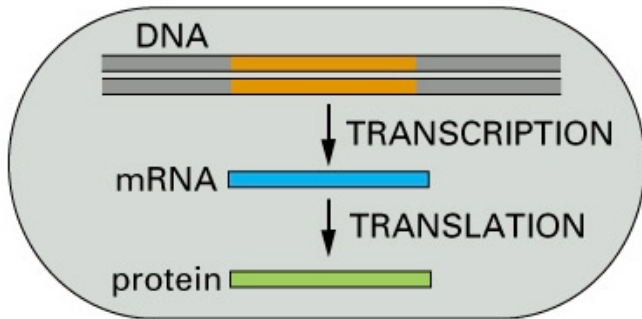
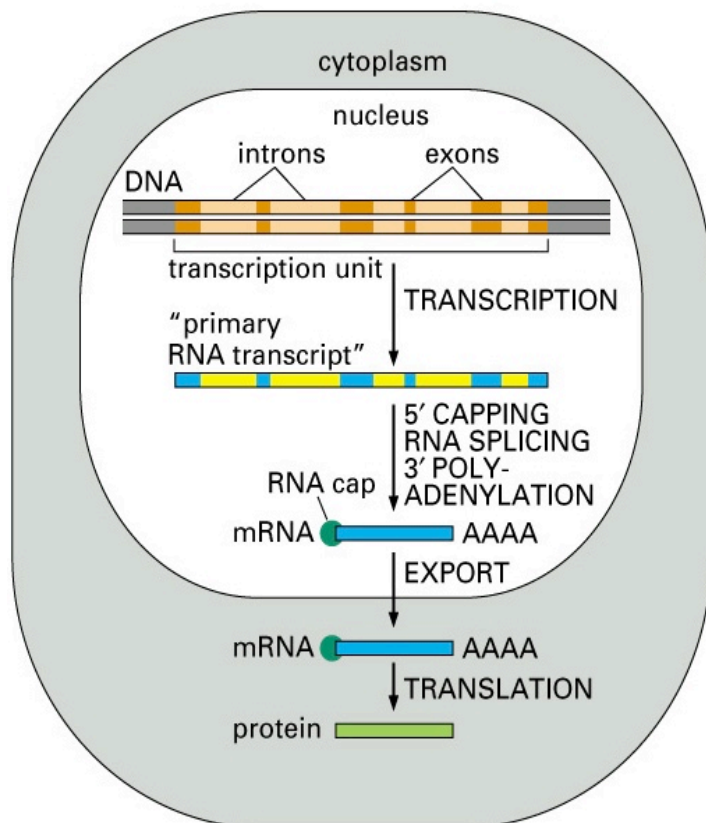


PROCARYOTES



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

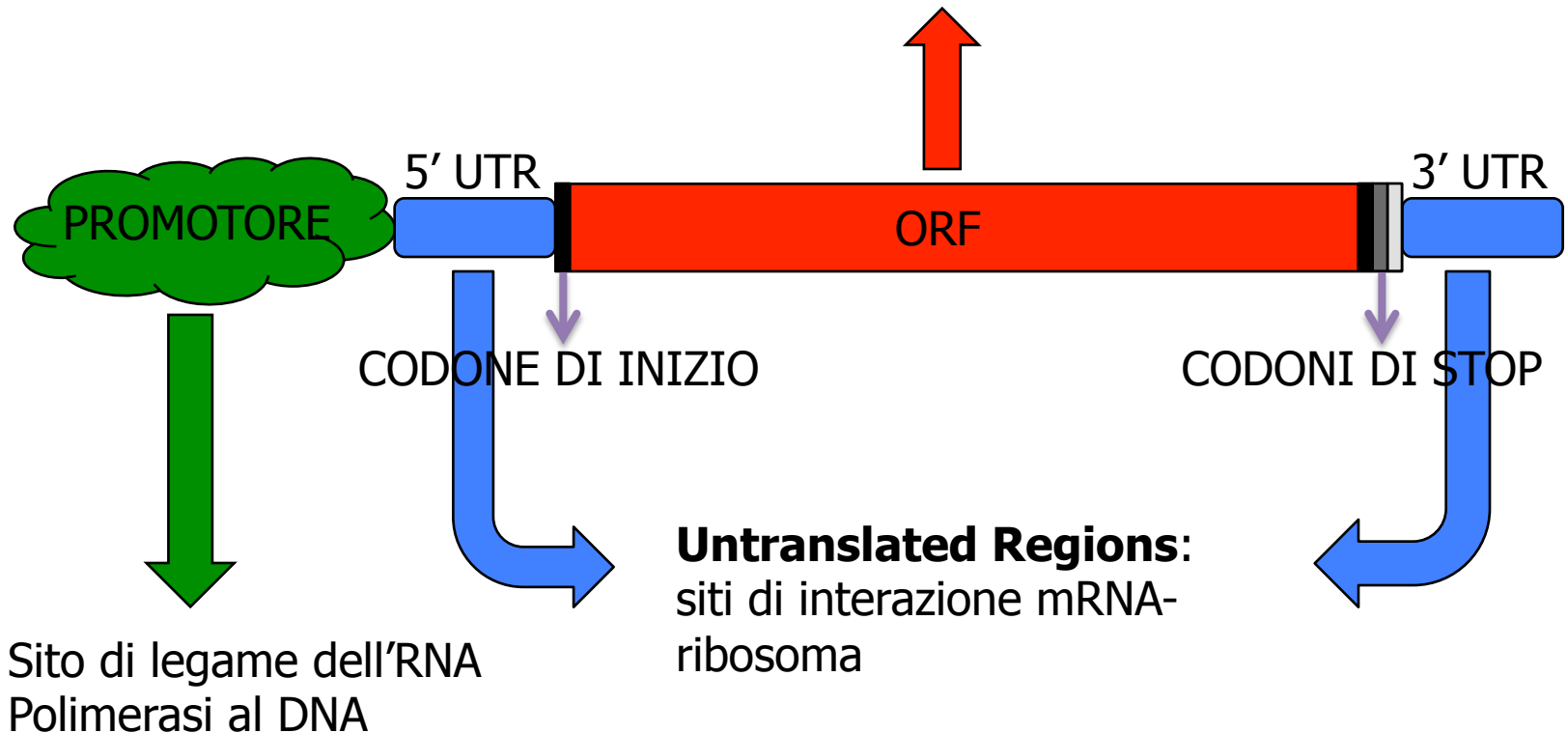
EUCARYOTES



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

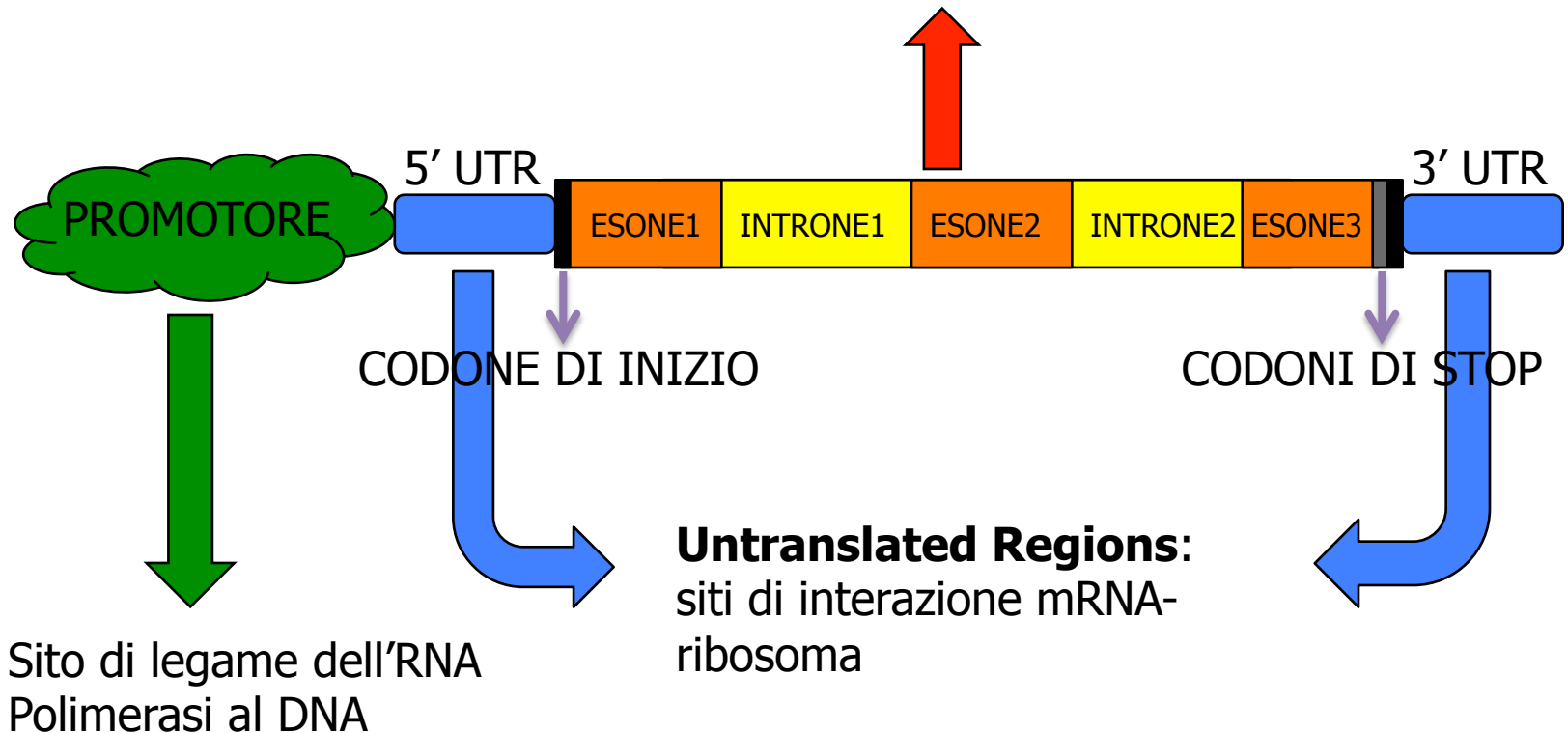
STRUTTURA DI UN GENE EUCARIOTA

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

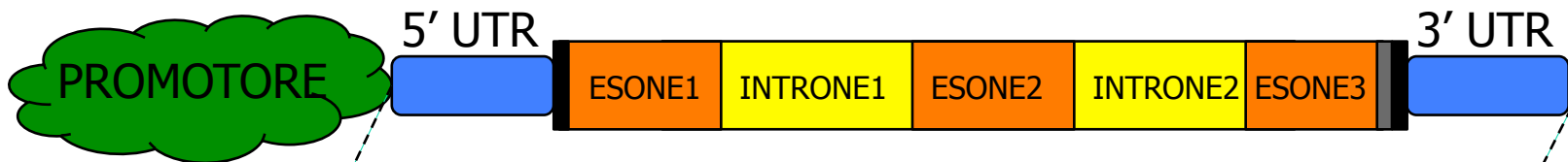


STRUTTURA DI UN GENE EUCARIOTA

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



DNA



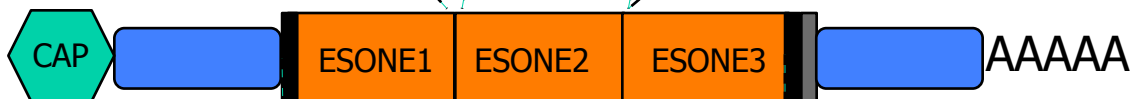
TRASCRIZIONE

Pre-mRNA



SPLICING

mRNA



TRADUZIONE

PROTEINA



RNA POLIMERASI EUCARIOTICHE

Si trovano esclusivamente nel nucleo e possono trascrivere vari tipi di RNA:

Table 6-1 Principal Types of RNAs Produced in Cells

TYPE OF RNA	FUNCTION
mRNAs	messenger RNAs, code for proteins
rRNAs	ribosomal RNAs, form the basic structure of the ribosome and catalyze protein synthesis
tRNAs	transfer RNAs, central to protein synthesis as adaptors between mRNA and amino acids
snRNAs	small nuclear RNAs, function in a variety of nuclear processes, including the splicing of pre-mRNA
snoRNAs	small nucleolar RNAs, used to process and chemically modify rRNAs
scaRNAs	small cajal RNAs, used to modify snoRNAs and snRNAs
miRNAs	microRNAs, regulate gene expression typically by blocking translation of selective mRNAs
siRNAs	small interfering RNAs, turn off gene expression by directing degradation of selective mRNAs and the establishment of compact chromatin structures
Other noncoding RNAs	function in diverse cell processes, including telomere synthesis, X-chromosome inactivation, and the transport of proteins into the ER

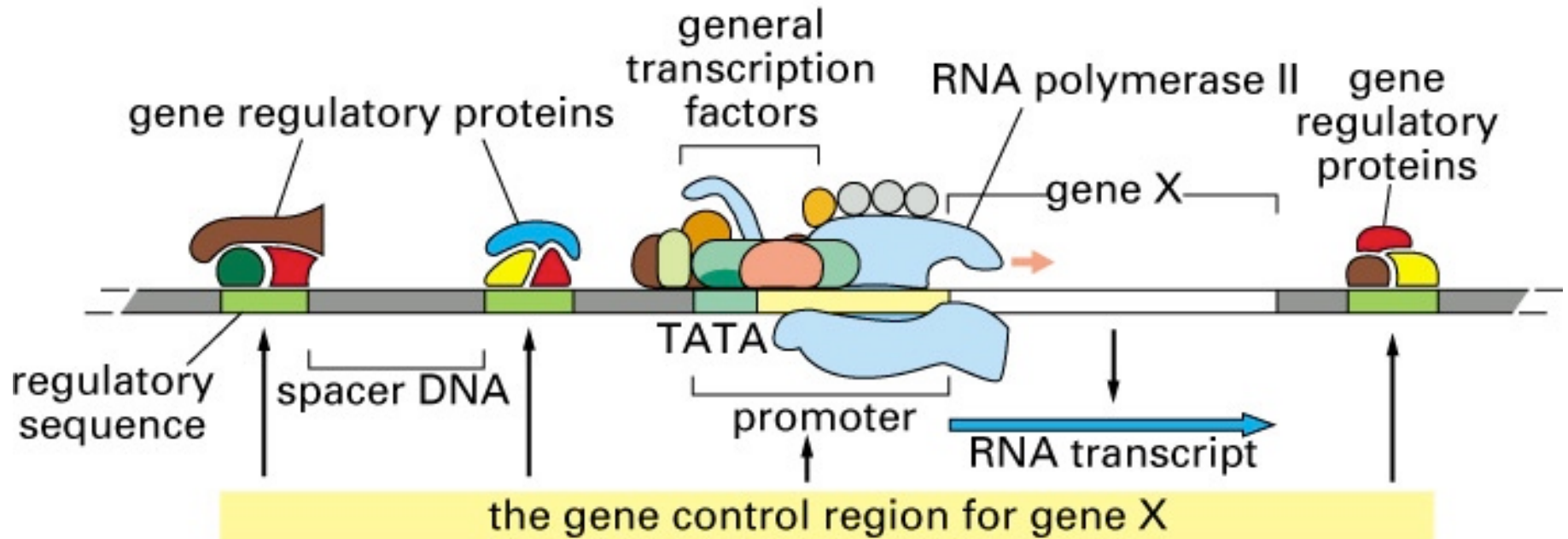
MESSAGGERI ←
(3-5% dell'RNA totale)

→ ca. 80%
dell'RNA tot.

NON CODING RNAs

N.B. Anche i batteri hanno mRNA, rRNA, tRNA e piccoli RNA regolatori!!!

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 EUCARIOTICHE

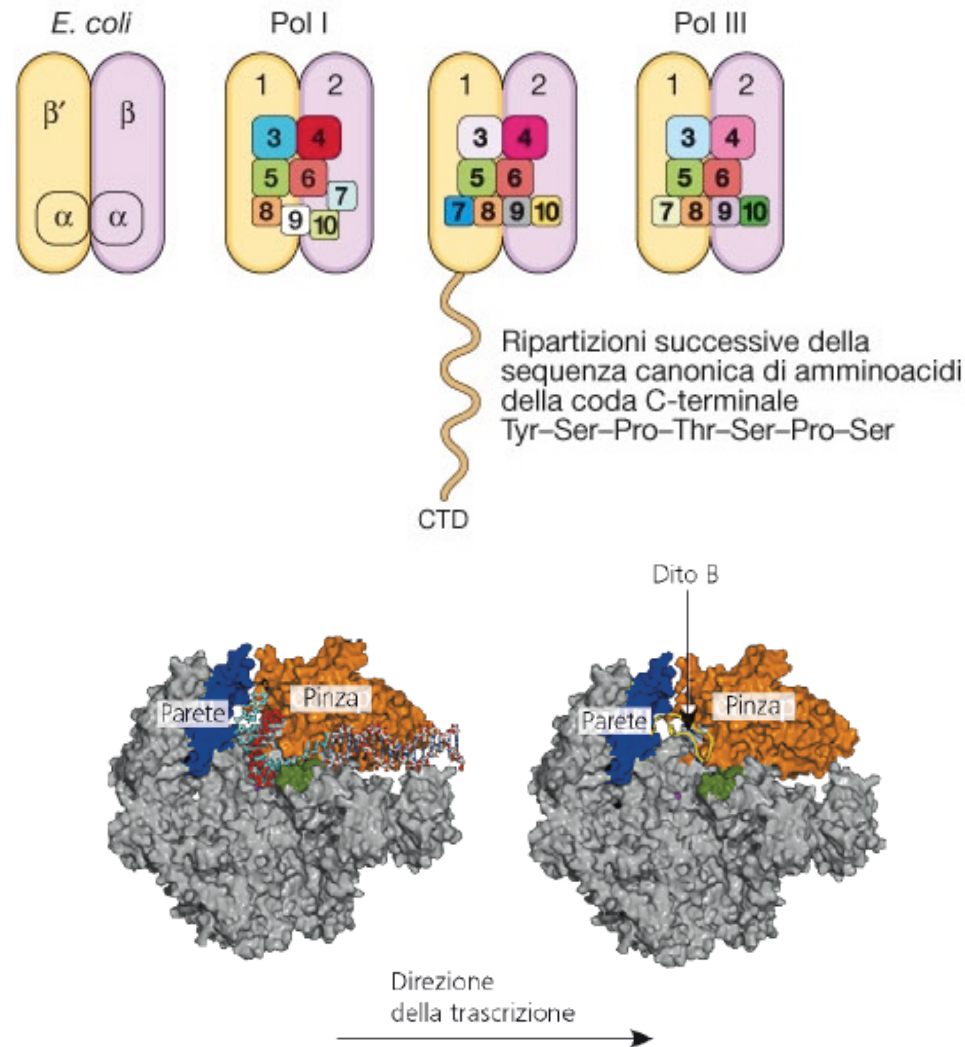
Nei nuclei delle cellule eucariotiche si trovano 3 RNA polimerasi (I, II e III), ciascuna costituita da più subunità

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.)

IL MACCHINARIO PROTEICO DELLA TRASCRIZIONE

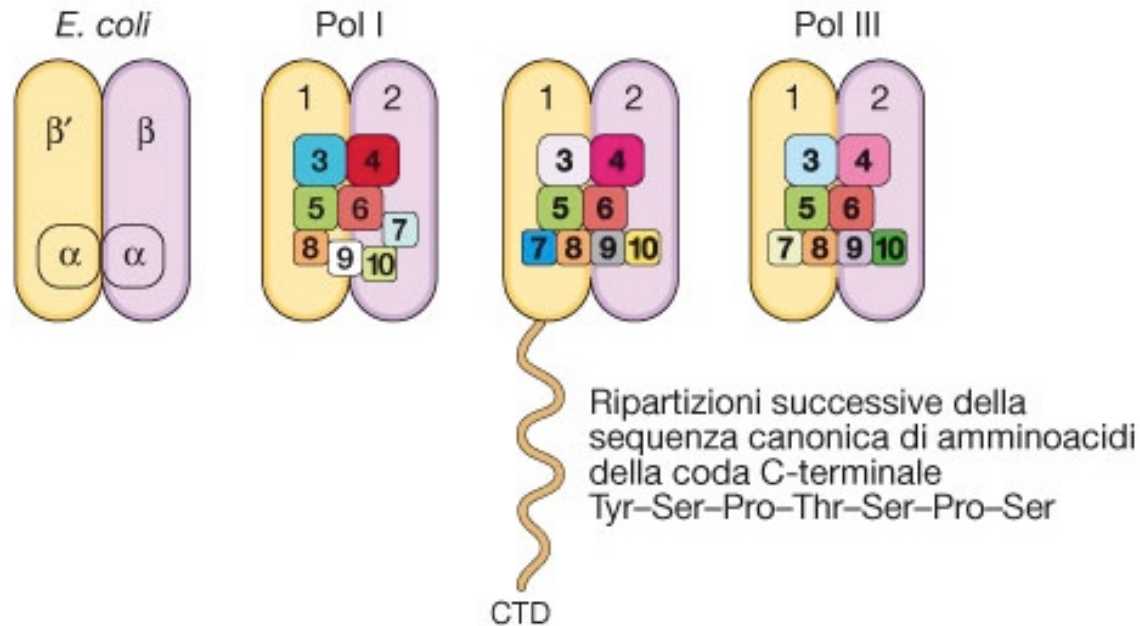
- RNA Polimerasi
- Fattori Generali della Trascrizione
- Attivatori, Repressori, Co-attivatori
- Fattori di trascrizione

RNA polimerasi II



L' RNA polimerasi II eucariota è molto simile strutturalmente a quella batterica

RNA polimerasi II



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

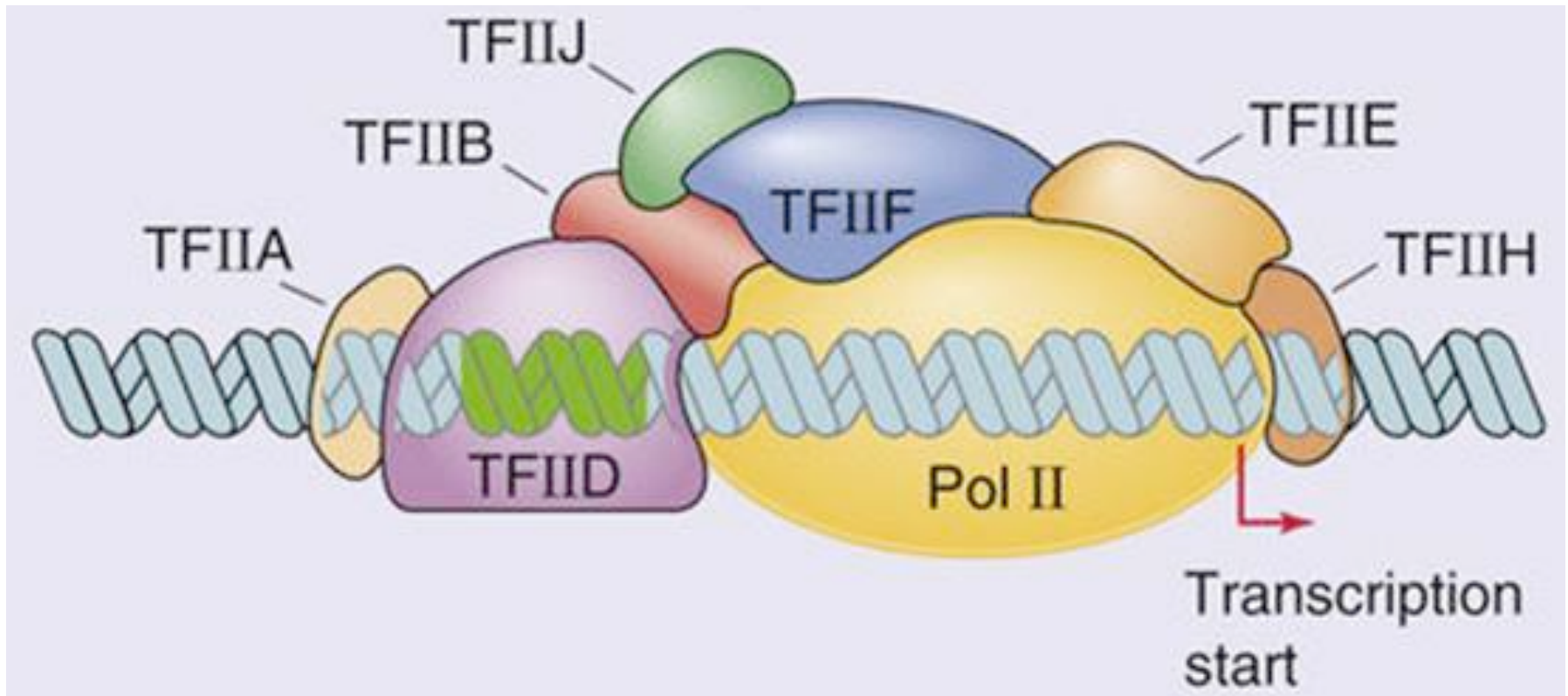
- la RNA pol negli eucarioti devono affrontare la struttura della cromatina
- la RNAPolII degli eucarioti richiede un set di proteine aggiuntive, chiamate *FATTORI GENERALI DELLA TRASCRIZIONE*

FATTORI GENERALI DELLA TRASCRIZIONE

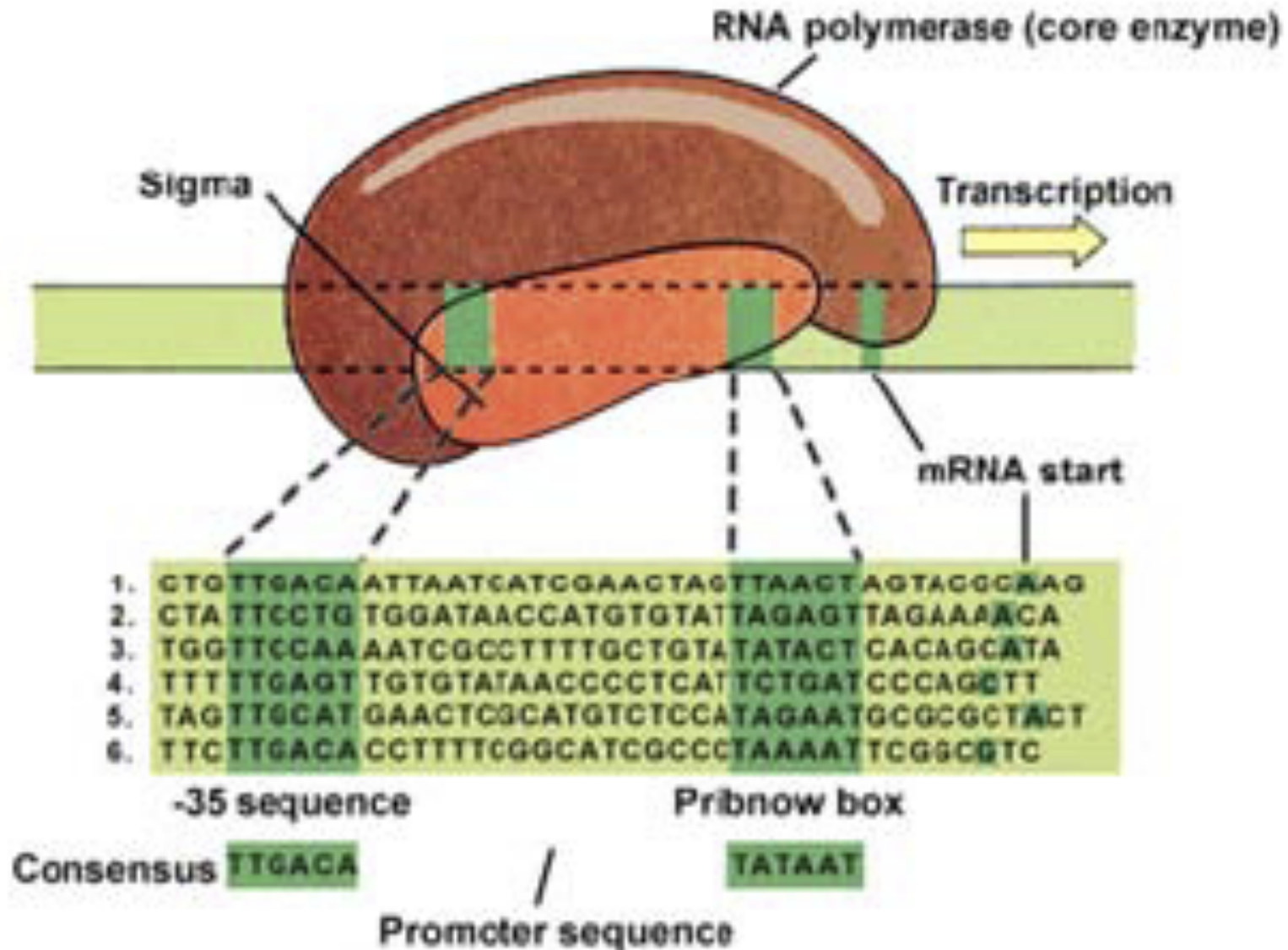
- 🔧 aiutano il posizionamento della RNAPol nella regione del promotore
- 🔧 contribuiscono allo svolgimento della doppia elica di DNA
- 🔧 aiutano il distacco della RNAPol dal promotore e l'avvio della fase di elongazione
- 🔧 si chiamano GENERALI perchè si assemblano su **tutti** i promotori usati dalla 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**

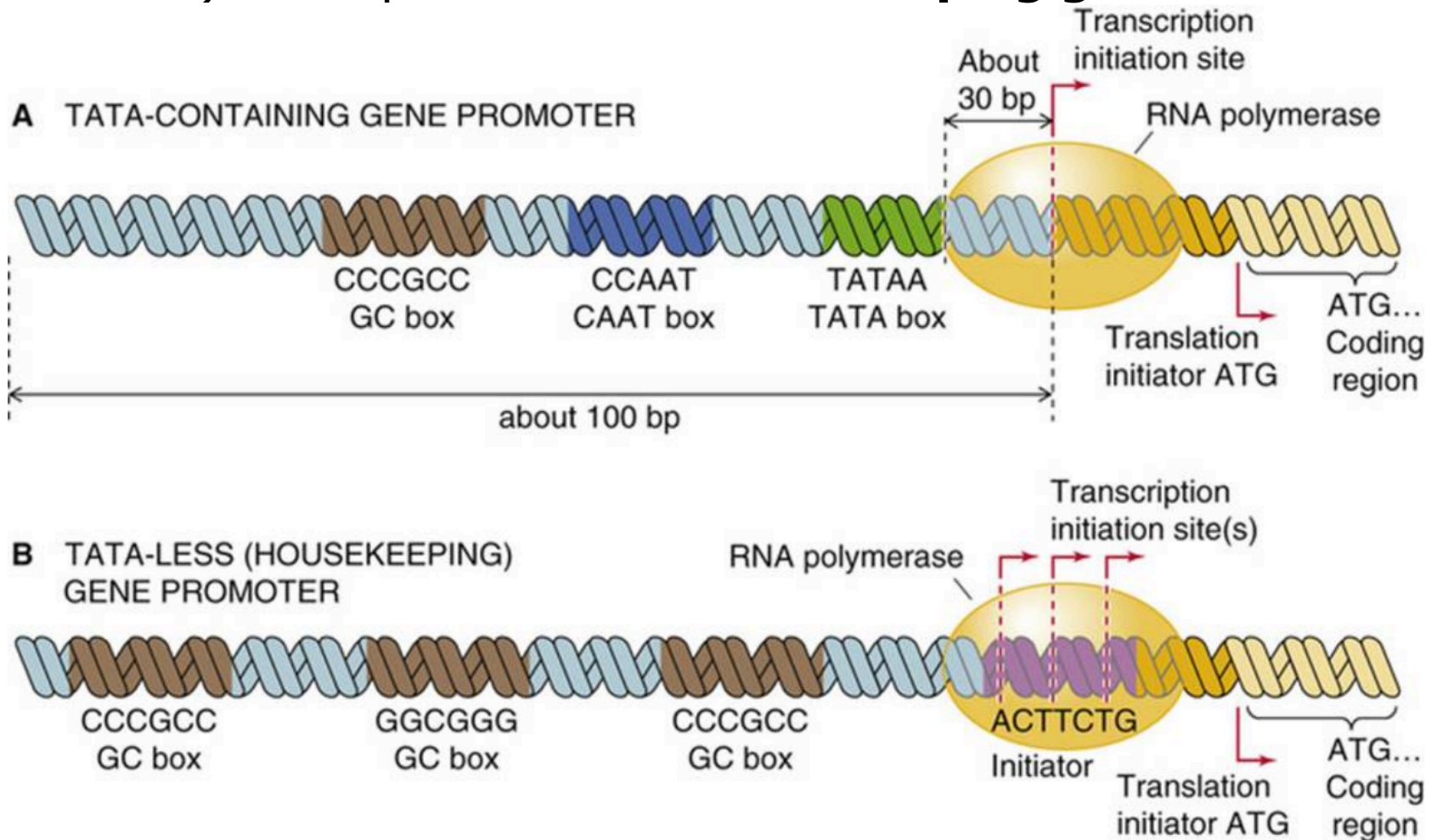


Il promotore tipico nei procarioti



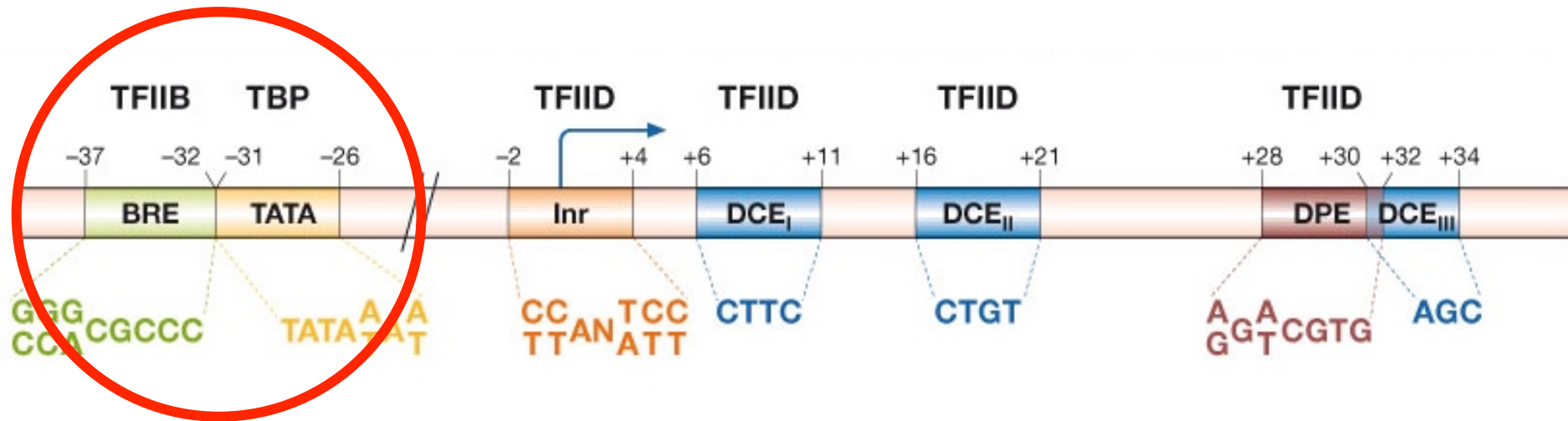
PROMOTORI PRIVI DI TATA box.

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

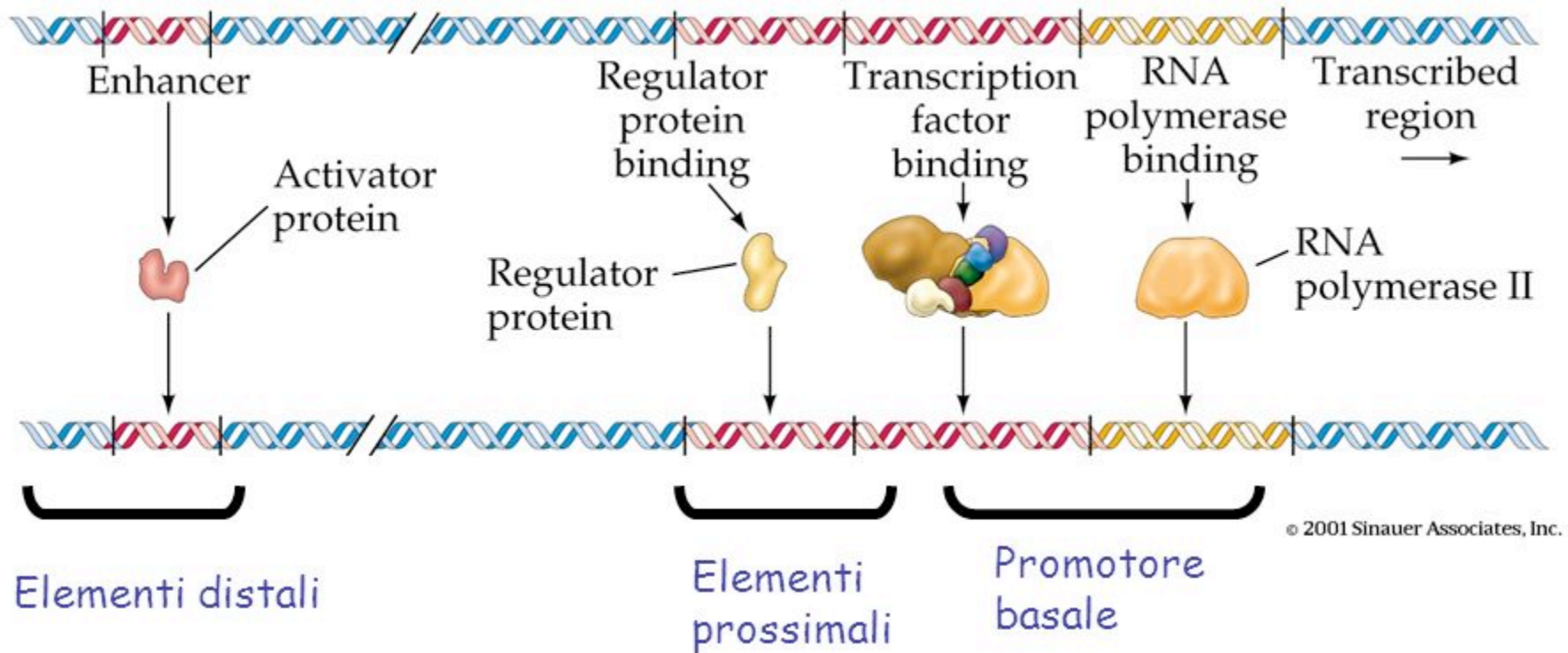
TIPICA UNITÀ TRASCRIZIONALE EUCARIOTICA



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.

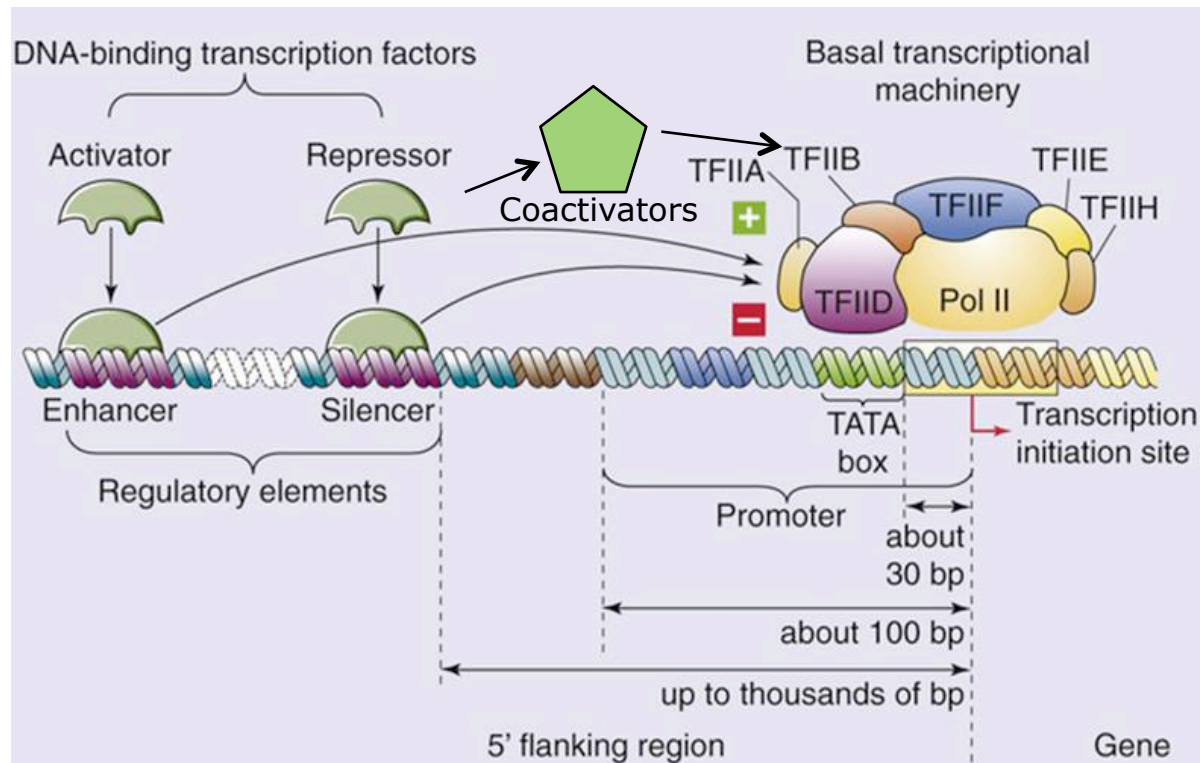
I siti di legame per gli altri fattori generali della trascrizione si trovano a valle del sito di inizio della trascrizione, sempre nella regione considerata "PROMOTORE".



Oltre agli elementi che costituiscono il promotore minimo, la struttura generale di un promotore di POLII contiene elementi regolatori nei pressi 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***.

A COMPREHENSIVE MODEL OF REGULATION OF RNA POLYMERASE II TRANSCRIPTION:

- **Activators** bind to **enhancer** sites, increasing transcription of a gene.
- **Repressors** bind to **silencer** sites, decreasing transcription of a 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.



**Come elementi così distali possono
influenzare l'attività delle DNA
Polimerasi II?**

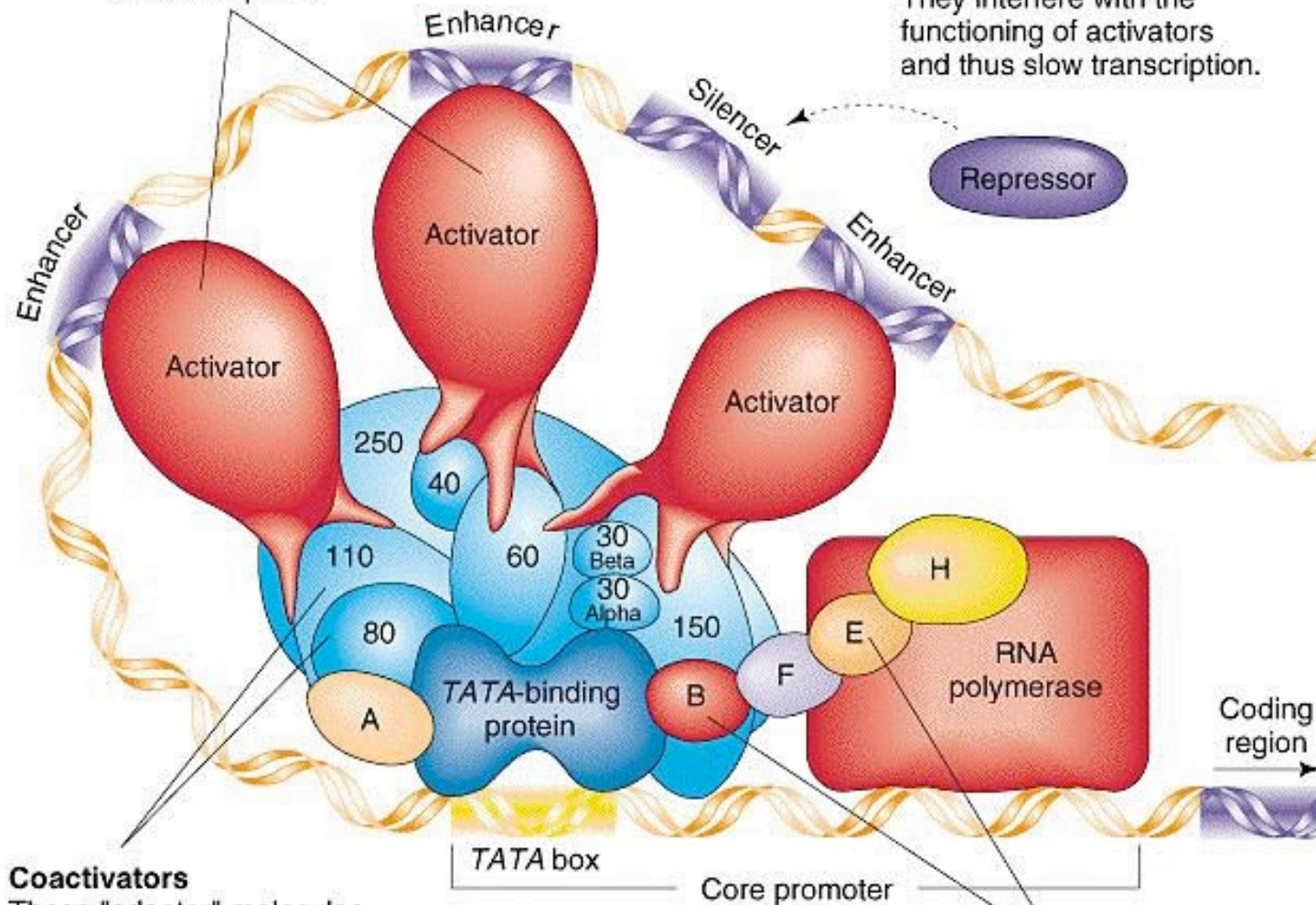
DNA looping

Activators

These proteins bind to genes at sites known as *enhancers*. Activators help determine which genes will be switched on, and they speed the rate of transcription.

Repressors

These proteins bind to selected sets of genes at sites known as *silencers*. They interfere with the functioning of activators and thus slow transcription.



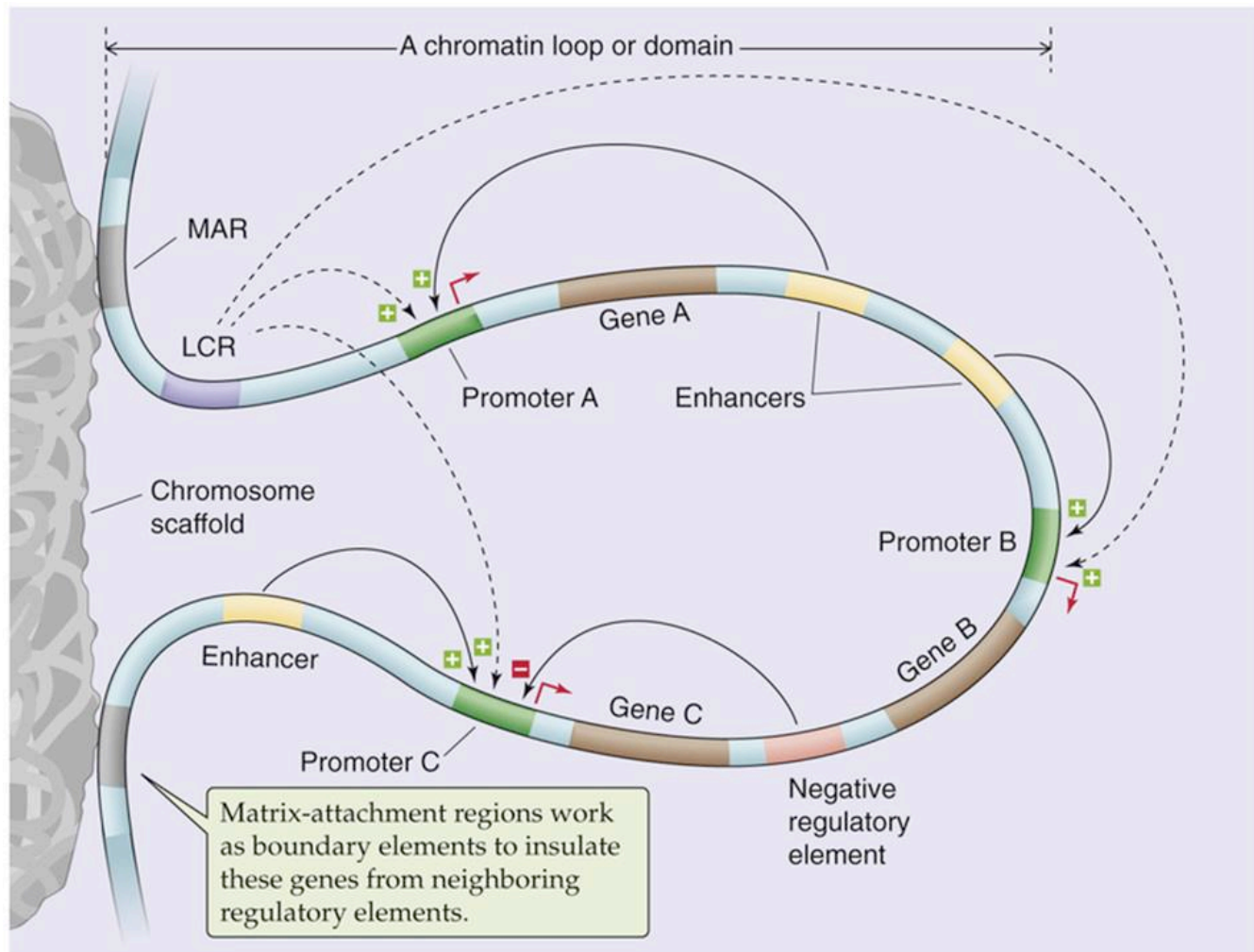
Coactivators

These "adapter" molecules integrate signals from activators and perhaps repressors and relay the results to basal factors.

Basal transcription factors

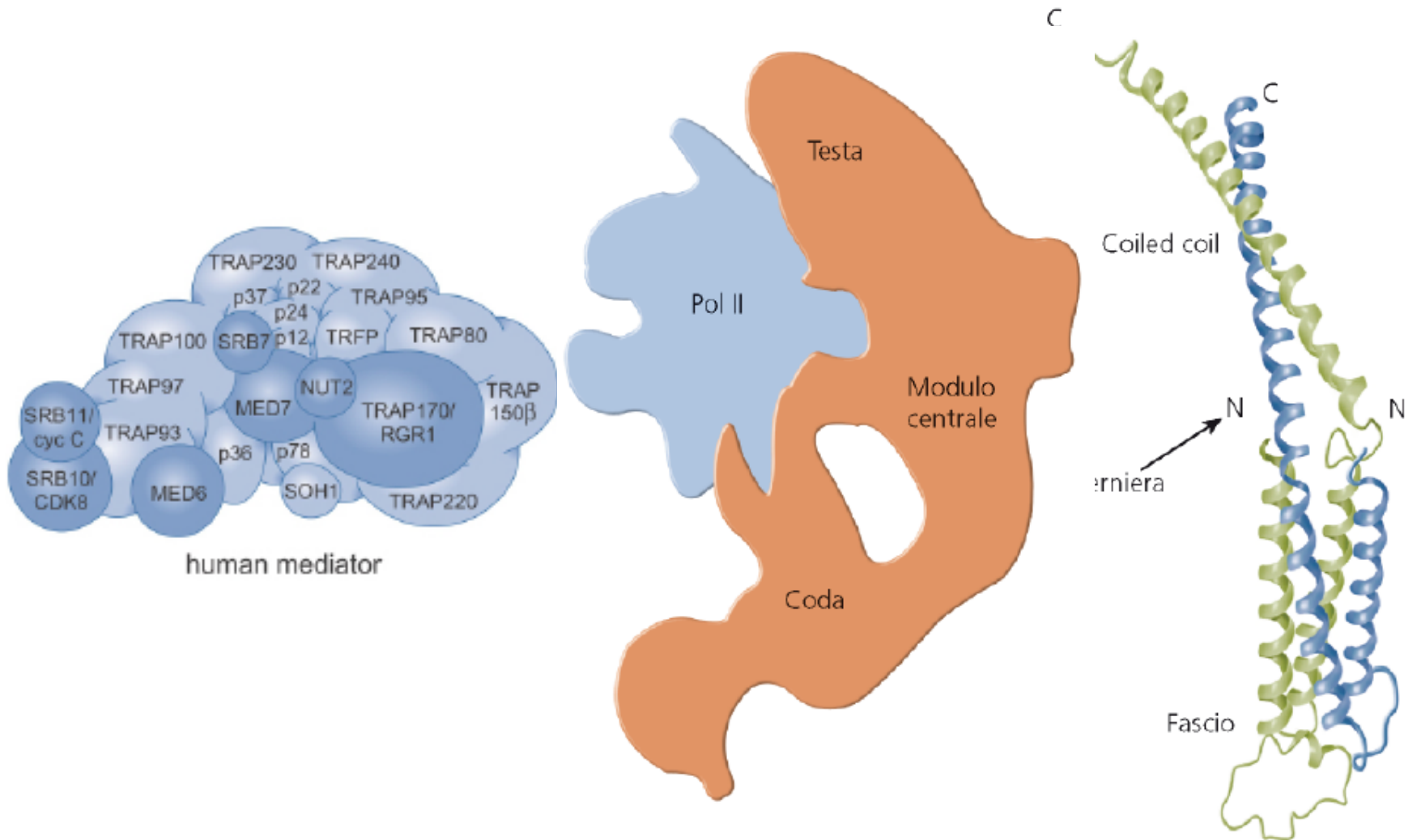
In response to injunctions from activators, these

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



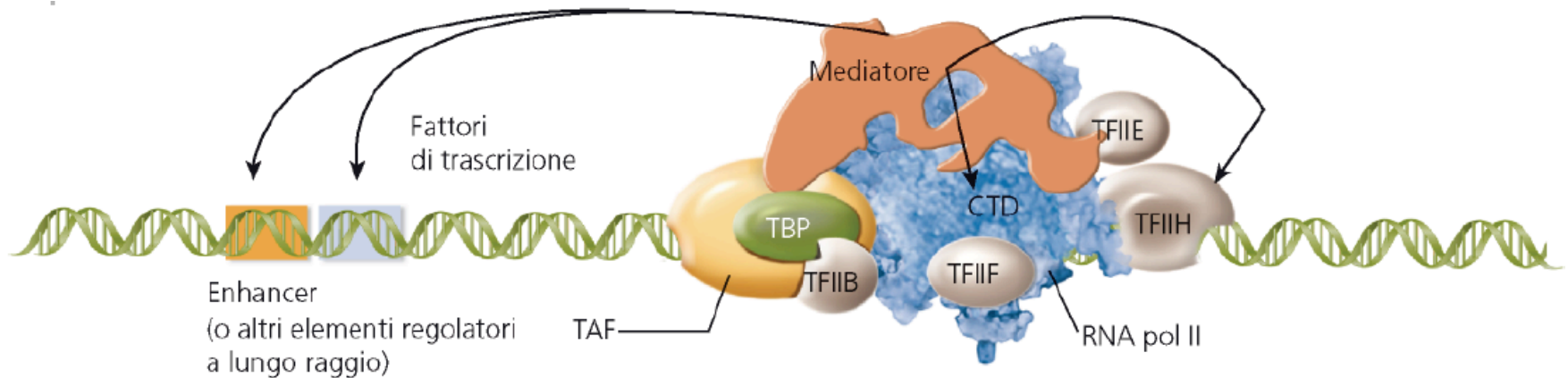
Il MEDIATORE

è un complesso proteico di circa 20 subunità'

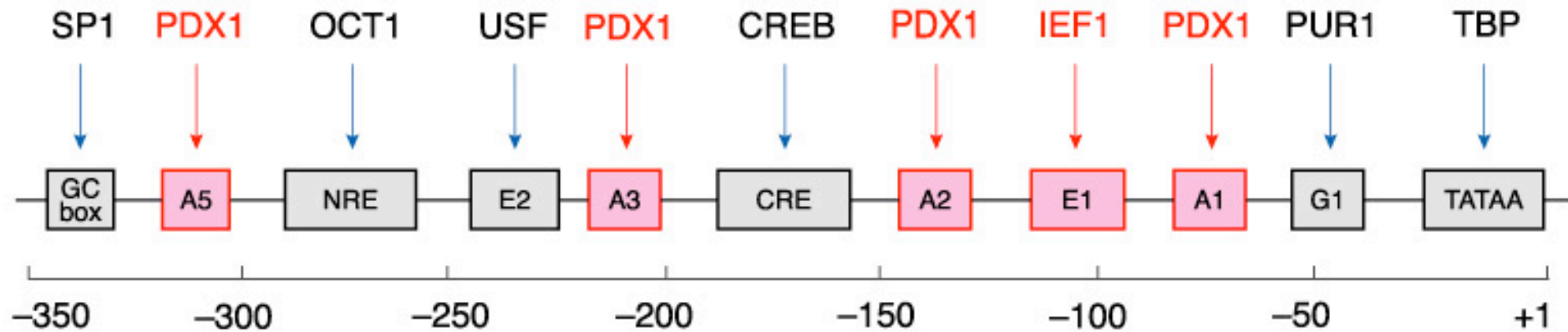


Il **MEDIATORE**

media l'interazione degli ELEMENTI REGOLATORI A LUNGO RAGGIO con la RNAPolII e con i fattori generali della trascrizione



Il promotore del gene umano dell'insulina



Nero: fattori ubiquitari

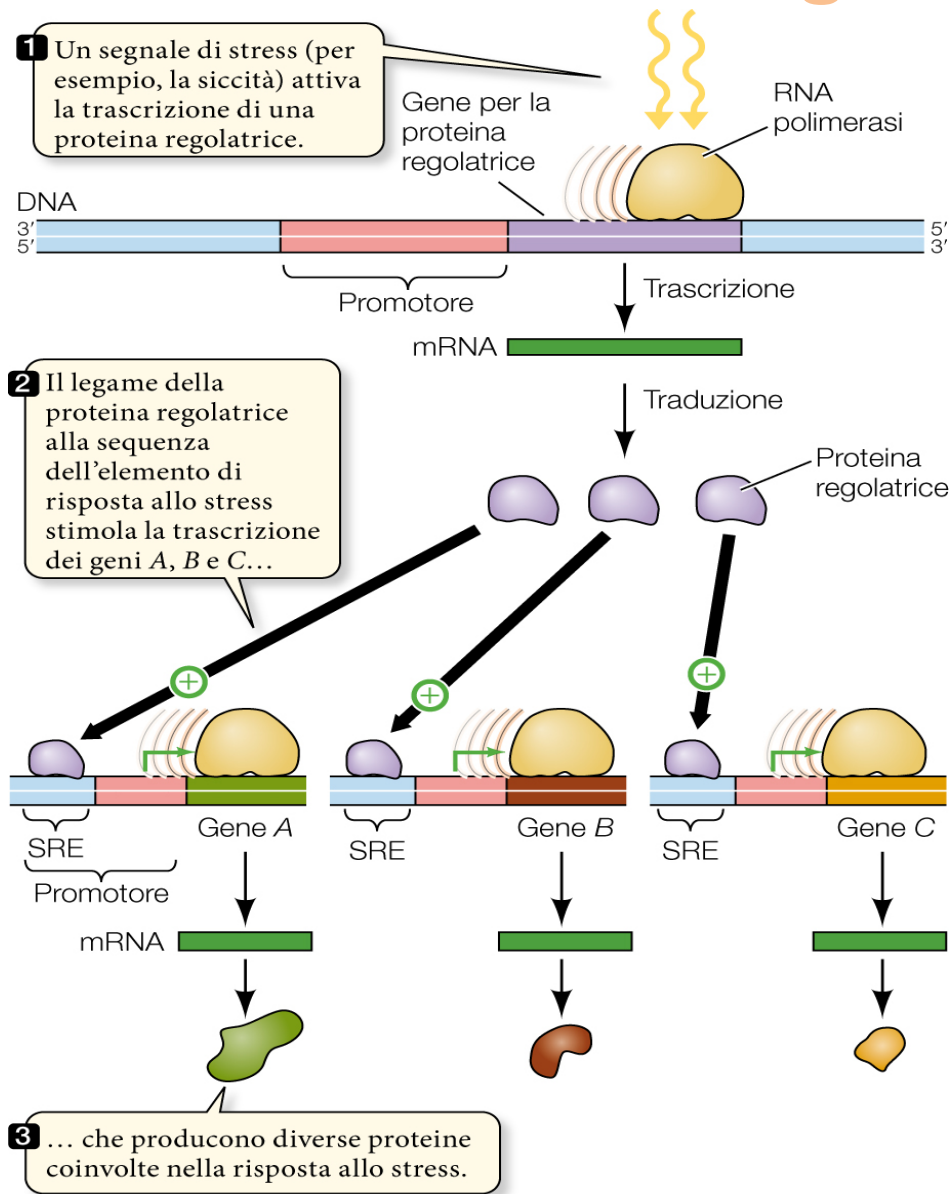
Rossi: fattori specifici delle cellule beta pancreatiche

FATTORI DI TRASCRIZIONE

- UBIQUITARI: legano i promotori di tutti i geni, grazie ad una consensus presente su tutti i promotori
- TESSUTO-SPECIFICI: legano i promotori di geni in un determinato tipo cellulare

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

La regolazione durante la trascrizione: coordinazione fra geni

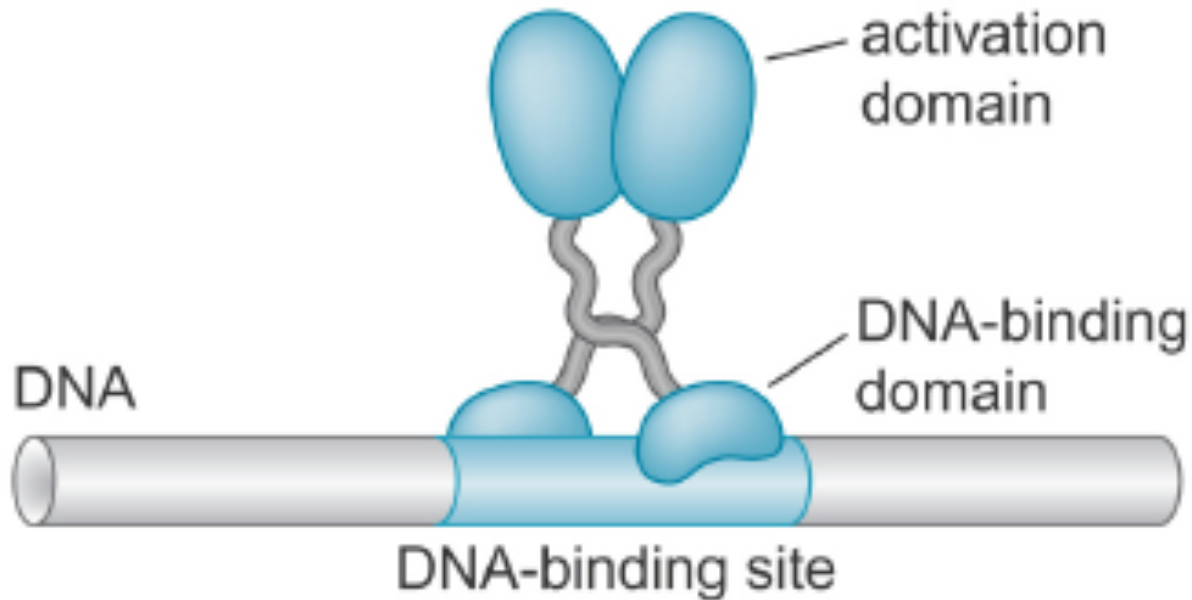


La coordinazione dell'espressione di più geni avviene grazie a un singolo segnale ambientale, che induce la sintesi di una proteina regolatrice della trascrizione.

Transcription Factors

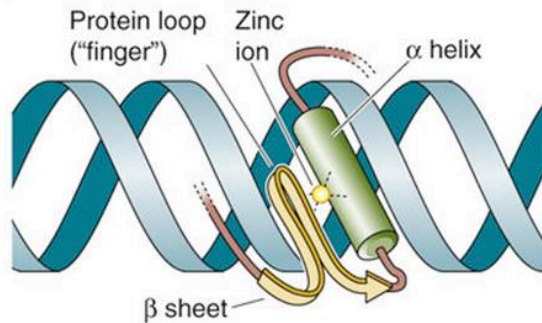
I *fattori di trascrizione* hanno un'organizzazione in domini di tipo modulare:

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

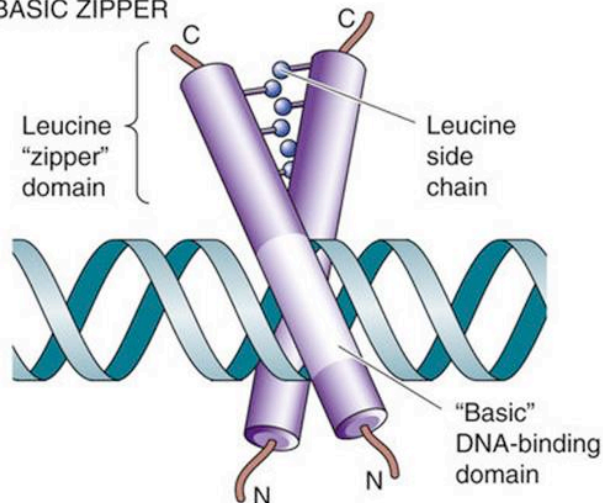


DNA-binding transcription factors have been grouped into families. Members of the same family use common structural motifs for binding DNA. Each of these motifs consists of a particular tertiary protein structure in which a component, usually an α helix, interacts with the major groove of the DNA.

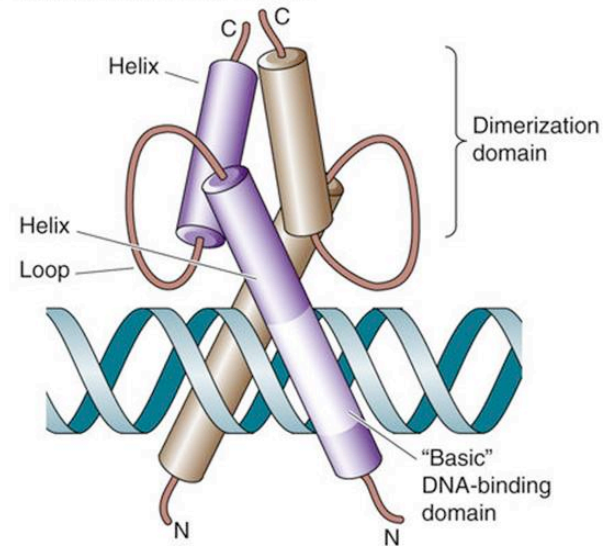
A ZINC FINGER



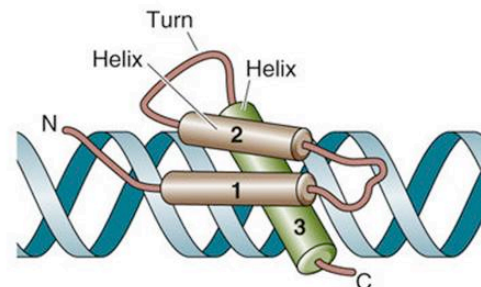
B BASIC ZIPPER



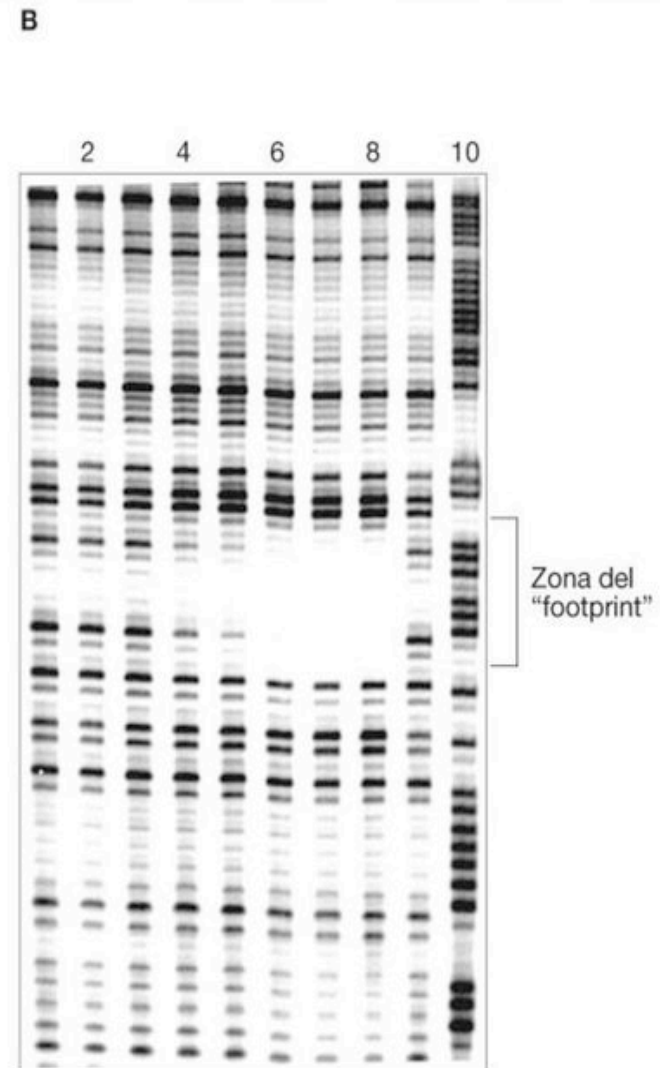
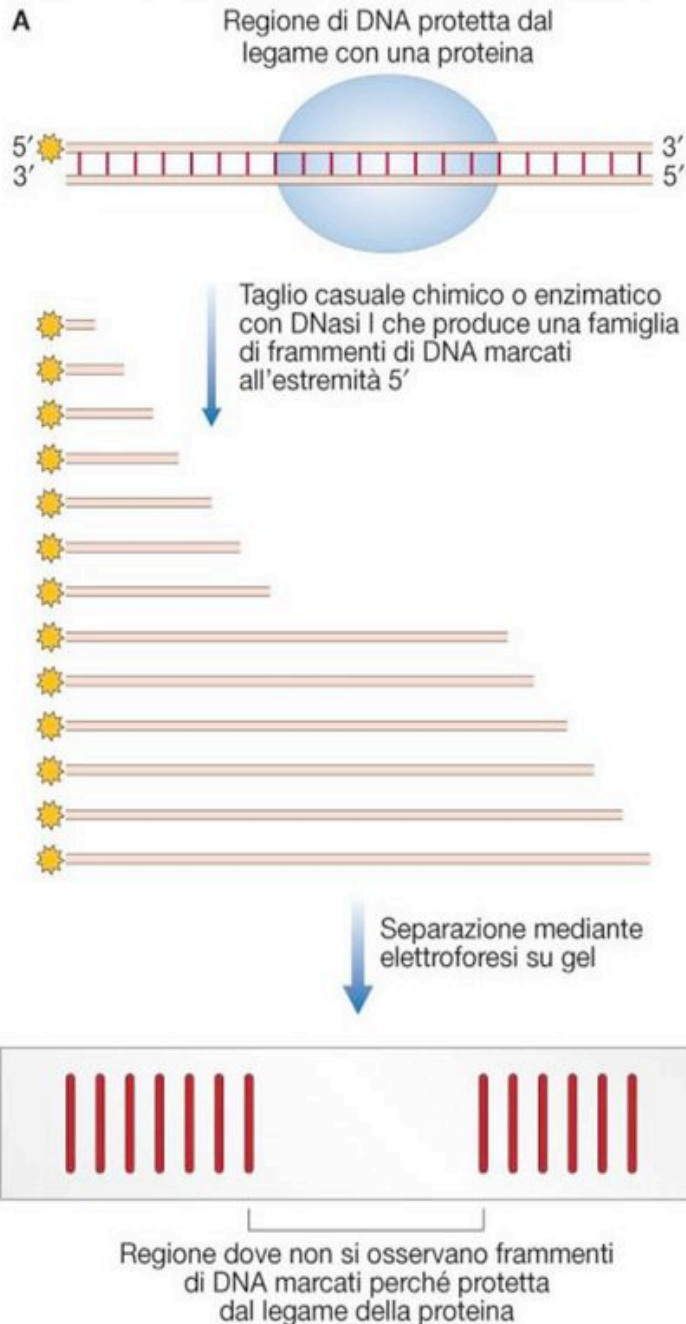
C BASIC HELIX-LOOP-HELIX



D HELIX-TURN-HELIX

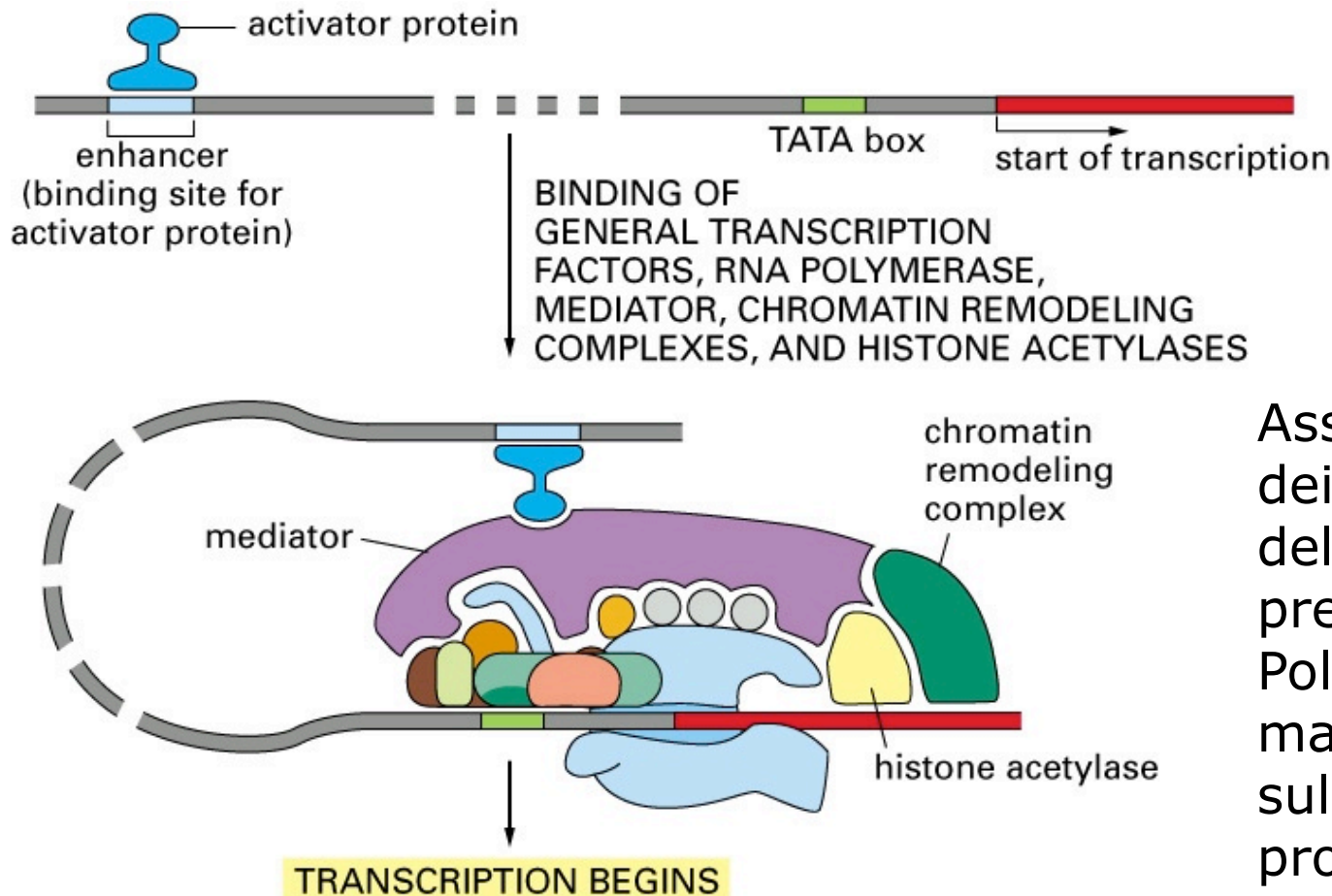


Analisi interazioni DNA-proteine: saggio di footprinting



TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI: MECCANISMO DELLA TRASCRIZIONE

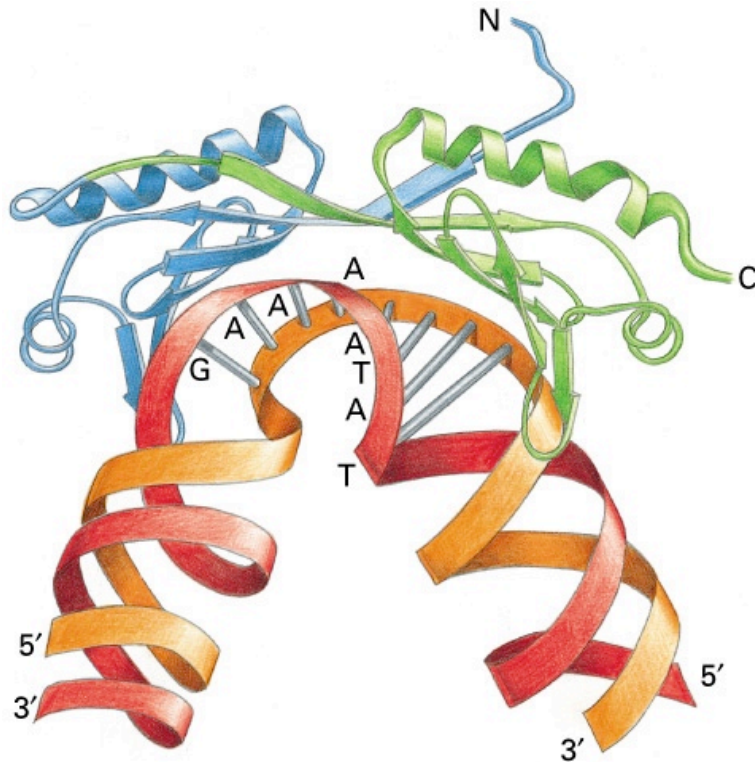
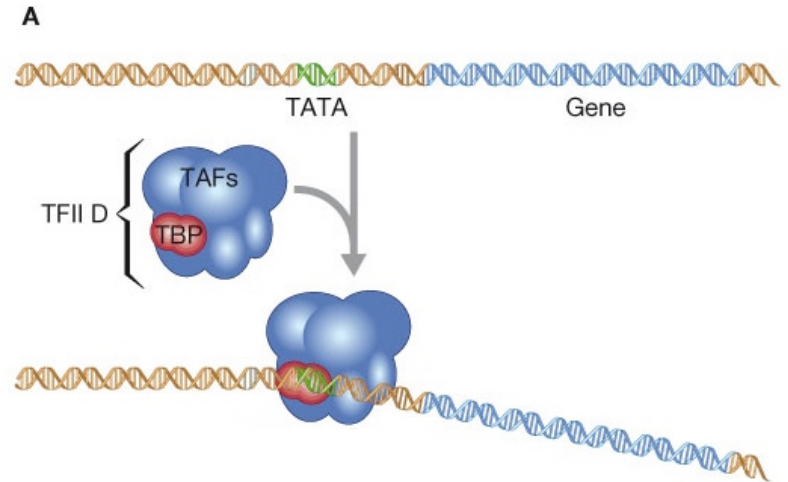
1. FORMAZIONE DEL COMPLESSO DI PREINIZIO:



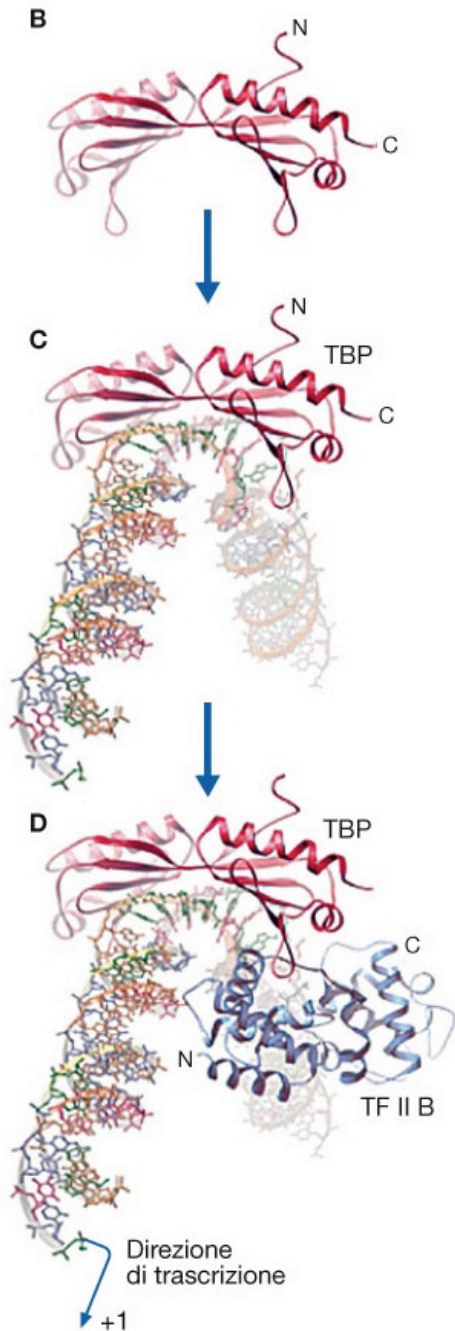
Assemblaggio dei componenti del complesso di preinizio; la RNA Pol non è attiva, ma "bloccata" sulla regione del promotore

1. Pre-Initiation Complex Formation

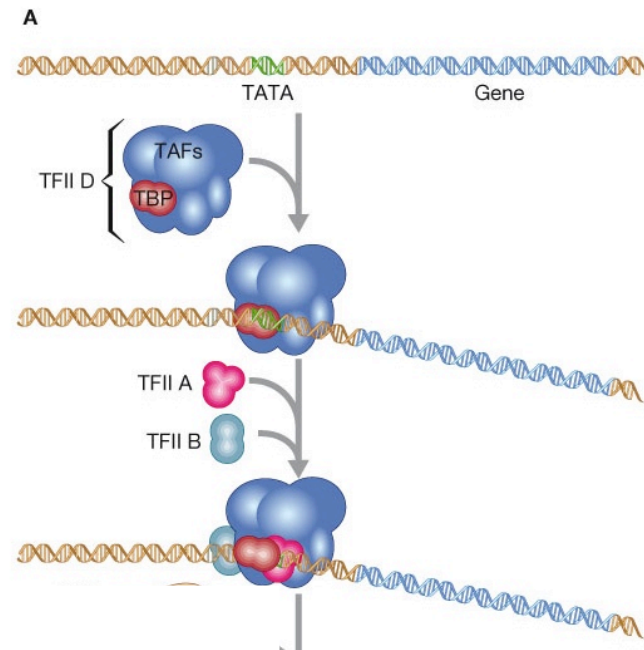
1. The assembly of the PIC starts with the binding of **TFIID** to the **TATA box**. The subunit of TFIID that recognizes it is called **TBP** (TATA-binding protein); 11 different **TAFs** are targets of activators which strengthen the transcription.



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.

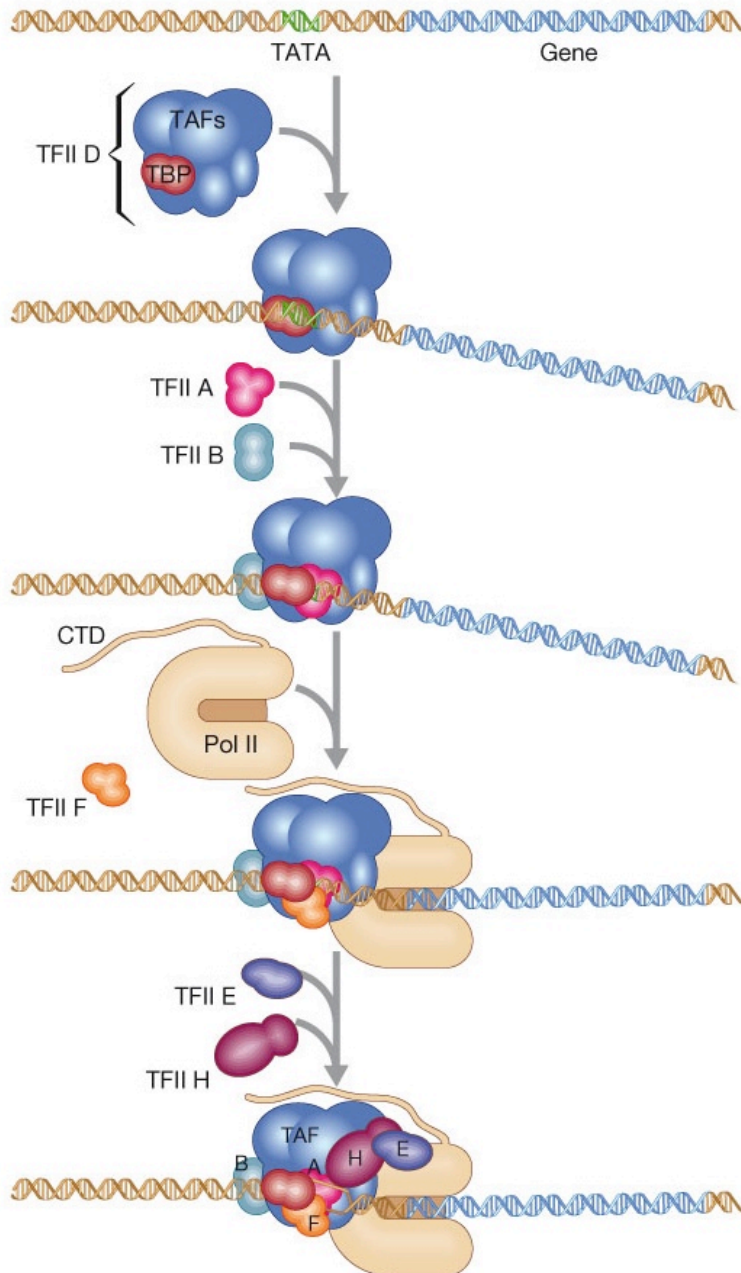


2. The DNA bend mediated by TBP provides a recognition structure for **TFIIB**, which ensures correct positioning of RNA polymerase II relative to the transcription start site.



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.

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 trascription reaction.

CTD RNA Pol II:

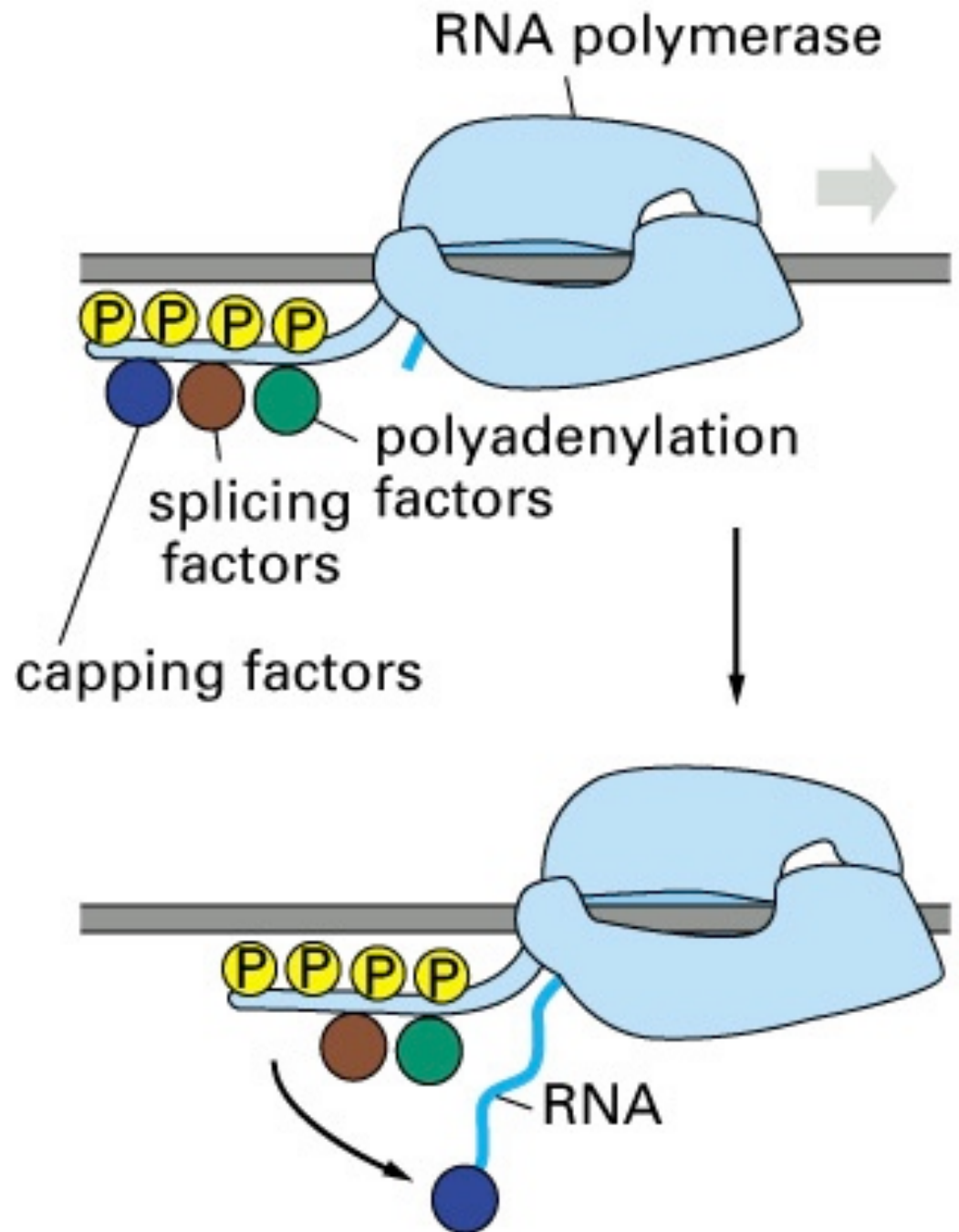
7 aminoacids repeats

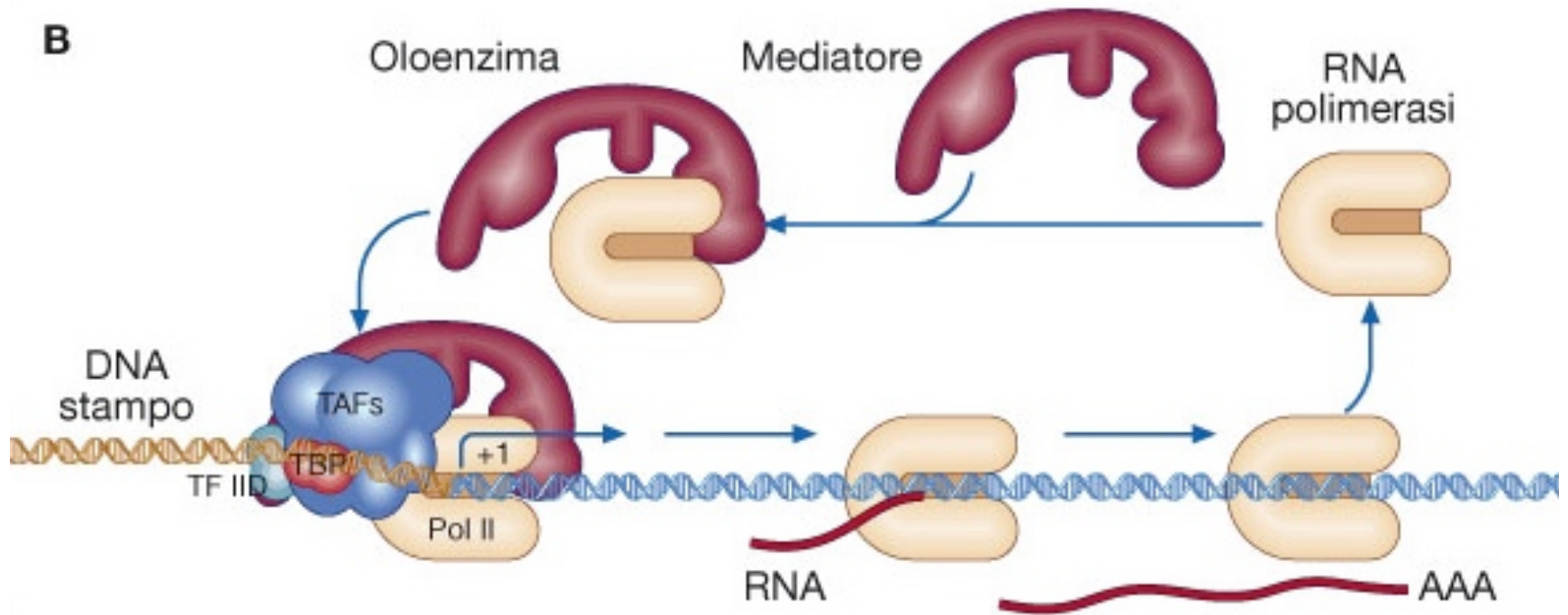
Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser

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**:

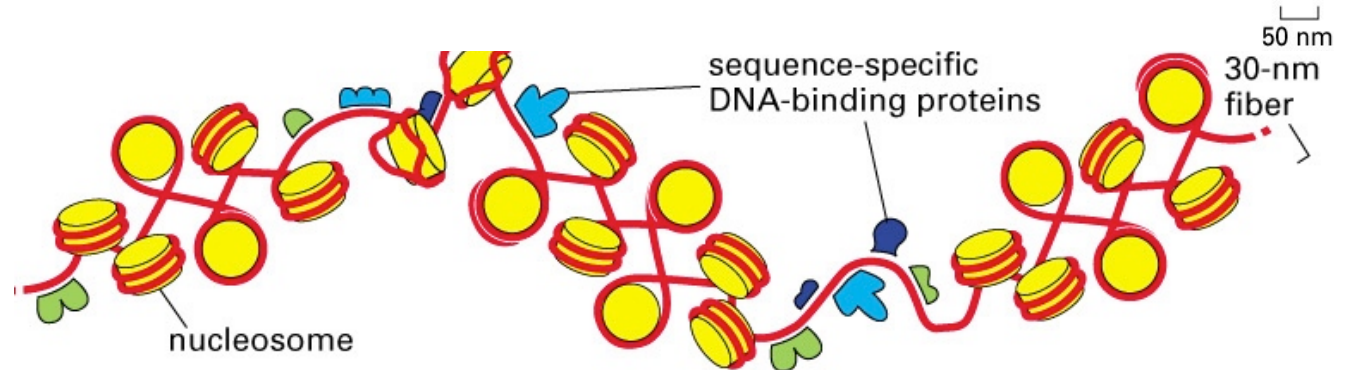
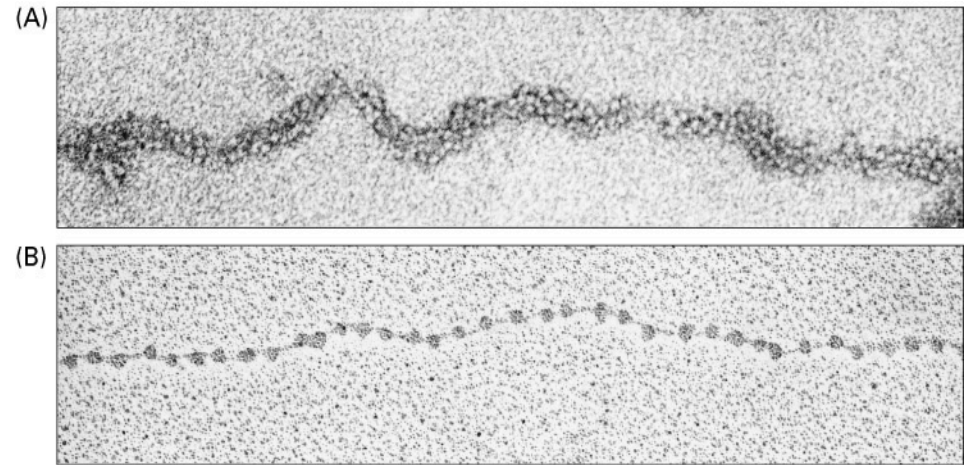
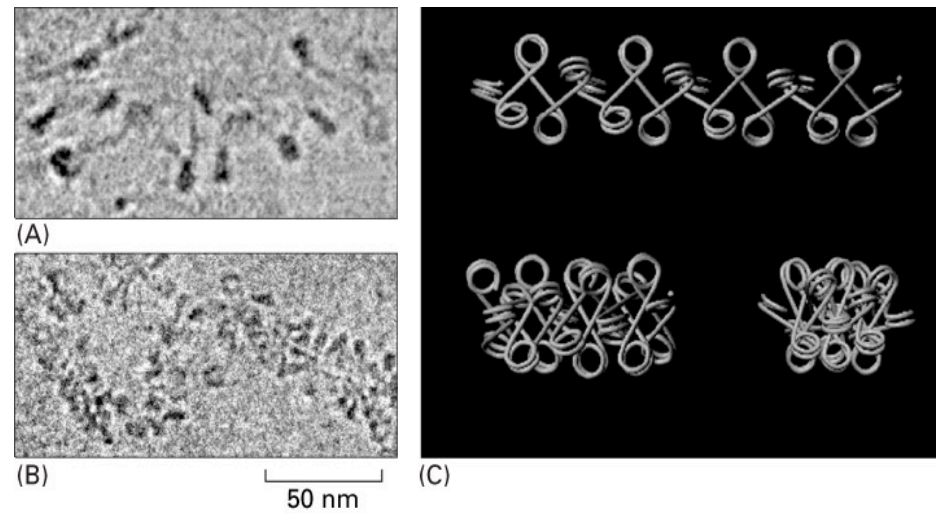
1. interagisce con il CTD della PolII
 2. Stimola la fosforilazione TFIID-dipendente del CTD
 3. La fosforilazione del CTD causa la dissociazione del mediatore dalla PolII.
- L'interazione con TFIID e' essenziale per assemblare un complesso attivo.

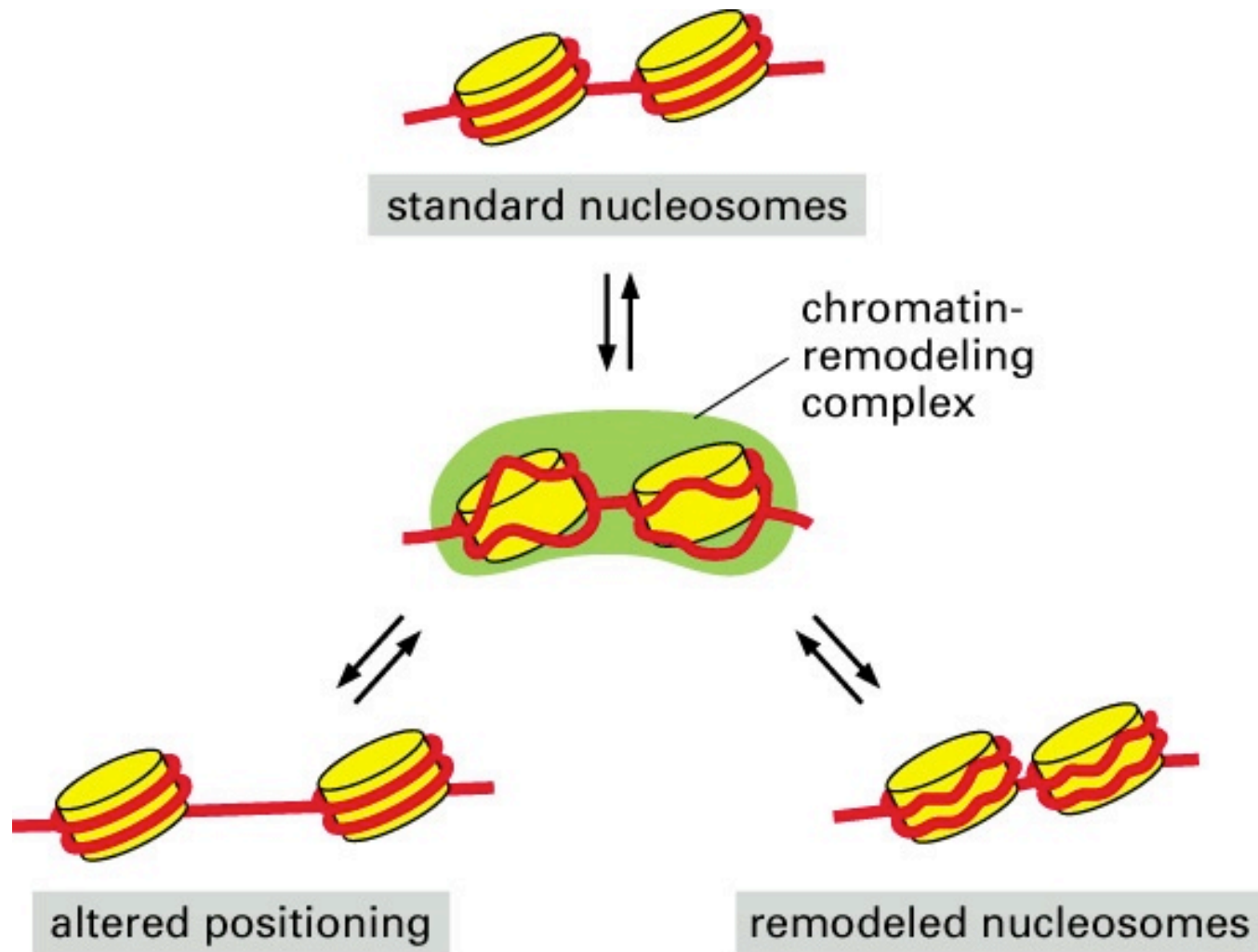
Once the polymerase II has begun elongating the RNA transcript, **most of the general transcription factors are released from the DNA** so that they are available to initiate another round of transcription with a new RNA polymerase molecule.

TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI: MECCANISMO DELLA TRASCRIZIONE

4. **ALLUNGAMENTO**: la RNA Pol si sposta lungo lo stampo mentre trascrive. Il DNA viene svolto davanti al sito attivo della polimerasi e riavvolto dietro di esso. La RNA Pol ovviamente ha la capacità di distinguere NTP da dNTP.

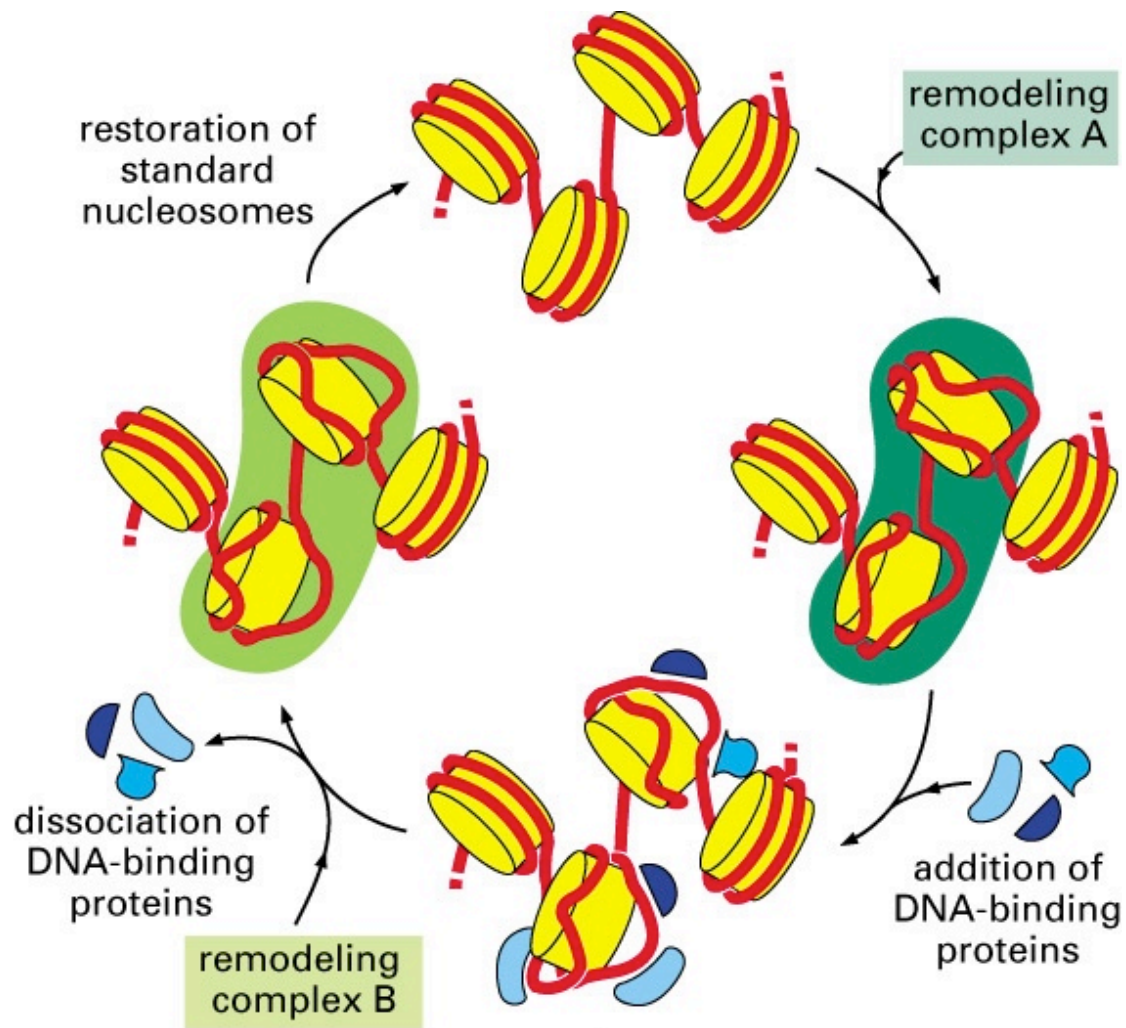
La posizione dei nucleosomi influenza l'attività della RNA Pol II.





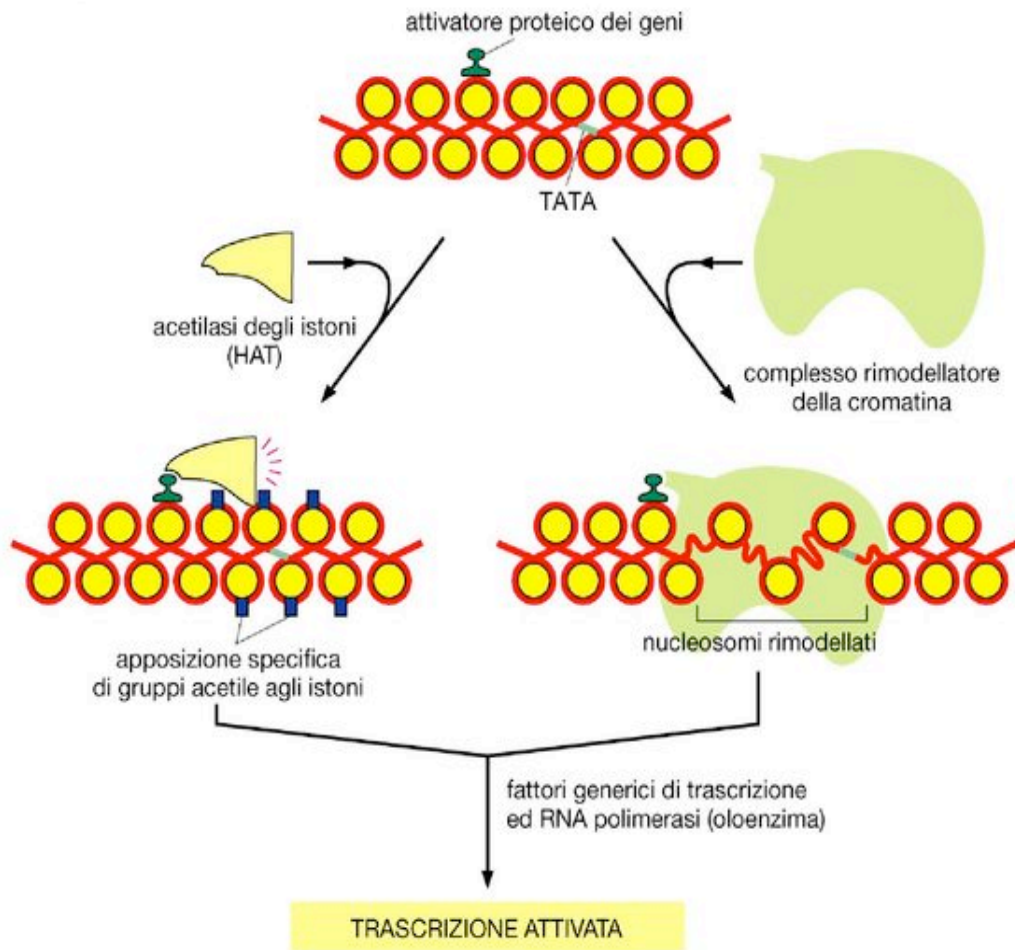
Chromatin remodelling complexes:

protein machines that use the energy of ATP hydrolysis to change the structure of nucleosomes temporarily so that DNA becomes less tightly bound to the histone core



GENE EXPRESSION, DNA REPLICATION,
AND OTHER PROCESSES THAT REQUIRE ACCESS TO
DNA PACKAGED IN NUCLEOSOMES

Pertanto, l'inizio della trascrizione *in vivo* richiede l'intervento di enzimi che rimodellano la cromatina.

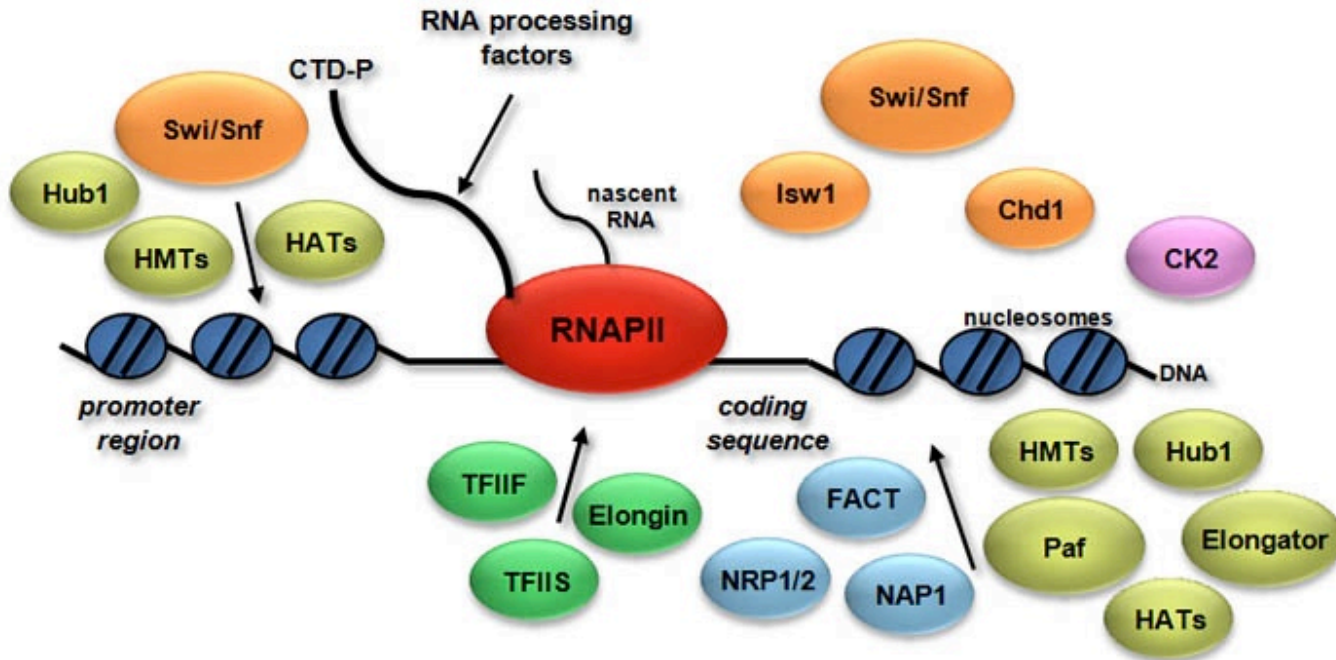


Attivatori e repressori in eucaroti attraggono proteine che modulano la struttura della cromatina modificando l'accessibilità del promotore ai fattori di trascrizione e alla RNA Pol

Proteine attivatrici attraggono le ACETILASI che aggiungono un gruppo acetile alle lisine delle code istoniche destrutturando la cromatina e rendendo accessibile il DNA

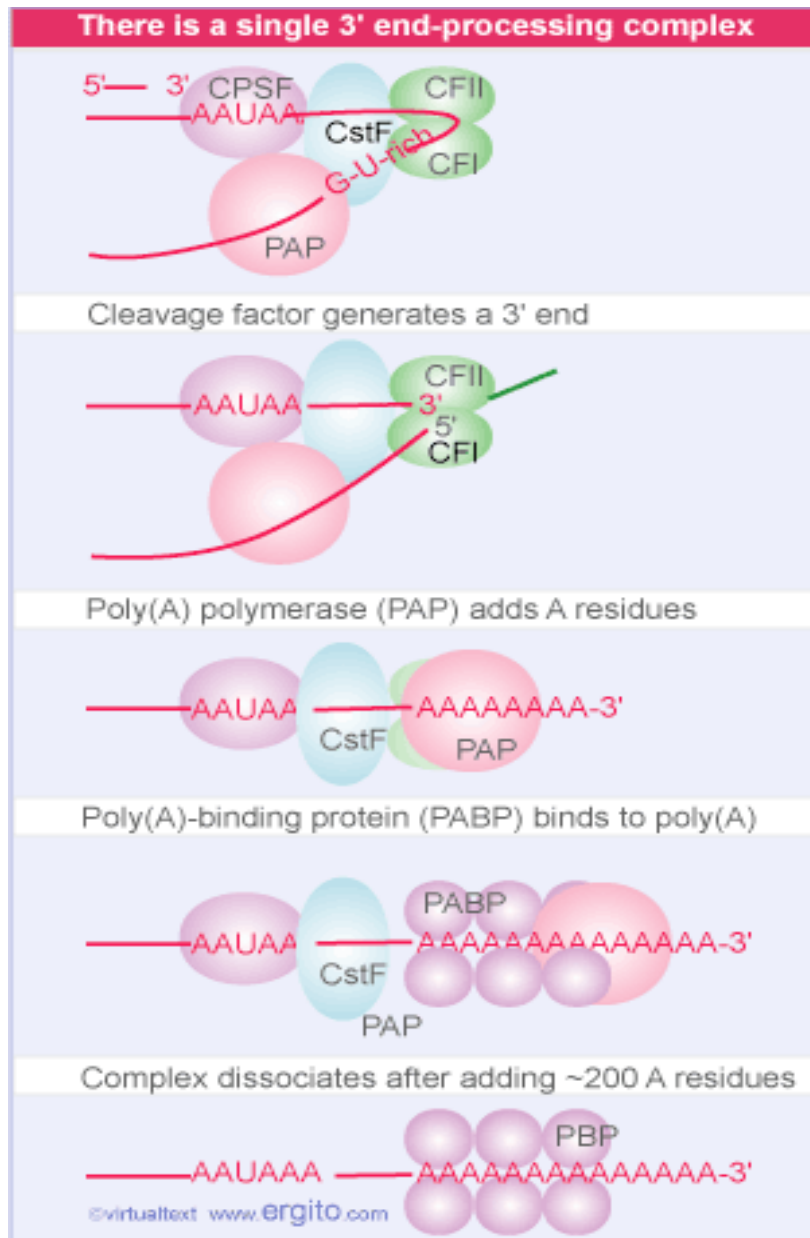
I repressori attraggono le DEACETILASI

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

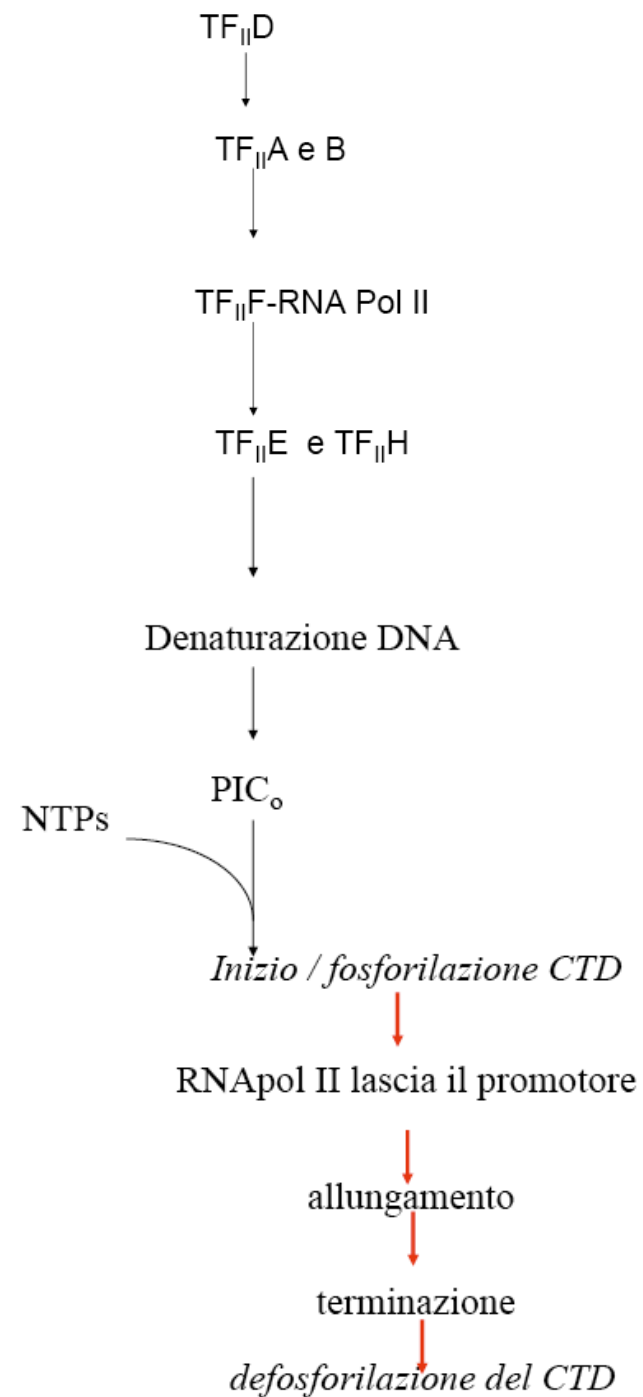
Un **Fattore di taglio** (endonucleasi) crea un'estremità' 3' libera

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

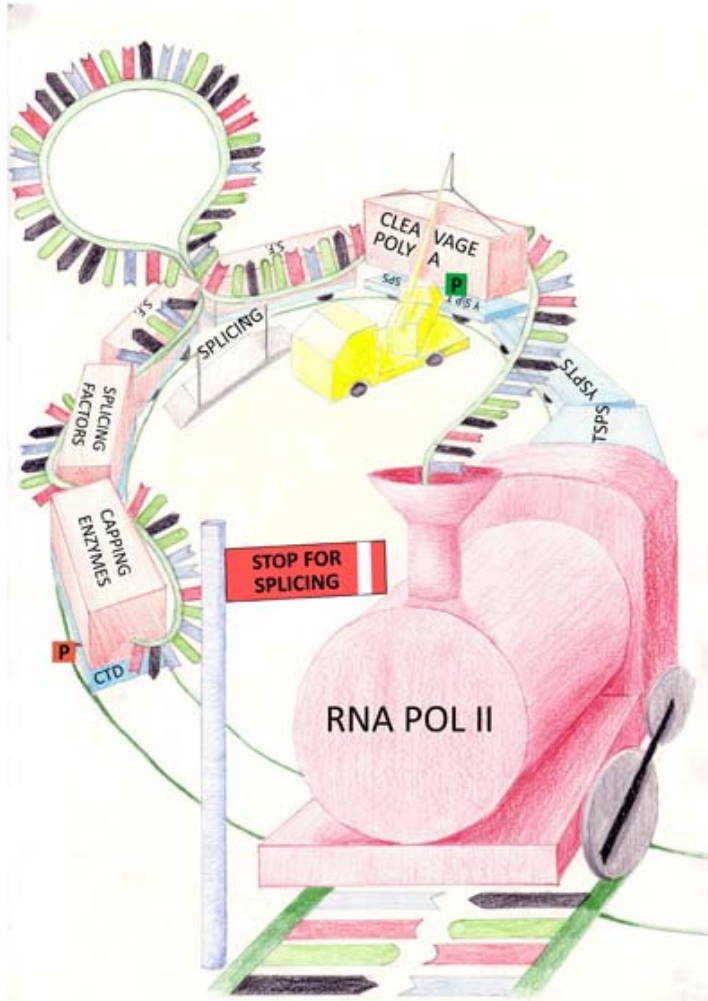
La **Poli(A) Polimerasi** (PAP) sintetizza la coda di poli(A) (in assenza di stampo)

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

In summary:



RNA PROCESSING

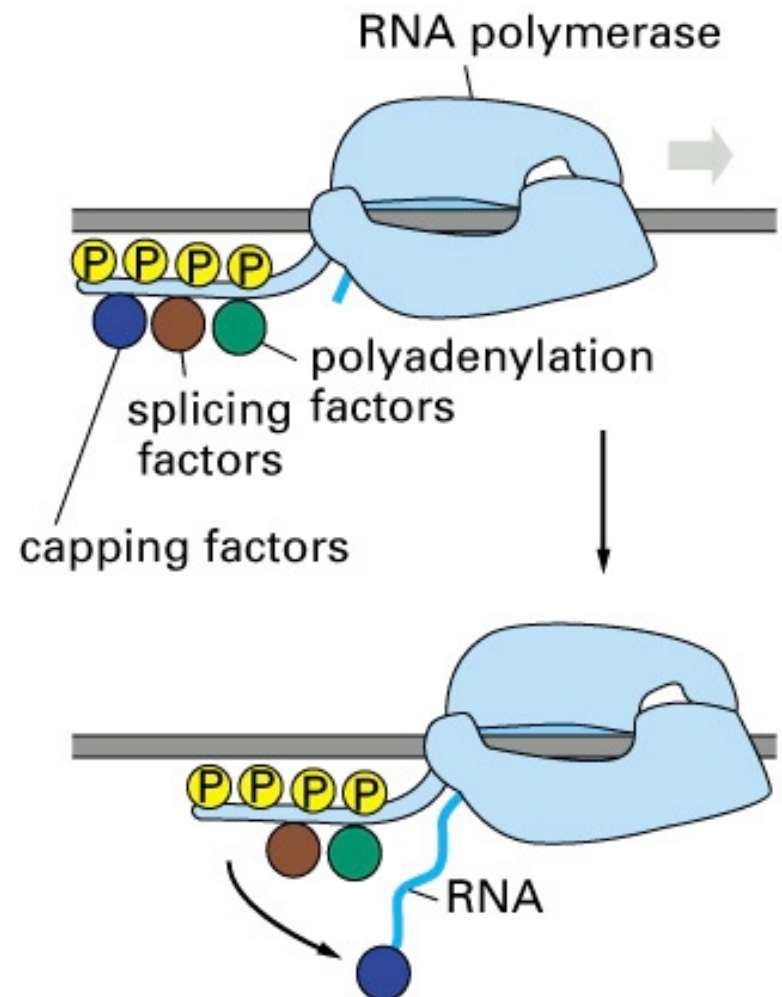


Modificazioni cui vanno incontro i trascritti per diventare RNA maturi

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 neo-sintetizzato**

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

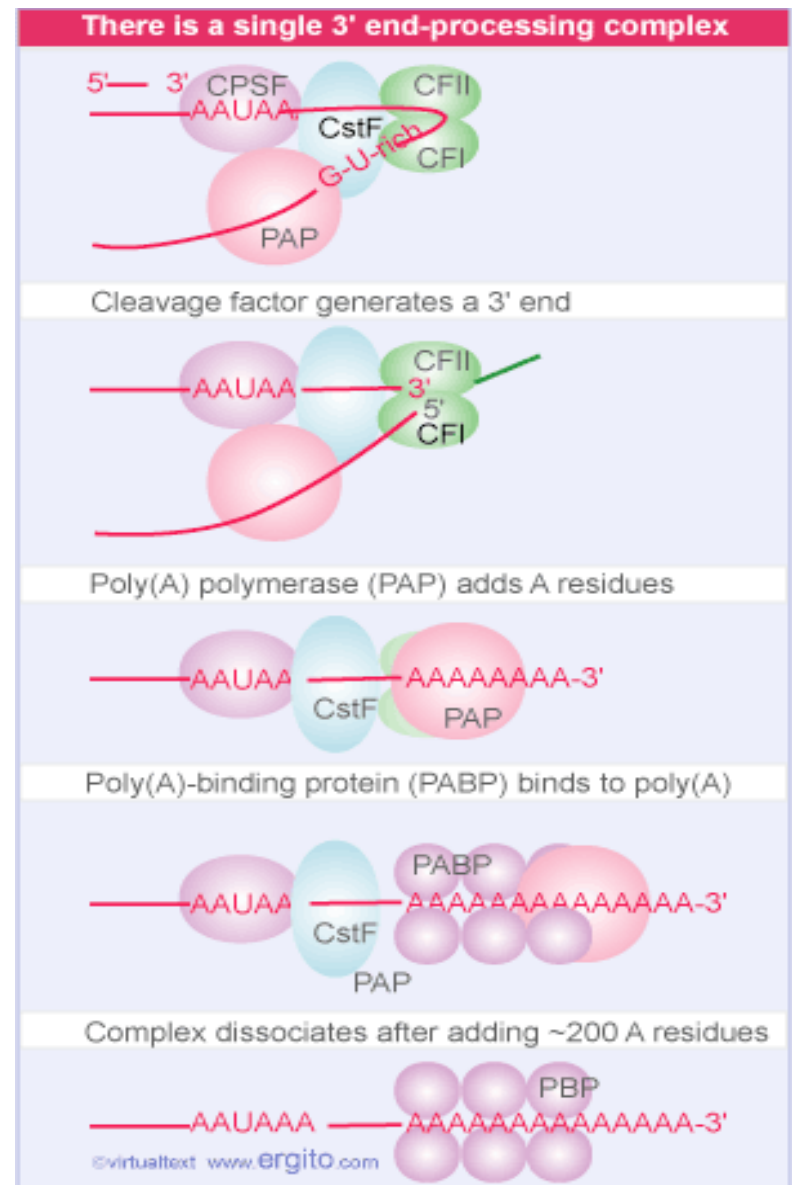
POLY(A)

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)

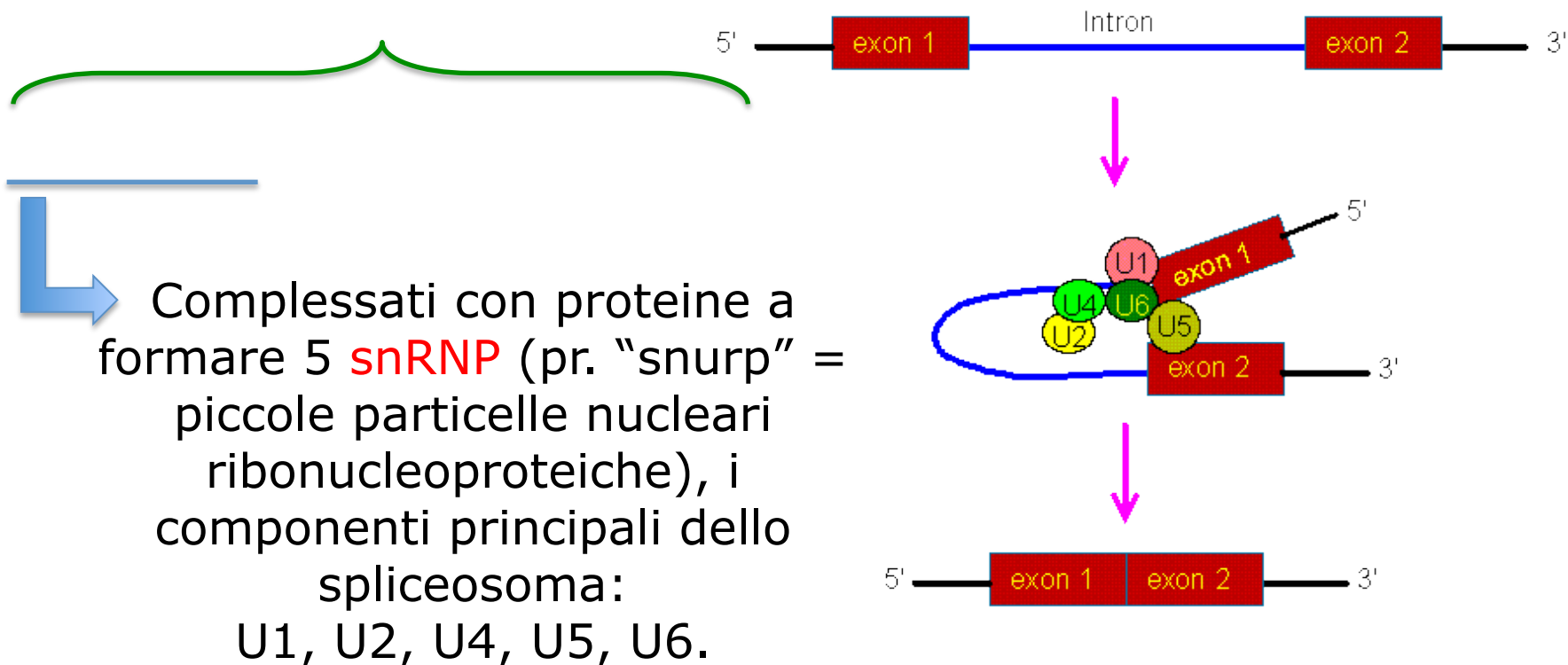
Dal punto di vista della pratica di laboratorio, il poly(A) viene utilizzato per purificare mRNA (isolandoli dagli altri RNA).



MECCANISMO DI SPLICING

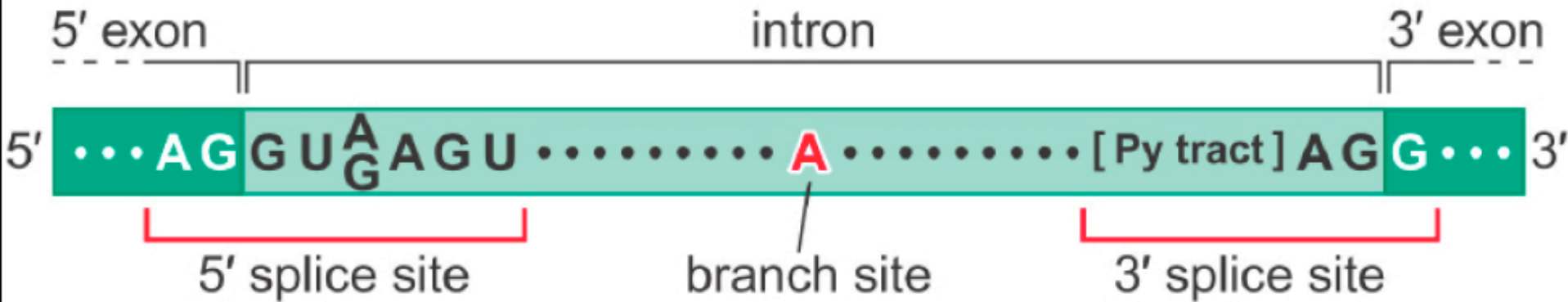
Lo splicing del pre-mRNA degli eucarioti multicellulari avviene grazie alla formazione di un enorme complesso RNA-proteine chiamato **SPLICEOSOMA**, che catalizza la **reazione di splicing**

5 snRNA + >200 proteine



I siti di splicing sono definiti da particolari sequenze di nucleotidi

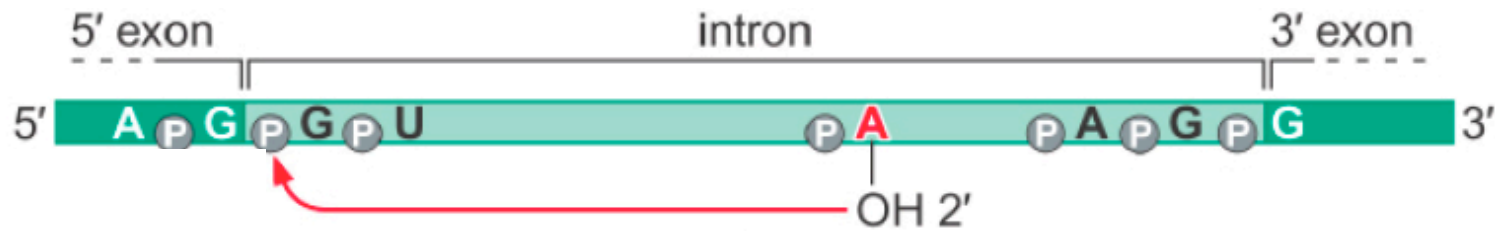
Analysis of a large number of mRNA genes has led to the identification of highly conserved consensus sequences at the 5' and 3' ends of essentially all mRNA introns



Tre sequenze consenso

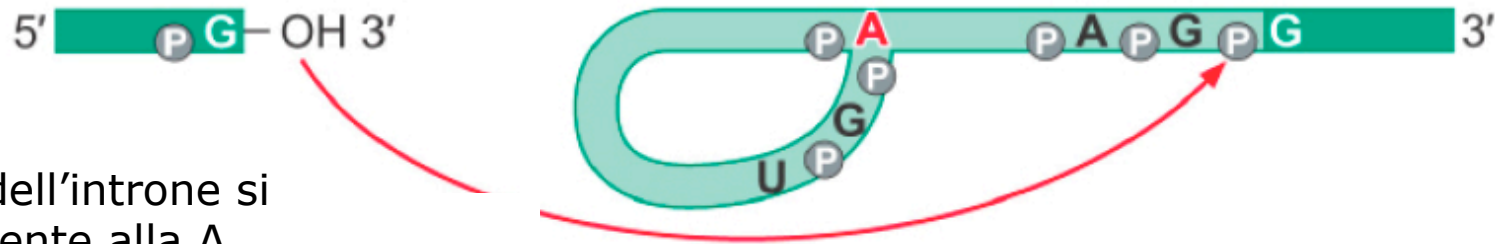
- 5' splice site
- 3' splice site
- Branch point+poli pyrimidine tract

sono riconosciute dai diversi componenti della splicing machinery.

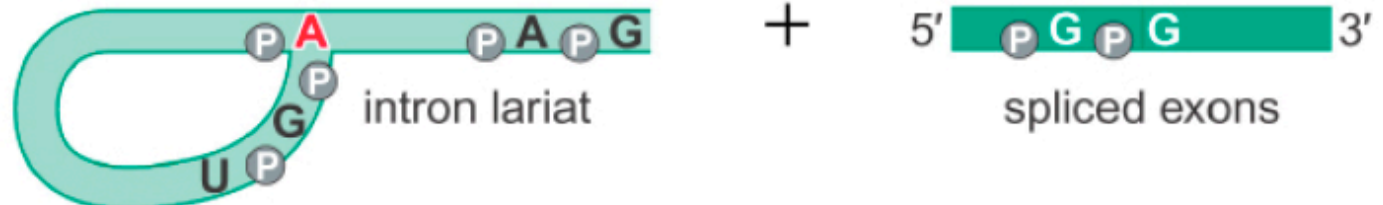


1. Il gruppo OH (2' del ribosio) della A del punto di ramificazione dell'introne "attacca" il fosfato al sito di splicing al 5' e fa tagliare il legame zucchero-fosfato.

Branch site A



2. L'estremità 5' dell'introne si lega covalentemente alla A, formando una struttura a **cappio** nella molecola di RNA. Contestualmente, il 3' OH dell'esone distaccato attacca il fosfato all'estremità 3' dell'introne e fa tagliare il legame zucch.-fosfato



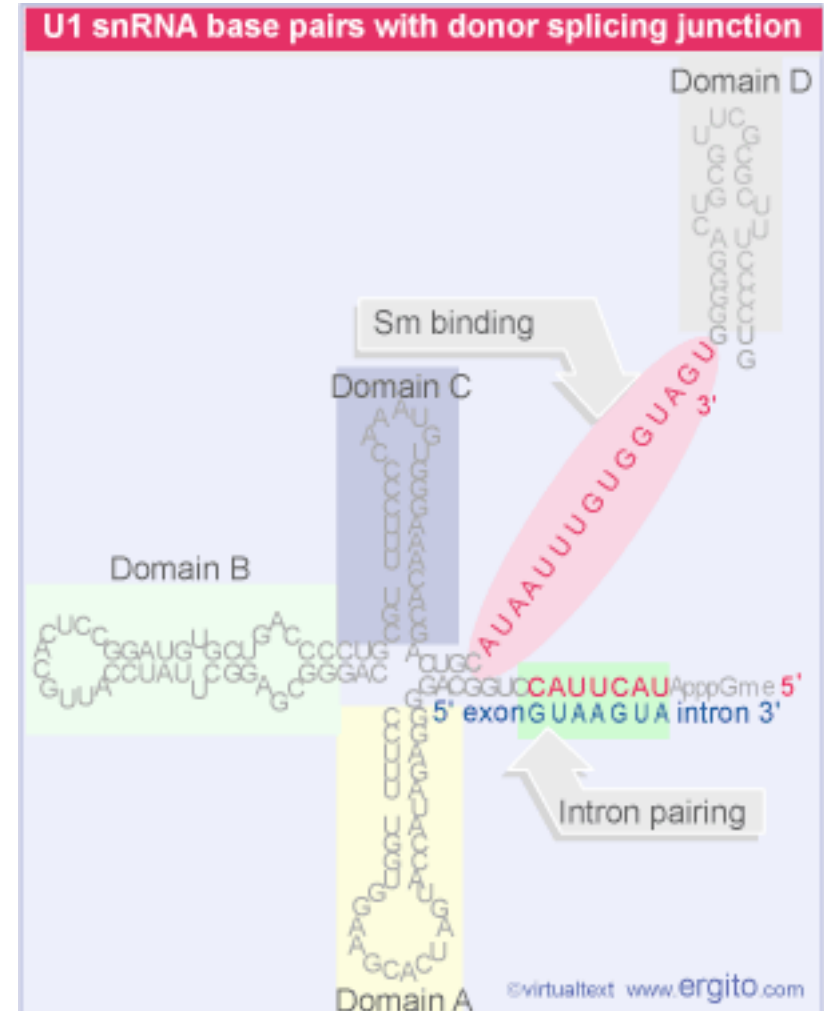
3. Le due estremità degli esoni si legano rilasciando l'introne sempre con una struttura a cappio

U1 snRNP e' composta da RNA e 8 proteine

Key concept

U1 snRNP inizia lo splicing legando il 5' splice site attraverso un appaiamento RNA-RNA

La struttura secondaria di snRNA contiene vari domini. Il Sm-binding site serve per l'interazione con proteine comuni a tutte le snRNP, mentre gli stem loops mediano il legame a proteine specifiche di U1.



SPLICING ED EXPORT NUCLEARE

Completato lo splicing, lo spliceosoma direziona un set di proteine alle giunzioni esone-esone a formare i complessi EJC (Exon Junction Complexes), che contribuiscono al trasporto dell'mRNA fuori dal nucleo e al controllo di qualità dell'mRNA in vista della traduzione

