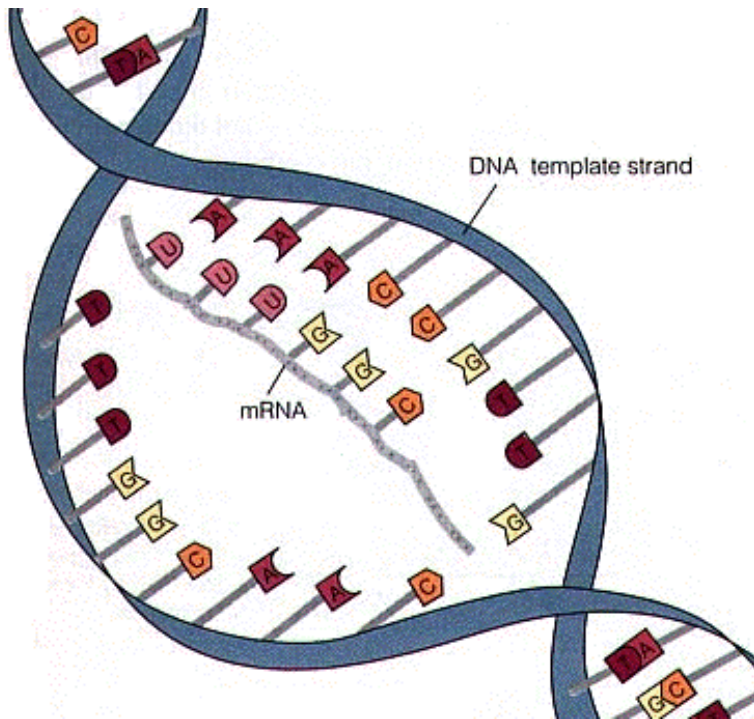
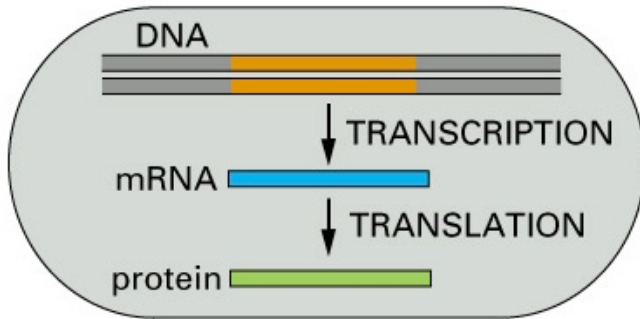


TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI

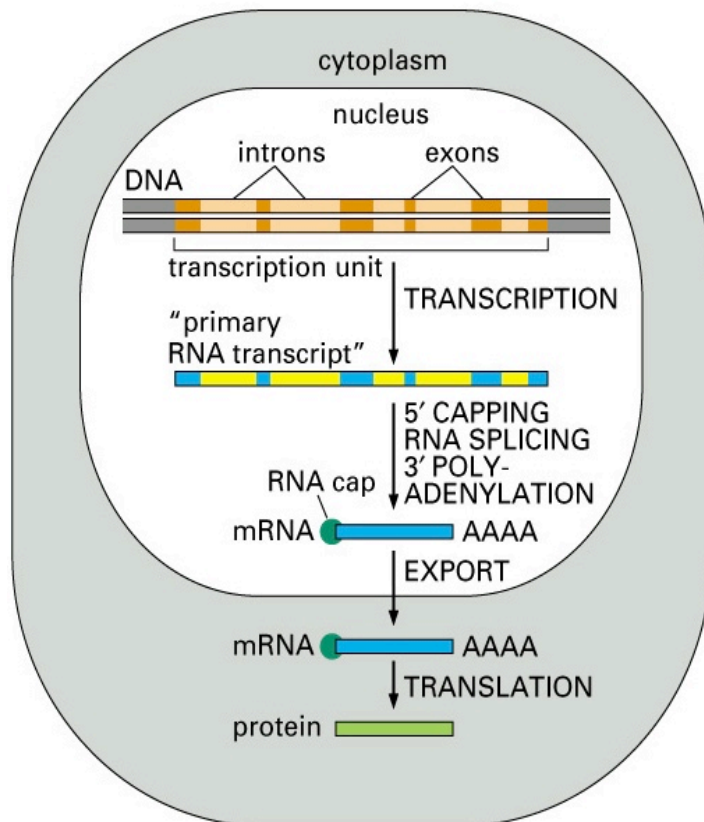


PROCARYOTES



Nei batteri i trascritti prodotti sono direttamente utilizzati per la sintesi proteica (trascrizione accoppiata a traduzione)

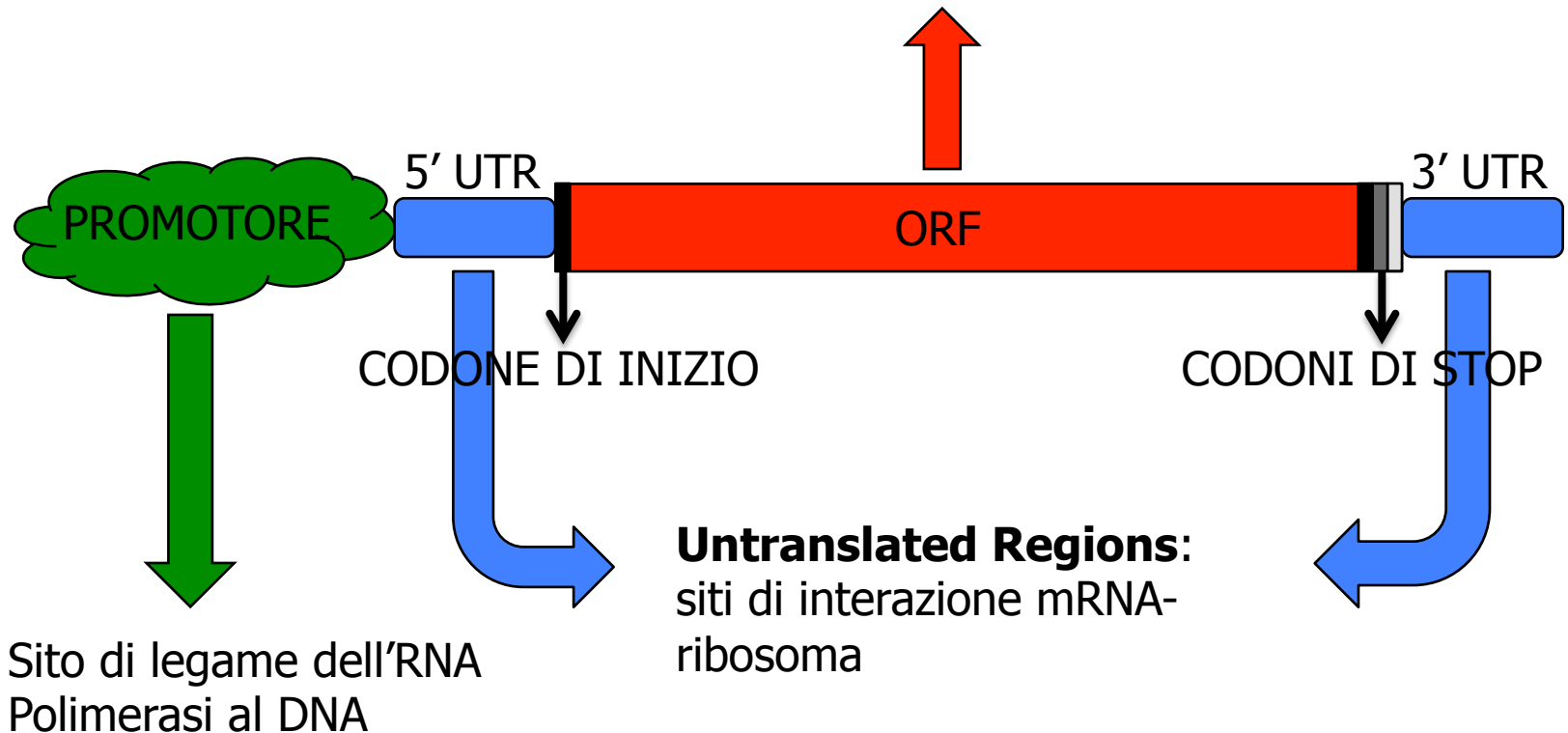
EUCARYOTES



Negli eucarioti la trascrizione è accompagnata e seguita da una serie di modificazioni covalenti alle estremità dell'RNA e dalla rimozione di tratti del trascritto. Tali modificazioni avvengono nel nucleo. Nel caso dei trascritti prodotti dalla RNA Pol II si distingue tra pre-mRNA (non ancora modificati) e mRNA (modificati). Gli mRNA vengono esportati nel citoplasma, dove servono da "messaggeri" per la traduzione

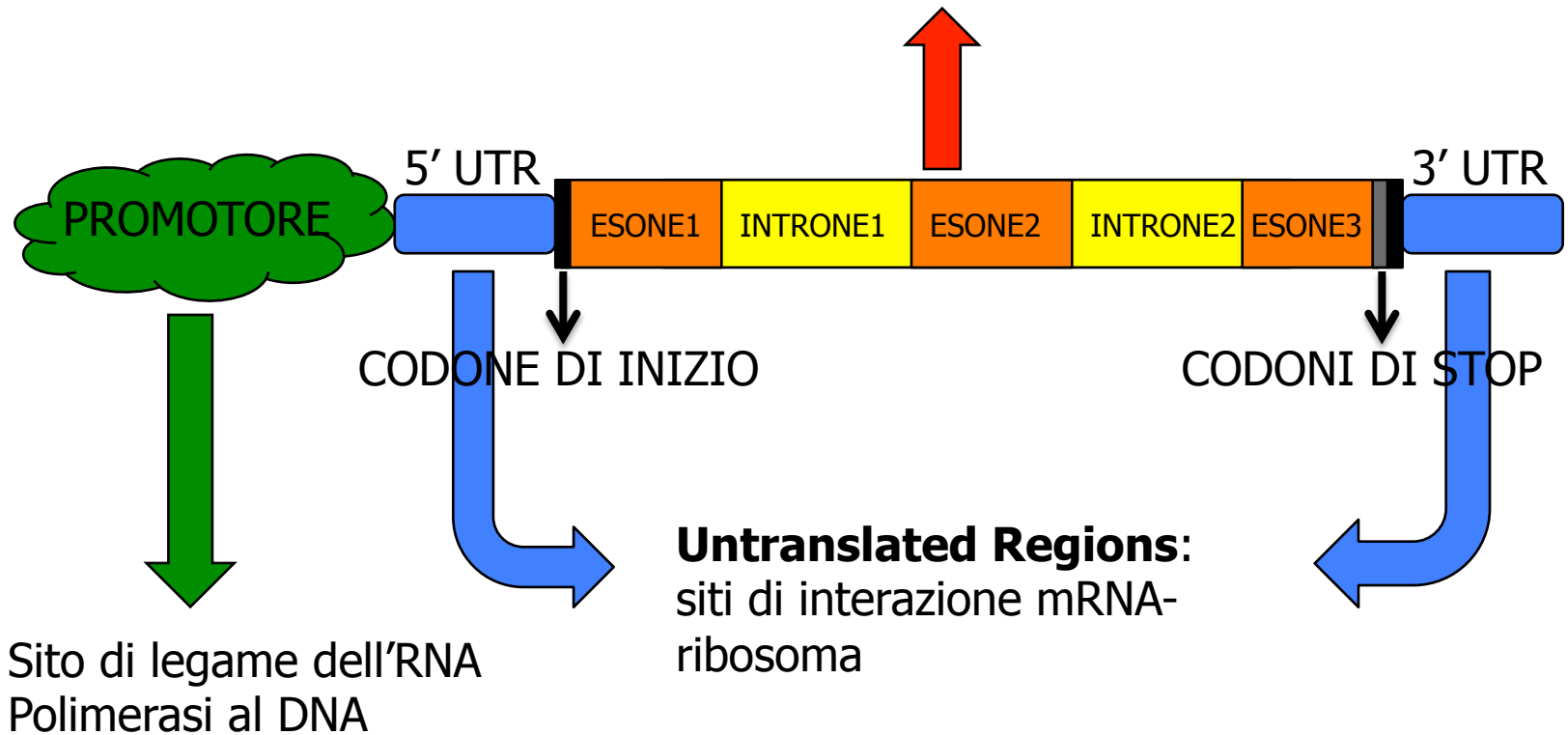
STRUTTURA DI UN GENE EUCARIOTA

Open Reading Frame (modulo aperto di lettura):
sequenza che viene trascritta e tradotta in proteina

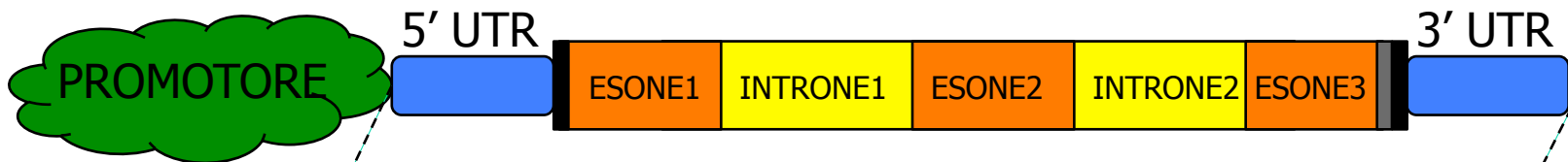


STRUTTURA DI UN GENE EUCARIOTA

Open Reading Frame (modulo aperto di lettura):
sequenza che viene trascritta e tradotta in proteina



DNA



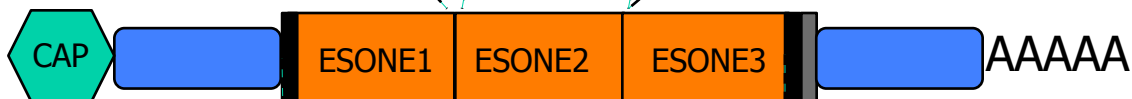
TRASCRIZIONE

Pre-mRNA



SPLICING

mRNA



TRADUZIONE

PROTEINA

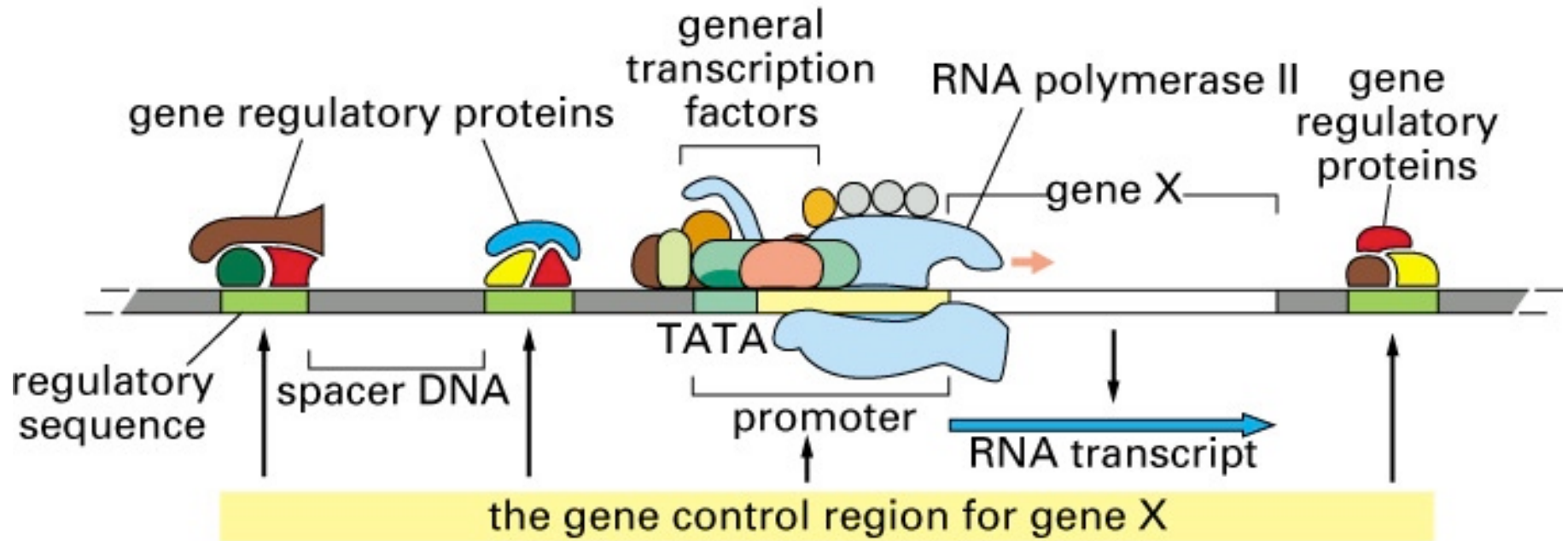


RNA POLIMERASI EUCARIOTICHE

Nei nuclei delle cellule eucariotiche si trovano 3 RNA polimerasi (I, II e III), ciascuna costituita da più subunità

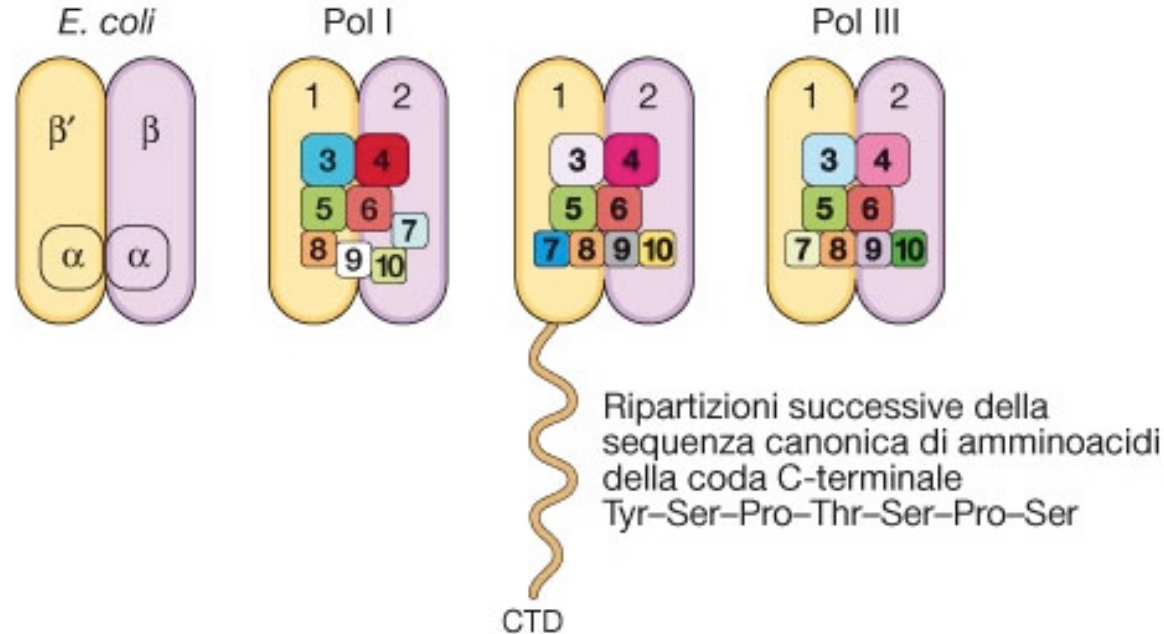
ENZIMA	Localizzazione	Geni trascritti
RNA Pol I	Nucleolus	RNA ribosomiale 45s (precursor of 28S, 18S e 5.8S)
RNA Pol II	Nucleoplasm	mRNA , snoRNA e alcuni snRNA
RNA Pol III	Nucleoplasm	tRNA rRNA 5S snRNA U6 Sequenze ripetitive (Alu, etc.)

Mechanism of RNA Polymerases



1. Transcription initiates, both in prokaryotes and eukaryotes, from many more sites than replication.
2. There are many more molecules of RNA polymerase per cell than DNA polymerase.
3. RNA polymerase proceeds at a rate much slower than DNA polymerase (approximately 50–100 bases/sec for RNA versus near 1000 bases/sec for DNA).
4. Finally the fidelity of RNA polymerization is much lower than DNA. This is allowable since the aberrant RNA molecules can simply be turned over.

RNA polimerasi II



L' RNA polimerasi II eucariota è molto simile strutturalmente a quella batterica, ma esistono delle **importanti differenze funzionali**:

- la RNAPolII degli eucarioti richiede un set di proteine aggiuntive, chiamate *FATTORI GENERALI DELLA TRASCRIZIONE*

- le RNA pol negli eucarioti devono affrontare la struttura della cromatina

FATTORI GENERALI DELLA TRASCRIZIONE

The recruitment of Pol II and initiation of transcription requires an assembly of proteins called general transcription factors. Six general transcription factors are known—TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, and TFIIH—each of which contains multiple subunits.

- 🔧 aiutano il posizionamento della RNAPol nella regione del promotore

- 🔧 contribuiscono allo svolgimento della doppia elica di DNA

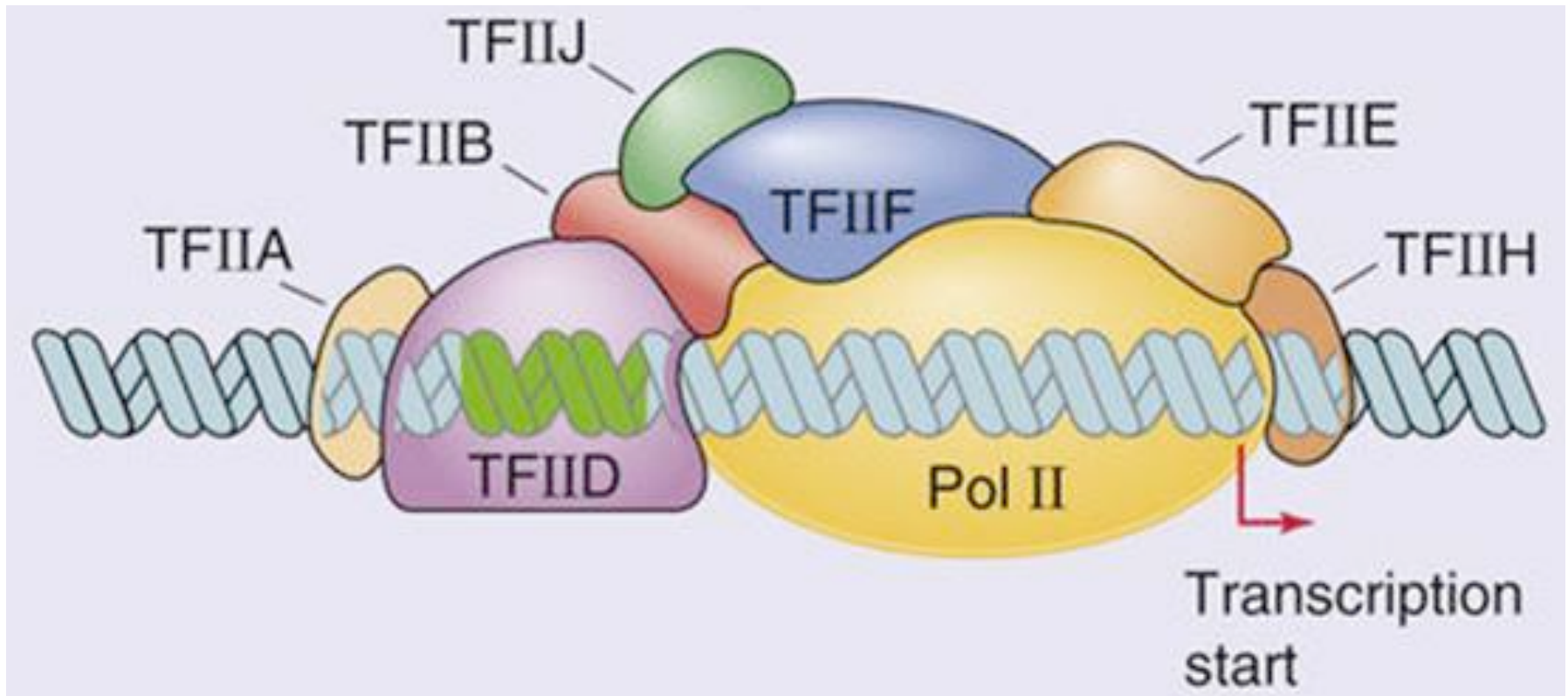
- 🔧 aiutano il distacco della RNAPol dal promotore e l'avvio della fase di elongazione

- 🔧 si chiamano GENERALI perchè si assemblano su **tutti** i promotori

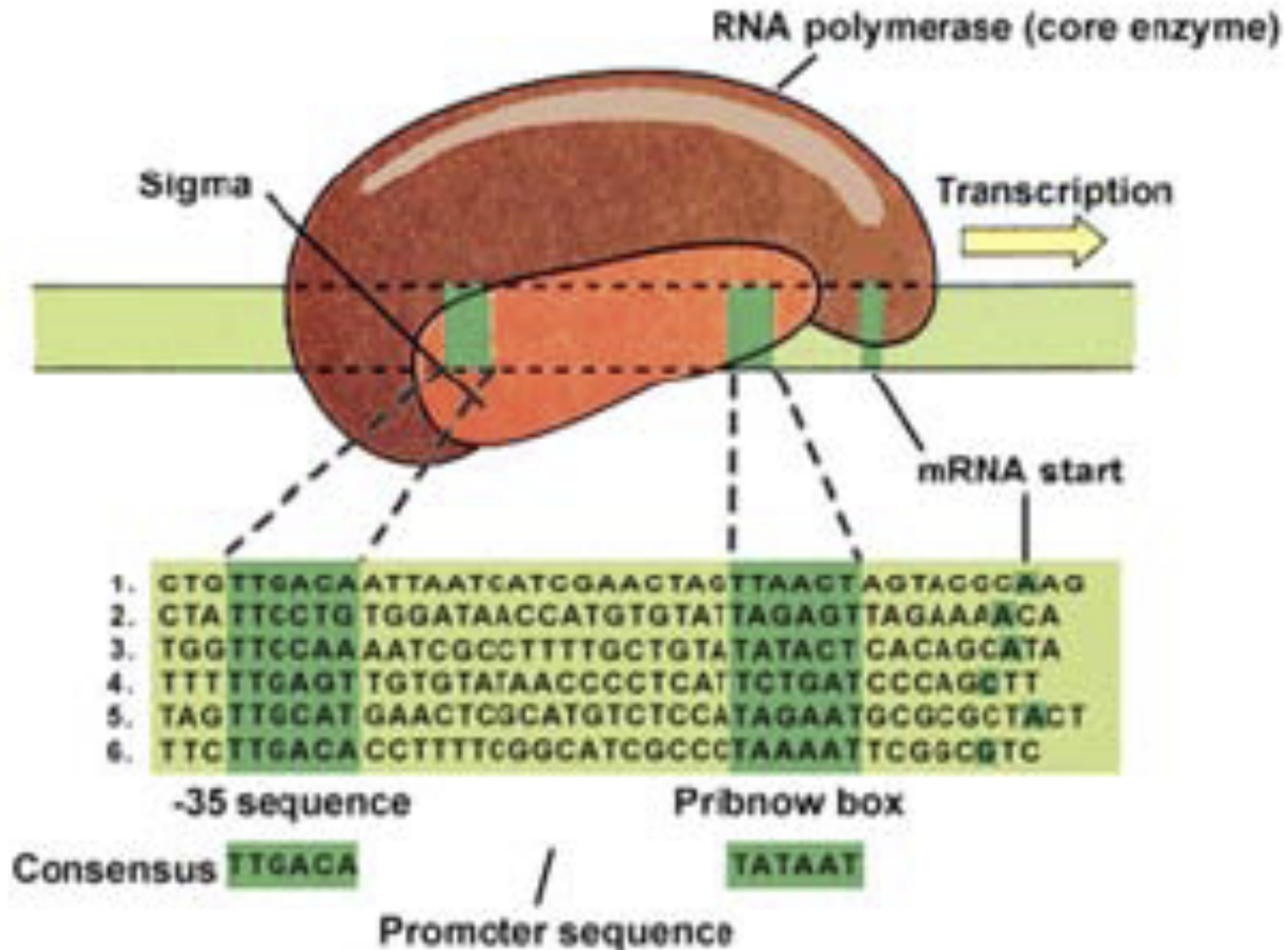
usati dalla RNAPol II

Fattore	Numero di subunità	Peso molecolare delle subunità in kDa	Funzioni
TFIIA	3	12, 19, 35	Stabilizza il legame di TBP e TFIIB
TFIIB	1	25	Lega TBP, seleziona il sito di inizio della trascrizione e recluta Pol II
TFIID	12	da 15 a 250	Interagisce con i fattori di regolazione ed è formata da TBP e TAF
TBP	1	38	Subunità di TFIID, si lega in maniera specifica alla TATA box
TFIIE	2	34, 57	Recluta TFIIH nel complesso di pre-inizio
TFIIF	2	30, 74	Lega Pol II e TFIIB
TFIIH		da 38 a 98	Ha un'attività elicasica che apre il promotore, fosforila la coda C-terminale (CTD) di Pol II
Pol II	12	da 10 a 220	Catalizza la sintesi dell'RNA usando il DNA come stampo
Totale	42	più di 1000	

Together with Pol II, the general transcription factors constitute the basal transcriptional machinery, which is also known as the RNA polymerase holoenzyme

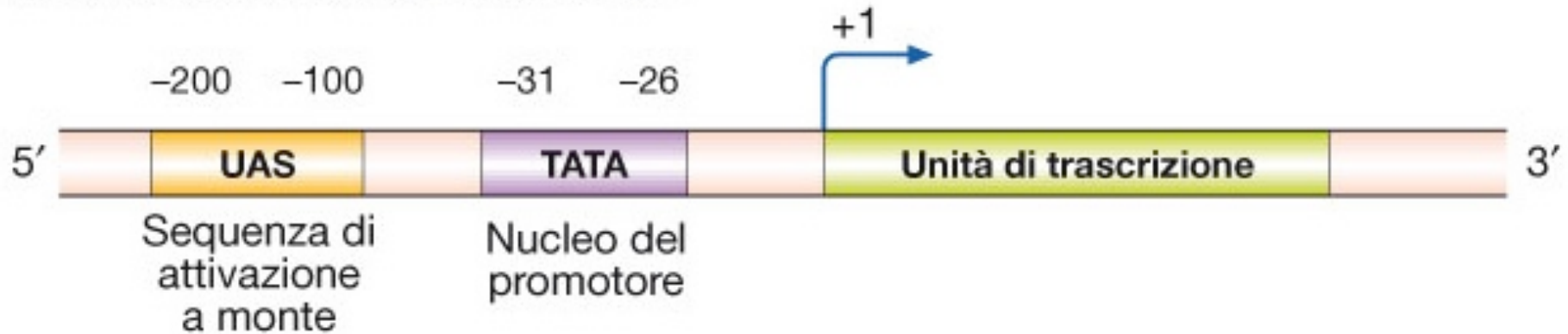


Il promotore tipico nei procarioti



Il promotore tipico della RNA Pol II

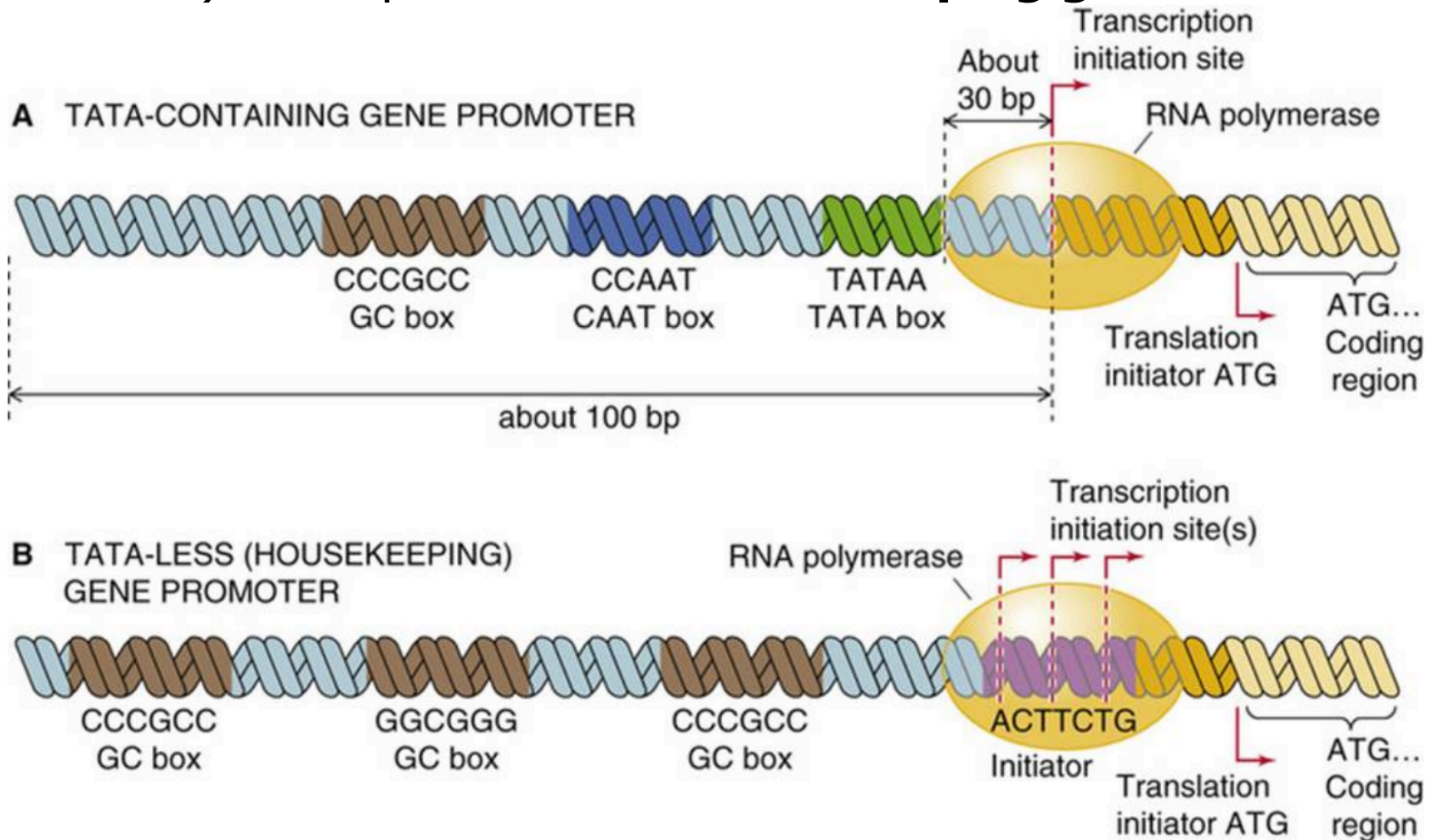
A. Unità di trascrizione del lievito



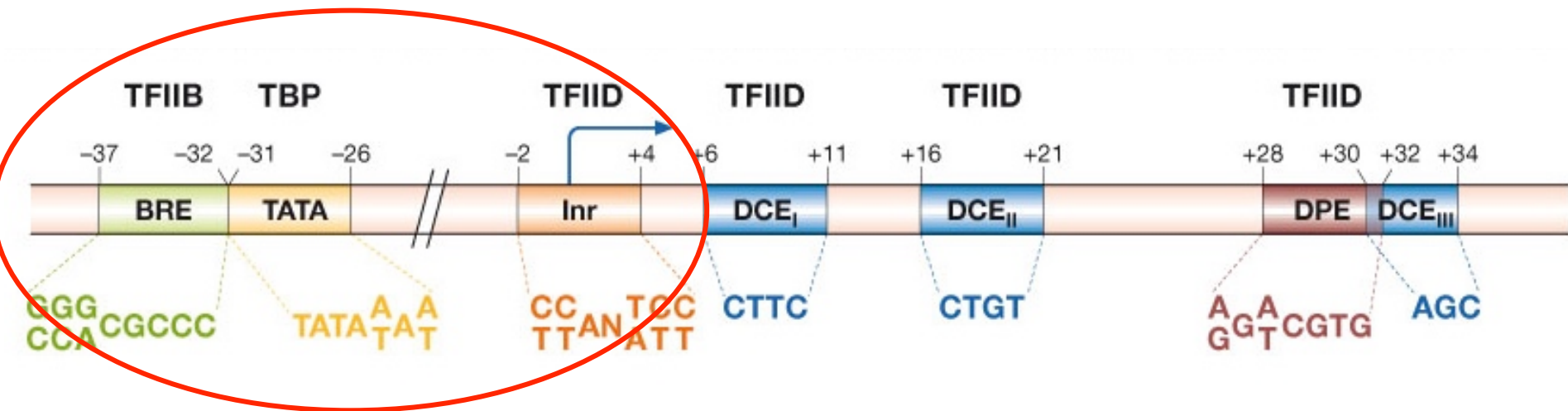
In lievito il promotore è costituito da una TATA box e da un elemento UAS (*upstream activating sequence*) riconosciuto da attivatori specifici.

PROMOTORI PRIVI DI TATA box.

CpG islands (20-50 nucleotides within 100-1000 bp upstream the start site) act as promoters for **housekeeping genes**



A transcription factor called **SP1** recognizes these CG rich regions



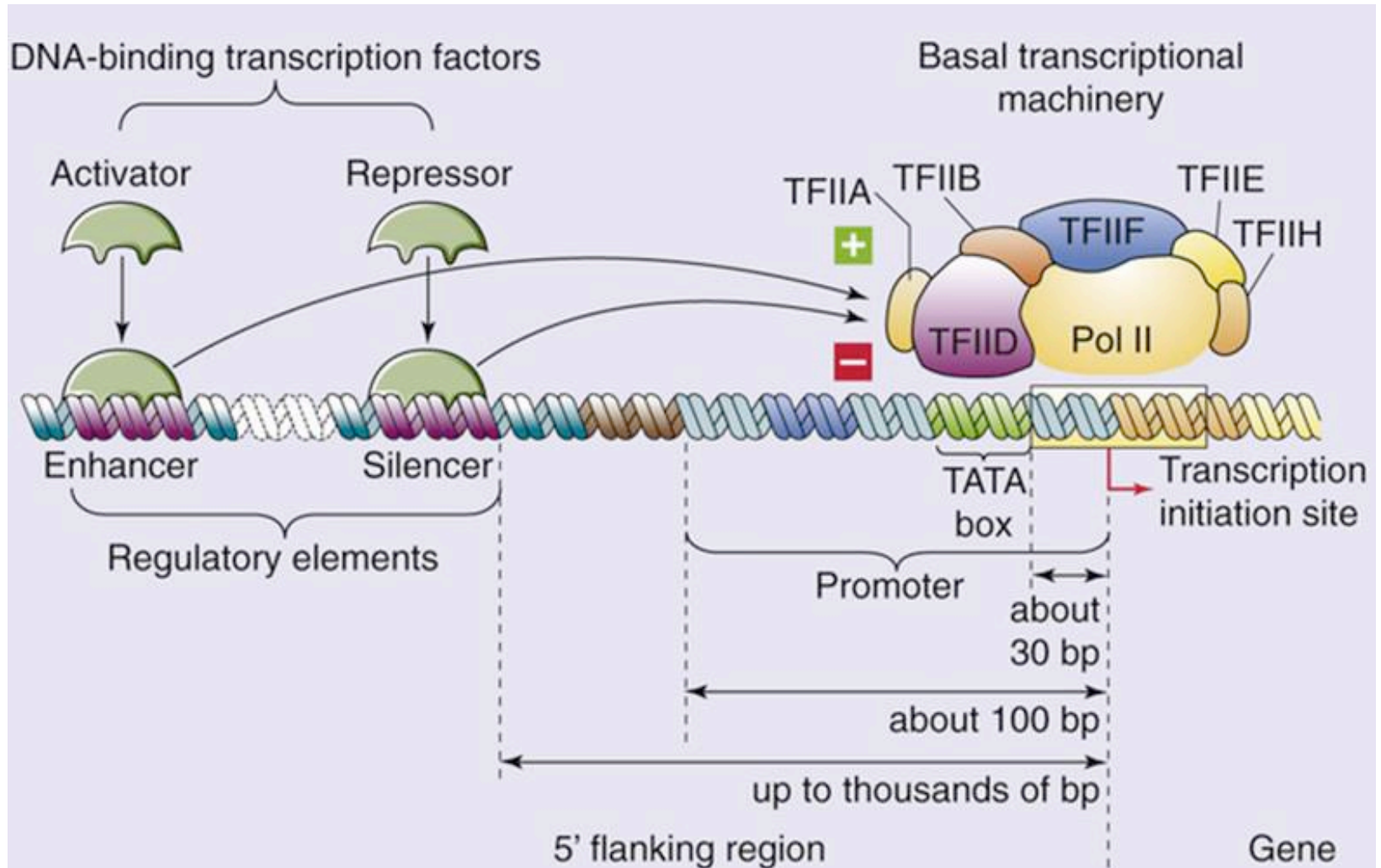
Il **promotore minimo** di PolII e' il tratto di DNA indispensabile per far iniziare la trascrizione.

Contiene **la TATA box**, preceduta, in genere, dall'elemento BRE (*B responsive element*) cui si lega TFIIB. Esistono anche siti a valle

Oltre agli elementi che costituiscono il promotore minimo, la struttura generale di un promotore di POLII contiene elementi fino a -200 bp a monte del sito d'inizio della trascrizione (**elementi prossimali**) ed elementi piu' **distali**, che possono essere posizionati fino a 10kbp dal sito d'inizio, detti **elementi regolatori a lungo raggio**.

ELEMENTI REGOLATORI A LUNGO RAGGIO

Gli “elementi regolatori a lungo raggio” sono sequenze regolatrici che funzionano a distanza di 100Kb o più dal promotore

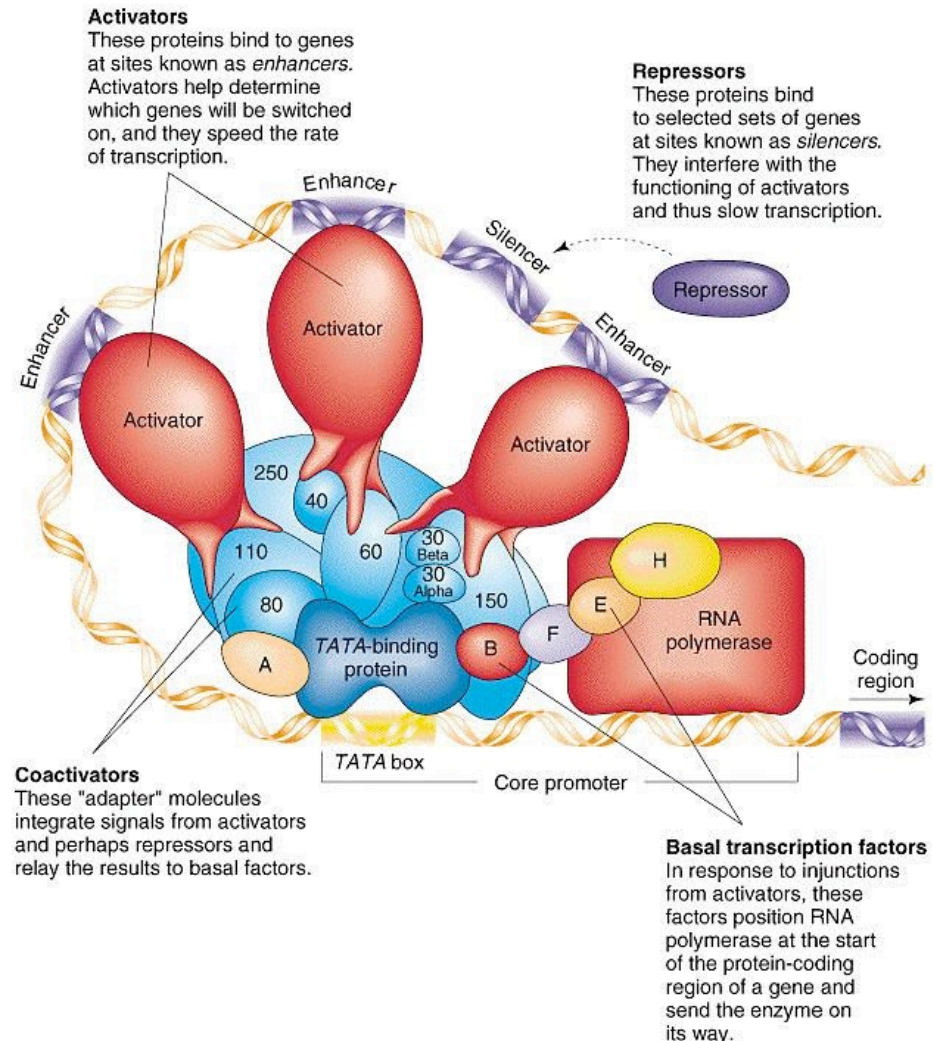


A COMPREHENSIVE MODEL OF REGULATION OF RNA POLYMERASE II TRANSCRIPTION:

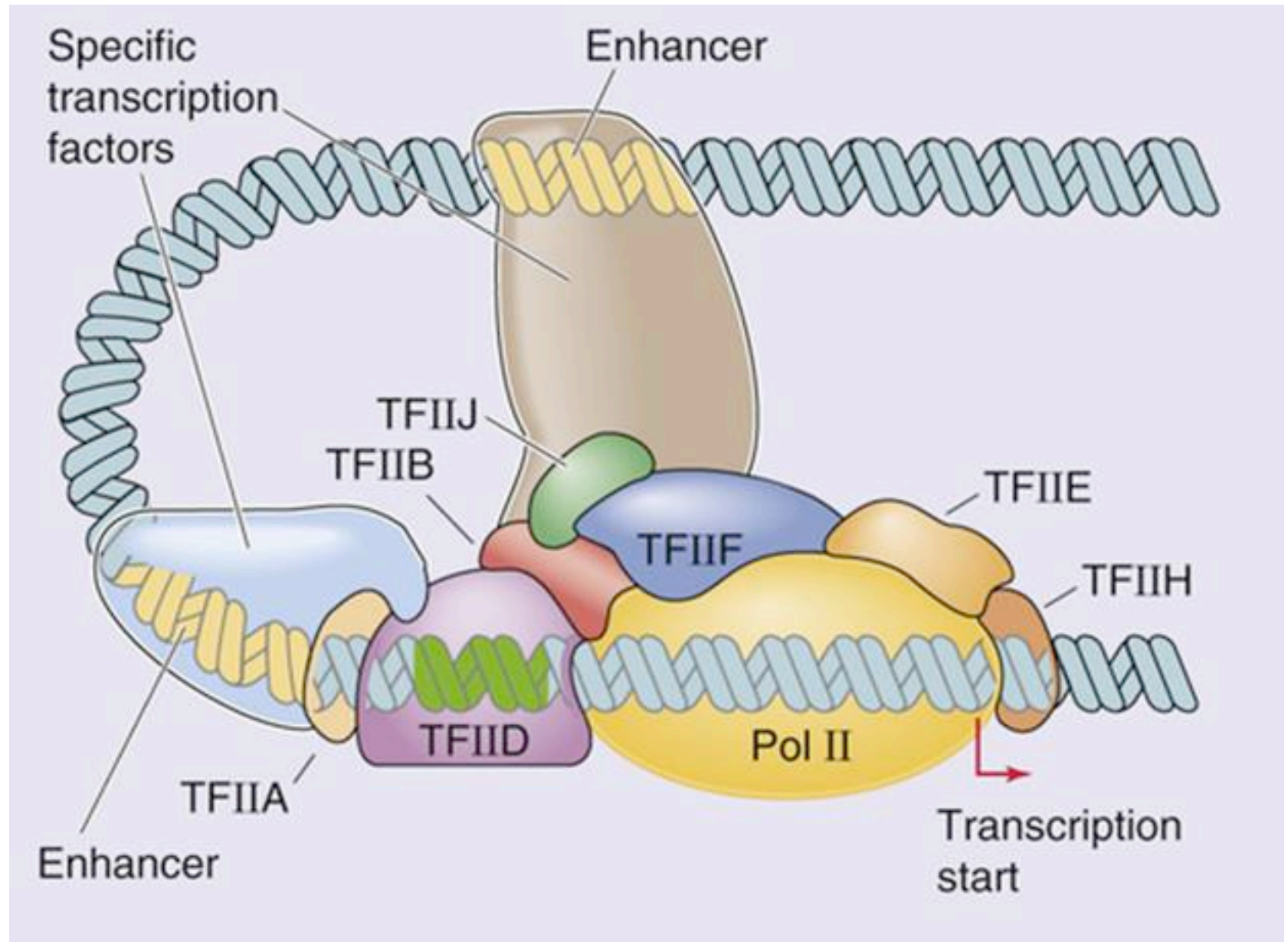
Activators bind to **enhancer** sites, controlled by hormones or other signals, increasing transcription of the regulated gene.

Repressors bind to **silencer** sites, controlled by hormones or other signals, decreasing transcription of the regulated gene, possibly by interfering with activators.

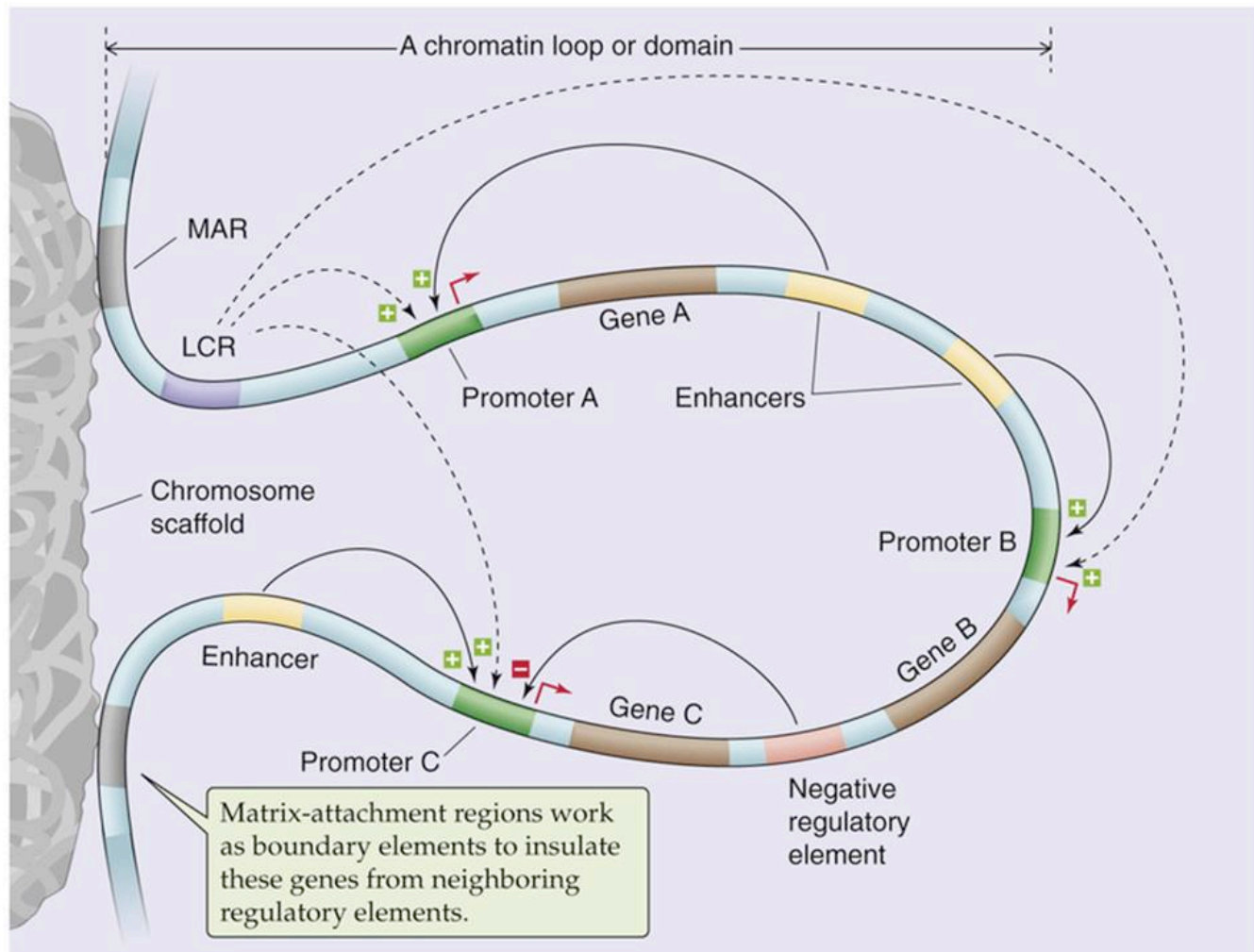
Coactivators bind to activators and/or repressors (at one end) and to basal factors (at the other end). The coactivators somehow communicate the signal from activators and/or repressors to the RNA polymerase.

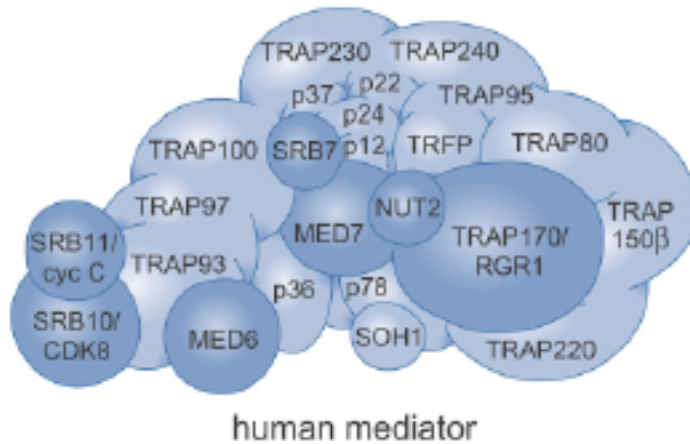


DNA looping

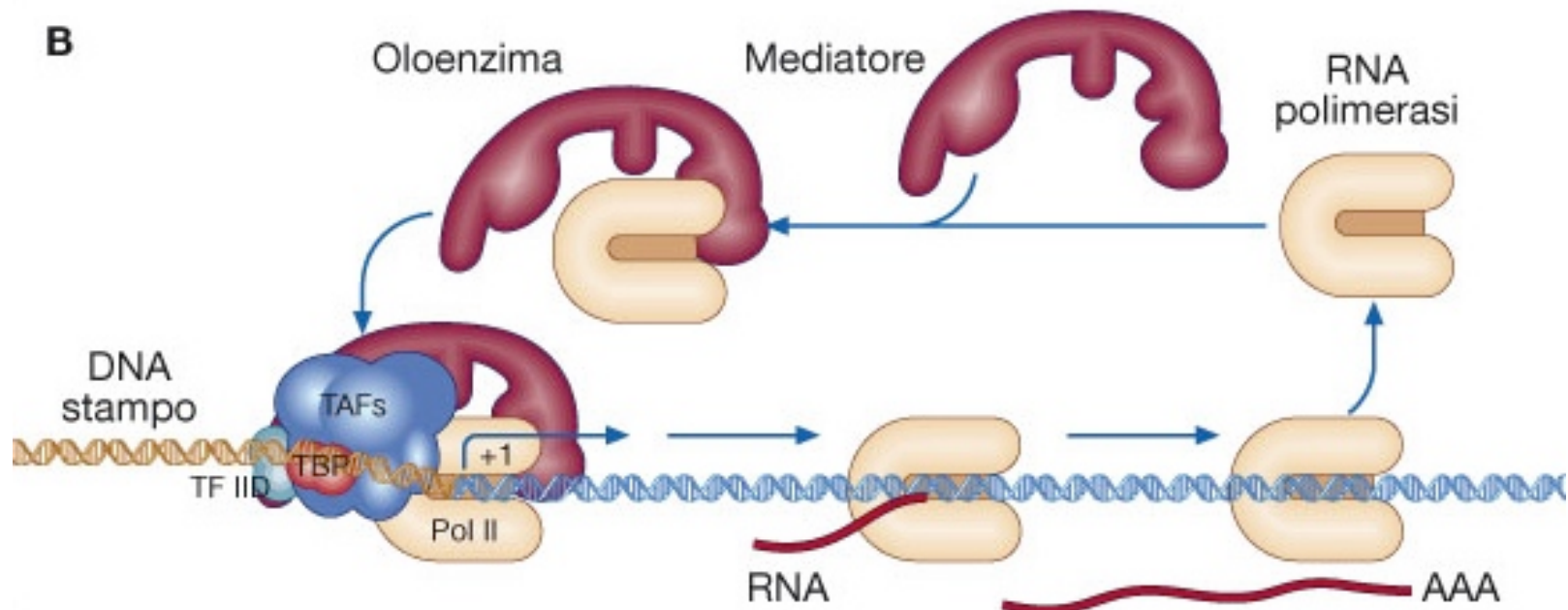


The **matrix-attachment region (MAR)** is an insulator element on the DNA. Matrix-attachment regions attach to the chromosome scaffold and thus isolate this loop of chromatin from other chromosomal domains. Contained within this loop are several cis-acting elements including promoters, enhancers, negative regulatory elements

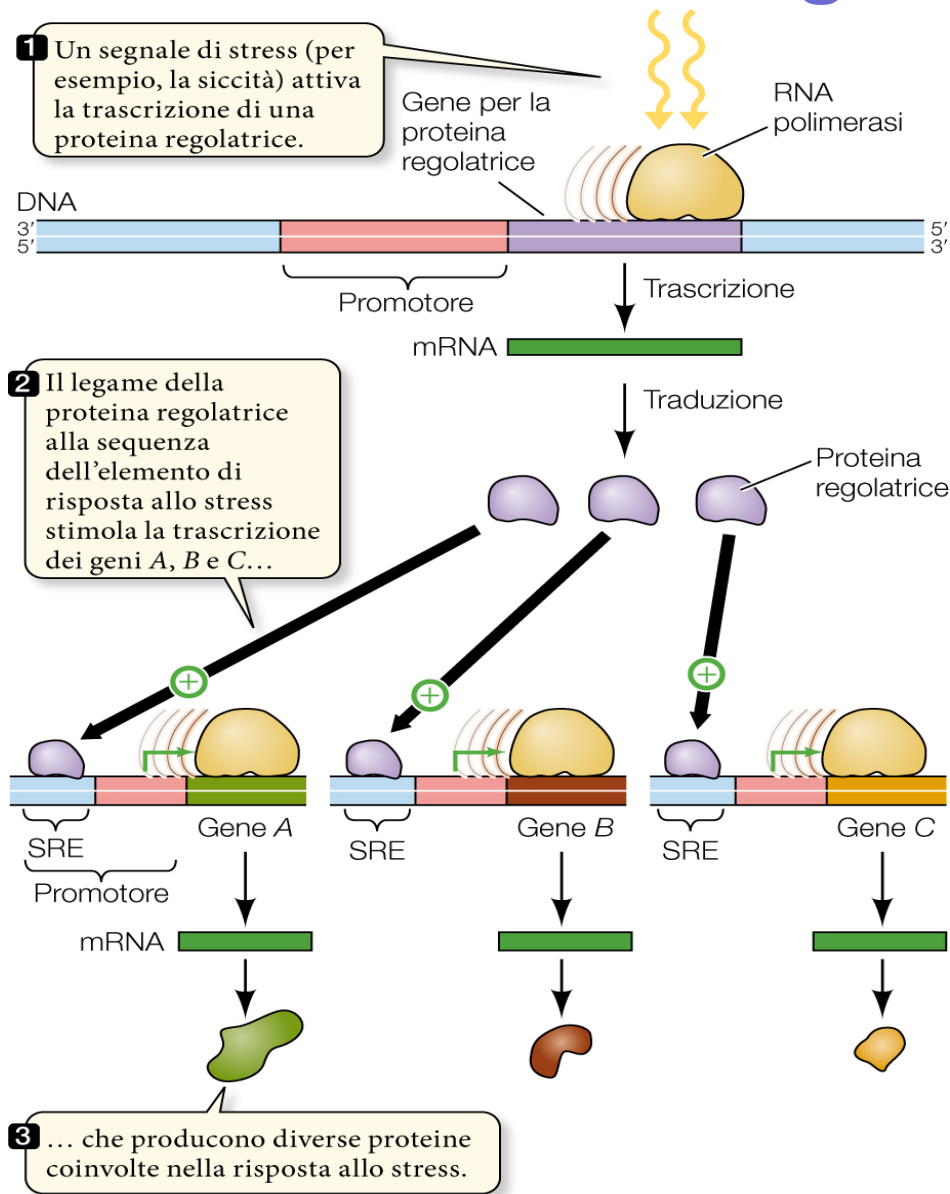




Il **MEDIATORE** è un complesso proteico di circa 20 subunita' che media l'interazione degli **ATTIVATORI TRASCRIZIONALI** con la RNAPolII e con i fattori generali della trascrizione

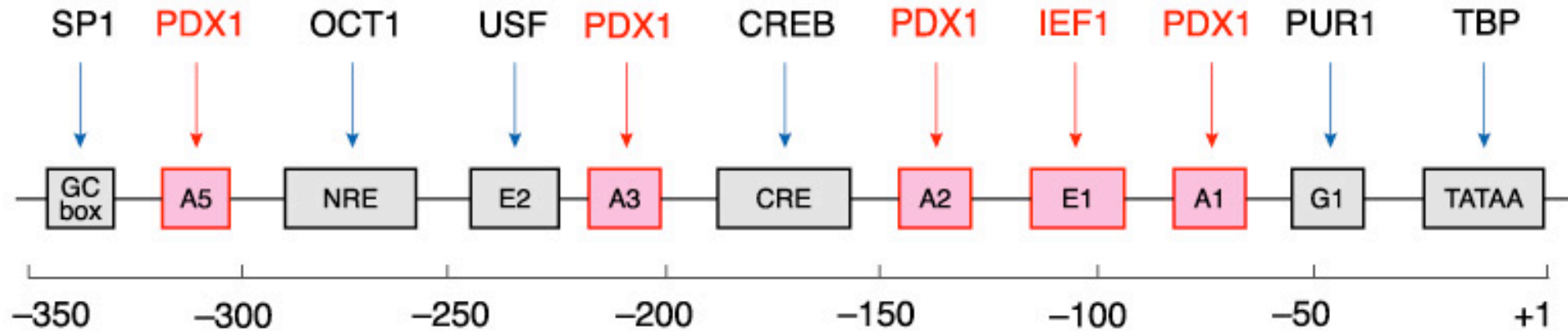


La regolazione durante la trascrizione: coordinazione fra geni



La coordinazione dell'espressione di più geni avviene grazie a un singolo segnale ambientale, che induce la sintesi di una proteina regolatrice della trascrizione (**fattore di trascrizione specifico**).

Il promotore del gene umano dell'insulina



Nero: fattori ubiquitari

Rossi: fattori specifici delle cellule beta pancreatiche

Transcription Factors

DNA-Binding Transcription Factors and the DNA Sequences They Recognize

NAME	TYPE	RECOGNITION SITE*	BINDS AS
Sp1	Zinc finger	5'-GGGCGG-3'	Monomer
AP-1	bZIP	5'-TGASTCA-3'	Dimer
C/EBP	bZIP	5'-ATTGCGCAAT-3'	Dimer
Heat shock factor	bZIP	5'-NGAAN-3'	Trimer
ATF/CREB	bZIP	5'-TGACGTCA-3'	Dimer
c-Myc	bHLH	5'-CACGTG-3'	Dimer
Oct-1	HTH	5'-ATGCAAAT-3'	Monomer
NF-1	Novel	5'-TTGGCN ₅ GCCAA-3'	Dimer

*N indicates any nucleotide; S indicates G or C.

DNA-binding transcription factors do not recognize single, unique DNA sequences; rather, they recognize a family of closely related sequences.

For example, the transcription factor AP-1 (activator protein 1) recognizes the sequences

5'-TGACTC-3'

5'-TGAGTC-3'

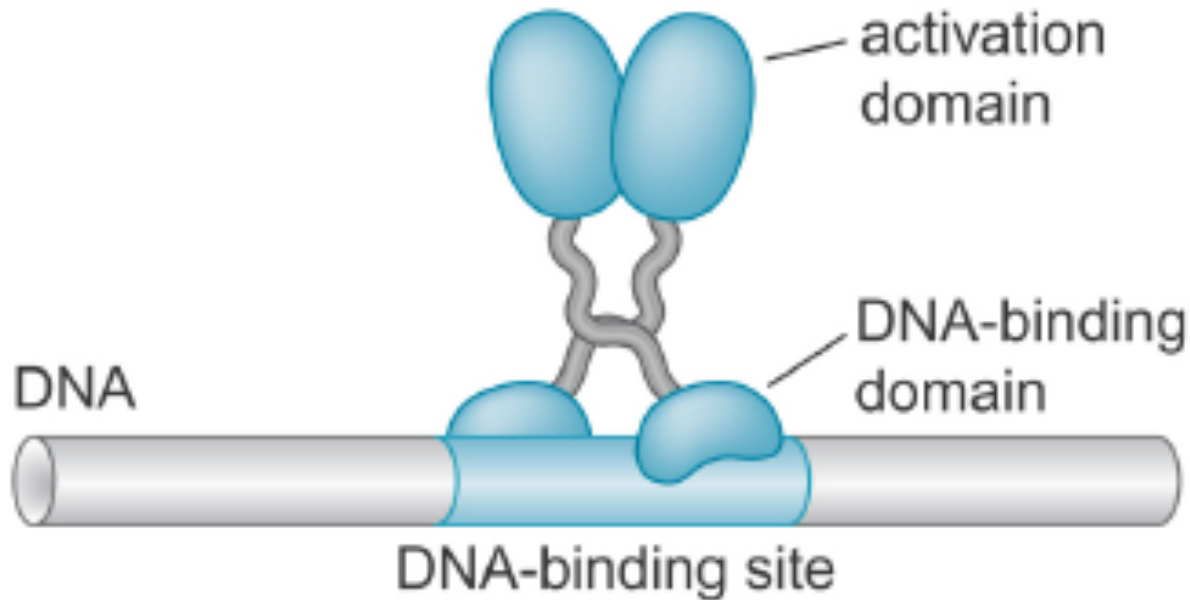
5'-TGAGTCT-3'

As a consequence of this redundancy, the recognition site for a transcription factor may occur many times in the genome.

Transcription Factors

I *fattori di trascrizione* hanno un'organizzazione in domini di tipo modulare:

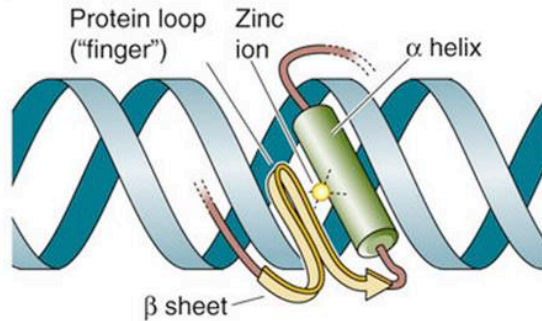
- a) Dominio di legame al DNA;
- b) Dominio di attivazione;
- c) Regione di dimerizzazione.



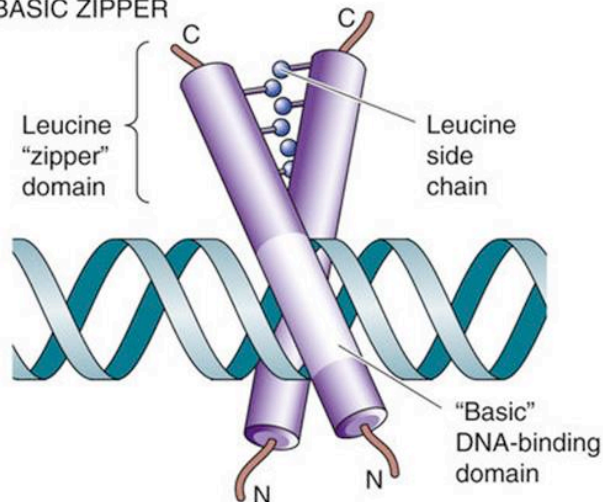
DNA-binding transcription factors have been grouped into families. Members of the same family use common structural motifs for binding DNA.

Each of these motifs consists of a particular tertiary protein structure in which a component, usually an α helix, interacts with the major groove of the DNA.

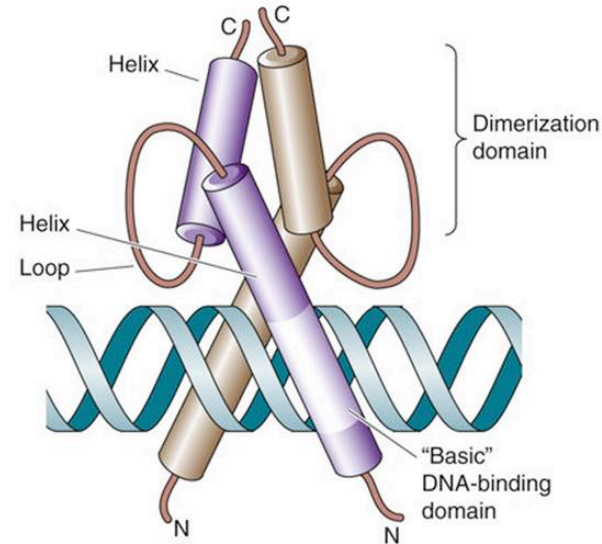
A ZINC FINGER



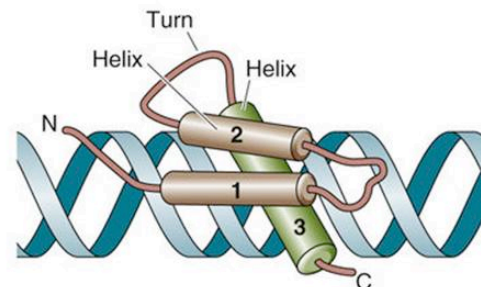
B BASIC ZIPPER



C BASIC HELIX-LOOP-HELIX

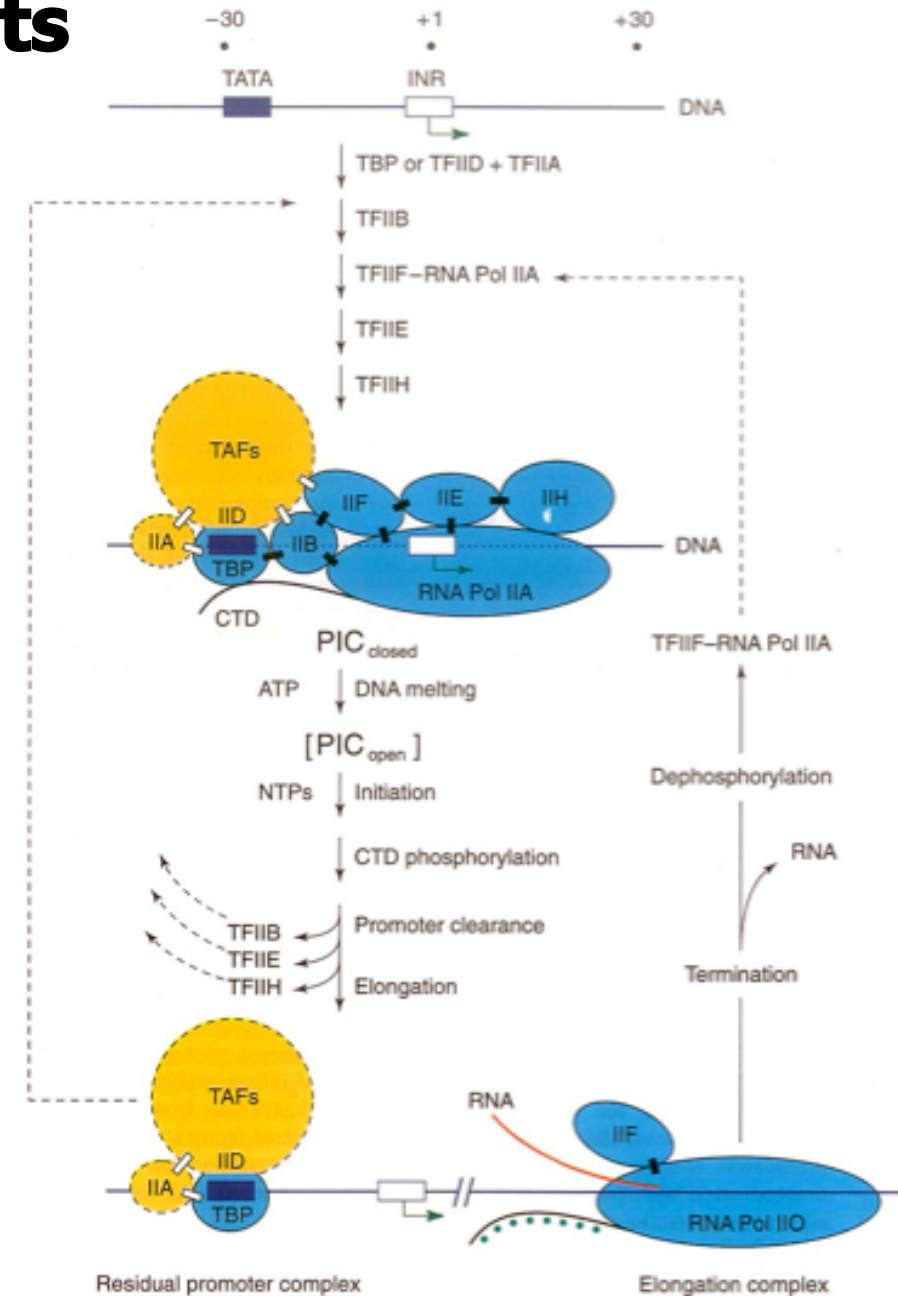


D HELIX-TURN-HELIX



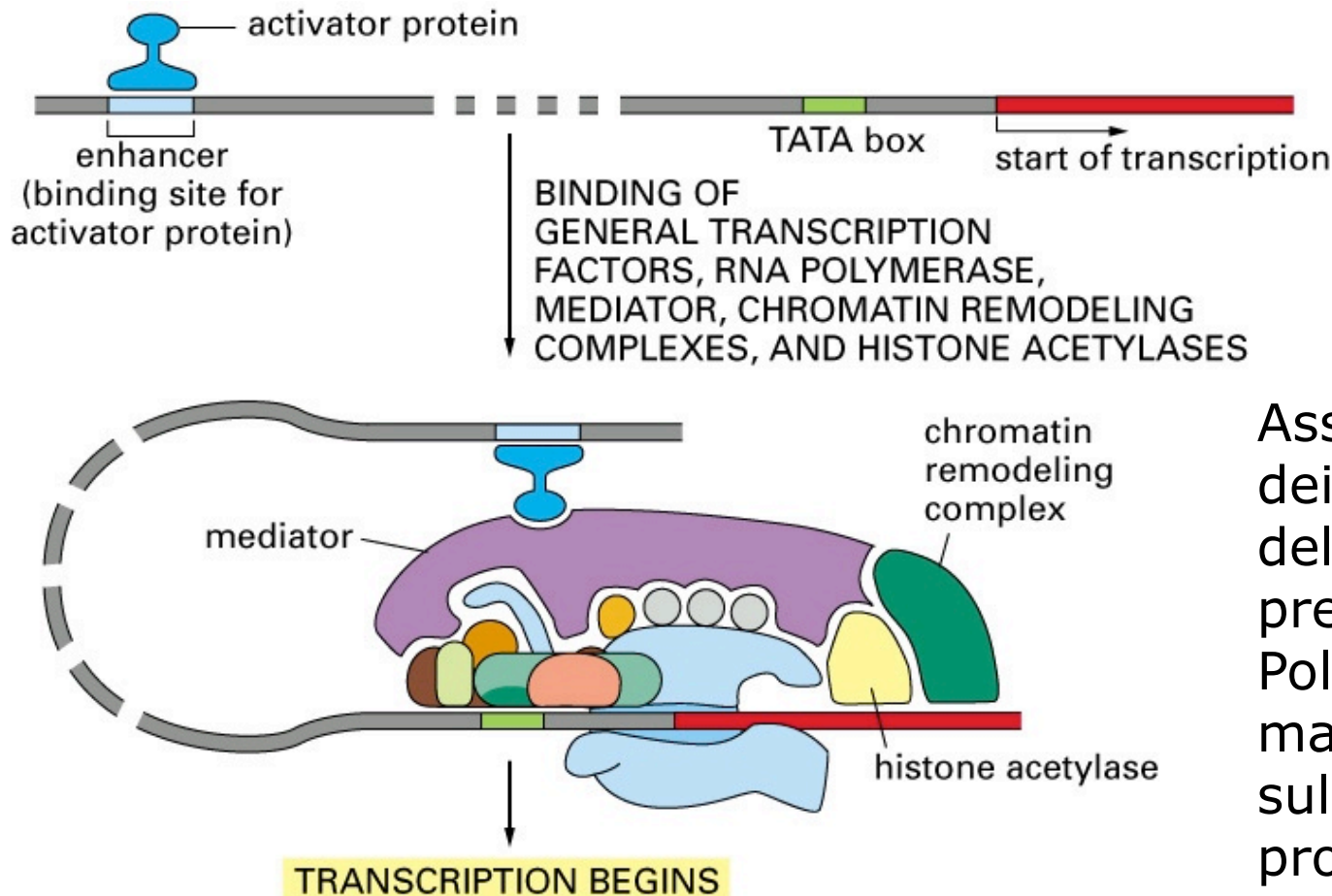
Transcription cycle consists of several steps

- ✧ Preinitiation- PreInitiation Complex (PIC) assembly at the promoter
- ✧ Initiation- Melting of dsDNA in an ATP dependent manner; Rna Pol-CTD phosphorylation
- ✧ Promoter clearance- stalled RNA Pol II and formation of RNA-DNA hybrid
- ✧ Elongation
- ✧ Termination



TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI: MECCANISMO DELLA TRASCRIZIONE

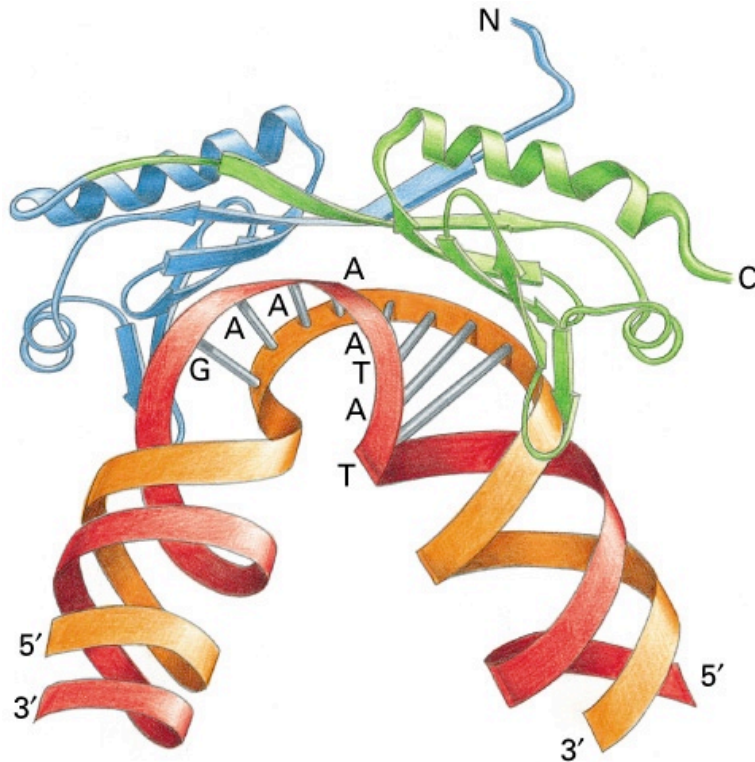
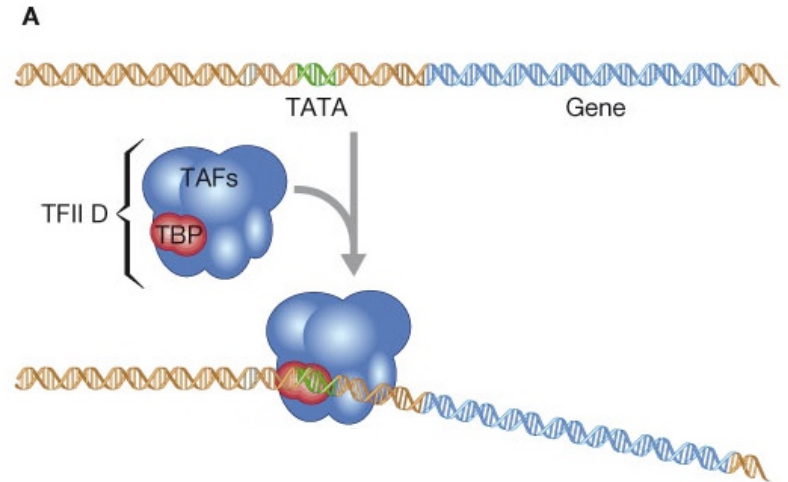
1. FORMAZIONE DEL COMPLESSO DI PREINIZIO:



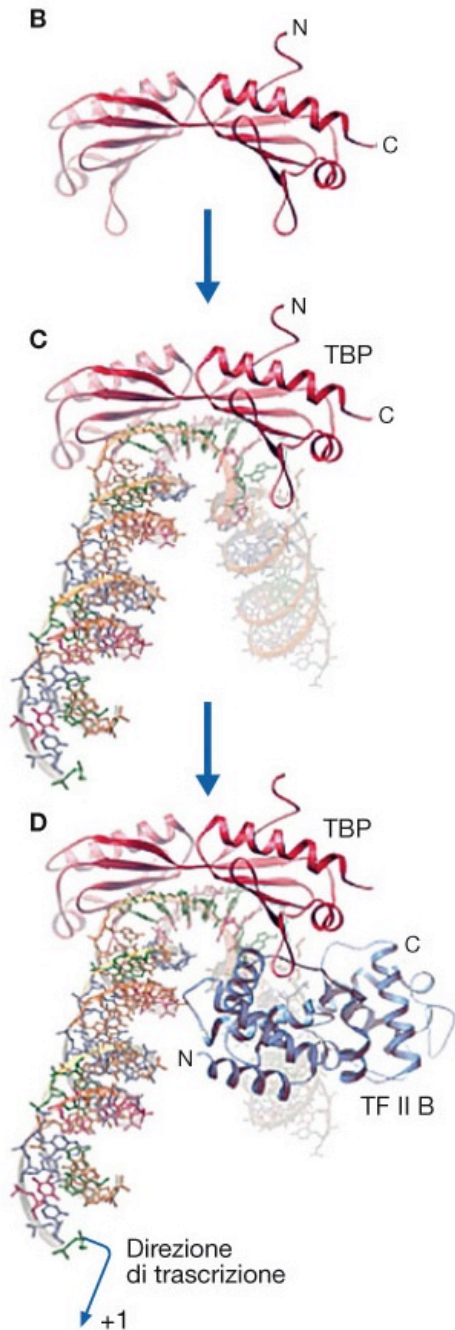
Assemblaggio dei componenti del complesso di preinizio; la RNA Pol non è attiva, ma "bloccata" sulla regione del promotore

1. Pre-Initiation Complex Formation

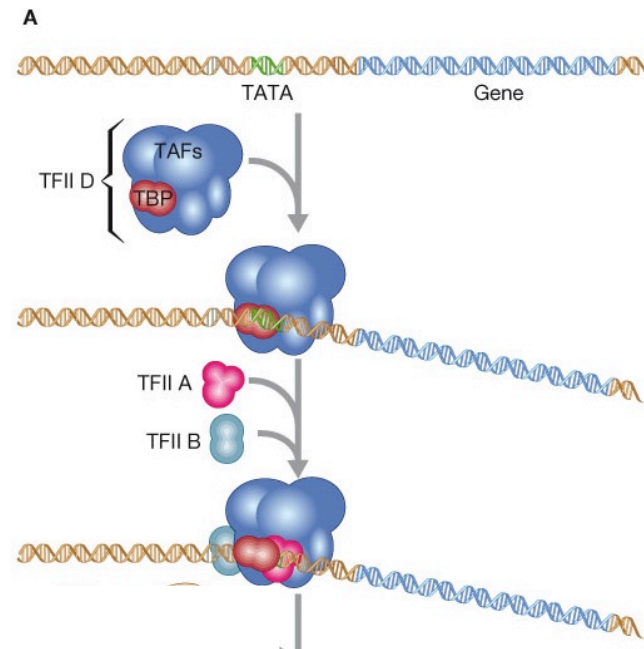
1. The assembly of the PIC starts with the binding of **TFIID** to the **TATA box**. The subunit of TFIID that recognizes it is called **TBP** (TATA-binding protein); 11 different **TAFs** are targets of activators which strengthen the transcription.



TBP binding induces the formation of a 80° bend in the DNA in the region of the TATA box. This distortion brings DNA sequences on both sides together for subsequent protein assembly.

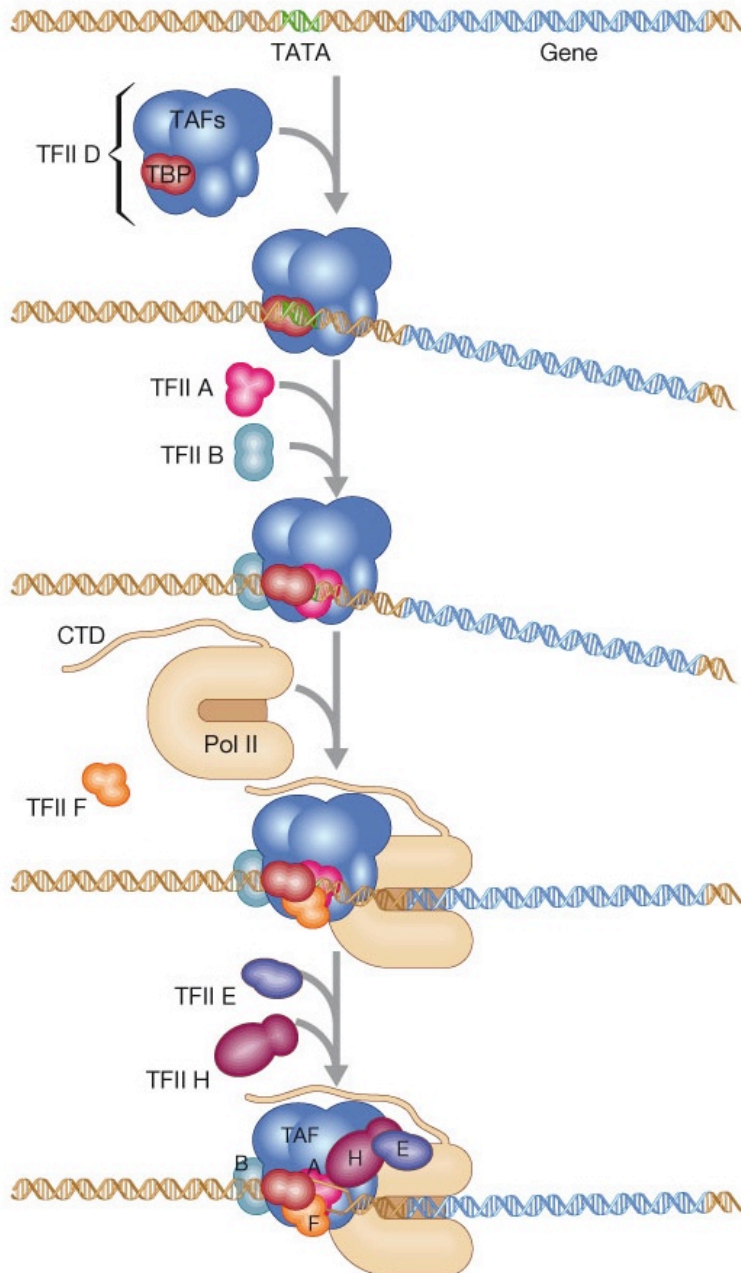


2. The DNA bend mediated by TBP provides a recognition structure for **TFIIB**, which ensures correct positioning of RNA polymerase II relative to the transcription start site.



3. **TFIIA** binding stabilizes TBP-DNA interaction and prohibits the binding of putative repressors able to block the PIC formation.

A



3. Once the RNA PolII is on the promoter, the **TFIIF** binding stabilizes TBP-DNA and DNA-TFIIB interactions.

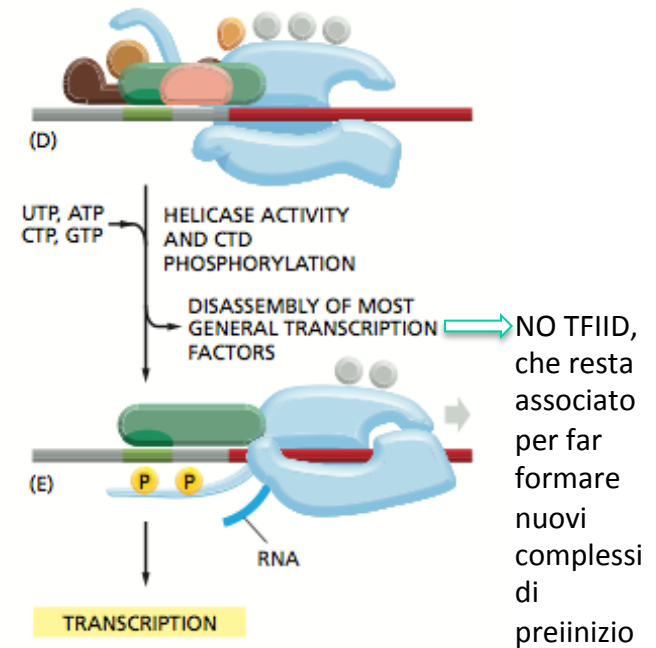
4. At this point, **TFIIE** binding brings **TFIIH** to the PIC complex. The disruption to the base pairing needed to form the open promoter complex is brought about by the helicase-ATP dependent activity of **TFIIH**.

TFIIH is not only able to open the DNA strands, but thanks to its Kinase activity, it **phosphorylates the C-terminal domain of the RNA PolII**.

TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI: MECCANISMO DELLA TRASCRIZIONE

2. **INIZIO ABORTIVO:** la RNA Pol non è ancora uscita dalla regione del promotore e sintetizza una serie di brevissimi trascritti; intanto la bolla di trascrizione si espande finché non vengano svolte 18bp dello stampo e l'RNA sia lungo almeno 7nt;

3. **CLEARANCE DEL PROMOTORE:** raggiunta una lunghezza del trascritto di 7nt, 8 bp a monte della bolla si riappaiano (collasso della bolla), non serve più l'attività elicastica di TFIIH e si ha la fosforilazione in più punti del CTD della RNA Pol II, che lascia la regione del promotore



La fosforilazione della coda C-terminale della RNA polimerasi II è un evento essenziale per iniziare una trascrizione processiva!!!

RNA POLII TAIL PHOSPHORYLATION

RNAPolII tail phosphorylation is *essential* to promote the promoter clearing and the elongation phase of transcription; moreover, it's important for a processive transcription reaction.

CTD RNA Pol II:

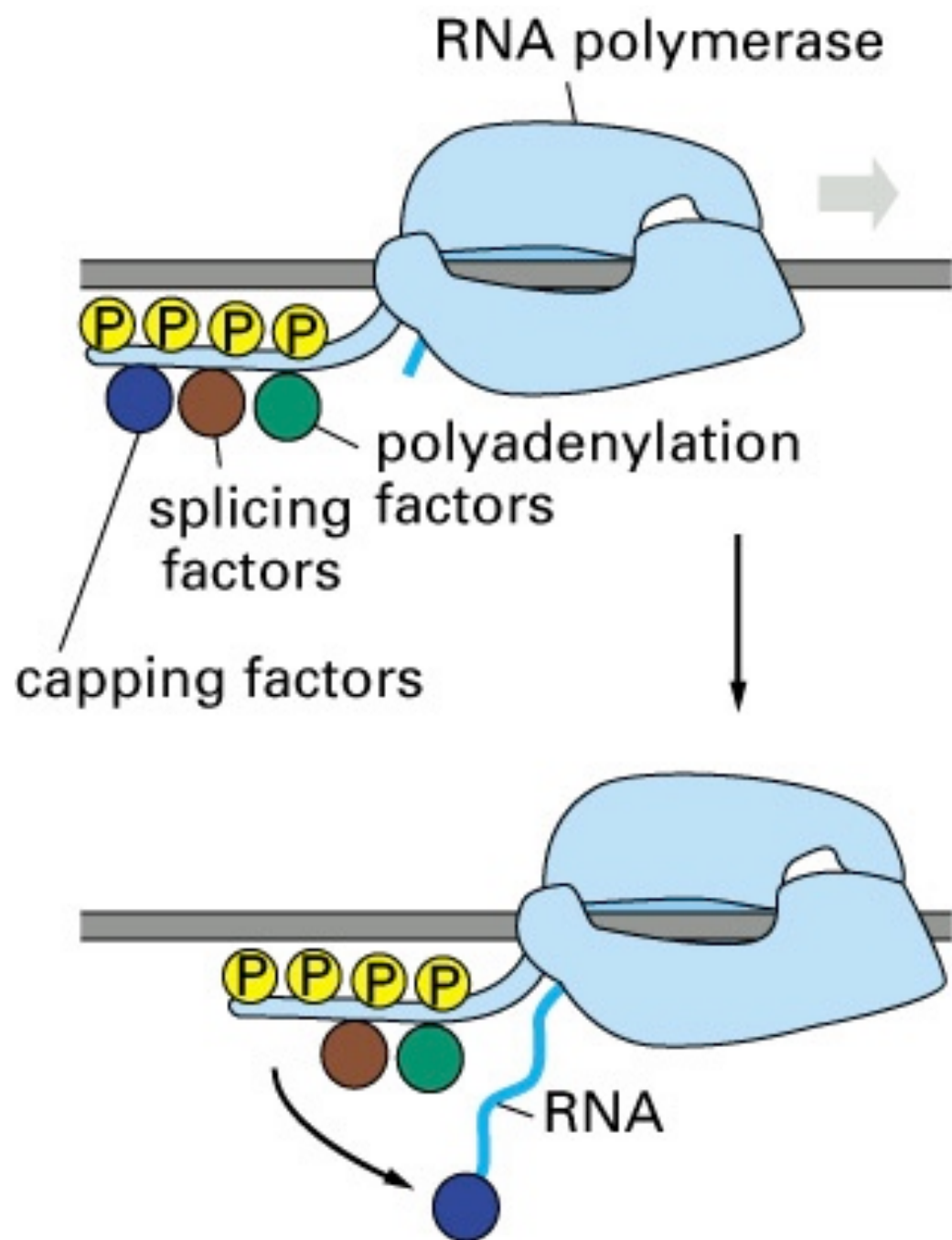
7 aminoacids repeats

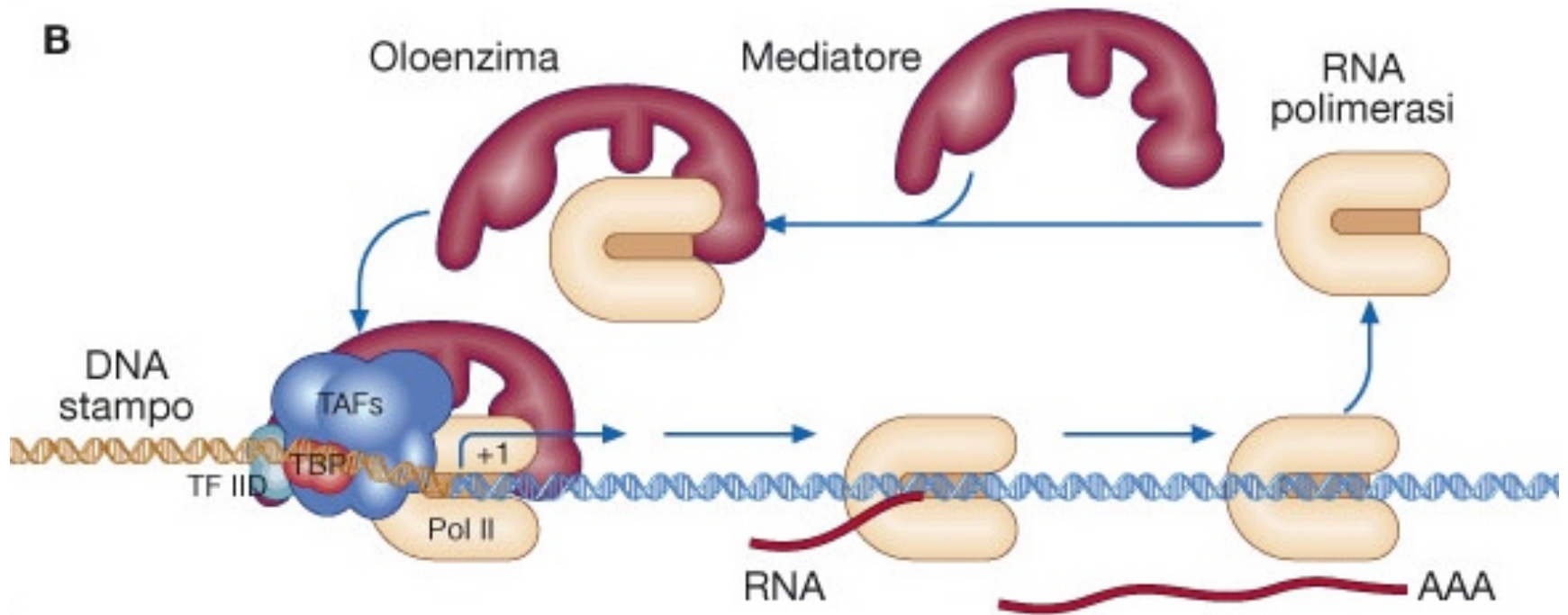
Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser

26 repeats in *S. cerevisiae*

52 repeats in mammalian cells

The tail phosphorylation of RNA polymerase II also causes **components of the RNA processing machinery (capping&splicing) to load onto the polymerase** and thus be in position to modify the newly transcribed RNA as it emerges from the polymerase.





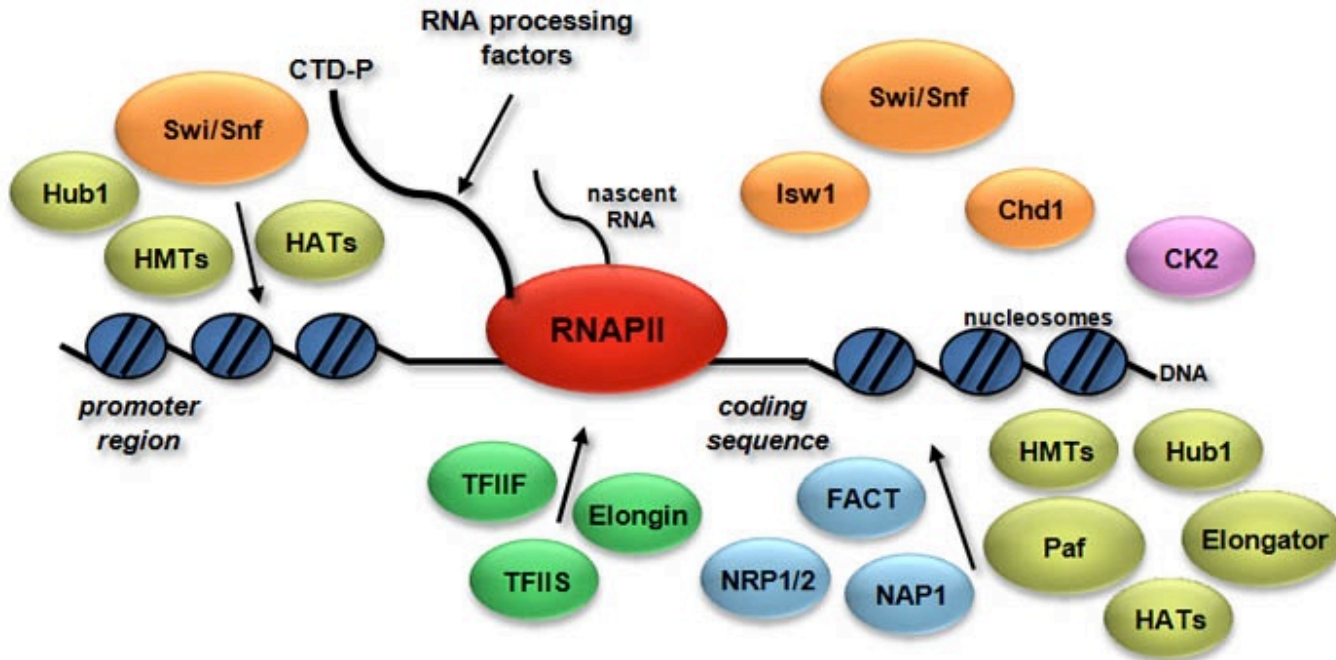
Il **MEDIATORE:**

1. interagisce con il CTD della PolII
2. Stimola la fosforilazione TFIIH-dipendente del CTD
3. La fosforilazione del CTD causa la dissociazione del mediatore dalla PolII.

L'interazione con TFIID e' essenziale per assemblare un complesso attivo.

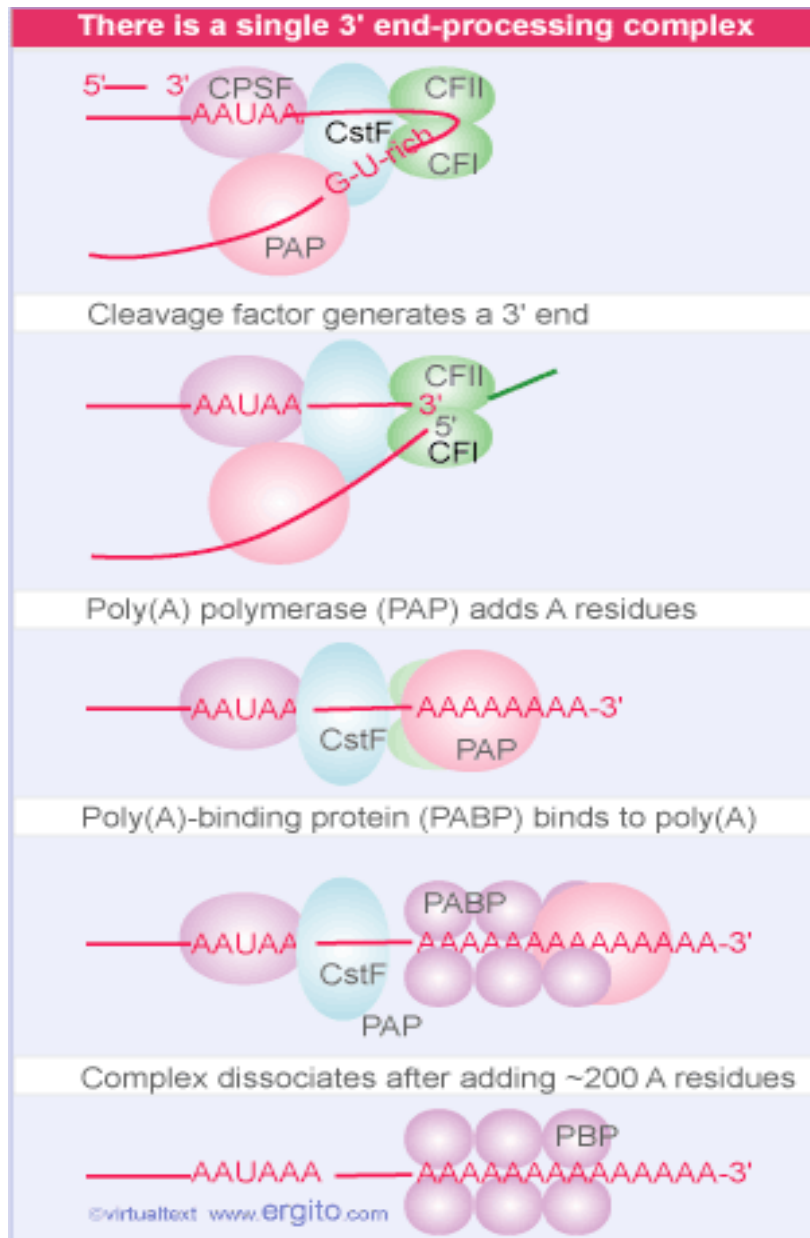
Once the polymerase II has begun elongating the RNA transcript, **most of the general transcription factors are released from the DNA** so that they are available to initiate another round of transcription with a new RNA polymerase molecule.

ALLUNGAMENTO: la RNA Pol si sposta lungo lo stampo mentre trascrive. Il DNA viene svolto davanti alla polimerasi e riavvolto dietro di essa.



Molti fattori intervengono durante l'allungamento, tra cui complessi di modificazione degli istoni e di rimodellamento della cromatina, perché è ovvio che la trascrizione procede attraverso la struttura dei nucleosomi che deve venir modificata e rimodellata affinché la RNA polimerasi possa passare (**verde**: fattori che controllano l'attività della RNA polimerasi; **blu** e **arancio**: fattori che facilitano il passaggio attraverso la cromatina; **turchese**: fattori che modificano gli istoni).

TERMINAZIONE: FATTORI PROTEICI COINVOLTI



Fattore di specificità (CPSF) riconosce la sequenza AAUAAA e aumenta la processività della poli(A) polimerasi

Fattore di stimolazione del taglio (CstF) lega la sequenza ricca in G-U a valle del sito di taglio

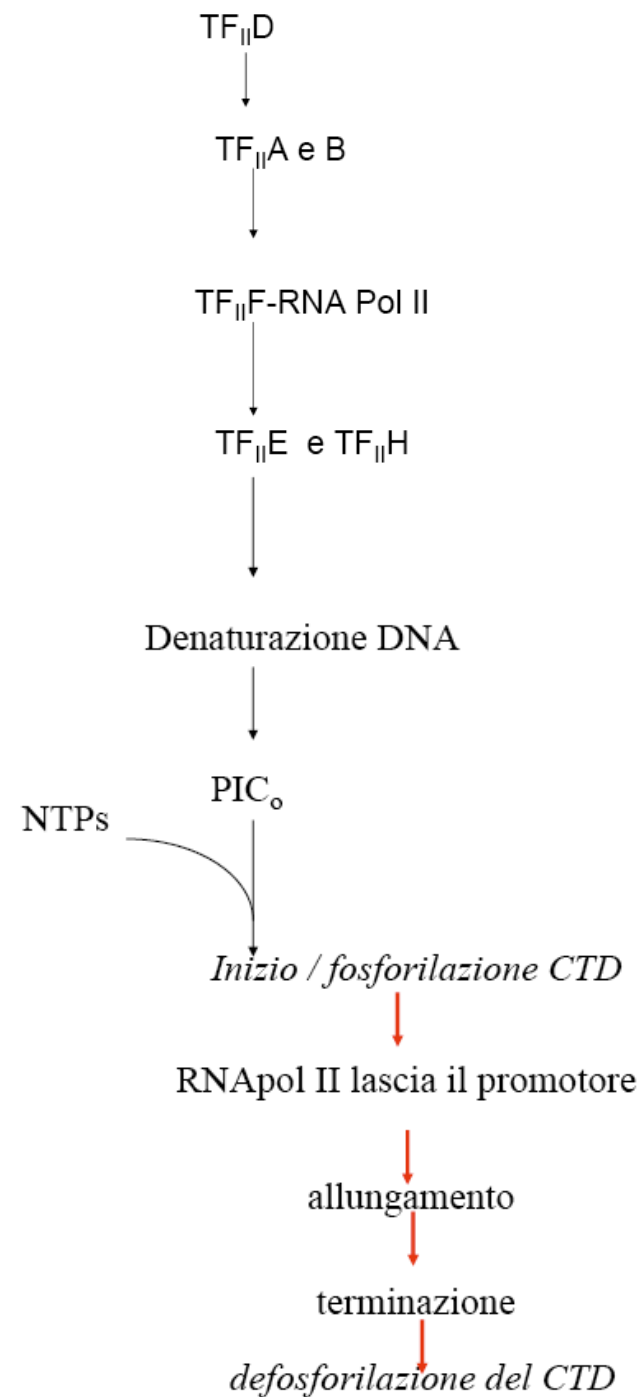
Un **Fattore di taglio** (endonucleasi) crea un'estremità 3' libera

Esonucleasi (Xrn2) per tagliare l'RNA trascritto a valle del taglio

La **Poli(A) Polimerasi** (PAP) sintetizza la coda di poli(A) (in assenza di stampo)

Le **Poly(A)-Binding Proteins** (PABP): PABPN1 aumenta la processività di PAP, così la coda di poliA diventa più lunga (ca. 250A)

In summary:



The molecular basis of eukaryotic transcription

Roger D. Kornberg*

Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305-5400

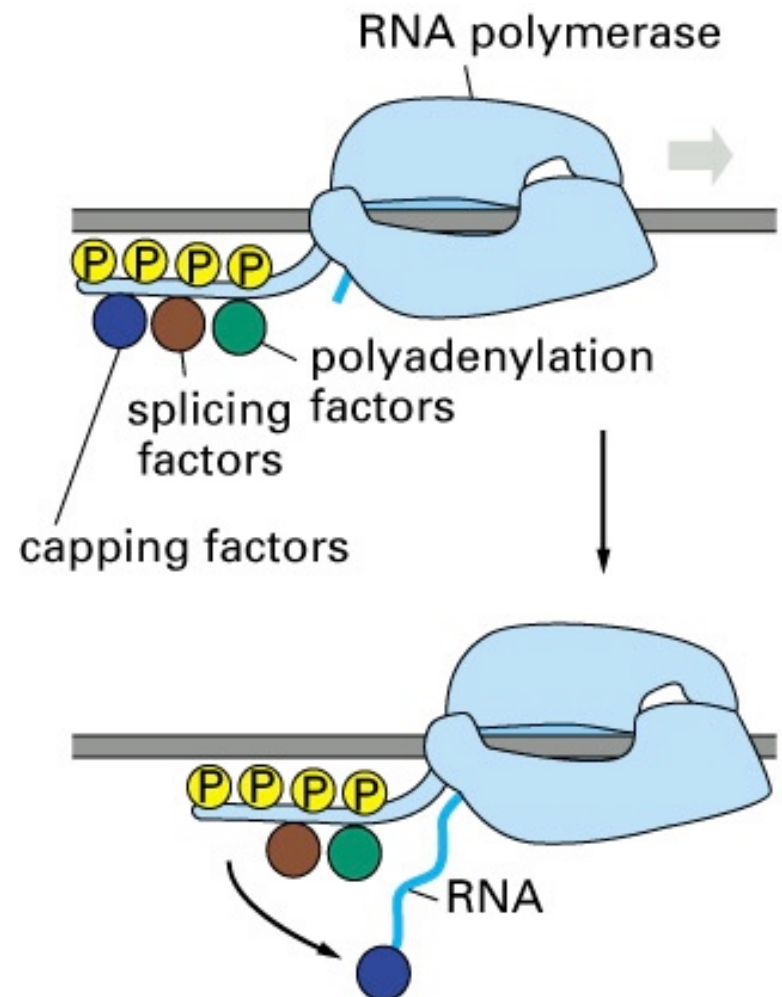
PHAS | August 7, 2007 | vol. 104 | no. 32 | 12955-12961

Modificazioni cui vanno incontro i trascritti per diventare RNA maturi

MODIFICAZIONI DEI TRASCRITTI PRODOTTI DALLA RNA POL II

Nella **fase di elongazione/allungamento** la RNA Pol II simultaneamente trascrive il DNA in RNA e avvia il processamento dell'RNA neosintetizzato

La **fosforilazione del CTD** non solo permette il distacco della RNA Pol II dalle altre proteine presenti nel sito di inizio della trascrizione, ma ne consente anche il **legame a proteine coinvolte nel processamento dell'mRNA**



MODIFICAZIONI DEI TRASCRITTI PRODOTTI DALLA RNA POL II

MODIFICAZIONE DI ENTRAMBE LE ESTREMITA':
CAPPING E POLIADENILAZIONE

TAGLIO DI ALCUNI TRATTI DI TRASCRITTO
(INTRONI) E SALDATURA DEI TRATTI RESTANTI
(ESONI): **SPLICING**

The 5' cap structure serves several roles:

Its **principal role** is to serve as a recognition feature during protein synthesis.

Eukaryotic mRNAs do not contain ribosome binding sites unlike prokaryotic mRNA which do (the Shine-Dalgarno sequence).

Eukaryotic ribosomes are positioned at the 5' end of mRNA through the action of **CBP-I**, an initiation factor that recognizes and binds to the 5' end.

MOREOVER

- The 5' cap may help the mRNA transport from the nucleus to the cytoplasm
- The 5' cap raises the efficiency of the splicing process

POLY(A)

100-250 adenosine 5'-monofosfato (AMP) vengono aggiunte all'estremità 3' dalla **poli(A) polimerasi** grazie anche al contributo di altre proteine con cui forma il COMPLESSO DI POLIADENILAZIONE.

FUNZIONI DEL POLY-A:

1. STABILIZZARE L'mRNA
2. REGOLARE LA TRADUZIONE (con la sua lunghezza)

Dal punto di vista della pratica di laboratorio, il poly(A) viene utilizzato per purificare mRNA (isolandoli dagli altri RNA).

