

# LA TRASCRIZIONE

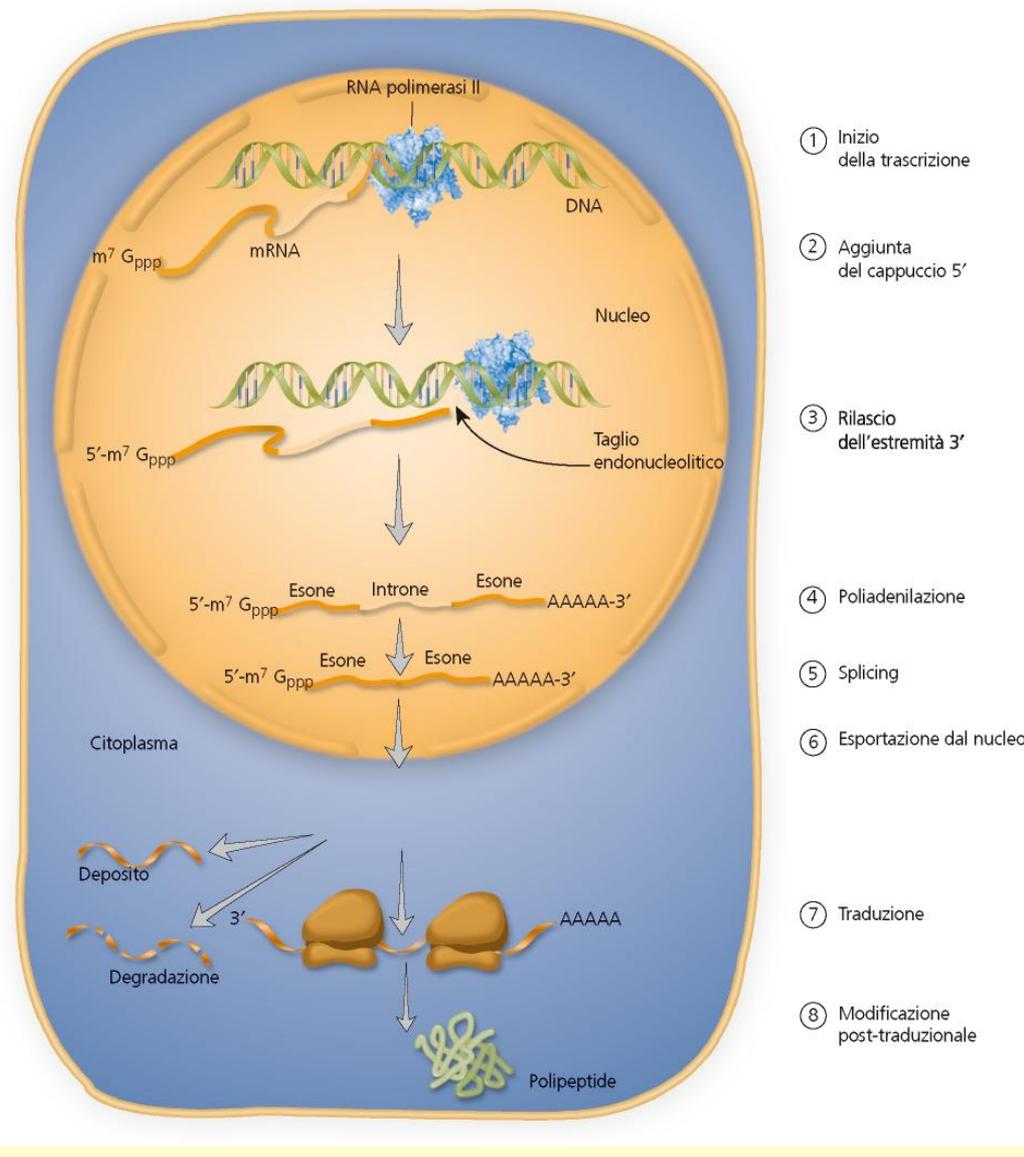
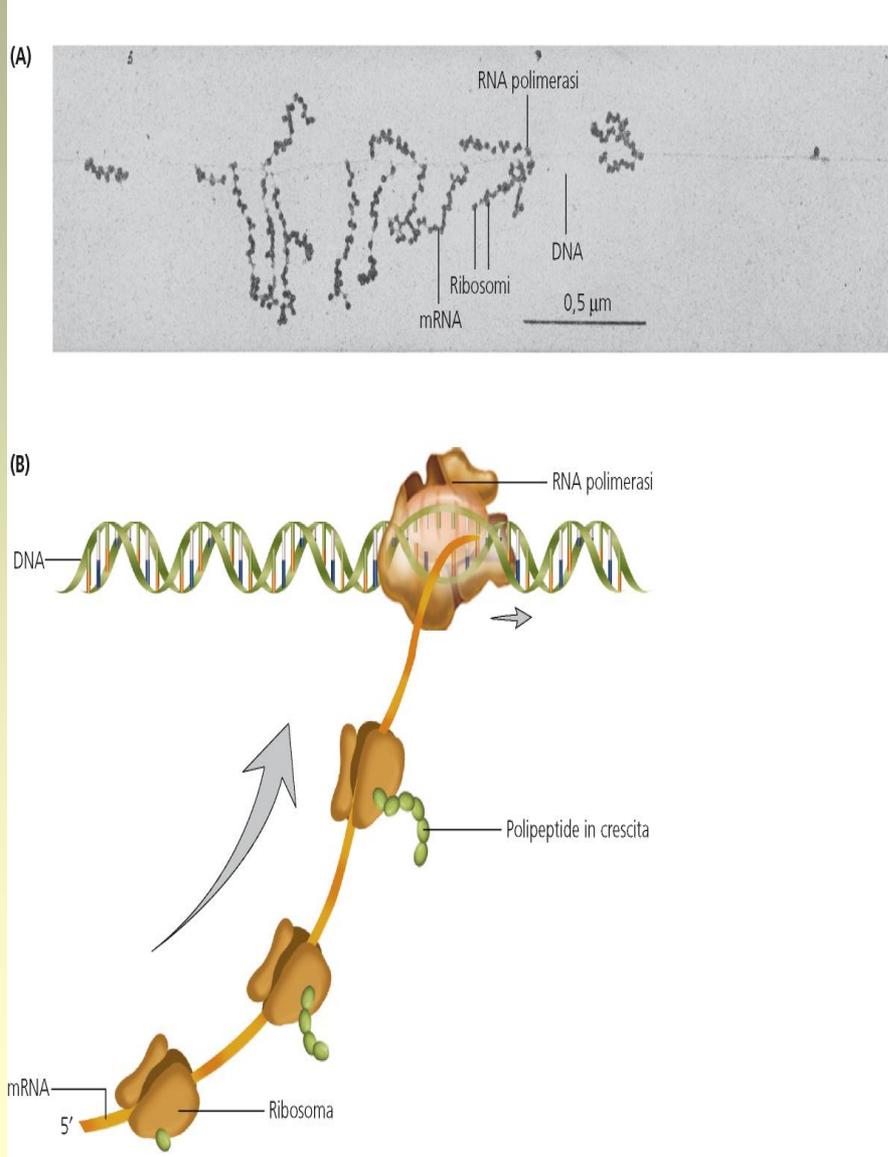
- processo nel quale il DNA stampo viene copiato in una molecola di RNA
- La molecola di RNA è identica in sequenza all'elica codificante e complementare a quella stampo.

La trascrizione è simile alla replicazione ma esistono alcune importanti differenze

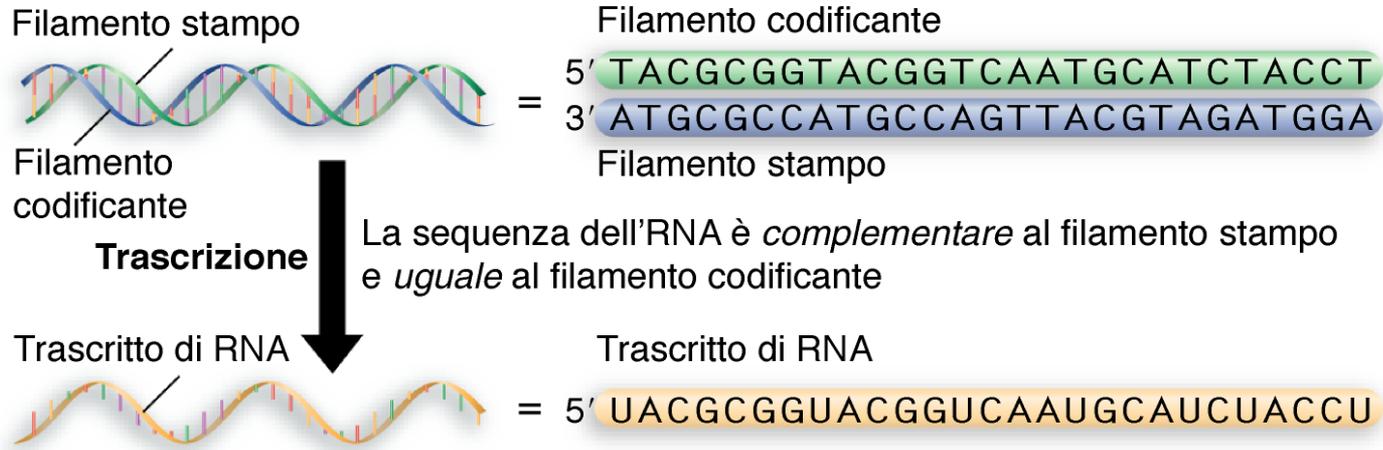
1. L'RNA è costituito da ribonucleotidi
2. L'RNA è sintetizzato dalla RNA polimerasi
3. La RNA polimerasi non necessita di un primer e può iniziare la trascrizione de novo
4. L'RNA prodotto non rimane appaiato allo stampo di DNA (solo in un breve tratto)
5. Sebbene accurata, la trascrizione è meno fedele della replicazione
6. La trascrizione copia solo alcune parti del genoma, ma molte centinaia o migliaia di volte

# Procarioti

# Eucarioti



## Un filamento del DNA viene trascritto in RNA



(5') CGCTATAGCGTTT (3')

**DNA nontemplate (coding) strand**

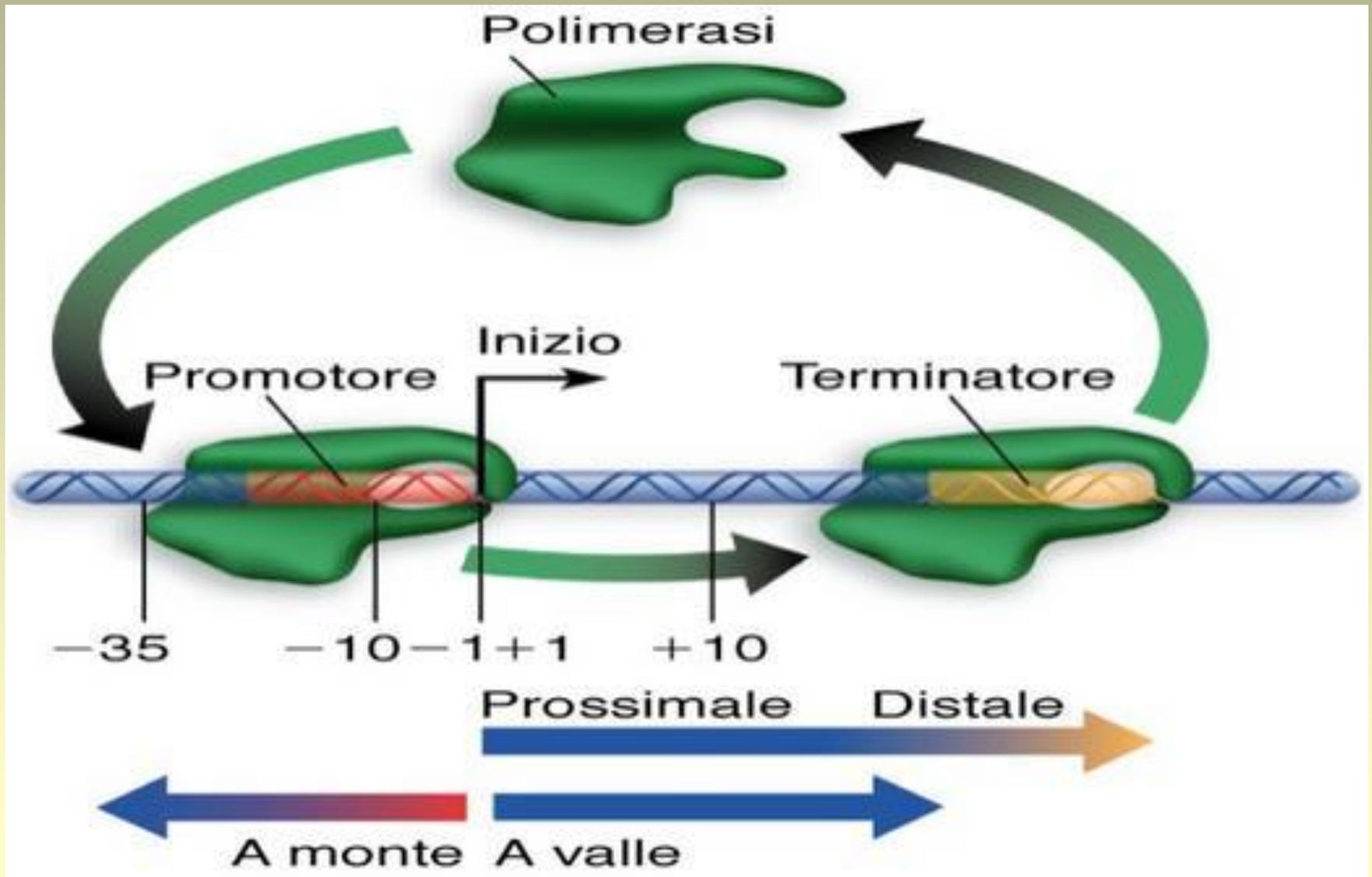
(3') GCGATATCGCAA (5')

**DNA template strand**

(5') CGCUAUAGCGUUU (3')

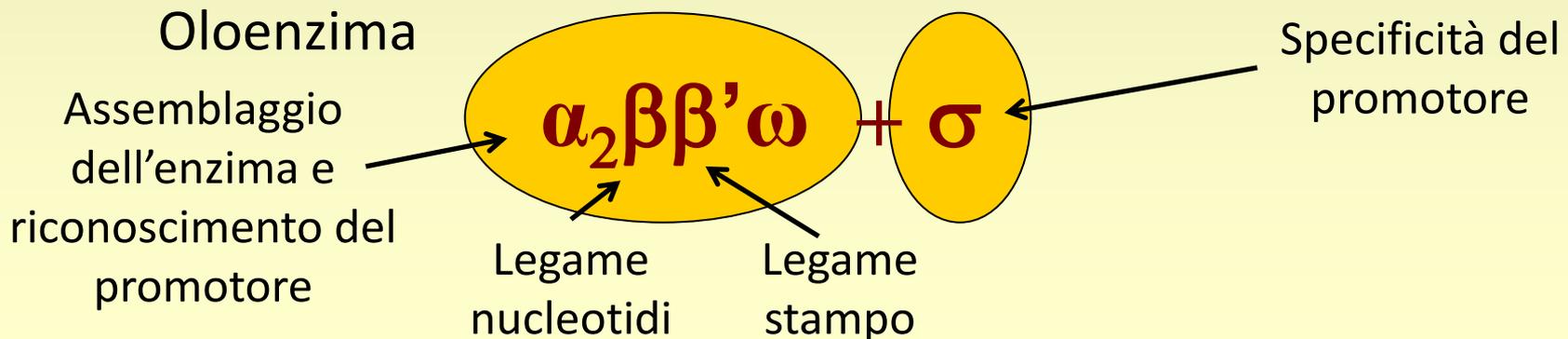
**RNA transcript**

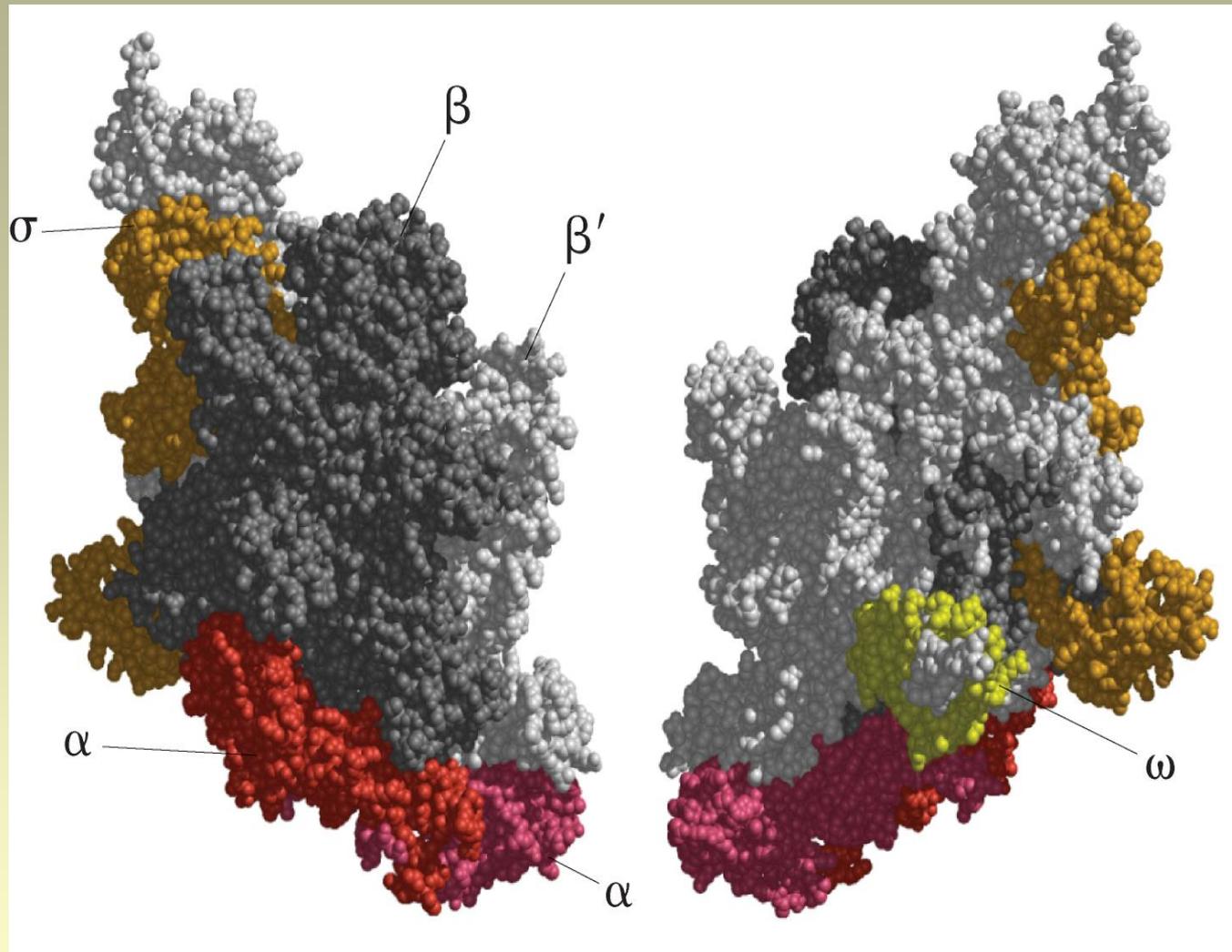
# Unità trascrizionale



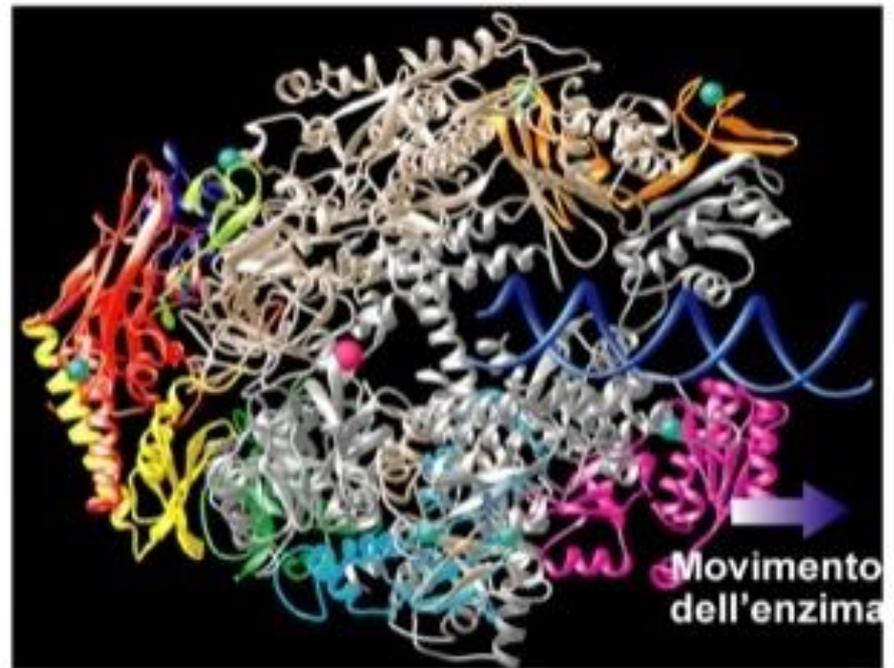
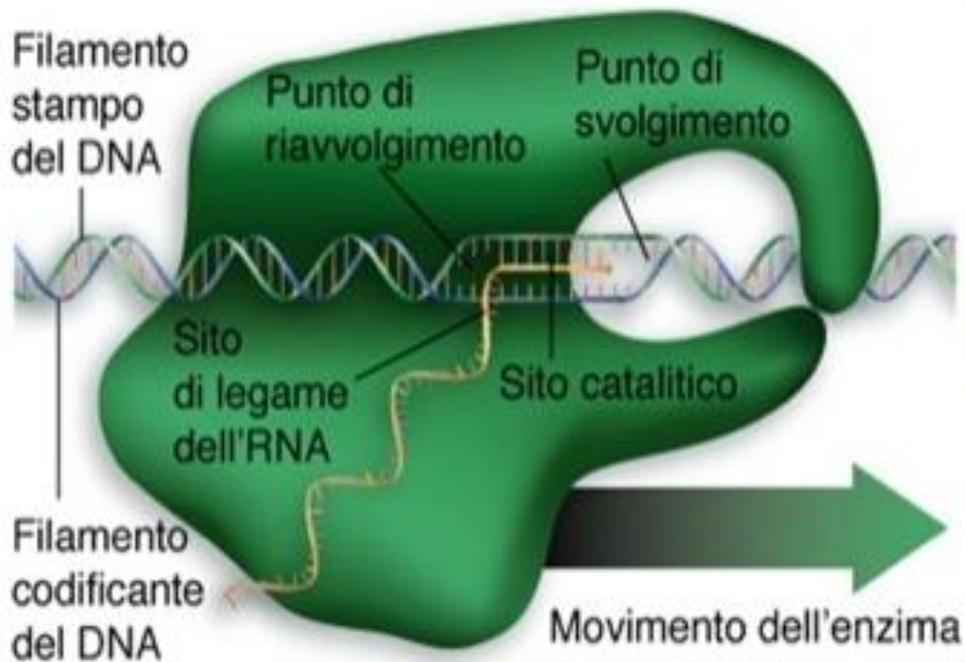
# Le subunità delle RNA polimerasi

Prokaryotic		Eukaryotic		
Bacterial	Archaeal	RNAP I	RNAP II	RNAP III
<b>Core</b>	<b>Core</b>	<b>(Pol I)</b>	<b>(Pol II)</b>	<b>(Pol III)</b>
$\beta'$	A'/A''	RPA1	RPB1	RPC1
$\beta$	B	RPA2	RPB2	RPC2
$\alpha^I$	D	RPC5	RPB3	RPC5
$\alpha^{II}$	L	RPC9	RPB11	RPC9
$\omega$	K	RPB6	RPB6	RPB6
	[+6 others]	[+9 others]	[+7 others]	[+11 others]





# Modello a chela di granchio



2 ioni Mg, 1 strettamente legato, il secondo introdotto ad ogni ciclo con il NTP

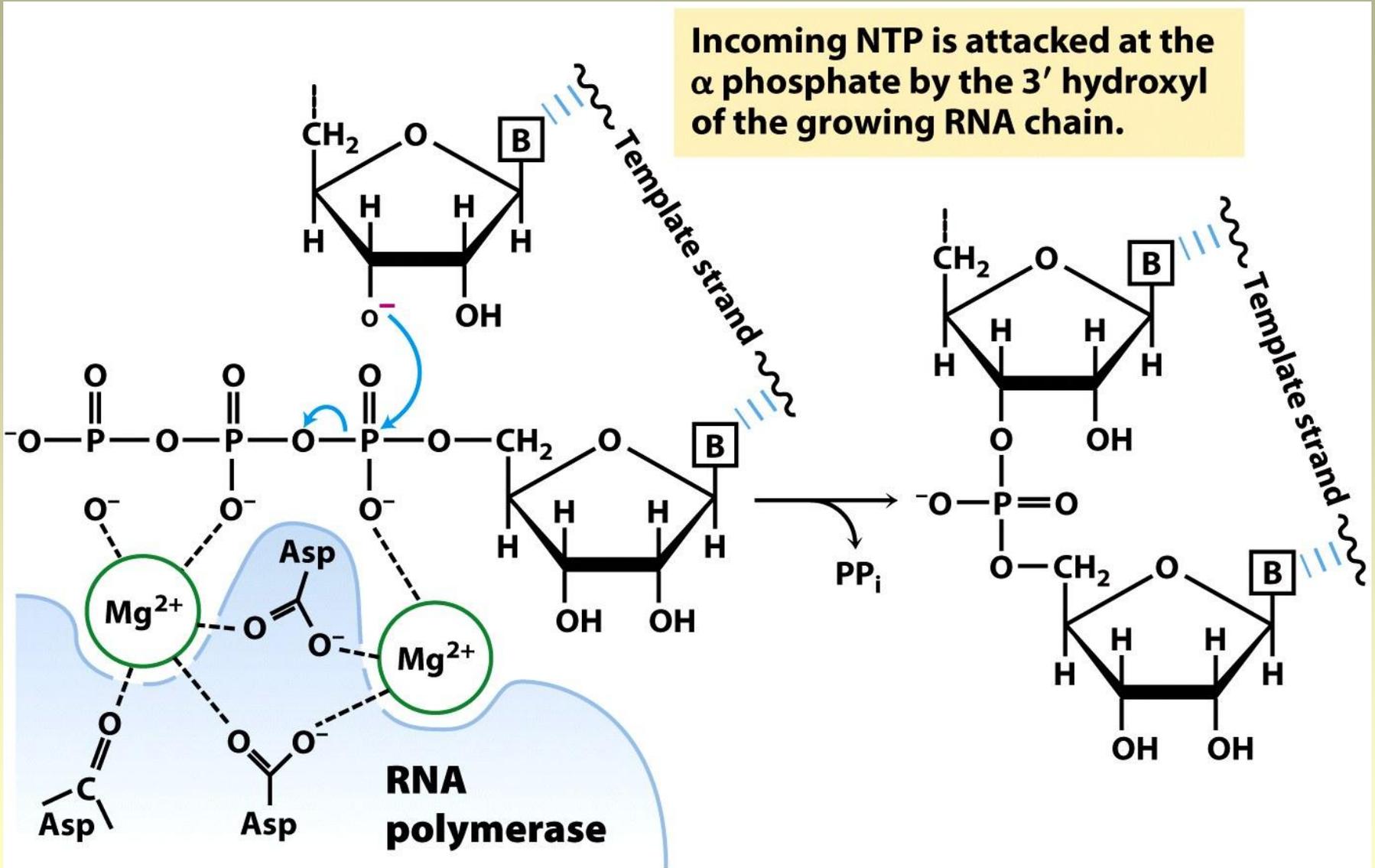
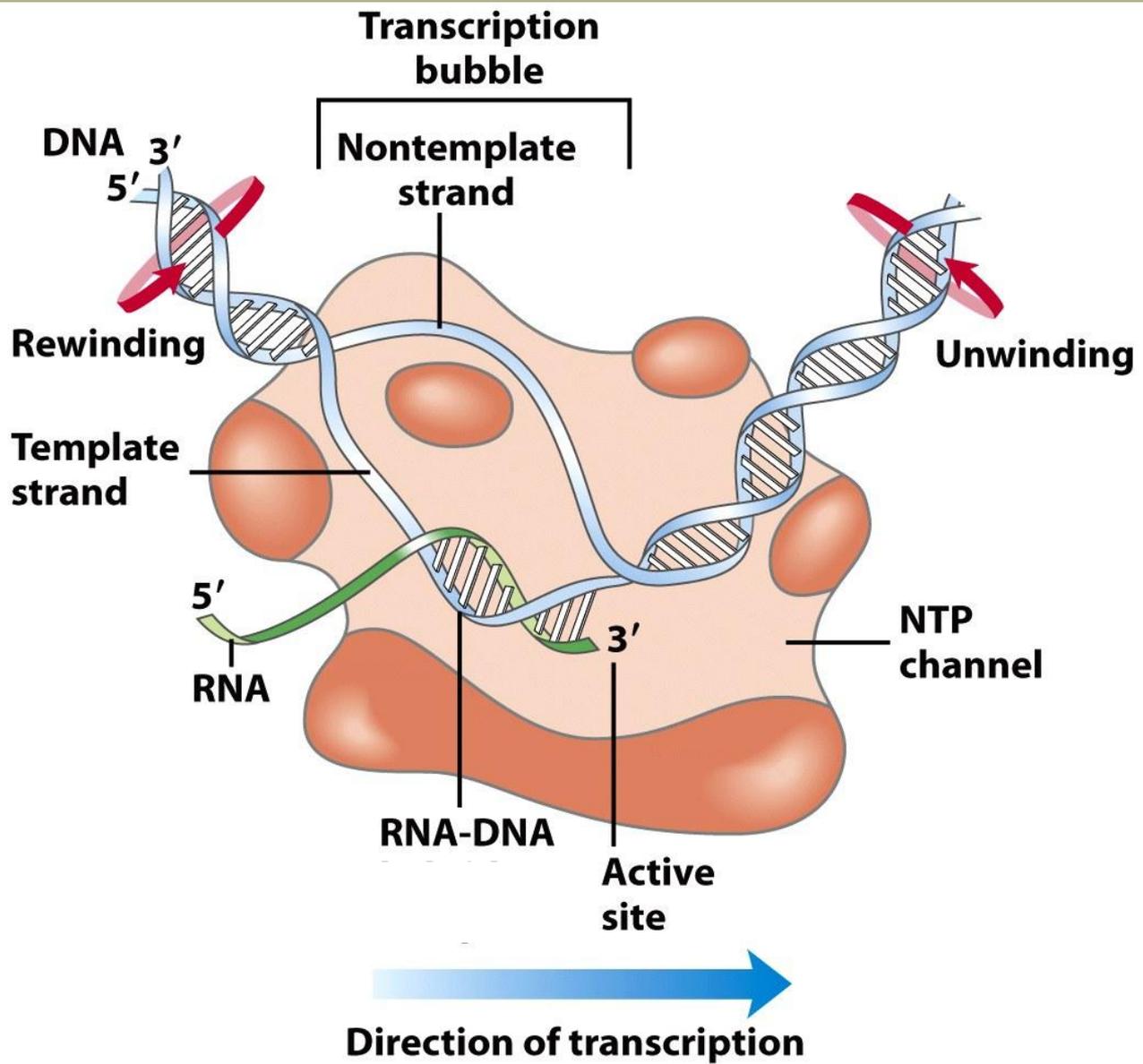


Figure 26-1b

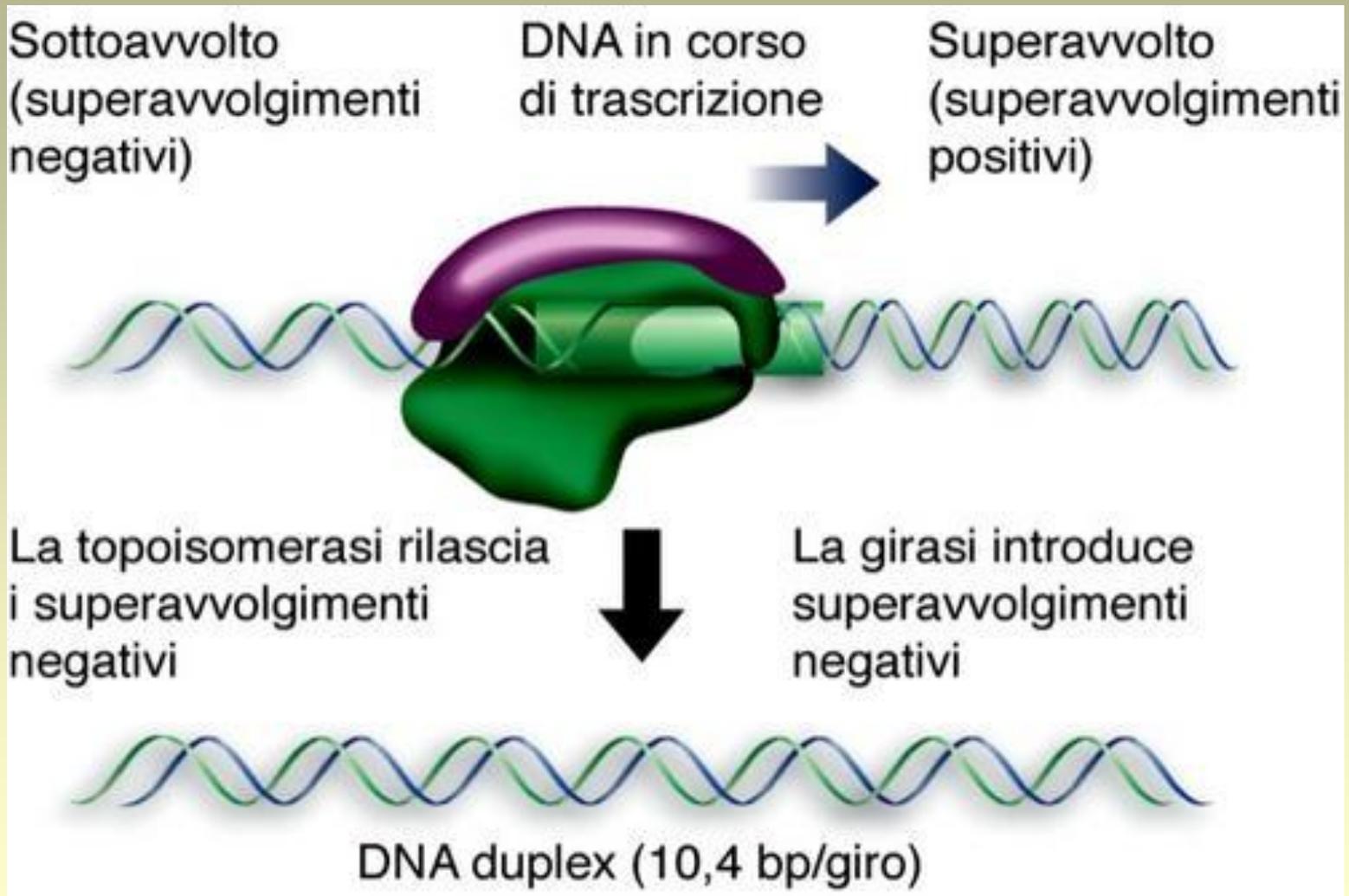
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company



**Figure 26-1a**  
*Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition*  
 © 2008 W. H. Freeman and Company

# Attività delle topoisomerasi

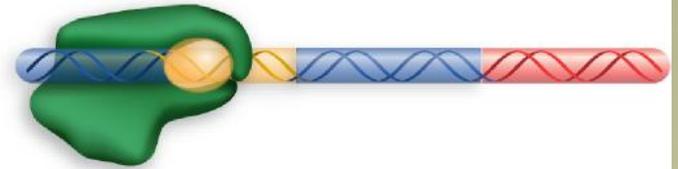


La trascrizione può essere divisa in quattro stadi:

1. Riconoscimento
2. Inizio
3. Allungamento
4. Terminazione

## L'RNA polimerasi catalizza la trascrizione

**Riconoscimento dello stampo:** la RNA polimerasi si lega al DNA duplex



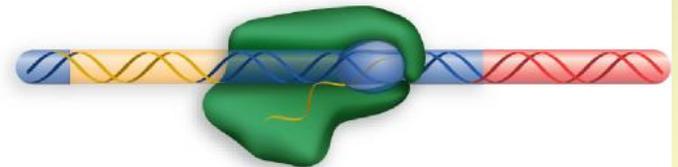
Il DNA viene svolto a livello del promotore



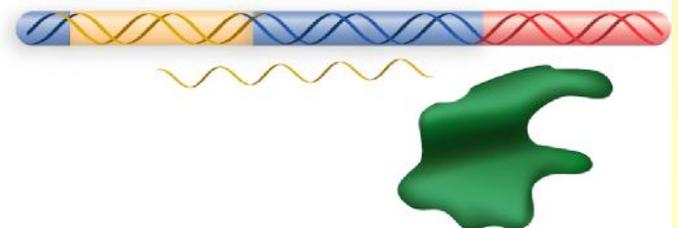
**Inizio:** vengono sintetizzate e rilasciate catene molto brevi



**Allungamento:** la polimerasi sintetizza RNA



**Terminazione:** la RNA polimerasi e l'RNA vengono rilasciati



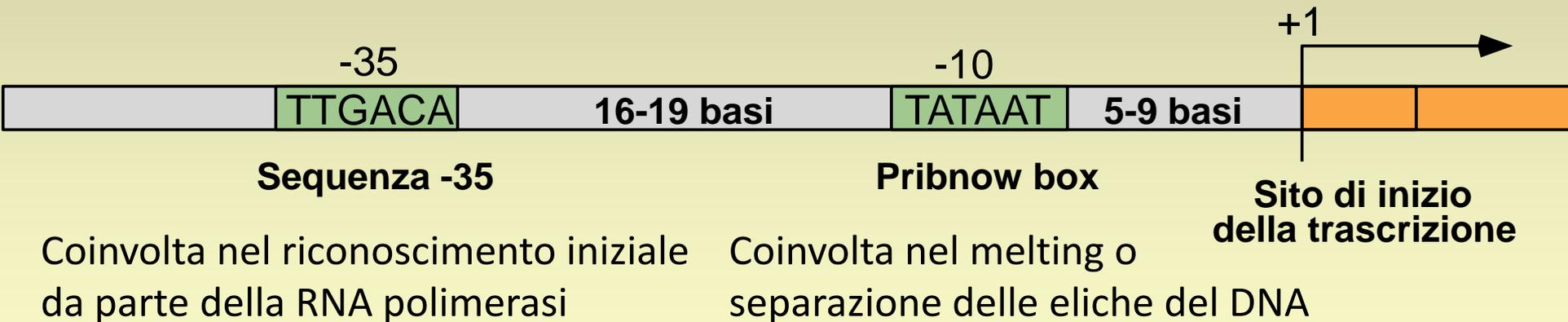
Elementi *cis*-agenti

Fattori *trans*-agenti

# I promotori procariotici

Un tipico promotore di *E.coli* è costituito da tre componenti:  
le sequenze consenso -35 e -10, e il sito d'inizio

La “**sequenza consenso**” è una sequenza ideale che rappresenta le basi che più frequentemente si trovano in una determinata posizione



La “**forza**” di un promotore descrive la frequenza con cui l’RNA polimerasi inizia la trascrizione, ovvero il numero di trascritti che produce in un determinato tempo.

← A monte

Gene	Regione -35	Pribnow box (regione -10)	Sito di inizio della trascrizione (TSS) (+1)
<i>araBAD</i>	GGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCAT	A	ACCCGTTTTT
<i>araC</i>	GCCGTGATTATAGACACTTTTGTACGCGTTTTTGTTCATGGCTTTGGT	C	CCCGCTTTG
<i>bioA</i>	TTCCAAAACGTGTTTTTTTGTGTTAATTGGGTGTAGACTTGTAA	A	CCTAAATCTTTT
<i>bioB</i>	CATAATCGACTTGTAAACCAAATTGAAAAGATTTAGGTTTACAAGTCT	T	AGACCGAAT
<i>galP2</i>	ATTTATTCCATGTCACACTTTTTCGCATCTTTGTTATGCTATGGTT	A	ATTTCATACCAT
<i>lac</i>	ACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA	A	ATTGTGAGCGG
<i>lacI</i>	CCATCGAATGGCGCAAAACCTTTCCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCG	G	GAAGAGAGTC
<i>rmA1</i>	AAAATAAATGCTTGACTCTGTAGCGGGAAGGCGTATTATCACACC	C	CGCGCCGCTG
<i>rmD1</i>	CAAAAAAATACTTGTGCAAAAAAATTGGGATCCCTATAATGCGCCT	C	CGTTGAGACGA
<i>rmE1</i>	CAATTTTTCTATTGCGGCCTGCGGAGAACTCCCTATAATGCGCCT	C	CATCGACACGG
<i>tRNA<sup>Tyr</sup></i>	CAACGTAACTTTACAGCGGCGCGTCATTTGATATGATGCGCCCC	G	CCTCCCGATA
<i>trp</i>	AAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACTAGTTAACTAGTACGCA	A	AGTTCACGTA

	Regione -35	Pribnow box	TSS
Sequenza	T C T T G A C A T	· · · [11-15 bp] · · · T A T A A T	· · · [5-8 bp] · · ·
consensus:			A
% di presenza della base indicata	42 38 82 84 79 64 53 45 41	79 95 44 59 51 96	C <sup>55</sup> G <sup>42</sup> A <sup>51</sup> T <sup>48</sup>

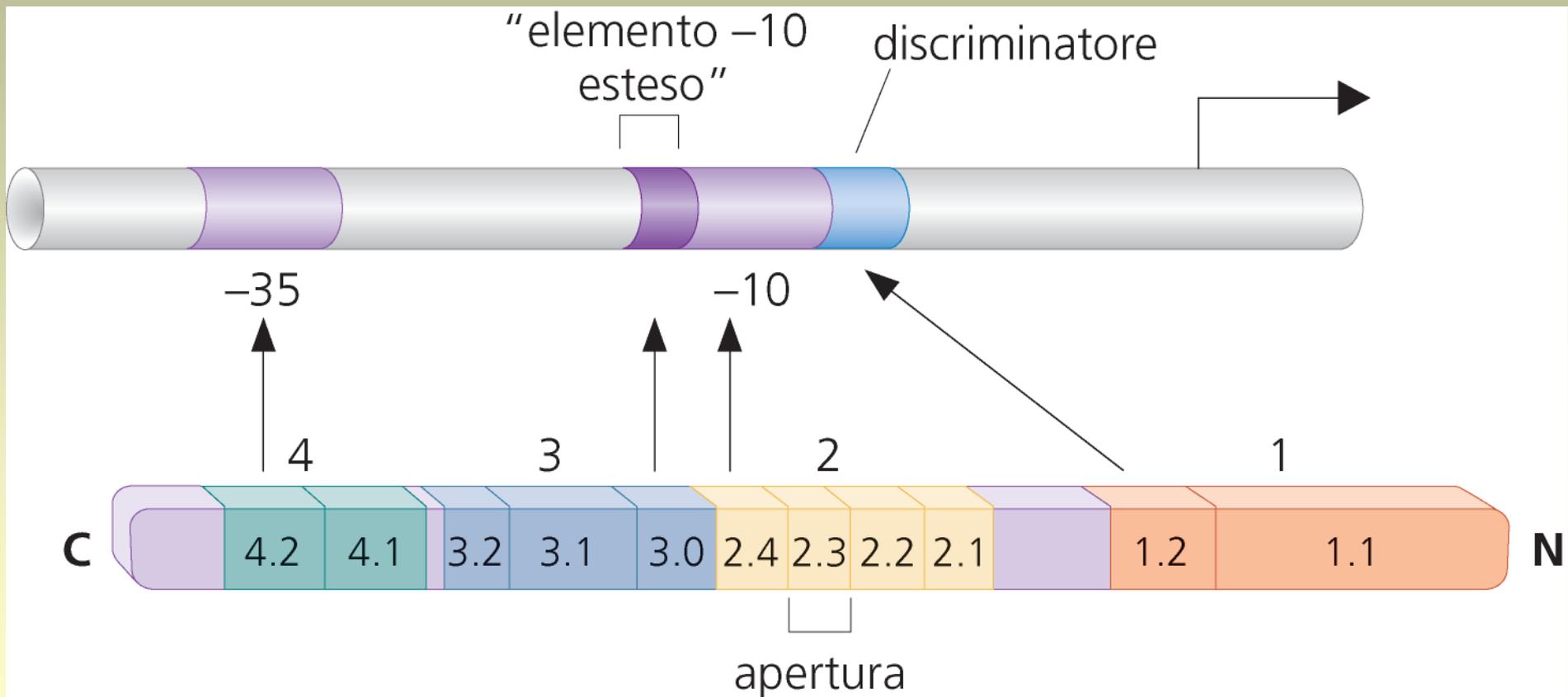
**FIGURA 11.2** Sequenze di promotori rappresentativi di *E. coli*. Per convenzione, queste sono date come le sequenze che si troverebbero spostandosi sul filamento codificante, da sinistra verso destra in direzione 5'-3'. I numeri al di sotto della sequenza consensus indicano la percentuale di comparsa del nucleotide indicato in quella specifica posizione.

# CONSENSUS SEQUENCE APPROACH TO THE IDENTIFICATION OF GENETIC SIGNALS

- I motivi **TTGACA** and **TATAAT** sono i segnali che vengono riconosciuti dalla subunità sigma70 della polimerasi.
- La “forza” relativa di un promotore e’ proporzionale alla sua similarita’ ad una specifica sequenza consenso.
- Mutazioni nelle regioni -10 and -35 alterano la “forza” del promotore.
- Esperimenti tipo footprinting confermano la loro attivita’.
- I geni che hanno bisogno di essere espressi più di altri hanno una sequenza molto più vicina a quella consenso

# Il fattore sigma

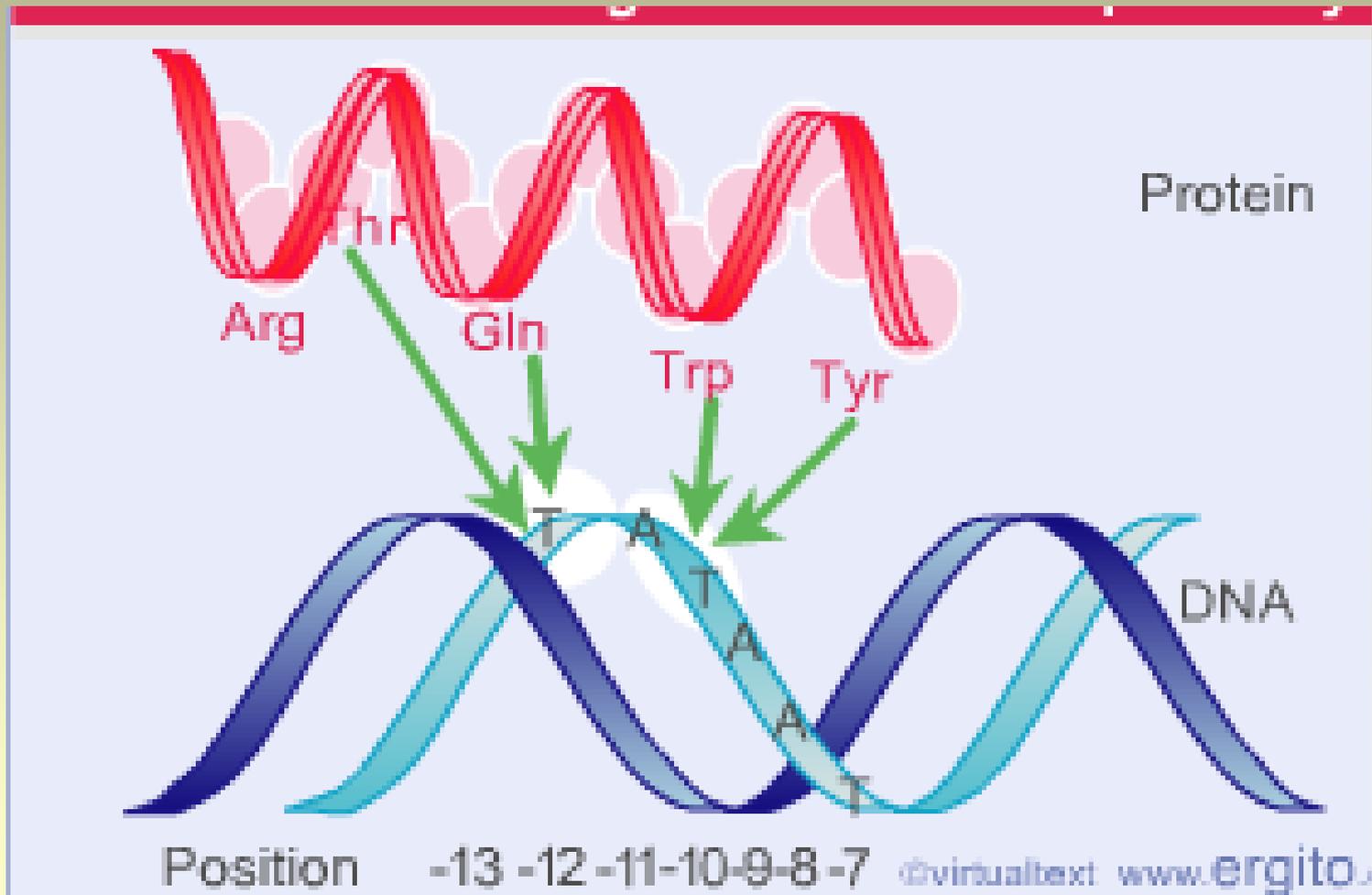
siti di legame del fattore sigma al DNA



regione 4 motivo elica-giro-elica

# Il fattore sigma lega il DNA

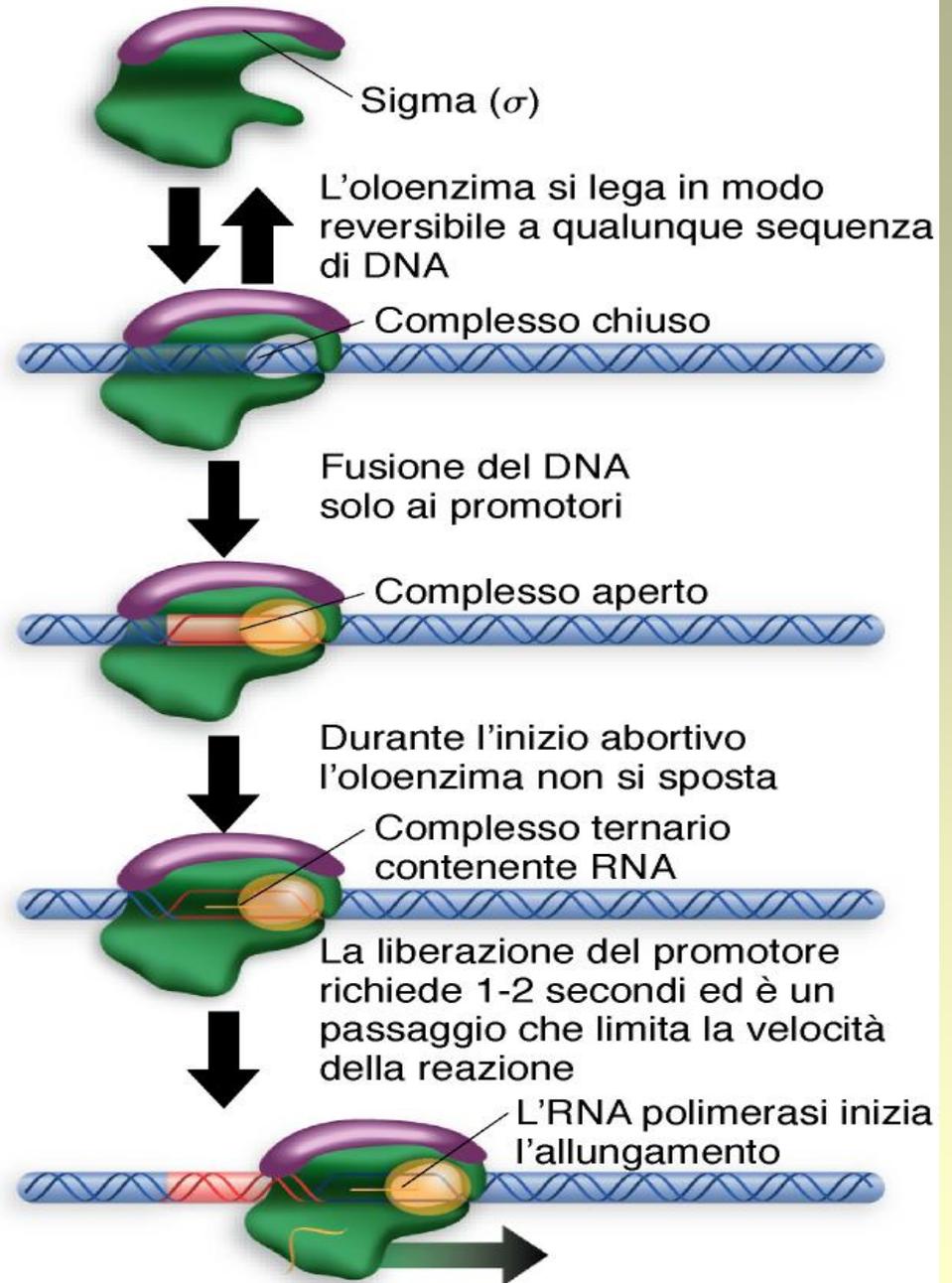
(interazione di una  $\alpha$ -elica con il solco maggiore)



interazione del fattore sigma con il filamento non stampo

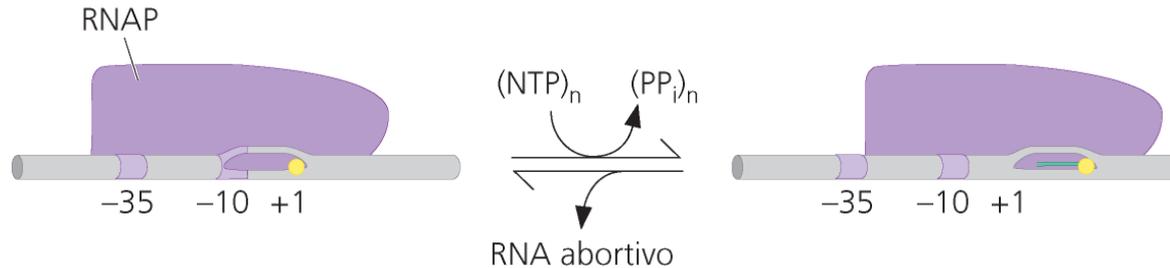
# INIZIO DELLA TRASCRIZIONE

L'inizio della trascrizione comprende più fasi

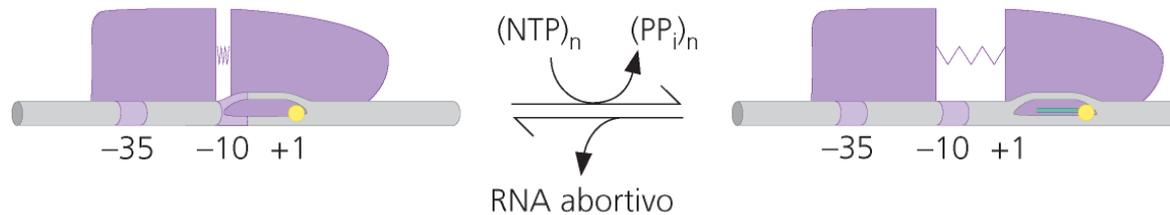


# Inizio della trascrizione (fase abortiva)

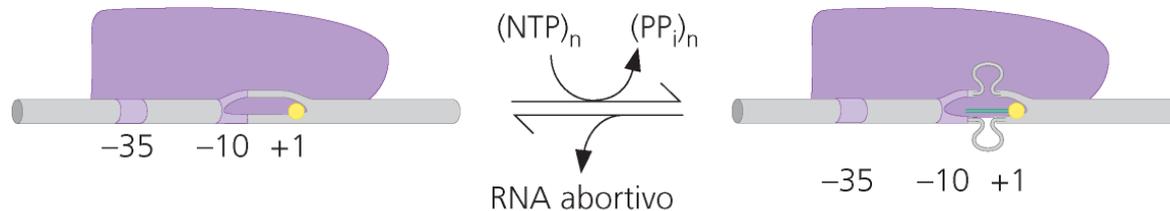
**"passaggio transiente"**



**"a bruco"**

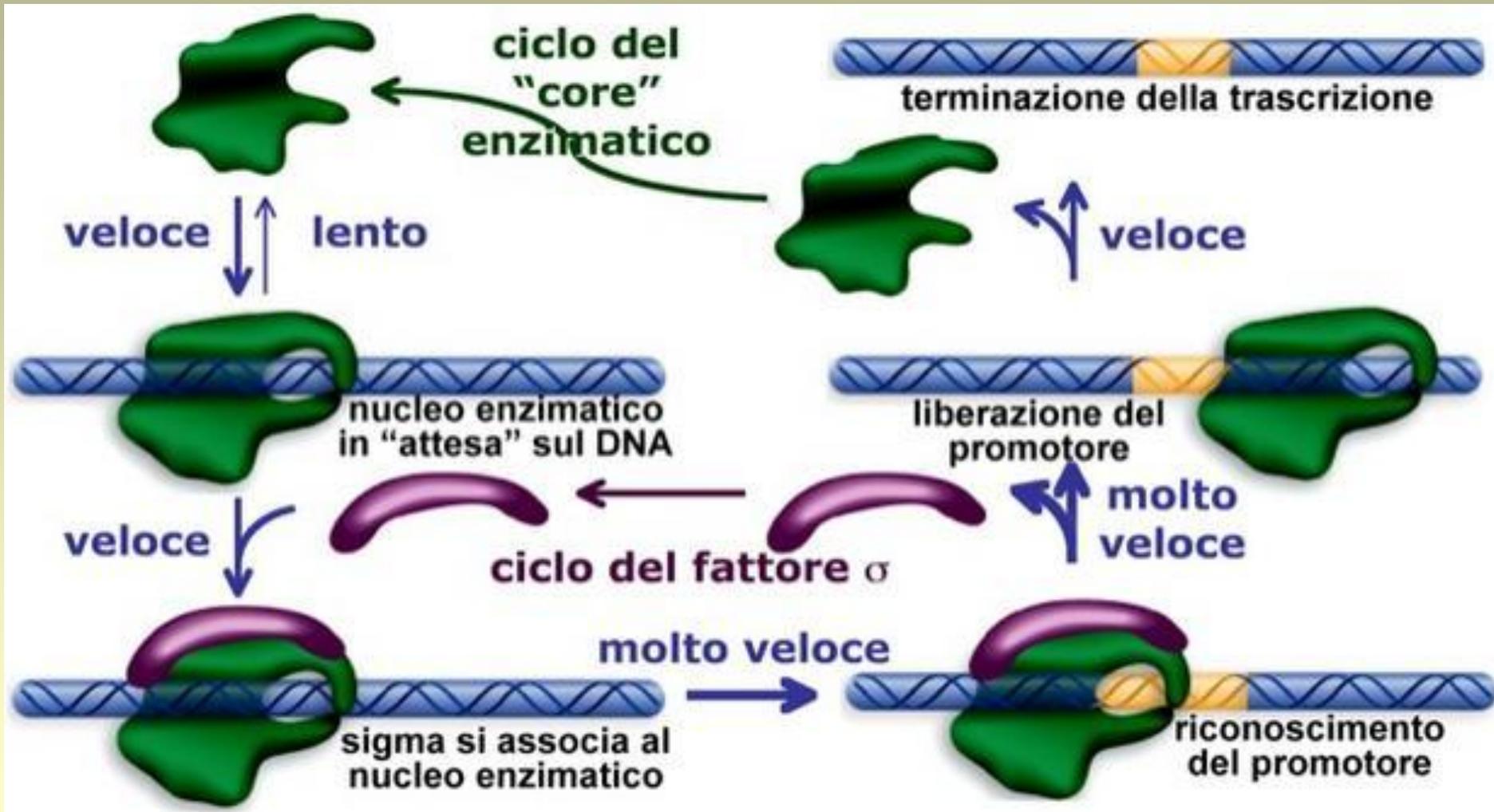


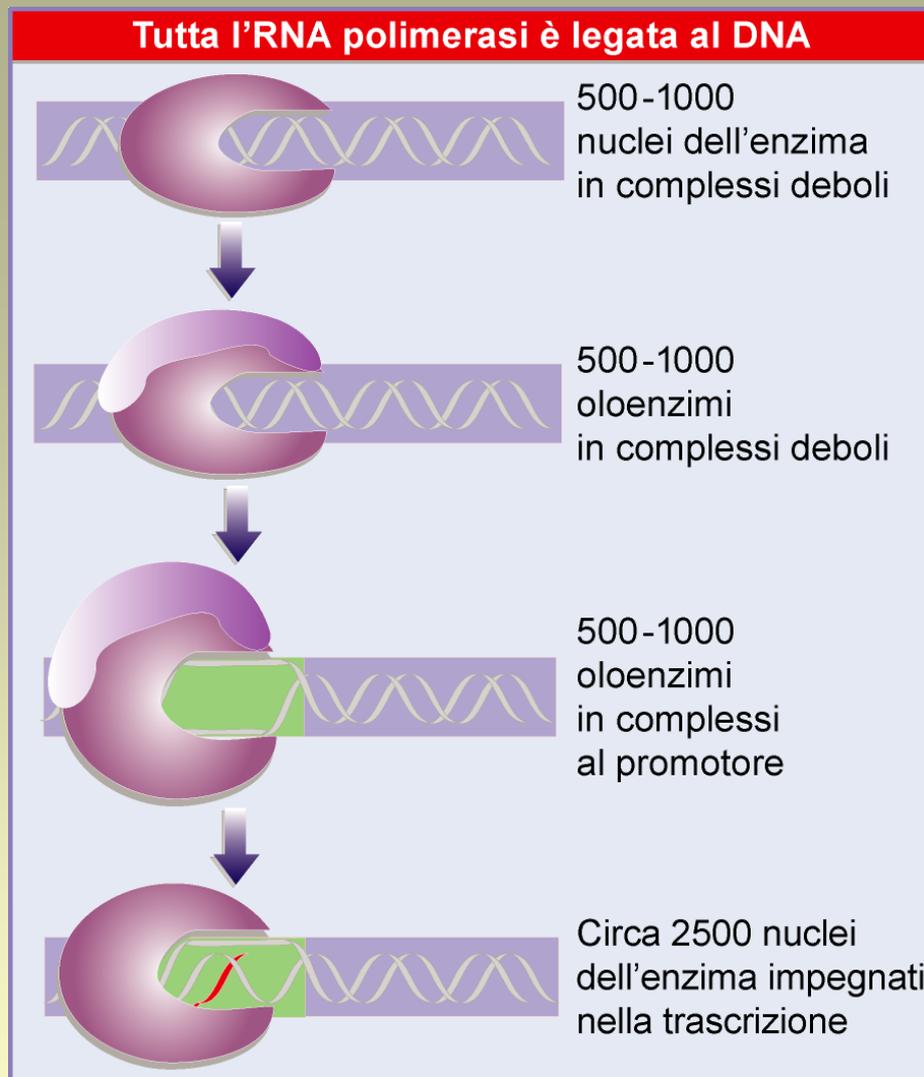
**accartocciamento**



passaggio transiente: l'RNA polimerasi va avanti e indietro  
a bruco: prevede l'esistenza di un elemento flessibile  
accartocciamento: l'enzima tira dentro di sé il DNA

# Associazione e dissociazione del fattore sigma





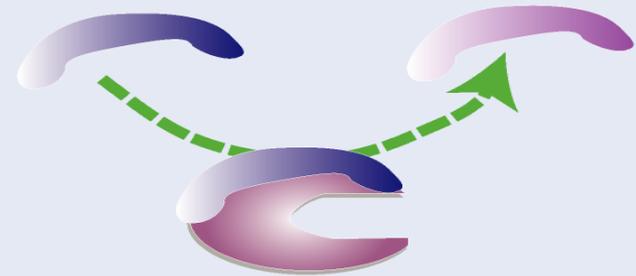
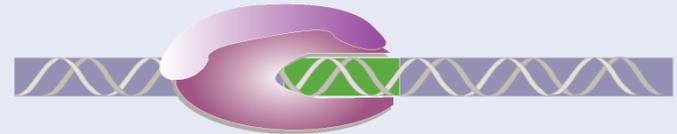
La velocità con cui l'RNA polimerasi si lega ai promotori è troppo grande per essere dovuta alla diffusione casuale (non esiste oloenzima libero)

# Fattori Sigma di *E.coli*

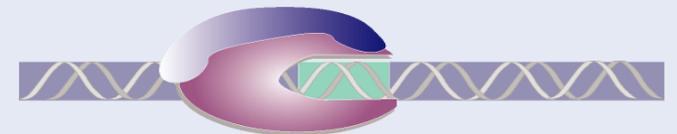
Fattori sigma diversi legano promotori diversi

## Sigma controlla il riconoscimento del promotore

L'oloenzima con  $\sigma^{70}$  riconosce una serie di promotori

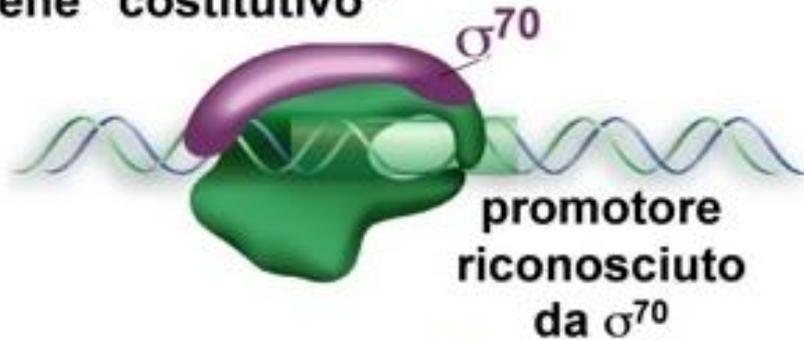


La sostituzione del fattore sigma fa riconoscere all'enzima una serie diversa di promotori

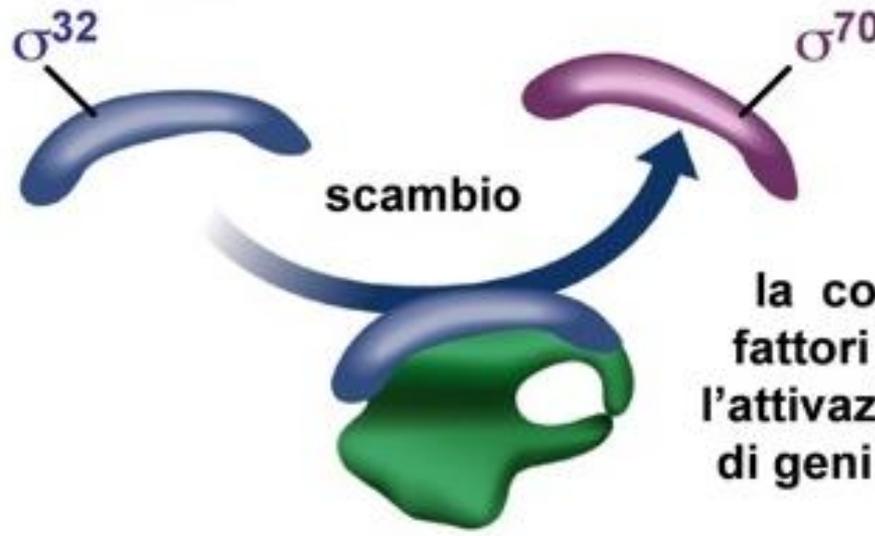
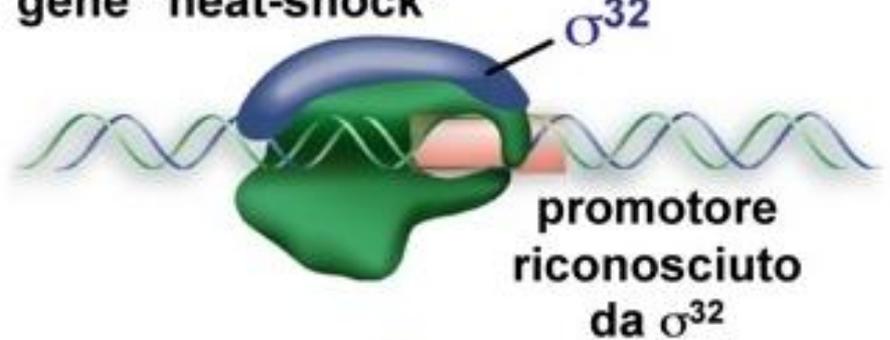


Sigma	Gene	Massa	Uso	Sequenza -35	Separazione	Sequenza -10
$\sigma^{70}$	rpoD	70,000	generale	TTGACA	16-18 bp	TATAAT
$\sigma^H$	rpoH	32,000	shock termico	CNCTTGAA	13-15 bp	CCCCATNT
$\sigma^N$	rpoN	54,000	carenza azoto	CTGGNA	6 bp	TTGCA
$\sigma^F$	flaI	28,000	flagellare	TAAA	15 bp	GCCGATAA

gene "costitutivo"

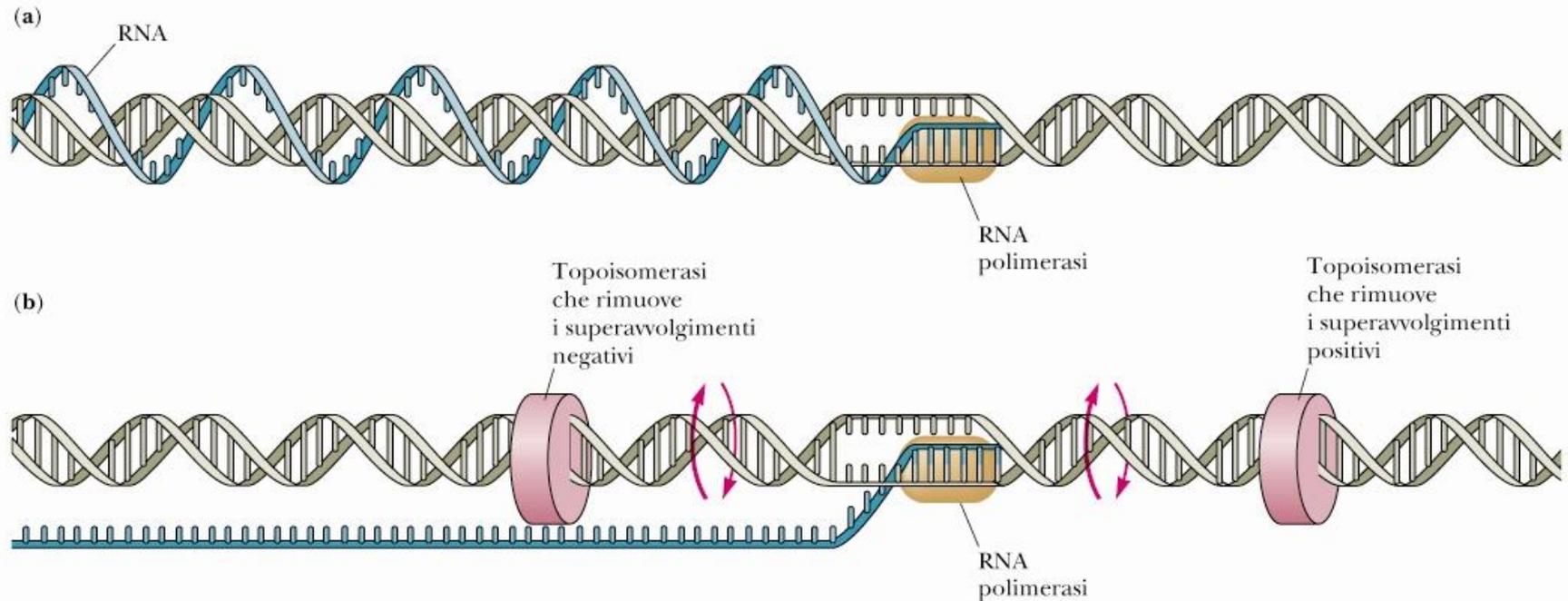


gene "heat-shock"



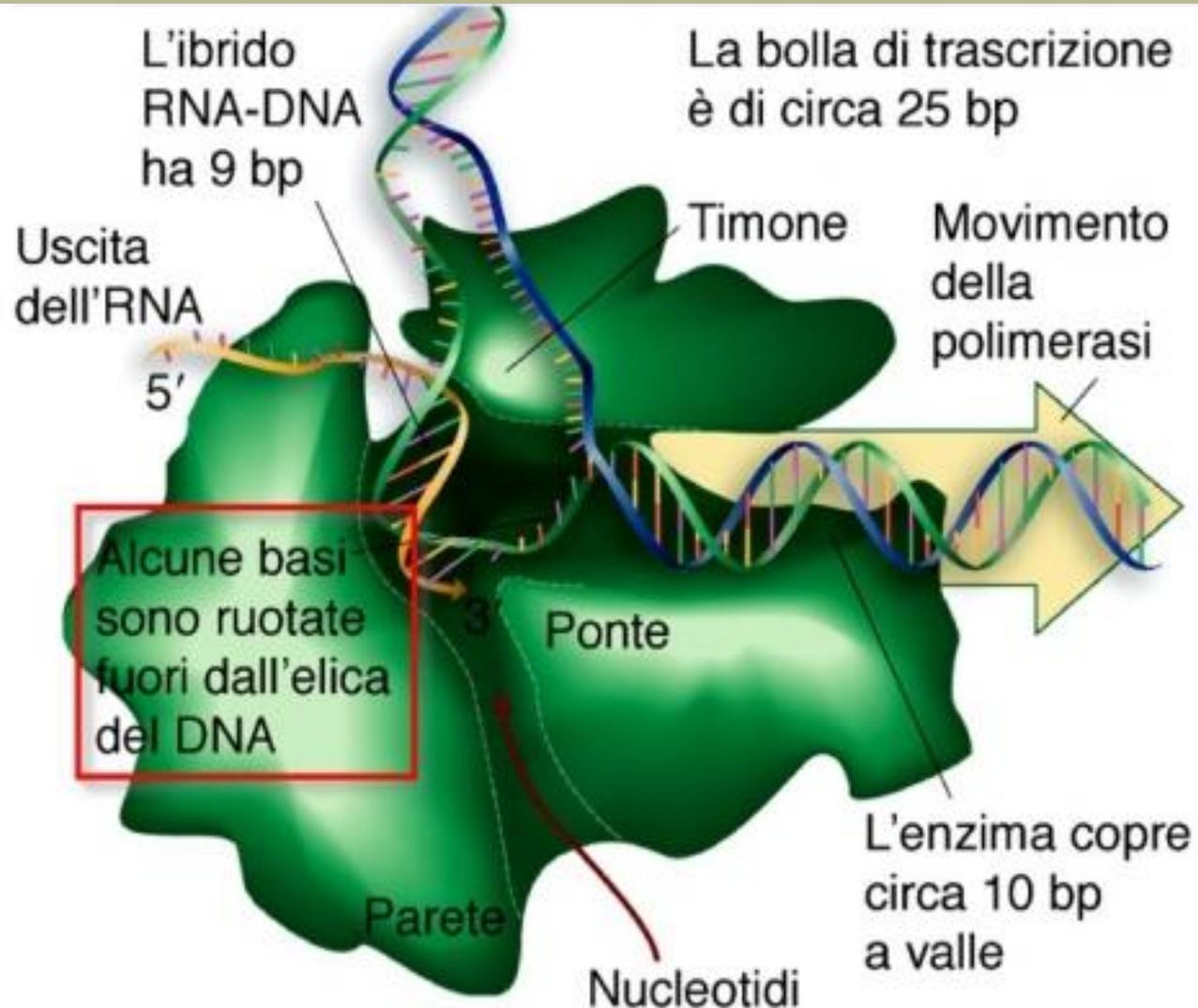
Ci sono più tipi di fattori sigma ognuno specifico per una classe diversa di promotori.  
Lo shock da calore aumenta la quantità di fattore sigma 32

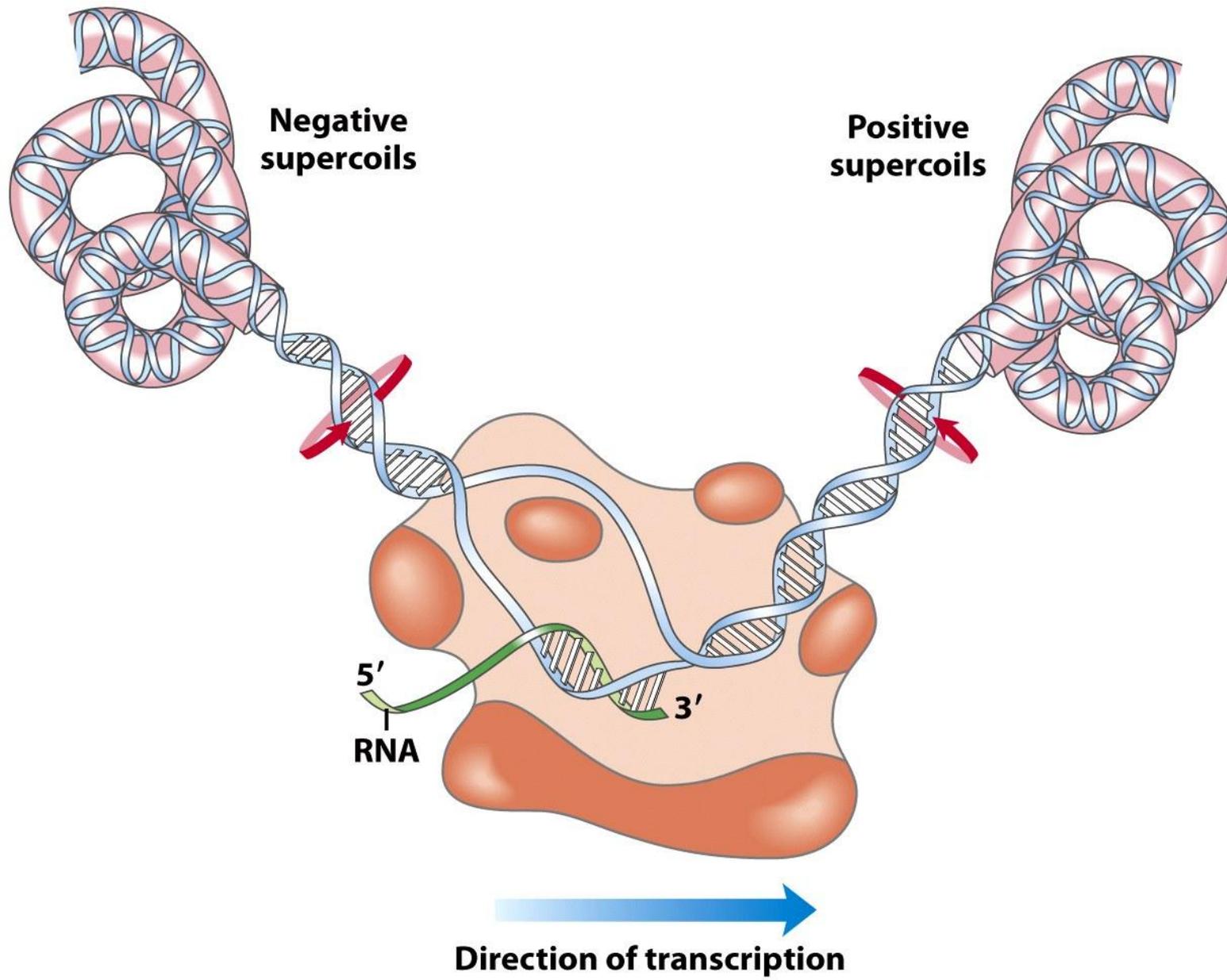
# ALLUNGAMENTO



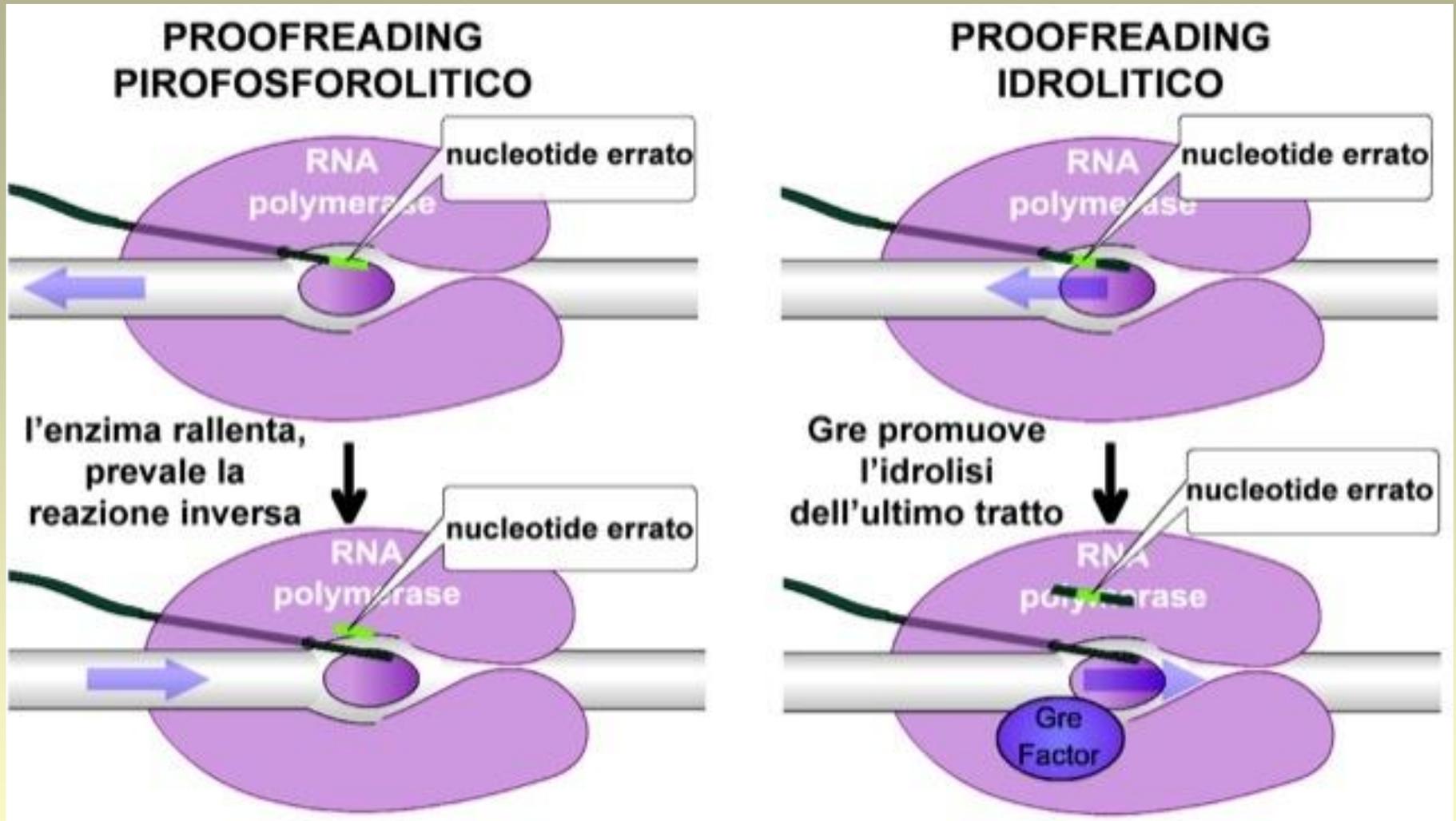
■ **FIGURA 11.4** Due modelli per la fase di allungamento della catena nel processo di trascrizione. (a) Se la RNA polimerasi seguisse il filamento stampo intorno all'asse del DNA a doppia elica, non ci sarebbe tensione e il DNA non si dovrebbe superavvolgere; in tal caso, la catena di RNA risulterebbe avvolta intorno alla doppia elica ogni dieci coppie di basi. Questa ipotesi sembra improbabile, perché risulterebbe difficile liberare il trascritto dal DNA a doppia elica. (b) Alternativamente, le topoisomerasi dovrebbero eliminare i superavvolgimenti. Una topoisomerasi capace di rilassare i superavvolgimenti positivi situati a monte della bolla di trascrizione dovrebbe rilassare il DNA. Una seconda topoisomerasi localizzata a valle rispetto alla bolla di trascrizione dovrebbe rimuovere i superavvolgimenti negativi. (Adattato da Futcher, B., 1988. *Supercoiling and transcription, or vice versa?* *Trends in Genetics*. 4: 271-272).

# La bolla di trascrizione





# Meccanismi di "Proofreading" dell'RNA polimerasi

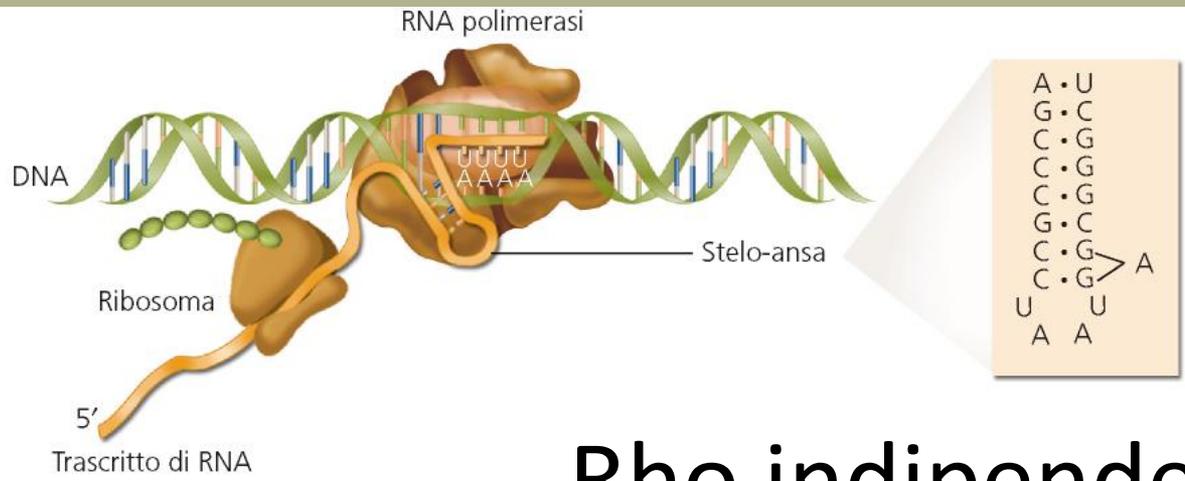


il pirofosfato è aggiunto di nuovo al nucleotide errato

Gre (fattore procariotico) fa invertire la direzione della sintesi

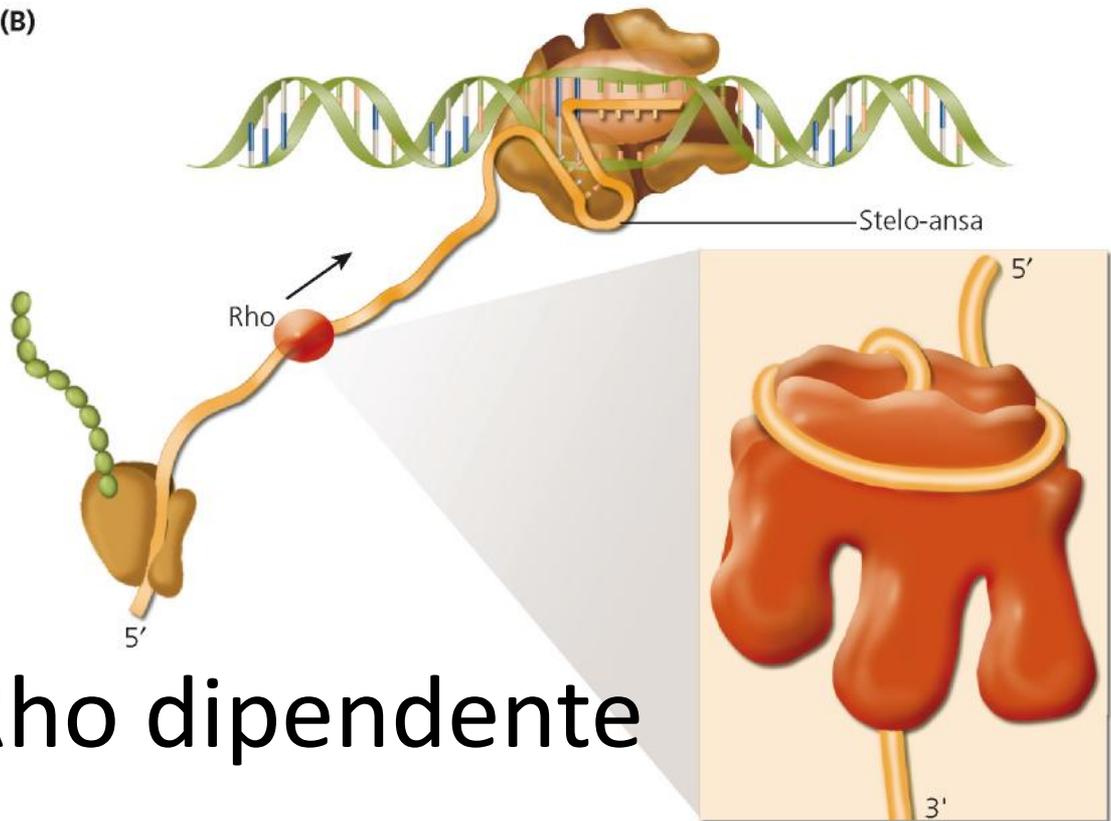
**TERMINE DELLA TRASCRIZIONE**

(A)



# Rho indipendente

(B)



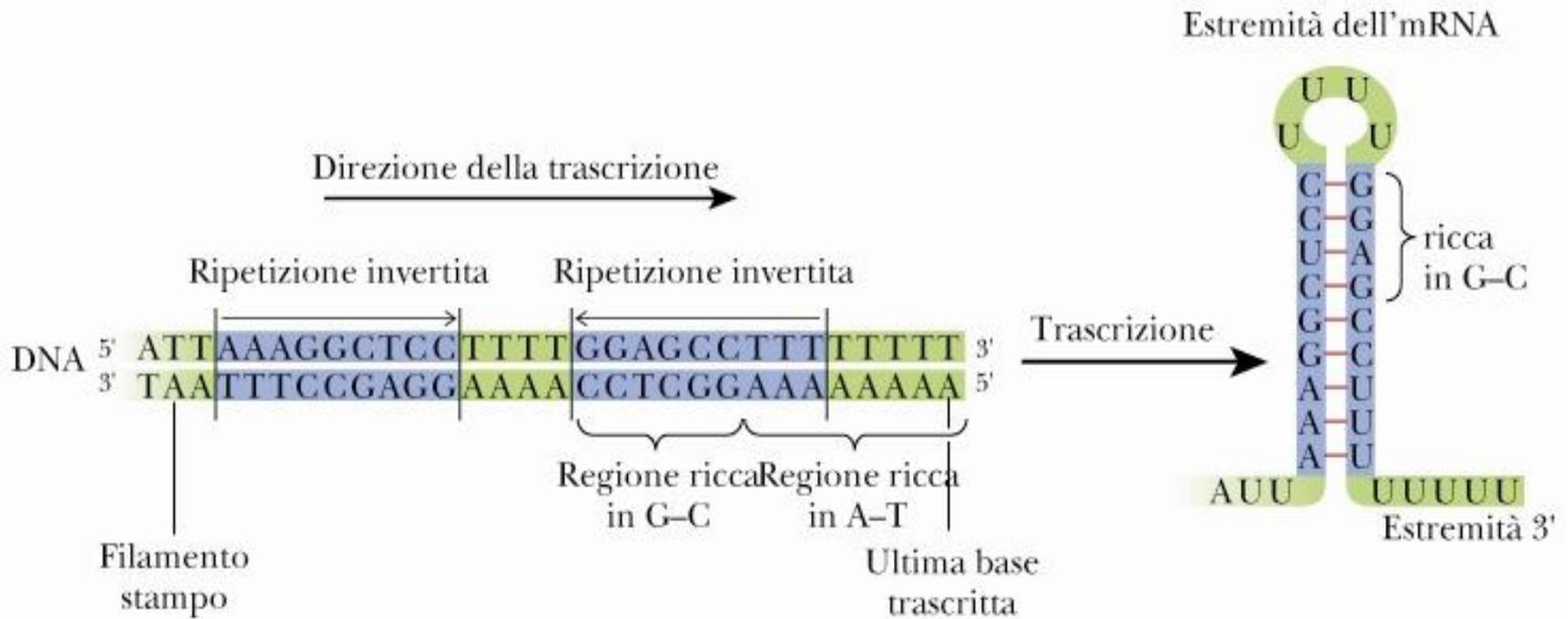
# Rho dipendente

# Termine Rho indipendente

La terminazione Rho indipendente richiede due sequenze adiacenti nella regione terminale del DNA trascritto

- Una sequenza ripetuta e inversa di circa 20 nucleotidi (ricca in G:C)
- Una sequenza di circa 8 basi ricca in coppie A:T

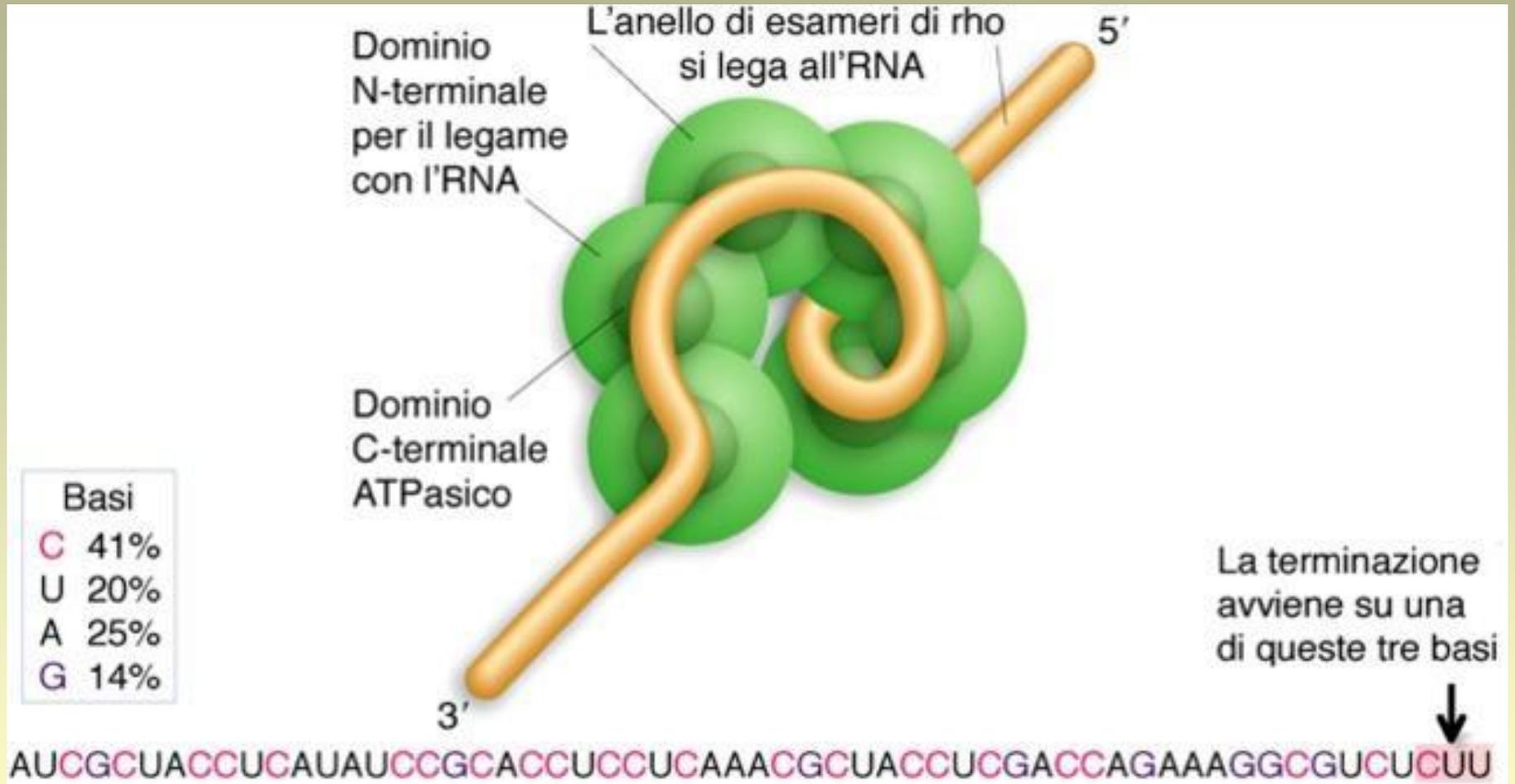
Questi elementi non hanno effetto fino a che non vengono trascritti dalla RNA polimerasi



**FIGURA 11.5** Ripetizioni invertite nella sequenza di DNA trascritta possono generare una molecola di mRNA che forma una struttura a forcina. Questa è spesso utilizzata per terminare la trascrizione.

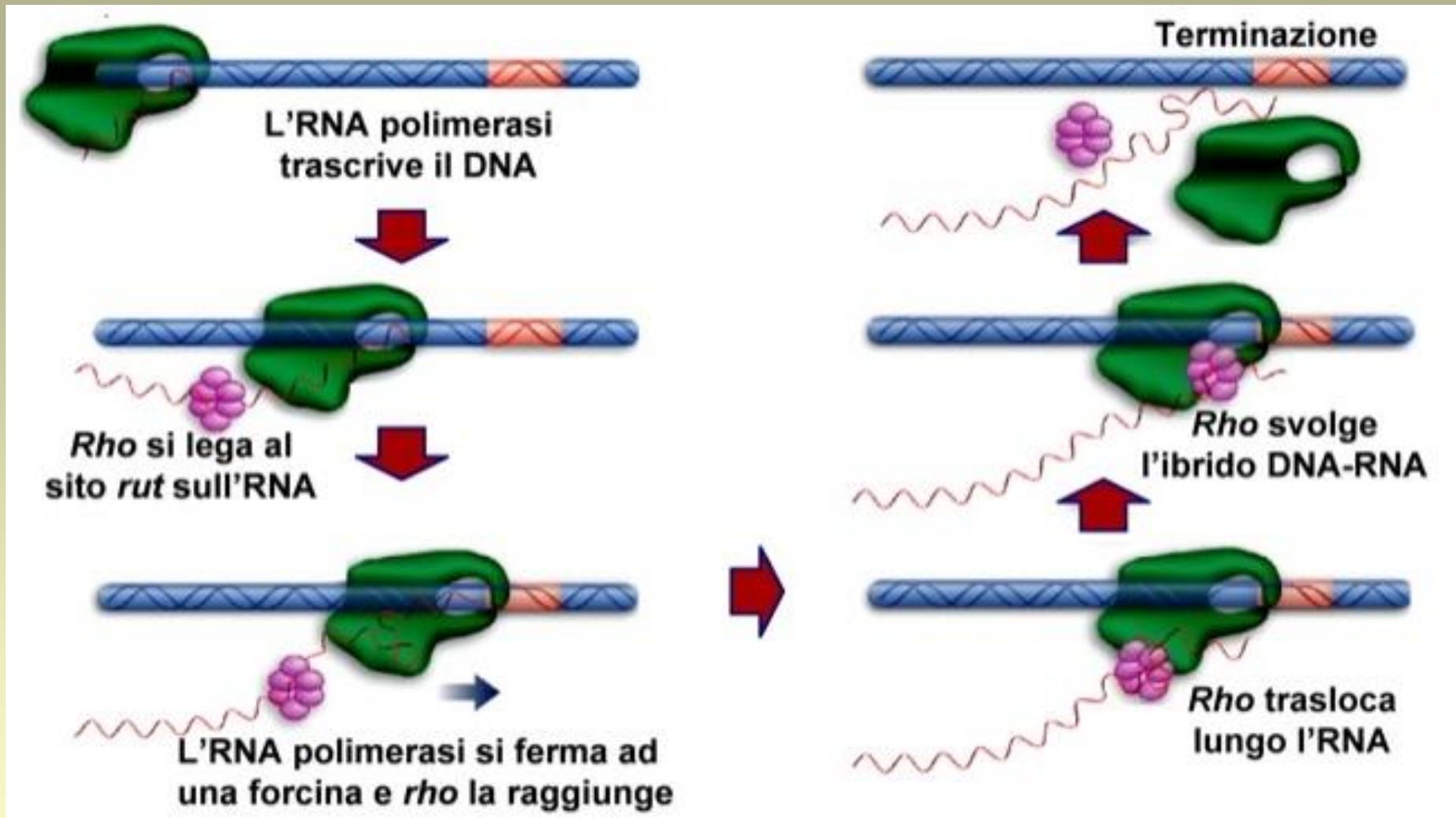
La ripetizione inversa permette la formazione di una struttura a forcina nell'RNA trascritto che rallenta la RNA polimerasi. La sequenza ricca in A:U nell'ibrido RNA-DNA favorisce la dissociazione dell'RNA (minori legami idrogeno e interazione di stacking) e il distacco dell'enzima

# Termine Rho dipendente



Legame di rho sul sito rut

(sequenza presente nella parte terminale del DNA trascritto)

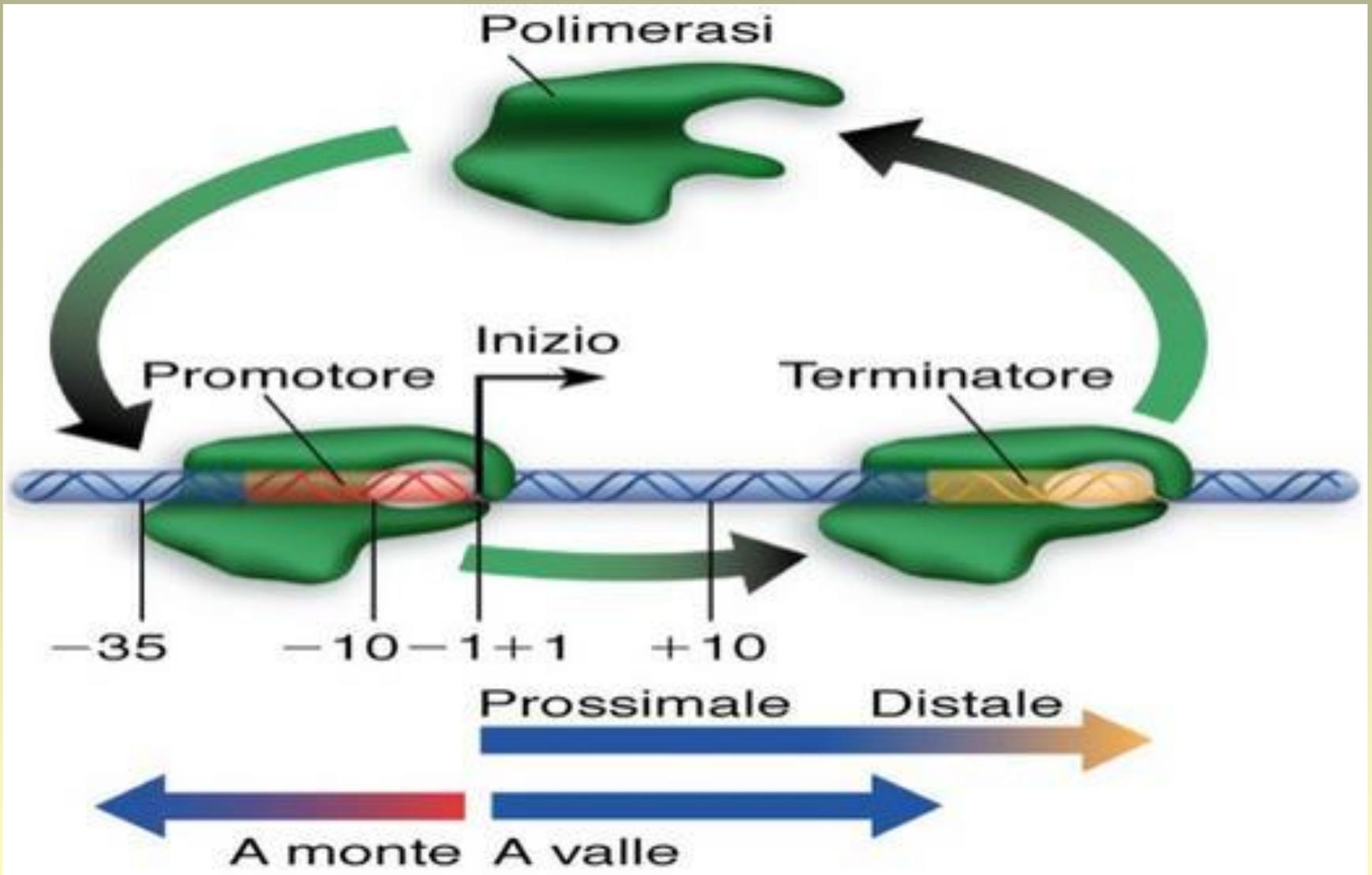


Sito *rut* ricco in citosine

# Inibitori delle RNA polimerasi

Inibitore	Enzima bersaglio	Azione dell'inibitore
Rifamicina	oloenzima proc.	lega $\beta$ e inibisce inizio
Streptolidigina	nucleo enz. proc.	lega $\beta$ e inibisce allungamento
Actinomicina D	pol I eucariotica	lega il DNA e inibisce allungamento
$\alpha$ -Amanitina	pol II eucariotica	lega la RNA polimerasi II

# CONTROLLO DELL'ESPRESSIONE GENICA NEI PROCARIOTI



Unità trascrizionale

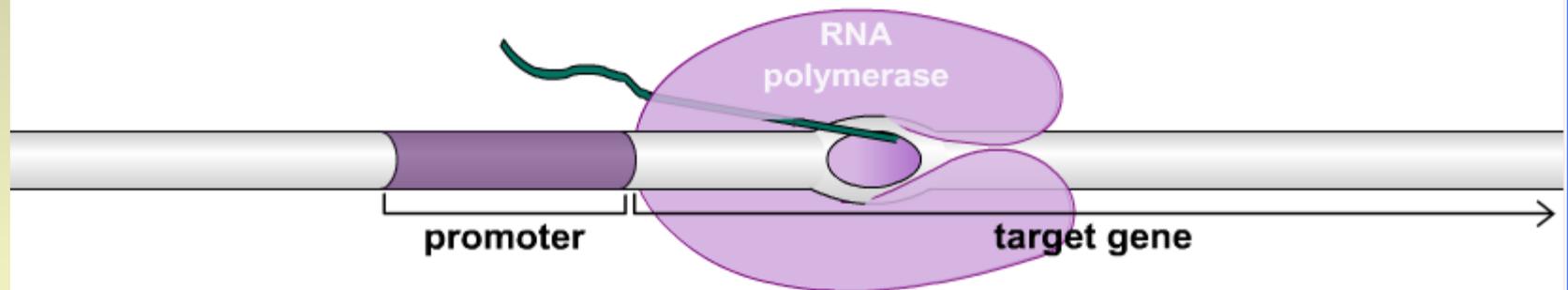
# E. Coli possiede diversi fattori sigma

Gene	Fattore	Sequenza -35	Separazione	Sequenza -10
<i>rpoD</i>	$\sigma^{70}$	TTGACA	16-18 bp	TATAAT
<i>rpoH</i>	$\sigma^{32}$	CCCTTGAA	13-15 bp	CCCGATNT
<i>rpoN</i>	$\sigma^{54}$	CTGGNA	6 bp	TTGCA
<i>fliA</i>	$\sigma^{28}(\sigma^F)$	CTAAA	15 bp	GCCGATAA
<i>sigH</i>	$\sigma^H$	AGGANPuPu	11-12 bp	GCTGAATCA

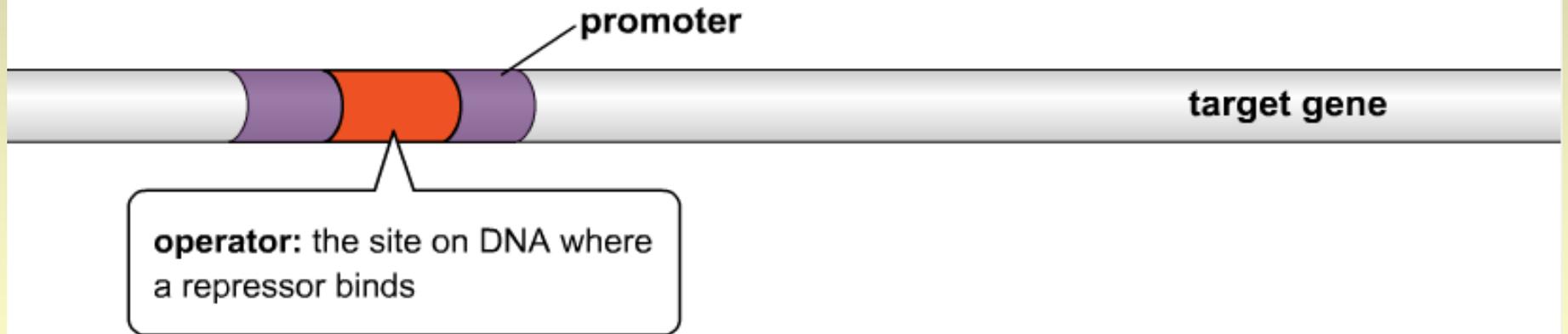
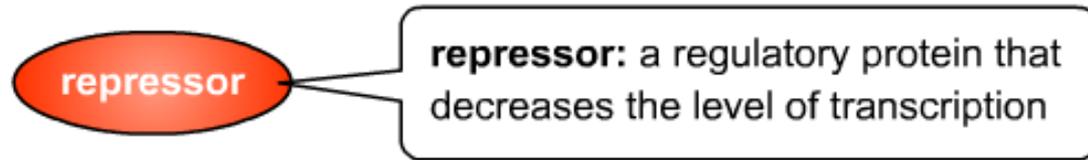
generale  
shock da  
calore  
carenza di  
azoto  
sintesi  
flagellare  
stress  
calore e sali

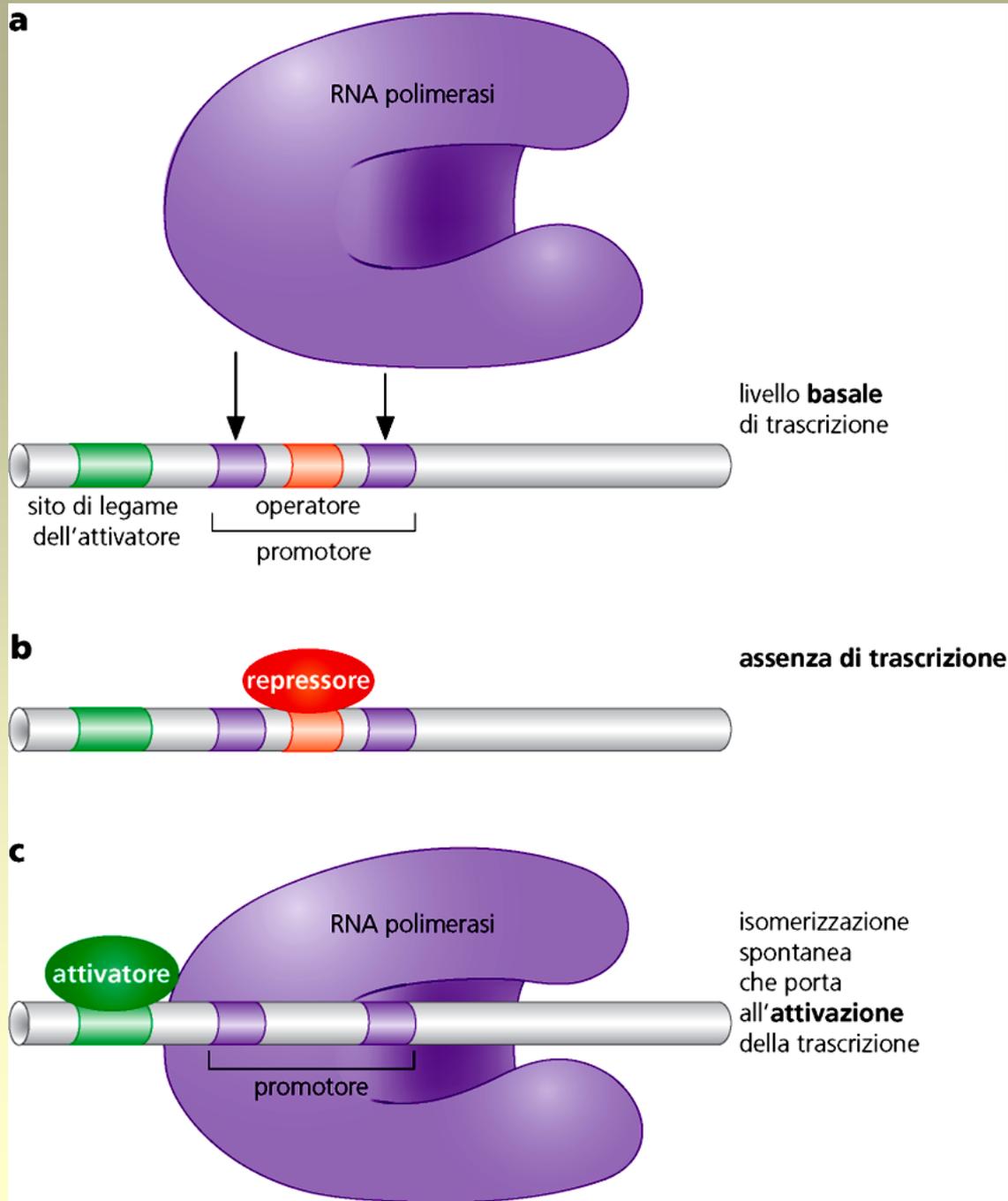
Fattori sigma diversi legano promotori diversi

- ▶ **constitutive expression:** transcription of RNA without the action of regulatory proteins
- ▶ **basal level:** the amount of RNA expressed without the action of regulatory proteins

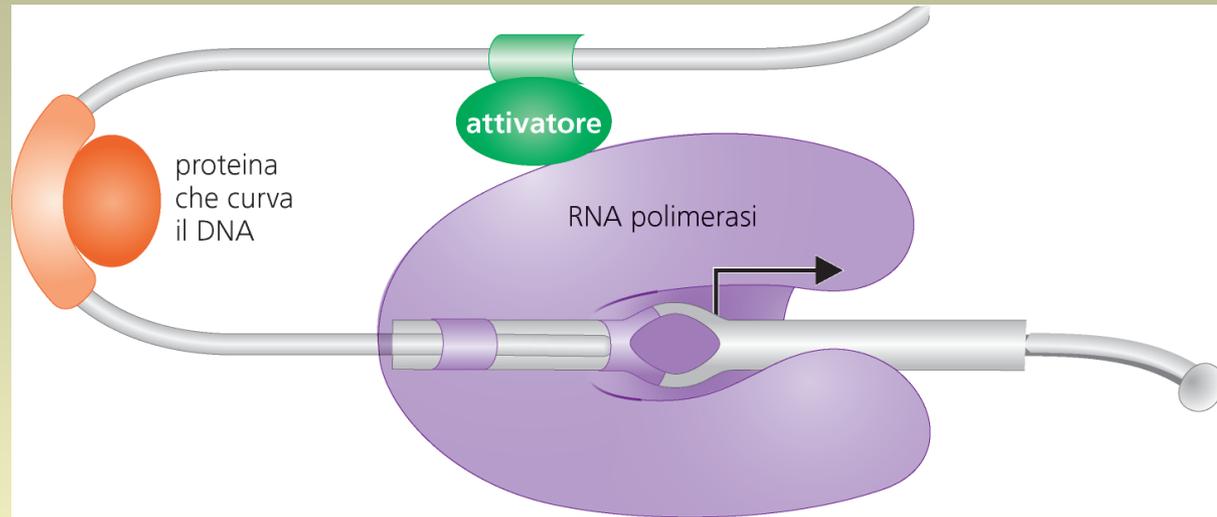
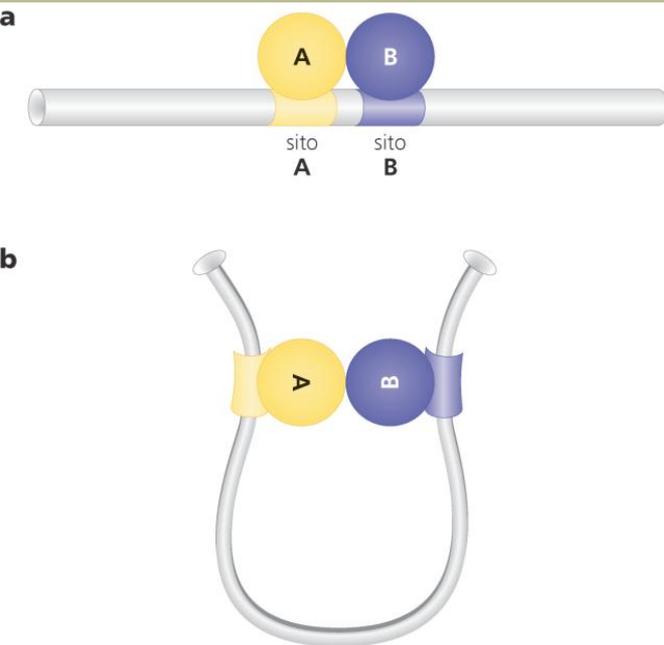


# I repressori



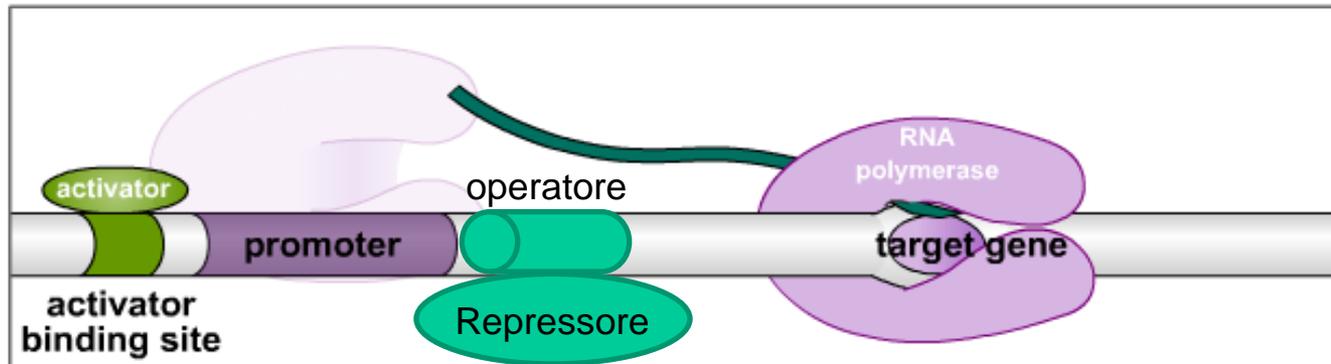


# Interazione tra proteine legate al DNA

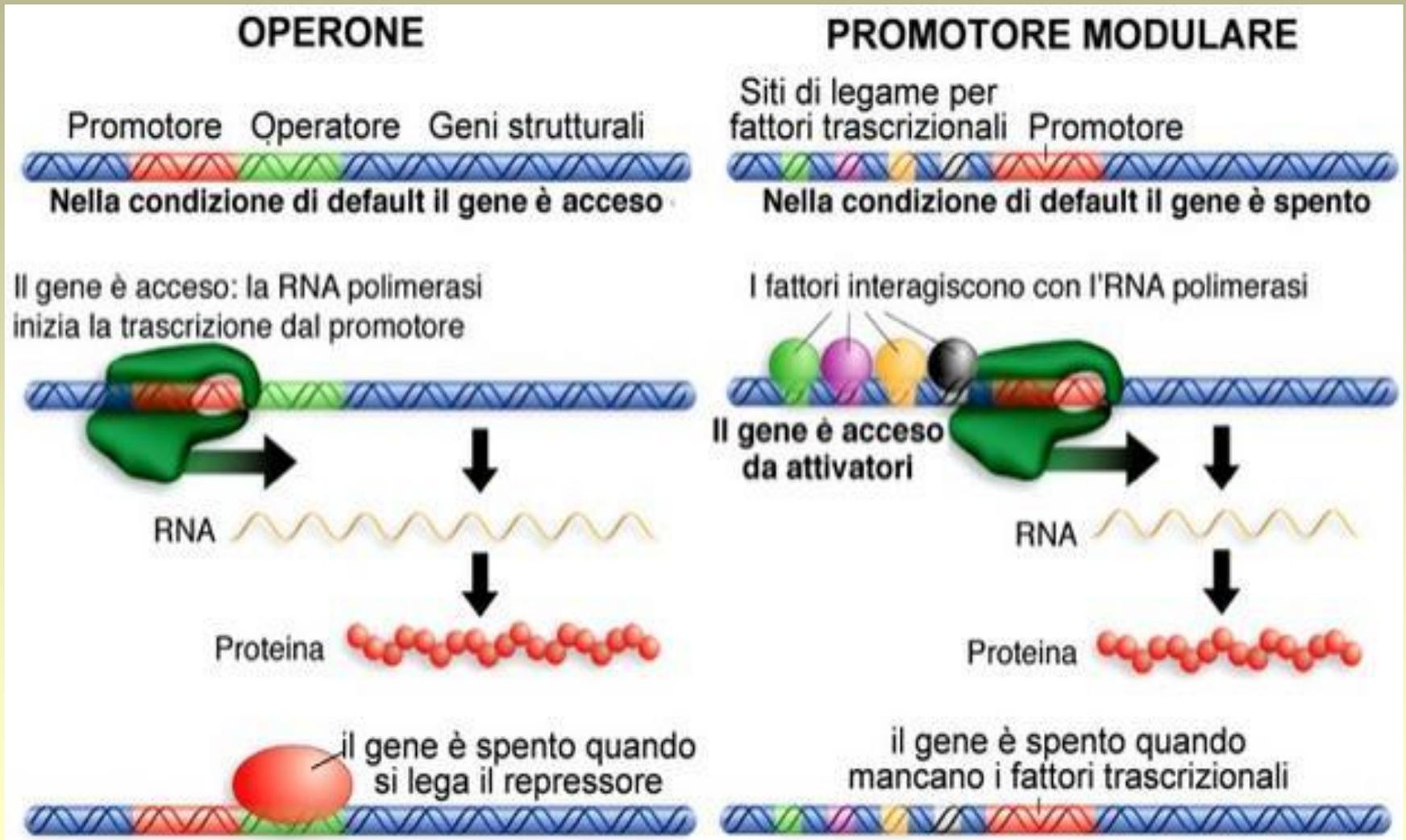


# Repressori e attivatori

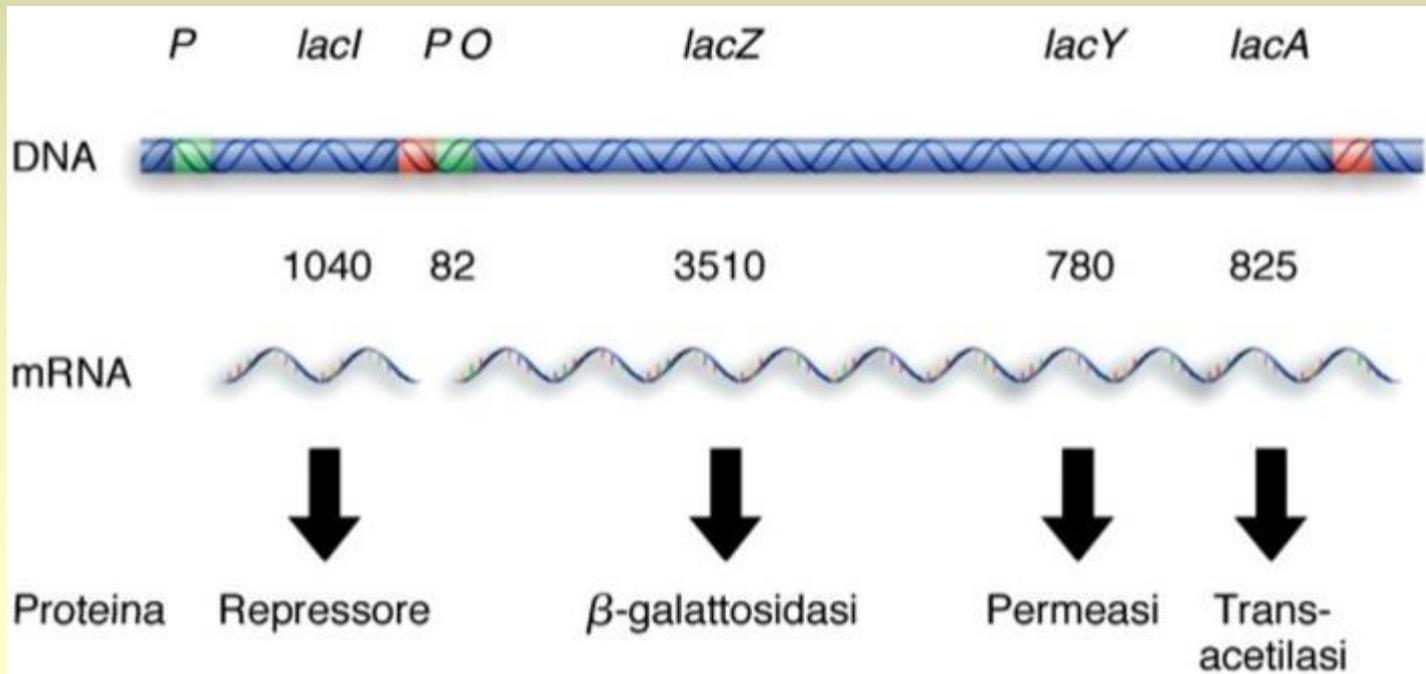
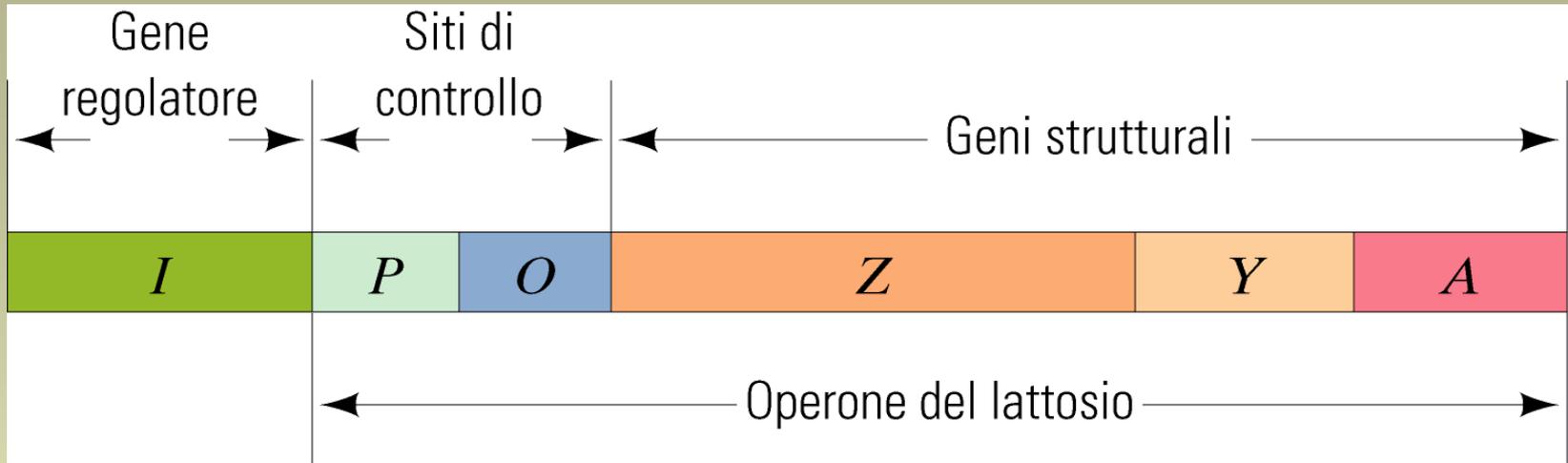
- ▶ In the absence of regulatory proteins, RNA is often expressed at a low, basal level
- ▶ An activator increases the level of transcription
- ▶ Activation can occur by recruitment or by allostery
- ▶ A repressor decreases the level of transcription
- ▶ The site on DNA where a repressor binds is called an operator

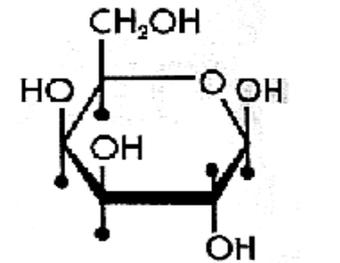
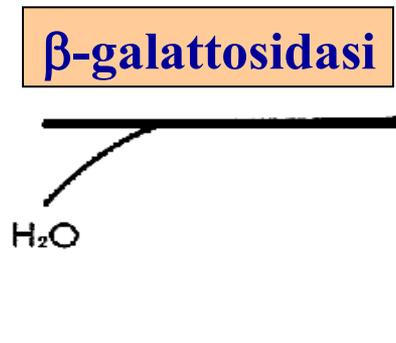
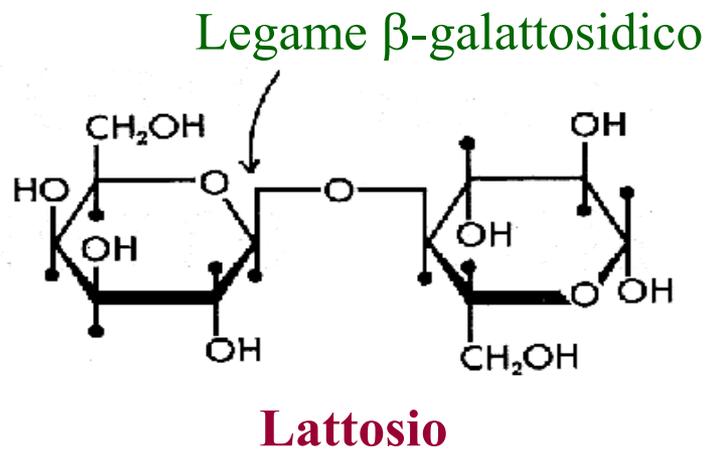


# 2 modelli di regolazione nei procarioti: negativa e positiva

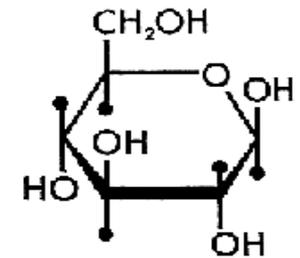


1961 Jacob e Monod proposero l'ipotesi dell'operoneRNA policistronico (Nobel 1965)





**Galattosio**



**Glucosio**

# L'espressione di *lac* risponde all'induttore

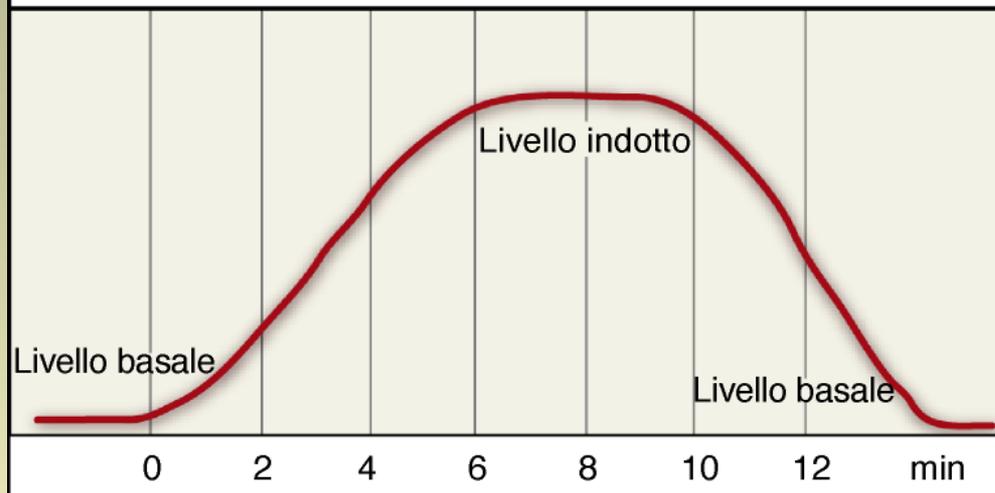
Aggiunta dell'induttore



Rimozione dell'induttore

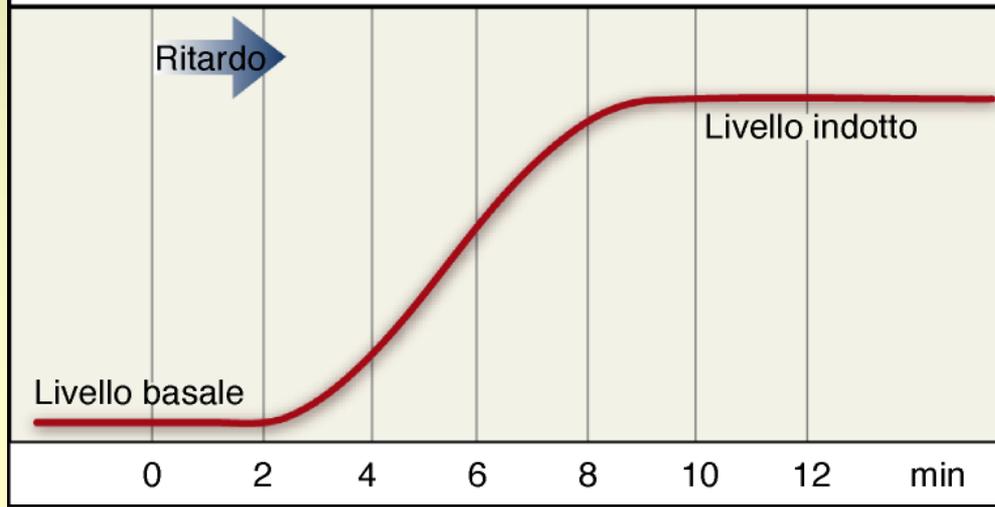


Livello di mRNA *lac*

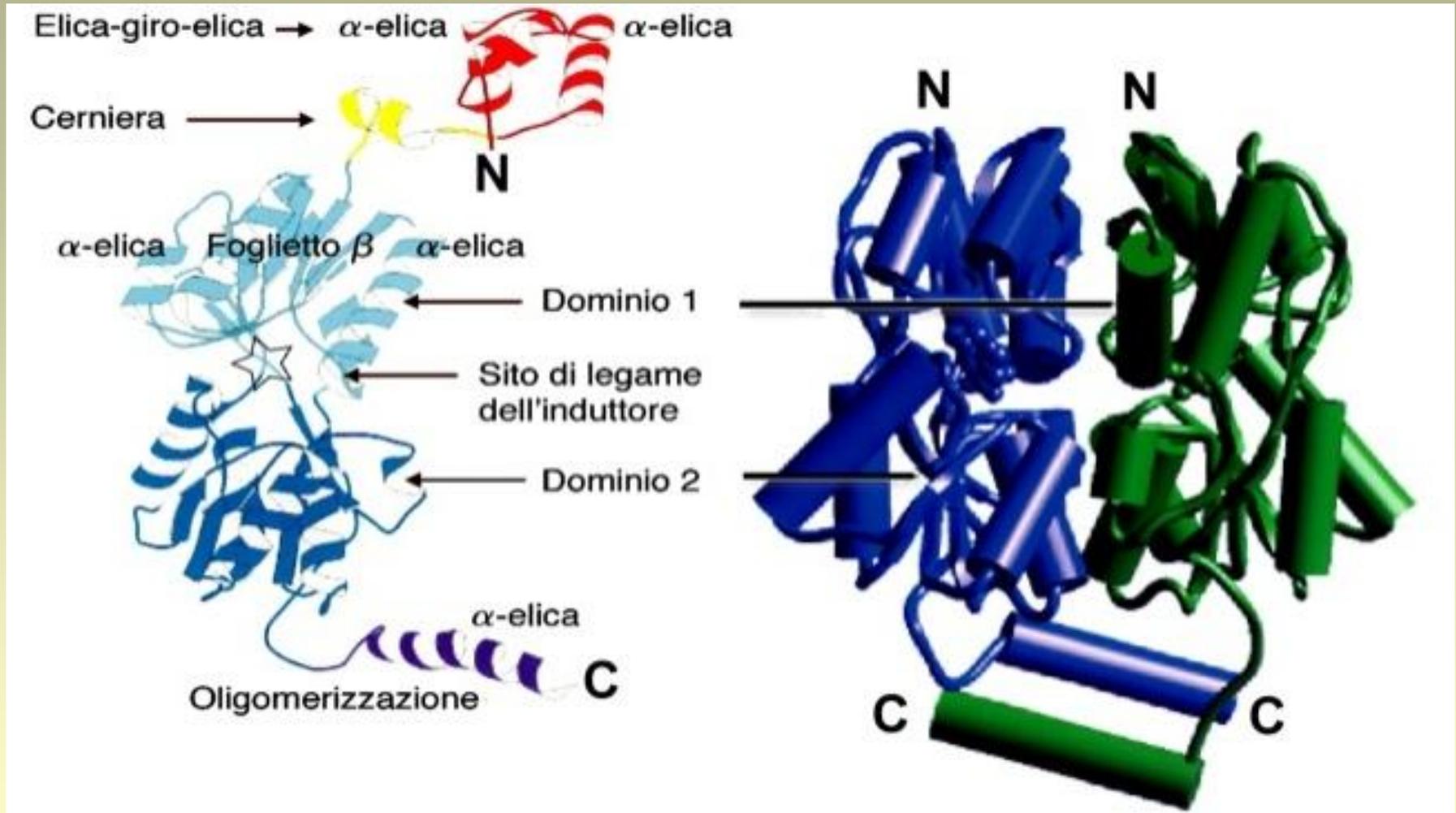


Induttore = allolattosio

Livello di  $\beta$ -galattosidasi

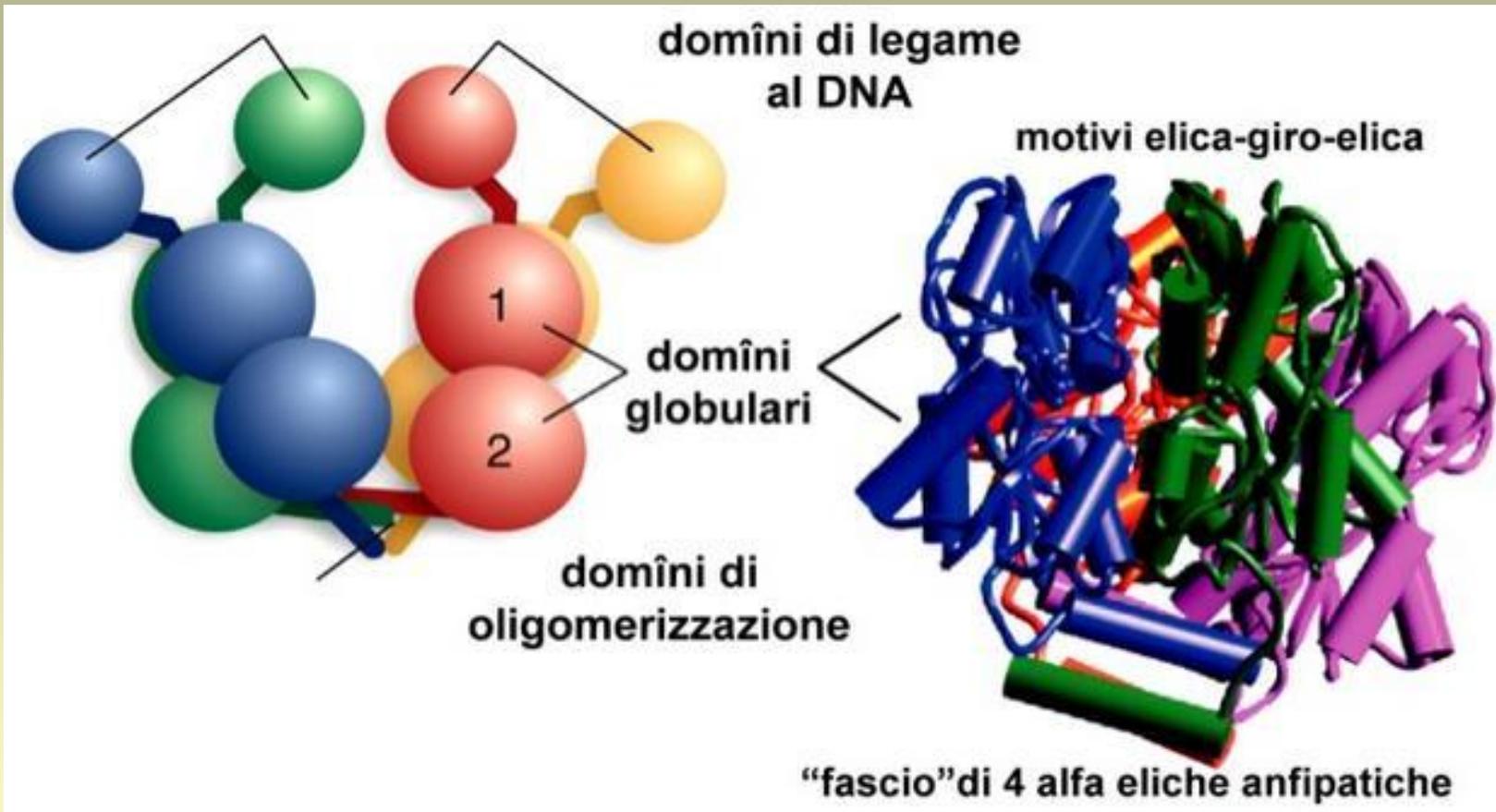


# Controllo negativo dell'operone del lattosio



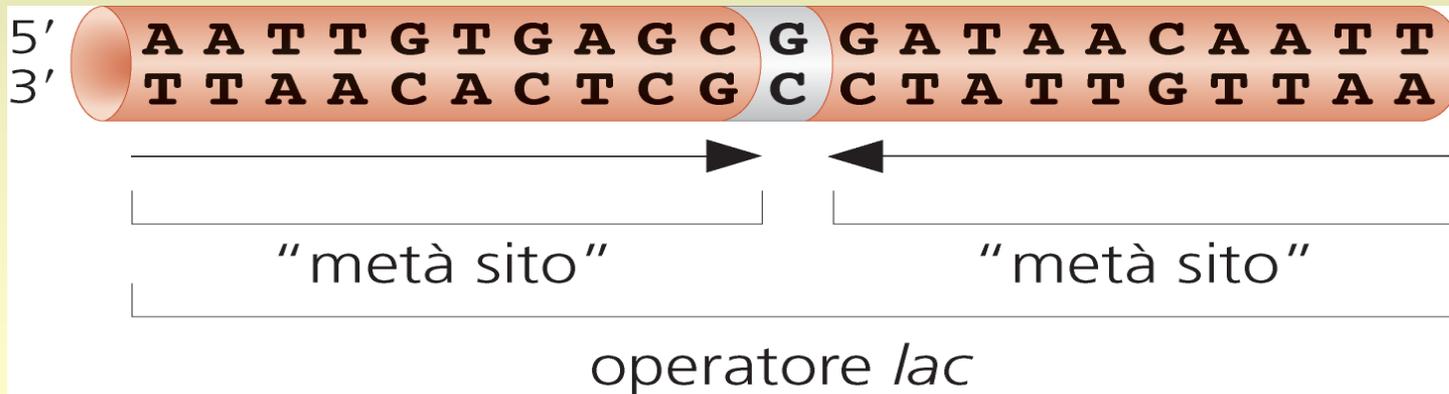
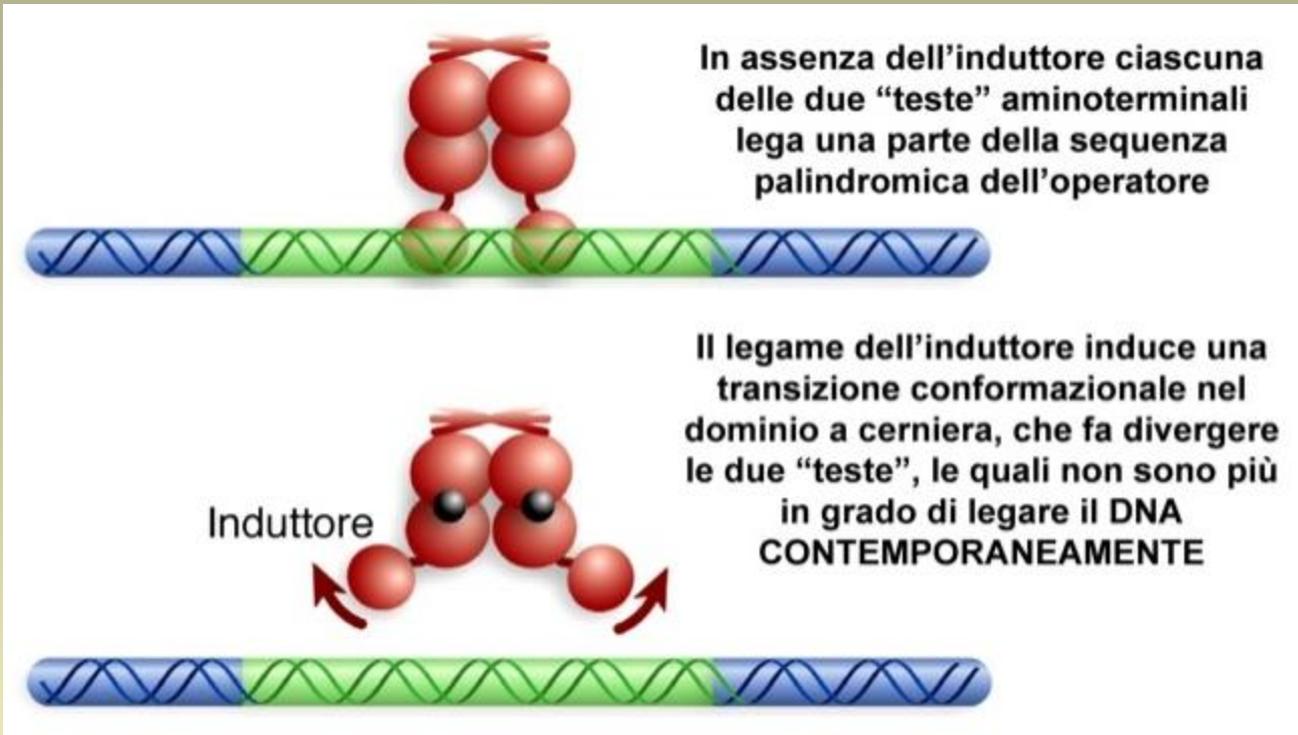
monomero e dimero del repressore Lac

# Controllo negativo dell'operone del lattosio



Struttura del tetramero lac R

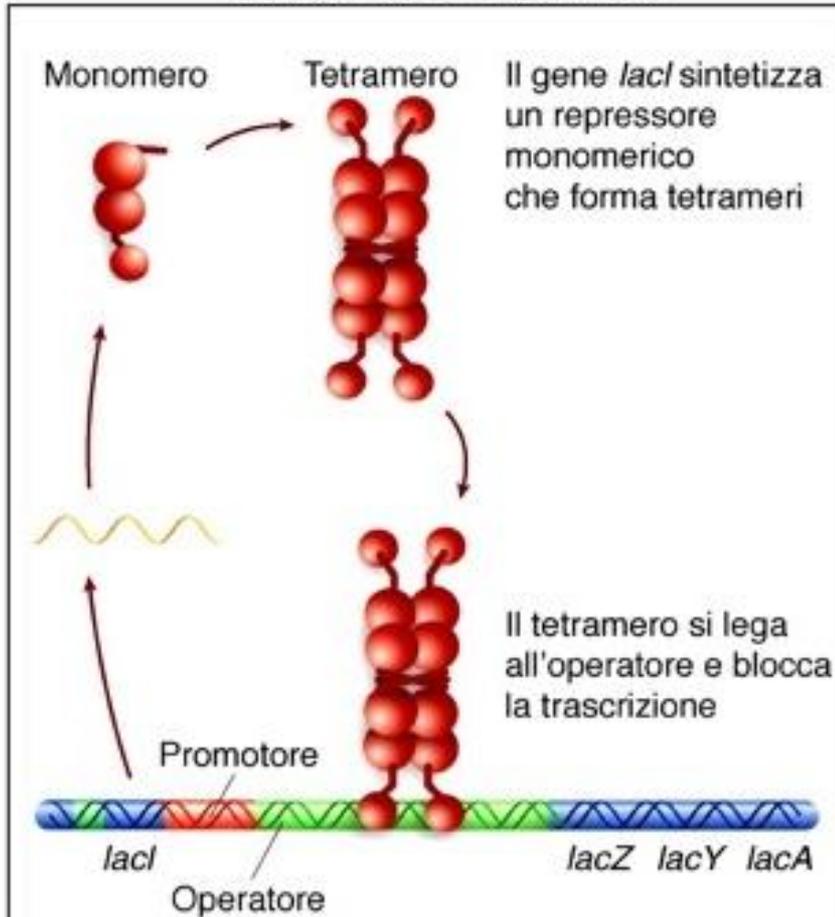
# Controllo negativo dell'operone del lattosio



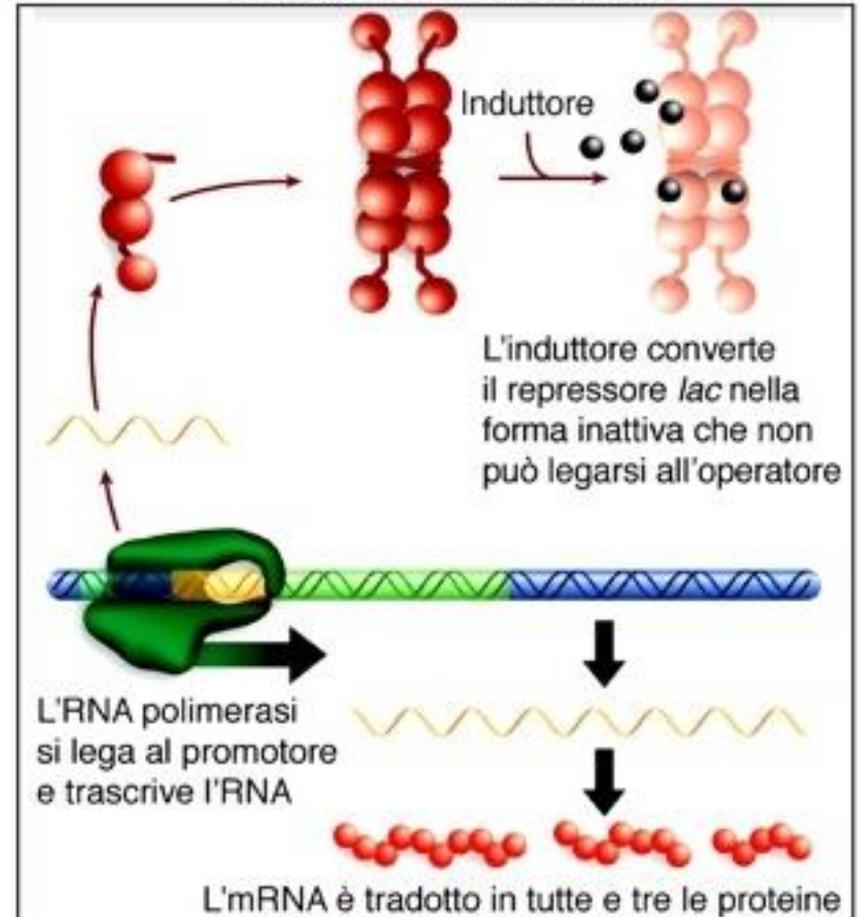
Legame dell'induttore

# Controllo negativo dell'operone del lattosio

## Assenza di lattosio



## Presenza di lattosio

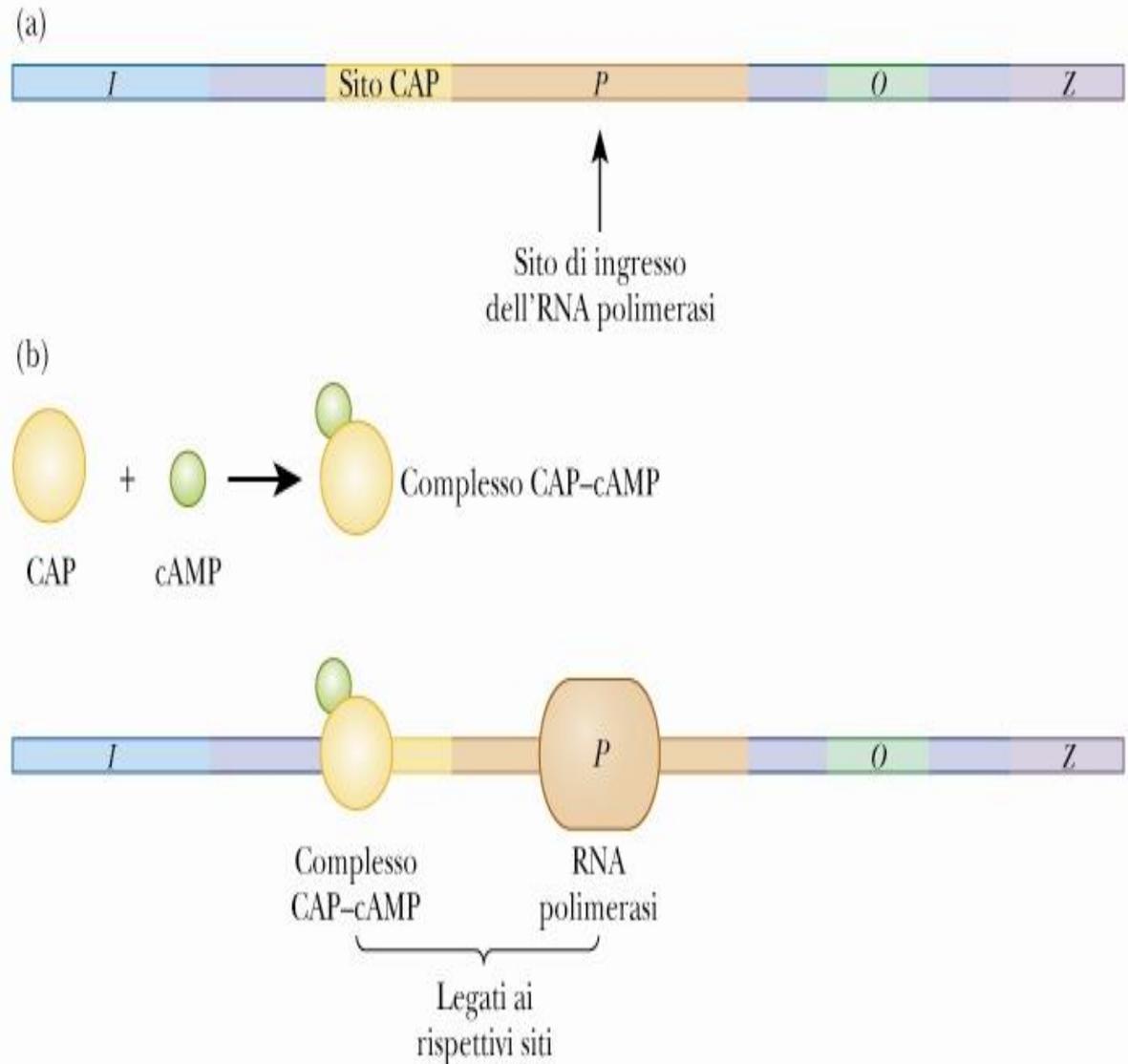


## Il repressore lac si lega al DNA con specificità diversa

DNA	Repressore	Repressore + induttore
Operatore	$2 \times 10^{13}$	$2 \times 10^{10}$
Altro DNA	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6$
Specificità	$10^7$	$10^4$
Operatori legati	96%	3%
L'operone è:	represso	indotto

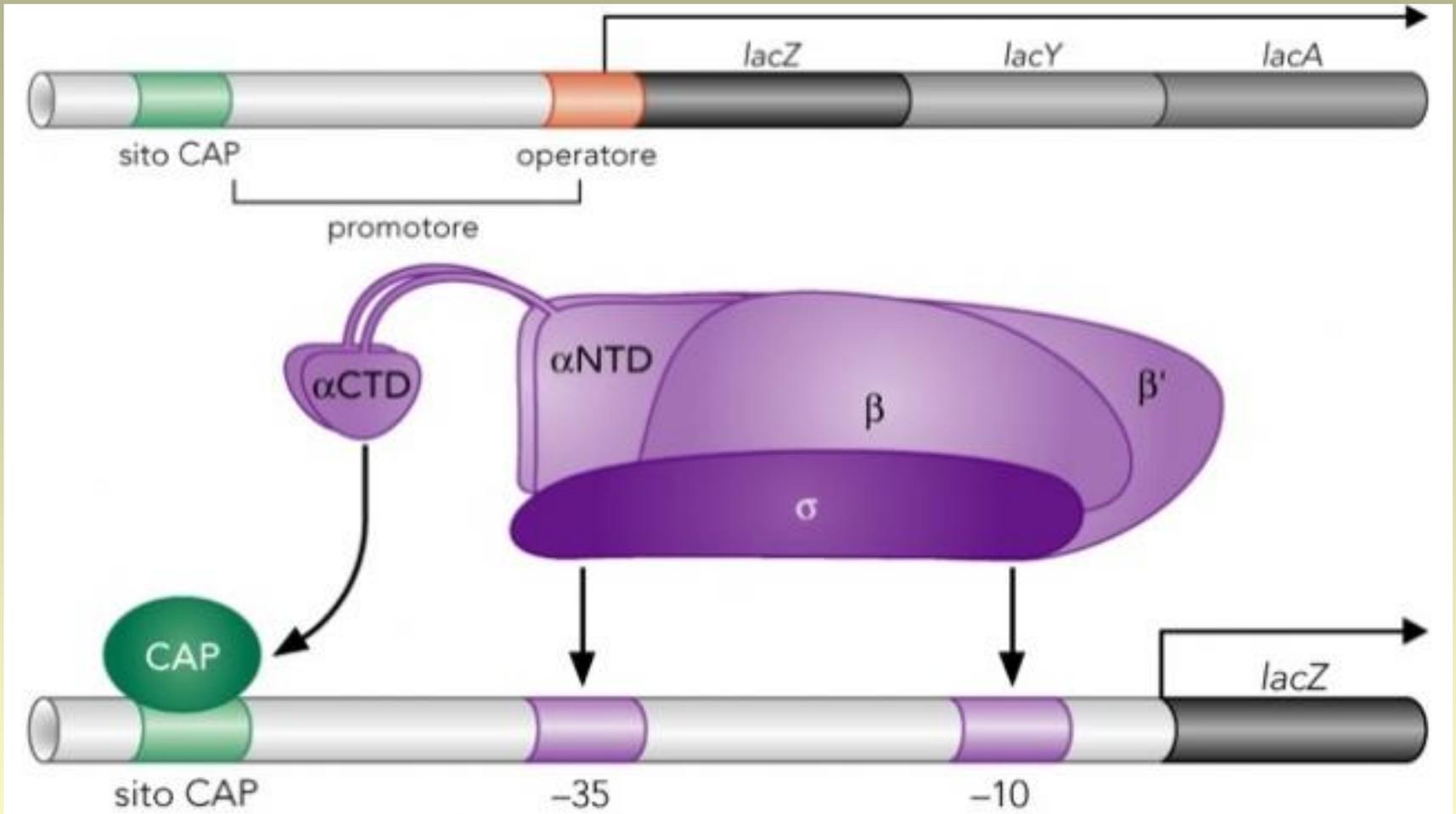
affinità del repressore per il DNA

# Controllo positivo dell'operone del lattosio



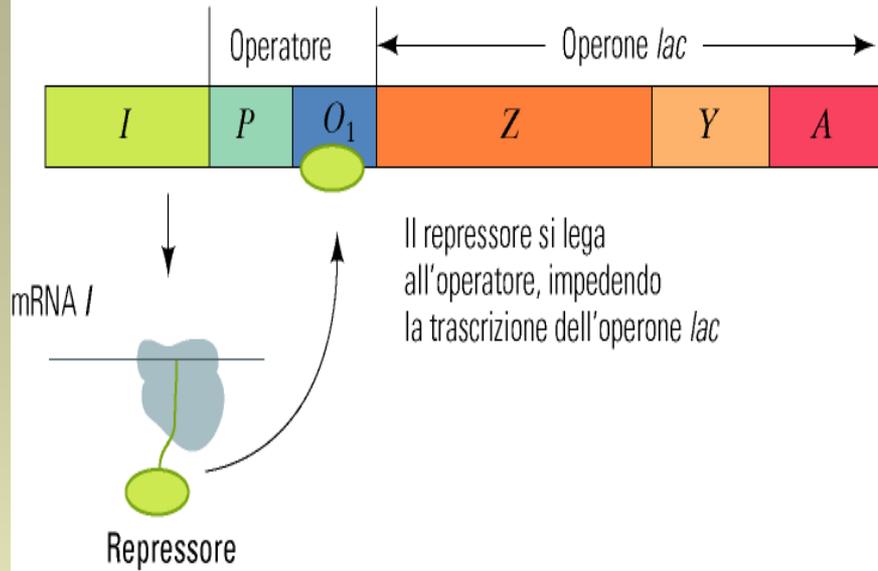
**FIGURA 11.11** Repressione da catabolita. (a) Siti di controllo dell'operone *lac*. Il complesso CAP-cAMP, non CAP da sola, si lega al sito CAP del promotore *lac*. Quando il sito CAP sul promotore non è occupato, l'RNA polimerasi non si lega. (b) In assenza di glucosio, il cAMP forma un complesso con CAP. Il complesso si lega al sito CAP, permettendo all'RNA polimerasi di legarsi al sito di ingresso sul promotore e di trascrivere i geni strutturali.

# Controllo positivo dell'operone del lattosio

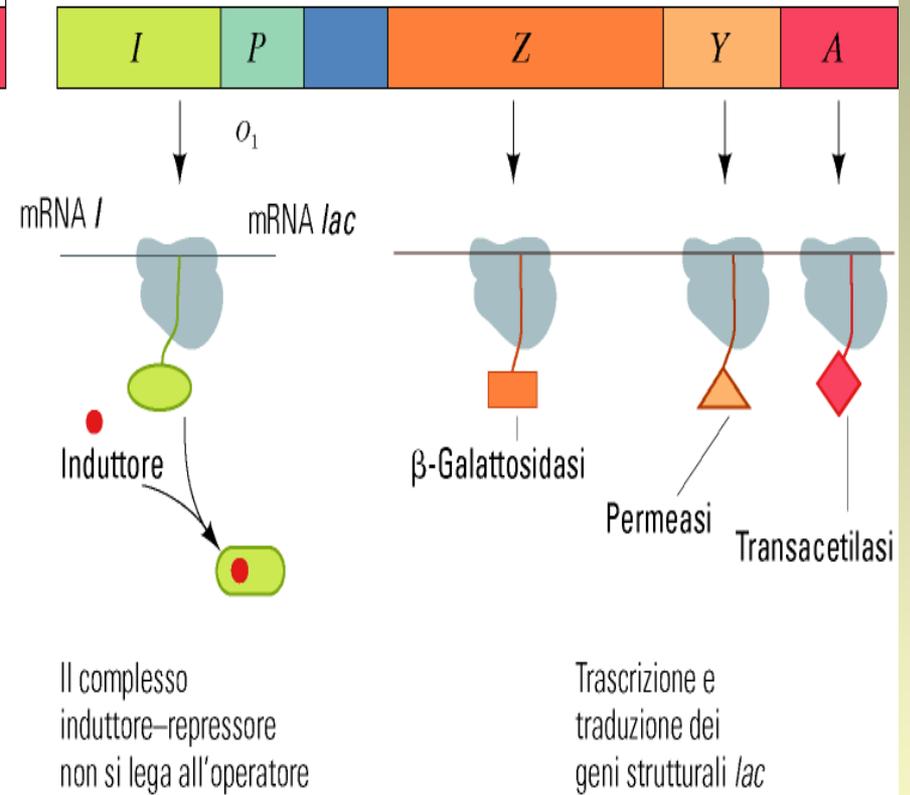


Cap aumenta la forza del promotore

(a) Assenza di induttore

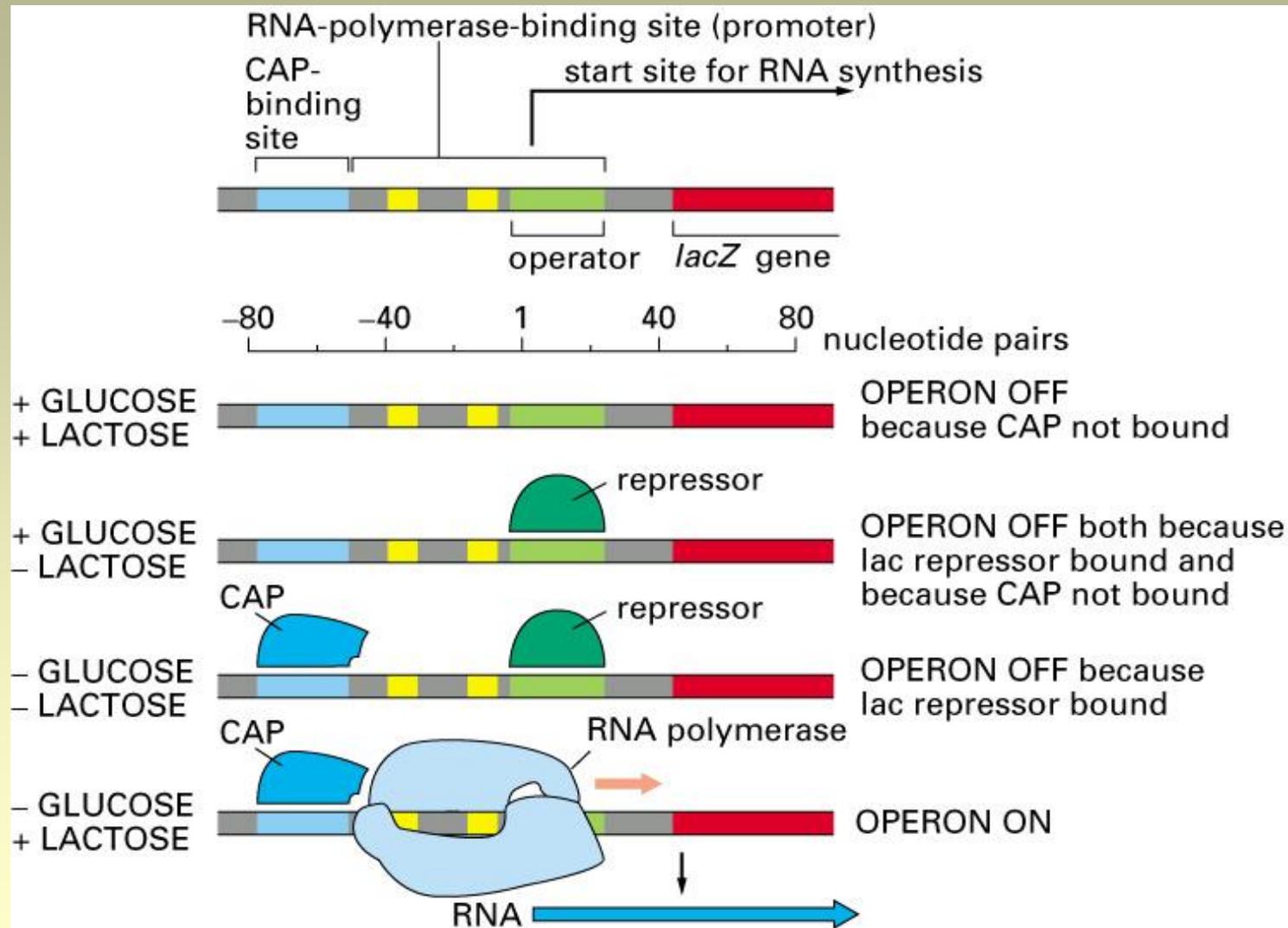


(b) Presenza di induttore

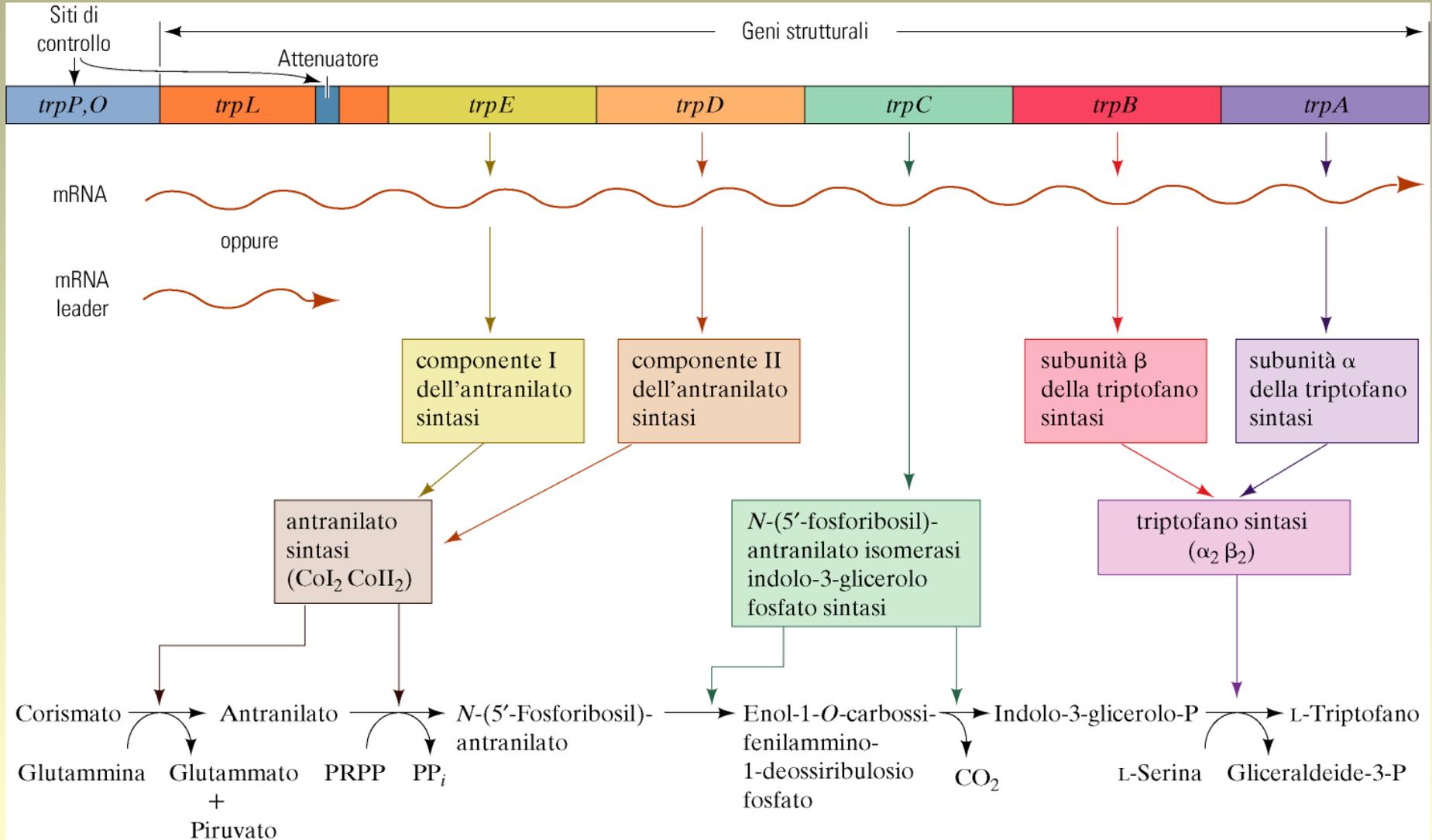


# Combinatory Regulation of Lac Operon

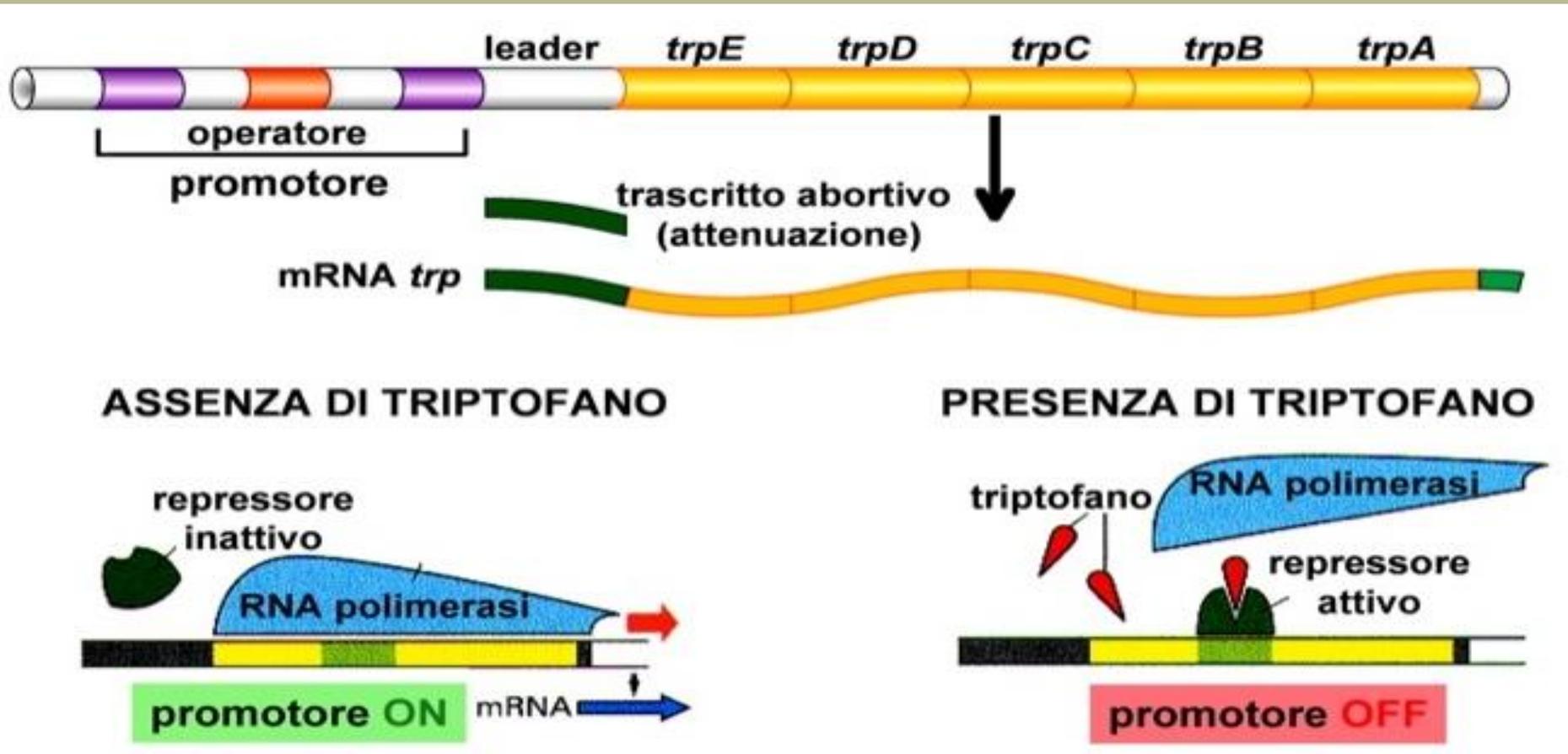
CAP: catabolite activator protein; breakdown of lactose when glucose is low and lactose is present



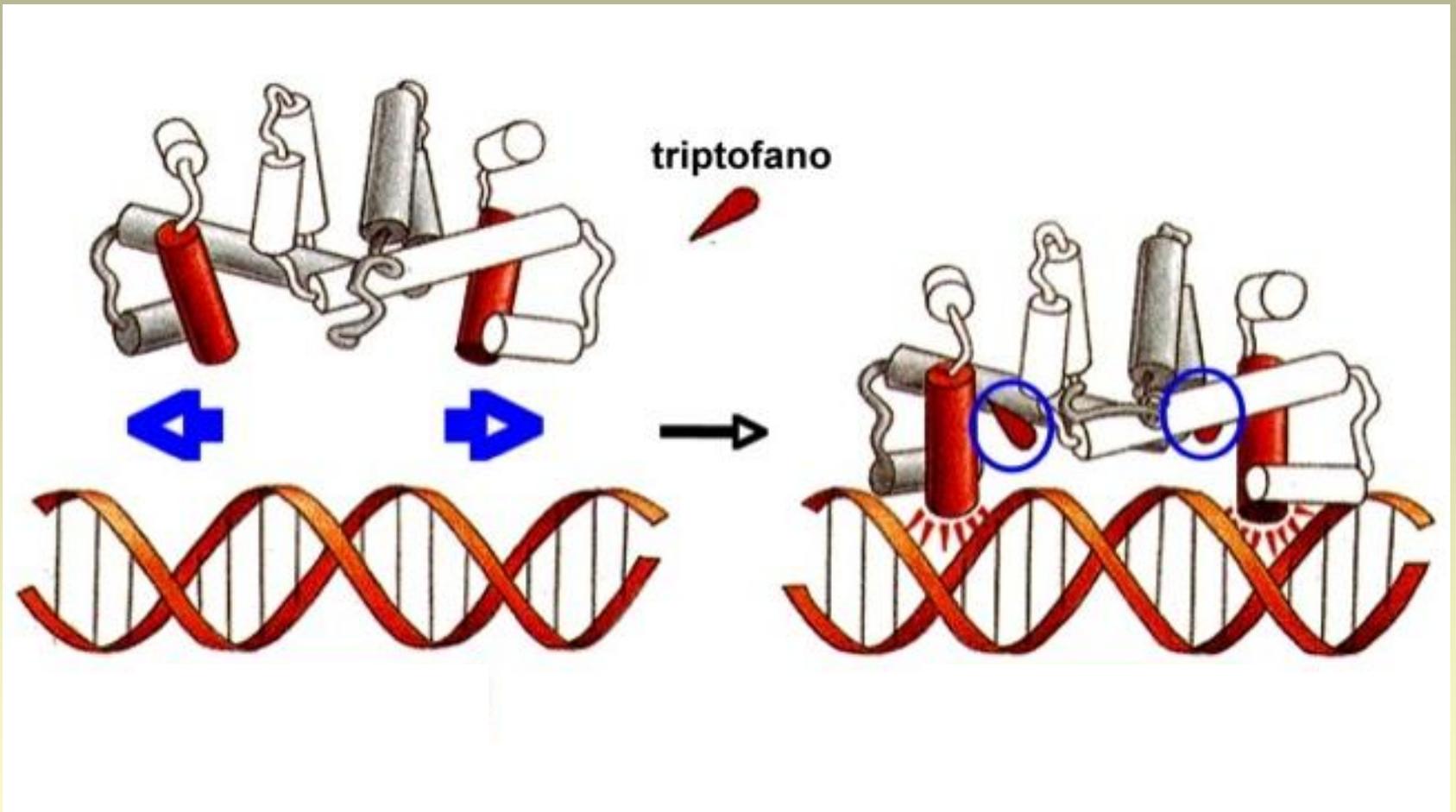
# Operone del triptofano



# Operone del triptofano

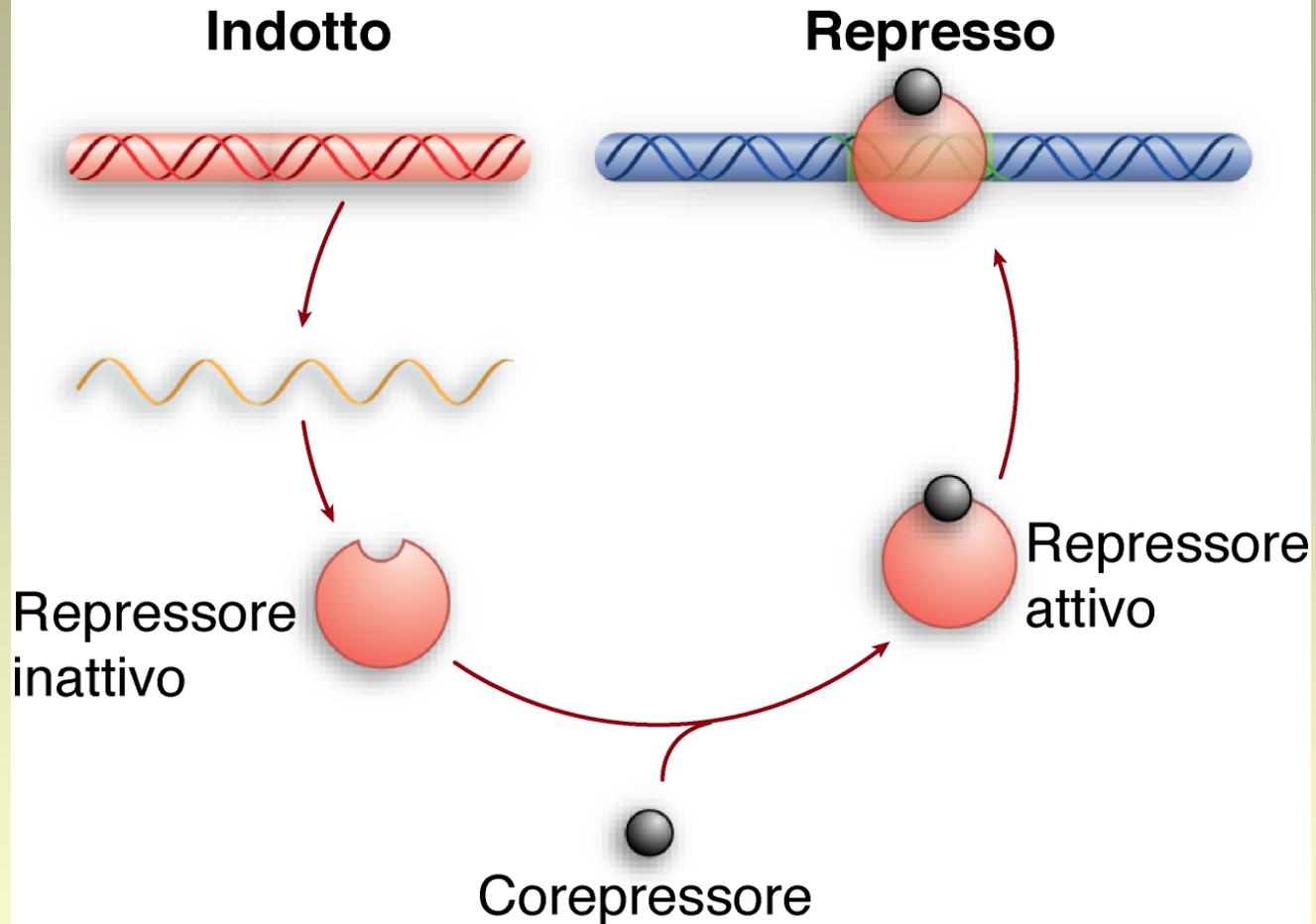


# Il repressore trp



il triptofano agisce da corepressore

# Un corepressore attiva un repressore



# Attenuazione



Attenuazione: meccanismo presente nei geni degli aminoacidi

La trascrizione degli enzimi biosintetici è rallentata se è presente il corrispondente aminoacido

# Attenuazione

## PRESENZA DI TRIPTOFANO



## ASSENZA DI TRIPTOFANO

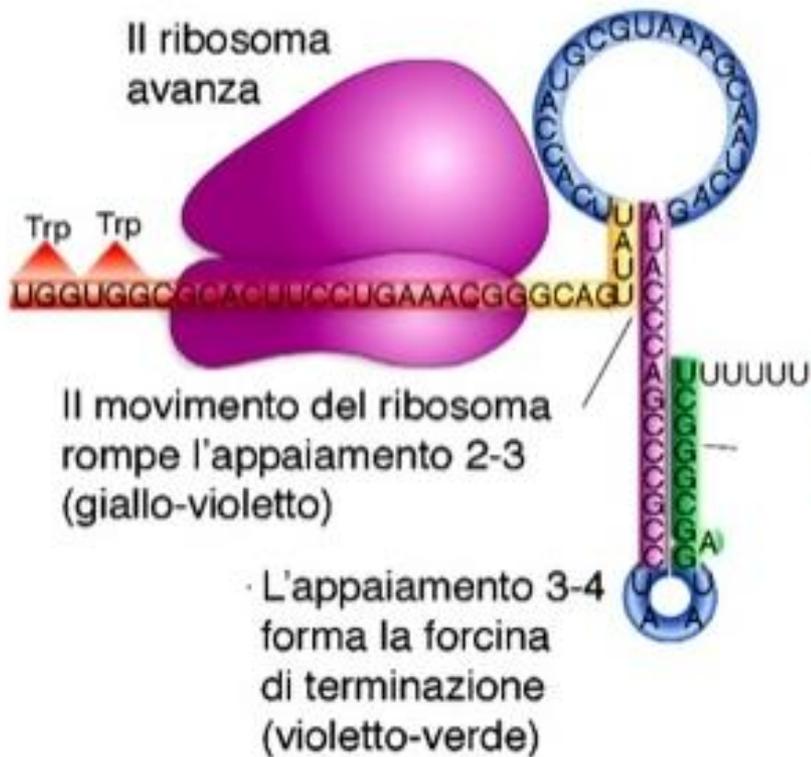


Strutture alternative nella regione leader dell'mRNA trp

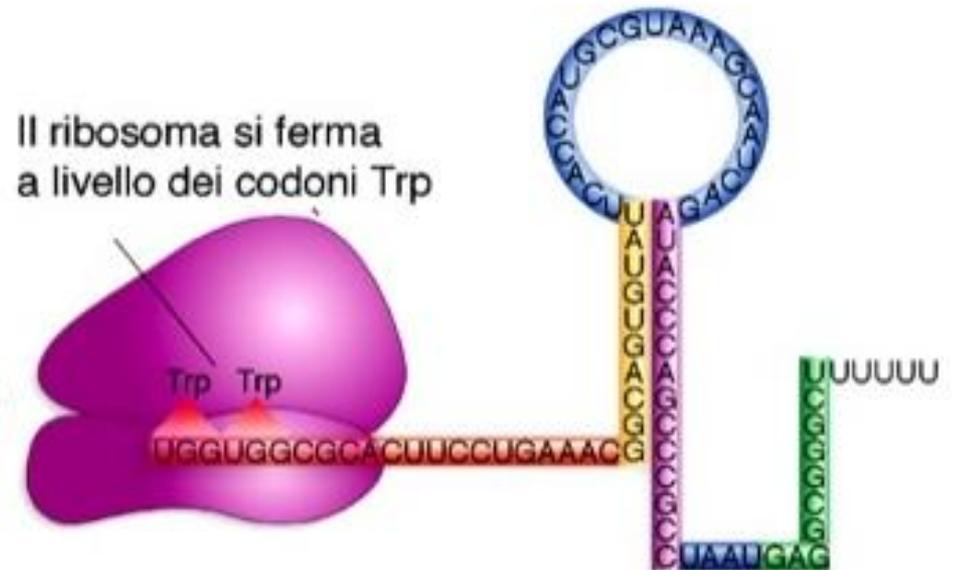
Il trascritto nella regione dell'attenuatore contiene 4 segmenti complementari

# Attenuazione

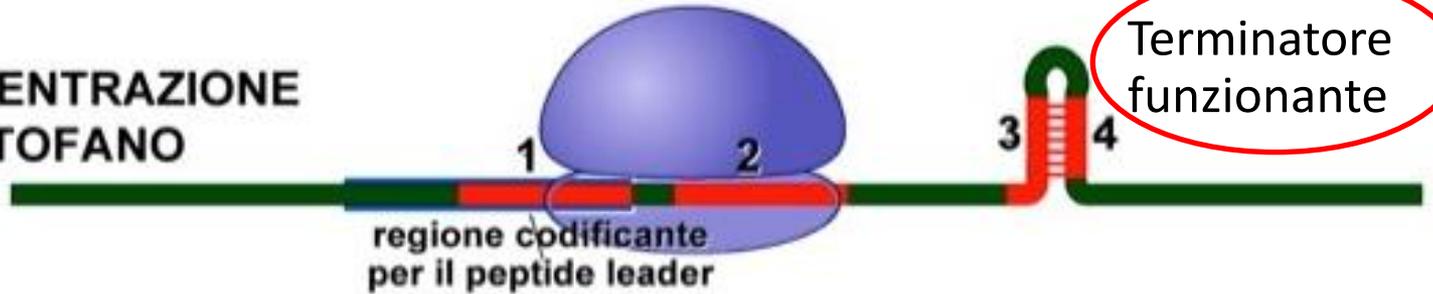
## IN PRESENZA DI TRIPTOFANO



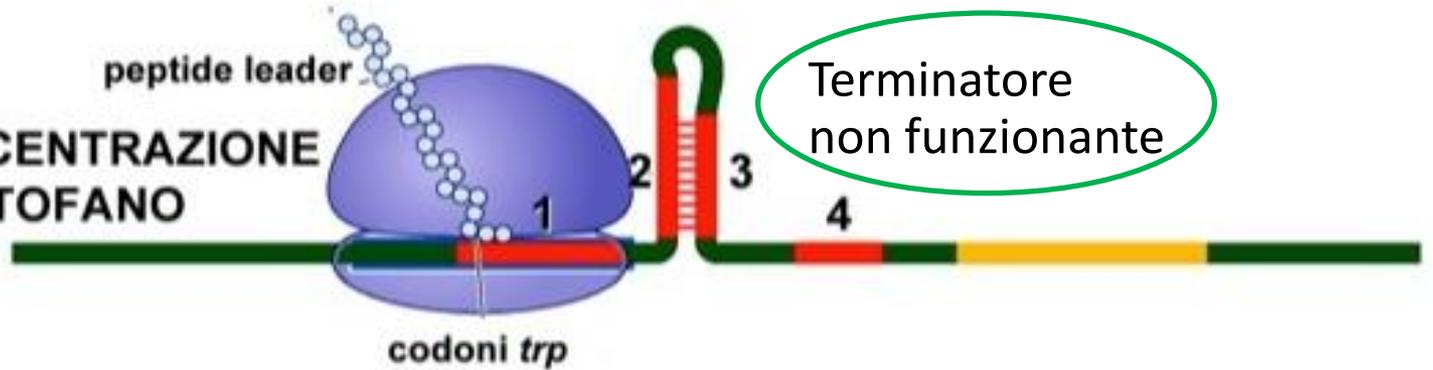
## IN ASSENZA DI TRIPTOFANO



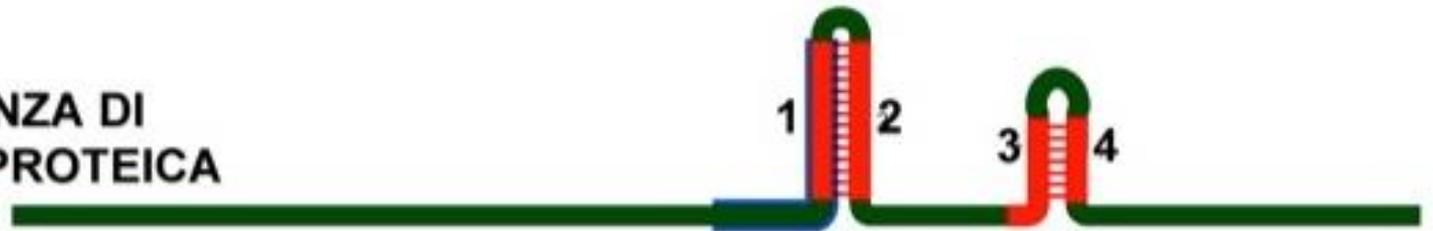
**ALTA CONCENTRAZIONE  
DI TRIPTOFANO**



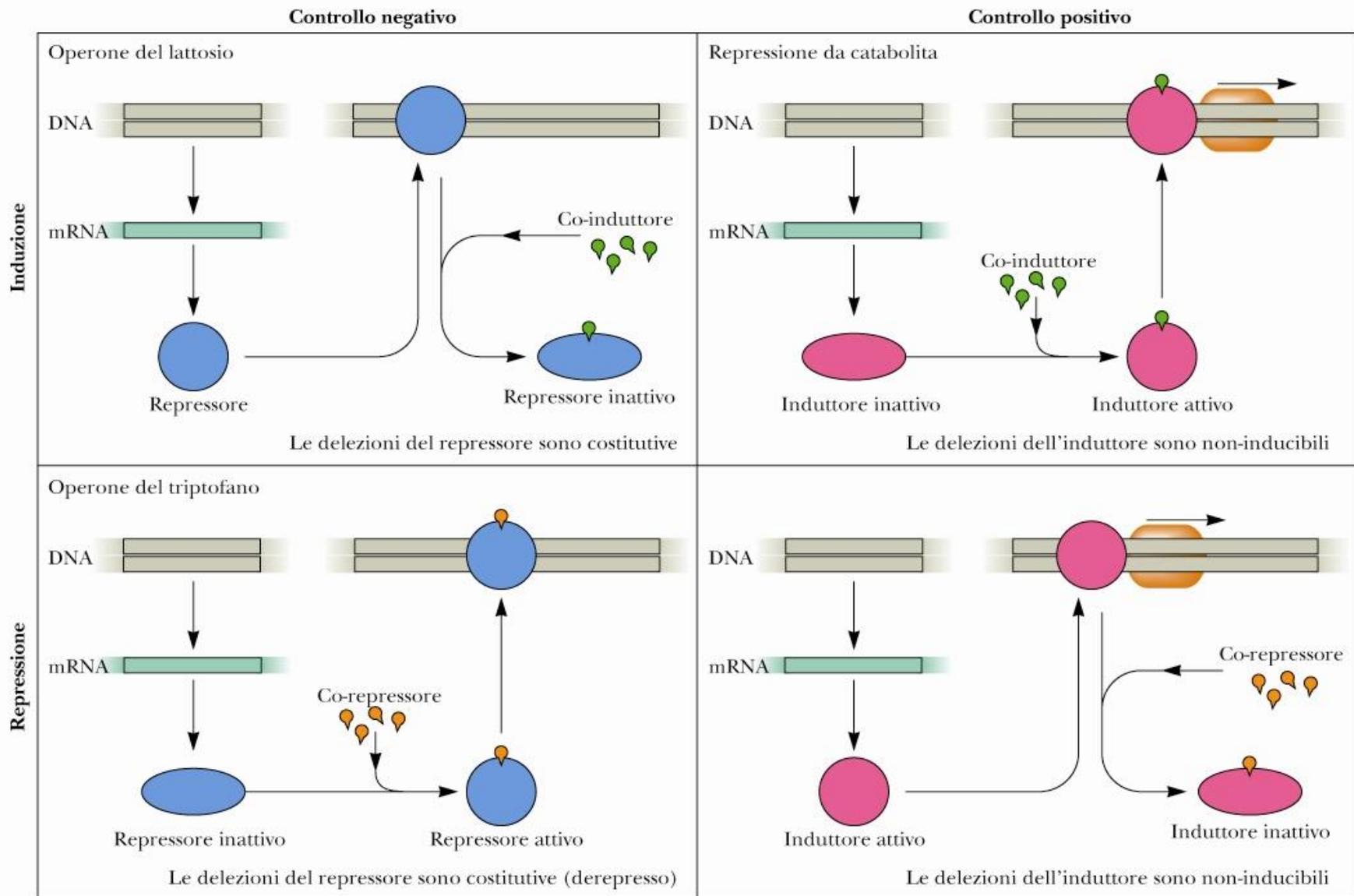
**BASSA CONCENTRAZIONE  
DI TRIPTOFANO**



**ASSENZA DI  
SINTESI PROTEICA**



conseguenze dell'attenuazione



▲ **FIGURA 11.12** Meccanismi fondamentali di controllo operanti nell'espressione dei geni. Questi possono essere inducibili o reprimibili, e controllati positivamente o negativamente.

# Motivi proteici per il legame con il DNA

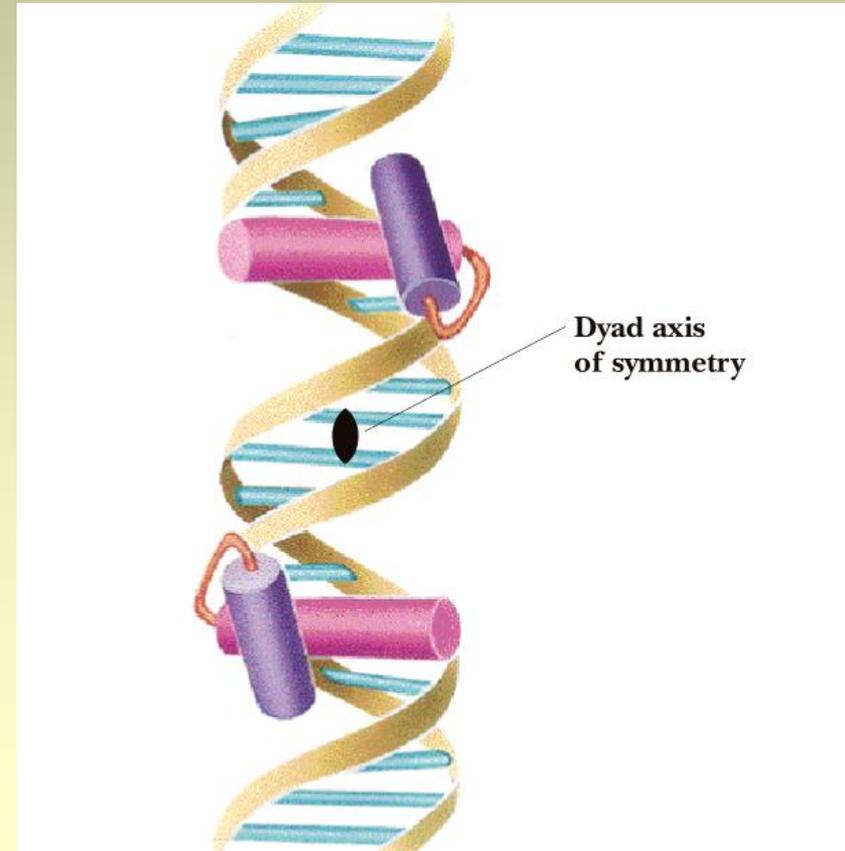
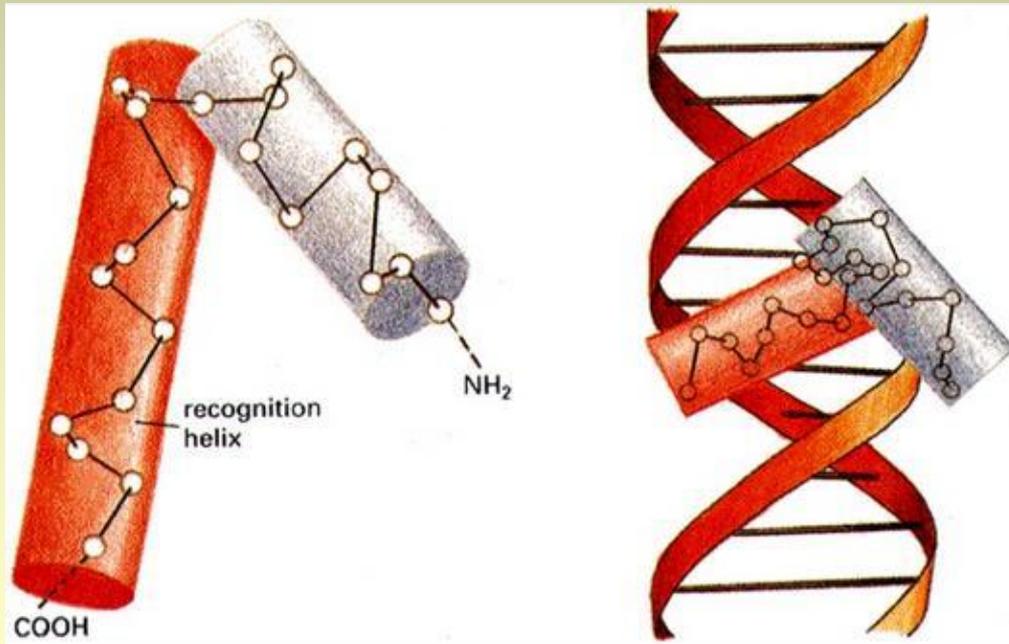
- Fattori di trascrizione
- Attivatori
- Repressori
- Enhancers

# Famiglie di fattori di trascrizione

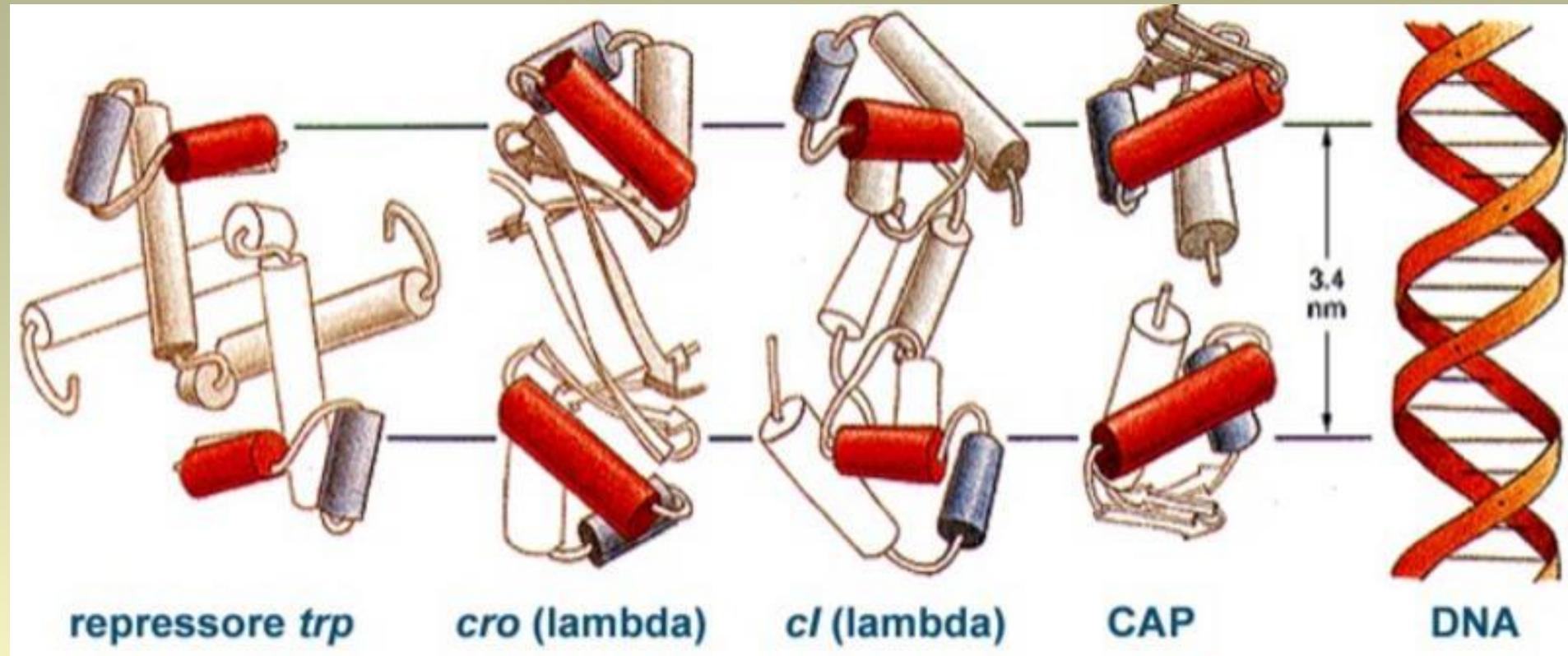
- Elica-giro-elica HLH
- Omeodominio (elica-giro-elica) HTH
- Dita di zinco
- Cerniera di leucina
- Elica-ansa-elica
- Nastro-elica-elica

# Il motivo elica-giro-elica (HTH)

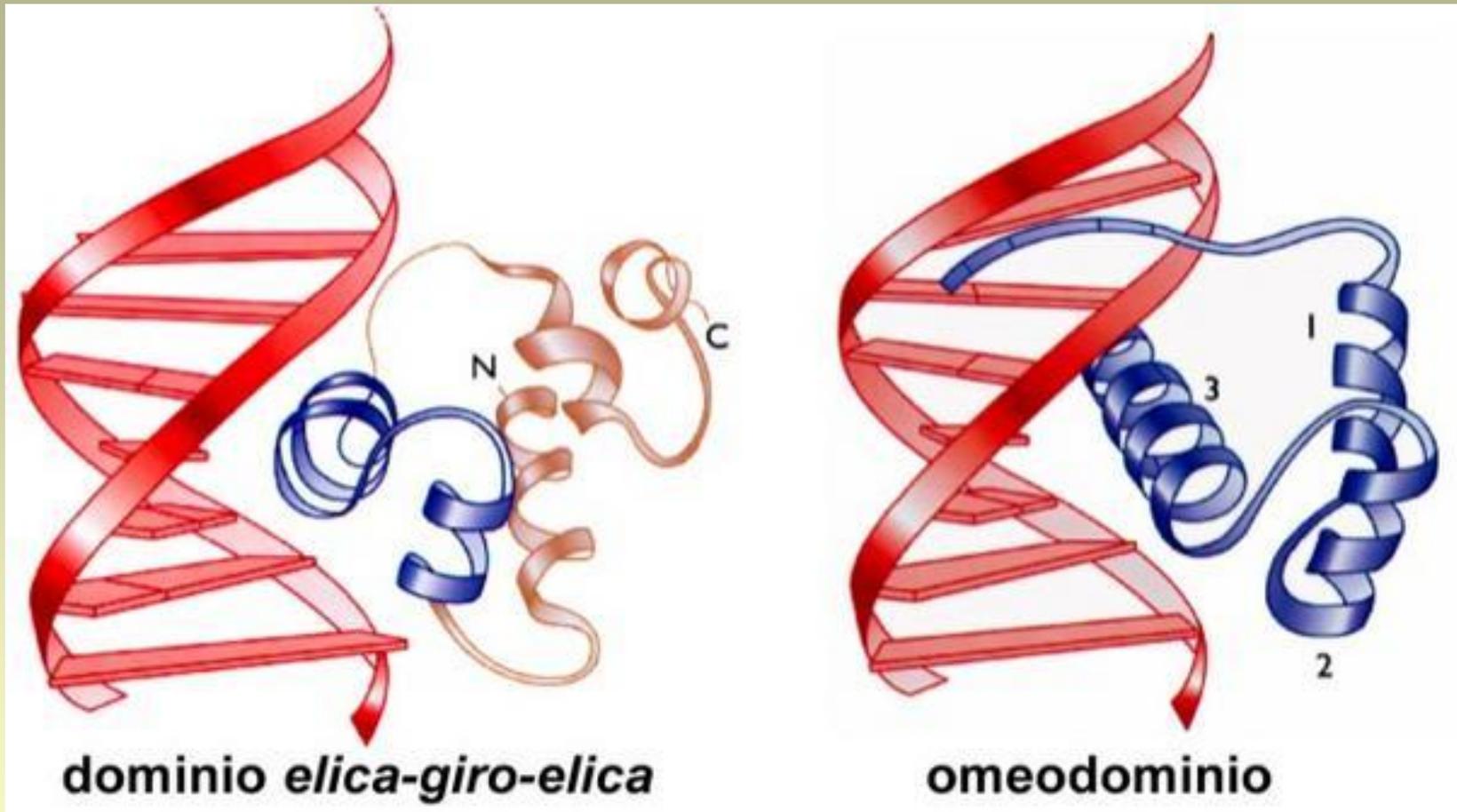
- Costituito da due eliche separate da un breve  $\beta$ -turn
- L'elica C-terminale si inserisce nel solco maggiore del DNA mentre l'elica N-terminale stabilizza il contatto attraverso interazioni idrofobiche con l'elica C-terminale



## Esempi di domini HTH



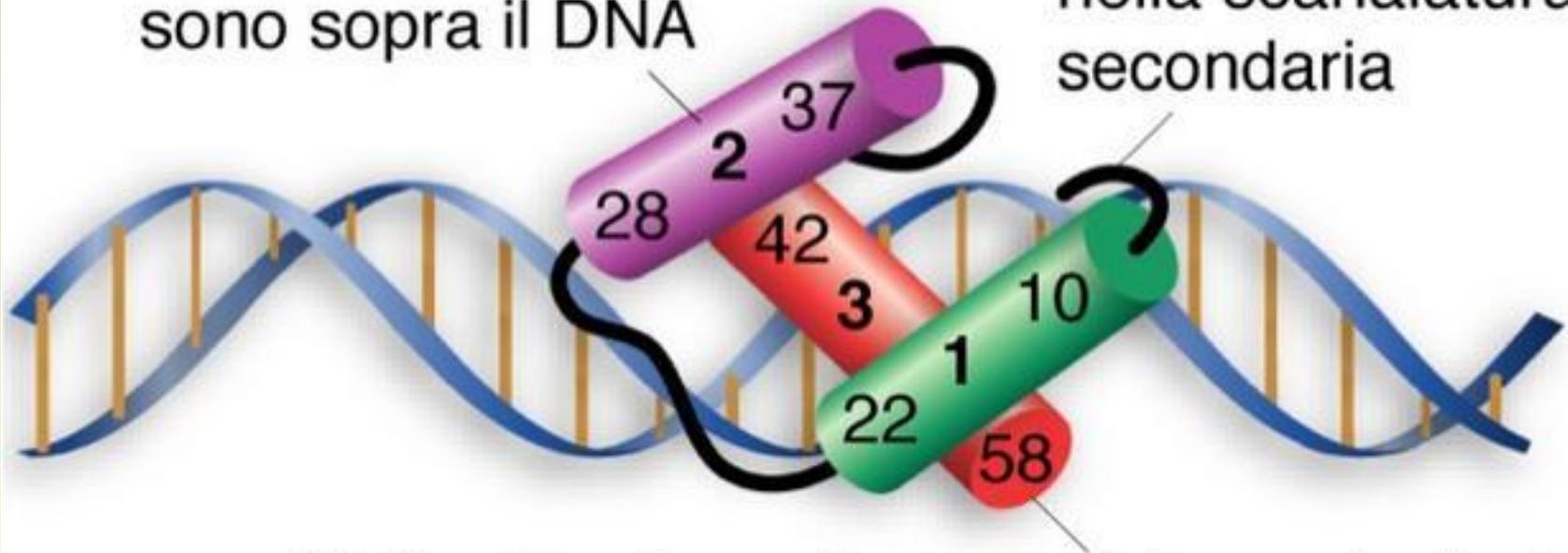
# Variazioni del motivo elica-giro-elica



Omeodominio sotto forma di monomero si lega a geni di sviluppo della drosophila  
L'elica di supporto è più lunga

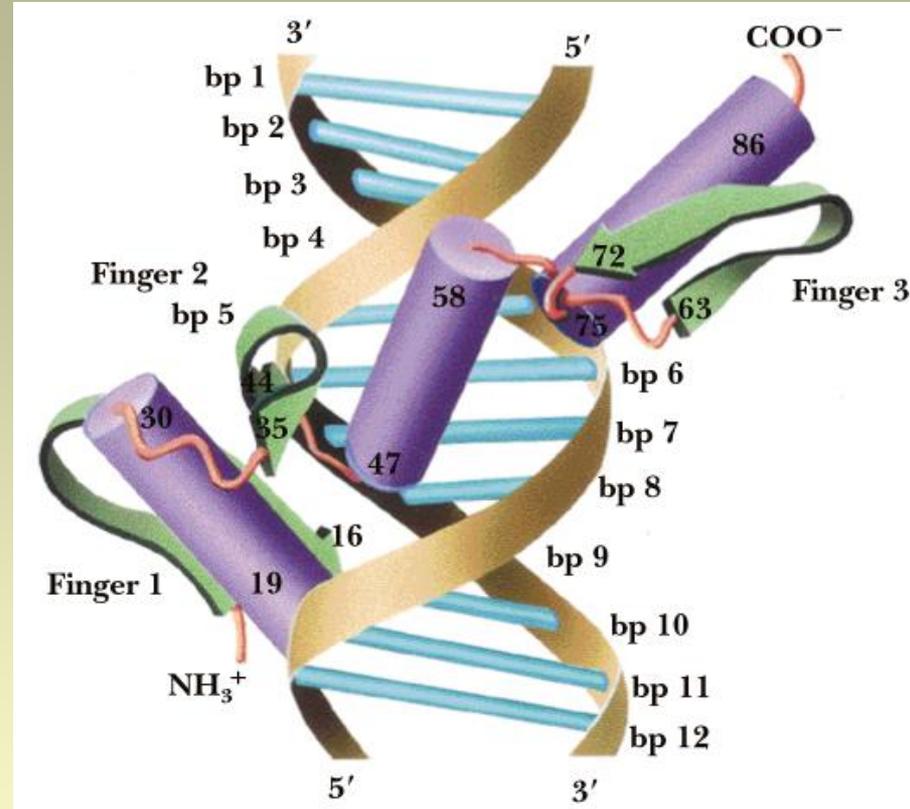
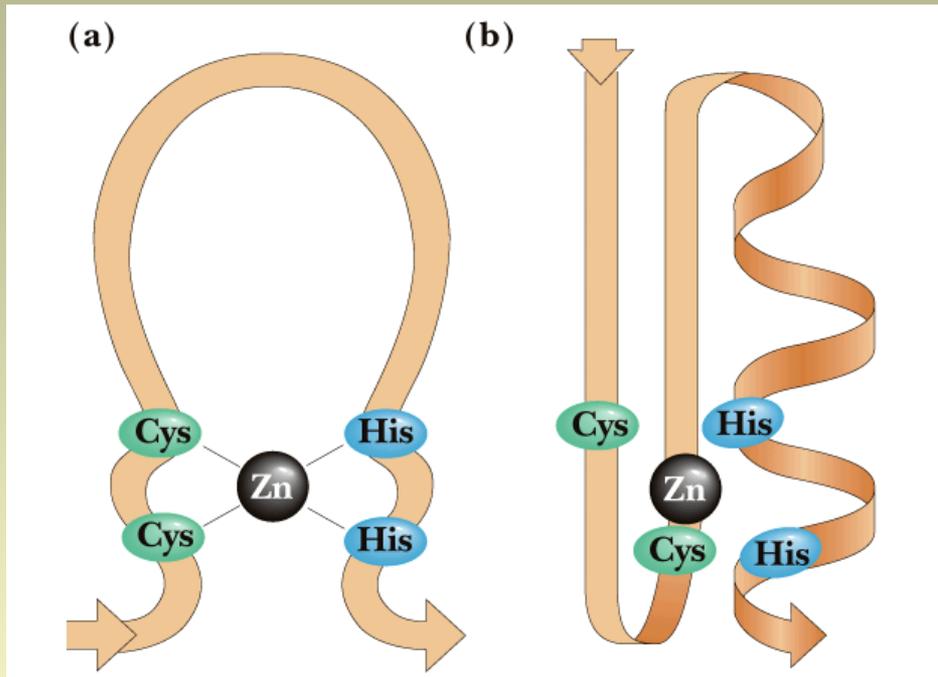
Le eliche 1 e 2  
sono sopra il DNA

Il braccio  
N-terminale entra  
nella scanalatura  
secondaria



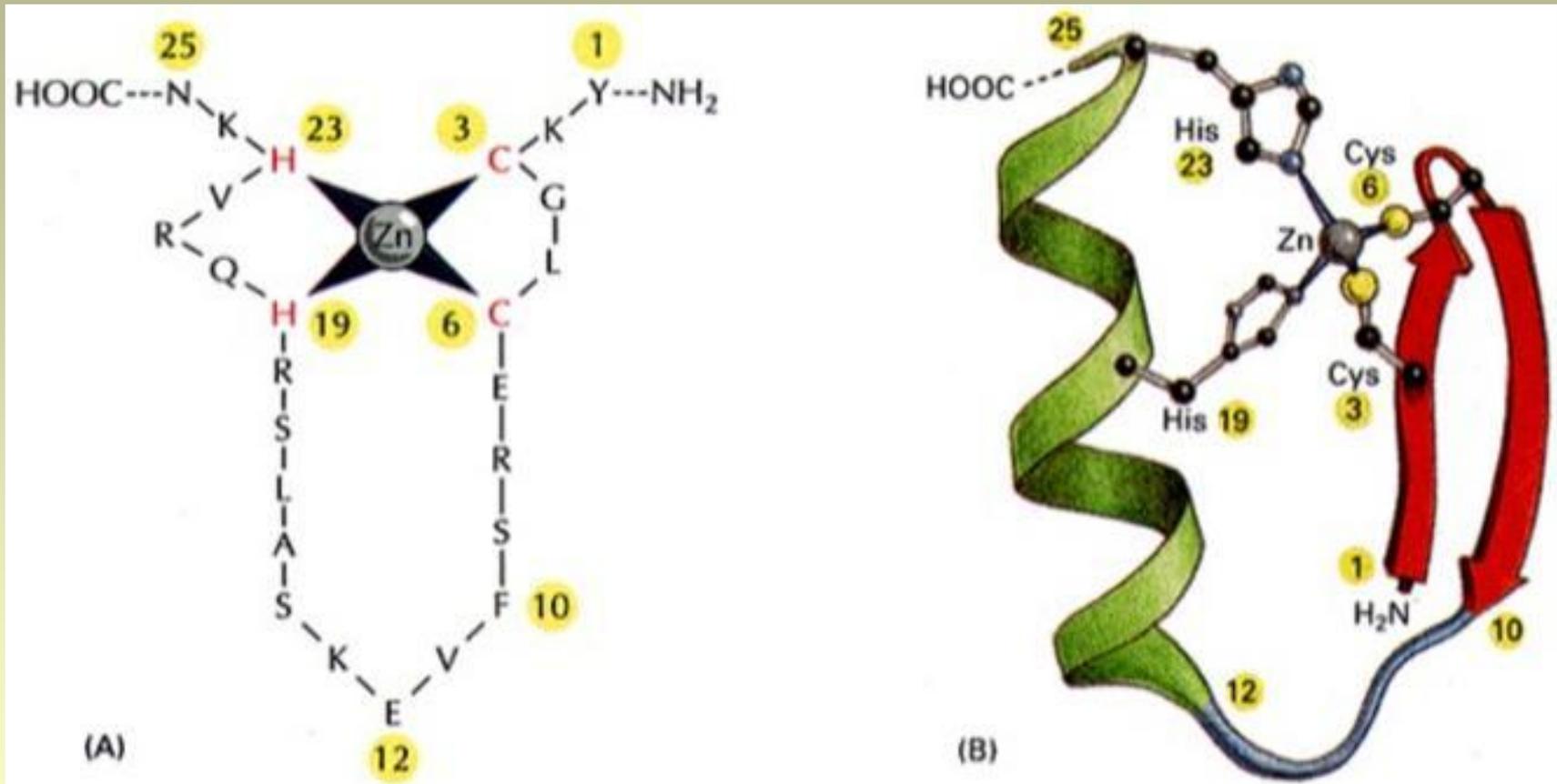
L'elica 3 entra nella scanalatura principale

# Il motivo a dita di zinco (Zn-Finger)

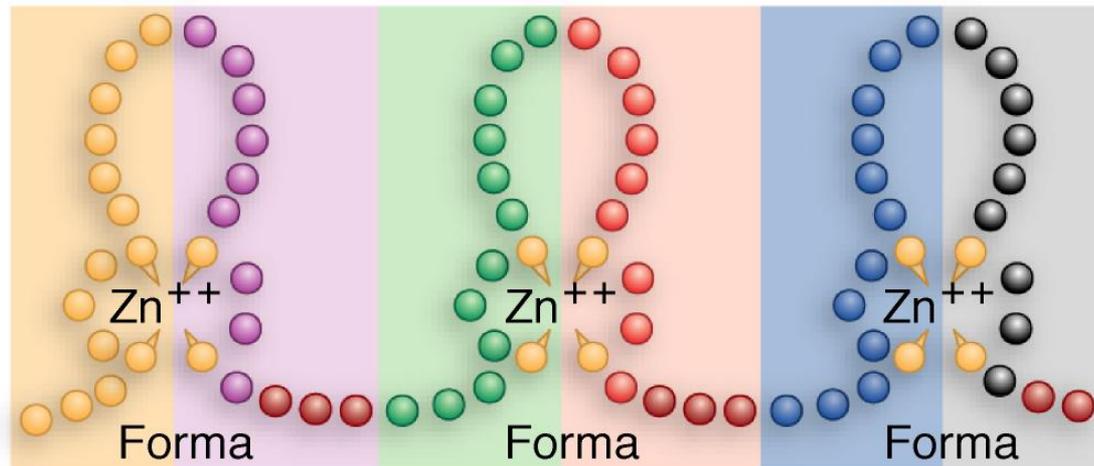


I motivi Zn fingers sono formati da un  $\beta$ -strand ed una  $\alpha$ -elica che si inserisce nel solco maggiore del DNA

# Il motivo a dita di zinco (Zn-Finger)



## Il dito di zinco è un motivo che lega il DNA



Foglietto  $\alpha$ -elica    Foglietto  $\alpha$ -elica    Foglietto  $\alpha$ -elica

$\beta$   
1

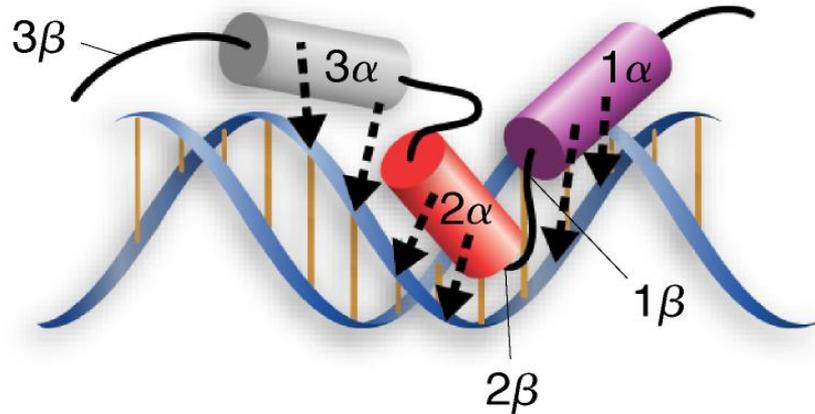
1

$\beta$   
2

2

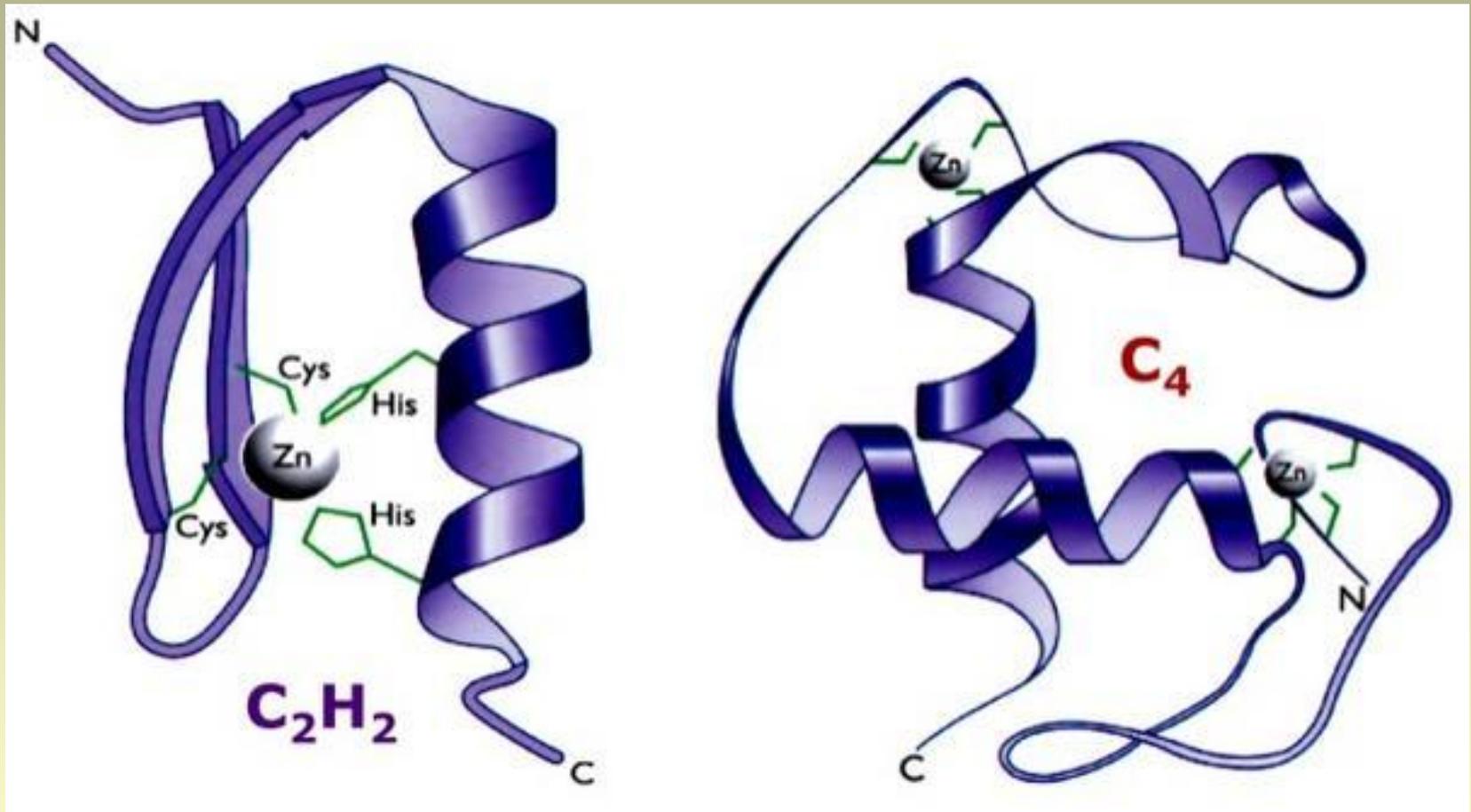
$\beta$   
3

3



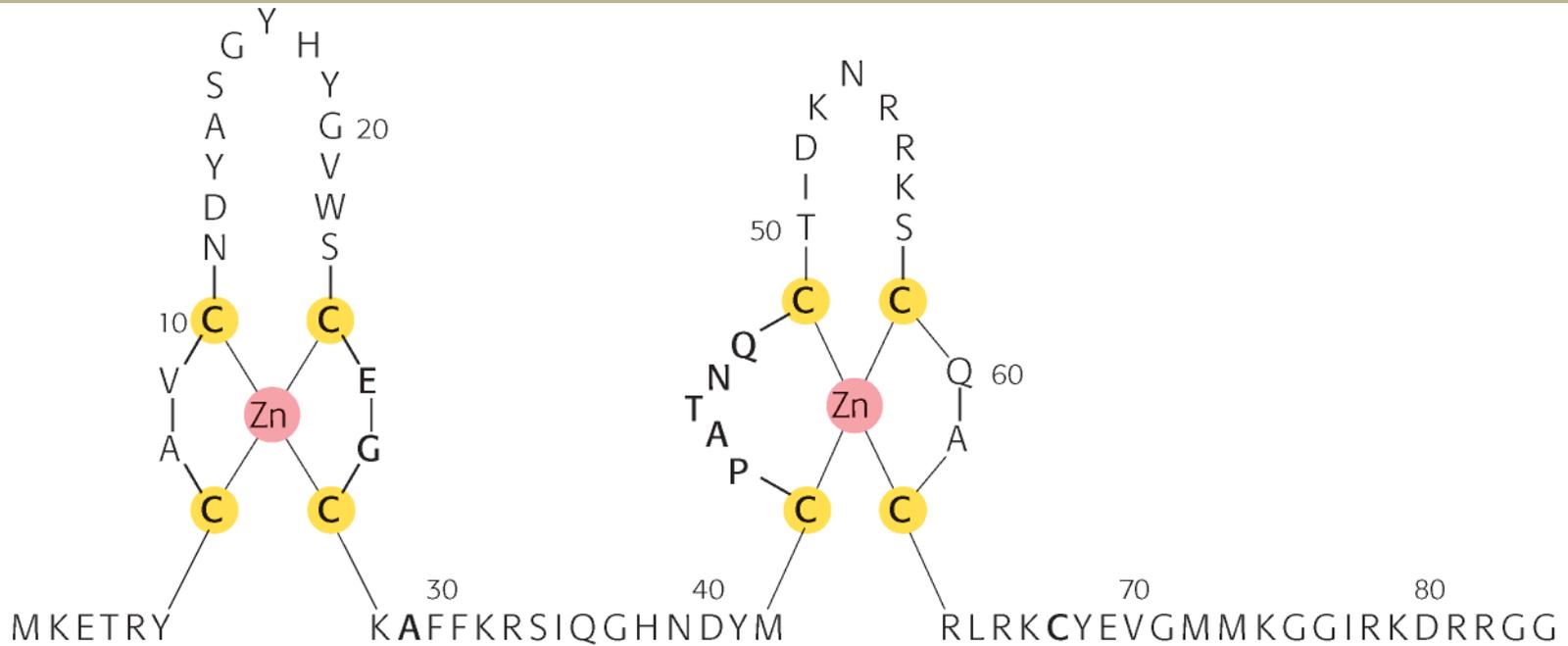
3 dita di zinco legano 6 nucleotidi

# Variazioni nel motivo a dita di zinco



## 2 diversi motivi a dita di zinco

Zn chelato da 2 His e 2 Cys; 2 dita con Zn chelato da 4 Cys

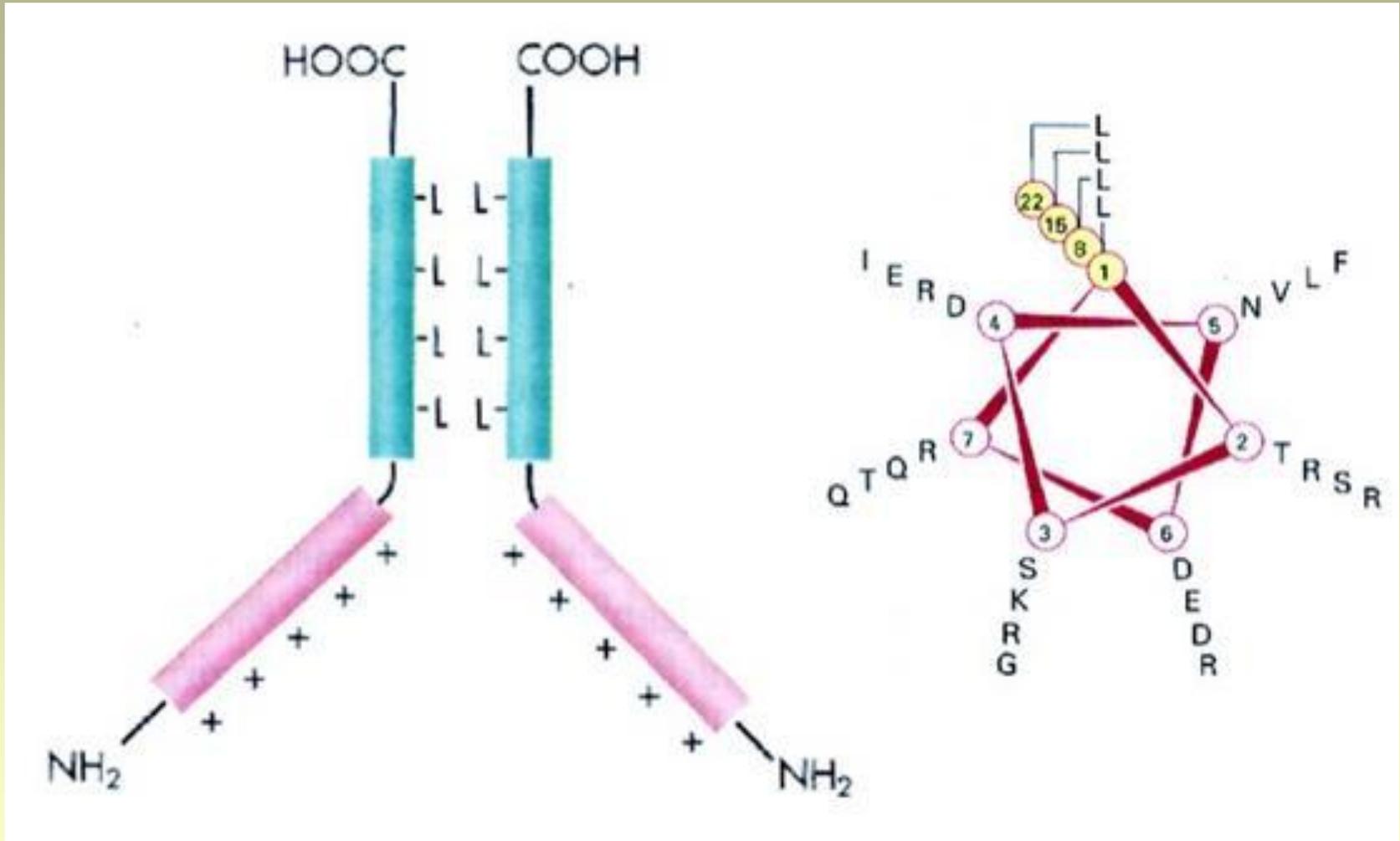


Attivazione della trascrizione (sequenza e lunghezza variabili)

Residui che legano il DNA (66-68 residui molto conservati)

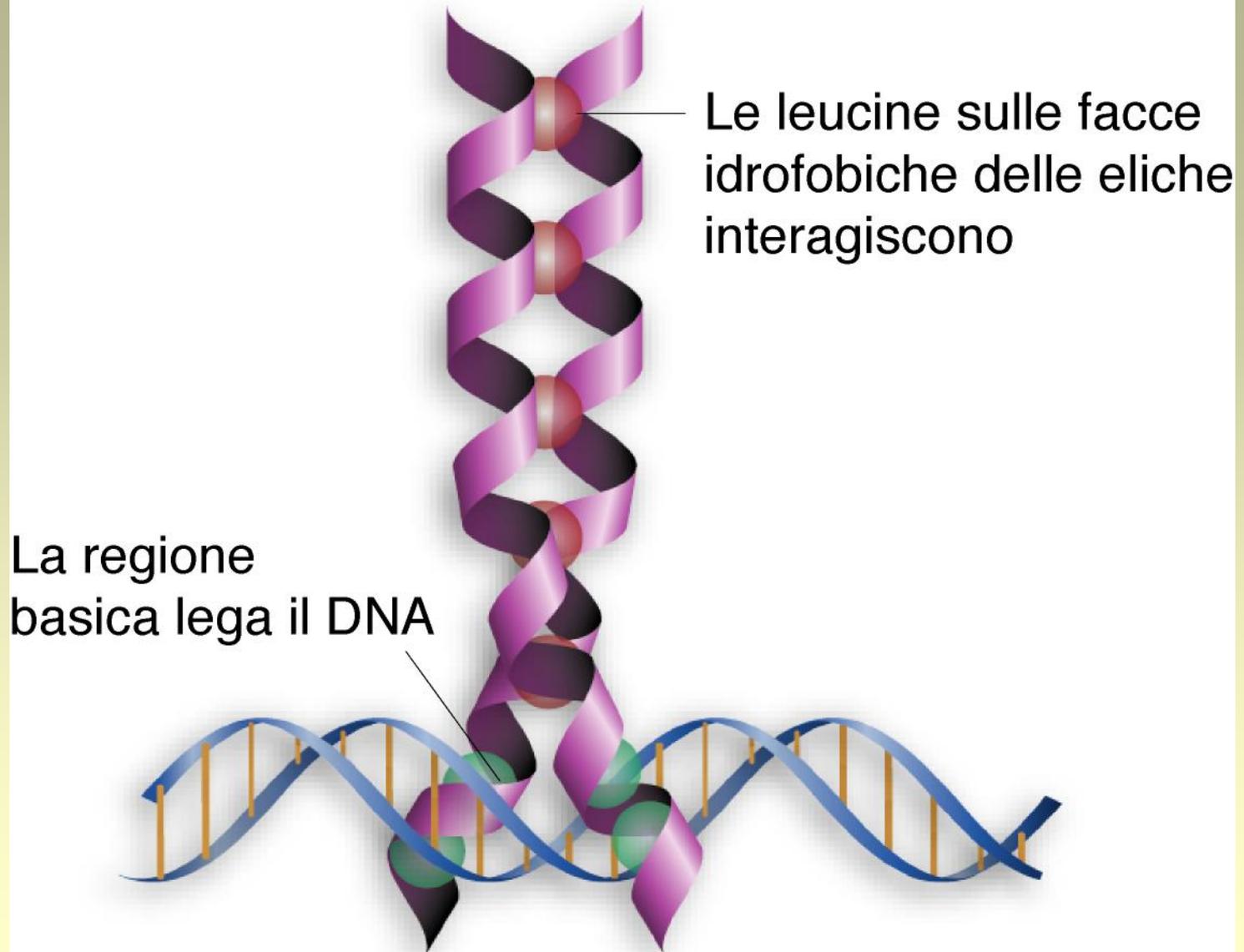
Legame dell'ormone (sequenza e lunghezza variabili)

# Il motivo Leucine Zipper



Alfa elica anfipatica con una leu ogni 7 aminoacidi

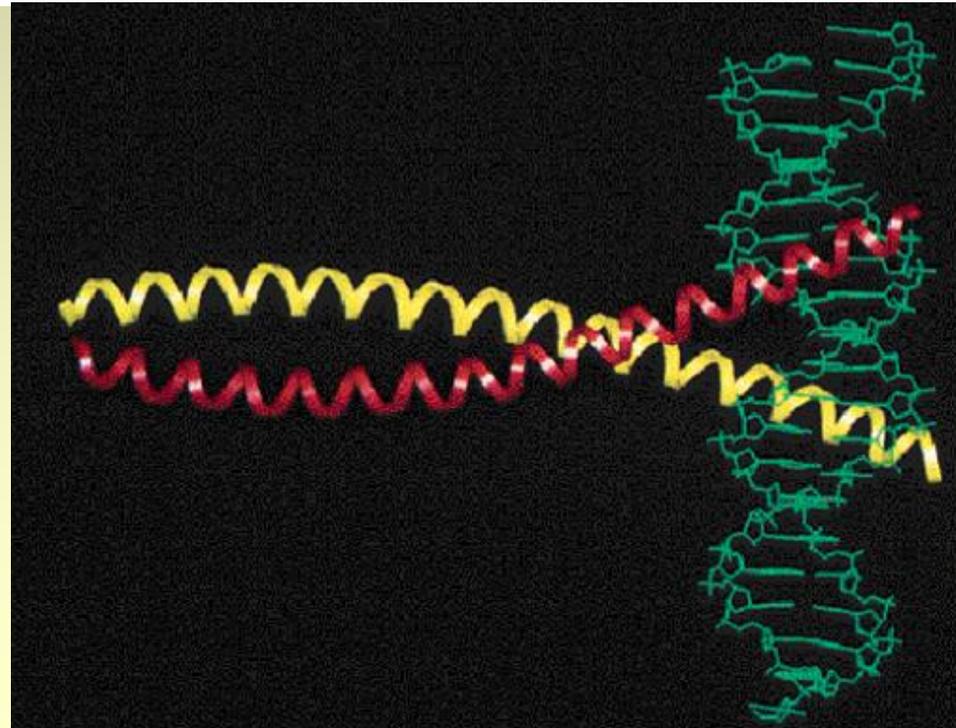
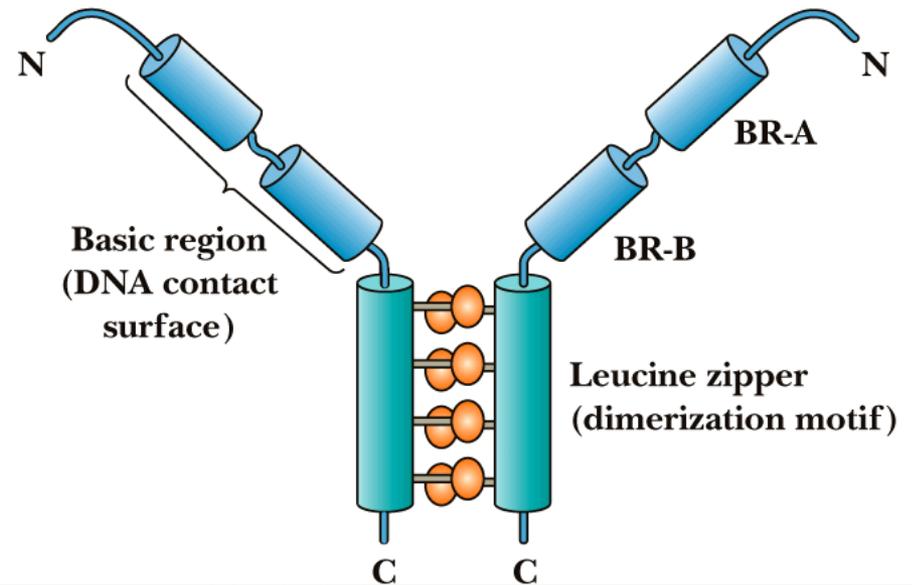
## Le cerniere di leucina dimerizzano



# Il motivo Leucine Zipper

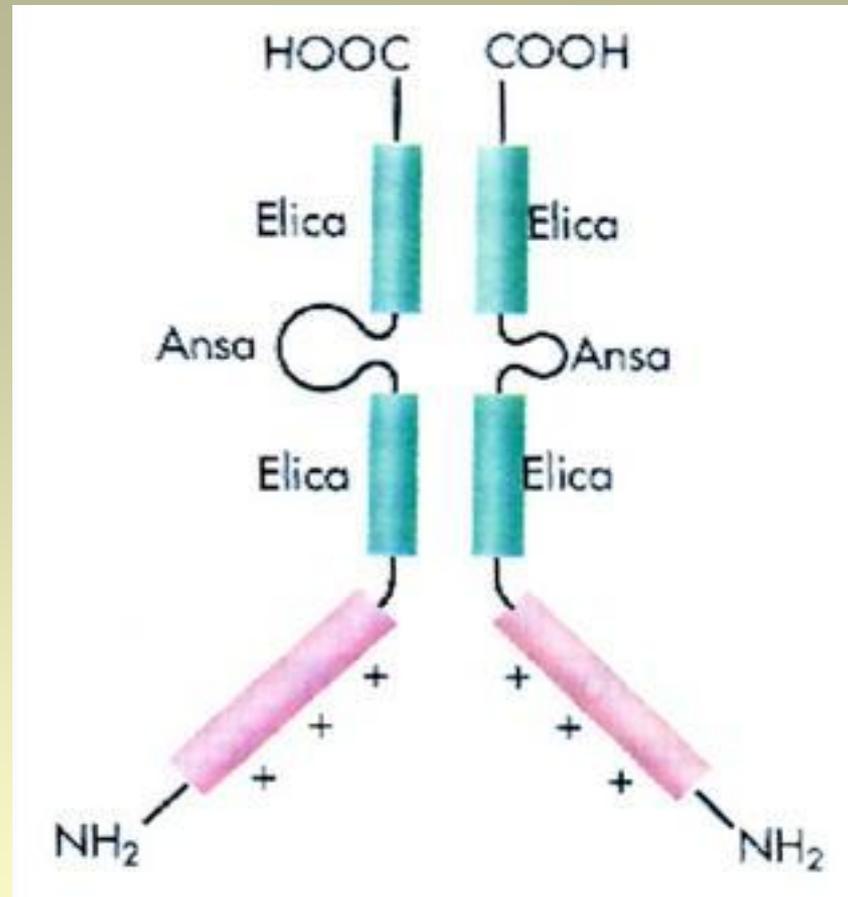
- Costituito da una elica anfipatica e una regione basica
- Le proteine con motivo leucine zipper dimerizzano sia come omodimeri che eterodimeri
- La regione basica contiene il sito per il legame con il DNA
- La regione basica è spesso formata da due eliche che interagiscono e avvolgono con il solco maggiore avvolgendolo

Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e  
Figure 31.43



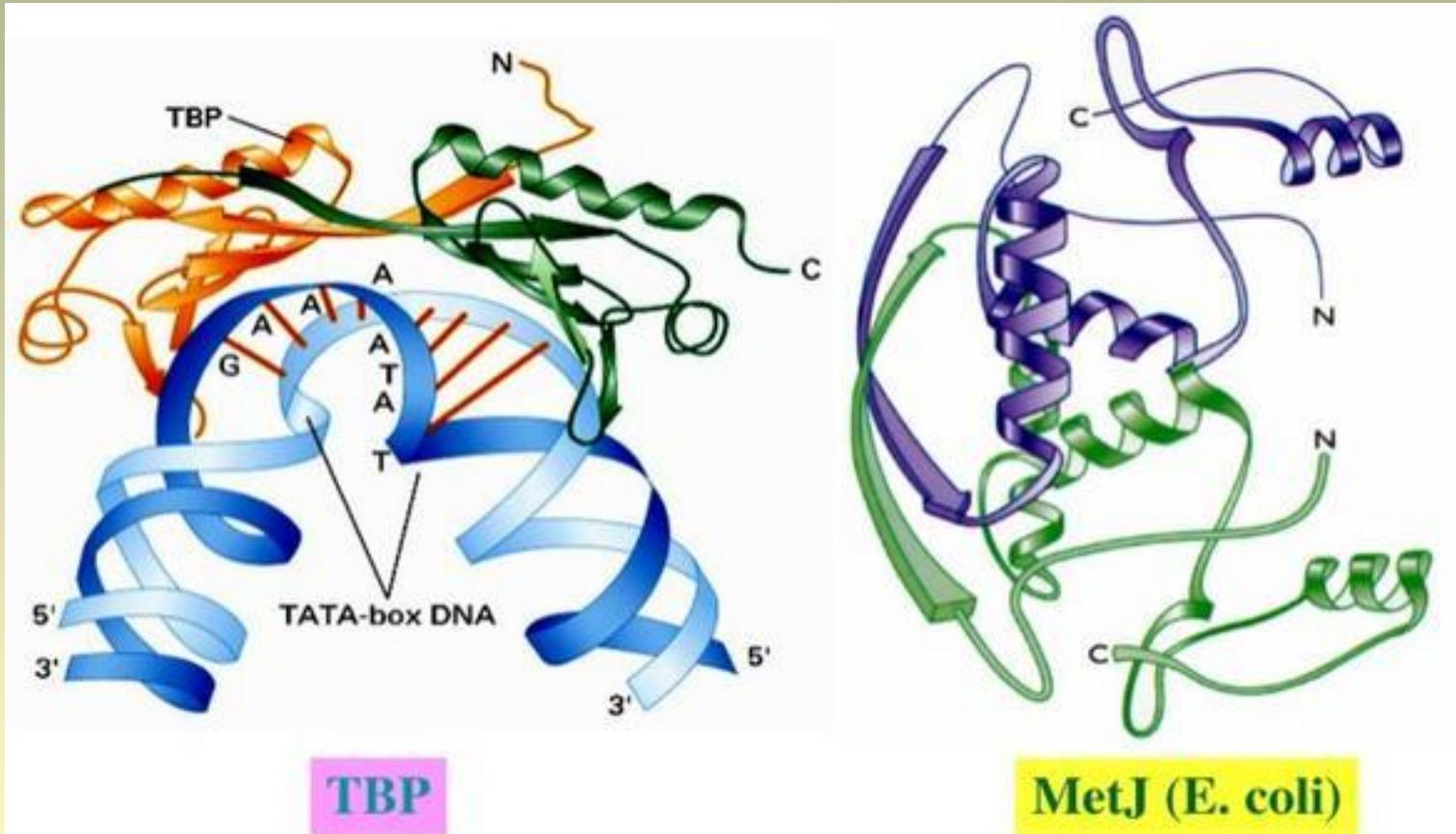


# Il dominio elica-ansa-elica (bHLH)



Proteine bHLH

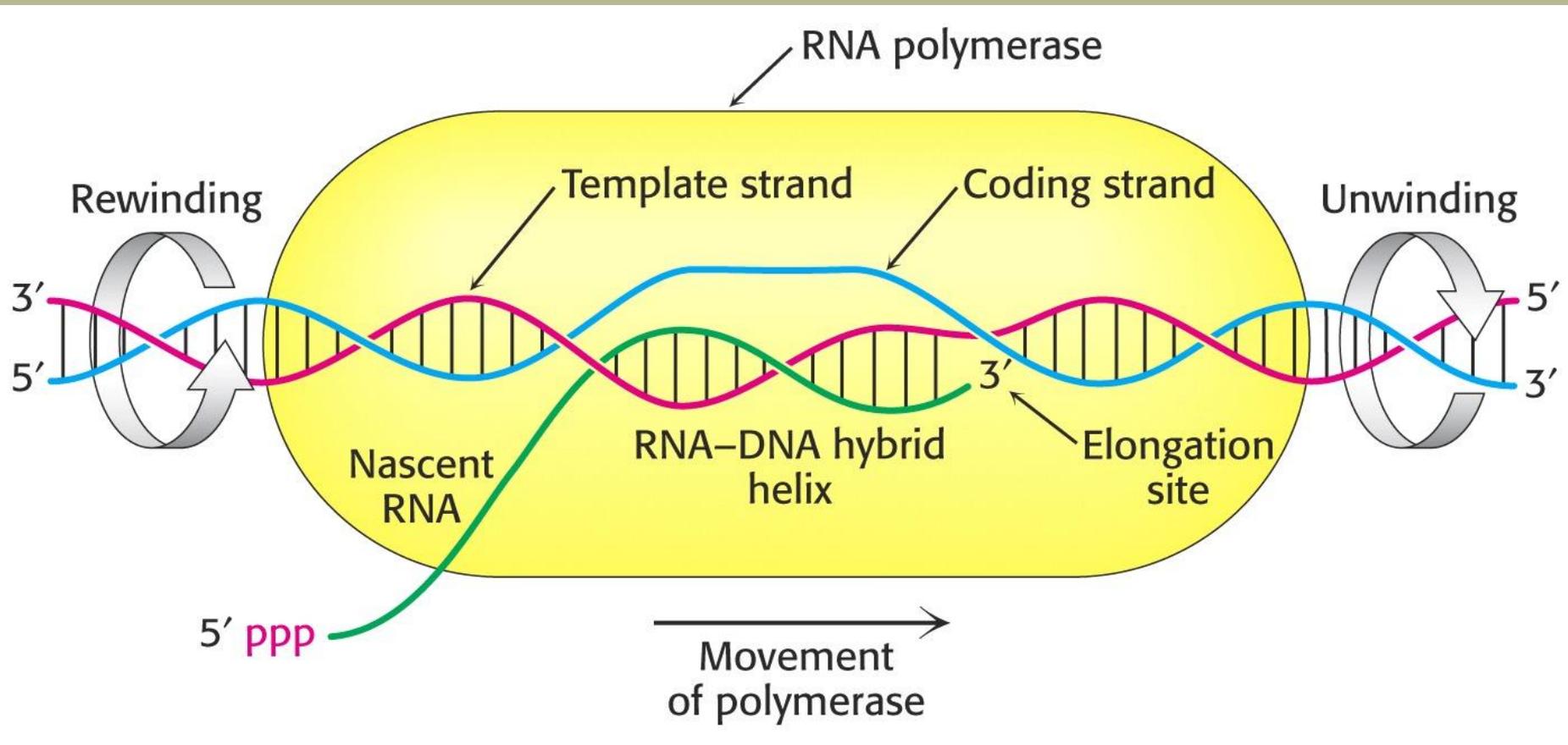
# Il dominio nastro-elica-elica



Costituito da due  $\alpha$ -eliche e un  $\beta$ -strand che si inserisce nel solco minore del DNA

# La trascrizione negli eucarioti

# Il meccanismo della trascrizione



# Trascrizione eucariotica

- Analoga a quella procariotica ma i complessi proteici delle RNAPolimerasi contengono molte più proteine accessorie
- Presenza di più RNA polimerasi
- Mentre nei batteri sono sufficienti pochi fattori trascrizionali ( $\sigma$ ) negli eucarioti sono necessari molti fattori per una trascrizione efficiente e promotore-specifica. Questi fattori sono chiamati general transcription factors (GTFs).

# Quali sono le funzioni delle tre RNA polimerasi?

RNA pol I	RNA pol II	RNA pol III	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precursore RNA ribosomali (rRNA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mRNA</li> <li>• small nuclear RNA (snRNA)</li> <li>• small nucleolar RNA (snoRNA)</li> <li>• microRNA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tRNA</li> <li>• 5 S rRNA</li> <li>• snRNA (U<sub>6</sub>)</li> <li>• Altri piccoli RNA</li> </ul>	Tipo di trascritto
nucleolo	nucleoplasma	nucleoplasma	localizzazione
Non sensibile	+++ [10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-8</sup> M]	++ [10 <sup>-5</sup> M]	Sensibilità amanitina

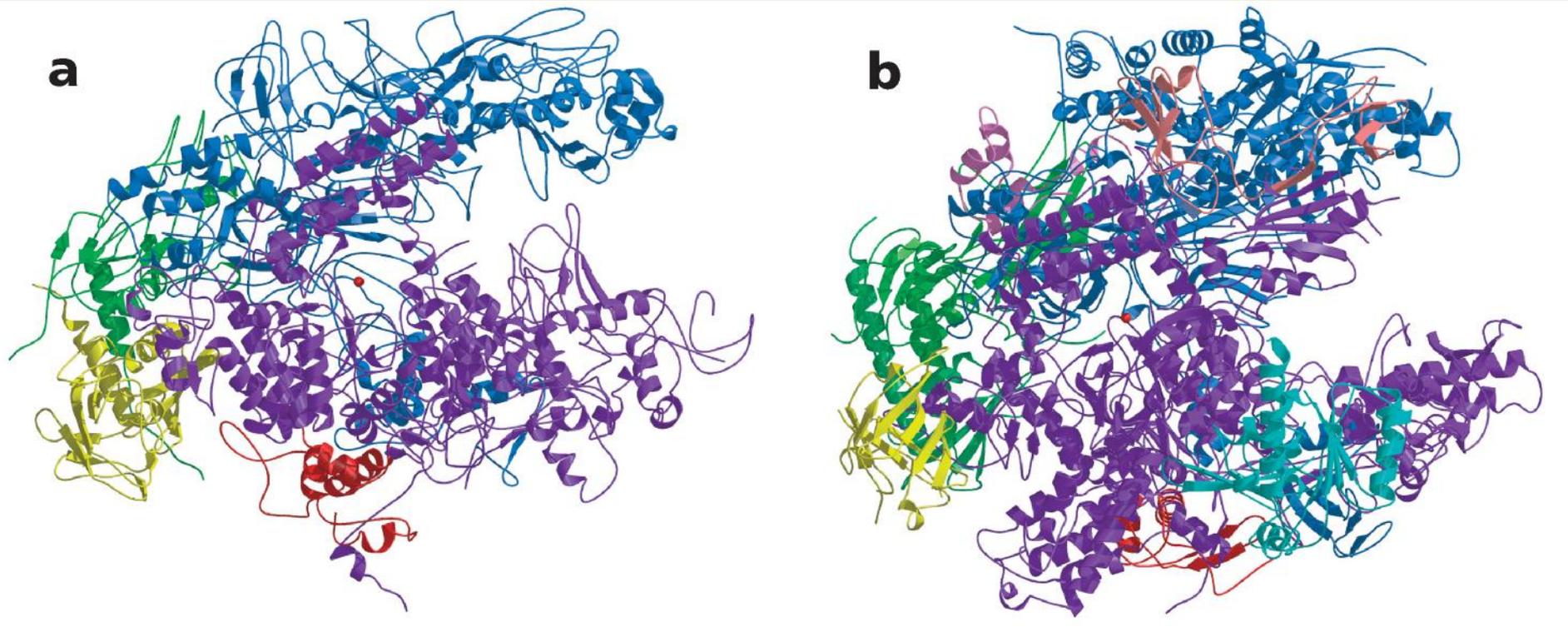
Inoltre nella cellula eucariotica esistono altre RNA polimerasi :

-Mitocondri [ simile a RNA pol del fago T7]

-Cloroplasti [simile a RNA pol batterica]

# RNA polimerasi eucariotiche

- Proteine multimeriche (500-700 kDalton)
- Due subunità grandi simili a quelle  $\beta$  e  $\beta'$  della RNA polimerasi di E.coli (i siti catalitici sono conservati)

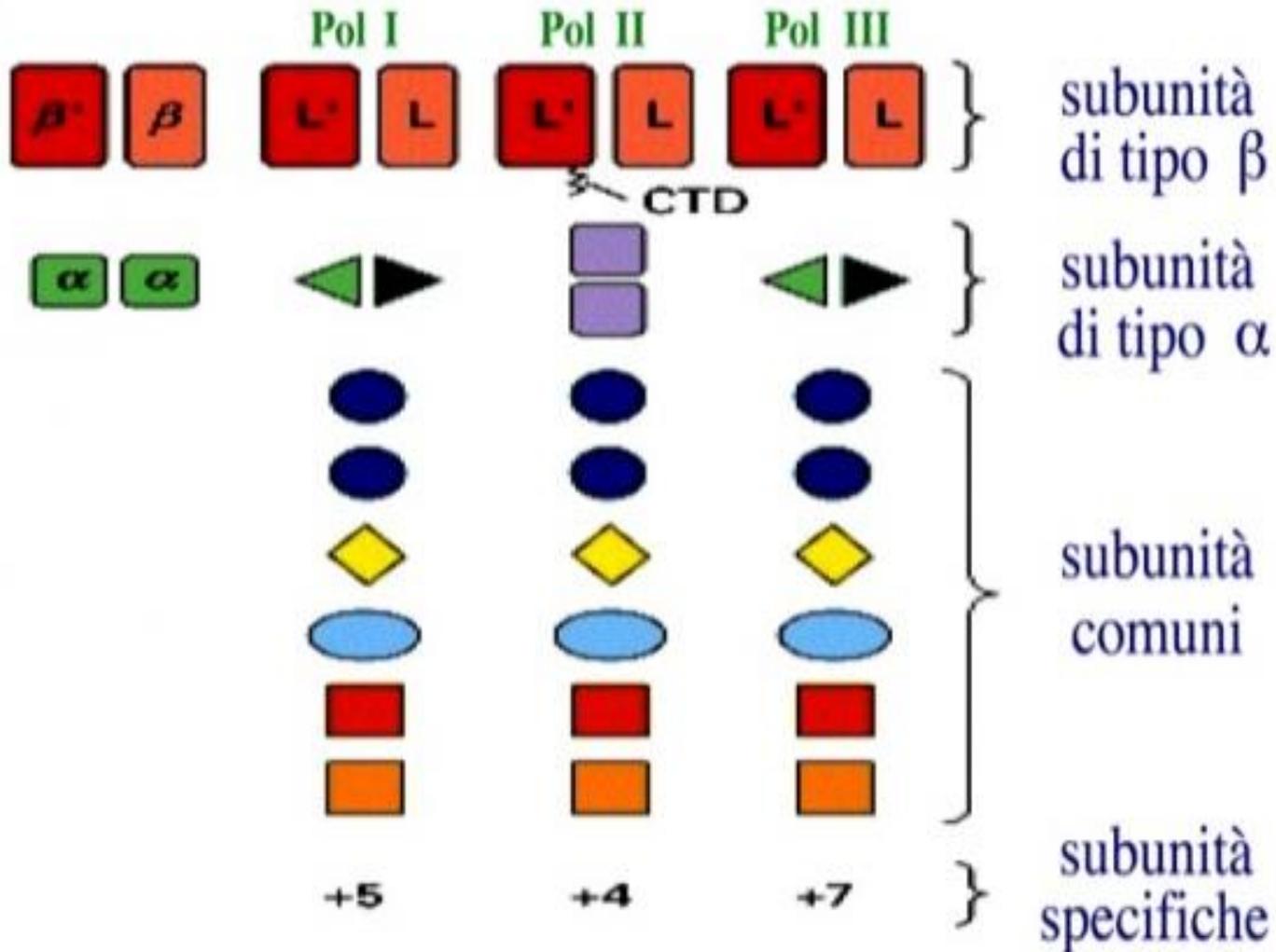


- a) RNA polimerasi procariotica  
b) RNA polimerasi II eucariotica

# RNA polimerasi eucariotiche

procarioti

eucarioti



Le RNA polimerasi eucariotiche sono composte da piu' di 10 subunita'  
 Valori espressi in kDa

RNA pol I	II	III
190	220	160
135	150	128
-	-	82
49	-	-
43	-	53
40	44.5	40
-	-	37
34.5	32	34
-	-	31
27	27	27
23	23	23
19	16	19
14.5	14.5	14.5
14	-	-
-	12.6	-
12.2		11
10	10	10

Simili a  $\beta'$  e  $\beta$

$\alpha$

# Fattori di trascrizione negli eucarioti

( trans-acting factors = fattori che agiscono in trans )

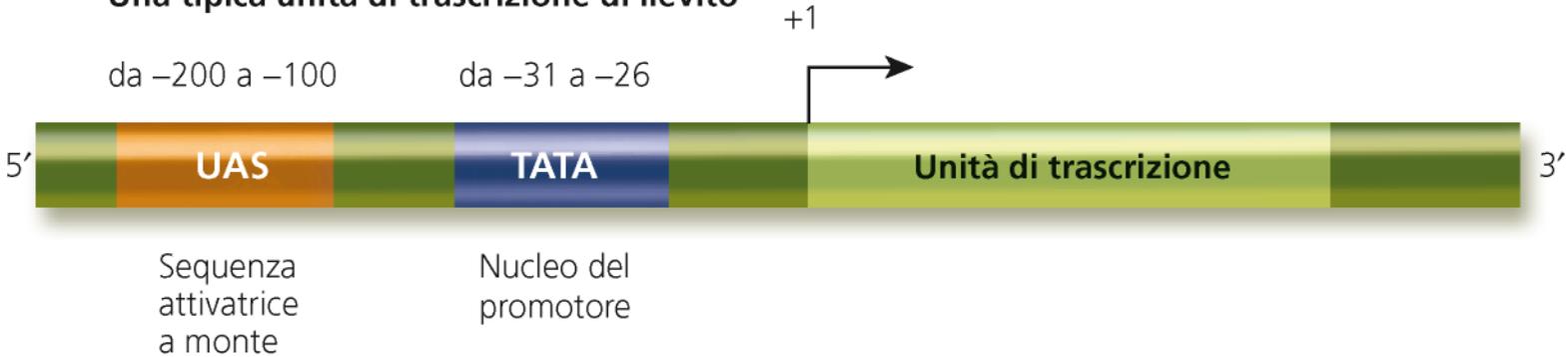
- Le RNA polimerasi I, II e III non sono in grado di legarsi al promotore in maniera specifica
  - Per il legame con il promotore devono interagire con i fattori di trascrizione
  - I fattori di trascrizione riconoscono gli elementi di controllo e permettono l'inizio specifico della trascrizione
  - Possono essere distinti in:
    - Fattori generali
    - Fattori a monte
    - Fattori inducibili
- TFIIB - TFIID - TFIIE - TFIIIF - TFIIH  
Coattivatori - corepressori



# I promotori eucariotici

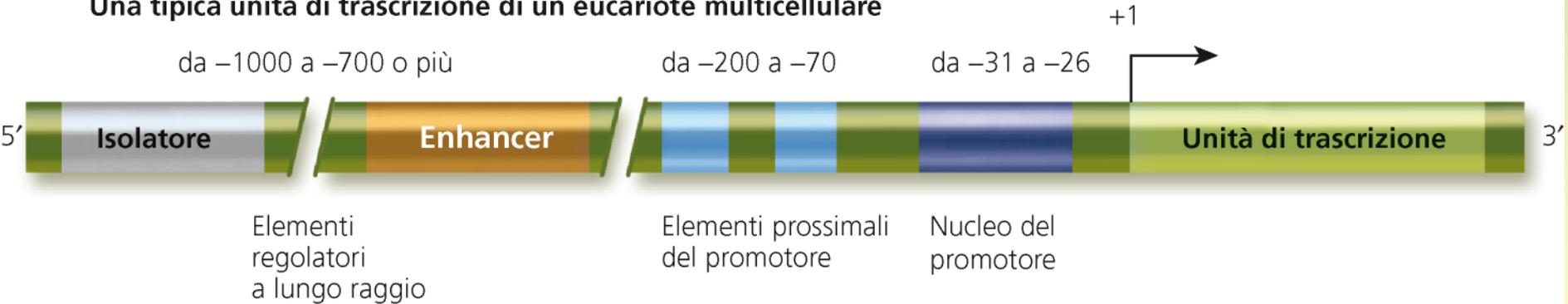
(A)

Una tipica unità di trascrizione di lievito

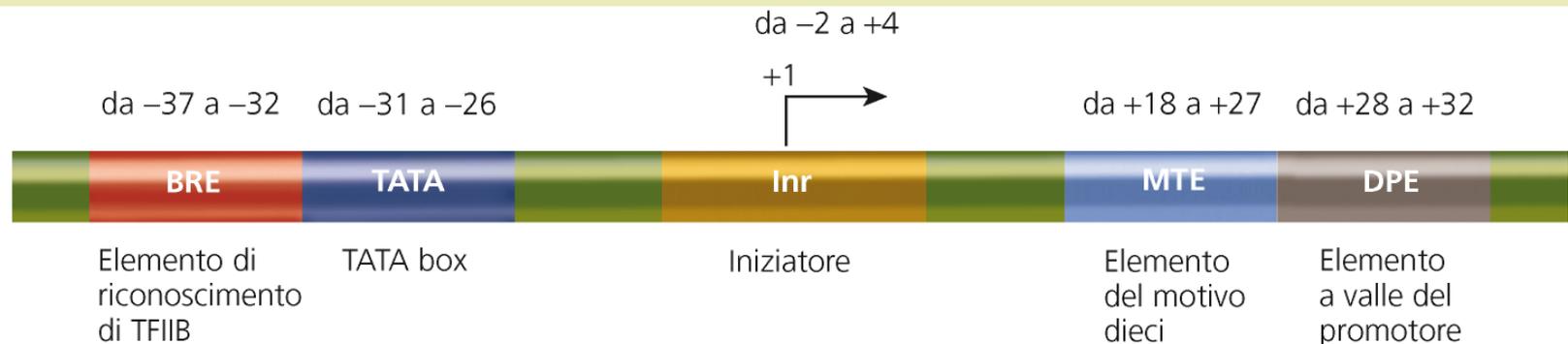
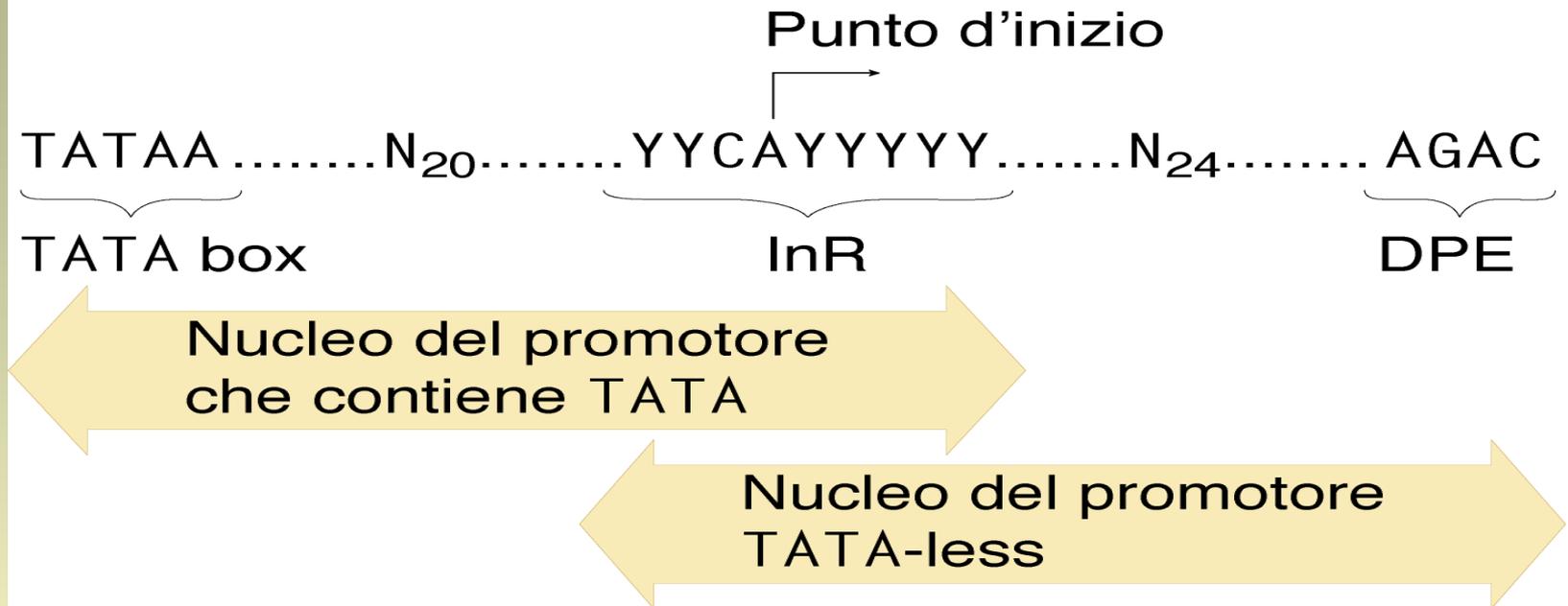


(B)

Una tipica unità di trascrizione di un eucariote multicellulare



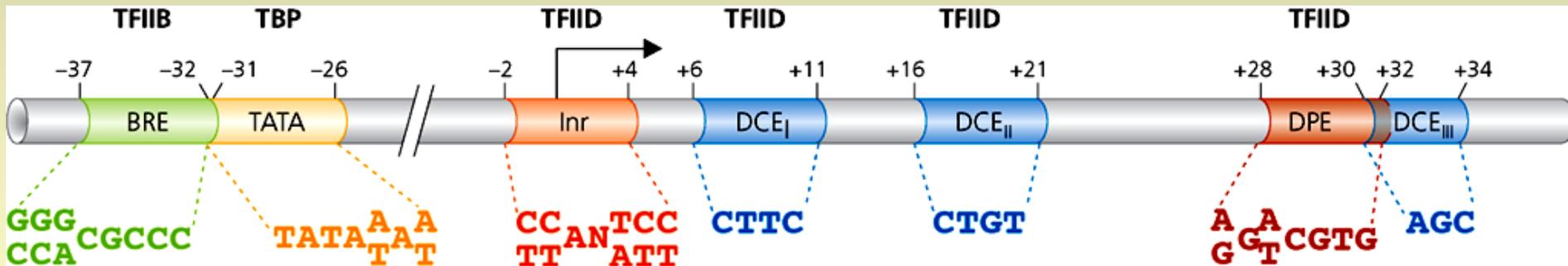
# Un promotore minimo della pol II ha soltanto due elementi



TATA box è presente solo nel 32% dei promotori

## Sequenze di regolazione dei promotori di Pol II (elementi di controllo “in cis”):

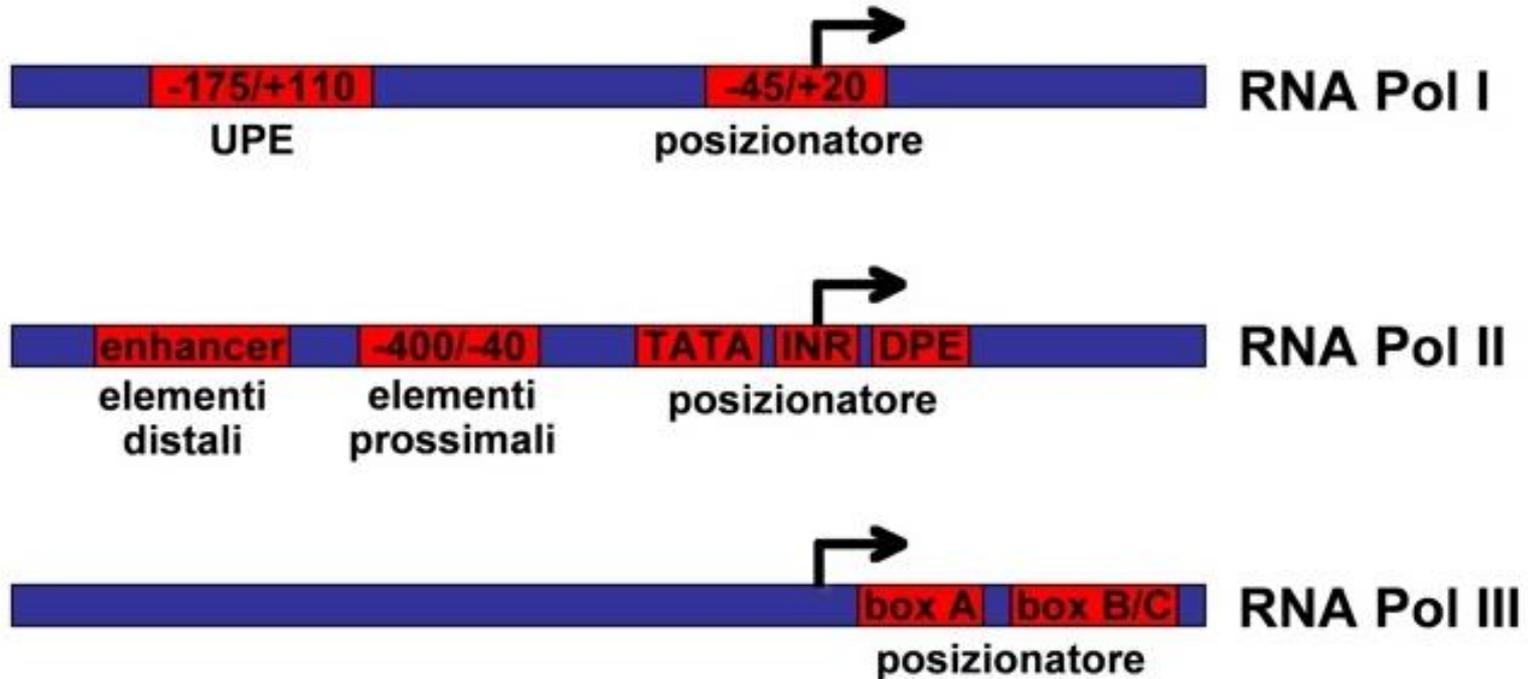
- **Elementi di POSIZIONAMENTO** ⇒ **posizionano Pol II**  
almeno due tra:
  - BRE (TF<sub>II</sub>B Responsive Element) lega TF<sub>II</sub>B
  - TATA box lega TBP
  - INR (Initiator) lega TF<sub>II</sub>D (una TAF)
  - DPE (Distal Promoter Element) lega TF<sub>II</sub>D (una TAF)
- **Elementi di REGOLAZIONE** ⇒ **trascrizione: quando e quanto**
  - Elementi PROSSIMALI -40/-200 legano fattori di regolazione
  - Elementi ENHANCER ovunque legano fattori di regolazione



elementi in *cis* presenti in un promotore “base” della Pol II  
(un promotore in genere contiene solo alcuni di questi elementi almeno 2)

TBP: *TATA-binding protein* TAF: *TBP-associated factors*

# I promotori delle varie RNA polimerasi



**Promotore:** insieme di elementi regolatori *cis*-agenti necessari per l'inizio della trascrizione

# RNA polimerasi II

## Il CTD (C-Terminal Domain) della RNA polimerasi II

A differenza delle altre RNA polimerasi, la subunità di 220 kDa della RNA pol II (omologa a b' di *E.coli*) presenta un'estensione C-terminale detta CTD (C-Terminal Domain)

Il CTD è costituito da ripetizioni di una sequenza di 7 amminoacidi (PTSPSYS) contenente siti di fosforilazione

**-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ser**

(52 ripetizioni in mammifero / 26 in lievito)

I residui di treonina (T) e serina (S) sono siti di fosforilazione da parte di proteine chinasi specifiche che regolano le funzioni del CTD.

Il CTD è coinvolto nella reazione d'inizio della trascrizione e inoltre

# Trascrizione mediata da RNA polimerasi II

- Il CTD è essenziale per le funzioni della RNA polimerasi e sporge al di fuori della porzione globulare dell'enzima (fino a 50 nm)
- Solo la RNA Pol II in cui la CTD non è fosforilata può iniziare la trascrizione mentre l'allungamento richiede la fosforilazione
- La TATA box (TATAAA) è un promotore universale

L'inizio della trascrizione richiede almeno 7 fattori generali di trascrizione (GTFs)

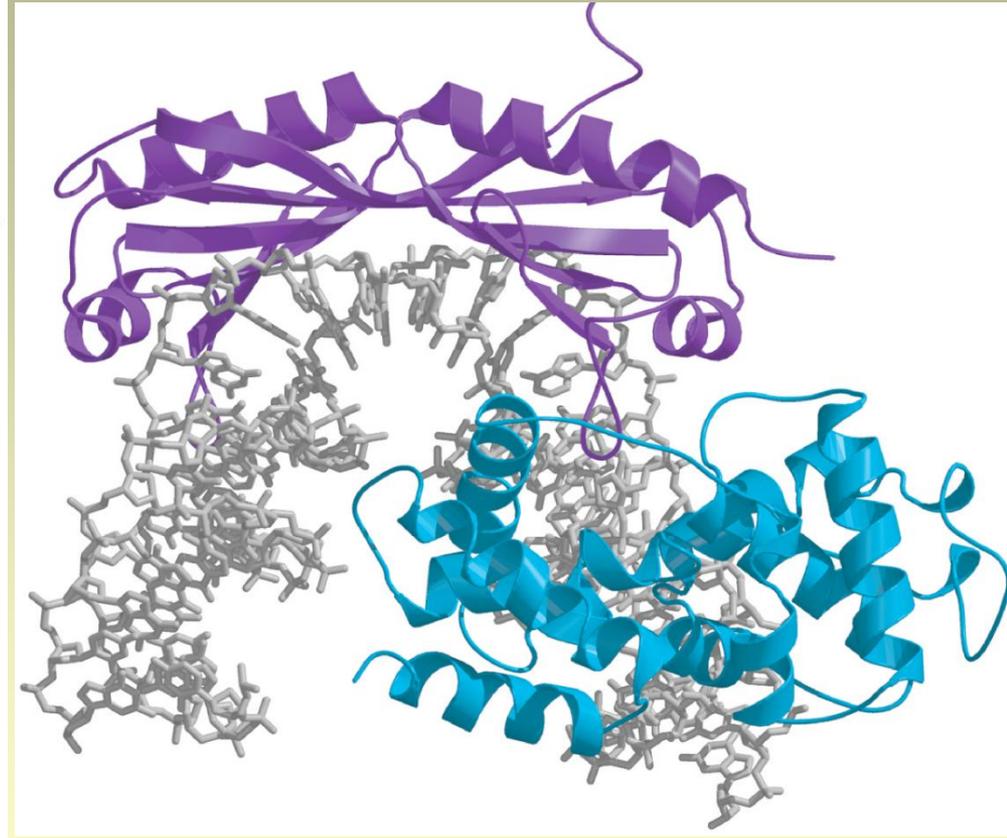
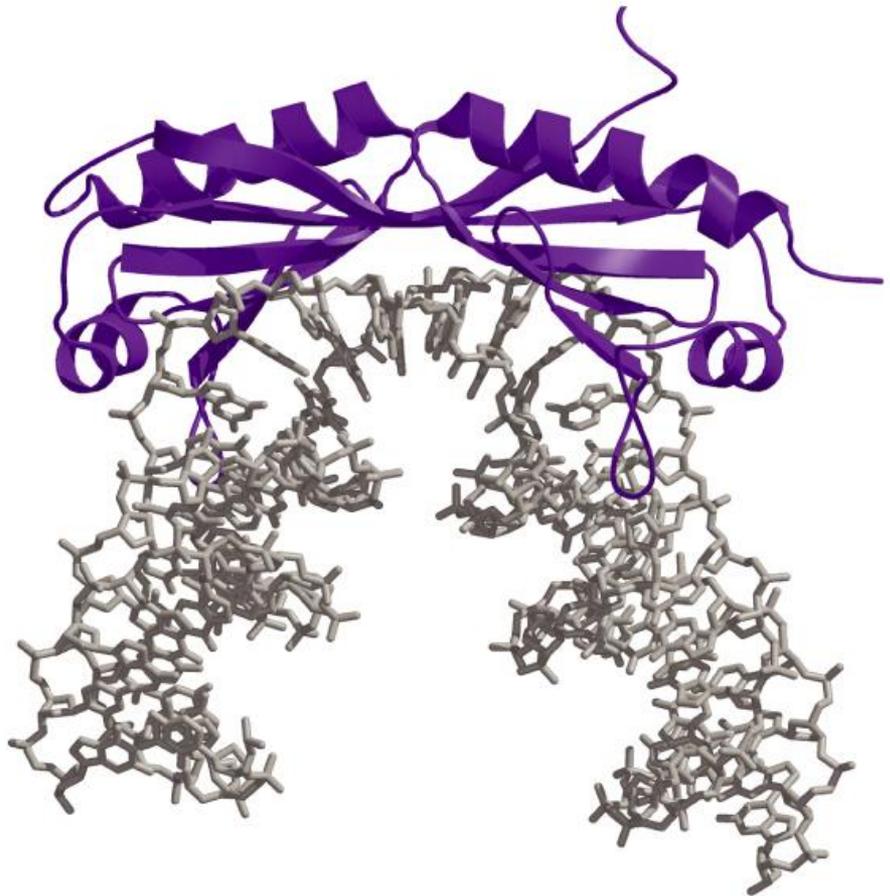
TFIIA   TFIIIB   TFIIID   TFIIIE   TFIIIF   TFIIH   TFIIJ

# INIZIO

La RNA polimerasi II interagendo con i fattori generali della trascrizione forma un complesso di pre-inizio (Pre-Initiation complex)

- L'elemento TATA è riconosciuto dal fattore generale di trascrizione **TFII D**.
- **TFII D** è formato da un complesso multiproteico
- Contiene **TBP** (TATA binding protein) e diverse **TAF** (TBP-associated factor). Sono note 14 TAF
- Dopo il legame con il DNA, TBP distorce la sequenza TATA (inserendo un  $\beta$ -sheet nel solco minore).
- Il complesso TBP-DNA costituisce una piattaforma a cui si associano altri fattori generali di trascrizione e la RNA pol II permettendo il corretto riconoscimento del sito di inizio

# TBP lega e distorce il DNA mediante un $\beta$ -sheet inserito nel solco minore

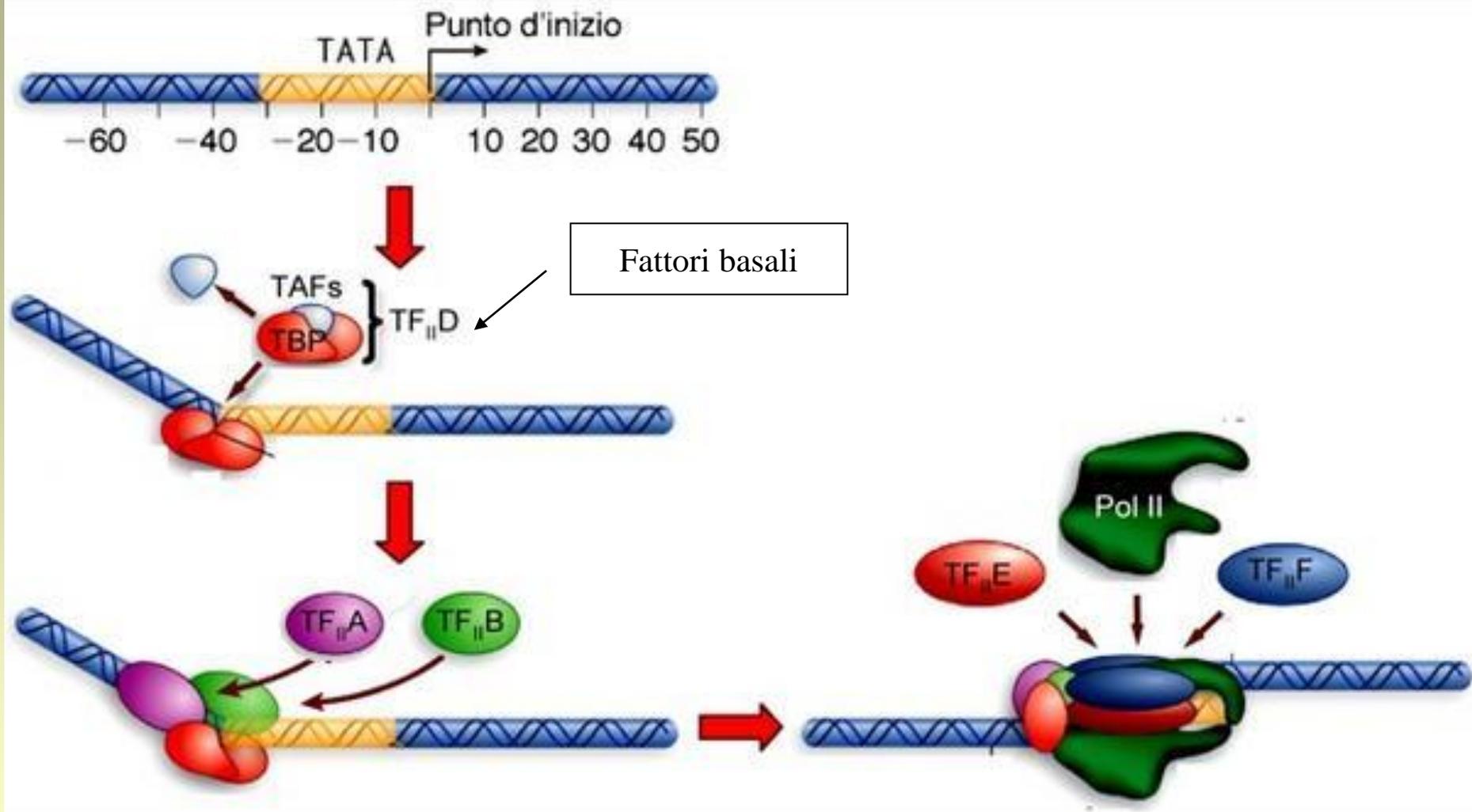


Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

In seguito al legame il solco minore si allarga e il DNA si piega di circa  $80^\circ$

Il legame di TBP e la piegatura sul DNA facilitano il legame di TFIIB al promotore

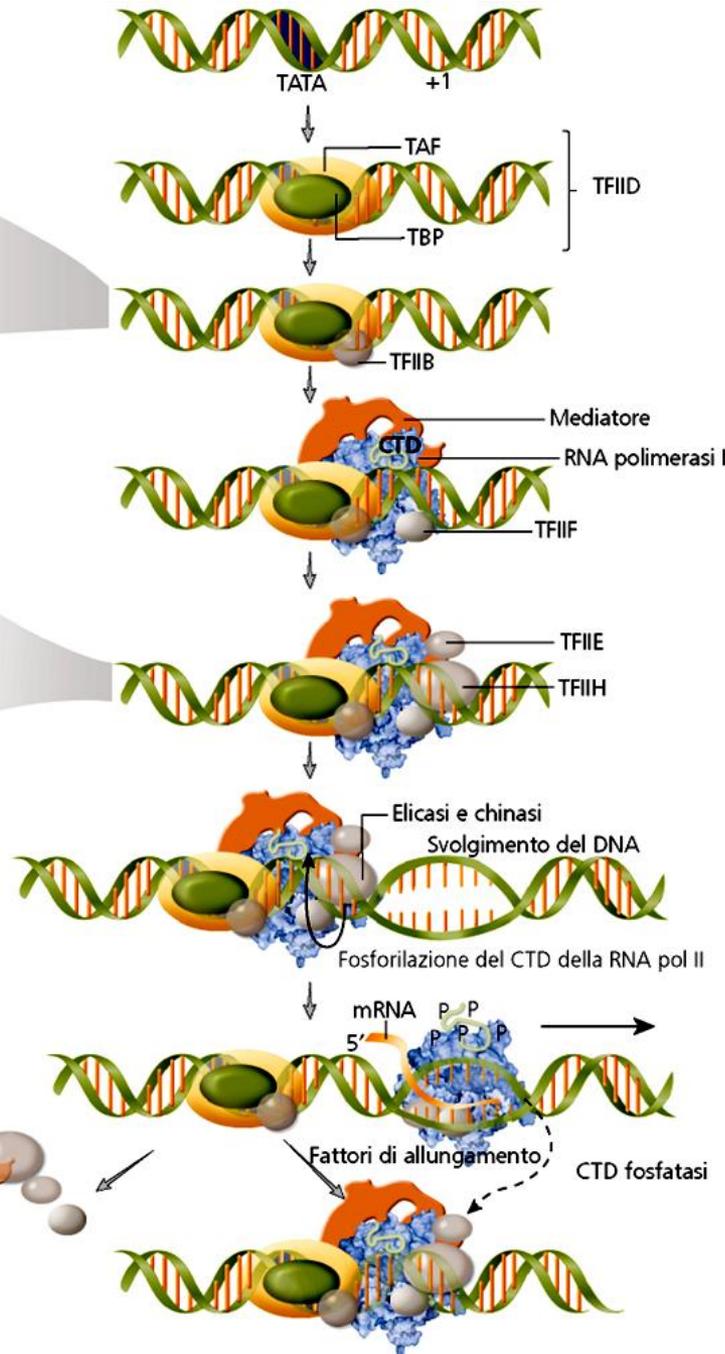
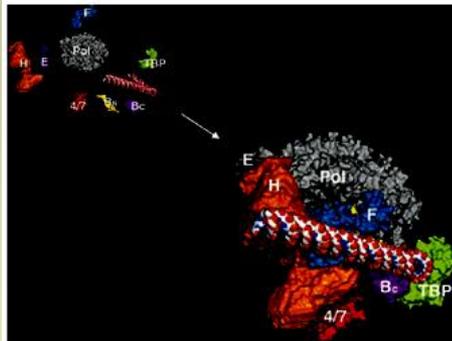
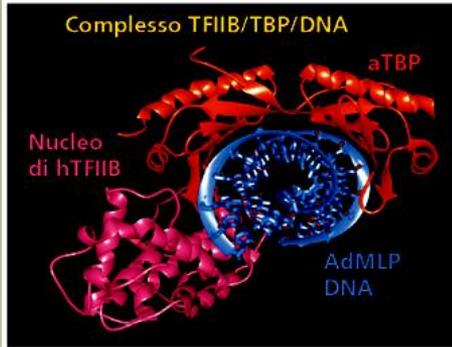
- TFIID recluta TFIIIB e TFIIIF assieme alla RNAPol II. Sono reclutate anche altre proteine come il “mediatore” che regolano il legame della RNAPol II
- TFIIIB orienta il complesso in una direzione specifica tramite contatti con la TBP e una sequenza ricca in GC che segue il TATA box. Il dominio N-terminale di TFIIIB (nastro di zinco ricco in Cys che legano Zn) interagisce con la RNAPol II posizionandola sul sito di inizio (+1)
- Successivamente TFIIIE e TFIIH si legano a valle della RNAPol II.
- TFIIH è il fattore più grande e complesso (9 subunità )
- In alcuni casi TFIIA è reclutato prima di TFIIIB contribuendo alla stabilità del complesso. (TFIIA assieme a TFIIJ non sono considerati come fattori generali per l’inizio della trascrizione).
- La trascrizione dipendente da DPE richiede due fattori addizionali, CK2 e PC4
- La formazione del complesso di pre-iniziazione è seguita dal melting o denaturazione del promotore. Questo richiede l’idrolisi di ATP e l’attività elicastica di TFIIH. TFIIH ha anche attività chinastica



complesso di pre-inizio di Pol II



① Assemblaggio del complesso di preinizio



② Inizio

③ Clearance del promotore e allungamento

④ Reinizio

TFII D

TFII B

RNApol  
Mediatore

TFII E

TFIIF

TFIIH

Fosforilazione  
CTD

Allungamento

# MEDIATORI DELLA TRASCRIZIONE

Il complesso tra fattori generali di trascrizione e RNAPol II non è in grado di rispondere agli attivatori trascrizionali (enhancers) ->

Attività basale della RNAPol II

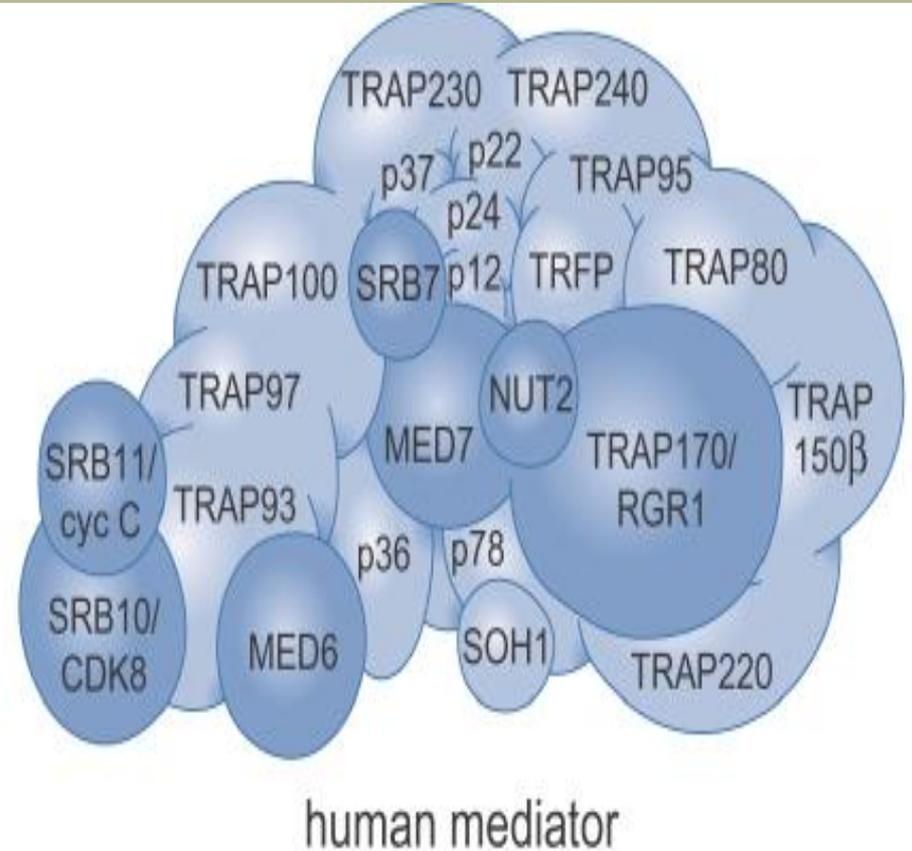
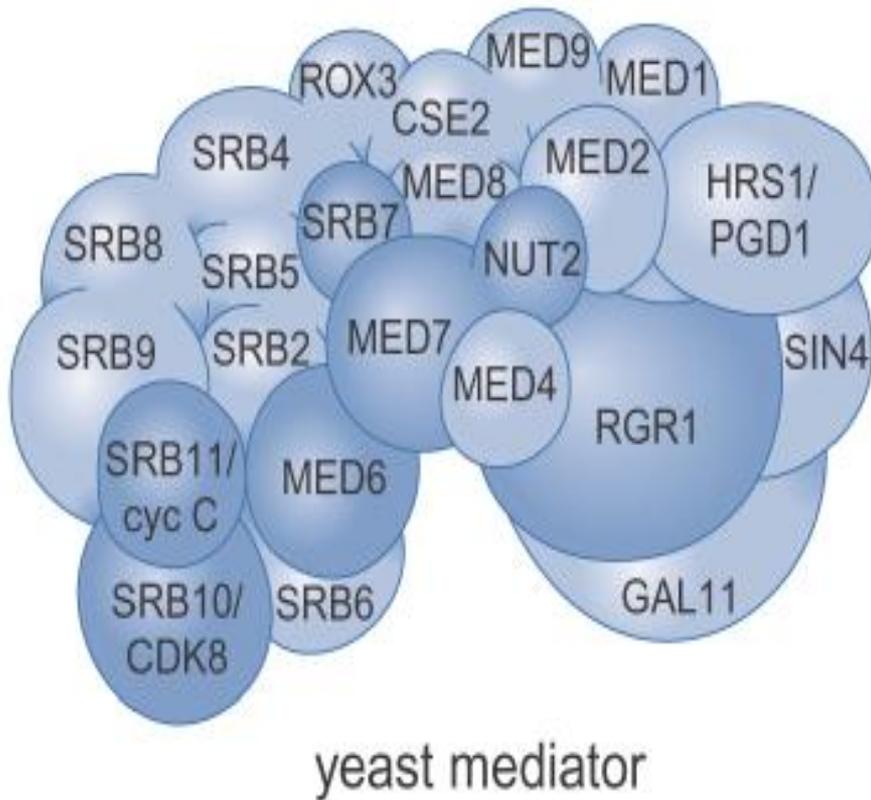
E' richiesto un ulteriore fattore proteico, il "mediatore", che funge da ponte molecolare tra il complesso di pre-inizio e gli elementi enhancers o altri regolatori a lungo raggio. Il mediatore può essere considerato un coattivatore

**Il mediatore da una parte è associato con la CTD della RNAPol II e dall'altra interagisce con attivatori legati al DNA**

Attivatori differenti interagiscono con differenti subunità del mediatore per facilitare l'interazione della RNAPol II con i vari geni

Il complesso mediatore promuove l'assemblaggio del complesso di pre-inizio e l'attività chinasi di TFIIH (la fosforilazione del CTD è essenziale per promuovere l'allungamento)

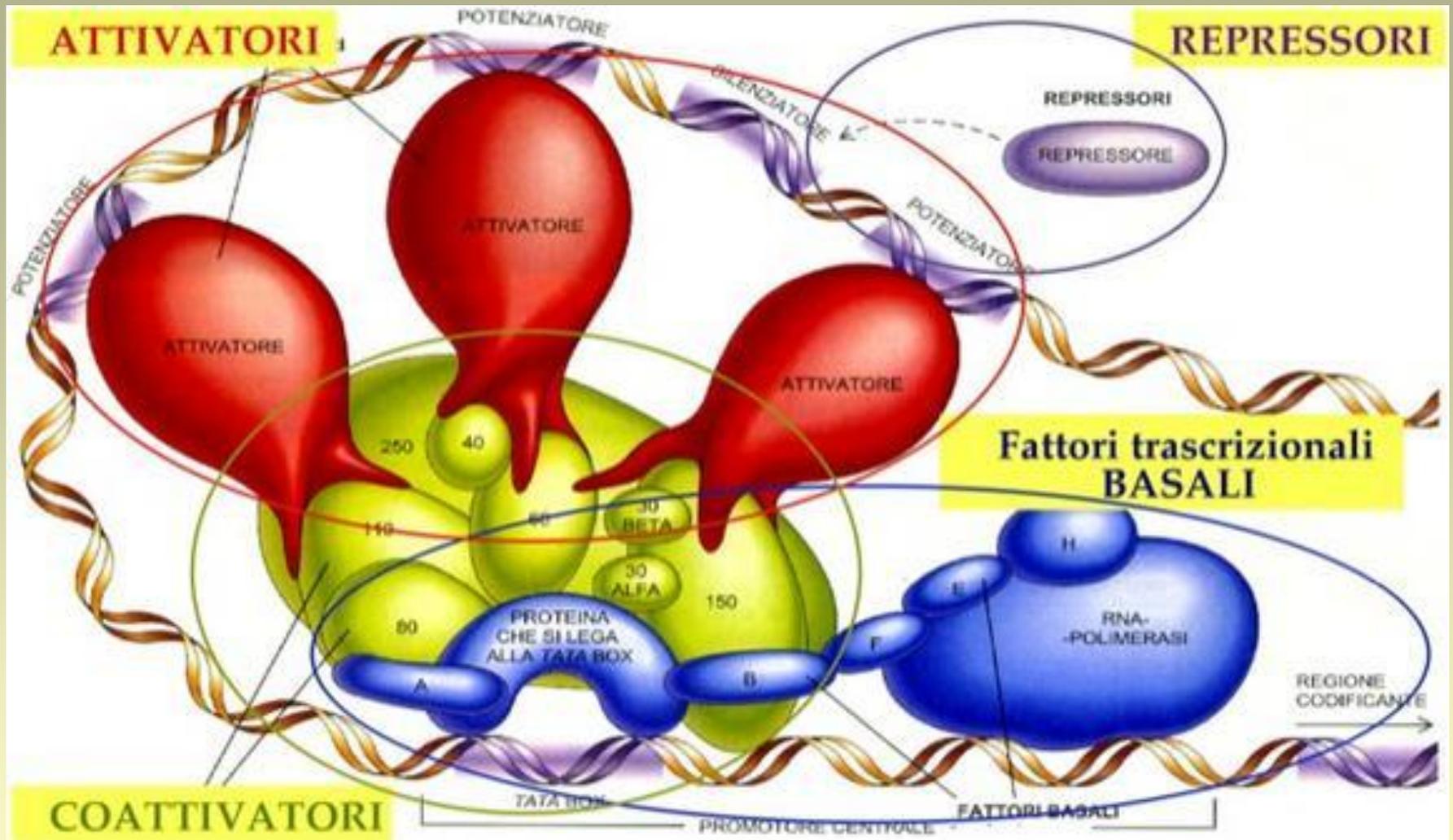
# Il mediatore è costituito da molte subunità, alcune conservate dal lievito all'uomo



❖ Le proteine omologhe son in blu scuro

Il mediatore stimola l'attività chinastica di TFIIF

trasmette informazioni regolatrici da attivatori e repressori alla polimerasi



Il promotore della RNAPol II

# I FATTORI DI TRASCRIZIONE

Stimolano il reclutamento dei fattori generali di trascrizione e della RNAPol II nella formazione del complesso di pre-inizio

Inducono cambiamenti conformazionali (modifiche post-traduzionali) che stimolano l'attività del complesso

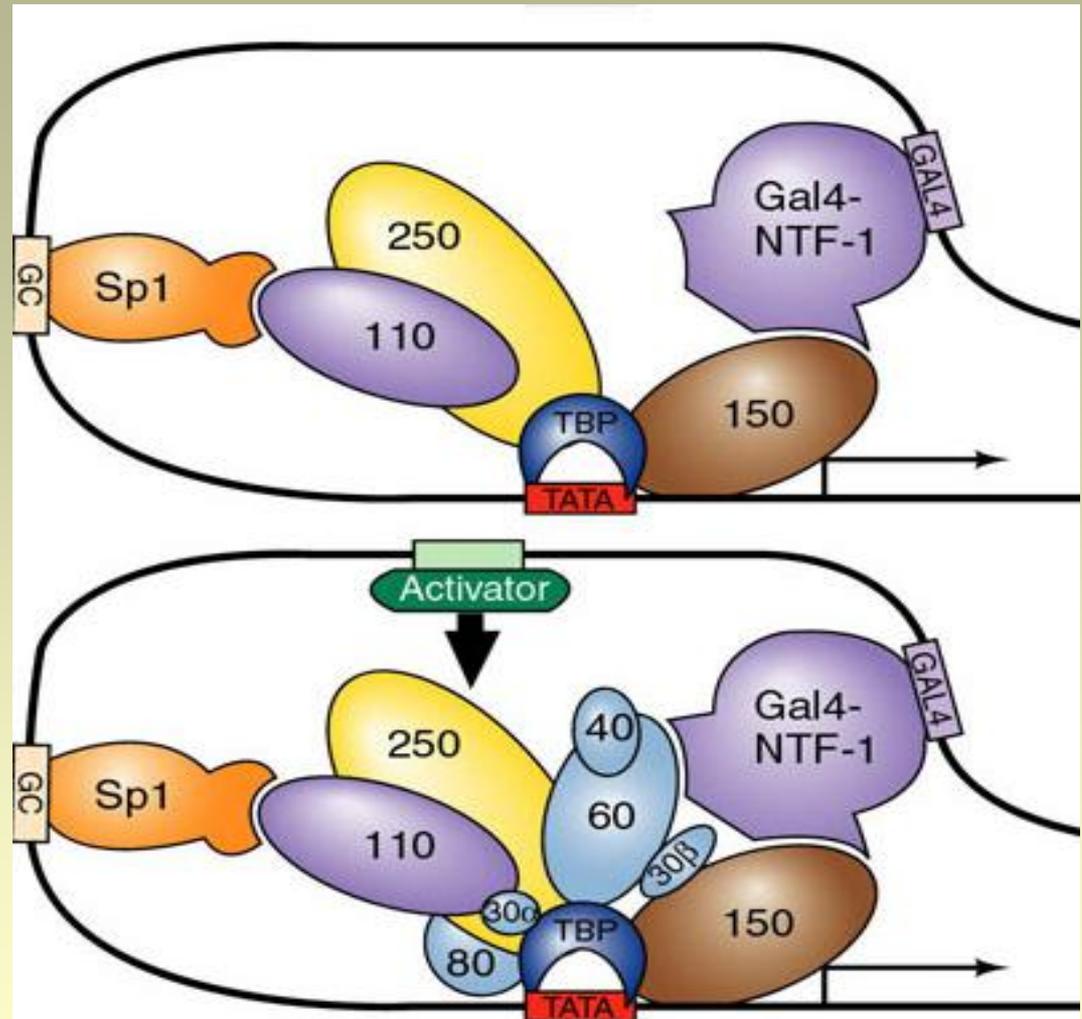
Interagiscono con i fattori di rimodellamento e modificazione della cromatina per modificare l'accessibilità del DNA ai fattori generali di trascrizione o attivatori specifici

# Alti livelli di trascrizione sono il risultato di interazioni multiple tra vari fattori

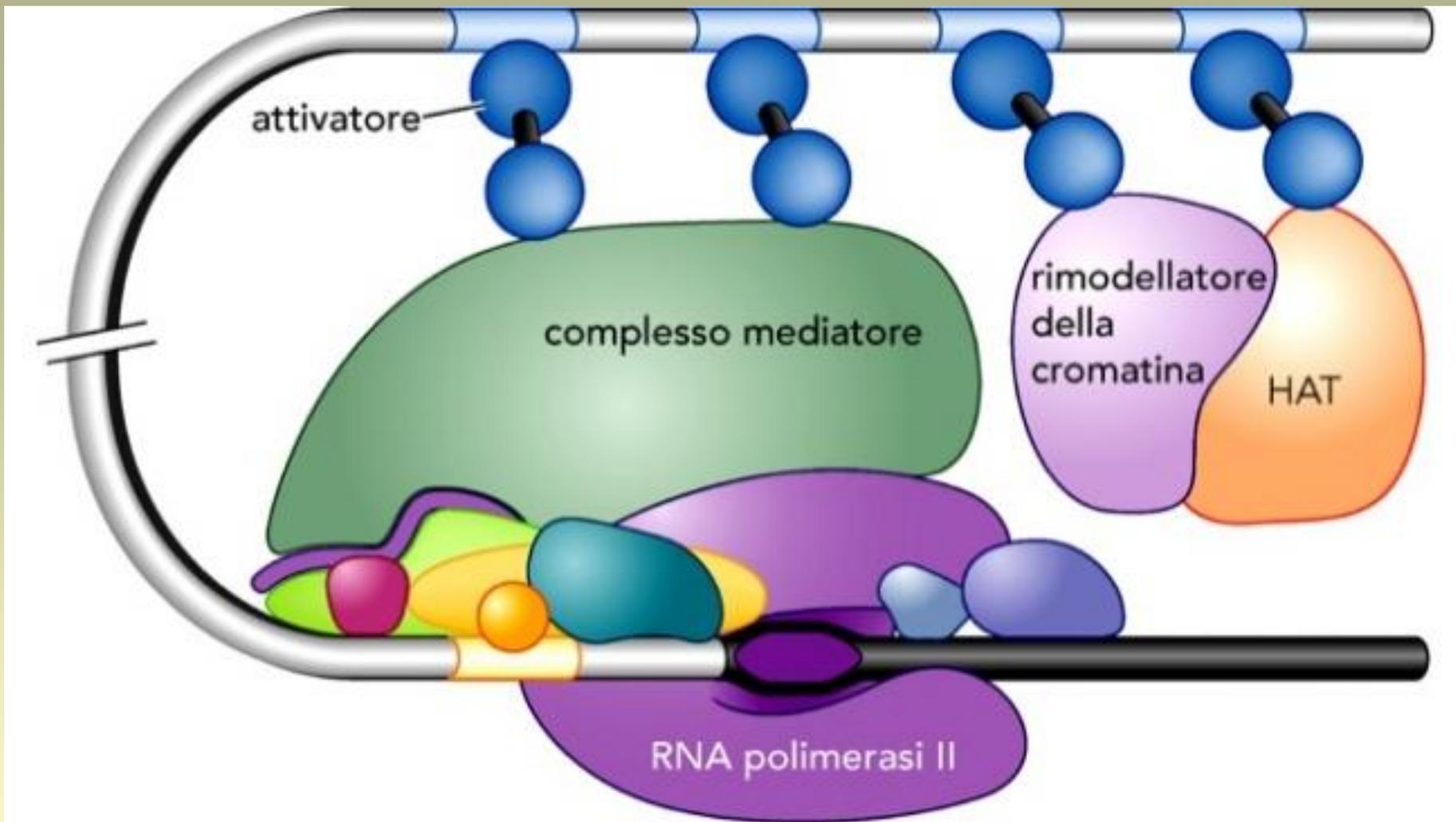
Gli elementi in cis controllano la trascrizione

Elementi prossimali (~250bp dal sito di inizio)

Elementi distali o Enhancer sono legate dalla proteina SP1, un attivatore di trascrizione che recluta il promotore attraverso il legame con TBP, 110



- I fattori trascrizionali regolano i livelli di trascrizione in maniera non-lineare
- L'attivazione sinergica è il risultato di contatti multipli

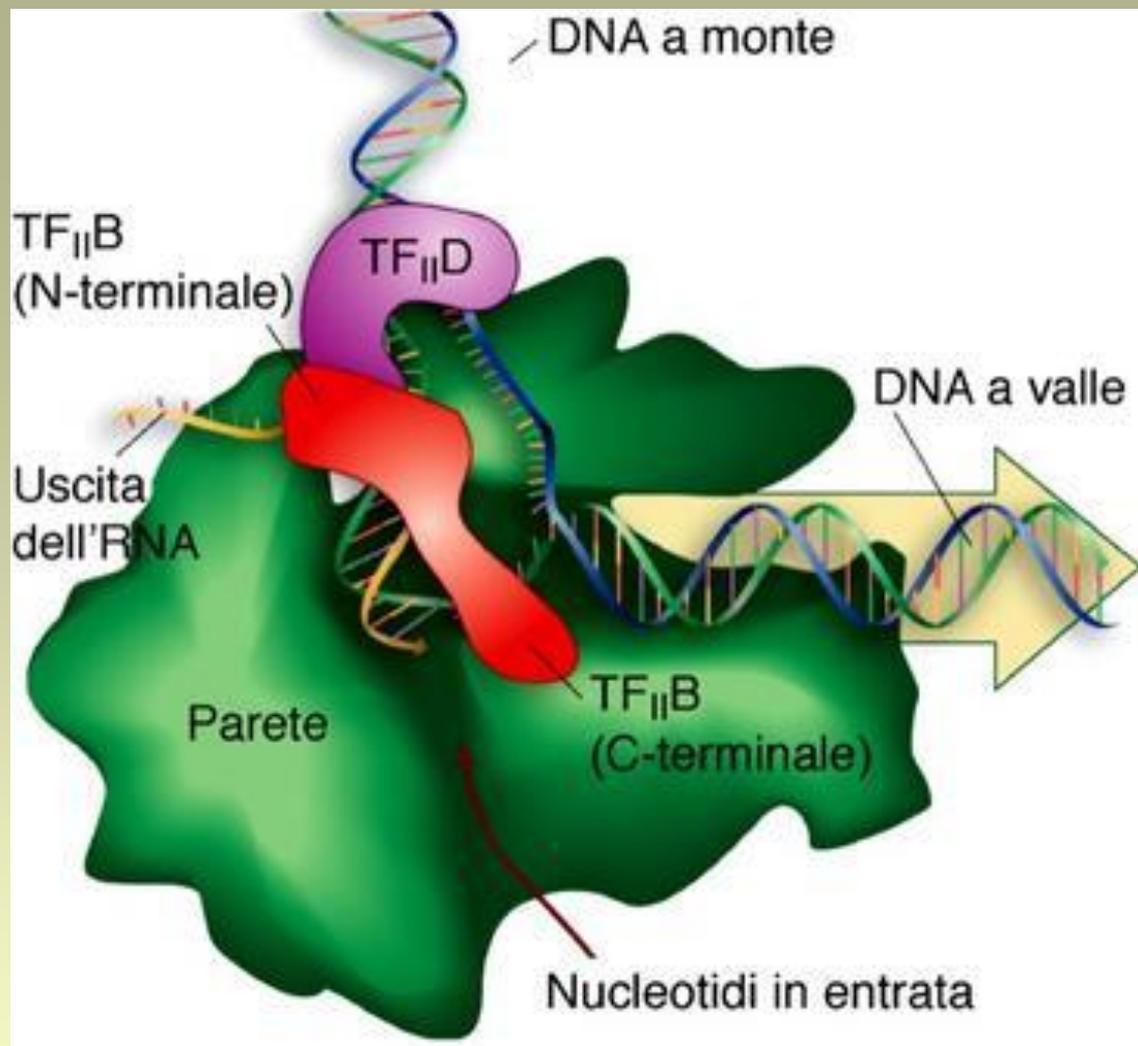


Complesso di inizio della RNAPol II

# ALLUNGAMENTO

Un nuovo set di fattori stimola l'allungamento e l'attività proofreading

La fosforilazione della CTD è essenziale per promuovere l'allungamento e l'interazione con vari fattori associati alla maturazione dell'RNA

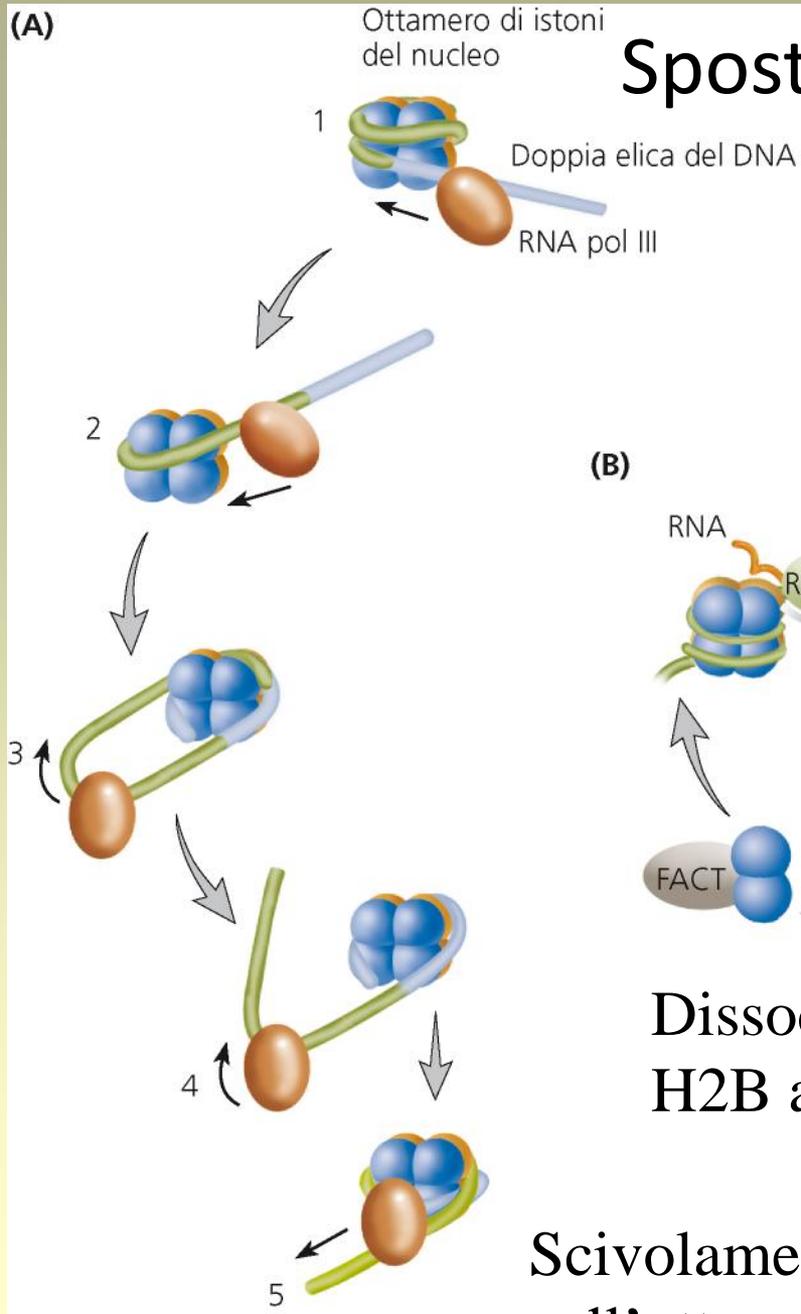


Il legame di TFIIB-TFIID alla RNAPol II blocca il canale di uscita dell'RNA

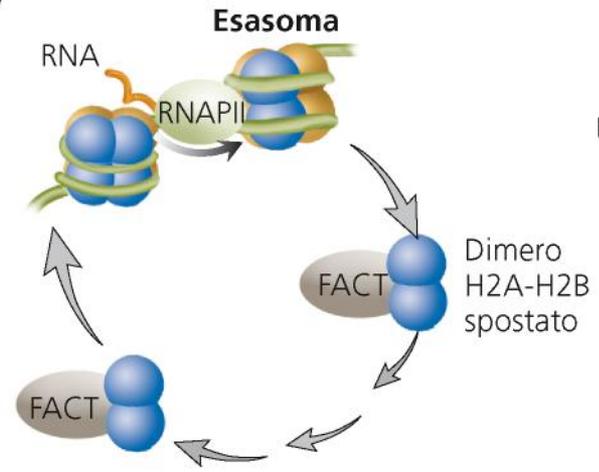
La clearance del promotore richiede la fosforilazione del CTD. Questo provoca il rilascio della maggior parte dei fattori generali di trascrizione (TFIIH resta legato per permettere la rapida formazione di un nuovo complesso di pre-inizio)

# Spostamento dell'ottamero istonico

(A)



(B)



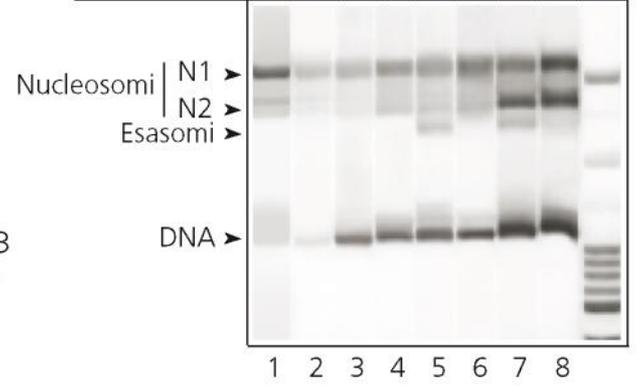
Dissociazione del dimero H2A-H2B ad opera di FACT

Scivolamento del DNA sull'ottamero

(C)

EC45 immobilizzato (DNA marcato) → -/+ KCl, -/+ rFACT, -/+ rFACTΔC, -/+ NTP → Supernatante → -/+ H2A/H2B → PAGE nativa

300 mM KCl	EC45								M
rFACTΔC	-	-	-	-	-	+	+		
rFACT	-	-	+	-	-	-	-		
NTP	-	-	-	+	+	-	-		
H2A/H2B	-	+	+	+	+	+	+		
	-	-	-	-	+	-	+		





# 5' end capping

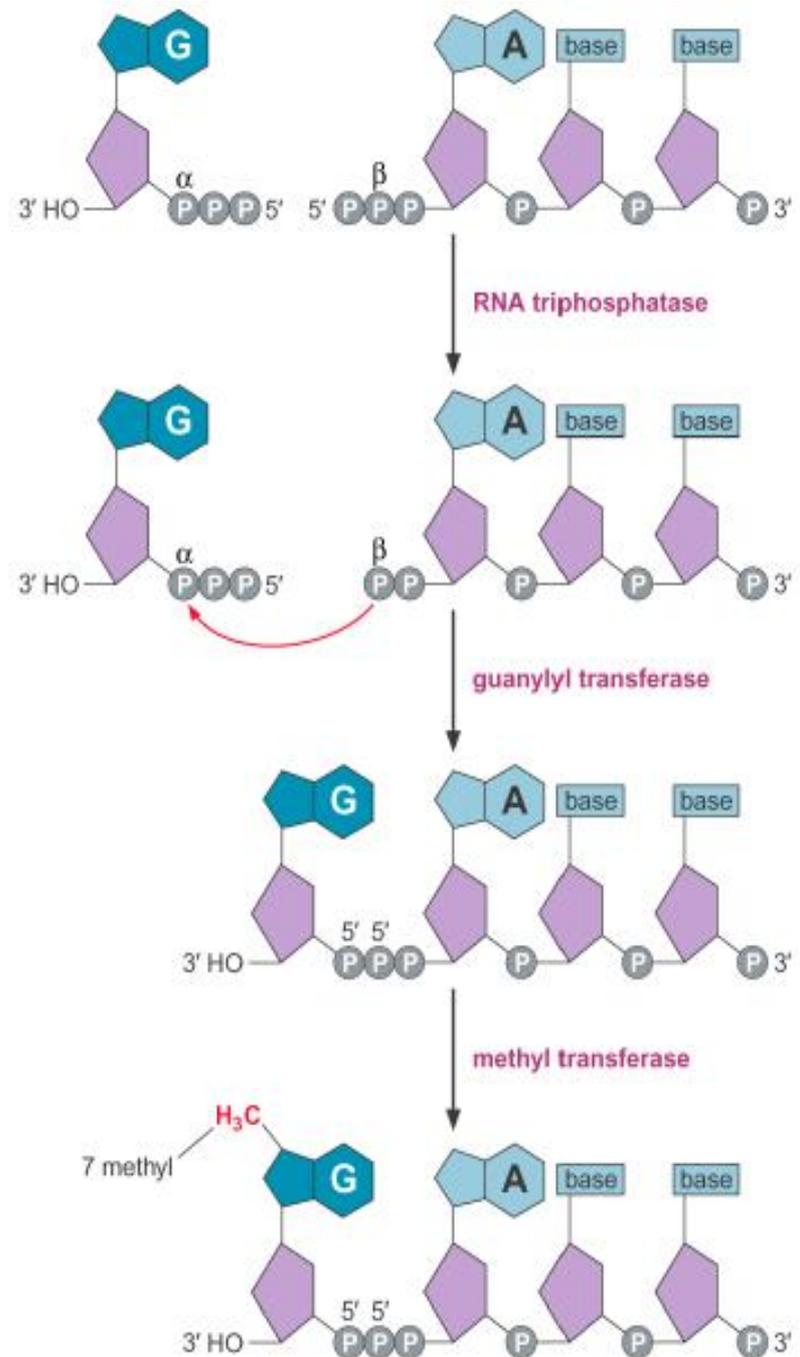
Il fosfato in posizione  $\gamma$  della estremità 5' dell'RNA è rimosso dalla RNA trifosfatasi

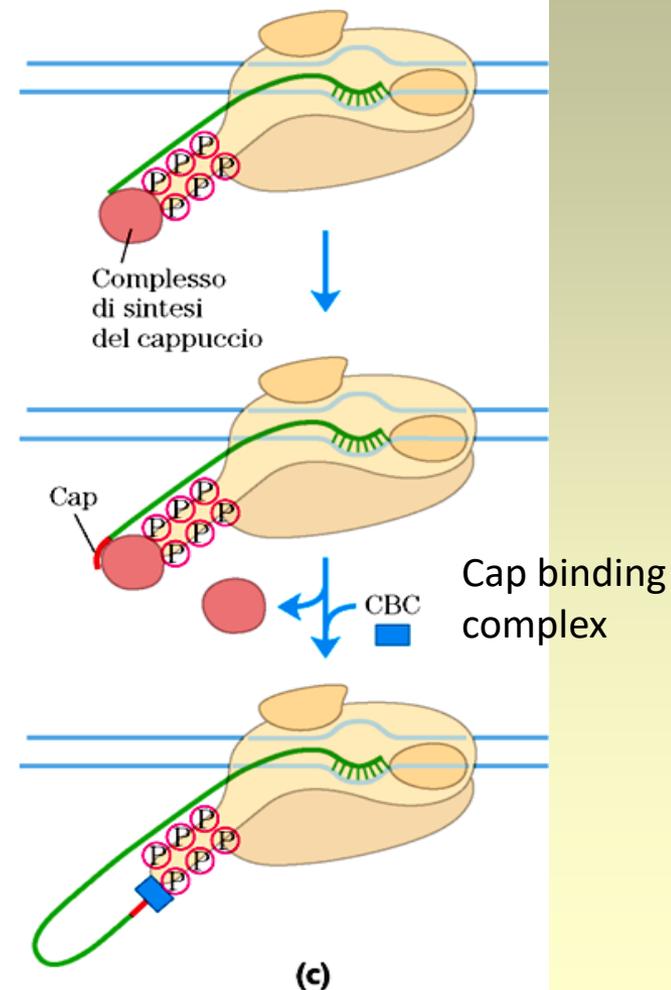
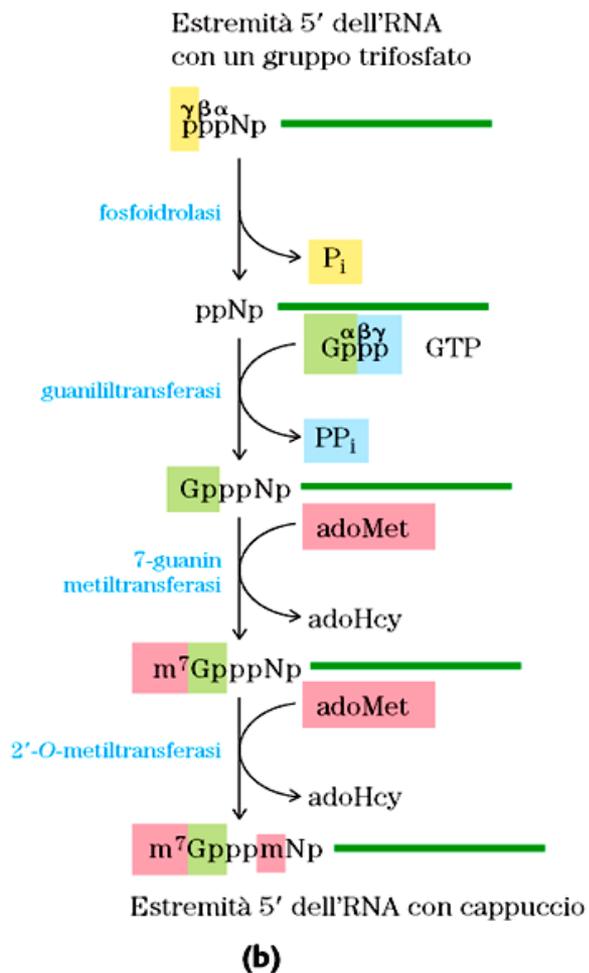
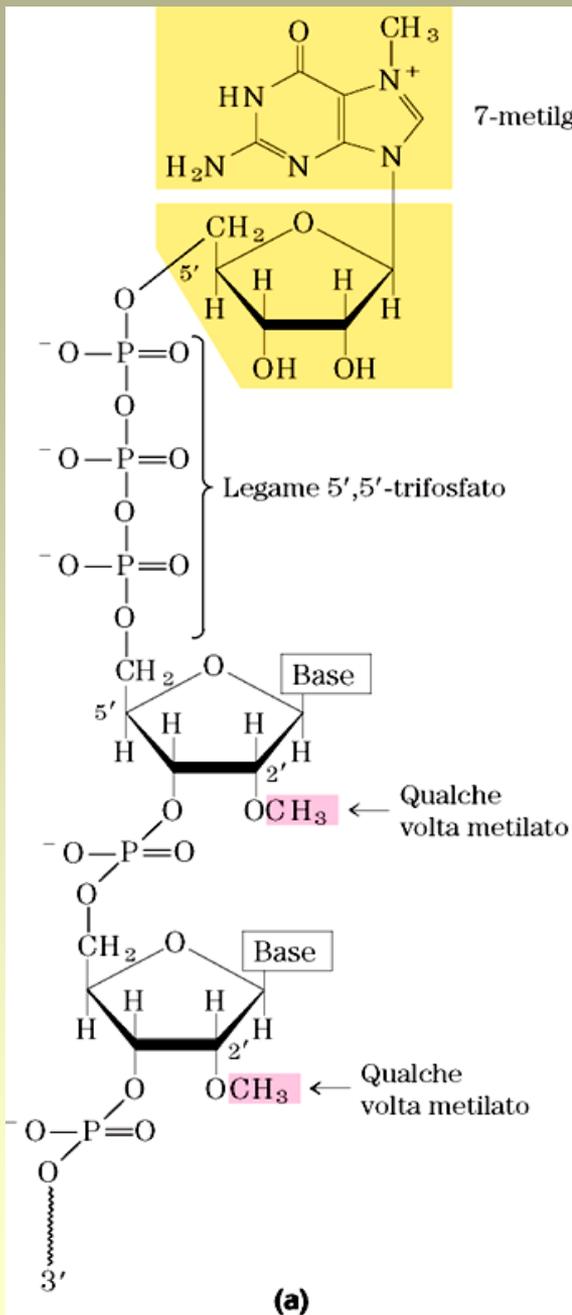
La guanil-trasferasi catalizza l'attacco nucleofilo del  $\beta$ -fosfato del terminale 5' con il fosfato  $\alpha$  del GTP portando alla formazione di un legame anidridico tra i fosfati  $\beta$ - $\alpha$  e l'uscita di pirofosfato

-----> Legame 5'-5' trifosfato

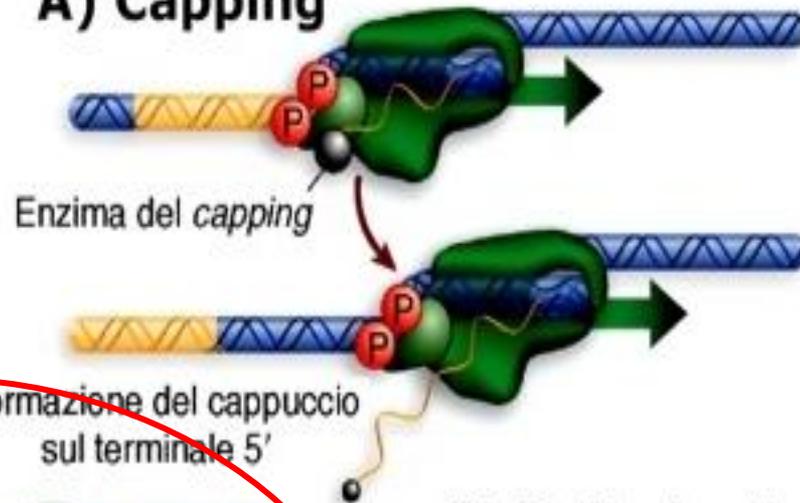
Successivamente una metiltrasferasi aggiunge un gruppo metilico in posizione 7 sulla base guanina del GTP addizionato

A volte l'OH 2' delle prime unità di ribosio viene metilato

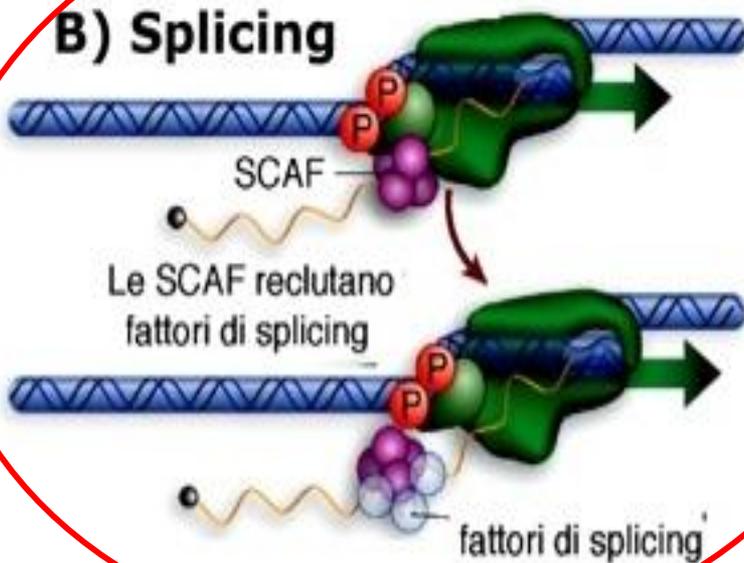




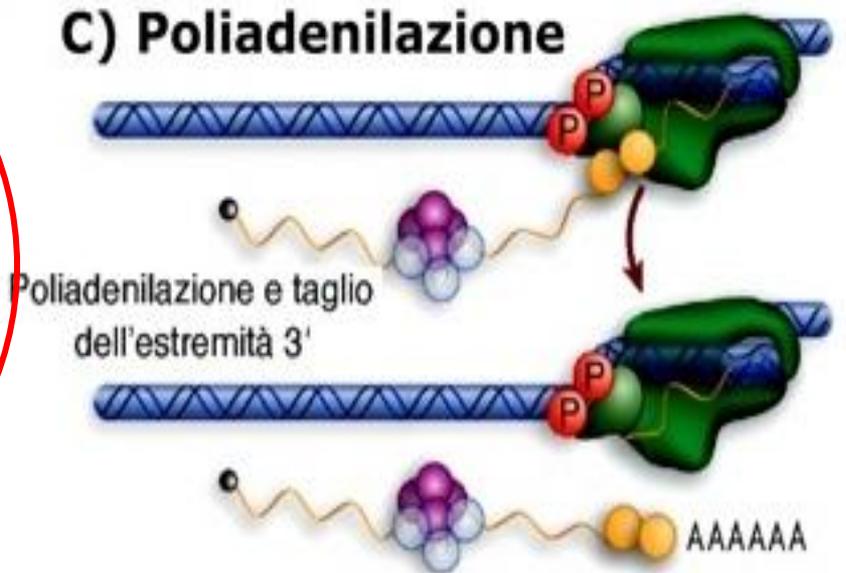
### A) Capping



### B) Splicing



### C) Poliadenilazione



SCAF: splicing complex associated factors

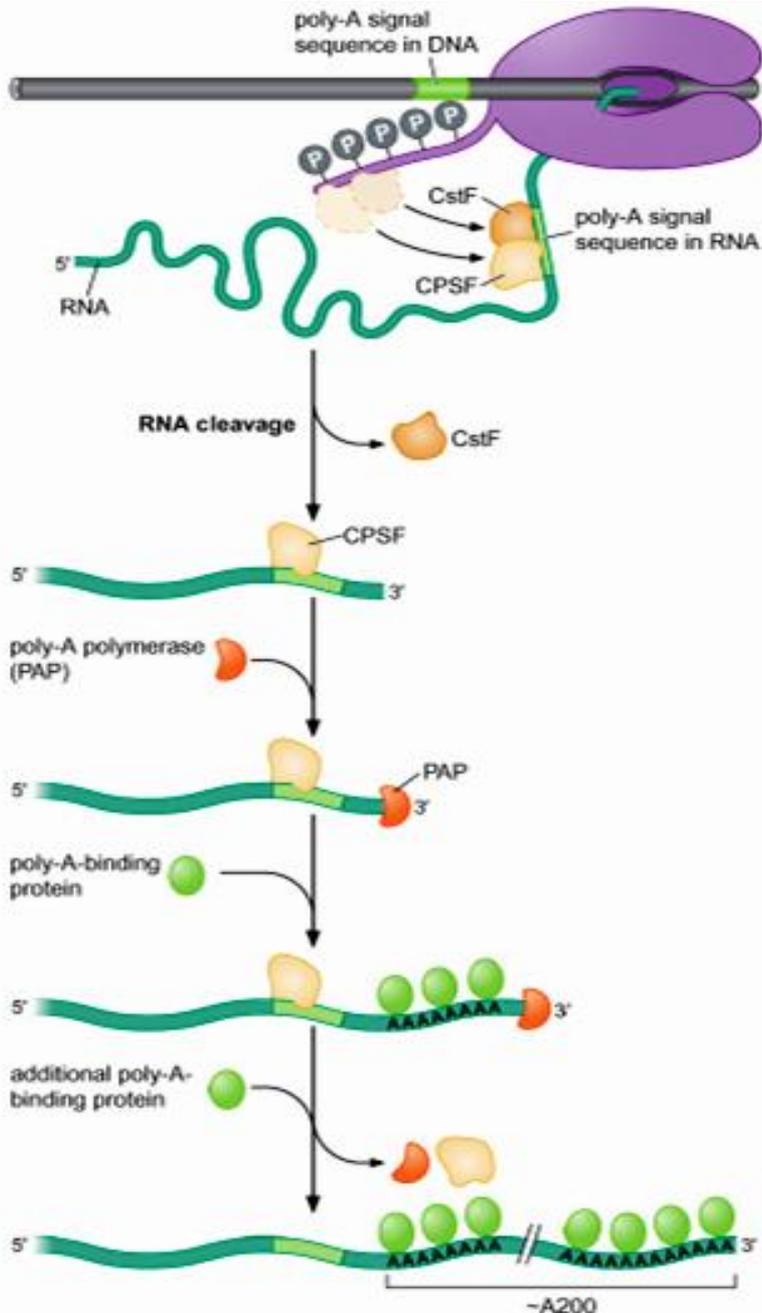
# Poli-adenilazione al 3' terminale

Fasi della poliadenilazione:

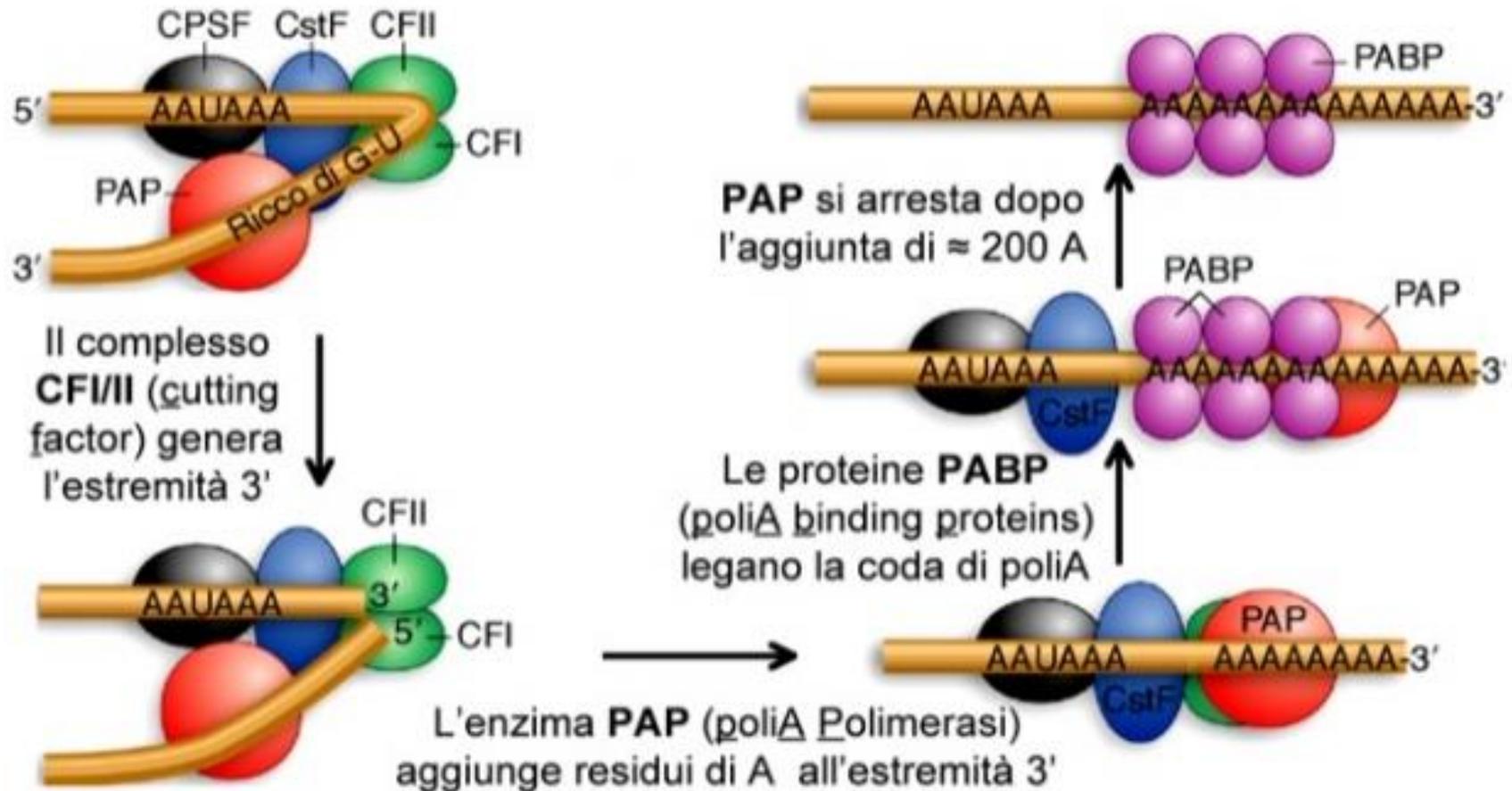
Trascrizione della sequenza di poli-adenilazione

Taglio dell'RNA

Poli-adenilazione da parte della poli-A polimerasi (utilizza ATP e libera PP)



# Poli-adenilazione al 3' terminale



**CPSF:** cleavage and polyadenylation specificity factor - riconosce seq. AAUAAA

**CstF:** cleavage stimulating factor - lega sequenza ricca in GU

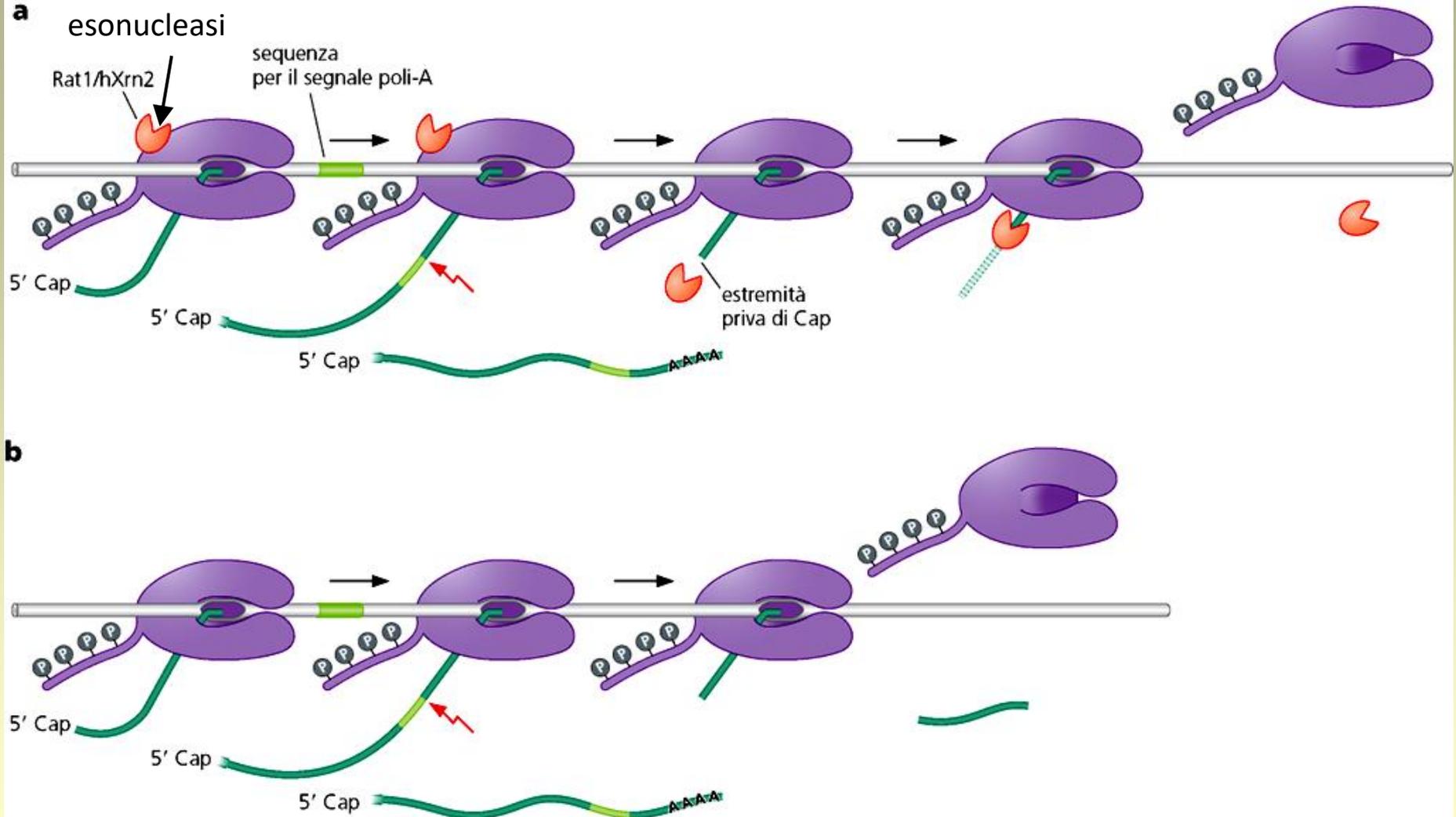
**CFI, CFII:** endonucleasi

**PAP:** Poli(A) Polimerasi

**PABP:** Poly(A) Binding Protein - trasporto RNA al citoplasma

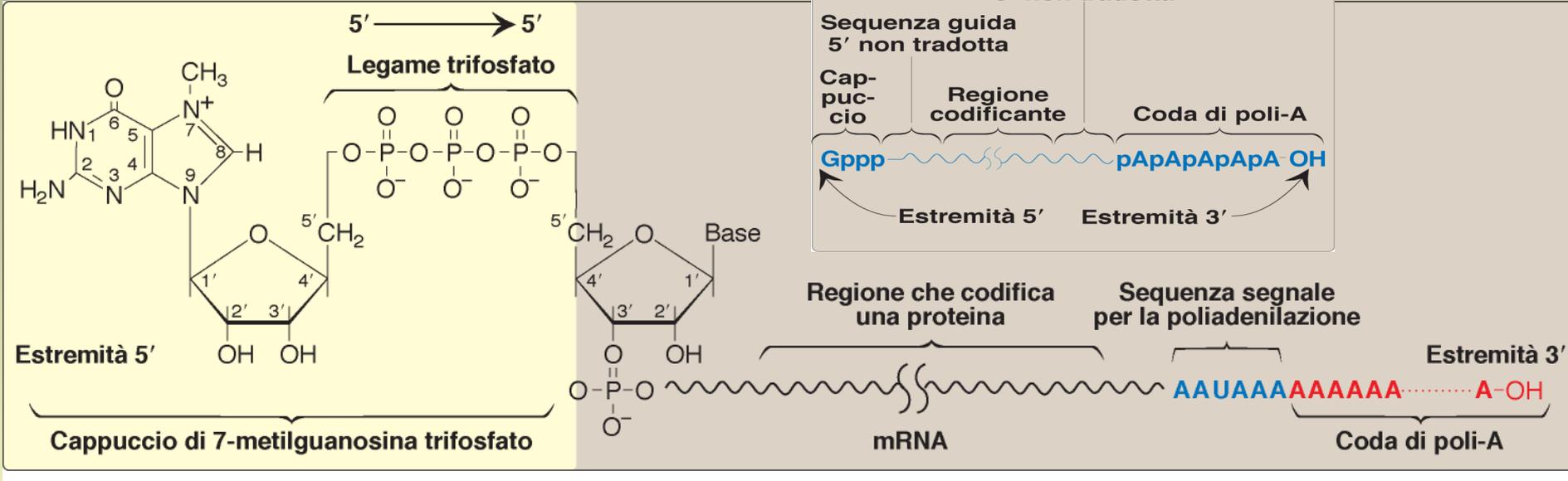
NB: gli mRNA degli istoni non sono poliadenilati

# TERMINE DELLA TRASCRIZIONE



# Stabilità dell'mRNA

UTR regioni non codificanti e non tradotte



Cappuccio al 5' –  
protezione dalle  
esonucleasi 5' → 3'

Elementi di sequenza specifici  
all'interno dell'mRNA possono  
stabilizzarlo o destabilizzarlo

Coda poli-A al 3' –  
protezione dalle  
esonucleasi 3' → 5'

# Controllo dell'espressione genica negli eucarioti

# Differenze della regolazione genica fra procarioti ed eucarioti

- Dimensione e complessità del genoma
- Compartimentazione del genoma
- Organizzazione strutturale del genoma
- Stabilità dell'mRNA
- Modificazione post-traduzionale delle proteine
- Turnover delle proteine

# La regolazione dell'espressione genica

- Nei procarioti:
  - un'espressione genica selettiva permette alle cellule di risparmiare energia
  - La regolazione avviene prevalentemente a livello trascrizionale
- Negli eucarioti:
  - l'espressione genica selettiva permette alle cellule di svolgere ruoli specializzati
  - La regolazione avviene a vari livelli

# ESPRESSIONE DEL GENOMA UMANO NELLE CELLULE DIFFERENZIATE

Tutte le cellule di un organismo hanno lo stesso corredo genomico (~40000 geni)

L'espressione genica tessuto specifica determina il fenotipo morfo-funzionale dei tipi cellulari e tissutali

In ogni cellula differenziata ed in ogni particolare momento dello sviluppo è attivo solo un sottoinsieme di geni

# Restrizione spaziale e temporale dell'espressione genica

- **Geni housekeeping (costitutivi)**
- **Geni con espressione ristretta nello spazio**
  - Espressione in più organi/tessuti diversi  
Stesso ruolo in più tessuti  
Il gene codifica per diverse isoforme (promotori alternativi e/o splicing alternativo tessuto specifico)
  - Espressione specifica per tessuto, linea o tipo cellulare
  - Espressione solo in singole cellule
  - Distribuzione intracellulare o extracellulare
- **Geni con espressione ristretta nel tempo**
  - Stadio di sviluppo
  - Stadio di differenziamento
  - Momento del ciclo cellulare
  - Espressione inducibile da parte di fattori ambientali o extracellulari

# Proteine che regolano la trascrizione

- Componenti del macchinario generale

RNA polimerasi e proteine necessarie per il riconoscimento del promotore: 5 fattori generali (TFIIB/D/E/F/H)

- Fattori di trascrizione

- Coattivatori e corepressori

stabiliscono interazioni proteina-proteina senza legarsi direttamente al DNA

# FATTORI DI TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI

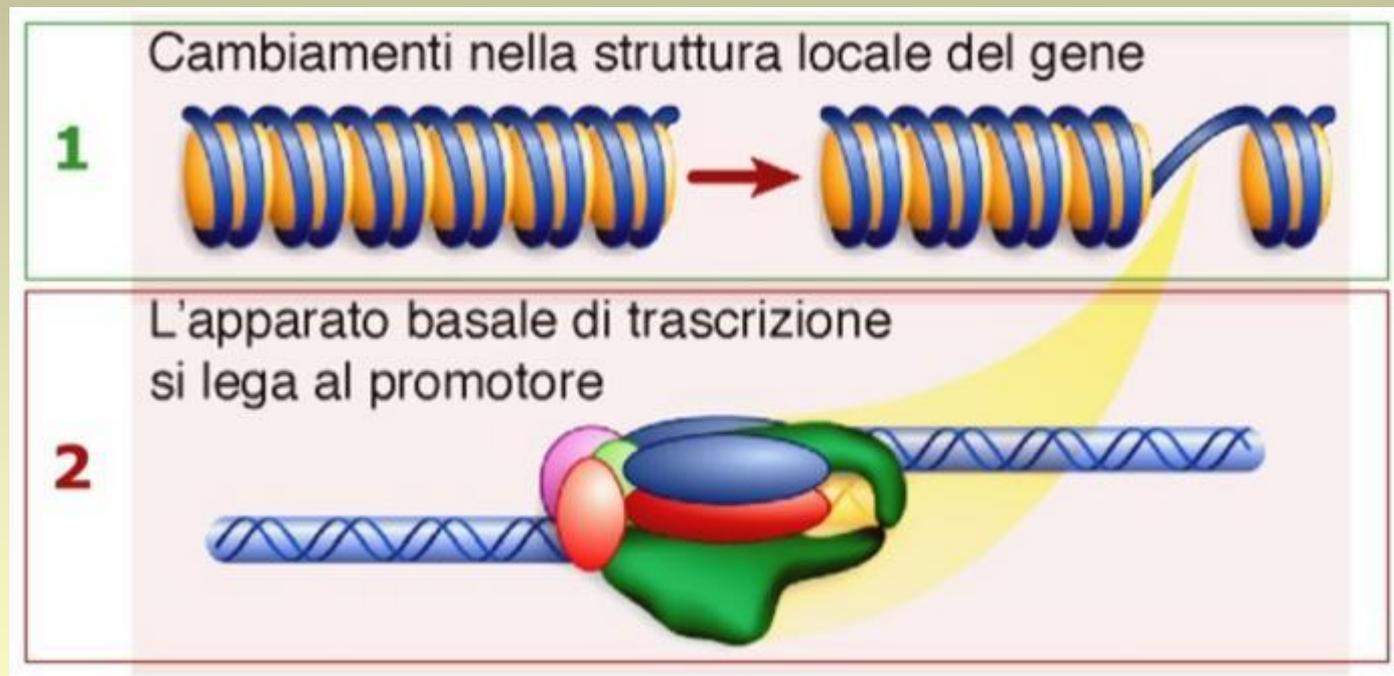
( trans-acting factors = fattori che agiscono in trans )

Possono essere distinti in:

- Fattori generali
  - Fattori a monte
  - Fattori inducibili
- } attivatori

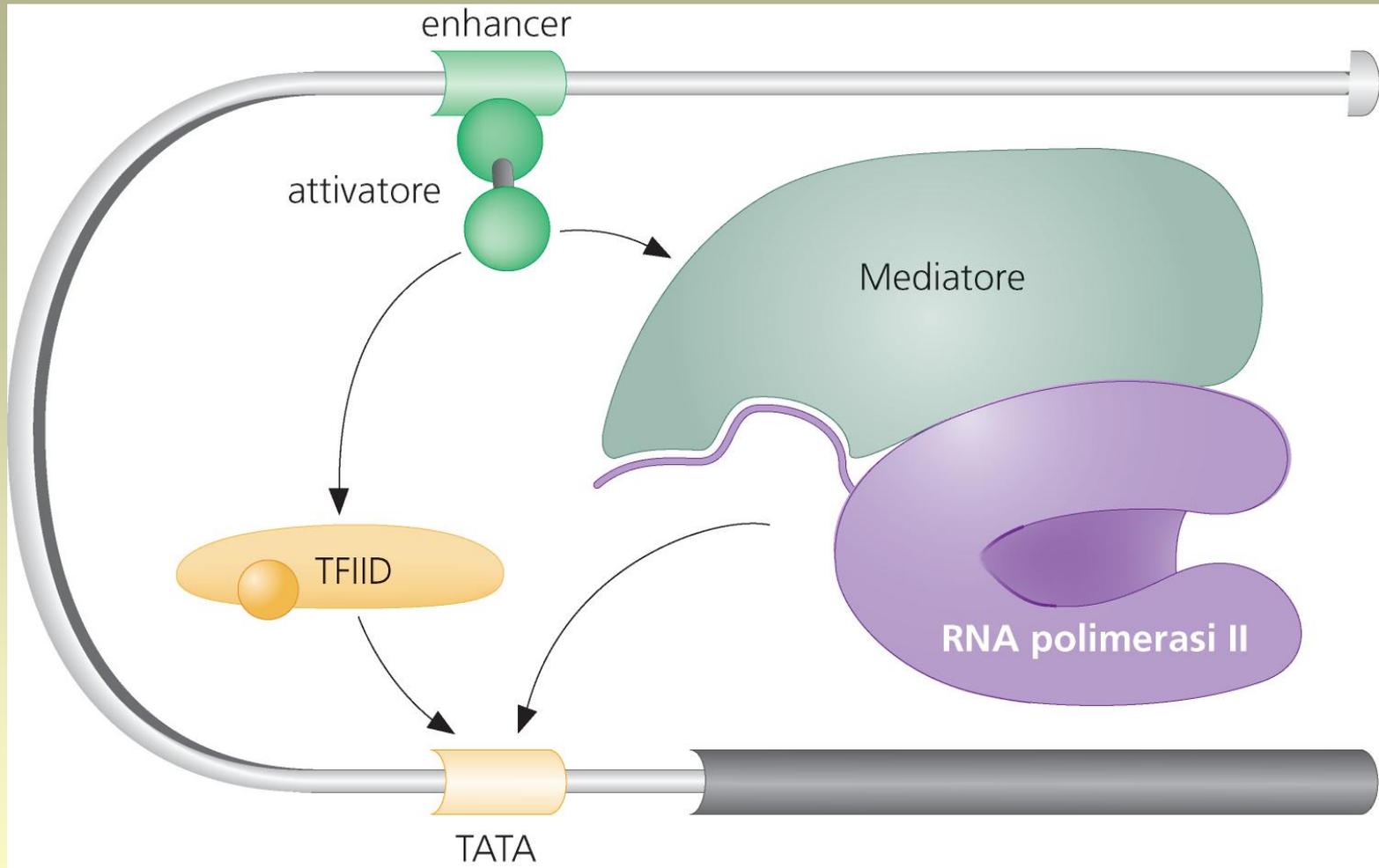
# Meccanismi molecolari del controllo trascrizionale negli eucarioti

La concentrazione e l'attività di attivatori e repressori regolano la struttura della cromatina (acetilazione-deacetilazione degli istoni – diverso posizionamento dei nucleosomi) e l'assemblaggio del complesso di inizio



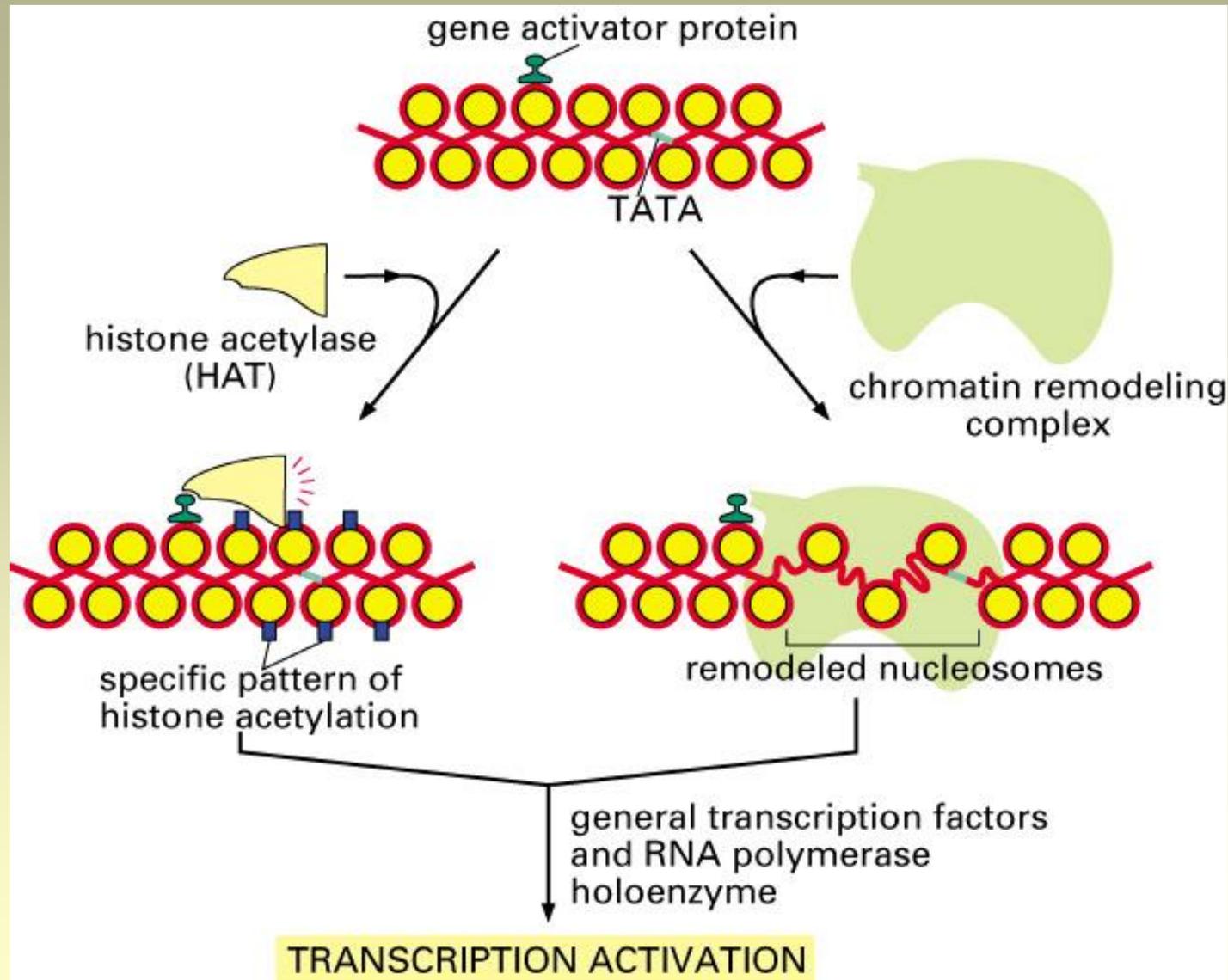
- Attivazione per reclutamento del complesso di trascrizione
- Attivazione per alterazione della struttura della cromatina

# Attivazione per reclutamento del complesso di trascrizione



Le proteine regolative aiutano il reclutamento e l'assemblaggio del complesso di inizio

# Attivazione per alterazione della cromatina



**Chromatin modulation proteins to induce transcription**

Figure 7-45. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Enzimi che regolano la struttura della cromatina

Histone modifiers, DNA metiltrasferasi e Chromatin remodelers

## Histone modifiers

Non alterano la posizione dei nucleosomi ma generano segnali (histone code) che sono letti da vari fattori.

## Chromatin remodelers

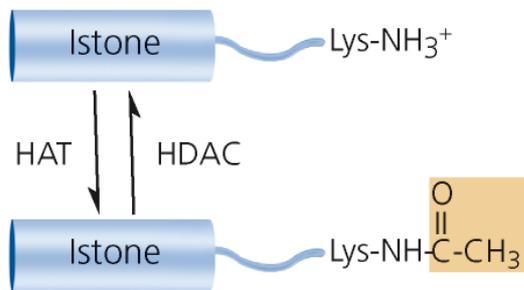
Utilizzano ATP per rimodellare la struttura cromatina, spostando i nucleosomi e rendendo leggibili sequenze di DNA regolatorie

Agiscono come complessi multiproteici permettendo un controllo fine sulla attività rimodellante

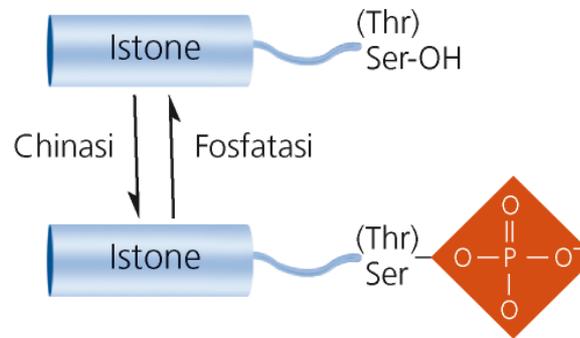
# Modifiche covalenti degli istoni

# Modifiche covalenti degli istoni

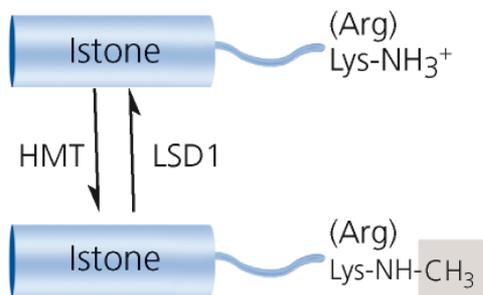
## Acetilazione



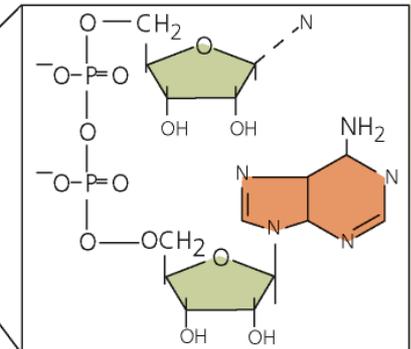
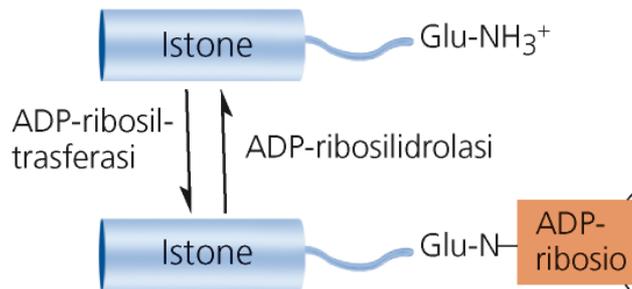
## Fosforilazione



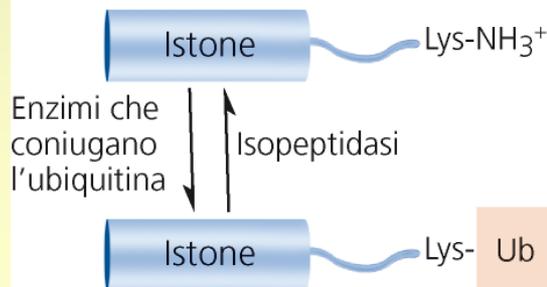
## Metilazione



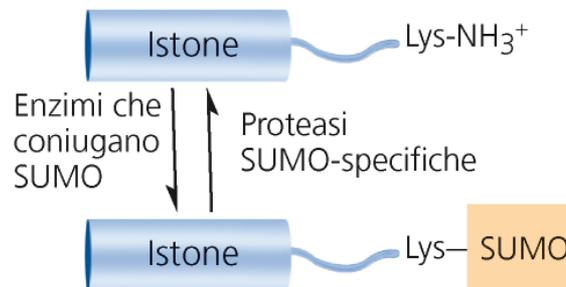
## ADP-ribosilazione



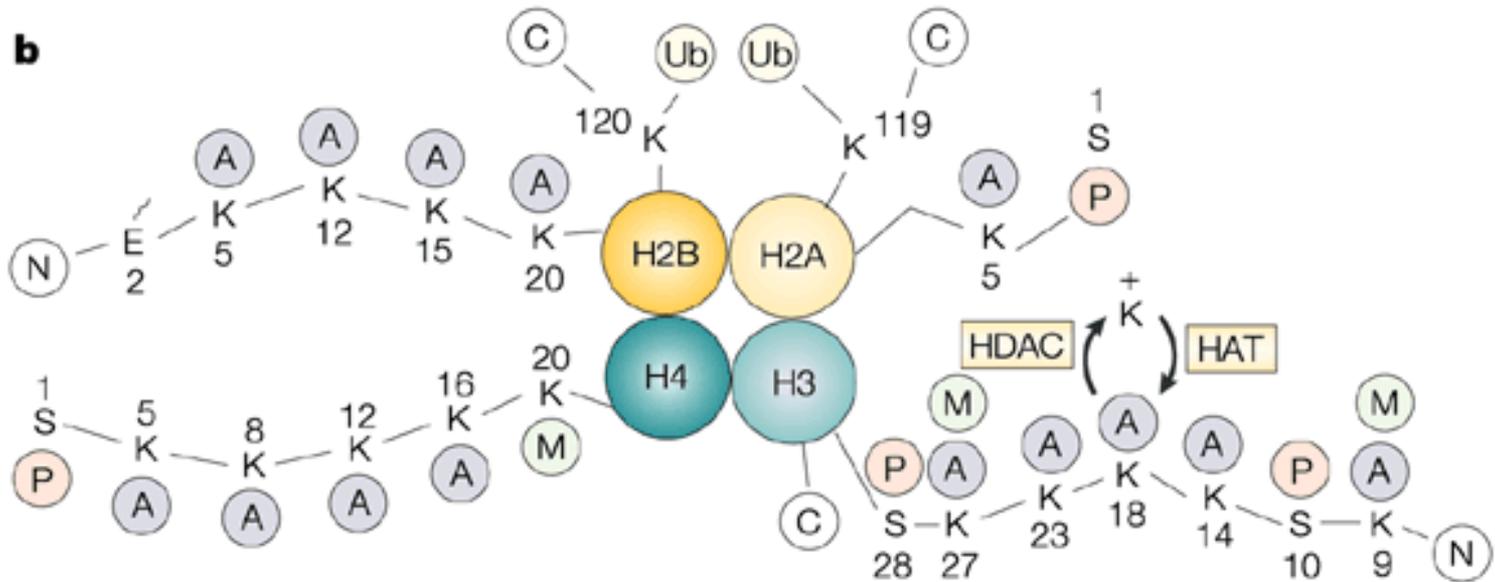
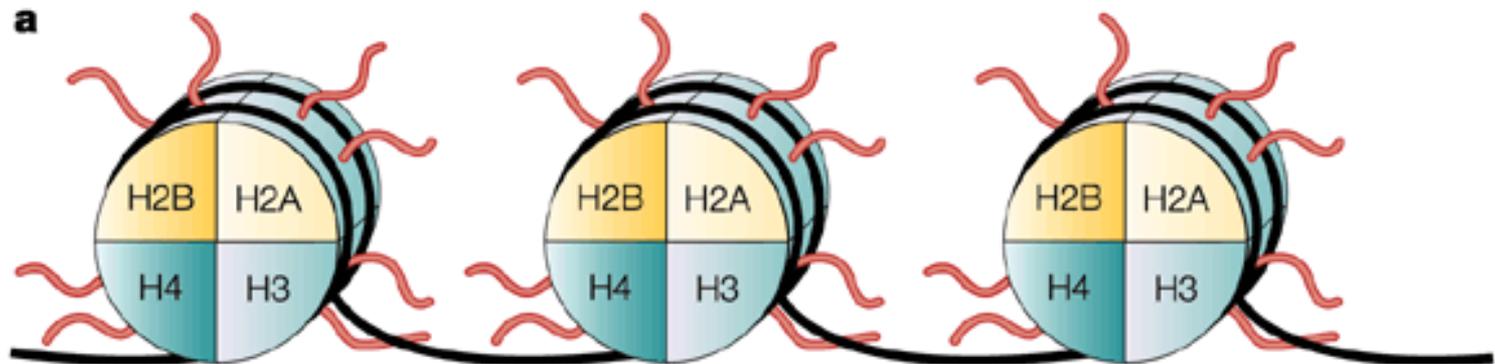
## Ubiquitinazione



## Sumoilazione



# Modifiche covalenti degli istoni



# Modifiche covalenti degli istoni

Modifiche apportate da specifici fattori proteici (writers) e rimosse da altri specifici fattori proteici (erasers)

Le modifiche vengono lette da appositi fattori (readers)

Acetilazione e metilazione delle lisine delle code istoniche (H3 e H4) sono coinvolte nel controllo e la regolazione della trascrizione

H4K16ac -> favorisce la trascrizione

H3K4me3 -> attivazione trascrizionale

H3K27me3 -> inattivazione trascrizionale

H3K9me -> inattivazione trascrizionale (eterocromatizzazione)

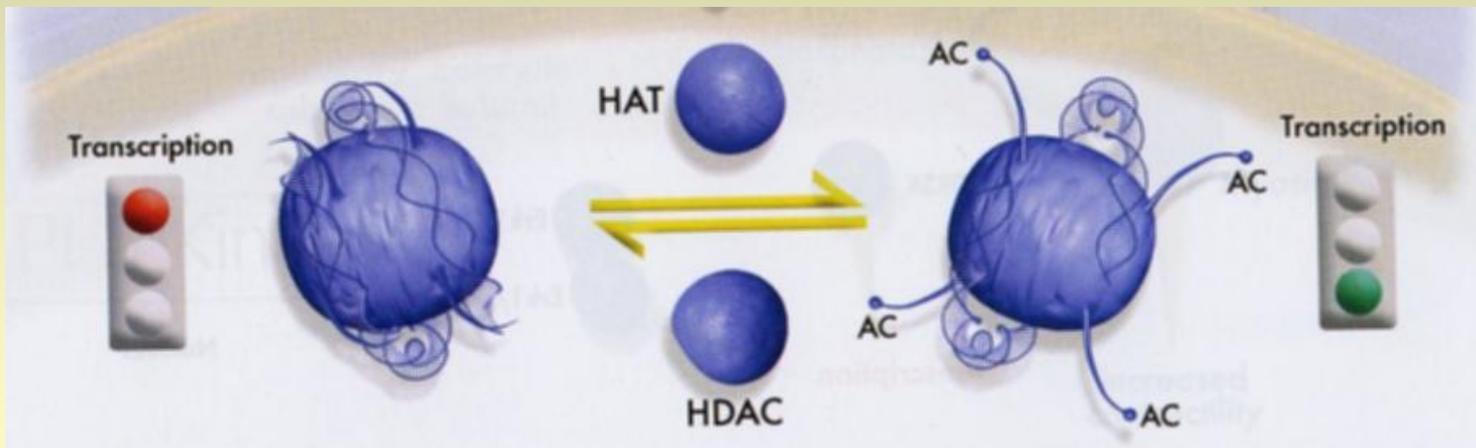
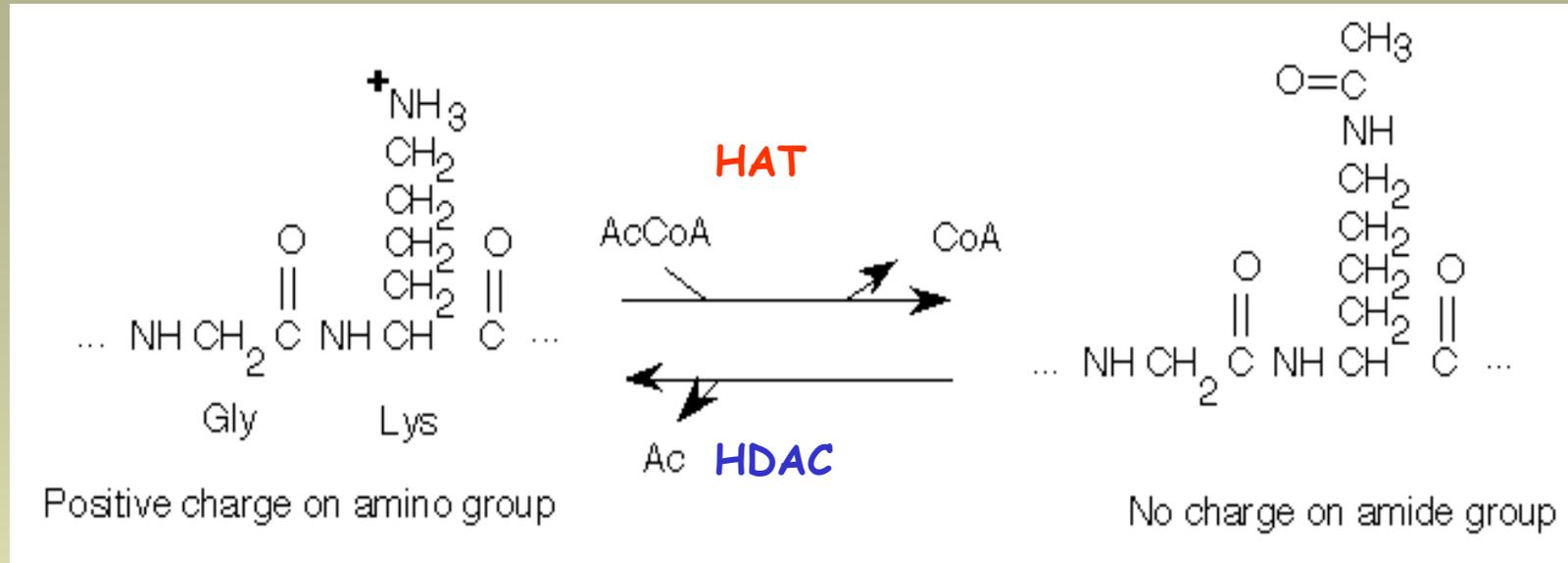
La fosforilazione degli istoni è coinvolta in altri processi nucleari

H2A.X (S139) -> riparo del DNA

H3 (S10) -> stabilità cromosomi e divisione cellulare

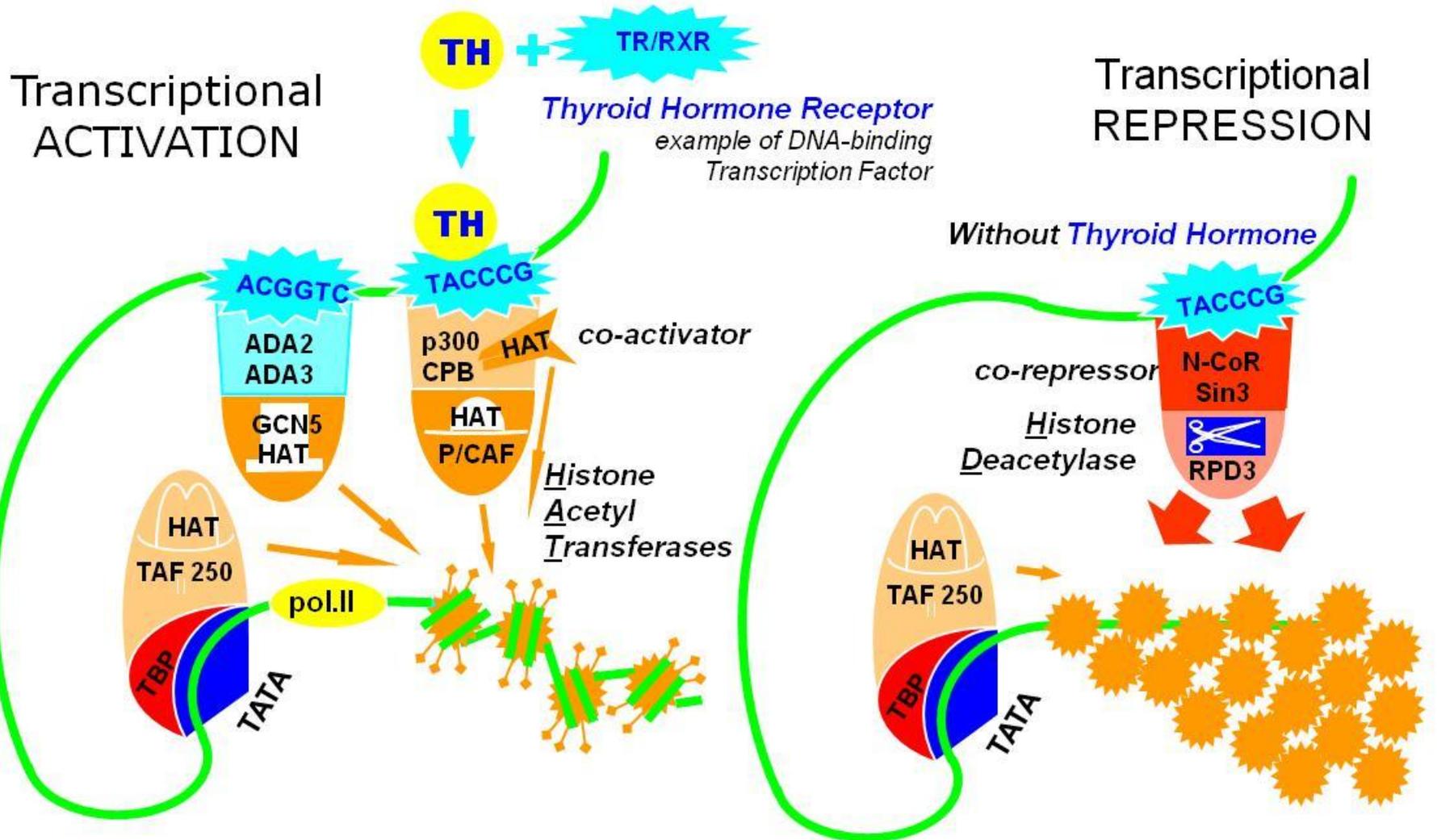
H2B (S14) -> apoptosi

# RUOLO DELL'ACETILAZIONE ISTONICA



- Decondensa la fibra da 30nm
- Favorisce l'accesso dei fattori di trascrizione sulla cromatina
- Agisce come segnale per il legame di proteine non istoniche

# Acetilazione al promotore

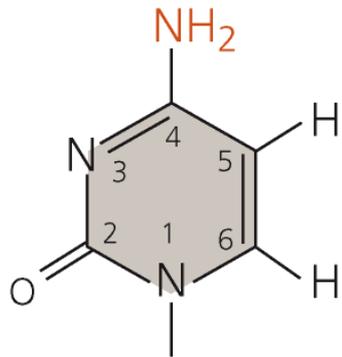


# Metilazione del DNA

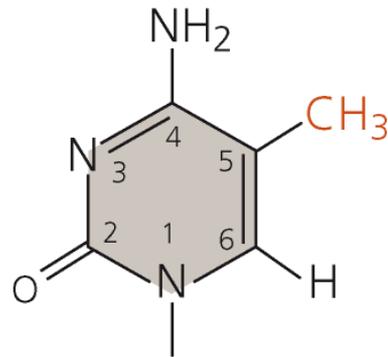
# Metilazione del DNA

La metilazione del DNA comporta l'aggiunta di un gruppo metile in posizione 5' della citosina.

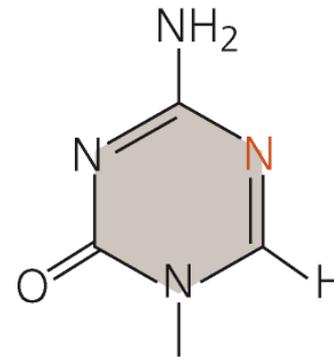
(A)



Citosina normale



5-Metilcitosina

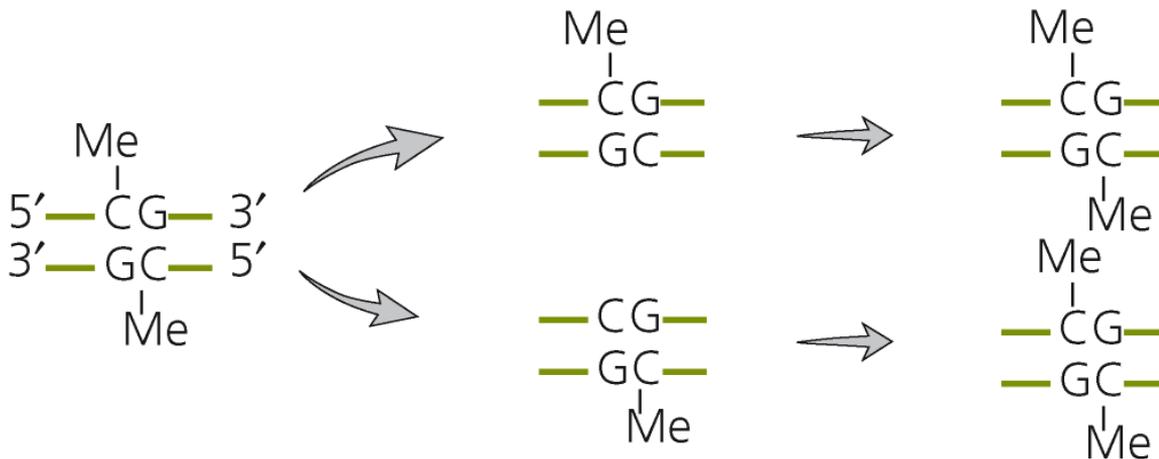


5-Aza-citosina

La metilazione avviene a livello di regioni ricche in CpG (CpG island) che si trovano spesso nei promotori. La metilazione ha un ruolo importante nell'espressione genica

La 5-aza-citosina, analogo della citosina che non può essere metilato, è utilizzato nella terapia anticancro

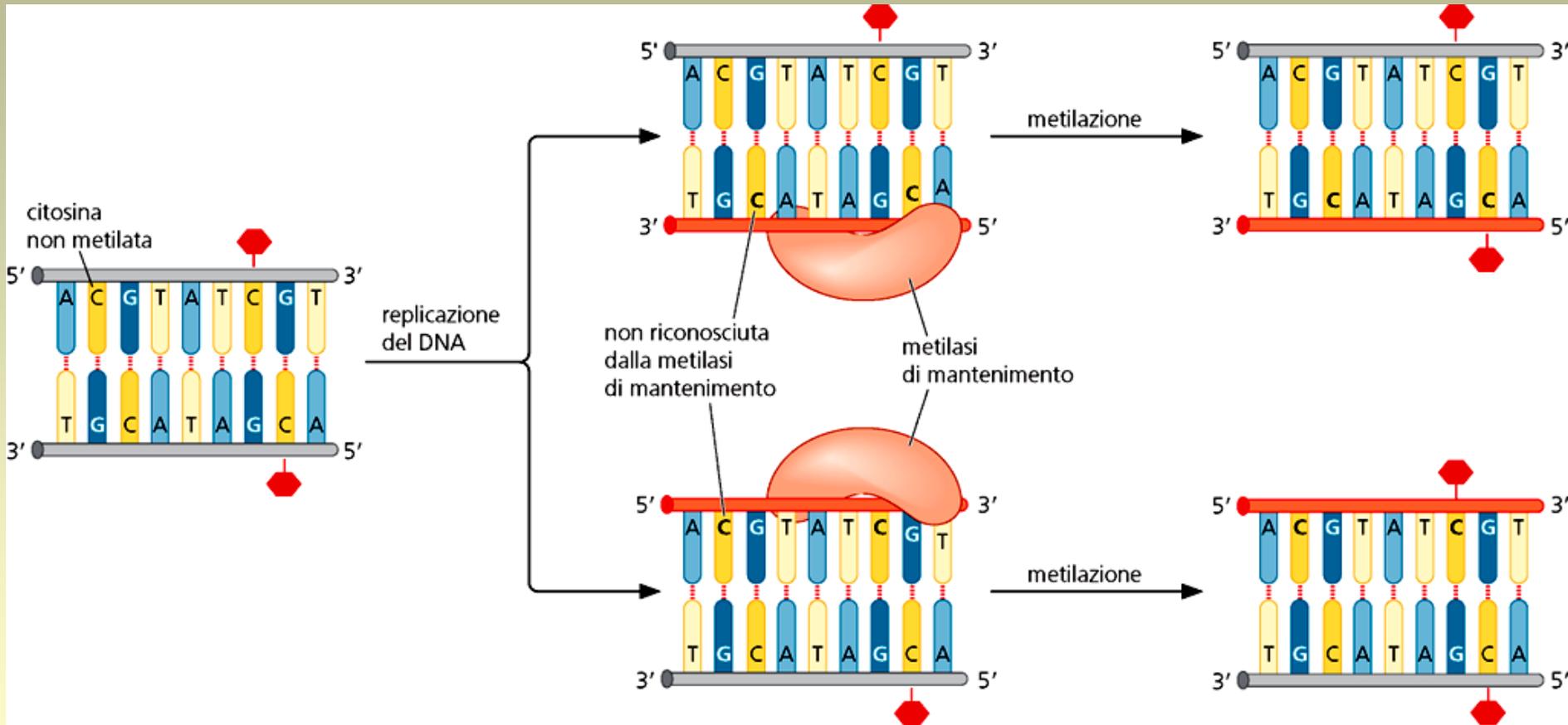
(B)



Replicazione del DNA  
(mitosi o meiosi)

Metilazione  
di mantenimento

La *DNA* (5-citosina)-metiltransferasi (DNMT) è responsabile della metilazione alla posizione C5 della citosina presente nelle isole CpG  
Le DNMT sono costituite da un dominio C-terminale catalitico ed un dominio N-terminale regolativo.



La metilazione è mantenuta nel corso della divisione cellulare (DNMT1 e 2) o può essere introdotta ex novo (DNMT3)

# Metilazione del DNA

La metilazione del DNA è principalmente localizzata in regioni del genoma che includono elementi ripetitivi e trasposoni.

Le CpG islands che si trovano nei promotori di geni housekeeping sono ipometilate e quindi trascrizionalmente attive.

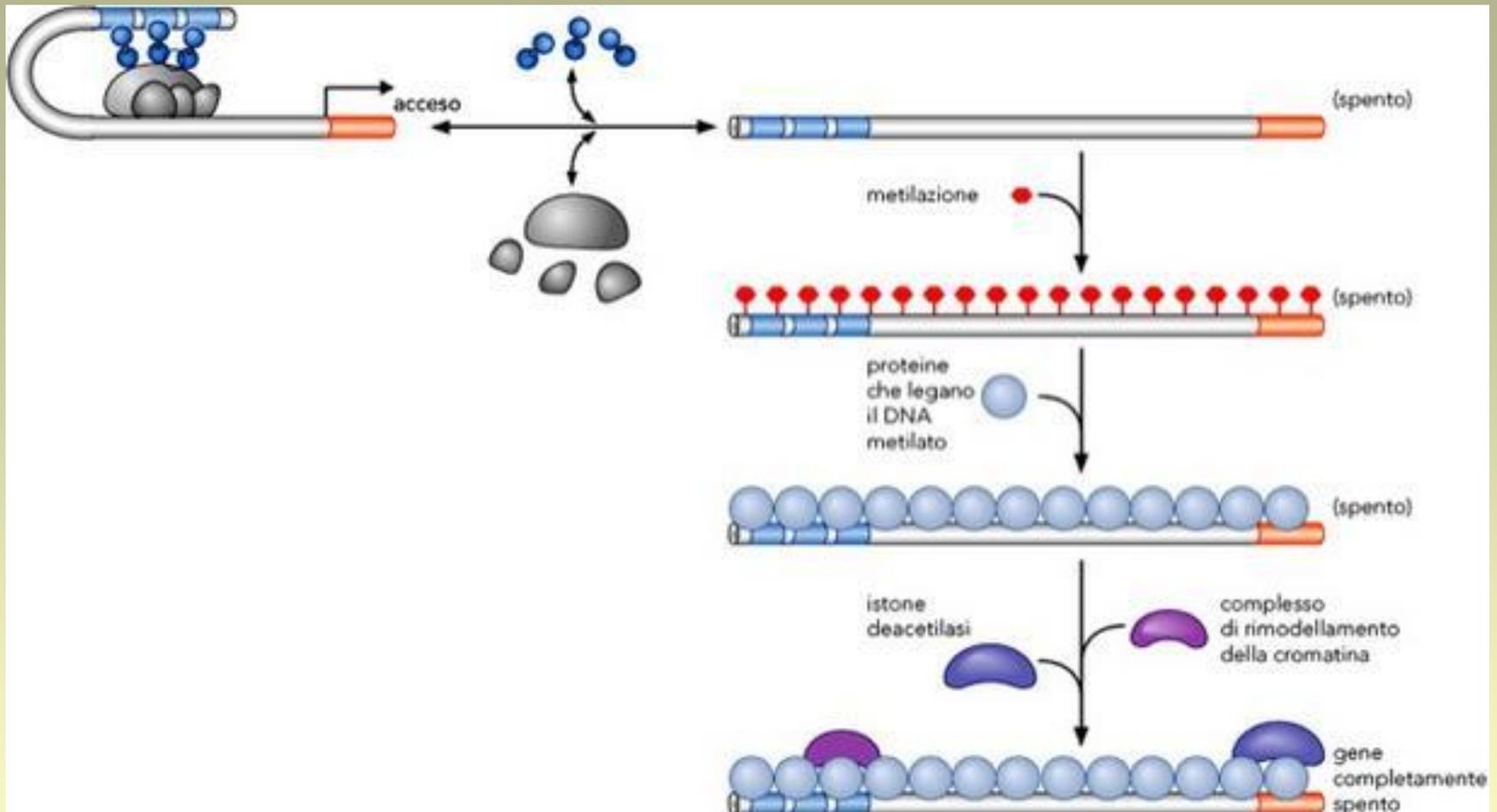
Alterazioni nel pattern di metilazione del DNA modificano il livelli di espressione e la stabilità genomica modificando la struttura della cromatina.

La metilazione costituisce il principale sistema di riprogrammazione epigenetica

Ondate di metilazione ex novo e di demetilazione avvengono durante la gametogenesi e durante lo sviluppo embrionale

La metilazione degli istoni è collegata allo stato di metilazione del DNA circostante.

# Metilazione e silenziamento



La metilazione del DNA generalmente inibisce l'espressione genica o direttamente bloccando il legame di attivatori trascrizionali, o legando delle metil-CpG-binding proteins che reclutano complessi co-repressori

# Rimodellamento della cromatina

# Regolazione della cromatina

Lo stato funzionale della cromatina è il risultato delle modificazioni covalenti a carico di istoni e DNA che ne alterano il grado di condensazione e quindi l'esposizione di sequenze di DNA a fattori proteici in grado di legarsi in maniera specifica.

Un ulteriore meccanismo di controllo funzionale è rappresentato dalla attività di specifici enzimi in grado di modificare il grado di condensazione di regioni cromatiniche.

## Fattori di rimodellamento

# Fattori di rimodellamento

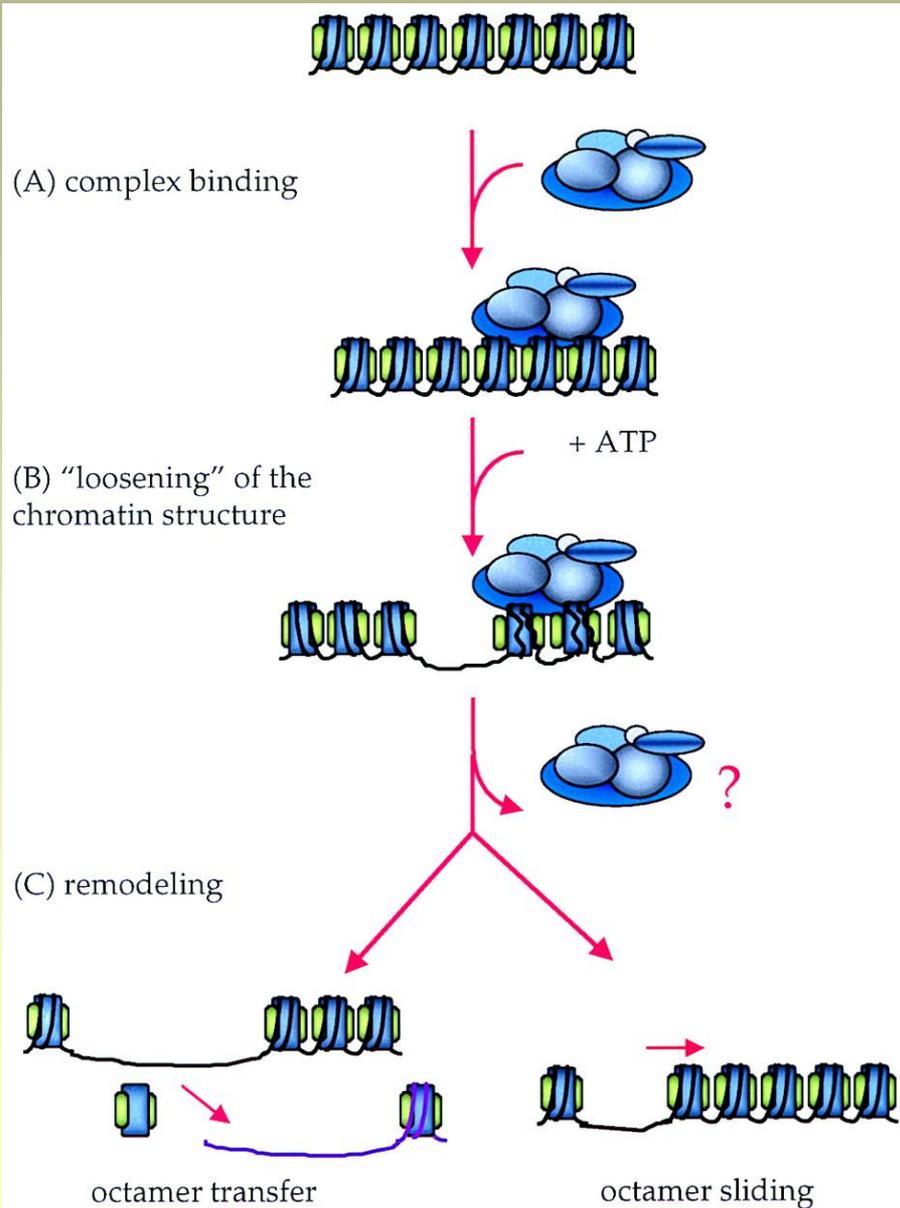
Fattori proteici che utilizzano ATP per riarrangiare l'organizzazione nucleosomiale della cromatina

La famiglia più conosciuta è quella dei fattori Swi/Snf

Sono presenti diversi complessi di rimodellamento

- Legame a domini di attivazione e decondensano la regione cromatinica
- Legame a domini di repressione e condensazione della regione di cromatina

# Rimodellamento della cromatina



Modello two-step dell'azione chromatin remodeling di SWI/SNF e RSC.

(A) Il complesso remodeling si lega alla cromatina in maniera ATP indipendente

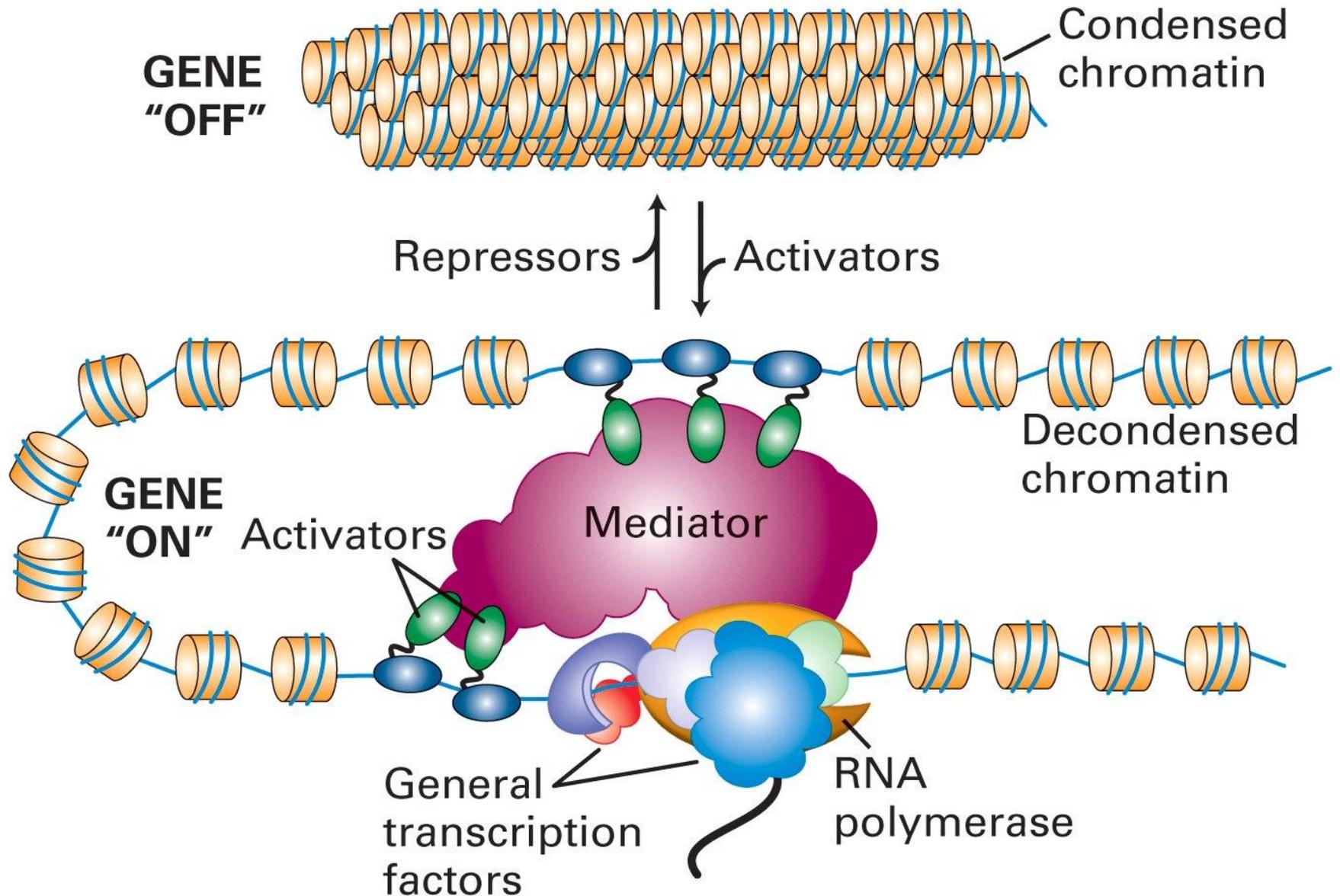
(B) L'aggiunta di ATP porta ad un cambiamento conformazionale nel nucleosoma come conseguenza di una alterazione nelle interazioni istoni-DNA

(C) Questa alterazione porta al remodeling della cromatina che può avvenire sia mentre il complesso è legato o persistere dopo il suo rilascio (da chiarire)

Il remodeling porta al trasferimento dell'ottamero istonico su un differente segmento di DNA (effetto trans) oppure allo slittamento dell'ottamero su un tratto adiacente di DNA (effetto cis)

La conseguenza del remodeling dipende dalla posizione del nucleosoma nella regione promotore e può portare sia ad attivazione che repressione della trascrizione.

# Attivazione per rimodellamento della cromatina



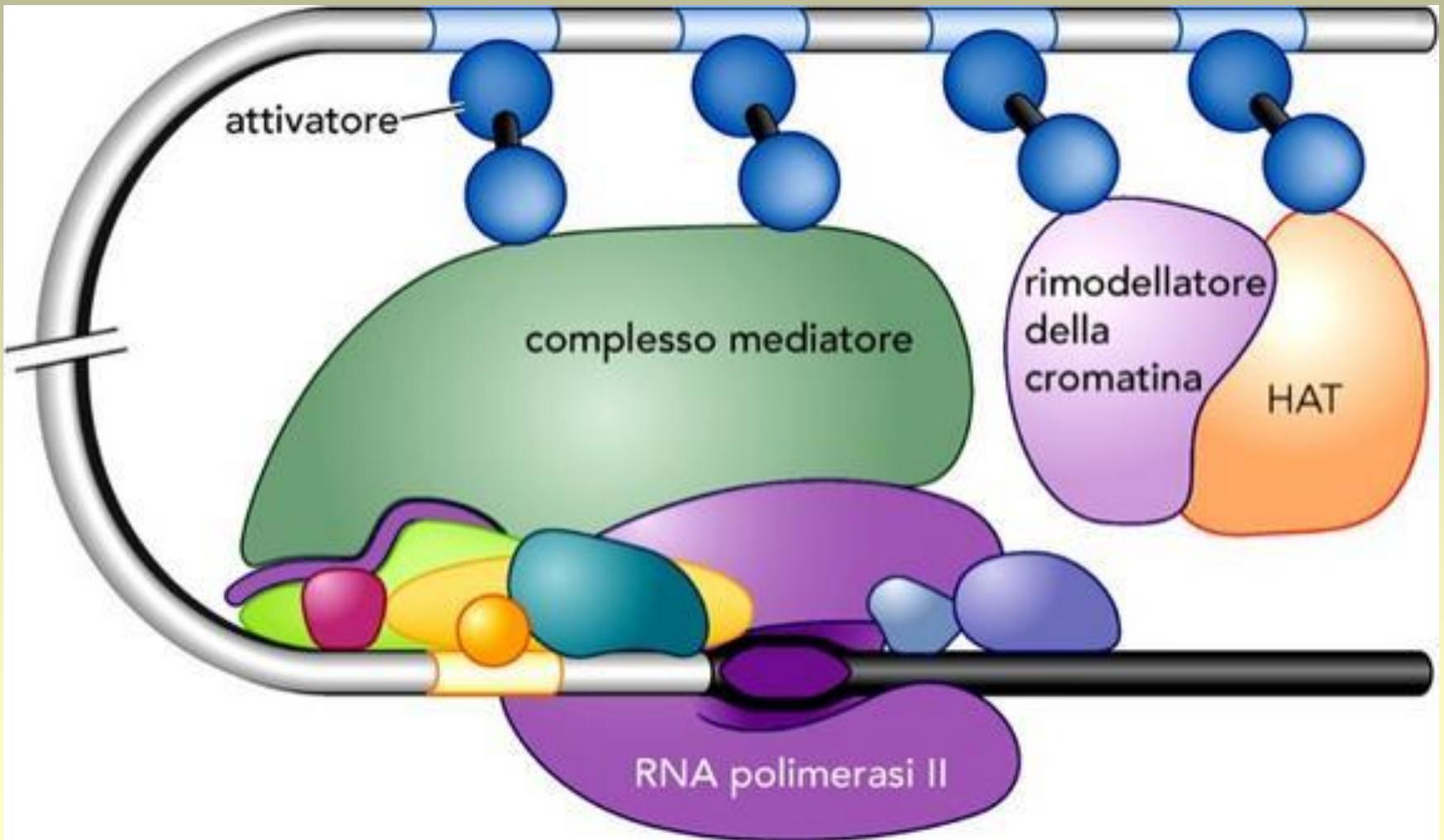
# Repressori

La trascrizione eucariotica è regolata da attivatori e repressori

I repressori sono funzionalmente inversi agli attivatori

Molti repressori sono costituiti da due domini:  
un DNA-binding domain e un repressor domain

L'attivazione o la repressione trascrizionale è il risultato dell'assemblaggio transiente di specifici complessi proteici che possono portare sia al reclutamento della RNA polII sia a modifiche della cromatina (modifiche istoni e DNA) e al suo rimodellamento



# Splicing nucleare

Il DNA non codificante è quindi quella parte di genoma che maggiormente varia al variare della complessità

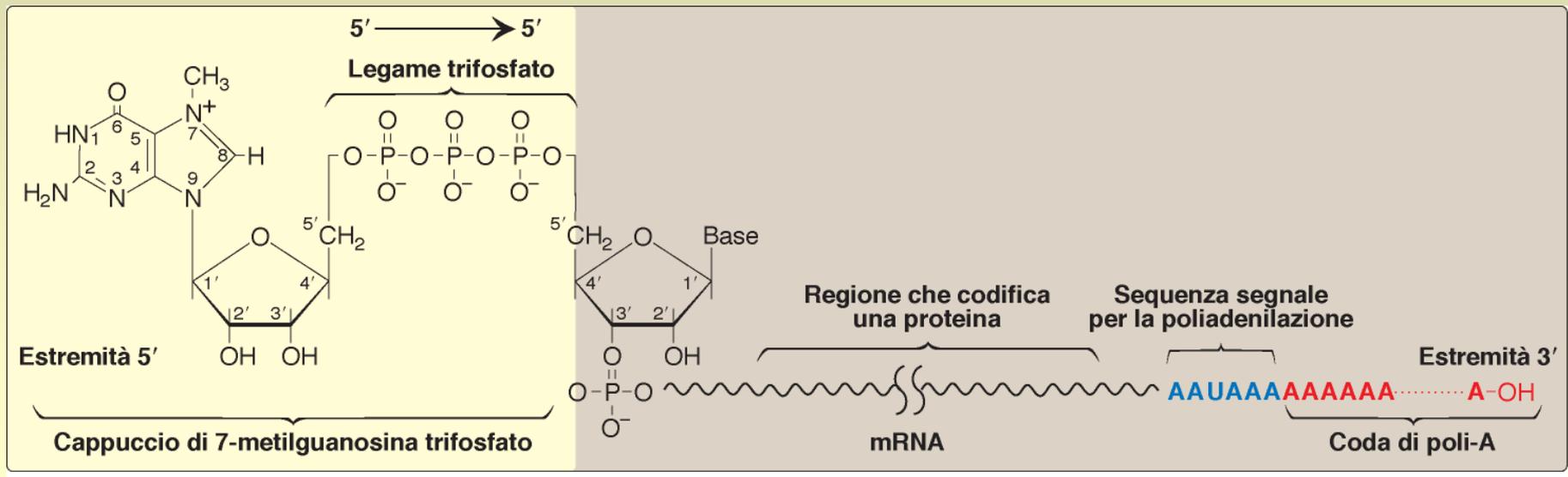
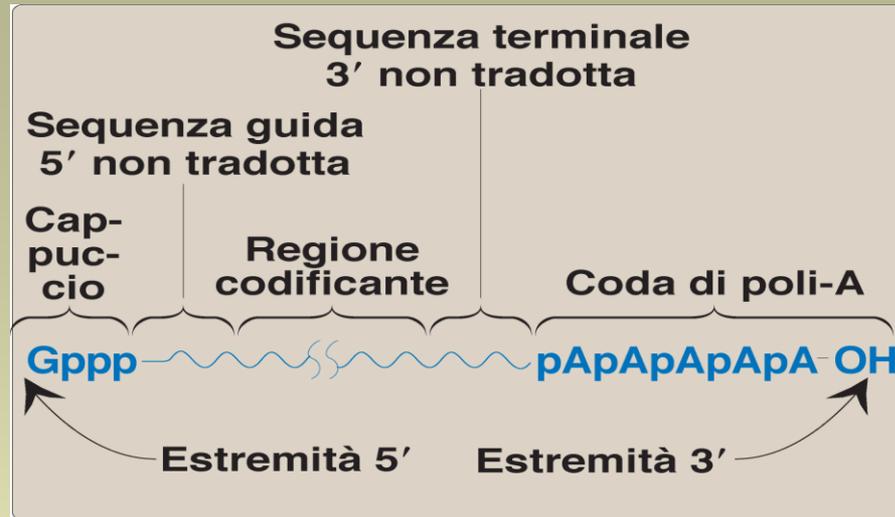


INTRONI  
UTRs

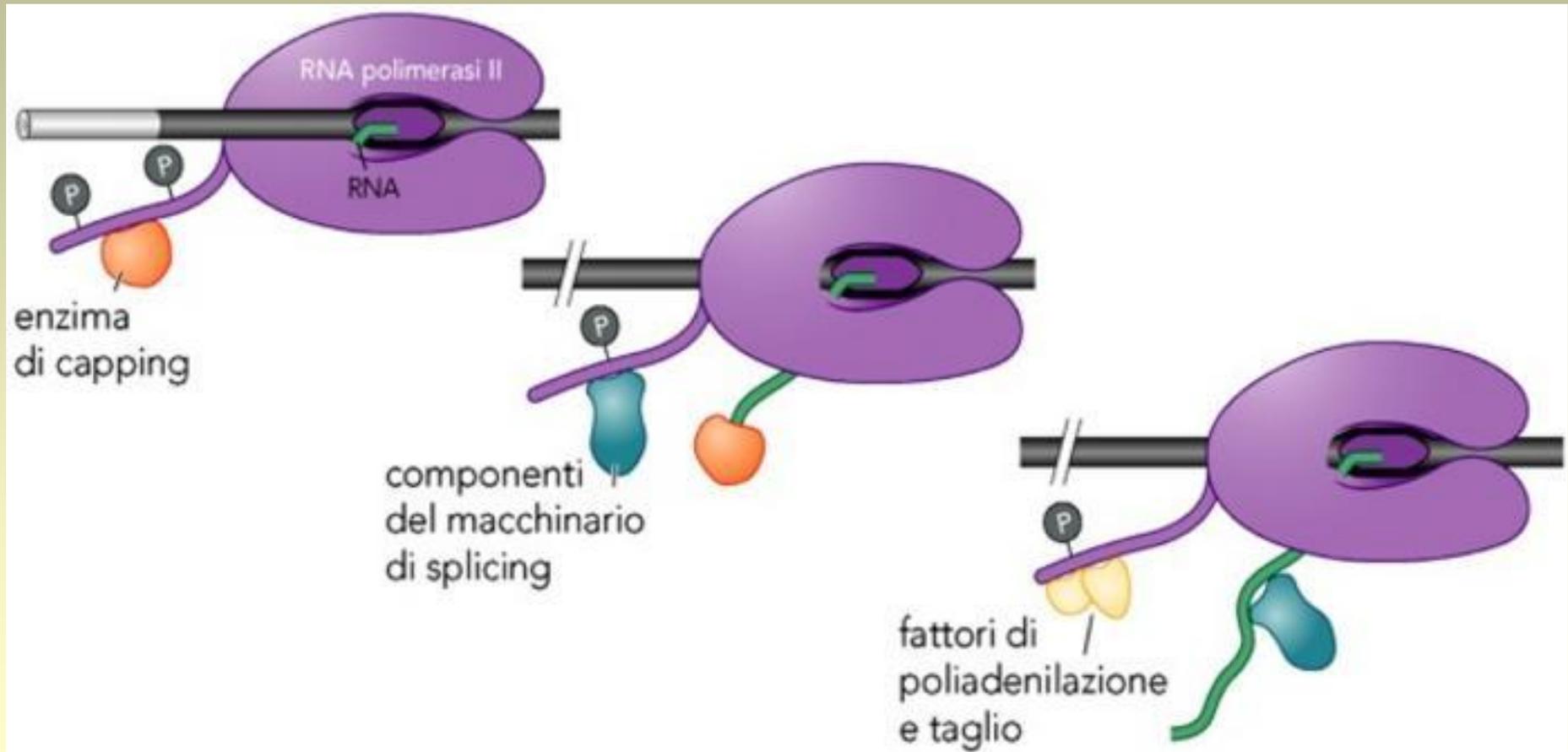
REGIONI  
INTERGENICHE

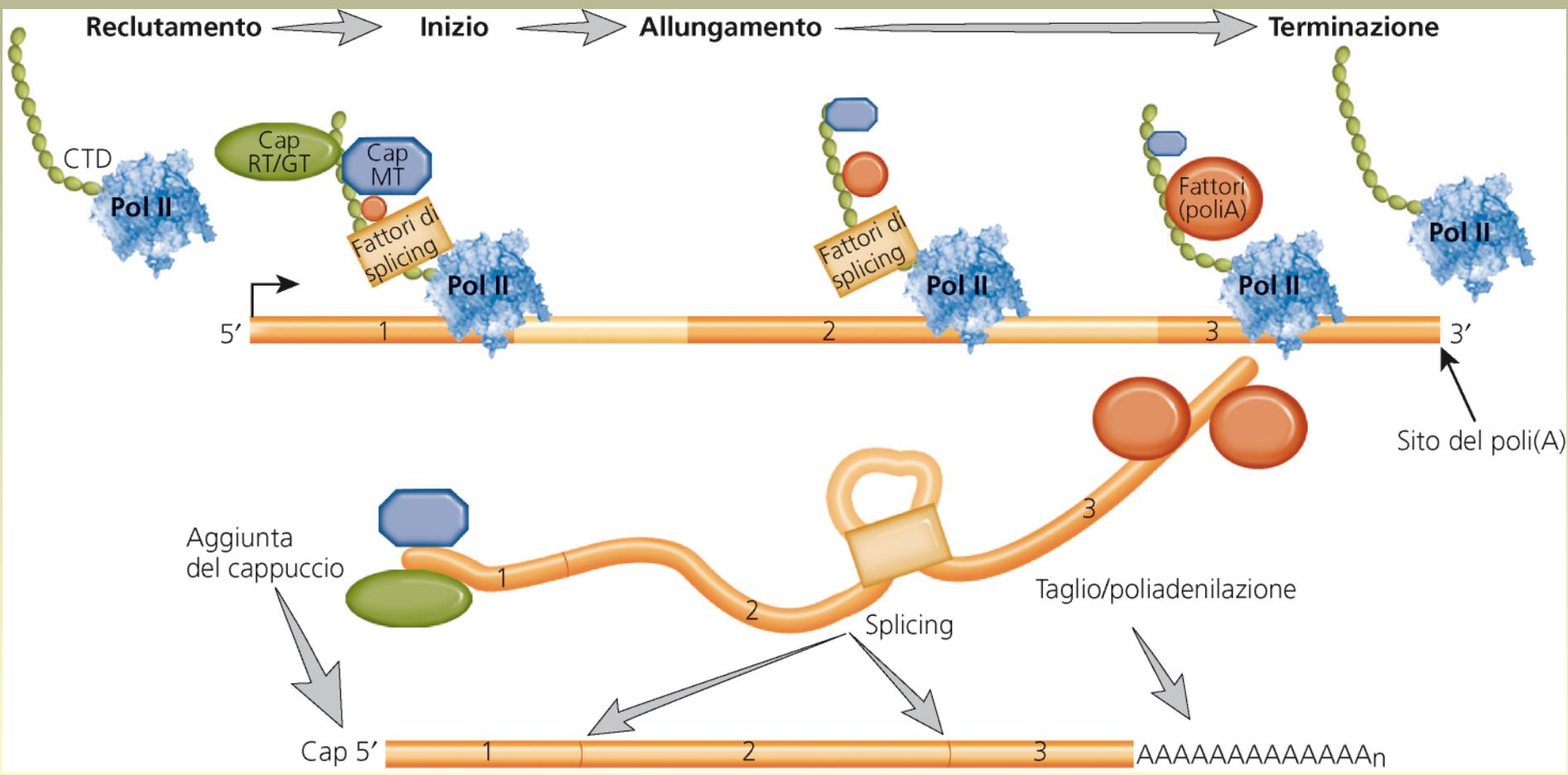
- DNA -> RNA eterogeneo (hnRNA) -> mRNA
- Il passaggio hnRNA -> mRNA consiste in:
  - Incappucciamento: alterazioni chimiche all'estremità 5'
  - Splicing : rimozione degli "introni"
  - Poliadenilazione: sostituzione dell'estremità 3' con un'estensione di circa 250 basi A non presenti nella sequenza del gene
- Introni/Esoni
- Esistono almeno 8 tipi diversi di introni
- Quello associato in modo predominante ai geni che codificano proteine segue la "regola GU-AG" (cioè: introne = GU\*...\*AG)
- **Esistono delle regole ben precise che determinano la rimozione precisa degli introni**
- Splicing alternativo

# mRNA – Modifiche al 5' e al 3'



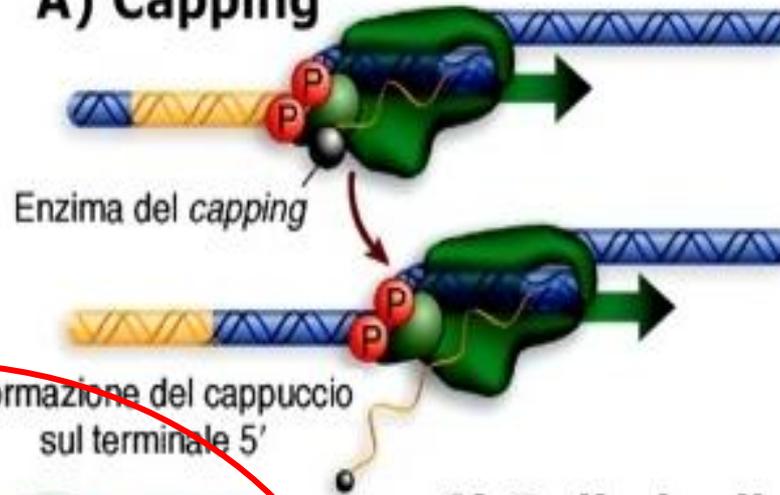
# mRNA – Modifiche durante la trascrizione



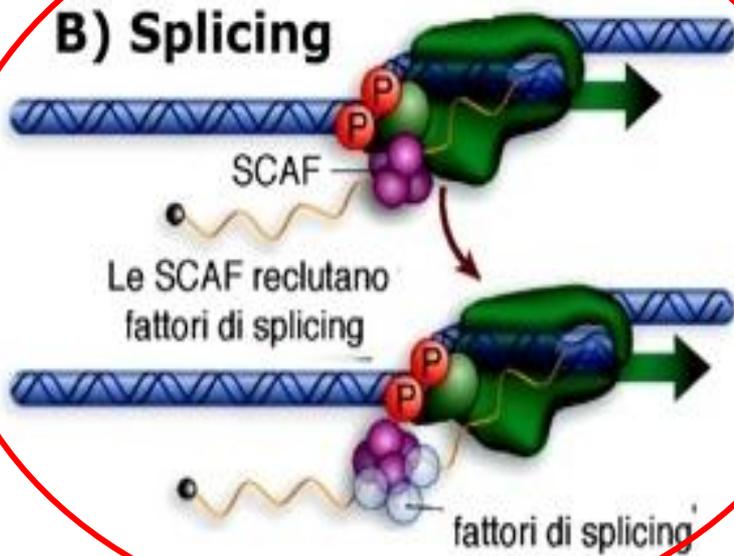


# SCAF: splicing complex associated factors

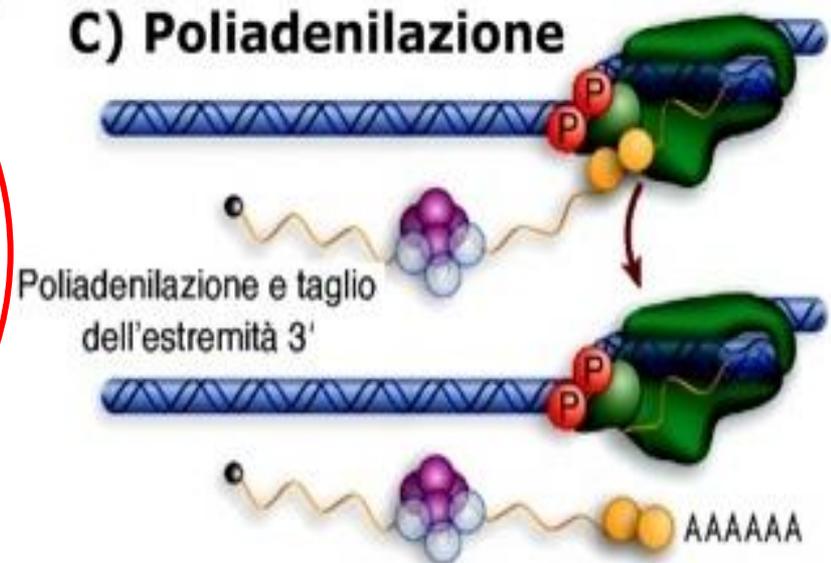
## A) Capping



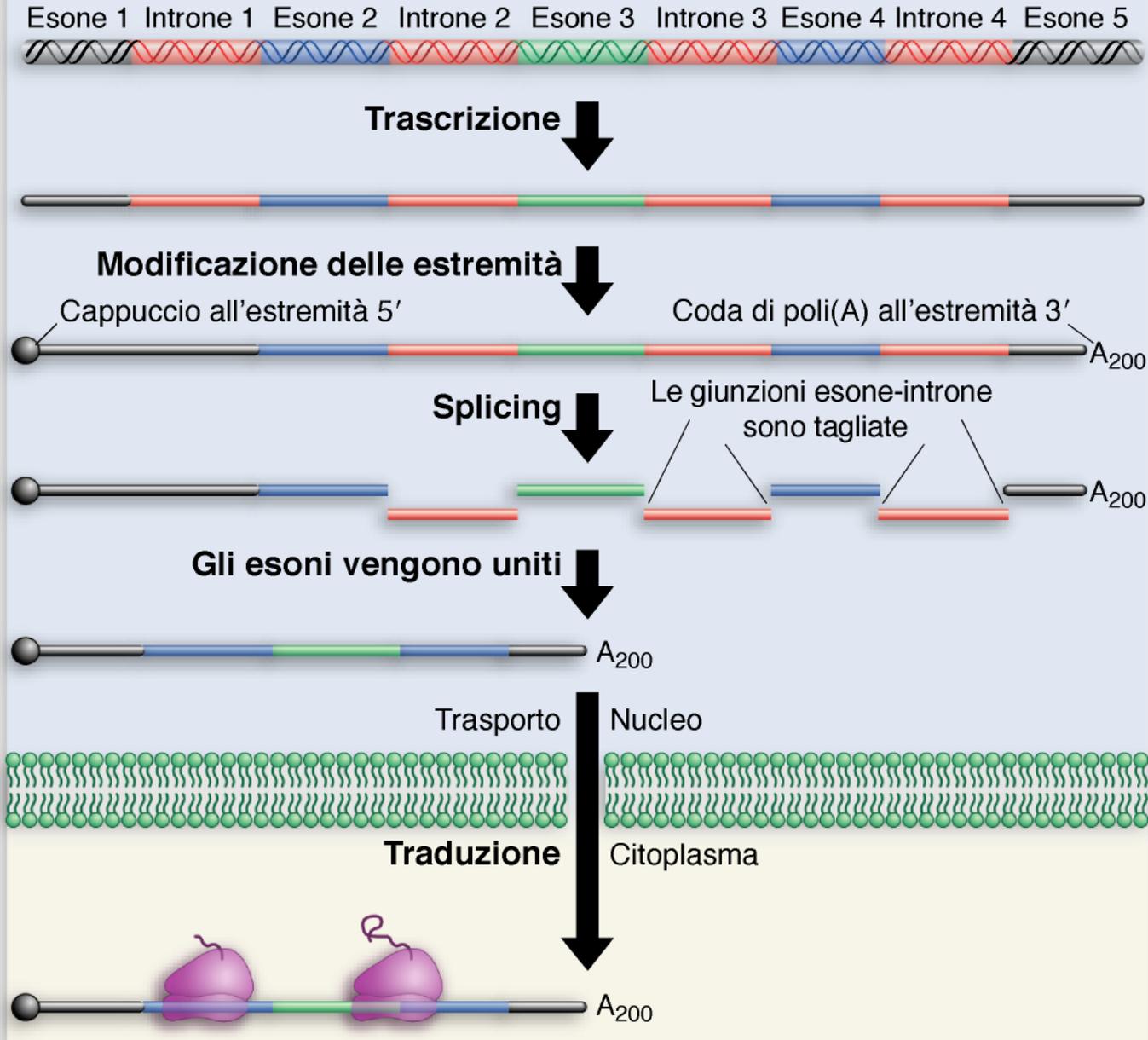
## B) Splicing

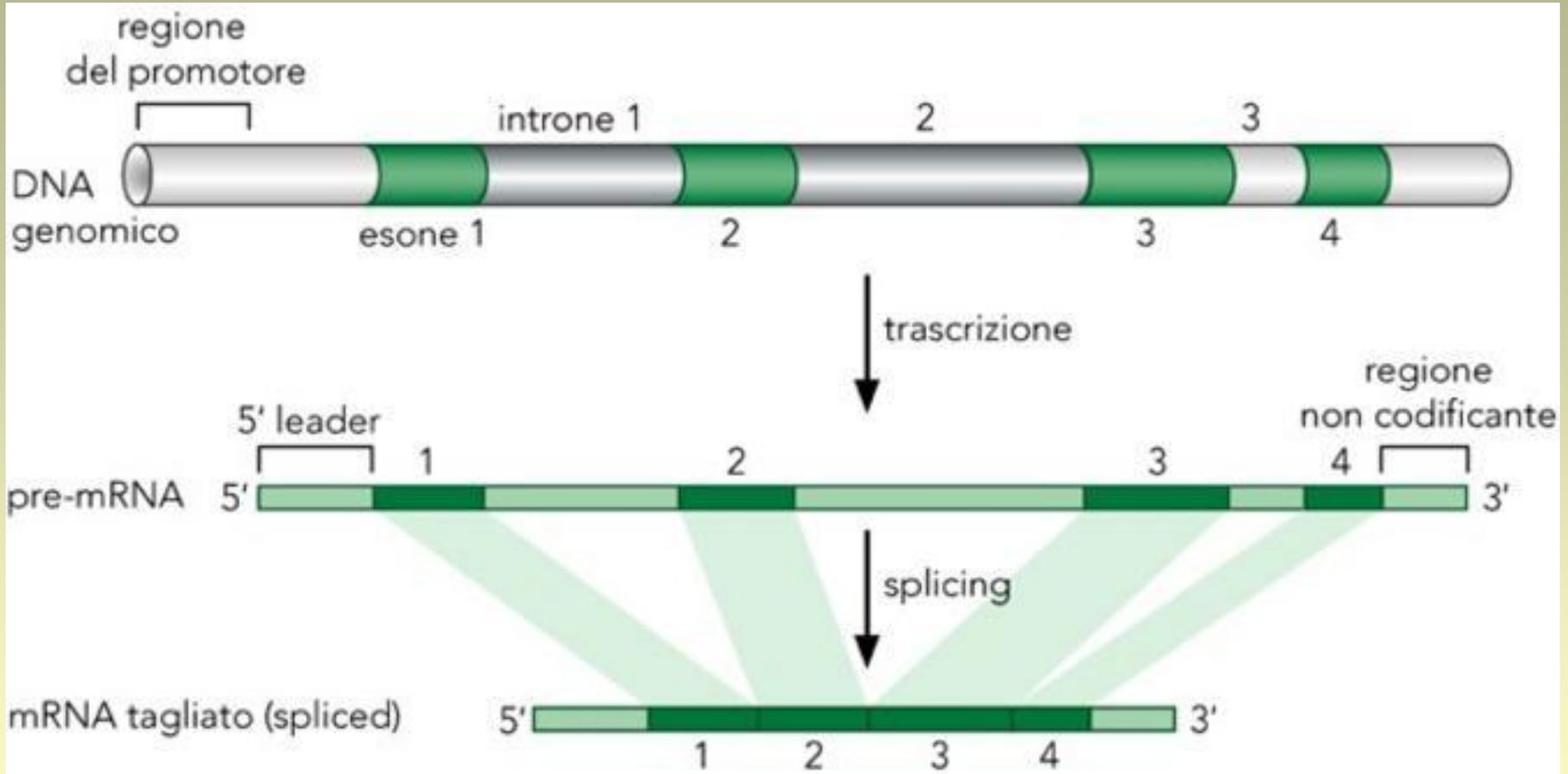


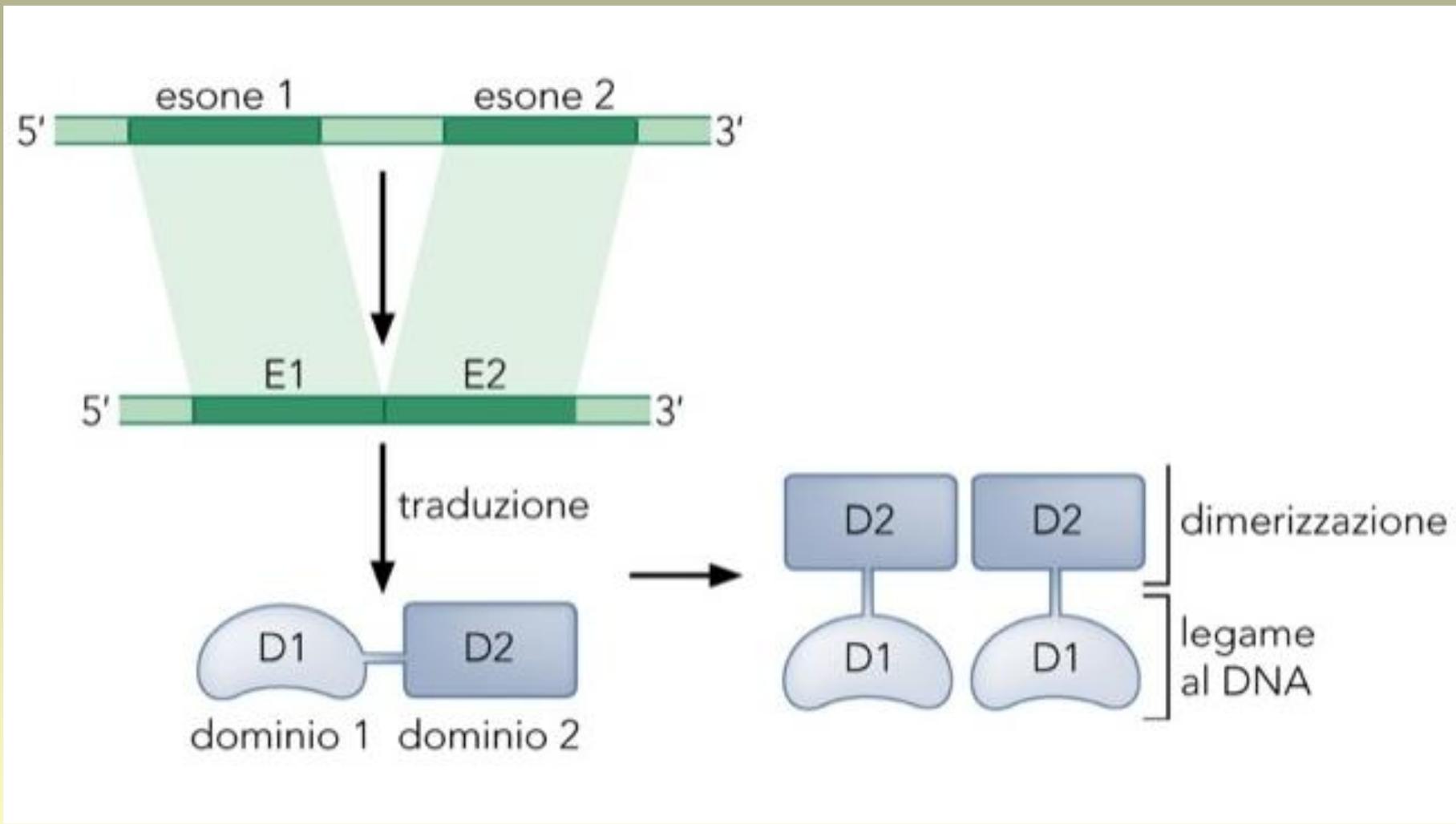
## C) Poliadenilazione



# L'mRNA eucariotico è modificato, maturato e trasportato



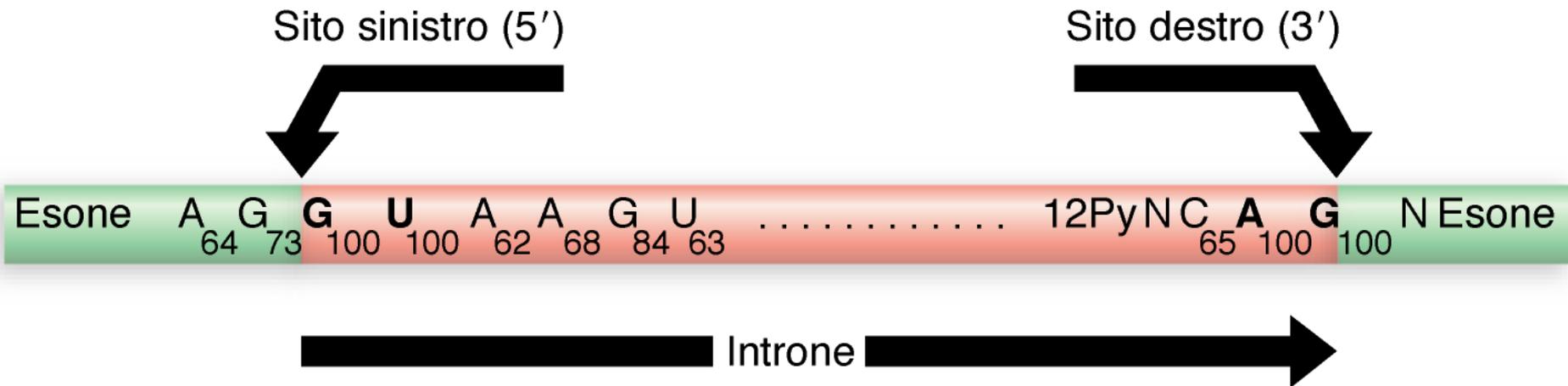




Esoni e domini funzionali delle proteine

# Le giunzioni di splicing sono conservate

**Ai confini introne-esone si trovano brevi sequenze consenso nell'introne**





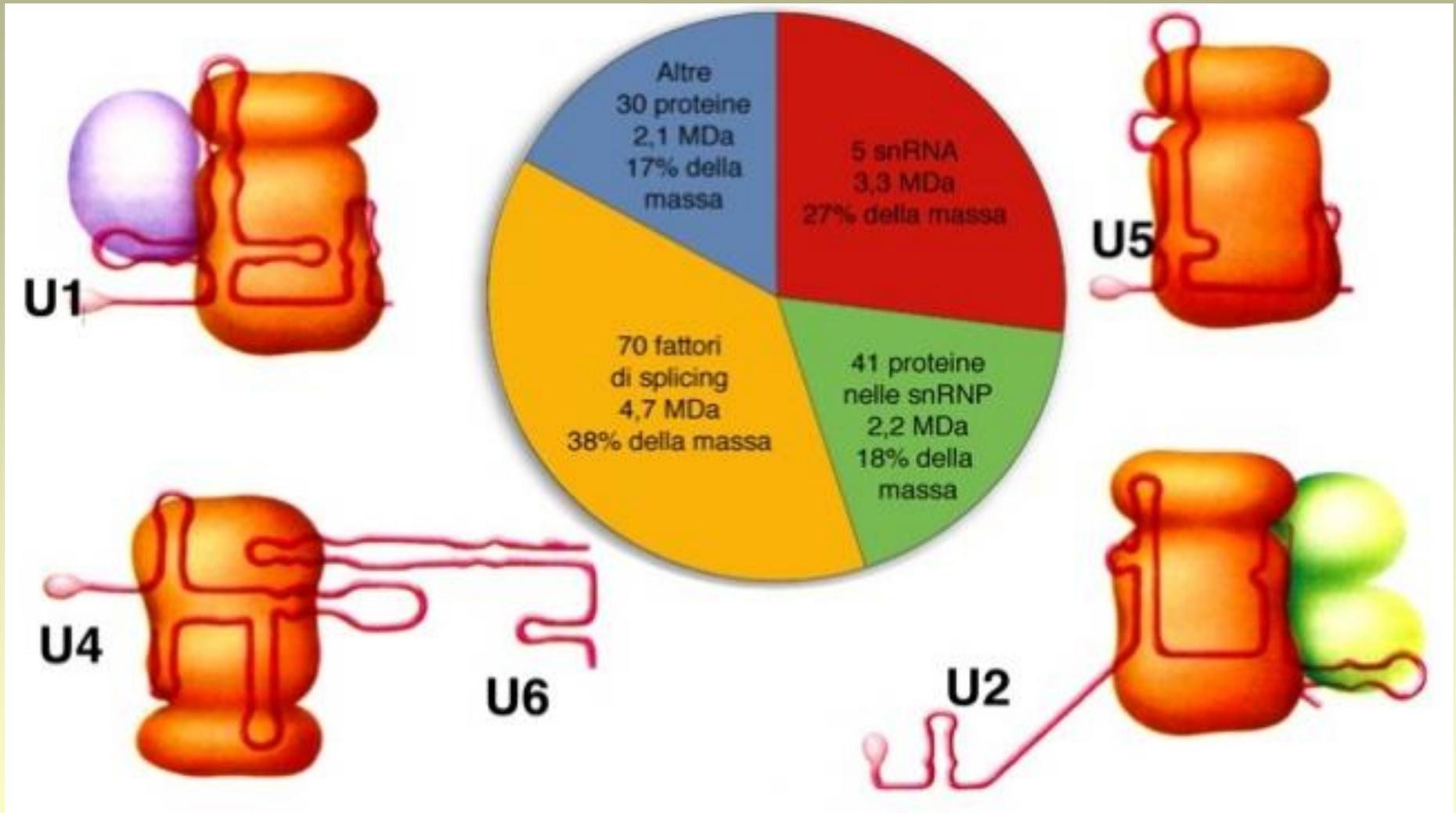
Lo splicing degli mRNA richiede lo “spliceosome”  
un complesso RNA-proteine



**pre-mRNA**

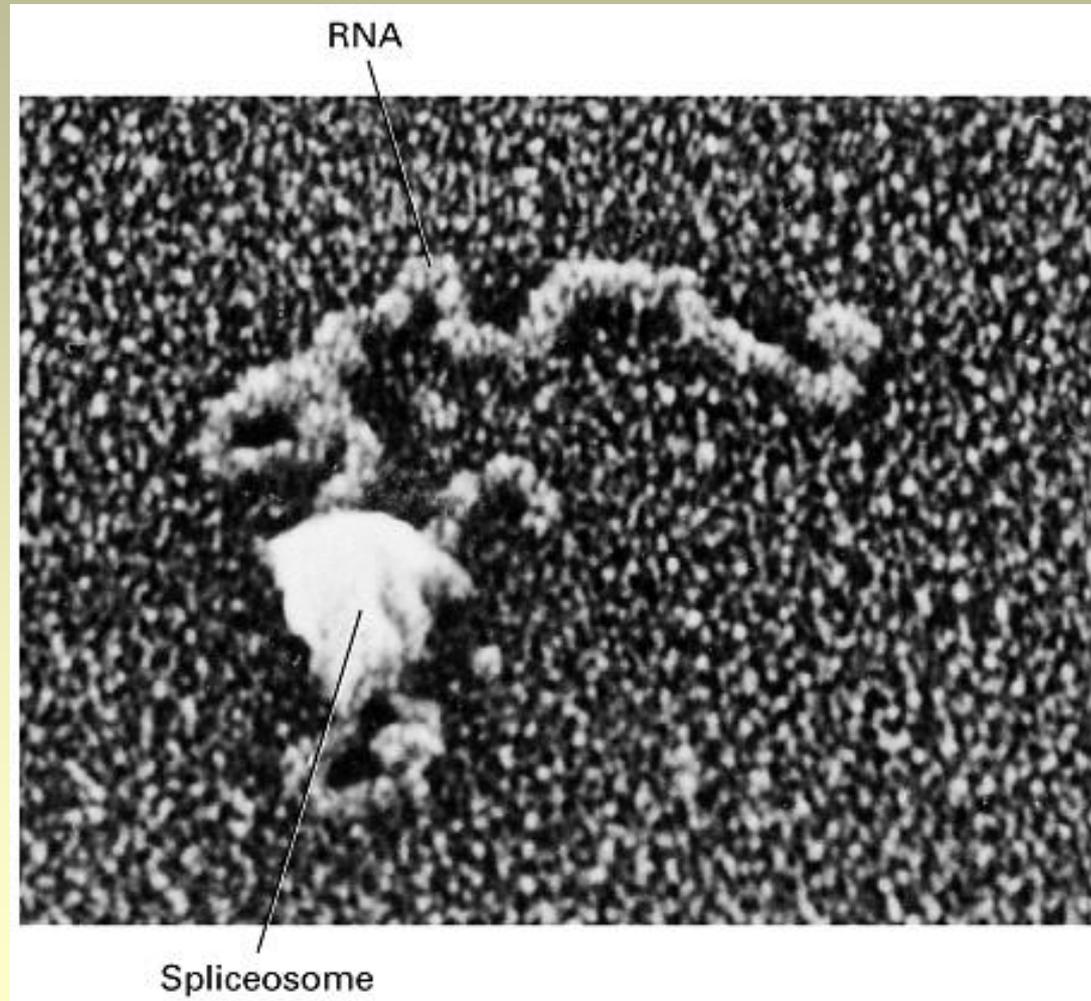
**spliced mRNA**

# Lo spliceosoma



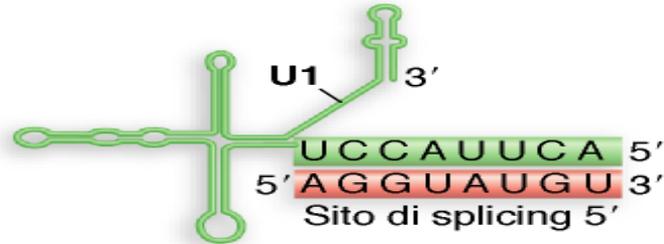
5 RNA e più di 200 proteine (7 comuni) (snurp snRNP) formano lo spliceosoma

The spliceosome is a ribonucleoprotein complex composed of multiple snRNPs



## L'appaiamento dell'snRNA è importante per lo splicing

U1 si appaia con il sito di splicing 5'



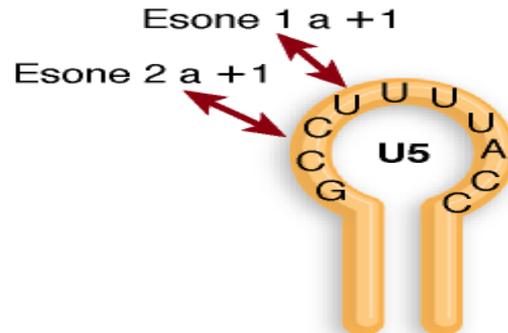
U2 si appaia con il sito di ramificazione



U6 si appaia con il sito di splicing 5'



U5 è vicina a entrambi gli esoni



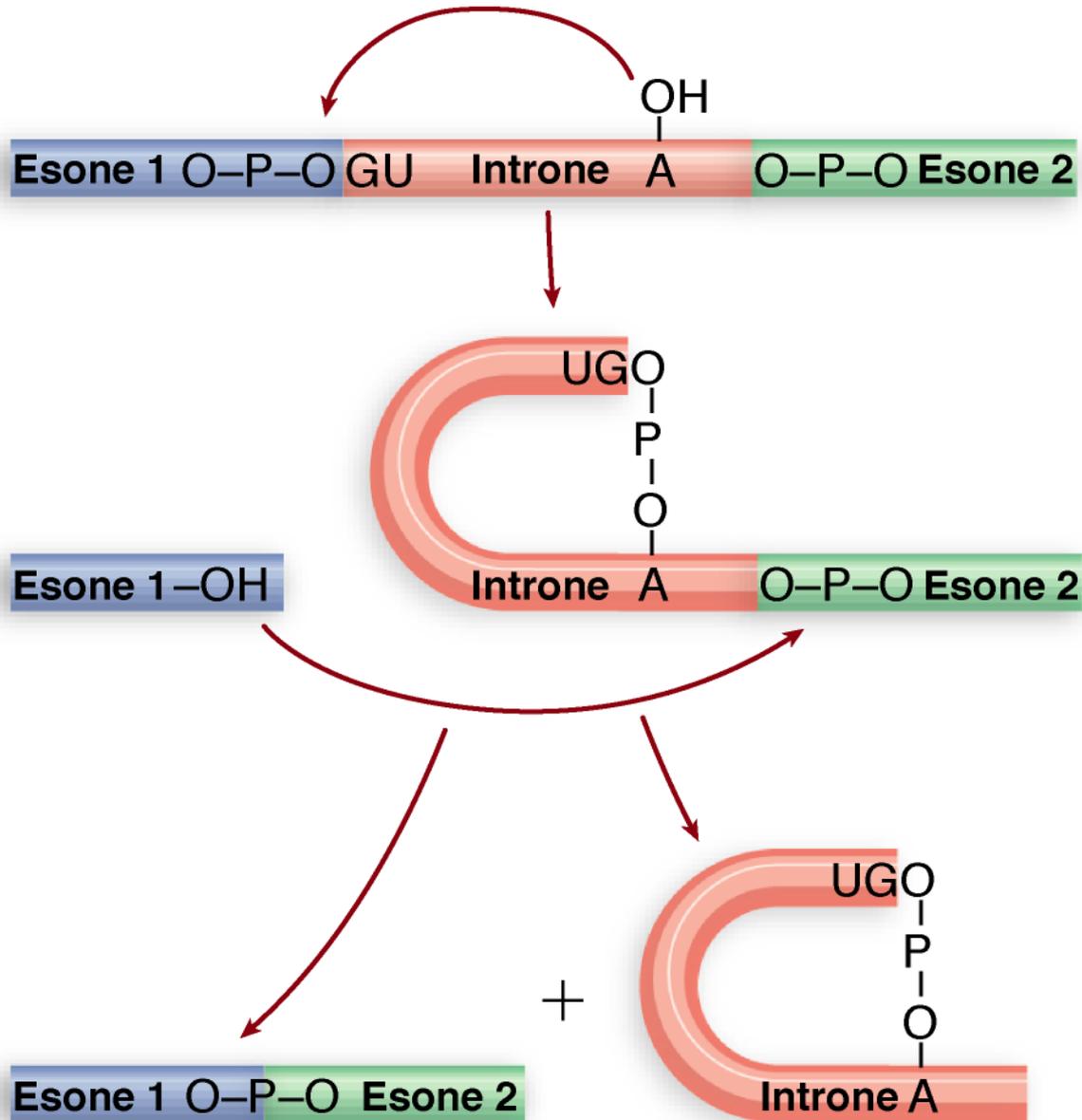
Interazioni tra  
sequenze introniche  
e snRNA

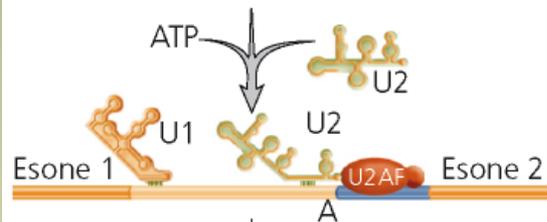
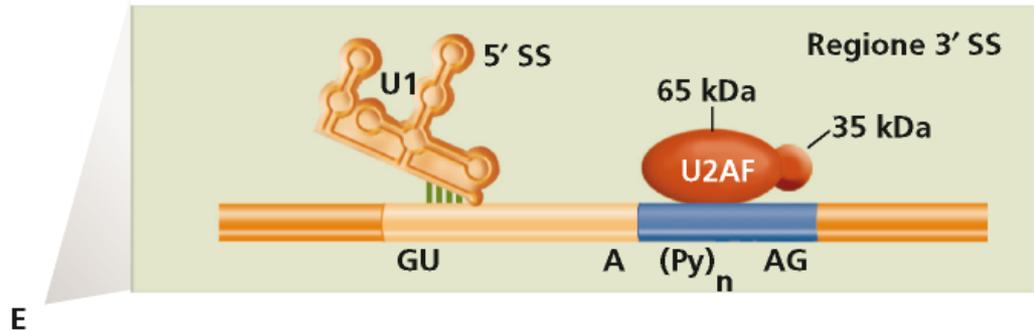
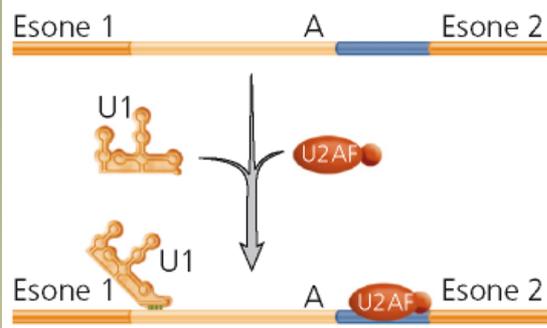
U1 = sito di splicing 5'

U2 = sito di ramificazione

U6 = sito di splicing 5'

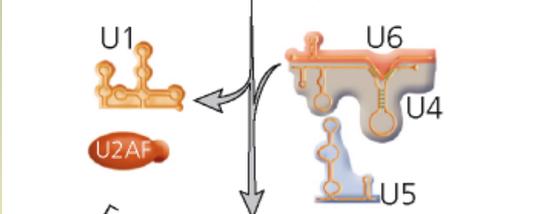
# Lo splicing implica transesterificazioni



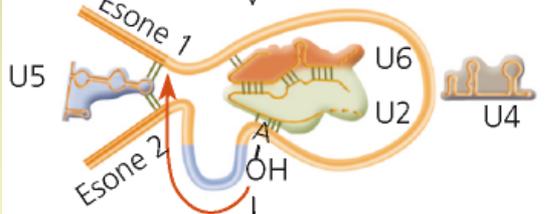


E

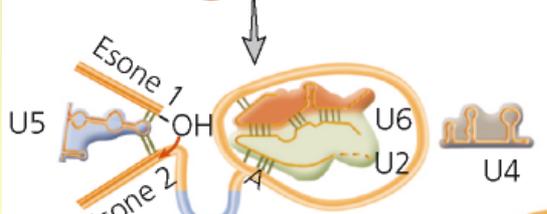
A "Pre-spliceosoma"



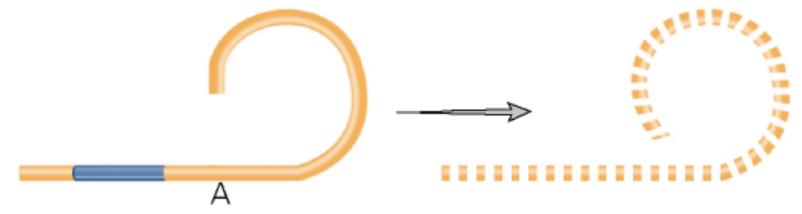
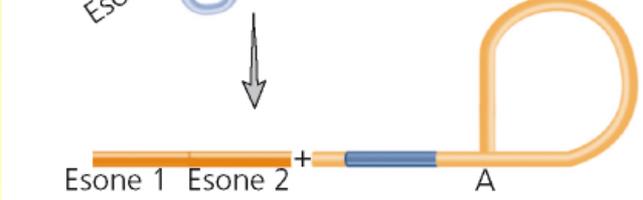
B → C "Spliceosoma"



Prima transesterificazione



Seconda transesterificazione



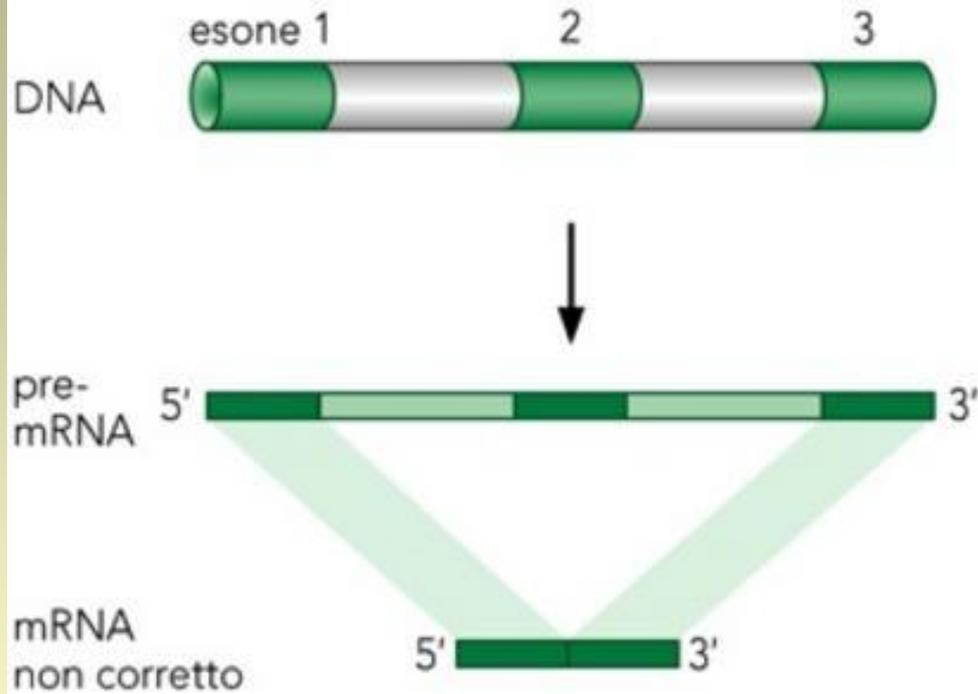
# Regolazione dello splicing

Difetti nello splicing implicati in numerose malattie

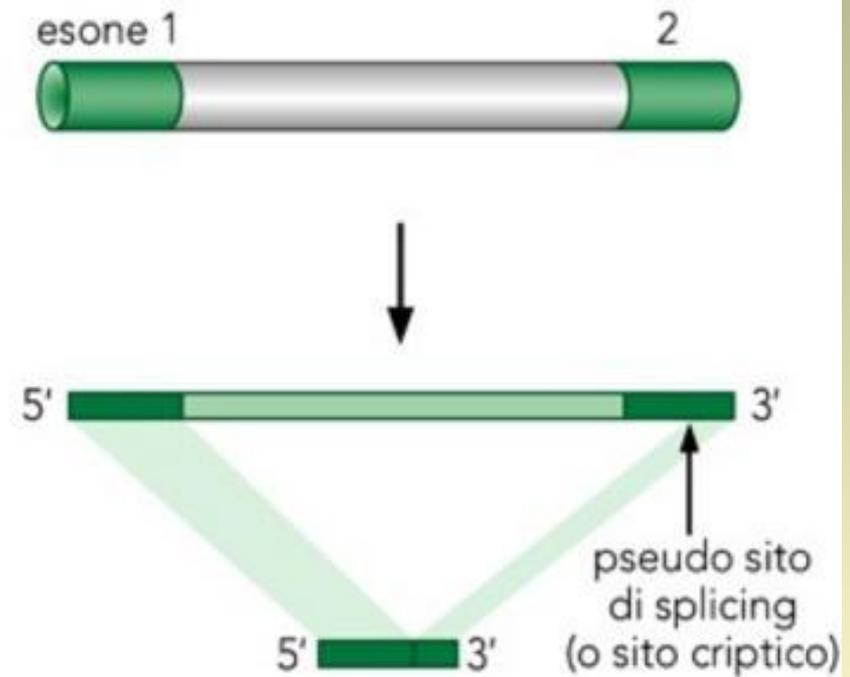
Splicing alternativo fonte di variazione genetica e  
meccanismo di regolazione di attività cellulari

# Conseguenze di mutazioni delle sequenze consenso di splicing

**a** salto dell'esone



**b** selezione di uno pseudo sito di splicing



sito di splicing    enhancer di splicing



RNA non tagliato



attivatore



mRNA finale dopo lo splicing

regolazione positiva dello splicing

tipo cellulare 1

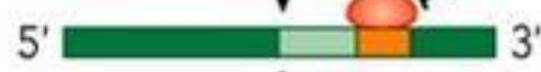
tipo cellulare 2

sito di splicing +  
sito repressore

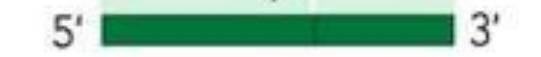
trascritto  
primario di RNA



trascritto  
primario di RNA



mRNA finale  
dopo lo splicing

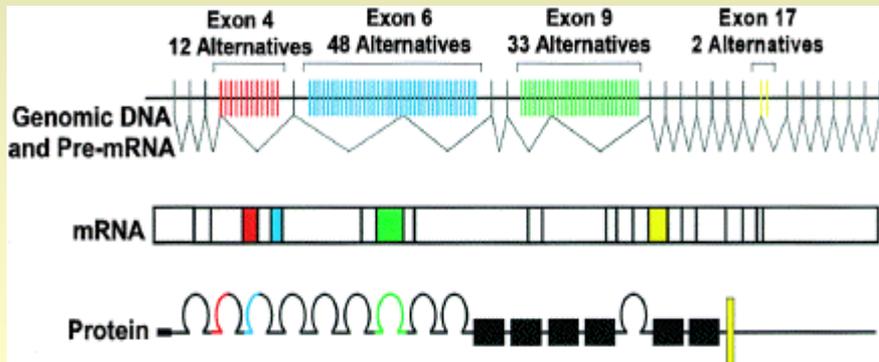


controllo negativo del sito di splicing

# Splicing alternativo

# Splicing alternativo

- Scoperto inizialmente nel 1980
- Meccanismo sottoposto a regolazione cellulare anche se può essere casuale
- Il gene *Dscam* di *Drosophila* può avere sino a 38000 differenti varianti di splicing



**Gene *DSCAM*** (codifica per una proteina della superficie cellulare coinvolta nella connettività tra neuroni)

Il gene DSCAM è lungo 61.2 kb e dopo la trascrizione e lo splicing produce un mRNA di circa 7.8 kb composto da 24 esoni. Gli esoni 4, 6, 9, e 17 sono mutualmente esclusivi e alternativi. Ogni mRNA finale prodotto contiene una delle 12 possibili alternative dell'esone 4, una delle 48 possibili per l'esone 6, una delle 333 possibili per l'esone 9 e una delle 2 possibili per l'esone 17. Tutte le possibili combinazioni dei singoli esoni 4, 6, 9, e 17 permettono di ottenere 38016 diverse varianti dell'mRNA per il gene *DSCAM* e quindi altrettante proteine diverse.

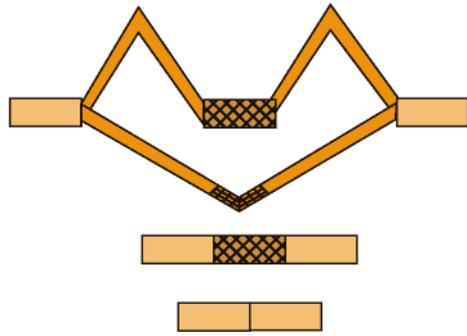
# Implicazioni nell'evoluzione

- Lo splicing alternativo modifica l'espressione del genoma aumentandone la complessità
- Quante proteina sono prodotte dai genomi eucariotici?
- Quanti geni sono necessari per un organismo pluricellulare complesso?
- Come le varianti di splice contribuiscono all'evoluzione?
- Quanto sono stabili i siti di splicing durante l'evoluzione?

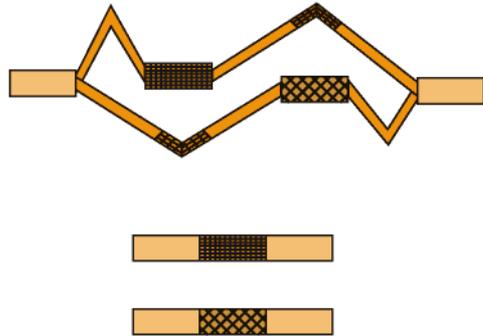
# Possibili effetti dello splicing alternativo

- Inclusione/esclusione di domini funzionali che possono modificare la funzione o la localizzazione
- Variazioni nella struttura proteica
- Variazioni nella regione 5' non tradotta che modificano l'efficienza di traduzione
- Variazioni nella sequenza di poliadenilazione che alterano la stabilità dell'mRNA

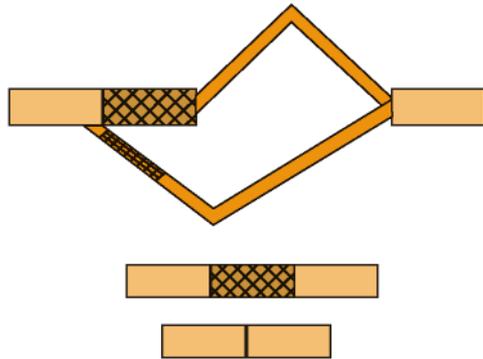
(A)



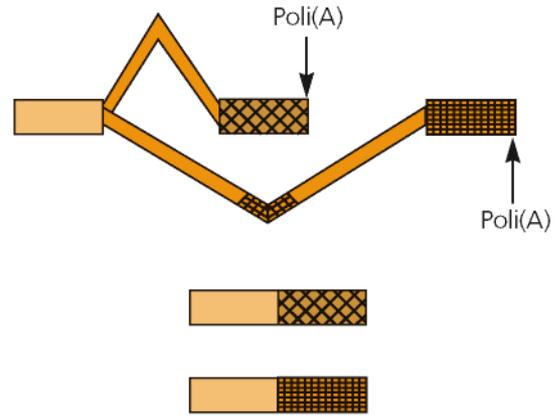
(B)



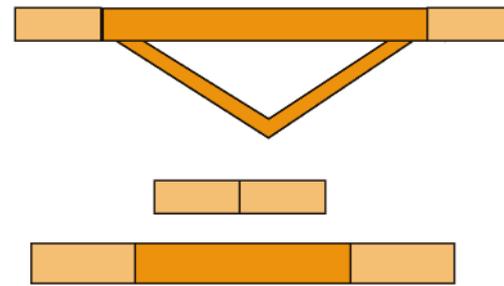
(C)



(D)

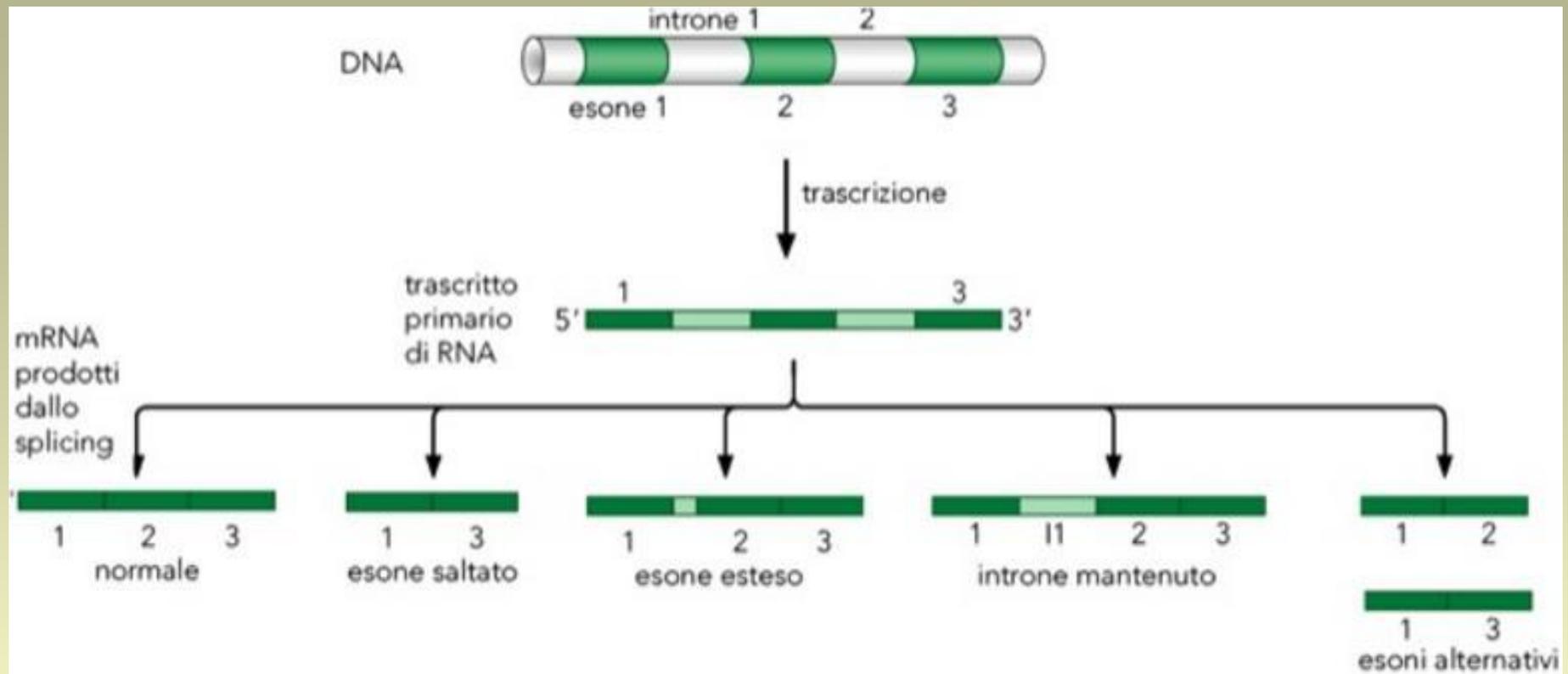


(E)

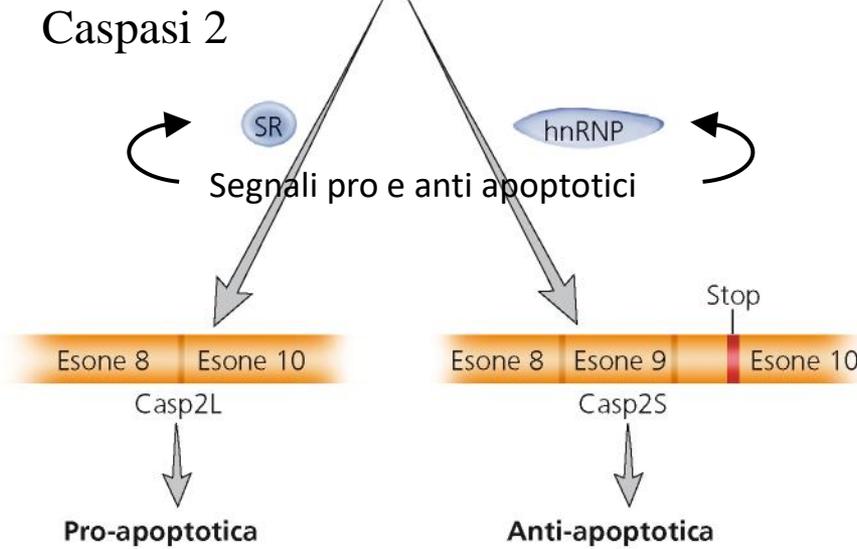
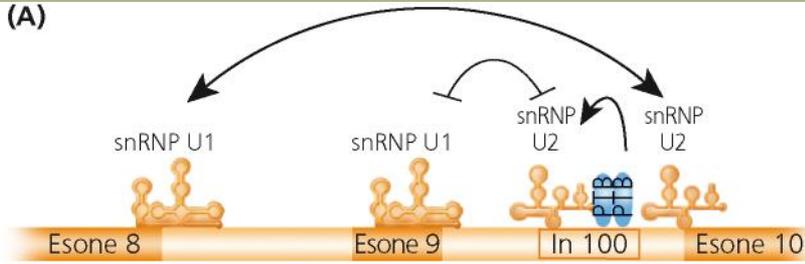


(F)

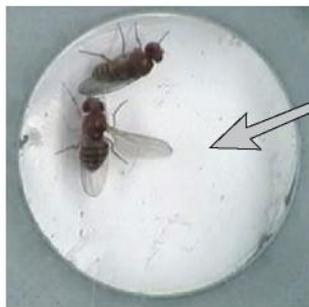




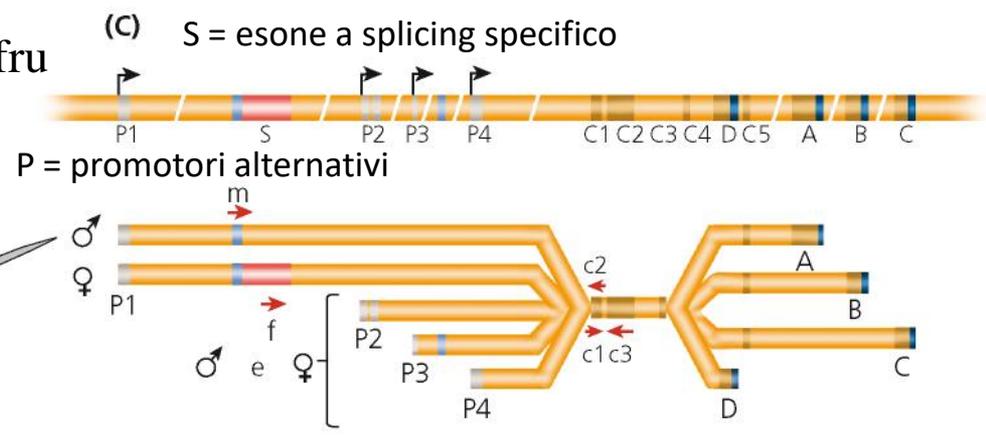
Diverse tipologie di splicing alternativo  
 proteoma più vario e complesso del trascrittoma



Fattore di trascrizione Zn-finger  
Espresso in alcuni neuroni sensoriali  
Controllo del comportamento



**Gene fru**



**(B)** CAMKII (chinasi II calmodulina dipendente)

