

Corso di  
**Metodologie diagnostiche di  
Biochimica e di Biologia molecolare**  
modulo di Biologia molecolare

A.A. 2012/2013

Michela A. Denti  
denti@science.unitn.it

Lezione 6:  
Trascrizione negli eucarioti. Controllo della trascrizione

## **Lezione 6**

**(18 ottobre 2012)**

- La trascrizione negli eucarioti.
- Il controllo trascrizionale dell'espressione genica.

*Allison cap. 10, 11*

*Alberts cap. 6, 7*

*Watson cap. 12, 16, 17*

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
Other noncoding RNAs	function in diverse cellular processes, including telomere synthesis and the transport of proteins into the ER

(RNAs found only in eukaryotes)

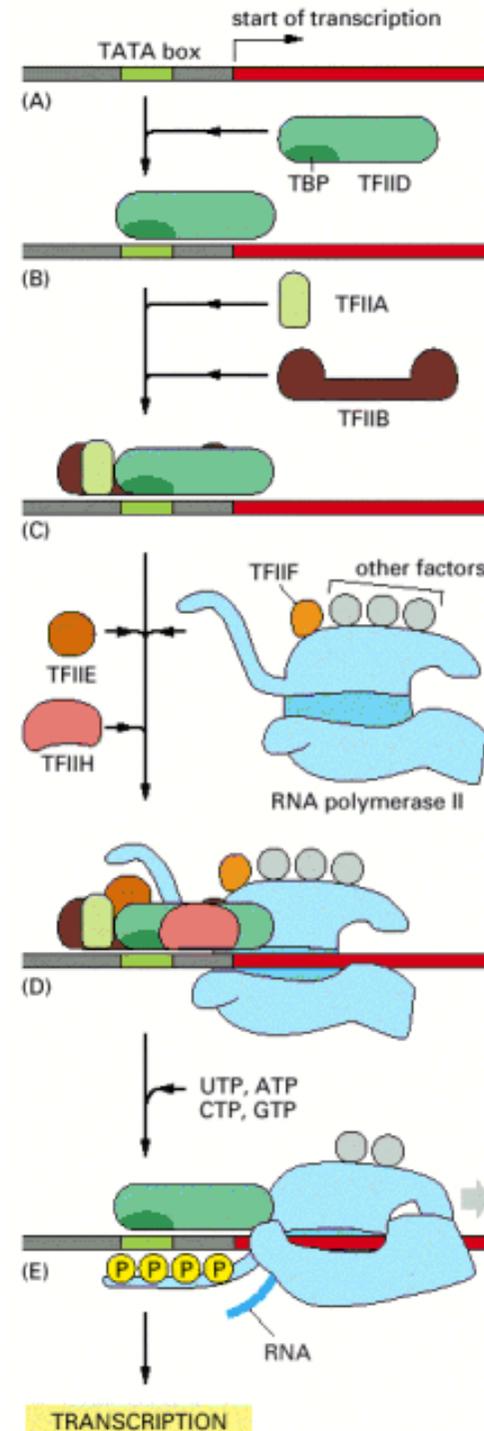
## EUKARYOTIC RNA POLYMERASES

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

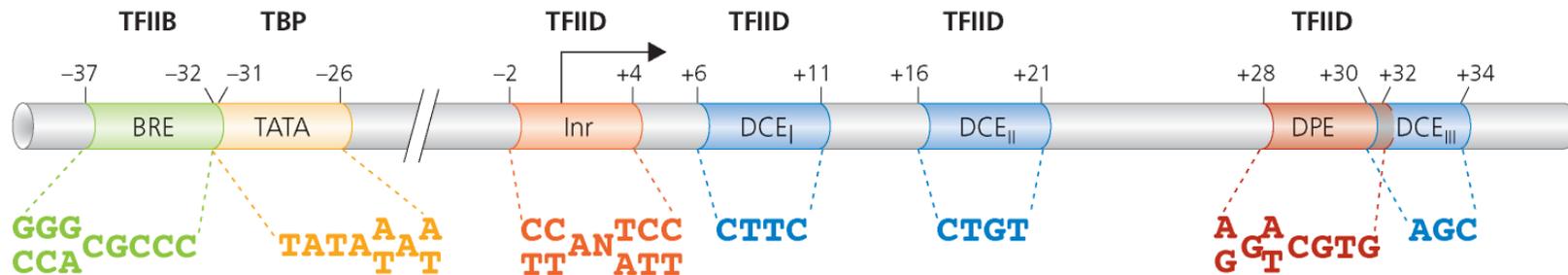
Sebbene la **RNA polimerasi II eucariotica** abbia molte somiglianze strutturali con la RNA polimerasi batterica, ci sono parecchie **differenze** importanti nel modo in cui funzionano i due enzimi.

1. Mentre la RNA polimerasi batterica richiede soltanto una singola proteina addizionale (fattore  $\sigma$ ) per iniziare la trascrizione *in vitro*, le RNA polimerasi eucariotiche richiedono molte altre proteine, chiamati **fattori generali di trascrizione**

2. L'inizio della trascrizione eucariotica deve tener conto del compattamento del DNA nei nucleosomi e in forme di ordine superiore di struttura della **cromatina**, caratteristiche assenti nei cromosomi batterici.



## Il promotore base della Pol II



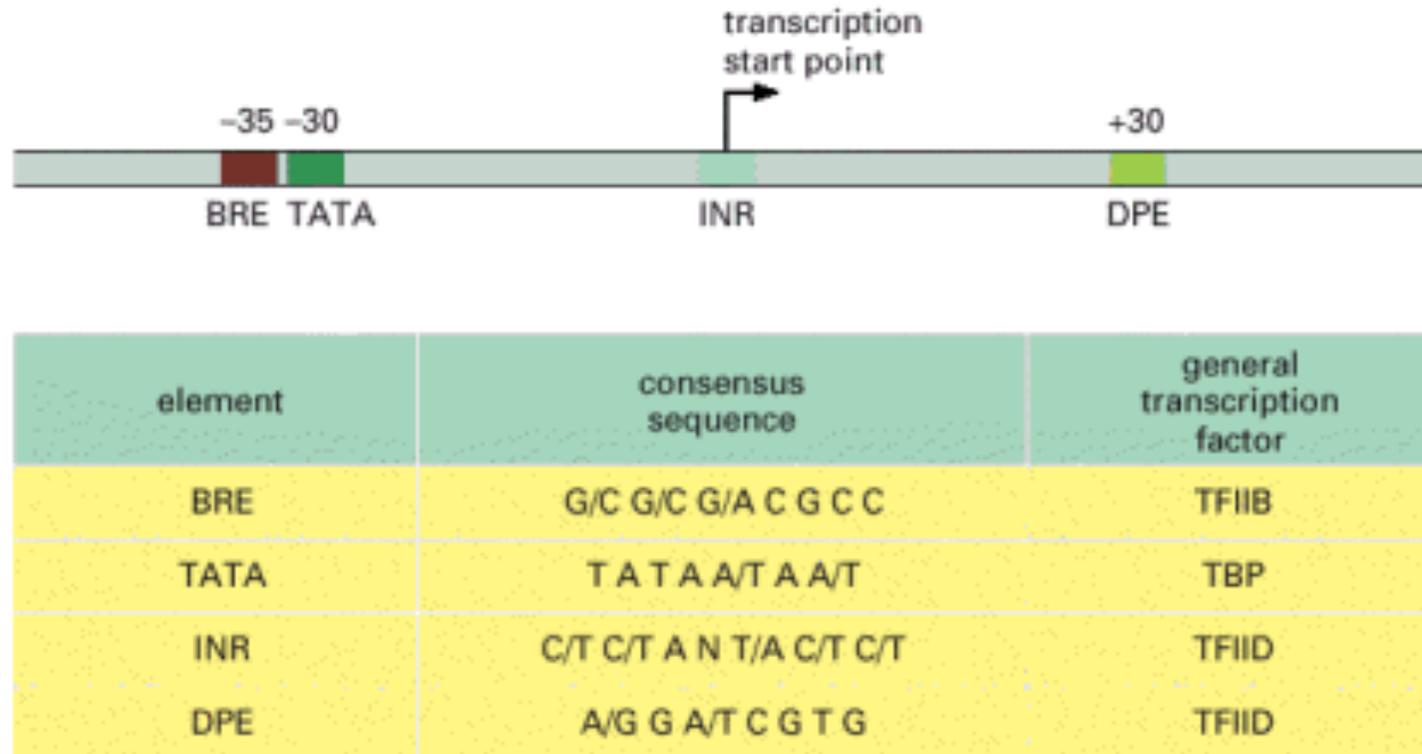
Il core dei promotori dell'RNA polimerasi II è costituito da una combinazione di 4 elementi:

BRE (TFII B Recognition Element)

TATA (riconosciuta da TBP)

Inr (Inziatore, riconosciuto da TFIID)

DPE (Downstream Promoter Element) o DCE (Downstream Core Element)



### Sequenze consenso trovate nelle vicinanze dei punti di inizio della RNA polimerasi II eucariotica.

Per la maggior parte dei punti di inizio della PolII sono presenti solo 2 o 3 delle 4 sequenze. Per esempio la maggior parte dei promotori PolII ha una TATA box e quelli che ne sono privi hanno di norma una “forte” sequenza INR.

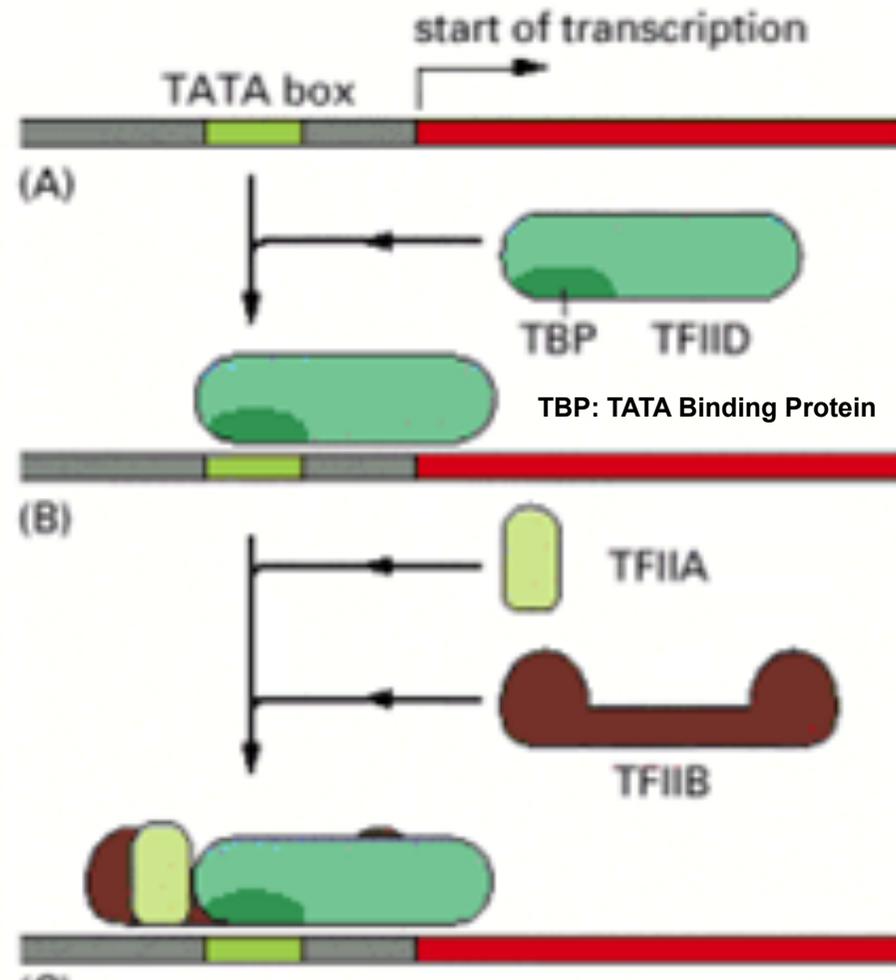
Sebbene la maggior parte delle sequenze che influenzano l’inizio della trascrizione sia posta “a monte” del punto di inizio della trascrizione, **alcune sono collocate nella regione trascritta**

## Inizio della trascrizione di un gene eucariotico da parte della RNA polimerasi II

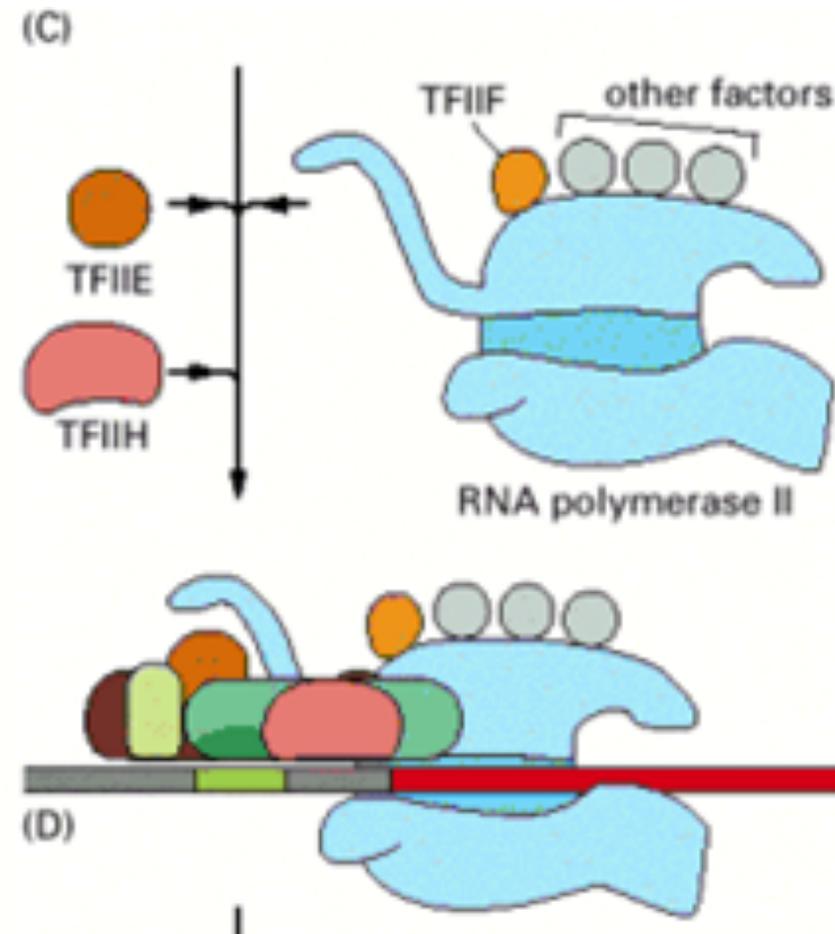
Per iniziare la trascrizione la polimerasi richiede i fattori generali di trascrizione

Il promotore contiene una sequenza di DNA chiamata **TATA box**, posta **25 nt a monte** del sito di inizio della trascrizione.

La TATA box è riconosciuta e legata dal fattore di trascrizione TFIID, tramite la sua subunità TBP, che quindi rende possibile l'attacco adiacente di TFIIB



Il resto dei fattori generali di trascrizione, insieme alla RNA polimerasi stessa, si assembla sul promotore

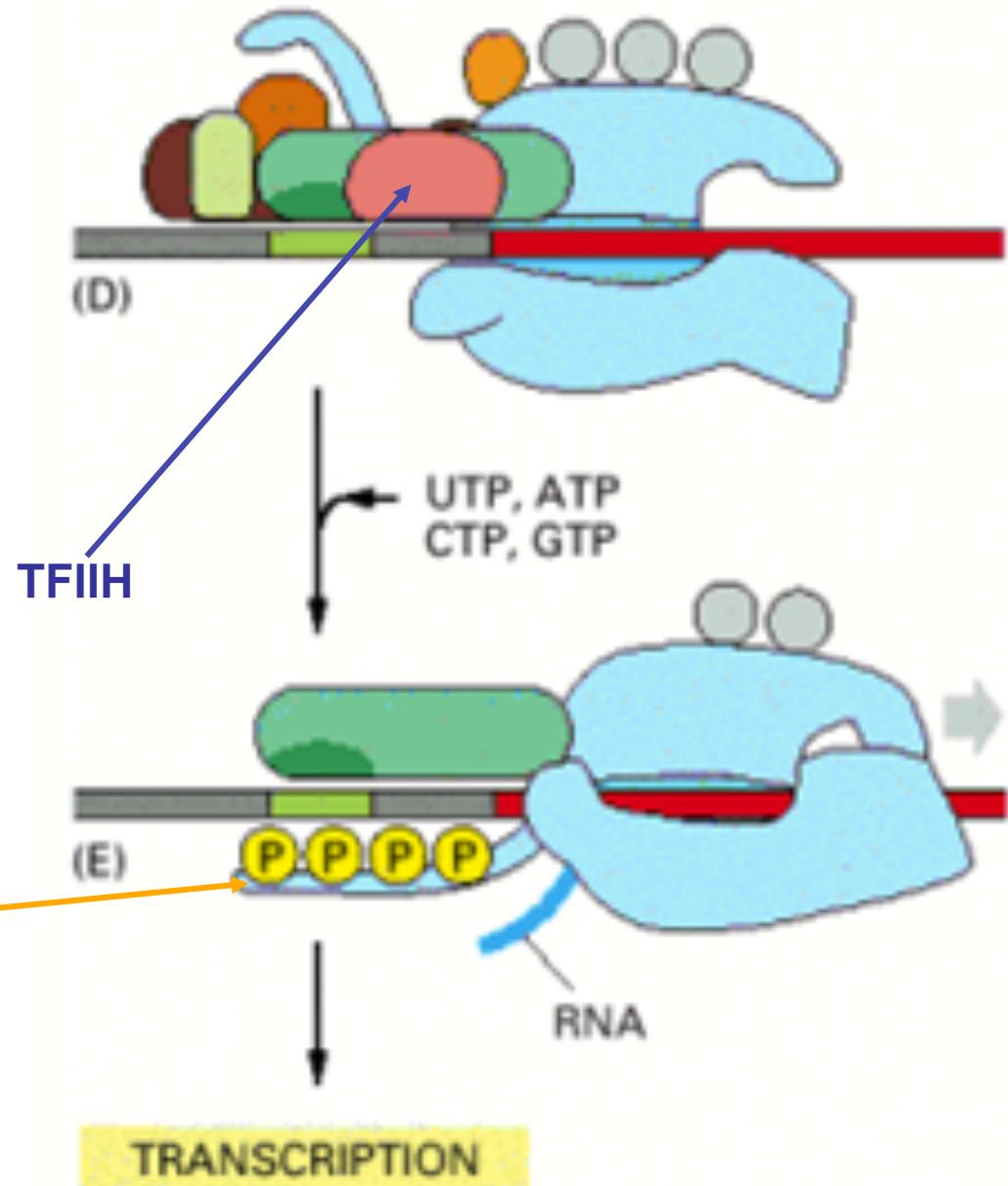


**Transcription initiation complex**

**TFIIH** (un complesso di 9 subunità, tra cui un'**elicasi**) usa quindi **ATP** per aprire la doppia elica di DNA al punto di inizio della trascrizione (nei batteri non è necessaria idrolisi di ATP, invece)

TFIIH fosforila anche la RNA polimerasi II (**attività chinasi**), cambiandone la conformazione così che la polimerasi viene rilasciata dai fattori generali e può cominciare la fase di allungamento della trascrizione.

Il **sito di fosforilazione** è una lunga coda polipeptidica C-terminale, chiamata anche dominio C-terminale (**CTD**)

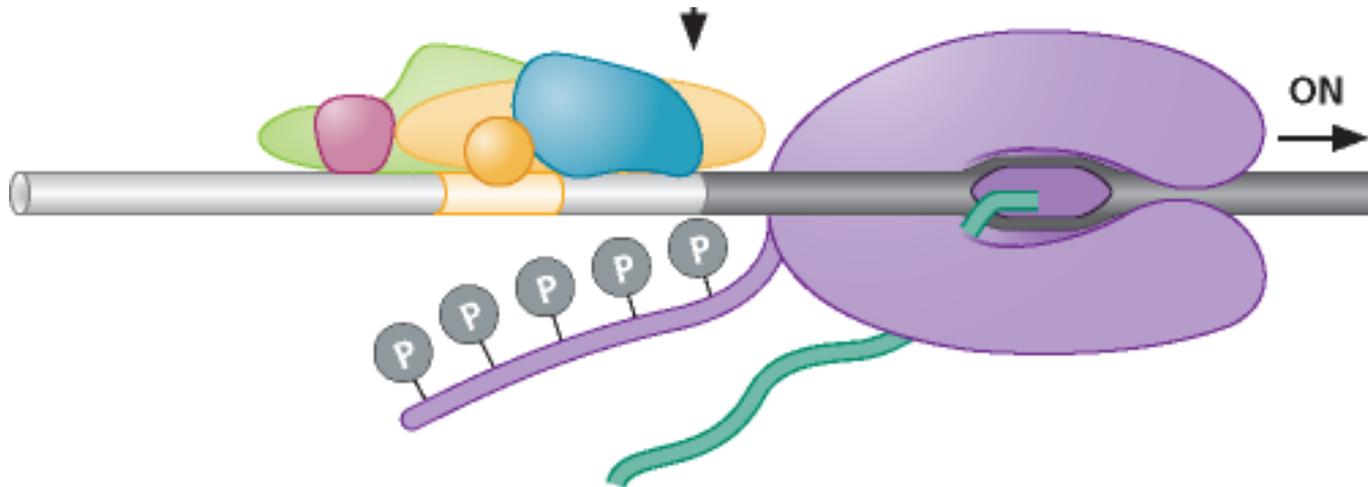


La subunità maggiore della PolII ha un dominio Carbossi-terminale (**CTD**), comunemente indicato come “coda”.

Il CTD contiene una serie di **ripetizioni Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser**.

Vi sono 27 di queste ripetizioni nella PolII di lievito, 32 nel nematode *Caenorhabditis elegans*, 45 nel moscerino *Drosophila*, e 52 nell'uomo.

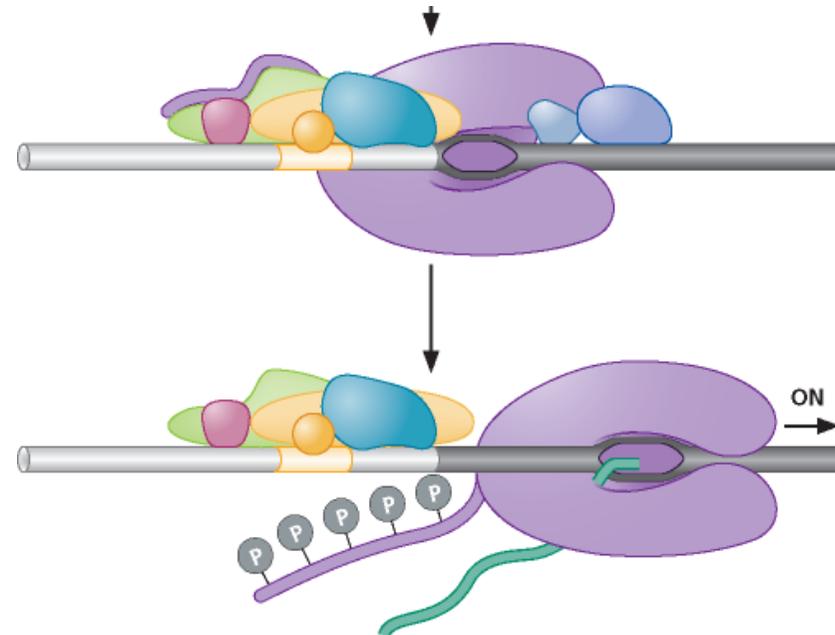
Ciascuna di queste ripetizioni contiene dei siti di fosforilazione da parte di chinasi specifiche, compresa quella che costituisce una subunità di TFIIF

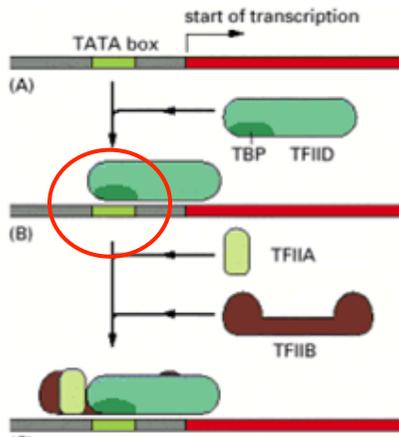


La forma della PolII che viene assemblata inizialmente sul promotore contiene una coda in gran parte **non fosforilata**, ma la forma che si trova nel **complesso di allungamento** ha, invece, **diversi gruppi fosfati** sulla coda.

L'aggiunta di questi fosfati aiuta la polimerasi a liberarsi dei fattori generali di trascrizione utilizzati per l'inizio e che l'enzima lascia indietro appena si distacca dal Promotore.

Oltre al TFH esistono numerose **chinasi** in grado di agire sul CTD, e numerose **fosfatasi** che rimuovono i fosfati aggiunti da tali chinasi.

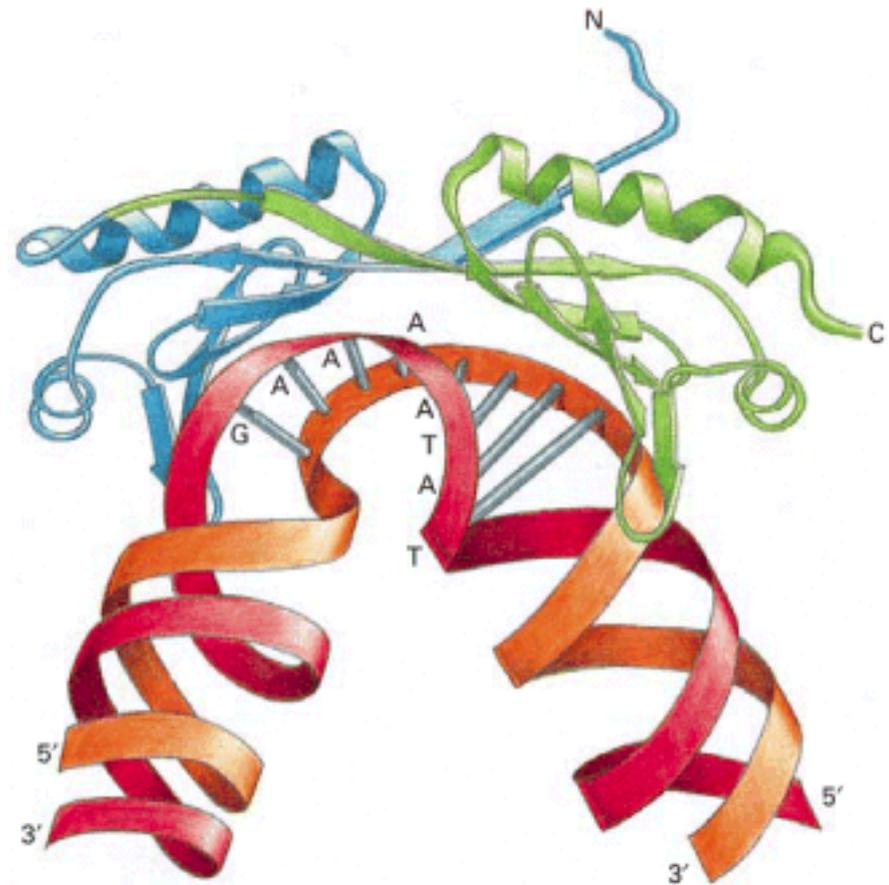


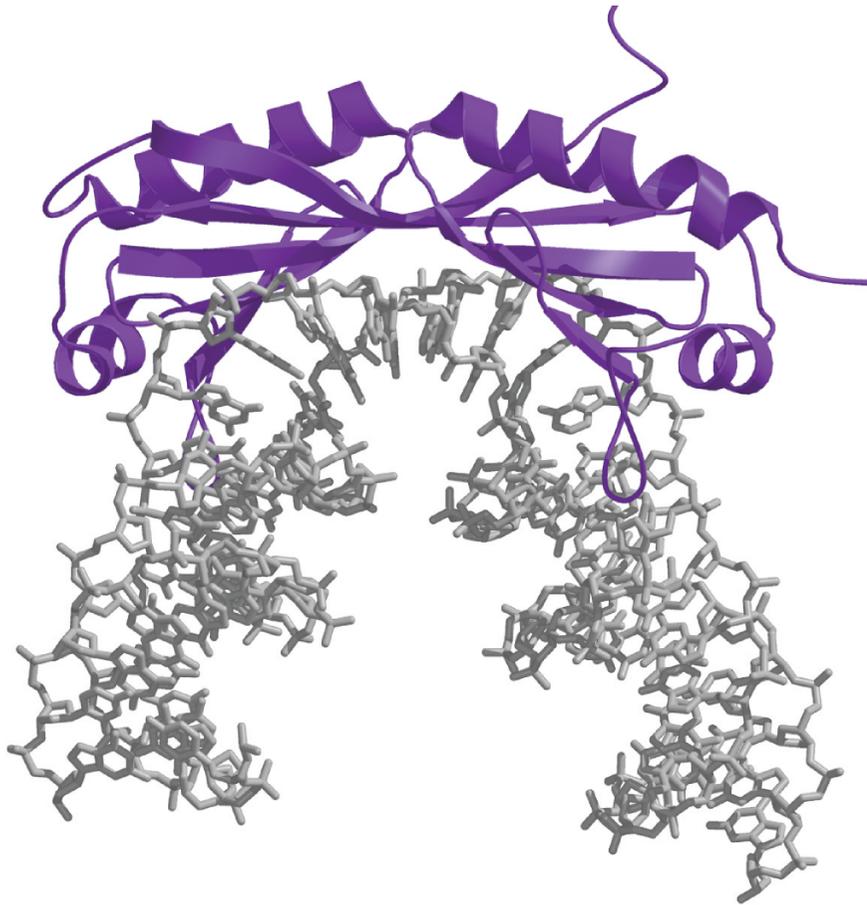


## Struttura tridimensionale della TBP (TATA Binding Protein) legata al DNA

La **particolare curvatura** causata da TBP – due eliche separate da DNA parzialmente svolto – può servire da punto di riferimento che aiuta ad attrarre gli altri fattori generali di trascrizione.

La TBP è una singola catena polipeptidica che si ripiega in due domini molto simili (verde e blu)





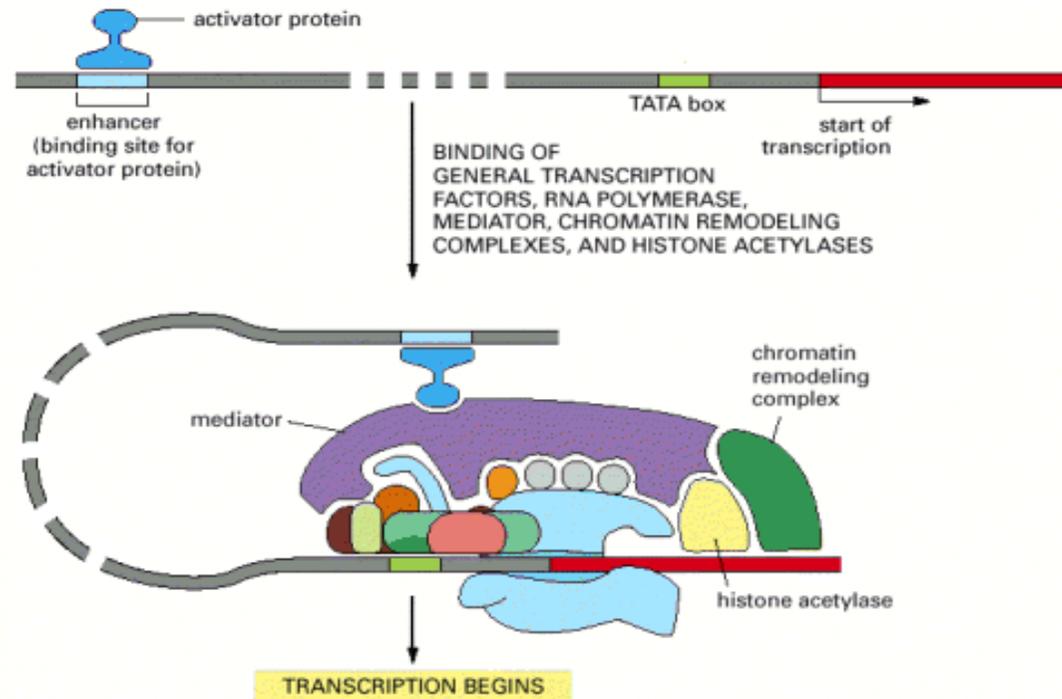
TBP usa una regione estesa a **foglietto  $\beta$**  per il riconoscimento del **solco minore** della TATA-box

La maggior parte della **specificità** è data da due coppie di **catene laterali di fenilalanina** che si intercalano tra le basi di entrambi i terminali della sequenza di riconoscimento e impongono un forte ripiegamento del DNA

Il modello per l'inizio della trascrizione appena descritto è stato stabilito studiando l'azione della RNA polimerasi II e dei suoi fattori generali di trascrizione su stampi di DNA purificato *in vitro*.

Tuttavia il DNA nelle cellule eucariotiche è compattato nei **nucleosomi**, che sono ulteriormente disposti in strutture di ordine superiore di **cromatina**.

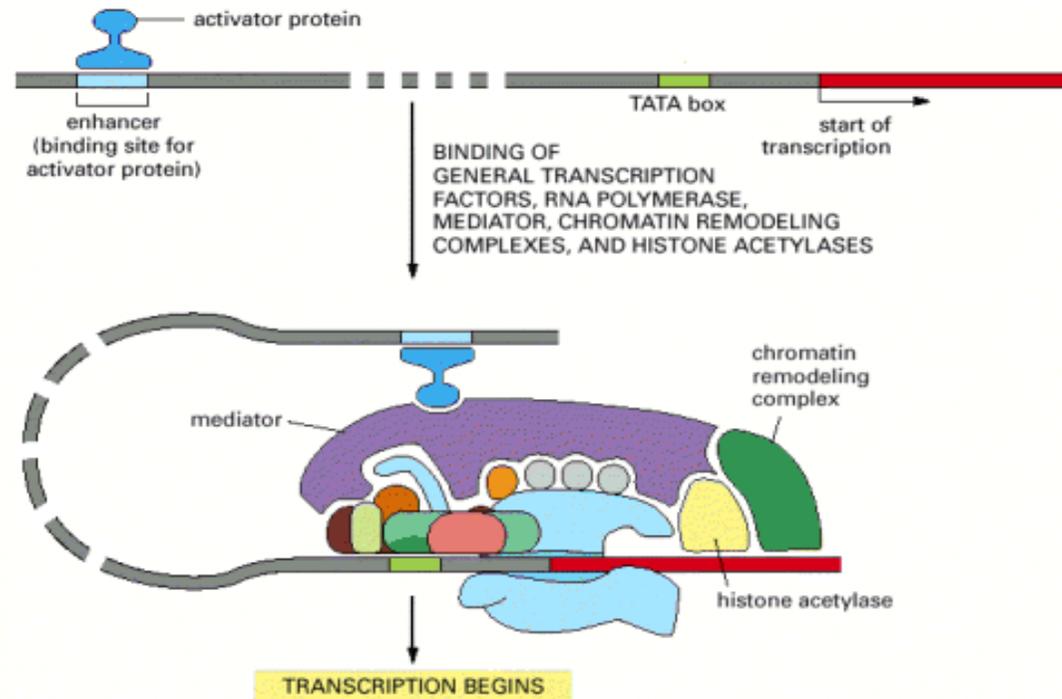
Come risultato l'inizio della trascrizione in una cellula eucariotica è **più complesso** e richiede **più proteine** di quelle necessarie su DNA purificato.



**Per prima** cosa, proteine regolatrici dei geni note come **attivatori trascrizionali** si legano a sequenze specifiche nel DNA e aiutano ad attrarre la RNA polimerasi al punto di inizio della trascrizione.

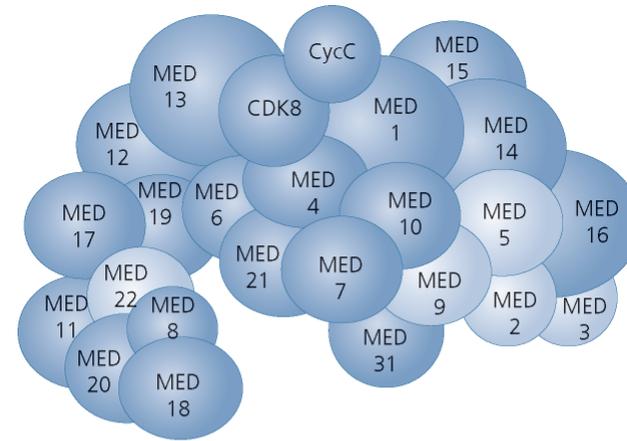
La loro presenza sul DNA è **necessaria** per l'inizio della trascrizione in una cellula eucariotica.

Gli attivatori rappresentano uno dei modi principali in cui la cellula **regola** l'espressione dei suoi geni.

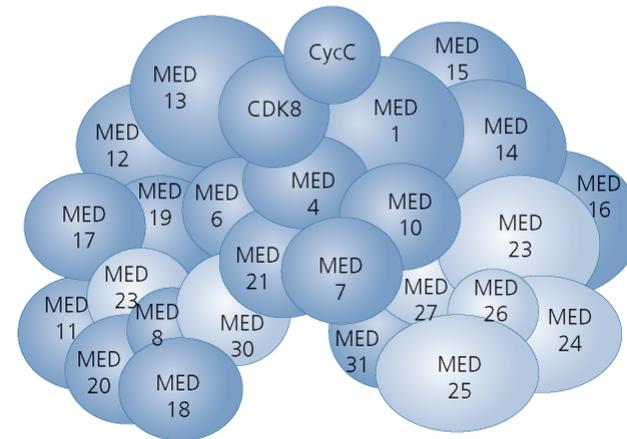


**In secondo luogo** l'inizio della trascrizione eucariotica *in vivo* richiede la presenza di un complesso proteico noto come **Mediatore**, che permette alle proteine attivatrici di comunicare in modo appropriato con la polimerasi II e con i fattori generali di trascrizione

Il Mediatore è composto da molte subunità, alcune delle quali sono conservate dal lievito all'uomo



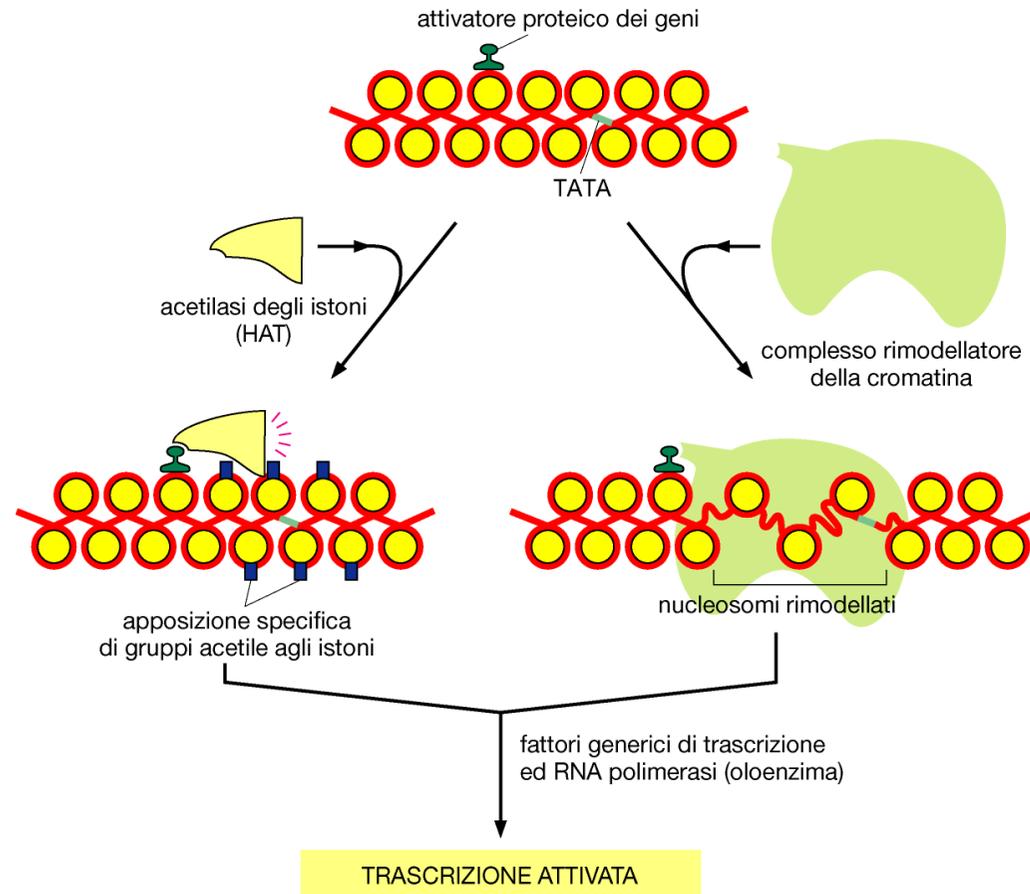
Mediatore del lievito



Mediatore umano

**Infine** l'inizio della trascrizione nella cellula eucariotica spesso richiede il reclutamento locale di enzimi che modificano la cromatina, compresi **complessi di rimodellamento della cromatina ed enzimi modificatori degli istoni**.

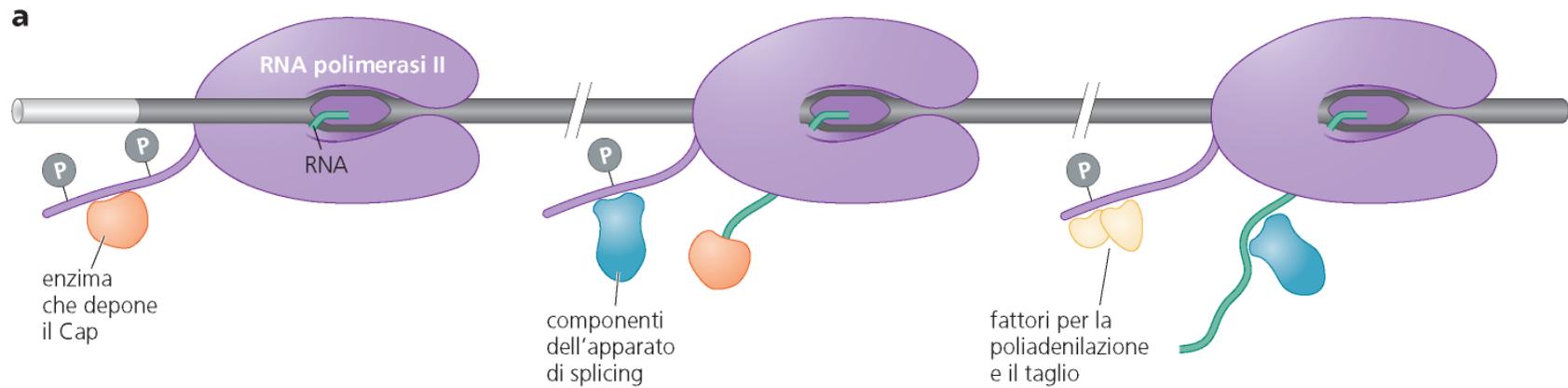
Entrambi i tipi di enzimi possono permettere maggiore accessibilità al DNA presente nella cromatina e in questo modo facilitano l'assemblaggio del macchinario di inizio della trascrizione sul DNA.



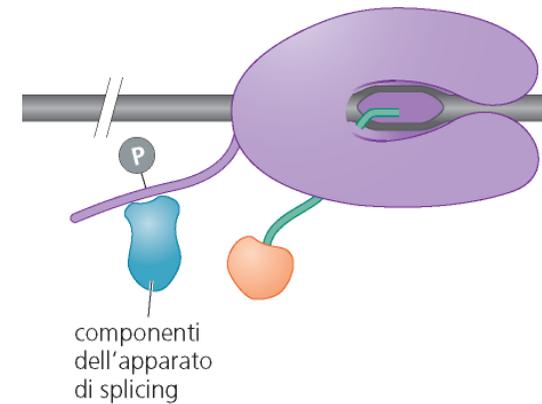
Una volta che la polimerasi si è distaccata dal promotore e ha iniziato la trascrizione, si passa alla **fase di allungamento**.

**La PolIII** si libera dei fattori di inizio, quali il Mediatore ed i fattori generali di trascrizione. Al loro posto vengono reclutati:

- **Fattori di allungamento (es. TFIIIS)**
- **Fattori necessari per la maturazione del mRNA**



Gli enzimi coinvolti nella maturazione dell'mRNA sono reclutati dalla coda CTD della polimerasi II. Diversamente però dai fattori di trascrizione, questi fattori preferiscono forme fosforilate del CTD



Il Fattore **TEFb** è una chinasi ed una fattore di allungamento. Viene reclutata sulla polimerasi dagli attivatori trascrizionali.

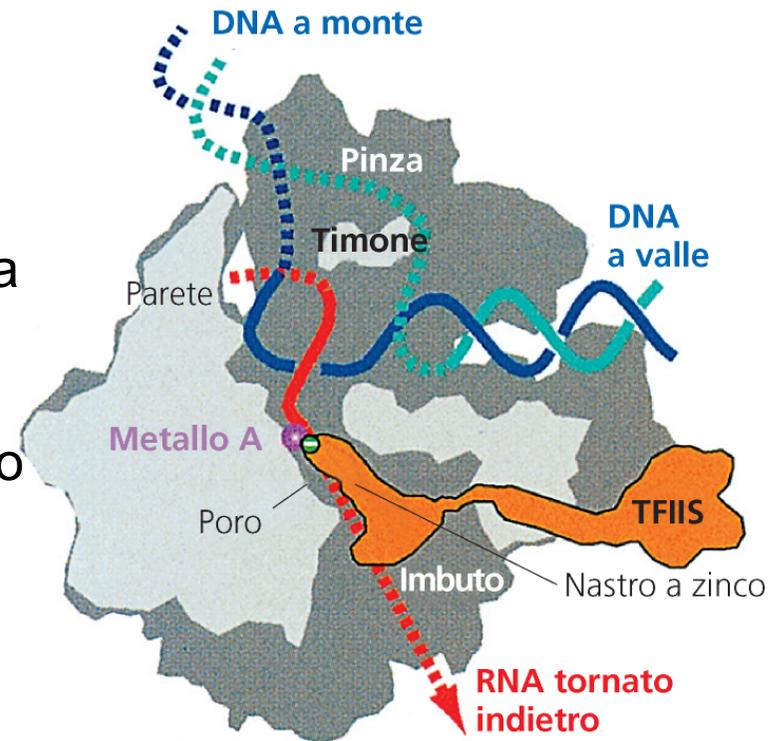
Una volta legata alla PolIII, fosforila la **serina in posizione 2** dei segmenti ripetuti del CTD.

Questa fosforilazione è in diretto collegamento con **l'allungamento**

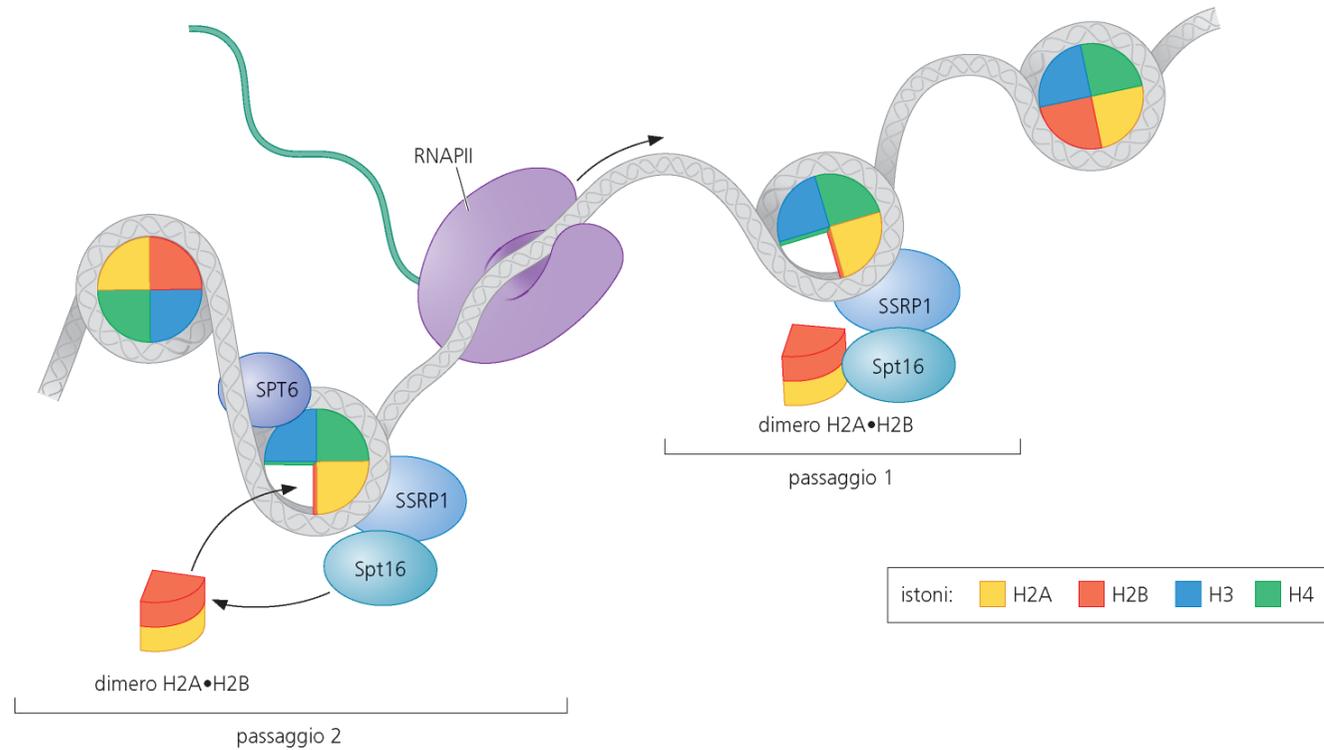
La polimerasi in allungamento non trascrive tutte le sequenze ad una velocità costante, ma si ferma periodicamente, qualche volta per lunghi intervalli, prima di riprendere la trascrizione.

In presenza del fattore TFIIIS, il tempo di fermata della polimerasi in ogni punto viene ridotto.

Inoltre TFIIIS stimola un'attività ribonucleasica intrinseca della polimerasi, operando **editing idrolitico**



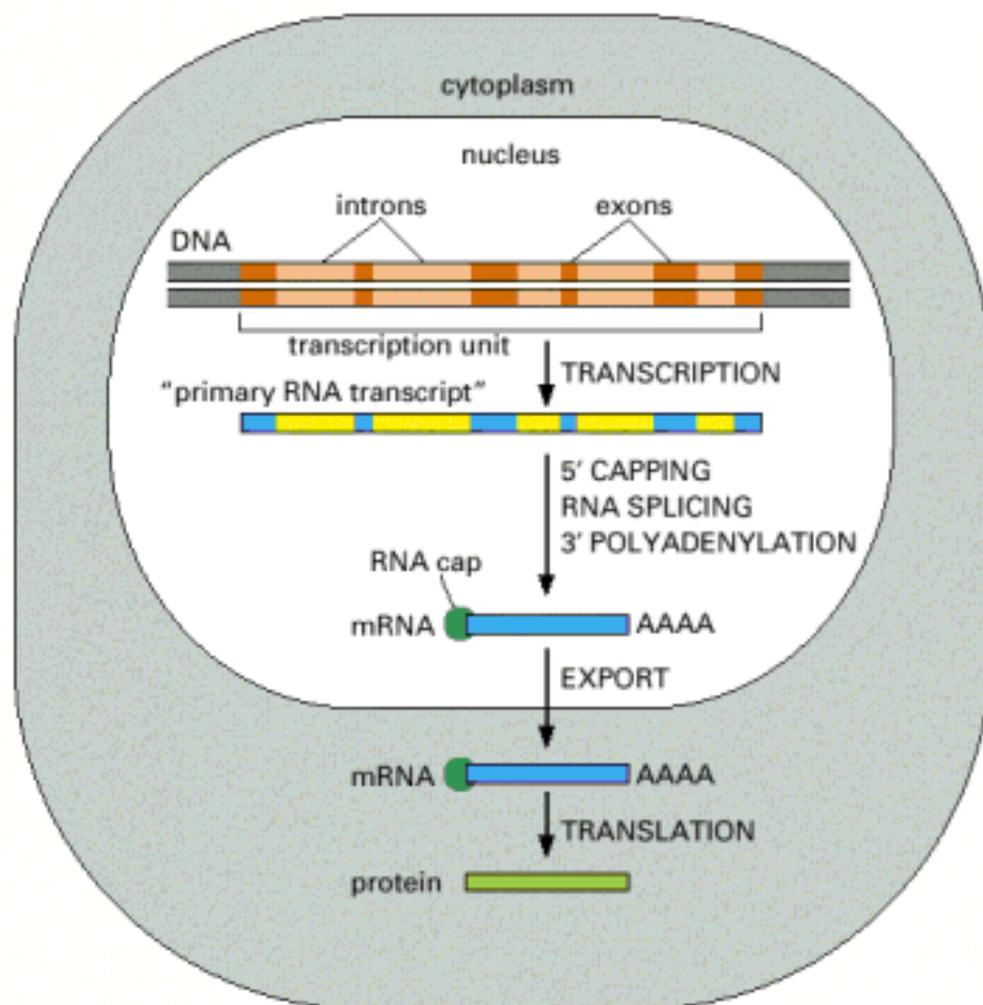
RNA polimerasi II del lievito



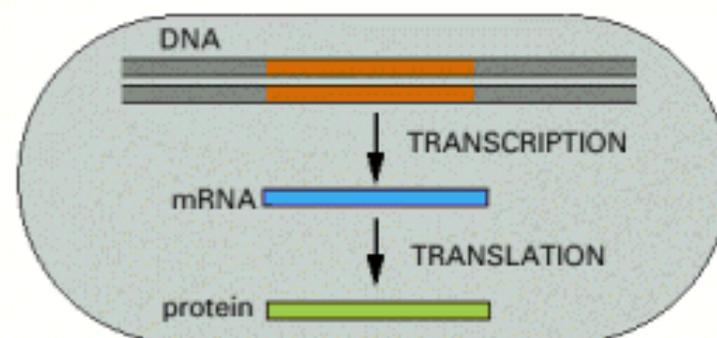
Le polimerasi in fase di allungamento devono risolvere **il problema dell'incontro con gli istoni**

**FACT** (FACilitates Chromatin Transcription, un eterodimero di SSRP1 e Spt16) è capace di smantellare i nucleosomi davanti alla RNA polimerasi che sta trascrivendo e assemblarli nuovamente dietro di essa.

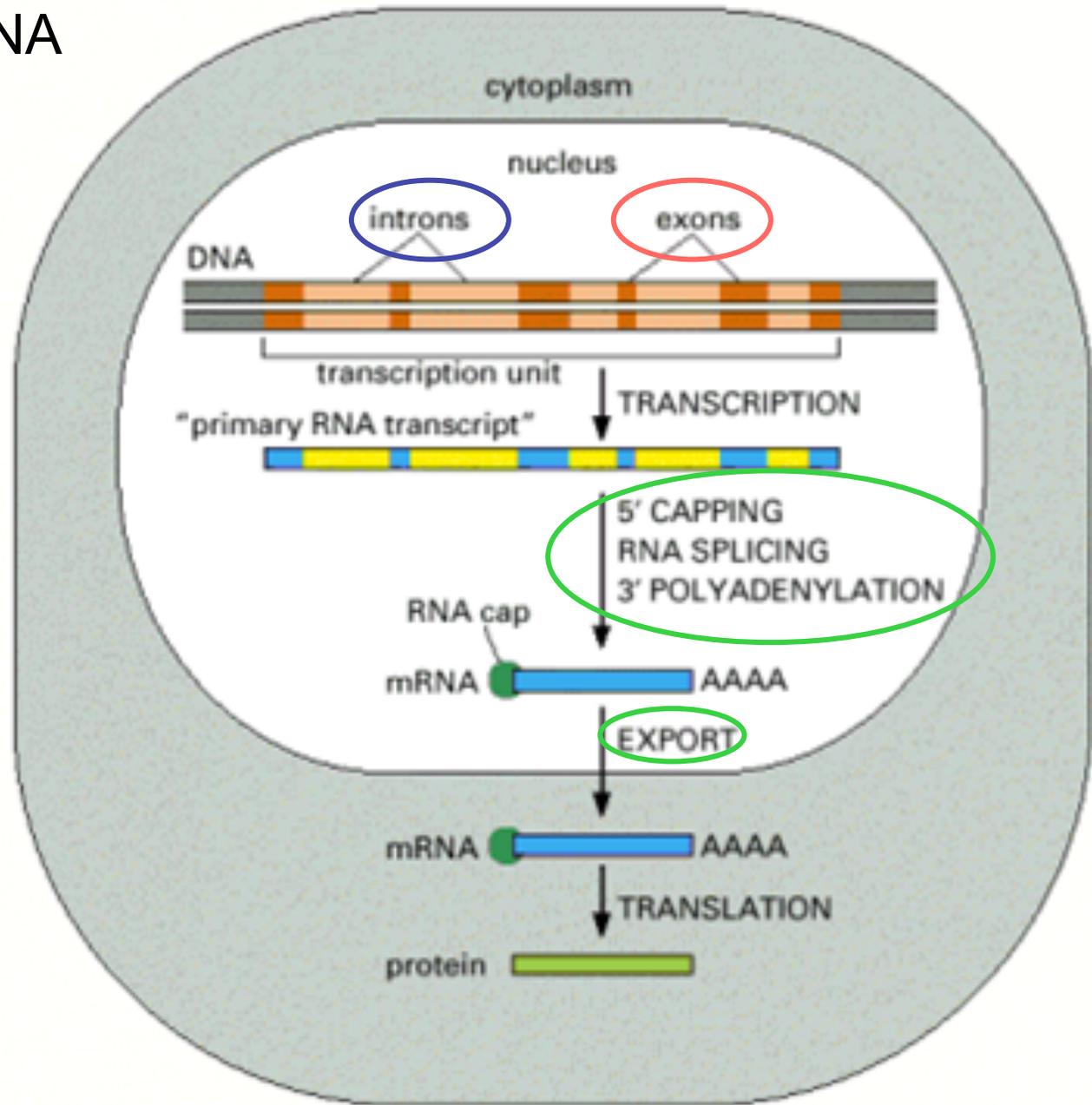
(A) EUCARYOTES



(B) PROCARYOTES



# Maturazione dell'RNA



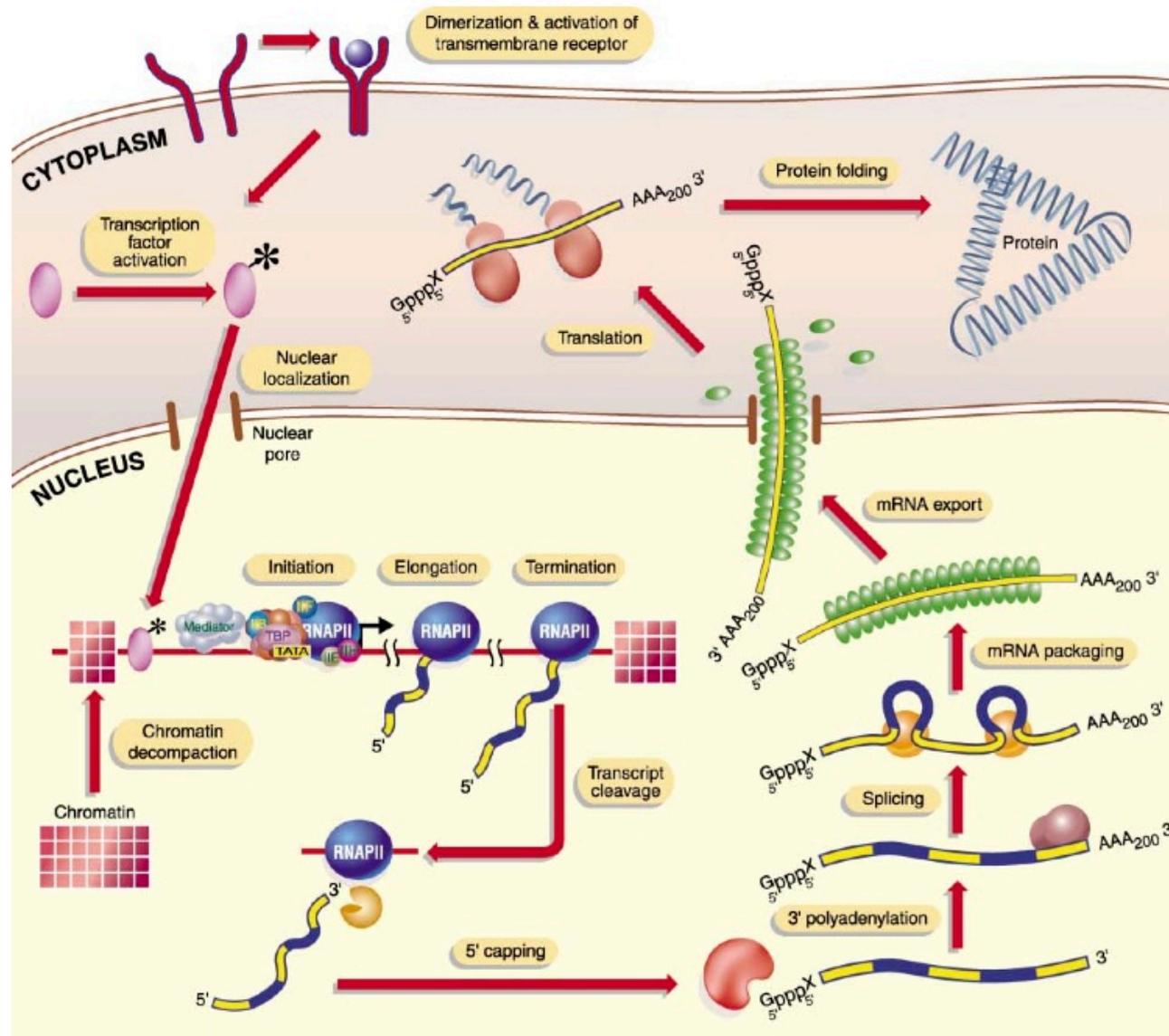


Figure 1. A Traditional View of Gene Expression

The different steps in the pathway from gene to protein have traditionally been viewed as independent events, with each going to completion before the next begins (see text for details).

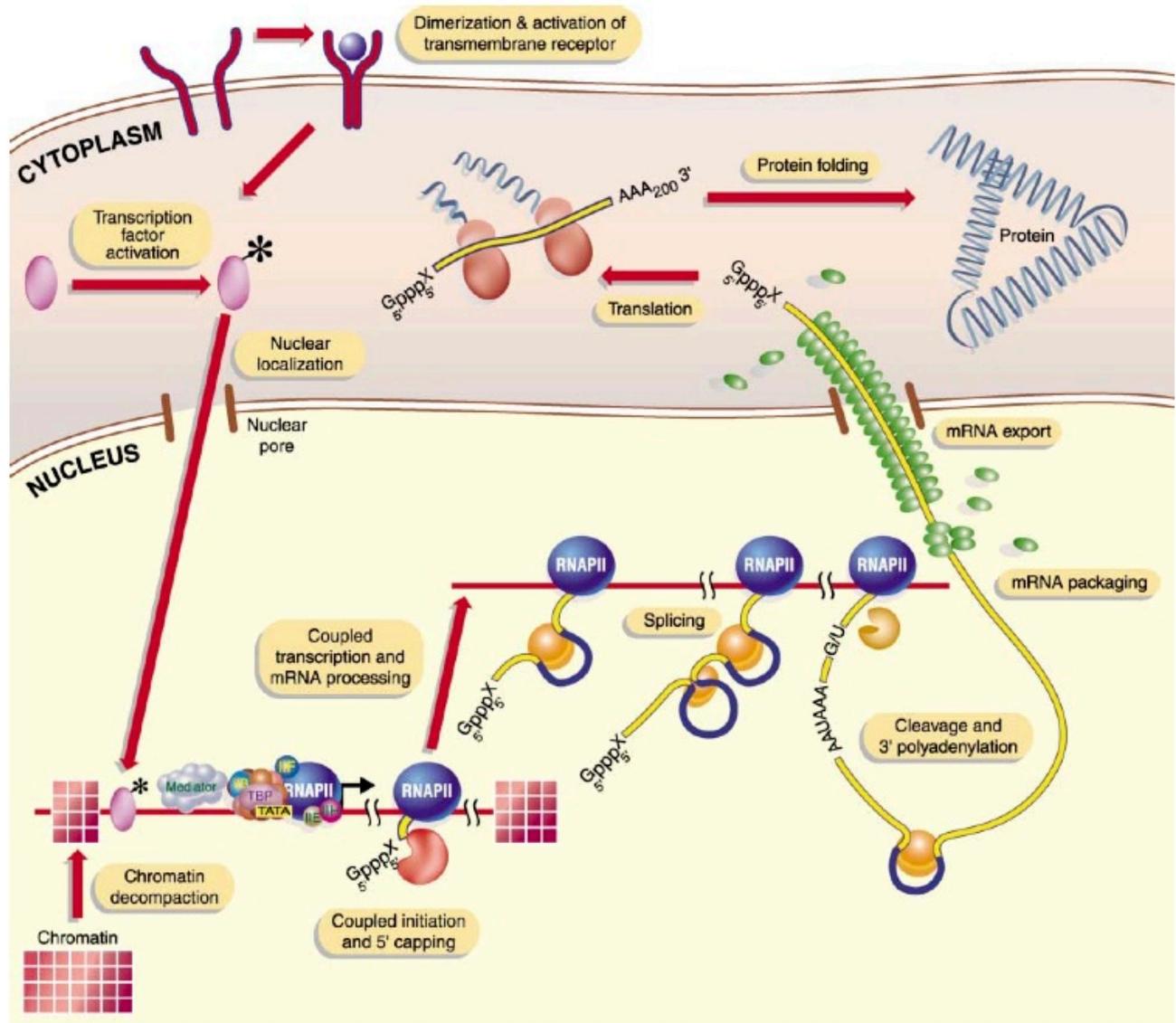
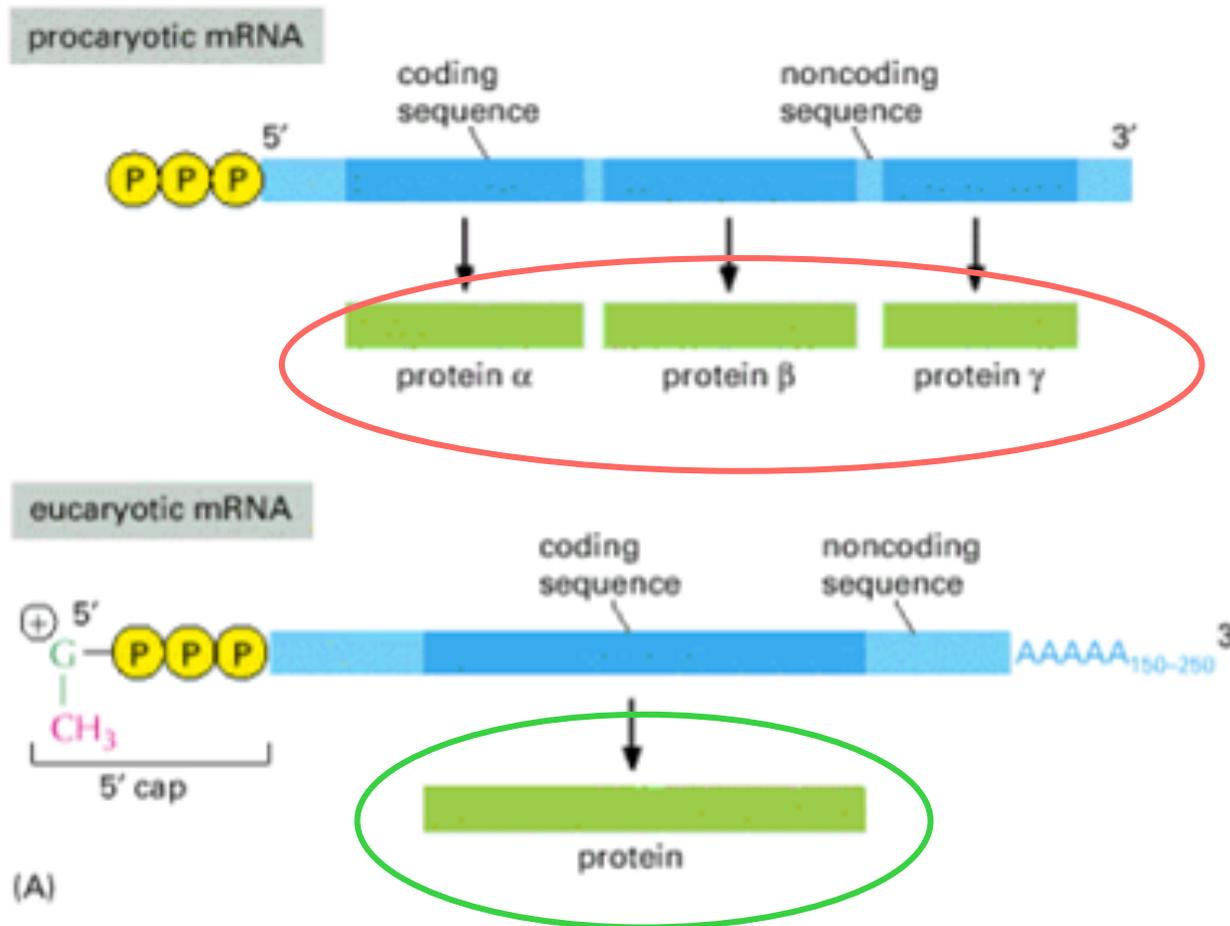


Figure 2. A Contemporary View of Gene Expression

Recent findings suggest that each step regulating gene expression (from transcription to translation) is a subdivision of a continuous process. In this contemporary view of gene expression, each stage is physically and functionally connected to the next, ensuring that there is efficient transfer between manipulations and that no individual step is omitted (see text for details).



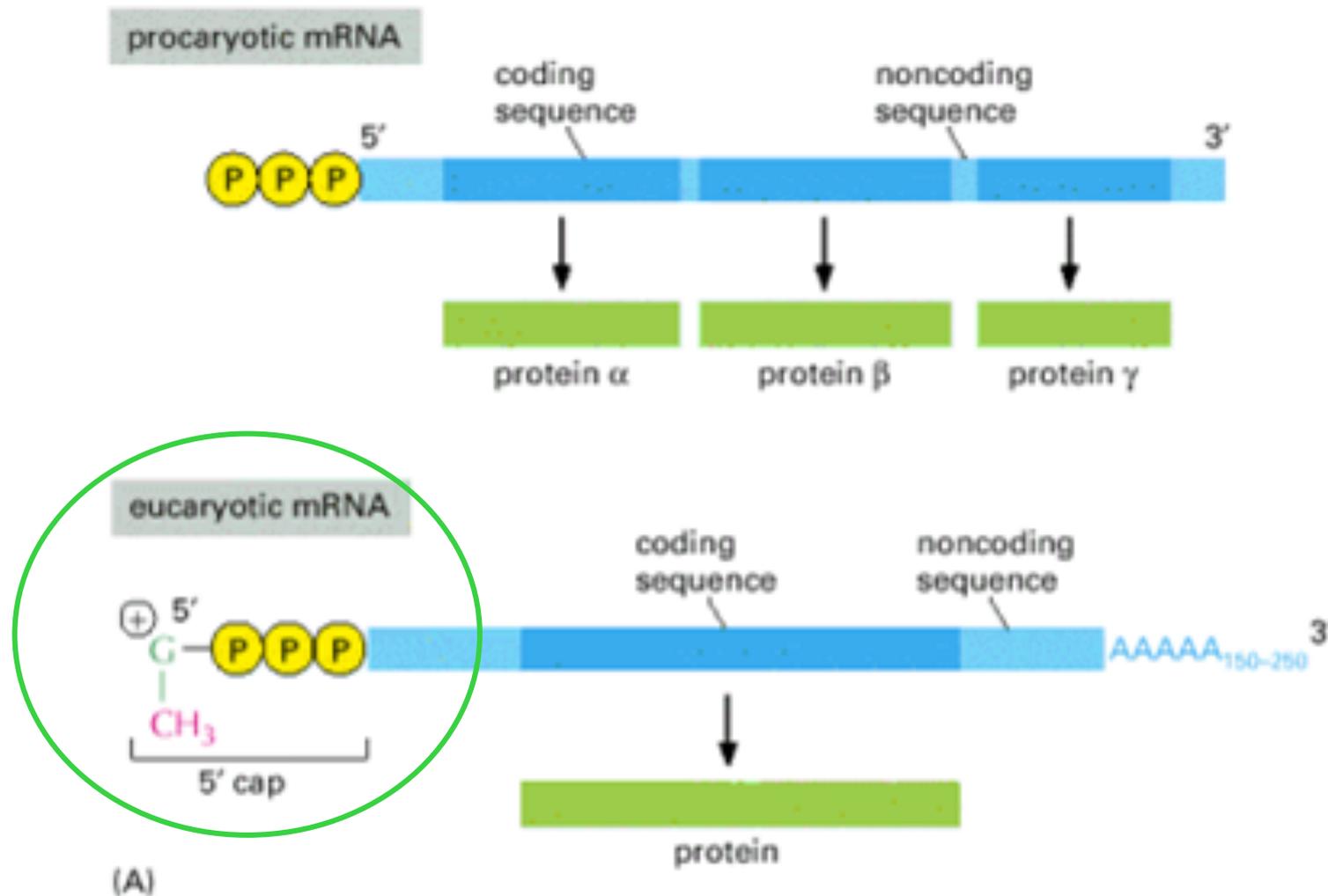
(A)

Confronto tra le strutture delle molecole di mRNA procariotiche ed eucariotiche.

## Capping

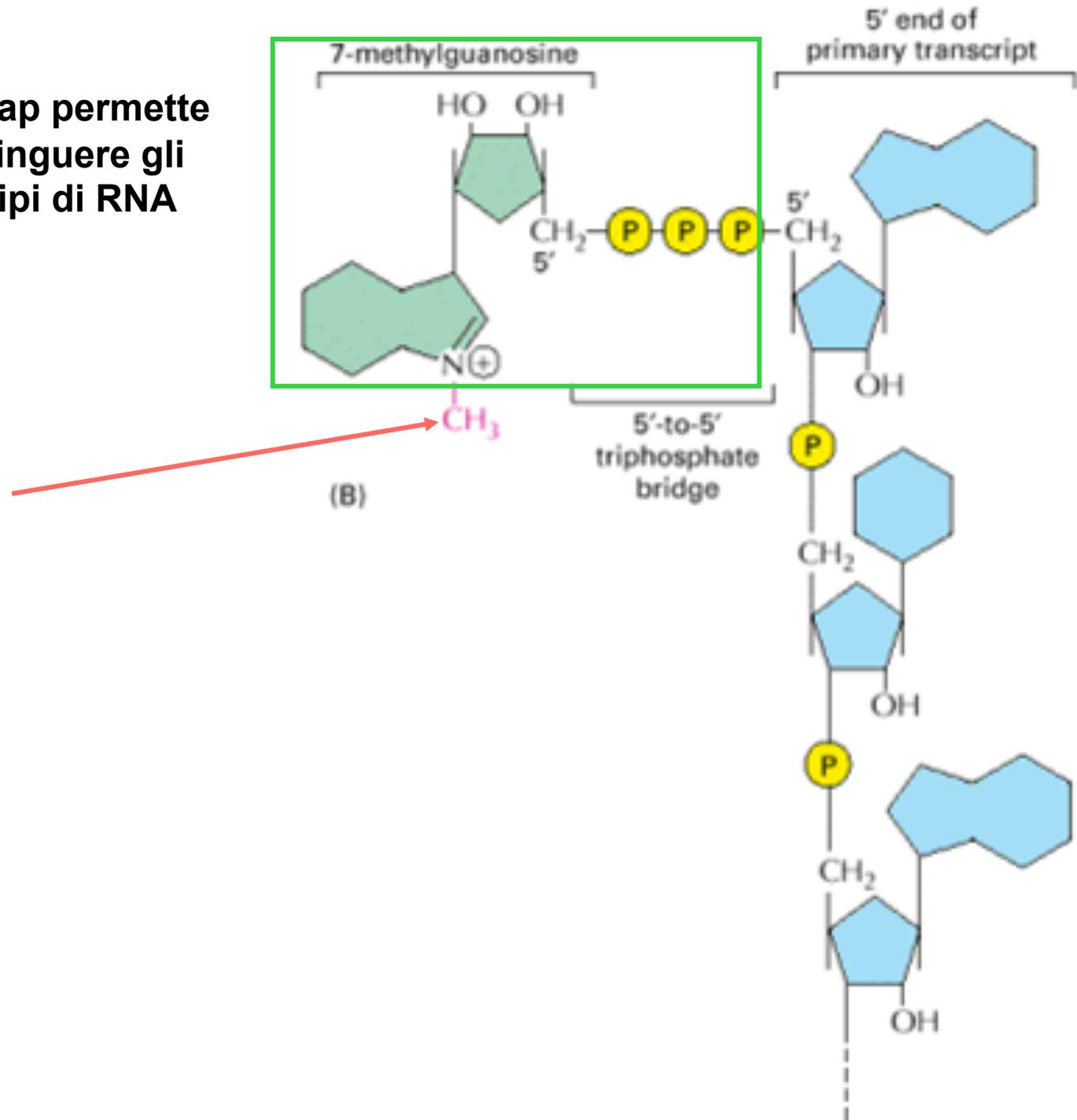
**Il capping dell'RNA è la prima modificazione che avviene sui pre-mRNA eucariotici**

Non appena l'RNA polimerasi ha prodotto 25 nt, l'estremità 5' della nuova molecola di RNA molecola è modificata mediante l'aggiunta di un "cap" che consiste in un nucleotide guanina modificato.



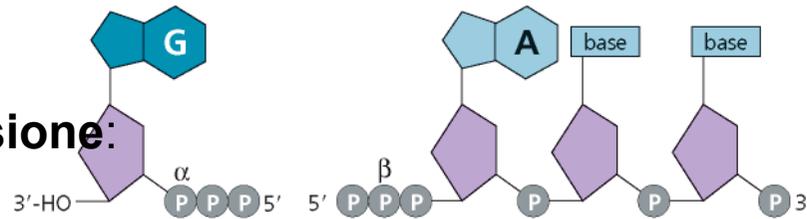
## Capping

La presenza del cap permette alle cellule di distinguere gli mRNA dagli altri tipi di RNA

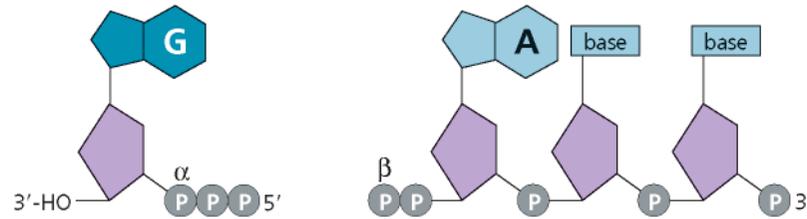


Tre enzimi in successione:

-Una fosfatasi rimuove un fosfato all'estremità 5'

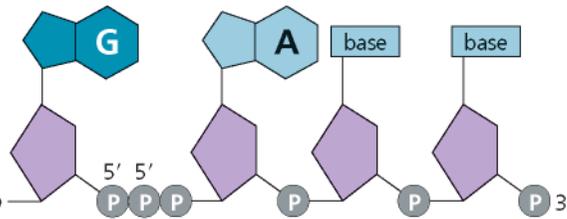


RNA trifosfatasi



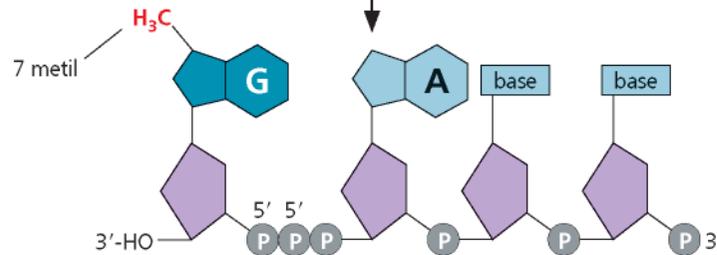
guaniltransferasi

Una guaniltrasferasi aggiunge un GTP

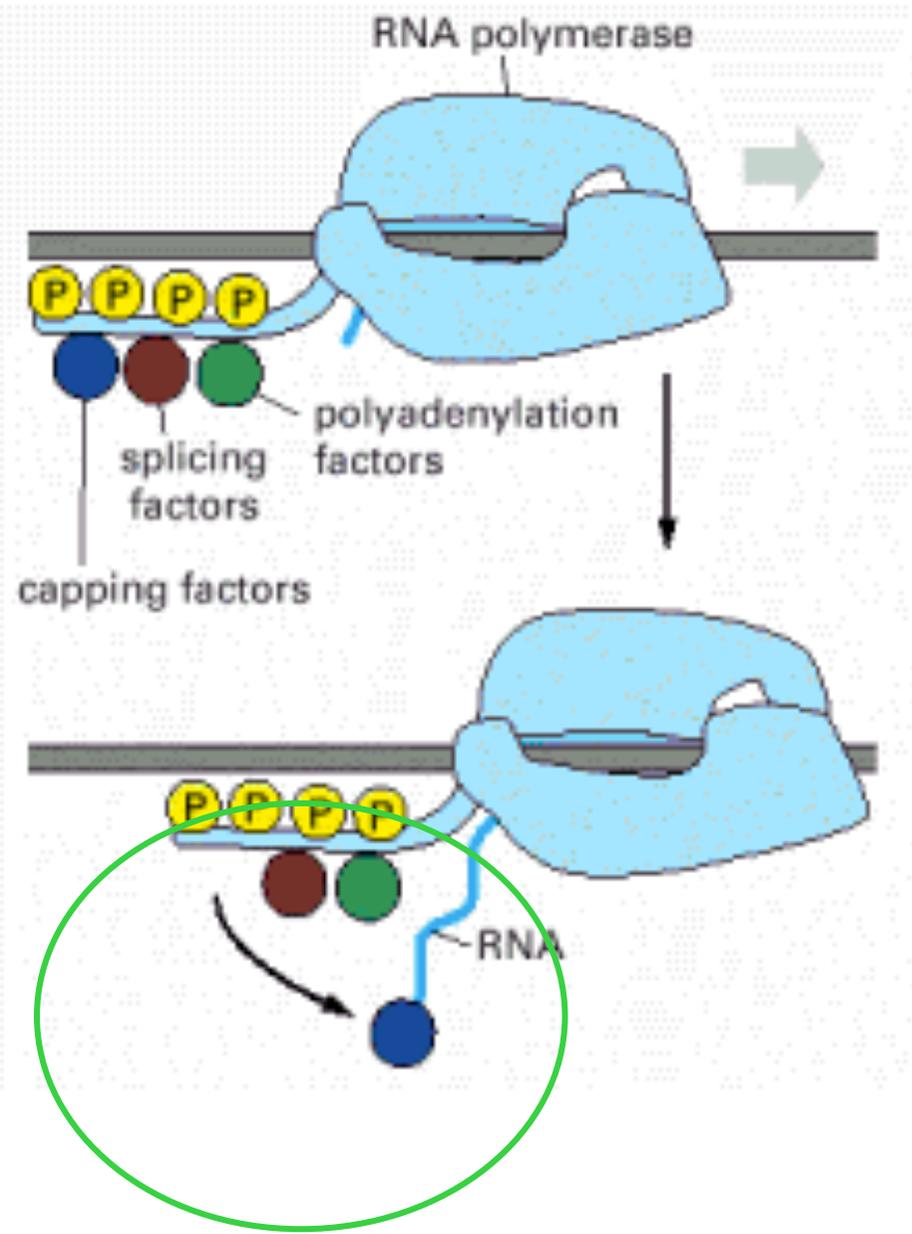
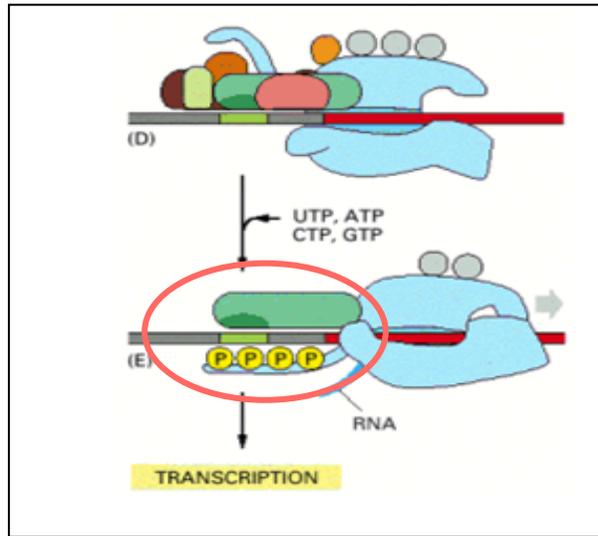


Una metiltrasferasi aggiunge un gruppo metilico alla guanosina

metiltransferasi



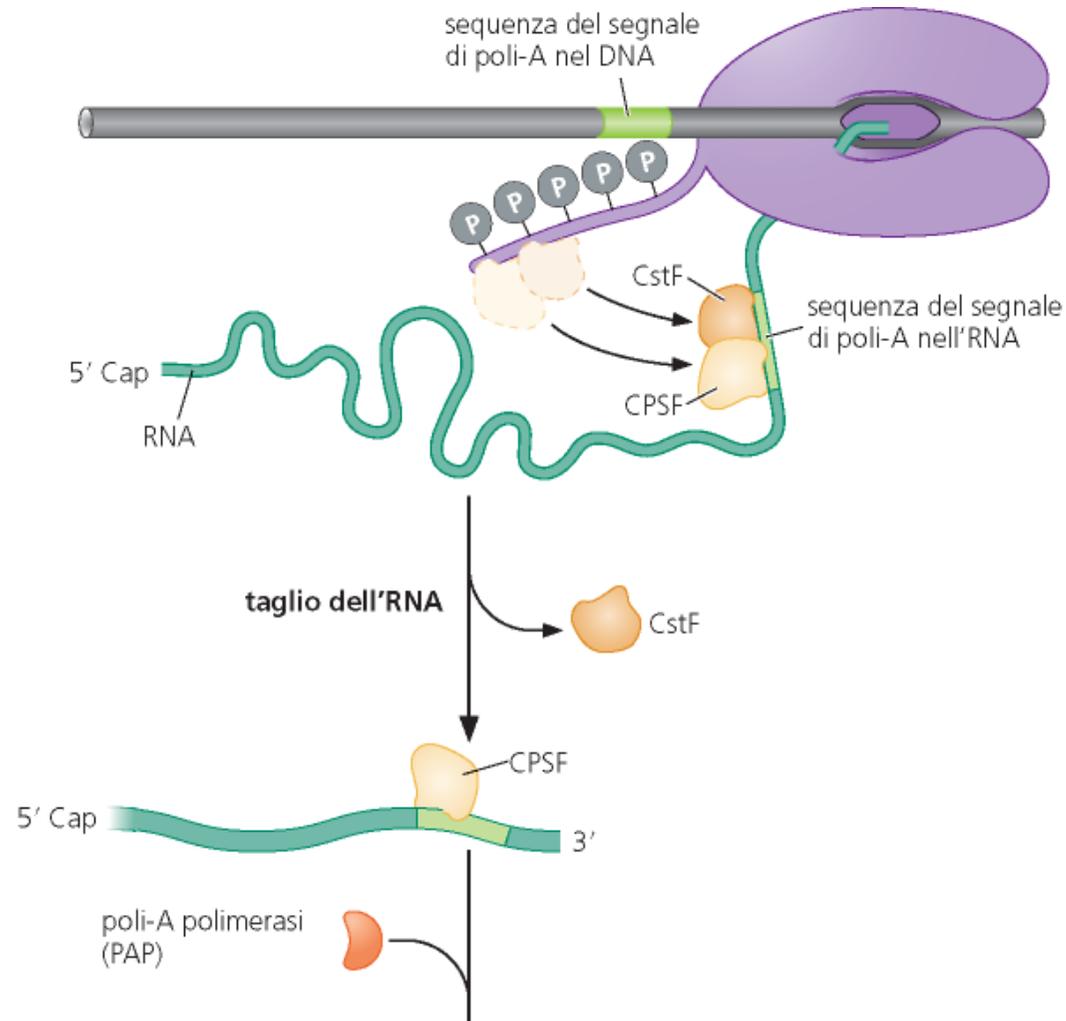
# Capping



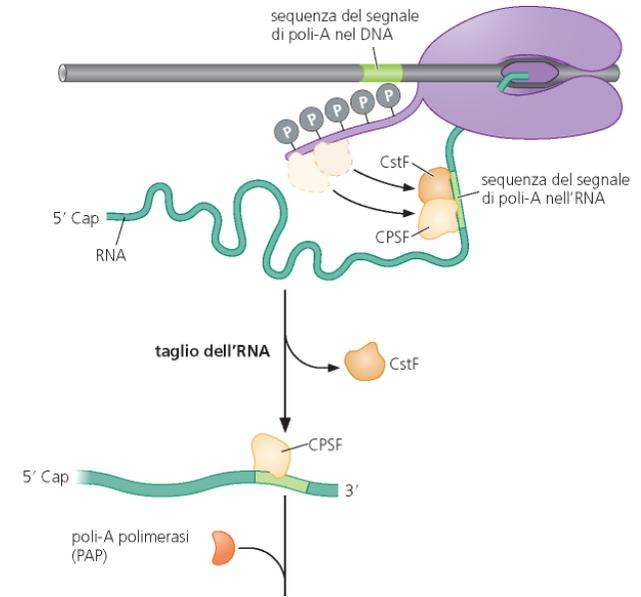
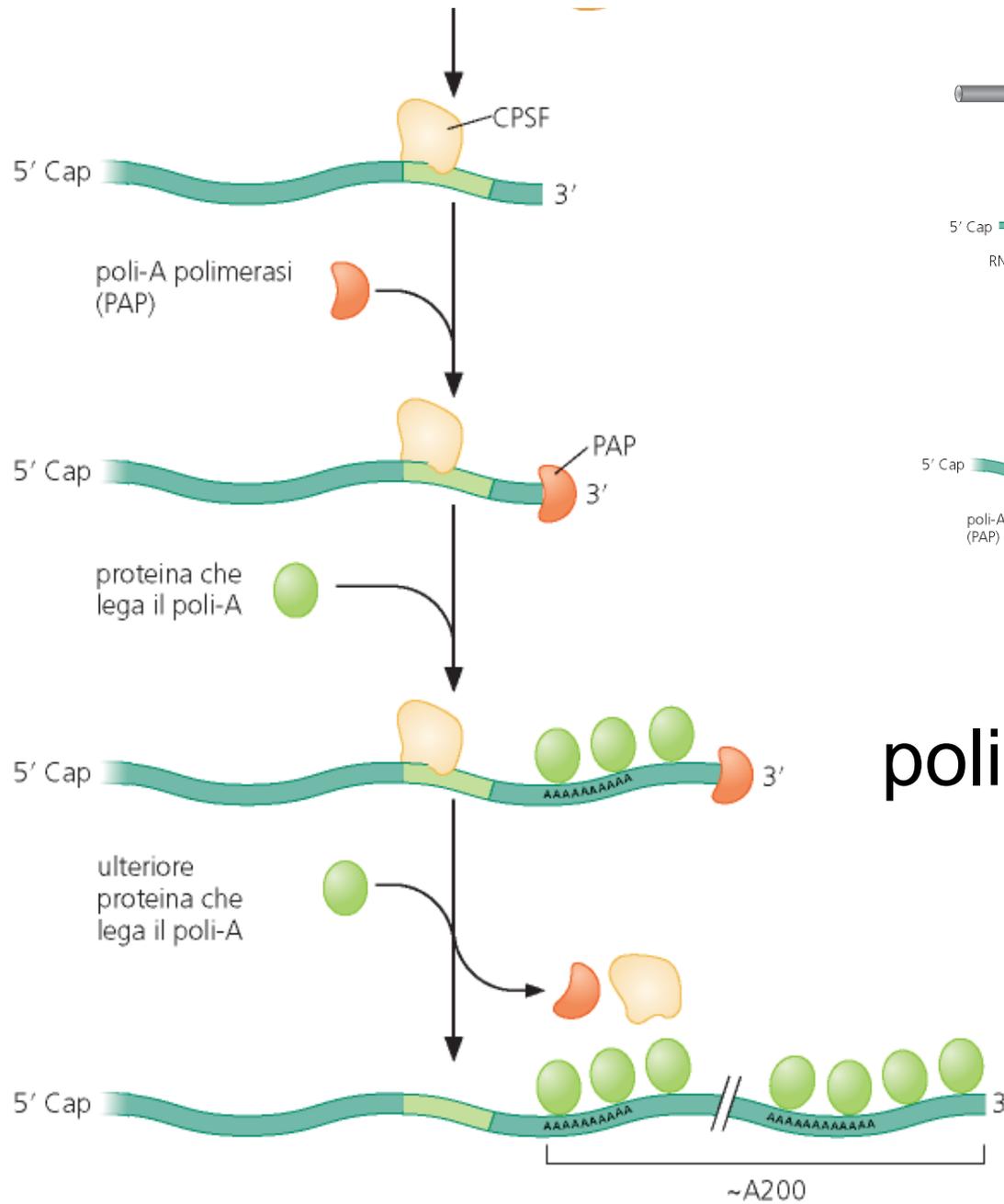
Concetto della “RNA factory”

# Poliadenilazione dell'estremità 3'

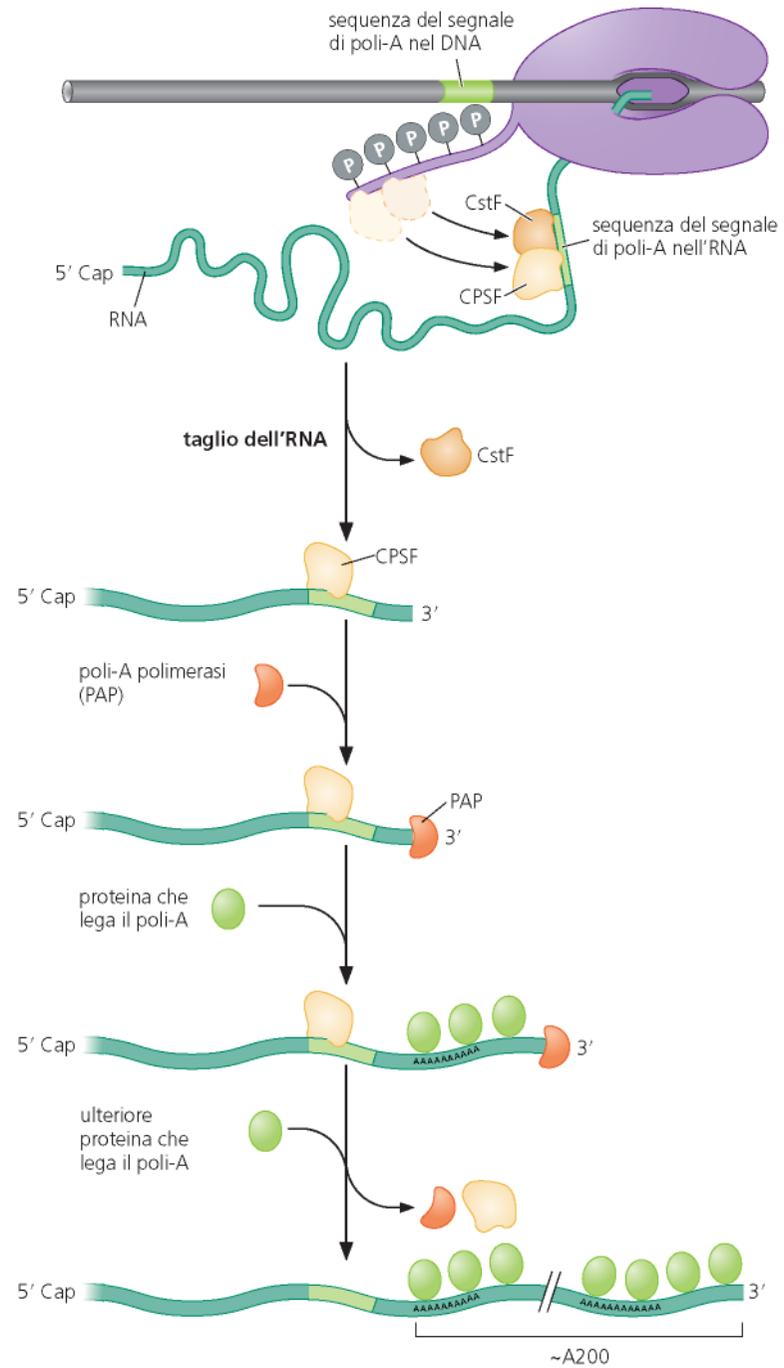
(strettamente connessa con la terminazione della trascrizione)



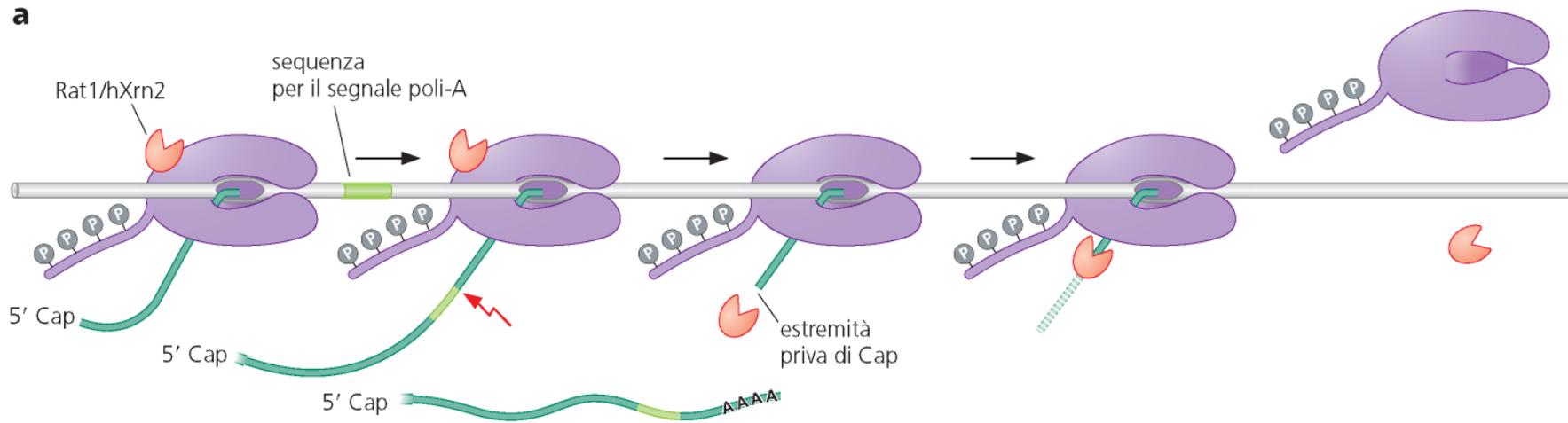
taglio



## poliadenilazione

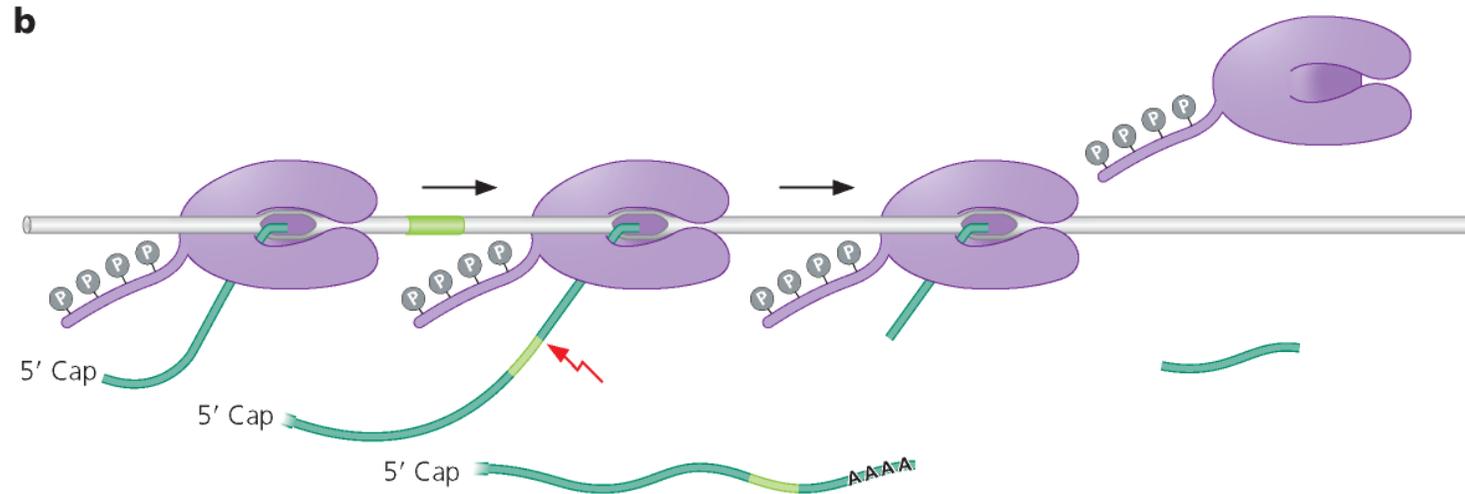


# Due modelli per la terminazione della trascrizione



“a siluro”

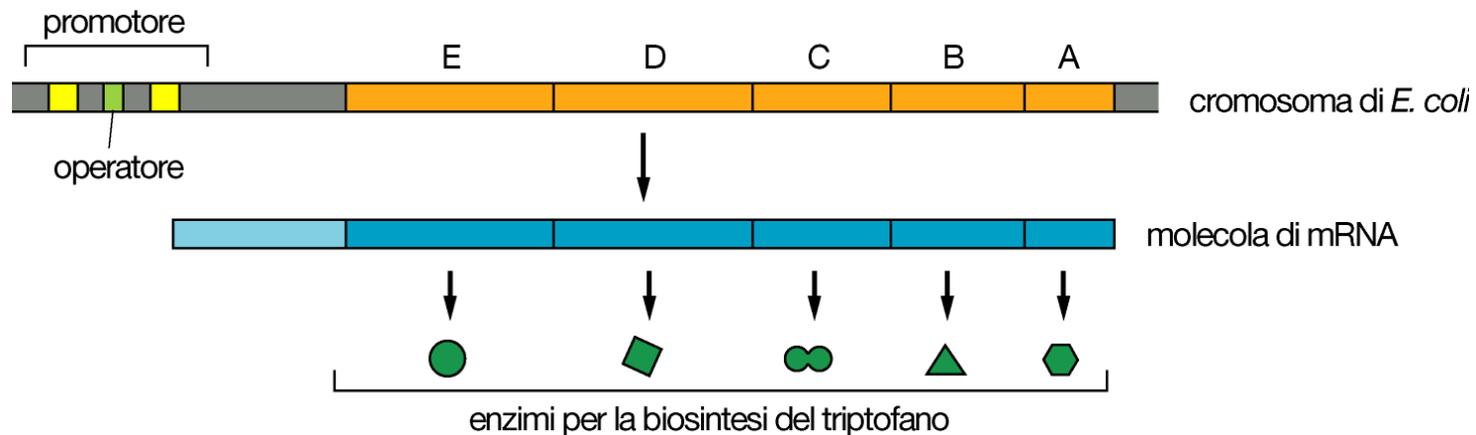
# Due modelli per la terminazione della trascrizione



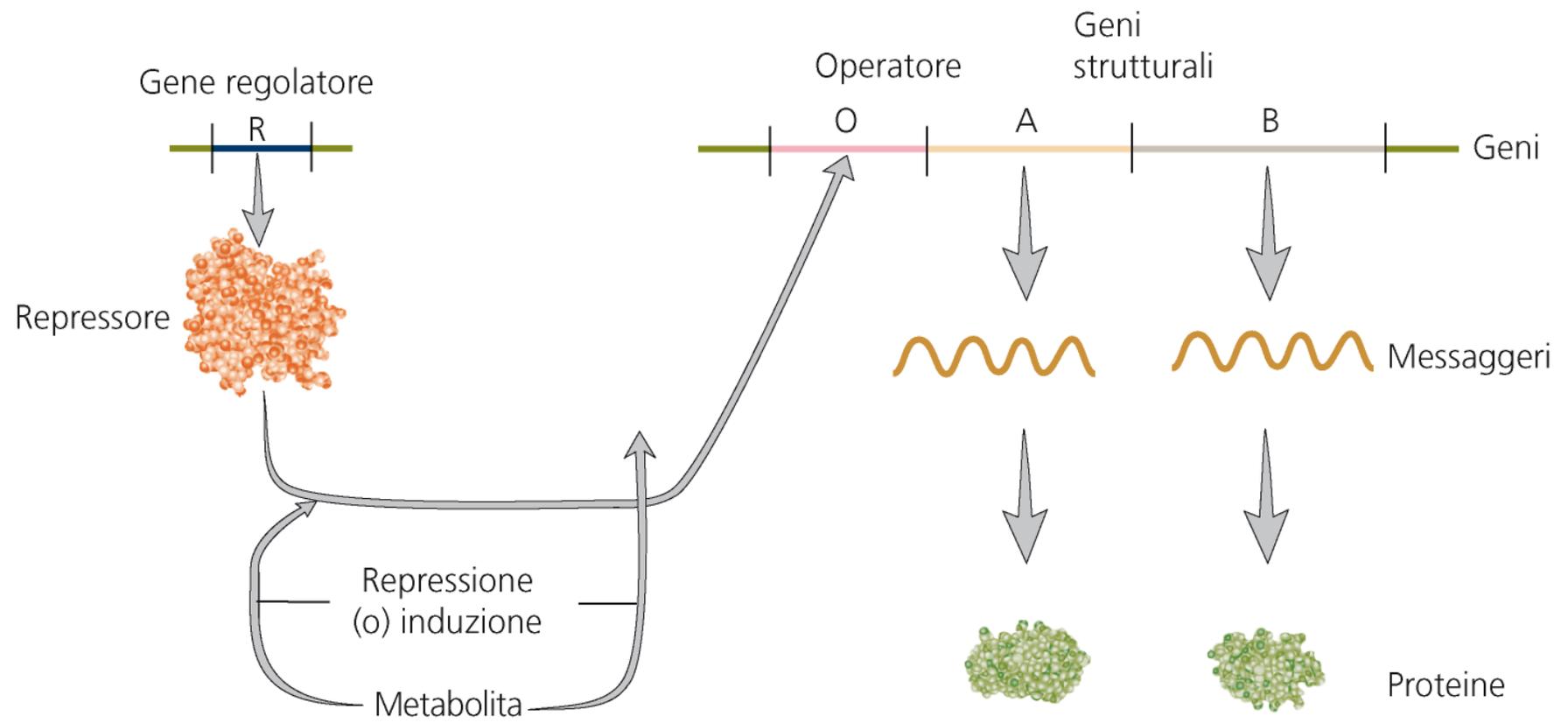
“allosterico”

Nei batteri un intero gruppo di geni può stare sotto il controllo di un unico promotore (trascritto policistronico). Ciò permette di coordinare la loro espressione.

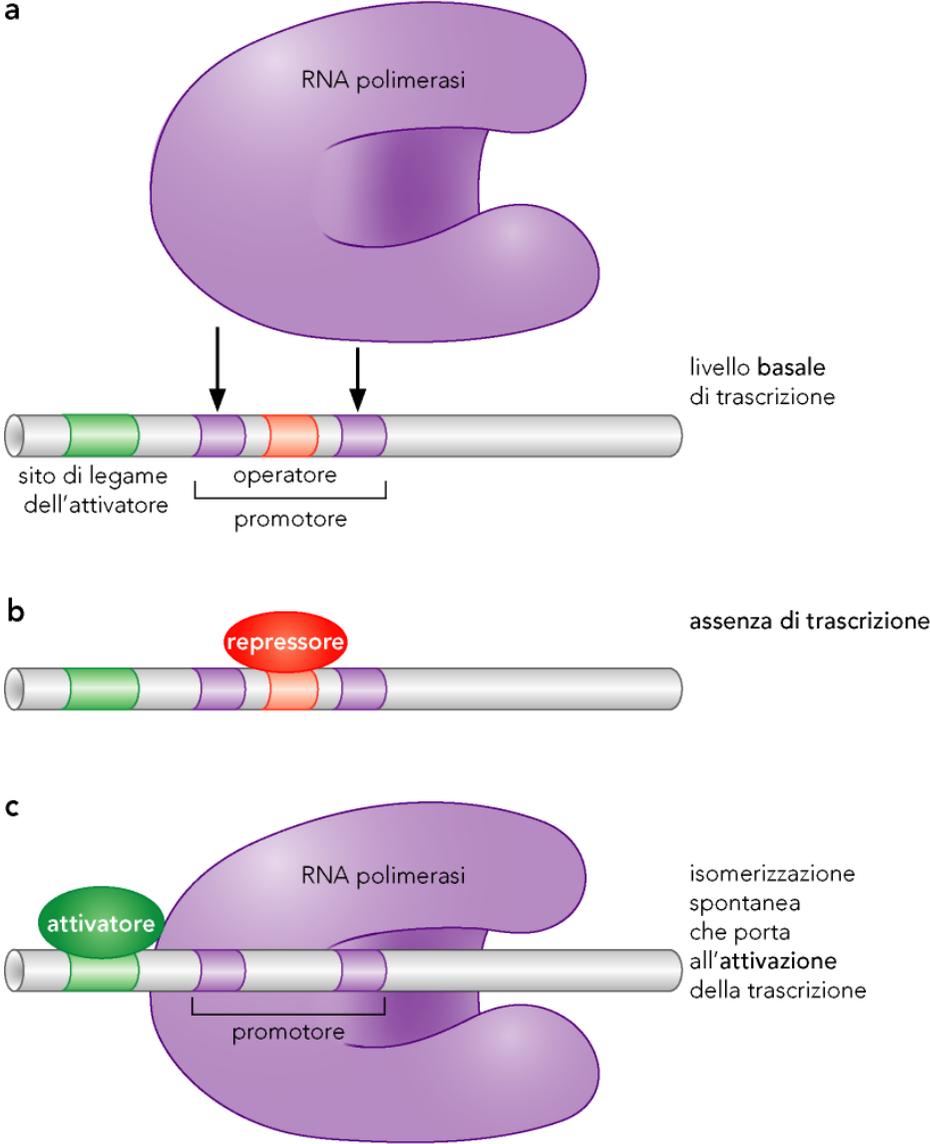
Un gruppo così organizzato è chiamato **operone**.



L'espressione dell'operone del triptofano è controllata da un **operatore**.

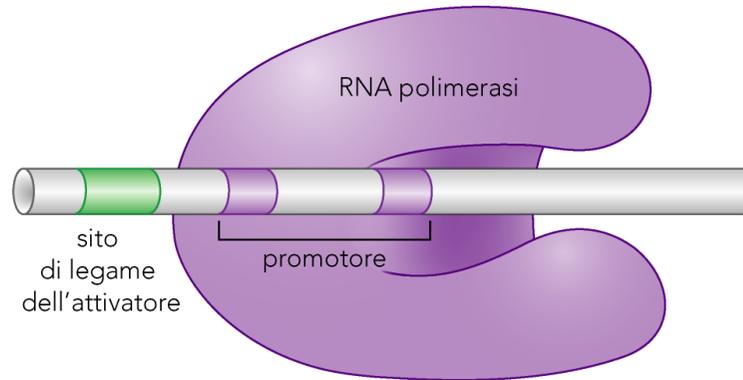


# Attivazione per mezzo del reclutamento della polimerasi



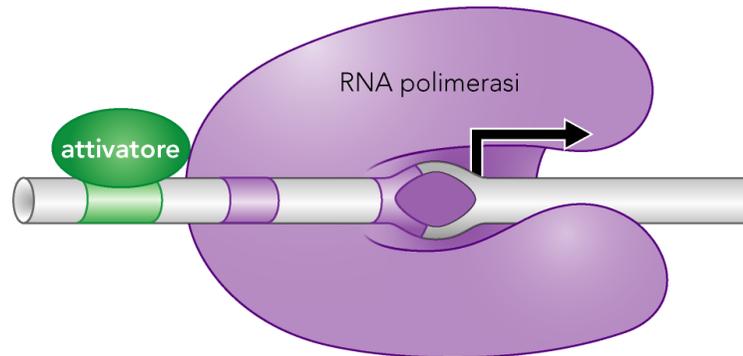
# Attivazione allosterica dell'RNA polimerasi

a



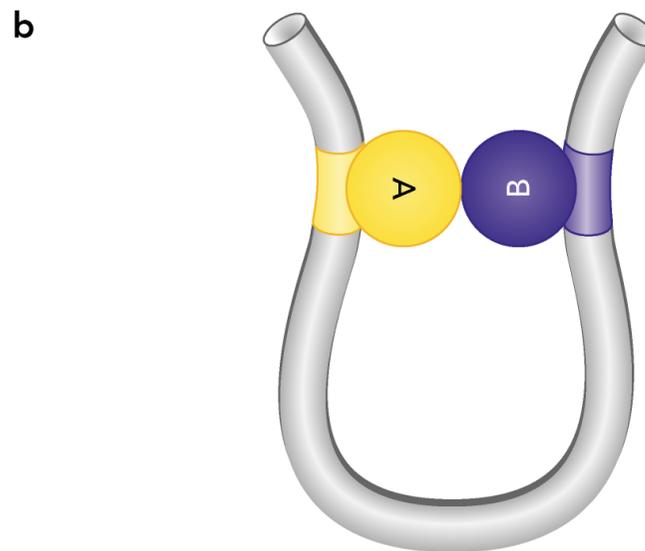
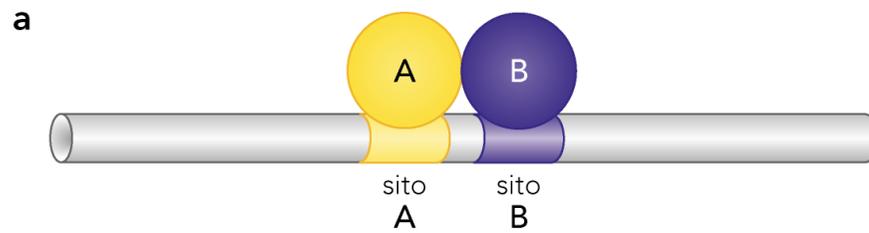
non si ha isomerizzazione spontanea e quindi non c'è trascrizione

b

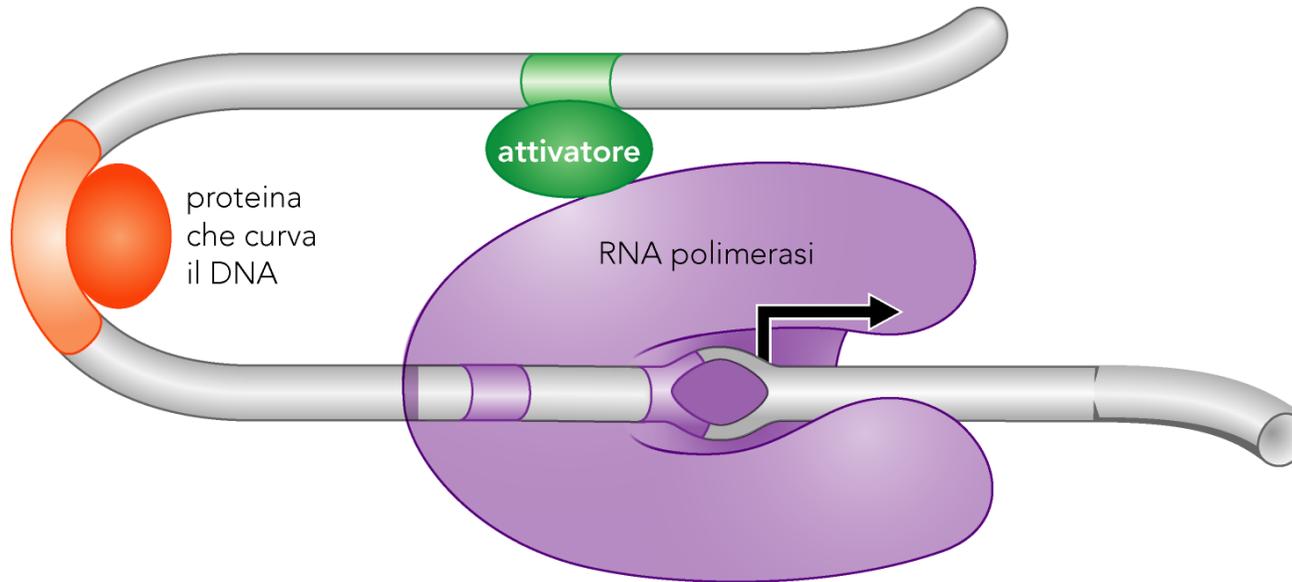


attivazione della trascrizione

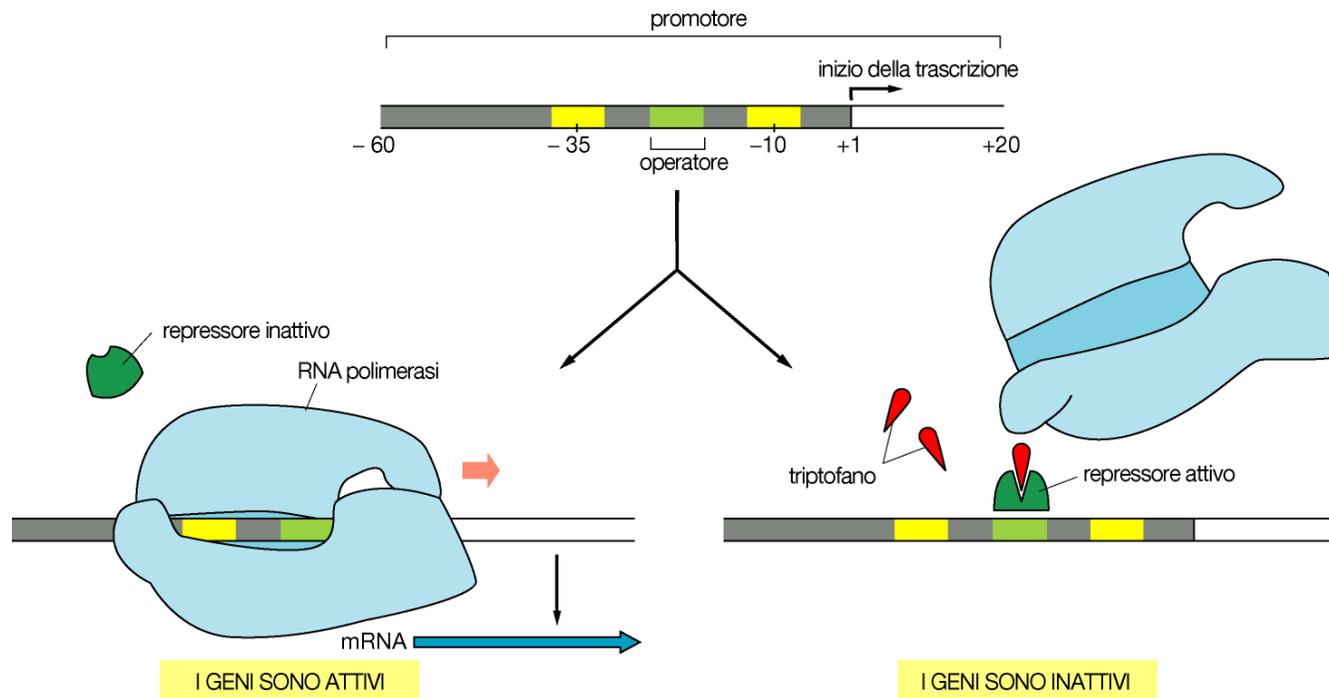
# Interazione tra proteine legate al DNA



Una proteina che curva il DNA può facilitare l'interazione tra due proteine di legame al DNA distanti fra loro

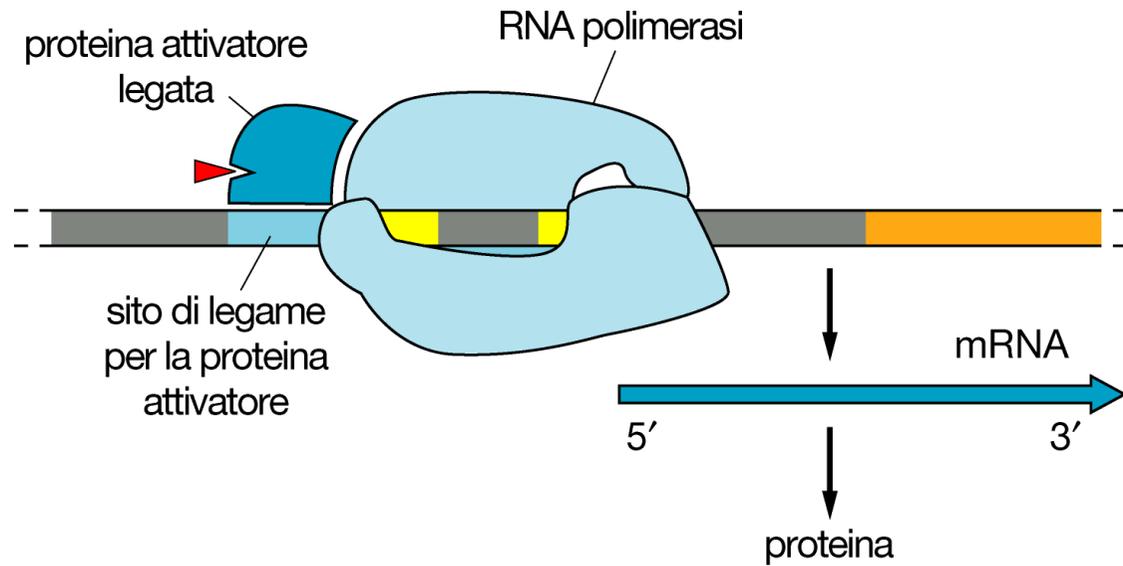


L'operatore dell'operone del triptofano è legato da una proteina detta **repressore del triptofano**

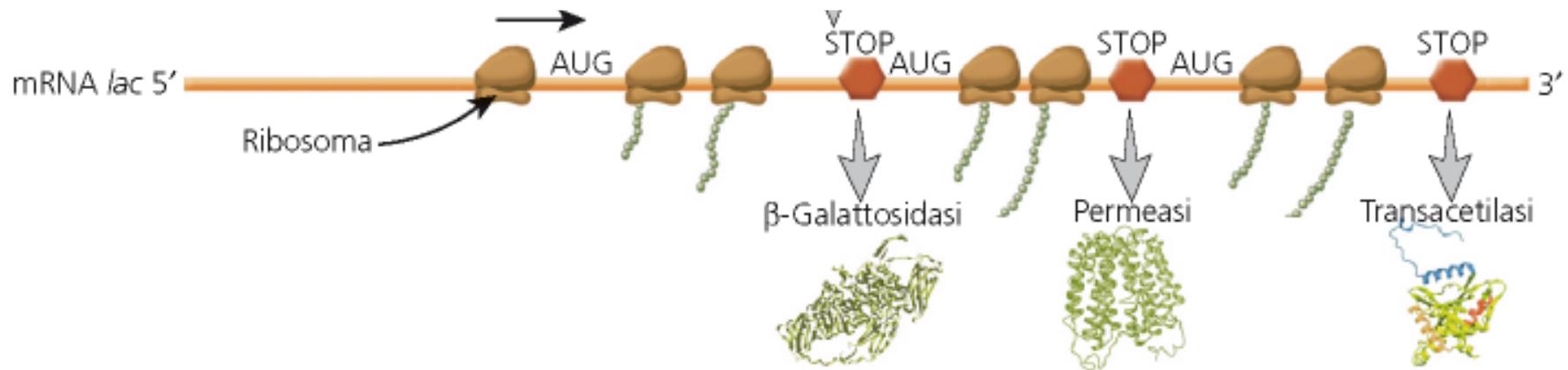
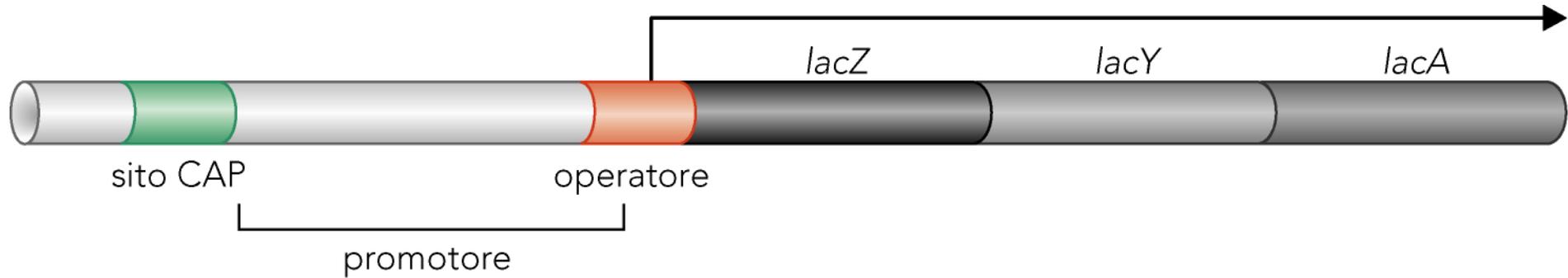


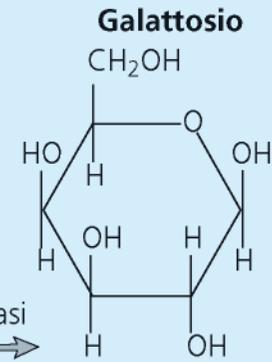
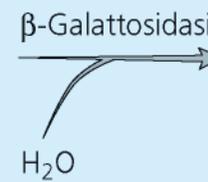
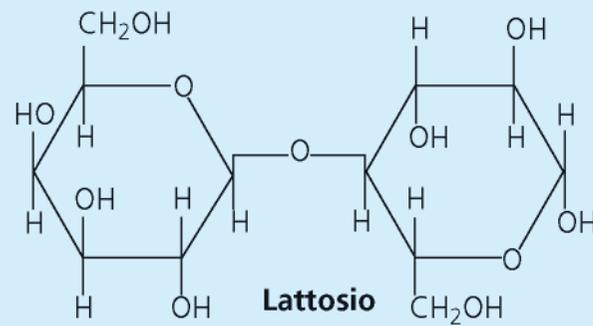
In presenza di triptofano il repressore è attivo e lega l'operatore

# L'espressione genica può essere regolata anche tramite **attivatori**

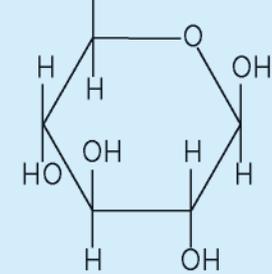


# L'operone Lac

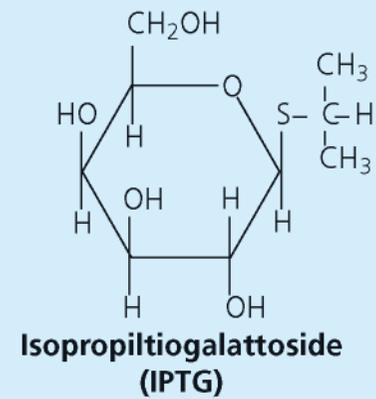
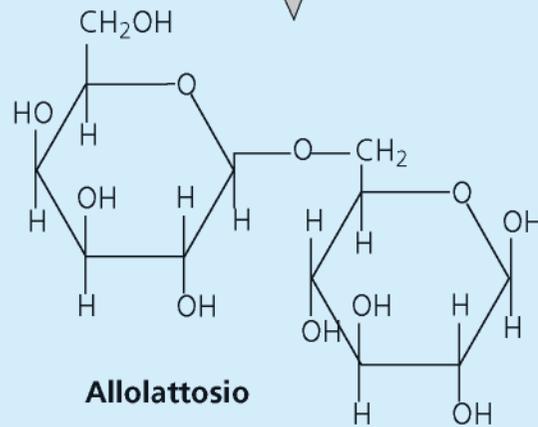
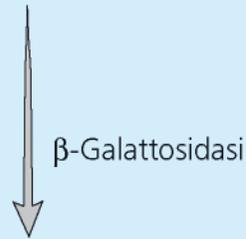




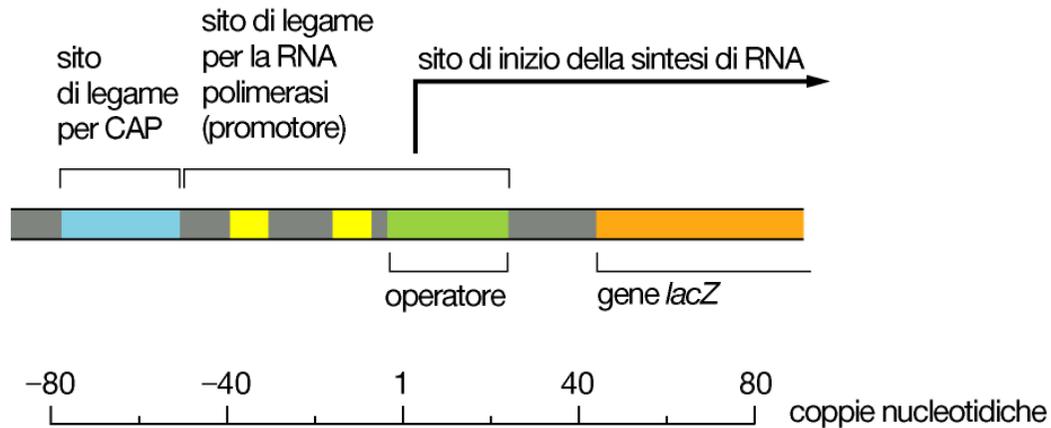
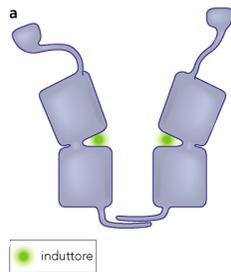
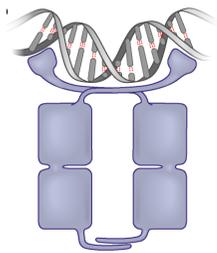
+  
CH<sub>2</sub>OH



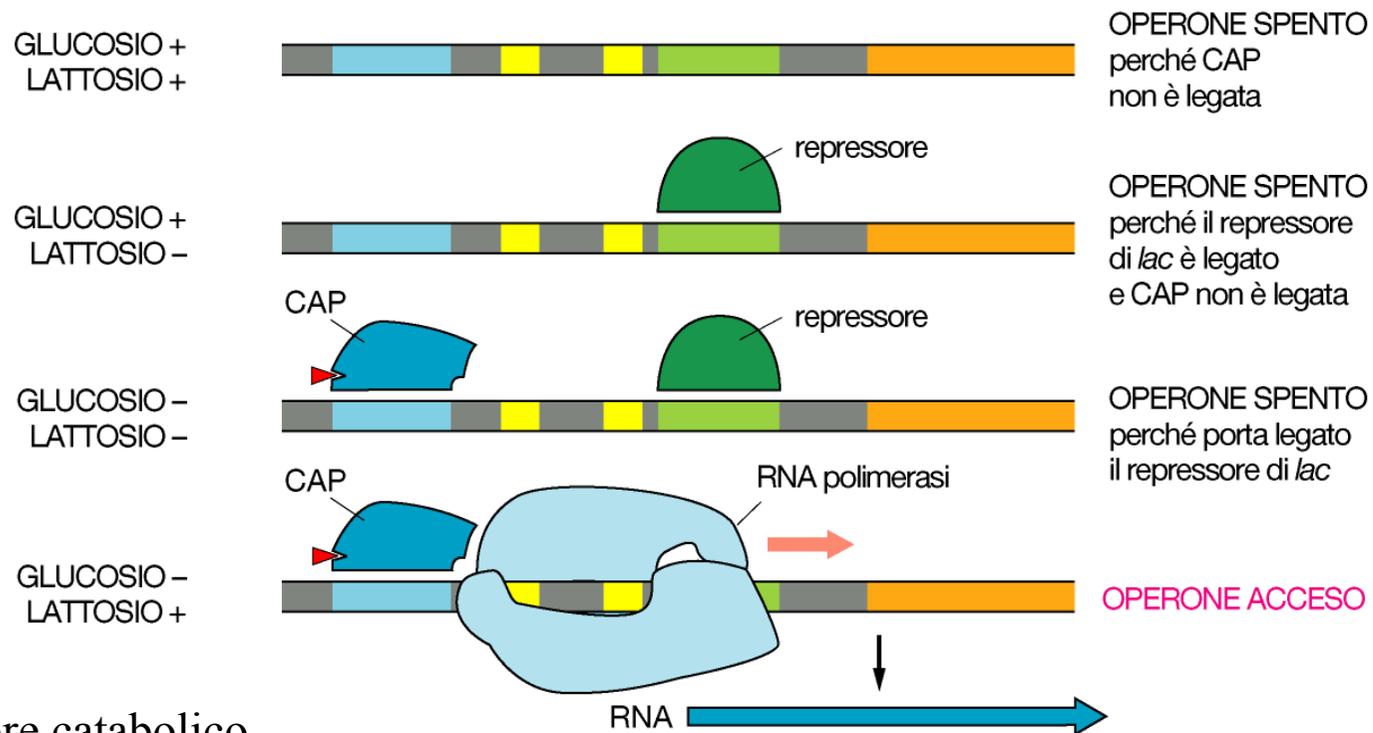
**Glucosio**



# Un attivatore ed un repressore controllano l'operone *lac*

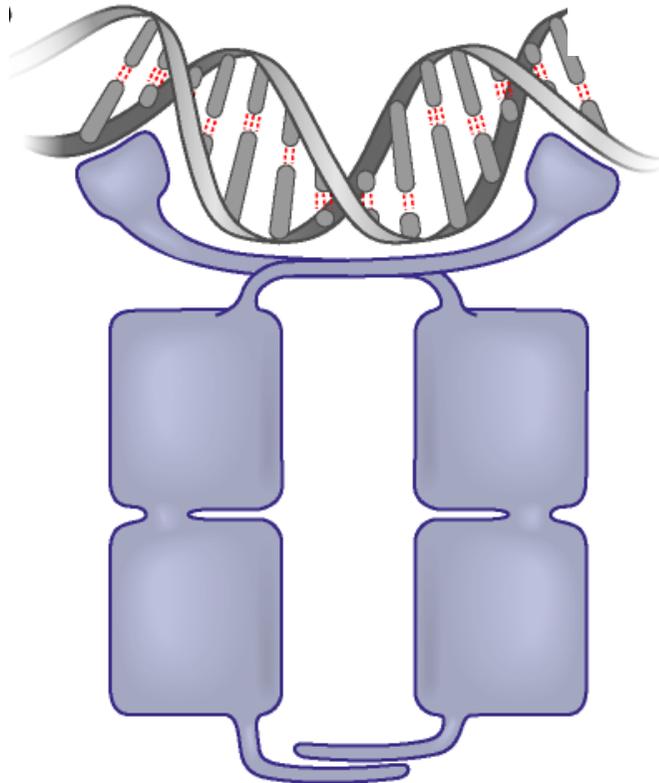
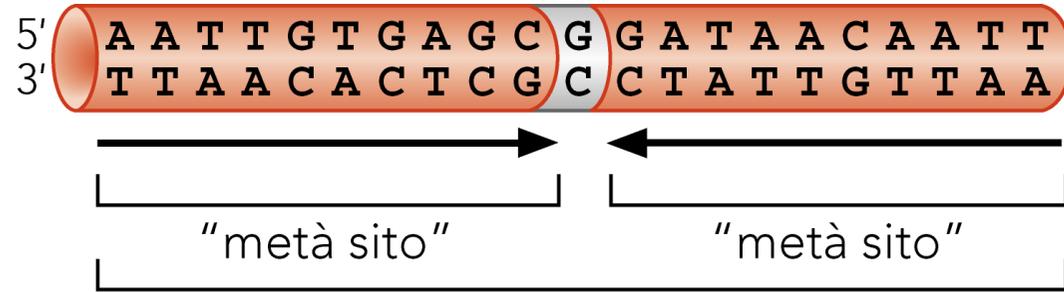


## Repressore *lac*

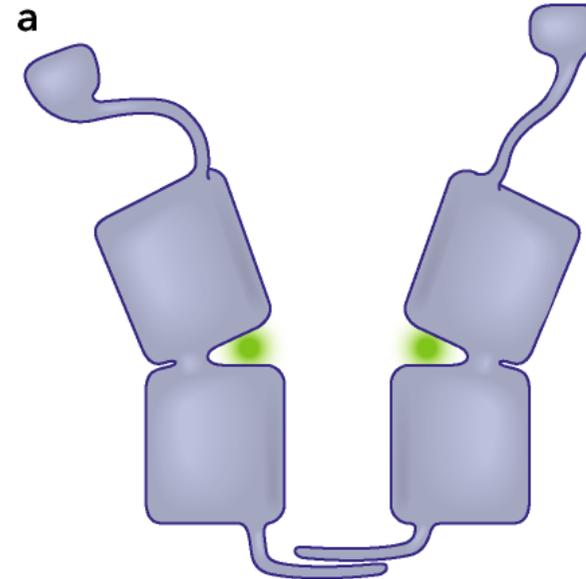


CAP = attivatore catabolico

# Repressore *lac*



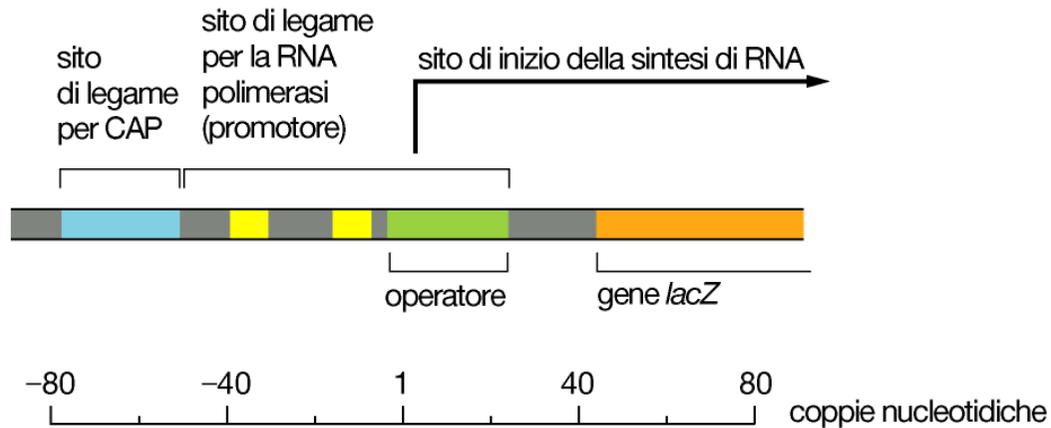
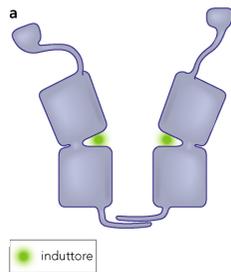
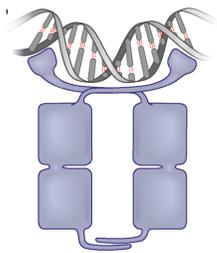
operatore *lac*



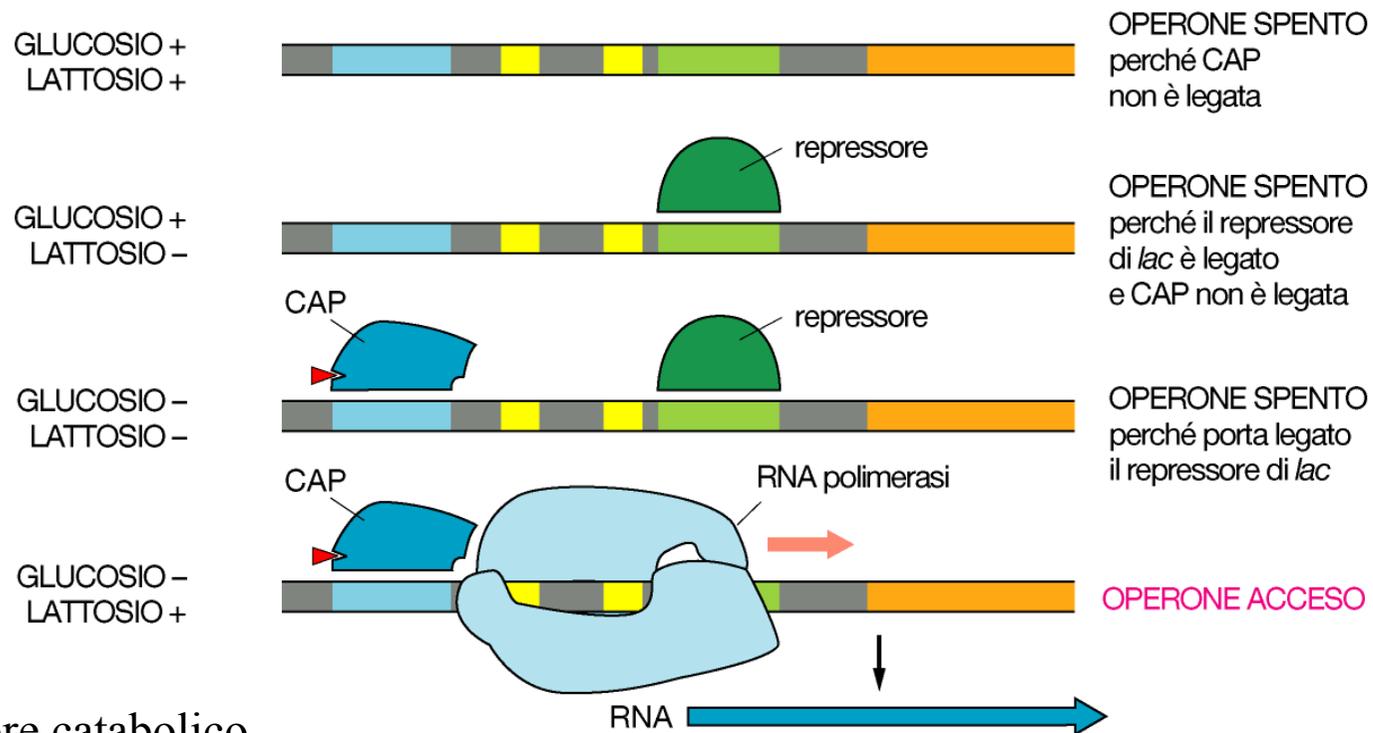
induttore

Induttore = allolattosio

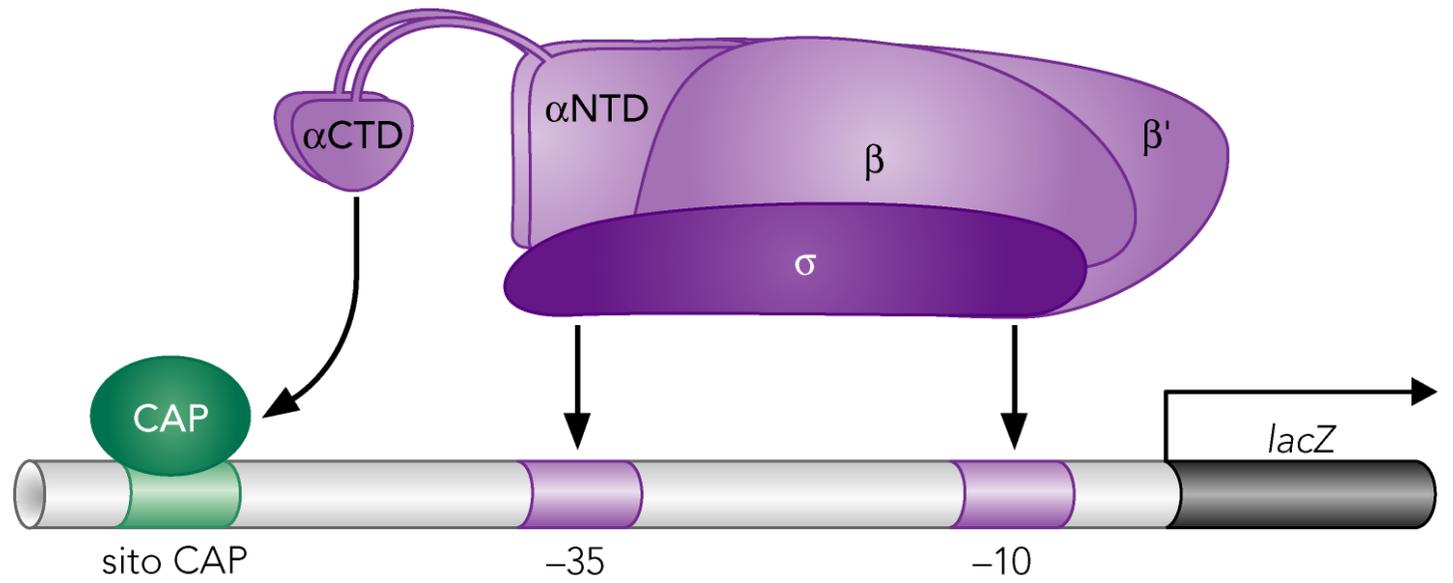
# Un attivatore ed un repressore controllano l'operone *lac*



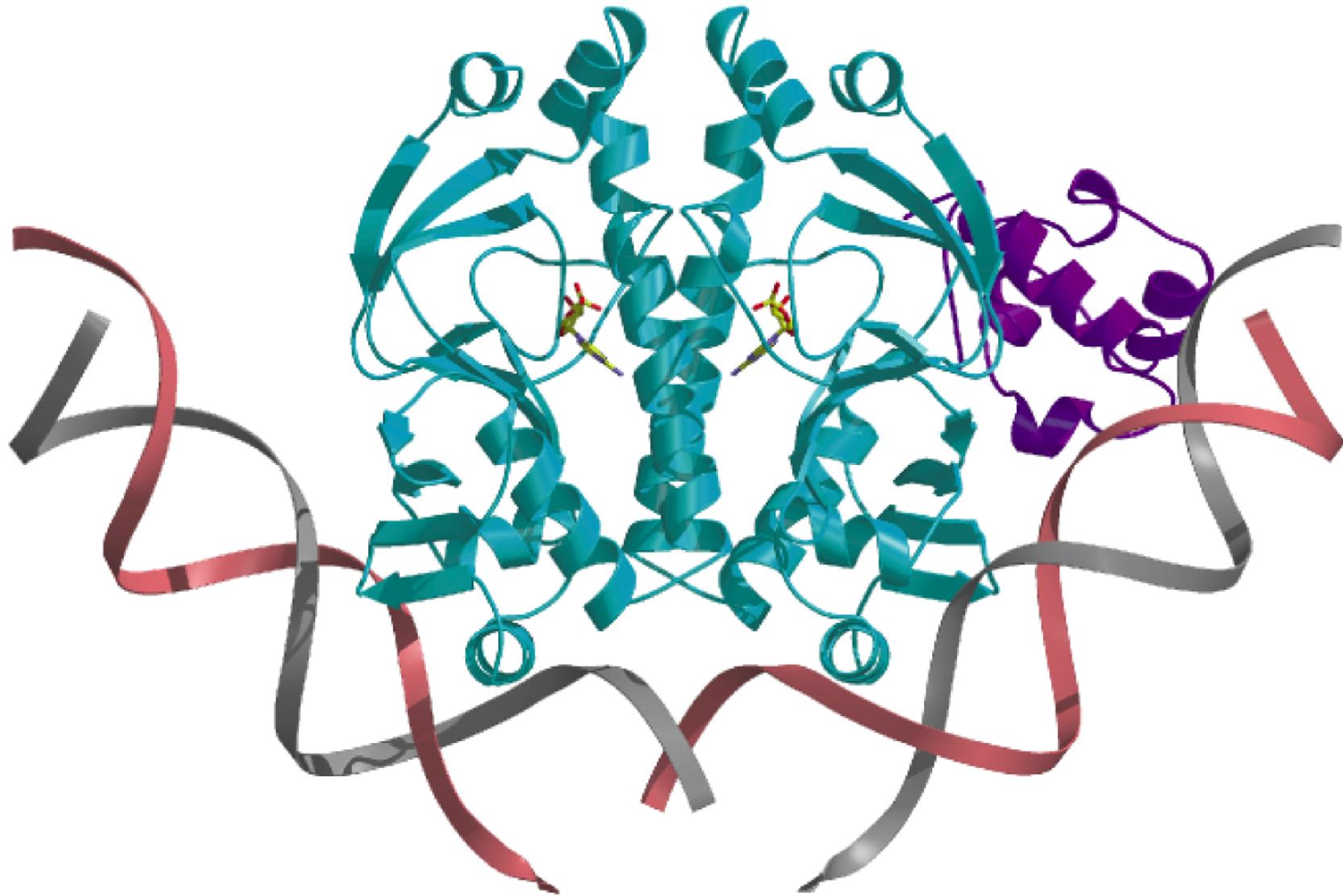
## Repressore *lac*

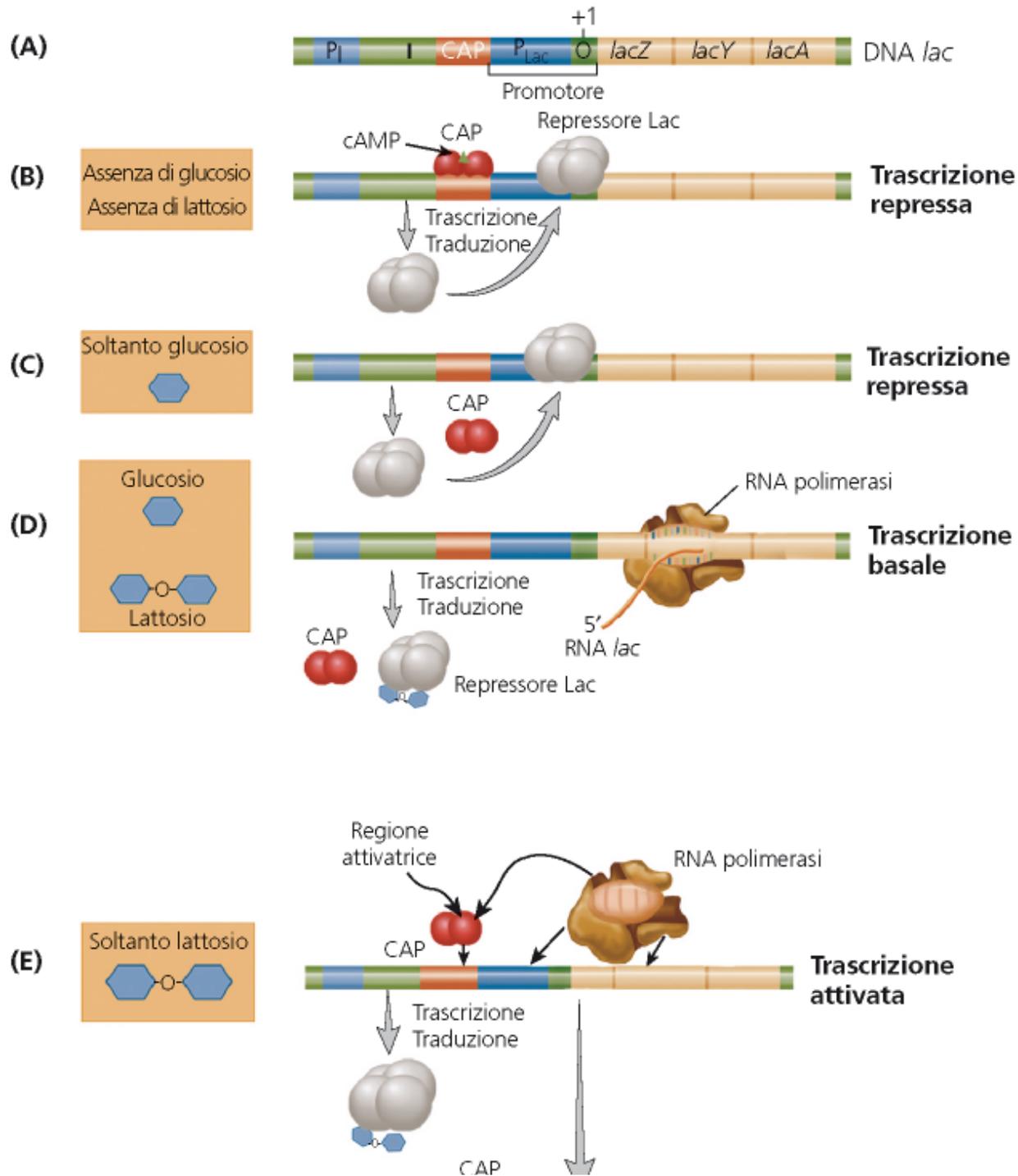


CAP = attivatore catabolico

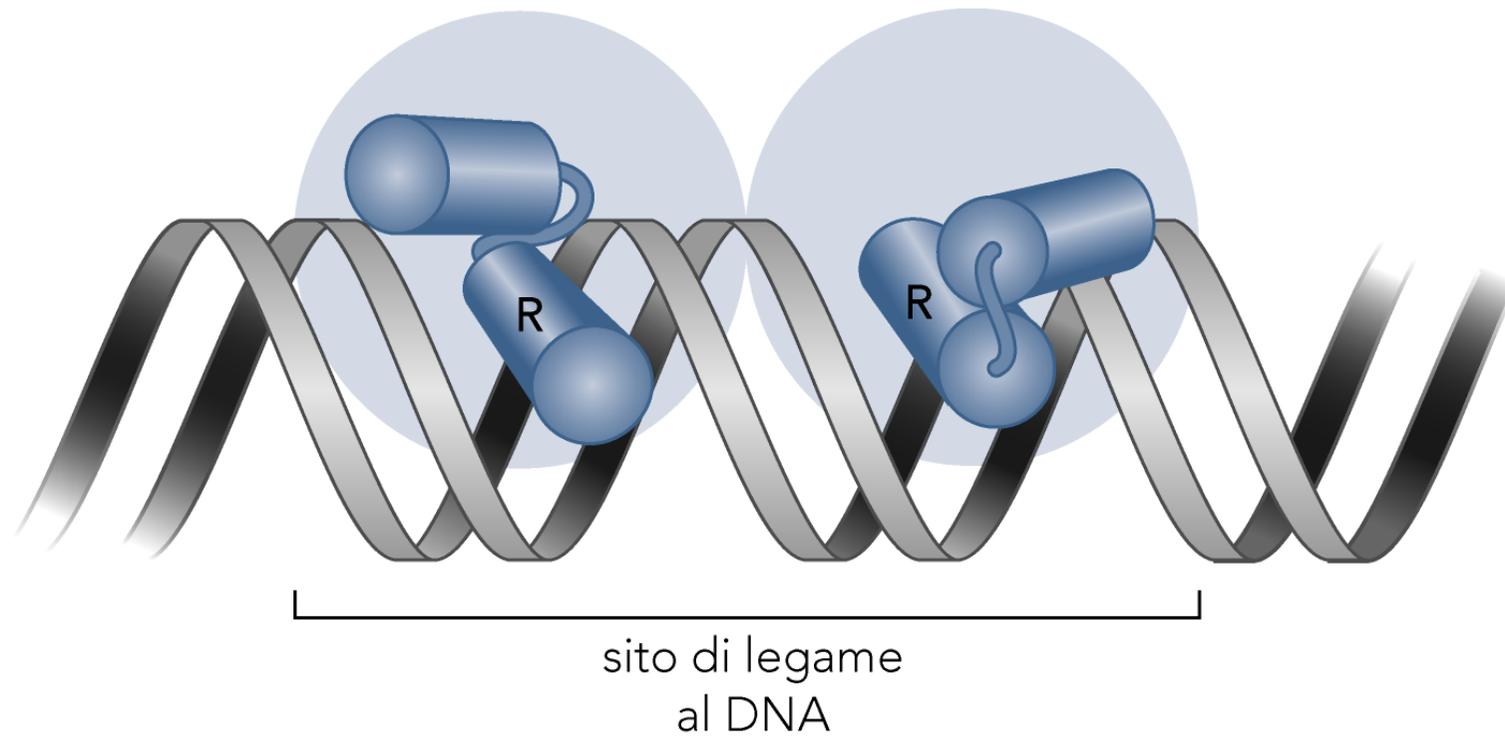


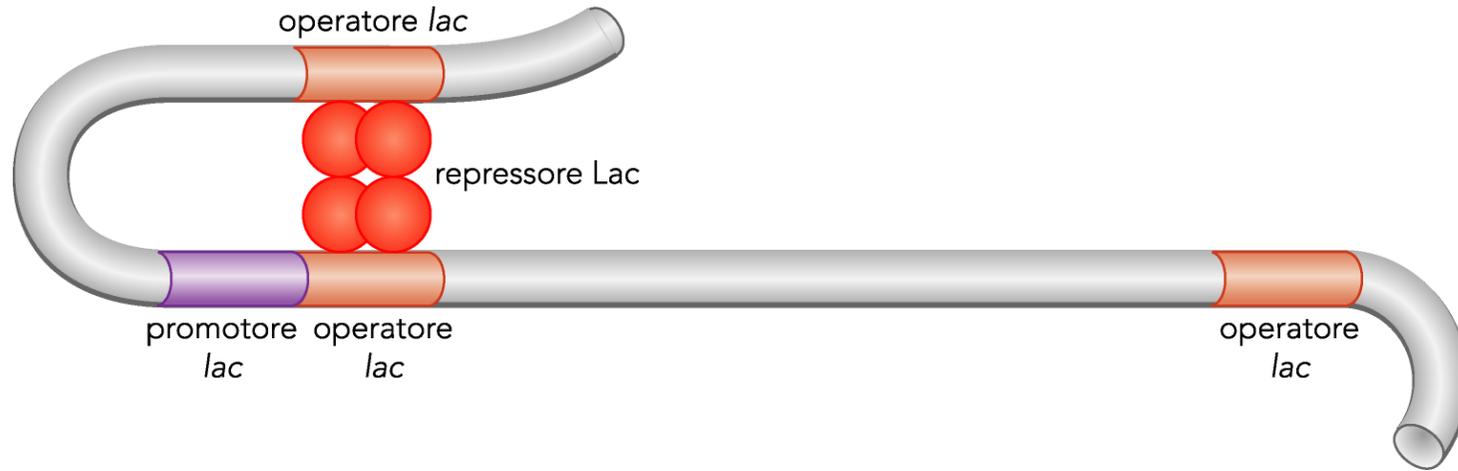
# Struttura del complesso CAP-alphaCTD-DNA



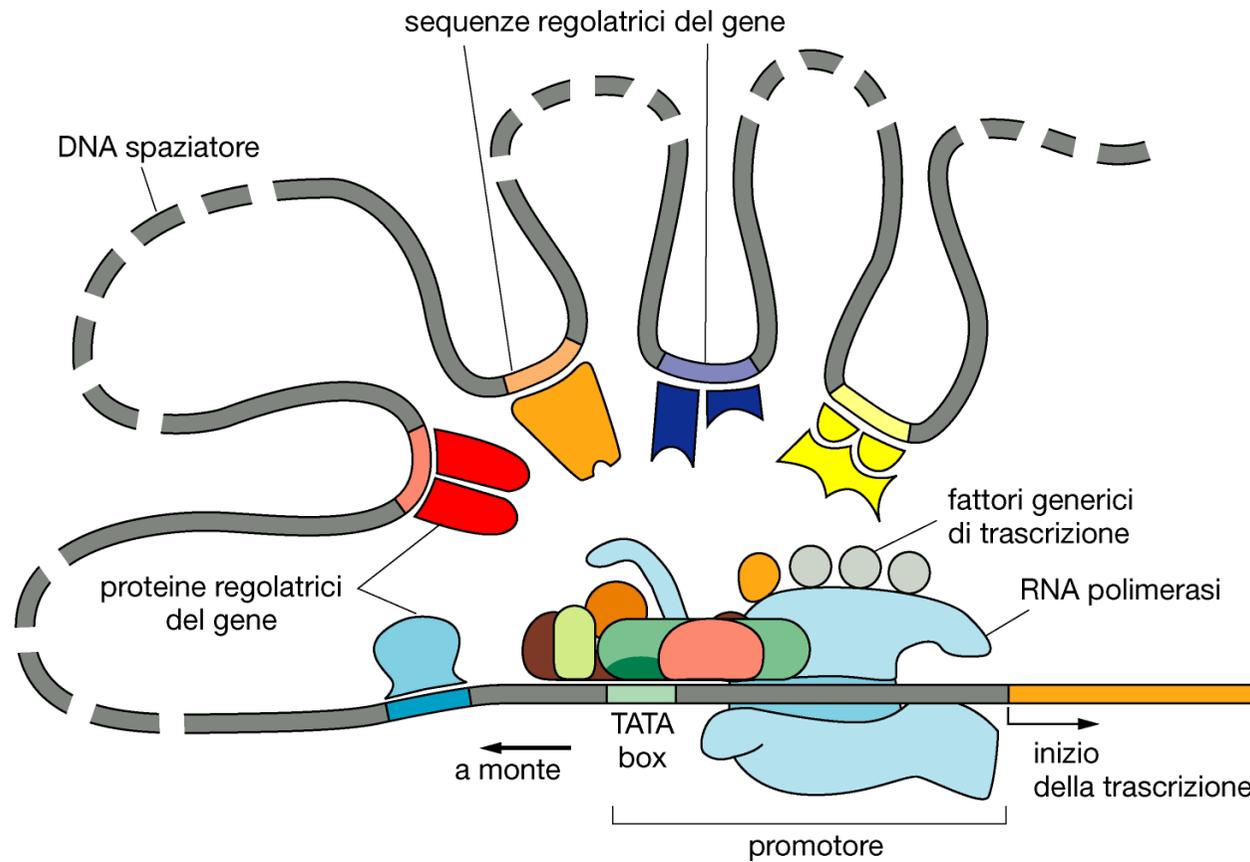


# CAP e repressore Lac si legano mediante Domini Helix-Turn-Helix

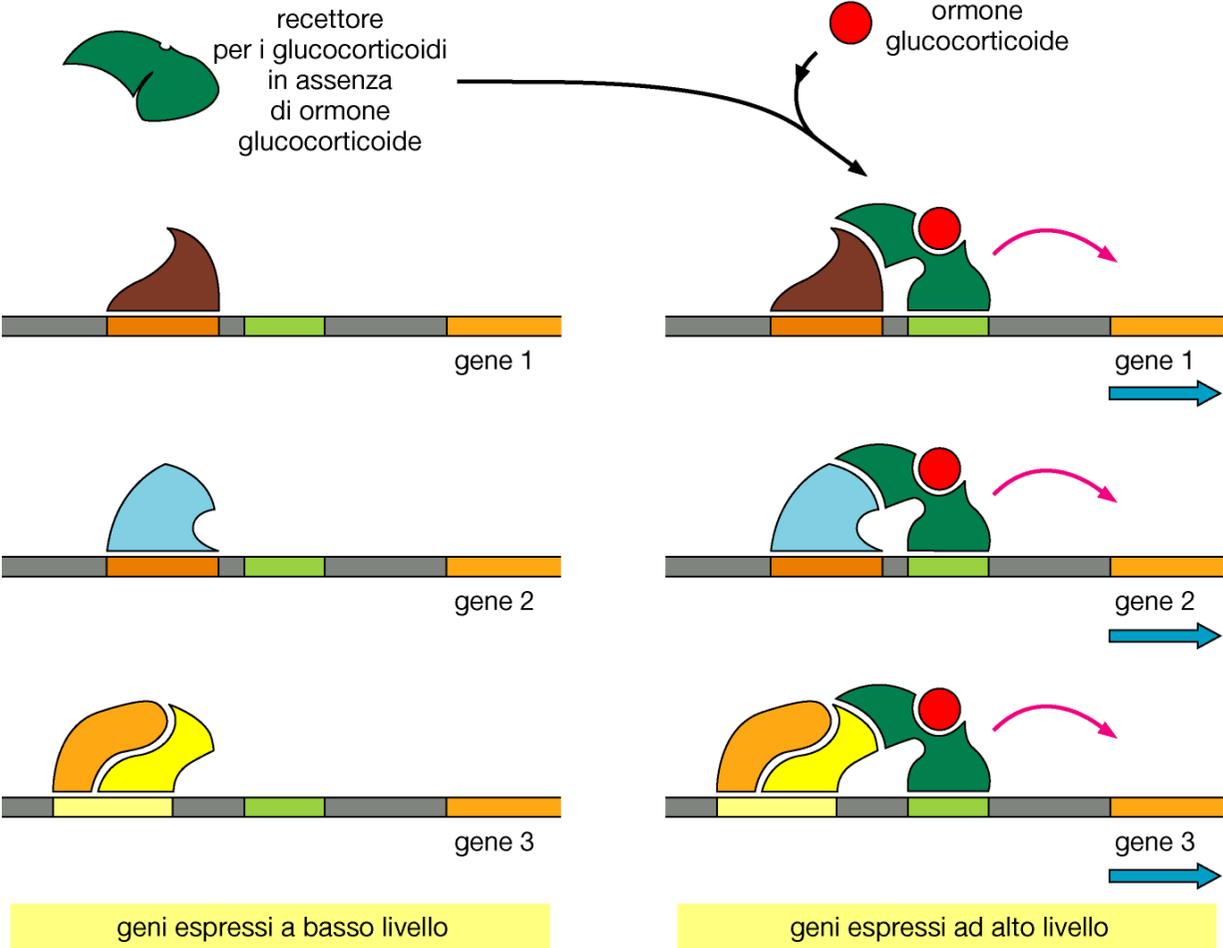




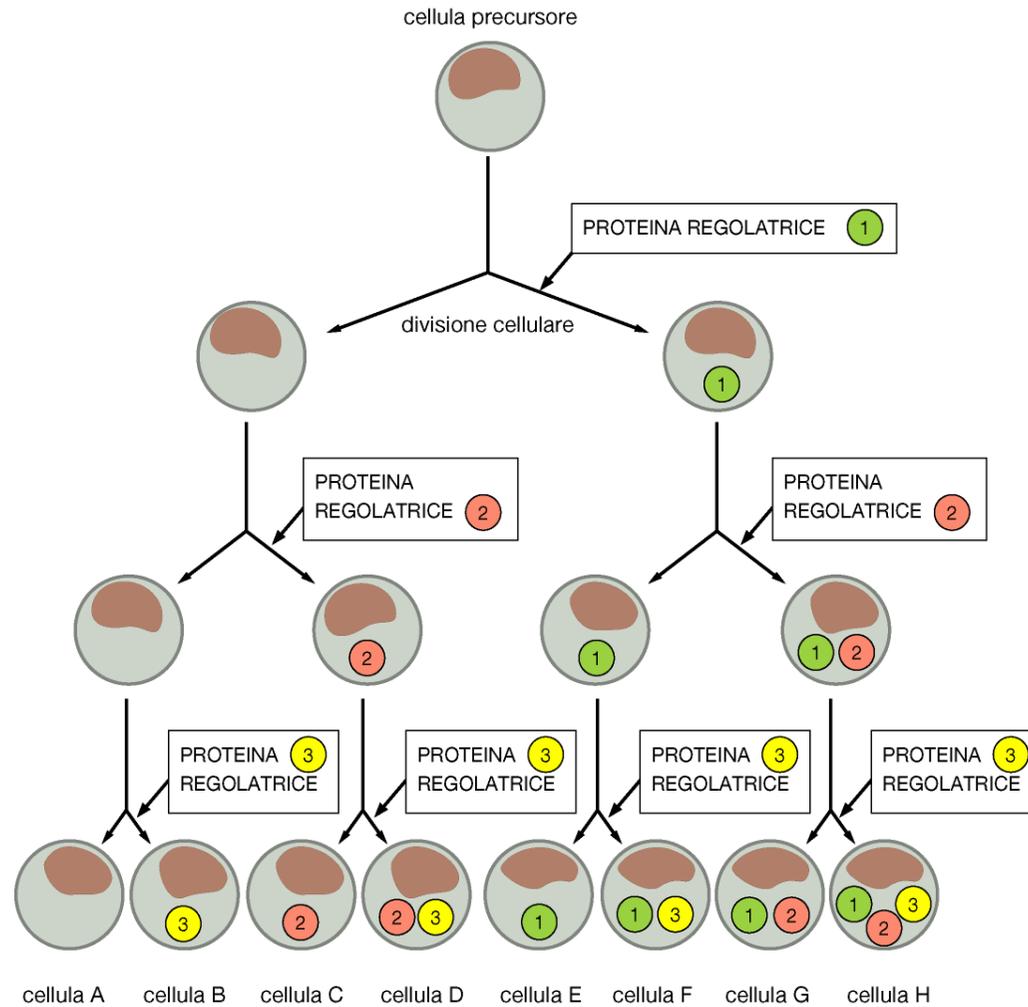
Negli eucarioti il controllo della trascrizione è largamente di tipo **combinatorio**

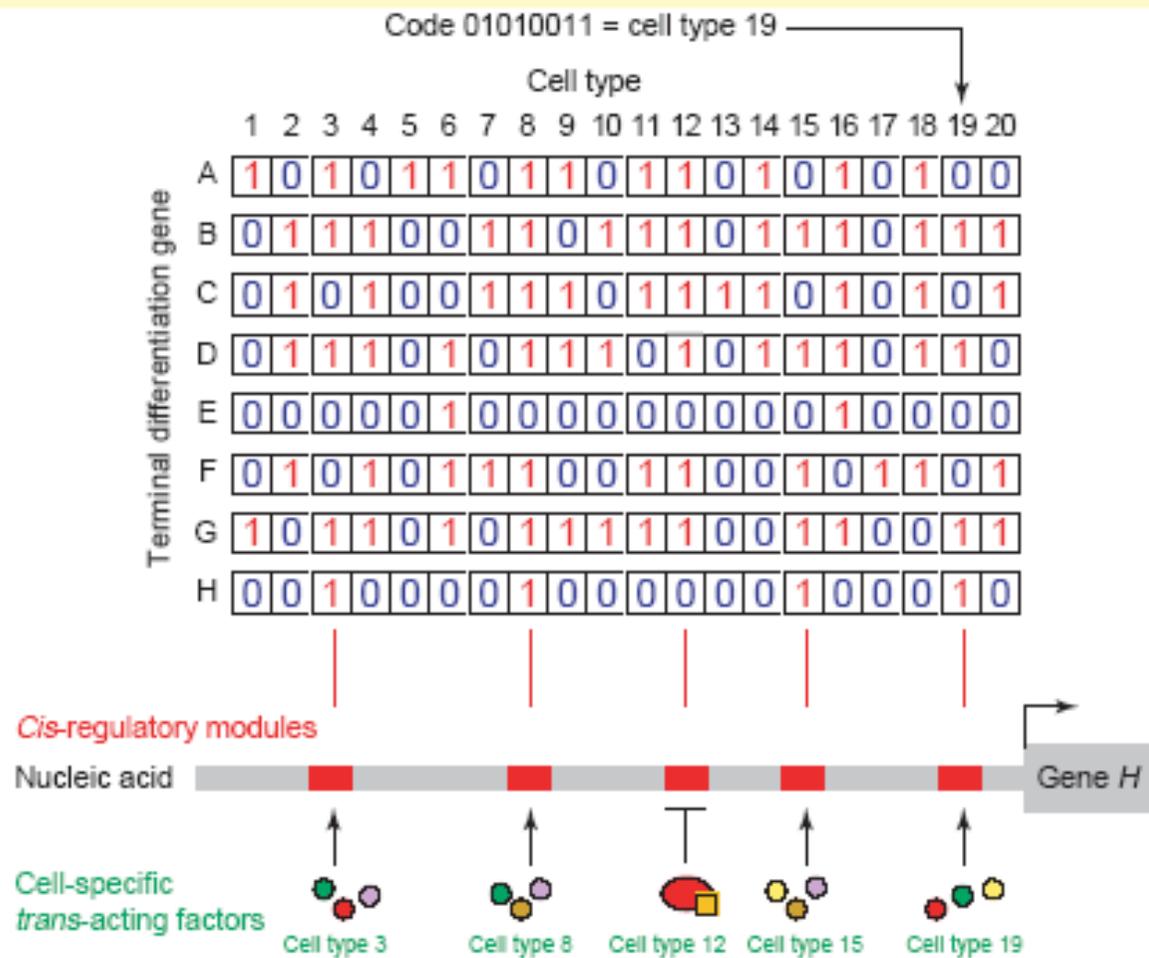


# Una sola proteina regolatrice può regolare l'espressione di molti geni

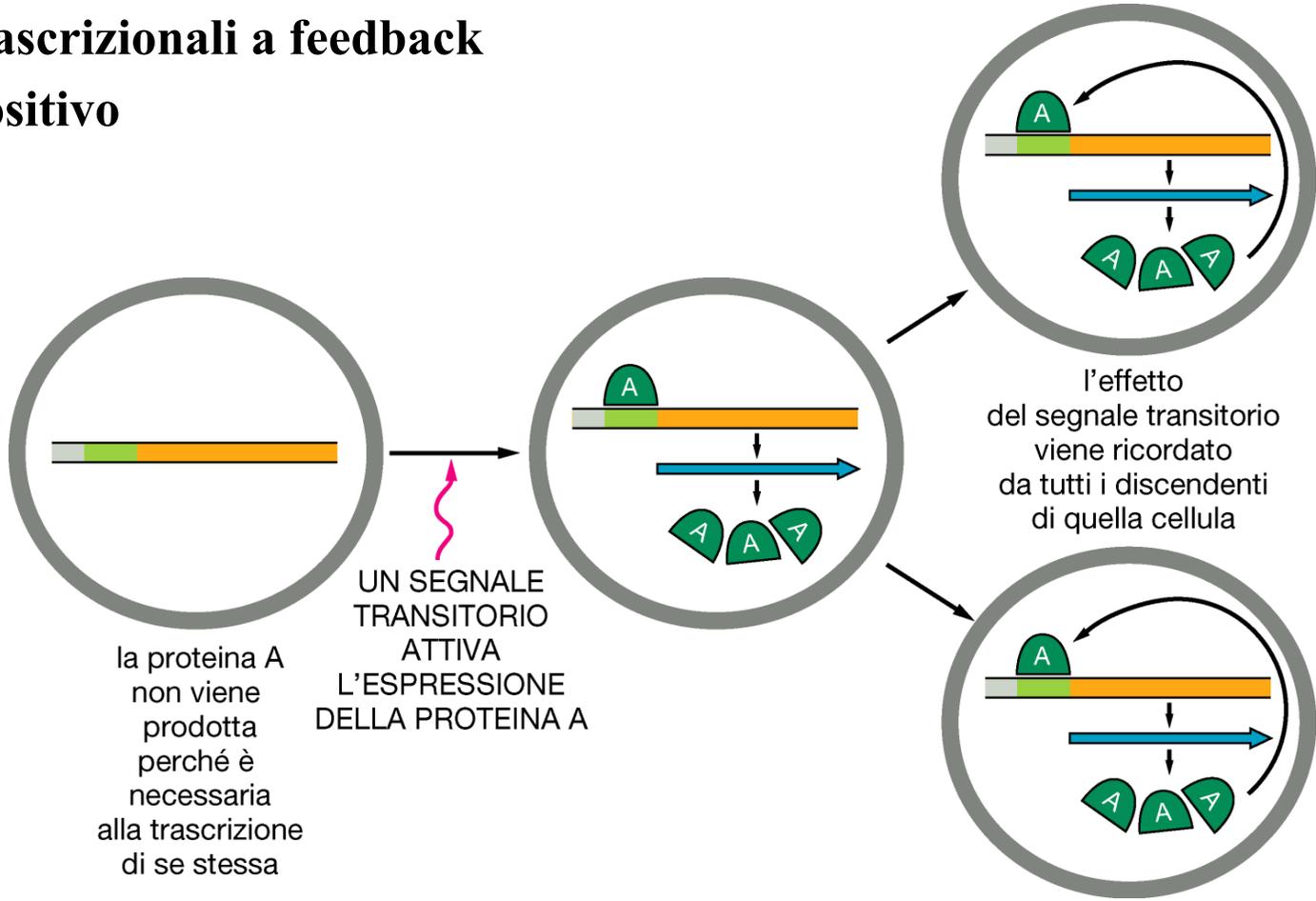


# La combinazione di pochi regolatori può dare origine a molti tipi cellulari diversi nel corso dello sviluppo





Il differenziamento cellulare si  
basa su **meccanismi**  
**trascrizionali a feedback**  
**positivo**



Il differenziamento cellulare si basa su  
mantenimento dello **stato della cromatina**

