

TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI

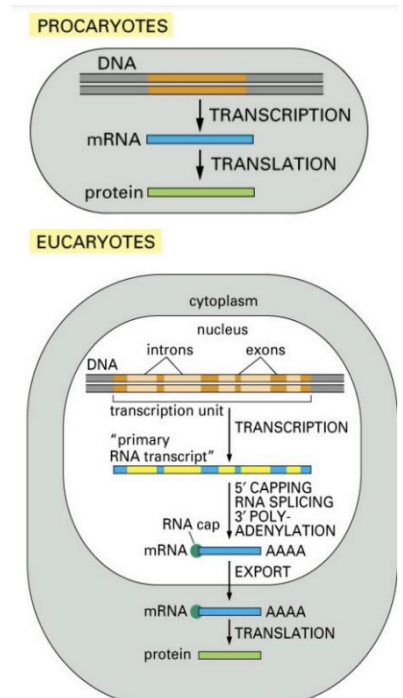
Principali differenze tra eucarioti e procarioti:

Nei procarioti:

- Un'espressione genica selettiva permette alle cellule di risparmiare energia; infatti se una determinata via metabolica non è necessaria non vengono sintetizzati geni e proteine necessari per quella determinata via metabolica (es. quando non è presente il lattosio non vengono trascritti i geni codificanti gli enzimi capaci di catabolizzare il lattosio);
- Nei procarioti abbiamo visto che i geni sono organizzati nell'operone, sono trascritti più geni (i quali hanno una funzione correlata) in un'unica molecola di RNA messaggero, che prende il nome di RNA messaggero policistronico;
- Nei procarioti la regolazione avviene a livello della trascrizione, viene modulata soprattutto la fase di inizio della trascrizione;
- Nei procarioti si ha un accoppiamento dei due processi (trascrizione e traduzione)
- E' utilizzata una sola RNA polimerasi;
- La RNA polimerasi procariotica richiede per iniziare la trascrizione soltanto il fattore sigma.

Negli eucarioti:

- L'espressione genica selettiva permette alle cellule di svolgere ruoli specializzati; tutte le cellule dell'organismo contengono le stesse informazioni genetiche (es. un cardiomiocita avrà le stesse informazioni genetiche presenti in un neurone), la differenza sta nel come queste informazioni sono utilizzate. Quindi la trascrizione serve proprio ad esprimere in modo differenziato queste informazioni a seconda del tipo di cellula e della funzione che svolge. Quindi il pattern di geni espressi per ogni tipo cellulare è diverso, quindi questa straordinaria specializzazione che vediamo all'interno dell'organismo si esplica attraverso il controllo dell'espressione e della regolazione di questi geni;
- Negli eucarioti i geni sono trascritti singolarmente ed inoltre negli RNA messaggeri è presente il CAP e la coda di poli-A;
- Negli eucarioti la regolazione avviene a vari livelli;
- Negli eucarioti la trascrizione avviene nel nucleo e poi successivamente l'RNA messaggero neosintetizzato si sposta nel citoplasma per far avvenire il processo di traduzione nei ribosomi. Inoltre in questo lasso di tempo pre-RNA messaggero subisce un processo di maturazione prima che il trascritto venga esportato nel citoplasma e poi tradotto;
- Le RNA polimerasi eucariotiche richiedono una serie di fattori trascrizionali (attivatori o repressori), che nel complesso costituiscono i fattori generali di trascrizione. Inoltre il genoma eucariotico è impacchettato in strutture complesse, per cui deve essere "liberato" per poter essere trascritto.



Negli eucarioti esistono tre differenti tipi di RNA polimerasi (di, di tipo II, di tipo III).

- **RNA polimerasi I** che trascrive i geni delle specie più grandi di RNA ribosomiale (quindi sintetizza rRNA);
- **RNA polimerasi II** che sintetizza i geni che codificano per le proteine (mRNA, miRNA, snRNA);
- **RNA polimerasi III** che sintetizza i geni delle specie più piccole degli RNA ribosomiali (rRNA 5S) e trascrive tutti gli RNA transfer (tRNA).

Inoltre nei cloroplasti e nei mitocondri abbiamo altre RNA polimerasi specializzate che sono distinte e simili a quelle viste nei batteri.

Ritornando alle tre RNA polimerasi, queste ultime sono complesse e sono costituite da numerose subunità e quindi sono dei complessi ad alto peso molecolare e soprattutto le funzione sono diverse, in quanto riconoscono promotori diversi, quindi avremo 3 differenti tipi di promotore.

Le RNA polimerasi sono costituite da 12 subunità (due più grandi e altre 10 più piccole):

le prime 5 subunità (1,2,3,11,6) sono omologhe alle 5 subunità facenti parte del RNA polimerasi procariotica; poi invece abbiamo altre 4 subunità (5,8,10,12) assenti nell'RNA polimerasi procariotica ma comuni tra le polimerasi eucariotiche; ed infine abbiamo altre subunità specifiche per ognuna di esse.

Da notare che la subunità 1 del RNA polimerasi II presenta un dominio carbossi-terminale che è costituito da una sequenza amminoacidica. Questo dominio è assente in tutte le altre RNA polimerasi sia eucariotiche che procariotiche, dove invece in queste ultime era presente un dominio alfa carbossi-terminale.

Come già detto precedentemente vi sono dei fattori di trascrizione che facilitano l'interazione tra RNA polimerasi ed il DNA. Si dividono in tre classi principali:

1. Fattori richiesti per l'inizio della trascrizione;
2. Fattori che aiutano il processo di allungamento dell'RNA da parte dell'RNA polimerasi;
3. Fattori che partecipano alla formazione di un complesso attivo di pre-inizio, che non sono più richiesti nelle fasi più avanzate della trascrizione.

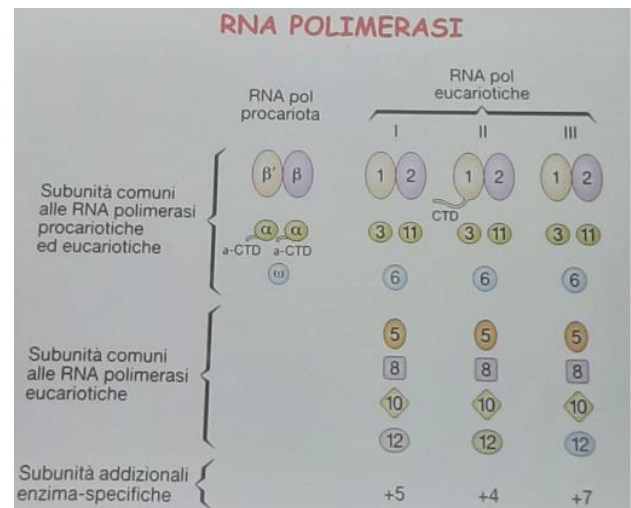
I primi due prendono il nome di **fattori generali di trascrizione** e sono quelli necessari per la trascrizione di tutti i geni, quelli responsabili della trascrizione costitutiva di quei geni che vengono detti 'austiping'.

Poi invece abbiamo il terzo gruppo che costituiscono i **fattori specifici** che servono solo per particolari geni, cioè le proteine regolatrici negli eucarioti.

Il primo gruppo è costituito dai "general transcription factors" (GTFs), i quali formano un complesso multiproteico con la polimerasi, che costituisce l'apparato trascrizionale di base.

Il secondo gruppo, gli "upstream factors", che riconoscono gli elementi prossimali attraverso un legame di sequenza-specifico al DNA.

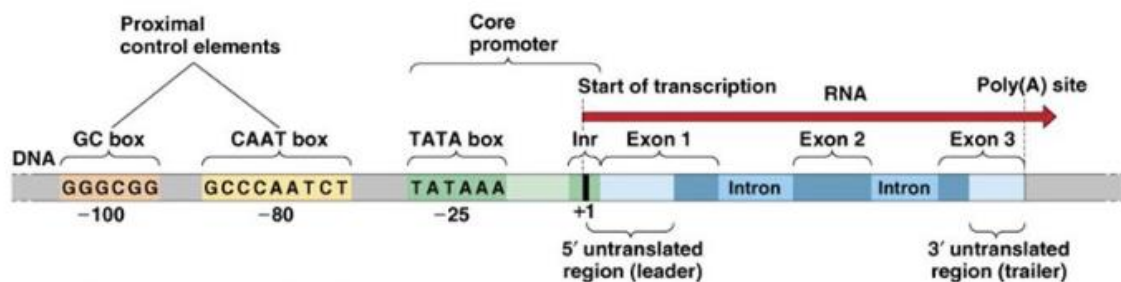
Il terzo gruppo è rappresentato dai fattori inducibili da stimoli extracellulari e/o tessuto-specifici, che si differenziano dalla classe precedente grazie al loro ruolo regolatorio.



PROMOTORE EUCARIOTE

Il **promotore eucariote** è la sequenza di DNA che viene riconosciuta dall'RNA polimerasi. Il promotore di un gene eucariotico è organizzato in una serie di elementi promotori, o moduli promotori; in genere le sequenze più comuni nei promotori eucariotici sono

- Il **TATA box** che si trova a -25/-30 dall'inizio della trascrizione ed in genere è presente nel 50% dei promotori dell'RNA polimerasi di tipo II;
- La sequenza **CAAT box** che si trova a -80 dall'inizio della trascrizione;
- **GC** che si trova a -100 dall'inizio della trascrizione. Queste ultime due sequenze fanno parte di una regione che si chiama elementi di controllo prossimali.



FASI DELLA TRASCRIZIONE

Anche negli eucarioti si riconoscono tre fasi della trascrizione:

1. Inizio
2. Allungamento
3. Termine

FASE DI INIZIO

L'RNA polimerasi non è capace di riconoscere da solo il proprio promotore quindi è necessaria la presenza di proteine specifiche, chiamate **fattori generali di trascrizione** che permettono l'inizio della trascrizione. Quindi la trascrizione richiede la formazione di un complesso di inizio a livello del promotore, la cui struttura varia a seconda dell'RNA polimerasi coinvolta. Quasi tutti i promotori contengono delle sequenze conservate che vengono riconosciute da questi fattori di trascrizione, quindi servono per la formazione di questi complessi.

Nei geni che codificano le proteine alcuni fattori di trascrizione si legano a sequenze specifiche del promotore, mentre altre sembra che si leghino direttamente all'RNA polimerasi quando questa inizia la trascrizione.

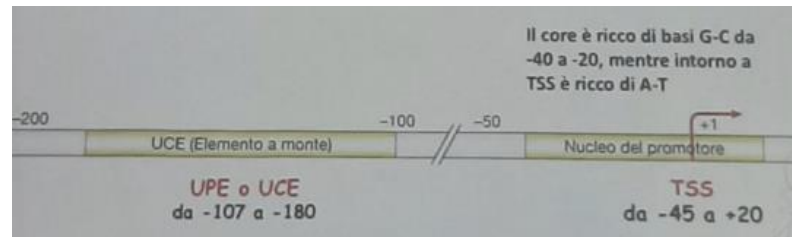
RNA polimerasi I e promotori di classe I

L'RNA polimerasi I è localizzata nel nucleolo e trascrive i geni per gli RNA ribosomiali. Questi geni sono presenti in copie multiple e quindi vengono trascritti ad altissimi livelli che, ovviamente, sono molto importanti per promuovere la sintesi proteica da parte dei ribosomi.

Il promotore è costituito da due regioni: **TSS** (nucleo del promotore) e **UCE** o **UPE** (elemento a monte).

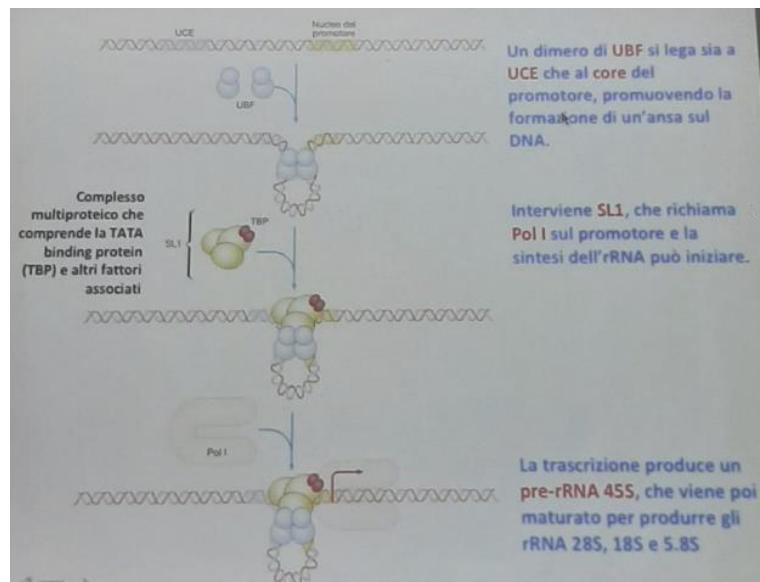
Abbiamo un tratto sovrapposto al sito d'inizio dove abbiamo **TSS**; abbiamo quindi questo nucleo del promotore (che abbiamo detto essere sovrapposto a questo sito d'inizio) che costituisce il core ed è ricco di

basi G-C da -40 a -20, mentre intorno a TSS è ricco di A-T. A monte del nucleo del promotore vi è un elemento chiamato UPE o UCE che si estende da -107 a -180.



L'inizio della trascrizione degli RNA ribosomiali avviene nel seguente modo:

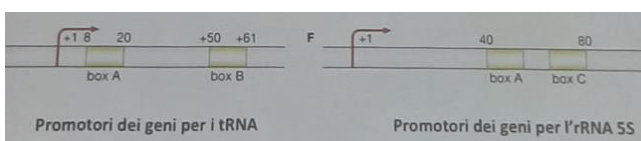
innanzitutto richiede dei fattori di trascrizione, in questo caso sono due. Abbiamo un fattore **UBF** che si lega sia a **UCE** che al **core** del promotore, promuovendo la formazione di un'ansa sul DNA che quindi avvicina le due sequenze. Una volta legato UBF richiama il secondo fattore di trascrizione che si chiama **SL1** (costituito da TBP che lega la sequenza TATA e altri fattori associati TAF), che richiama la **Pol I** sul promotore e la sintesi dell'rRNA può iniziare. Una volta formatosi questo complesso di inizio si avrà la trascrizione che produrrà pre-rRNA 45S, che viene poi maturato per produrre gli rRNA 28S, 18S e 5.8S.



RNA polimerasi III e promotori di classe III

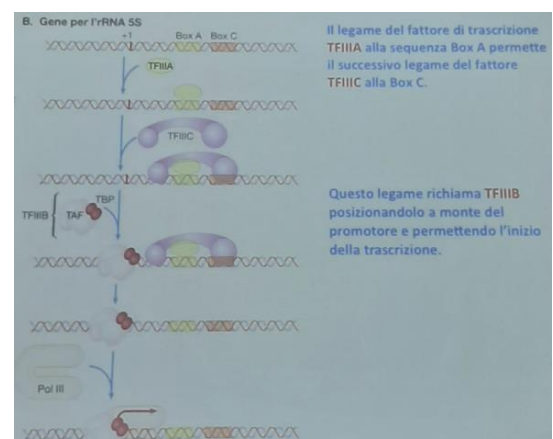
L'RNA polimerasi III è localizzata nel nucleoplasma e trascrive i geni per gli RNA transfer (tRNA), per gli RNA ribosomiali 5S e per i piccoli RNA nucleari (snRNA).

Una caratteristica dei promotori è che si trovano a valle del TSS cioè gli elementi del promotore sono localizzati a valle quindi, nella zona trascritta, sono dei promotori interni; contengono degli elementi di controllo box. Nel caso dei geni che codificano per l'RNA transfer abbiamo box A e box B, mentre nel caso dei geni per RNA ribosomiale abbiamo box A e box C. Questi elementi sono riconosciuti da fattori di trascrizione che si posizionano a monte del TSS.



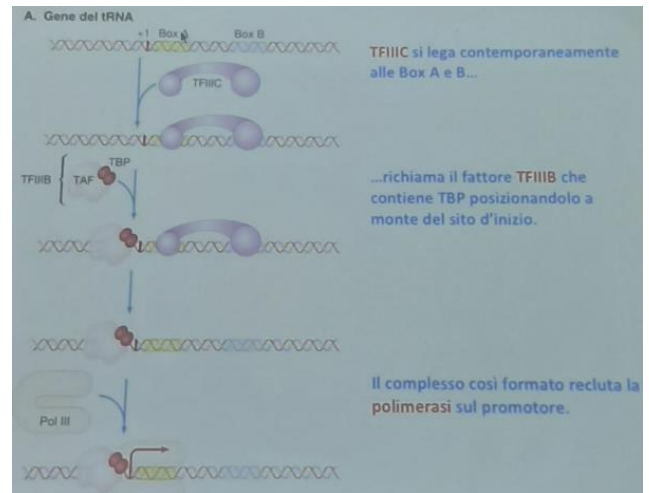
La formazione del complesso di pre-inizio per quanto riguarda il caso del gene per l'RNA ribosomiale 5S avviene nel seguente modo:

vi è il primo fattore di trascrizione **TFIIIA** il quale si lega alla sequenza box A che permette il successivo legame del fattore **TFIIIC** alla box C. Quest'ultimo a sua volta richiama **TFIIIB** (avente anch'esso fattori TAF e TBP) posizionandolo a monte del promotore e permettendo l'inizio della trascrizione.



La formazione del complesso di pre-inizio per quanto riguarda il caso del gene per l'RNA transfer avviene invece così:

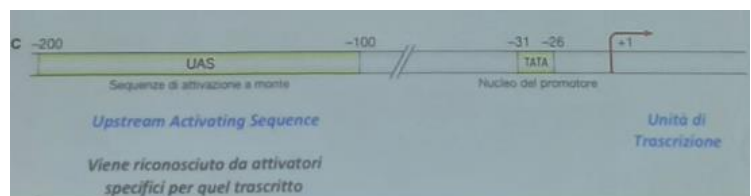
In questo vi è il fattore di trascrizione **TFIIIC**, il quale si lega contemporaneamente alle box A e B e richiama il fattore **TFIIIB** che contiene la TBP posizionandolo a monte del sito d'inizio. Il complesso così formato recluta la **RNA polimerasi** sul promotore.



RNA polimerasi di tipo II e promotori di classe II

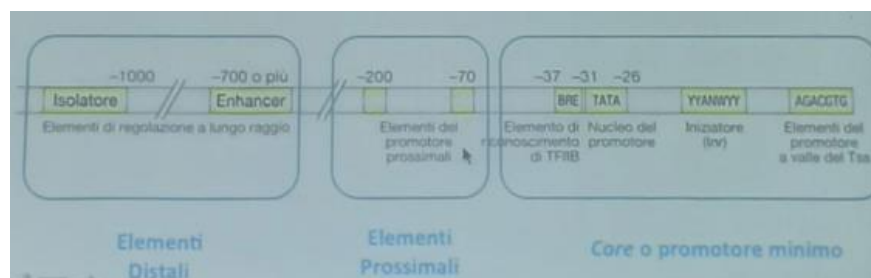
L'RNA polimerasi II è localizzata nel nucleoplasma, è implicata nella formazione dei trascritti primari di RNA (mRNA) ed è il promotore di eucarioti unicellulari e multicellulari.

Negli **organismi unicellulari** abbiamo un promotore che è costituito da una sequenza TATA che si trova a -26 dal sito d'inizio della trascrizione; poi abbiamo un elemento UAS che viene riconosciuto da attivatori specifici per quel trascritto.



Negli **organismi multicellulari** abbiamo un'organizzazione in 3 blocchi:

- La prima parte viene rappresentata dal core o promotore minimo; questo contiene le sequenze di riconoscimento.
- Poi abbiamo degli elementi prossimali, i quali sono localizzati a -200 dal sito d'inizio, questi elementi vengono riconosciuti da attivatori trascrizionali.
- Ed infine abbiamo gli elementi distali posizionati a -1000 dal sito d'inizio; questi sono costituiti dalle sequenze Enhancer o Silencer e poi abbiamo la sequenza isolatore. Le sequenze silencer sono delle sequenze che svolgono funzioni di attivazione o repressione dell'espressione genica, quindi agiscono sul promotore minimo aumentando o inibendo la trascrizione (enhancer o silencer), oppure possono anche modificare la cromatina in modo tale da rendere il DNA visibile per la formazione del complesso di inizio. Poi abbiamo anche gli isolatori che regolano degli enhancer o dei silencer.



Ovviamente non tutti i geni trascritti dall'RNA polimerasi contengono tutti questi elementi.

Nel core o promotore minimo abbiamo un elemento Inr (iniziatore), che contiene il sito d'inizio della trascrizione. Poi abbiamo la TATA box, localizzata a monte dal sito d'inizio, ed in genere è preceduto dalla sequenza BRE. Nel promotore minimo a volte abbiamo DCE i quali si trovano a valle dal sito d'inizio. Infine abbiamo l'elemento DPE, che è caratteristico dei promotori che non contengono la TATA box, quindi viene definito promotore TATA less.

Funzionamento RNA polimerasi II

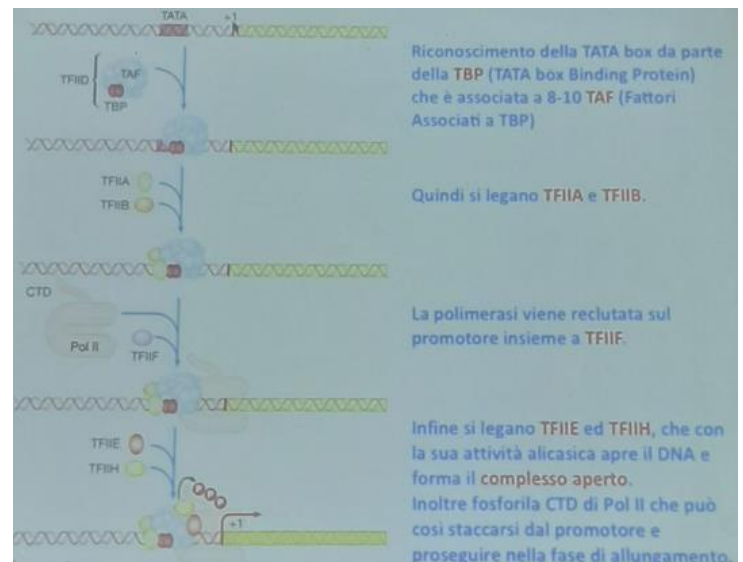
L'RNA polimerasi necessita di fattori di trascrizione (TFII), che si devono legare al promotore prima che si leghi l'enzima; quindi la prima fase della trascrizione consiste nella formazione di questo complesso chiuso. Quindi questi fattori sono di fondamentale importanza per il riconoscimento del promotore, per posizionarvi l'RNA polimerasi II, per separare la doppia elica.

I vari fattori sono: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIIF, TFIIH.

Il primo fattore di trascrizione che entra in gioco è TFIID (complesso multiproteico costituito da TBP e altri fattori associati a TBP (TAF)). Poi vi si aggiungono altri fattori di trascrizione e l'RNA polimerasi II; l'insieme di questo complesso è chiuso perché il doppio filamento non è stato ancora aperto.

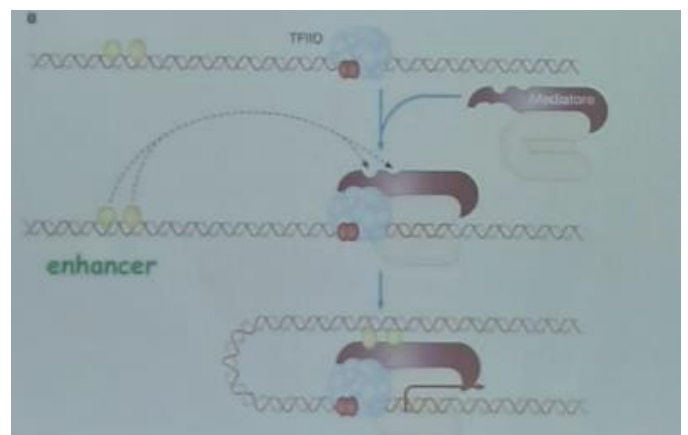
Nello specifico:

si ha il riconoscimento della TATA box da parte della **TBP** (TATA box binding protein) che è associata a 8-10 **TAF** (fattori associati a TBP). Successivamente si legano altri due fattori **TFIIA** e **TFIIB**. Poi viene reclutata la polimerasi sul promotore insieme al fattore **TFIIIF**. Infine si legano **TFIIIE** ed **TFIIH**, quest'ultimo con la sua attività elicasica apre il DNA e forma il **complesso aperto**. Inoltre fosforila il dominio carbossi-terminale (CTD) della polimerasi II che può così staccarsi dal promotore e proseguire nella fase di allungamento.



Ciò che abbiamo detto precedentemente accade in vitro invece in vivo vi è in aggiunta la presenza di un mediatore.

Il **mediatore** è un complesso di proteine, che interagisce con i fattori di trascrizione generali e con la RNA polimerasi II, per stimolare la trascrizione. Quindi non solo stimola la trascrizione basale, ma gioca un ruolo di collegamento tra i fattori generali e i fattori specifici che regolano l'espressione genica. Il mediatore quindi forma questo 'ponte levatoio' molecolare tra i domini di trans-attivazione e di vari fattori di trascrizione e l'RNA polimerasi II. Ciò che permette il legame sono delle anse presenti nell'DNA.



FASE DI ALLUNGAMENTO

- L'allungamento è facilitato dai fattori di allungamento, dopo che si sono dissociati TFIIIE e TFIIH;
- La fase di allungamento è del tutto simile a quella dei procarioti ed avviene in direzione 5' → 3'.

In questa fase le sequenze ripetute della coda CTD dell'RNA polimerasi sono fosforilate durante ciascuna fase della trascrizione.

FASE DI TERMINAZIONE

- I fattori di allungamento si dissociano. Il CTD viene defosforilato non appena termina la trascrizione, un processo favorito da fattori di terminazione;
- Non sono state individuate sequenze specifiche che indicano la **fine della trascrizione** negli eucarioti;
- Per l'RNA polimerasi II si è osservato che la terminazione avviene circa 1000 nt a valle della sequenza consenso 5'-AAUAAA-3'.

REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

Sono alcuni geni vengono costituzionalmente trascritti per ogni cellula (geni housekeeping: enzimi del metabolismo, RNA polimerasi, ribosomi, istoni...).

Per tutti gli altri esistono **meccanismi che permettono di regolare** se, quando (meccanismi di regolazione temporali) e quanto un gene deve essere trascritto.

Ciò è particolarmente evidente e importante negli organismi eucarioti multicellulari dove esiste una regolazione tessuto-specifica (cellule diverse producono proteine diverse).

Il principio centrale della regolazione dei geni è che il controllo della trascrizione è mediato **dall'interazione di proteine regolatrici con sequenze specifiche** di DNA. Le sequenze regolatrici sono chiamate elementi di controllo:

- **Elementi che agiscono in cis:** controllano soltanto l'espressione dei geni adiacenti, collegati sulla stessa molecola di DNA.
- **Elementi che agiscono in trans:** possono controllare l'espressione dei geni posti su altri cromosomi all'interno della cellula.

Entrambi possono agire da attivatori o da repressori della trascrizione.

Potenziati punti di controllo dell'espressione genica

A livello pre-trascrizionale c'è un controllo a livello della cromatina, la quale grazie alla sua forma condiziona la trascrizione.

Poi vi è il controllo trascrizionale: esercitato da interruttori molecolari, fattori di trascrizione, proteine che si legano al DNA nel sito promotore dei singoli geni o in corrispondenza di altre sequenze regolatrici (*enhancers*, *silencers*) poste anche a 20 kb dal gene.

Gli elementi regolatori in posizione più distale sono chiamati **enhancers** e sono necessari per ottenere il massimo grado di trascrizione per un dato gene.

Esistono anche elementi, chiamati **silencers**, che hanno caratteristiche simili agli enhancer ma che reprimono la trascrizione anziché attivarla.

Enhancers: sequenze regolatrici poste molto più lontane lontano dal sito d'inizio della trascrizione, talvolta più 10-20 Kb. L'attività degli enhancer non dipende né dalla distanza, né dall'orientamento, rispetto al sito d'inizio della trascrizione. E neanche dalla posizione: possono essere sia a monte che a valle del promotore, orientate sia in un senso che nell'altro. Gli enhancer legano fattori di trascrizione specifici, quindi gli enhancer attivano la trascrizione.

Come i promotori, gli enhancer funzionano legando fattori di trascrizione che regolano poi l'RNA polimerasi. Ciò è possibile per il ripiegamento del DNA, che permette ad un fattore di trascrizione legato ad un enhancer distante da interagire con l'RNA polimerasi o con i fattori basali di trascrizione presenti sul promotore.

Il mediatore legato alla polimerasi è in grado di riconoscere i fattori basali della trascrizione come il complesso di TFIID e legarsi al promotore.

Gli attivatori, legati agli enhancer, riconoscono e legano in modo specifico alcuni componenti del mediatore.

Quando queste interazioni sono stabili, il complesso è in grado di trascrivere.

Un'altra funzione degli enhancer è quella di regolare l'espressione tessuto-specifica di alcuni particolari geni. L'enhancer può essere attivo in alcuni tipi di cellule ed in altri no.

[Un esempio è quello della trascrizione del gene dell'albumina in una cellula epatica, cioè nel fegato questa proteina è quella maggiormente prodotta, mentre l'enhancer riguardante questo gene nel cervello non è attivo infatti non avviene la sintesi dell'albumina.]

Isolatori: sono sequenze di DNA a cui si legano specifiche proteine che influenzano l'azione degli enhancer.

Le RNA polimerasi sono il bersaglio di vari farmaci:

- L'actinomicina D è un antibiotico che impedisce il movimento della polimerasi batterica lungo lo stampo durante la trascrizione, nella fase di allungamento;
- La rifampicina, un importante antibiotico usato per la terapia della tubercolosi (TBC), causata dal batterio *Mycobacterium tuberculosis*, inibisce la sintesi di RNA batterico impedendo la fase di distacco dal promotore della trascrizione;
- Il fungo *Amanita* produce una sostanza, l' α -amanitina, che impedisce la trascrizione nelle cellule animali bloccando la RNA polimerasi II e, a più alte concentrazioni, la polimerasi III.