

Modulo 7

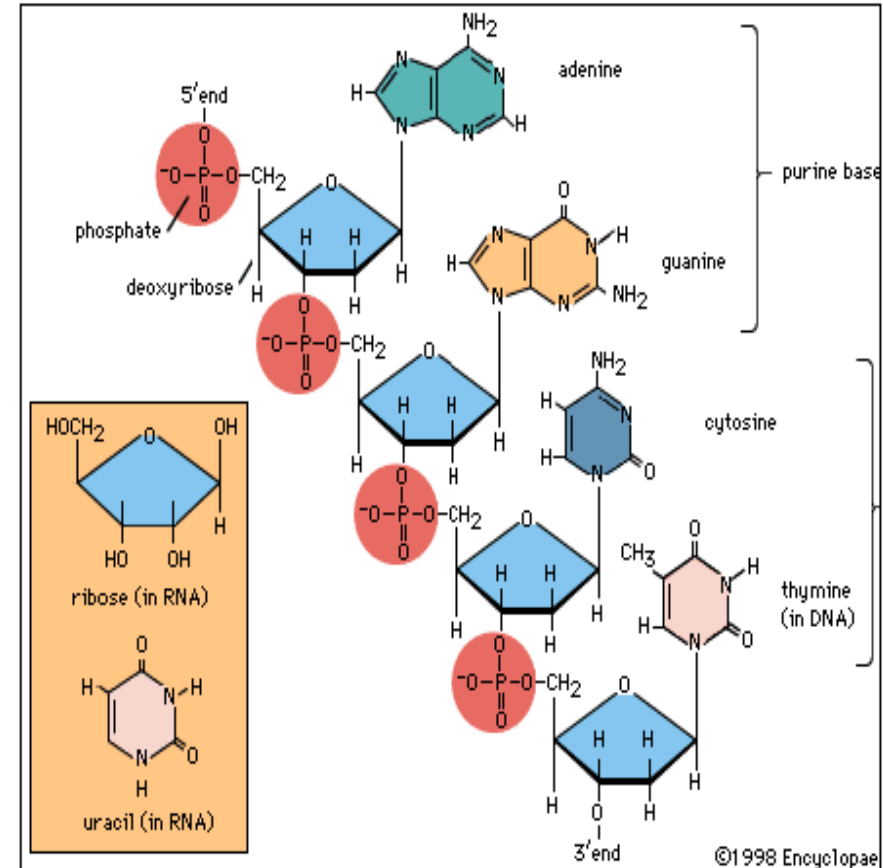
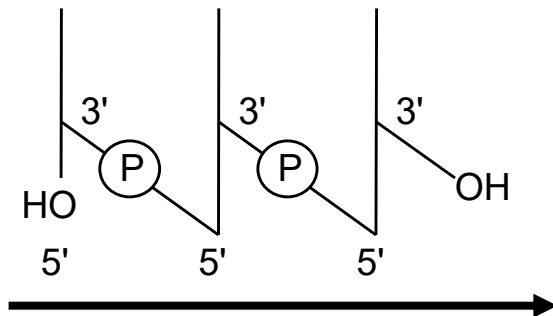
Gli Acidi Nucleici

2022-23

DNA e RNA: struttura 1^a

► DNA/RNA – struttura 1°

- sequenza di residui (**nucleotidi**) composti da **basi azotate** (pirimidine o purine) **legate al D-ribosio (RNA) o al desossiribosio (DNA)** (nella forma ciclica) **connessi da legami 3',5'-fosfodiesteri**



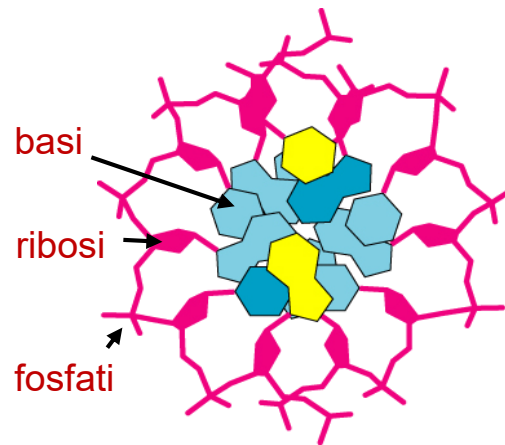
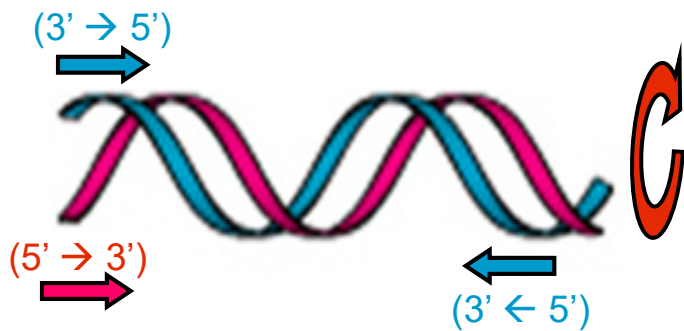
- le catene polinucleotidiche **hanno una direzione** - per convenzione va dal carbonio 5' del ribosio al carbonio 3'

(5' → 3')

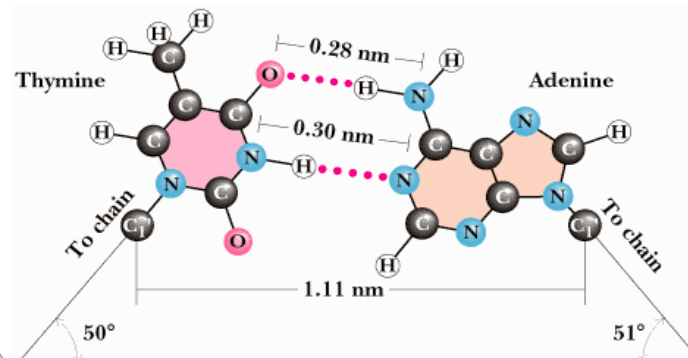
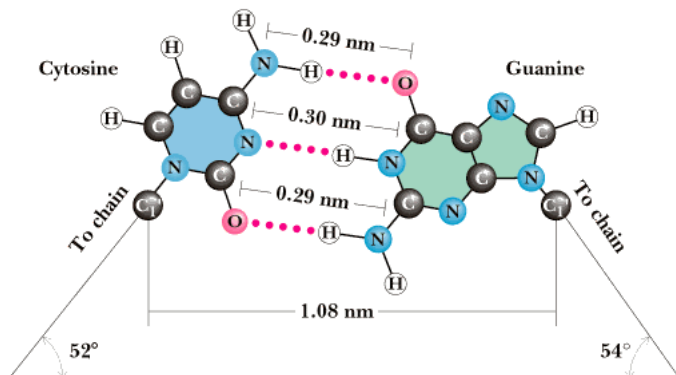
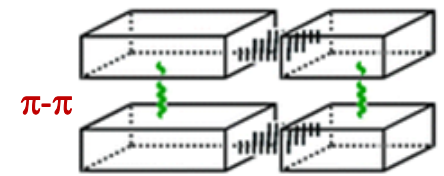
DNA : struttura 2^a

► La struttura 2° è una doppia elica destrorsa con le due catene orientate in modo antiparallelo con asse comune

- il piano delle basi è perpendicolare all'asse – i ribosi e gruppi fosfato sono esterni, e le basi interne all'elica (interazioni idrofobiche, interazione π - π e legami-H).
- le basi interagiscono all'interno dell'elica in maniera SPECIFICA (G:C e A:T; appaiamento WC) mediante legami-H (questa specificità determina i processi di replicazione/traduzione)



legami-H, idrofobici

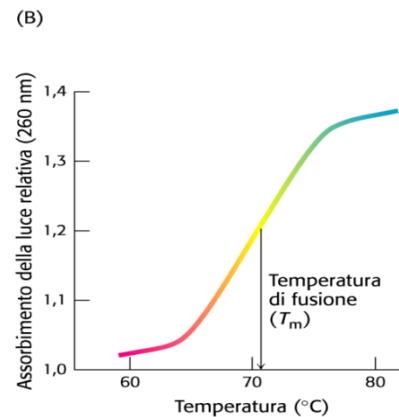
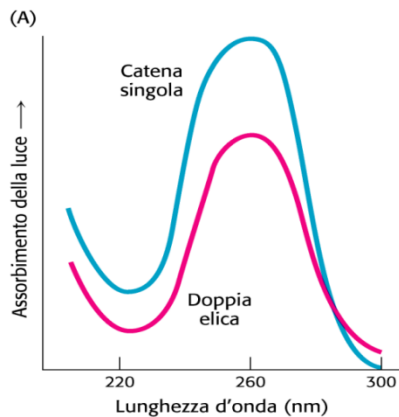
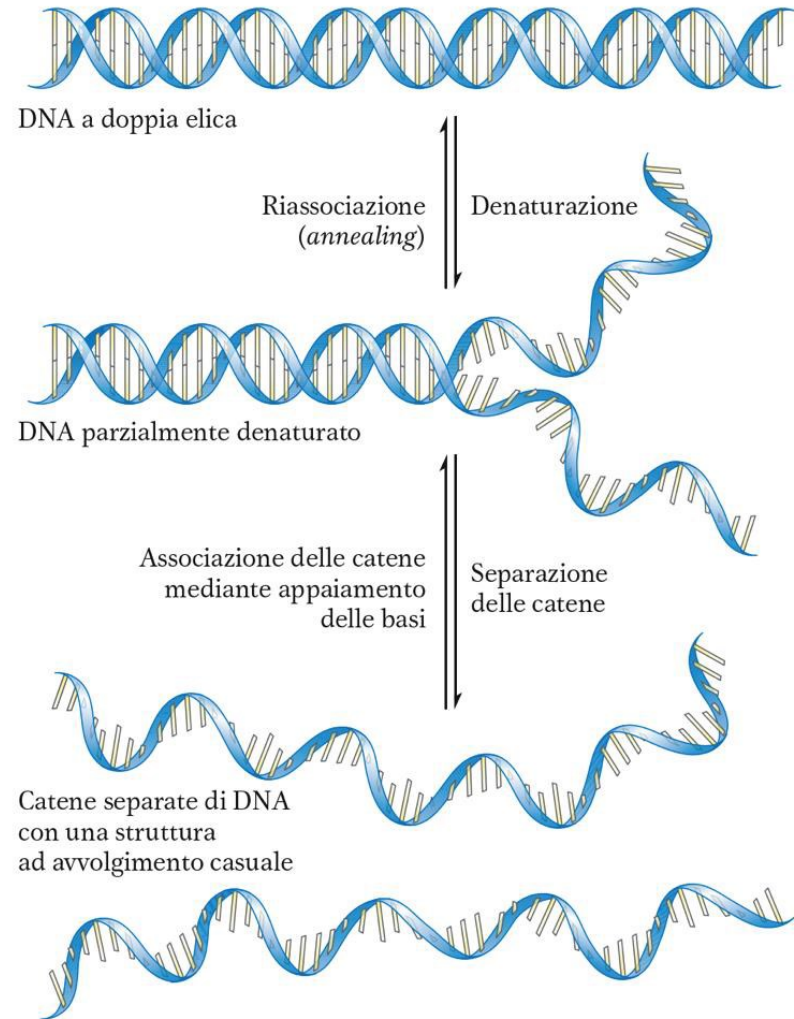


appaiamento di basi secondo Watson-Crick

DNA : struttura 2^a (cont.)

► Il *folding* del DNA in doppia elica è un processo cooperativo e reversibile

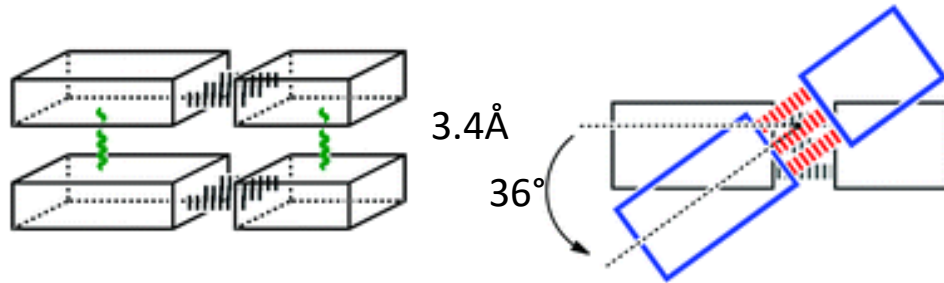
- la rottura dei legami-H tra le paia di basi permette la **denaturazione** del DNA e avviene per aumento di temperatura (non fisiologico) o per un processo enzimatico (fisiologico)
- le basi nel DNA denaturato (**ssDNA**) assorbono la luce più intensamente che nel dsDNA (**effetto ipercromico**) e questo può essere utilizzato per seguire la denaturazione
- La temperatura al punto medio di della fusione (T_M) è nota come T di fusione (*melting temp.*)



DNA : struttura 2^a (cont.)

► La doppia elica destrorsa ha una struttura dinamica

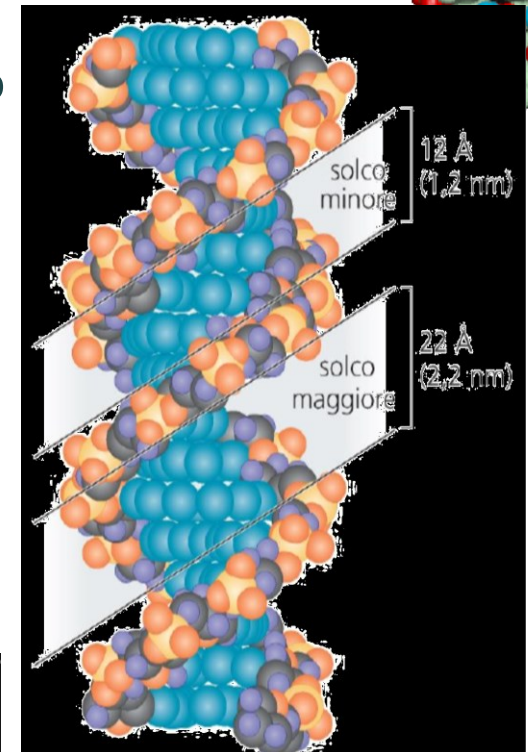
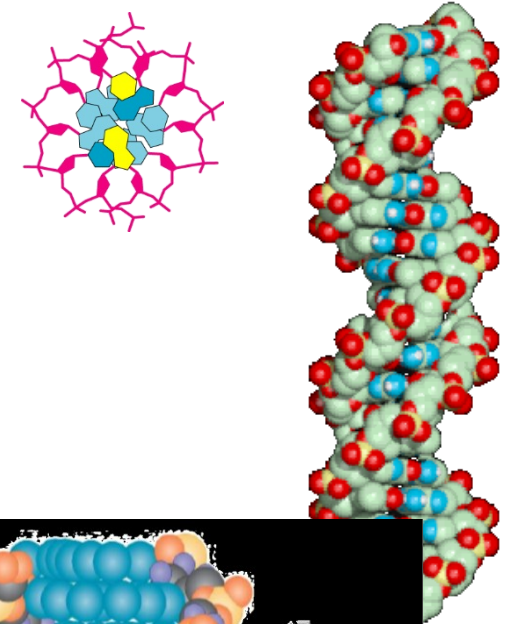
- la configurazione più comune (B-DNA) ha una doppia elica con diametro $\sim 20\text{\AA}$ e le basi sono impilate a $\sim 3.4\text{\AA}$ di distanza, con torsione (base-pair twist) di 36° , 1 giro/10 res.



- la struttura e dinamica e cambia configurazione a secondo delle condizioni (A-DNA è più tozza, Z-DNA è sinistrogira)

► la doppia elica presenta due scanalature avvolte attorno all'asse (i solchi)

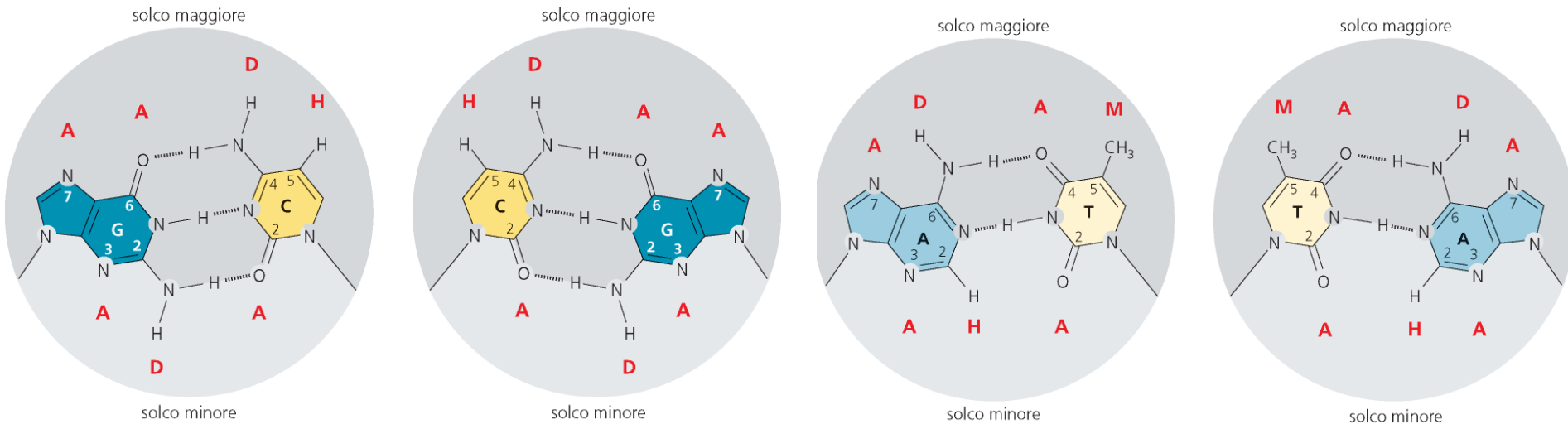
- il **solco maggiore** e il **solco minore** sono foderati dagli atomi sui lati esterni delle basi
- questo permette **interazioni non covalenti** con le proteine che legano al DNA e che possono **riconoscere specifiche sequenze di basi**



DNA : i solchi

► Caratteristiche dei solchi maggiore e minore

- gli angoli che si formano tra i legami glicosidici della coppia di basi con le rispettive unità di ribosio sono di circa 120° (formerà il solco minore) sull'altro lato (240°) si formerà il solco maggiore
- i lati delle basi che si affacciano nei solchi maggiore e minore creano un sistema di donatori ed accettori di idrogeno e superfici di van der Waals
- molte proteine che legano al DNA sono in grado di riconoscere specifici pattern di questi donatori/accettori e agiscono in prossimità di quelle sequenze



A: accettore legame H D: donatore legame H M: gruppo metilico H: idrogeno non polare

DNA : il codice genetico

► L'appaiamento di basi Watson-Crick e il codice genetico

- ci sono **20 AA** ma **4 basi**; un codice genetico basato su singole basi codificherebbe per solo 4, uno basato su doppiette solo per 16

- Il codice genetico si basa su **triplette di basi** (noti come **codoni**) che permette $4^3 = 64$ diverse unità di informazione; c'è **ridondanza** nel codice genetico.

- Il codice genetico è **universale** e cambia di pochissimo nei diversi organismi; solo i mitocondri hanno un codice lievemente diverso.

1ª base (5')	2ª base				3ª base (3')
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Esempi: UUU o UUC = codoni per Phe

UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC = codoni per Ser

AUG = codone per Met ma è anche il codone di START

UAA, UAG, UGA = codoni STOP

Ridondanza: 6 x L,R,S 4 x V, P, T, A, G 3 x I, Stop 2 x F,Y,N,K,D,E,Q,C 1 x Start, M, W

DNA : leggere il codice genetico

► I codoni di start e stop definiscono la sequenza di un gene (la *cornice di lettura*)

GUCGCCCAUGGGGCGUGAUUAUACAGCCCGCUUAACGCCAU

Val Ala Pro Trp --- --- ---

Ser Pro His

Arg Pro Met Gly Arg Asp Ile Gln Pro Gly Stop

1ª base (5')	2ª base			3ª base (3')
	U	C	A	G
U	Phe	Ser	Tyr	Cys
	Phe	Ser	Tyr	Cys
	Leu	Ser	Stop	Stop
	Leu	Ser	Stop	Trp
C	Leu	Pro	His	Arg
	Leu	Pro	His	Arg
	Leu	Pro	Gln	Arg
	Leu	Pro	Gln	Arg
A	Ile	Thr	Asn	Ser
	Ile	Thr	Asn	Ser
	Ile	Thr	Lys	Arg
	Met	Thr	Lys	Arg
G	Val	Ala	Asp	Gly
	Val	Ala	Asp	Gly
	Val	Ala	Glu	Gly
	Val	Ala	Glu	Gly

- mutazioni nella sequenza del gene (variazione genotipica) possono avere, o non avere un'effetto sulla sequenza proteica (effetto fenotipico)

GUCGCCCAUGGGUCGUGAUAGACAGCCCGCUUAACGCCAU

Met Gly Arg Asp Arg Gln Pro Gly Stop

Mutazioni puntiforme
sinonima / non sinonima
(missense)

GUCGCCCAUGGGGCGUGAUUAUAGCCCGCUUAACGCCAU

Met Gly Arg Asp Ile Stop

stop prematuro
(nonsense)

GUCGCCCAUGGGGGUGAUUAUACAGCCCGCUUAACGCCAU

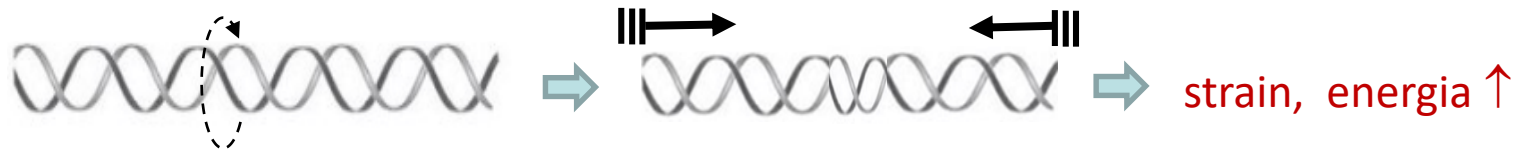
Met Gly Val Ile Cys Ser Pro Leu Asn Ala.....

inserzione/Delezione
slitta la cornice di lettura

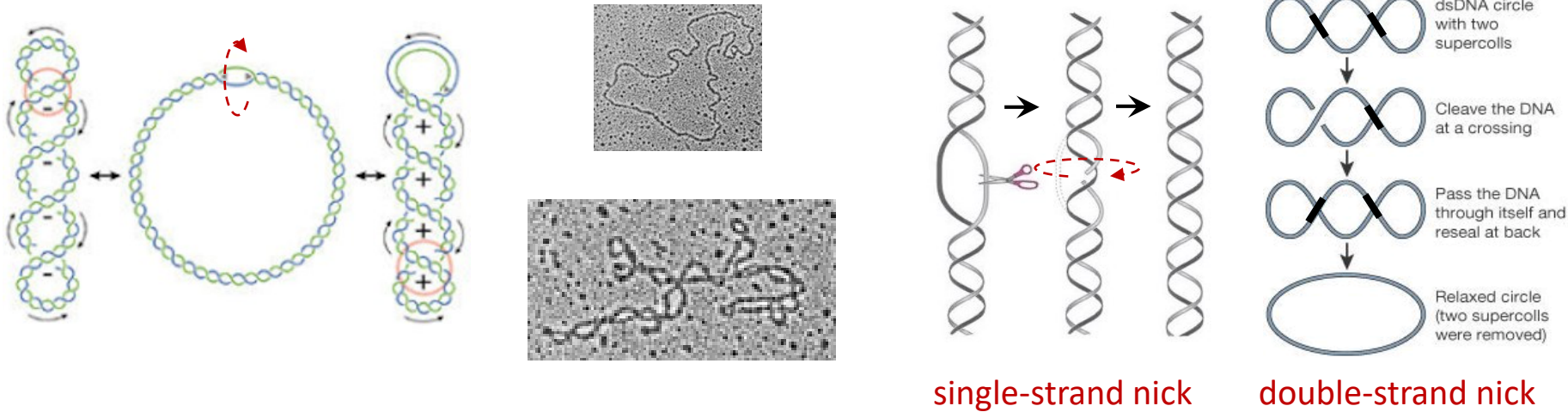
DNA : struttura 3^a

► La doppia elica può adottare strutture a più alto livello

- Le molecole di DNA possono essere lineari e molto lunghe, o circolari (es. cromosomi procariotici, plasmidi) e questo impedisce il disavvolgimento/avvolgimento locale



- se sovra- o sotto-avvolte (normale ≈ 10 res./giro), serve **rilassare lo strain** formando strutture topologiche superiori (**strutture super-avvolte**), che altera l'interazione con altre molecole
- Il super-avvolgimento può essere negativo e positivo (dipende dal senso d'avvolgimento)



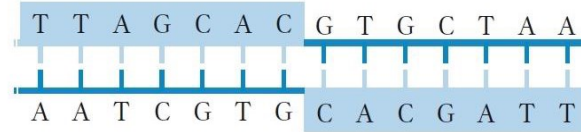
- Specifici enzimi, le **topoisomerasi** possono variare il grado di super-avvolgimento effettuando tagli transienti a livello di uno o di entrambe i filamenti di DNA

DNA : struttura 3^a

► Alcune particolari sequenze di DNA inducono varianti strutturali

- Le sequenze **palindromiche** sono successioni di sequenze di **basi ripetute ed invertite**; danno luogo a **ripetizioni speculari e simmetriche** su ogni catena

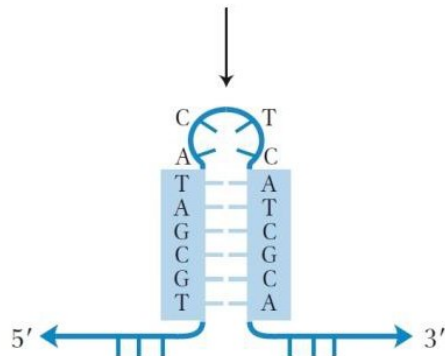
rotazione di 180 °C attorno all'asse orizzontale e 180 °C sull'asse verticale



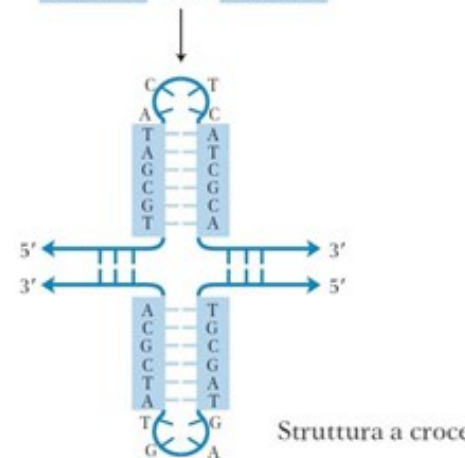
palindromo

autocomplementari

- Le sequenze palindromiche sono **auto-complementari** e pertanto in grado formare appaiamenti intra-catena fin strutture a forcina se è coinvolta una sola catena (es nell'RNA), oppure a croce se sono coinvolte entrambe le catene (es. dsDNA)



Struttura a forcina



Struttura a croce

DNA: replicazione semiconservativa

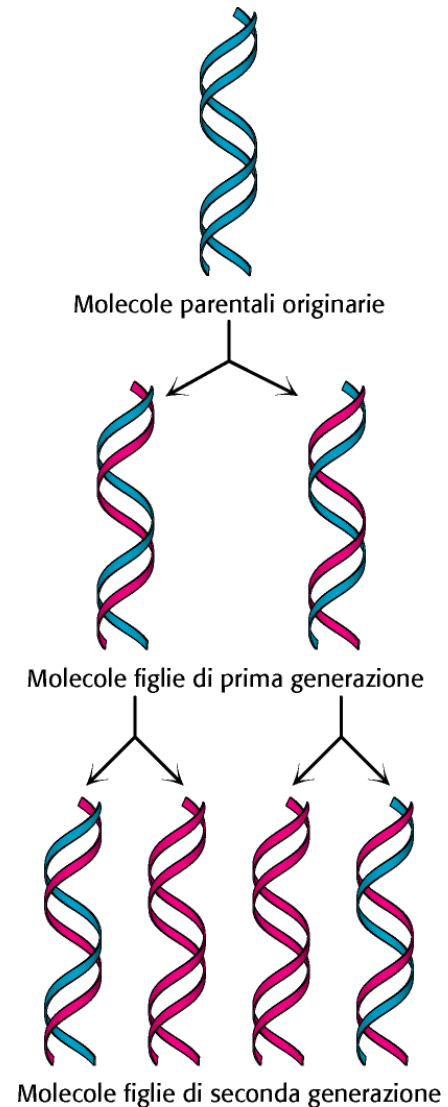
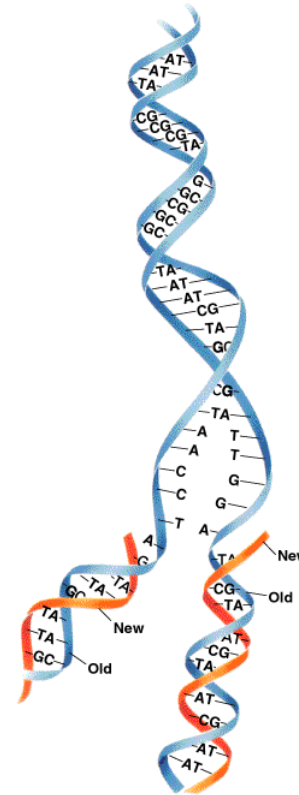
► La replicazione di DNA ha una natura semiconservativa

- i cromosomi sono lunghe sequenze formate da un unico filamento di dsDNA
- variano in grandezza da ~3 milioni di basi nei batteri a >250 milioni di basi negli eucarioti
- l'organizzazione a doppia elica con filamenti complementari antiparalleli facilita la replicazione
- Il meccanismo di copiatura dell'DNA coinvolge:

1) **srotolamento** dei due filamenti

2) entrambi i filamenti fungono da stampo per la **sintesi** di un nuovo filamento complementare a quello parentale

3) sono **prodotte due molecole identiche** di ds DNA ciascuna con un filamento parentale e un filamento **nuovo** (replicazione semiconservativa)



RNA: struttura e funzione

▶ RNA di diverso tipo hanno diverse strutture e funzioni

- gli RNA non sono materiale genetico che viene duplicato ma sono copiati da tratti di DNA
- ogni tipo di RNA ha una specifica funzione e svolgono diverse funzioni nella sintesi proteica o nella sua regolazione:

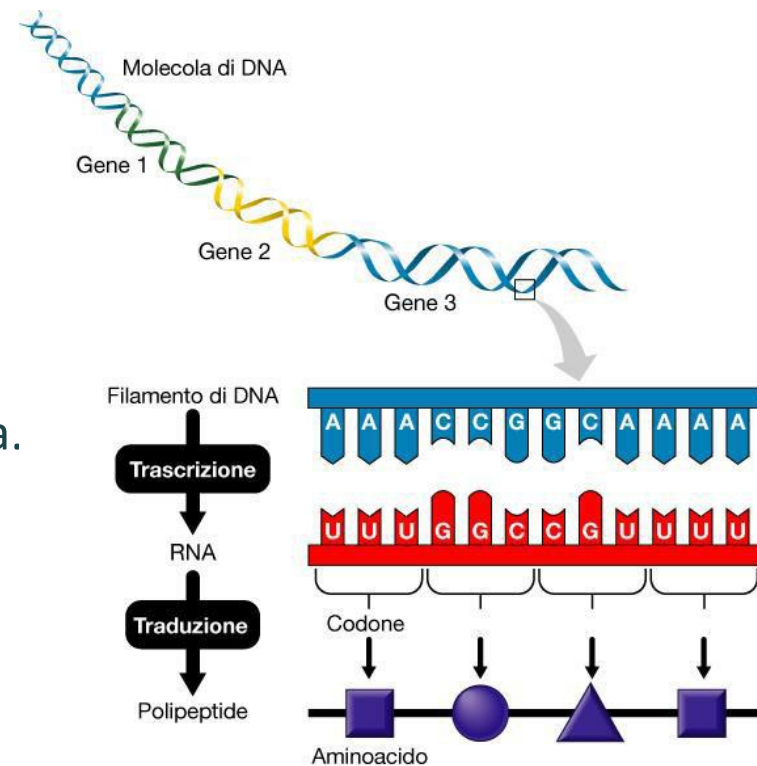
mRNA - funzione di intermediario dell'informazione genetica (copia del gene)

tRNA - funzione di raccordo (trasporta il corretto AA corrispondente ad un codone)

rRNA - funzione strutturale e catalitica nei ribosomi dove forma strutture 4° con subunità proteiche

sRNA - funzione strutturale e catalitica nei spliceosomi che processano l'mRNA trascritto ad RNA maturo negli eucarioti (rimozione di sequenze introniche non-codificanti)

RNA regolatori - miRNA, siRNA, snRNA, ncRNA hanno funzioni di regolazione nell'espressione genica.



RNA: struttura 3a

► RNA DI TRANSFER (tRNA)

- molecole adattatrici che contengono una sequenza (tripletta di residui nota come **anticodone**) complementare alla tripletta del codone che lo codifica

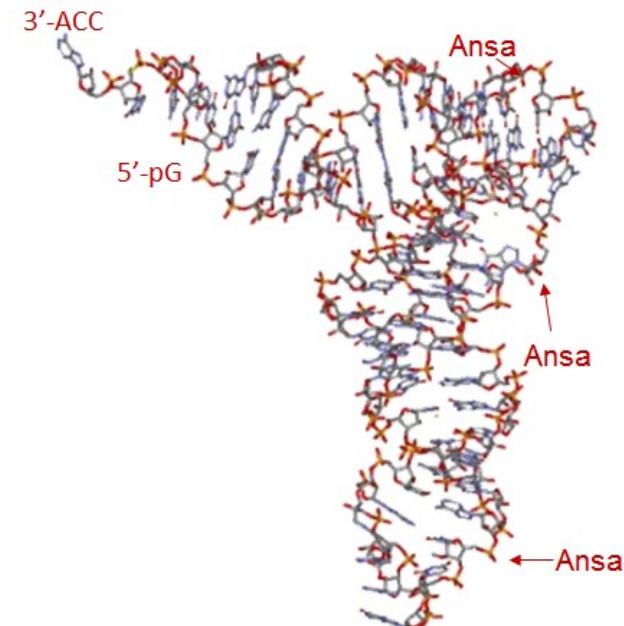
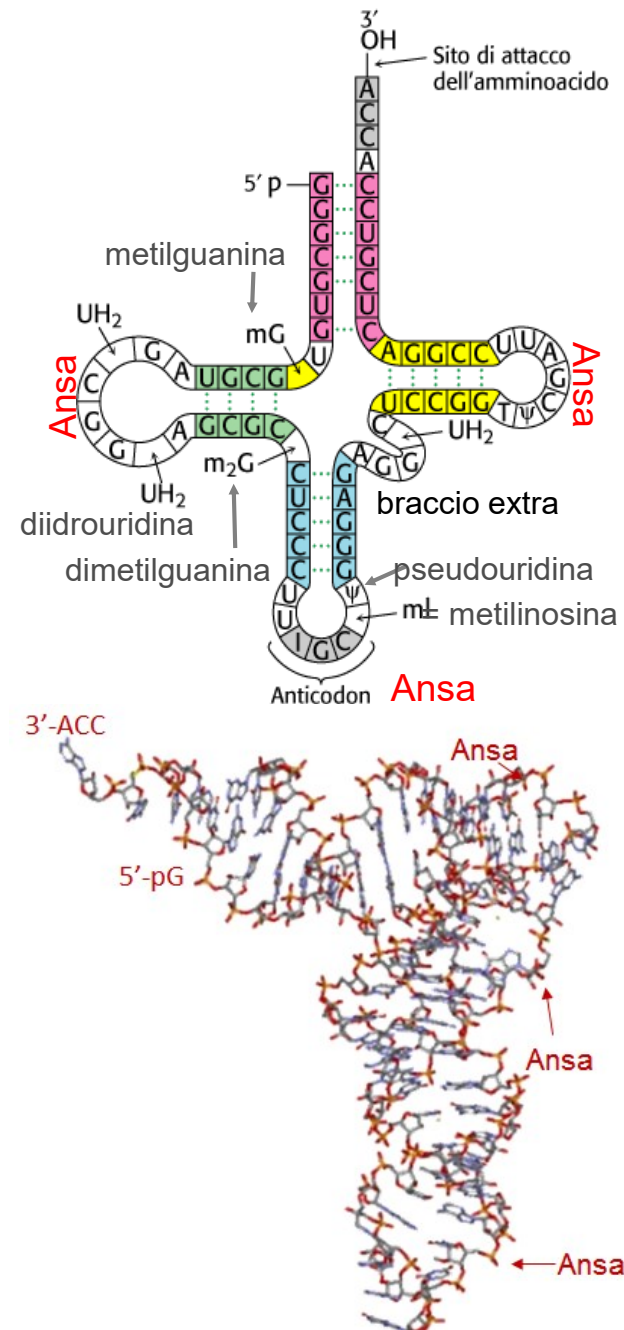
- hanno una **topologia a trifoglio**, dove i terminali 3' e 5' sono vicini e terminale 3' porta l'amino acido legato al 2' o 3' del ribosio, mentre l'ansa centrale del trifoglio porta la tripletta che riconosce il codone nell'mRNA (**ansa del anticodone**).

-ha una forma ad «L» e la singola catena di 73 - 93 nucleotidi che si ripiega in modo che ~ la metà formano tratti a doppia elica

-questi tratti corrispondono agli steli nella topologia a trifoglio e le zone a singolo filamento corrispondono alle anse

- contiene diverse basi inusuali, derivate da A,U,C e G, che formano appaiamenti non-WK e al 5' si trova un G fosforilata e al 3' la tripletta CCA con l'AA legato ad A

-l'ansa dell'anticodone è composta da 7 residui; con i tre residui centrali complementari alla tripletta codone presente sul mRNA.



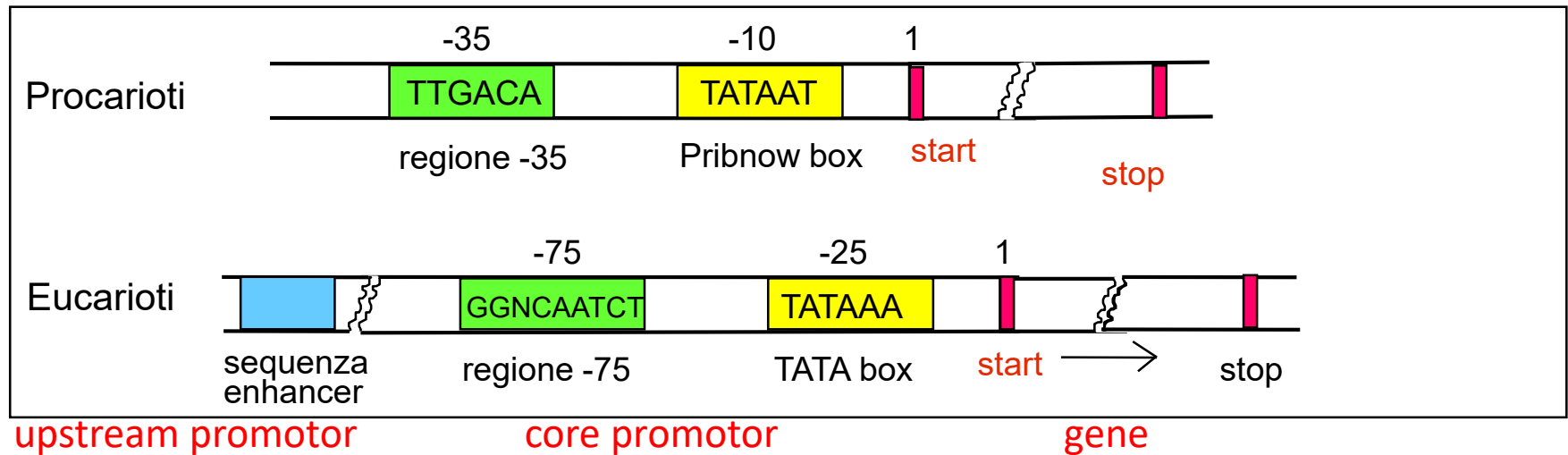
flusso dell'informazione genetica – il dogma centrale

► Il flusso di informazione genetica va dal DNA al mRNA ai ribosomi.

- La **replicazione** = duplicazione del DNA (due molecole identiche)
- La **trascrizione** = DNA → mRNA con sequenza identica (T → U)
- La **traduzione** = sequenza nucleotidica (mRNA) → sequenza amminoacidica

- le sequenze dei geni e delle proteine che codificano sono **COLINEARI**.

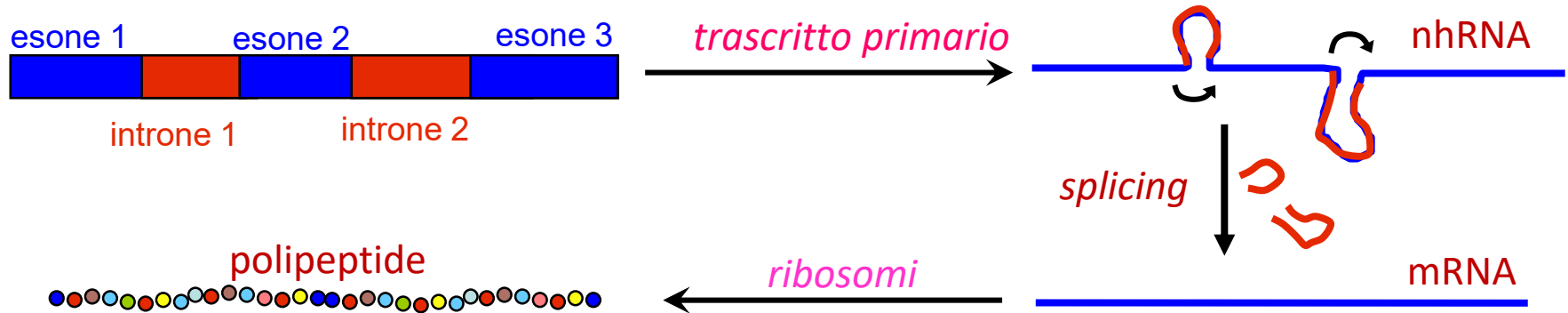
- la trascrizione inizia nella vicinanza di specifiche sequenze conservate, i cosiddetti "**SITI PROMOTORI**" e termina a livello di sequenze specifiche note come "**SITI TERMINATORI**"



- la traduzione è governata dai specifici segnali di *start* e *stop* presenti nel mRNA; i segnali *start* sono preceduti da specifiche sequenze che legano l'apparato proteico necessario per la traduzione mentre i segnali *stop* sono riconosciuti da proteine note come fattori di rilascio, che staccano l'RNA dal ribosoma.

flusso dell'informazione genetica – il dogma centrale

- ▶ Negli eucarioti, i geni sono discontinui: sono formati da diverse **sequenze codificanti (esoni)**, intercalate alle quali ci sono **sequenze non codificanti (introni)**

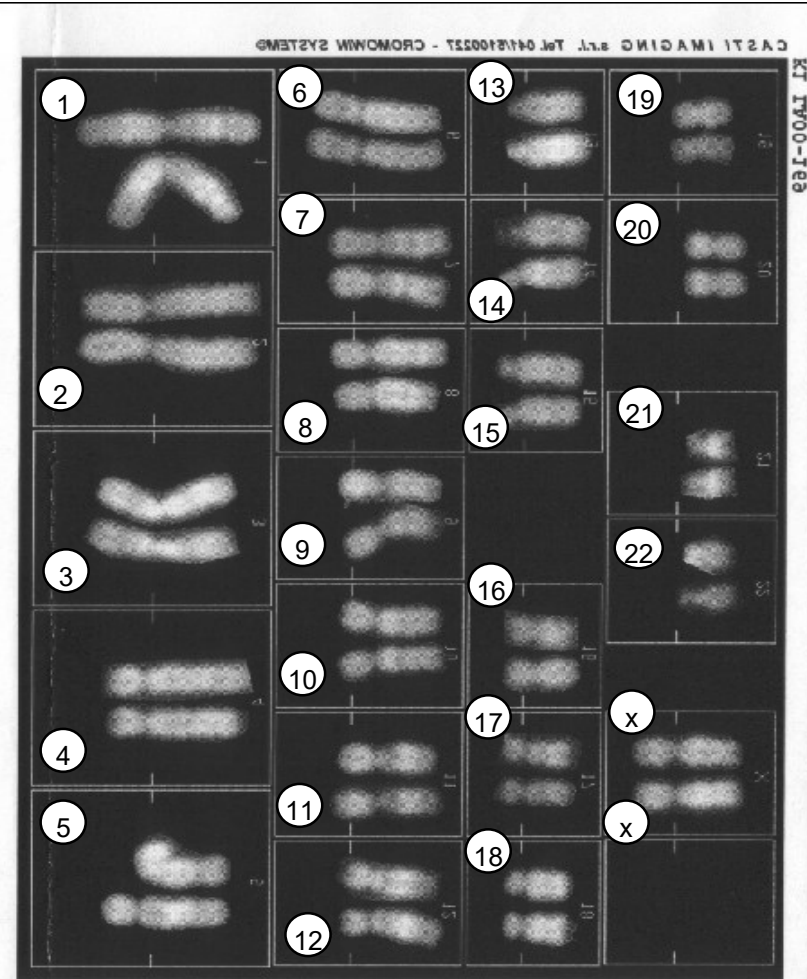
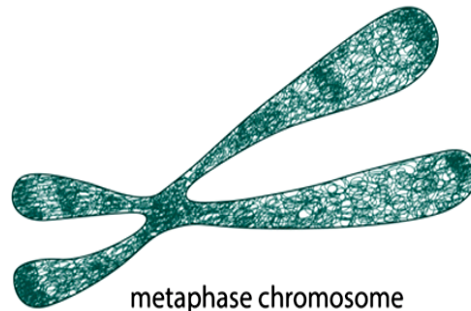
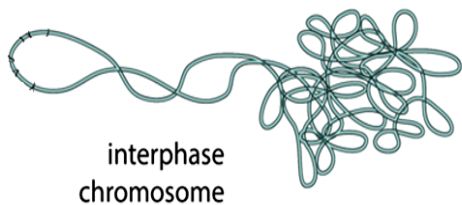


- l'**RNA inizialmente trascritto** è una **copia esatta dell'intero gene** con introni ed esoni (RNA nucleare eterogeneo, **nhRNA**)
- gli introni sono rimossi (**splicing**) da complessi proteina/RNA noti come **spliceosomi** e l'RNA ricongiunto come catena unicamente codificante (maturo, mRNA)
- è un processo **co-trascrizionale** e i **spliceosomi** riconoscono **specifici segnali intronici** e rimuovono gli introni ricucendo l'**mRNA maturo** con **solo la sequenza codificante**.
- un **esone spesso corrisponde ad un dominio strutturale o funzionale** nella proteina; durante l'evoluzione proteine con **nuove funzioni** si possono sviluppare per **ricombinazione di esoni** che codificano elementi strutturali discreti
- lo **splicing differenziato (alternative splicing)** di mRNA genera proteine correlate ricomponendo l'RNA nascente in diverse maniere (aumenta la **diversità genica**)

struttura del cromosoma nel uomo

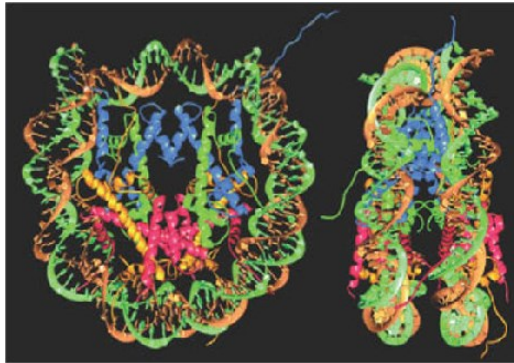
▶ il materiale genetico umano è organizzato in 23 paia di cromosomi

- ciascun cromosoma è formato da una **lunghissimo dsDNA** (>2m in totale ma con spessore di solo 20 Å), **impaccato nel nucleo** della cellula (5 - 10 μm).
- per ottenere questo grado di impaccamento il **DNA è avvolto attorno** a complessi proteici con diversi livelli di complessità
- qui vediamo la struttura di cromosomi durante la **metafase**, quando la cellula si sta dividendo e sono nella **forma più compatta**; i geni non sono accessibili a questo grado di impaccamento
- nell'**interfase** (quando la cellula si è divisa ed è **diventata attiva**, sono impaccati in modo più lasco

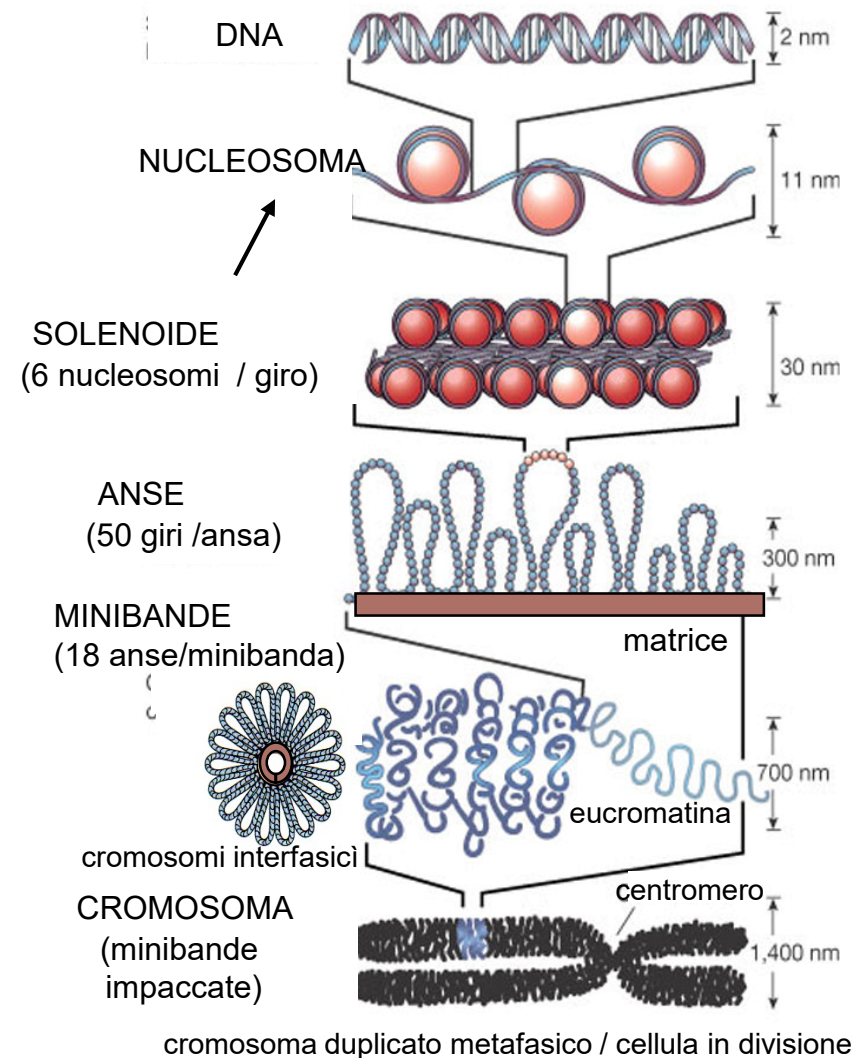


struttura del cromosoma (cont.)

- 5 diversi tipi di proteine basiche, gli **istoni**, formano l'ottamero del **nucleosoma** attorno al quale si avvolge inizialmente il doppio filamento di DNA (2 giri), formando una super-elica sinistrogira.

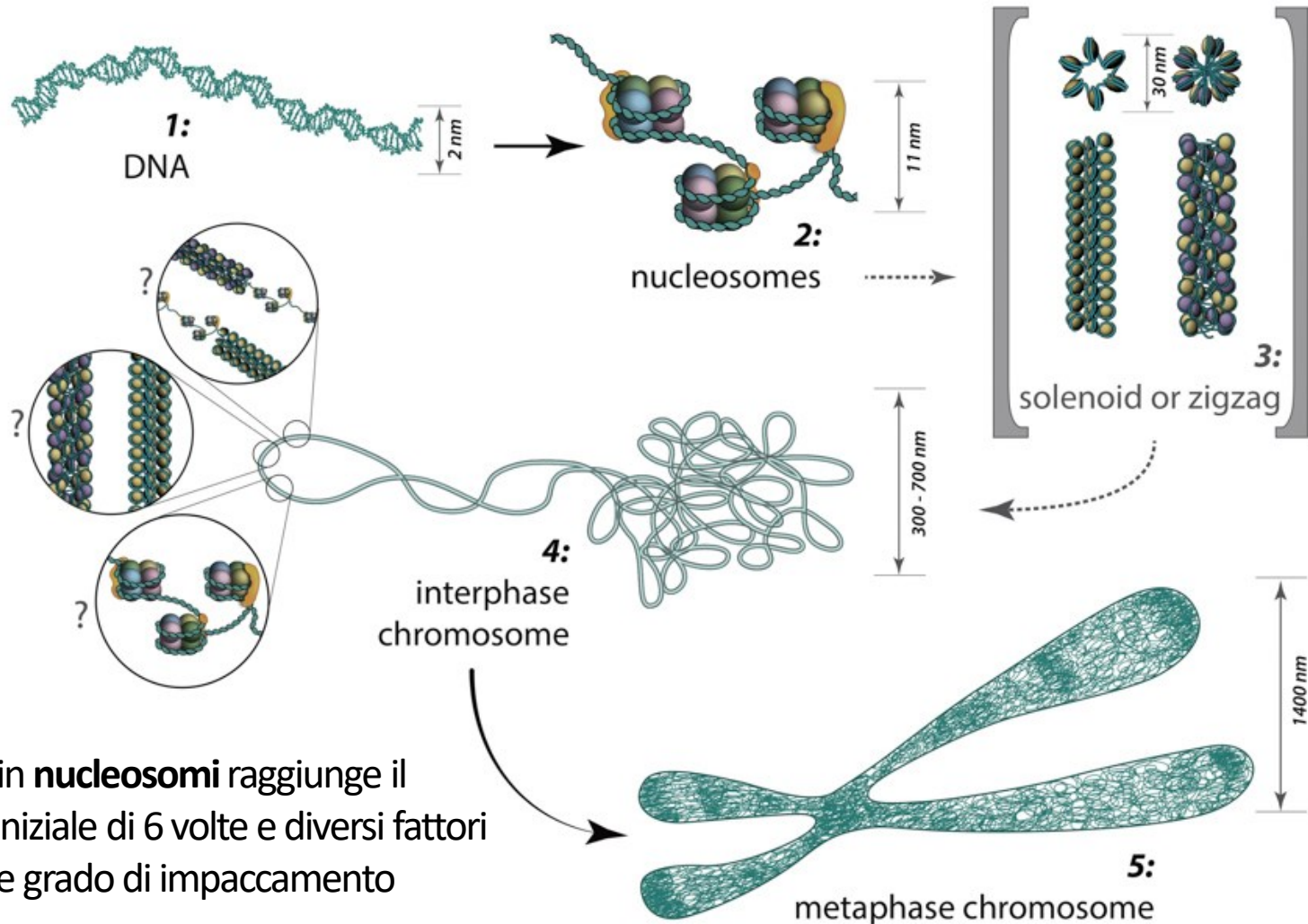


- i nucleosomi si impaccano a forma di **solenioide** (6 per giro) e formano un **filamento**
- questo si organizza attorno al complesso proteico della **matrice** (a mo' di **anse**).
- ~20 anse si dispongono in una **minibanda**, che forma una sezione del cromosoma.



nucleosoma → ca. 200 bp solenoide → ca. 1200 bp ansa → 60-150 kb,
minibanda → 1-3 megabasi cromosoma tipico → 10⁶ minibande.

struttura del cromosoma (cont.)



Il ripiegamento del DNA in **nucleosomi** raggiunge il livello di compattazione iniziale di 6 volte e diversi fattori determinano il successivo grado di impaccamento

L'ulteriore condensazione della cromatina nelle fibre da 30 nm (solenoidi) è suggerita da dati in vitro ma deve ancora essere comprovata in vivo. Durante l'interfase, la cromatina è ripiegata in domini di $300-700\text{ nm}$, che insieme costituiscono un **territorio cromosomico**. La struttura e l'organizzazione dei circuiti cromatinici all'interno di un territorio cromosomico rimane oggetto di dibattiti ed è stata proposta l'esistenza sotto forma di solenoide, o zigzag, o nucleosomi, o un ibrido di questi.

Enzimi che agiscono sul DNA

► il DNA può essere facilmente deformato e modificato

- i solchi maggiore e minore espongono **siti di riconoscimento specifici** per la formazione di **legami-H multipli** fra le basi e catene laterali delle proteine che agiscono sul DNA.

- **4 tipi di enzimi** agiscono sul DNA:

NUCLEASI (idrolisi del legame fosfodiesterico in oligonucleotidi)

LIGASI (formazione del legame fosfodiesterico fra due oligonucleotidi)

TOPOISOMERASI (GIRASI, ELICASI) (variazione di superavvolgimenti)

POLIMERASI (polimerizzazione mediante la condensazione di nucleotidi)

- questi enzimi spesso si **agganciano e scorrono lungo la molecola** di DNA come su una rotaia (**diffusione 1D**) finchè non raggiungono un sito di riconoscimento, dove si fermano ed iniziano la loro attività

► LE NUCLEASI

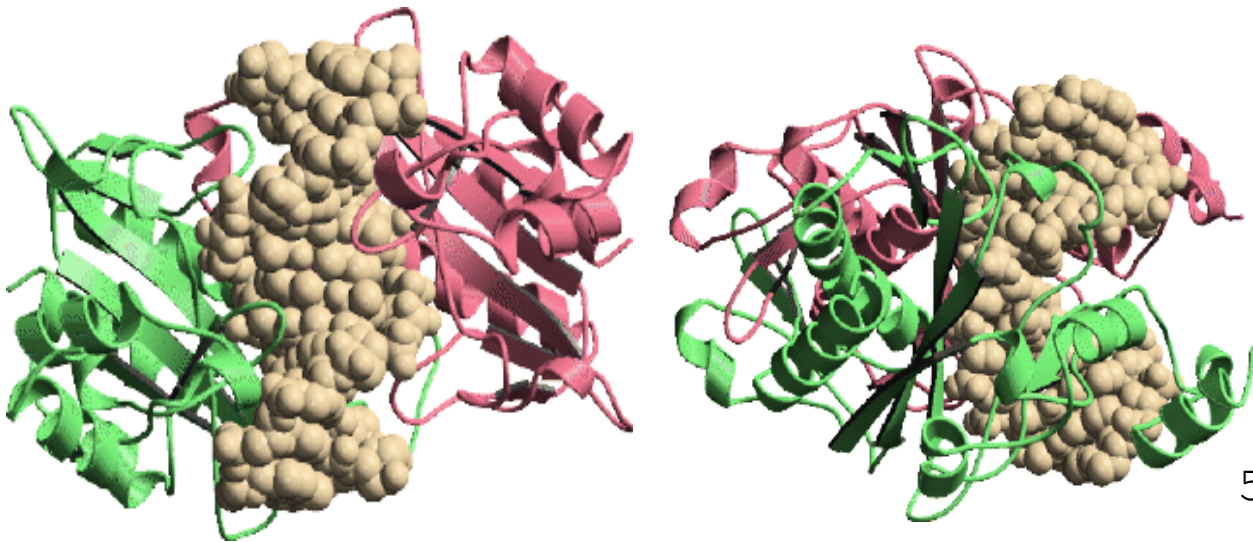
- idrolizzano il legame fosfodiesterico in una catena di DNA (***DNA_{si}***) o di RNA (***RNA_{si}***)

endonucleasi - tagliano una catena all'interno

esonucleasi - staccano nucleotidi dalle estremità della catena

Enzimi che agiscono sul DNA: endonucleasi di restrizione (

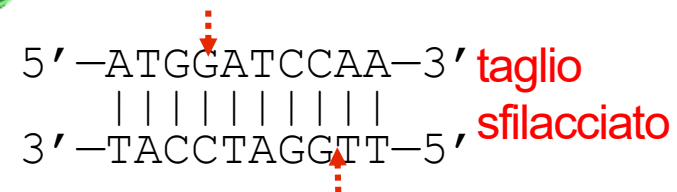
- sistema di difesa batterico contro virus (fagi); agiscono solo su DNA di origine esogena mentre il DNA endogeno è protetto mediante metilazione delle basi.
- sono di **3 tipi**: 1) **I** aspecifici; 2) **II** specifici per sequenze palindromiche e non necessitano ATP; 3) **III** specifici per sequenze invertite e necessitano ATP



Sito di taglio di EcoRV
(*E. coli* Restrict. Endonucl. V) TIPO II



Sito di taglio di BamH1
(*B. megaterium*) TIPO II

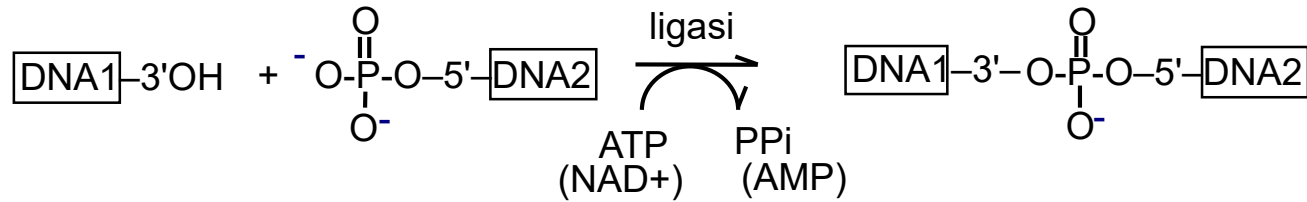


- Sono **proteine omodimeriche** simmetriche che riconoscono un bersaglio simmetrico.
- sondano il solco maggiore scorrendo lungo il doppio filamento di DNA fermandosi in corrispondenza al sito palindromico (riconoscono uno specifico pattern di basi).
- sia l'enzima che il DNA subiscono mutamenti conformazionali - il DNA si piega, poi avviene il taglio; necessitano Mg^{++} per funzionare

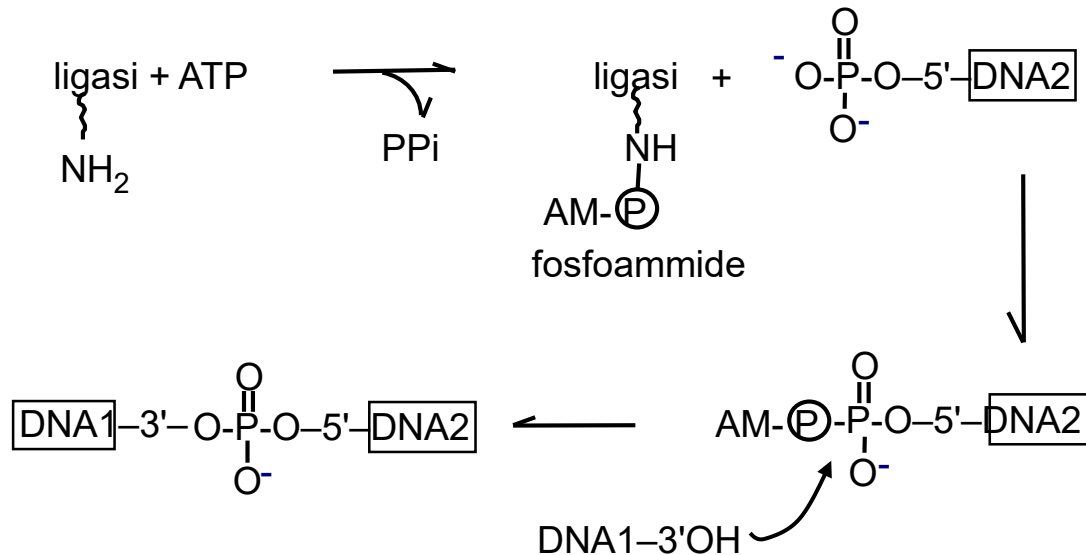
Enzimi che agiscono sul DNA: ligasi

Enzimi che congiungono catene di DNA

- catalizzano la **formazione di un legame fosfodiesterico** fra un ossidrile al 3' di un frammento con il fosfato sul 5' di un altro

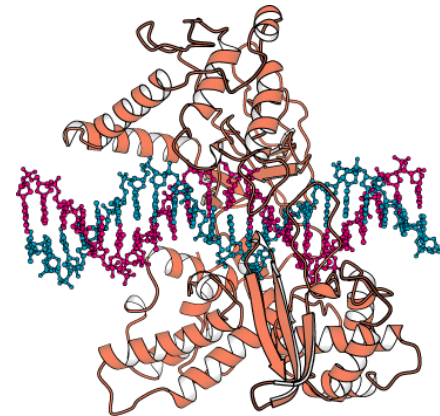
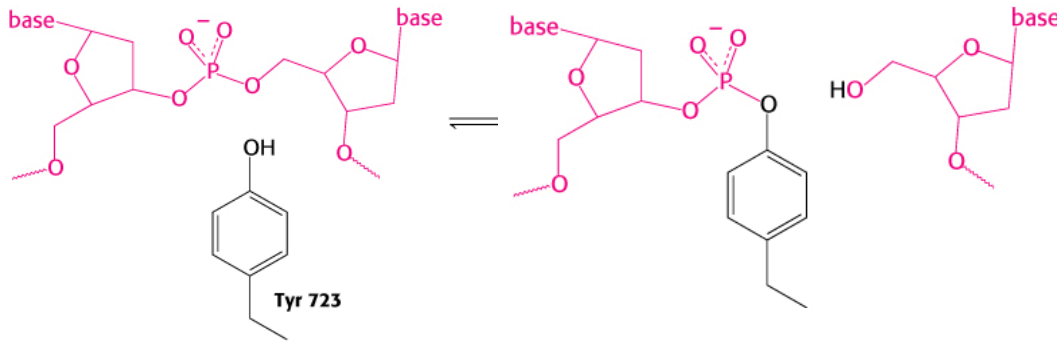
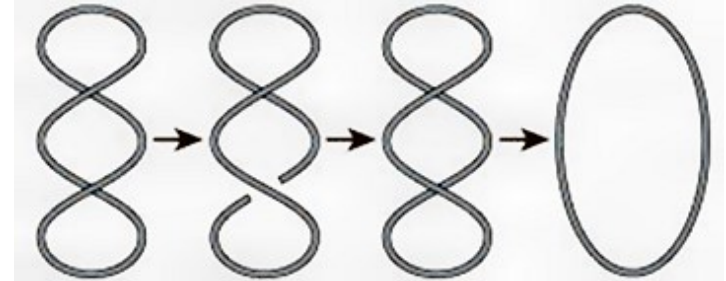


- **agiscono su dsDNA**, chiudendo rotture su una delle due catene; ATP è usato come attivatore dagli eucarioti, NAD⁺ dai batteri
- si forma un intermedio nel quale una unità di AMP si lega al fosfato 5' di un frammento e lo attiva per la formazione del legame con OH sul 3' dell'altro frammento.



Enzimi che agiscono sul DNA: topoisomerasi

- **tipo I**: rilassano DNA superavvolto **tagliando solo un filamento**, e permettendo lo srotolamento dell'altro (processo energeticamente favorevole che **non richiede l'idrolisi di ATP**), poi **ricongiungono il filamento tagliato** (riducono localmente lo *strain* per tratti di doppia elica sovra- o sotto-avvolti)
- **tipo II** (girasi) **tagliano entrambe i filamenti** e permettono il **passaggio di un altro tratto** di doppia elica attraverso il taglio, aggiungendo **superavvolgimenti negativi** (processo che richiede ATP)
- per entrambe i tipi, durante il taglio si forma un **legame fosfoesterico transiente** con una tirosina enzimatica, ed è liberato l'OH 5', che poi attacca la fosfotirosina dopo lo srotolamento.



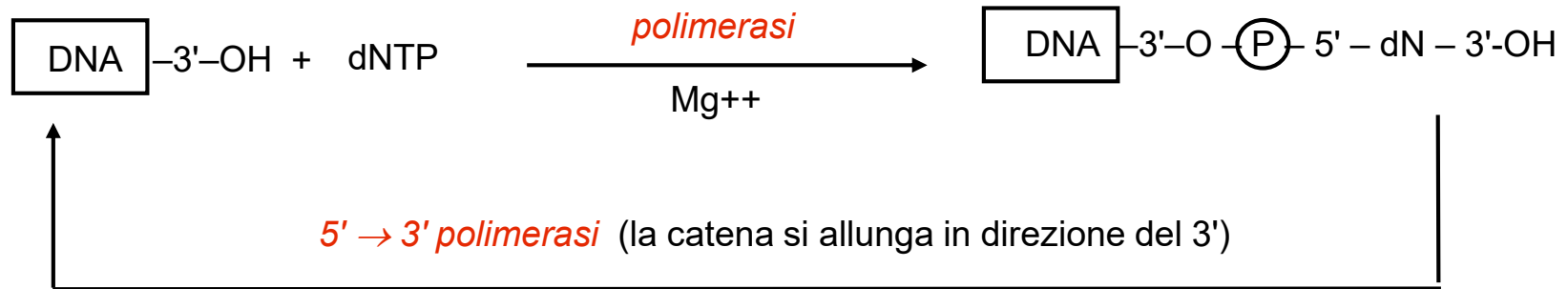
- Le topoisomerasi e girasi sono necessarie durante la replicazione o trascrizione del DNA, per evitare **crisi topologiche** a monte e/o a valle del DNA localmente disavvolto.
- la girasi batterica è bersaglio di **antibiotici** (novobiocina, acido nalidixico, ciprofloxacina) e la topoisomerasi di tipo I umana è bersaglio per **l'agente antitumorale** camptotecina

Enzimi che agiscono sul DNA: polimerasi

Le polimerasi sono enzimi coinvolti nella **sintesi del DNA durante la sua replicazione**.

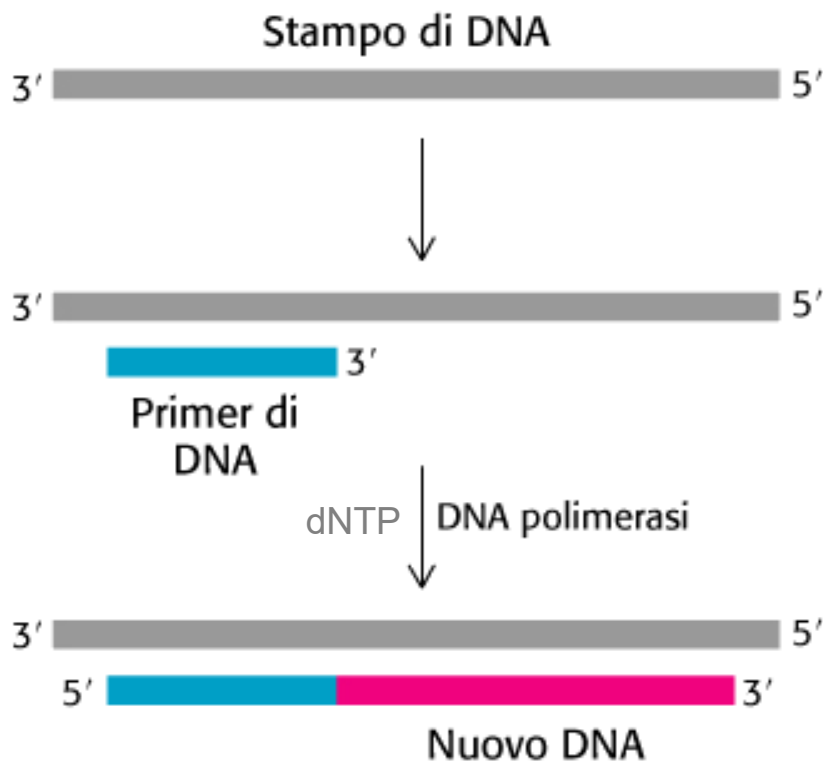
DNA POLIMERASI I di *E. coli*:

sintetizza singoli filamenti di DNA utilizzando monodesossinucleotidi trifosfati (dNTP = dATP, dGTP, dCTP o dTTP (nucleotidi attivati))



- è un enzima **processivo**, aggiunge in media 20 dN prima di staccarsi (un enzima **distributivo** si lega e stacca ad ogni ciclo).
- mostra anche due distinte attività di **idrolasi**, una che funziona su basi male appaiate (non W-C) come meccanismo di auto-correzione. L'idrolisi avviene in senso opposto alla polimerizzazione (**3' → 5' esonucleasi**). L'altra serve per completare l'opera di replicazione ed agisce in direzione (**5' → 3'**).

Enzimi che agiscono sul DNA: DNA polimerasi I



- la DNA polimerasi I richiede un **FILAMENTO STAMPO**, a catena singola di DNA, sul quale agire, e sintetizza una catena esattamente complementare allo stampo (appaiamento Watson-Crick corretti fra la base entrante e quella dello stampo)

- richiede anche una catena **PRIMER** (che può essere DNA o RNA) con un terminale 3'-OH libero sulla quale innestare il primo dNTP (NB: le **DNA polimerasi** richiedono un primer, le RNA polimerasi no).

- Si lega alla catena stampo al sito di origine della sintesi.

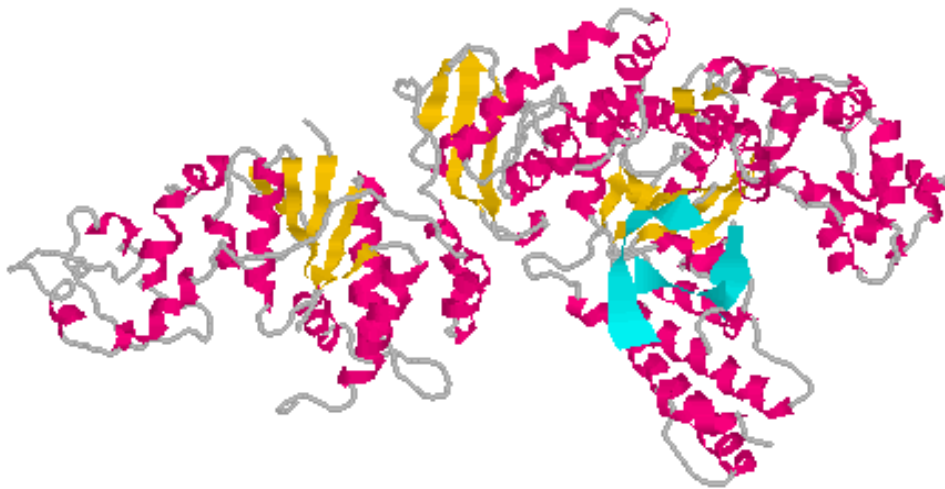
- La polimerasi:

- raramente inserisce basi male appaiate (**dominio 5'→3' polimerasi molto fedele**)
- controlla l'appaiamento dopo ogni accoppiamento
- elimina residui con basi appaiate incorrettamente (**dominio 3'→5' esonucleasi**)
- contiene una ulteriore attività di **idrolasi**, con funzione **5'→3' esonucleasi**, che serve per rimuovere la sequenza primer alla fine della sintesi.

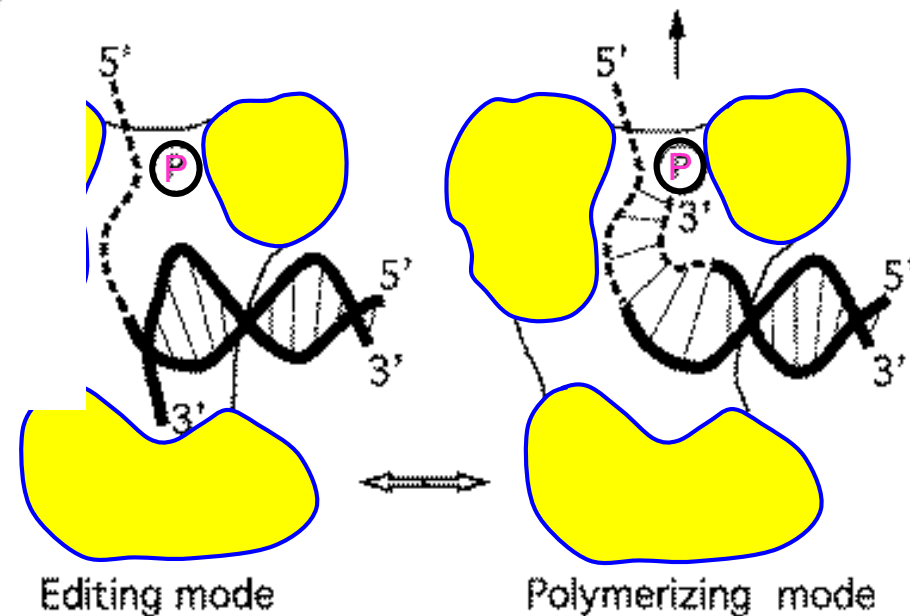
Enzimi che agiscono sul DNA: DNA polimerasi I

► Meccanismo di editing

- questo enzima riunisce le tre attività catalitiche in una struttura relativamente piccola e a singola catena polipeptidica. La tripsina taglia questa proteina in due subunità autonomamente attive, con la *5'→3'-esonucleasi* nel dominio N-terminale. Il frammento C-terminale contiene (il Klenow).

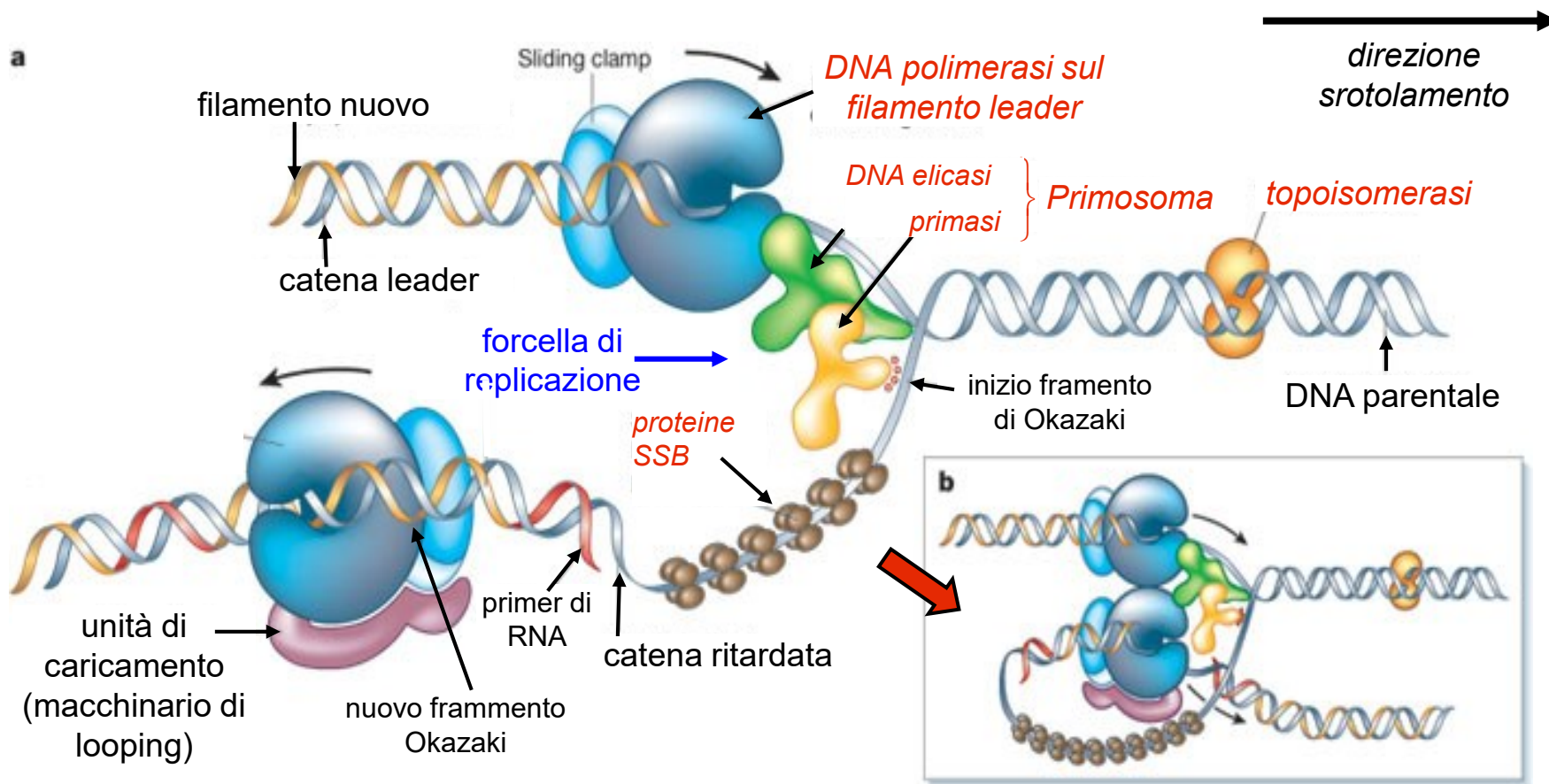


polimerasi, e permette lo scanning per la correzione del DNA nascente, senza che la catena di DNA si debba staccare dall'enzima, permettendo una elevata processività



Enzimi che agiscono sul DNA: DNA polimerasi III oloenzima

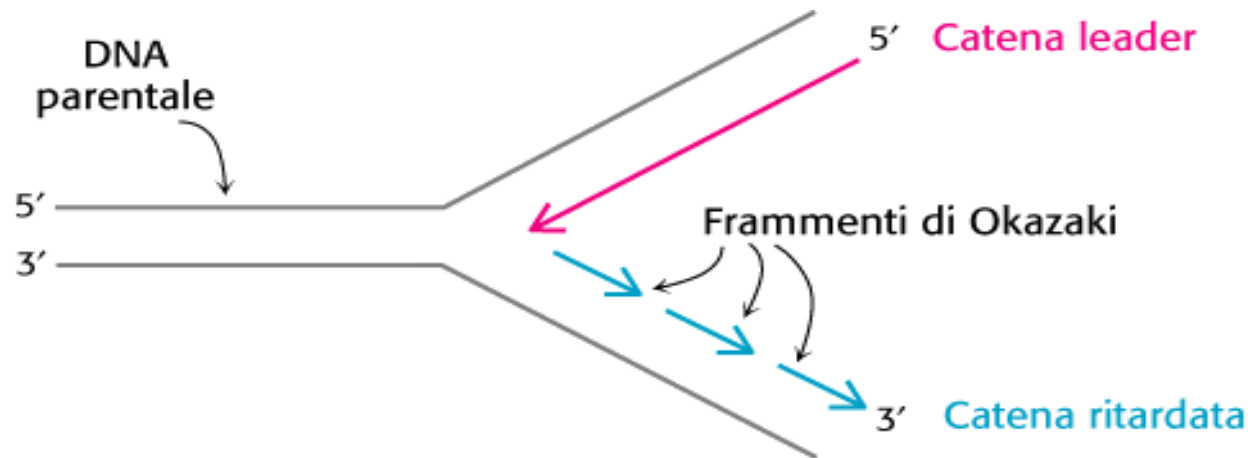
► ruolo della DNA polimerasi III oloenzima (*E. coli*) nella replicazione



- La replicazione (duplicazione) inizia con la formazione di un complesso proteico, il **primosoma**, ai siti di origine della duplicazione, dove il dsDNA si apre nella **forcella di replicazione**. Questo complesso è composto, fra altre proteine, anche da **girasi** ed **elicasi** che servono per risolvere “**crisi topologiche**” a monte della forcella.

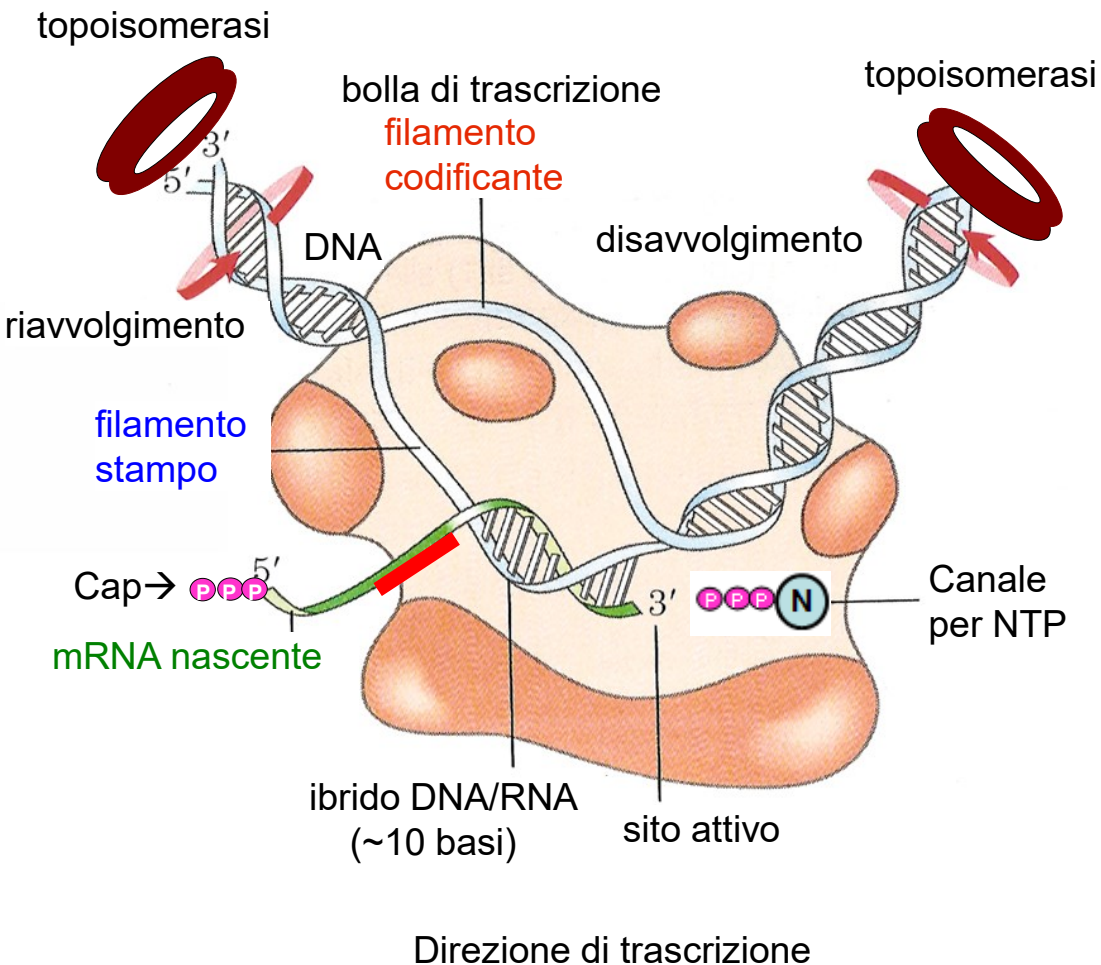
Enzimi che agiscono sul DNA: DNA polimerasi III (cont.)

- La sintesi è svolta da un unico oloenzima (la *polimerasi III*), che utilizza primer di RNA aggiunti da una specifica *RNA polimerasi* (la *primasi*, che non richiede un primer). Questa si lega al apparato proteico d'inizio (*primosoma*).
- entrambe i filamenti fungono da stampo, e la replicazione procede nella direzione di srotolamento. Procede in maniera ininterrotta per la catena stampo ($3' \rightarrow 5'$ = *catena guida*). Un complesso processo di looping del DNA orienta l'altro filamento per brevi tratti con direzione $3' \rightarrow 5'$ parallela. I frammenti sintetizzati formano la *catena ritardata*.



- Il *replisoma* è un complesso multimerico composto da molte subunità di diverso tipo - *girasi/elicasi*, *primasi*, *primosoma*, *SSBP*, le due di subunità di *polimerasi III* (due copie di *subunità a pinza* all'interno delle quali scorrono i filamenti di DNA, e siti catalitici per la condensazione e l'editing - *esonucleasi $3' \rightarrow 5'$*) ed il *macchinario di looping* per il filamento lento. Ha una sovrastruttura dimerica asimmetrica.

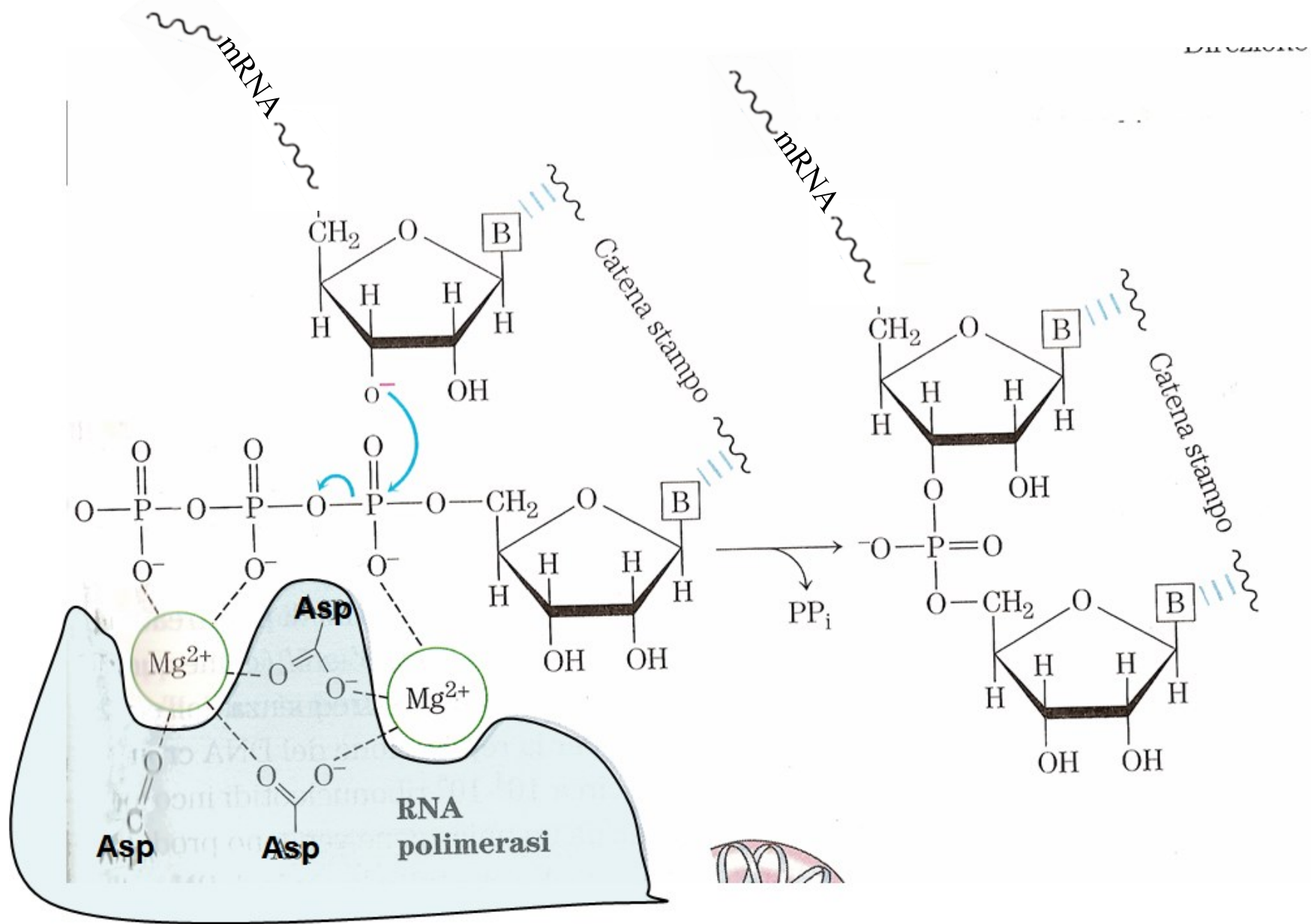
RNA polimerasi e la trascrizione



- l'enzima cerca i siti di inizio del gene sul DNA (siti promotori).
- L'iniziazione della trascrizione richiede la formazione di complessi multiproteici a livello di queste specifiche sequenze, a monte della sequenza codificante (*fattori trascrizione tipo II per mRNA*).
- srotola un breve tratto di doppia elica (ca. 17 residui) **liberando la catena stampo** (transcription bubble)
- procede con la **polimerizzazione**, utilizzando gli NTP corretti (**azione completamente processiva**)
- Si forma una doppia elica ibrida DNA/RNA (~8 residui), poi si srotola.
- Ai **segnali di terminazione** e si stacca del tutto; termina la trascrizione

- la sua attività è modulata dai **fattori di trascrizione** (proteine regolatrici) e fosforilazione
- Gli introni sono rimossi **co-trascrizionalmente** dai spliceosomi. Al 5' viene aggiunto un 'Cap', al 3' viene aggiunta una coda di poli(A).
- negli eucarioti sono presenti diverse polimerasi; tipo I per rRNA, **tipo II per mRNA** ed sRNA e tipo III per rRNA e tRNA (II e III sono inibite dall' α -amantidina)
- l'RNA polimerasi batteriche sono il bersaglio per la **rifampicina** e l'**actinomicina**

RNA polimerasi: meccanismo d'azione



Le polimerasi come strumento di ricerca

<i>POLIMERASI</i>	<i>STAMPO</i>	<i>PRODOTTO</i>	<i>PRIMER</i>	<i>NUCLEOTIDE</i>
<i>DNA polimerasi</i>	DNA	DNA	DNA o RNA	dNTP
<i>RNA polimerasi</i>	DNA	RNA	-	NTP
<i>trascrittasi inversa</i>	RNA	DNA	RNA/tRNA	dNTP

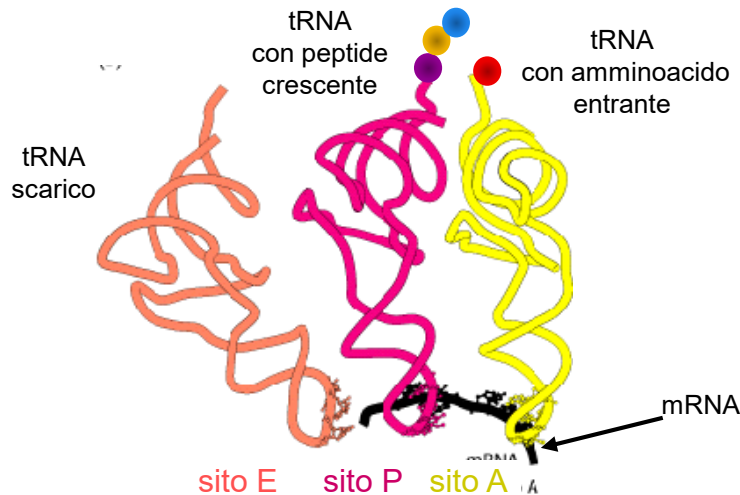
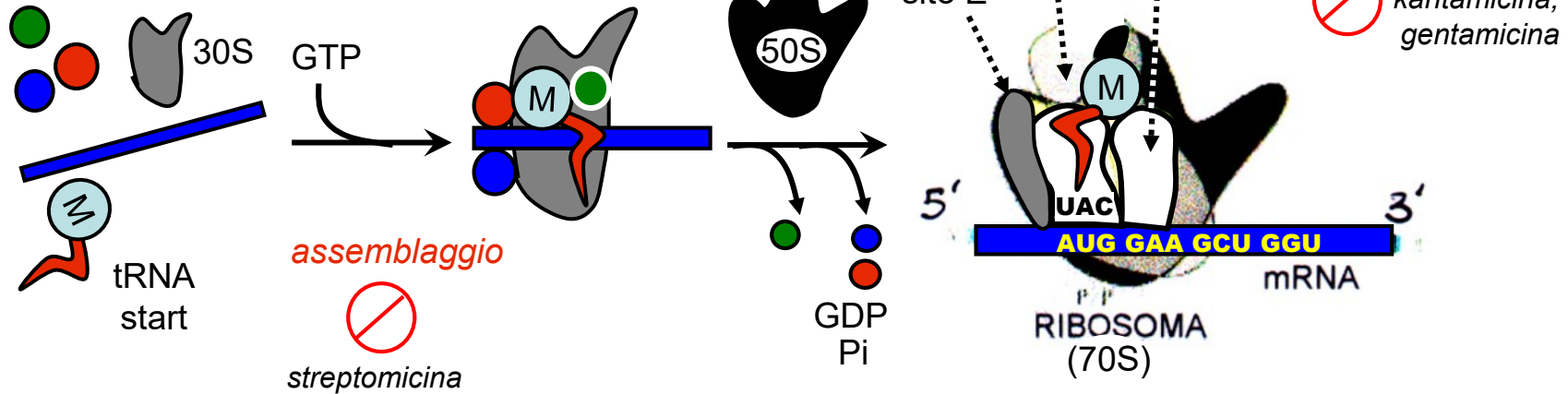
Librerie di cDNA

- l'mRNA presente in una cellula in un dato momento rappresenta tutti i geni che sono in fase di trascrizione in quel momento (**trascrittoma**).
- l'mRNA, non essendo una molecola molto stabile, non è però adatta per lo studio del trascrittoma.
- può essere riconvertita a DNA, in laboratorio, utilizzando le **trascrittasi inverse** (DNA copia o **cDNA**).
- Le librerie di cDNA sono stabili e presentano solo DNA codificante (a differenza del DNA genomico che nei geni presenta anche *introni*)
- Sono molto utili per studiare le attività cellulari, specialmente con le nuove tecnologie DNA Chip (microarrays).

I RIBOSOMI e la biosintesi di proteine - la traduzione

La biosintesi di proteine è svolta dai **ribosomi**. Questi hanno un'architettura caratteristica. Sono organizzati in due Subunità principali: la cosiddetta subunità piccola (30S in *E. coli* / 40S Eucarioti) è formata da 21/33 catene proteiche e da 1 catena di rRNA. Quella grande (50S/60S) da 31/49 catene proteiche e da 2/3 catene di rRNA.

IF-1,2,3 (fattori d'iniziazione)



I RIBOSOMI e la biosintesi di proteine - la traduzione

