

IL FLUSSO DELL' INFORMAZIONE GENETICA

A. La **replicazione** del DNA trasmette l'informazione genetica alle cellule figlie.

B. L'**espressione genica**, cioè l'attuazione dell'informazione genetica, avviene attraverso due stadi fondamentali:

1. La **trascrizione** dei geni e di sequenze non codificanti polipeptidi in corrispondenti sequenze di RNA

2. La **traduzione** dell'informazione passata agli mRNA in polipeptidi, ad opera dei ribosomi, attraverso la mediazione degli amminoacil-tRNA che decodificano le sequenze degli mRNA secondo il codice genetico.

Trascrizione

- E' il processo in cui la sequenza nucleotidica del DNA, che porta l'informazione per una funzione, viene trascritta in una sequenza nucleotidica di RNA
- La sequenza di RNA è complementare alla sequenza del DNA stampo

Similarità tra replicazione and trascrizione

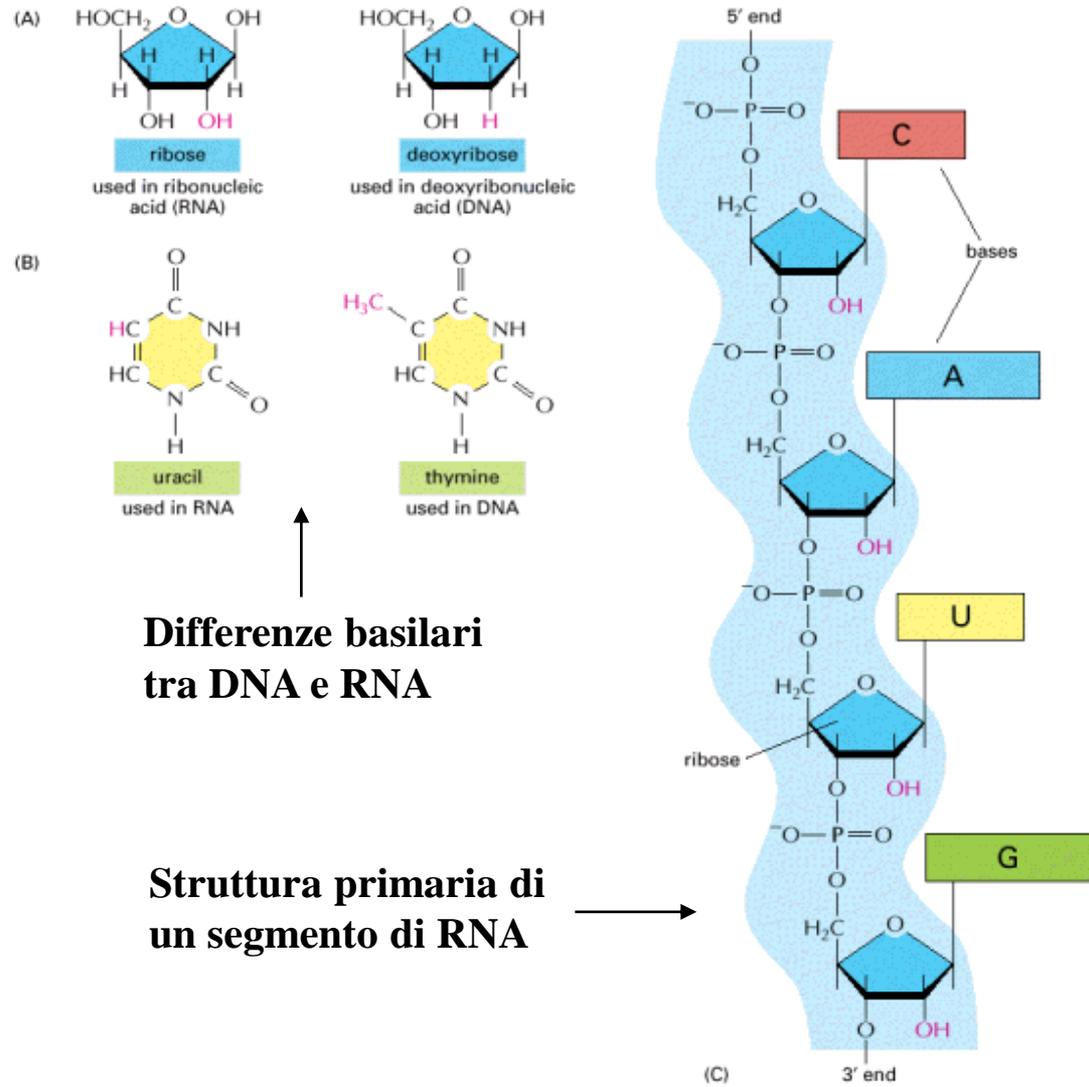
- Entrambi usano il DNA come **stampo**.
- Entrambi formano **legami fosfodiesterici**.
- Entrambi sintetizzano in **direzione 5'**
verso **3'**.

Differenze tra replicazione e trascrizione

	replicazione	trascrizione
stampo	Doppio filamento	Singolo filamento
substrato	dNTP	rNTP
primer	si	no
Enzima	DNA polimerasi	RNA polimerasi
prodotto	dsDNA	ssRNA
Coppie	A-T, G-C	A-U, G-C

L'azione dell'RNA polimerasi (DNA dipendente) presenta analogie con quella della DNA polimerasi (DNA dipendente)

1. Utilizza un filamento stampo di DNA percorrendolo in direzione 3' -> 5'.
2. Costruisce un filamento di RNA complementare allo stampo utilizzando come precursori ribonucleotidi trifosfati (rNTP), procedendo in direzione 5' -> 3', catalizzando l'attacco dell'ossidrile 3' della catena in crescita al fosfato α dell'rNTP entrante, con liberazione di pirofosfato, e generando un tratto (transiente, circa un giro d'elica) di eteroduplex DNA:RNA antiparallelo.
3. Nell'RNA la base uracile sostituisce la timina del DNA, le altre tre sono le stesse.



Stampo

Il filamento stampo è il filamento dal quale l'RNA è trascritto. E' noto come filamento **antisenso**.

Il filamento codificante è il filamento la cui sequenza in basi specifica la sequenza aminoacidica del polipetide codificato. E' chiamato filamento **senso**.

5'----- G C A G T A C A T G T C----- 3'

coding
strand

3'----- C G T C A T G T A C A G----- 5'

template
strand

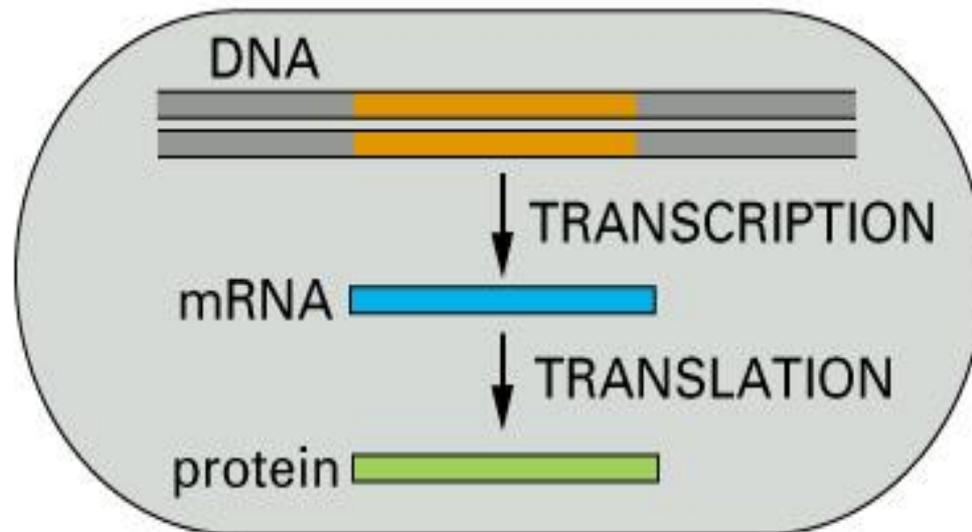


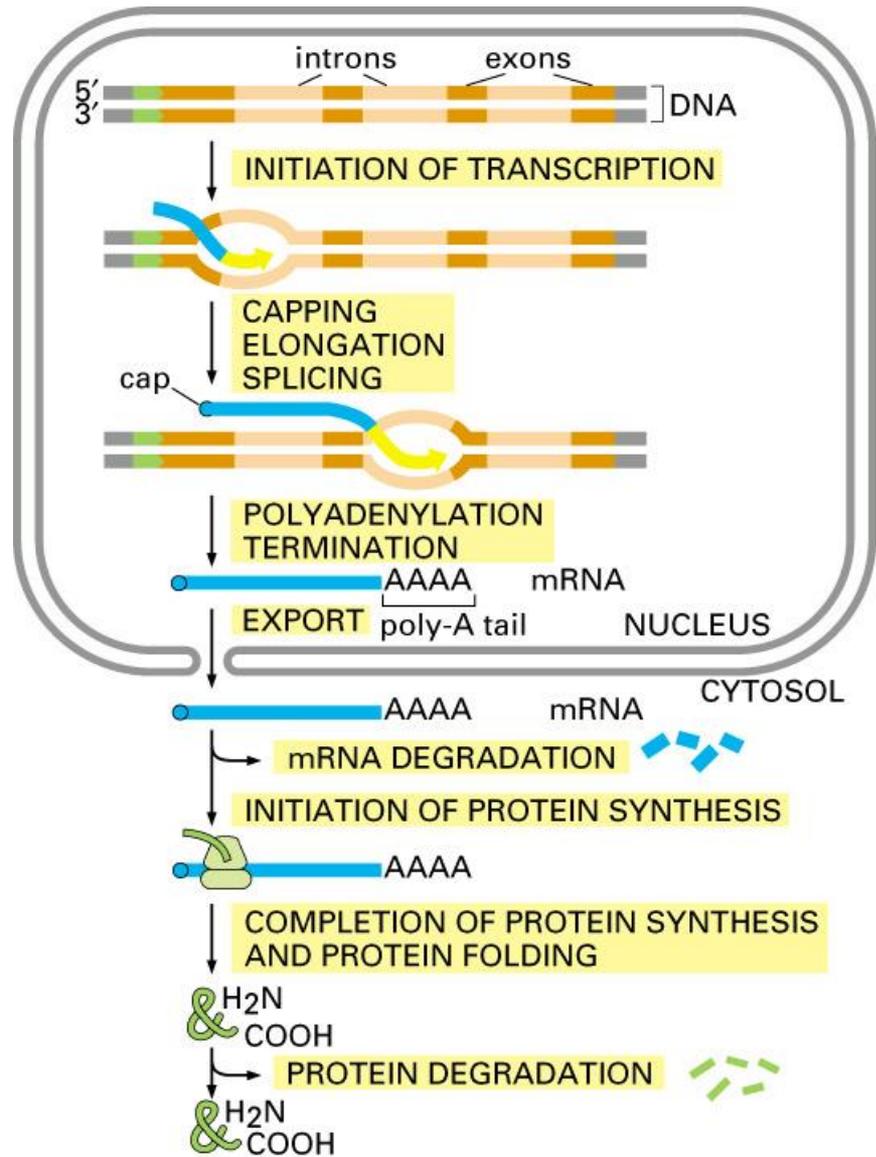
transcription

5'----- G C A G U A C A U G U C----- 3'

RNA

(B) PROCARYOTES





Trascrizione in procarioti e in eucarioti: due situazioni a confronto.

Procarioti:

- Un' unità trascrizionale, cioè la porzione di DNA trascritta a partire da un dato elemento **promotore**, contiene normalmente più geni posti in tandem, ed è detta **operone**.
- La trascrizione di tutti i tipi di RNA (mRNA, tRNA, rRNA) è effettuata da un' **unica RNA polimerasi**, assistita al promotore da uno dei fattori di trascrizione ed eventualmente controllata da **proteine regolatrici**, che possono avere **azione attivante o repressiva**.
- **L' mRNA è immediatamente pronto per essere tradotto dai ribosomi, anche prima che la sua sintesi sia conclusa** (considerato che l' RNA viene trascritto nello stesso verso in cui verrà tradotto dal ribosoma, e che il DNA e i ribosomi non sono separati da una membrana).

Trascrizione in procarioti e in eucarioti: due situazioni a confronto.

Eucarioti:

- Un' **unità trascrizionale** codificante polipeptide contiene un **unico gene** (eccezione i geni per più tRNA o rRNA che fanno di un' unica unità).
- Vi sono tipicamente **tre RNA polimerasi** che operano su geni diversi:
 - RNA polimerasi I, trascrive i geni rDNA (per gli rRNA) meno il più piccolo.
 - RNA polimerasi II, trascrive i geni codificanti le proteine, e alcuni snRNA e snoRNA.
 - RNA polimerasi III, trascrive i geni per i tRNA, il minore degli rRNA e alcuni snRNA.
- La RNA polimerasi II, richiede un complesso di **vari fattori di trascrizione generali**, più altri **fattori specifici** ed è controllata da **proteine regolatrici**.
- L' **mRNA** funzionale non deriva direttamente dalla trascrizione, ma il trascritto primario va incontro ad un **processamento** (capping, splicing, tailing) nel nucleo prima di essere esportato nel citoplasma e tradotto nei ribosomi.

L'RNA messaggero (mRNA)

L'mRNA si occupa di trasportare le informazioni codificate nel DNA affinché siano tradotte in polipeptidi nel citoplasma..

- *L'mRNA si presenta sotto forma di filamento sul quale sono presenti **triplette di nucleotidi** (detti **codoni**).*
- *La sequenza base del filamento di mRNA è **complementare** a quella del filamento del DNA dal quale è stato copiato, **e non identica**.*
- *Quando l'mRNA ha trasmesso l'informazione si scompone nei nucleotidi che lo componevano.*

L'RNA transfer (tRNA)

L'RNA transfer è costituito da un filamento di RNA di circa 80 basi azotate ripiegato a formare tre lobi, che ricordano la caratteristica forma di un trifoglio.

*Un lobo riconosce tramite una **tripletta** detta **anticodone** la tripletta (codone) sull'RNA messaggero corrispondente all'amminoacido trasportato dal transfer; un altro riconosce l'enzima che attacca l'amminoacido al transfer; un terzo è il sito di riconoscimento del ribosoma.*

Trasferisce ai ribosomi i vari amminoacidi, che uniti formano fra loro un legame peptidico per poter formare i polipeptidi.

L'RNA ribosomiale (rRNA)

Nel citoplasma, forma assemblandosi con proteine particolari (complesso riboproteico) organuli, i ribosomi, sui quali avviene la sintesi proteica.

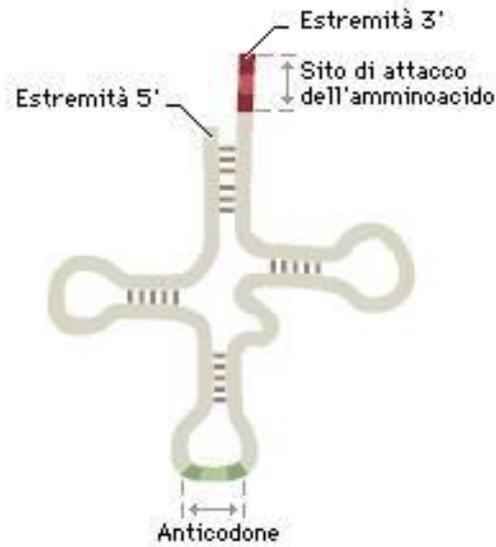
***Traduzione dell'mRNA** - Il meccanismo utilizzato per la conversione dell'informazione da sequenze di nucleotidi in sequenze di amminoacidi è conosciuto come **codice genetico**;*

*-il processo di trasferimento di informazione dagli mRNA alle proteine costituisce la cosiddetta **traduzione** dell'informazione genetica.*

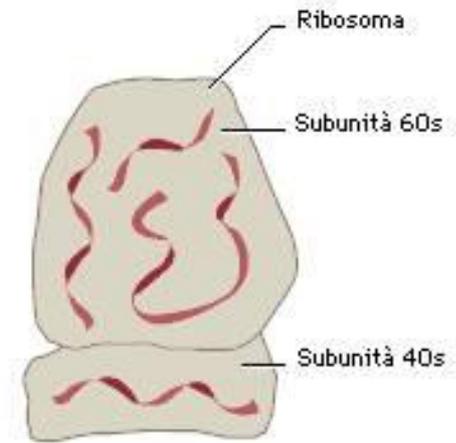
*- Il codice genetico consiste nell'esistenza di una corrispondenza tra unità di messaggio, costituite a sequenze di tre nucleotidi (**triplette o codoni**) contenute negli mRNA, e uno dei venti amminoacidi che costituiscono le proteine.*



**RNA messaggero
(m-RNA)**



**RNA transfer
(t-RNA)**



**RNA ribosomiale
(r-RNA)**

Principali tipi di RNA

- mRNA** RNA messaggeri, ciascuno contiene la sequenza codificante un polipeptide (o nel caso dei batteri più di uno) secondo le triplette del codice genetico o codoni
- tRNA** RNA transfer, decodificano i codoni trasferendo al polipeptide in sintesi il residuo amminoacidico corrispondente a ciascun codone
- rRNA** RNA ribosomici, assieme a numerose proteine formano i ribosomi, organuli sede della biosintesi proteica

hnRNA RNA eterogeneo nucleare, è costituito dai precursori dell' mRNA maturo (pre-mRNA) negli eucarioti

snRNA RNA nucleari piccoli, fanno parte dello spliceosoma, complesso che produce mRNA maturi trattando i pre-mRNA negli eucarioti

snoRNA RNA nucleolari piccoli, servono a processare i precursori degli rRNA

Ci sono poi altri RNA con funzioni particolari, ad esempio quello che fa parte della telomerasi, enzima che sintetizza il DNA telomerico negli eucarioti, quello (7SL) del complesso ribonucleoproteico SRP (signal recognition particle del RER), quello che è coinvolto nell' inattivazione di uno dei due cromosomi X nelle femmine di molti mammiferi, gli RNA interferenti (particolarmente i micro RNA – miRNA), di più recente scoperta, ecc.

Types of RNAs

Functions

snRNAs

splicing of pre-mRNAs

snoRNAs

**process and chemically modify
rRNAs**

MicroRNAs

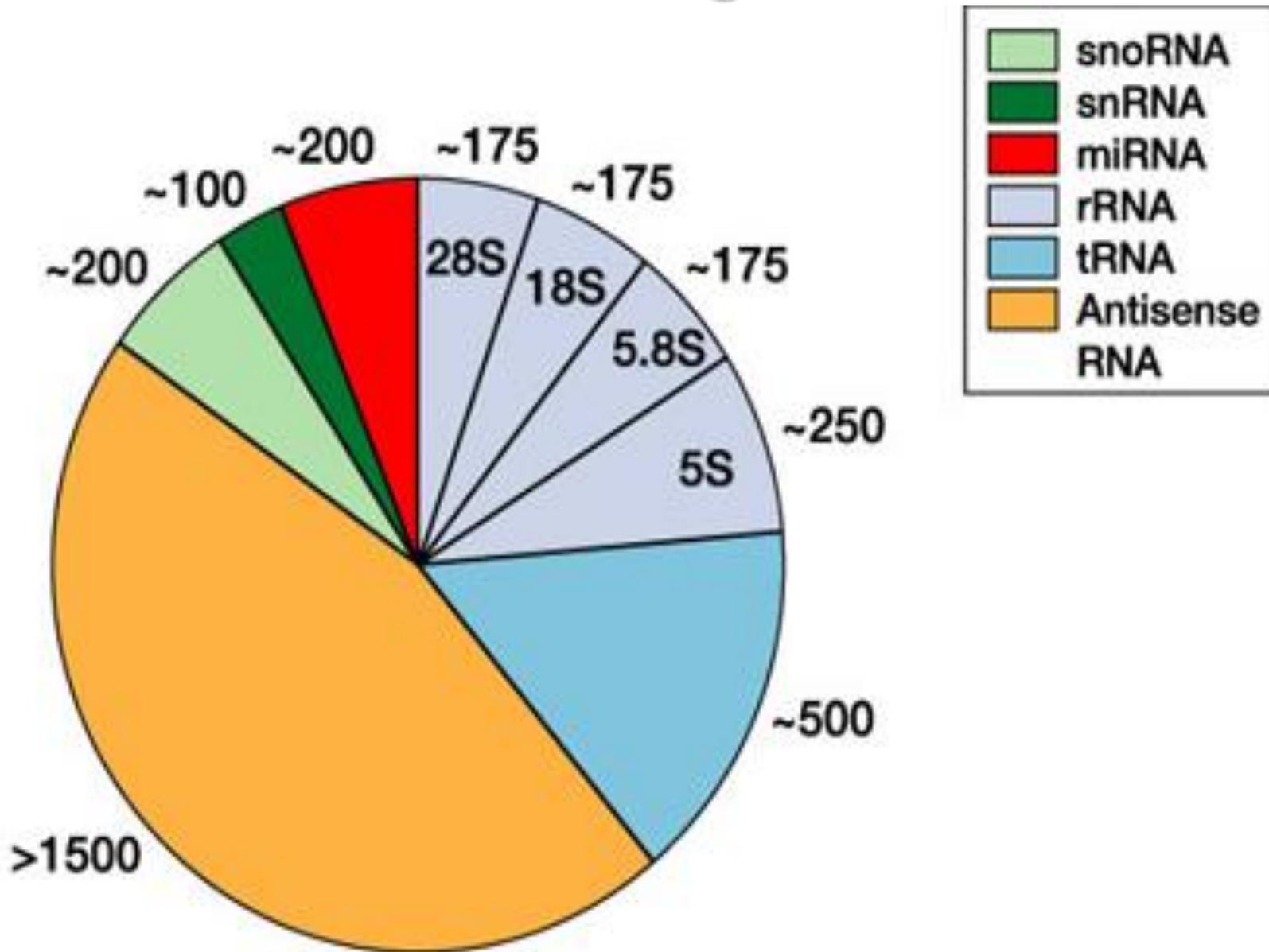
translation and mRNA degradation

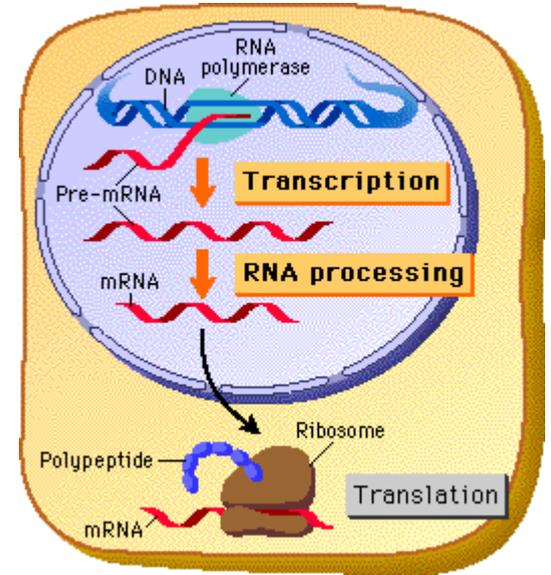
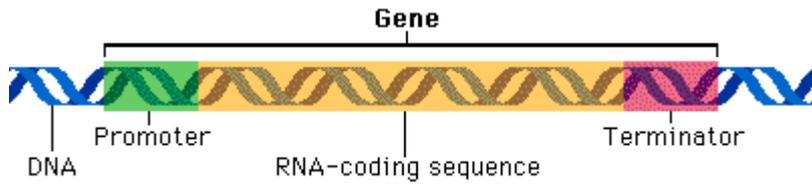
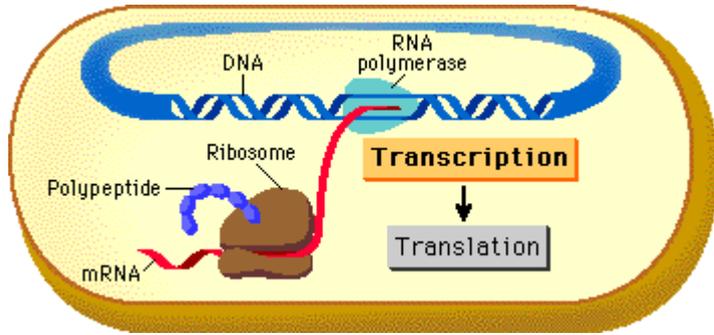
**Other non-coding
RNAs**

**telomere synthesis, X-chromosome
inactivation, protein transport**

Class of RNA	Example types	Function
microRNA (miRNA)	>200 types	Regulatory RNA
XIST RNA		Inactivation of X chromosome
Imprinting associated RNA	H19 RNA	Genomic imprinting
Antisense RNA	>1500 types	Suppression of gene expression
Telomerase RNA		Telomere formation

Types of RNA (different from mRNA) in the human genome





PROMOTORE

- Sequenza situata immediatamente “a monte” del sito di inizio della trascrizione.
- Consente l’attacco dell’RNA polimerasi e di altri fattori che facilitano l’inizio della trascrizione
- Il sito di attacco dell’RNA polimerasi è sull’elica stampo

RNA polimerasi

- Sintetizza il filamento di RNA a partire da uno stampo di DNA.
E' una RNAPol DNA-dipendente
- La sintesi avviene in direzione 5' --> 3'
- Nei procarioti esiste una sola RNA polimerasi trascrive tutti gli RNA
- Negli eucarioti esistono 3 RNA polimerasi
 - RNA pol I trascrive rRNA
 - RNA pol II trascrive mRNA
 - RNA pol III trascrive tRNA e 5S rRNA

Four RNA Polymerases of Eukaryotic Cells

Type of Polymerase

Genes Transcribed

RNA pol I
(nucleolus)

5.8S, 18S, and 28S rRNA genes

RNA pol II
(nucleoplasma)

protein coding genes, snoRNA
genes, some snRNA genes,
microRNAs

RNA pol III
(nucleoplasma)

tRNA genes, 5S rRNA genes
some snRNA genes, genes
for other small RNAs

RNA pol IV
(nucleoplasma)

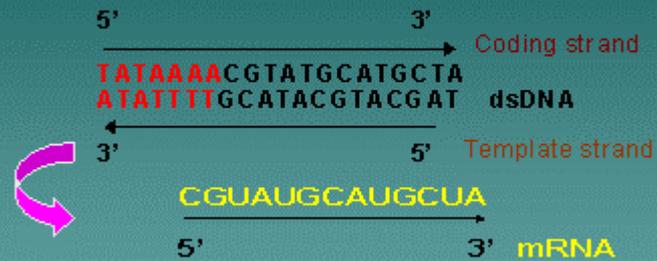
plants only; small interfering
RNAs (**siRNAs**)

- La RNA pol può iniziare la trascrizione senza bisogno di un primer
- L'RNA prodotto non rimane accoppiato al DNA se non per pochi nucleotidi
- Più molecole di RNAPol possono trascrivere un DNA contemporaneamente
- La RNAPol non è accurata come la DNAPol ($1/10^4$ anziché $1/10^7$)

- La RNAPol è costituita da subunità multiple
- Ha la forma di una chela di granchio
- Il sito attivo è alla base delle pinze
- Ha diversi canali per il passaggio del DNA, dell'RNA e dei rNTPs

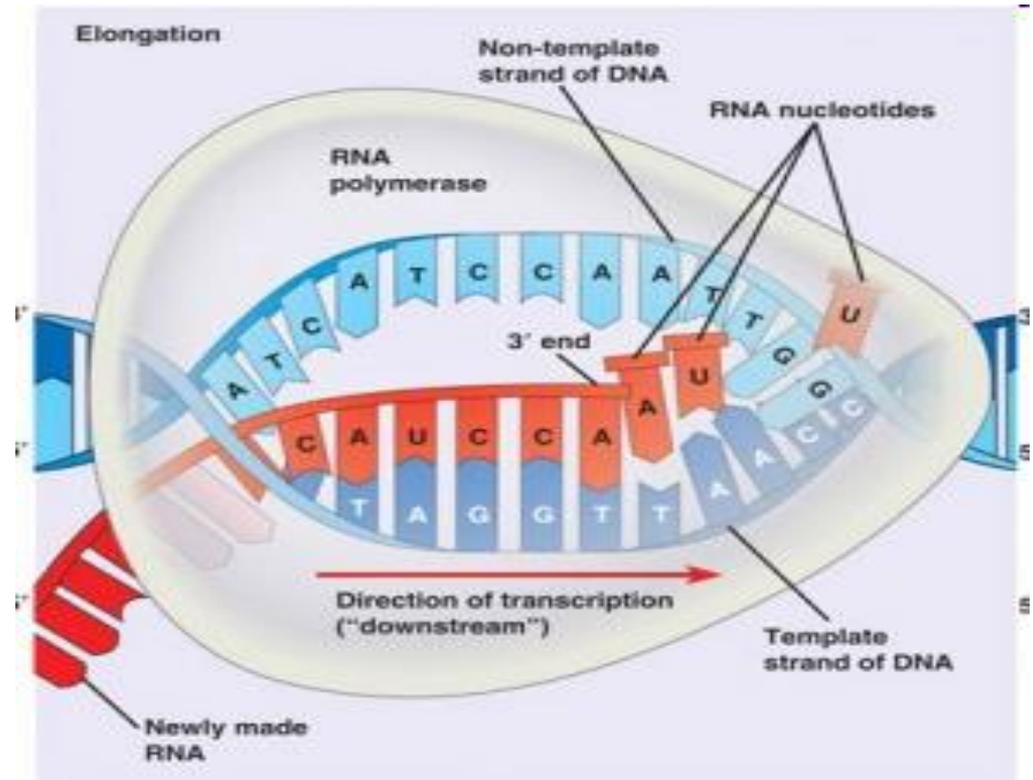


Transcription



RNA Polymerase

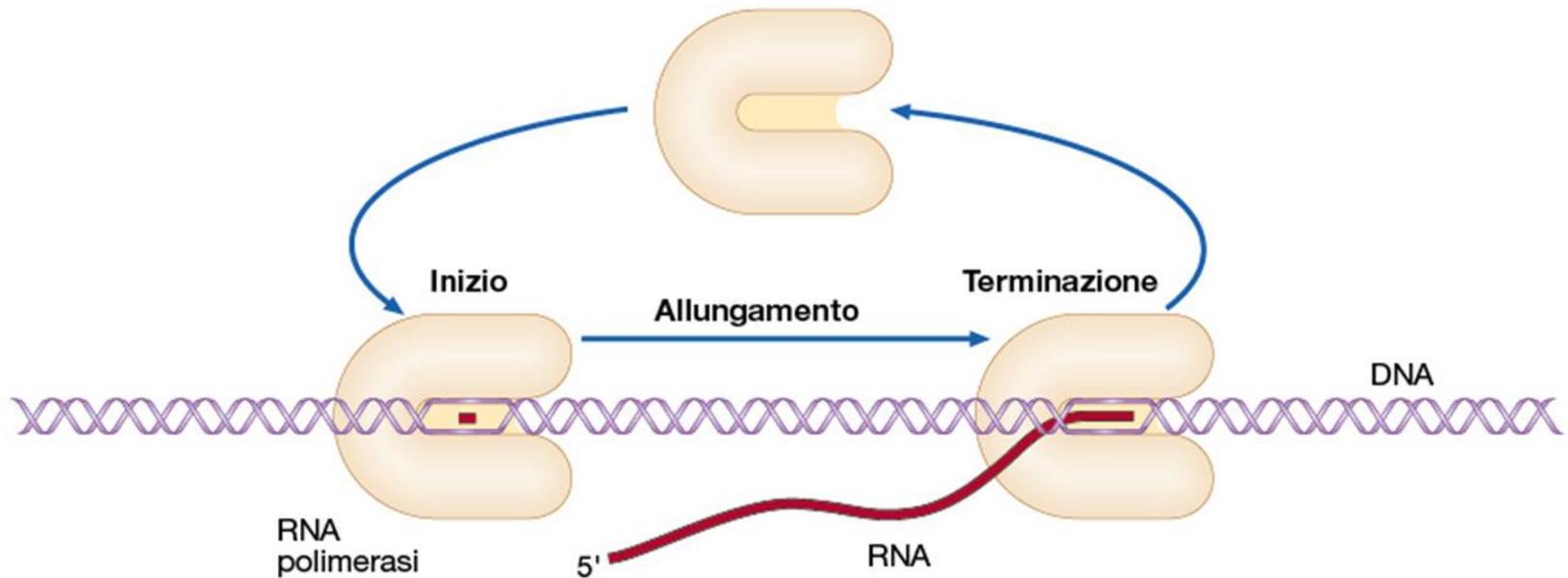
Figure used with permission
 Of Joan Polancic ©2003



- La RNA pol si lega al promotore (indicato con numeri negativi) a monte del gene – formazione del **complesso chiuso-**
- La trascrizione inizia a valle del promotore da un sito di inizio indicato come +1 al quale la RNA pol si lega per far sì che si produca una “bolla di trascrizione”- **complesso aperto-**
- La trascrizione procede da 5' → 3' con orientamento prefissato
- Dopo aver sintetizzato un piccolo RNA di circa 10nt (complesso iniziale della trascrizione) se questo rimane attaccato allo stampo (stabile) si ha l'allungamento durante il quale la RNA pol svolge il DNA davanti e lo riavvolge dietro –**evasione dal promotore-** Complesso stabile ternario tra RNA pol-DNA-RNA
- Alla terminazione del gene (o geni) la RNA pol si ferma, rilascia l'RNA prodotto e si dissocia dal DNA

Trascrizione nei Procarioti

Avviene nel citoplasma



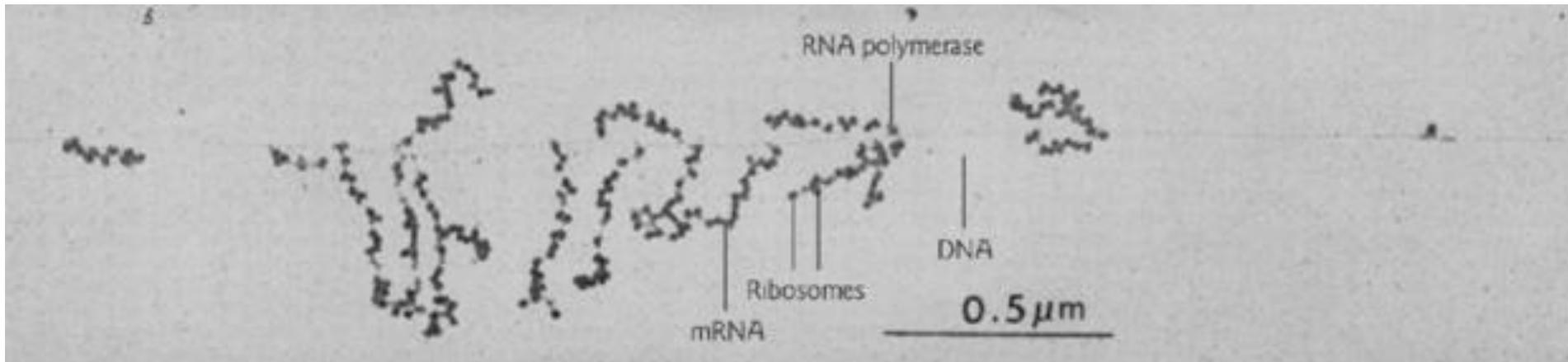


Figura 9.2A Accoppiamento trascrizione/traduzione nei procarioti. (A) Immagine al microscopio elettronico in cui si osserva una serie di RNA messaggeri, coperti di ribosomi, che si diramano dalla doppia elica di DNA. (B) Rappresentazione schematica dell'accoppiamento trascrizione/traduzione nelle cellule procariotiche.

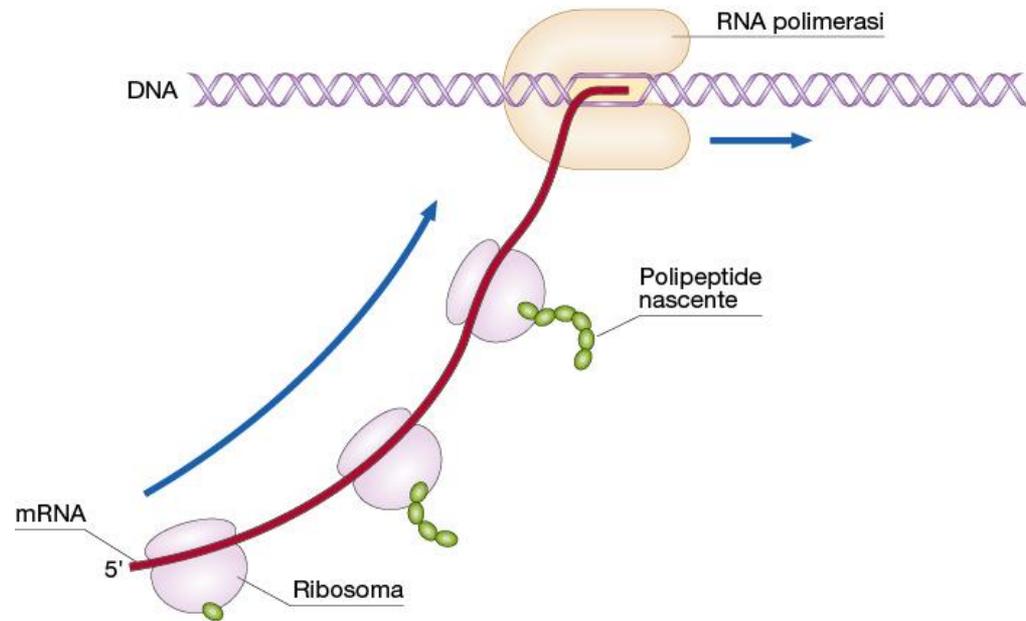
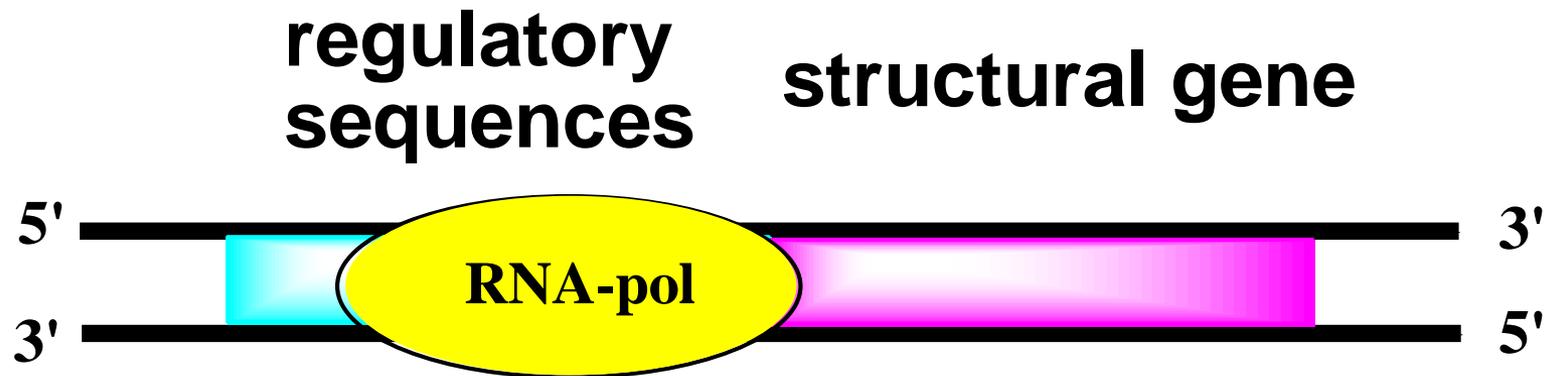


Figura 9.2B Accoppiamento trascrizione/traduzione nei procarioti. (A) Immagine al microscopio elettronico in cui si osserva una serie di RNA messaggeri, coperti di ribosomi, che si diramano dalla doppia elica di DNA. (B) Rappresentazione schematica dell'accoppiamento trascrizione/traduzione nelle cellule procariotiche.

Riconoscimento delle Origini di trascrizione

- Ogni regione trascrivibile è chiamata **operone**.
- Un operone include parecchi **geni strutturali** e a monte **sequenze regolatorie** (o regulatory regions).
- Il **promotore** è la sequenza di DNA che la RNA pol può legare. E' il punto chiave per il controllo della trascrizione.

Promoter



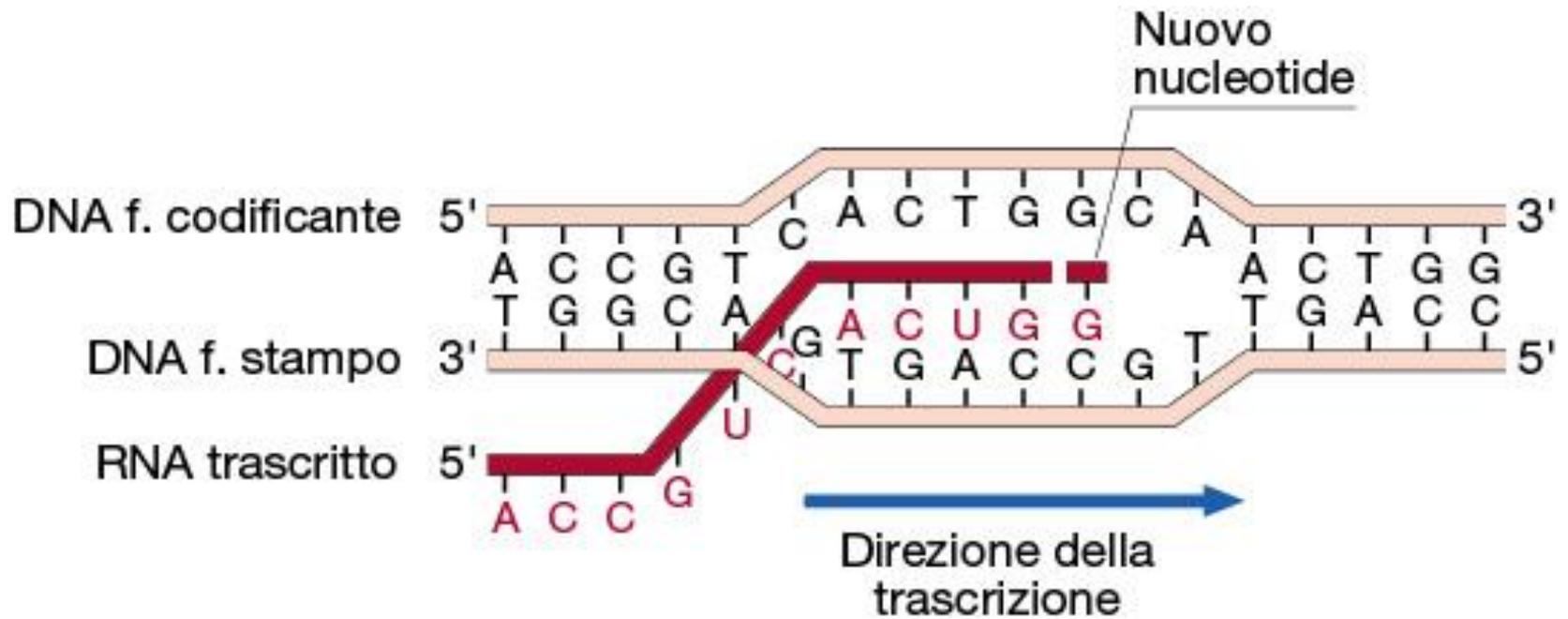


Figura 9.3 L'RNA polimerasi trascrive uno solo dei due filamenti della doppia elica del DNA. Nella trascrizione la RNA polimerasi usa, come stampo, uno solo dei due filamenti di DNA. La sequenza dell'RNA trascritto è complementare a quella del filamento stampo ed equivalente a quella del filamento codificante.

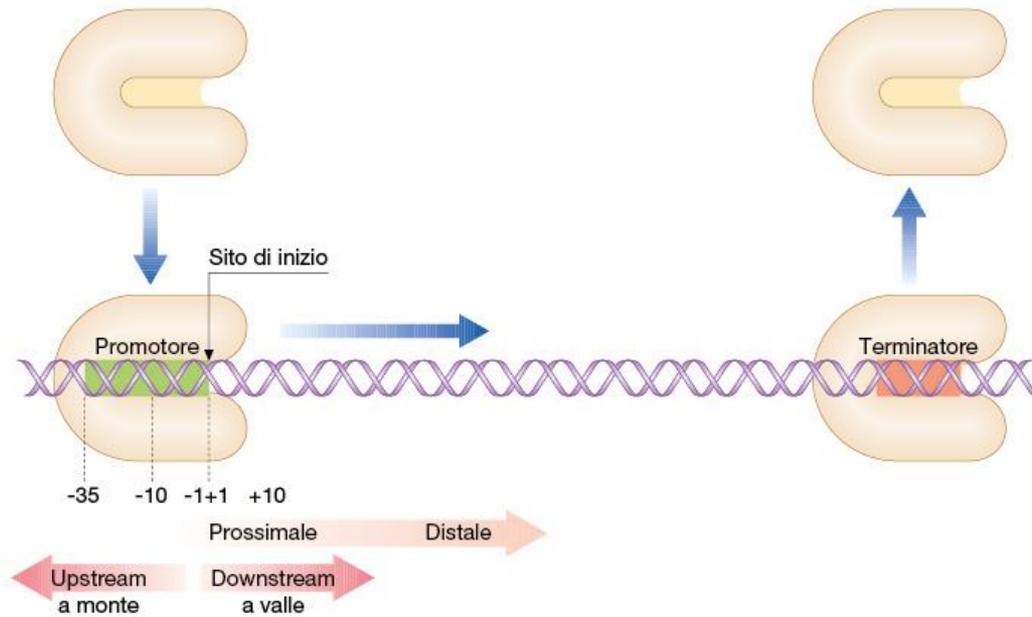


Figura 9.4 Un'unità di trascrizione è delimitata dal promotore e dal terminatore. Il punto di inizio della trascrizione divide la regione in sequenze "a monte" (*upstream*) in cui le basi sono numerate con valori negativi, e sequenze "a valle" (*downstream*) in cui le basi sono numerate con valori positivi. I termini "prossimale" e "distale" si riferiscono alla posizione delle regioni del gene rispetto al sito di inizio.

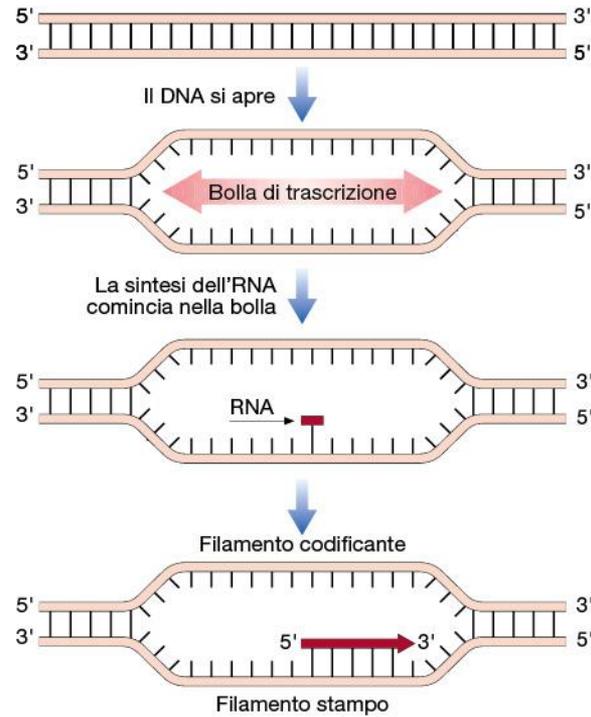


Figura 9.5 Bolla di trascrizione e sintesi dell'RNA. Nella fase di inizio della trascrizione l'RNA polimerasi si lega al promotore e provoca l'apertura della doppia elica formando così la "bolla di trascrizione". Senza bisogno di un "innesco", il primo nucleoside trifosfato si posiziona esponendo il 3'-OH che reagisce con il successivo dando così inizio alla trascrizione.

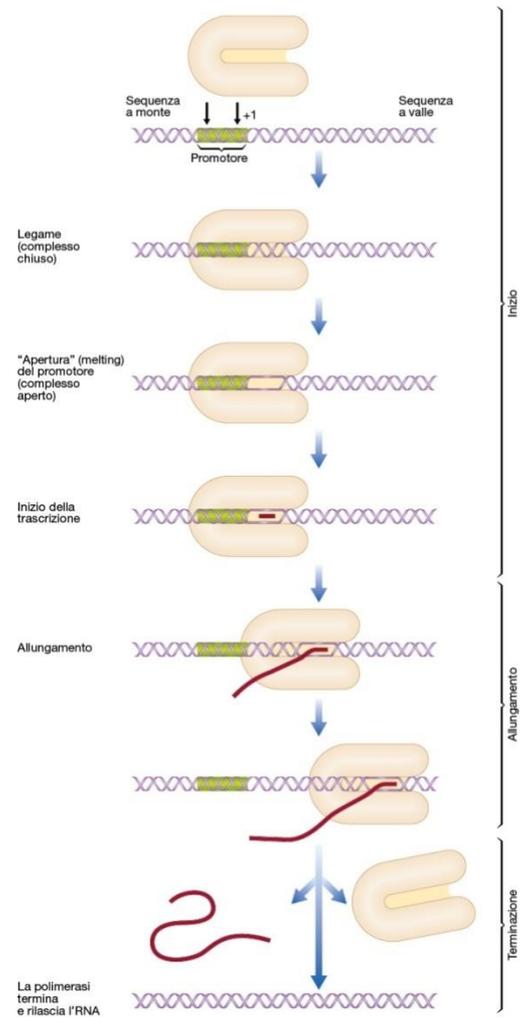


Figura 9.6 Le tre fasi della trascrizione. La polimerasi si lega in modo specifico al promotore e si forma il complesso chiuso. Successivamente si forma il complesso aperto e, dopo una fase abortiva, inizia l'allungamento del trascritto. La polimerasi raggiunge il terminatore e si stacca dal DNA.

Promotore procariotico

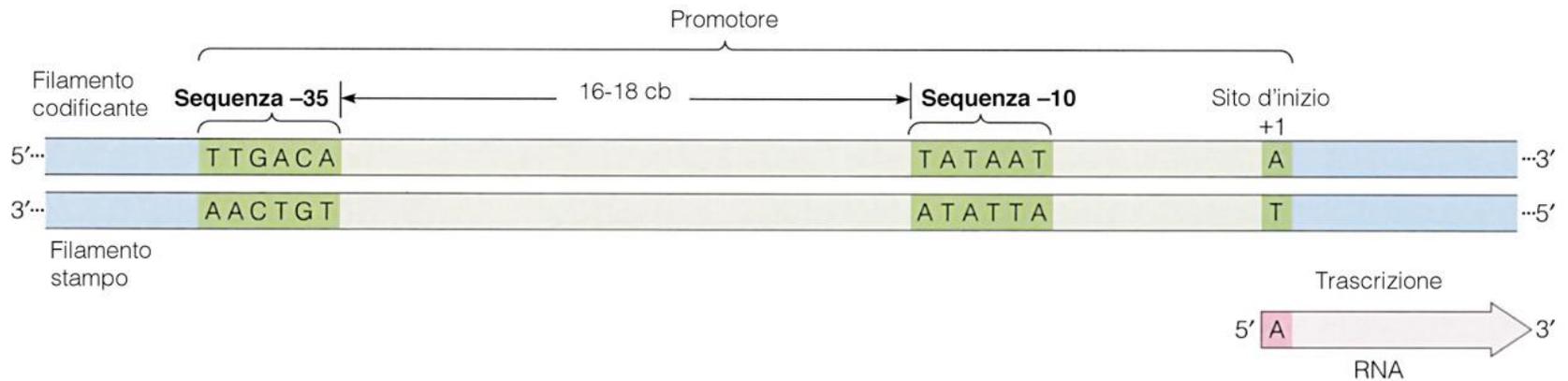


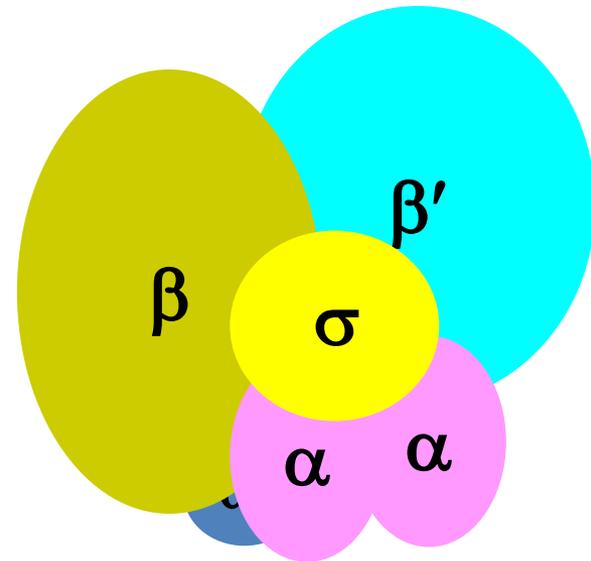
Figura 19-10

- Generalmente a -35 c'è la regione con la sequenza **TTGACA** che è il **sito di riconoscimento** e di legame della RNA pol.
- La regione a -10 ha sequenza **TATAAT** ed è qui che si forma un complesso **stabile** tra il DNA e la RNA pol.

- In generale, i promotori batterici variano in forza e sequenza, ma hanno caratteristiche generali e 3 regioni conservate:
 - a. consensus sequence a -35,**
 - b. consensus sequence a -10 e**
 - c. lunghezza degli spaziatori di 17 - 19 bp**
(segmenti non specifici in sequenza).

Oloenzima

L' **oloenzima** di RNA-pol in *E.coli*
consiste of 5 differenti subunità: α_2 β β'
 ω σ .



RNA pol of *E. Coli*

subunit	MW	function
α	36512	Determine the DNA to be transcribed
β	150618	Catalyze polymerization
β'	155613	Bind & open DNA template
σ	70263	Recognize the promoter for synthesis initiation

Esistono diverse subunità sigma, ciascuna “specializzata” nella trascrizione di specifiche classi di geni

Tabella 10.1 Fattori sigma di *E. coli*

Fattore sigma	Promotori riconosciuti	Sequenze consenso del promotore	
		Regione -35	Regione -10
σ^{70}	La maggior parte dei geni	TTGACAT	TATAAT
σ^{32}	Geni indotti da shock termico	TCTCNCCCTTGAA	CCCATNTA
σ^{28}	Geni per la mobilità e la chemiotassi	CTAAA	CCGATAT
σ^{38}	Geni per la fase stazionaria e la risposta allo stress	?	?
σ^{54}	Geni per il metabolismo dell'azoto e altre funzioni	Regione -24 CTGGNA	Regione -12 TTGCA

FONTI: C.A. Gross, M. Lonetto e R. Losick (1992), a cura di S.L. McKnight e K.R. Yamamoto, *Transcriptional Regulation*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; D.N. Arnosti e M.J. Chamberlin (1989), *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* **86**: 830; R. Hengge-Aronsis (1996), *Mol. Microbiol.* **21**: 887.

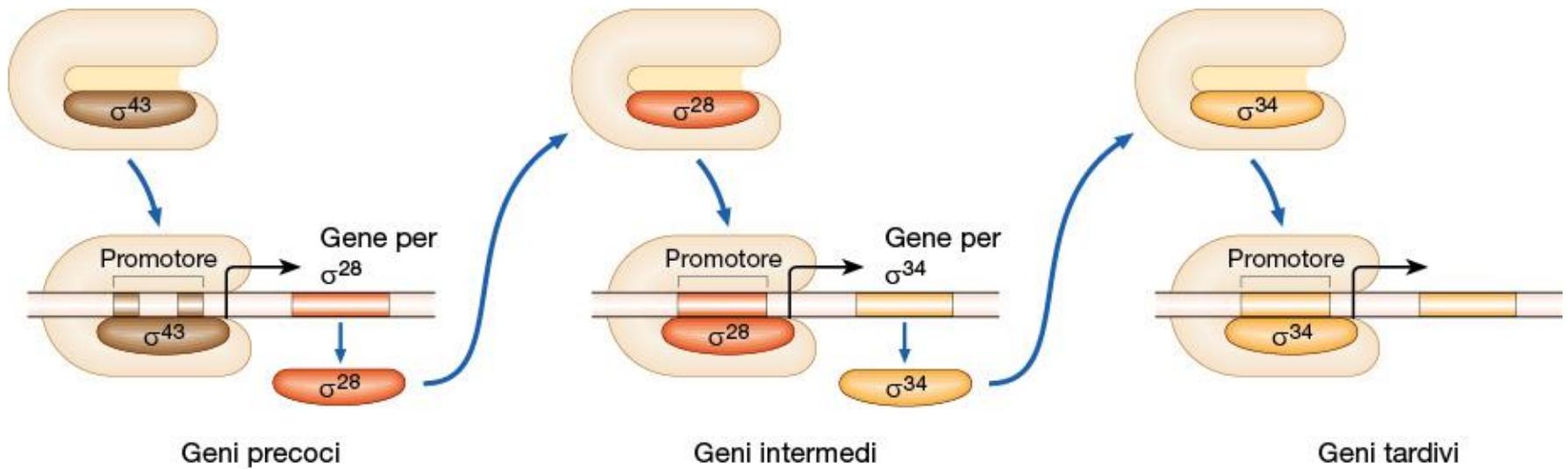
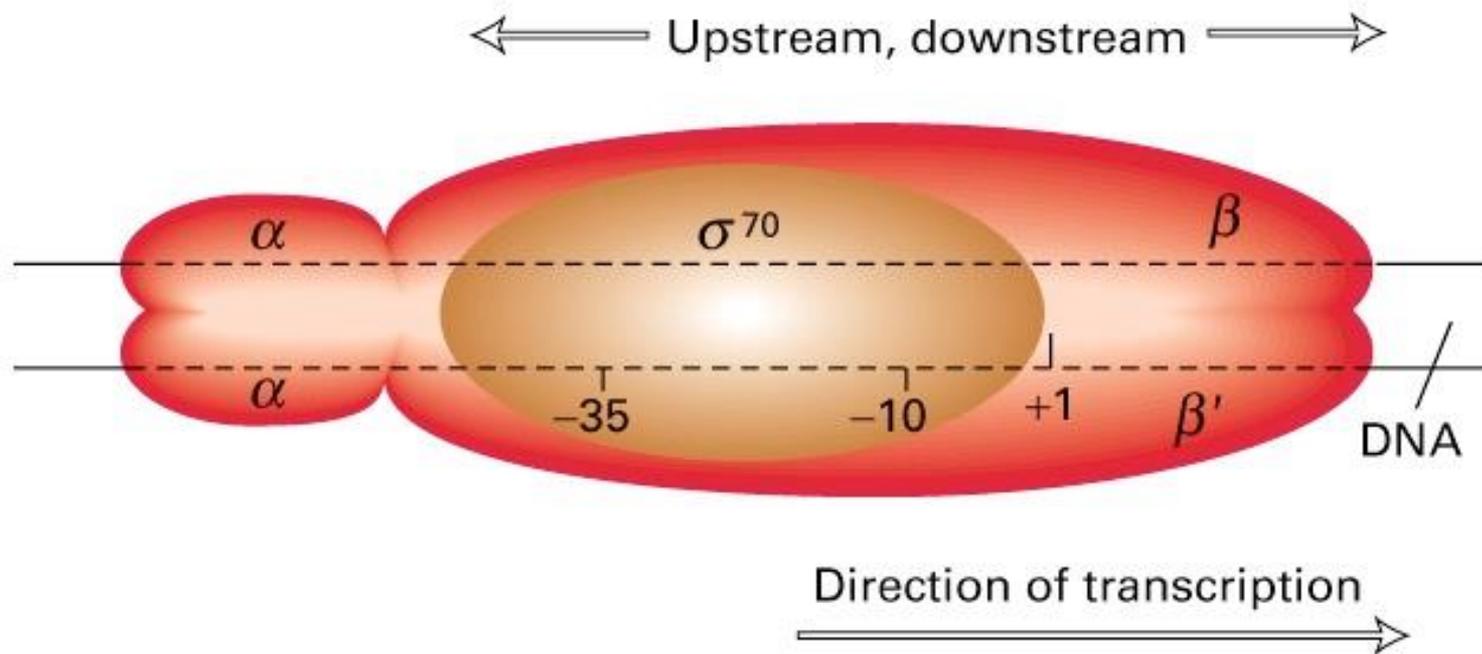
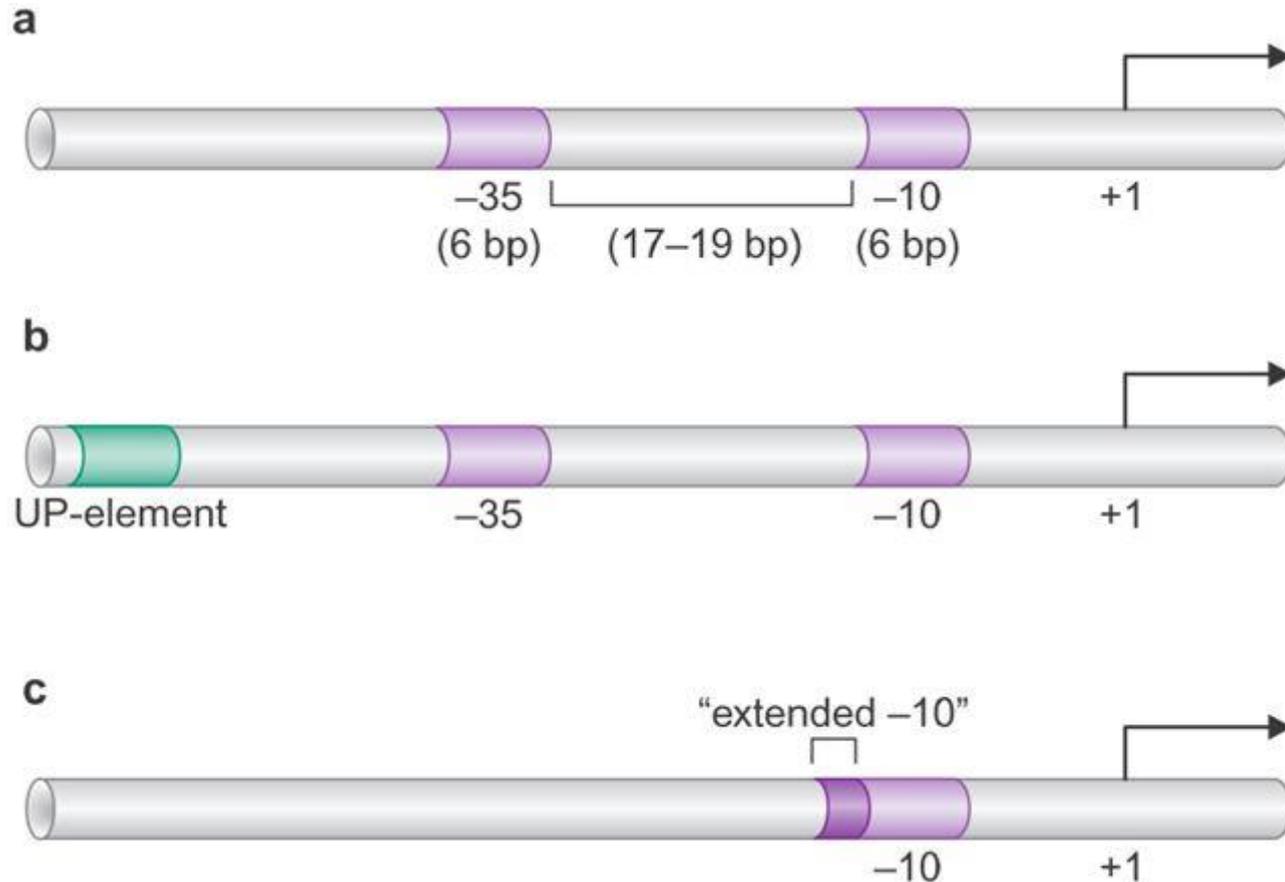


Figura 9.16 Fattori σ alternativi. Vari fattori σ diversi agiscono su promotori differenti e regolano le fasi del ciclo di infezione del batteriofago SPO1 nel batterio *Bacillus subtilis*.

L'RNA polimerasi dei procarioti sul promotore tipo



- I promotori con la sequenza più vicina a quella consenso sono generalmente più “forti” (numero di trascritti/tempo): aumenta la affinità di σ per il promotore
- Gli rRNA hanno promotore forte con elemento addizionale (UP-element) che aumenta la forza di interazione tra l’enzima e il DNA e che viene riconosciuto dal dominio carbossiterminale della subunità α



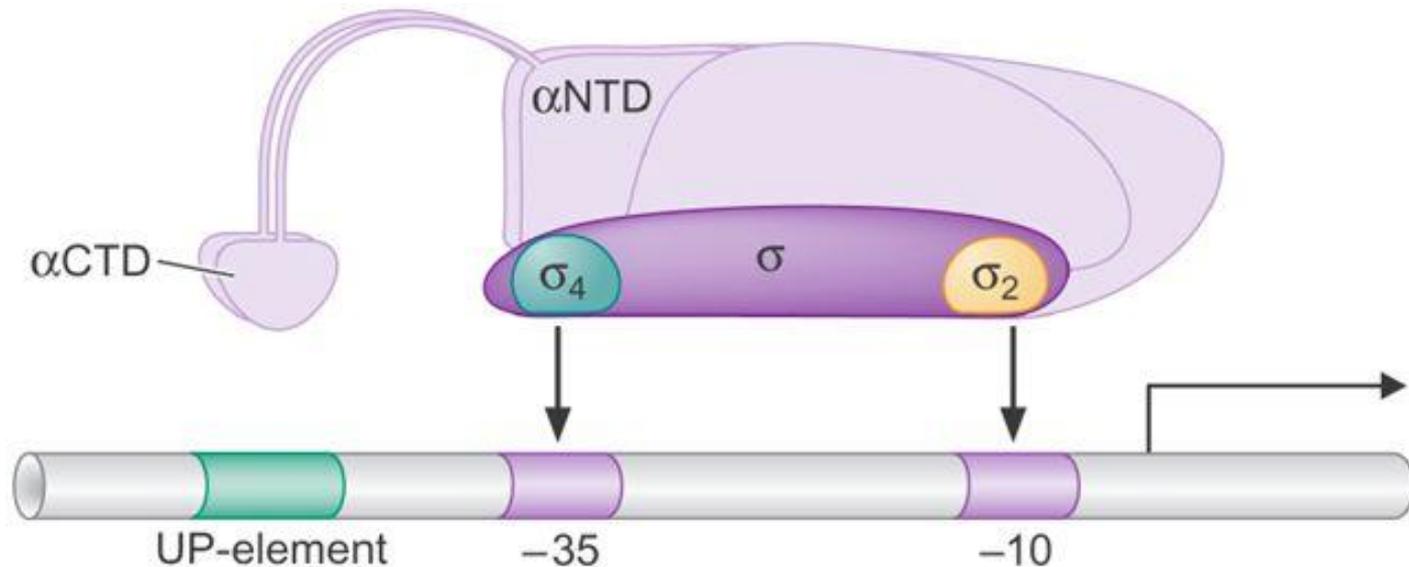
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

An additional DNA element, **UP-element**, that binds RNA polymerase is found in some strong promoters and increase polymerase binding by providing an additional specific interaction between the enzyme and the DNA. Another class of promoters lacks a -35 region and instead has a so-called “ **extended -10**” element.

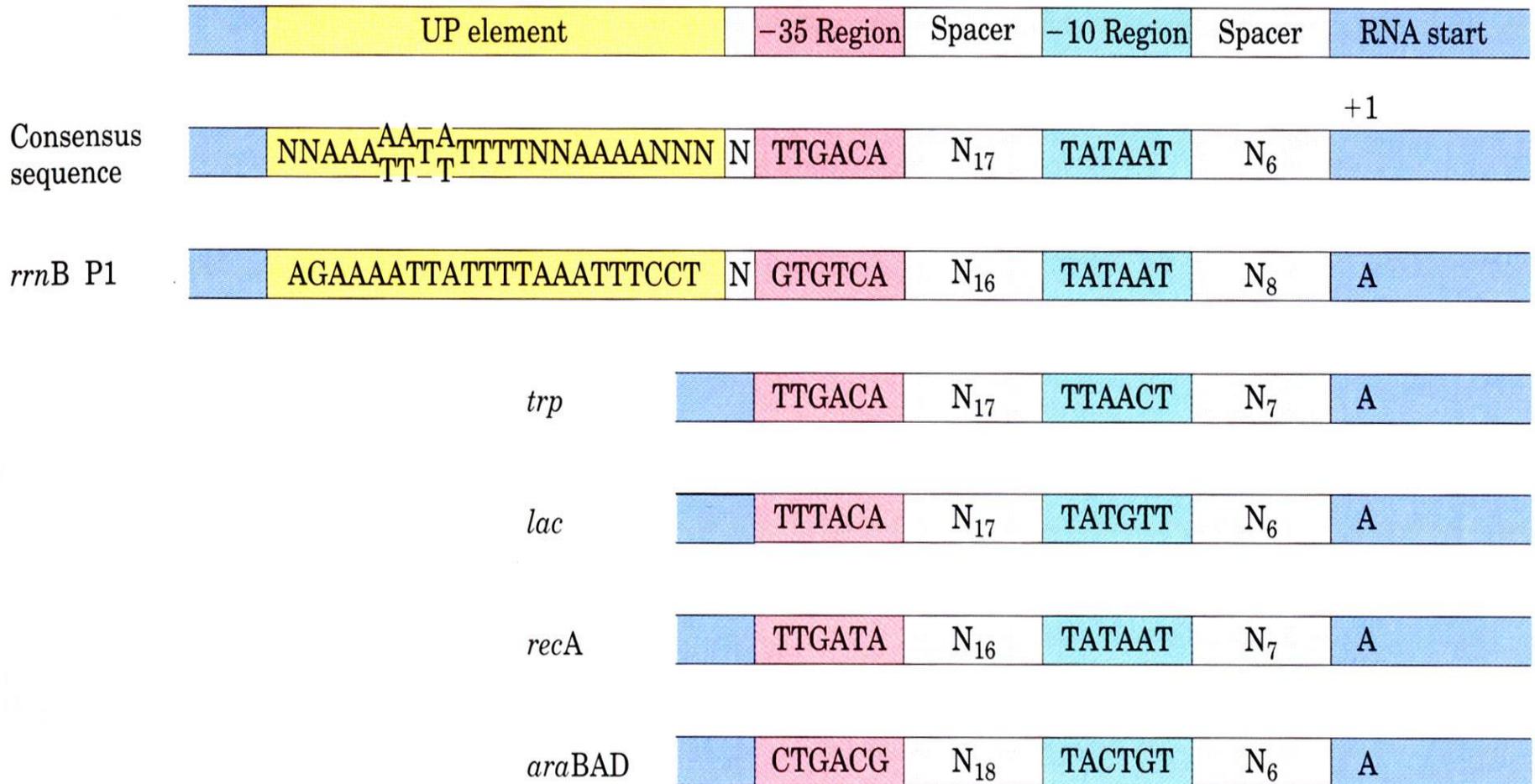
La subunità α della RNA pol ha un dominio C-terminale che può riconoscere e legarsi all'elemento UP del promotore e che determina un legame molto stretto tra enzima e promotore.

Il dominio α -CTD è connesso all' α NTD da un linker flessibile.

La subunità α interagisce con attivatori, repressori, allungatori e fattori di trascrizione.



Typical E.coli promoters recognized by an RNA polymerase holoenzyme containing $\sigma 70$



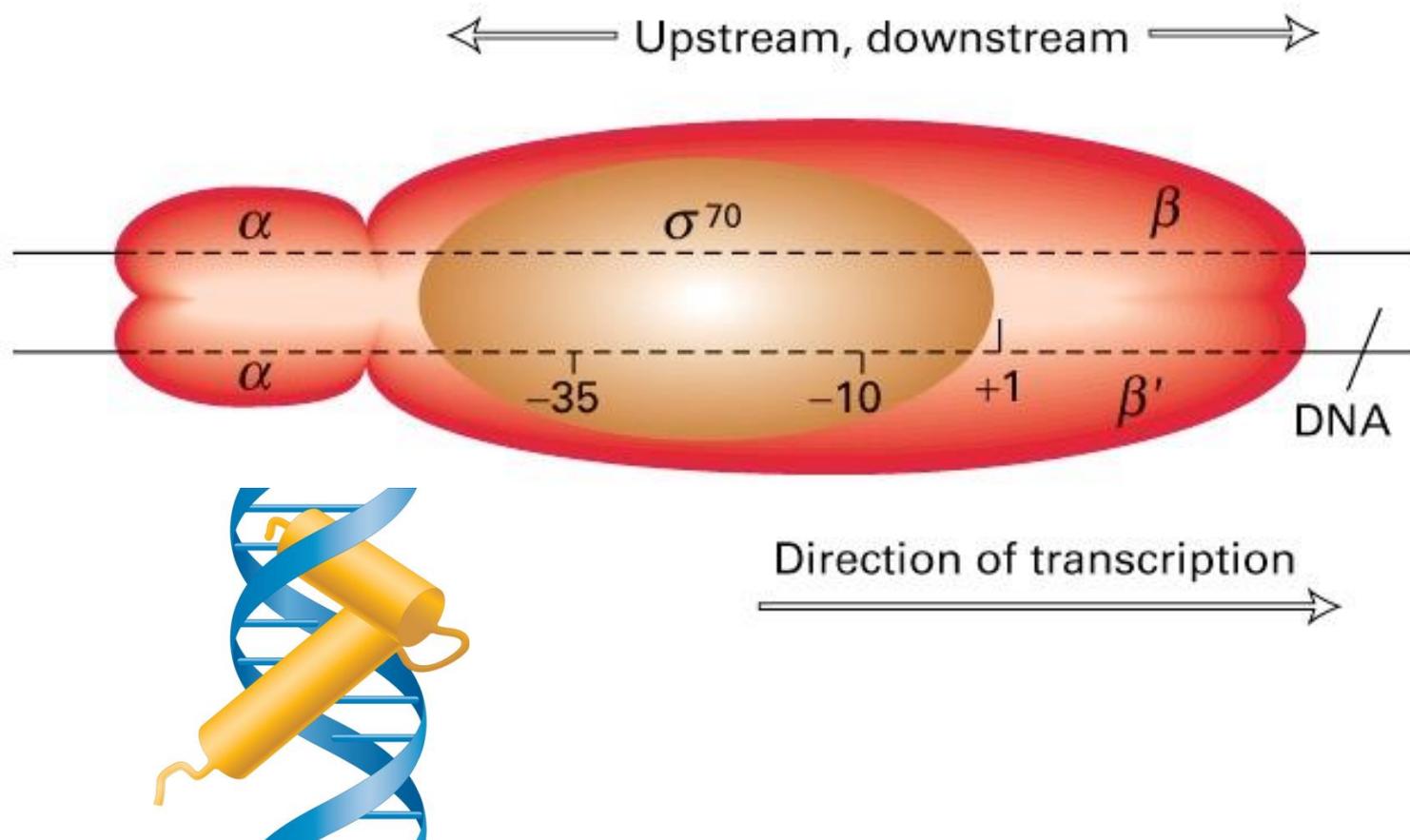
Promotori Forti: consensus sequences e spaziatori molto simili a quelle ottimali (-35 TTGACA, spacer 17, -10 TATAAT, spacer 6)

Promotori Deboli: sostituzioni di basi nelle consensus sequences a -35 e a -10

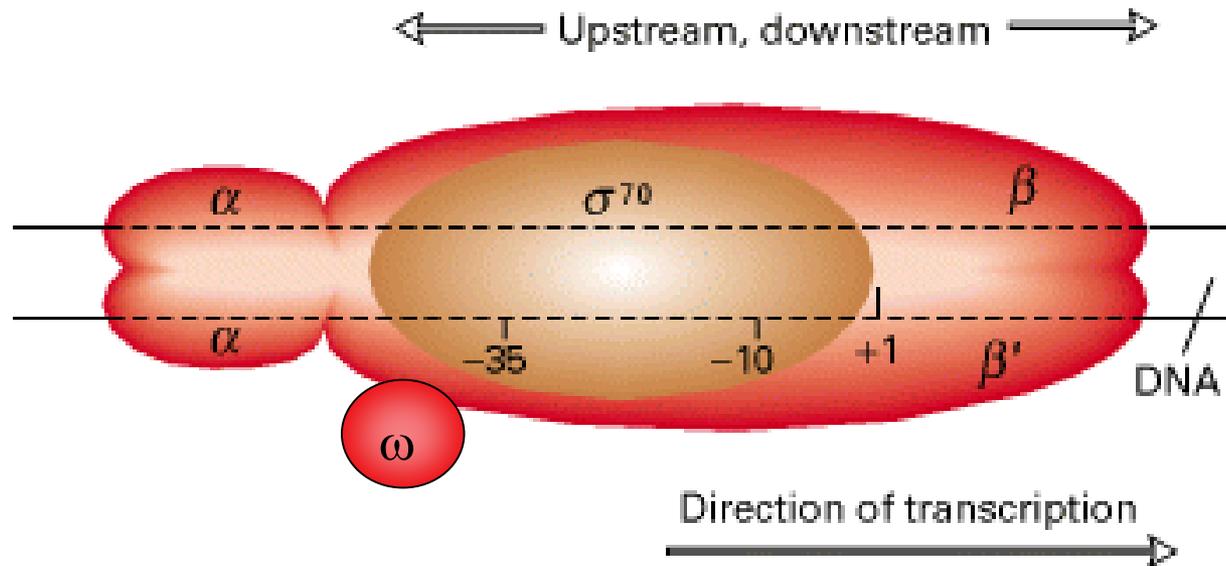
Ruolo della subunità σ

- Oloenzima: σ , β, β' , $\alpha(2)$ e ω .
- L'enzima "Core", $\alpha(2)$, β , β' , lega il DNA anche in assenza di un promotore ma inizia a trascrivere in modo non-specifico
- **La subunità σ è responsabile dell'inizio specifico della trascrizione**

Oloenzima- tutte le subunità Enzima-core- $\alpha 2/\beta/\beta'$

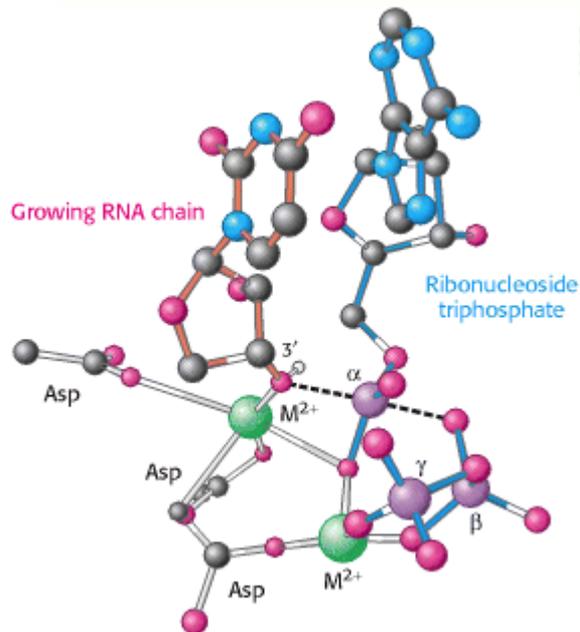
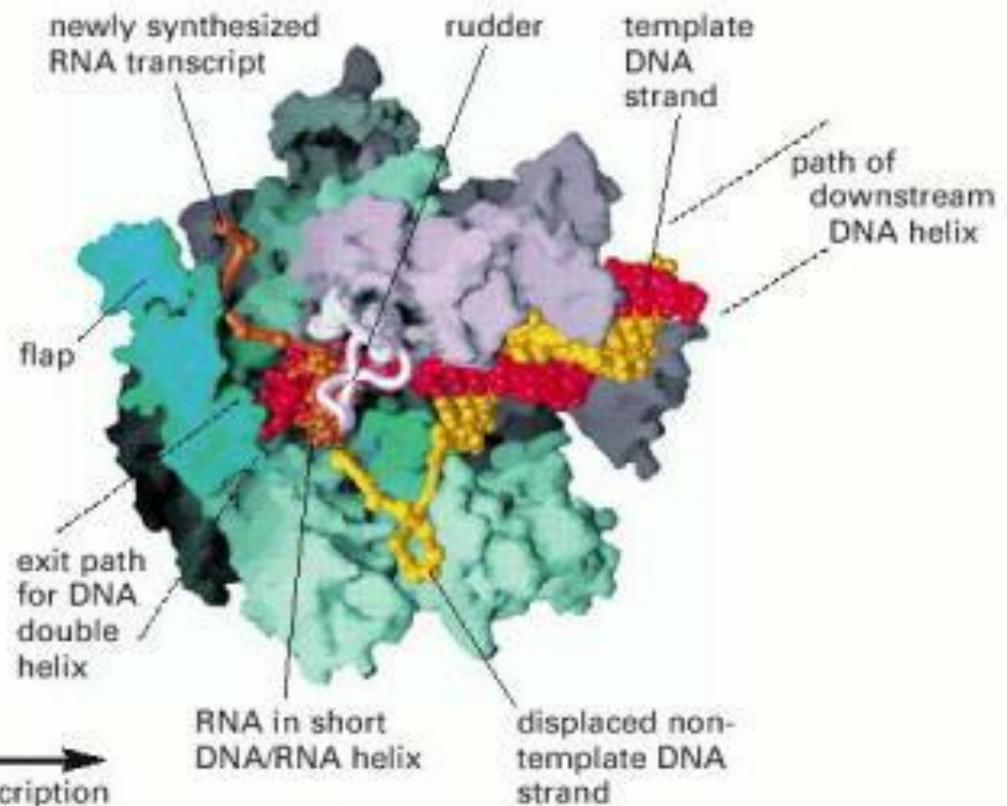
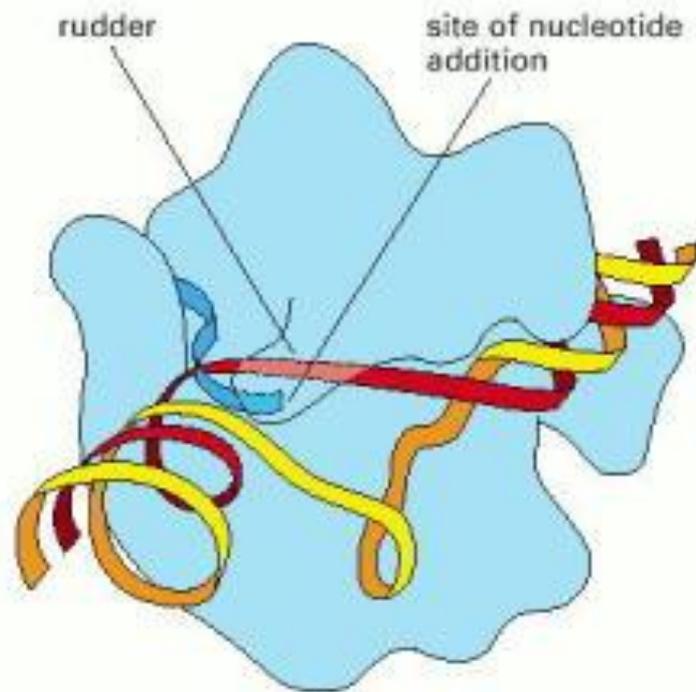


E. coli RNA polymerase holoenzyme bound to DNA



<u>Subunit</u>	<u>Stoichiometry in holoenzyme</u>	<u>Role</u>
α	2	Binds regulatory sequences/proteins
β	1	Forms phosphodiester bonds
β'	1	Bind and open DNA
σ	1	Promoter recognition
ω	1	RNAP assembly

A single RNA polymerase makes multiple types of RNAs (rRNA, tRNA and mRNA) in prokaryotes.



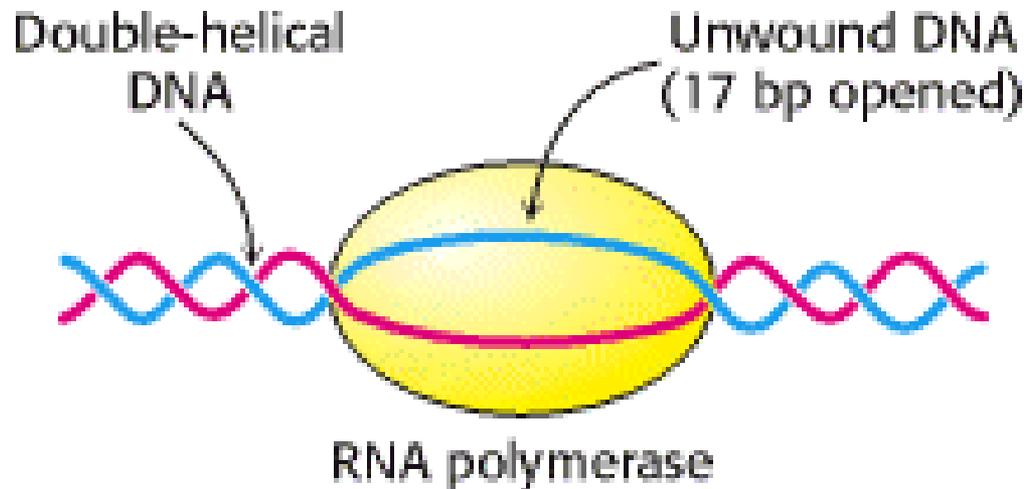
La RNA polimerasi batterica è un complesso di quattro tipi di subunità in figura rappresentate in colori diversi: due copie di α (37 kDa), una di β (151 kDa), una di β' (155 kDa), una di ω (10 kDa). A questo complesso si associa transientemente un fattore di inizio σ , diverso a seconda dei gruppi di geni da trascrivere.

Il sito catalitico (usa Mg^{2+} come cofattore)

- **La Rifampicina**, un antibiotico per la tubercolosi, può legare in modo specifico la subunità β subunit della RNA pol e inibire la sintesi di RNA.

Inizio della trascrizione

- La RNA pol **riconosce** la regione del promotore a -35 (TTGACA), e **scivola** sulla regione del promotore a -10 (TATAAT), poi **apre** il DNA duplex.
- La regione svolta è di circa 17 ± 1 bp.



Fasi dell'inizio della trascrizione

- **Primo step:** legame della RNA pol al promotore sul DNA-
formazione del **complesso chiuso**.
- **Secondo step:** il complesso chiuso subisce una transizione
conformazionale a **complesso aperto** durante il quale i filamenti
di DNA si separano in prossimità dell'inizio della trascrizione.
- **Terzo step:** quando la RNA pol ha svolto localmente la doppia
elica, inizia la sintesi di RNA. Quando l'enzima è riuscito a
sintetizzare più di 10 nt si dice che evade il promotore. Si forma
un **complesso ternario stabile** enzima, DNA e RNA. Questa è la
transizione verso la fase di allungamento.

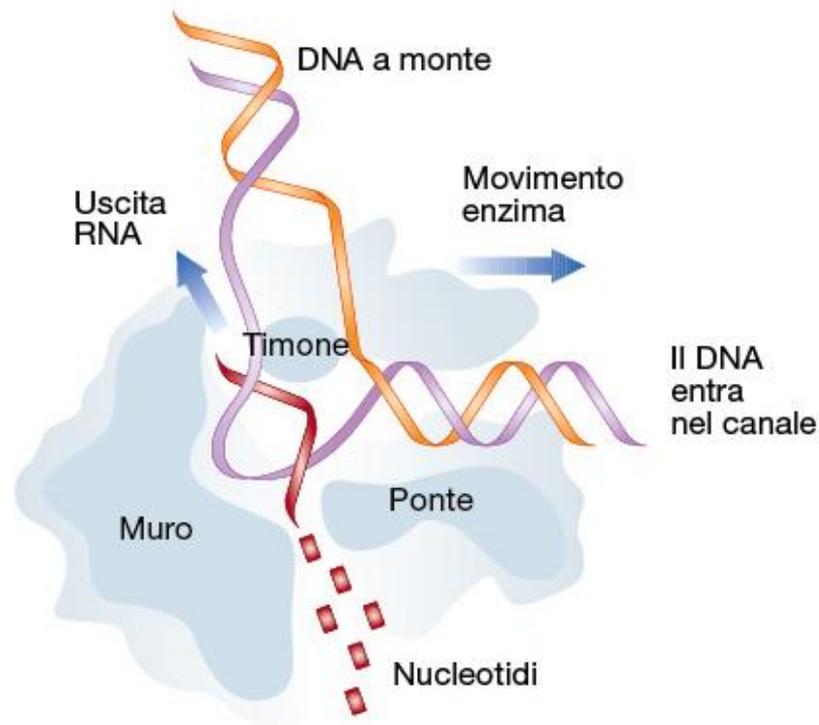


Figura 9.11A Principali domini strutturali interni della RNA polimerasi. (A) Rappresentazione schematica dei domini strutturali della RNA polimerasi e della loro relazione con il DNA nel complesso aperto. (B) La bolla di trascrizione con la regione ibrida RNA-DNA di 9 nucleotidi.

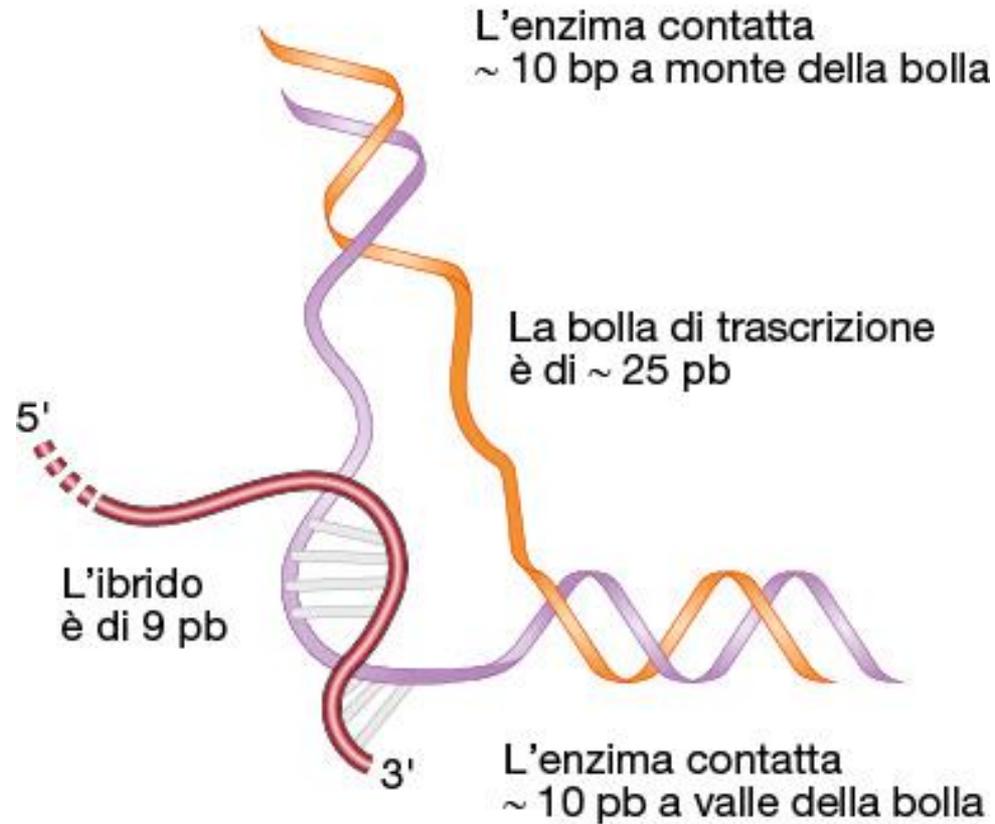
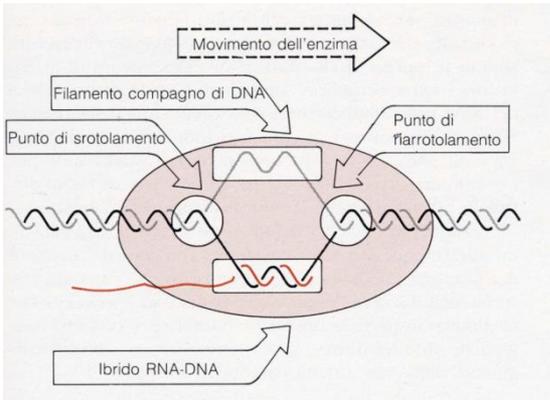
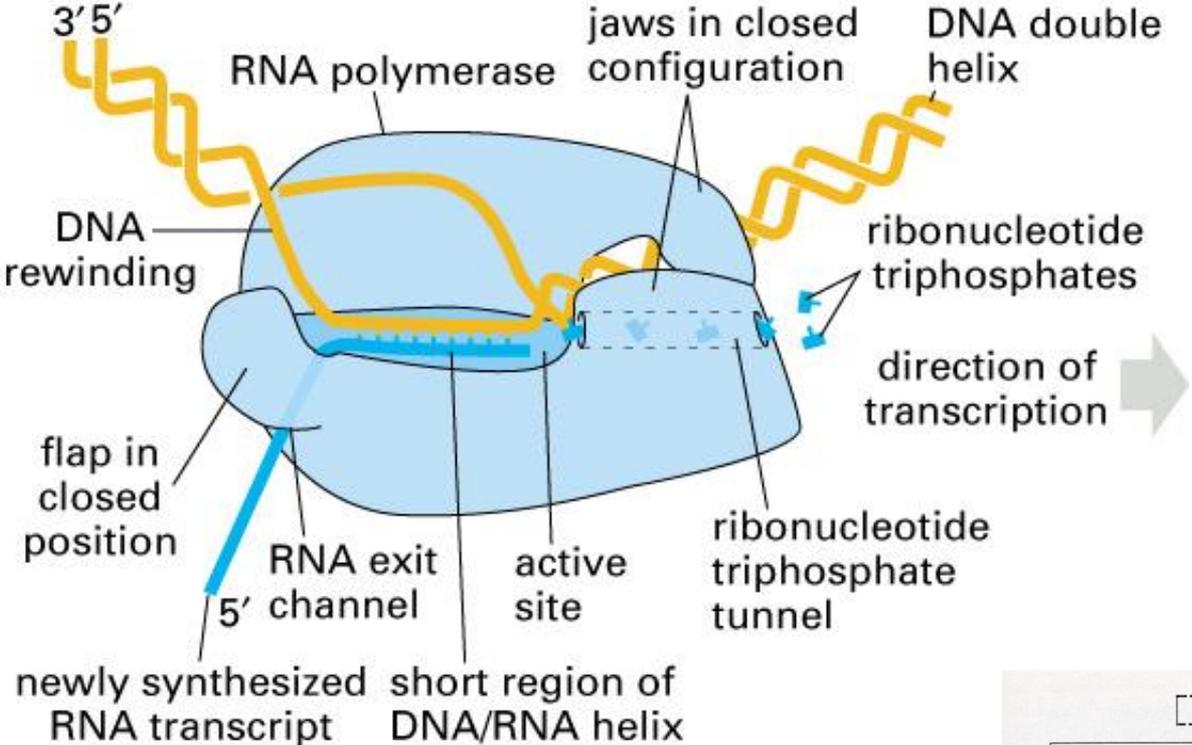
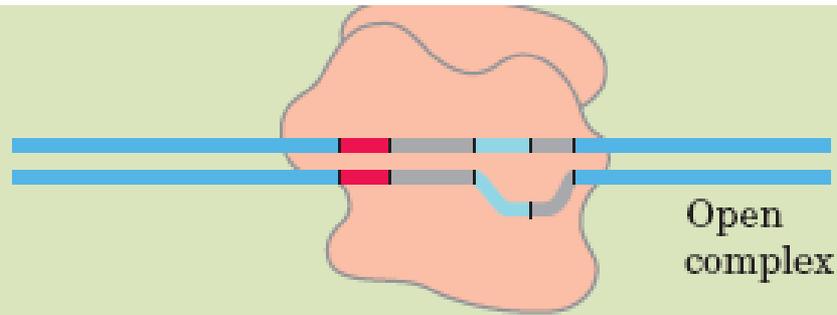


Figura 9.11B Principali domini strutturali interni della RNA polimerasi. (A) Rappresentazione schematica dei domini strutturali della RNA polimerasi e della loro relazione con il DNA nel complesso aperto. (B) La bolla di trascrizione con la regione ibrida RNA-DNA di 9 nucleotidi.

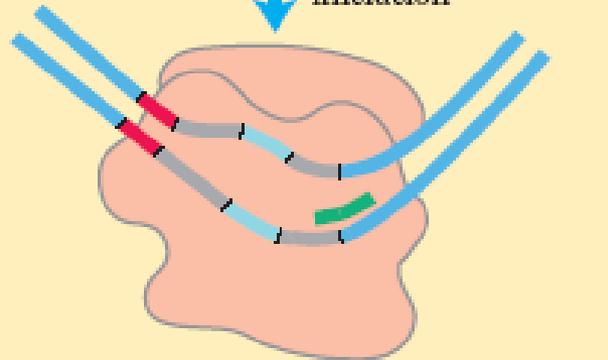
RNA Polymerase



Initiation

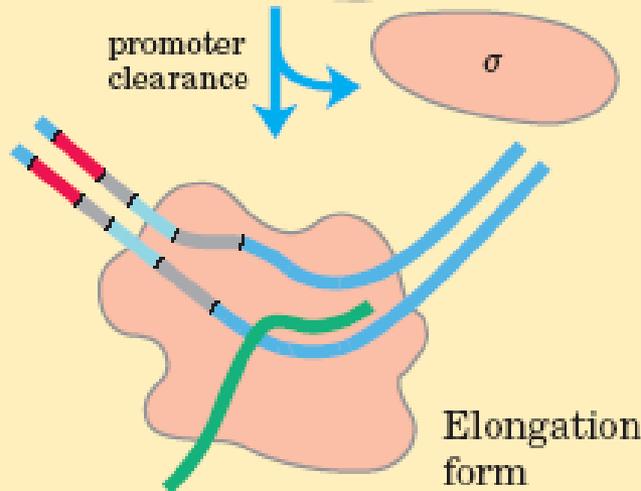


transcription initiation



promoter clearance

σ



Copyright ©The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

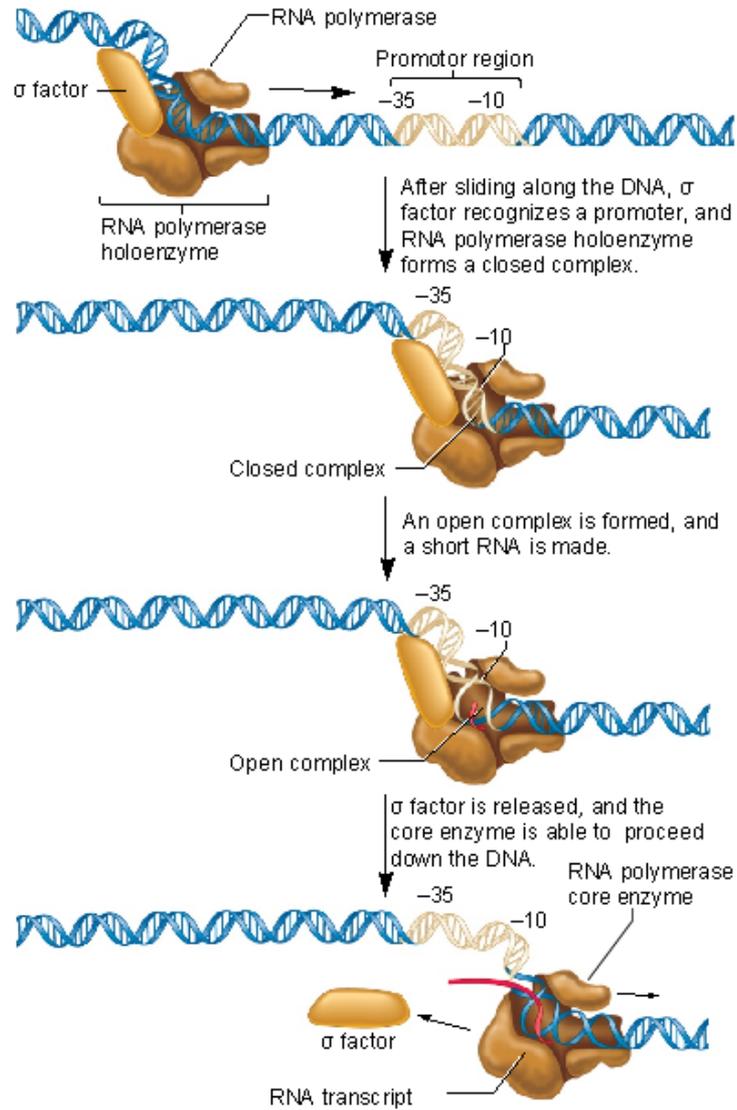


Figure 12.7

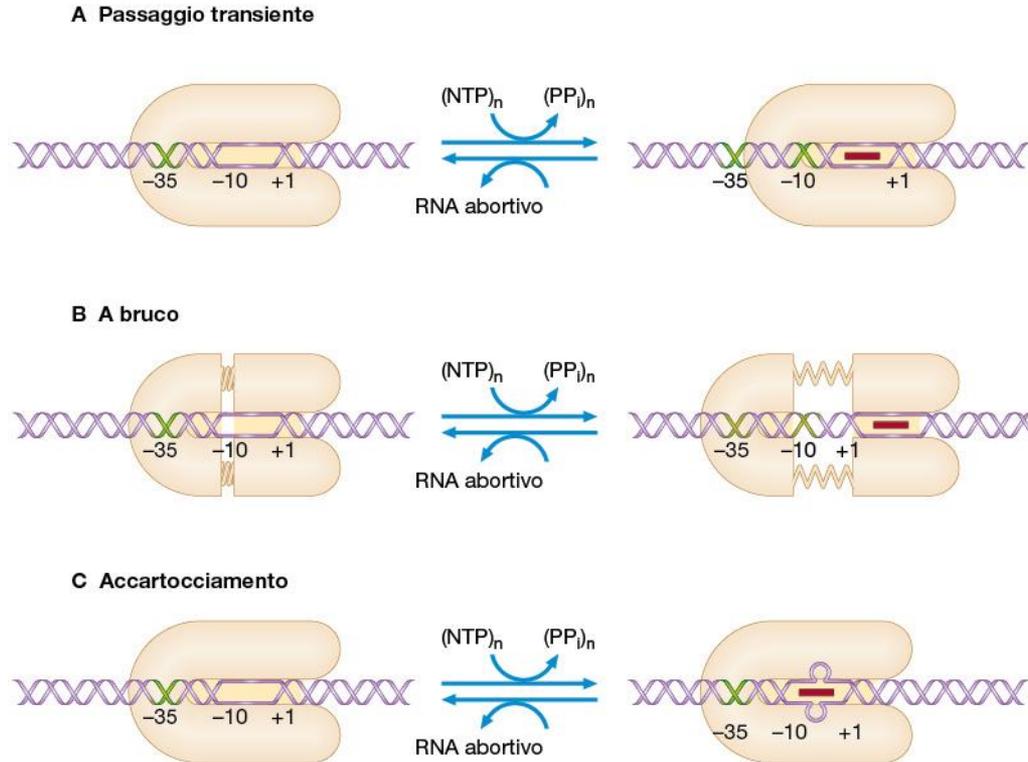
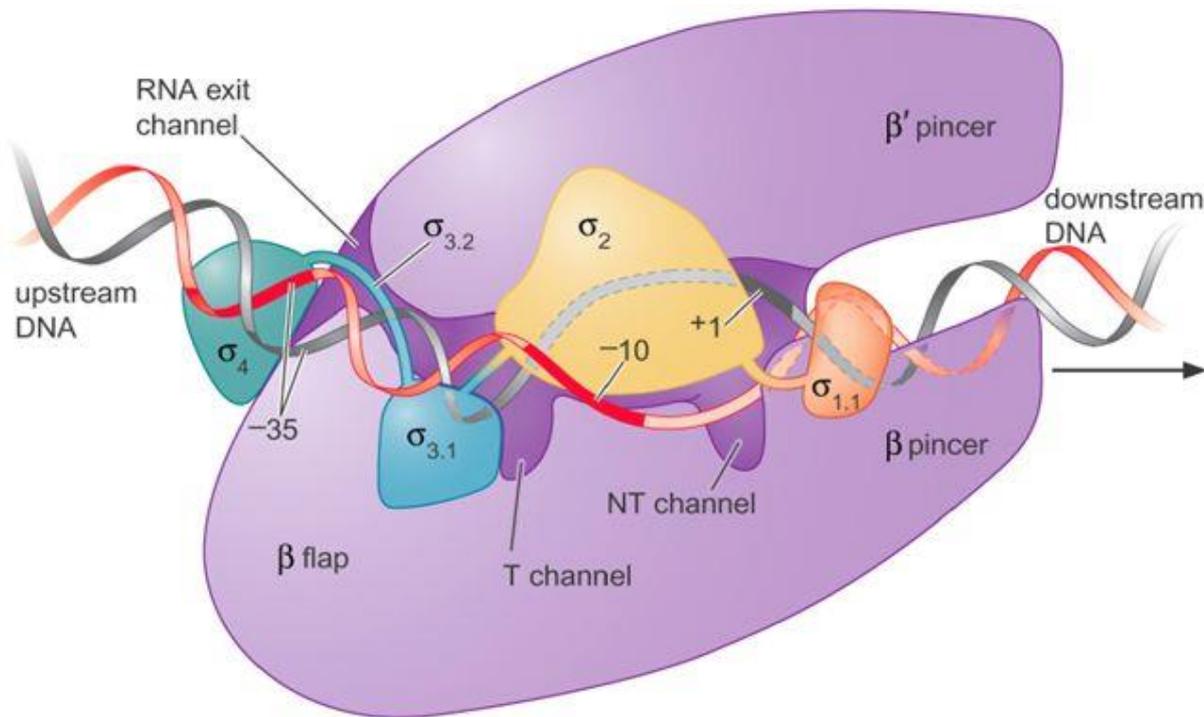


Figura 9.12 I tre modelli che descrivono la fase iniziale della sintesi dell'RNA. **(A)** La polimerasi si sposta avanti e indietro sul promotore. **(B)** La polimerasi, che deve contenere una regione estendibile, si allunga sul DNA occupando una zona più vasta del suo ingombro in assenza dei nucleotidi. **(C)** La polimerasi richiama al suo interno un tratto di DNA "downstream" che si apre e si accartocchia al suo interno. Questo accartocciamento si pensa fornisca energia per promuovere il distacco dal promotore.

La transizione da complesso chiuso a complesso aperto richiede un cambiamento strutturale dell'enzima e l'apertura della doppia elica. La subunità $\sigma 70$ subisce una isomerizzazione che non richiede apporto di energia (ATP). Il sito attivo dell'enzima (nelle subunità β e β') è alla base delle pinze (fenditura del centro attivo).

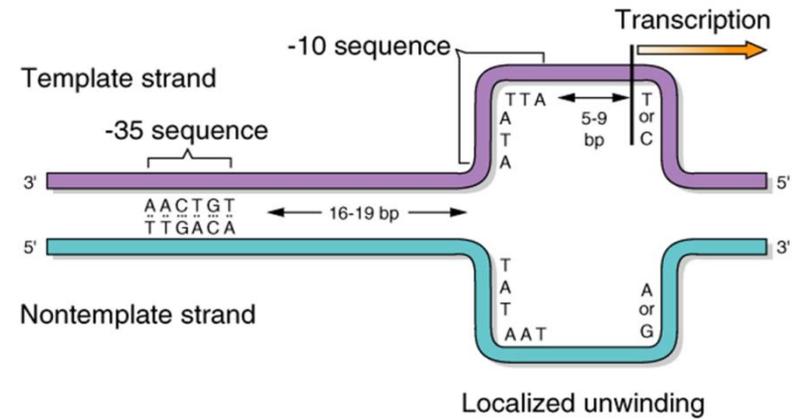
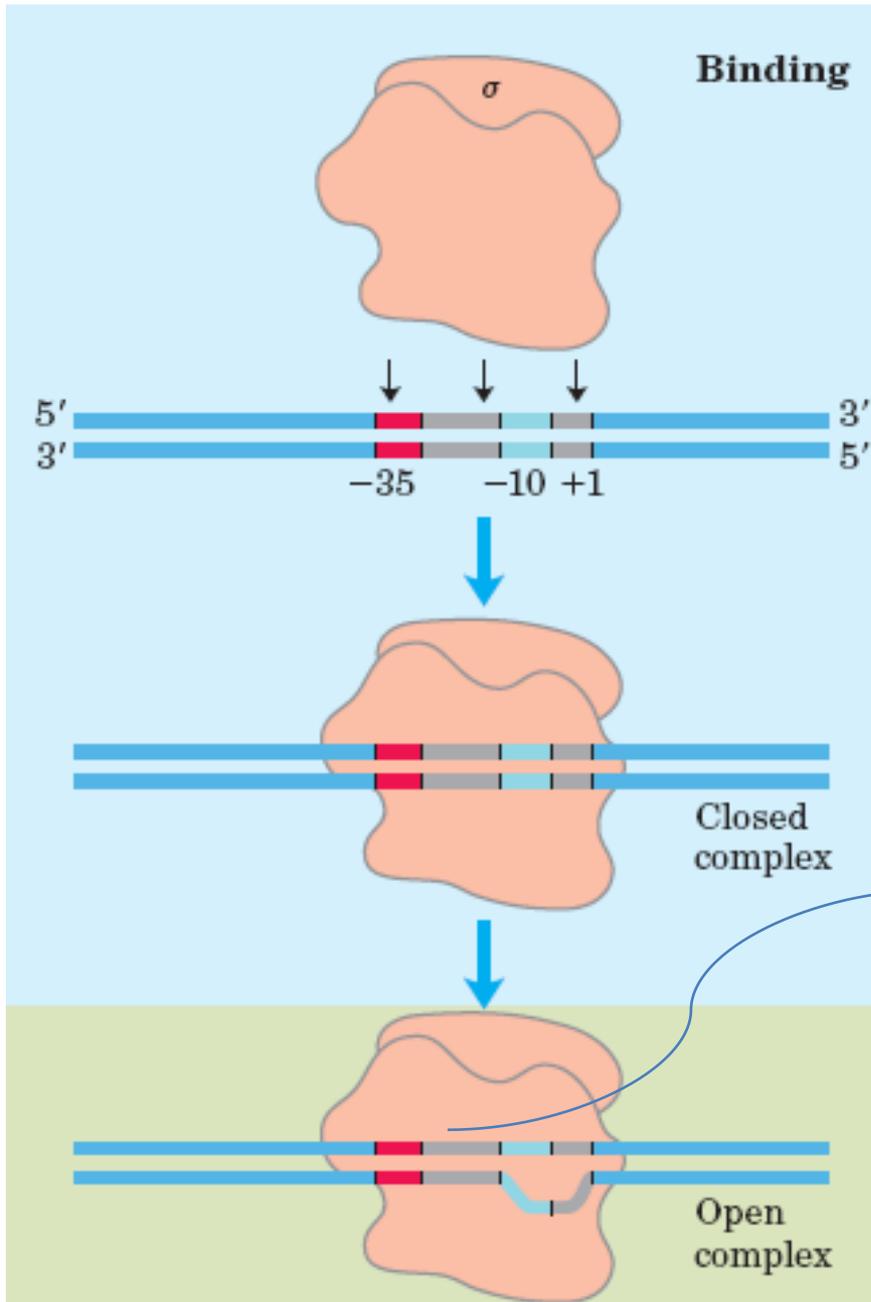


La RNA pol inizia la trascrizione senza bisogno di un primer

- I ribonucleotidi di inizio vengono portati nel sito attivo e tenuti stabilmente sul filamento stampo mentre il successivo rNTP viene presentato per la corretta geometria del legame.
- La RNA pol stabilisce specifiche interazioni con gli rNTP iniziali.
- **Le interazioni sono specifiche per le purine e le catene che iniziano con A o con G possono dare un efficiente inizio della trascrizione.**

La RNA pol sintetizza parecchi corti RNA prima di riuscire ad entrare nella fase di allungamento

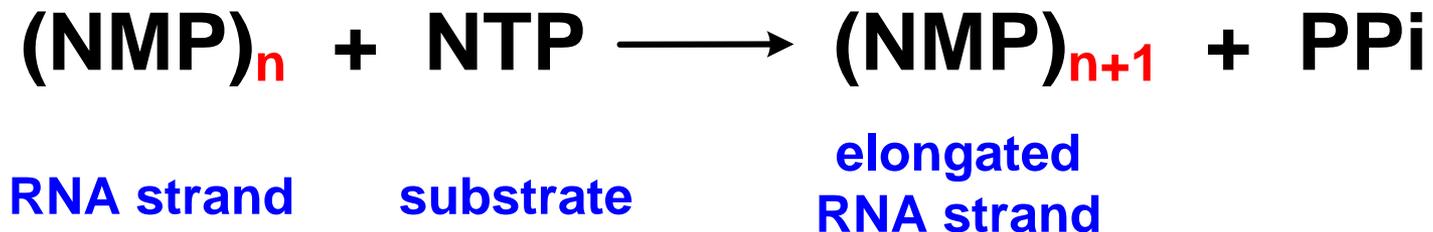
- **Inizio abortivo:** l'enzima sintetizza corte molecole di RNA di lunghezza inferiore ai 10 nt che vengono rilasciati dalla polimerasi. La RNA pol reinizia una nuova sintesi.
- Quando la RNA pol riesce a fare un corto frammento di RNA superiore a 10 nt, si stabilisce un **complesso ternario stabile** (RNA pol-DNA-RNA) e può aver inizio la fase di allungamento.
- La regione 3.2 del fattore σ è coinvolta in quanto mimica l'RNA.



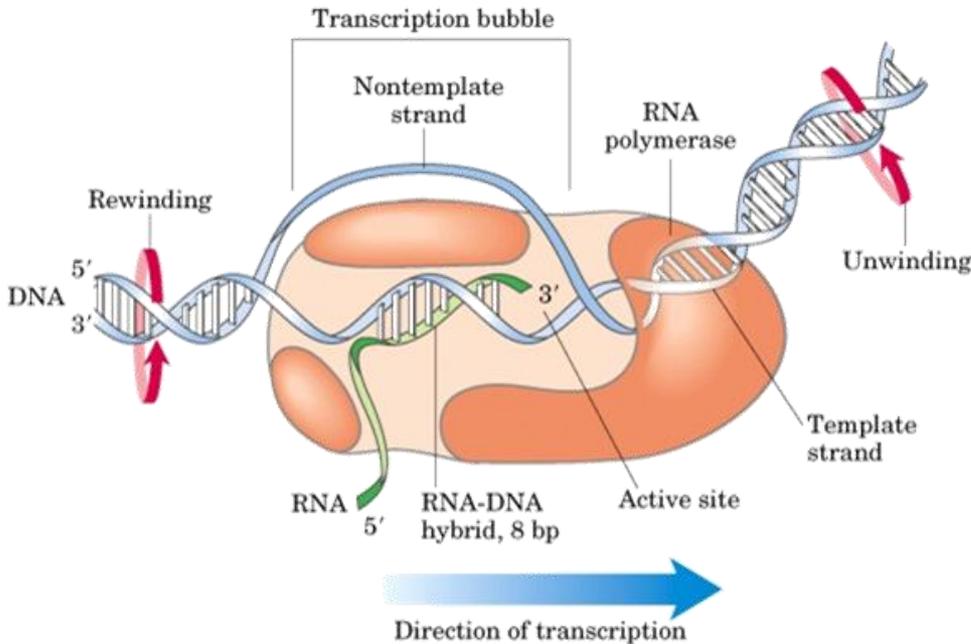
Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

Allungamento

- Il rilascio della subunità σ causa il cambiamento conformazionale nel “core” enzimatico. Il **core enzimatico scivola** sul DNA stampo verso l'estremità 3'.
- I NTPs sono aggiunti sequenzialmente al 3' -OH del filamento nascente di RNA.



La bolla di trascrizione



- La RNA-pol, un segmento di DNA e la catena nascente di RNA formano un complesso chiamato **bolla di trascrizione**.
- Il segmento **3'** dell'RNA nascente ibridizza con il DNA stampo e il suo **5'** terminale si estende fuori della bolla di trascrizione, man mano che la sintesi procede.
- Il DNA a doppio filamento entra davanti tra le due pinze e all'inizio del solco alla base delle pinze dove c'è il sito catalitico I due filamenti si separano: canale di entrata per lo stampo e di uscita per quello non stampo.
- L'elica del DNA si svolge davanti alla RNA pol e si riavvolge dietro alla RNA pol.

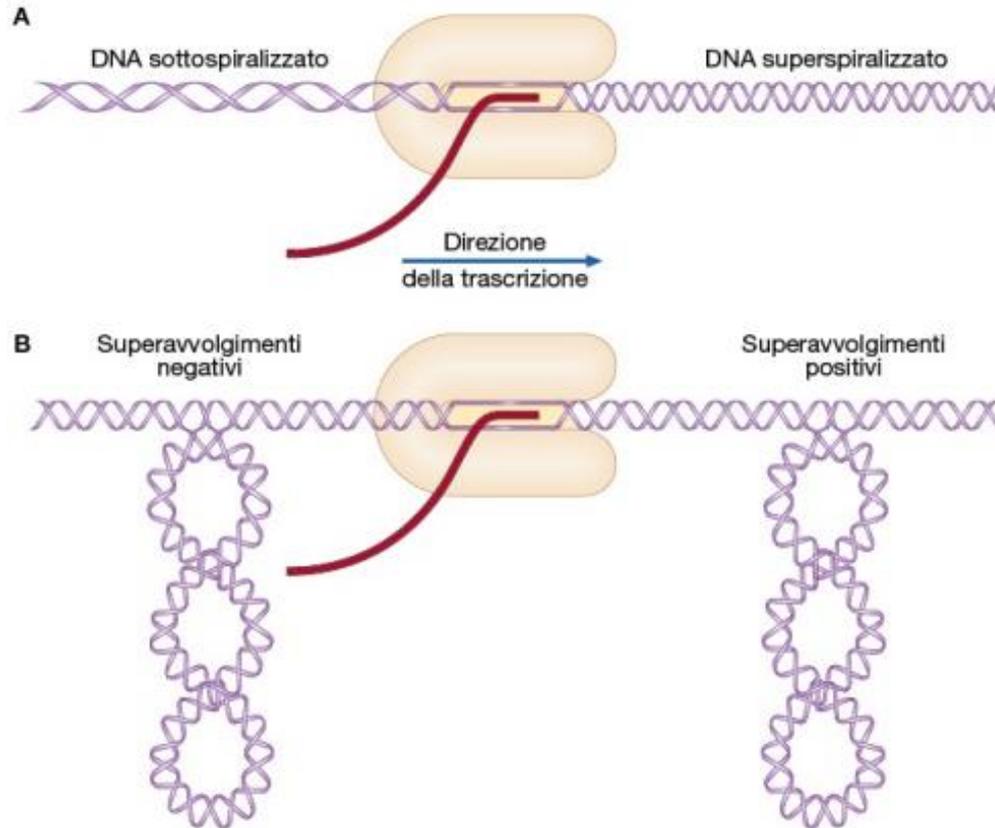


Figura 9.18 Modello dei domini gemelli (*twin domain model*) per la trascrizione. Durante la trascrizione, l'avanzamento della RNA polimerasi lungo il DNA e l'apertura della bolla di trascrizione inducono la formazione di domini superspiralizzati a valle e di domini sottospiralizzati a monte, che vengono chiamati "domini gemelli". Questi possono essere rappresentati come cambiamento del Twist della doppia elica (**A**) o come formazione di superavvolgimenti dell'asse della doppia elica, Writhe (**B**). In natura si possono verificare entrambe queste situazioni. Lo stato topologico del DNA è tenuto sotto controllo da alcune topoisomerasi specifiche.

La RNA pol può effettuare attività di proofreading

- **Editing Piroforolitico:** usa il suo sito attivo per catalizzare la rimozione di un nucleotide inserito in modo non corretto usando P_{Pi}.
- **Editing idrolitico:** torna indietro di uno o più nucleotidi e taglia la regione che contiene l'errore. Questa attività è stimolata da fattori Gre, proteine coinvolte nell'allungamento.

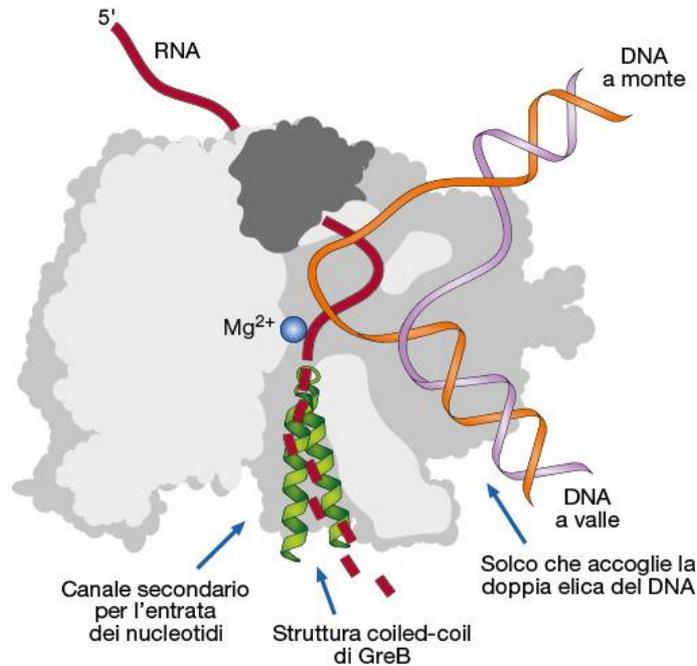
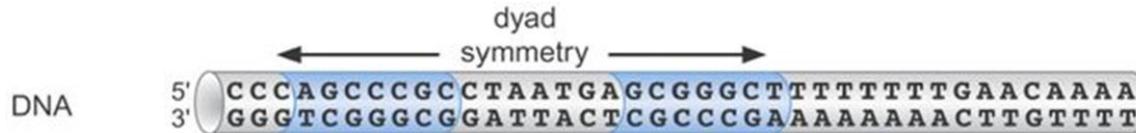


Figura 9.17 Arretramento (backtracking) della RNA polimerasi e controllo dell'allungamento da parte del fattore GreB. La figura mostra uno spaccato della RNA polimerasi: sotto è indicato il canale secondario per l'ingresso dei nucleotidi in cui si inserisce il tratto coiled-coil di GreB (verde); sopra a sinistra della RNA polimerasi si vede una coda di RNA (rosso) già sintetizzato e il tratteggio rosso che lo prosegue in basso rappresenta il tratto di RNA, liberato dall'arretramento della RNA polimerasi sul DNA, che viene poi rimosso dall'attività endonucleasica della polimerasi stessa. È anche mostrato l'atomo di magnesio vicino al sito attivo (piccola sfera blu) della polimerasi. [Modificata da: Opalka, N. et al. (2003), *Cell*, 8, pp. 335-345.]

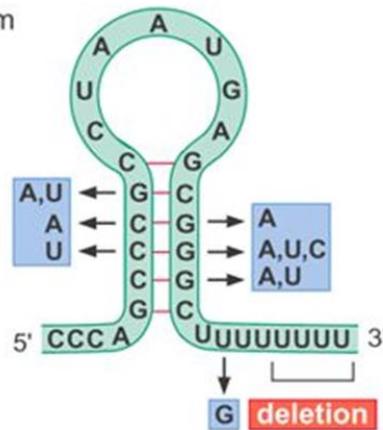
Terminazione

- La RNA-pol si ferma quando c'è un preciso segnale. L' RNA trascritto è rilasciato completamente dal complesso di trascrizione.
- La terminazione avviene o in modo ρ - dipendente o ρ - indipendente.

Terminazione Intrinseca (terminazione **Rho-independent**) : coinvolge sequenze terminatrici all'interno delle quali ci sono segnali per far fermare la RNA pol. Normalmente sono sequenze palindromiche di circa 20 nt seguite da una stringa di circa 8 A:T bp che formano strutture a hairpin stem-loop che portano alla dissociazione della RNA pol dallo stampo.



transcript folded to form termination hairpin



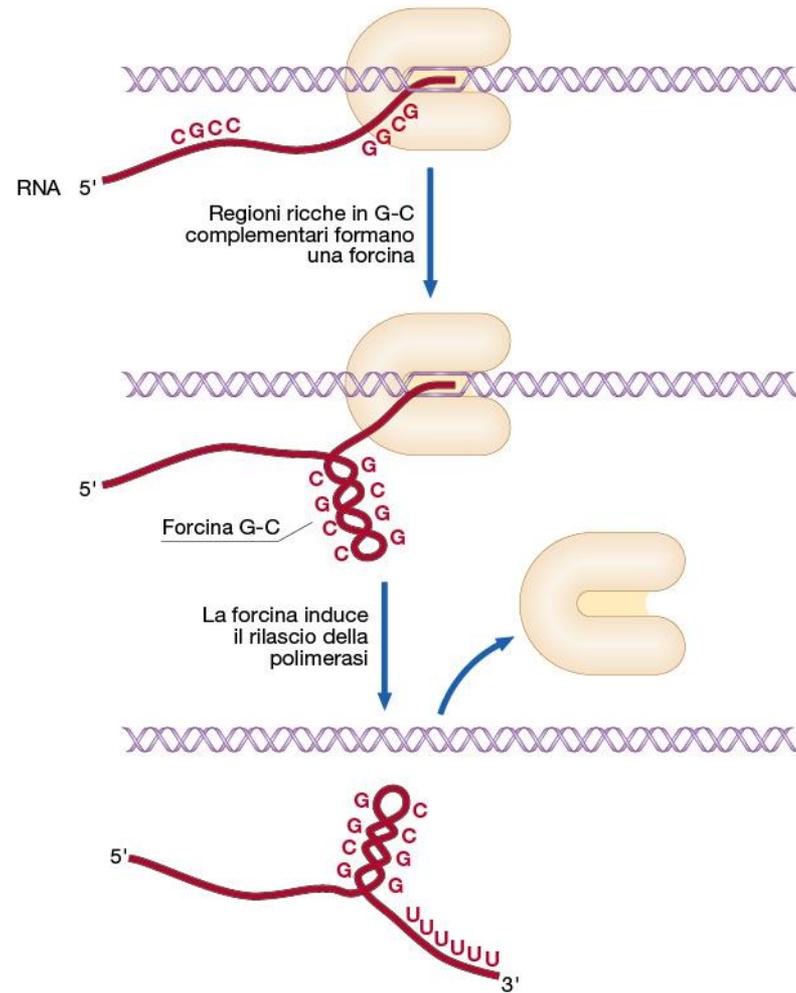
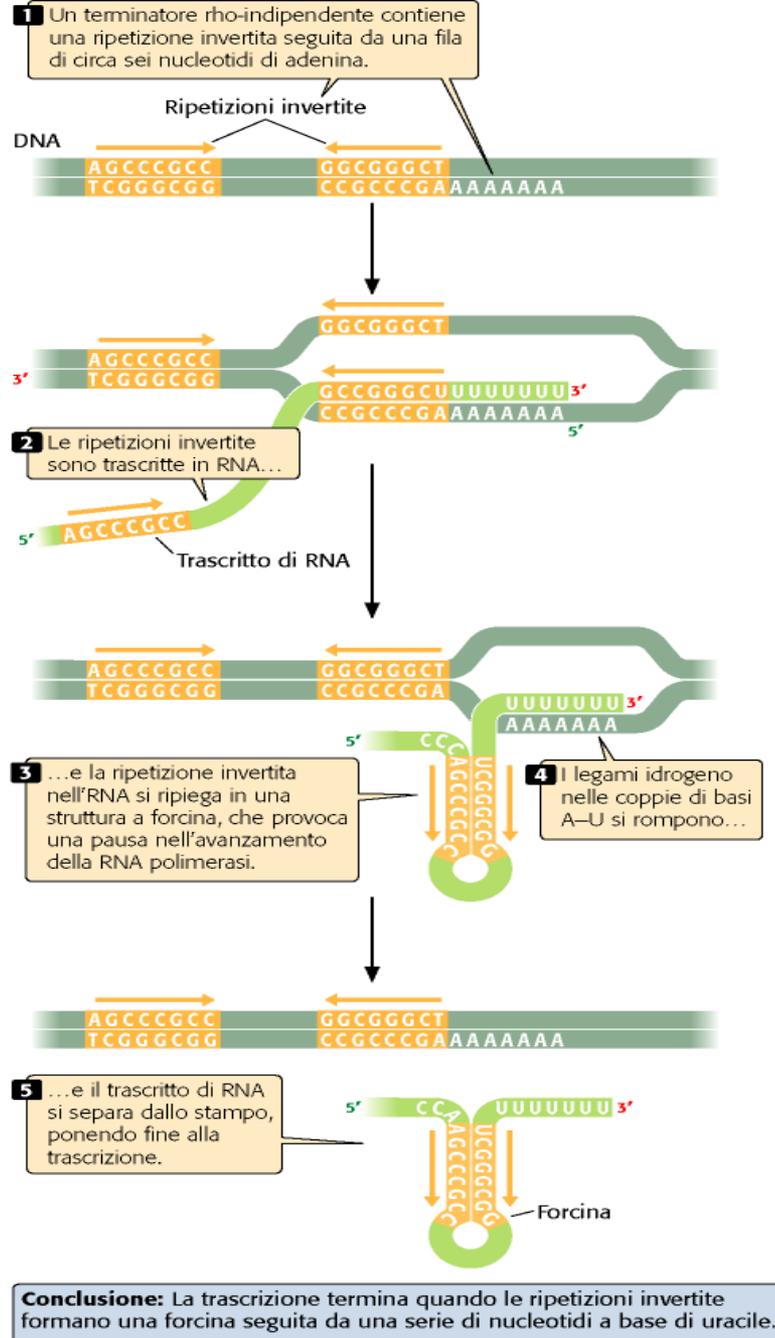


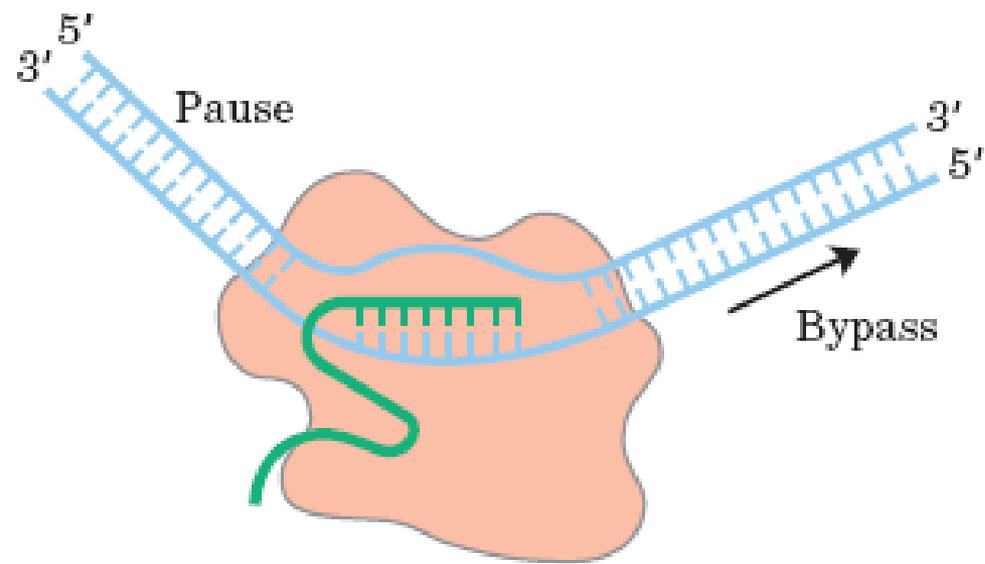
Figura 9.20 Rappresentazione schematica della terminazione intrinseca (Rho-indipendente). La polimerasi incontra e trascrive la regione del terminatore; l'RNA nascente assume la struttura a forcina che destabilizza il complesso di allungamento e ne provoca la dissociazione in corrispondenza della sequenza di U.

Azione dello Stem-loop

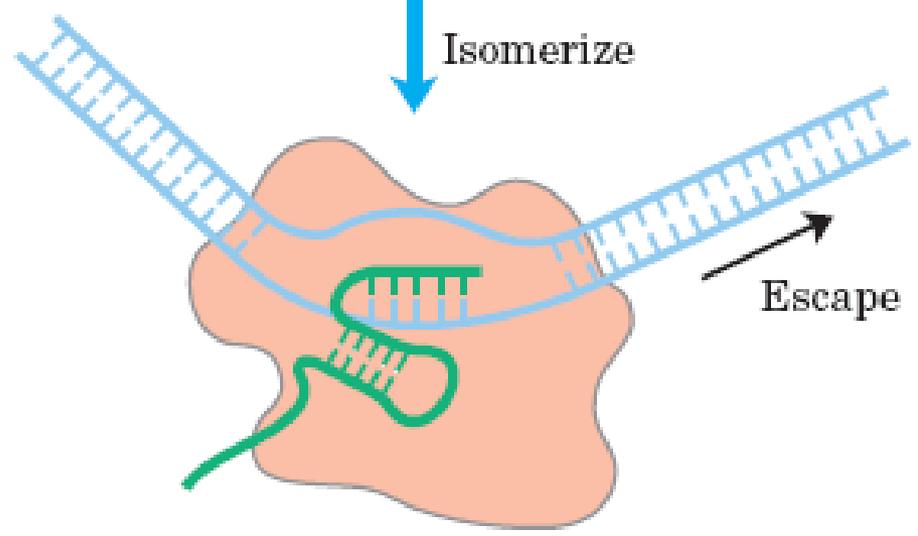
- La struttura a Stem-loop altera la **conformazione della RNA-pol**, fermando il suo movimento (stallo).
- La competizione dell'ibrido RNA-RNA e dell'ibrido DNA-DNA riduce la stabilità dell'ibrido **DNA-RNA** e causa la dissociazione del complesso di trascrizione (tra l'appaiamento delle basi quello rU:dA è uno dei più instabili).

Terminazione della trascrizione





Isomerize



Terminate

Terminazione ρ -dipendente

- **Terminazione Rho-dipendente:** usa un fattore di terminazione chiamato fattore ρ (rho factor) che è una proteina che ferma la sintesi dell' RNA in specifici siti (siti rut, ricchi in C e lunghi circa 40 nt che non formano strutture secondarie). La proteina si lega ad un sito rho sull'RNA nascente e si muove verso la RNA pol.
- Rho è una RNA elicasi composta da 6 subunità identiche. Ogni subunità ha un dominio di legame per RNA e un dominio ATPasico (richiede ATP per funzionare).
- Rho fa rilasciare l'RNA dal suo stampo.
- **Rho non si lega a trascritti che si stanno traducendo**

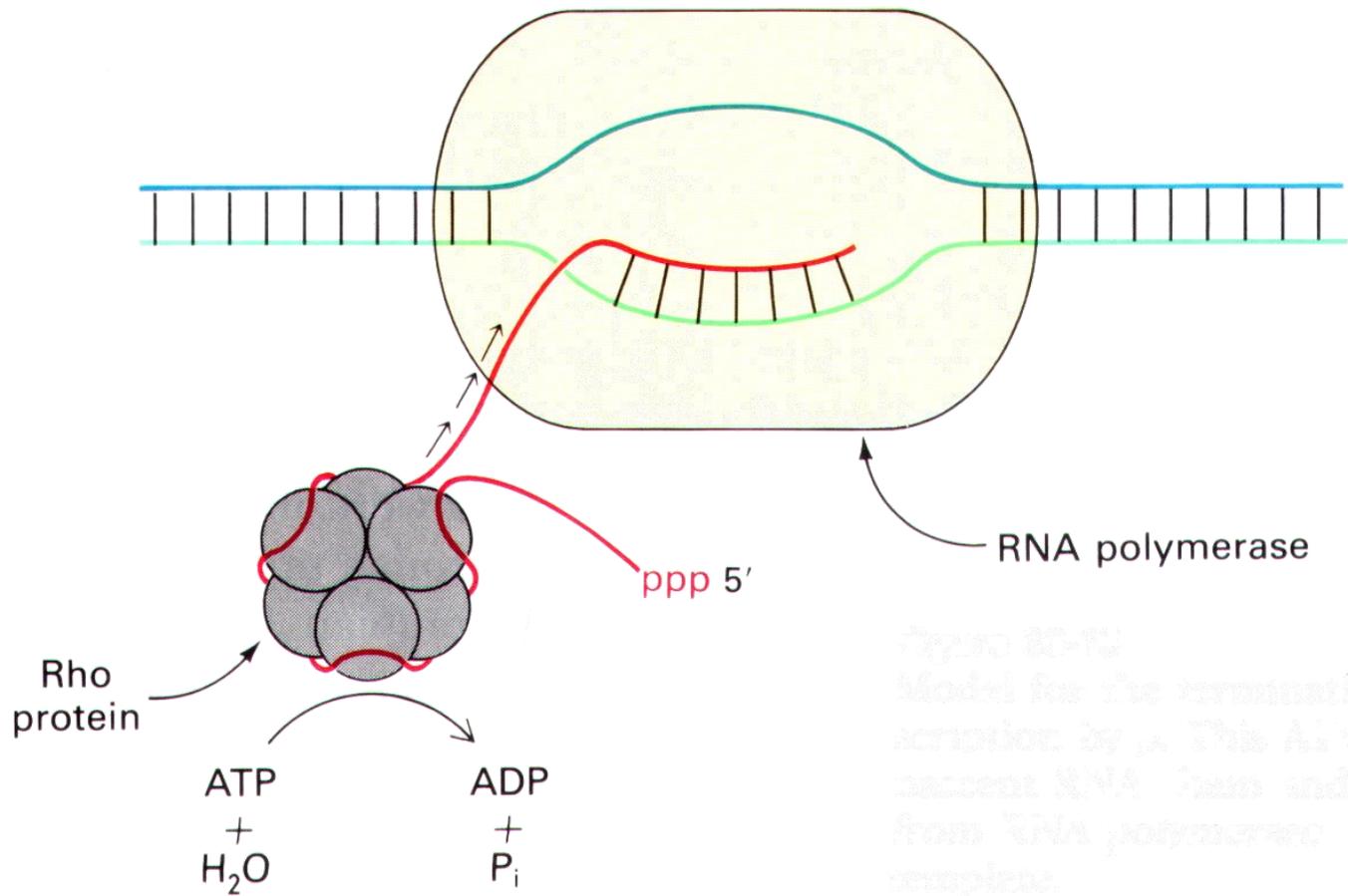


Figure 10-10
 Model for the termination
 of transcription by ρ . This ρ factor
 binds to the RNA chain and ρ
 moves toward RNA polymerase
 using energy from ATP hydrolysis.
 Upon reaching the polymerase,
 it causes the polymerase to
 dissociate from the DNA template.

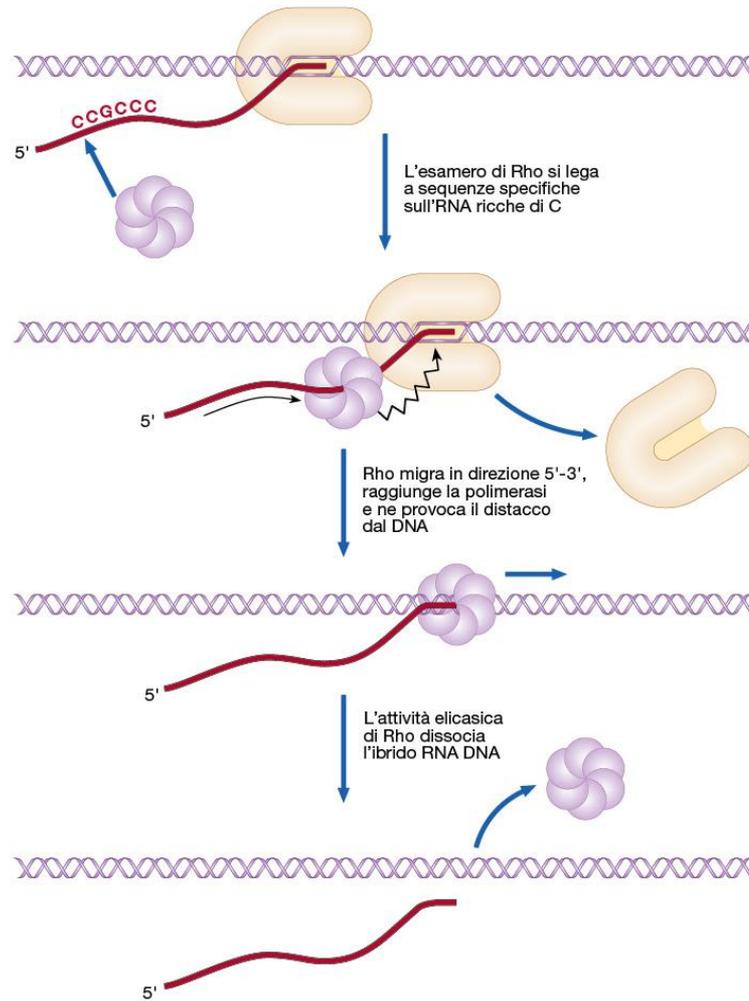
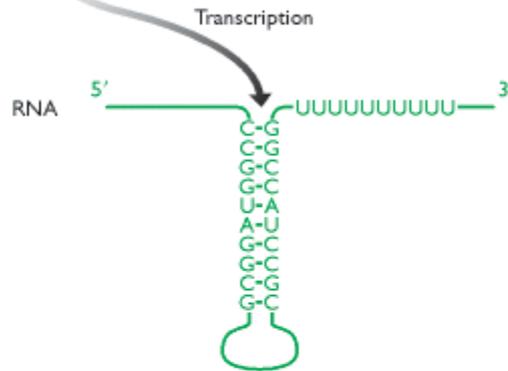


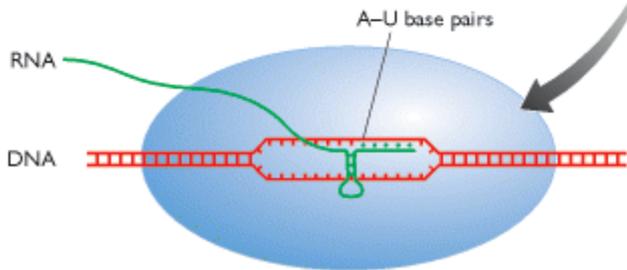
Figura 9.23 Modello per la terminazione Rho-dipendente. Quando l'RNA polimerasi ha trascritto e superato Rut, questo lega il fattore Rho, che poi trasloca lungo l'RNA seguendo la polimerasi. Quando questa sintetizza la sequenza diadica, che assume una struttura a forcina, rallenta (o stalla), Rho la raggiunge e innesca la terminazione.



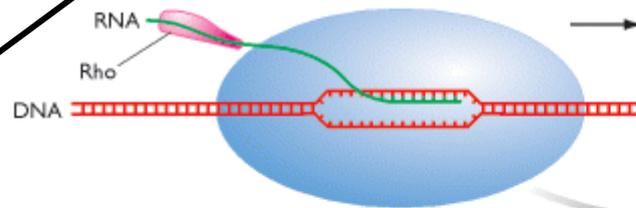
Rho-independent termination



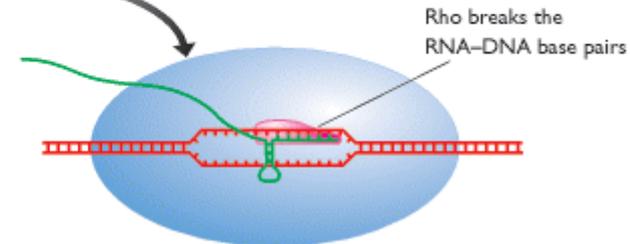
Rho-dependent Termination

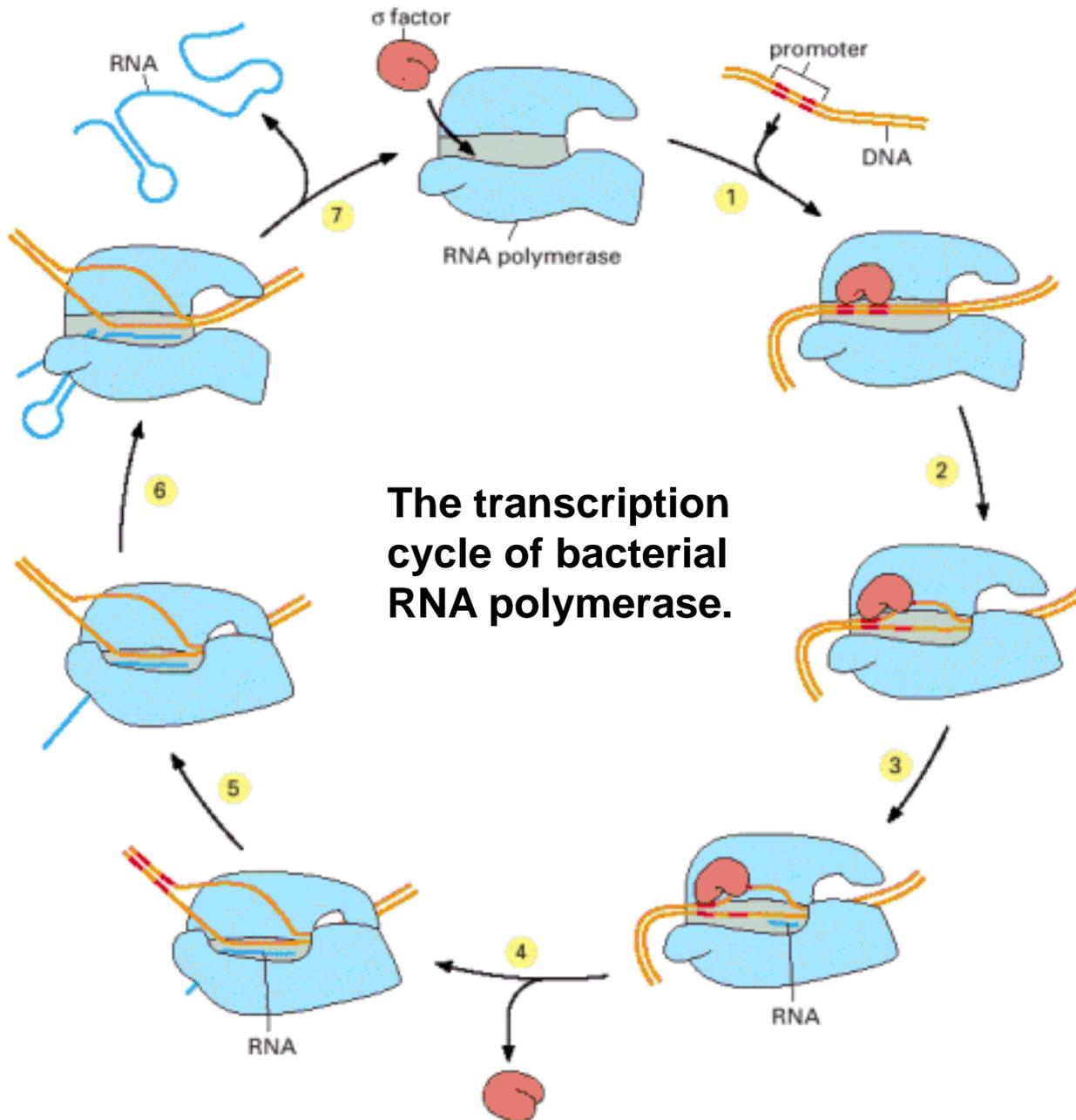


Rho is a hexamer of six identical subunits with helicase activity that binds to a 70 nt long RNA stretch rich in C and poor in G



Elongation complex stalls at a hairpin loop

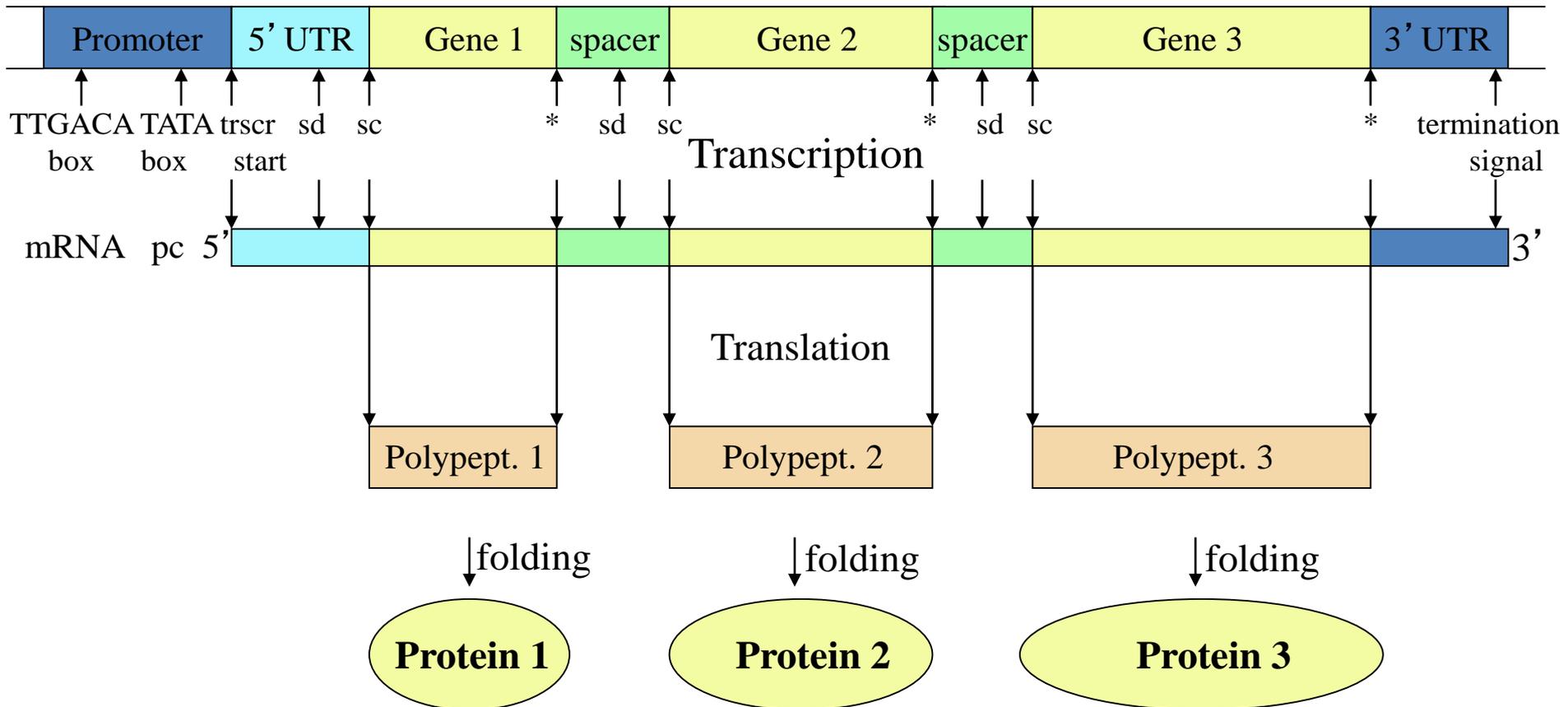




The transcription cycle of bacterial RNA polymerase.

In step 1, the RNA polymerase holoenzyme (core polymerase plus σ factor) forms and then locates a promoter. The polymerase unwinds the DNA at the position at which transcription is to begin (step 2) and begins transcribing (step 3). This initial RNA synthesis (sometimes called "abortive initiation") is relatively inefficient. However, once RNA polymerase has managed to synthesize about 10 nucleotides of RNA, σ relaxes its grip, and the polymerase undergoes a series of conformational changes (which probably includes a tightening of its jaws and the placement of RNA in the exit channel). The polymerase now shifts to the elongation mode of RNA synthesis (step 4), moving rightwards along the DNA in this diagram. During the elongation mode (step 5) transcription is highly processive, with the polymerase leaving the DNA template and releasing the newly transcribed RNA only when it encounters a termination signal (step 6). Termination signals are encoded in DNA and many function by forming an RNA structure that destabilizes the polymerase's hold on the RNA, as shown here. In bacteria, all RNA molecules are synthesized by a single type of RNA polymerase and the cycle depicted in the figure therefore applies to the production of mRNAs as well as structural and catalytic RNAs.

L' unità trascrizionale nei batteri è l' operone

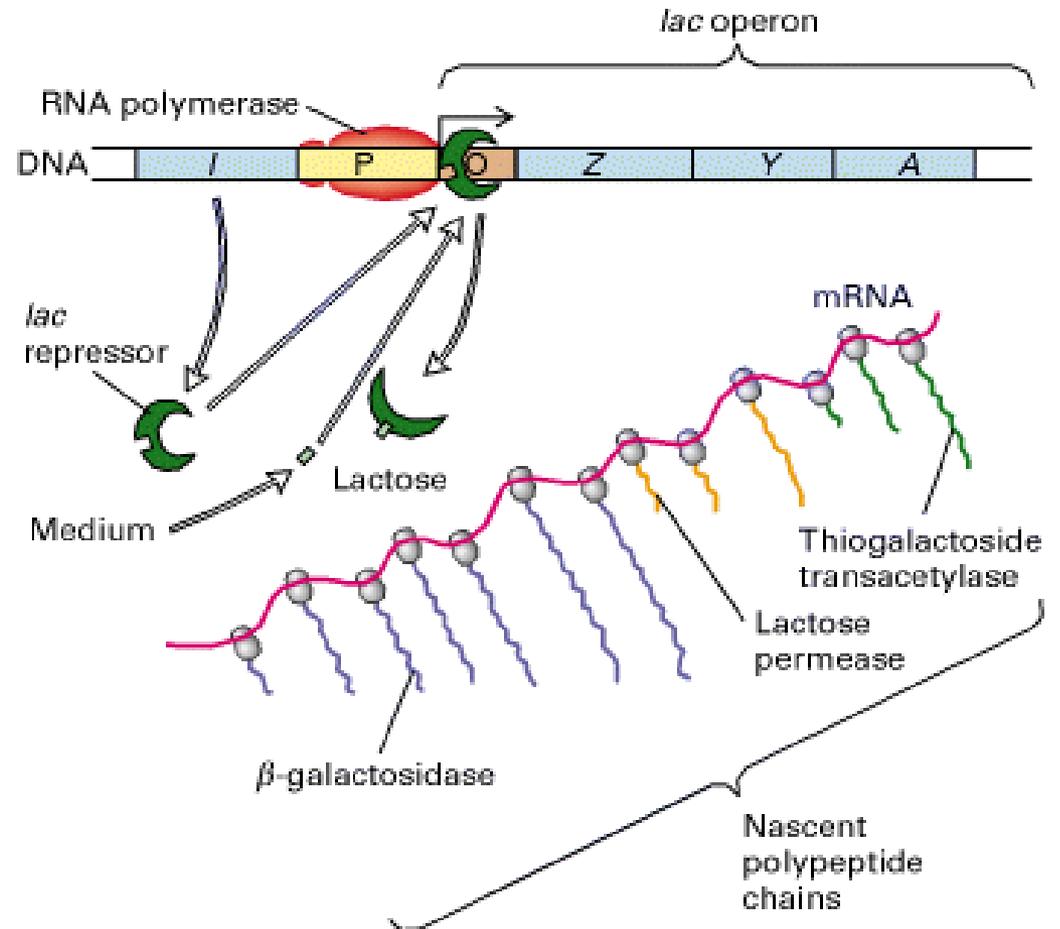


sd = Shine-Dalgarno

sc = start codon

* = stop codon

- Molecular details of gene expression control in bacteria: *lac* operon *E. coli* (Jacob & Monod 1960s)



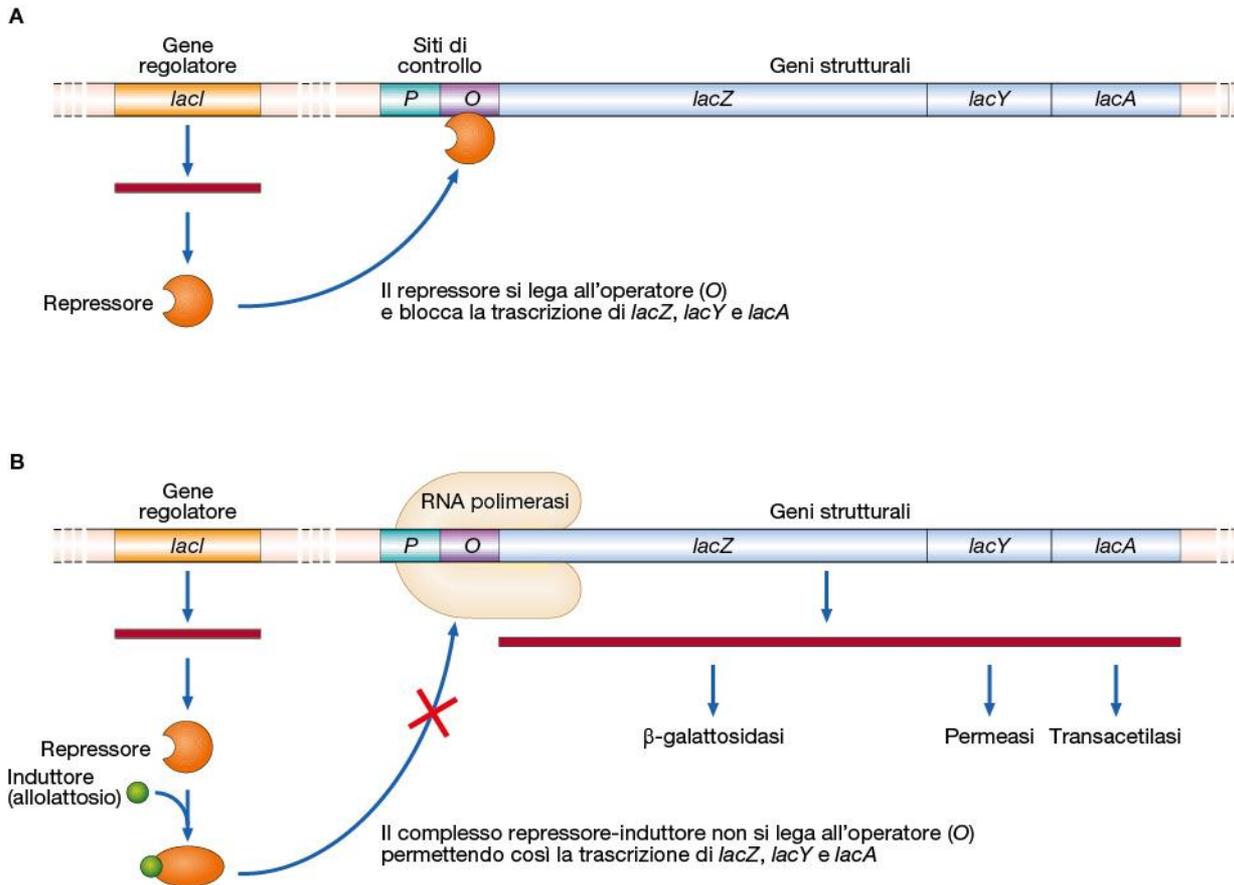


Figura 10.5 Operone lattosio. L'operone lattosio è un operone inducibile a controllo negativo. In (A) è mostrato lo stato represso dell'operone quando, in assenza di lattosio, una molecola di repressore è legata al sito operatore e impedisce alla RNA polimerasi di legarsi al promotore e iniziare la trascrizione dei geni a valle. In (B) si vede che l'induttore, l'allolattosio o l'IPTG, si lega al repressore, formando un complesso che non è più in grado di legarsi all'operatore. In questo caso, la polimerasi troverà il promotore libero e potrà trascrivere i geni strutturali.

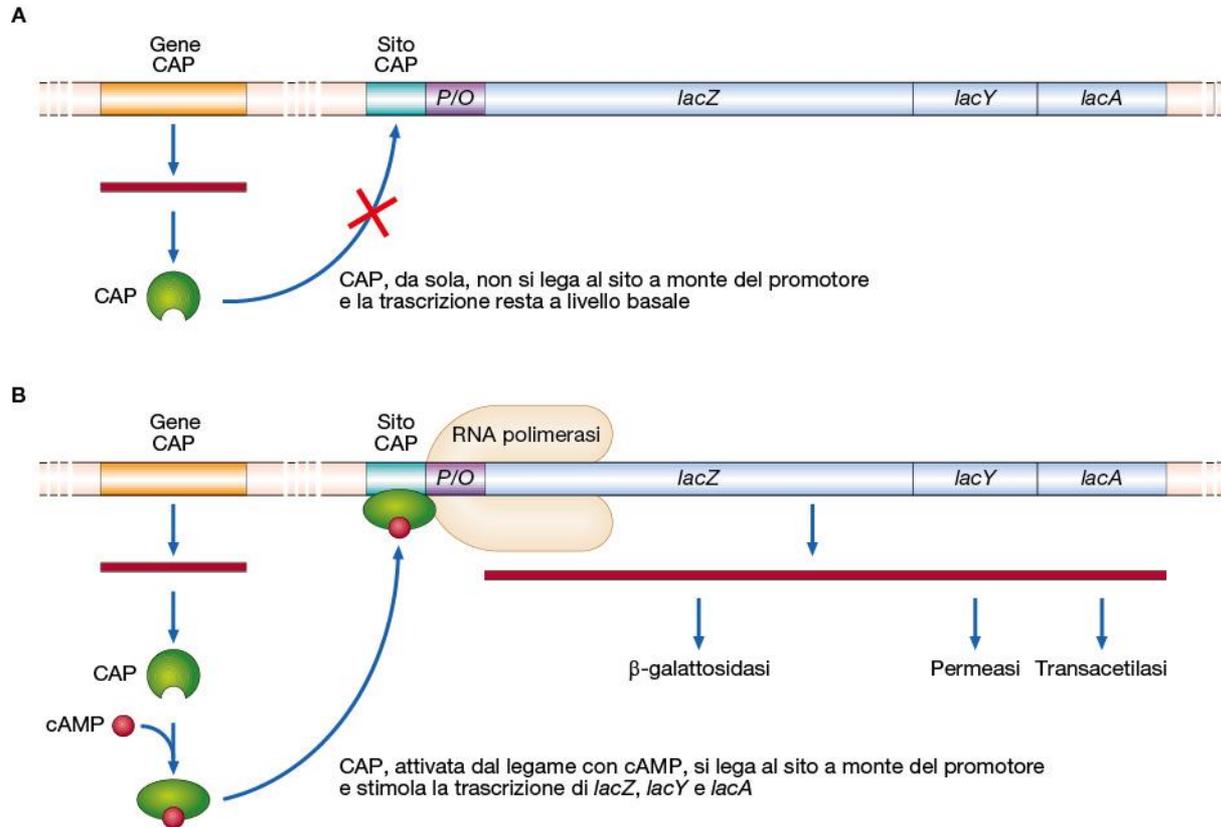
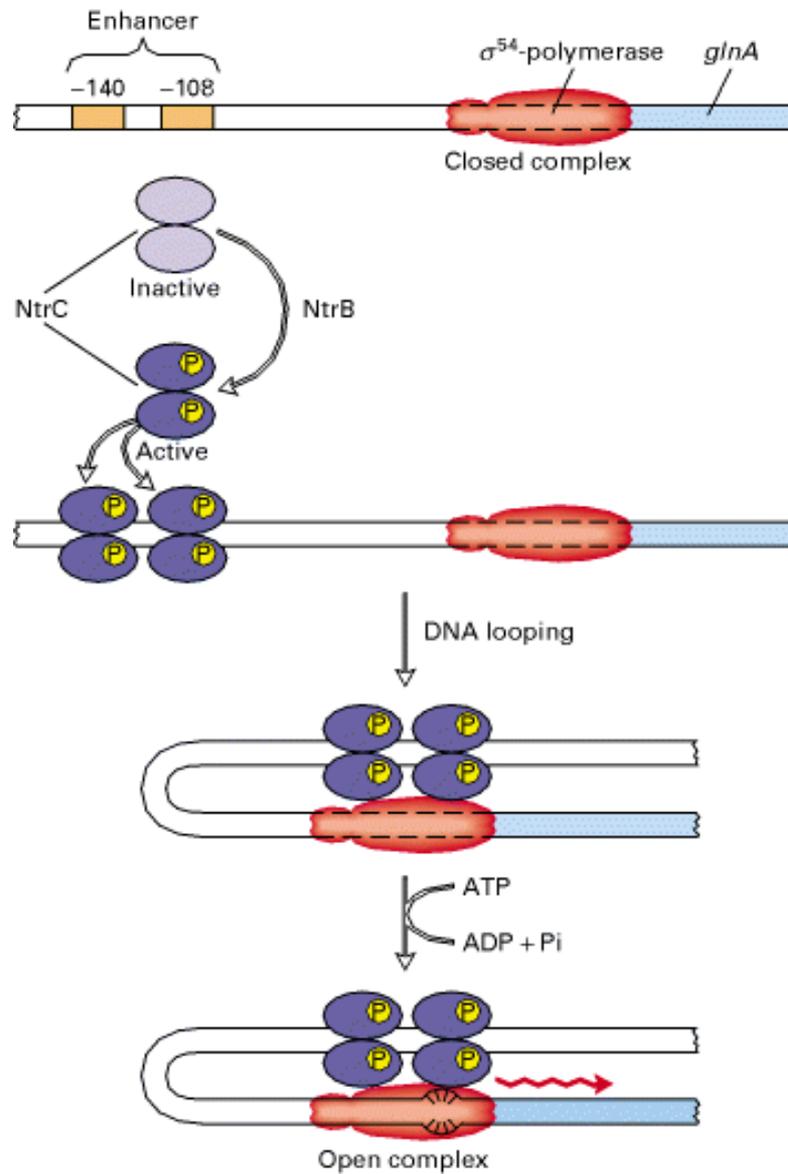


Figura 10.11 Controllo positivo dell'operone lattosio. Oltre al controllo negativo sopra descritto, l'operone *lac* è soggetto anche a un controllo di tipo positivo. **(A)** A monte della regione regolativa promotore/operatore dell'operone *lac* è presente un sito di legame per la proteina regolatrice CAP, prodotto da un gene localizzato a distanza nel genoma. CAP, da sola, non è in grado di riconoscere e legare il corrispondente sito bersaglio, determinando un basso livello di trascrizione. **(B)** In assenza di glucosio si ha un aumento del cAMP, che, legando CAP, la rende in grado di legare il sito CAP e di attivare così la trascrizione dei geni strutturali.

Enhancer batterici



Trascrizione
Glutamina sintetasi

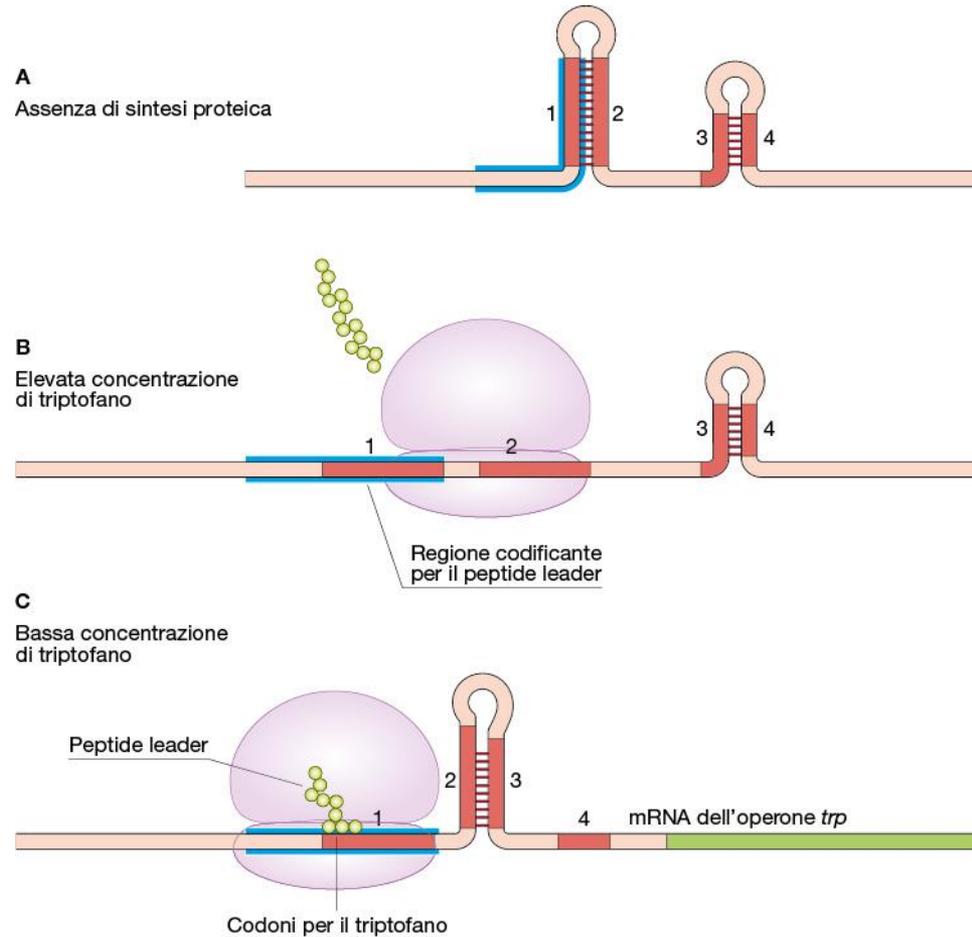


Figura 10.19 Meccanismo dell'attenuatore *trp*. (A) Le regioni 1, 2, 3 e 4 dell'RNA nascente possono appaiarsi a formare le forchine 1-2 e 3-4; quest'ultima è una efficiente forchina di terminazione. (B) Quando nella cellula è presente molto triptofano, e non vi è quindi necessità di attivare l'operone, il ribosoma che traduce la sequenza leader dell'mRNA nascente, coprirà le sequenze 1 e 2 impedendo la formazione della forchina 1-2 ma non della 3-4, che quindi provocherà interruzione della trascrizione a monte delle ORF dei geni strutturali. (C) In condizioni di bassa concentrazione di triptofano il ribosoma si arresterà sui due codoni *trp* presenti nella sequenza leader, coprendo la sequenza 1 ma non la 2; questa è libera di formare la forchina alternativa 2-3, energeticamente favorita a discapito della 3-4. Verrà così a mancare il terminatore trascrizionale e la trascrizione potrà proseguire per tutto l'operone policistronico.