

PROCARIOTI

non possiedono nucleo

il DNA genomico è sparso nel citoplasma

la trascrizione è accoppiata alla traduzione

EUCARIOTI

il DNA genomico è organizzato in cromosomi nel nucleo

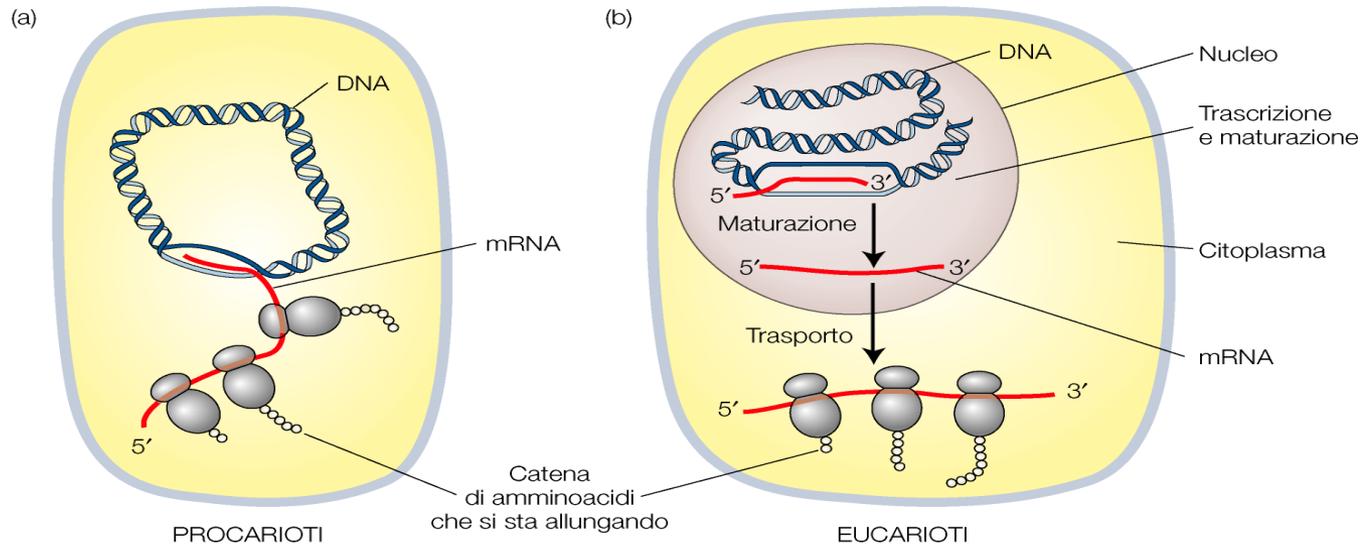
presenza di istoni associati al DNA e formazione di cromatina

la trascrizione avviene nel nucleo.

La traduzione nel citoplasma dopo che l'RNA è maturato a messaggero (perdita degli introni, poliadenilazione, ecc.)

- La trascrizione negli eucarioti è più complessa perché il DNA è compattato nella cromatina e nucleosomi.

Differenze nella Trascrizione e traduzione tra Procarioti e Eucarioti



Negli eucarioti:

1. Il DNA è organizzato in cromatina
2. 3 RNA polimerasi
3. maturazione dell RNA e trasporto nel citoplasma

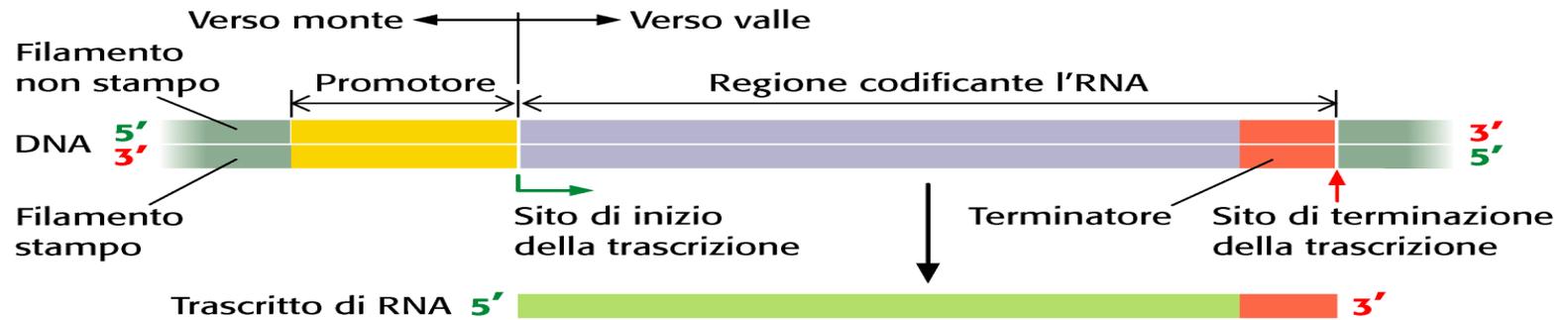
EUCROMATINA

cromatina decondensata dispersa nel nucleo --> consente la trascrizione dei geni

ETEROCROMATINA

cromatina nello stato compattato --> non consente la trascrizione dei geni

L'Unità trascrizionale



1. Promotore
2. Regione trascritta (5'UTR, regione tradotta, 3'UTR)
3. terminatore

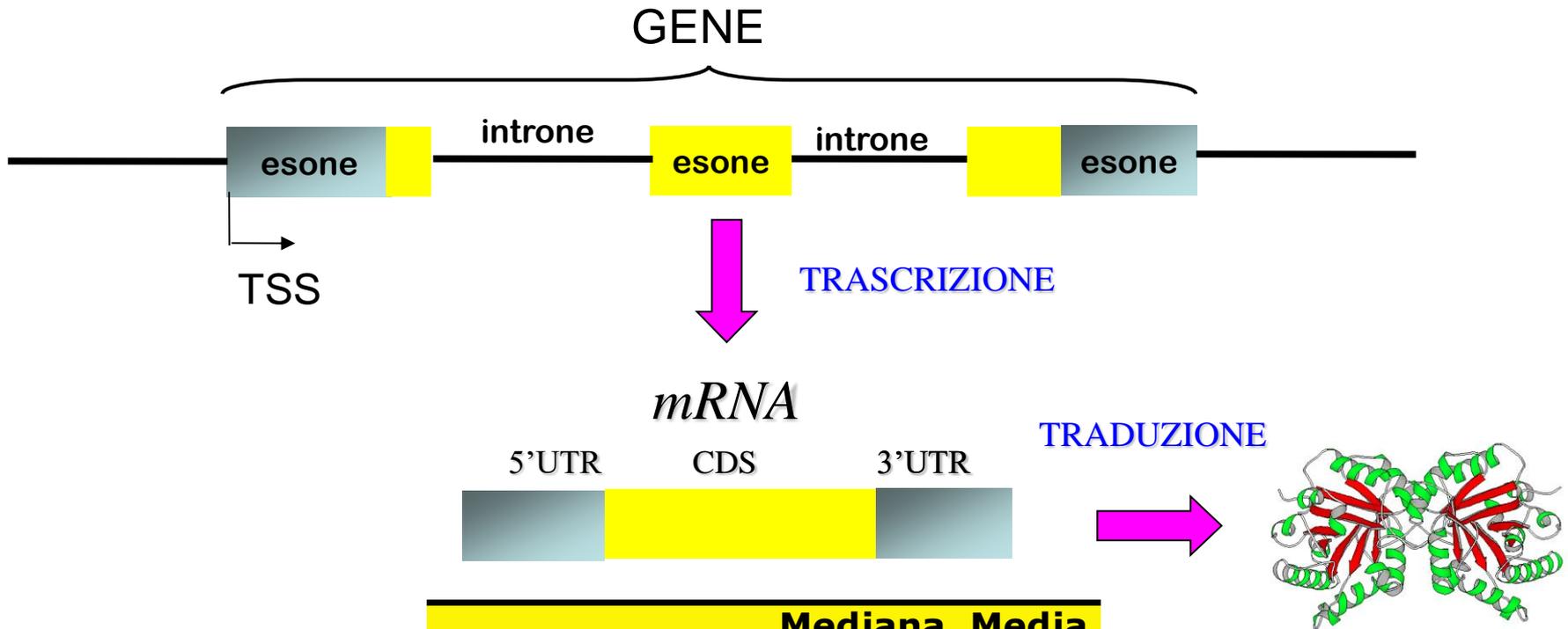
Porzione codificante del genoma eucariotico

- **geni codificanti per proteine**, in copia singola
- **geni codificanti per proteine**, organizzati in **famiglie geniche**
- **geni per rRNA, tRNA ed istoni**, organizzati in unità ripetute in tandem
- **geni per ncRNA**



**Ridondanza genetica
del genoma nucleare**

La struttura dei geni eucariotici



Caratteristiche
dei geni umani

	Mediana	Media
Numero di esoni	7	8,8
L introni (bp)	1023	3365
L 5'UTR (bp)	240	300
L CDS (bp)	1100	1340
L 3'UTR (bp)	400	770
L gene (bp)	14000	27000

La struttura dei geni eucariotici

I geni eucariotici presentano una grande varietà di strutture e dimensioni.

Ad esempio nel **genoma umano**:

Il più piccolo:

tRNA^{GLU} (69 bp)

Il più grande:

Distrofina (2.4 Mb, la sua trascrizione richiede circa 17h)

Il numero di esoni può variare da **1** (geni privi di introni come molti geni per ncRNA, interferoni, istoni, ribonucleasi, HSP, GPCR, ecc.) sino a **363** (**Titina, proteina gigante del muscolo striato**). Le dimensioni degli esoni e degli introni sono estremamente variabili.

A fronte di esoni costituiti da pochi nucleotidi, l'esone più grande è presente nel gene per **ApoB (lipoproteina componente le LDL)** (7.6 kbp). Anche le dimensioni degli introni possono variare da pochi nucleotidi fino a 800 kbp (gene **WWOX, nel cromosoma X; è un oncosoppressore**).

Le proteine codificate possono variare nelle dimensioni da pochi residui (piccoli ormoni) sino a molte migliaia (**Titina**, 38.138 aa).

Gli introni dei geni altamente espressi sono circa 14 volte più corti dei geni scarsamente espressi.

Geni per ncRNAs

I genomi eucariotici codificano per un gran numero di RNA non codificanti proteine (ncRNA). Circa il 30% dei trascritti identificati nel topo risulta non codificante per proteine.

N	ncRNA	Descrizione
~200	snoRNA	small nucleolar RNA, over 100 types - RNA modification and processing
~100	snRNA	small nuclear - involved in splicing
~700	miRNA	very small ~22bp , regulation
~1200	18S, 5.8S, 28S	nuclear rRNA subunits - cytosolic ribosome
~250	5S	nuclear rRNA subunit - cytosolic ribosome
>500	tRNA	transfer RNA
>1500	Antisense RNA	> 1500 types

Le RNA Polimerasi Eucariotiche

■ RNA pol I

- Transcrive tutti i geni rRNA (meno 5S rRNA)

■ RNA pol II

- Transcrive tutti i geni strutturali (tutti i mRNA)
- Transcrive alcuni geni snRNA
- Trascrive i miRNA

■ RNA pol III

- Transcrive tutti i geni tRNA
- Trascrive il gene 5S rRNA

I promotori eucariotici

- Sono sequenze più variabili e spesso più complesse di quelle dei batteri.
- Per i geni strutturali, si riconoscono tre caratteristiche comuni:
 - Elementi regolatori
 - TATA box
 - Sito di inizio della trascrizione

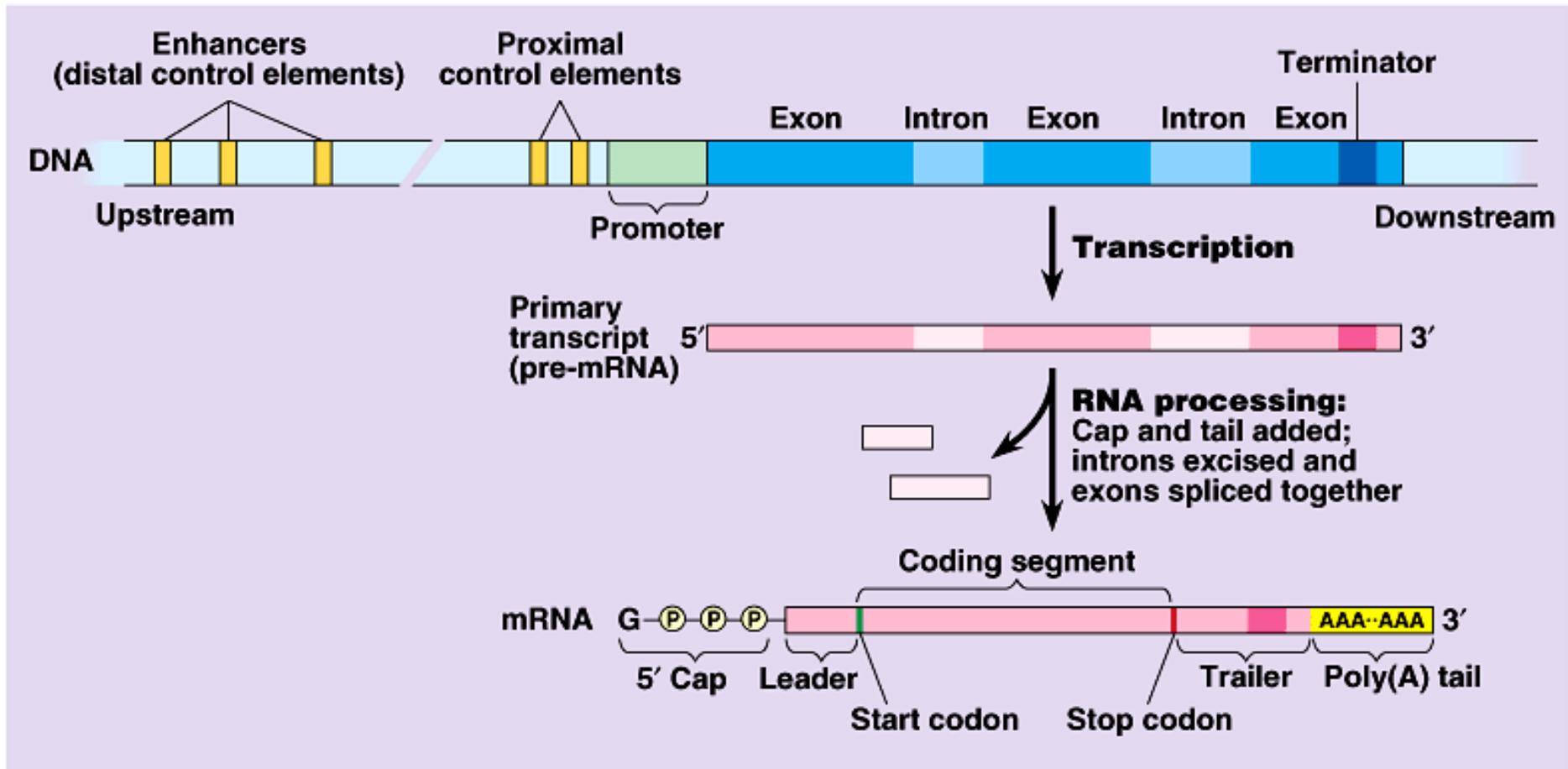
Promotore

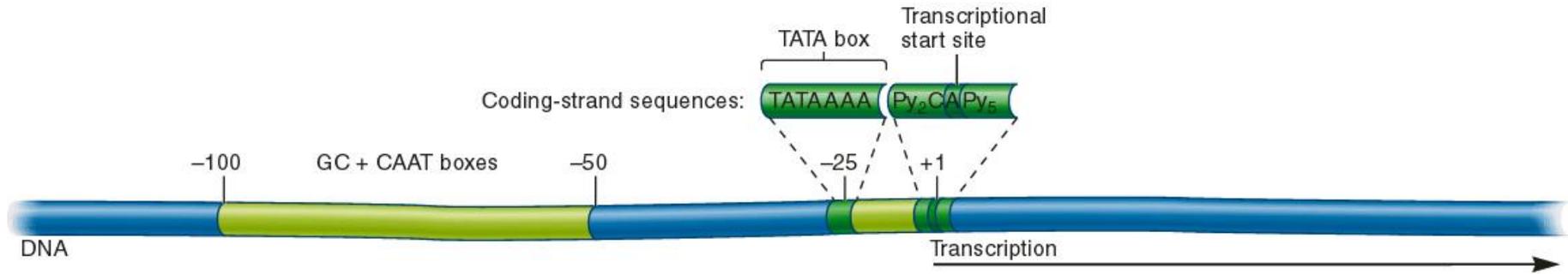
- L'inizio ad un promotore eucariotico coinvolge un gran numero di fattori che si legano a diversi **cis-acting elements**.
- Un promotore è definito come la **regione di DNA** che contiene tutti questi siti di legame, cioè che inizia la trascrizione con efficienza normale e controllo appropriato
- Il core è l'elemento centrale del promotore. E' lungo circa 40-60 nt e si estende a monte o a valle del sito di inizio (+1)

Geni Strutturali degli Eucarioti

- Fattori che controllano l'espressione genica:
 - *cis-acting elements*
 - Sequenze di DNA che esercitano il loro effetto solo su un particolare tipo di gene che stabiliscono interazioni intramolecolari
 - *trans-acting elements*
 - Geni che codificano per proteine regolatorie che si legano ai *cis-acting elements* o sequenze adiacenti al gene da regolare che stabiliscono interazioni intermolecolari

A eukaryotic gene and its transcript





- **Elementi regolatori** influenzano il legame della RNA pol al promotore
 - Possono essere
 - **Enhancers**
 - Stimolano la trascrizione
 - **Silencers**
 - Inibiscono la trascrizione
 - Possono trovarsi in posizioni e distanza variabili rispetto al promotore, ma spesso sono nella regione da -50 a -100

Fattori di trascrizione

- L'inizio della trascrizione necessita dell'enzima RNA polimerasi e dei **fattori di trascrizione (TF)**.
- Un fattore di trascrizione è una proteina che è necessaria per l'inizio della trascrizione, ma che **non è parte della RNA polimerasi**.

I FATTORI DI TRASCRIZIONE sono proteine che facilitano l'interazione tra la RNA polimerasi ed il DNA.

Si dividono in:

- Fattori richiesti per l'inizio della trascrizione;
- Fattori che partecipano alla formazione di un complesso attivo di pre-inizio, che non sono più richiesti nelle fasi avanzate della trascrizione.
- Fattori che aiutano il processo di allungamento dell'RNA da parte dell'RNA polimerasi;

Sequenze consenso di RNA pol II (promotori di classe II)

Sequenze consenso trovate i prossimità dello start point di Pol II.

Di solito ne sono presenti 2 o 3

La più comune è **TATA-box**, che è talvolta sostituita da una forte sequenza INR

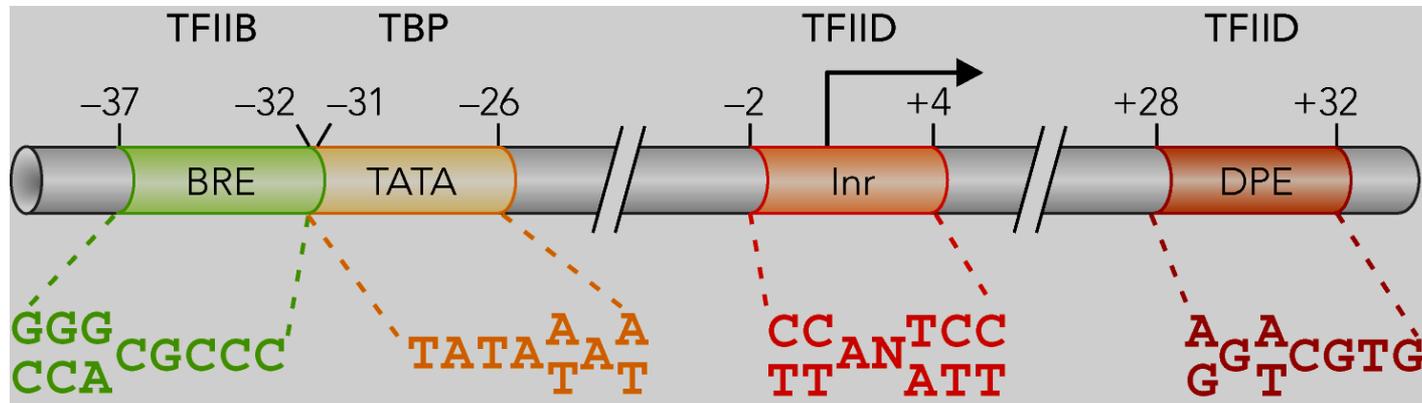
Quattro siti canonici del promotore di base (core promoter):

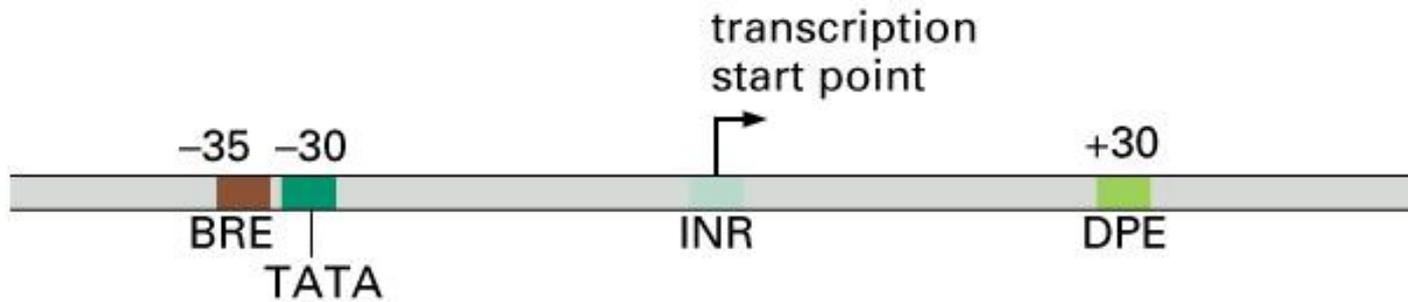
BRE (B recognition element, lega TFIIB)

TATA (Lega TBP)

INR (initiator element, Inziatore)

DPE (Downstream promoter element)





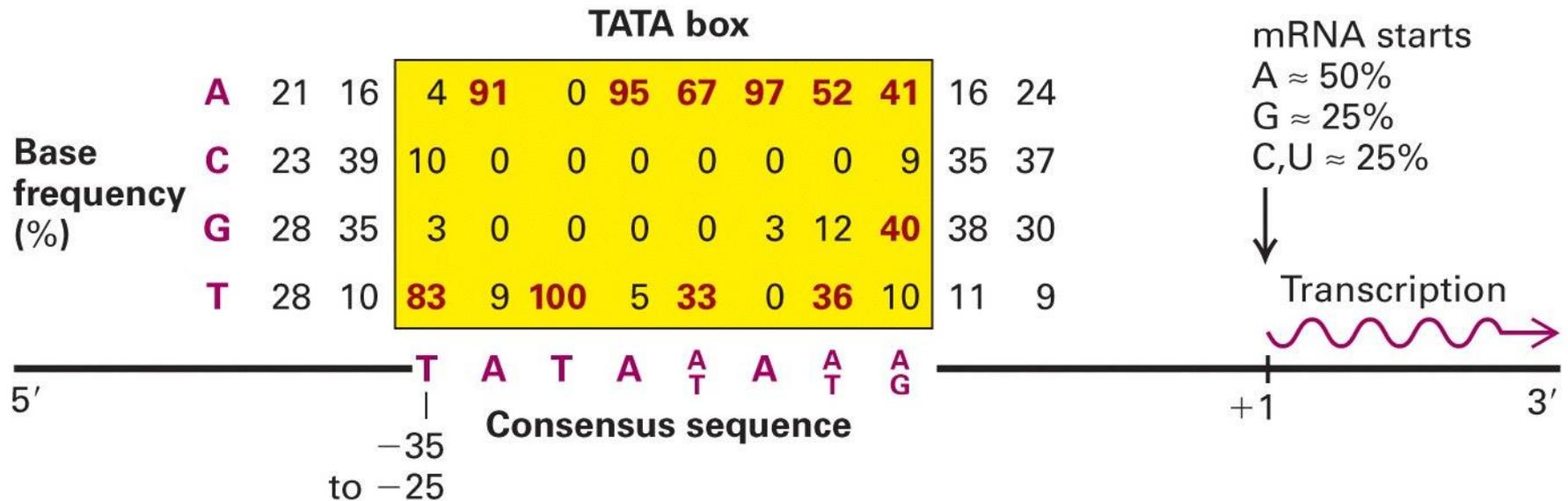
element	consensus sequence	general transcription factor
BRE	G/C G/C G/A C G C C	TFIIB
TATA	T A T A A/T A A/T	TBP
INR	C/T C/T A N T/A C/T C/T	TFIID
DPE	A/G G A/T C G T G	TFIID

Sequences that can act as promoters (TATA is preferred)

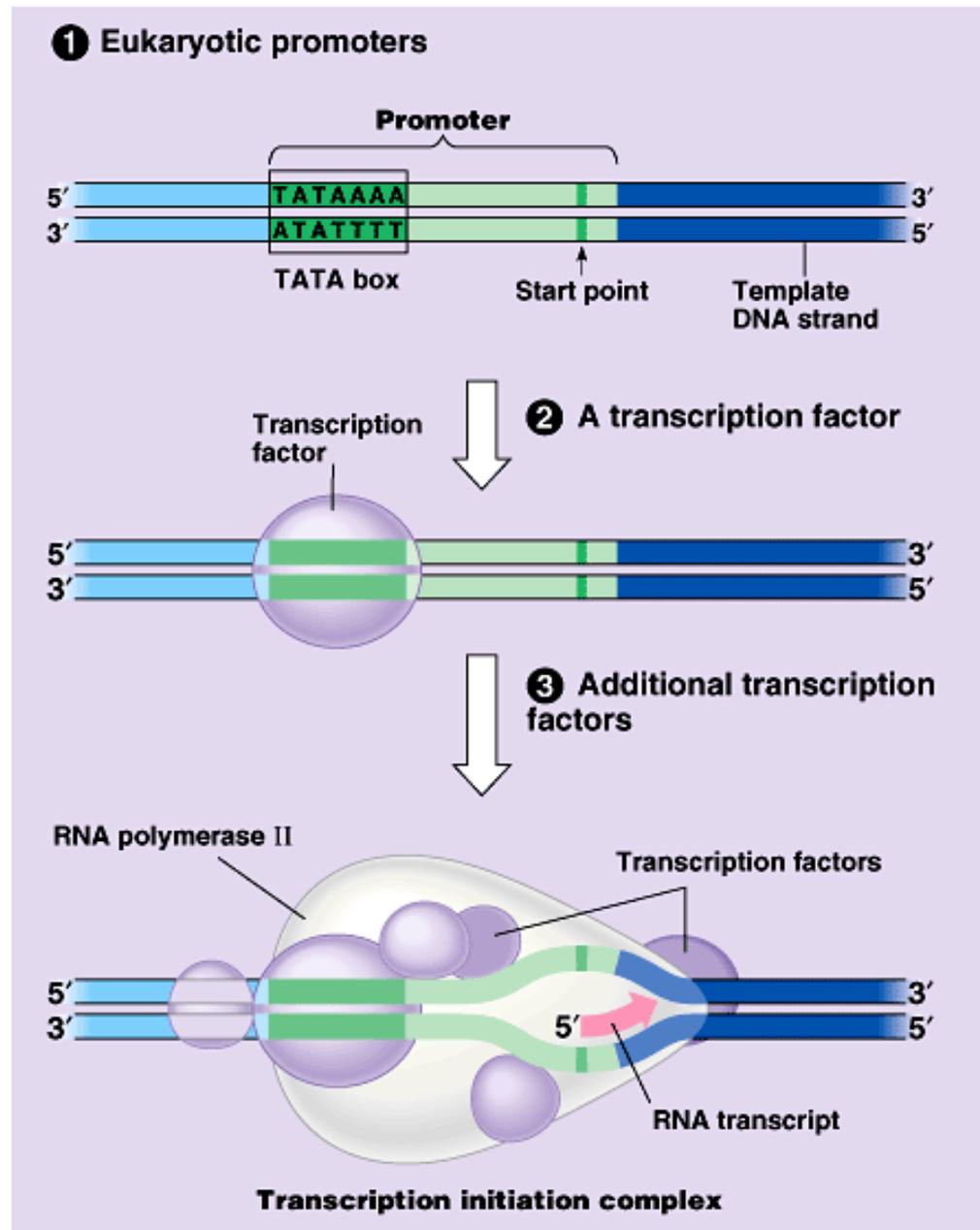
- Il promotore centrale può contenere fino a quattro elementi: TATA (circa a -25), BRE (riconosce TFIIB, a monte di TATA), Inr (iniziatore, sul sito di inizio della trascrizione) e un elemento a valle (DPE).
- La TATA box è la più studiata. Ha alcune eccezioni nella sequenza consenso (es. CATA nel gene della β -globina. **I geni housekeeping (ubiquitari) tendono ad avere GCbox al posto di TATAbox.** Anche i geni che regolano lo sviluppo sono privi di TATA box
- In generale la TATA box è presente nei geni “specializzati” (trascritti solo da alcuni tipi di cellule)
- La TATA box sembra importante per localizzare l’inizio della trascrizione, ma non l’efficienza della trascrizione.
- Alcuni promotori hanno bisogno di TATA box per funzionare, altri solo per posizionare il sito di inizio trascrizione.
- Gli elementi a monte del promotore legano fattori di trascrizione gene-specifici (es. GC box che legano Sp1 e CCAAT box che legano CTF)

- I promotori della maggior parte dei geni trascritti dalle RNA polimerasi II comprendono anche diversi elementi del promotore posti a monte a cui si legano in maniera specifica proteine diverse dall'RNA polimerasi II
- Considerando il numero di geni e i tipi di cellule presenti negli eucarioti, è stato stimato un minimo di **cinque elementi** promotori a monte richiesti per identificare univocamente un particolare gene codificante ed assicurare che esso sia espresso in modo appropriato
- Se le proteine regolatrici, che riconoscono gli elementi del promotore posti a monte, non si legano ad essi correttamente, il processo di trascrizione può divenire inefficiente

La RNA pol II sa dove iniziare la trascrizione grazie alla TATA box



The initiation of transcription at a eukaryotic promoter

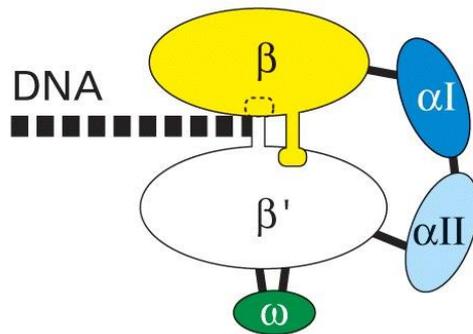
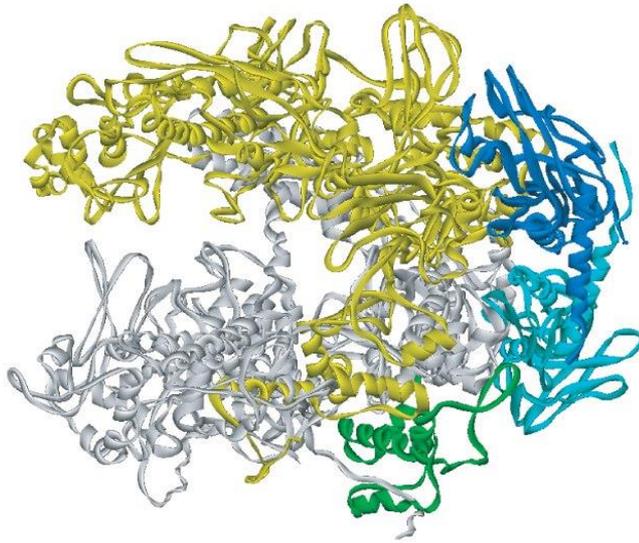


RNA Polimerasi II e I suoi Fattori di Trascrizione

- Tre categorie di proteine sono richieste dal promotore per la trascrizione basale:
 - RNA polimerasi II
 - Cinque fattori generali della trascrizione(GTFs)
 - Un complesso di proteine chiamato mediatore

RNA Pol batteriche ed eucariotiche a confronto

(a) Bacterial RNA polymerase



(b) Yeast RNA polymerase II

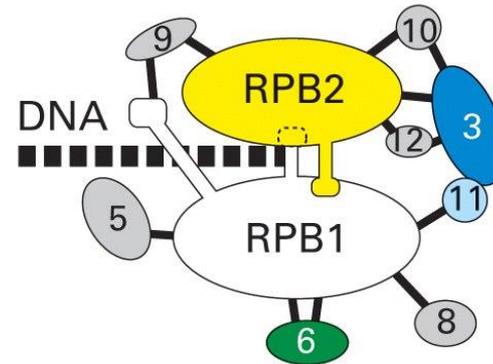
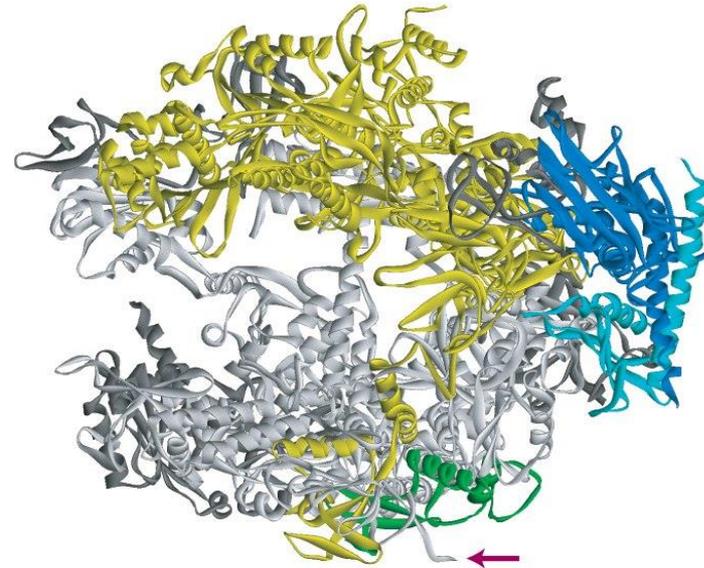


TABLE 12-1 The Subunits of RNA Polymerases

Prokaryotic		Eukaryotic		
Bacterial	Archaeal	RNAP I	RNAP II	RNAP III
Core	Core	(Pol I)	(Pol II)	(Pol III)
β'	A'/A''	RPA1	RPB1	RPC1
β	B	RPA2	RPB2	RPC2
α'	D	RPC5	RPB3	RPC5
α''	L	RPC9	RPB11	RPC9
ω	K	RPB6	RPB6	RPB6
	[+6 others]	[+9 others]	[+7 others]	[+11 others]

Note: The subunits in each column are listed in order of decreasing molecular weight.

Source: Data adapted from Ebright R.H. 2000 *J. Mol. Biol.* **304**: 687–698. Fig. 1, p. 688. © 2000 Academic Press.

Pol II

- La subunità maggiore di RNA polimerasi II ha un **dominio carbossi-terminale (CTD)**, che consiste di ripetizioni multiple di una sequenza consenso di 7 amino acidi.
- La sequenza è unica della RNA polimerasi II. Ci sono ~26 repeats nel lievito e ~50 nei mammiferi.
- In tutti gli eucarioti la attività di RNA polimerasi II è inibita da basse concentrazioni di **α -amanitina**, un octapeptide bi-ciclico.
- RNA polimerasi I non è inibita.

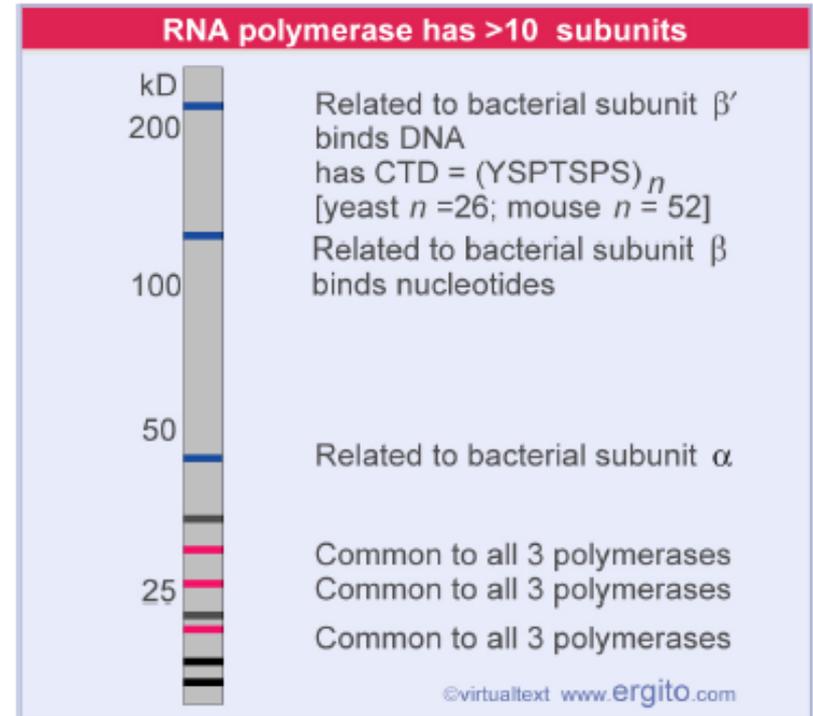


Figure 21.2 Some subunits are common to all classes of eukaryotic RNA polymerases and some are related to bacterial RNA polymerase.

mRNA di procarioti ed eucarioti

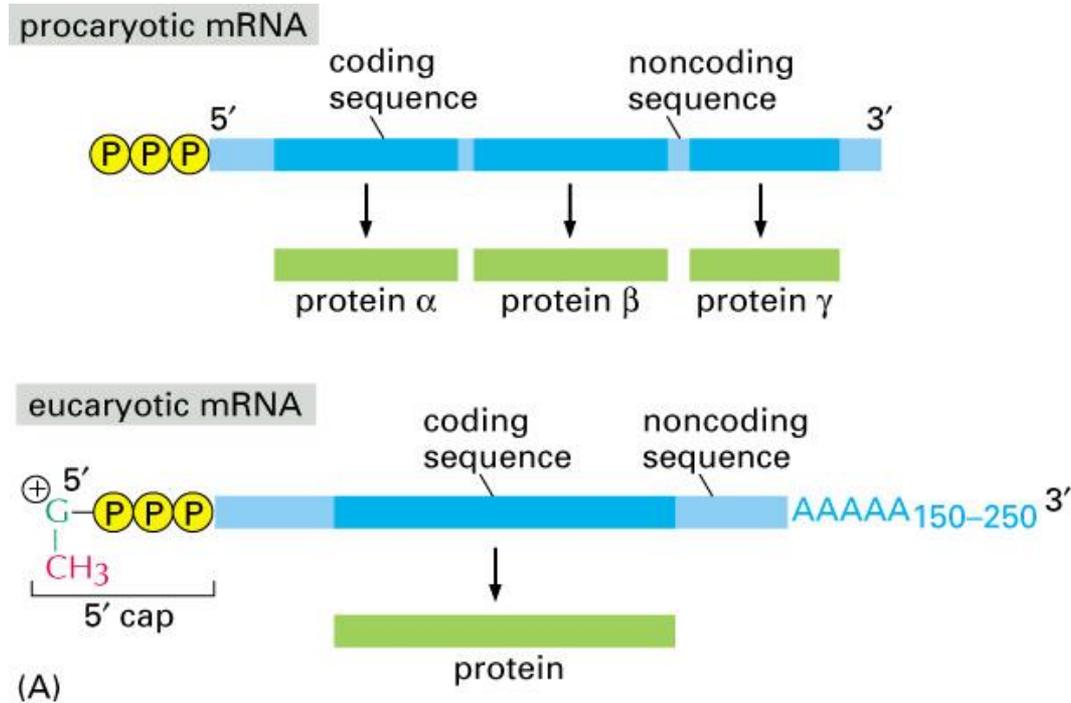


Figure 6-22 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

I GTFs hanno la funzione di σ

- I fattori generali della trascrizione (GTFs) aiutano la RNA pol a legarsi al promotore e a separare la doppia elica, a lasciare il promotore per passare alla fase di allungamento
- Il gruppo dei GTFs e della RNA pol si chiama complesso di pre-inizio (molto frequentemente è la TATA box che determina la formazione di tale complesso).

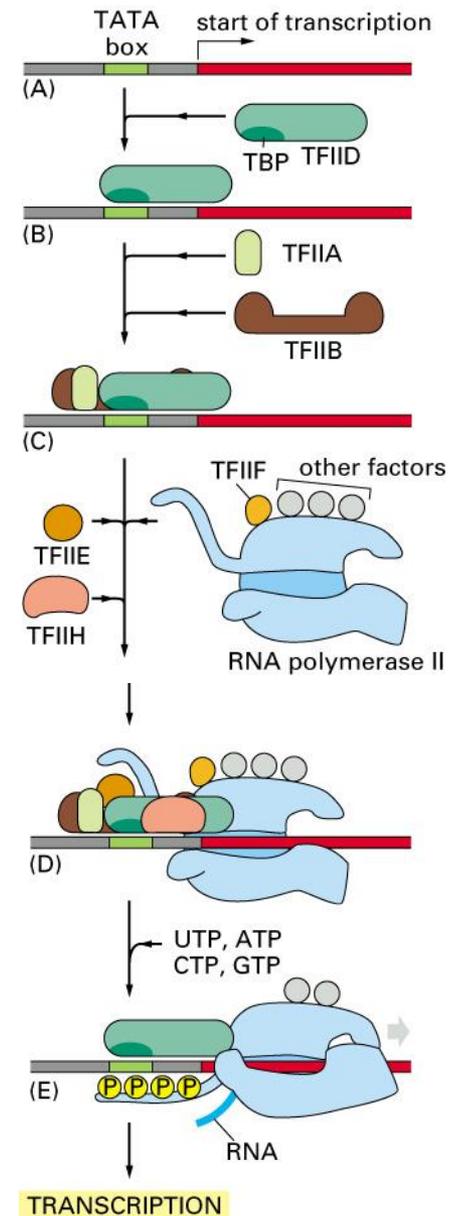
Alcuni fattori di trascrizione

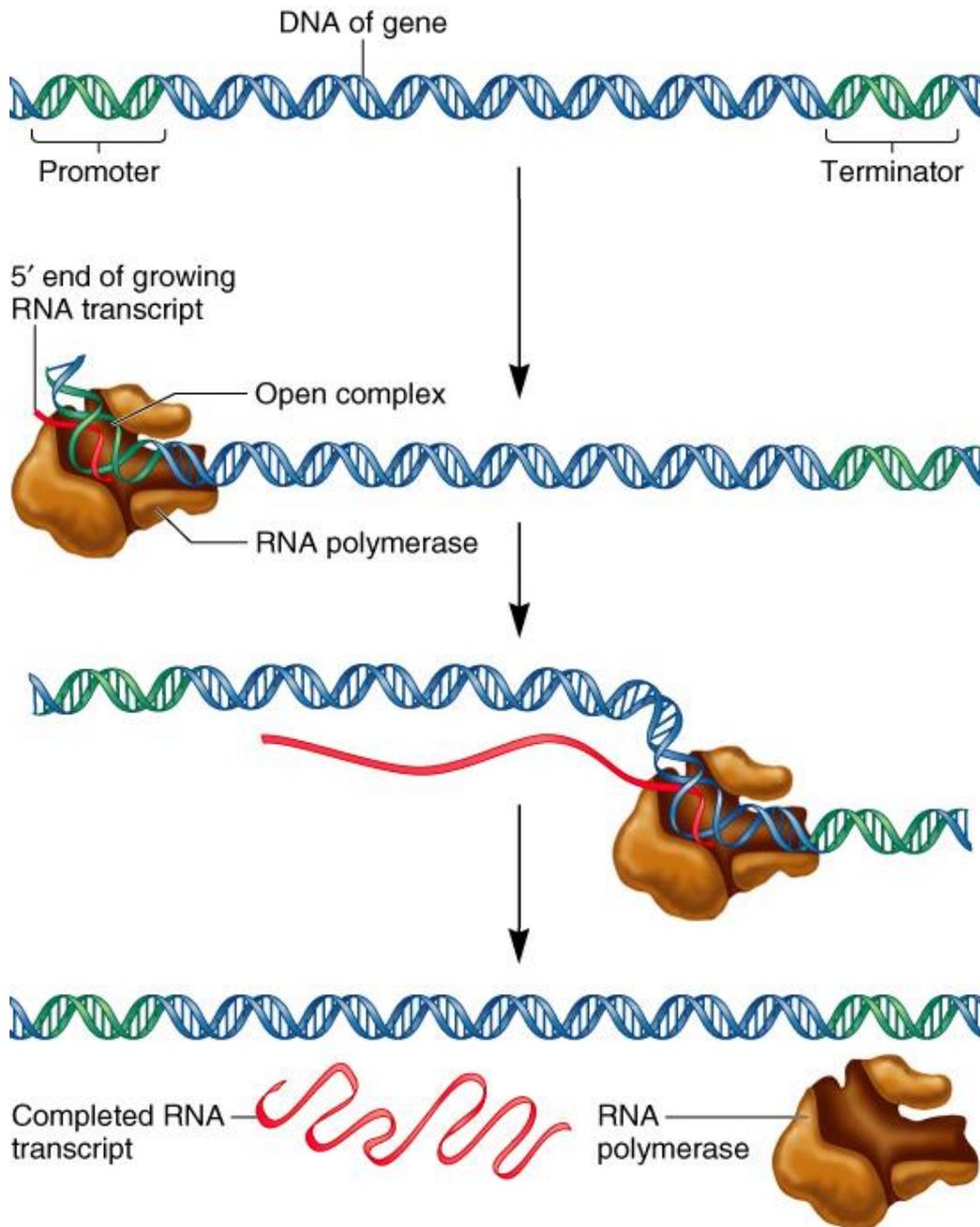
- **TAF (TBP-Associated Factors)** : TBP si associa a circa 10 TAF diversi per legare il promotore. **TFIID**: contiene TBP e fornisce la piattaforma per il reclutamento degli altri fattori.
- **TFIIB**: proteina a singola catena che entra nel complesso dopo TBP
- **TFIIF** il suo legame con Pol II è necessario per reclutare TFIIE e TFIIH
- **TFIIE- TFIIH**. TFIIE recluta TFIIH. **TFIIH è una elicasi.**

- TFIIB riconosce BRE, la TATA box, l'inziatore (Inr) e l'elemento del promotore a valle (DPE, DCE e MTE)
- In genere un promotore contiene solo alcuni di questi elementi (es. TATA o DPE)
- Inr è comunemente trovato con TATA e con DPE.
- Altre sequenze sono quelle regolatrici: UAS(upstream activator sequences), enhancer, silencers, elementi di confine (boundary elements) e isolatori (insulators) che legano proteine attivatrici o repressori della trascrizione

Inizio della trascrizione in eucarioti: pol II

- Per iniziare la trascrizione le pol eucariotiche necessitano l'aiuto di un gran numero di proteine “**General Transcription Factors**” (GTF).
- Quelli di pol II sono **TFII**
- TATA binding protein (**TBP**) è parte di **TFIID**





Initiation

- The promoter functions as a recognition site for transcription factors
- The transcription factors enable RNA polymerase to bind to the promoter forming a **closed promoter complex**
- Following binding, the DNA is denatured into a bubble known as the **open promoter complex**, or simply an **open complex**

Elongation

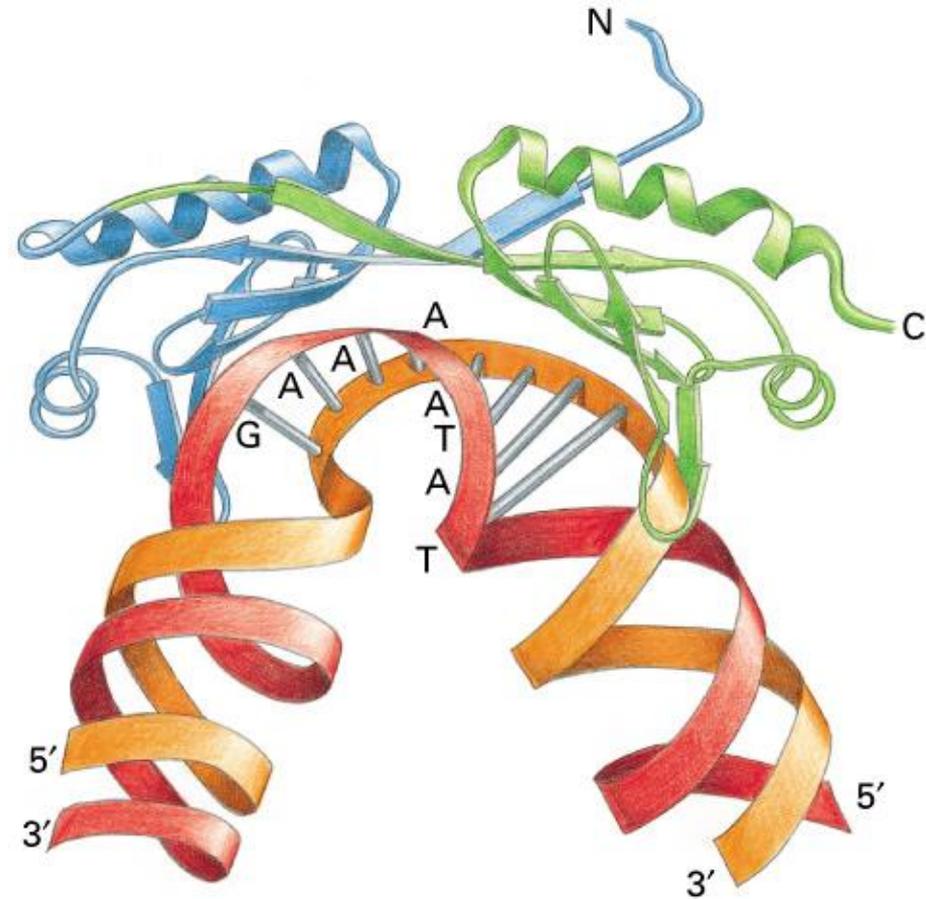
- RNA polymerase slides along the DNA in an open complex to synthesize the RNA transcript

Termination

- A termination signal is reached that causes RNA polymerase to dissociate from the DNA

TATA-Binding protein(TBP)

- **TBP è una subunità** di TFIID. E' composta da due domini simili. Lega TATA box e ripiega il DNA dando così un segnale agli altri general TF
- TFIID, è fatto da TBP e **11 TAFs (TBP associated factor)**, con una massa totale di **~800 kD**
- TBP lega il DNA nella **minor groove**, con un dominio beta, lo distorce e lo allarga.



TBP lega il DNA in un modo inusuale

- TBP si lega alla TATA box nel **minor groove** of DNA e usa il β -foglietto per contattarlo .
- Forma una sella intorno al DNA (lo allarga) e lo piega di $\sim 80^\circ$.

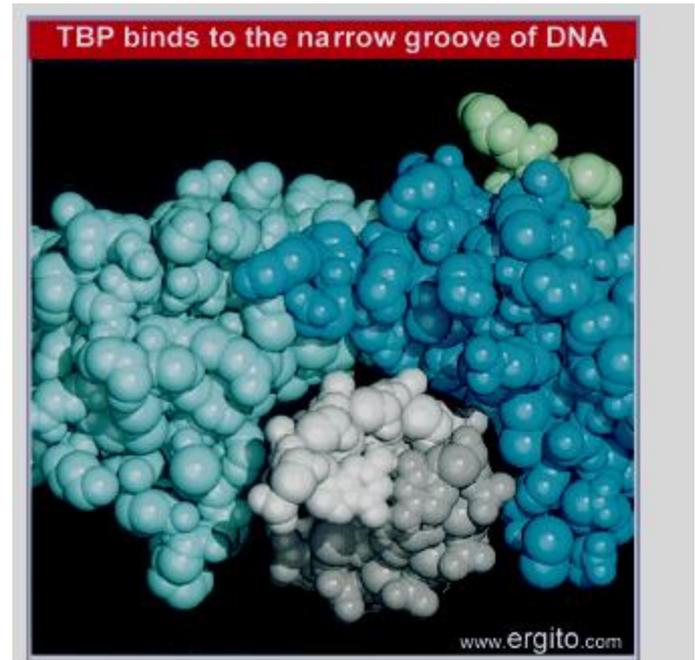


Figure 21.12 A view in cross-section shows that TBP surrounds DNA from the side of the narrow groove. TBP consists of two related (40% identical) conserved domains, which are shown in light and dark blue. The N-terminal region varies extensively and is shown in green. The two strands of the DNA double helix are in light and dark grey. Photograph kindly provided by Stephen Burley.

TATA box



TBP



1

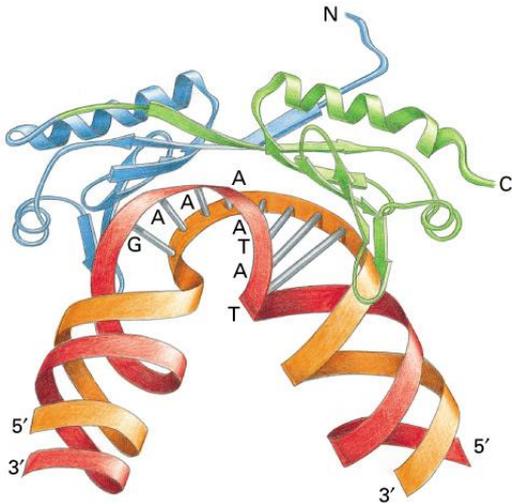
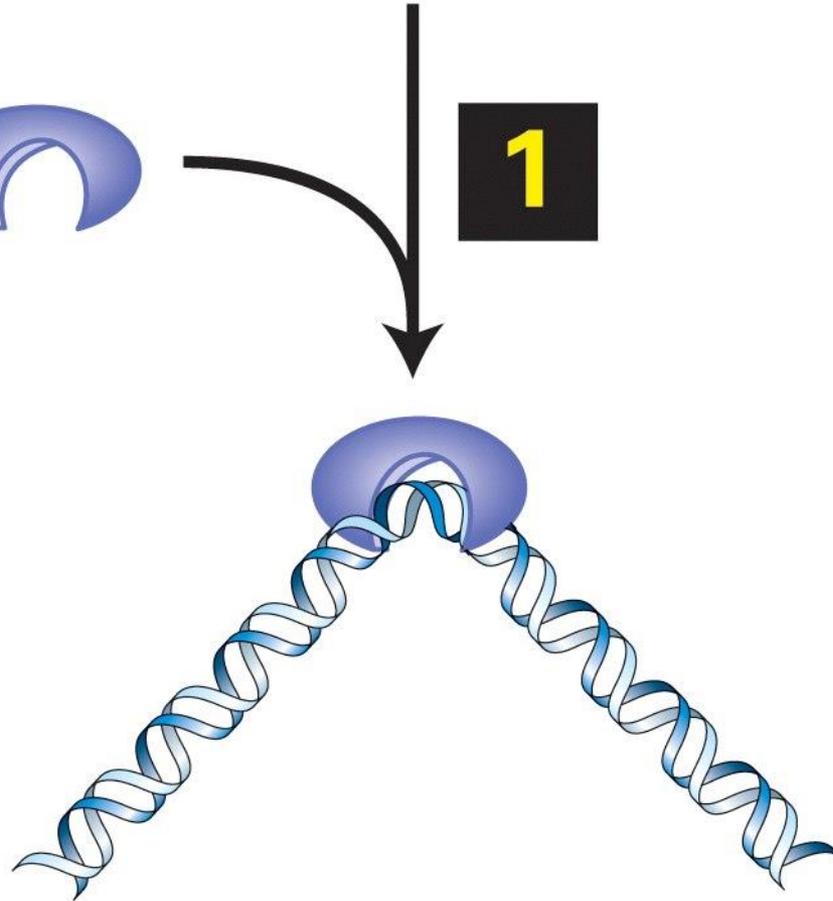
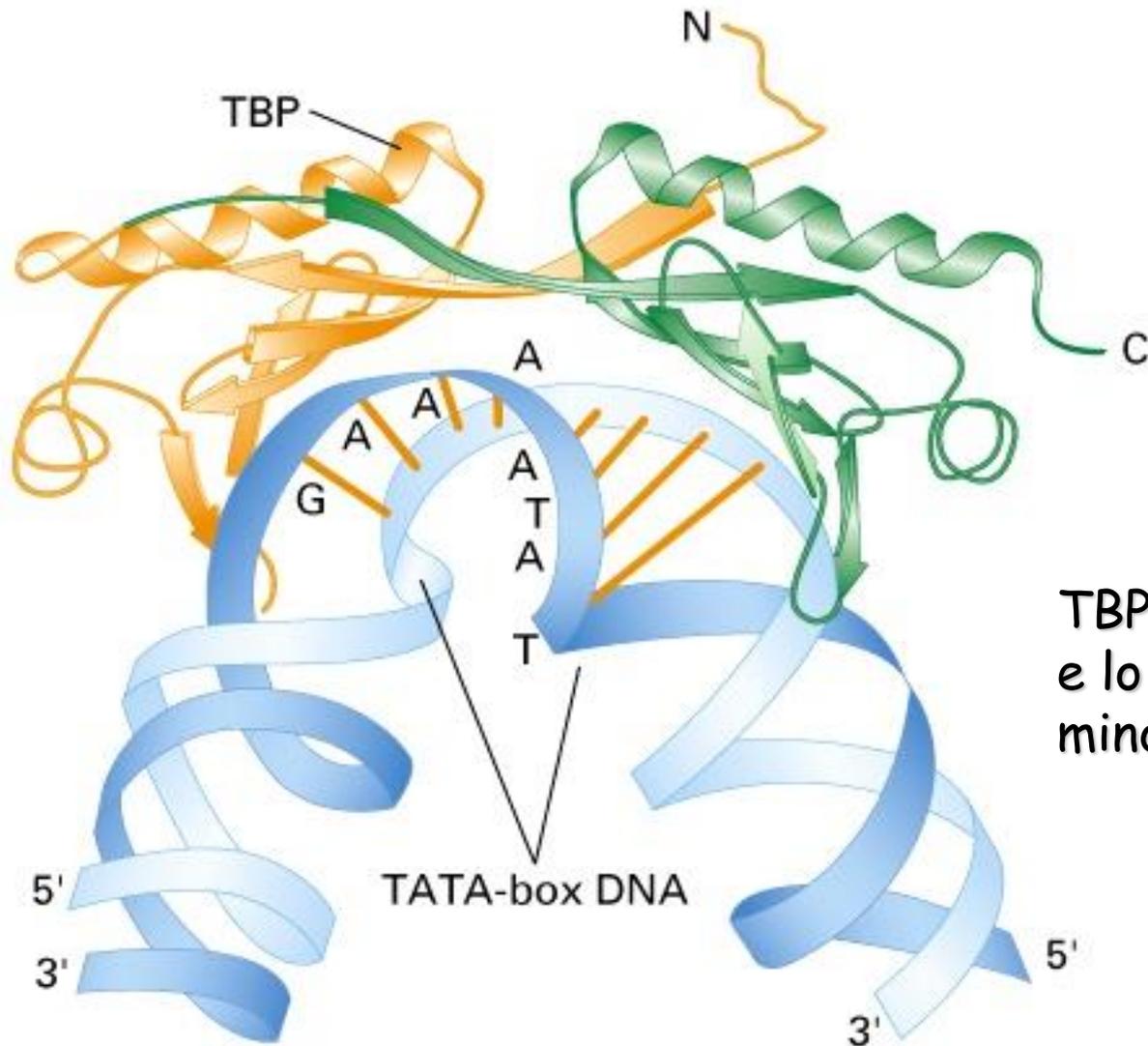
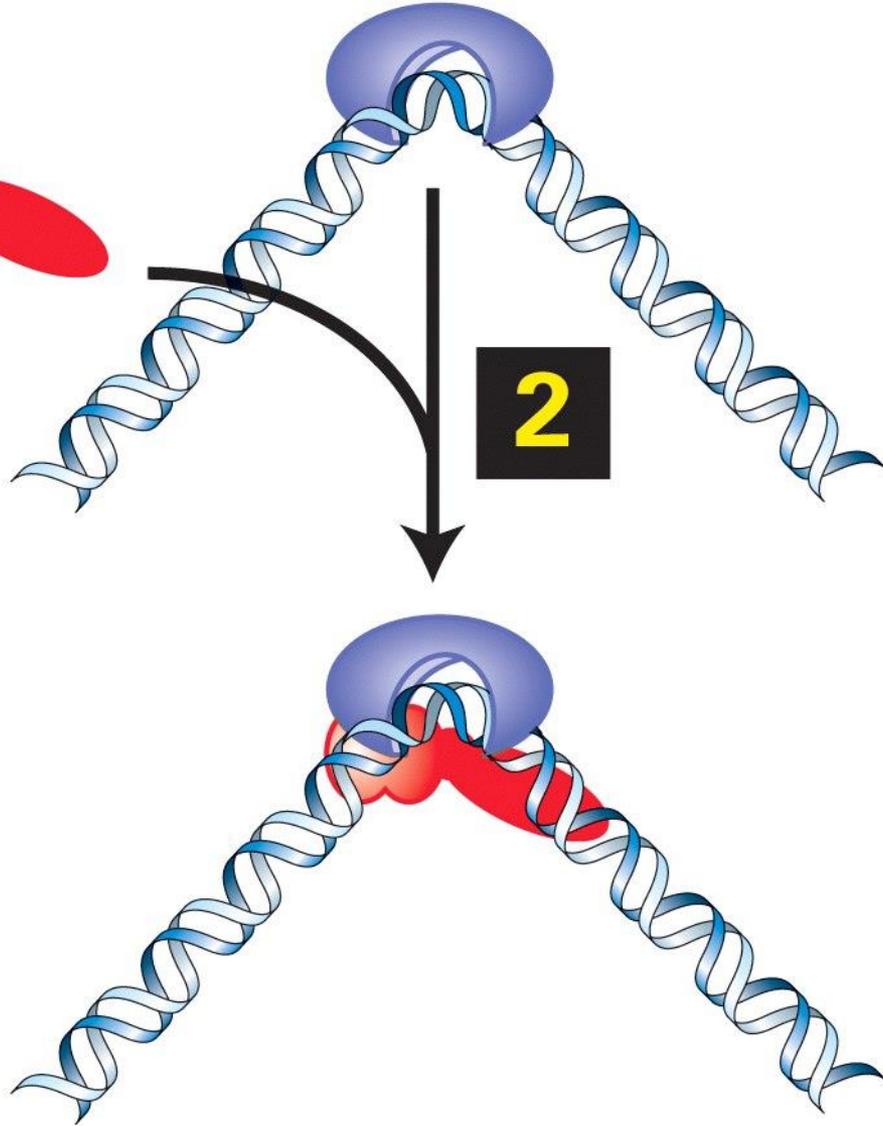
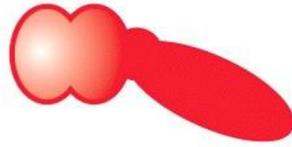


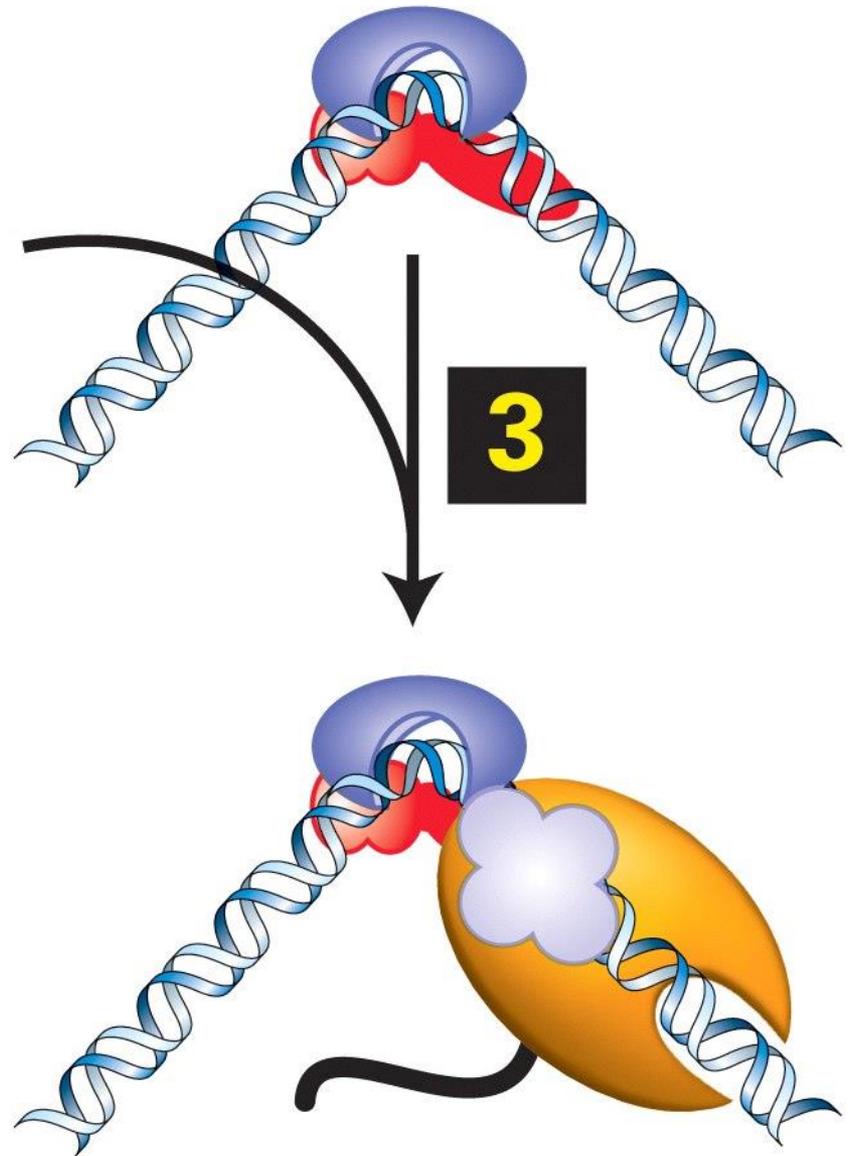
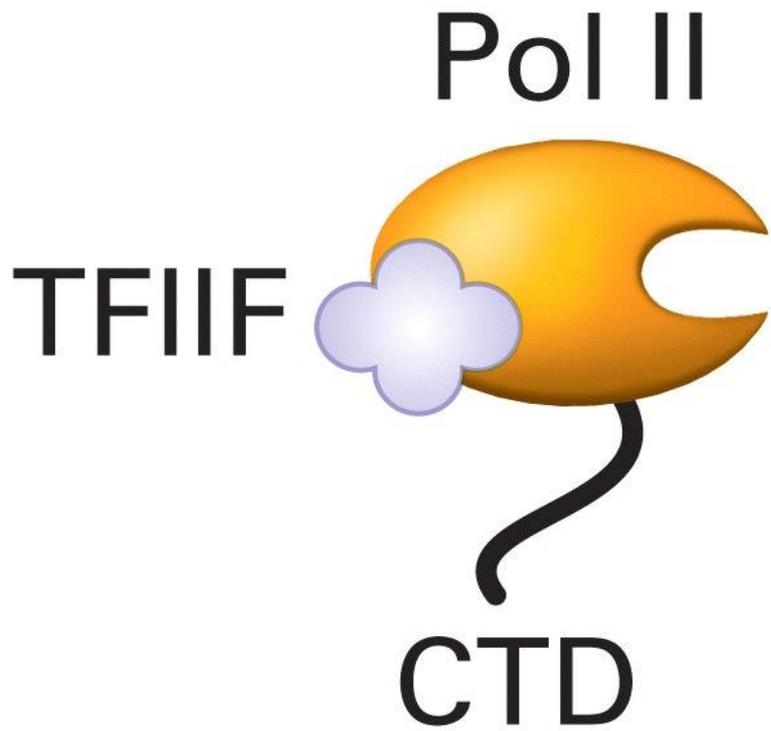
Figure 6-18. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

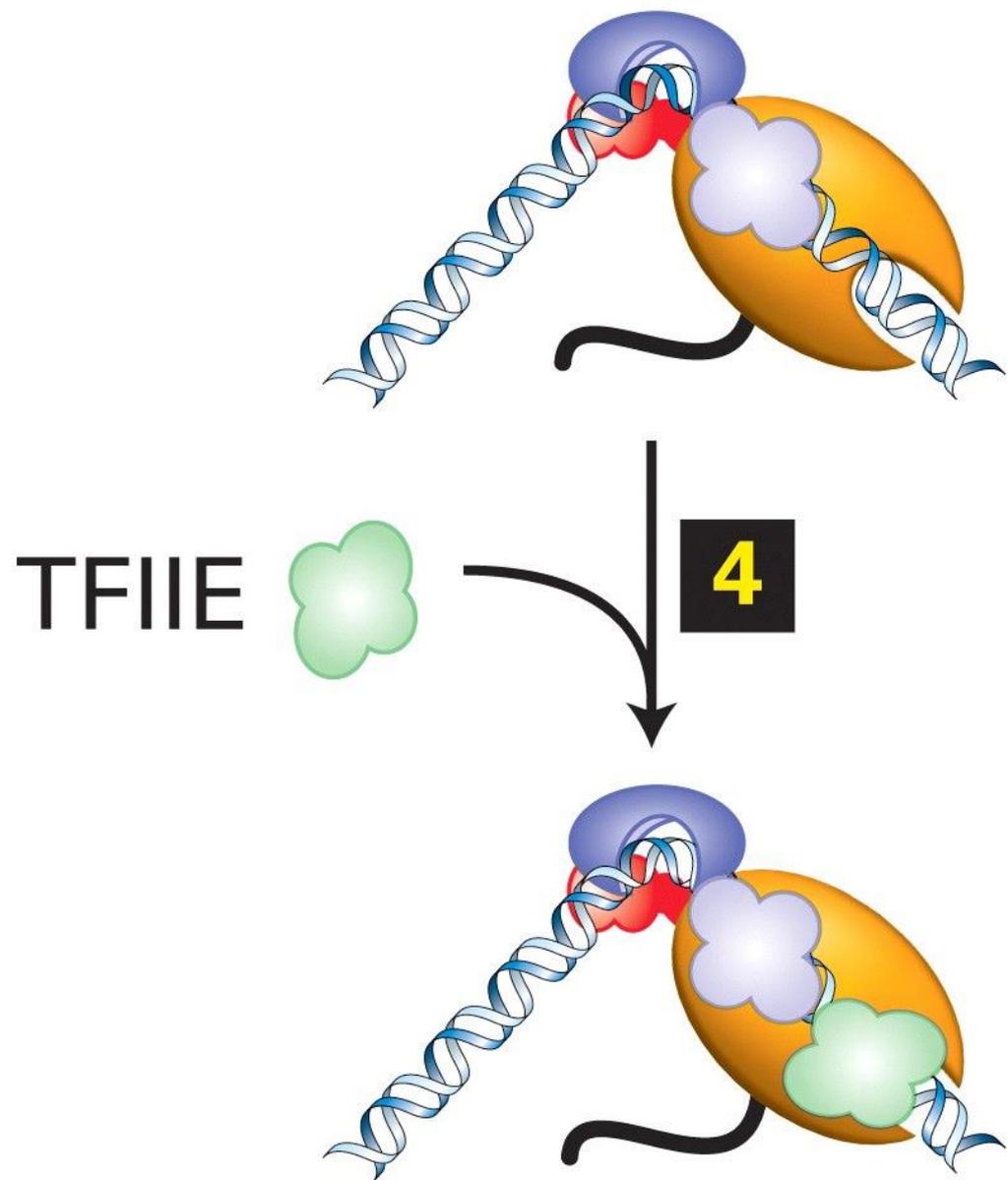


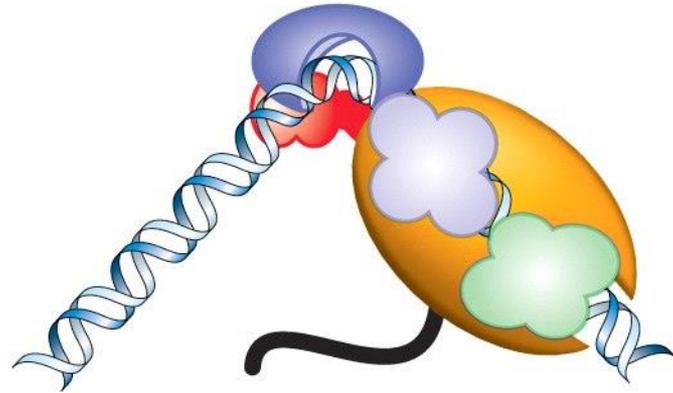
TBP piega il DNA di $\sim 80^\circ$
e lo forza ad aprire il
minor groove.

TFIIB



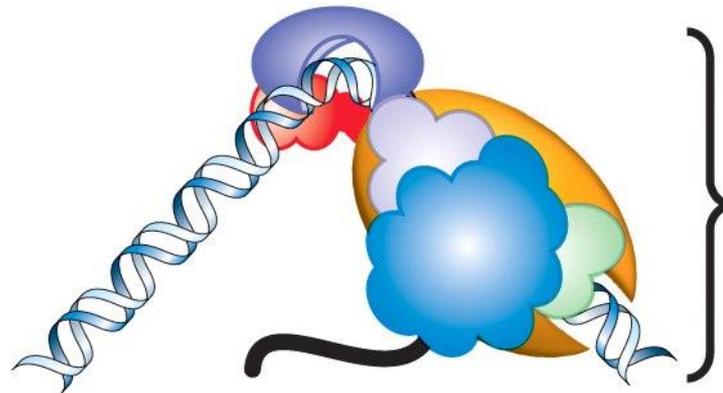




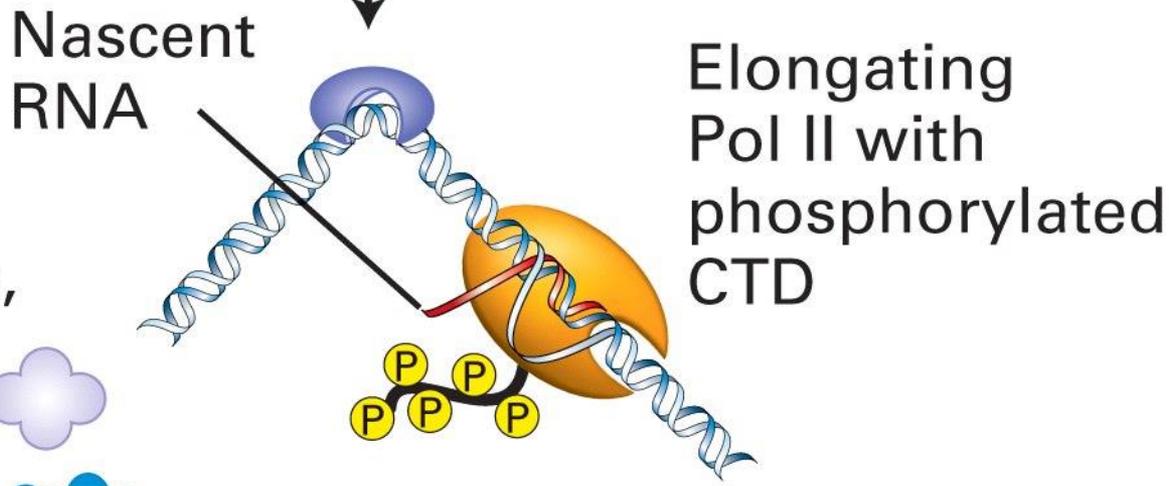
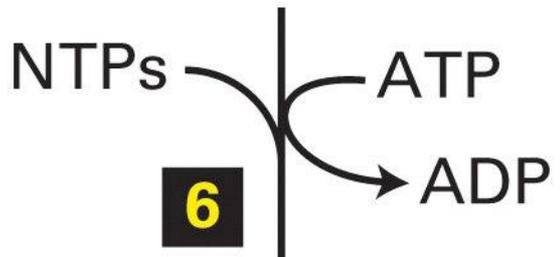
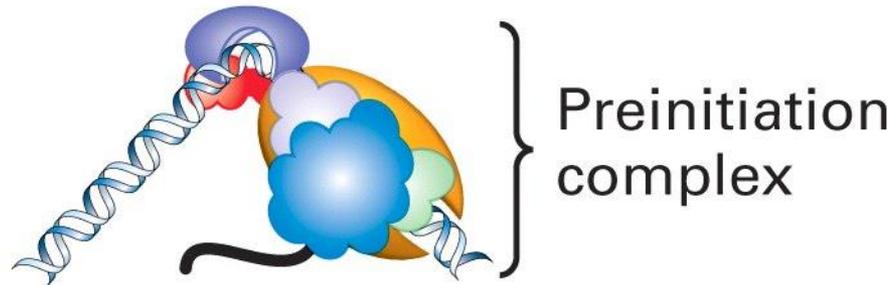


TFIIH 

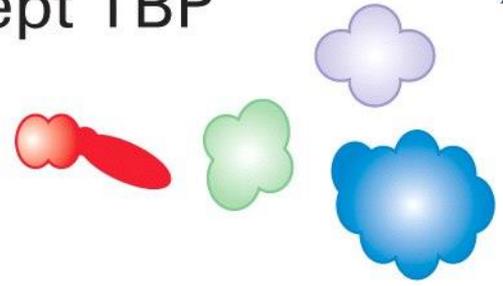
5



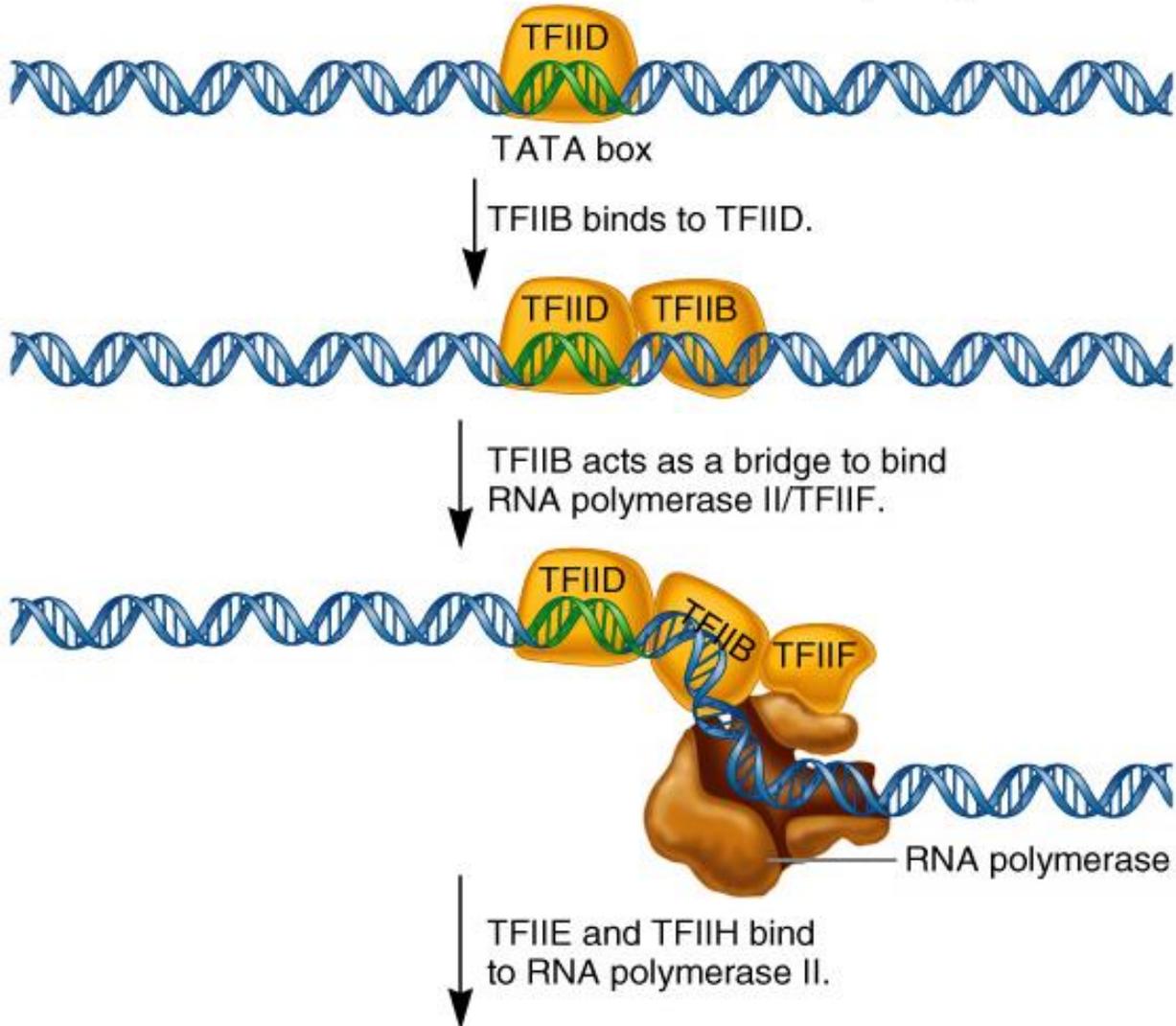
Preinitiation complex

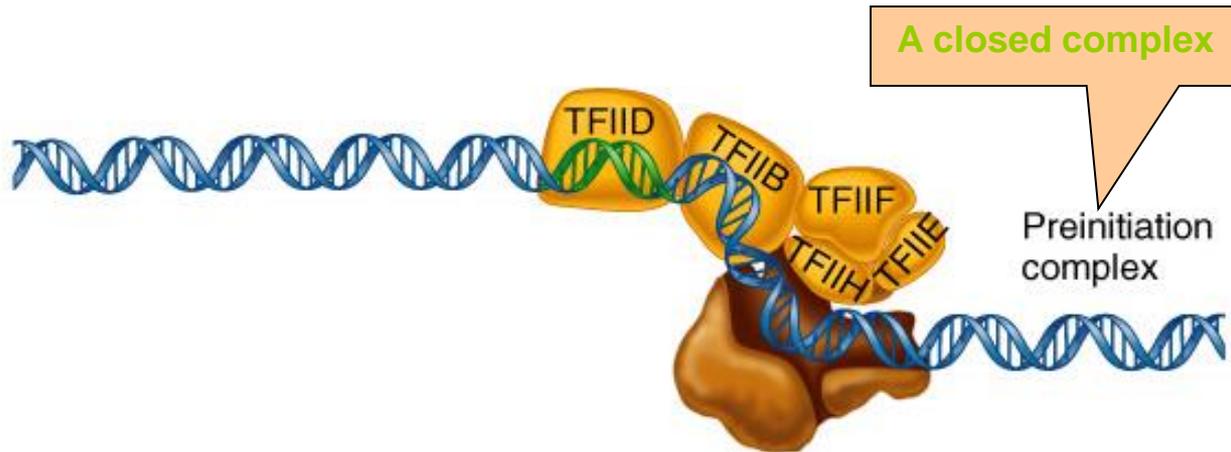


Release of general factors, except TBP



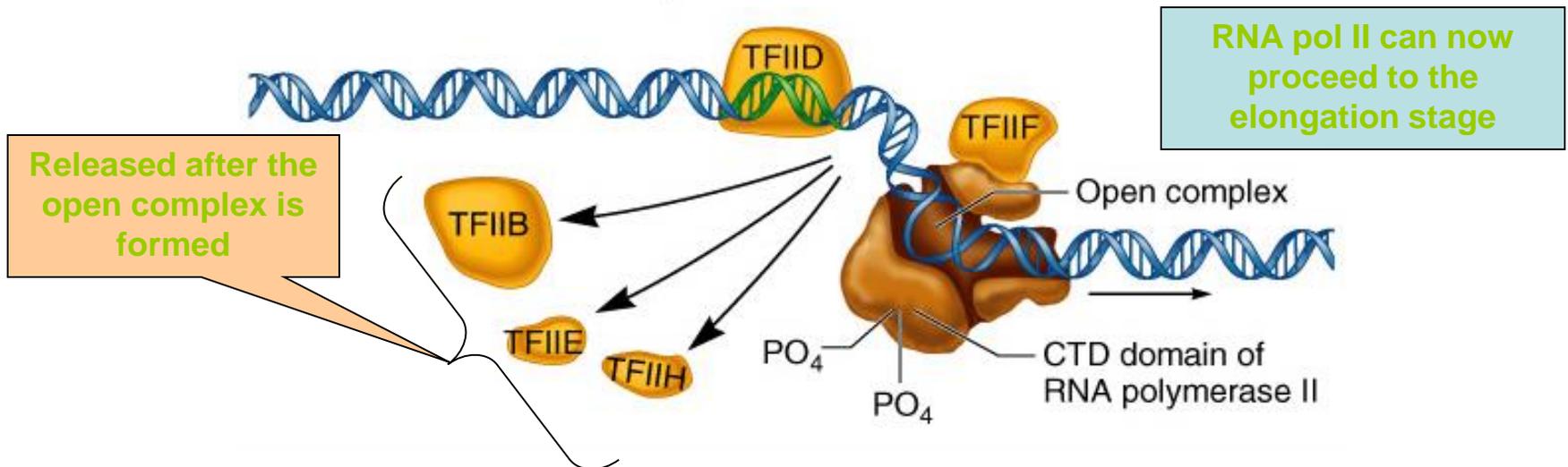
TFIID binds to the TATA box. TFIID is a complex of proteins that includes the TATA binding protein (TBP) and several TBP-associated factors (TAFs).





- TFIIH plays a major role in the formation of the open complex
 - It has several subunits that perform different functions

- One subunit hydrolyzes ATP and phosphorylates a domain in RNA pol II known as the carboxyl terminal domain (CTD)
 - This releases the contact between TFIIB and RNA pol II
- Other subunits act as helicases
 - Promote the formation of the open complex



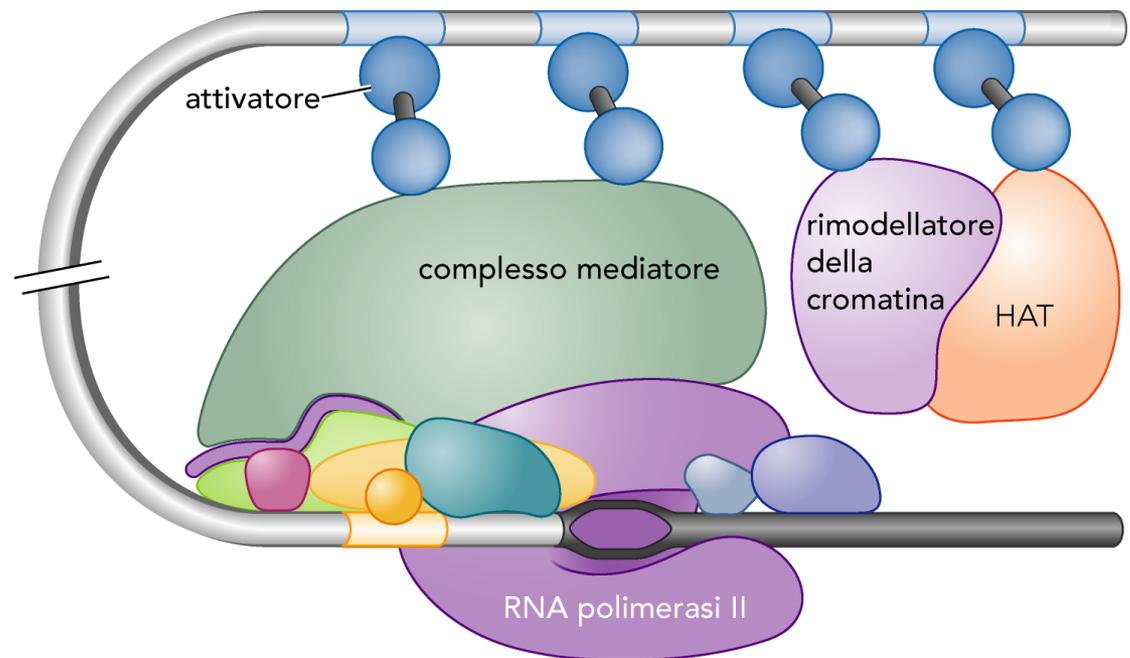
- **Apparato di trascrizione basale**
 - RNA pol II + 5 GTFs
- Il terzo componente della trascrizione è un grande complesso di proteine noto come **MEDIATORE**
 - Media l'interazione tra la RNA pol II e i vari fattori di trascrizione regolatori
 - Si associa alla coda CTD della RNA pol II e presenta superfici di legame debole per l'interazione con attivatori legati al DNA.
 - Composizione complessa e variabile (quello dell'uomo ha almeno 20 subunità). E' organizzato in moduli.

Il mediatore e gli altri complessi di proteine per la trascrizione

Transcriptional activators
aiutano l'inizio della
trascrizione

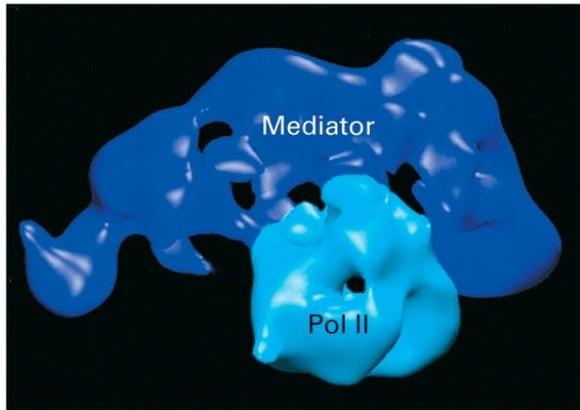
Il **Mediatore** aiuta a
comunicare activators con
pol II e GTFs

La RNA polimerasi si
associa agli **Elongating
Factors**

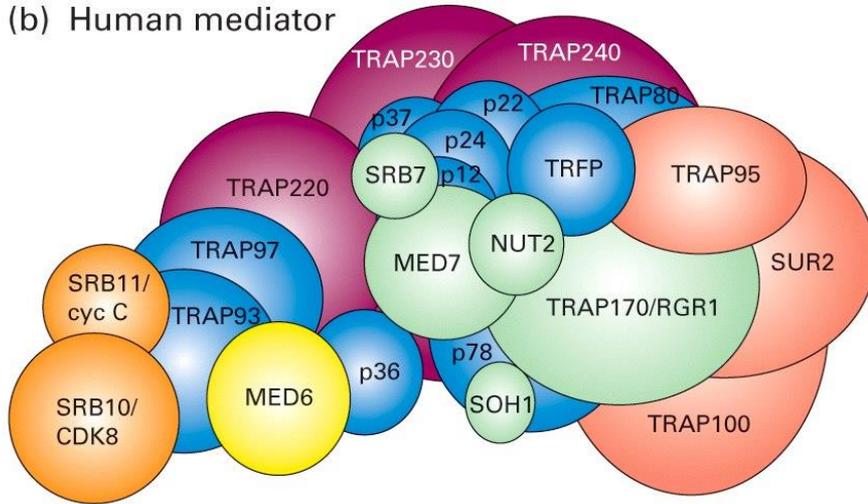


- Il mediatore serve per la trascrizione in vivo e si associa alla CTD della RNA pol II
- HAT: histone acetyltransferase

(a) Yeast mediator–Pol II complex



(b) Human mediator



Mediator subunits

Srb2
Srb4
Srb5
Srb6
Srb7

CTD-binding

Gal11
Rgr1
Sin4
Pgd1
Rox3
Nut1
Nut2
Cse2

repression

Med1
Med2
Med4
Med6
Med7
Med8
Med11

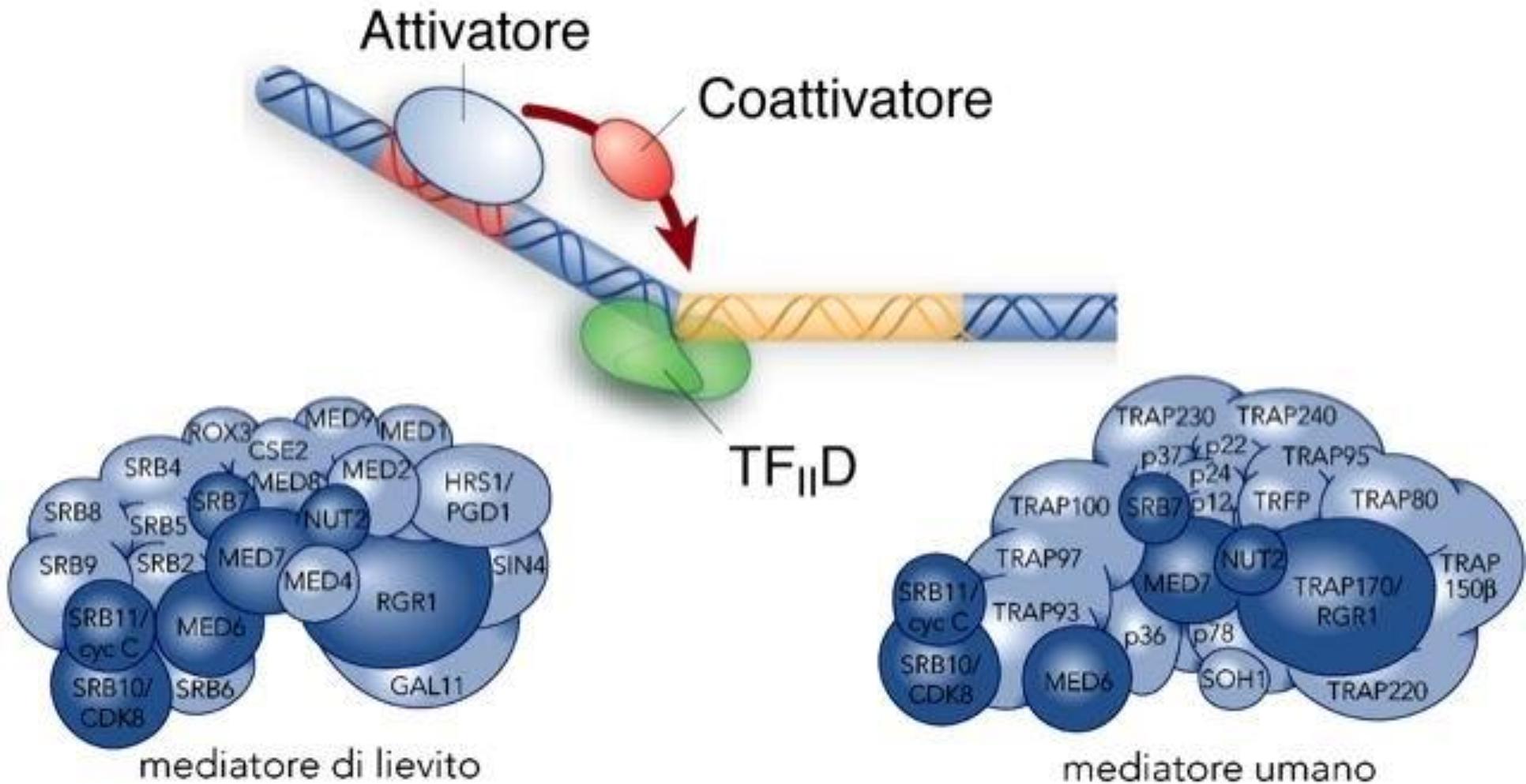
activation

Il mediatore è **esclusivo degli eucarioti** e serve da “ponte molecolare” per connettere gli attivatori trascrizionali legati agli enhancer o ad altri **elementi regolatori a lungo raggio** alla RNA pol II.

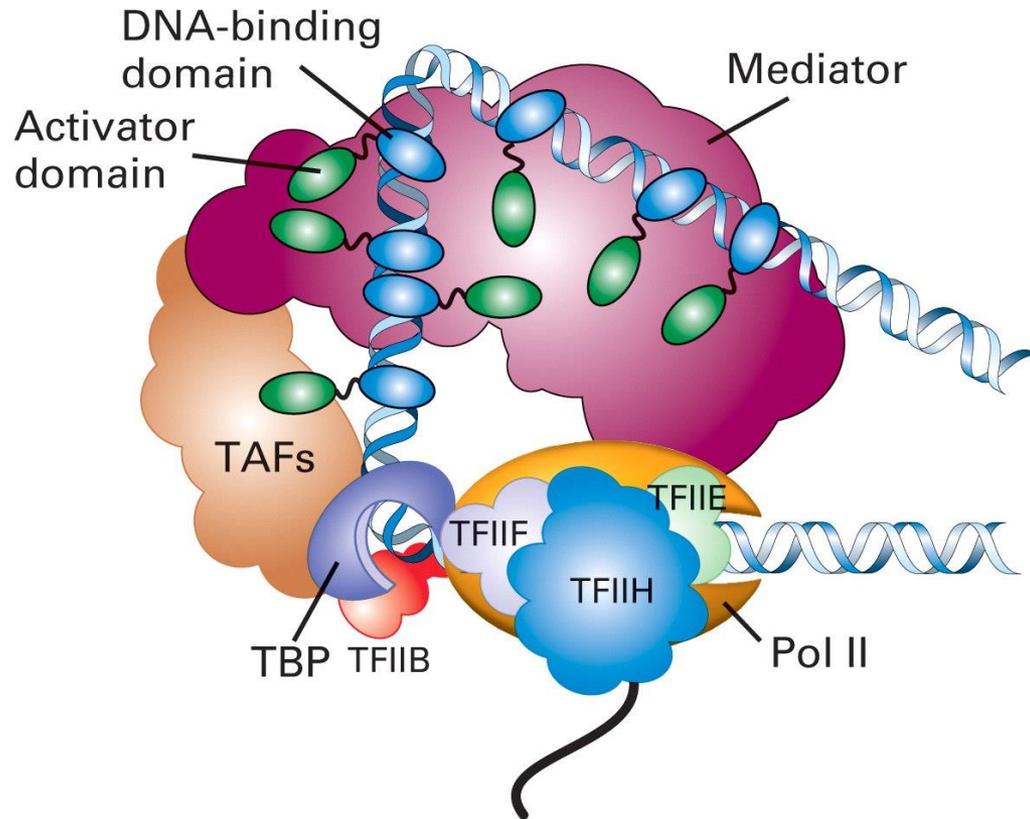
Non è necessario per la trascrizione basale e quindi non è un fattore generale di trascrizione.

E' un componente del complesso di pre-inizio e stimola anche l'attività di TFIIF

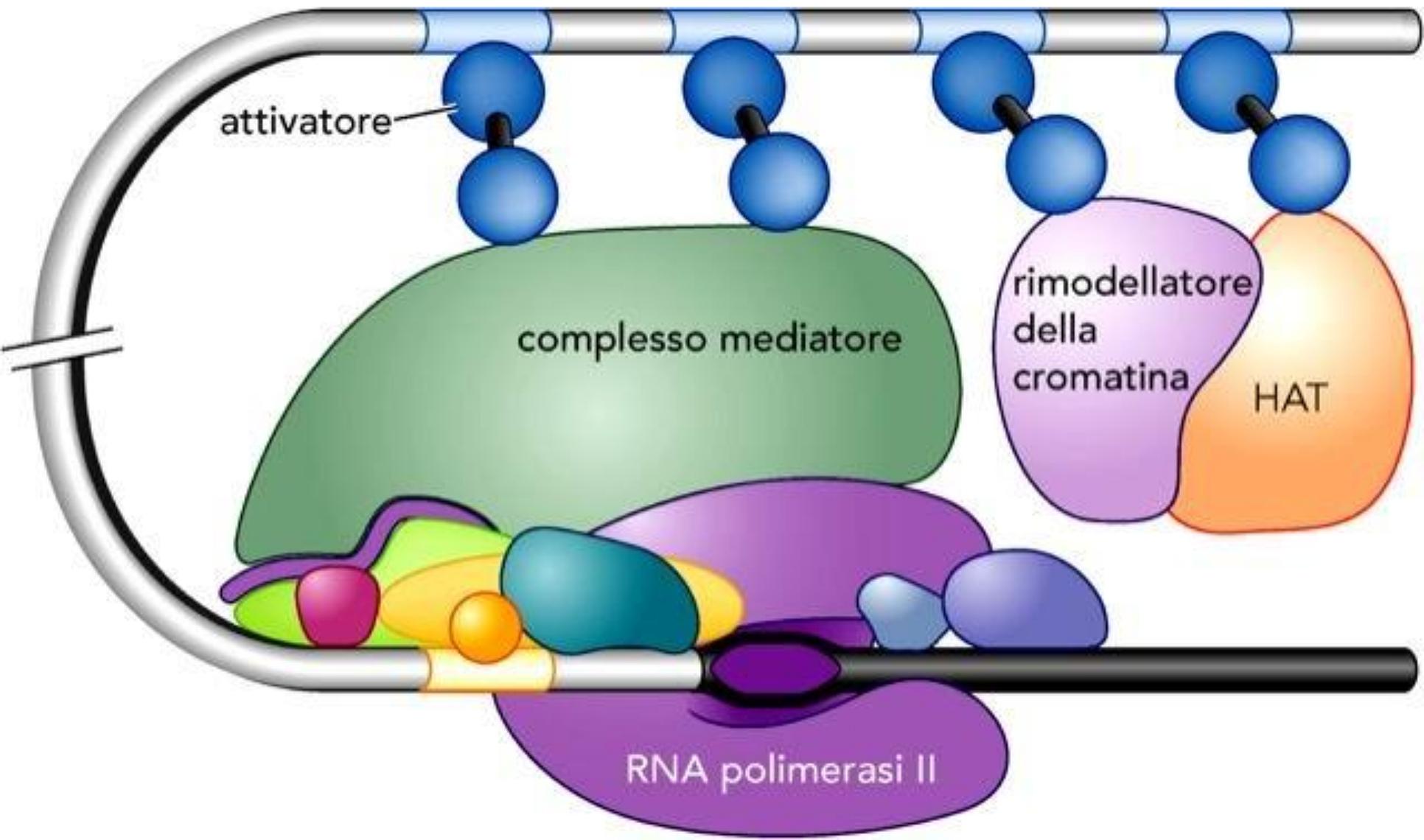
Attivazione trascrizionale tramite complessi "mediatori"



La maggior parte dei complessi del mediatore agiscono da **co-attivatori** trascrizionali, esiste però un complesso del mediatore che funge da **repressore** e uno che può agire **sia da repressore che da attivatore**



Il complesso d'inizio di Pol-II



In generale.....

- * I fattori di trascrizione sono proteine che legano specifiche sequenze di DNA ai promotori dei geni e agli elementi di regolazione che mediano l'attivazione o la repressione specifica della trascrizione.
- * I co-attivatori e i co-repressori sono proteine che fanno aumentare o diminuire l'attività di trascrizione tramite interazioni proteina-proteina senza legarsi direttamente al DNA. Sono necessari ma non indispensabili (senza di essi si ha la trascrizione basale).

Quindi.....

- I fattori di trascrizione marcano un gene per l'attivazione o la repressione tramite il reclutamento di co-attivatori o co-repressori
- I co-attivatori e co-repressori servono per il riconoscimento di altre proteine che andranno ad alterare la struttura della cromatina modificandola.
- La trascrizione è mediata dall'azione collettiva di fattori di trascrizione che insieme al macchinario basale, ad un assortimento di co-regolatori e a fattori che mobilizzano i nucleosomi e modificano gli istoni e altre proteine, permette la sintesi e le modificazioni del mRNA

- **TFIID**: contiene TBP e fornisce la piattaforma per il reclutamento degli altri fattori.
- TFIIB**: orienta il complesso sul promotore (si lega con un'estremità di TBP e con l'altra a una sequenza consenso ricca in GC).
- TFIIE, TFIIF, TFIIH**: completano la formazione del complesso di pre-inizio caricando adeguatamente la RNA pol II e il mediatore sul promotore. TFIIH è il più complesso dei fattori, ha attività chinasi ed elicasi e funziona anche nella riparazione del DNA (sia nei procarioti che eucarioti c'è attivazione della riparazione durante la trascrizione).
- **Mediatore**: fa da ponte molecolare per i contatti con gli attivatori o i repressori della trascrizione

Human Transcription Complex

Activators

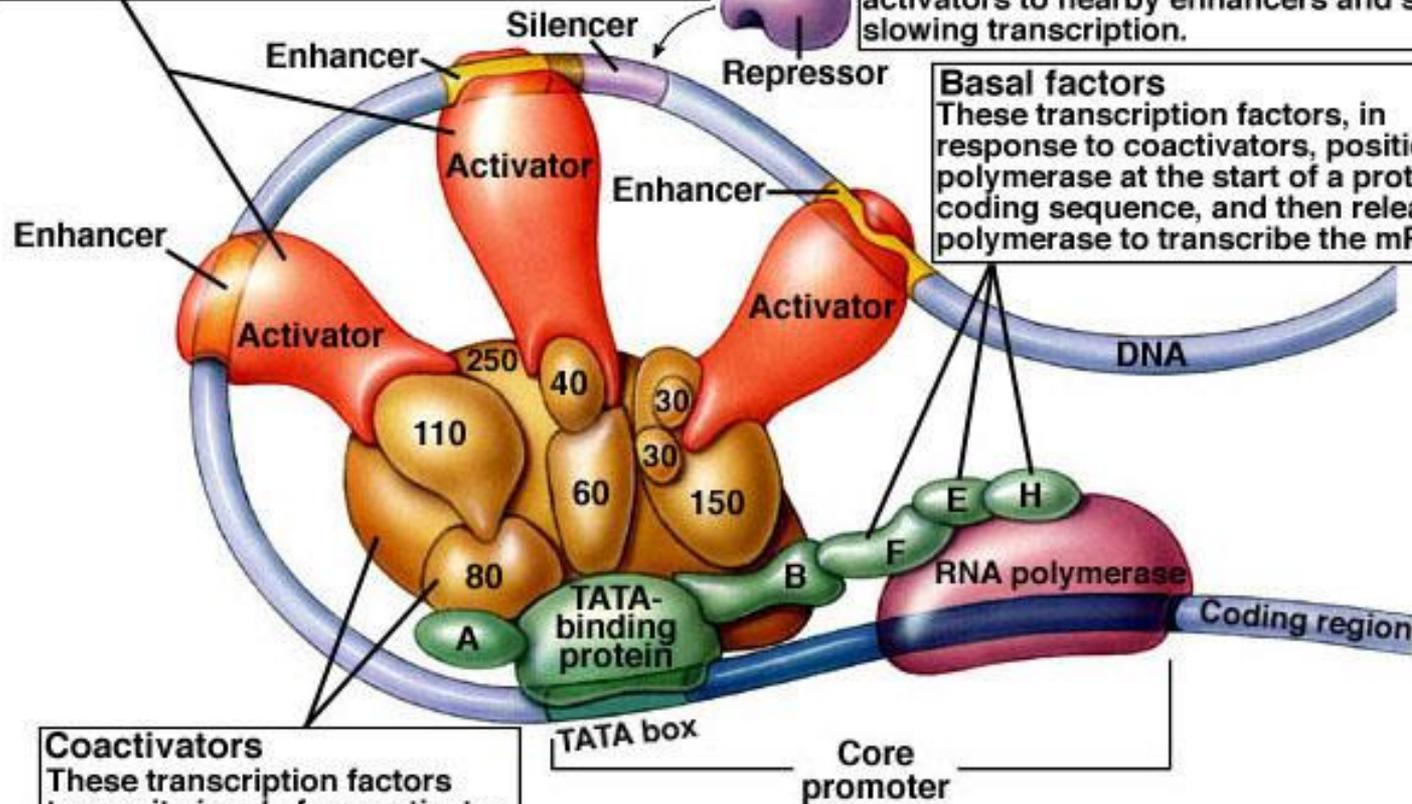
These regulatory proteins bind to DNA at distant sites known as enhancers. When DNA folds so that the enhancer is brought into proximity with the transcription complex, the activator proteins interact with the complex to increase the rate of transcription.

Repressors

These regulatory proteins bind to "silencer" sites on the DNA, preventing the binding of activators to nearby enhancers and so slowing transcription.

Basal factors

These transcription factors, in response to coactivators, position RNA polymerase at the start of a protein-coding sequence, and then release the polymerase to transcribe the mRNA.



Coactivators

These transcription factors transmit signals from activator proteins to the basal factors.

Il dominio C-terminale della RNA pol II (CTD)

E' necessario per la modificazione del mRNA

Subisce fosforilazione dinamica (catalizzata da TFIIF e altre chinasi)

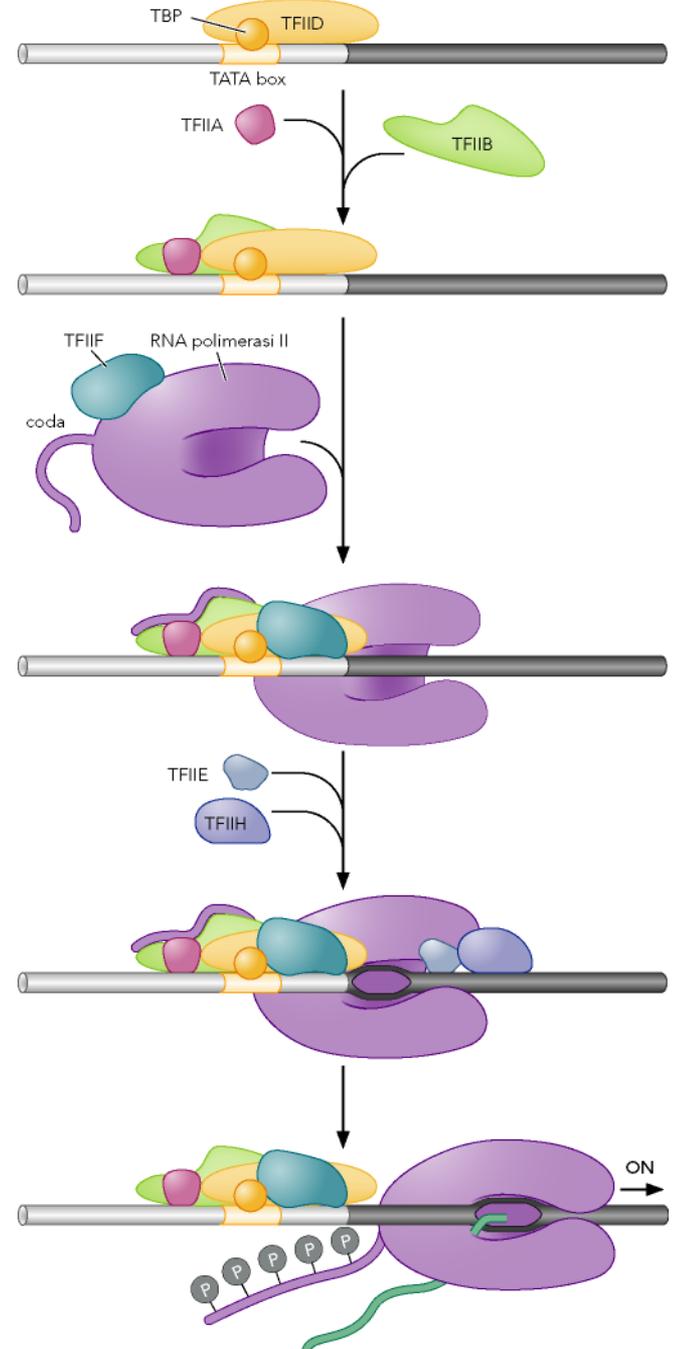
All'inizio della trascrizione non è fosforilato

Viene fosforilato durante la fase di allungamento e allora può legare i fattori proteici che modificheranno il mRNA (il CTD è coinvolto nel processamento del mRNA durante la sua sintesi e dopo che è stato rilasciato dalla RNA pol II)

Quando la RNA pol II viene riciclata il CTD viene defosforilato

L'apparato basale si assembla sul promotore

- Il legame di **TFIID** alla TATA box è il primo step
- Altri TFs si legano **in ordine definito.**
- Quando la **RNA pol II** si lega al complesso, inizia la trascrizione.



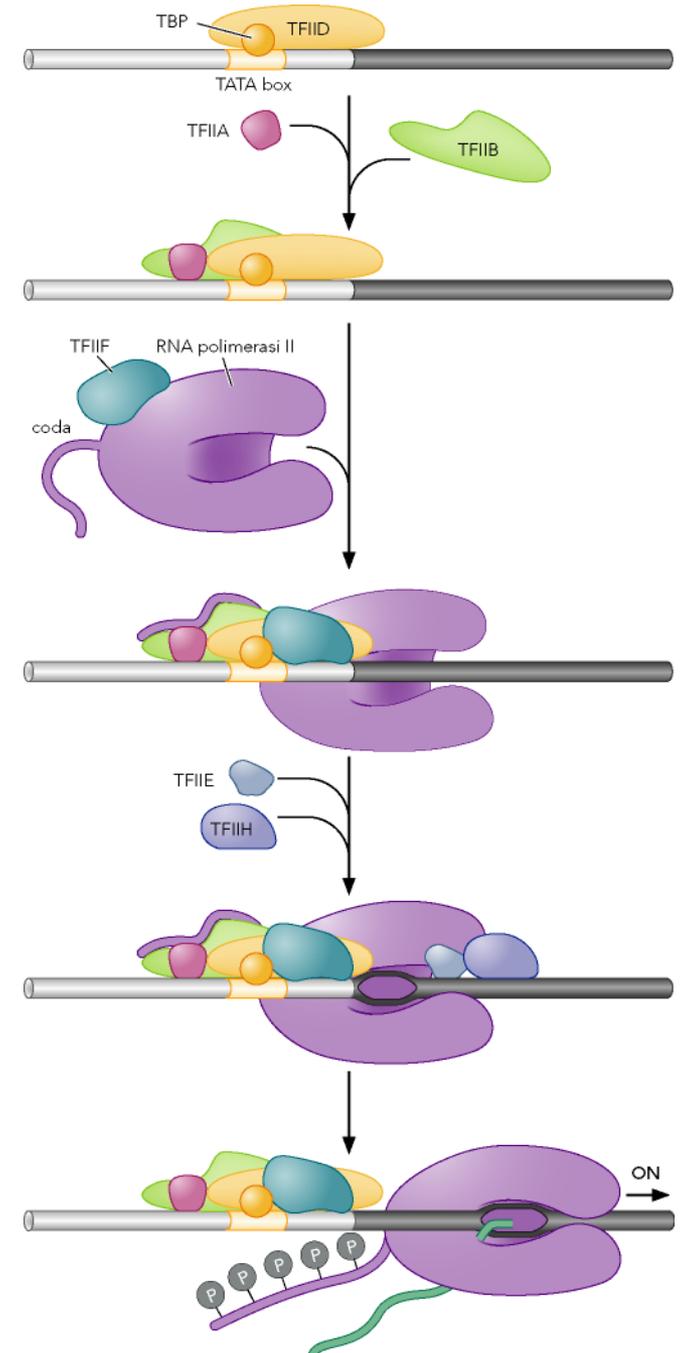
L'inizio è seguito dall'evasione dal promotore

E' l'evento principale che determina se un gene sarà espresso o meno

- **TFIIE** e **TFIIH** aprono il **DNA** (denaturazione) e permettono alla RNA pol di muoversi.
- **La fosforilazione del CTD** di RNA pol serve per iniziare l'allungamento.
- Ulteriori fosforilazioni di CTD sono richieste per la sintesi abortiva.
- La CTD coordina il processing del RNA con la trascrizione.

Durante il passaggio della RNA pol gli ottameri istonici devono essere transitoriamente modificati (rimozione del dimero H2A/H2B per lasciare un esamero che è più facile da spostare).

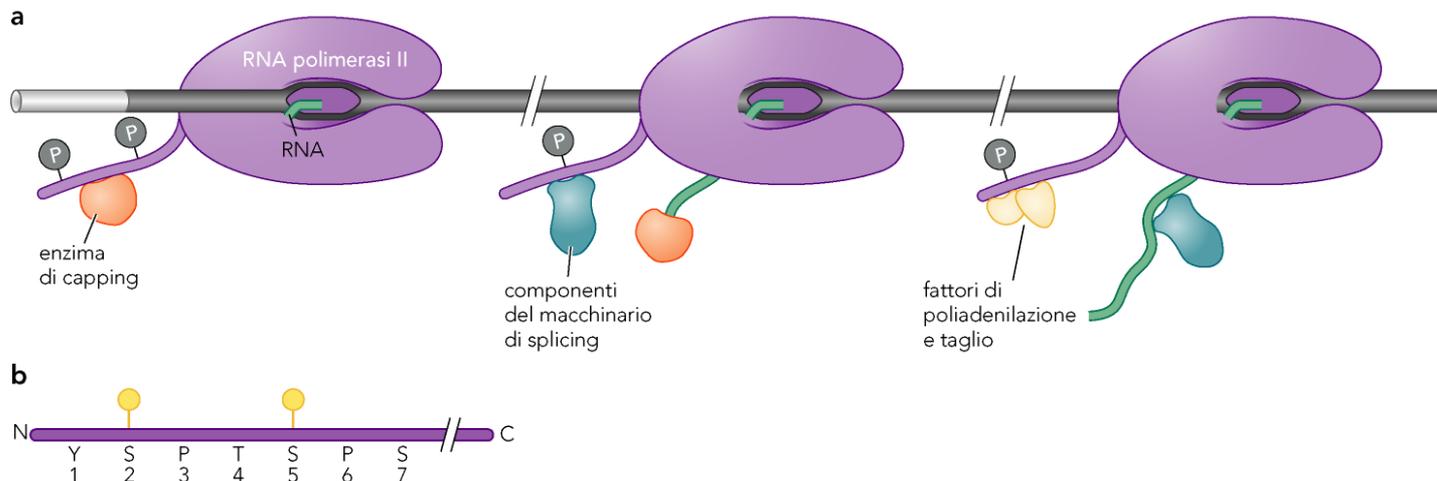
L'ottamero istonico è ricostituito dietro alla RNA pol



Fattori che stimolano l'allungamento e la correzione

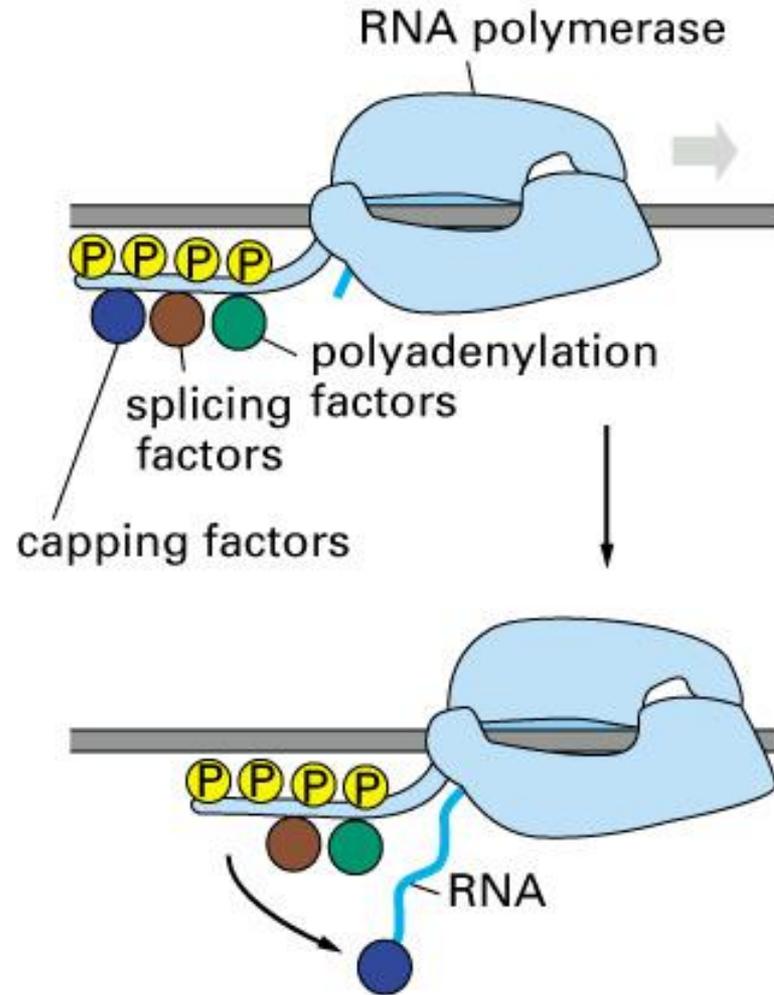
- Nell'allungamento la Pol II si libera di molti TFs e recluta altri **fattori di allungamento** (come TFIIS e hSPT5) alcuni dei quali sono necessari per la maturazione dell'RNA. Lo scambio dei fattori è mediato dalla fosforilazione della CTD della RNA pol II.
- **TFIIS** stimola l'allungamento e facilita la correzione (stimola l'attività RNasi latente della RNA pol per rimuovere i nucleotidi incorporati erroneamente all'estremità del RNA nascente). Inoltre limita le pause della RNA pol a siti definiti (questa attività è svolta anche da TFIIIF).

- Il complesso di pre-inizio è ipofosforilato
- TFIIF fosforila il CTD che è essenziale per l'inizio della trascrizione (TFIIF ha anche attività elicastica).
- La **CTD** fosforilata **recluta** gli enzimi per il **capping** e per lo **splicing**
- Il capping viene effettuato subito dopo la sua sintesi
- Alcune fosforilazioni vengono perse durante il passaggio dalla fase di inizio a quella di allungamento (la RNA pol può fermarsi se defosforilata tutta....).
- TFIIF e TFIIE non sono essenziali per la formazione di un complesso aperto o per l'allungamento ma sono richiesti per l'evasione dal promotore

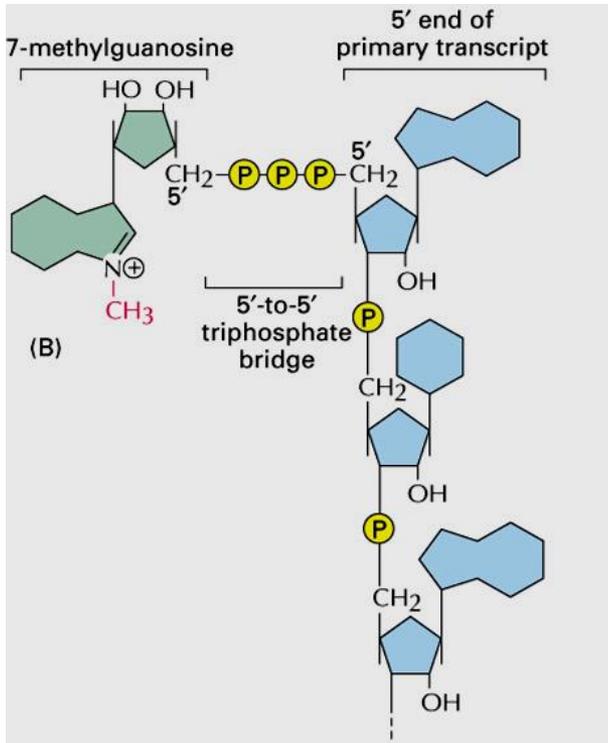


RNA factory

- Gli enzimi per il processamento del RNA sono portati dalla coda CTD della RNA Pol II.

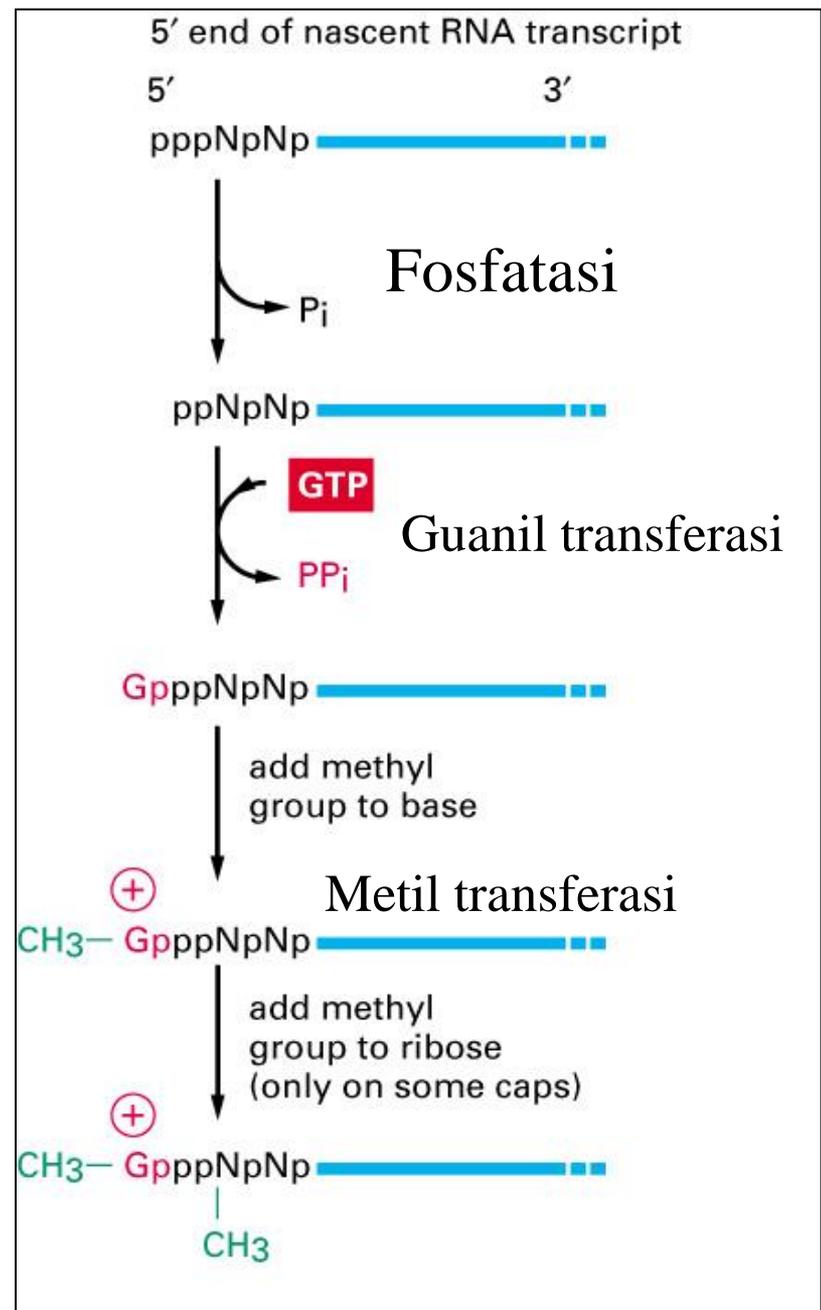


RNA capping

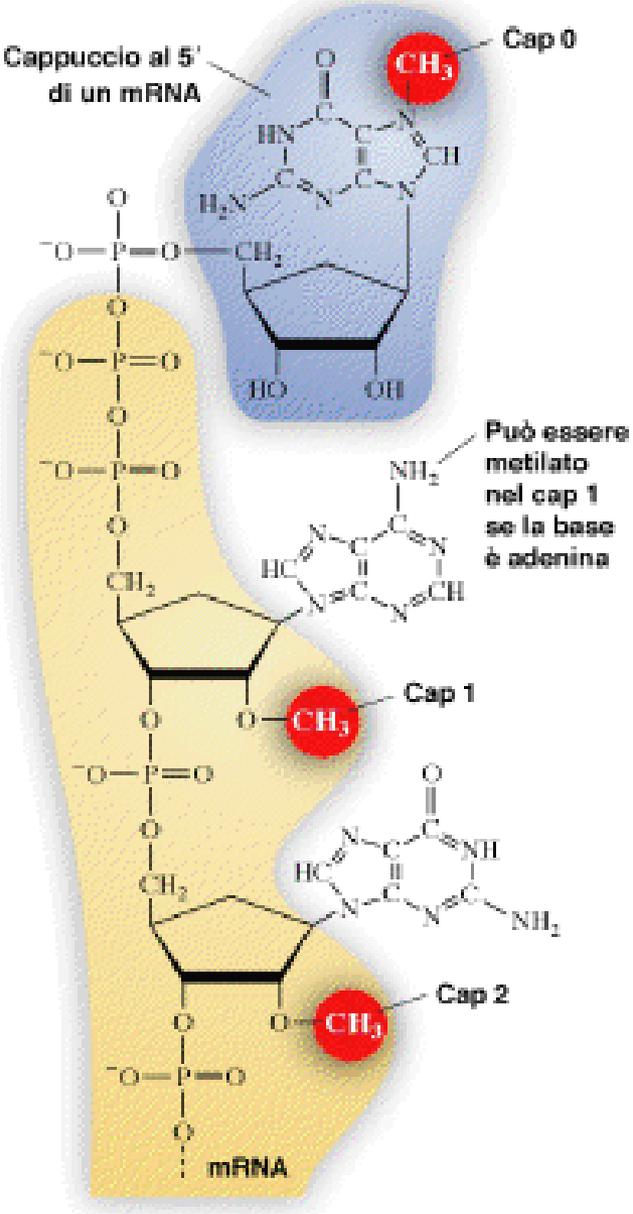


Tre enzimi:

- Fosfatasi
- Guanil transferasi
- Metil transferasi



L'mRNA eucariotico ha al 5' un cappuccio metilato



Capping

- Molti mRNAs hanno la 7-metil guanosina attaccata covalentemente al terminale 5'
- Le proteine del Cap-binding hanno un ruolo fondamentale
 - Traslocazione di alcuni RNAs dal nucleo al citoplasma
 - Inizio della traduzione
 - Splicing degli introni

Tailing

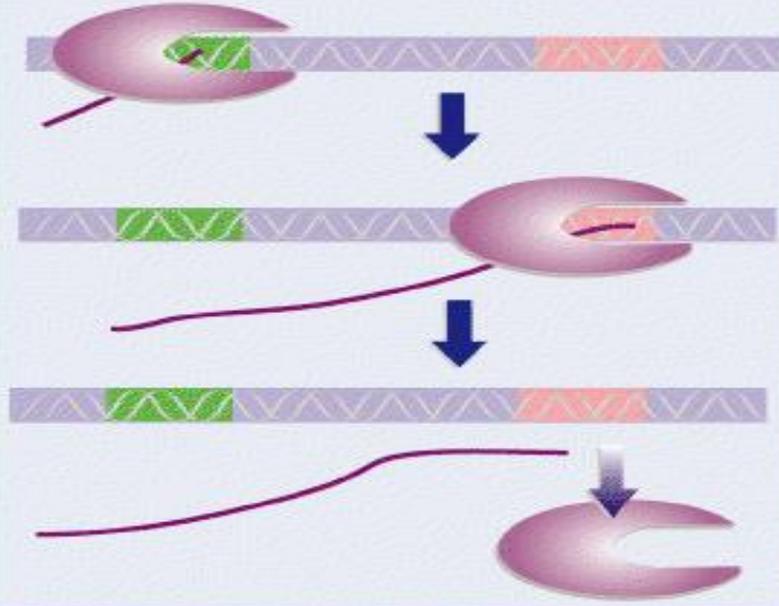
- Molti mRNA maturi hanno una coda di poli A al loro terminale 3'
- La coda di poli A non è codificata dalla sequenza del gene ma è aggiunta dopo che il gene è stato trascritto

Terminazione della trascrizione

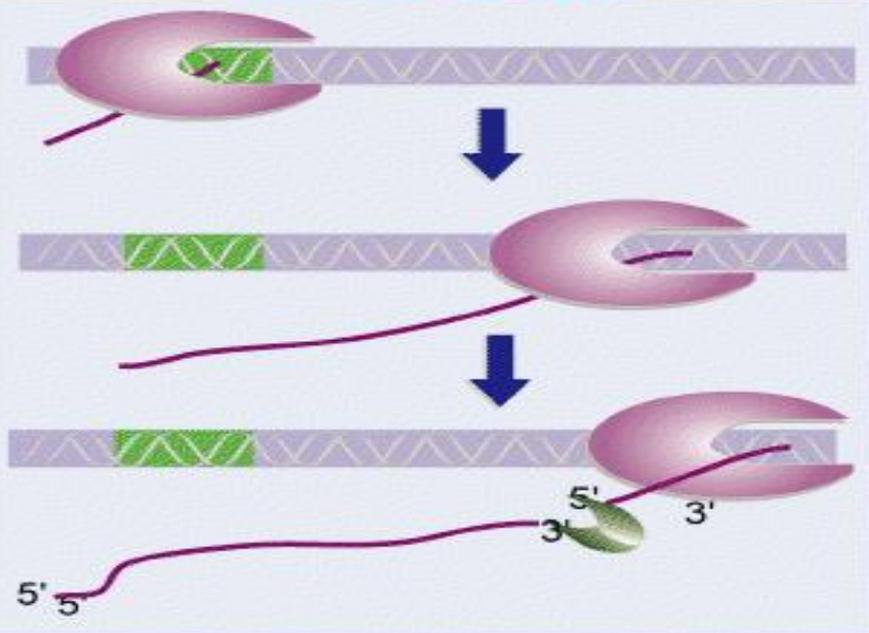
- I pre-mRNAs sono modificati mediante il taglio all'estremità 3' e successiva addizione di una coda di poliA
- La trascrizione termina 500-2000 nt a valle della sequenza segnale per poliA
- Quando viene trascritto il segnale di poliadenilazione (normalmente AAUAAA a 5-30nt a monte del segnale di taglio e poliadenilazione) ha inizio il processo di terminazione della trascrizione grazie ai cleavage and polyA specific factor (CPSF)

Un'estremità 3' può essere generata dalla terminazione

Promotore Terminatore



Un'estremità 3' può essere generata per taglio



3' terminale di mRNA eucariotici

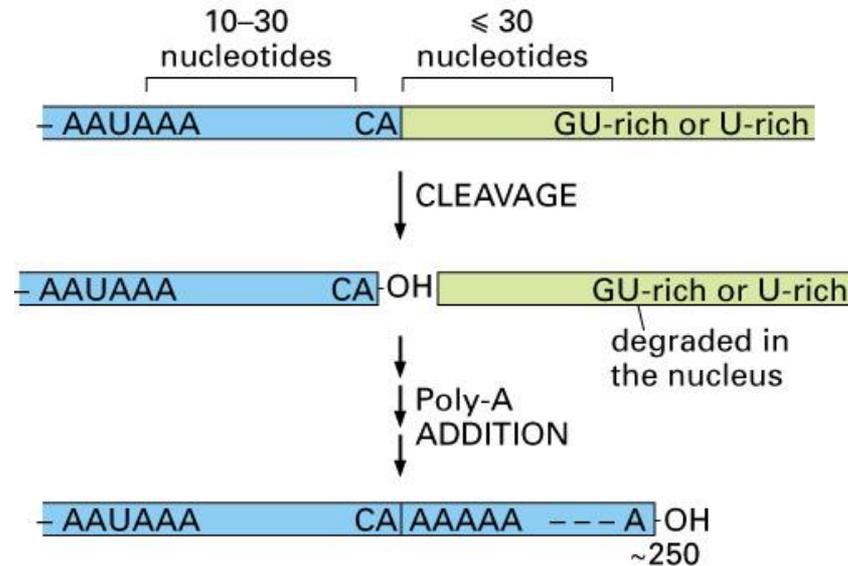


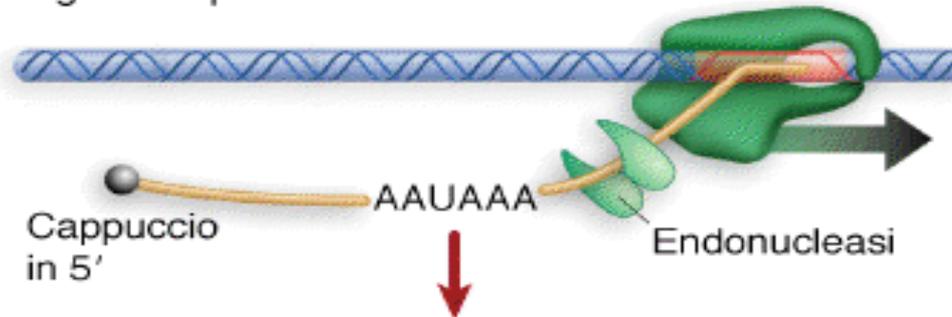
Figure 6-37. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Sequenze consenso

- AAUAAA è riconosciuta da *cleavage and polyadenylation specific factor* (**CPSF**)
- La regione **GU-rich** da *Cleavage stimulation factor F* (**CstF**)

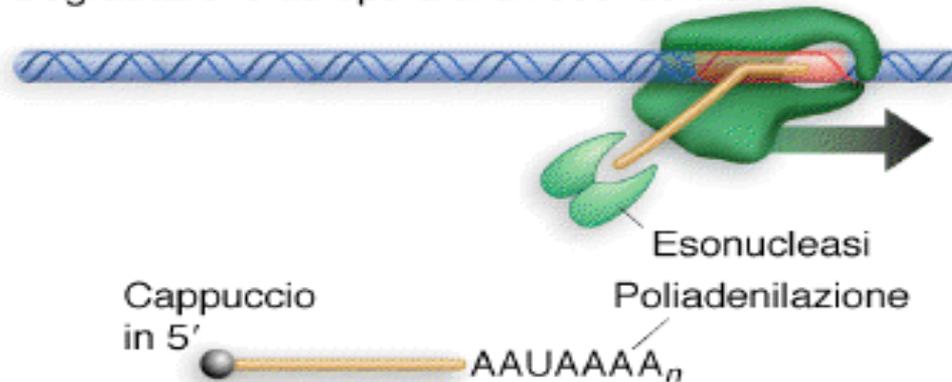
L'estremità 3' dell'mRNA è generata da un taglio

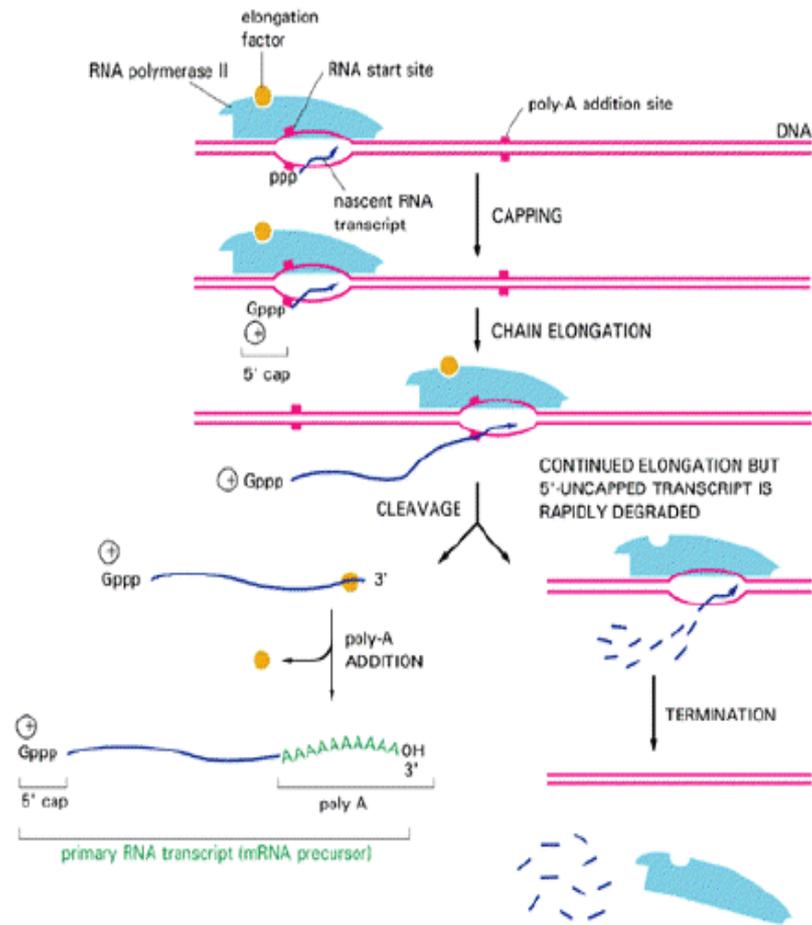
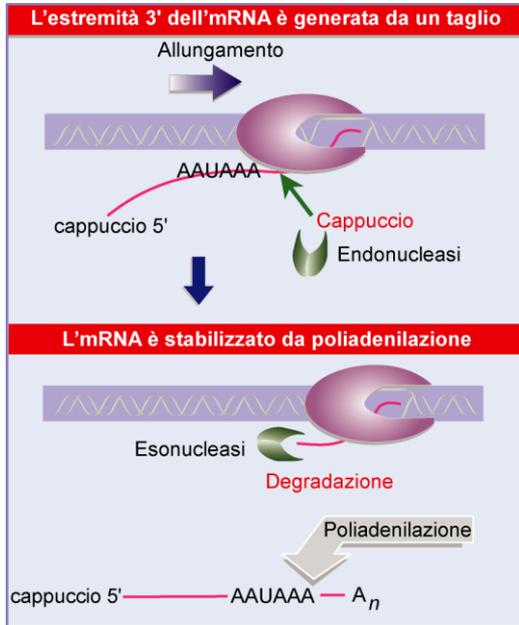
Taglio ad opera di un'endonucleasi



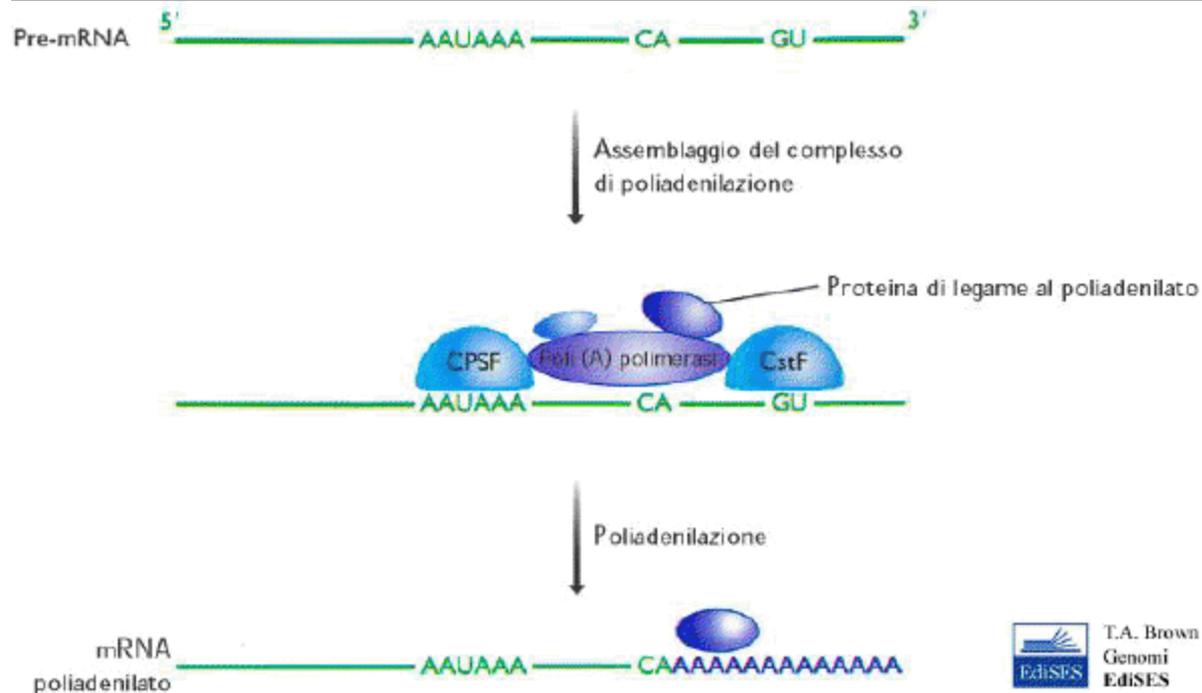
L'mRNA è stabilizzato dalla poliadenilazione

Degradazione ad opera di un'esonucleasi





La poliadenilazione degli mRNA eucariotici



CPSF riconosce seq. AAUAAA

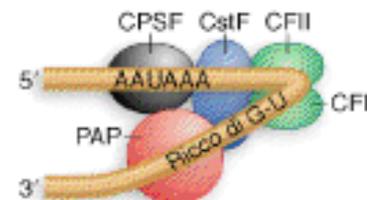
CstF lega GU, stimola

CFI, CFII endonucleasi

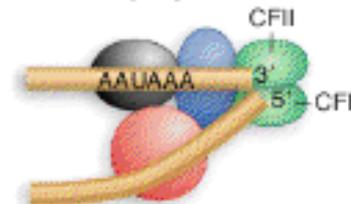
PAP Poli(A) Polimerasi

PABP Poly(A) Binding Protein

C'è un unico complesso per la maturazione dell'estremità 3'



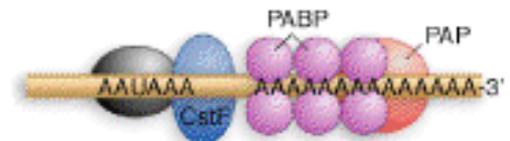
Un fattore di taglio genera un'estremità 3'



La poli(A) polimerasi (PAP) aggiunge residui di A



PABP, la proteina che lega poli(A), si lega a poli(A)



Il complesso si dissocia dopo l'aggiunta di circa 200 residui di A



Funzioni della coda di poliA

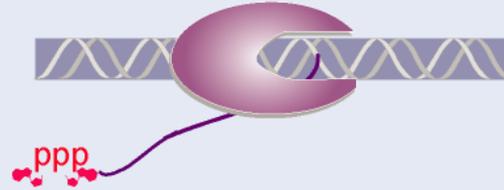
La coda di poliA è presente nella maggior parte degli mRNA fatta eccezione per quelli degli istoni.

Ha la funzione di stabilizzare e proteggere il mRNA dalla degradazione, di aumentare l'efficienza della traduzione, di favorire i processi di splicing e la traslocazione dal nucleo al citoplasma

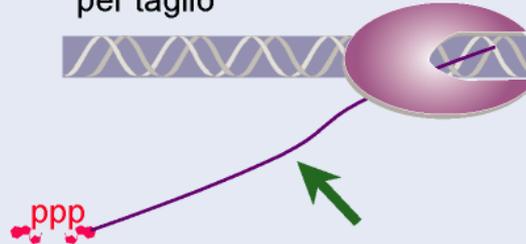
La lunghezza della coda di poliA del mRNA nel citoplasma non è costante: può essere accorciata da una RNasi e allungata da una poli(A)polimerasi citoplasmatiche.....

L'mRNA eucariotico è modificato ed esportato

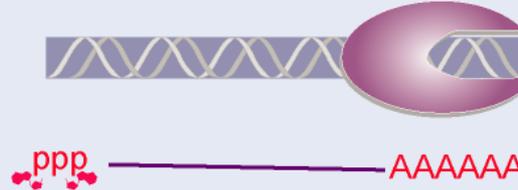
<1 min La trascrizione inizia; viene modificata l'estremità 5'



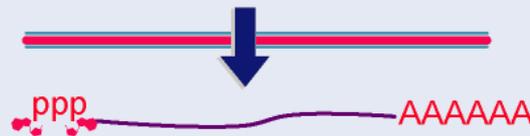
6 min L'estremità 3' dell'mRNA è rilasciata per taglio



20 min L'estremità 3' è poliadenilata



25 min L'mRNA è trasportato nel citoplasma



> 4 ore I ribosomi traducono l'mRNA



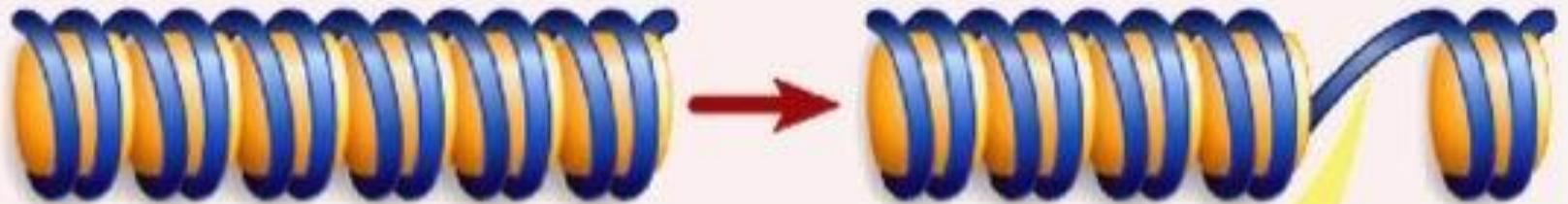
La struttura della cromatina e la trascrizione

- La compattazione del DNA in cromatina è un ostacolo per la trascrizione
- La maggior parte della trascrizione avviene nell'interfase del ciclo cellulare quando il DNA è organizzato in fibre sui nucleosomi e compattato

Due tappe nella regolazione dell'inizio della trascrizione

Cambiamenti nella struttura locale del gene

1



L'apparato basale di trascrizione si lega al promotore

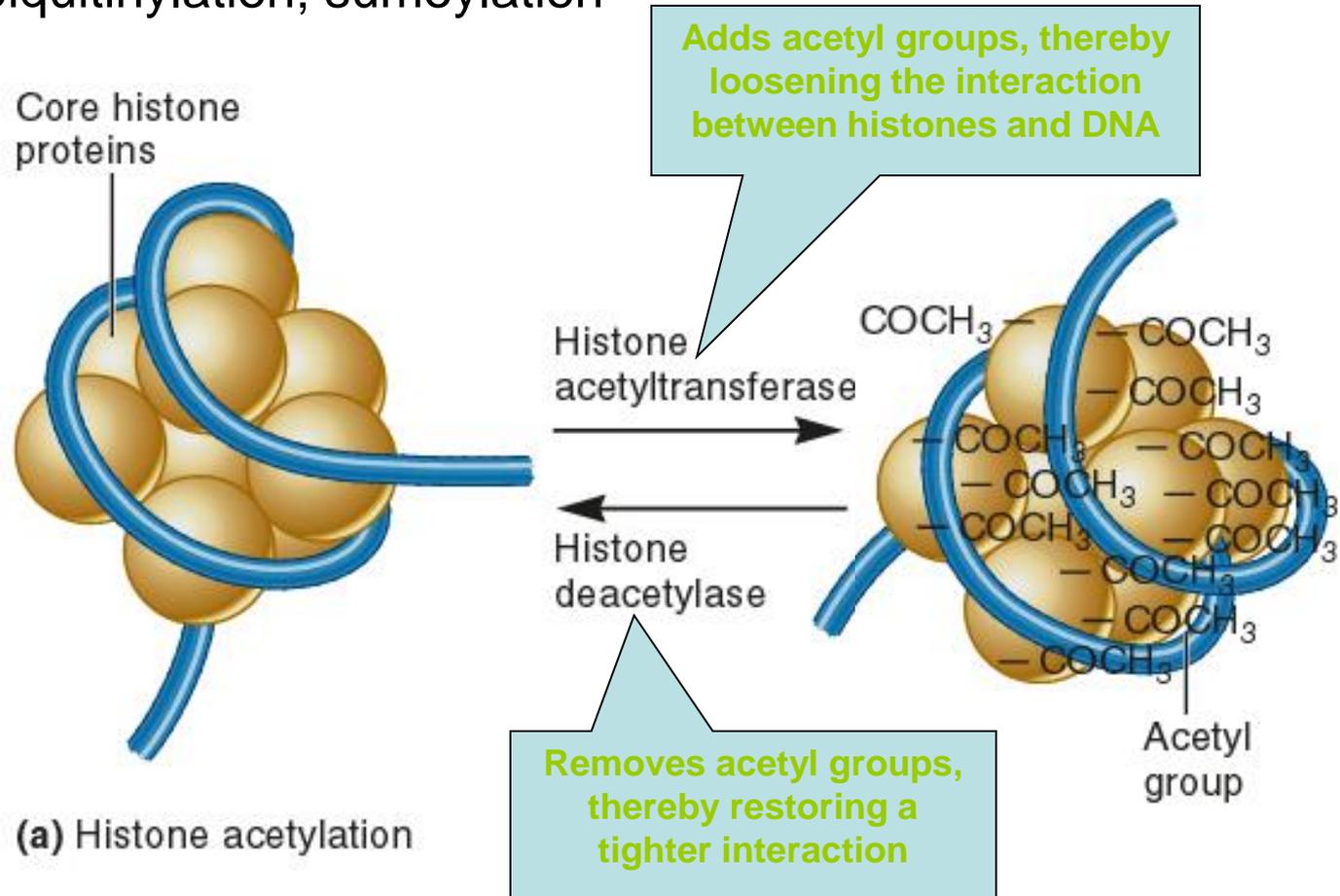
2



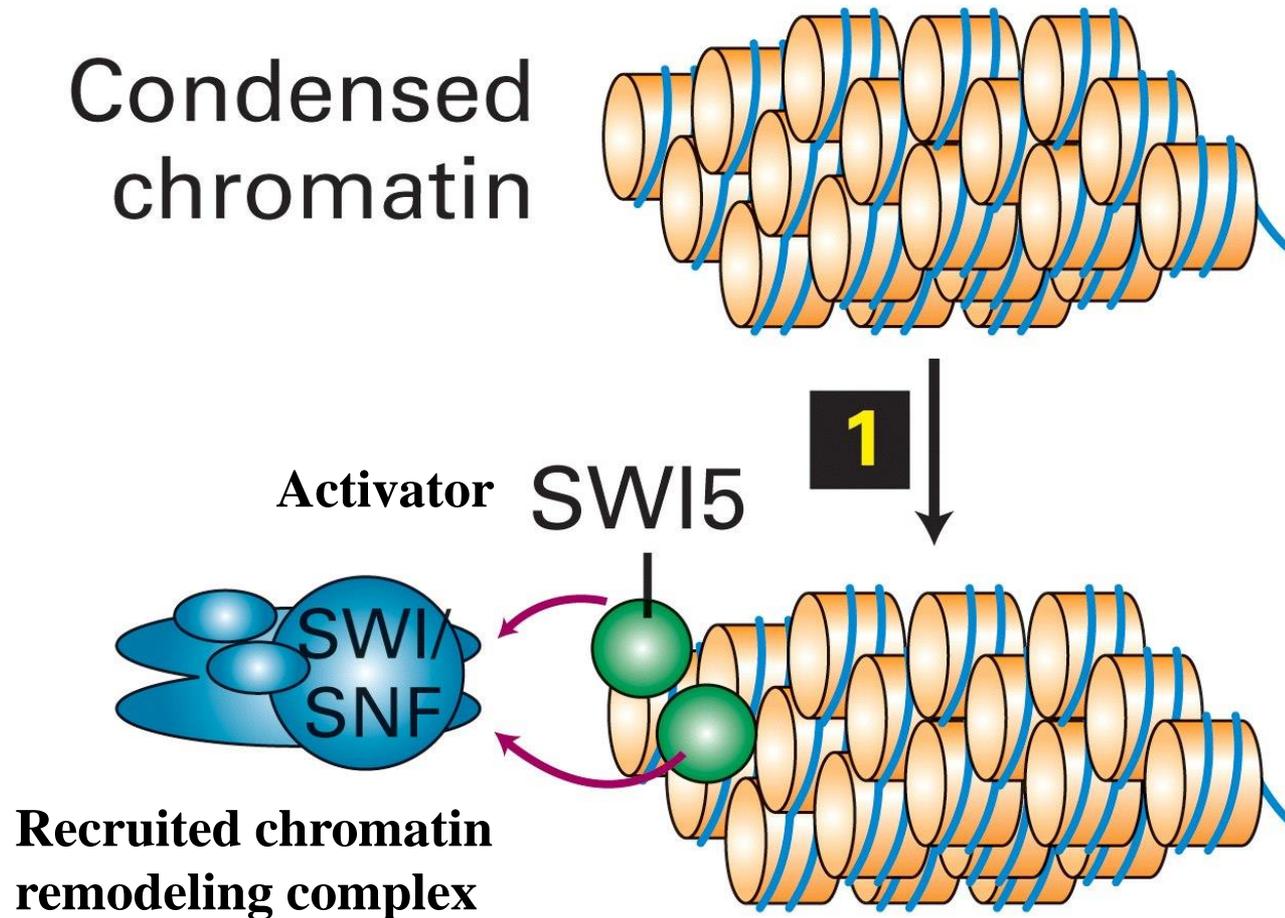
Chromatin Structure and Transcription

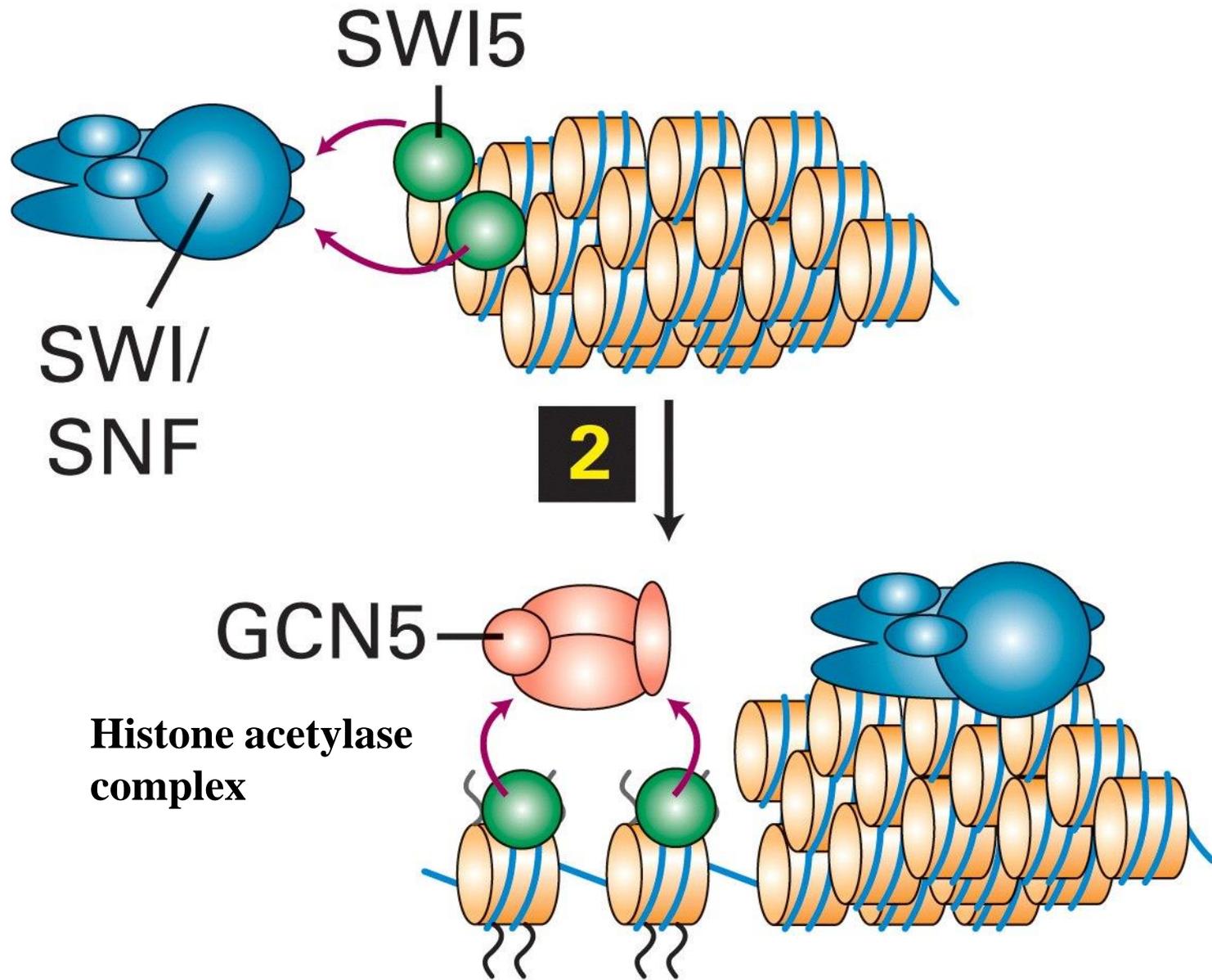
- The histone octamer is roughly **five times smaller** than the complex of RNA pol II and the GTFs
- The tight wrapping of DNA within the nucleosome inhibits the function of RNA pol
- To circumvent this problem, the chromatin structure is significantly loosened during transcription
- Two common mechanisms alter chromatin structure

- 1. Covalent modification of histones
 - Amino terminals of histones are modified in various ways
 - acetylation; phosphorylation; methylation; ADP-ribosylation; ubiquitinylation; sumoylation

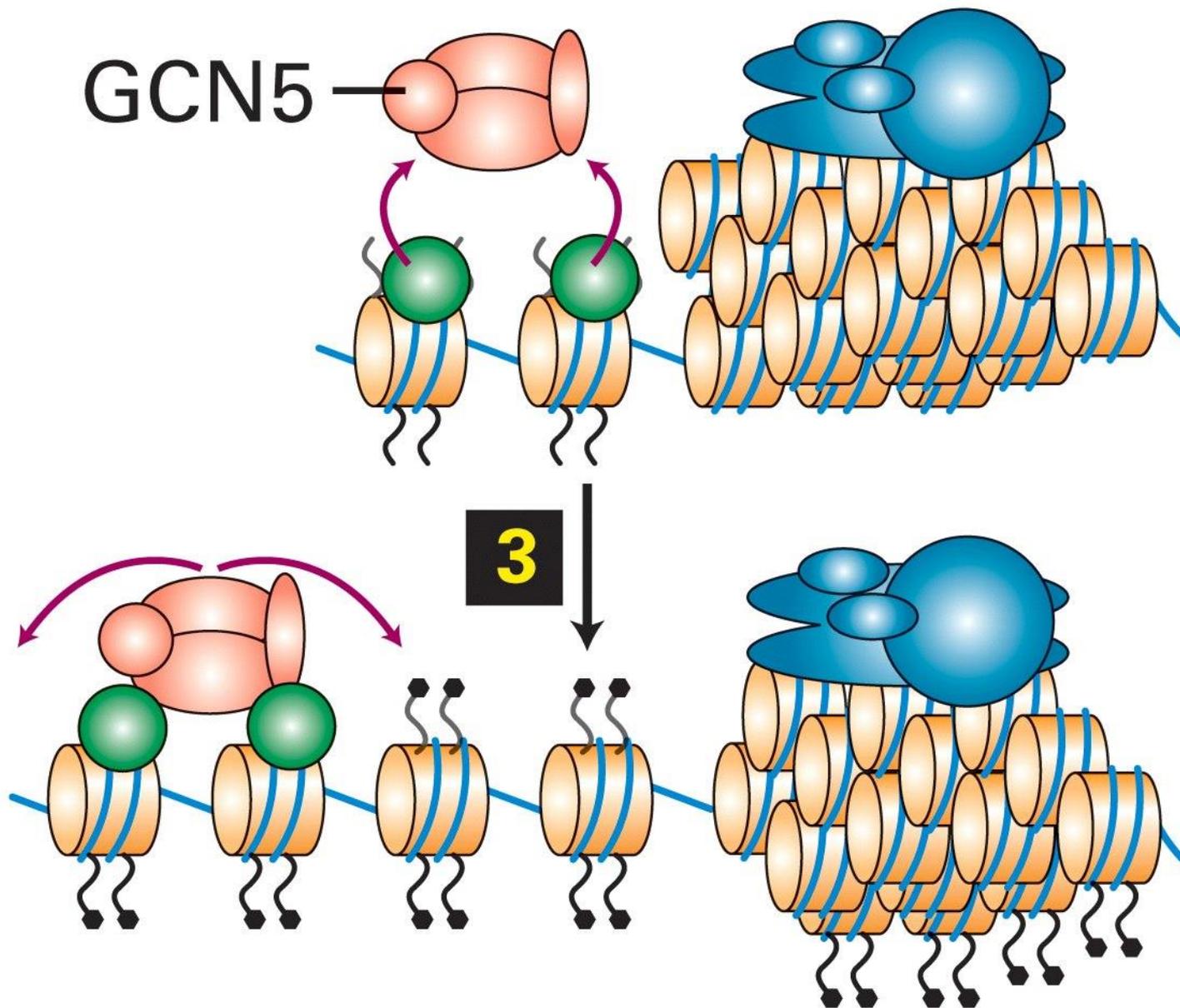


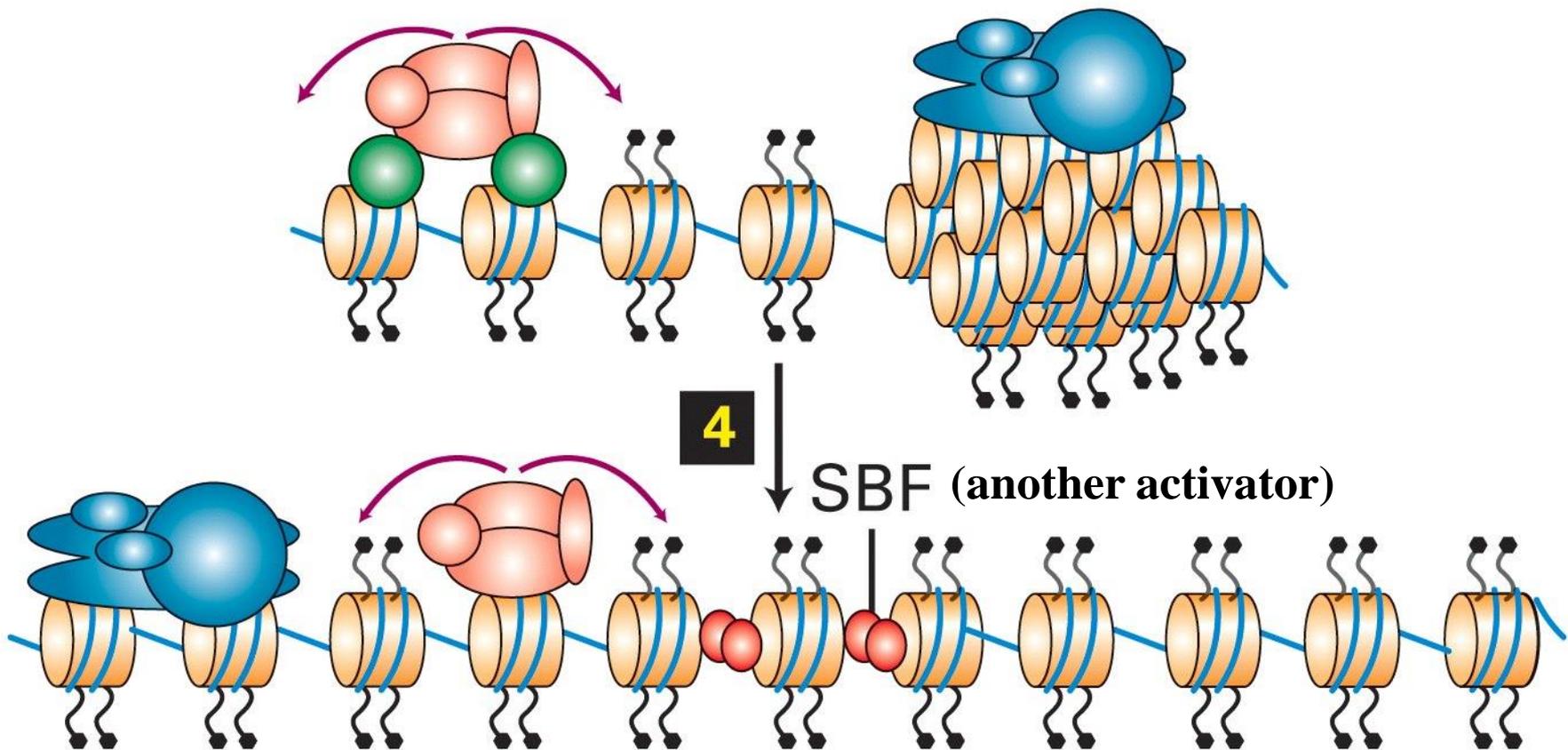
The Highly Orchestrated Binding of Activators Leads to Transcription

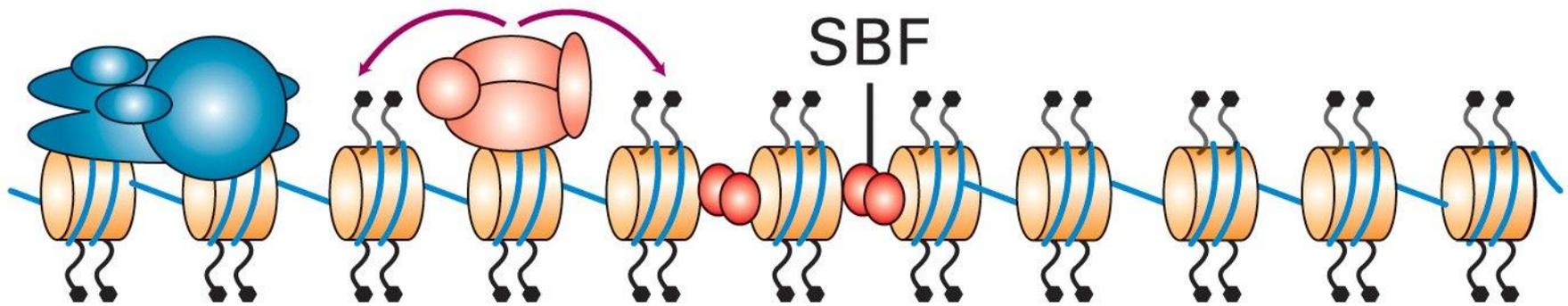




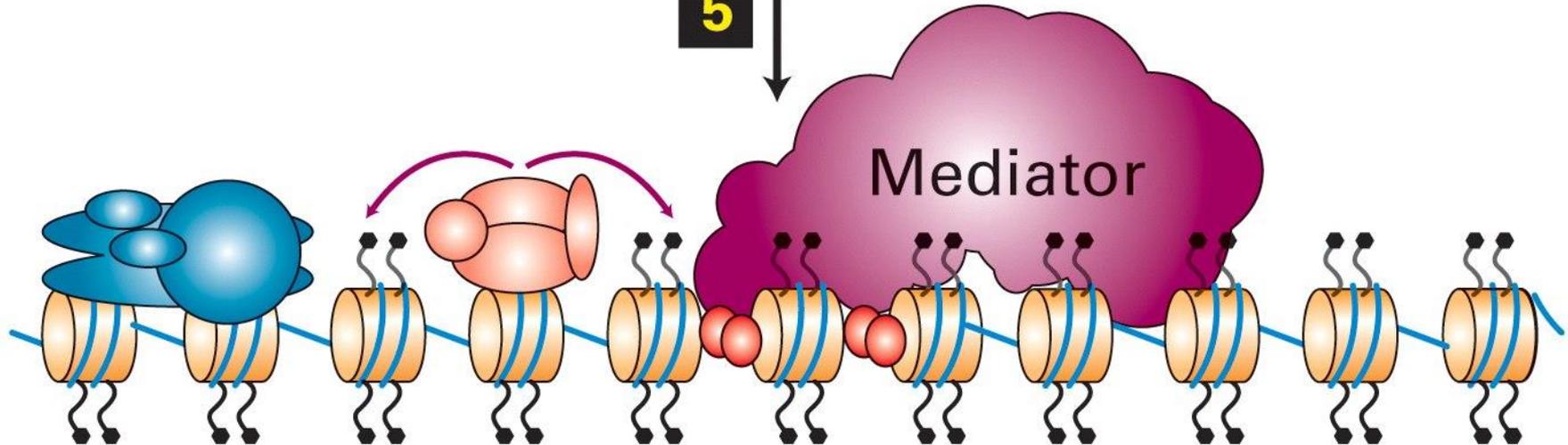
GCN5

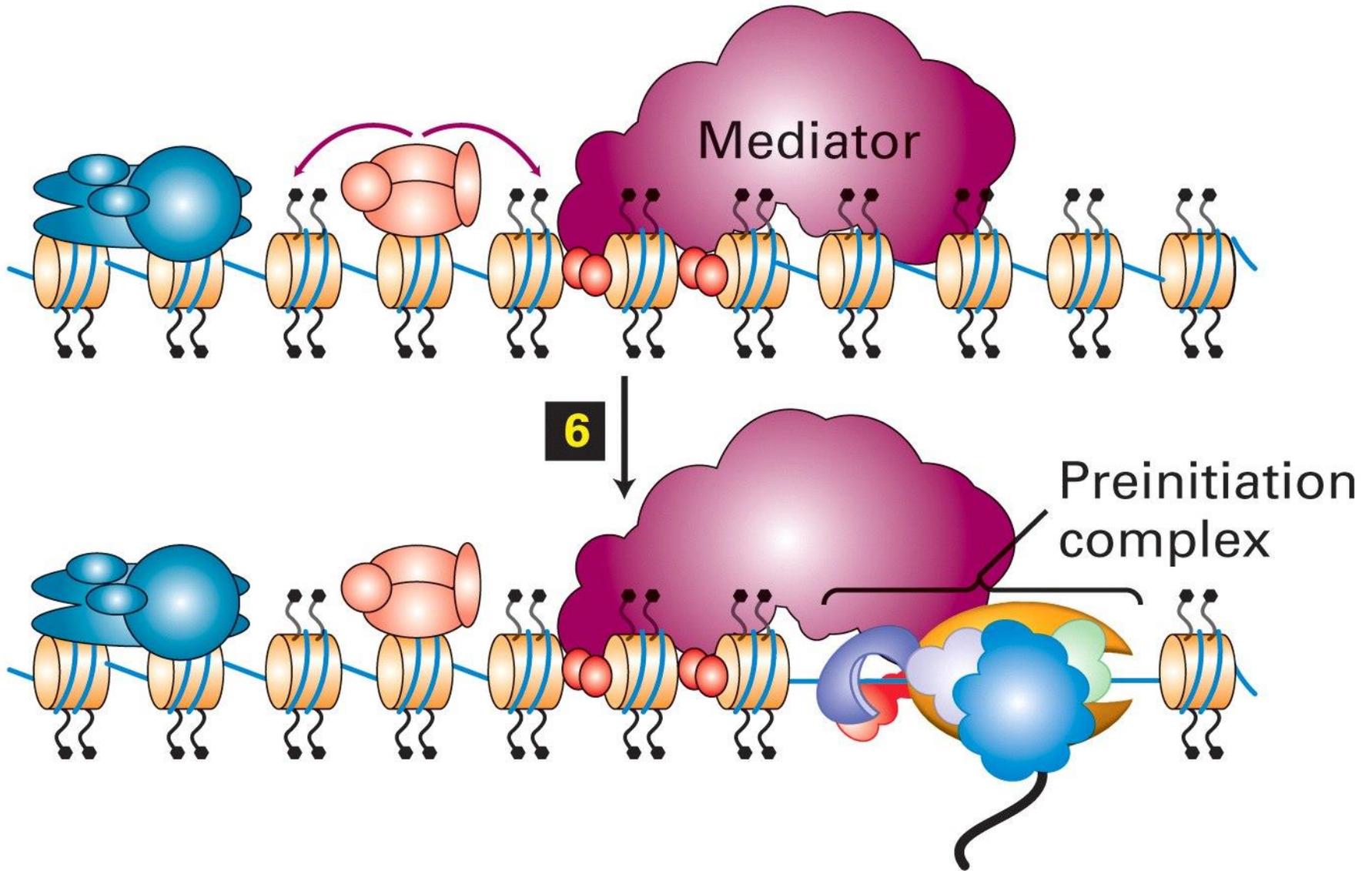






5

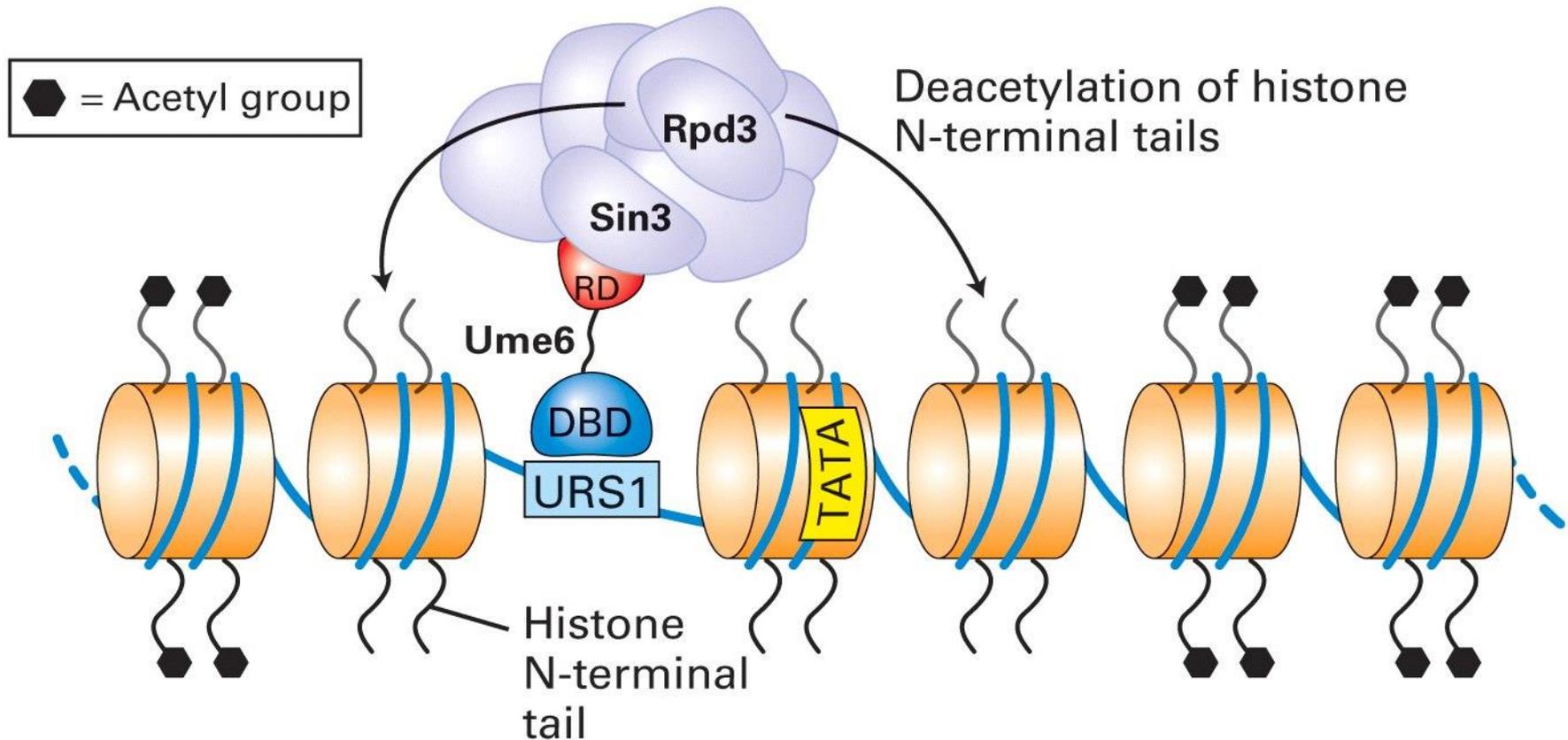




Boom! Transcription

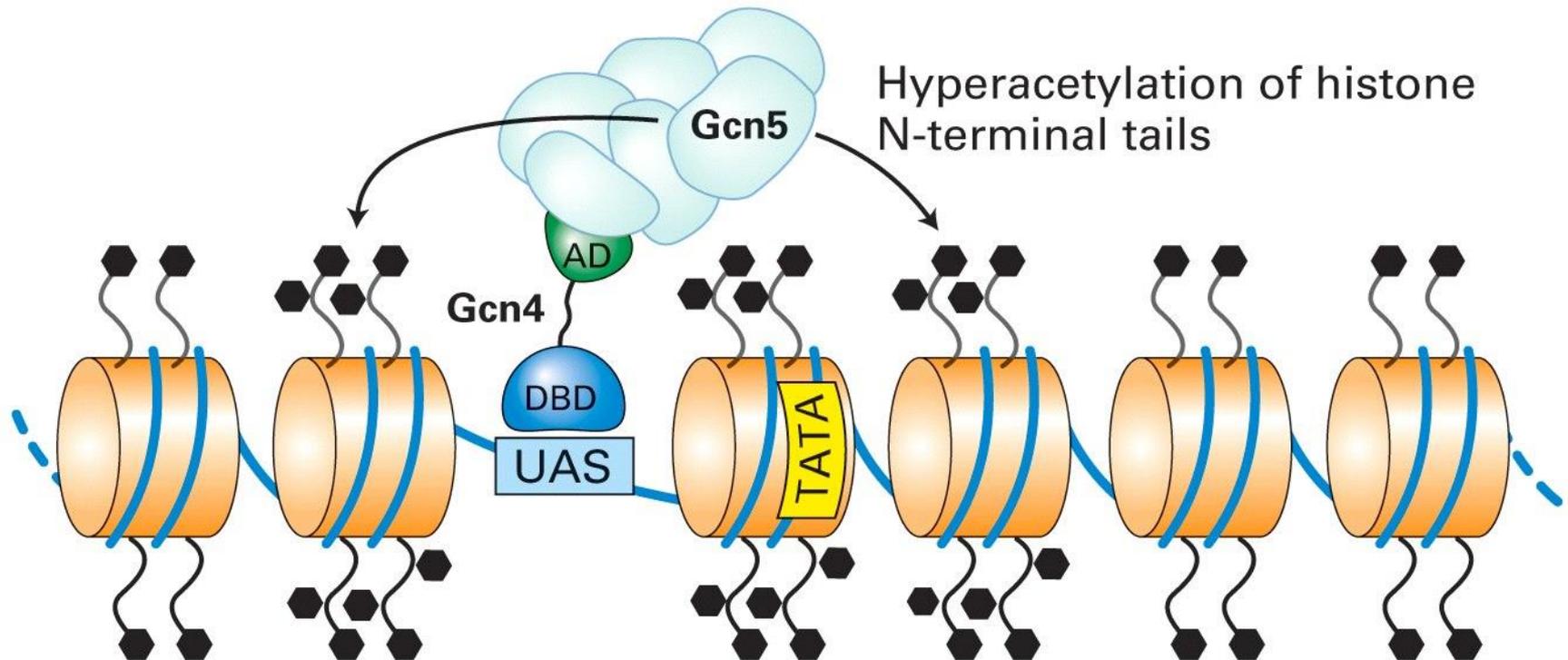
Modello di repressione trascrizionale nel lievito: la de-acetilazione degli istoni rafforza il legame tra gli istoni e il DNA (code basiche) rendendo difficile la trascrizione

(a) Repressor-directed histone deacetylation

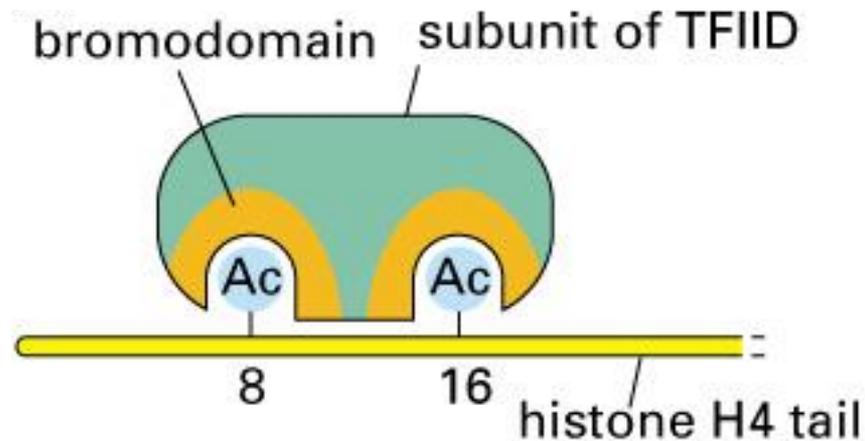


Modello di attivazione trascrizionale nel lievito: l'iper-acetilazione degli istoni indebolisce il loro legame con il DNA e favorisce la trascrizione

(b) Activator-directed histone hyperacetylation

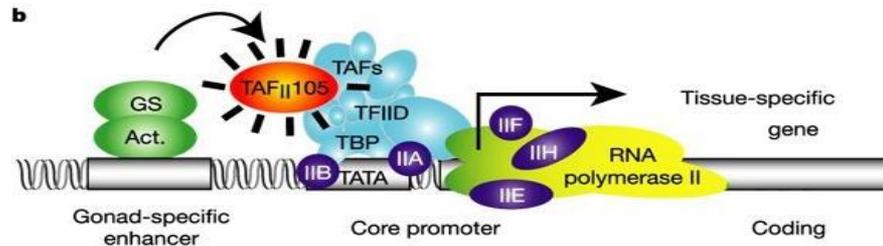
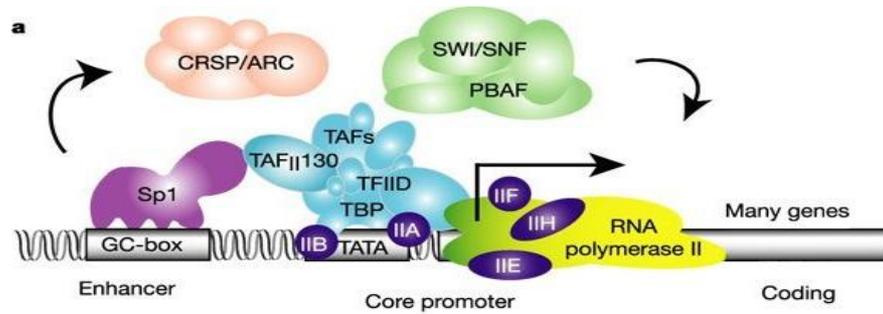


Specific Proteins can Recognize these Codes to Activate or Repress Transcription

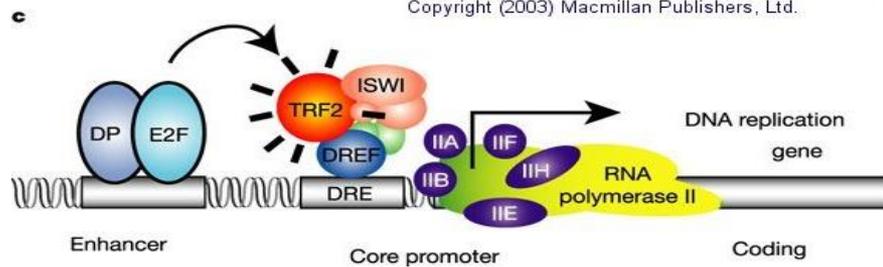


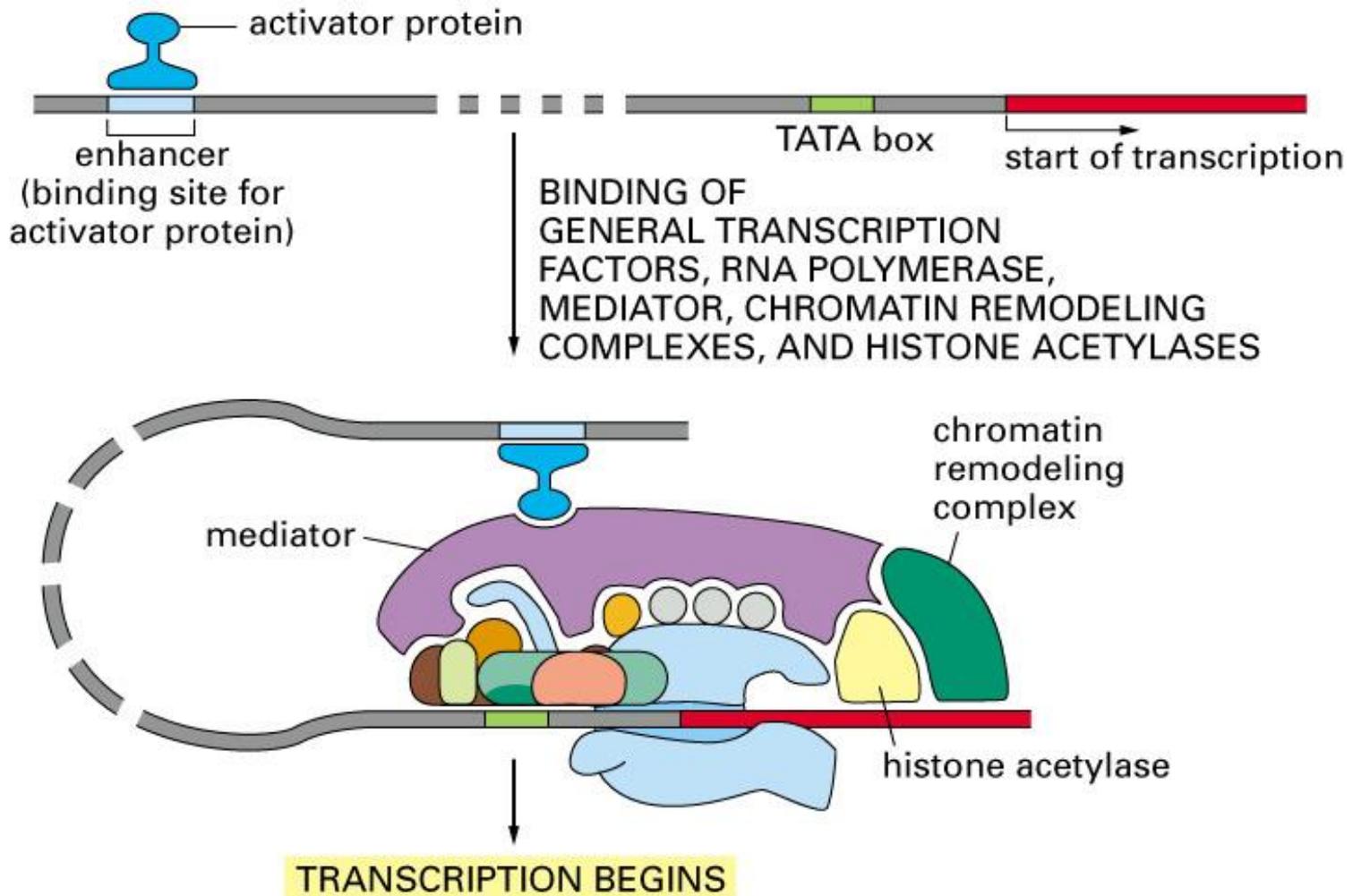
Enhancer e Silencers

- Sono elementi di DNA indipendenti per posizione e orientamento rispetto al promotore. Essi stimolano o reprimono la trascrizione dei geni ai quali sono associati mediante il legame alle loro sequenze di proteine.
- Sono molto importanti per l'espressione dei geni tessuto-specifici



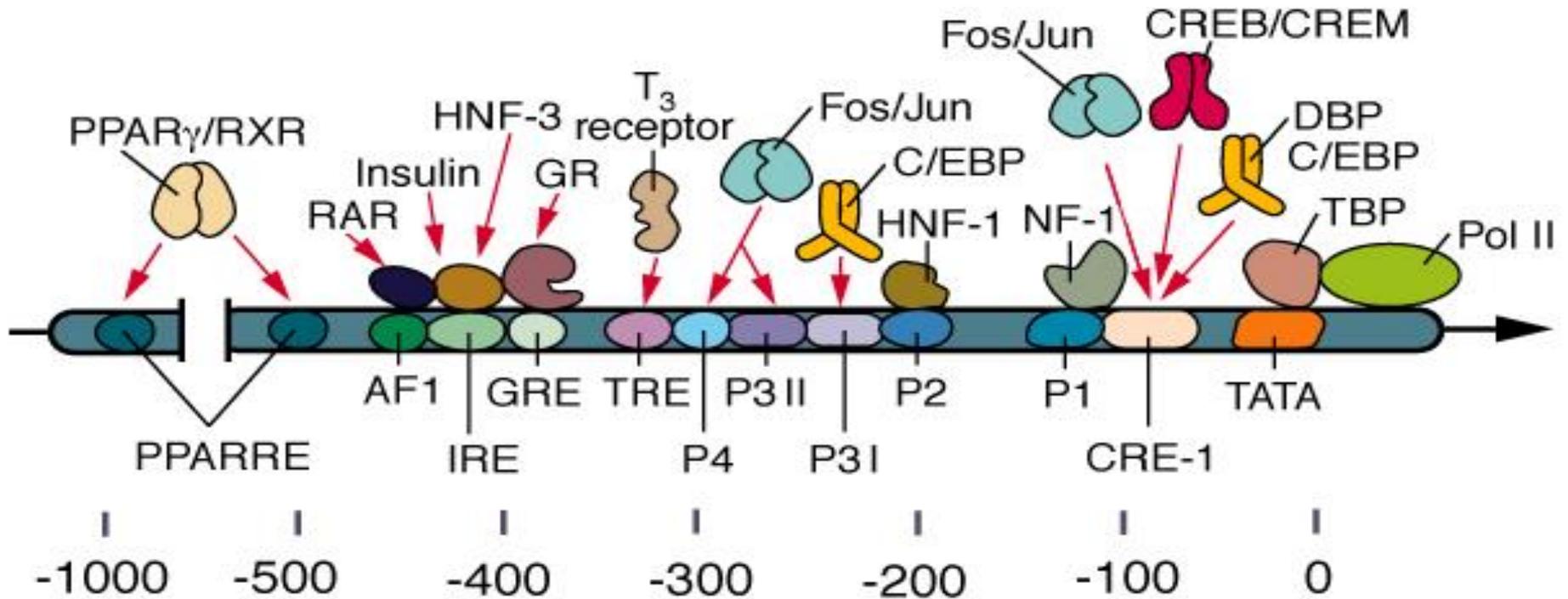
Reprinted by permission from Nature
Levine, M. & Tjian, R., Nature, **424**, 147-151 (2003)
Copyright (2003) Macmillan Publishers, Ltd.





Transcription initiation in the cell often requires the local recruitment of chromatin-modifying enzymes, including chromatin remodeling complexes and histone acetylases - greater accessibility to the DNA present in chromatin

ESEMPIO DELLA COMPLESSITA' DI UN PROMOTORE EUCARIOTICO



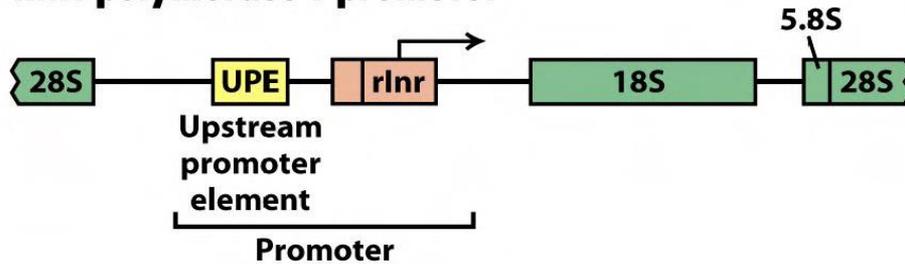
Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

promotore del gene PEPCK (fosfoenolpiruvatocarbossichinasi)

RNA polymerase I and III recognize distinct promoters, using distinct sets of transcription factors, but still require TBP

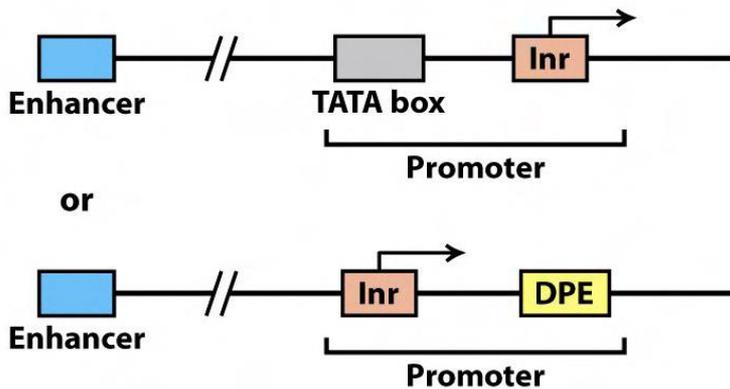
Each of these enzymes also works with its own unique set of general transcription factors. However, TBP is universal for most of the cases.

RNA polymerase I promoter



I promotori di classe I sono riconosciuti da due TF: uno si lega all'elemento UPE e uno all'elemento centrale RInr (che è responsabile del reclutamento della RNA pol I)

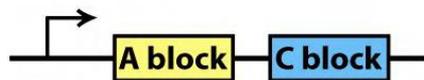
RNA polymerase II promoter



I promotori di classe III richiedono fattori che si legano ad un promotore che è a monte e interno al sito di inizio della trascrizione

RNA polymerase III promoter

Type I: 5S rRNA



Type II: tRNA

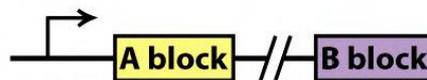
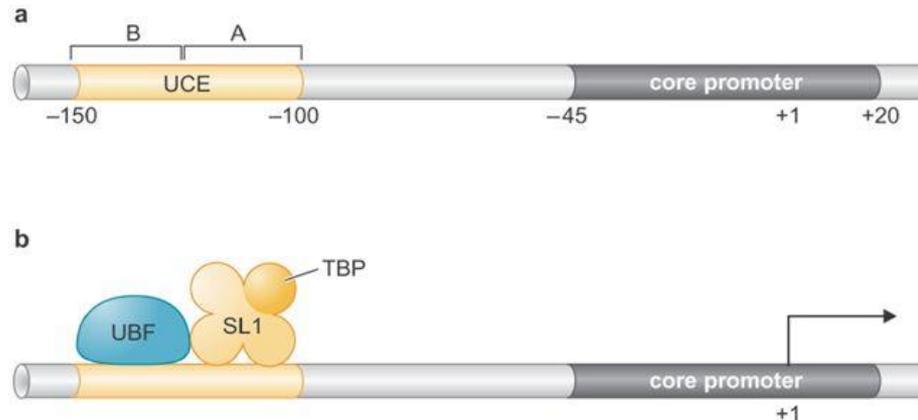


Figure 29-17
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

RNA polymerase I resides in the nucleolus and is responsible for synthesizing three of the four types of rRNA found in eukaryotic ribosomes (28S, 18S, and 5.8 S rRNA).

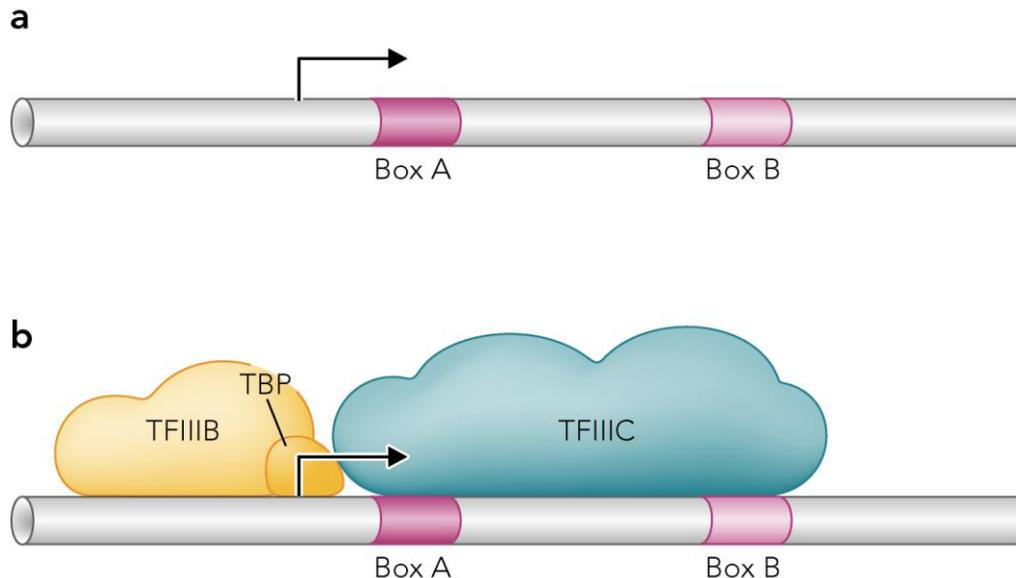
The promoter for the rRNA genes comprise : the core element and the UCE (upstream control element).

Pol I promoter initiation requires Pol I, SL1 and UBF. SL1 comprises TBP and three TAFs, and binds DNA only in the presence of UBF.



RNA polimerase III usa promotori sia a valle che a monte

- RNA polimerase III ha due tipi di promotore.
- I **promotori interni** hanno sequenze consenso corte localizzate all'interno della unità di trascrizione e determinano l'inizio della trascrizione ad una distanza fissa a monte (tRNA e rRNA 5S).
- I **promotori a monte** contengono tre corte sequenze consenso a monte del sito di trascrizione che sono riconosciute dai fattori di trascrizione (snRNA).



Pol III

- TFIIIA e TFIIIC si legano alle sequenze consenso e permettono a TFIIIB di legarsi allo startpoint.
- TFIIIB ha TBP una subunità e permette alla RNA polimerase di legarsi.

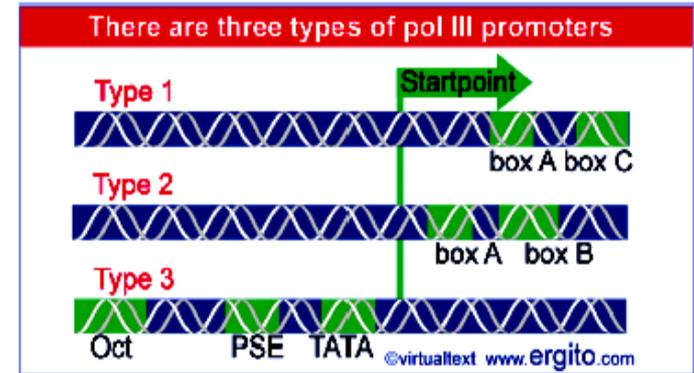


Figure 21.7 Promoters for RNA polymerase III may consist of bipartite sequences downstream of the startpoint, with box A separated from either box C or box B. Or they may consist of separated sequences upstream of the startpoint (Oct, PSE, TATA).

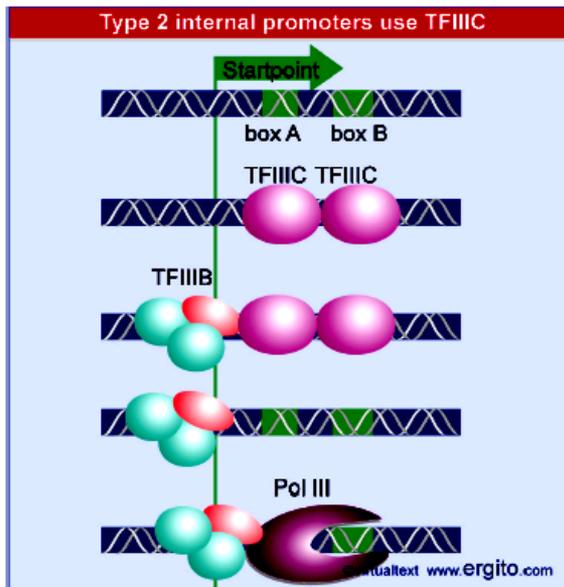


Figure 21.8 Internal type 2 pol III promoters use binding of TFIIIC to box A and box B sequences to recruit the positioning factor TFIIIB, which recruits RNA polymerase III.

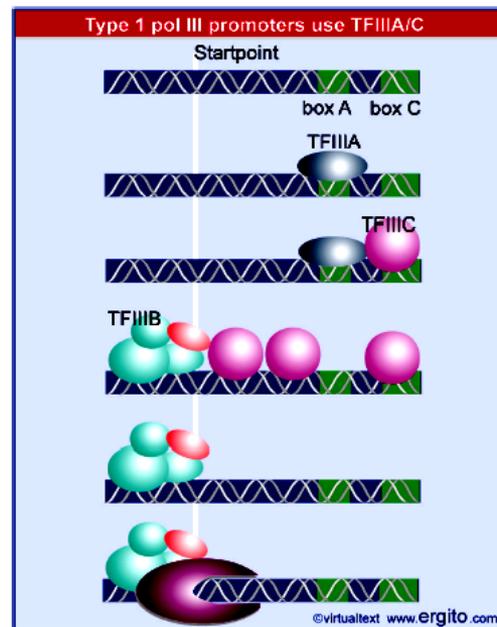
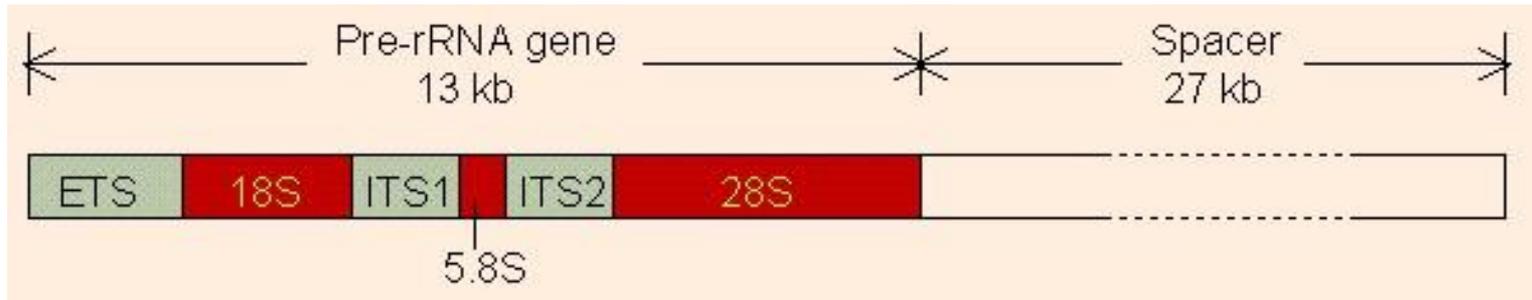


Figure 21.9 Internal type 1 pol III promoters use the assembly factors TFIIIA and TFIIIC, at box A and box C, to recruit the positioning factor TFIIIB, which recruits RNA polymerase III.

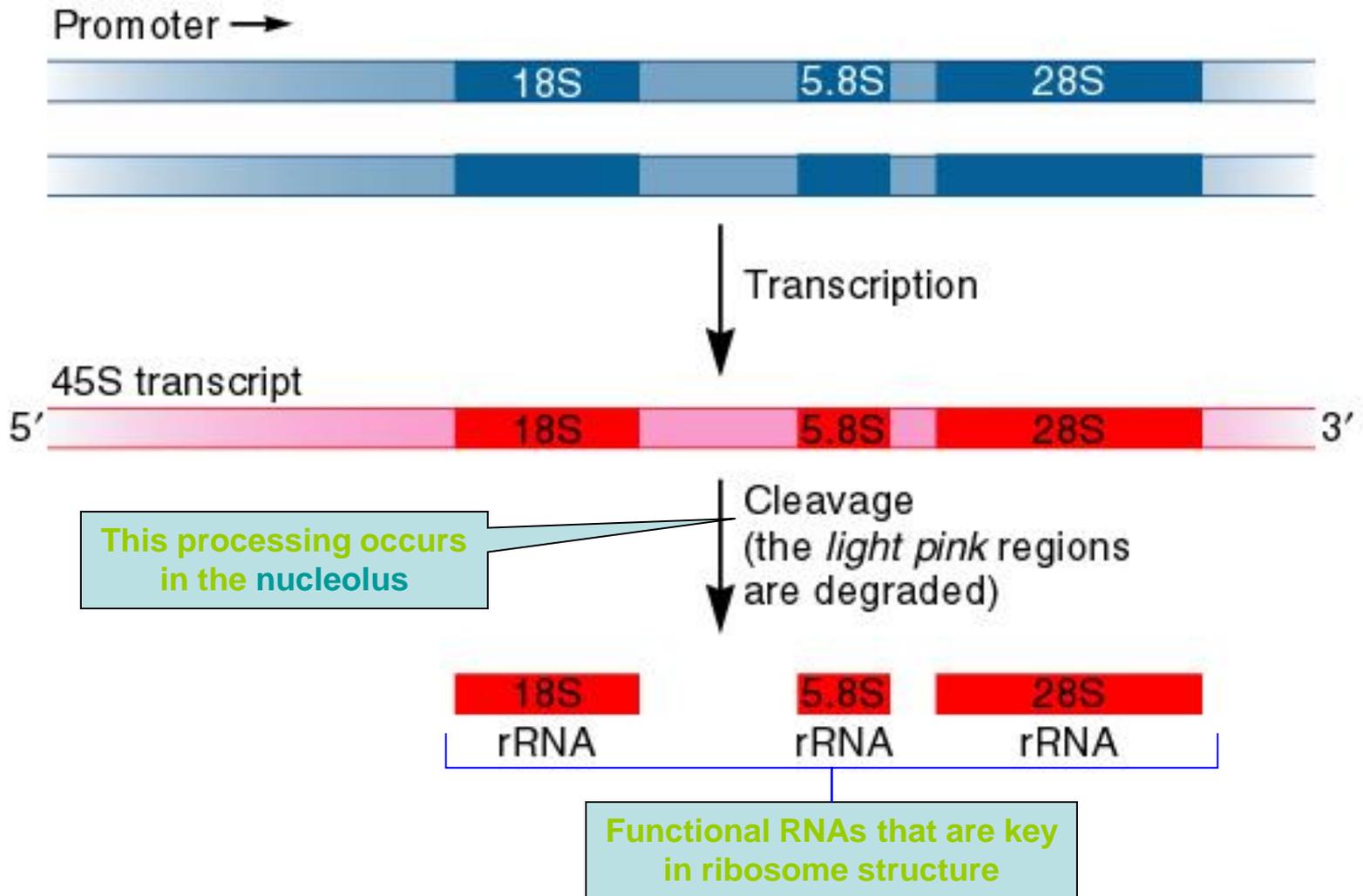
Geni codificanti gli rRNA

I geni codificanti per gli **rRNA 28S, 5,8S e 18S** sono organizzati in un'unità trascrizionale ripetuta in tandem.



Nel genoma umano, le ripetizioni sono organizzate in 5 cluster di circa 150-200 copie presenti sul braccio corto dei cromosomi 13,14,15, 21 e 22 (solo una frazione di esse però è trascritta, mentre le altre sono silenziate).

I geni l'**rRNA 5S** sono organizzati in unità ripetute che formano un cluster di ~200-300 geni in prossimità dell'estremità telomerica del cromosoma 1

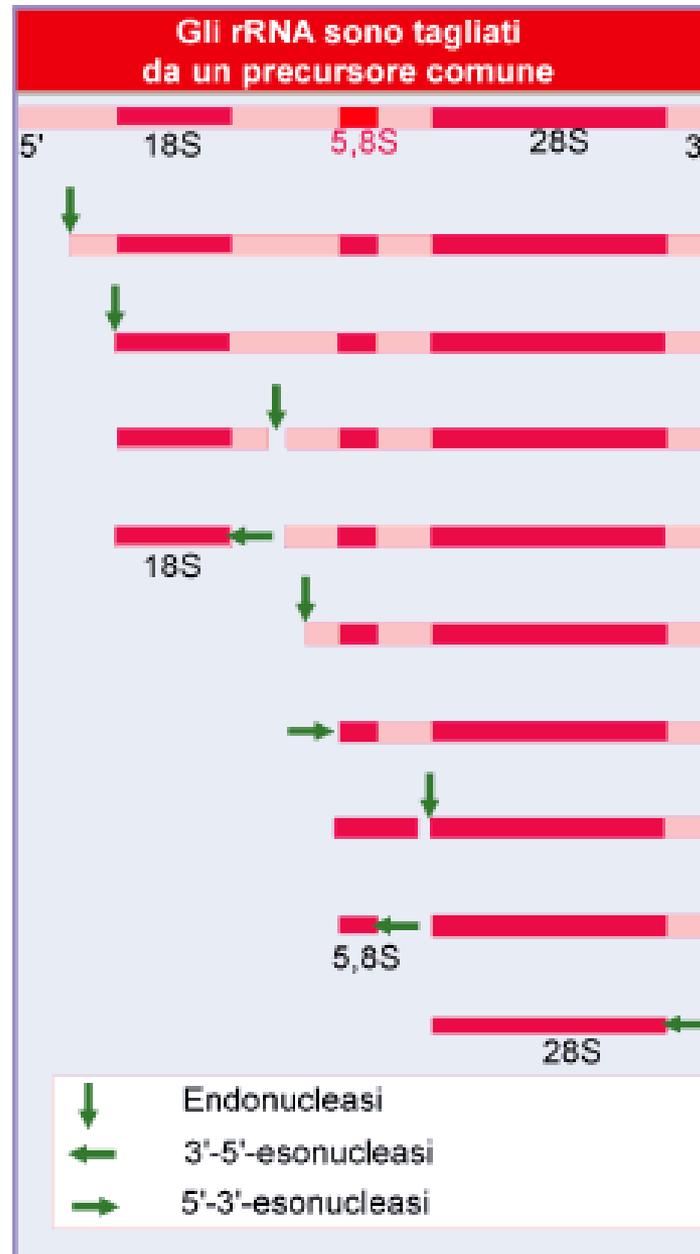


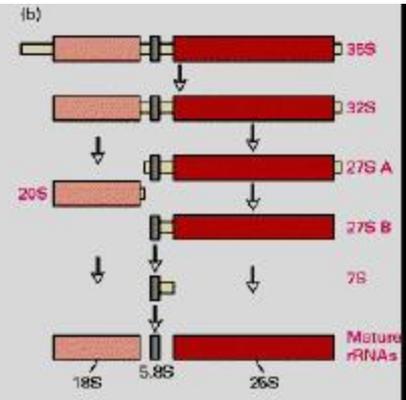
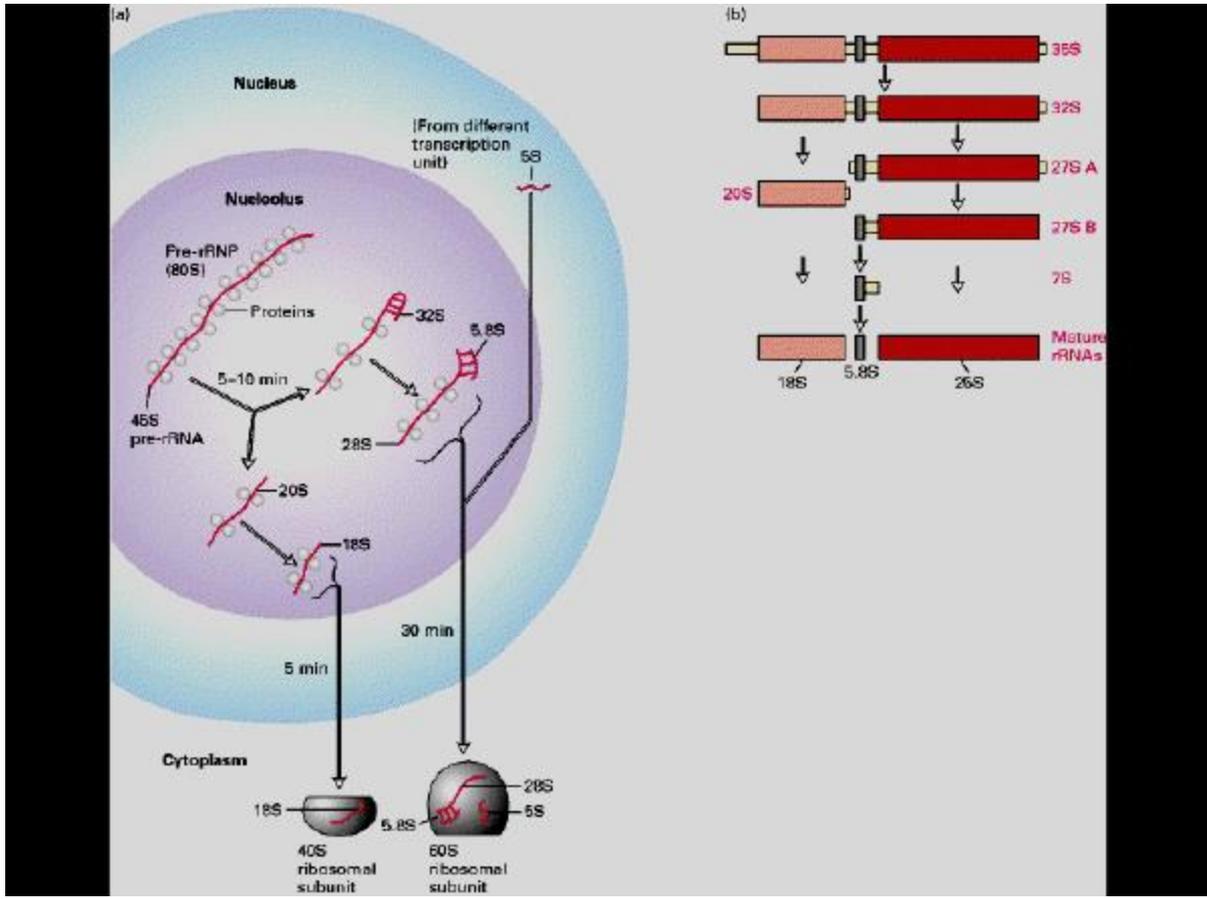
Processing degli rRNA

Vengono trascritti sotto forma di grandi molecole precursore. Negli eucarioti pre-rRNA 45S che contiene rRNA 28S, 18S e 5.8S separati tra loro da sequenze ITS (Internal Transcribed Spacer)

La sintesi e processing ha luogo nel nucleolo dove ha sede anche l'assemblaggio dei ribosomi e richiede l'intervento di snoRNA con proteine (complesso ribonucleoproteico) che genera tagli endonucleolitici specifici per togliere ITS.

La sintesi della 5S avviene ad opera della RNA polIII e il precursore è presente come centinaia di copie disposte in tandem che poi una volta processato raggiunge il nucleolo per essere allestito con gli altri rRNA nei ribosomi.





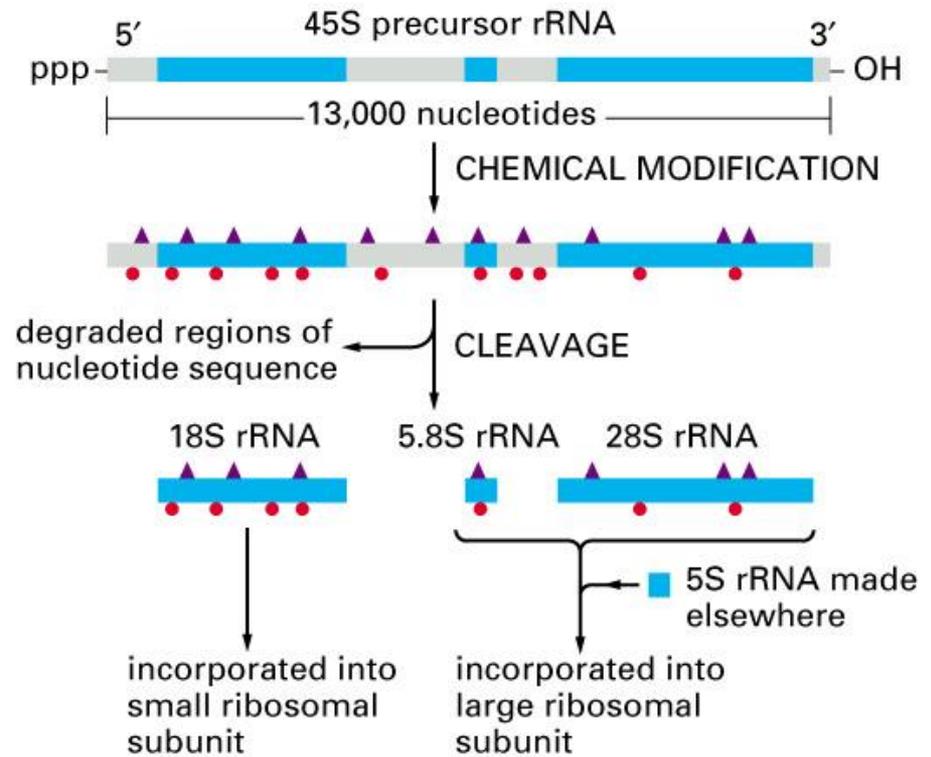
Modificazioni dell'rRNA

- **Metilazione** (55 lievito, 110 vertebrati)
- **Pseudouridilazione** (45 in lievito, 100 vertebrati)

RNA Pol I

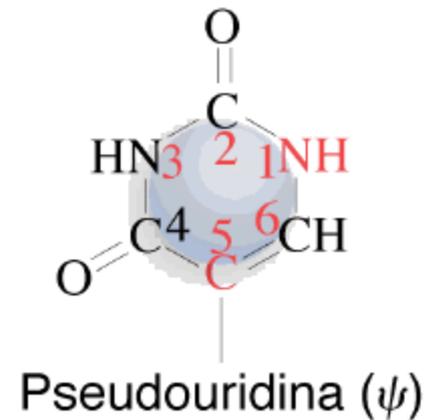
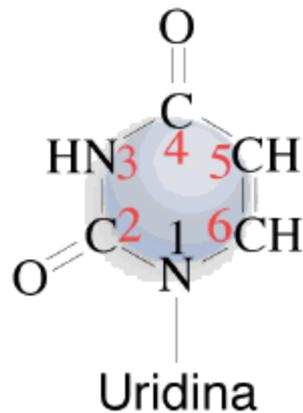
RNA pol I sintetizza gli rRNA 18S, 5.8 S e 28S partendo da un **unico RNA precursore**, che viene modificato chimicamente e poi tagliato

L'rRNA 5S è sintetizzato da RNA Pol III



La pseudouridina è derivata dalla uridina

Pseudouridina
sintasi



snoRNP (small nucleolar RNP)

- Box C/D → metilazione
- Box H/ACA → pseudouridilazione

Geni codificanti i tRNA

I singoli geni codificanti per i tRNA sono presenti in copie multiple nel genoma.

Nella sequenza del genoma umano, sono stati individuati 497 geni per tRNA, che rappresentano 49 specie di tRNA sulla base dell'anticodone (21 isoaccettori).

I geni per tRNA sono dispersi nel genoma ma sono organizzati in cluster: più del 50% sono localizzati sul cromosoma 6 (140 geni in una regione di 4Mpb) e sul cromosoma 1. Altri cromosomi hanno meno di 10 geni per tRNA.

Il **numero di geni per tRNA** risulta correlato con le dimensioni degli **oociti**.

Table 19 Number of tRNA genes in various organisms

Organism	Number of canonical tRNAs	SeCys tRNA
Human	497	1
Worm	584	1
Fly	284	1
Yeast	273	0
<i>Methanococcus jannaschii</i>	36	1
<i>Escherichia coli</i>	86	1

IHGSC, Nature 2001 409:860-921, Tab. 35

Il processing dei tRNA

I pre-tRNA sono monocistronici e contengono estremità estese sia la 5' che al 3' che saranno tolte da endo ed eso-nucleasi (endonucleasi RNasi P per il 5' e taglio endonucleolitico da RNasiZ al quale fa seguito l'aggiunta di CCA da una tRNA nucleotidiltransferasi)

Alcuni tRNA possono contenere introni che verranno rimossi con lo splicing

Segue tutta una serie di modificazioni chimiche delle basi ad opera di enzimi specifici (pseudouridina, diidrouridina, etc) per dare le caratteristiche basi insolite che determinano la specificità dei tRNA per la loro composizione in basi e struttura terziaria.