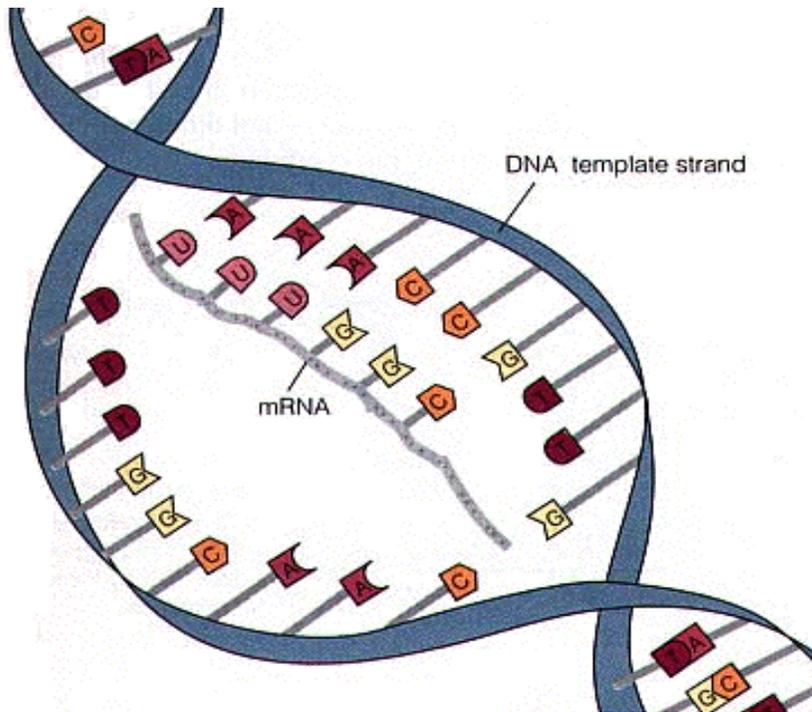
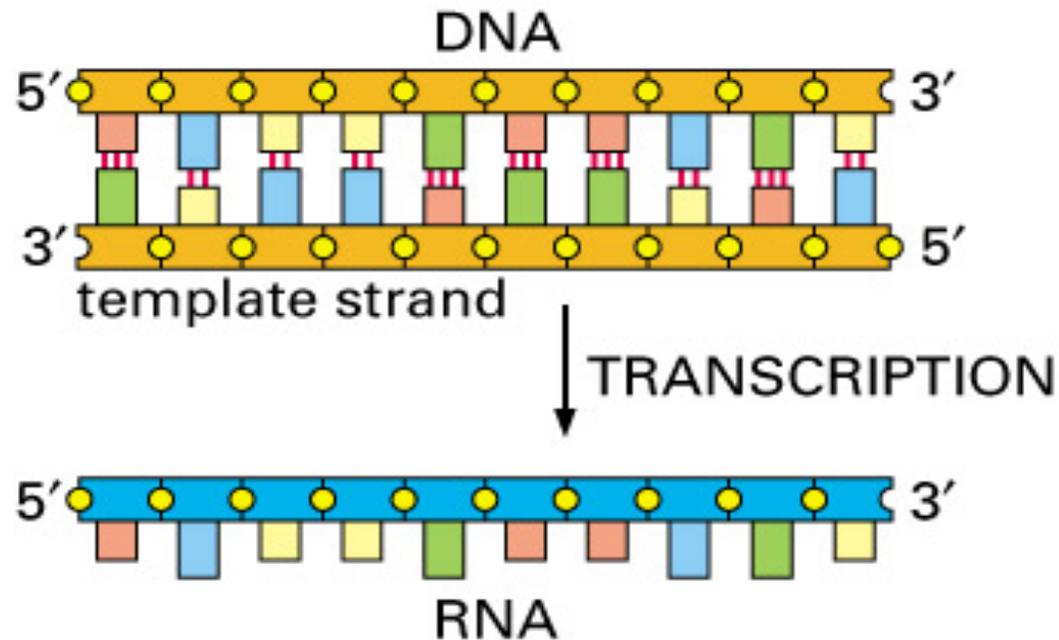


# TRASCRIZIONE

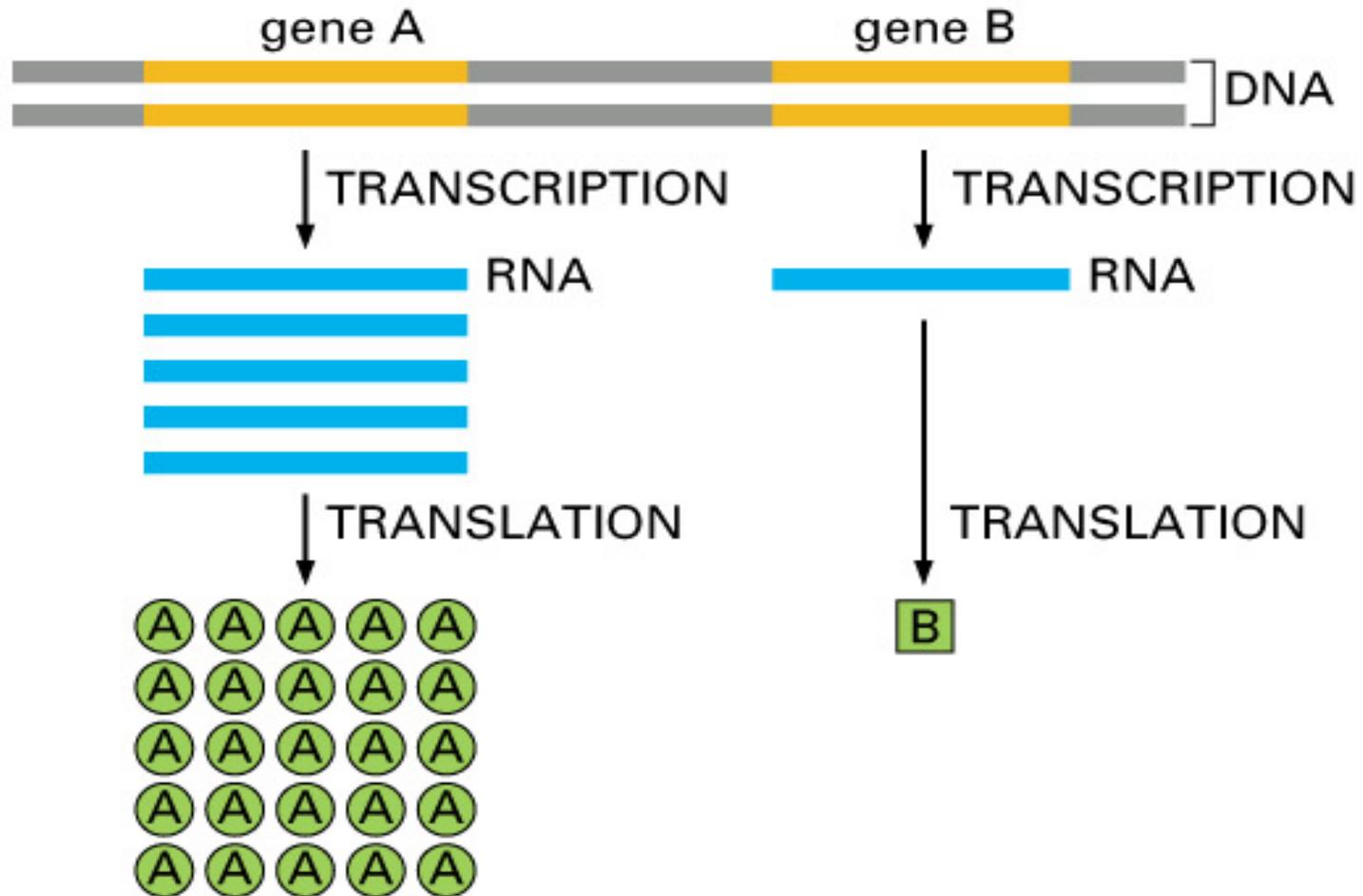


**La TRASCRIZIONE** e' il processo che sintetizza una molecola di RNA complementare ad un segmento di DNA



La trascrizione avviene secondo il principio generale della complementarieta' delle basi.

# I geni possono essere espressi con diversa efficienza

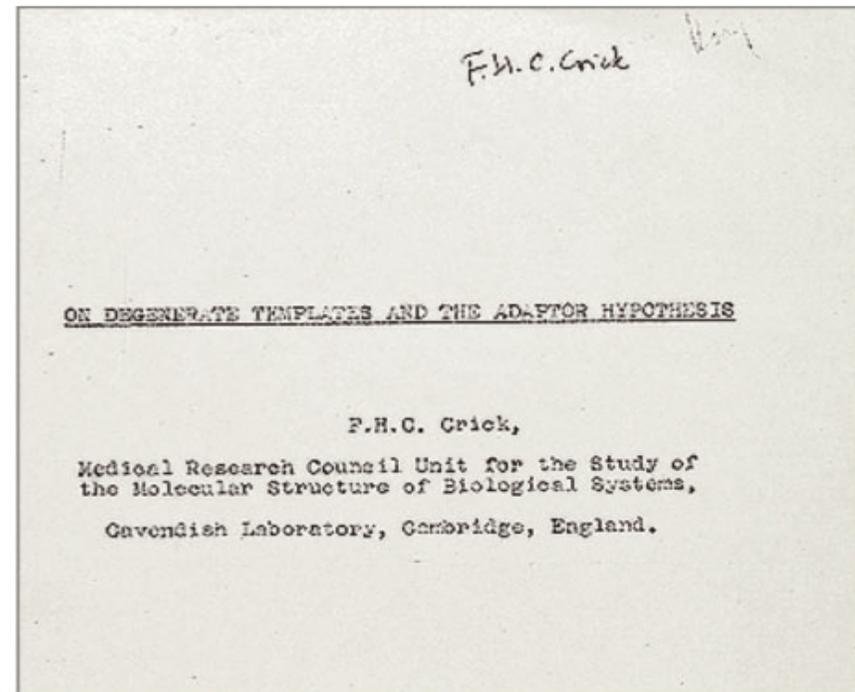


# L'RNA TIE CLUB



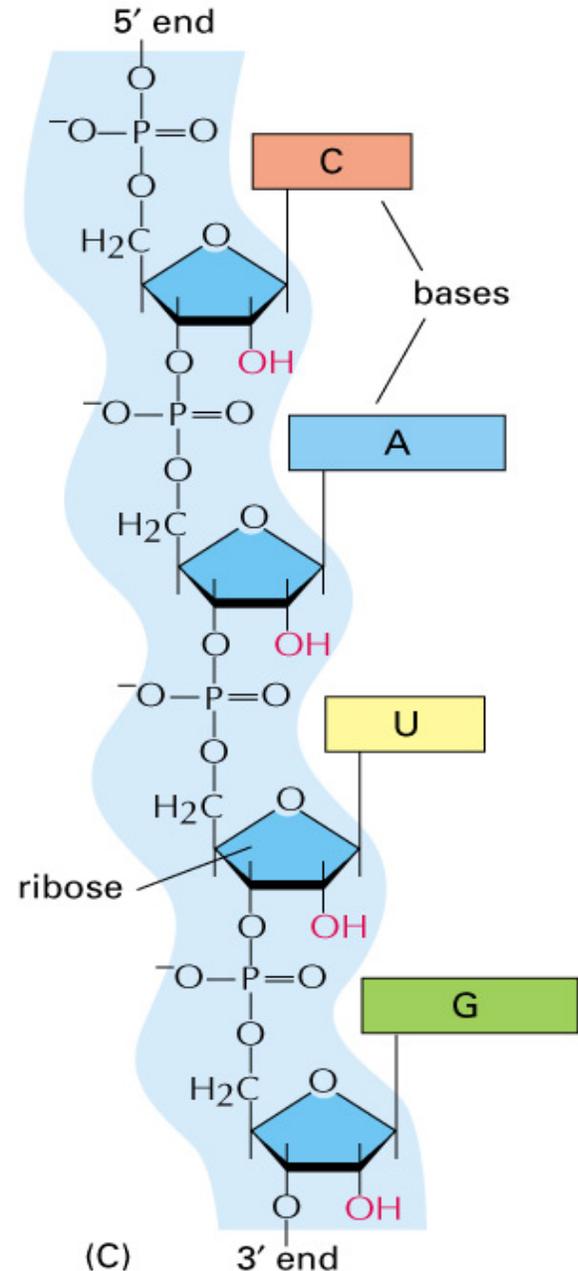
Risolta la struttura del DNA, nel 1954 il fisico russo GAMOW fondò l'*RNA Tie Club*, con l'obiettivo di risolvere la struttura dell'RNA e capire come esso intervenga nella costruzione delle proteine.

Nel 1955 Crick propose l'*ipotesi dell'adattatore*, secondo cui una struttura non ancora scoperta avrebbe portato gli amminoacidi e li avrebbe messi in ordine su una catena di acido nucleico.

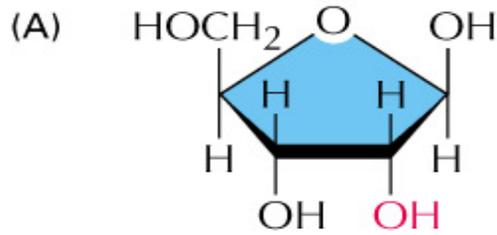


# La struttura chimica dell' RNA

Come il DNA, l' RNA è un polimero lineare composto da 4 nucleotidi legati da legami fosfodiesterici

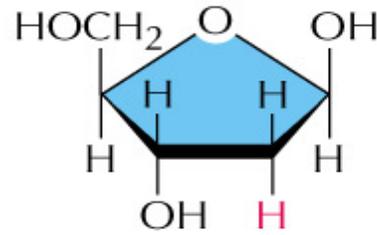


# Differenze tra RNA e DNA



ribose

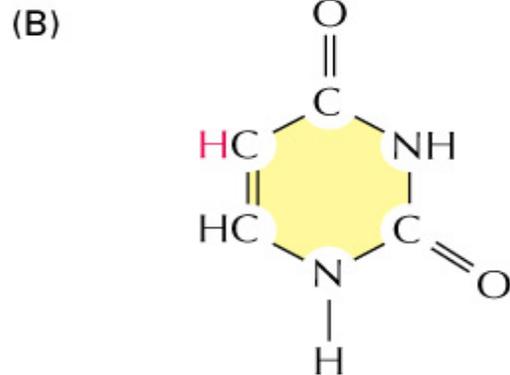
used in ribonucleic acid (RNA)



deoxyribose

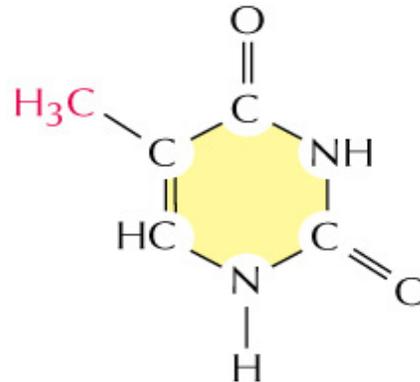
used in deoxyribonucleic acid (DNA)

I nucleotidi dell' RNA contengono ribosio invece di desossiribosio



uracil

used in RNA

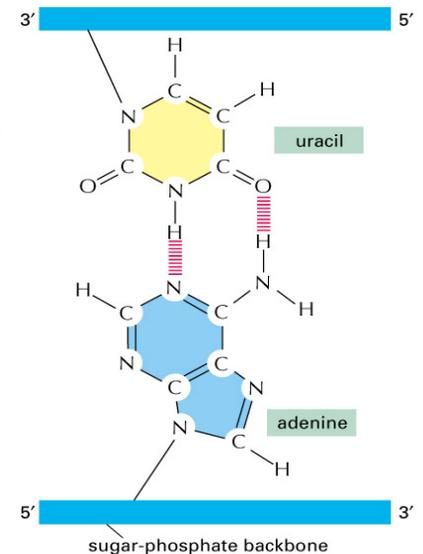


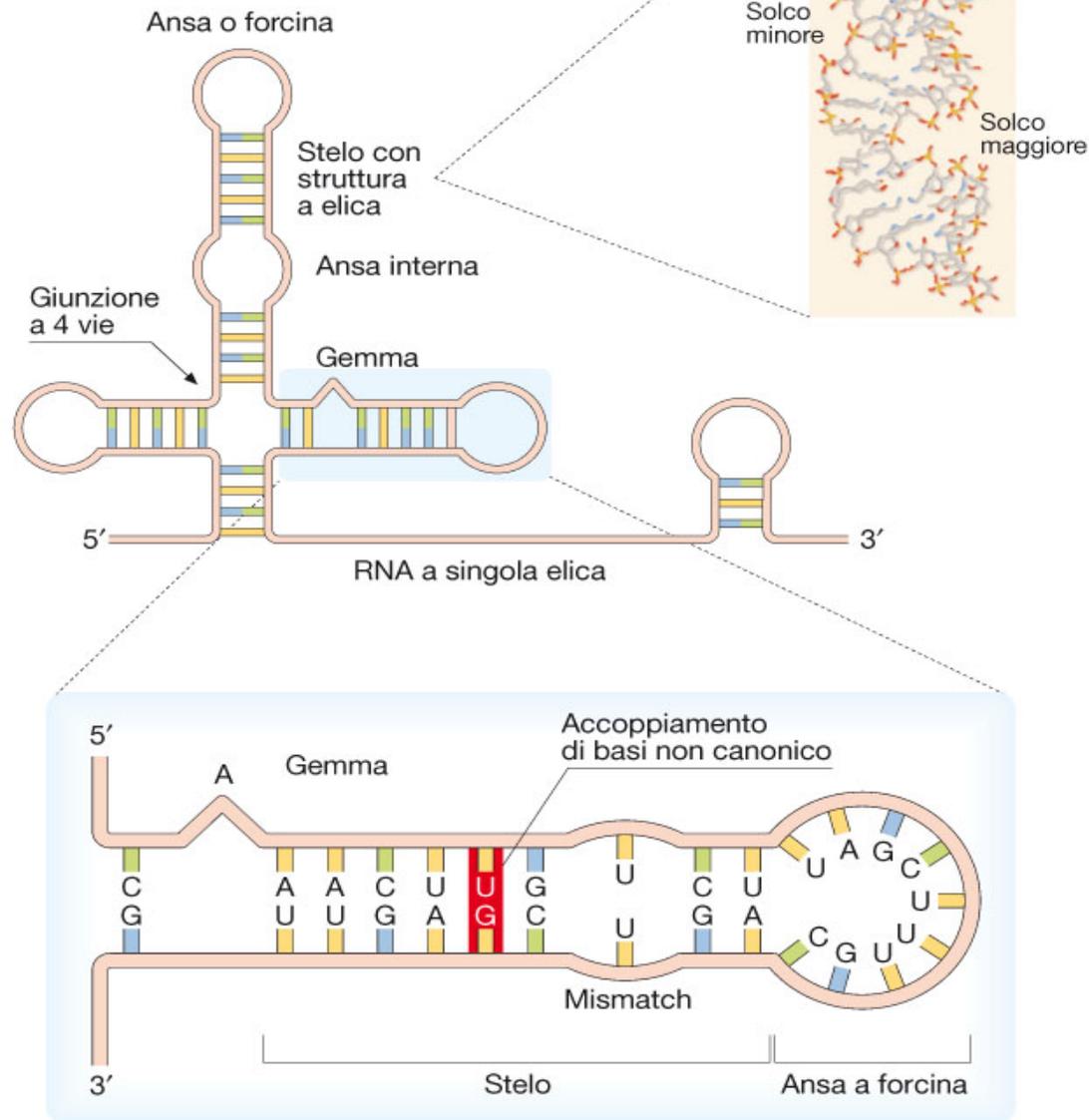
thymine

used in DNA

L' RNA contiene Uracile al posto della Timina

U si accoppia ad A, ma sono possibili altri tipi di appaiamento (ad esempio U-G)



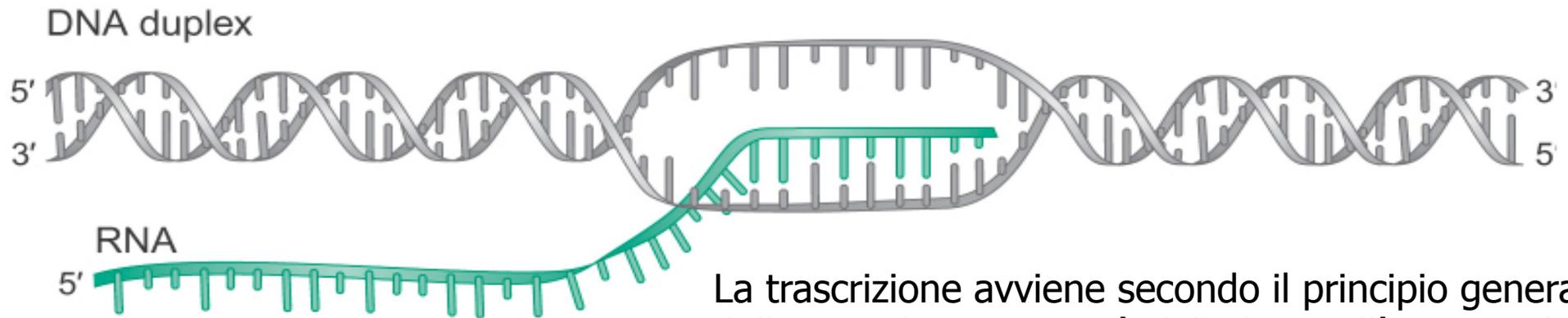


**Figura 2.48** Conformazione che può assumere l'RNA quando esistono sequenze complementari per alcuni tratti. Le zone non appaiate prendono il nome di forcine, anse, steli, gemme, anse interne e giunzioni a 4 vie. La parte in basso mostra un dettaglio di uno stelo che contiene anche un appaiamento G-C non canonico. La parte sulla destra mostra la struttura tridimensionale di un tratto di RNA a doppia elica: è visibile la stretta cavità del solco maggiore e il solco minore più esposto all'esterno.



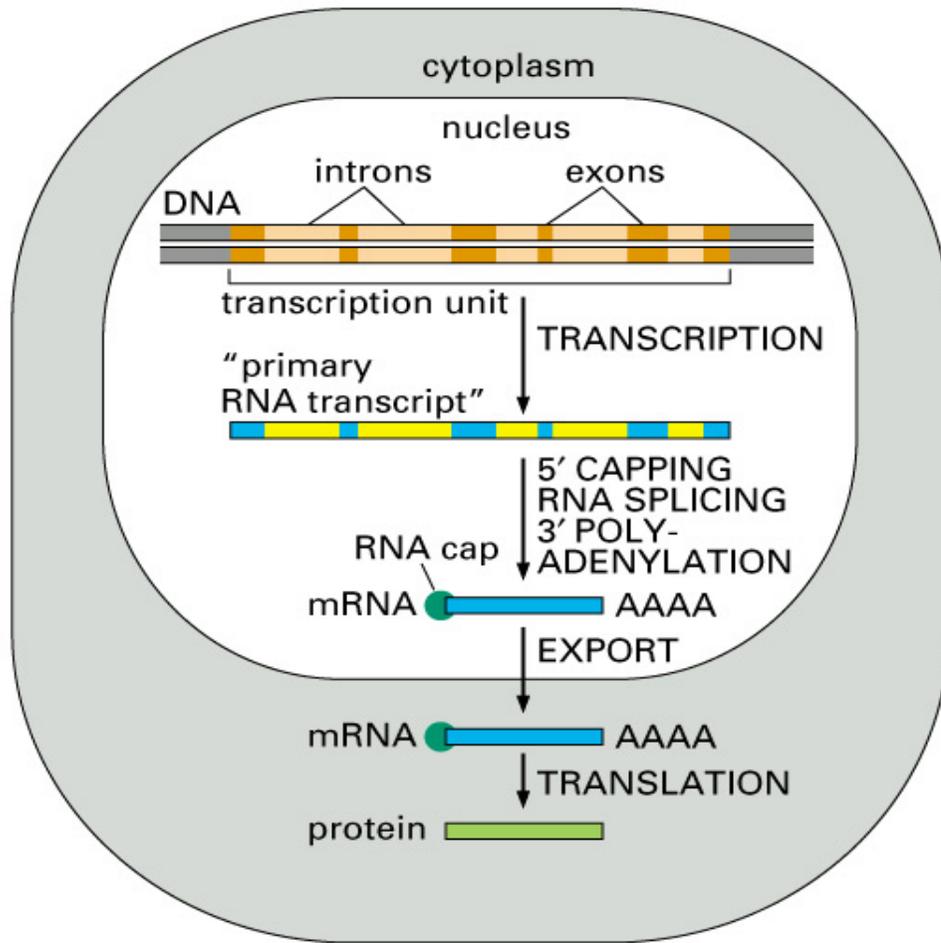
**La TRASCRIZIONE** avviene ad opera della **RNA Polimerasi**, un complesso multiproteico che si lega al DNA e lo denatura localmente creando una *bolla di trascrizione*.

In questa regione il DNA a singolo filamento fornisce lo stampo all'enzima che sintetizza la molecola di RNA. L'RNA prodotto, non rimane appaiato al DNA, ma si stacca immediatamente dallo stampo.



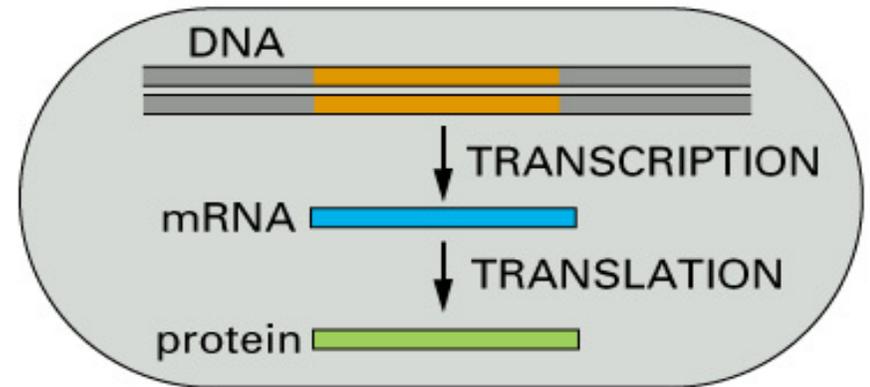
La trascrizione avviene secondo il principio generale della complementarietà delle basi. All'interno di una "transcription bubble" il DNA è transitoriamente convertito a singolo filamento per dirigere la sintesi dell'RNA. La lunghezza della forcella è di 12-14 bp, mentre l'ibrido DNA-RNA generalmente consiste di 8-9 bp.

(A) EUCARYOTES



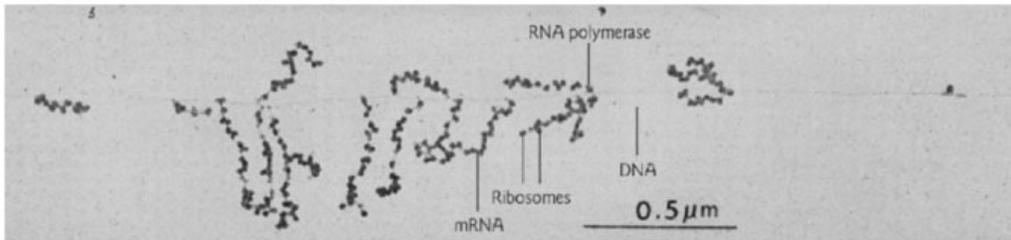
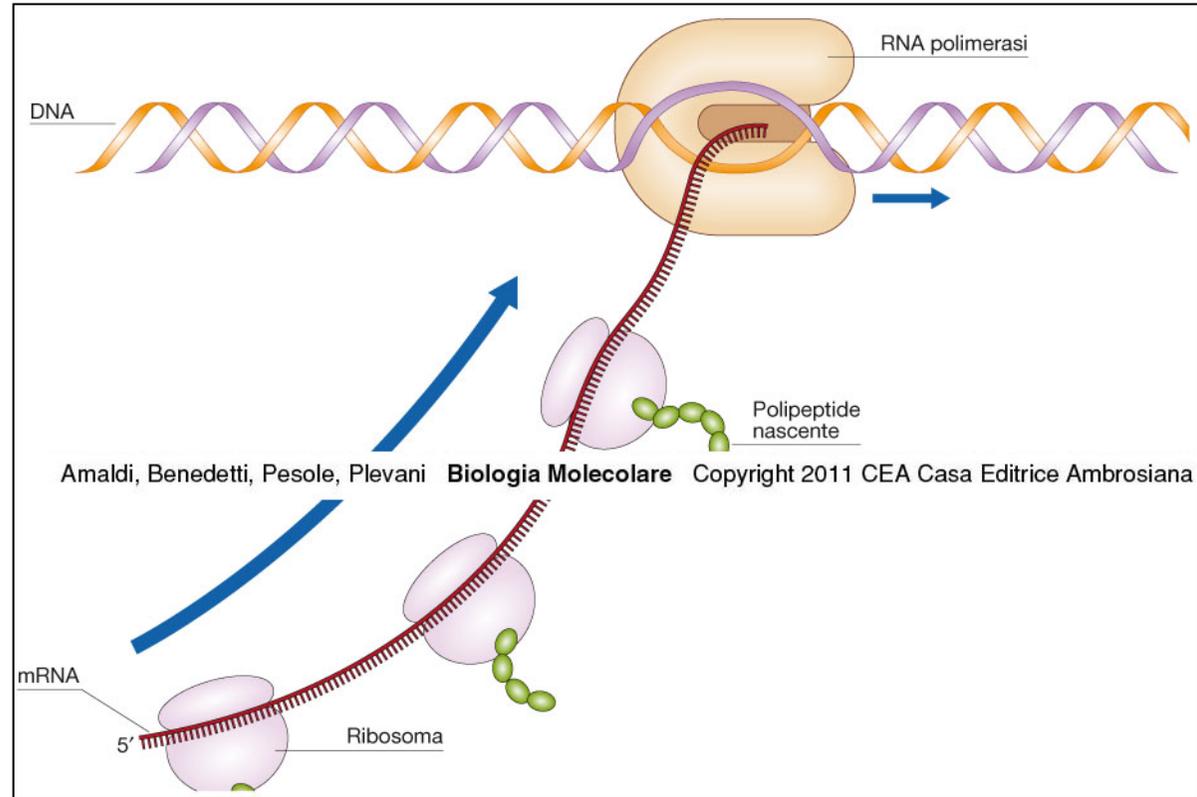
TRASCRIZIONE E  
TRADUZIONE SEPARATE

(B) PROCARYOTES

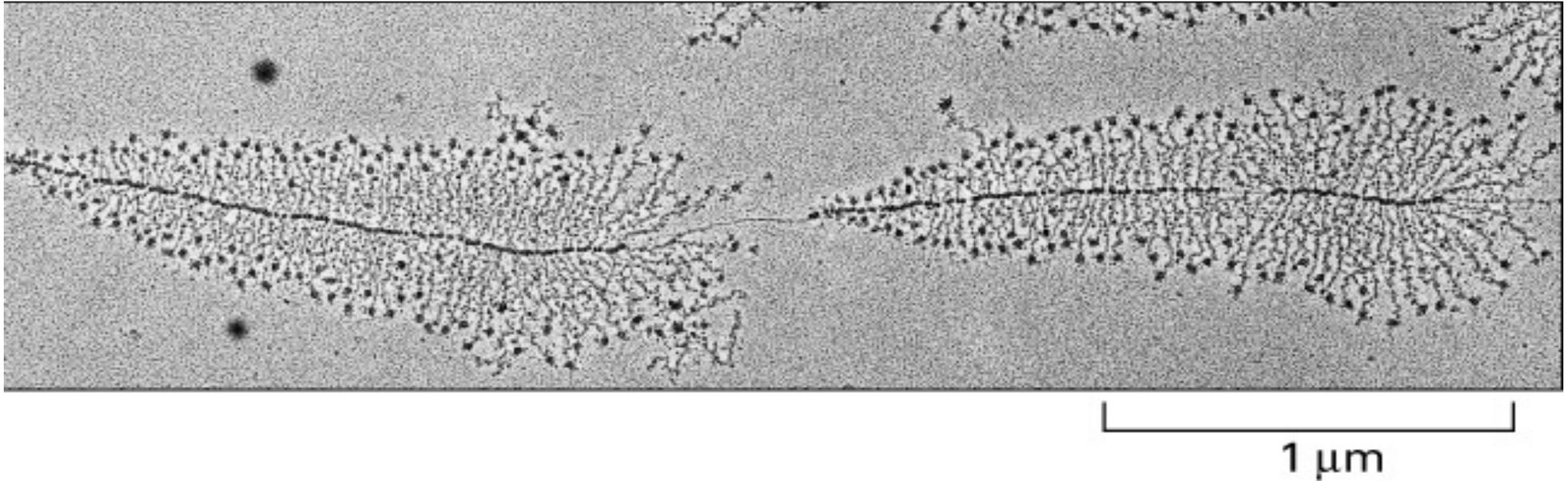


TRASCRIZIONE E  
TRADUZIONE  
ACCOPPIATE

Nei procarioti, l'RNA neo-sintetizzato e' immediatamente disponibile per la sintesi delle proteine.



Al ME si possono osservare una serie di mRNA coperti di ribosomi, che diramano dalla catena di DNA. Più molecole di RNAPol possono trascrivere lo stesso gene contemporaneamente, producendo più copie dello stesso RNA messaggero.



Due geni ribosomiali adiacenti trascrizionalmente attivi al M.E.

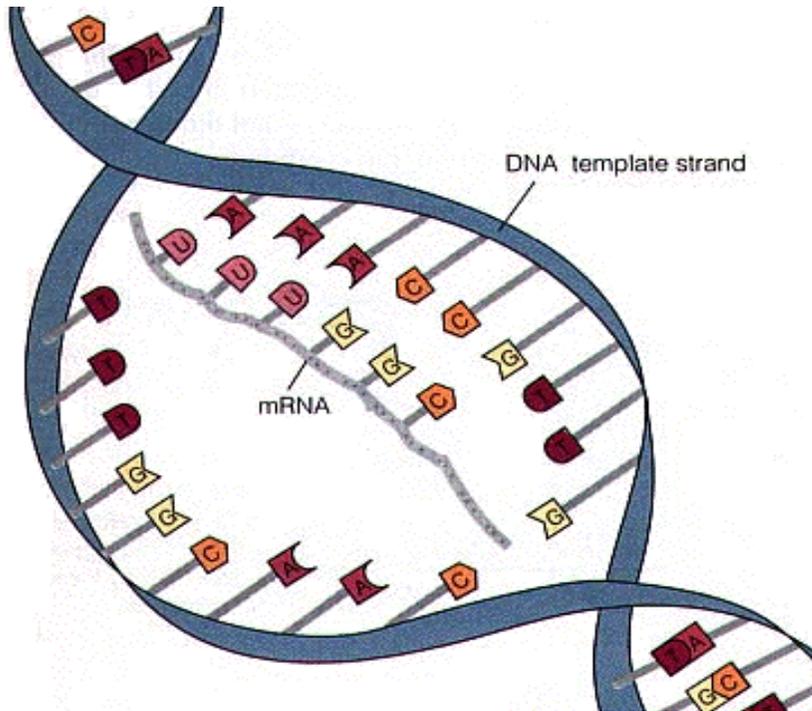
Le molecole di RNAPol sono visibili come pallini lungo il DNA da cui si diparte l' RNA (le particelle all' estremita' libera di ogni trascritto verosimilmente corrispondono all' iniziale assemblamento del ribosoma)

La lunghezza crescente dei trascritti indica la direzionalita' della trascrizione: da sinistra a destra

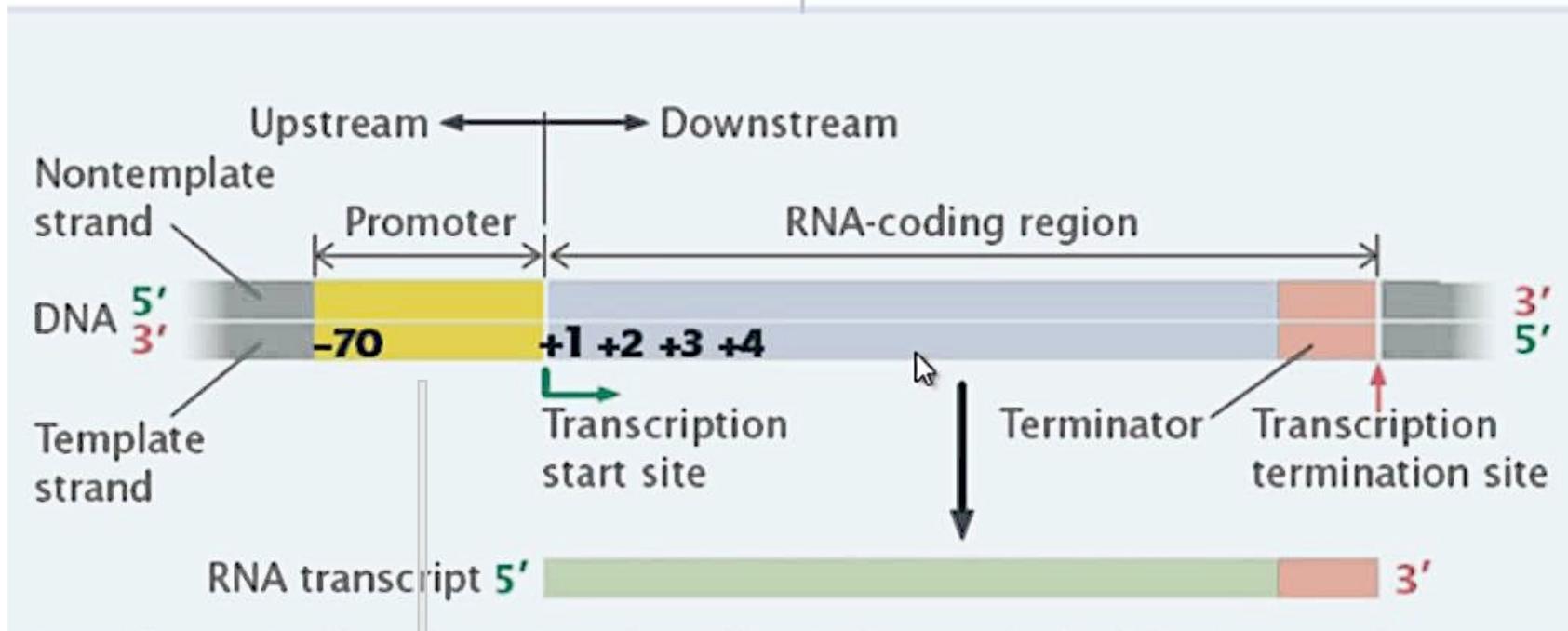
## Open Questions

- Come fa la RNA Polimerasi a riconoscere il punto preciso d'inizio di un gene?
- La RNA Pol si lega al DNA in un punto preciso?
- Come riconosce la fine di un gene?
- Come si stacca?
- Esistono delle sequenze precise a limitare le sequenze codificanti sul DNA che devono essere trascritte in RNA?

# TRASCRIZIONE NEI PROCARIOTI



## Promotore procariotico

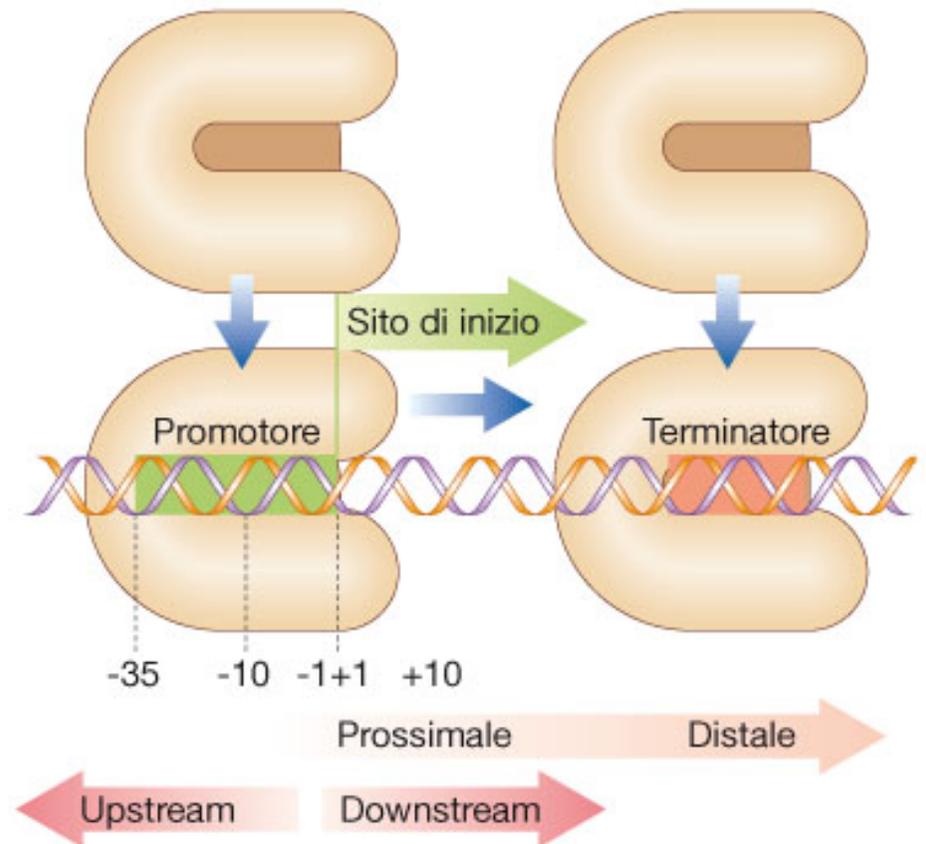


Sito di legame dell'RNA  
Polimerasi al DNA

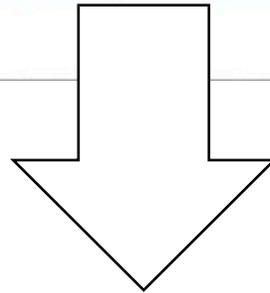
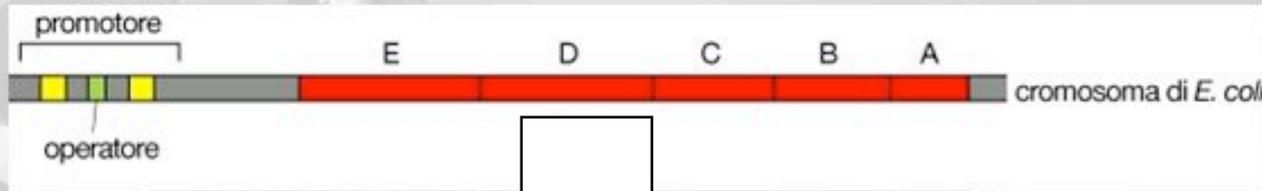
La RNApol si lega a particolari sequenze sul DNA dette **promotori**, situate all'inizio del gene. La trascrizione procede fino a una particolare sequenza detta **terminatore**.

Il tratto di DNA dal promotore al terminatore, espresso come una singola molecola di RNA viene detta *unita' di trascrizione*.

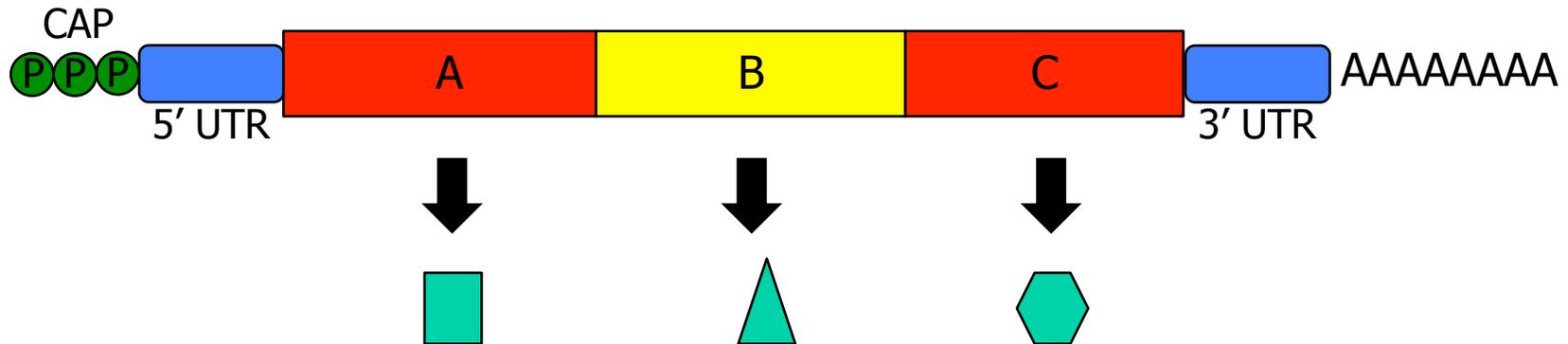
Le sequenze di DNA che precedono il punto d'inizio della trascrizione sono dette "a monte" (*upstream*), mentre quelle che seguono sono dette "a valle" (*downstream*).



- Spesso, nei genomi procariotici, diversi geni vengono controllati da un'unica regione regolatrice: un tale insieme di geni viene definito **operone** (Es. operone formato dai geni A, B, C, D, E).

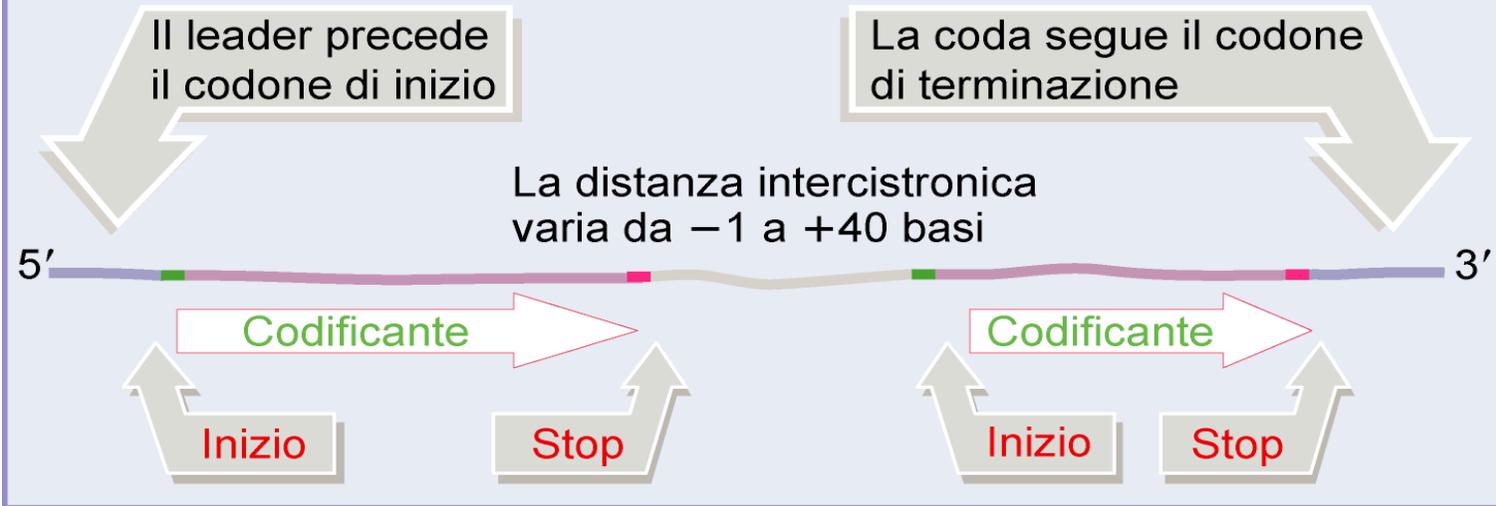


## mRNA POLICISTRONICO

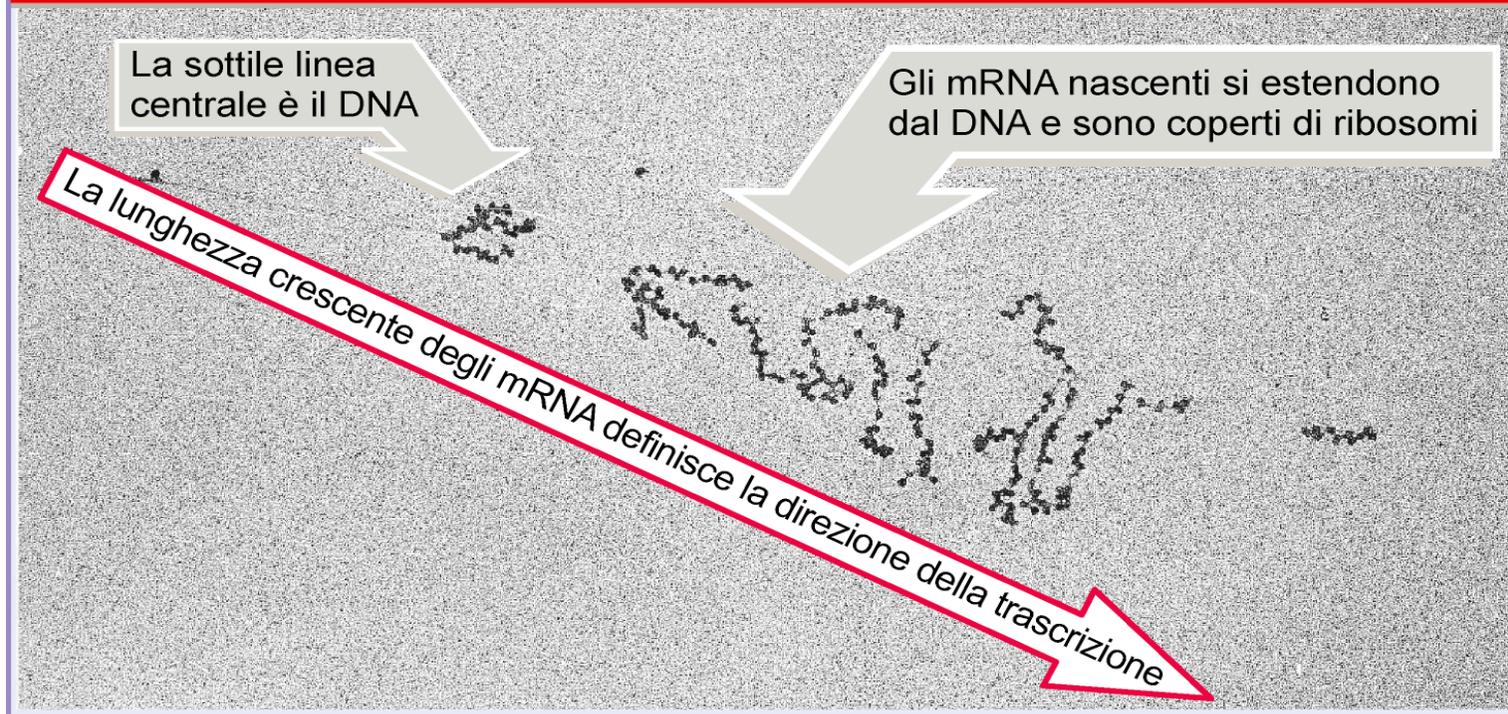


Bacterial **operons** produce polycistronic mRNAs; the same mRNA codes for more than one protein, usually on the same metabolic pathway

## Gli mRNA batterici sono multicistronici



## Gli mRNA batterici sono tradotti mentre sono ancora trascritti

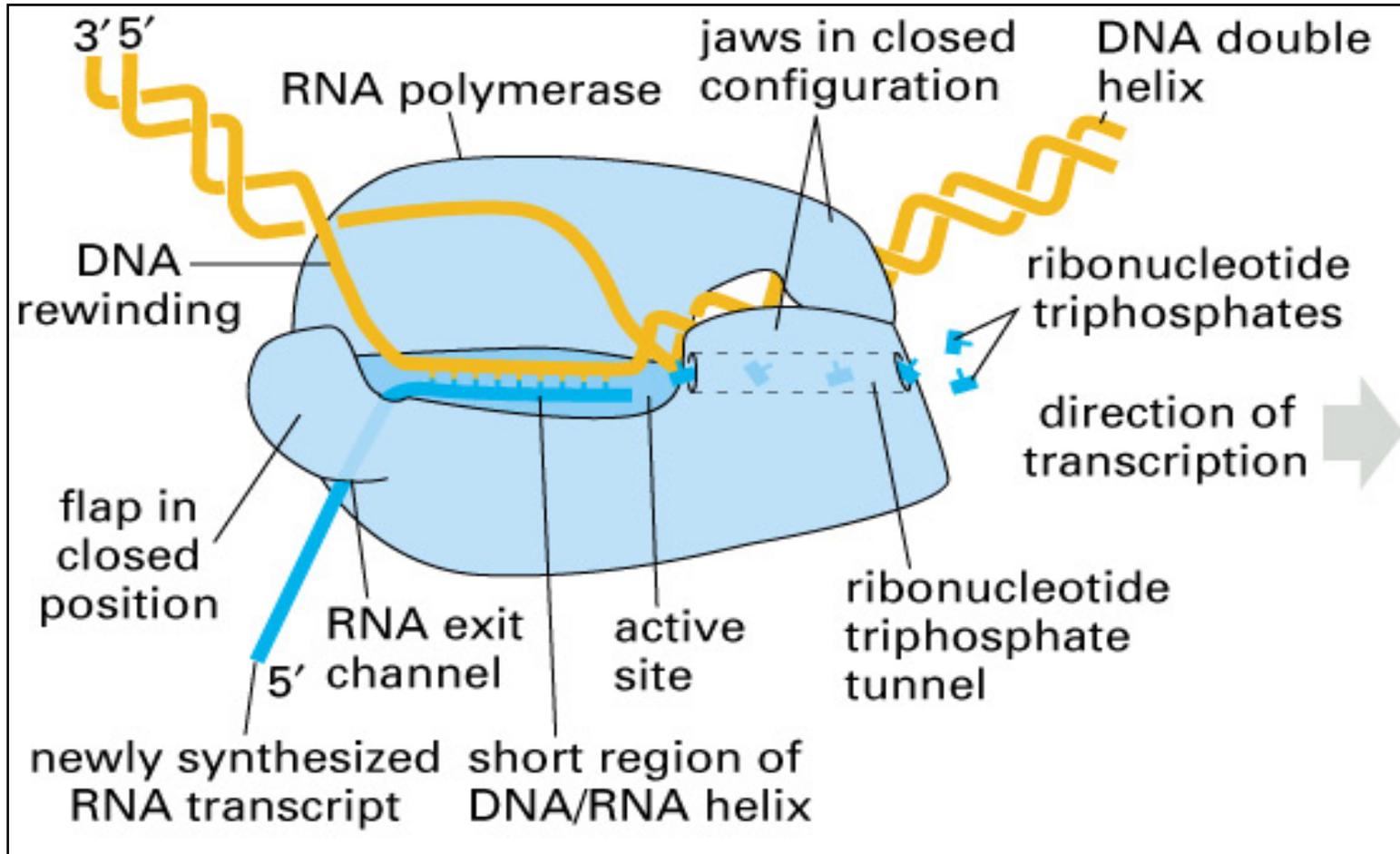


# REQUISITI **MINIMI** E **GENERALI** DELLA TRASCRIZIONE:

1. Presenza di una **RNA POLIMERASI** (enzima che sintetizza RNA usando il DNA come stampo)
2. Presenza nel DNA a monte del gene da trascrivere di una sequenza chiamata **PROMOTORE** che venga riconosciuta e legata dalla RNA polimerasi

PER **REGOLARE** LA TRASCRIZIONE SONO NECESSARI FATTORI ULTERIORI, DISTINTI IN PROCARIOTI ED EUCARIOTI

# La **RNA polimerasi** denatura il DNA e copia lo stampo sintetizzando ex novo una molecola di RNA

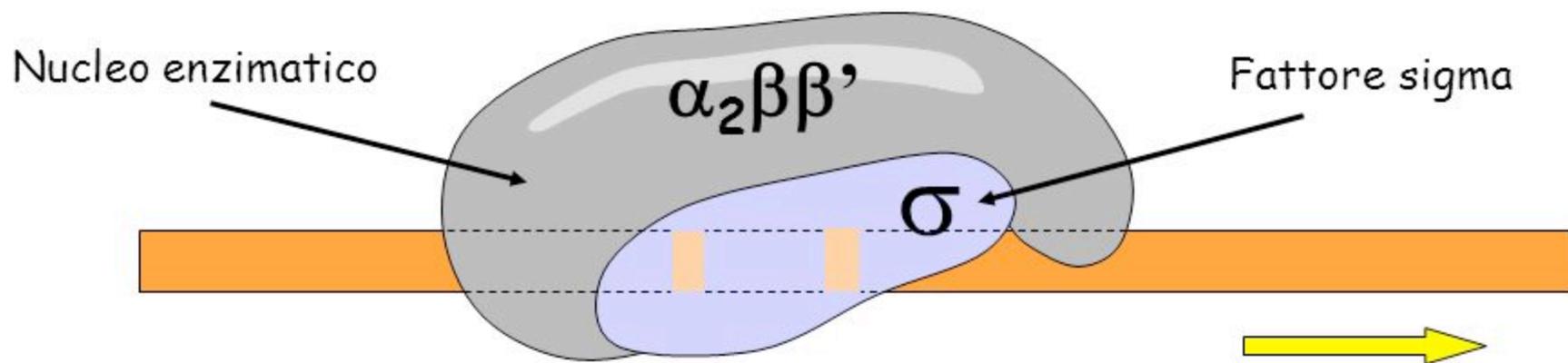


- L' RNA neosintetizzato viene deviato consentendo il riavvolgimento della doppia elica di DNA

- L' energia necessaria alla reazione deriva dall' idrolisi dei legami P-P dei nucleotidi

## RNA polimerasi

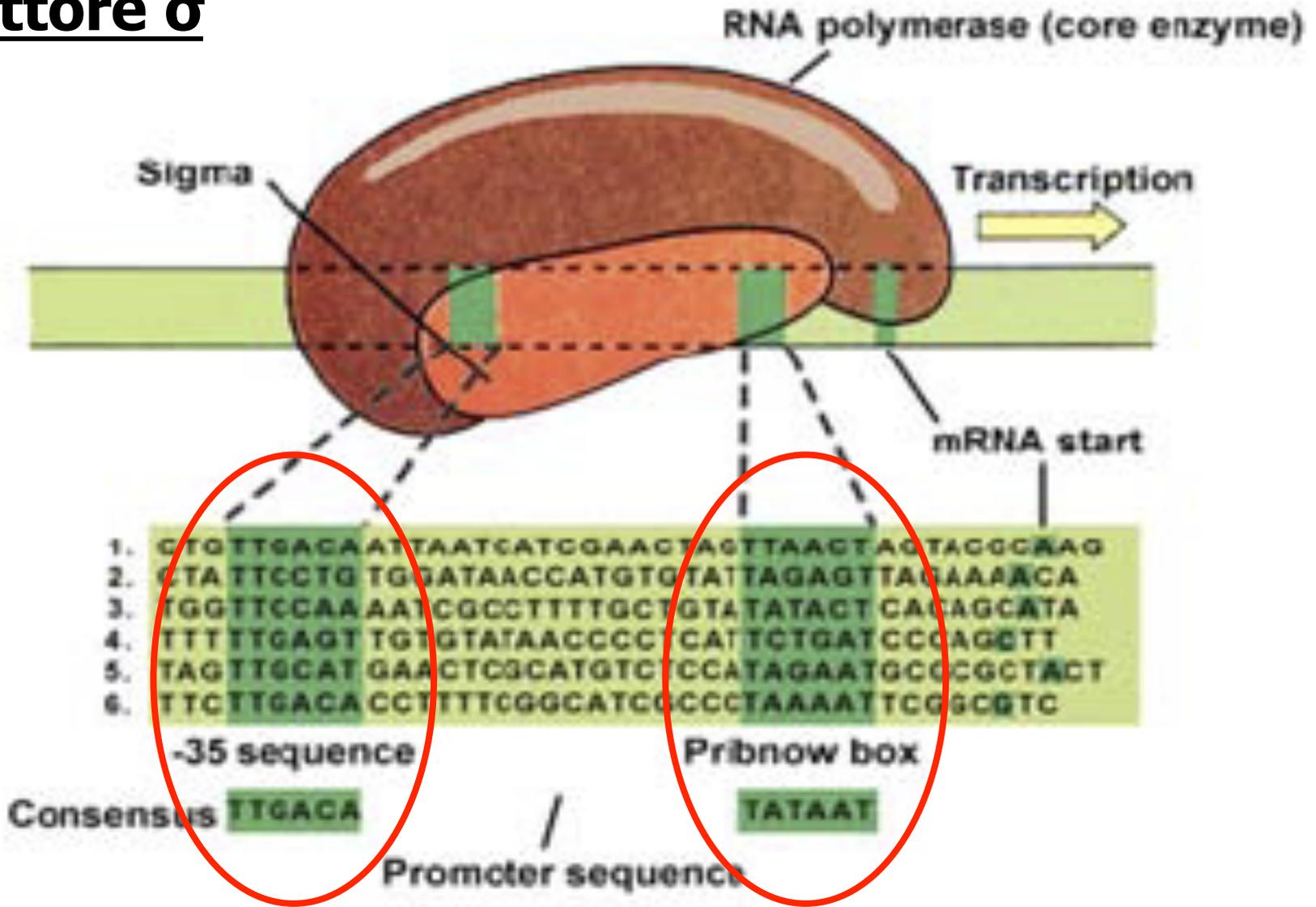
Complesso proteico di 480.000 D costituito da 5 subunità:  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$



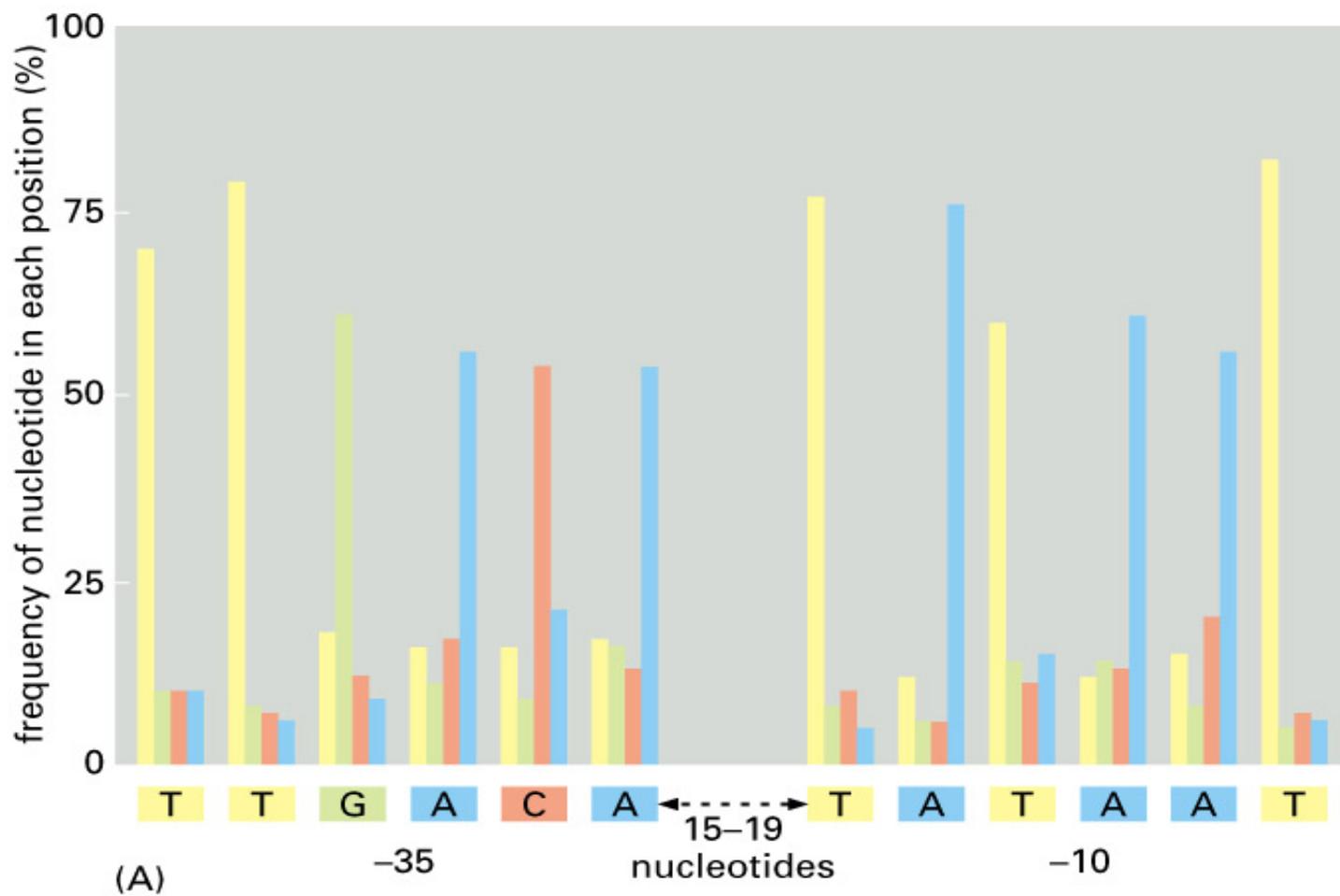
Il nucleo enzimatico ha la capacità di sintetizzare RNA su uno stampo di DNA, ma non è in grado di iniziare la trascrizione al sito corretto.

Il fattore sigma è responsabile del corretto riconoscimento del promotore. Viene rilasciato appena inizia la trascrizione.

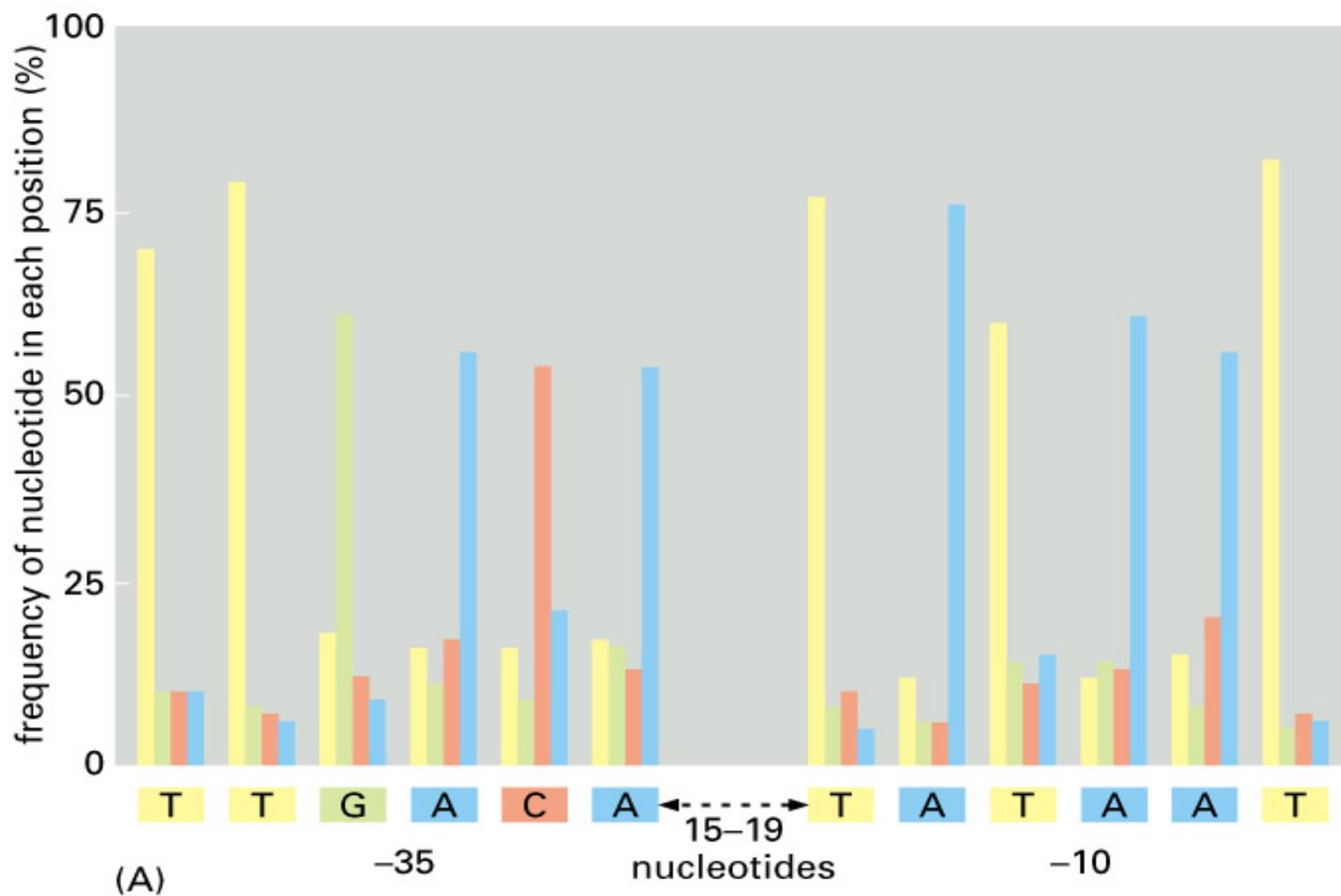
# Il fattore $\sigma$



I promotori procarioti contengono due sequenze esameriche in posizione -10 e -35, riconosciute dal Fattore Sigma.



La sequenza consensus riflette i nucleotidi **piu' frequenti** in ogni posizione in una serie di promotori batterici analizzati.



La sequenza consensus riflette i nucleotidi **piu' frequenti** in ogni posizione in una serie di promotori batterici analizzati.

- Quale scopo ha questa variabilita' di consensus?

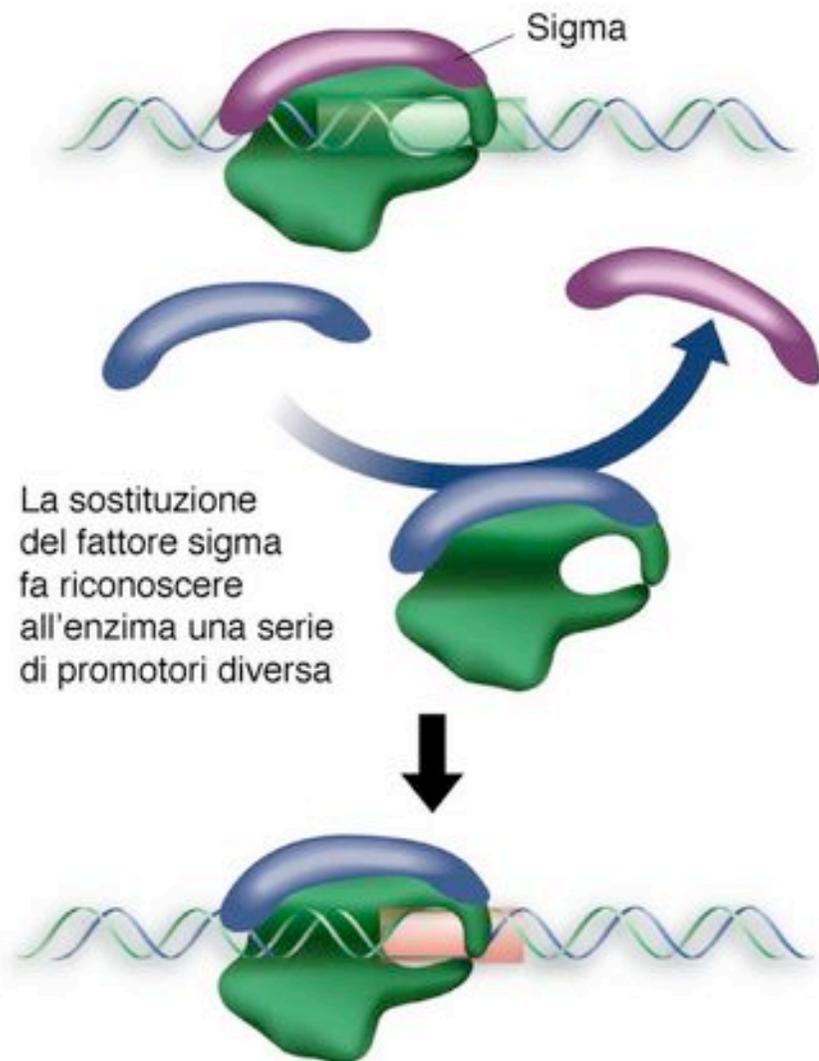
## Promotori diversi hanno differenti sequenze consensus

Gene	Sequenza -35	Separazione	Sequenza -10
<i>rpoD</i>	TTGACA	16-18 bp	TATAAT
<i>rpoH</i>	CCCTTGAA	13-15 bp	CCCGATNT
<i>rpoN</i>	CTGGNA	6 bp	TTGCA
<i>fliA</i>	CTAAA	15 bp	GCCGATAA
<i>sigH</i>	AGGANPuPu	11-12 bp	GCTGAATCA

E. Coli ha diversi Fattori  $\sigma$  che riconoscono le diverse consensus

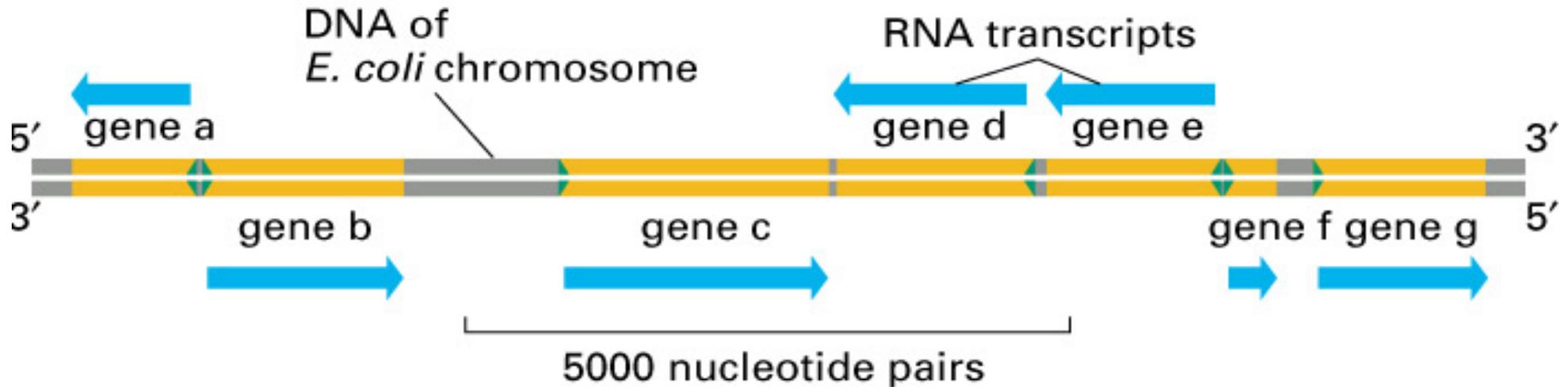
Gene	Fattore	Utilizzo
<i>rpoD</i>	$\sigma^{70}$	Generale
<i>rpoS</i>	$\sigma^S$	Stress
<i>rpoH</i>	$\sigma^{32}$	Shock da calore
<i>rpoE</i>	$\sigma^E$	Shock da calore
<i>rpoN</i>	$\sigma^{54}$	Carenza di azoto

Gene	Fattore	Utilizzo
<i>rpoD</i>	$\sigma^{70}$	Generale
<i>rpoS</i>	$\sigma^S$	Stress
<i>rpoH</i>	$\sigma^{32}$	Shock da calore
<i>rpoE</i>	$\sigma^E$	Shock da calore
<i>rpoN</i>	$\sigma^{54}$	Carenza di azoto



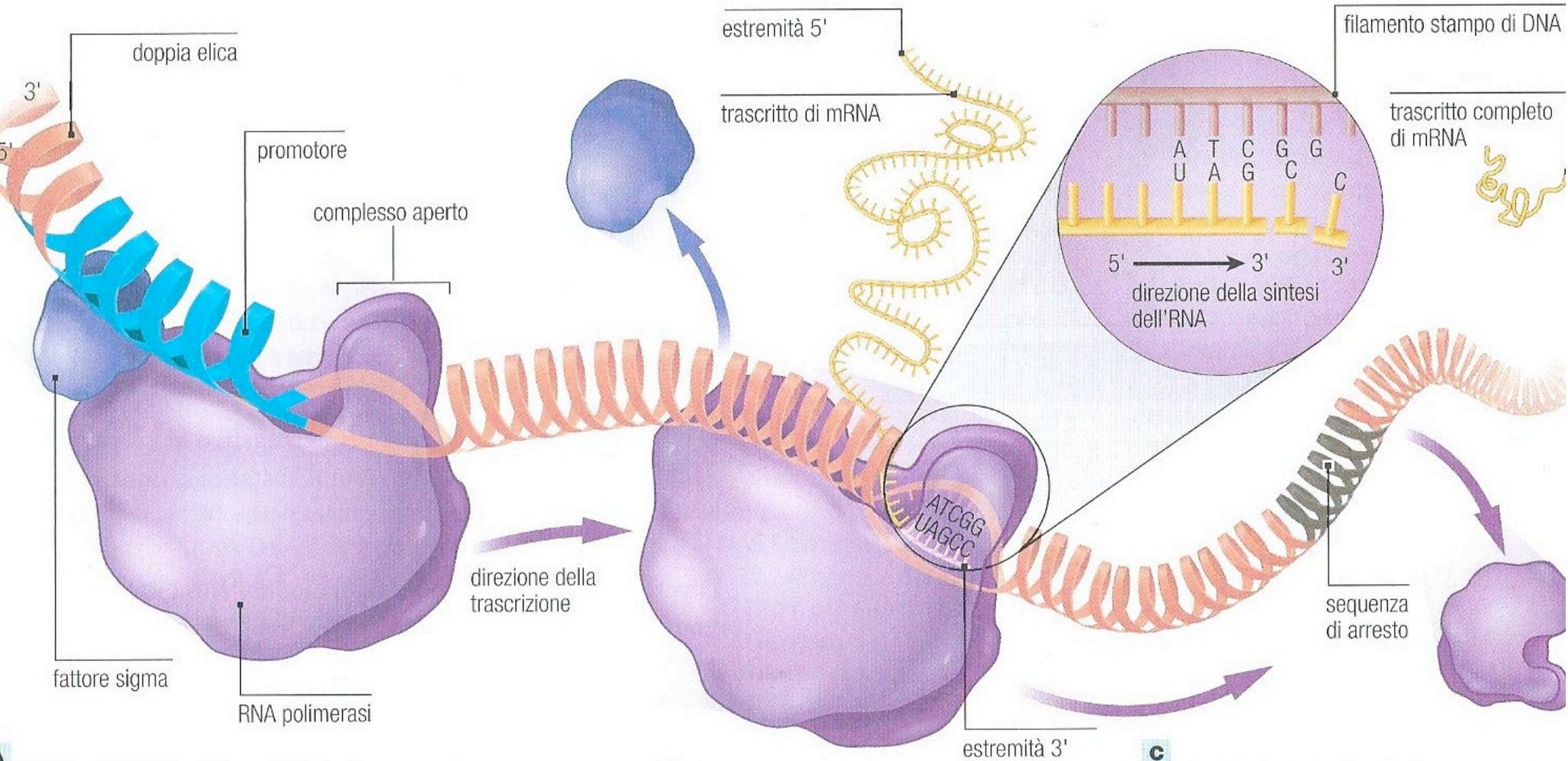
**L'espressione di differenti fattori sigma è indotta da differenti condizioni ambientali**

# Direzionalita' della trascrizione lungo una piccola porzione del cromosoma di E.Coli



La direzione della RNAPol e' determinata dall' orientamento del promotore.

# La TRASCRIZIONE avviene in tre fasi:



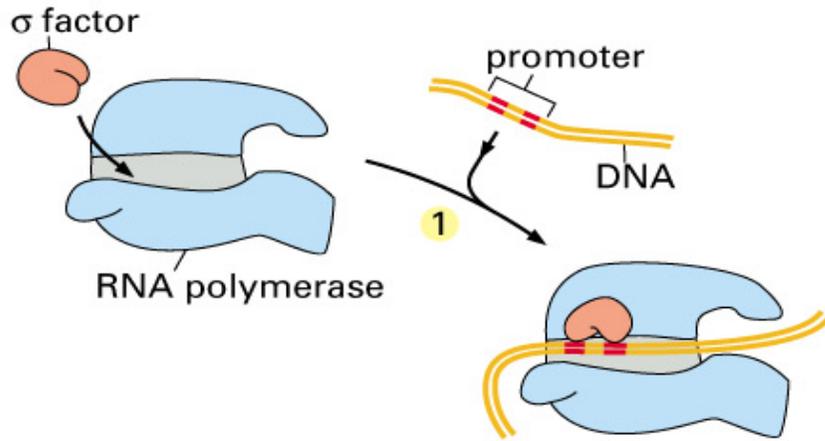
**A** Inizio: il promotore funziona come un sito di riconoscimento per il fattore sigma; l'RNA polimerasi è unita al fattore sigma e si può così legare al promotore; in seguito al legame, il DNA si srotola formando un complesso aperto.

**B** Allungamento: il fattore sigma si stacca e l'RNA polimerasi scorre lungo la doppia elica di DNA per sintetizzare il trascritto di mRNA.

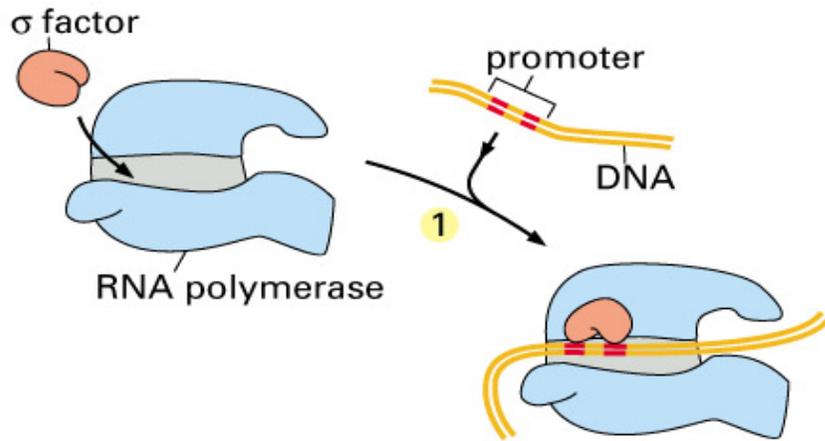
**C** Terminazione: quando l'RNA polimerasi raggiunge la sequenza di arresto, l'enzima e il trascritto di RNA si staccano dalla molecola di DNA.

# 1. BINDING

- La RNA Pol riconosce la regione del promotore tramite il fattore  $\sigma$
- Nella fase iniziale, sintetizza e rilascia dei corti frammenti di RNA, fino al raggiungimento di una lunghezza di 9-12 bp, che permette all'RNA di spiazzare il fattore  $\sigma$  (**fase iniziale abortiva**).



Nella **fase di inizio**, il **fattore**  $\sigma$  riconosce il sito di inizio della trascrizione (regione del **promotore**), lo lega e innesca la denaturazione del DNA per formare la *bolla di trascrizione*.

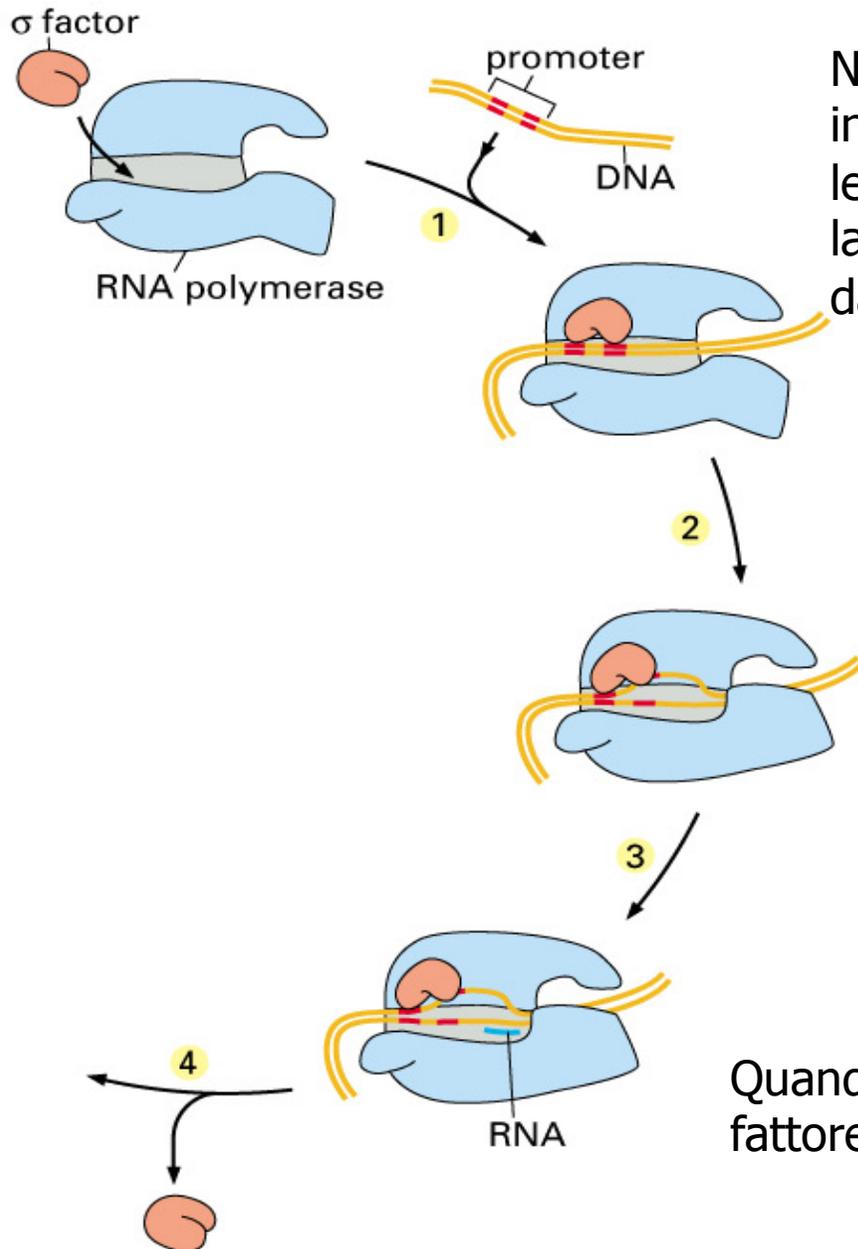


Nella **fase di inizio**, una subunita' distaccata della RNAPol, chiamata **fattore**  $\sigma$ , riconosce il sito di inizio della trascrizione (regione del **promotore**), lo lega e innesca la denaturazione del DNA per formare la *bolla di trascrizione*.

**N.B.:**

LA RNA POLIMERASI NON NECESSITA  
DI UN PRIMER PER INIZIARE A  
TRASCRIVERE!!!

LA RNA POLIMERASI APRE LA DOPPIA  
ELICA SENZA CONSUMO DI ATP  
(DIVERSO DA ELICASI)!!!



Nella **fase di inizio**, il **fattore**  $\sigma$  riconosce il sito di inizio della trascrizione (regione del **promotore**), lo lega e innesca la denaturazione del DNA per formare la *bolla di trascrizione* (senza consumo di ATP: diverso da elicasi!!)

Nella **fase di allungamento** la RNAPol e la bolla si muovono lungo il DNA estendendo la catena di RNA nascente.

Quando sono stati incorporati circa 10 nn, il fattore  $\sigma$  si dissocia

La fase di elongazione procede alla velocità di circa 50 nn/sec fino a che la RNAPol incontra un secondo segnale nel DNA, il **terminatore**, che induce l'arresto della polimerasi con rilascio del DNA stampo e dell'RNA neo-sintetizzato (**fase di terminazione**).

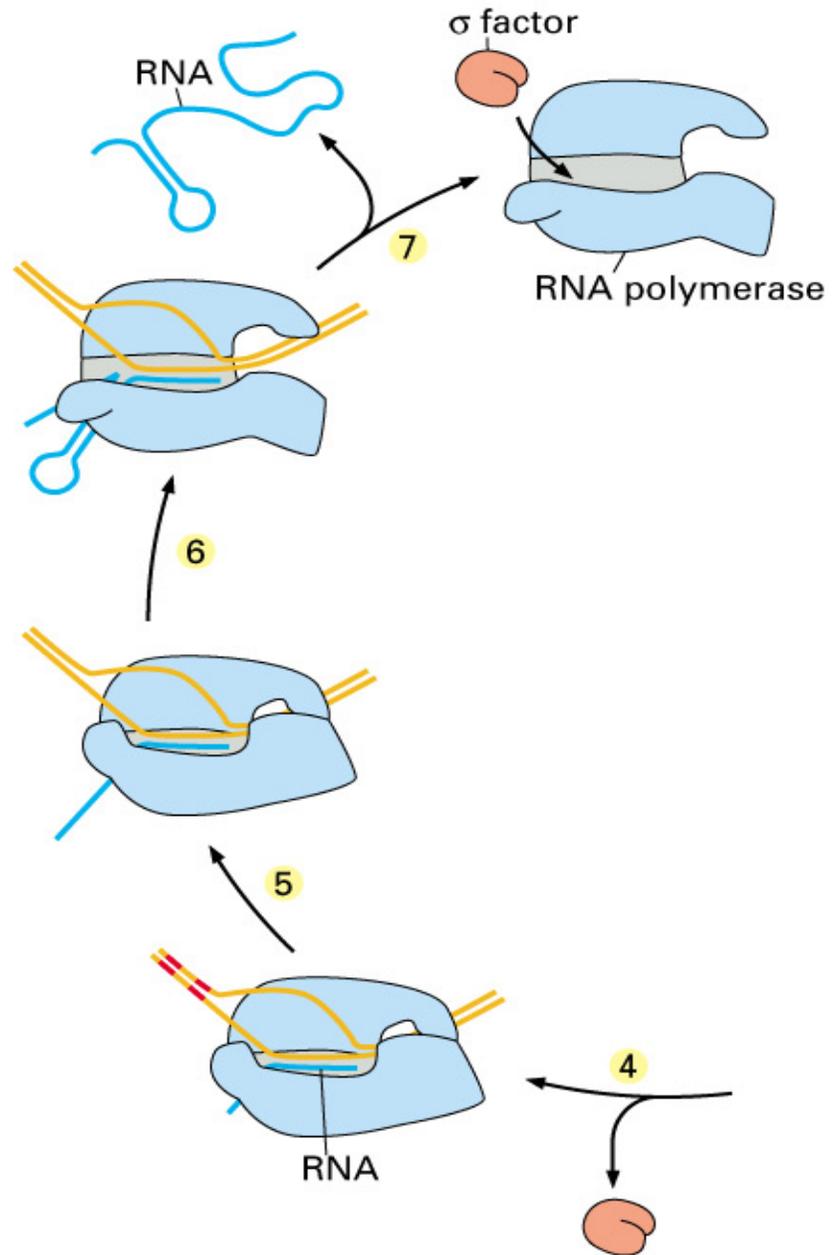


Figure 6-10 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# 4. Termination

L' RNAPol batterica termina la trascrizione in corrispondenza di siti precisi, che di solito prevedono il riconoscimento del **terminatore** nel DNA e la formazione di una struttura a forcina (hairpin) nell' RNA.

2 tipi di  
terminatori in  
E. Coli

**Terminatori intrinseci**: non richiedono altri fattori, terminano la trascrizione anche in vitro

**Terminatori Rho-dipendenti**: richiedono l' intervento della proteina Rho che svolge l' ibrido DNA-RNA

# Terminatori intrinseci

I **terminatori intrinseci** sono rappresentati da un tratto di DNA che contiene sequenze palindromiche ricche in G-C, seguite da un tratto di 8-9 nucleotidi ricco di A-T.

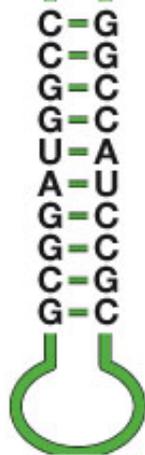
A



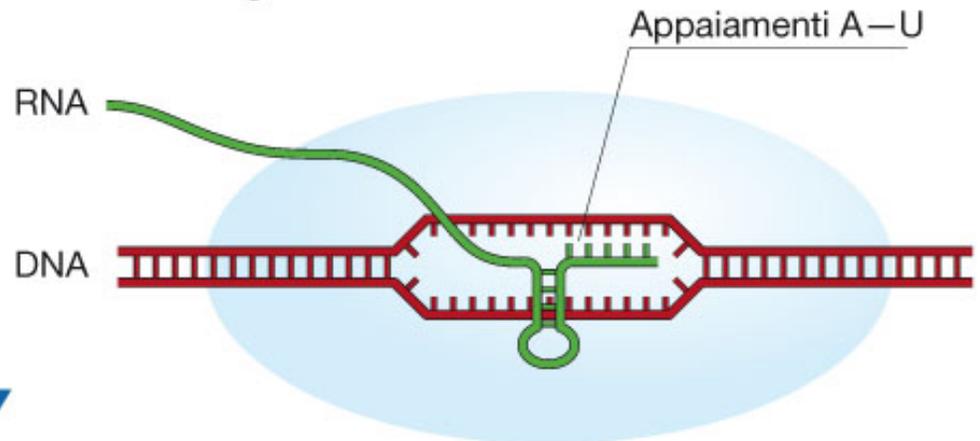
Trascrizione

RNA 5' ——— 3' UUUUUUUUUUU

B

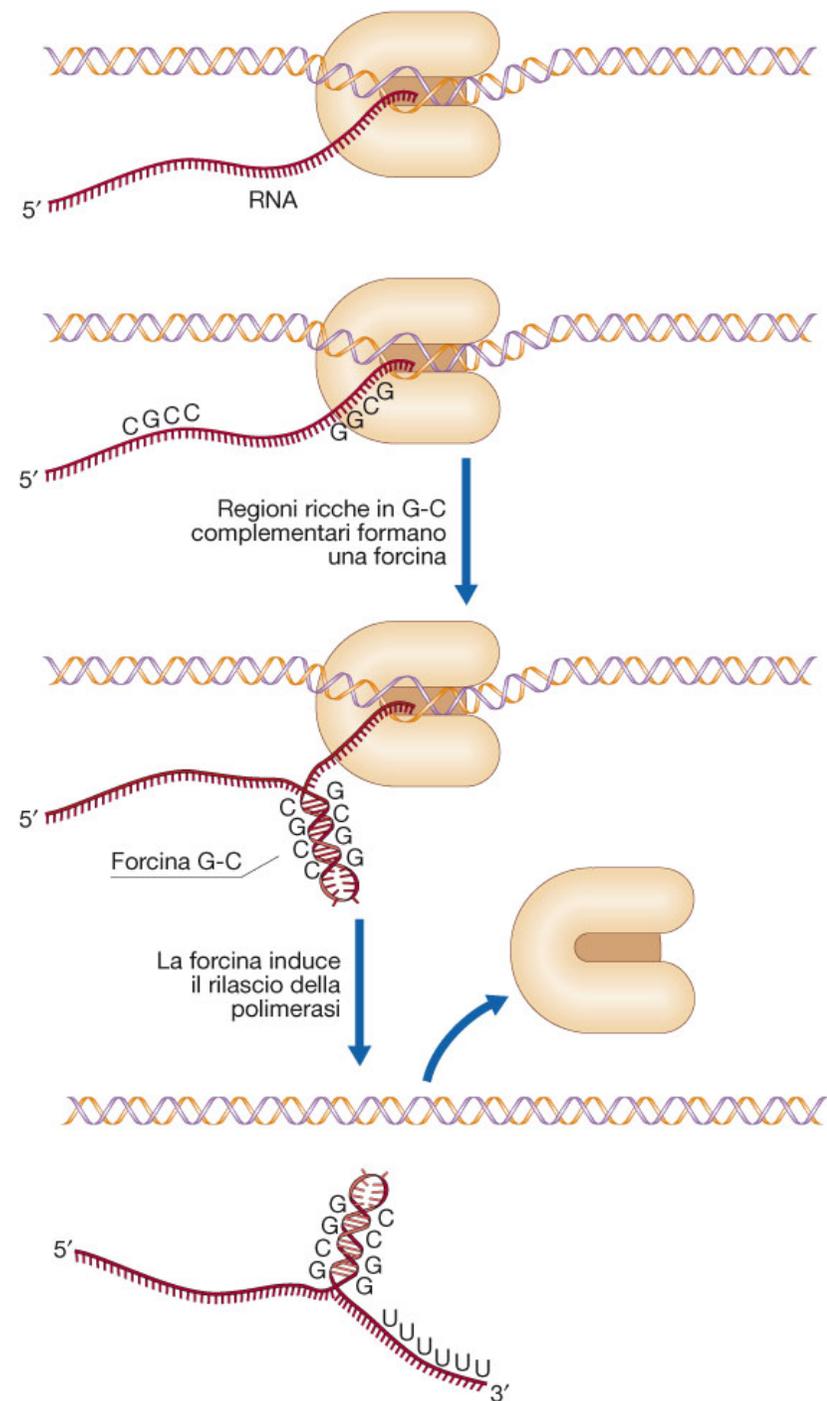
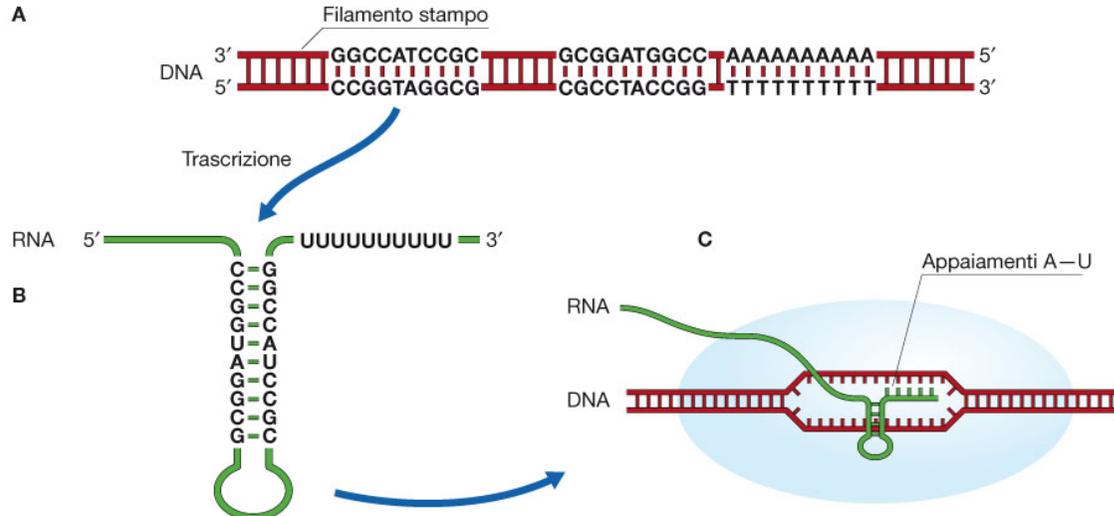


C



# Terminatori intrinseci

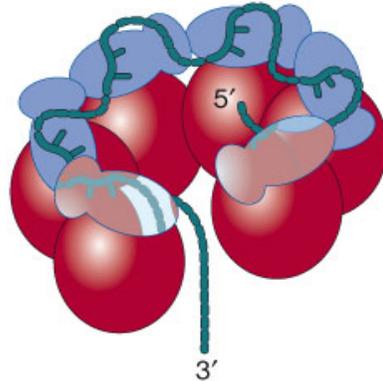
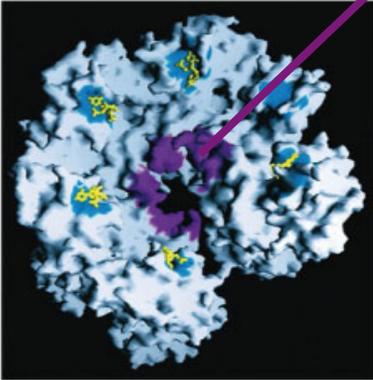
Il tratto di RNA trascritto in questa regione forma una forcina (hairpin) che destabilizza l'ibrido DNA-RNA quando la polimerasi si arresta in corrispondenza dell' hairpin.



# Terminatori *Rho*-dipendenti

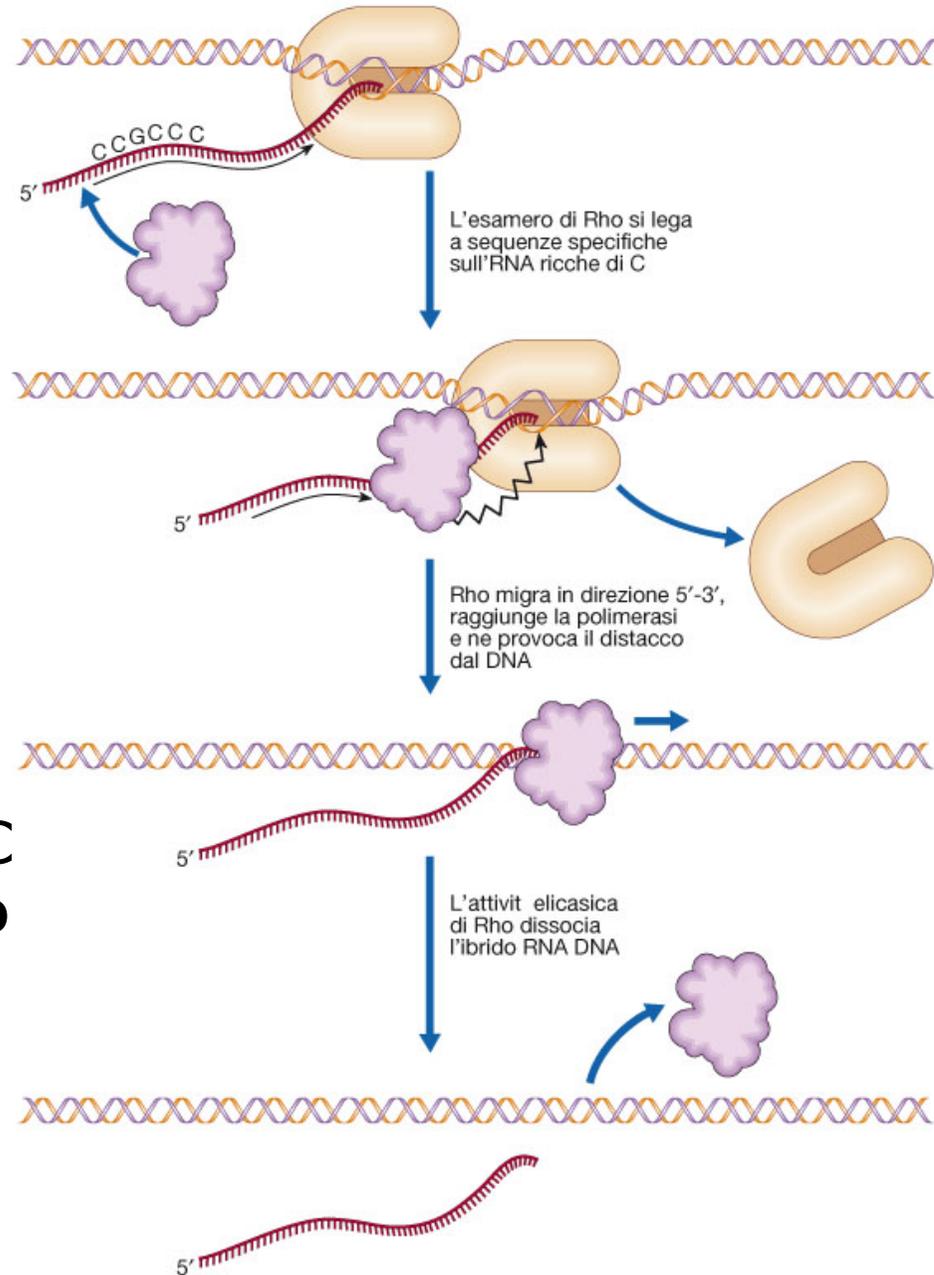
Questo meccanismo di terminazione è mediato dalla proteina esamerica *Rho*.

## Sito ATPasico



In vivo *Rho* si associa all'RNA nascente in una regione di circa 40 nucleotidi ricca di C a valle della regione codificante, detta **sito di utilizzo di Rho**.

*Rho* agisce come una **elicasi ATP-dipendente**, si muove in direzione 5'-3' verso il sito di trascrizione e promuove il distacco della polimerasi.



# REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

- Interessa la grandissima maggioranza dei geni espressi in modo non costitutivo
- E' vantaggiosa in termini di risparmio energetico (nessuna produzione di RNA/proteina)
- E' realizzabile a diversi livelli (inizio, allungamento, terminazione, stabilità dell'RNA)
- E' effettuabile con varie modalità (attivazione, repressione, attenuazione)

# REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

Condizioni ambientali variabili richiedono che l'espressione genica sia regolata



# REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

## Meccanismi:

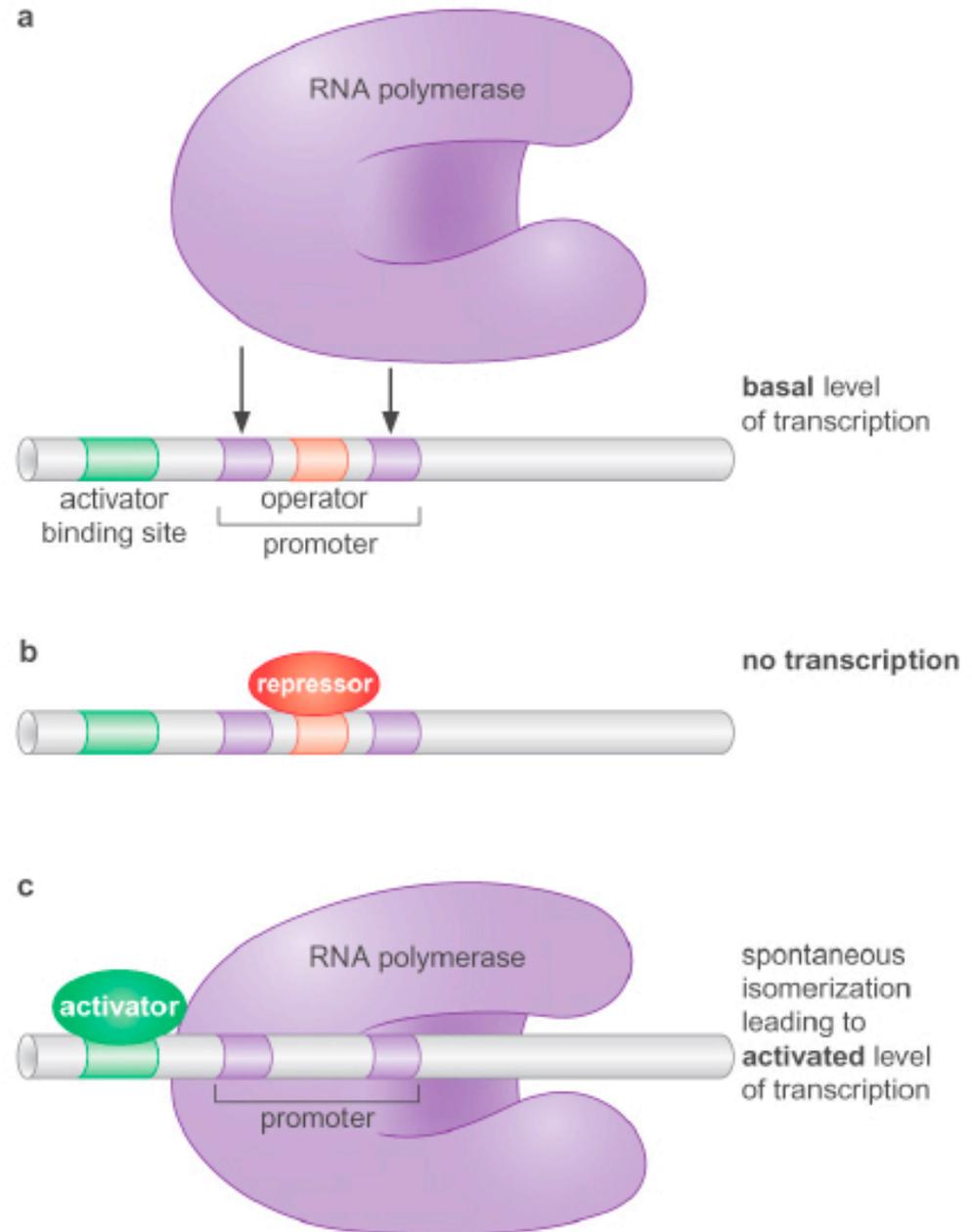
1. Attivazione
2. Repressione
3. Attenuazione trascrizionale

# La regolazione della trascrizione puo' essere *positiva o negativa*

L'RNA Pol e' in grado di legarsi alle sequenze del promotore trascrivendo a bassi livelli l'RNA.

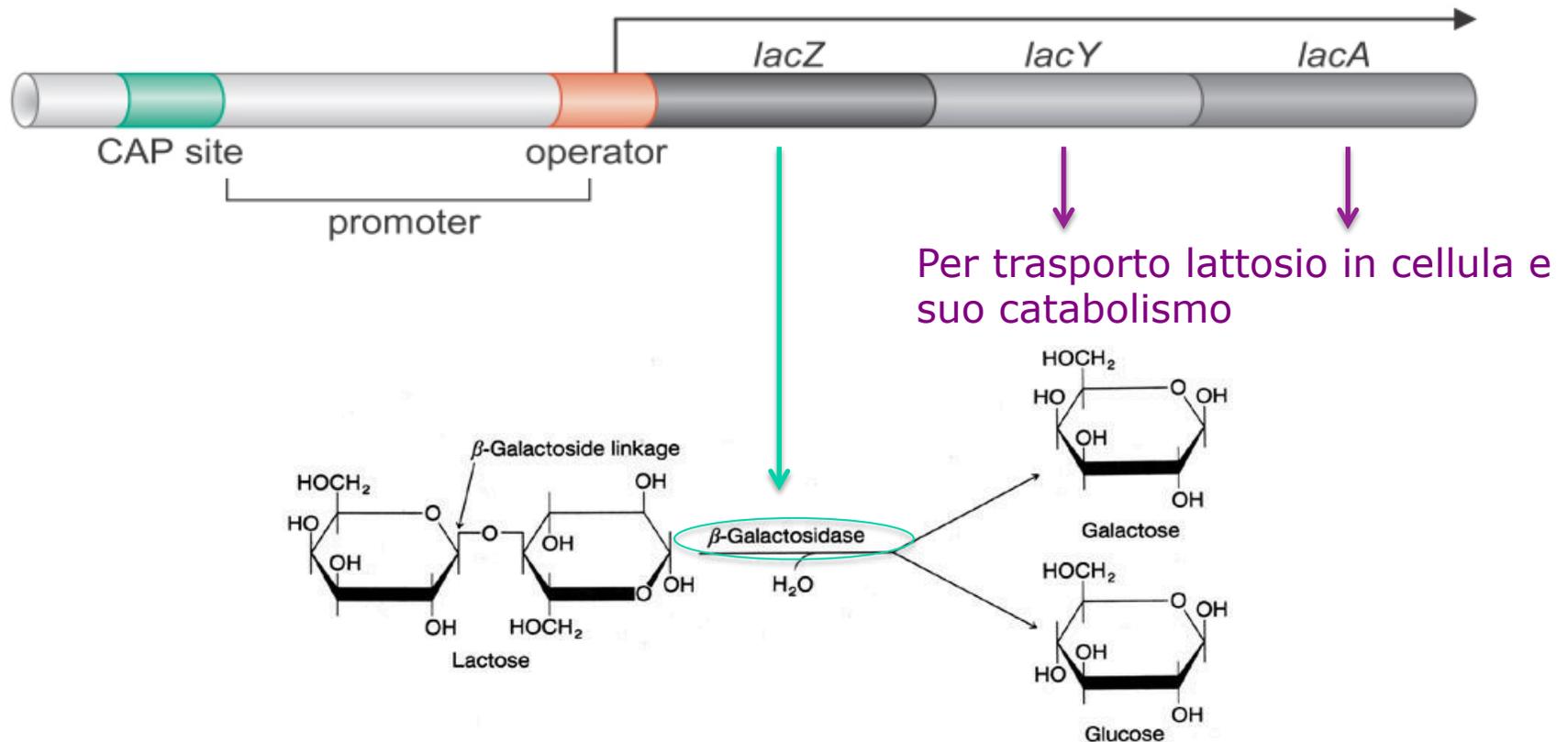
In presenza di una molecola di **repressore**, che si lega al sito *operatore*, sovrapposto alle sequenze del promotore, la polimerasi non e' piu' in grado di legarsi e la trascrizione non avviene.

La polimerasi viene reclutata sul promotore con grande efficienza da una molecola di **attivatore** che si lega nella regione del promotore a monte dei siti di riconoscimento per la polimerasi. L'attivatore interagisce direttamente anche con la RNAPol, facendo aumentare di molto i livelli di RNA.



# REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

## Esempio di Attivazione e Repressione: l'operone del lattosio (lac)



# REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

- In presenza di glucosio l'operone è espresso a livelli bassissimi
- L'operone viene efficientemente espresso solo quando si ha assenza di glucosio e presenza di lattosio

# Elementi di controllo dell' operone lac

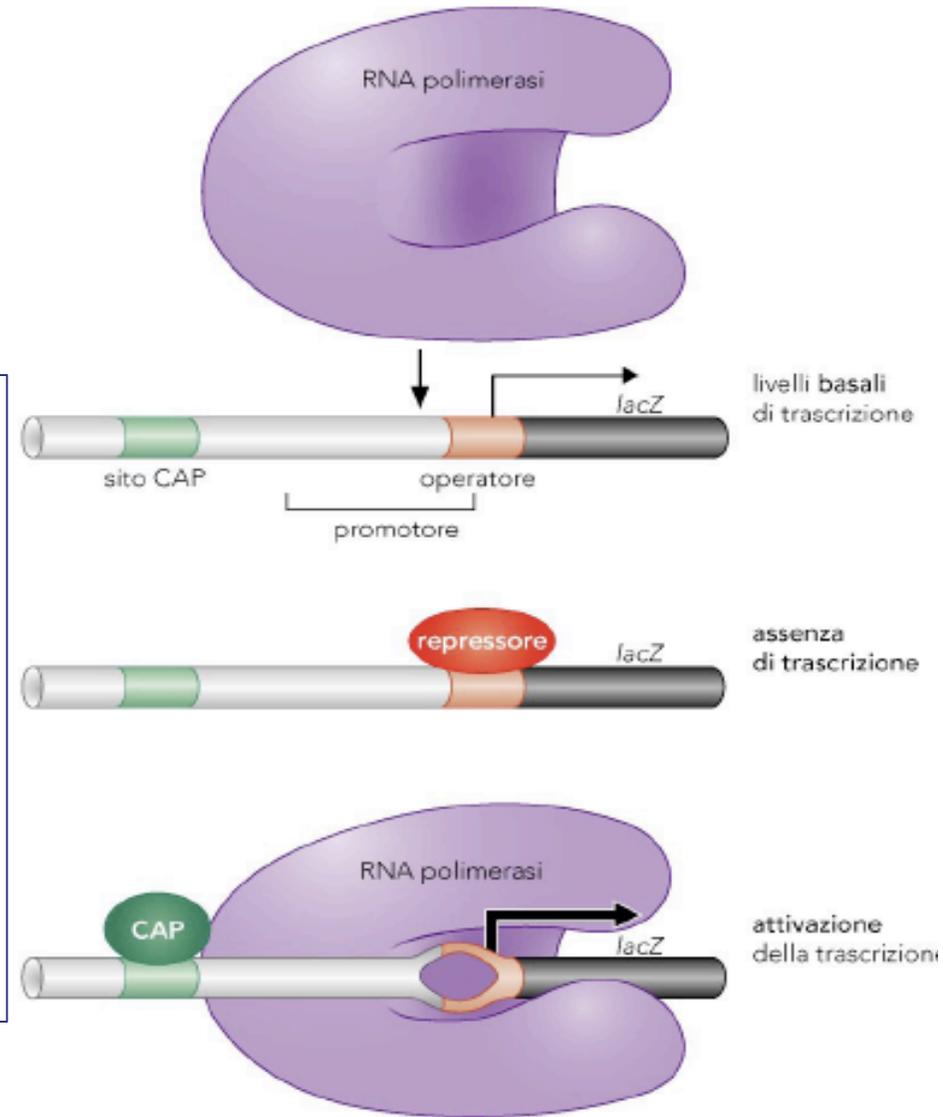
La trascrizione di questi geni è regolata da due proteine:

## 1) l' attivatore CAP

(Catabolite Activator Protein), che consente l' utilizzo di zuccheri alternativi al glucosio (come il lattosio)...

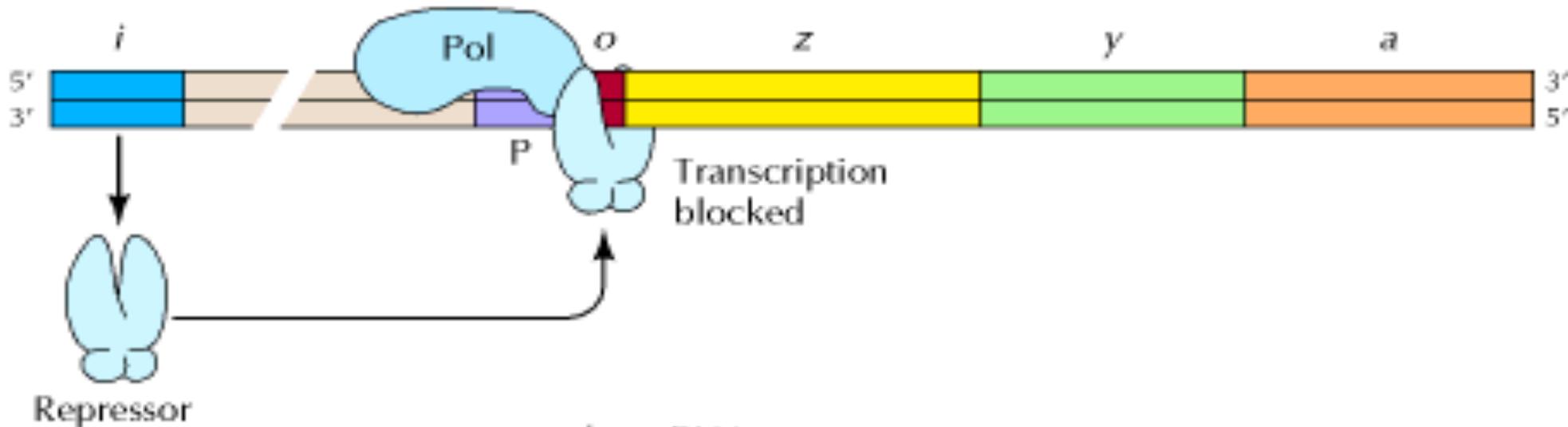
2) il **repressore Lac**, che assicura che la repressione della trascrizione in assenza di lattosio.

glucosio	lattosio
+	+
+	-
-	+



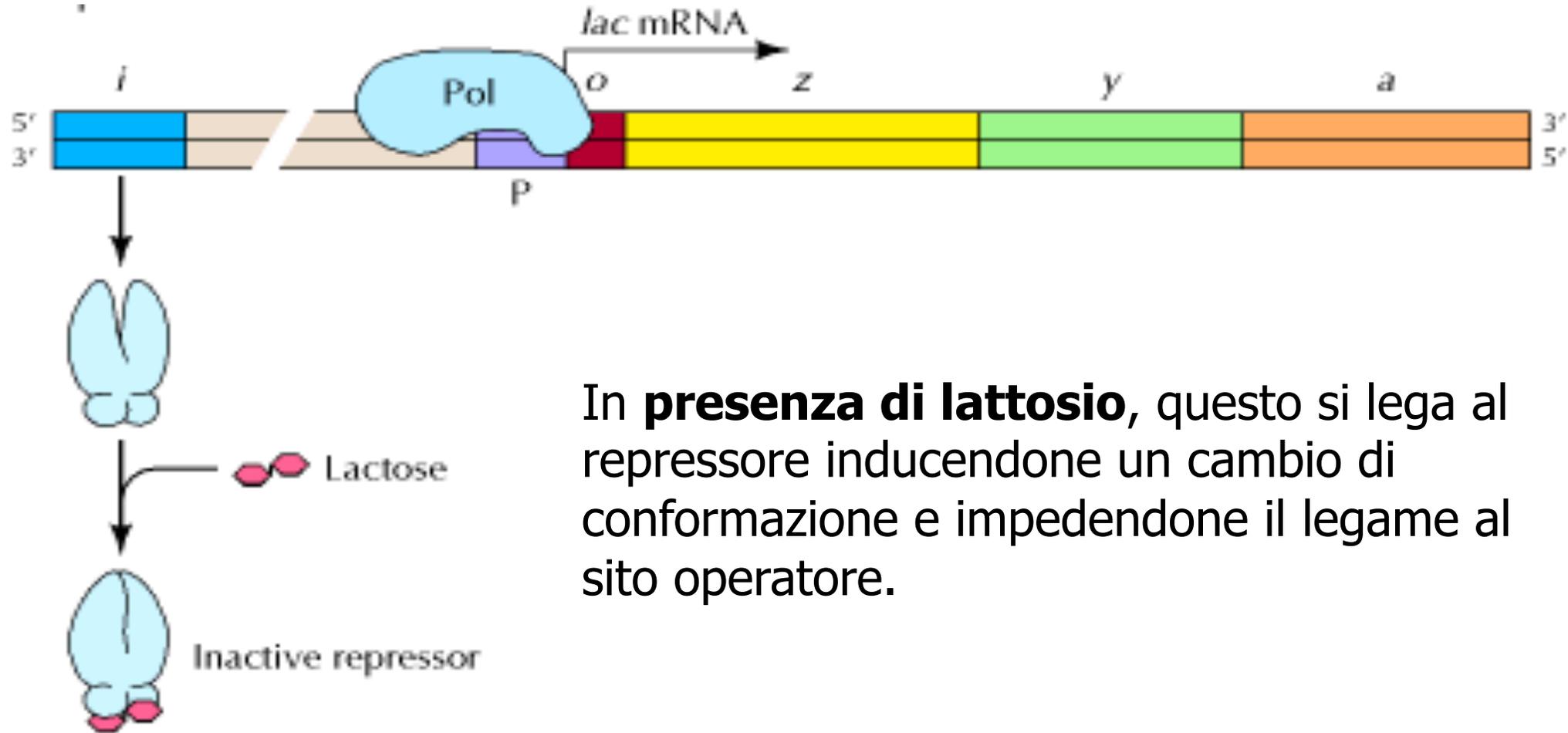
L'attività di CAP e del repressore, dipendono rispettivamente dalla concentrazione cellulare di glucosio (CAP) e lattosio (repressore)

# REGOLAZIONE NEGATIVA DELL' OPERONE LAC



In **assenza di lattosio**, il repressore si lega al sito operatore impedendo alla RNA polimerasi di trascrivere I geni dell'operone

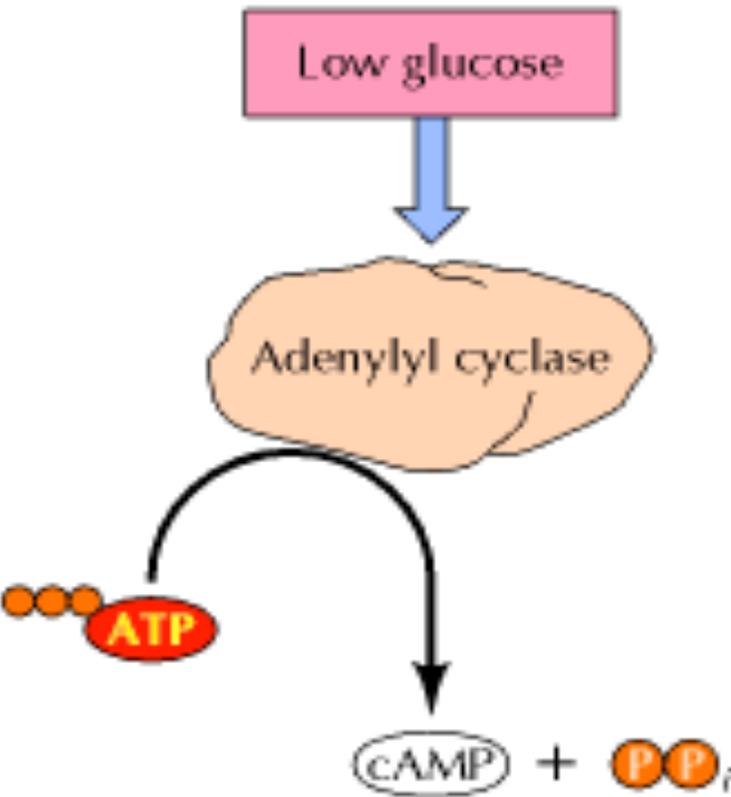
# REGOLAZIONE POSITIVA DELL' OPERONE LAC



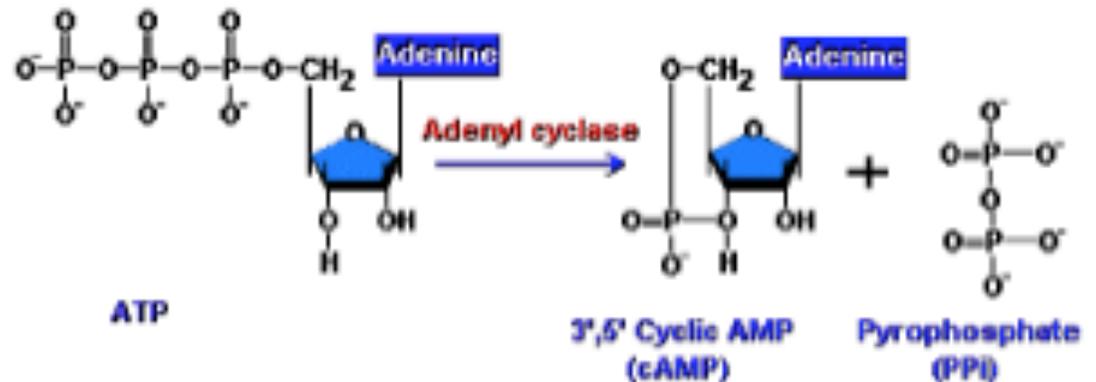
In **presenza di lattosio**, questo si lega al repressore inducendone un cambio di conformazione e impedendone il legame al sito operatore.

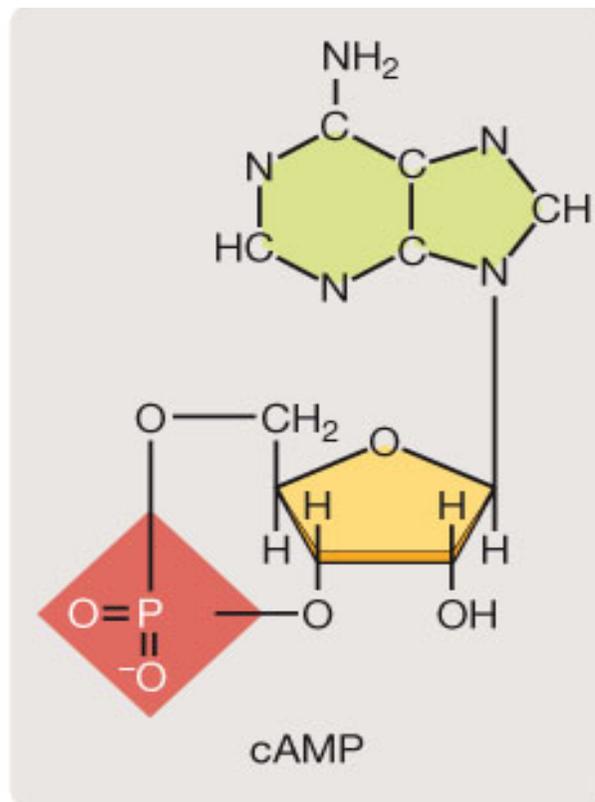
# REGOLAZIONE POSITIVA DELL' OPERONE LAC

L'Operone lac e' soggetto a regolazione positiva, basata sulla proteina **CAP** e l'AMP ciclico (**cAMP**)



- glucose inhibits synthesis of other sugar metabolizing pathway enzymes (e.g., lactose pathway)
- Cells respond to low glucose with high levels of cAMP and vice-versa



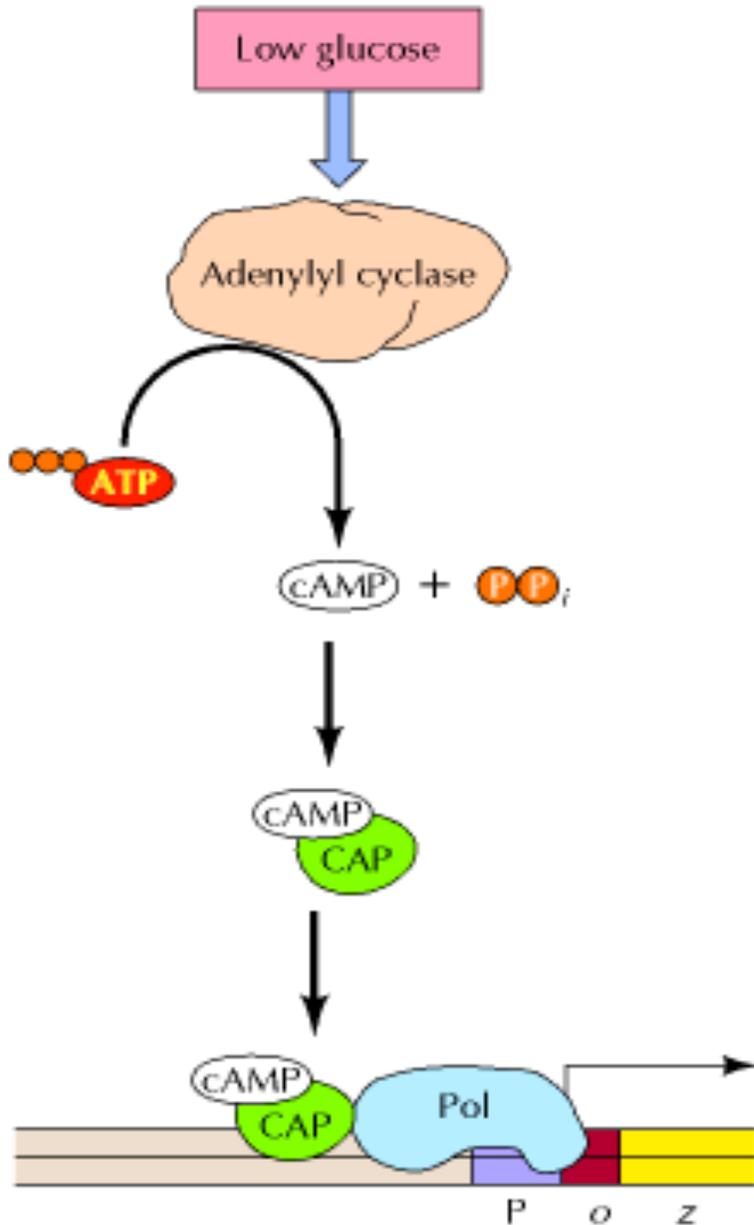


---

glucose ↑ cAMP ↓

- Stimulates Lac operon (*lacZ* production) as the co-activator for the CAP protein (catabolite activator protein)

# Positive Control of Lac Operon



La proteina CAP viene attivata dal legame con il cAMP e interagisce con la RNA polimerasi aumentandone l'efficienza di trascrizione

La quantità di cAMP, e quindi l'attivazione di CAP, è modulata dal glucosio

# RIASSUNTO SU CARATTERISTICHE GENERALI TRASCRIZIONE

1. E' la copiatura in RNA della sequenza del filamento stampo di un gene con una accuratezza di circa 1 errore/10<sup>5</sup> nt trascritti
2. Come requisiti minimi richiede una RNA POLIMERASI e un PROMOTORE
3. La RNA Polimerasi catalizza l'unione di ribonucleosidi trifosfato con legami fosfodiesterici da 5' a 3' e copia un segmento di DNA secondo il principio generale della complementarità delle basi. Non necessita di un primer; necessita di un filamento stampo (antisenso) di DNA per produrre la copia della sequenza presente sul filamento senso
4. Può essere REGOLATA o COSTITUTIVA
5. Negli eucarioti avviene nel nucleo (separatamente dalla traduzione che avviene nel citoplasma); nei procarioti è accoppiata alla traduzione

# RIASSUNTO SU TRASCRIZIONE IN PROCARIOTI

1. Richiede sequenze consenso nel PROMOTORE a -35 e -10 che sono riconosciute dal fattore  $\sigma$  della RNA Polimerasi
2. Può essere REGOLATA attraverso l'uso di fattori  $\sigma$  alternativi che riconoscono diversi sottotipi di promotori e attraverso ATTIVATORI, REPRESSORI o attraverso il meccanismo dell'ATTENUAZIONE TRASCRIZIONALE
3. Termina grazie a TERMINATORI INTRINSECI (la cui sequenza fa formare alla fine del trascritto una struttura che determina il collasso della bolla trascrizionale) oppure TERMINATORI RHO-DIPENDENTI che richiamano la proteina RHO (che svolge l'ibrido DNA-RNA)
4. Può avvenire su OPERONI, cioè gruppi di geni la cui trascrizione è controllata da un unico promotore (e regolata da una sequenza chiamata OPERATORE cui si legano repressori/attivatori). Il trascritto prodotto è un RNA policistronico che codifica per più di una proteina.