

La trascrizione

Caratteristiche generali della trascrizione

Il primo passaggio della lettura di una parte necessaria delle istruzioni genetiche di una cellula è quello di copiare una porzione della sequenza nucleotidica del suo DNA – un gene – in una sequenza nucleotidica di RNA.

L'informazione del DNA, anche se copiata in un'altra forma chimica, è ancora scritta essenzialmente nello stesso linguaggio del DNA – **il linguaggio di una sequenza nucleotidica**. Da cui il nome **trascrizione**.

Un segmento di DNA che viene espresso per ottenere un **prodotto funzionale**, corrispondente o ad una molecola di RNA (es. **RNA ribosomiali o RNA transfer**) o ad un **polipeptide** si chiama **GENE** e può essere suddiviso in tre regioni:

Promotore – contiene segnale di inizio di trascrizione

Regione codificante

Segnale di fine trascrizione



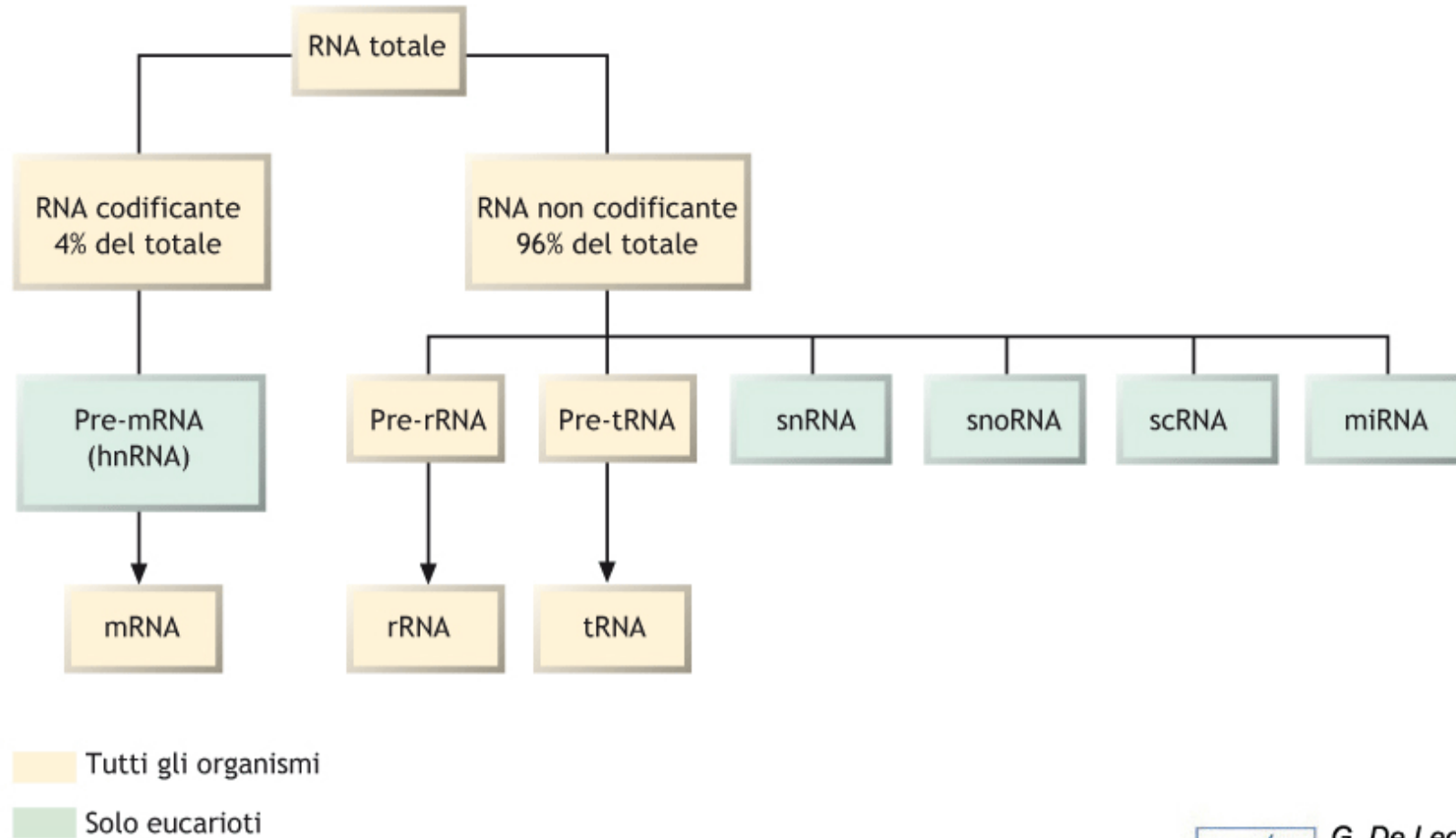


Figura 4.66 Trascrittoma: solo il 4% dei trascritti è tradotto.

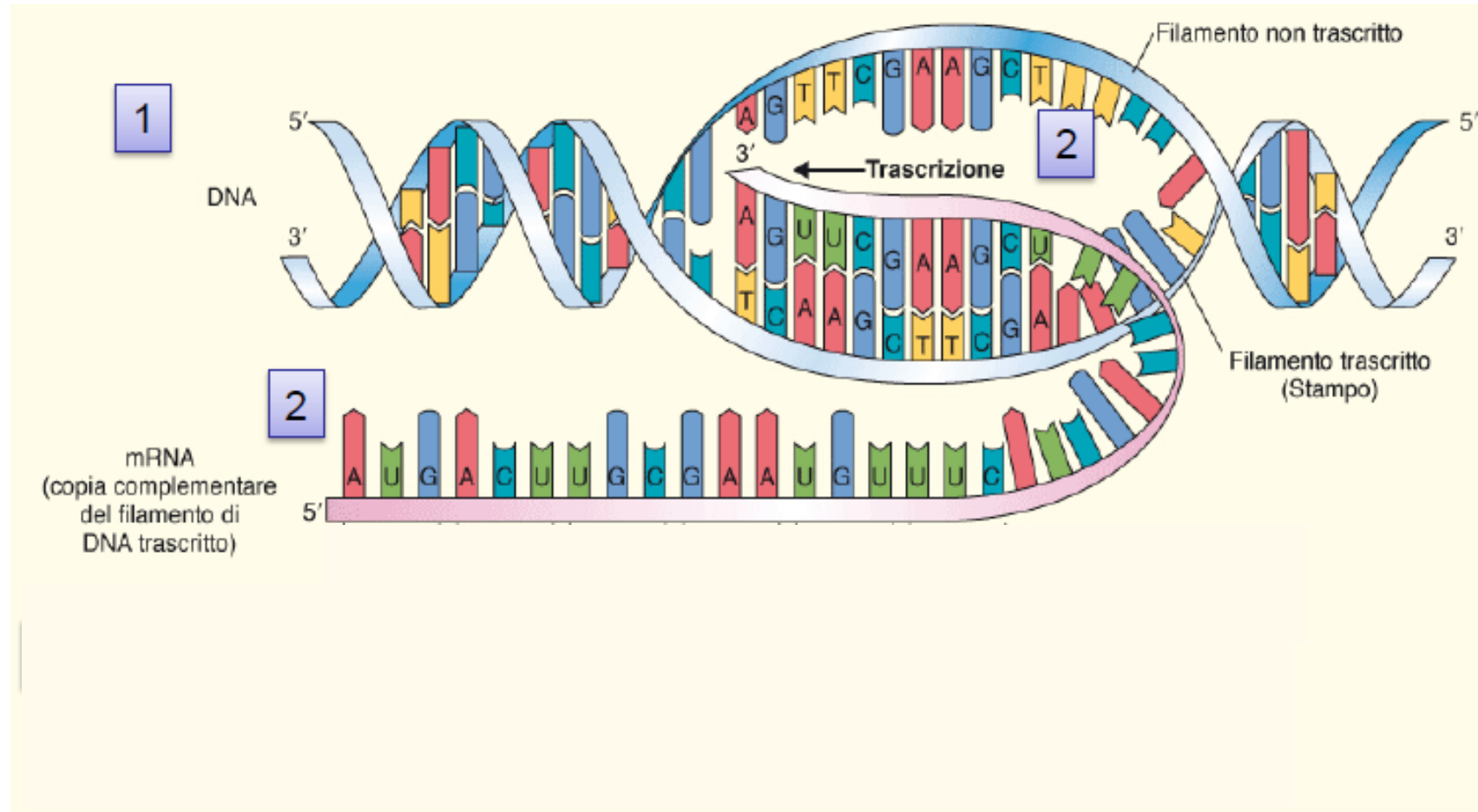
RNA negli eucarioti: molteplici funzioni

- **mRNA**
- **tRNA**
- **rRNA**
- **TERC** (telomerase RNA component)
- **snRNA** (small nuclear RNA) coinvolti nello splicing
- **snoRNA** (small nucleolar RNA) coinvolti nella maturazione dell'rRNA
- **scRNA** (small cytoplasmic RNA) coinvolto nello smistamento delle proteine
- **miRNA** (microRNA (20-25 nt) trascritti da geni specifici che controllano l'espressione di 1/3 dei geni umani
- **long non coding RNA-** numero variabile di nucleotidi da 70 a qualche migliaio. La loro funzione è quella di regolare l'espressione genica

La trascrizione

La trascrizione richiede

- uno stampo di DNA
- i ribonucleotidi trifosfati (ATP, GTP, CTP e UTP)
- un enzima chiamato RNA polimerasi che sintetizza l'RNA con sequenza complementare al DNA trascritto
- **il filamento di RNA verrà sintetizzato in direzione 5'-3'**



Le due catene di DNA complementari coinvolte nella trascrizione hanno ruoli diversi

(5') C G C T A T A G C G T T T (3')

Catena non-stampo (codificante) di DNA

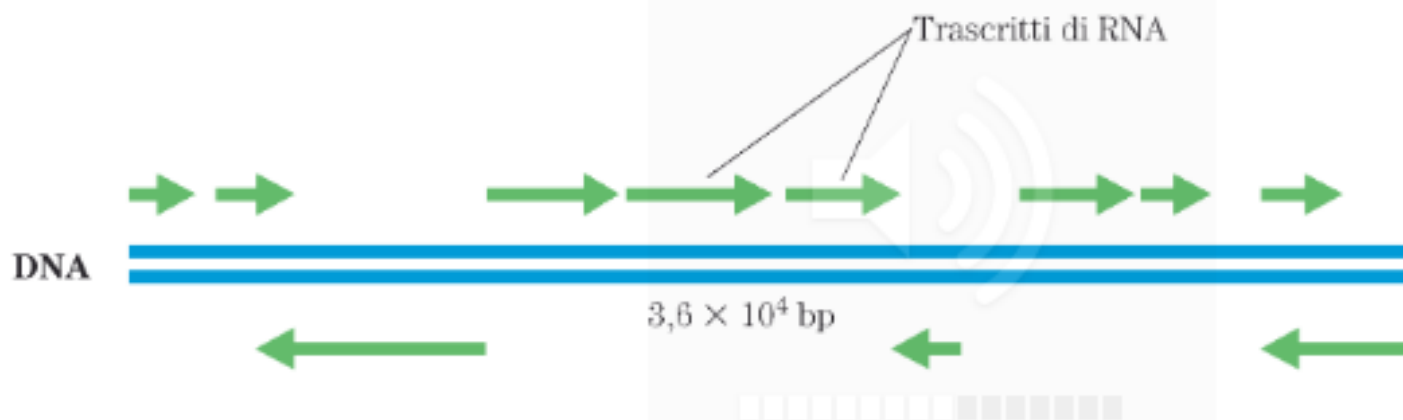
(3') G C G A T A T C G C A A A (5')

Catena stampo di DNA

(5') C G C U A U A G C G U U U (3')

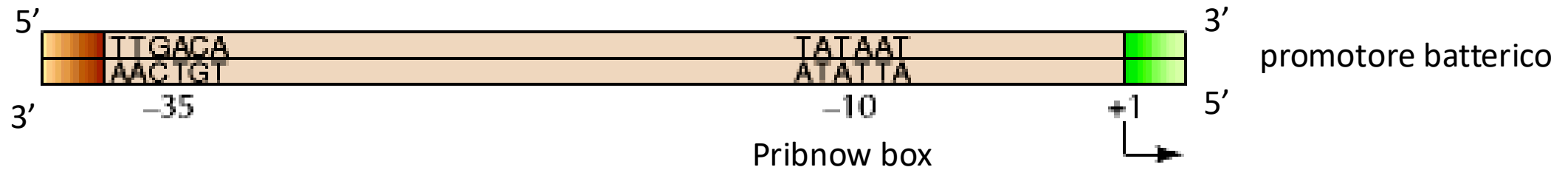
Trascritto di RNA

La catena non-stampo ha la stessa sequenza del trascritto.

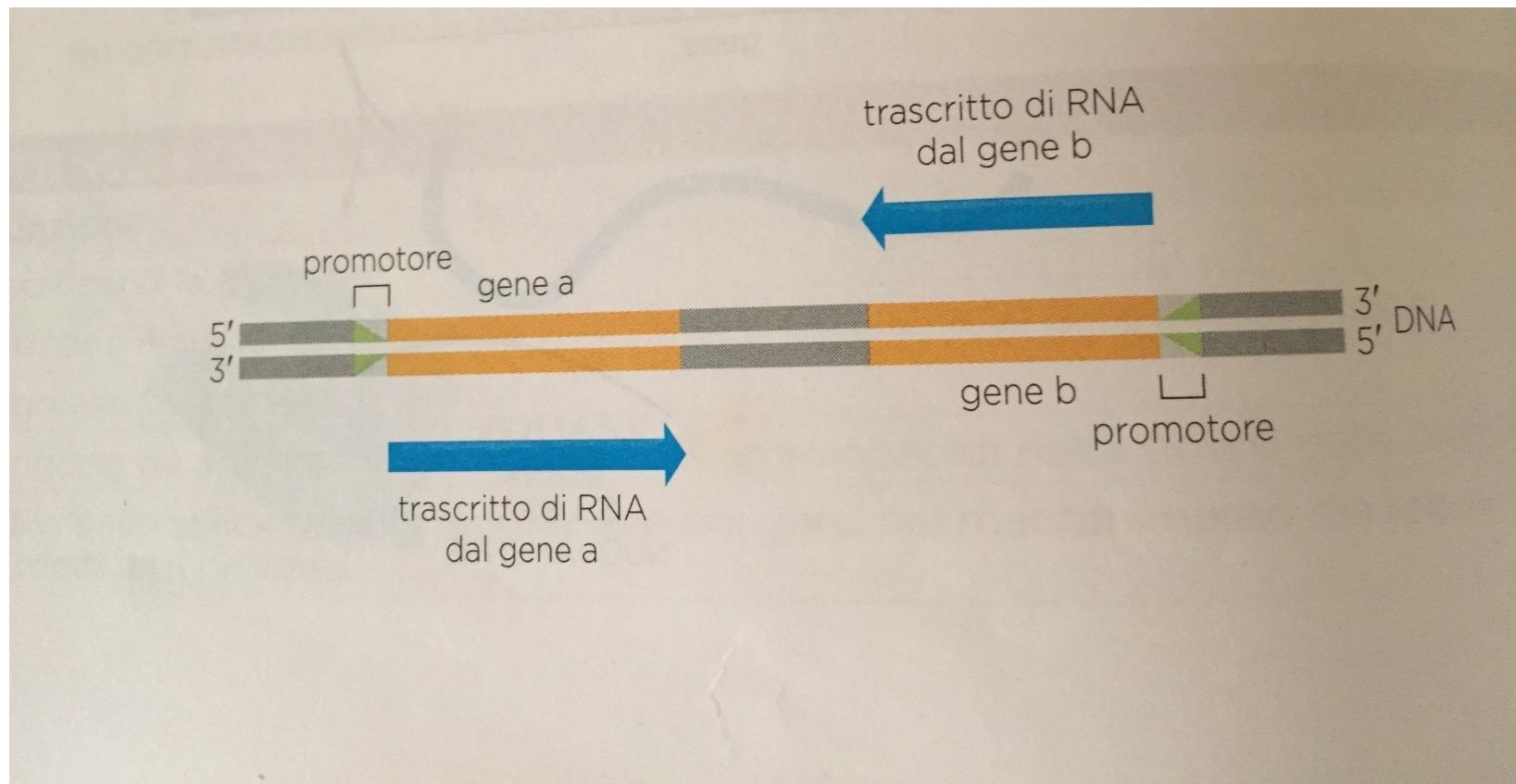


La catena codificante di un gene si può trovare su entrambi i filamenti di un cromosoma.

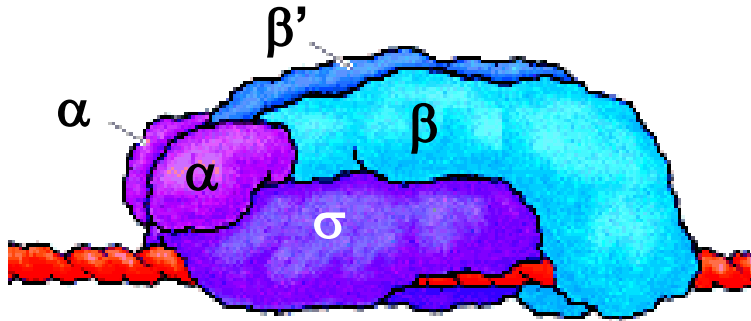
- Il promotore ha una **orientazione precisa** sul DNA



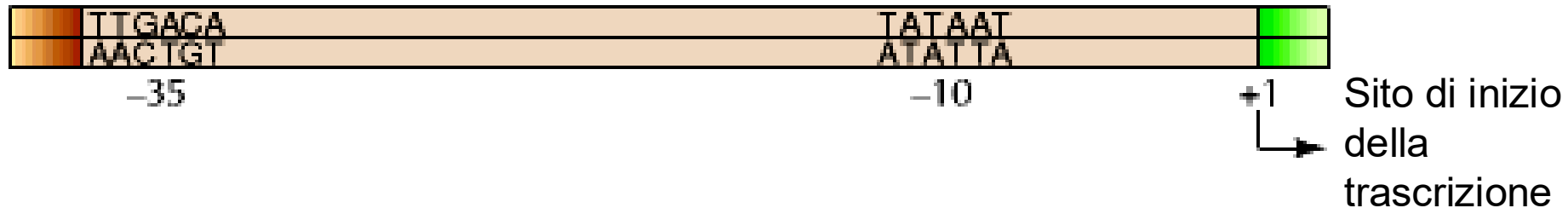
- L'orientamento del promotore deciderà la direzione della trascrizione e di conseguenza il filamento di DNA stampo



Trascrizione degli RNA nei procarioti: RNA polimerasi

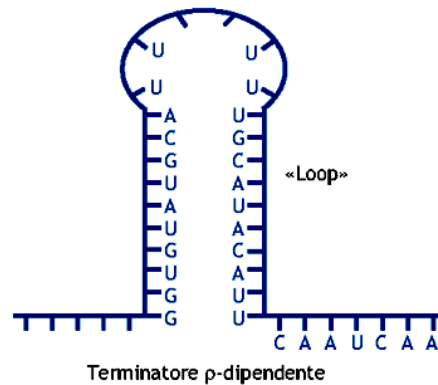
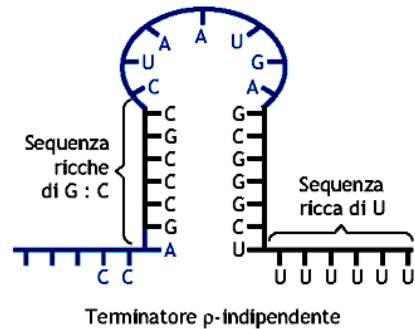


L'enzima completo consiste di 5 subunità: 2 α , 1 β , 1 β' e 1 σ . La subunità σ è attaccata in modo relativamente debole e può essere dissociata dalle altre subunità che costituiscono il nucleo della polimerasi

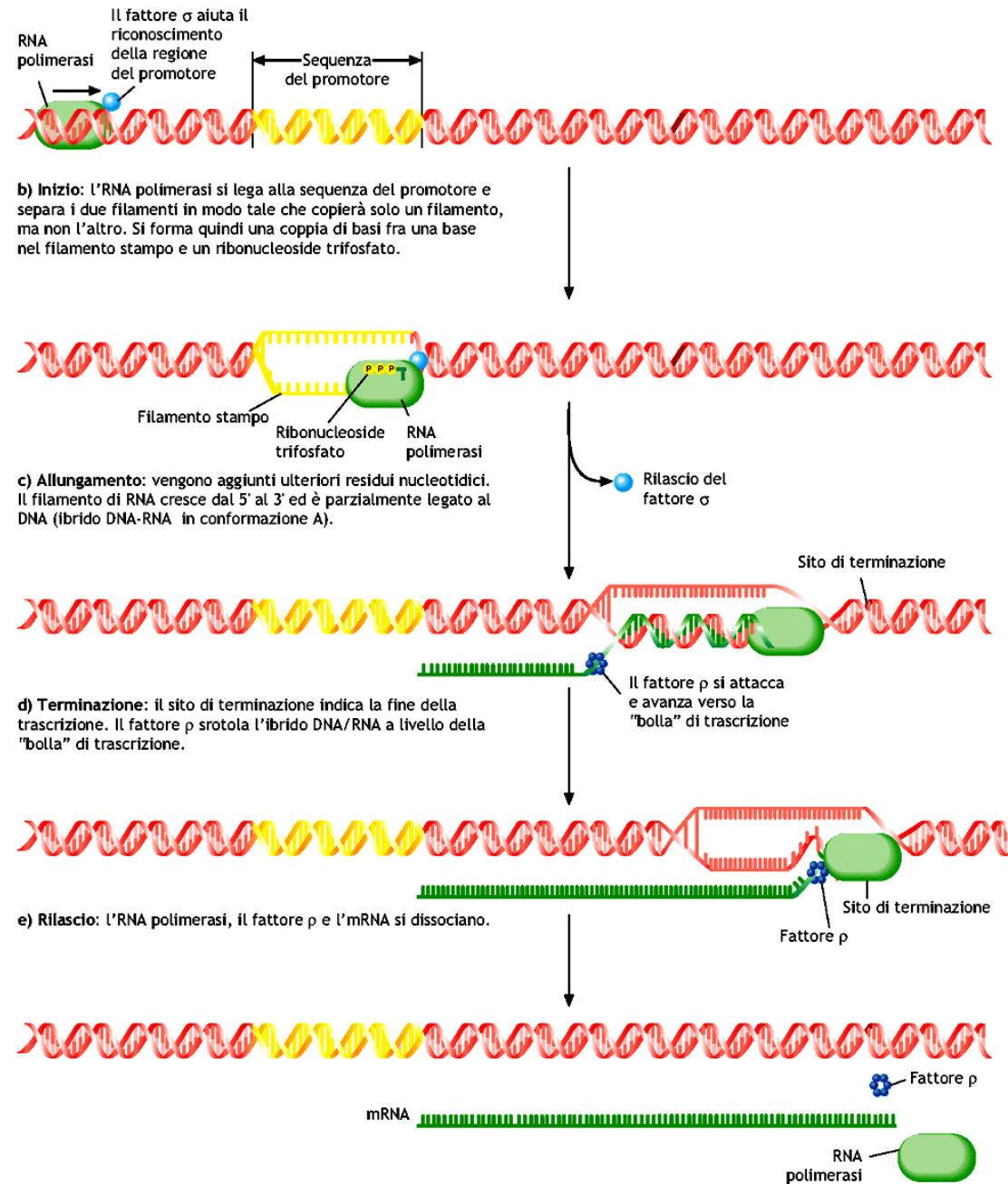


La RNA polimerasi per iniziare la trascrizione di un gene si lega al promotore del gene

Riconoscimento del promotore e terminazione della trascrizione nei procarioti



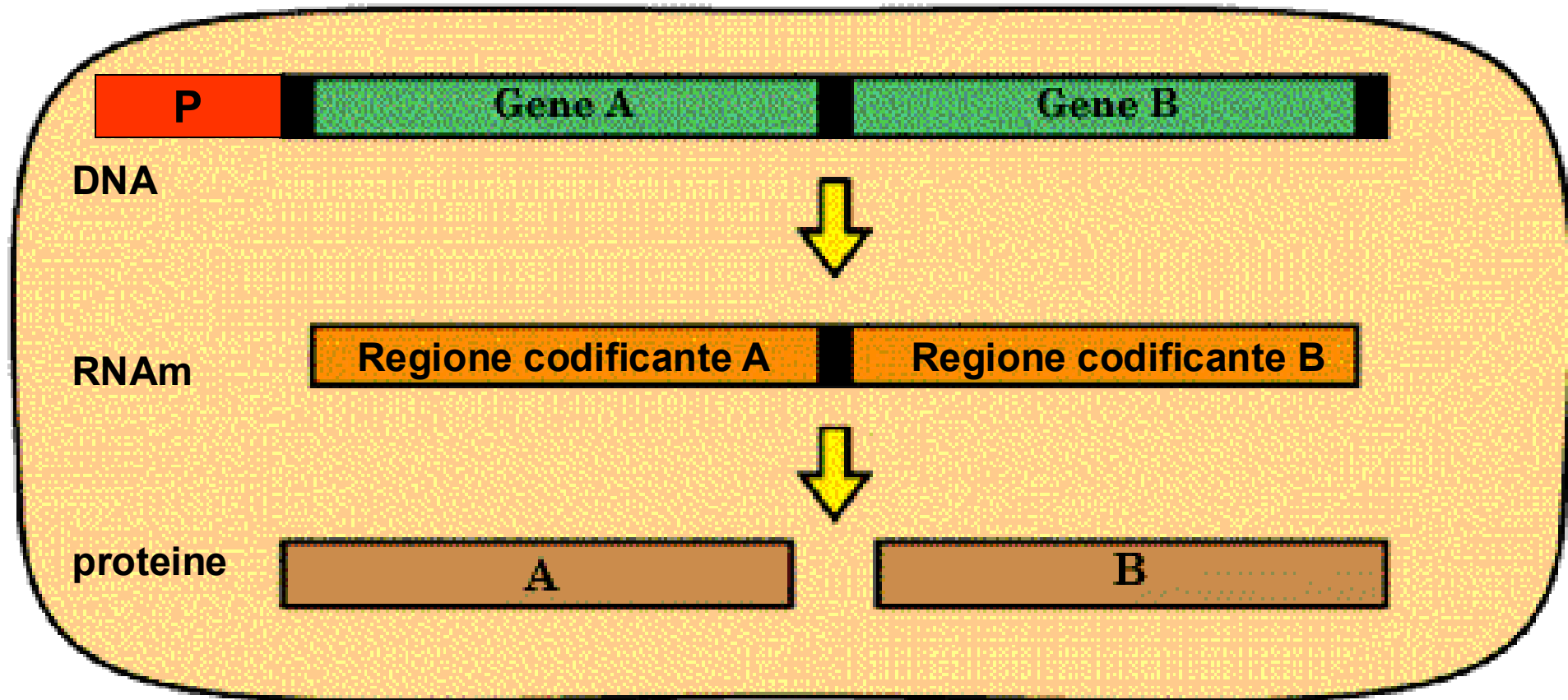
■ **Figura 4.28** La terminazione della trascrizione mediante formazione di loop nelle molecole di mRNA.



■ **Figura 4.27** La trascrizione nei batteri.

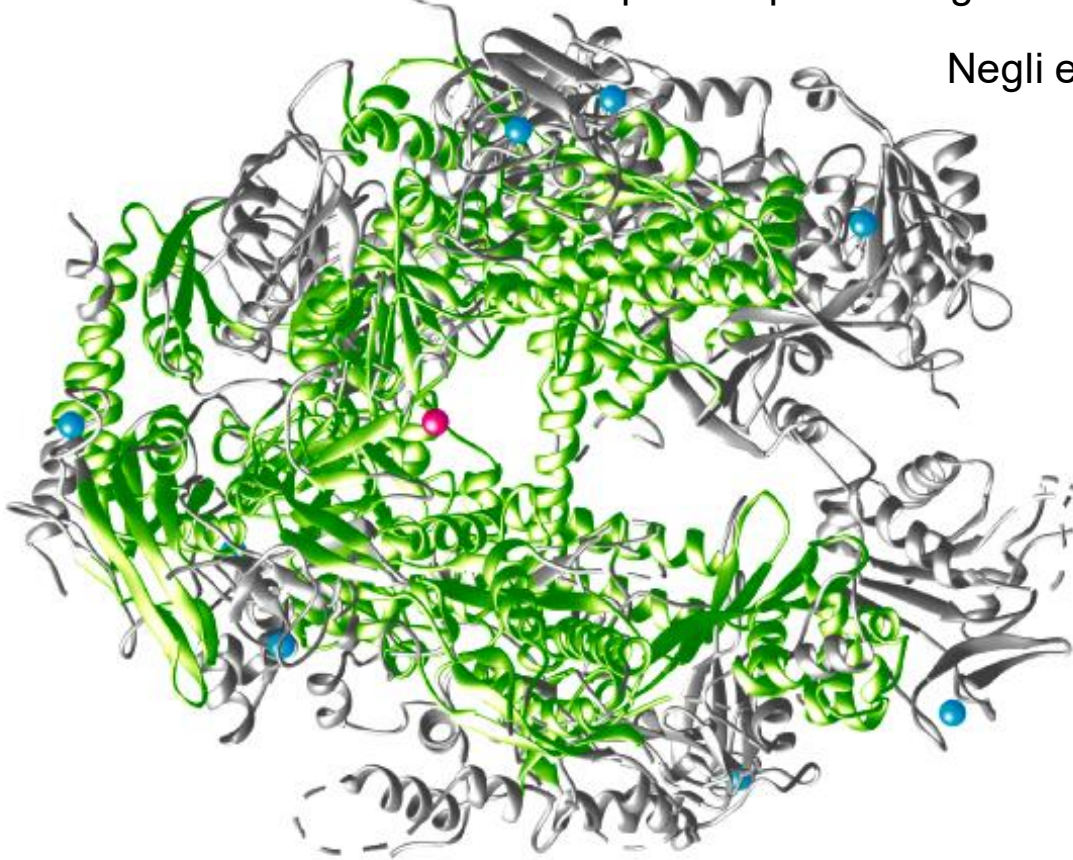
L'RNAm dei procarioti è policistronico

Nei procarioti più geni si trovano sotto il controllo di un unico promotore a formare i cosiddetti operoni. Questi geni, in genere, codificano proteine necessarie in una specifica via metabolica come la biosintesi di un amminoacido o il catabolismo del glucosio. Ne consegue che l'RNAm trascritto da un operone procariotico è policistronico cioè codifica più proteine da un singolo trascritto.



Trascrizione negli eucarioti: RNA polimerasi

Sebbene il meccanismo della trascrizione del DNA sia simile nei procarioti e negli eucarioti, il macchinario è considerevolmente più complesso negli eucarioti.



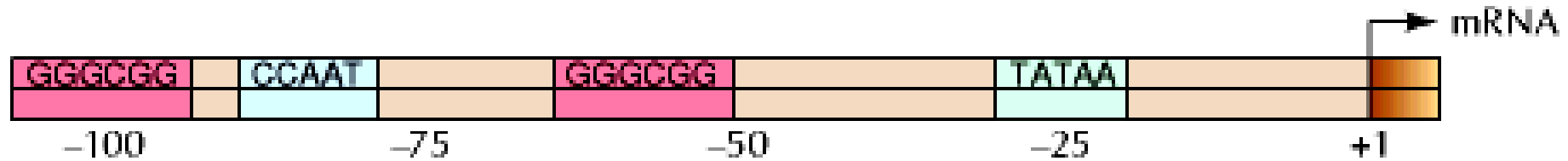
Negli eucarioti ci sono tre RNA polimerasi:

- 1. RNA polimerasi I:**
sintetizza i grossi RNA ribosomiali (28S, 18S, 5,8S).
- 2. RNA polimerasi II:**
trascrive i geni il cui RNA verrà tradotto in proteine, geni di snoRNA, geni di snRNA, miRNA, lncRNA.
- 3. RNA polimerasi III:**
sintetizza una varietà di RNA piccoli e stabili come l'RNA ribosomale 5S, gli RNA transfer, il scRNA, alcuni geni di snRNA

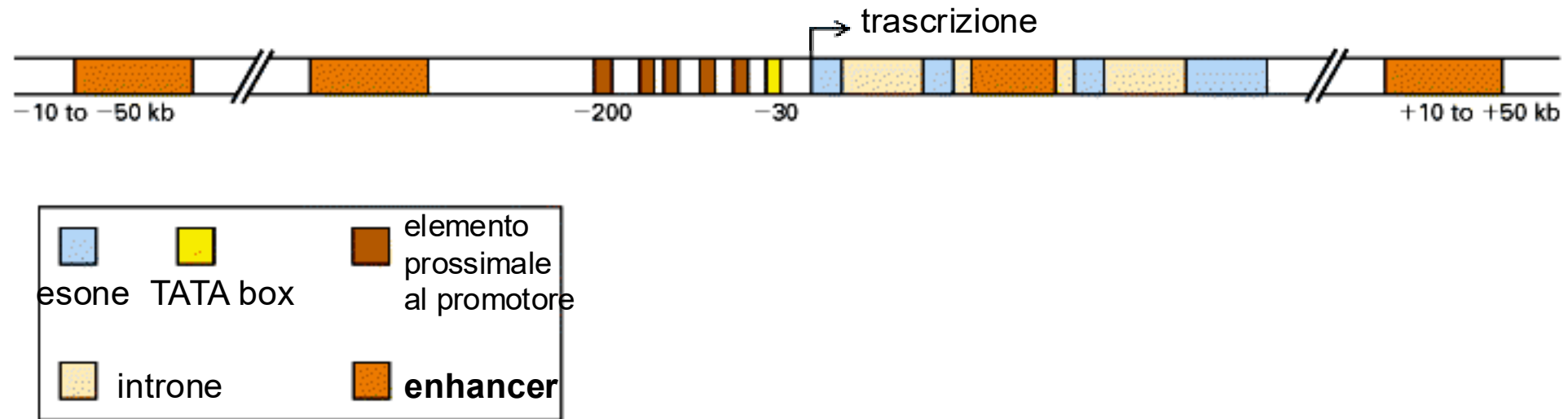
Una distinzione importante tra la RNA polimerasi batterica e la RNA polimerasi II degli eucarioti è che

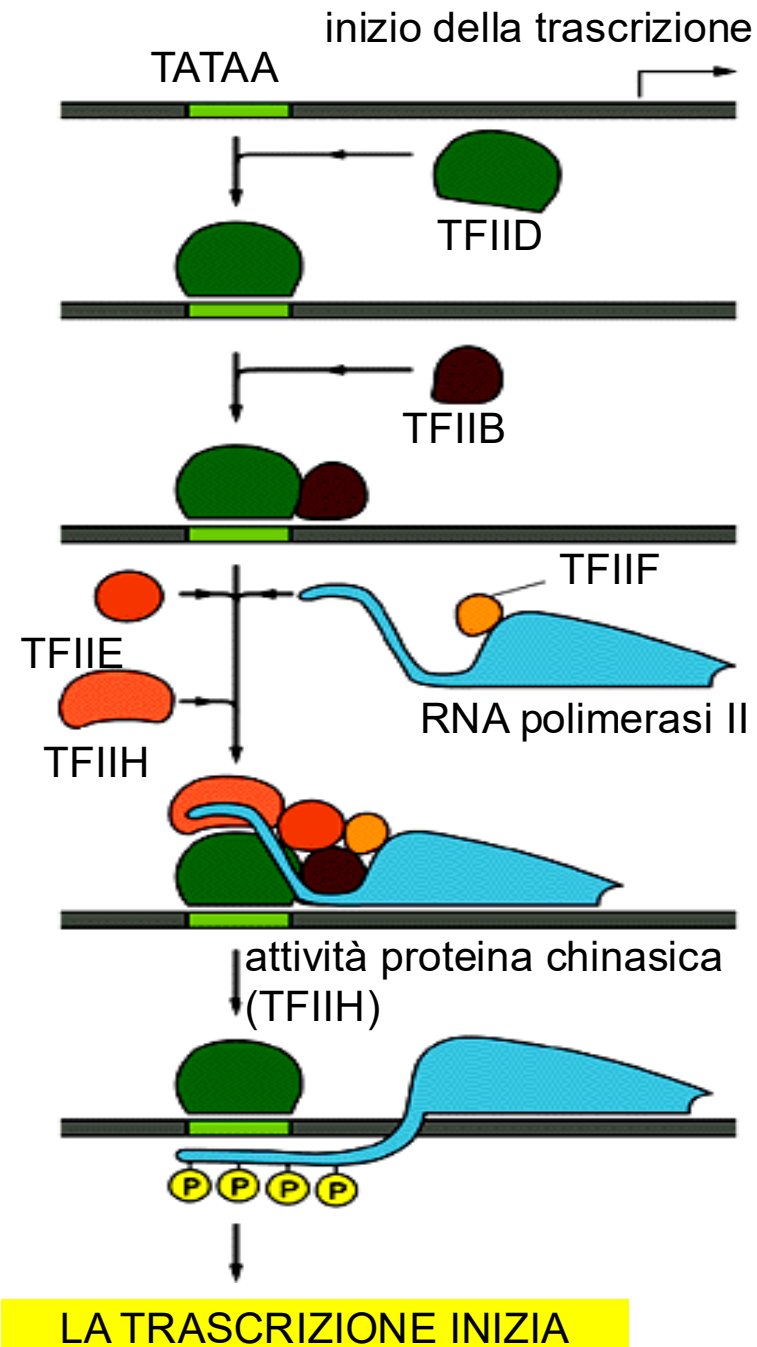
- (1) l'enzima eucariotico per iniziare la trascrizione necessita di **proteine di inizio** che devono legarsi al promotore prima che si possa legare l'enzima.
- (2) L'inizio della trascrizione eucariotica deve tenere conto del **compattamento del DNA** nei nucleosomi e in forme di ordine superiore di struttura della cromatina, caratteristiche assenti nei cromosomi dei batteri.

Trascrizione e maturazione degli RNA negli eucarioti



Promotore eucariotico. Il promotore del gene della timidina chinasi di herpes simplex virus (HSV) contiene 3 sequenze a monte del TATA box che sono necessari per una efficiente trascrizione: 1 CCAAT box and 2 GC boxes (sequenze consenso GGGCGG).





LA TRASCRIZIONE NEGLI EUKARIOTI

L'RNA polimerasi II richiede i fattori generali di trascrizione Le proteine sono definite "**generali**" perché si assemblano su **tutti i promotori** usati dall'RNA polimerasi II.

- (1) **Aiutano a posizionare l'RNA polimerasi** correttamente sul promotore;
- (2) **aiutano a separare i due filamenti di DNA** per permettere l'inizio della trascrizione e rilasciano l'RNA polimerasi dal promotore nella modalità di allungamento una volta che la trascrizione è cominciata.

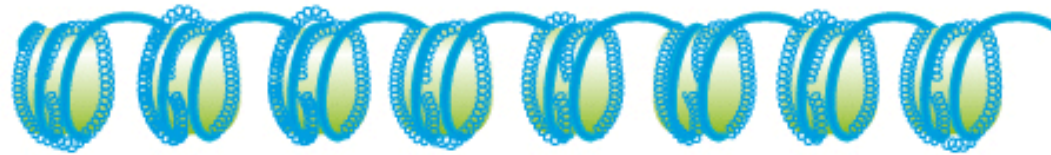
Come la RNA polimerasi batterica, la polimerasi II rimane nel promotore, fino a che subisce un cambiamento conformazionale e viene rilasciata per iniziare a trascrivere un gene. Un passaggio chiave in questo rilascio è **l'aggiunta di gruppi fosfato alla "coda" della RNA polimerasi (nota come CTD o dominio C-terminale)**. Questa fosforilazione è catalizzata anche da **TFIIH**, che, oltre ad un'**elicasi**, contiene come subunità una **proteina chinasi**. La polimerasi può allora staccarsi dal gruppo dei fattori generali di trascrizione, subendo una serie di cambiamenti conformazionali che rafforzano la sua interazione con il DNA e acquisendo nuove proteine che le permettono di trascrivere per lunghe distanze senza dissociarsi.

PROBLEMA NELLA TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI:

DNA è complessato a proteine



a) Cromatina acetilata: attiva nella trascrizione

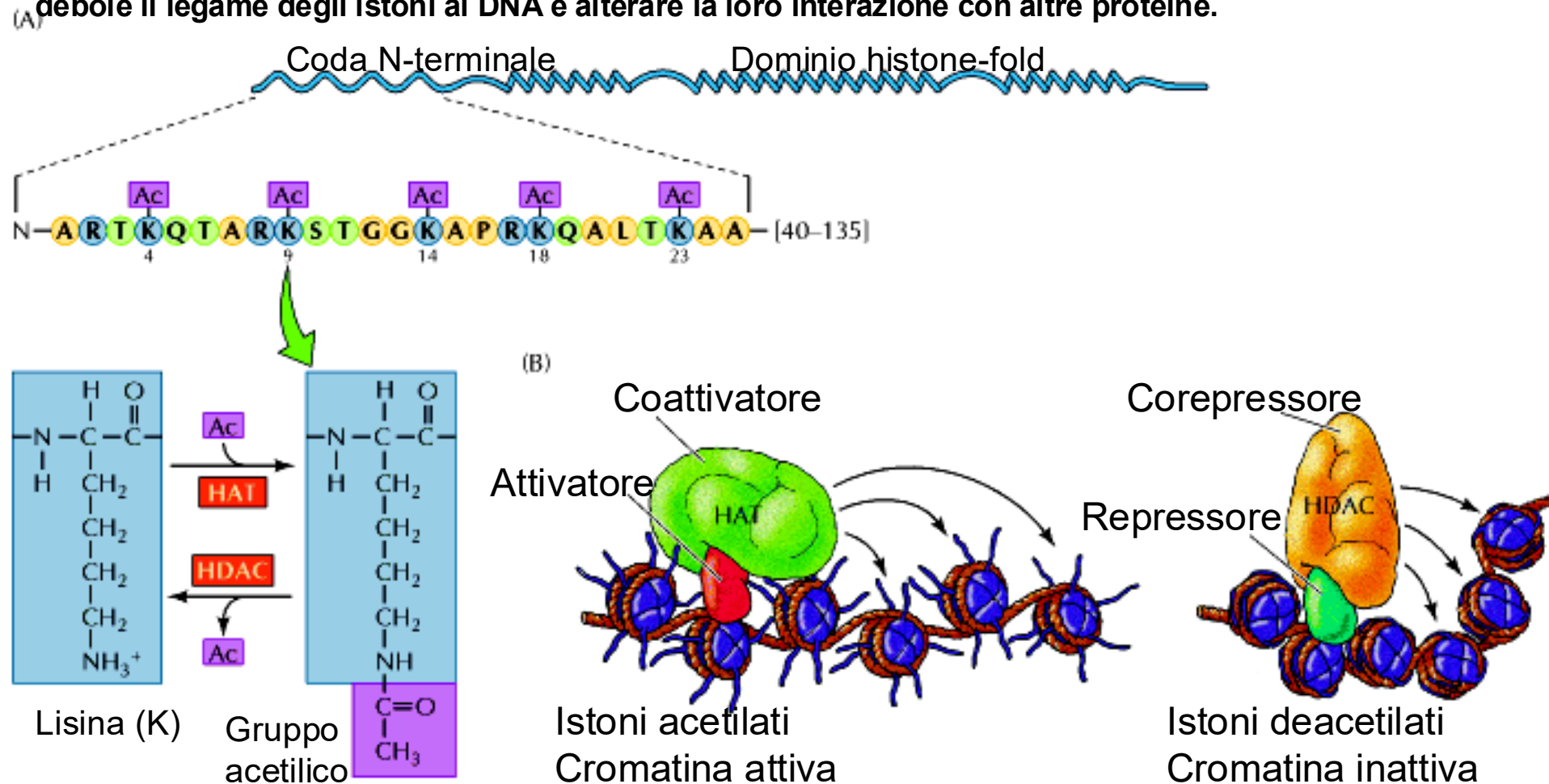


b) Cromatina deacetilata: la trascrizione è repressa

Figura 4.35 Ruolo dell'acetilazione e deacetilazione nell'attivare o reprimere la trascrizione.

REGOLAZIONE ESPRESSIONE GENICA: ACETILAZIONE ISTONI

Molte modificazioni sono caratteristiche della cromatina trascrizionalmente attiva, incluse le modificazioni degli istoni e i riarrangiamenti dei nucleosomi. L'**acetilazione** degli istoni è stata collegata alla cromatina **trascrizionalmente attiva** in un largo numero di tipi cellulari. (A) Gli istoni del core (H2A, H2B, H3, H4) hanno domini histone fold, che interagiscono con gli istoni e il DNA del nucleosoma. Le code N-terminali degli istoni del core sono modificate attraverso l'aggiunta di gruppi acetilici (ac) alle catene laterali di specifici residui di lisina. (B) gli attivatori e repressori trascrizionali sono associati con co-attivatori e co-repressori, che possiedono attività iston-acetiltrasferasica (HAT) e iston-deacetilasi, rispettivamente. L'acetilazione degli istoni è caratteristica della cromatina attivamente trascritta e potrebbe rendere più debole il legame degli istoni al DNA e alterare la loro interazione con altre proteine.



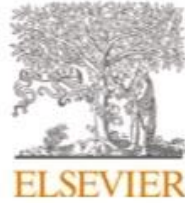
Eterocromatina costitutiva: sempre inattiva (centromeri e telomeri)

Eucromatina: attiva

Eterocromatina facoltativa: Può essere attiva o inattiva

Le differenze possono essere imputate a:

- 1) Diversa interazione tra DNA linker e H1
- 2) Acetilazione istoni
- 3) Fosforilazione H2
- 4) Metilazione istoni
- 5) Ubiquitinazione- influenza sia l'attivazione che la repressione della trascrizione genica.
- 6) Sumoilazione- SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier)-In molti casi, anche la sumoilazione è associata alla repressione della trascrizione genica.
- 7) Proteine di rimodellamento della cromatina (SWI/SNF) utilizzano ATP per modificare la posizione dei nucleosomi.



Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell and Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcdb

Review

Immunomodulatory properties of HDAC6 inhibitors in cancer diseases: New chances for sophisticated drug design and treatment optimization



1. Introduction

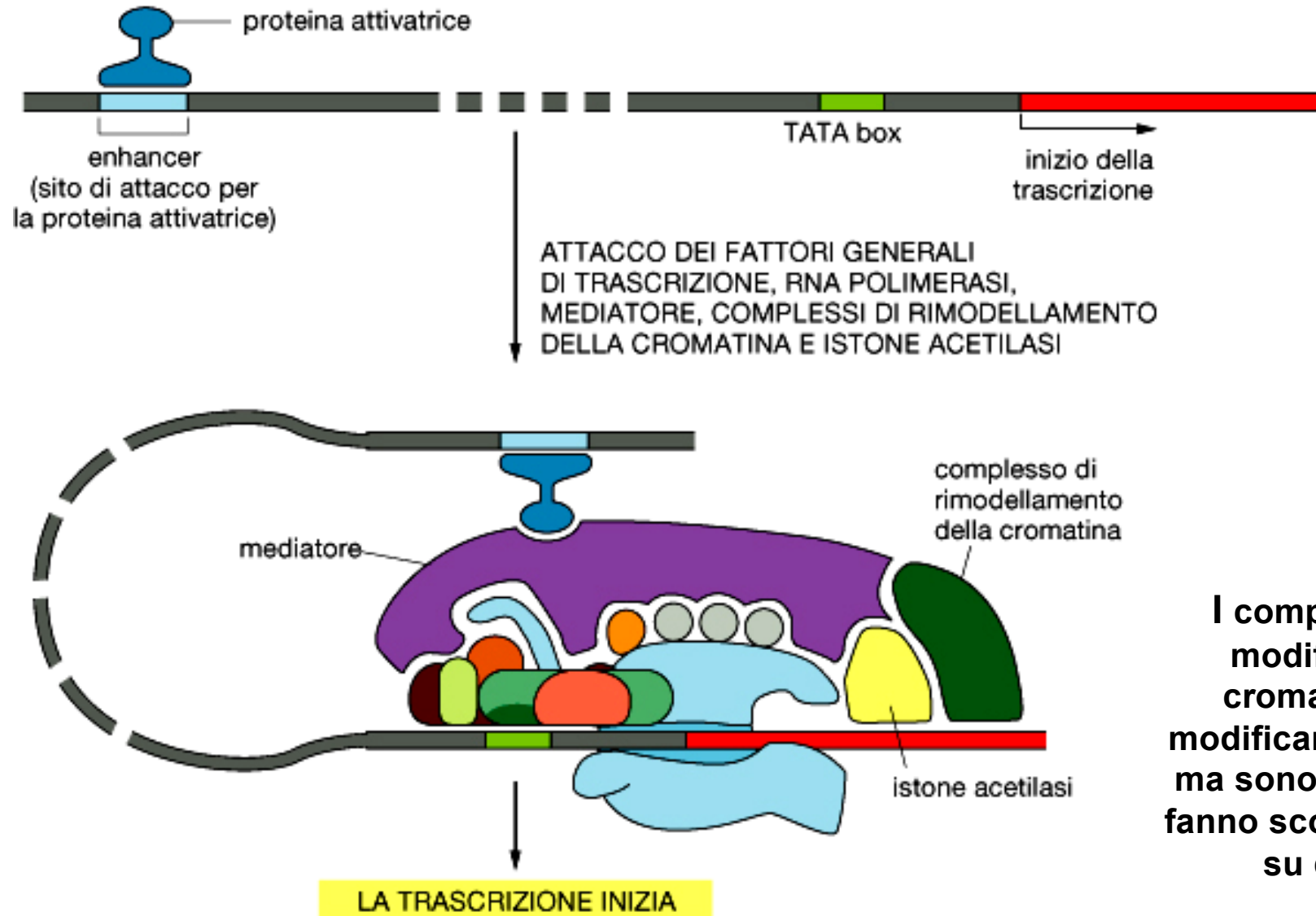
The prospering field of epigenetics research comprises the investigation of posttranslational modifications of proteins, which are crucial for the maintenance and proliferation of human cells [1]. Histones are important epigenetic target, and the histones H1, H2A, H2B, H3, and H4 are small, positively charged DNA-binding proteins, which are essential for DNA packing as chromatin and chromosomes in cells. Two units of H2A, H2B, H3, and H4 build up the histone core octamer, which is wrapped in a DNA band of 147 base pairs to form a nucleosome, while one histone H1 protein is attached to the nucleosome [2,3]. Certain positively charged histone *N*-terminal lysine residues are essential for histone-DNA interaction, which are epigenetically regulated by acetylation and deacetylation in order to control the histone-DNA binding, chromatin condensation and decondensation [4]. The regulation of the acetylation state of histone lysines by histone deacetylases (HDACs) and histone acetyl transferases (HATs) ultimately controls gene expression and DNA replication [5]. Any deregulation of epigenetic mechanisms can eventually lead to the formation of cancer diseases, and HDACs, for

example, are overexpressed in various cancers and associated with bad prognosis rendering HDACs a potential target for tumor selective drug design [6]. Hence, HDACs are of particular interest as drug targets for new anticancer therapies. Several HDAC inhibitors (HDACi) have already passed clinical trials and are currently applied for the treatment of leukemias, lymphomas and myelomas. Vorinostat, belinostat, and panobinostat are prominent examples of clinically applied HDACi (Fig. 1) [7]. However, their performance in solid tumors was found to be relatively poor. The combination of HDACi with other drugs appears to be a more promising strategy, and panobinostat in combination with the anti-androgen bicalutamide are currently in clinical trials with castration-resistant prostate cancer patients [8].

HDAC enzymes are subdivided into the classes I (HDAC1, –2, –3, –8), IIa (HDAC4, –5, –7, and –9), IIb (HDAC6 and –10), and IV (HDAC11), which are dependent on a catalytic zinc ion in the active site, while class III HDACs (sirtuins) do not depend on metals [9,10]. The catalytic zinc ion of class I, II, and IV HDACs, is targeted by many HDAC inhibitors having a zinc-binding group (ZBG) such as hydroxamic acids (e.g., vorinostat, belinostat, panobinostat), benzamides (e.g., entinostat),

Trascrizione del DNA negli eucarioti

La polimerasi II richiede anche proteine attivatrici, mediatrici e di modificazione della cromatina



I complessi che modificano la cromatina non modificano gli istoni, ma sono ATPasi che fanno scorrere il DNA su di essi

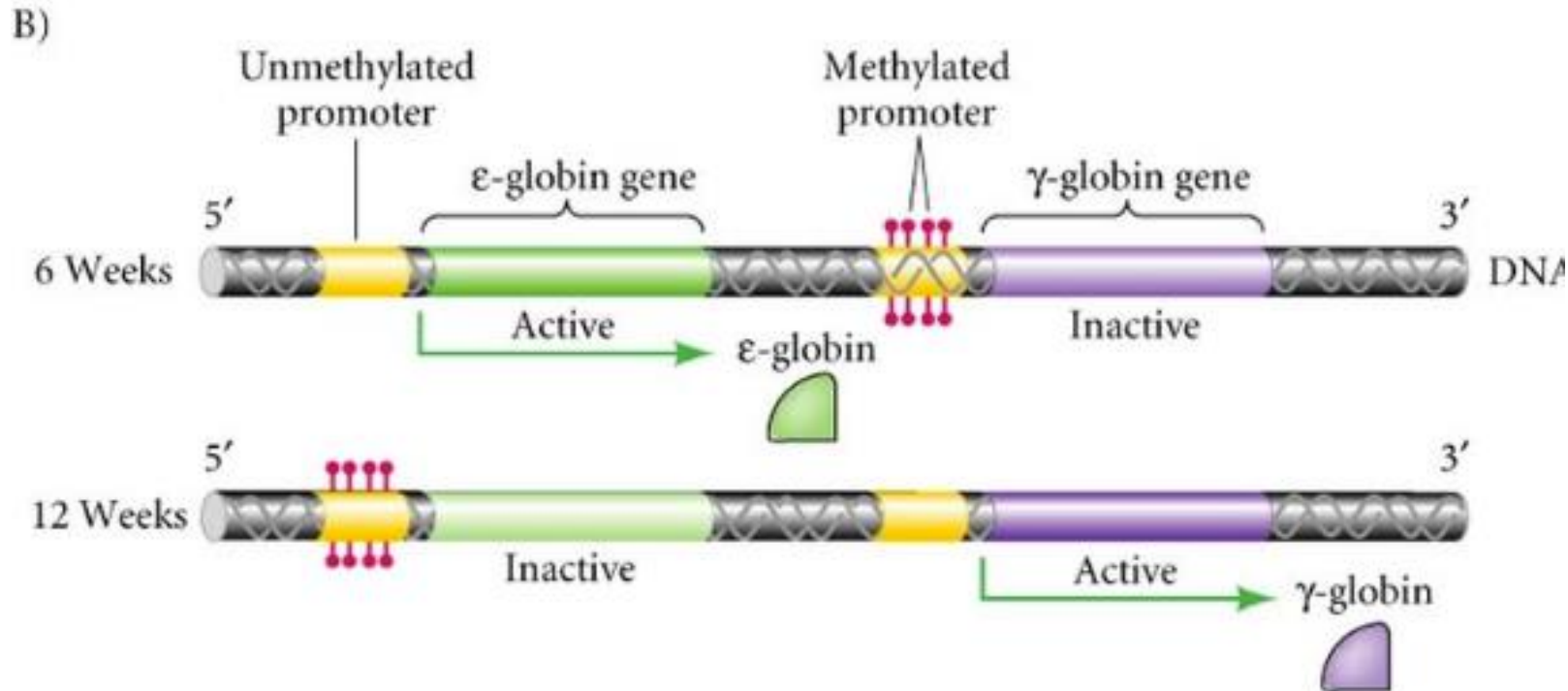
Regolazione trascrizione RNA POL II

Fattori generali della trascrizione: necessari per il reclutamento della polimerasi-elicasa- e fosforilazione del COOH della polimerasi (cambiamento di conformazione che lega stabilmente l'RNA polimerasi II. TUTTE LE CELLULE
NECESSARIA MA NON SUFFICIENTE!!!

Fattori specifici della trascrizione o attivatori: si legano a sequenze specifiche del promotore e 1) facilitano l'assemblamento della polimerasi- 2) reclutano **coattivatori o corepressori** e **proteine di rimodellamento del DNA** CELLULA SPECIFICI

- *recettori nucleari (recettore estrogeni)*
- *HTH (helix-turn-helix)*
- *CREB*
- *P53*
- *E2F*
- *cfos cJun, AP1—A VALLE DI RAS!*
- *Mediatore*
- *HAT e HDAC*
- *SWI/SNF*

REGOLAZIONE ESPRESSIONE GENICA: La metilazione delle citosine del DNA



La metilazione delle citosine del DNA del promotore blocca la trascrizione

Basi genetiche ed epigenetiche della diversità biologica

Le mutazioni del DNA sono alla base delle differenze di cui parlava Darwin

ATTCGGTTTAAAGCGGGG DNA
ATTCGGTTTAAAGCG**A**GG MUTAZIONE

Per epigenetica si intendono modifiche al DNA (ma non nella sequenza) indotte dall'ambiente (metilazione delle basi) che possono anche essere trasmesse alla progenie

ATTCGGTTTAAAGCGGGG DNA
ATT**C**GGTTTAAAGCGGGG

MATTER

The Famine Ended 70 Years Ago, but Dutch Genes Still Bear Scars



Jan. 31, 2018



In September 1944, trains in the Netherlands ground to a halt. Dutch railway workers were hoping that a strike could stop the transport of Nazi troops, helping the advancing Allied forces.

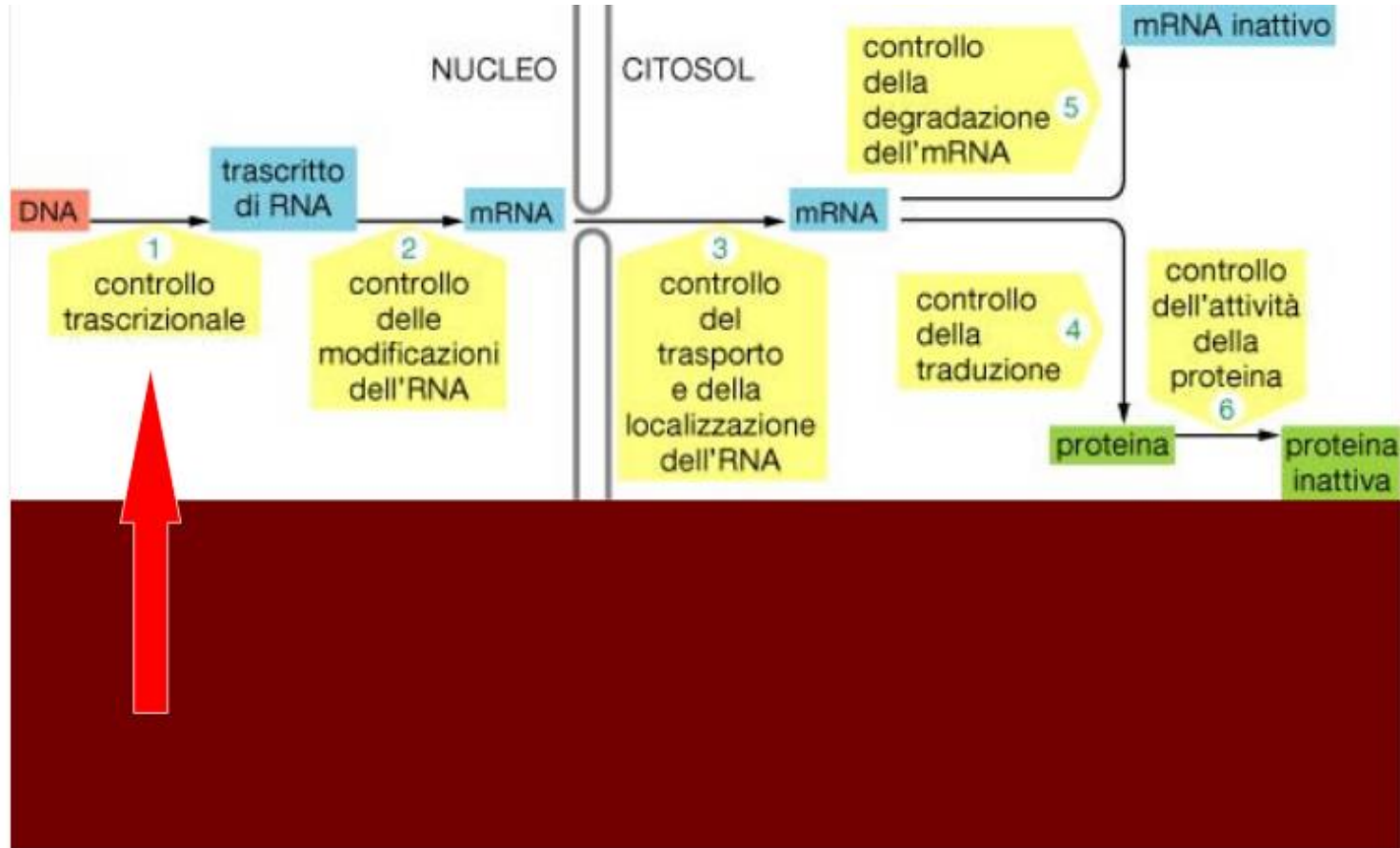
But the Allied campaign failed, and the Nazis punished the Netherlands by blocking food supplies, plunging much of the country into famine. By the time the Netherlands was liberated in May 1945, more than 20,000 people had died of starvation.

The Dutch Hunger Winter has proved unique in unexpected ways. Because it started and ended so abruptly, it has served as an unplanned experiment in human health. Pregnant women, it turns out, were uniquely vulnerable, and the children they gave birth to have been influenced by famine throughout their lives.

When they became adults, they ended up a few pounds heavier than average. In middle age, they had higher levels of triglycerides and LDL cholesterol. They also experienced higher rates of such conditions as [obesity](#), diabetes and schizophrenia.

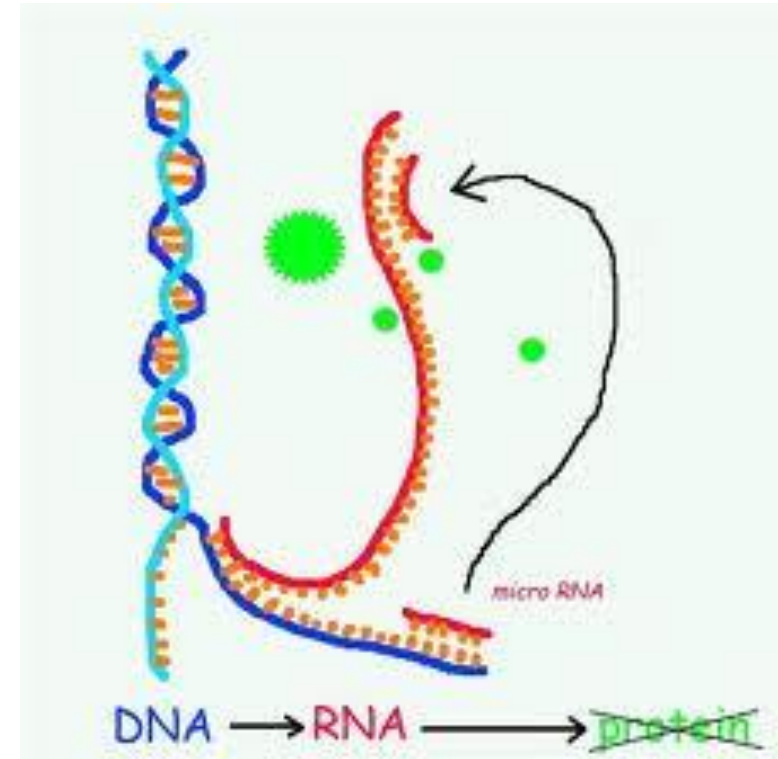
La carestia olandese del 1944: i discendenti di soggetti esposti alla carestia presentavano un rischio maggiore di malattie cardiovascolari

Controllo dell'espressione genica eucarioti

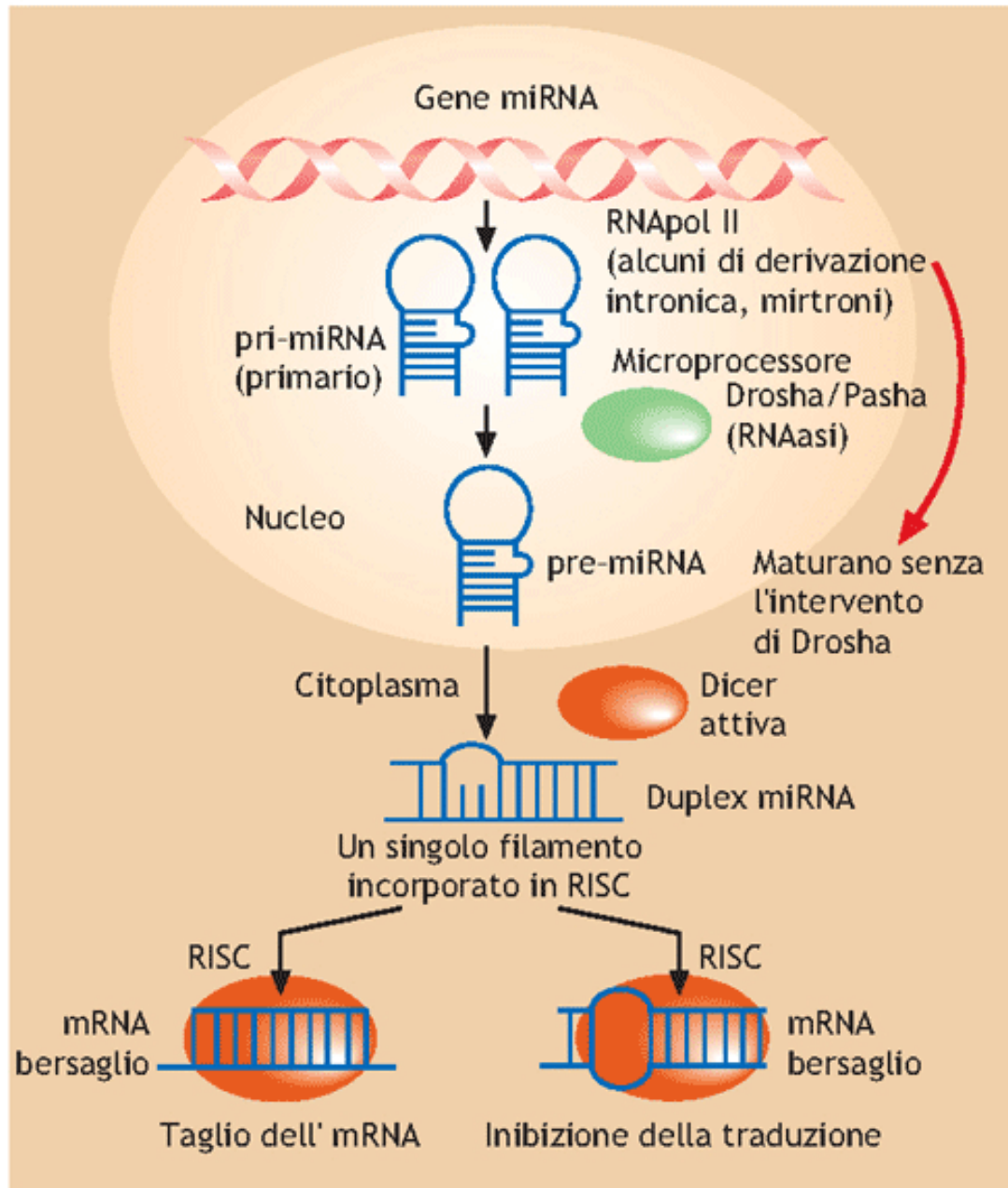


Regolatori dell'espressione genica: microRNA (miRNA)

- RNA a singola elica lunghi 19-30 nucleotidi
- Regolatori negativi dell'espressione genica
- Regolano anche geni che controllano la proliferazione e la sopravvivenza cellulare
- Attualmente, 3012 miRNA umani unici sono stati riconosciuti e archiviati nel database miRTarBase, con una vasta capacità stimata di 4.475.477 potenziali interazioni miRNA-bersaglio (Huang 2020 doi: 10.1093/nar/gkz896)



microRNA:
importanti regolatori
dell'espressione genica



RISC: RNA-induced silencing complex



“microRNAs in the Genesis of Human Cancers”

Carlo M. Croce, M.D

La mancata espressione di un miRNA può portare a stati patologici attraverso la disregolazione dei livelli fisiologici di una certa proteina

Un approccio terapeutico quindi potrebbe essere quello di somministrare il microRNA assente

MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer

Mattia Boeri^{a,1}, Carla Verri^{a,1}, Davide Conte^{a,1}, Luca Roz^{a,1}, Piergiorgio Modena^b, Federica Facchinetti^a, Elisa Calabrò^c, Carlo M. Croce^{d,2,3}, Ugo Pastorino^{c,2}, and Gabriella Sozzi^{a,2,3}

- Explored microRNA (miRNA) expression profiles of lung tumors, normal lung tissues and plasma samples
- miRNA expression patterns significantly distinguished: (i) tumors from normal lung tissues, (ii) tumor histology and growth rate, (iii) clinical outcome, and (iv) year of lung cancer CT detection..
- miRNA expression analyses in plasma samples collected 1– 2 y before the onset of disease, at the time of CT detection and in disease-free smokers enrolled in the screening trial, resulted in the generation of miRNA signatures with strong predictive, diagnostic, and prognostic potential

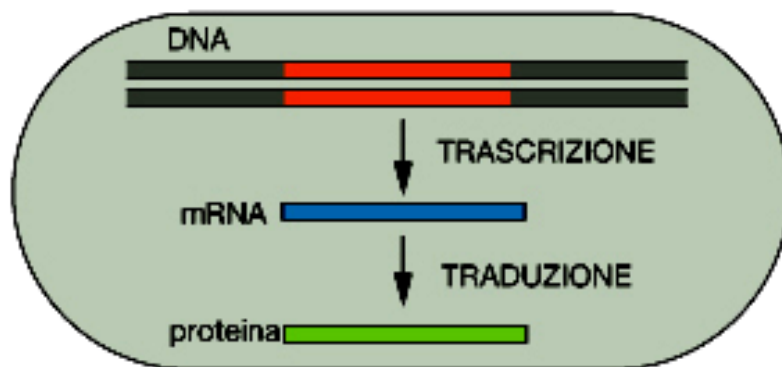
Maturazione degli RNA negli eucarioti

RNA : molteplici funzioni

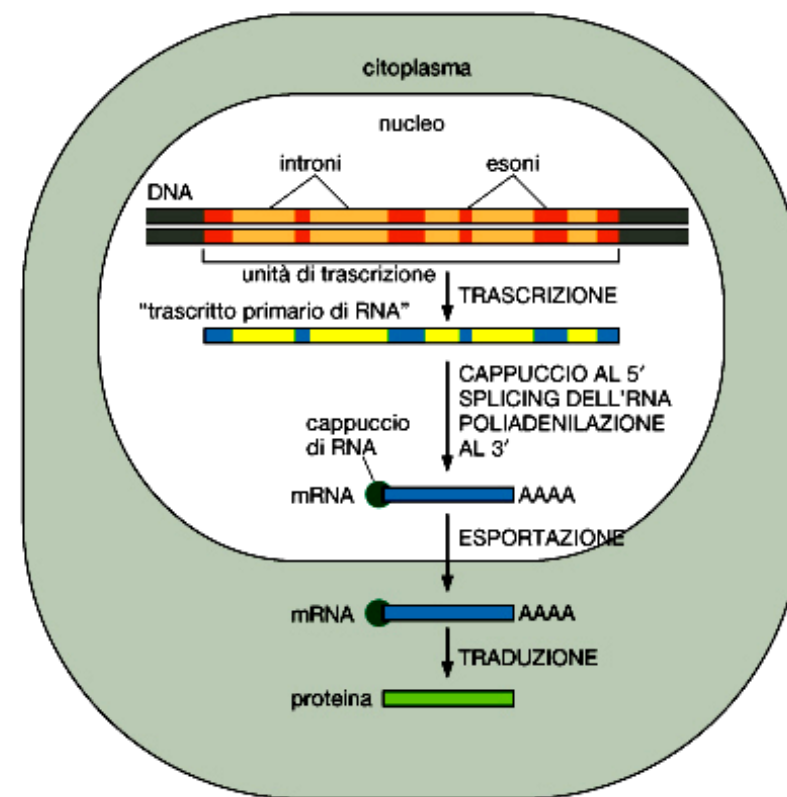
- mRNA (procarioti ed eucarioti)
- tRNA (procarioti ed eucarioti)
- rRNA (procarioti ed eucarioti)
- **TERC** (telomerase RNA component) (eucarioti)
- **snRNA** (small nuclear RNA) coinvolti nello splicing (eucarioti)
- **snoRNA** (small nucleolar RNA) coinvolti nella maturazione dell'rRNA (eucarioti)
- **scRNA** (small cytoplasmic RNA) coinvolto nello smistamento delle proteine (eucarioti)
- **siRNA** (small interfering RNA- 20 25 nt derivanti da lunghe molecole di RNA a doppio filamento)- regolazione espressione genica (eucarioti)
- **miRNA** (microRNA (20-25 nt) trascritti da geni specifici che controllano l'espressione di 1/3 dei geni umani)(eucarioti)
- **Long non coding RNA**- numero variabile di nucleotidi da 70 a qualche migliaio. La loro funzione è quella di regolare l'espressione genica (eucarioti)

Maturazione mRNA: procarioti ed eucarioti

(B) PROCARIOTI

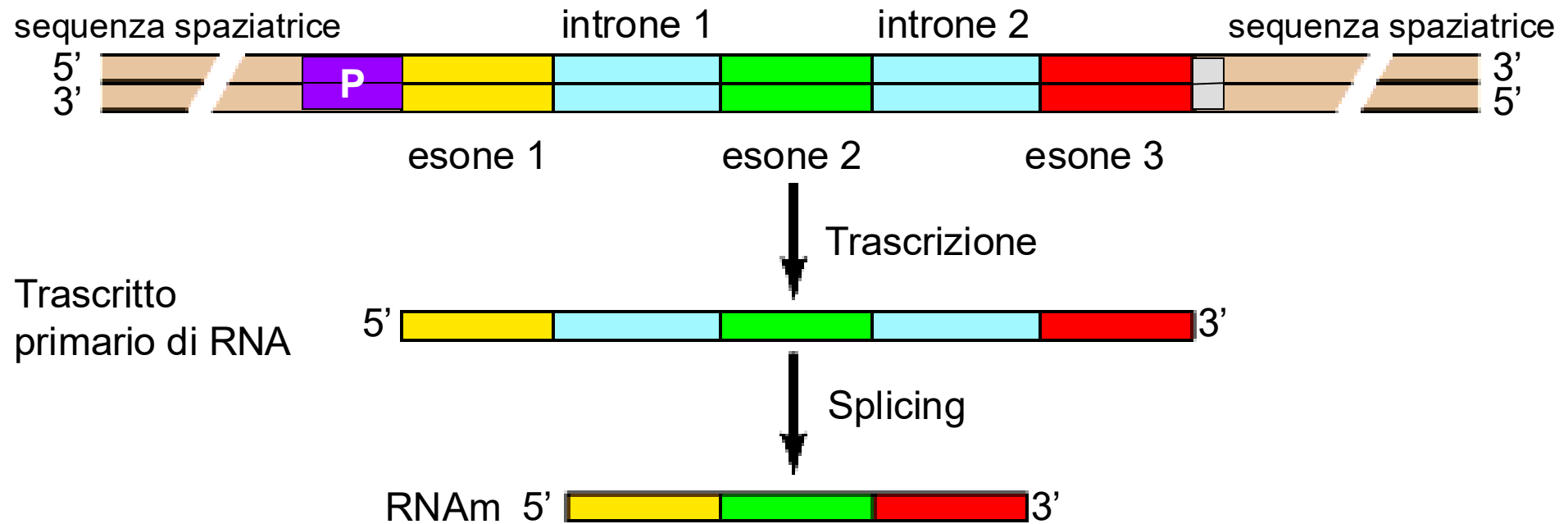


(A) EUCARIOTI



Trascritto primario di RNA

I geni degli eucarioti presentano sequenze codificanti - **ESONI**- alternate a sequenze non codificanti - **INTRONI**



1) Maturazione del trascritto primario: splicing

Nel processo intervengono:

- 1) Siti di splicing (GU...AG)
- 2) Small nuclear (snRNA) associati a proteine che formano snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particle, U)
- 3) Fattori di splicing alternativo (proteine) o siti alternativi di inizio della trascrizione “decidono” il processo di maturazione

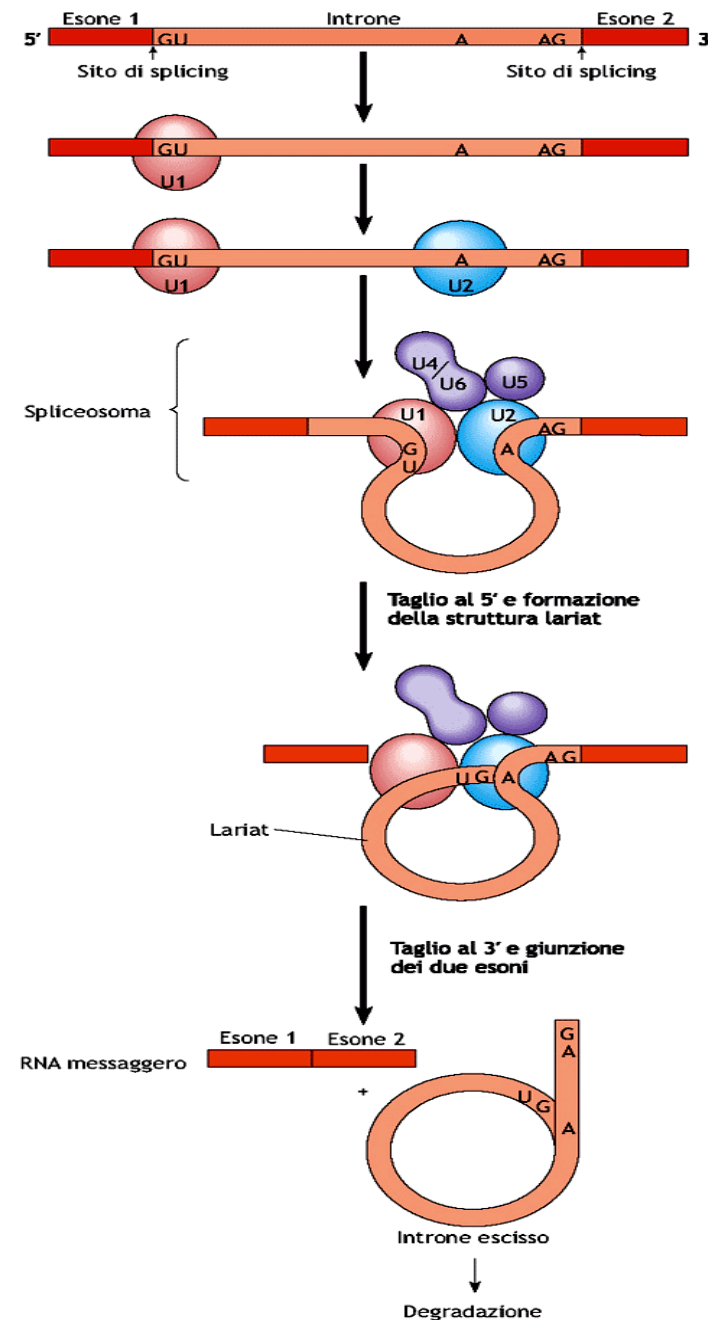


Figura 4.39 Processo di splicing. Formazione e funzionamento dello spliceosoma.

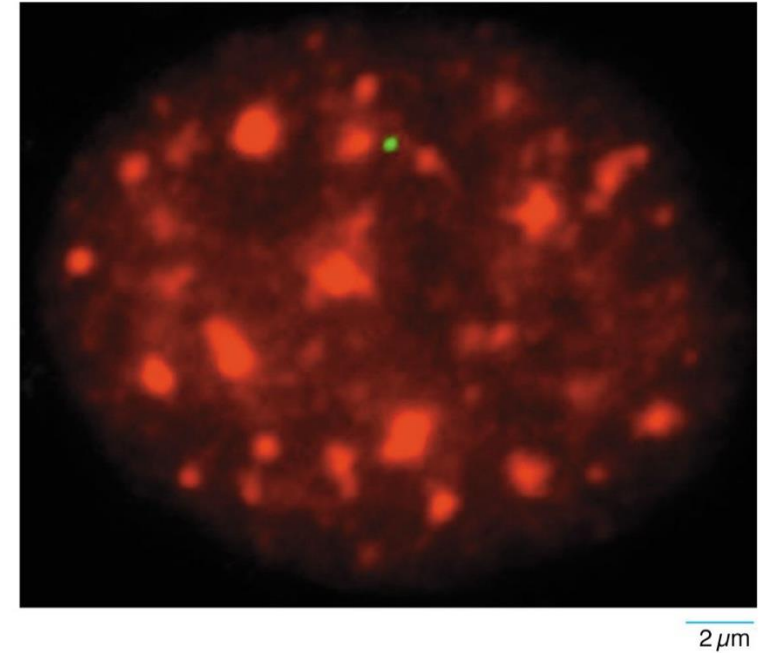


FIGURA 2.57 Strutture subnucleari. Nei nuclei, i componenti molecolari che sono coinvolti nel processamento dell'RNA non sono distribuiti casualmente in tutto il nucleoplasma, ma si concentrano a formare degli aggregati distinti; tali aggregati possono essere evidenziati come macchioline o speckles (in rosso nella foto) quando il nucleo delle cellule viene trattato con anticorpi marcati con coloranti fluorescenti specifici per alcuni fattori dello splicing.

Il significato degli introni

- Sono presenti nella maggior parte degli eucarioti complessi, anche se non sono universali. Quasi tutti i geni degli istoni ad es., sono privi di introni. Inoltre, gli introni non si trovano nella maggior parte degli eucarioti semplici come ad es, in molti lieviti.
- Si pensa che gli introni rappresentino ciò che rimane di sequenze che avevano avuto importanza nell'evoluzione. In particolare, gli introni potrebbero avere aiutato ad accelerare l'evoluzione facilitando la ricombinazione fra regioni che codificano (esoni) geni diversi (processo noto come il rimescolamento degli esoni). E' infatti stato dimostrato che alcuni geni sono delle chimere di esoni derivati da parecchi altri geni.
- La rimozione di un esone al posto di un altro **dà la possibilità di ottenere più mRNA a partire da un unico trascritto primario** (splicing alternativo)
- Alcuni **microRNA e snoRNA sono intronici**

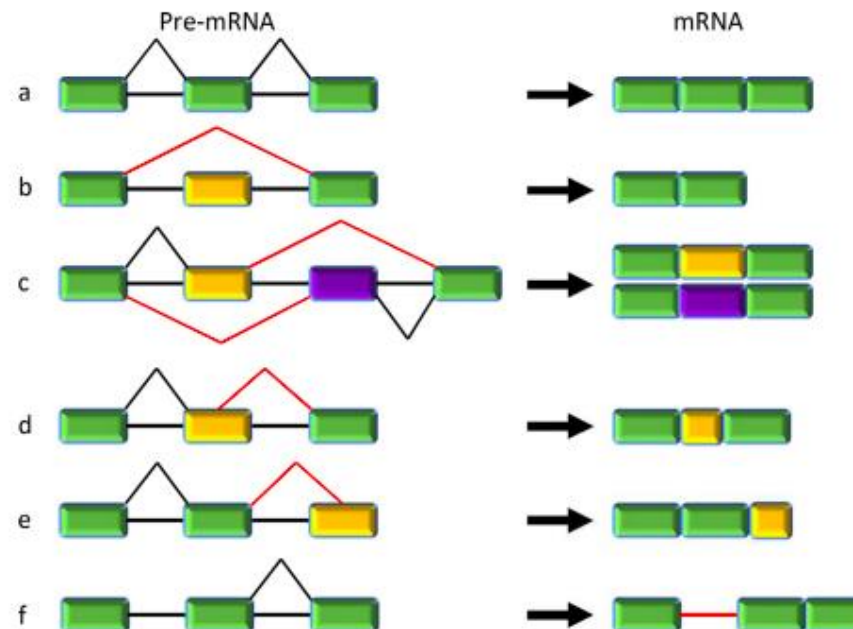


Fig. 1. Constitutive and five major types of alternative splicing: a: Constitutive splicing; b: exon skipping (cassette exons); c: mutually exclusive exons; d: alternative 5' splice sites (alternative donors); e: alternative 3' splice sites (alternative acceptors); f: intron retention.

Nel lievito la delezione degli introni riduce la sopravvivenza cellulare in carenza di nutrienti

nature > articles > article

Article | Published: 16 January 2019

Introns are mediators of cell response to starvation

Julie Parenteau, Laurine Maignon, Mélodie Berthoumieux, Mathieu Catala, Vanessa Gagnon & Sherif Abou Elela 

Nature **565**, 612–617(2019) | [Cite this article](#)

31k Accesses | **38** Citations | **257** Altmetric | [Metrics](#)

Abstract

Introns are ubiquitous features of all eukaryotic cells. Introns need to be removed from nascent messenger RNA through the process of splicing to produce functional proteins. Here we show that the physical presence of introns in the genome promotes cell survival under starvation conditions. A systematic deletion set of all known introns in budding yeast genes indicates that, in most cases, cells with an intron deletion are impaired when nutrients are depleted. This effect of introns on growth is not linked to the expression of the host gene, and was reproduced even when translation of the host mRNA was blocked. Transcriptomic and genetic analyses indicate that introns promote resistance to starvation by enhancing the repression of ribosomal protein genes that are downstream of the nutrient-sensing TORC1 and PKA pathways. Our results reveal functions of introns that may help to explain their evolutionary preservation in genes, and uncover regulatory mechanisms of cell adaptations to starvation.

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

 Access through your institution

[Buy or subscribe](#)

Associated Content

Nature | News & Views

Intron RNA sequences help yeast cells to survive starvation

Samantha R. Edwards & Tracy L. Johnson

Nature | News

Gaps in our genes are more important than we thought

Shamini Bundell

Sections

[Figures](#)

[References](#)

[Abstract](#)

[Data availability](#)

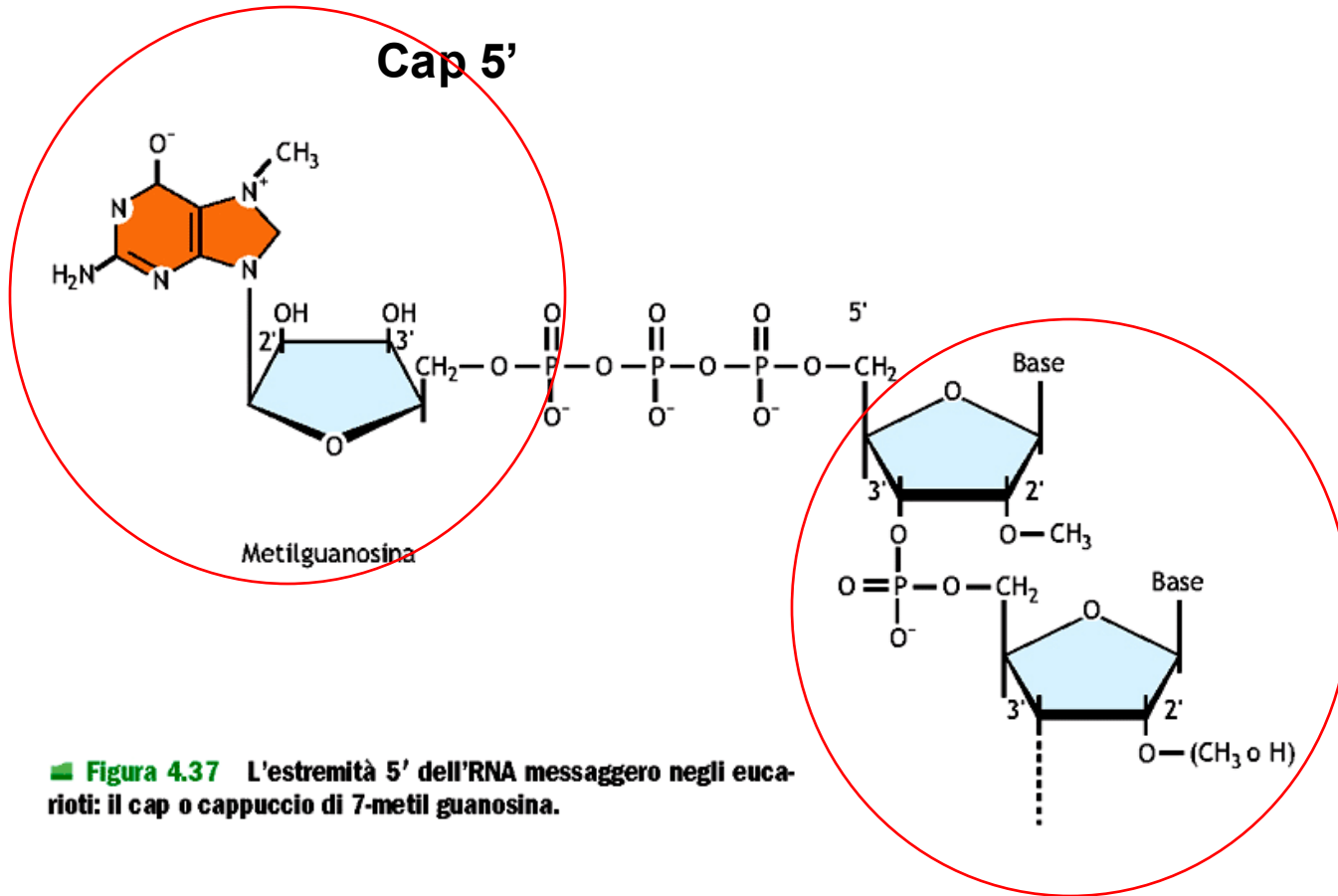
[References](#)

[Acknowledgements](#)

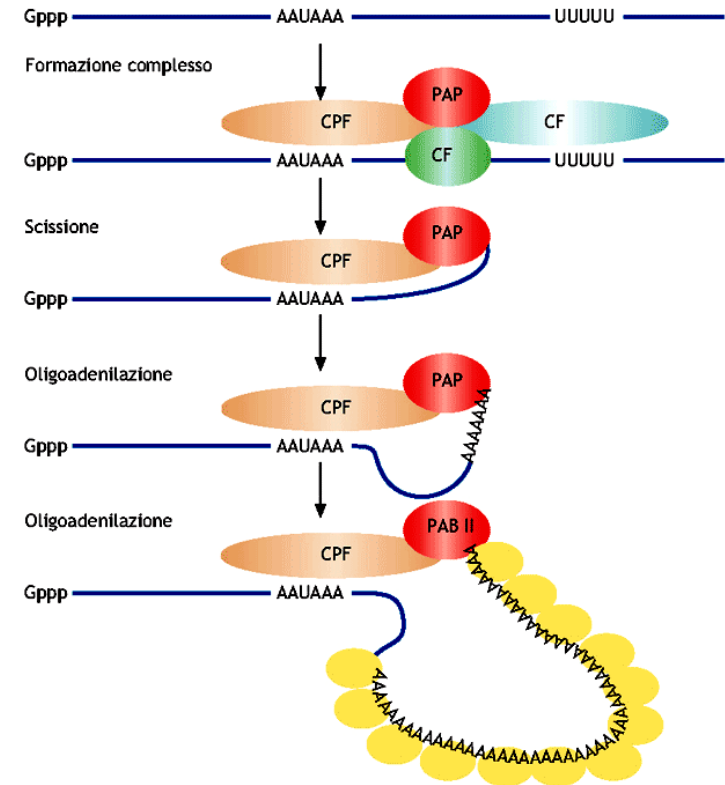
[Author information](#)

[Ethics declarations](#)

2) Maturazione del trascritto primario: cap 5' e poliadenilazione



Poliadenilazione 3'



• Le modificazioni al 5' e 3' permettono alla cellula di stabilire se sono presenti entrambe le estremità di una molecola di RNA (e perciò se il messaggero è intatto) prima di esportare l'RNA dal nucleo per tradurlo in proteina;

• Il **Cap 5'** (aggiunta di guanosina monofosfato e 2'O- metilazione del ribosio) media il legame con i ribosomi, quindi è necessario per la traduzione.

Gene structure

