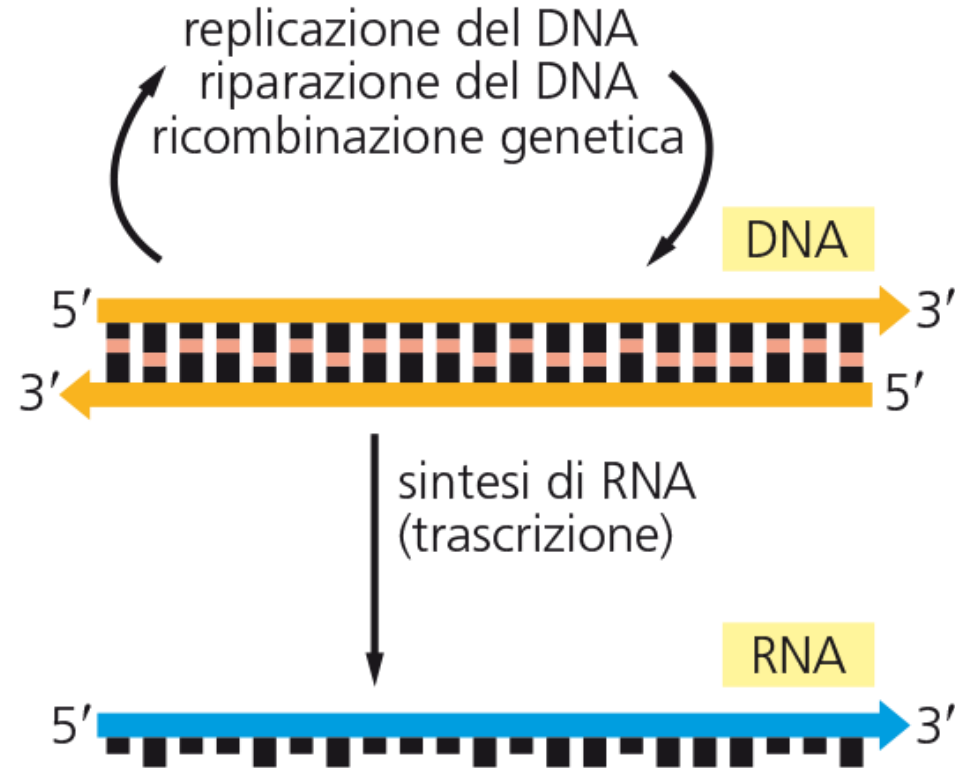
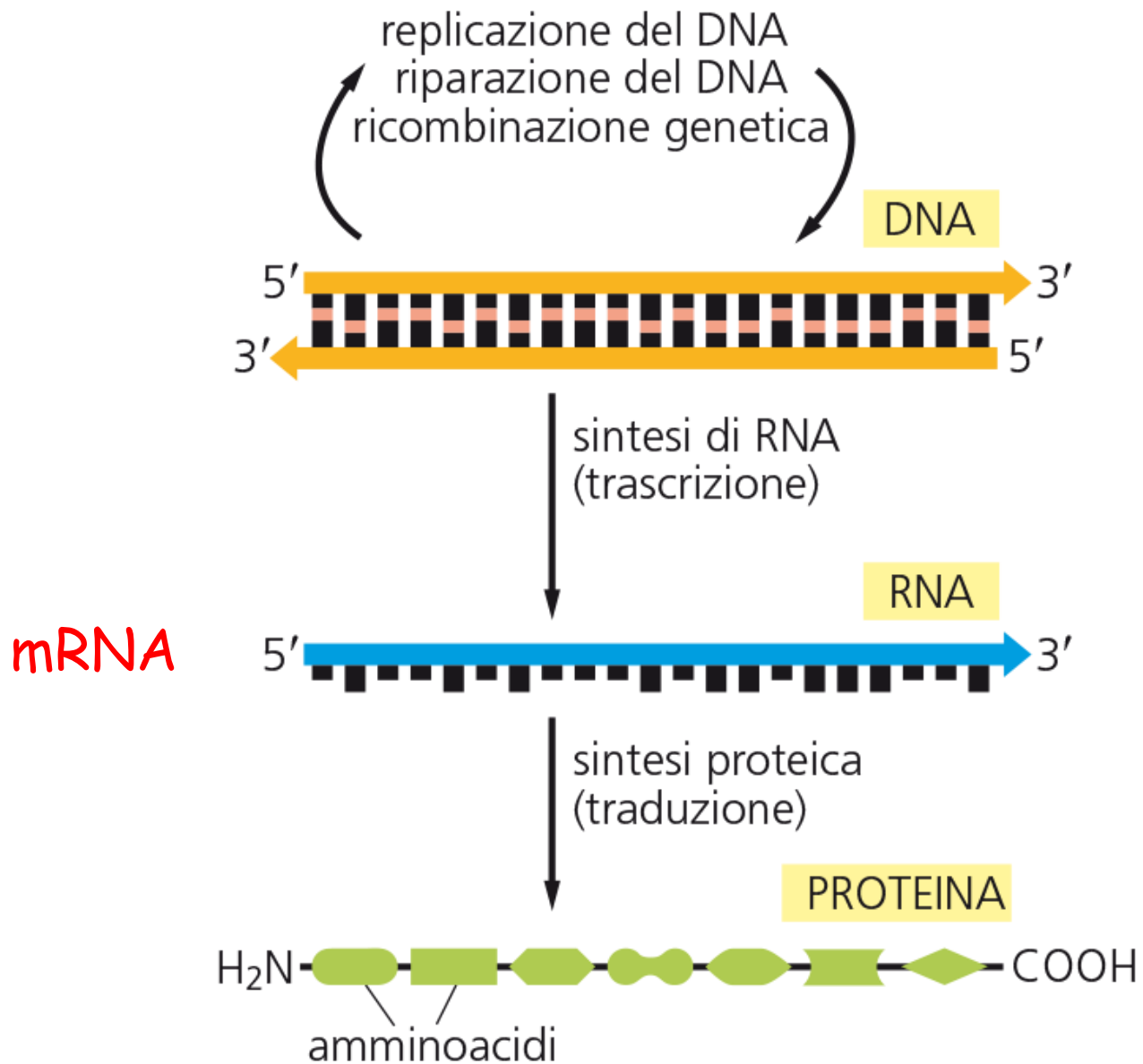


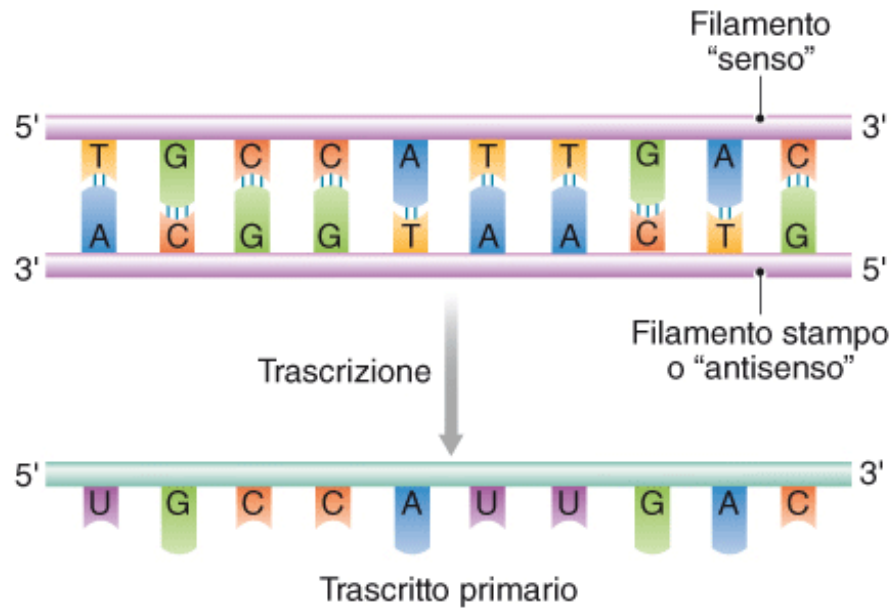
# La trascrizione



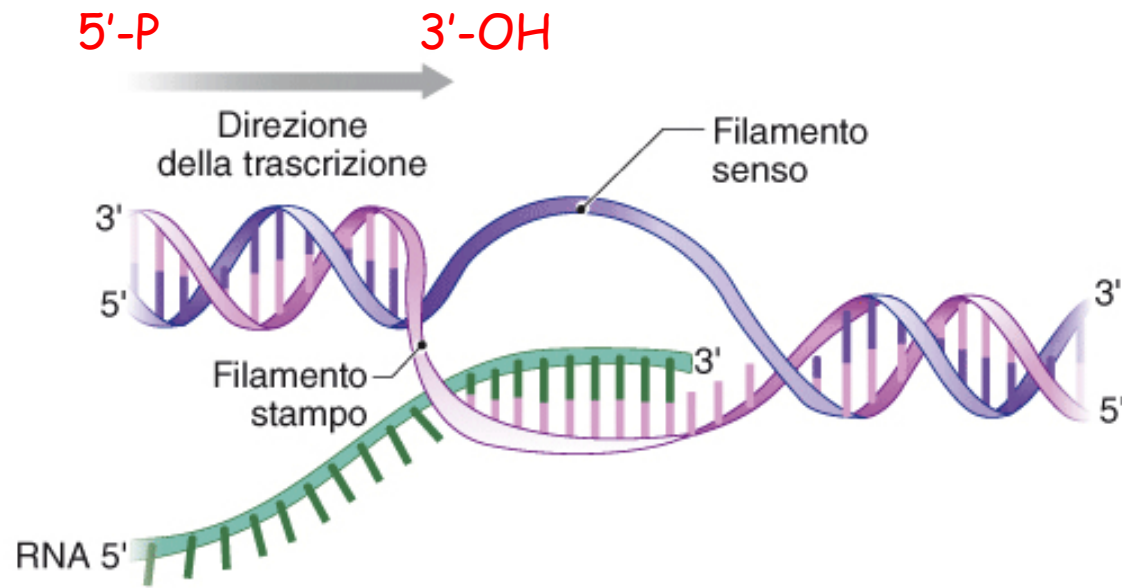
## La trascrizione produce molti tipi di RNA

Tipo di RNA	Funzione
mRNA	RNA messaggeri, codificano proteine
rRNA	RNA ribosomiali, componenti dei ribosomi
tRNA	RNA transfer, partecipano alla traduzione
snRNA	Piccoli RNA nucleari
miRNA, siRNA	microRNA, regolano l'espressione genica
snoRNA	piccoli RNA nucleolari, partecipano alla maturazione degli RNA ribosomiali
RNA telomerico	Componente della telomerasi
Lunghi RNA non codificanti	regolativa





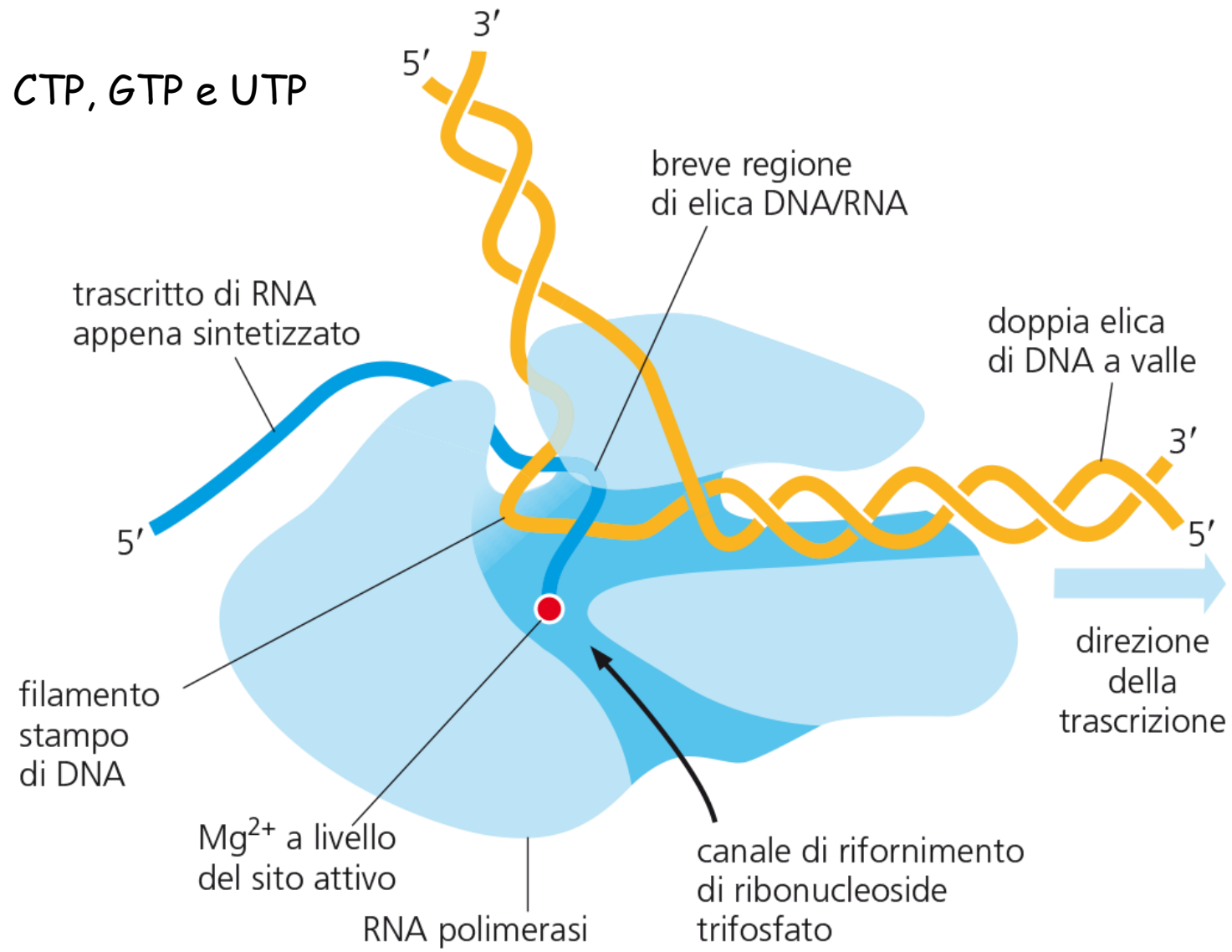
**FIGURA 5.3** ◀ La nomenclatura dei filamenti di DNA coinvolti nella reazione di sintesi dei trascritti. La molecola di RNA viene sintetizzata usando come stampo uno dei due filamenti antiparalleli del DNA, definito anche come filamento stampo o antisenso (il filamento in basso, in figura). Si noti che l'RNA prodotto possiede la sequenza corrispondente al filamento senso o anche filamento codificante (il filamento in alto); quest'ultimo non partecipa attivamente alla sintesi.

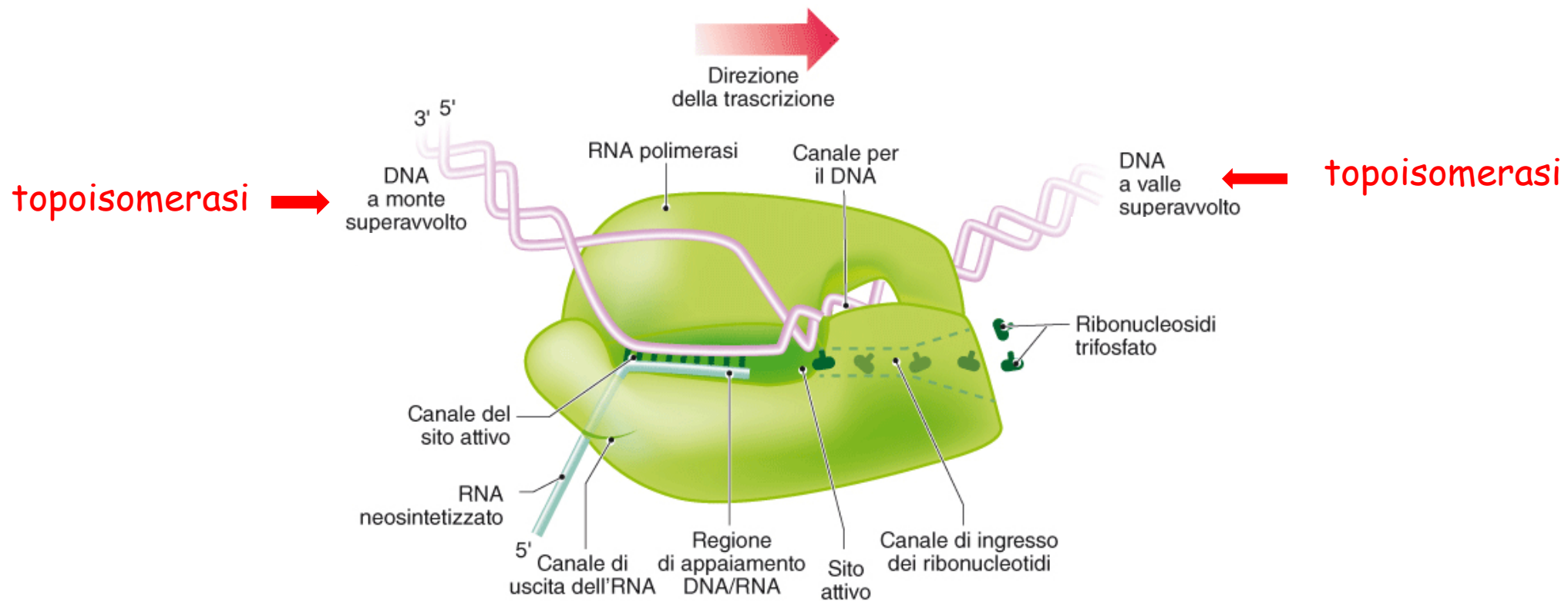


**FIGURA 5.4 ▲** Rappresentazione schematica della bolla di trascrizione. La denaturazione dello stampo in corso di trascrizione è limitata a una regione di 12 coppie di basi, denominata bolla di trascrizione. Il trascritto in via di sintesi è appaiato, per 9 posizioni verso la sua estremità 5', al filamento stampo antiparallelo. Le prime tre posizioni all'estremità 5' dello stampo sono esposte nella bolla, in prossimità del centro attivo della polimerasi. L'estremità 5' del trascritto emerge gradualmente dalla struttura dell'RNA polimerasi, man mano che l'enzima, spostandosi sullo stampo, sintetizza nuovi legami fosfodiesterici. Lo spostamento dell'RNA polimerasi comporta lo spostamento della bolla, la cui ampiezza rimane costante in corso di trascrizione, per formazione di nuovi appaiamenti verso l'estremità 3' del trascritto, e conseguente perdita all'estremità 5'.

# La trascrizione è eseguita dall' RNA polimerasi

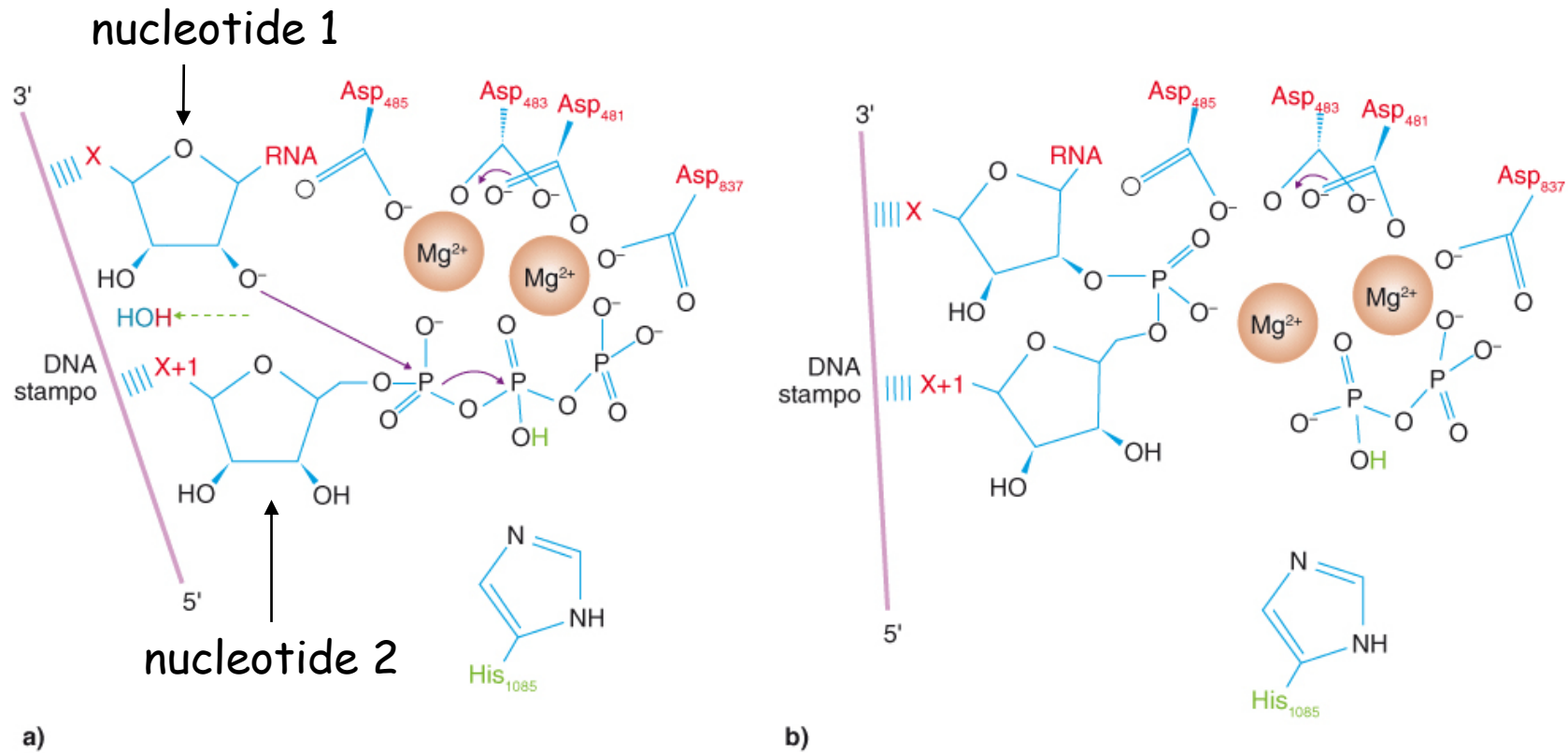
Substrati: ATP, CTP, GTP e UTP





**FIGURA 5.8 ▲** Assemblaggio dell'RNA polimerasi sulla bolla di trascrizione. Durante la fase di inizio, le RNA polimerasi si assemblano sul DNA formando la bolla di trascrizione, attraverso cui lo stampo è continuamente esposto durante la sintesi. Il modello riporta una sezione trasversale di una porzione dell'enzima, che fa apprezzare la disposizione dei filamenti (senso e antisense del DNA), della molecola di RNA nascente, che emerge dalla porzione posteriore dell'enzima, e del canale di ingresso dei ribonucleosidi trifosfato. Si noti che il movimento dell'enzima, comportando il continuo spostamento della bolla nella direzione della trascrizione, genera superavvolgimenti positivi a valle della stessa e superavvolgimenti negativi a monte. Le attività di topoisomerasi contribuiscono a compensare queste alterazioni dello stato topologico del DNA durante la trascrizione (si veda il Paragrafo 2.4).





**FIGURA 5.2 ▲** La reazione RNA polimerasica. Le RNA polimerasi iniziano la sintesi di un poliribonucleotide *ex novo*, in assenza di un innesco. Due nucleotidi appaiati sullo stampo (a) a sinistra sono polimerizzati (b) dall'attività RNA polimerasica. Il ribonucleoside trifosfato (ATP in un'ampia percentuale delle molecole di RNA) in alto a sinistra, indicato con X, che si ritroverà all'estremità 5' dei trascritti, fornisce l'ossidrilico al 3' come innesco per la sintesi del primo legame fosfodiesterico con il nucleotide X + 1; la deprotonazione dell'estremità (freccia tratteggiata verde nel pannello di sinistra) è favorita da ioni OH<sup>-</sup> presenti nel solvente acquoso (in azzurro) che li captano. La reazione di sintesi libera pirofosfato dal nucleotide entrante, quest'ultimo risulterà incorporato nella catena nascente grazie a un legame 3'-5' fosfodiesterico. Lo stampo di DNA è continuamente richiesto nella reazione di sintesi. Due cationi bivalenti (Mg<sup>2+</sup>), gli ioni metallici A e B, partecipano alla catalisi. Uno dei due (metallo A, a sinistra) si associa alle subunità maggiori delle diverse RNA polimerasi, mentre il metallo B (a destra) è associato al nucleotide in ingresso (si veda in seguito). Nell'immagine sono mostrati i residui di acido aspartico (Asp) dell'RNA polimerasi II di lievito che stabilizzano i due ioni metallici nel sito attivo. Anche il residuo His<sub>1085</sub> gioca un ruolo importante nel meccanismo di reazione, favorendo la deprotonazione del nucleotide e la successiva riprotonazione dell'ossigeno legato al fosfato β del nucleotide. Si rimanda al Paragrafo 5.2.6.3 e alla Figura 5.17 per il chiarimento di questi meccanismi.



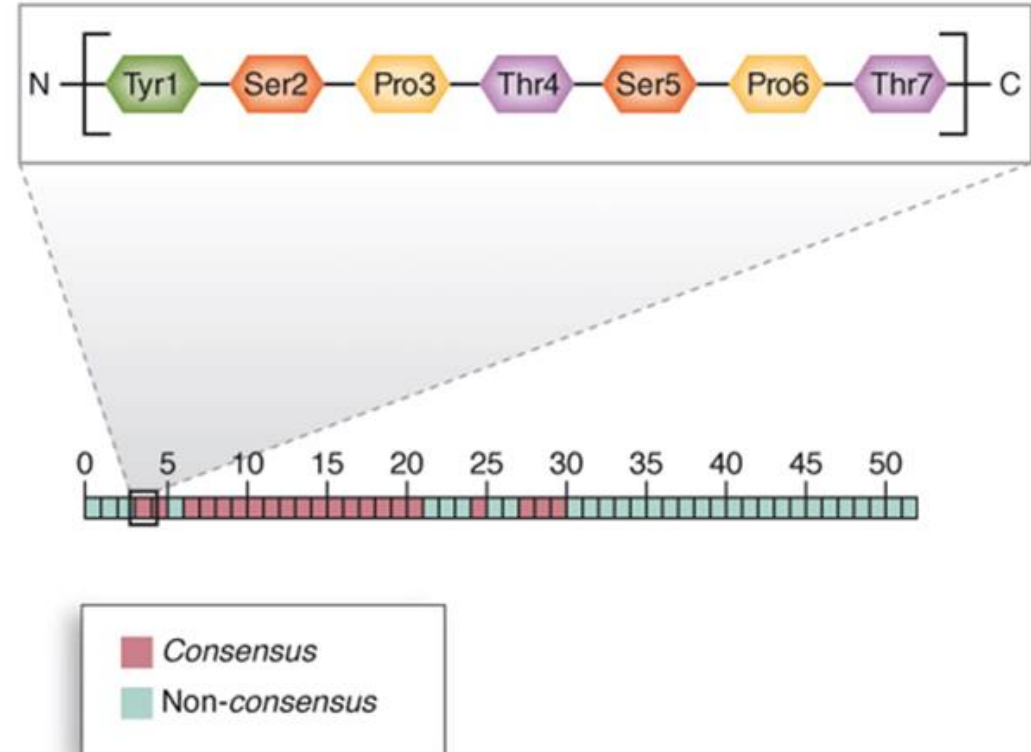
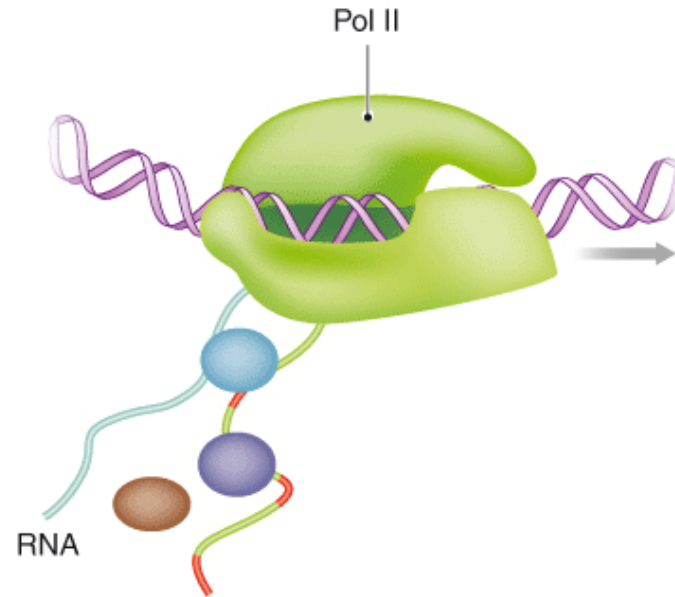
## Differenze fra DNA polimerasi e RNA polimerasi

1. L'RNA polimerasi catalizza l'unione di ribonucleotidi, la DNA polimerasi di deossiribonucleotidi
2. L'RNA polimerasi sono primer-indipendenti
3. L'RNA polimerasi ha una piu' bassa capacità di riparare gli errori introdotti durante la trascrizione
4. L'RNA polimerasi sintetizza RNA continuo non frammentato (come i frammenti di Okazaki)

# Le RNA polimerasi negli eucarioti

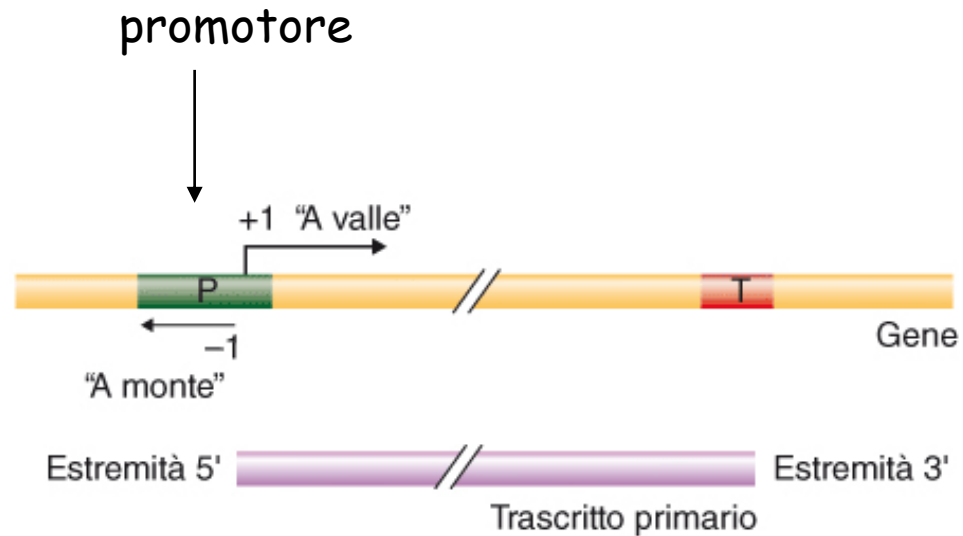
- RNA polimerasi I: rRNA 28S, 18S, 5,8S
- RNA polimerasi II: mRNA, la maggior parte dei piccoli RNA nucleari (snRNA, snoRNA), microRNA, RNA della telomerasi
- RNA polimerasi III: tRNA, rRNA 5S, altri piccoli RNA
- RNA polimerasi mitocondriale

# Il dominio CTD dell'RNA polimerasi II degli eucarioti



**FIGURA 5.12** ◀ Il dominio CTD dell'RNA polimerasi II. **a)** Il dominio CTD corrisponde alla porzione C-terminale della subunità Rpb1 delle RNA polimerasi II eucariotiche. Il dominio emerge dalla struttura dell'enzima come un'appendice non strutturata su cui si assemblano complessi per le modifiche co-trascrizionali degli RNA emergenti dalla polimerasi. Esso consta di ripetizioni (26 nel lievito, 52 nell'uomo) di una sequenza di 7 amminoacidi, la cui *consensus* (**b**) è mostrata nel pannello B della figura. **b)** Lo schema rappresenta le 52 ripetizioni epta-peptidiche presenti nel CTD di RPB1 umana. Da notare che le ripetizioni conformi alla *consensus* si concentrano nella regione N-terminale, mentre quelle con maggiori differenze si concentrano nella porzione C-terminale del dominio.

# L'unità trascrizionale



**FIGURA 5.1** ◀ Struttura schematica di una generica unità trascrizionale. Le RNA polimerasi trascrivono unità trascrizionali, il più delle volte corrispondenti a singoli geni, in prossimità di un promotore (P). Il promotore si trova nelle adiacenze del sito di inizio della trascrizione (posizione +1, indicata dalla freccia sormontata da un tratto verticale) che corrisponde all'estremità 5' della nuova molecola di RNA del trascritto primario. Le posizioni a valle sono tutte identificabili, in maniera progressiva, attraverso numeri preceduti dal segno + (in figura, verso destra) e conducono verso il terminatore (T), un sito che delimita il confine al 3' del gene e l'estremità 3' del trascritto. Le posizioni a monte (in figura, verso sinistra) sono identificate a partire dalla posizione -1, immediatamente precedente al sito di inizio della trascrizione.

---

# La trascrizione negli eucarioti

## 1. RNA polimerasi

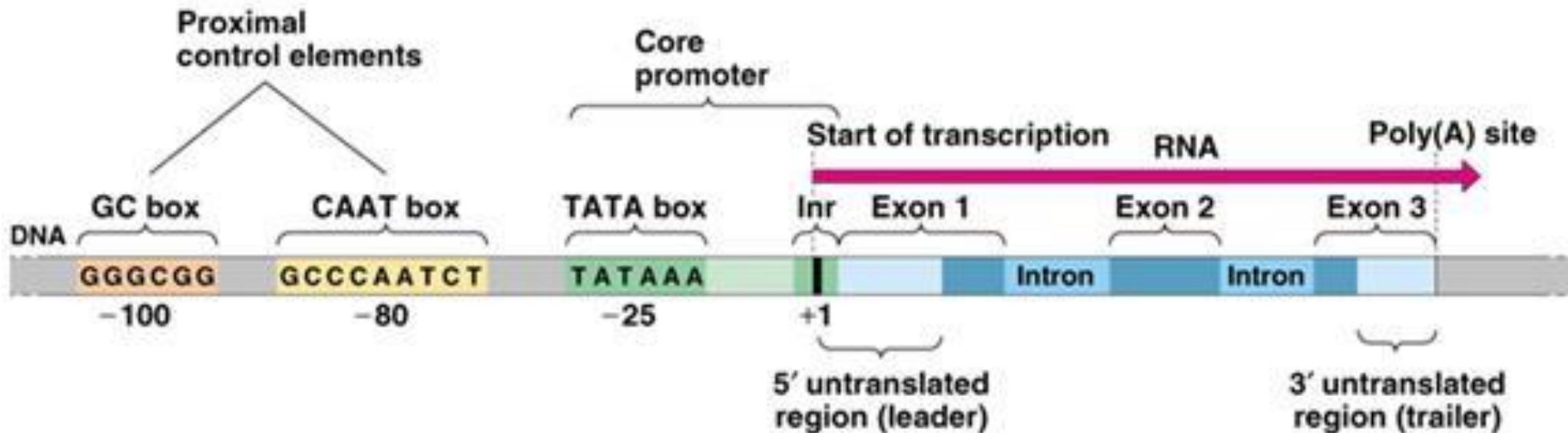
- RNA polimerasi I: rRNA 28S, 18S, 5,8S
- RNA polimerasi II: mRNA, la maggior parte dei piccoli RNA nucleari (snRNA, snoRNA), microRNA, RNA della telomerasi
- RNA polimerasi III: tRNA, rRNA 5S, altri piccoli RNA
- RNA polimerasi mitocondriale

## 2. Promotori più complessi e diversificati

## 3. Presenza di fattori di trascrizione

L'RNA polimerasi si lega ad una regione ben precisa del DNA chiamata promotore

### Il gene eucariotico



Regione regolatoria, non trascritta

Regione trascritta

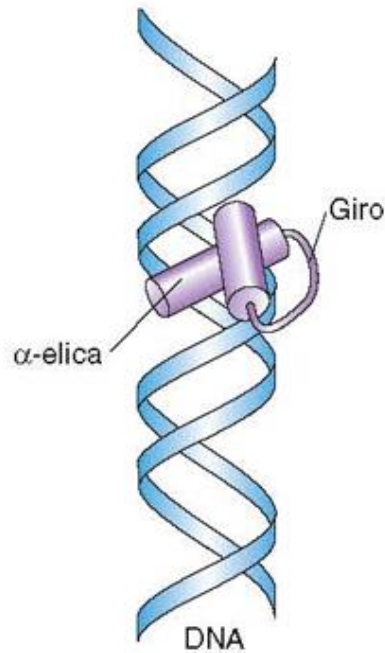
# I fattori trascrizionali

Sono proteine che riconoscono e si legano a sequenze specifiche sul DNA e regolano la trascrizione

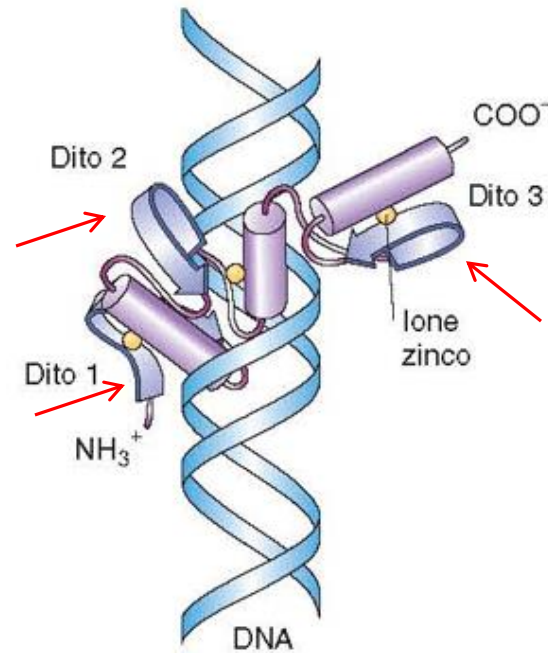




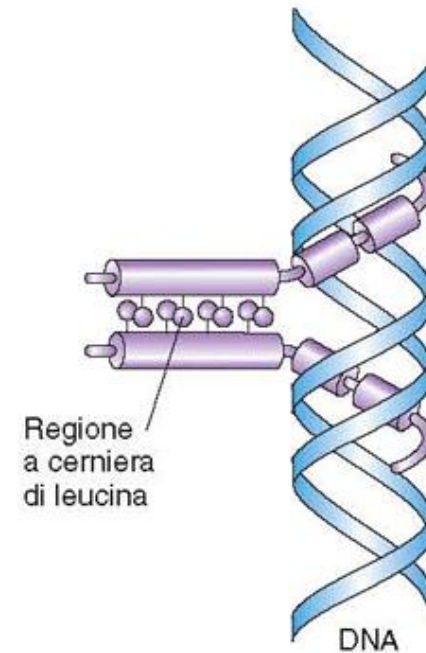
## I fattori trascrizionali sono in grado di legarsi al DNA mediante specifiche strutture secondarie



(a) **Elica-giro-elica.** Questa regione di una proteina di regolazione (in viola) contiene un'organizzazione elica-giro-elica (*helix-turn-helix*). L'elica di riconoscimento è inserita nel solco del DNA ed è connessa con una seconda elica, che aiuta la prima a rimanere nella corretta posizione, mediante una sequenza di aminoacidi che permette la formazione di una curvatura (turn).



(b) **Dita di zinco.** Regioni di certi fattori di trascrizione formano delle anse dette dita di zinco (*zinc fingers*) che possono inserirsi nei solchi del DNA e legarsi a specifiche sequenze.



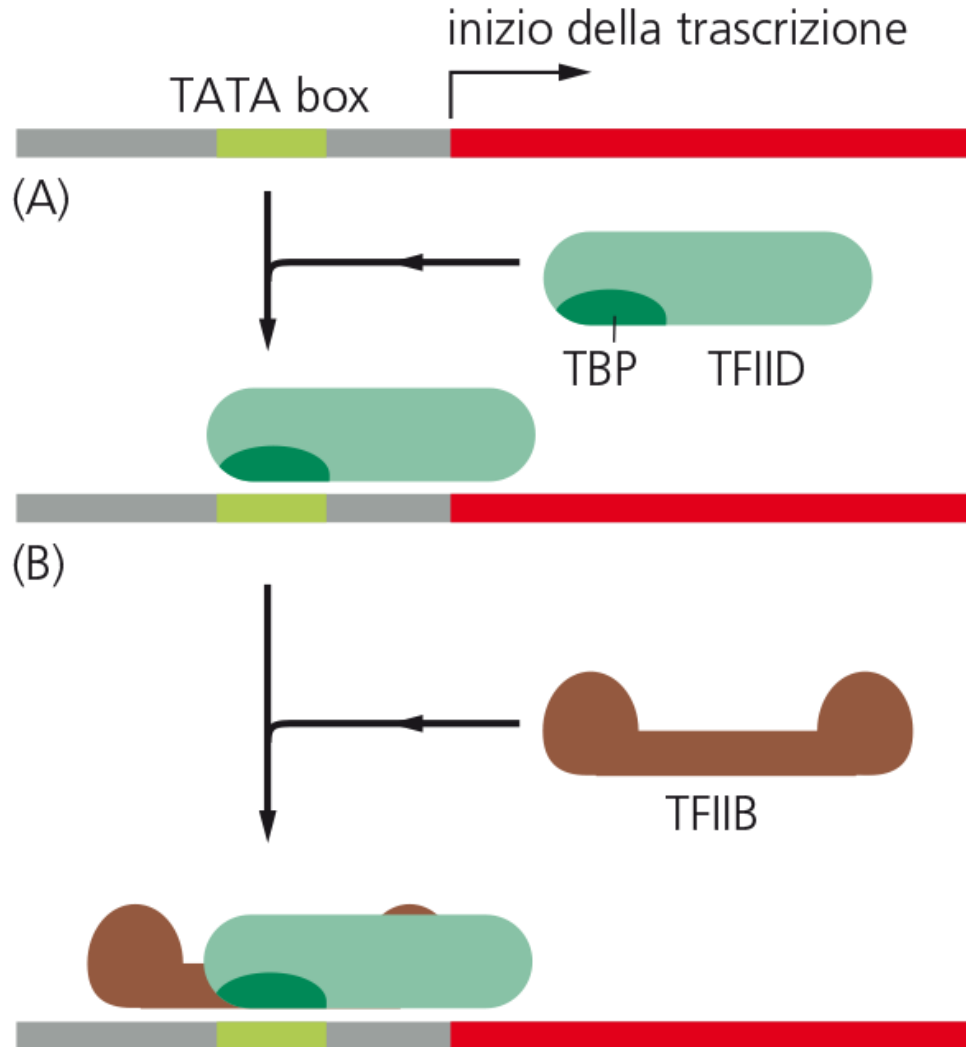
(c) **Cerniera di leucina.** Questa proteina a cerniera di leucina (*leucine zipper*) è un dimero tenuto insieme da interazioni idrofobiche che coinvolgono catene laterali di leucina ed altri aminoacidi.

# La trascrizione negli eucarioti è iniziata da fattori **trascrizionali generici**

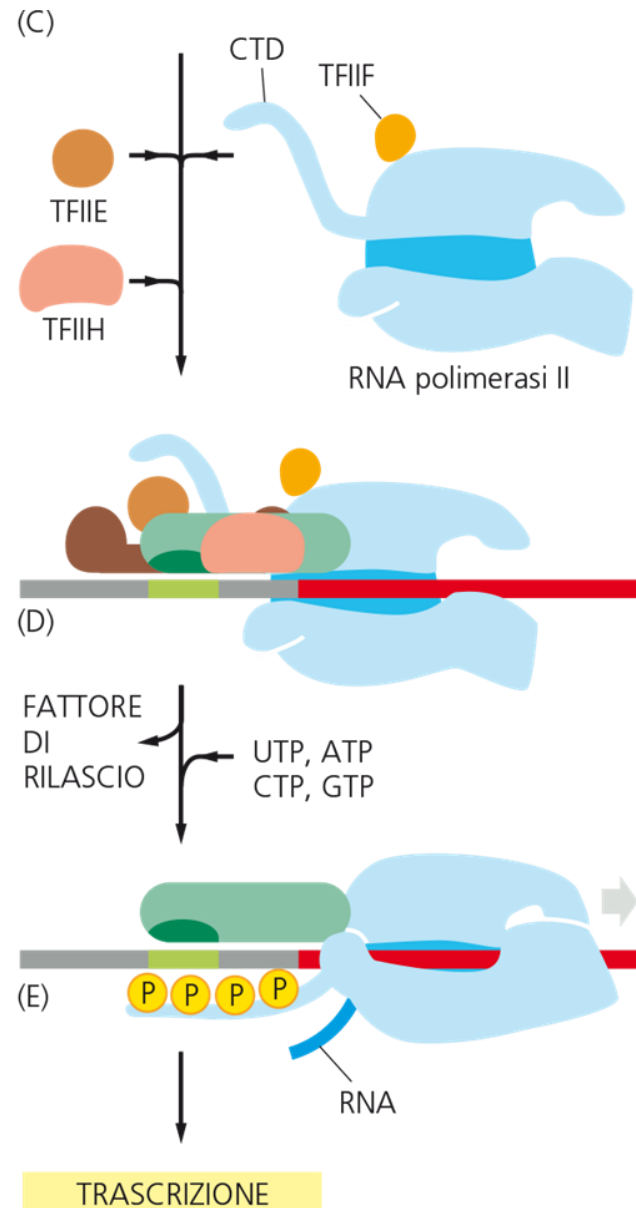
**TF**: fattore trascrizionale

**TFIID** e **TFIIB** sono fattori trascrizionali

**TBP**: TATA Binding Protein è una proteina che si lega specificamente alla TATA box.



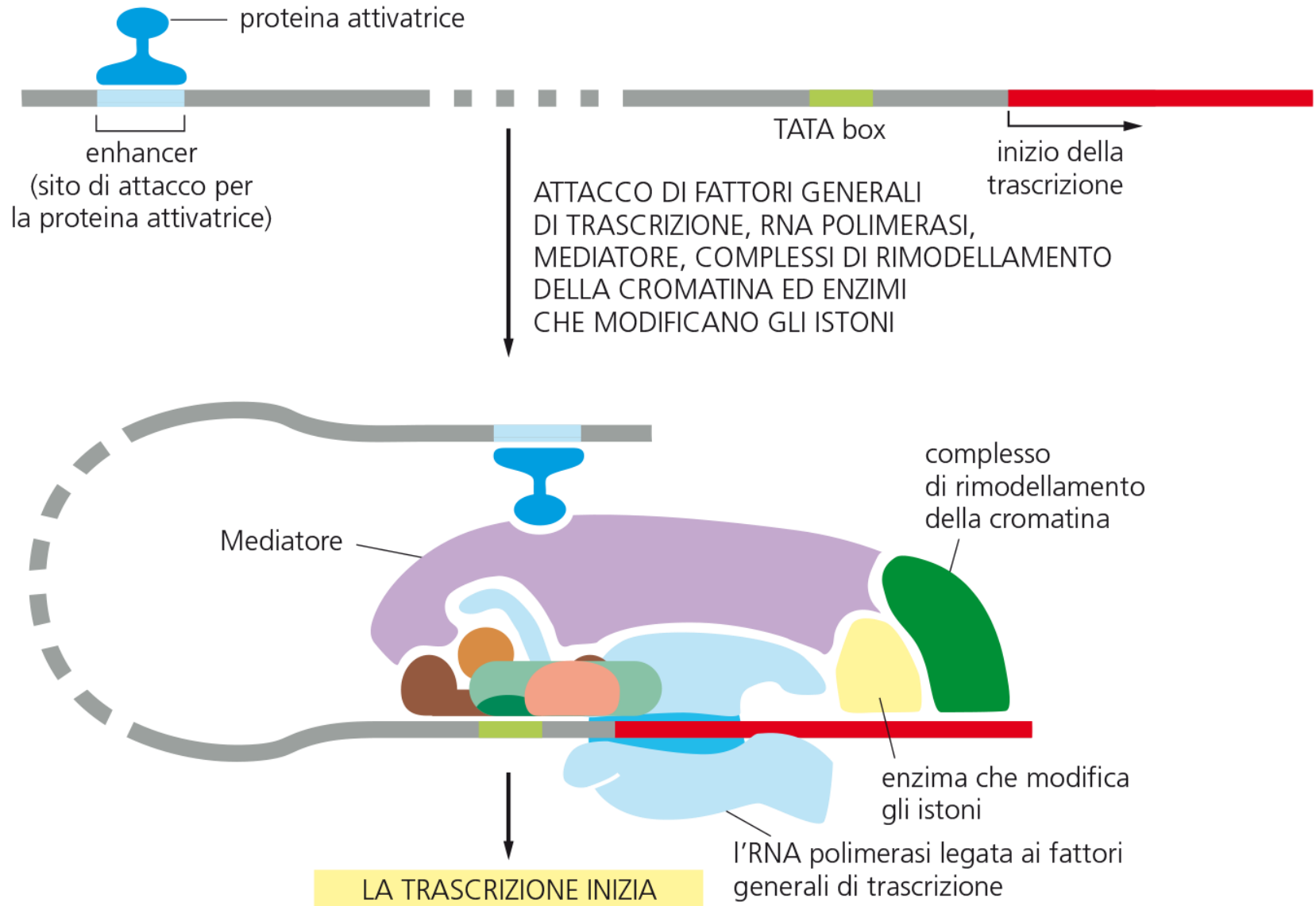
# La trascrizione negli eucarioti è iniziata da fattori **trascrizionali generici**



**TFIIE e TFIIH** si associano al complesso.

**TFIIH** è un fattore composto da diverse subunità, tra cui una **proteina chinasi** che fosforila sequenze ripetute presenti nel dominio C-terminale della subunità della RNA polimerasi II. La fosforilazione di queste sequenze rilascia la polimerasi dalla sua associazione con il complesso di inizio, permettendole di procedere lungo lo stampo ed allungare la catena di RNA in crescita.

L'RNA polimerasi II è associata a **TFIIF**, importante per la formazione del complesso di pre-inizio che precede la trascrizione vera e propria

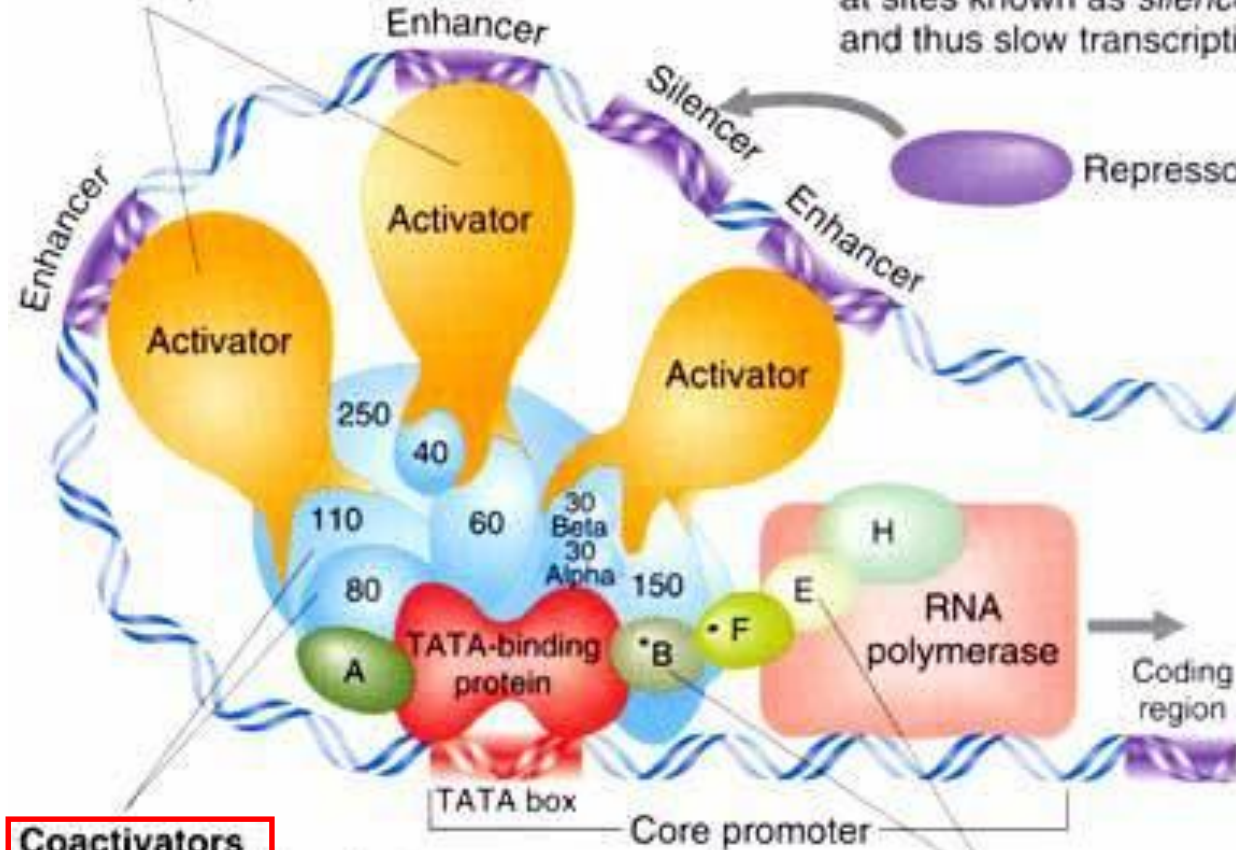


**Activators**

These proteins bind to genes at sites known as *enhancers* and speed the rate of transcription.

**Repressors**

These proteins bind to selected sets of genes at sites known as *silencers* and thus slow transcription.



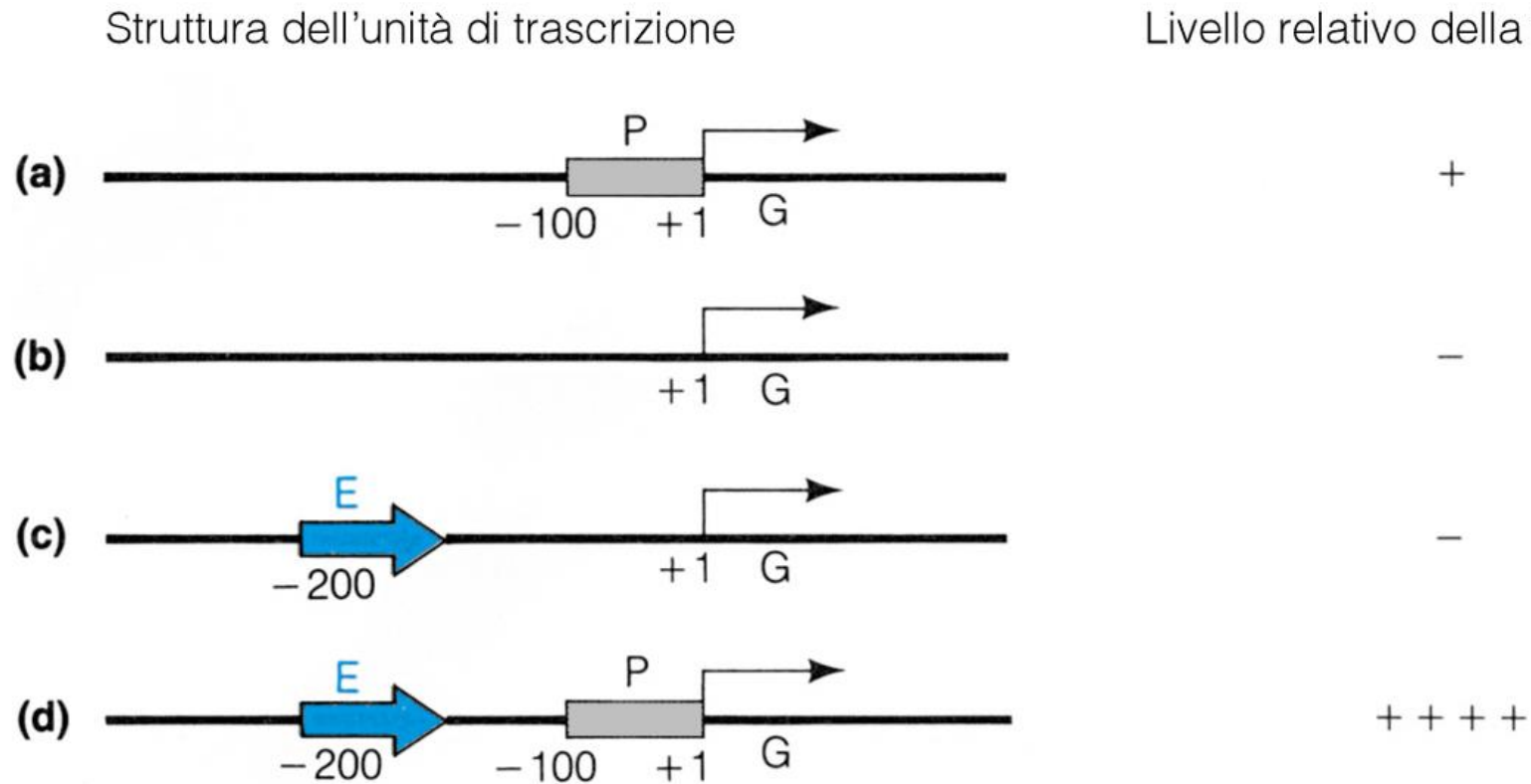
**Coactivators**

These "adapter" molecules integrate signals from activators and perhaps repressors.

**Basal transcription factors**

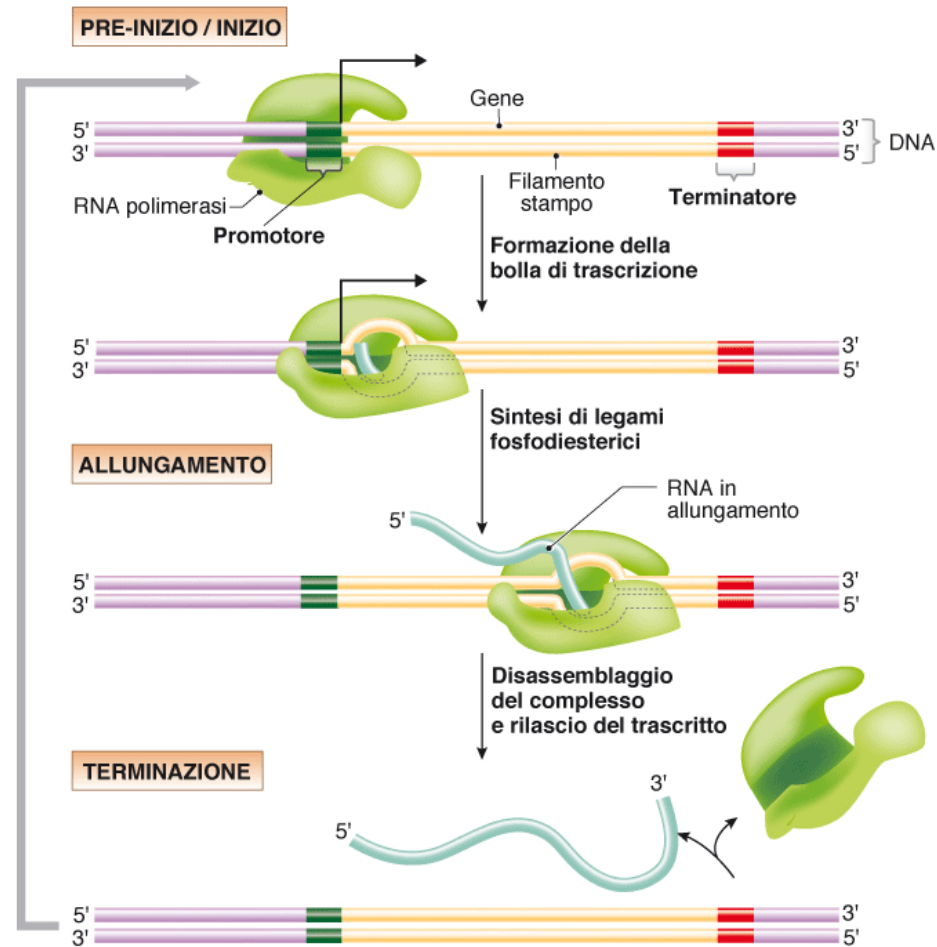
In response to injunctions from activators, these factors position RNA polymerase at the start of transcription and initiate the transcription process.

# Il promotore è un elemento fondamentale per la trascrizione!





# Le fasi della trascrizione

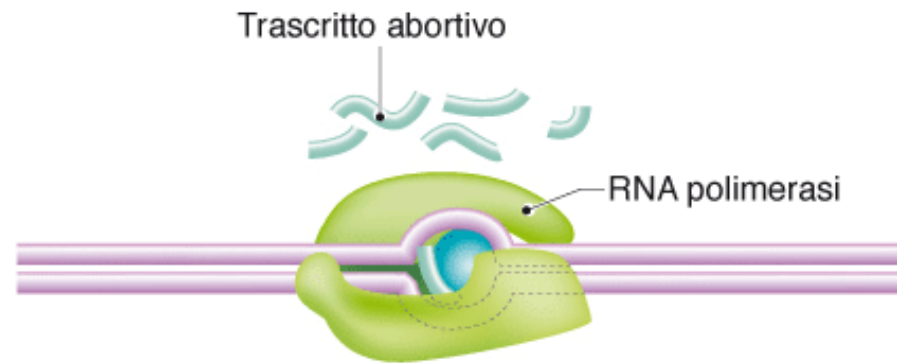


**FIGURA 5.6 ▲** Il ciclo di attività dell'RNA polimerasi. L'attività trascrizionale di una RNA polimerasi prevede genericamente tre tappe, note come fase di inizio, fase di allungamento e fase di terminazione. La fase di inizio può essere preceduta da quella di pre-inizio, che culmina con la formazione della bolla di trascrizione. L'insieme delle tappe individua, sul gene trascritto, le regioni rilevanti sul DNA: il promotore nella fase di inizio, la regione trascritta durante l'allungamento, e il terminatore nella tappa di terminazione. Il ciclo di attività di una RNA polimerasi sullo stampo definisce pertanto l'unità trascrizionale. Ciascuna delle tappe, e quindi le caratteristiche delle regioni corrispondenti e dei meccanismi coinvolti, possiedono peculiarità, tipiche delle diverse RNA polimerasi.

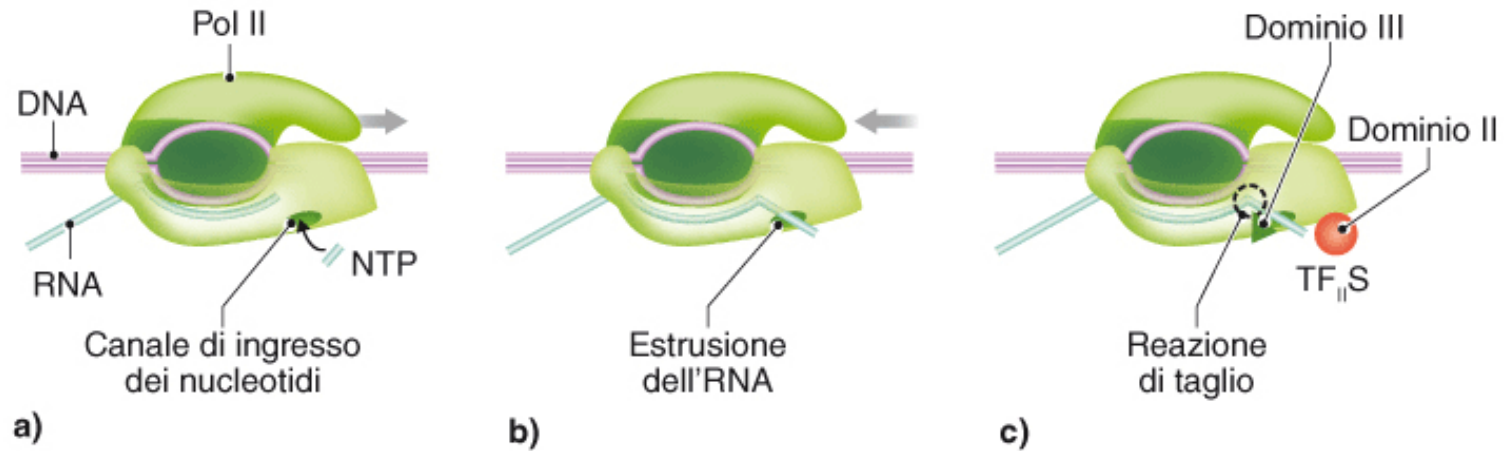


**FIGURA 5.7** ► I trascritti abortivi. Il passaggio dalla fase di inizio della trascrizione a quella effettiva di allungamento è caratterizzato dalla sintesi di corti trascritti di 2-12 nucleotidi, noti come trascritti abortivi.

---



## Il fattore di allungamento TFS

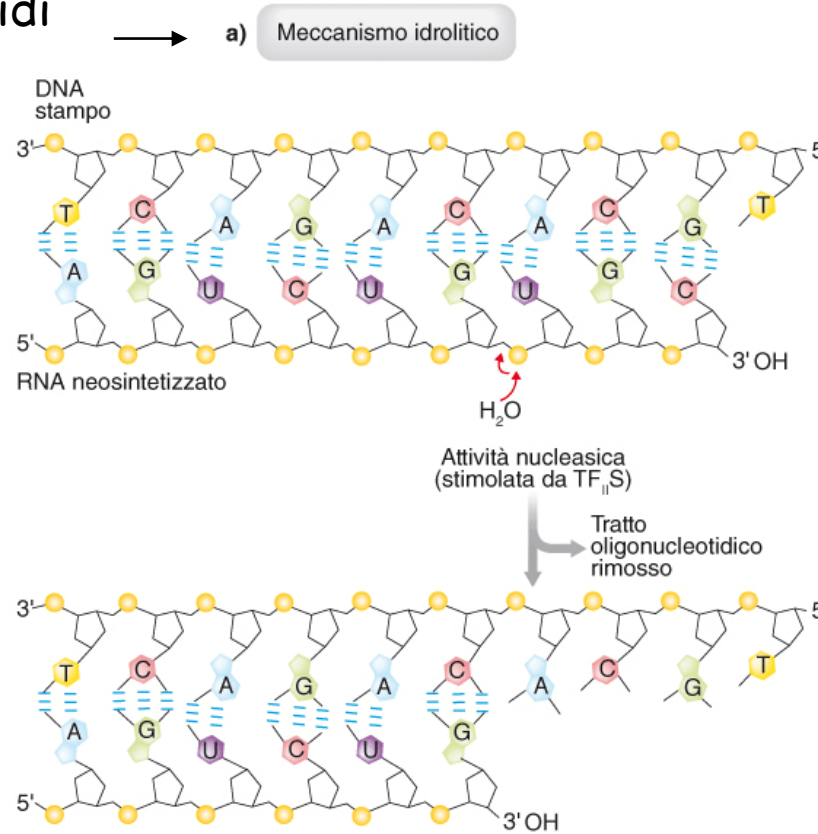


**FIGURA 5.34 ▲** Funzione del fattore di allungamento TF<sub>II</sub>S. Il fattore TF<sub>II</sub>S si associa all'RNA polimerasi II in corso di allungamento, qualora essa osservi la pausa sullo stampo. In questa situazione la polimerasi compie piccoli movimenti in senso retrogrado, che comportano la fuoriuscita dell'estremità 3' del trascritto attraverso il poro di ingresso dei nucleotidi. Infine, il fattore stimola l'attività endonucleasica endogena dell'RNA polimerasi, che rimuove un breve tratto del trascritto e promuove la ripresa della trascrizione. Si noti che TF<sub>II</sub>S negli eucarioti e GreB nei procarioti sfruttano simili meccanismi nei confronti delle rispettive RNA polimerasi.

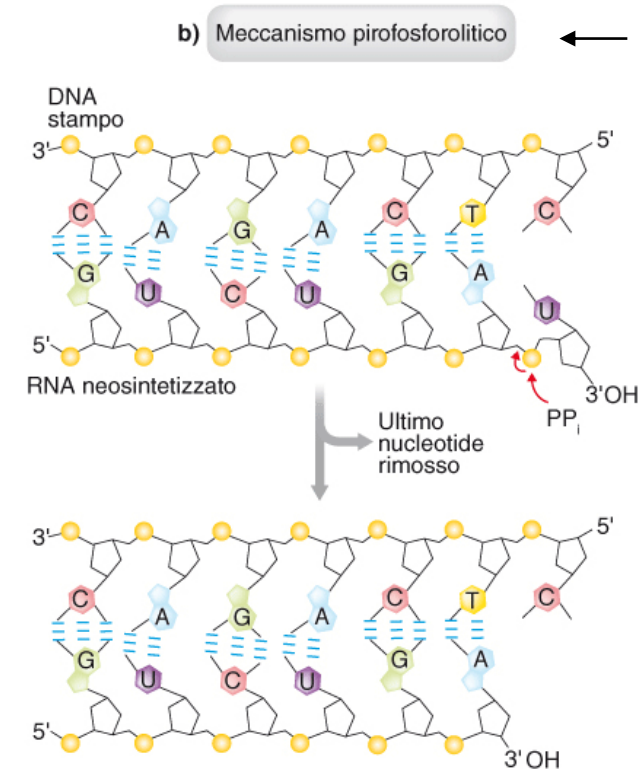
---

# Meccanismi di taglio dell'RNA polimerasi

Rimuove corti nucleotidi all'estremità 3-OH

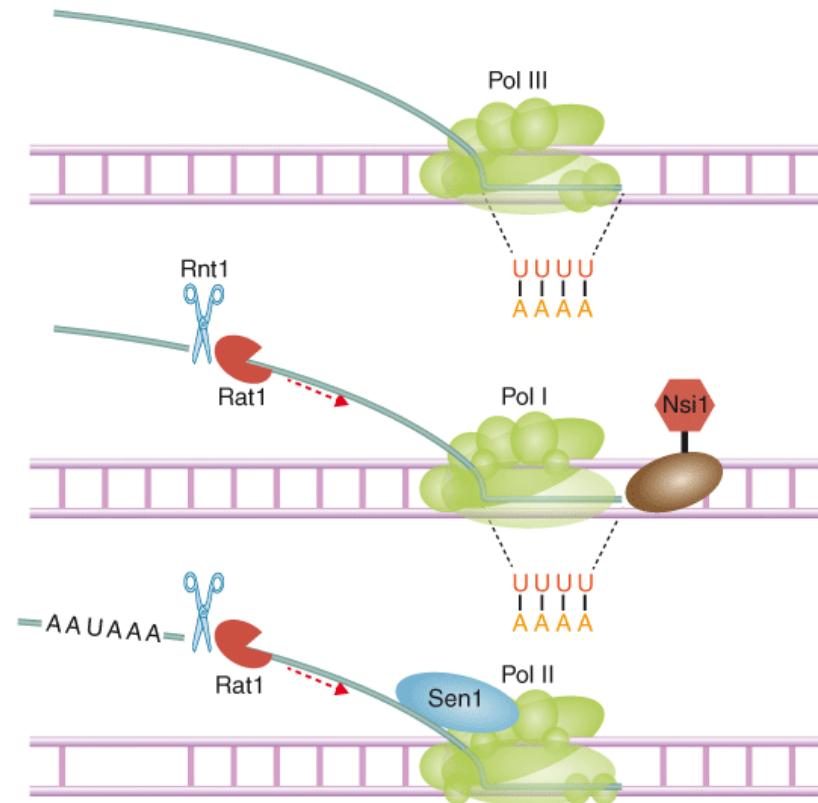


Rimuove un solo nucleotide all'estremità 3-OH



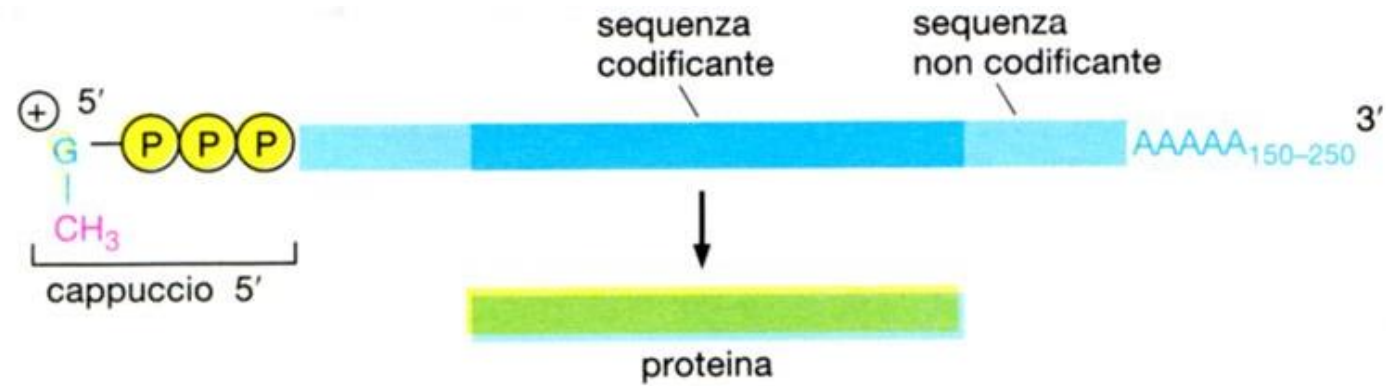
**FIGURA 5.36 ▲** I meccanismi di reazione, idrolitico e pirofosforolitico, per la rimozione di nucleotidi da parte delle RNA polimerasi. Oltre all'attività di sintesi di legami fosfodiesterici tra ribonucleosidi, le RNA polimerasi possiedono meccanismi di rimozione di nucleotidi incorporati per facilitare la ripresa della trascrizione durante le pause, ed eventualmente per correggere errori di incorporazione. **a)** Il meccanismo idrolitico può rimuovere contemporaneamente, e mediante una attività endonucleasica stimolata da TF<sub>II</sub>S, corti oligonucleotidi all'estremità 3' del trascritto, estrusi attraverso il poro di ingresso dei nucleotidi durante il movimento retrogrado dell'RNA polimerasi. **b)** Tipicamente, invece, la correzione pirofosforolitica rimuove l'ultimo residuo nucleotidico incorporato, grazie alla riaggiunta del pirofosfato, liberatosi a seguito della reazione di sintesi di un legame fosfodiesterico.

# Meccanismi di terminazione della trascrizione negli eucarioti

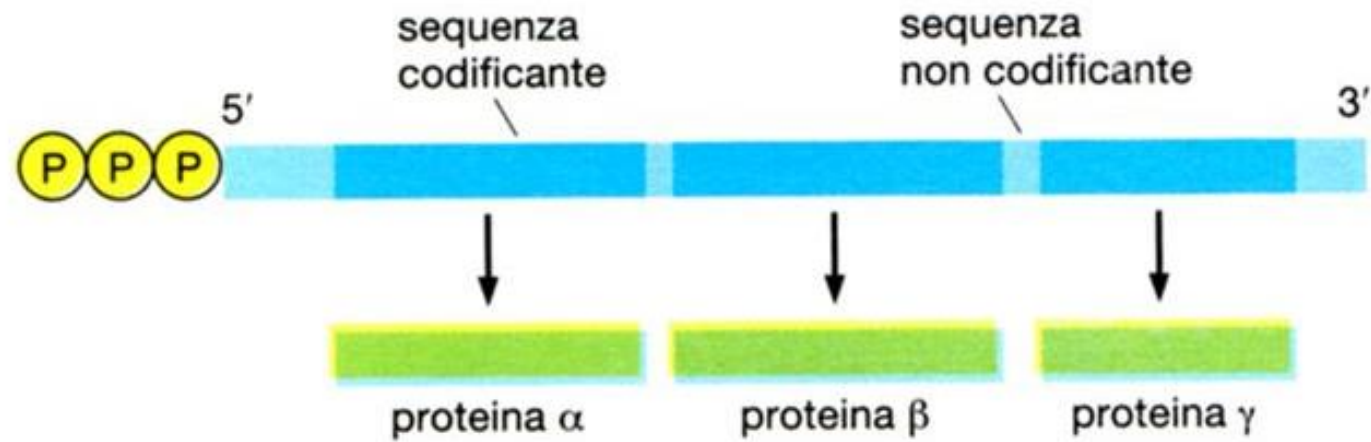


**FIGURA 5.39** ▲ Meccanismi di terminazione della trascrizione in eucarioti. Il meccanismo di terminazione della trascrizione di classe III (in alto) ricapitola quello della terminazione intrinseca dei procarioti, ma senza la formazione di strutture a forcina. I meccanismi di terminazione di classe I e di classe II sono invece accomunati da un taglio a monte dell'attività di polimerizzazione delle rispettive RNA polimerasi, che prosegue verso l'estremità 3'. Nel caso dei trascritti di RNA polimerasi II, il taglio avviene al 3' della sequenza AAUAAA nella regione di poliadenilazione. Le estremità 5' delle porzioni estese del trascritto richiamano attività esonucleasiche (5' → 3' di Rat 1) che ne determineranno la degradazione. La dissociazione del complesso ternario RNA polimerasi II-DNA-RNA è favorita dall'attività elicastica di Sen1.

# Gli eucarioti originano mRNA monocistronici



# I procarioti originano mRNA policistronici



## Gli ormoni steroidei.

Un esempio di ormoni che attivano direttamente la trascrizione funzionando da fattori trascrizionali

