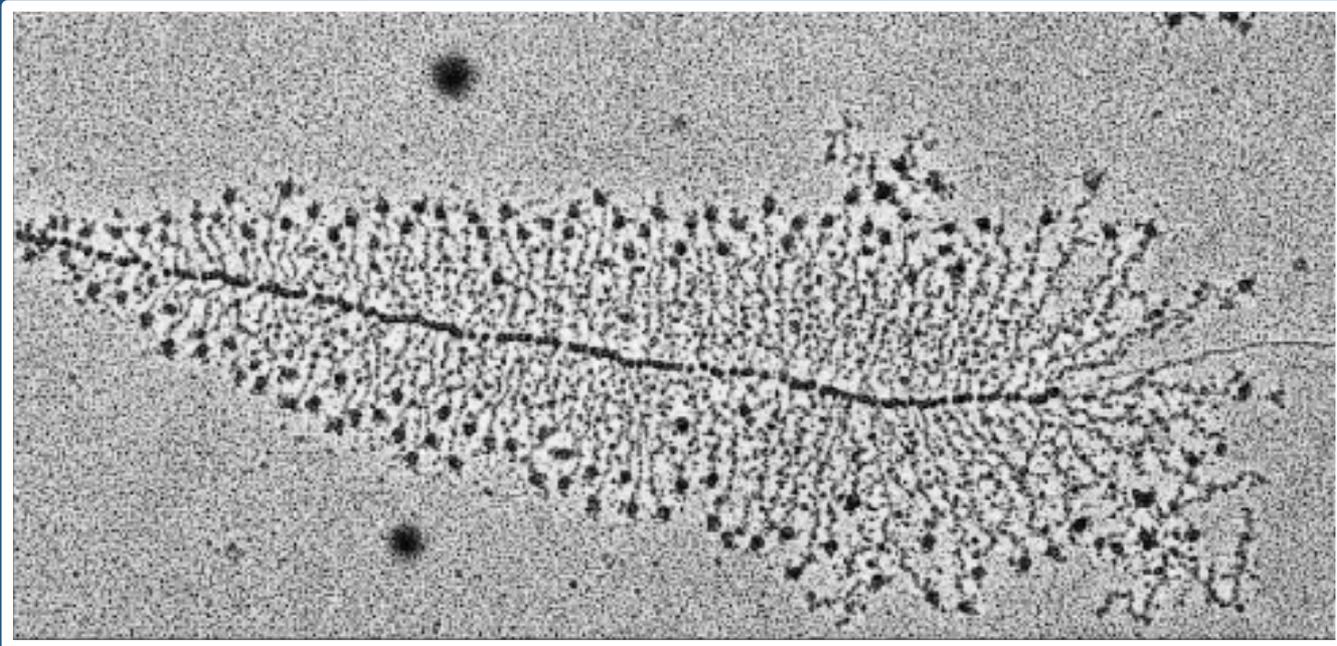
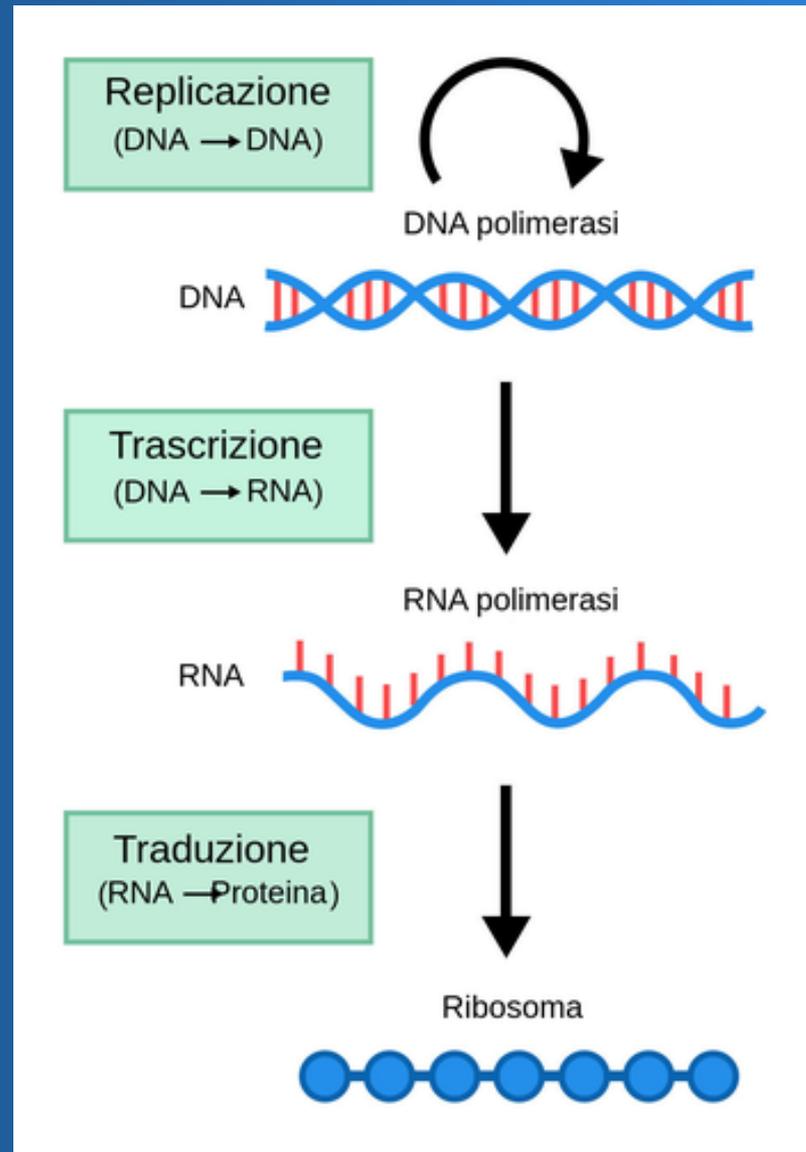


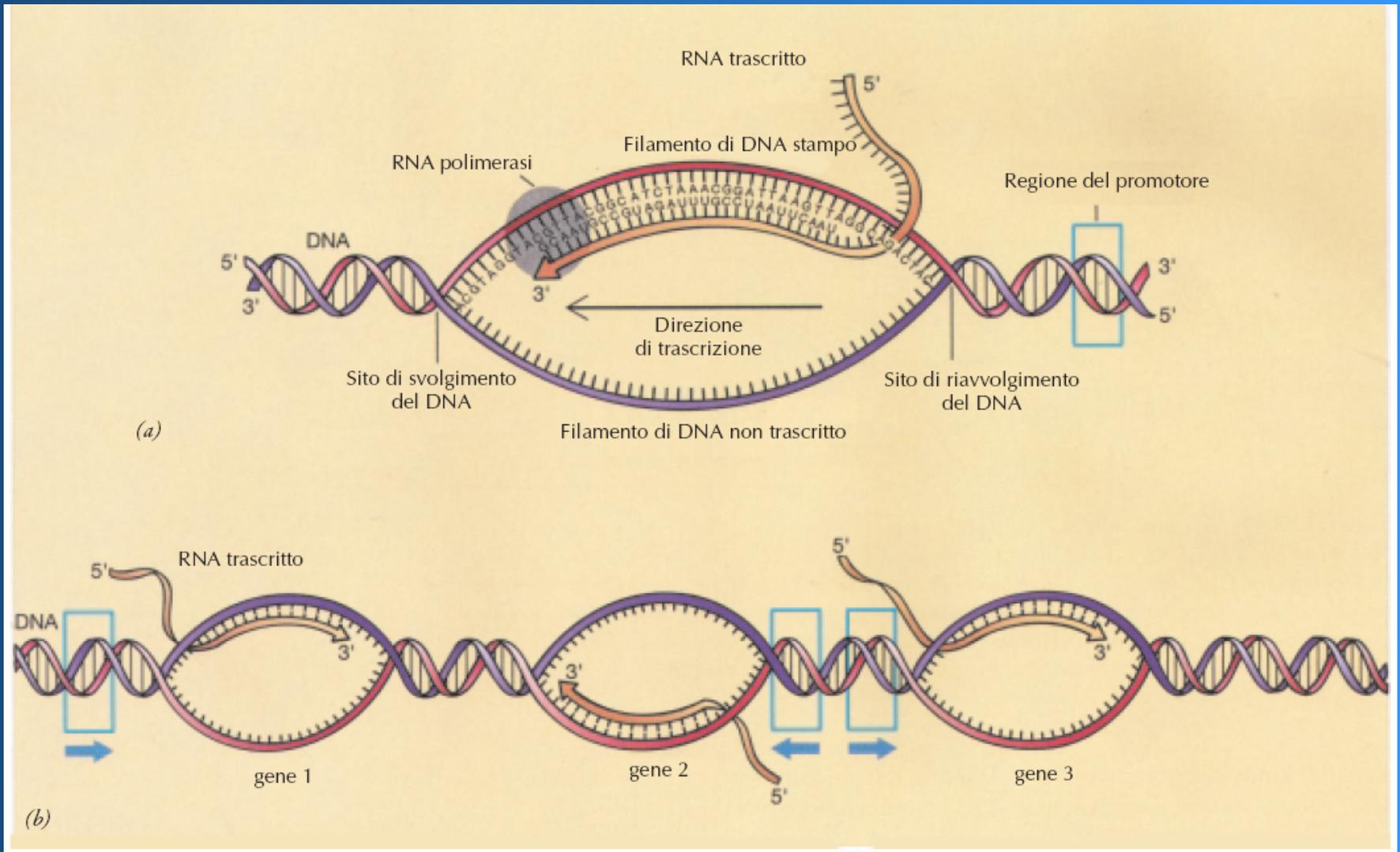
Esprimere il contenuto dei geni: la trascrizione



Il dogma centrale della biologia

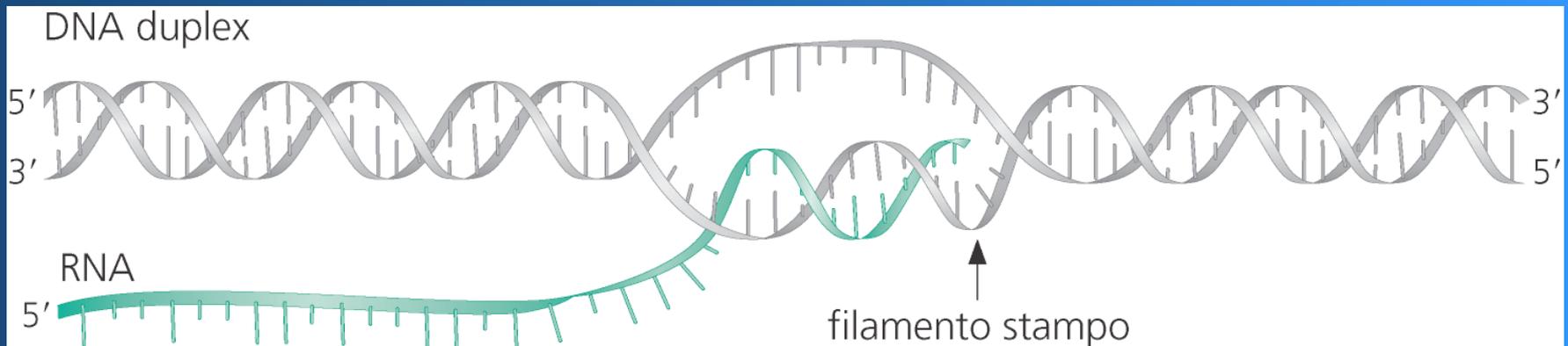


Il processo di trascrizione



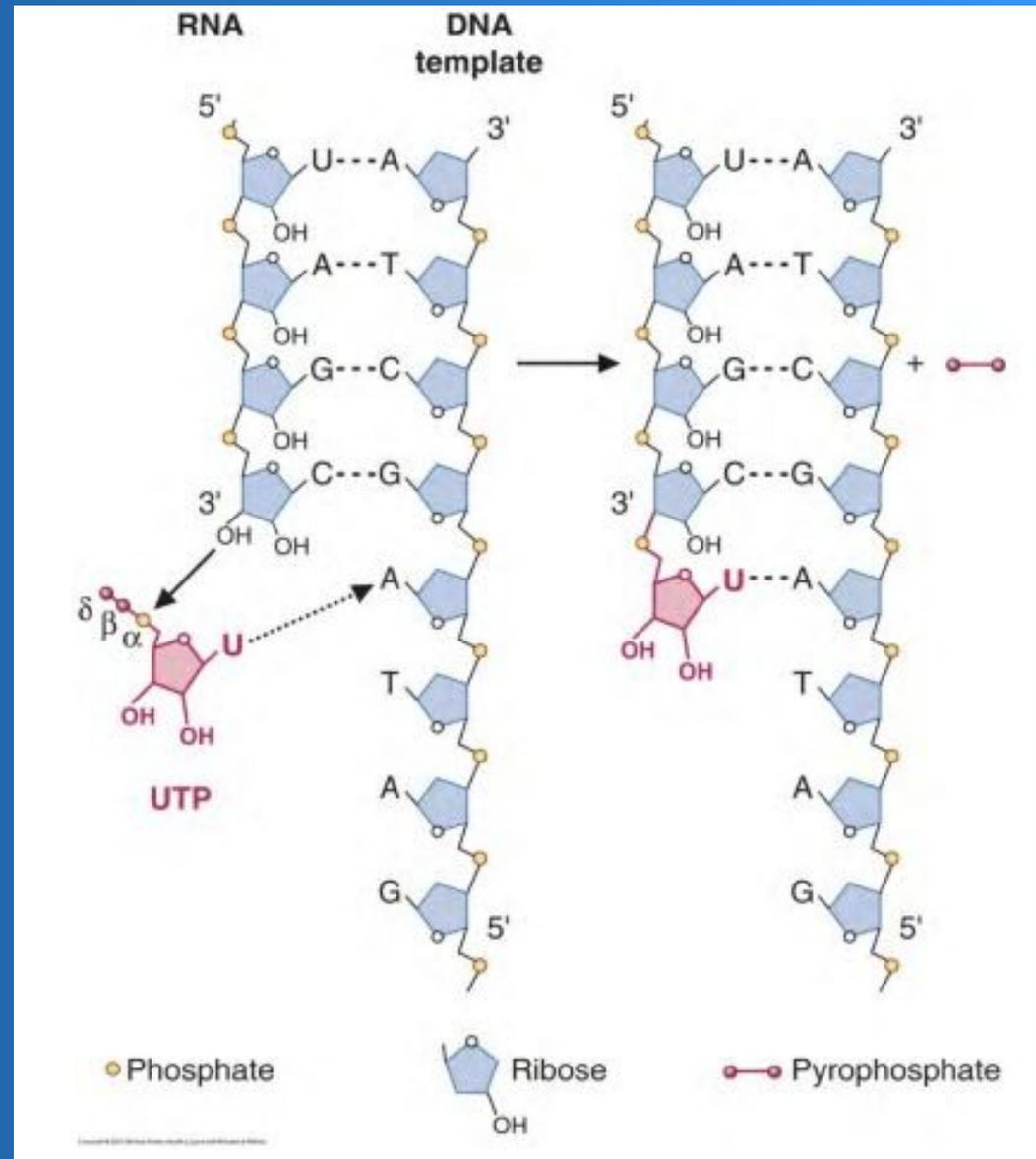
Caratteristiche

- ✓ Non ha bisogno di innesco
- ✓ Inizia a livello di un **promotore**
- ✓ La **RNA polimerasi** è totalmente processiva
- ✓ Assenza di un efficace proof-reading
- ✓ L'RNA prodotto si stacca subito dal DNA
- ✓ **Accurata regolazione** a livello di ogni singolo gene
- ✓ Trascrittoma = insieme dei trascritti presenti in una cellula

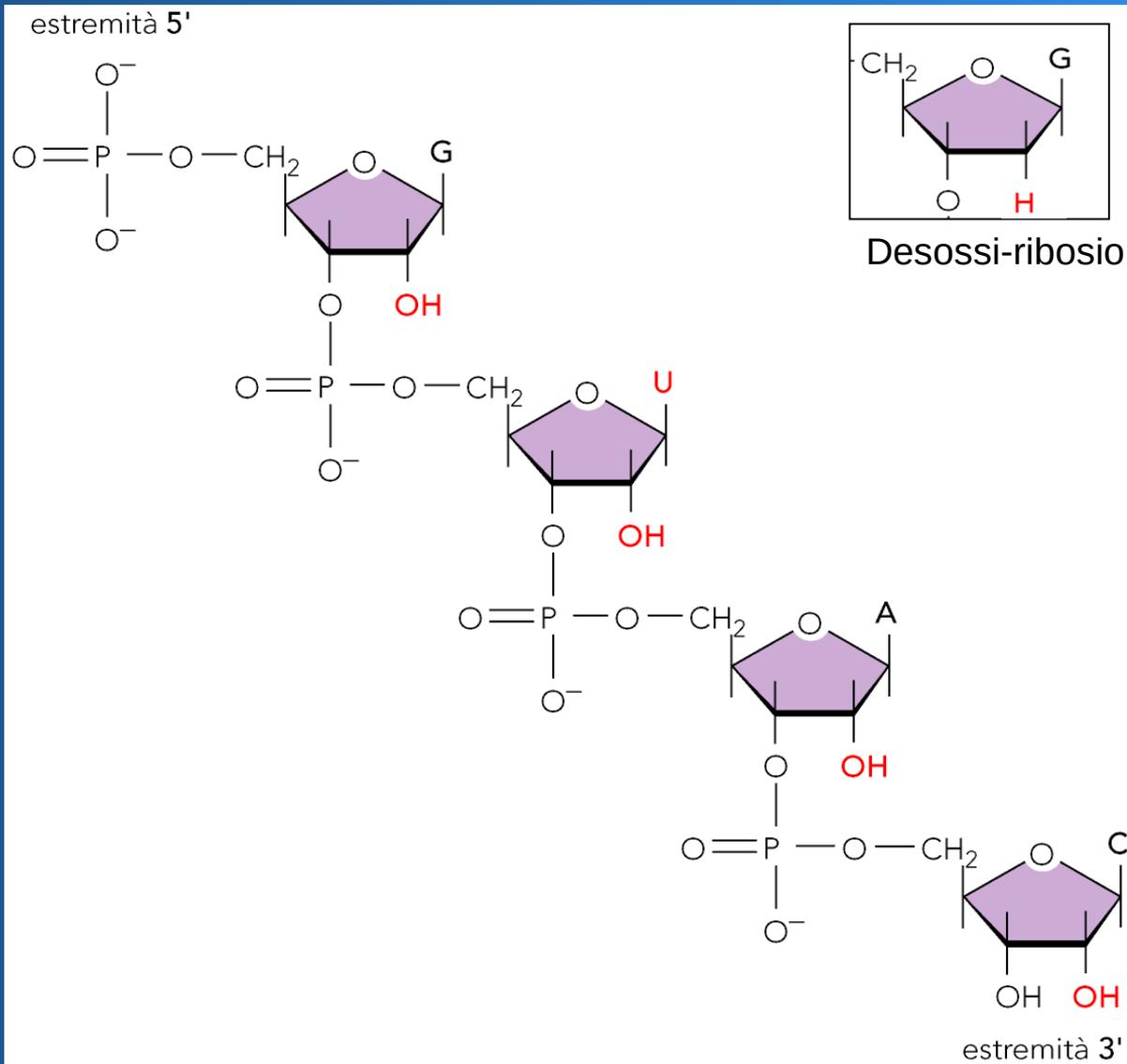


Schema generale

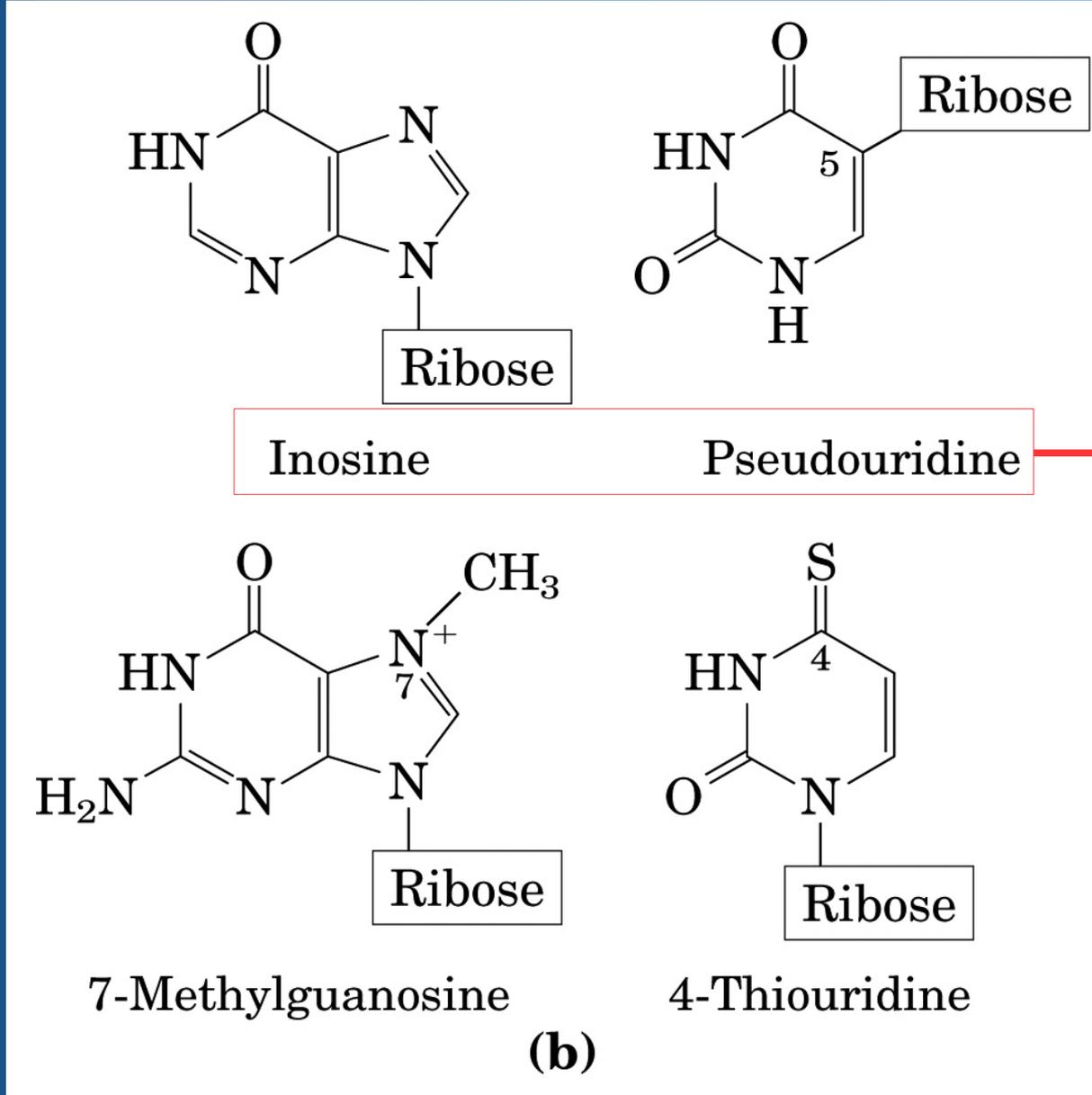
- ✓ Incorporazione **ribonucleotidi**
- ✓ lettura stampo DNA
- ✓ appaiamento basi complementari
- ✓ **RNA polimerasi**
- ✓ direzione 5'-3'



Acido ribonucleico

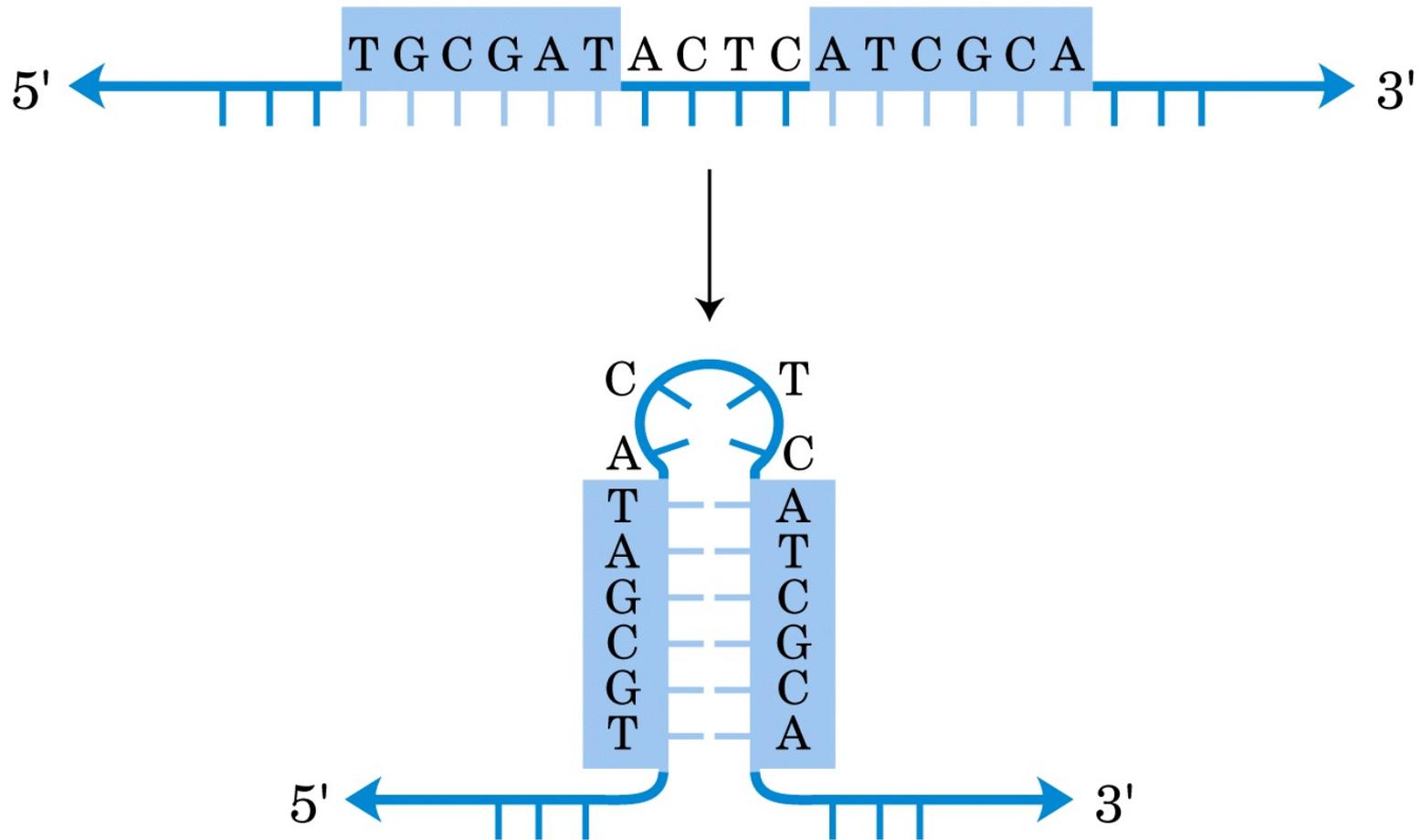


RNA: basi azotate non canoniche



Nei tRNA
permettono
appaiamenti
non canonici

Tendenza al ripiegamento

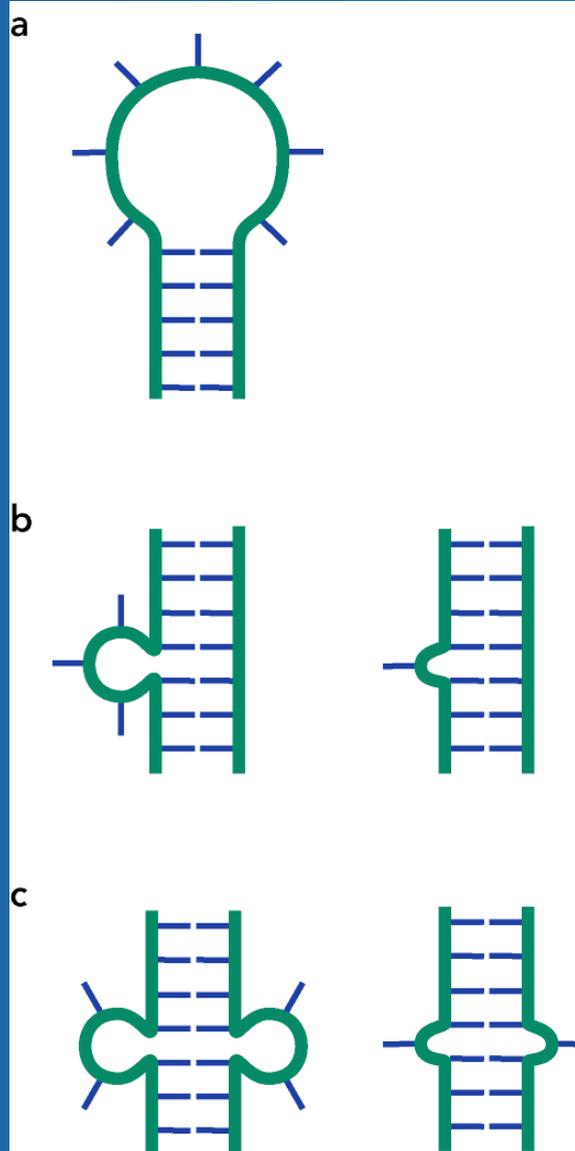


Hairpin

(a)

Tipi di ripiegamento

Forcina

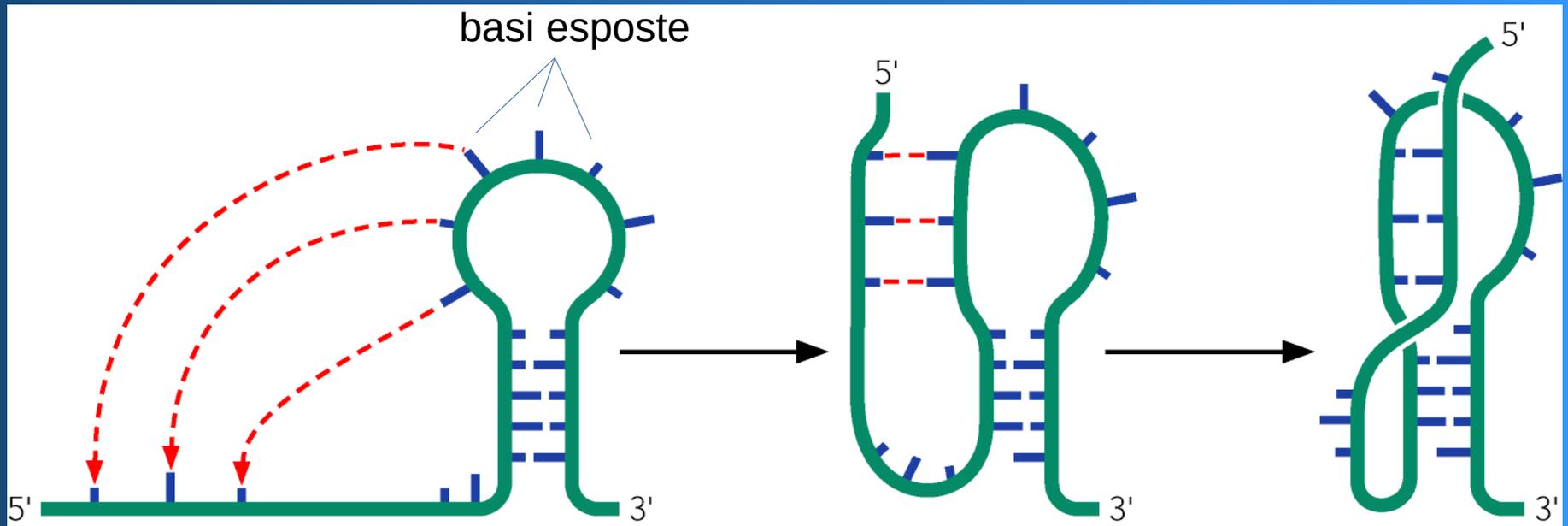


Gemma

Ansa

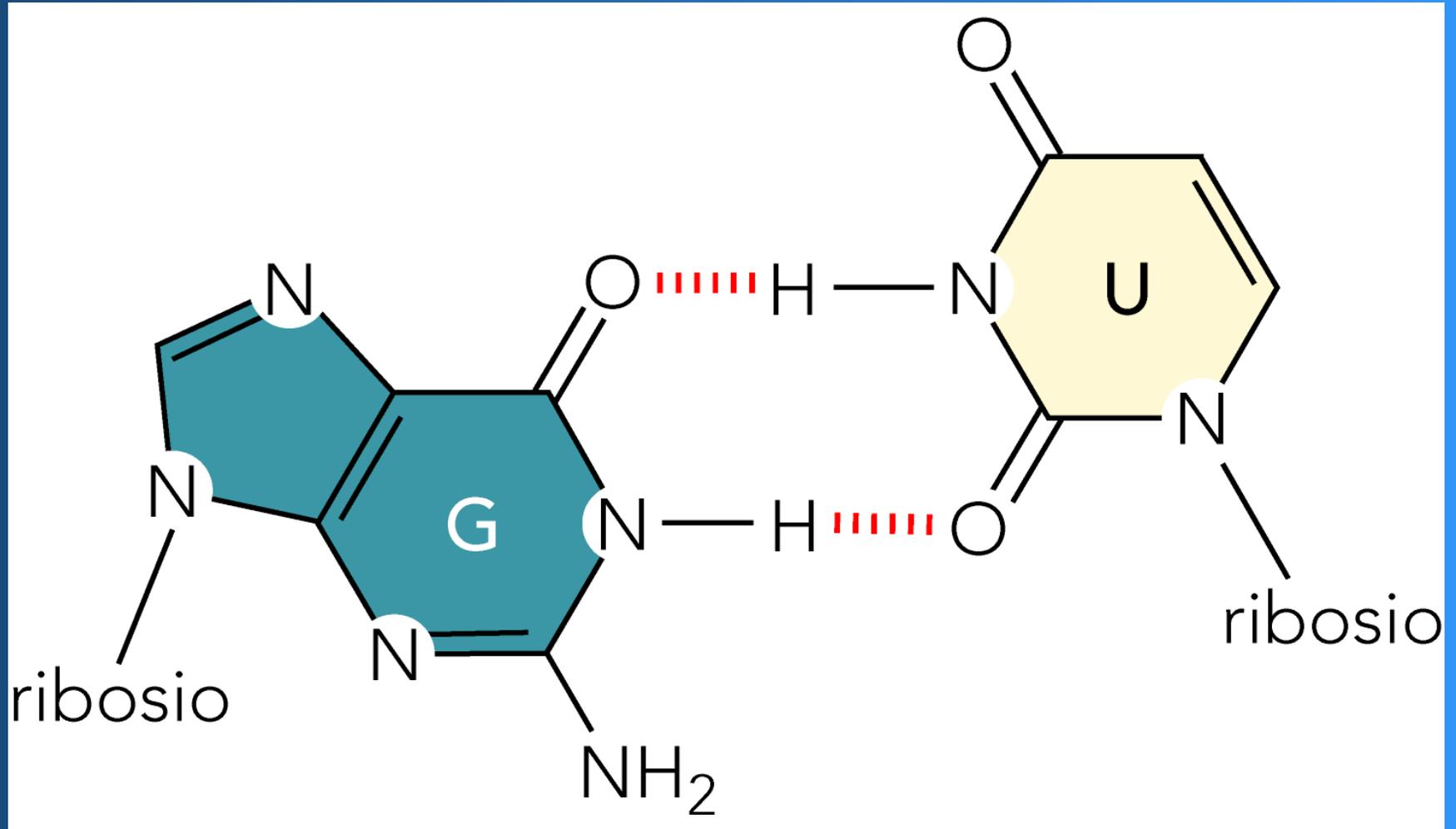
Tipi di ripiegamento

Pseudo-nodi

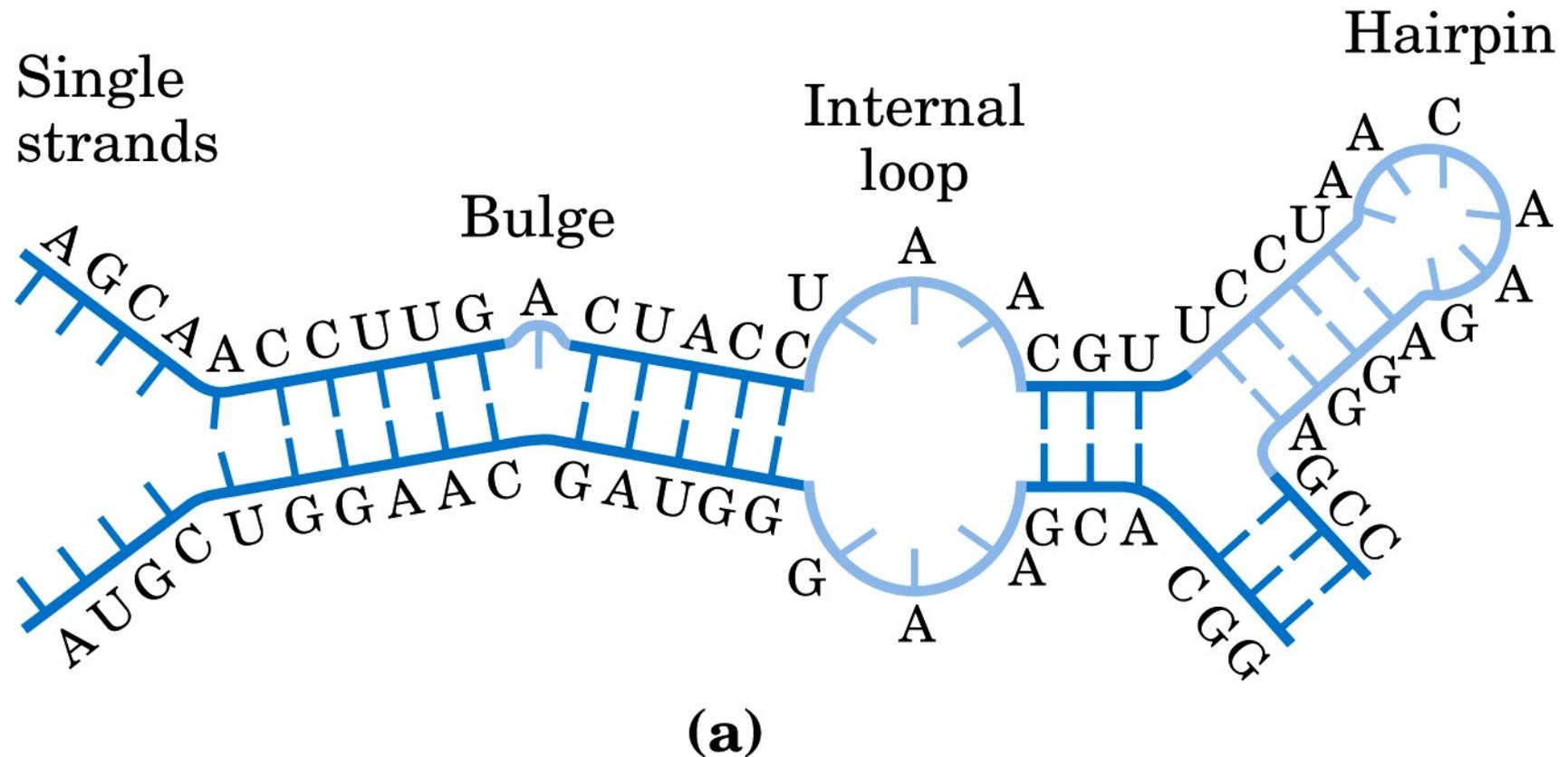


Appaiamento fra sequenze **distanti** lungo la catena

Appaiamenti non canonici

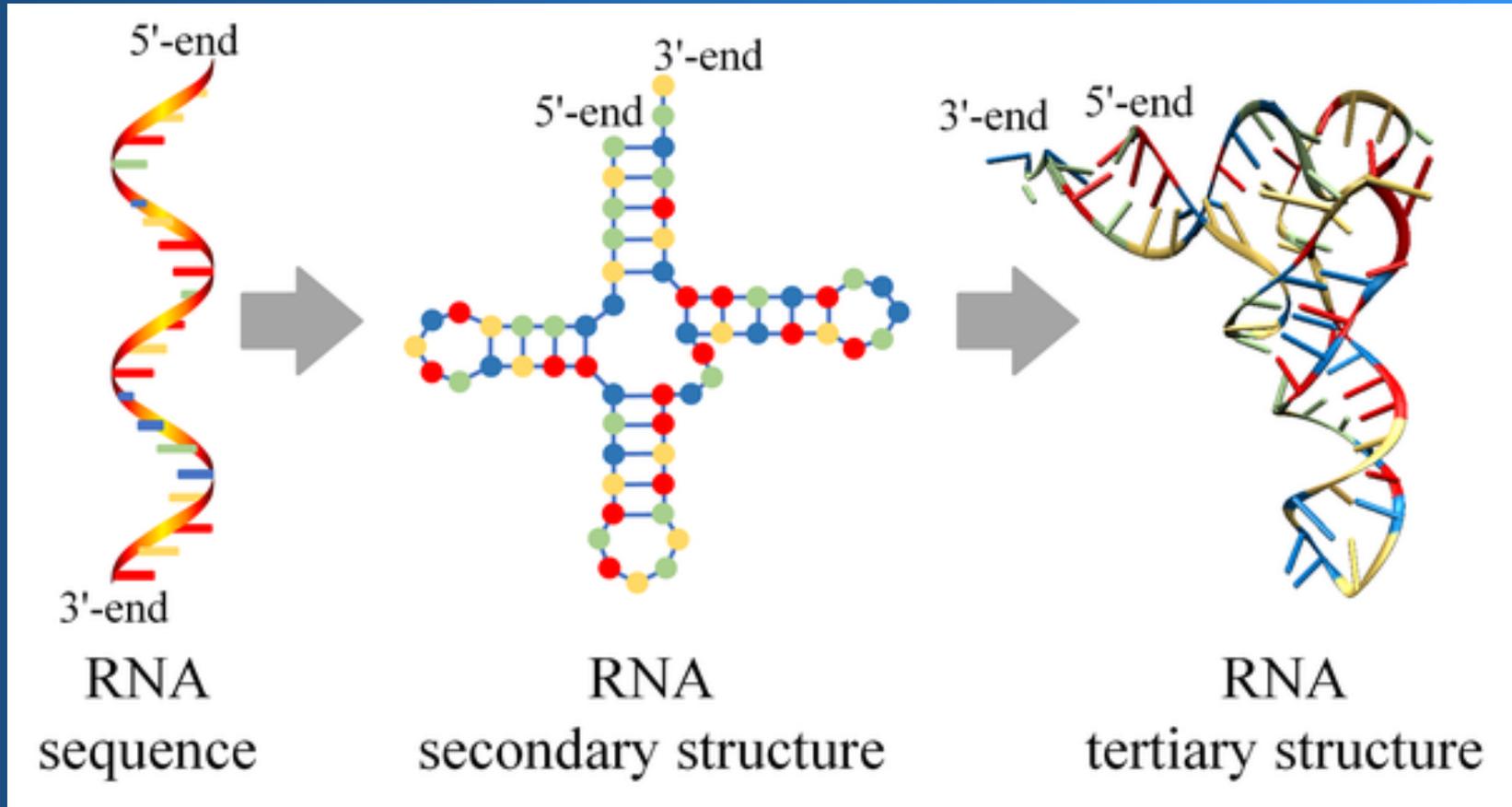


Struttura dell'RNA ripiegato



Le regioni appaiate nell'RNA hanno solitamente una struttura **elicoidale destrorsa** tipo A

Struttura dell'RNA ripiegato



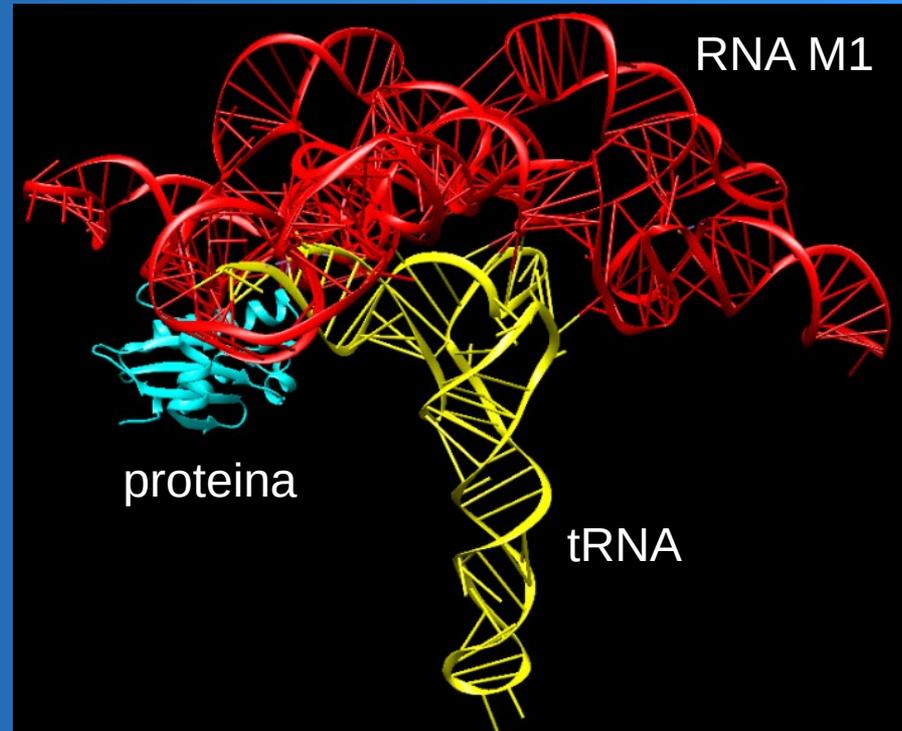
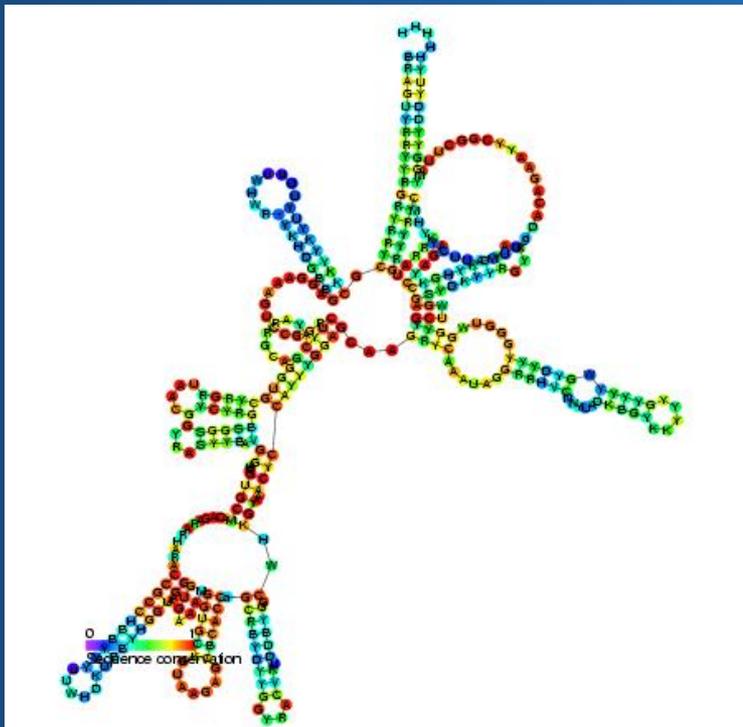
In alcuni casi la **forma tridimensionale** dell'RNA è decisiva per la sua funzione

RNA M1 – cofattore dell'enzima RNasi P

E' un complesso formato da 2 molecole di RNA e 1 proteina

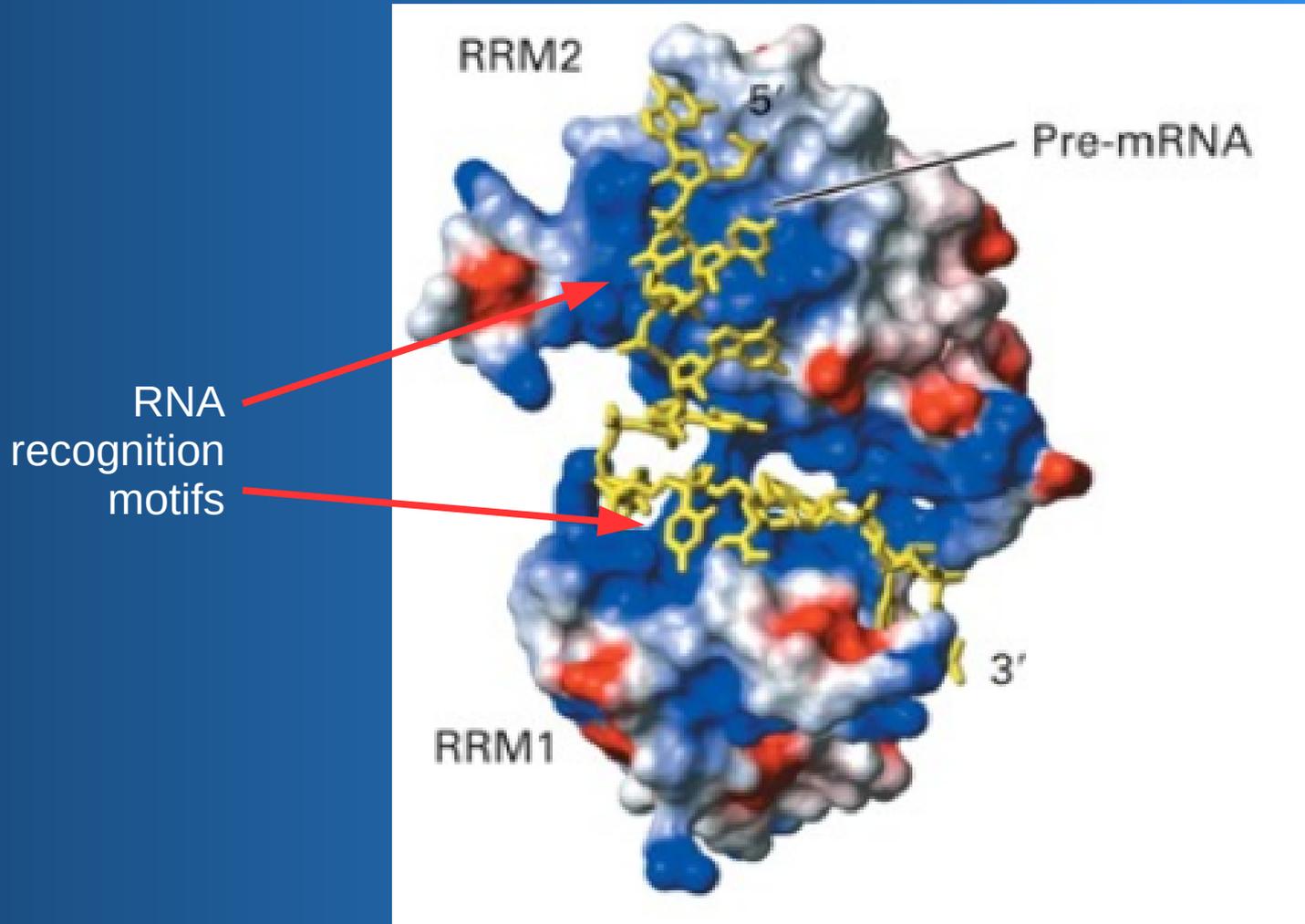
RNasi P: coinvolta nella maturazione dei tRNA

RNA M1: costituisce il sito catalitico dell'enzima



Il complesso della RNASI P è considerato un FOSSILE MOLECOLARE

L'RNA è chimicamente reattivo, ma protetto



Le regioni libere da legami dell'RNA possono reagire con elementi cellulari, quindi spesso l'RNA è protetto.

Trascrizione negli eucarioti

Negli eucarioti, come nei procarioti, la trascrizione è regolata da **attivatori** e **repressori**, ma esistono caratteristiche proprie delle cellule eucariotiche che rendono **più complessa** l'attività di queste proteine e che conferiscono una maggior complessità alla regolazione genica:

- 1) Presenza dei **nucleosomi**: regolazione delle modifiche a carico dei nucleosomi
- 2) Presenza di un elevato numero di **proteine regolatrici** e presenza di molti siti regolatori (enhancer, isolatori etc..) favoriscono l'integrazione dei segnali per la trascrizione di un dato gene.

Prodotti della RNA polimerasi

RNA transfer o tRNA

trasporto degli aminoacidi nella sintesi proteica

RNA messaggero o mRNA

trasporto dell'informazione dal DNA al sistema ribosomiale

RNA ribosomiale o rRNA:

sintesi proteica. Sono associati a proteine per formare i ribosomi

RNA polimerasi - subunità

Formata da numerose subunità

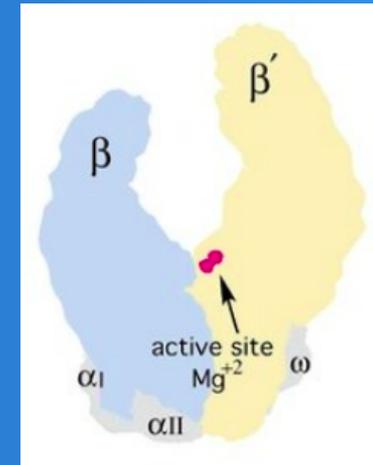
Nucleo dell'enzima batterico: **core** formato da

α (40 KDa) x 2

β (155 KDa)

β' (160 KDa)

ω

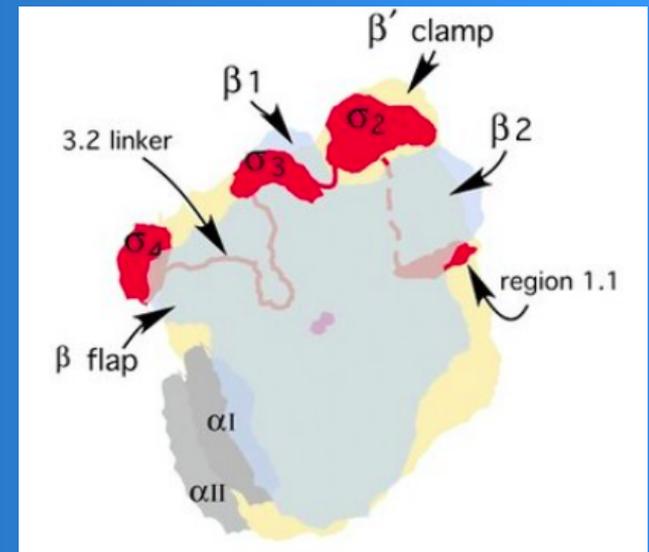


core: chela di granchio

Fattori di riconoscimento promotori

σ 1,2,3 (32-90 KDa)

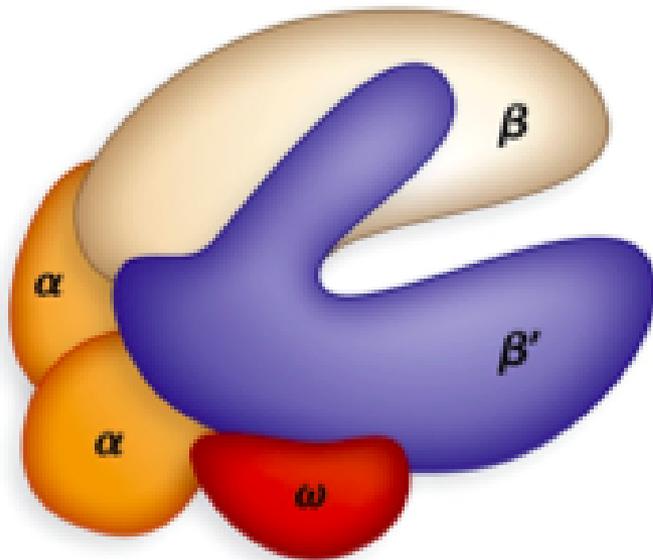
Negli eucarioti si riconoscono 3 RNA pol denominate I, II e III, ciascuna con oltre 10 subunità



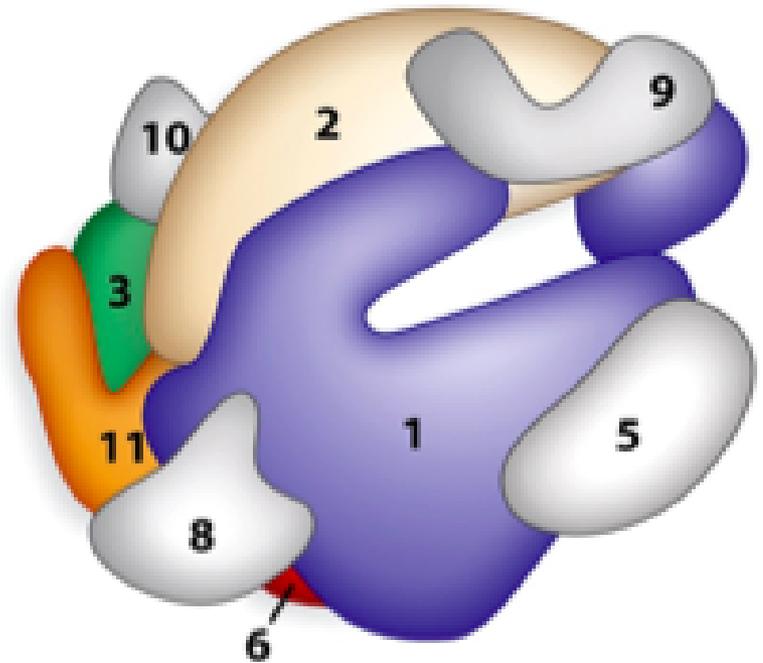
oloenzima

RNA polimerasi a confronto

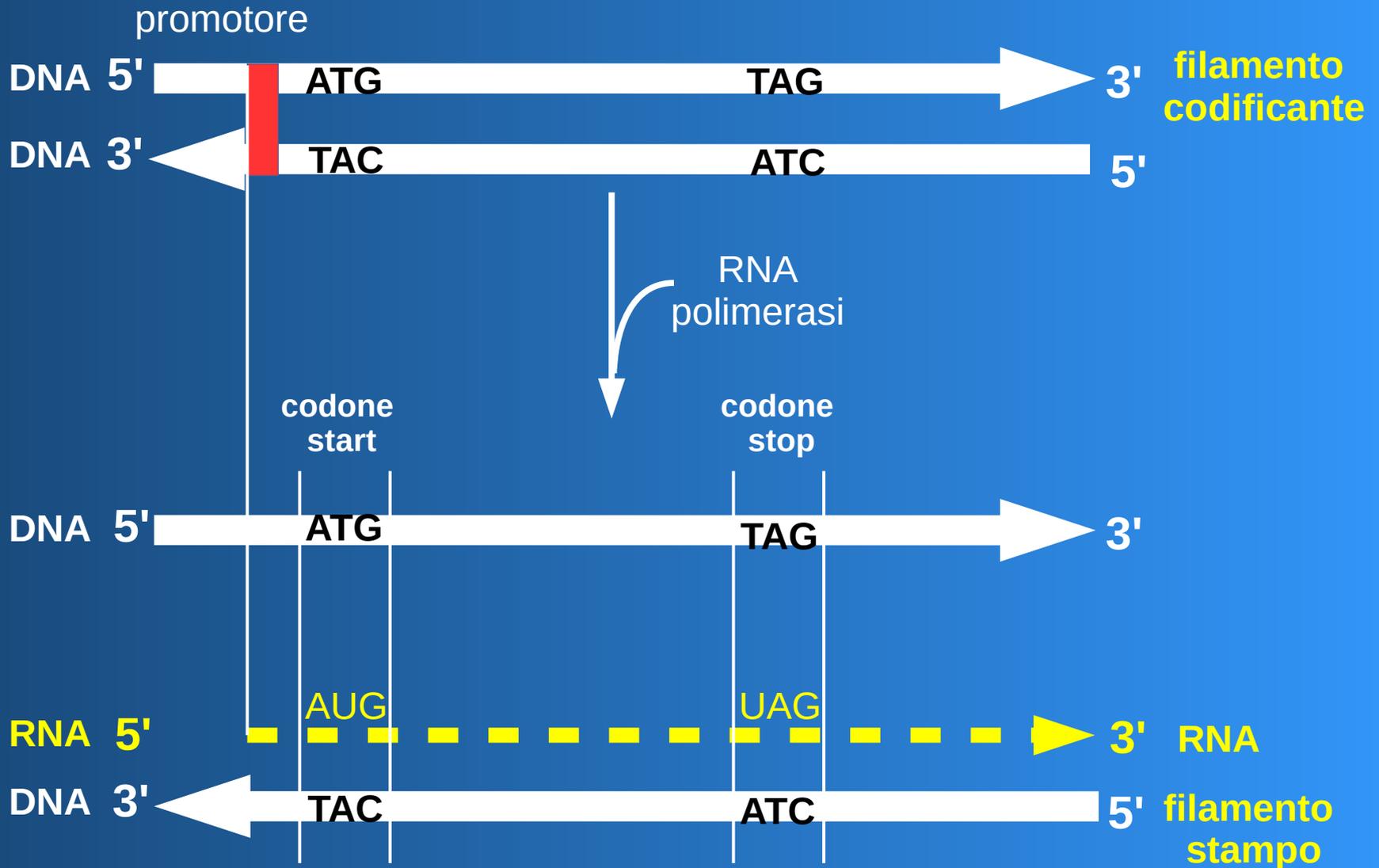
Bacterial RNA polymerase



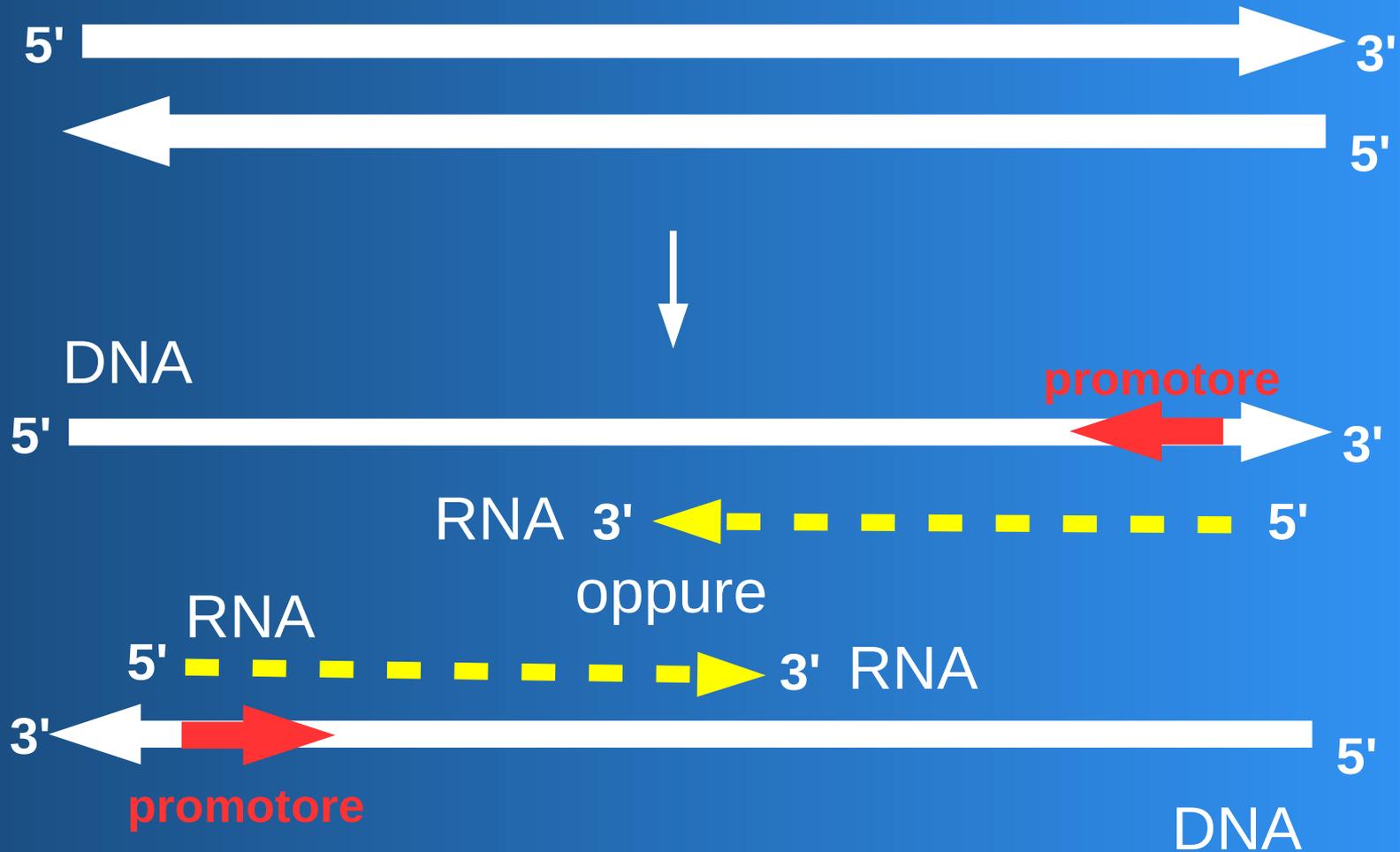
Eukaryotic RNA polymerase II



La polimerasi trascrive il filamento stampo

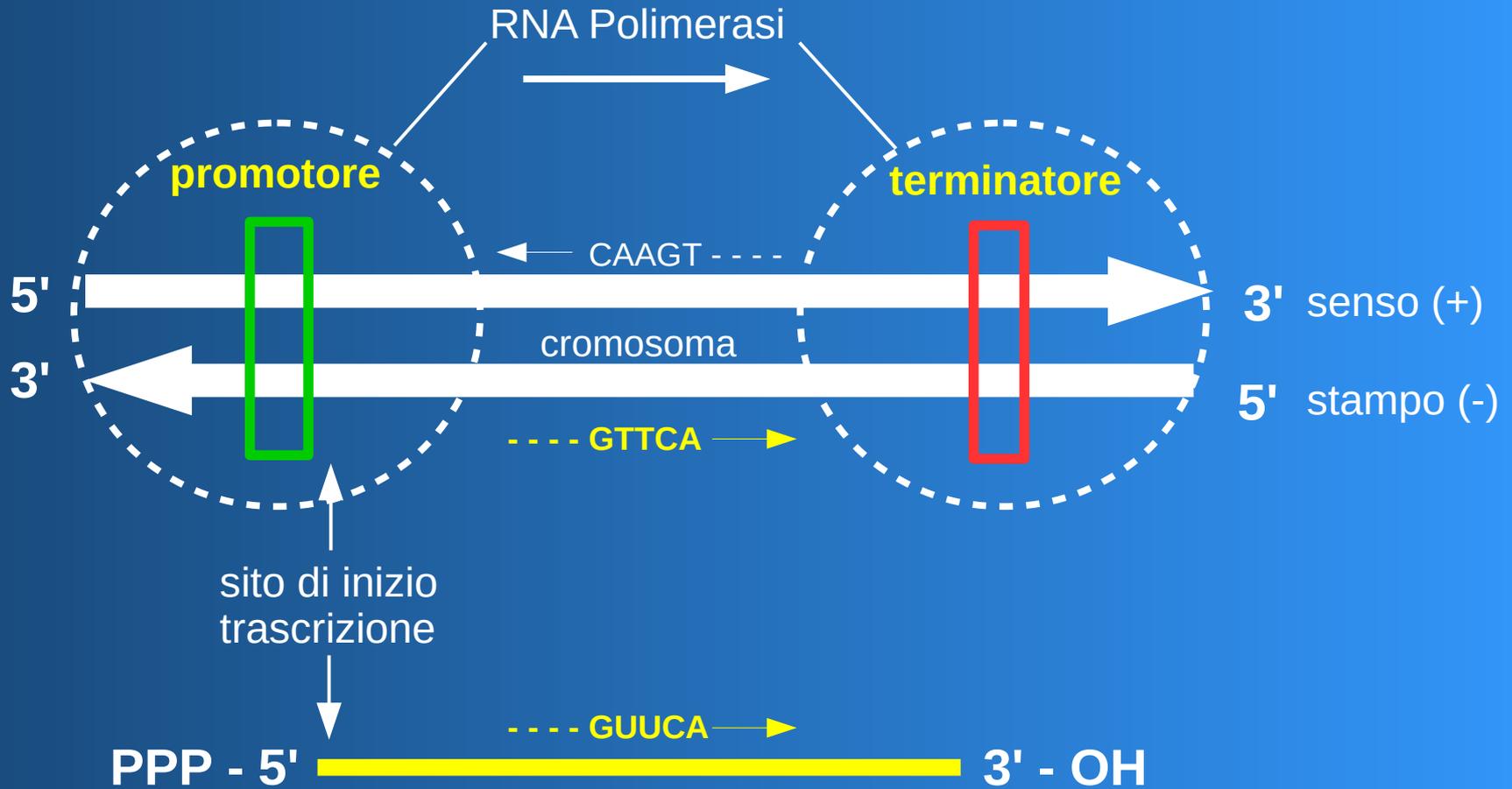


Entrambi i filamenti possono essere trascritti

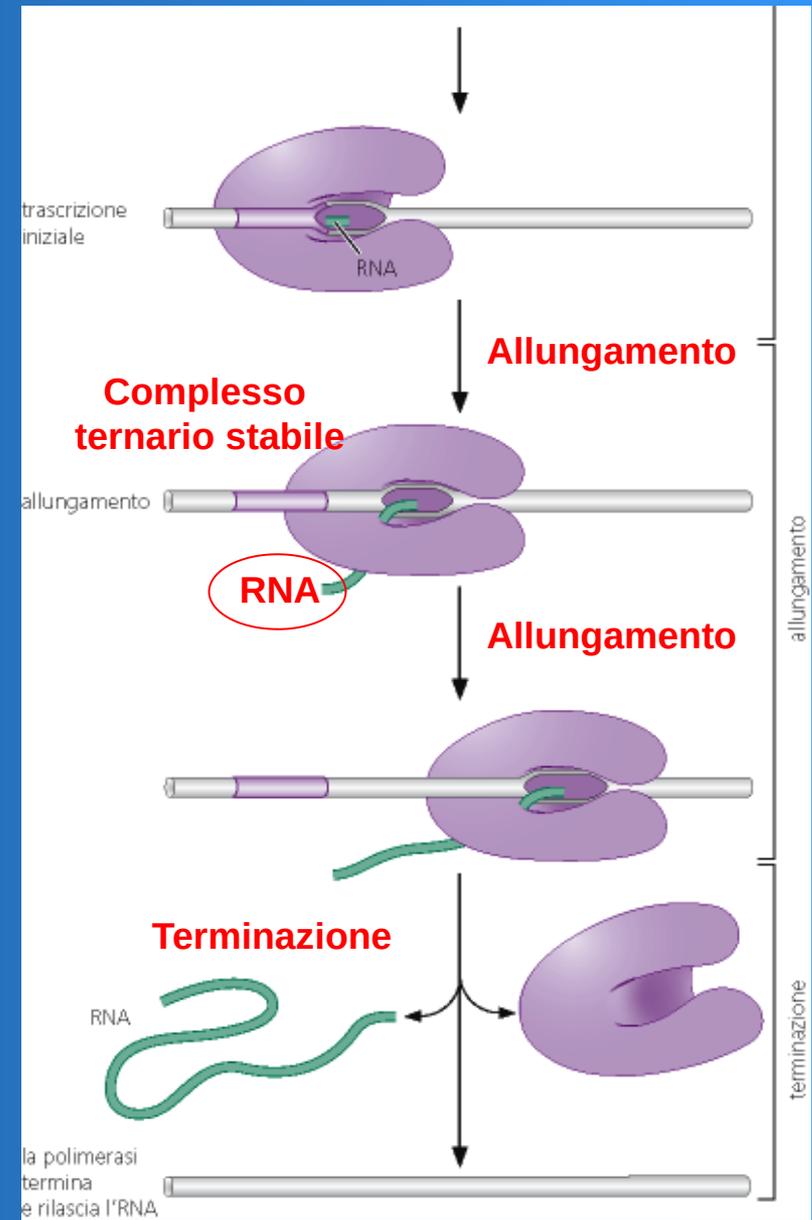
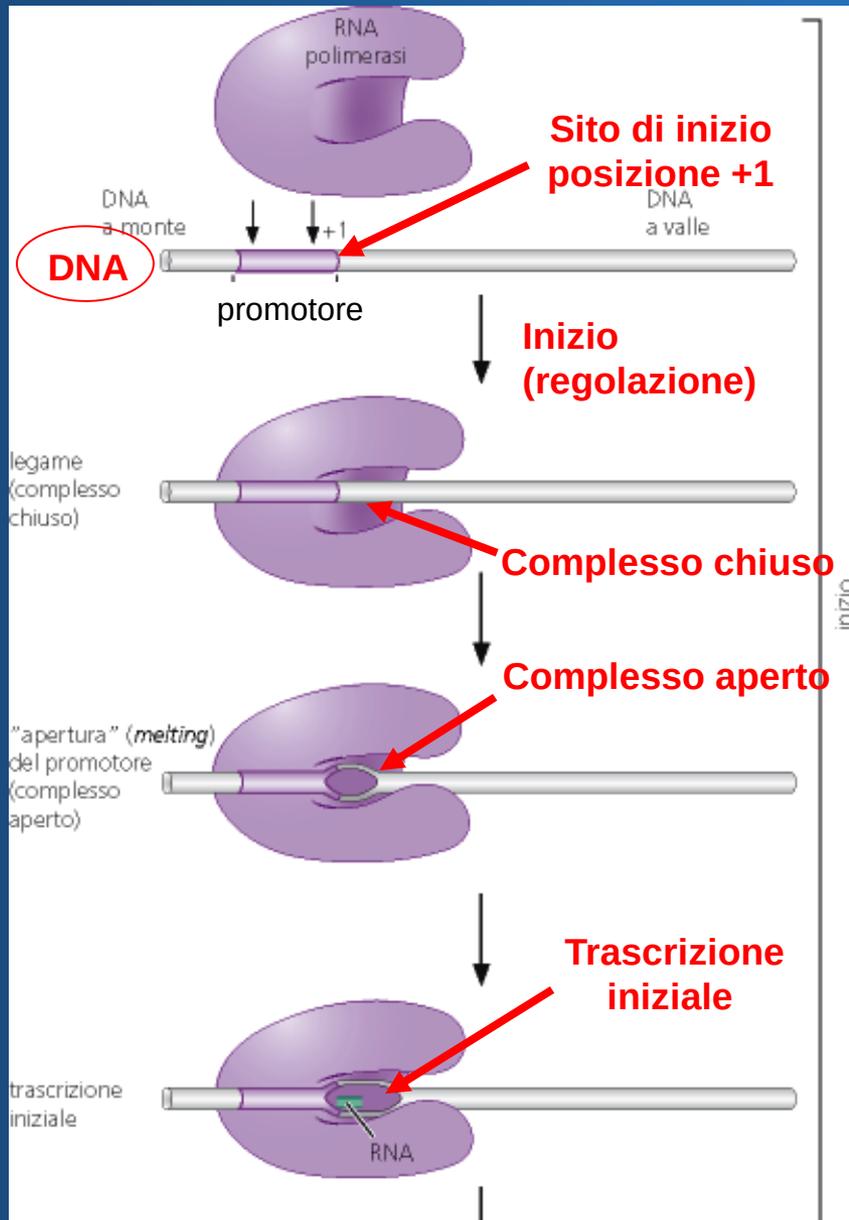


Decide tutto la posizione del promotore !!!

Architettura della trascrizione



Il promotore determina inizio e direzione



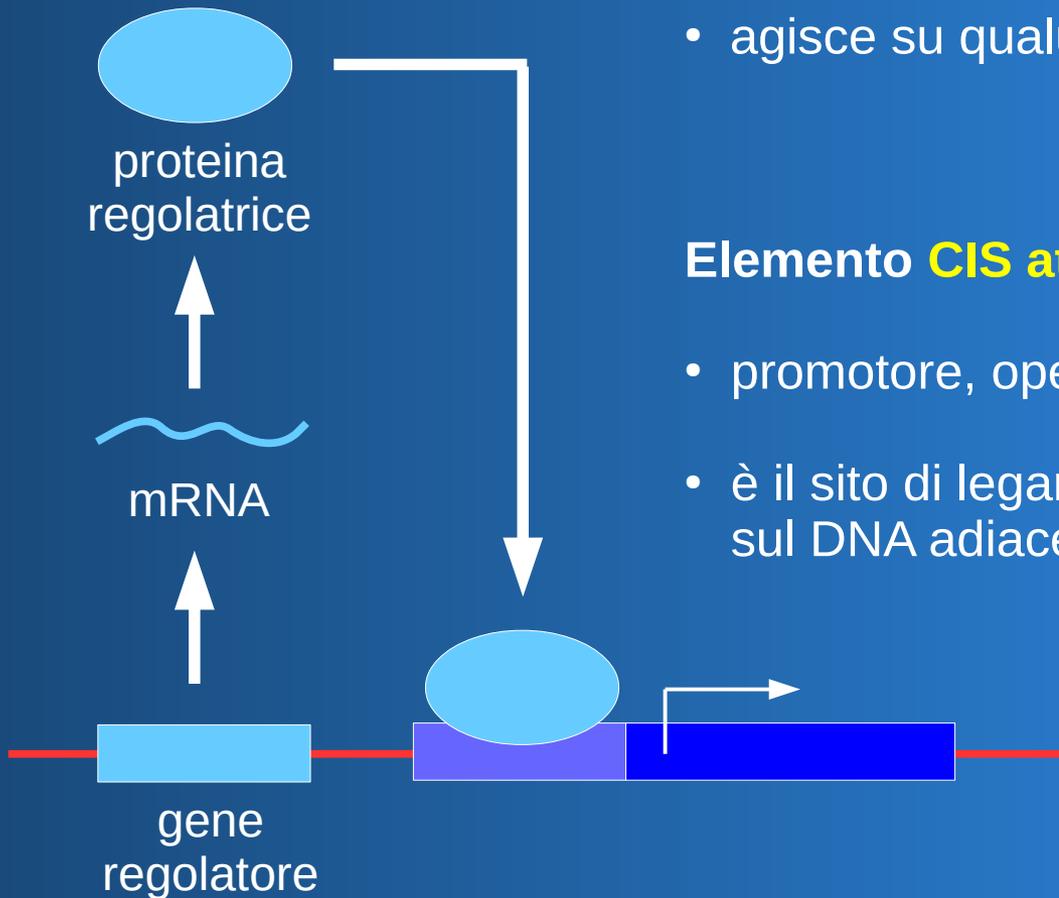
Elementi Cis e Trans

Elemento **TRANS attivo**: elemento **diffusibile**

- RNA polimerasi, fattori di trascrizione etc.
- agisce su qualunque copia del suo bersaglio

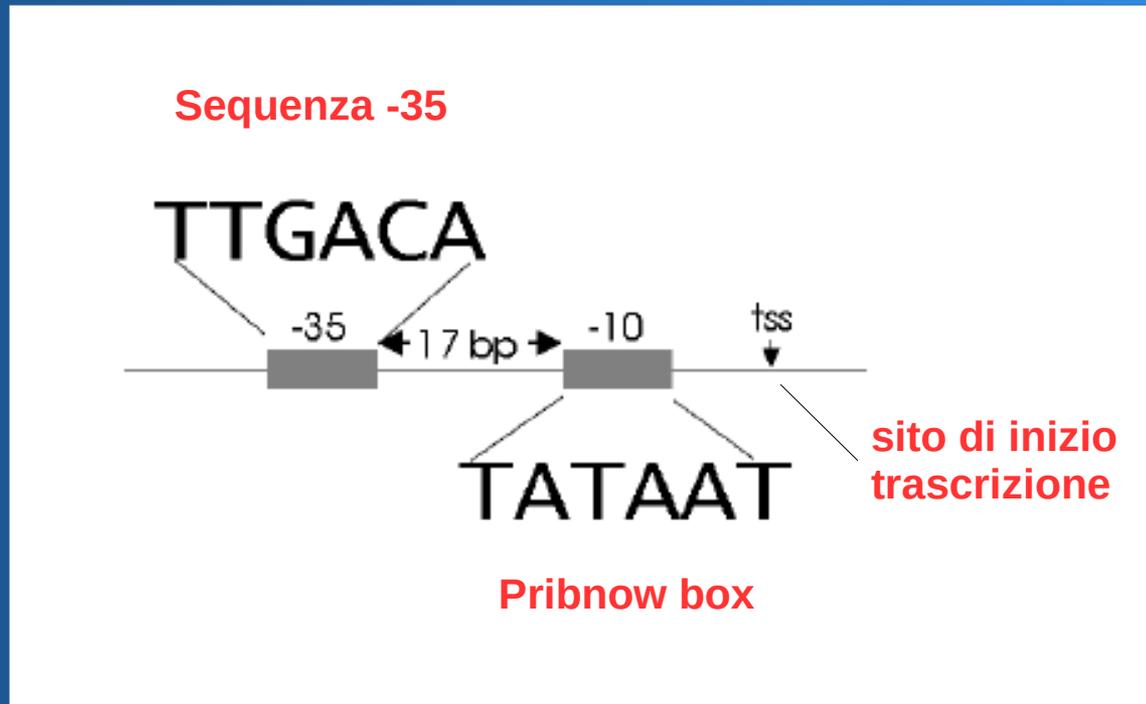
Elemento **CIS attivo**: elemento **fisso** sul DNA

- promotore, operatore, enhancer ecc.
- è il sito di legame (bersaglio) e ha effetto solo sul DNA adiacente



Il promotore procariotico

Sequenza di DNA a cui si lega la RNA polimerasi. I promotori servono a specificare il punto di inizio della trascrizione e quale filamento di DNA leggere



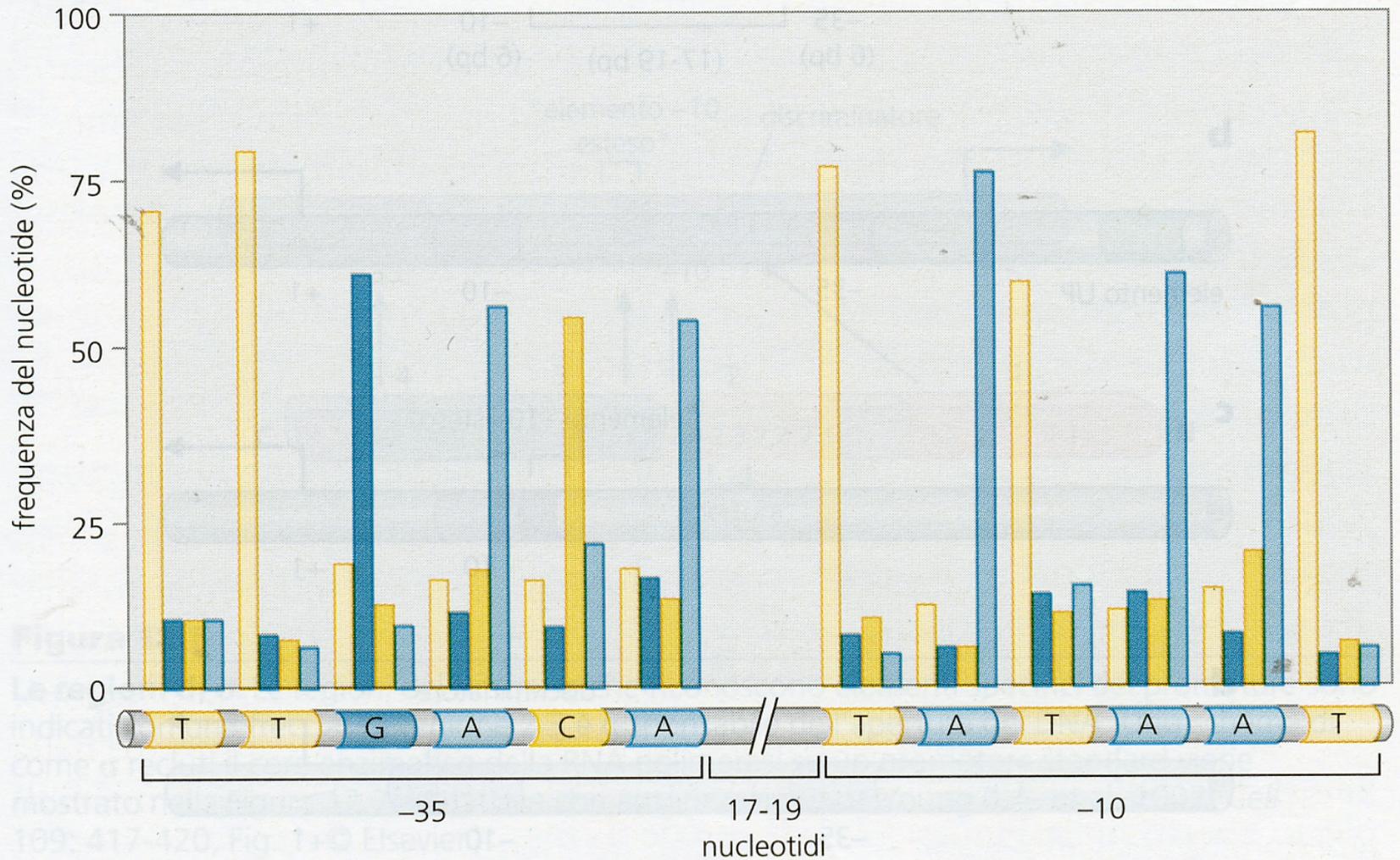
Alcuni promotori forti hanno un elemento addizionale di DNA che si chiama **elemento UP**

Promotori di E. coli

-35
TTGACA
-10
TATAAT
+1
sito di
inizio

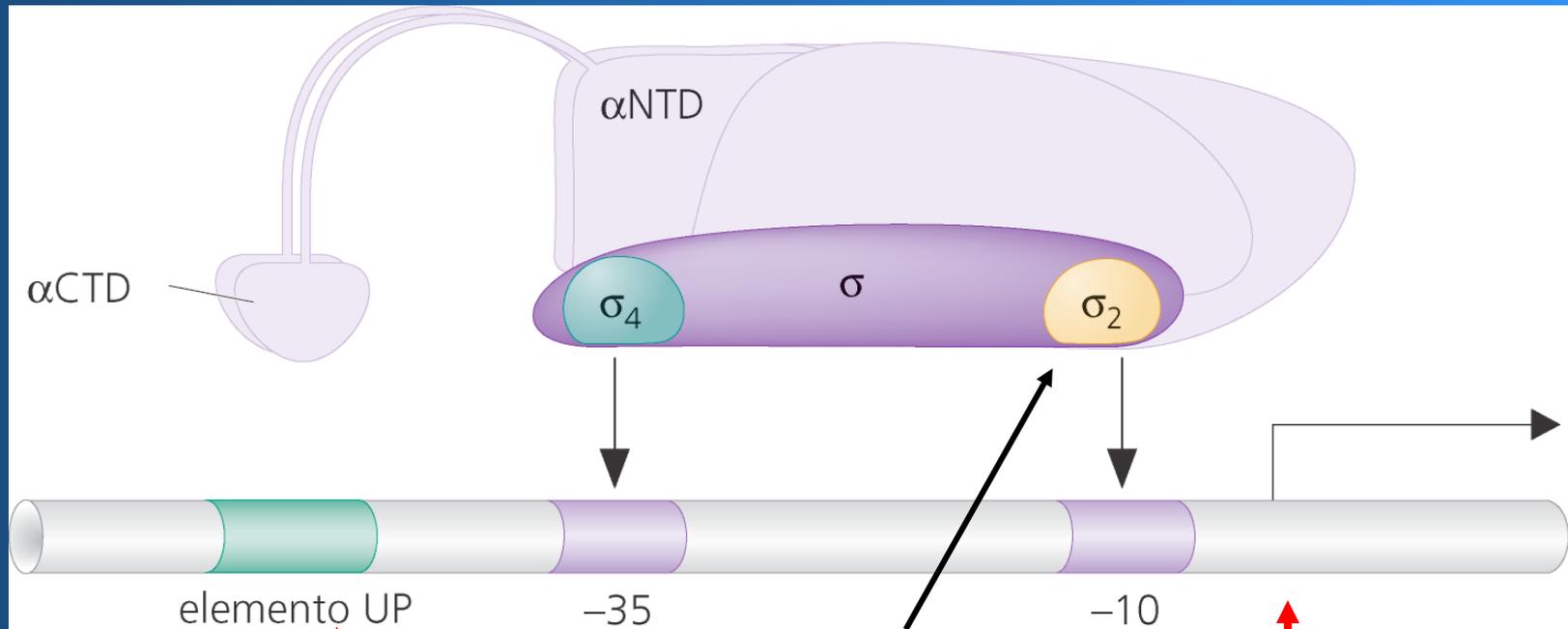
	UP element	-35 Region	Spacer	-10 Region	Spacer	RNA start
Consensus sequence	NNAAA ^{AA} _{TT} ^A _T TTTNNAAAANN	N TTGACA	N ₁₇	TATAAT	N ₆	+1
<i>rrnB</i> P1	AGAAAATTATTTTAAATTCCT	N GTGTCA	N ₁₆	TATAAT	N ₈	A
<i>trp</i>		TTGACA	N ₁₇	TTAACT	N ₇	A
<i>lac</i>		TTTACA	N ₁₇	TATGTT	N ₆	A
<i>recA</i>		TTGATA	N ₁₆	TATAAT	N ₇	A
<i>araBAD</i>		CTGACG	N ₁₈	TACTGT	N ₆	A

Struttura di un promotore procariotico



Fattori addizionali della RNA polimerasi

La subunità α con i fattori σ legano la RNA polimerasi al promotore. In fase di allungamento i fattori σ vengono solitamente rimossi



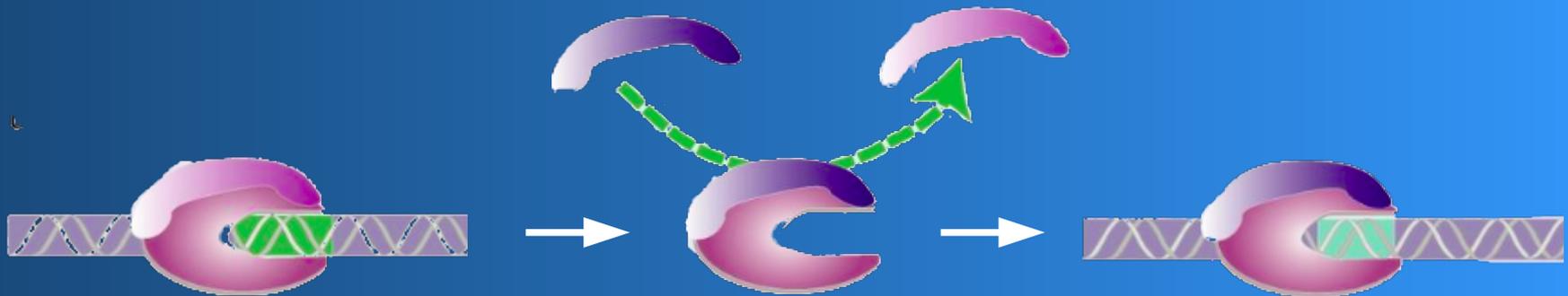
Presente in promotori particolarmente forti (riconosciuto dalla sub α)

Media l'apertura del DNA (AA aromatici)

Sito di inizio della trascrizione

Fattori sigma

Sigma	Gene	Massa	Uso	Sequenza -35	Separazione	Sequenza -10
σ^{70}	rpoD	70,000	generale	TTGACA	16-18 bp	TATAAT
σ^H	rpoH	32,000	shock termico	CNCTTGAA	13-15 bp	CCCCATNT
σ^N	rpoN	54,000	carenza azoto	CTGGNA	6 bp	TTGCA
σ^F	flaI	28,000	flagellare	TAAA	15 bp	GCCGATAA

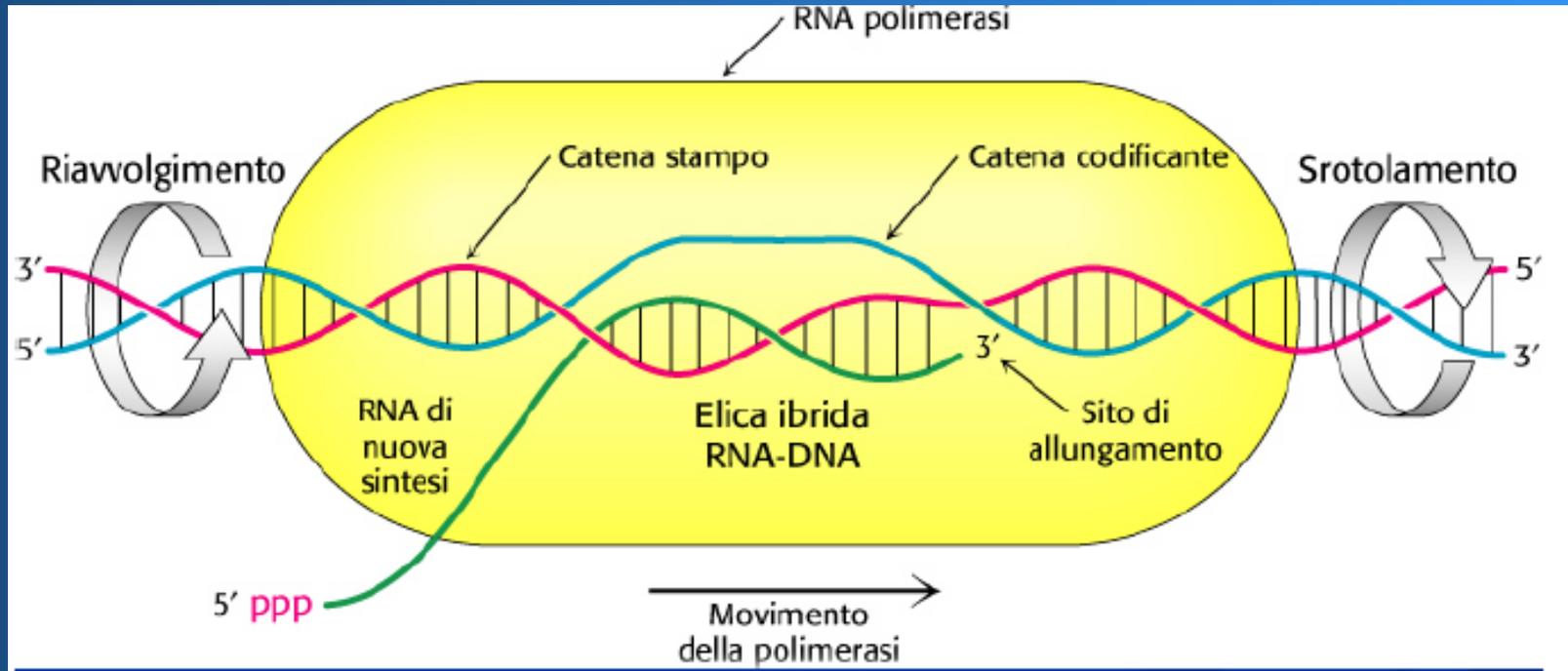


σ^{70} permette il legame a specifici promotori

Il cambio di condizioni ambientali provoca il cambio del fattore σ

Il cambio di σ permette il legame a promotori diversi

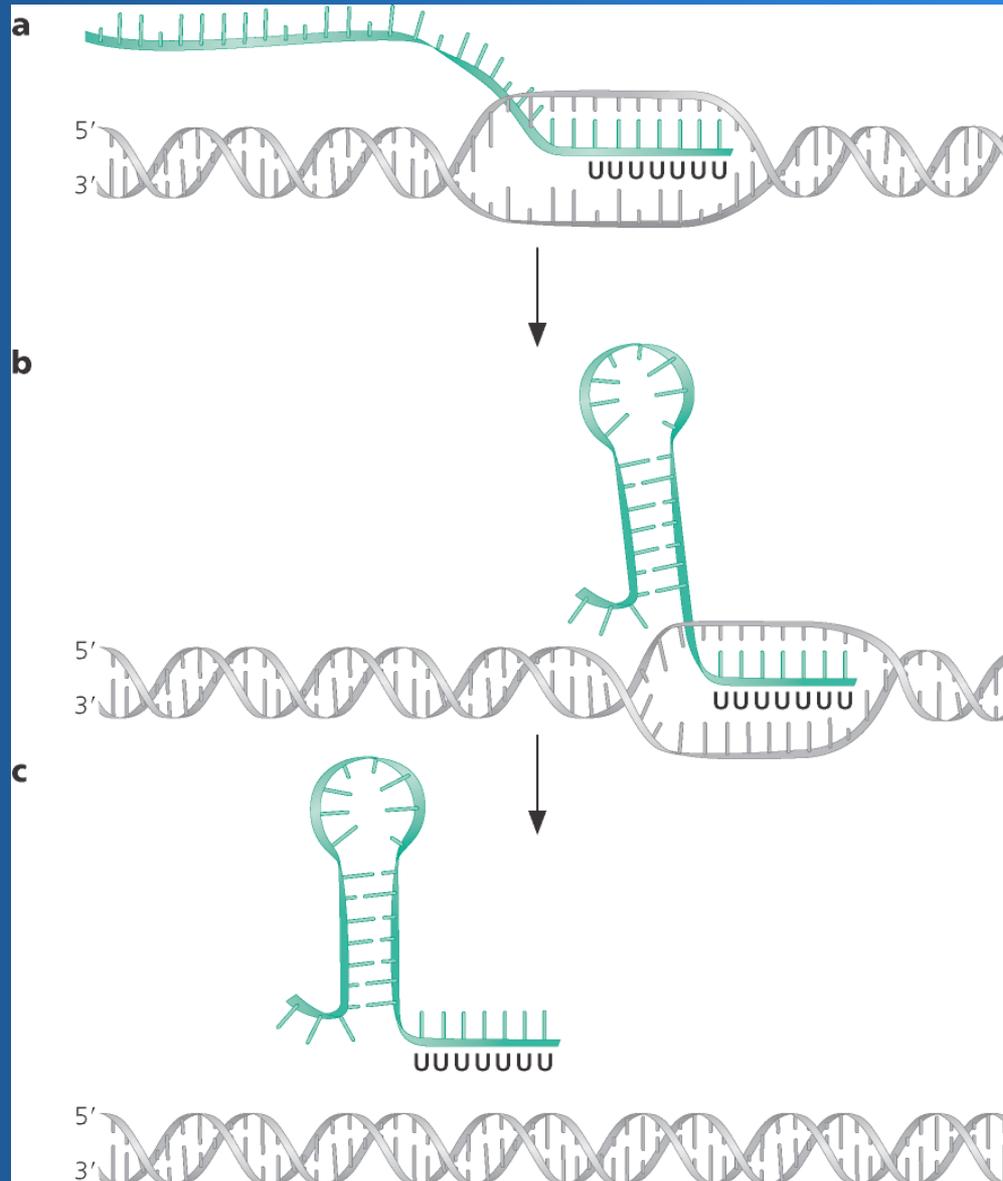
Trascrizione attiva



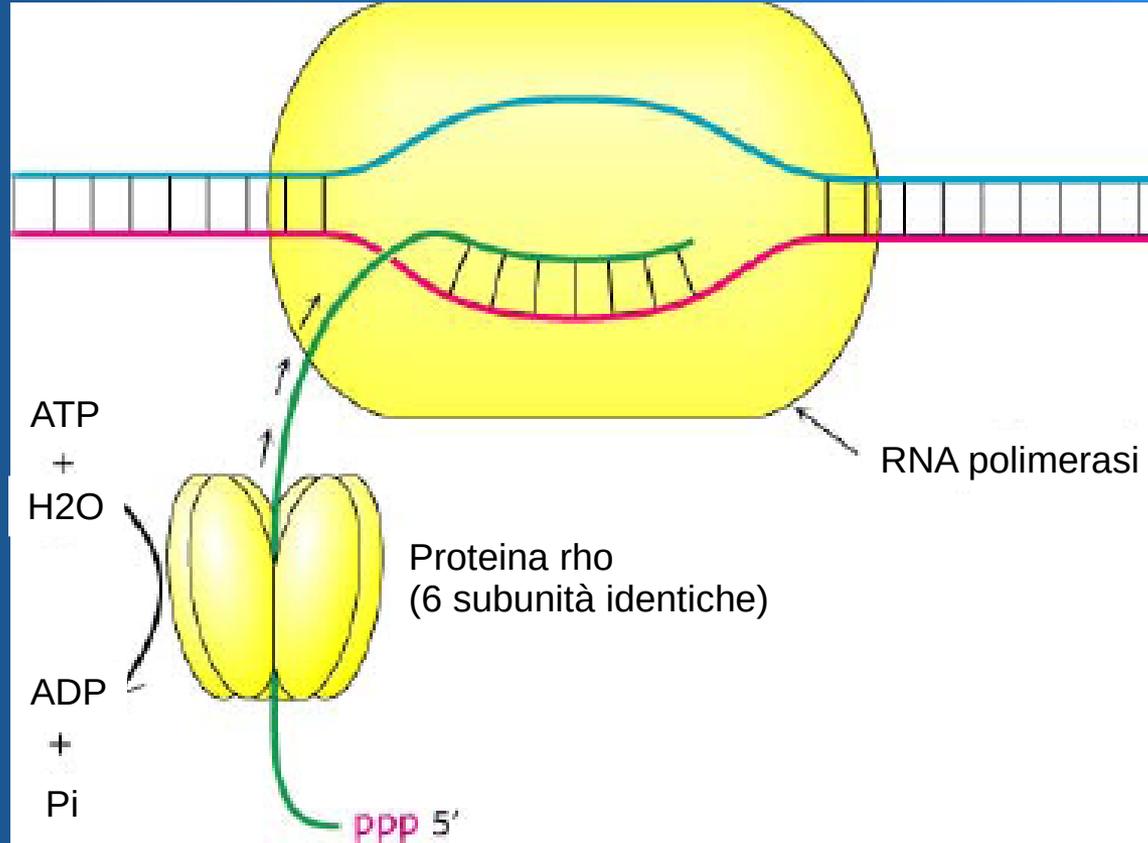
La polimerasi forma una bolla di trascrizione in cui:

- il DNA scorre e i filamenti vengono aperti
- l'RNA viene polimerizzato (si forma un ibrido DNA/RNA)
- l'RNA esce dalla bolla man mano che viene prodotto
- il DNA si riavvolge subito dopo la bolla

Terminazione della trascrizione rho indipendente



Terminazione della trascrizione rho-dipendente



Rho lega i **siti rut** (Rho utilization, una serie di circa 40 nucleotidi) sull'RNA uscente e "rincorre" la RNA polimerasi finché non si raggiungono i siti di terminazione. Questi siti **rallentano** la Pol che **viene raggiunta da Rho** e il complesso trascrizionale si dissocia.

Controllo dell'espressione genica

L'espressione genica è controllata da proteine regolatrici :

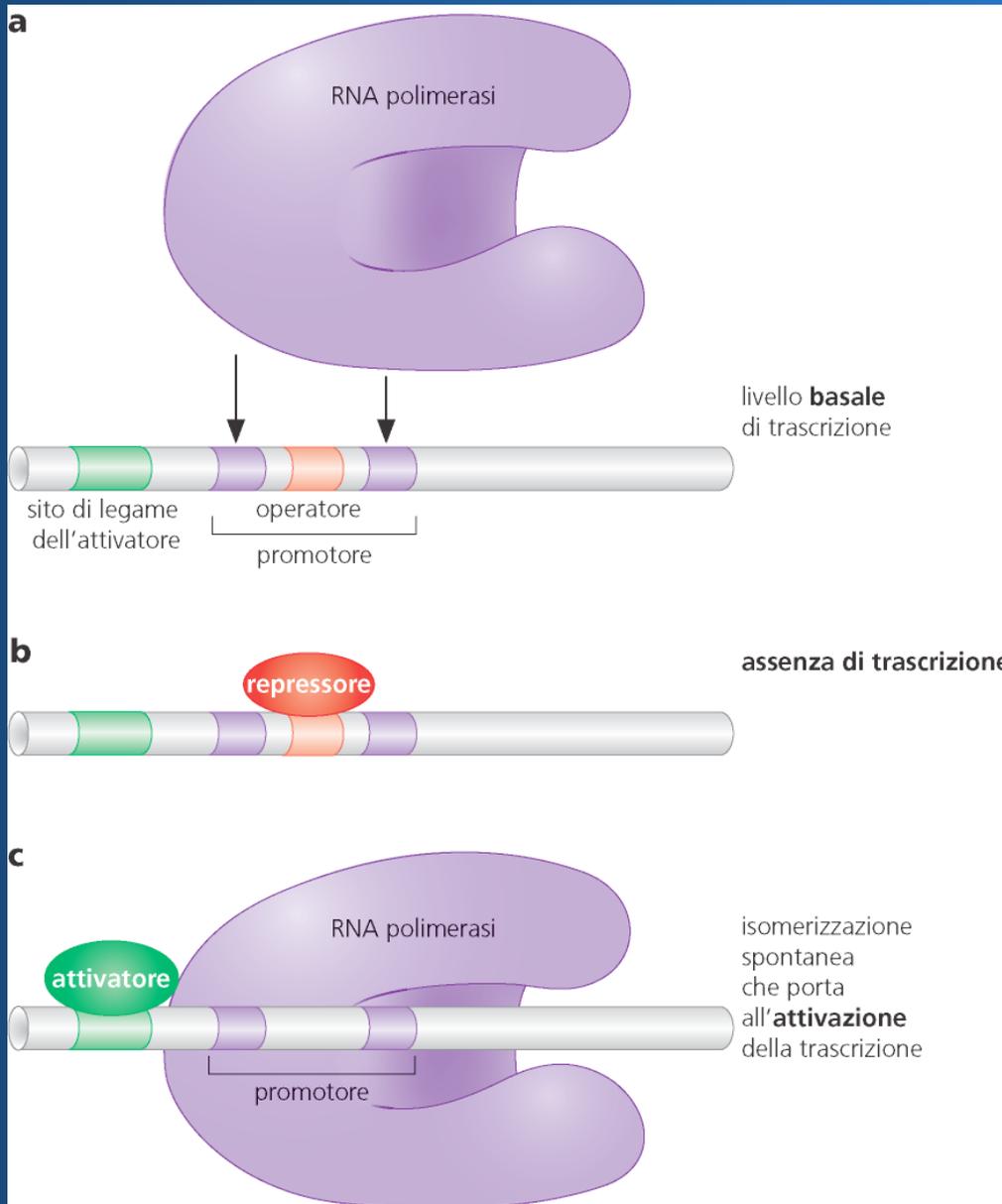
Attivatori: in grado di aumentare la trascrizione del gene regolato

Repressori: in grado di diminuire o abolire la trascrizione del gene regolato

Solitamente nei **procarioti** i fattori di regolazione agiscono legando **piccole molecole** (es. metaboliti).

L'interazione permette ai fattori di regolazione di legare (o allontanarsi) regioni vicine all'**inizio** della regione contenente il gene da trascrivere, favorendo o inibendo il legame dell'RNA polimerasi al DNA.

Repressori e attivatori

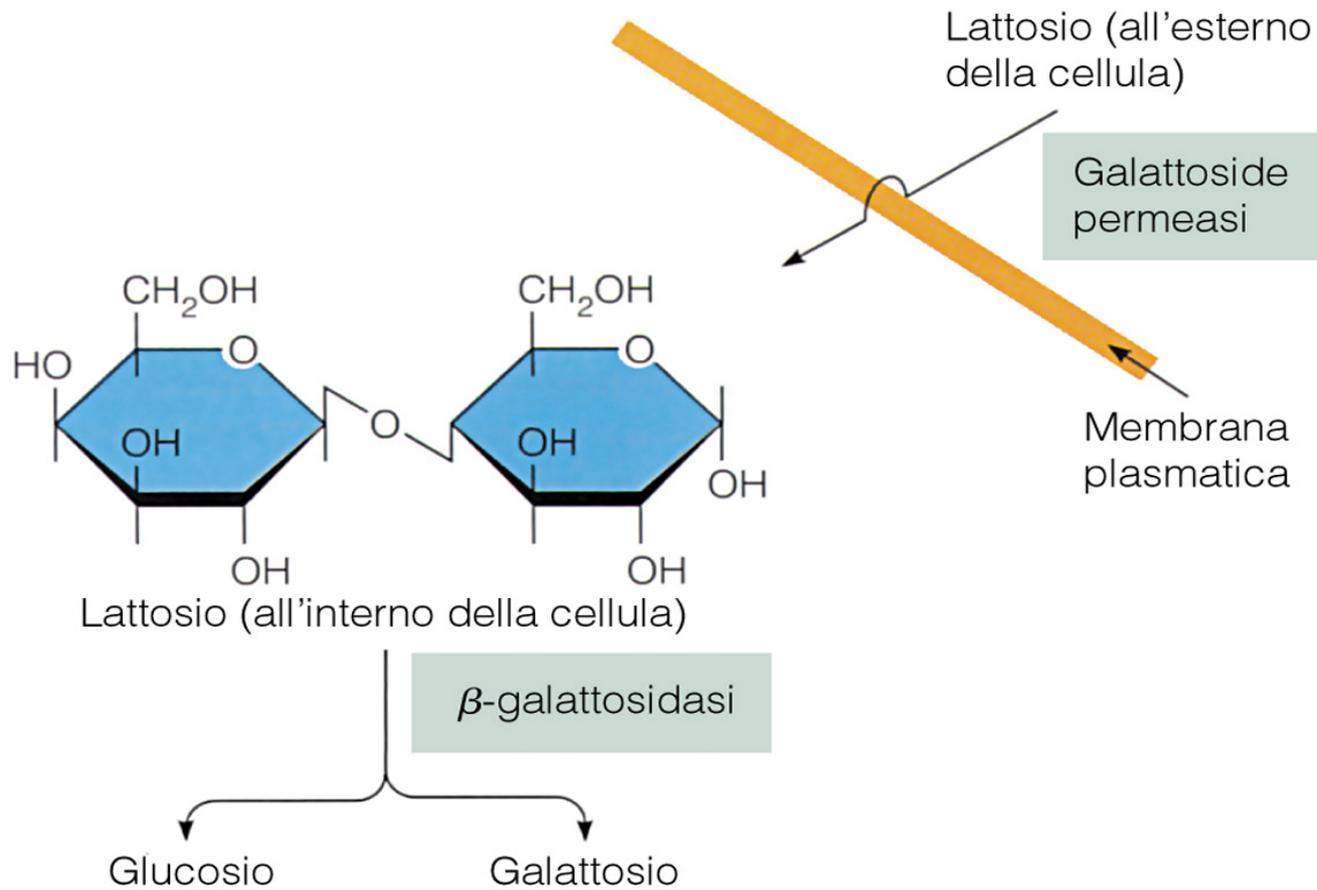


In assenza di un attivatore la RNA polimerasi può interagire debolmente tramite i σ con il promotore e produrre bassi livelli di mRNA (**trascrizione basale**)

Un **repressore** agisce occupando il sito di binding della polimerasi, bloccando quindi la trascrizione

Un **attivatore** stabilizza il legame della polimerasi e ne favorisce la forma chiusa con incremento della attività trascrizionale

Vie cataboliche e induzione da substrato

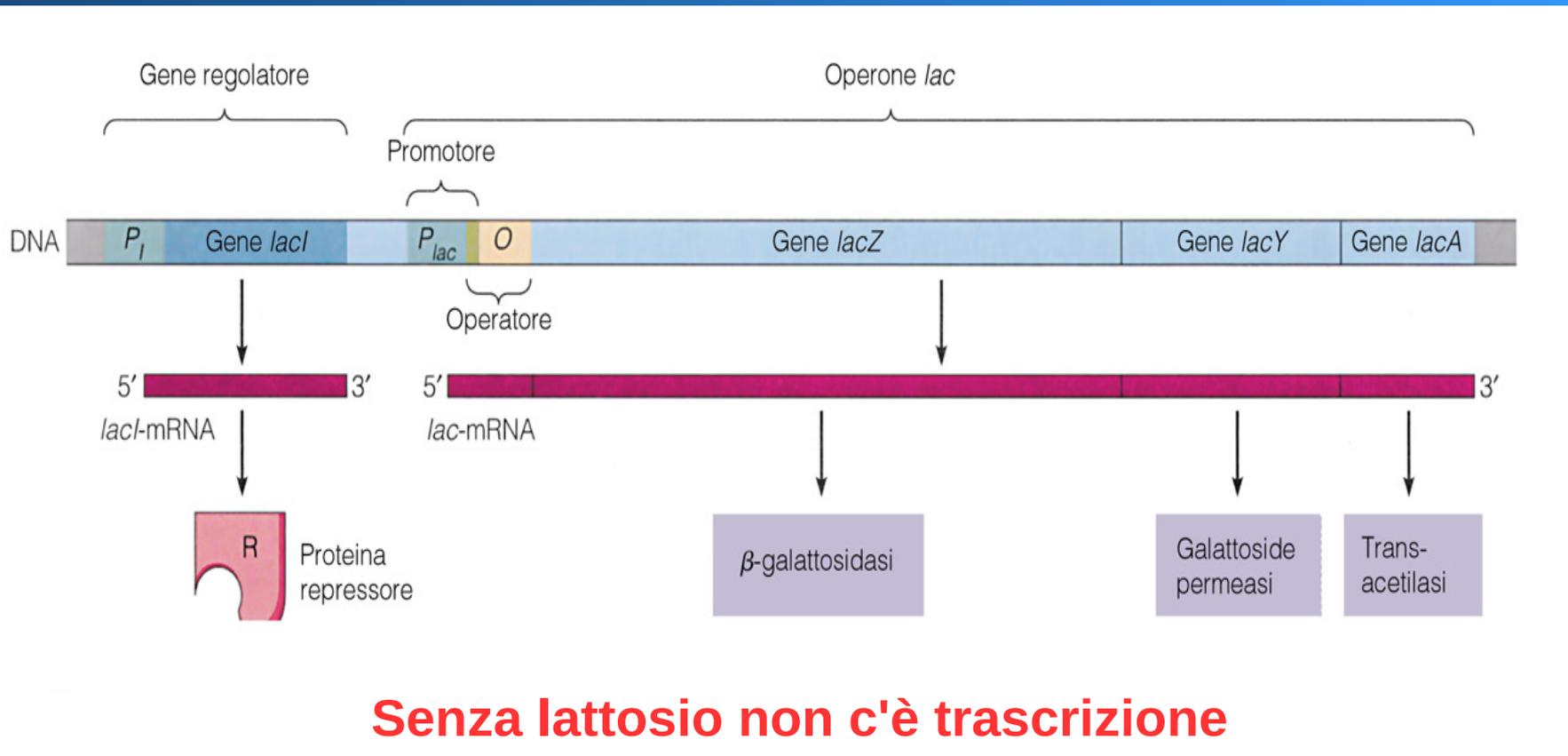


Catabolismo del lattosio: l'operone lac

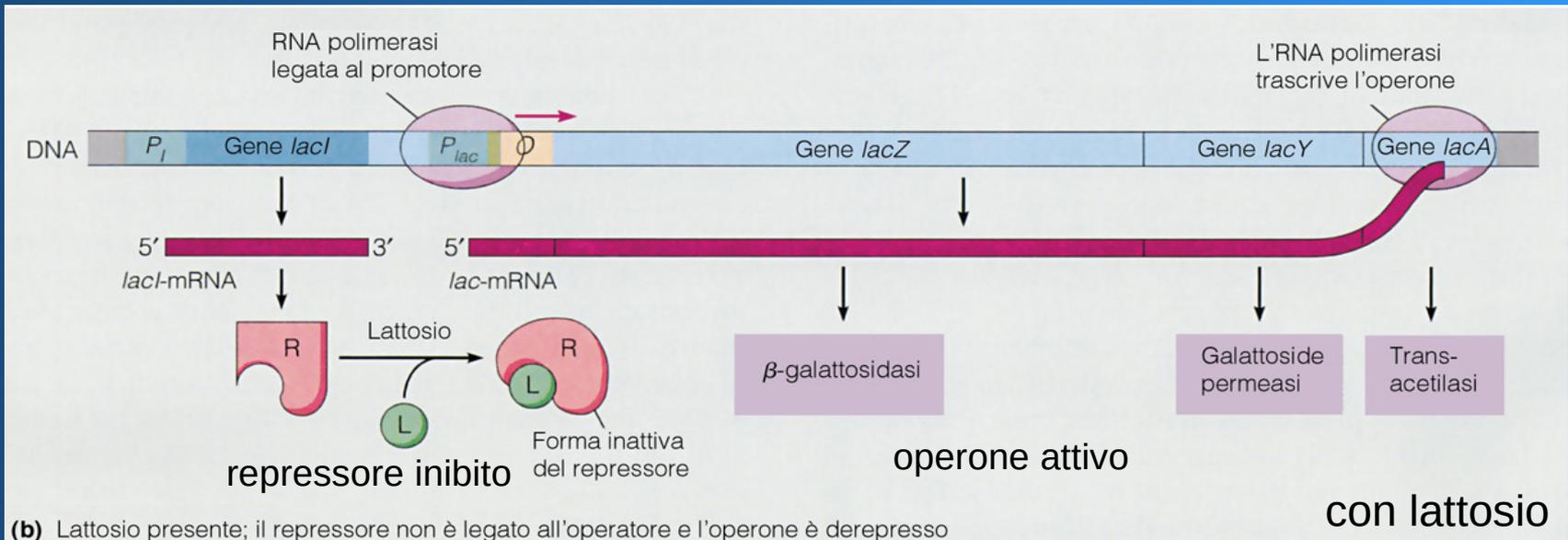
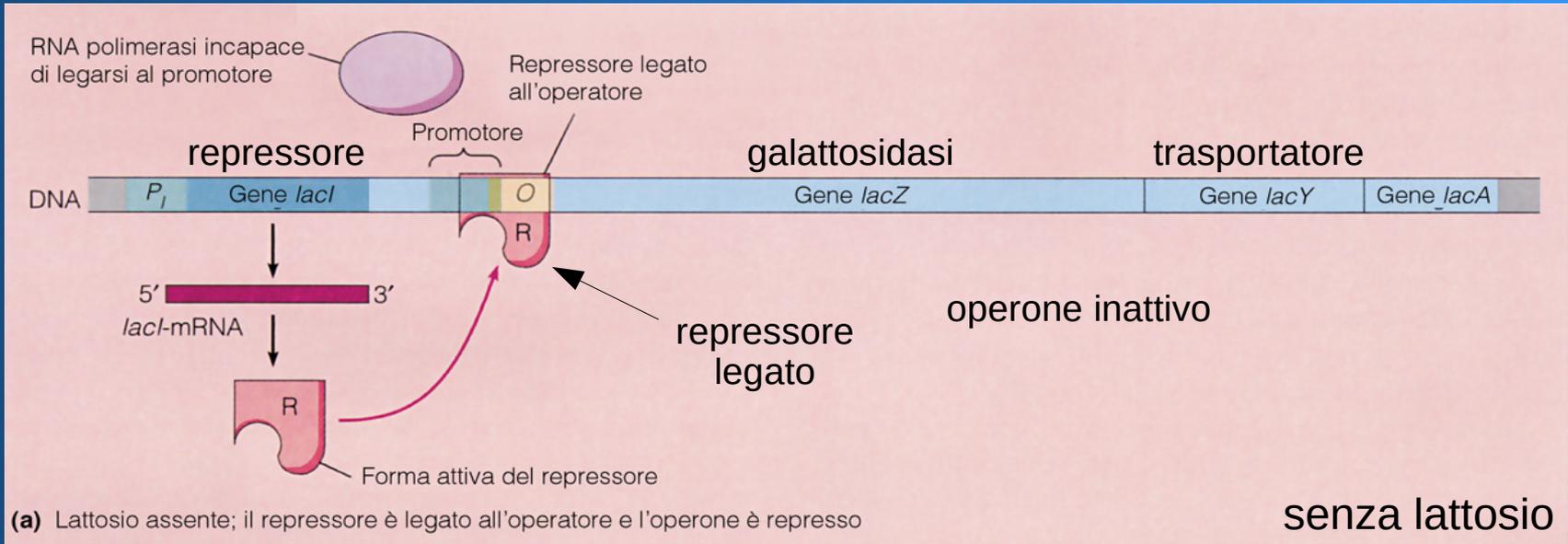


Jacob Monod
Nobel 1965

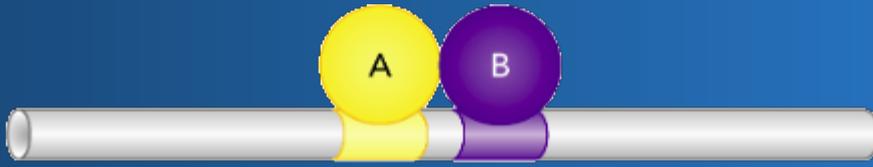
Essendo un nutriente occasionale, il gene per l'utilizzo del lattosio è **indotto** dalla sua presenza.



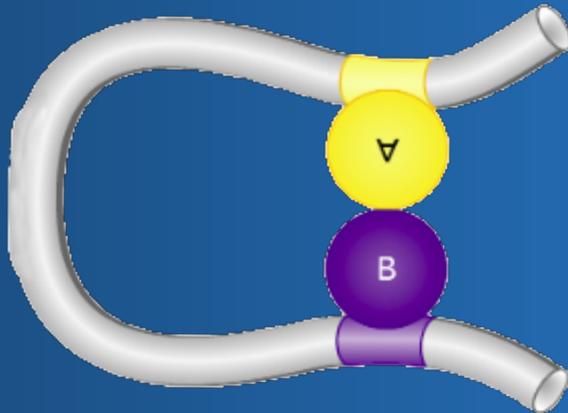
Regolazione dell'operone lac in E. coli



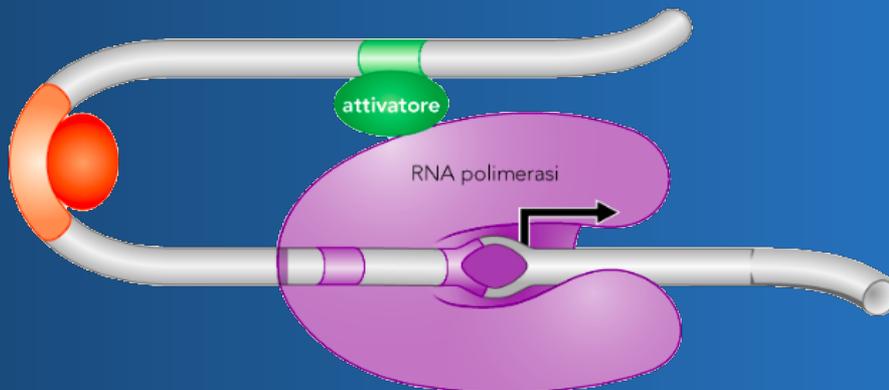
Regolazione per allosterismo



Interazione a breve distanza

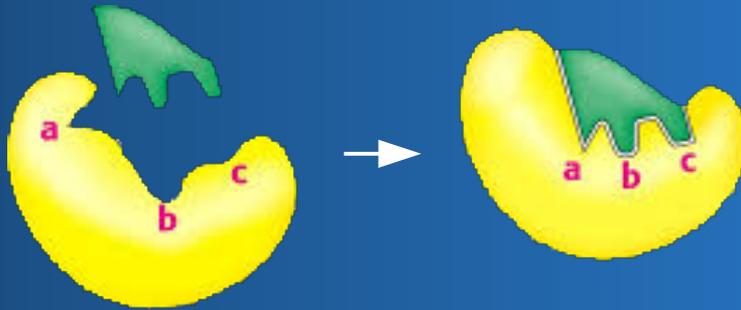


Interazione a media distanza



Interazione a lunga distanza
(con un fattore che favorisce
la curvatura)

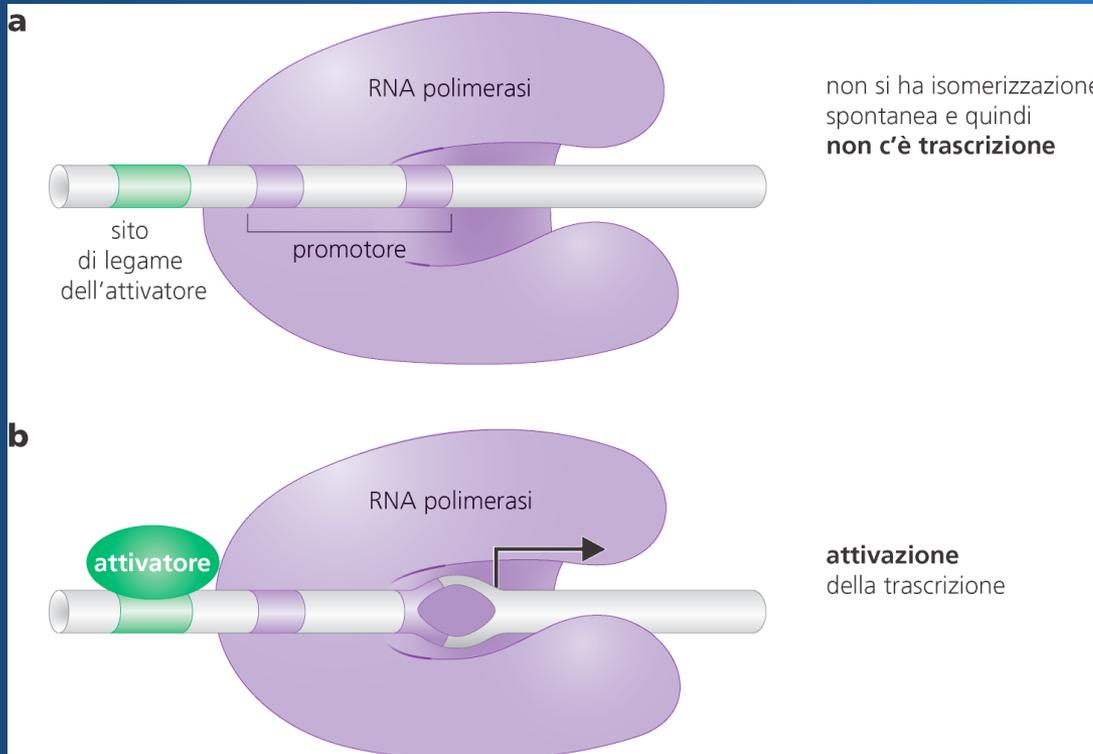
Regolazione per allosterismo



La RNA polimerasi è associata in modo stabile al promotore ma non è attiva.

L'attivatore della RNA polimerasi è controllato da un metabolita che lo rende affine al sito di legame

La trascrizione sarà più intensa quanto più abbondante è il metabolita

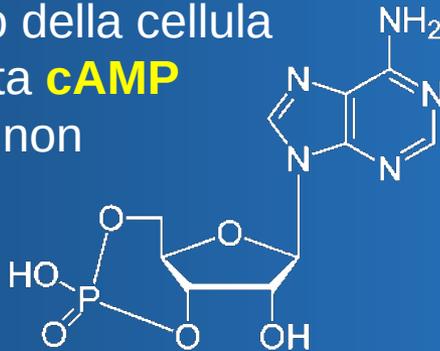


Effetto del glucosio sull'operone Lac in E. coli

Due attori in gioco:

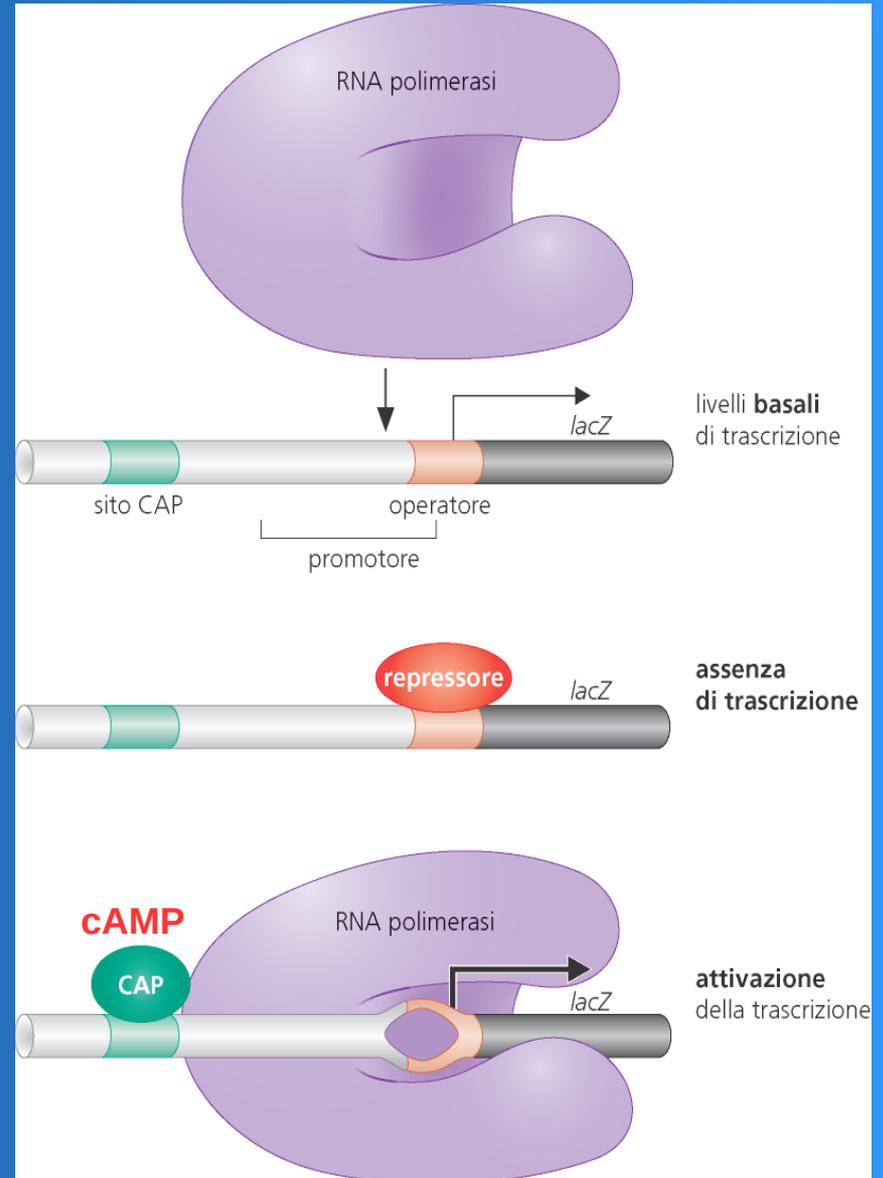
- **LacI: Lactose inhibitor (repressore)**
 - sempre attivo
 - rimosso dal lattosio
- **CRP/CAP: Catabolite Activator Protein**
 - sensore dell'AMP ciclico (cAMP)
 - recluta la polimerasi

L'operone sente oltre che il lattosio anche lo stato energetico della cellula tramite il metabolita **cAMP** che è alto solo se non c'è glucosio

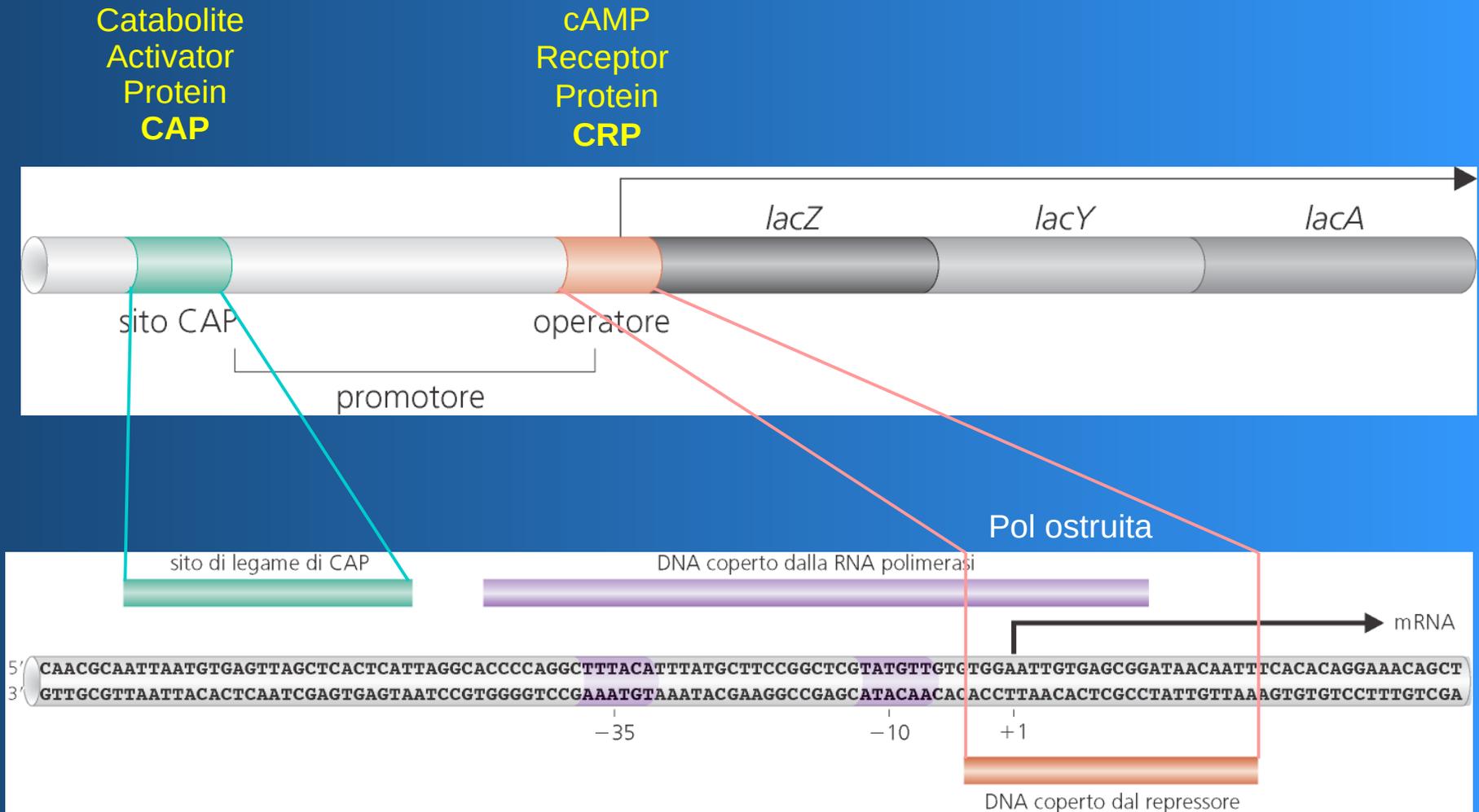


Abbiamo tre condizioni possibili:

glucosio	lattosio	stato attivazione
+	+	-
+	-	-
-	+	+



Doppia regolazione dell'operone Lac



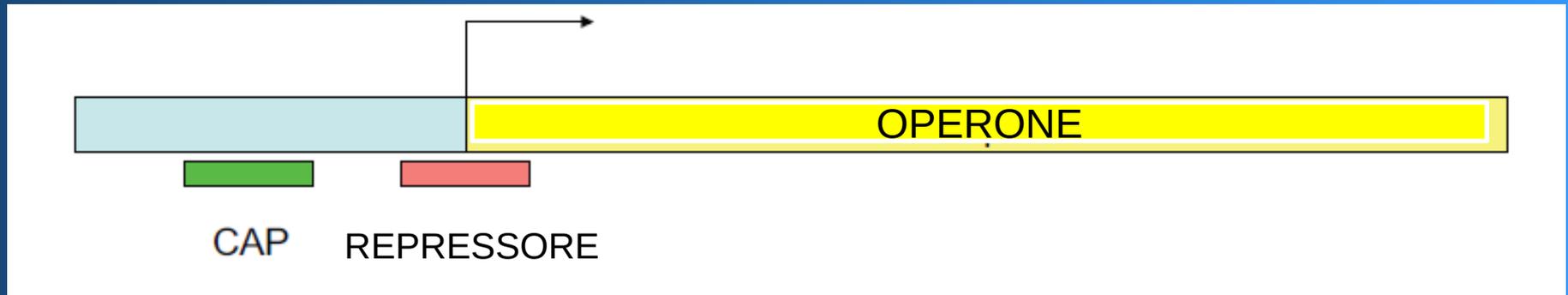
attiva solo con alto cAMP = basso GLUCOSIO

Controllo combinatorio della regolazione genica

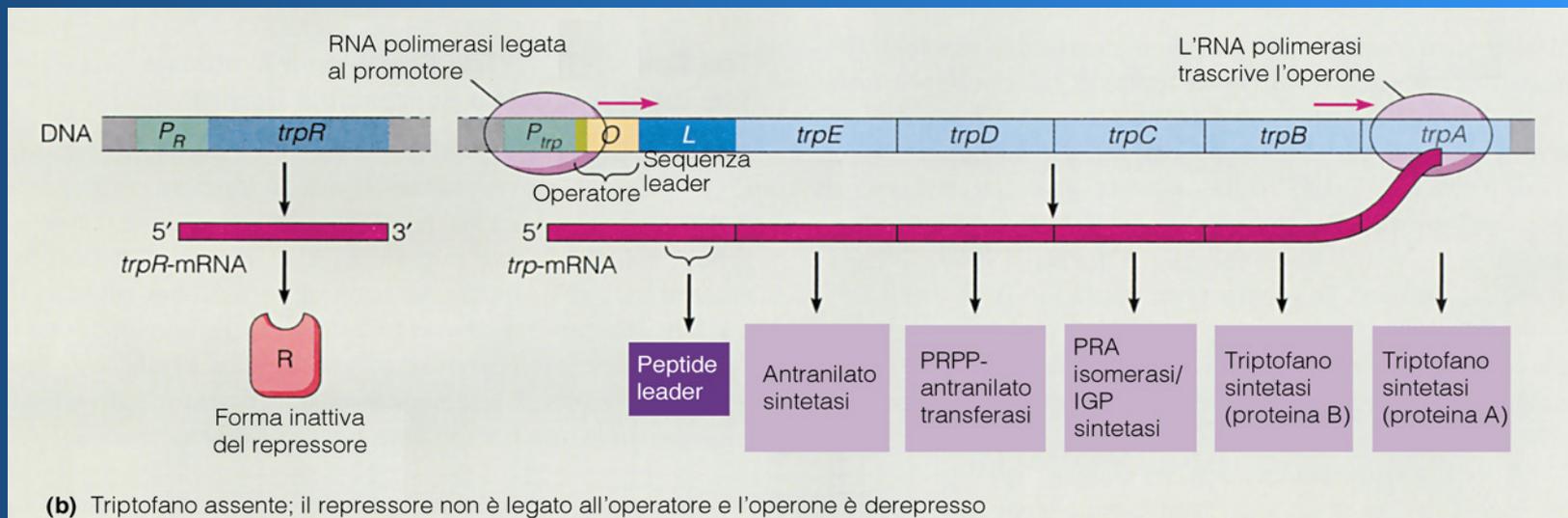
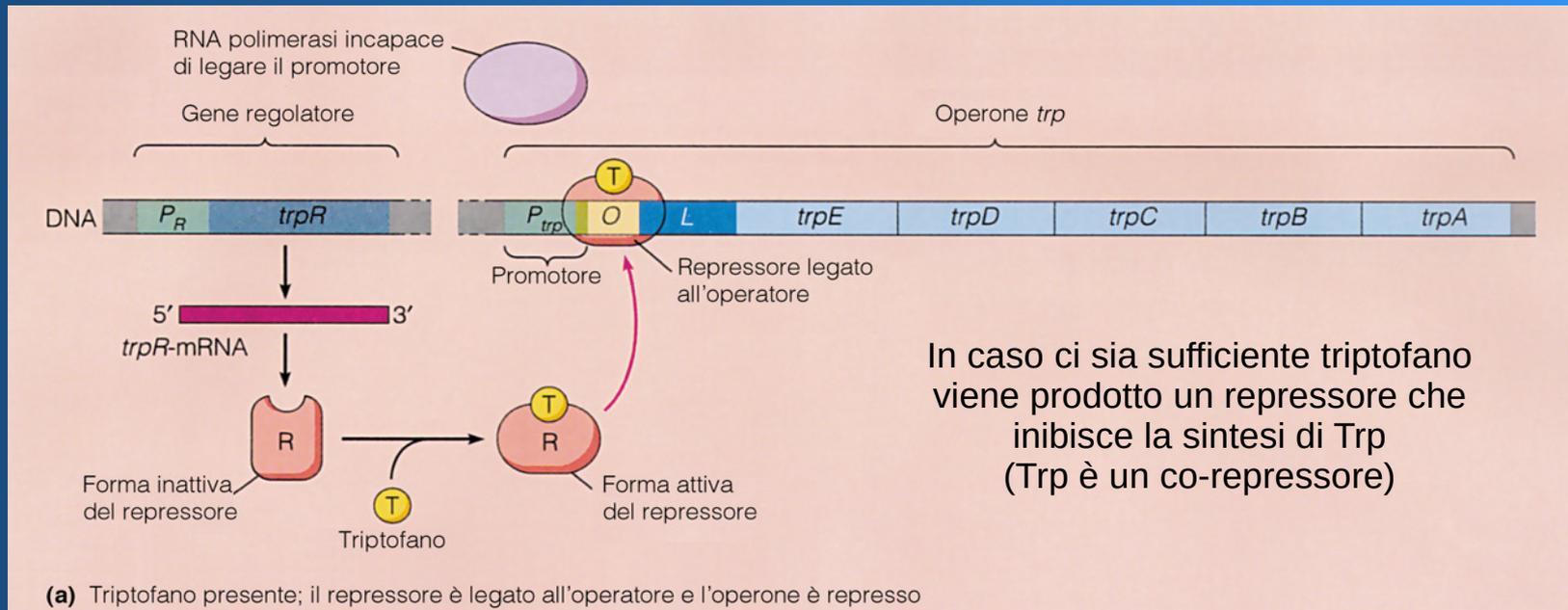
L'operone Lac fornisce un esempio di **integrazione** del segnale di regolazione mediato da due segnali distinti.

I segnali possono essere anche più di due e lo **stesso segnale** può intervenire **in diversi pathway** di regolazione.

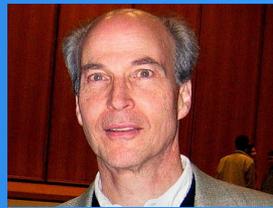
Ad esempio, l'attivatore CAP controlla in *E. coli* oltre 100 geni differenti.



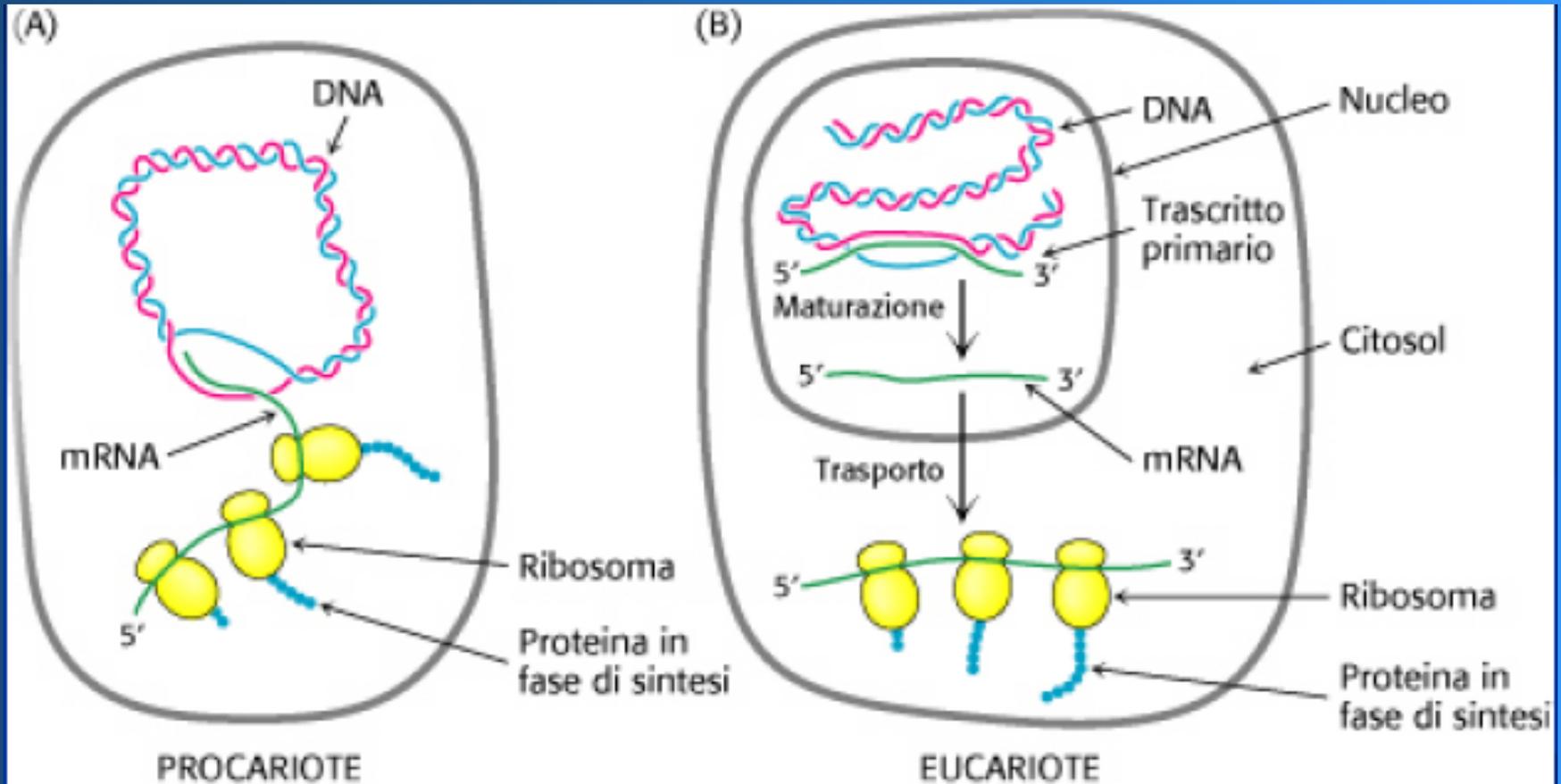
Regolazione negativa dell'operone triptofano



La trascrizione negli eucarioti



Roger Kornberg
Nobel 2006



La trascrizione negli eucarioti

Mentre nei procarioti il controllo è soprattutto a livello trascrizionale e riguarda una sola polimerasi, negli eucarioti esistono vari livelli di controllo e vari tipi di polimerasi

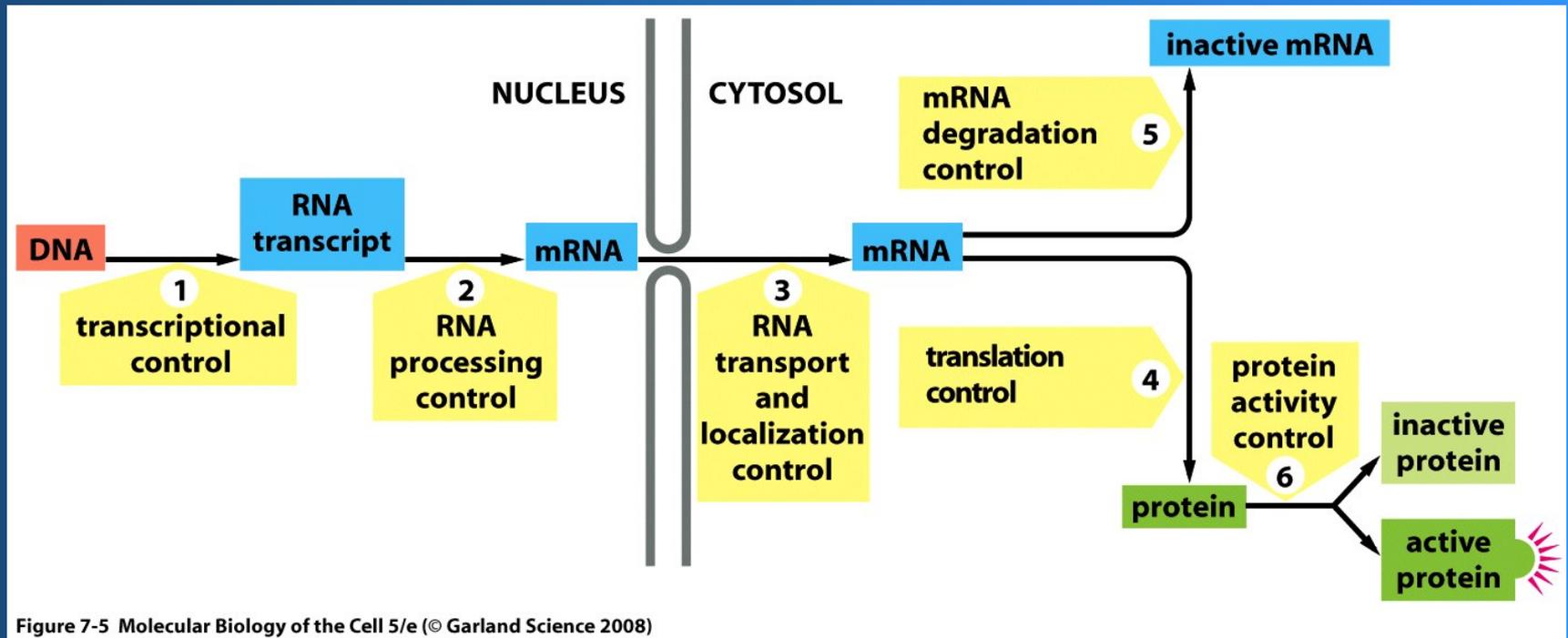


Figure 7-5 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

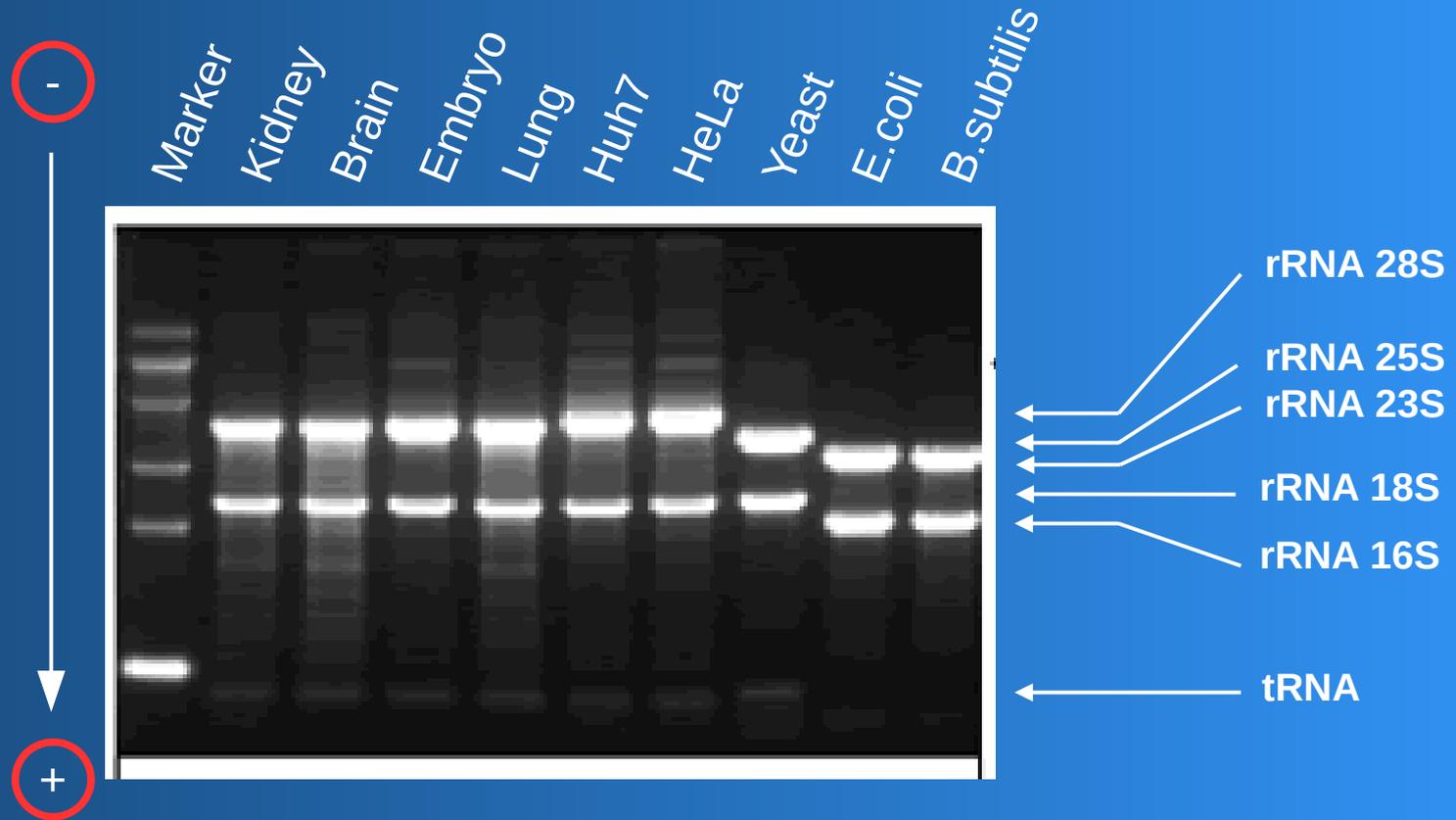
La trascrizione negli eucarioti

Polimerasi diverse sono dedicate e quindi trascrivono tipologie diverse di target.

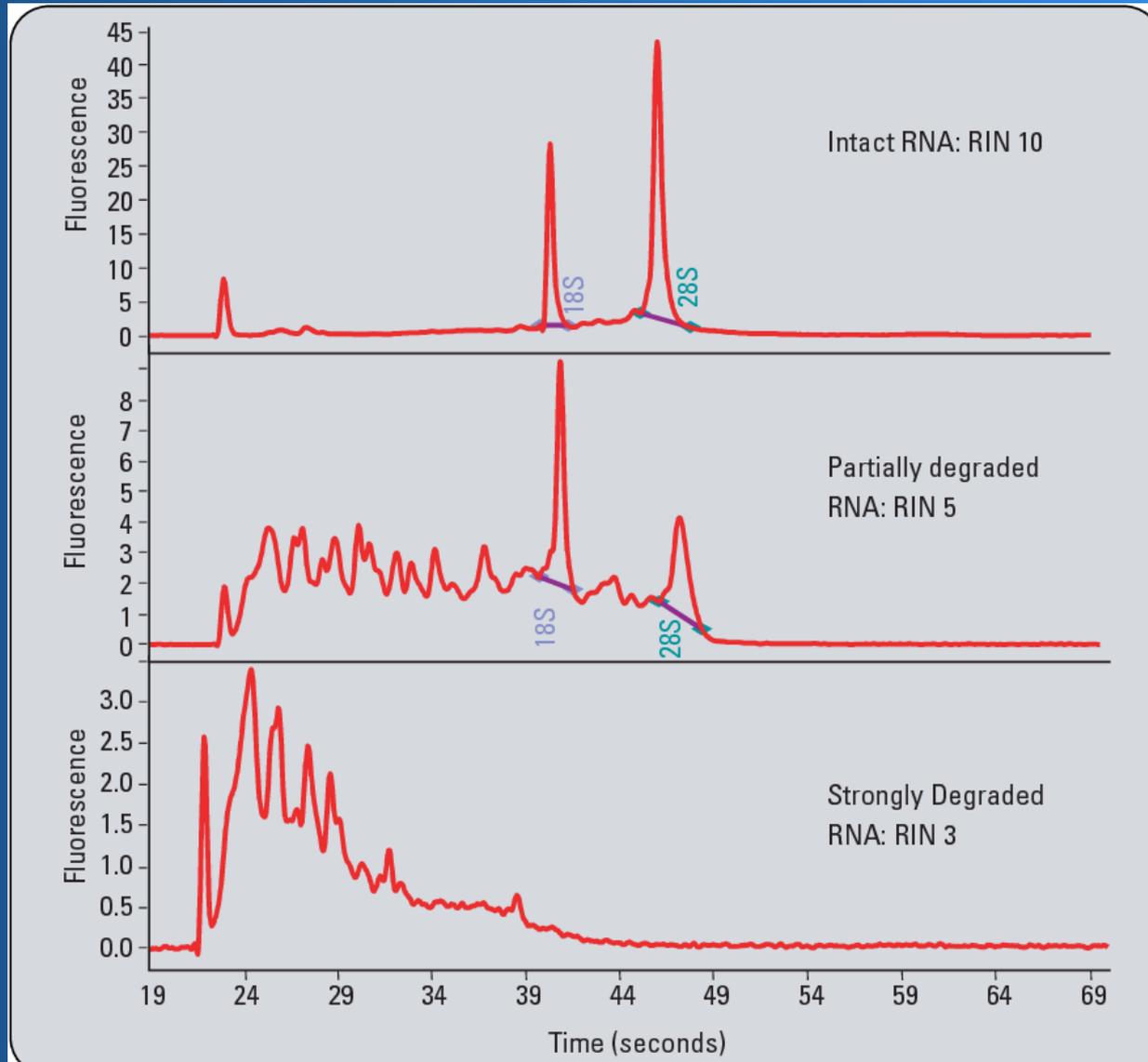
Nell'uomo sono note 3 polimerasi

Name	Can be found in	Transcribes
RNA Polymerase I	All Eukaryotes	Large rRNAs
RNA Polymerase II	All Eukaryotes	mRNA, snoRNAs, some snRNAs and miRNAs
RNA Polymerase III	All Eukaryotes	tRNAs, small rRNAs, some snRNAs and miRNAs
RNA Polymerase IV	Plants	some siRNAs
RNA Polymerase V	Plants	RNAs important in heterochromatin formation

Separazione delle forme di RNA



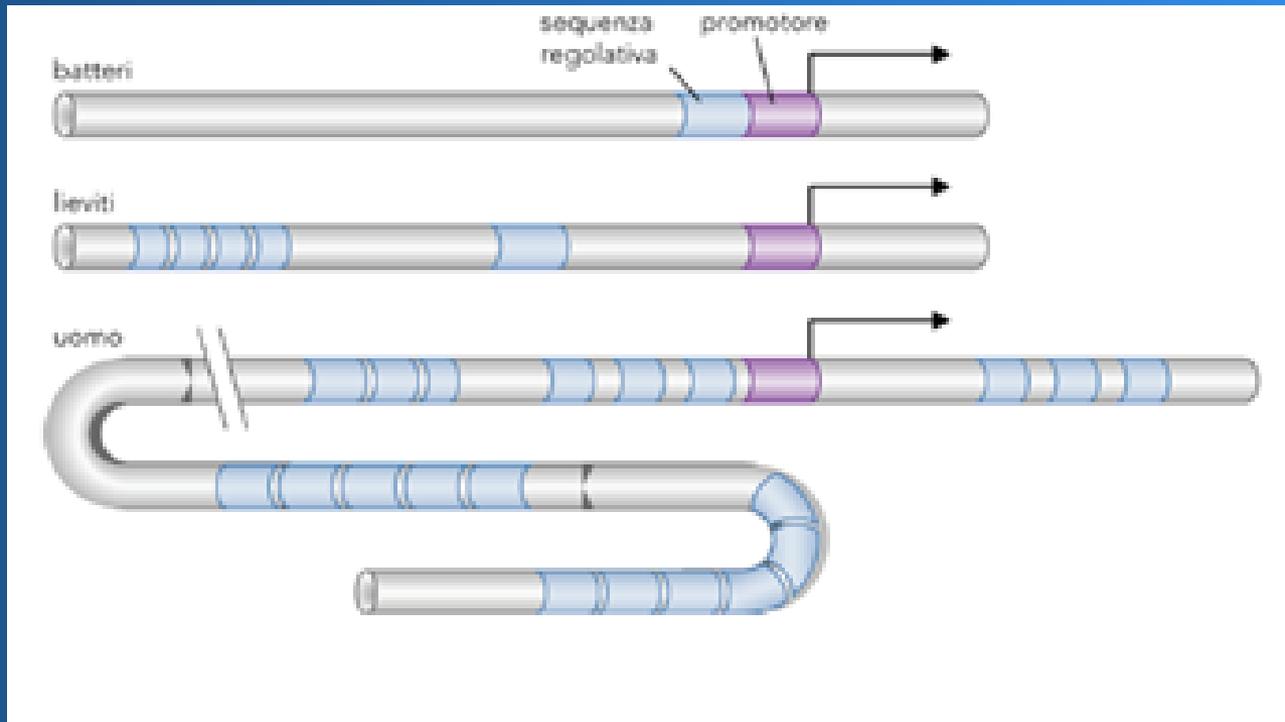
Separazione delle forme di RNA



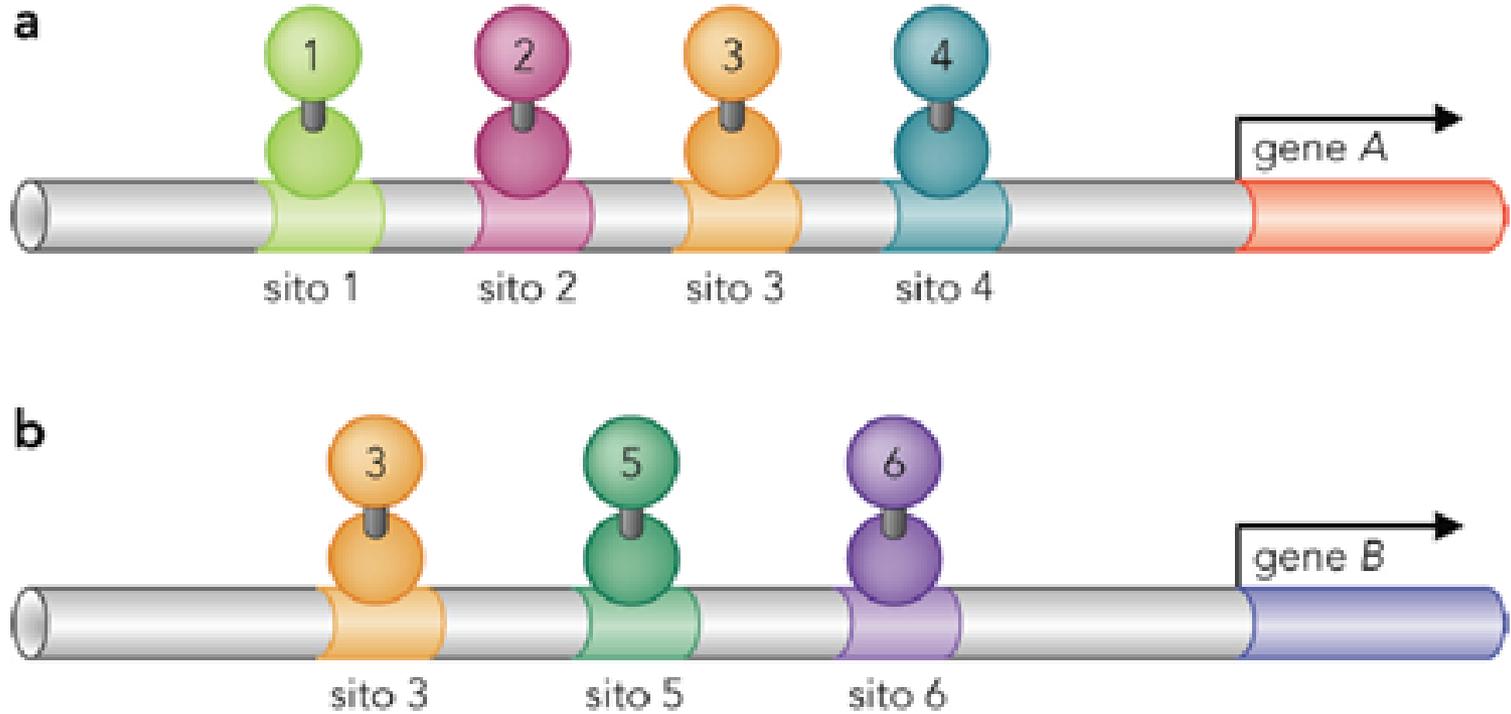
La trascrizione negli eucarioti

Rispetto ai procarioti le diversità sono dovute a:

1. struttura interrotta di geni
2. nucleosomi e loro modificazioni
3. molti più siti di regolazione (con mediatori proteici diversi)
4. siti di regolazione anche molto distanti dal gene (sia a monte che a valle)



Controllo combinatoriale



In vitro vs in vivo

- ***In vitro*** sono sufficienti la Pol II ed i fattori generali di trascrizione per trascrivere uno stampo di DNA
- ***In vivo*** servono altri fattori, come il complesso del mediatore contenente proteine regolatrici e vari enzimi che rimodellano la cromatina

La polimerasi II media la trascrizione dei mRNA

Intervengono numerosi fattori che regolano l'inizio della trascrizione e ne controllano le dinamiche di funzionamento



I promotori eucariotici hanno una struttura modulare

Si possono riconoscere:

- ✓ Elementi del promotore "core": TATA box
- ✓ Elementi basali: CAAT box, GC box
- ✓ Enhancers e silencers
- ✓ Moduli di risposta a segnali dall'esterno della cellula
- ✓ Moduli di risposta tessuto specifici
- ✓ Moduli di risposta a regolatori dello sviluppo

Fattori generali di trascrizione

TABELLA 12.2

I fattori generali di trascrizione dell'RNA polimerasi II

GTF	Numero di subunità
TBP	1
TFIIA	2
TFIIB	1
TFIIE	2
TFIIF	3
TFIIH	10
TAF	11

I numeri si riferiscono al lievito, ma sono simili per gli altri eucarioti, incluso l'uomo. Esistono, però, alcune differenze: per esempio, nell'uomo TFIIF ha solo due subunità, mentre TFIIA ne ha tre.

TATA binding protein

Stabilizza il complesso

Assembla il complesso di preinizio

Aprire il DNA a livello del promotore

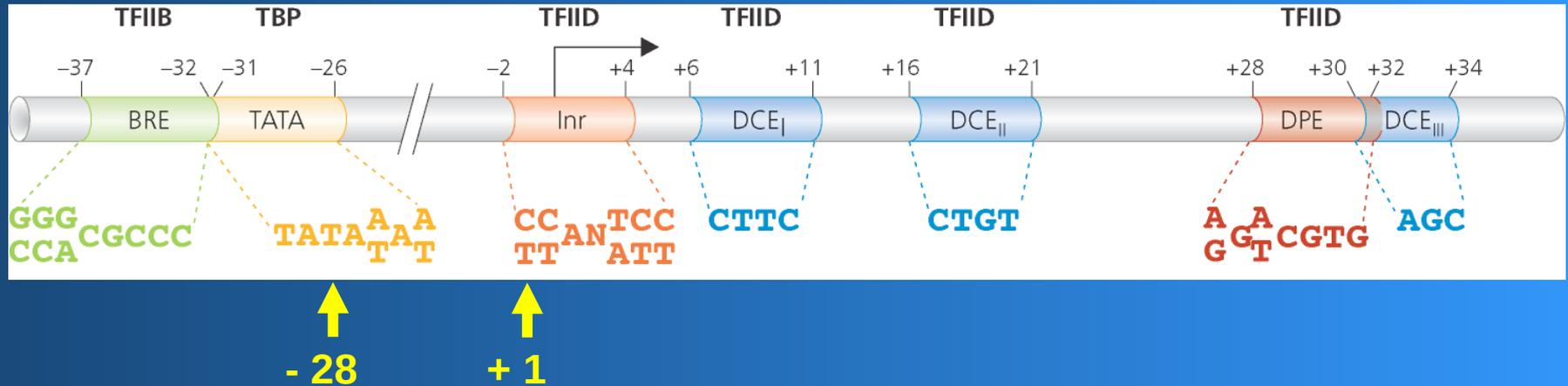
Recluta E ad H

Attività elicastica (ATP dipendente)

TBP-Associated Factors

Core del promotore della RNA Pol II

Gruppo **minimo** di sequenze necessarie per un inizio accurato da parte di Pol II *in vitro* (sono presenti in ogni promotore solo alcuni di questi elementi)



necessari (ma non sufficienti) per attivare la trascrizione

Altre sequenze regolatrici a monte che includono:

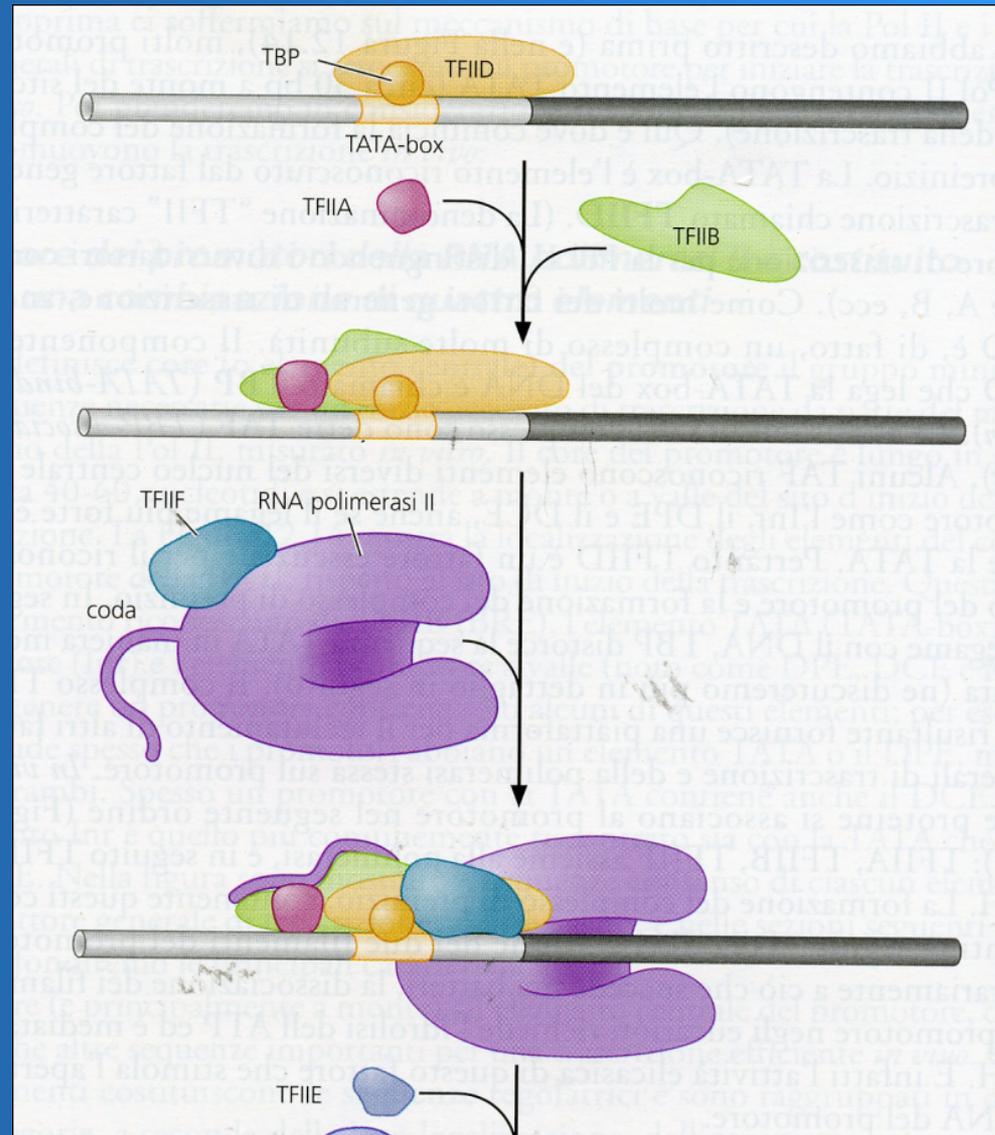
- upstream activator sequences (UAS)
- enhancer, silencers, insulators che legano proteine regolatrici
- che aiutano o inibiscono la trascrizione dal core del promotore

Inizio della trascrizione

TFIID legato a **TBP** e i suoi TAF (TBP associated factors) riconosce la **TATA box** e piega il DNA

TFIIA/B si associano e determinano il punto di **posizionamento** della RNA polimerasi II subito a valle della TATA box

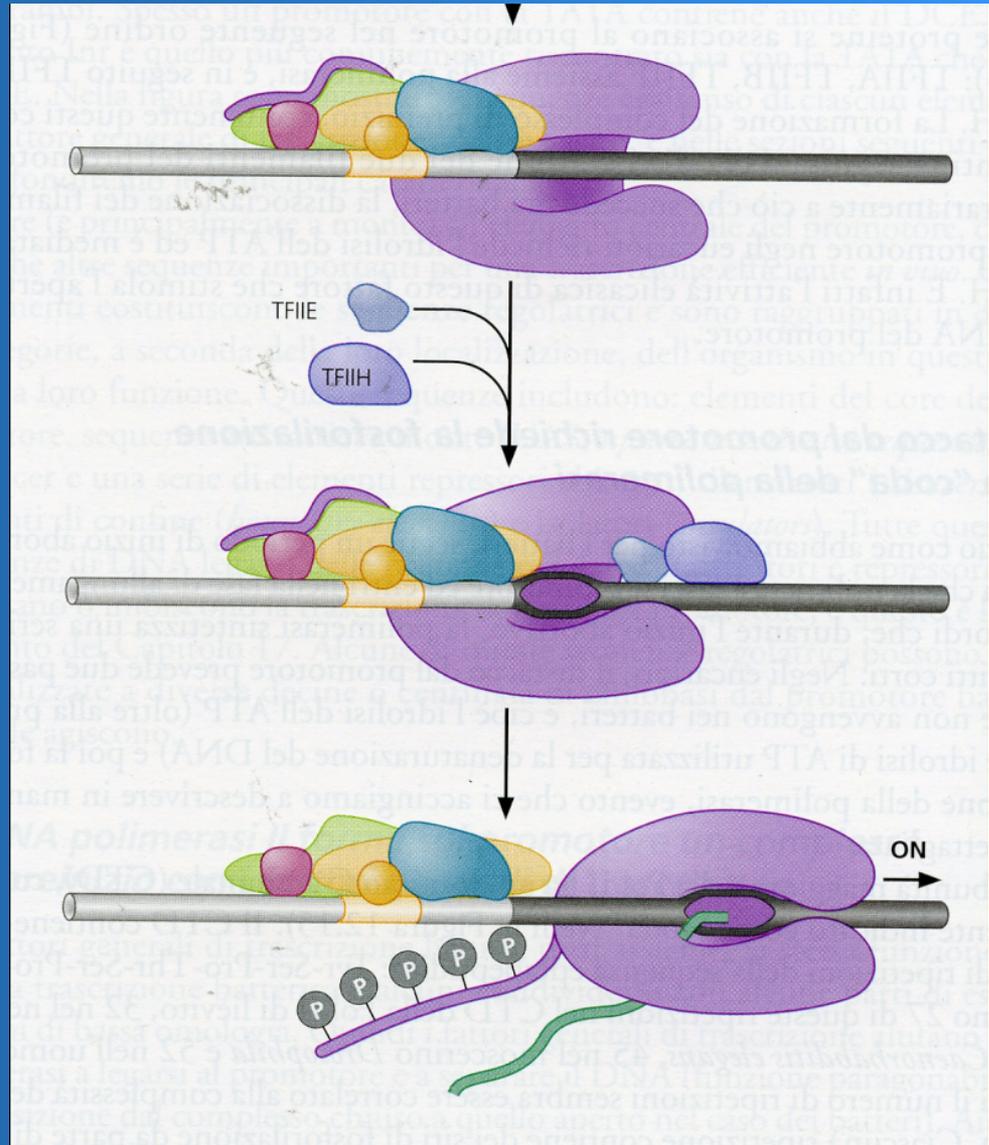
L'arrivo sul DNA della **RNA pol II** associata a **TFIIF** definisce il **PIC (complesso di pre-inizio)**



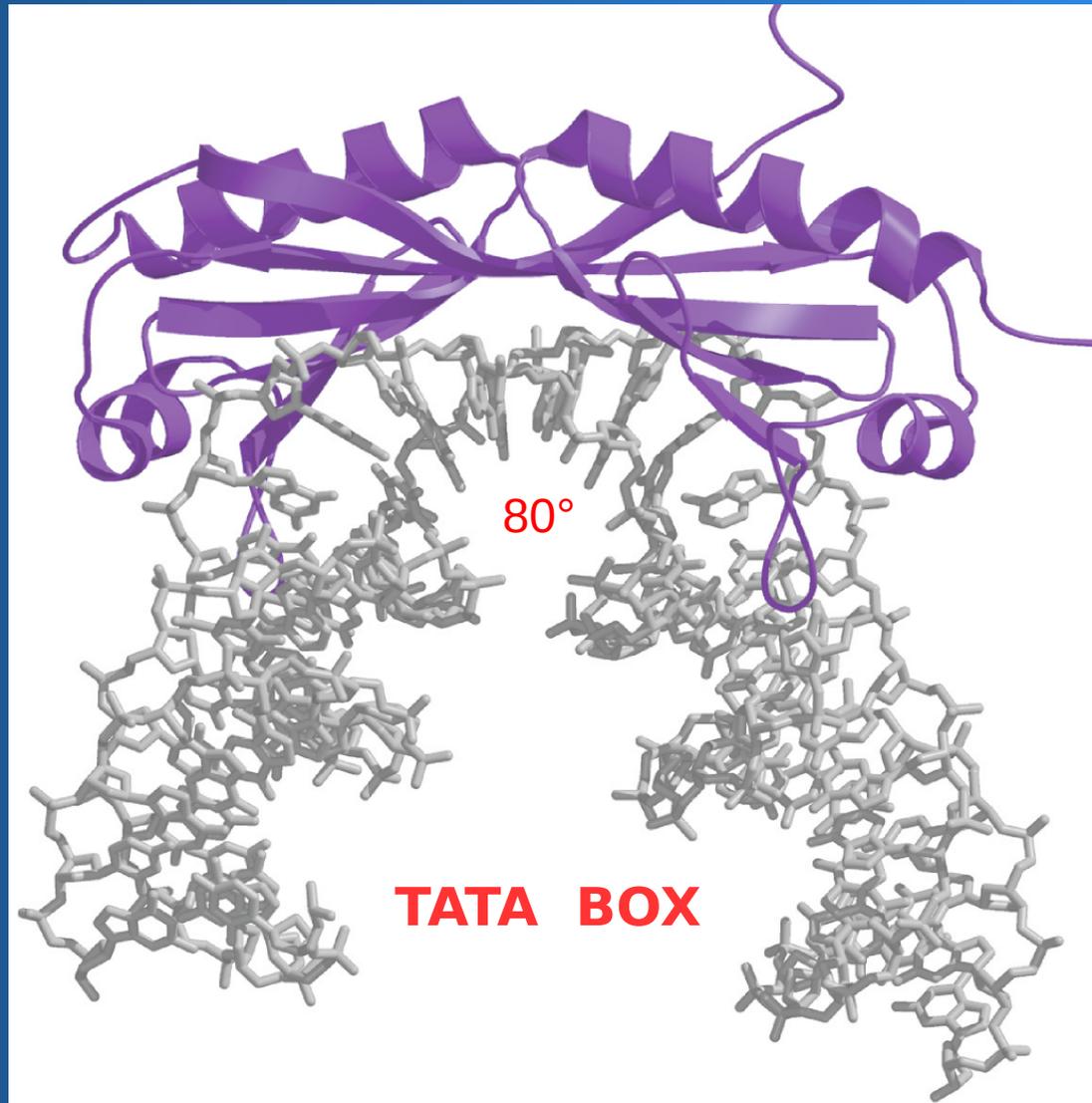
Inizio della trascrizione

TFIIF richiama **TFIIE**
(**elicasi ATP dipendente**) e
TFIIH (**chinasi**) che
mediano la transizione **da**
complesso chiuso a
complesso aperto

L'ultimo evento è la
fosforilazione da parte di
TFIIH della "**coda**" della
RNA pol II, che presenta
ripetizioni del peptide
Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser,
ricco in siti di fosforilazione

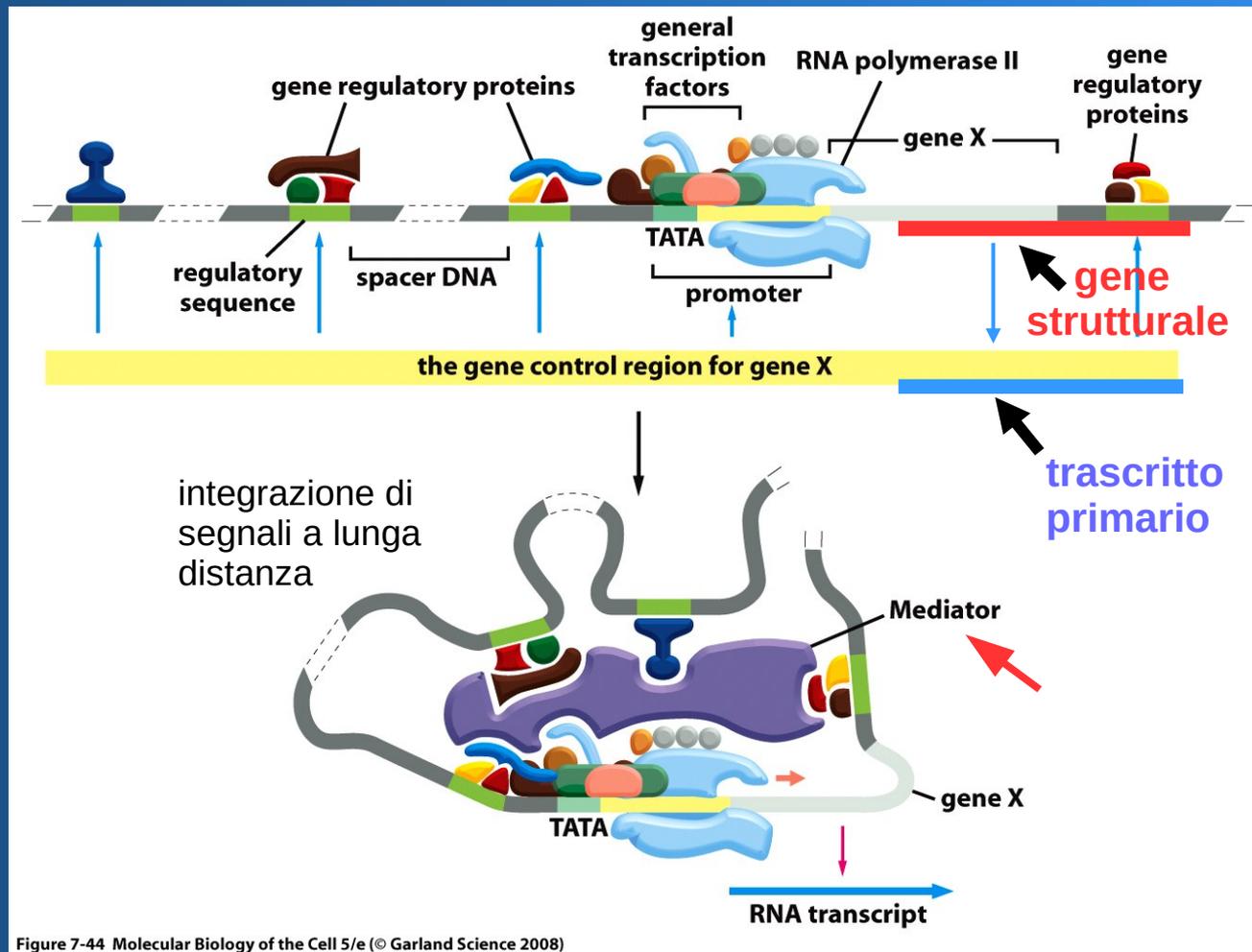


Azione della TATA binding protein (TBP)



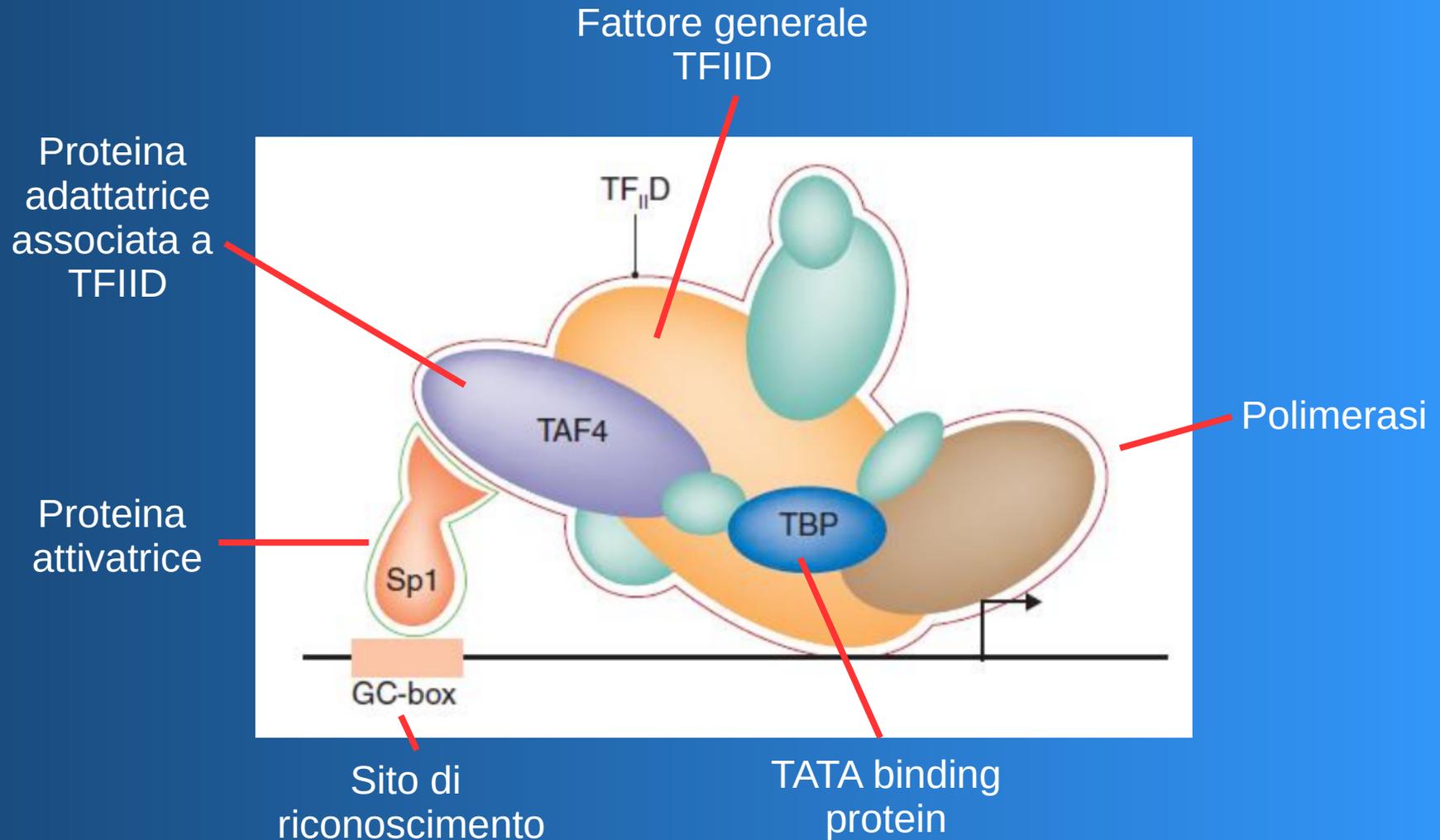
Complesso trascrizionale attivo

In vivo l'inizio della trascrizione ha bisogno anche del **complesso del mediatore**, di proteine trascrizionali **regolatrici** e di molti **enzimi che modificano i nucleosomi**



Elementi prossimali

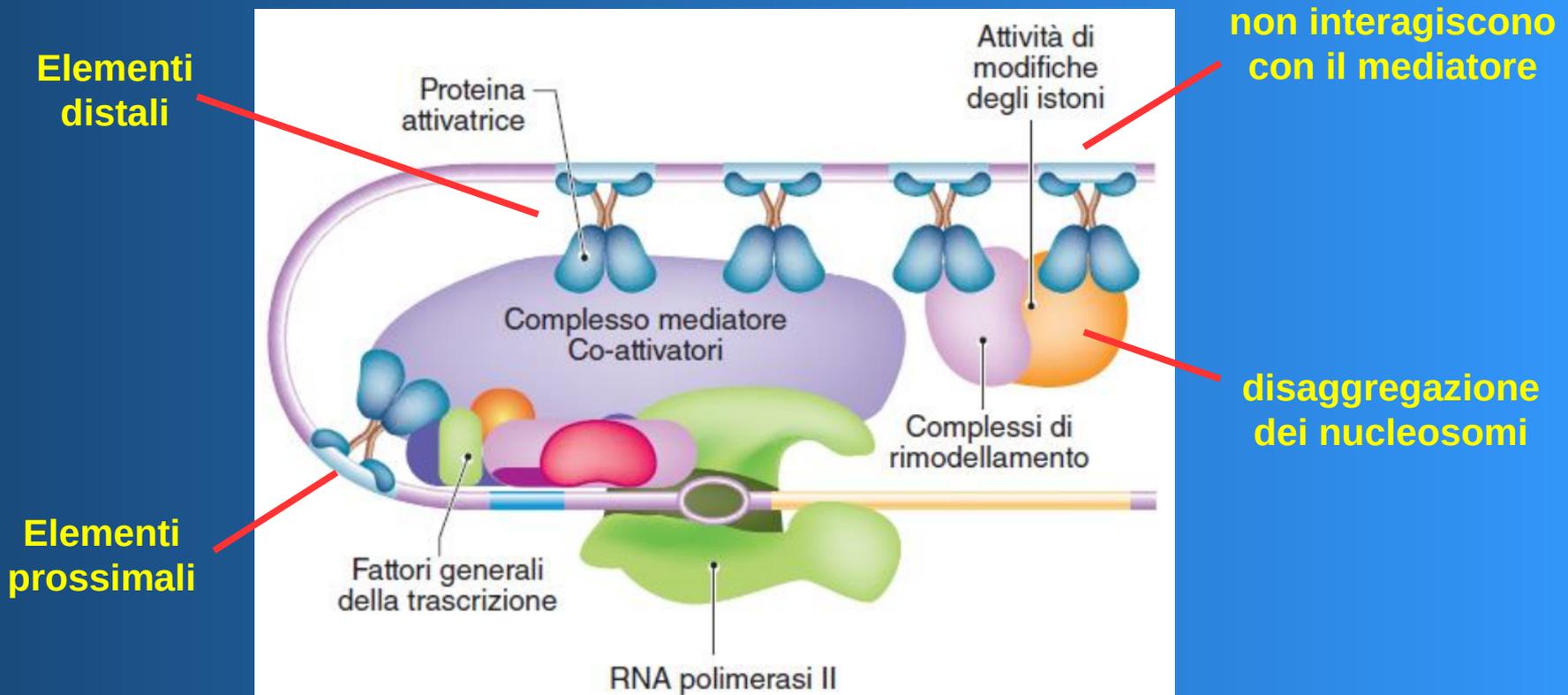
Il DNA contiene motivi riconosciuti da proteine specifiche coevolute con essi. Mediante proteine adattatrici è possibile richiamare i fattori per procedere con la trascrizione.



Complesso del mediatore

Il mediatore è formato da più di 20 unità e si associa:

- con la coda della RNA polimerasi II
- con gli attivatori legati al DNA



Combinazione cis / trans

Table 7-1 Some Gene Regulatory Proteins and the DNA Sequences That They Recognize

	NAME	DNA SEQUENCE RECOGNIZED*
Bacteria	Lac repressor	5' AATTGTGAGCGGATAACAATT 3' TTAACACTCGCCTATTGTTAA
	CAP	TGTGAGTTAGCTCACT ACACTCAATCGAGTGA
	Lambda repressor	TATCACCGCCAGAGGT ATAGTGGCGGTCTCCAT
Yeast	Gal4	CGGAGGACTGTCCTCCG GCCTCCTGACAGGAGGC
	Mata2	CATGTAATT GTACATTAA
	Gcn4	ATGACTCAT TACTGAGTA
<i>Drosophila</i>	Kruppel	AACGGGTAA TTGCCCAATT
	Bicoid	GGGATTAGA CCCTAATCT
Mammals	Sp1	GGGCGG CCCGCC
	Oct1 Pou domain	ATGCAAAT TACGTTTA
	GATA1	TGATAG ACTATC
	MyoD	CAAATG GTTTAC
	p53	GGGCAAGTCT CCCGTTCAGA

TRANS
↓
Fattori trascrizionali (proteine)

CIS
↓
Sequenze del promotore (DNA)

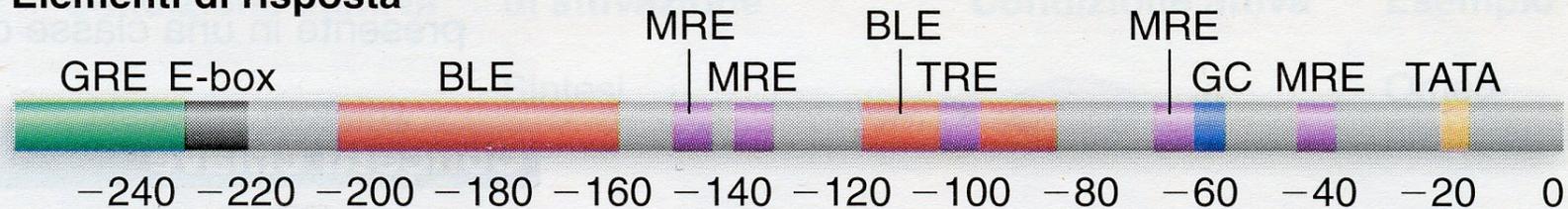
*For convenience, only one recognition sequence, rather than a consensus sequence (see Figure 6-12), is given for each protein.

Regolazione combinatoria

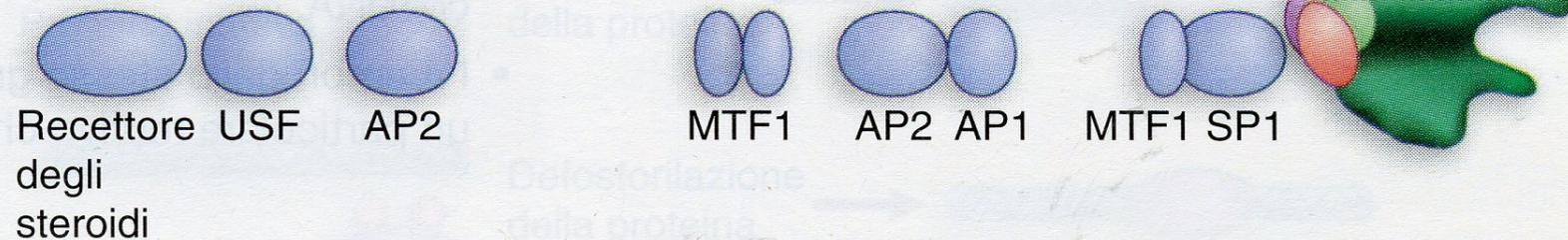
Esempio: il gene della metallothioneina (regolazione dei metalli, protezione contro lo stress ossidativo)

Il gene della MT contiene molti elementi di risposta

Elementi di risposta



Legame della proteina



BLE = elemento di livello basale

GRE = elemento di risposta ai glicocorticoidi

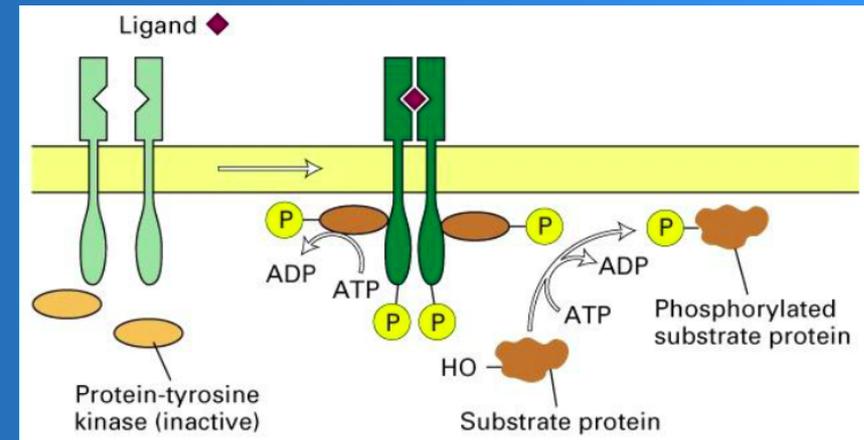
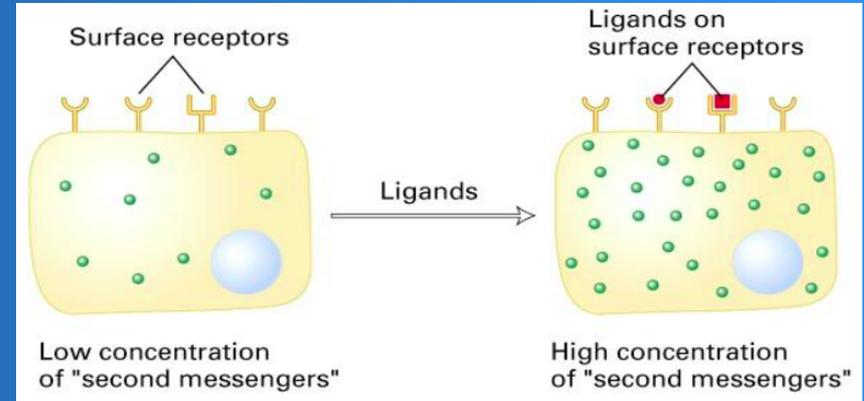
MRE = elemento di risposta ai metalli

TRE = elemento di risposta a TPA

Recettori di membrana

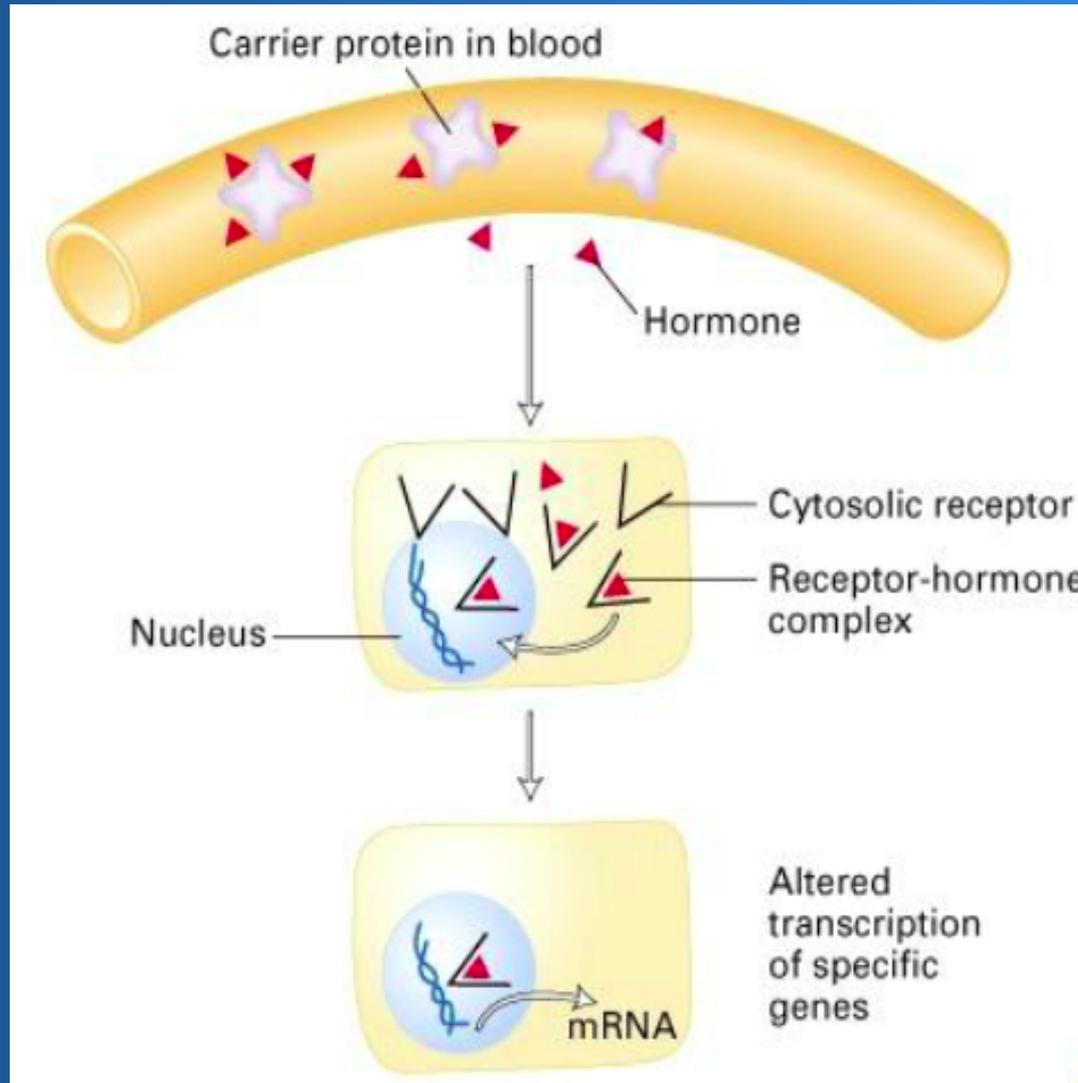
Ormoni proteici, neurotrasmettitori, fattori di crescita non possono segnalare la loro presenza e necessitano di interagire con **recettori di membrana**. L'effetto del contatto può indurre:

- **variazioni di attività** di enzimi che incrementano la concentrazione di secondi messaggeri
- **stimolazione** dei recettori stessi che propagano il segnale all'interno tramite attività enzimatica o capacità legante



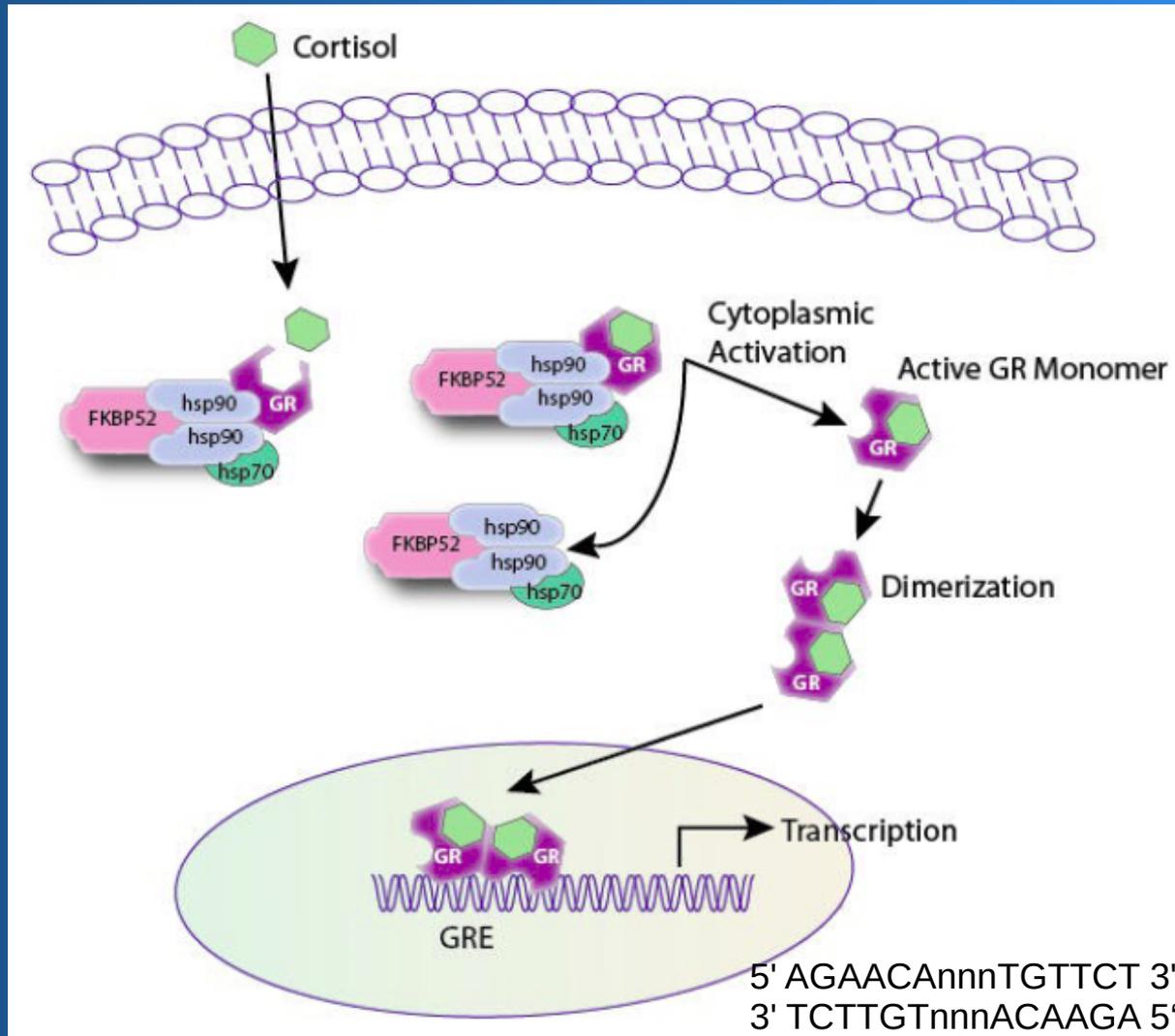
Recettori intracellulari

Le molecole idrofobiche (es. **ormoni steroidei**) possono penetrare la membrana. I loro recettori sono quindi **intracellulari**



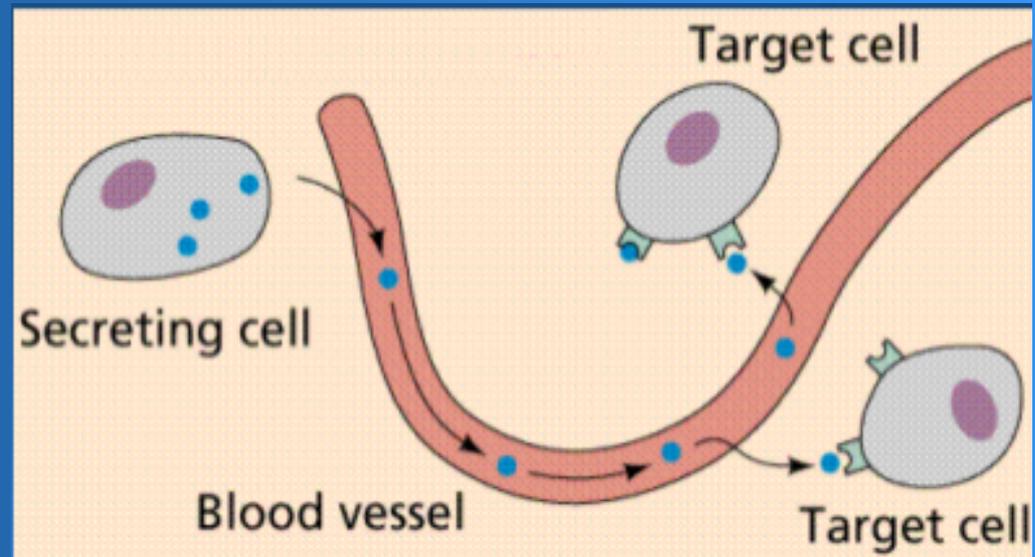
Recettore per i glucocorticoidi (GRE)

Ormoni steroidei (corticosteroidi, **idrofobici**) prodotti nella corteccia del surrene



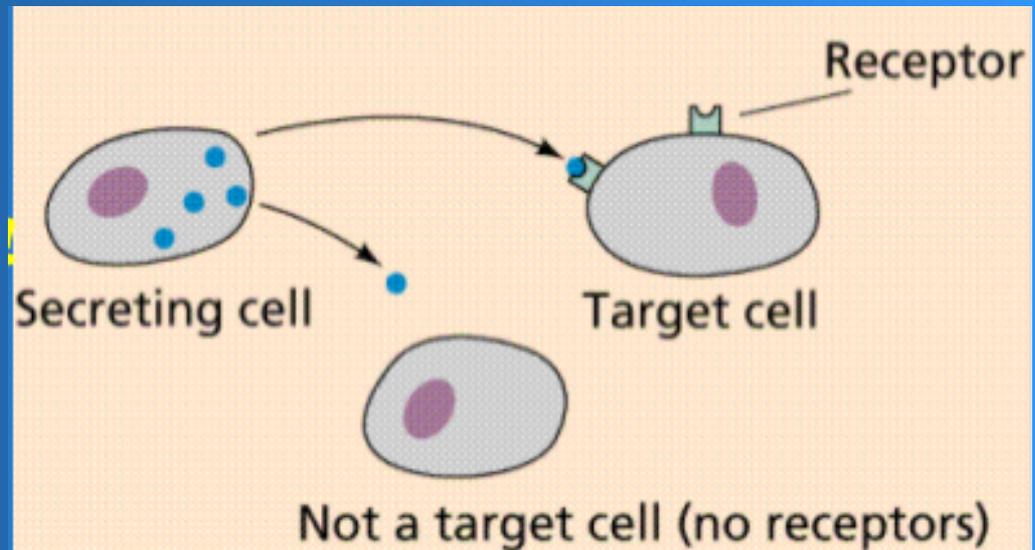
Selettività e specificità

Fattori di segnalazione **secreti nel circolo sanguigno** extravasano nei tessuti raggiungendo le cellule.



Tali cellule però possono

- non avere i recettori adatti
- non avere le regioni di legame sul DNA adatte

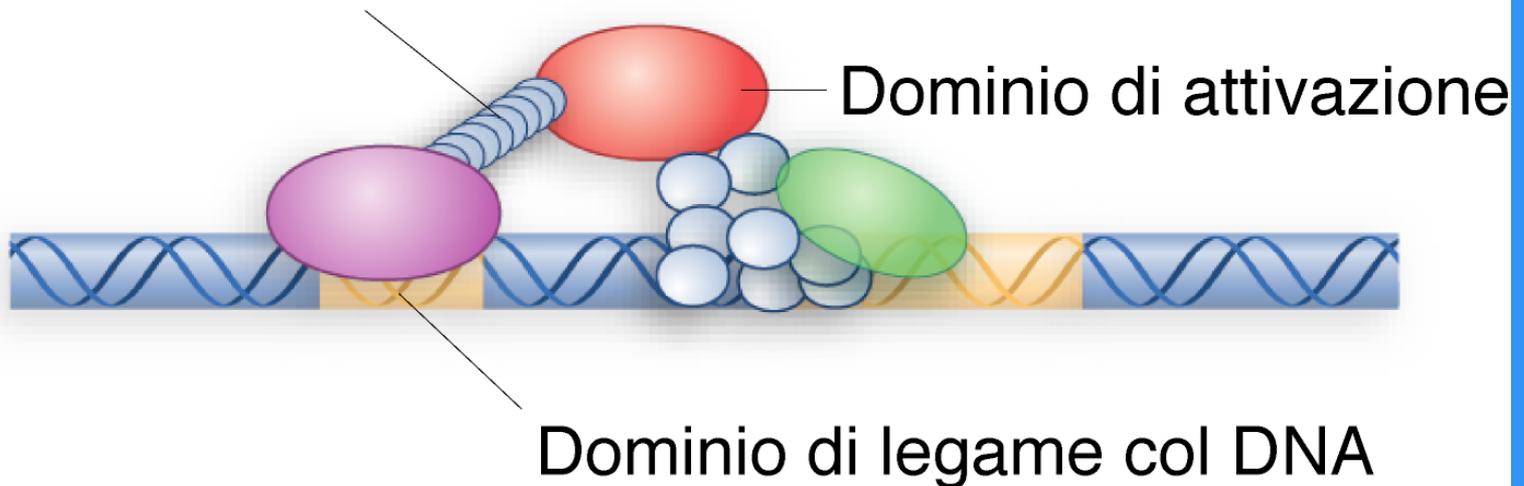


Strutture degli attivatori

La **regolazione** dell'espressione genica negli eucarioti (come nei procarioti) è esercitata soprattutto a livello della fase di **inizio della trascrizione** e utilizza **ATTIVATORI** e **REPRESSORI**

Un attivatore ha domini indipendenti

Dominio di connessione



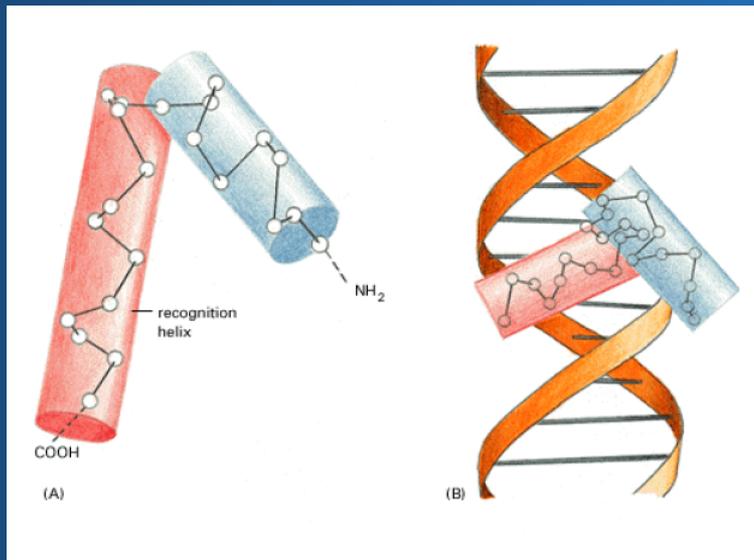
Struttura di un generico attivatore

Famiglie di domini di legame al DNA dei regolatori eucariotici:

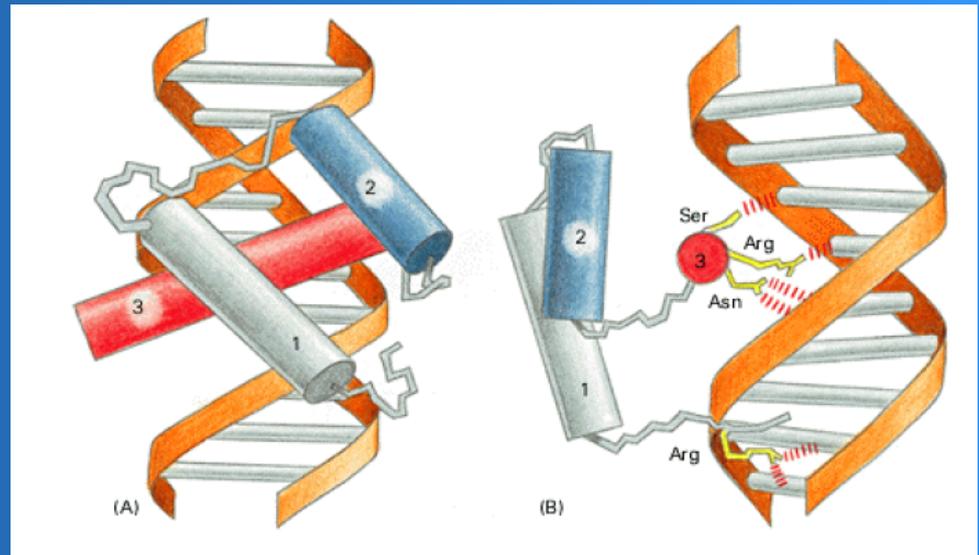
- ✓ Omeodominio (elica-giro-elica)
- ✓ Dita di zinco
- ✓ Elica-ansa-elica
- ✓ Cerniera di leucina

Omeodominio (helix-turn-helix)

Dominio di circa 60 aminoacidi contenuto in proteine coinvolte
nello **sviluppo embrionale**



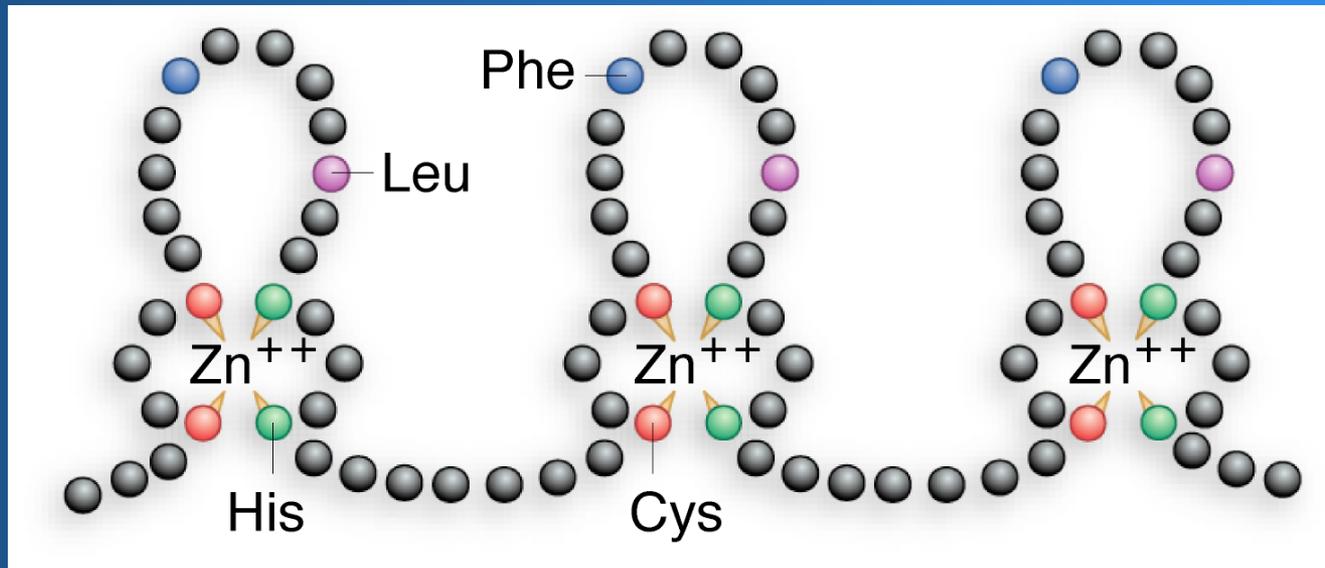
Le eliche 1 e 2 sono sullo stesso piano e quasi parallele e mediano il contatto con altri fattori



L'elica 3 riconosce il solco maggiore DNA in una regione del DNA di ~ 180 bp definita **homeobox**

Domini a dita di zinco (zinc fingers)

I domini zinc-finger presentano un atomo di **zinco** (Zn^{++}) stabilizzato da **2 residui di cisteina** e **2 di istidina** a formare un tetragono.



Si forma così un **alfa elica** che viene inserita nel solco maggiore del DNA

Molteplici copie consecutive di questi domini spesso si affiancano per una stabilizzazione più stabile

Domini a dita di zinco

es. TFIIIA

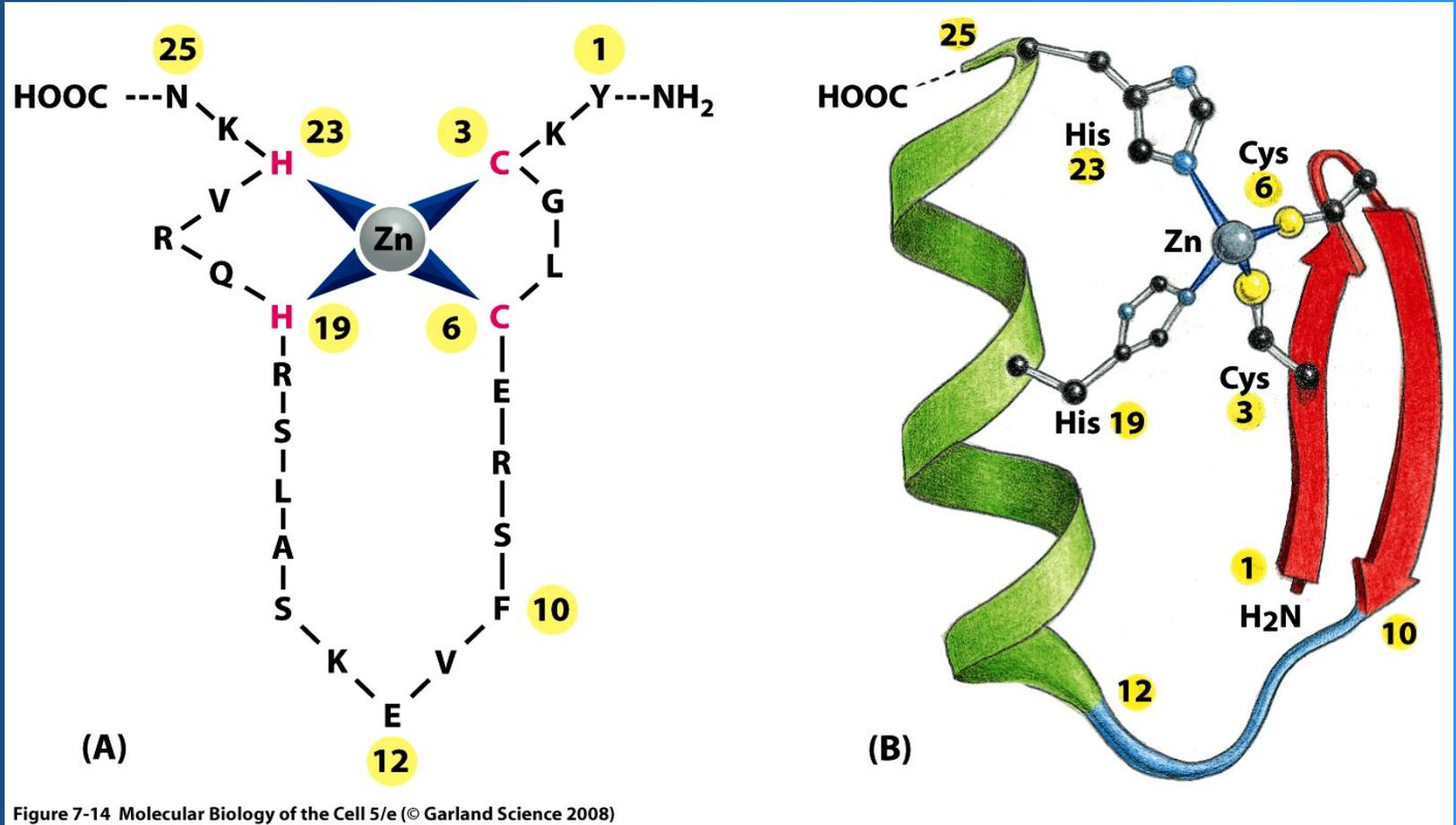
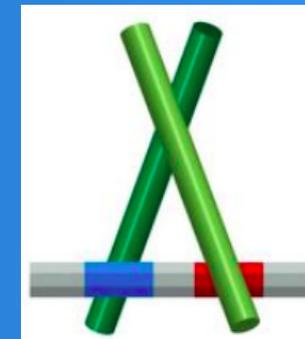
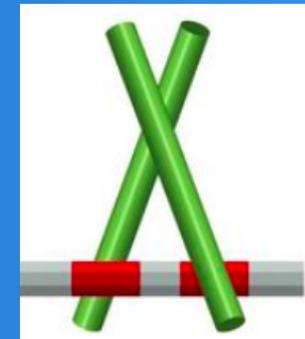
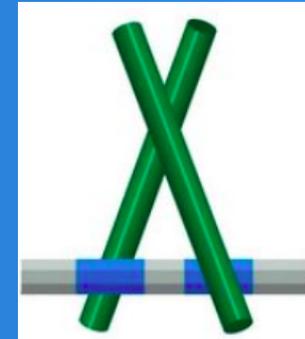
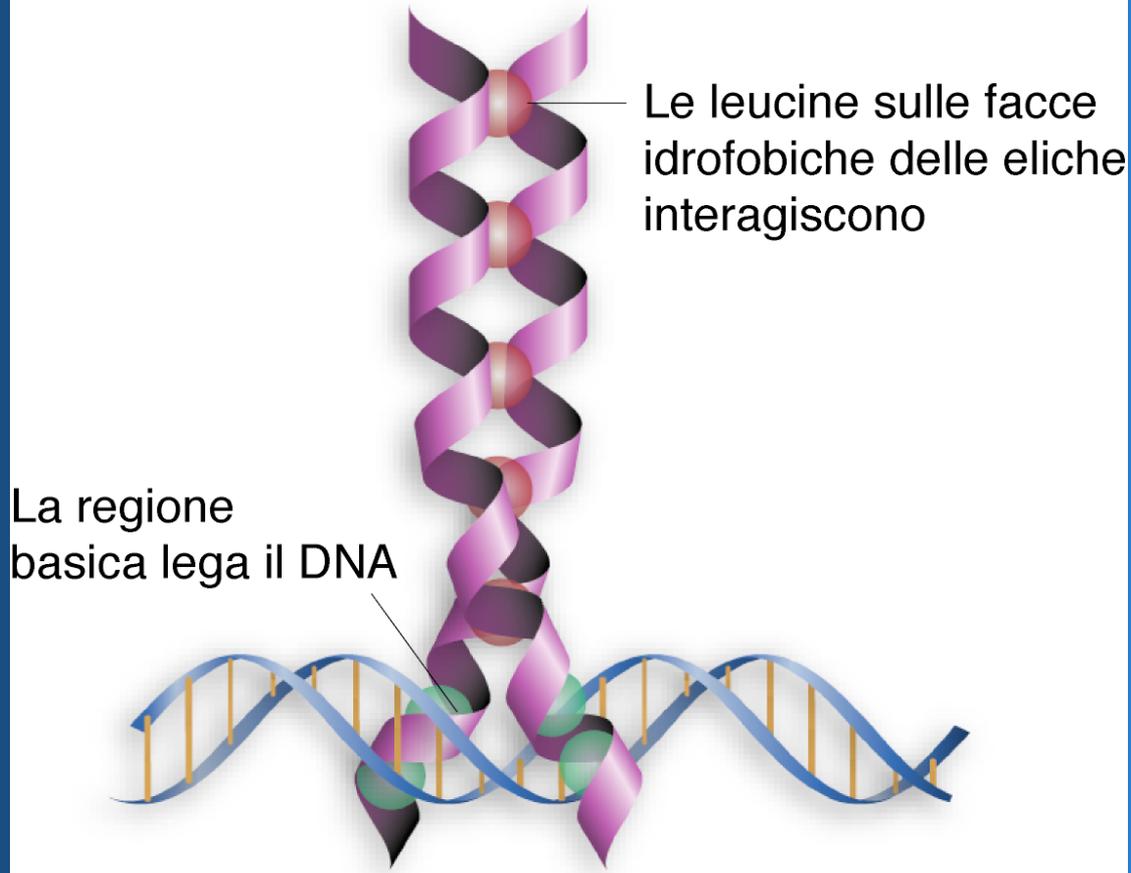


Figure 7-14 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

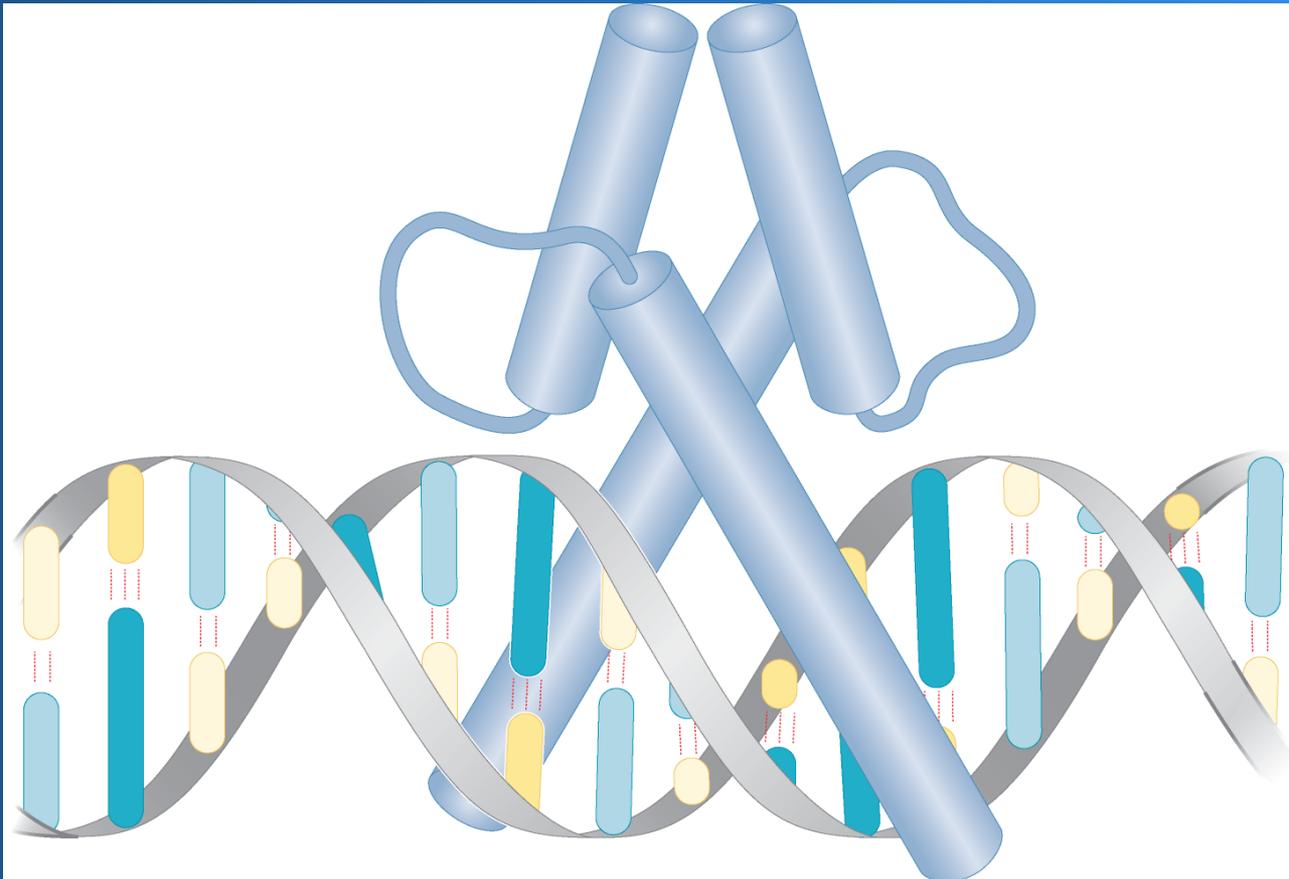
Cerniere di leucina (leucine zipper)

Le cerniere di leucina dimerizzano



Elica-Ansa-Elica (helix-loop-helix)

Lavorano come dimeri



I fattori trascrizionali (attivatori) reclutano:

- ✓ le proteine del mediatore e il fattore generale di trascrizione, che poi richiamano la RNA pol II
- ✓ i fattori attivi nello smantellamento dei nucleosomi e sul rimodellamento della cromatina
- ✓ fattori che stimolano l'inizio o l'allungamento della trascrizione