

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea in Biologia Molecolare



Elaborato di Laurea
**Il meccanismo molecolare nella risposta cellulare
alle diossine: AHR e suoi interattori**

Tutor: Prof. Silvio Tosatto
Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott. Giovanni Minervini
Dipartimento di Biologia

Laureando: Jacopo Amerigo Carpentieri

Anno Accademico 2012/2013

INDICE

| | | |
|---|------------|-----------|
| ABSTRACT | pag | 2 |
| 1) INTRODUZIONE | pag | 3 |
| 1.1 Sensing intracellulare delle diossine | pag | 3 |
| 1.2 Interconnessione con il pathway di sensing dell'ossigeno | pag | 4 |
| 1.3 Scopo dell'elaborato | pag | 5 |
| 2) MATERIALI E METODI | pag | 6 |
| 3) RISULTATI | | |
| 3.1 Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) | pag | 7 |
| 3.2 Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) | pag | 8 |
| 3.3 Aryl hydrocarbon receptor repressor (AHRR) | pag | 10 |
| 3.4 Hipoxia inducibile factor 1-α (HIF1-α) | pag | 11 |
| 4) DISCUSSIONE E CONCLUSIONI | | |
| 4.1 Meccanismo molecolare di Aryl hydrocarbon receptor (AHR) nel captare le diossine | pag | 12 |
| 5) BIBLIOGRAFIA | pag | 14 |

Abstract

La proteina AhR (Aryl-hydrocarbon Receptor) è espressa in numerosi tessuti di mammifero. AhR è in grado di legare sostanze chimiche di natura antropica quali idrocarburi aromatici alogenati e policiclici o sostanze naturali di origine microbica, vegetale ed animale. Recentemente il pathway metabolico di AhR è stato associato alla via di sensing dell'ossigeno intracellulare. In particolare, la proteina ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator) è sospettata essere un interattore comune alle due vie. In questa tesi, si è scelto di caratterizzare *in silico* la proteina AhR ed il correlato meccanismo di sensing delle diossine (TCDD). I risultati ottenuti attraverso l'analisi dei domini funzionali della proteina, nonché la comparazione della stessa con gli ortologi conosciuti, hanno permesso di formulare un modello teorico di meccanismo molecolare di AhR. Infine, la caratterizzazione di AhR e delle proteine connesse ha evidenziato importanti dettagli funzionali comuni tra la via di sensing dell'ossigeno e quella dei TCDD.

1) INTRODUZIONE

1.1 Sensing intracellulare delle diossine

Come per tutte le molecole non appartenenti al pattern cellulare, altresì dette sostanze xenobiotiche, anche per le diossine (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina -TCDD-) sono presenti proteine capaci di elaborarle ed eliminarle. Nel caso specifico, la prima molecola con cui la risposta a TCDD viene avviata è l'Aryl hydrocarbon receptor (AHR). Tale proteina ha sia funzione di sensore, sia funzione di cointerattore nucleare utile ad avviare la risposta trascrizionale di quelle proteine, come per esempio il citocromo 450, necessarie all'ossidazione e conseguente detossificazione delle TCDD.

La diossina, essendo una molecola altamente idrofoba, attraversa spontaneamente la membrana cellulare alla volta del citosol. Una volta nella cellula, la sostanza xenobiotica viene captata prevalentemente da AHR. Questa molecola infatti, mostra una elevata affinità per la TCDD, nella regione compresa tra gli amminoacidi H320 e A375, che, tra l'altro, risultano essere cruciali per il corretto binding della sostanza [1]. L'alta affinità viene regolata per mezzo di cambiamenti di conformazione che la molecola assume. Recenti studi hanno dimostrato che la molecola si trova di norma associata a diverse chaperonine quali XAP2 e HSP90 [2].

XAP2 media il legame di AHR con un dimerico di HSP90, in quanto induce il corretto ripiegamento della chaperonina e ne ottimizza la capacità di legame con Ahr. Inoltre XAP2 evita che l'Ahr non legato alla diossina, venga poliubiquitinato e quindi instradato verso la relativa via di degradazione.

HSP90 sembra invece essere implicata nell'induzione del corretto ripiegamento di AHR neo sintetizzato e nella stabilizzazione della conformazione legante il ligando [2]. Inoltre è stato dimostrato un suo ruolo attivo nell'inibizione dell'associazione costitutiva - nucleare e/o citoplasmatica - con il suo interattore necessario per l'avvio della risposta trascrizionale [2]. Studi molecolari hanno dimostrato che AHR è del tutto incapace di legare le diossine quando non associata alla chaperonina, in quanto è proprio questa che consente il mantenimento di una conformazione idonea alla formazione di legami [2,3].

Una volta legata la diossina, AHR subisce un cambiamento conformazionale che provoca l'esposizione della sua NLS Nuclear localization sequence sita in posizione 13-18 della molecola [3,4]. Il complesso HSP90-AHR-ligando viene traslocato verso il nucleo (tramite un meccanismo ad oggi ancora ignoto) e giunto in prossimità di uno dei tanti complessi del poro disseminati sulla membrana

nucleare, viene quindi importato all'interno dell'organello grazie all'azione delle α e β importine. E' stato dimostrato che in questa fase XAP2 è dissociata dal complesso, in quanto qualora ancora associata ad AHR, rende impossibile il riconoscimento dell'intero complesso [2]. HSP90 sembra essere necessaria per il corretto transito di AhR all'interno del nucleo; tuttavia non è ancora chiaro se la chaperonina transiti nel nucleo come parte del suddetto complesso o si dissocia da questo prima della effettiva importazione [2].

Una volta nel nucleo, AHR dimerizza con ARNT utilizzando due dei suoi tre domini (in particolare PASA e HLH) [5,9].

ARNT è una proteina a localizzazione nucleare con caratteristiche similari ad AHR almeno per quanto concerne la struttura secondaria e l'organizzazione dei domini.

Formatosi il dimero, questi va a legare una sequenza nucleotidica, con funzione di E-box, definita XRE (xenobiotic response element), che in questo caso specifico è nota come DRE (dioxin response element) [6].

La sequenza in questione è così composta:

TGAGCTCGGAGTTGCGTGAGAAGAGCCCGGA. Ciascuna molecola costituente il dimero prende contatto con i nucleotidi tramite il proprio dominio HLH. Cruciale per il legame è quella che viene definita la sequenza "core" (5'-CGTG-3'), in quanto, sembrerebbe che ARNT prenda contatto diretto con la T in posizione 17, mentre AHR con la T in posizione 13. Sembra inoltre, che il limite di interazione tra queste due molecole sia situato proprio su questi quattro nucleotidi [1].

XRE non è relativo ad un singolo gene ma, in quanto enhancer, può esserlo per molti altri promuovendone quindi la trascrizione. In particolare, è stata dimostrata l'attività di un XRE (che ancora una volta sarà meglio definito come DRE) nei pressi di tutti i geni coinvolti nella risposta intracellulare alle diossine [6]. Si riporta come esempio il gene codificante il citocromo 450: quest'ultimo è implicato in reazioni di ossidazione di varie molecole tra cui, per l'appunto, gli xenobiotici come la diossina [4,5,6].

1.2 Interconnessione con il pathway di sensing dell'ossigeno

Il sensing delle diossine risulta essere altamente interconnesso con il pathway di sensing dell'ossigeno, in particolare per quanto concerne l'interattore nucleare della molecola HIF1- α (hypoxia inducible factor-alpha); questo infatti è ARNT, che in questa via prenderà il nome di HIF1- β . Tuttavia le due vie non risultano essere mutualmente esclusive, anzi possono coesistere tranquillamente non compromettendo così la capacità responsiva cellulare ad entrambe le condizioni,

sia che si tratti di ipossia, sia che si tratti di esposizioni potenzialmente dannose a diossine [4,7,8]; inoltre è da considerare anche che le due molecole, AHR ed HIF1- α , in seguito ad analisi eseguite con ELM e CSpritz, sembrerebbero avere una similitudine sia nella organizzazione interna di percentuale di disordine, sia nella struttura secondaria e nella distribuzione dei domini (vedi Fig. 1).

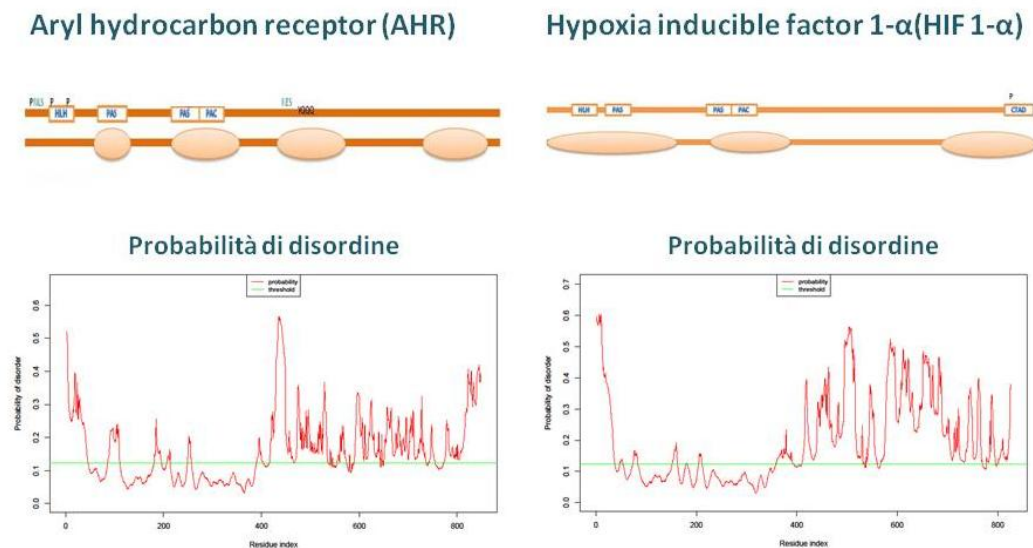


Fig. 1: AHR ed HIF 1- α messe a confronto. In alto a destra ed in alto a sinistra l'organizzazione dei domini funzionali e globulari nelle due proteine. In basso a destra ed in basso a sinistra la distribuzione della probabilità di disordine nelle due molecole.

1.3 Scopo dell'elaborato

L'elaborato si propone di analizzare dal punto di vista strutturale e funzionale le principali molecole implicate nel pathway di sensing delle diossine utilizzando i materiali e le metodiche di ricerca e predizione che la bioinformatica fornisce. In particolare, si è andati ad indagare circa la proteina AhR Aryl hydrocarbon receptor (AHR), Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), Aryl hydrocarbon receptor repressor (AHRR). Inoltre, vista la forte interconnessione con la via di risposta intracellulare alla condizione di ipossia, si è effettuata una ricerca dello stesso calibro per la principale molecola implicata in detto pathway, quale Hipoxia inducibile factor 1 alpha (HIF1- α).

A tal fine è stata condotta una analisi in parallelo per quanto riguarda AHR e HIF1- α umane.

Con i risultati ottenuti si è tentato di ricostruire l'intero meccanismo molecolare di sensing delle diossine, trasporto verso il nucleo e infine attivazione di una risposta

trascrizionale da parte di AHR (ad oggi non ancora del tutto noto), incrociando le informazioni ottenute tramite ricerche in banche dati biologiche e le evidenze sperimentali bioinformatiche riscontrate.

2) MATERIALI E METODI

La ricerca bibliografica è stata condotta utilizzando la banca dati PubMed. Le sequenze umane delle proteine qui studiate, sono state recuperate interrogando il database di sequenze proteiche Uniprot (URL: www.uniprot.org). I codici utilizzati sono i seguenti: P35869 (AHR); Q16665 (HIF 1- α); P27540 (ARNT); A9YTQ3 (AHRR). Uniprot è una affidabile banca dati di sequenze proteiche ad ognuna delle quali è associata una gran quantità di informazioni relative a funzione, localizzazione nucleare, domini funzionali, eventuali modificazioni post-traslazionali. Sequenze ortologhe sono state recuperate tramite interrogazione del server OMABrowser (URL: www.omabrowser.org). Questo server, una volta inserita una sequenza query, effettua una ricerca su una banca dati di 4,7 mln di sequenze proteiche, includendo nella ricerca 1000 differenti specie. Le varie sequenze così ottenute sono state usate per costruire un allineamento multiplo con i vari orologi, al fine di valutarne il grado di conservazione sia per quanto concerne le proprietà chimiche dei singoli amminoacidi, sia per quanto riguarda i vari domini funzionali. La generazione, visualizzazione e manipolazione degli allineamenti è stata condotta utilizzando il programma Jalview (URL: www.jalview.org). Gli allineamenti sono stati generati usando l'algoritmo TCoffee, usando le impostazioni di default per proteine.

I domini identificati sono stati poi classificati e caratterizzati funzionalmente utilizzando i database integrati in ELM e Pfam. Il primo è un server automatico usato per la predizione di siti funzionali, che vengono identificati tramite pattern in proteine eucariotiche; il secondo è una banca dati che mantiene una collezione di allineamenti multipli di sequenza basati su Hidden Markov Model (HMM) che coprono domini e famiglie proteiche comuni.

Per la caratterizzazione strutturale, si è ricorsi a programmi di predizione di struttura secondaria come Psipred e del disordine come CSpritz. Psipred (URL: www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/) utilizza i profili di PSIBLAST; è basato su due reti neurali la seconda delle quali decide la propensione per struttura secondaria del residuo sulla base dell'input della prima; il tutto dando risultati aventi una Q_3 (accuratezza) pari al 75%. CSpritz (URL: www.protein.bio.unipd.it/cspritz/), invece, inserita una sequenza query, fornisce come risultato della ricerca la

propensione di interi segmenti proteici all'ordine o al disordine. Infine, per analizzare in parallelo le sequenze umane di AHR e HIF1- α si è utilizzato BLAST, programma euristico per la ricerca di omologie locali di sequenza.

3) RISULTATI

3.1 Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR)

La molecola possiede 44 ortologi, i quali una volta inseriti in un allineamento multiplo con la sequenza umana, hanno reso evidente l'alto grado di conservazione di quattro regioni ben definite, almeno per quanto concerne le prime 389 posizioni; per il resto il grado di conservazione è abbastanza basso.

Prendendo come riferimento quella umana di 848 amminoacidi, le regioni risultano essere quella dalla posizione 34 alla 88, da 113 a 179, da 272 a 342, da 348 a 389. Per meglio definire tali regioni poi si è passati ad una ricerca con Pfam ed ELM, i quali hanno chiarito che queste sequenze altro non sono se non domini bene definiti: nell'ordine HLH, PASA, PASB, PAC. Il primo di essi ha una struttura secondaria helix-loop-helix e risulta essere utile sia al legame della molecola con il DNA sia, anche se in piccola parte, alla dimerizzazione con ARNT. Il dominio PASA ha una struttura secondaria costituita da alpha eliche e foglietti beta; sembra essere coinvolto in larga misura nel processo di dimerizzazione intranucleare [4,9]. Il dominio PASB, invece, è costituito in struttura secondaria da elementi di alpha eliche e foglietti beta e sembra essere implicato dal punto di vista funzionale nel legame delle varie chaperonine come HSP90 e XAP2 e nel legame con la TCDD [1,4,6]. L'ultimo dominio, e cioè il PAC, con struttura secondaria di soli foglietti beta, sembra avere la sola funzione di favorire il corretto ripiegamento del dominio PASB adiacente. Per quanto riguarda la struttura terziaria sono stati riscontrati quattro domini globulari che si estendono dalla posizione 102 a 181, da 258 a 420, da 536 a 654, da 733 a 827. Si è dunque passati all'analisi dei vari siti di interesse localizzati sull'intera proteina. Nello specifico, si è riusciti ad identificare una sequenza NLS posizionata a partire dalla posizione 13 alla 18; una sequenza NES (segnale di esportazione nucleare) dalla posizione 538 alla 552. Inoltre non meno importanti sono i siti leganti domini PDZ localizzati su tutta la proteina così come i siti di fosforilazione 12S, 36S, 68S e 378Y.

Dal punto di vista del disordine (CSpritz), la molecola sembra essere suddivisa in due regioni ben definite: la prima si estende per le prime 400 posizioni e possiede

un buon grado di ordine; la seconda dalla posizione 400 in poi, ha un grado di disordine che si mantiene costante intorno allo 0.30. E' tuttavia presente un picco che raggiunge lo 0,56% di probabilità di disordine che risulta essere un sito di taglio per le caspasi 3 e 7.

Sulla base dei risultati ottenuti la proteina risulta organizzata in due sezioni: una utile alla dimerizzazione con più molecole, come ARNT, chaperonine, TCDD ed una sezione effettrice, contenete svariati siti di interazione con varie proteine, probabilmente utile all'avvio della trascrizione nel nucleo quando legata al DNA insieme al suo interattore (vedi Fig. 2).

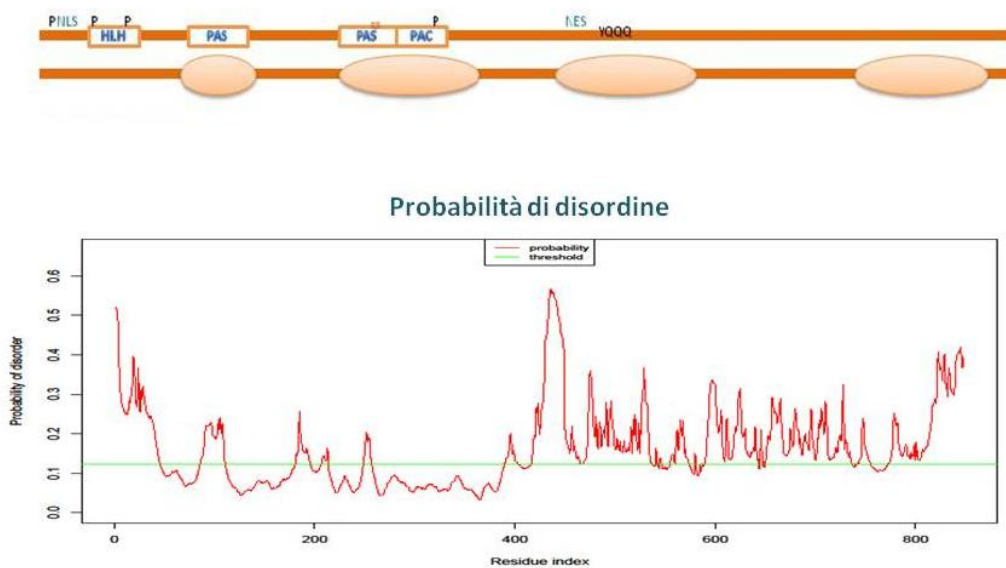


Fig. 2: in alto, distribuzione dei domini funzionali e globulari di AHR; in basso, distribuzione della probabilità di disordine

3.2 Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)

La molecola possiede 49 ortologi. Generato un allineamento multiplo con la sequenza umana di 789 amminoacidi, si è potuto evincere l'alto grado di conservazione di quattro domini: HLH, PASA, PASB, PAC. Questi si estendono rispettivamente dalla posizione 85 a 141, da 163 a 230, da 349 a 417, da 424 a 467. Per quanto concerne le funzioni, il primo dominio permette il legame con la sequenza nucleotidica mentre il secondo permette l'associazione con AHR. Il terzo è utile all'associazione con altre molecole di vario genere. Il quarto dominio risulta importante nel mantenimento del corretto ripiegamento del dominio PAS subito precedente. In riferimento alla struttura secondaria, si assiste ad una distribuzione di alpha eliche e foglietti beta nelle prime 400 posizioni della

proteina, organizzazione che tuttavia svanisce oltre. Ricontriamo poi, tre domini globulari disposti dalla posizione 65 alla 141, da 158 a 290, da 358 a 463. Dislocati sulla proteina sono stati rinvenuti alcuni siti di interesse come una sequenza di localizzazione nucleare (NLS) dalla posizione 36 alla 46; siti di interazione con proteine 14-3-3 e domini PDZ nelle posizione da 659 a 664, da 737 a 742. In posizione 77 è presente una serina fosforilabile.

Dal punto di vista del disordine si è ottenuto un risultato simile a quello ottenuto per AHR. La proteina sembra essere suddivisa in due regioni: la prima comprendente le prime 400 posizioni in cui la probabilità di disordine si mantiene relativamente bassa; la seconda dove invece il disordine risulta essere elevato. Anche qui si può andare quindi a dividere la molecola in due regioni: una utile alla dimerizzazione, una effettrice (vedi Fig. 3).

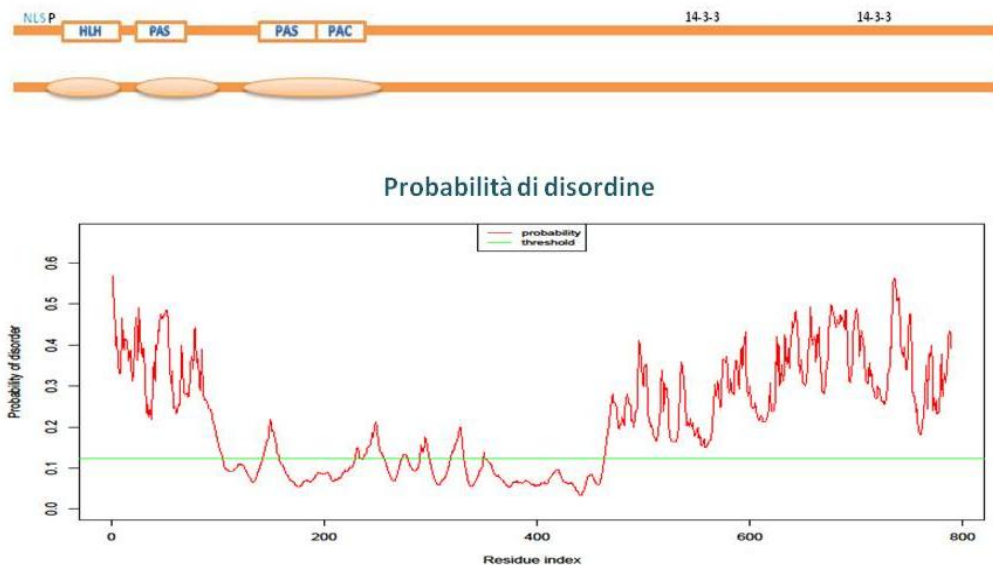


Fig.3: in alto, la distribuzione dei domini funzionali e globulari di ARNT; in basso la distribuzione della probabilità di disordine

3.3 Aryl hydrocarbon receptor repressor (AHRR)

La proteina possiede 27 ortologi. Prendendo sempre come riferimento la sequenza umana di 701 amminoacidi, tramite ELM e Pfam sono stati identificati due domini differenti. Il primo HLH esteso dalla posizione 41 alla 89, sembra permettere alla molecola l'associazione con la sequenza nucleotidica; il secondo, PAS, esteso dalla posizione 114 alla 180, ha probabilmente il compito di

permettere la dimerizzazione con AHR al fine di reprimere la sua azione. Nell'organizzazione della struttura secondaria distinguiamo una serie di alpha eliche e foglietti beta nelle prime 350 posizioni. Nella regione successiva distinguiamo solo poche alpha eliche. Dall'analisi del disordine risulta che la proteina è organizzata in due regioni differenti nelle quali vediamo una bassa percentuale di disordine relativa ai primi 350 amminoacidi circa, seguita da un alto grado di disordine per la regione successiva, disordine che si protrae fino alla regione C-terminale. Per la proteina AHRR, tuttavia, si hanno poche informazioni bibliografiche che hanno inficiato la caratterizzazione funzionale. Vista l'omologia di organizzazione strutturale con le altre proteine considerate in questo studio, possiamo ipotizzare che le diverse regioni evidenziate nella proteina, possano svolgere funzioni analoghe a quanto visto per le precedenti. Si può quindi speculare in una regione utile alla dimerizzazione ed una a funzione effettrice (vedi Fig.4).

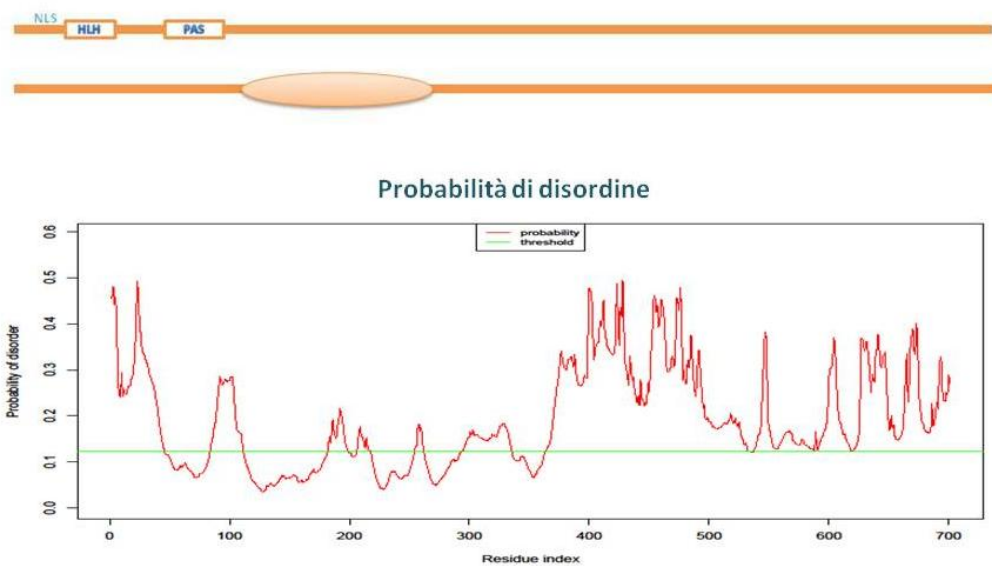


Fig.4: in alto, distribuzione dei domini funzionali e globulari di AHRR; in basso distribuzione della probabilità di disordine.

3.4 Hypoxia inducible factor 1- α (HIF1- α)

La sequenza umana di 826 amminoacidi ha 49 ortologhi. L'analisi ha evidenziato la presenza di quattro domini funzionali. Dalla posizione 23 alla 78 viene a trovarsi il dominio HLH utile al legame con il DNA; dalla posizione 87 alla 153 abbiamo il dominio PASA utile alla dimerizzazione con ARNT; dall'amminoacido 269 al 296 il dominio PASB utile al legame con proteine

accessorie; dalla posizione 302 alla 345 un dominio PAC ha la funzione di mantenere stabile il ripiegamento di PASB. Dal punto di vista della struttura secondaria abbiamo anche qui una buona distribuzione di alpha eliche e foglietti beta per le prime 400 posizioni oltre le quali non si riscontra una altrettanto ben strutturata organizzazione.

Per quanto concerne la struttura terziaria è possibile distinguere tre domini globulari distribuiti dalla posizione 1 alla 200, dalla 236 alla 408 e dalla 671 alla 824. Di particolare interesse sono le posizioni da 400 a 413 e da 562 a 574 dove sono dislocati i siti di interazione con la proteina VHL. Inoltre altrettanto importante è la regione terminale della proteina definita CTAD (dall'amminoacido 787 al 826, avente struttura helix-loop-helix), in quanto tale regione va ad interagire con vari fattori di trascrizione. È stato infine riscontrato un sito di fosforilazione al livello di una treonina in posizione 796.

La percentuale di disordine riscontrata con CSpritz risulta essere bassa dalla posizione 1 alla 380 circa. Oltre, tale percentuale assume valori al di sopra della soglia (vedi Fig.5).

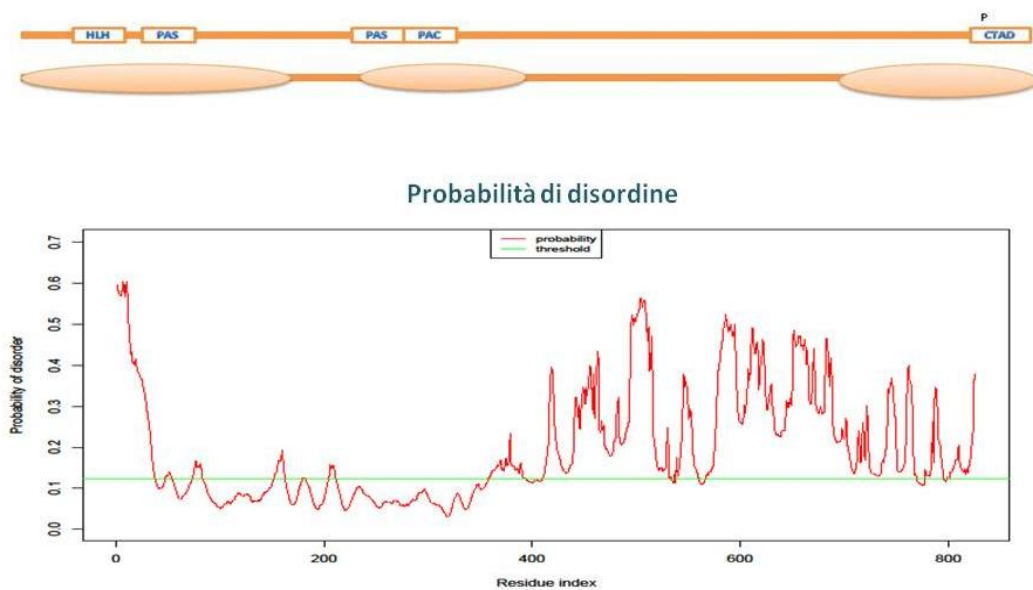


Fig.5: in alto, distribuzione dei domini funzionali e globulari di HIF1- α ; in basso, distribuzione della probabilità di disordine.

4) DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

4.1 Meccanismo molecolare di Aryl hydrocarbon receptor (AHR) nel captare le diossine

AHR è la proteina che a livello intracellulare funge da sensore per le diossine. La cellula tuttavia, per poter captare in tempi brevi la presenza di xenobiotici, richiede verosimilmente un recettore o una proteina a funzione recettoriale in prossimità della membrana. Per questo motivo si è pensato che AHR possa essere mantenuto in questa condizione grazie all'ausilio di proteine "scaffale". Queste molecole sono di vario tipo e tra i tanti ne esiste uno in grado di associarsi alle giunzioni cellulari occludenti grazie alla presenza di svariati domini globulari. Queste giunzioni sono generalmente situate tra cellule di epitelio tipo quelli della cute o alcuni epitelio luminali, andando a differenziare a livello di membrana citosolica, un dominio apicale ed uno basolaterale. Le proteine scaffale dunque fungerebbero da ancora per AHR che si verrebbe a trovare in prossimità del dominio apicale, il quale normalmente è quello a contatto con l'ambiente esterno (ad esempio nel caso della cute). Questa ipotesi si trova in accordo con la considerazione che le diossine sono in grado di entrare nella cellula per diffusione diretta dal mezzo esterno (aria, acqua) verso il dominio apicale. Viene quindi da se che quanto più AHR si trovi in prossimità del "confine" interno/esterno, tanto più veloce e repentina sarà la percezione della sostanza estranea e dunque altrettanto veloce e repentina sarà l'attivazione della risposta metabolica agli xenobiotici.

In vivo AHR si trova associata a chaperonine quali un dimero di HSP90, XAP2 e p23. La proteina XAP2, legandosi sul dominio PASB, oltre ad evitare che AHR venga poliubiquitinato e quindi degradato, è utile al legame delle due heat shock protein, in quanto induce il corretto ripiegamento delle chaperonine al fine di ottimizzare la capacità di legare AHR. HSP90 lega sia il dominio PASB che il dominio HLH. Sembra essere implicata nell'induzione e nel mantenimento del corretto ripiegamento di AHR neo sintetizzato e nell'inibizione dell'associazione costitutiva con ARNT. È stato dimostrato che AHR, qualora non sia legato alla heat shock protein, è del tutto incapace di formare legami con la TCDD, in quanto è proprio HSP90 che consente il mantenimento di un ripiegamento idoneo alla formazione del complesso AHR-TCDD. Infine p23, proteina accessoria legante HSP90, aiuta nel binding di AHR con il ligando.

In seguito all'entrata in cellula della diossina, questa va a legarsi sul dominio PASB di AHR, provocandone un cambiamento conformazionale che provoca in

qualche modo il distacco dalle proteine scaffale e l'esposizione di una sequenza di localizzazione nucleare. La proteina a questo punto deve essere portata in prossimità del nucleo: l'insieme delle molecole implicate non è ad oggi noto, ma dai risultati prodotti in questa ricerca, si è potuto evincere che AHR interagisce con SMARCA4. Questa proteina sembra a sua volta interagire con l'actina. Quest'ultima evidenza rende SMARCA4 un'ottima candidata per il trasporto di AHR dalla membrana al nucleo.

E' noto che AHR giunta in prossimità dell'organello, già dissociata da XAP2 (in quanto le impedirebbe il transito), viene riconosciuta sotto forma di complesso HSP90-AHR-TCDD dal sistema delle alpha e beta importine. Non è ancora noto se sia l'intero complesso a transitare nel nucleo o se HSP90 venga lasciato fuori. Tuttavia, una volta dentro, AHR con la diossina legata è in grado di dimerizzare con ARNT tramite il dominio PASA e HLH. Il dimero, a questo punto, va a legare una sequenza nucleotidica, con funzione di E-box definita XRE (xenobiotic response element), in questo caso DRE (dioxin response element). Ciascuna molecola costituente il complesso prende contatto con i nucleotidi tramite il proprio dominio HLH. Cruciale per il legame, è quella che viene definita la sequenza core (5'-CGTG-3'), in quanto ARNT prende contatto diretto con la T in posizione 17, mentre AHR con la T in posizione 13; inoltre sembra che il limite di interazione tra le due molecole sia situato proprio su questi quattro nucleotidi.

L'elemento di risposta XRE non è relativo solo ad un gene ma, in quanto enhancer, può esserlo per molti altri. Nel caso particolare, è possibile riscontrare un XRE (che ancora una volta sarà meglio definito come DRE) nei pressi di tutti quei geni coinvolti nella risposta alle diossine.

Un esempio di questi geni, può essere riscontrato in CYP1A1 codificante il citocromo 450. Quest'ultimo è implicato in reazioni di ossidazione di varie molecole tra cui gli xenobiotici (vedi Fig.6).

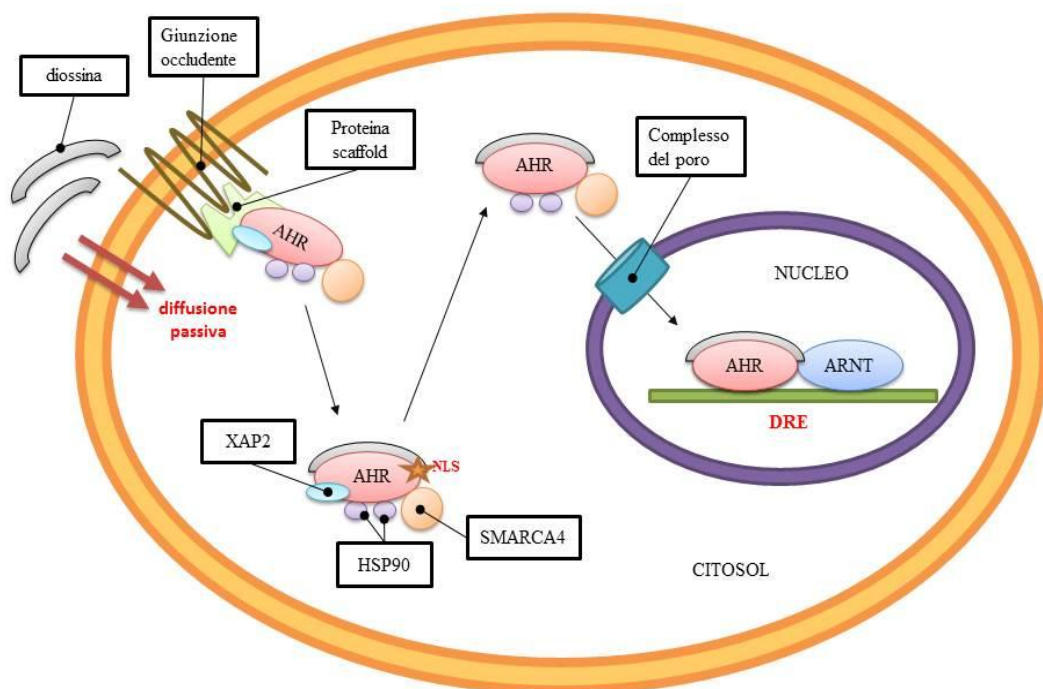


Fig.6: In alto a sinistra le diossine sono all'esterno della cellula. Una volta entrate per diffusione semplice vanno a legarsi ad una molecola di Aryl Hydrocarbon receptor (AHR), complessata a chaperonine ed associata alle giunzioni occludenti tramite proteine scaffold. Una volta formatosi il complesso AHR-diossine-chaperonine, questo viene trasportato nei pressi del nucleo da SMARCA4. Rilasciate sia XAP2 sia SMARCA4 e probabilmente HSP90, AHR ancora associata alla diossina transita nel nucleo; dimerizza con ARNT e comincia la trascrizione di geni utili alla detossificazione cellulare a partire da E-box definiti Dioxin Response Element (DRE)

5) BIBLIOGRAFIA

1. Alessandro Pandini, Anatoly A. Soshilov, Yujuan Song, Jing Zhao, Laura Bonati, Michael S. Denison. *Detection of the TCDD binding-fingerprint within the Ah receptor ligand binding domain by structurally driven mutagenesis and functional analysis.*
2. John R. Petrusis, Gary H. Perdew. *The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex.*
3. Anatoly Soshilov, Michael S. Denison. *Role of Per/Arnt/Sim domains in ligand-dependent transformation of the Aryl Hydrocarbon Receptor.*
4. Brian E. McIntosh, John B. Hogenesch, Christopher A. Bradfield. *Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation.*
5. S. Reisz-Porszasz, M. R. Probst, B. N. Fukunaga, O. Hankinson. *Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT).*
6. Steven G. Bacsı, Suzanne Reisz-Porszasz, Oliver Hankinson. *Orientation of the heterodimeric Aryl Hydrocarbon (Dioxin) receptor complex on its asymmetric DNA recognition sequence.*
7. Kang Ae Lee, Lyle D. Burgoon, Laura Lamb, Edward Dere, Timothy R. Zacharewski, John B. Hogenesch, John J. LaPres. *Identification and characterization of genes susceptible to transcriptional cross-talk between the hypoxia and dioxin signaling.*
8. K. gradin, J. McGuire, R. H. wenger, I. Kvietikova, M. L. Fhitelaw, R. Toftgard, L. Tora, M. Gassmann, L. Poellinger. *Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor.*
9. Bert N. Fukunaga, Markus R. Probst, Suzanne Reisz-Porszasz, Oliver Hankinson. *Identification of functional Domains of the aryl hydrocarbon receptor.*