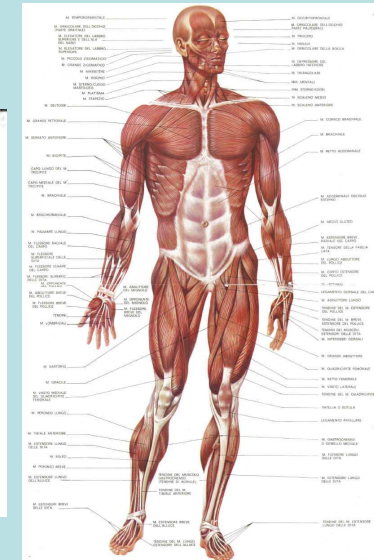
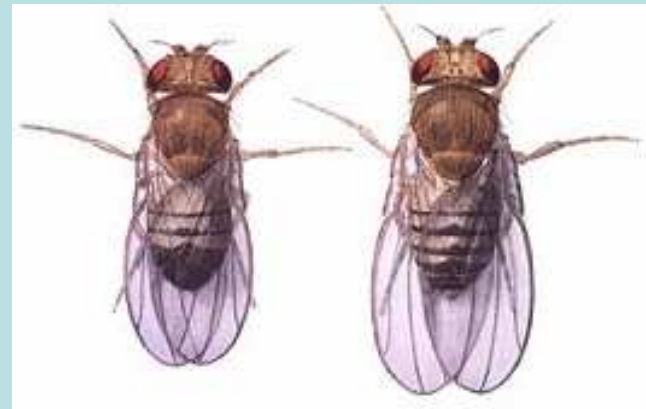
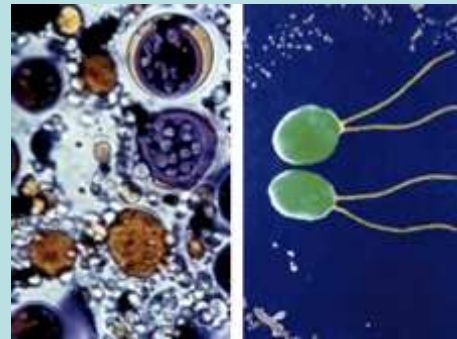
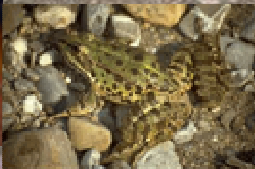


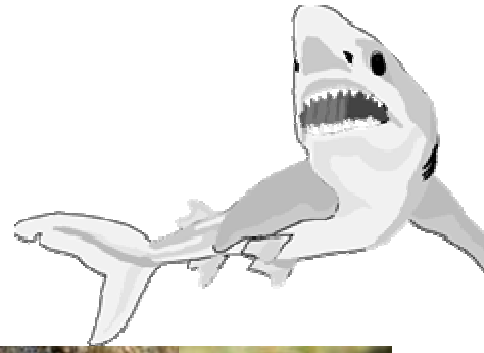
Dal macroscopico al microscopico. L'interpretazione molecolare

Giuseppe Macino La Sapienza Roma

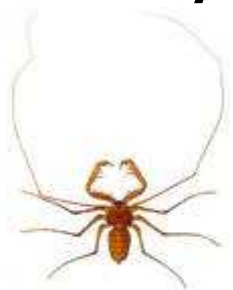


Animali buoni

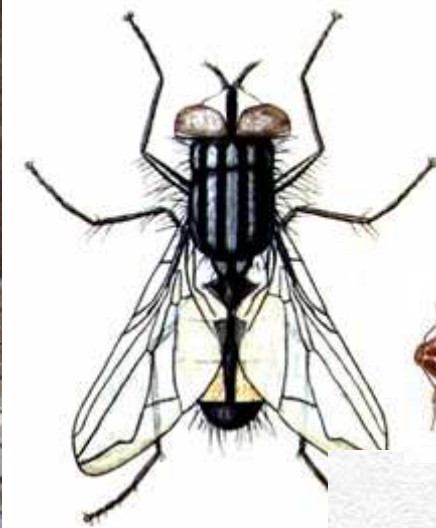
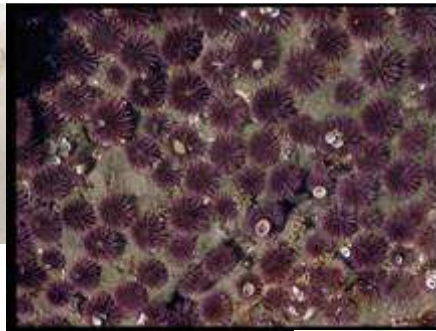




- Animali pericolosi



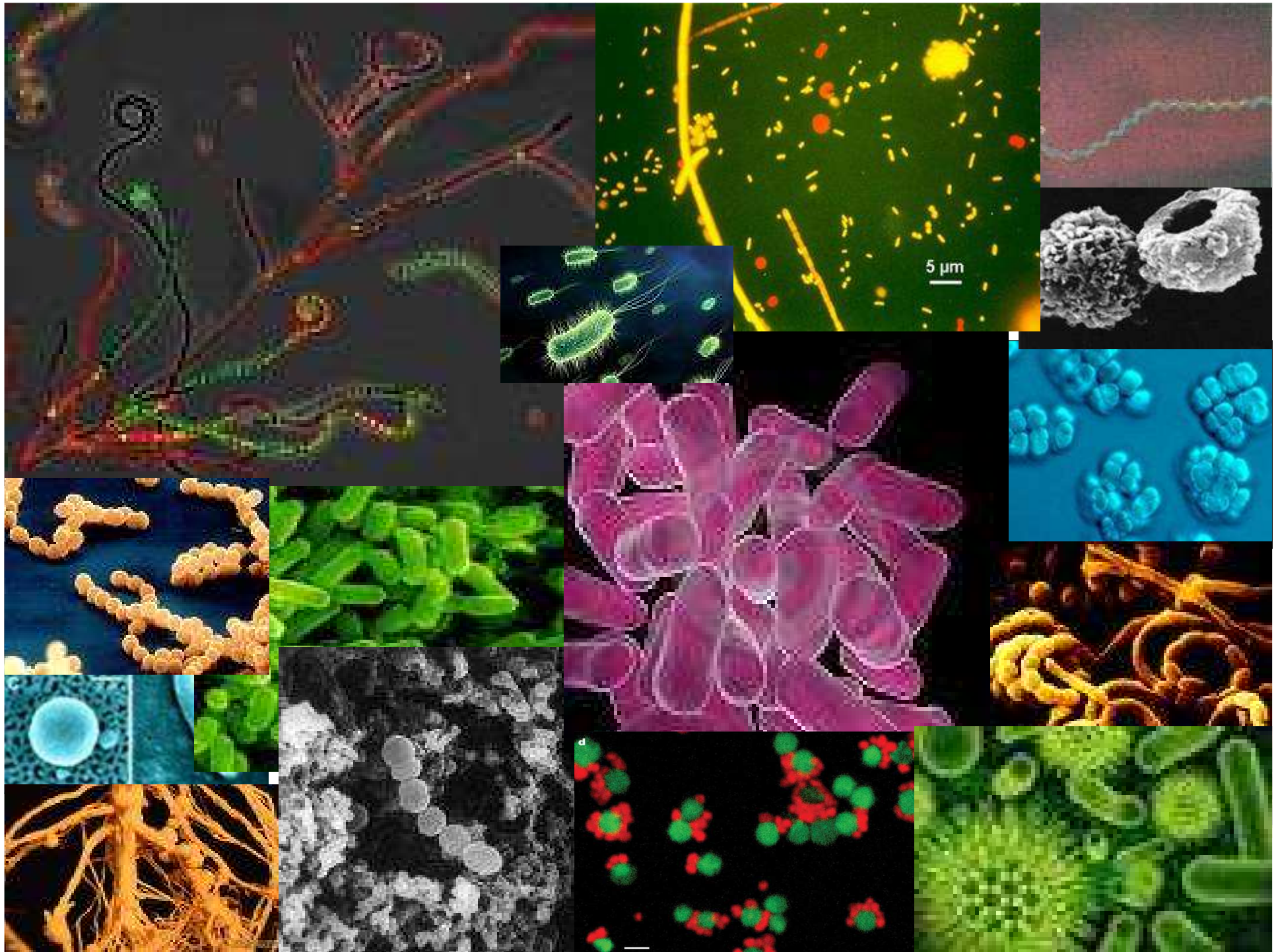
Animali fastidiosi





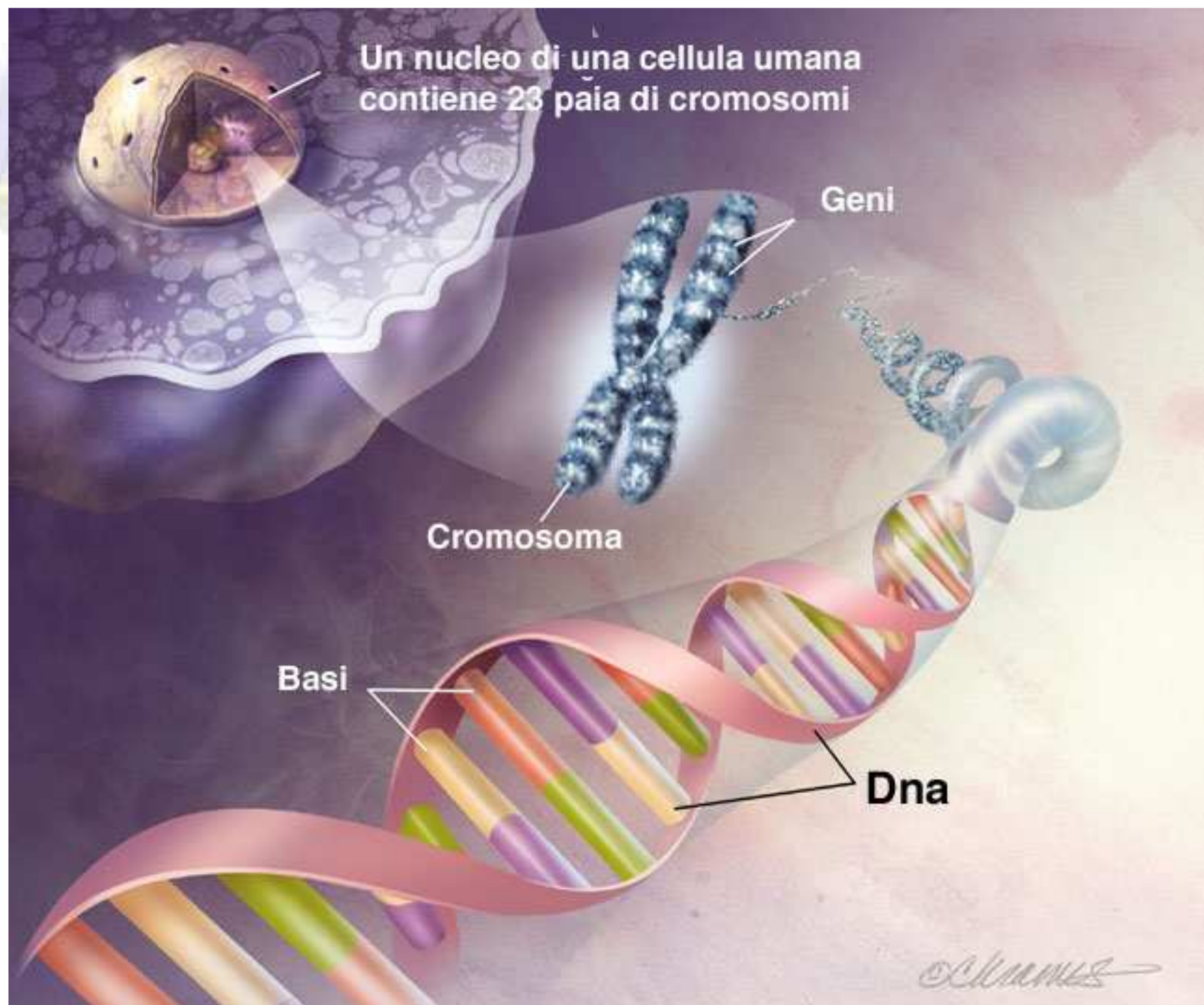
- Animali inutili





Cromosomi umani





Quanto DNA e' contenuto nei genomi di

Zea maize 2 miliardi c.b.



Homo sapiens 2,9 miliardi c.b



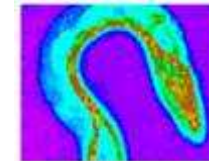
Arabidopsis thaliana 125 milioni c.b.



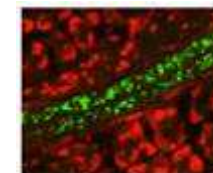
Drosophila melanogaster 120 milioni c.b.



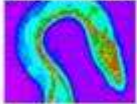
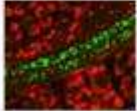
Caenorhabditis elegans 97 milioni c.b.



Escherichia coli 4,1 milioni c.b.



Quanti geni ci sono nelle varie specie?

Specie	Dimensioni del genoma	Numero di geni
Uomo 	2,9 miliardi paia di basi	20000
Drosophila melanogaster 	120 milioni paia di basi	13.601
Saccaromyces cerevisiae 	12 milioni paia di basi	6.275
Caenorhabditis elegans 	97 milioni paia di basi	19.000
E.coli 	4.1 milioni paia di basi	4.800
Arabidopsis thaliana 	125 milioni paia di basi	25.000

•Quello che ci ha detto la **genomica**

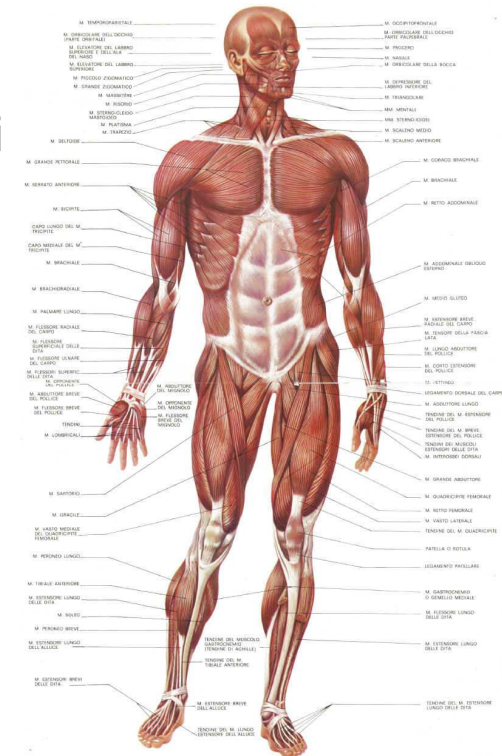


Il verme ha mille cellule
e 20.000 geni

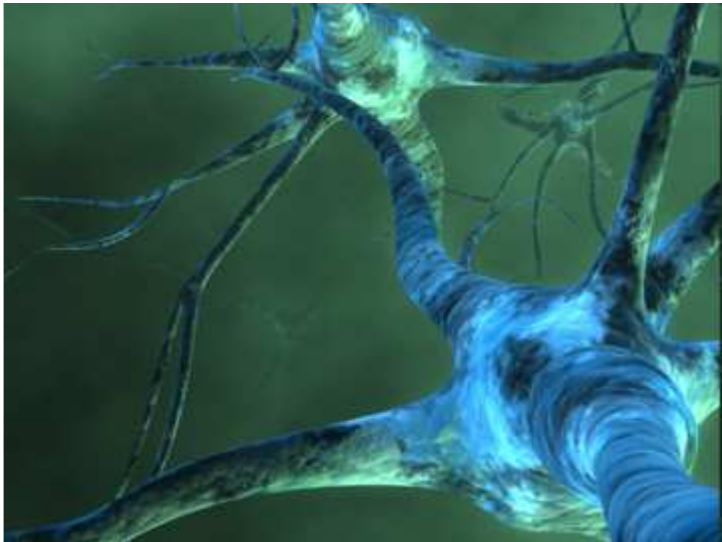
- L'uomo ha migliaia di miliardi di cellule e 20.000 geni.

•Dov'è la differenza che ci rende così diversi?

- Nei livelli di interazione tra i prodotti dei geni
- Ovvero nell' **EPIGENOMA**



- Nei tanti tipi cellulari dell'uomo il GENOMA e' identico, ma le sue cellule sono estremamente differenti (neurone, osso, fegato etc)



Percentuali di geni sul genoma totale

Homo sapiens	3%
Zea maize	4%
Arabidopsis	80%
Drosophila	50%
Nematode C.elegans	85%
Lievito del pane	70%
Echerichia coli	85%

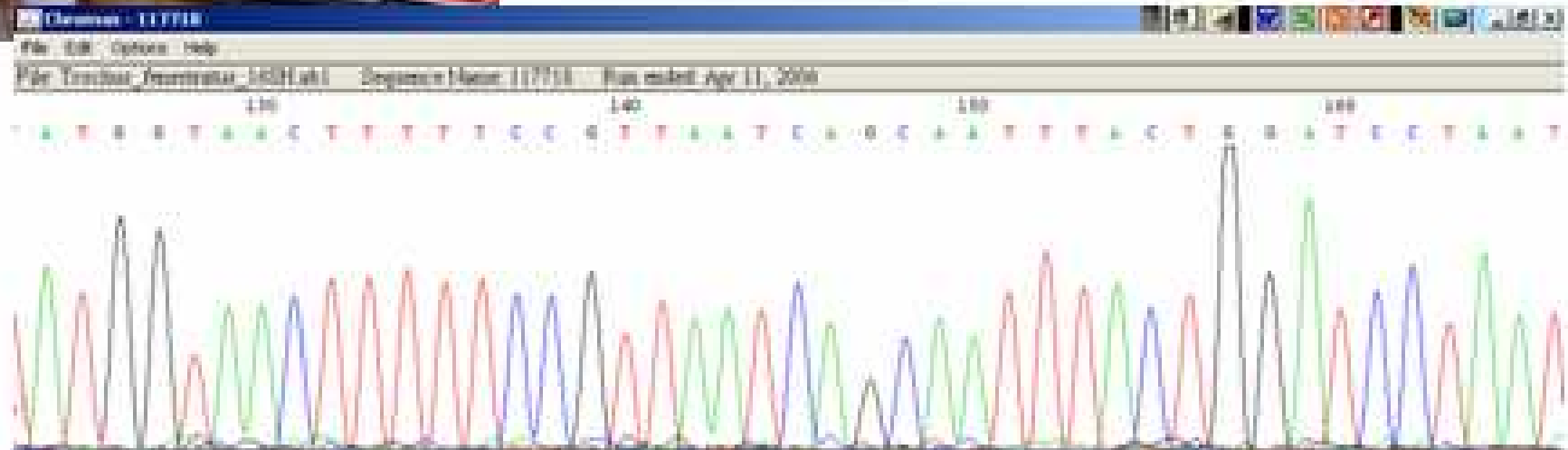
Pensavamo che fossero necessari
100-200 **mila** geni per specificare
un organismo animale come l'uomo

La differenza nel numero di geni
non spiega la grande varietà di
specie.

Quali sono le basi molecolari della
biodiversità?

- L'idea comunemente accettata e' che i geni sono isole di informazione nel vasto spazio del DNA, circondati da sequenze prive di significato.(solo il 3% del DNA di mammifero e' informativo)

Sequenziamento



```
GCTTTAATTGTTCTAAGTCGCCCCAACTAAAGATTACTCACAAATTTAATTTTCGTTATCACGAAACAT  
AAAAATCTTACTTAAACAGCAAGATTTAAAAAATTTTATCATTTCCTCAAGCTCAATAGGGTCTTCTTG  
TCCCTCAATTGAATTTAGACTTCTTCATCTAAAAATTAATTTCTAAAAATTTAGAAAGAGACAGCTTAGCT  
TTCGTCAAACCATTCATACAAGCCTCCAATTAAAAGGCCAAATGATTATGCTACCTTTGCACGGTCAGGG  
TACCGCGGCCGTTTAACACTCTCGTCACTGGGCAGGCCCGACTCTTTATATTTAGGTTACAAAGAG
```

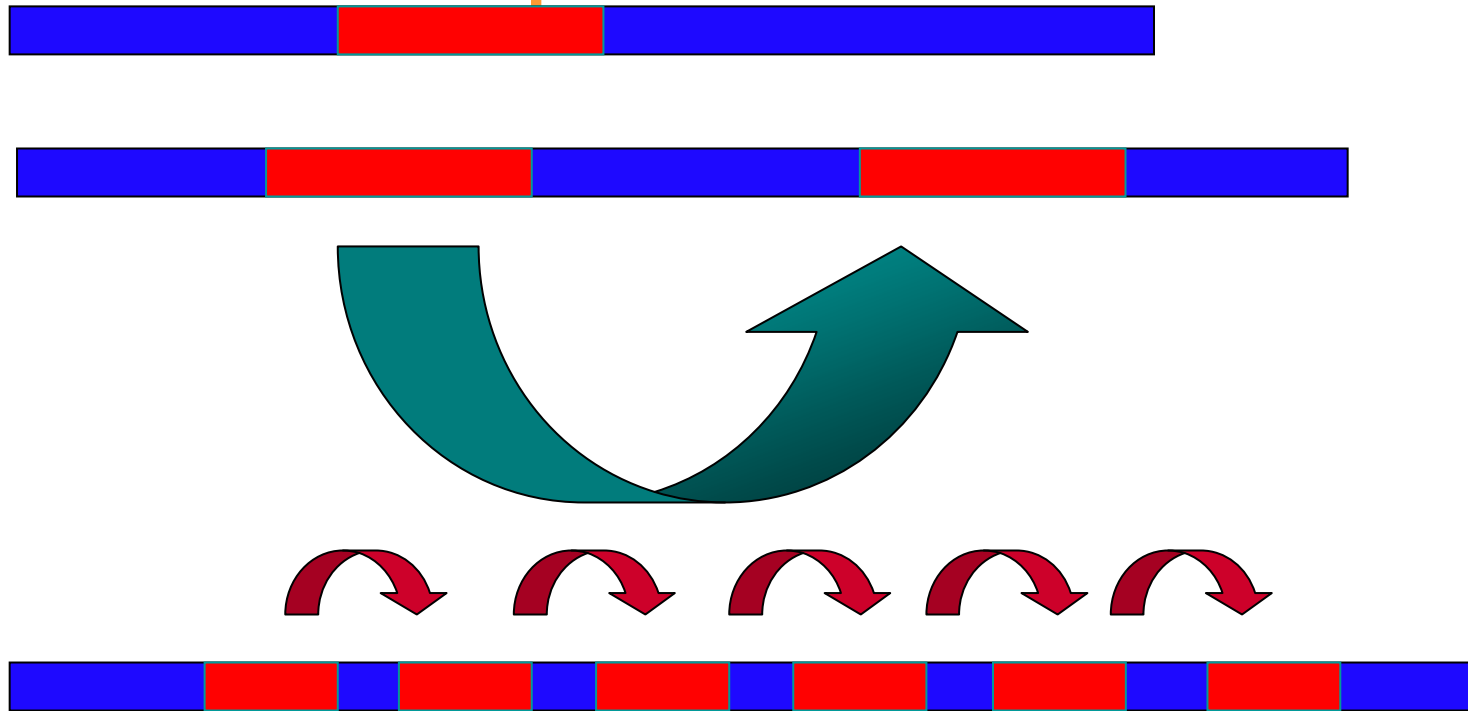
Da cosa sono composte le
sequenze che costituiscono i
genomi?

GENI e duplicazioni geniche

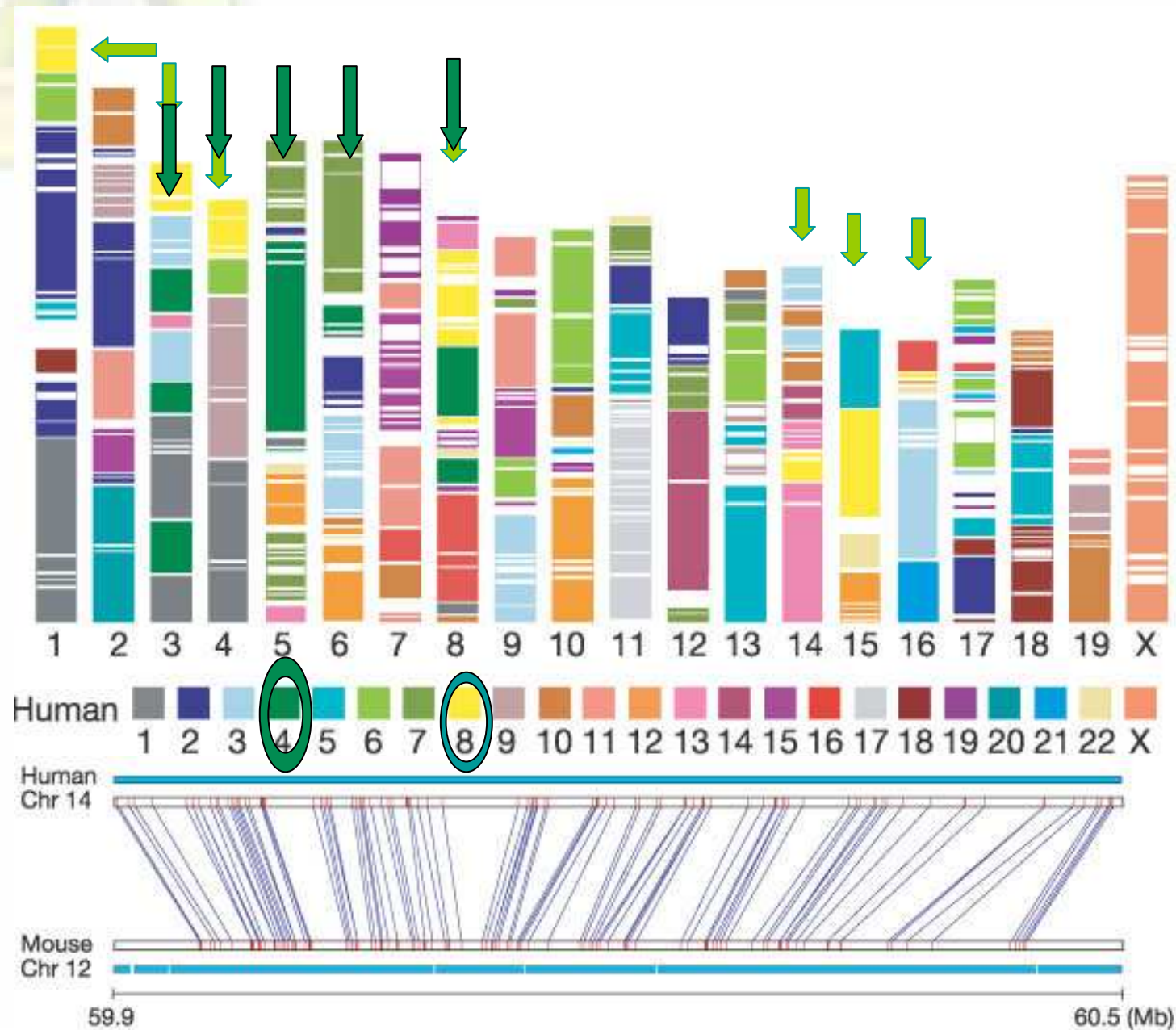
- SEQUENZE RIPETUTE fino a milioni di volte
- TRASPOSONI a DNA in migliaia di copie
- RETRO TRASPOSONI AD RNA in centinaia di migliaia di copie
- SEQUENZE VIRALI e RETROVIRALI in decine di migliaia di copie

- Cosa sono i trasposoni?

Come gli elementi mobili
(trasposoni) si integrano ed
espandono



Sintenia tra uomo e topo

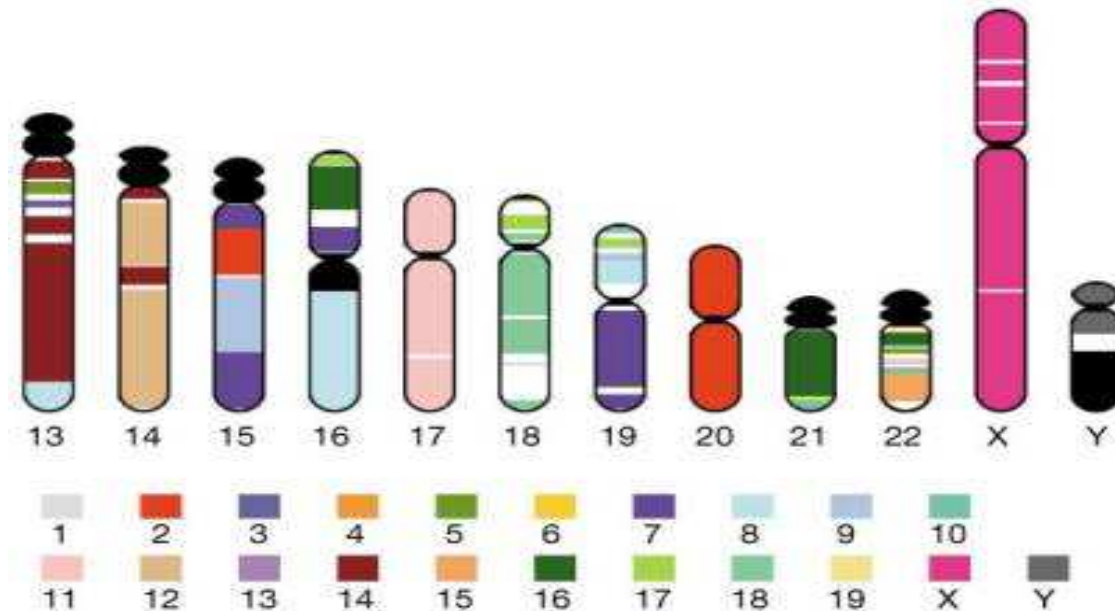


Sintenia tra topo

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

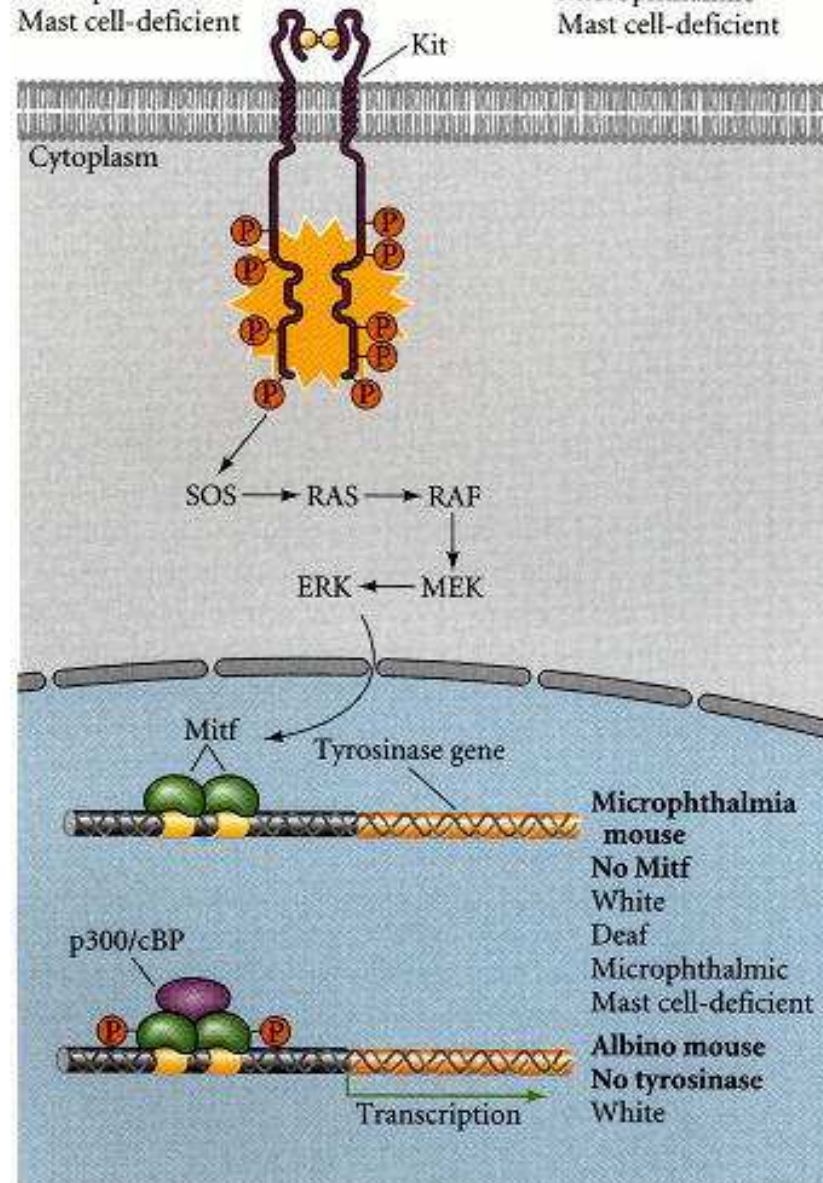
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 X Y

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 X Y



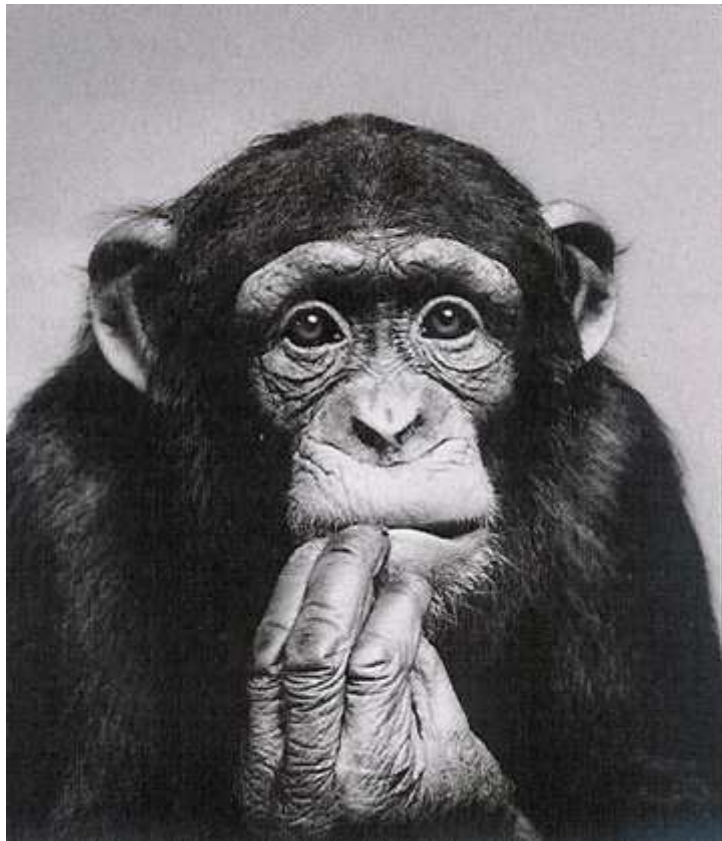
STEEL MOUSE
No Steel (ligand)
 White
 Sterile
 Anemic
 Deaf
 Microphthalmic
 Mast cell-deficient

WHITE MOUSE
No Kit (receptor)
 White
 Sterile
 Anemic
 Deaf
 Microphthalmic
 Mast cell-deficient

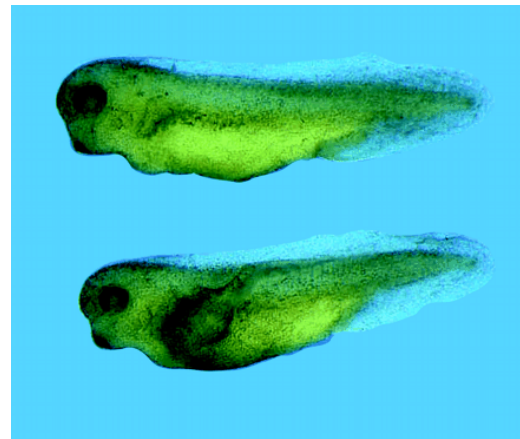
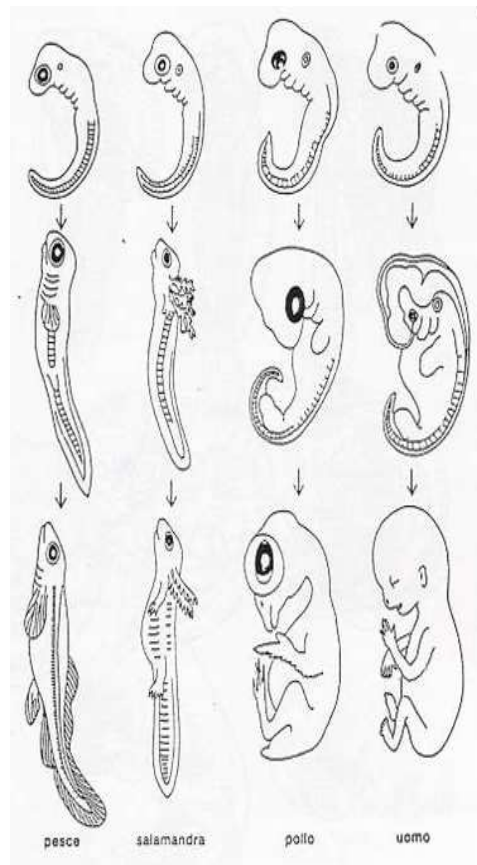




Il genoma dello scimpanze e'
identico al 99% a quello dell'uomo



- Abbiamo creduto per tanto tempo che le differenze tra le specie fosse dovuta al numero di geni. Ora sappiamo che le sequenze che circondano i geni sono importanti e servono a regolare l'espressione dei geni.

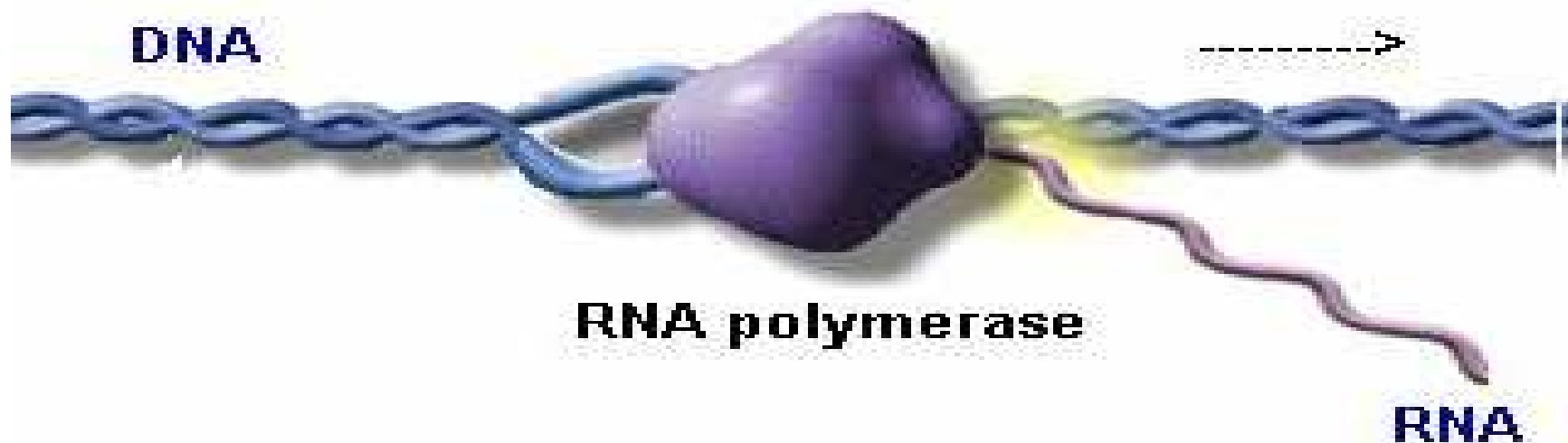


trascrizione

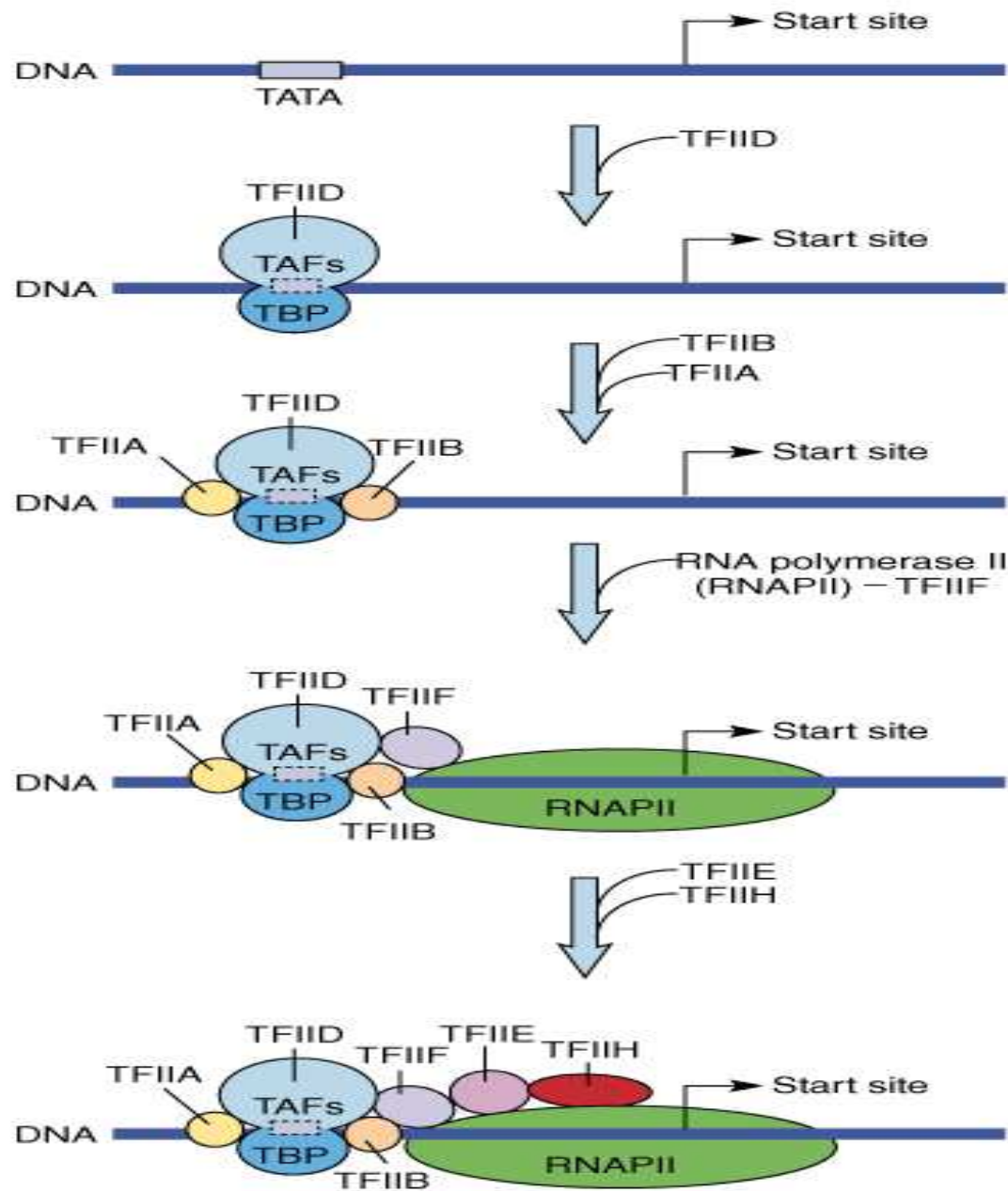
DNA: 3'-ACGCGCGCGATAATG-5'

↓ Transcription

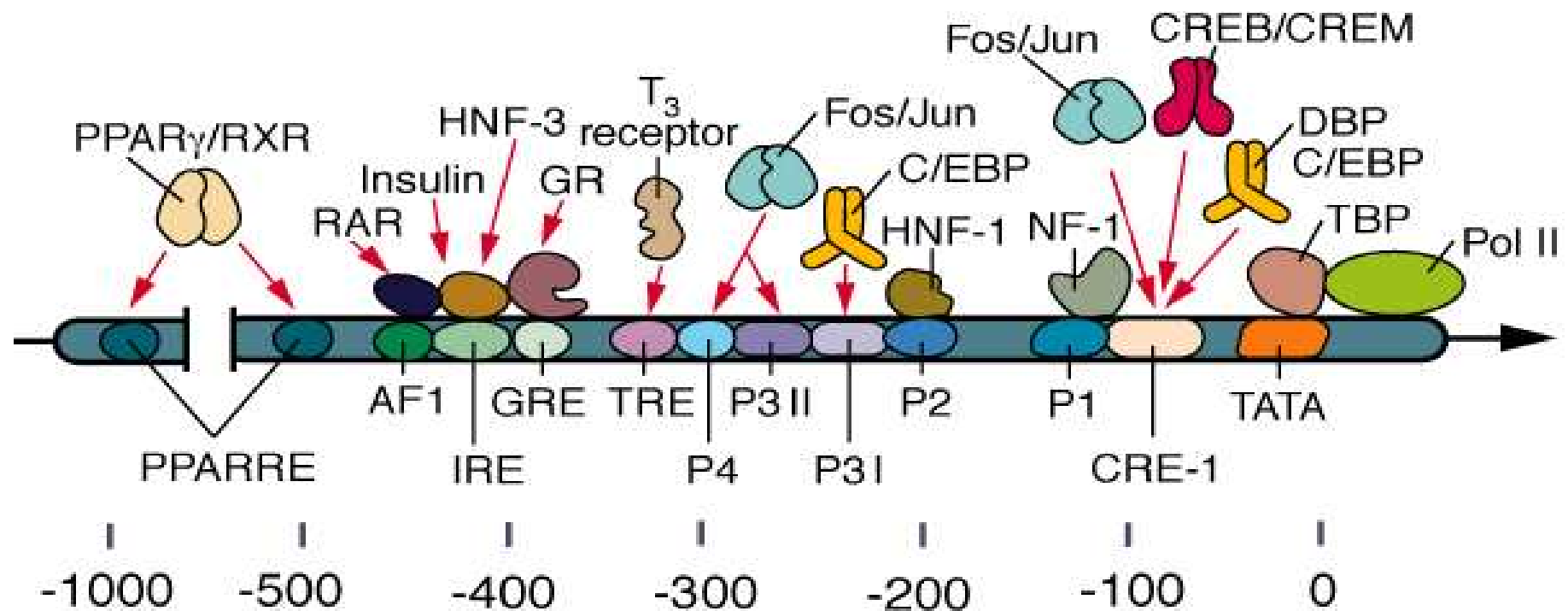
RNA: 5'-UGC GCG CGC UAU UAC-3'



Assemblaggio del complesso d'inizio

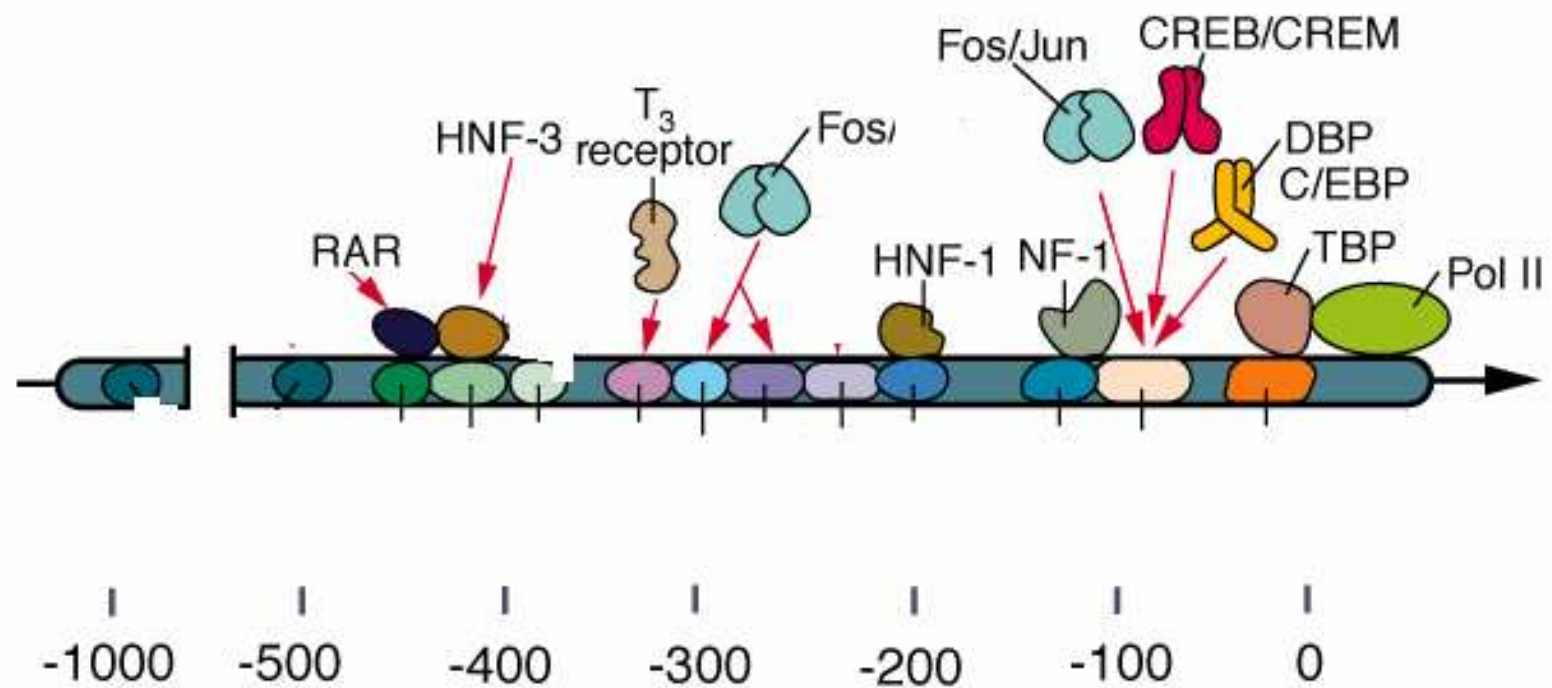


ESEMPIO DELLA COMPLESSITA' DI PROMOTORE EUCARIOTICO



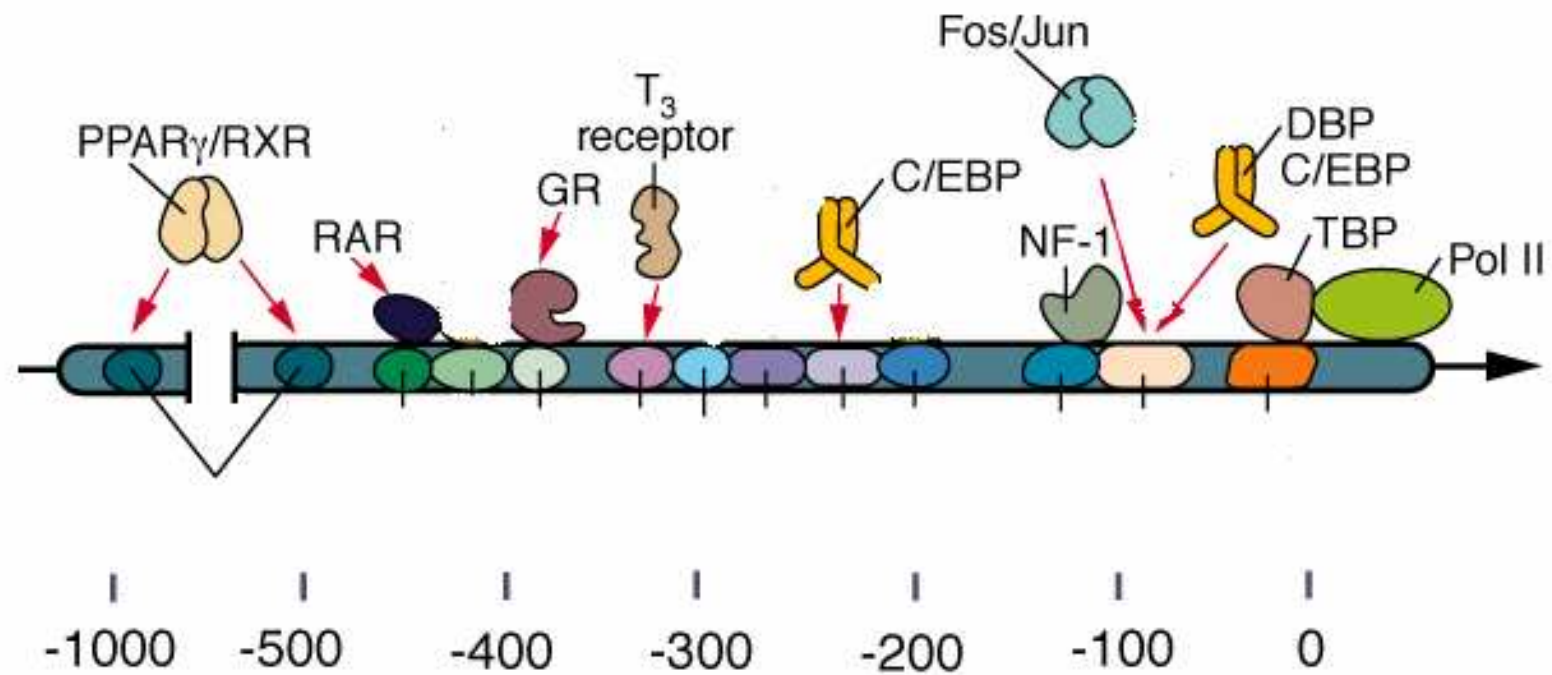
Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

promotore del gene PEPCK (fosfoenolpiruvatocarbossichinasi)

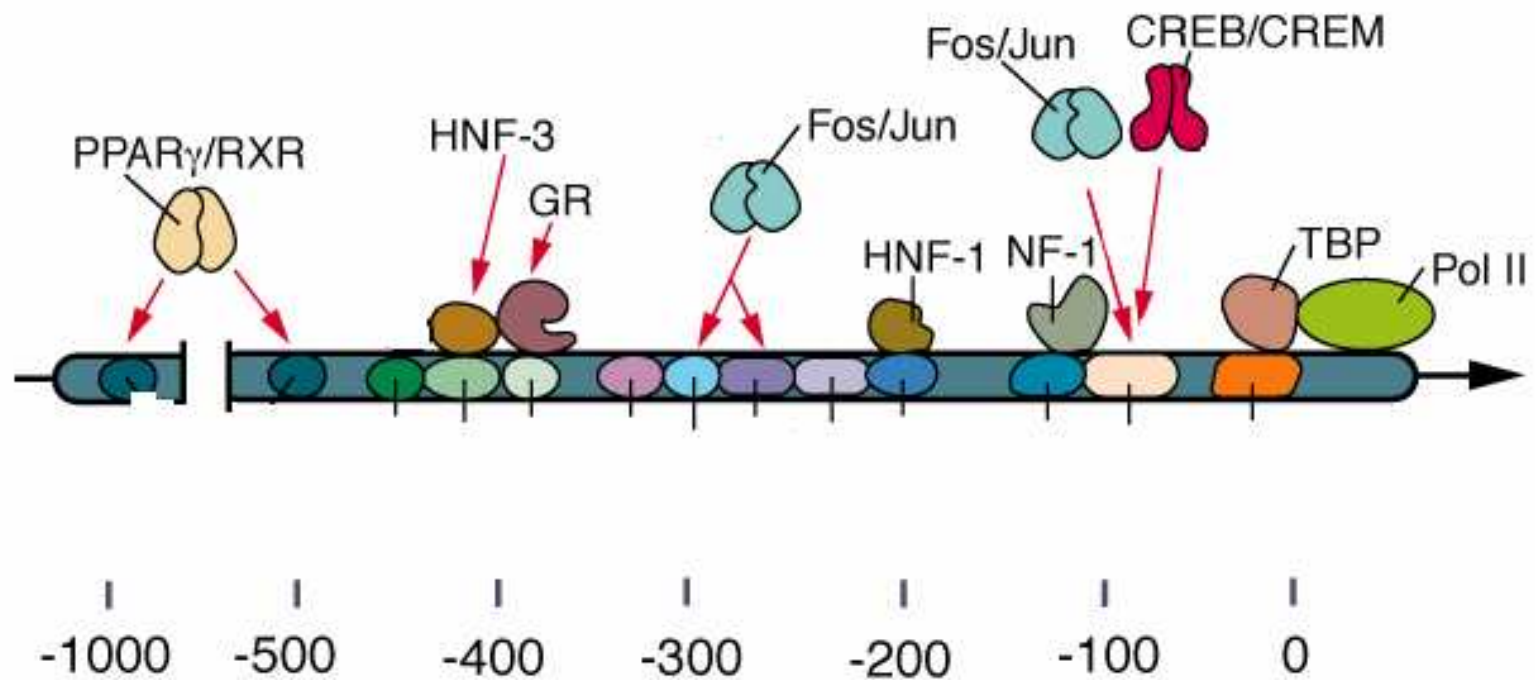


Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

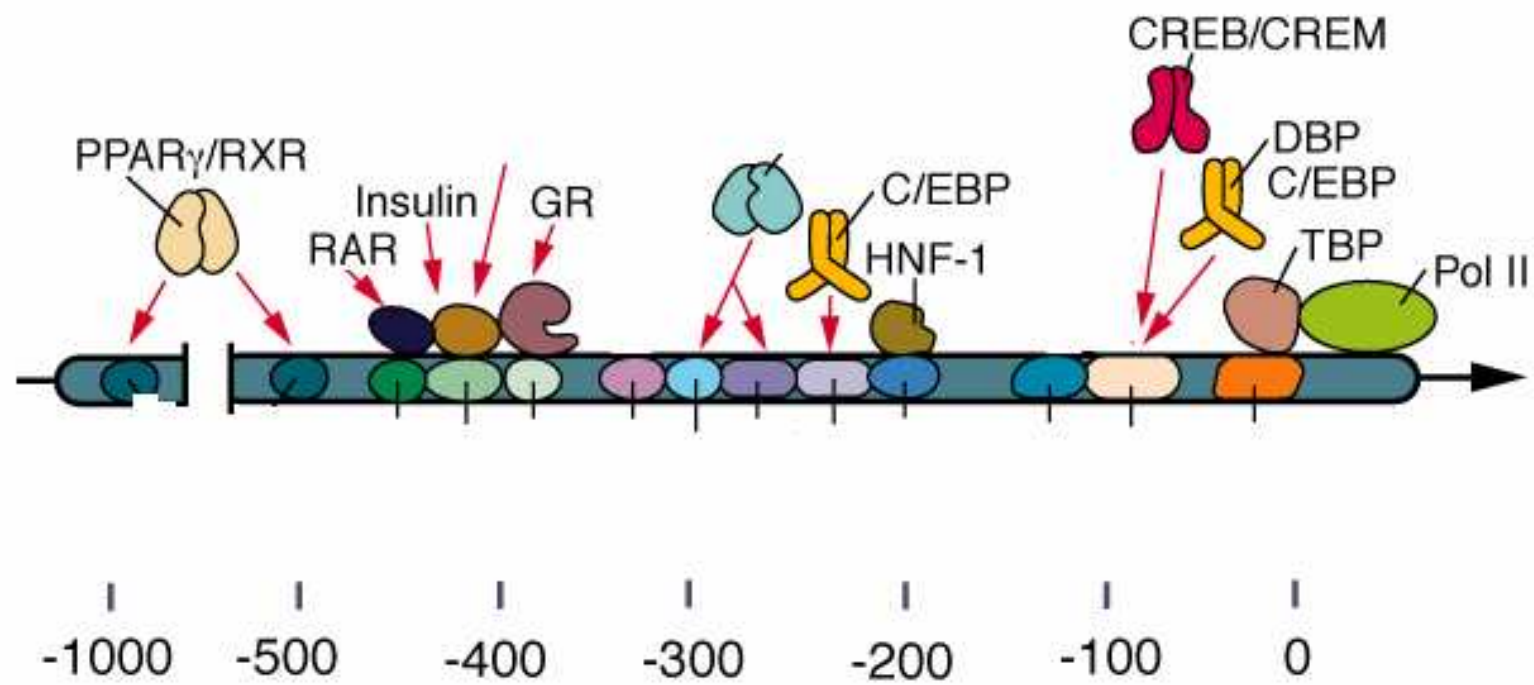


Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.



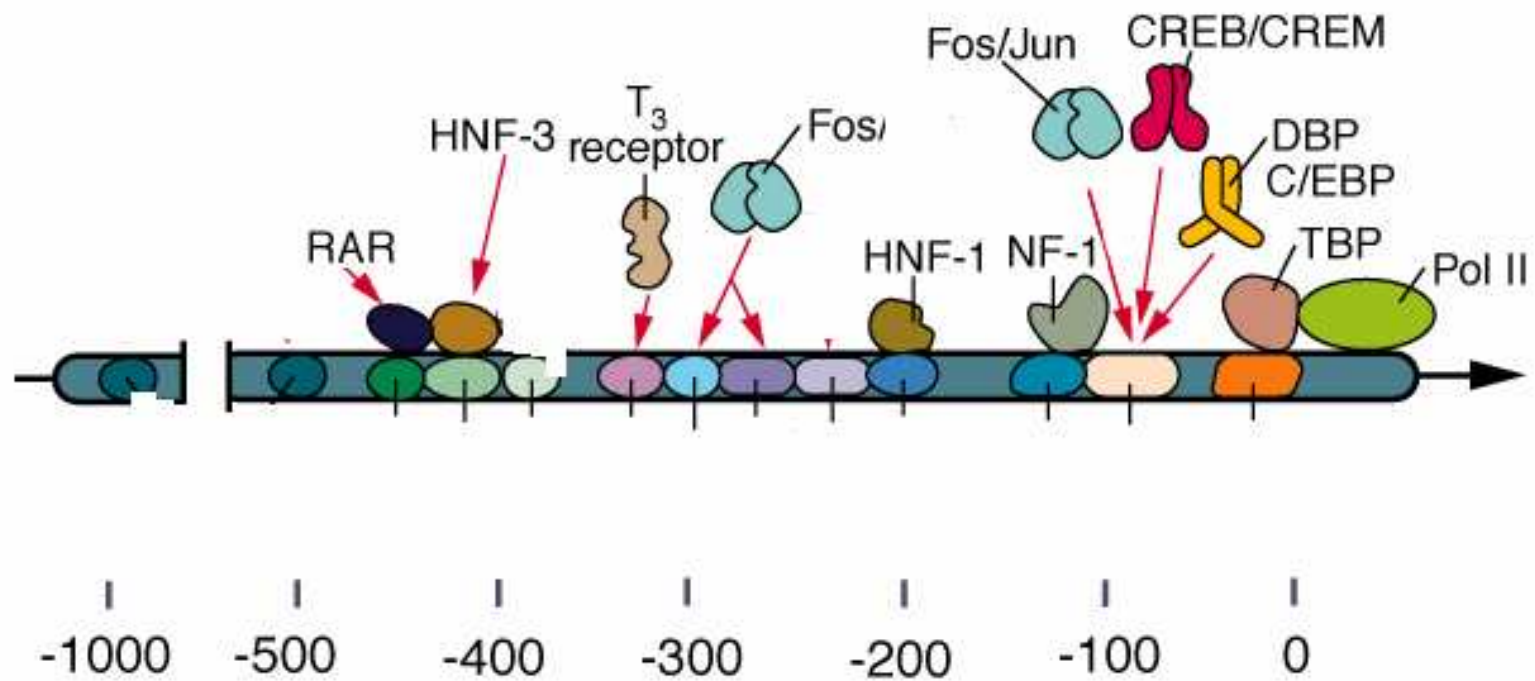
Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.



Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

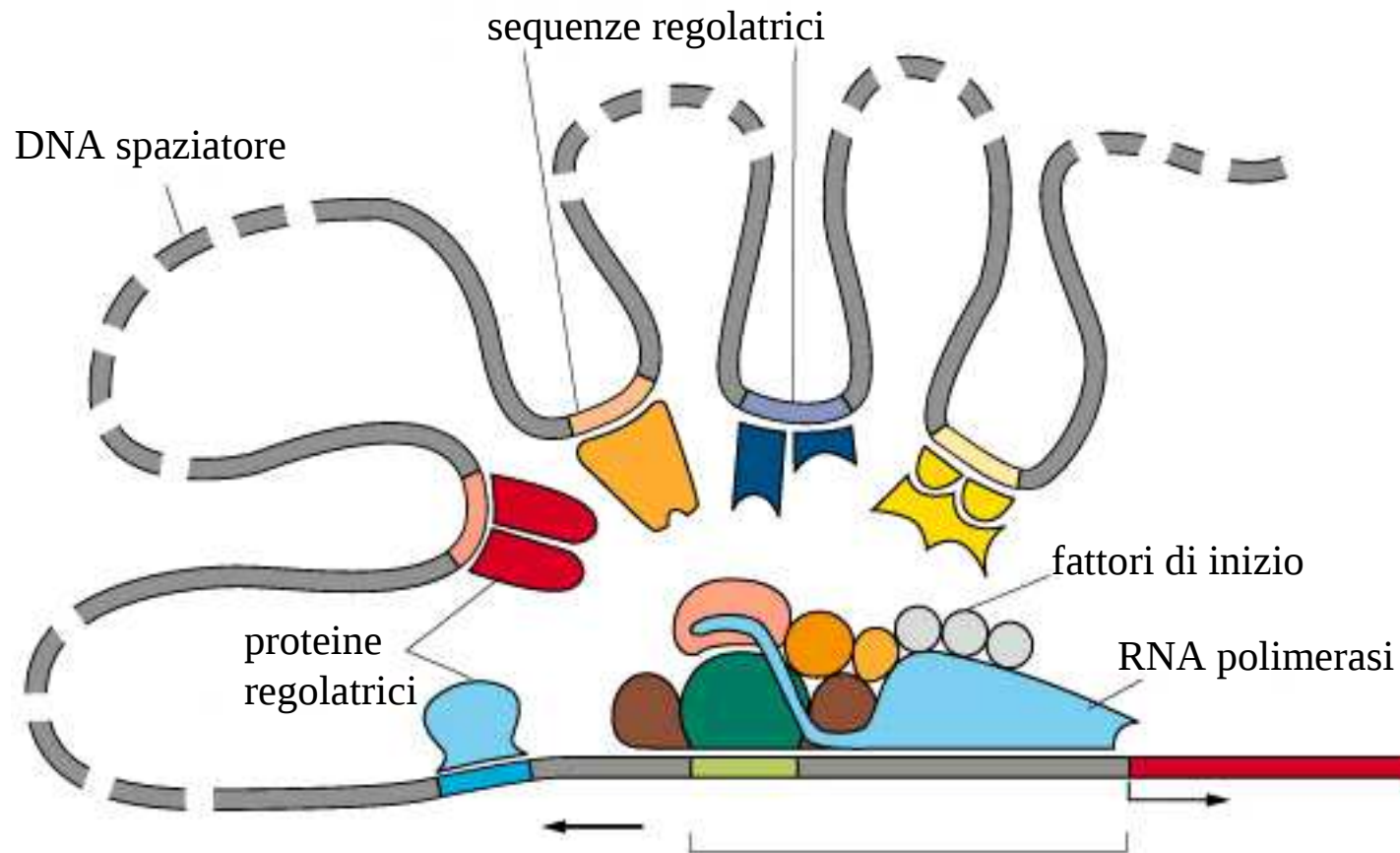
Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

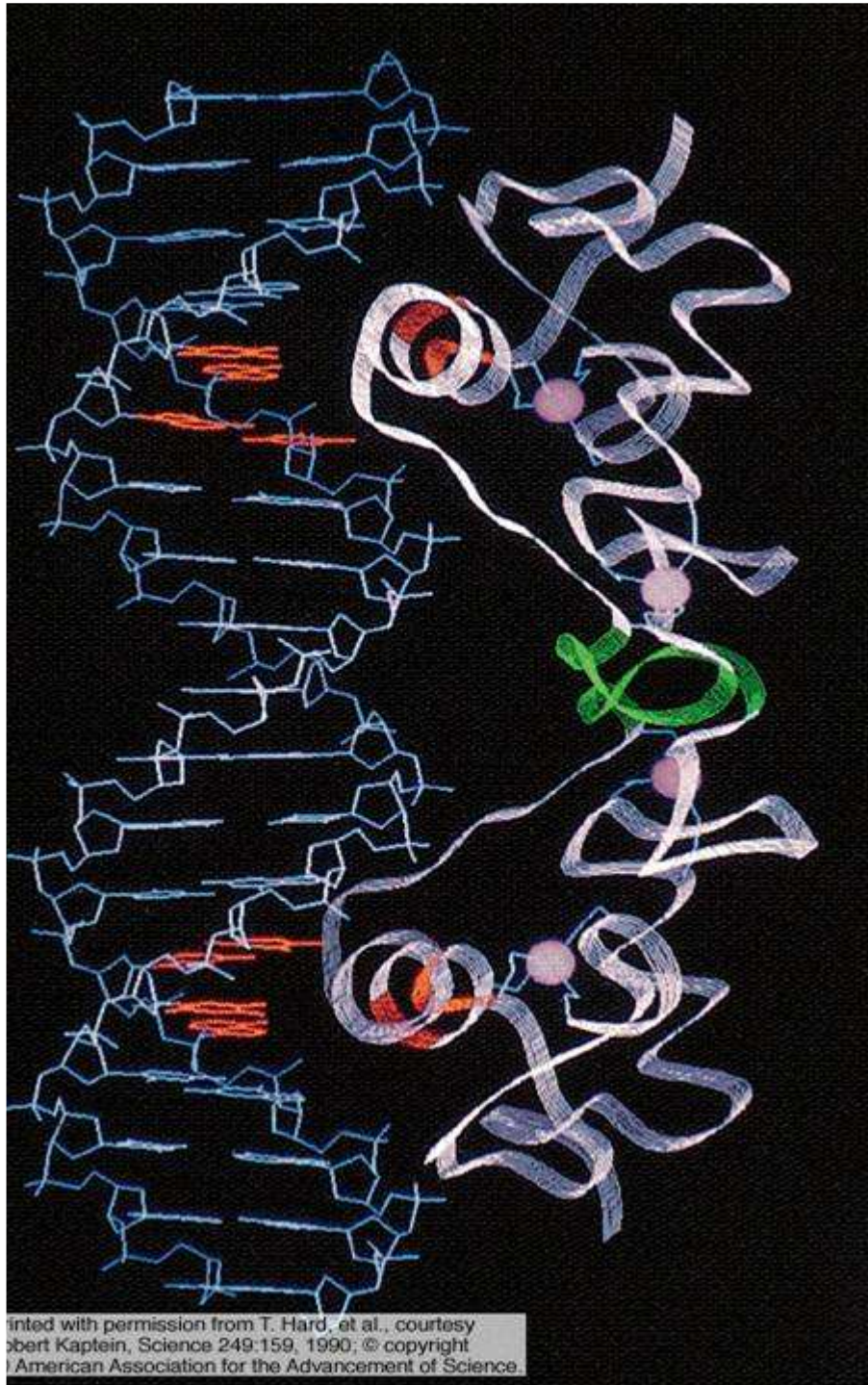


Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

La trascrizione negli eucarioti è regolata da più proteine regolatrici





Struttura generale dei fattori trascrizionali

dominio di legame al DNA:

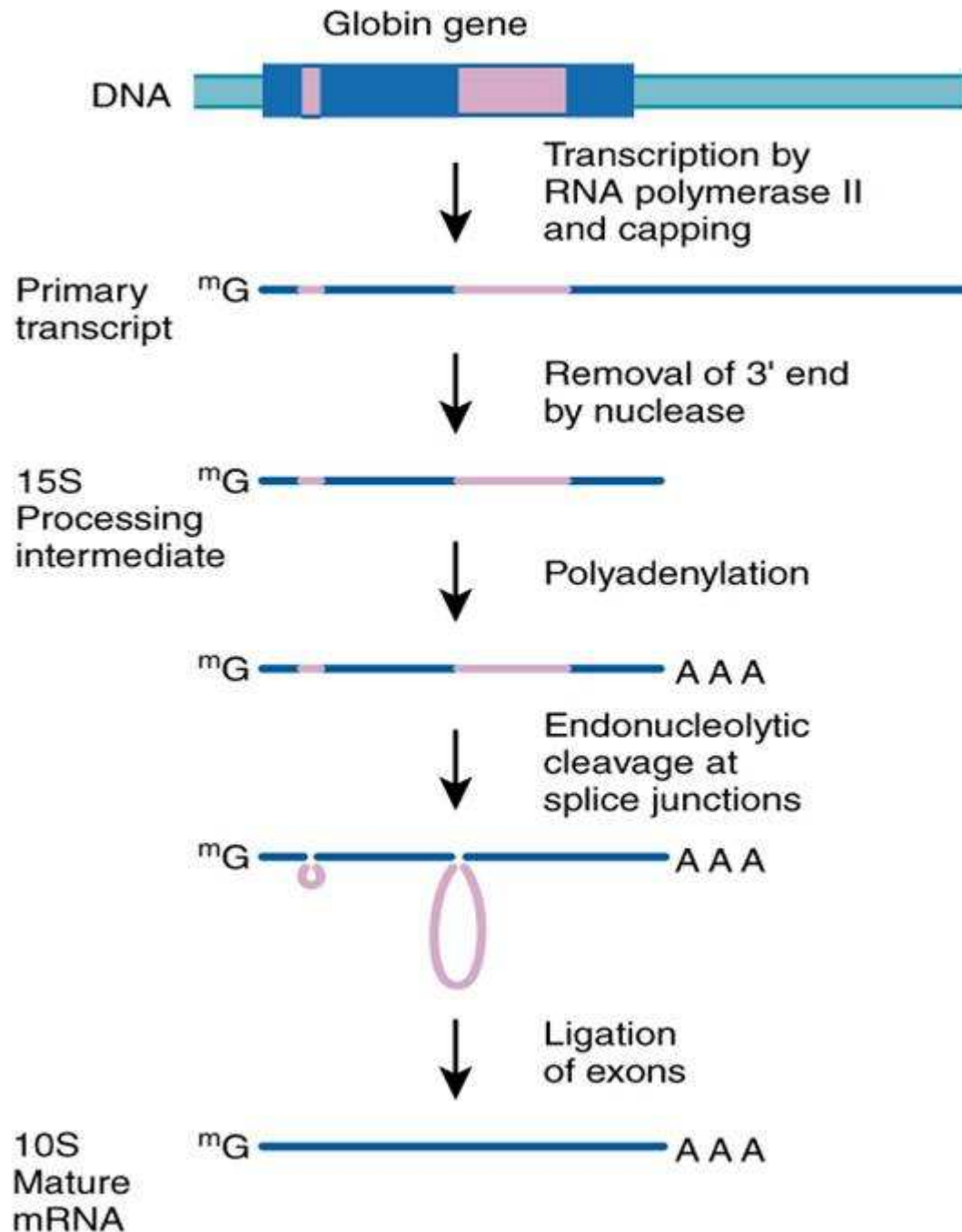
assicura il riconoscimento sequenza specifico.

sono noti diversi tipi:

- motivo Zn-finger
- motivo HLH (helix-loop-helix)
- motivo LZ (leucine zipper)
- motivo HMG box

dominio di attivazione: attiva la trascrizione interagendo con altre proteine

- Gli introni permettono l'aumento della variabilità delle proteine. Da un solo gene si può produrre più di una proteina diversa dall'altra (splicing alternativo)

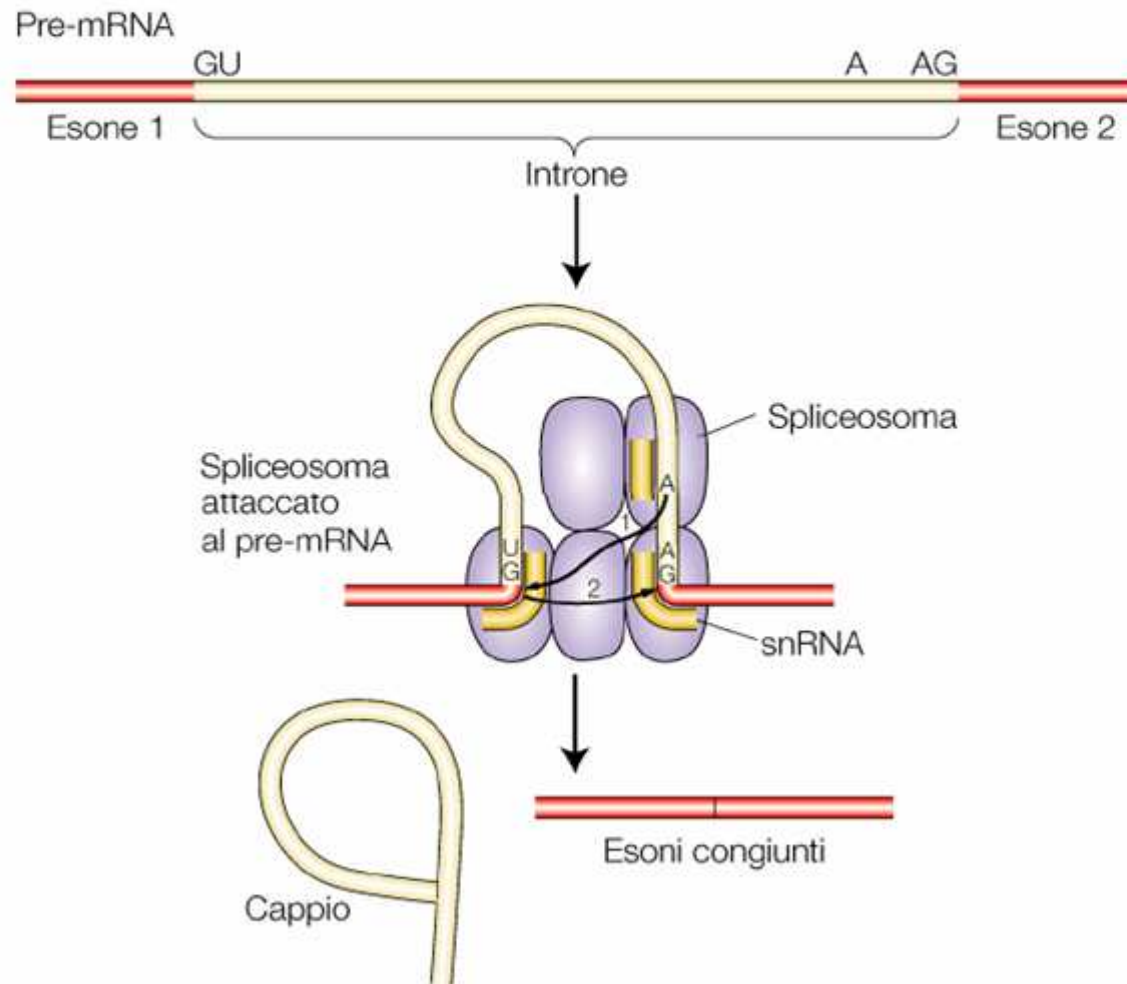


TAPPE NELLA MATURAZIONE DEGLI RNA MESSAGGERI

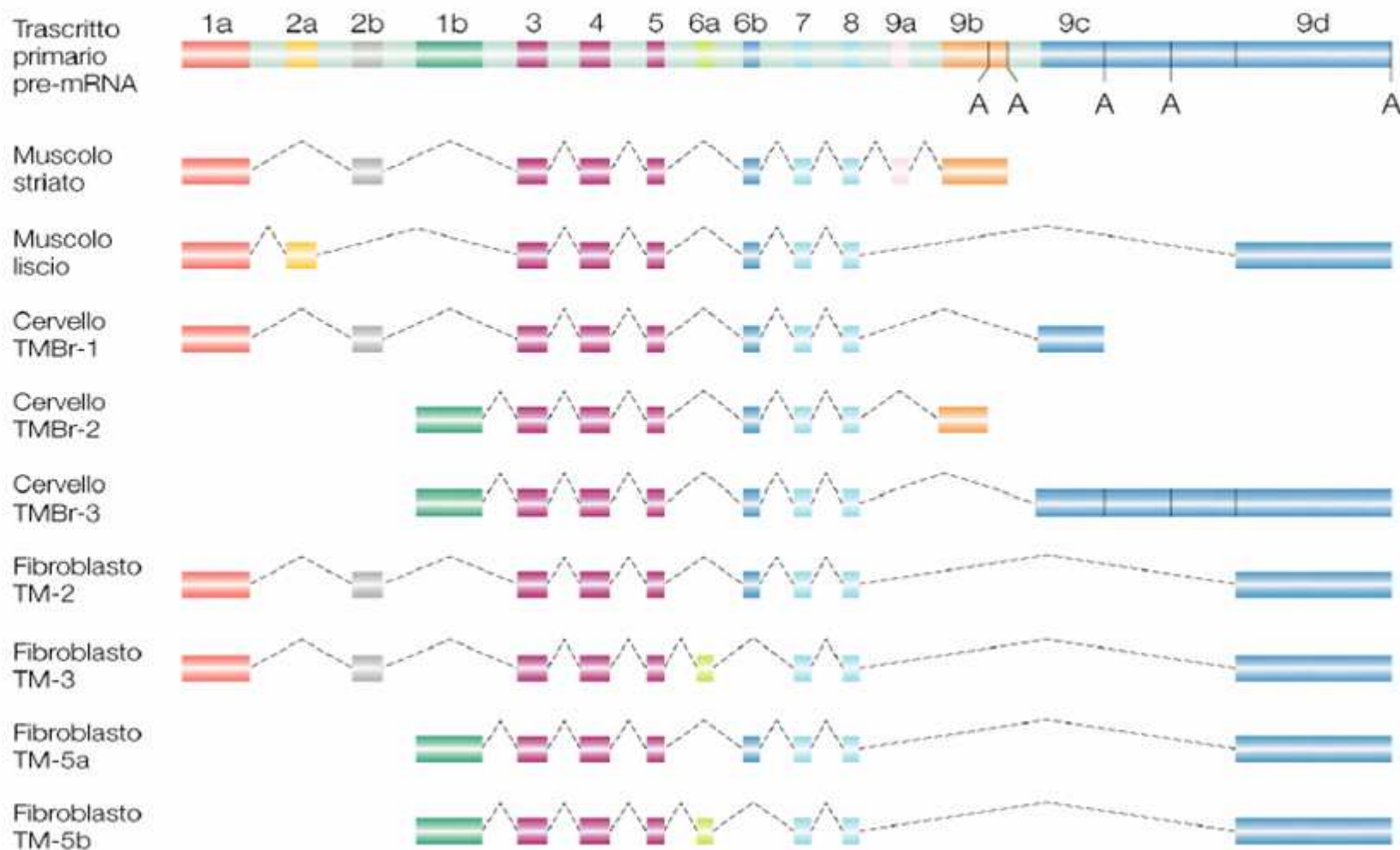
Introni sequenze
presenti nel trascritto
primario che vengono poi
rimosse dal meccanismo
di **splicing**

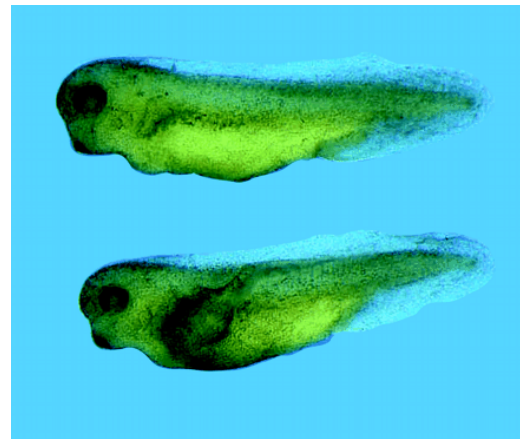
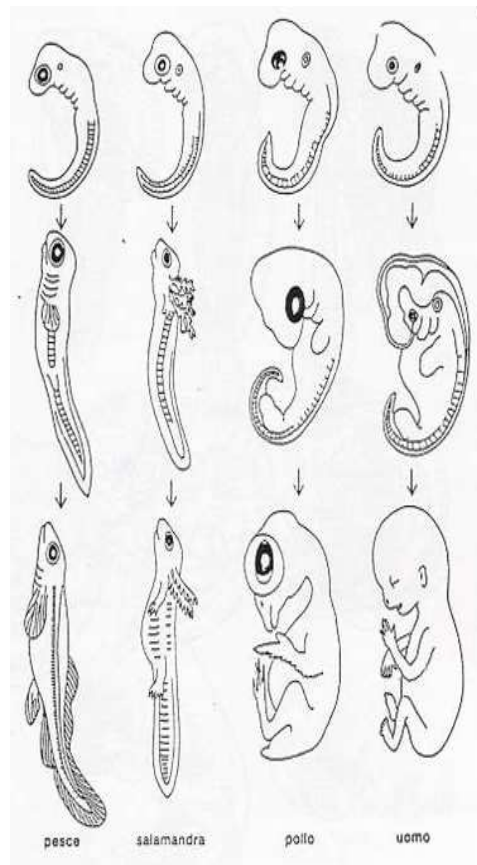
Esoni sequenze geniche
che vengono trascritte e
che compongono l' mRNA
maturo

Il complesso dello spliceosoma



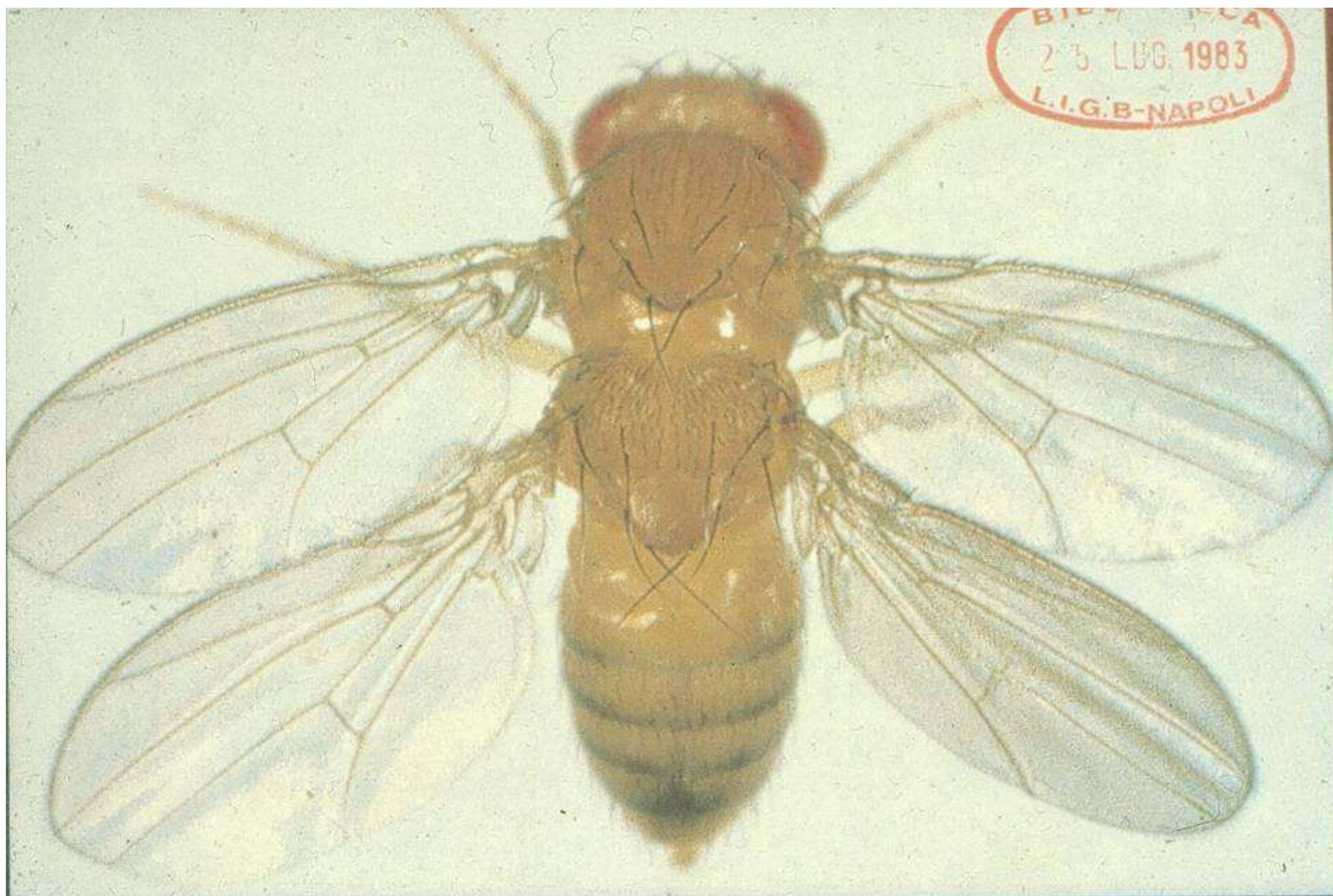
Splicing alternativo del pre-mRNA del gene dell' α -tropomiosina



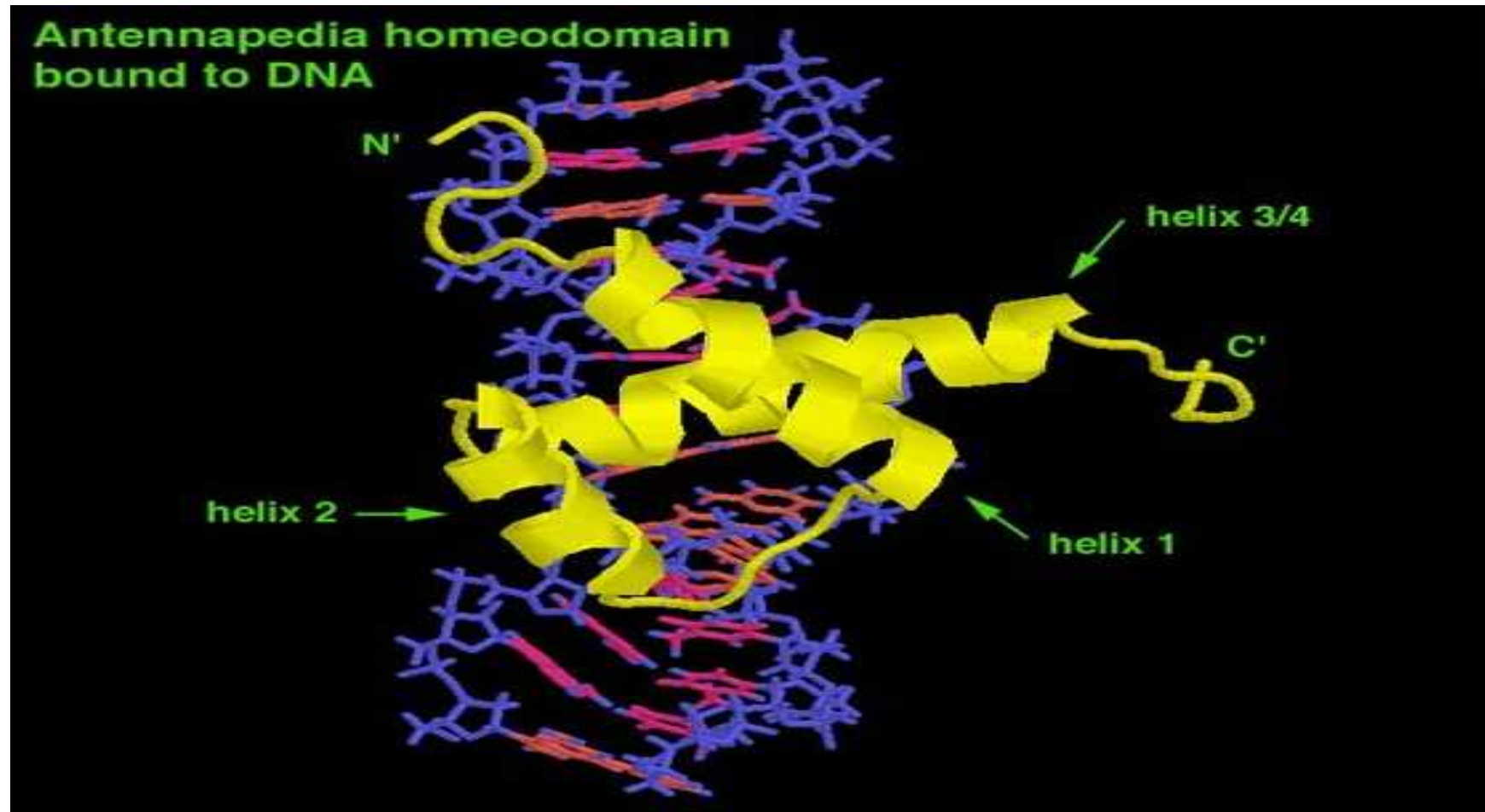


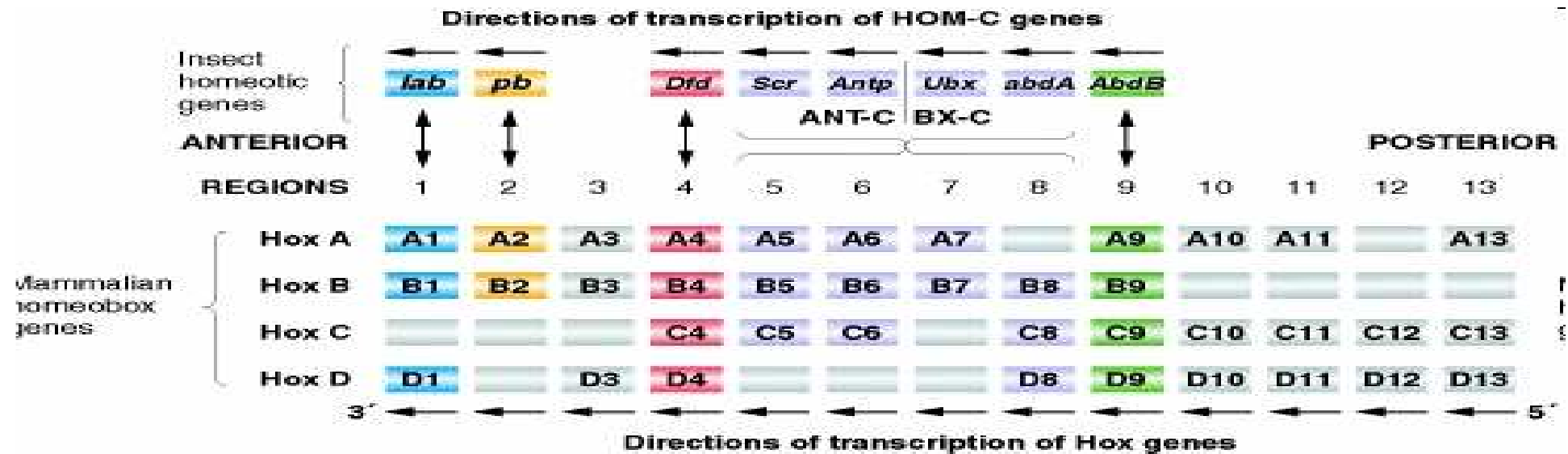
- I geni omeobox



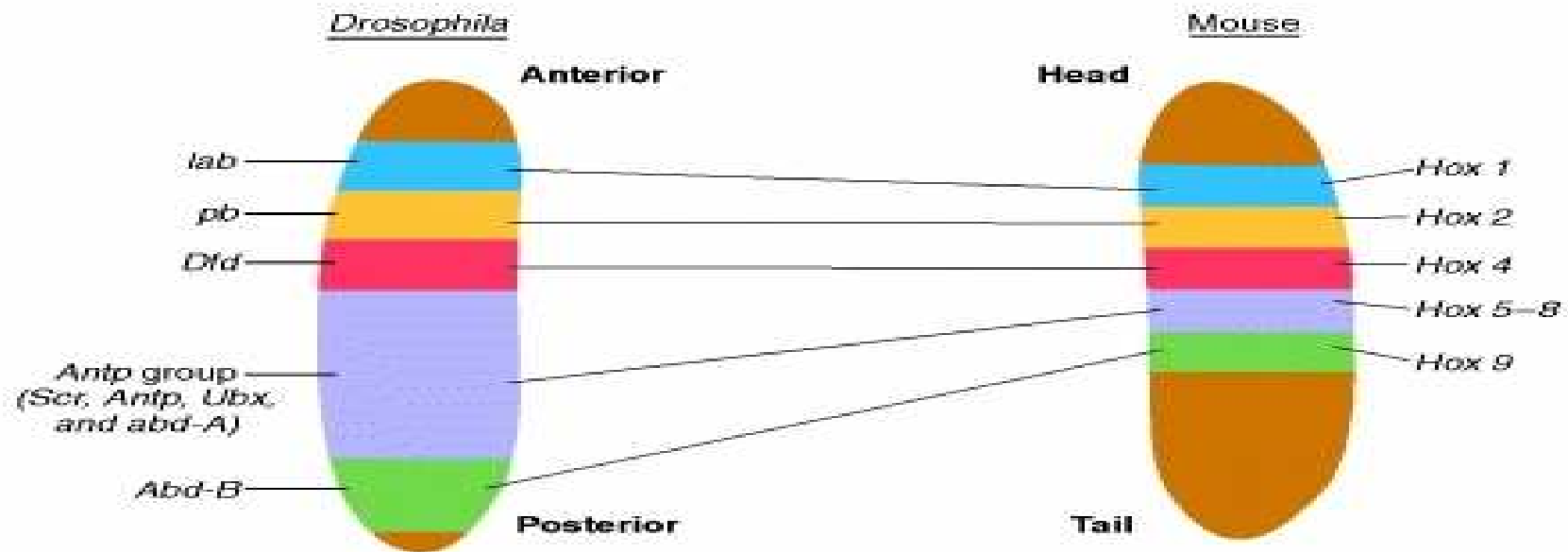


Antennapedia legato al DNA

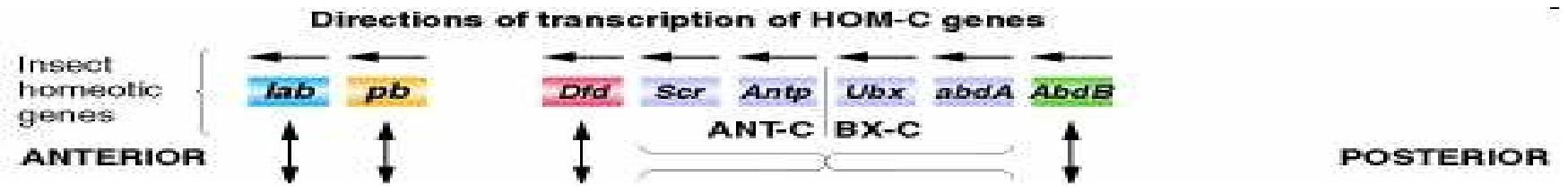




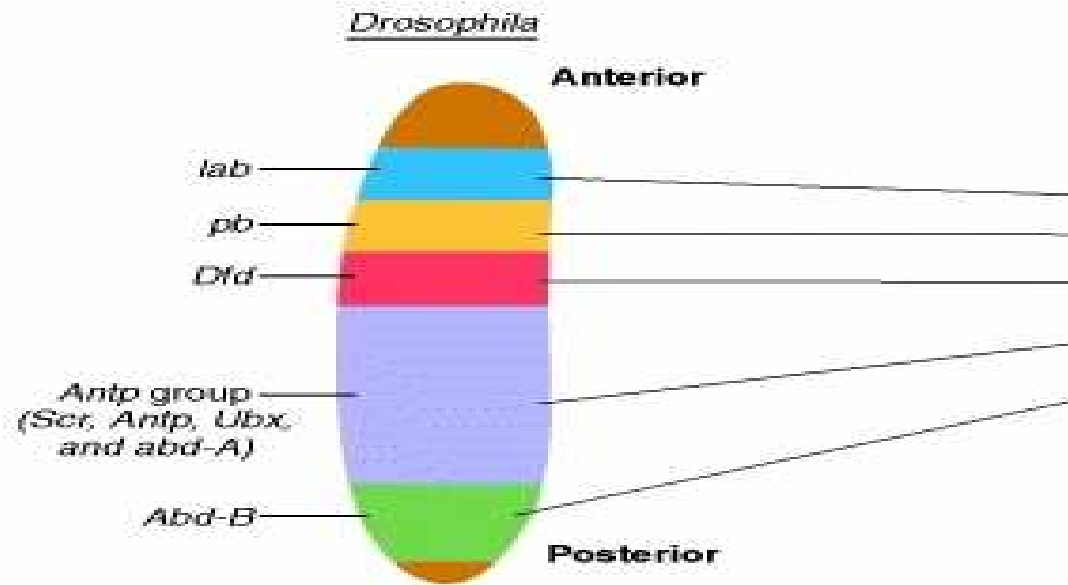
(a)



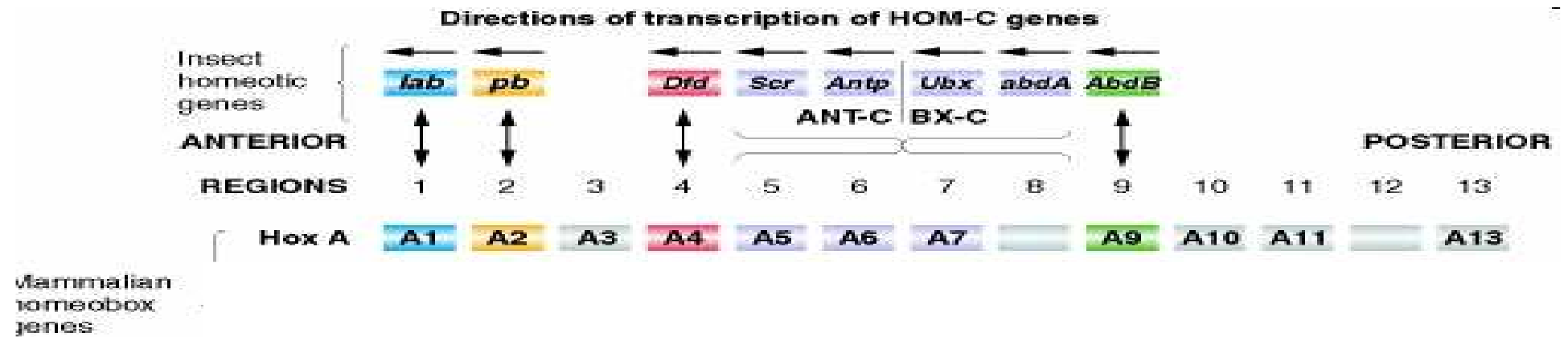
(b)



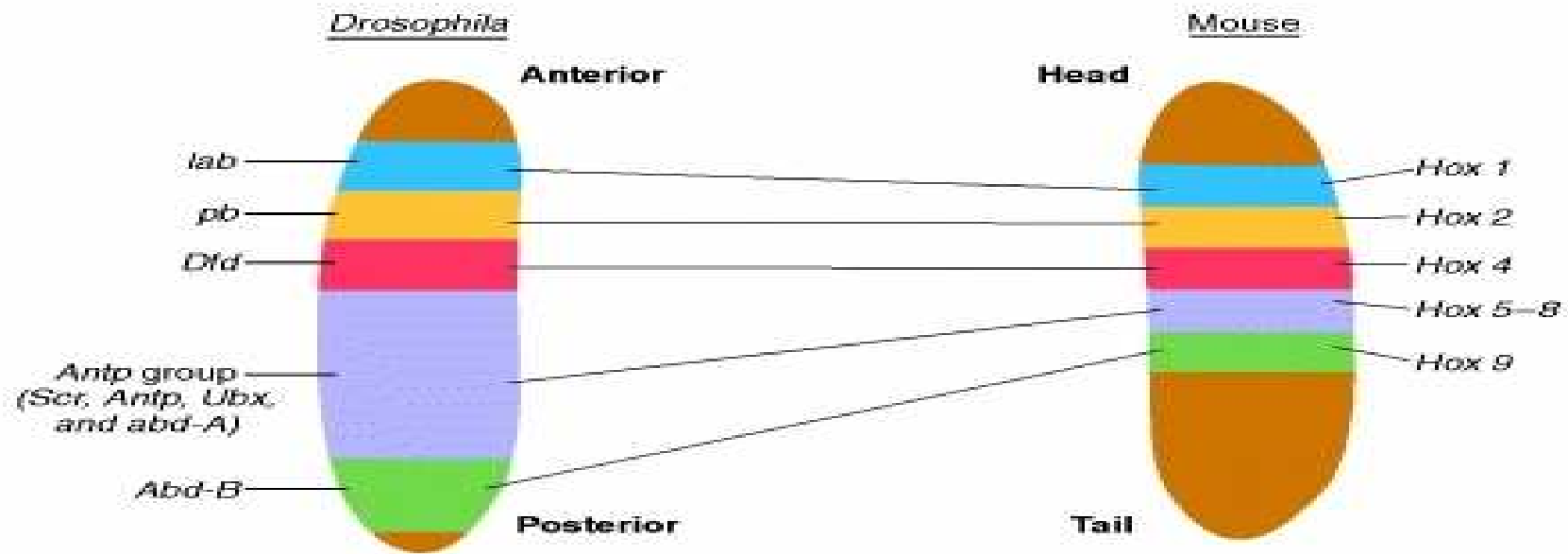
(a)



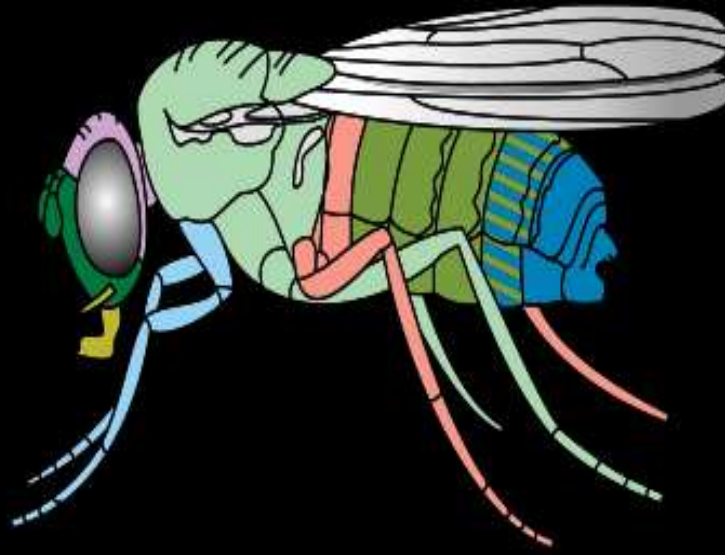
(b)



(a)

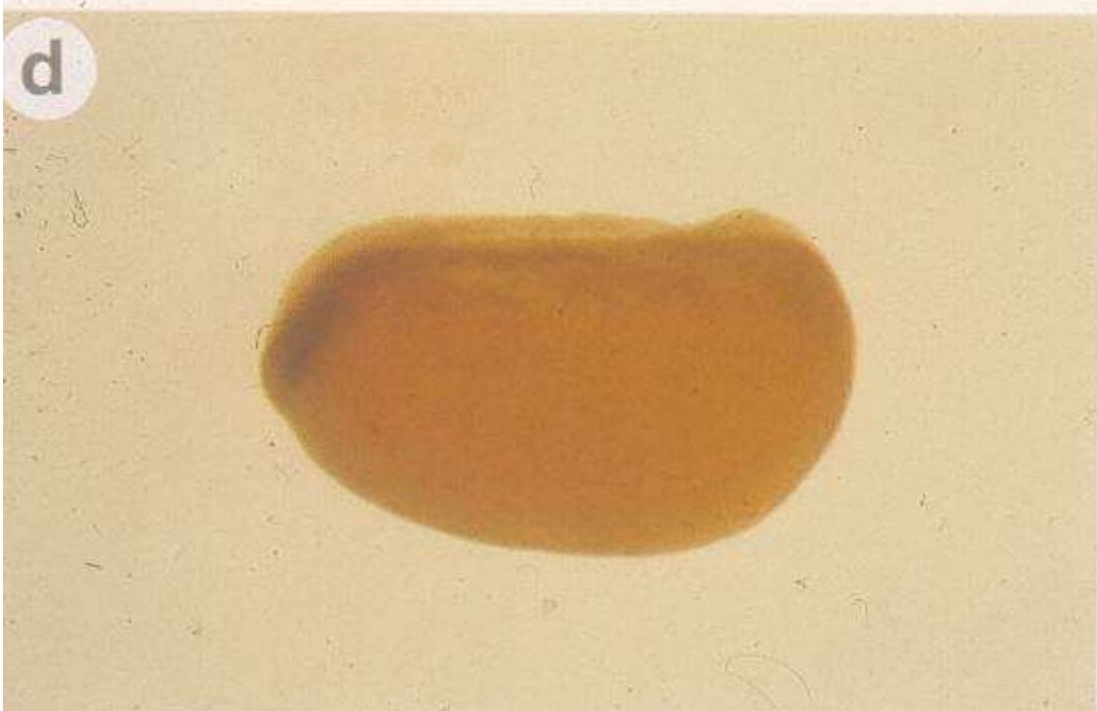
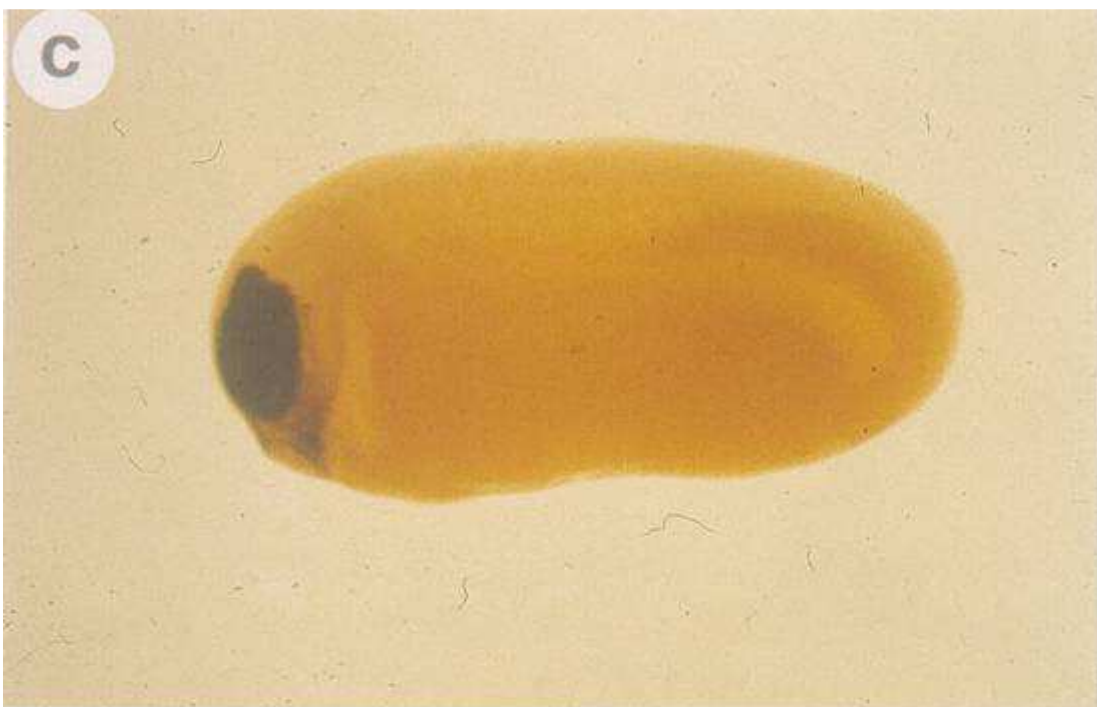


(b)



- OTX2 gene che specifica la testa



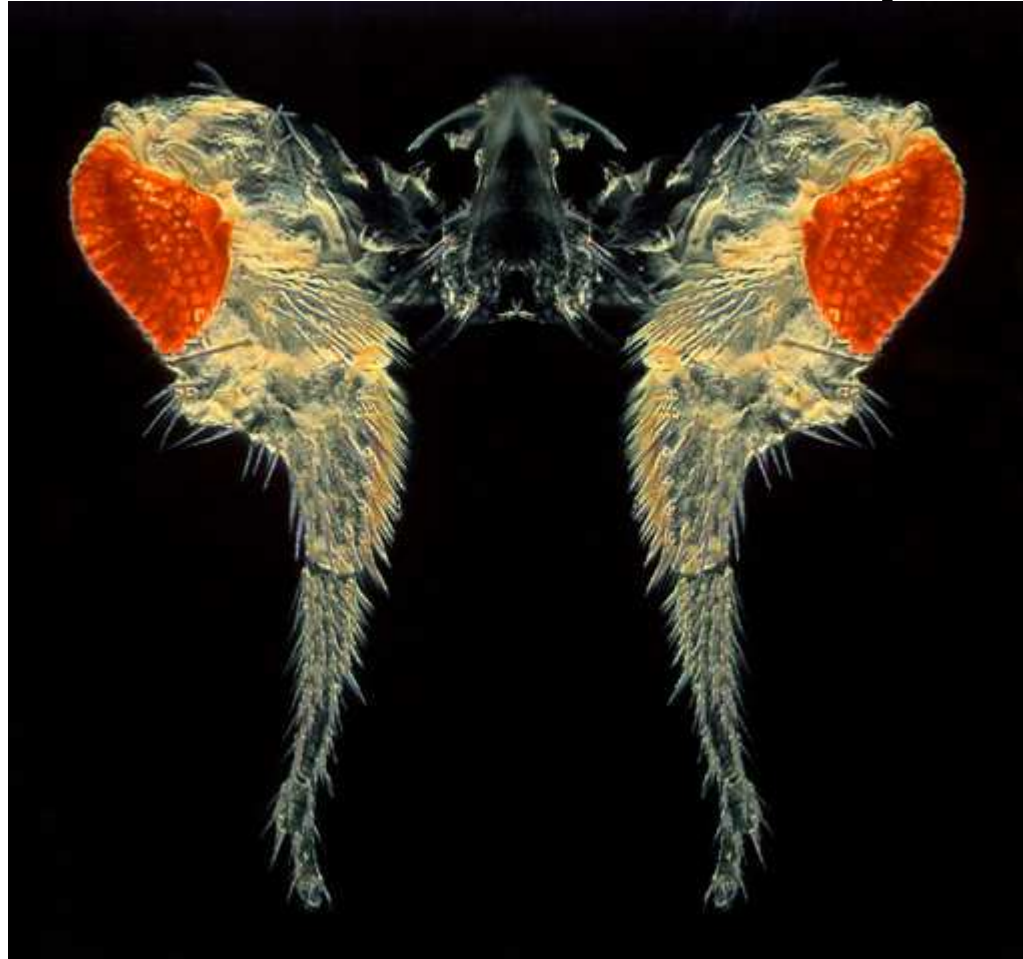




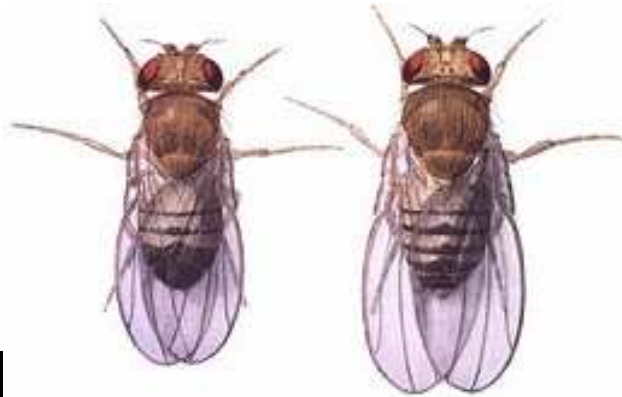
PAX-6



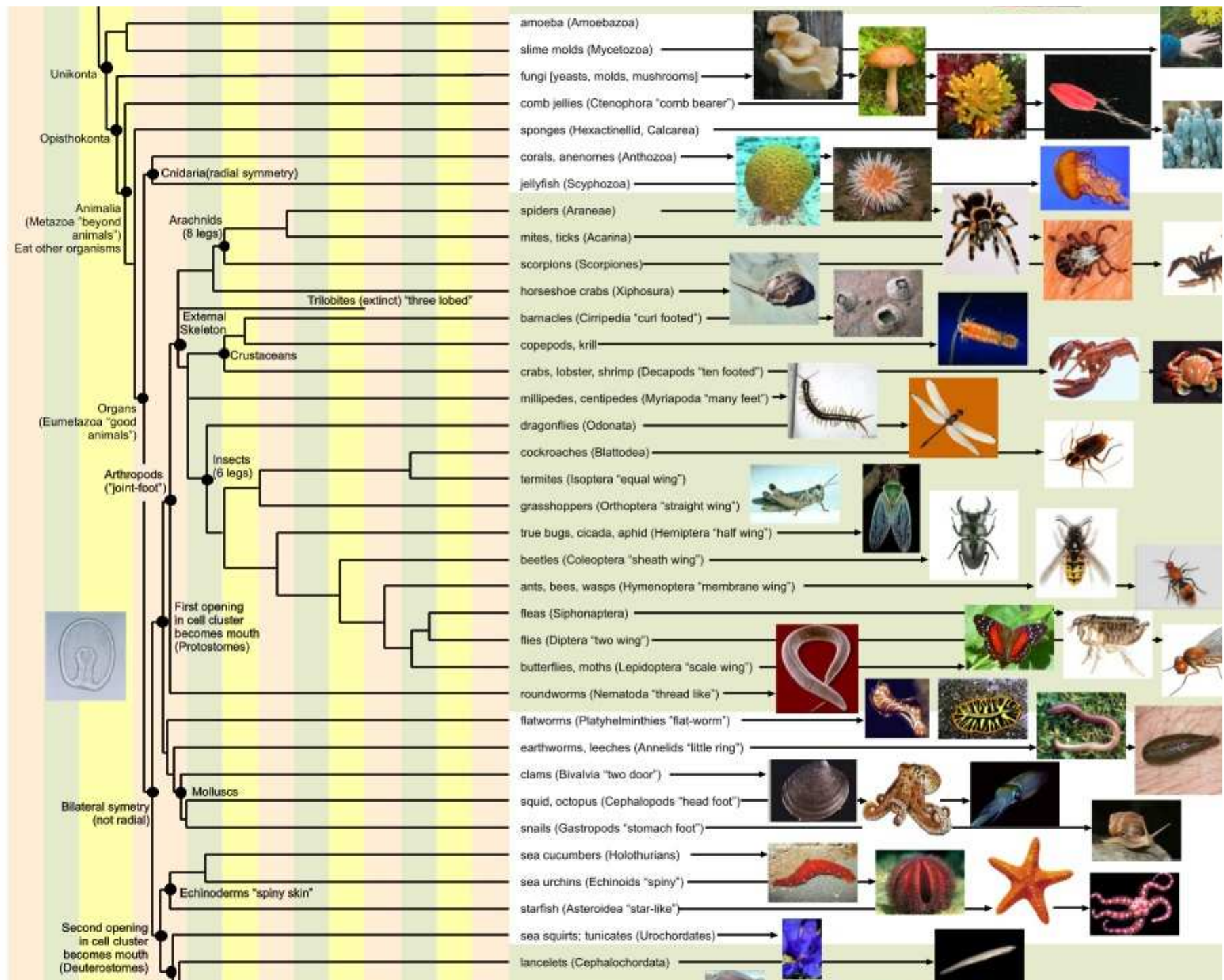
Occhi nelle zampe



- Espressione di Distal-less controlla la formazione degli arti



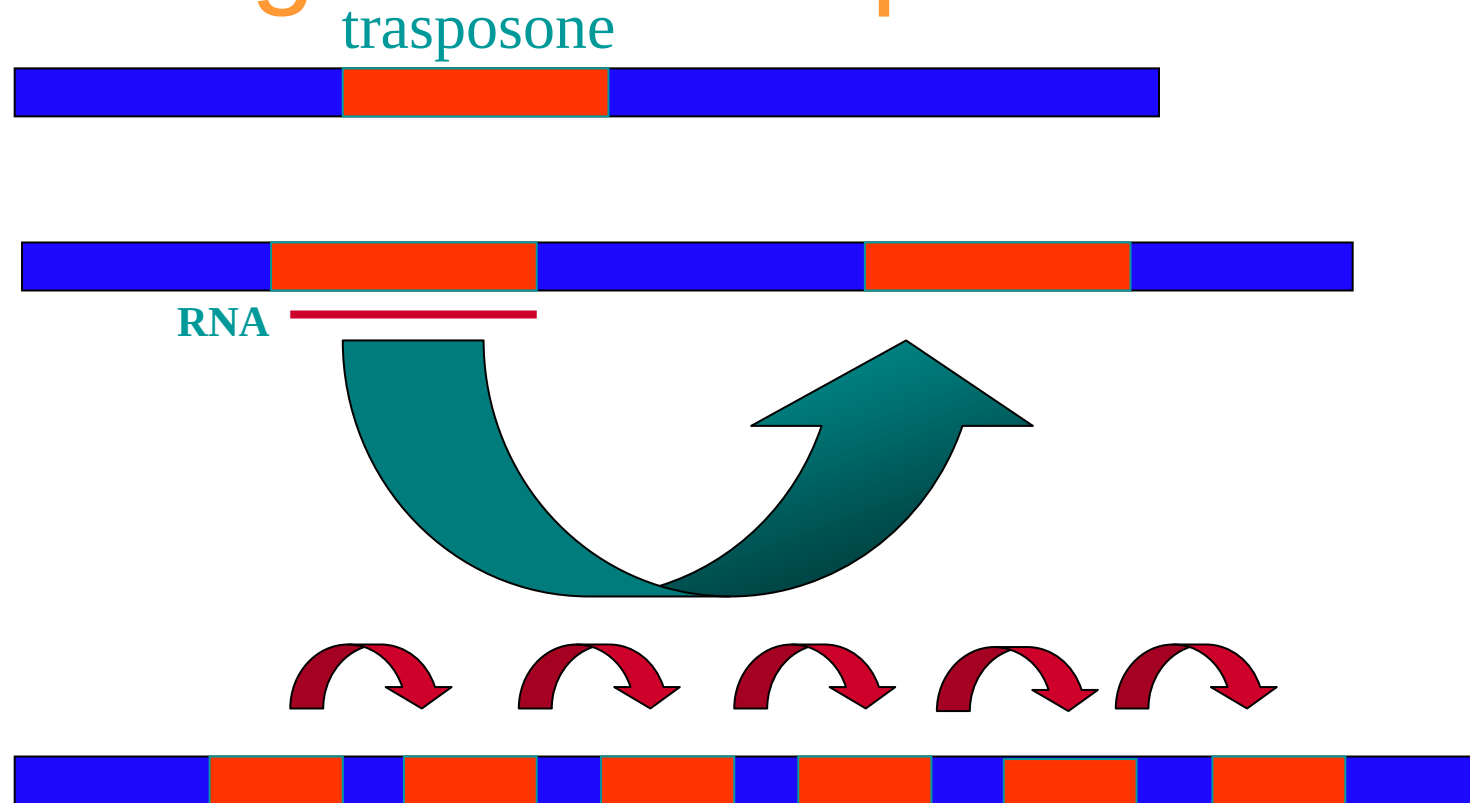
- Durante la “Cambrian explosion” tutti i geni erano già presenti.
- Sono cambiate le sequenze regolatrici del DNA e la “geografia dell’embrione”



Perche' tutti i genomi non sono
enormi?

Potrebbe esistere un
meccanismo di difesa che
impedisce o ritarda l'invasione di
questi elementi che si espandono
con tanta efficienza?

Come gli elementi mobili si integrano ed espandono



Silenziamento genico post-trascrizionale



Quale e' la funzione del silenziamento genico?

- La difesa del genoma

Questi meccanismi riducono moltissimo l'espansione delle sequenze non geniche ma non la eliminano completamente.

Perche'?

La variabilita' dei genomi permette l'evoluzione delle specie ed, eventualmente, la creazione di nuove specie

- Abbiamo avuto la sorpresa di scoprire che anche le regioni non geniche sono trascritte (L'RNA prodotto viene chiamato non –coding) e che un meccanismo simile a quello di silenziamento per difesa produce piccoli RNA cellulari che hanno funzioni straordinarie

MicroRNAs MICROCONTROLLERS OF MULTIPLE PATHWAYS

These noncoding genes, found in nearly every eukaryotic organism, are often highly conserved through evolution and are involved in regulation of a diverse range of biological pathways.



Plant



Nematode



Mouse

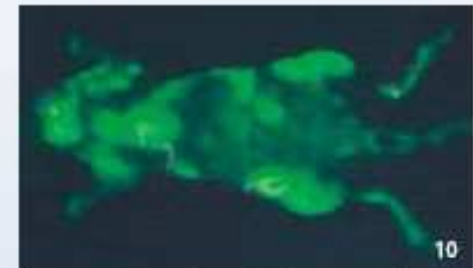


Fruit fly

MicroRNAs are encoded in the genome and produced by the maturation of a hairpin-shaped RNA transcript. These RNAs are key regulators of many biological processes such as development (see example in Zebrafish at top right), cell proliferation, apoptosis, morphogenesis, oncogenesis (see example in mouse at bottom right), and hematopoiesis. In animals, they generally work by blocking protein synthesis or destabilizing mRNA. In contrast, miRNAs from plants and some from animals predominantly induce mRNA degradation and are important for plant siRNA formation. They also act as defense mechanisms by targeting RNA from viruses, leading to silencing of viral protein expression. MicroRNAs produced by viruses can also affect expression of host genes.



Ventral view of mir-140 expression in Zebrafish embryos.



Overexpression of mir-17-19b clusters accelerates lymphomas formation in mice.

miRNAs

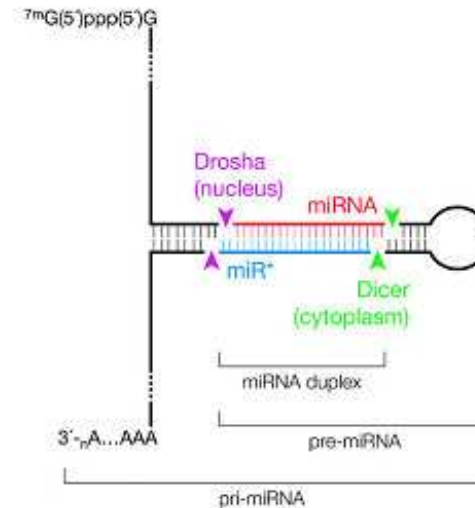
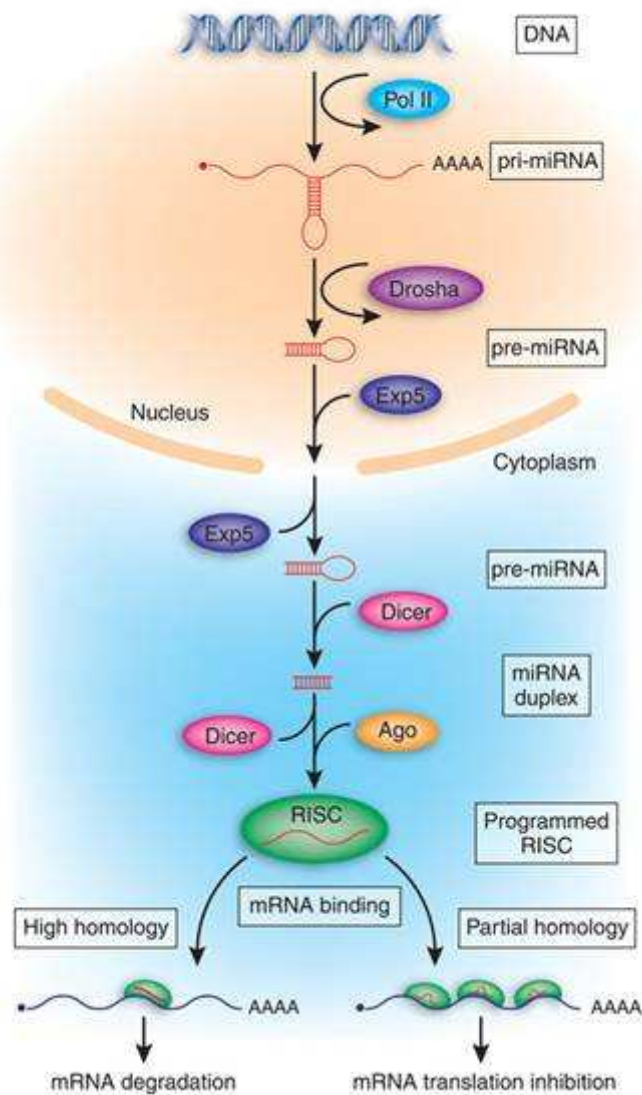
- miRNA lin4 e let7 sono stati inizialmente scoperti nei nematodi
- Sono conservati dai vermi fino all'uomo
- La loro funzione e' il controllo della TRADUZIONE di specifici mRNA
- Funzionano come MODULATORI

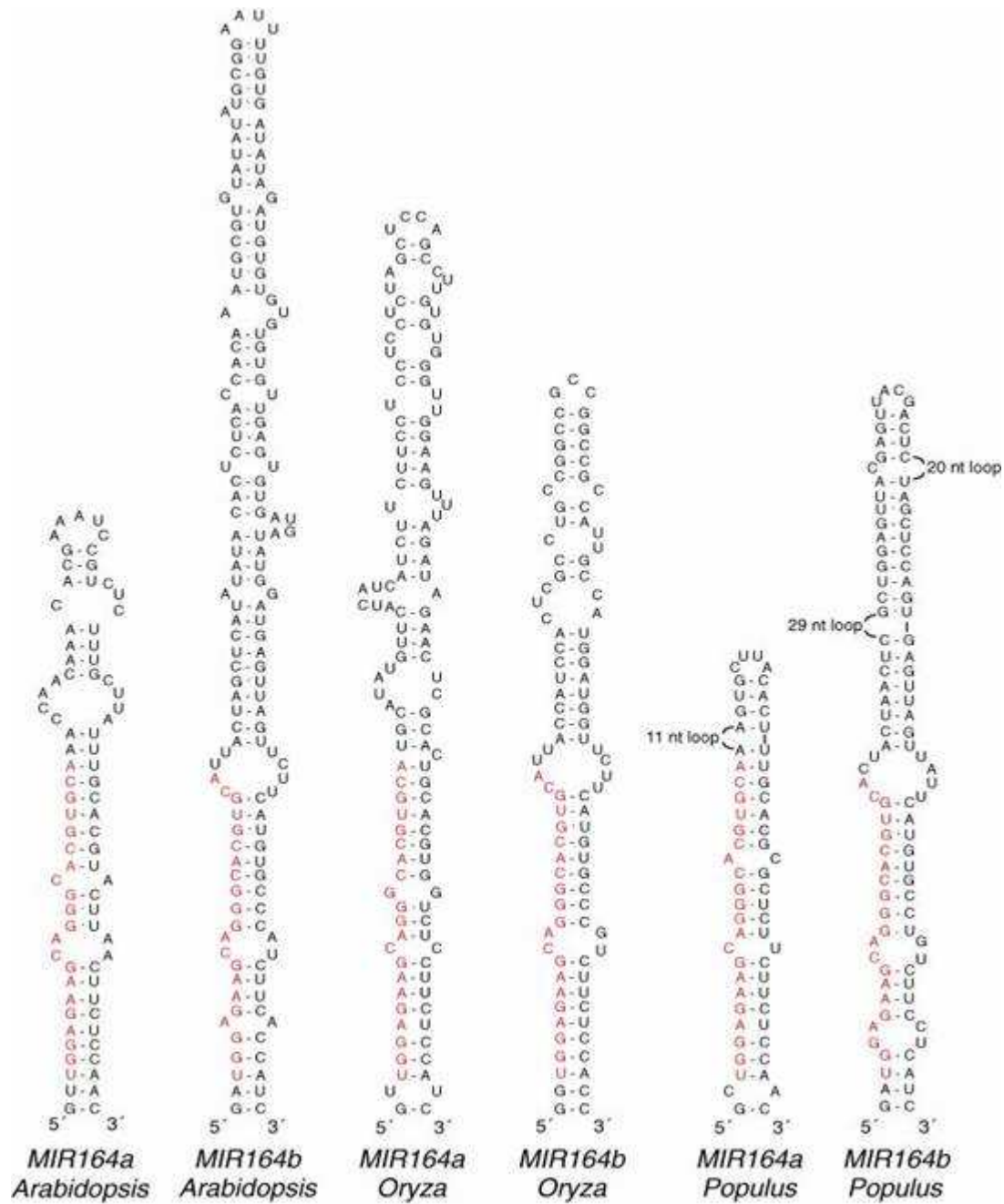
Funzione dei miRNA

- Controllo della proliferazione cellulare
- Controllo della apoptosi
- Differenziamento ematopoietico
- Controllo dello sviluppo in piante ed animali
- Controllo della identità cellulare delle cellule staminali

Biogenesi dei microRNA

I microRNA sono molecole 21-25 nucl di lunghezza che regolano l'espressione dei geni a livello post-trascrizionale

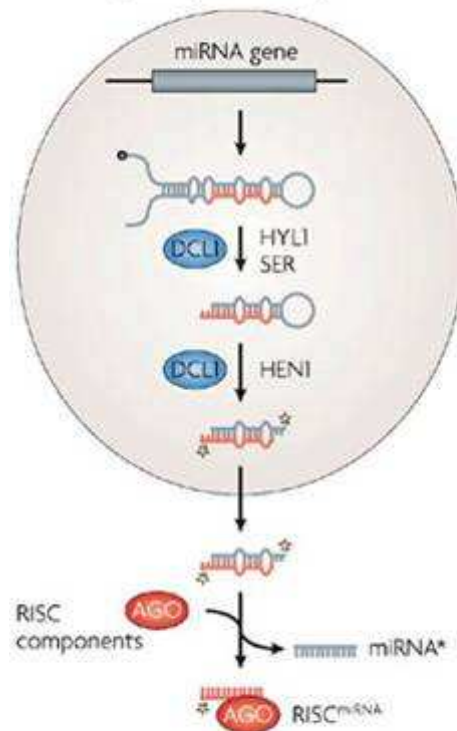




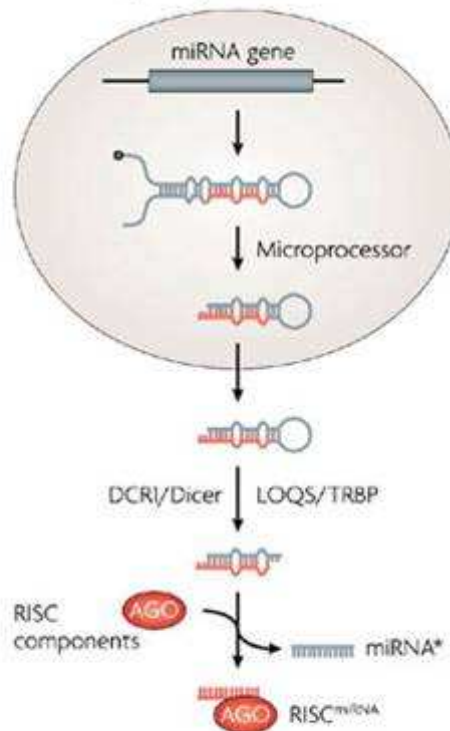
Annual Reviews

Biogenesi dei miRNA nelle piante e negli animali

a miRNA pathway in *Arabidopsis*



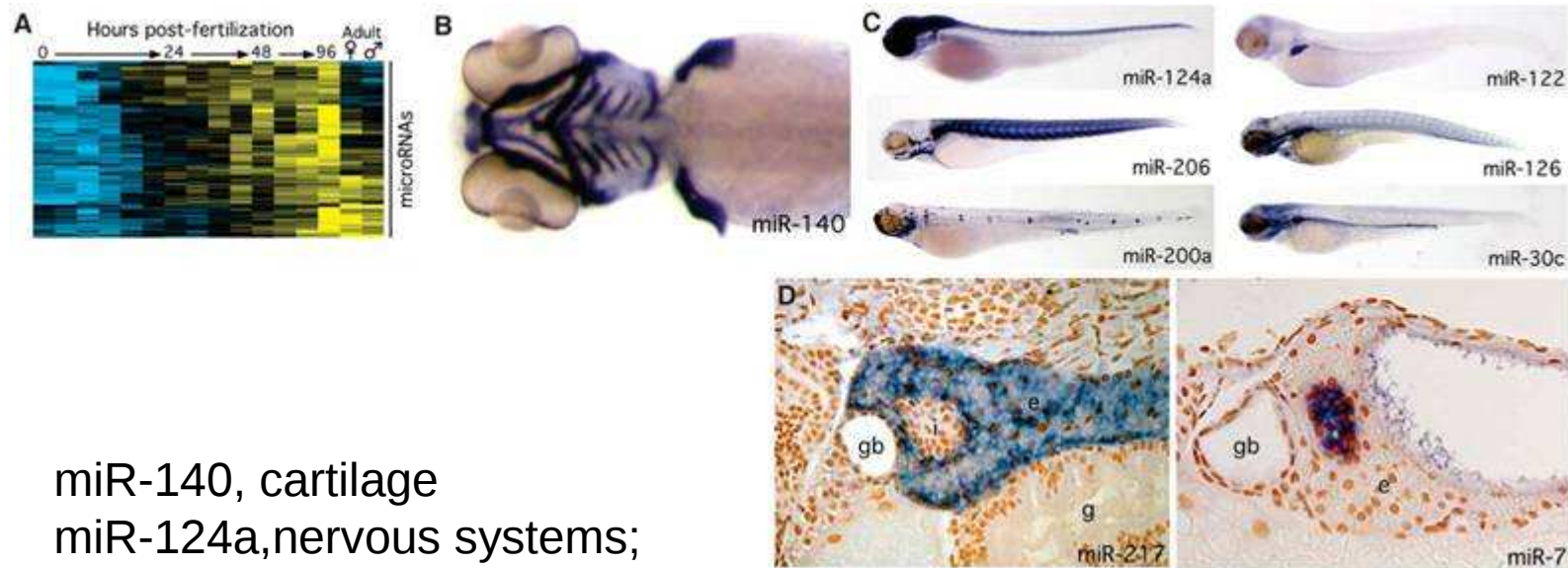
b miRNA pathway in animals



I geni per MicroRNA sono molto abbondanti

- Più di 100 in Arabidopsis
- Tra 700 e 1000 negli uomini

Espressione dei miR durante lo sviluppo nel pesce zebra



miR-140, cartilage

miR-124a, nervous systems;

miR-122, liver;

miR-206, muscles;

miR-126, blood vessels and heart;

miR-200a, lateral line system and sensory organs;

miR-217, miR-7 in pancreas

Meccanismi del funzionamento di miRNA in piante

- MicroRNA portano al taglio e degradazione di mRNA
- La gran parte dei bersagli dei miRNA in pianta codifica per proteine regolatrici suggerendo che i miRNA hanno una funzione gerarchicamente molto elevata
- miRNA coinvolti nello sviluppo e nell'identità delle cellule staminali

Conseguenze della overespressione di miRNA

miRNA regolano famiglie di Fattori Trascrizionali

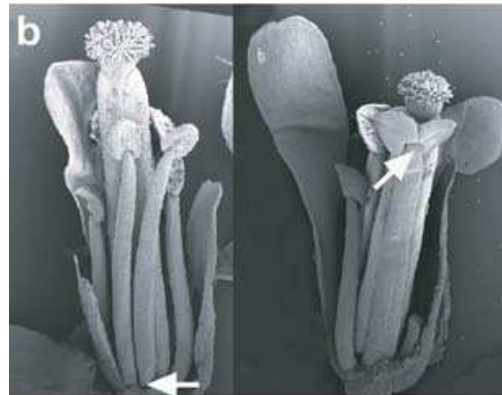
- **miR159** MYB TFs Sterilita' maschile, fioritura ritardata
- **miR319** TCP TFs Irregolare forma delle foglie e fioritura ritardata
- **miR160** ARF TFs Radici aberranti
- **miR164** NAC domain TFs Fusione degli organi e ridotta formazione di radici laterali
- **miR166** HD-ZIP TFs Germinazione bloccata, sterilita' femminile
- **miR172** AP2-like TFs Fioritura anticipata, mancanza di petali, trasformazione dei sepali pistilli

Fenotipi derivanti da overespressione di miRNA in *Arabidopsis*.

miR156



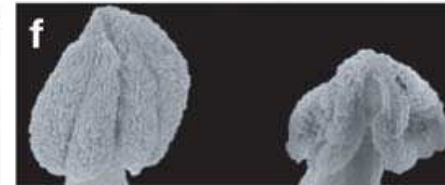
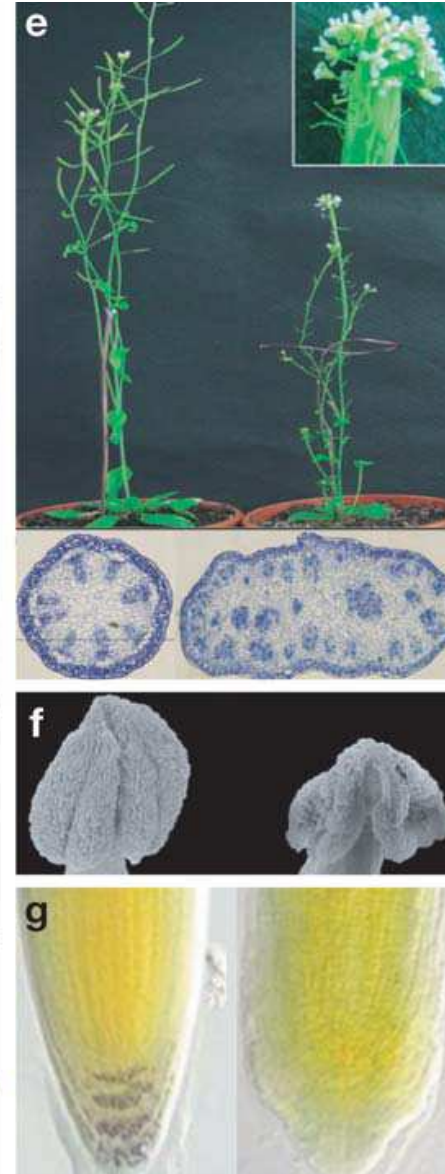
miR164



miR172



miR319



Le funzioni regolate dal silenziamento genico negli Eucarioti

- Trascrizione
- Stabilita' dell'mRNA
- Traduzione
- Riparazione del DNA
- Stabilita' dei geni per rDNA
- Meccanismo di difesa
- Conformazione della cromatina
- Regolazione spazio-temporale