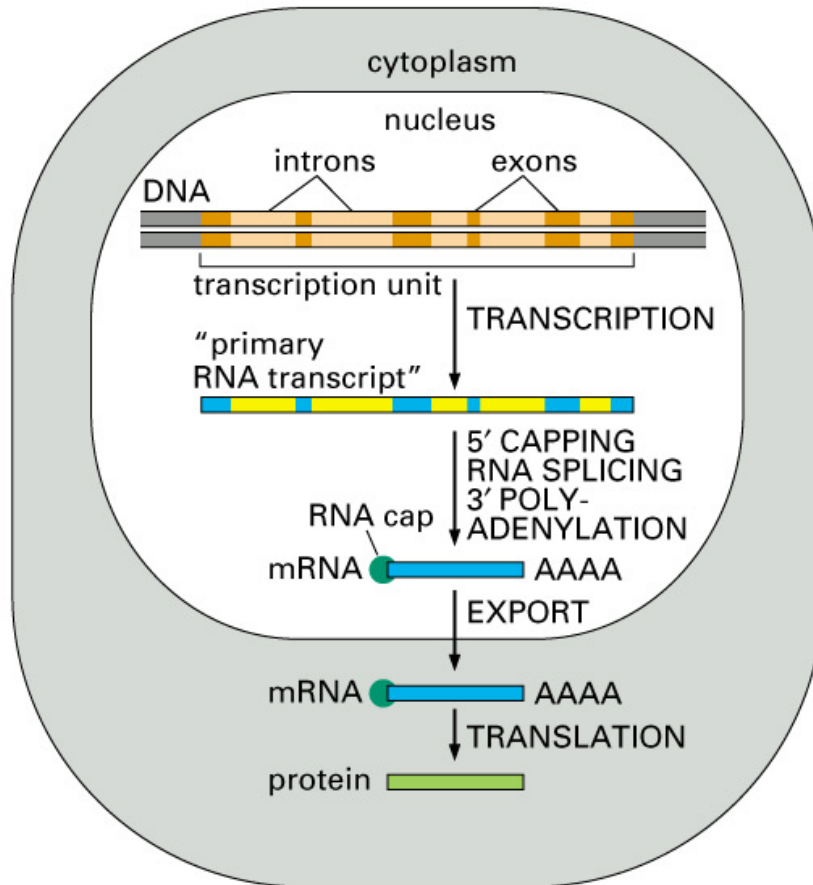


La trascrizione negli eucarioti

Paragone fra procarioti ed eucarioti

(A) EUCARYOTES



(B) PROCARYOTES

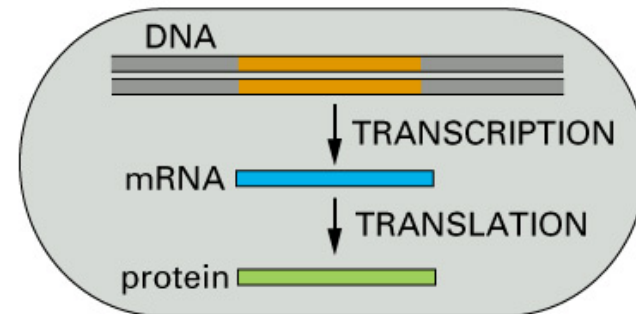


Figure 6-21 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Figure 6-21 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

mRNA di procarioti ed eucarioti

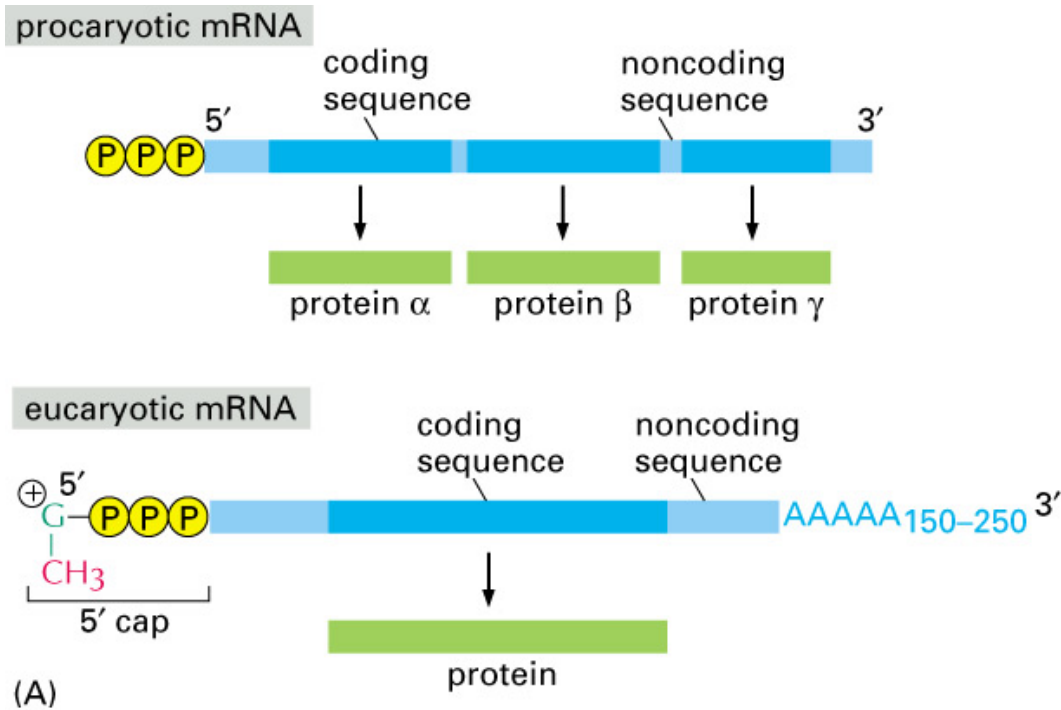
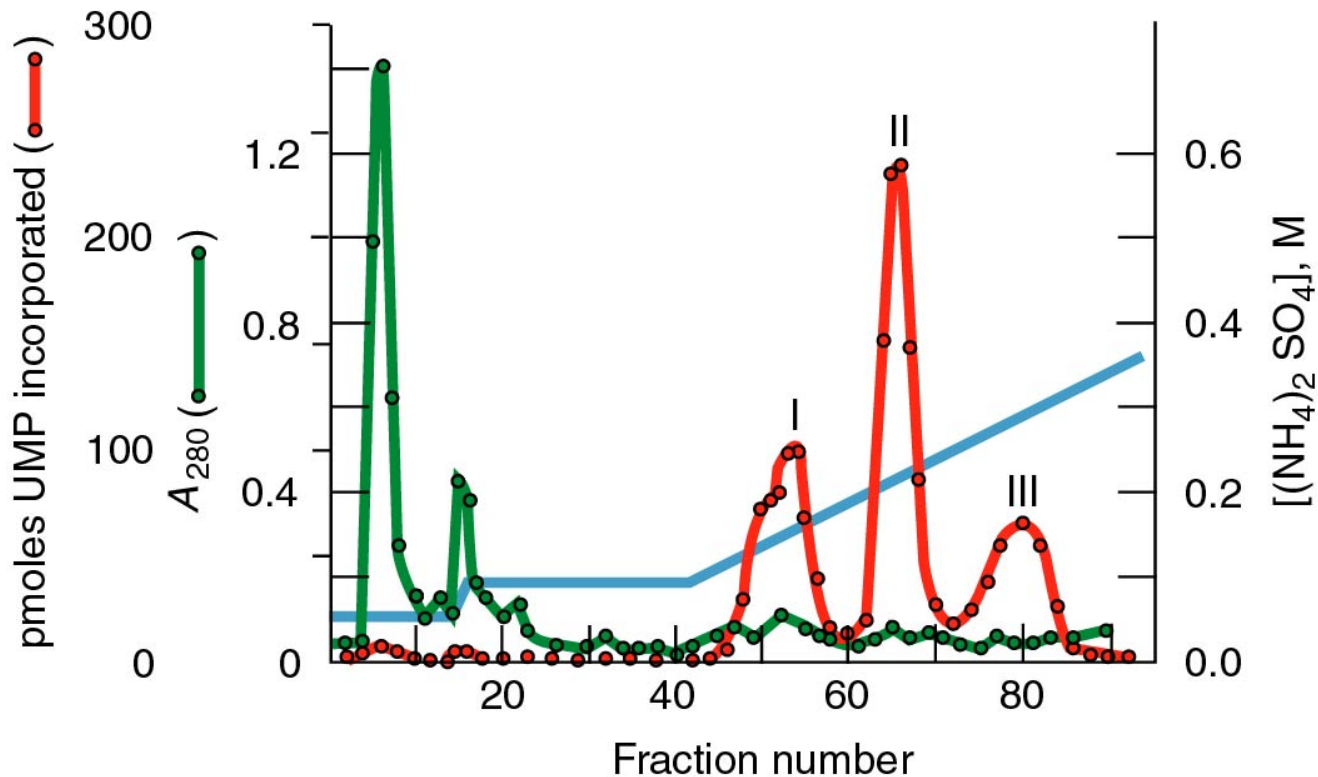


Figure 6-22 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

RNA polimerasi degli eucarioti

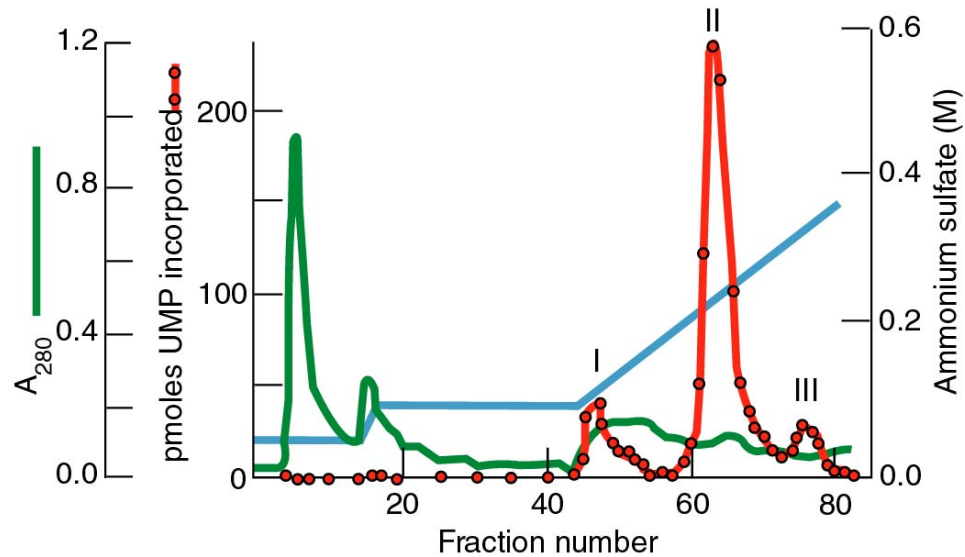
Le cellule procariotiche hanno una sola RNA pol che sintetizza tutti e tre i tipi di RNA: mRNA, rRNA e tRNA

Nel 1969 Roeder e Rutter hanno dimostrato che le cellule eucariotiche hanno tre distinte RNA pol: RNA pol I, pol II e pol III

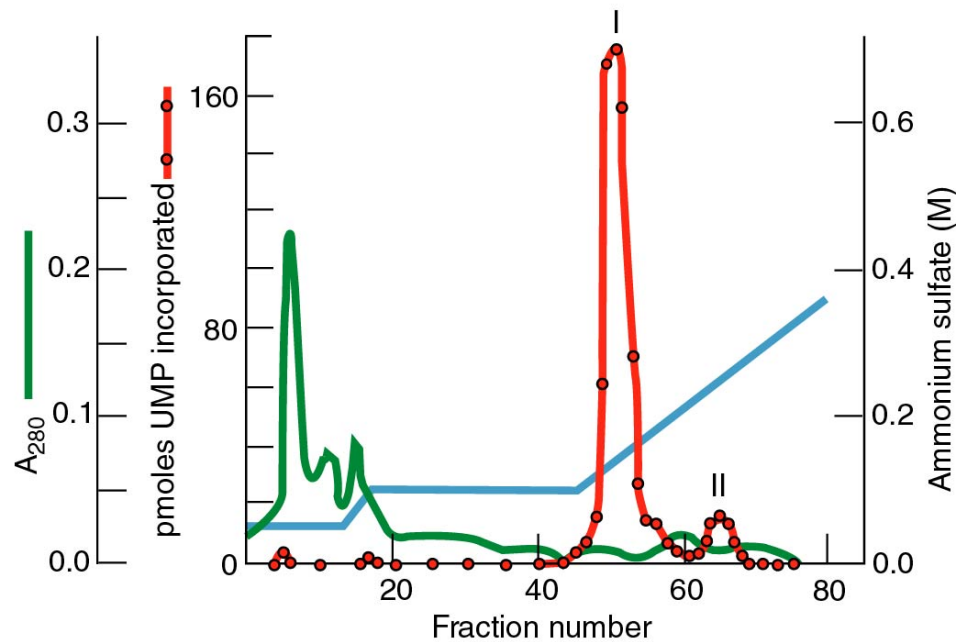


Localizzazione subcellulare delle tre RNA pol


Frazione nucleoplasmatica



Frazione nucleolare



50+ years of eukaryotic transcription: an expanding universe of factors and mechanisms

Robert G. Roeder  Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, The Rockefeller University, New York, New York, USA.

PubMed
[Create RSS](#) [Create alert](#) [Advanced](#)

Format: Summary ▾ Sort by: Most Recent ▾ Per page: 20 ▾

Send to ▾ |

Search results

Items: 1 to 20 of 528

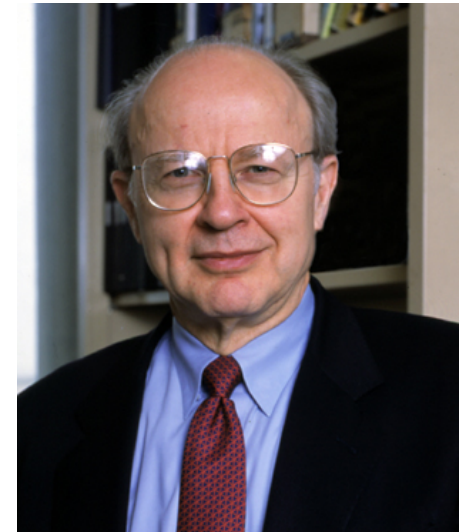
<< First < Prev Page 1 of 27 Next > Last >>

- [Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation.](#)
 1. Zhang D, Tang Z, Huang H, Zhou G, Cui C, Weng Y, Liu W, Kim S, Lee S, Perez-Neut M, Ding J, Czyz D, Hu R, Ye Z, He M, Zheng YG, Shuman HA, Dai L, Ren B, **Roeder RG**, Becker L, Zhao Y. *Nature*. 2019 Oct;574(7779):575-580. doi: 10.1038/s41586-019-1678-1. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31645732 [Similar articles](#)

- [AFF1 acetylation by p300 temporally inhibits transcription during genotoxic stress response.](#)
 2. Kumari N, Hassan MA, Lu X, **Roeder RG**, Biswas D. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Oct 29;116(44):22140-22151. doi: 10.1073/pnas.1907097116. Epub 2019 Oct 14. PMID: 31611376 **Free Article** [Similar articles](#)

- [Specific nucleolar and nucleoplasmic RNA polymerases.](#)
 527. **Roeder RG**, Rutter WJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970 Mar;65(3):675-82. PMID: 5267147 **Free PMC Article** [Similar articles](#)

- [Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms.](#)
 528. **Roeder RG**, Rutter WJ. *Nature*. 1969 Oct 18;224(5216):234-7. No abstract available. PMID: 5344598 [Similar articles](#)



Major discoveries https://en.wikipedia.org/wiki/Robert_G._Roeder

1969-1977: In 1969, as a graduate student at the University of Washington, Roeder **discovers the three enzymes called RNA polymerases.**

1977-1979: Roeder **develops cell-free systems** to better study transcription.

1980: identification of complex sets of proteins called **accessory factors** that are essential for each individual RNA polymerase

1980: Roeder identifies the first mammalian gene-specific activator, called **TFIIIA**

1990s: discovery of **coactivators**, large protein complexes that provide a bridge between the activators and repressors

1992: Roeder's laboratory demonstrates that coactivators can be ubiquitous,

1996: Roeder's laboratory discovers the major conduit for communication between gene-specific activators and the general transcription machinery in animal cells: a giant coactivator (TRAP/SMCC) that consists of about 25 different protein chains and is referred to as the human mediator after its counterpart in yeast.

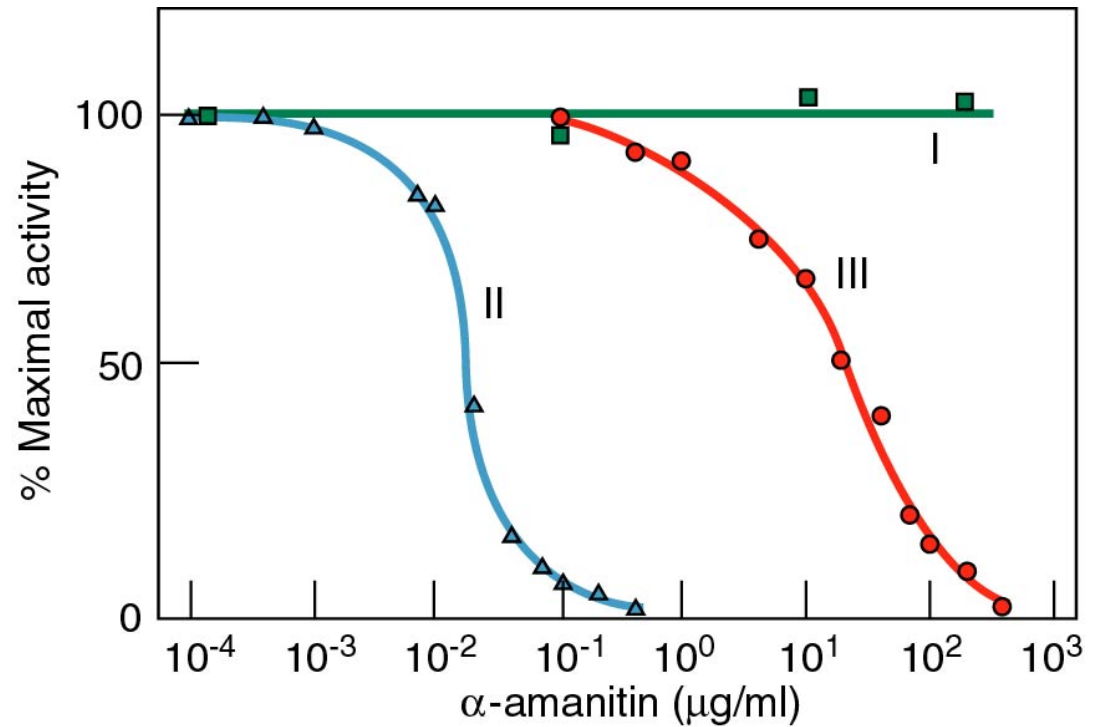
2002: Roeder and colleagues show that a single component of the mediator is essential for the formation of fat cells —

I was able to identify three chromatographically distinct RNA polymerases (in sea urchin embryos, rat liver and yeast) that exhibited different metal ion and DNA template preferences. This was a truly 'eureka' moment for me—both assuring me a respectable thesis and swelling my mind with many future experiments.

We reported this exciting discovery at an international meeting in April 1969 and later in a 1969 Nature article that, remarkably and memorably, was originally rejected on the grounds that it was not of general interest!

Roeder, R. G. & Rutter, W. J. Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. Nature 224, 234–237 (1969)

Nel 1974 Roeder e coll. hanno dimostrato che la α -amanitina ha effetti diversi sulle tre RNA pol



RNA polimerasi degli eucarioti

- Tutte le RNA polimerasi eucariotiche hanno ~ 12 subunità e sono complessi di > 500 kD.
- Alcune subunità sono comuni a tutte e tre le RNA polimerasi.
- La più grande subunità dell'RNA polimerasi II ha un dominio carbossi-terminale (CTD) costituito da ripetizioni multiple di un eptamero.

TABLE 6-2 The Three RNA Polymerases in Eucaryotic Cells

TYPE OF POLYMERASE	GENES TRANSCRIBED
RNA polymerase I	5.8S, 18S, and 28S rRNA genes
RNA polymerase II	all protein-coding genes, plus snoRNA genes and some snRNA genes
RNA polymerase III	tRNA genes, 5S rRNA genes, some snRNA genes and genes for other small RNAs

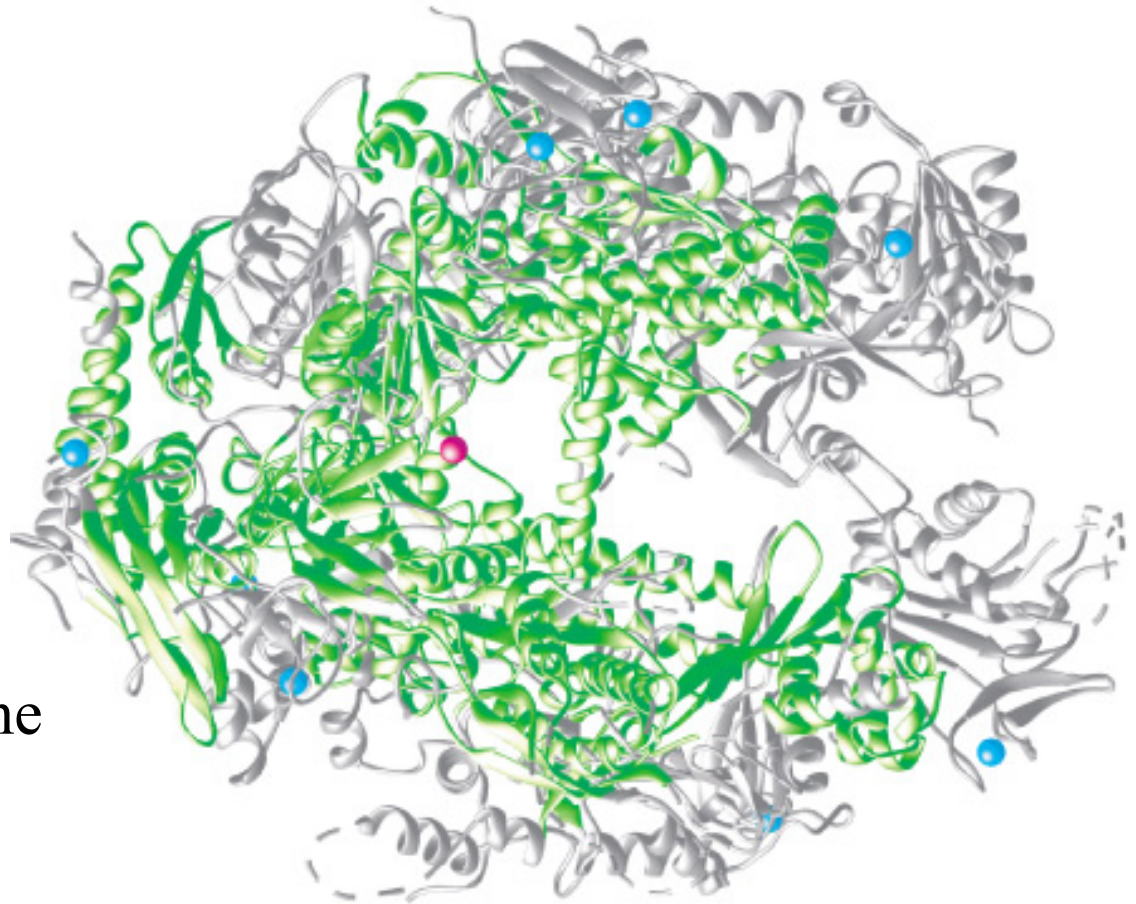
Tabella 10.2 Subunità dell'RNA polimerasi II umana

Subunità	Gene di lievito	Proteina di lievito (kD)	Caratteristiche
hRPB1	<i>RPB1</i>	192	Contiene CTD, lega il DNA; coinvolta nella selezione del sito di inizio; ortologo di β'
hRPB2	<i>RPB2</i>	139	Contiene il sito attivo; coinvolta nella selezione del sito di inizio e nel tasso di allungamento; ortologo di β
hRPB3	<i>RPB3</i>	35	Può funzionare con Rpb11 come ortologo del dimero α dell'RNA polimerasi procariotica
hRPB4	<i>RPB4</i>	25	Sub-complesso con Rpb7; coinvolta nella risposta allo stress
hRPB5	<i>RPB5</i>	25	Condivisa con polimerasi I, II e III; bersaglio per gli attivatori trascrizionali
hRPB6	<i>RPB6</i>	18	Condivisa con polimerasi I, II e III; funzioni di assemblaggio e stabilità
hRPB7	<i>RPB7</i>	19	Forma sub-complessi con Rpb4 cui si lega preferenzialmente durante la fase stazionaria
hRPB8	<i>RPB8</i>	17	Condivisa con polimerasi I, II e III; ha un dominio di legame oligonucleotidico/oligosaccaridico
hRPB9	<i>RPB9</i>	14	Contiene un motivo a nastro di zinco che può essere coinvolto nell'allungamento: funziona nella scelta del sito di inizio
hRPB10	<i>RPB10</i>	8	Condivisa con polimerasi I, II e III
hRPB11	<i>RPB11</i>	14	Può funzionare con Rpb3 come ortologo del dimero α dell'RNA polimerasi procariotica
hRPB12	<i>RPB12</i>	8	Condivisa con polimerasi I, II e III

Da: Lee, T.I. e Young, R.A. 2000. Eukaryotic transcription. *Annual Review of Genetics* 34: 77-137.

Struttura della RNA polimerasi

- Pol batteriche ed eucariotiche.
- In verde le sovrapposizioni.
- La pol batterica ha 5 subunità, pol II ha 12 subunità
- Il sito catalitico contiene ioni metallici



Fattori generali della trascrizione

- L'inizio della trascrizione necessita dell'enzima RNA polimerasi e dei **fattori generali della trascrizione (GTF)** (svolgono la funzione di **sigma** nei procarioti).
- Un GTF è una proteina che è necessaria per l'inizio della trascrizione, ma che **non è parte della RNA polimerasi**.
- Il test definitivo per definire se appartiene all'apparato di trascrizione è funzionale: la proteina deve essere **necessaria** affinché la trascrizione avvenga ad un promotore specifico o ad una serie di promotori.

Promotore

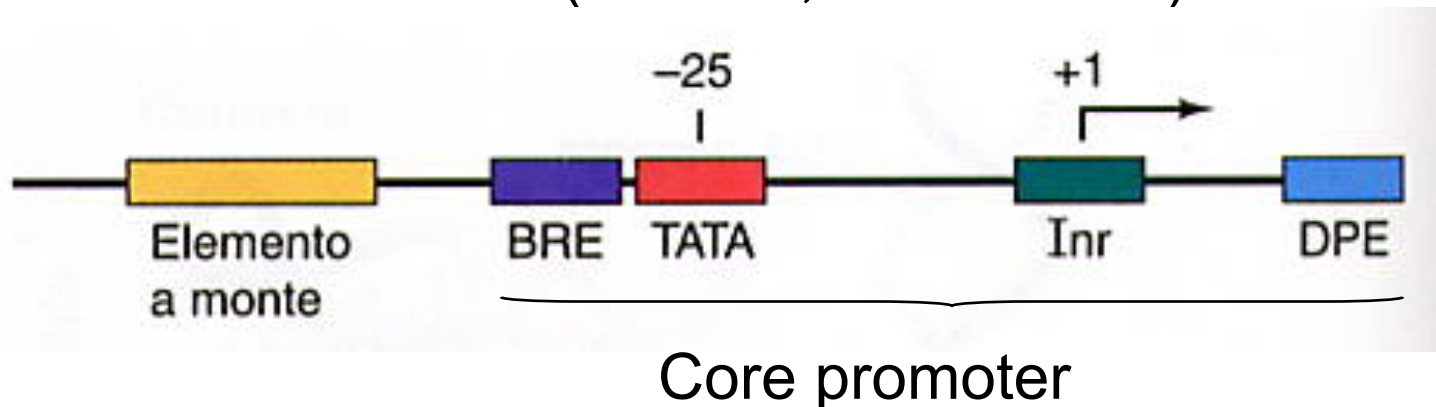
- L'iniziazione ad un promotore eucariotico coinvolge un gran numero di fattori che si legano a diversi **cis-acting elements**.
- promotore è definito come la **regione di DNA** che contiene tutti questi siti di legame, cioè che inizia la trascrizione con efficienza normale e controllo appropriato

Promotori

Le tre RNA pol hanno strutture differenti, trascrivono differenti classi di geni e riconoscono differenti promotori.

Promotori di classe II

Sono presenti due parti: un **promotore principale** e un **elemento a monte**. Il promotore centrale è generalmente definito come il tratto di DNA minimo sufficiente per dirigere l'inizio accurato della trascrizione da parte dell'RNA pol II. Gli elementi a monte sono indipendenti dall'orientamento e potenziano la trascrizione (GC box, CCAAT box).



Sequenze consenso di RNA pol II

Sequenze consenso trovate in 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):

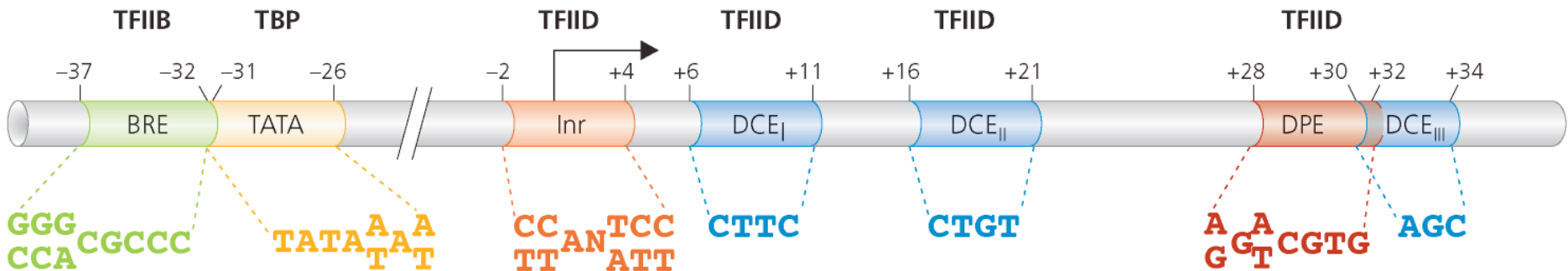
BRE (TFIIB Recognition Element)

TATA (TATA box: lega TBP)

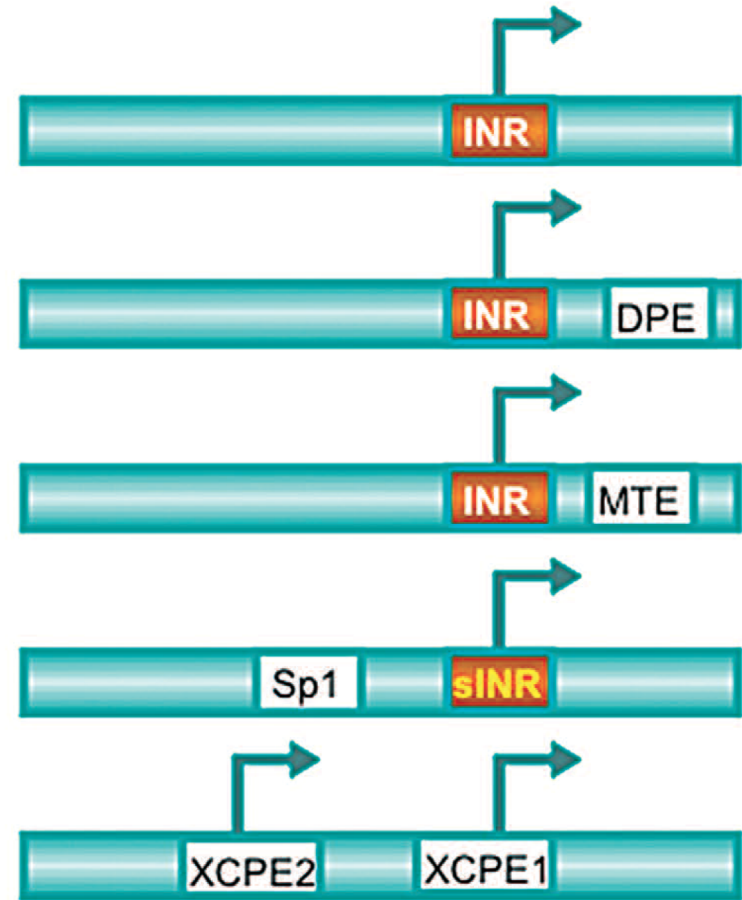
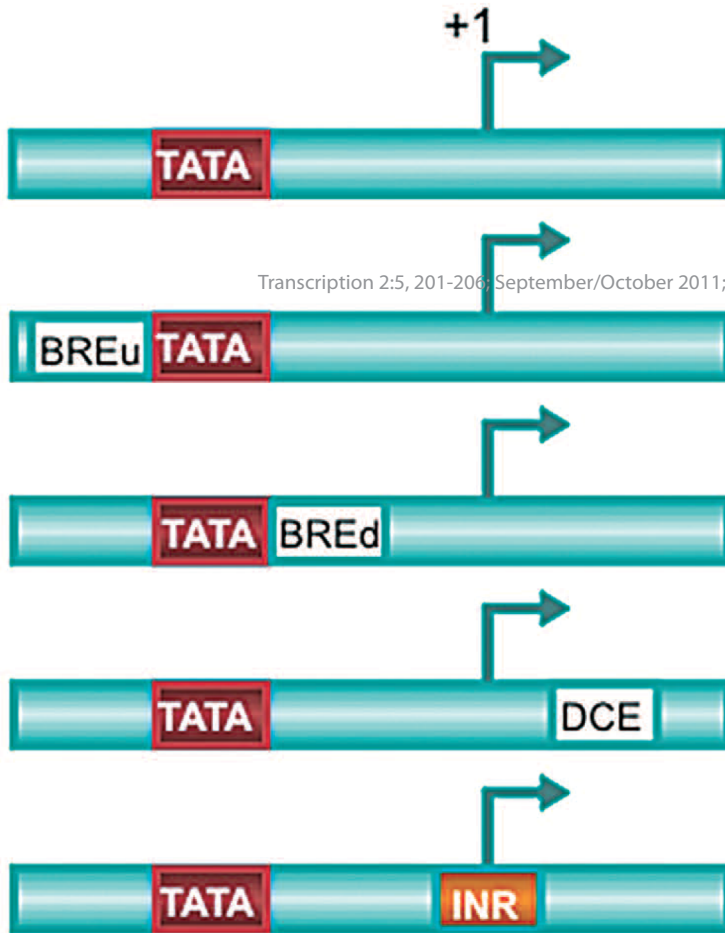
INR (Initiator)

DPE (Downstream Promoter Element)

DCE (Downstream Core Element)



Gli elementi possono essere presenti in diverse combinazioni

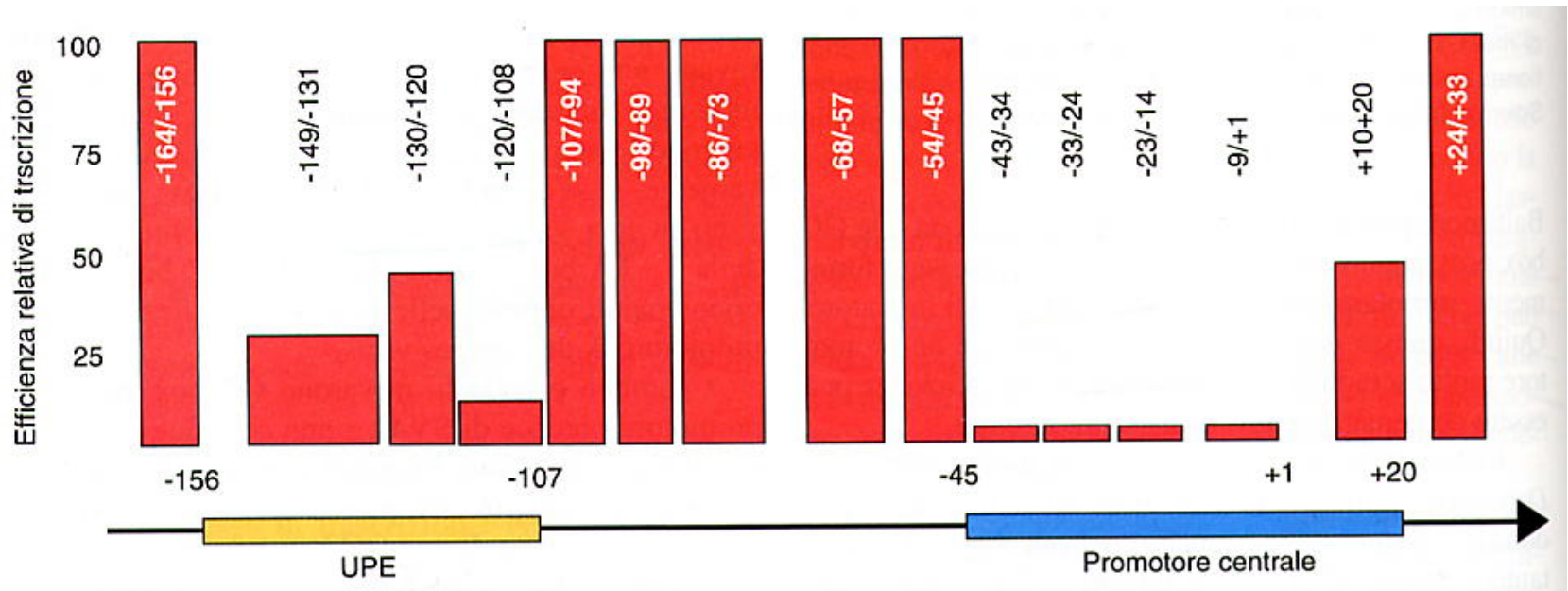


Promotori di classe I

Solo un gene è riconosciuto da RNA pol I: rRNA (presente in centinaia di copie in ogni cellula).

L'architettura generale del promotore è ben conservata:

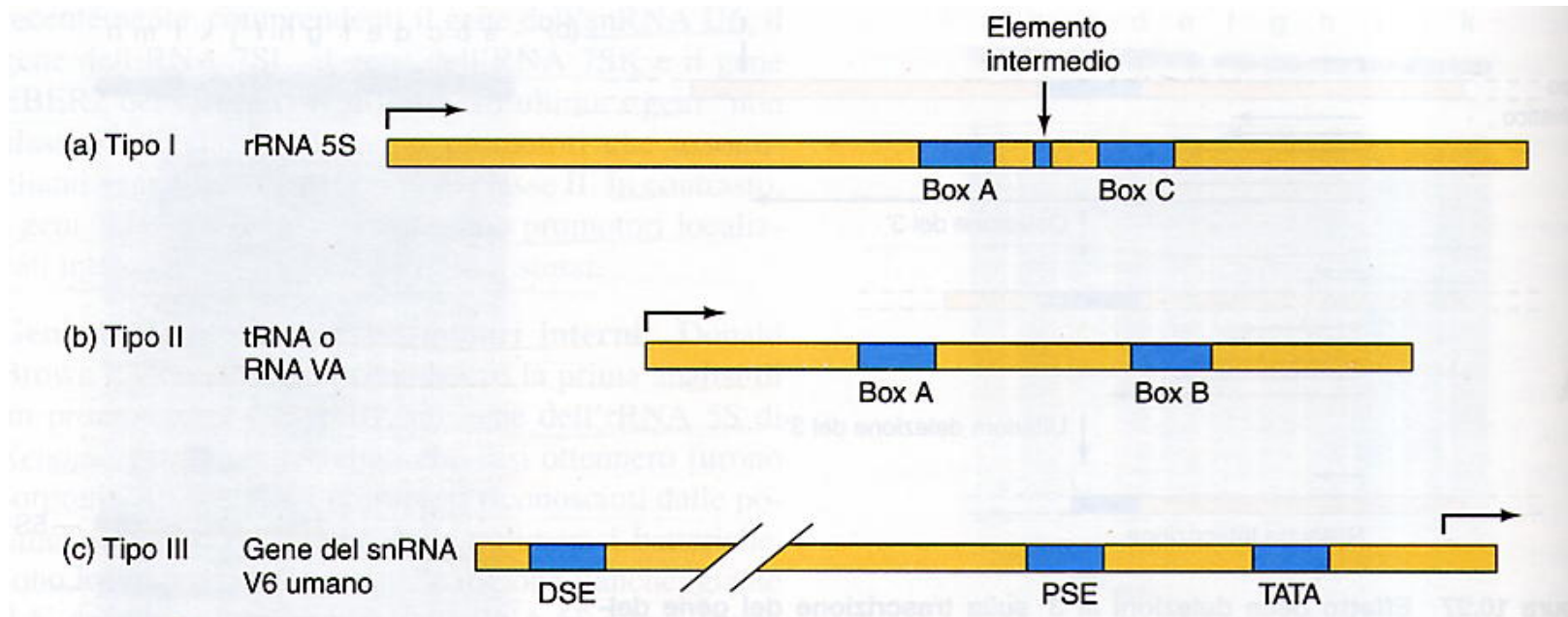
- 1) Un **elemento centrale** che circonda l'inizio della trascrizione, ricco in AT (rINR);
- 2) **Elemento promotore a monte (UPE)** a circa 100 bp



Linker scanning mutagenesis

Promotori di classe III

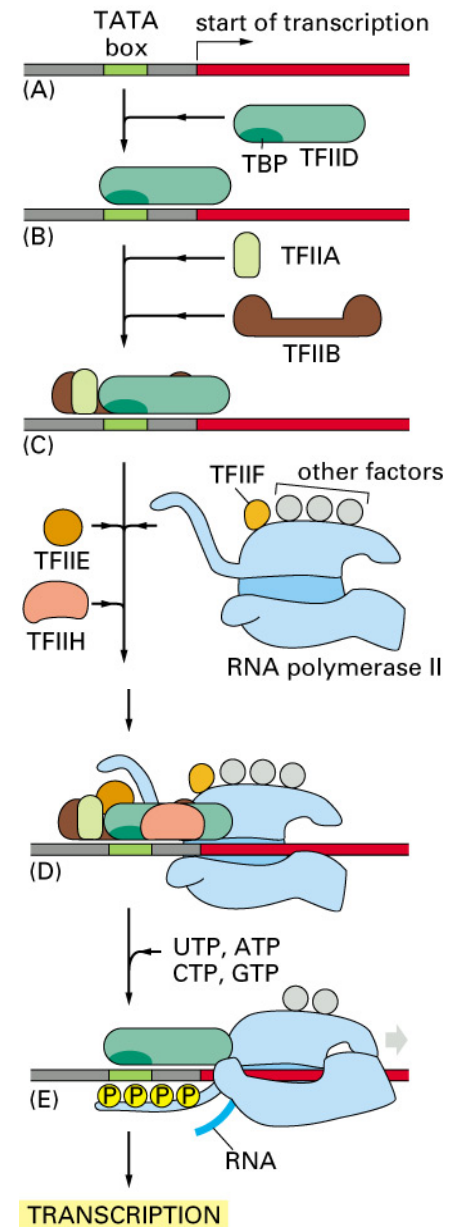
1) L'RNA pol III trascrive i geni che codificano per i piccoli RNA:
Geni "classici" di classe III (rRNA5S), geni per i tRNA,
Geni RNA VA da adenovirus (con promotori interni) (a, b);



2) Geni di classe III scoperti di recente (snRNA U6, RNA 7SL) simili ai geni di classe II (c).

Inizio della trascrizione negli eucarioti: pol II

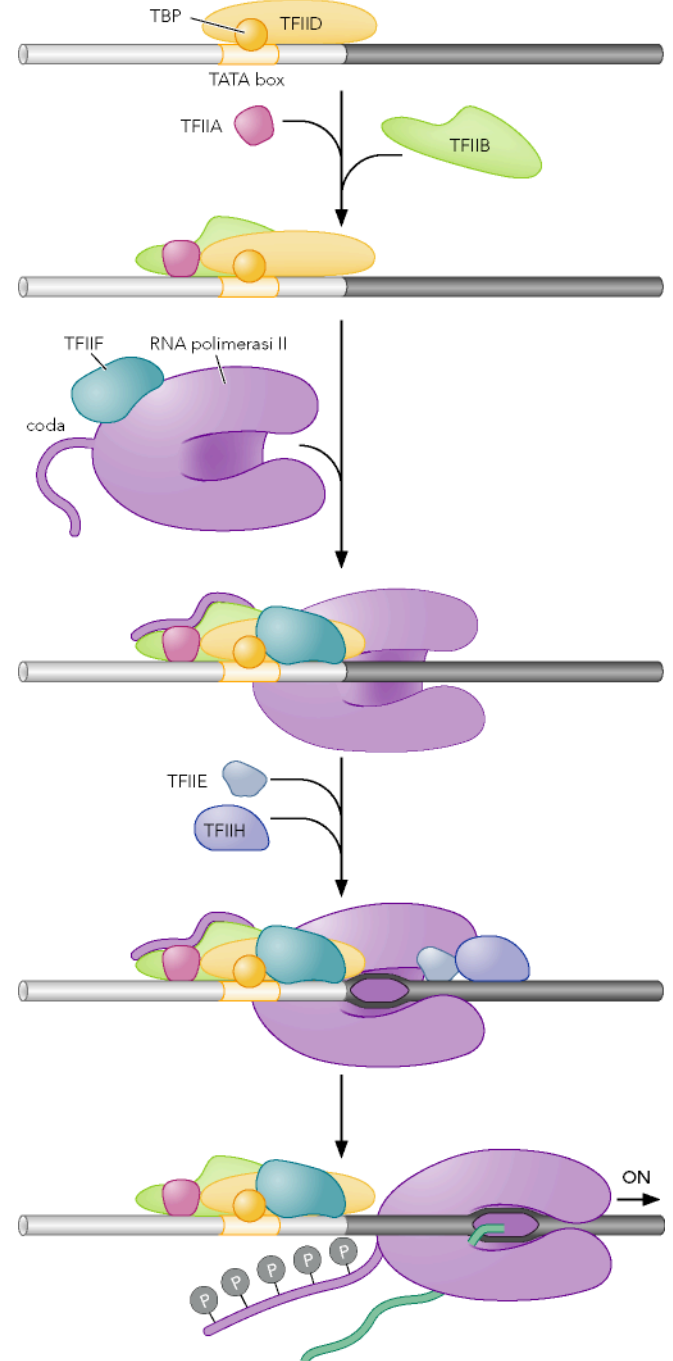
- La trascrizione negli eucarioti è più complessa perché il DNA è compattato nella cromatina e nucleosomi.
- Per iniziare la trascrizione le pol eucariotiche necessitano l'aiuto di un gran numero di proteine “**general Transcription factors**” (GTF).
- Quelli di pol II sono **TFII**



L'apparato basale si assembla in corrispondenza del promotore

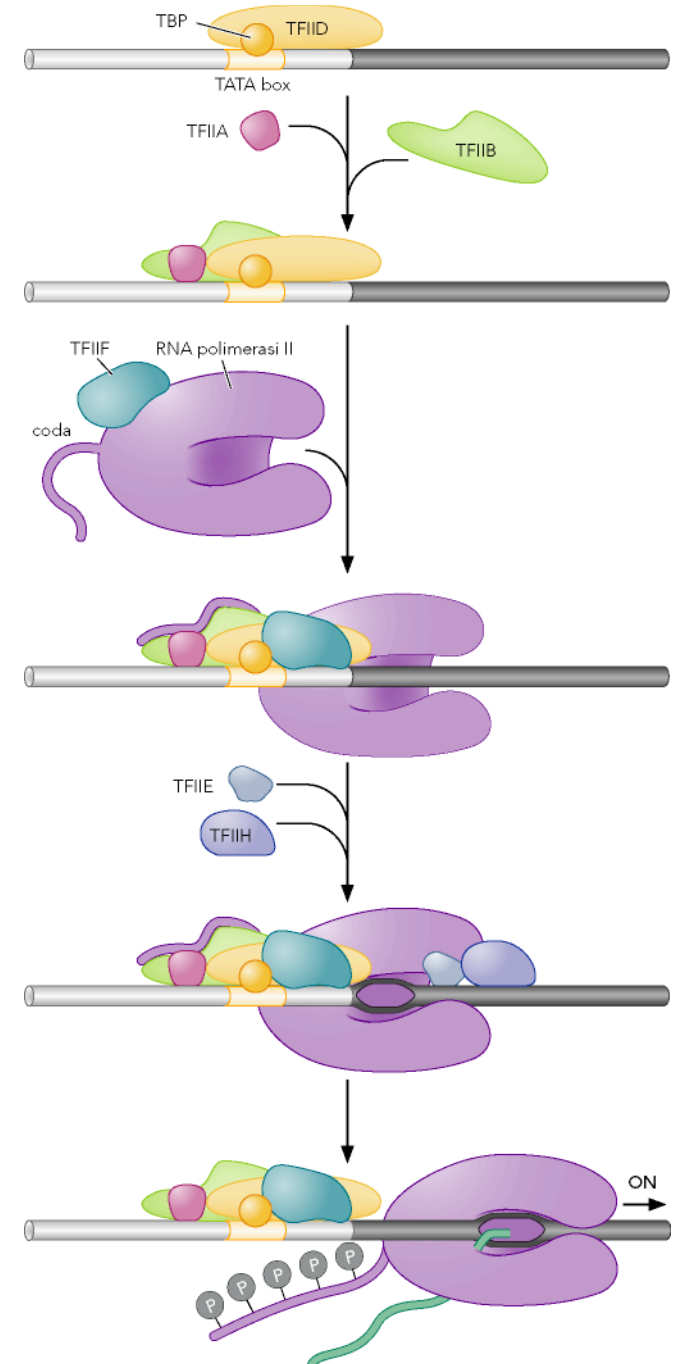
Il legame di **TFIID** alla TATA-box è il primo passo nell'iniziazione

- Altri fattori di trascrizione (**TFIIB** e **TFIIA**) si legano al complesso in un ordine definito, estendendo la lunghezza della regione protetta sul DNA
- Quando l'RNA polimerasi II viene reclutata sul complesso, tramite **TFIIF**, avvia la trascrizione



L'inizio è seguito dalla liberazione del promotore

- **TFIIE** e **TFIIH** sono necessari per il *melting* del DNA per consentire il movimento della polimerasi.
- La **fosforilazione** del **CTD** sembra sia necessaria per iniziare l'allungamento.
- Il CTD può coordinare il **processamento** dell'RNA con la trascrizione.

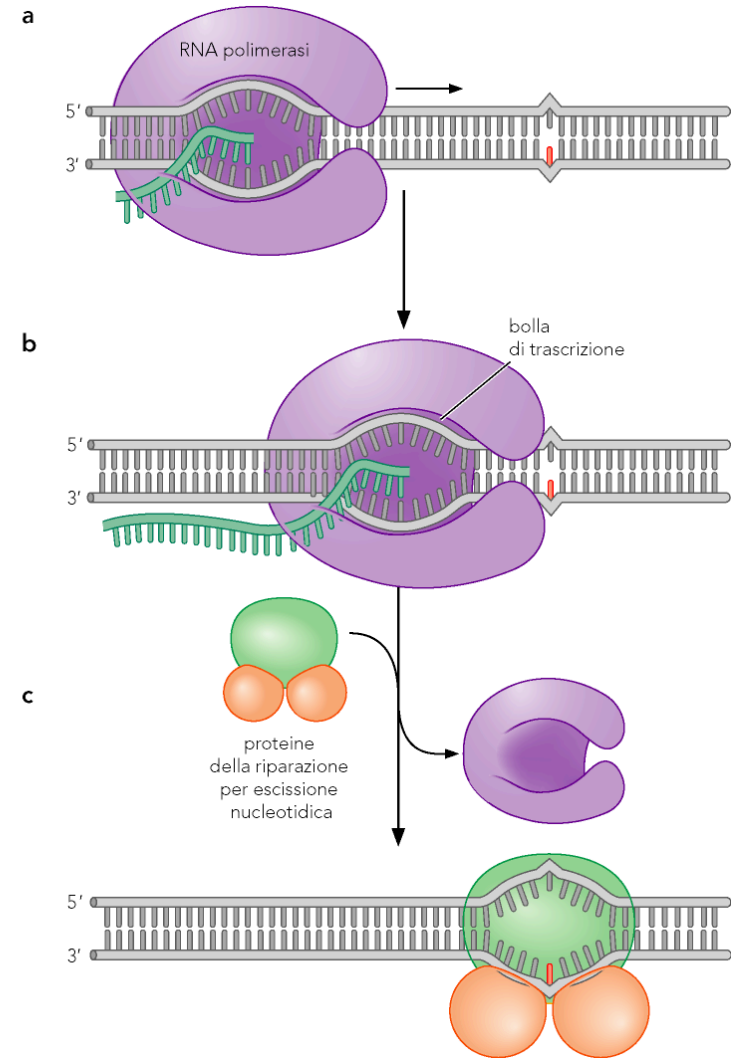


Caratteristiche dei fattori generali della trascrizione

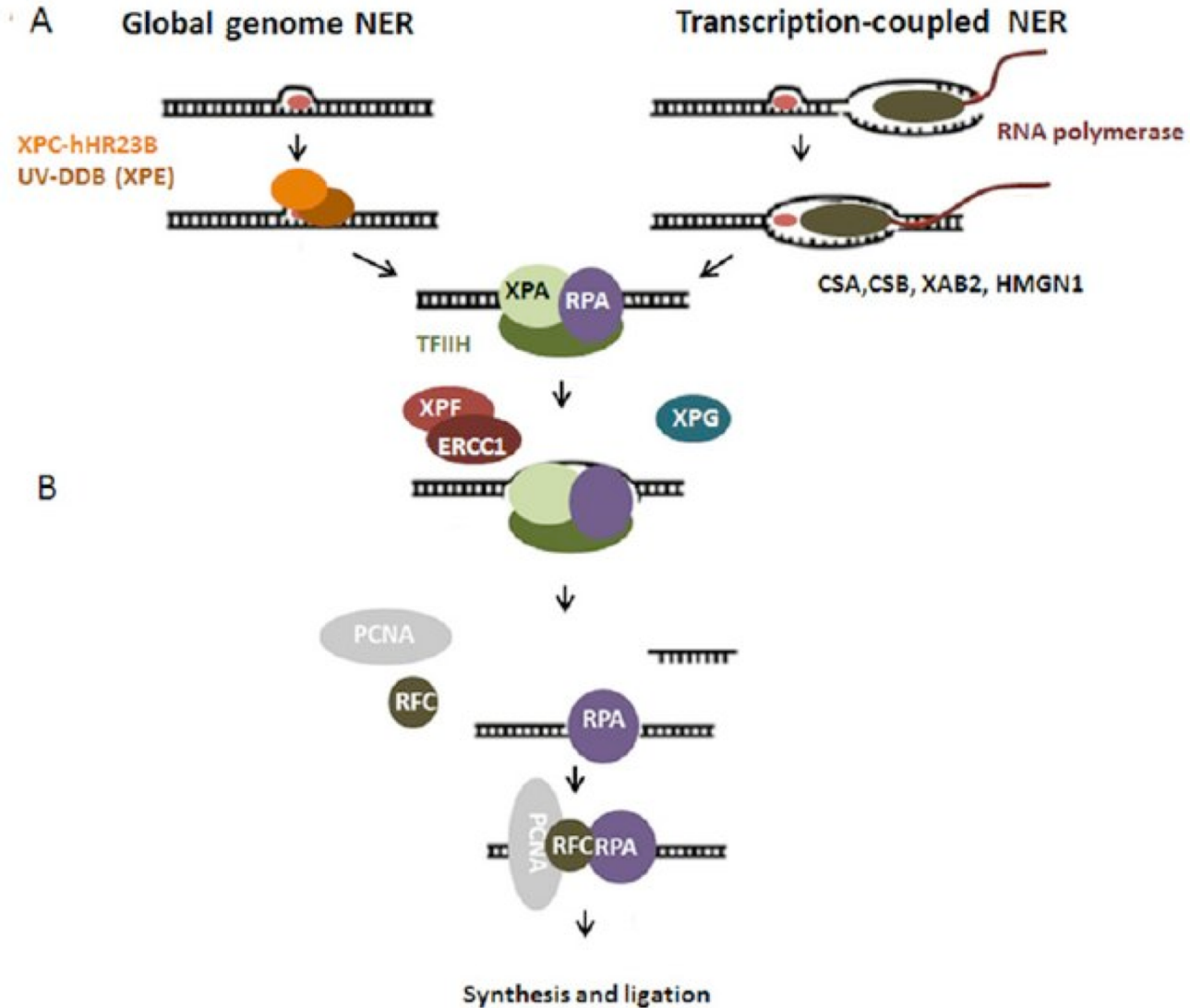
- **TFIID:** TBP si associa a circa 13 TAF (TBP-associated factors) diversi per legare il promotore, ed altro
- **TFIIB e TFIIA:** stabilizzano il legame di TBP
- **TFIIF** il suo legame con Pol II è necessario per reclutare TFIIE e TFIIH
- **TFIIE- TFIIH.** TFIIE recluta TFIIH. Questo è molto grosso (9 subunità) induce la formazione del complesso aperto, ha attività **elicastica** (coinvolta anche nel **mismatch repair**) e **chinastica** (fosforila CTD).

Trascrizione accoppiata alla riparazione del DNA (NER!!)

- Quando la RNA polimerasi trova un mismatch, si ferma.
- Recluta il **sistema di riparazione per escissione nucleotidica (NER)** e si distacca.
- Al sistema partecipa TFIIH che fa parte dei fattori generali di trascrizione
- **XP G** eucariotica taglia un frammento di 24-32 nt

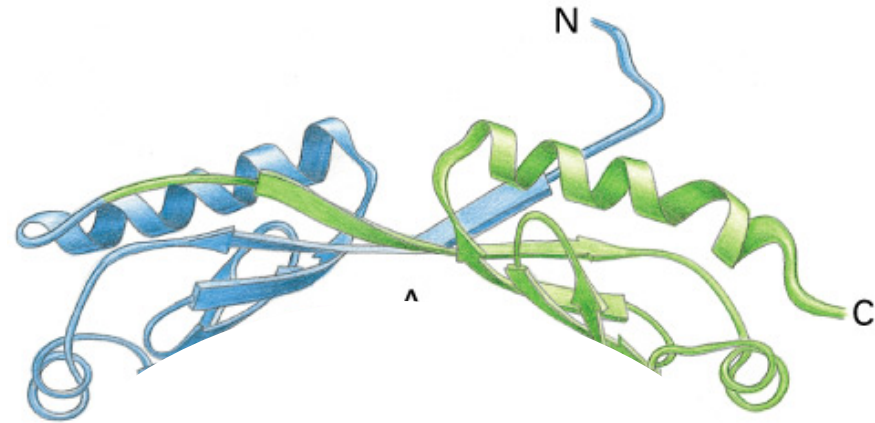


Riparazione per escissione di nucleotidi Gg NER e Tc NER



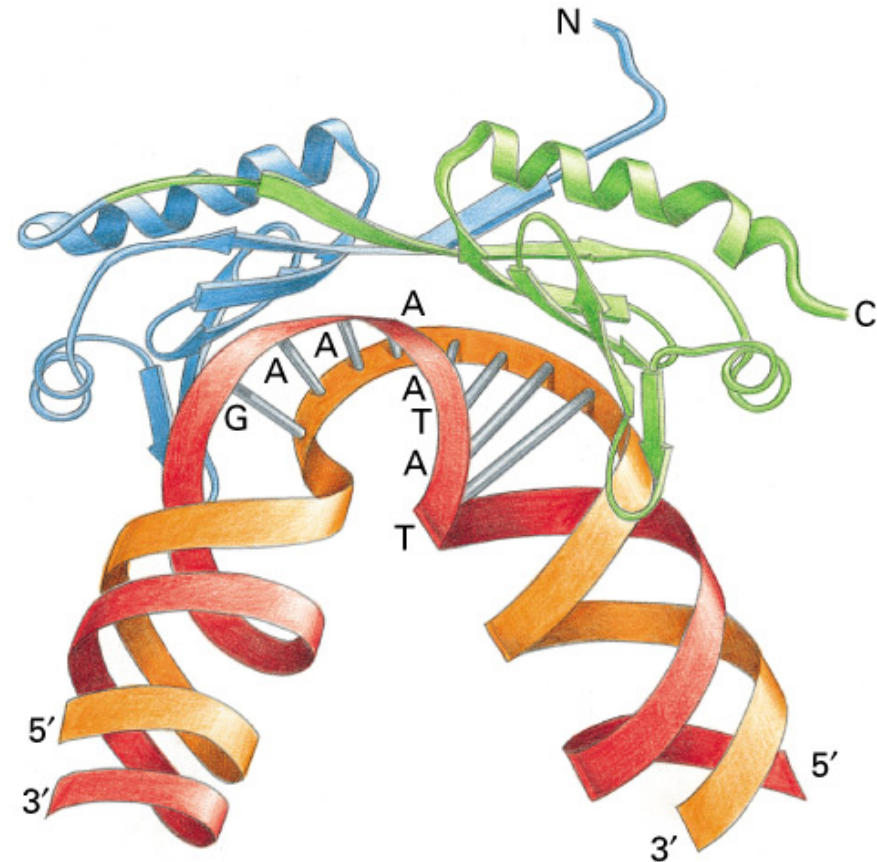
TATA-Binding protein (TBP)

- **TBP è una subunità** di TFIID. E fatto da due domini simili. Lega TATA box (tramite regione a foglietto beta) e ripiega il DNA;

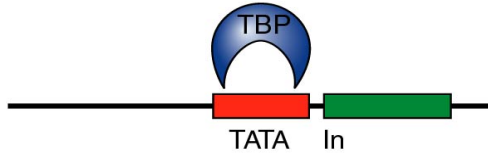


TATA-Binding protein (TBP)

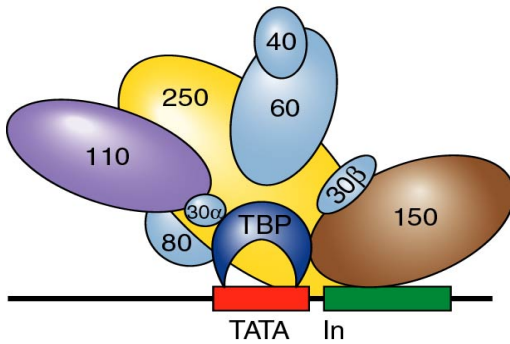
- **TBP è una subunità di TFIID.** E fatto da due domini simili. Lega TATA box (tramite regione a foglietto beta) e ripiega il DNA;
- TBP lega il DNA nel solco **minore** **come una sella** e lo piega di $\sim 80^\circ$ (due coppie di Phe che si intercalano fra le basi del DNA), provocando una locale denaturazione ;
- TFIID, è costituito da TBP e **13 TAFs**
- TBP è altamente conservato in specie molto diverse ed è coinvolto anche nella trascrizione di RNA pol I e RNA pol III



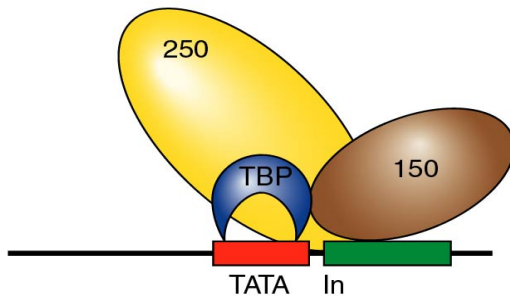
A model for the interaction between TBP and TATA box containing promoters



TBP binds to the TATA box

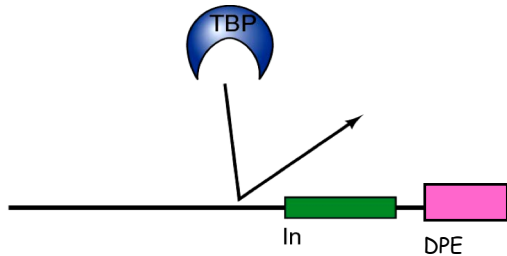


TBP binds with all the TAF_{II} in TFIID

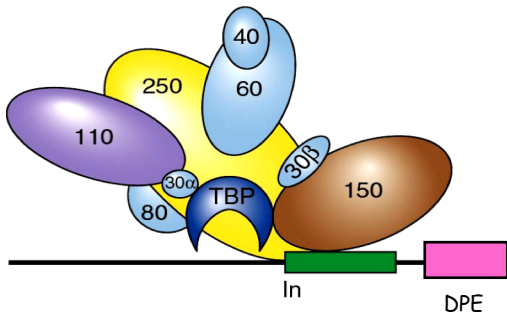


TBP binds with a subgroup of TAF_{II}

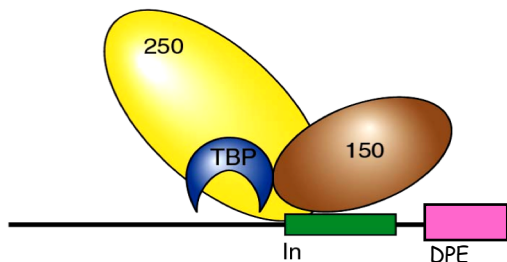
A model for the interaction between TBP and TATA-less promoters with initiator and DPE



TBP by itself cannot bind to the promoter

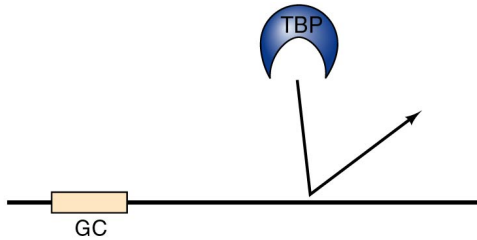


TFIID is competent, through the interactions of TAF_{II}250 and TAF_{II}150, for the binding of TBP to the promoter

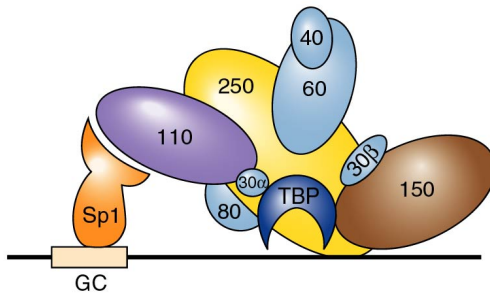


TAF_{II}250 and TAF_{II}150 are sufficient to recruit TBP

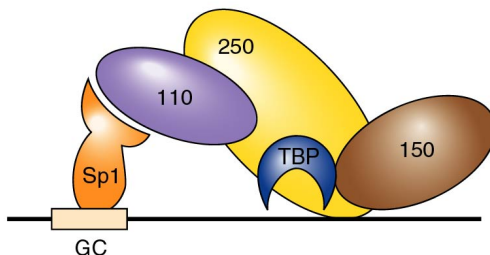
A model for the interaction of TBP with TATA-less promoters containing GC box



TBP cannot bind by itself to the promoter



TFIID can bind to the promoter through the interaction of Sp1 bound to GC box

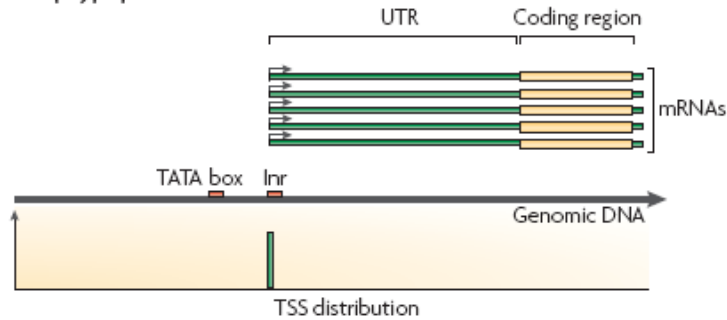


TAF_{II}250, TAF_{II}150 and TAF_{II}110 are sufficient to associate to Sp1 - bound to GC box – and allow the interaction of TBP to the promoter

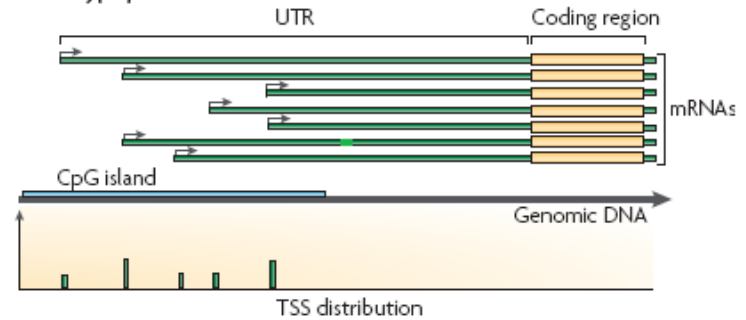
Goodrich, J.A. et al. *Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription.* Cell 84:826, 1996

TSS classes in mammalian promoters

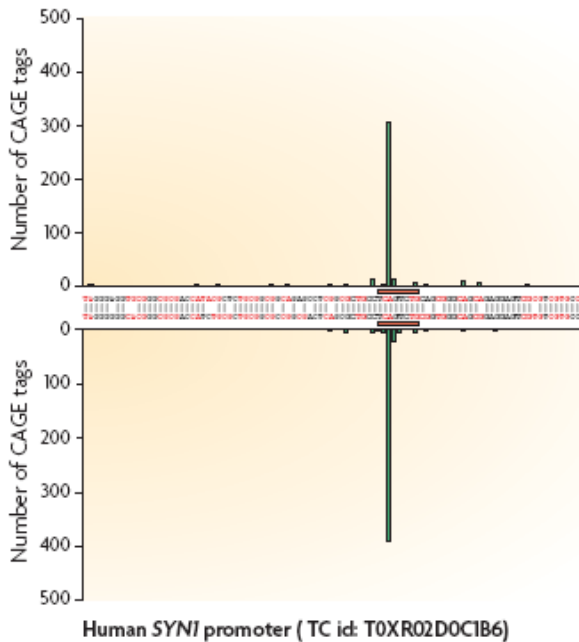
Aa
Sharp type promoter



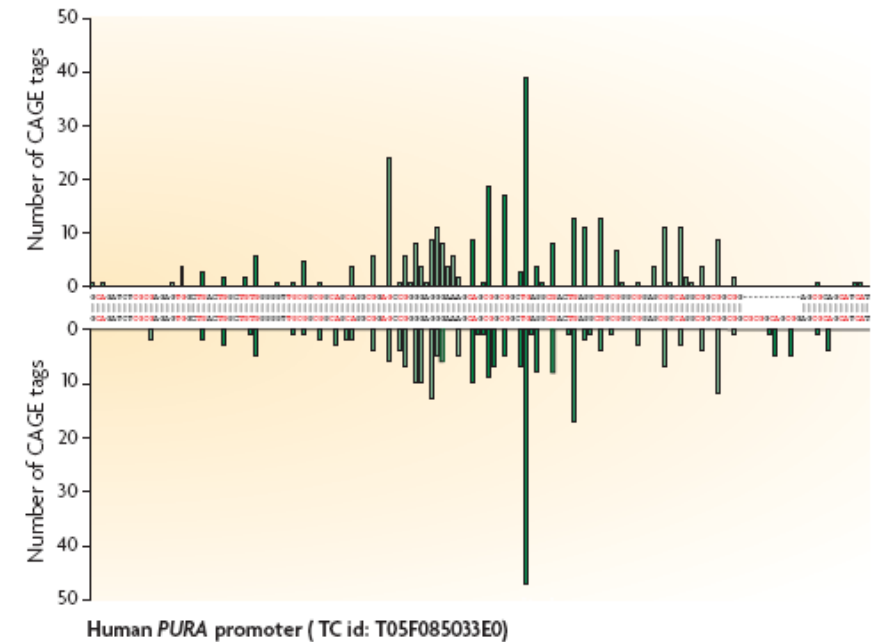
Ab
Broad type promoter



Ba Mouse *Syn1* promoter (TC id: T0XR0125C59F)



Bb Mouse *Pura* promoter (TC id: T18F0230753D)



Enhancers e silenziatori

Several eukaryotic genes (in particular class II) are associated with cis elements that strongly influence transcription.

Enhancers

The first enhancer discovered was in SV40, it stimulates transcription even though inverted or in a different position in the genome.

They are found at the 5' but sometimes also within the gene.



Silencers

Induce condensation in chromatin. Sometimes the same element on DNA can function as enhancer or silencer depending on the factors that bind to it.

Promotori ed enhancers

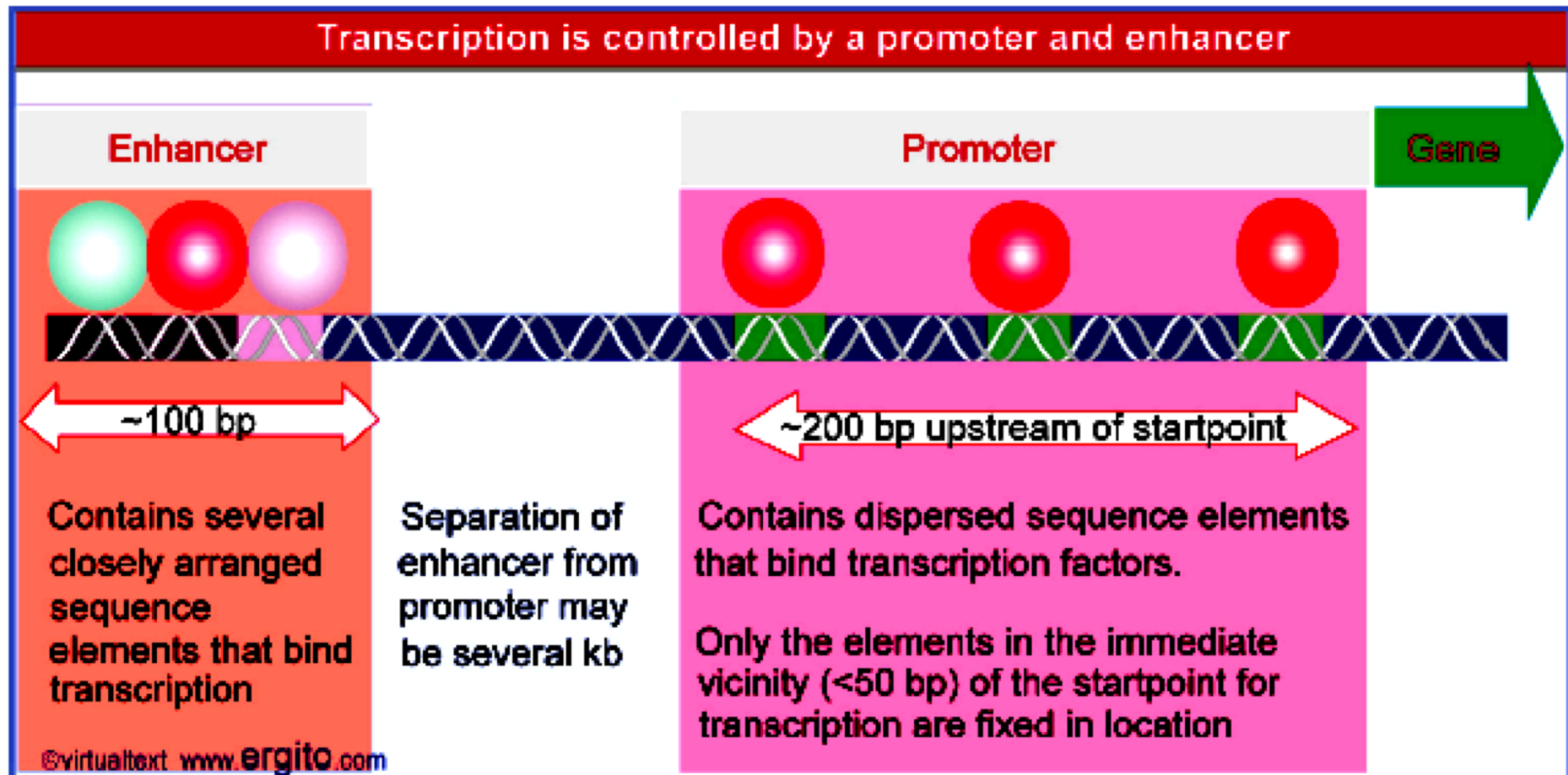


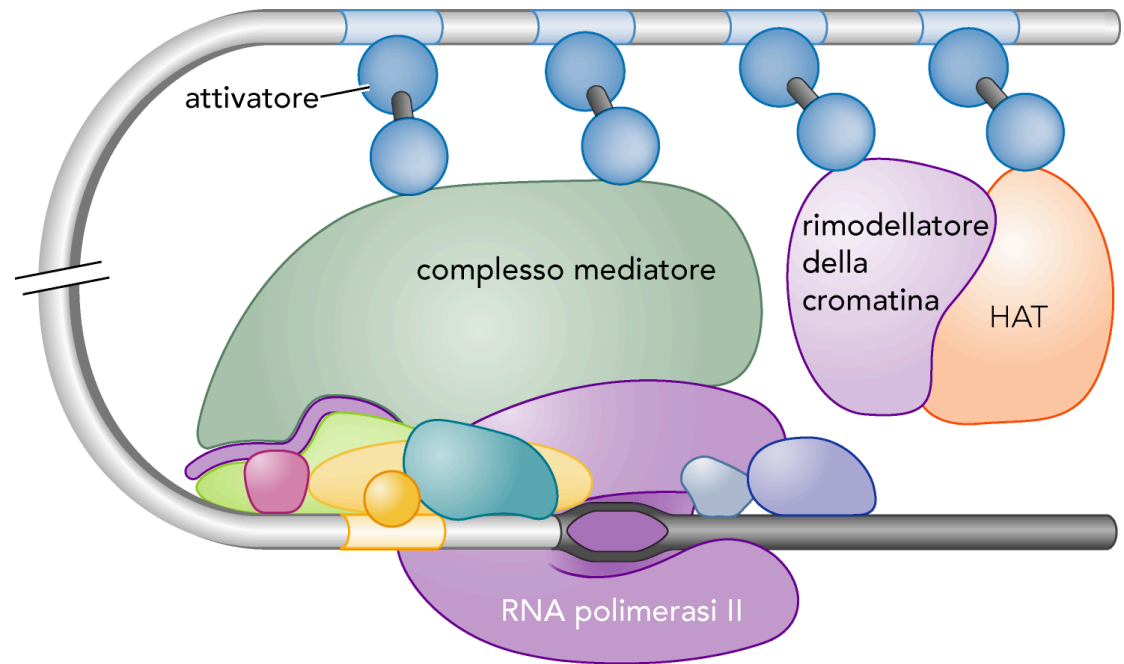
Figure 21.1 A typical gene transcribed by RNA polymerase II has a promoter that extends upstream from the site where transcription is initiated. The promoter contains several short (<10 bp) sequence elements that bind transcription factors, dispersed over >200 bp. An enhancer containing a more closely packed array of elements that also bind transcription factors may be located several kb distant. (DNA may be coiled or otherwise rearranged so that transcription factors at the promoter and at the enhancer interact to form a large protein complex.)

Inizio della trascrizione in eucarioti

Transcriptional activators aiutano l'inizio della trascrizione

Il **mediatore** (oppure altri coattivatori) aiuta a comunicare gli attivatori con pol II e GTF

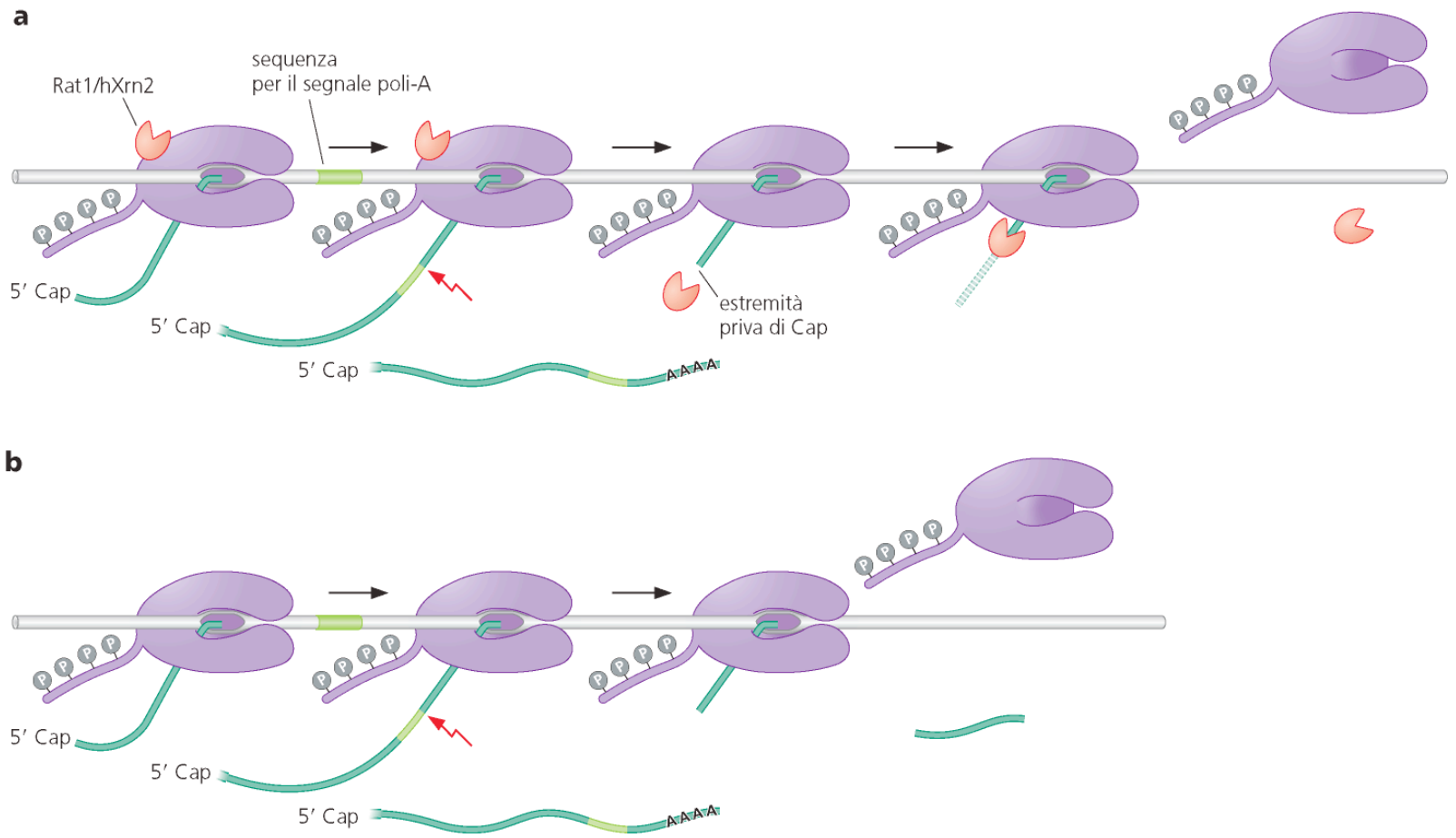
La RNA pol si associa ad **elongation factors**



Fattori che stimolano l'allungamento e la correzione

- Nell'allungamento la PolII si libera di molti GTF e recluta **fattori di allungamento** (TFIIS e hSPT5)
- **TFIIS** stimola l'allungamento e facilita la correzione (editing idrolitico).

La terminazione della trascrizione è associata alla distruzione dell' RNA da parte di una RNasi altamente processiva



Video trascrizione eucarioti

<https://www.youtube.com/watch?v=vVDDV8jH1Wc>

Zanichelli

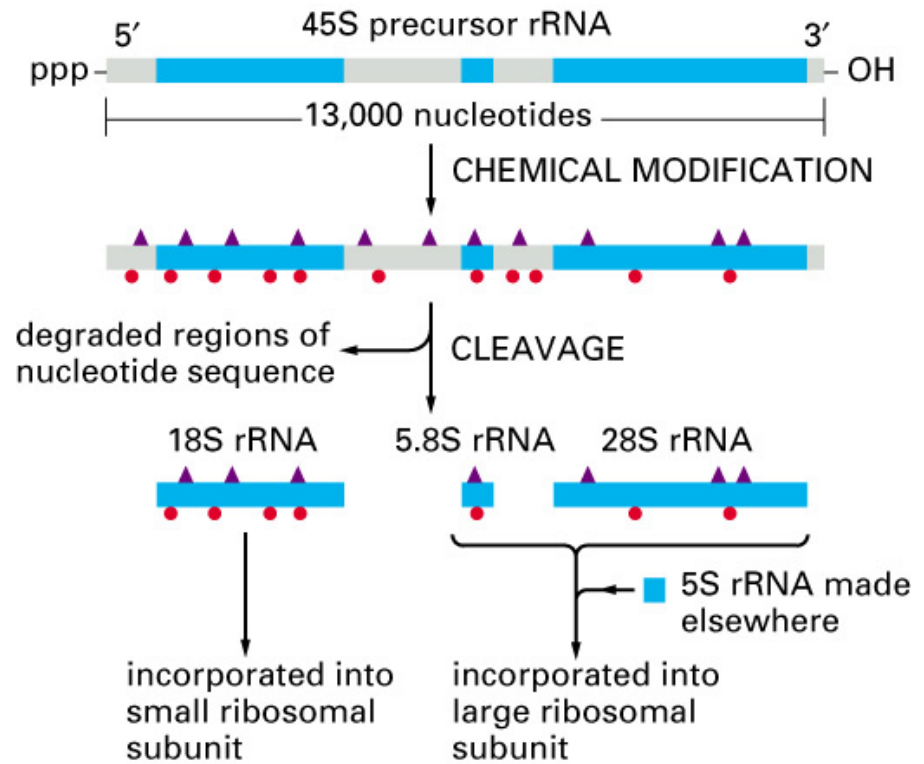
Struttura degli enzimi – L'RNA polimerasi II

Struttura delle proteine – La proteina che lega la TATA box

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



2 μm

RNA Pol I

- Il core promoter da -45 a $+20$,
- Il fattore che si lega al core promoter è fatto da 4 proteine.
- Uno di questi componenti è **TBP**,

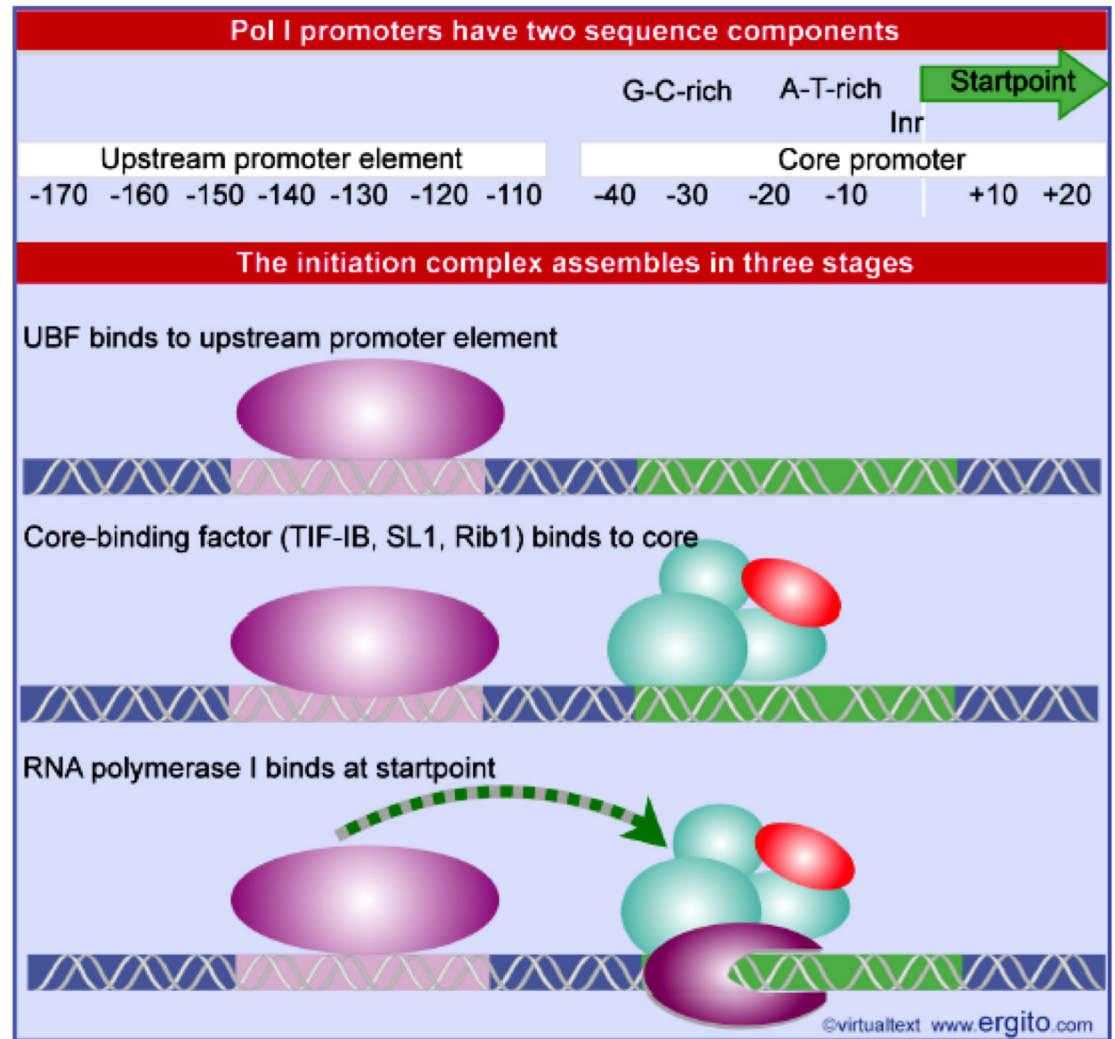


Figure 21.5 Transcription units for RNA polymerase I have a core promoter separated by ~ 70 bp from the upstream promoter element. UBF binding to the UPE increases the ability of core-binding factor to bind to the core promoter. Core-binding factor positions RNA polymerase I at the startpoint.

RNA pol III usa elementi sia a valle che a monte del TSS

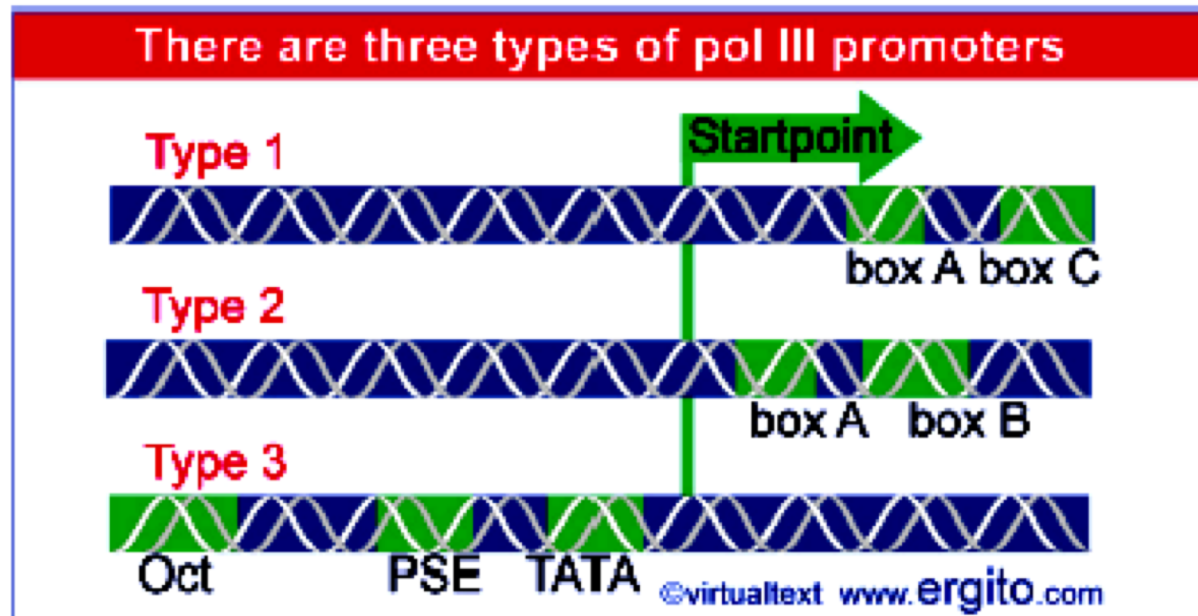


Figure 21.7 Promoters for RNA polymerase III may consist of bipartite sequences downstream of the startpoint, with box A separated from either box C or box B. Or they may consist of separated sequences upstream of the startpoint (Oct, PSE, TATA).

Pol III

- **TFIIIA** e **TFIIIC** si legano alle sequenze consenso e permettono a **TFIIIB** di legarsi allo startpoint.
- **TFIIIB** ha **TBP** come subunità e permette alla RNA polimerasi III di legarsi.

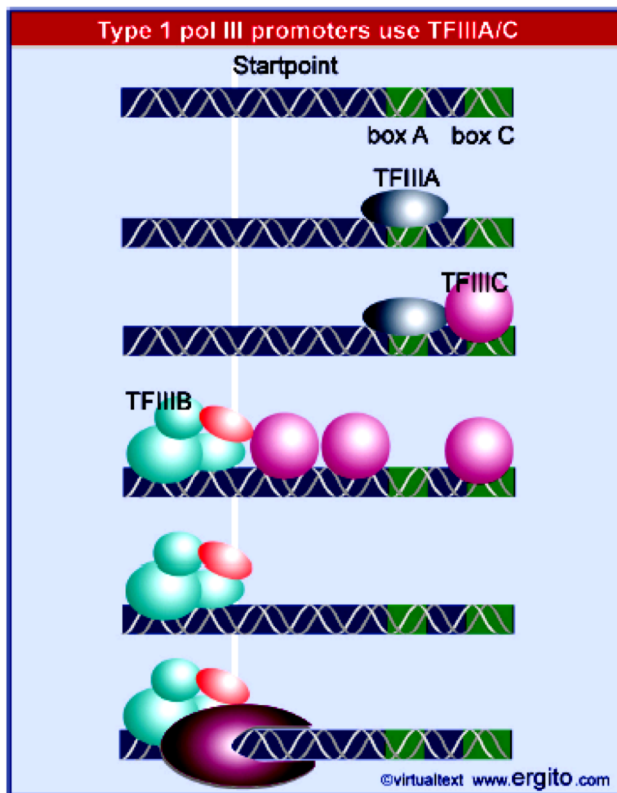


Figure 21.9 Internal type 1 pol III promoters use the assembly factors TFIIIA and TFIIIC, at boxA and boxC, to recruit the positioning factor TFIIIB, which recruits RNA polymerase III.

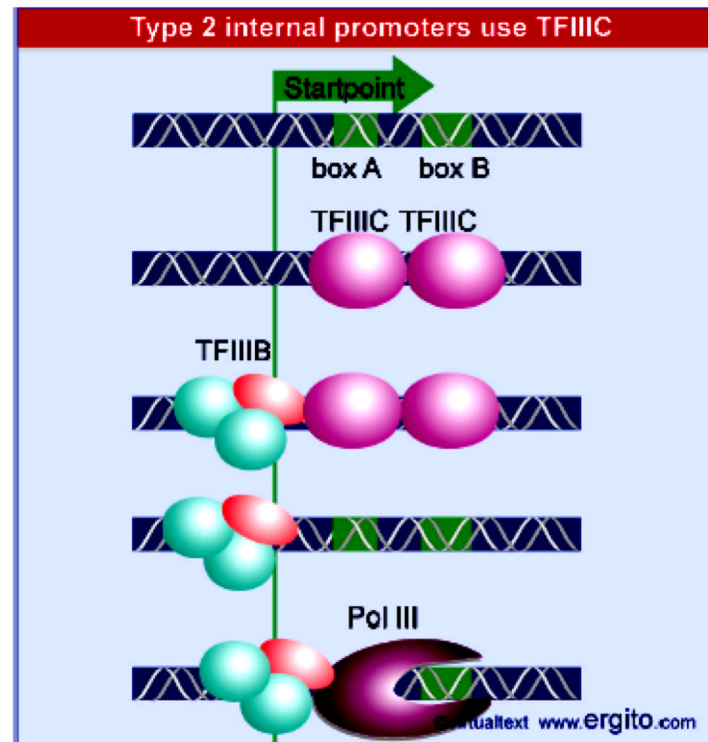


Figure 21.8 Internal type 2 pol III promoters use binding of TFIIIC to boxA and boxB sequences to recruit the positioning factor TFIIIB, which recruits RNA polymerase III.