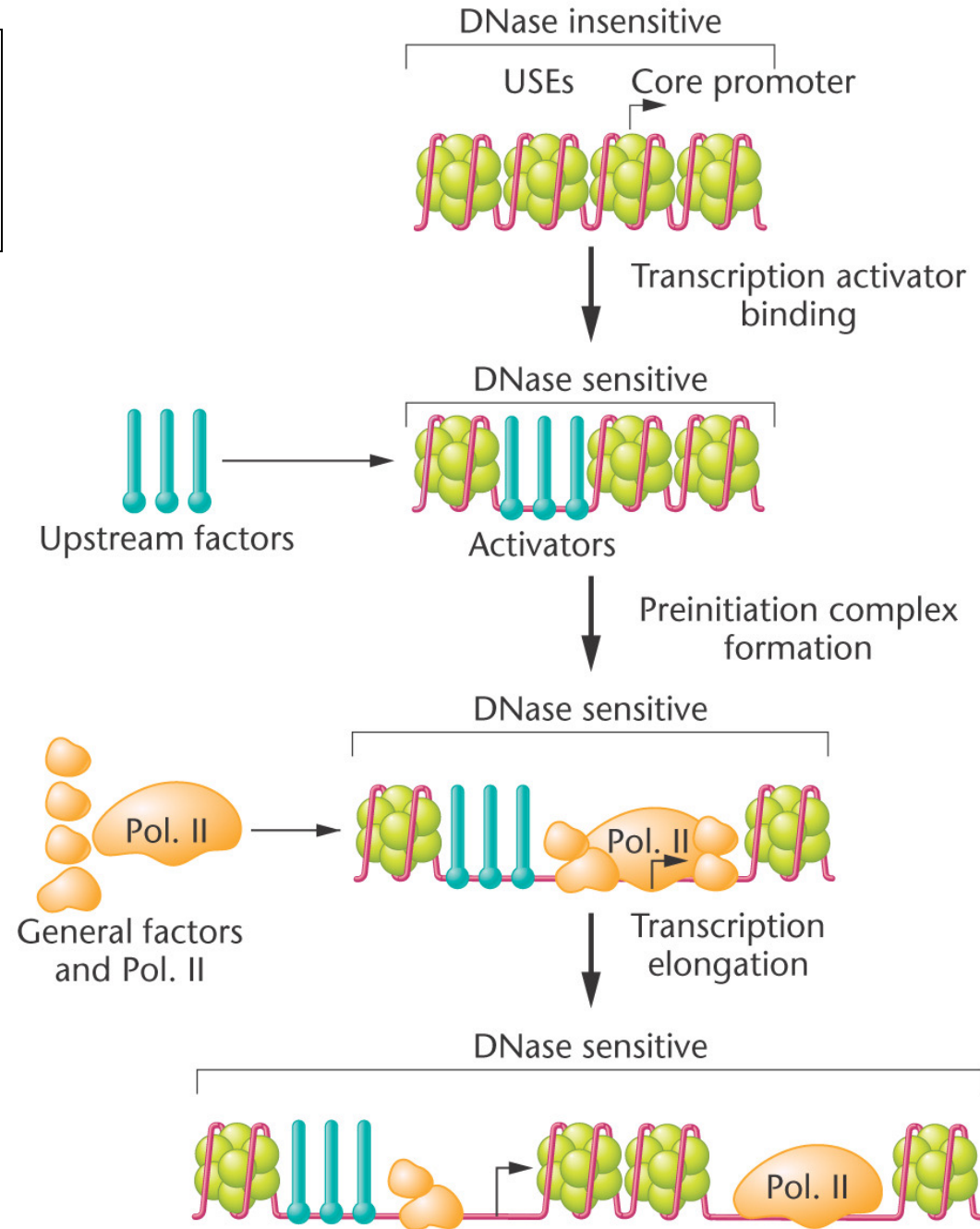
**Heterochromatin** – highly condensed, non-expressed DNA

**Euchromatin** – less condensed, accessible to transcription machinery, accessible to pancreatic DNase I

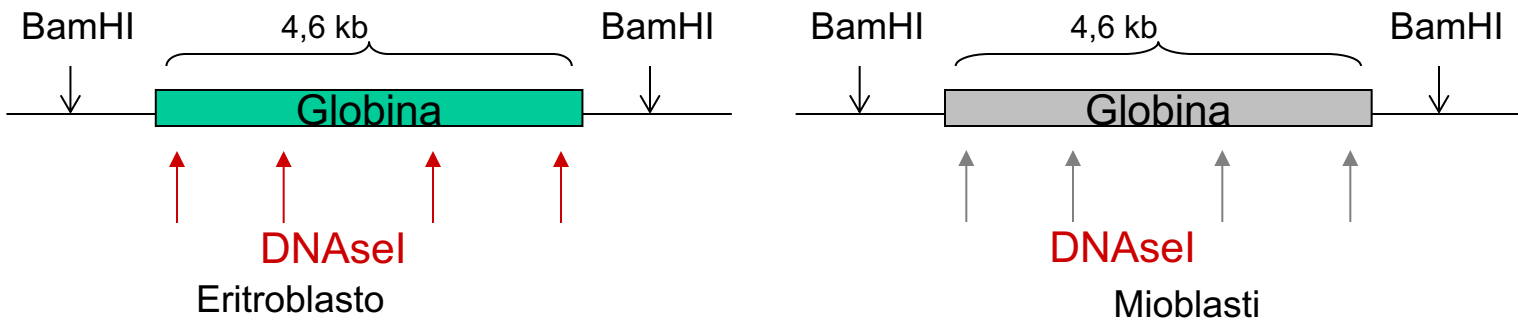


# Nucleosomes and Transcription

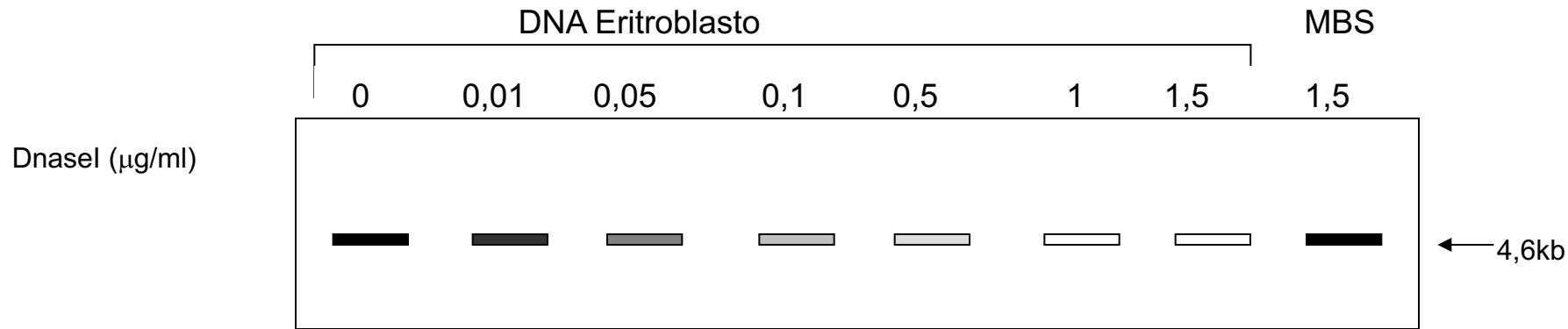
- Inactive genes resistant to DNase digestion
- Activation of genes increases their sensitivity to DNase



Negli eucarioti superiori i geni inattivi da un punto di vista trascrizionale hanno una struttura cromatinica meno accessibile

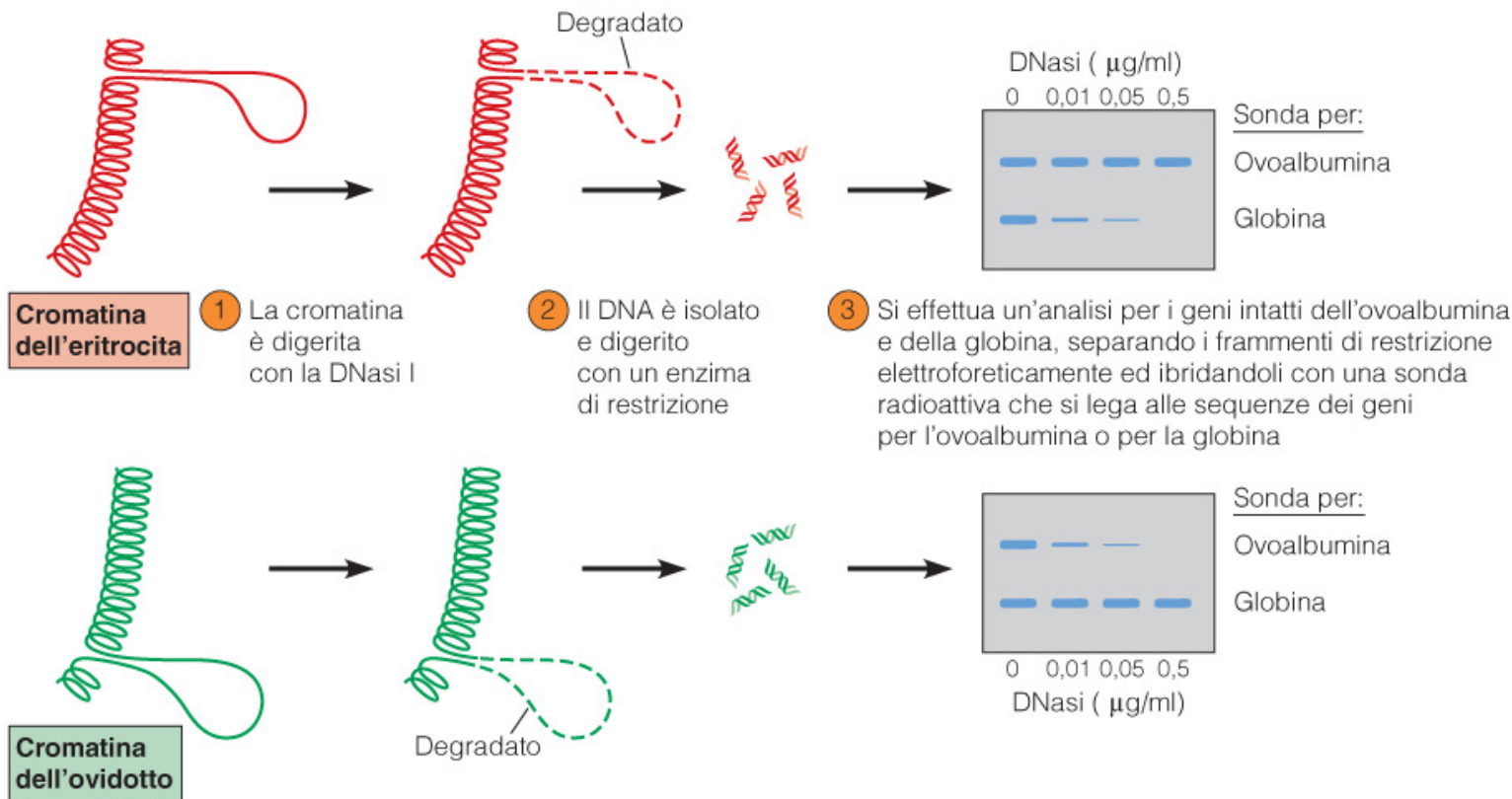


Isolamento dei nuclei e digestione con quantità crescente di Dnasil. Estrazione DNA, digestione con BamHI , Southern Blot ed ibridazione con globina



Geni attivi da un punto trascrizionale sono più suscettibili di quelli inattivi alla digestione con DNAsil

Sono in una conformazione cromatinica particolare che li rende più accessibili a DNAsil



**Figura 23-17 Sensibilità alla digestione con la DNasi I dei geni attivi presenti nella cromatina.**

La struttura della cromatina dei geni attivi può essere analizzata trattando i nuclei con la DNasi I. La DNasi I, una endonucleasi, digerisce il DNA con tagli ripetuti a livello dei legami fosfodiesterici interni. Però, il DNA presente nella cromatina condensata è protetto dalla digestione con l'enzima, probabilmente perché la struttura è molto spiralizzata e complessata con proteine. L'esperimento mostrato utilizza la cromatina estratta da due differenti tipi di cellule, eritrociti e cellule dell'ovidotto di pollo, e considera i geni della globina e dell'ovoalbumina, che sono espressi rispettiva-

mente in eritrociti e in cellule dell'ovidotto. Nel passaggio ①, la cromatina è digerita con una bassa concentrazione di DNasi I, che taglia preferenzialmente il DNA nelle regioni despiralizzate della cromatina. Nel passaggio ②, la componente proteica della cromatina è rimossa, mentre il DNA è purificato e digerito con un enzima di restrizione che rilascerà un frammento di DNA contenente un gene della globina o dell'ovoalbumina intatto (se non è stato tagliato dalla DNasi I). Infine, la presenza di un tale frammento di restrizione è messa in evidenza nel passaggio ③ separando elettroforeticamente i frammenti di DNA, trasferendo i frammenti separati su un filtro (Southern blot) ed ibridando con

la sonda per il gene della globina e dell'ovoalbumina. Il DNA isolato dalla cromatina degli eritrociti trattati con concentrazioni crescenti di DNasi I contiene quantità sempre più piccole del frammento di restrizione intatto del gene per la globina; risultati analoghi si ottengono per il gene dell'ovoalbumina nella cromatina delle cellule dell'ovidotto. Al contrario, anche le concentrazioni elevate di DNasi I non hanno alcun effetto sul gene della globina presente nella cromatina delle cellule dell'ovidotto o sul gene dell'ovoalbumina presente nella cromatina degli eritrociti. In altre parole, i geni sono più suscettibili all'attacco della DNasi I nei tessuti in cui sono attivamente trascritti.



# CROMATINA

- **EUCROMATINA** -> TRASCRIZIONE POTENZIALE

- a) geni housekeeping

- b) geni tessuto-specifici

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

Fornisce un meccanismo di compensazione:

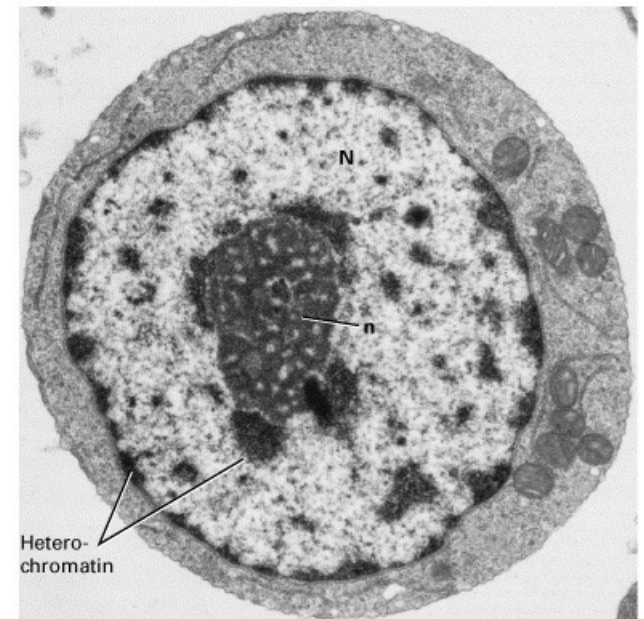
rapporto geni autosomici/geni X-linked

maschi = 2/1     donne = 1/1

- **ETEROCROMATINA COSTITUTIVA** ->

sempre inattiva; Localizzata nelle regioni

peri - e centromeriche



1 μm

I meccanismi epigenetici mascherano definitivamente le regioni cromosomiche che non devono mai essere trascritte, in nessun tipo cellulare.

I geni mappano tutti in regioni le cui caratteristiche generali possono essere definite inizialmente eucromatiche, nelle quali, ancora una volta, agiscono i meccanismi epigenetici per tenerle più o meno aperte e quindi più o meno disponibili ad interagire con i meccanismi di controllo trascrizionale. Durante il differenziamento alcune di queste regioni possono eterocromatizzare definitivamente.

La decondensazione della cromatina  
rappresenta un prerequisito  
dell'attivazione trascrizionale

## Meccanismi epigenetici

Fattori che vengono trasmessi alla progenie, ma che non sono direttamente attribuibili alla sequenza del DNA.

- Metilazione del DNA;

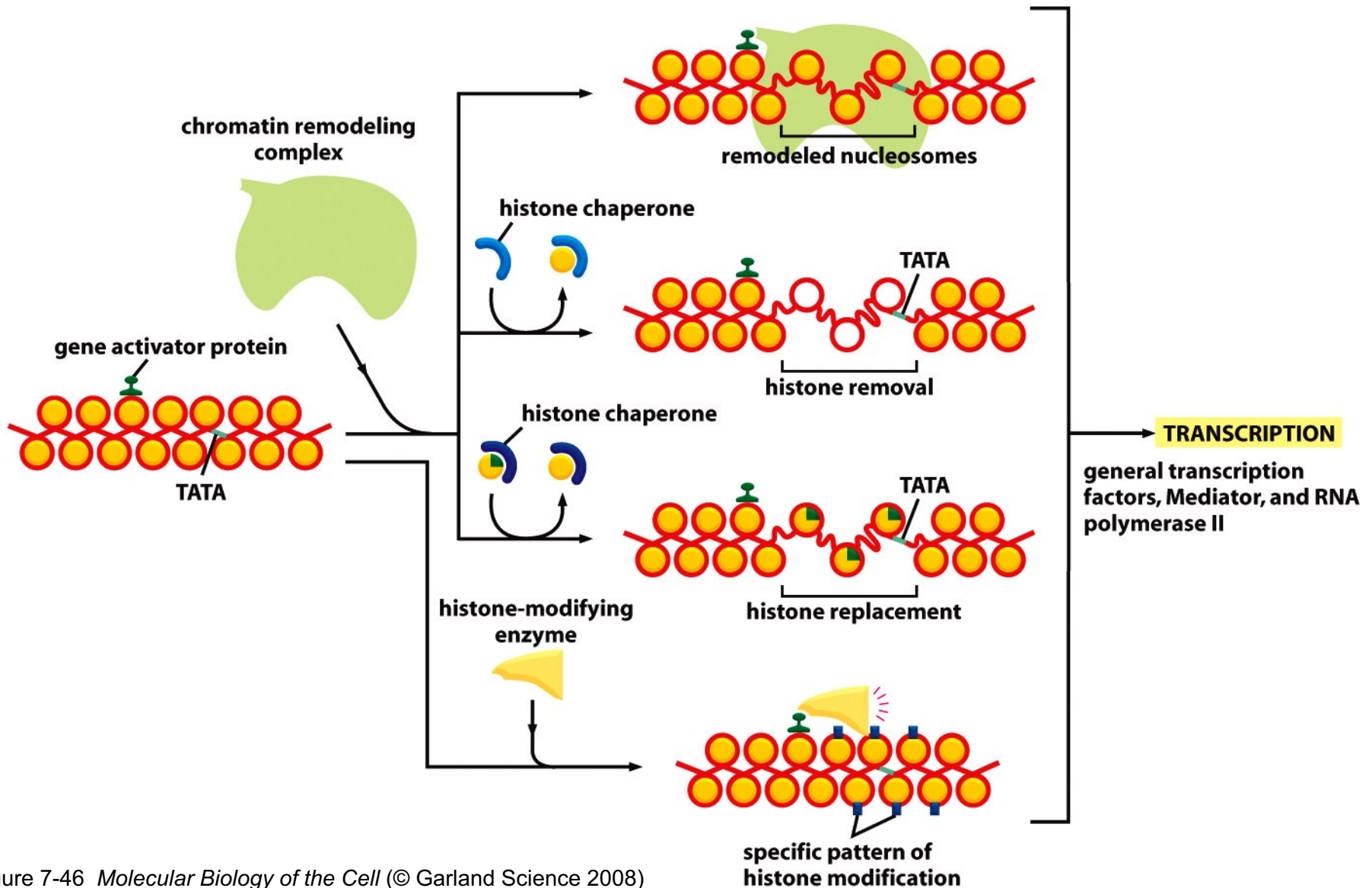
Nelle cellule eucariotiche la metilazione è a carico della C. In genere bersaglio della metilazione è la C della sequenza 5'CpG (circa il 3% delle C).

- Modificazioni degli istoni;

Acetilazioni, fosforilazioni e metilazioni, responsabili di cambiamenti conformazionali della cromatina.

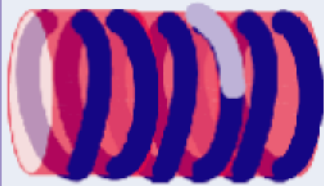
- Architettura del nucleo e territori cromosomici;

# Le modificazioni della cromatina coinvolte nell'attivazione dell'espressione genica sono diverse



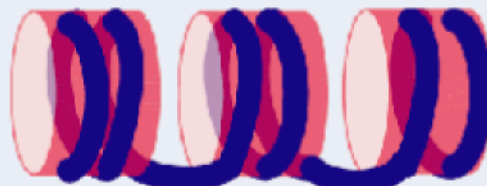
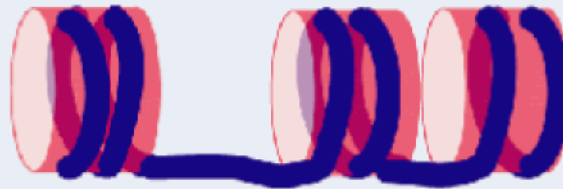
## Il rimodellamento cambia l'organizzazione dei nucleosomi

Scivolamento dei nucleosomi



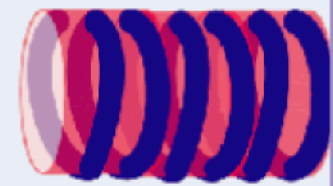
La sequenza cambia posizione

Modificazione della spaziatura



La spaziatura diventa uniforme

Spostamento del nucleosoma

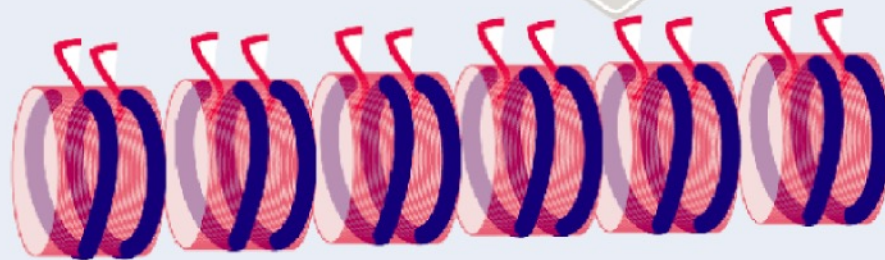


Interruzione di DNA libero



## La struttura della cromatina è stabile

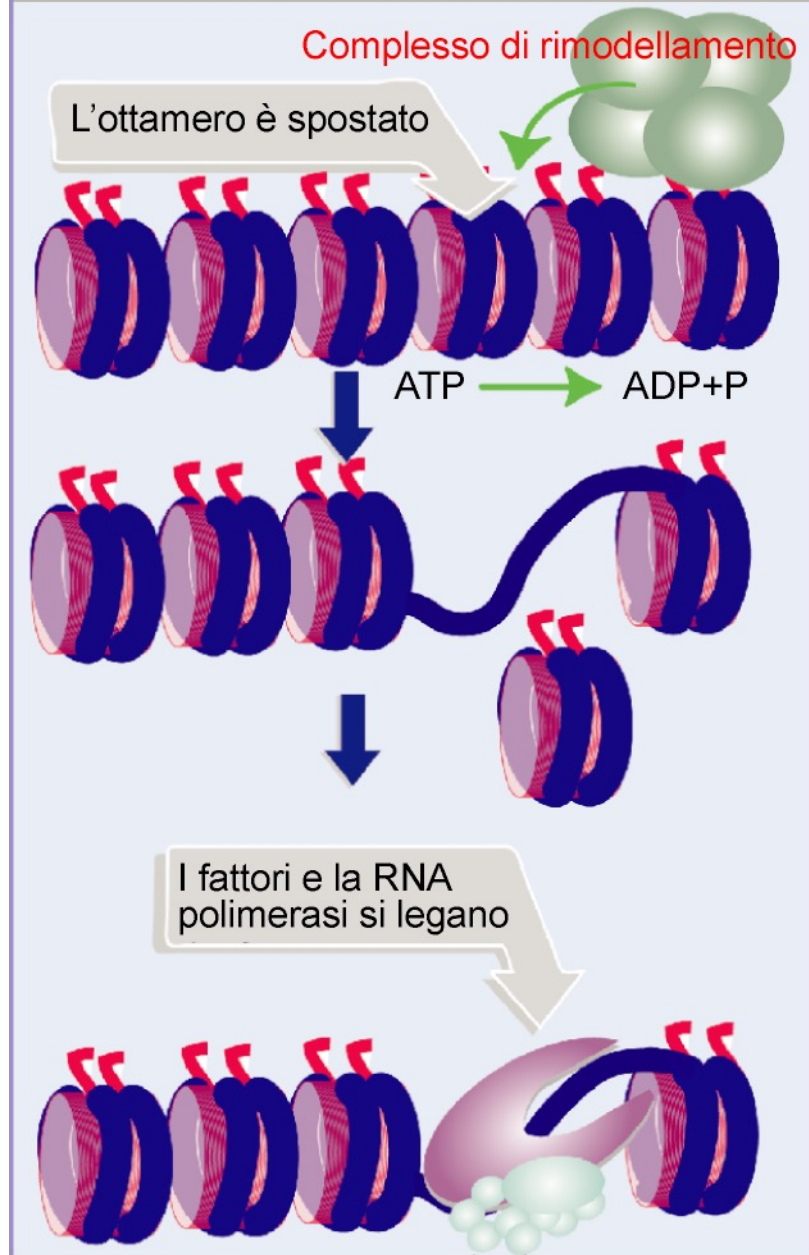
La RNA polimerasi e i fattori non possono accedere al DNA



Gli ottameri di istoni non possono accedere al DNA

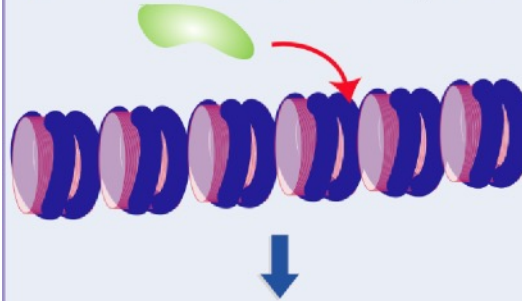


# Lo spostamento dei nucleosomi è un processo attivo

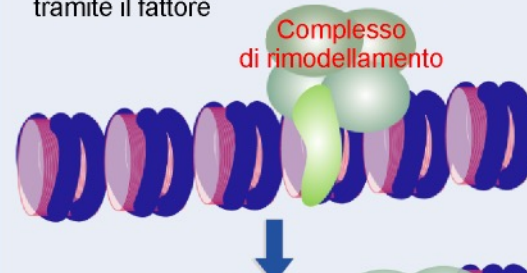


## I complessi di rimodellamento si legano tramite attivatori

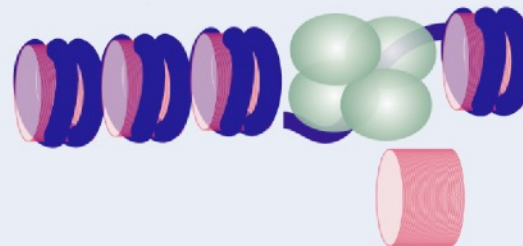
1 Il fattore sequenza-specifico si lega al DNA



2 Il complesso di rimodellamento si lega al sito  
tramite il fattore



3 Il complesso di rimodellamento sposta  
il nucleosoma



## Esistono diversi tipi di complessi di rimodellamento

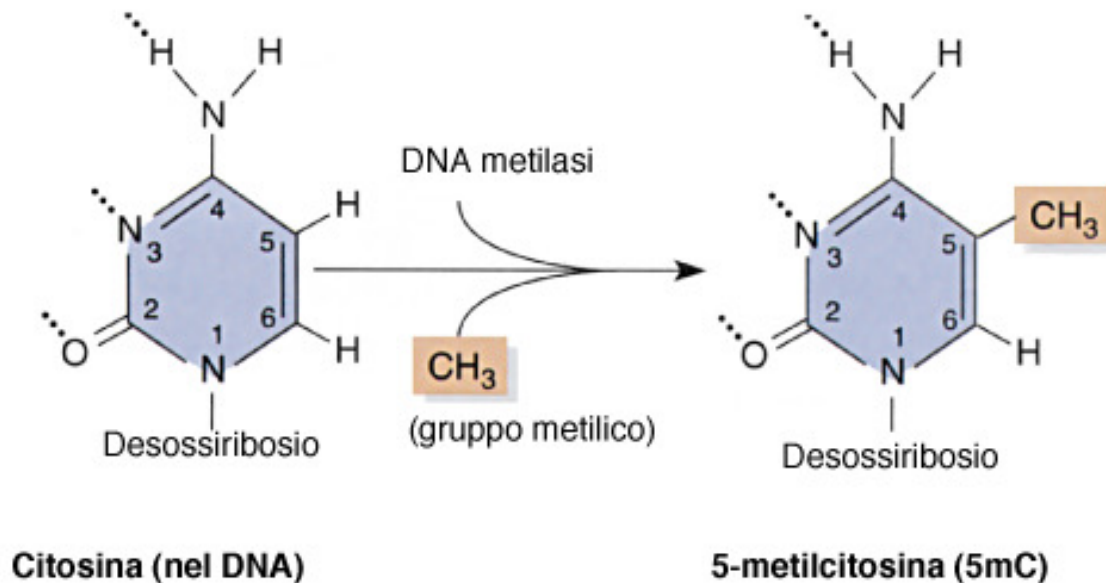
| Tipo di complesso | SWI/SNF              | ISW                        | Altro |
|-------------------|----------------------|----------------------------|-------|
| Lievito           | SWI/SNF<br>RSC       | ISW1<br>ISW2               |       |
| Mosca             | dSWI/SNF<br>(Brahma) | NURF<br>CHRAC<br>ACF       |       |
| Uomo              | hSWI/SNF             | RSF<br>hACF/WCFR<br>hCHRAC | NuRD  |
| Rana              |                      |                            | Mi-2  |

# Meccanismi epigenetici: metilazione del DNA

La metilazione del DNA è un processo post-replicativo. L'estensione delle modificazioni riguardanti la metilazione del DNA è fondamentalmente decisa durante lo sviluppo. La metilazione del DNA è quindi uno dei meccanismi correlati con il differenziamento cellulare, tramite l'inibizione dell'espressione genica a livello trascrizionale.

## Figura 17.5

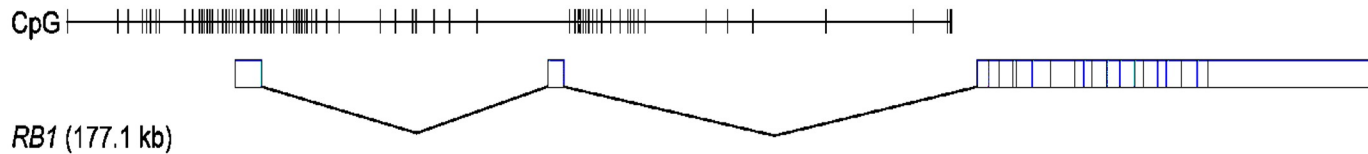
Produzione di 5-metilcitosina nel DNA per azione dell'enzima DNA metilasi.



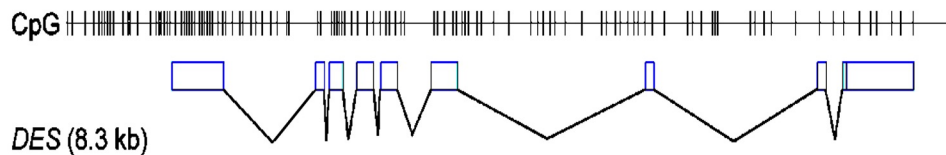
# Quali regioni sono bersaglio della metilazione?

- Nel genoma umano la frequenza della sequenza 5'CpG è inferiore del 20% rispetto all'atteso.
- I geni dei vertebrati attivamente trascritti sono "marcati" al 5' da "isole CpG". In queste regioni la frequenza di 5'CpG è uguale a quella attesa nel DNA totale.
- Nel genoma umano il 56% dei geni sono associati a isole CpG: tutti i geni housekeeping ed il 40% dei geni con espressione tessuto-specifica
- I geni tessuto-specifici sono metilati in CpG nei tessuti dove non sono espressi

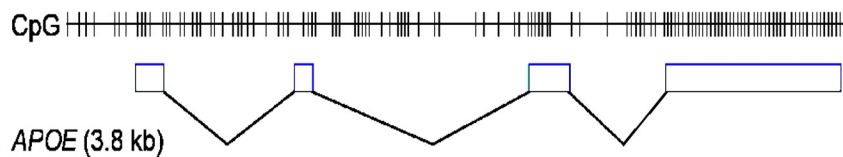
(A)



(B)



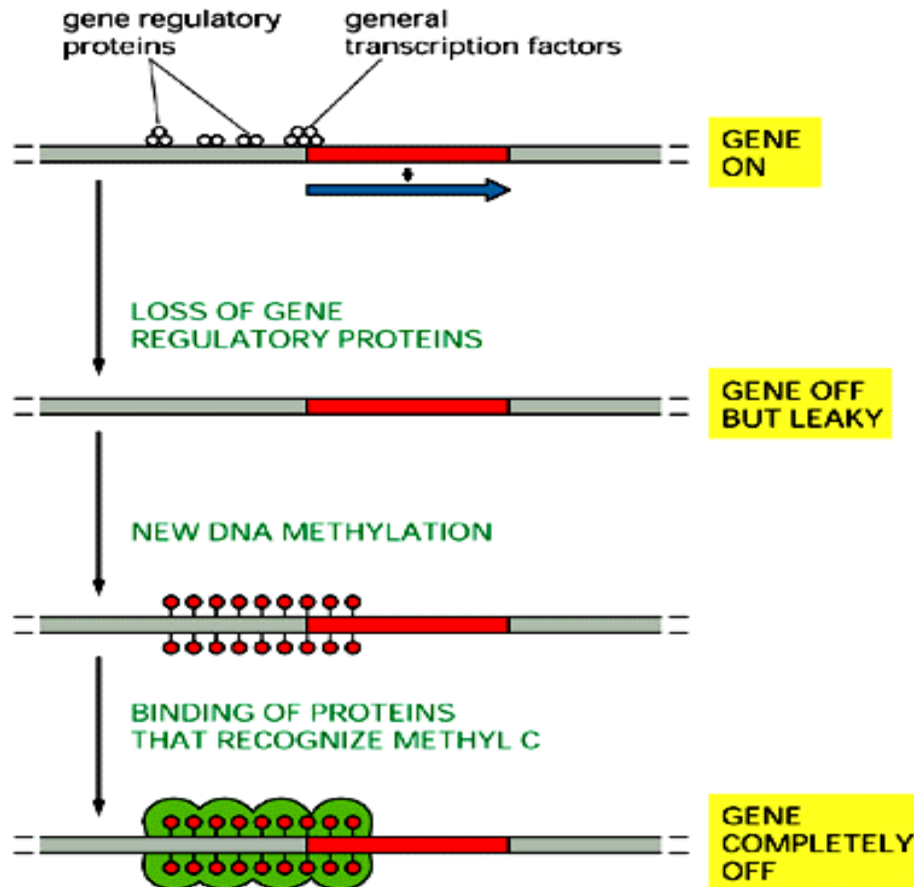
(C)



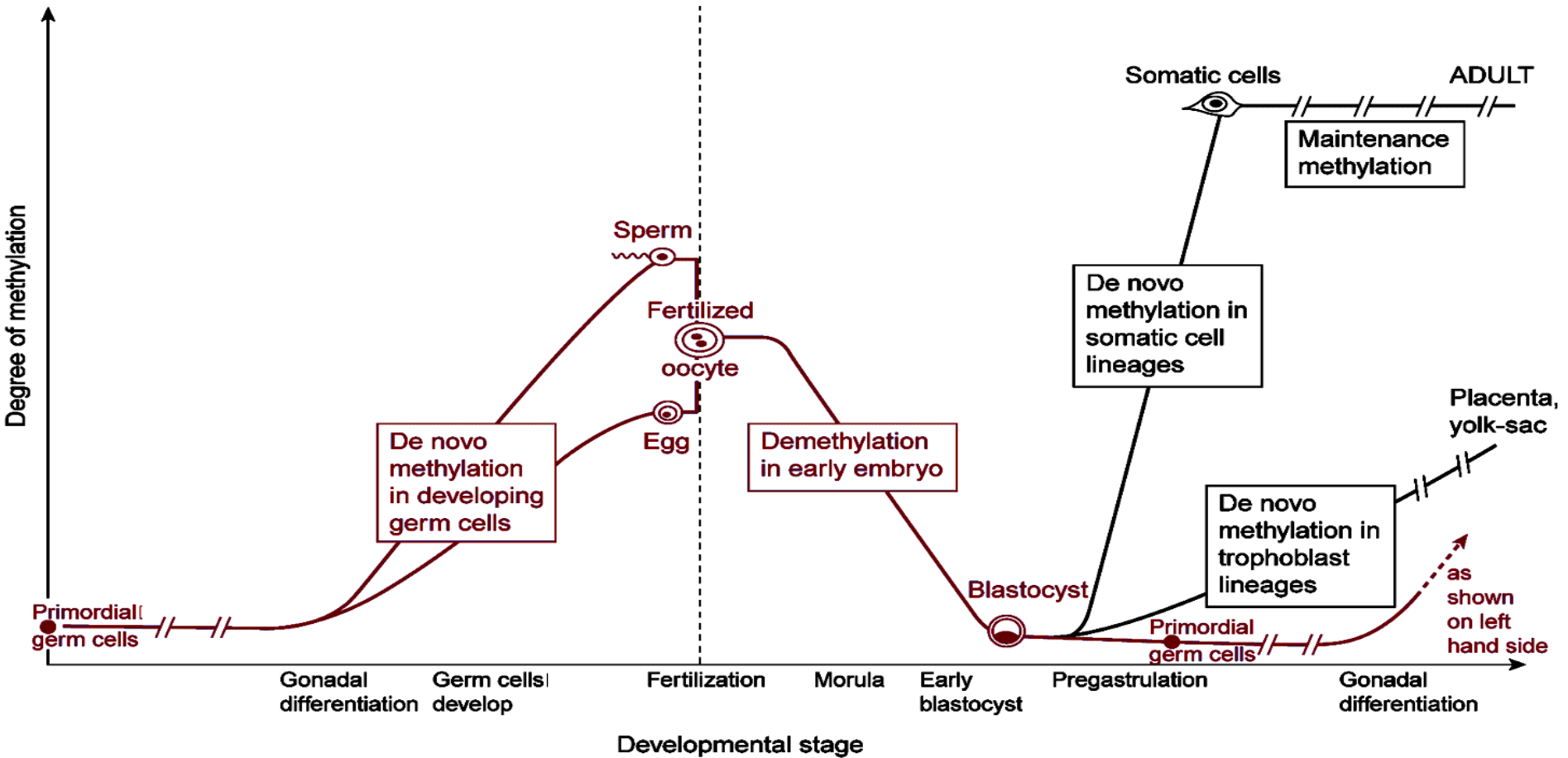


# METILAZIONE DEL DNA

Regola l'espressione genica -> la metilazione dei promotori inibisce l'espressione genica

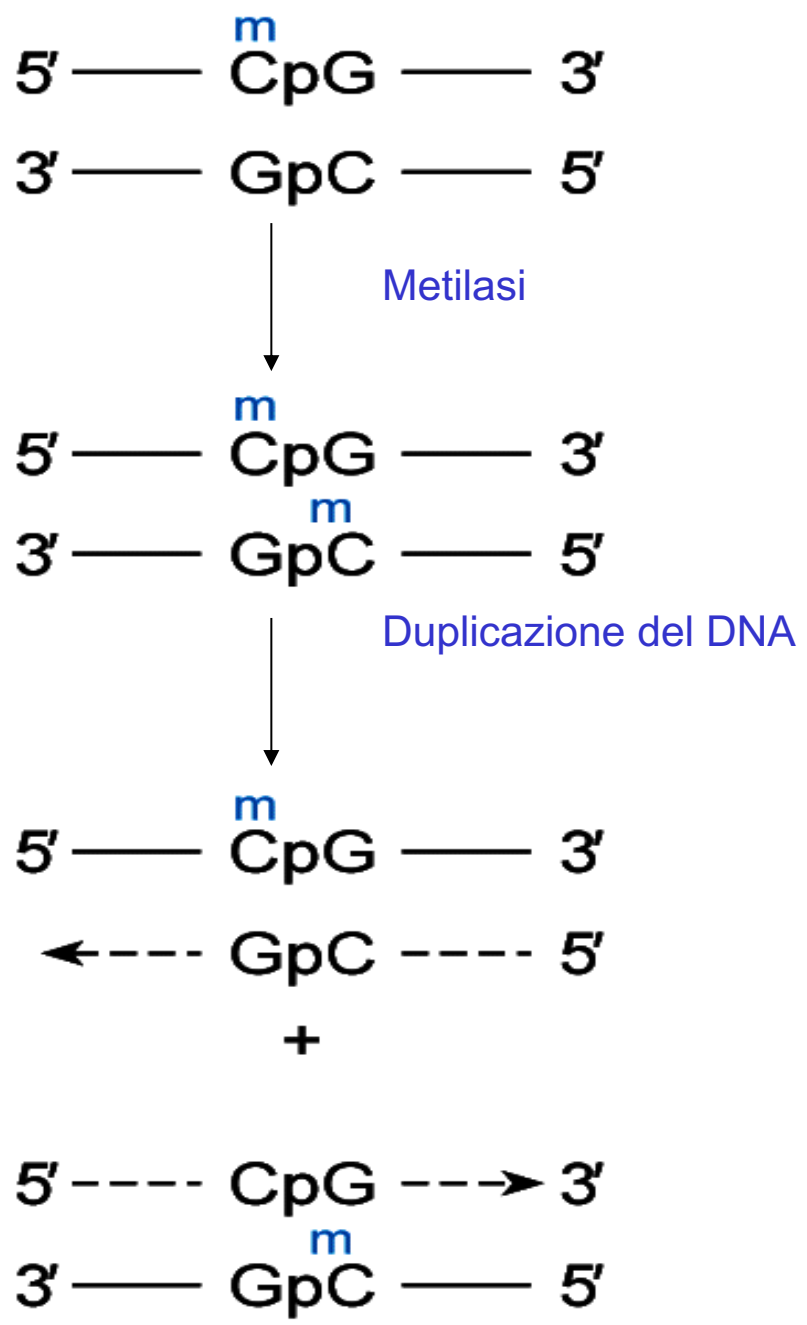


How DNA methylation may help turn off genes. The binding of gene regulatory proteins and general transcription factors near an active promoter prevents DNA methylation by some unknown mechanism. If most of these sequence-specific DNA-binding proteins dissociate, however, as generally occurs when a gene is turned off, the DNA becomes methylated, which enables other proteins to bind, and these shut down the gene completely.



Cambiamenti della metilazione del DNA durante lo sviluppo dei mammiferi

Il mantenimento della metilazione di CpG avviene grazie a metilasi specifiche che riconoscono, dopo la duplicazione del DNA, le sequenze emi-metilate (Dmt-1)



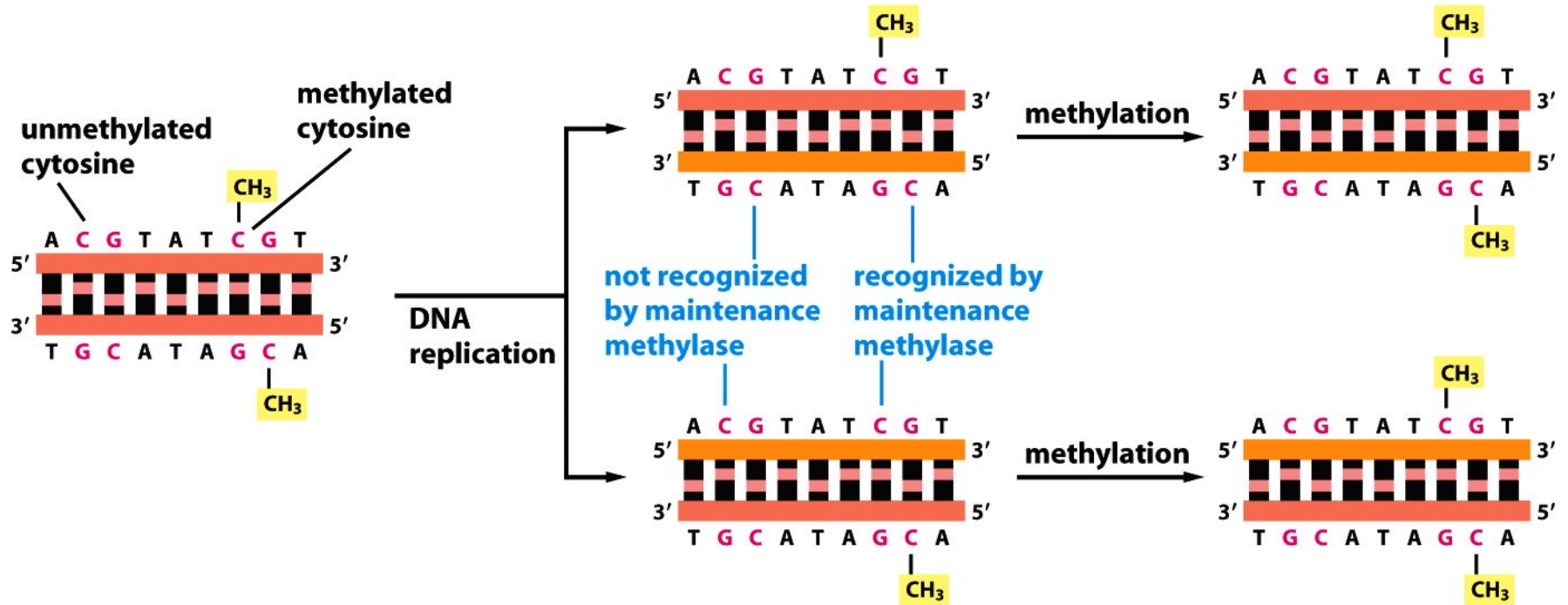


Figure 7-80 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

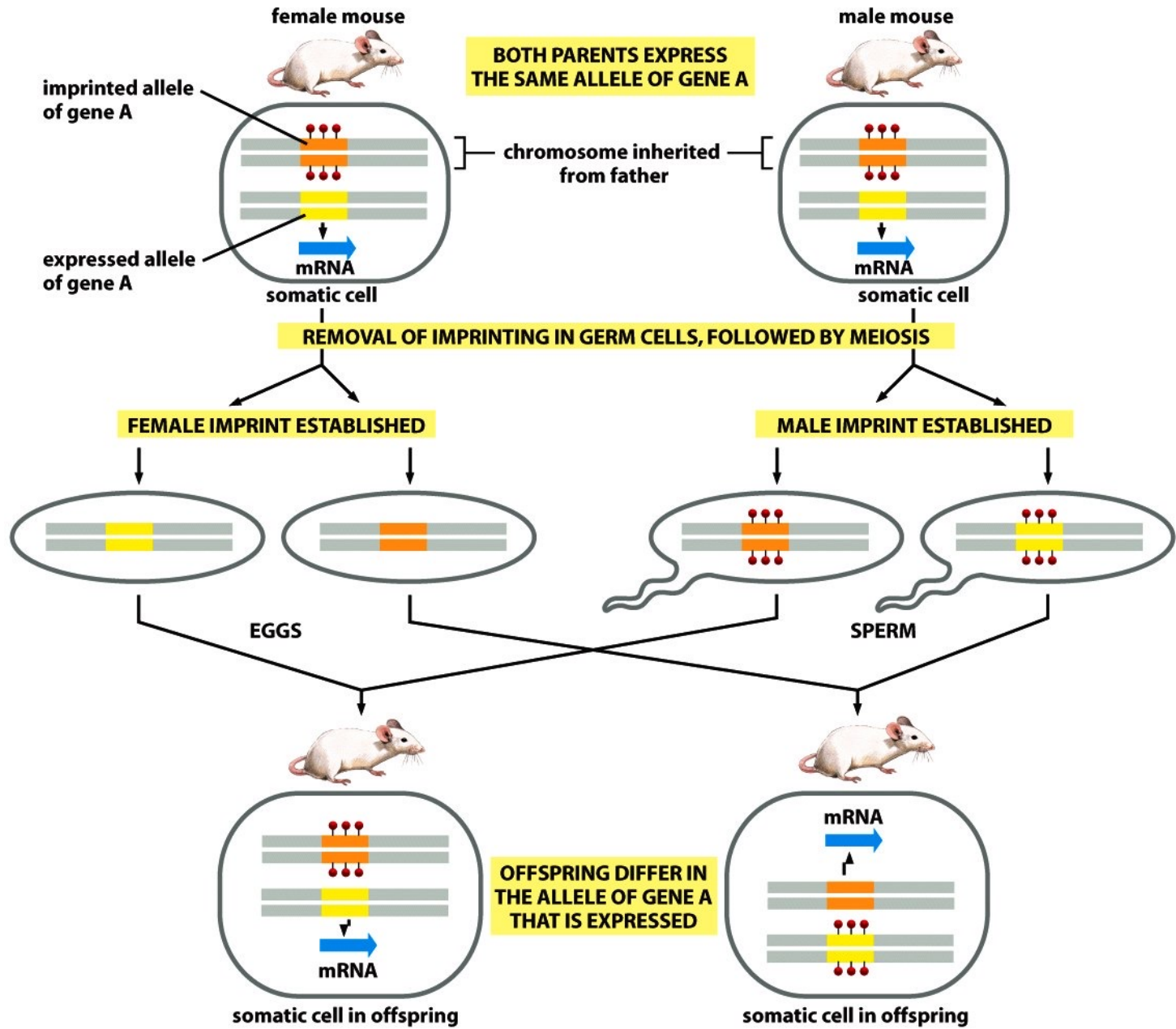
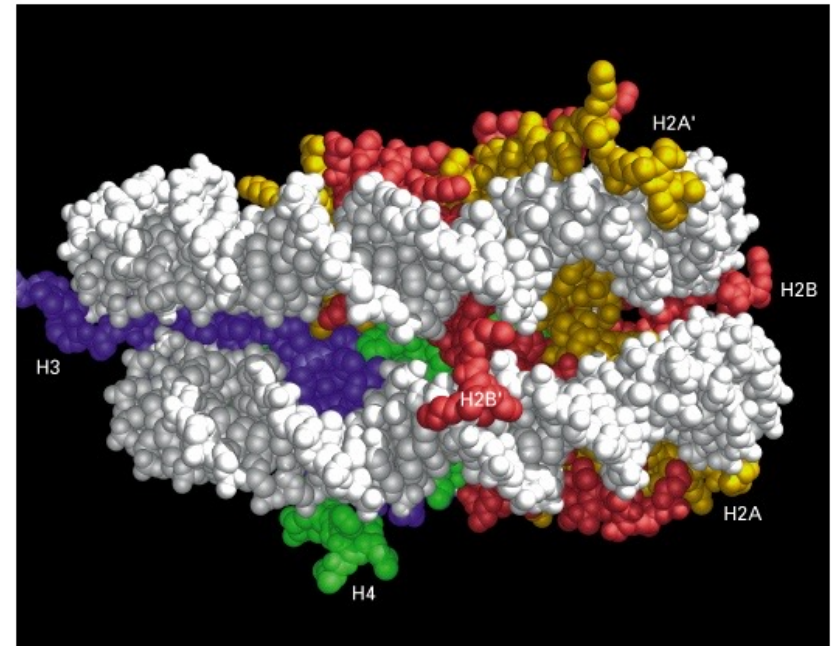


Figure 7-82 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

# 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.

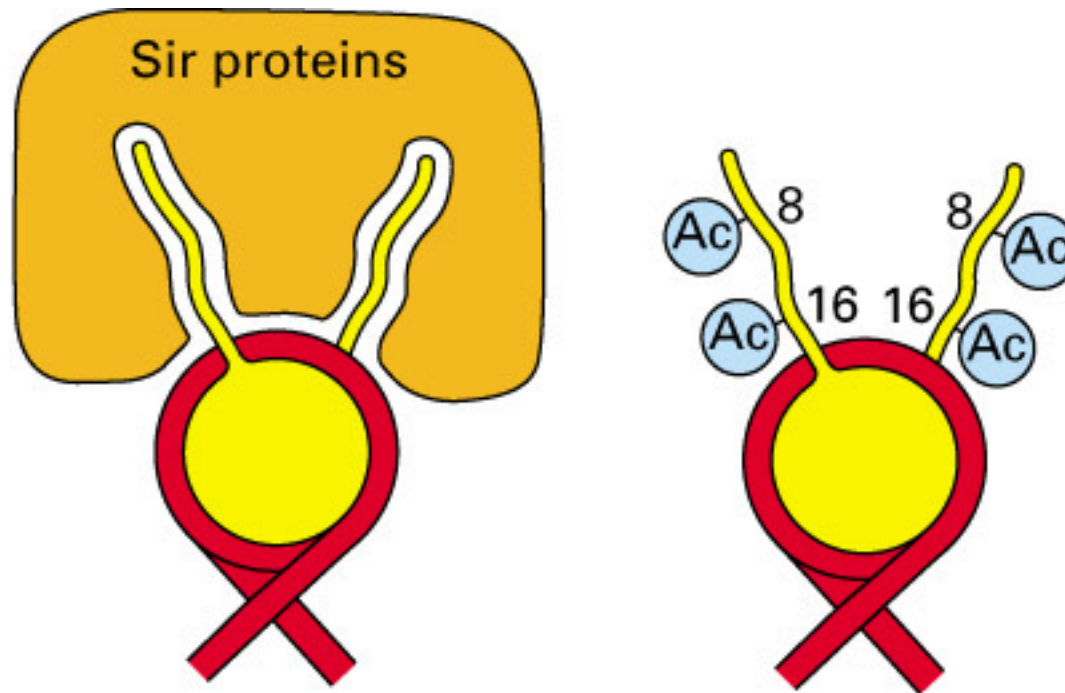
Queste regioni sono particolarmente ricche in lisina (K) che può essere reversibilmente modificata mediante acetilazione, fosforilazione e metilazione.





Le modificazioni delle code istoniche sono importanti per l'assemblaggio di fattori di eterocromatinizzazione.

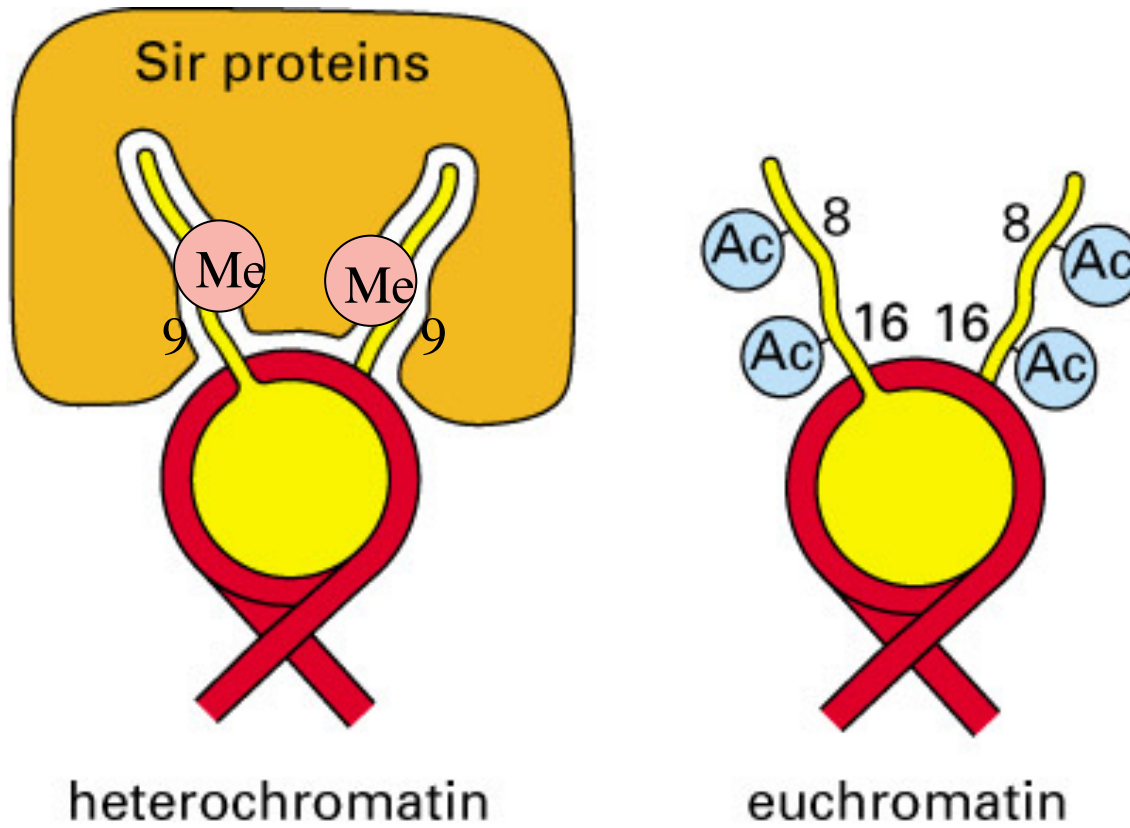
In lievito, le proteine SIR si legano alla coda di H4 non acetilata



heterochromatin  
(A)

euchromatin

Nelle cellule umane, la proteina HP1 si lega alle code dell'istone H3, metilato a livello della lisina 9

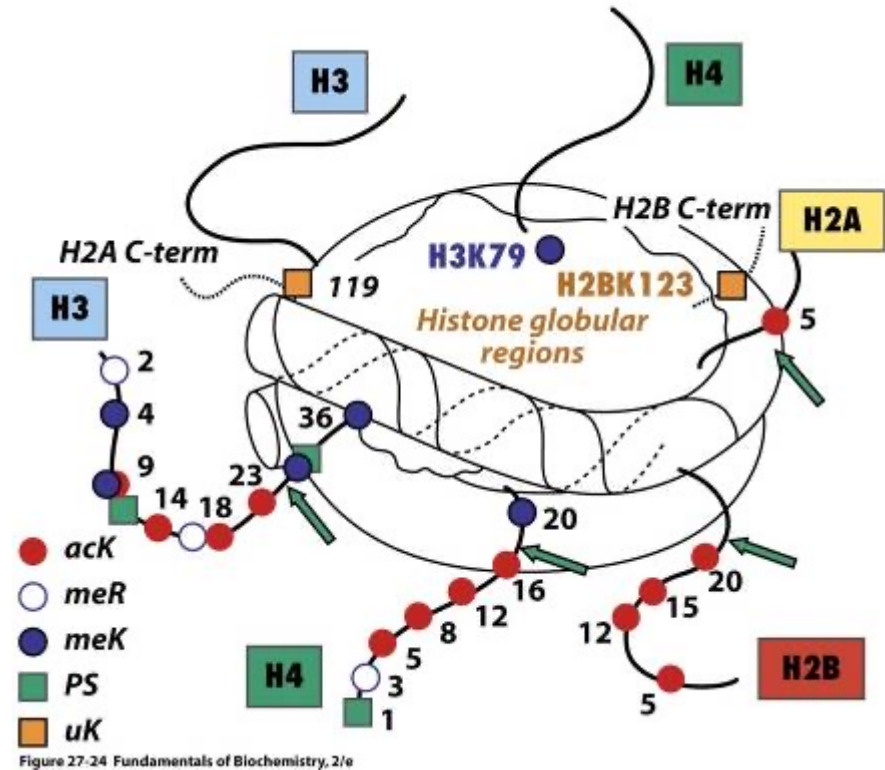


(A)



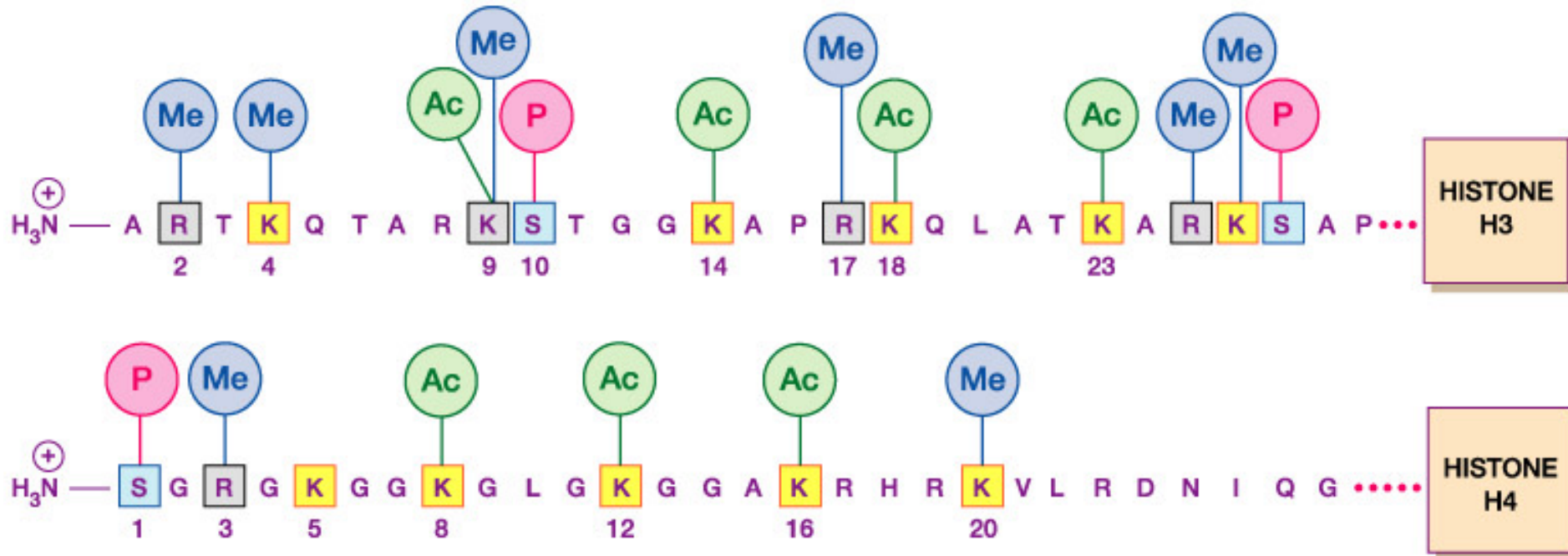
# Covalent modification of histones

- N –terminal tails are covalently modified – postraslational modifications
  - Lys: **acetylated** and **methylated**, **ubiquinated**
  - Arg: **methylated**
  - Ser, Thr – **phosphorylated**
- Modifications (except methylation) removes positive charge => decreases electrostatic interactions between DNA and histones=> promotion decondesation of nucleosome
- Methylation => increases hydrophobicity => promotes condensation

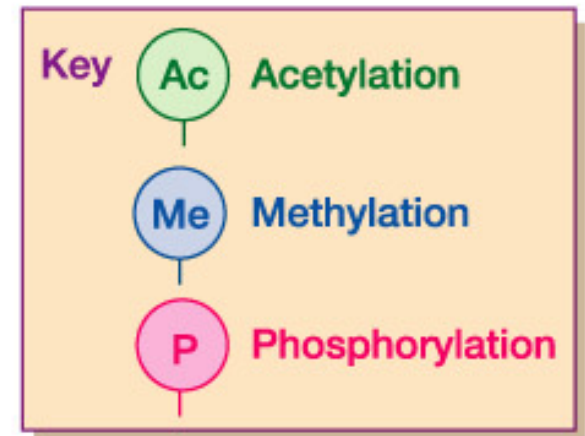


Modified histone tails interact with chromatin associated nonhistone proteins => modulation of the gene accessibility

# Modificazioni degli istoni H3 e H4

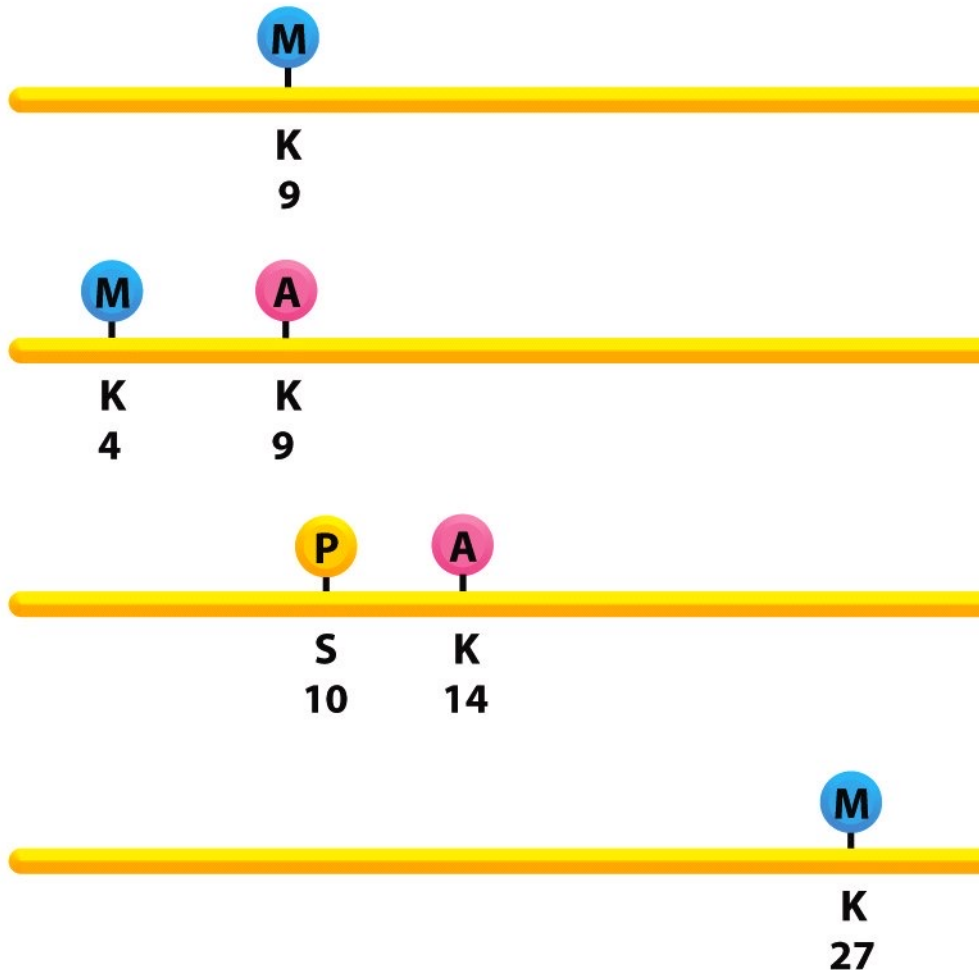


La lisina 9 di H3 (k9H3) può essere sia acetilata che metilata. L'acetilazione è associata alla cromatina trascrizionalmente attiva, ma se la regione cromatinica viene metilata a livello del DNA (CpG), le proteine che si legano al DNA metilato richiamano le deacetilasi istoniche, che rimuovono i gruppi acetile e le metil transferasi istoniche, legate alle CpG binding protein, metilano gli istoni. Il risultato è la condensazione della cromatina.



**modification state**

**“meaning”**



**heterochromatin formation,  
gene silencing**

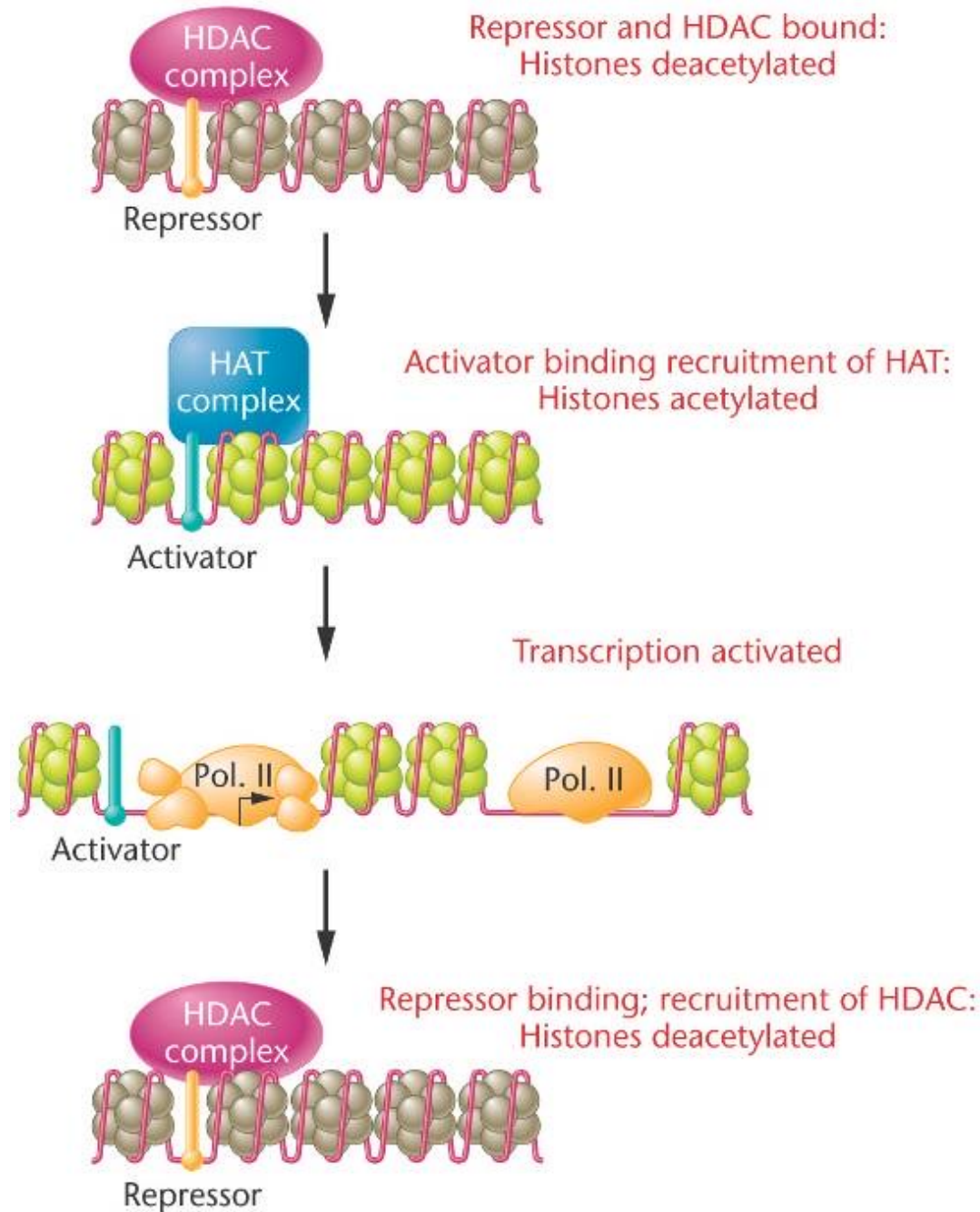
**gene expression**

**gene expression**

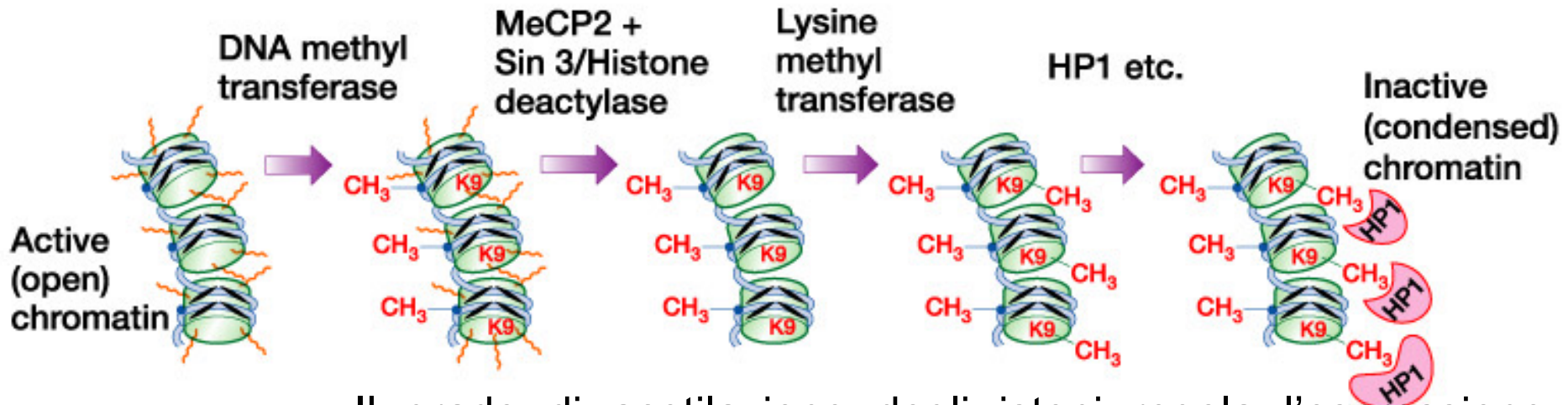
**silencing of Hox genes,  
X chromosome inactivation**

# HAT and HD

- Actions of HDAC and HAT complexes under control of activating and repressor transcription factors



# L'acetilazione degli istoni è associata al controllo dell'espressione genica in interfase.



**Key**  
Acetyl tail

Il grado di acetilazione degli istoni regola l'espressione genica.

Gli istoni acetilati hanno un'affinità ridotta per il DNA, quindi la cromatina è più aperta.

La repressione delle sequenze CpG metilate nei promotori è legata a due proteine che si legano a CpG metilati ed attivano la deacetilazione degli istoni.



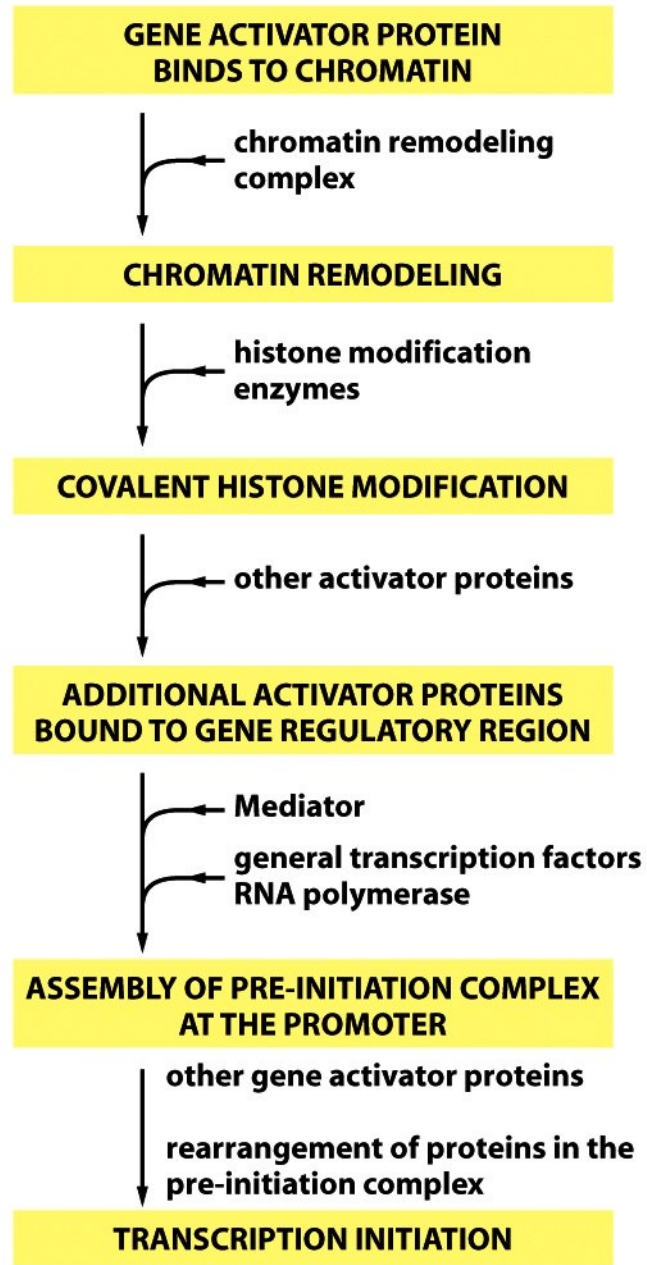


Figure 7-49 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

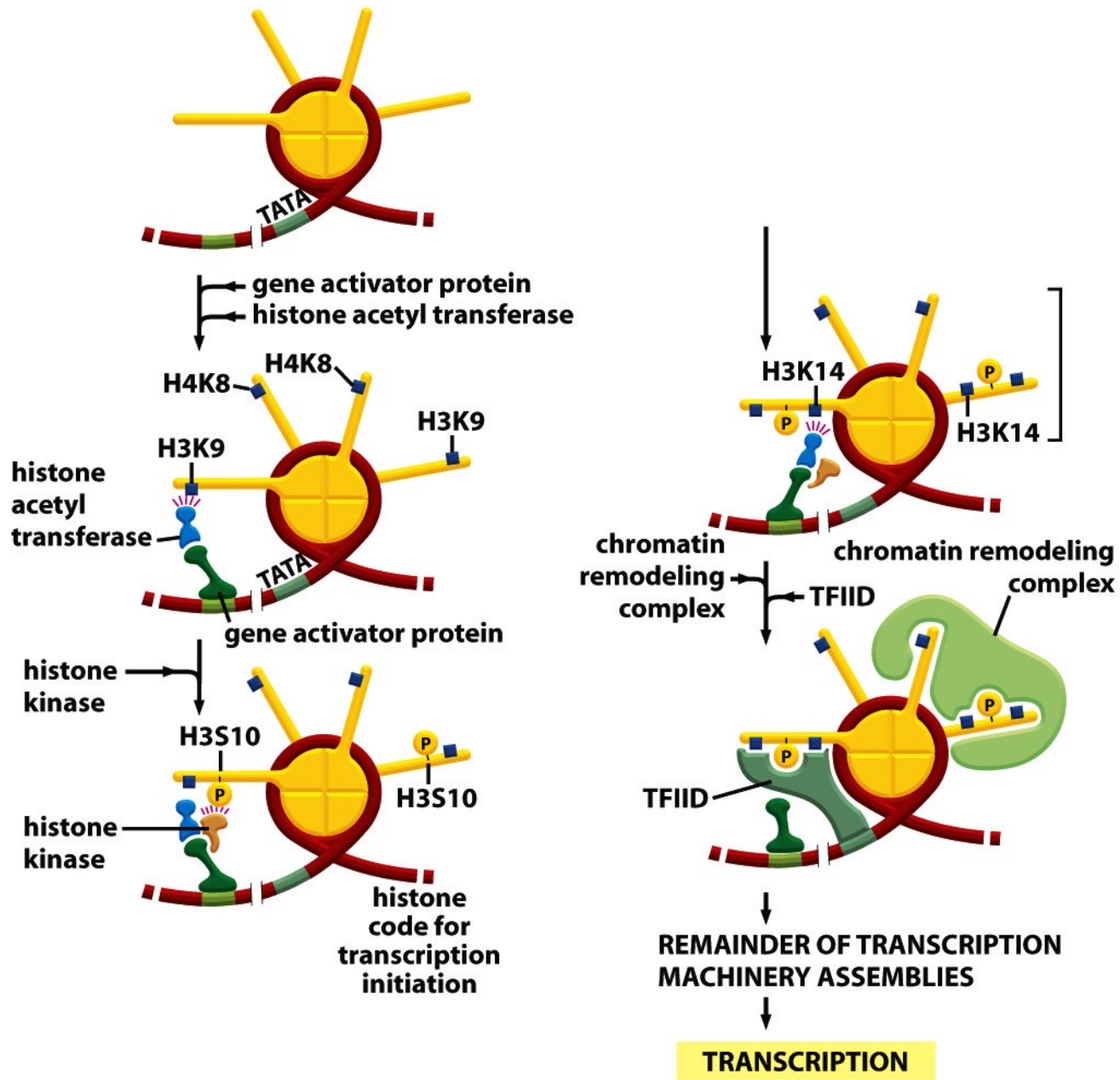
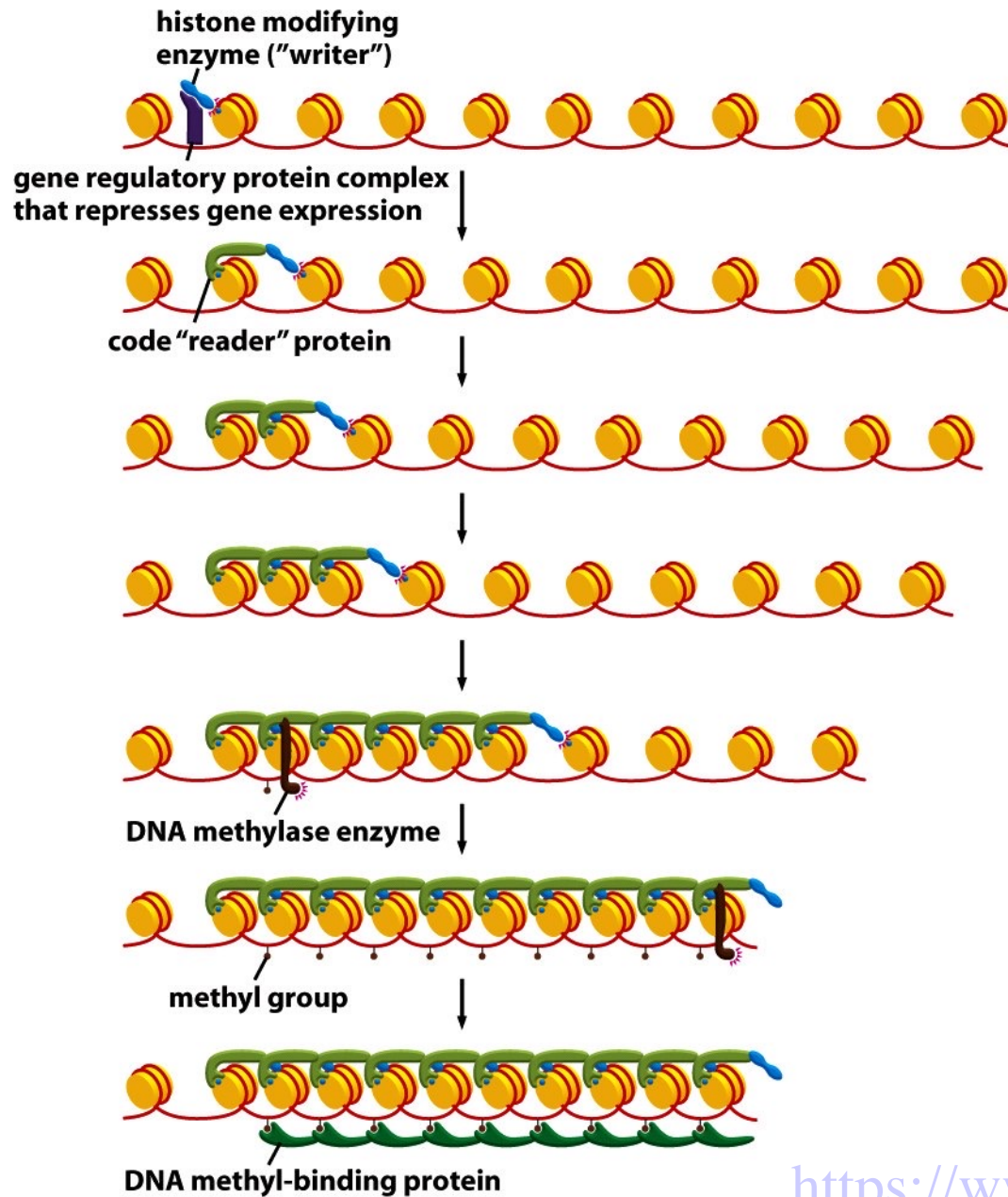


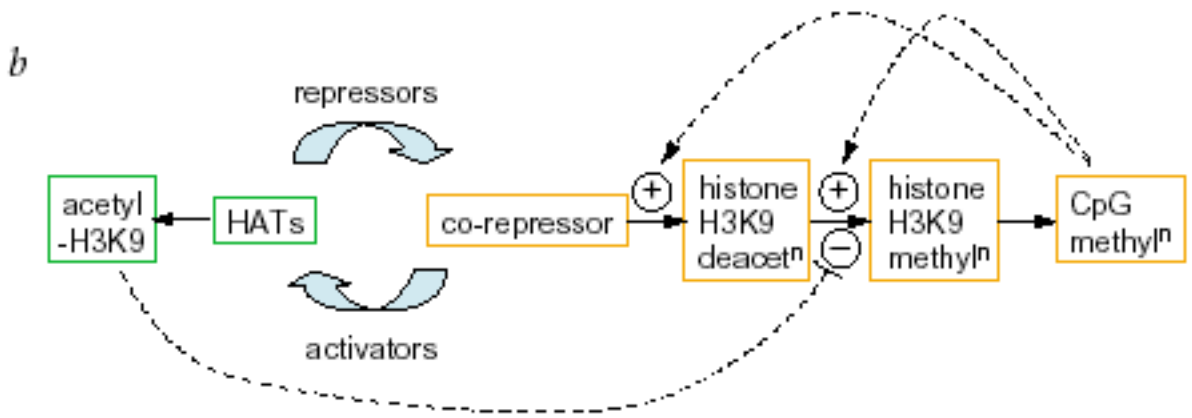
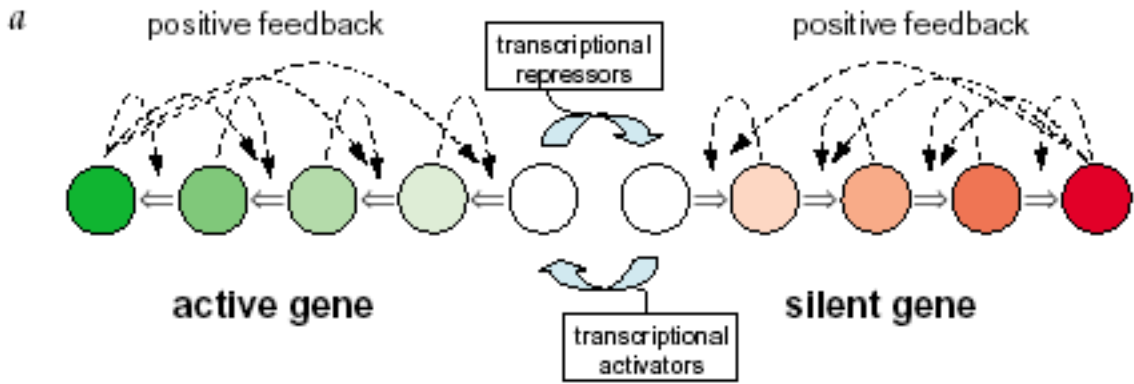
Figure 7-47 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)





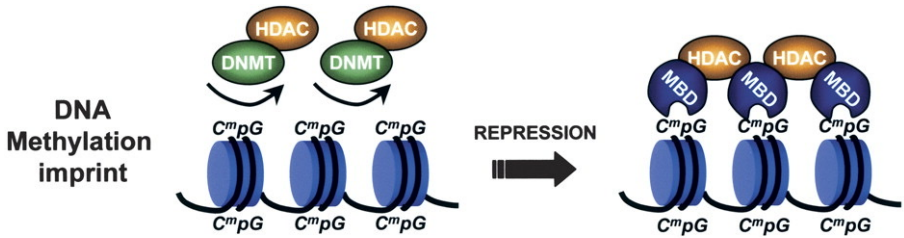
<https://www.jove.com/it/embed/player?id=11538&t=1&s=1&fpv=1>

Figure 7-81 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



La metilazione delle CpG, richiama delle CpG binding protein che a loro volta, sono associate a delle metil transferasi istoniche in grado di metilare gli istoni e delle deacetilasi che rimuovono i gruppi acetile. Il risultato è la condensazione della cromatina.

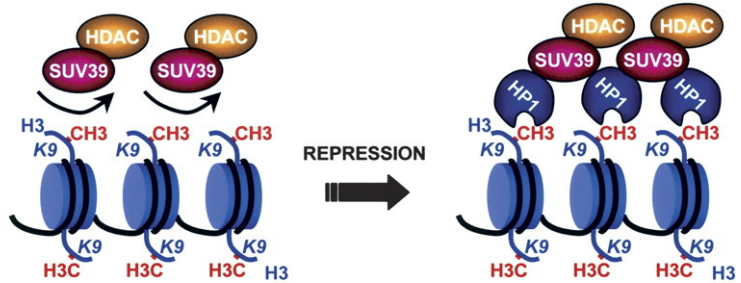
# Esempi di complessi proteici coinvolti nella regolazione epigenetica



DNA Methylation imprint

REPRESSION

Histon methyltransferase  
Trimetila H3K9  
SUV39 imprint

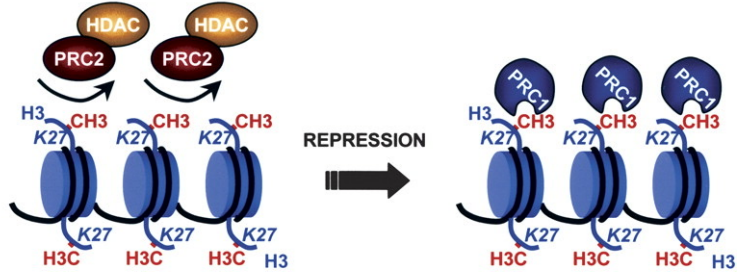


REPRESSION

Heterochromatin regions

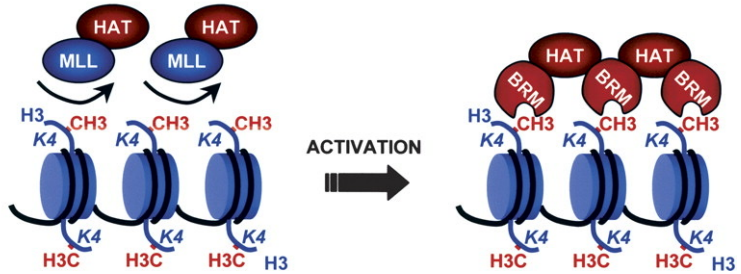
Recluta HP1

Polycomb repressive complex 2 (PRC2)  
Trimetila H3K27  
Polycomb imprint



REPRESSION

Trithorax imprint



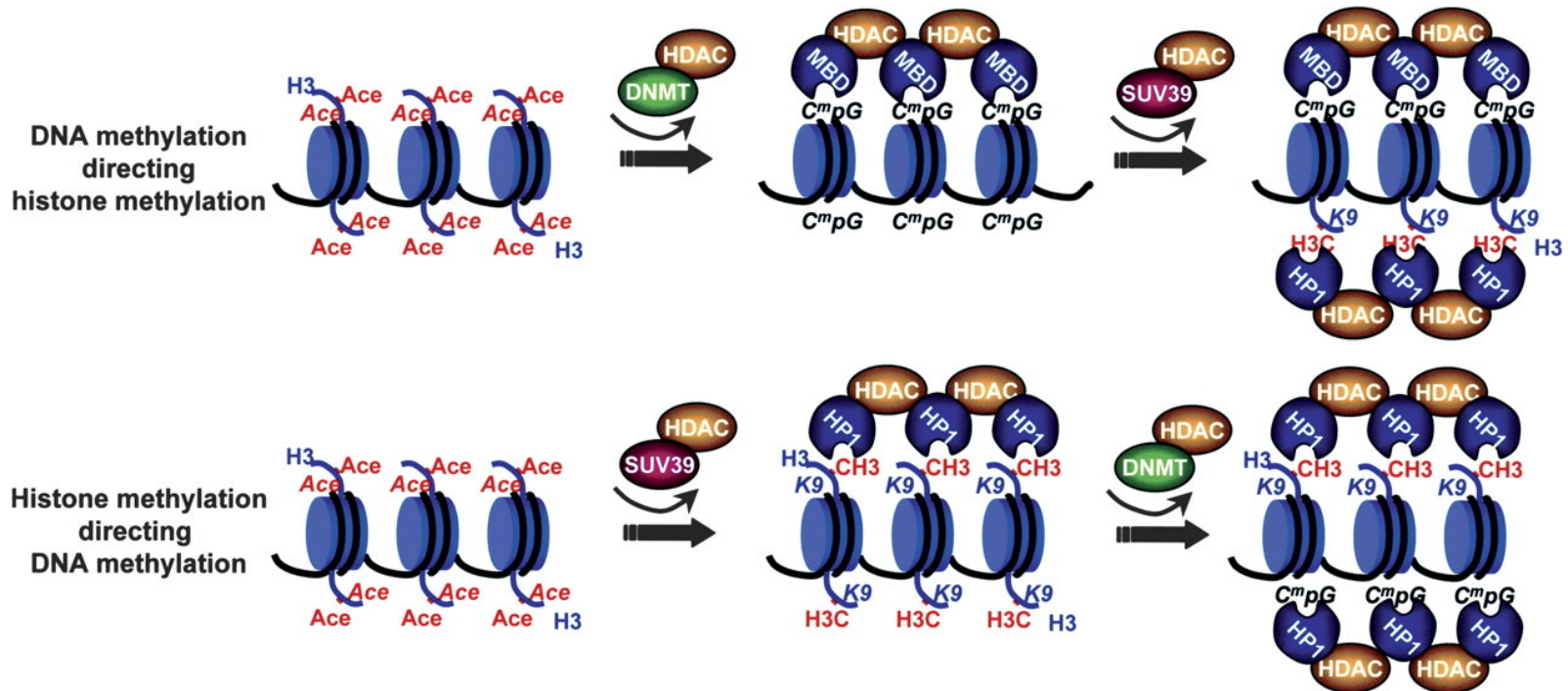
ACTIVATION

Cold Spring Harbor Laboratory Press



# Regolazione Epigenetica Integrata

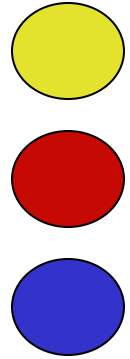
Più complessi proteici agiscono insieme in modo coordinato



1 genoma



“n” epigenomi

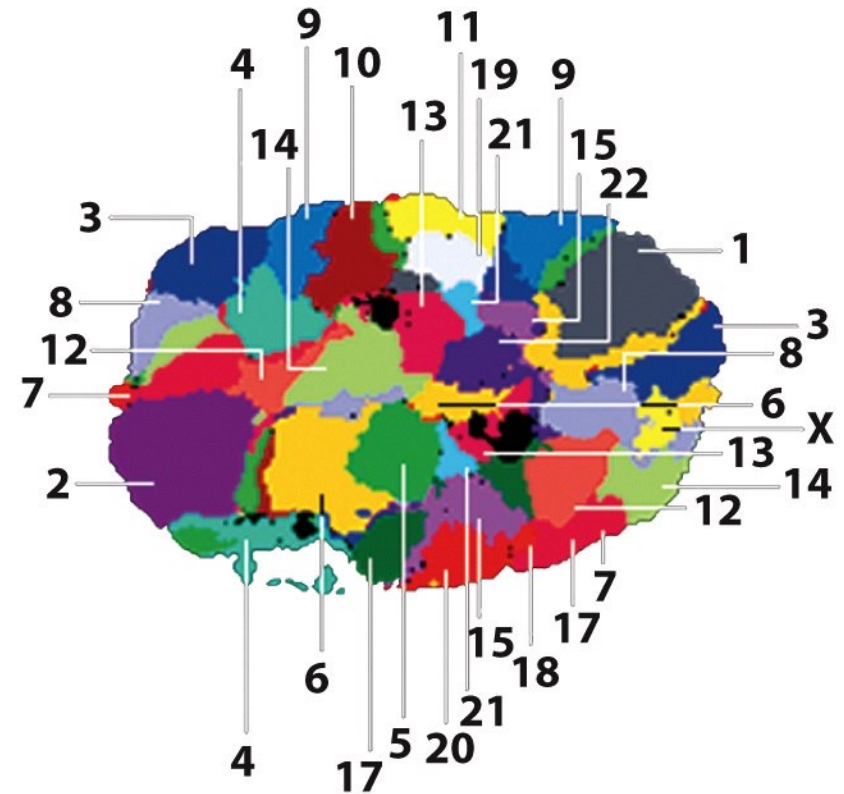
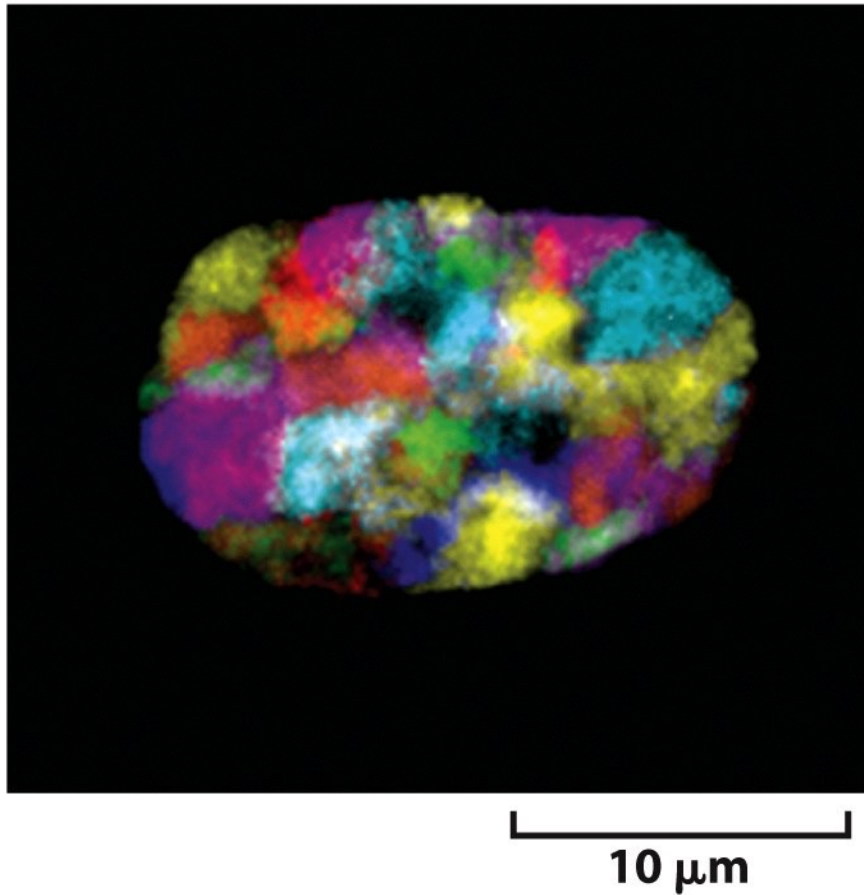


Tutte le cellule di un organismo sono uguali perché hanno lo stesso genoma  
Tuttavia, differiscono l'una dall'altra perché hanno un epigenoma diverso

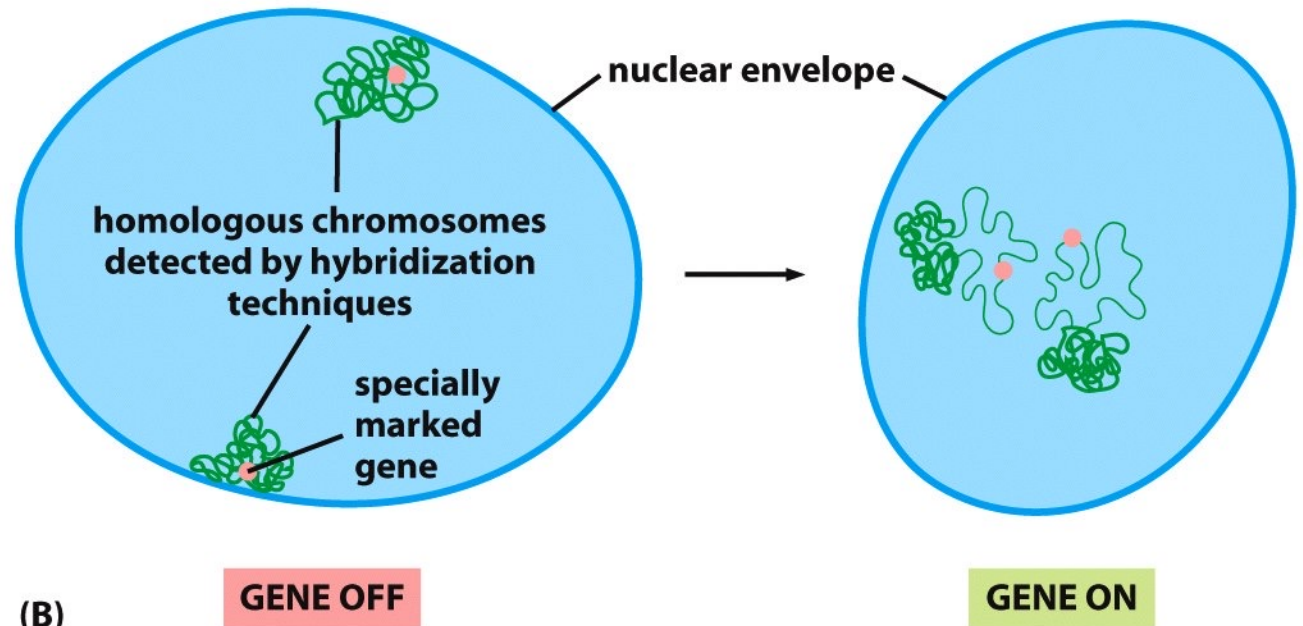
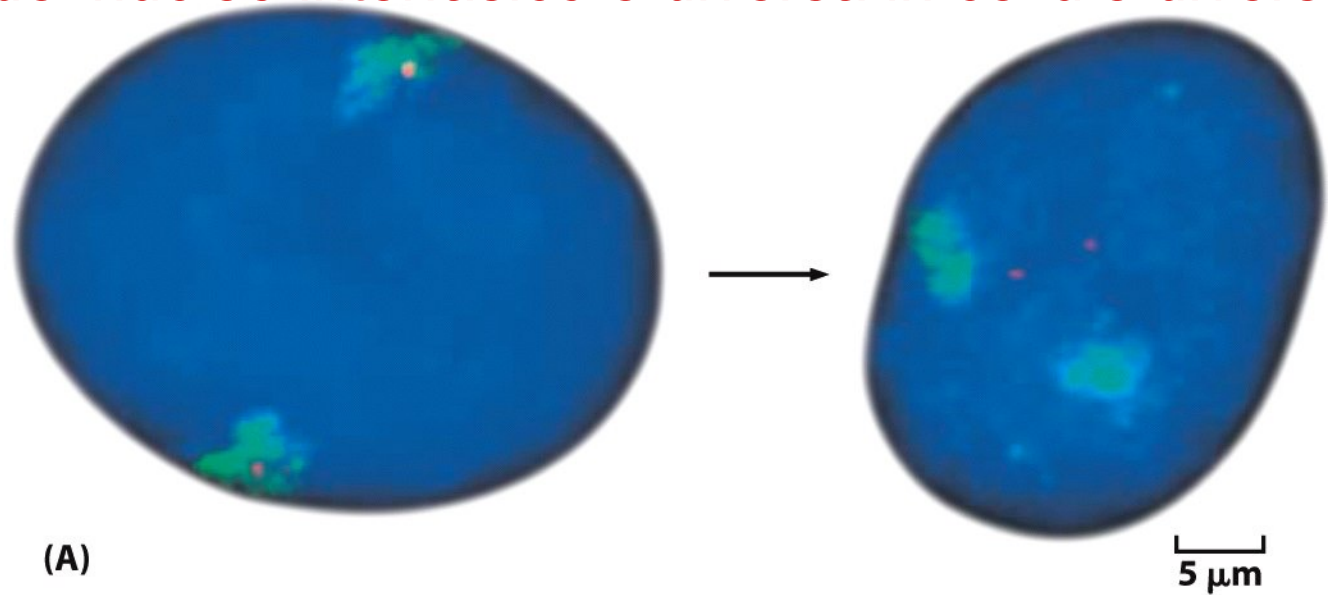




# TERRITORI CROMOSOMICI, ARCHITETTURA NUCLEARE E REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA NELLE CELLULE DEI MAMMIFERI



# L'architettura del nucleo interfase è diversa in cellule diverse





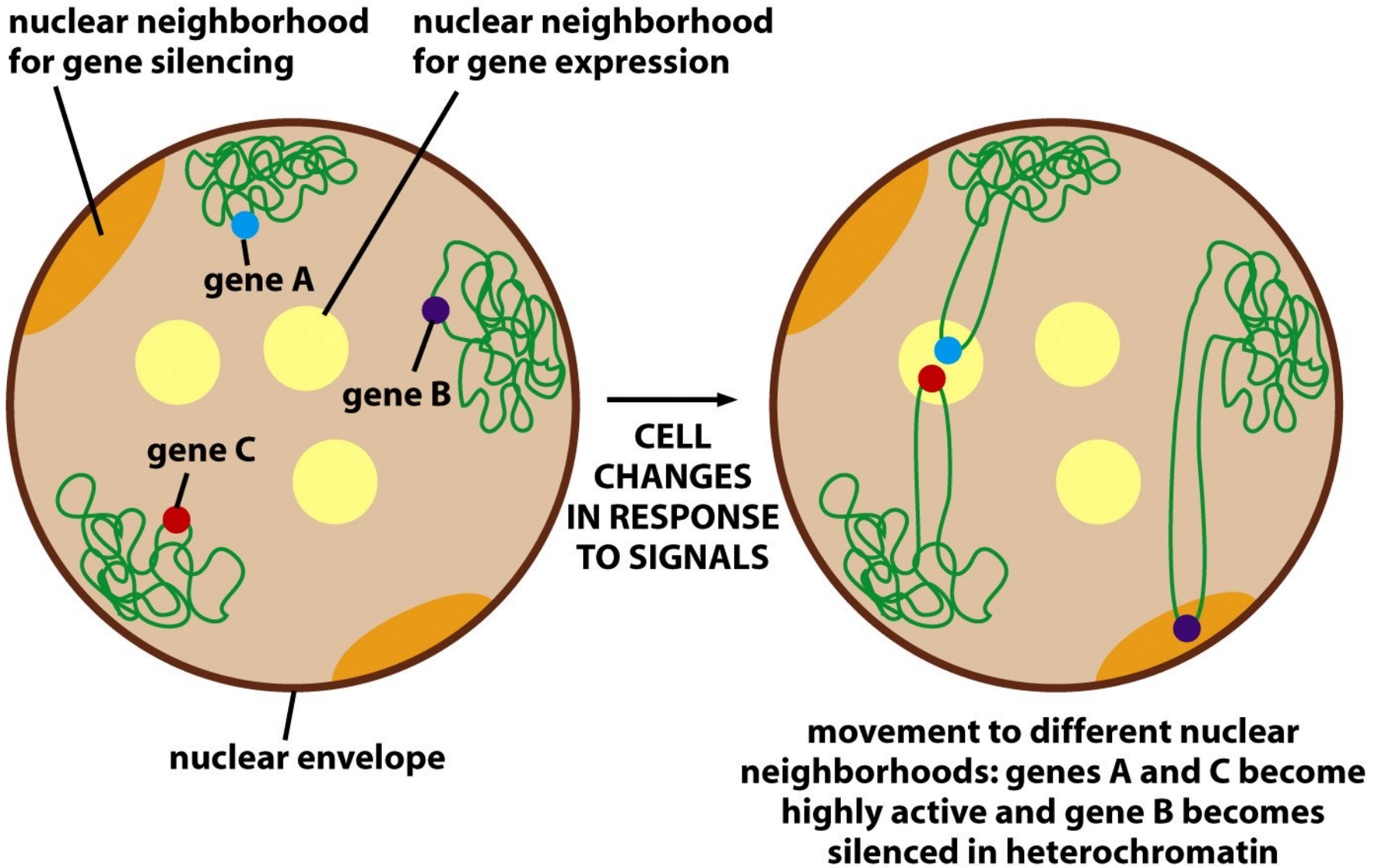


Figure 4-66 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

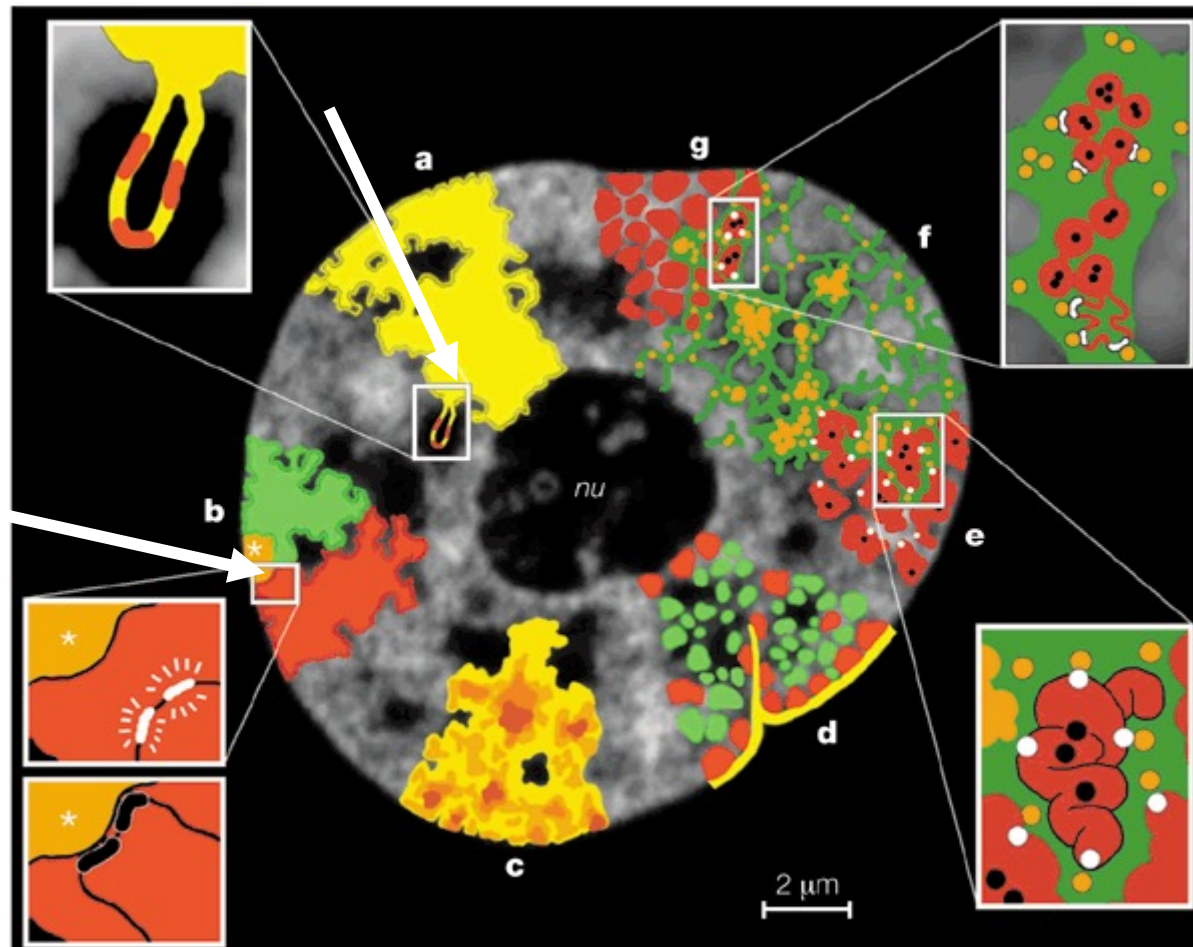
**a.** Territorio Cromosomico (CT). **Inserto:** modello topologico di regolazione genica.

Un loop gigante di cromatina con parecchi geni attivi (rossi) protrude dalla superficie del CT nel compartimento interno cromatinico (IC).

**b** I CT contengono separatamente i domini dei bracci corti (p) e lunghi (q), e i domini centromerici (\*).

**Inserto:** in alto, geni attivamente trascritti (bianco) sono localizzati in loop cromatinici lontani dall'eterocromatina centromerica.

Basso, l'avvicinamento degli stessi geni (nero) all'eterocromatina centromerica porta al loro silenziamento.



The 30nm fiber is organized to loops that can be opened up individually

This allows individual genes and sets of genes to be accessed without a global unpacking of the chromosome

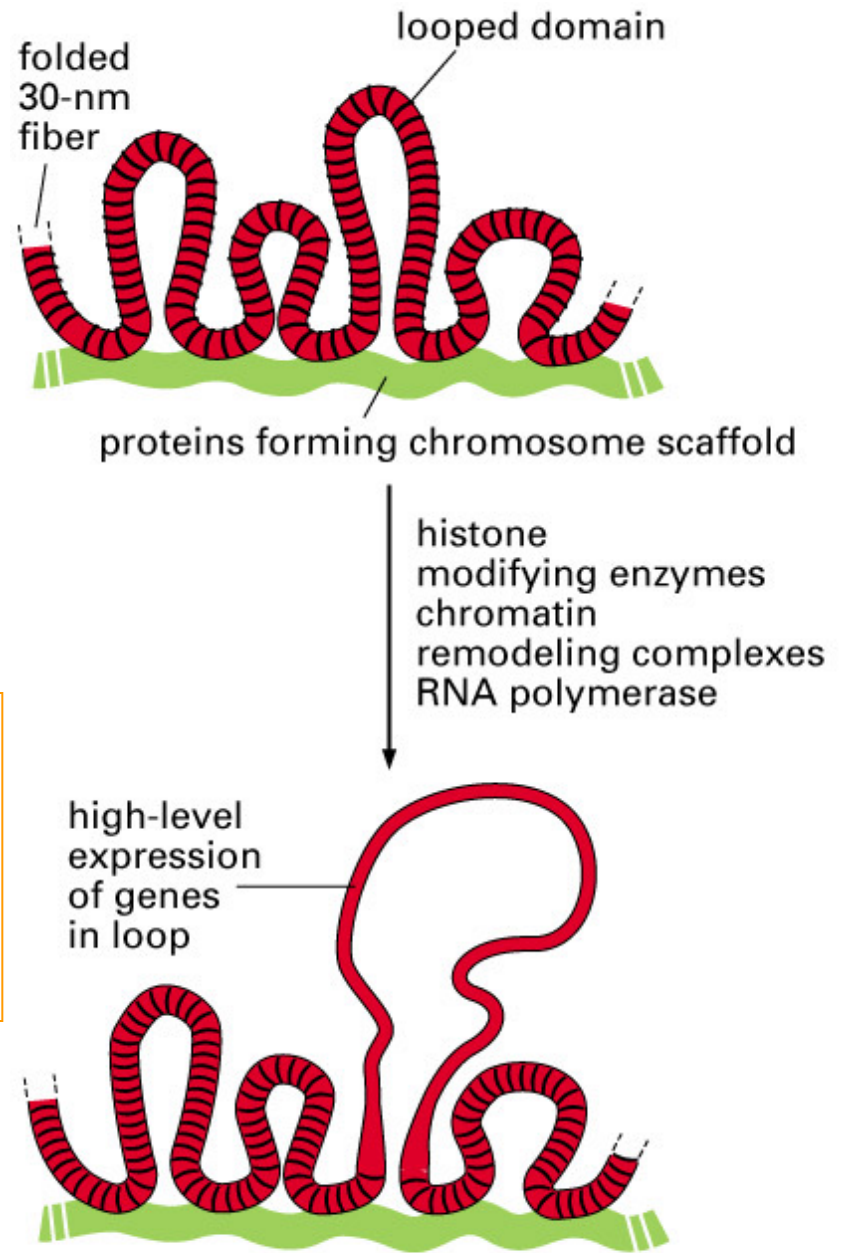
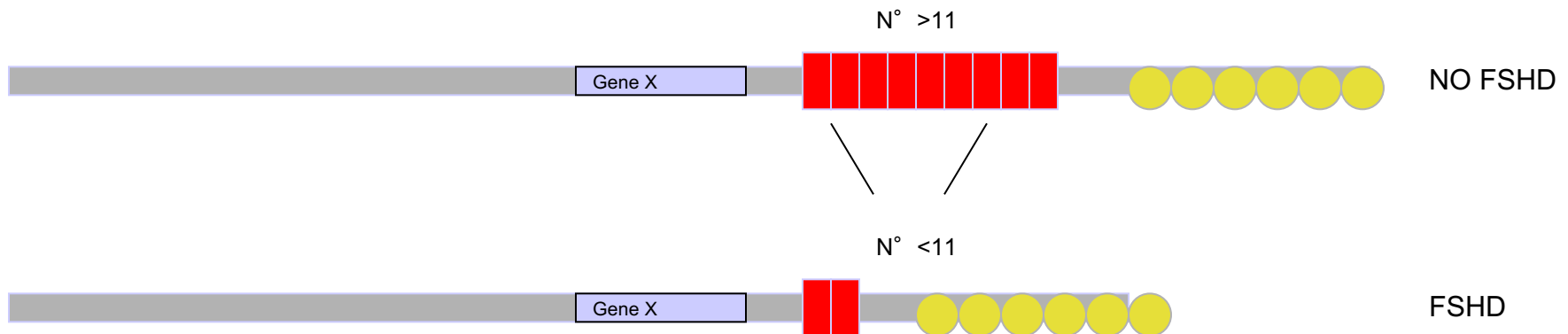


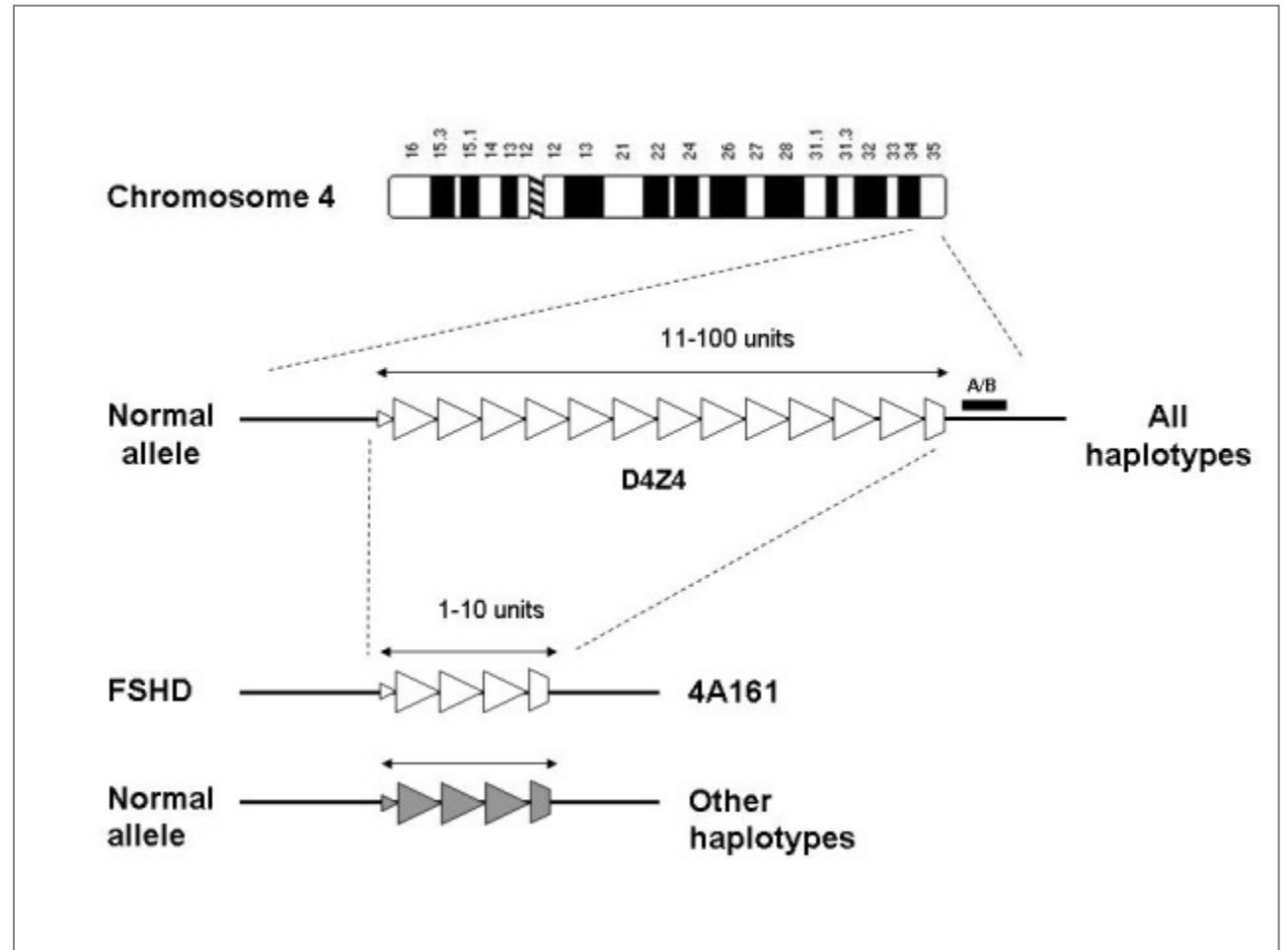
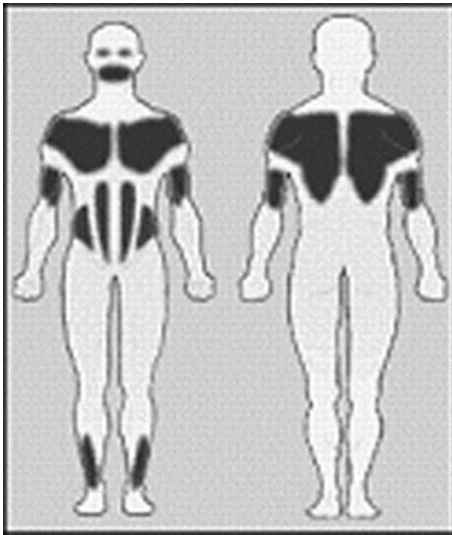
Figure 4-44. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## CONTROLLO A DISTANZA DELL'ESPRESSIONE GENICA

La struttura della cromatina può svolgere un controllo a distanza sull'espressione genica

- **EFFETTO DI POSIZIONE** la vicinanza a regioni eterocromatiche può sopprimere l'espressione genica presumibilmente per alterazione della struttura di un ampio dominio cromatinico (distrofia facio-scapolo-omerale FSHD)







## An insulator may block heterochromatin



An active insulator is a barrier to heterochromatin



## Caratteristiche della cromatina trascrizionalmente attiva e di quella inattiva

| <i>Caratteristica</i>                | <i>Cromatina attiva</i>   | <i>Cromatina inattiva</i> |
|--------------------------------------|---|---------------------------|
| <i>Conformazione della cromatina</i> | Estesa, aperta  | Condensata                |
| <i>Metilazione del DNA</i>           | Poco metilata<br>specialmente<br>nelle regioni del<br>promotore | Metilata                  |
| <i>Acetilazione degli istoni</i>     | Istoni acetilati  | Istoni non acetilati      |



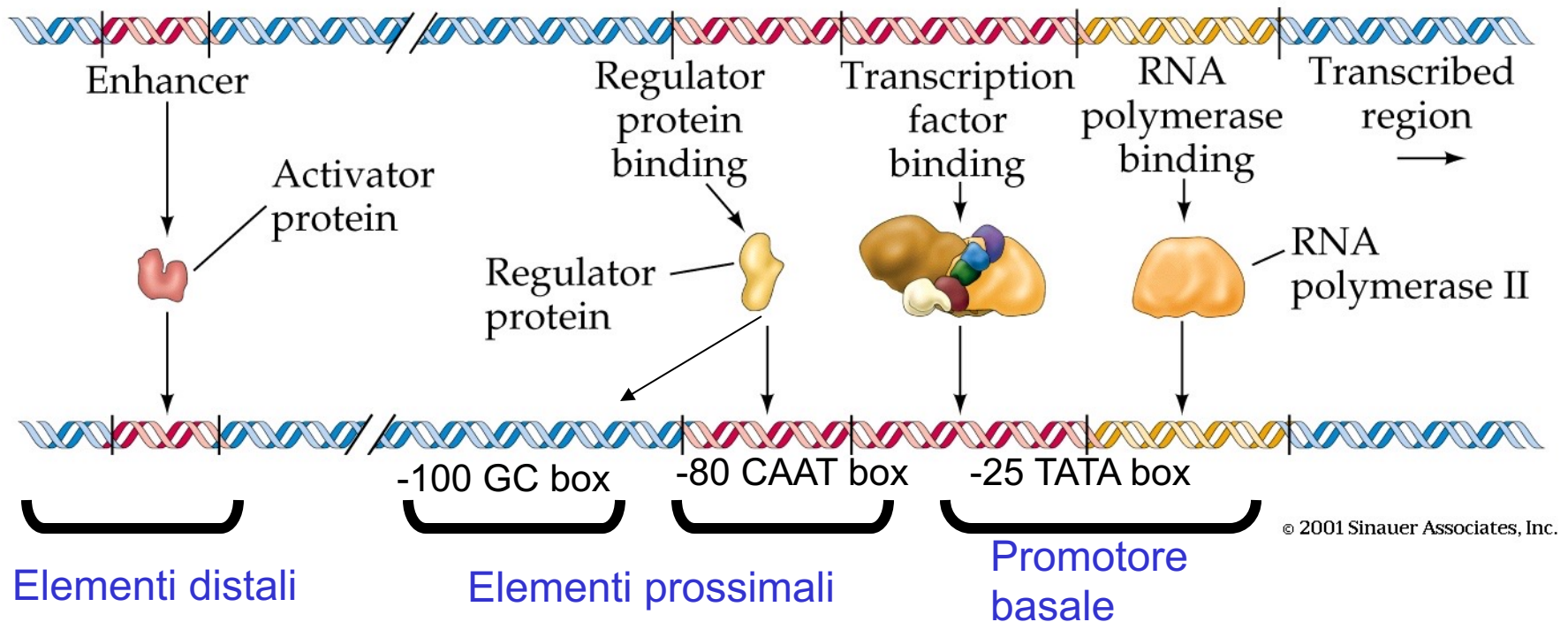
# Controllo trascrizionale

# REGOLAZIONE GENICA A LIVELLO TRASCRIZIONALE

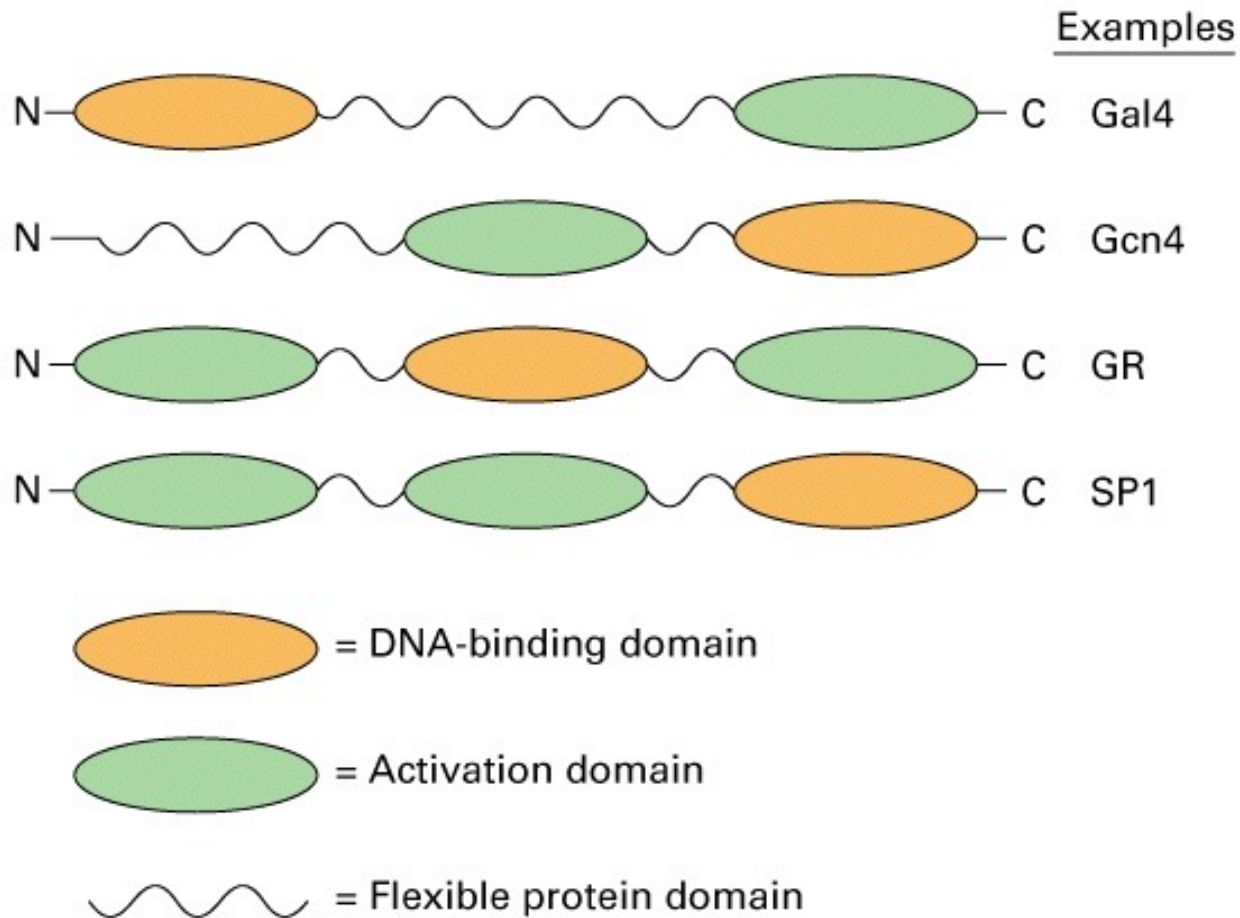
LA REGOLAZIONE GENICA A LIVELLO TRASCRIZIONALE AVVIENE ATTRAVERSO IL LEGAME DI FATTORI PROTEICI A SEQUENZE NUCLEOTIDICHE DI REGOLAZIONE.

I FATTORI PROTEICI IMPEGNATI A REGOLARE L'ESPRESSIONE GENICA **AGISCONO IN TRANS** LEGANDOSI ALLE SEQUENZE DI DNA CHE SONO IN PROSSIMITA' DEL GENE (**IN CIS**)

- L'efficienza della trascrizione dipende anche dal legame di proteine di regolazione, attivatrici e, in alcuni casi di repressione, agli elementi prossimali.
- Altre sequenze di DNA, spesso molto distanti dal promotore, sono ulteriormente implicate nella regolazione, aumentandola (enhancer) o reprimendola (silencer).



# Gli attivatori trascrizionali sono proteine modulari composte da distinti domini funzionali



# Control of gene expression: transcription factors

Transcription factors are DNA binding proteins that bind to *cis*-acting elements in the promoter. These *cis*-acting elements are oftentimes (but not always) short (6-10 bp) palindromic sequences.

The binding of a transcription factor facilitates the recruitment of the TATA-binding protein and the other components of the transcription initiation complex.

The transcription factors themselves are controlled by internal or external cues. They may be present in the cytosol in an inactive state, and after becoming activated get transferred to the nucleus.

There are several classes of transcription factors, including:

**Helix-turn-helix** transcription factors – two helices, one binding the minor groove of the DNA, the other lying across it at an angle.

**Leucine zippers** – has a stretch of aa with leucine residues at every 7<sup>th</sup> position; the zipper in one protein may interact with that of another to form a dimer. The DNA is bound by positively charged amino acids adjacent to the zippers.

**Zinc fingers** – these transcription factors contain a loop-forming stretch of aa that binds  $Zn^{2+}$

Cys2/His2 fingers: **Cys-X<sub>2-4</sub>-Cys-Phe-X<sub>5</sub>-Leu-X<sub>2</sub>-His-X<sub>3</sub>-His**

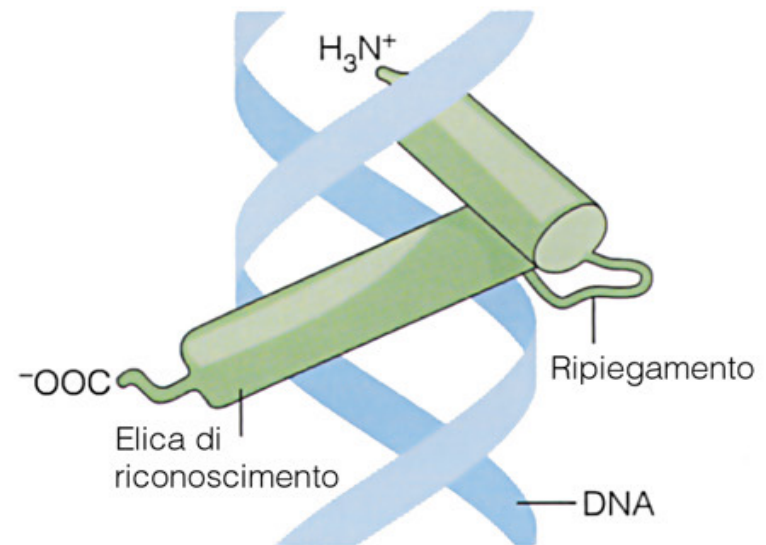
Cys2/Cys2 fingers: **Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>13</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys**

## Come avviene l'interazione DNA- proteine?

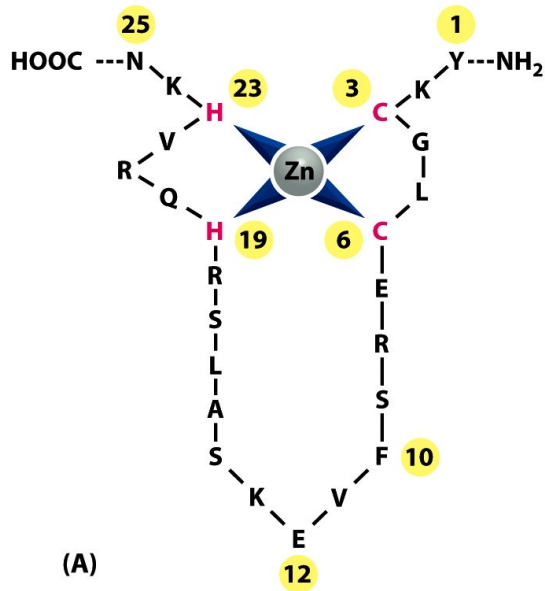
Le proteine con DNA binding domains hanno dei motivi particolari:

A) Motivo helix-turn-helix (elica-giro-elica), consiste di due  $\alpha$  eliche separate da un ripiegamento della catena polipeptidica.

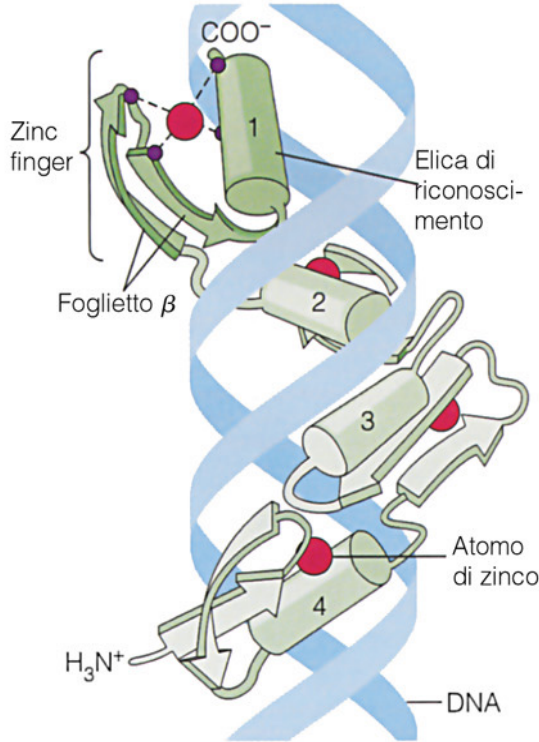
una  $\alpha$  elica di riconoscimento, che con le catene laterali dei suoi residui amminoacidici riconosce specifiche sequenze di DNA (posizionate nel solco maggiore) alle quali si lega (leg. idrogeno). La seconda  $\alpha$  elica stabilizza la conformazione



(a) Motivo helix-turn-helix

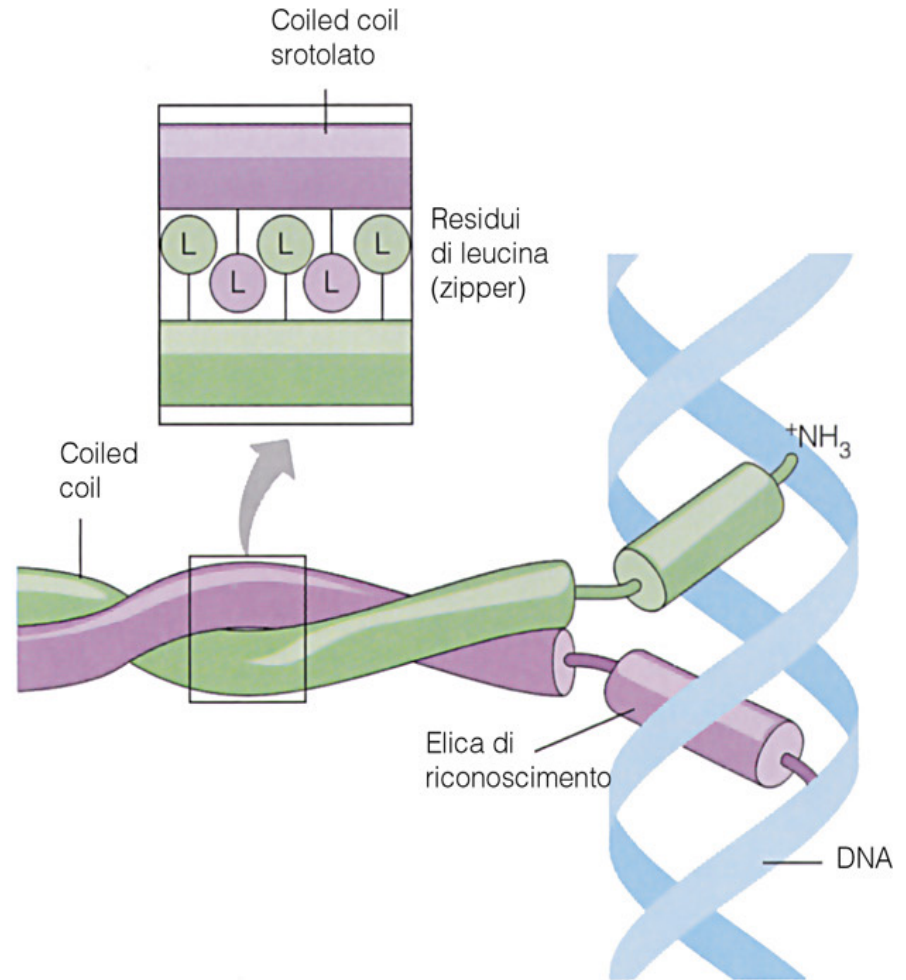


C) Motivo Zinc finger (a dita di zinco), è costituito da una  $\alpha$  elica e da due segmenti a foglietti  $\beta$ , tenuti insieme da residui di cisteina o istidina, posti in modo preciso, con un atomo di zinco. Il numero di zinc finger varia tra un fattore di trascrizione e un altro. Le strutture zinc finger protrudono dalla superficie della proteina e servono da punto di contatto con specifiche sequenze di DNA posizionate nel solco maggiore della doppia elica.



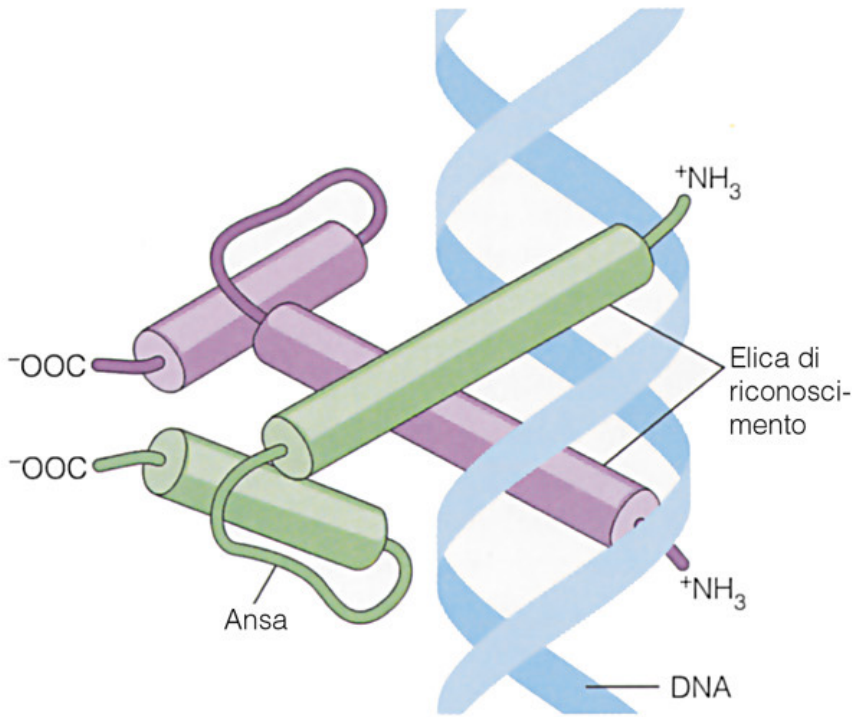


D) Motivo leucine zipper (a cerniera di leucine), è formato dall'interazione di due catene polipeptidiche, ognuna contenente una  $\alpha$  elica con residui di leucina (a.a. idrofobico) regolarmente spazati. Le leucine, interagendo tra di loro, provocano un attorcigliamento delle due eliche. Il motivo è utilizzato per unire due polipeptidi uguali o diversi. Il legame al DNA è reso possibile dalla presenza di due ulteriori regioni ad  $\alpha$  elica che interagiscono con le sequenze del solco maggiore.



(d) Motivo leucine zipper

Figura 21-25



(e) Motivo helix-loop-helix

E) Motivo helix-loop-helix (elica-ansa-elica), consiste di due  $\alpha$  eliche una più piccola e una più grande, separate da un'ansa. I motivi helix-loop-helix contengono regioni idrofobiche che permettono di connettere due polipeptidi uguali o diversi. La formazione di un fascio di 4  $\alpha$  eliche provoca la giustapposizione dell'elica di riconoscimento di un polipeptide con quella dell'altro, creando così un dominio di legame al DNA bipartito.

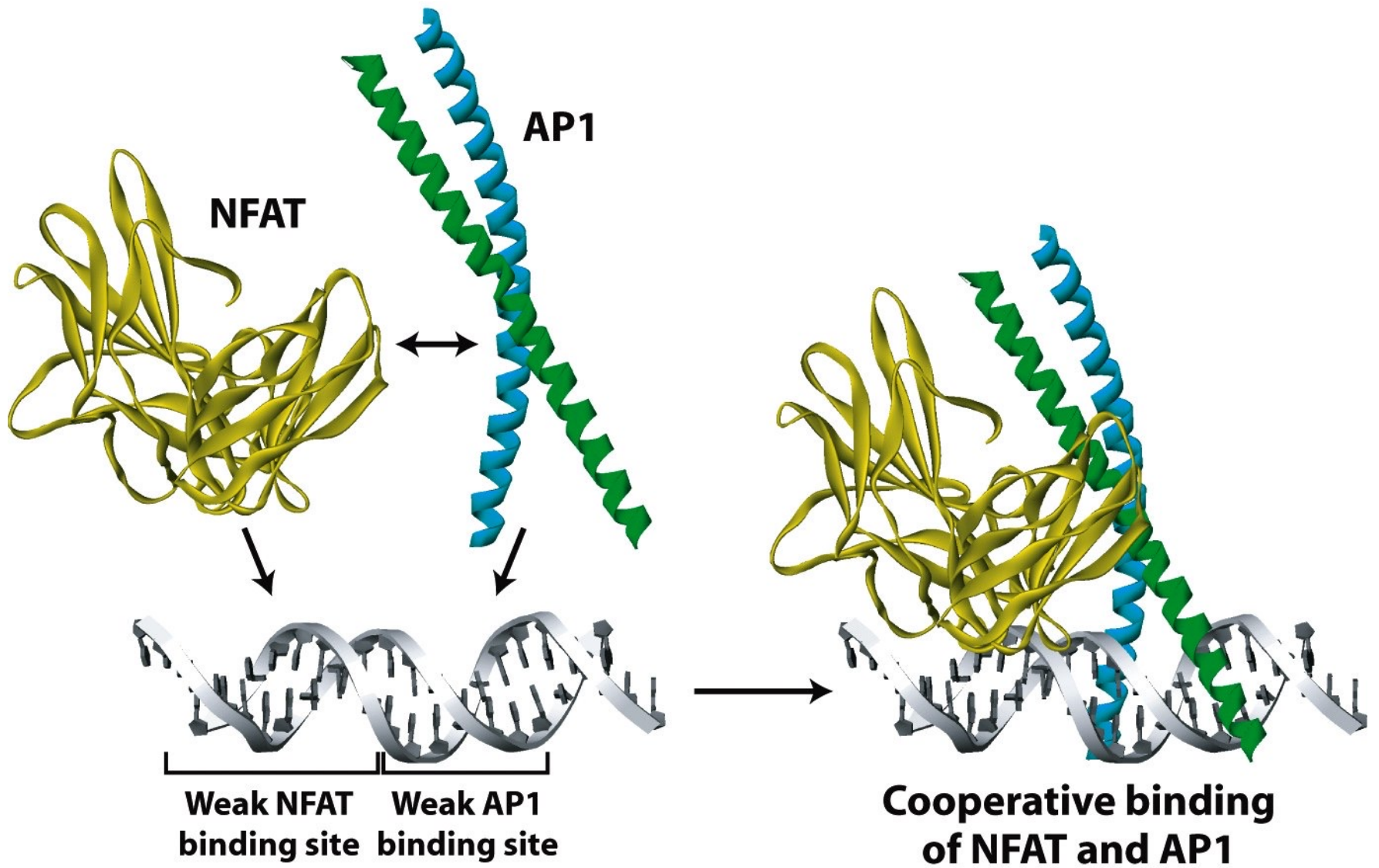


Figure 7-29  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W. H. Freeman and Company



# Methods by which a transcription factor can become activated

**Figure 21.2** The activity of a regulatory transcription factor may be controlled by synthesis of protein, covalent modification of protein, ligand binding, or binding of inhibitors that sequester the protein or affect its ability to bind to DNA.

| Inactive Condition                       | Active Condition | Example           |
|--|------------------|-------------------|
| <b>Protein synthesized</b>               |                  |                   |
| No protein                               |                  | Homeoproteins     |
| <b>Protein phosphorylated</b>            |                  |                   |
|  |                  | HSTF              |
| <b>Protein dephosphorylated</b>          |                  |                   |
|  |                  |                   |
| <b>Ligand binding</b>                    |                  |                   |
|  |                  | Steroid receptors |
| <b>Cleavage to release active factor</b> |                  |                   |
|  |                  | Sterol response   |
| <b>Release by inhibitor</b>              |                  |                   |
|  |                  | NF- $\kappa$ B    |
| <b>Change of partner</b>                 |                  |                   |
|  |                  | HLH<br>(MyoD/ID)  |

# Enhancer e silencer

Una sequenza enhancer classica contiene al suo interno parecchi elementi di controllo differenti, ognuno dei quali è costituito da una corta sequenza di DNA che funziona da sito di legame per uno specifico fattore di trascrizione regolativo (attivatore).

Spesso i siti di legame possono essere gli stessi presenti nelle sequenze prossimali.

I silencer sono meno abbondanti, legano fattori in grado di ridurre l'efficienza di trascrizione (repressori).

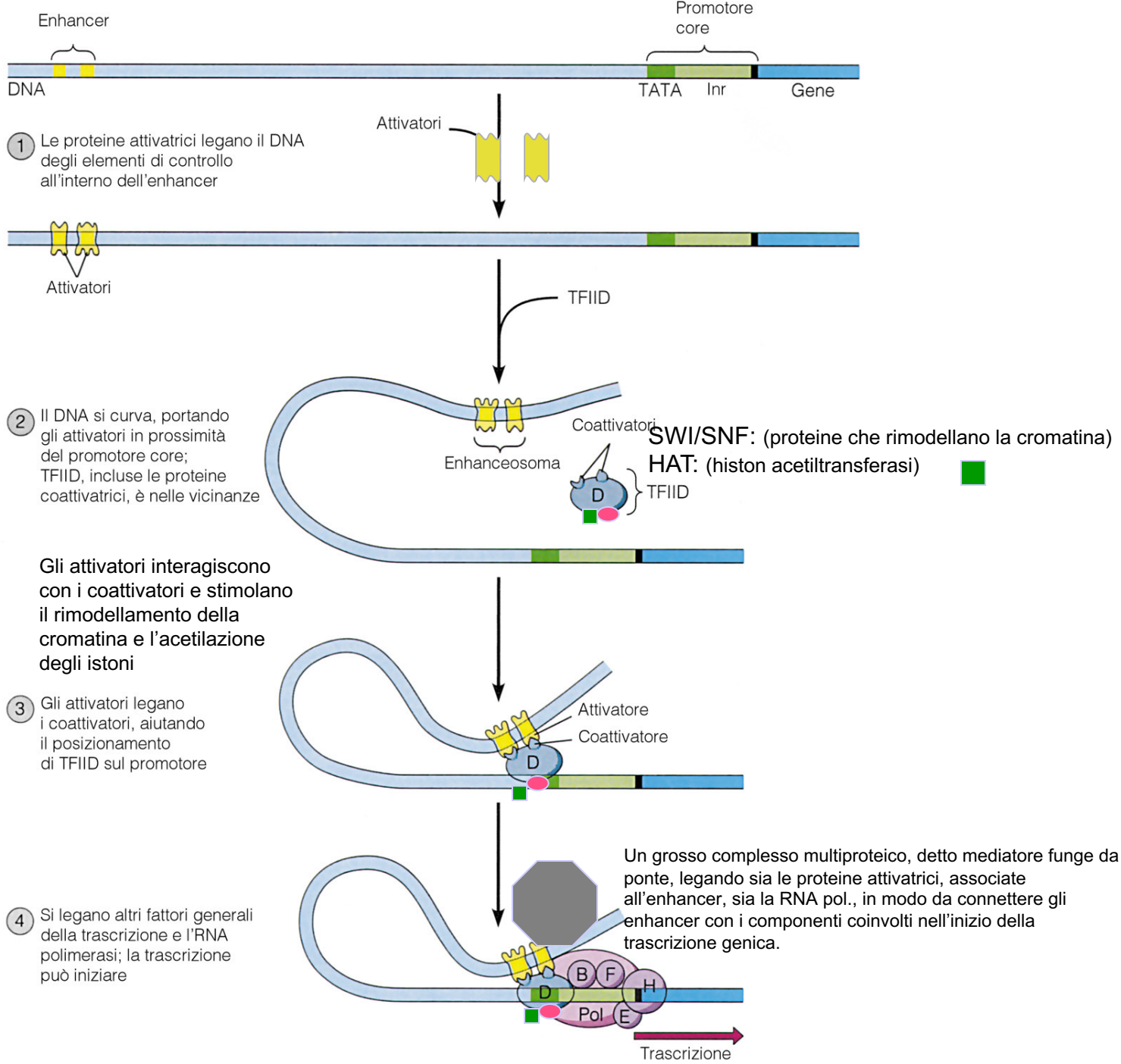
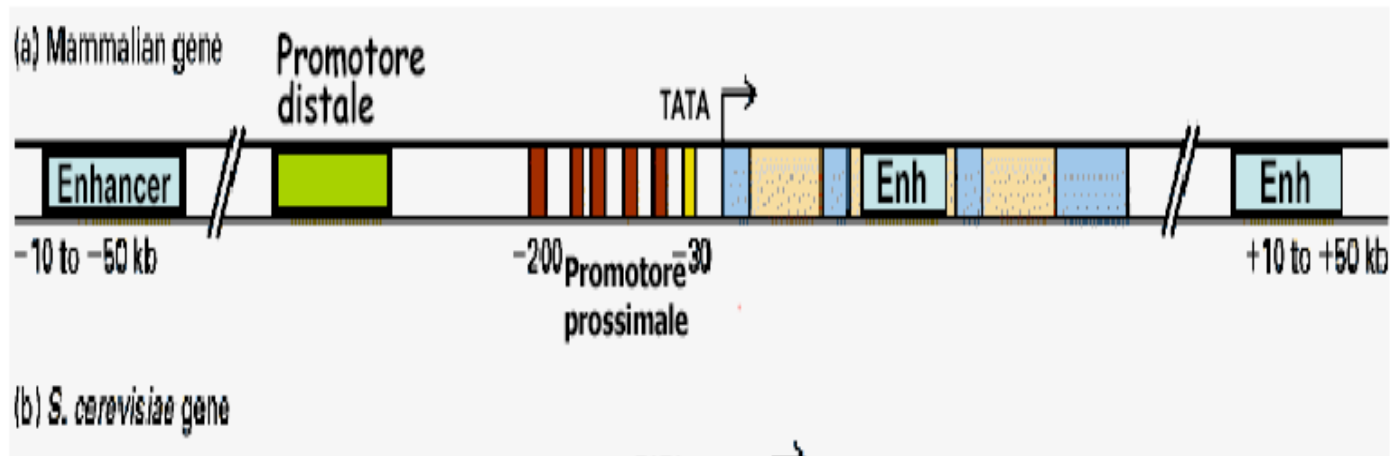


Figura 21-23



## Promotori Pol II

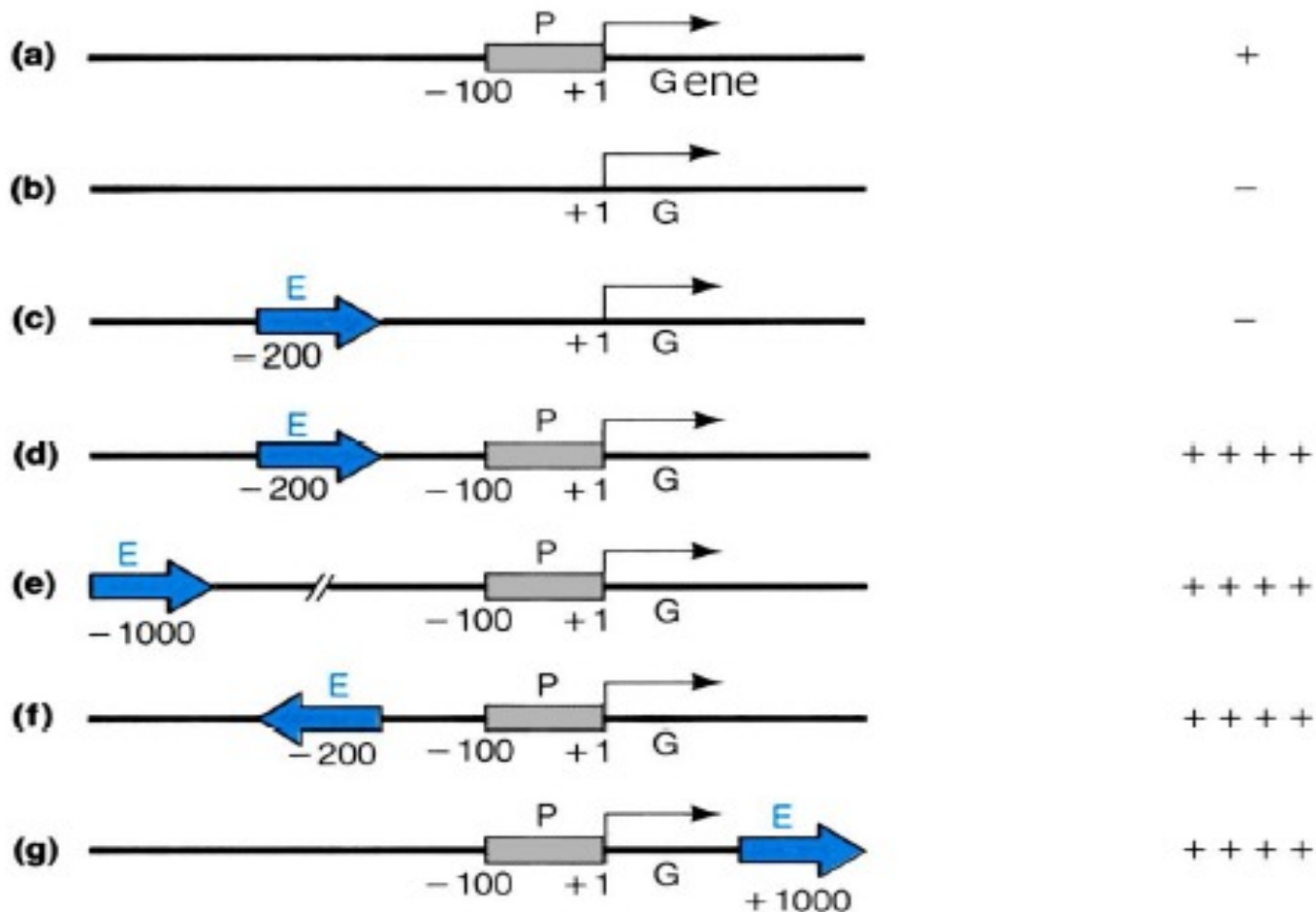
**Gli enhancers possono essere localizzati a monte o a valle, distanti anche più di 50 kb dal sito d'inizio, oppure negli introni**



Gli enhancer (E) sono degli elementi di sequenza cis-agenti che intensificano la trascrizione indipendentemente orientamento (d) dalla distanza (e), e posizione (g)

Struttura dell'unità di trascrizione

Livello relativo della trascrizione

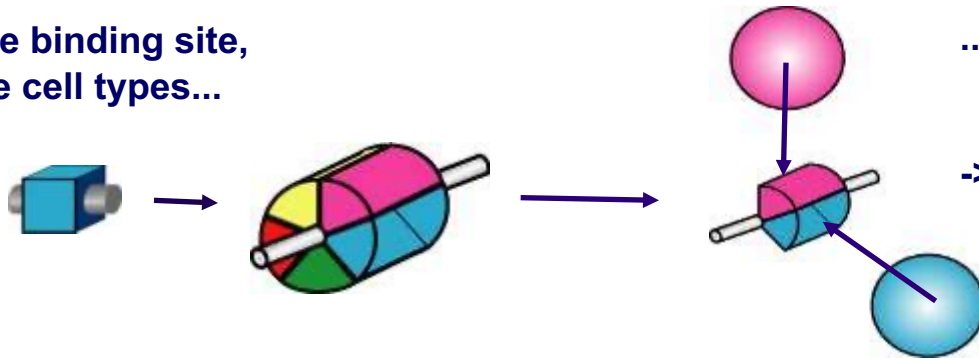


# Physical vs functional TFBS

## A functional binding site depends on context!

- A functional binding site requires a cellular context

One binding site,  
five cell types...

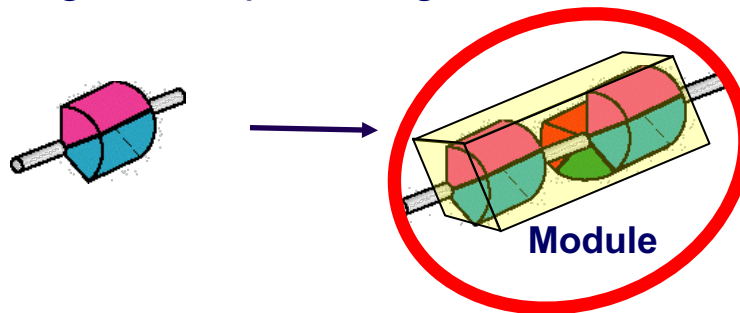


...but binding proteins are  
present only in 2 cell types!

-> no *functional* binding site  
in the other 3 cell types!

- A functional binding site requires a genomic context

Even when  
binding proteins  
are present...



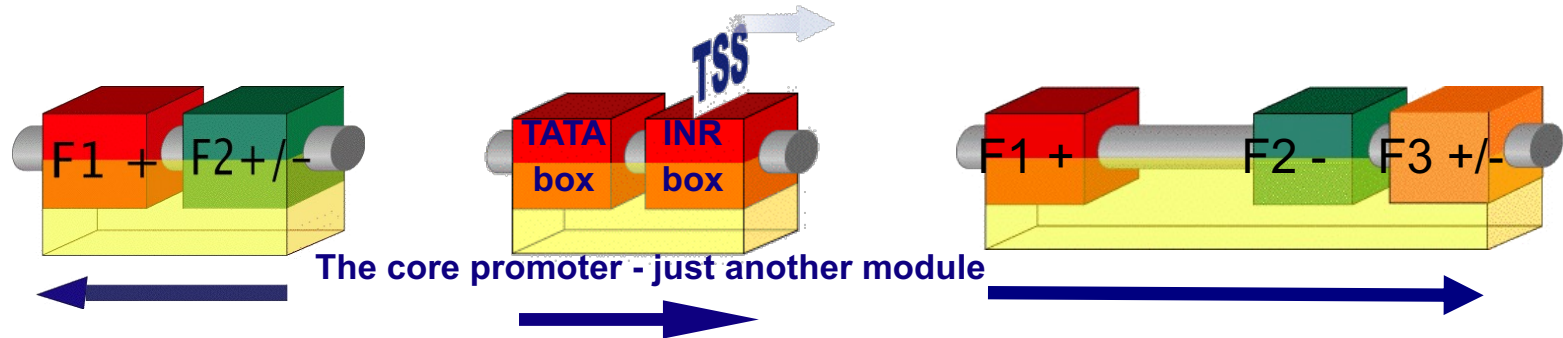
...biological function  
may require additional  
binding sites!

Transcriptional function is defined by the cellular and genomic context

# Transcriptional modules

## A transcriptional module is the smallest functional unit

- A transcriptional module consists of two or more TFBSs
- Strand orientation, relative order and distance of TFBSs are important
- A module also has a strand orientation and can shift within a promoter
- Transcriptional modules are present in promoters and enhancers



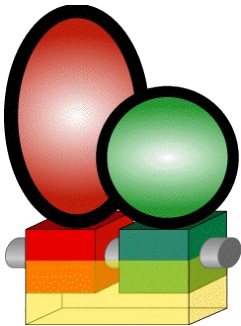
Transcriptional modules integrate signals via the interacting TFs

# Transcriptional modules

**Promoter modules can work in three different ways**

Synergistic

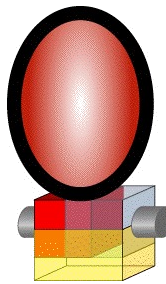
“Short range module”  
distance  $\leq 50$  bp



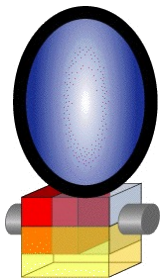
High / Low  
Is possible

Antagonistic

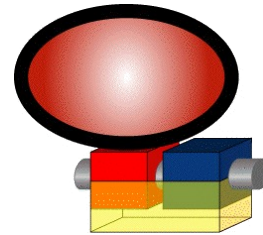
“Composite elements”  
“Short range module”  
distance  $\leq 50$  bp



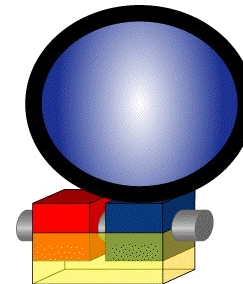
or



High / Low  
Is possible



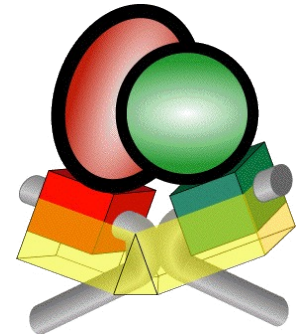
or



High / Low  
Is possible

Synergistic

“Looping module”  
distance up to 300bp



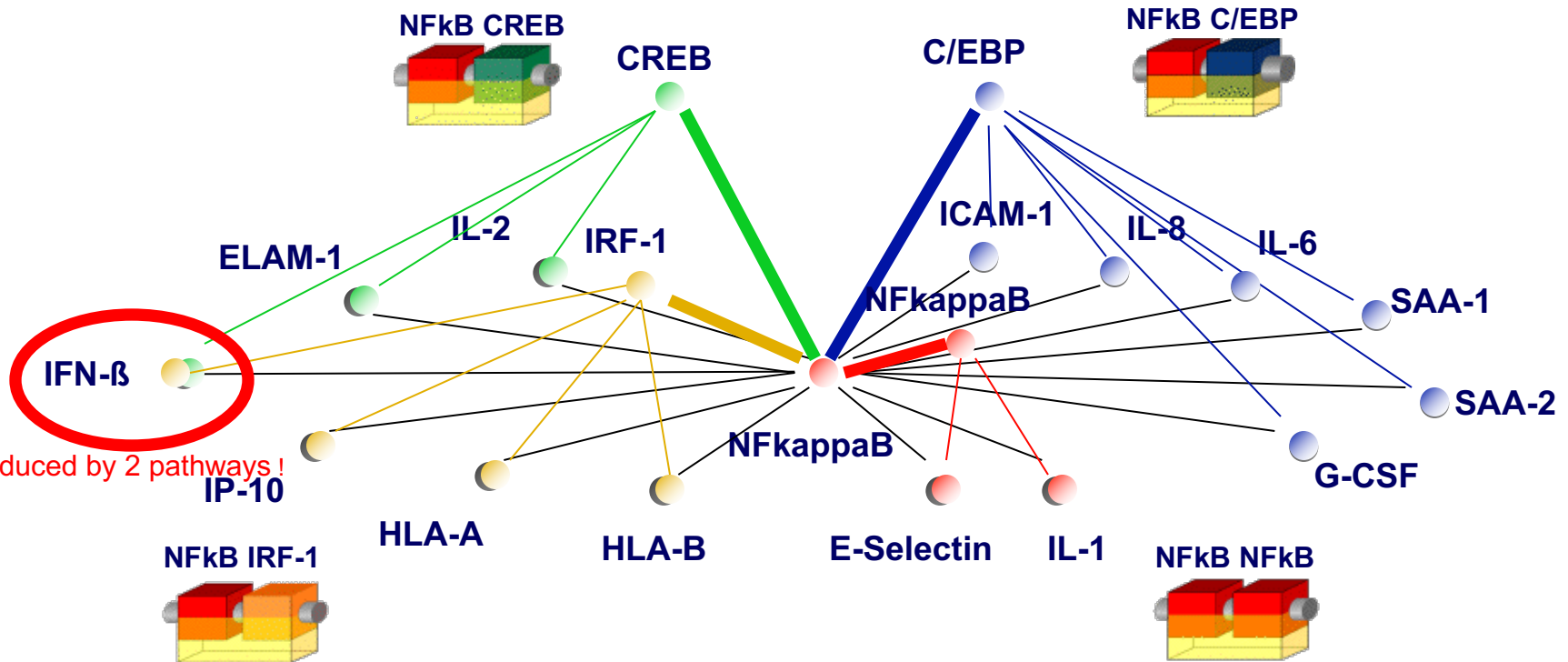
High / High  
only

Binding  
Affinity:

# Transcriptional modules

## Transcriptional modules define target genes of pathways

- NFkappaB is involved in regulation of target genes of several pathways

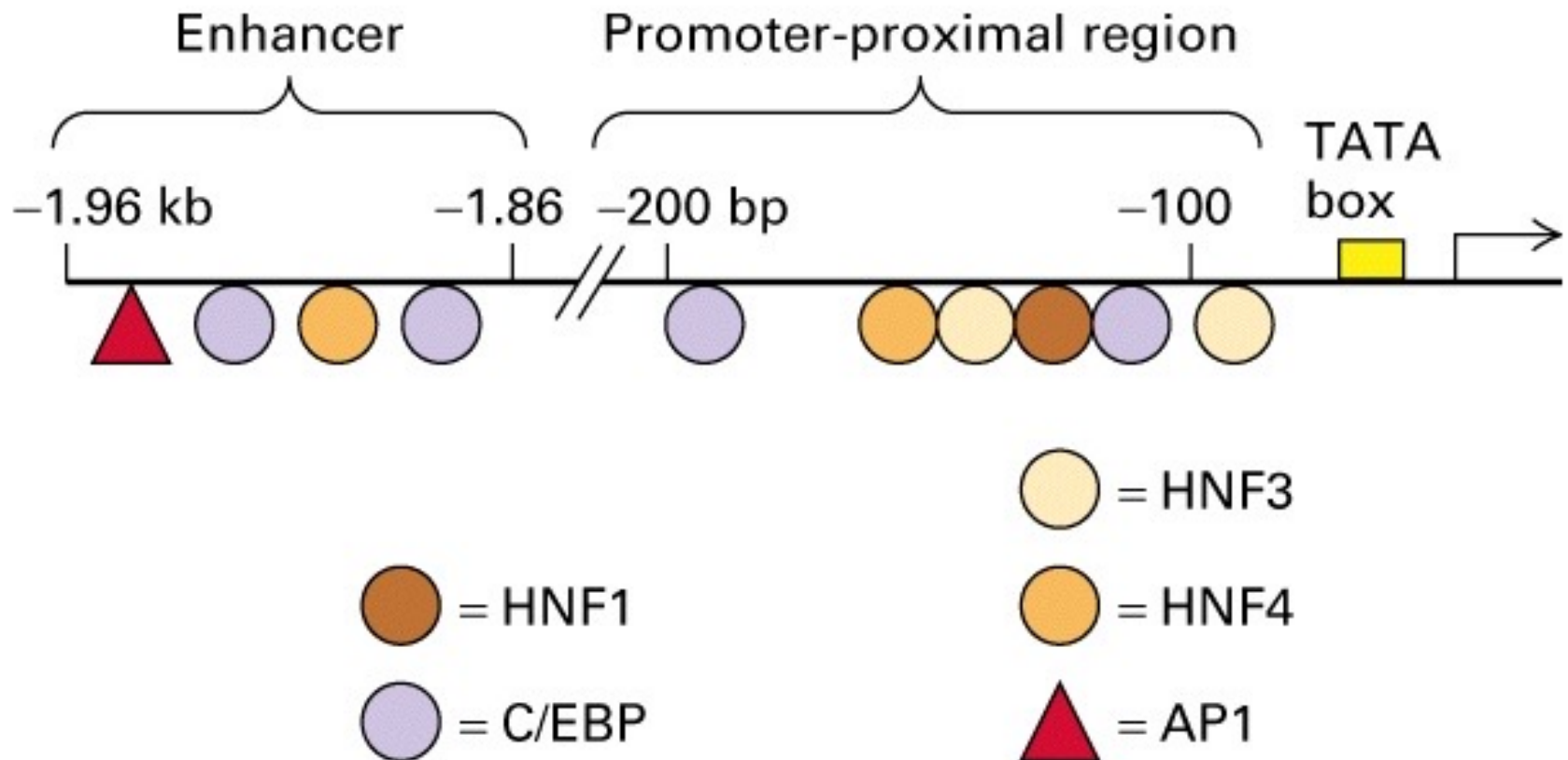


Modules are the basic elements of regulatory pathways and networks

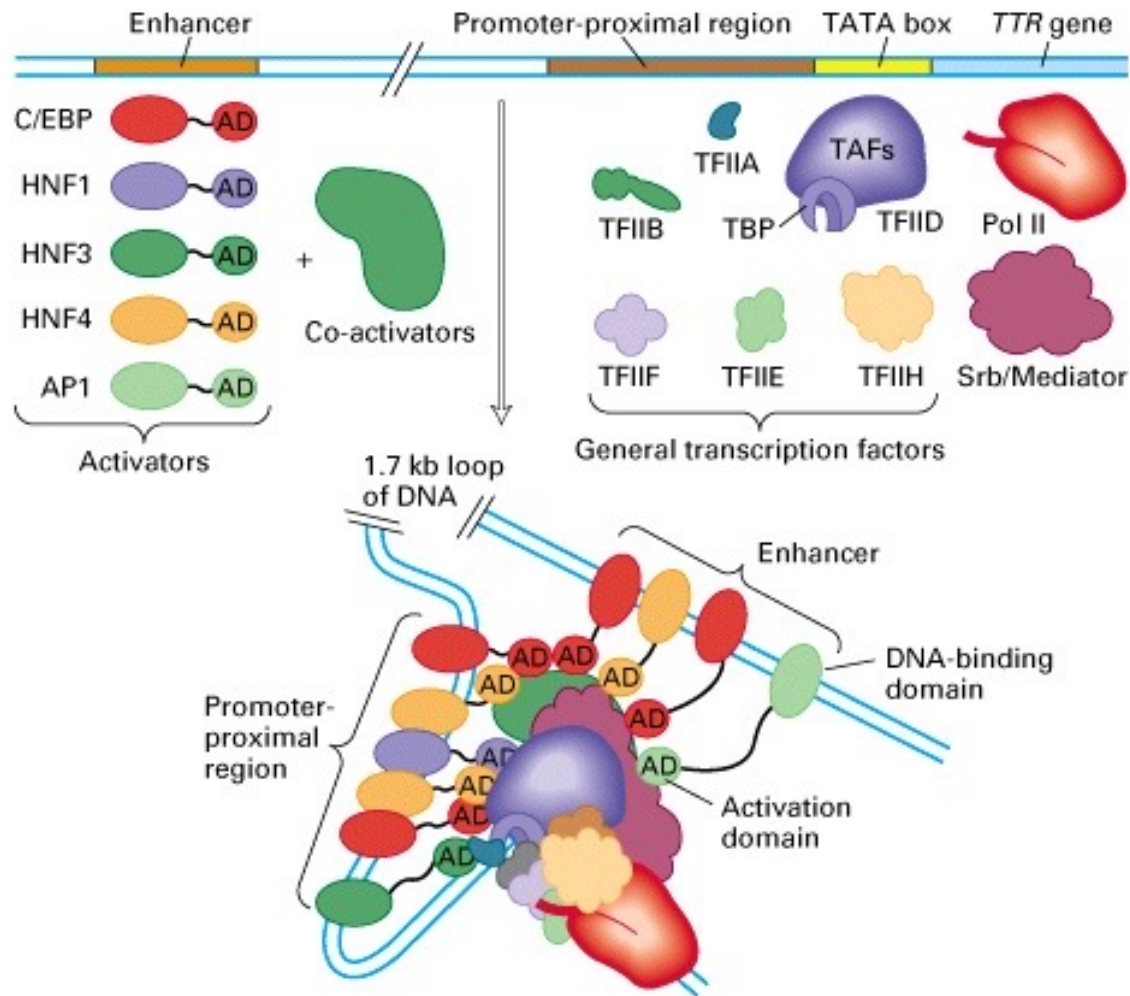


# Activators stimulate the highly cooperative assembly of initiation complexes

Binding sites for activators that control transcription of the mouse *TTR* gene

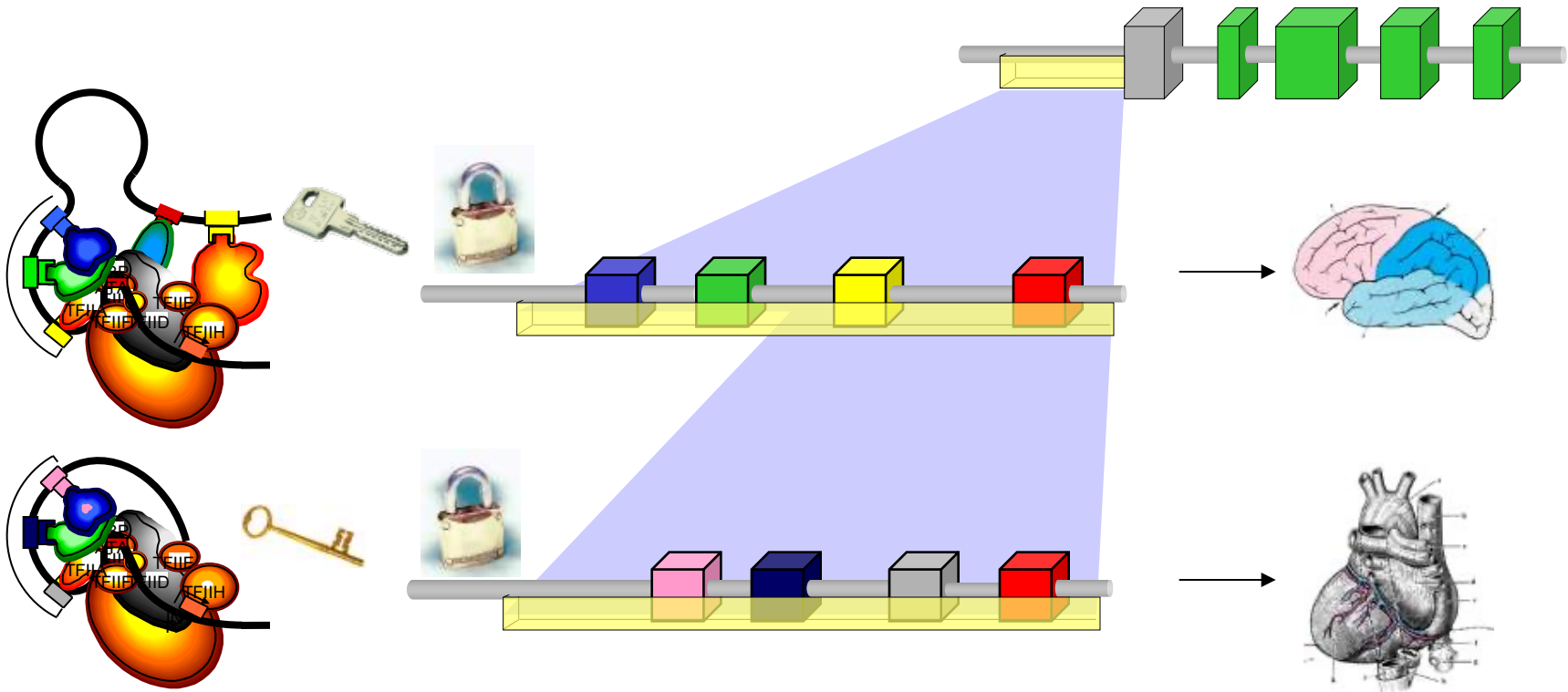


# Model for cooperative assembly of an activated transcription-initiation complex in the *TTR* promoter

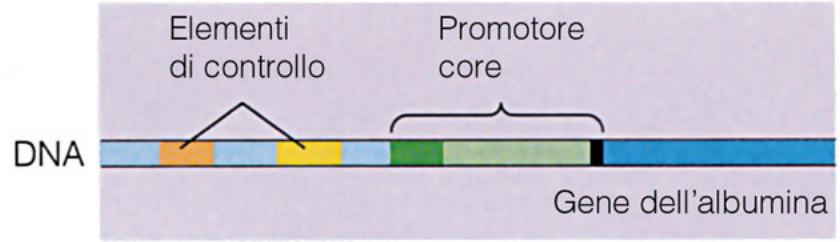


# Transcriptional modules

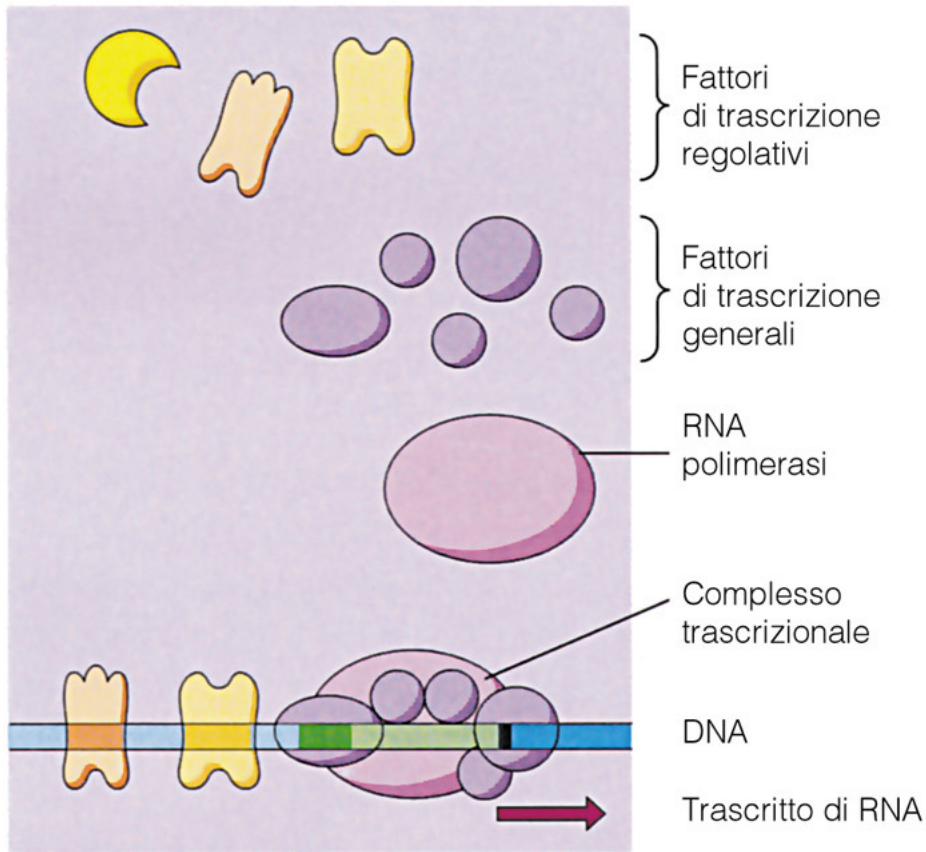
Context dependent expression by different protein complexes



Same lock – different keys: Same gene - different biological context

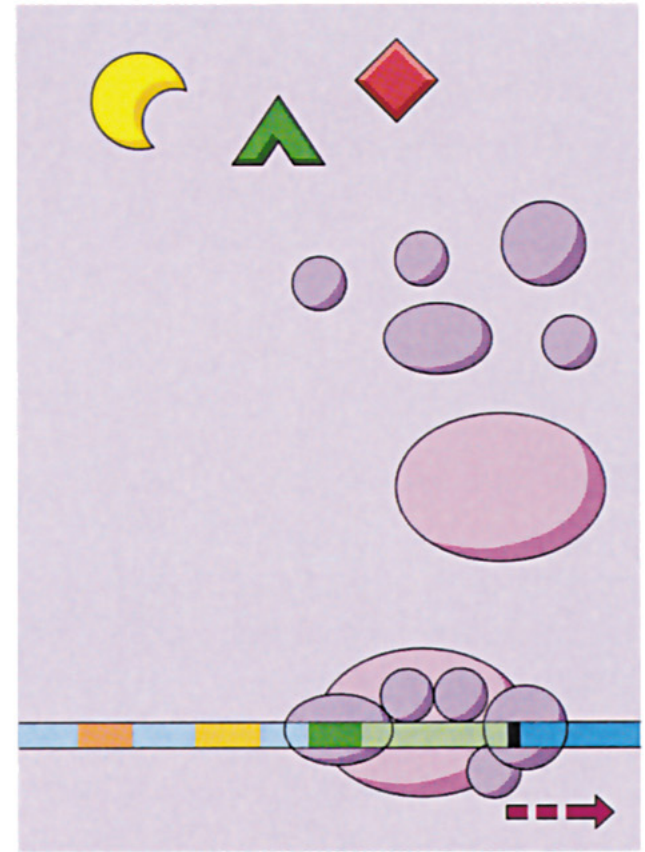


**(a)** Nucleo della cellula di fegato



Trascrizione del gene dell'albumina ad un livello alto

**(b)** Nucleo della cellula di cervello

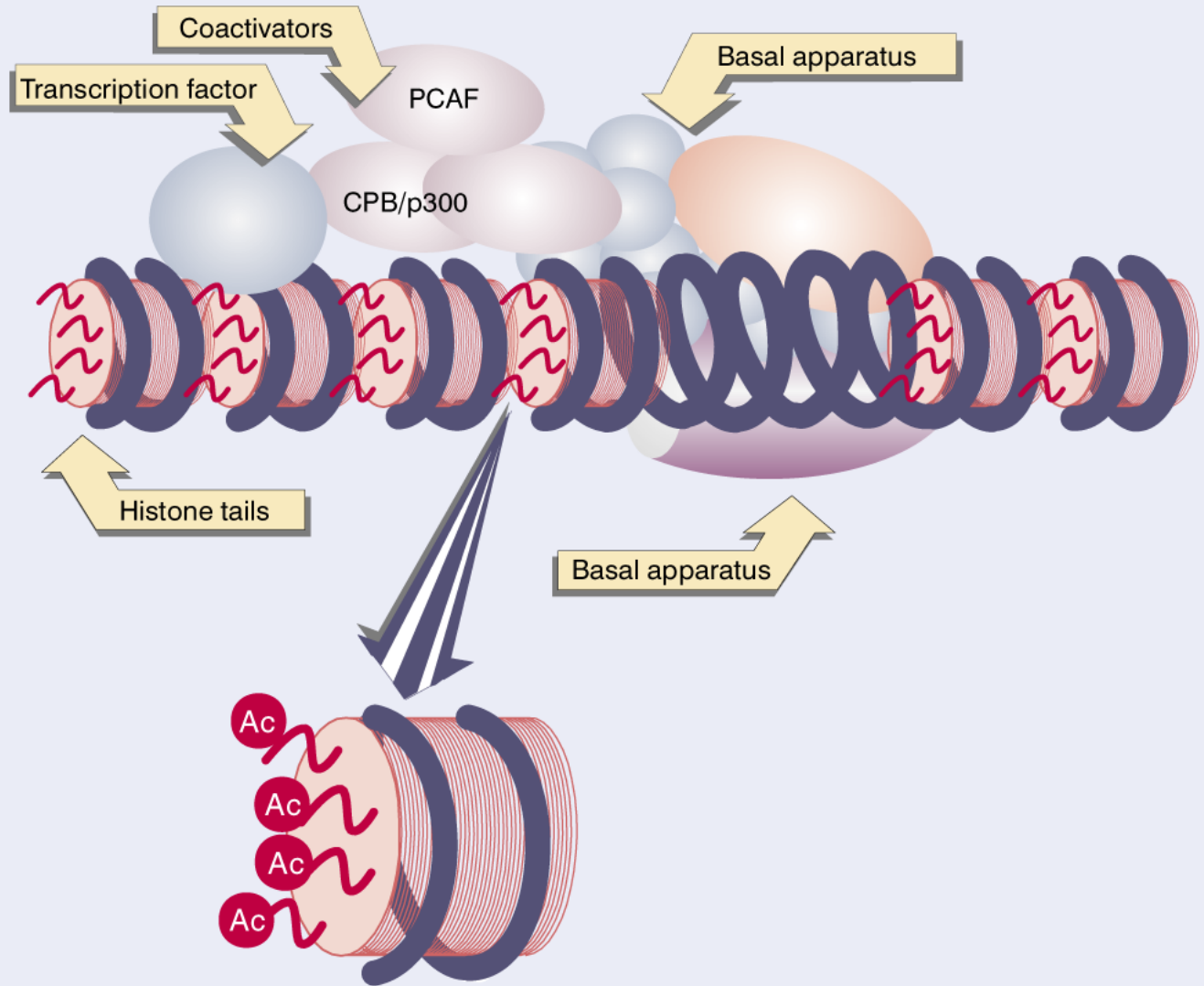


Trascrizione del gene dell'albumina ad un livello molto basso (basale)

**Figura 21-24**

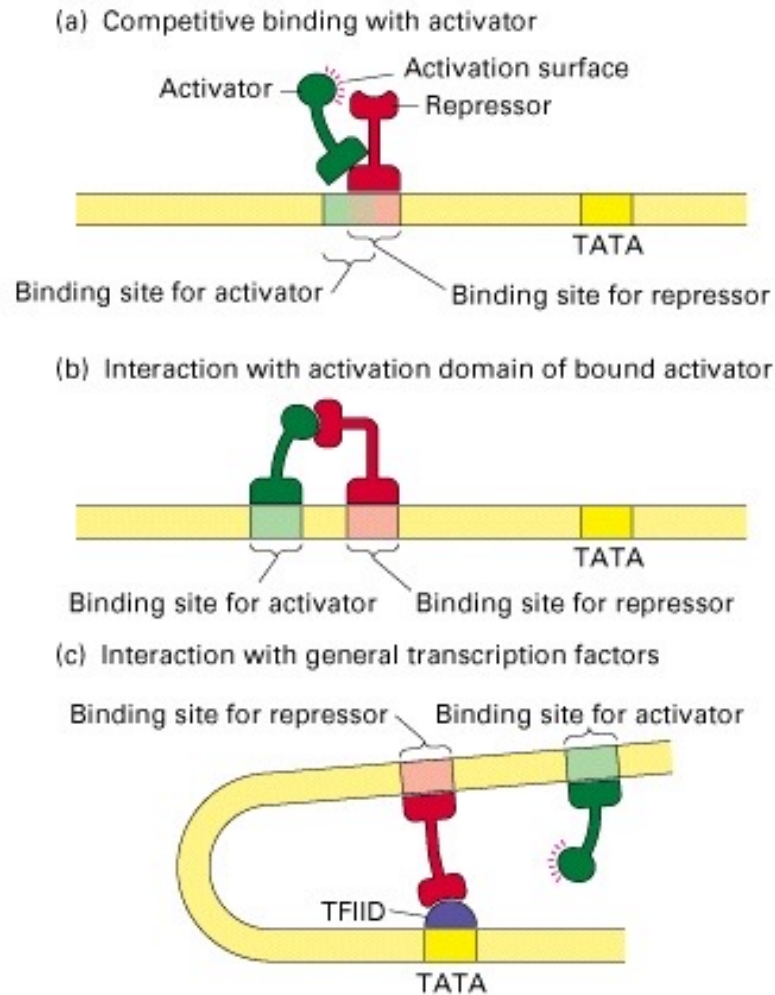
**Figure 21.19**

Coactivators may have HAT activities that acetylate the tails of nucleosomal histones.





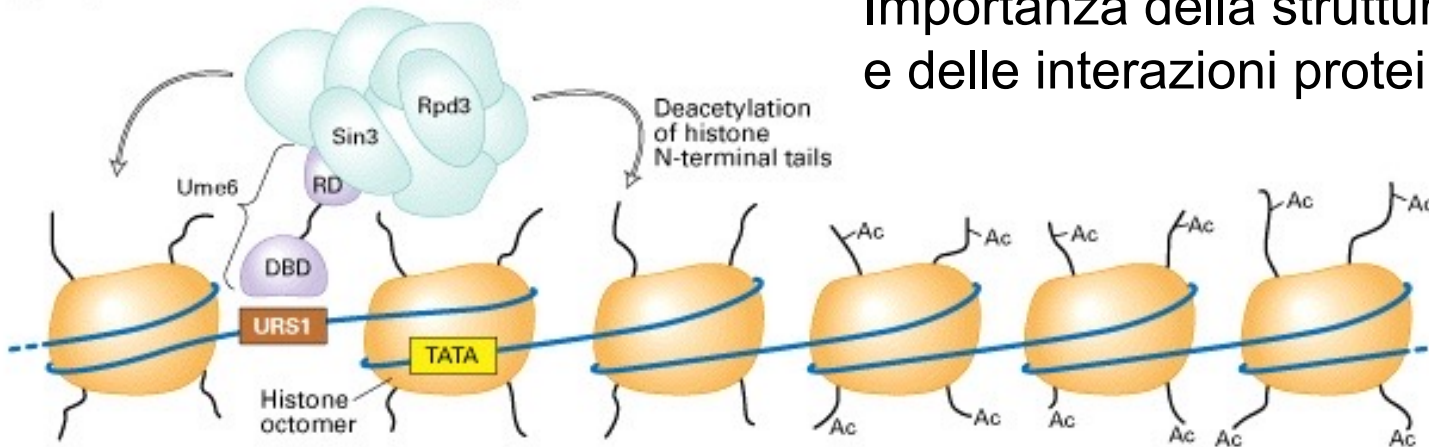
# Repressors interfere directly with transcription initiation in several ways





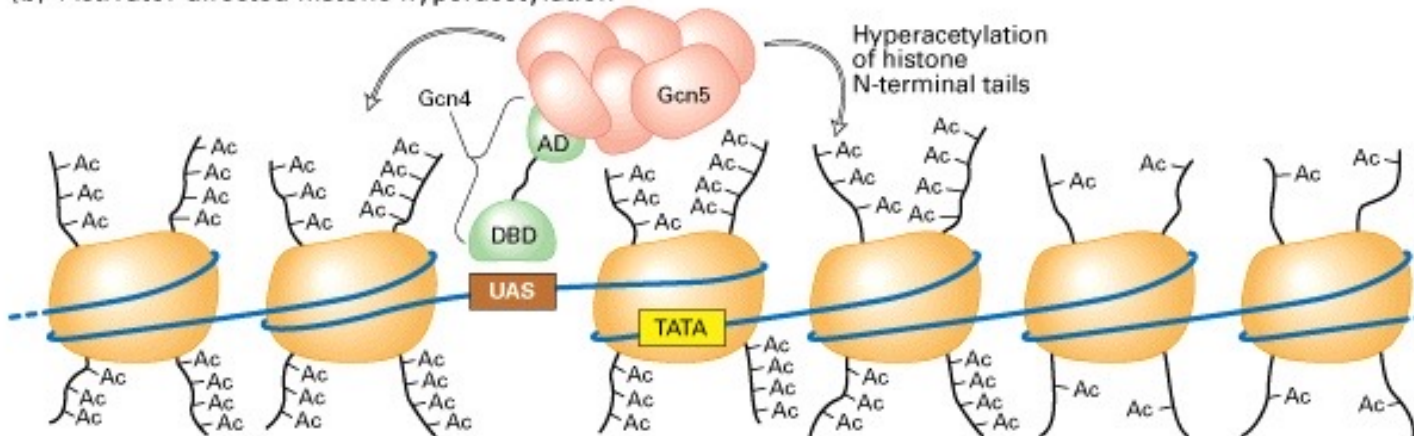
# Repressori e attivatori, grazie a co-attivatori/co-repressori, dirigono quindi la deacetilazione/acetilazione degli istoni a livello di specifici geni

(a) Repressor-directed histone deacetylation

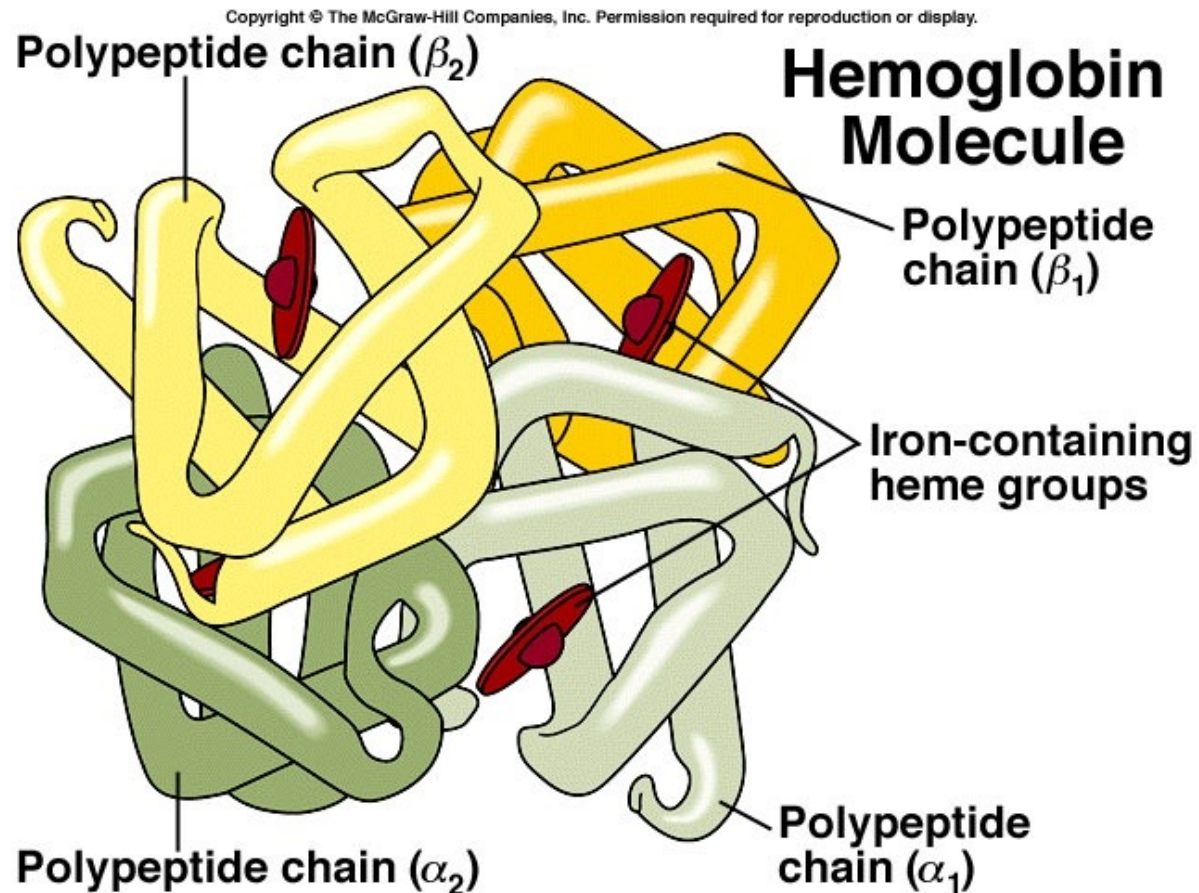


Importanza della struttura modulare e delle interazioni proteina-proteina

(b) Activator-directed histone hyperacetylation



# Controllo trascrizionale coordinato di geni vicini



**Emoglobina embrionale:** 2 catene  $\zeta$  combinate con  
(sacco vitellino)

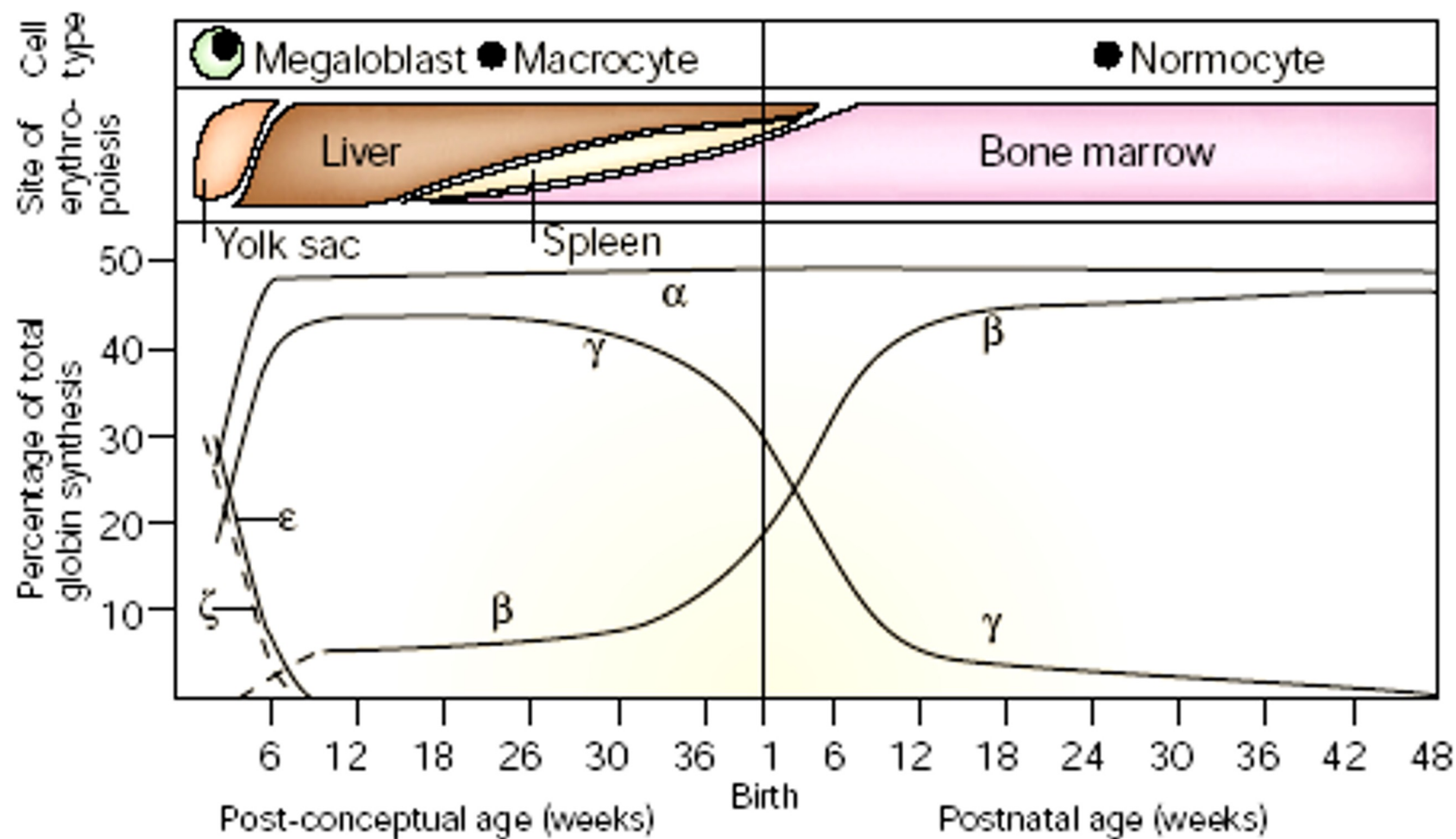
- 2 catene  $\gamma$  (Hb Portland,  $\zeta_2\gamma_2$ )
- 2 catene  $\varepsilon$  (Hb Gower,  $\zeta_2\varepsilon_2$ )

**Emoglobina fetale:** 2 catene  $\alpha$  combinate con  
(fegato embrionale)

- 2 catene  $\gamma$  (HbF,  $\alpha_2\gamma_2$ )

**Emoglobina adulta:** 2 catene  $\alpha$  combinate con  
(midollo osseo)

- 2 catene  $\beta$  (HbA,  $\alpha_2\beta_2$ )
- 2 catene  $\delta$  (HbA2,  $\alpha_2\delta_2$ )



The genes encoding hemoglobin occur in two clusters on two separate chromosomes

- The  $\alpha$ -globin cluster contains three functional genes that spans 28 kb on chromosome 16

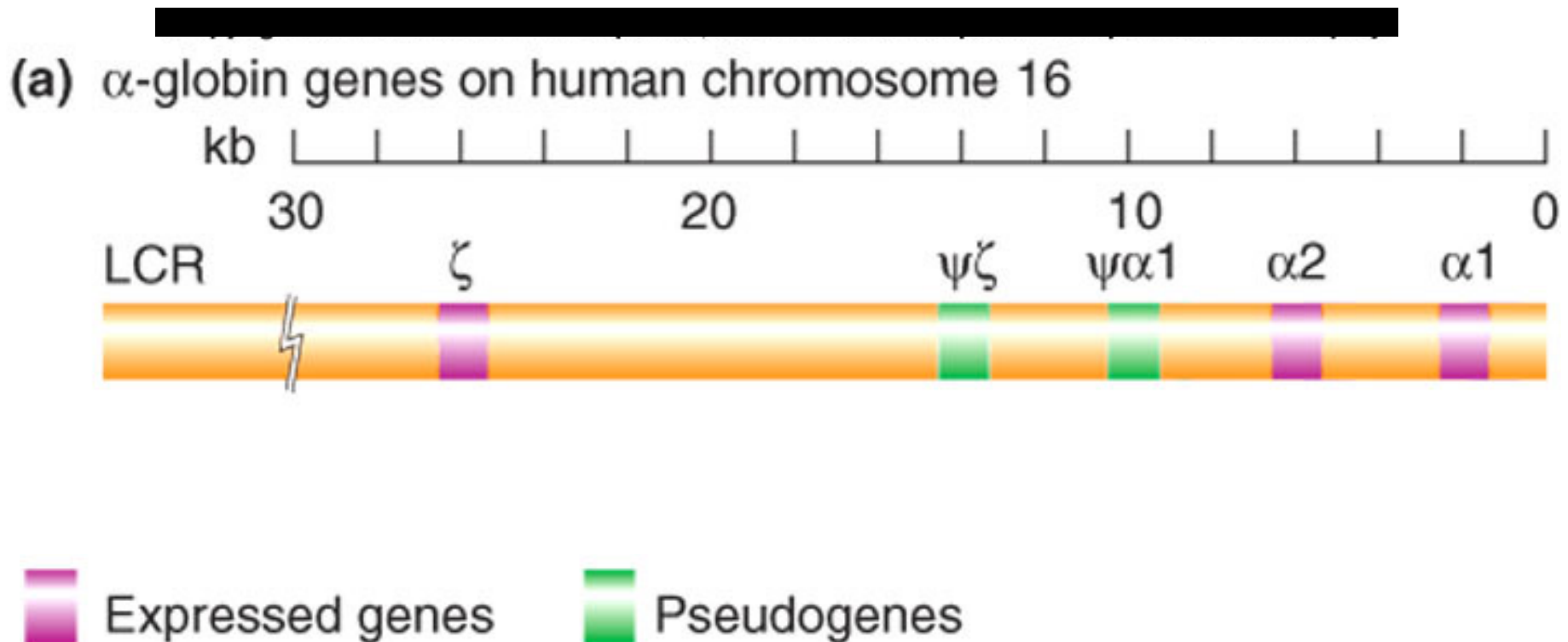
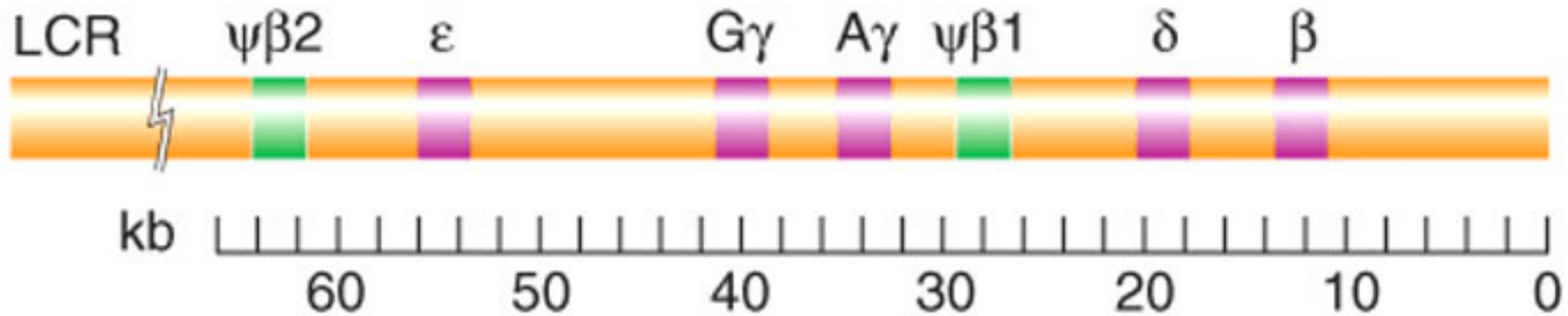


Fig. 9.20 a

The genes encoding hemoglobin occur in two clusters on two separate chromosomes

- The  $\beta$ -globin cluster contains five functional genes and two pseudogenes spanning 50 kb on chromosome 11

(b)  $\beta$ -globin genes on human chromosome 11





 Expressed genes       Pseudogenes

Fig. 9.20

b



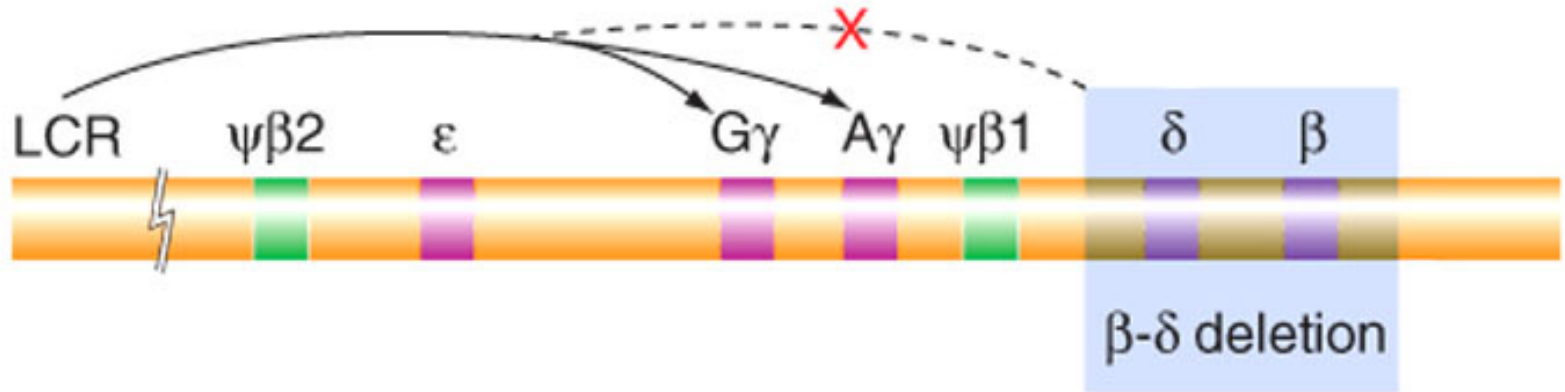
The succession of genes in each cluster correlates with the sequence of expression during development

- $\alpha$  – globin cluster
  - $\zeta$  during the first five weeks of embryonic life
  - Two  $\alpha$  chains during fetal and adult life
- $\beta$  – globin cluster
  - $\epsilon$  during first five weeks of embryonic life
  - Two  $\gamma$  chains during fetal life (presenza di polimorfismo in posizione 136 (glicina/alanina))
  - $\beta$  and  $\delta$  within a few months of birth

# Locus control region (LCR) turns genes on and off

- LCR associates with specialized DNA binding proteins at 5' end of each gene cluster, bending chromosome back on itself to turn genes on and off

(c) Mutant deleted form of  $\beta$ -globin locus

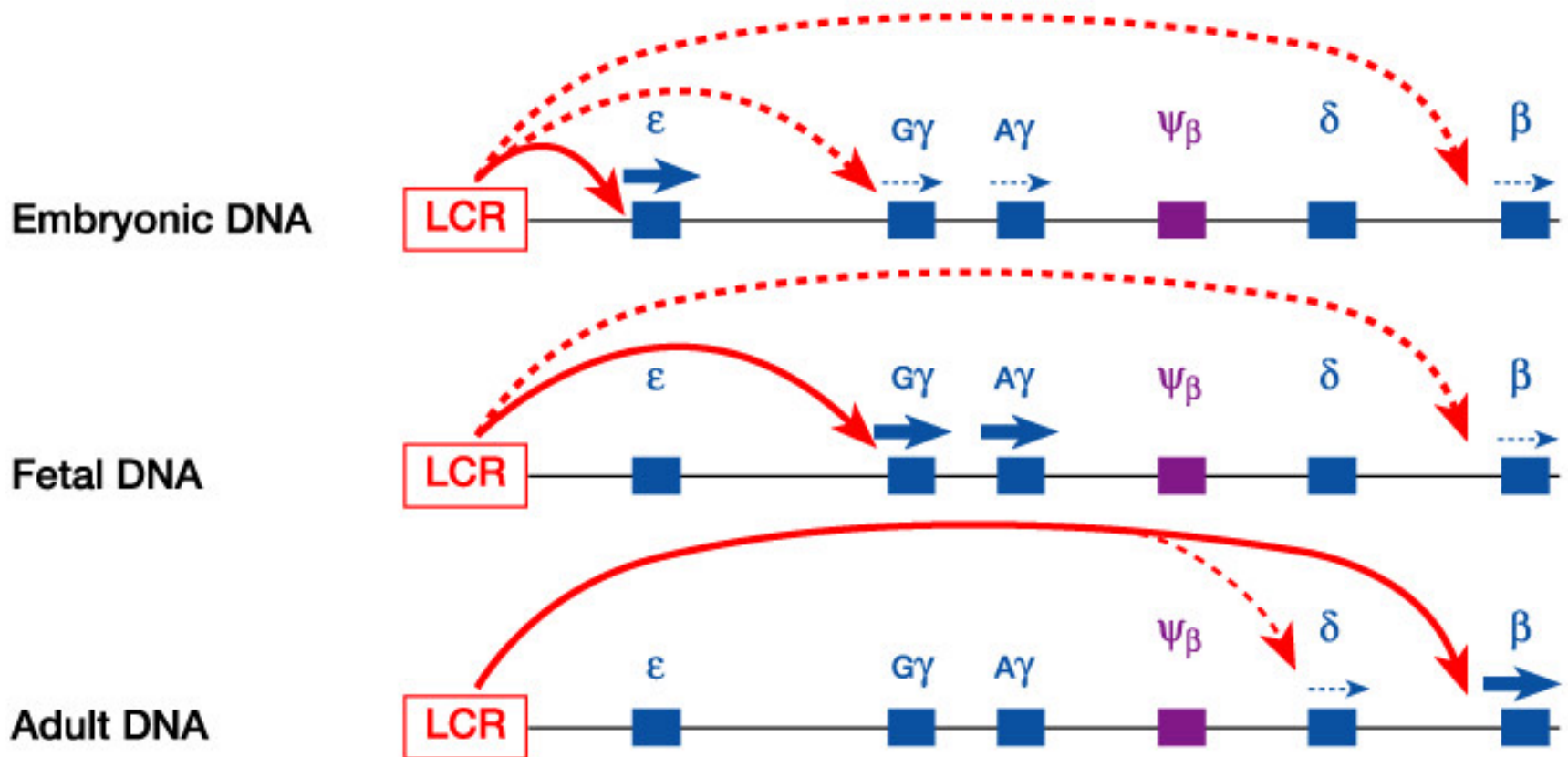


 Expressed genes       Pseudogenes

- Example where adult  $\beta$ -globin genes are removed
  - LCR cannot switch from activating fetal genes to activating adult genes
  - Fetal genes remain active in adult

# COMPETIZIONE

l'espressione di alcuni geni (geni umani delle globine) è coordinata da una regione di controllo dominante LCR localizzata a monte dei geni delle globine

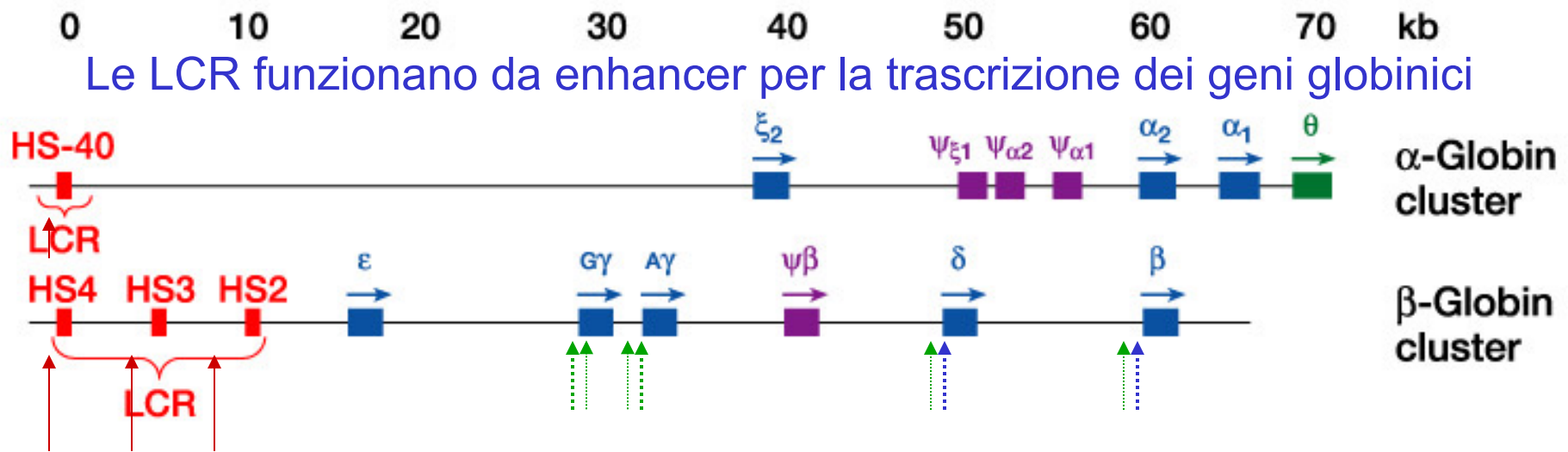


$\zeta_2\varepsilon_2$ , Emoglobina Embrionale (espressione nel sacco vitellino)

$\alpha_2\gamma_2$  HbF Emoglobina fetale (espressione nel fegato e nella milza)

$\alpha_2\delta_2$  HbA<sub>2</sub> Emoglobina dell'adulto

$\alpha_2\beta_2$  HbA



Altri siti ipersensibili nella regione dei promotori dei singoli geni -> specificità dello stadio di sviluppo.

Siti ipersensibili del fegato fetale

Siti ipersensibili nel midollo osseo adulto

Siti ipersensibili a DNAsi I  
Eritroide-specifici (enhancer)

## Come viene coordinata l'espressione di geni fisicamente separati?

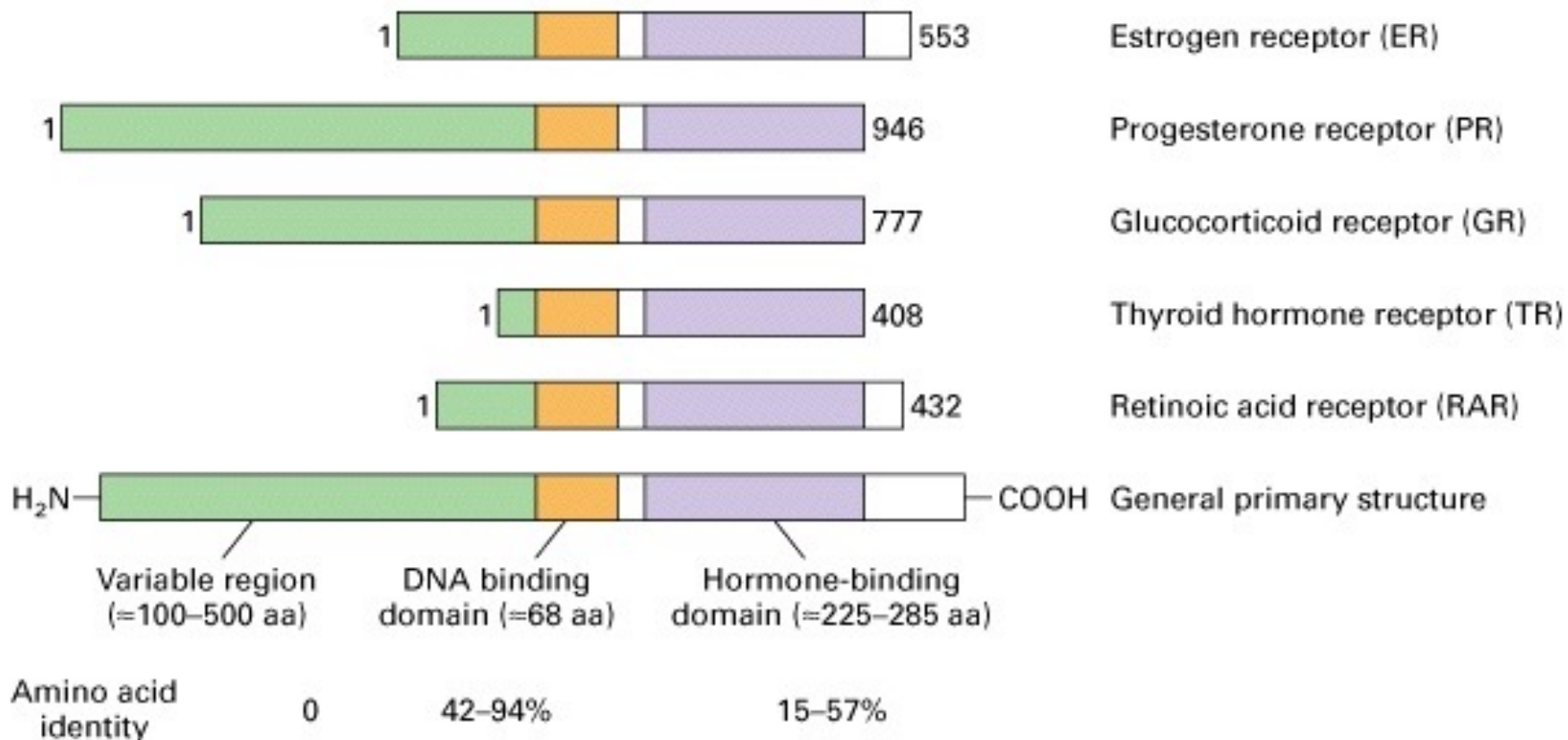
Gli eucarioti utilizzano sequenze di controllo sul DNA, chiamate elementi responsivi. Questi possono funzionare sia come elementi di controllo prossimali, sia come componenti degli enhancer. La presenza dello stesso elemento responsivo in prossimità di geni diversi ne permette il controllo simultaneo.

La regolazione della trascrizione in risposta a stimoli extra-cellulari determina l'attivazione specifica di un fattore di trascrizione ed il suo legame agli elementi responsivi

1) SEGNALI LIPOSOLUBILI

2) SEGNALI PROTEICI

# Una classe di fattori trascrizionali coinvolti nella regolazione genica coordinata: i recettori nucleari



Fattori di trascrizione inducibili da ormoni steroidei (progesterone, estrogeno, testosterone, glucocorticoidi)

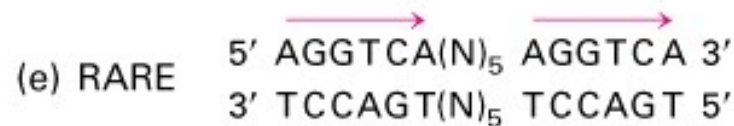
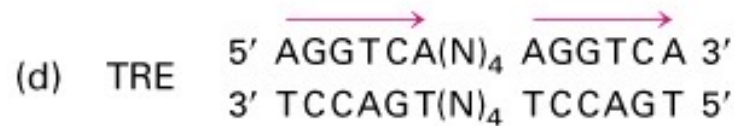
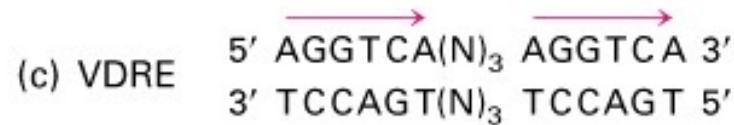
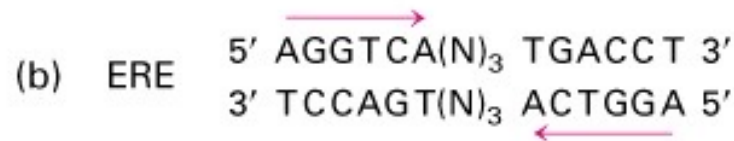
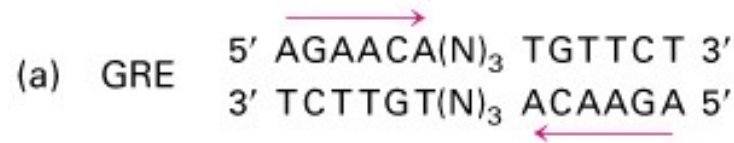
Si legano a recettori citoplasmatici o nucleari. I recettori presentano due domini conservati

a) dominio di legame con il DNA (68 aa) ( zinc finger)

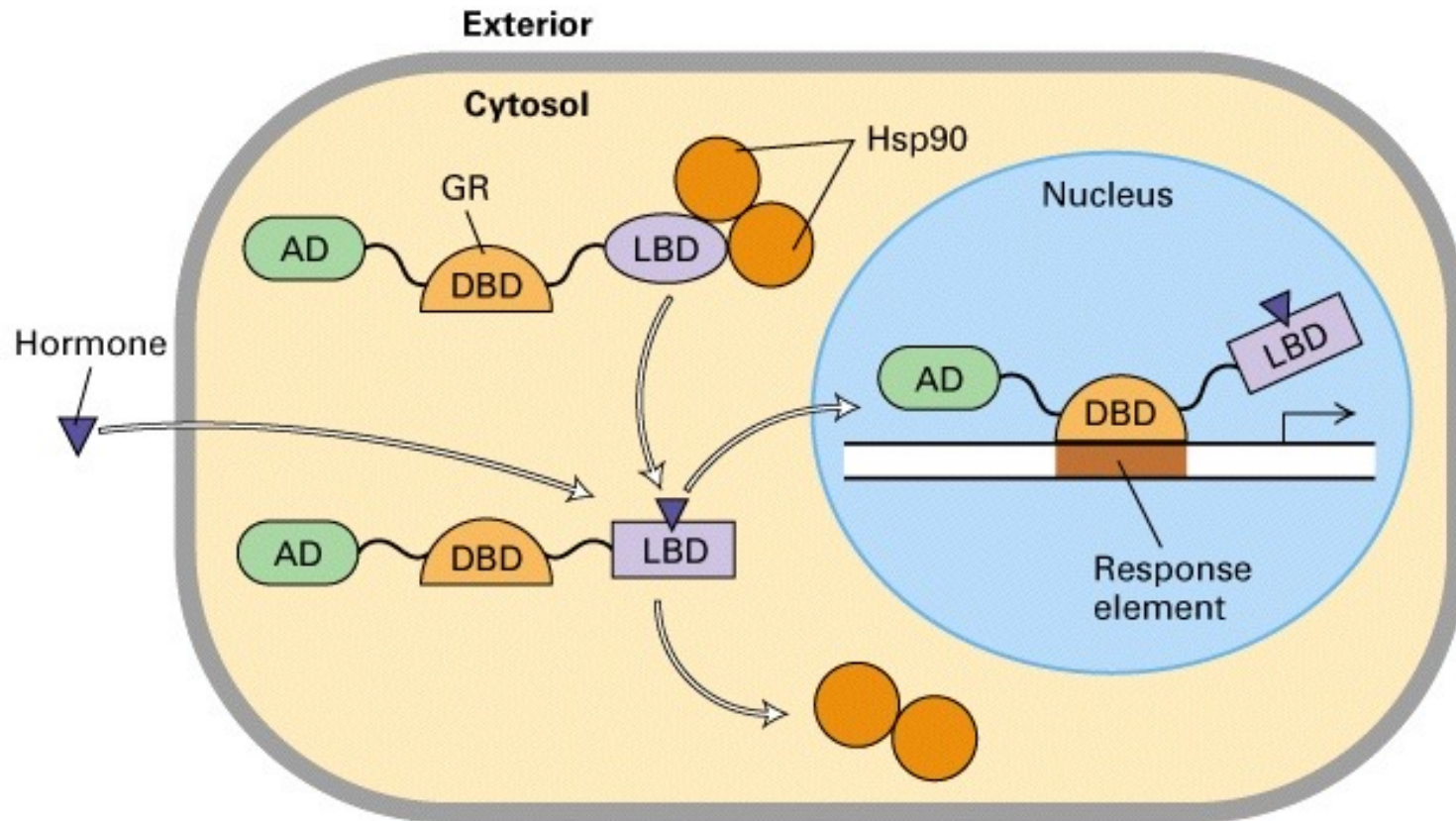
b) dominio di legame con il ligando (240 aa).



# Response elements are DNA sites that bind several major nuclear receptors

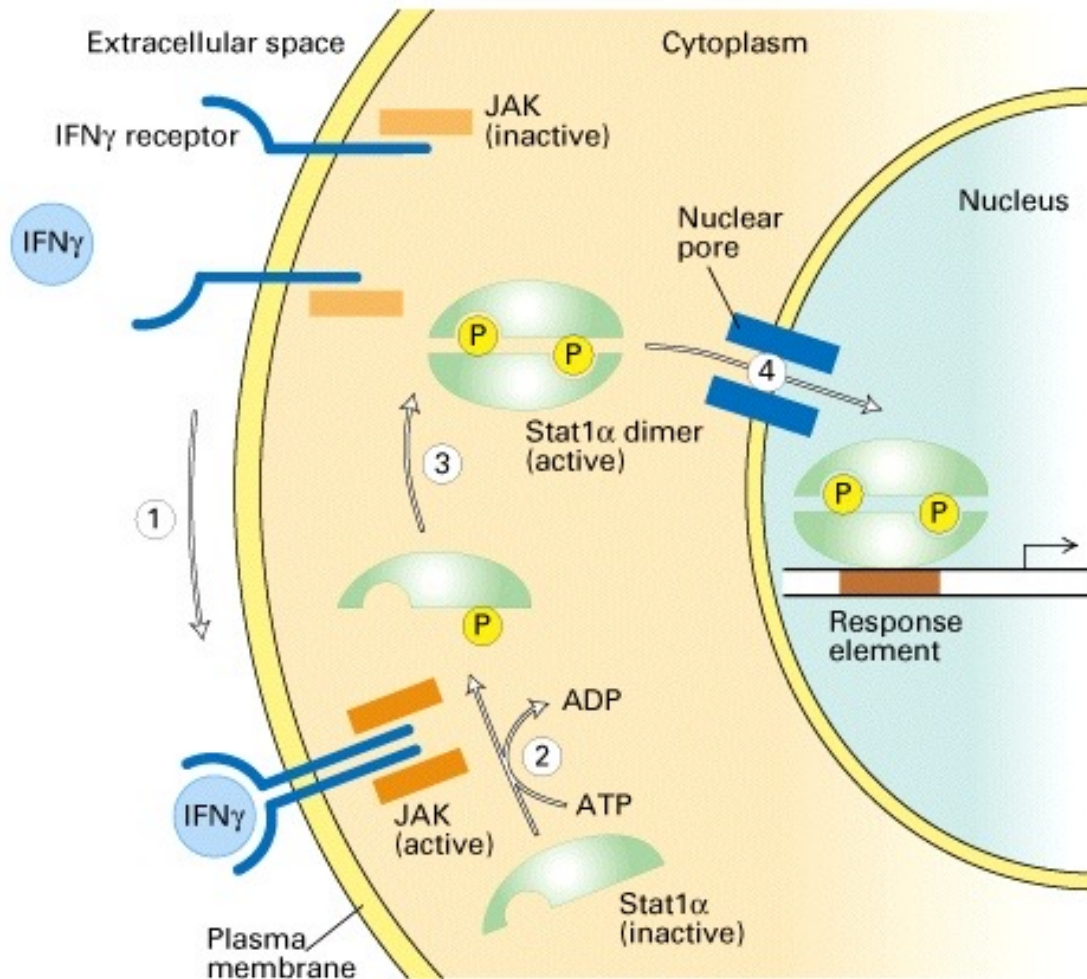


# Model of hormone-dependent gene activation by the glucocorticoid receptor



In assenza di stimolo il recettore è inattivato mediante il legame con una proteina di inibizione (HSP90)

# Polypeptide hormones signal phosphorylation of some transcription factors



**Model of IFN $\gamma$ -mediated gene activation by phosphorylation and dimerization of Stat1 $\alpha$**

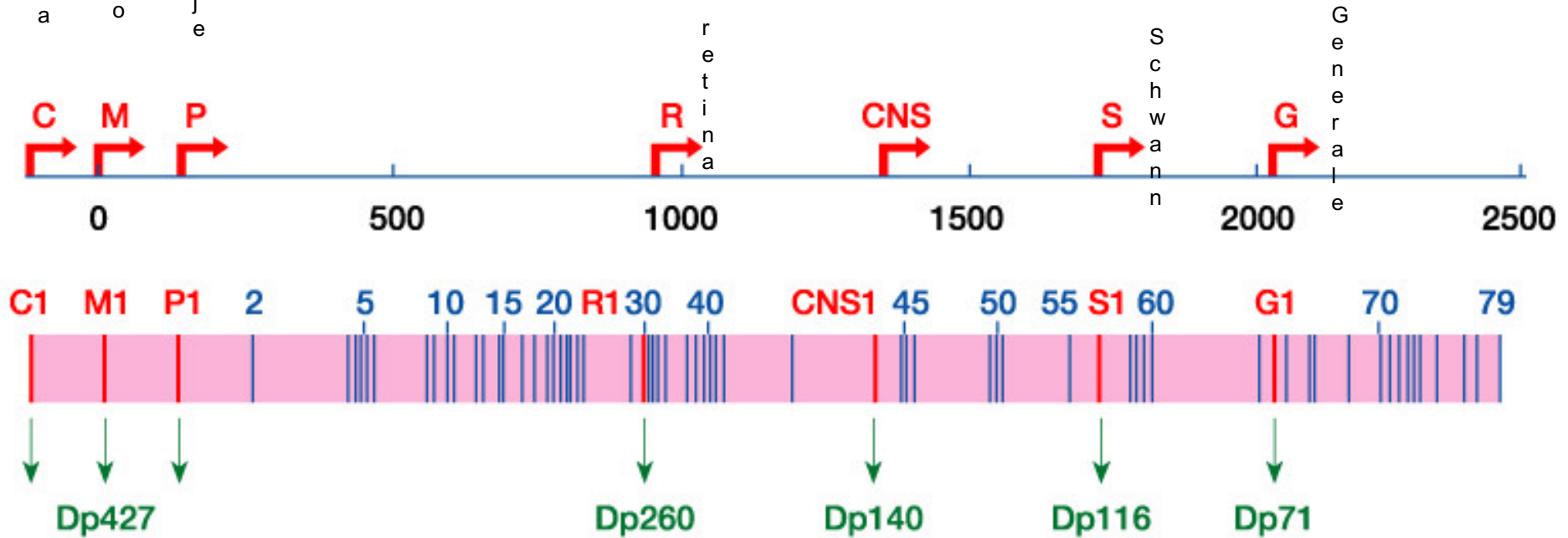
# Controllo post-trascrizionale

L'uso di **promotori alternativi**, di **splicing alternativi**, di **poliadenilazioni alternative** e di **editing**, può dare luogo a isoforme diverse con proprietà differenti quali :

- Isoforme tessuto-specifiche. Gene DMD presenta otto promotori diversi a seconda del tessuto, che danno origine a 8 diverse proteine
- Isoforme stadio di sviluppo specifiche
- Isoforme transmembrana o solubili
- Diversa localizzazione cellulare
- Funzione cambiata -> isoforme di fattori trascrizionali che agiscono da attivatori o repressori a seconda dei domini contenuti

Lo splicing alternativo è controllato da proteine che si legano alle molecole di pre-mRNA e fanno in modo che alcuni siti di splicing non vengano utilizzati e altri siano invece attivati.

# Promotori alternativi: Il gene della distrofina

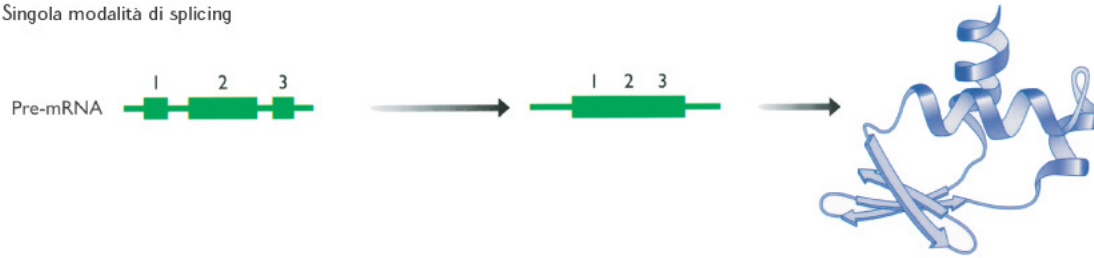


- Tessuto-specificità
- Diverso stadio di sviluppo
- Differente localizzazione sub-cellulare
- regolazione genica sesso-specifica

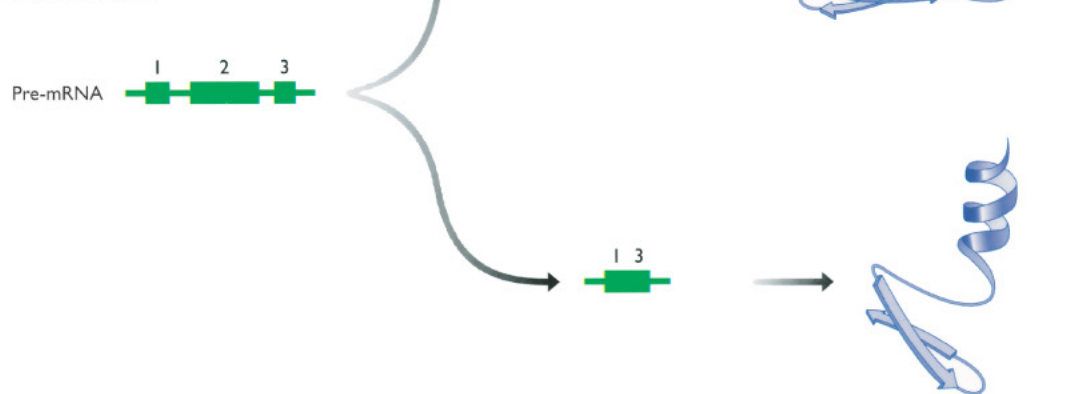


# Splicing alternativo

(A) Singola modalità di splicing



(B) Splicing alternativo

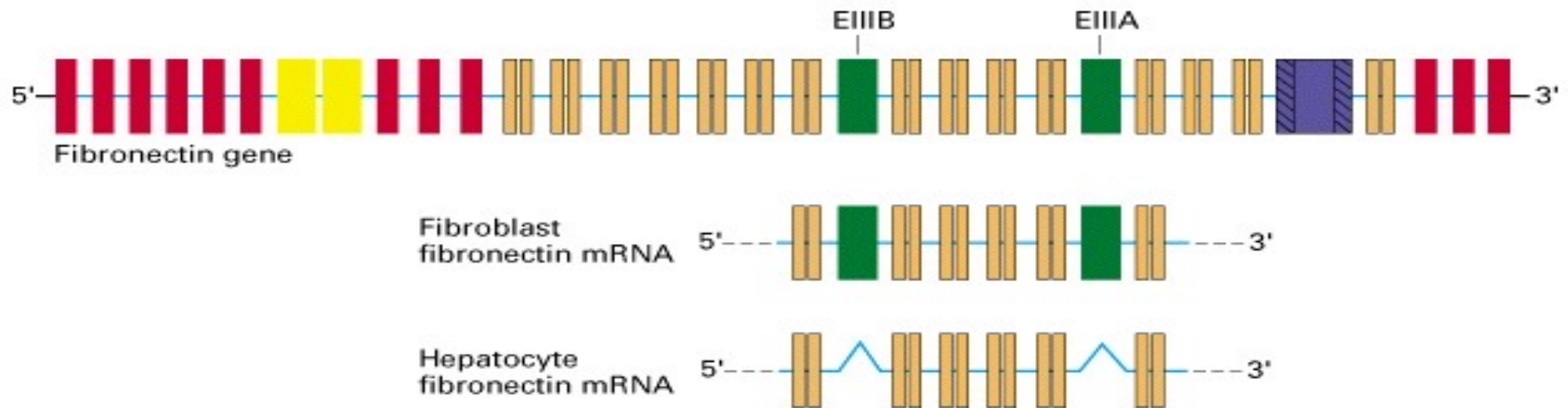


**Figura 10.19** L'idea che ciascun pre-mRNA segua una singola modalità di splicing si è dimostrata sbagliata con la scoperta dello splicing alternativo.

For example, exons can be extended or shortened, skipped or included, and introns can be removed or retained in the mRNA

# Splicing alternativo

splicing alternativo, tessuto-specifico degli mRNA delle fibronectine

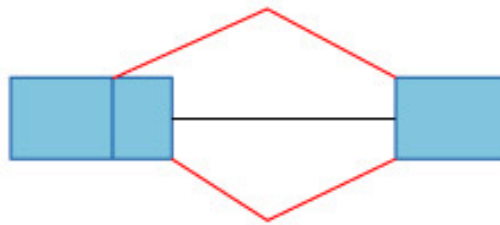


# Splicing Alternativo e promotori multipli

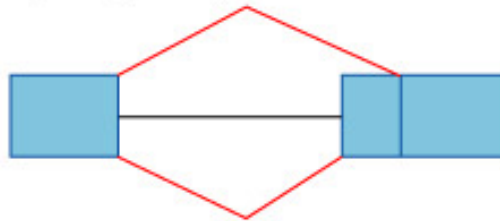
(A) Retained intron



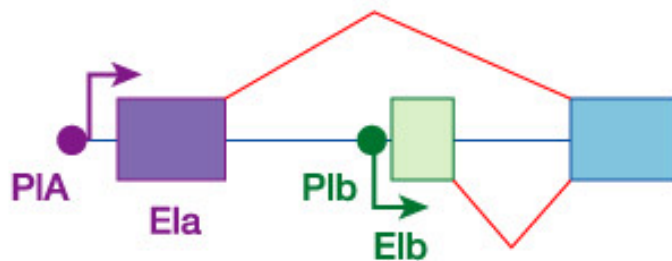
(B) Competing 5' splice sites



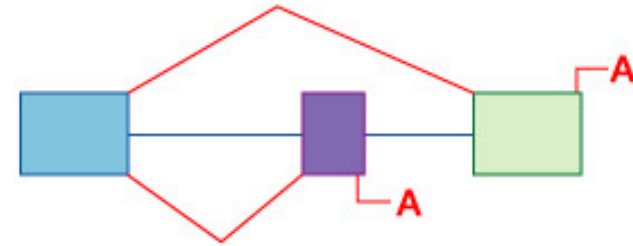
(C) Competing 3' splice sites



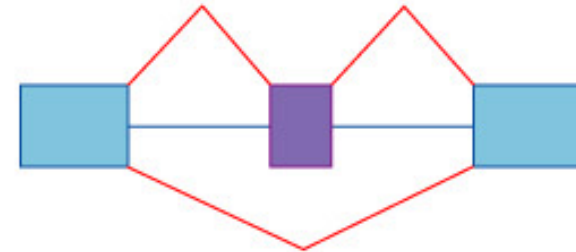
(D) Multiple promoters



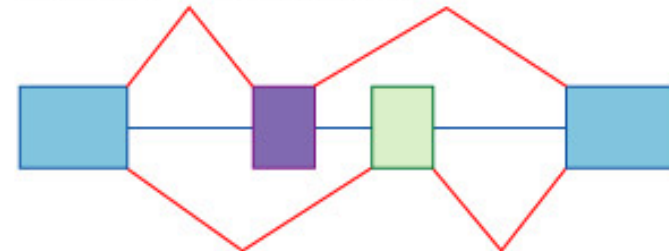
(E) Multiple poly(A) sites



(F) Cassette exons

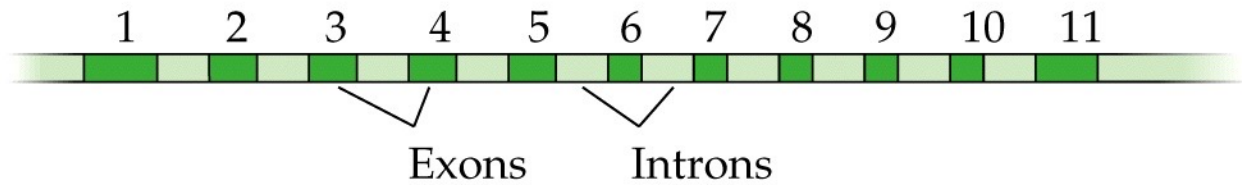


(G) Mutually exclusive exons



# Splicing alternativo delle tropomiosine

Primary RNA transcript for tropomyosin: 11 exons



Initially processed mRNA transcripts

Skeletal muscle: missing exon 2



Smooth muscle: missing exons 3 and 10



Fibroblast: missing exons 2, 3, and 10



Liver: missing exons 2, 3, 7, and 10



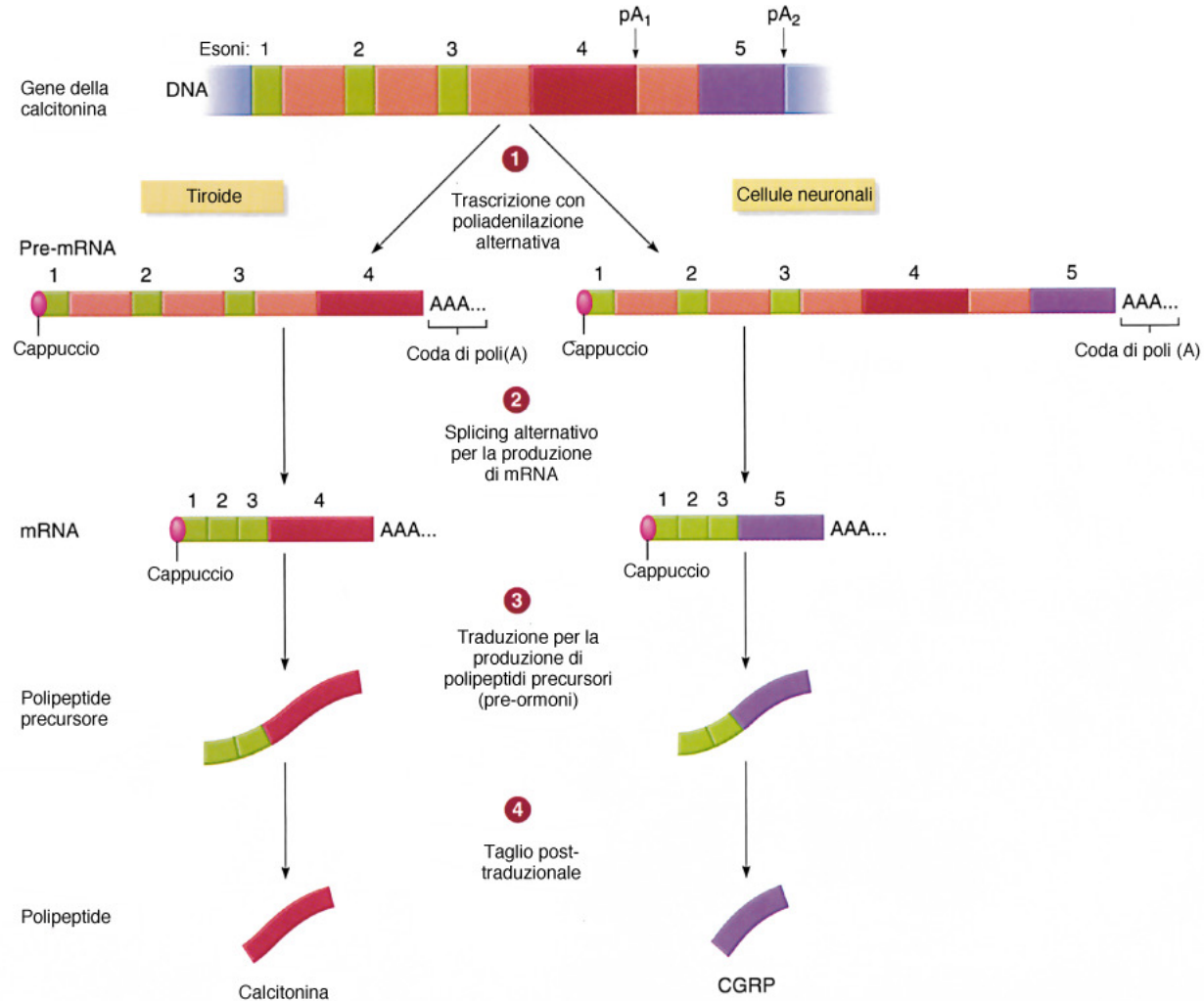
Brain: missing exons 2, 3, 10, and 11



# Polyadenilazione e splicing alternativi

**Figura 17.14**

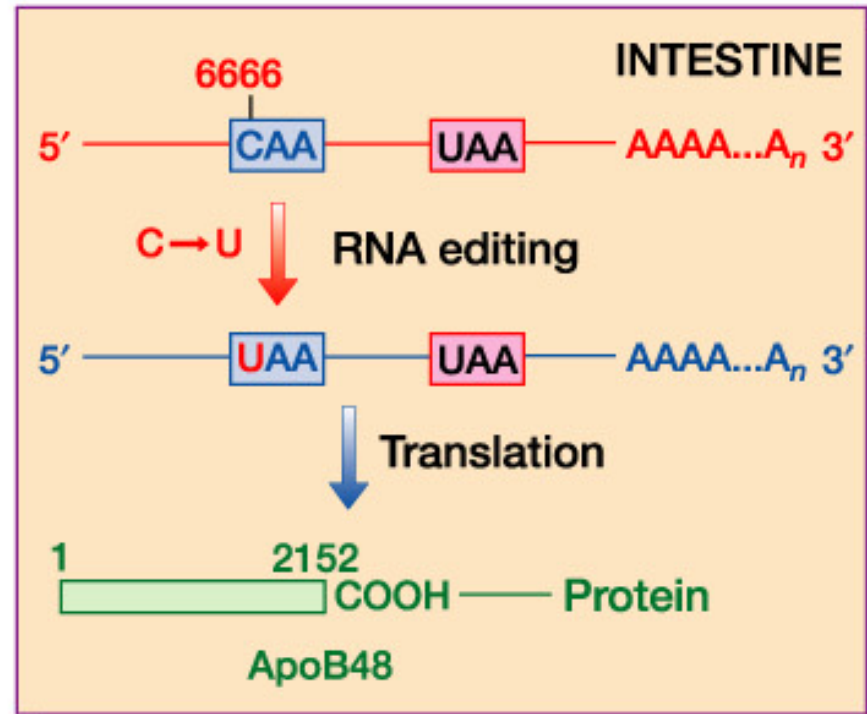
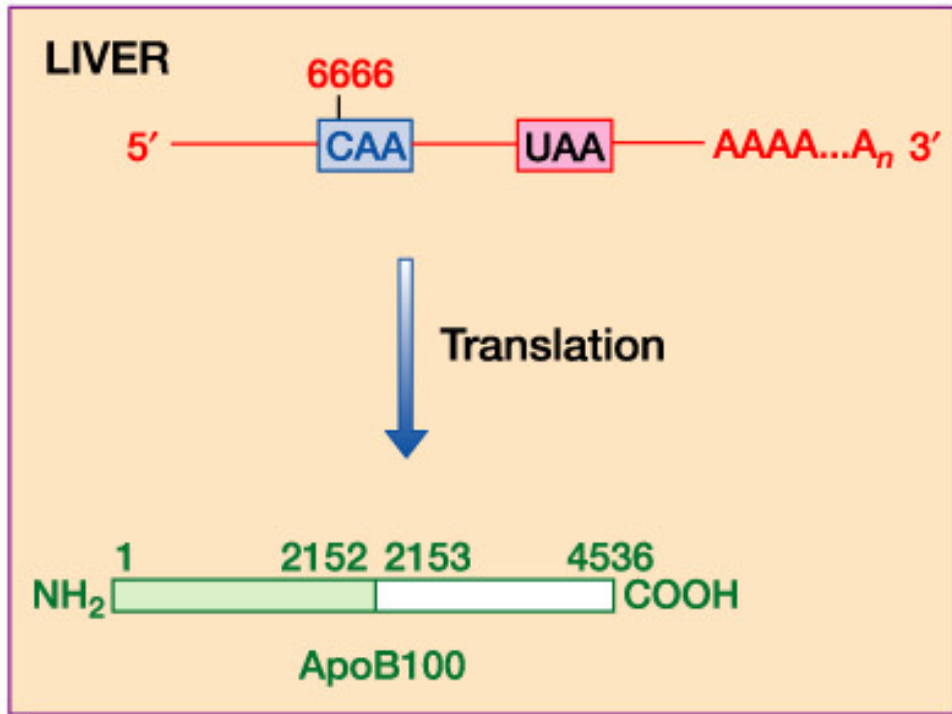
**Poliadenilazione alternativa e splicing alternativo per la formazione di prodotti tessuto-specifici del gene umano della calcitonina, *CALC*.** Nella ghiandola tiroide viene prodotta la calcitonina, mentre in alcuni neuroni viene prodotto il CGRP (peptide correlato al gene della calcitonina).



# RNA editing: il gene ApoB



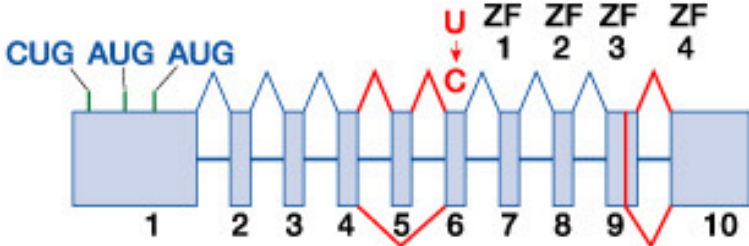
altera la sequenza dei pre-mRNAs



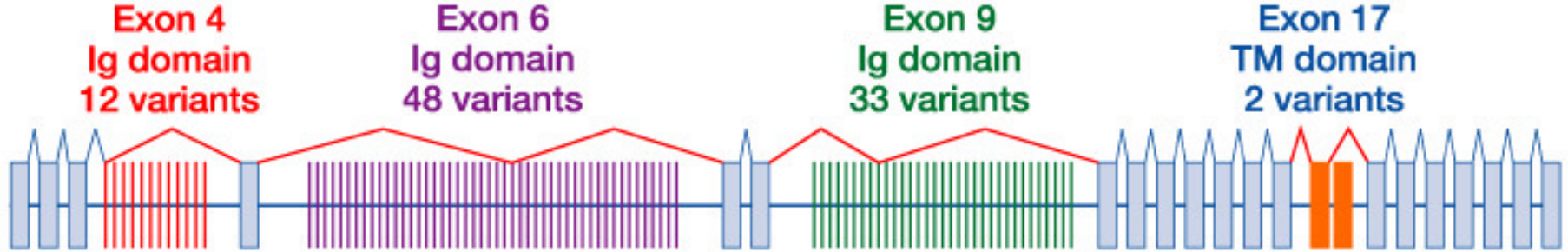


Gene del Tumore di Wilms: sono possibili 24 isoforme grazie a tre diversi codoni di inizio nell'esone 1, un RNA editing U-->C, nell'esone 6 e due splicing alternativi, Una omissione variabile (skipping) dell'esone 5 e una variazione di lunghezza dell'esone 9 dovuta alla competizione di un sito di splicing 5'. (3X2X2X2)

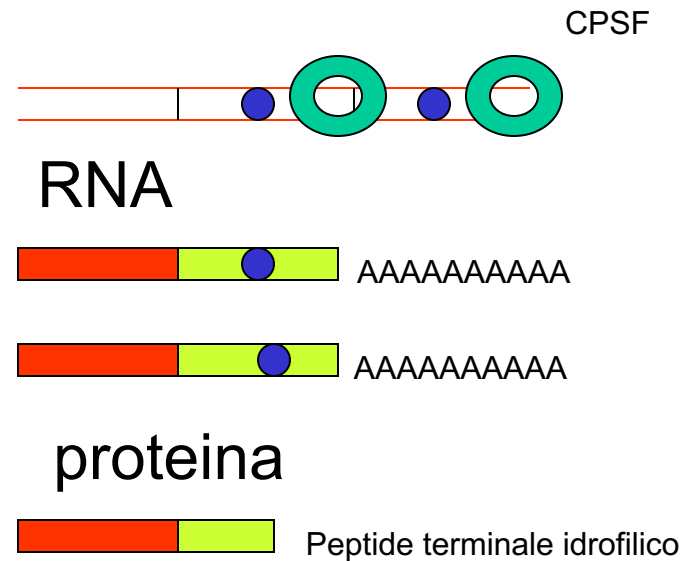
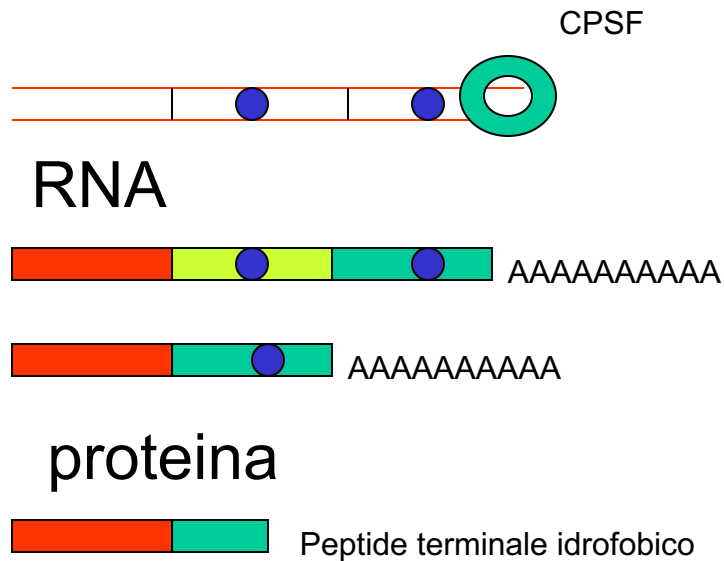
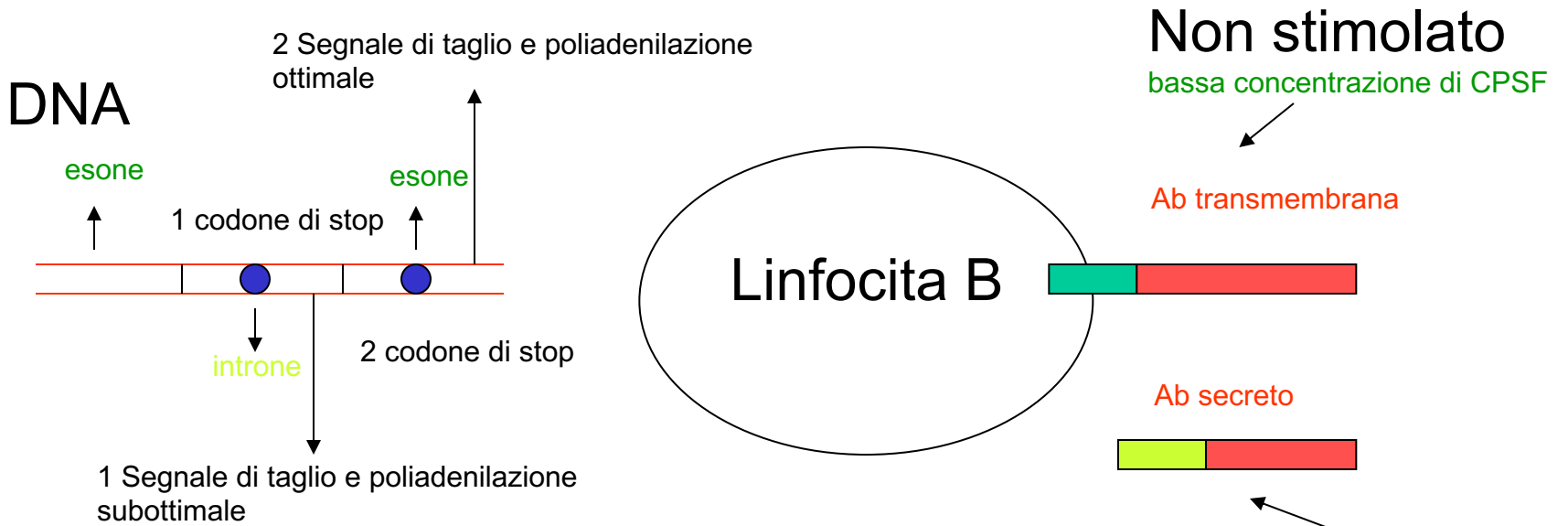
(A) WT1



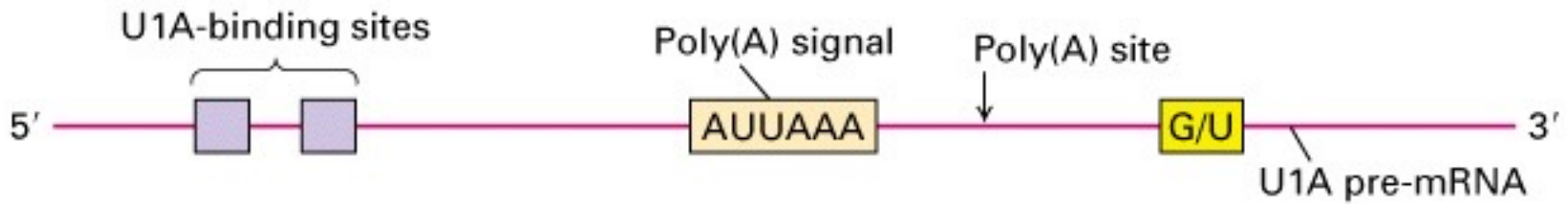
(B) Dscam



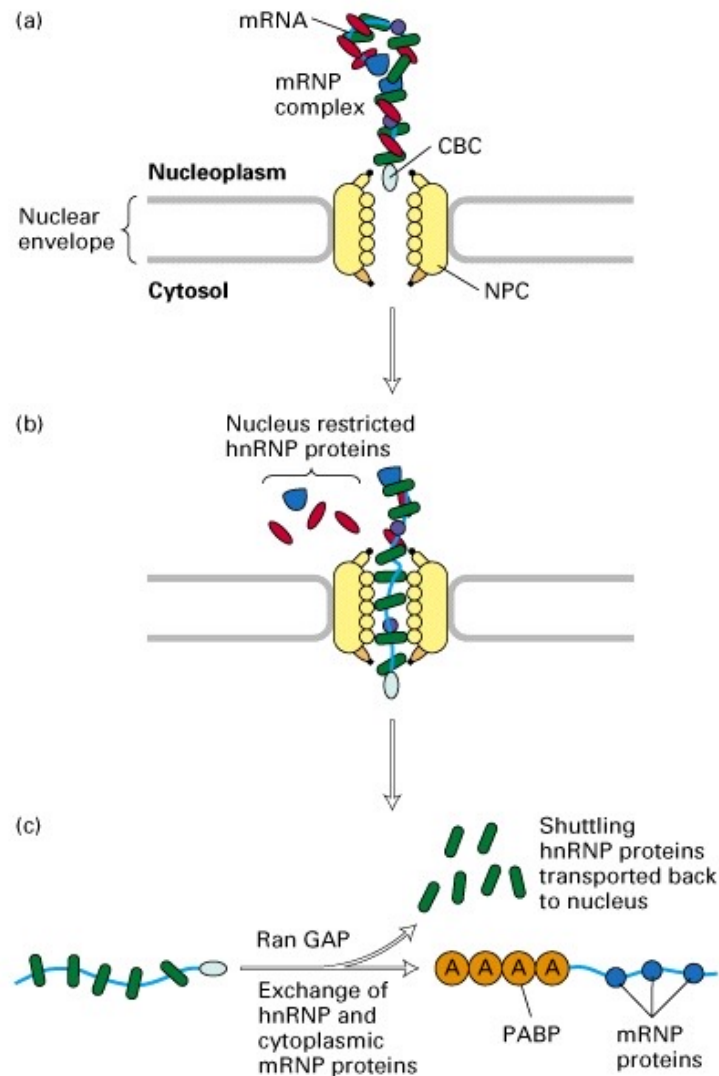
Gene Dscam di drosophila: sono possibili 38.016 isoforme (12X48X33X2) selezionando Varianti mutualmente esclusive da ciascuno degli esono 4, 6 e 9.



# Regolazione del processamento dell' mRNA: la proteina U1A inibisce la poliadenilazione del suo stesso pre-mRNA



# A model for hnRNP-mediated export of mRNAs from the nucleus



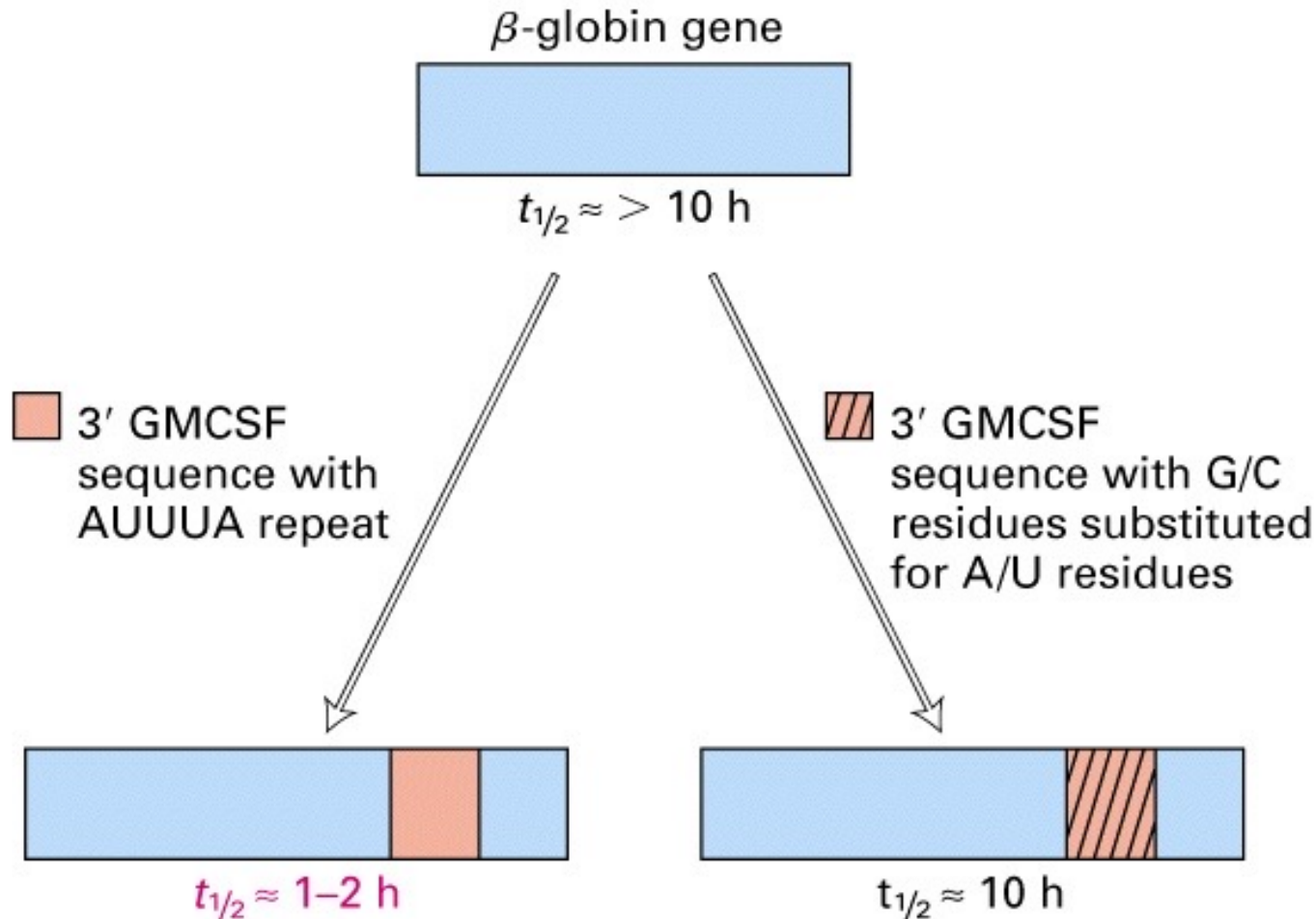
# La stabilità dell' mRNA citoplasmatico è variabile

**TABLE 11-1** Half-Lives of Messenger RNAs

| Cell                                    | Cell Generation Time | mRNA Half-Lives* |  |
|---|----------------------|------------------|--|
|   |                      | Average          | Range Known for Individual Cases   |
| <i>Escherichia coli</i>                 | 20–60 min            | 3–5 min          | 2–10 min   |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast) | 3 h                  | 22 min           | 4–40 min   |
| Cultured human or rodent cells          | 16–24 h              | 10 h             | 30 min or less (histone and <i>c-myc</i> mRNAs)<br>0.3–24 h (specific mRNAs of cultured cells) |

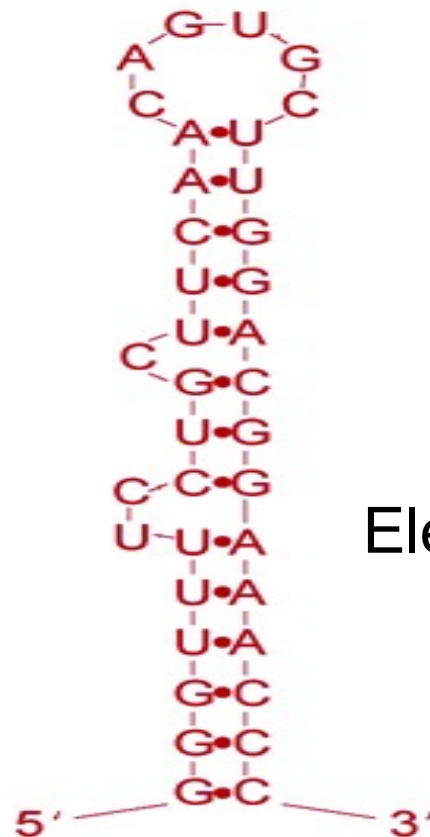
\*For information on specific mRNA half-lives for *E. coli*, see A. Hirashima, G. Childs, and M. Inouye, 1973, *J. Mol. Biol.* **119**: 373; for yeast, see L.-L. Chia and C. McLaughlin, 1979, *Mol. Gen. Genet.* **170**:137; and for mammalian cells, see M. M. Harpold, M. Wilson, and J. E. Darnell, 1981, *Mol. Cell Biol.* **1**:188.

# The destabilizing effect of AUUUA sequences on mRNA half-life ( $t_{1/2}$ )





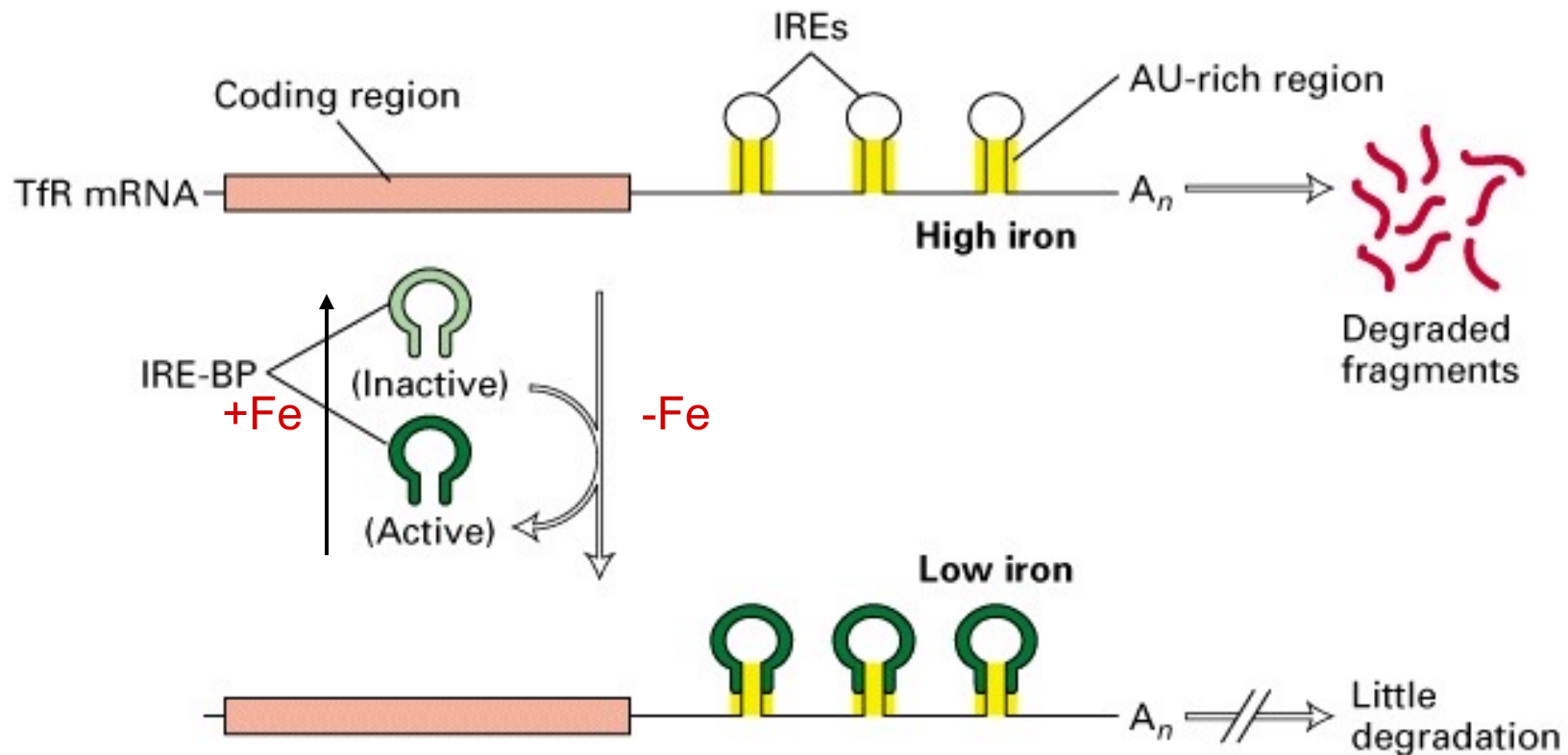
Sono state evidenziate numerose sequenze di regolazione all'interno delle sequenze non tradotte (5' e 3' UTR). Esistono proteine che legandosi a specifiche sequenze di RNA controllano l'espressione genica a livello traduzionale



Elemento IRE

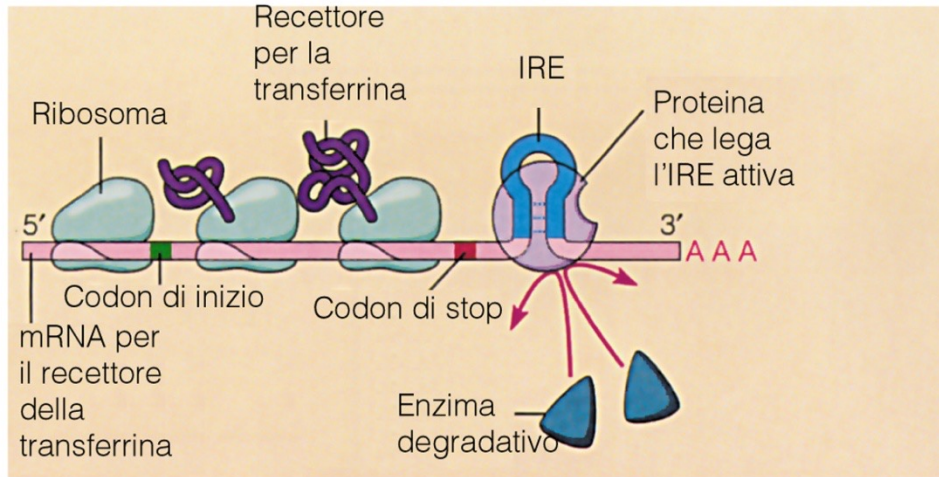
# La velocità di degradazione di alcuni mRNA eucariotici è regolata

Regolazione Ferro-dipendente della stabilità dell' mRNA del recettore della transferrina



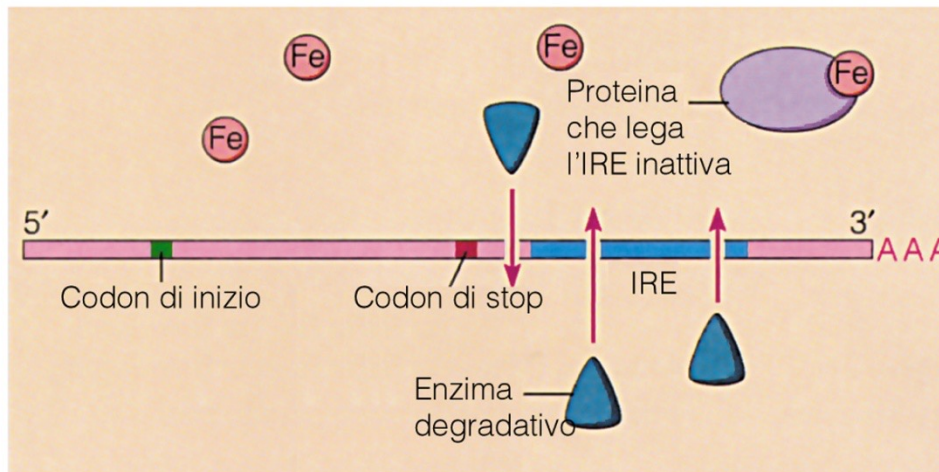
Una proteina in grado di legarsi a IRE (IRE-BP) regola la produzione della transferrina. Essa in presenza di basse concentrazioni di ferro si lega agli elementi di risposta al ferro (IRE) che si trovano nella regione non tradotta al 3', impedendo la degradazione dell'mRNA

### Ferro basso



La proteina si lega all'IRE;  
l'mRNA è protetto; elevata sintesi  
del recettore per la transferrina

### Ferro alto

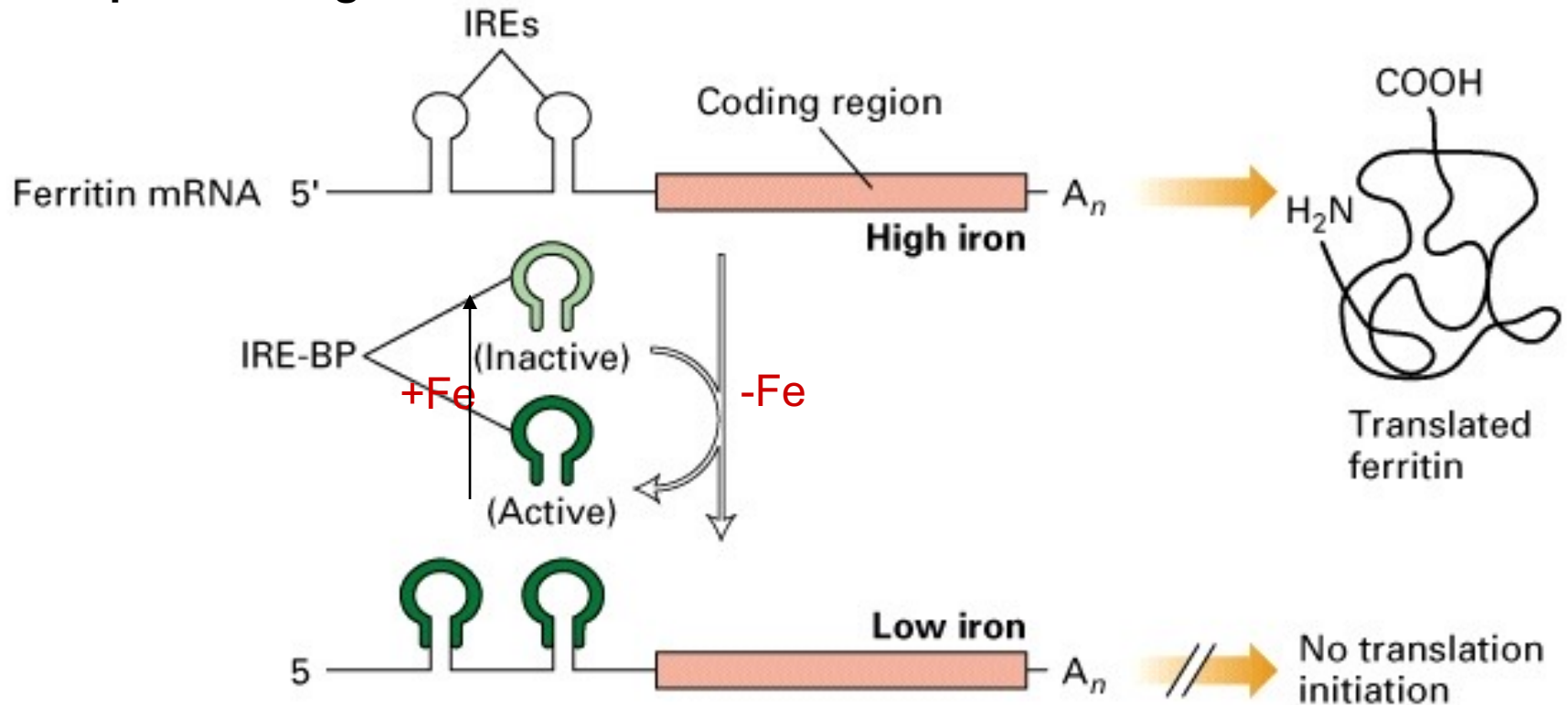


La proteina non può legarsi all'IRE;  
l'mRNA è degradato; bassa sintesi  
del recettore per la transferrina

# Controllo tradizionale

# Translation of some mRNAs is regulated by specific RNA-binding proteins

## Iron-dependent regulation of translation of ferritin mRNA

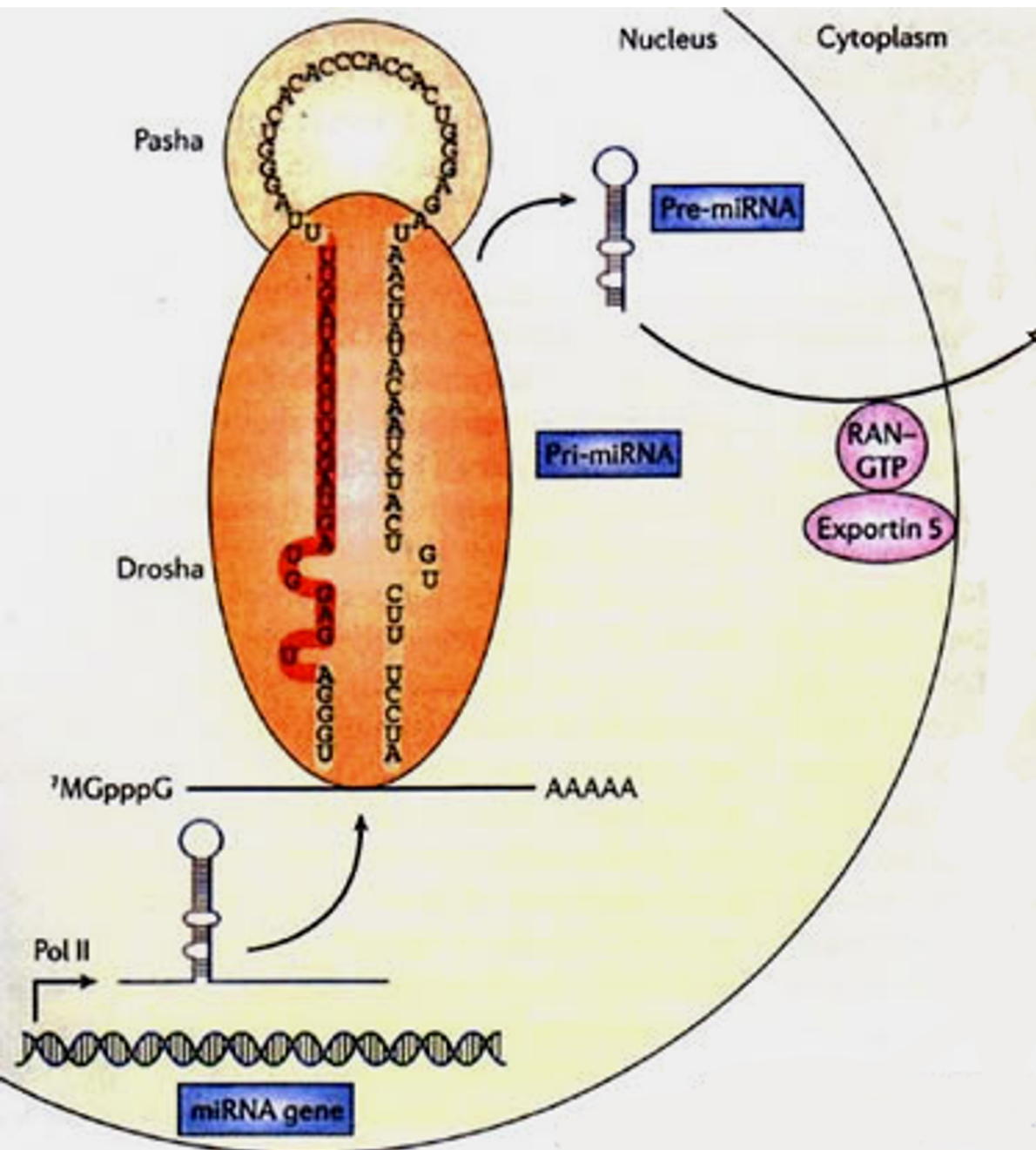


La proteina che si lega a IRE (IRE-BP) inibisce la produzione della catena pesante della ferritina legandosi agli elementi di risposta al ferro (IRE) che si trovano nelle regioni non tradotte al 5'

Controllo post-  
trascrizionale/traduzionale  
da parte dei piccoli ncRNA



# Genesi dei microRNA:



Sequenze di RNA che possono formare strutture a "forcina per capelli" (hairpin loop) Producono un pri-miR

Il Pri-miR viene processato da un complesso nucleasico: **DROSHA, PASHA**

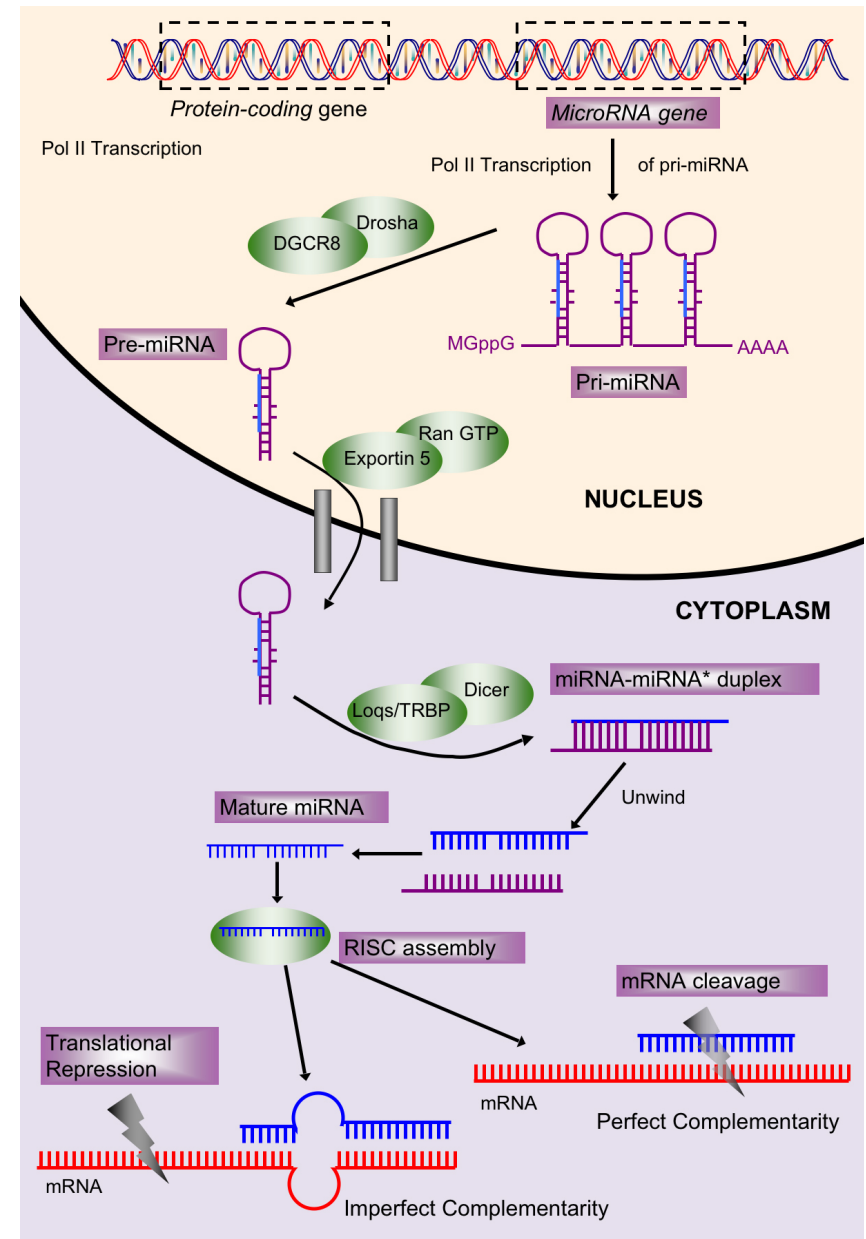
Si genera un pre-miR

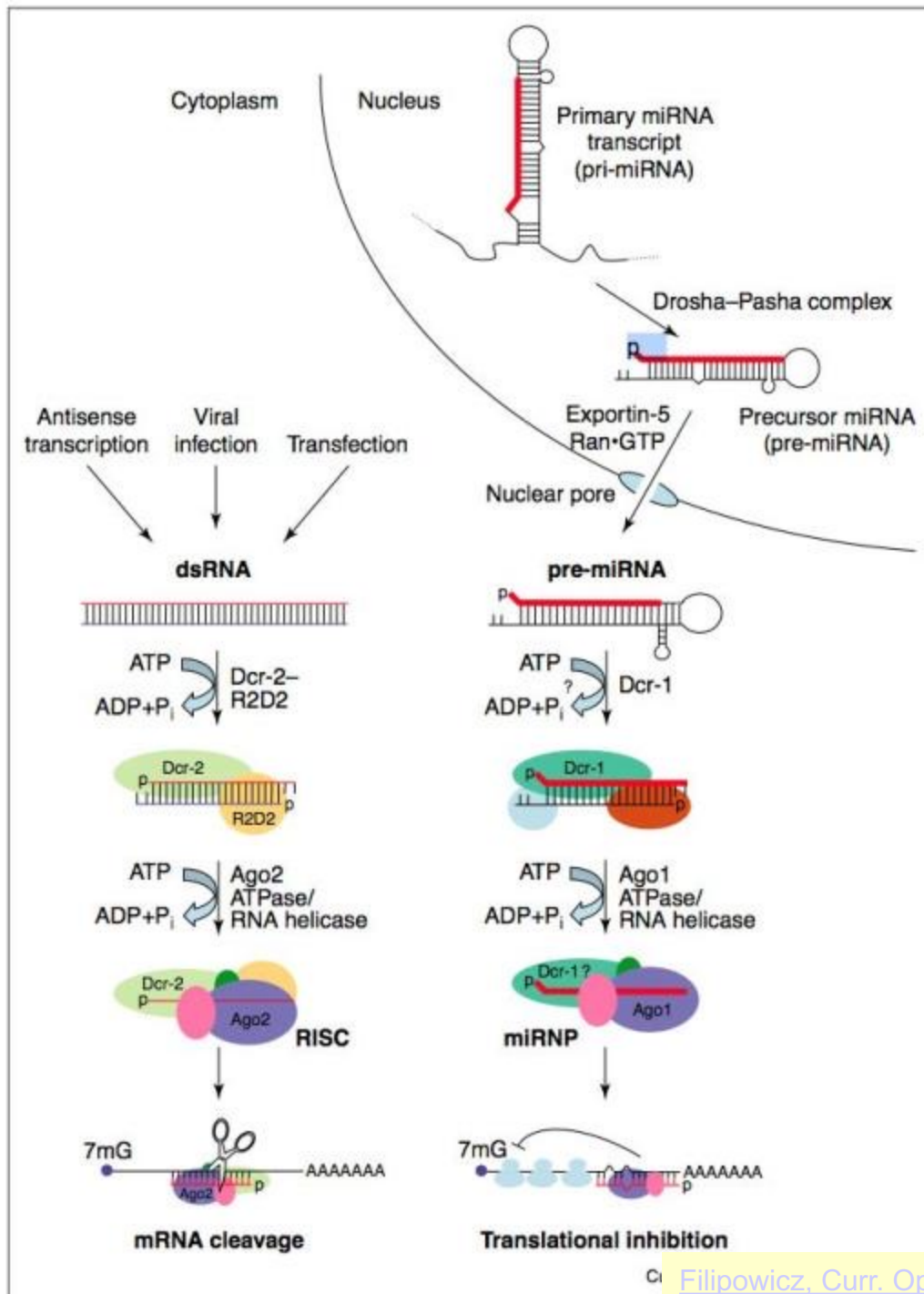
Il pre-miR viene esportato dal nucleo al citoplasma da esportina 5/RAN

# miRNA transcription and maturation

1. Nuclear gene to primary-miRNA
2. Cleavage to miRNA precursor by Drosha/Rnase III
3. Transported to cytoplasm by Ran-GTP/Exportin 5
4. Loop cut by DICE
5. \*duplex is short-lived and cut by helicase to single strand RNA forming RNA-induced silencing complex (RISC)/maturation

Kadri et al  
2009





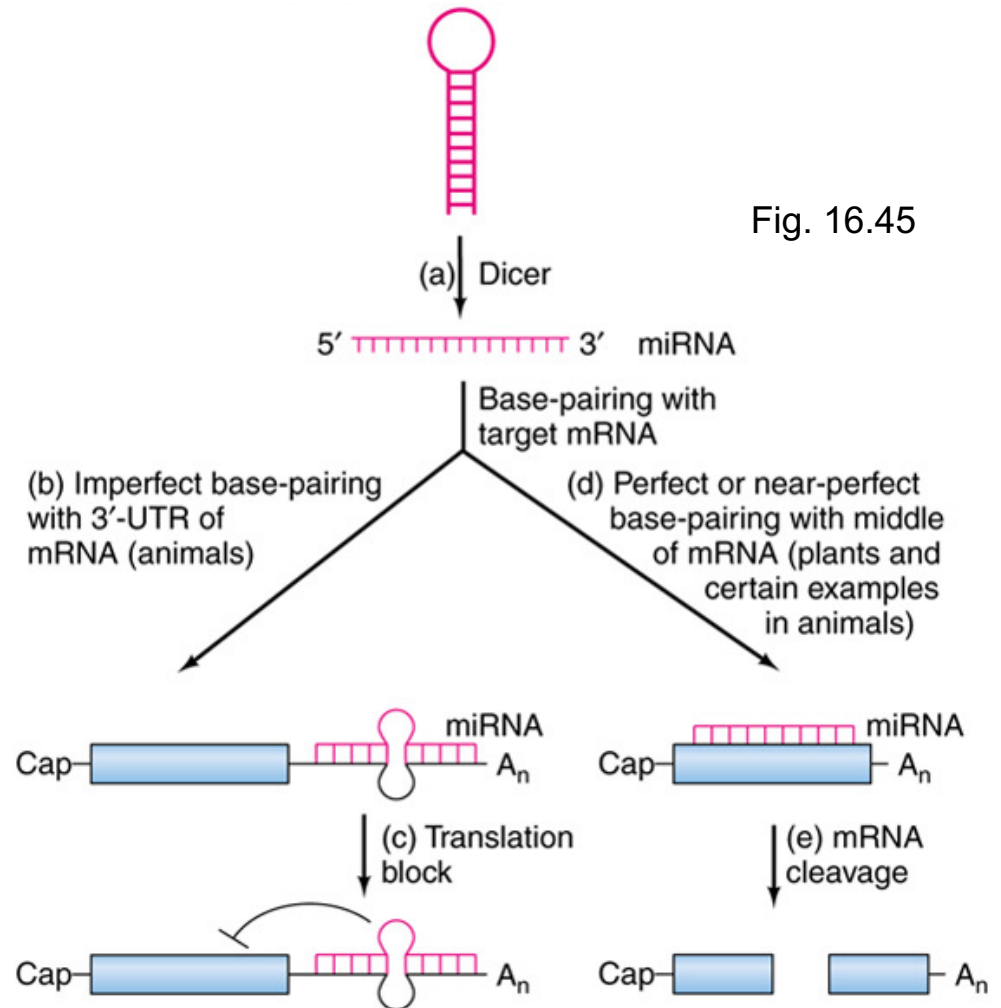
siRNA mediated degradation of mRNA

versus

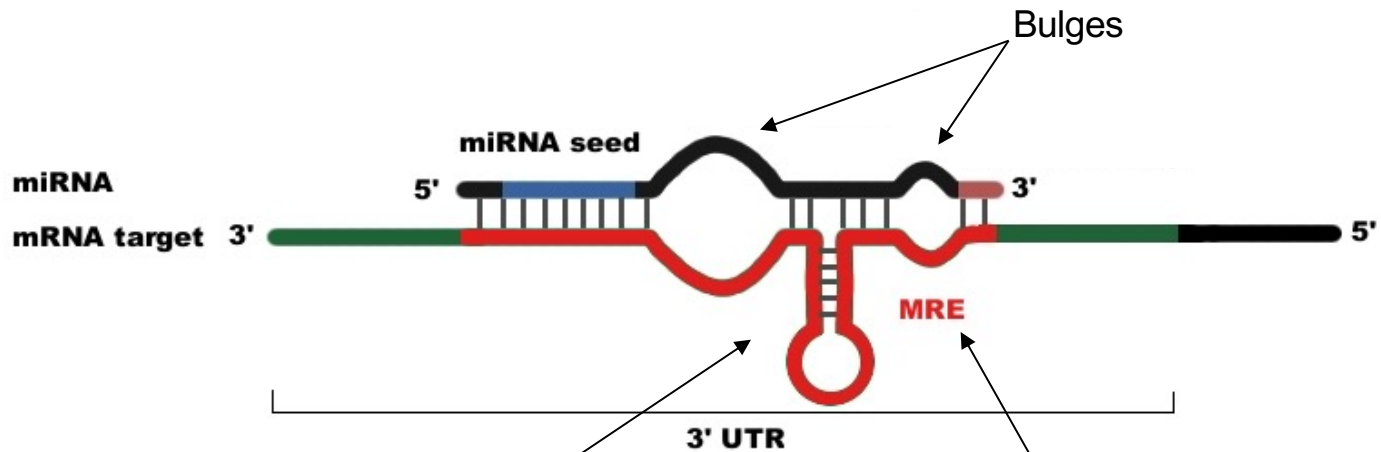
miRNA mediated inhibition of mRNA translation

# Extent of Complementarity Determines Whether miRNA Gives Cleavage or Repression of Target mRNA

- With perfect or near-perfect complementarity, miRNA can act like siRNA, giving cleavage of target
- This pathway operates extensively in plants, less so in animals



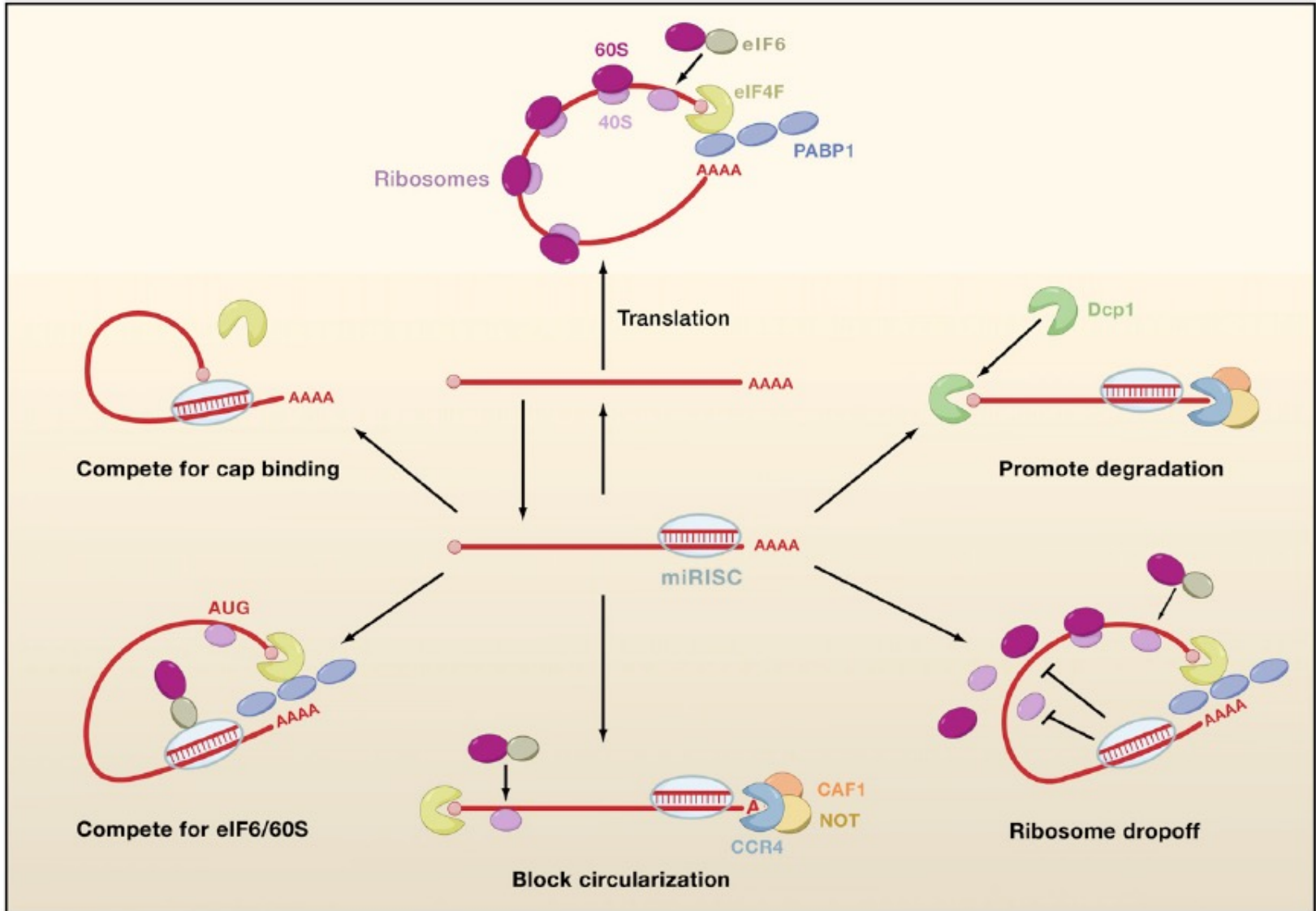
# miRNA Binding



Hairpin is more stable than a simple bulge

The MRE is known as the "miRNA recognition element." This is simply the sequence in the target that an miRNA binds to

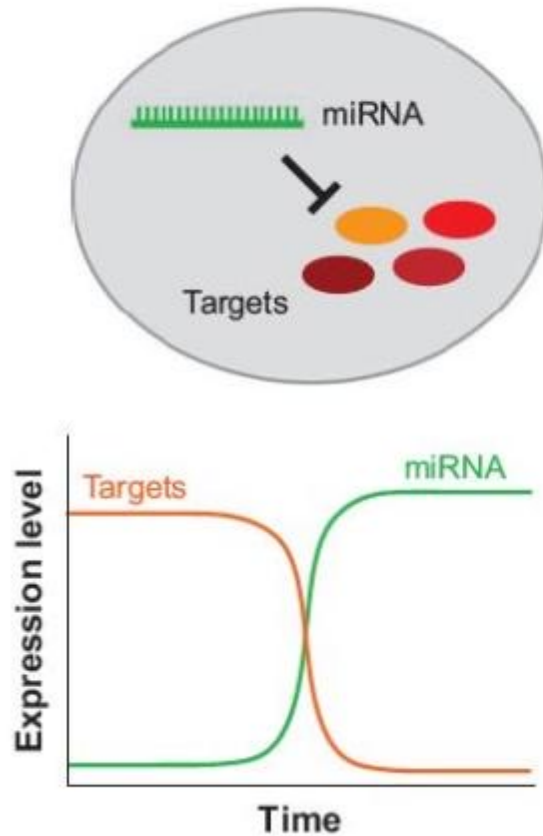
# Possible Mechanisms of Translation Inhibition by miRNA



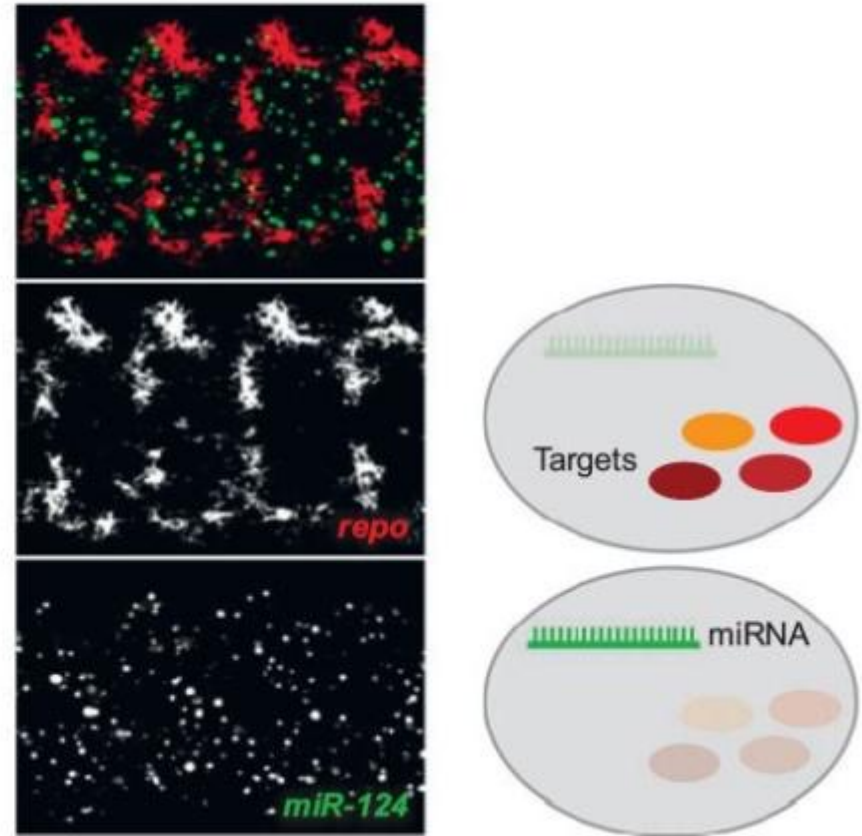


# miRNA Expression Results in Temporal and Spatial Reciprocity with Target Expression

**a** Temporal reciprocity

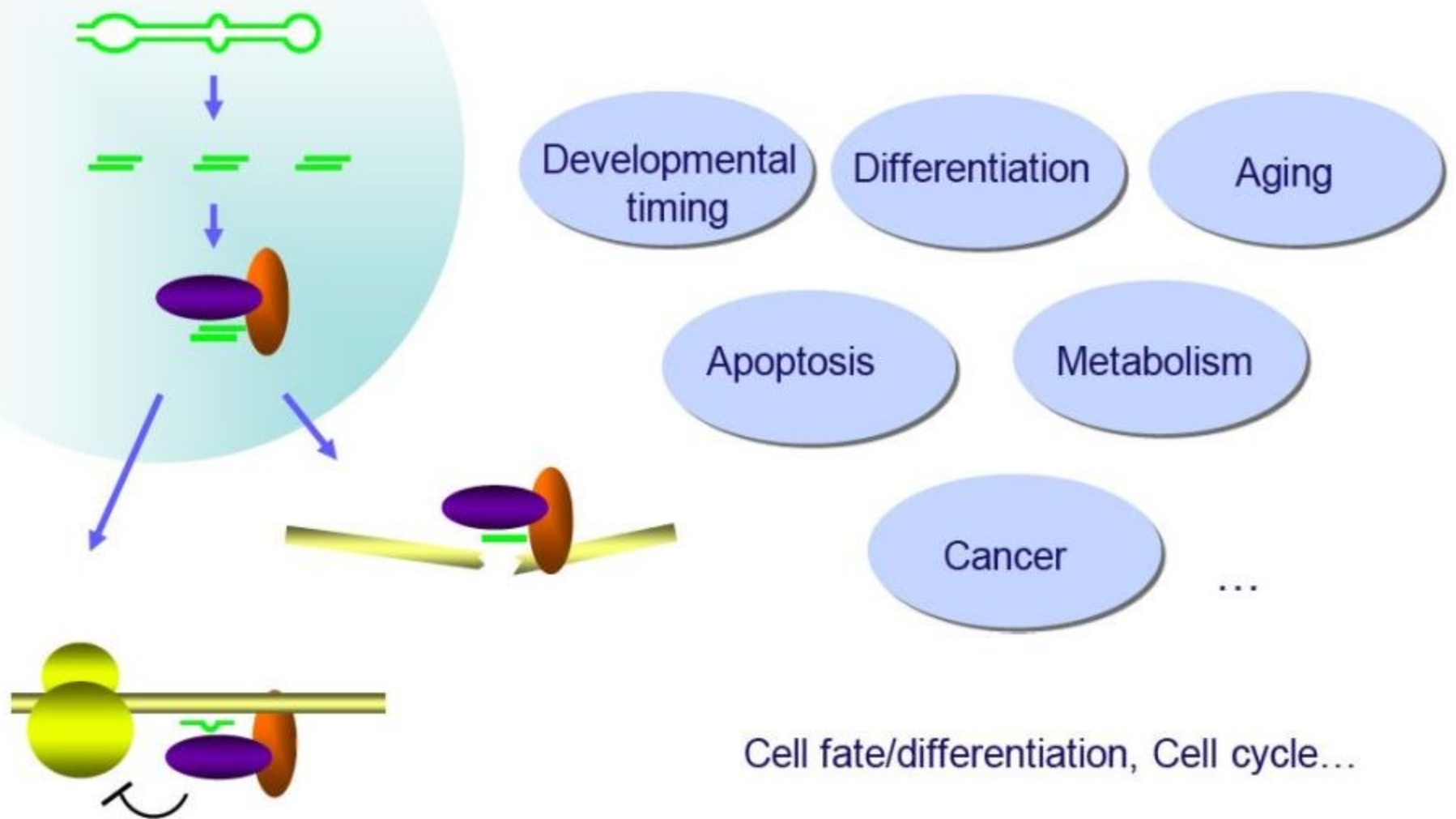


**b** Spatial reciprocity

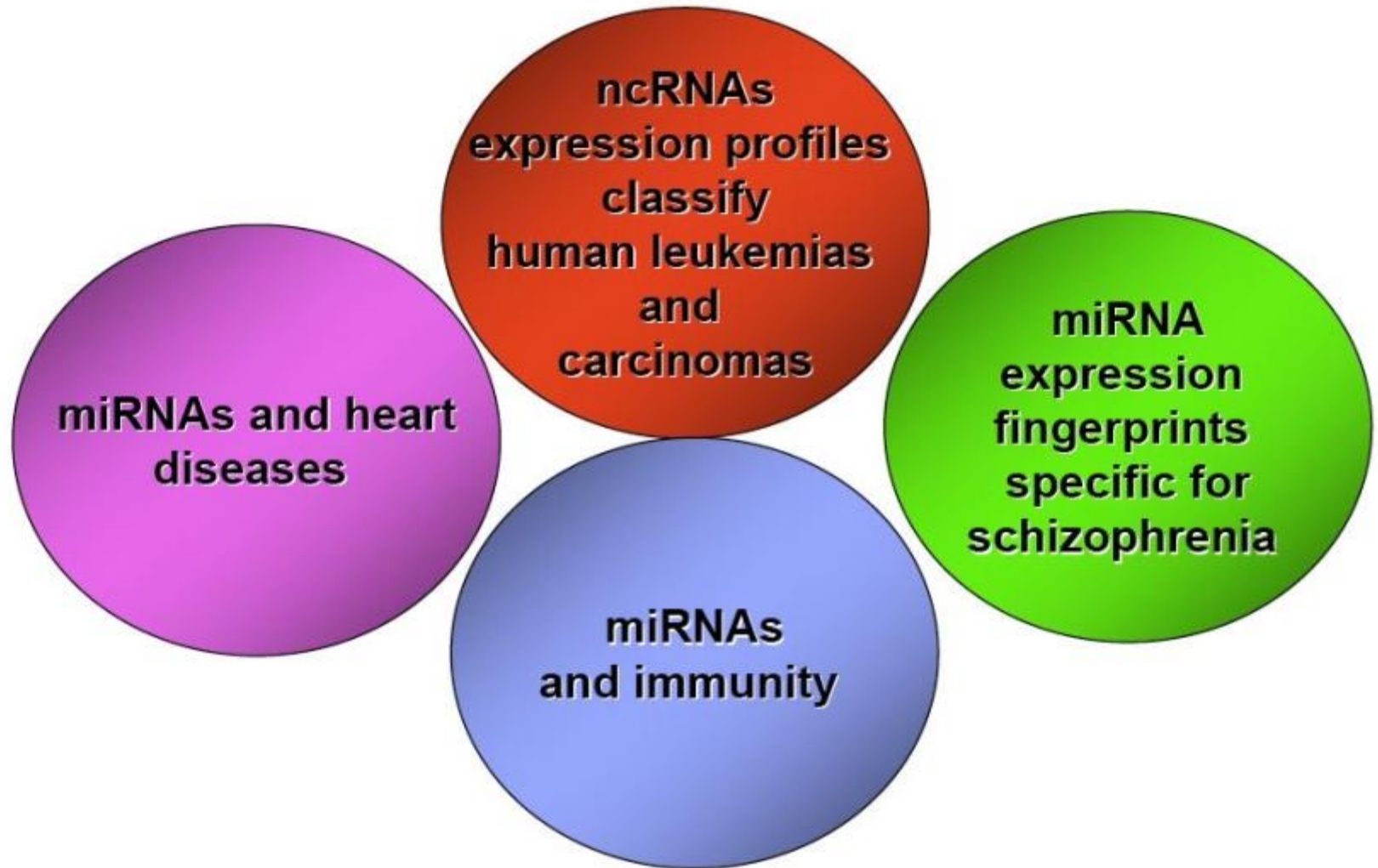




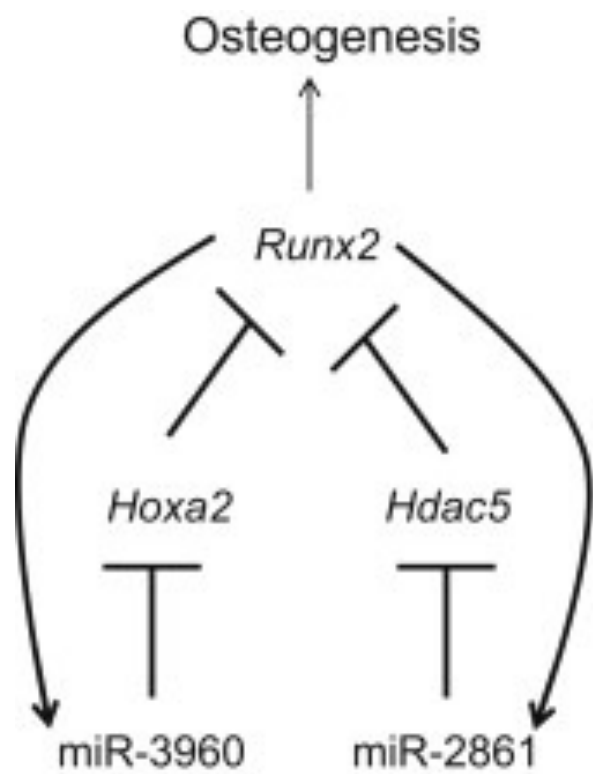
# Thousands of microRNAs act in multiple biological events



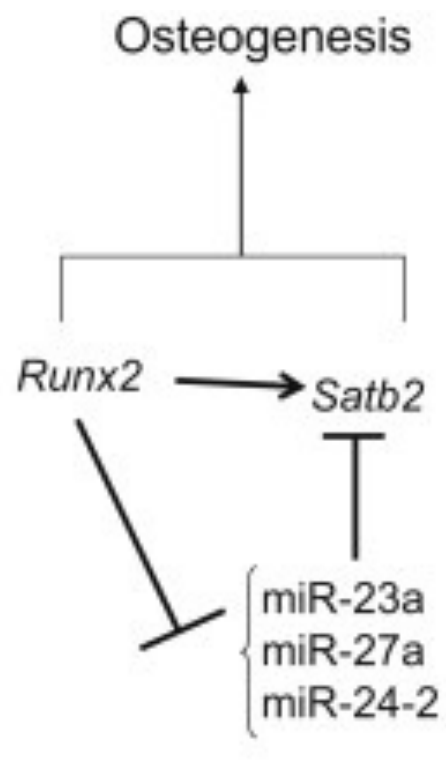
***ALTERATIONS OF NONCODING RNAS ARE FOUND IN EVERY TYPE OF HUMAN DISEASE***



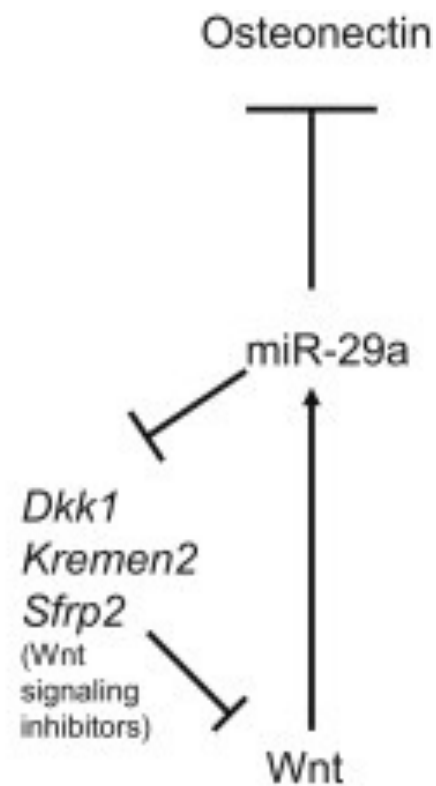
(Calin et al, PNAS 2002; Lu et al, Nature, 2005; Landgraf et al, Cell 2007; Perkins et al Genome Biol 2007; Hansen et al PLoS ONE, 2007; Beveridge et al, Hum Molec Genet 2008, Baltimore D, Nat Immunol 2008; van Rooij, Trends Genet, 2008 )



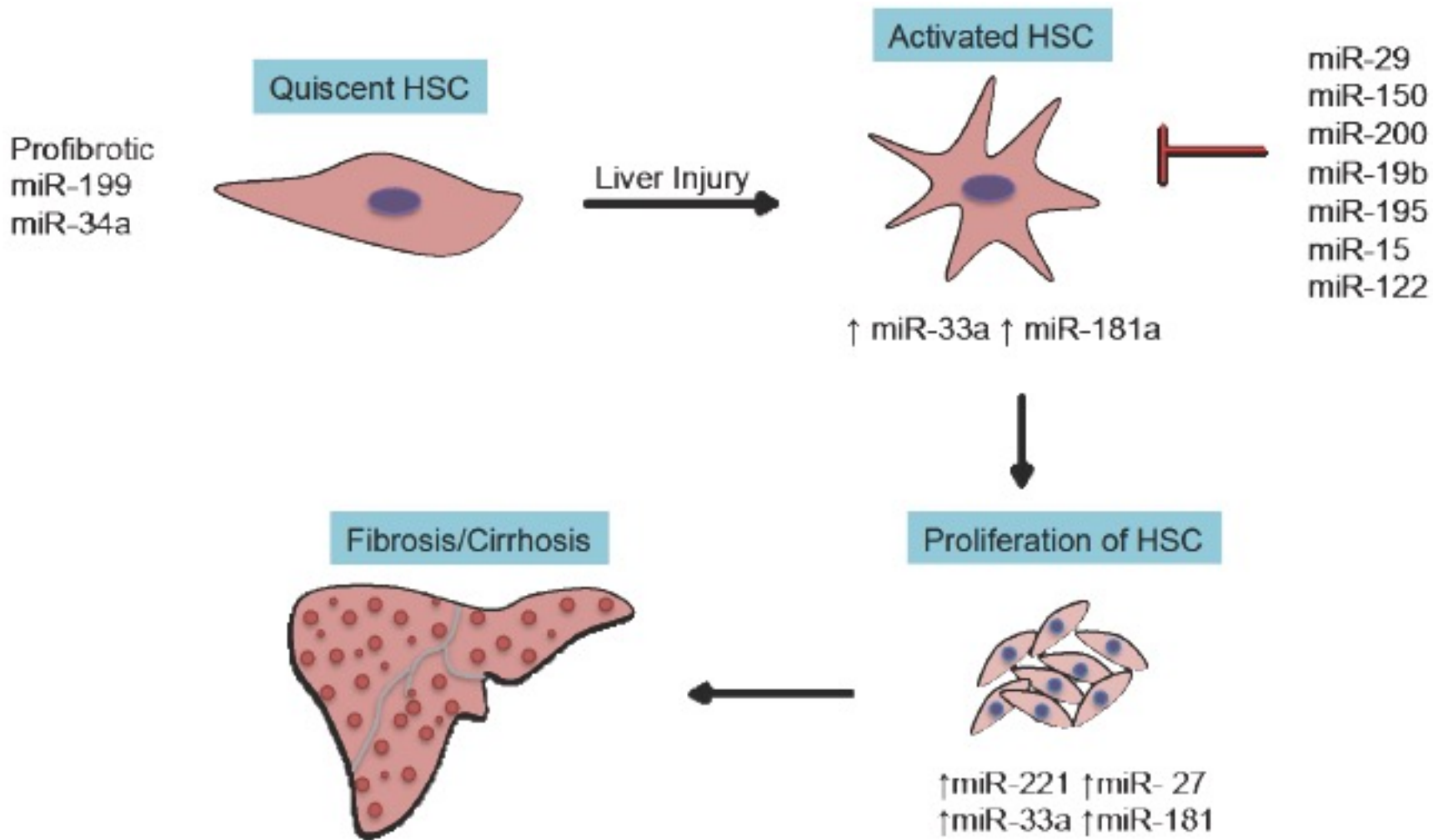
(a)



(b)



(c)



**Table 1** Profibrotic miRNAs

| miRNA                           | Models/site of action  | Function  | Target genes                                       | Reference |
|---------------------------------|--|---|--|-----------|
| miR-33a                         | TGF $\beta$ 1-induced HSCs (human)   | ↑ Proliferation of HSCs   | <i>PPAR<math>\alpha</math></i>                     | (50)      |
| miR-200c                        | HCV-infected liver (human)   | ↑ cSrc signaling cascade  | <i>FAP-1</i>                                       | (51)      |
| miR-199a/<br>miR-199a*/miR-199b | CCl <sub>4</sub> -induced liver fibrosis (human, mouse)                                    | ↑ ECM synthesis   |  | (46)      |
| miR-34a                         | DMN-induced, CCl <sub>4</sub> -treated, ethanol-mediated ALD (human, mouse)                | ↑ Proliferation   | <i>RXR<math>\alpha</math>, ACSL1, CASP2, SIRT1</i> | (52,53)   |
| miR-27a/b                       | Activated HSC (rat)  | ↑ Lipid accumulation and proliferation of HSC   | <i>RXR<math>\alpha</math></i>                      | (49)      |
| miR-21                          | PDGF-BB induced HSC, HCV-infected liver, CCl <sub>4</sub> -treated (human)                 | ↑ TGF $\beta$ signaling   | <i>PTEN, Smad7</i>                                 | (54,55)   |
| miR-221/222                     | HCV-infected liver (F3-F4), NASH (F3-F4), TAA-induced, HSC, Biliary atresia (human, mouse) | ↑ Col1A1 and MMP-2 expression;<br>↑ p-AKT and cell proliferation                      | <i>CDKN1B, PPP2R2A</i>                             | (56)      |
| miR-181a/b                      | TGF $\beta$ 1-induced HSCs (human, rat)  | ↑ Cell cycle and proliferation  | <i>p27</i>   | (57)      |
| miR-214                         | HCV-infected liver(F3-F4), MCDD-fed, activated HSC (human, mouse)                          | ↑ $\alpha$ -SMA, Col1A1, PDGFR- $\beta$ , FN1, MMP-2, MMP-9, TGF $\beta$ 1 expression |  | (58)      |

**Table 2** Antifibrotic miRNAs

| miRNA                | Models/site of action   | Function   | Target genes  | Reference |
|----------------------|---|--|---|-----------|
| miR-29               | IFN $\alpha$ & TGF $\beta$ 1 stimulated HSC (human, mouse)              | ↓ ECM synthesis  | <i>FBN1, ELN1, MMP2, ITGB1, Col1a1, Col1a2, Col4a5, Col5a3</i>    | (59)      |
| miR-150              | Activated HSC, NASH (rat, human)  | ↓ Activation and proliferation in HSC                    | <i>c-myb, Col4A4, Sp1</i>   | (60)      |
| miR-132              | Activated HSC from CCl <sub>4</sub> -treated, and BDL-livers (mouse)    | ↓ PPAR $\gamma$ transcription                            | <i>MeCP2</i>  | (61)      |
| miR-122              | NASH,ALD (human)  | ↓ Proliferation and activation of HSCs                   | <i>P4HA1</i>  | (62)      |
| miR-335              | Activated HSC (rat)   | ↓ Cell migration   | <i>TNC</i>  | (63)      |
| miR-101              | Activated HSC from CCl <sub>4</sub> -treated (mouse)                    | ↓ TGF $\beta$ , signaling, apoptosis                     | <i>CTGF, TSP-1, KLF6</i>  | (64)      |
| miR-107/<br>miR-449a | HCV (human)   | ↓ NF $\kappa$ B transcription                            | <i>YKL40, NOTCH-1</i>   | (65)      |
| miR-200a/b           | TGF $\beta$ -induced HSC, CCl <sub>4</sub> -treated (mouse, rat, human) | ↓ TGF $\beta$ dependent EMT, proliferation               | <i>ZEB1/2, TGF<math>\beta</math>2, <math>\beta</math>-catenin</i> | (66,67)   |
| miR-126              | Activated HSC(rat)  | ↓ Migration of HSC                                       | <i>CRK</i>  | (68)      |
| miR-483              | HSC, CCl <sub>4</sub> -treated (mouse)                                  | ↓ TGF $\beta$ -induced PDGF $\beta$ and TIMP2 expression | <i>Socs3</i>  | (69)      |
| miR-195              | Activated HSC (human)   | ↓ Cell proliferation                                     | <i>CyclinE1</i>   | (70)      |
| miR-15b/16           | Activated HSC (rat)   | ↑ Apoptosis  | <i>Bcl-2</i>  | (48)      |
| miR-133              | TGF $\beta$ -treated HSC (mouse, human)                                 | ↑ ECM secretion  | <i>Col1A1</i>   | (71)      |
| miR-146a             | CCl <sub>4</sub> -treated, TGF- $\beta$ 1-treated HSCs (rat)            | ↓ Proliferation of HSC                                   | <i>SMAD4</i>  | (72)      |
| miR-19b              | Activated HSC (rat, human)  | ↓ Fibrotic TGF- $\beta$ signaling                        | <i>TGF-<math>\beta</math>RII</i>                                  | (43)      |