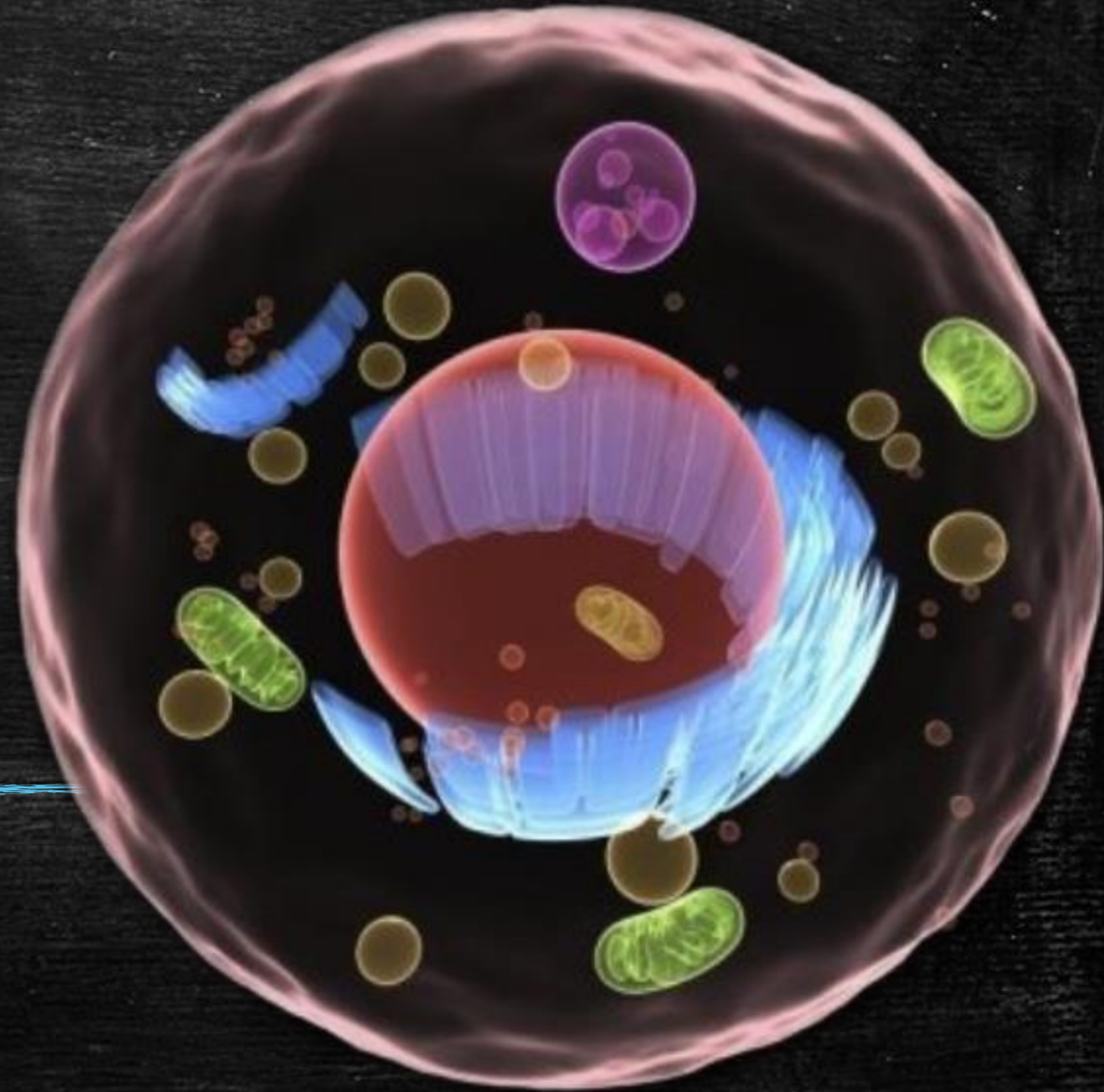


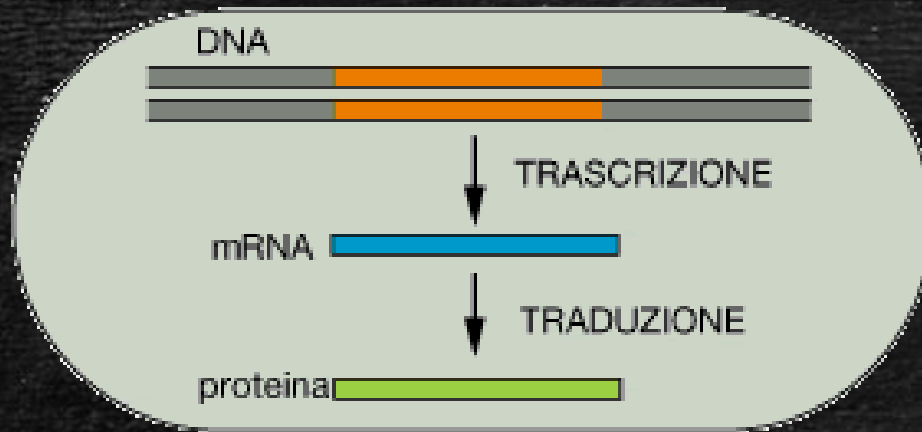
Trascrizione e regolazione negli Eucarioti

Inizio → Allungamento → Terminazione

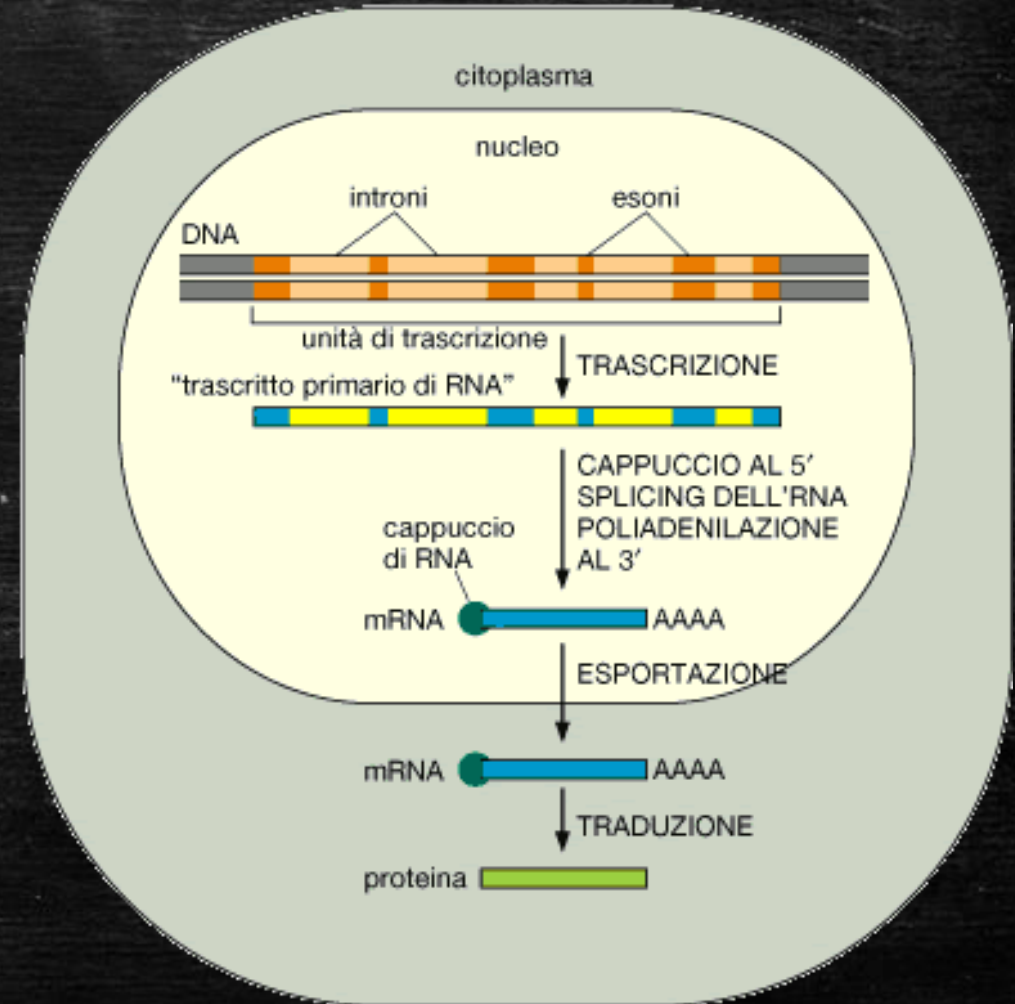


Espressione genica: Procarioti vs. Eucarioti

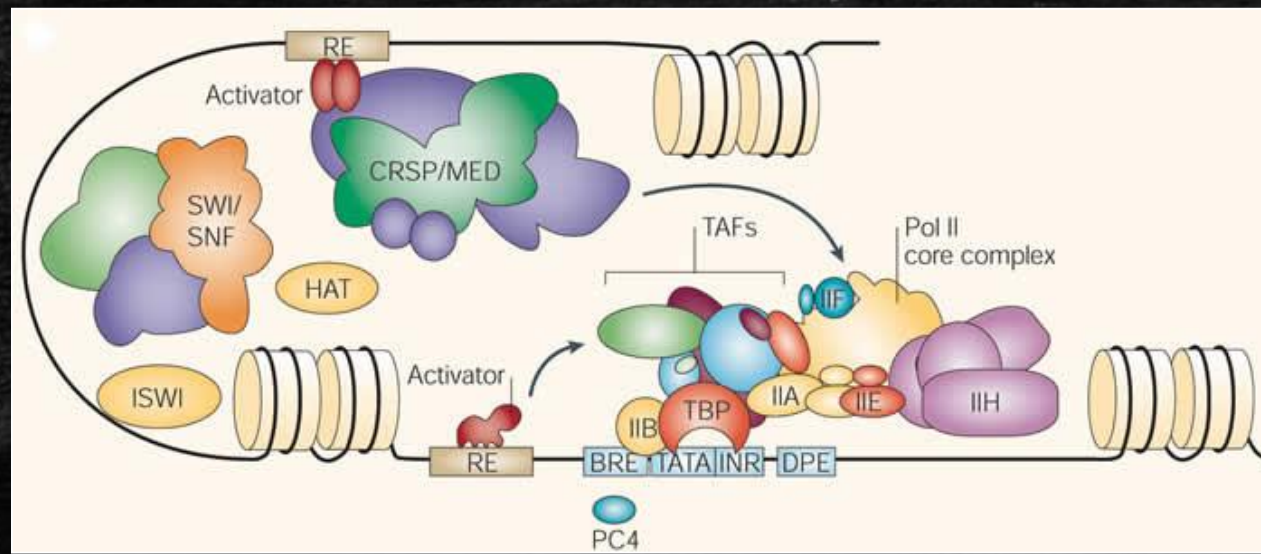
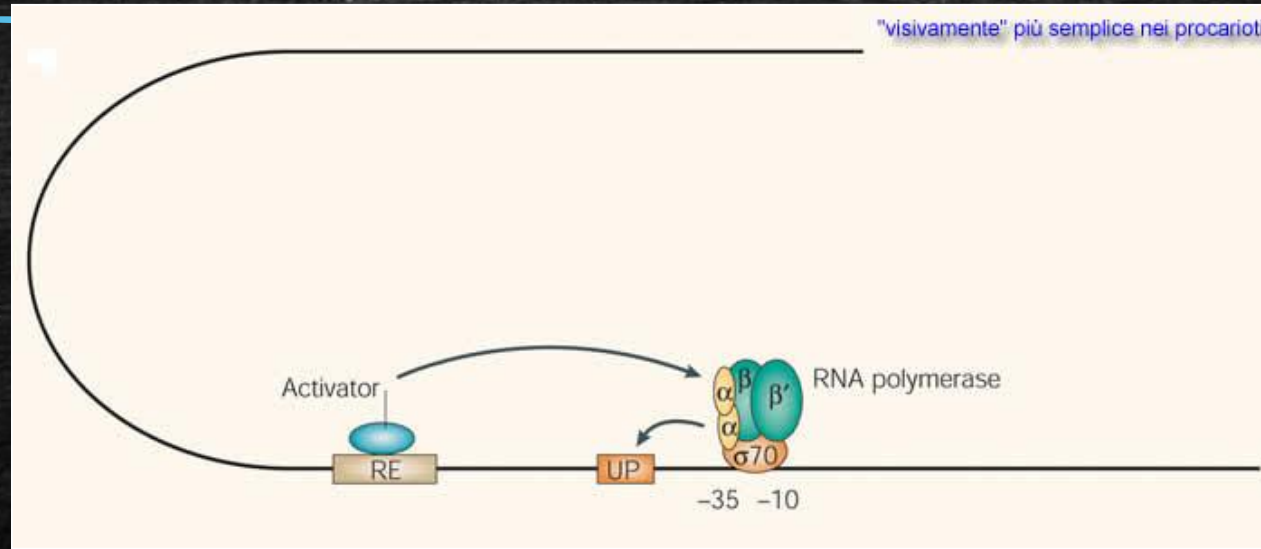
PROCARIOTI



EUCARIOTI



La macchina trascrizionale : un esempio importante di evoluzione molecolare.



Negli eucarioti per effettuare la trascrizione non basta la RNA polimerasi

Principali differenze Procarioti - Eucarioti

1. Gli eucarioti possiedono **3 RNA polimerasi**: I, II, e III; ogni una trascrive un tipo specifico di geni
 - **RNA pol I**: trascrive i geni per l'rRNA
 - **RNA pol II**: trascrive i precursori del mRNA e piccoli RNA implicati nella regolazione genica post-trascrizionale
 - **RNA pol III**: trascrive i geni per l'rRNA_{5S}, per i tRNA e per i piccoli RNA implicati nella maturazione del mRNA

Principali differenze Procarioti - Eucarioti

Negli eucarioti ogni gene è regolato e trascritto singolarmente ,a differenza dei trascritti policistronici procariotici.

Negli eucarioti i fattori di trascrizione hanno un ruolo fondamentale nel reclutare la RNA pol sui promotori aprendo anche la cromatina.

L'organizzazione del DNA in forma di cromatina pone il problema di come la RNA pol e fattori di trascrizione possano riconoscere i promotori o altre sequenze del DNA. I fattori che regolano la compattezza della cromatina regolano la trascrizione.

Tre sistemi di trascrizione

Pol I

rRNA

Localizzata principalmente nel **nucleolo**

Il Nucleolo è formato da tratti di DNA che codificano per l'RNA ribosomiale, da filamenti di rRNA nascenti e da proteine

Pol II

Precursori mRNA

miRNA

snRNA

Localizzata principalmente nel **nucleoplasma**

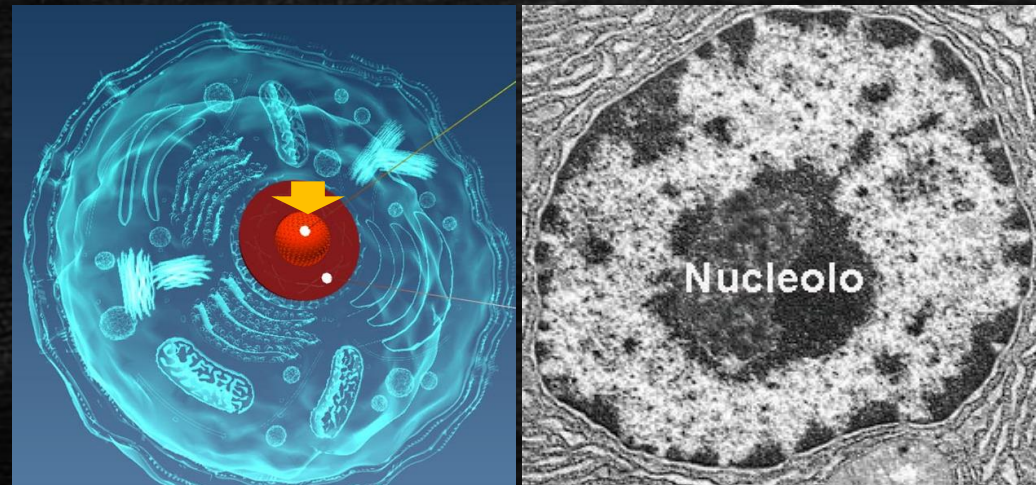
Pol III

rRNA 5S

tRNA

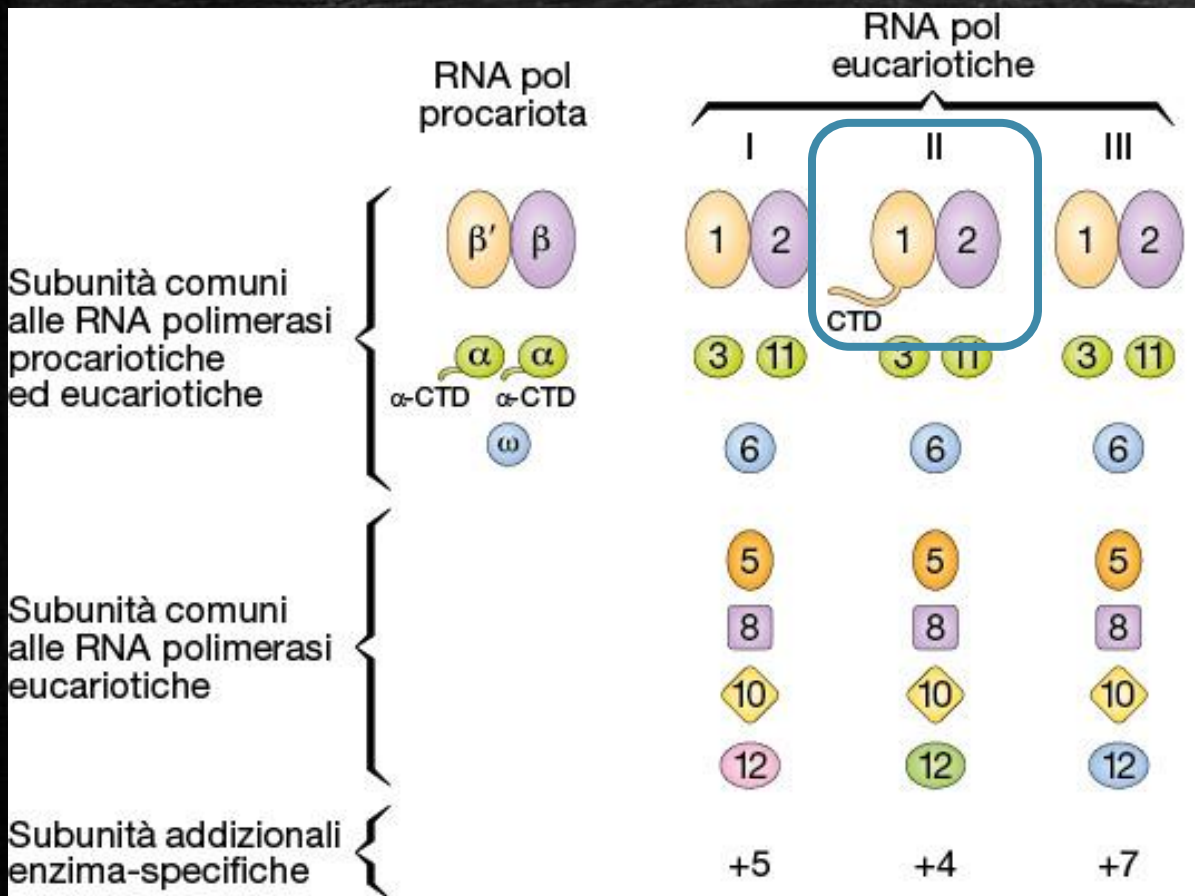
Some specific snRNA

Localizzata principalmente nel **nucleoplasma**



Nelle piante esistono anche la **Pol IVa e IVb**,

Struttura RNA polimerasi eucariotiche (12 subunità, 500kDa)



Rpb1, Rpb2, Rpb3, Rpb11, Rpb6

Omologhe alle subunità β, β', α e ω dei procarioti

La presenza di un **dominio CTD** (C-terminal domain) caratterizza la Pol II

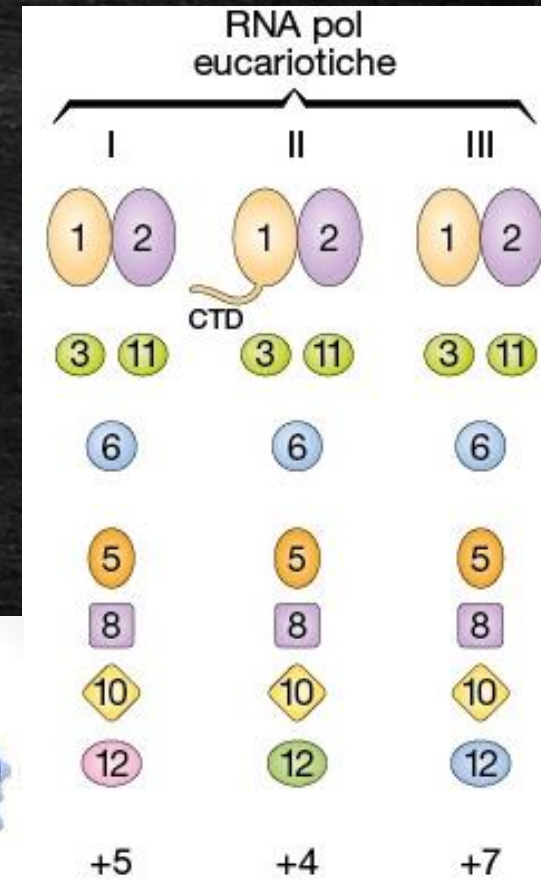
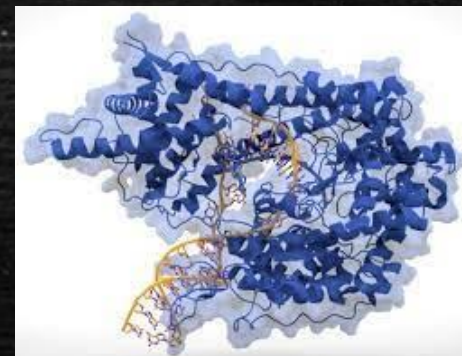
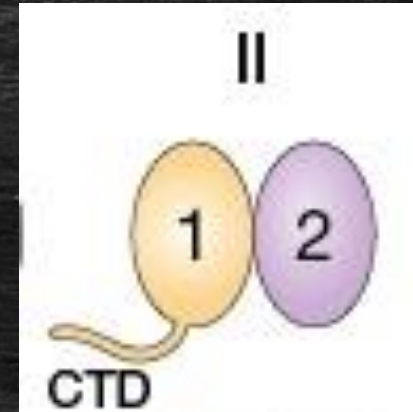
Struttura RNA polimerasi eucariotiche (12 subunità, 500kDa)

- La presenza di un **dominio CTD** (C-terminal domain) **nella subunità Rpb1** contraddistingue la Pol II
- Questo dominio è una coda costituita da ripetizioni della sequenza amminoacidica: **Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser**. Può raggiungere fino alle 52 ripetizioni della sequenza

E' fondamentale

- (1) nella formazione del complesso d'inizio della trascrizione
- (2) nel distacco della RNA pol dal promotore

La sua funzione è regolata dallo stato di **fosforilazione** dei suoi residui



Differenze RNA polimerasi - attività

N° e varietà

di geni da trascrivere

Pol II Pol III Pol I



N° di fattori

regolatori necessari
per il reclutamento
nel promotore

Pol II Pol III Pol I



Fattori di trascrizione
basali

*Formano il complesso
d'inizio della trascrizione*

Fattori regolatori
della trascrizione

Le differenze sono
dovute principalmente
alla **complessità dei
diversi promotori** per
ogni RNA pol

Fasi della Trascrizione

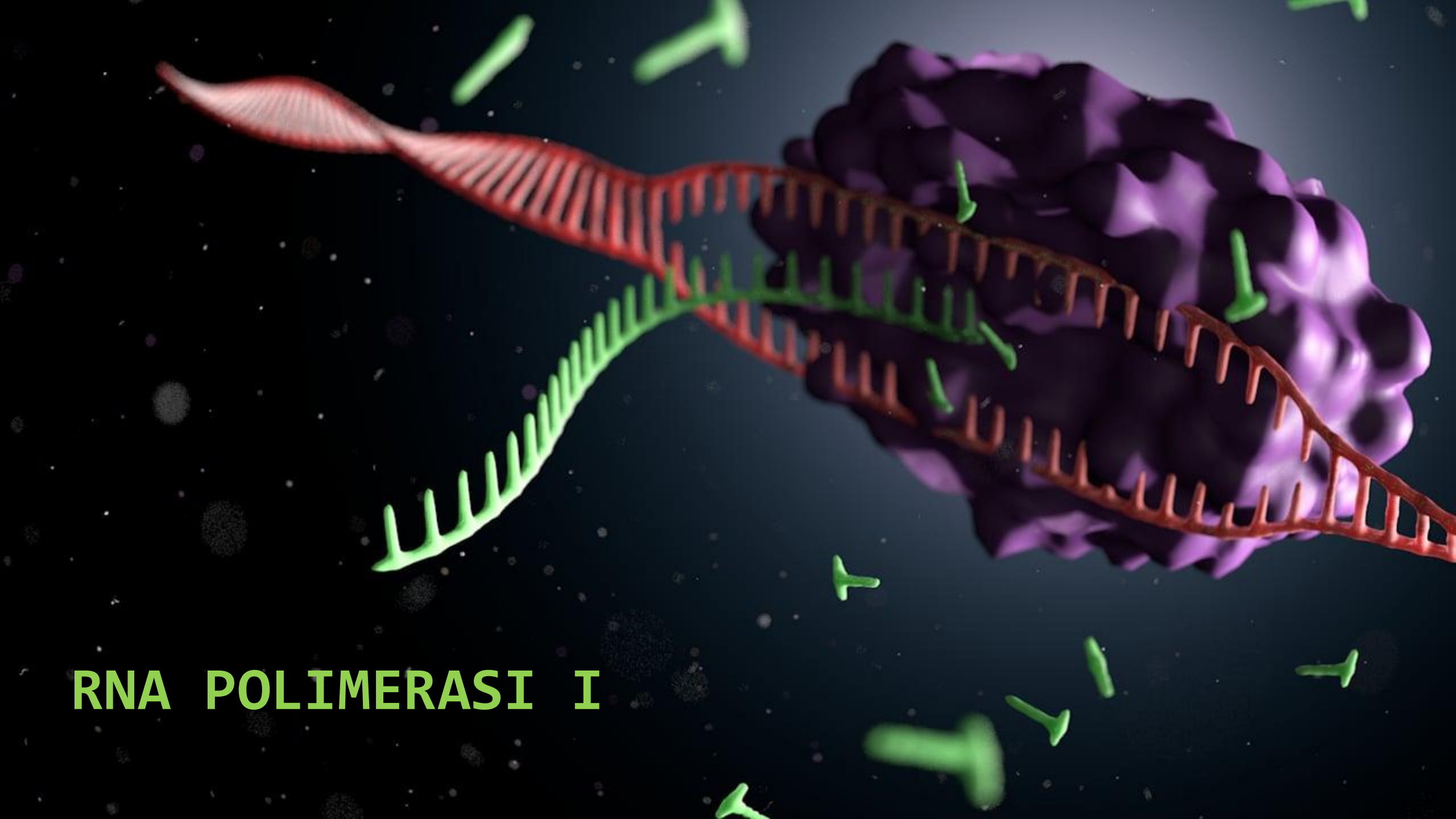
▪ Iniziazione:

- La RNA pol e i fattori di trascrizione si legano al promotore formando il complesso di pre-inizio o PIC.
- Dipendendo della RNA pol I, II o III, il promotore sarà diverso e anche i fattori di trascrizione che si assemblano.
- Esiste una fase abortiva.
- Il livello di trascrizione (Pol II), basale o potenziato, dipende di fattori (attivatori o repressori) legati a regioni distali a monte del promotore

▪ Allungamento:

- avviene sempre in direzione 5'→3', con delle pause.
- La regione CTD della subunità Rbp1 della RNA pol II è importante per il processamento del RNA man mano che esce per il canale d'uscita nella RNA pol.
- Minore velocità di polimerizzazione che in procarioti, favorendo una maggiore fedeltà del processo.

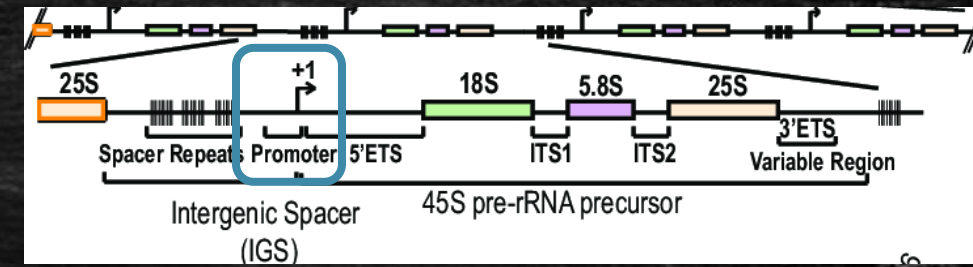
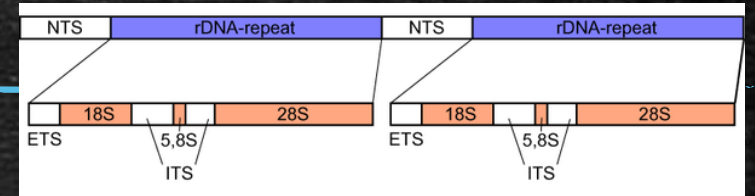
▪ Terminazione: Poco conosciuta, diverso per ogni RNA polimerasi.



RNA POLIMERASI I

Polimerasi I: Promotore e fattori regolatori

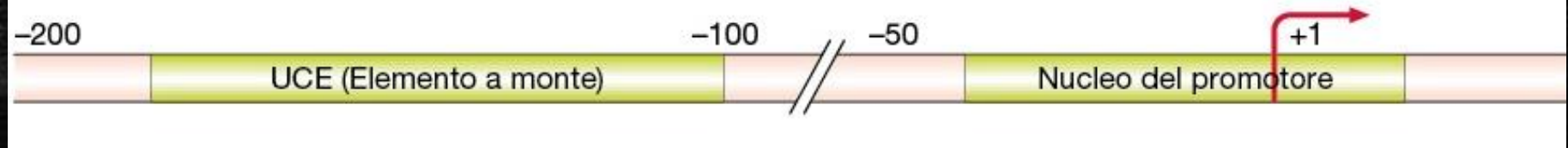
- Trascrive i geni per gli **rRNA**
- I geni degli rRNA sono organizzati in cluster contenenti la sequenza di diversi rRNA ripetuti in tandem, dove il cluster è ripetuto decine o centinaia di volte.
- Questi geni all'interno di ogni cluster sono separati da spaziatori (Internal Transcribed Spacers:ITS).



Promotore canonico



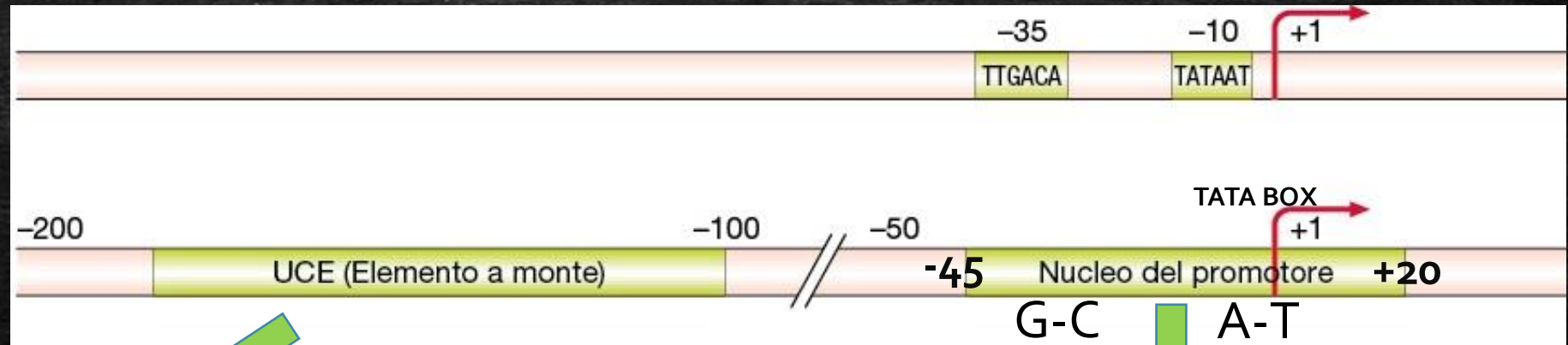
Promotore rRNA



Polimerasi I: Promotore e fattori regolatori

Promotore canonico

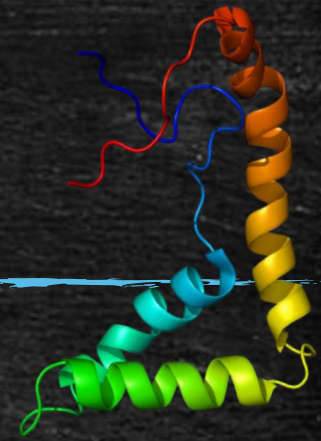
Promotore rRNA (Pol I)



L'elemento **UCE** (*Upstream control element*)
Occupa nt dal **-107 al -180**
E' ricco in bassi **G-C**

Il **Nucleo del promotore** si sovrappone al sito d'inizio della trascrizione o TSS (transcription starting site, +1).
Occupante dal **-45 al +20**
E' ricco in **bassi G-C** nella regione **-40 a -20**.
Nella regione intorno alla **TSS** è ricco in **A-T** (**TATA BOX**).

Polimerasi I: Promotore e fattori regolatori



Complesso d'inizio della trascrizione
[Proteina UBF + complesso SL1]

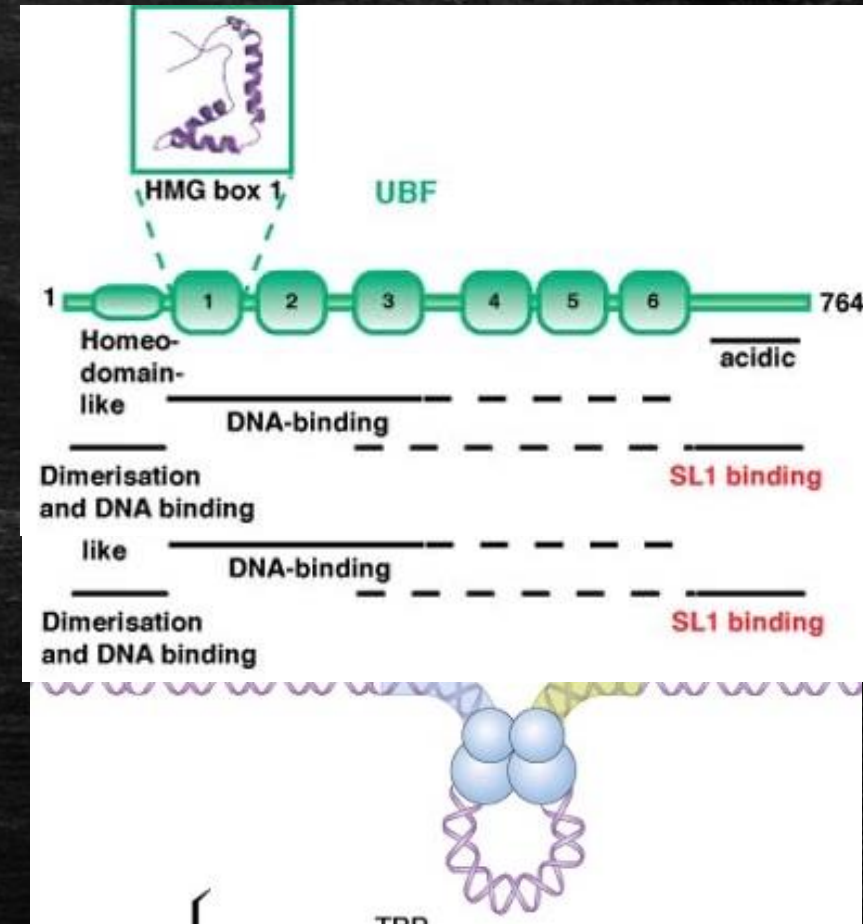
▪ UBF (upstream binding factor) :

lega il DNA con domini multipli del tipo **HMG** (*High mobility group*).

Interagisce, in forma di **dimero**, con il nucleo del promotore e con l'elemento UCE formando un'ansa

La regione **C-terminale** è necessaria per l'attivazione della trascrizione e si trova **altamente fosforilata**

Si ipotizza che UBF possa regolare il numero di copie dei geni rRNA trascritti e la frequenza temporale già che gran parte dei cluster contenenti questi geni sono di solito silenziati.



Polimerasi I: Promotore e fattori regolatori

Complesso d'inizio della trascrizione Protein UBF + complesso SL1

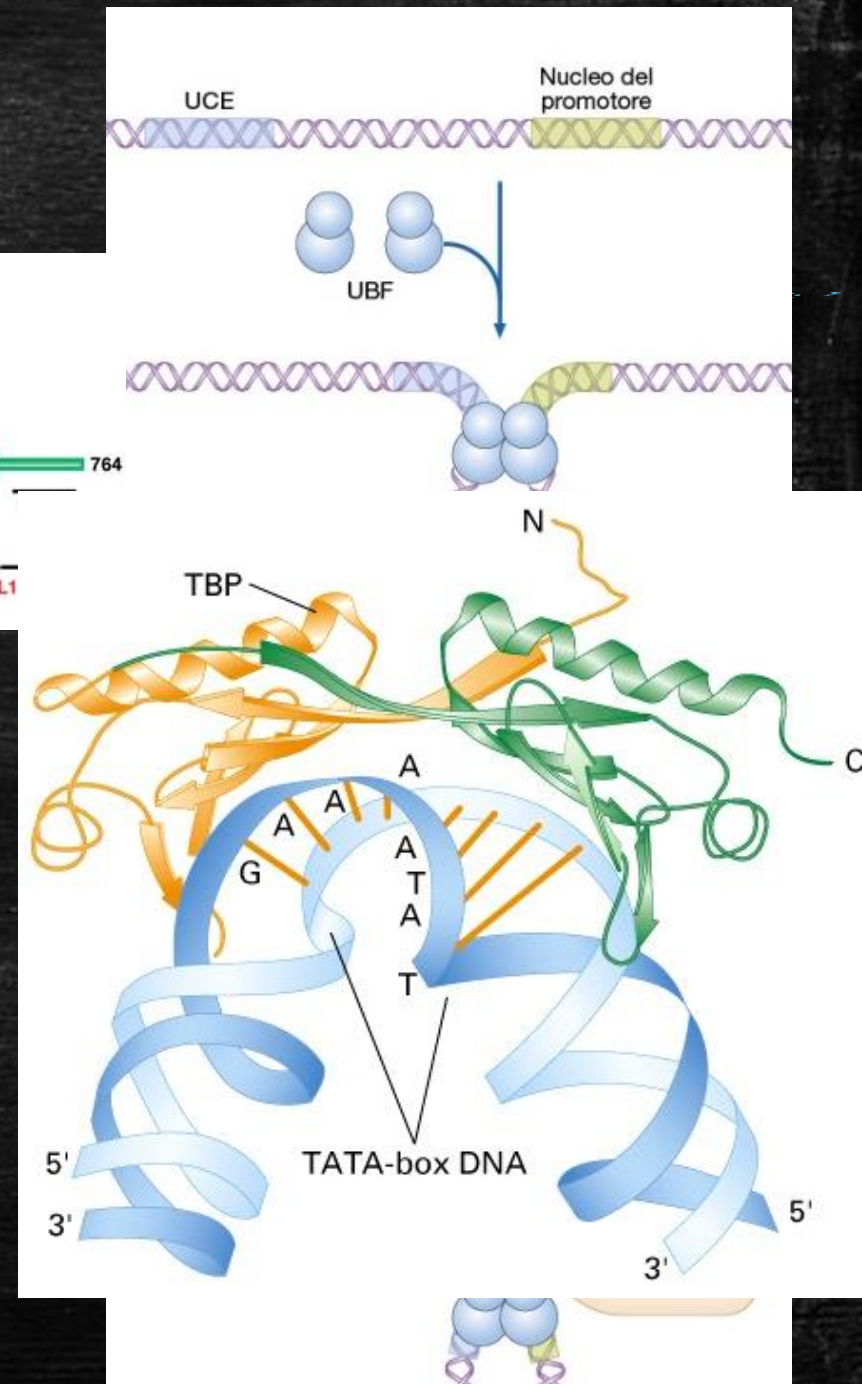
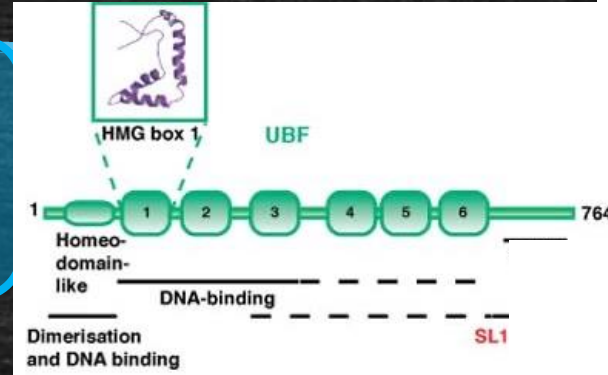
- **Complesso SL1** : TBP+TAF

TBP (TATA binding protein): comuni per tutte le RNA pol, si lega nel **solco minore**, nella TATA BOX e induce un **piegamento di 80°** che **favorisce il reclutamento della RNA pol**. Allo stesso tempo lascia libero ed esposto il solco maggiore dove possono posizionarsi altre proteine

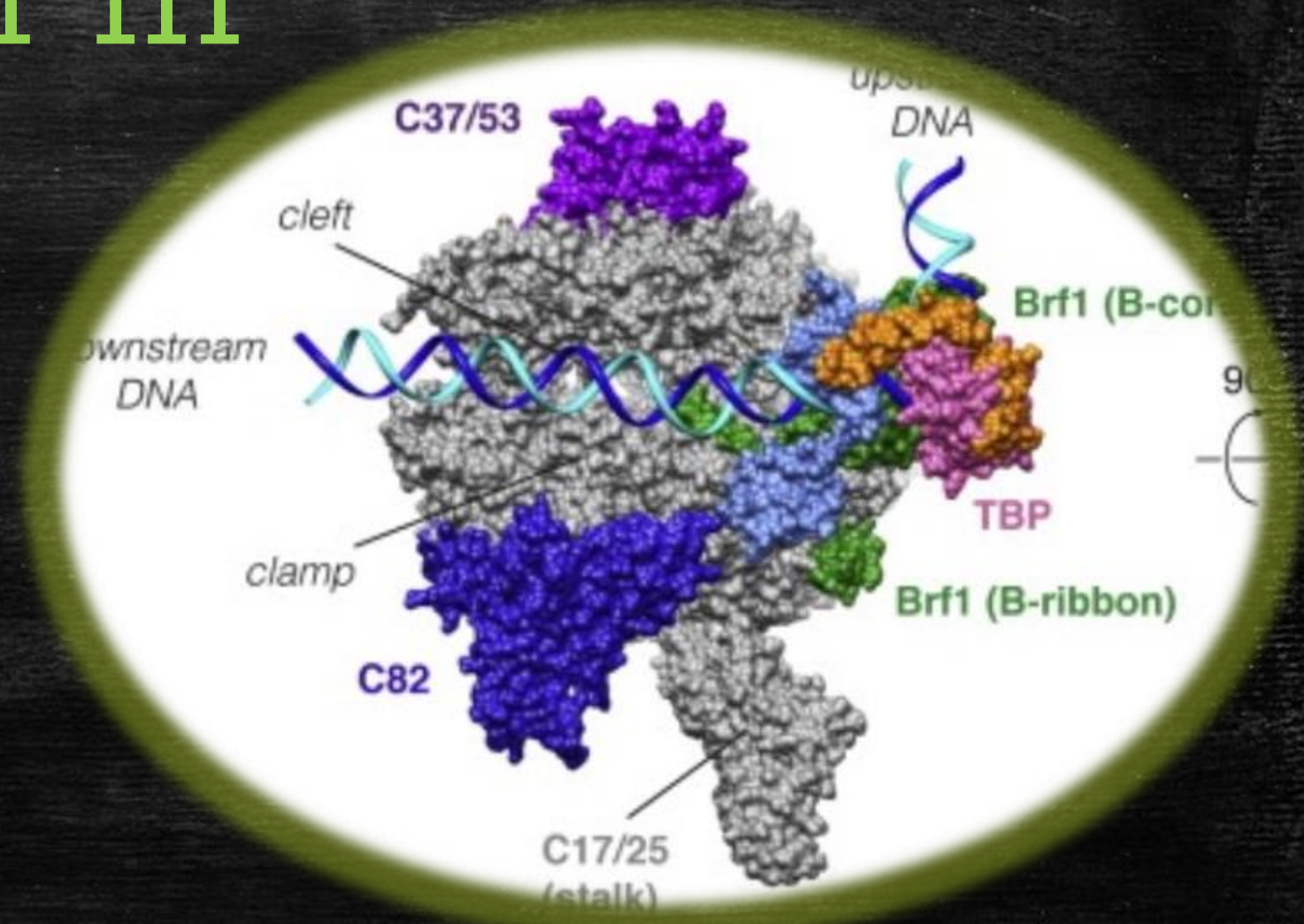
TAF (TBP associated factors): Altri fattori associati specifici per Pol I

Il reclutamento di SL1 sul promotore è mediato da UBF. Questa interazione permette la posteriore interazione di SL1 con il DNA reclutando la RNA pol e promovendo la trascrizione.

Lo stato di fosforilazione di UBF influenza il legame di SL1



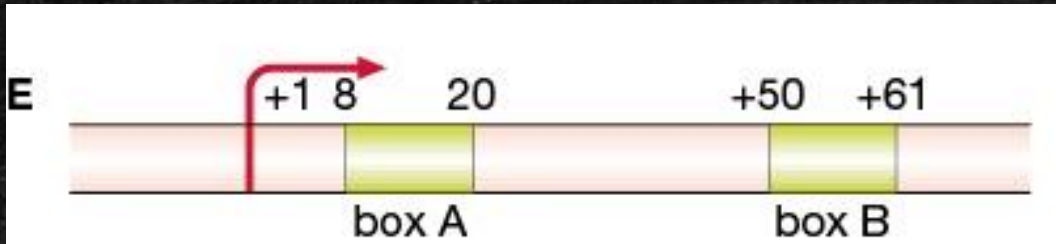
RNA POLIMERASI III



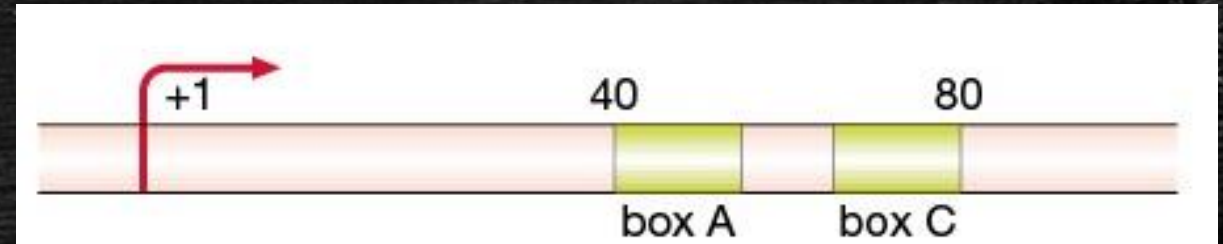
Polimerasi III: Promotore e fattori regolatori

- Trascrive i geni per i **tRNA**, **l'rRNA 5S** e **snRNA** (small nuclear RNA)
- Come promotore usa degli **elementi interni** che si sovrappongono alle regioni trascritte e che contengono degli elementi di controllo (chiamati **BOX**). Queste sequenze BOX vengono **considerati promotori interni**
- Negli elementi BOX si legano i fattori d'inizio che posizionano la RNA pol *a monte* del TSS

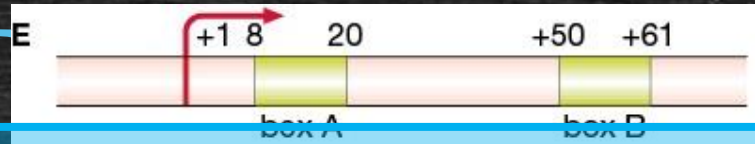
Elementi del promotore tRNA



Elementi del Promotore rRNA_{5S}



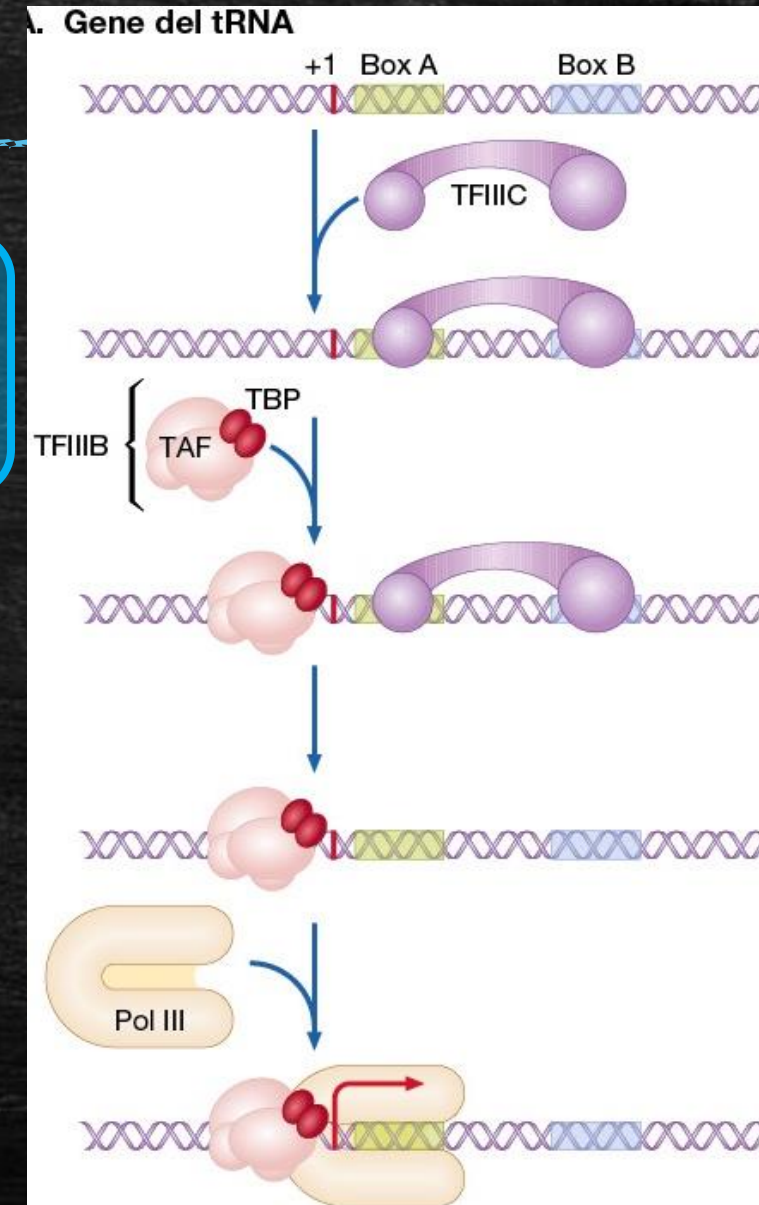
Polimerasi III: Promotore e fattori regolatori



Promotori **tRNA**: **Complesso d'inizio della trascrizione**
(promotori *a valle* del sito inizio trascrizione)

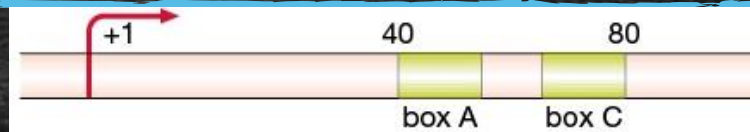
Il **fattore TFIIC** si lega alle BoxA e BoxB, e questo richiama sul promotore il fattore **TFIIB**

Il complesso **TFIIB** è formato da diverse proteine, tra queste il **TBP** e **altre TAF**. Questo complesso richiama la RNA pol III sul TSS (+1) procedendo con la trascrizione dei geni *a valle*

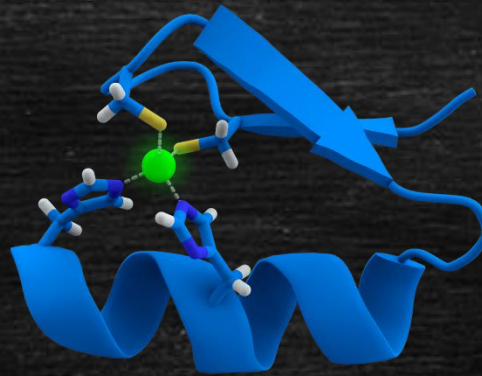
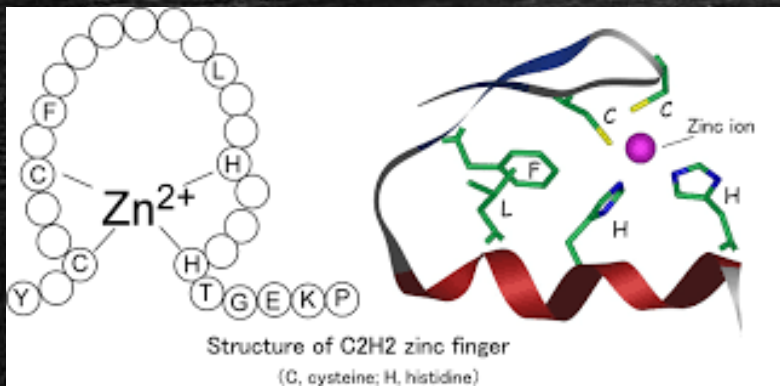


Polimerasi III: Promotore e fattori regolatori

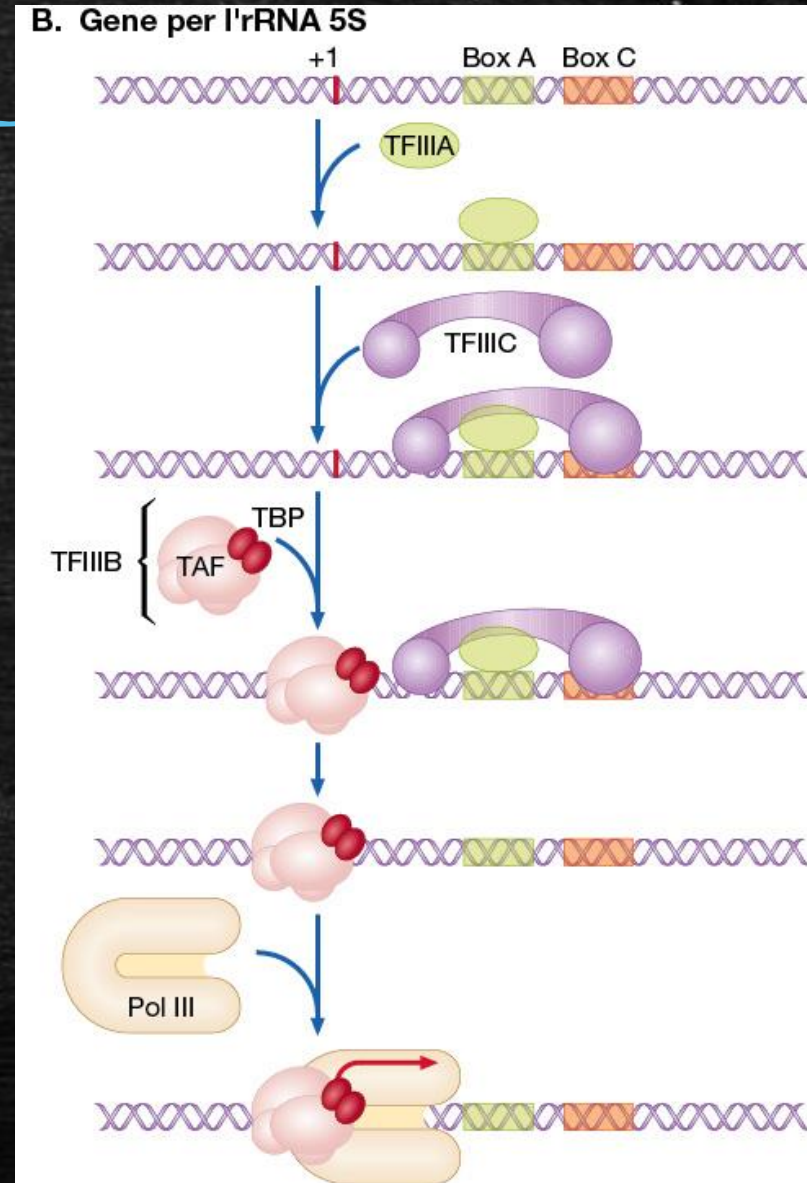
Promotore rRNA 5s



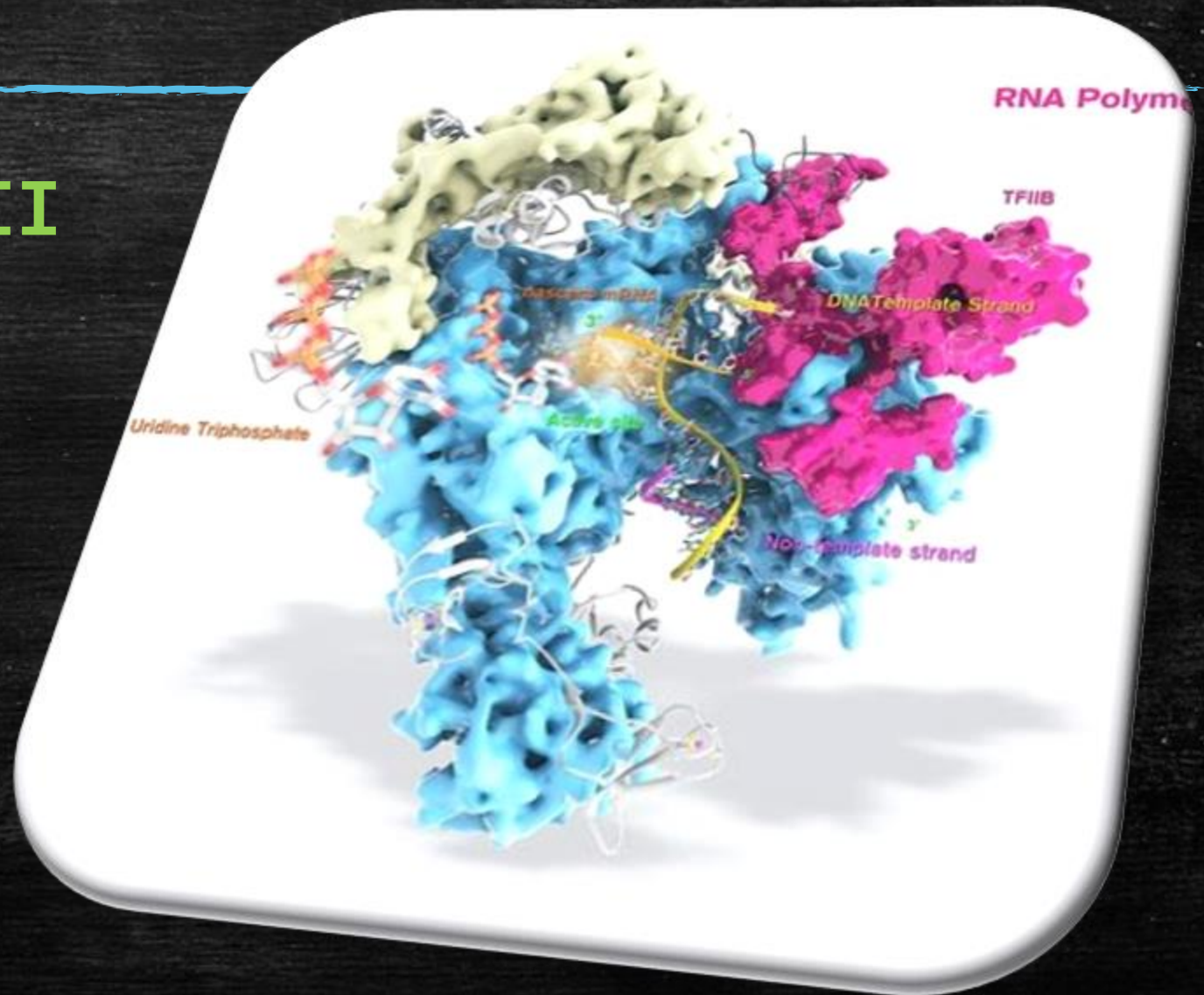
Il fattore **TFIIIA** si lega specificamente al DNA a livello del Box A attraverso dei domini «Zinc finger», permettendo a **TFIIIC** posizionarsi sul promotore



TFIIIA e **TFIIIC** agiscono come fattori di assemblaggio e richiamano **TFIIIB** sul sito d'inizio della trascrizione (TSS). La subunità TBP si lega al DNA e recluta la RNA pol III



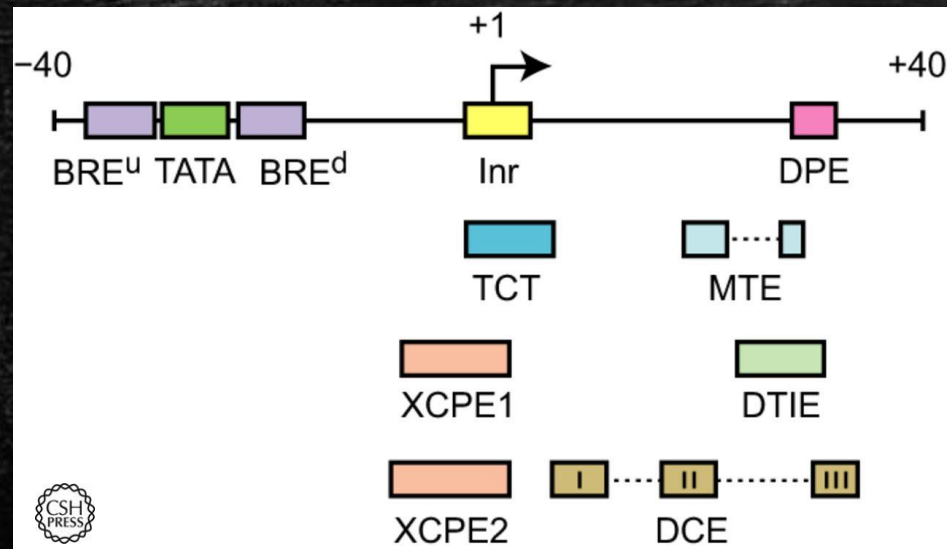
RNA polymerase II



RNA polimerase II: precursori mRNA, miRNA e snRNA

- Promotore molto lungo e modulare

- 2 gruppi di fattori di trascrizione



1. Fattori basali

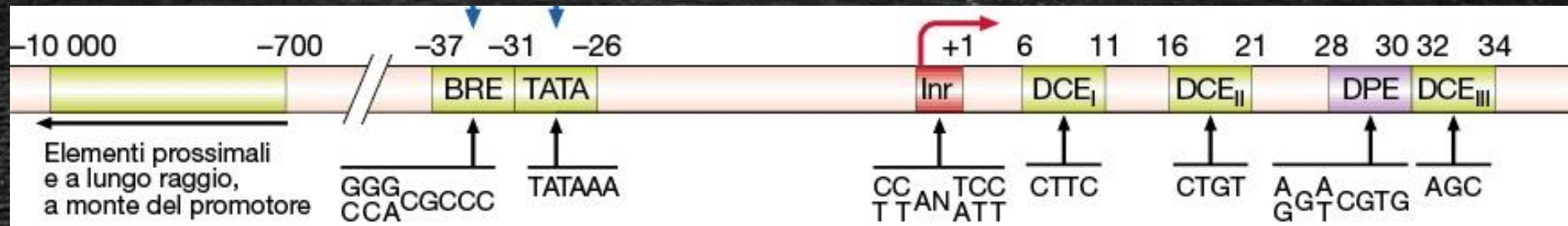
che formano il complesso d'iniziazione e si legano al Nucleo del Promotore

2. Fattori regolatori

Attivatori o repressori che si legano a regioni distali o prossimali

RNA polimerase II:

Promotore: «Core elements» + altri elementi



Upstream della TSS

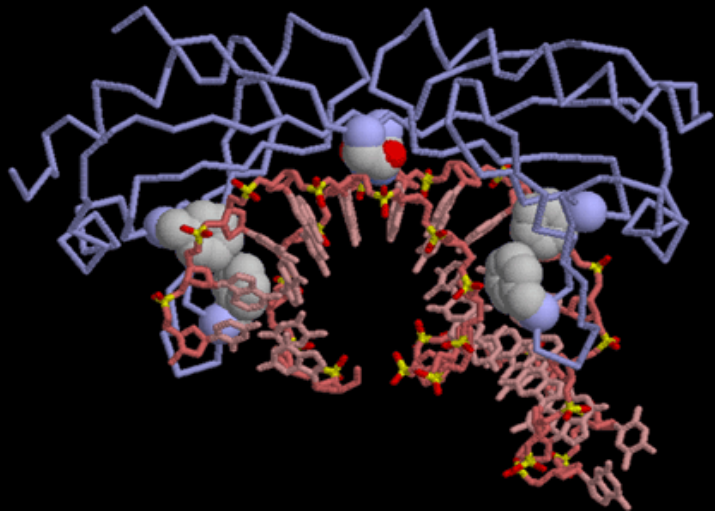
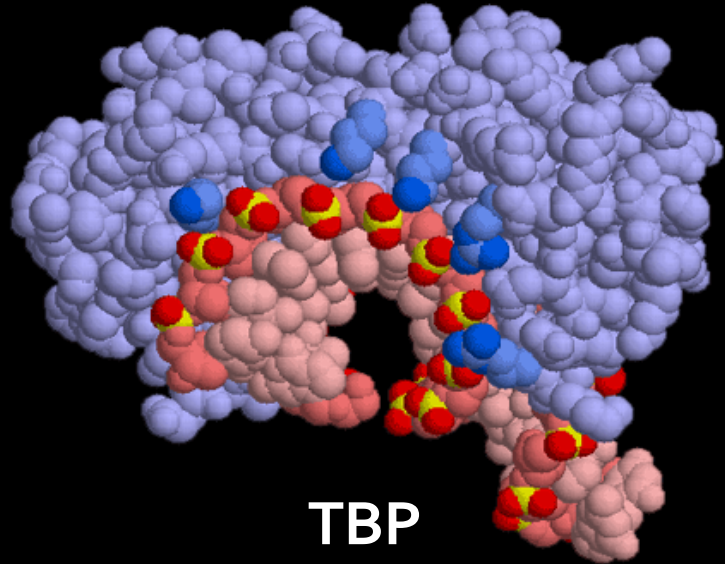
- **INR o Inziatore:** sequenza conservata dalla quale parte la trascrizione nel sito TSS (+1), generalmente da una A
- **TATA Box:** sequenza conservata TA-TAAA in posizione (-26)
- **BRE (*B Responsive Element*):** permette il legame di TFIIB

Downstream della TSS

- **DPE (*Downstream Promoter Element*):** (+28 a +34) Tipico dei promotori che non presentano la TATA Box (*promotori TATA-less*)
- **DCE (*Downstream Core Element*):** possono essere presenti in più copie (DCE_{I-III}) nei promotori contenenti la TATA
- **Isole CpG:** costituiti da dinucleotidi GC

Gli **elementi prossimali e distali** si trovano *a monte* -200 fino a -10000 dal sito d'inizio (TSS)

RNA polimerase II: Fattori trascrizione



- I fattori trascrizionali basali si assemblano formando il **Complesso di pre-inizio** o **PIC** (*pre-initiation complex*)

TFIID = TBP + 13 TAF (*TBP associated factors*)

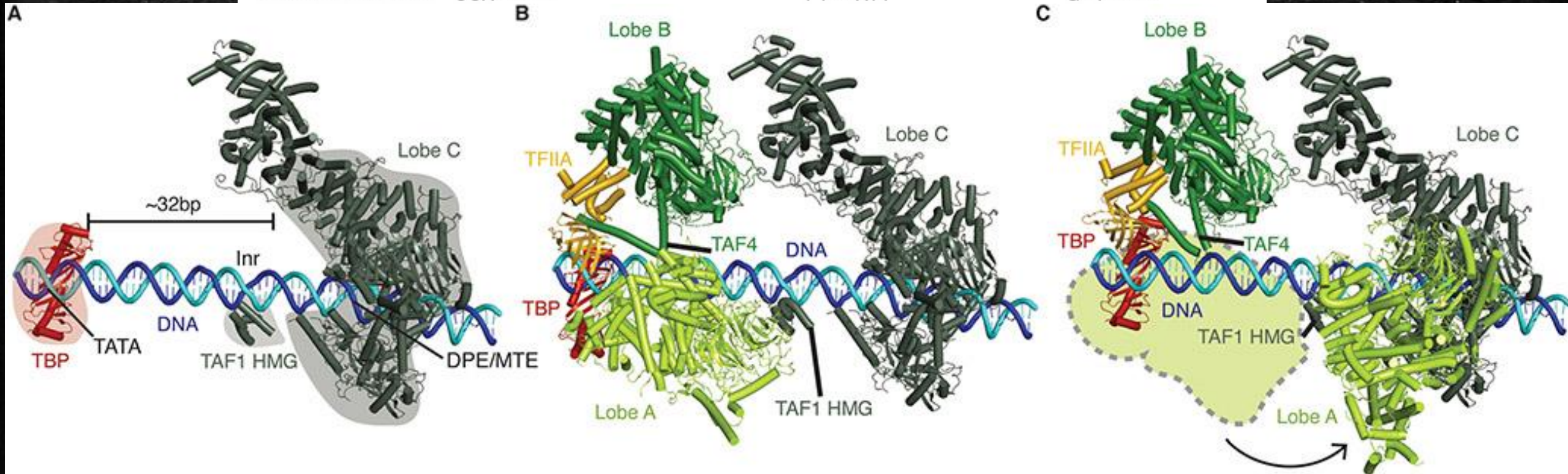
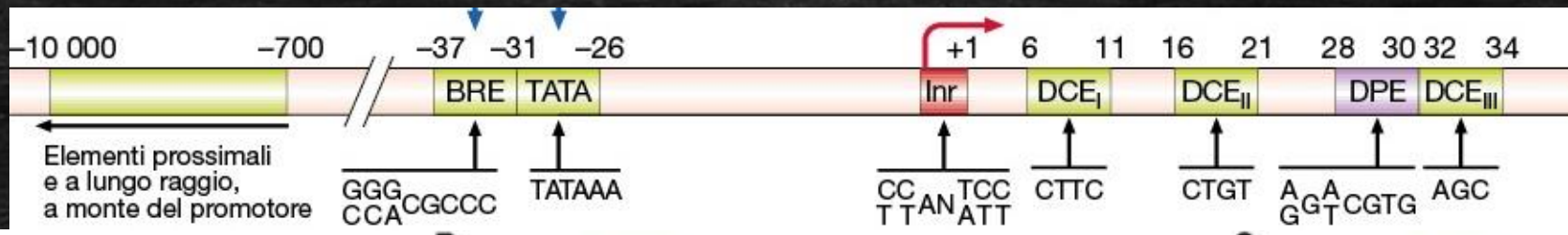
Promuove trascrizione
basale dal promotore

Bersaglio di proteine attivatrici che
aumentano la trascrizione regolando
la conformazione della cromatina.
Questi sono diversi per ogni RNA pol
I-II o III.

TBP

- è un monomero con un asse di simmetria che lo fa sembrare una «sella».
- Si lega alla **TATA box**, piegando il DNA di 80° e così facilitando l'interazione di diverse regioni del promotore.

TFIID riconosce elementi nella sequenza del promotore e posiziona TBP nella TATA box



Binding sites for TFIID lobes on promoter DNA. Lobe C binds the MTE/DPE elements. The Inr element is associated with the TAF1 HMG domain. TBP binds the upstream TATA element (PDB ID 7EGJ)[16].

B-C. TFIID lobe A is highly mobile. In panel B, lobe A is associated with TBP at the TATA site (PDB ID 7EGD) [16]. In panel C, lobe A has rotated and lies next to lobe B/C (PDB ID 7EGJ) [16]. The position of lobe A as seen in panel B is shown as a lime green surface.

RNA polimerase II: Fattori trascrizione

- I fattori trascrizionali basali si assemblano formando il **Complesso di pre-inizio** o **PIC** (*pre-initiation complex*)

TFIID = TBP + 13 TAF (*TBP associate factors*)

TFIIA (dimero):

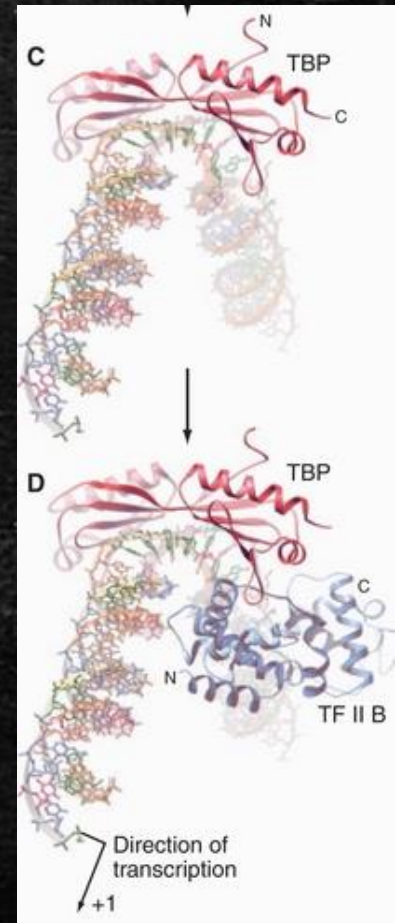
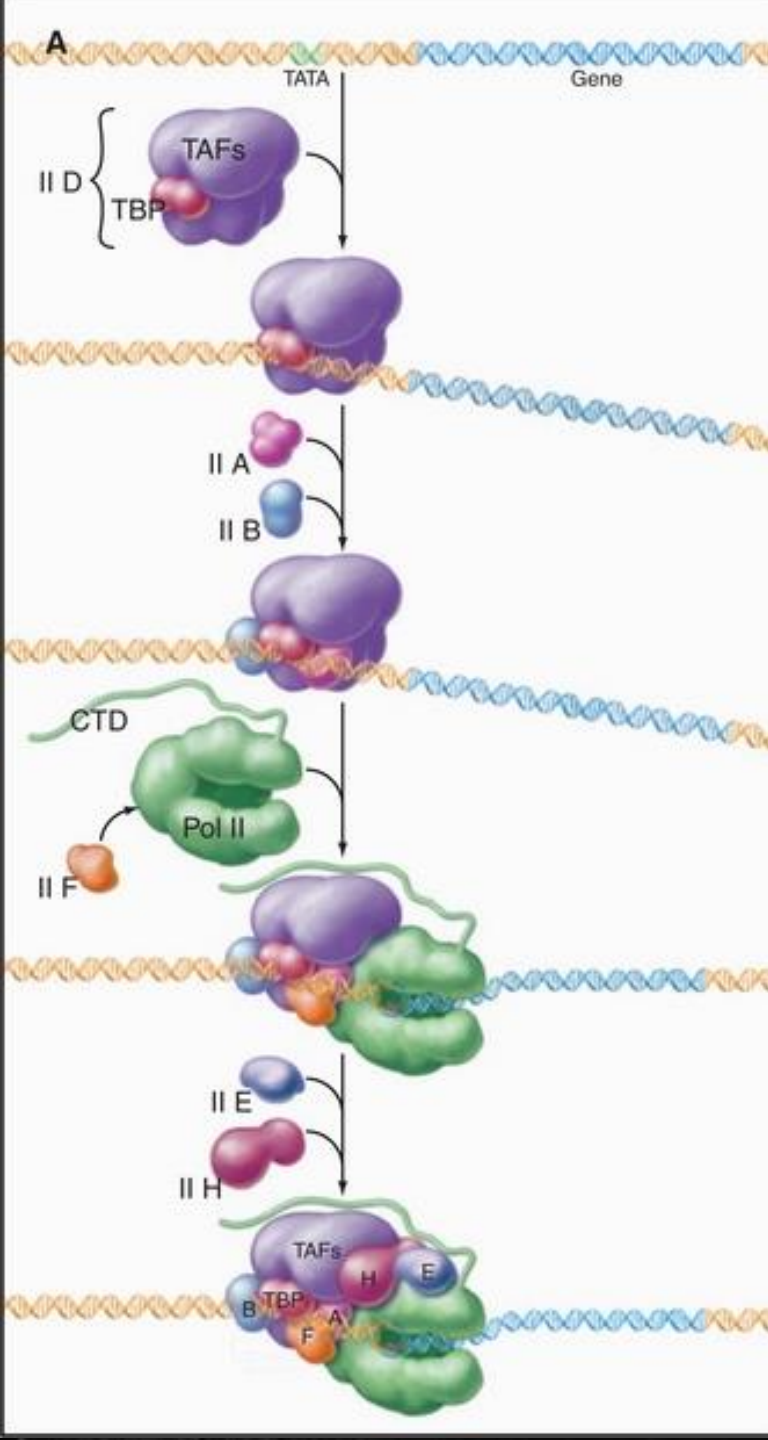
- Stabilizza il complesso TFIID-DNA
- Impedisce il legame di repressori che possano interferire con la formazione di PIC

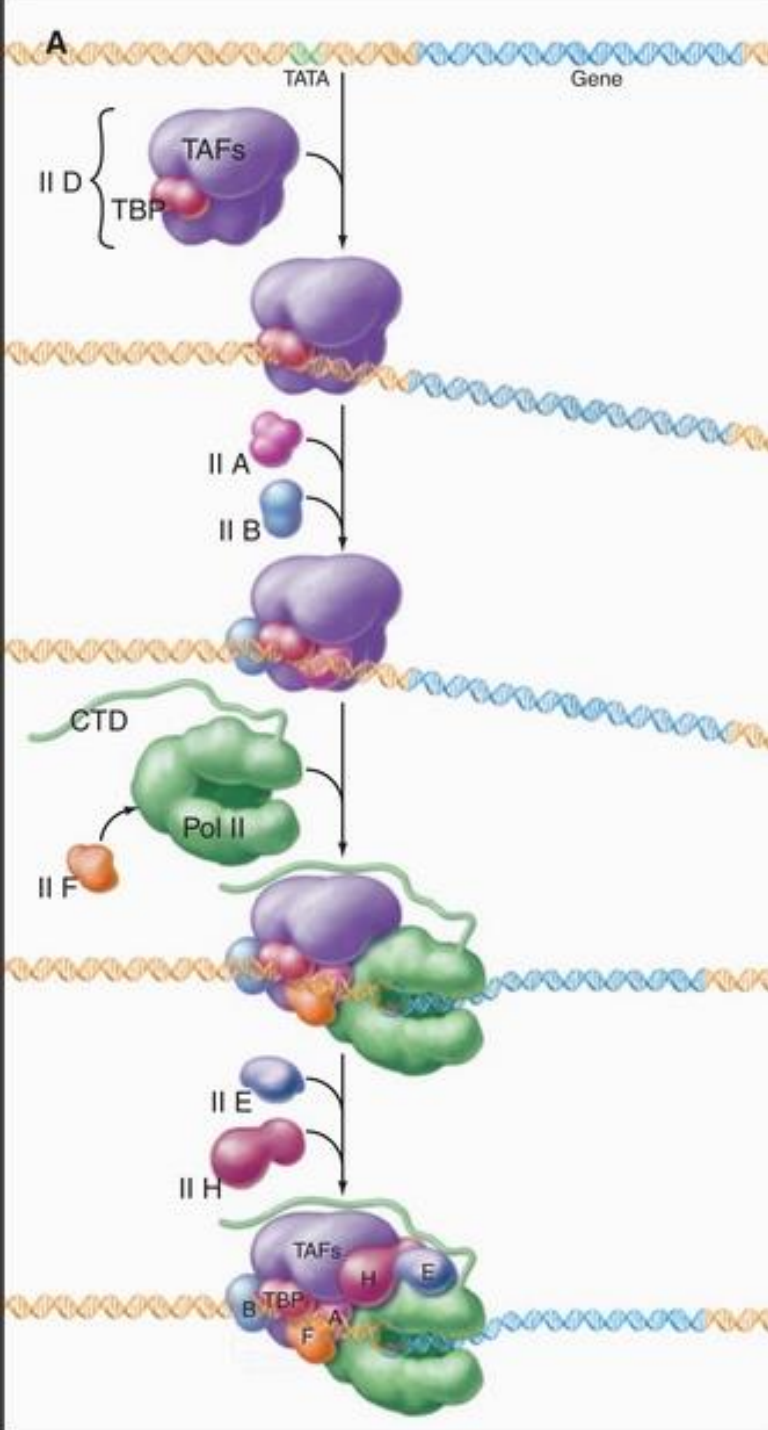
TFIIB:

Dopo il legame TFIIA con DNA, TFIIB posiziona la Pol II sul sito d'inizio (mutazioni di TFIIB provocano un inizio alterato del trascritto).

Interagisce con il DNA -TBP grazie alla piegatura indotta da TBP *a monte* e *a valle* della TATA box

Nella regione N-ter presenta un loop (β -finger) che entra nella regione del centro attivo della pol II, nella stessa regione del ibrido RNA-DNA stabilizzandolo.





RNA polimerase II: Fattori trascrizione

- I fattori trascrizionali basali si assemblano formando il **Complesso di pre-inizio** o **PIC** (*pre-initiation complex*)

TFIID = TBP + 13 TAF (*TBP associate factors*)

TFIIA

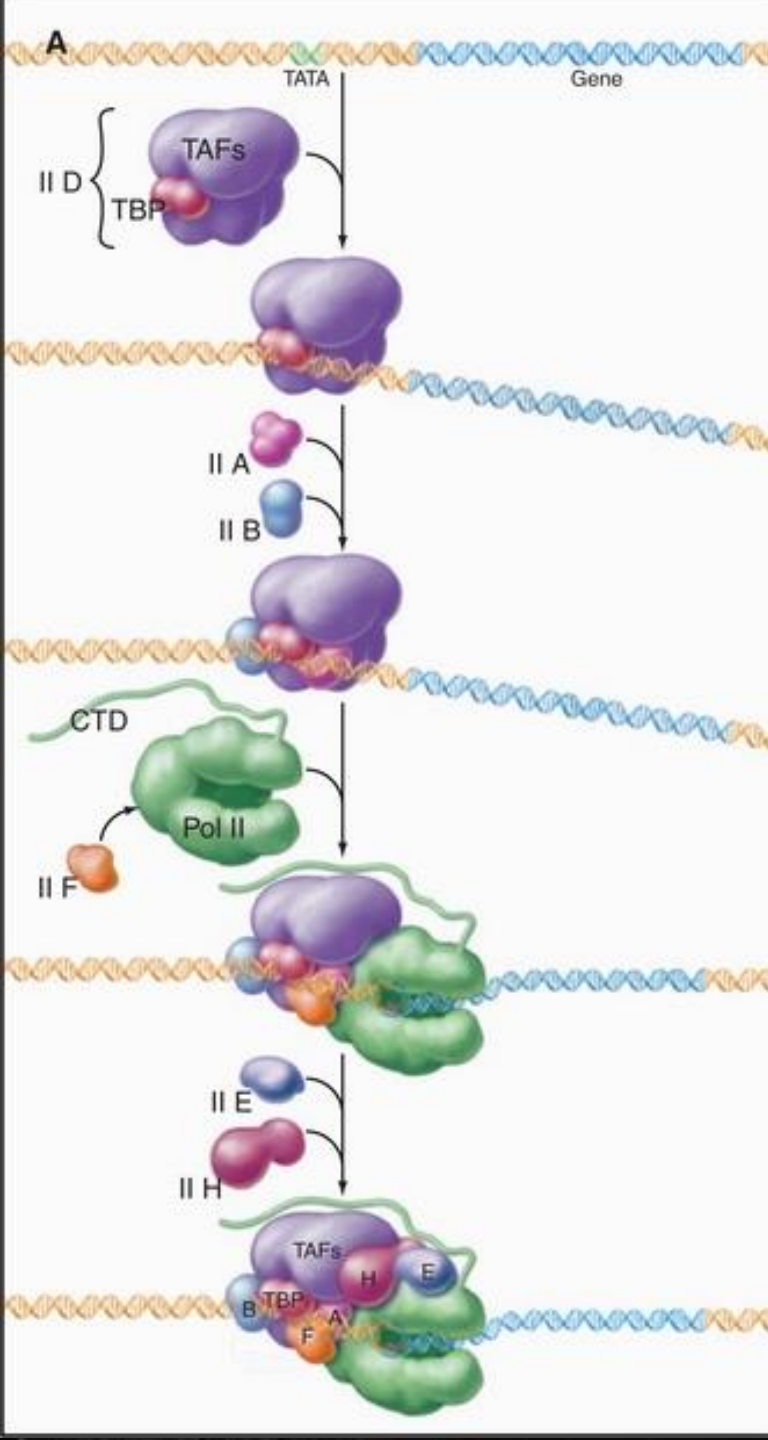
TFIIB

TFIIF:

Aiuta all'assemblaggio della pol II al complesso già creato.

In questo complesso la Pol II mostra la coda C-terminale CTD libera e non modificata, e si aggiungono altri 2 fattori

TFIIE & TFIIH



RNA polimerase II: Fattori trascrizione

I fattori trascrizionali basali si assemblano formando il **Complesso di pre-inizio** o **PIC** (*pre-initiation complex*)

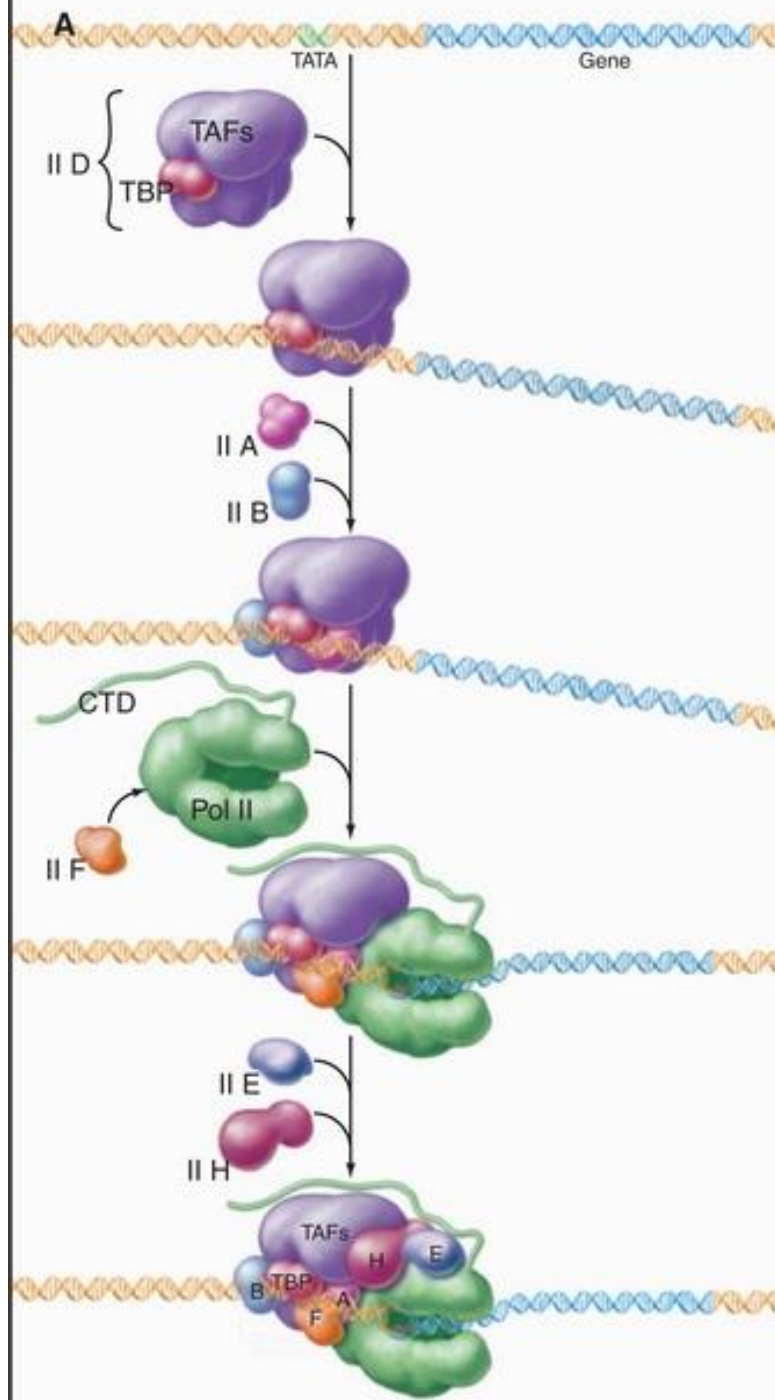
TFIID = TBP + 13 TAF (*TBP associate factors*)

TFIIA **TFIIB** **TFIIF** **RNA pol II**

TFIIE: Recluta TFIIH

TFIIH: costituito da 10 subunità

1. Attività elicasica ATP-dipendente che apre il DNA dando luogo al complesso «aperto»
2. Fosforila la regione CTD (insieme ad una chinasi) cambiando la qualità dell'interazione con gli altri componenti di PIC, inducendo lo staccamento della Pol II dal PIC e l'inizio della fase di allungamento.



Complesso di pre-inizio o PIC (*pre-initiation complex*)

Tabella 11.1 Fattori generali di trascrizione della RNA polimerasi II.

Fattore	Numero di subunità	Peso molecolare delle subunità in kDa	Funzioni
TFIIA	3	12, 19, 35	Stabilizza il legame di TBP e TFIIB
TFIIB	1	25	Lega TBP, seleziona il sito di inizio della trascrizione e recluta Pol II
TFIID	12	Da 15 a 250	Interagisce con i fattori di regolazione ed è formata da TBP e TAF
TBP	1	38	Subunità di TFIID, si lega in maniera specifica alla TATA box
TFIIE	2	34, 57	Recluta TFIIH nel complesso di pre-inizio
TFIIF	2	30, 74	Lega Pol II e TFIIB
TFIIH	9	Da 38 a 98	Ha un'attività elicastica che apre il promotore, fosforila la coda C-terminale (CTD) di Pol II
Pol II	12	Da 10 a 220	Catalizza la sintesi dell'RNA usando il DNA come stampo
Totale	42	Più di 1000	

Tabella 11.1

RNA polimerase II: PIC e il Mediatore

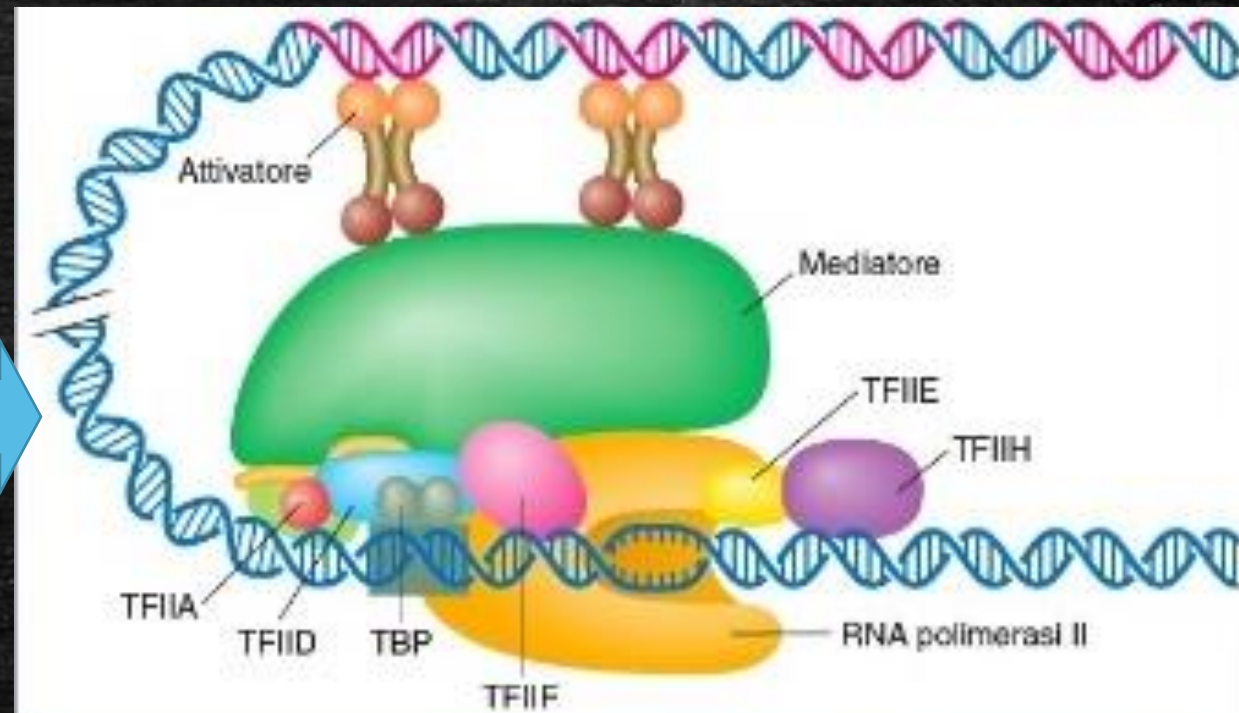
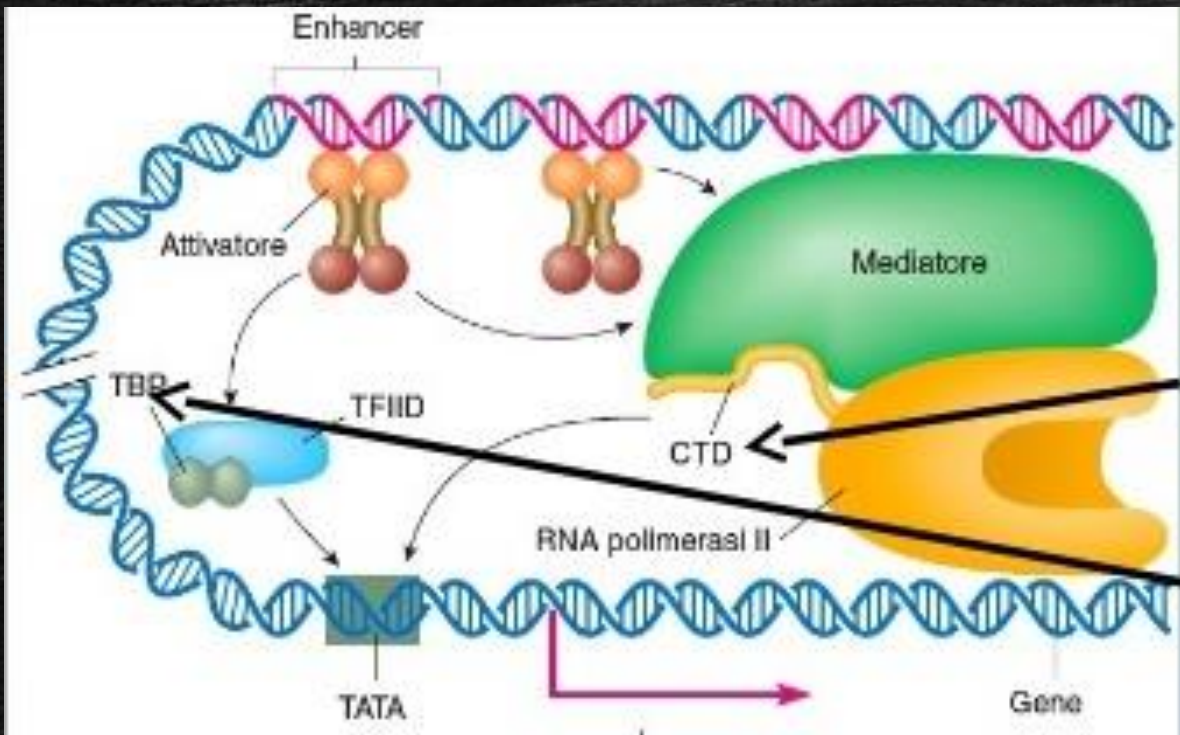
- *In vitro*, nel DNA nudo, Il complesso PIC è sufficiente per indurre la trascrizione
- *In vivo* occorrono altri componenti che modifichino la cromatina e aumentino la trascrizione.

«Complesso Mediatore»

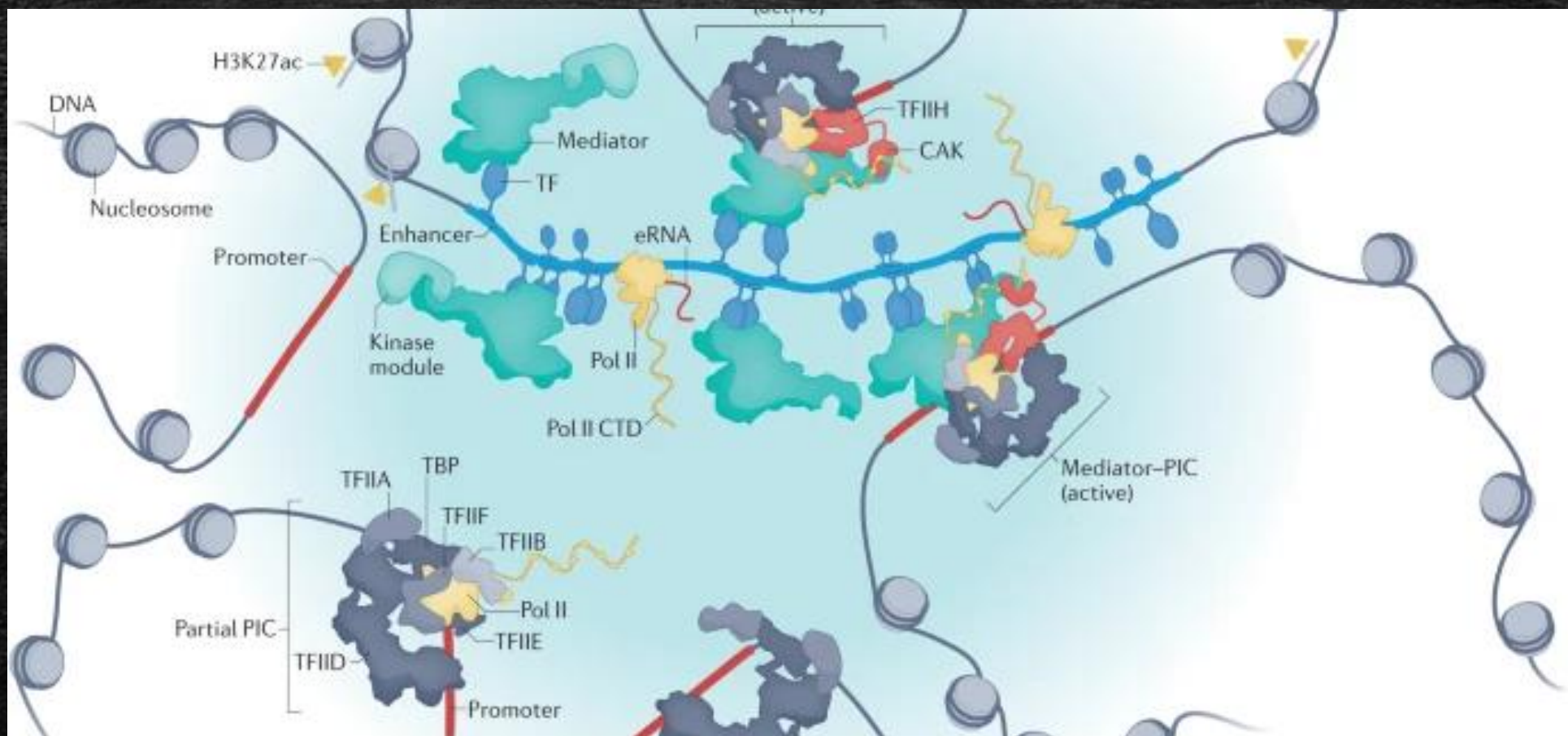
- E' un complesso proteico formato da circa 26 subunità delle quali al meno 7 sono molto conservate. Flessibile conformazionalmente, facilita interazione con numerosi fattori regolatori.
- Il mediatore **si lega alla RNA pol II** attraverso il **CTD (ancora non fosforilato)**.
- **E' indispensabile per la trascrizione**, e lega la **RNA pol II** e gli attivatori posizionati nella **regione enhancer** (elementi distali e prossimali descritti come parte del promotore)
- Il mediatore **media la comunicazione tra gli elementi prossimali o distali e il promotore in presenza degli attivatori.**
- E' coinvolto anche nella repressione

RNA polimerase II: PIC e il Mediatore

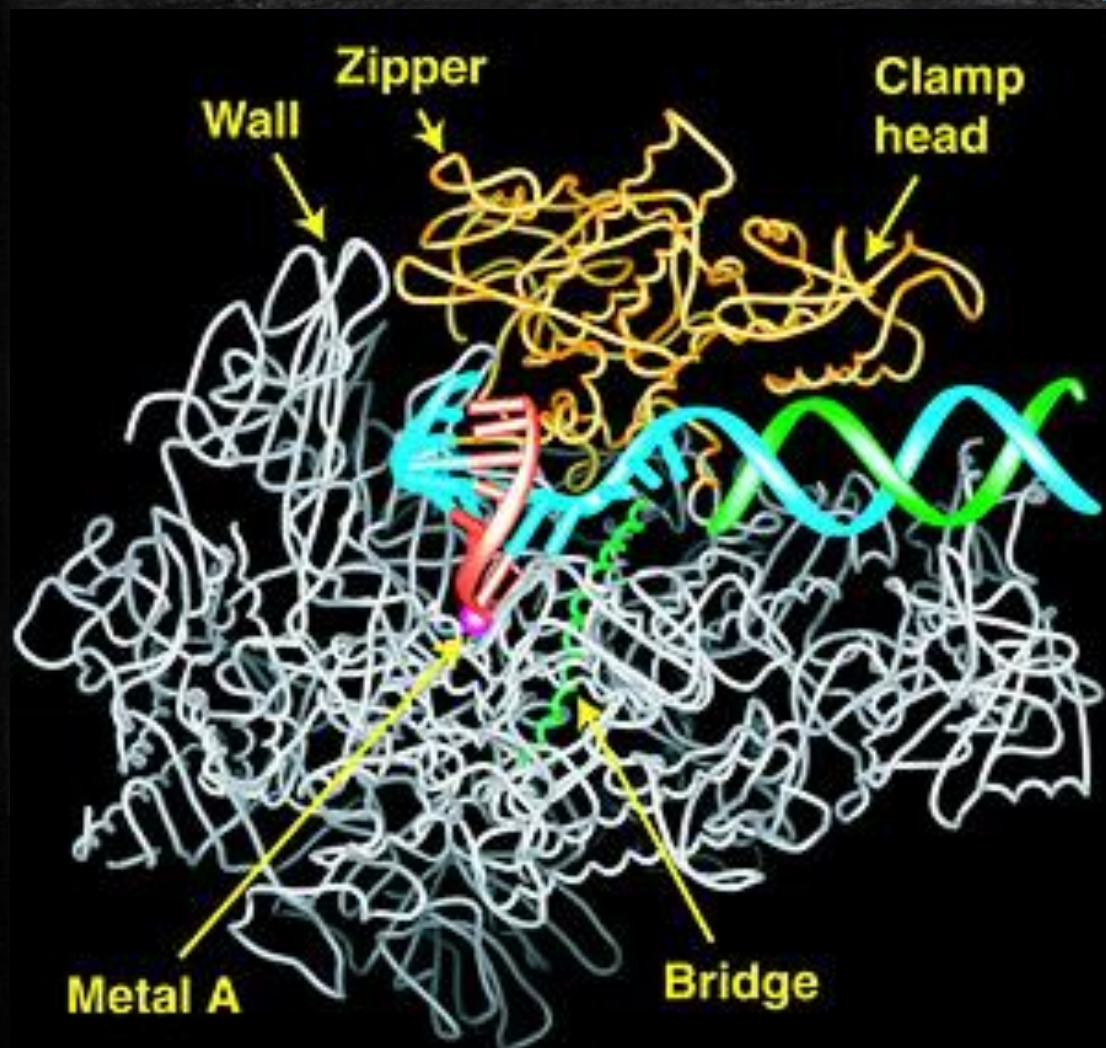
«Complesso Mediatore»



https://www.youtube.com/watch?annotation_id=annotation_2005982055&feature=iv&src_vid=qeNcQCUBB7g&v=WWgIlyM_FCo



RNA polimerase II: struttura



- Molto simile alla RNA pol batterica dal punto di vista strutturale e del meccanismo.
- Forma a «pinza», con un solco di entrata del DNA fino alla regione detta «muro» dove il DNA stampo deve girare esponendo la base non appaiata nel sito attivo pronta ad appaiarsi con il nucleotide in entrata al complesso.
- La regione CTD si trova vicino al canale d'uscita del RNA
- Presenta degli ioni Mg^{2+} , e le forze d'impilamento sono importanti per il riconoscimento del nucleotide come corretto.
- Esiste, come nei procarioti, la fase abortiva

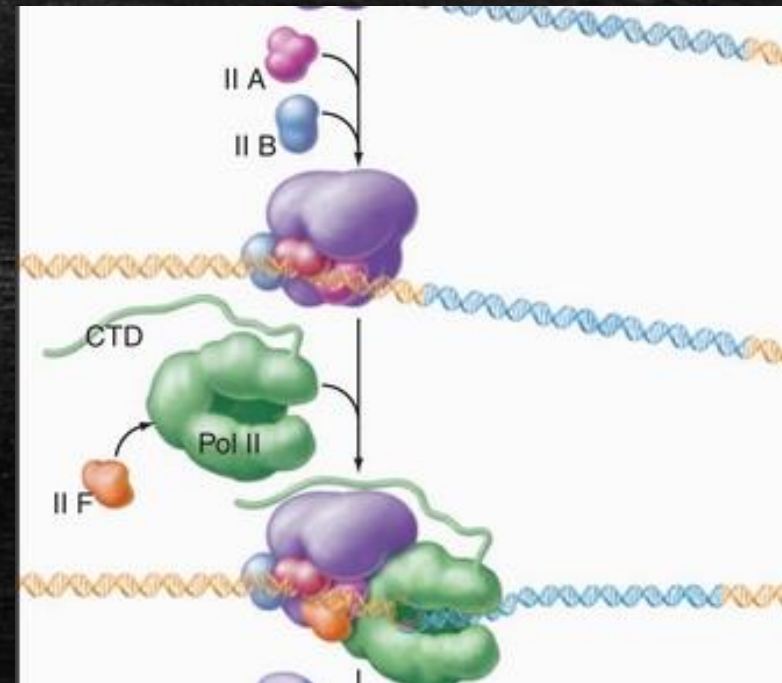
RNA polimerase II: Fase inizio_ sintesi abortiva

- Fase abortiva:
- La estensione del RNA nascente oltre 12-13 nt provoca la dissociazione di TFIIIB dalla RNA pol II., permettendo che possa lasciare il promotore.



TFIIB:

Dopo il legame TFIIA con DNA, TFIIB posiziona la Pol II sul sito d'inizio



RNA polimerase II: Fase Allungamento

Superata la fase abortiva, **la RNA pol si stacca** dal promotore e della maggior parte dei fattori basali, e va avanti con l'aggiunta di nuovi nucleotidi.

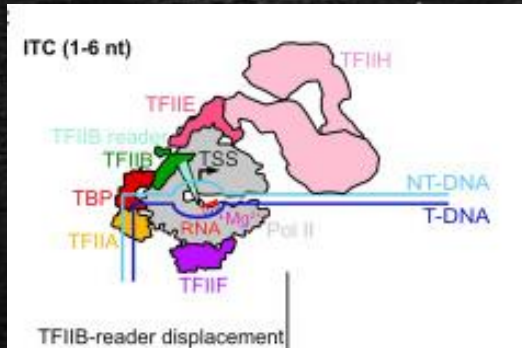
DSFI: elongation factor

RNGTT: the capping enzyme RNGTT

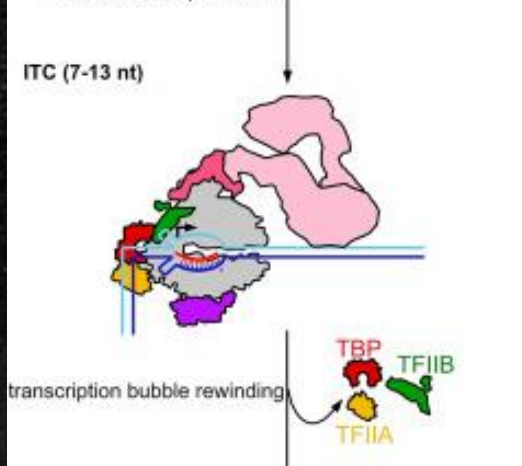
NELF: pausing factor, which binds when RNA reaches lengths of 24–50 nt,

Eliminano il resto dei fattori del PIC per potere procedere con la fase di allungamento

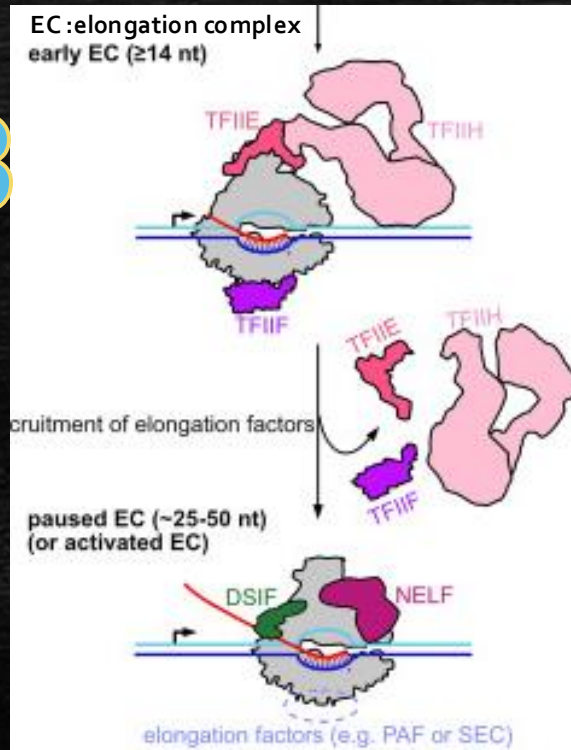
1



2

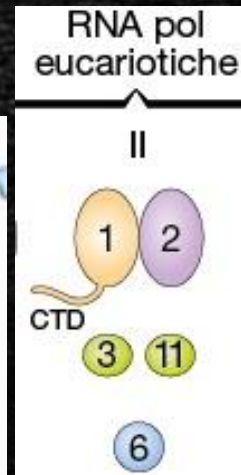
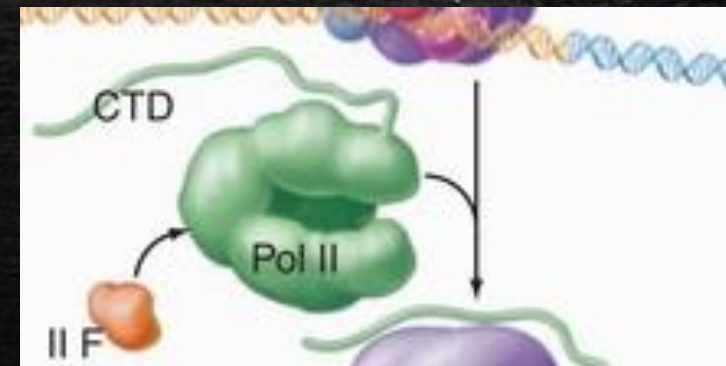


3

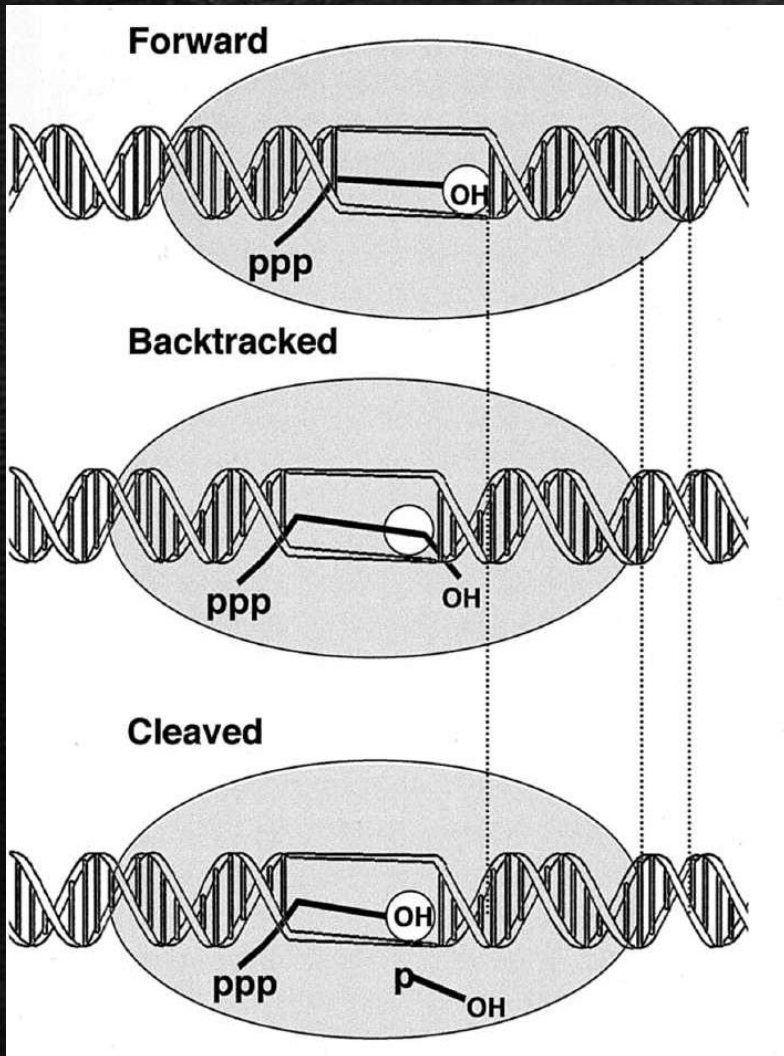


4

Il **CTD fosforilato**, trovandosi vicina al canale d'uscita del RNA, recluta dei fattori necessari per il processamento dell'RNA



RNA polimerase II: Fase Allungamento



- Durante l'allungamento, analogamente a alla RNA Pol batterica, **ci sono delle pause** e dei **fattori di allungamento** che permettono il proseguimento della RNA pol.
- Un fattore importante nel evitare le pause è **TFIIS**, che interagendo con la RNA pol elimina l'estremo 3' che è uscito del centro attivo del enzima e permette la creazione di uno nuovo nel centro attivo permettendo l'aggiunta di dNTPs
- **TFIIS** stimola **l'attività di correzione e ribonucleasica della RNA pol II**

RNA polimerasi I, II o III: Fase Terminazione

Molto meno conosciuta della terminazione in procarioti - I meccanismi di terminazione dipendono dalla RNA Polimerasi in analisi

1. RNA Polimerasi I:

Una proteina di terminazione, **TTF-1** (Transcription Termination Factor for RNA Polymerase I), **si lega al DNA in sequenze specifiche** (11 bp in umano; 18 bp in topo) **bloccando** la trascrizione e **rilasciando** la RNA pol, il RNA e il DNA.

2. RNA Polimerasi III:

Ha delle **similitudini con la terminazione intrinseca** dei batteri perché richiede delle regioni di **poli-U**, **non richiede strutture secondarie** nell'mRNA, ma un intorno ricco in **GC**

3. RNA Polimerasi II:

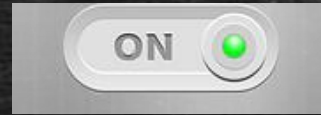
non ha sequenze terminatori, la **terminazione è strettamente correlata ai processi di maturazione dell'mRNA** e può avvenire **0.5-2 Kb a valle del sito di poliadenilazione** RNA. Avviene un taglio in un sito considerato la fine del gene, anche se la trascrizione può continuare per migliaia di pb. Il resto del trascritto sarà digerito per una esonucleasi che aiuterà anche allo stacco della RNA pol II.

RNA polimerasi II: Regolazione della trascrizione

Esistono dei **fattori di regolazione** che possono controllare la trascrizione in modo **POSITIVO** o **NEGATIVO**

FATTORI DI REGOLAZIONE

ATTIVATORI



REPRESSORI



- Si possono **legare alle regioni distali** (principale sito di regolazione) e **a volte alle prossimali**.
- Gli Enhancers si possono trovare a migliaia di basi dal promotore (upstream, downstream, or within introns, and they continue to work whether in the normal orientation or turned backward in the genome)
- Non **interagiscono** direttamente con la RNA pol, ma con il **mediatore o altri fattori basali**.
- La regolazione è conseguenza del legame di tutti i fattori che interagiscono con il DNA sulla regione regolatrice

Transcription factors

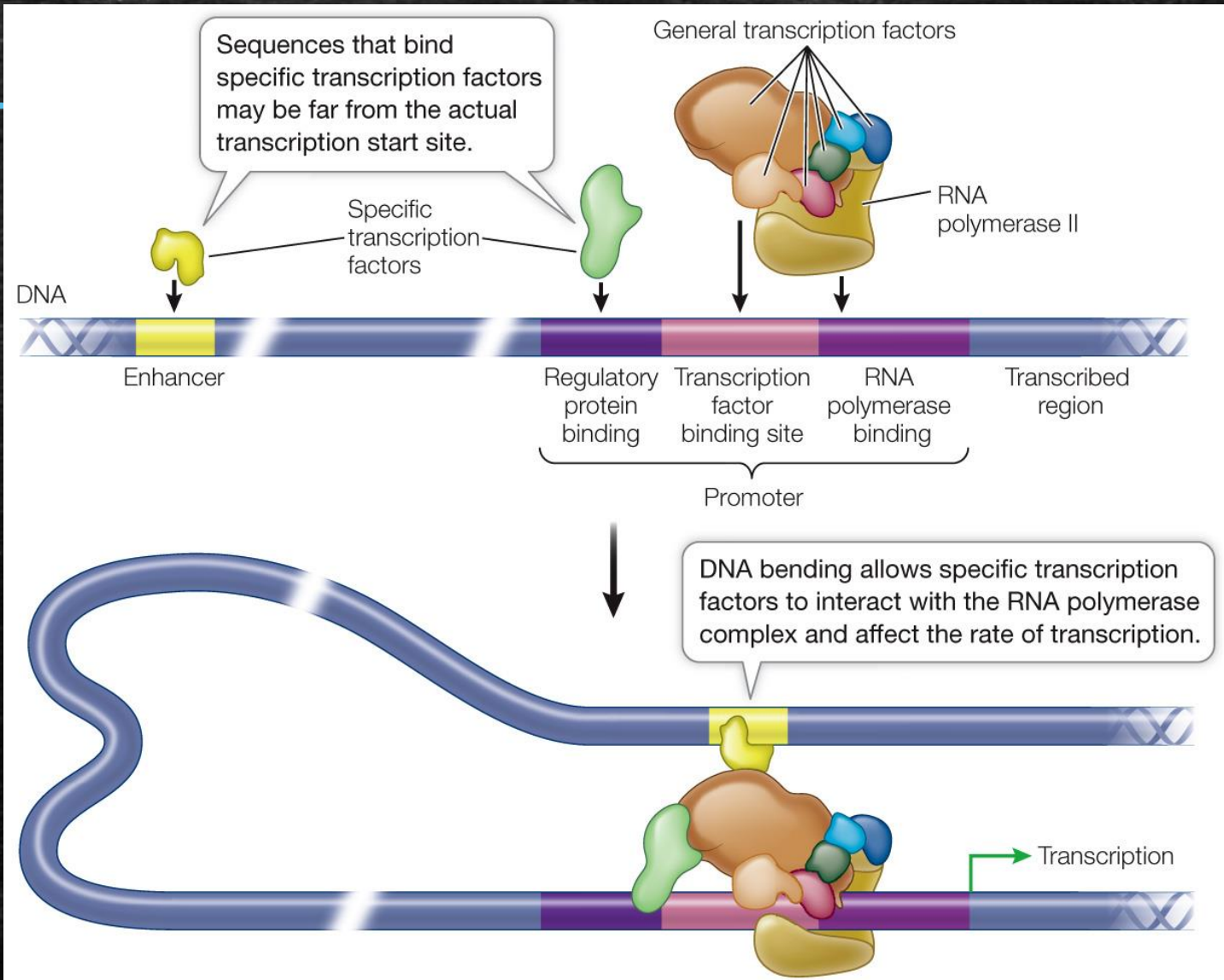
- The **mode of action of TFs** is to recognize and bind to a segment of DNA in the promoter and/or enhancer region.
- A typical TF has **multiple functional domains**, not only **for recognizing and binding** to the appropriate DNA strand, but also **for interactions with other TFs**, with proteins called **coactivators**, with **RNA polymerase II**, with **chromatin remodeling complexes**, and with **small noncoding RNAs**.
- Many TFs are known to facilitate transcription at hundreds of different promoters, while some are only active at a select few.
- A typical enhancer can be up to 500 base pairs in length and contain multiple binding sites for at least two or three different TFs. Two TFs bound at sites near one another on the DNA strand can combine to form a dimer and bend the DNA in what is believed to be part of the activation process. Chromatin structure allows activators to associate with one another, even when they are bound to DNA sequences many hundreds of base pairs apart. Some TFs are believed to act as tethering elements between distant enhancers and promoters by forming connections with other proteins.
- **yeast genome encodes around 300 TFs**, or one per every 20 genes, while humans express approximately **3,000 TFs**, or one per every 10 genes

SITI DI LEGAME dei fattori di Regolazione



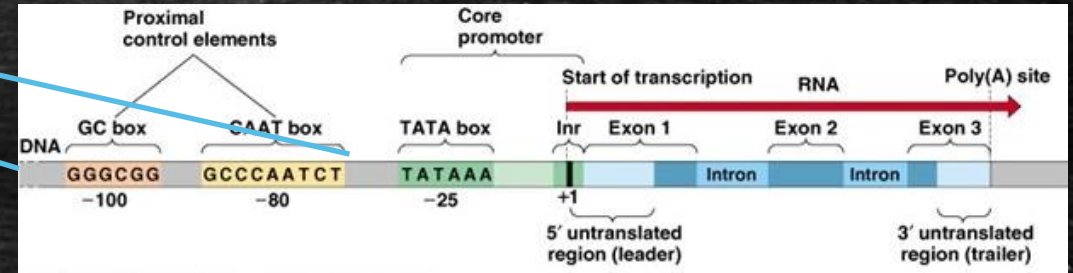
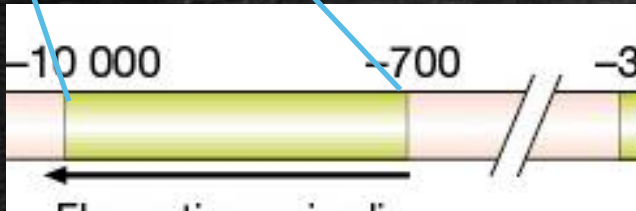
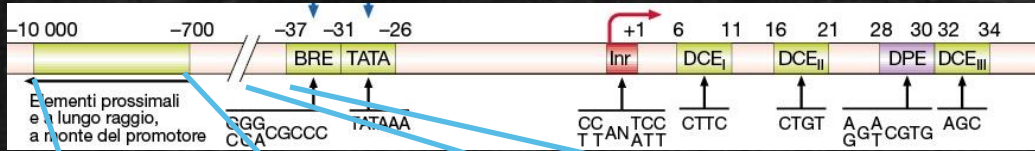
Si legano fattori normalmente attivatori che formeranno un complesso chiamato ENHANCEOSOMA

Formato di sequenze a blocchi (box) ai quali si legano fattori di trascrizione (a volte anche attivatori)



LIFE: THE SCIENCE OF BIOLOGY 11e, Figure 16.9
 © 2017 Sinauer Associates, Inc.

SITI DI LEGAME dei fattori di Regolazione



Regioni Distali

a. Attivatori

recruit a complex array of transcription factors and chromatin-modifying activities that facilitate gene transcription

b. Repressori

bind proteins and/or modify chromatin structure to inhibit gene transcription

c. Isolatori

provide additional regulation by preventing the spread of heterochromatin and restricting transcriptional enhancers from activating unrelated promoters

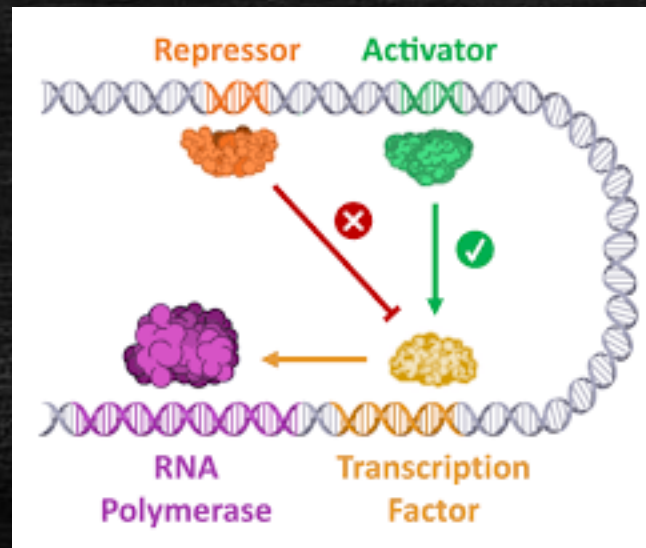
Regioni Prossimali

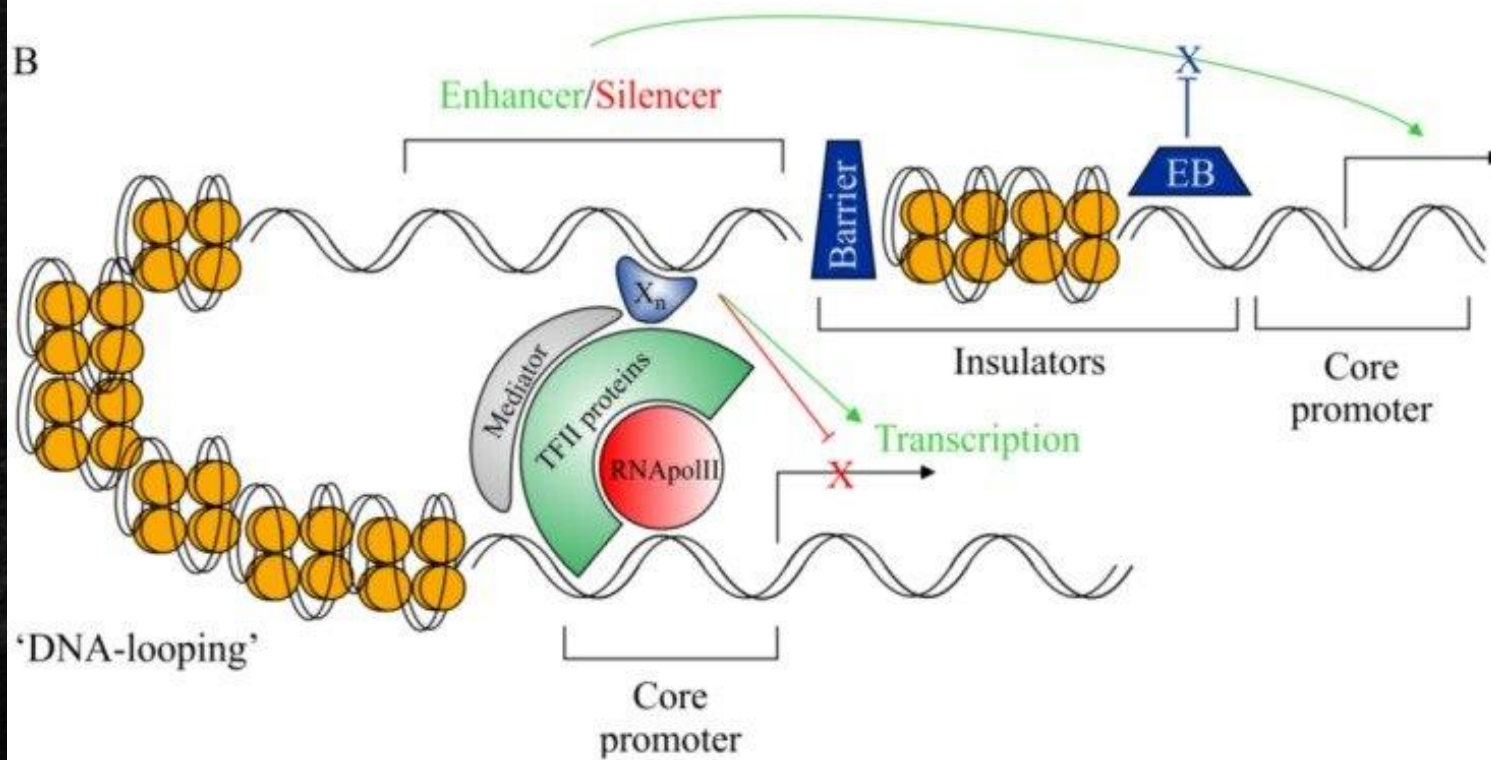
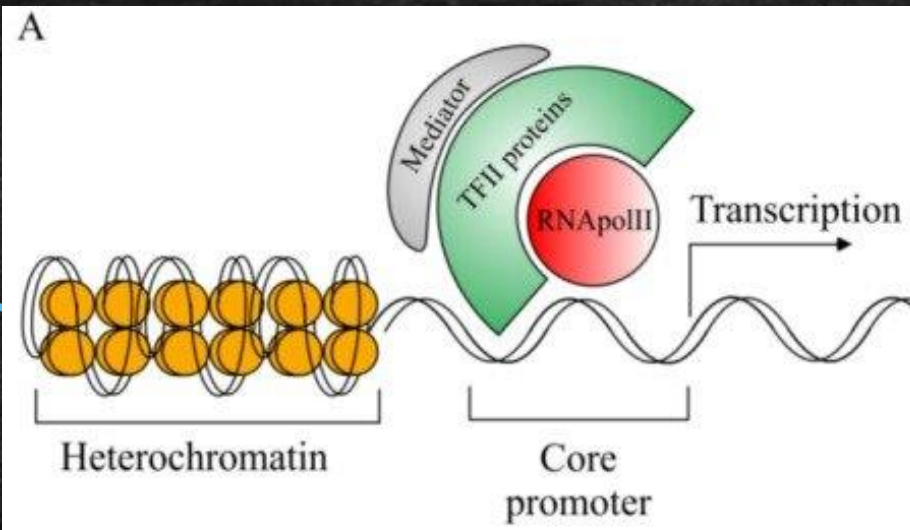
a. CAAT Box

b. GC Box

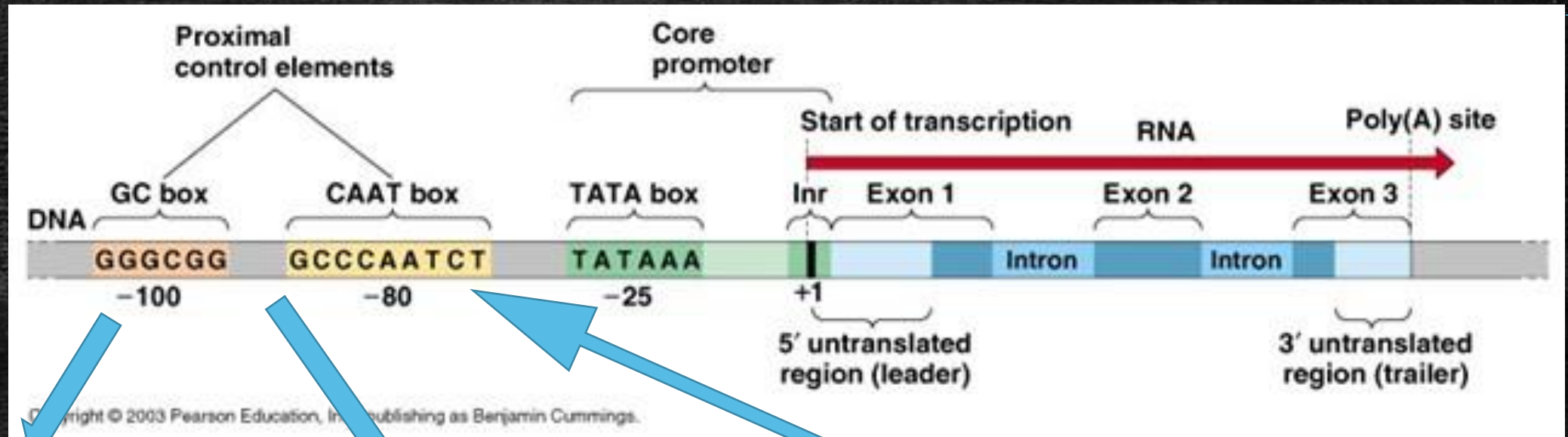
c. Metal response elements (MRE)

▪ others..





FATTORI DI REGOLAZIONE: SITI PROSSIMALI NEL PROMOTORE



Coinvolto nella espressione di geni necessari per la vitalità cellulare e dai quali si necessita una espressione basale costitutiva (Housekeeping genes)

Altri elementi prossimali sono quelli coinvolti nella risposta a vari tipi di stress ed esposizione metalli pesanti (Elementi MRE, BLE, GRE, Oct)

- Si lega il fattore CBT (CAAT binding factor)
- Funziona in entrambi orientamenti, influenzando l'efficienza del promotore che si trova a destra o sinistra

Siti prossimali

Consensus sequences of several transcriptional regulatory elements

BRE^u = transcription factor IIB upstream response element, found just before the TATA box in eukaryotes

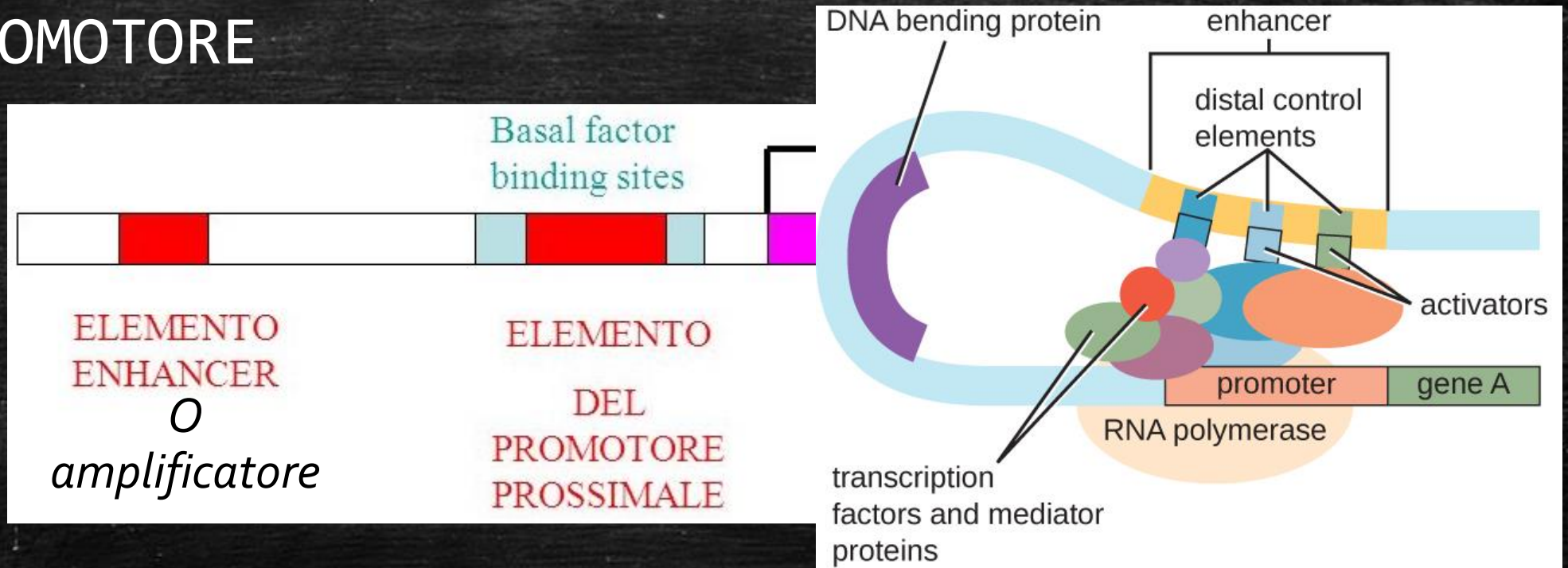
BRE^d = transcription factor IIB downstream response element, found just after the TATA box in eukaryotes

DPE = downstream promoter element, found after transcriptional start site

INR = initiator element, encompasses transcriptional start site

Element	Consensus sequence	Binds protein
TATA box	TATA(A/T)A(A/T)(A/G)	TATA-binding protein (TBP)
GC box	GGGCGG	SP ₁ transactivator Sp ₁
CAAT box	GG(T/C)CAATCT	CAAT enhancer binding protein (C/EBP)
BRE ^u	(G/C)(G/C)(G/A)CGCC	Transcription factor IIB (TFIIB)
BRE ^d	(G/A)T(G/A/C)(G/T)(G/T)(G/T)(G/T)	Transcription factor IIB (TFIIB)
DPE	(A/G)G(A/T)CGTG	Transcription factor IID (TFIID)
INR	(C/T)(C/T)AN(T/A)(C/T)(C/T)	Transcription factor IID (TFIID)

FATTORI DI REGOLAZIONE: SITI DISTALI NEL PROMOTORE



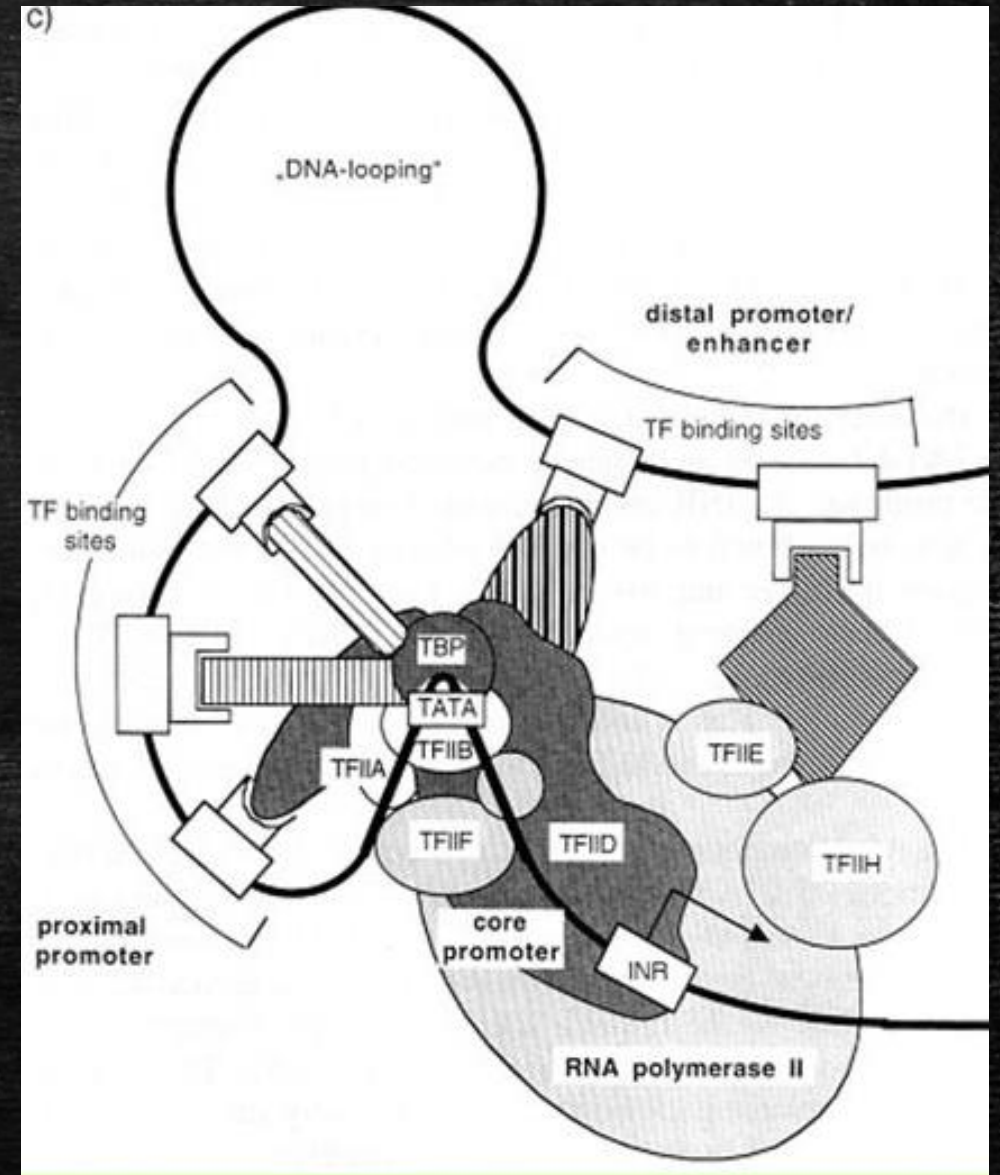
- L'elemento **Enhancer** è formato da numerose sequenze di riconoscimento per diversi fattori di regolazione (attivatori o repressori).
- L'insieme di fattori che si legano al Enhancer formano **enhanceosoma (enhanceosome)**
- L'enhanceosoma entra in contatto con le regioni prossimali del promotore mediante la formazione di un'ansa sul DNA

FATTORI DI REGOLAZIONE: SITI DISTALI NEL PROMOTORE , ENHANCER

- L'enhanceosoma entra in contatto con le regioni prossimali del promotore mediante la formazione di un'ansa sul DNA che lega l'attivatori legati al enhancer con il «mediatore» che a sua volta promuove il legame della RNA pol

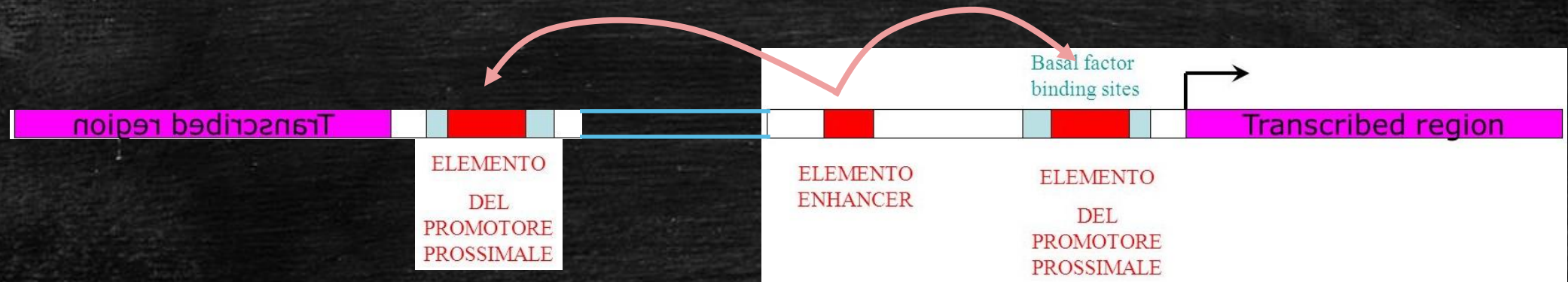


La formazione delle anse spiega come un elemento lontano in sequenza possano essere elementi *in cis*



FATTORI DI REGOLAZIONE: Attivatori

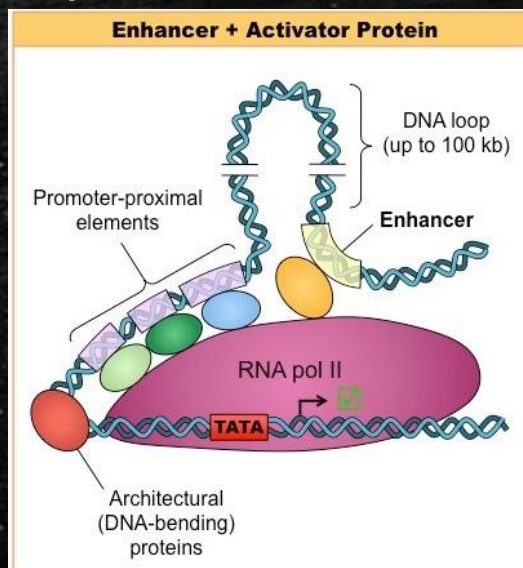
1. Gli attivatori possono **funzionare in entrambi gli orientamenti** rispetto alla direzione della trascrizione
2. **Possono trovarsi sia a monte che a valle** dei geni che controllano.
3. Le sequenze enhancer legano fattori di trascrizione che generalmente hanno funzione attivatrice della trascrizione



La specificità della trascrizione dipende dal promotore e dell'attivatore. Questo ultimo può agire permettendo o aumentando la trascrizione dal promotore

Azione degli **ATTIVATORI**

1. Stimolano il **reclutamento dei fattori** basali della trascrizione di Pol II per formare il complesso pre-inizio
2. Inducono **modificazioni** (steriche o chimiche) dei fattori di trascrizione che andranno a regolare il processo
3. **Interagiscono funzionalmente con il promotore** del gene che deve essere trascritto, in modo di indurre il **rimodellamento della cromatina** che renderà accessibile il promotore permettendo la formazione del complesso di pre-inizio.



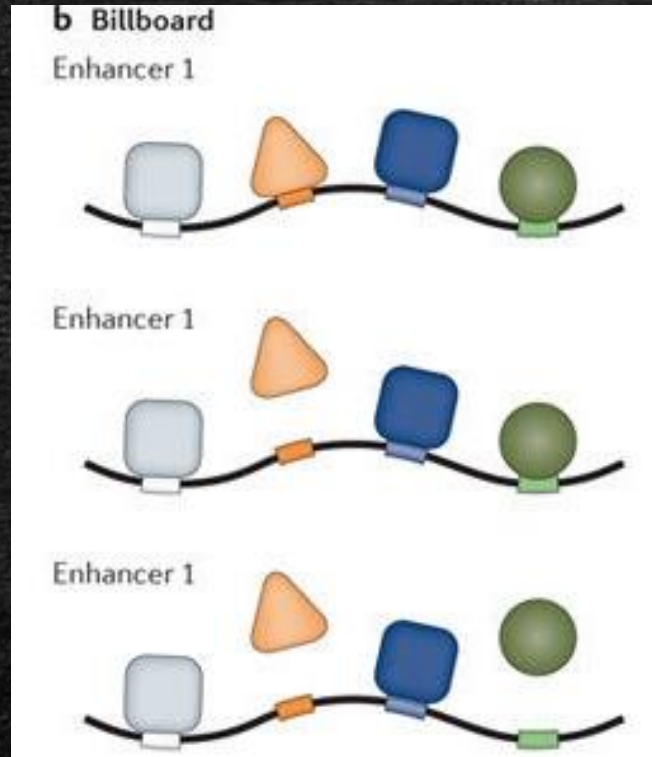
Questo avviene tramite l'interazione dell'attivatore legato al sito di legame e dell'attivatore con altre proteine del mediatore, RNA pol e altri fattori

[**proteina-proteina**]

FATTORI DI REGOLAZIONE:

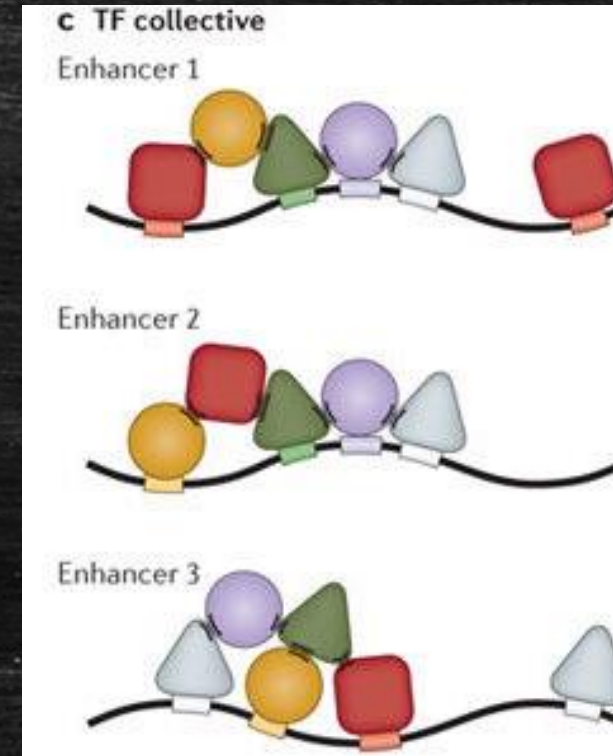
Modelli sul controllo dell'attività degli ENHANCER

Tabelloni flessibili



I vari attivatori e co-attivatori **si legano in modo indipendente** e il loro effetto combinato è «letto» dal mediatore e dall'apparato basale di trascrizione

Teoria della collettività



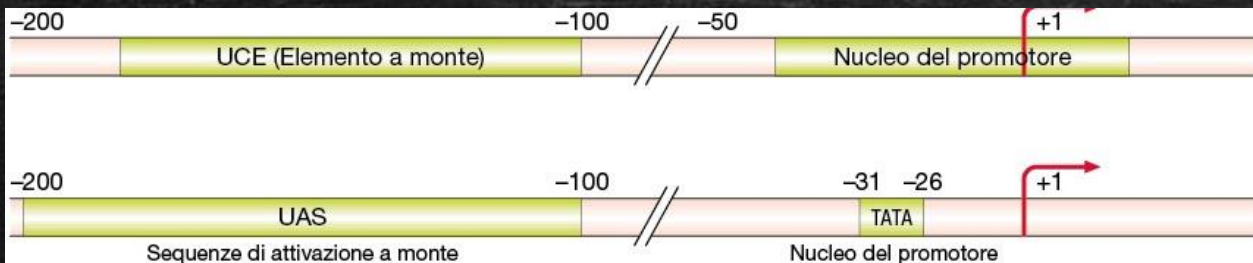
I fattori di trascrizione **si legano in modo Cooperativo, Coordinato e Specifico** per formare l'enhanceosoma: Alterazioni in un solo componente induce un'alterazione globale del enhanceosoma.

FATTORI DI REGOLAZIONE-SITI LEGAME DNA

- La **presenza e distribuzione delle sequenze** di legame dei regolatori trascrizionali suggerisce la **natura combinatoria della regolazione della trascrizione negli eucarioti**
- La trascrizione è il risultato **del legame altamente specifico sul DNA dei regolatori in *trans***

STRUTTURA FATTORI DI TRASCRIZIONE

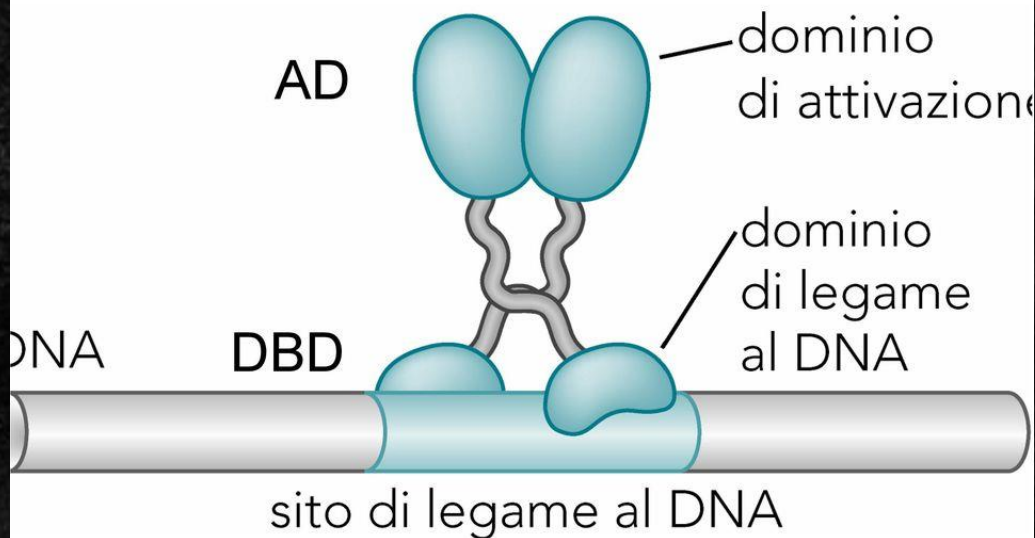
ATTIVATORI



2 domini _____ Sito di ATTIVAZIONE (*Activation Domain*, AD)
Sito di LEGAME DNA (*DNA Binding Domain*, DBD)



Struttura Gal4



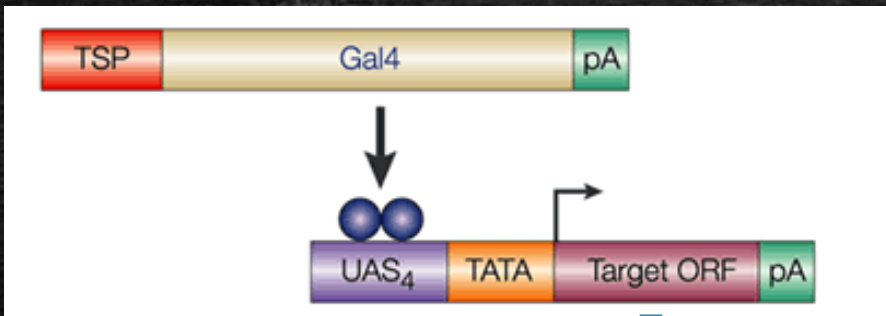
«Upstream activating sequence»

STRUTTURA FATTORI DI TRASCRIZIONE

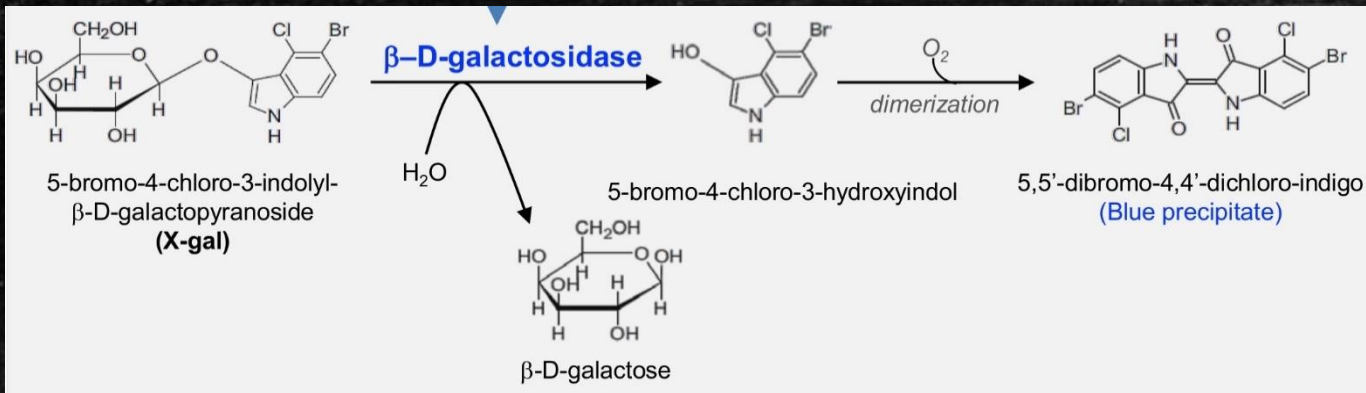
Gal4: attivatore dei geni per l'utilizzo del galattosio in lievito legandosi al promotore di *GAL1* (*b galattosidasi lievito*)

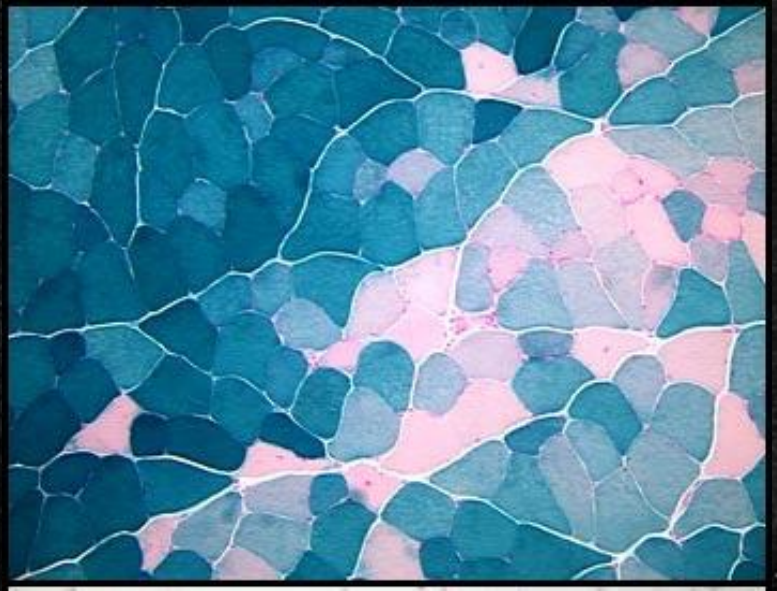
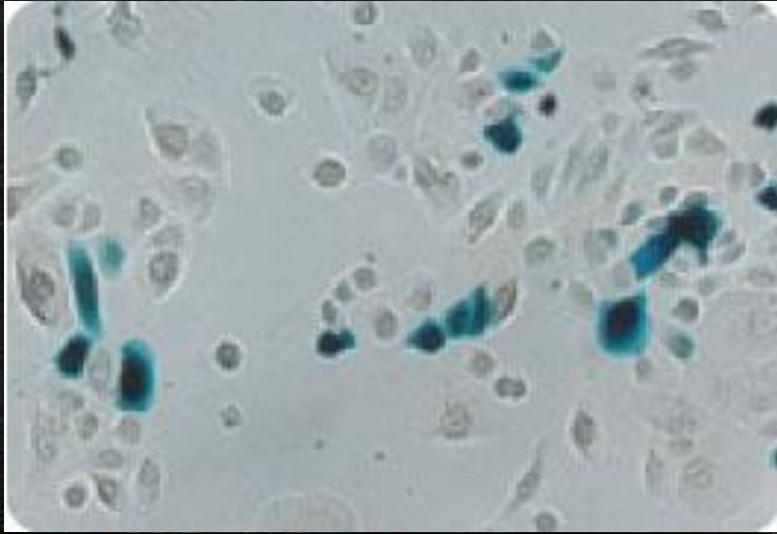
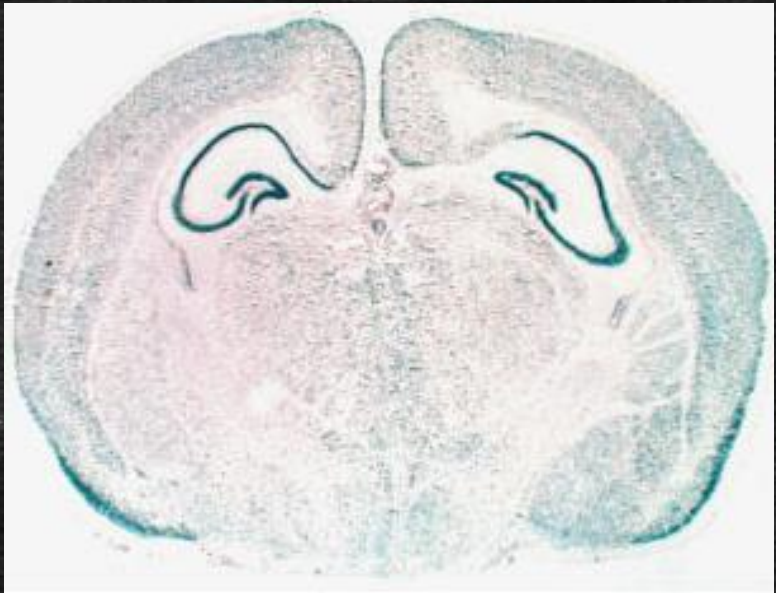
ATTIVATORI

Esperimenti in vitro per studiare i domini attivatori

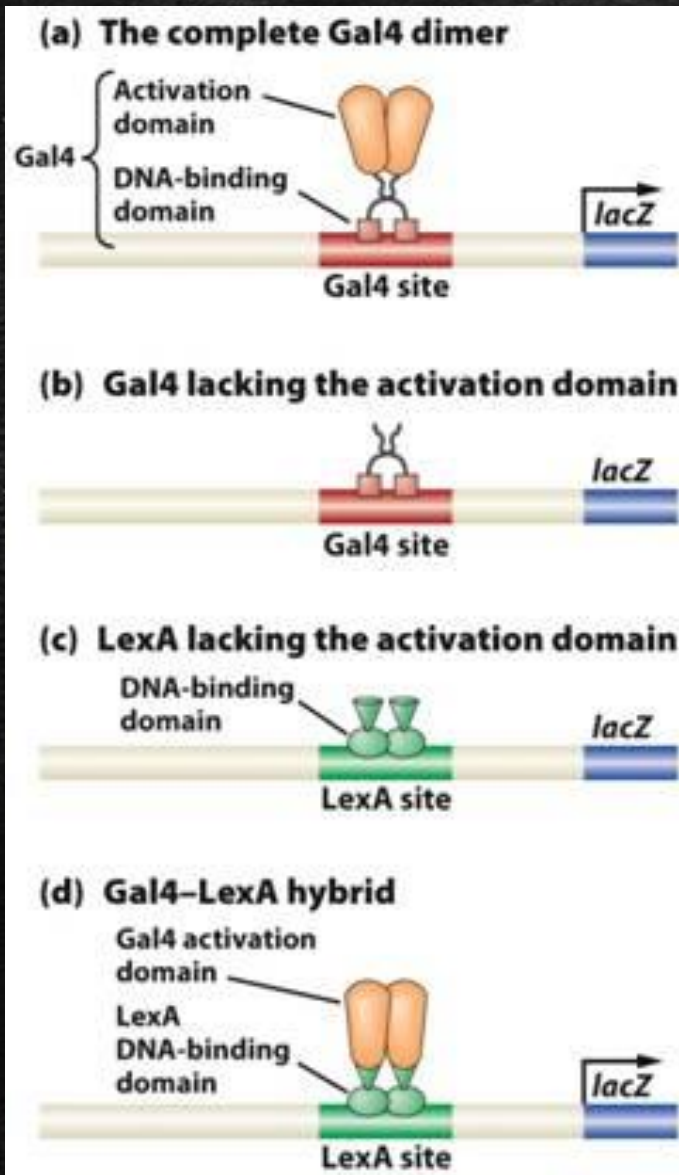


β galattosidase





Studi sullo scambio dei domini del attivatore



+X-Gal



Senza Dominio di attivazione trascrizionale



Senza Dominio di attivazione trascrizionale

+

è stata scambiata la sequenza di riconoscimento di Gal 4 con quella di LexA (repressore batterico geni SOS)



è stata scambiata solo la sequenza di riconoscimento di Gal 4 con quella di LexA (repressore batterico geni SOS), la regione di attivazione è quella di Gal4 wild type

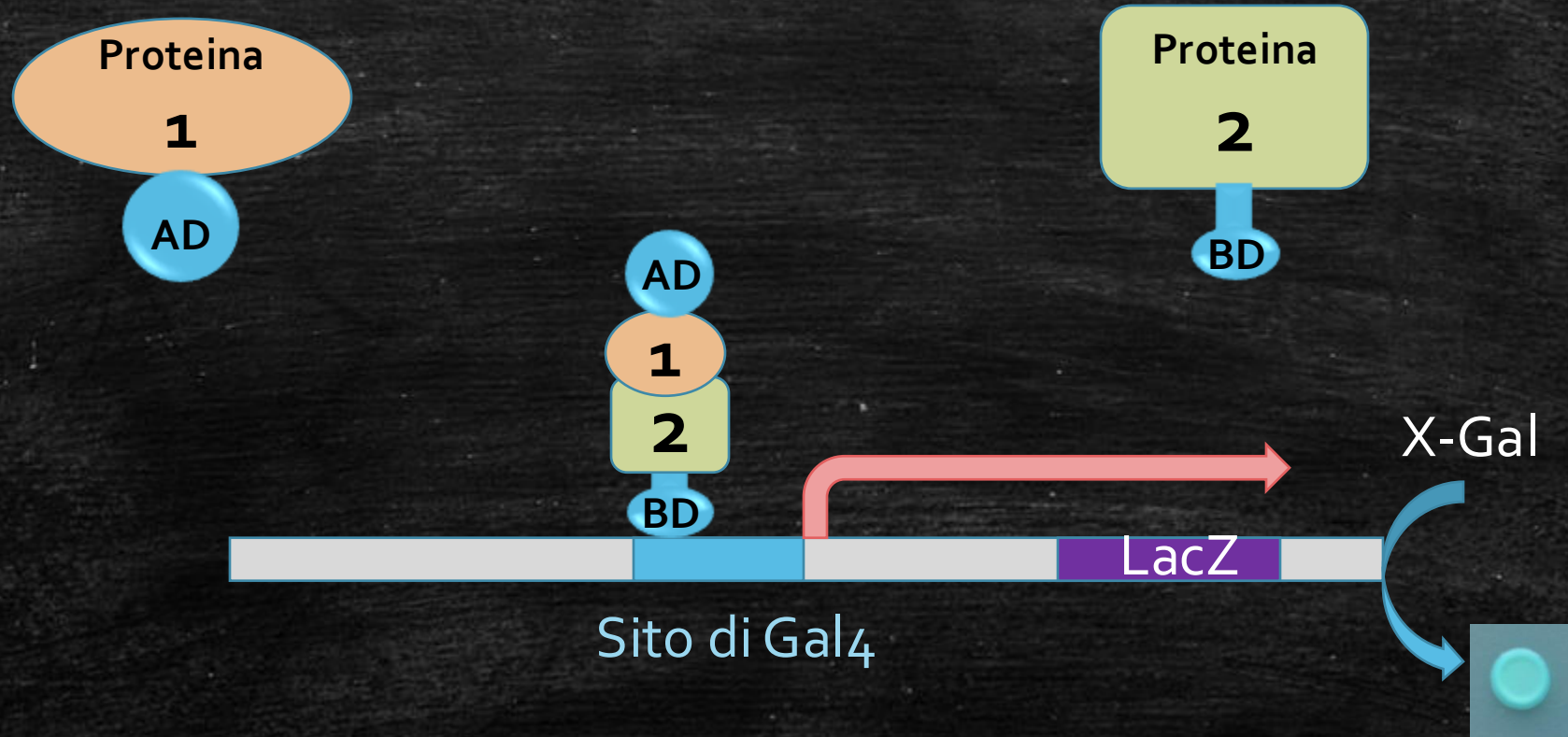
- Gli attivatori della trascrizione sono composti da 2 domini separati, funzionalmente indipendenti
- Sono proteine modulari i cui domini, con funzioni diverse, si assemblano formando una molecola funzionale.



SAGGIO DEL DOPPIO IBRIDO

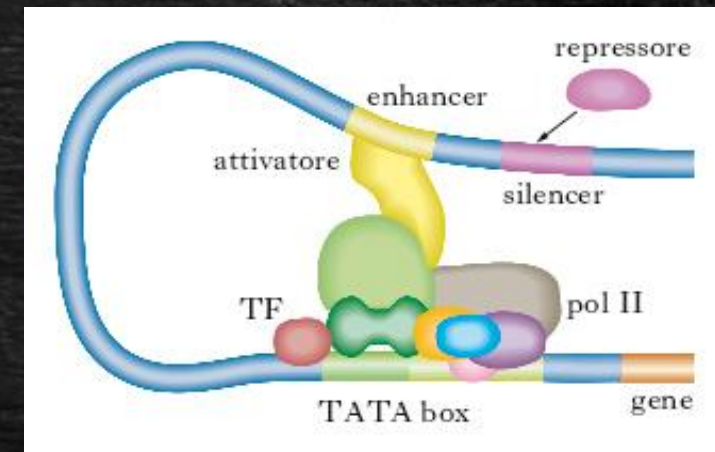
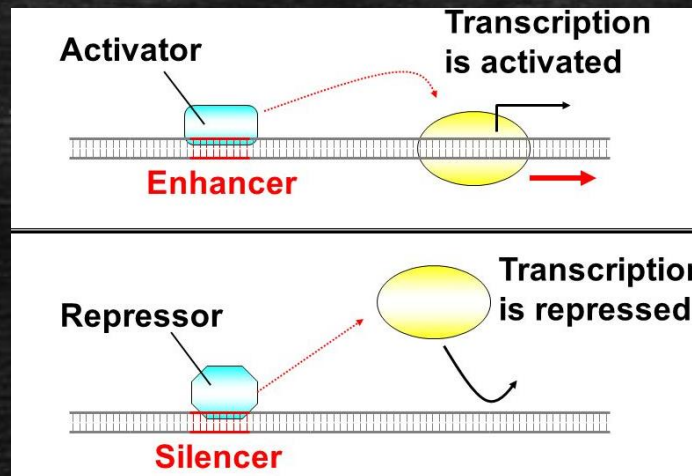
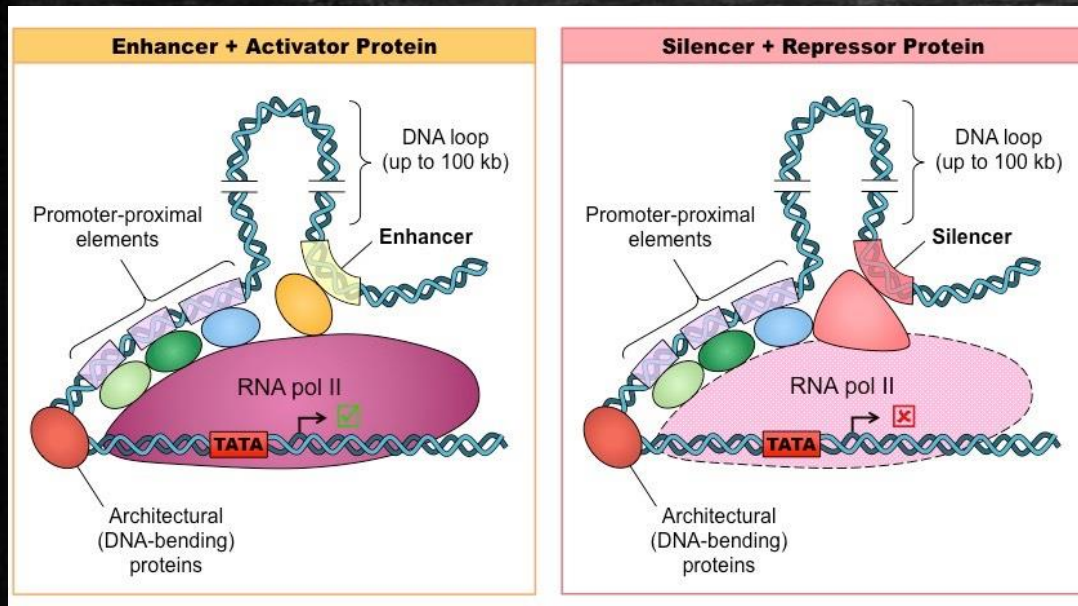
SAGGIO DOPPIO IBRIDO

Permette identificare interazioni tra proteine e dimostra ancora la presenza di 2 domini funzionalmente indipendenti negli attivatori



FATTORI DI REGOLAZIONE: **Repressori**

- I repressori si legano su regioni distali chiamate *silencer*
- Possono trovarsi *a valle o a monte* dei geni che controllano
- Inibiscono la trascrizione



- I repressori possono agire:
 - ✓ Mascherando la regione di attivazione degli attivatori
 - ✓ Competendo con il legame sul mediatore

FATTORI DI REGOLAZIONE: ISOLATORI

Sono delle sequenze posizionate in modo di **controllare l'azione degli enhancer contigui, isolando la loro azione** in una delle due direzioni, ed evitare la sua azione su 2 promotori diversi.

Legano dei repressori

FUNZIONI

- **Impediscono la azione di attivazione** da parte di un enhancer
- Sono dei **marcatori di confine** tra una zona di eucromatina ed eterocromatina

