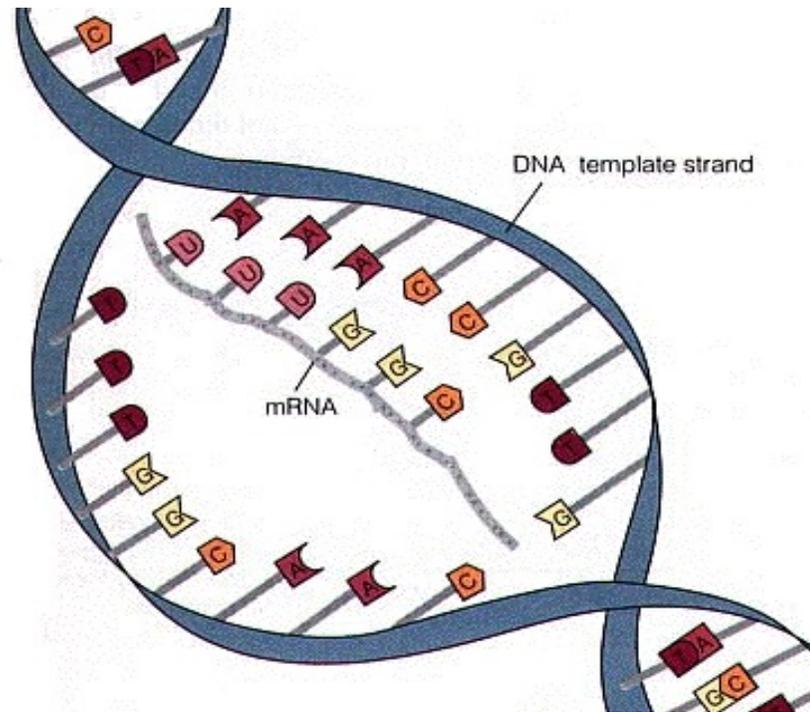
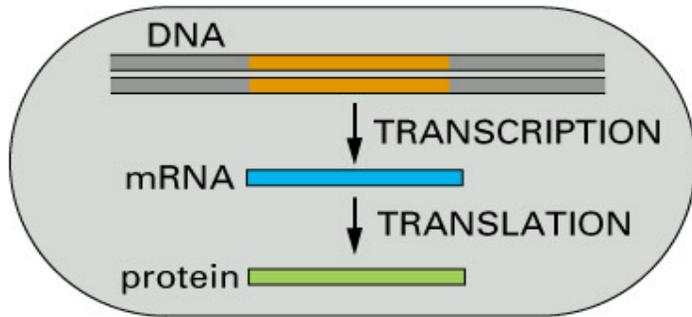


# TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI

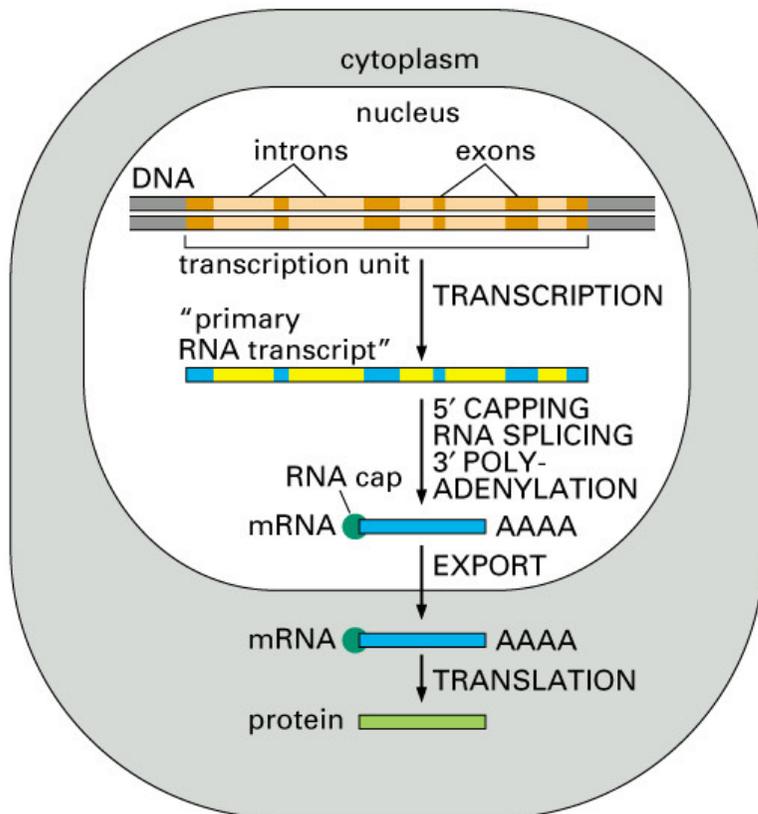


## PROCARYOTES



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

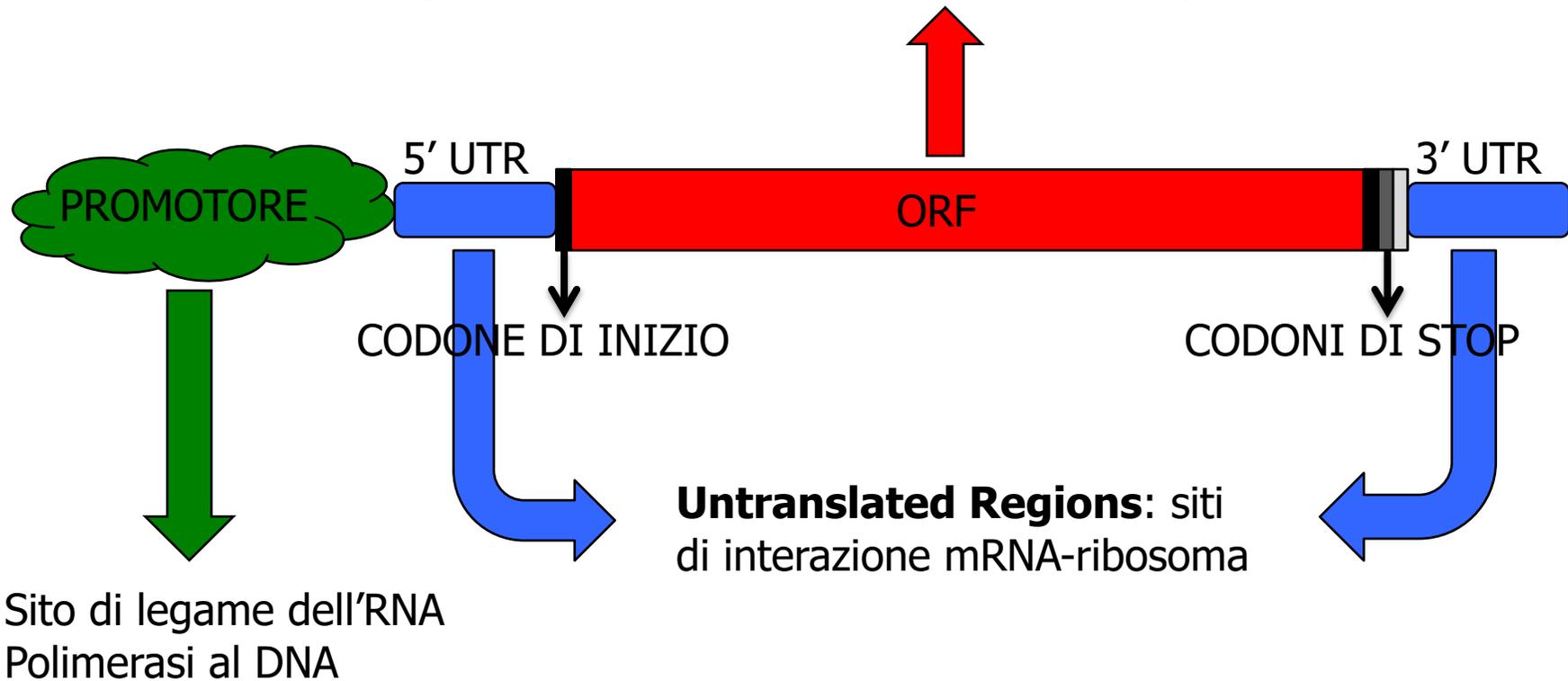
## EUCARYOTES



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

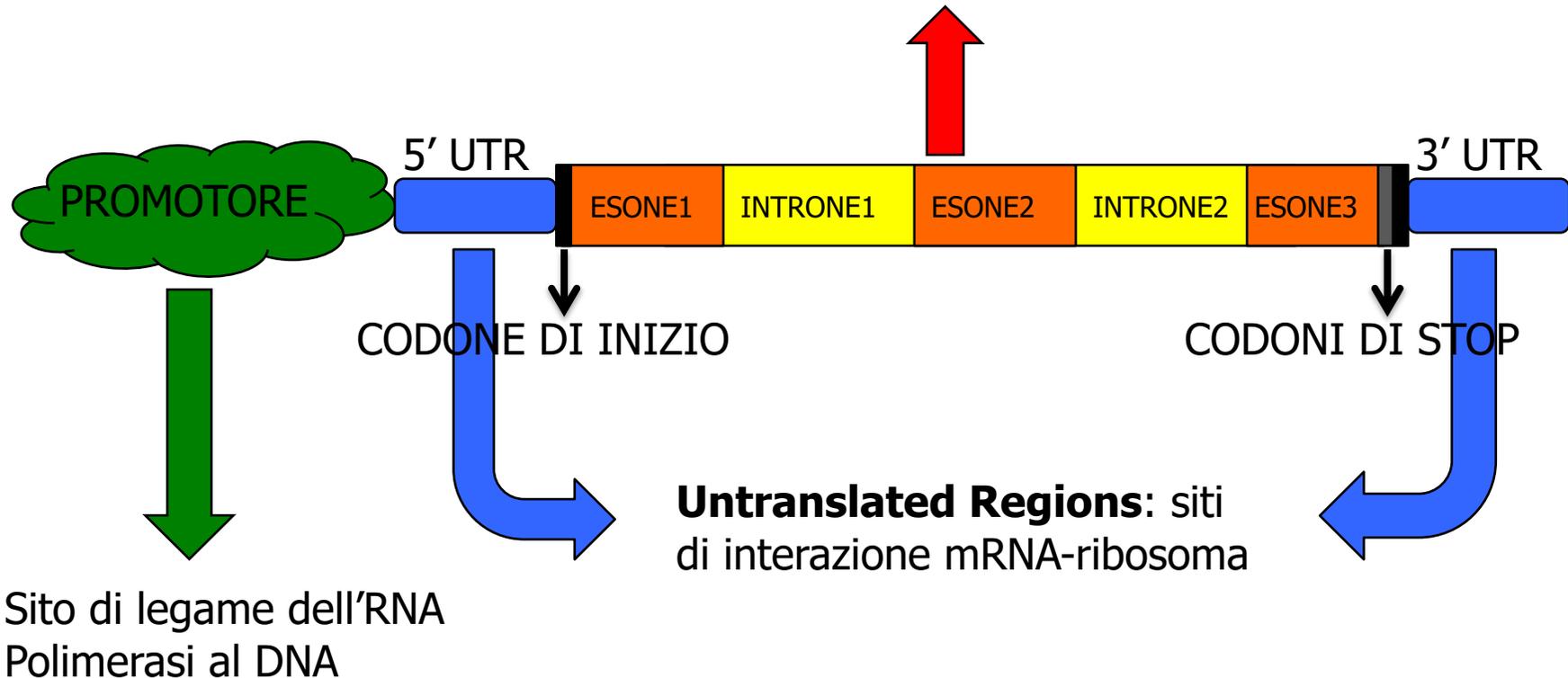
# STRUTTURA DI UN GENE EUCARIOTA

**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

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

Table 6-1 Principal Types of RNAs Produced in Cells

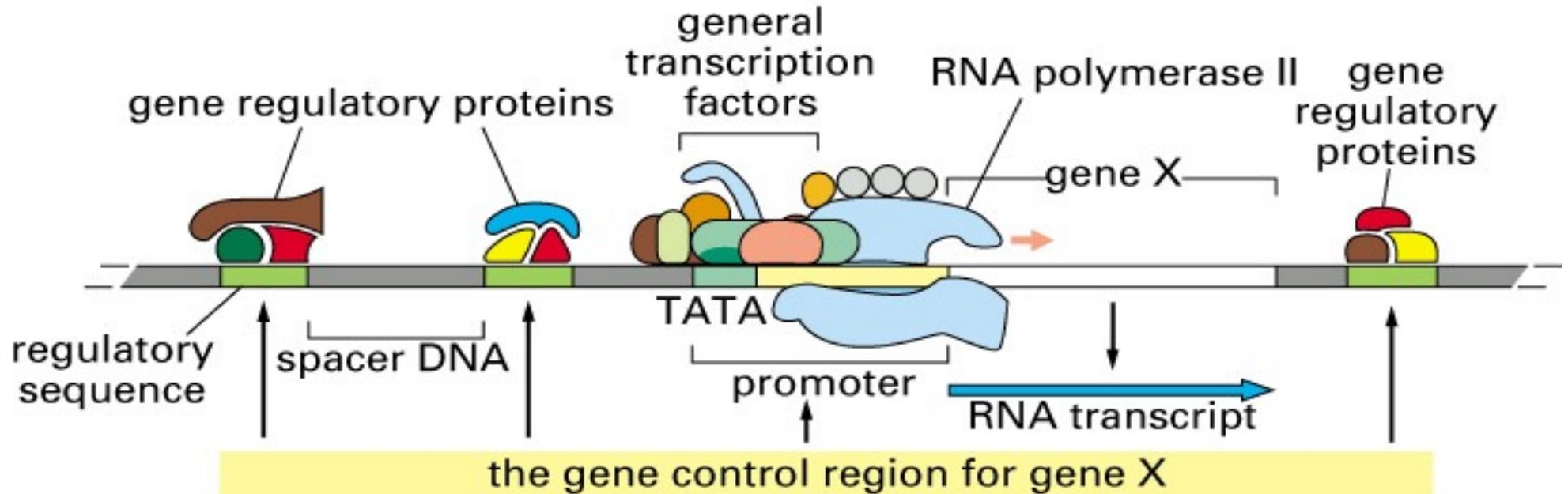
TYPE OF RNA	FUNCTION
mRNAs	messenger RNAs, code for proteins
rRNAs	ribosomal RNAs, form the basic structure of the ribosome and catalyze protein synthesis
tRNAs	transfer RNAs, central to protein synthesis as adaptors between mRNA and amino acids
snRNAs	small nuclear RNAs, function in a variety of nuclear 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

## 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

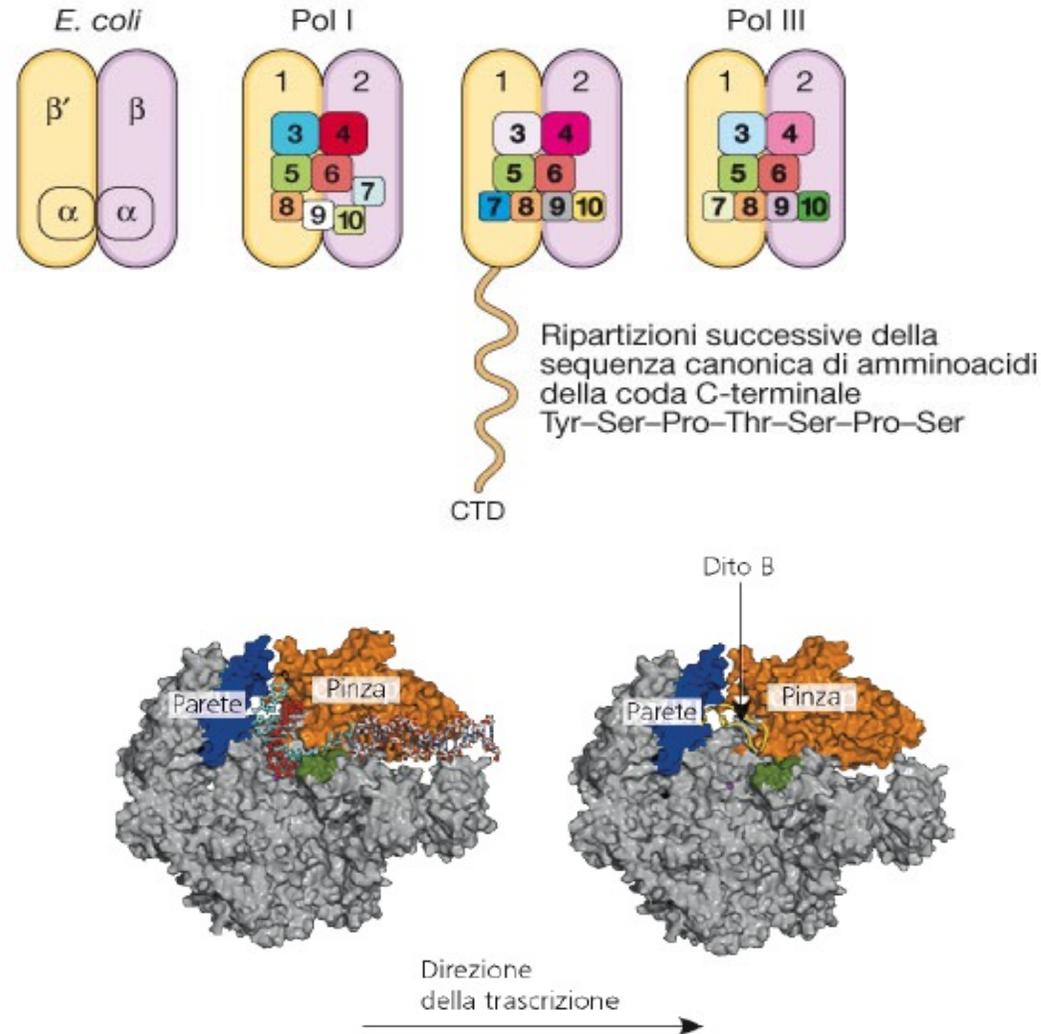
Nei nuclei delle cellule eucariotiche si trovano 3 RNA polimerasi (I, II e III), ciascuna costituita da più subunità

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

# IL MACCHINARIO PROTEICO DELLA TRASCRIZIONE

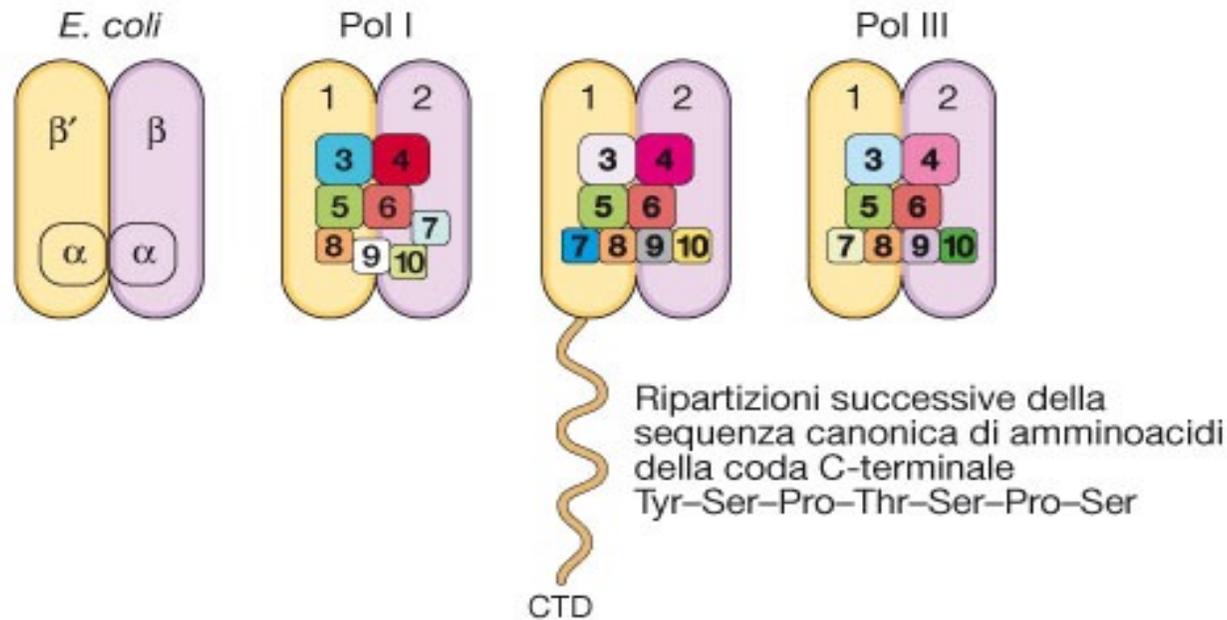
- RNA Polimerasi
- Fattori Generali della Trascrizione
- Attivatori, Repressori, Co-attivatori
- Fattori di trascrizione

# 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**:

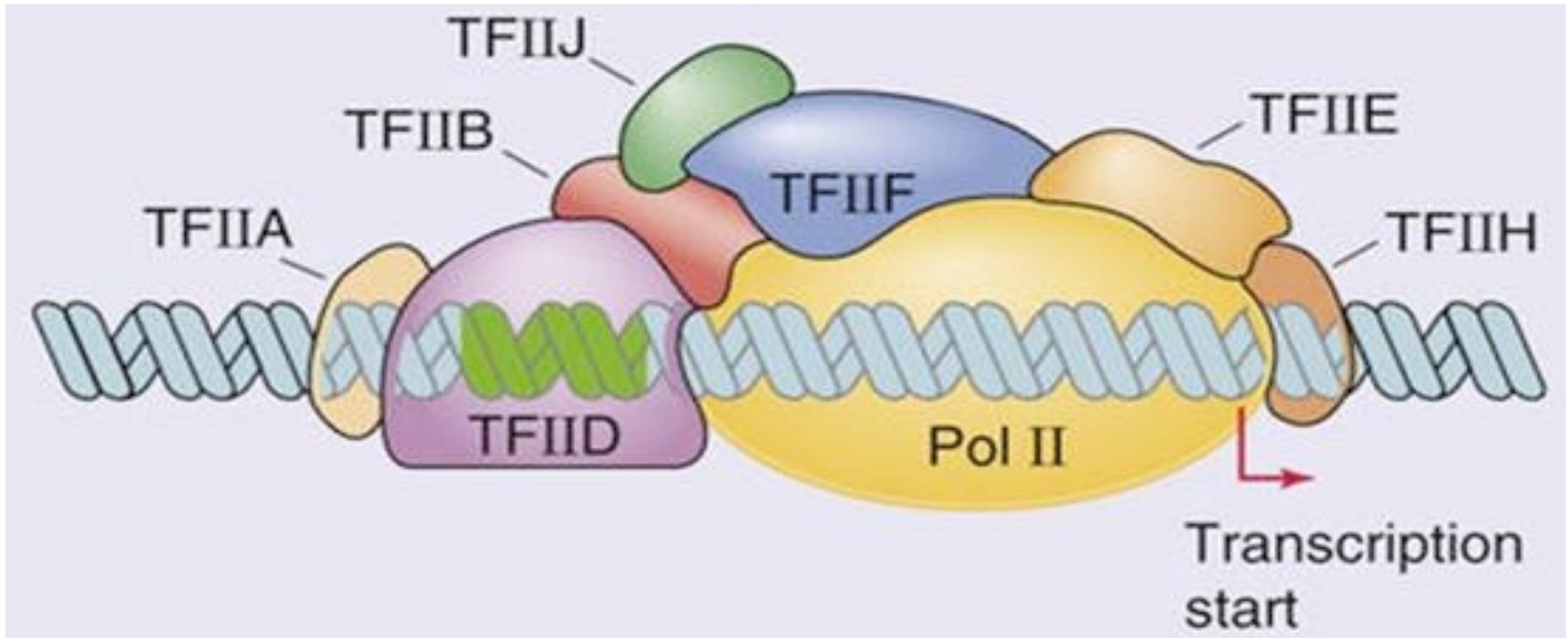
- la RNA pol negli eucarioti devono affrontare la struttura della cromatina
- la RNAPolII degli eucarioti richiede un set di proteine aggiuntive, chiamate  
*FATTORI GENERALI DELLA TRASCRIZIONE*

# FATTORI GENERALI DELLA TRASCRIZIONE

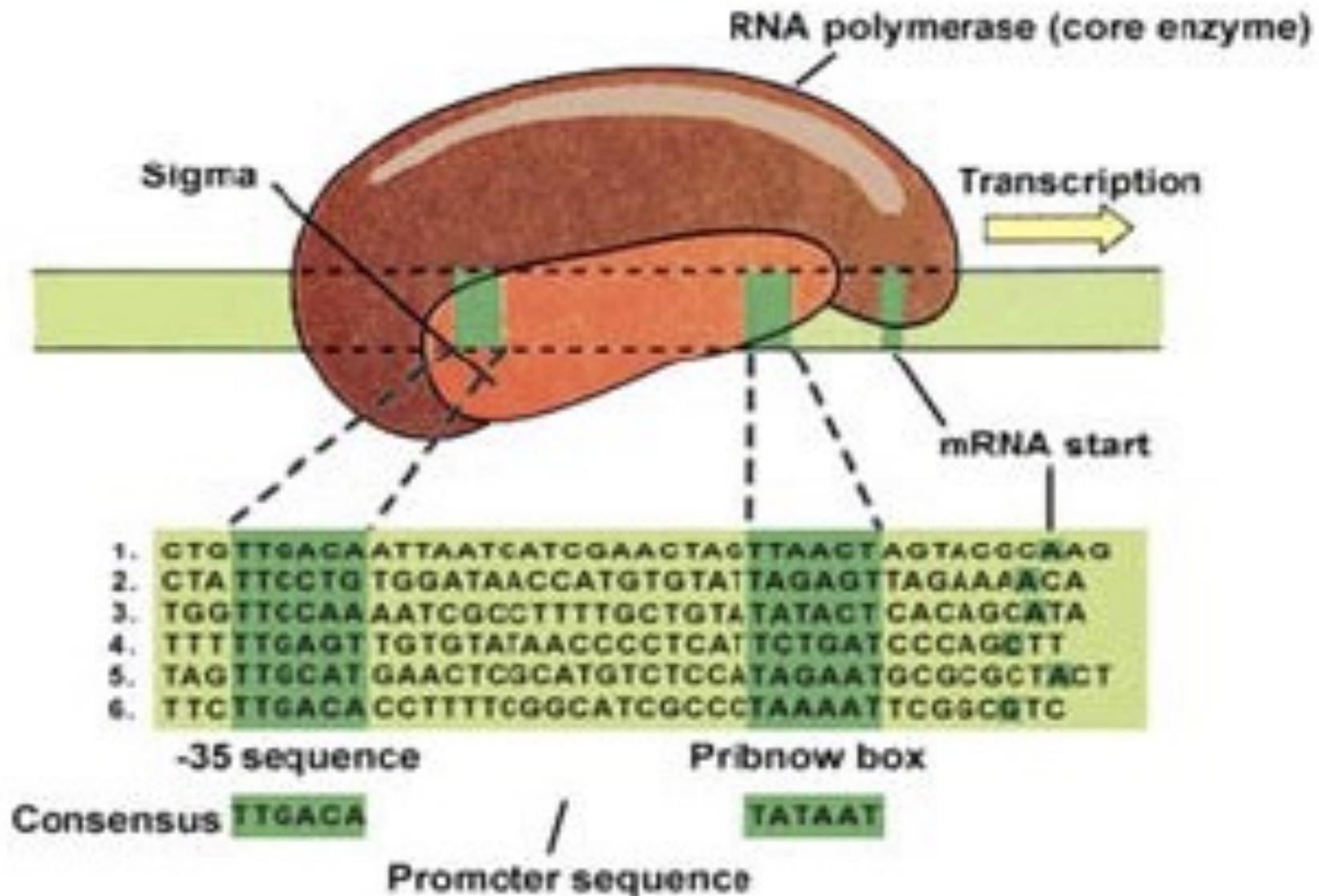
- aiutano il posizionamento della RNAPol nella regione del promotore
- contribuiscono allo svolgimento della doppia elica di DNA
- aiutano il distacco della RNAPol dal promotore e l'avvio della fase di elongazione
- si chiamano GENERALI perchè si assemblano su **tutti** i promotori usati dalla RNAPol 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 TFIIF nel complesso di pre-inizio
TFIIF	2	30, 74	Lega Pol II e TFIIB
TFIIH		da 38 a 98	Ha un'attività elicastica 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
<i>Totale</i>	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**

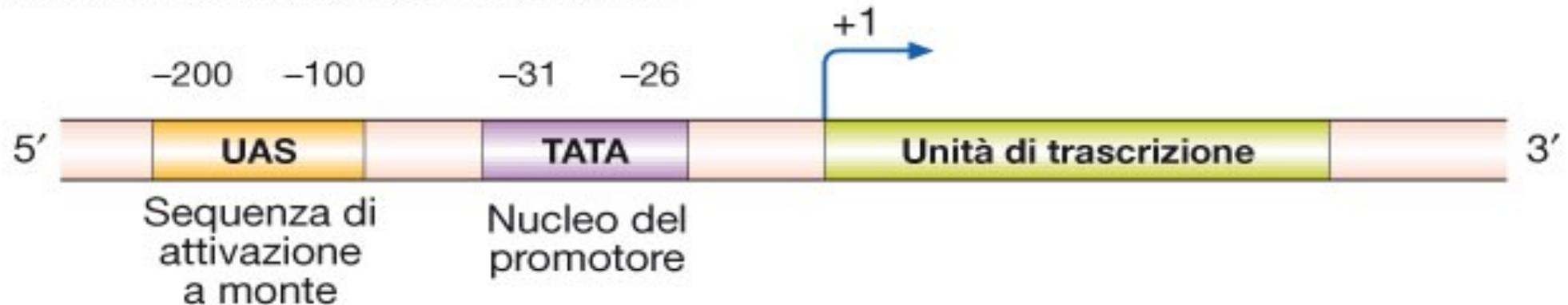


# Il promotore tipico nei procarioti



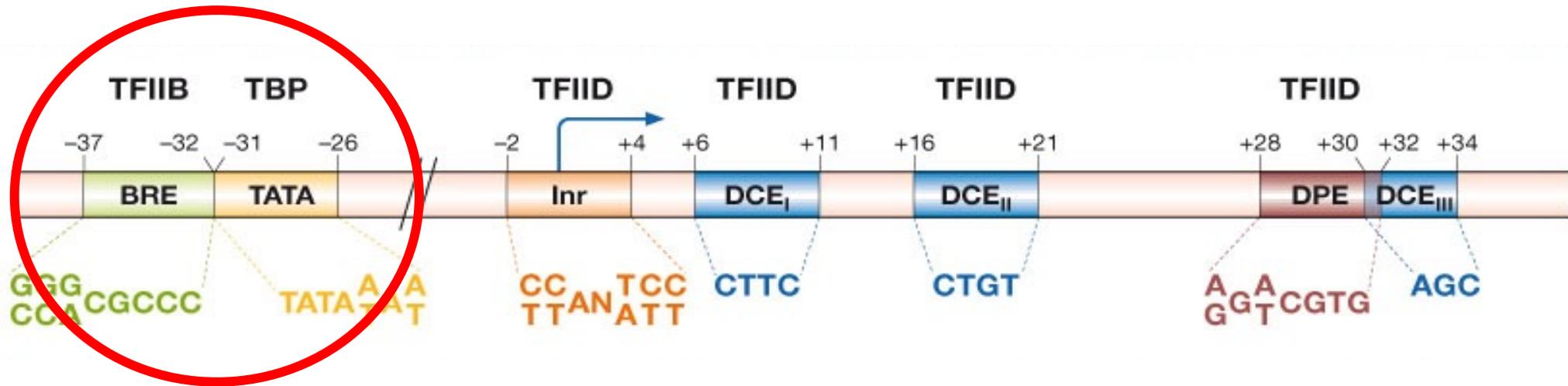
# Il promotore tipico della RNA Pol II in LIEVITO

## 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.

# TIPICA UNITÀ TRASCRIZIONALE EUCARIOTICA

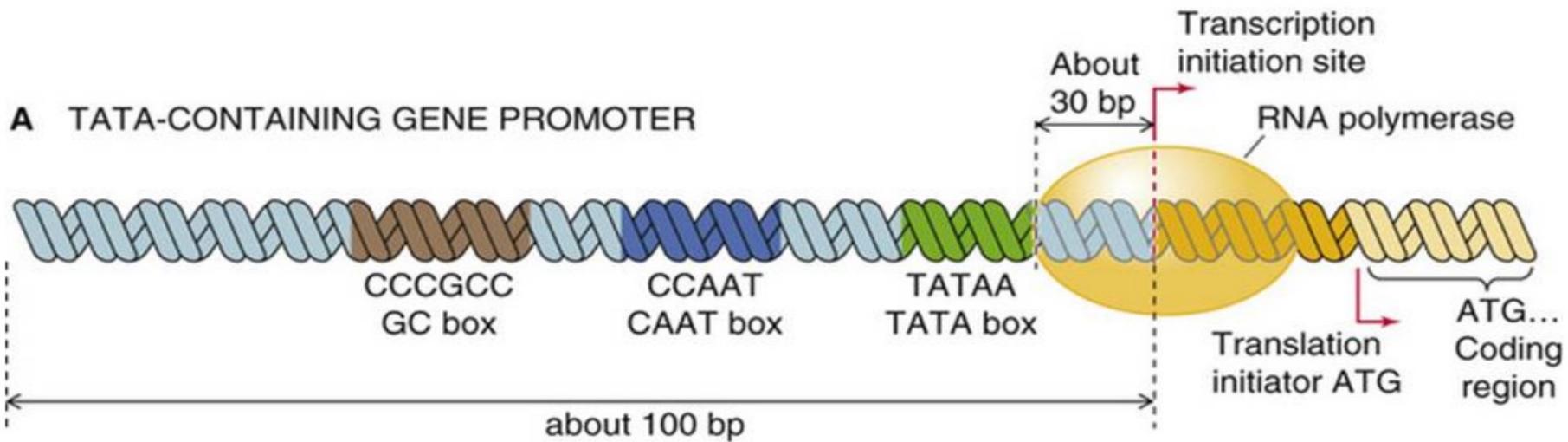


Il **promotore *minimo*** di PolII e' il tratto di DNA indispensabile per far iniziare la trascrizione.

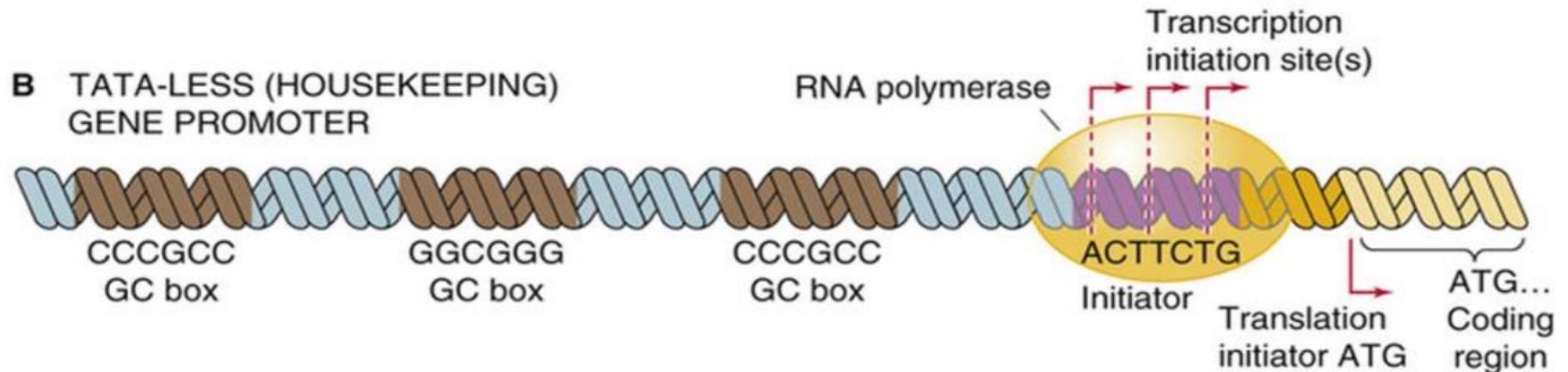
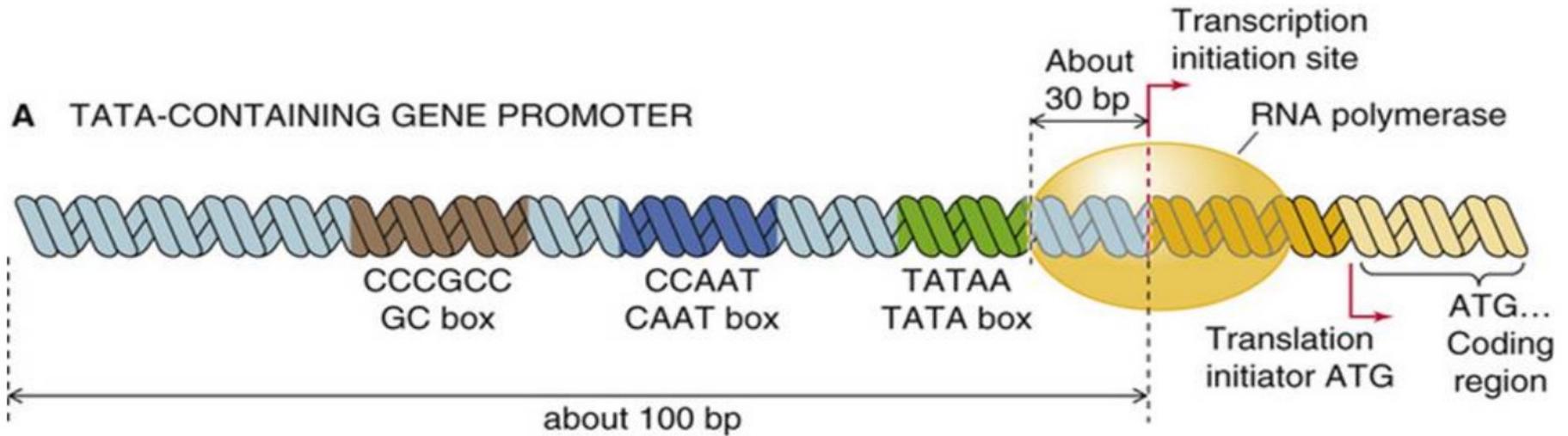
Contiene **la TATA box**, preceduta, in genere, dall'elemento **BRE** (*B responsive element*) cui si lega TFIIB.

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".

**A TATA-CONTAINING GENE PROMOTER**

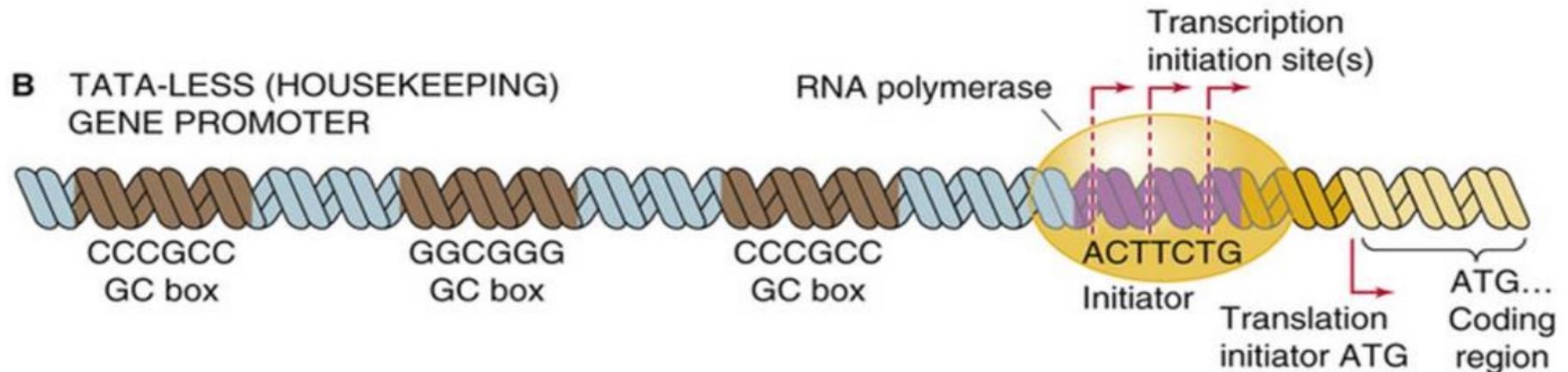
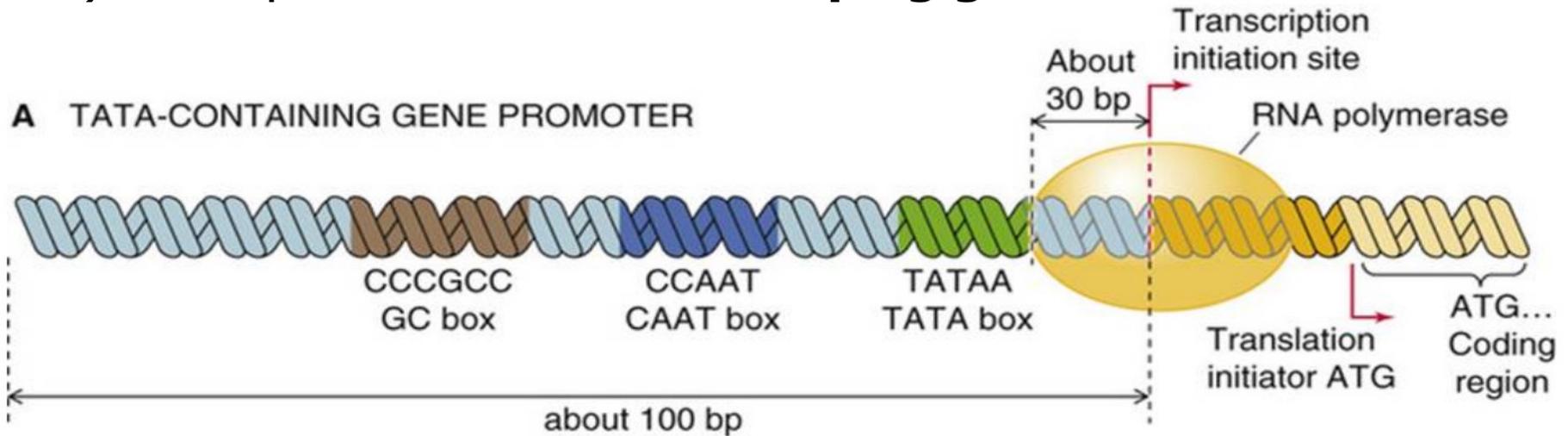


# PROMOTORI PRIVI DI TATA box.

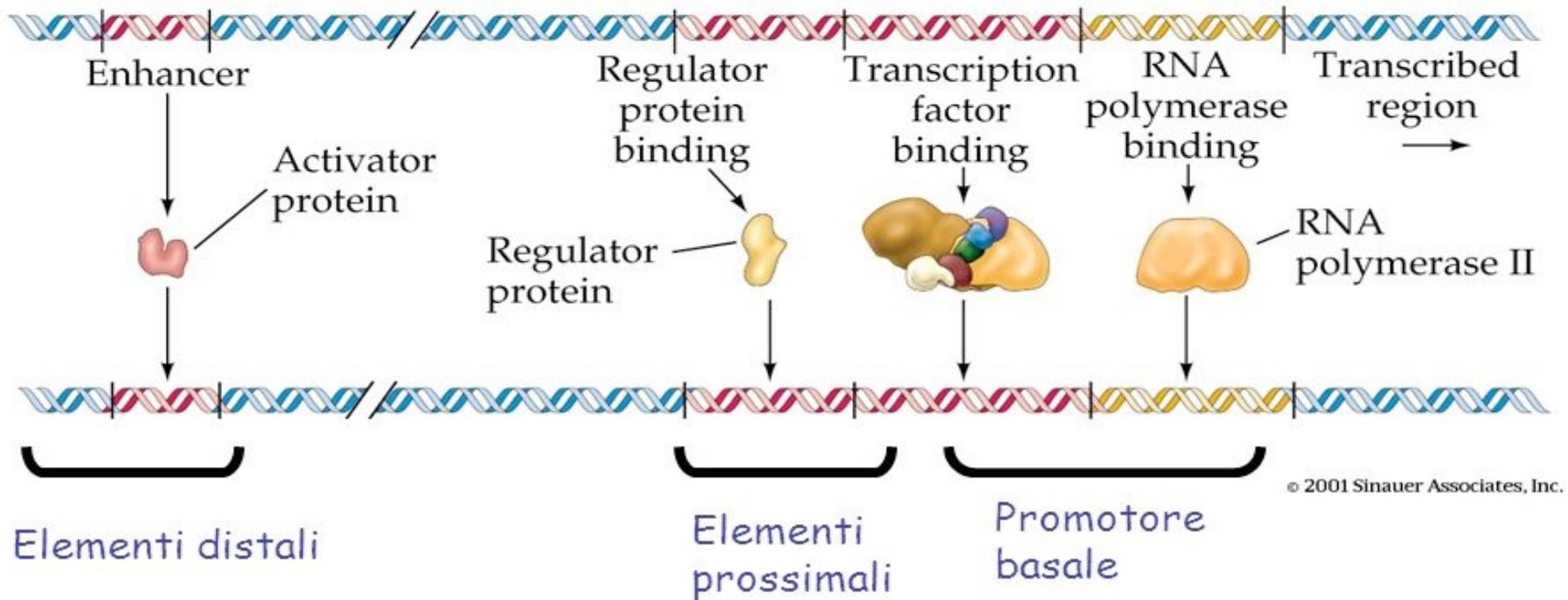


# PROMOTORI PRIVI DI TATA box.

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



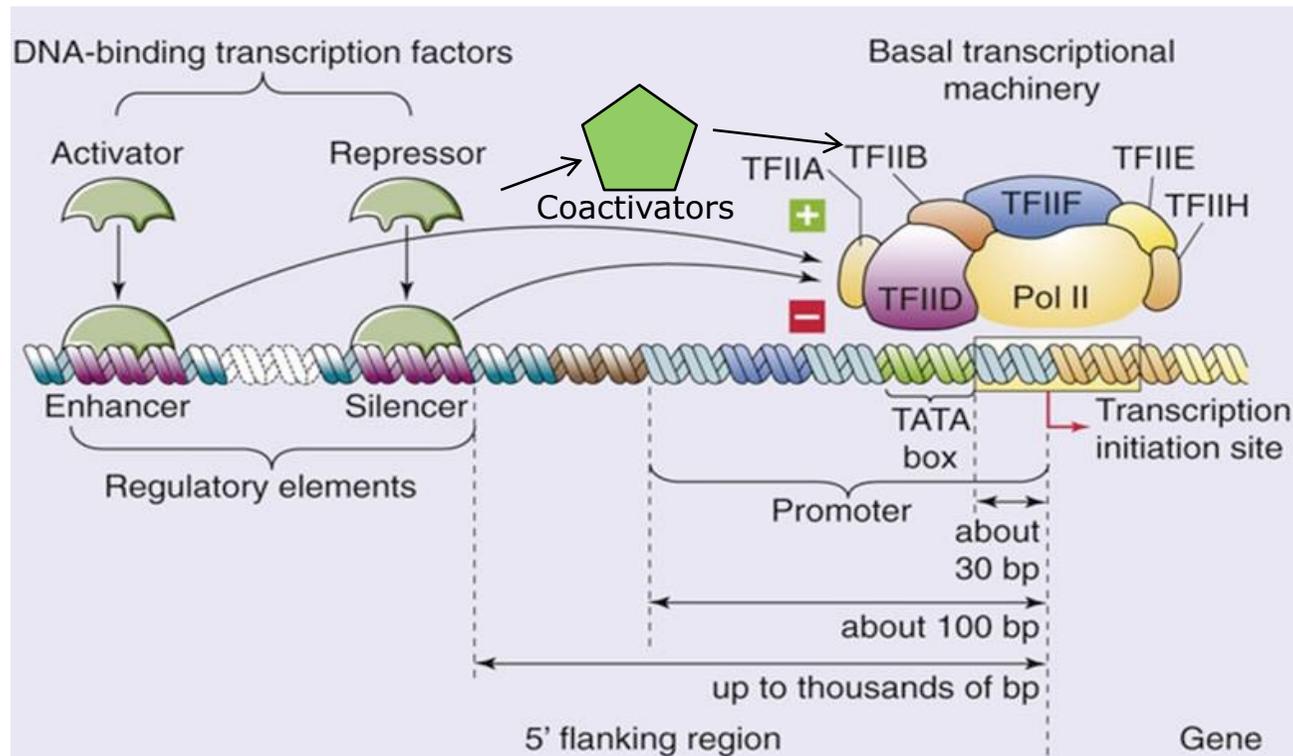
A transcription factor called **SP1** recognizes these CG rich regions



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 più ***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?**

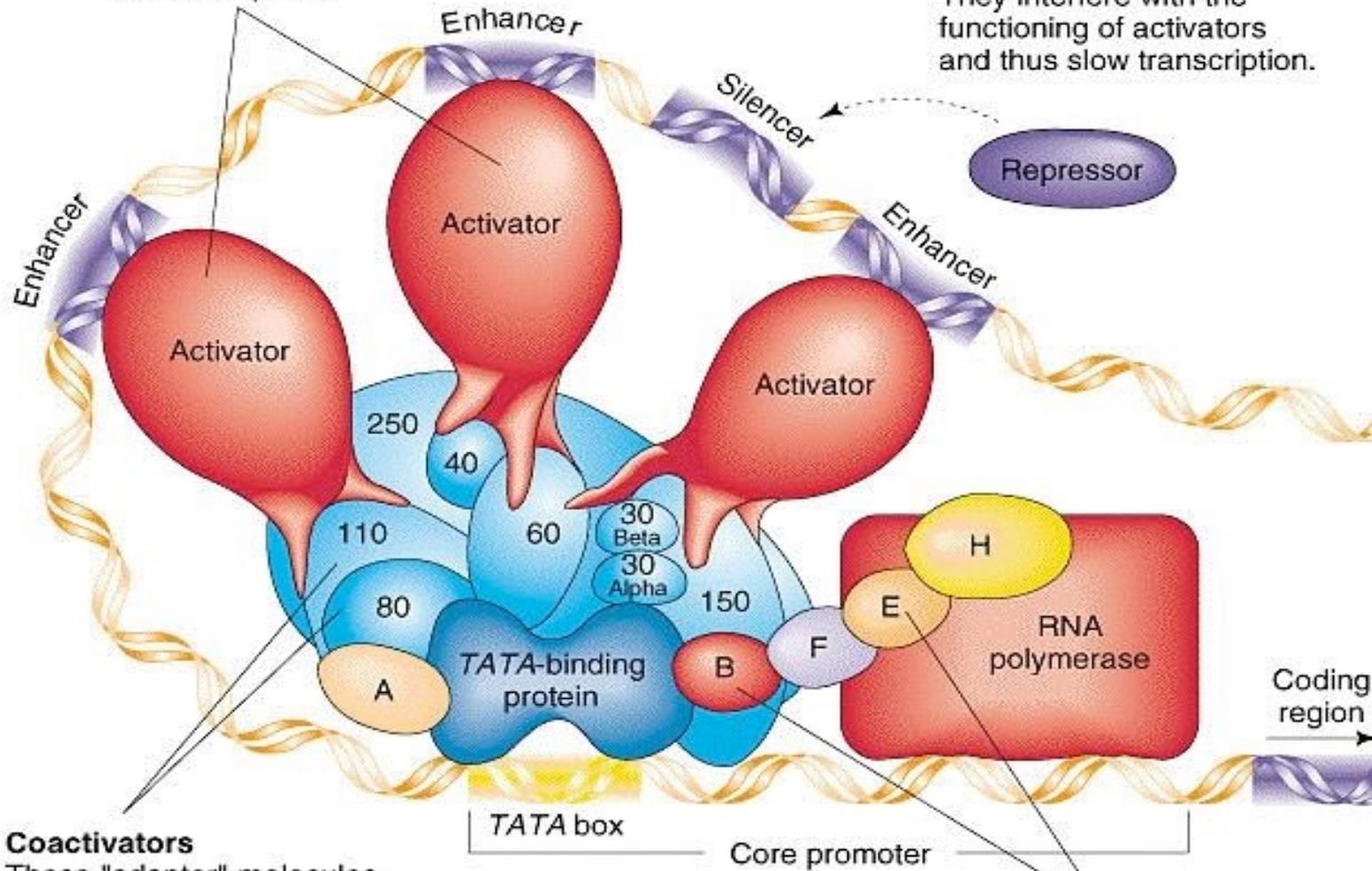
# DNA looping

## 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.

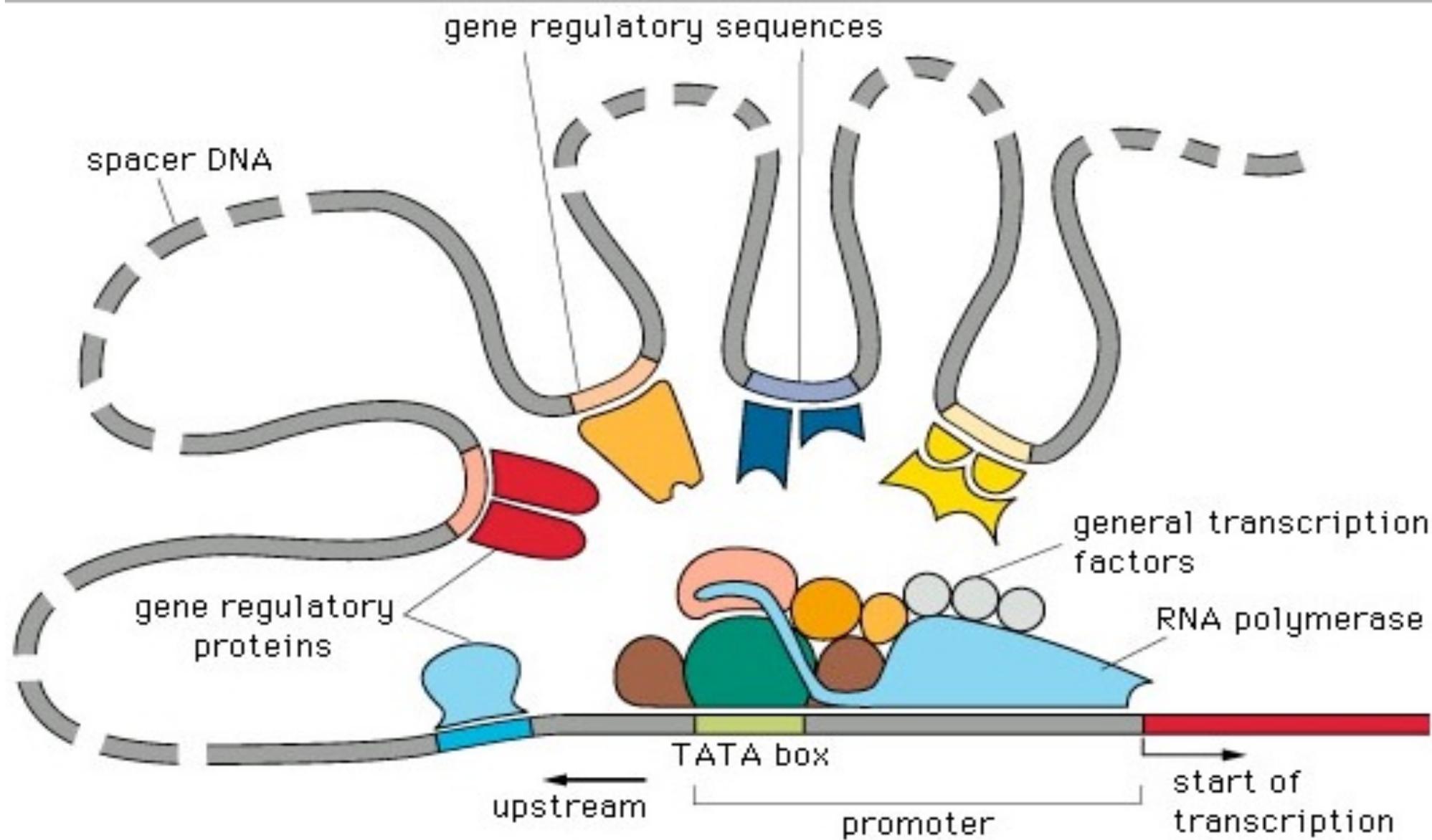


## Coactivators

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

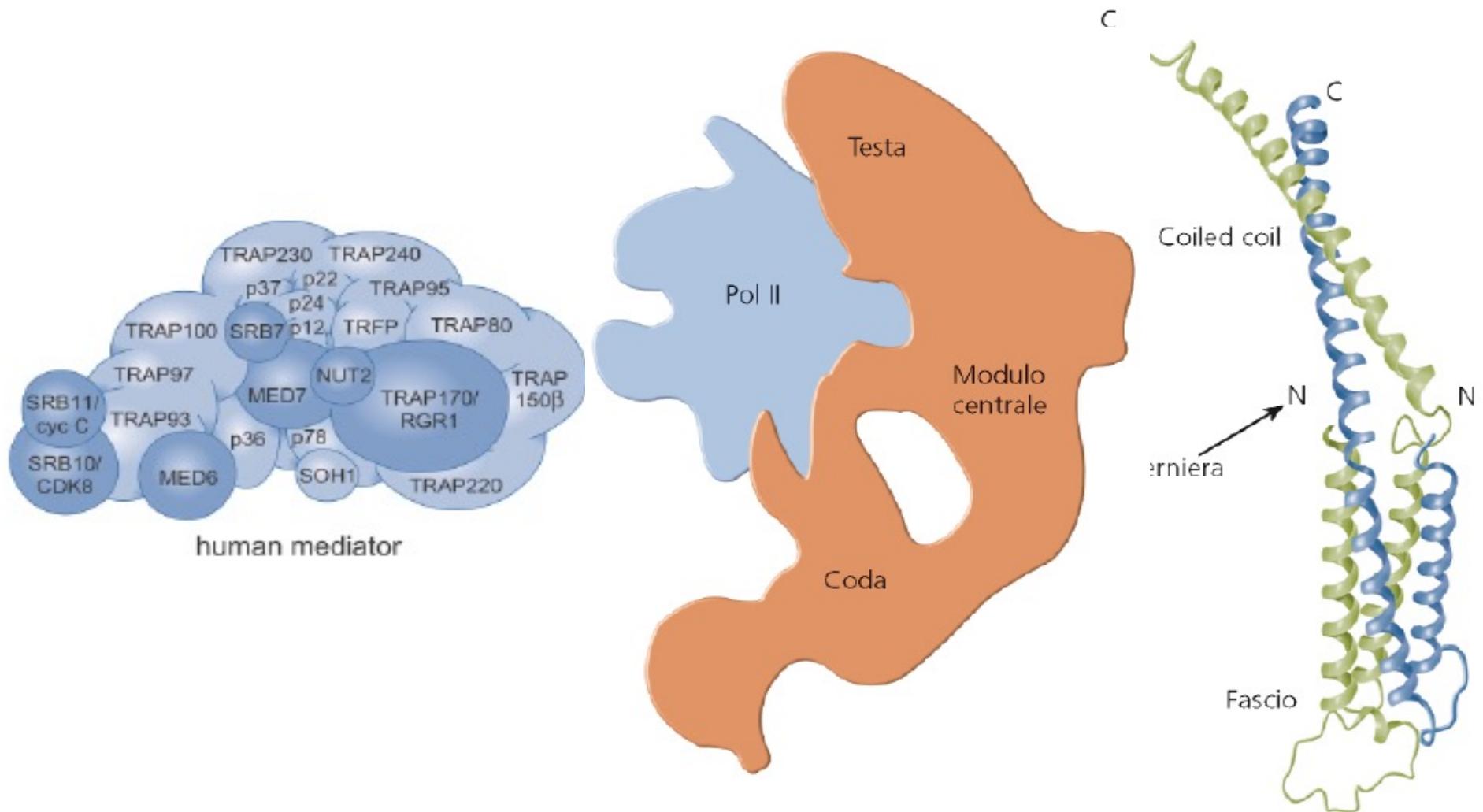
## Basal transcription factors

In response to injunctions from activators, these



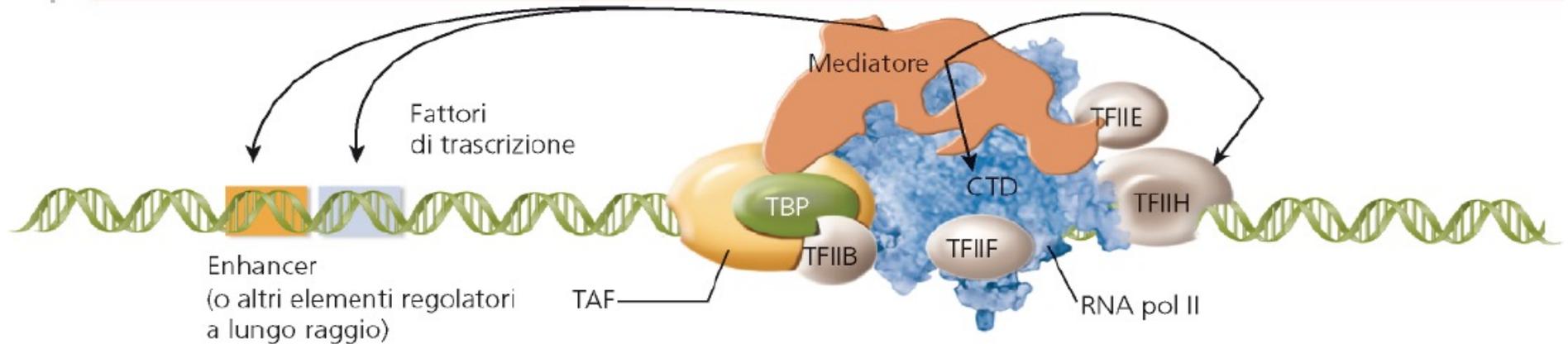
# Il **MEDIATORE**

è un complesso proteico di circa 20 subunita'



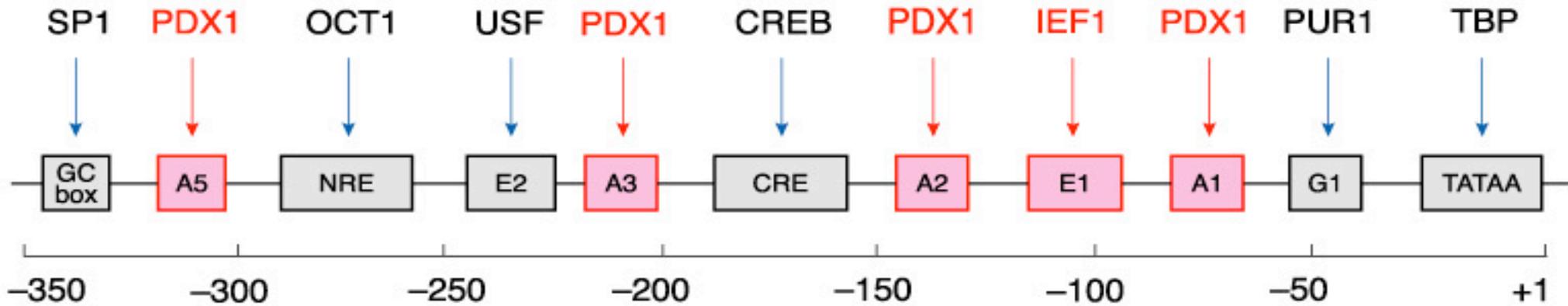
# Il **MEDIATORE**

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

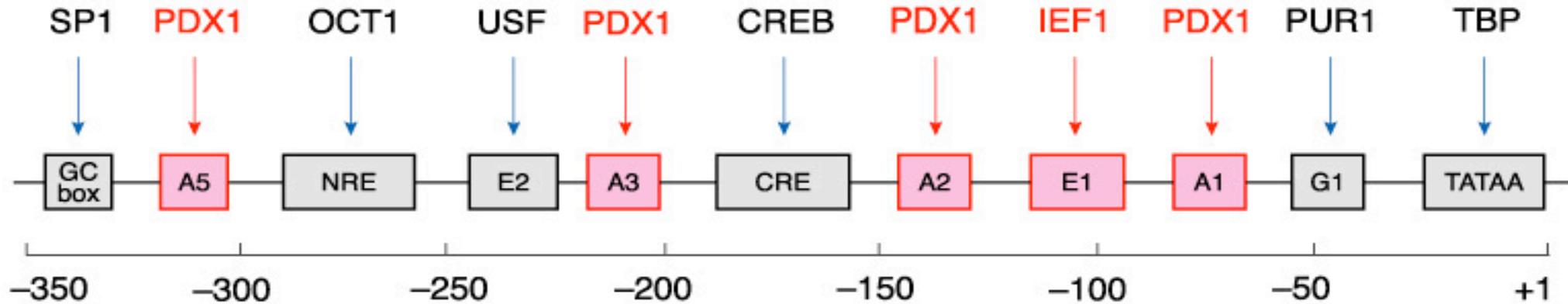


- A parità di sequenza del DNA in tutte le cellule di un organismo, come si spiega la tessuto specificità di espressione di alcuni geni?
- In altre parole .....
- Come l'insulina viene espressa solo e soltanto dalle cellule beta del pancreas e non in altre cellule?

## Il promotore del gene umano dell'insulina



# Il promotore del gene umano dell'insulina



Nero: fattori ubiquitari

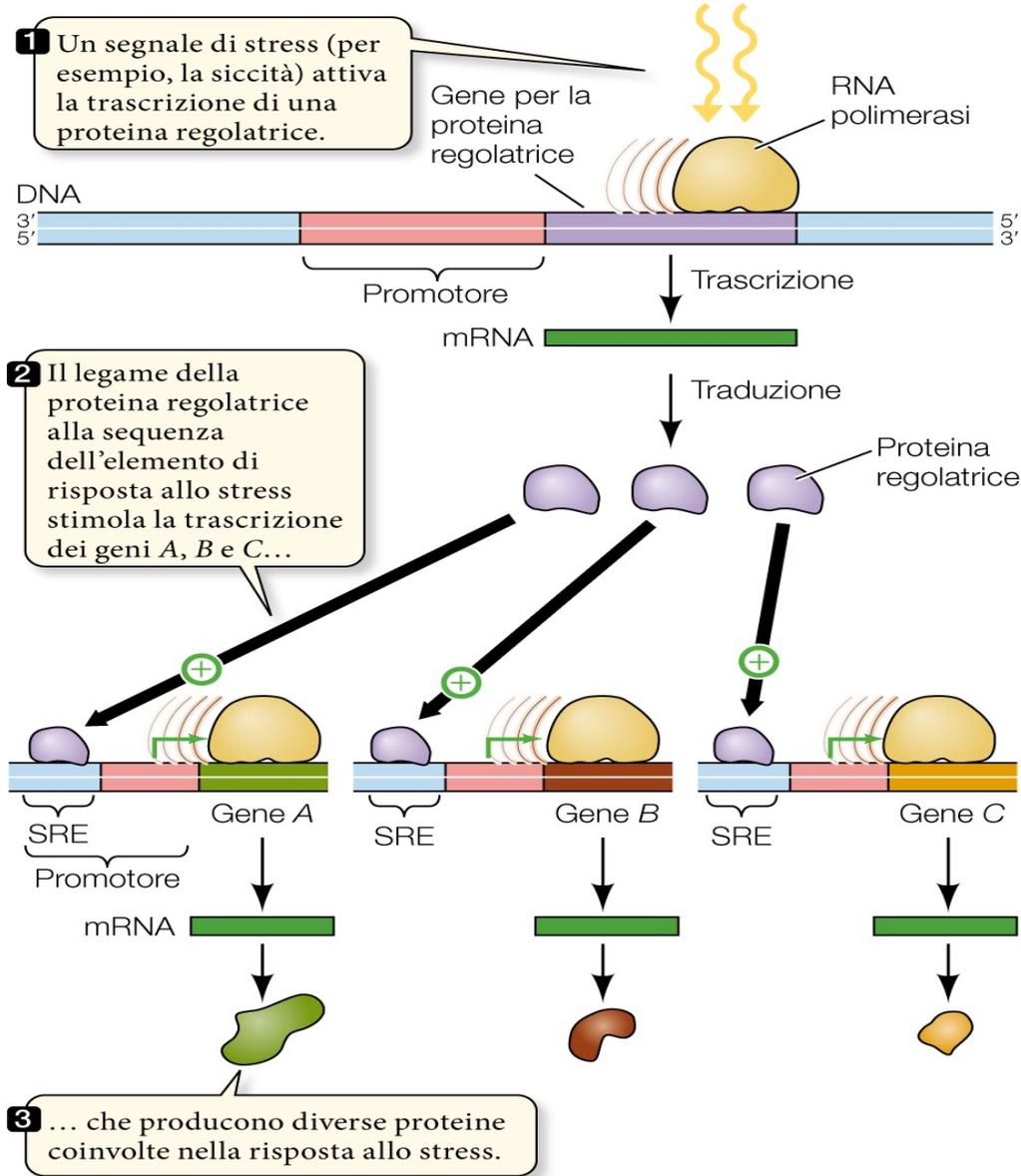
Rossi: fattori specifici delle cellule beta pancreatiche

# 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 <sub>5</sub> GCCAA-3'	Dimer

# La regolazione durante la trascrizione: coordinazione fra geni

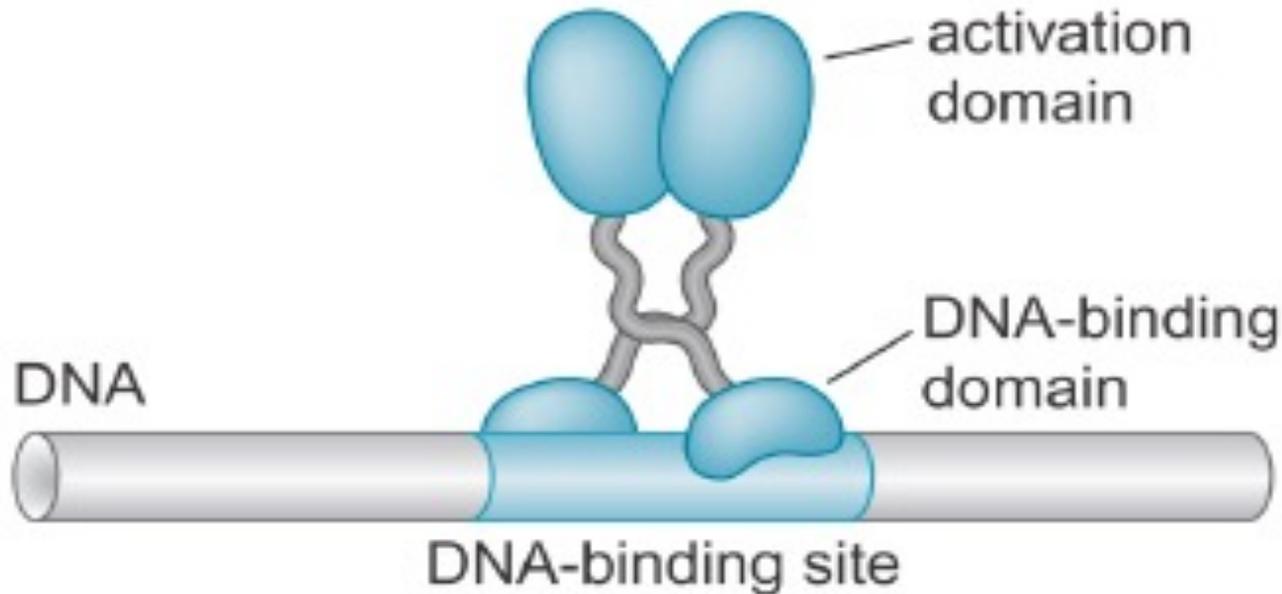


La coordinazione dell'espressione di più geni avviene grazie a un singolo segnale ambientale, che induce la sintesi di una proteina regolatrice della trascrizione.

# Transcription Factors

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

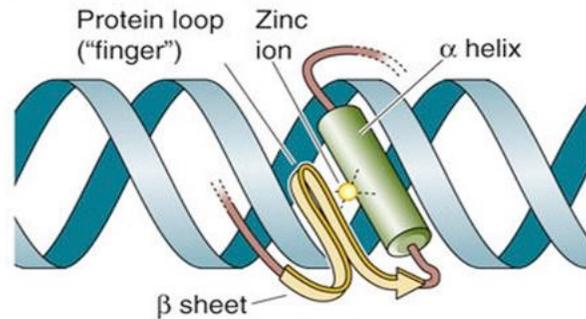
- a) Dominio di legame al DNA;
- b) Dominio di attivazione;
- c) Regione di dimerizzazione.



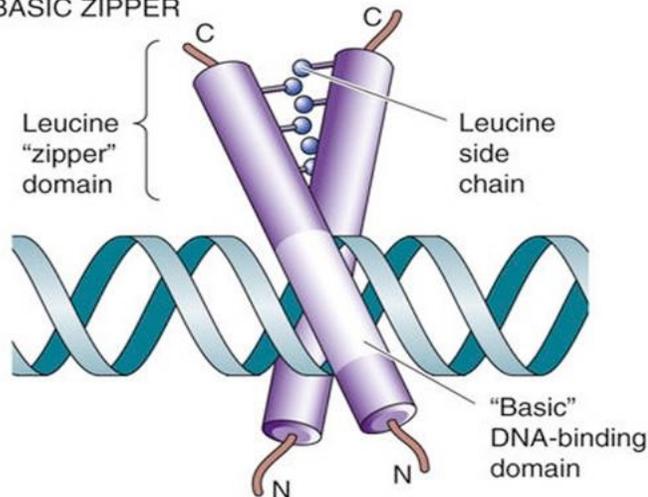
DNA-binding transcription factors have been grouped into families. Members of the same family use common structural motifs for binding DNA.

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

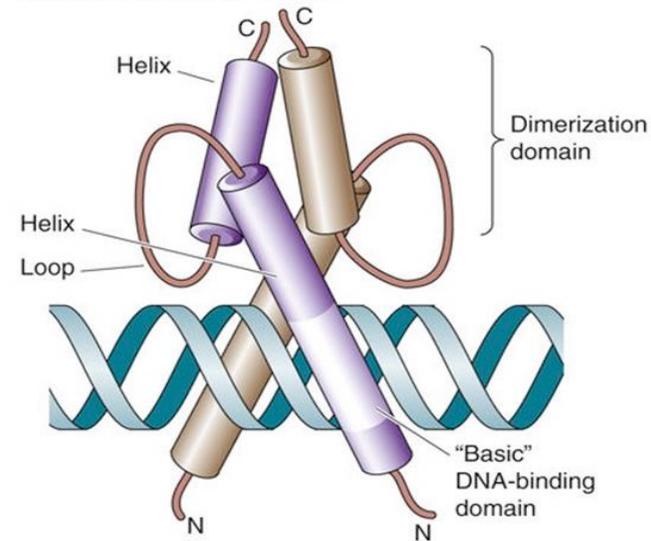
A ZINC FINGER



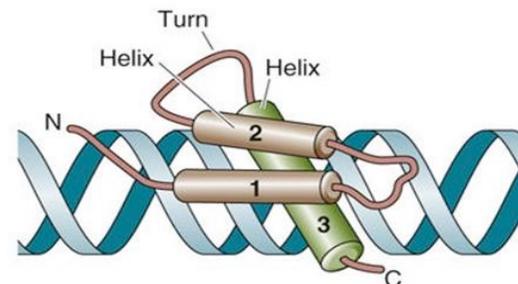
B BASIC ZIPPER



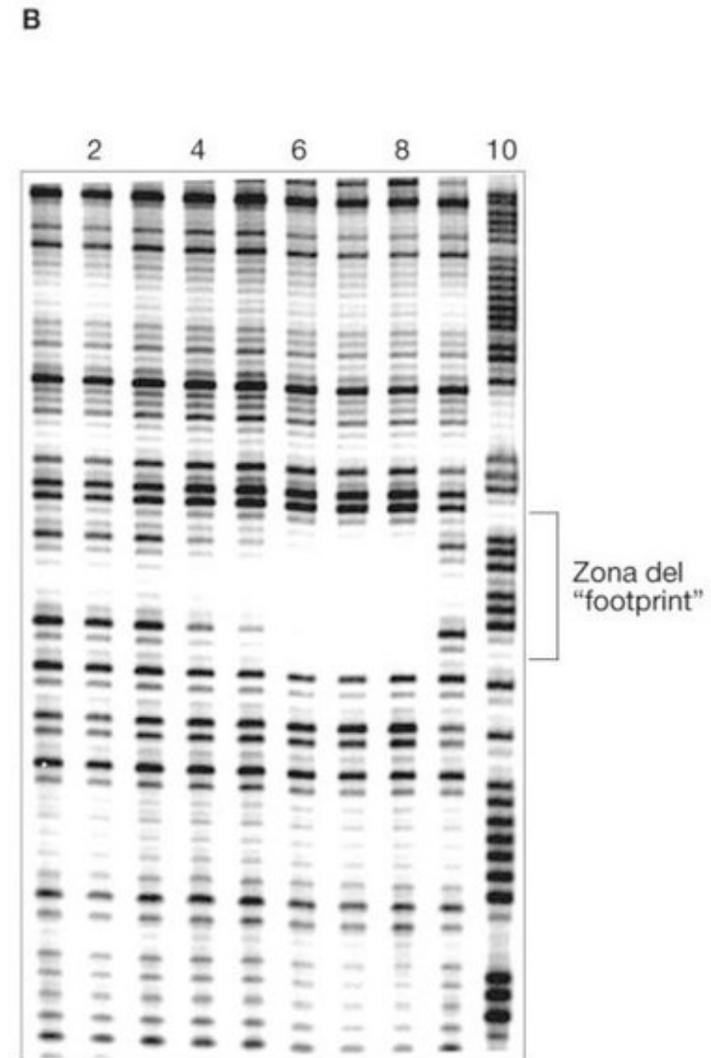
C BASIC HELIX-LOOP-HELIX



D HELIX-TURN-HELIX

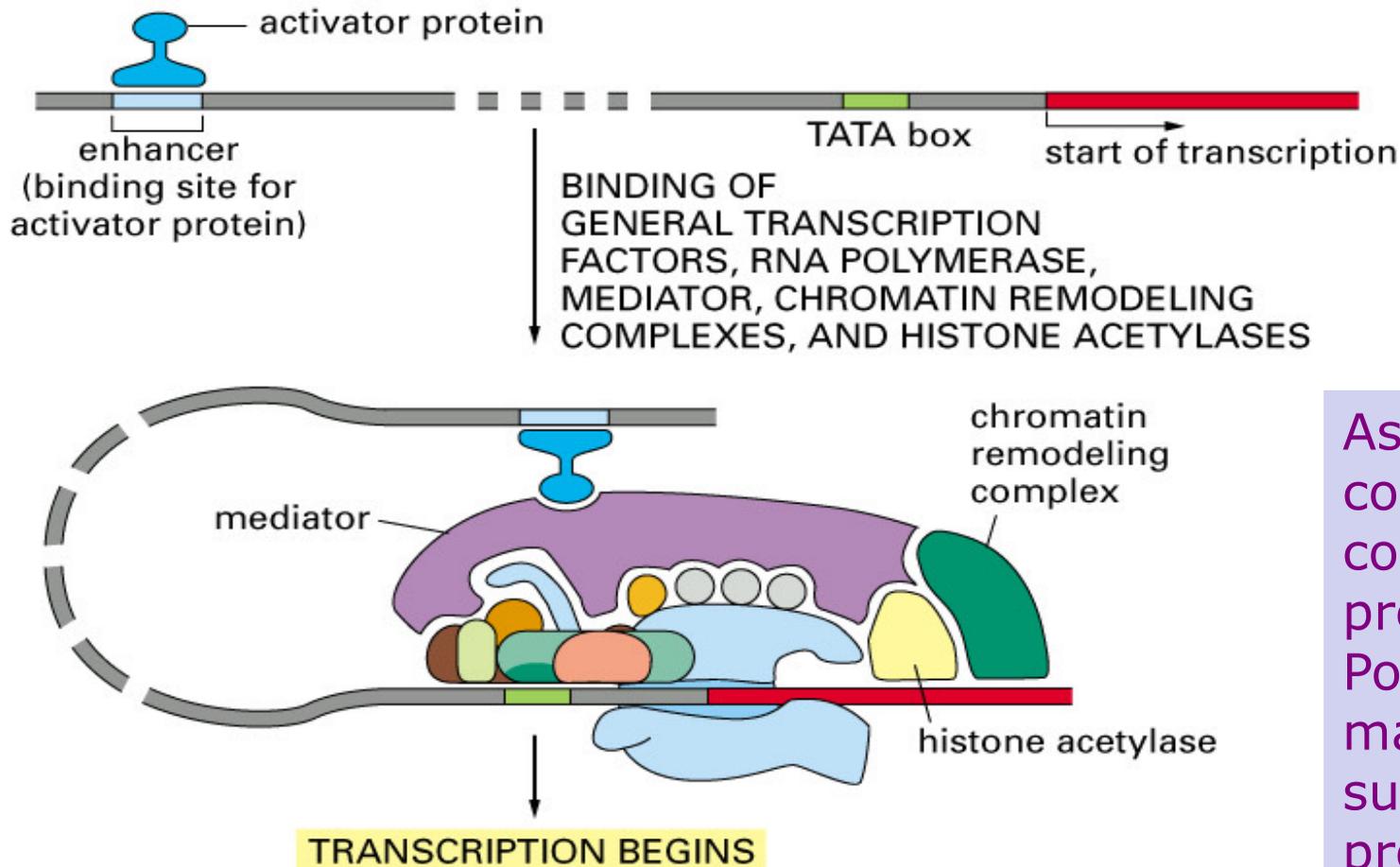


# Analisi interazioni DNA-proteine: saggio di footprinting



# TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI: MECCANISMO DELLA TRASCRIZIONE

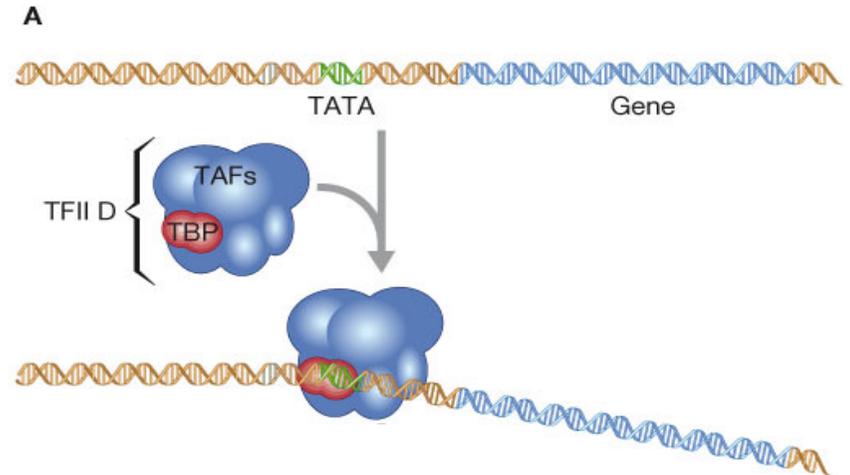
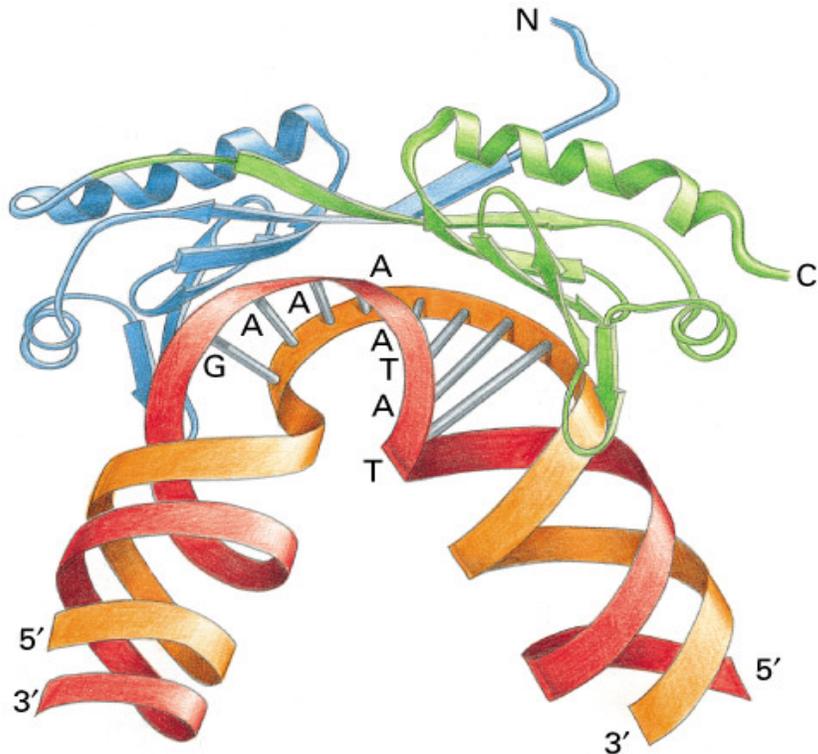
## 1. FORMAZIONE DEL COMPLESSO DI PREINIZIO:



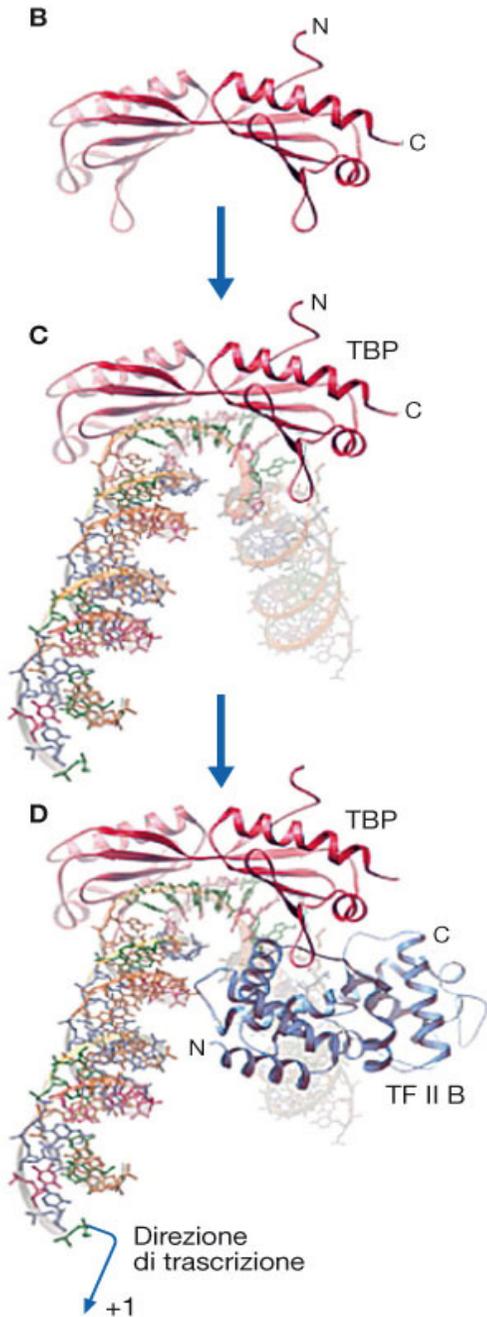
Assemblaggio dei componenti del complesso di preinizio; la RNA Pol non è attiva, ma "bloccata" sulla regione del promotore

# 1. Pre-Initiation Complex Formation

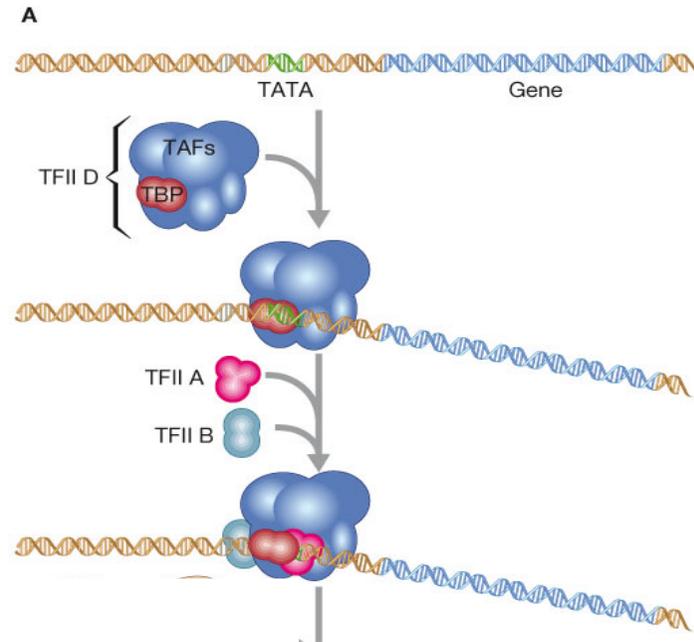
1. The assembly of the PIC starts with the binding of **TFIID** to the **TATA box**. The subunit of TFIID that recognizes it is called **TBP** (TATA-binding protein); 11 different **TAFs** are targets of activators which strengthen the transcription.



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.

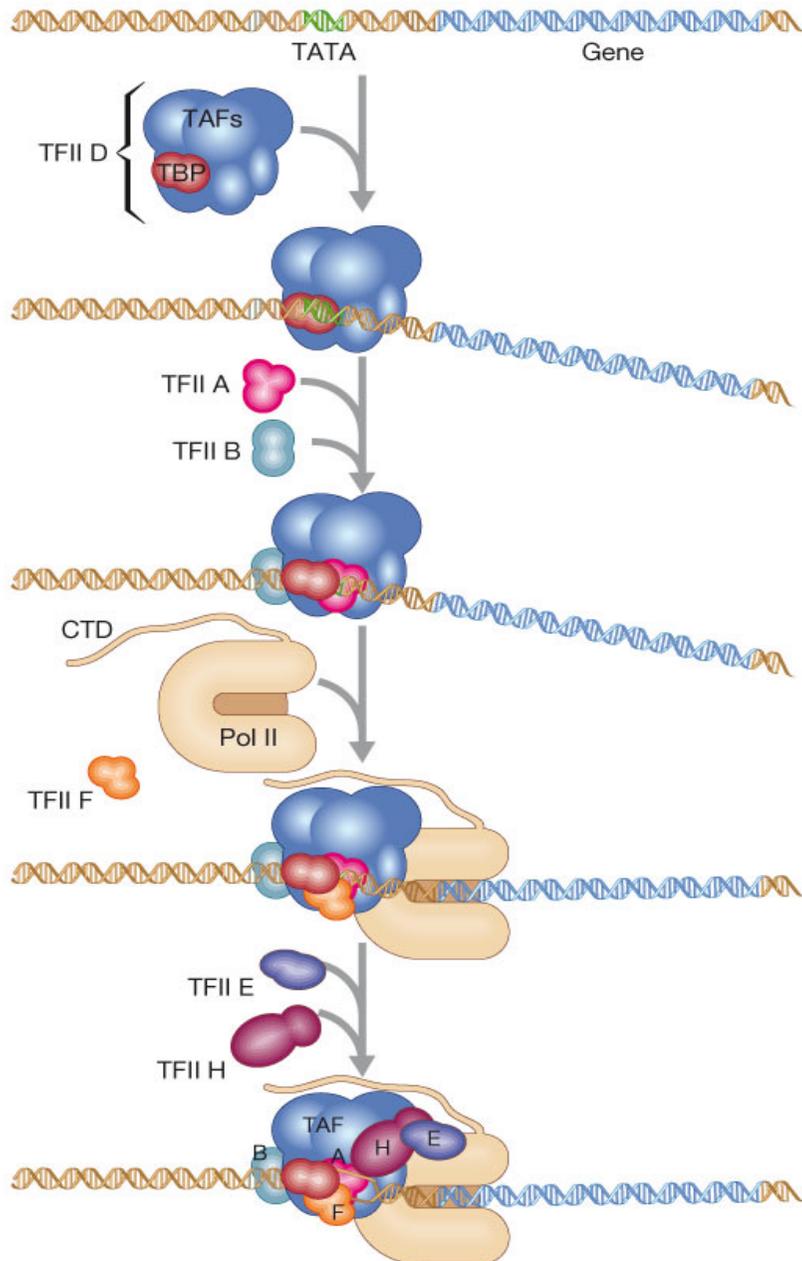


2. The DNA bend mediated by TBP provides a recognition structure for **TFIIB**, which ensures correct positioning of RNA polymerase II relative to the transcription start site.



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

**RNAPolIII 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:

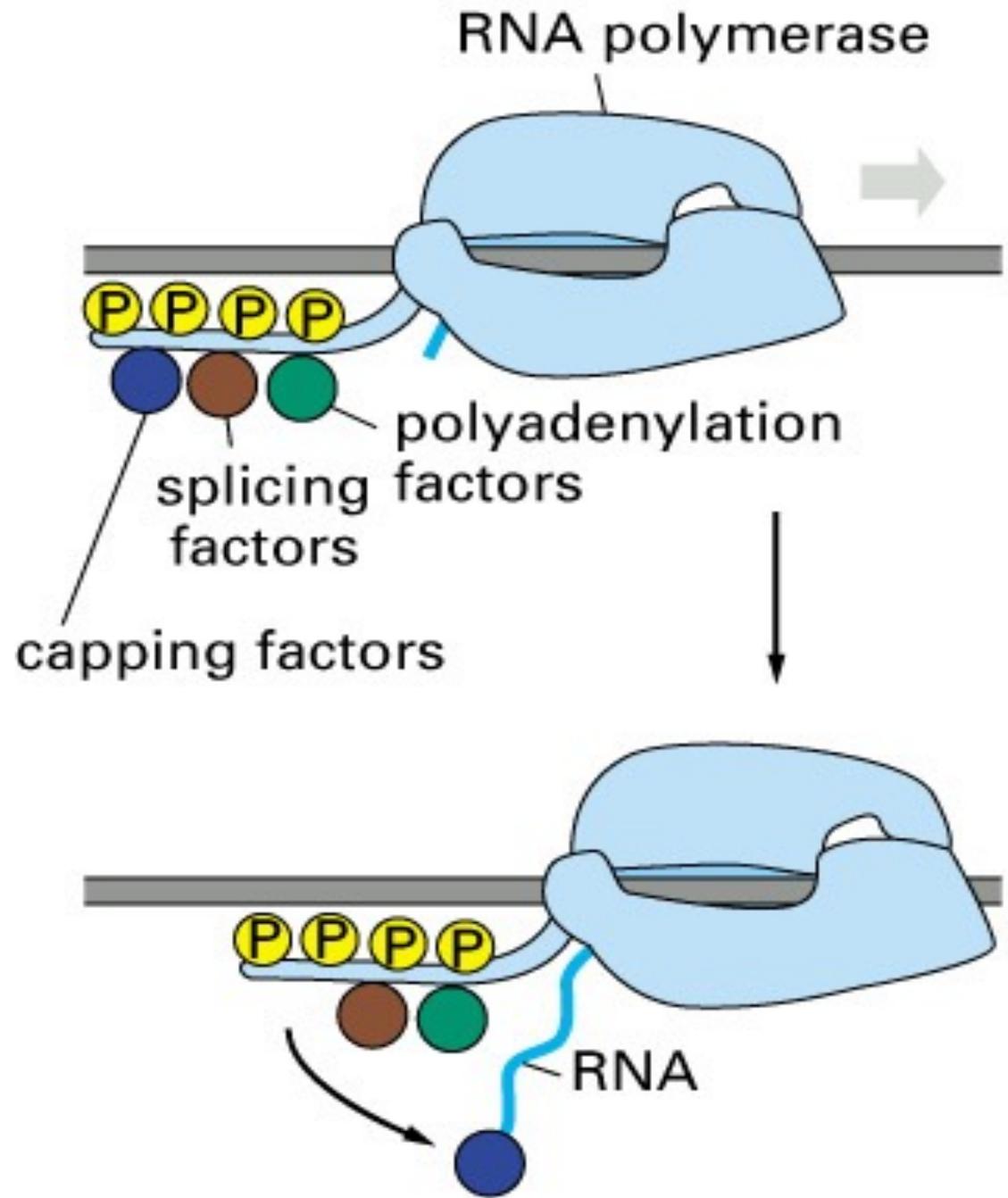
7 aminoacids repeats

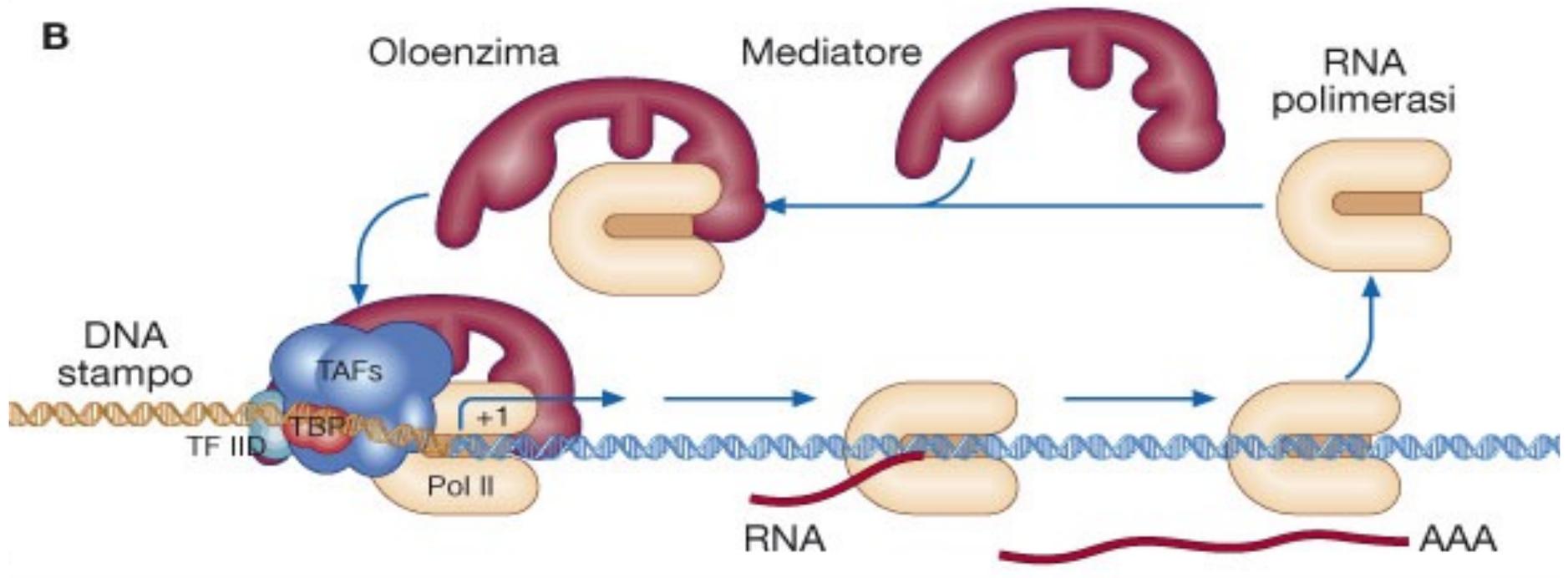
**Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser**

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 TFIIH-dipendente del CTD
3. La fosforilazione del CTD causa la dissociazione del mediatore dalla PolII.

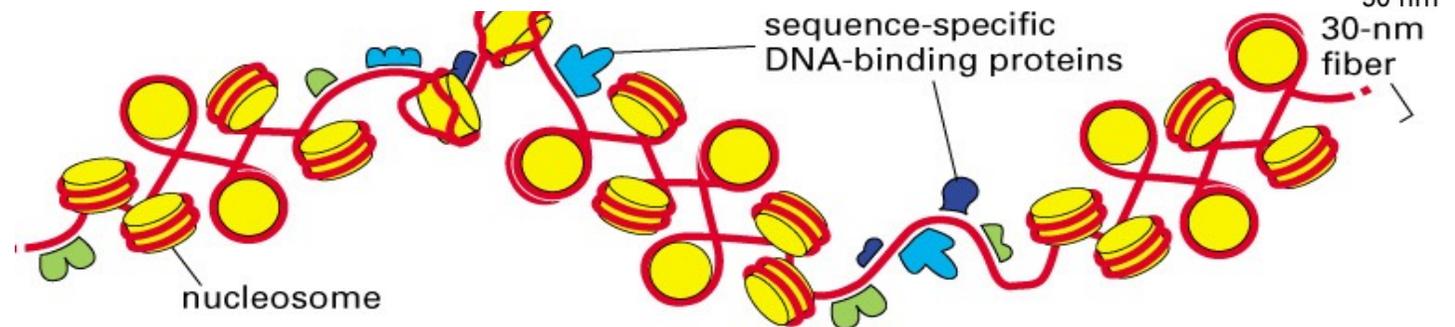
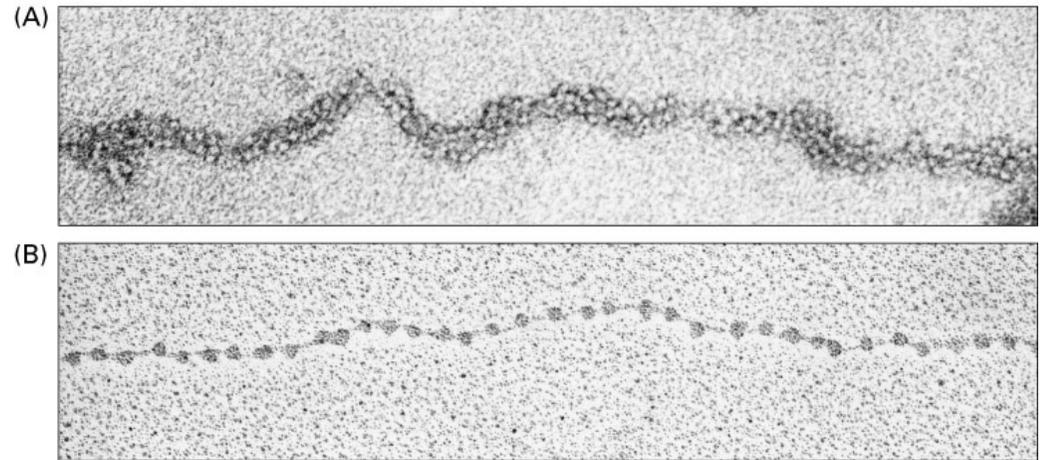
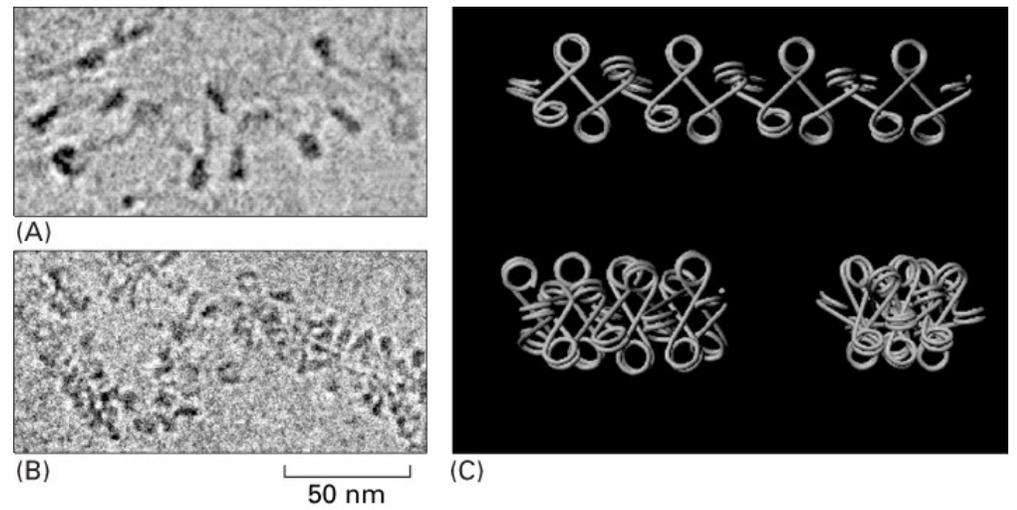
L'interazione con TFIID e' essenziale per assemblare un complesso attivo.

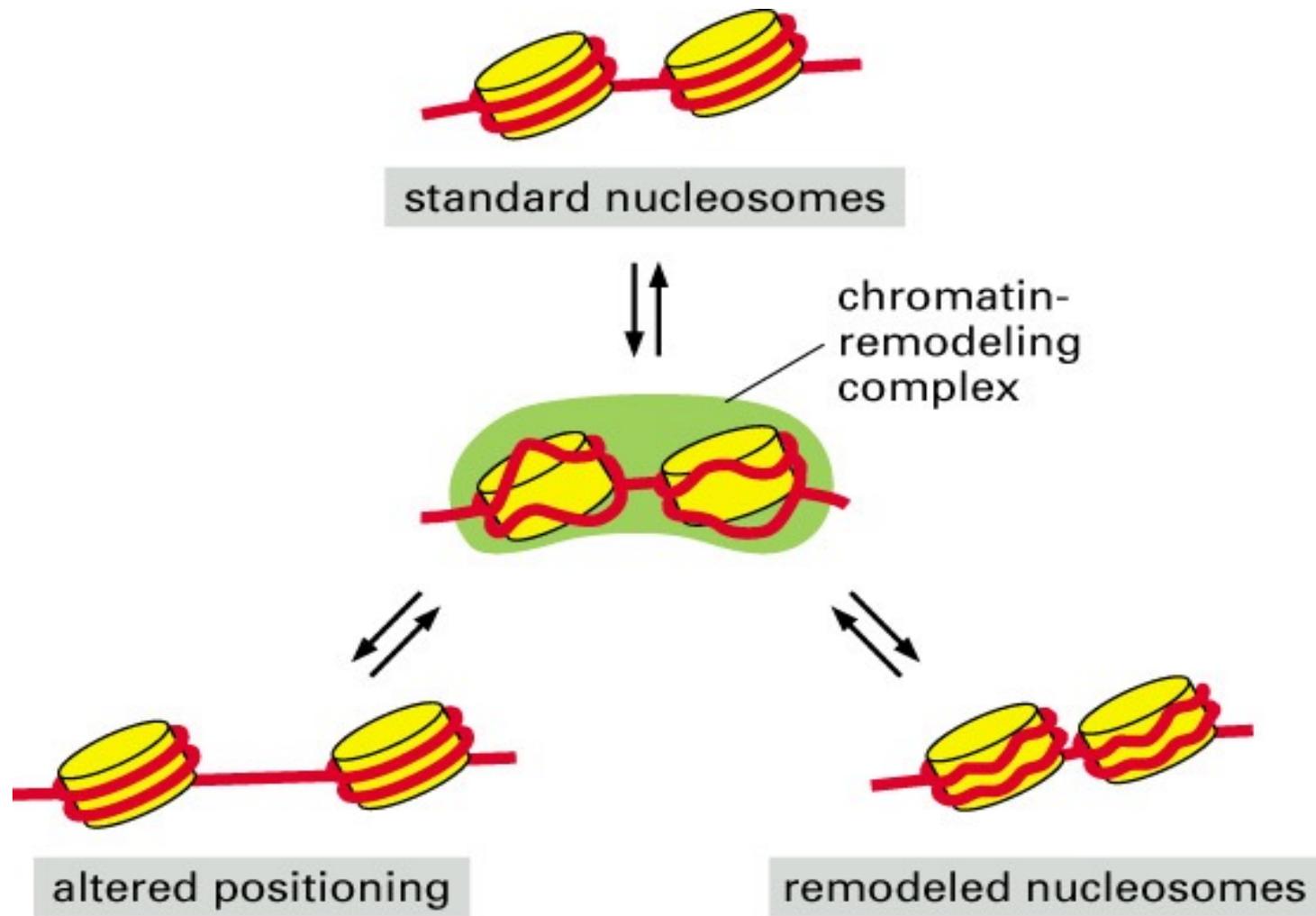
Once the polymerase II has begun elongating the RNA transcript, **most of the general transcription factors are released from the DNA** so that they are available to initiate another round of transcription with a new RNA polymerase molecule.

# 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.

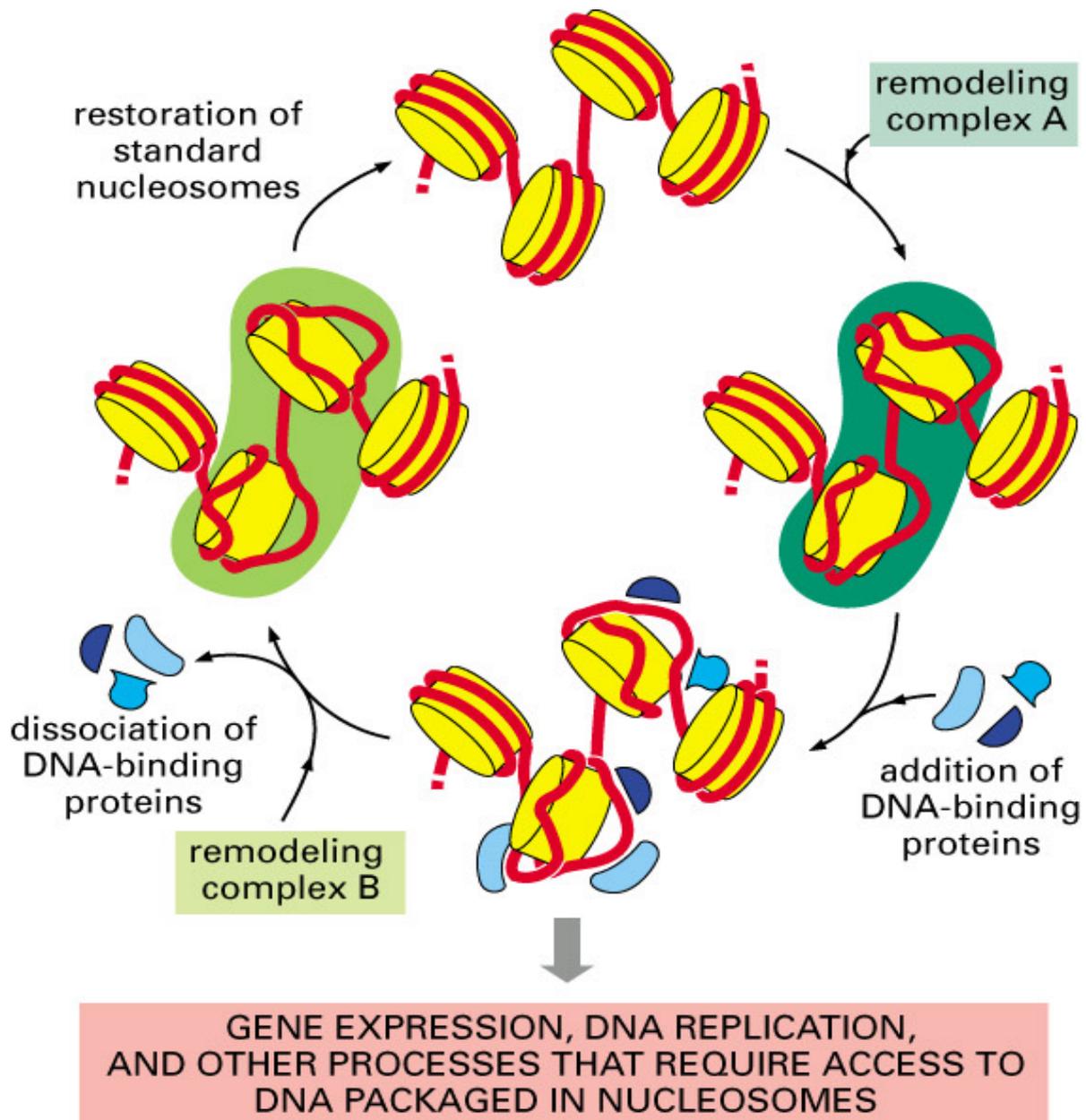
# La posizione dei nucleosomi influenza l'attività della RNA Pol II.



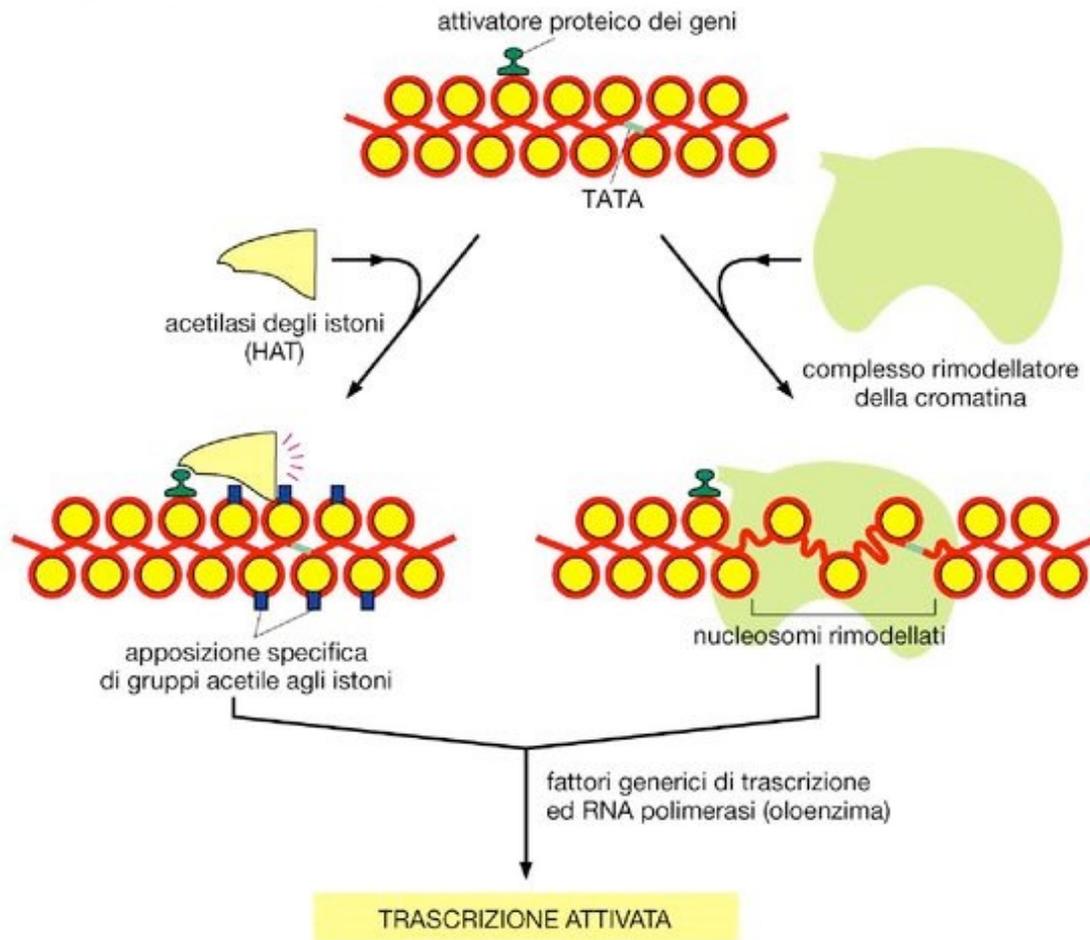


## Chromatin remodelling complexes:

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



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

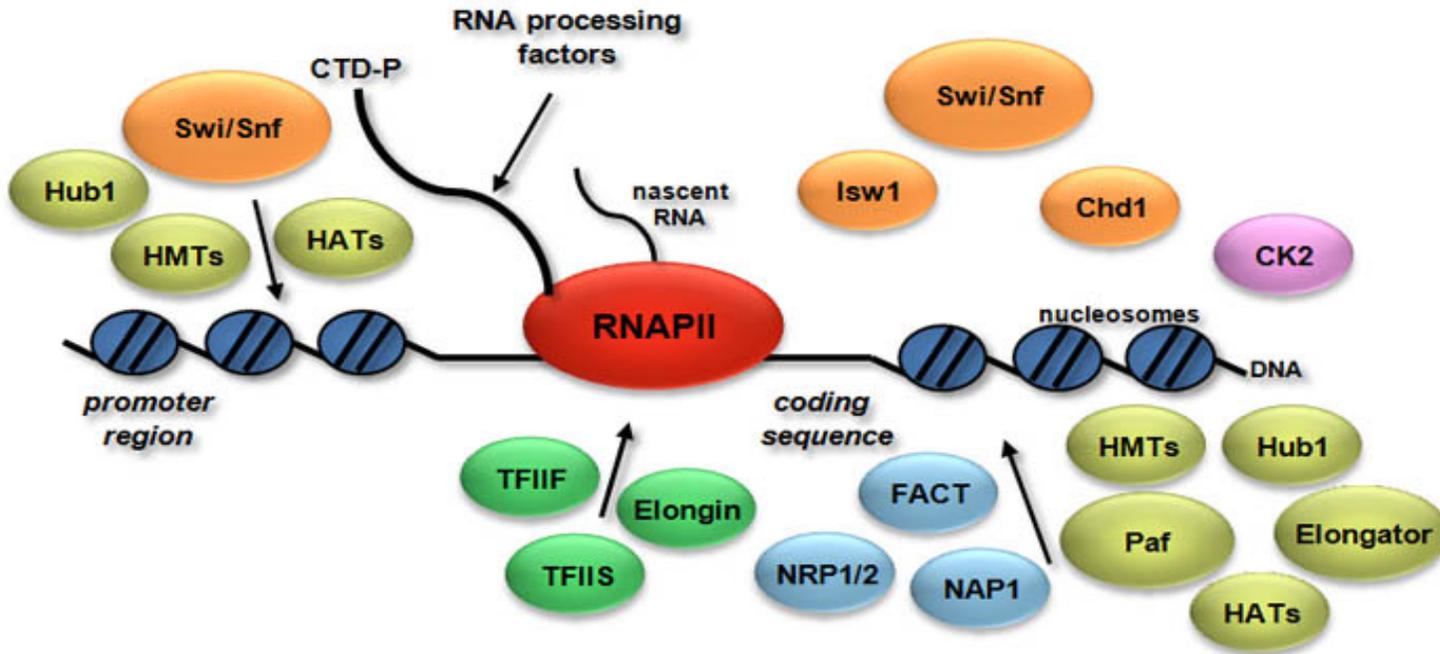


**Attivatori e repressori in eucaroti attraggono proteine che modulano la struttura della cromatina modificando l'accessibilità del promotore ai fattori di trascrizione e alla RNA Pol**

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

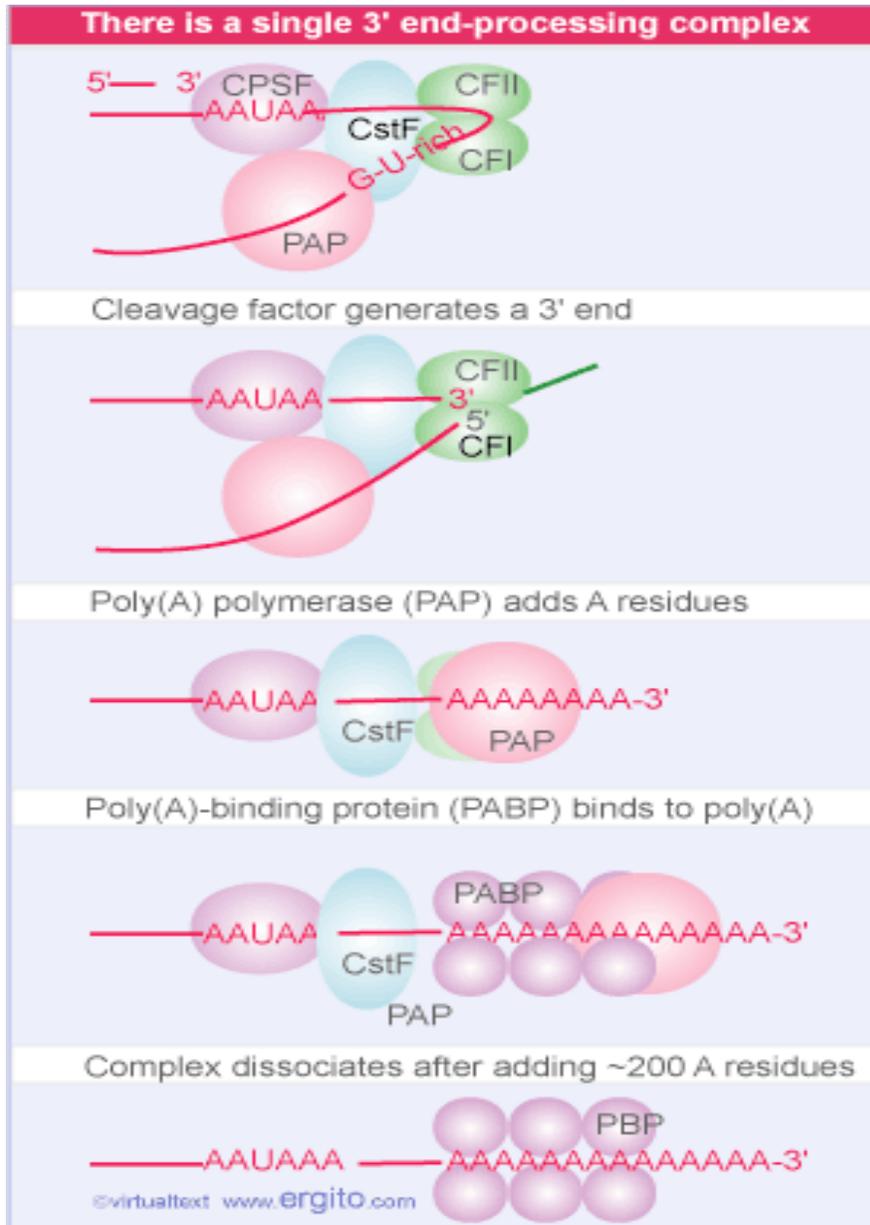
**I repressori attraggono le DEACETILASI**

**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)

# 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