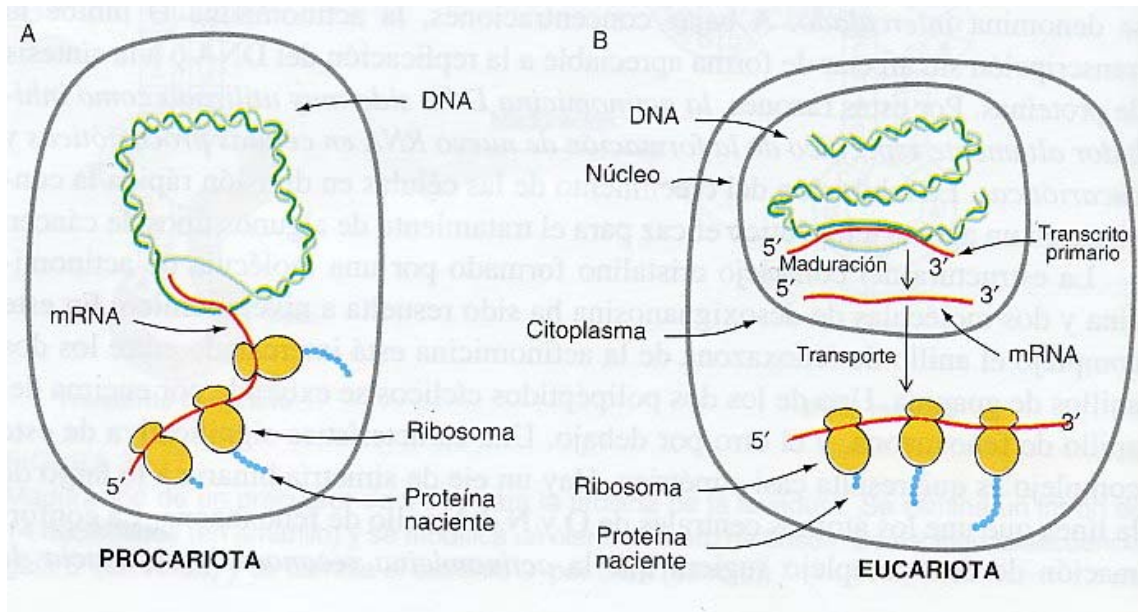
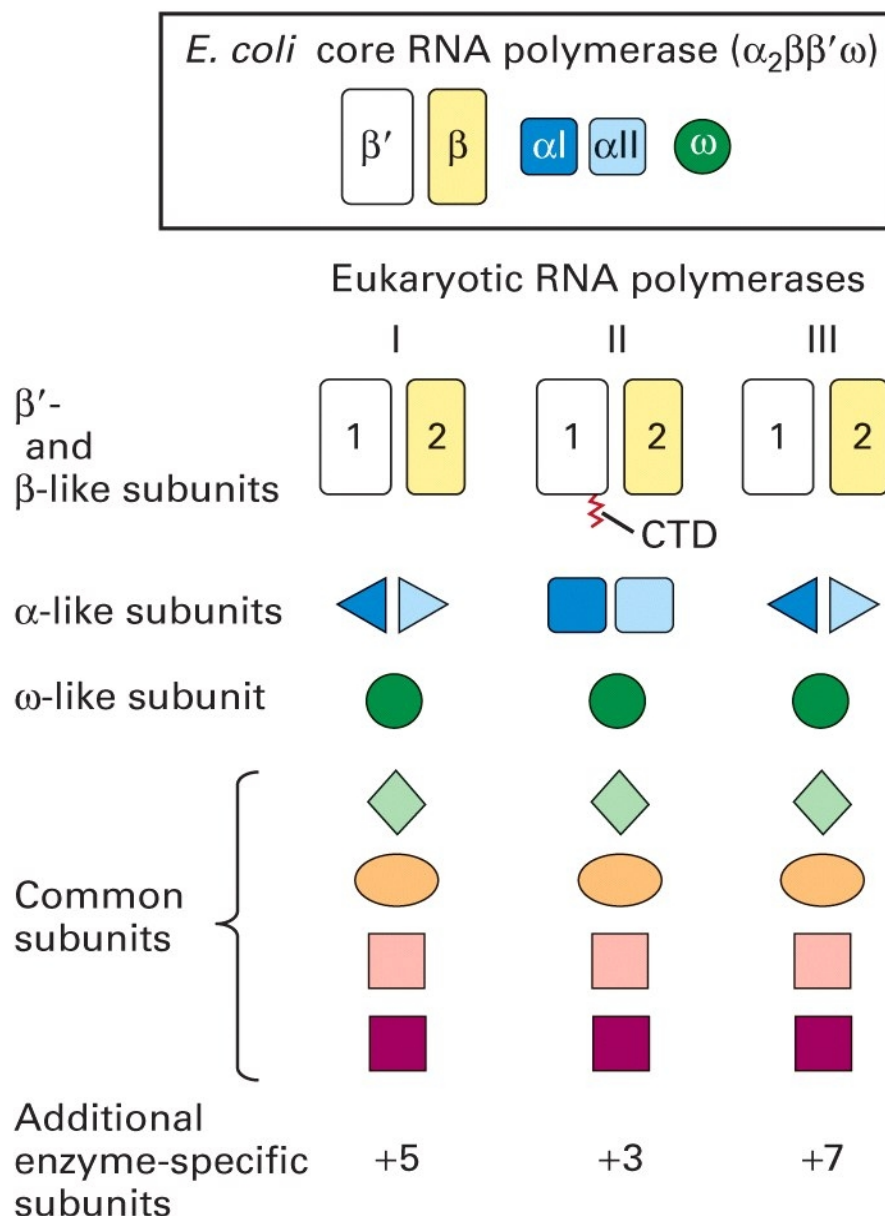


La transcripción en eucariotas



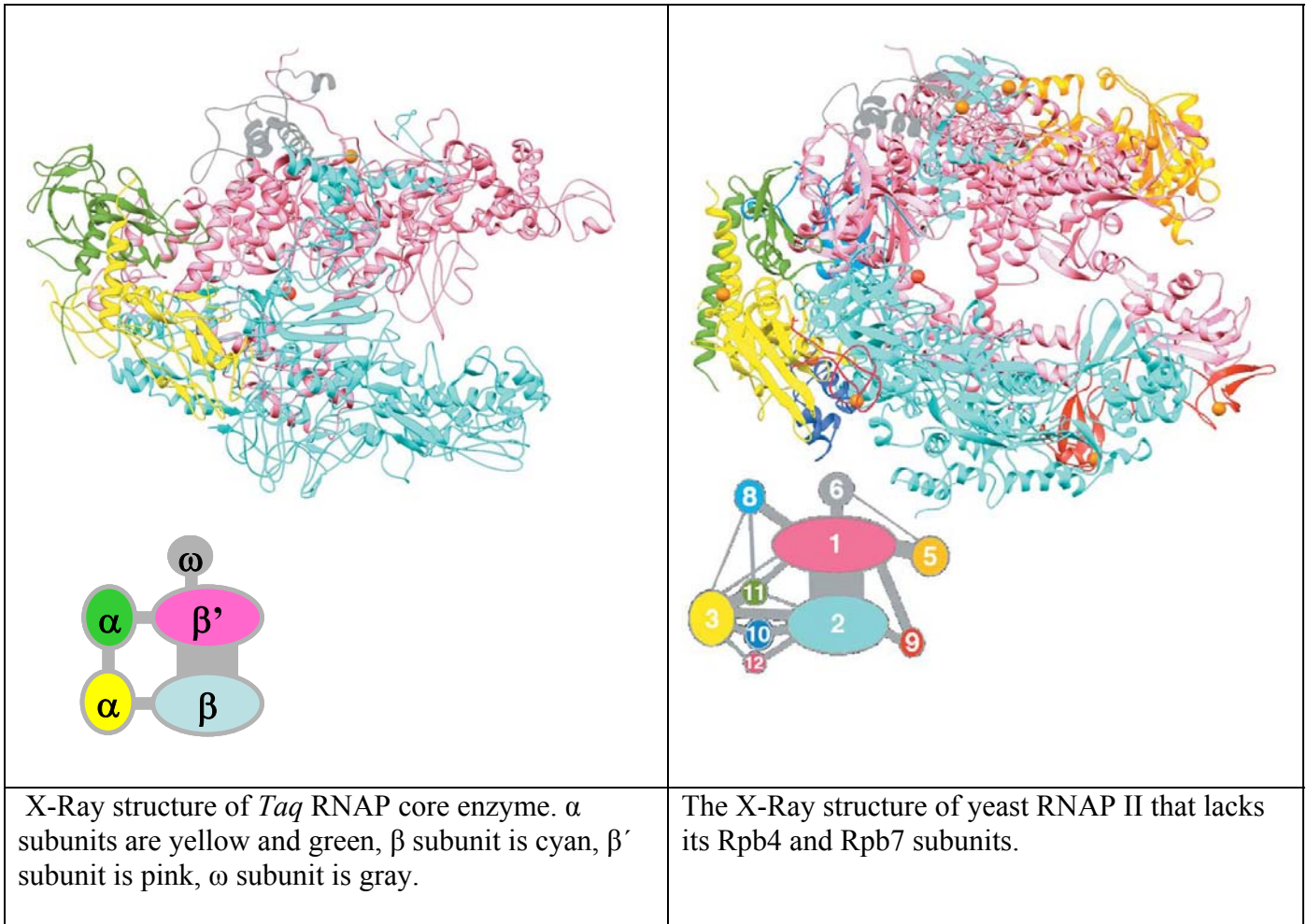
RNA polimerasas de los eucariotas

Tipo	Localización	Transcritos	Efecto de la α -amanitina
I	Nucleolo	rRNA de 18 S, 5.8 S y 28 S	Insensible
II	Nucleoplasma	Precursores del mRNA y snRNA	Fuertemente inhibida
III	Nucleoplasma	tRNA y rRNA de 5 S	Inhibida a altas concentraciones



Las tres polimerasas de las levaduras poseen cuatro subunidades centrales que presentan alguna homología con las subunidades β , β' y α de la RNA polimerasa de *E. coli*. La subunidad más grande 1 (β') de la RNA polimerasa II también contiene un dominio C-terminal (CTD) esencial. Las RNA polimerasas I y III poseen las mismas dos subunidades α -símiles no idénticas, mientras que la polimerasa II tiene dos copias de una subunidad α -símil diferente. Las tres polimerasas comparten otras 5 subunidades comunes. Además cada polimerasa de levadura contiene cuatro a siete subunidades singulares más pequeñas.

Structural similarity between prokaryotic and eukaryotic RNAPs



<i>S. cerevisiae</i> RNAP I (14 subunits)	<i>S. cerevisiae</i> RNAP II (12 subunits)	<i>S. cerevisiae</i> RNAP III (15 subunits)	<i>E. coli</i> RNAP Core (5 subunits)	Class ^b
Rpa1 (A190)	Rbp1 (B220)	Rpc1 (C160)	β	Core
Rpa2 (A135)	Rbp2 (B150)	Rpc2 (C128)	β'	Core
Rpc5 (AC40)	Rpb3 (B44.5)	Rpc5 (AC40)	α	Core
Rpc9 (AC19)	Rpb11 (B13.6)	Rpc9 (AC19)	α	Core
Rbp6 (ABC23)	Rbp6 (ABC23)	Rpb6 (ABC23)	ω	Core/common
Rpb5 (ABC27)	Rpb5 (ABC27)	Rpb5 (ABC27)		Common
Rpb8 (ABC14.4)	Rpb8 (ABC14.4)	Rpb8 (ABC14.4)		Common
Rbp10 (ABC10 β)	Rpb10 (ABC10 β)	Rpb10 (ABC10 β)		Common
Rbp12 (ABC10 α)	Rpb12 (ABC10 α)	Rpb12 (ABC10 α)		Common
Rpa9 (A12.2)	Rpb9 (B12.6)	Rpc12 (C11)		
Rpa8 (A14) ^c	Rpb4 (B32)	—		
Rpa4 (A43) ^c	Rpb7 (B16)	Rpc11 (C25)		
+2 others ^d		+4 others ^d		

^aHomologous subunits occupy the same row. In the alternative subunit names in parentheses, the letter(s) indicates the RNAPs in which the subunit is a component (A, B, and C for RNAPs I, II, and III) and the numbers indicate its approximate molecular mass in kD.

^bCore: sequence partially homologous in all RNAPs; common: shared by all eukaryotic RNAPs.

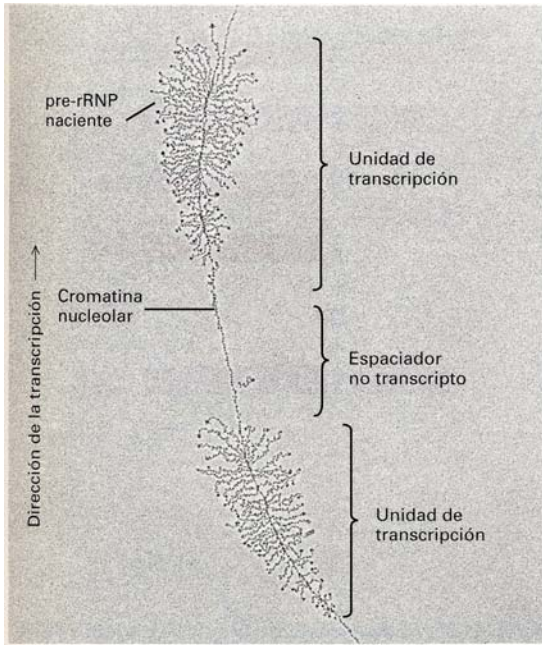
^cPotential homologs of Rbp4 and Rbp7.

^dRpa3 (A49) and Rpa5 (A34.5) in RNAP I and Rpc3 (C74), Rpc4 (C53), Rpc6 (C34), and Rpc8 (C31) in RNAP III.

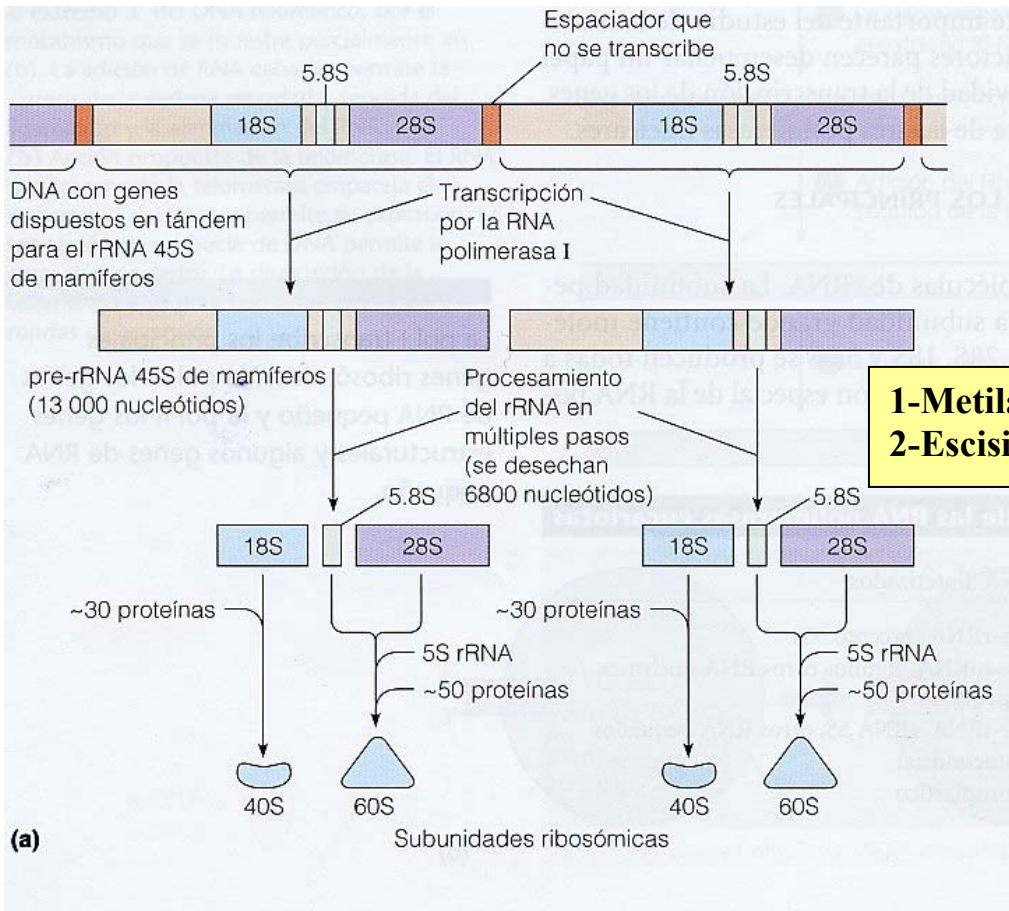
Source: Mainly Cramer, P., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 89 (2002).

RNA POLIMERASA I

La Pol I es un enzima que contiene 13 subunidades y un peso molecular de 600 Kd. Se sabe que necesita al menos de dos factores de transcripción. Transcribe los RNA ribosómicos 28 S 18 S y 5.8 S. EL gen que codifica el precursor de 45 S se encuentra en el nucléolo en multiples copias dispuestas en tándem.

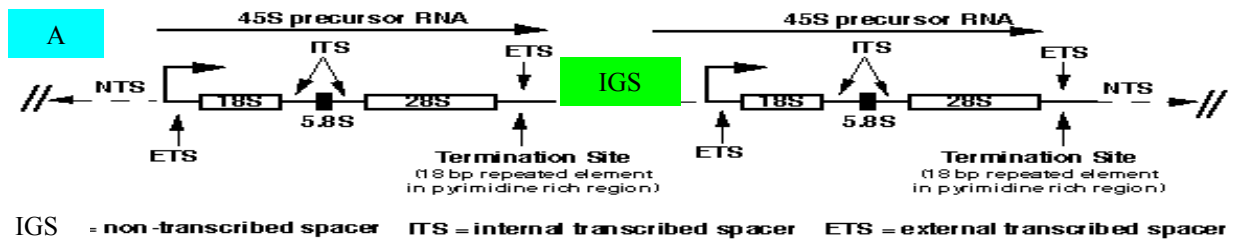


Micrografía electrónica de unidades de transcripción de pre-rRNA del nucléolo de un oocito de batracio. Cada pluma representa una molécula de pre-rRNA asociadas con proteínas en una pre-rRNP que surge de una unidad de transcripción. Las unidades de transcripción de pre-rRNA están dispuestas en tándem, separadas por regiones espaciadoras no transcritas de cromatina nucleolar.



POL I TRANSCRIPTION UNIT AND rRNA REPEAT

11/2/95



B Components in the IGS

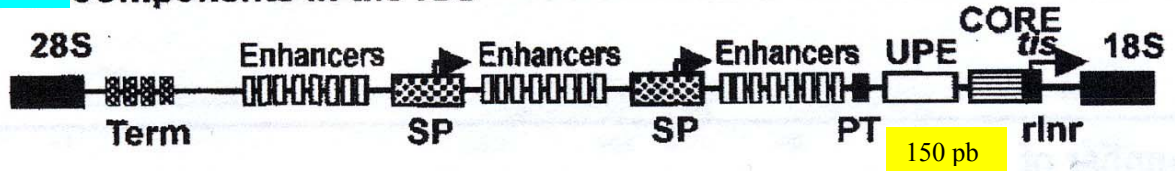
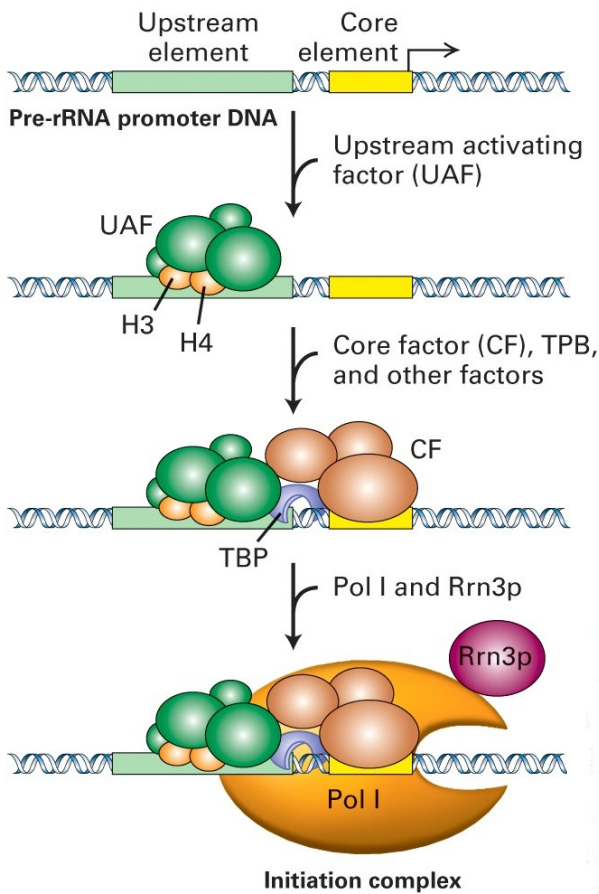


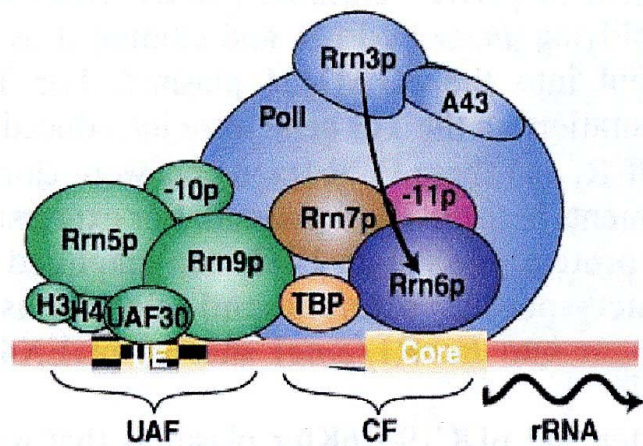
Figure 1. Generic organisation of pol I transcription units. (A) The rRNA coding units are separated by intergenic spacers (IGS). (B) The IGS contains a series of terminators (term), enhancers, a spacer promoter (SP), a proximal terminator (PT), the upstream promoter element (UPE) and the promoter core, which includes the rInr. The sites of transcription initiation are indicated by *tis* and/or the bent arrows.

Complejo de iniciación de la RNapolimerasa I (Levaduras)



UAF
Rm5p, Rm9p
10p, Uaf30p
H₃ y H₄

Core factor
Rm6p, Rm7p, 11p
TPB



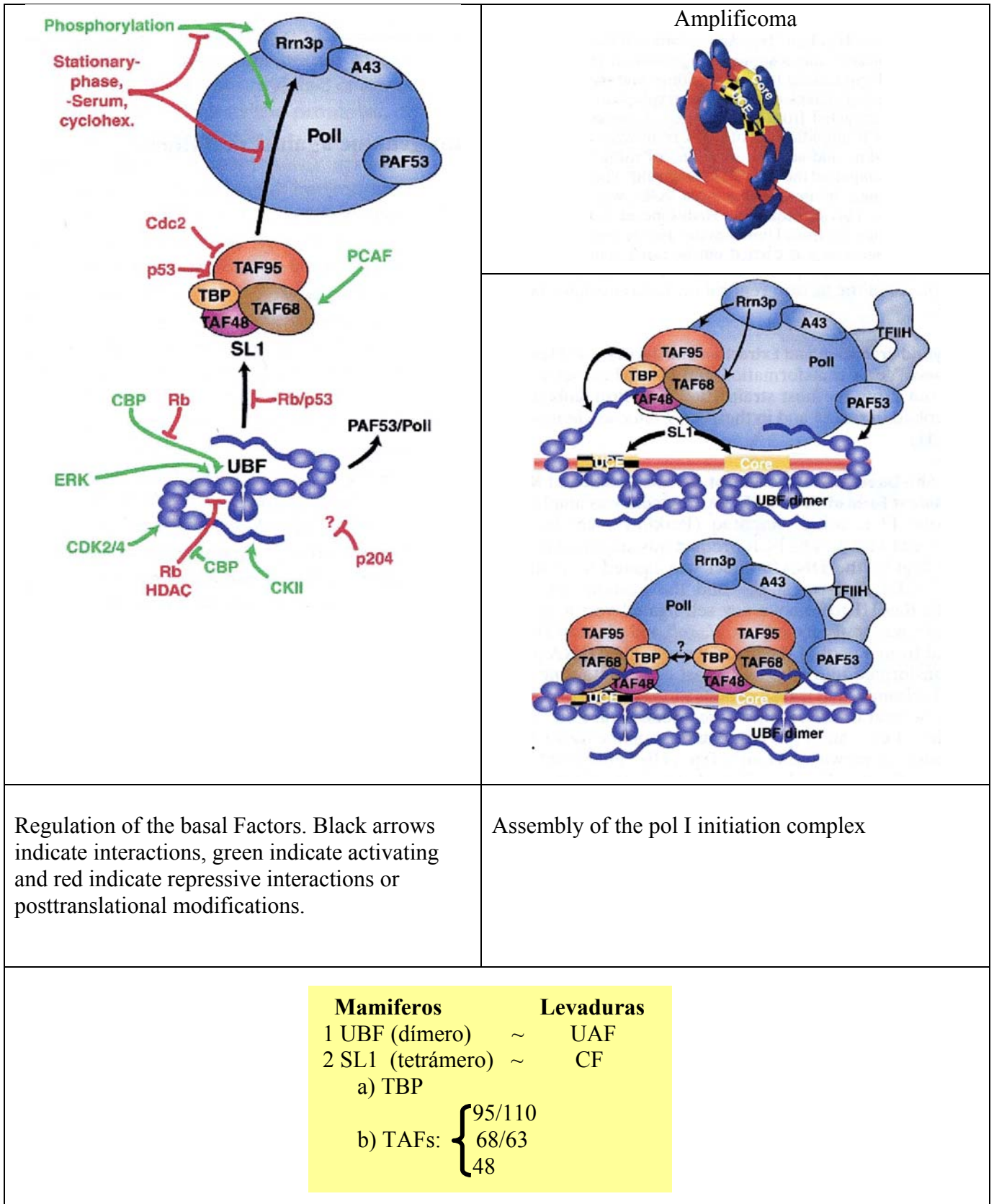
Transcription factors associated with rRNA transcription			
UPE-binding factors	Core-bind. fact.	Enhancer-bind. fact.	Termination fact.
UAF (S.cerevisiae)	CF (yeast)	Reb1p (S.cerevisiae)	Reb1p (S.cerevisiae)
UBF (human, mouse, rat, Xenopus)	SLI (human, rat)	UBF (human, mouse, rat, Xenopus)	TTF-1 (mouse, human)
	Rib1 (Xenopus)	E ₁ BF (rat)	
	TIF-IB (mouse, A.castellani)	EBF (A.castellani)	

- **Promoter Elements** (see Handout)
 - **Bipartite promoter**
 - **Core sequence element** = -45 to +20 in humans (+10 on average in other systems)
 - Absolutely required for Tx
 - **Upstream control element (UCE)** = -156 -107 in humans (~-145 to core in other systems)
 - Affects efficiency of transcription, but not absolutely required for Tx
 - Deletion of UCE drops Tx 10-20 fold
 - Both elements G/C-rich and ~85% similar to each other in humans
 - **Core Factors**
 - UBF1 and SL-1
 - UBF1 binds core promoter and UCE
 - UBF1 improves binding of SL-1 to core promoter
 - SL-1 (Selectivity factor 1) binds core promoter
 - These two factors position polymerase so that it binds and initiates at +1
 - TBP (transcription binding protein) is essential positioning factor and component of SL-1
 - Mutations in yeast TBP identified that do not affect pol I but do affect pol II or pol III Tx
 - Mutations likely alter regions in TBP that interact with polymerase specific TAFs
 - **TBP common to all RNA polymerases and critical positioning factor**
 - SL-1 is an analog of TFIID in Pol II containing TBP and 3 TAFs (transcription binding protein activating factors) specific and unique to pol I
 - UBF1 binds core sequence element----->> then SL-1 (4 proteins, one is TBP) ----->> Pol I binds and transcription
 - UBF1 binding to core and UCE increases affinity and how tightly bound to site
- Polymerase footprinting on promoter
 - Does not footprint on its own
 - Polymerase-dependent footprint shows no sequence dependence
 - Mutations in region of footprint do not alter footprint
 - Polymerase-dependent footprint is extended by UBF footprint and bound SL-1
 - Region bound by polymerase is same as UBF and is extended by UBF/SL-1
- In some cases, an enhancer-like element may be present further upstream in form of repeated sequence
 - In Xenopus, repeats resemble the promoter
 - Take up 50% of NTS
 - 75% similarity to UCE (-114 to -72)
 - Occasional repeats with 90% similarity to full promoter (-147 to +4)
 - In yeast, repeats are different
 - Mechanism of action of enhancer unknown
- UBF1 and RNA pol I from any eukaryote can function on a heterologous DNA template
- SL1 confers species specificity on the initiation reaction

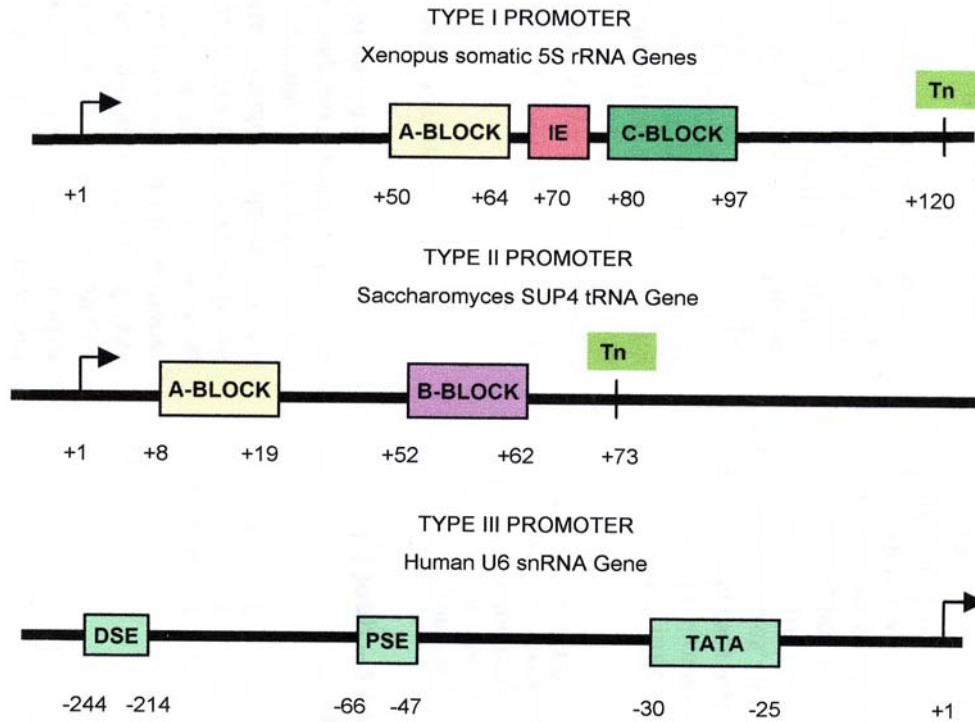
Termination

- *Discrete termination site ~1000 bp 3' of mature rRNA terminus (mature 3' end generated by RNA cleavages)
- *Involves recognition of **18 bp element present in multiple copies (AGGTCGACCA/TT/ANTCCG termed "Sal Box")**
- ***T-rich element located upstream of the terminator** (mouse)
- ***Transcription termination factor (TTF-I)** binds to elements and facilitates termination
- *TTF-I that stops elongating Pol I and **PTRF** (Pol I and transcrip release factor, a 44 KDa protein that interacts with Pol I, TTF-I and the 3' end of pre-rRNA) that dissociates TTF-I-paused transcription complexes.
- *TTF specific for pol I and no effect on pol II or E.coli RNA polymerase

Complejo de iniciación de la RNA polimerasa I Mamíferos



Promotores de la RNA polimerasa III



Organisation of the three general types of promoter used by polIII. The site of transcription initiation is indicated by +1 and the site of termination is indicated by Tn. Also shown are the positions of various promoter elements, including the intermediate element (IE), proximal sequence element (PSE) and distal sequence element (DSE).

TFIIIC subunits in *S. cerevisiae*

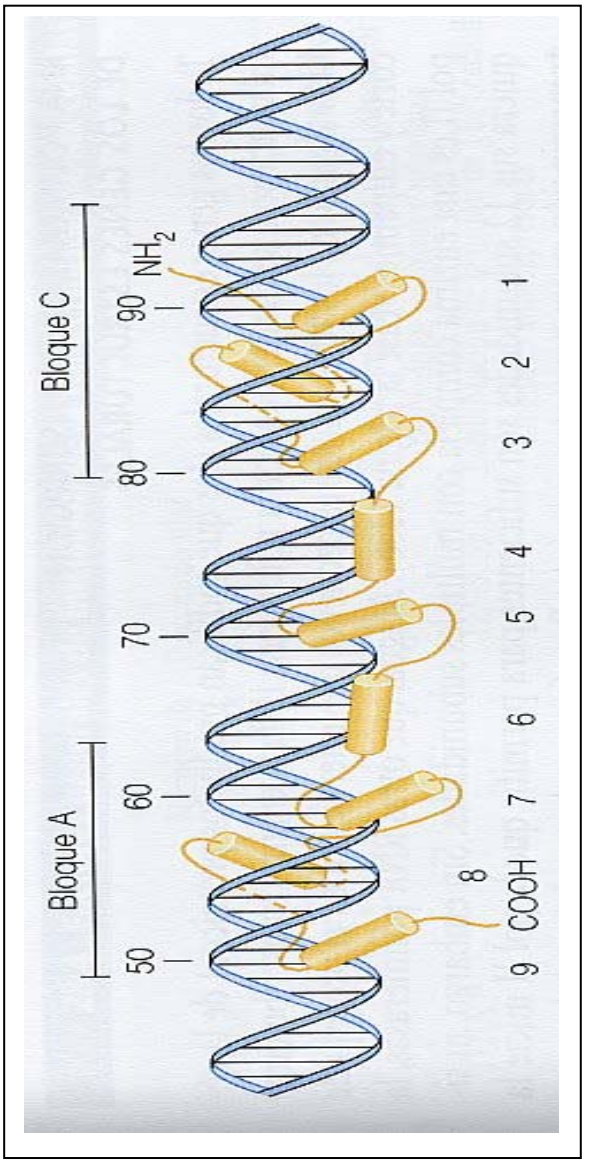
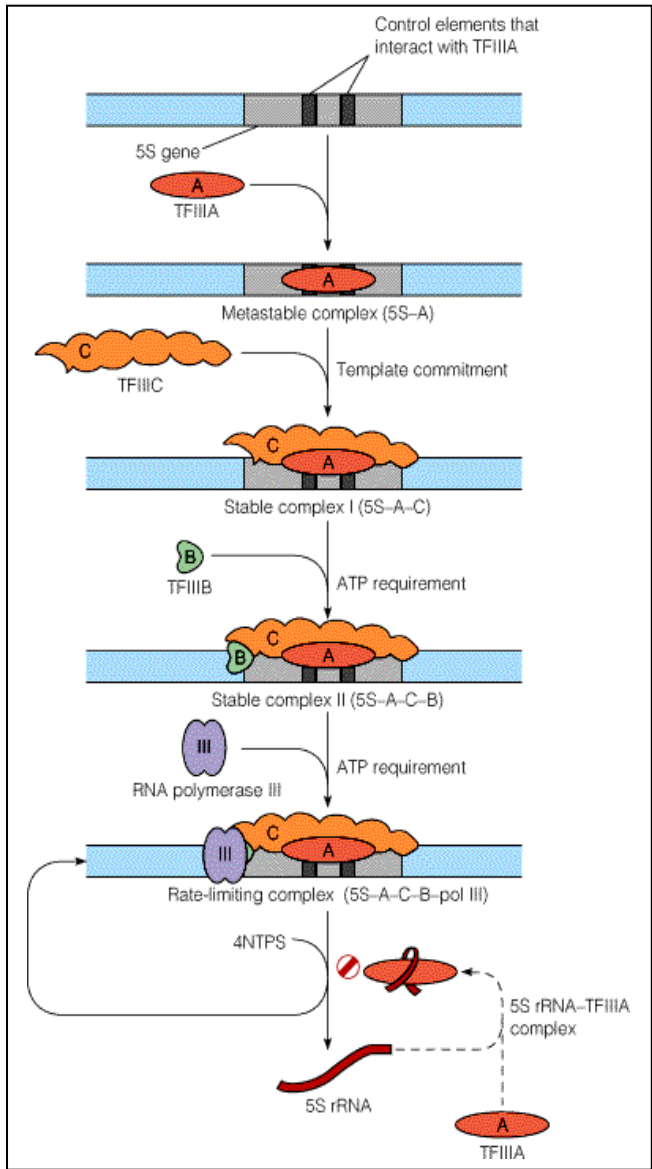
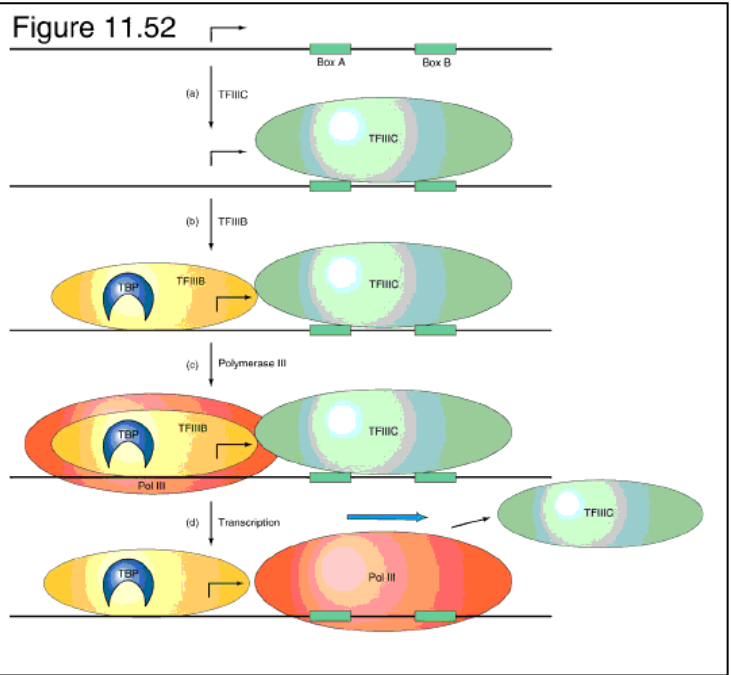
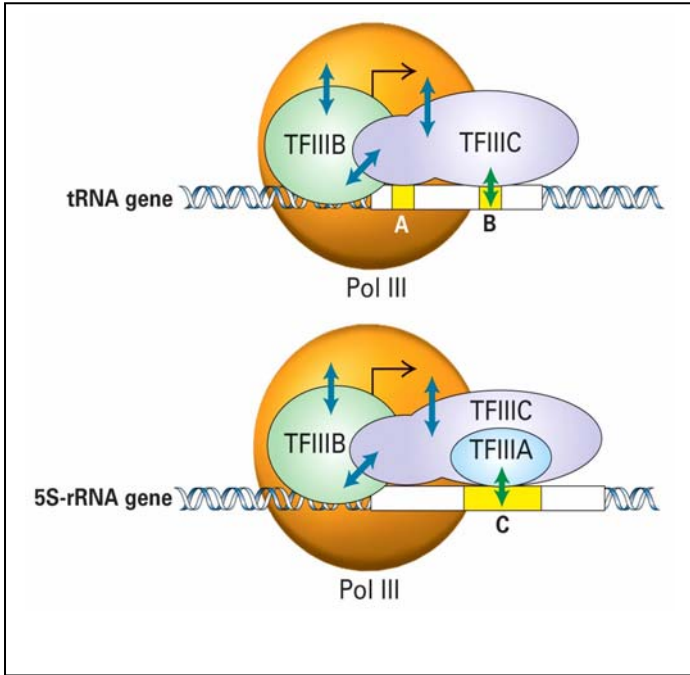
Subunit	Gene	Reference	Remarks
τ 138	TFC3	(346)	Two regions of weak HMG homology
τ 131	TFC4	(347)	Multiple TPR repeats; HLH homology
τ 95	TFC1	(348)	HTH homology
τ 91	TFC6	(349)	No significant homologies
τ 60	TFC8	(351)	No significant homologies
τ 55	TFC7	(350)	Chimeric protein generated by chromosomal rearrangement

TFIIIB subunits in *S. cerevisiae*

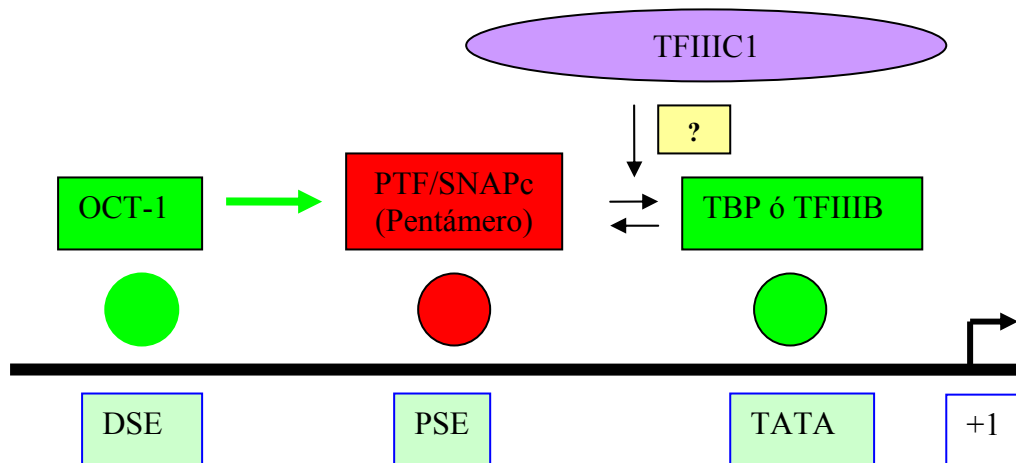
TBP	(Tx binding protein)
90 KDa (B)	TFIIIB, no ability to bind to a gene in absence of either TFIIIA or TFIIIC
70KDa	

TFIIIA

40 KDa	Binds 5S ICR sequence specific fashion also binds 5S RNA facilitating feedback regulation only required for Tx of 5S genes
--------	---



Human U6 snRNA Gene



RNA POLIMERASA III

La pol III tiene 14 subunidades y un peso molecular de 700 kDa. Todos los genes que transcribe son pequeños y están regulados por secuencias que se encuentran dentro de la región transcrita. De todos los genes transcritos por la pol III, el que más se conoce es el del RNA 5 S. Este gen está presente también en múltiples copias, aunque generalmente no se agrupan en tanden, ni se localizan en una zona concreta del núcleo.

Factores de transcripción de la pol III para la síntesis del RNA 5 S

TF III A, específico para la síntesis del RNA 5 S, monómero, reconoce la secuencia bipartita de 12 nucleótidos en el DNA, además se fija también a TF III B, TF III C, y al RNA 5S. La fijación al DNA lo hace mediante dedos de zinc.

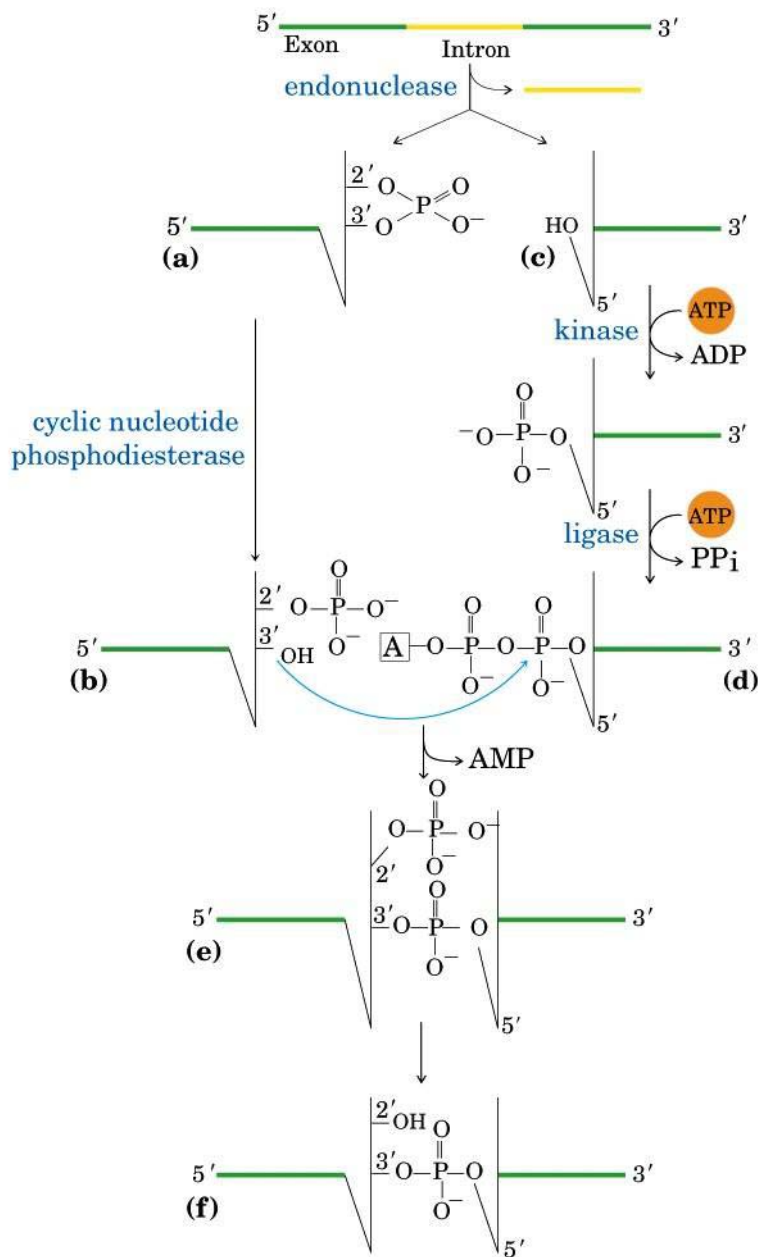
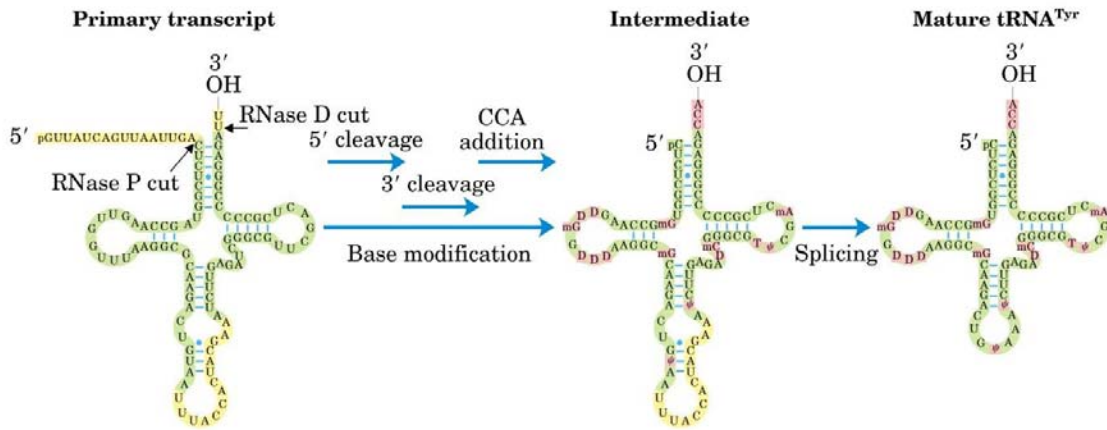
TF III B, también para la síntesis de tRNA, es un trímero

TF III C, también para la síntesis de tRNA, es un hexámero

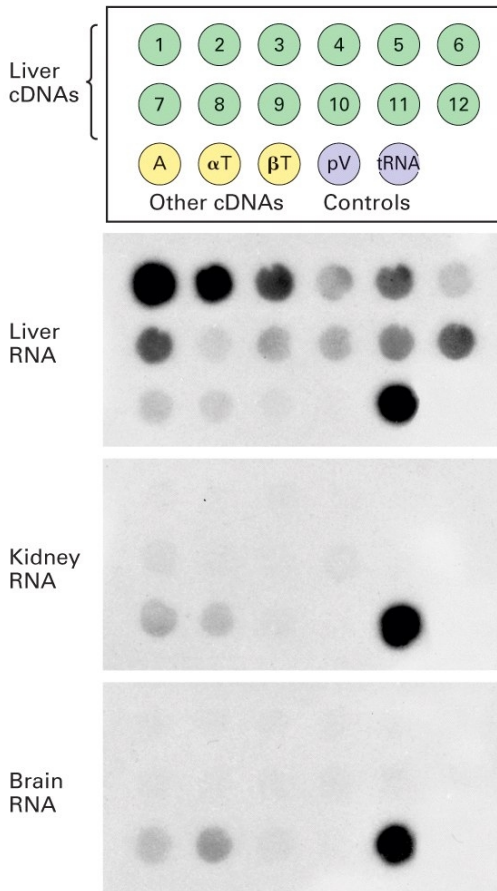
- **Termination of pol III genes**

- occurs in a run of 4 Us located in a G/C-rich region
- some heterogeneity in 3' end formed within the Us

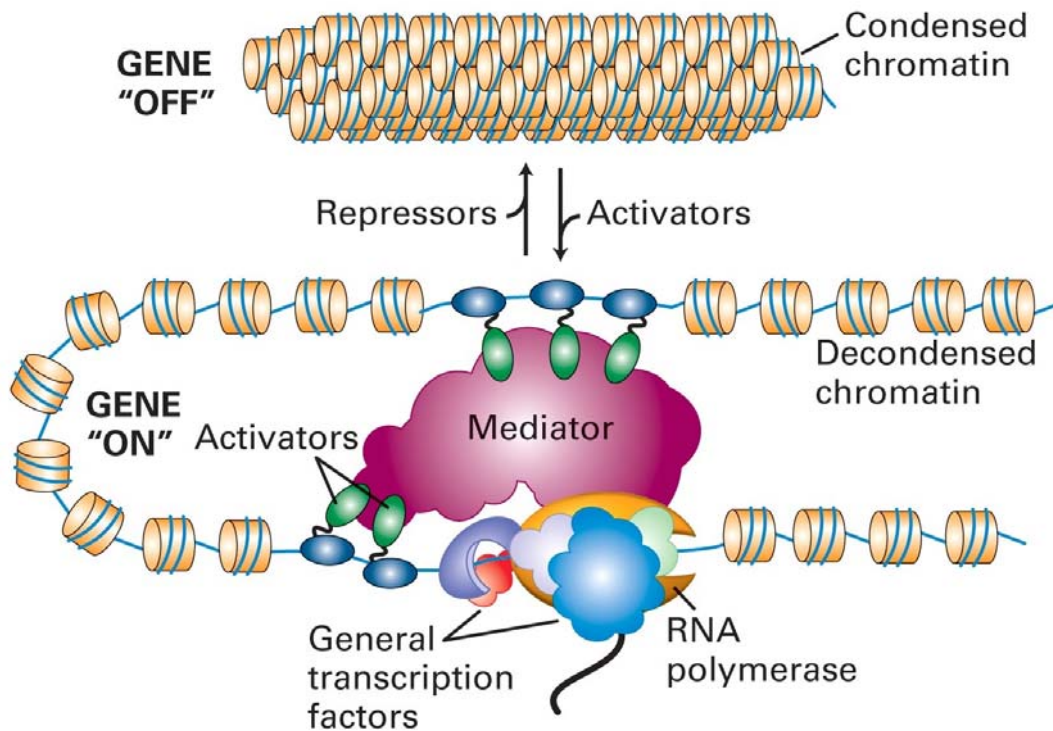
Procesamiento de los tRNA en eucariotas



La síntesis diferencial de proteínas específicas de un tejido, implica un control de la transcripción de los genes correspondientes, específico para cada tejido.



► Fig. 10-23. Demostración experimental de la síntesis diferencial de 12 mRNA codificadores de proteínas específicas del hígado. Se expusieron ³²P-UTP núcleos colulares de hígado, riñón y cerebro de ratones y el RNA marcado resultante se hibridó con diversos cDNA fijados a nitrocelulosa. Tras la eliminación de los RNA no hibridados, los híbridos fueron revelados mediante autorradiografía. Los cDNA marcados 1-12 codifican proteínas sintetizadas activamente en el hígado (p. ej., 4 = albúmina; 3 = α₁-antitripsina; 6 = transferrina) pero no así en la mayoría de los demás tejidos. Los otros cDNA examinados fueron actina (A) y tubulina α y β (αT, βT), que son proteínas halladas en casi todos los tipos celulares. El tRNA de metionina y el DNA de plásmido (pB) en el que fueron clonados los cDNA se incluyeron como testigos. La intensidad de las motas, generadas por la hibridación del RNA sintetizado durante la transcripción experimental in vitro en los núcleos aislados de los tres tejidos, indica que los genes expresados específicamente en los hepatocitos se transcriben en el hígado y no en las células de otros tejidos. [Véase Derman, E y col., *Cell*, 1981; 23:731; Powell, D.J y col., *J Mol Biol*, 1984; 197:21.]



Secuencias reguladoras en los genes eucariontes codificadores de proteínas

La expresión de los genes eucariontes codificadores de proteínas suele estar regulada por medio de múltiples regiones de control de la transcripción de acción cis. Algunos elementos de control están ubicados cerca del inicio (elementos proximales del promotor) mientras que otros se encuentran más distantes (amplificadores).

Los promotores determinan el sitio de iniciación de la transcripción y dirigen la unión de la RNA polimerasa II. En el DNA eucarionte se han identificado tres tipos de secuencias promotoras. La caja TATA, que es la más común, prevalece en los genes de transcripción rápida. Los promotores iniciadores se encuentran con poca frecuencia en algunos genes y las islas CpG son características de los genes que se transcriben.

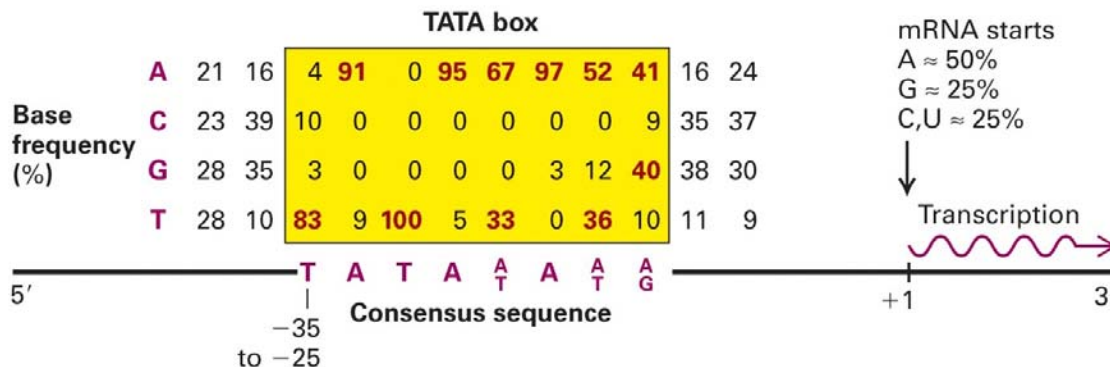
Los elementos proximales del promotor aparecen a no más de 200 bp del sitio de inicio. Varios de estos elementos, con hasta 20 bp, contribuirían a regular un gen en particular.

Los amplificadores que suelen tener una longitud de 100 – 200 bp, contienen múltiples elementos de control de 8 a 20 bp. Pueden estar ubicados desde 200 bp hasta decenas de kilobases hacia 5' o hacia 3' de un promotor, en un intrón o hacia 3' del exón final de un gen.

Los elementos proximales del promotor y los amplificadores a menudo son específicos de tipo celular y sólo funcionan en tipos celulares diferenciados específicos.

Promotores eucarióticos

a) caja TATA



b) iniciador



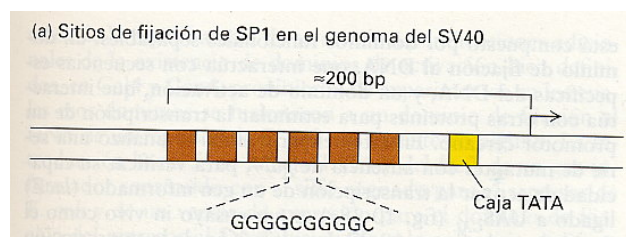
A⁺¹ = comienza la transcripción

Y = cualquiera de las pirimidinas (C o T)

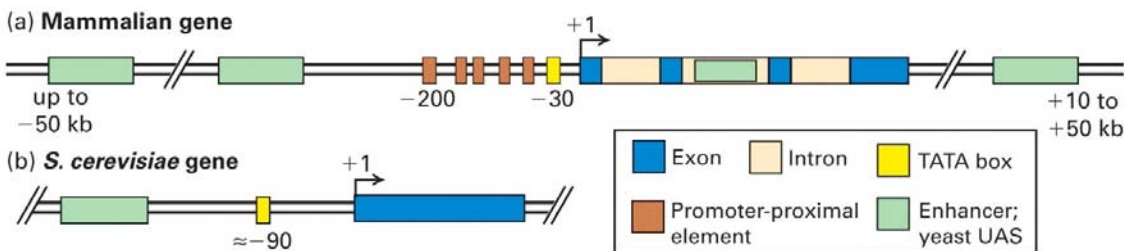
N = cualquiera de las 4 bases

T/A = es T o A

c) islas CpG



Nombre de la secuencia	Secuencia de consenso	Factor(es) de transcripción	Comentario
Algunos elementos promotores y potenciadores generales			
Caja TATA	TATAAAA	TBP, TFIID	Éste es el elemento promotor central más común
Caja CAAT	GGCCAATCT	CP1	Elemento común hacia arriba
Caja GC	GGGCGG	SP1	Se encuentra a menudo en los promotores sin TATA
Octámero	ATTGTCAT	Oct1, Oct2	Oct1 y Oct2 contienen dominios homeo
Algunos elementos promotores y potenciadores especiales			
HSE	CNNGAANNNTCCNNG	Factor del choque térmico	Interviene en la respuesta al choque térmico
GRE	TGGTACAAATGTTCT	Receptor de glucocorticoides	Una proteínas a las hormonas glucocorticoides
TRE	CAGGGACGTGACCGCA	Receptor tiroideo	Una proteínas a las hormonas tiroideas



Modelo general de los elementos de control de acción cis que regulan la expresión génica en levaduras y organismos multicelulares. (a) Los genes de los organismos multicelulares contienen tanto elementos proximales del promotor como amplificadores y también una caja TATA u otro elemento promotor. Los amplificadores pueden estar hacia 5' o hacia 3' y hasta 50 kb de distancia desde el sitio de inicio. (b) La mayoría de los genes de levadura contiene una sola región reguladora, llamada secuencia activadora hacia 5' (UAS), y una caja TATA que se encuentra a ~ 90 pares de bases hacia 5' del sitio de inicio.

Complejo de iniciación de la transcripción de la RNA polimerasa II (Factores de transcripción generales)

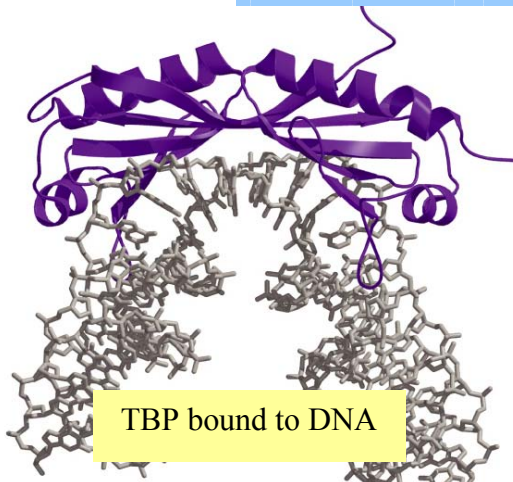
table 26-1

Proteins Required for Transcription at the RNA Polymerase II Promoters of Eukaryotes			
Transcription factor	Number of subunits	Subunit M_r	Functions
Initiation			
RNA polymerase II	12	10,000–220,000	Catalyzes RNA synthesis
TBP (TATA-binding protein)	1	38,000	Specifically recognizes the TATA box
TFIIA	3	12,000, 19,000, 35,000	Stabilizes binding of TFIIB and TBP to the promoter
TFIIB	1	35,000	Binds to TBP; recruits RNA polymerase–TFIIF complex
TFIID	12	15,000–250,000	Interacts with positive and negative regulatory proteins
TFIIE	2	34,000, 57,000	Recruits TFIIH; ATPase and helicase activities
TFIIF	2	30,000, 74,000	Binds tightly to RNA polymerase II; binds to TFIIB and prevents binding of RNA polymerase to nonspecific DNA sequences
TFIIH	12	35,000–89,000	Unwinds DNA at promoter; phosphorylates RNA polymerase; recruits nucleotide-excision repair complex
Elongation*			
ELL [†]	1	80,000	
P-TEFb	2	43,000, 124,000	
SII (TFIIS)	1	38,000	
Elongin (SIII)	3	15,000, 18,000, 110,000	

*All elongation factors suppress the pausing or arrest of transcription by the RNA polymerase II – TFIIF complex.

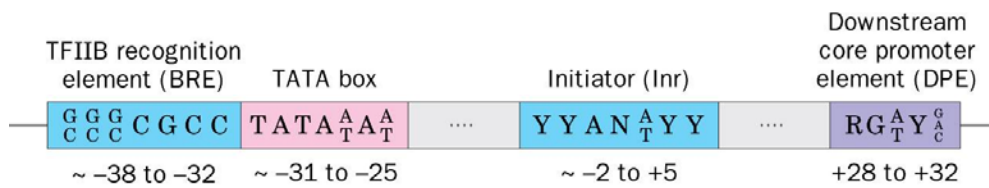
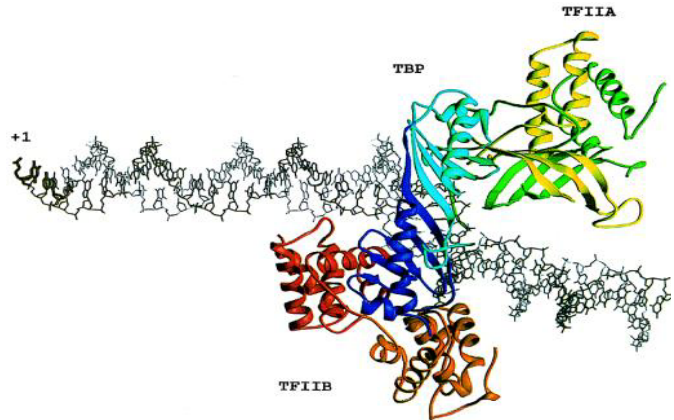
[†]The name is derived from the term *eleven-nineteen lysine-rich leukemia*. The gene for the factor ELL is the site of chromosomal recombination events frequently associated with the cancerous condition known as acute myeloid leukemia.

Formación del complejo de iniciación Sequential Binding Model for assembly of PIC

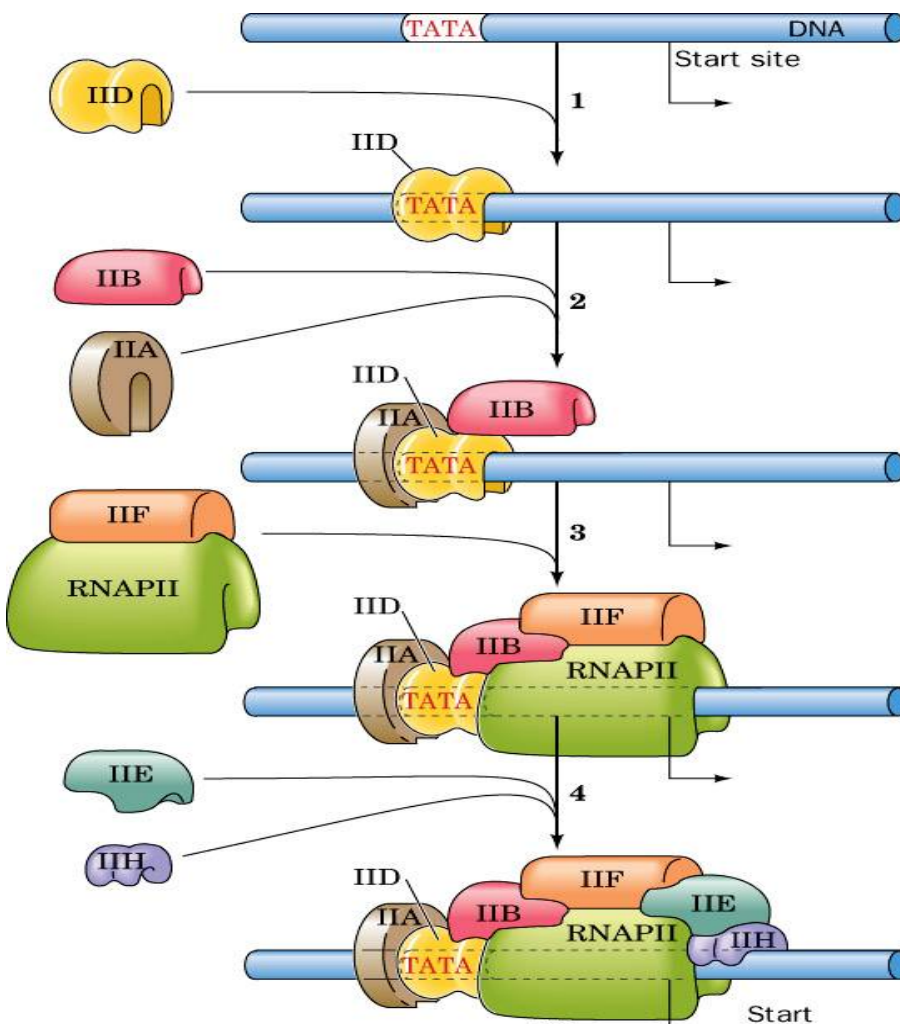


TATA-box Binding Protein = TBP

TBP binds in the narrow groove of DNA at the TATA box found about 20-25 bp 5' to the start site for transcription of *many* (but not all) genes transcribed by Pol II



The sequence elements in a typical class II core promoter.



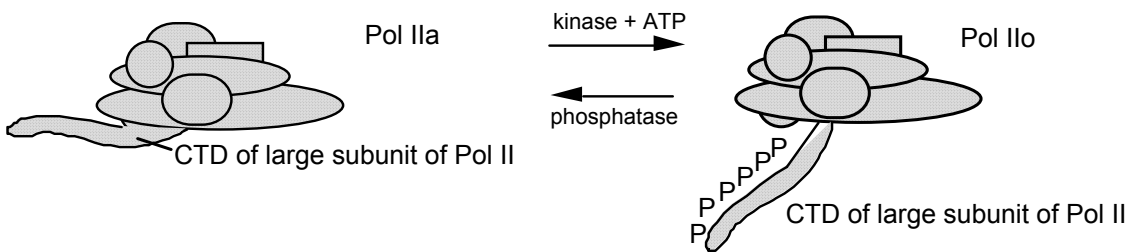
Assembly of the preinitiation complex (PIC) on a TATA box-containing promoter.

Carboxyl-terminal domain (CTD) of the Pol II largest subunit (Rpb1)

- Conserved repeats of heptad PTSPSYS sequences
- 52 in mammal, 26 in yeast, other eukaryotes have intermediate value
- Ser residues are subject to reversible phosphorylation by CTD kinases and CTD phosphatases

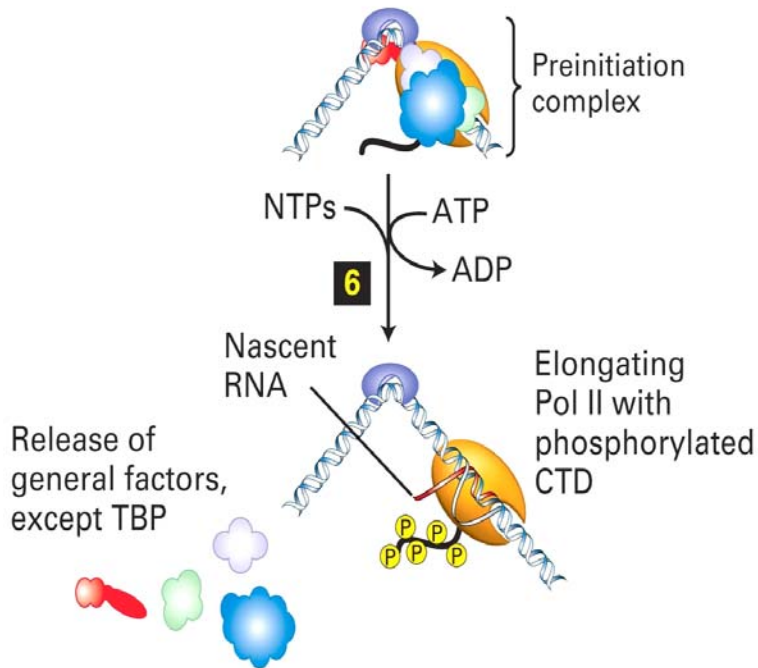
Phosphorylation of CTD

Eukaryotic RNA polymerase II



CTD has repeat of (PTSPSYS)₂₆₋₅₂.

ELONGACION



Polymerization of 1st few NTPs and phosphorylation of CTD leads to promoter clearance. TFIIB, TFIIE and TFIIH dissociate, Pol II+IIF elongates, and TFIID + TFIIA stays at TATA

La pol II requiere varios factores de transcripción generales para localizar el sitio de inicio adecuado en un molde de DNA e iniciar la transcripción. Entre ellos se encuentra el TF IID, que se une a una caja TATA a través de su subunidad TBP.

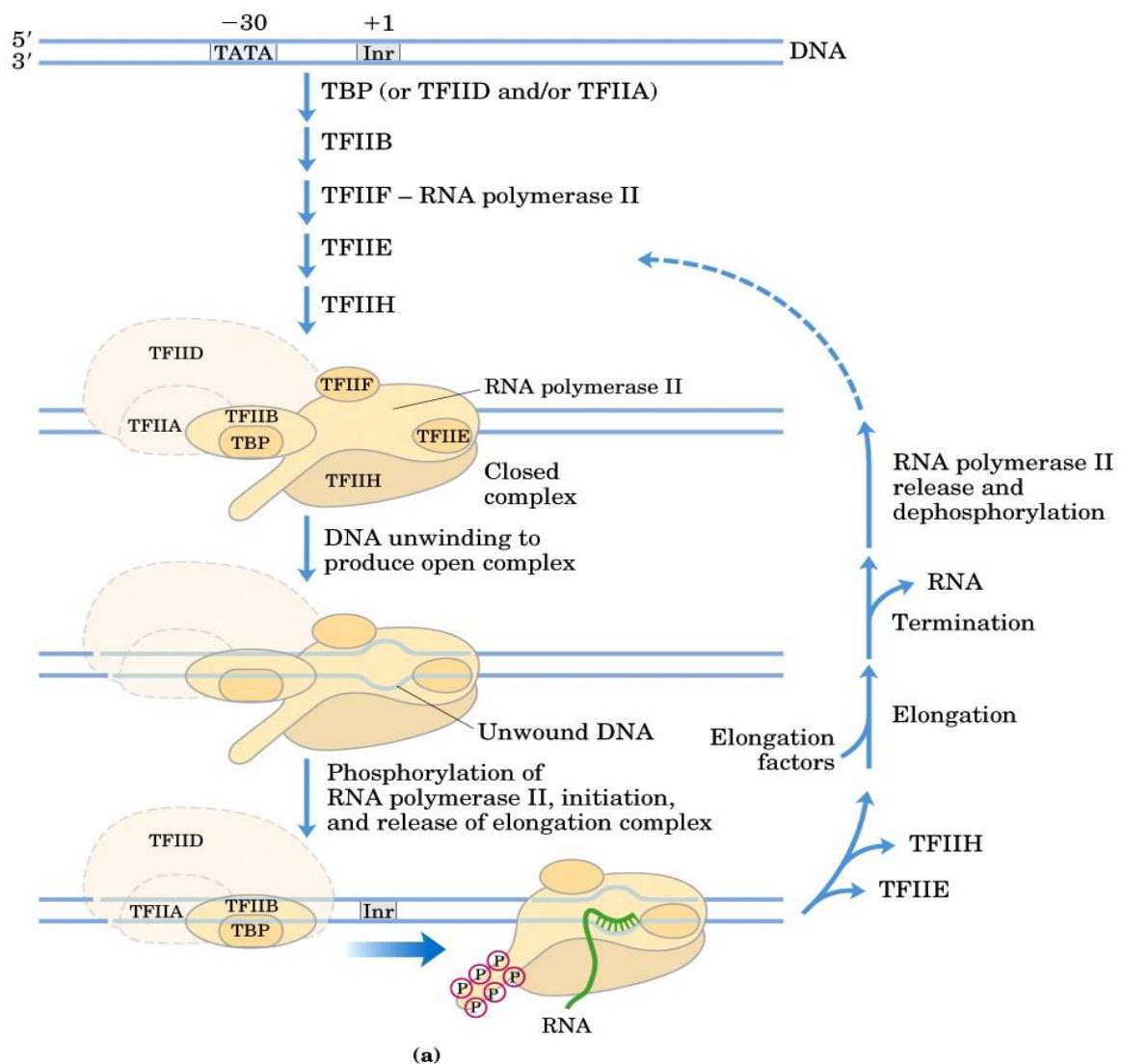
La pol II puede iniciar la transcripción "In Vitro" mediante la unión secuencial de los siguientes elementos en el orden indicado: TBP, que se une al DNA, TF IIB, un complejo de pol II y TF IIF, TF IIE y TF IIH

Las actividades de helicasa de dos subunidades de TF IIH separan la hebra molde a la altura del sitio de inicio en la mayoría de los promotores, un proceso que requiere el consumo de ATP. Conforme la pol II comienza a alejarse del sitio de inicio, su CTD es fosforilado por otra subunidad del TF IIH.

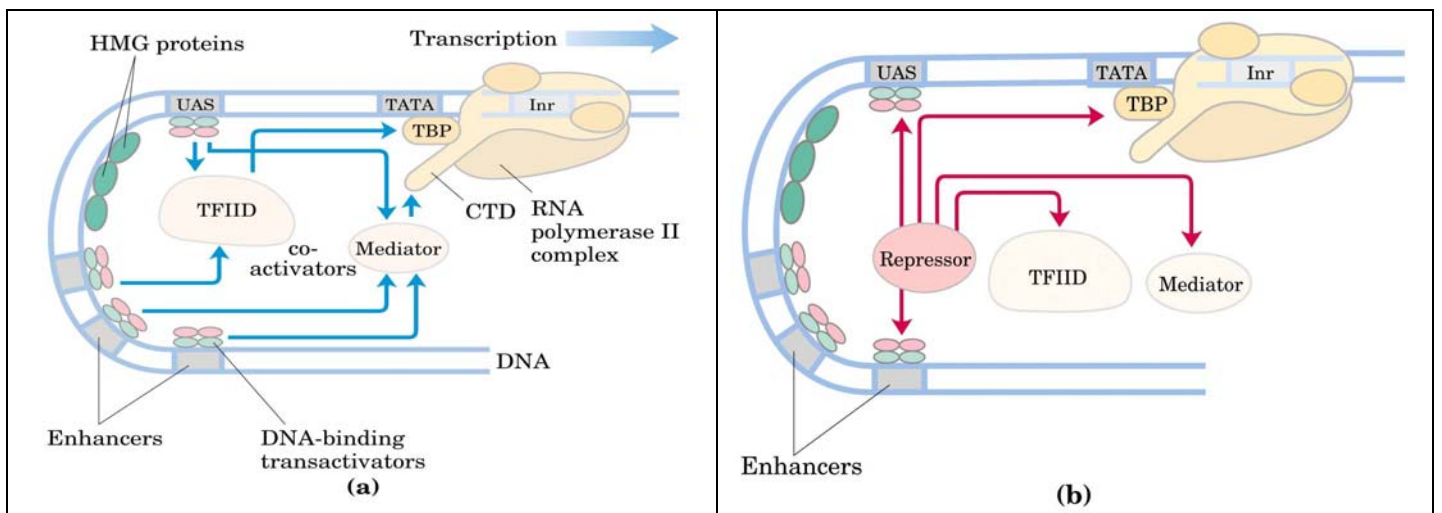
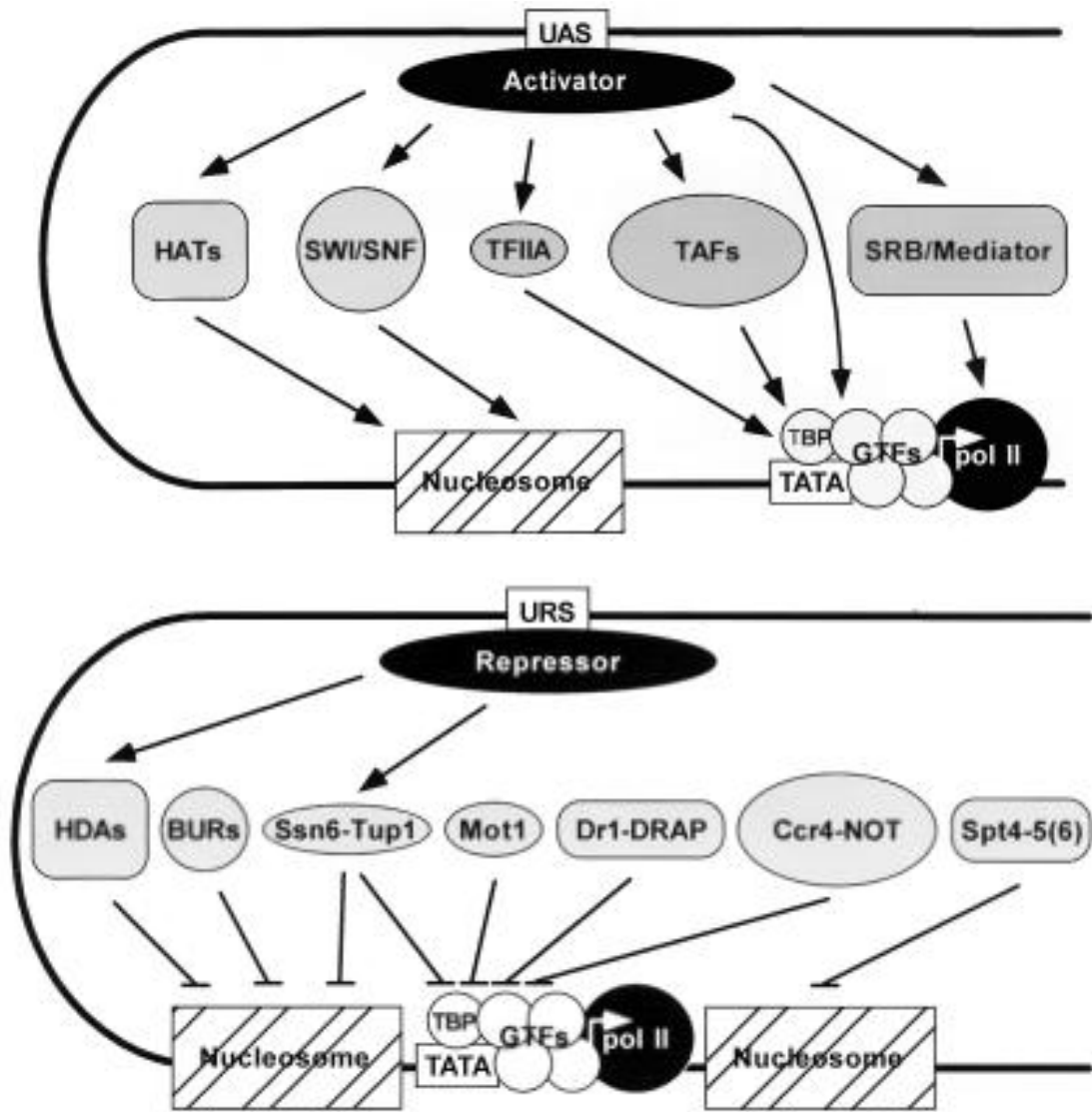
La iniciación por la pol II in vivo requiere el complejo mediador multiproteico. Este se asocia con el CTD no fosforilado de la pol II para formar un complejo holoenzimático muy grande, que también incluye la mayoría de los factores de transcripción generales. Se cree que "In Vivo" esta holoenzima prearmada se une al DNA promotor en un solo paso.

El complejo de iniciación de la transcripción de la pol II que "In Vivo" se ensambla en los promotores contendría hasta 60 -70 polipéptidos con una masa total semejante a la de un ribosoma.

Fase de elongación



Regulación de la expresión génica en eucariotas: Iniciación



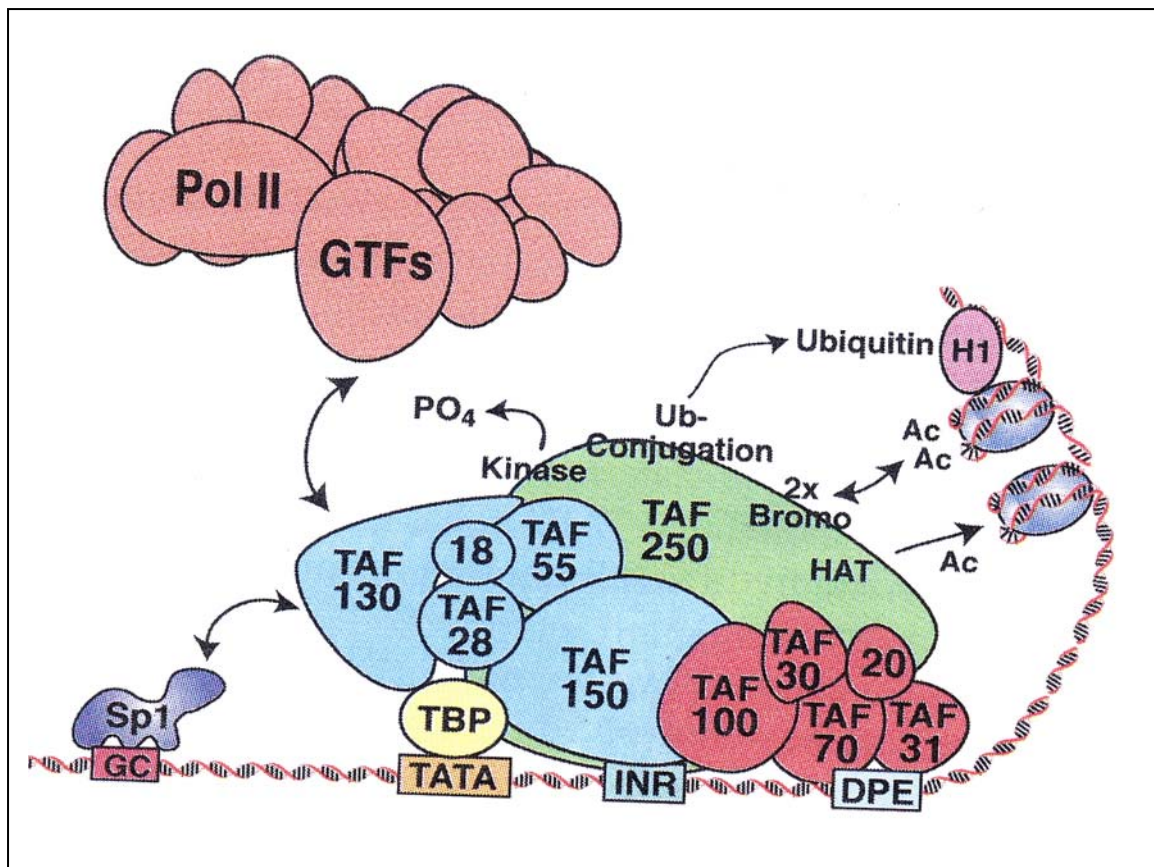
Activación. Schematic summary of yeast coactivators and their activities. Transcriptional activation by a UAS-activator complex can occur by direct interaction between an acidic activator protein and components of the core transcriptional machinery or can be indirect, mediated by coactivators that interact either with components of the core transcriptional machinery (TFIIA, TAFs, SRB/mediator) or with nucleosomes (SWI/SNF, HATs). TFIIA interacts with the core transcriptional machinery through TBP, functioning as either an antirepressor or coactivator. TAFs also interact with TBP as components of the TFIID complex. Although initially thought to be requisite coactivators of transcription, TAFs now appear to be required for activation of only a subset of genes with noncanonical TATA elements. SRB/mediator is a component of an RNA pol II holoenzyme complex, interacting with RNA pol II through the CTD of Rpb1. The SRB/mediator includes subunits that function in transcriptional repression as well as activation. Several HATs have been identified in yeast, including the Gcn5-containing SAGA complex. HATs appear to mediate transcriptional activation by acetylation of nucleosomal histones, resulting in chromatin remodeling. The SWI/SNF complex also appears to facilitate chromatin remodeling, in this case by promoting nucleosome displacement in an ATP-dependent manner.

Represión. Schematic summary of general transcriptional repressors and their activities. Comparable to coactivators, general repressors can interact either with the core transcriptional machinery or with nucleosomes. Mot1, Dr1-DRAP1 (NC2), and the Ccr4-Not complex confer transcriptional repression by interaction with components of the core machinery. Mot1 interacts directly with TBP and promotes TATA-TBP dissociation in an ATP-dependent manner. Dr1-DRAP1 also interacts directly with TBP but, in contrast to Mot1, represses transcription by blocking TBP interaction with TFIIA and TFIIB rather than by displacing TBP from DNA. The Ccr4-NOT complex also targets the core machinery. Whereas Mot1 promotes TBP-DNA dissociation, the Ccr4/NOT complex has been proposed to negatively regulate the activity of factors (e.g., TFIIA) that facilitate TBP-TATA association. In contradistinction to HATs (Fig.4), HDA complexes repress transcription by deacetylation of histones or other factors, presumably allowing reestablishment of repressive chromatin structures. HDAs do not bind DNA directly but are targeted by URS-repressor complexes. Ssn6-Tup1 is also targeted by URS-repressor complexes and was recently reported to interact with histones H3 and H4. Thus, HDAs and Ssn6/Tup1 are similar in their modes of transcriptional repression, although Ssn6/Tup1 is not an HDA. The BUR proteins, including Bur1, Bur2, Bur4, and Bur5, appear to mediate repression by affecting chromatin structure. (BUR5 is identical to HHT1/SIN2, which encodes histone H3.) The Spt4-Spt5 complex also regulates transcription by affecting the chromatin structure. Recently, a human Spt4-Spt5 complex, denoted DSIF, was identified as a transcription elongation factor. Spt6 is functionally related to Spt4 and Spt5 but does not appear to be a component of the Spt4-Spt5 complex. An important characteristic of several general transcriptional repressors is that they can also function in transcriptional activation.

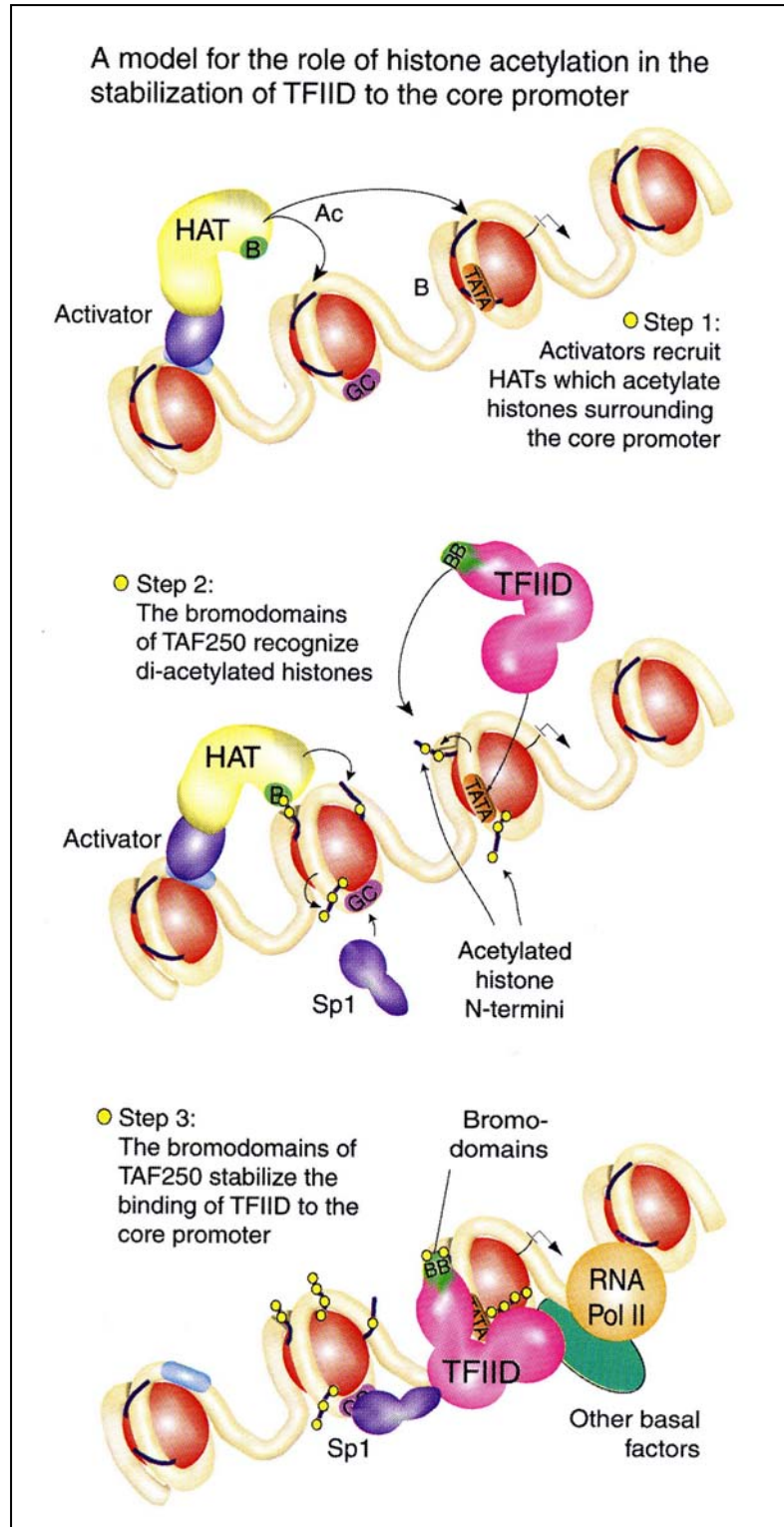
TFIID: TAFs

TABLE 3. TAF subunits of yeast TFIID

Factor	Mass (kDa)	Gene(s)	Essential	Characteristics	Metazoan homolog(s)	Reference(s)
TAF _{II} 150	155	<i>TSM1</i>	Yes	Scaffold for assembly of TFIID; directly contacts TBP	dTAF _{II} 150	371, 385
TAF _{II} 145/TAF _{II} 130	121	<i>TAF130</i>	Yes		dTAF _{II} 80 binds TFIIE α and TFIIIF α	hTAF _{II} 250 (CCG1), dTAF _{II} 230
TAF _{II} 90	89	<i>TAF90</i>	Yes	Structural similarity to histone H2B	hTAF _{II} 100, dTAF _{II} 80	371, 388
TAF _{II} 67	67	<i>TAF67</i>	Yes		hTAF _{II} 55	329
TAF _{II} 61/TAF _{II} 68	61	<i>TAF61</i>	Yes	Structural similarity to histone H4	hTAF _{II} 15/20, dTAF _{II} 30 α (p28/p22)	329, 517
TAF _{II} 60	58	<i>TAF60</i>	Yes		hTAF _{II} 80, dTAF _{II} 60	371
TAF _{II} 47	40	<i>TAF47</i>	Yes	dTAF _{II} 40 binds TFIIB Subunit common to TFIID, TFIIIF, and the SWI/SNF complex	None	517
TAF _{II} 40	41	<i>TAF40</i>	Yes		hTAF _{II} 28, dTAF _{II} 30 β	255, 329
TAF _{II} 30	27	<i>TAF30, ANCI, TFG3, SWP29</i>	No		AF-9, ENL	55, 196, 531
TAF _{II} 23/TAF _{II} 25	23	<i>TAF25</i>	Yes	Structural similarity to histone H3	hTAF _{II} 30	256, 329
TAF _{II} 19	19	<i>TAF19, FUN81</i>			hTAF _{II} 18	329
TAF _{II} 17	17	<i>TAF17</i>	Yes		hTAF _{II} 32, dTAF _{II} 40/42	329



A model of functions associated with TFIID and its subunits. Activator-targeting is indicated by TAF 130 interaction with the Sp1 transactivator (purple). Several TFIID subunits have been implicated in DNA binding, including TBP (yellow), which binds to the TATA sequence; TAF 150 (blue), which interacts with the initiator element (INR); and TAF 70 (red) and TAF 31 (red), which interact with a downstream promoter element (DPE). A submodule of TAFs (in red) has been found associated with other coactivator complexes. The largest subunit of TFIID, TAF250 (green), exhibits a number of activities, including protein kinase, ubiquitin ligase, histone acetyltransferase (HAT), and histone-interacting tandem bromodomains (2xBromo). (Ac, acetyl; H1, histone H1; Ub, ubiquitin.) TFIID has been proposed to nucleate the formation of a pre-initiation complex by recruiting RNA polymerase II (pol II) and the other general transcription factors (GTFs) (orange). The molecular weights of TAFs shown here represent human TFIID subunits, although some functions depicted have been described only for *Drosophila* TFIID.



A model for the potential role of histone acetylation in stabilizing TFIID interaction with active chromatin regions via the TAF250 tandem bromodomains.

SRB/Mediator

SRB/mediator is functionally defined by three activities:

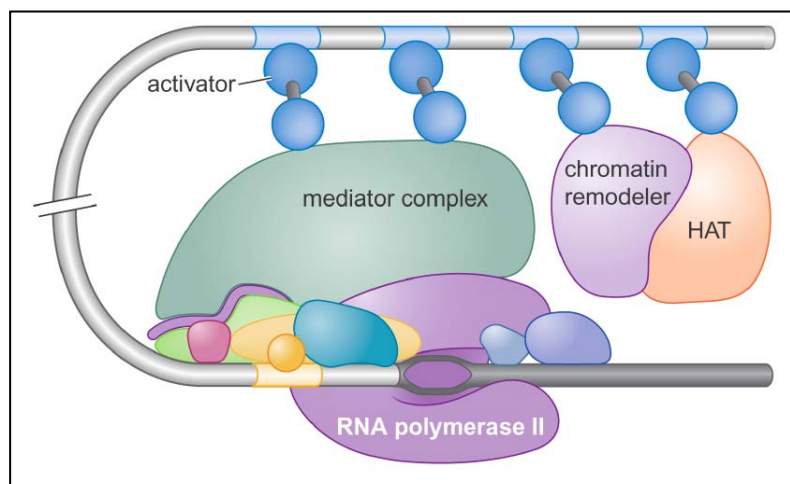
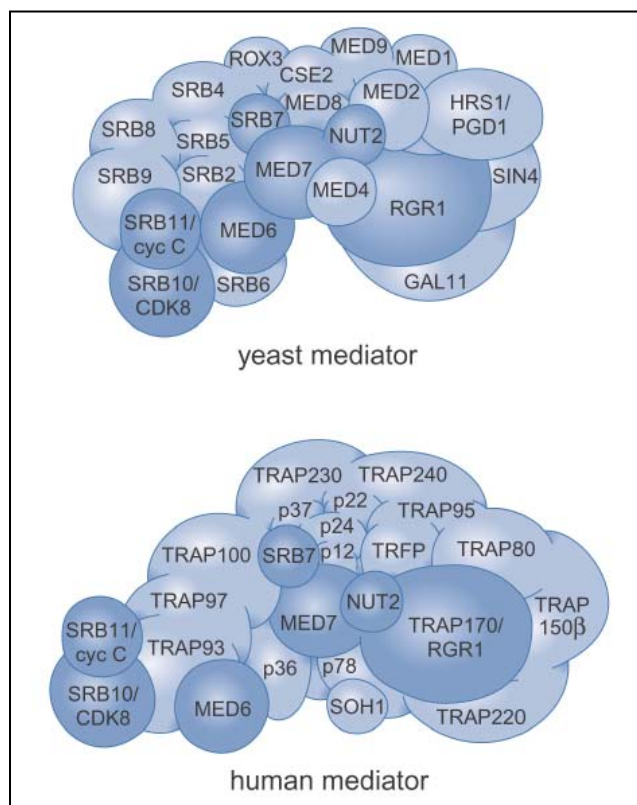
- Stimulation of basal transcription in a highly purified system.
- Response to transcriptional activators “in vitro”.
- Stimulation of phosphorylation of the RNA pol II CTD by the TFIIF Kinase.
- In contrast to TAFs, which appear to function as coactivators in a gene-specific manner, SRB/mediator appears to play a more general role in transcriptional activation.

TABLE 4. Yeast SRB/mediator subunits^a

Factor	Mass (kDa)	Gene(s)	Essential	Metazoan homologs	Reference(s)
Srb2	23	<i>SRB2</i>	No		252, 260, 261, 483
Srb4	78	<i>SRB4</i>	Yes		252, 261, 483, 484
Srb5	34	<i>SRB5</i>	No		252, 261, 483
Srb6	14	<i>SRB6</i>	Yes		252, 261, 483, 484
Srb7	16	<i>SRB7</i>	Yes	Yes	194, 283
Srb8	167	<i>SRB8, SSN5, ARE2</i>	No		194, 283
Srb9	160	<i>SRB9, SSN2, UME2</i>	No		194, 283
Srb10	63	<i>SRB10, SSN3, UME5, ARE1</i>	No		265, 285, 461, 516
Srb11	36	<i>SRB11, SSN8, UME3</i>	No		98, 265, 285
Gal11	38	<i>GAL11, SPT13, SDS4, RAR3</i>	No		130, 252, 261
Sin4	111	<i>SIN4, SSN4, TSF3</i>	No		72, 230, 282
Rgr1	123	<i>RGR1</i>	Yes	Yes	230, 282
Rox3 ^b	25	<i>ROX3, SSN7</i>	Yes		170, 396
Med1	64	<i>MED1</i>	No		Cited in 330
Med2	48	<i>MED2</i>	No		330
Med3, Pgd1, Hrs1	47	<i>PGD1, HRS1</i>	No		330
Med4	32	<i>MED4</i>	Yes		330
Med6	33	<i>MED6, MTR32</i>	Yes	Yes	278
Med7	32	<i>MED7</i>		Yes	330
Med8	25	<i>MED8</i>	Yes		330

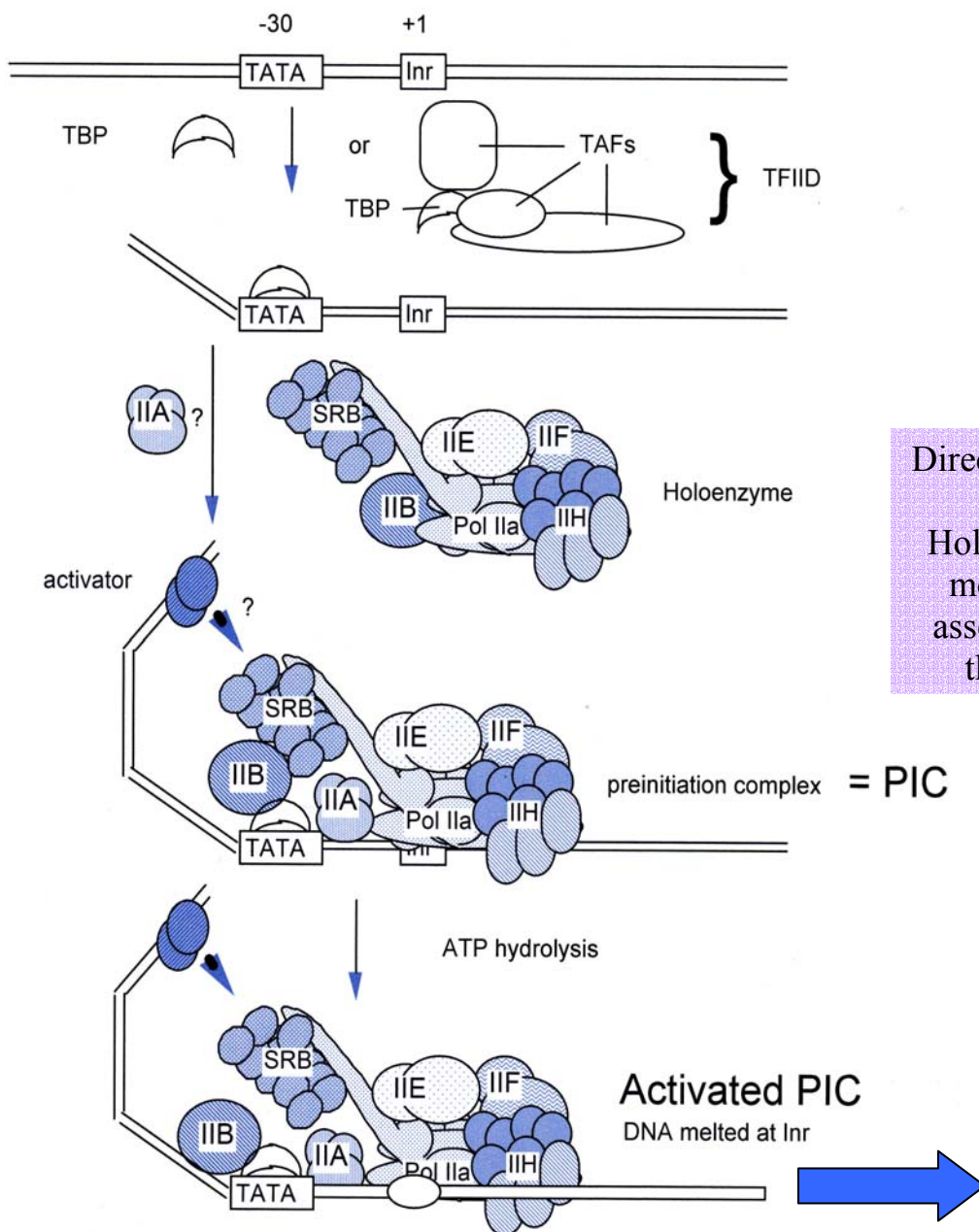
^a Srb2, Srb4, Srb5, Srb6, and Srb7 are subunits of the SRB/mediator as described by both the Kornberg and Young laboratories. Srb8 to Srb11 are components of the SRB/mediator defined by Young and coworkers (194) but not by Kornberg and coworkers (330). The SWI/SNF complex has also been reported by Young and colleagues to be associated with the holoenzyme (535) but is not included in the SRB/mediator defined by Kornberg and coworkers (330). Sug1 was identified as a suppressor of a *gal4* mutation (468) and proposed to be a component of SRB/mediator (252, 261, 469). More recently, Sug1 has been defined as a subunit of the 26S proteasome (402) and is no longer included as a subunit of the SRB/mediator (330).

^b Rox3 was initially reported to be identical to Med8 (170). Subsequent analysis of Med8 revealed two distinct polypeptides, one of which is Rox3; however, the Med8 designation was retained for the other (330). Accordingly, Rox3 and Med8 now refer to distinct polypeptides that are both components of SRB/mediator.



Pol II Holoenzyme and Mediator

- **Holoenzyme**
 - Pol II + (TFIIB, E, F, H) + (Srb2, 4, 5, 6) + (Rgr1, Gal11, others)
 - Correct initiation in presence of TBP (TFIID)
 - Responds to transcriptional activators
- **Mediator**
 - Complex needed for a response to transcriptional activators by purified Pol II plus GTFs
 - Yeast Mediator has 20 subunits, including Srb2, 4, 5, 6; Srb7, Rgr1, Gal11, Med 1, 2, 6, 7, Pgd1, Nut 1, 2, and others
- **Pol II + Mediator (+ some GTFs?) = Holoenzyme**



Estado de la cromatina

table 28-2

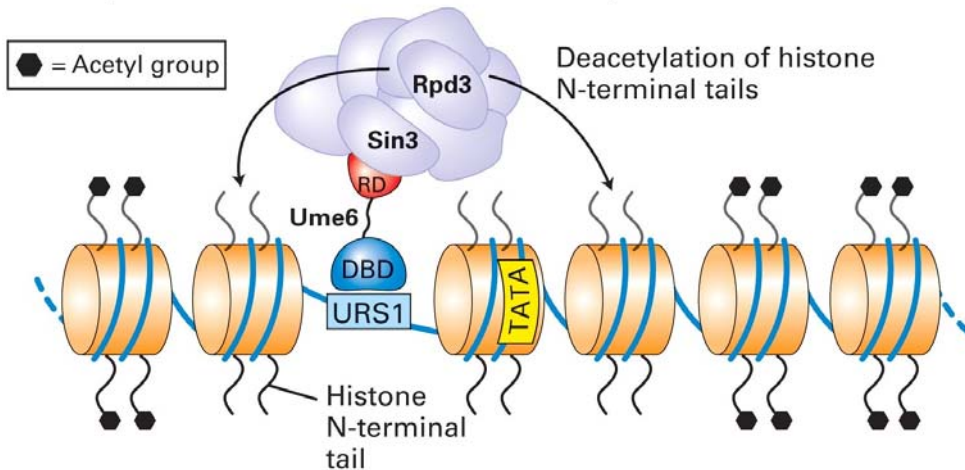
Some Enzyme Complexes Catalyzing Chromatin Structural Changes during Transcription

Enzyme complex*	Oligomeric structure	Source	Activities
GCN5-ADA2-ADA3	3 polypeptides	Yeast	GCN5 has type A HAT activity
SAGA/PCAF	>20 polypeptides	Eukaryotes	Includes GCN5-ADA2-ADA3
SWI/SNF	>11 polypeptides; M_r 2×10^6	Eukaryotes	ATP-dependent nucleosome remodeling
NURF	4 polypeptides; M_r 500,000	<i>Drosophila</i>	ATP-dependent nucleosome remodeling
CAFI	>2 polypeptides	Humans; <i>Drosophila</i>	Responsible for binding histones H3 and H4 to DNA
NAP1	1 polypeptide; M_r 125,000	Widely distributed in eukaryotes	Responsible for binding histones H2A and H2B to DNA

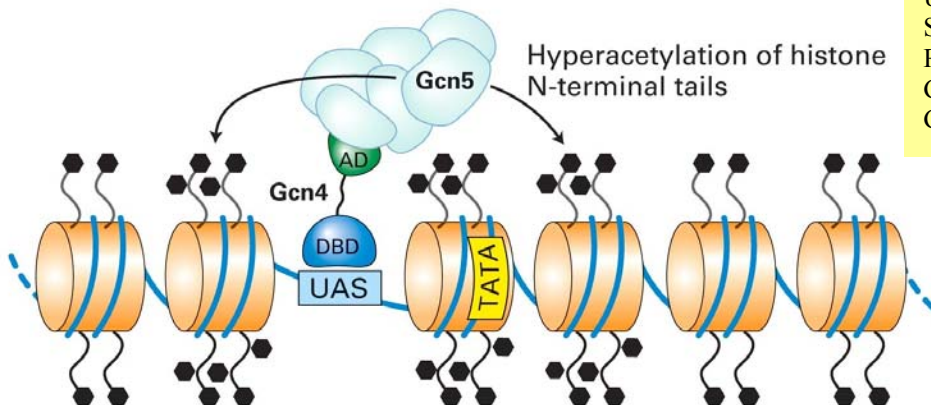
*The abbreviations used to identify eukaryotic genes and proteins are often more confusing or obscure than those used for bacteria. The complex of GCN5 (general control nonrepressible) and ADA (alteration/deficiency activation) proteins was discovered during investigation of the regulation of the genes of nitrogen metabolism in yeast. These proteins can be part of the larger SAGA complex. SAGA (SPF, ADA2,3, GCN5, acetyltransferase) is a yeast complex; its equivalent in humans is PCAF (p300/CBP-associated factor). SWI was

discovered as a protein required for expression of certain genes involved in mating type switching in yeast, and SNF (sucrose nonfermenting) as a factor for expression of the yeast gene for sucrose. Subsequent studies revealed multiple SWI and SNF proteins that acted in a complex. The SWI/SNF complex has a role in the expression of a wide range of genes and has been found in many eukaryotes, including humans. NURF is nuclear remodeling factor; CAF1, chromatin assembly factor; and NAP1, nucleosome assembly protein.

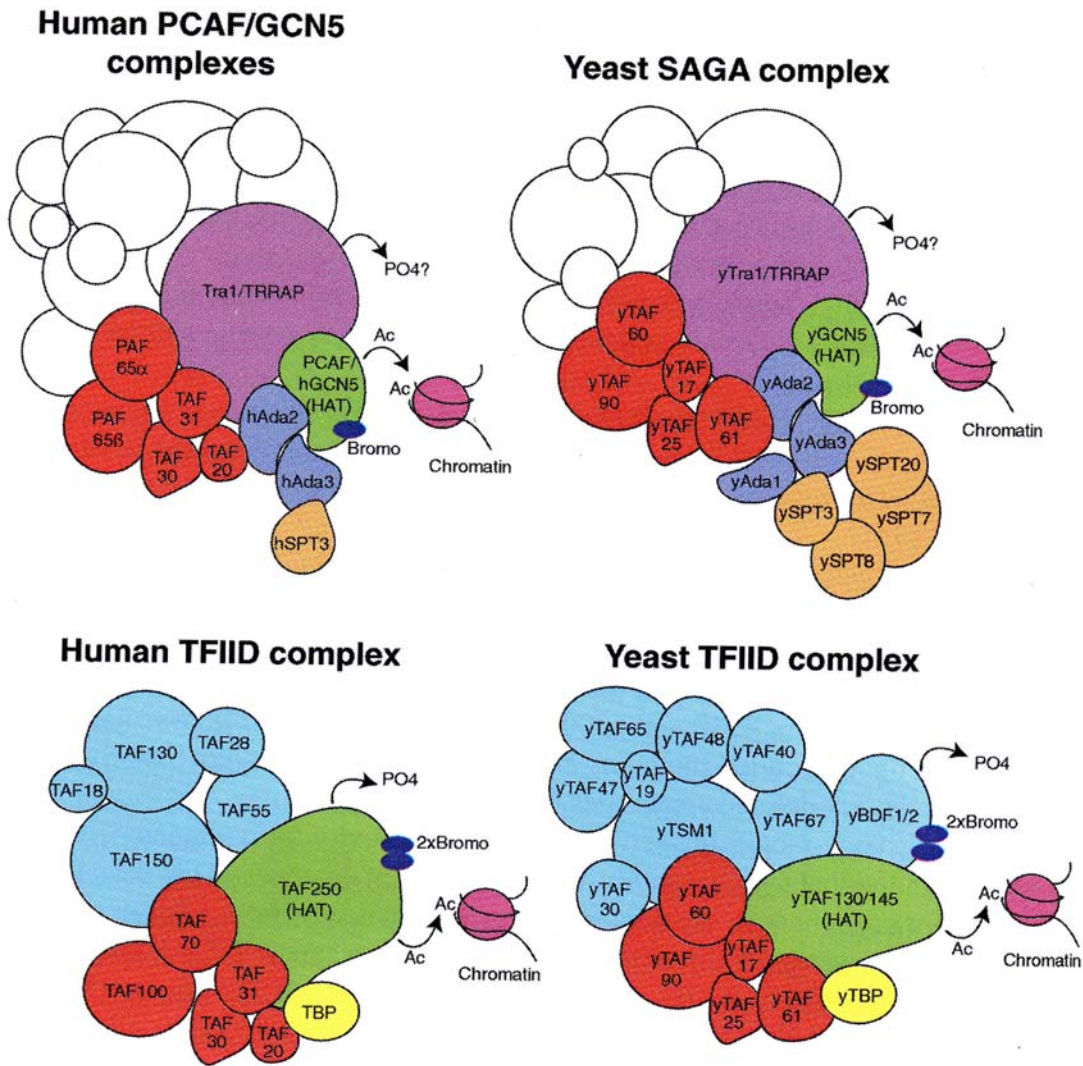
(a) Repressor-directed histone deacetylation



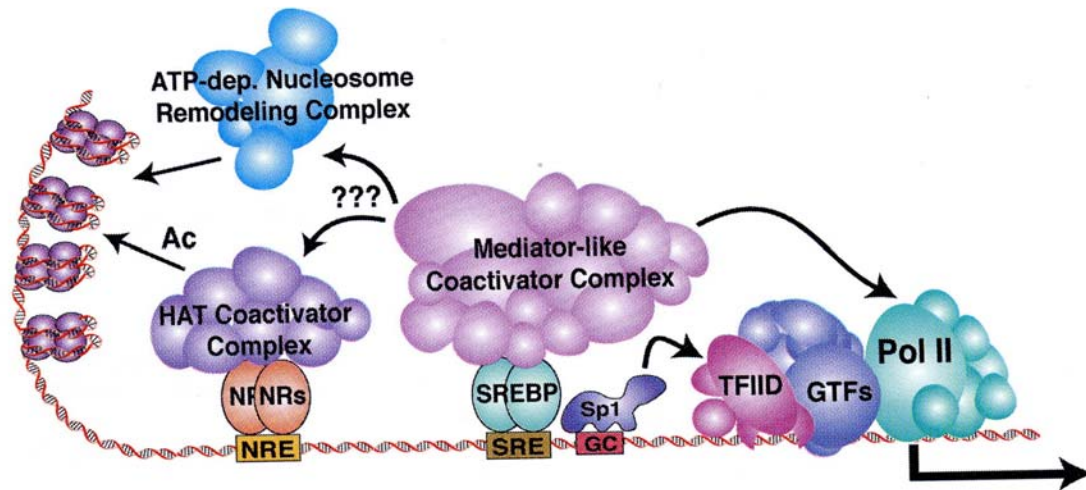
(b) Activator-directed histone hyperacetylation



URS1, UAS = elementos de control
 Um6 = represor
 Sin3 = fijación
 Rpd3 = desacetilasa
 Gcn4 = activador
 Gcn5 = acetilasa



Yeast and human PCAF/GCN5 and TFIID coactivator complexes are assembled in a modular fashion. TAFs or TAF paralogs that appear to constitute a core module present in all PCAF/GCN5 and TFIID complexes are colored red. All complexes also harbor subunits (green) mediating histone acetyltransferase (HAT) activity [arrow to acetyl (Ac) on nucleosome, denoted chromatin]. (Top) Comparison of human complexes containing either the human PCAF or hGCN5 HATs (green), and the yeast SAGA coactivator complex containing the yeast GCN5 HAT (green). Besides containing GCN5 homologs and TAFs or TAF paralogs, these complexes also share some ADA polypeptides (light blue), SPT proteins (beige/peach), and a TraI/TRRAP homolog (mauve), distantly related to PI3 kinases (indicated by arrow to PO4?). Other as-yet-unidentified subunits of these complexes are shown in white. (Bottom) comparison of human and yeast TFIID complexes. In addition to sharing a subset of TAFs with the GCN5-containing complexes, these complexes also contain TFIID-specific subunits, including a HAT (green) and other TAFs (cyan), as well as a TATA-binding protein (TBP in yellow). Interestingly, whereas the human TAF250 contains HAT activity, two bromodomains (dark blue ovals), and a C-terminal protein kinase activity (arrow to PO4), in yeast these functional domains appear to be present on separate polypeptides: the yeast TAF130/145 protein harbors HAT activity and the yeast BDF1/2 proteins contain the two bromodomains and protein kinase activity.



A model of some of the different activities displayed by distinct types of transcriptional coactivator complexes in regulating gene activity. ATP-dependent nucleosome remodeling complexes (light blue), which may or may not be directly recruited by sequence-specific activators, help activators and the transcriptional apparatus to gain access to their cognate enhancer/promoter sequence by mobilizing nucleosomes. Histone acetyltransferase (HAT) containing coactivator complexes (light purple) have been shown to be recruited by activators such as nuclear receptors (NRs, orange), to specific target genes. HATs may acetylate nucleosomes to counter repressive effects of local chromatin structure or generate targets for bromodomain interactions. HAT complexes could also acetylate other target polypeptides, such as the activators themselves, with important functional consequences. Mediator-type coactivator complexes (lavender) may be directed to select genes by interaction with activators, such as SREBPs [sterol-regulated transcription factor (blue-green)], and to mediate recruitment of RNA polymerase II (green) and possibly, chromatin-directed activities. Other activators, like SP1 (dark blue) may bind to TAF components of TFIID (light red) and serve to recruit this coactivator complexes to nucleate the formation of a pre-initiation complex of general transcription factors (GTFs, blue) and Pol II, which can then proceed to initiate gene transcription.

Activadores y represores de la transcripción eucarionte

Los amplificadores suelen contener múltiples sitios de fijación acumulados para factores de transcripción. La unión cooperativa de múltiples activadores a sitios cercanos forman un complejo multiproteico denominado **amplificosoma**. El ensamblaje de estas estructuras a menudo requiere **proteínas pequeñas, que se unen al surco menor del DNA y curvan mucho la doble hélice para que las proteínas a ambos lados de la curvatura interactúen con más facilidad.**

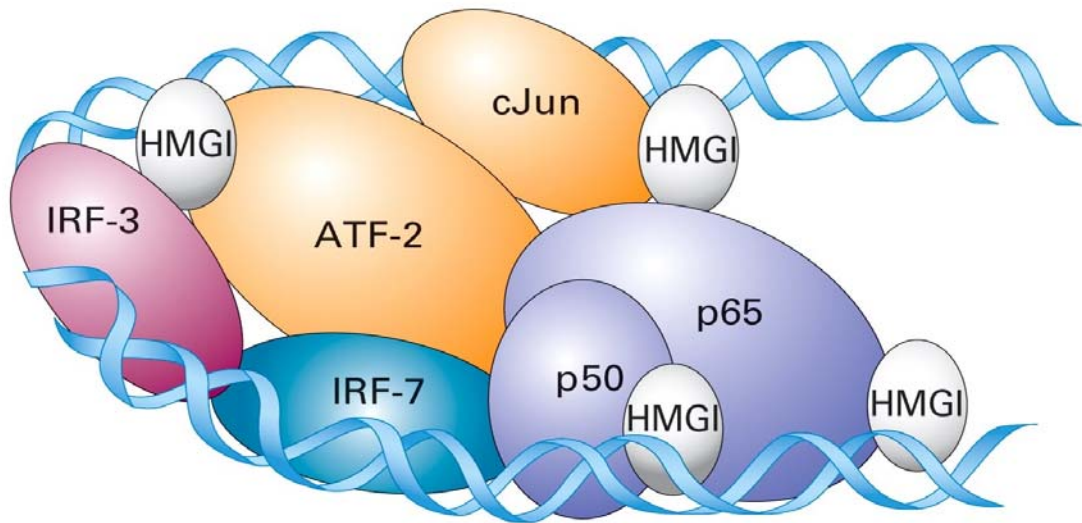
Los activadores suelen ser proteínas modulares que contienen un solo dominio de unión al DNA y uno o más dominios de activación; los diferentes dominios con frecuencia están vinculados a través de regiones polipeptídicas flexibles. Esto permitiría la interacción de dominios de activación de diferentes activadores, incluso cuando sus dominios de fijación al DNA estuviesen separados por decenas de pares de bases.

Los represores eucariontes también son, en su mayoría, proteínas modulares. Al igual que los activadores, suelen contener un solo dominio de fijación al DNA y uno o más dominios de represión, y pueden controlar la transcripción cuando se unen a sitios ubicados de cientos a miles de bp de un sitio de inicio.

Los dominios de fijación al DNA de los factores de transcripción eucariontes presentan una gran variedad de estructuras. Entre los motivos estructurales más comunes están: el homeodominio, la cremallera básica (cremallera de leucina), la hélice-bucle-hélice y varios tipos de dedos de cinc. En general, una alfa hélice (o más de ellas) en un dominio de fijación al DNA interactúa con el surco mayor en su sitio cognado.

La capacidad de algunos factores de transcripción de formar heterodímeros aumenta la cantidad de sitios en el DNA desde los cuales esos factores pueden controlar la transcripción y las maneras en que pueden ser controlados.

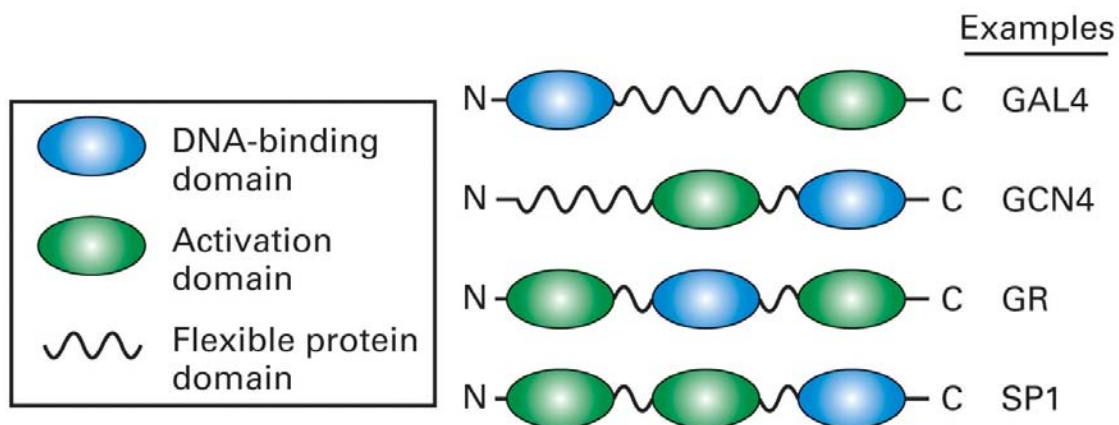
Aunque algunos dominios de activación y de represión son ricos en aminoácidos particulares, en los diferentes factores de transcripción estos dominios funcionales exhiben una gran variedad de secuencias de aminoácidos y estructuras proteicas. **Ejemplo**



Modelo de amplifcosoma (amplificador del interferón β). El heterodímero cJun/ATF-2, IRF-3, IRF-7 y NF- κ B un heterodímero (p50 y p65) se unen a los cuatro elementos de control en el amplificador. La unión cooperativa de estos factores de transcripción es facilitada por HMGI, que se une al surco menor del DNA. Las proteínas cJun, ATF-2, p50 y p65 parecen interactuar de manera directa con un HMGI unido adyacente a ellas. La curvatura de la secuencia amplificadora debida a la unión HMGI es decisiva para la formación de un amplifcosoma. Proteínas curvadoras del DNA diferentes actúan de manera similar en otros amplificadores.

Estructura general de los factores de transcripción

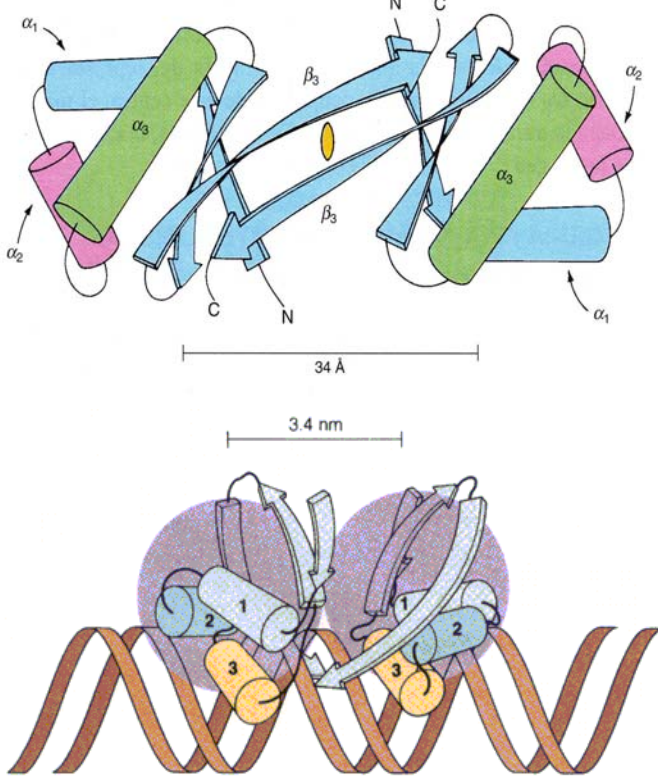
Los factores de transcripción eucariontes contienen diversos motivos estructurales que interactúan con secuencias de DNA específicas.



Estructura modular de los activadores de la transcripción en eucariontes

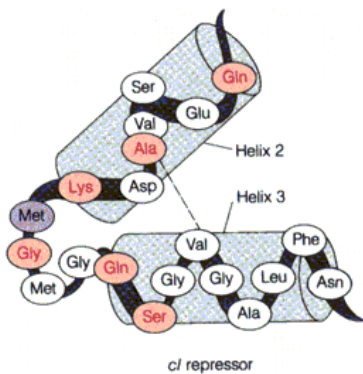
Estos factores de transcripción pueden contener más de un dominio de activación, pero rara vez poseen más de un dominio de fijación al DNA. Gal4 y Gnc4 son activadores de la transcripción en levaduras. El receptor de glucocorticoides (GR), que también contiene un dominio de fijación a la hormona (no ilustrado), activa la transcripción de los genes objetivo en presencia de su ligando. SP1 se une a elementos promotores ricos en GC en una gran cantidad de genes de mamíferos. Los dominios proteicos muy flexibles y relativamente poco estructurados de los activadores presentan gran sensibilidad a la digestión de proteasas.

Hélice-giro-hélice (Cro de λ , el represor cI de λ y CRP)

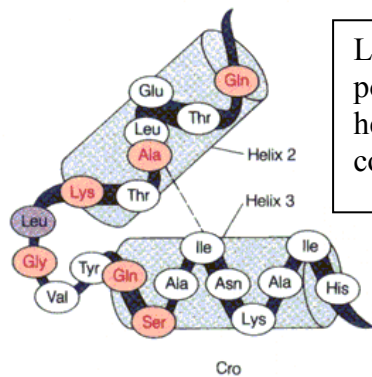


Proteína Cro, dímero formado por subunidades idénticas de 66 residuos de aa, cada una posee tres hélices α y tres hojas β antiparalelas. El dímero se mantiene unido por la asociación de dos hebras β antiparalelas, entre las que se sitúa el eje de simetría binario

La hélice α -3 (hélice de reconocimiento) de una subunidad está alejada 3.4 nm de su homóloga situada en la otra subunidad, la misma distancia que separa dos surcos mayores consecutivos de una doble hélice de Watson y Crick. Una hélice α tiene un diámetro aproximado de 1.2 nm, el tamaño exacto para encajar en el surco mayor del DNA, que mide 1.2 nm de ancho y 0.7 nm de profundidad.

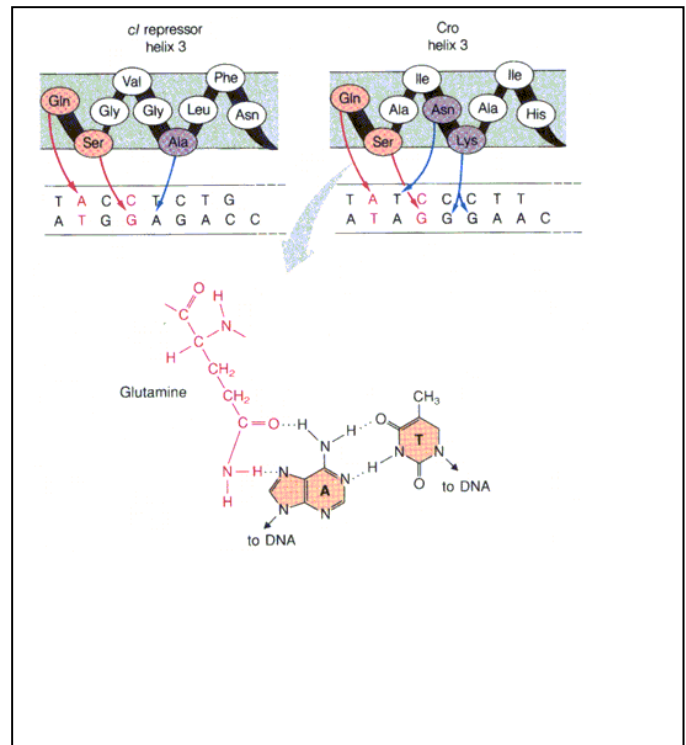


La unión al DNA es un motivo hélice-giro-hélice (HTH). Los residuos del 1 al 7 forman la hélice N-terminal, los residuos del 8 al 11 forman el giro y los residuos del 12 al 20 forman la hélice C-terminal de este módulo repetitivo



Los contactos no polares entre estas hélices estabilizan el conjunto

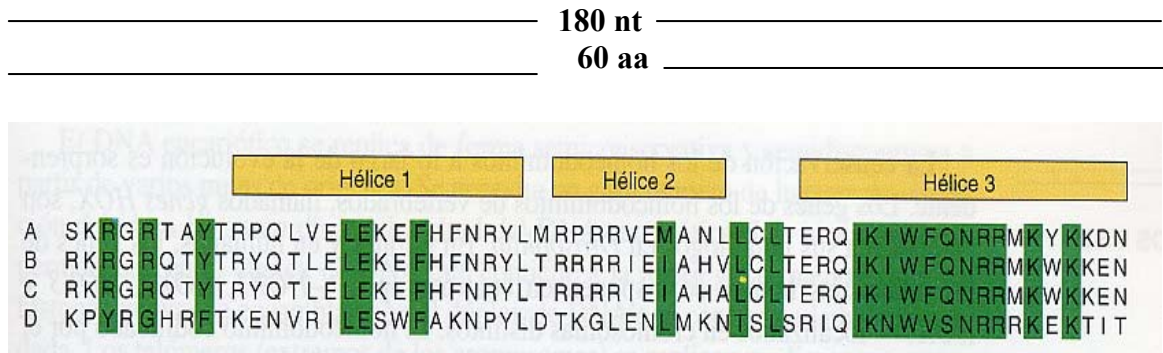
Los residuos de este lado forman puentes de hidrógeno con las bases del surco mayor



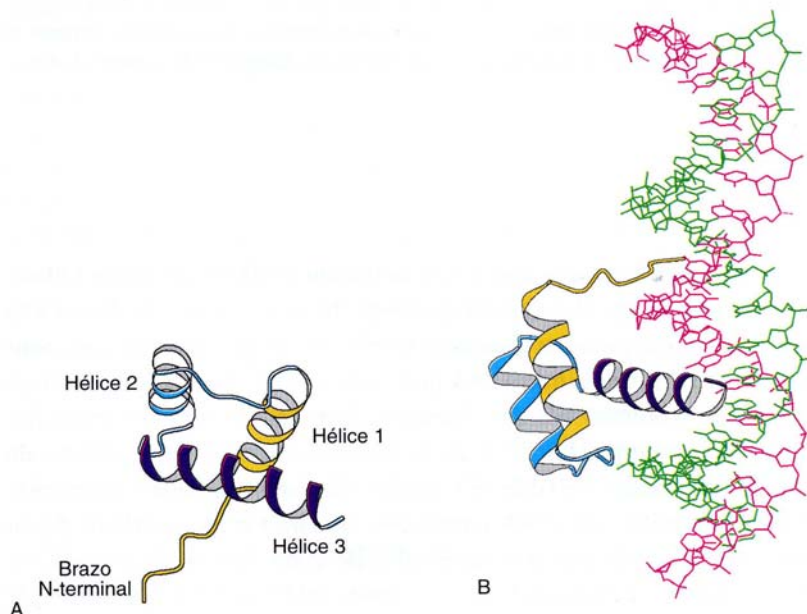
Proteínas de homeodominio

La secuencia homeo es un motivo que aparece en los genes que controlan el desarrollo en insectos y en vertebrados. La secuencia homeo consta de 180 bp y está bastante conservada, codifica el homeodominio de 60 aa con un alto contenido en aa básicos y se unen a secuencias específicas en el DNA

(A) gen MO-10 del ratón; (B) gen MM3 de rana (C) gen Antp de Drosophila (D) gen MA $\alpha 2$ de levadura.



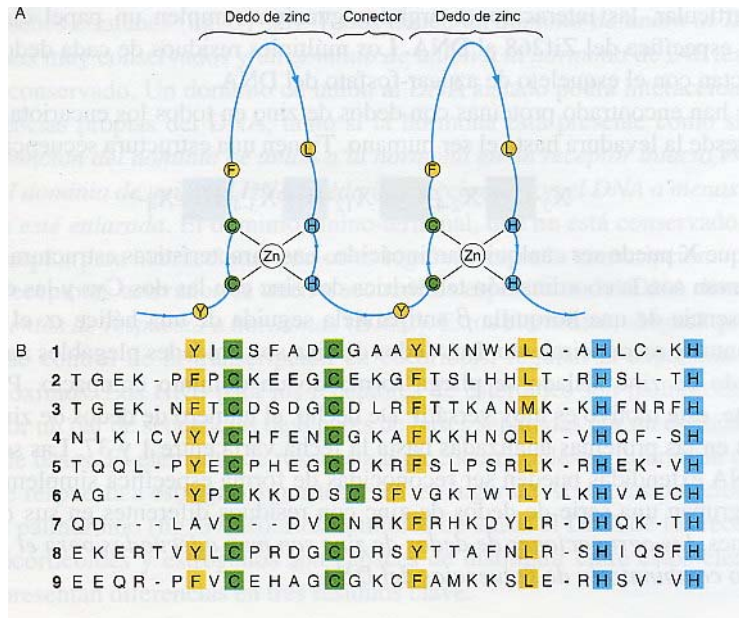
El dominio presenta un brazo amino-terminal extendido y tres alfa hélices. Las hélices 1 y 2 son antiparalelas entre sí, y casi perpendiculares a la hélice 3. La cara hidrofóbica de la hélice 3 se empaqueta frente a las hélices 1 y 2 para formar el interior de la proteína. Los homeodominios se fijan a lugares específicos del DNA en forma de monómeros. El brazo amino-terminal encaja en el surco menor, mientras que la hélice 3 se introduce en el surco mayor. La disposición de las hélices 2 y 3 del homeodominio es parecida a la del motivo hélice-vuelta-hélice (HTH) que aparece en reguladores génicos de procariontas.



(A) Representación lineal del motivo del homeodominio. (B) Muestra la unión de la proteína a un duplex de DNA de 21 pb. La hélice 3 en púrpura del homeodominio ocupa el surco mayor del DNA, mientras que el brazo N-terminal (en amarillo) se une al surco menor.

Dedos de zinc (C₂H₂)

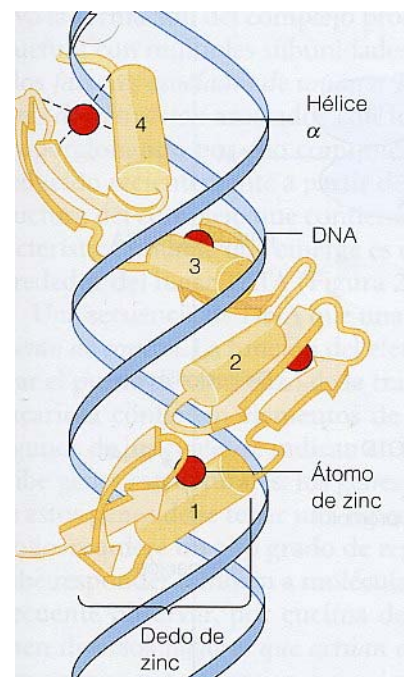
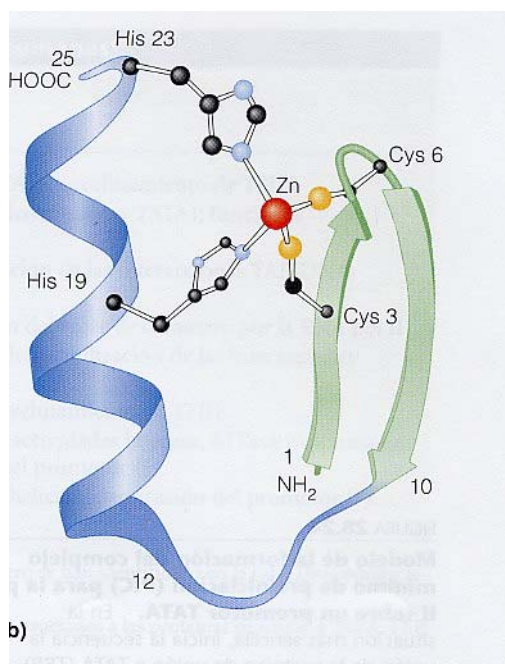
El TF IIIA contiene nueve dominios similares, cada uno de ellos de unos 30 residuos, cada una de estas unidades repetitivas contiene dos cisteínas y dos histidinas en localizaciones idénticas. Estos residuos invariantes están coordinados tetraédricamente con un ión zinc. Además se conservan tres residuos hidrofóbicos



Secuencia consenso : -X₃-Cys-X₂₋₄-Cys-X₁₂-His-X₃₋₄-His-X₄-

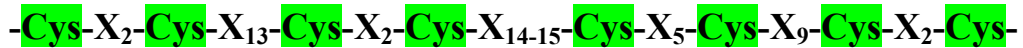
Residuos hidrofóbicos

Una horquilla β antiparalela (residuos 1-10) va seguida por una vuelta y después por una hélice α. El átomo de zinc, que se encuentra encerrado en su interior, estabiliza el módulo debido a que está unido a dos cisteínas de la horquilla β y a dos histidinas de la hélice α.

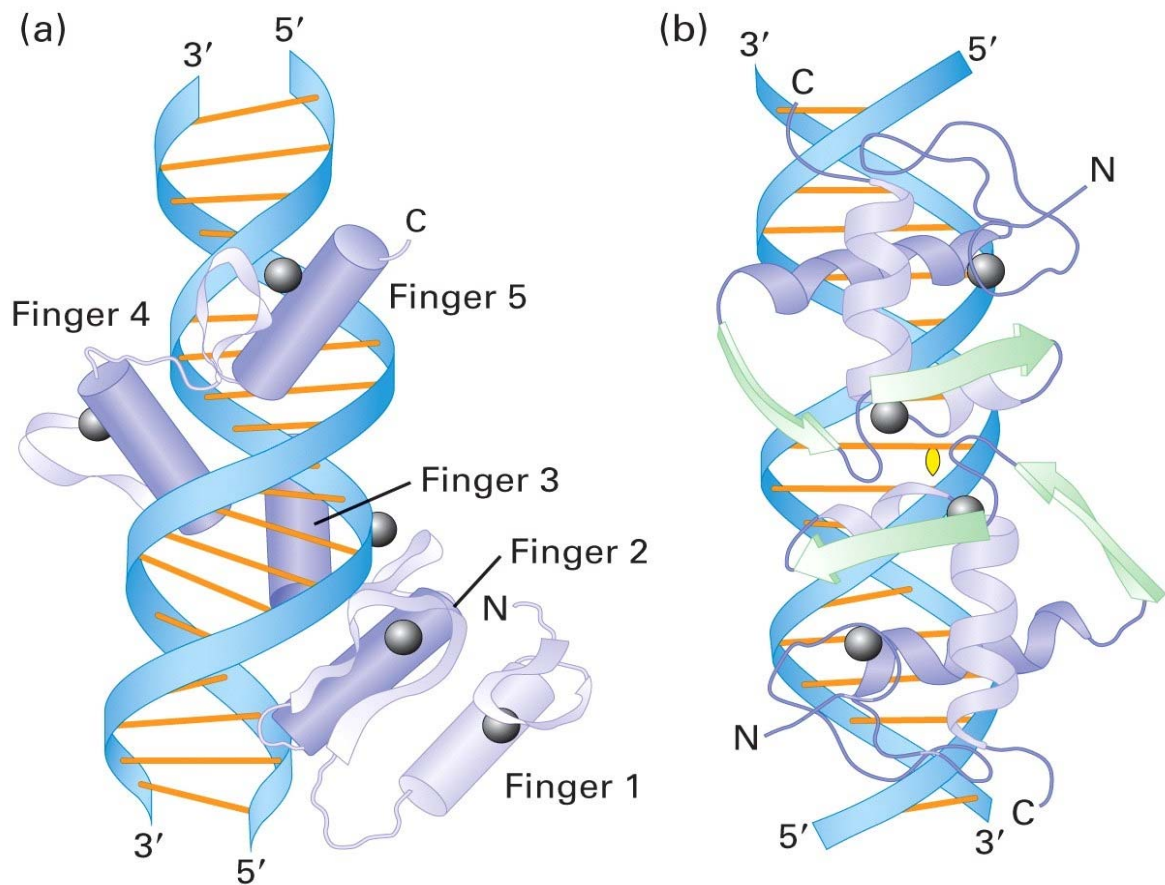


Dedos de Zinc C₄

Los dedos C₄ se descubrieron en los receptores nucleares. El dominio de fijación al DNA de estas proteínas posee la secuencia consenso:



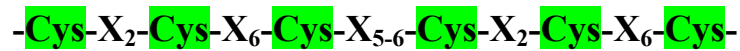
Cada uno de los dos grupos de cuatro cisteínas fija un ión zinc. A diferencia de las C₂H₂ que contienen tres o más dedos y se fijan al DNA como monómeros, éste grupo suelen contener sólo **dos dedos** y se fijan como **homodímeros** o **heterodímeros**. Los **homodímeros** suelen tener **simetría rotacional doble**.



a) La proteína GL1 con cinco dedos C₂H₂, esta proteína monomérica es codificada por un gen que está amplificado en varios tumores humanos. El dedo 1 no interactúa con el DNA, mientras que los otros cuatro dedos sí lo hacen. Los pequeños círculos negros representan átomos de Zn²⁺. b) el receptor de glucocorticoides, una proteína C₄ homodimérica. Dos hélices α (más oscuras), una en cada monómero, interactúan con el DNA. Como todos los homodímeros con dedos de Zn²⁺ C₄, este factor de transcripción posee una simetría rotacional doble; el centro de simetría está señalado por la elipse amarilla. Las esferas grises indican iones de Zn²⁺.

Dedo de zinc C₆

La proteína Gal 4 de levadura es un tercer tipo de motivo en dedo de cinc. Las proteínas de esta clase poseen la secuencia consenso:



Las seis cisteínas fijan 2 iones Zn^{2+} , con lo que la región se pliega en un dominio globular compacto. La proteína Gal 4 se fija al DNA en forma de un homodímero, en el cual los monómeros se asocian a través de interacciones hidrofóbicas a lo largo de una cara de sus regiones alfa helicoidales, para formar una estructura superhelicoidal .

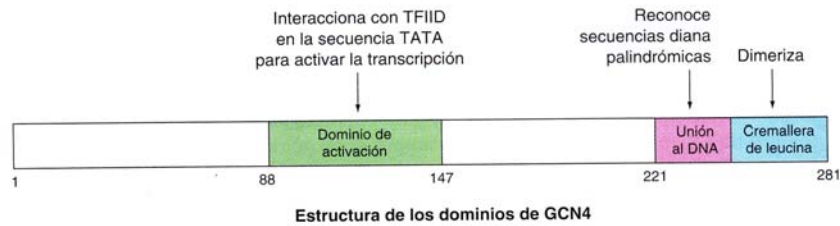


Modelo tridimensional de la interacción entre la Gal 4 y el DNA.

Esta proteína se fija al DNA como un homodímero en donde los monómeros interactúan para formar una hélice enrollada que se ubica perpendicular a la doble hélice del DNA. La unión de residuos de cisterna a dos iones Zn^{2+} (en amarillo) en cada monómero forma dos dominios globulares que interactúan con el DNA.

Las proteínas con cremallera de leucina

- Presencia de segmentos con una longitud de aproximadamente 35 residuos en los que la leucina aparece cada 7 residuos. Esta regularidad sugiere que forman un alfa-helicoide enrollado (superenrollamiento). Además, hay una región básica de unos 30 residuos hacia el extremo amino terminal. Esta región actúa como un módulo de unión al DNA.
- La función de la región de cremallera de leucina es la de acercar una pareja de módulos de unión al DNA para que se unan a dos secuencias de DNA adyacentes.
- Las cremalleras de leucina pueden formar homodímeros o heterodímeros.

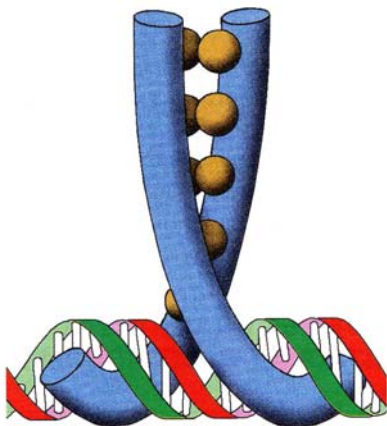


Source	Regulatory protein	Amino acid sequence		
		DNA-binding region	6-Amino acid connector	Leucine zipper
Mammal	C/EBP	DKNSNEYRVRREERNIAVRKSRDKAKQRNVETQQKVLELTSDNDR	L	LKRVEQLSRELDTLRG-
	Jun	SQERIKAEKRMRNRIAASKCRKRLERLARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLTEQVAQLKQ-	L	L
	Fos	EERRRIRRI RREERNKMAAAKCRNRRELDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEF-	L	L
Yeast	GCN4	PESSDPAALKRARNTAAARRSRARKLQRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGER	L	L
Consensus molecule		RR R N	R R RR	L L L L L
		KK K	K R KK	

(a)

K leucina
R arginina
L leucina

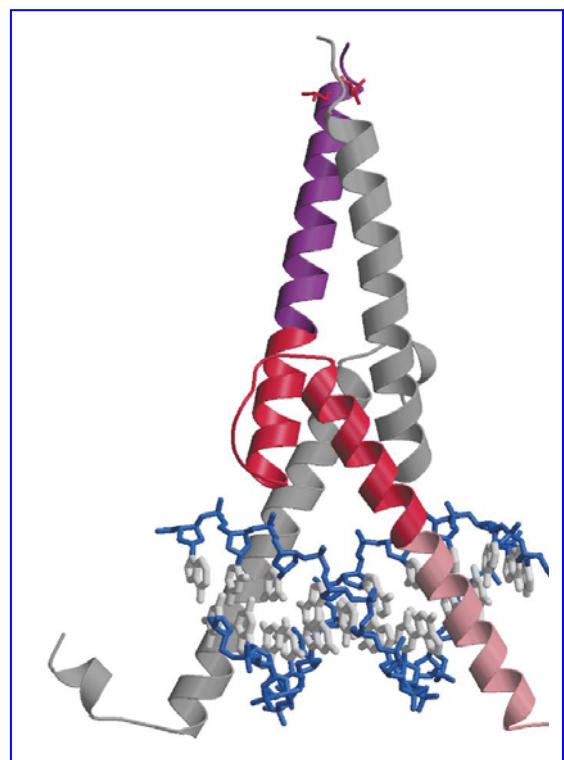
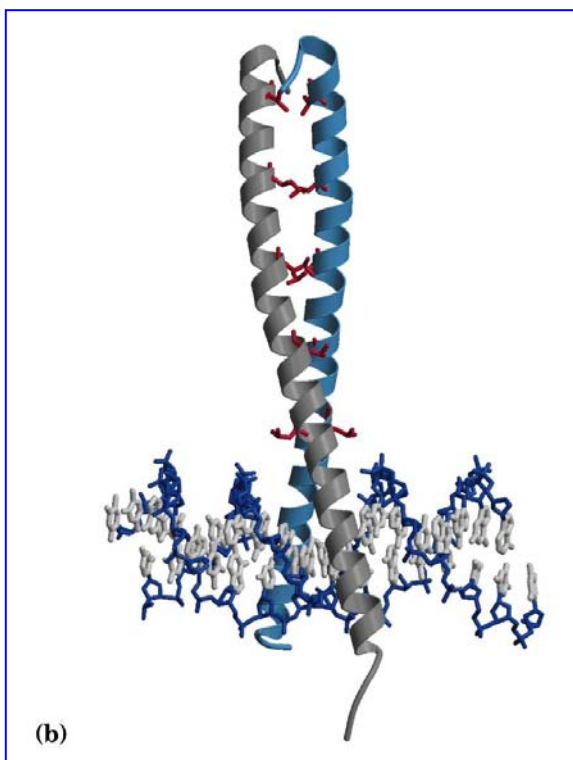
Invariant Asn



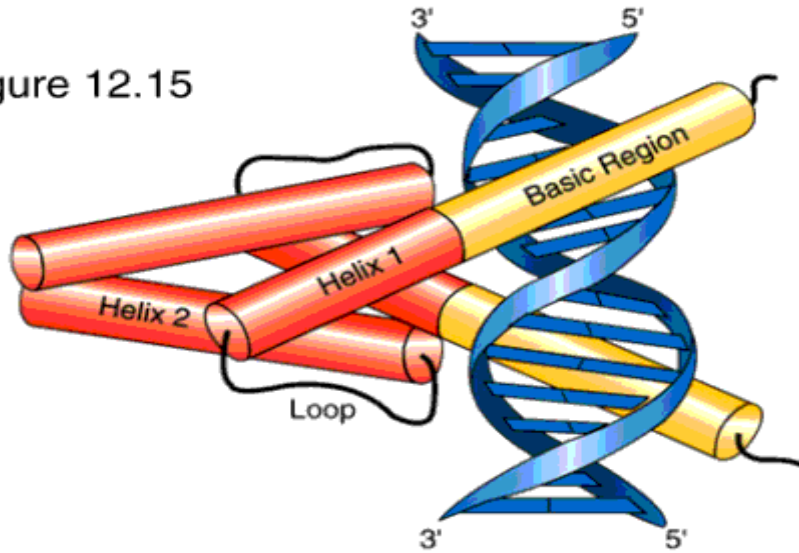
Modelo propuesto para la unión de una proteína con cremallera de leucina a una secuencia diana palindrómica del DNA. La cremallera está estabilizada por interacciones hidrofóbicas y de van der Waals entre leucinas.

Hélice-lazo-hélice

El dominio de fijación al DNA de otra clase de factores de transcripción diméricos contiene un motivo estructural muy similar al de cremallera básica, excepto que un bucle no helicoidal de la cadena polipeptídica separa dos regiones α -helicoidales en cada monómero, llamado hélice-lazo-hélice (HLH). Estas proteínas contienen una hélice α N-terminal con residuos básicos que interactúan con el DNA, una región intermedia en bucle y una región C-terminal con aminoácidos hidrófobos espaciados a intervalos característicos de una α -hélice antipática. Debido a los aminoácidos básicos característicos de este motivo, los factores de transcripción que lo contienen a veces se denominan proteínas con hélice-bucle-hélice básicas (bHLH). Como ocurre con las proteínas de cremallera básica, las diferentes proteínas con hélice-lazo-hélice pueden formar heterodímeros.



(b)
Figure 12.15



Homodimers vs. Heterodimers Dimerization and Generation of DNA Binding Motifs

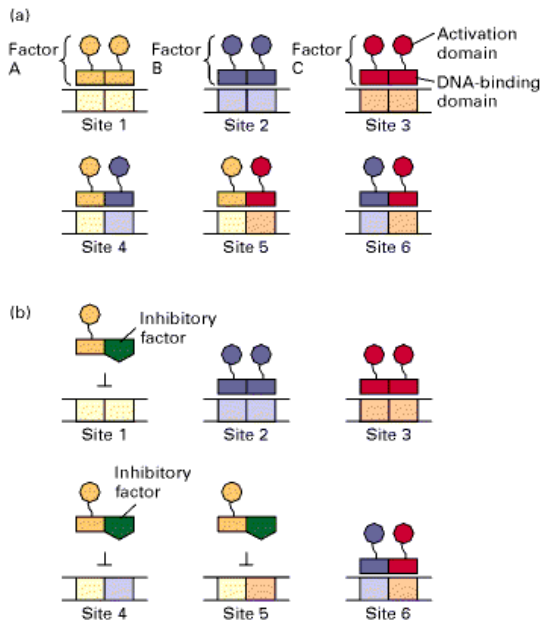


Figure 10-45. Combinatorial possibilities due to formation of heterodimeric transcription factors. (a) In the hypothetical example shown, transcription factors A, B, and C can each interact with each other, permitting the three factors to bind to six different DNA sequences (sites 1–6) and creating six combinations of activation domains. (Note that each binding site is divided into two half-sites, and that a single heterodimeric factor contains the activation domains of each of its constituent monomers.) Four different factor monomers could combine to make 10 homo- and heterodimeric factors; five monomers could make 15 dimeric factors; and so forth. (b) When an inhibitory factor (green) is expressed that interacts only with factor A, binding to sites 1, 4, and 5 is inhibited, but binding to sites 2, 3, and 6 is unaffected.

© 2000 by W. H. Freeman and Company. All rights reserved.

Activation domains for pol II factors

- **"Acid Blob" or Acidic domains**
 - Acidic activators that have preponderance of negatively charged residues
 - This general structure may allow a wide variety of sequences to have activator function
 - Recent data suggest that although many different sequences do work that not all sequences of equivalent charge will activate and thus there is some restriction on range of potential structures
 - Ex. Gal4 and VP16
- **Glutamine Rich**
 - Ex. Sp1 binds Sp1 box (GGGCGG)-- two glutamine-rich domains essential for activation
- **Proline Rich**
 - CTF/NF1 binds CCAAT box -- 25% of residues are prolines
 - Ex. AP2 and jun

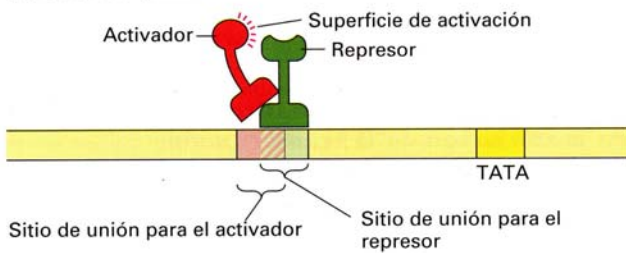
Mecanismos de acción de los represores

-Indirecta, modificando el estado de la cromatina (desacetilación de histonas)

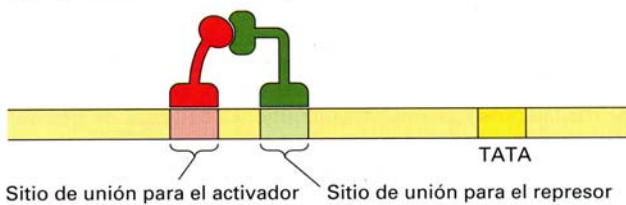
-Directa:

- competitividad con el sitio de fijación del activador
- competitividad por el sitio de fijación de los factores generales de transcripción de los activadores (en el esquema C)
- interactúan directamente con el dominio de activación de los activadores bloqueándolos.

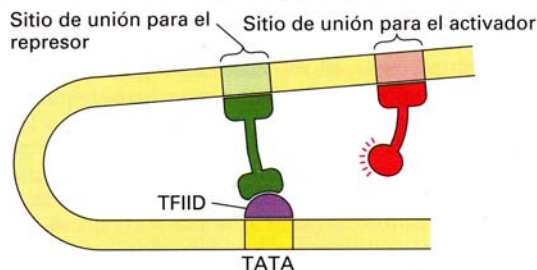
(a) Unión competitiva con activador



(b) Interacción con el dominio de activación del activador unido

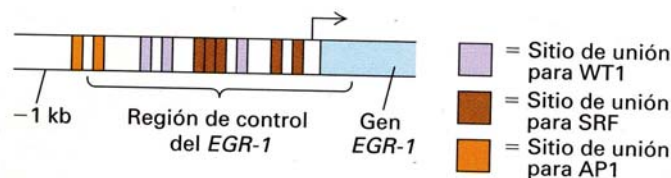


(c) Interacción con factores de transcripción generales



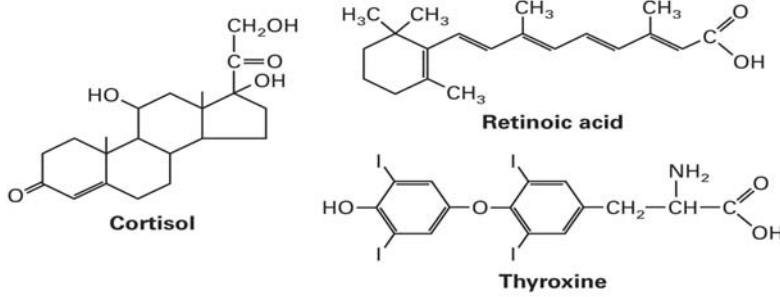
Algunos represores eucariontes pueden inhibir la transcripción por mecanismos diferentes a la desacetilación de histonas. En los tres mecanismos, el represor inhibe la activación o interfiere directamente la formación del complejo de iniciación. Además algunos represores interactúan con proteínas “correpresoras”, que a su vez interactúan con factores de transcripción generales.

Ejemplo:

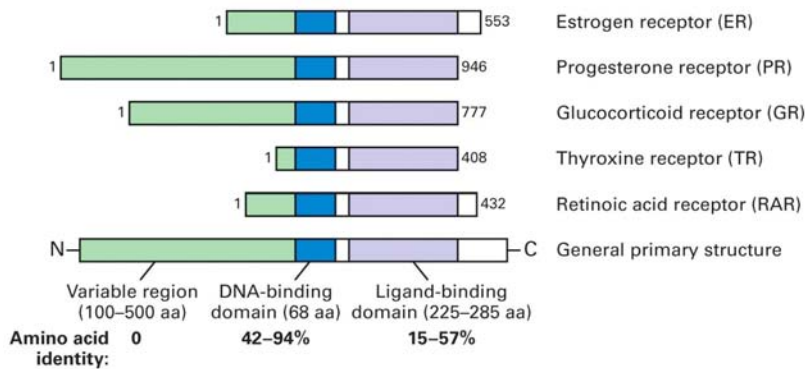


Región de control del gen codificador de EGR-1, un activador de la transcripción. Los sitios de unión para la WT1, una proteína represora eucarionte, no se superponen con los sitios de unión para SRF y AP1, dos activadores ubicuos, ni con el sitio de inicio. Por tanto, la represión por la WT1 no interfiere en la unión de otras proteínas.

Receptores nucleares



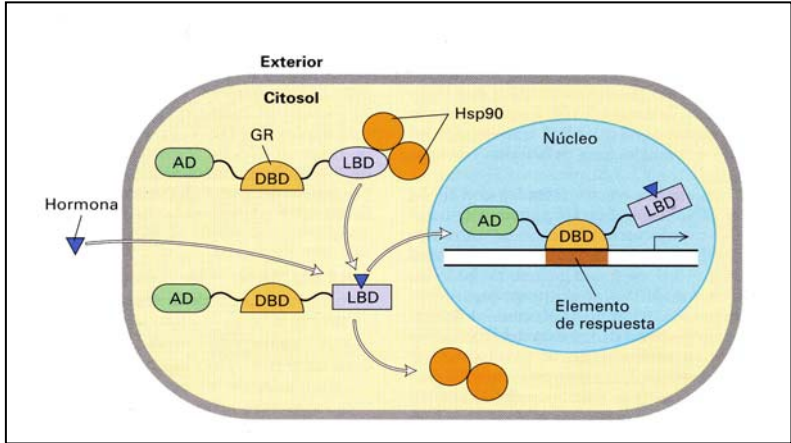
Hormonas liposolubles que se unen a los miembros de la superfamilia de receptores nucleares de los factores de transcripción.



Modelo general de los factores de transcripción en la superfamilia de los receptores nucleares.

- (a) **GRE**
 5' AGAACA(N)₃ TGTTCT 3'
 3' TCTTGT(N)₃ ACAAGA 5'
- (b) **ERE**
 5' AGGTCA(N)₃ TGACCT 3'
 3' TCCAGT(N)₃ ACTGGA 5'
- (c) **VDRE**
 5' AGGTCA(N)₃ AGGTCA 3'
 3' TCCAGT(N)₃ TCCAGT 5'
- (d) **TRE**
 5' AGGTCA(N)₄ AGGTCA 3'
 3' TCCAGT(N)₄ TCCAGT 5'
- (e) **RARE**
 5' AGGTCA(N)₅ AGGTCA 3'
 3' TCCAGT(N)₅ TCCAGT 5'

Secuencias consenso de los sitios del DNA, llamados "elementos de respuesta", que fijan el receptor de glucocorticoides (GRE), el receptor de estrógenos (ERE), el receptor de la vitamina D₃ (VDRE), el receptor de hormona tiroidea (TRE) y el receptor de ac. retinoico (RARE).



Los activadores estimulan el ensamblaje altamente cooperativo de los complejos de iniciación.

A) **HNF1** : con caja homeótica, específica del hepatocito

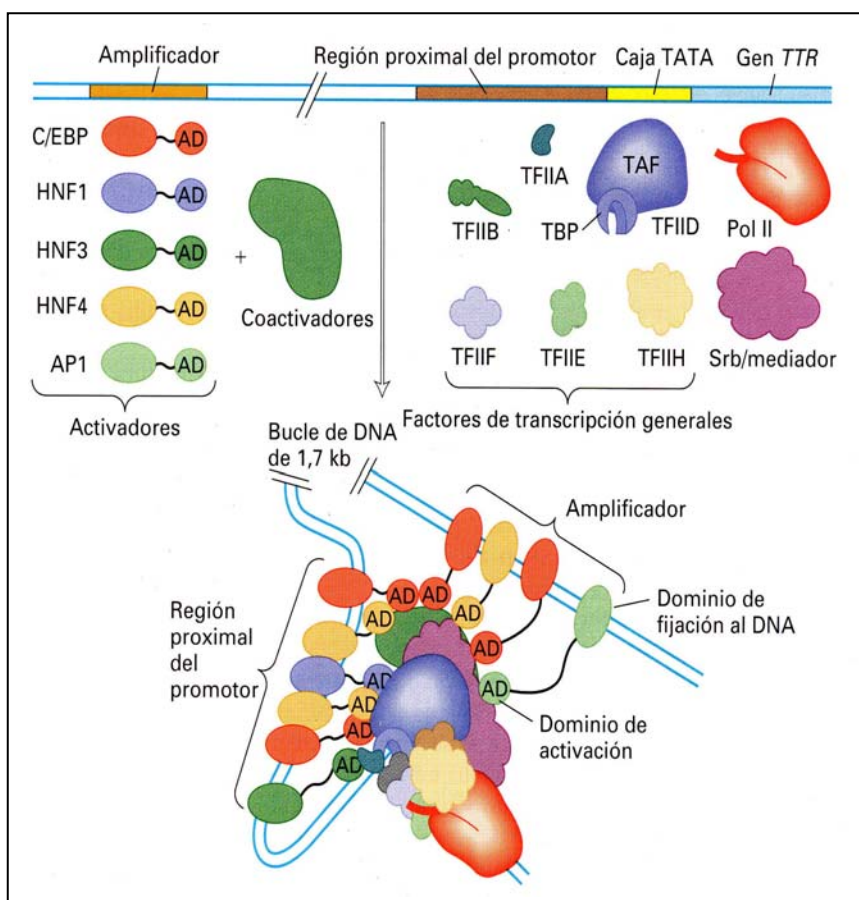
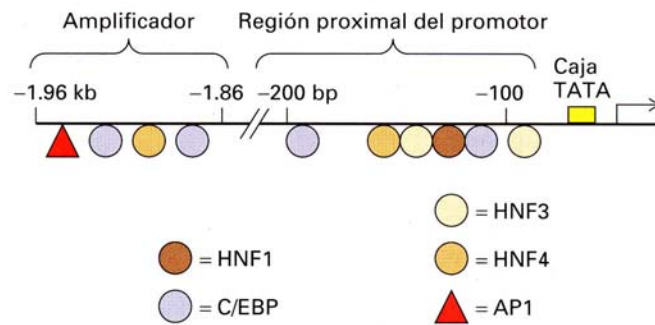
B) **HNF3** : con hélice alada, específica del hepatocito

C) **HNF4** : receptor nuclear se encuentra además, en epitelio intestinal y células de los túbulos renales

D) **C/EBP**: heterodímero con cremallera básica, además está en intestino, adipocitos y neuronas

E) **AP1**: familia de proteínas pequeñas con cremallera básica, heterodiméricas de expresión general

Activadores que controlan la transcripción del gen de la transtirretina (TTR)



Modelo del armado cooperativo de un complejo de iniciación de la transcripción activado en el promotor *TTR* de los hepatocitos.

Cuatro activadores enriquecidos en los hepatocitos más el ubicuo factor AP1 se unen a sitios en la región proximal del promotor y el amplificador con especificidad hepatocítica del gen *TTR*. Los dominios de activación de los activadores fijados interactúan ampliamente con coactivadores, subunidades TAF del TFIID, proteínas SrB/mediador y factores de transcripción generales, lo que trae como consecuencia la aparición de un bucle en el DNA y la formación de un complejo de iniciación activado estable. Con motivo de la índole altamente cooperativa del armado del complejo, en las células epiteliales intestinales, que contienen sólo dos de los cuatro factores de transcripción enriquecidos en los hepatocitos, no se forma un complejo de iniciación a la altura del promotor *TTR*. Muchos de los factores de transcripción generales, las proteínas SrB/mediador y la RNA polimerasa II (Pol II) pueden ser prearmados en un complejo holoenzimático.

Procesamiento del mRNA eucarionte.

Los precursores del mRNA eucarionte se procesan por adición de un capuchón 5', escisión y poliadenilación 3', y empalme del RNA para eliminar los intrones, antes de ser transportados al citoplasma en donde son traducidos por los ribosomas.

El capuchón es añadido al extremo 5' de un transcrito naciente de un pre-mRNA, por una enzima que se asocia con el CTD fosforilado de la RNA polimerasa II, poco después de iniciada la transcripción.

En la mayoría de los genes codificadores de proteínas hay una señal de poliadenilación (AAUAAA) conservada que está 10-30 nucleótidos hacia 5' de un sitio poli(A), en donde se produce el corte y la poliadenilación. Una secuencia rica en GU o en U, hacia 3' del sitio poli(A), contribuye a la eficacia de la escisión /poliadenilación.

Un complejo multiproteico que incluye la poli(A) polimerasa (PAP) realiza el corte y la poliadenilación de un pre-mRNA. Una proteína nuclear fijadora de poli(A), la PAB II, estimula la adición de residuos de A por la PAP y detiene el proceso una vez que la cola de poli(A) alcanza los 200-250 residuos.

Los transcritos de pre-mRNA nacientes se asocian con una clase de proteínas fijadoras de RNA abundantes llamadas proteínas hnRNP.

El empalme de RNA esta a cargo de un complejo ribonucleoproteico muy grande, el espliceosoma, que se arma mediante las interacciones que cinco partículas de snRNP diferentes establecen entre si y con el pre-mRNA. El espliceosoma cataliza dos reacciones de transesterificación que ligan los exones y eliminan el intrón en estructura de lazo que luego se degrada.

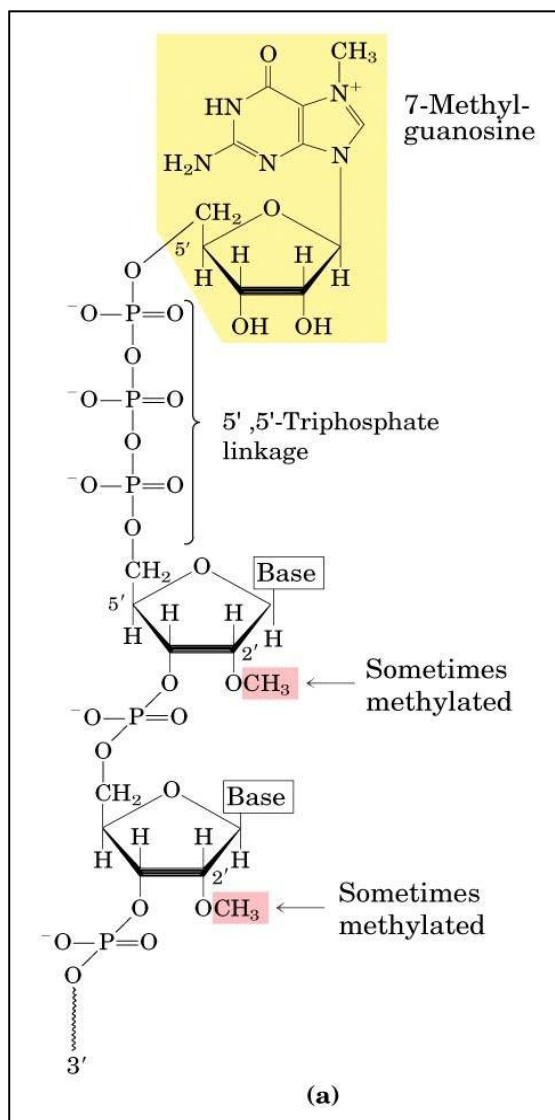
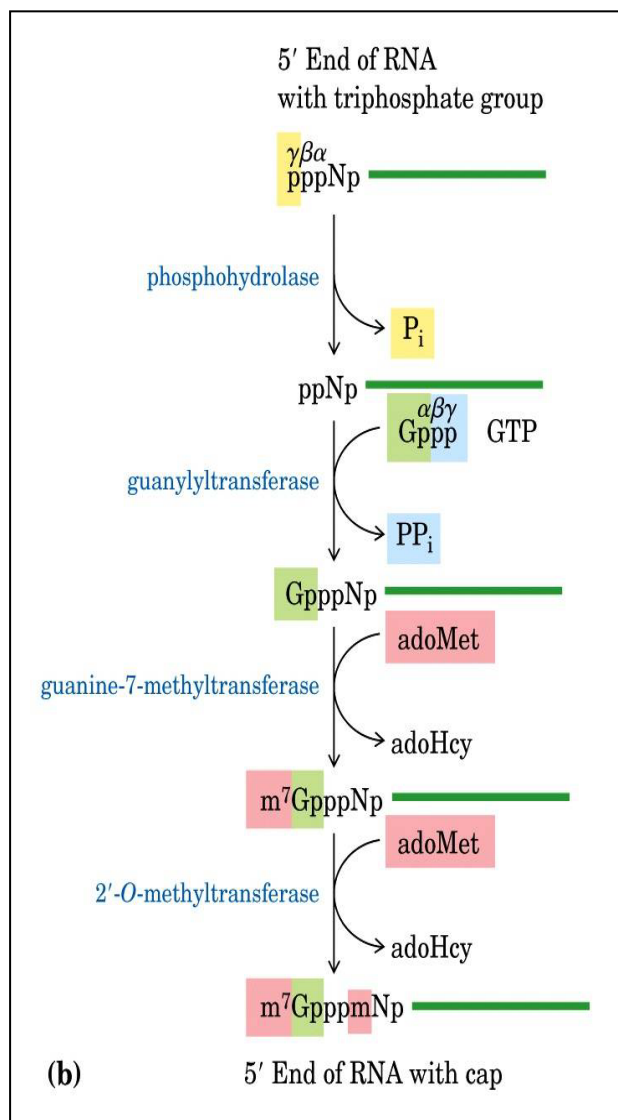
En la eliminación de los intrones son importantes dos características: a) las moléculas de RNA de los snRNP juegan un papel clave en la dirección del alineamiento de los centros de empalme y en la catálisis y b) las proteínas dependientes de ATP desenrollan los RNA duplex intermediarios e inducen la liberación de las ribonucleoproteínas de los precursores de mRNA y de los productos.

La mayor parte de la transcripción y del procesamiento del RNA en el núcleo de una célula de mamífero tiene lugar en una cantidad limitada de regiones. A través de todo el núcleo hay una matriz o almacén nuclear formada por una red de proteínas fibrosas: esta matriz nuclear contribuiría a organizar los focos de transcripción y procesamiento del RNA.

Los precursores de los mRNA adquieren la estructura cap 5' durante la transcripción

Las funciones de la caperuza son:

- La protección de la molécula frente a exonucleasas
- Marcar al hnRNA como sustrato de otras reacciones de procesamiento en el núcleo
- Marcar el final de la iniciación para comenzar la elongación de la transcripción
- Señalar el mRNA como traducible
- Ayudar a eliminar el primer intrón.



(a) La 7- metilguanosina se une al extremo 5' de casi todos los mRNA eucarióticos con un enlace poco usual 5'-5'-trifosfato. Hay tres tipos de caperuzas:

Tipo 0: se produce por metilación en el N-7 de la guanosina terminal. Se encuentra en todos los mRNA eucariotas.

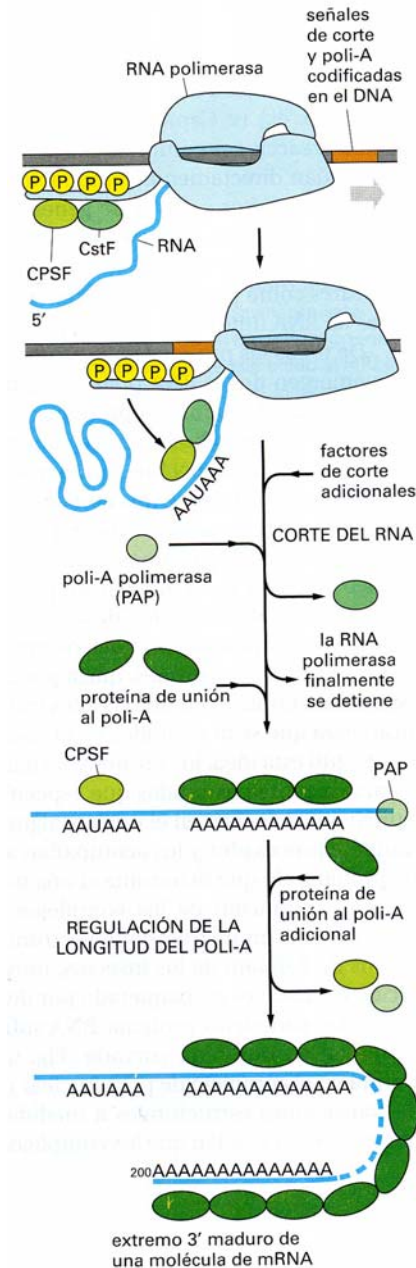
Tipo 1: metilación de una caperuza tipo 0 en el 2'-OH del primer nucleótido del hnRNA. No están en levaduras por carecer de esta enzima.

Tipo 2: se metila una caperuza tipo 1 en el 2'OH de la ribosa siguiente. Es habitual encontrarla en los snRNA, y sólo se suele encontrar en vertebrados. (b) La formación de la caperuza en 5' precisa de cuatro a cinco pasos diferentes.

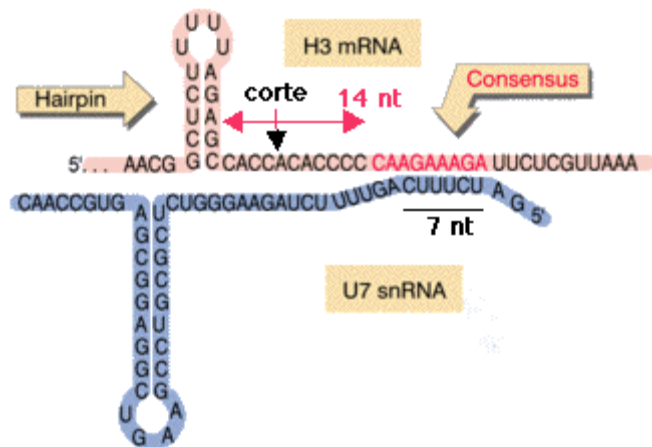
Poliadenilación

Aunque la poliadenilación del mRNA se descubrió en 1970, su función todavía no está clara:

- Parece intervenir en el transporte del mRNA al citoplasma;
- Parece determinar la duración de la vida media del mRNA;
- Interviene en la correcta o eficiente traducción del mRNA;
- Parece ser la señal que indica qué hnRNA van a madurar y cuáles no;
- Parece ser esencial para la eliminación del último intrón.



Modificación 3': Terminación de histonas



El mRNA de las histonas no se poliadenila sino que termina en una posición determinada definida por el snRNA U7 que forma parte de la snRNP U7. El corte del mRNA lo establece y produce la propia snRNP U7 gracias a que se aparean 9 nt entre el mRNA y el snRNA U7 unos 14-17 nt después de la horquilla. A unos 5 nt de la horquilla se produce el corte que liberará el mRNA maduro.

Algunos de los pasos principales del proceso de generación del extremo 3' de un mRNA eucariota. Este proceso es mucho más complejo que su equivalente en bacterias, en el que la RNA polimerasa se detiene al llegar a una señal de terminación y libera tanto el extremo 3' de su transcrito como el molde de DNA.

La mayoría de los pre-mRNA son escindidos en sitios 3' específicos y poliadenilados

CPSF : Cleavage and polyadenylation specificity factor

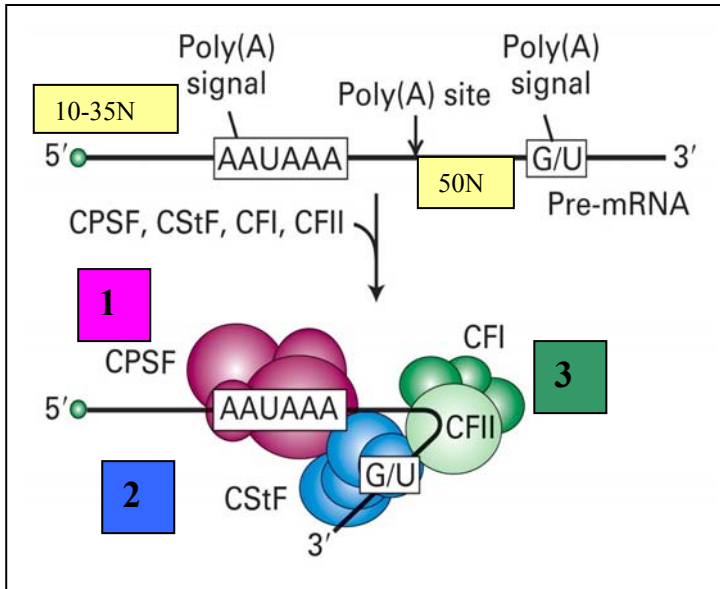
CStF : Cleavage stimulatory factor

CFI : Cleavage factor I

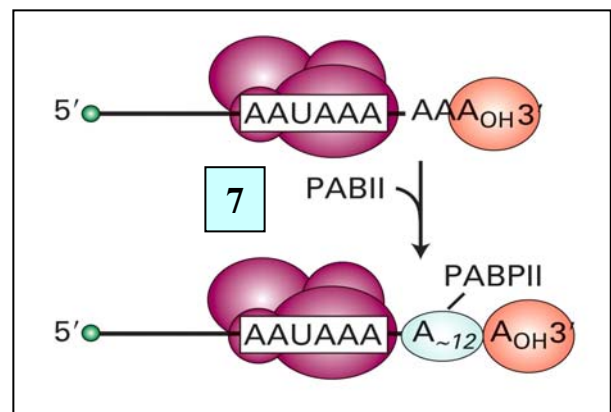
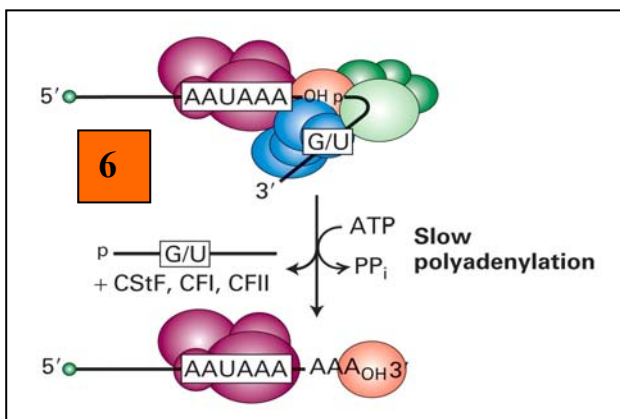
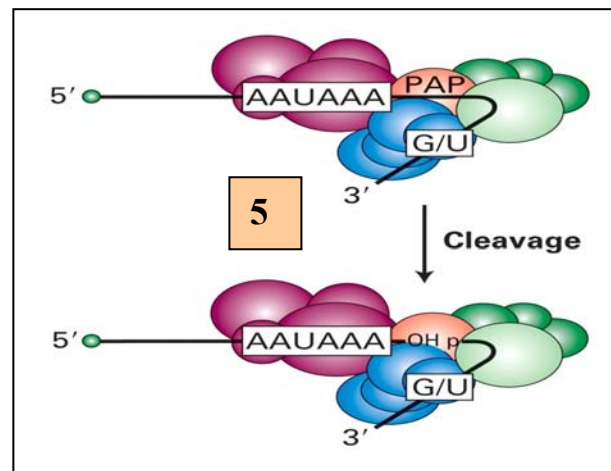
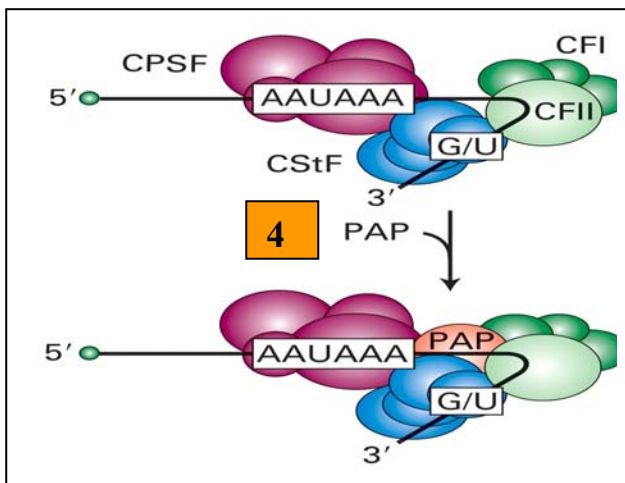
CFII : Cleavage factor II

PAP : Poli (A) polimerasa

PABII: Proteína de fijación a poli (A)

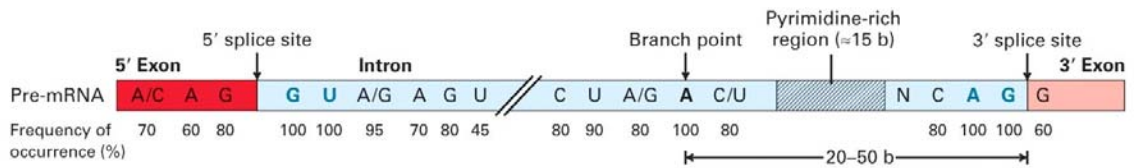


- 1 CPSF, Heterotetrámero señal de poli(A)
- 2 CStF, Heterotrímero G/U
- 3 CFI, Heterotrímero CPSF-RNA-CStF
- 3 CFII, Monómero CPSF-RNA-CStF
- 4 PAP, Poli(A) polimerasa
- 7 PABII Proteína fijadora de poli(A), la fase rápida requiere la fijación de múltiples copias de PABII.

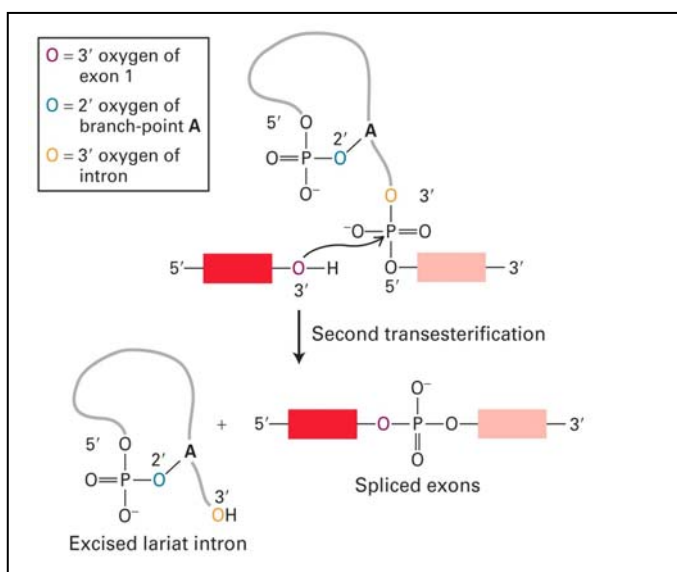
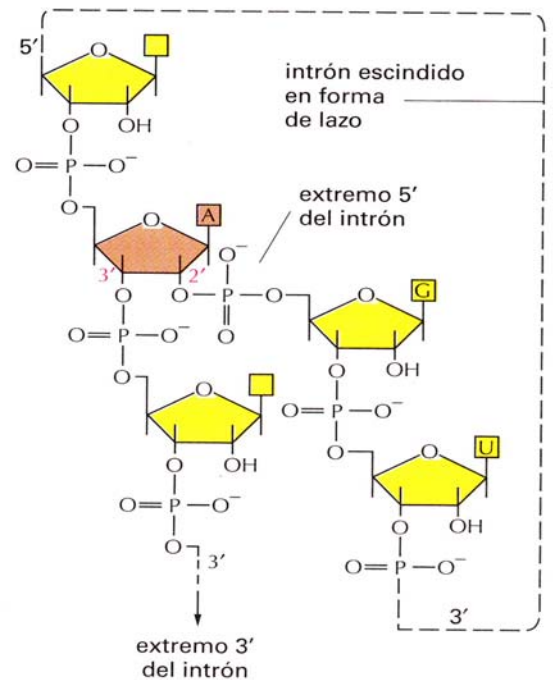
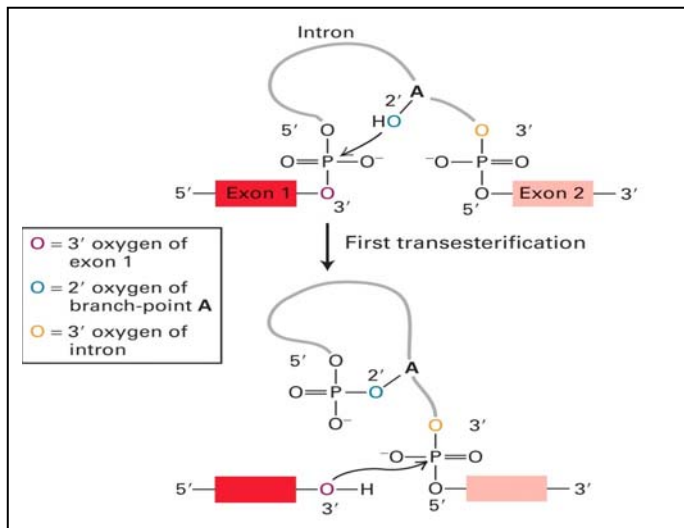


Eliminación de intrones

Los puntos de empalme de los precursores de mRNA se especifican mediante secuencias situadas en los extremos de los intrones y la fusión de los exones se realiza mediante dos reacciones de transesterificación.



Secuencias consenso alrededor de los sitios de empalme 5' y 3' en los pre-mRNA de vertebrados. Las únicas bases casi invariables son las GU (5') y AG (3') del intrón. En la mayoría de los casos se encuentra una región rica en pirimidinas cerca del extremo 3' del intrón. La adenosina del punto de ramificación, también invariable, suele estar a 20-50 bases del sitio de empalme 3'. La región central del intrón cuya longitud oscila entre 40 bases y 50 kilobases, en general no es necesaria para que el empalme tenga lugar.



Procesamiento de los snRNA de tipo U

Estos RNAs los transcribe la RNA-polimerasa II, excepto el U6 que lo transcribe la III. Se expresan en todas las células eucarióticas, y sus genes suelen estar repetidos en tándem. No están poliadenilados, pero sí tienen caperuza. Necesitan salir al citoplasma para que se eliminen de 2 a 12 nucleótidos en el extremo 3' para madurar, y luego han de volver a entrar en el núcleo para cumplir su función.

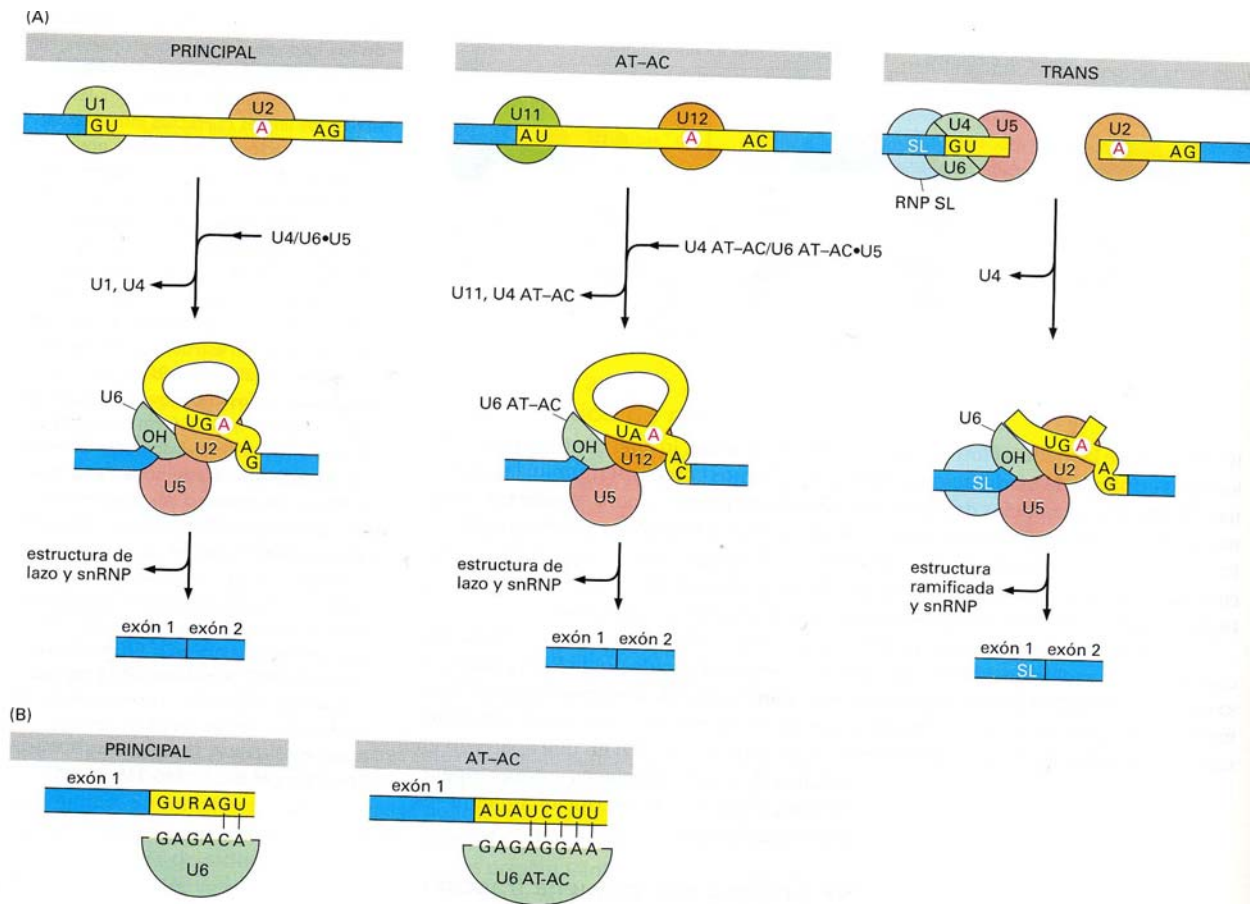
Tipos

U1, U2, U4, U5 y U6 son los más abundantes (más de 20.000 copias por núcleo) e intervienen en el ajuste
U3 interviene en la terminación de los rRNA

U7 interviene en la terminación de las histonas

U11 (snoRNA) interviene en la poliadenilación y a veces en el ajuste, sustituyendo a U1

U12 (snoRNA) también intervienen en el ajuste sustituyendo a U2.

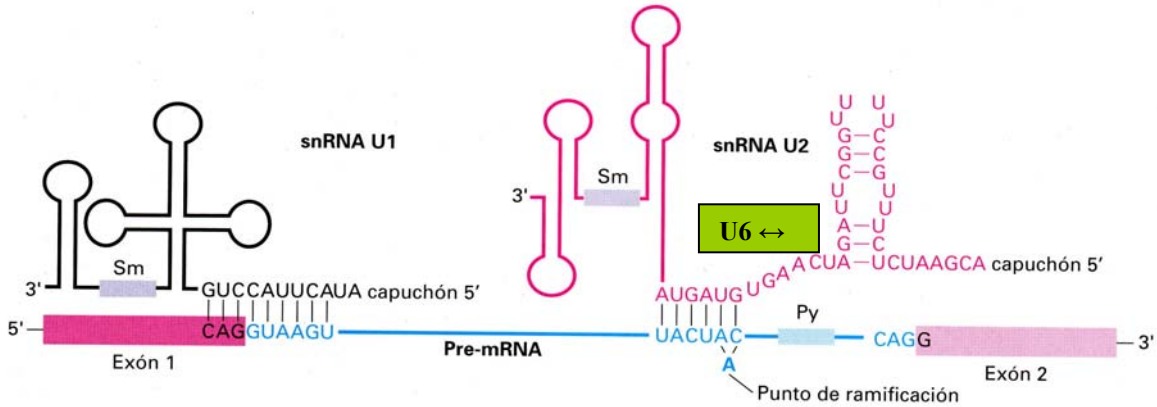


Esquema de los mecanismos utilizados en los tres tipos de maduración del RNA. (A) Tres tipos de espliceosomas. El espliceosoma principal (izquierda), el espliceosoma AT-AC (centro) y el transespliceosoma (derecha) se representan en dos estados diferentes de ensamblaje. La SnRNP U5 es el único componente común de los tres espliceosomas. Los intrones eliminados por el espliceosoma AT-AC tienen una secuencia consenso de maduración diferentes a las de los intrones eliminados por el espliceosoma principal. En los seres humanos, se estima que el 0.1% de los intrones es eliminado por el espliceosoma AT-AC. En la transmaduración, una parte del SnRNA SL se convierte en el primer exón del mRNA maduro, por lo que snRNP SL acaba siendo consumida durante la reacción. (B) Tanto la snRNP U6 principal como la snRNP U6 AT-AC reconocen el sitio 5' de maduración, pero lo hacen mediante apareamientos de bases diferentes. Las secuencias representadas corresponden al humano.

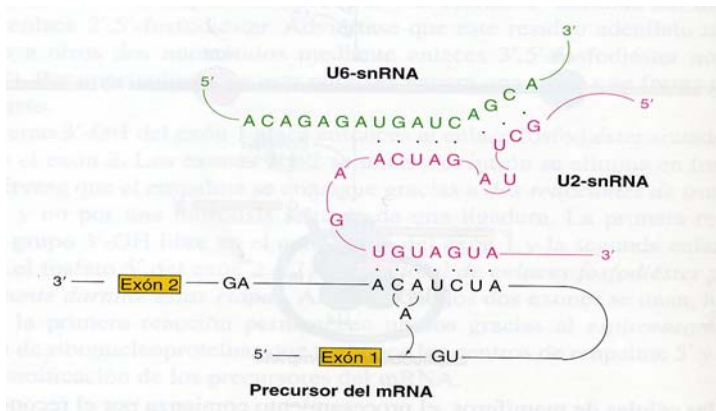
Los RNAs nucleares pequeños (SnRNAs) de los espliceosomas catalizan el empalme de los precursores del mRNA.

Pequeñas partículas de ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) implicadas en el procesamiento de los precursores de mRNA

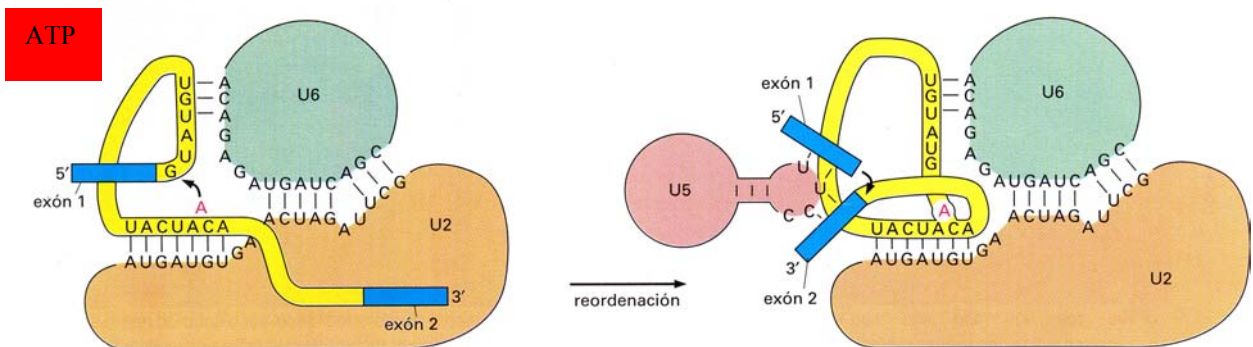
snRNP	Tamaño de snRNA (nucleótidos)	Función
U1	165	Se une al centro de empalme 5' y después al centro de empalme 3'
U2	185	Se une al centro de ramificación y forma parte del centro catalítico
U5	116	Se une al centro de empalme 5'
U4	145	Enmascara la actividad catalítica de U6
U6	106	Cataliza el empalme



Interacciones entre pre-mRNA, snRNA U1 y snRNA U2 al comienzo del proceso de empalme. La región 5' del snRNA U1 inicialmente aparece sus bases con nucleótidos en el extremo 5' del intrón y el extremo 3' del exón 5' del pre-mRNA; el snRNA U2 aparece con una secuencia que incluye la A del punto de ramificación, aunque este residuo no sufre apareamiento (levadura). Los rectángulos púrpuras (Sm) representan secuencias que fijan proteínas de snRNP reconocidas por anticuerpos anti-Sm y el verde el sitio de fijación de U6.



El centro catalítico del espliceosoma está formado por el U2-snRNA (rojo) y el U6-snRNA (verde), cuyas bases están apareadas. U2 también se aparea con el centro de ramificación del precursor del mRNA. Además U6 también aparece con el extremo 5' del intrón, mientras U5 aparece primero con el extremo 3' del exón 1 y a continuación con el extremo 5' del exón 2



Ciclo de empalme del empalmosoma

