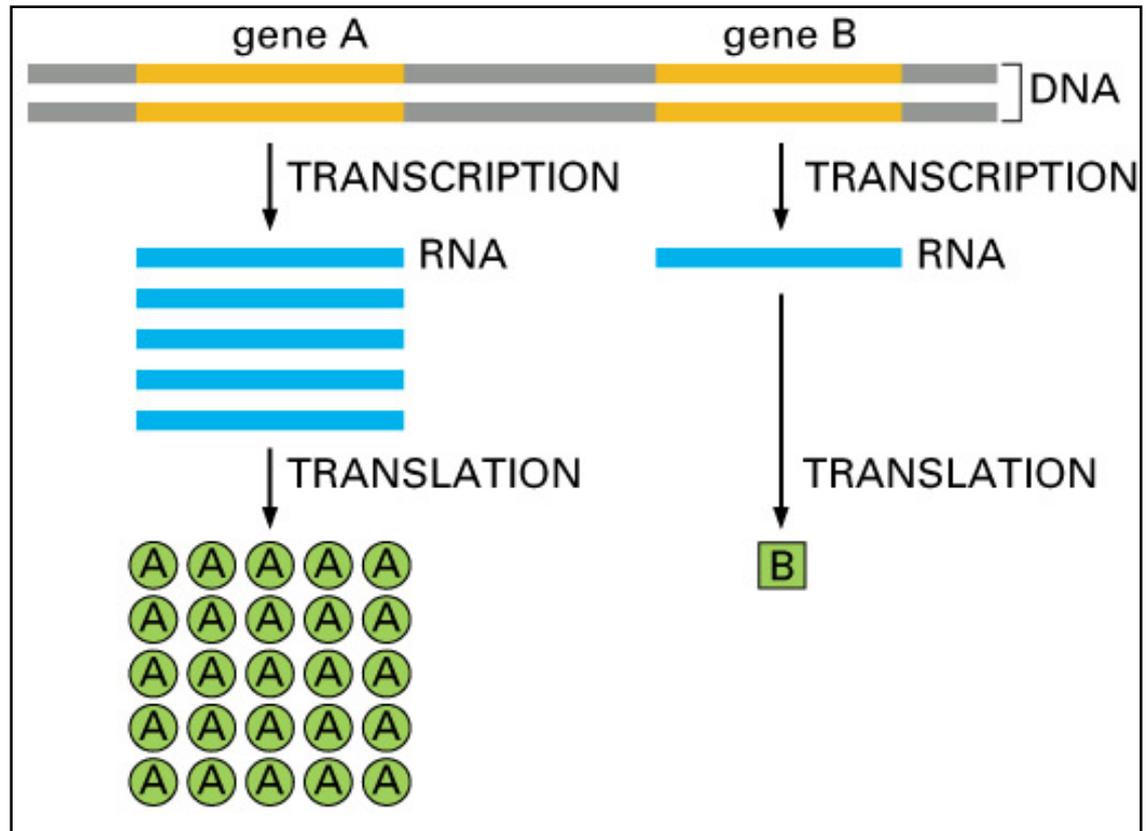
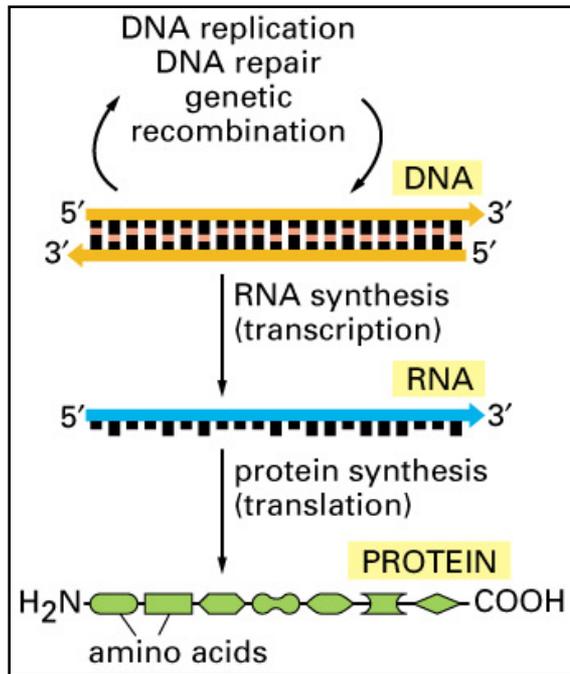


La trascrizione nei procarioti

Da DNA a Proteine



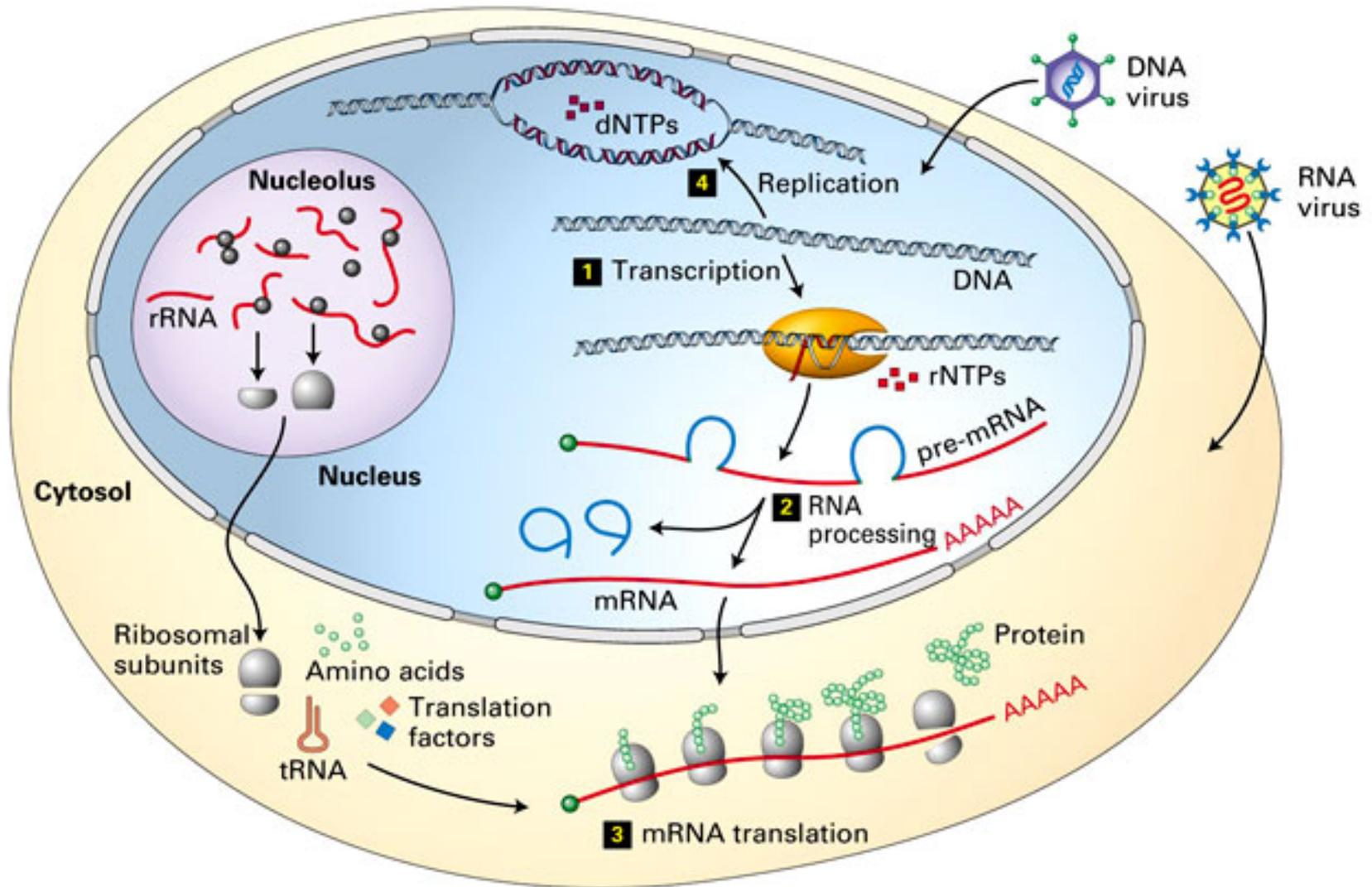
Il dogma centrale

--- i geni sono

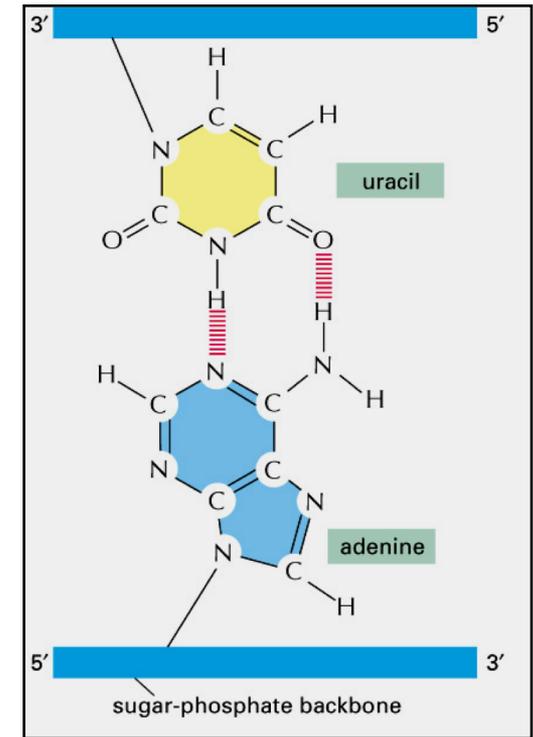
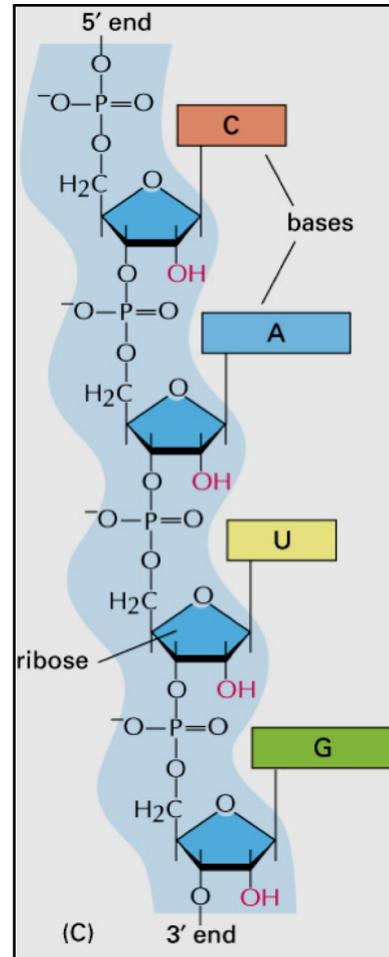
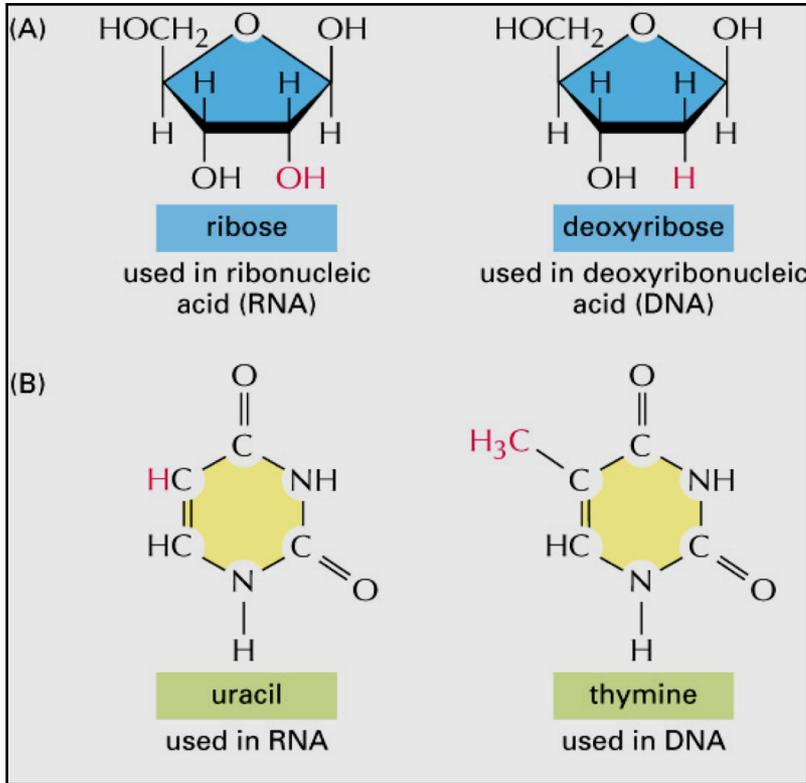
espressi con diversa efficienza

Schema molto molto generale.....!!

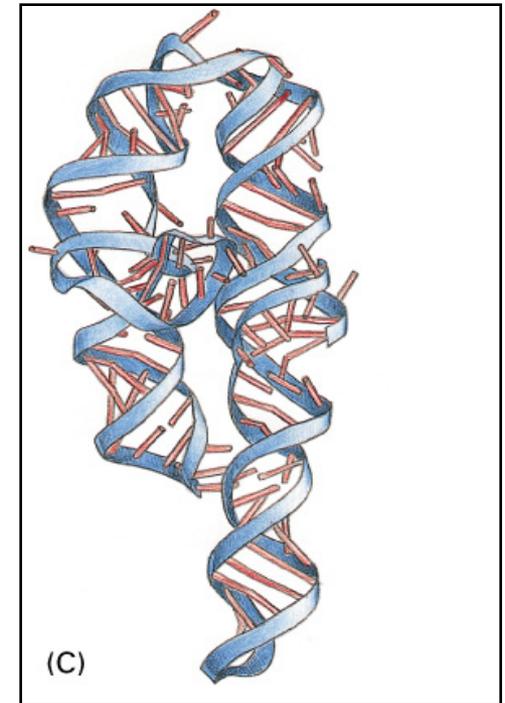
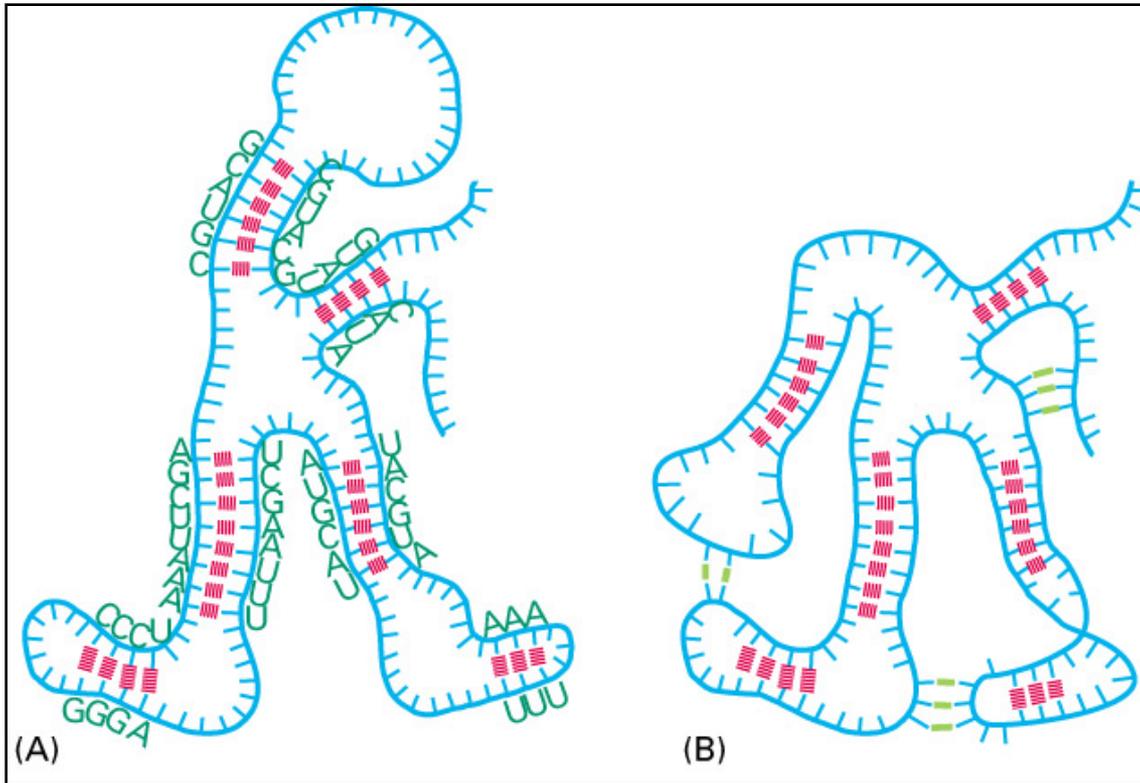
Il flusso dell'informazione genetica negli eucarioti



Chimica dell' RNA



Folding dell'RNA



- L'RNA a singolo filamento si ripiega in strutture stabilizzate da base-pair convenzionali (rossi) e non convenzionali (verdi) .

Nomenclatura

- la **coding strand (Sense strand)** del DNA ha la stessa sequenza del mRNA
- la **antisense strand (Template strand)** è quella che funge da template per la sintesi del mRNA.
- **RNA polymerases** sono enzimi che sintetizzano RNA usando DNA come template.
- Un **promotore** è una regione di DNA dove la RNA polimerasi si lega per iniziare la trascrizione.
- **Startpoint (Startsite)** si riferisce alla posizione sul DNA che corrisponde alla prima base incorporata nel RNA
- Un **terminatore** è una sequenza di DNA che fa terminare la trascrizione alla RNA polimerasi.
- A **transcription unit** è la distanza tra i siti di iniziazione e di terminazione della RNA polymerase; può includere più di un gene.
- **Upstream** = a monte.
- **Downstream** = a valle.
- A **primary transcript** è il prodotto di RNA non modificato che corrisponde ad una unità di trascrizione.

La trascrizione avviene con l'appaiamento di basi in una "bolla" di DNA

RNA pol separa i due filamenti di DNA in una *"bolla" transiente* ed usa un filamento come template per la sintesi di una sequenza di RNA complementare. NON HA BISOGNO DI INNESCO!!!

La bolla è lunga ~12-14 bp, e la lunghezza dell'ibrido RNA-DNA è di ~8-9 bp.

La **velocità della reazione** è di ~40 nt/sec a 37° C (per la RNA pol batterica); che è simile alla **velocità di traduzione** (15 amino acidi/sec), ma molto più lenta di quella di replicazione del DNA (800 bp/sec).

Un **errore** ogni 10.000 nucleotidi (nella duplicazione 1:10.000.000). Non c'è un meccanismo così preciso per la correzione nella trascrizione.

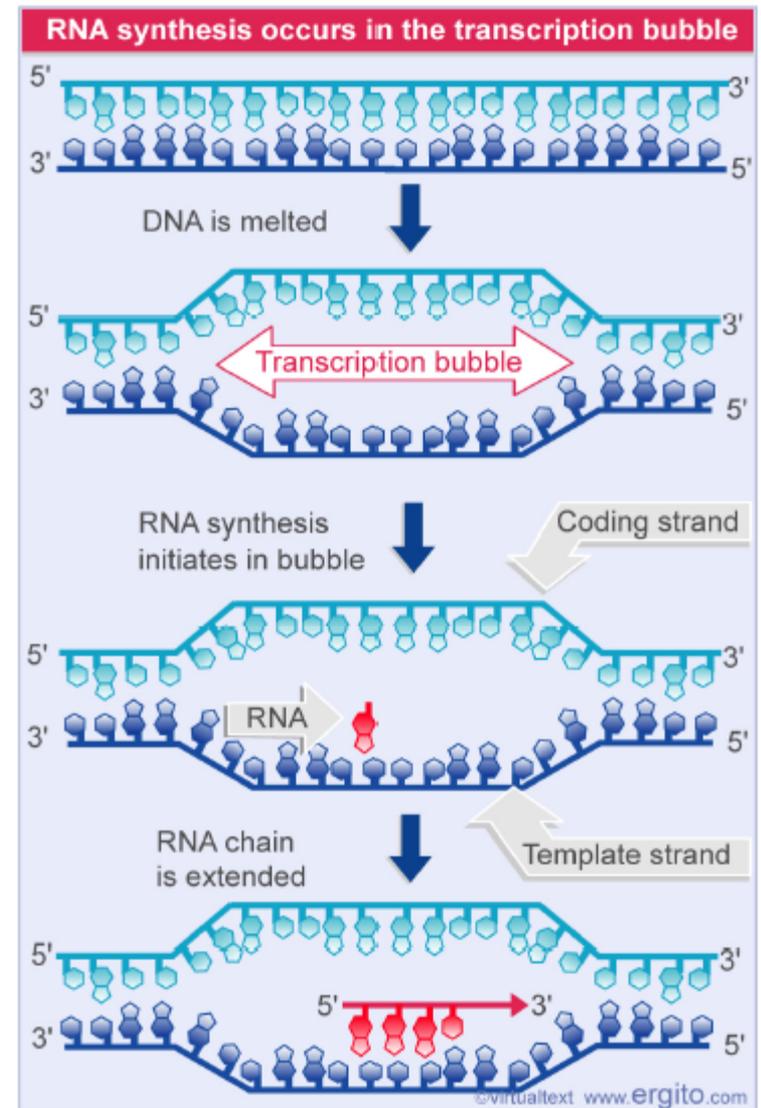
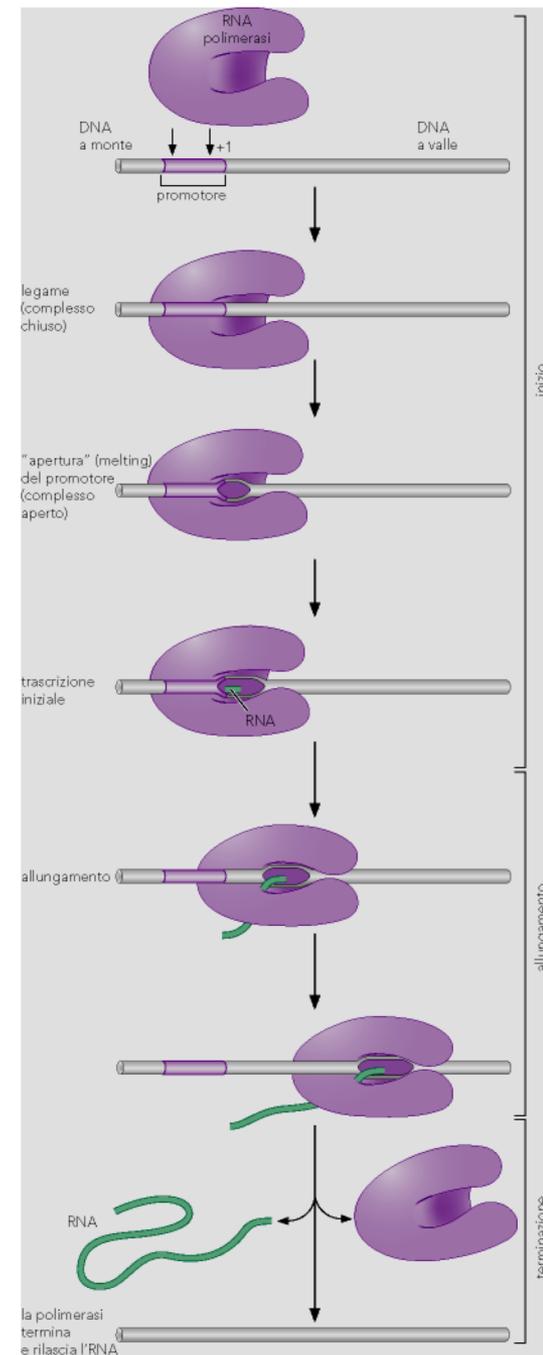


Figure 9.3 DNA strands separate to form a transcription bubble. RNA is synthesized by complementary base pairing with one of the DNA strands.

La trascrizione ha tre passaggi

- **Inizio** descrive il passaggio fino alla sintesi del primo legame del RNA. Include il legame della RNA polimerasi al promotore ed il “melting” di una corta regione di DNA ($\approx 14\text{pb}$) in singolo filamento. Complesso **chiuso**, **aperto**, **evasione**
- **Allungamento** è il passaggio nella reazione di sintesi della macromolecola quando la catena nucleotidica si allunga per l’aggiunta della subunità.
- **Terminazione** è il passaggio che termina la sintesi della macromolecola bloccando l’aggiunzione delle subunità, e generalmente causando la dissoluzione dell’apparato di sintesi



T7 RNA polimerasi

- ❖ le RNA polimerasi dei fagi T3 e T7 sono **polipeptidi singoli** e riconoscono un piccolo numero di promotori dei fagi.
- ❖ Sono catene polipeptidiche di <100 kD. Sintetizzano RNA alla velocità di ~200 nt/sec a 37° C, più rapidamente delle RNA polimerasi batteriche.
- ❖ La struttura mostra che il DNA sta in un "palmo" circondato da "dita" and un "pollice"

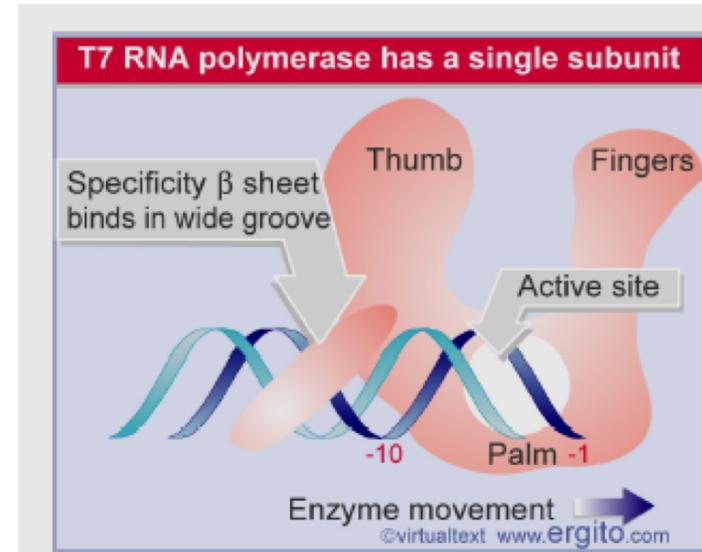


Figure 9.7 T7 RNA polymerase has a specificity loop that binds positions -7 to -11 of the promoter while positions -1 to -4 enter the active site.

La RNA polimerasi batterica è fatta da subunità multiple

- L'oloenzyme (enzima completo) è un complesso di 5 subunità che comprende il “core enzyme” (α_2 , β , β') e il fattore σ che è competente per l'inizio della trascrizione batterica.
- RNA core polimerasi batteriche sono ~ 500 kD complessi multisubunità con la struttura generale $\alpha_2 \beta \beta'$.
- Negli eubatteri un solo tipo di RNA polimerasi è responsabile della sintesi di tutti i RNA (mRNA, rRNA e tRNA)

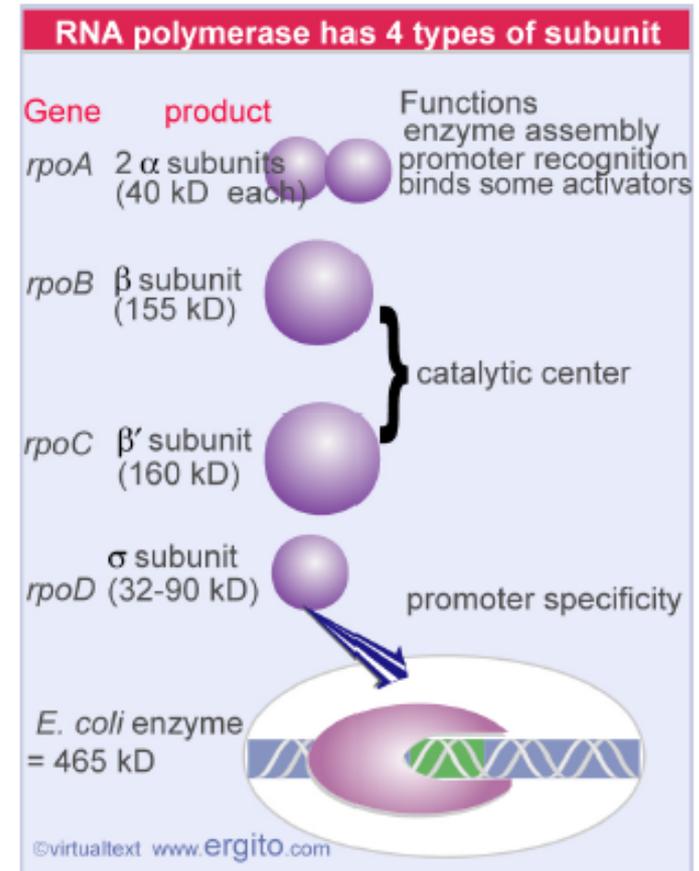
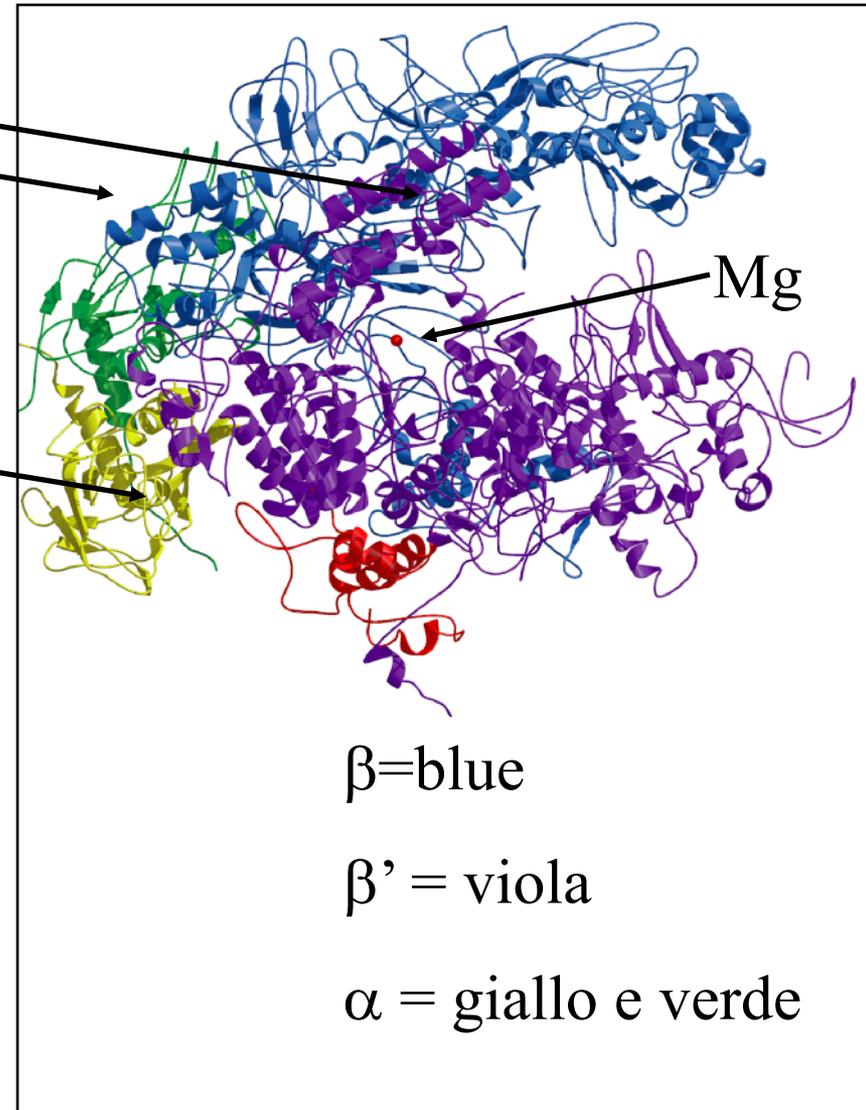


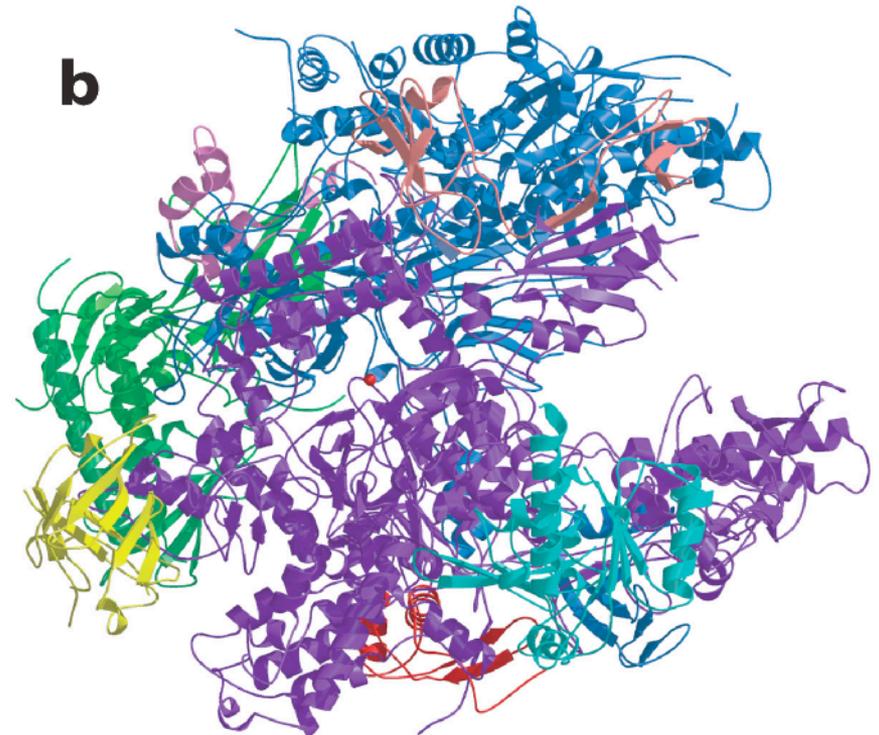
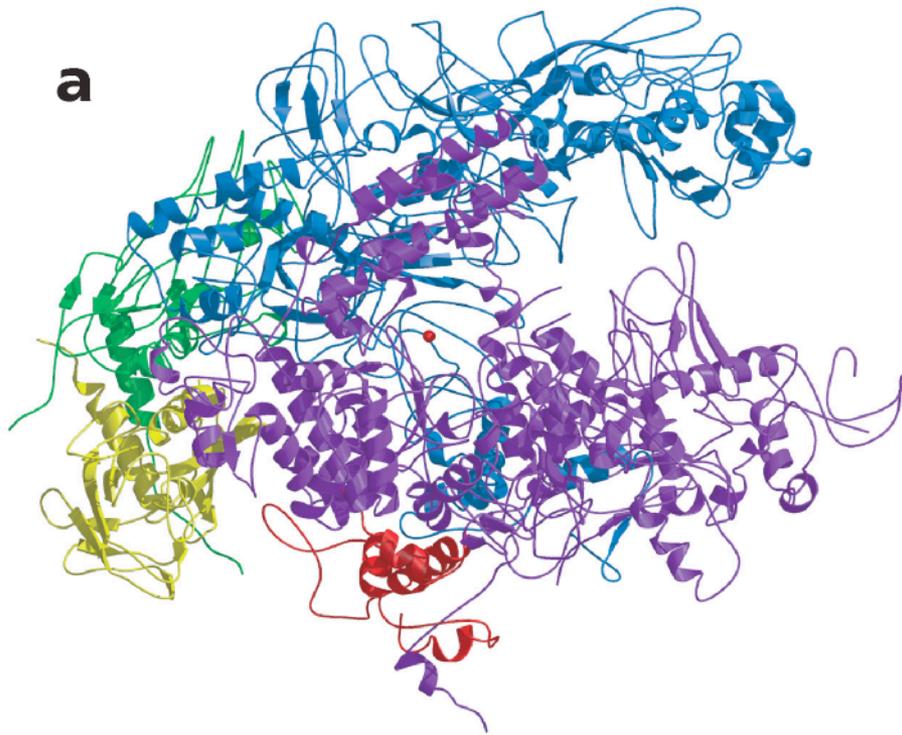
Figure 9.16 Eubacterial RNA polymerases have four types of subunit; α , β , and β' have rather constant sizes in different bacterial species, but σ varies more widely.

RNA polimerasi batterica

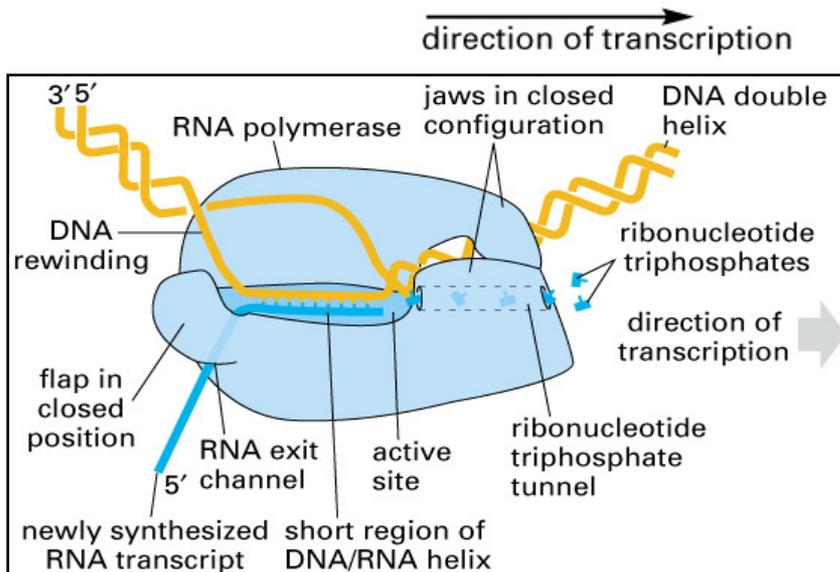
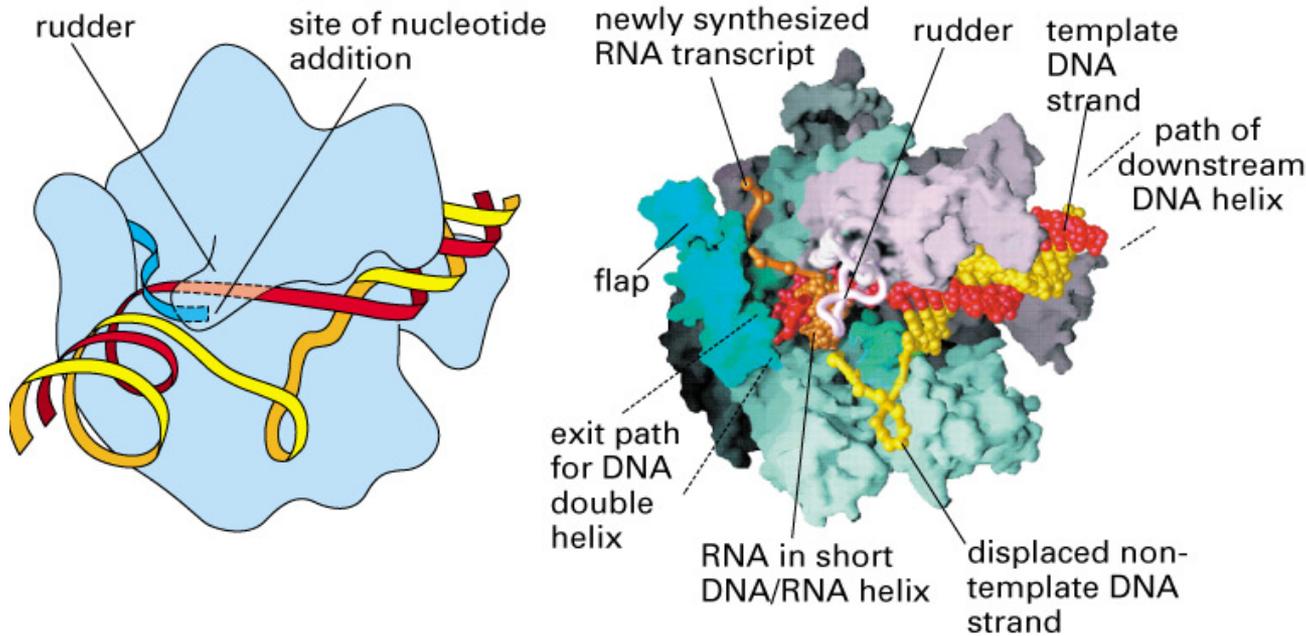
- Le subunità β and β' insieme fanno il **centro catalitico**.
- La subunità α è necessaria per **assemblaggio** del core enzyme.
- La subunità σ è interessata specificamente con il riconoscimento del **promotore**,



Confronto fra le strutture delle RNA pol procariotica (a) ed eucariotica (b)

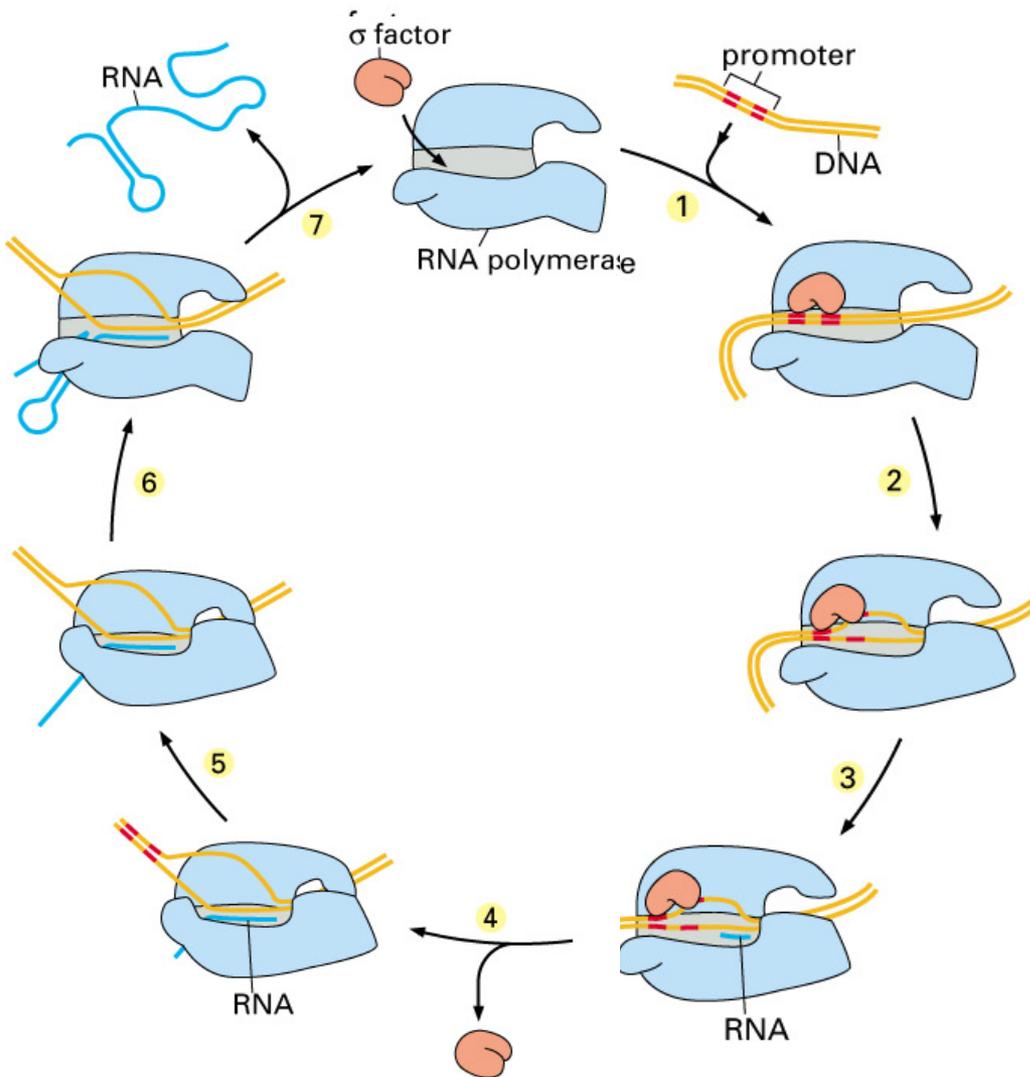


Struttura della RNA pol batterica



- Si muove srotolando l'elica al sito attivo
- Aggiunge nucleotidi usando un filamento di stampo, separato dall'altro da un "timone".
- Una finestra di 9 nt DNA-RNA si muove lungo il DNA

RNA polimerasi batterica



Il ciclo della pol batterica:

– **Iniziazione**

- Legame
- Complesso chiuso
- Complesso aperto
- evasione

– **Elongazione**

– **Terminazione**

– La subunità **sigma** è necessaria nella iniziazione.

- ✓ **Iniziazione** necessita di un forte legame *solo* con sequenze particolari (promotori), mentre la **elongazione** necessita l'associazione *con tutte le sequenze* che l'enzima incontra durante la trascrizione.
- ✓ Quando l'enzima **rilascia sigma** (o cambia la sua associazione), torna ad avere affinità generale per tutto il DNA, indipendente dalla sequenza, per la continuazione della trascrizione.
- ✓ Come peptide indipendente, sigma non si lega al DNA, ma quando in complesso nell'oloenzima, σ ha **contatti col DNA nella regione a monte del sito di inizio**.

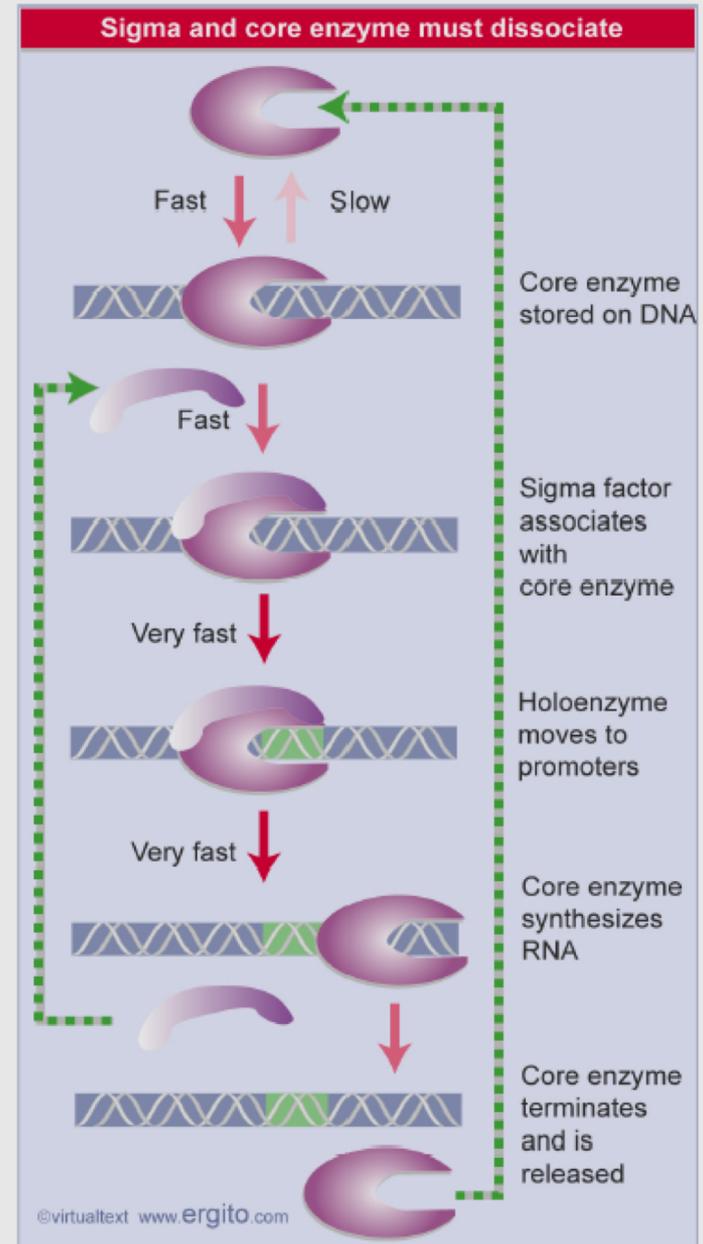


Figure 9.26 Sigma factor and core enzyme recycle at different points in transcription.

- *Il Core enzyme non distingue tra promotori e le altre sequenze del DNA (loose binding site).*
- *L'oloenzima ha una capacità molto più bassa nel riconoscere i loose binding sites, e questo gli dà la capacità di riconoscere siti di legame specifici.*
- Le costanti di legame sono tra $\sim 10^{12}$ e $\sim 10^6$.

Oloenzima dell'RNA pol di *Thermus aquaticus*. In grigio core, in viola σ

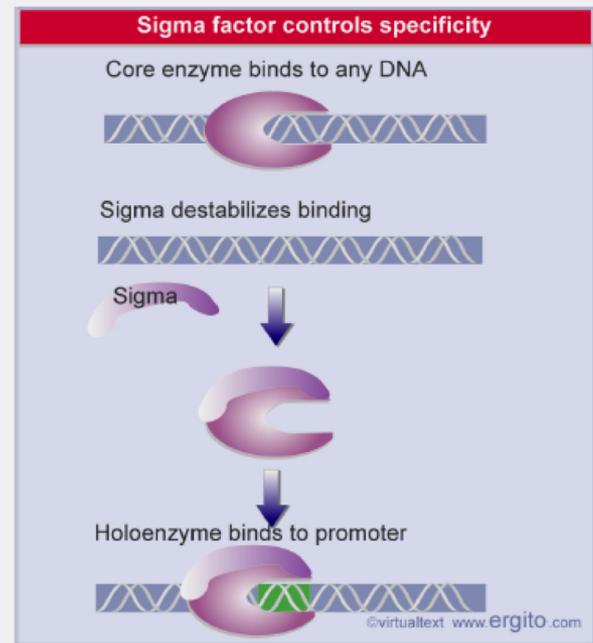
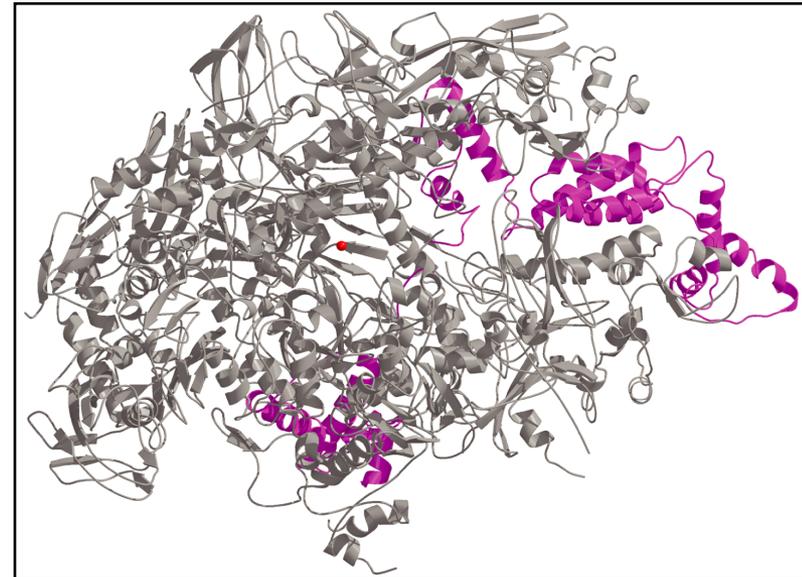


Figure 9.18 Core enzyme binds indiscriminately to any DNA. Sigma factor reduces the affinity for sequence-independent binding, and confers specificity for promoters.



Promotore batterico

Un promotore è caratterizzato dalla presenza di alcune **sequenze consenso**.

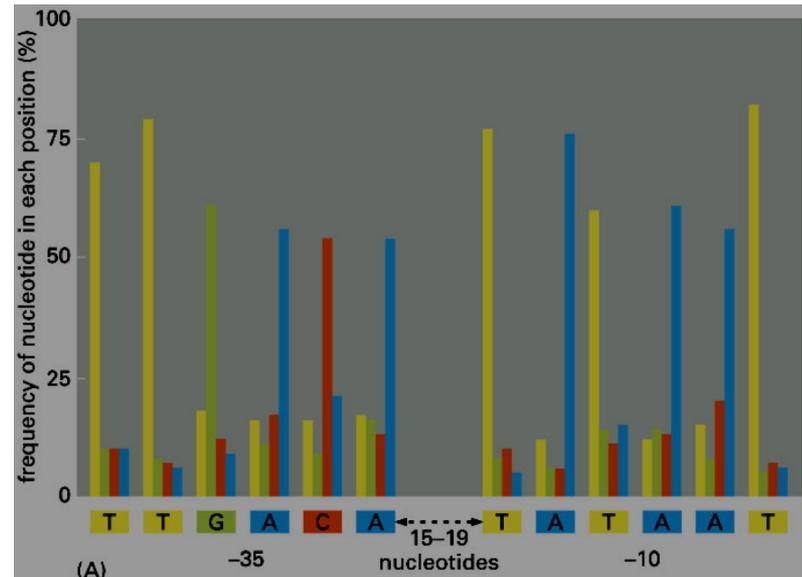
La struttura del promotore consiste in una **purina** al punto di inizio, l'**esamero TATAAT** a **-10**, ed un altro **esamero a-35**.

Un promotore è una sequenza particolare di DNA che è **riconosciuta dalla RNA polimerasi**.

Ogni promotore deve includere questa sequenza.



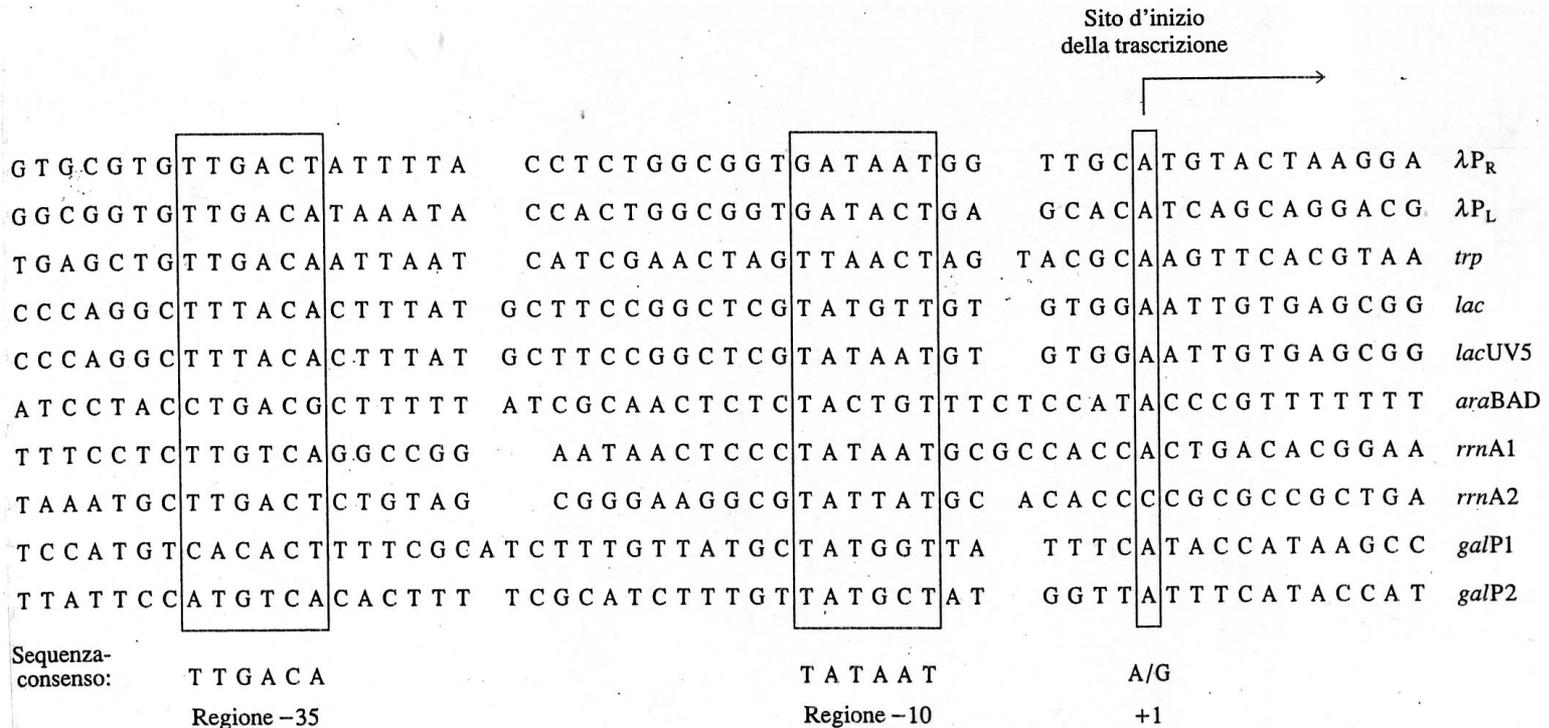
Figure 9.27 A typical promoter has three components, consisting of consensus sequences at -35 and -10, and the startpoint.



Consenso e spaziatura

Promotore batterico

Una **sequenza consenso** sul DNA può essere definita come una sequenza ideale che rappresenta le basi più spesso trovate in ogni posizione. Una **sequenza consenso** è identificata dall'allineamento di tutti gli esempi noti così da massimizzare la loro omologia.



Promotore batterico

Ci sono alcune caratteristiche conservate in un promotore batterico:

Il punto di inizio (startpoint)

La sequenza -10 ;

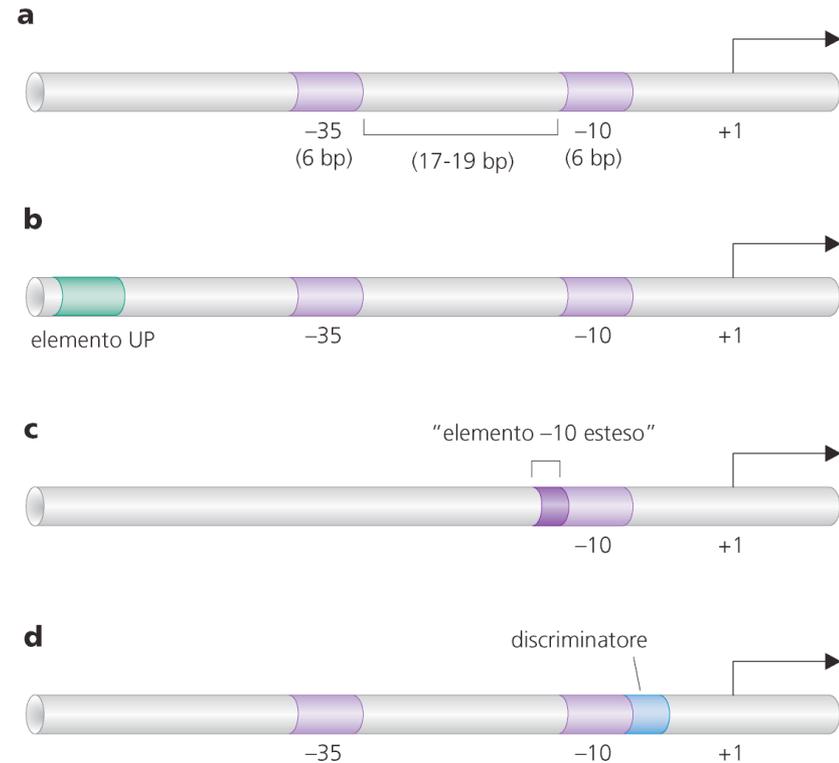
La sequenza -35 ;

La distanza tra le sequenze -10 e -35 ;

L'elemento UP (qualche volta);

L'elemento -10 esteso che compensa la mancanza del -35 ;

Il discriminatore.



Startpoint

- Lo startpoint è di solito (>90% delle volte) una purina. Spesso è la base centrale della sequenza CAT, ma la conservazione della tripletta non è grande.

La sequenza -10

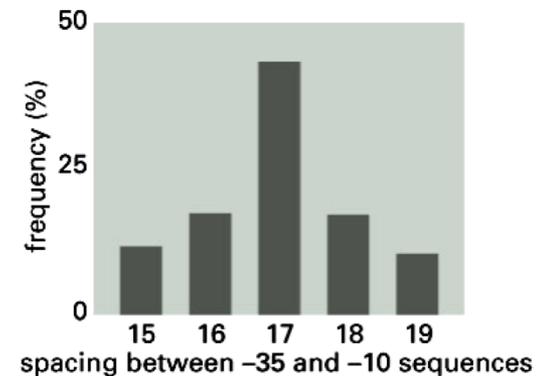
- la regione di 6 bp è riconoscibile in quasi tutti i promotori. Il **centro dell'esamero** è generalmente circa **10 bp a monte** dello startpoint, ma la distanza varia da -18 a -9. L'esamero è spesso chiamato la sequenza **-10**.
- Il consenso è *TATAAT*, e può essere indicato nella forma $T_{80}A_{95}T_{45}A_{60}A_{50}T_{96}$ dove il pedice indica la percentuale dell'occorrenza della base più comune, che varia 45-96%. (dove non c'è evidente preferenza si usa una N). Le basi più importanti sembrano essere le più conservate: la TA iniziale e la T finale.

La sequenza -35

- Un altro esamero conservato è centrato ~35 bp a monte dello startpoint. È chiamata la sequenza -35.
- Il consenso è *TTGACA*;
- in forma più dettagliata $T_{82}T_{84}G_{78}A_{65}C_{54}A_{45}$

Distanza -10 / -35

- La distanza che separa i siti -35 e -10 è tra 16-18 bp nel 90% dei promotori; ma può essere fino a 15 o 20 bp.
- La sequenza nella regione non è importante, ma la distanza è critica per tenere i due siti nella geometria corretta per il legame al promotore.



Elemento UP

- Alcuni promotori hanno una sequenza ricca di A-T localizzata ancora più a monte. E' denominata elemento **UP**. La si trova tipicamente nei promotori che sono molto espressi, quali quelli dei geni per **rRNA**.
- E' riconosciuto dal dominio C-terminale della **subunità alfa** (α CTD) della RNA polimerasi.

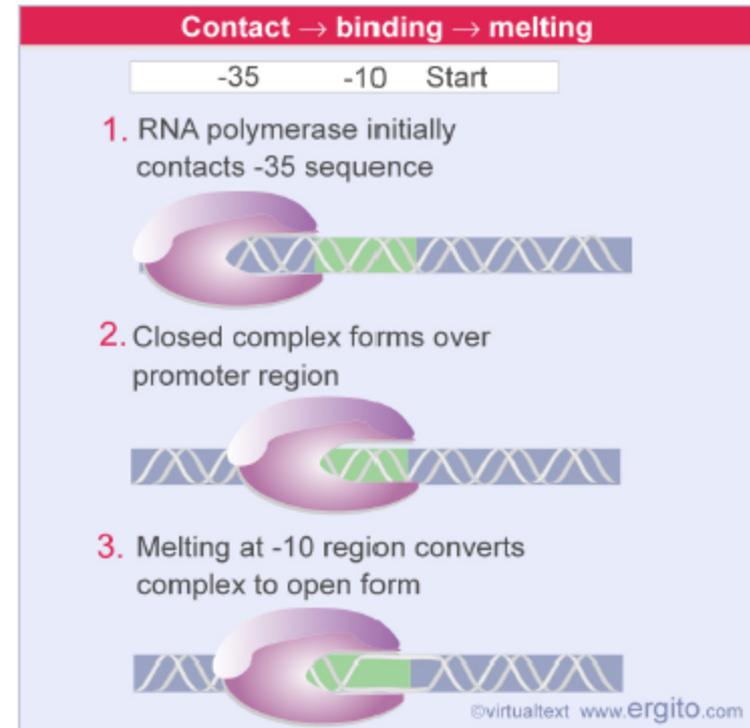


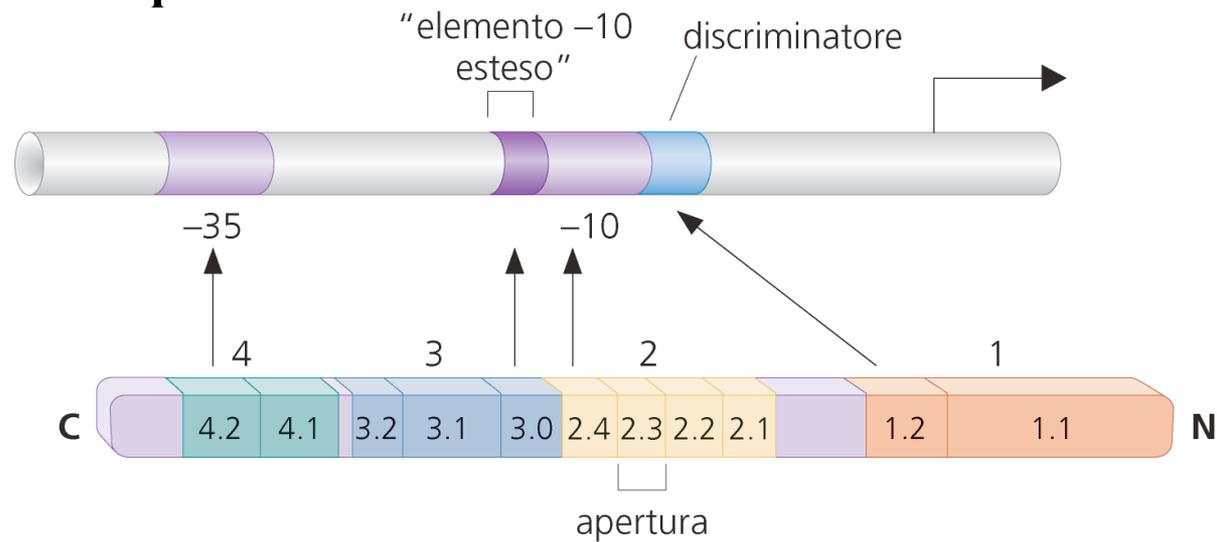
Figure 9.28 The -35 sequence is used for initial recognition, and the -10 sequence is used for the melting reaction that converts a closed complex to an open complex.

Legame al DNA

Il DNA binding domain del fattore **sigma** è helix-turn-helix che riconosce il **sito -35**

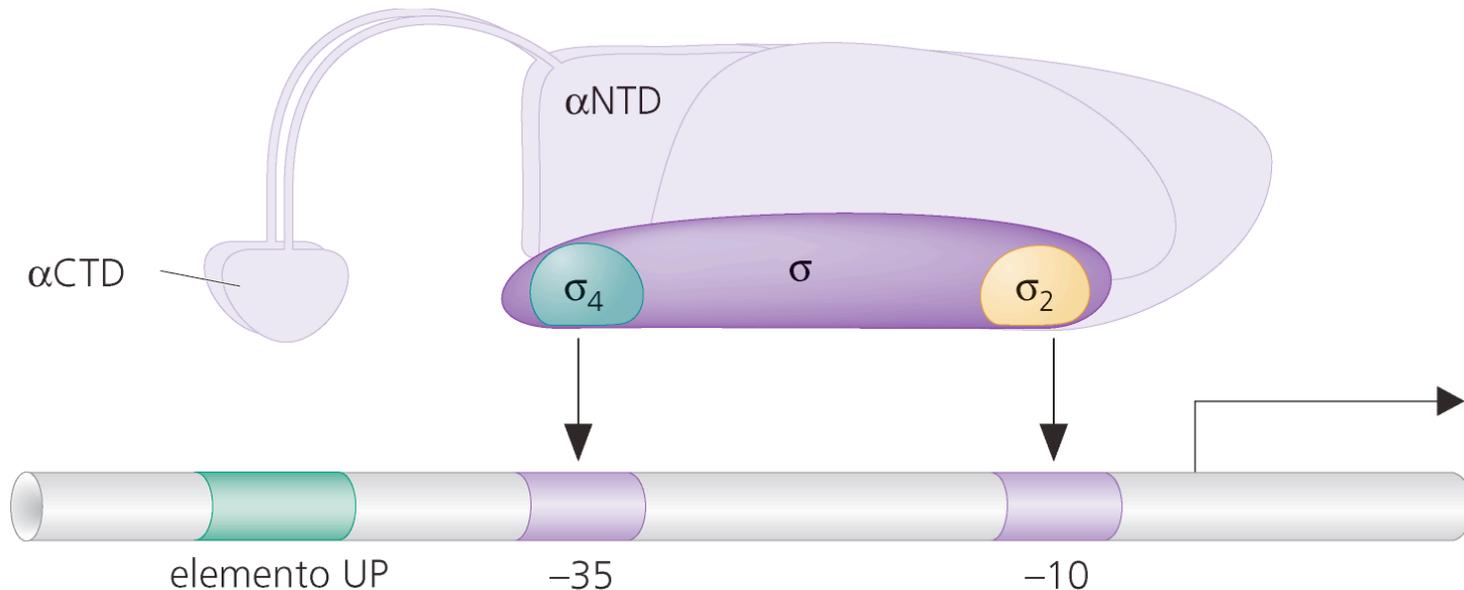
Il sito **-10** è riconosciuto da una regione che ha amino acidi aromatici che aiutano l'apertura del DNA.

La **forza di un promotore** è collegata alla affinità di legame ed alla capacità di evadere dal promotore



Fattore sigma
4 regioni

La RNA pol



A differenza degli altri elementi del promotore, il sito **UP** è riconosciuto dal dominio C-terminale (CTD) della **subunità alfa**.

Fattori sigma

- *E. coli* ha **diversi fattori sigma**, ognuno dei quali fa sì che la RNA polimerasi inizi a dei promotori definiti da specifiche sequenze -35 e -10.

<i>E. coli</i> has several sigma factors		
Gene	Factor	Use
<i>rpoD</i>	σ^{70}	general
<i>rpoS</i>	σ^S	stress
<i>rpoH</i>	σ^{32}	heat shock
<i>rpoE</i>	σ^E	heat shock
<i>rpoN</i>	σ^{54}	nitrogen
<i>fliA</i>	σ^{28} (σ^F)	flagellar

©virtualtext www.ergito.com

Figure 9.33 In addition to σ^{70} , *E. coli* has several sigma factors that are induced by particular environmental conditions. (A number in the name of a factor indicates its mass.)

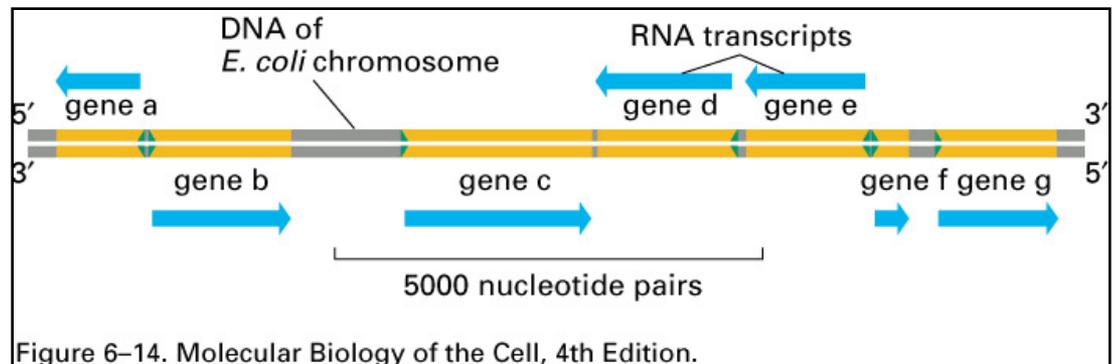
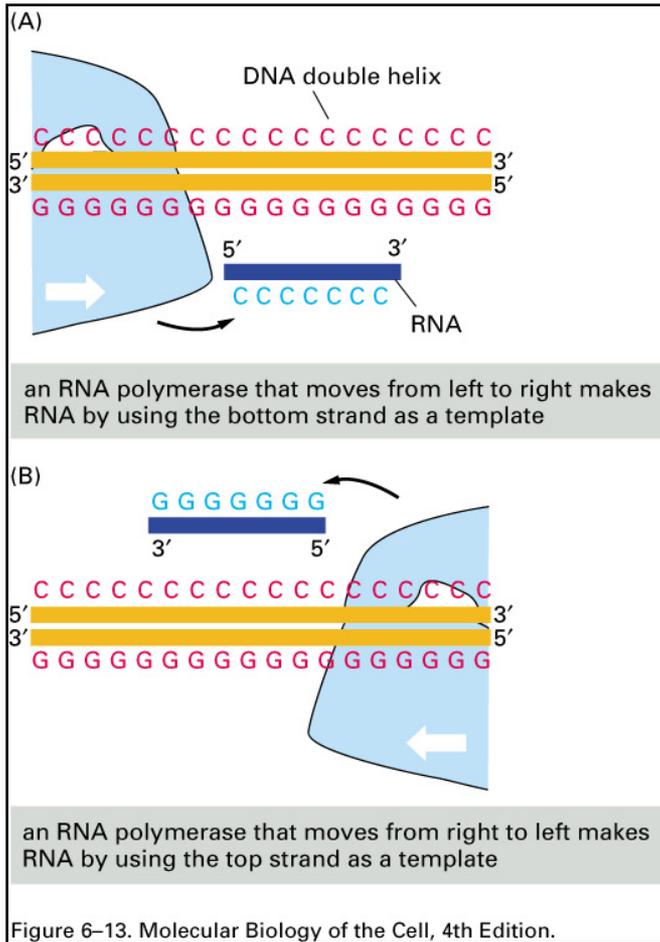
Sigma factors recognize promoters by their consensus sequences				
Gene	Factor	-35 Sequence	Separation	-10 Sequence
<i>rpoD</i>	σ^{70}	TTGACA	16-18 bp	TATAAT
<i>rpoH</i>	σ^{32}	CCCTTGAA	13-15 bp	CCCGATNT
<i>rpoN</i>	σ^{54}	CTGGNA	6 bp	TTGCA
<i>fliA</i>	σ^{28} (σ^F)	CTAAA	15 bp	GCCGATAA
<i>sigH</i>	σ^H	AGGANPuPu	11-12 bp	GCTGAATCA

©virtualtext www.ergito.com

Figure 9.35 *E. coli* sigma factors recognize promoters with different consensus sequences.

Orientazione della RNA pol

- I promotori sono direzionali e indicano quale dei due filamenti deve essere usato come stampo



La correzione

- Esistono due meccanismi di correzione:
 - Editing **pirofosfolitico** (immediato), rimuove il nucleotide incorporato erroneamente tramite reincorporazione di PPi.
 - Editing **idrolitico** (torna indietro di uno o due nt) . Stimolato dai **fattori Gre** che stimolano anche l'allungamento
 - Gli errori sono 1/10.000

Tensione superelica- DNA supercoiling

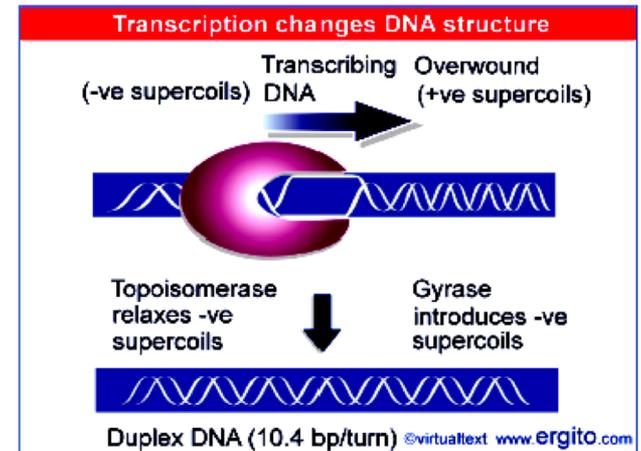
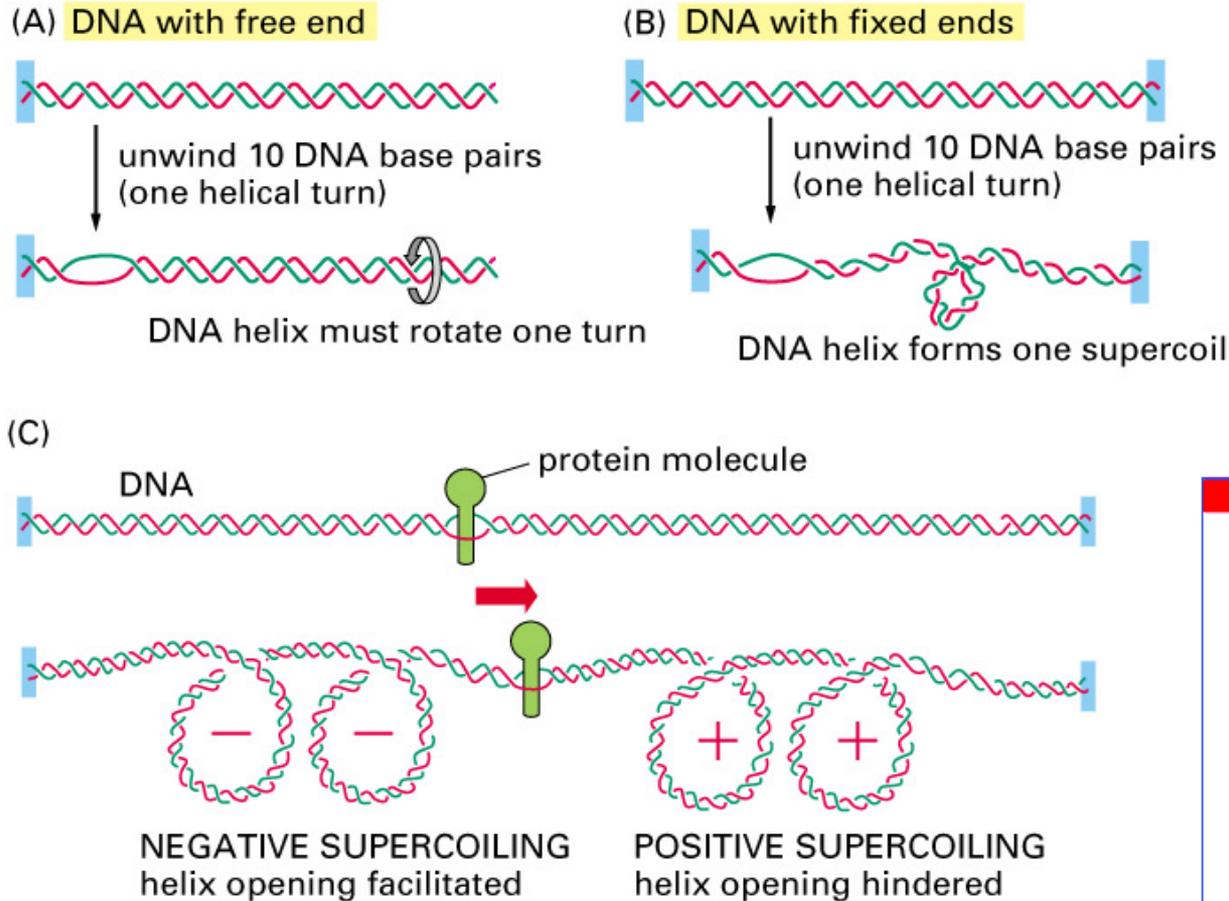


Figure 6–20. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Figure 9.31 Transcription may generate more tightly wound (positively supercoiled) DNA ahead of RNA polymerase, while the DNA behind becomes less tightly wound (negatively supercoiled).

La terminazione nei batteri

Ci sono sequenze sul DNA (terminatori) che segnalano alla RNA pol di staccarsi dal DNA.

Ci sono due tipi di terminatori:

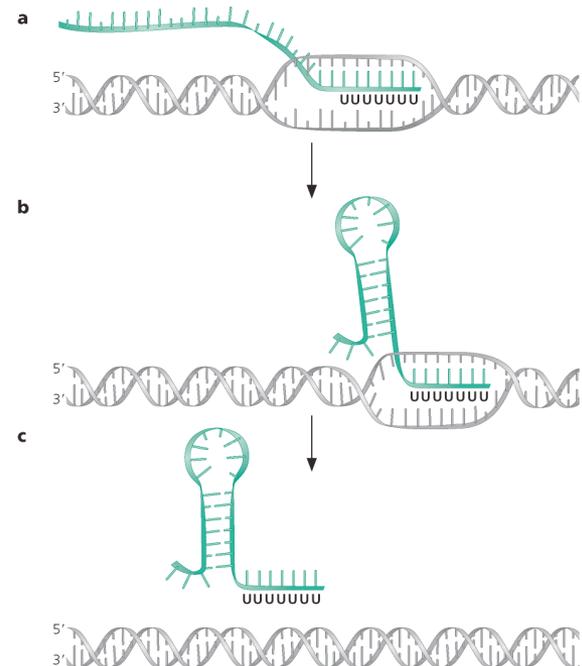
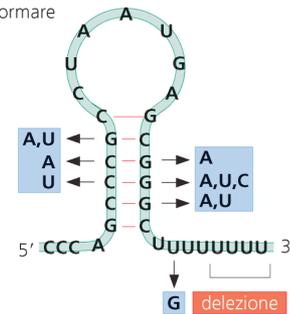
- **Rho-indipendenti**
- **Rho-dipendenti**

Rho-indipendenti

- E' presente una **sequenza invertita** (palindromica) di **20 nt** seguita da circa **8 nt A-T**
- L'informazione necessaria per la terminazione risiede nella sequenza appena trascritta dalla RNA polimerasi
- I terminatori rho-indipendenti (terminatori intrinseci) richiedono la formazione di una **forcina** nella struttura secondaria seguita da una **sequenza di A (>8)**



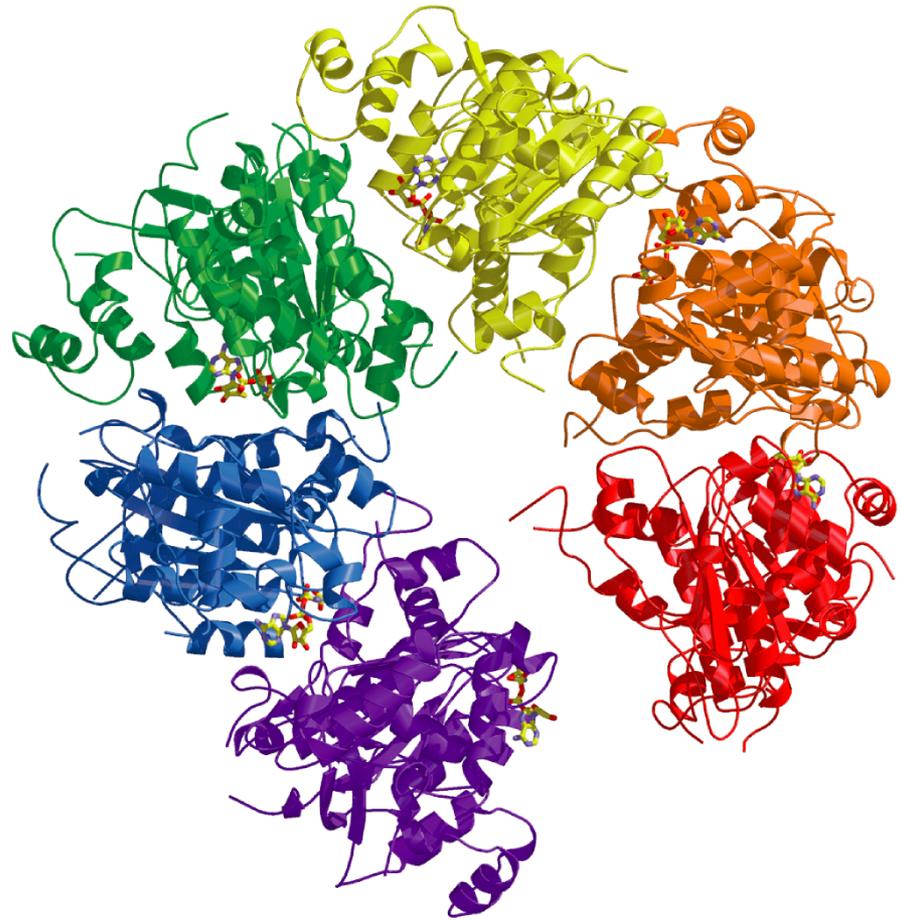
il trascritto si ripiega per formare la forcina di terminazione



Rho-dipendenti

Rho-dipendenti: reclutano la proteina **Rho**, una ATPasi ad anello che separa l' RNA dallo stampo. Siti **rut** (utilizzatori di **Rho**), circa 40 nt ricchi di C .

Struttura di Rho



Rho factor

- Il fattore Rho è una proteina terminatore che si lega al RNA in una **sequenza che è ricca in C e povera di G** che precede il sito di terminazione.
- ~275 kD **esamero di Rho** subunità identiche, della famiglia delle elicasi ATP-dipendenti che funzionano passando l'acido nucleico nel foro dell'esamero.
- I terminatori Rho-dipendenti sono la metà dei terminatori di *E. coli*.

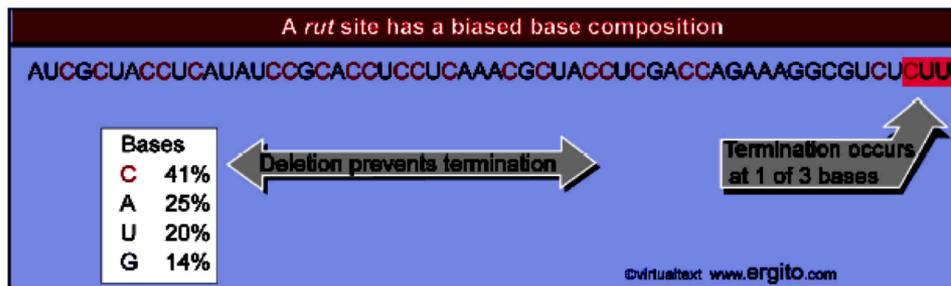


Figure 9.48 A rho-dependent terminator has a sequence rich in C and poor in G preceding the actual site(s) of termination. The sequence is shown in the form of the RNA. It represents the 3' end of the RNA.

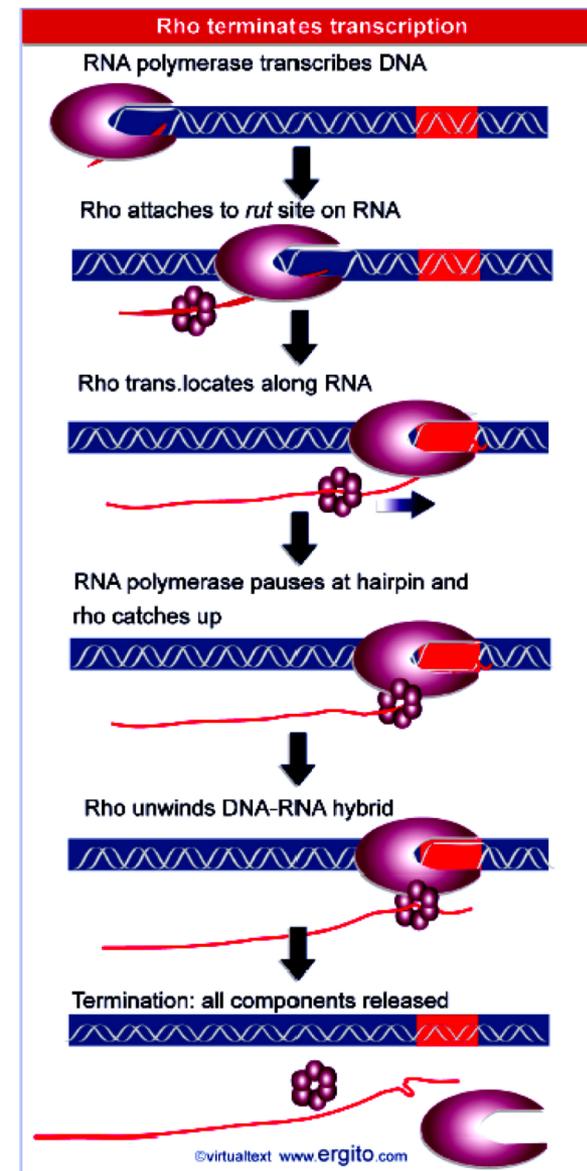


Figure 9.49 Rho factor pursues RNA polymerase along the RNA and can cause termination when it catches the enzyme pausing at a rho-dependent terminator.

TABLE 6-3 Inhibitors of Protein or RNA Synthesis

INHIBITOR	SPECIFIC EFFECT
<i>Acting only on bacteria</i>	
Tetracycline	blocks binding of aminoacyl-tRNA to A-site of ribosome
Streptomycin	prevents the transition from initiation complex to chain-elongating ribosome and also causes miscoding
Chloramphenicol	blocks the peptidyl transferase reaction on ribosomes (step 2 in Figure 6-65)
Erythromycin	blocks the translocation reaction on ribosomes (step 3 in Figure 6-65)
Rifamycin	blocks initiation of RNA chains by binding to RNA polymerase (prevents RNA synthesis)
<i>Acting on bacteria and eucaryotes</i>	
Puromycin	causes the premature release of nascent polypeptide chains by its addition to growing chain end
Actinomycin D	binds to DNA and blocks the movement of RNA polymerase (prevents RNA synthesis)
<i>Acting on eucaryotes but not bacteria</i>	
Cycloheximide	blocks the translocation reaction on ribosomes (step 3 in Figure 6-65)
Anisomycin	blocks the peptidyl transferase reaction on ribosomes (step 2 in Figure 6-65)
α -Amanitin	blocks mRNA synthesis by binding preferentially to RNA polymerase II

The ribosomes of eucaryotic mitochondria (and chloroplasts) often resemble those of bacteria in their sensitivity to inhibitors. Therefore, some of these antibiotics can have a deleterious effect on human mitochondria.

Video sulla trascrizione nei procarioti

<https://www.youtube.com/watch?v=vLz2A1cjPH8>

Zanichelli

La trascrizione