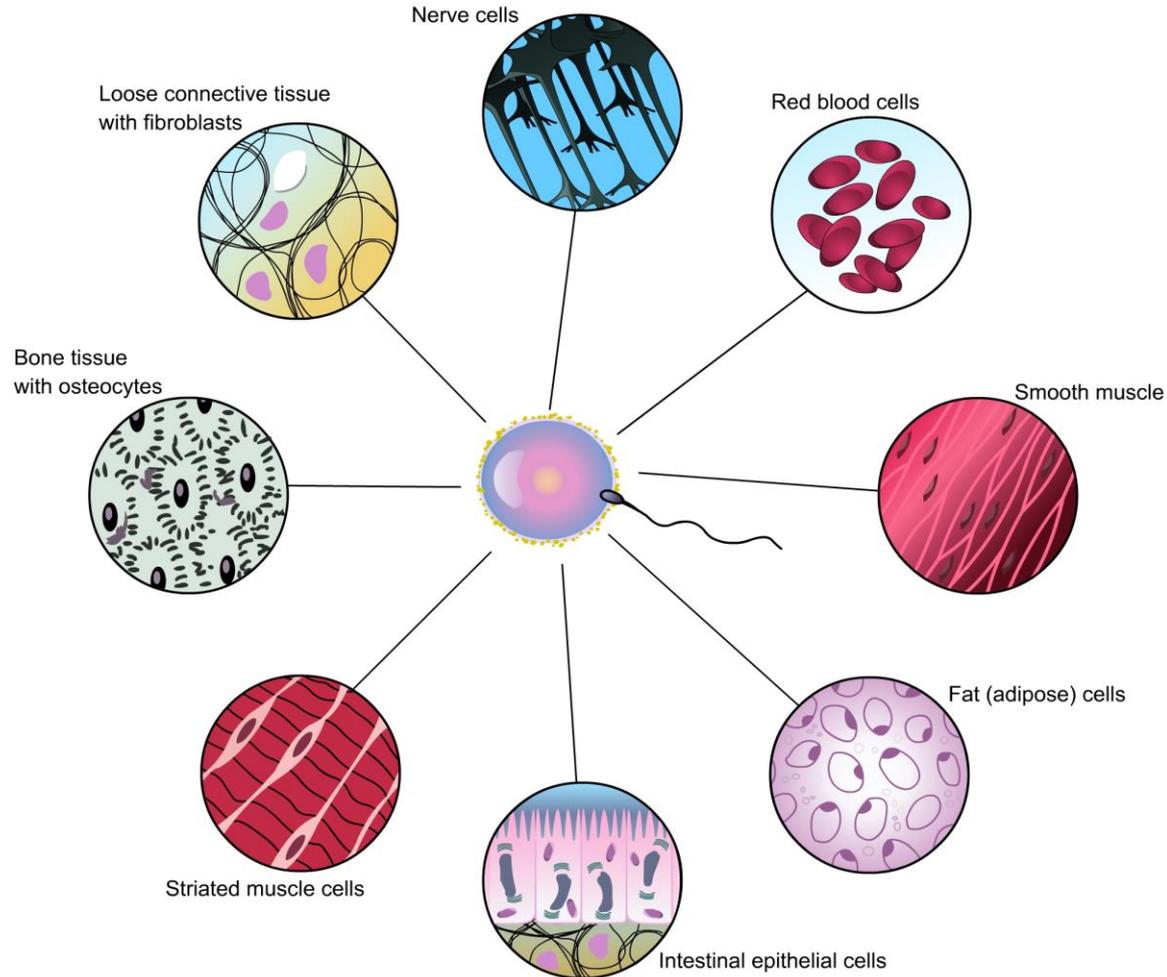


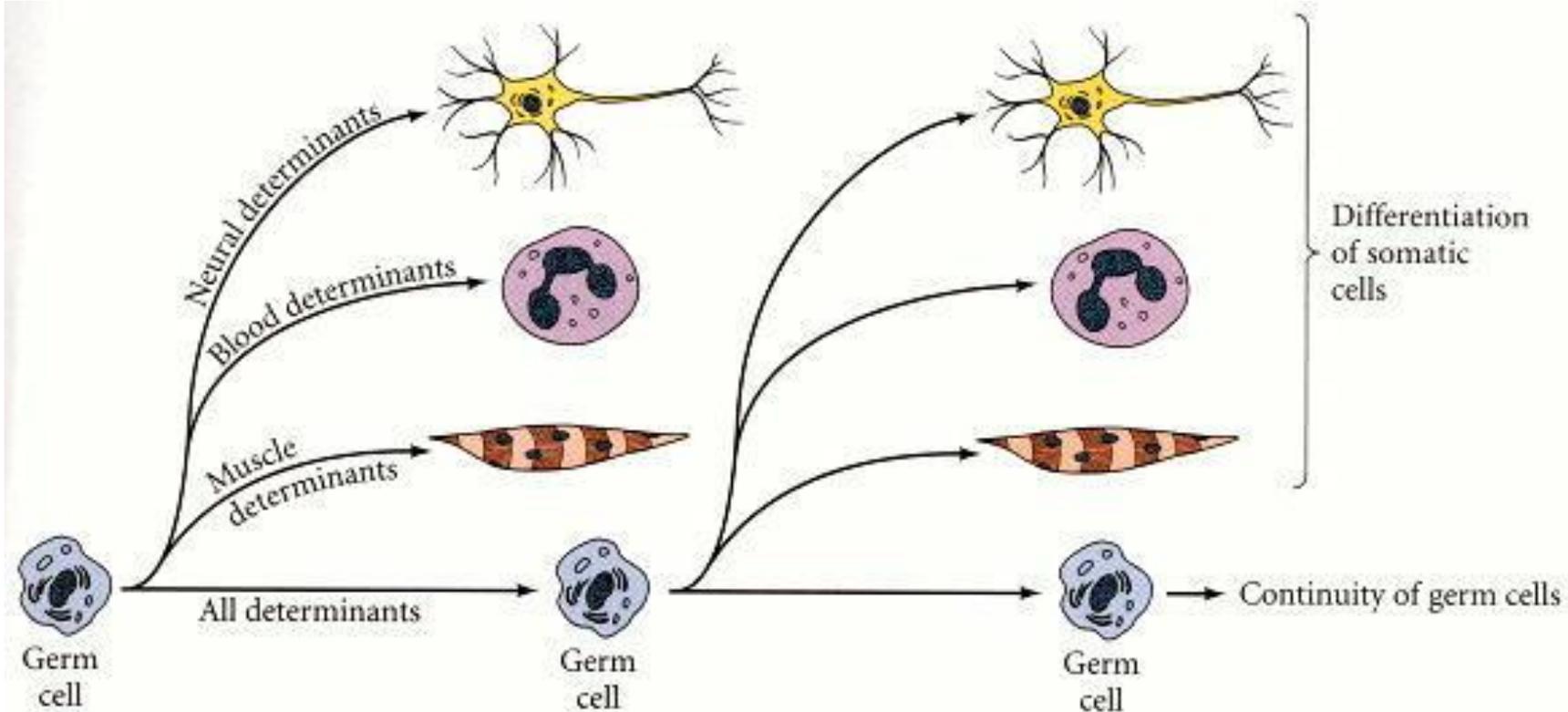
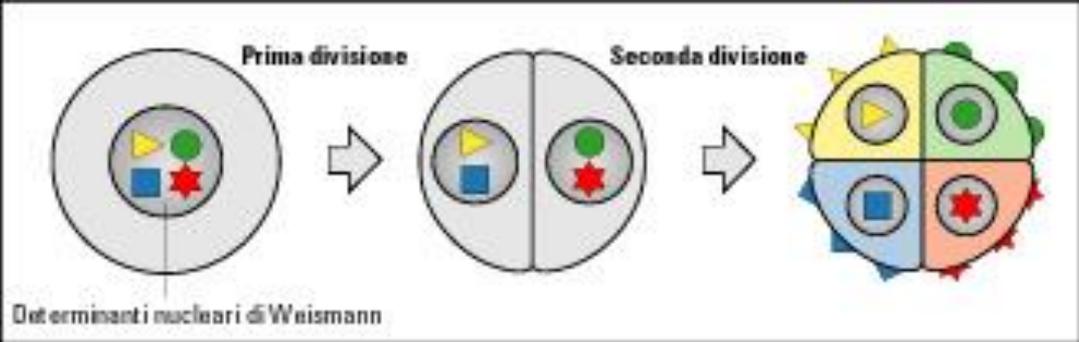
DIFFERENZIAMENTO CELLULARE

Processo per cui un'unica cellula totipotente (zigote) dà origine a una moltitudine di tipi cellulari specializzati.



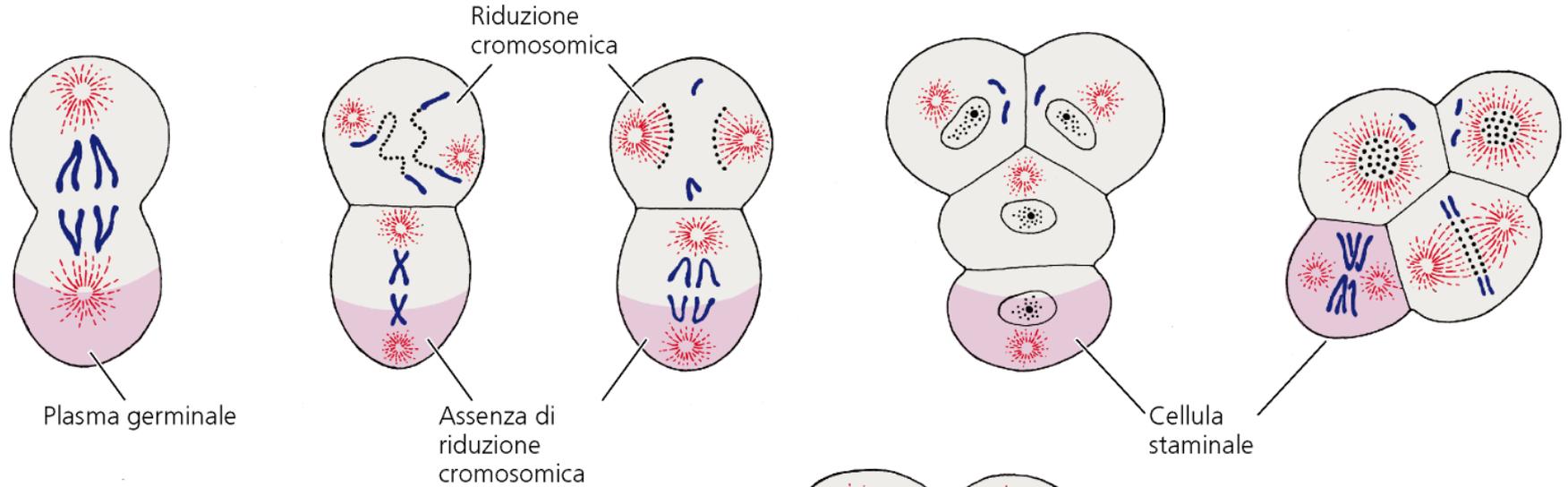
C'è equivalenza genica tra i diversi tipi cellulari?

Teoria dell'ereditarieta' di Weismann: solo le cellule germinali mantengono tutta l'informazione genica. Le cellule somatiche ereditano solo i determinanti necessari alla loro funzione.

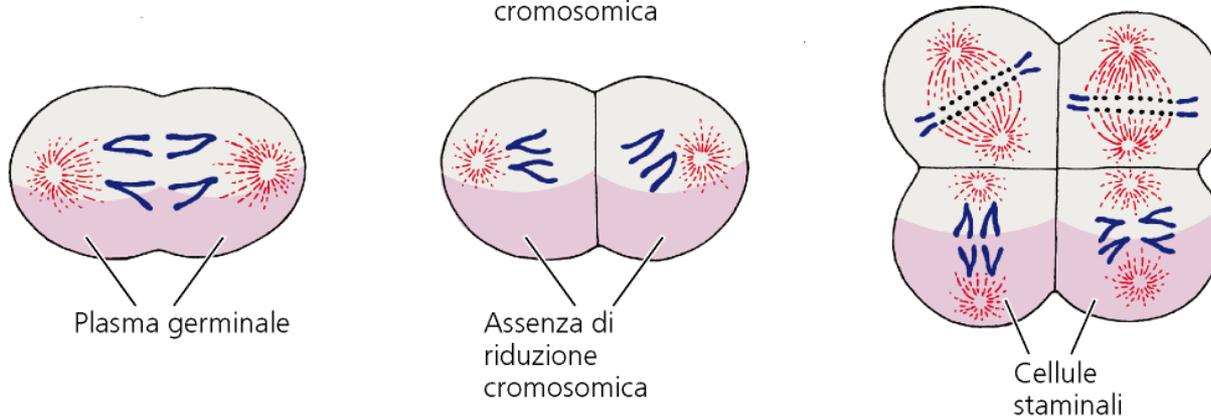


Plasma germinale (Parascaris)

(A)



(B)



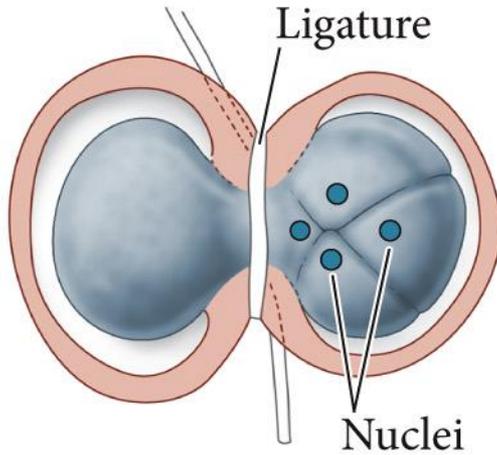
Se il piano di divisione viene alterato mediante centrifugazione entrambi i blastomeri ereditano il plasma germinale



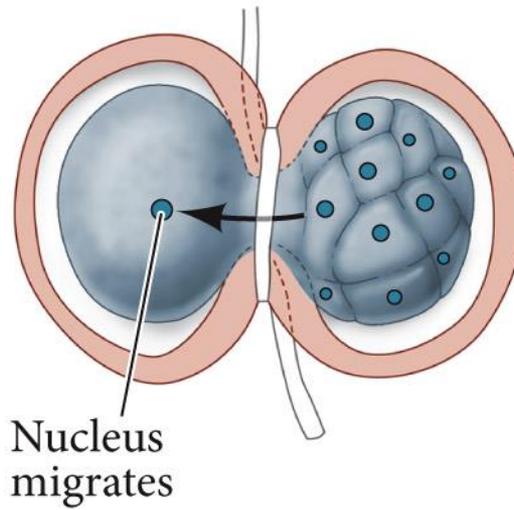
**Hans Spemann,
Nobel Prize 1935**

EQUIVALENZA DEI NUCLEI A STADI DI SEGMENTAZIONE NEGLI ANFIBI

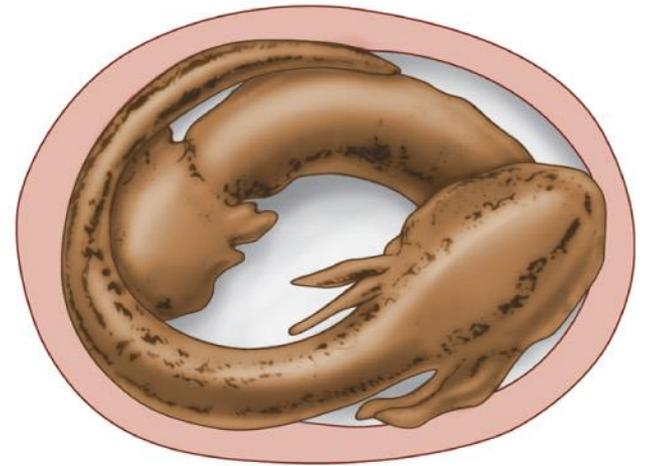
(A) 8-Cell stage



(B) 16-Cell stage

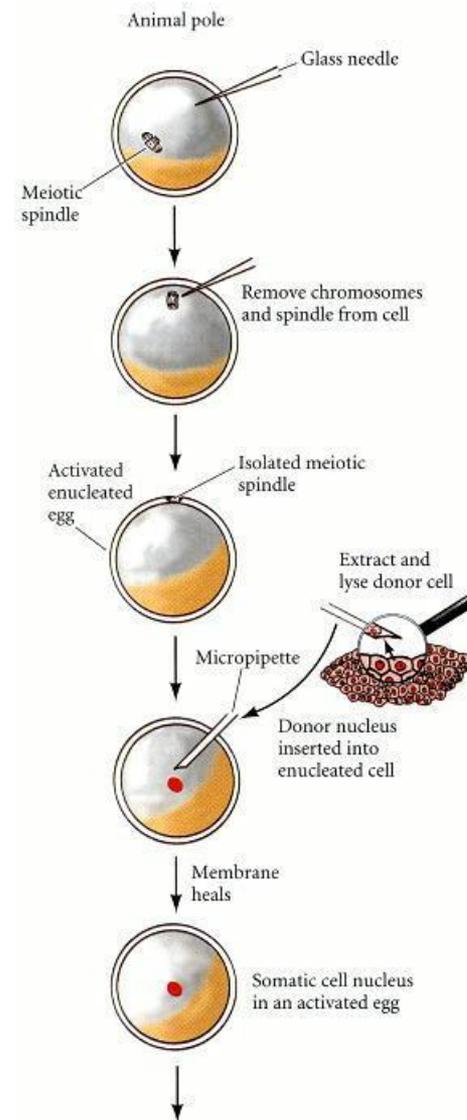


(C) 14 Days



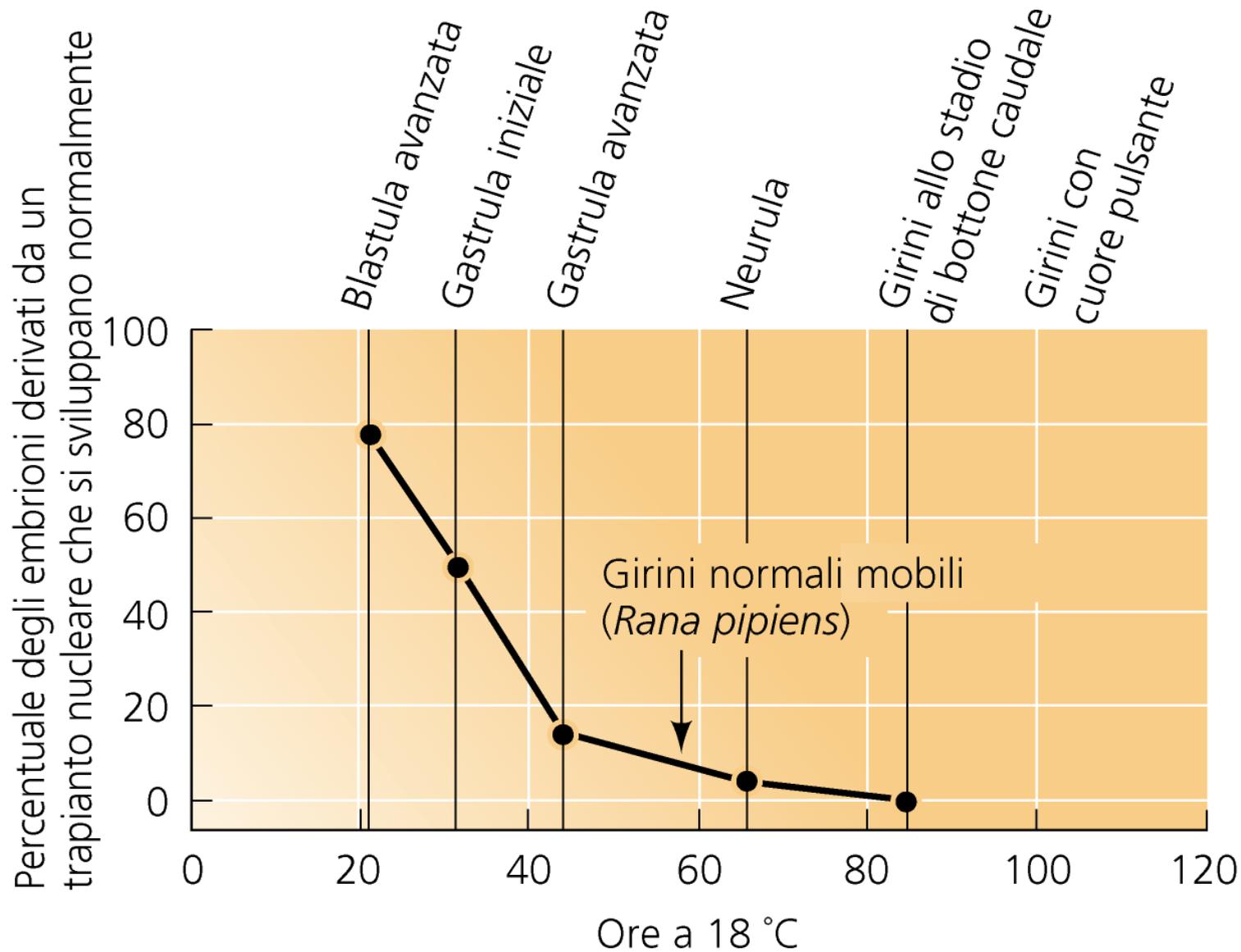
Trapianto nucleare negli anfibi (Briggs and King, 1952)

Nuclei di cellule di blastula potevano dirigere lo sviluppo di un nuovo organismo se trasferiti nel citoplasma di un uovo attivato ed enucleato.



Briggs and King, 1956

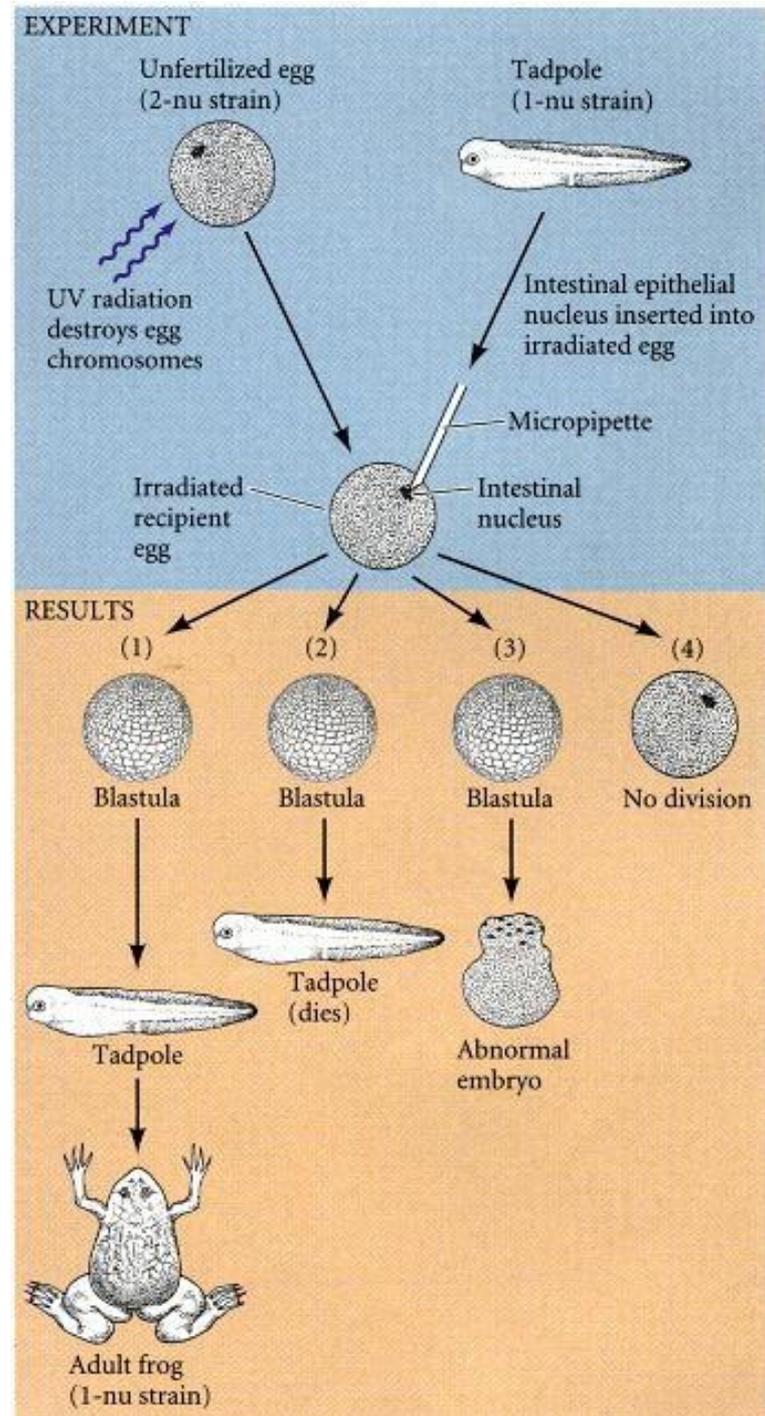
Stadio di sviluppo in cui sono stati prelevati i nuclei



In embrioni a stadi avanzati, solo i nuclei di cellule germinali, ma non di cellule somatiche, erano in grado di dirigere lo sviluppo di un nuovo individuo

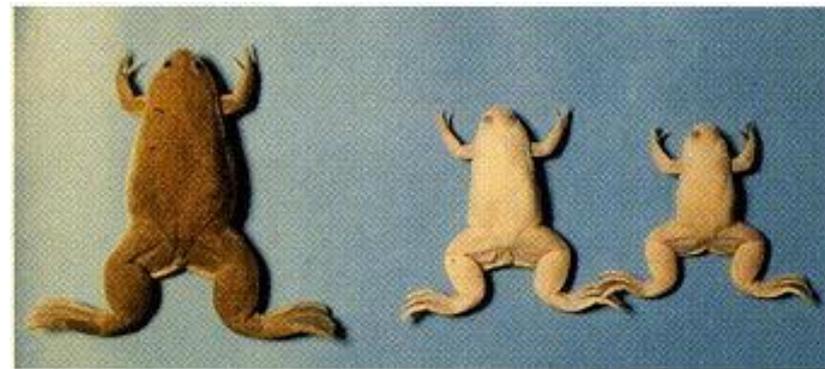
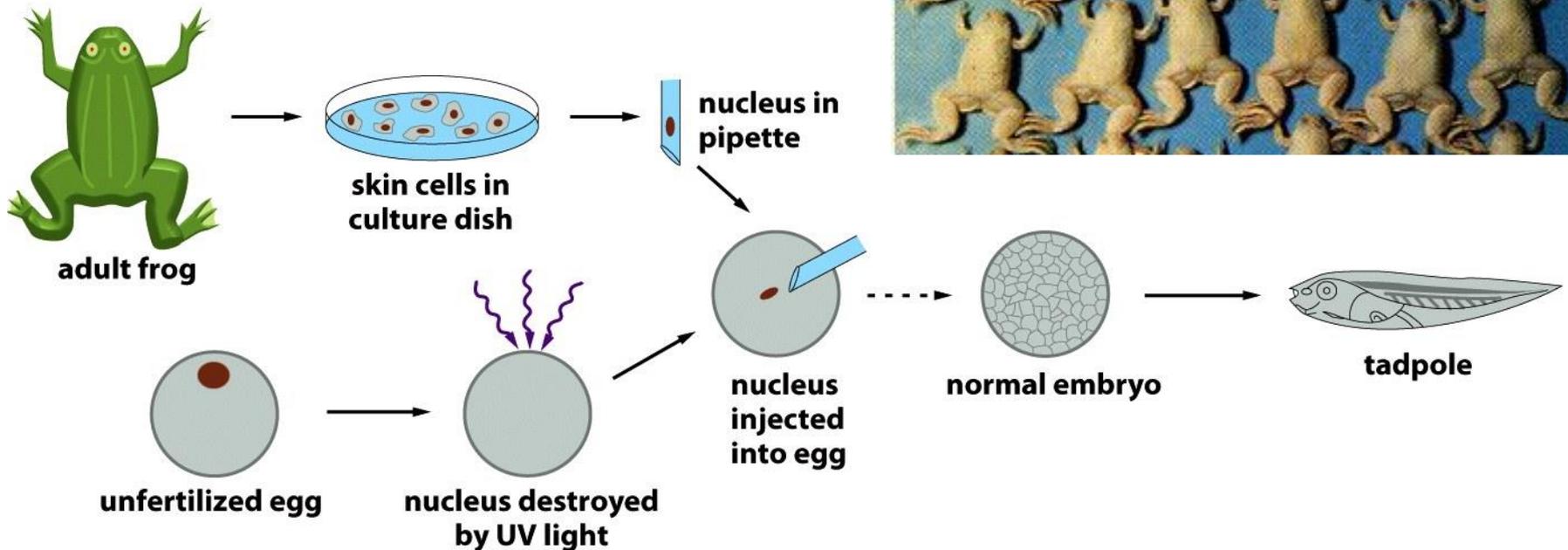
Clonazione negli anfibi (John Gurdon, Nobel Prize 2012)

Trapianto di nuclei da cellule somatiche differenziate (es. cellule epidermiche o cellule intestinali).



CELLULE DIVERSE DI UN ORGANISMO CONTENGONO LO STESSO DNA (ESPERIMENTI DI CLONAZIONE)

IL DNA CONTENUTO IN UNA CELLULA
SPECIALIZZATA E' IN GRADO
DI DIRIGERE LA FORMAZIONE DI UN
ORGANISMO INTERO



Wild-type female donor
of enucleated eggs

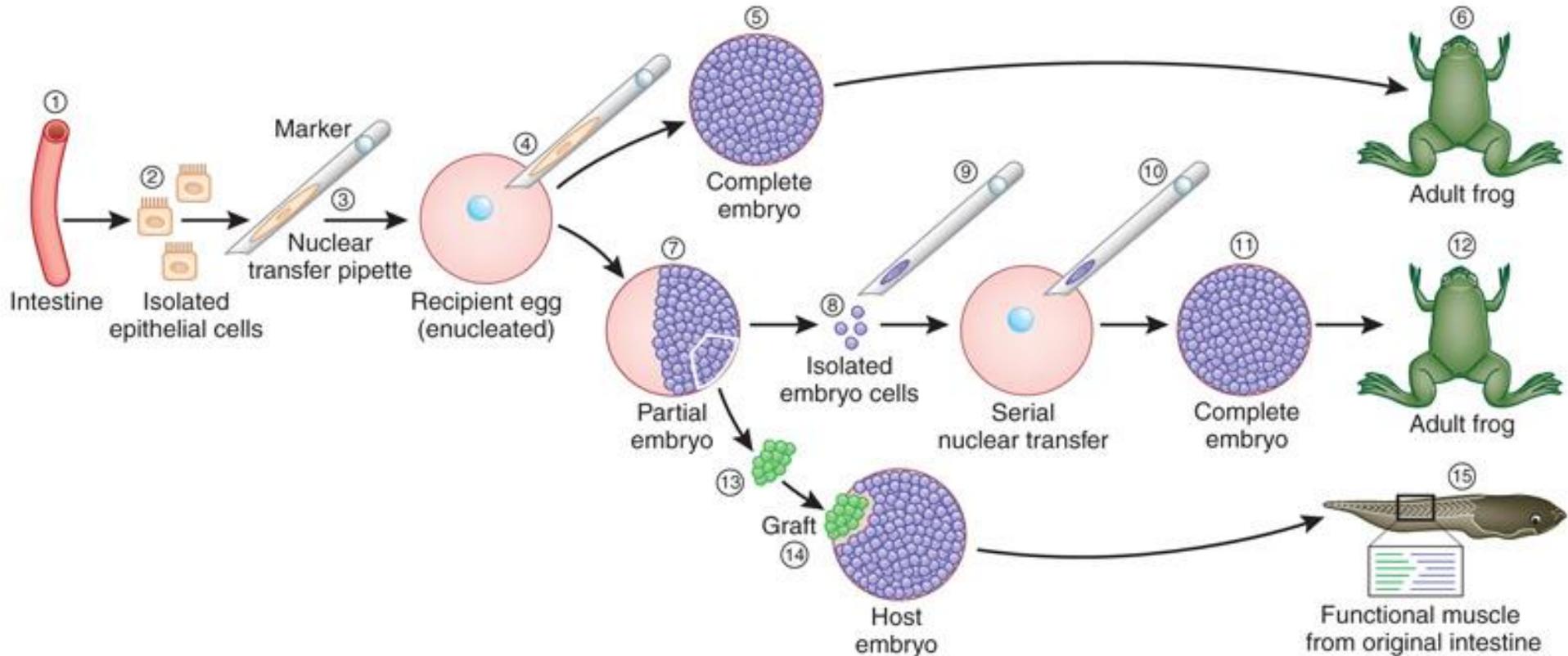
Albino parents
of nucleus donor



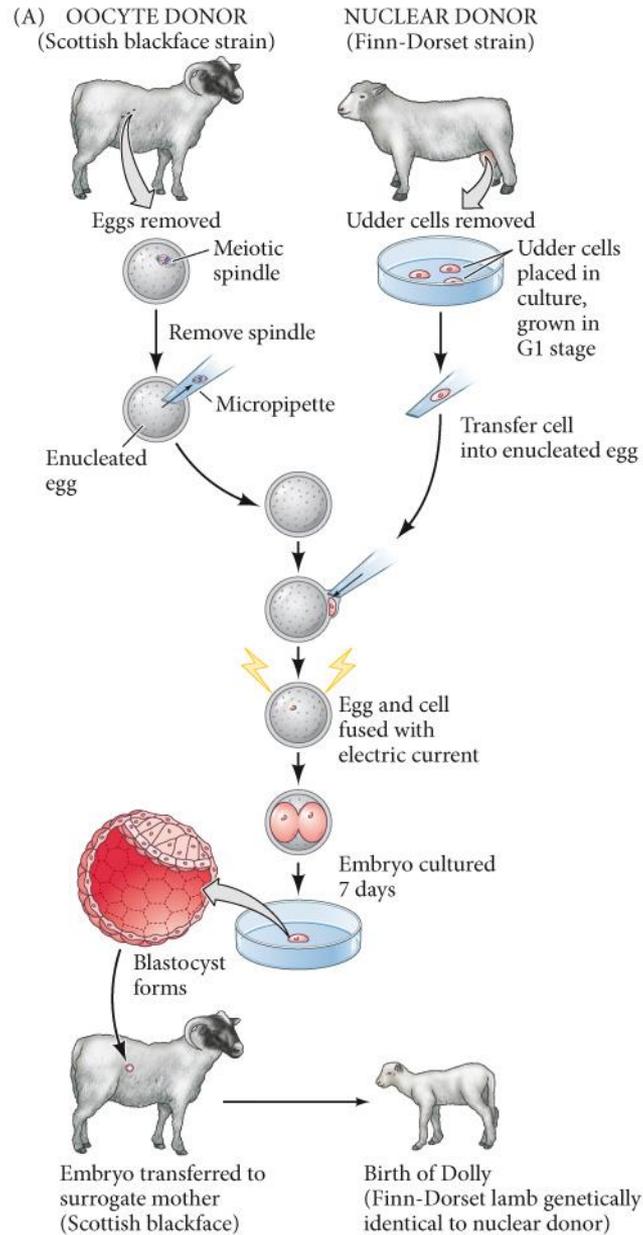
L'efficienza del trapianto aumentava quando, in seguito al trapianto, i nuclei venivano prelevati da embrioni allo stadio di blastula e trapiantati nuovamente in cellule uovo.

RIPROGRAMMAZIONE DEL GENOMA

Fattori molecolari presenti nell'uovo sono in grado di riprogrammare il nucleo di una cellula somatica in modo da riattivare geni silenziati durante il differenziamento tissutale.



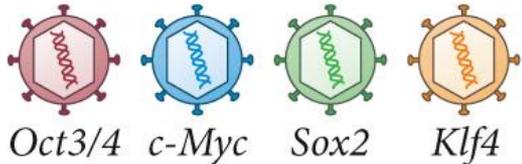
Clonazione nei mammiferi



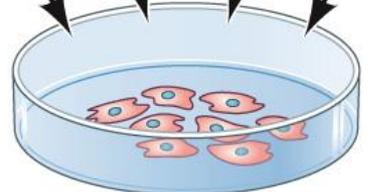
DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 3.3

© 2016 Sinauer Associates, Inc.

Geni di controllo della pluripotenza



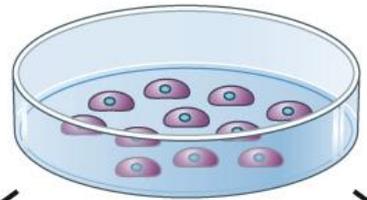
Viral infection to misexpress master regulatory transcription factors (Yamanaka factors)



Culture of differentiated mouse fibroblasts

Riprogrammazione

Selection for antibiotic resistance restricts growth to only viral-infected cells

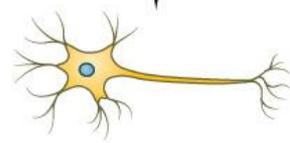


Resulting culture contains iPSCs

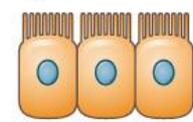
Directed differentiation



Mesoderm lineages (e.g., red blood cells)

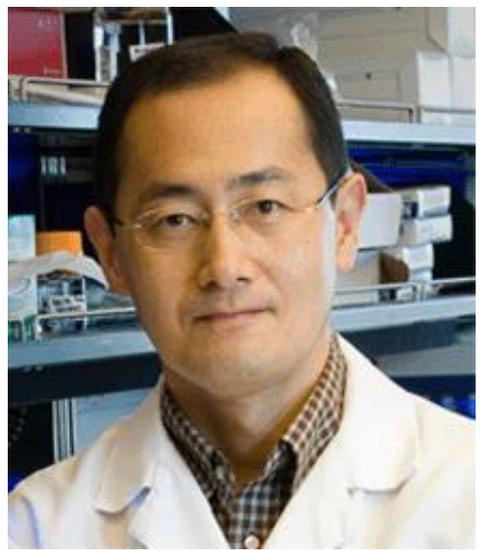


Ectoderm lineages (e.g., neuron)



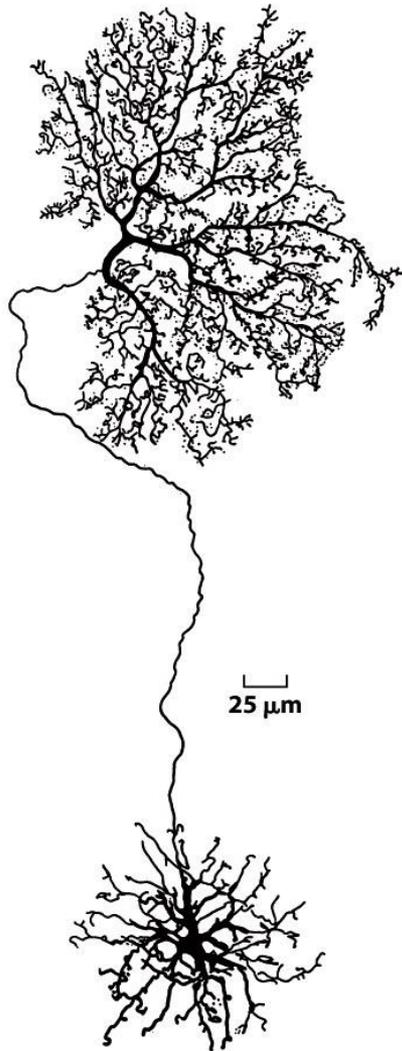
Endoderm lineages (e.g., pancreatic endocrine cells)

Cells from many lineages can stem from iPSC cells



Cellule staminali pluripotenti indotte (Shinya Yamanaka, Nobel Prize 2012)

PATRIMONIO GENETICO ED ESPRESSIONE GENICA: LO STESSO GENOTIPO PUO' CODIFICARE PER FENOTIPI MOLTO DIVERSI



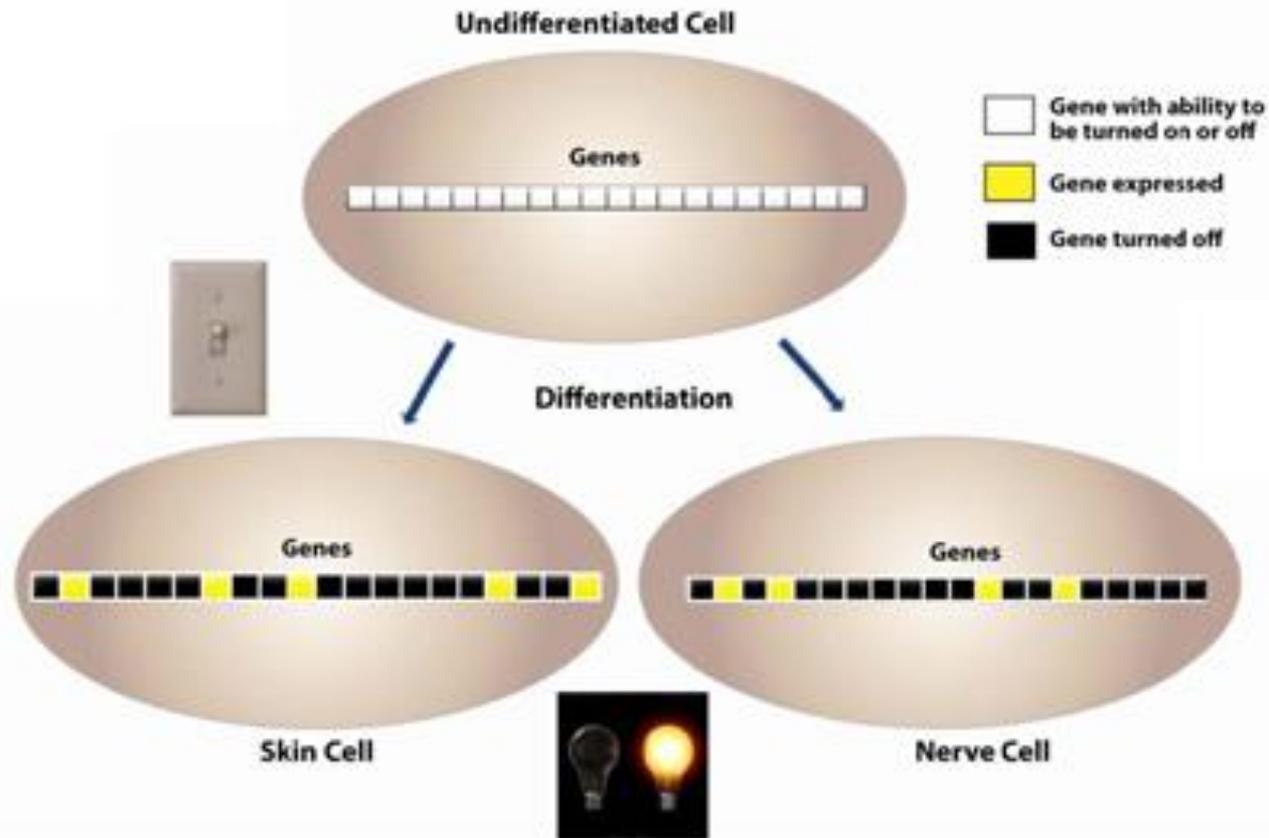
neuron

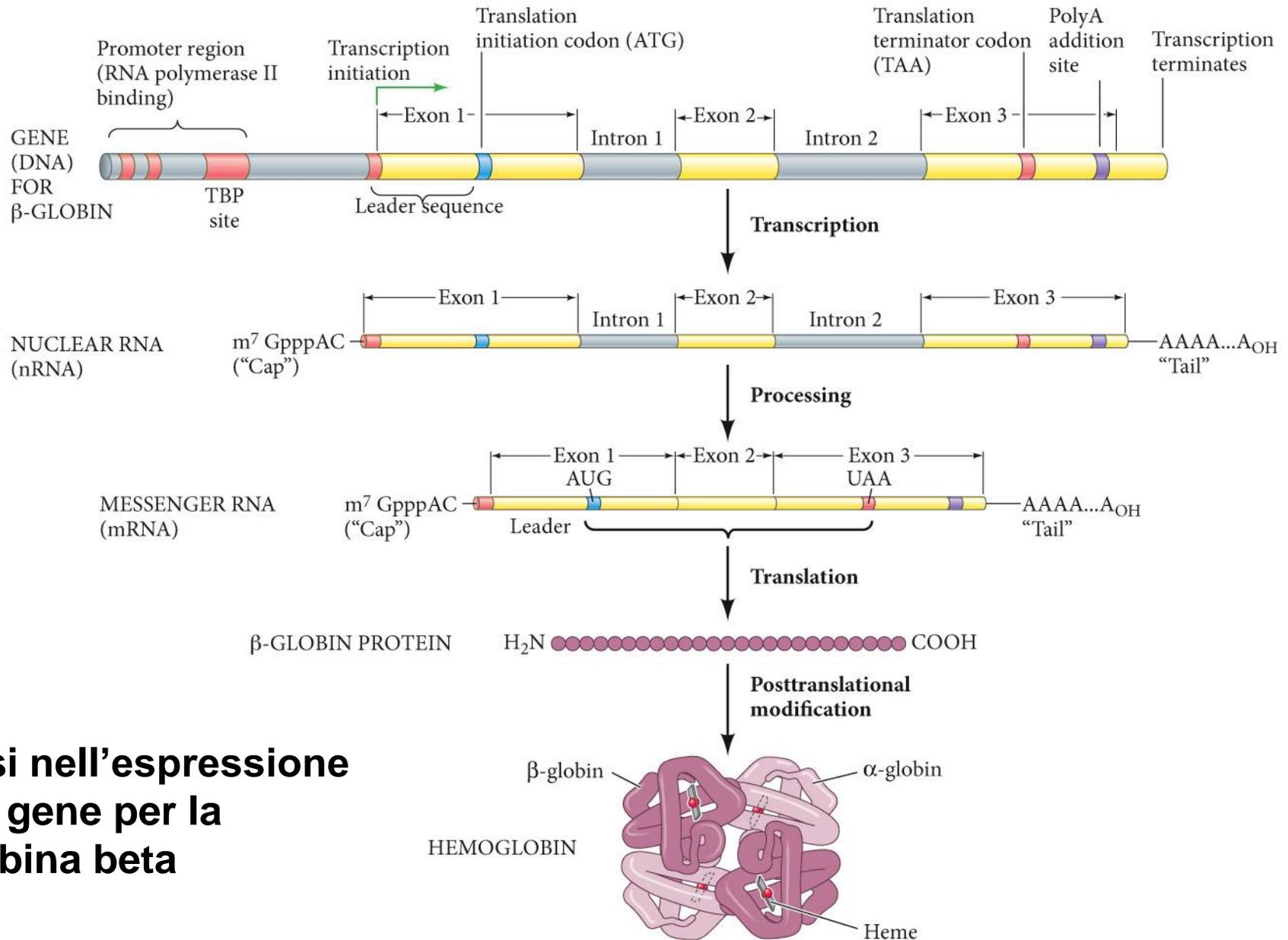
lymphocyte

IL FENOTIPO CELLULARE E' CONTROLLATO DALL'ATTIVAZIONE DI PORZIONI DIVERSE DEL DNA IN CELLULE DIVERSE

TEORIA DELL'ESPRESSIONE GENICA DIFFERENZIALE

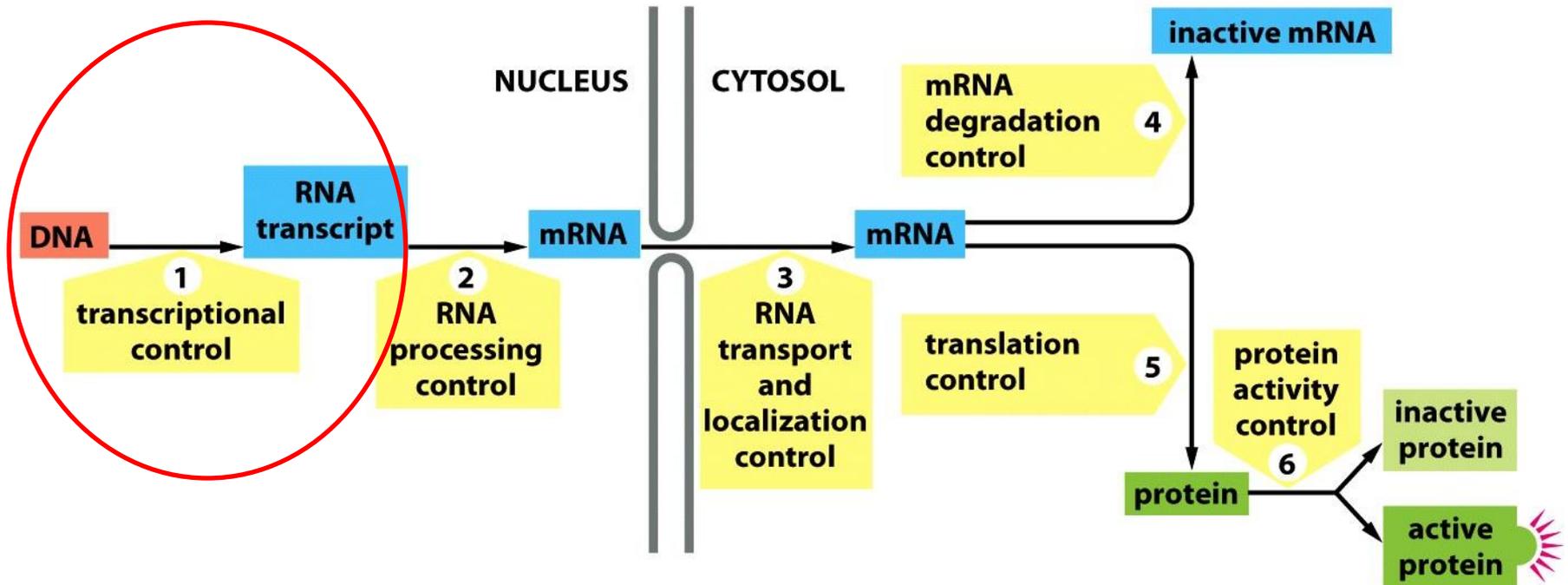
- 1) TUTTE LE CELLULE DIFFERENZIATE HANNO LO STESSO DNA.
- 2) I GENI INUTILIZZATI NELLE CELLULE DIFFERENZIATE NON VENGONO DISTRUTTI NE' MUTATI.
- 3) SOLO UNA PERCENTUALE RISTRETTA DEL GENOMA VIENE ESPRESSA IN OGNI CELLULA DIFFERENZIATA.





Fasi nell'espressione del gene per la globina beta

IL CONTROLLO DELL'ATTIVITA' (ESPRESSIONE) GENICA PUO' ESSERE REGOLATO A DIVERSI LIVELLI

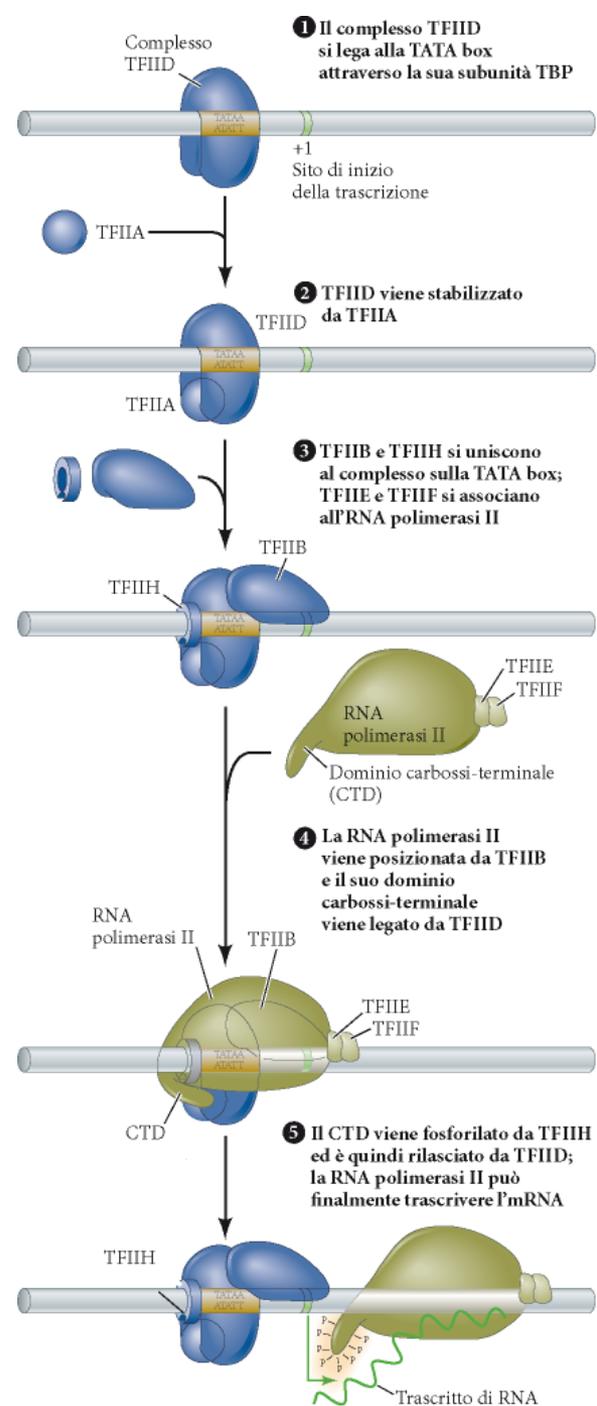


Promotori: siti in cui l'RNA polimerasi si lega al DNA per iniziare la trascrizione. In genere immediatamente a monte del sito di inizio della trascrizione.

Il legame dell'RNA polimerasi al promotore è coadiuvato da complessi proteici (TFIID, TFIIA, TFIIIB, etc) che legano sia la RNA polimerasi, sia sequenze di DNA nel promotore (es. TATA box).

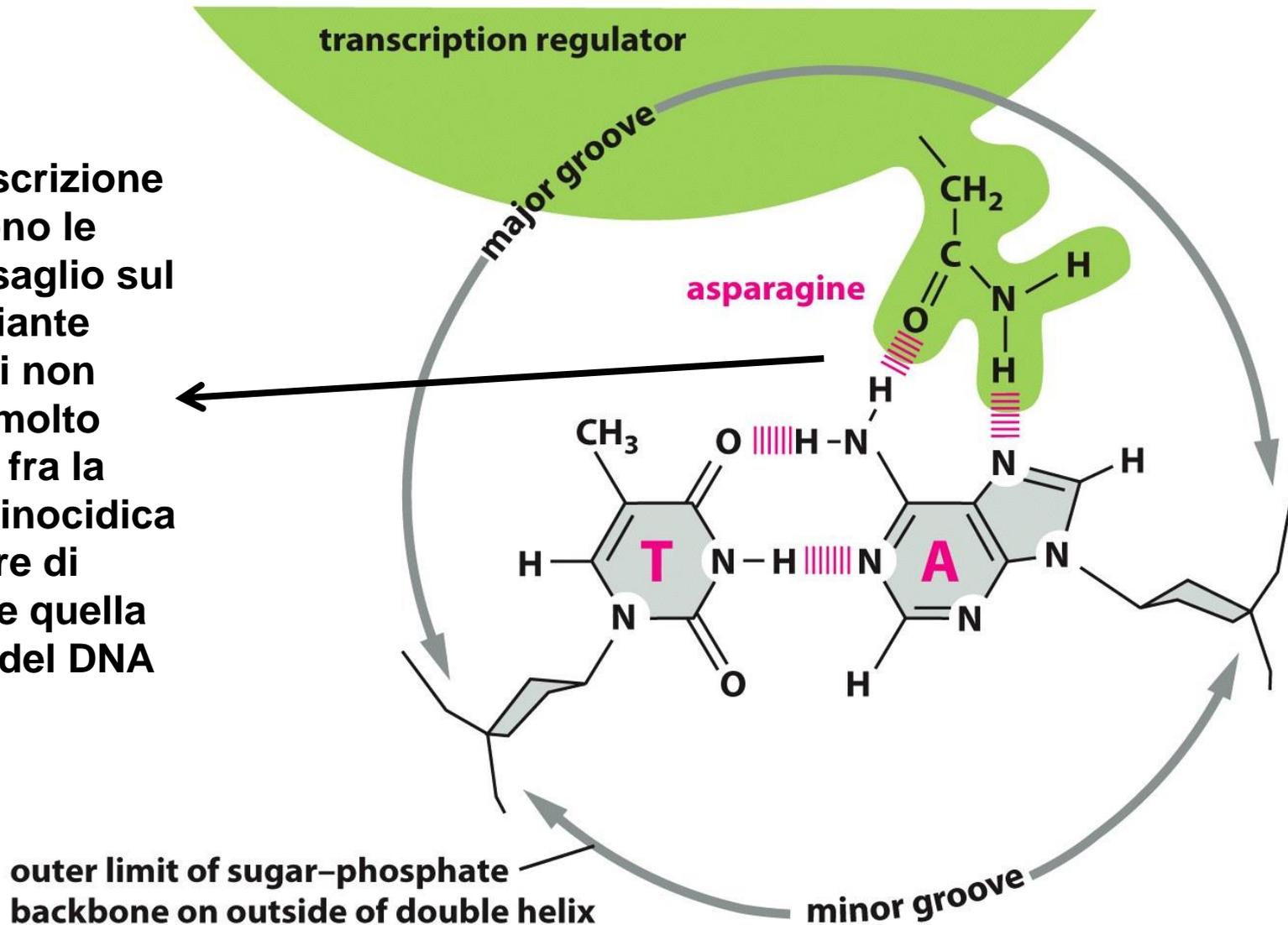
Questo costituisce l'apparato basale di trascrizione, che agisce nella maggior parte dei geni. L'efficienza di trascrizione di un promotore specifico è inoltre regolata da ulteriori sequenze regolatorie di DNA all'interno o al di fuori del promotore e fattori proteici che le legano: **i fattori di trascrizione**.

I fattori di trascrizione possono funzionare da attivatori o repressori trascrizionali.

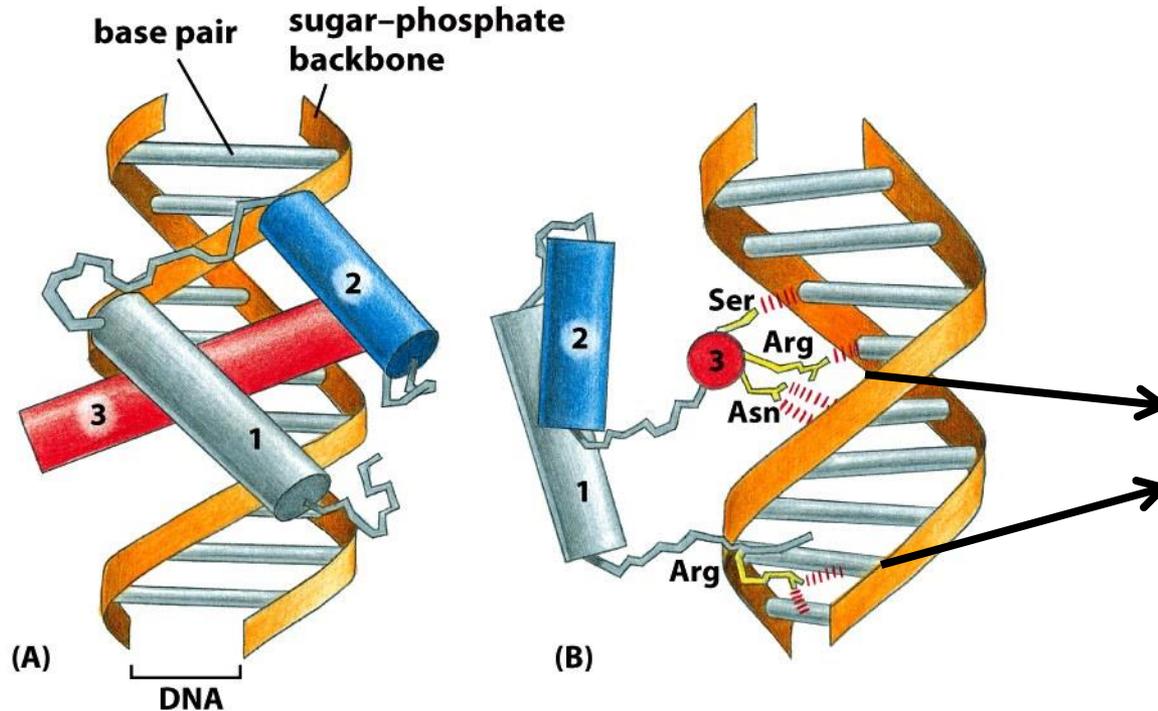


ALCUNE PROTEINE SONO IN GRADO DI RICONOSCERE E LEGARE SPECIFICHE SEQUENZE DI DNA A LIVELLO DELLE REGIONI REGOLATORIE DEI GENI (FATTORI DI TRASCRIZIONE)

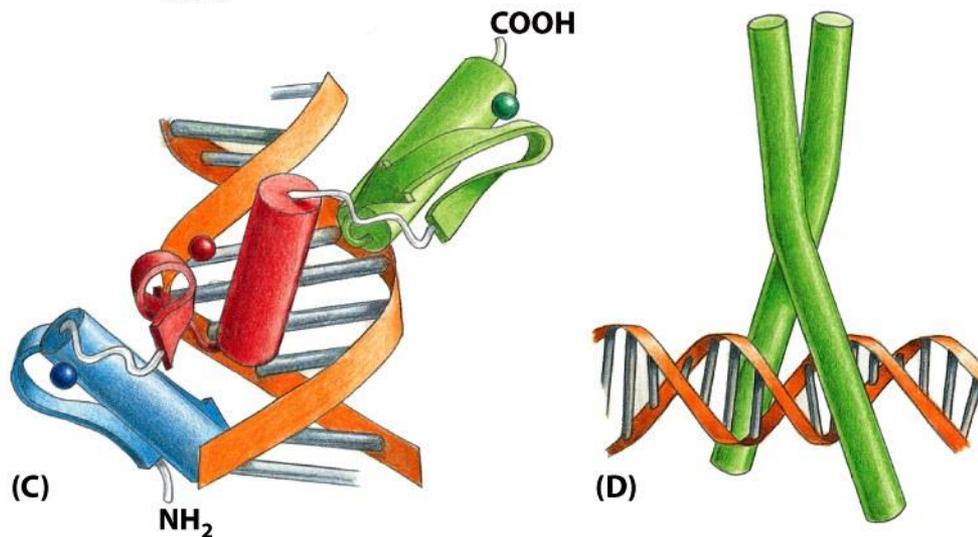
I fattori di trascrizione riconoscono le sequenze bersaglio sul DNA mediante interazioni non covalenti molto specifiche fra la struttura amminocidica del fattore di trascrizione e quella nucleotidica del DNA



LA STRUTTURA PROTEICA TRIDIMENSIONALE DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE PERMETTE L'ASSOCIAZIONE STABILE AL DNA



Gli amminoacidi critici per il riconoscimento della sequenza nucleotidica bersaglio possono inserirsi all'interno dei solchi nella doppia elica di DNA e contattare basi specifiche

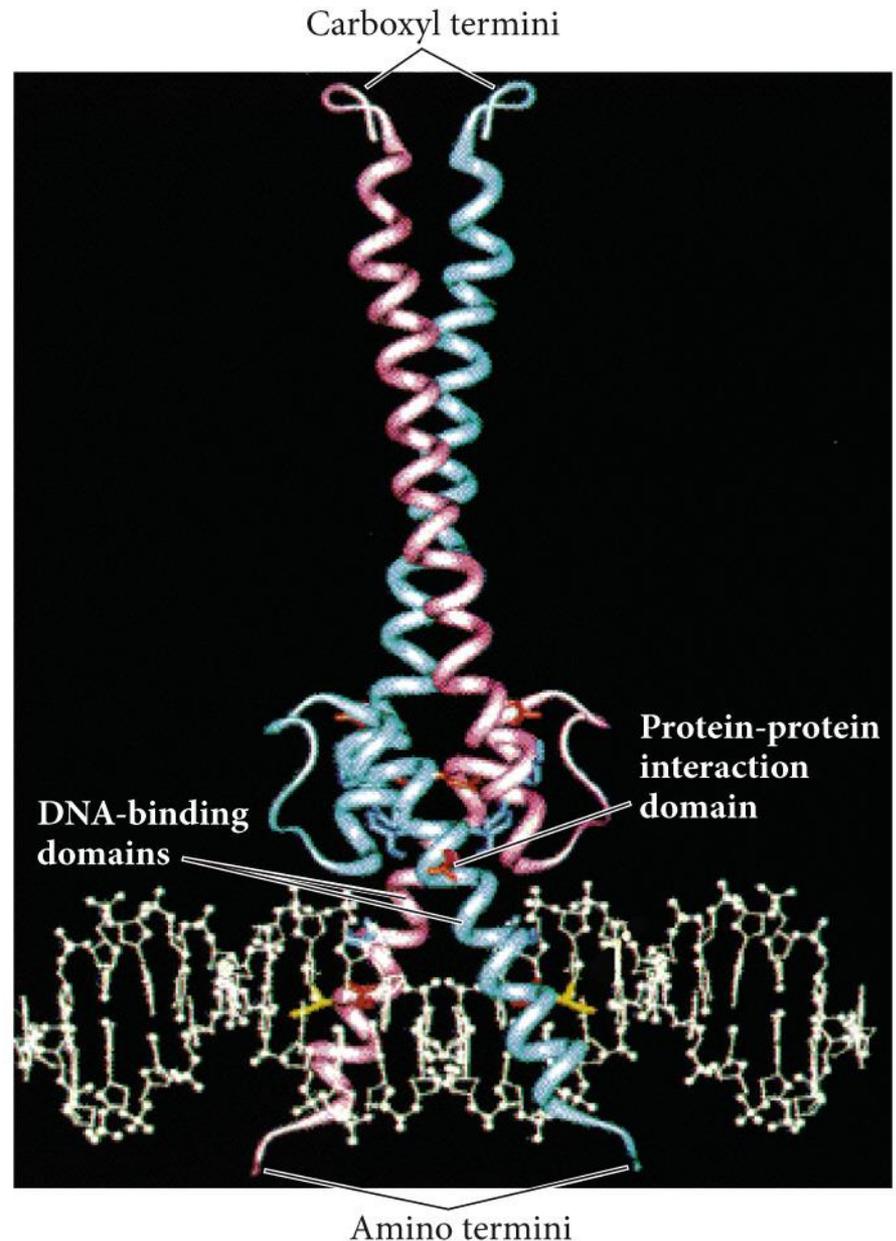


STRUTTURA PROTEICA DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE

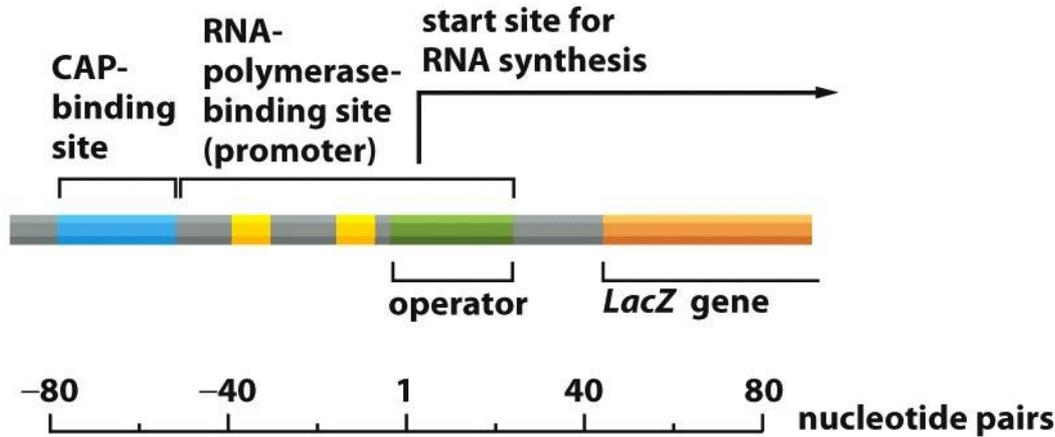
Dominio di legame al DNA: lega le sequenze regolatorie dei geni bersaglio

Dominio di attivazione o repressione trascrizionale: interagisce con RNA polimerasi o fattori ad essa associati sul promotore (TFIIB, TFIID, etc)

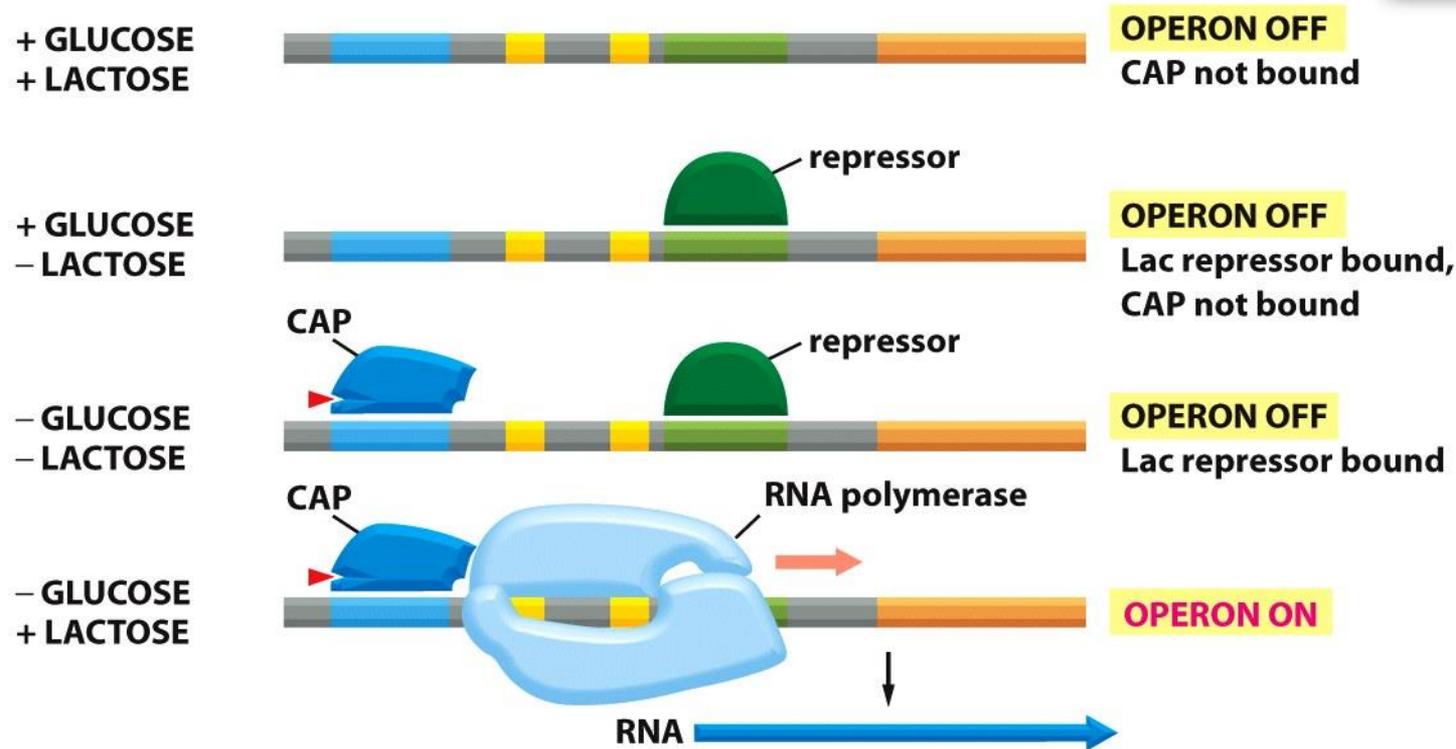
Domini di interazione proteina-proteina: mediano interazioni con altri fattori di trascrizione



NEI PROCARIOTI L'ESPRESSIONE DEI GENI PER IL METABOLISMO DEL LATTOSIO VIENE REGOLATO DA DUE SEGNALI ATTRAVERSO UN FATTORE DI TRASCRIZIONE ATTIVATORE E DI UN REPRESSORE

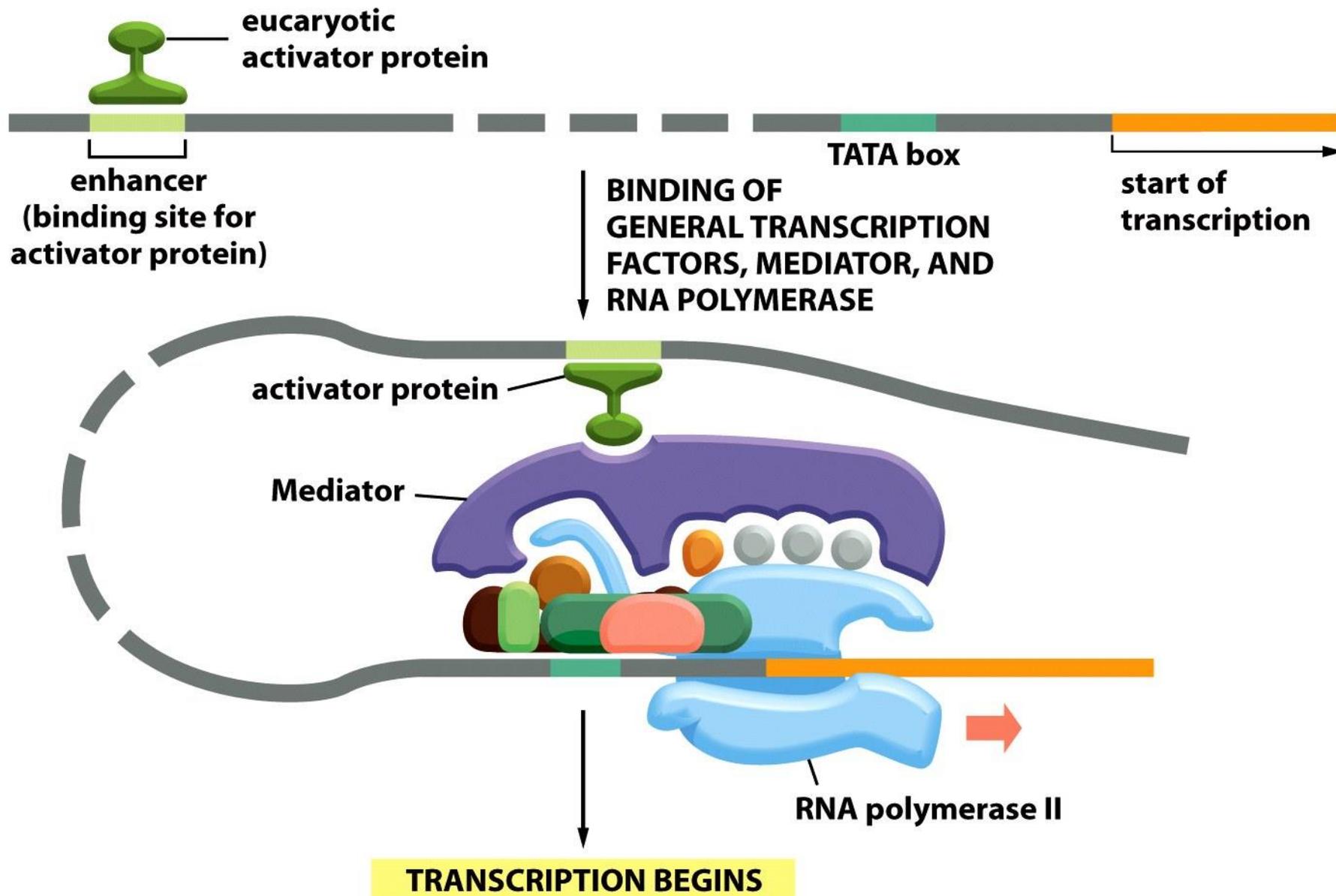


**Jacques Monod
Francois Jacob
Andre' Lwoff
Nobel Prize 1965**

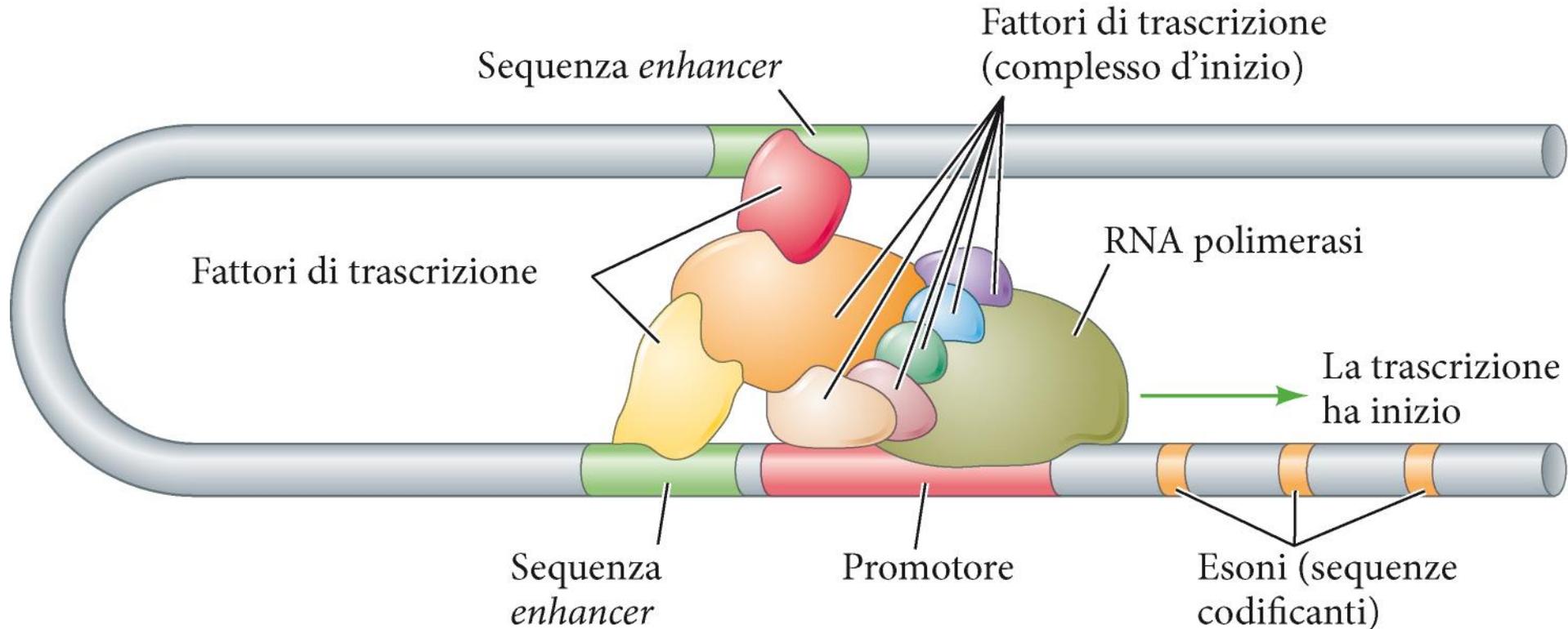


La presenza di glucosio blocca la formazione di un attivatore della proteina CAP (fattore attivatore).
La presenza di lattosio provoca la produzione di un inibitore del fattore repressore.

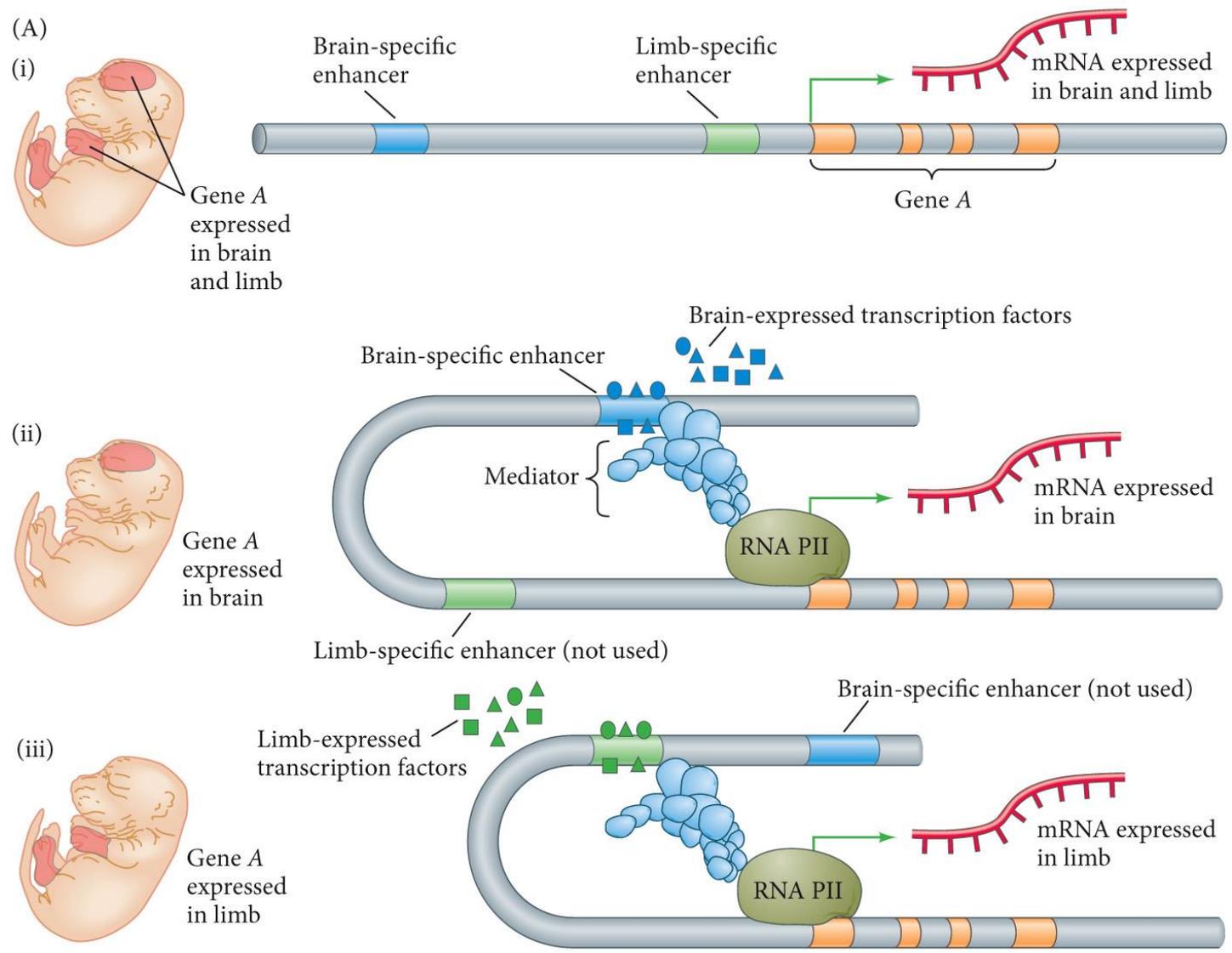
NEGLI EUCARIOTI I FATTORI DI TRASCRIZIONE POSSONO AGIRE ANCHE A DISTANZA MEDIANTE LEGAME A SEQUENZE ENHANCER



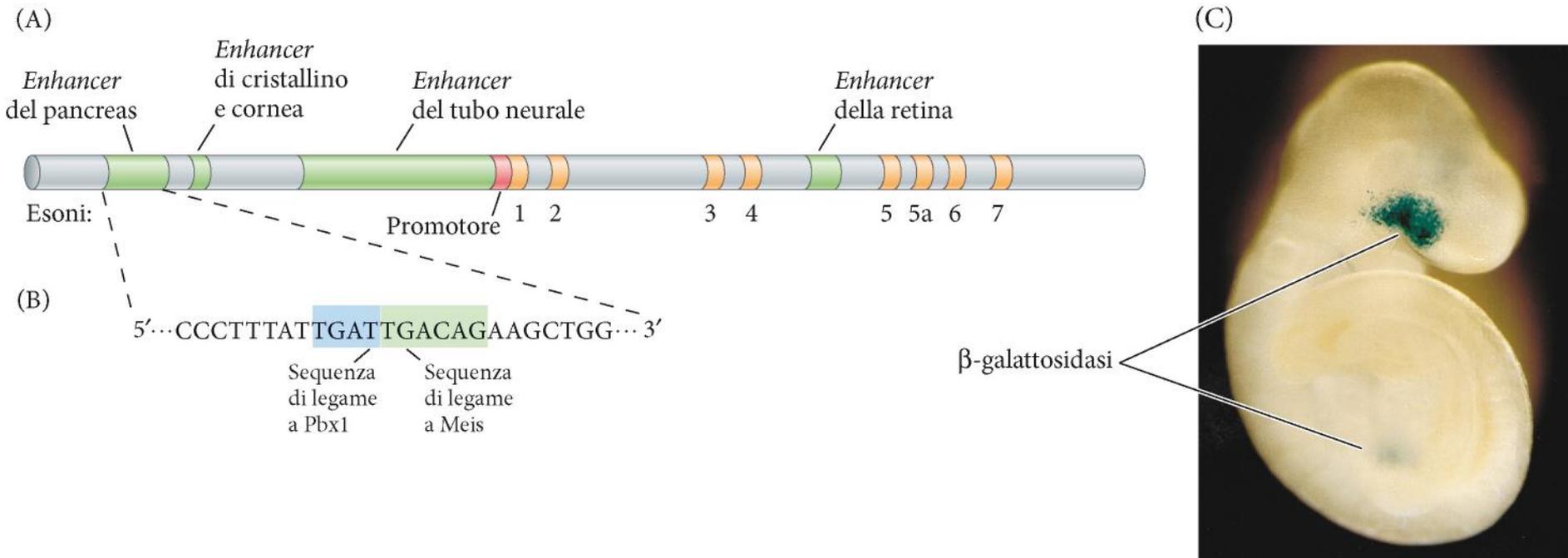
La trascrizione dei geni eucariotici può essere regolata da diversi fattori di trascrizione che si legano in diverse regioni regolatorie del gene (promotore e sequenze enhancer)



Le regioni regolatorie della trascrizione sono spesso organizzate in maniera **MODULARE**: ogni modulo è regolato da fattori di trascrizione specifici che promuovono (o reprimono) l'espressione in un certo dominio spazio-temporale



Sequenze regolatorie del gene Pax6, un gene chiave per lo sviluppo di diversi tessuti (tessuto neurale, retina, cristallino, pancreas). Elementi regolativi (moduli) specifici, localizzati su enhancer differenti, guidano l'espressione in tessuti diversi. Essi possono essere studiati ponendoli a monte di un gene reporter in animali transgenici.



Le sequenze regolatorie di un certo gene sono le stesse in tutti i tipi cellulari (equivalenza del genoma). Cio' che cambia da un tipo cellulare all'altro e' la combinazione di fattori di trascrizione presenti, il che determina lo stato di attivazione o repressione dei vari moduli.

MODULI REGOLATORI DIVERSI IN GENERE REGOLANO L'ESPRESSIONE IN DOMINI SPAZIO-TEMPORALI DIVERSI: all'interno di un modulo possono essere presenti diversi siti di legame, sia per attivatori che promuovono l'espressione in un certo dominio, sia per repressori, che la reprimono al di fuori di esso



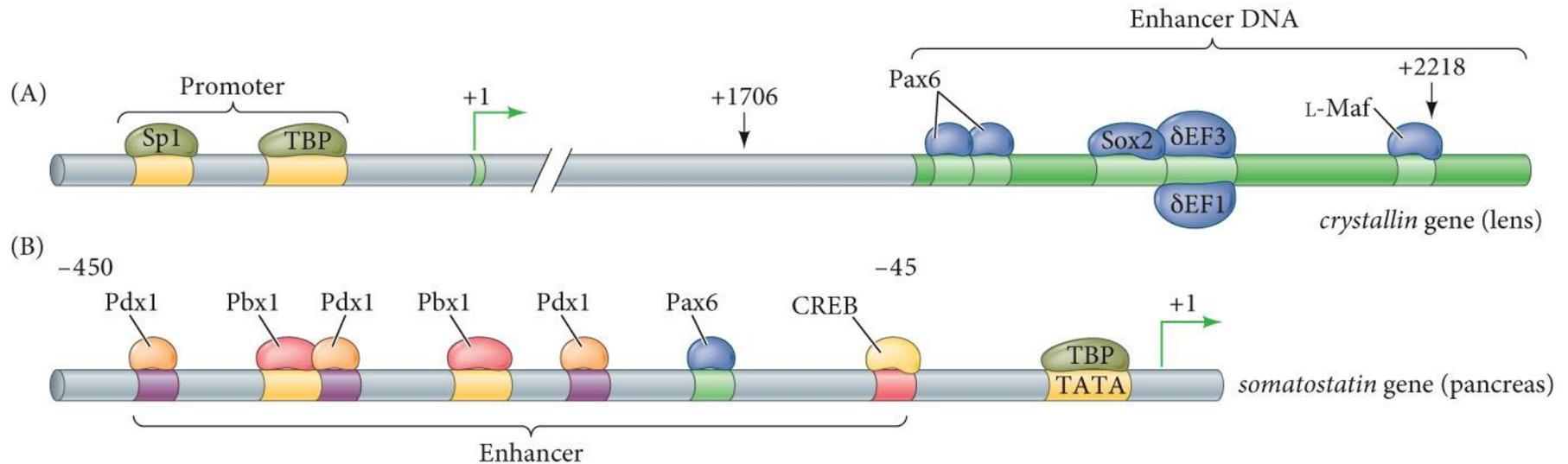
**SITI DI LEGAME PER DIVERSI FATTORI DI TRASCRIZIONE
(ATTIVATORI E/O REPRESSORI)**

I fattori di trascrizione agiscono in modo **COMBINATORIO**

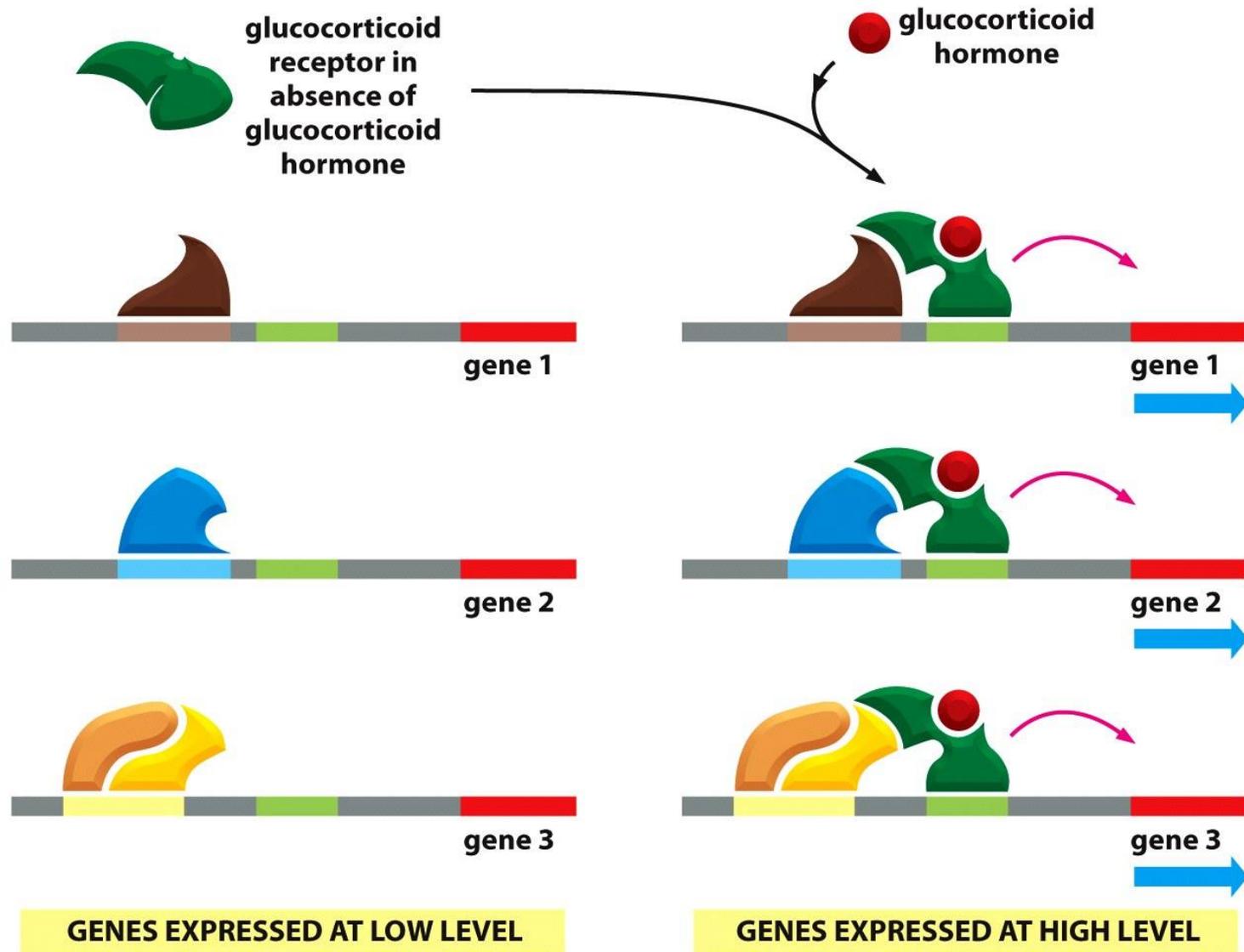
Il gene Pax6 codifica per un fattore di trascrizione che agisce in diversi tessuti.

In che modo uno stesso fattore attiva geni diversi in tessuti diversi?

Pax6 collabora in ciascun tessuto con fattori di trascrizione diversi, da solo non e' sufficiente ad attivare i geni bersaglio.



UN FATTORE DI TRASCRIZIONE PUO' REGOLARE L'ESPRESSIONE DI MOLTI GENI DIVERSI IN CONTESTI DIVERSI INTERAGENDO CON ALTRI FATTORI DI TRASCRIZIONE A LIVELLO DI CIASCUN GENE



A small number of genes expressed in different combinations could specify many different cell types

