

## LEZIONE 18/10/2021 – PRIMA LEZIONE PARISI

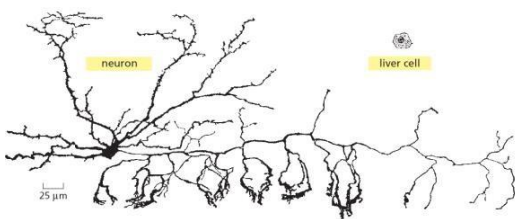
**INTRODUZIONE PROGRAMMA:** Si inizia con il primo meccanismo del controllo dell'espressione genica seguendo un filo logico in cui tratteremo per prima la

Regolazione dell'espressione genica a partire dall'organizzazione della cromatina, da quella che si chiama Architettura nucleare, cioè cercheremo di capire in che modo c'è accessibilità al Dna per poter poi esprimere determinati geni e regolarne

l'espressione. Inizieremo quella parte chiamata **EPIGENETICA**, la quale include la metilazione del Dna (meccanismo epigenetico) e i Complessi di Repressione della Cromatina che andremo a studiare dal punto di vista del dettaglio molecolare della regolazione dell'espressione genica. Poi faremo una piccolissima parte della Regolazione Trascrizionale cercando di capire la correlazione tra regolazione trascrizionale e i meccanismi epigenetici. Parleremo di RNA interference, microRNAs, ncRNAs introducendo piccoli concetti. Dopodiché una parte finale, che dovrebbe essere un po' un riassunto di tutto quello che facciamo perché guardiamo tutti i meccanismi di regolazione dell'espressione genica come realmente funzionano in un processo di differenziamento delle cellule staminali pluripotenti (PSCs) ma soprattutto della riprogrammazione cellulare. Cercheremo di capire come tutti questi meccanismi si incrociano per consentire una massiva regolazione

dell'espressione genica. Tutto quello che faremo è incentrato a capire come si può utilizzare il DNA in maniera diversa. In altre parole tutte le cellule del nostro corpo hanno lo stesso DNA però le cellule dei vari tessuti sono completamente diverse sia in forma sia in funzione sia nella capacità di rispondere anche a stimoli extracellulari.

*Come fanno due cellule che hanno genoma identico, Dna identico, ad avere struttura, forma e funzione completamente diverse?*



*The same genotype can lead to different phenotype*

Dall'esempio di un neurone e di una cellula epatica è chiaro che, guardando la scala di grandezza, il neurone rispetto all'altra ha una forma, struttura e funzione diversa.

Quindi svolgono funzioni completamente diverse e hanno anche la capacità di rispondere a stimoli extracellulari diversi. Bisogna capire in che modo due cellule possono utilizzare la stessa

informazione genetica in maniera diversa per fare cose diverse, in altre parole, in che modo viene regolata l'espressione genica.

**ESPRESSIONE GENICA** (gene expression): Serie di processi che permettono a partire da un gene di ottenere la corrispondente proteina (o le corrispondenti proteine nel caso di uno splicing alternativo ma ci sono anche altri fenomeni, come le modifiche post traduzionali degli istoni che permettono di avere più proteine □ cambia poco la struttura della proteina però cambia completamente la funzione). La regolazione dell'espressione genica diventa sempre più complessa se ci muoviamo nella scala evolutiva. Studieremo la regolazione dell'espressione genica dei mammiferi superiori, dell'uomo (utilizzando come sistema modello a volte anche i topi).

Cambiamenti nell'espressione genica, fundamentalmente, consentono la vita. Innanzitutto consentono lo sviluppo embrionale, quindi a partire dalla cellula uovo fecondata (lo zigote). Step by step durante lo sviluppo avremo delle variazioni

dell'espressione genica nelle diverse cellule che prenderanno dei destini diversi.

**LA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA** è molto importante perché:

- Consente alle cellule adulte di mantenere la loro identità e di rispondere a specifici stimoli all'interno del tessuto in cui si trovano.

- Permette anche di subire dei cambiamenti morfologici e funzionali a seconda del microambiente, a seconda dei livelli dei nutrienti, dei fattori di crescita che arrivano sulla cellula e la stimolano.

Inoltre questa regolazione DIPENDE:

- Dall'ambiente in cui si trova la cellula, dai segnali extracellulari;
- Da uno stress che arriva alla cellula, dallo stadio del ciclo cellulare (nel quale ci sono profondi cambiamenti di espressione genica come per esempio c'è una specifica espressione genica nella fase G1 e un'altra nella G2). Inoltre durante lo sviluppo, a poche ore di differenza, una cellula mentre si divide, cambia anche identità e funzione, quindi cambia completamente l'espressione genica, cioè il corredo di geni che viene espresso, che viene utilizzato.

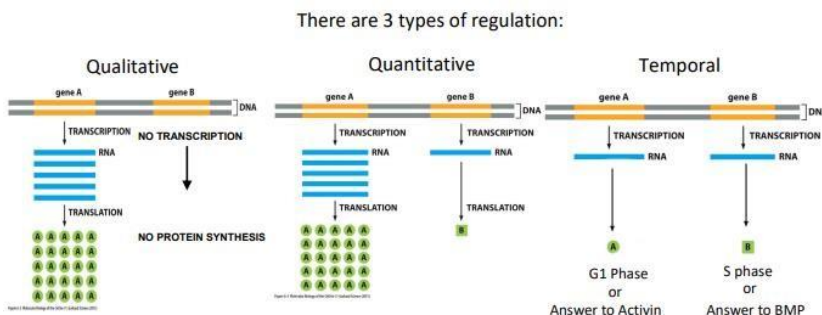


FENOTIPI DIFFERENTI RIFLETTONO una DIVERSA ESPRESSIONE GENICA.

Esempio: ci sono dei Crayfishes prodotti per partenogenesi quindi hanno lo stesso identico Dna, che sono stati soggetti a diversi microambienti, sono stati cresciuti in masse diverse e nonostante abbiano lo stesso Dna, hanno il fenotipo diverso.

**FENOTIPO:** manifestazione del genotipo, risultato dell'espressione

La Regolazione dell'espressione genica avviene a tre diversi livelli :



• **REGOLAZIONE QUALITATIVA:**

La regolazione dell'espressione genica permette innanzitutto di decidere se un gene deve essere espresso o no. Qui abbiamo il gene A espresso e il gene B non espresso. Quindi in una cellula un subset di geni viene espresso, altri no; in un'altra cellula

viene espresso un subset che non viene espresso in quella cioè quelli che erano espressi non vengono espressi, per esempio alcuni vengono espressi in un gruppo altri no.

• **REGOLAZIONE QUANTITATIVA:** Sappiamo che il punto cruciale della regolazione dell'espressione genica è il punto in cui ci sono più controlli, in cui si decide di più se vale la pena esprimere un gene o no e quindi utilizzare il prodotto di quel gene. La cellula è in grado di decidere quanto di quel gene esprimere. Per esempio la cellula decide di esprimere gene A e B perché gli servono entrambi, però del gene A vuole 100 proteine del gene B ne vuole 10, perché in quel momento ha bisogno di questo, perciò è detta quantitativa. La cellula riesce a decidere quanto prodotto genico produrre e utilizzare e ciò avviene per lo più a livello trascrizionale ma non solo, anche con i meccanismi post trascrizionali.

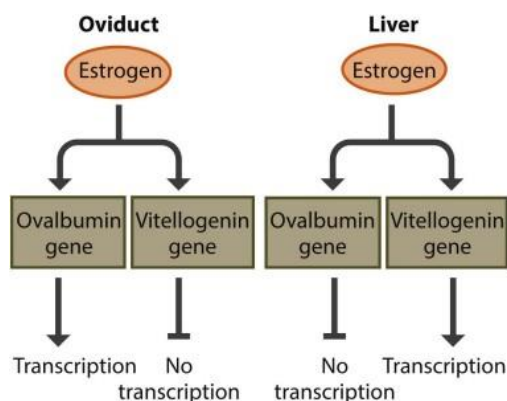
- **REGOLAZIONE TEMPORALE:** Per esempio una stessa cellula in fase S del ciclo cellulare esprimerà dei geni ed esprimerà altri geni in un'altra fase del ciclo cellulare (Le Cicline sono un gruppo di geni espresso nel differenziamento durante il ciclo cellulare). Una cellula può esprimere in maniera temporale diversa, se per esempio pensiamo allo sviluppo, a livello di blastocisti una cellula sente il segnale dell'Activina, fattore di crescita – proteina solubile che arriva sulla cellula (morfogeno).

**Morfogeno** è una proteina solubile che funziona principalmente durante l'embriogenesi per consentire di generare le varie strutture. Sono le proteine solubili che vengono prodotte da una cellula e arrivano a concentrazione diversa sulle altre cellule circostanti, cioè sulla cellula più vicina arrivano alte concentrazioni;

Su quella più lontana, a più bassa concentrazione e questo determina una variazione dell'espressione genica, cioè la cellula più vicina che ne sente di più esprimerà dei geni, la cellula più lontana che ne sente di meno, ha più geni o ne esprime di meno di quei geni. Quindi la regolazione dell'espressione genica in un morfogeno è uno degli esempi per eccellenza della regolazione per cui se una cellula sente durante l'embriogenesi un'alta concentrazione di attivina risponde in un modo, se dopo due ore sente BMP (proteina morfogenetica ossea) risponde in un altro modo. O cellule adiacenti possono sentire poca attivina e molto BMP e rispondono in un modo, o possono sentire molta attivina e poco BMP rispondendo in un altro modo. Dunque dipende anche, in quel momento, da cosa sta sentendo la cellula.

**COME AVVIENE LA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA?** Quando si parla di espressione genica viene spontaneo pensare alla trascrizione. Esprimere un gene o non esprimerlo, trascrivere un gene o no: diventano quasi concetti equivalenti.

La **TRASCRIZIONE** è la disponibilità dei fattori di trascrizione che sono in grado di promuovere, per esempio, la trascrizione (?).



Immaginiamo di avere due cellule diverse, cellula dell'ovidotto e cellula del fegato, che hanno gli stessi fattori di trascrizione per esempio il recettore degli estrogeni. Sentono l'estrogeno quindi hanno la stessa capacità di regolare la trascrizione però una risponde andando a trascrivere l'Ovalbumin (uno dei geni target dell'albumina) e non la Vitellogenina (altro gene target), l'altra cellula il contrario. Però le abbiamo messe nelle stesse condizioni, cioè hanno lo stesso fattore di trascrizione che serve per promuovere l'espressione in entrambi i geni e il segnale che è arrivato è lo stesso, cosa cambia fra le due

cellule? Cambia la disponibilità degli elementi regolatori che devono essere legati da questi fattori di trascrizione. Dunque, al di là della trascrizione, che è il fenomeno più importante per la regolazione dell'espressione genica, c'è uno step precedente pre-trascrizionale che è la regolazione, dal punto di vista epigenetico, della cromatina.

In che forma si trova la cromatina? Com'è strutturata?

**STEP della REGOLAZIONE ESPRESSIONE GENICA:** quando arriva il segnale alla cellula questa deve decidere che cosa deve esprimere quindi che tipo di regolazione dell'espressione genica deve fare, come deve usare il suo DNA.

- 1. ORGANIZZAZIONE DELLA CROMATINA.** Ci troviamo ancora sul Dna, non siamo già partiti con la trascrizione e quindi a seconda dello stato della cromatina, la cellula può decidere se esprimere un gene o l'altro. A parità di fattori trascrizionali disponibili, ci sono dei geni che non sono disponibili perché lo stato della cromatina non lo è e altri invece sono disponibili. Step particolare perché permette di capire come la cromatina, cioè come può essere riarrangiata, come può cambiare lo stato della cromatina. (Non semplicemente con le modifiche post traduzionali degli istoni).
- 2. TRASCRIZIONE.** Con una serie di combinazioni che devono avvenire affinché la trascrizione sia compiuta o sia bloccata perché appunto già conosciamo sia una regolazione trascrizionale positiva e una regolazione negativa e questo perché i fattori di trascrizione possono funzionare sia da attivatori che da repressori della trascrizione.

- 3. MATURAZIONE mRNA.** Step importante della regolazione dell'espressione principalmente per lo Splicing poiché permette addirittura di utilizzare la stessa informazione dello stesso gene per fare due geni diversi. C'entra anche l'Emivita perché la lunghezza del poliA è l'orologio biologico di un mRNA.

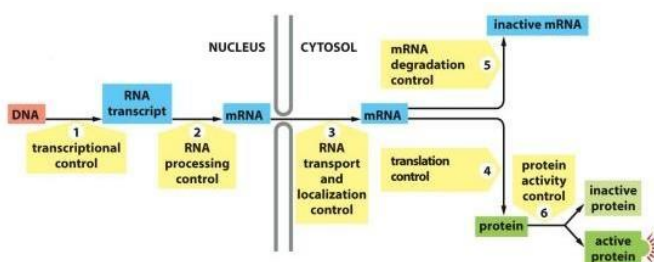
L'espressione genica è regolata anche dal trasporto dell'mRNA perché una volta che questo è stato prodotto, processato, maturato nel nucleo, si associa a una serie di proteine che lo accompagnano nel trasporto dal nucleo al citoplasma; se queste proteine non si associano perché probabilmente c'è un errore nella maturazione dell'mRNA, questo consente di bloccare mRNA e quindi di bloccare l'espressione genica.

A questo punto l'mRNA se è arrivato al citoplasma maturo dovrebbe essere tradotto e bisogna controllare se c'è la disponibilità del sistema di traduzione, cioè se ci sono tutti i componenti che la consentono.

- 1. EVENTI POST TRASCRIZIONALI:** c'è un meccanismo post trascrizionale che interviene tra trascrizione e traduzione in cui agiscono i microRNA e sono in grado di decidere se un mRNA maturo che è ok per la cellula quindi che ha superato il controllo, se può essere effettivamente tradotto o no.

**2. TRADUZIONE.**

**EVENTI POST TRADUZIONALI.** Step che consentono di modificare l'espressione genica, modificando lo stato della proteina. Quindi sono modifiche che possono far sì che la proteina faccia una funzione o un'altra, per esempio sia inattiva o attiva (fosforilazione).

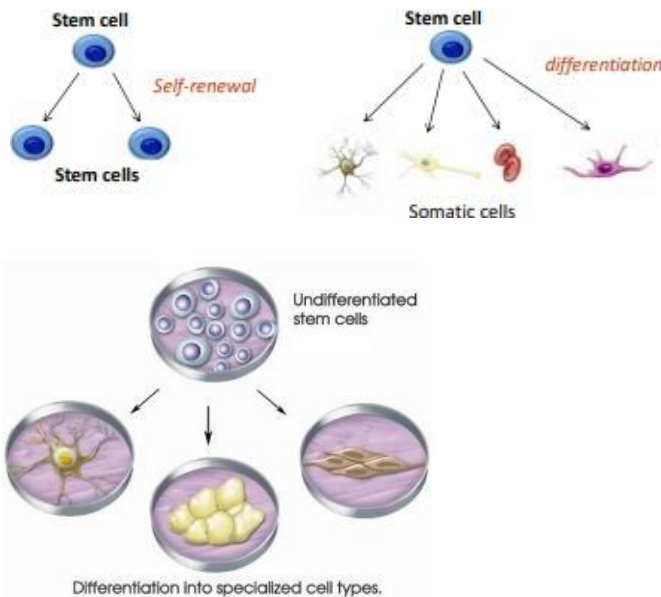


**IN CHE MODO STUDIAMO LA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA?**

**CELLULE STAMINALI:** sono cellule indifferenziate che hanno la capacità o di mantenere questo loro stato indifferenziato (in cui il loro destino non è ancora definito) o hanno la capacità di acquisire, di iniziare un percorso per diventare cellula somatica.

O mantengono la loro identità e quindi ancora non hanno deciso cosa essere o differenziano, diventando somatiche. Le **cellule staminali pluripotenti** sono in grado di formare tutti i tessuti di un organismo. Sono cellule indifferenziate che ancora non hanno deciso cosa fare, hanno un alto potenziale e in queste cellule, la maggior parte dei geni sono attivi cioè è possibile utilizzare la maggior parte dei geni, cosa non possibile in una cellula somatica perché le somatiche sono cellule già differenziate, non possono rispondere agli stimoli perché la cromatina è chiusa. Le indifferenziate invece hanno una cromatina molto aperta e quindi hanno la capacità di modulare l'espressione genica in maniera molto veloce e dinamica. La maggior parte dei geni sono espressi nelle indifferenziate ma sono espressi di solito a bassi livelli, dopodiché quando inizia il differenziamento inizia quella massiva regolazione

dell'espressione genica. Cosa devo esprimere di più? Cosa devo spegnere? Cosa devo mantenere acceso? Regolazione dell'espressione genica studiata nelle cellule pluripotenti rappresenta il sistema ideale (per studiarla appunto). Andremo a vedere cosa succede, quali sono i meccanismi che vengono applicati il differenziamento delle staminali pluripotenti per poter decidere quale destino la cellula deve avere e capire come si regola l'espressione genica. (Come l'embriogenesi anche se viene fatta in vitro).



I **geni Housekeeping** sono geni espressi costitutivamente che producono proteine strutturali, così come per esempio i geni che producono le proteine ribosomiali sono sempre espressi, mentre la maggior parte dei geni subisce una regolazione dell'espressione genica.

**1° PUNTO** della Regolazione dell'espressione genica è l'organizzazione del genoma (della cromatina) e vedremo come questa è correlata all'architettura nucleare.

Ci sono due problemi. **PROBLEMA TOPOLOGICO:** perché sappiamo di avere un Dna che srotolato è lungo metri e deve essere compattato, quindi come facciamo a compattare il nostro Dna in uno spazio così piccolo? Dal punto di vista della

regolazione dell'espressione genica ci interessa come fare contemporaneamente a compattare il Dna ma anche a organizzarlo in maniera tale che in qualsiasi momento, per esempio nella staminale, si può decidere quale gene utilizzare senza che questo sia aggrovigliato in una matassa di Dna che non può essere accessibile, per esempio a un macchinario trascrizionale.

**PROBLEMA DI ORGANIZZAZIONE DEL GENOMA:** Oltre ad essere compattato il Dna deve essere ovviamente anche organizzato in modo tale che il genoma sia disponibile per poter consentire la regolazione dell'espressione genica.

**ORGANIZZAZIONE DEL DNA** nel nucleo è possibile perché si genera la Cromatina e quello che chiamiamo **EPIGENOMA** è quella serie di modifiche che avvengono sul genoma, non dentro il genoma. Sono quelle modifiche che non riguardano la sequenza del Dna ma la struttura del Dna, quindi riguardano per lo più le proteine che interagiscono con il Dna, però non tutte, perché c'è una modifica epigenetica che riguarda proprio il Dna ovvero la Metilazione della citosina. Queste modifiche che avvengono sulle proteine che legano il Dna e formano la cromatina, consentono di determinare lo stato del Dna, quindi la sua disponibilità e consentono proprio di dividere il DNA in domini: **Eucromatina** ed **Eterocromatina**. Sono tutte ovviamente modifiche reversibili perché avvengono in maniera estremamente dinamica.

**MODIFICHE EPIGENETICHE** che modificano lo stato della cromatina sono le:

- ☐ Modifiche post traduzionali degli istoni;
- ☐ Varianti istoniche;
- ☐ Rimodellamento della cromatina (complessi di rimodellamento cromatina);
- ☐ Metilazione del Dna (importante per modulare la disponibilità della cromatina);
- ☐ I complessi di repressione della cromatina.