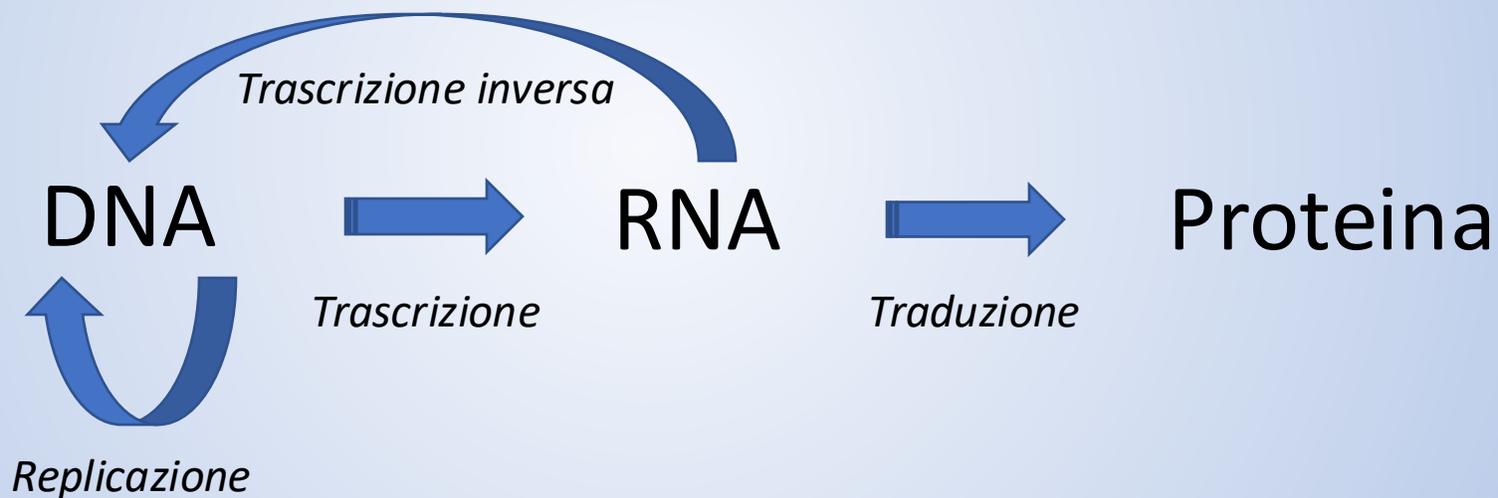
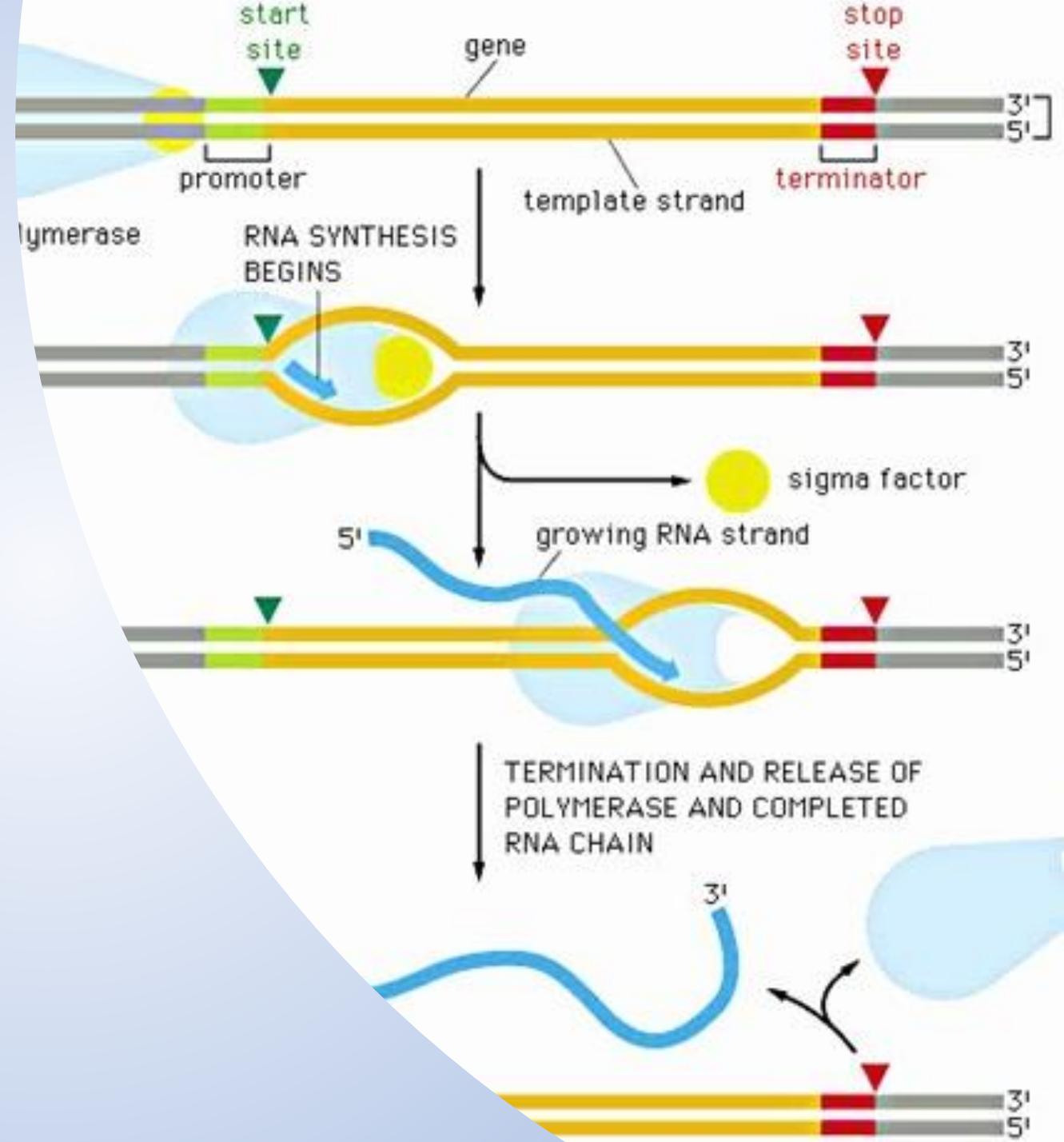


Trascrizione



Durante la trascrizione l'informazione genetica contenuta nella molecola di DNA è trascritta in una molecola complementare di RNA grazie all'enzima RNA polimerasi

Procarioti



Fasi della trascrizione

1. Inizio
2. Allungamento
3. Terminazione

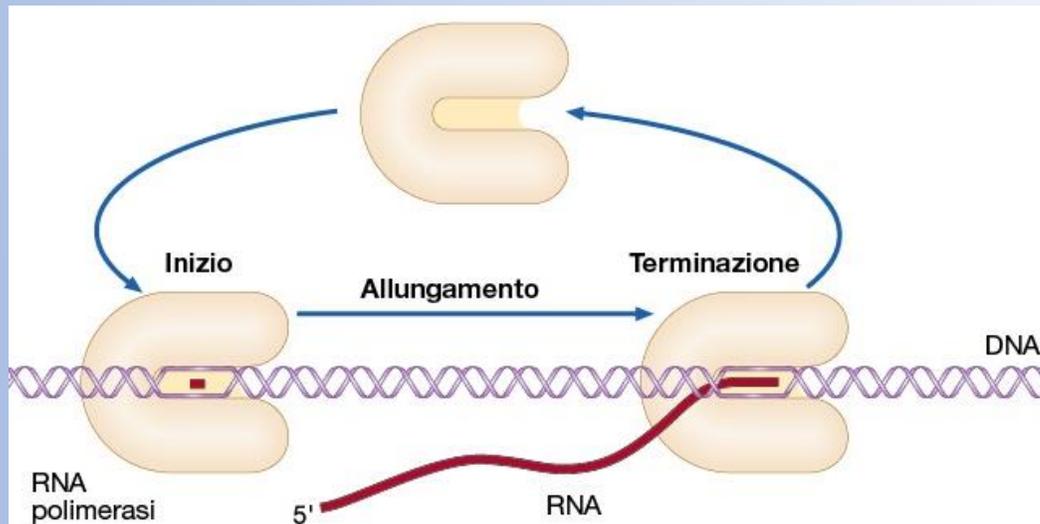


Fig.9.1

Man mano che la molecola di RNA si sintetizza si separa del DNA essendo subito disponibile per il processo di traduzione. Il tratto ibrido DNA-RNA è lungo 8-9 nt

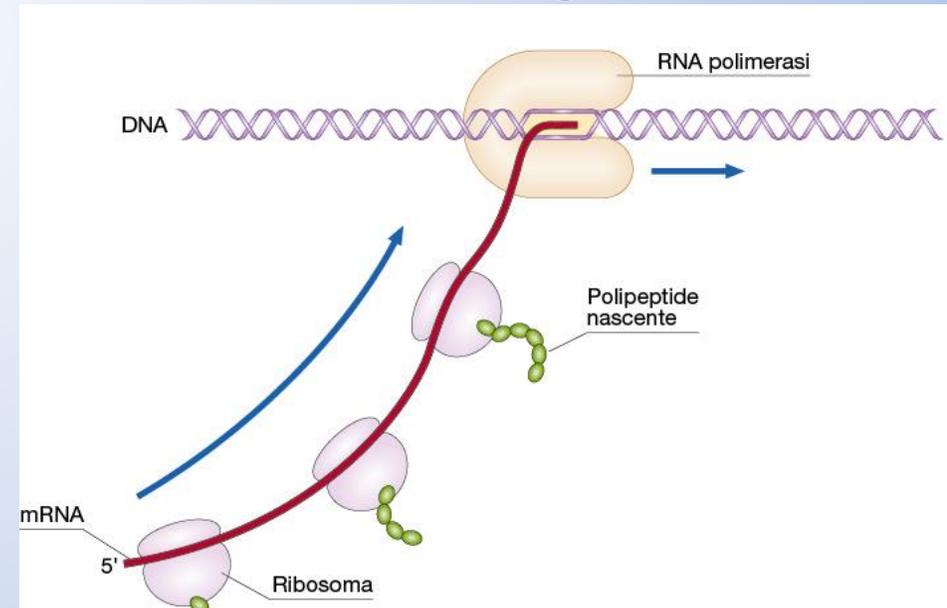
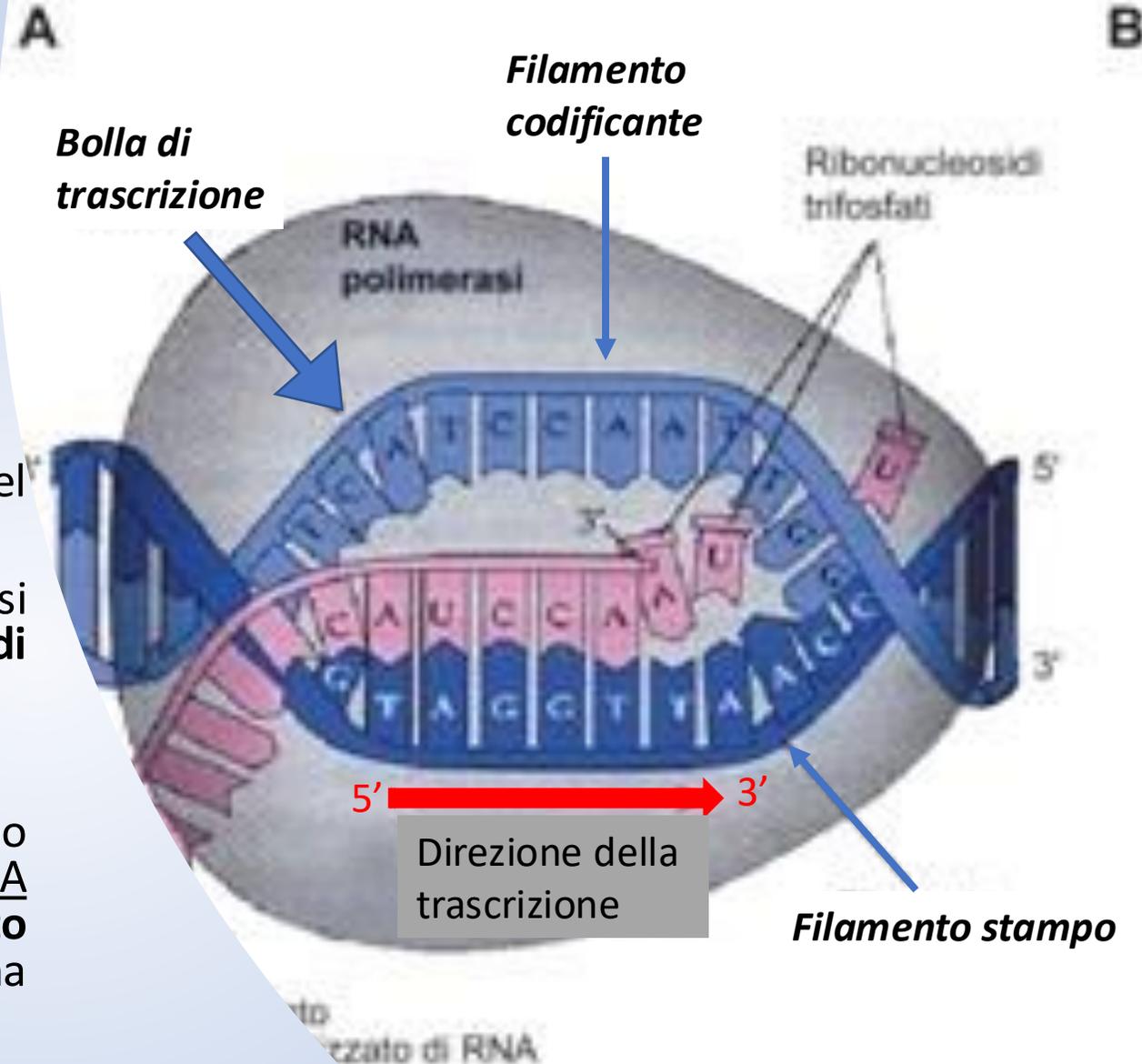


Fig.9.2B

RNA Polimerasi e Unità di Trascrizione

- La RNA polimerasi è l'enzima responsabile del processo di trascrizione.
- La trascrizione avviene dopo che la RNA polimerasi si lega al DNA aprendolo dando luogo alla **Bolla di Trascrizione**, che è lunga circa 25 pb.
- l'ibrido DNA-RNA è lungo 8-9nt
- La RNA pol usa solo un filamento come stampo (**Filamento stampo**) che sarà complementare al RNA messaggero. L'altro filamento, chiamato **filamento codificante**, avrà la stessa sequenza del mRNA ma con le U al posto delle T
- La sintesi del RNA segue la **direzione 5'→3'**
- La RNA pol non ha bisogno di un primer.



Unità di Trascrizione

La RNA pol si lega ad una sequenza specifica del DNA chiamata **Promotore** situata prima del gene («*a monte*»).

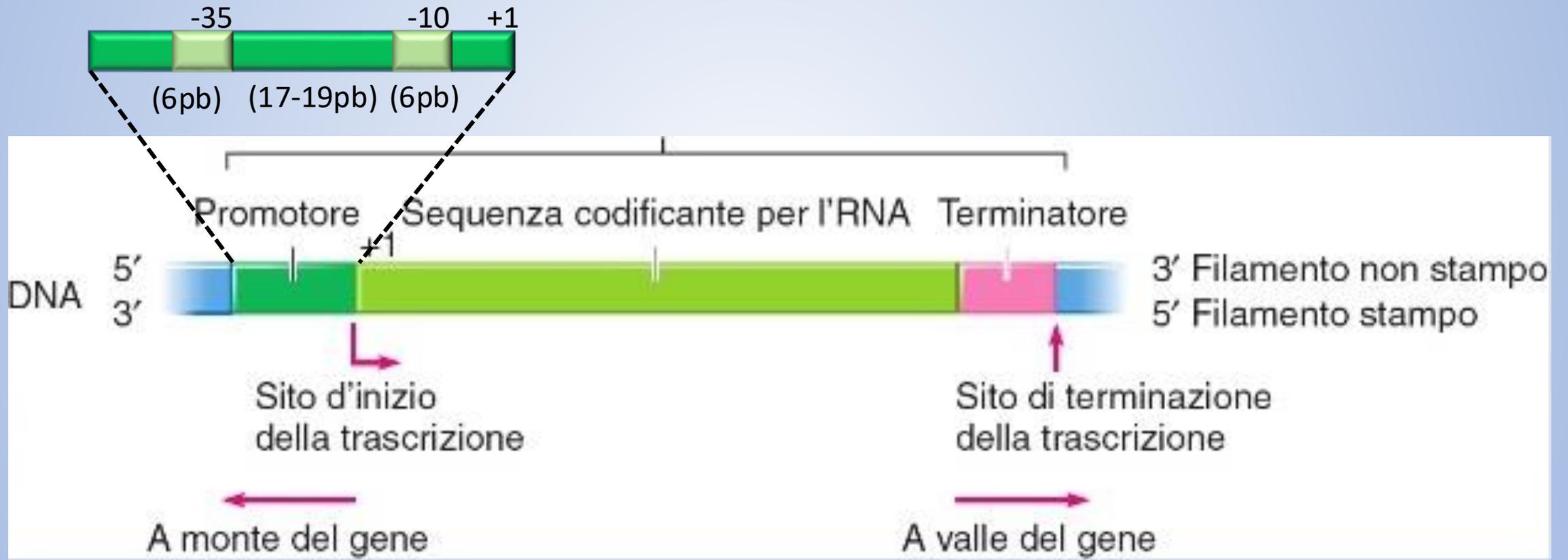
Il tratto di DNA che va dal promotore al terminatore si chiama **Unità di Trascrizione** ed è rappresentata dalla molecola di RNA



Il promotore contiene nella sua sequenza il primo nucleotide stampo per la sintesi del RNA. Questo ultimo si chiama **Sito d'inizio della Trascrizione (TSS, transcription starting site)**.

Il **sito di terminazione** identifica la sequenza dove la sintesi di RNA finisce

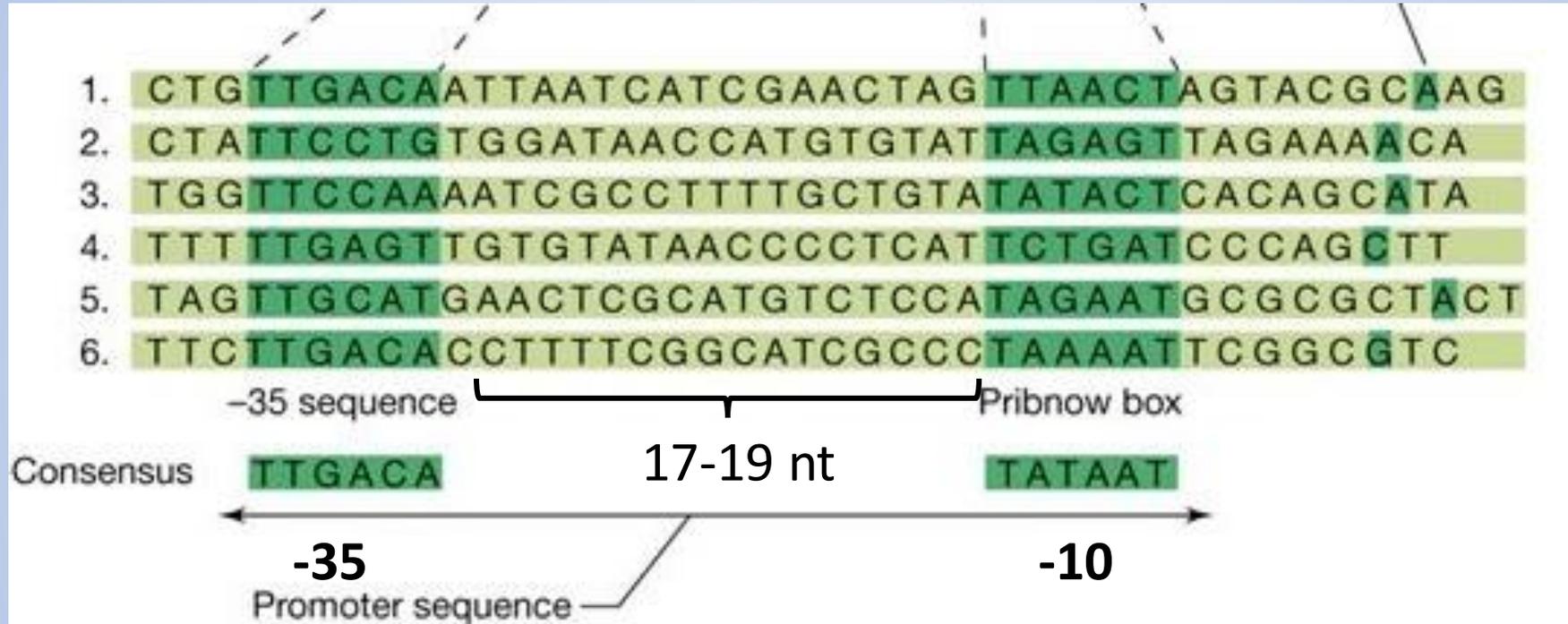
Sequenza di promotore tipico



Upstream o «***a monte***»

Downstream o «***a valle***»

Sequenza di promotore tipico

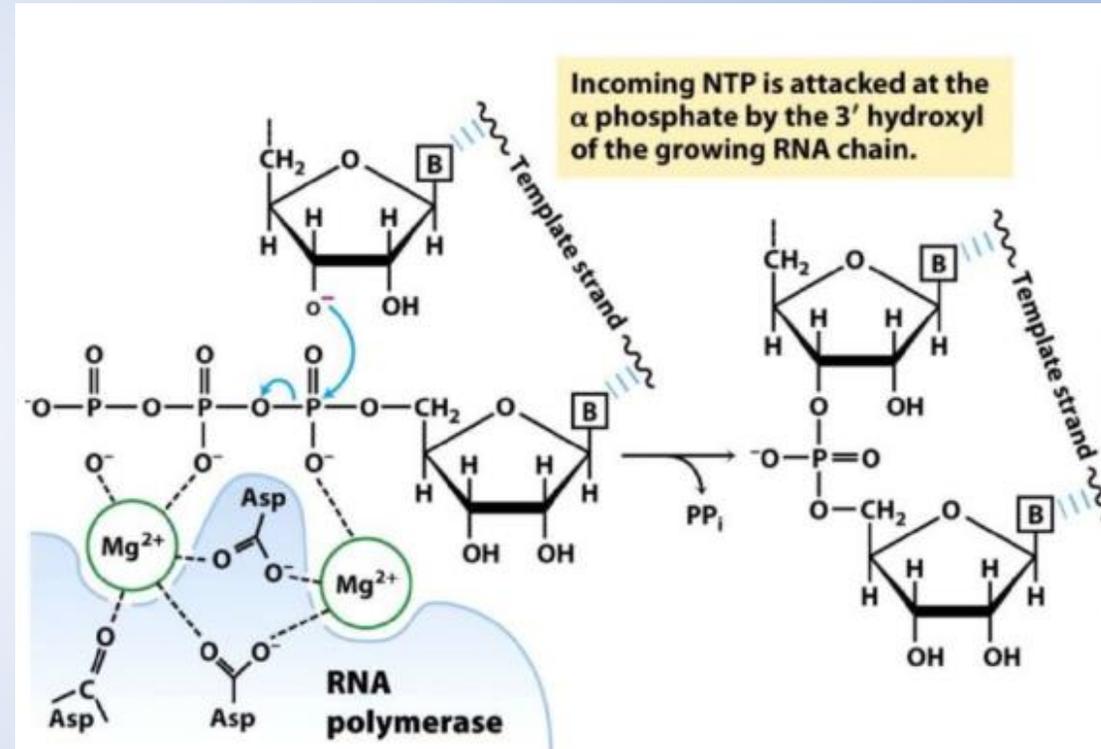


Due sequenze conservate di 6 nucleotidi in **posizione -10 (Pribnow box) e -35** separate da una sequenza di 17-19 nt.

Tutti e due sequenze sono ricche in A e T, che li rende facilmente denaturabili

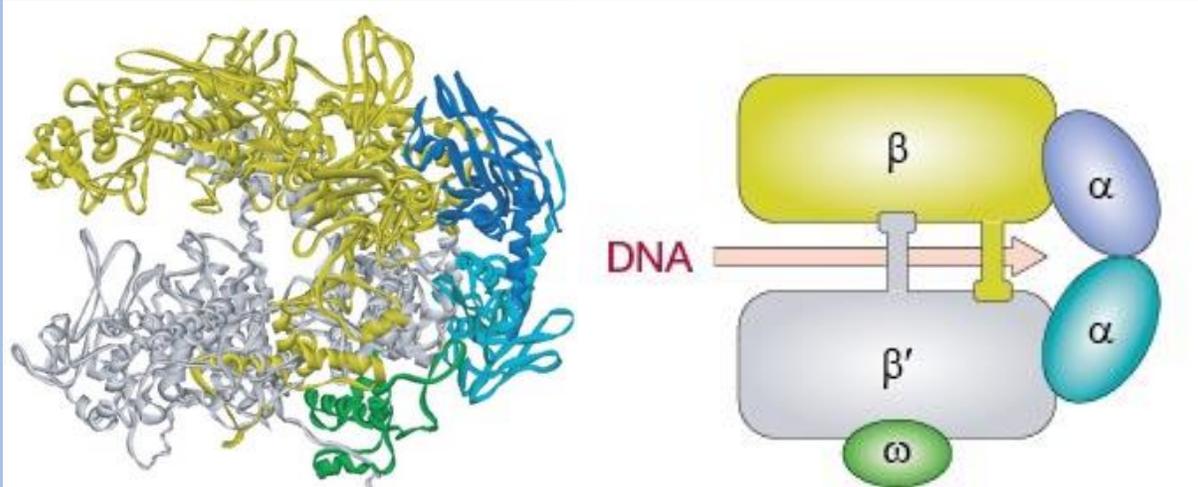
RNA Polimerasi e Unità di Trascrizione

- La **reazione di polimerizzazione** avviene nello stesso modo che nel DNA, con la differenza che si aggiungono **ribonucleotidi trifosfato** (ATP, UTP, GTP, CTP).
- Il fosfato in posizione α forma un **legame fosfodiesterico** con il gruppo 3'OH del nucleotide precedente. I fosfati β e γ rilasciati come pirofosfato verranno idrolizzati da una pirofosfatasi rilasciando energia libera, necessaria per la polimerizzazione
- Velocità di sintesi: **50nt/secondo**



Procariotica

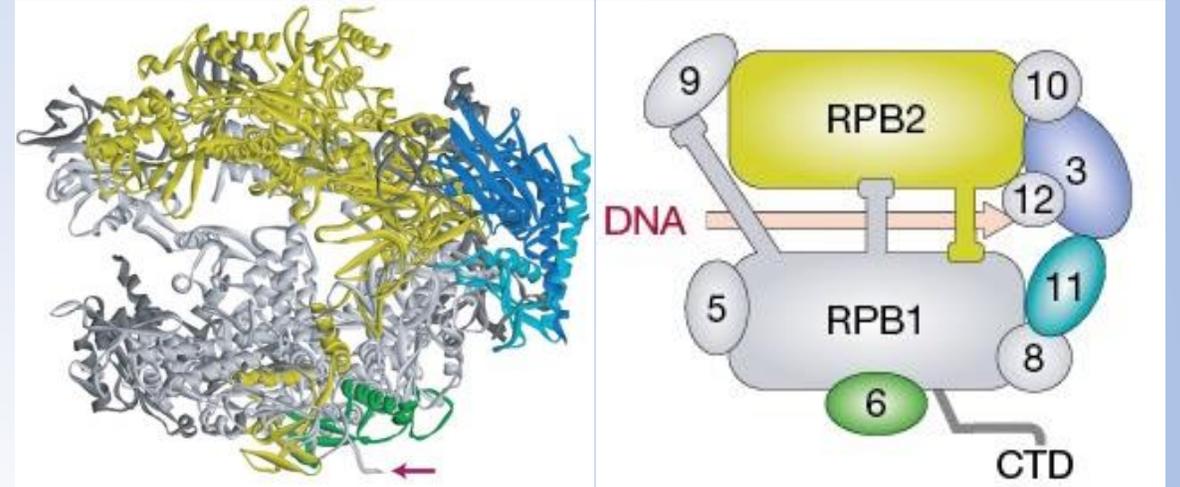
Thermus aquaticus



Nei batteri esiste una sola RNA pol

Eucariotica

Saccharomyces cerevisiae



In eucarioti esistono 3 RNA pol I-II-III

Fig.9.8

Struttura molto conservata, soprattutto nella parte centrale o core
Forma a «pinza» che le permette agganciarsi al DNA

Struttura RNA polimerasi

RNA polimerasi batterica

È un oloenzima (480kDa) costituito da 6 subunità: 2 α , β , β' , ω e σ

- Core centrale: 2 α , β , β' , ω

Le subunità α sono responsabili dell'assemblaggio del complesso. Contengono due domini:

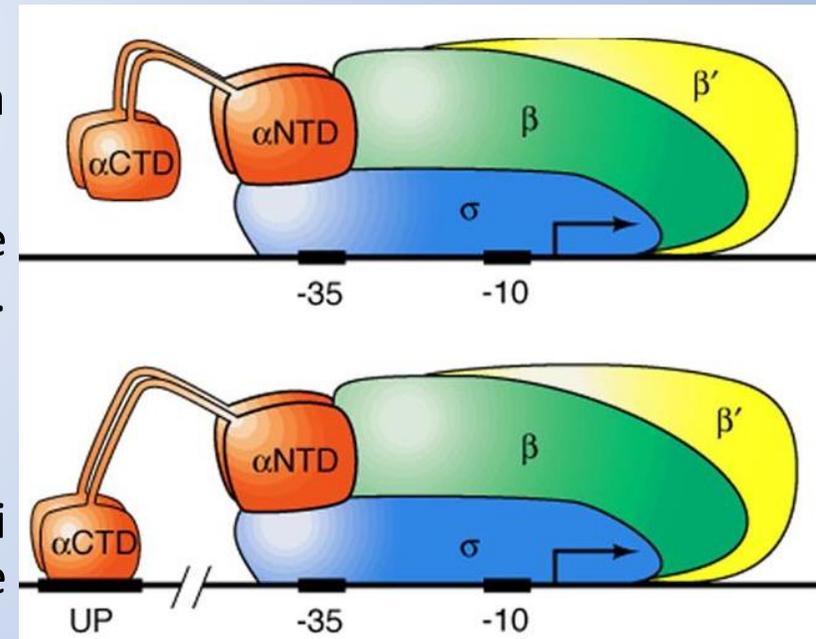
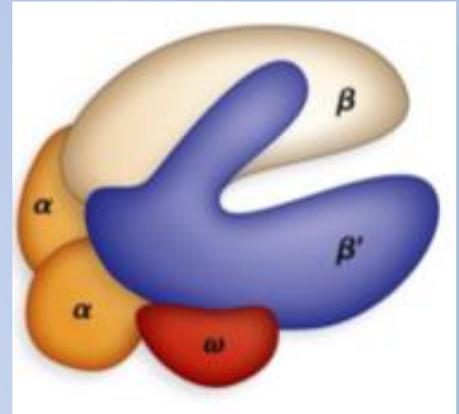
C-terminale (α -CTD): si lega ad una zona del promotore chiamata *UP-element* (upstream element, elemento a monte)

N-terminale (α -NTD): mantiene l'interazione con le altre subunità dell'enzima

La subunità β contiene il *sito catalitico di polimerizzazione* e che include anche 2 atomi di Mg^{2+} , uno di questi sempre presente nel sito attivo. L'altro atomo di Mg^{2+} viene trasportato all'interno dai nucleotidi.

La subunità β' si lega al DNA in maniera non specifica

La subunità ω mantiene la stabilità del complesso agendo in modo simile ai chaperoni molecolari (guidano il corretto folding - conformazione delle proteine)



RNA polimerasi batterica

È un oloenzima (480kDa) costituito da 6 subunità: 2 α , β , β' , ω e σ

- Subunità σ

Permette il legame specifico con il DNA a livello del promotore ma solo quando l'oloenzima è completo di tutti i suoi componenti. Solo quando si lega al core centrale si attiva la trascrizione: agisce come un fattore di iniziazione (non di allungamento)

Costituito da 4 domini conservati σ_1 , σ_2 , σ_3 e σ_4 che occupando il core rimangono una parte esposti verso l'esterno per riconoscere e legare il promotore, e una parte verso la pinza che si forma tra le subunità β e β' (dove si posiziona il DNA).

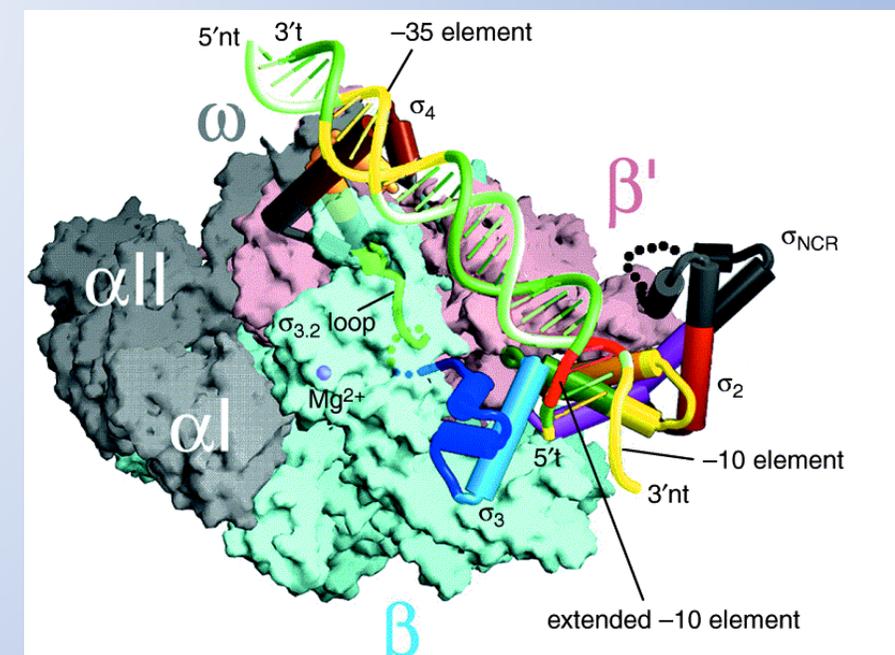
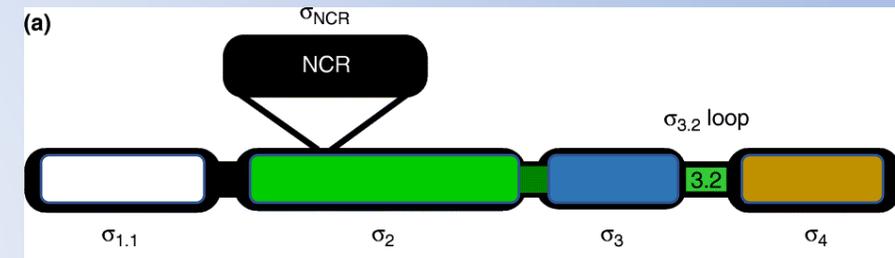
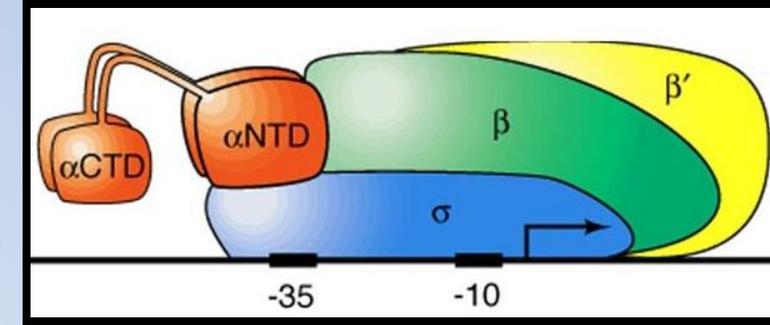
Quando σ è legato si aumenta moltissimo l'affinità della RNA pol per il promotore.

Quando σ non è legato, la RNA pol rimane legata al DNA in modo non specifico facendo che l'enzima non si disperda nella cellula.

[Katsuhiko Smurakami, Seth ADarst](#)

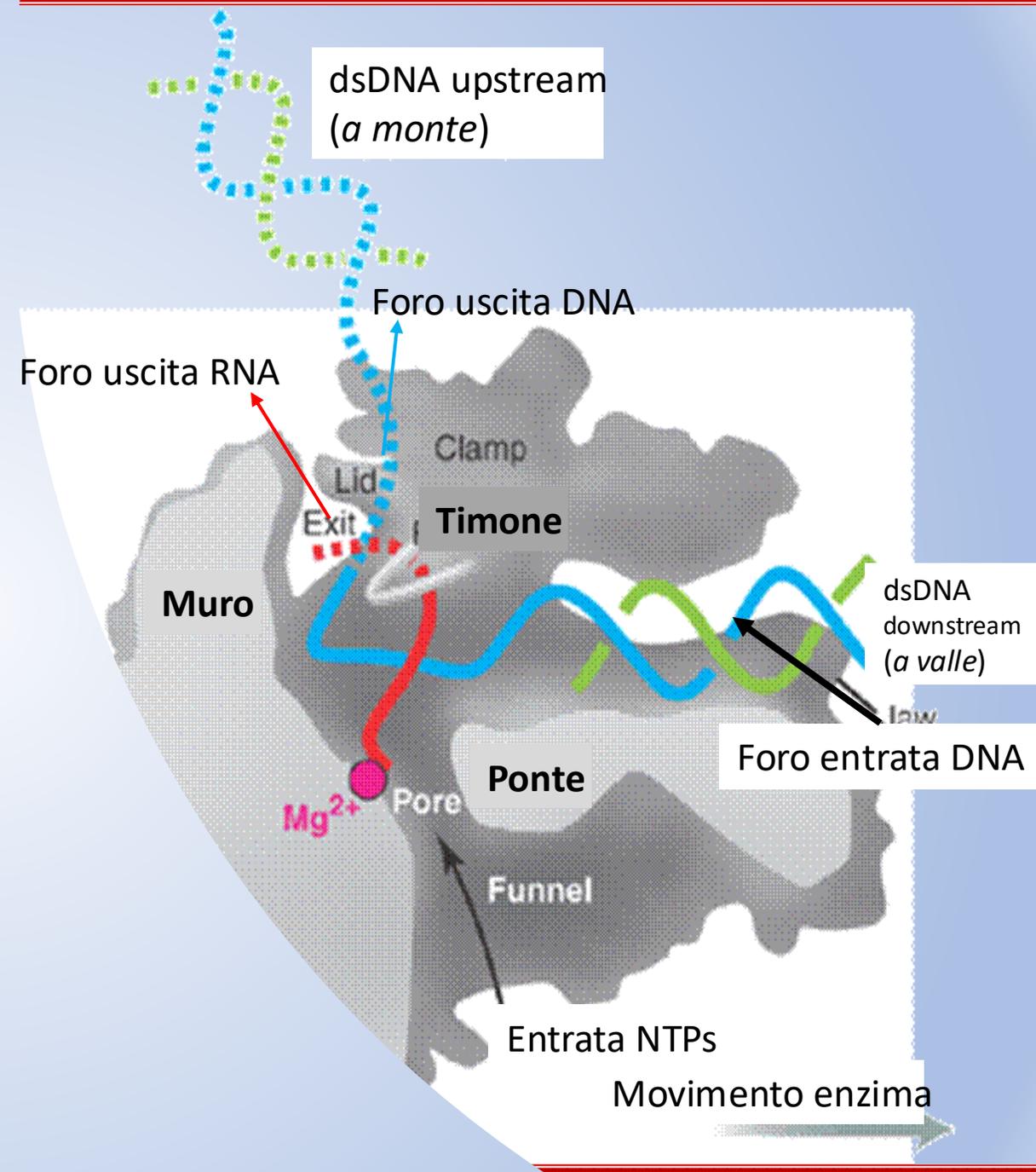
[Current Opinion in Structural Biology](#)

[Volume 13, Issue 1, February 2003, Pages 31-39](#)



RNA polimerasi batterica

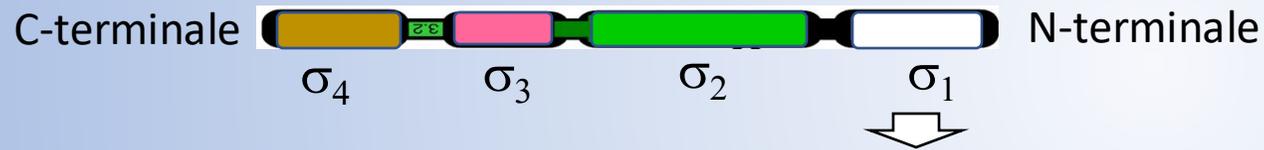
- All'interno della RNA pol si formano dei **solchi** che guidano la funzione dell'enzima.
- Un **primo solco** di circa 55Å **accoglie 15-16pb della doppia elica** di DNA. In fondo al solco il DNA deve piegarsi di 90° quando trova la regione del enzima chiamata **muro**.
- Al di sopra del muro ci sono il **foro di uscita del RNA trascritto sulla sinistra** e un **secondo foro di uscita del DNA sulla destra**
- Nella parte inferiore esiste una **entrata a imbuto da dove entrano i ribonucleosidi trifosfato** che sono inseriti nel RNA sintetizzato nella zona centrale della struttura del enzima, nel punto d'incontro dei 3 solchi. Sarà in questo punto dove si trova la bolla di trascrizione che rimane aperta con l'aiuto di una struttura chiamata **timone**.



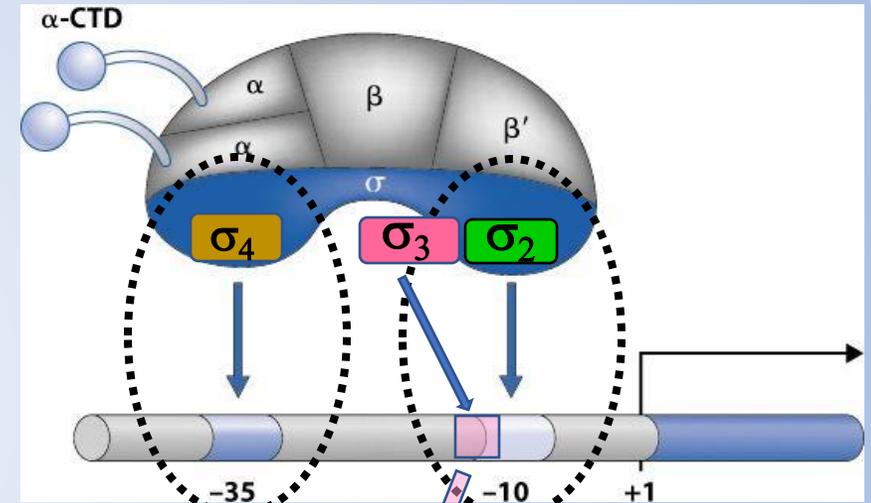
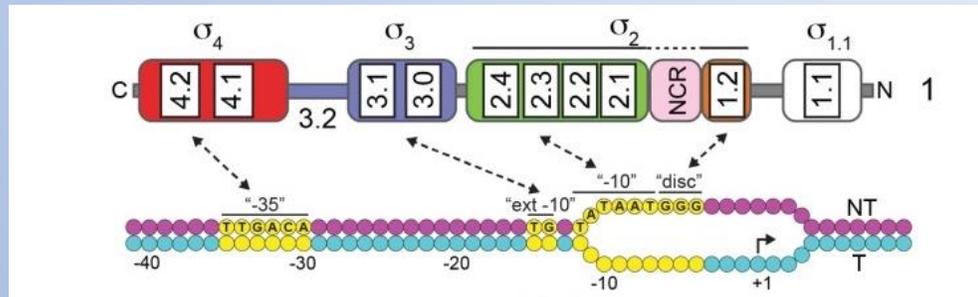
Fasi trascrizione: INIZIO – riconoscimento promotore

- L'enzima deve riconoscere il promotore in modo specifico e si lega stabilmente

σ subunit



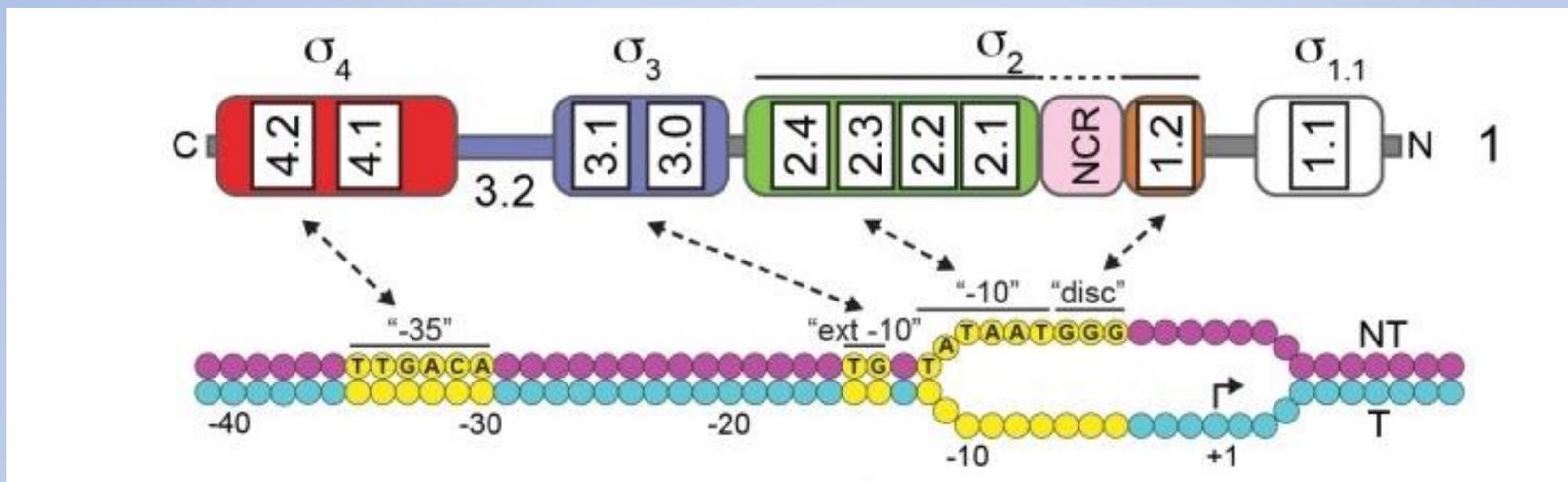
maschera le regioni σ_4 e σ_2 in modo che non si leghino in modo stabile al promotore. Solo quando l'oloenzima è completa avviene un cambio conformazionale che espone i domini di legame al DNA



Lega specifica e stabilmente l'oloenzima al DNA

Induce la transizione conformazionale del complesso enzima-DNA dallo *stato chiuso* allo *stato aperto*

Elemento -10 esteso



Domain σ_4 ($\sigma R4.1-4.2$) is comprised of four helices with the third and fourth forming a helix-turn-helix motif that binds to the -35 element (Figure 1). Domain σ_4 forms the second largest interface with RNAP through its interaction with the β flap, and also acts as a contact point for transcriptional activators that bind DNA upstream of -35 .

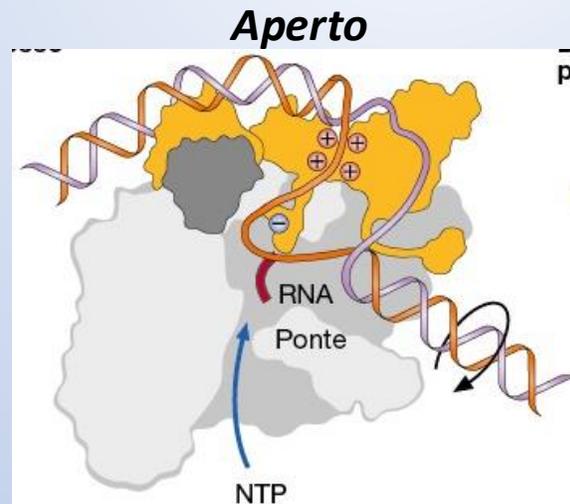
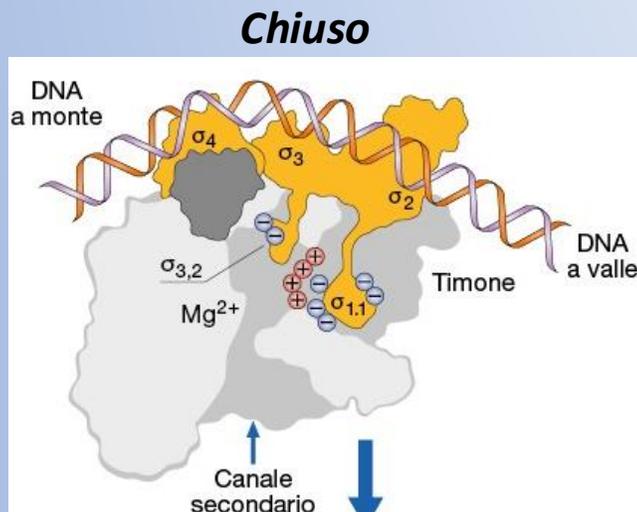
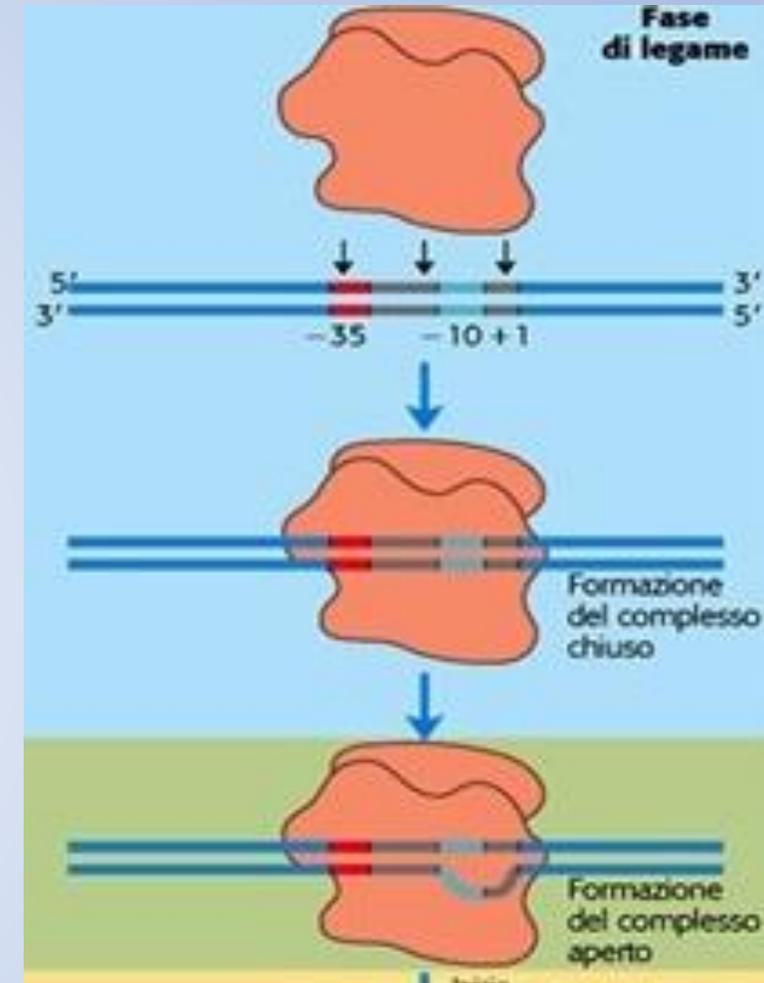
Domain σ_2 ($\sigma R1.2-2.4$) is the most conserved, and forms part of an extensive interface. During the process of DNA melting σ_2 makes base-specific interactions with the single-stranded non-template DNA of the -10 element ($\sigma R2.3-2.4$) thereby capturing the DNA and stabilizing it "compleso aperto".

Domain σ_3 is a compact three-helix bundle that interacts with the major groove of duplex DNA just upstream from the -10 element. Interactions with these "extended -10 " elements can stabilize initiation complexes to such an extent that the otherwise crucial -35 element is not required.

A conserved linker ($\sigma R3.2$) between σ_3 and σ_4 threads through the RNAP active site channel and occupies the RNA exit path,

Fase trascrizione: INIZIO – Complesso Aperto/Chiuso

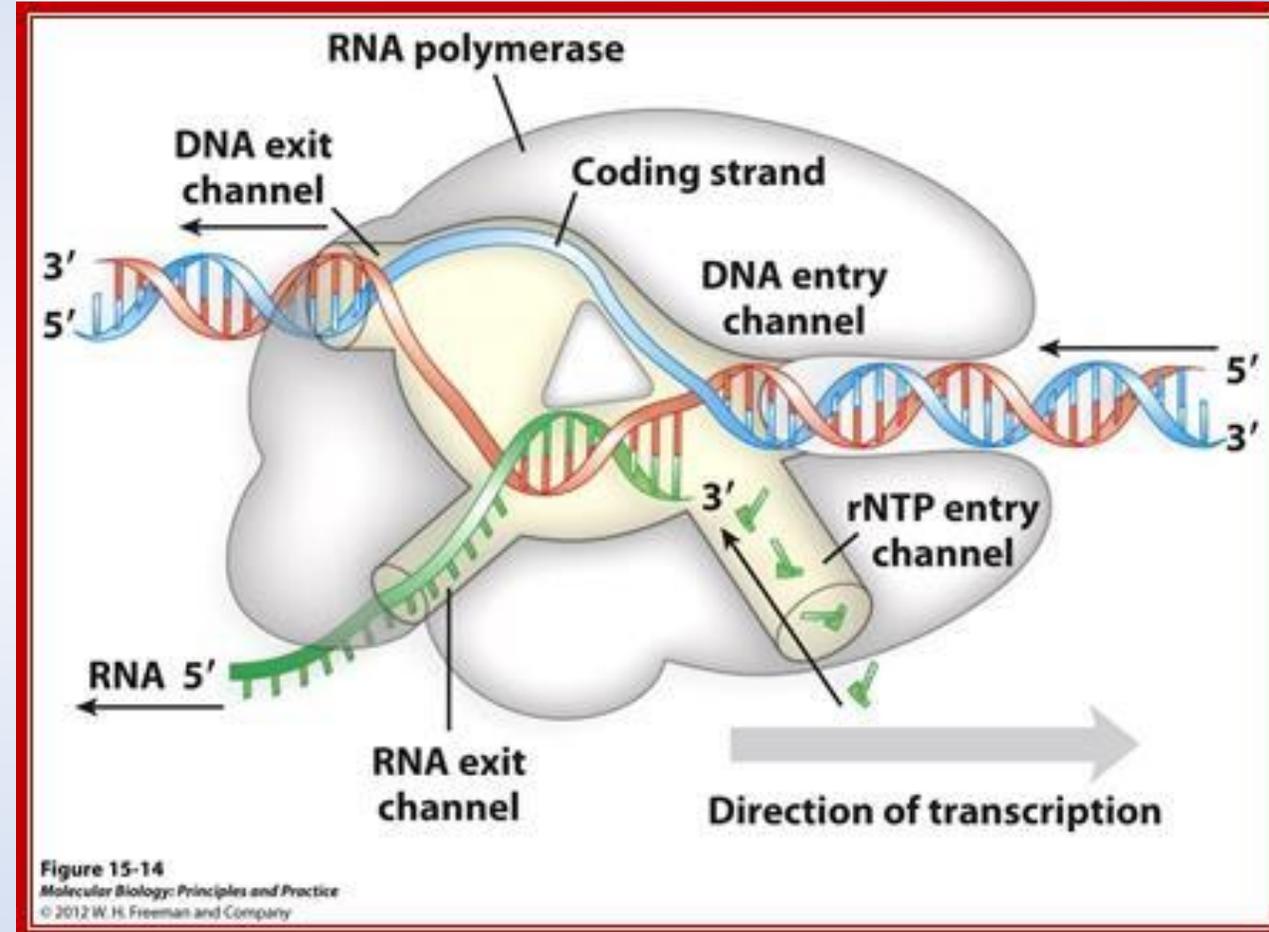
- Nella fase di legame enzima-DNA si crea inizialmente un legame di riconoscimento del Promotore che forma il **Complesso CHIUSO** (il DNA non è aperto e non forma la bolla di trascrizione)
- Quando l'enzima è stabilmente legato al promotore, la sua conformazione cambia provocando l'apertura del DNA a livello del promotore e la formazione della bolla di trascrizione: **Complesso APERTO**



Fase trascrizione: INIZIO – Complesso Aperto

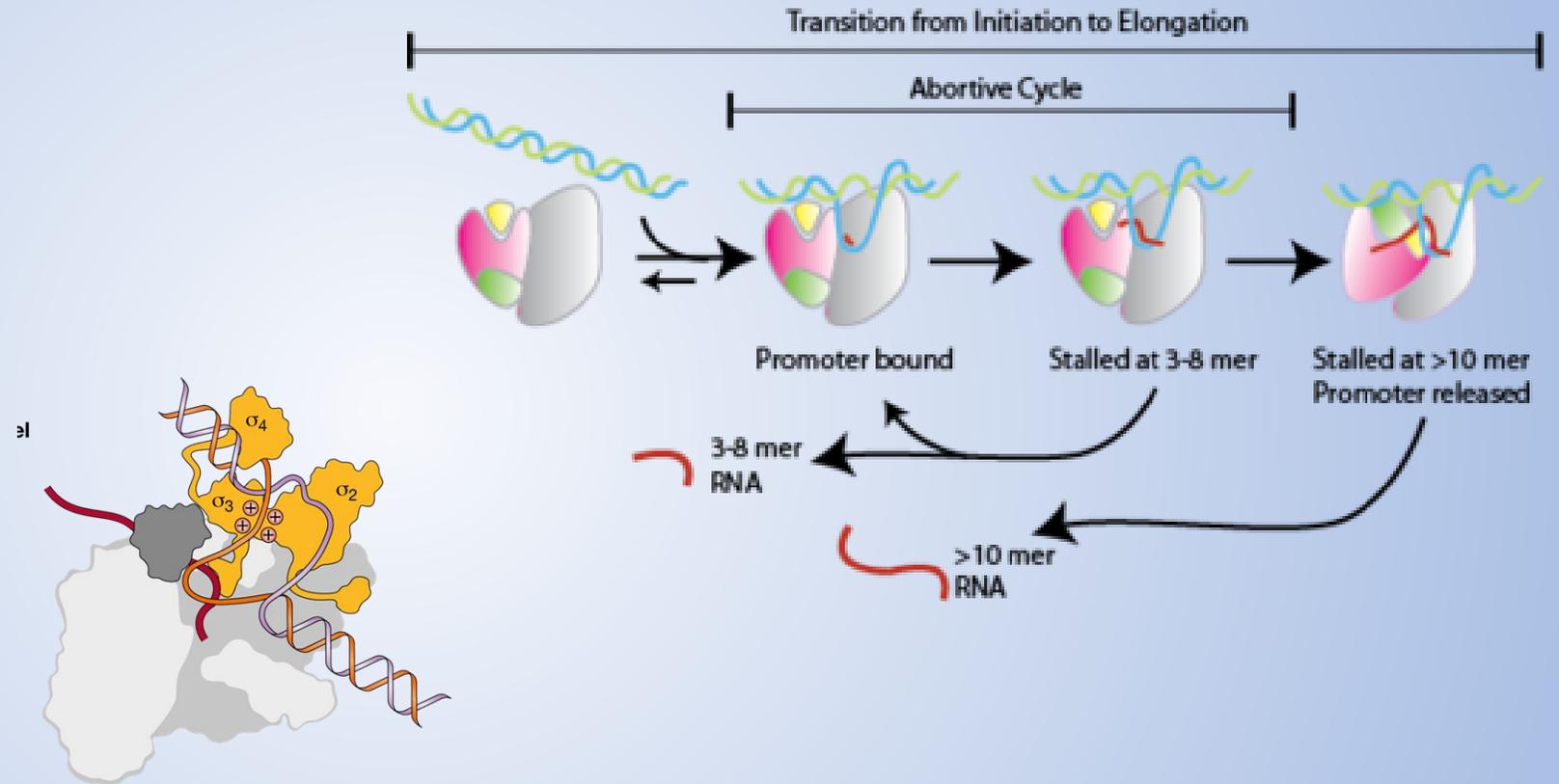
Nella conformazione aperta:

- Il DNA è posizionato nel solco formato tra le subunità β e β' aprendosi nella regione che va dal -11 al +3 (bolla di trascrizione). La presenza della proteina timone aiuta a mantenere la bolla di trascrizione.
- In questo punto il filamento stampo aderisce al centro attivo (dove si trovano gli ioni Mg^{2+} ed entrano gli rNTPs) mentre quello codificante si sposta dal canale centrale.
- Nel complesso aperto il filamento stampo è disponibile per il riconoscimento da parte dei nucleotidi che entrano iniziando la trascrizione



Fase trascrizione: INIZIO – Sintesi Abortiva

- La RNA pol non ha bisogno di un innesco per cominciare la trascrizione.
- Normalmente comincia i trascritti con la A suggerendo una particolare affinità per questo nucleoside trifosfato. Anche la subunità σ attraverso le regioni $\sigma 2/\sigma 3/\sigma 4$ favorisce l'inizio della trascrizione.
- La sintesi del RNA inizia formando dei piccoli frammenti che non riescono a raggiungere i 9 nt, staccandosi per poi essere eliminati. Questo evento è chiamato **SINTESI ABORTIVA**



Solo quando il frammento raggiunge i 9 nt l'ibrido DNA-RNA è stabile abbastanza da continuare la polimerizzazione, la RNA pol abbandona il promotore e il $\sigma 2/\sigma 3$ loop libera il canale d'uscita

RNA pol e sintesi abortiva

3 modelli per spiegare l'avanzamento della RNA polimerasi

1. Passaggio transiente

L'enzima avanza sintetizzando un corto frammento abortivo e poi indietreggia al punto di partenza sul promotore

2. A bruco

Questo modello presuppone che l'enzima è molto flessibile e si allunga e si contrae sul DNA durante la sintesi abortiva.

3. Accartocciamento («scrunch»)

L'enzima è ferma sul promotore ed è il DNA che si accartocchia al suo interno. Questo stesso meccanismo è stato proposto durante la fase di allungamento. Si pensa che lo svolgimento del DNA in entrata e lo accartocciamento forniscano l'energia per staccare lo enzima dal promotore

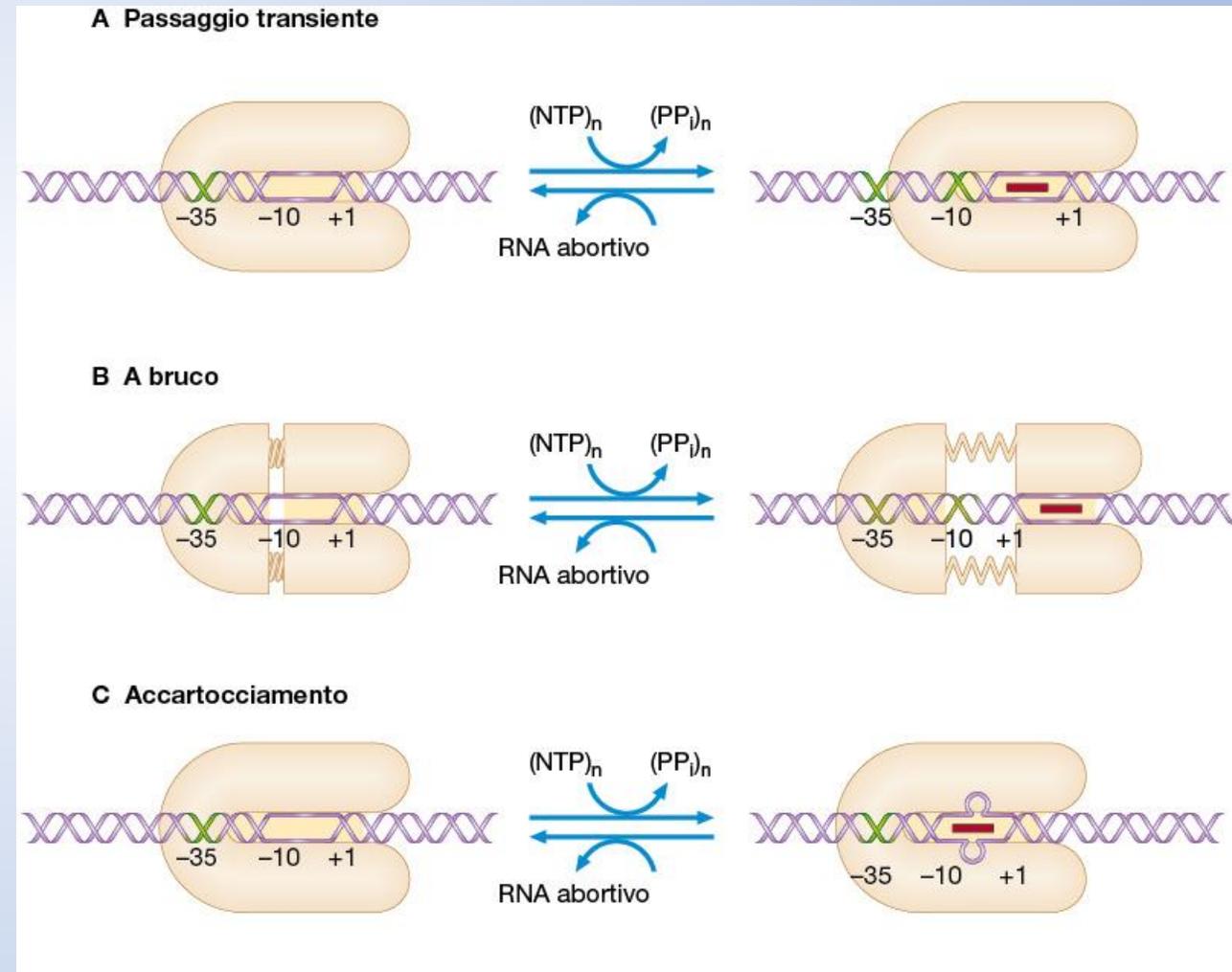


Fig.9.12

Fattori σ : σ^{70}

In E. coli esistono diversi fattori σ che riconoscono diversi tipi di promotori, ma σ^{70} è quello più frequente

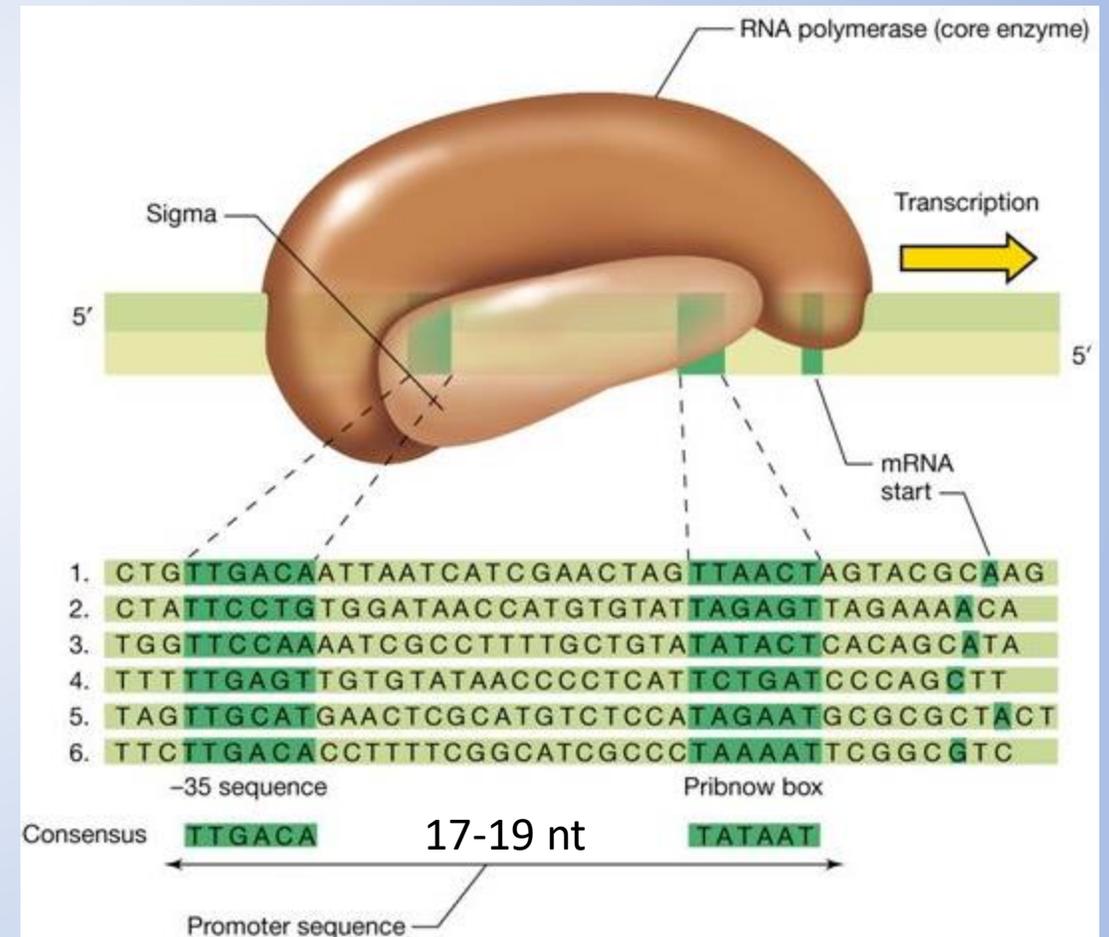
σ^{70}

Riconosce un promotore classico costituito dalle 2 sequenze conservate di 6 nucleotidi in **posizione -10 (Pribnow box) e -35**, separate da una sequenza di 17-19 nt.

Tutti e due sequenze sono ricche in A e T, che li rende facilmente denaturabili per formare il complesso aperto

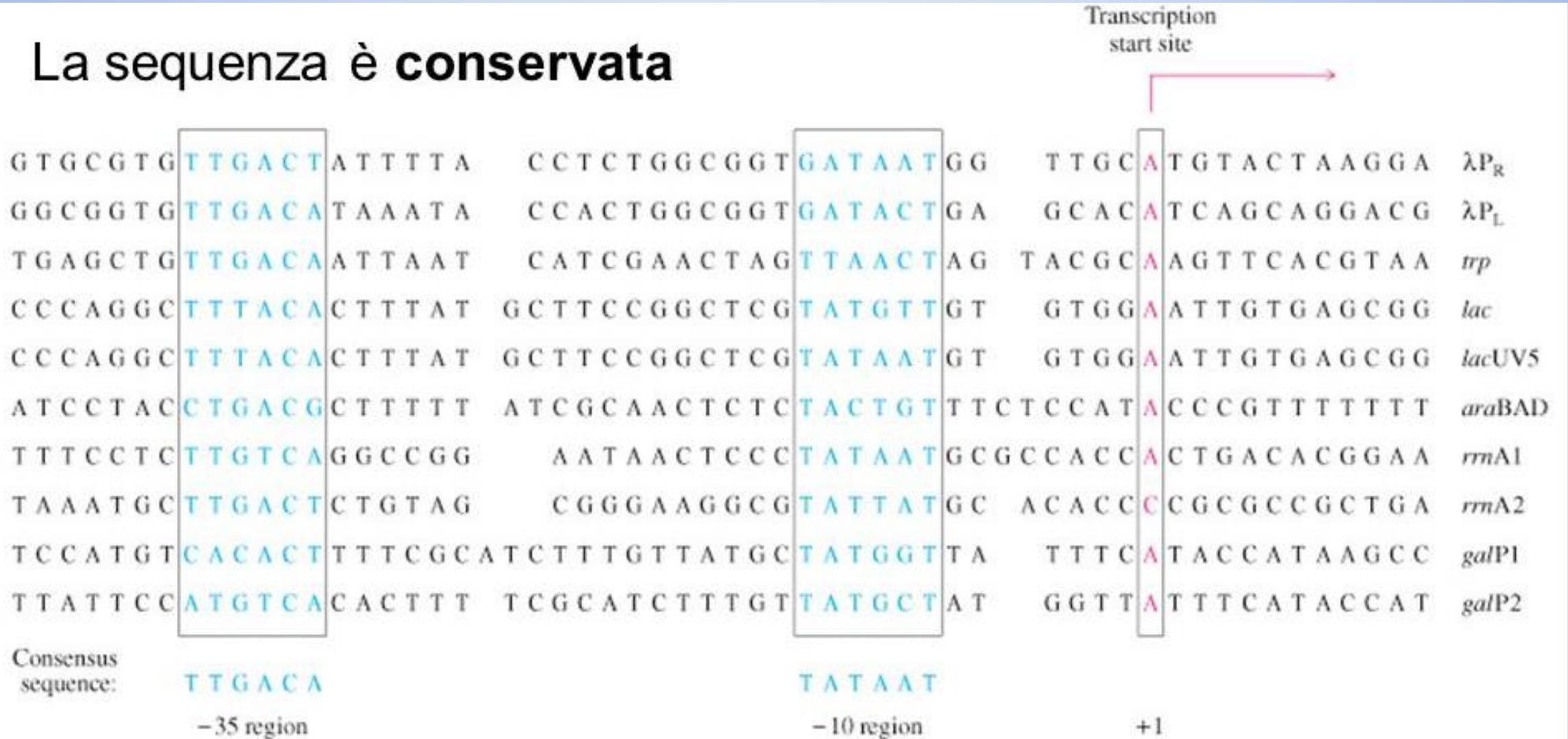
Più si avvicina la sequenza di un promotore alla sequenza consenso più forte sarà il promotore.

Un promotore forte avrà una grande affinità per la RNA pol e per questo sarà trascritto più frequentemente

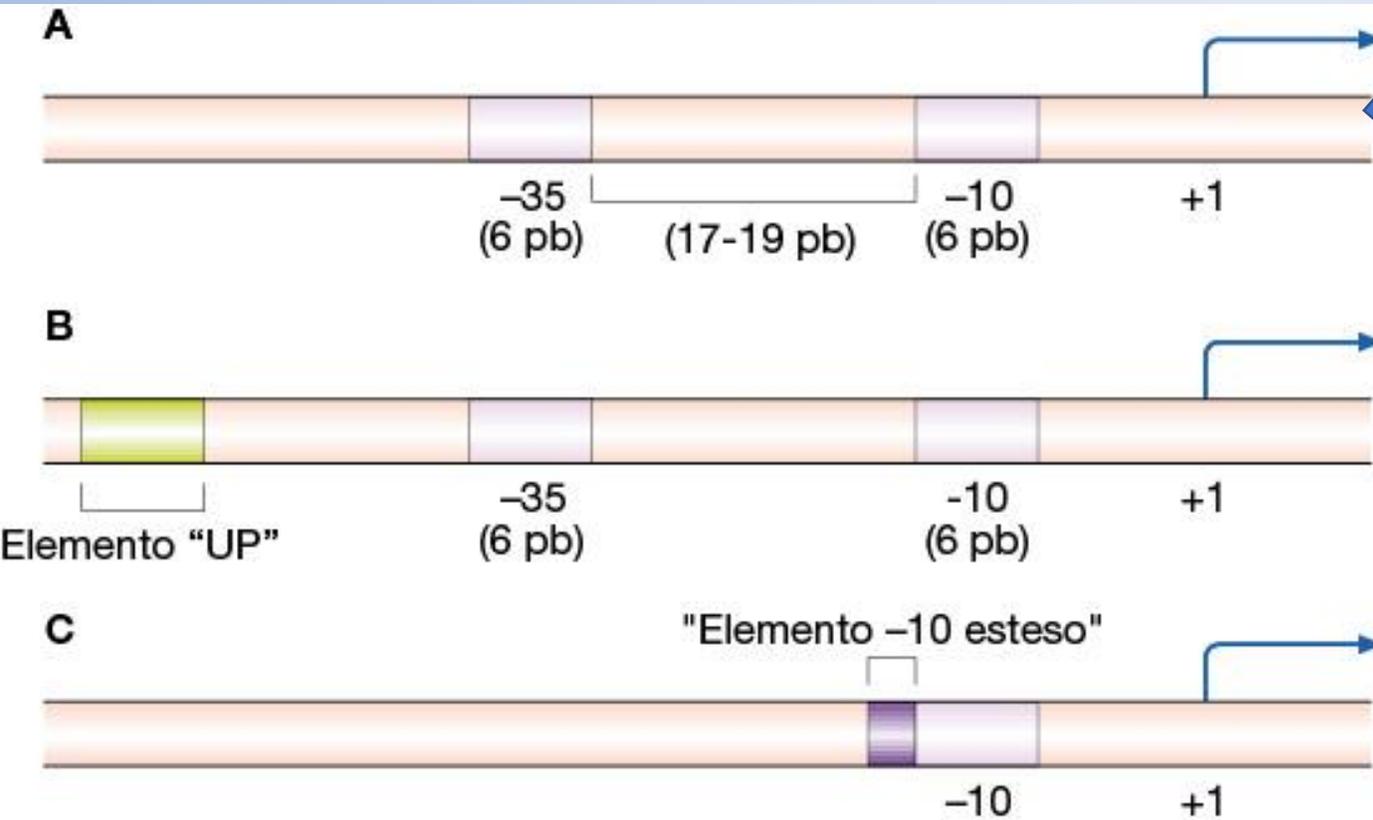


σ^{70} promotore: sequenza consenso

La sequenza è **conservata**



σ^{70} e i suoi promotori

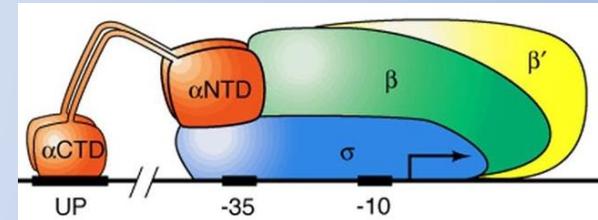


Promotore classico

Promotore di RNA ribosomiale:

Contiene l'elemento UP «a monte» della sequenza -35 che è riconosciuto del dominio C-ter della subunità α della RNA pol (α -CTD)

In questo caso la RNA pol è legata al DNA attraverso σ e la subunità α



Promotore senza sequenza -35:

in compenso hanno una sequenza -10 estesa con una sequenza addizionale conservata a monte della -10

Fig. 9.14

Altri fattori σ

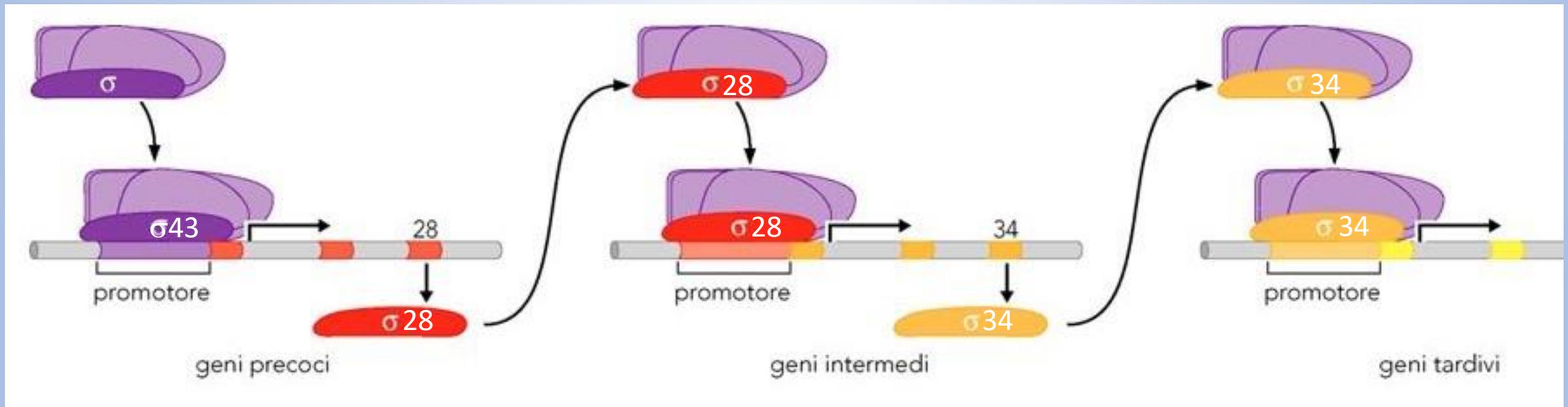
Gene	Fattore	Sequenza -35	Separazione	Sequenza -10	Utilizzo
<i>rpoD</i>	σ^{70}	TTGACA	16-18 bp	TATAAT	Generale
<i>rpoH</i>	σ^{32}	CCCTTGAA	13-15 bp	CCCGATNT	Shock da calore
<i>rpoN</i>	σ^{54}	CTGGNA	6 bp	TTGCA	Carenza di azoto
<i>fliA</i>	$\sigma^{28}(\sigma^F)$	CTAAA	15 bp	GCCGATAA	Sintesi flagellare

Ogni uno di questi fattori riconoscono promotori con sequenze -10 e -35 specifiche e diverse della consenso

Il fattore σ^{32} verrà prodotto nel caso i batteri siano cresciuti a temperatura più alta di 37°C, inducendo la trascrizione di geni che proteggono il batterio dallo shock termico

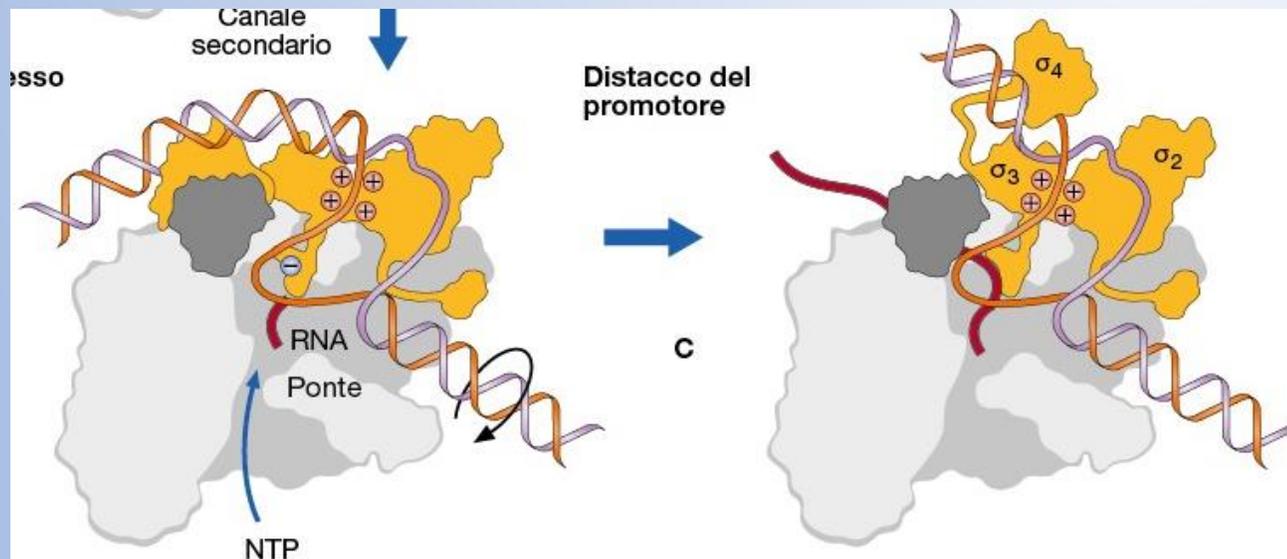
Controllo temporale della trascrizione attraverso fattori σ diversi

In *Bacillus subtilis* il ciclo di infezione del fago SPO è regolato temporalmente dalla attivazione genica sequenziale controllata da fattori sigma la cui trascrizione è mediata da un altro fattore σ precedentemente trascritto e attivato



Fasi trascrizione: Allungamento

- Dopo che il RNA raggiunge 9-12 nt di lunghezza, questo sposta la regione $\sigma 2$ - $\sigma 3$ loop e il dominio $\sigma 4$ liberando il canale di uscita per il RNA.
- Questi cambiamenti conformazionali stimolano la fase di allungamento (non è chiaro se durante la fase di allungamento il fattore σ rimanga legato alla RNA pol)

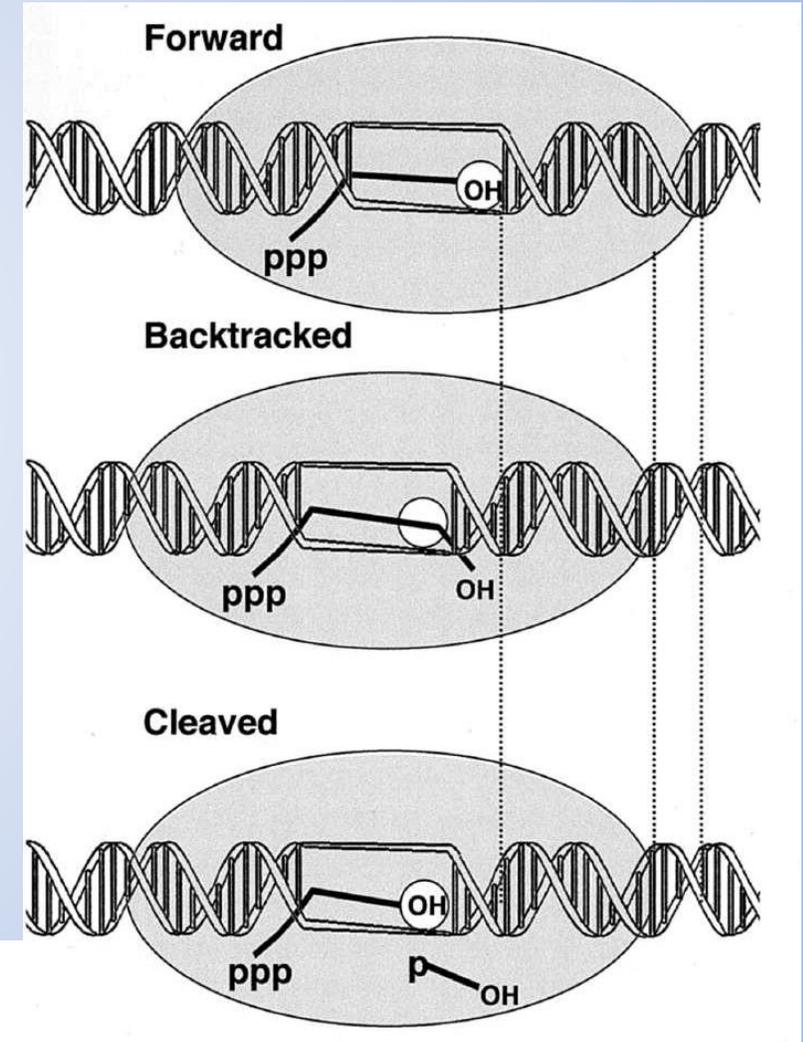


La fase di allungamento inizia con la RNA pol che abbandona la regione del promotore avanzando sul DNA stampo

Fasi trascrizione: Allungamento

L'allungamento non è un processo continuo, essendo spesso rallentato o bloccato:

- A volte la **RNA pol torna indietro** rimanendo l'estremità 3'OH del trascritto fuori dal sito attivo. Questo evento ferma la trascrizione ma può essere riattivato mediante il taglio idrolitico della estremità fuori dal sito catalitico ripristinando la presenza di una estremità 3'OH all'interno del sito catalitico. Esistono dei fattori di allungamento che mitigano le pause e/o contribuiscono al ripristino della trascrizione: **GreA** e **GreB** (procarioti) , **TFIIS** (eucarioti)

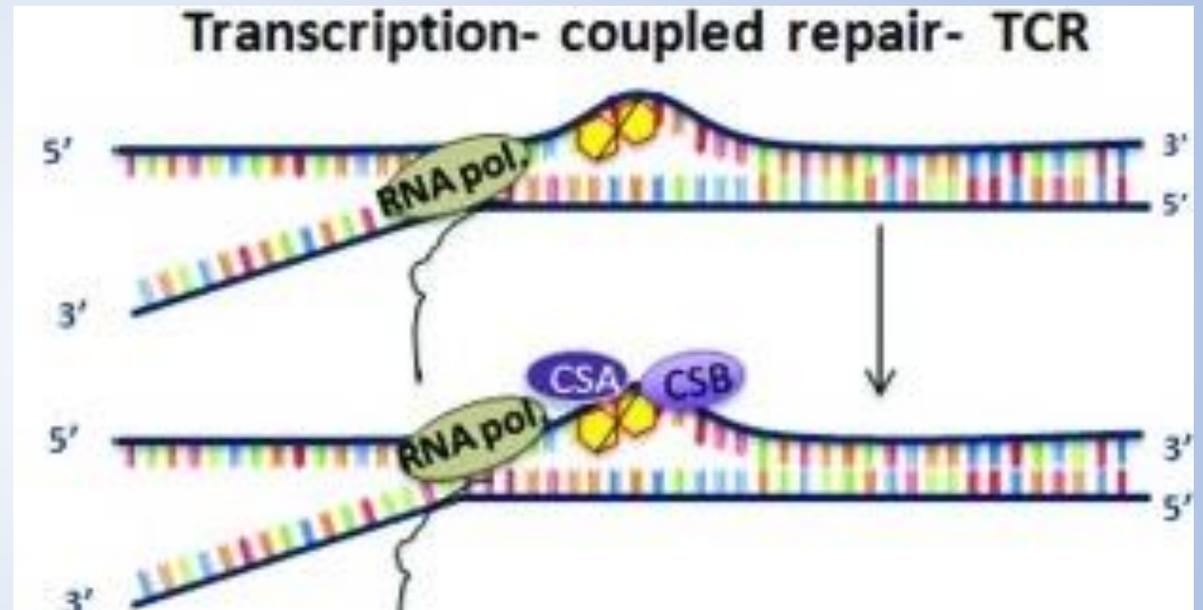


[Michael TMarr¹ Jeffrey WRoberts¹;](#)
[Mol Cell 2000](#)

Fasi trascrizione: Allungamento

L'allungamento non è un processo continuo, essendo spesso rallentato o bloccato:

- La trascrizione si blocca anche quando la **RNA pol incontra danni sul DNA** (provocano una distorsione della doppia elica). Il ripristino della trascrizione avviene dopo che la proteina TRCF (Transcription Repair Coupling Factor) rimuove la RNA pol e recluta degli enzimi di riparazione.



↓

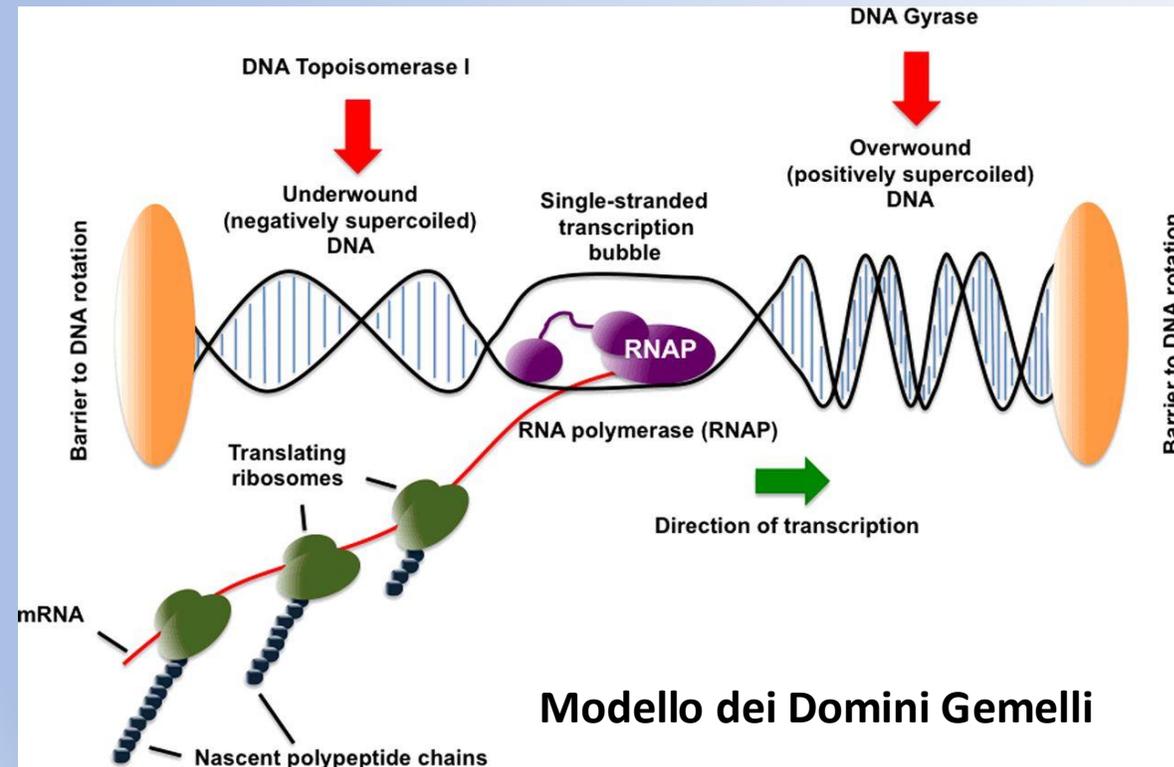
Riparazione (tipo NER)

Fasi trascrizione: Allungamento

- La **topologia del DNA** è un importante fattore che regola anche l'allungamento del RNA.
- L'avanzamento della RNA pol provoca lo spostamento della bolla di trascrizione che apre il doppio filamento d'avanti e lo richiude dietro.

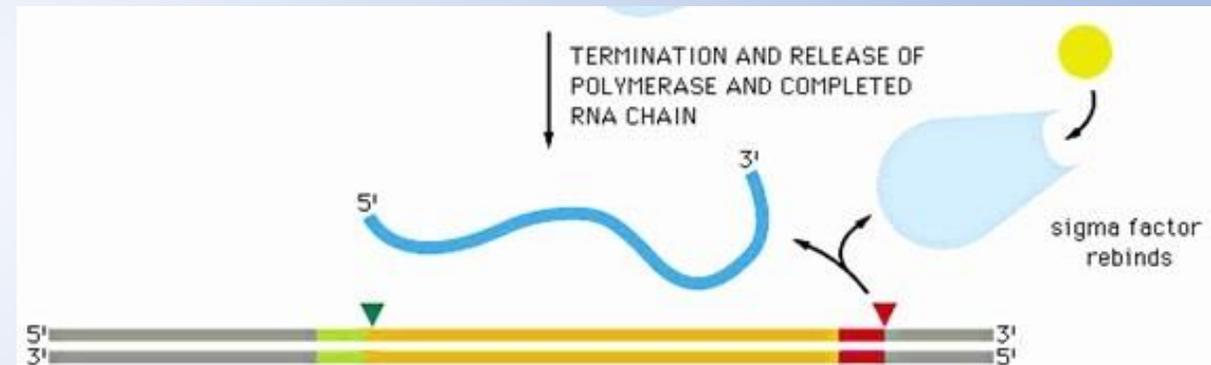
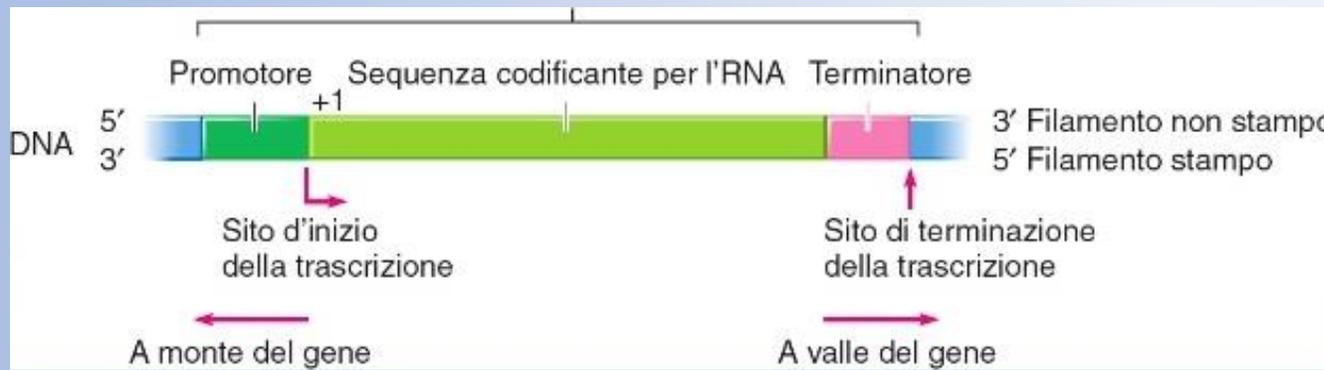
L'avanzamento induce la formazione di superavvolgimenti positivi davanti e negativi dietro: **Modello dei Domini Gemelli (*Twin Domain Model*)**

Ogni 10 nt di polimerizzazione → 1 superavvolgimento positivo a valle e uno negativo a monte della bolla.
I superavvolgimenti positivi d'avanti creano una compattezza che blocca l'avanzamento della RNA pol.



Fasi trascrizione: Terminazione

- Il **terminatore** è la sequenza del DNA che determina la fine della trascrizione provocando la dissociazione della RNA pol e il re-appaiamento dei due filamenti di DNA.

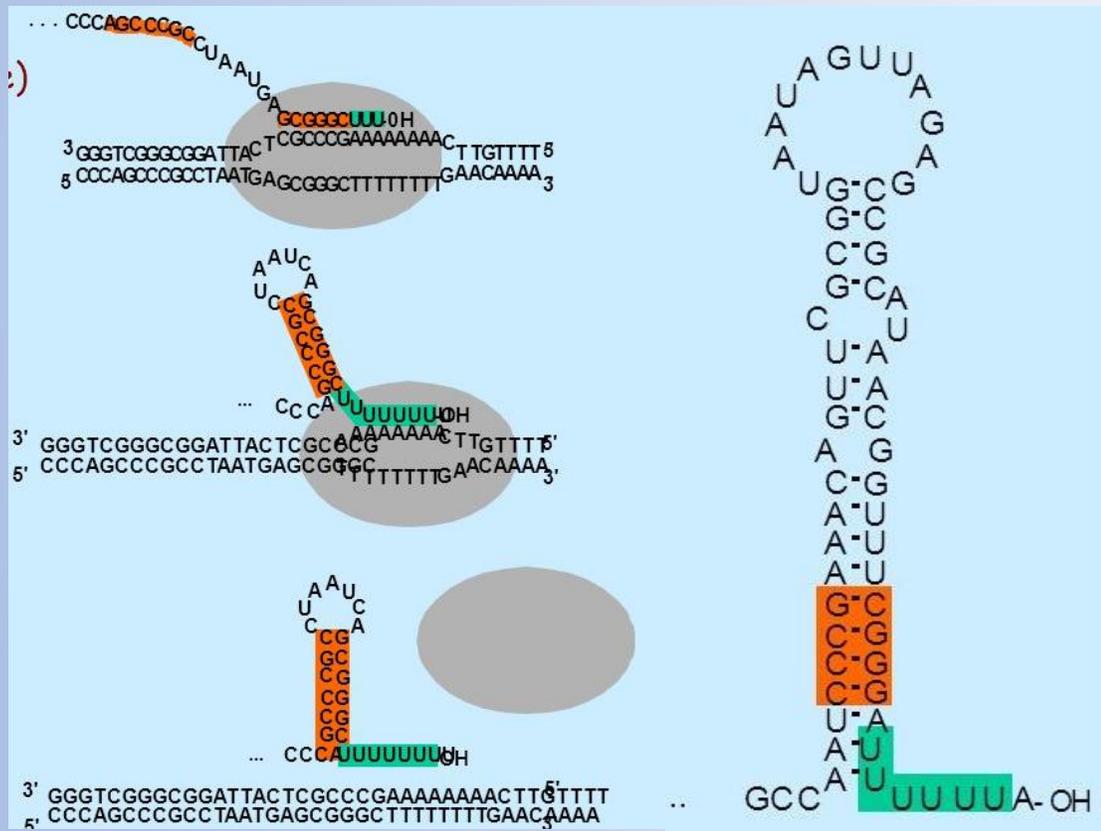


1. Terminatori Intrinseci o Rho-indipendenti

2. Terminatori Rho-dipendenti

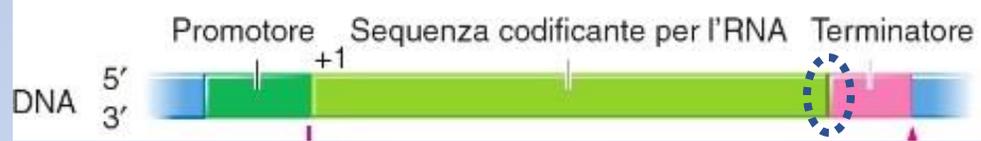
Terminatori Intrinseci

- La sequenza di un terminatore intrinseco è caratterizzato dalla presenza di **sequenze palindromiche ricche in G-C** seguite da un **tratto di 8-9 nucleotidi ricchi in A** (che determina la presenza di una stringa di U al 3' del mRNA)



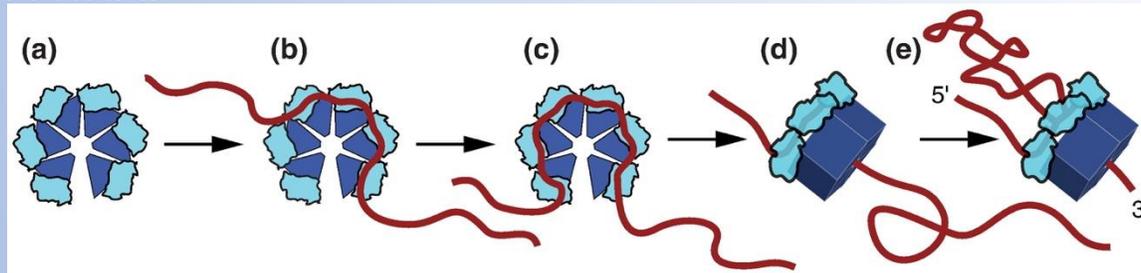
Quando la sequenza viene trascritta la regione palindromica forma una forcina (hairpin) che seguita dalla sequenza ricca in U destabilizza il complesso trascrizionale (i legami idrogeno sono molto deboli). La forcina blocca la RNA pol, favorisce lo staccamento dal RNA e si pensa che contribuisca anche alla separazione dell'ibrido DNA - RNA.

L'importanza della sequenza nucleotidica nella terminazione è stata dimostrata mediante studi di mutagenesi

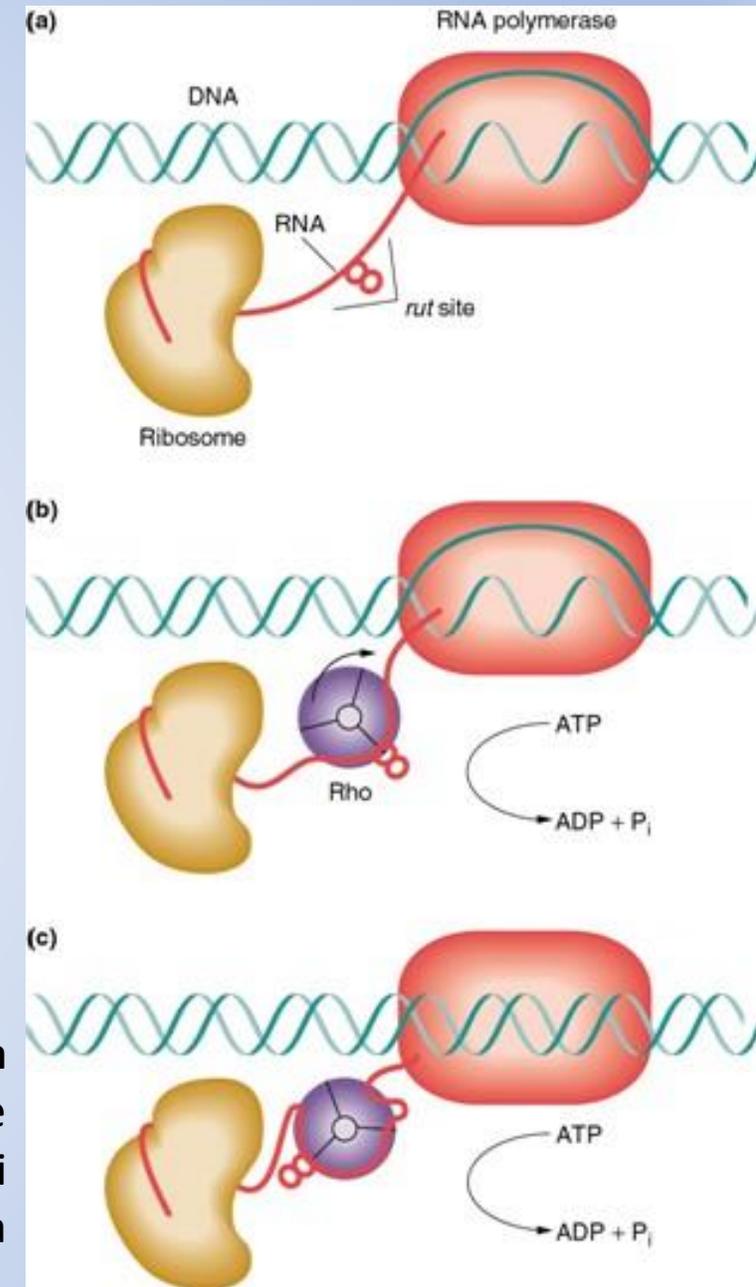


Terminatori Rho - dipendenti

- La terminazione è mediata da una proteina chiamata **Rho (ρ)**.
- Rho si associa ad una **sequenza di 40 nt ricca in citosine (C) del RNA trascritto chiamata «rut» (Rho utilization site)** che si trova «a valle» della sequenza codificante e «a monte» del terminatore.
- Una volta legato si sposta per il RNA in direzione **5'->3'** in modo **ATP-dipendente** fino a raggiungere la RNA pol nella zona del terminatore, per poi staccarla grazie alla sua funzione **elicastica** che separa anche l'ibrido DNA-RNA.



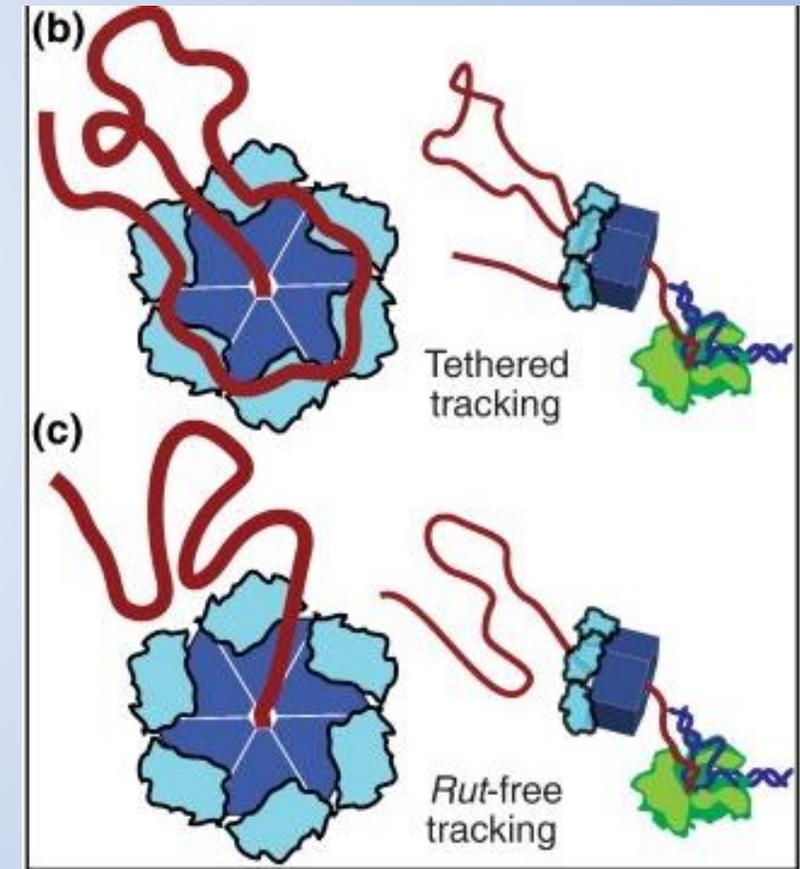
La proteina Rho è organizzata come un **esamero**. Il **RNA nelle sequenze «rut» si lega a l'estremità N-ter di ogni molecola Rho e dopo al canale centrale** (dove risiede l'attività ATPasica) del esamero passando così a formare un **esamero chiuso**. L'idrolisi del ATP proporziona l'energia che permetterà la traslocazione di Rho fino a raggiungere la RNA pol, staccandola.



Terminatori Rho - dipendenti

- Esistono 2 modelli di traslocazione di Rho e terminazione della trascrizione:

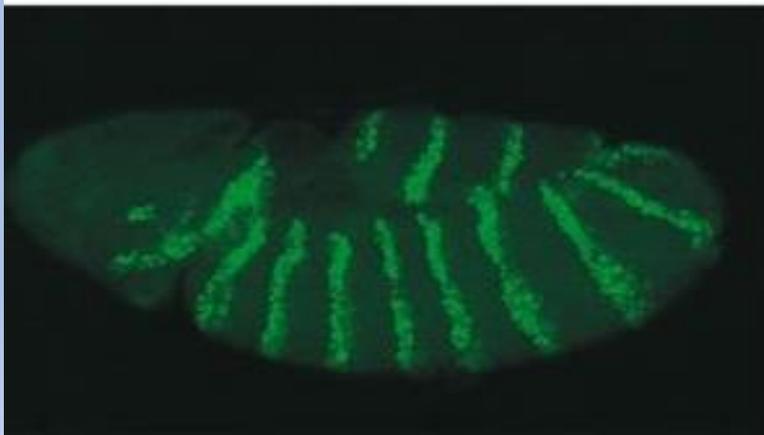
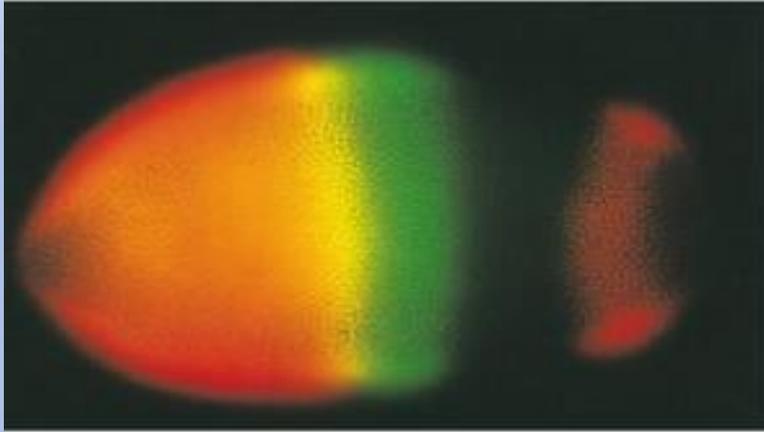
1. **Rho avanza rimanendo l'esamero associato esternamente alle regioni «rut».** Questo comporterebbe un'alterazione strutturale che contribuisce allo staccamento dell'enzima e dissociazione del RNA, che porta alla ri-associazione della doppia elica.
2. **Rho si dissocia della regione «rut» e trasloca fino alla RNA pol creando dei contatti che inducono il distacco e terminazione**



REGOLAZIONE della trascrizione in Procarioti

La regolazione della espressione genica è fondamentale nell'adattamento cellulare ai cambiamenti.

Il processo di trascrizione, principalmente nella fase d'inizio, è uno dei livelli più importanti nella regolazione della espressione genica



Proteine regolatrici della trascrizione

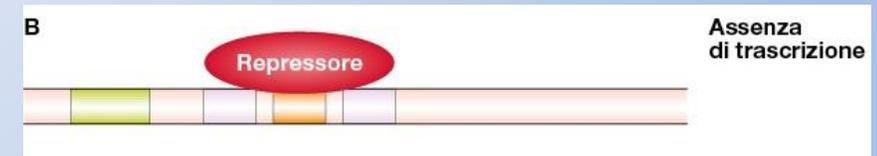
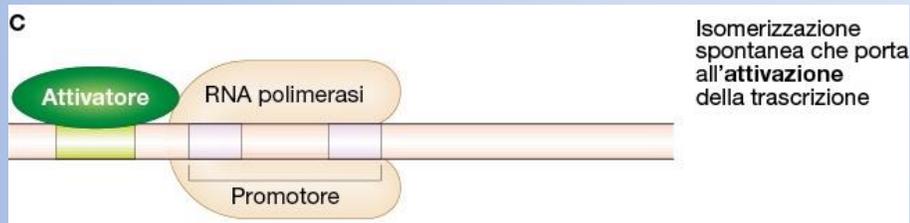
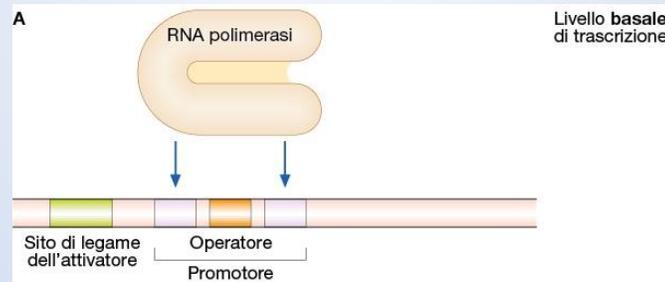
Agiscono legandosi a siti specifici vicini alla sequenza codificante del gene **influenzando il legame della RNA pol al promotore**

- Attivatori

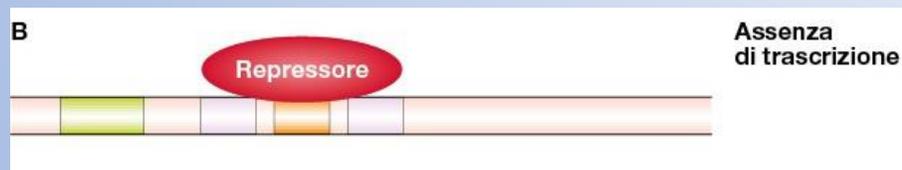
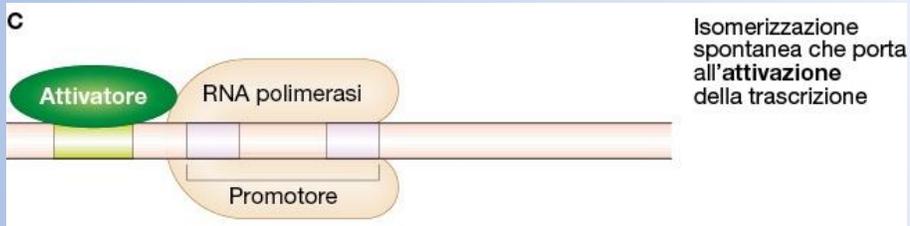
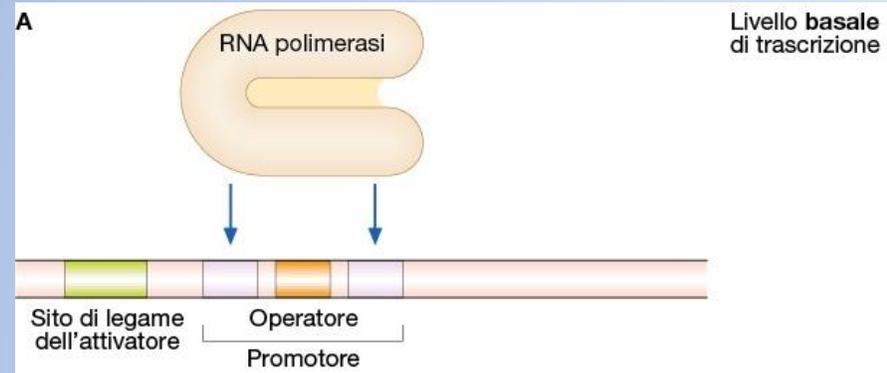
- ✓ Favoriscono il legame con il promotore
- ✓ Inducono una regolazione positiva contribuendo e incrementando il livello di trascrizione

- Repressori

- ✓ Inibiscono il legame con il promotore impedendo la trascrizione
- ✓ Regolazione negativa



Proteine regolatrici della trascrizione



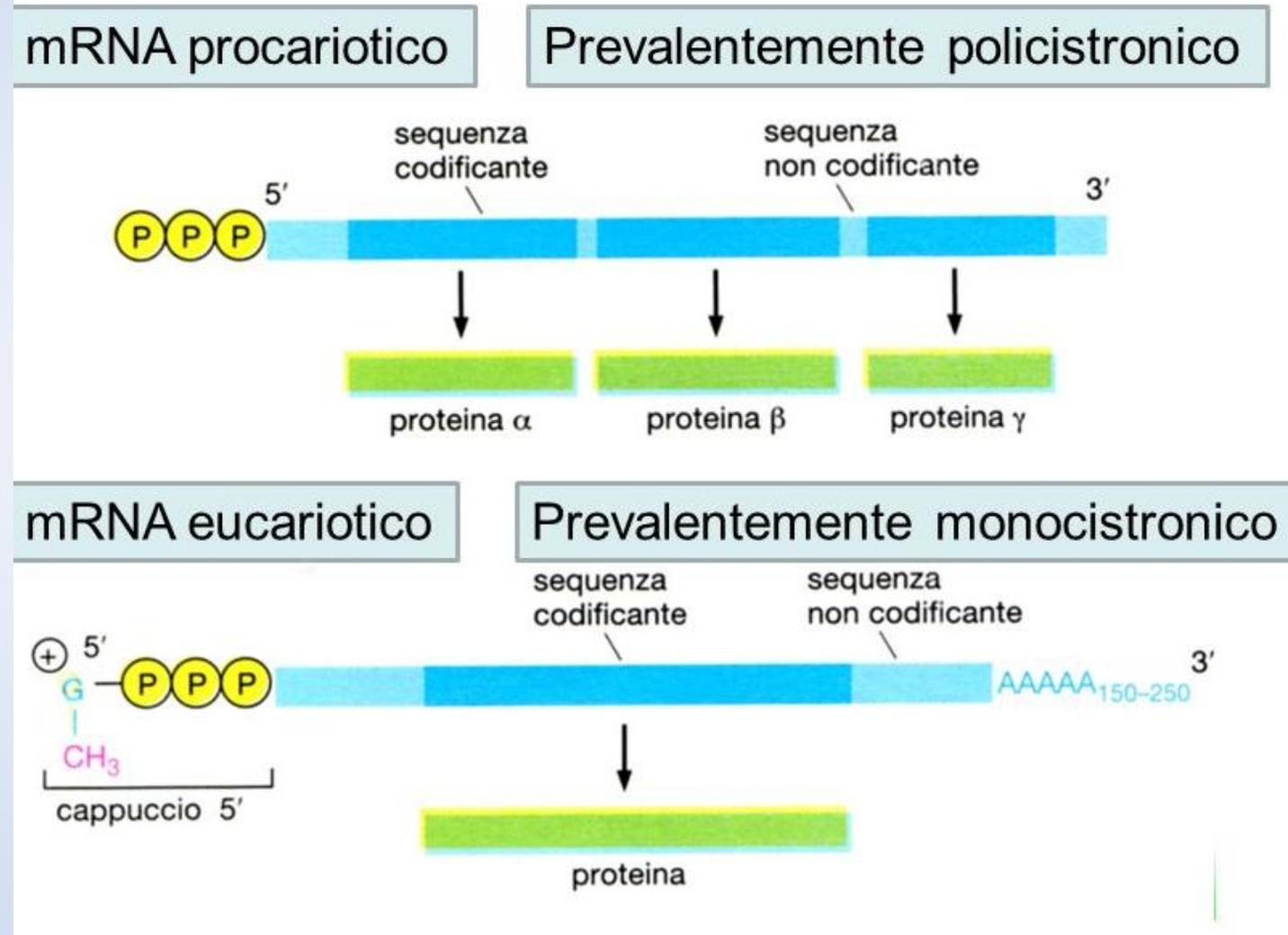
In assenza di proteine regolatrici la RNA pol si lega in modo «debole» al promotore dando luogo ad una espressione genica costitutiva basale

L'**attivatore** ha 2 domini di legame: uno interagisce con la *RNA pol* e l'altro con una *sequenza sul DNA «a monte» del promotore*.

Il **repressore** si lega ad una sequenza del DNA chiamata **Operator** che si trova al interno o adiacente al promotore e non permette il legame o avanzamento della RNA pol

Espressione genica Operoni

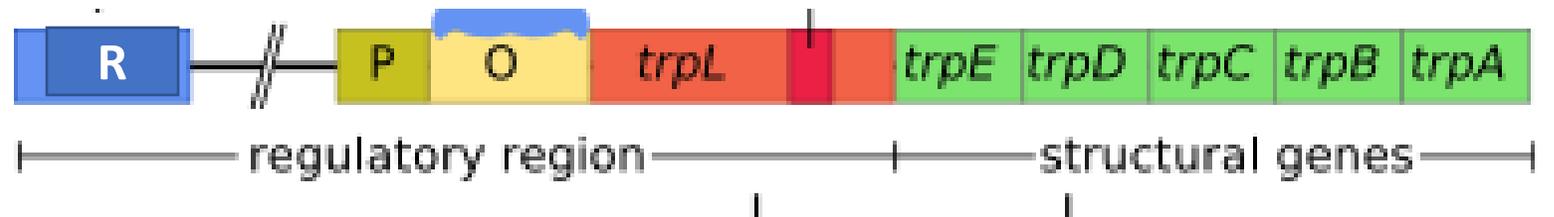
- Il genoma dei procarioti è organizzato in Operoni.
- Un **Operone** contiene un gruppo di geni adiacenti, di solito correlati funzionalmente, che vengono trascritti insieme in una singola molecola di mRNA policistronico da un unico promotore.



Struttura operoni

Gene regolatore che codifica per la proteina regolatrice in *Trans*

Promotore a monte della sequenza codificante capace di legare la RNA pol



Sequenza **operatore** adiacente o sovrapposta al promotore che interferisce con l'associazione RNA pol – promotore

Geni strutturali adiacenti che codificano le proteine

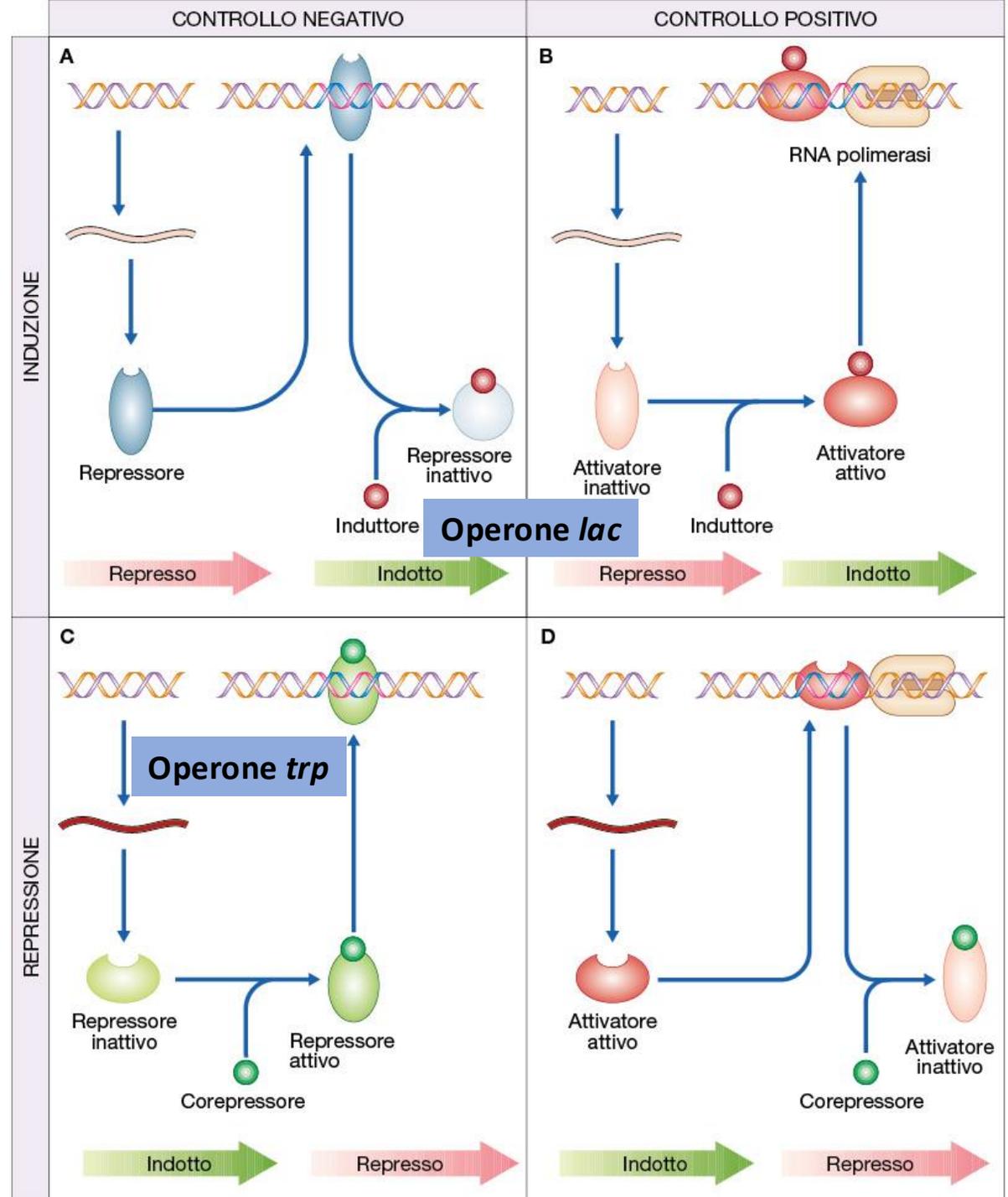
Tipi di Operoni

- **Inducibili**: la cui **trascrizione viene indotta** dalla aggiunta al mezzo di coltura di una molecola segnale o **induttori**
 - Operone lac
- **Reprimibili**: la cui **trascrizione viene repressa** da una molecola segnale **Co-repressore**
 - Operone trp

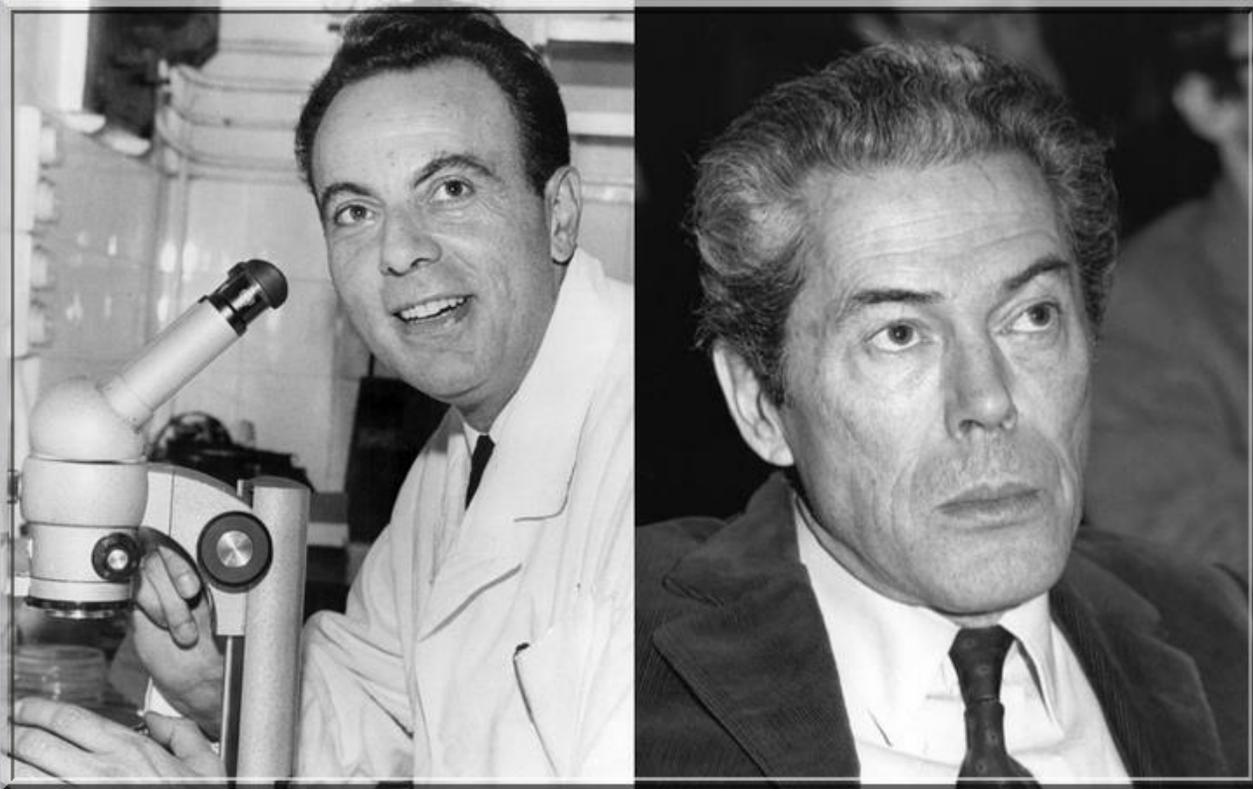
Regolazione degli Operoni: 2 meccanismi

- **Controllo Negativo**: l'elemento *in trans* è un repressore
- **Controllo Positivo**: l'elemento *in trans* è un attivatore

Combinazione tipo operone - regolazione



Esperimenti Jacob e Monod



Francois Jacob

Jacques Monod

Genetisti-microbiologi all'Istituto Pasteur di Parigi

Premio Nobel Medicina 1965 per il loro **lavoro sulla organizzazione e regolazione degli operoni**

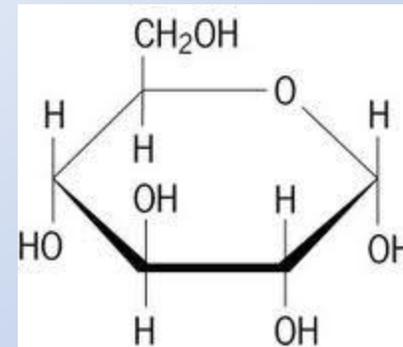
Introducono il concetto di geni regolatori (in trans) che codificano per prodotti (proteine) che controllano altri geni.

Operone *lac*

- Studi in *E.coli* mostrarono che la composizione del mezzo di crescita dei batteri influenzava la crescita cellulare.

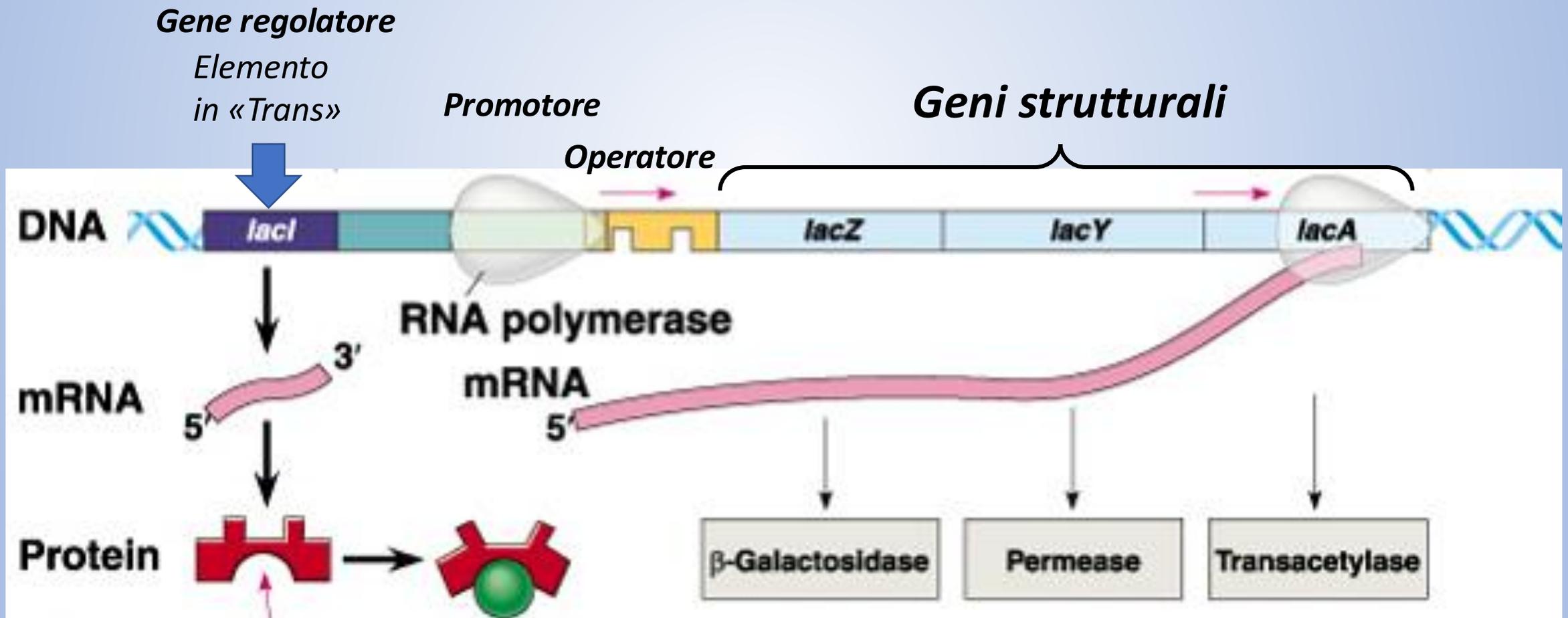
Il mezzo di coltura deve contenere *carbonio* e uno zucchero come fonte di energia. I zuccheri che possono essere usati sono diversi (glucosio, lattosio, etc..) e le proteine necessarie per il loro metabolismo vengono sintetizzate solo quando sono necessarie (in modo di risparmiare energia)

Glucosio



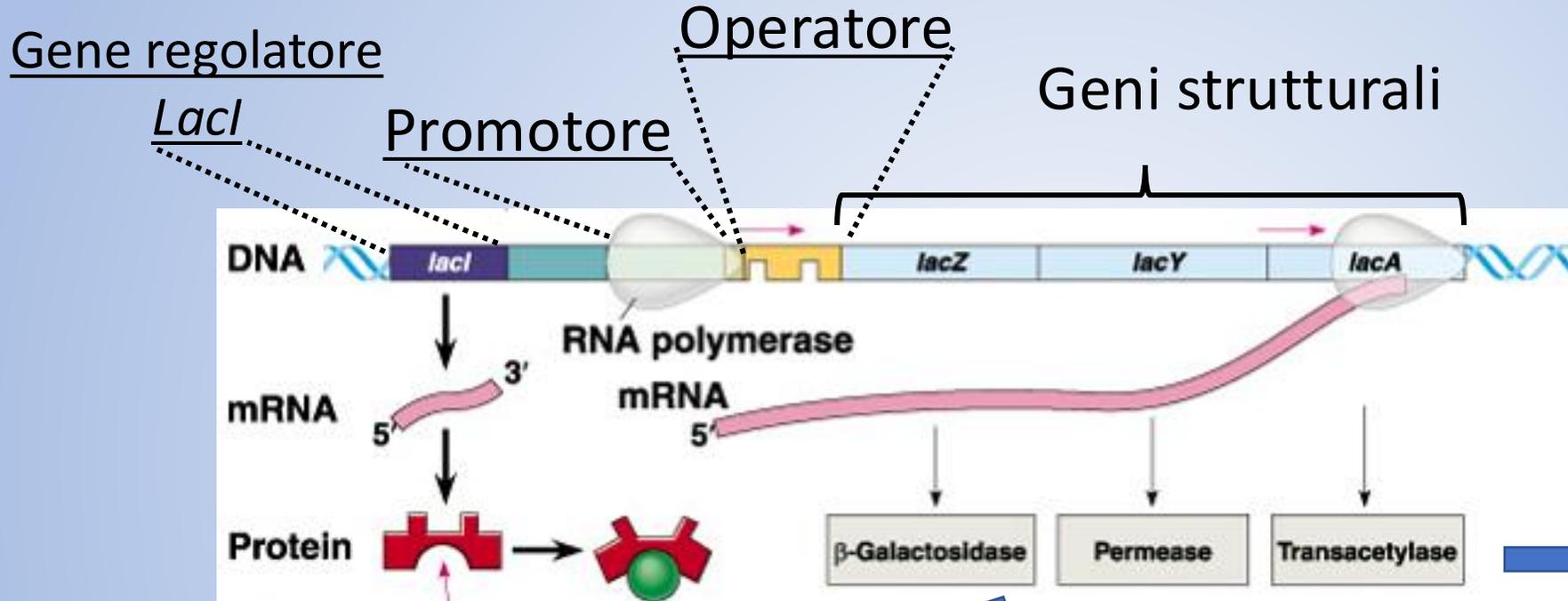
Operone *lac* : Inducibile

Regola la trascrizione dei geni necessari per il metabolismo del lattosio quando il glucosio (zucchero preferito) non è presente

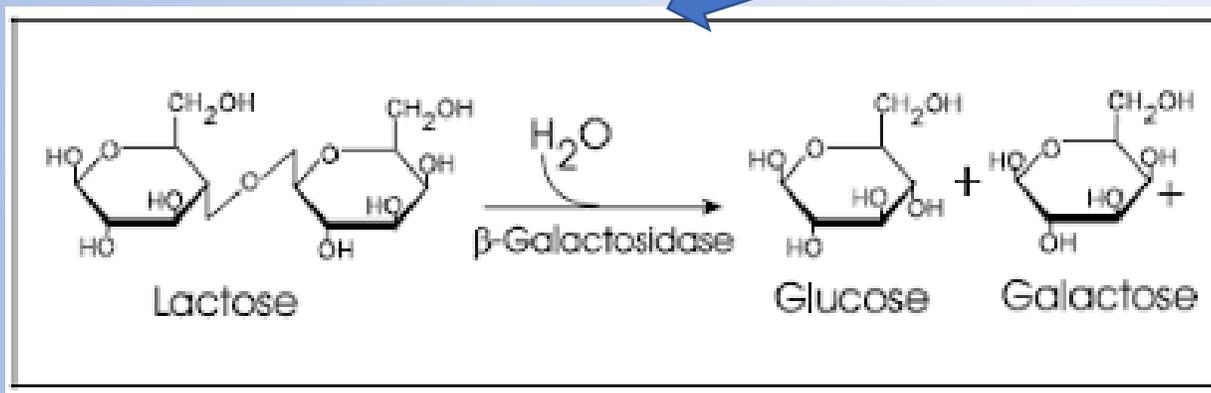


Operone *lac*

<https://www.youtube.com/watch?v=oBwtxdI1zvK>



Trasferisce un gruppo acetilico ai β -galattosidi



Permette l'ingresso del lattosio all'interno della cellula

Operatore Lac è un operone inducibile con 2 meccanismi di regolazione

- ***Regolazione specifica:***

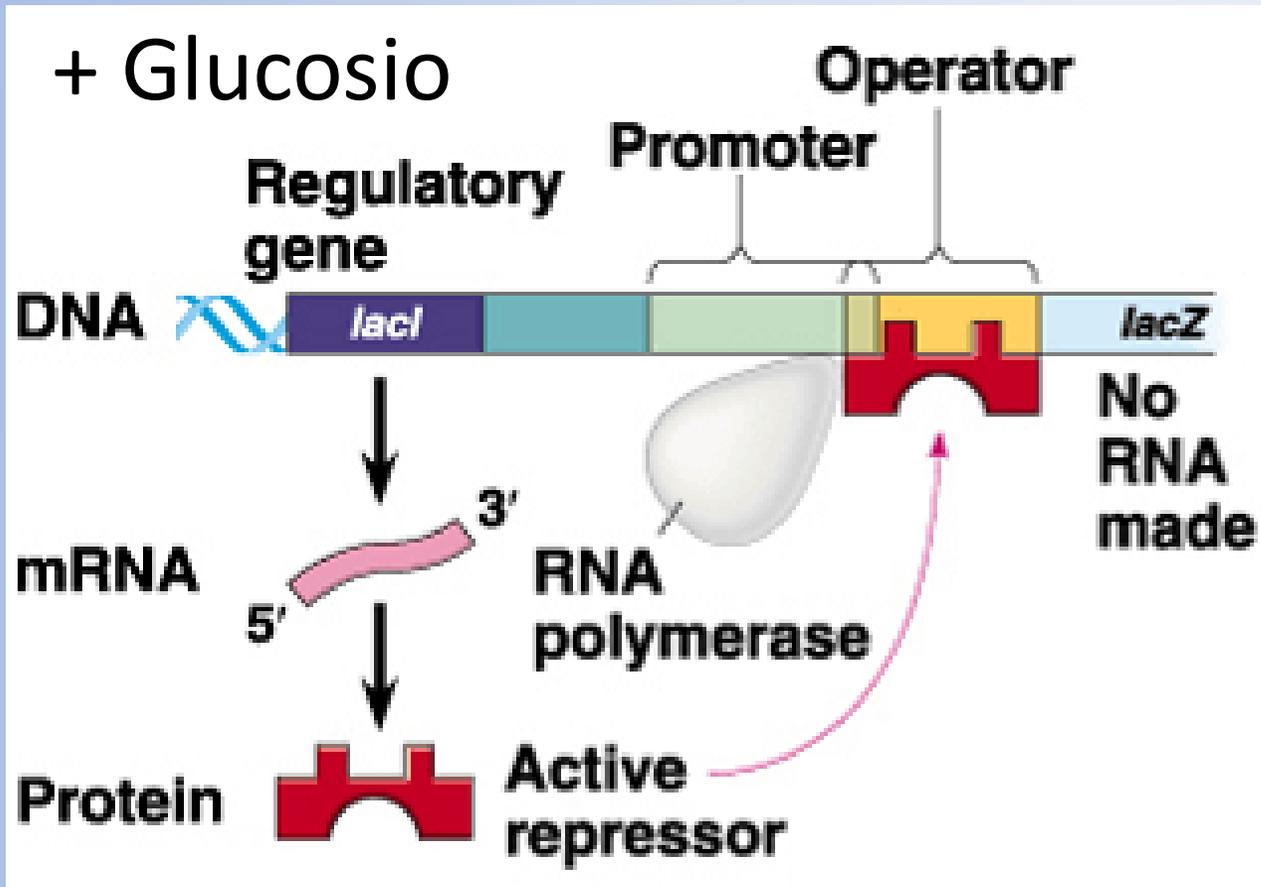
mediante un controllo negativo da parte da un repressore che risponde alla disponibilità di glucosio

- ***Regolazione globale:***

mediante un controllo positivo attraverso una proteina attivatrice che risponde a cambiamenti ambientali più globali come può essere la necessità di energia da parte della cellula

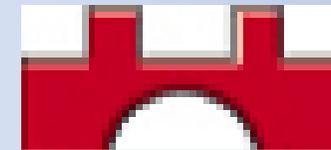
Operone *lac*: controllo negativo o regolazione specifica

Il *gene regolatore in trans* induce la trascrizione di una proteina *repressore*



Riconosce la sequenza **operatore**

2 domini

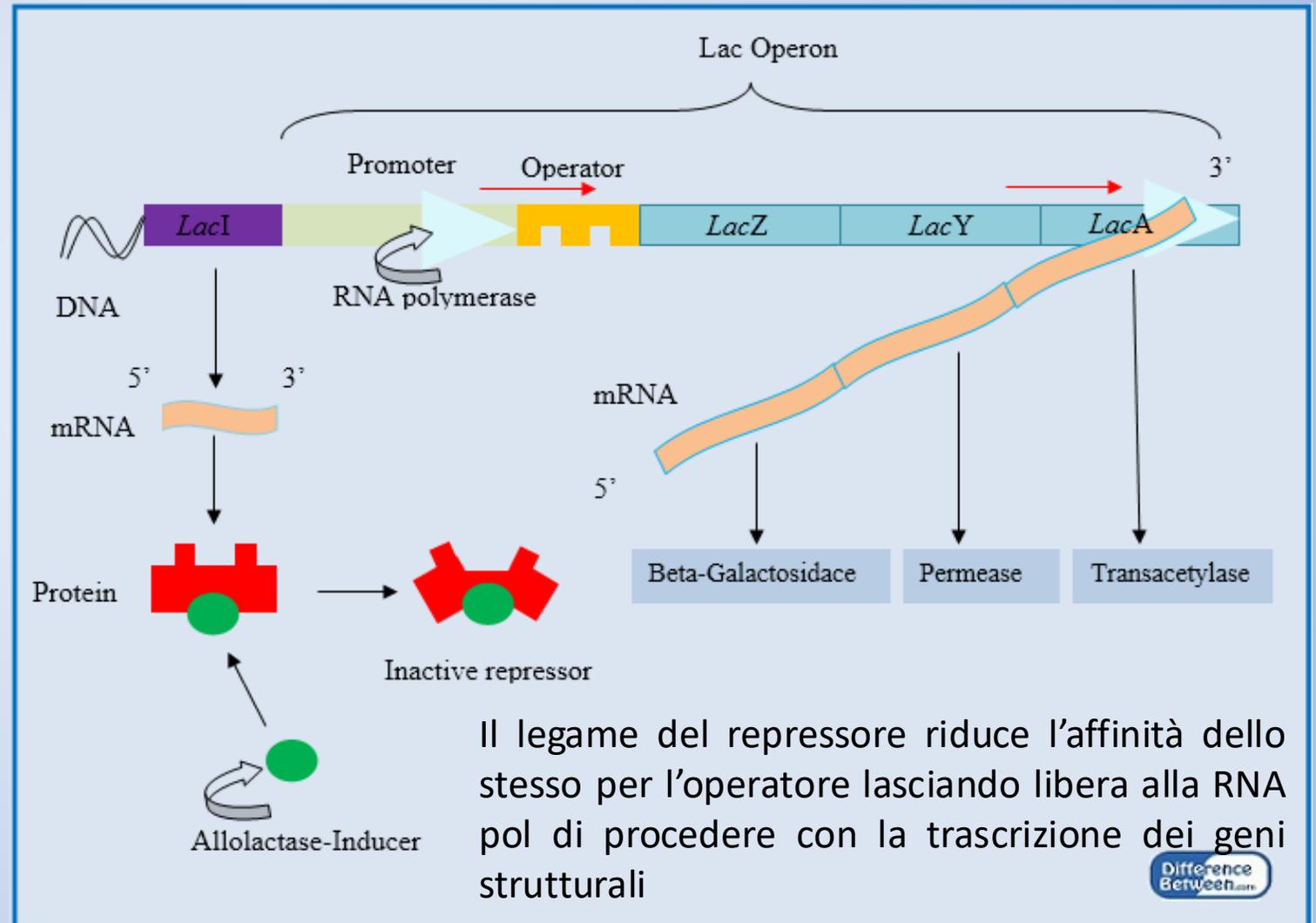
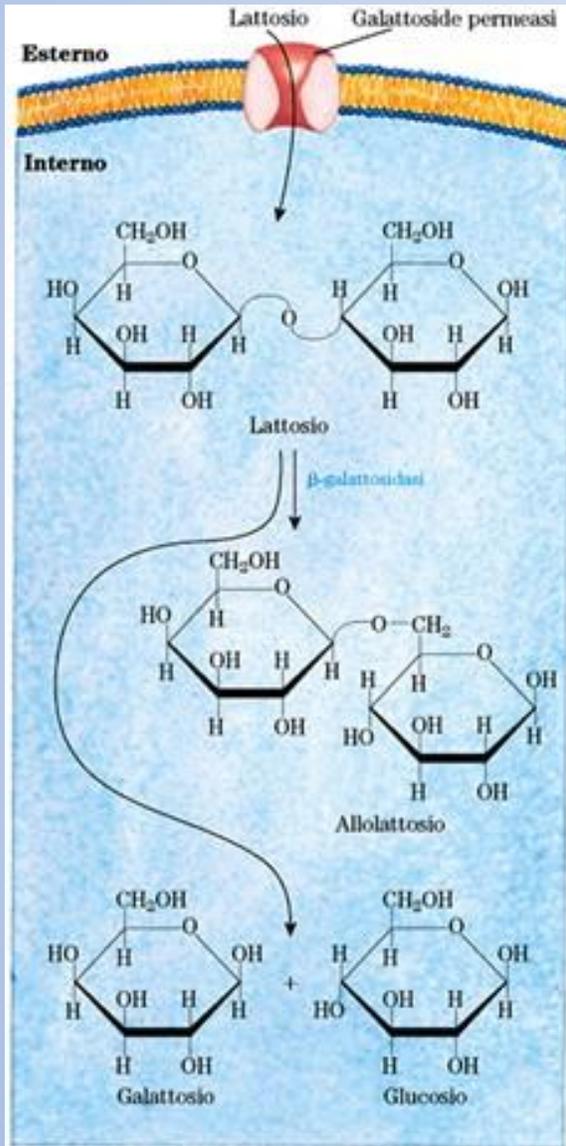


Lega la molecola segnale (**allolattosio**)

Il repressore si lega all'operatore inibendo la trascrizione dei geni strutturali.

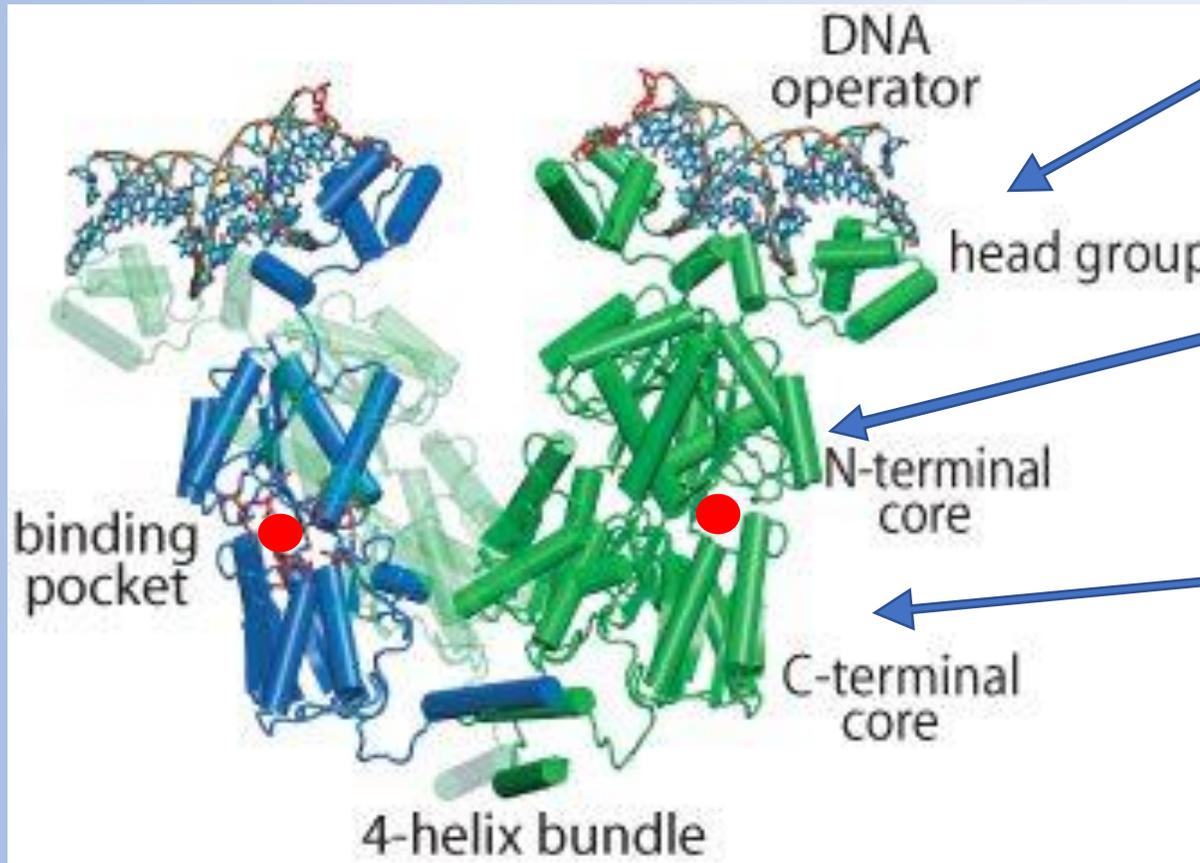
Operone *lac* [+ Lattosio] [↓Glucosio]

Il repressore va inattivato dal analogo del lattosio : allolattosio



Repressore Lac

- Si lega al operatore come dimero, ogni monomero di 38kDa

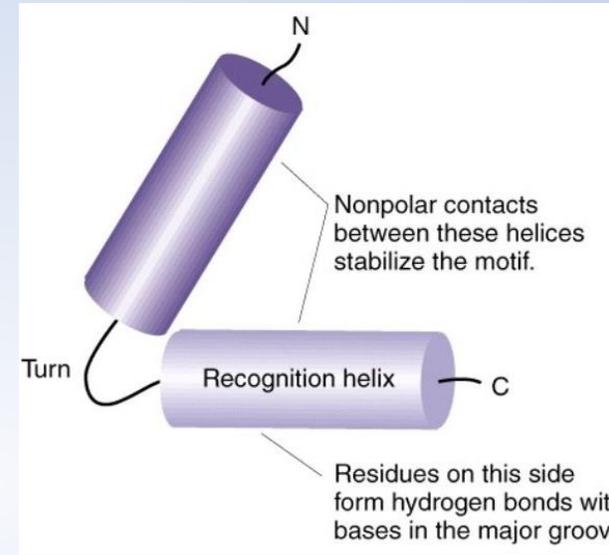
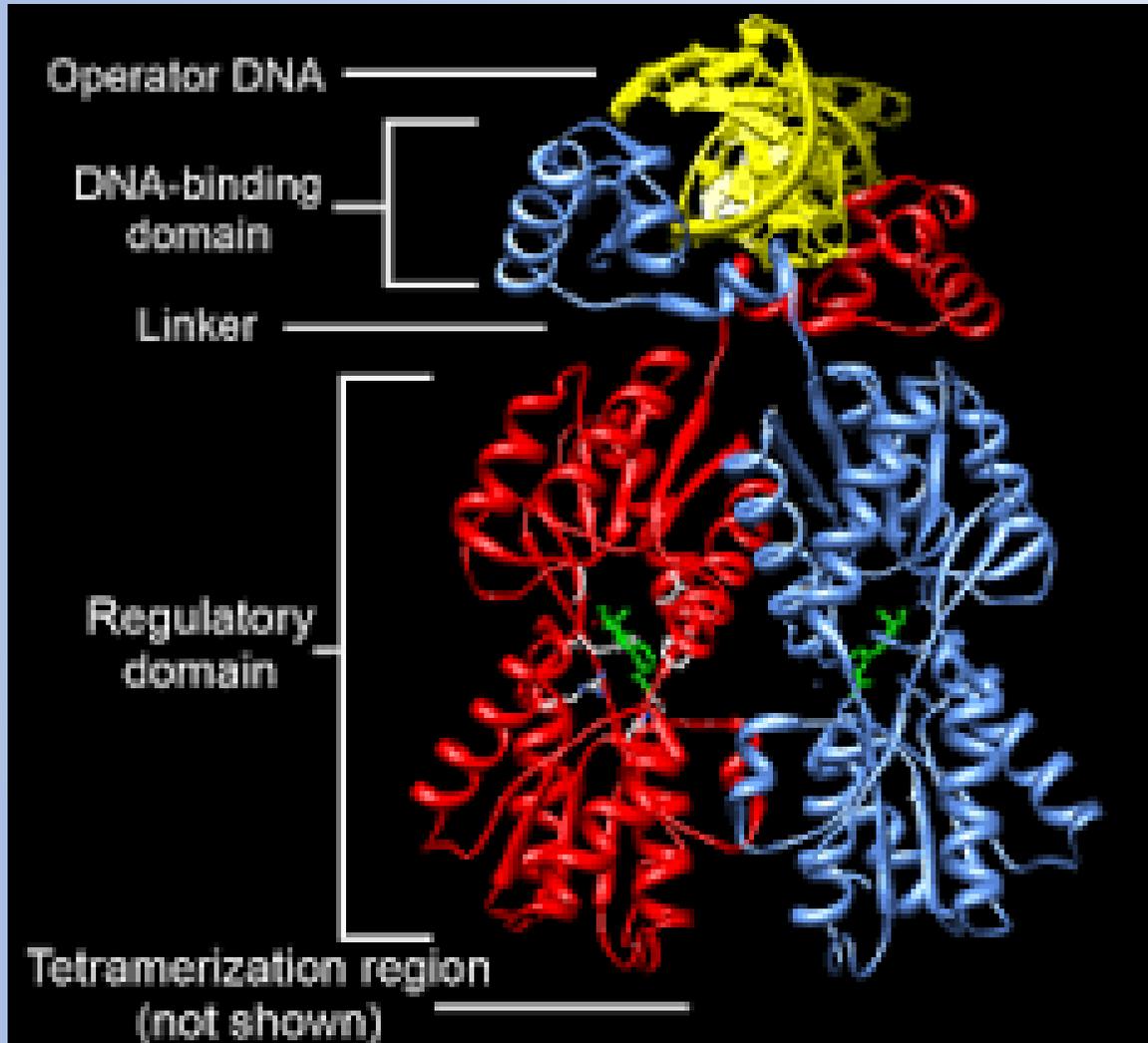


- **Dominio N-terminale o *testa***: lega il DNA

- **Dominio core centrale**: contiene il *sito di legame* per l'**induttore**

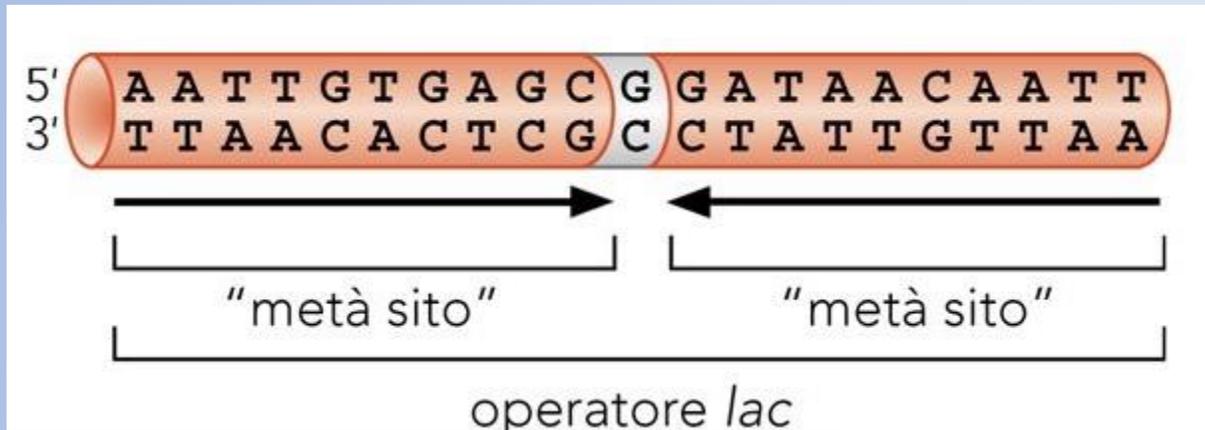
- **Dominio C-terminale** di **oligomerizzazione**, con una α -*elica* implicata nella formazione dei dimeri o tetrameri

Repressore Lac: legame con il DNA (testa)



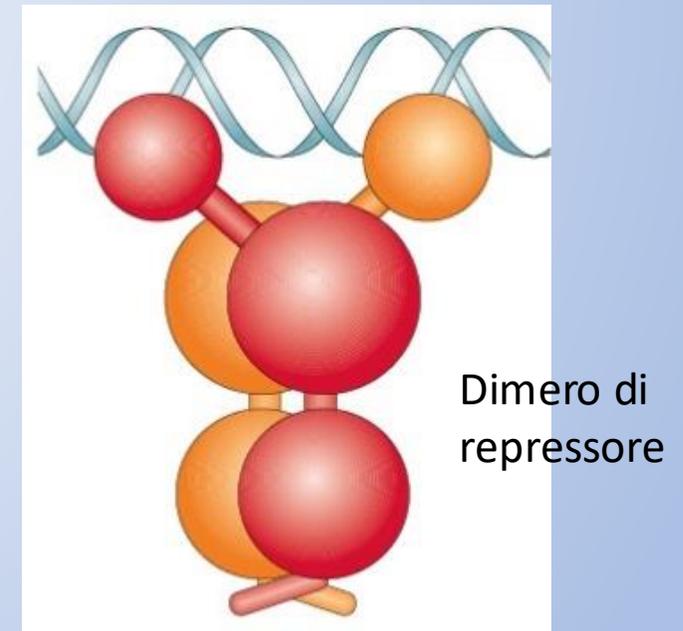
Una struttura secondaria conservata ***elica-giro-elica*** (Helix-Turn-Helix)(N-terminale) è alla base del riconoscimento del DNA da parte del repressore. La elica di riconoscimento (R) si lega specificamente al DNA nel solco maggiore. L'altra elica stabilizza la struttura senza legare il DNA

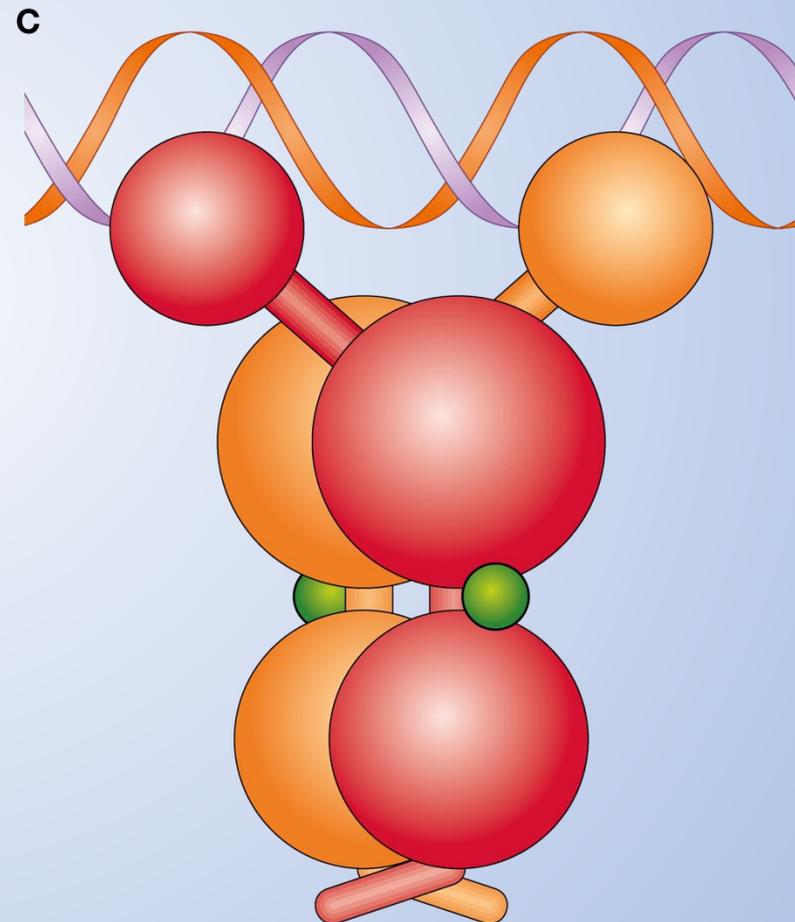
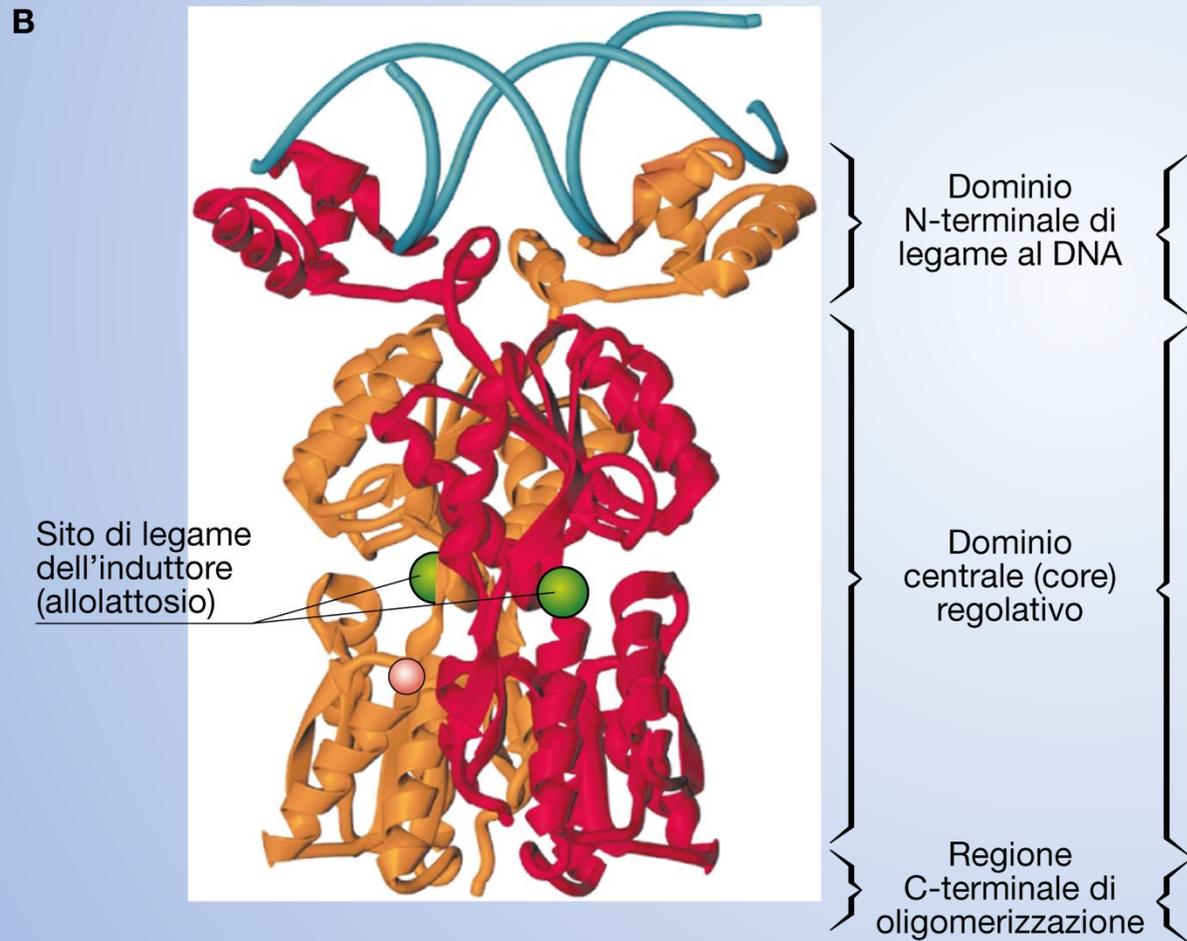
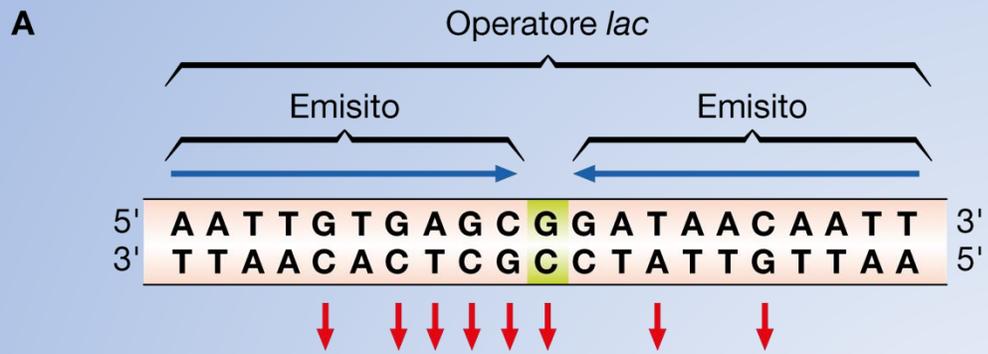
Repressore Lac: legame con l'operatore



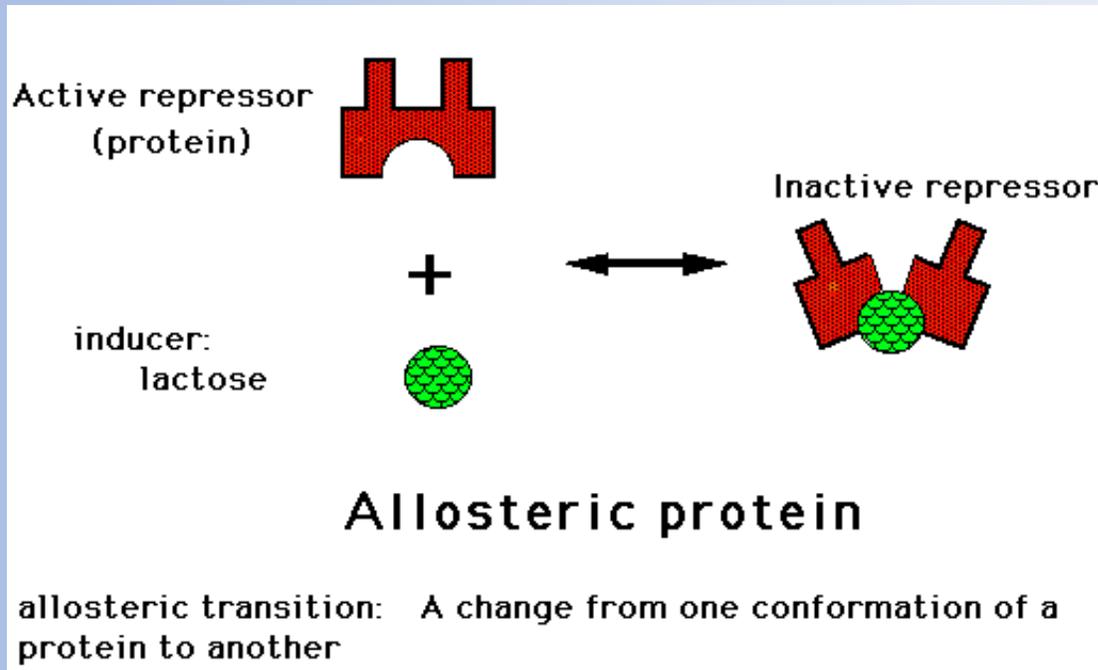
La regione del operatore che lega il repressore è costituita da una sequenza di 21 nt composta da **2 parti ripetute (non perfettamente) e palindromiche**. Ad ogni parte si lega un monomero del repressore attraverso la regione N-terminale o testa

- Il legame di un monomero su metà sito risulta (emisito) in una interazione a **bassa affinità**.
- Quando sono i due monomeri (dimero) a legarsi simultaneamente mediante le teste inserendosi nel solco maggiore di due giri d'elica consecutivi, allora l'interazione diventa ad **alta affinità**





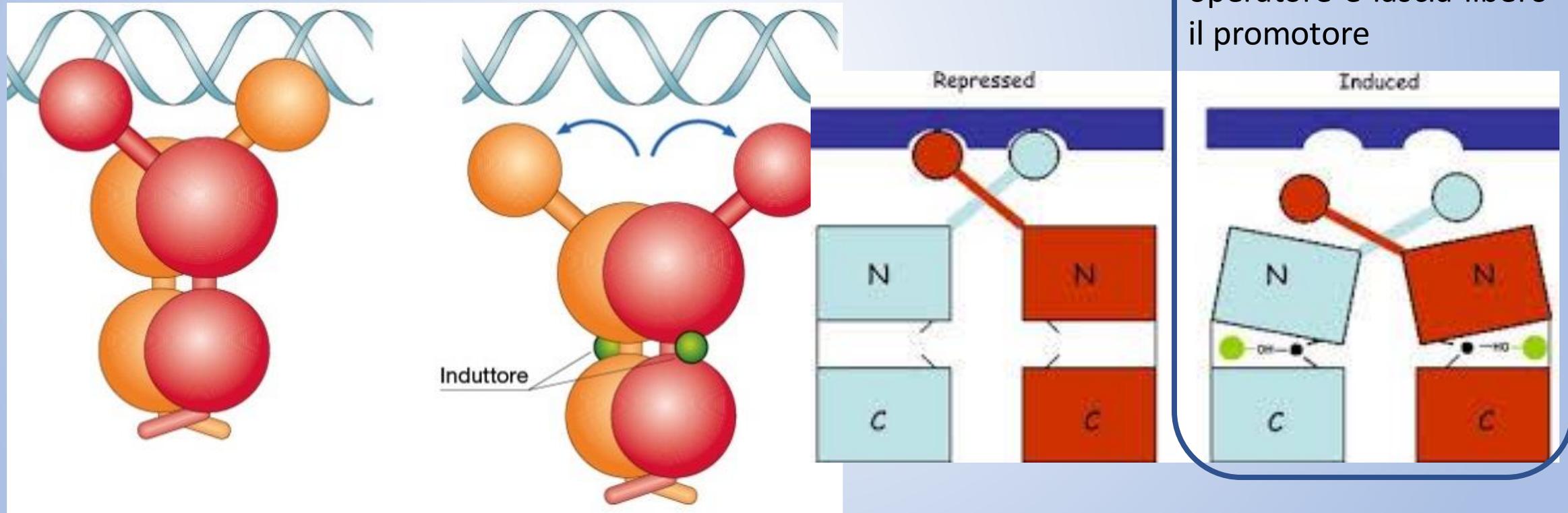
Repressore Lac: legame con l'operatore e attivazione



Quando il repressore si lega all'induttore del Operone (allolattosio..), provocando una modificazione allosterica del repressore nella quale le teste del dimero si allontanano non legandosi più alla regione specifica sul solco maggiore. Come conseguenza, il repressore non è più in grado di legarsi al operatore liberando il promotore per la RNA pol

Repressore Lac: legame con l'operatore – inibizione/ attivazione

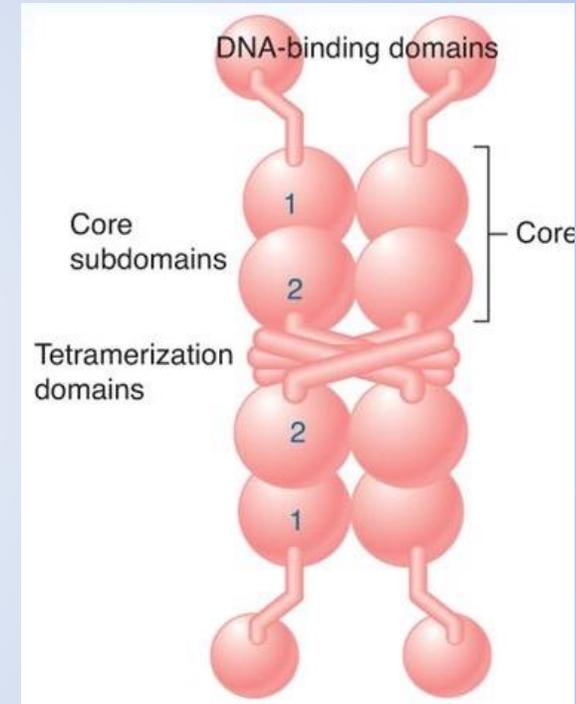
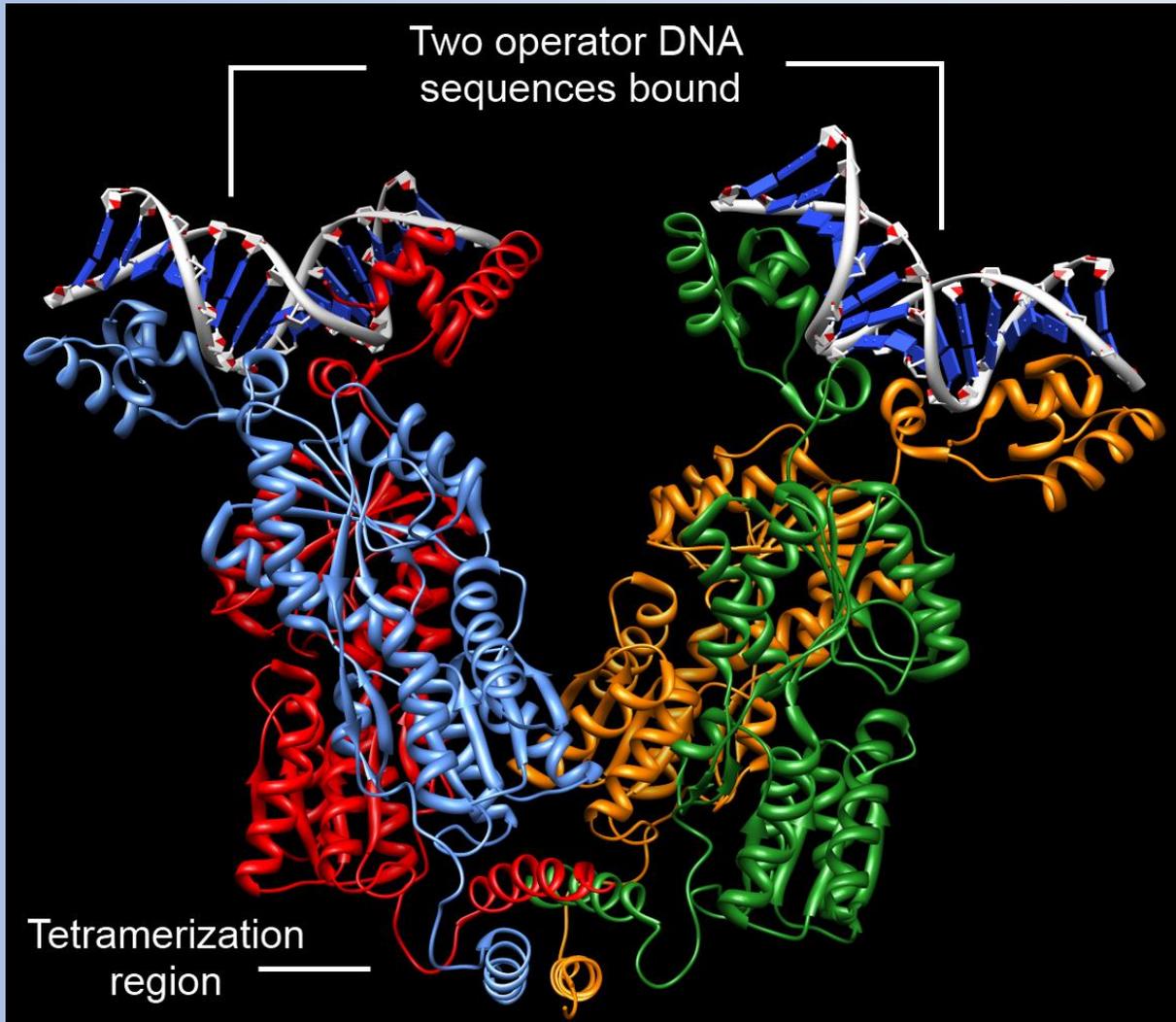
Il legame dell'induttore al repressore induce in questo un cambiamento conformazionale che allontana tra di loro i domini N-ter di legame al DNA, perdendo l'affinità per il DNA



Induce la trascrizione perché il repressore non si può legare al operatore e lascia libero il promotore

Repressore Lac: tetramero

- Il repressore lavora in forma tetramericata quando lega 2 siti operatori nel DNA



Il tetramero si forma e mantiene attraverso la formazione di un fascio di 4 α -eliche, ciascuna appartenenti a un monomero del repressore.

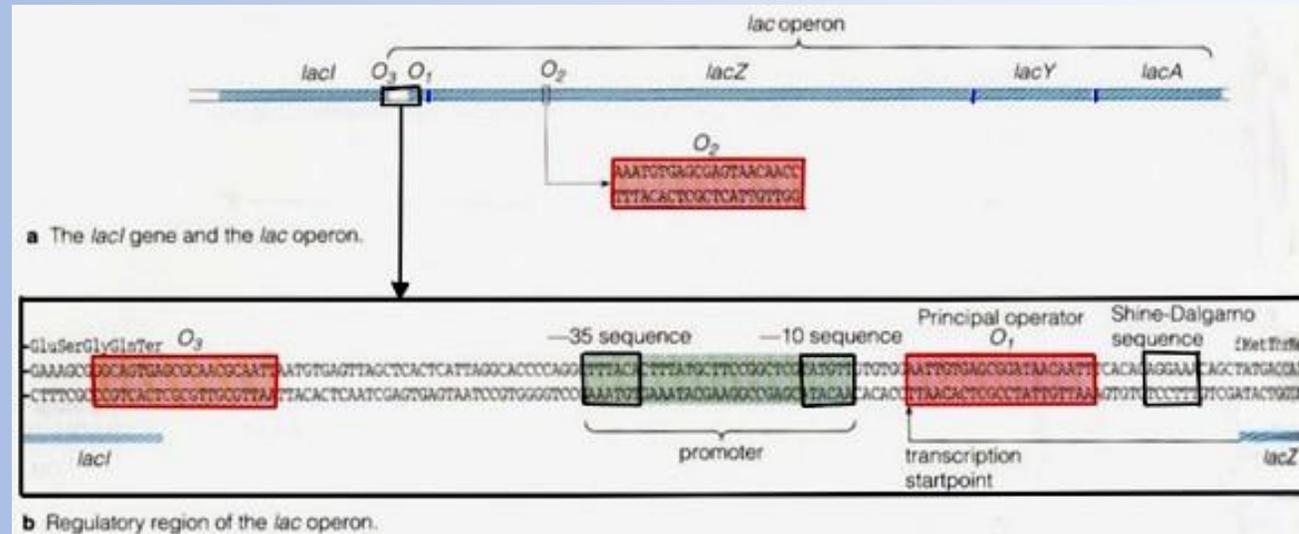
Operatore Lac: sequenze O_1 , O_2 e O_3



L'operatore Lac è costituito da 3 sequenze O_1 , O_2 e O_3

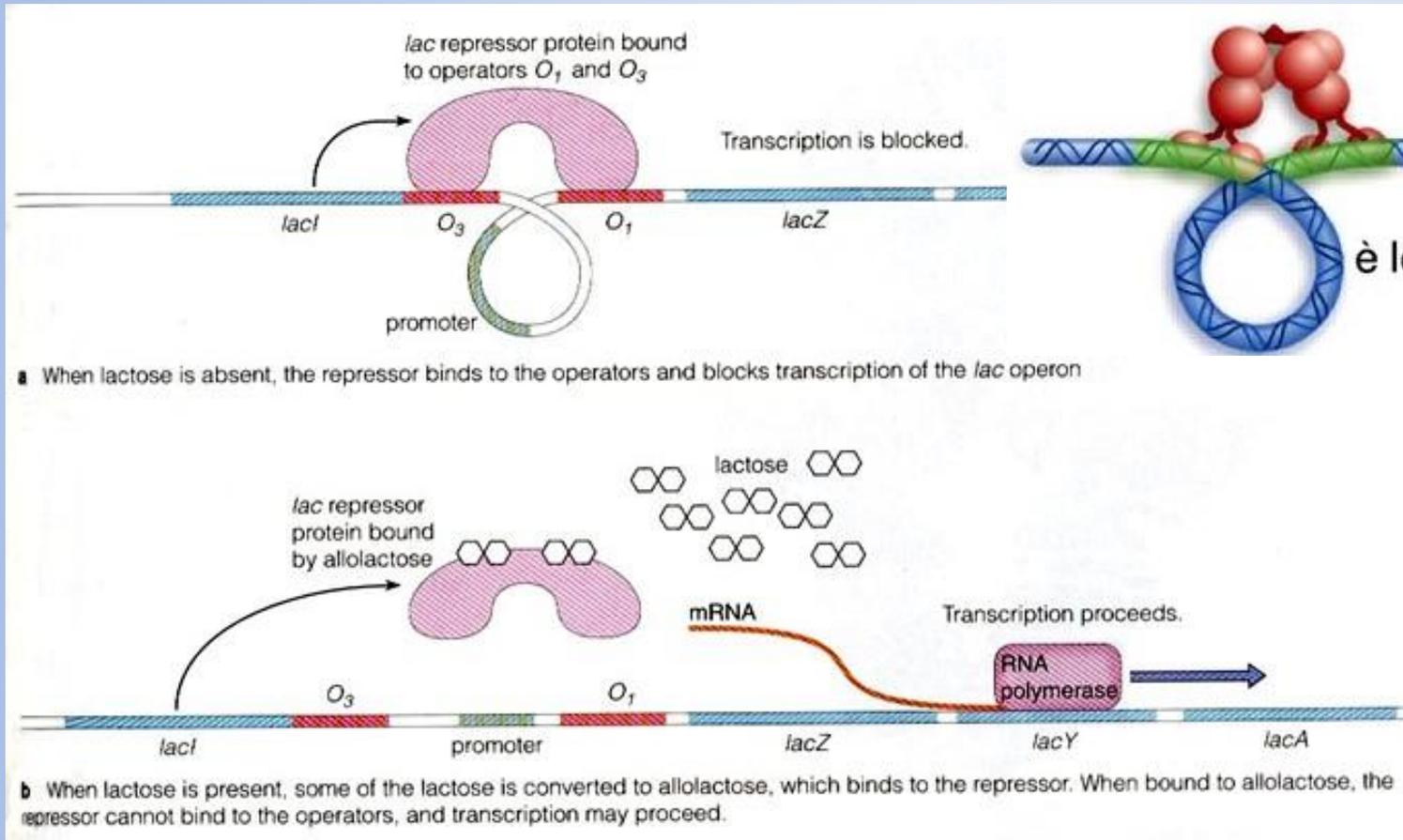
L'operatore O_1 è quello principale posizionato «a monte» del gene *lacZ*. Ha la più alta affinità per il repressore.

O_3 si trova 83 pb «a monte» di O_1
 O_2 si trova 410 pb «a valle» di O_1



Il repressore tetramericco lega il sito primario O_1 e uno dei 2 siti a bassa affinità. Questo secondo legame influenza l'efficienza di repressione.

Operatore Lac: sequenze O_1, O_2 e O_3



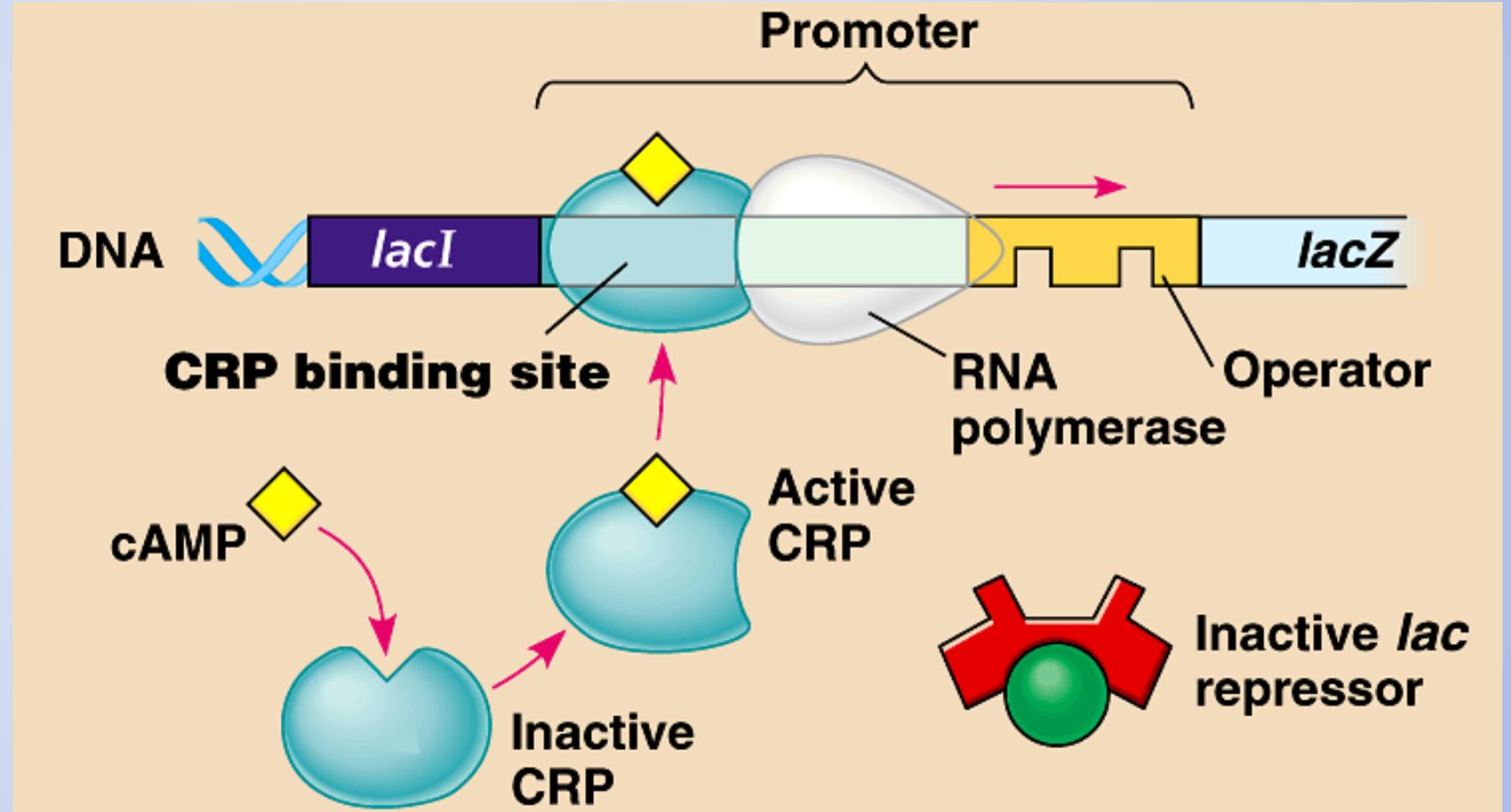
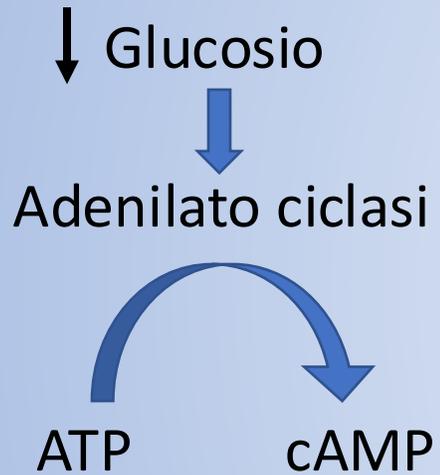
Il repressore tetramerico legandosi a O_1 e un altro $O_{(2-3)}$ secondario porta alla **formazione di un ansa del DNA** (90-400pb) conseguenza del avvicinamento delle sequenze del operatore. Questa conformazione **rende il promotore inaccessibile alla RNA pol.**

Quando l'induttore lega il repressore, induce la modificazione allosterica che porta alla liberazione del operatore rendendo il promotore accessibile alla RNA pol e permettendo la trascrizione

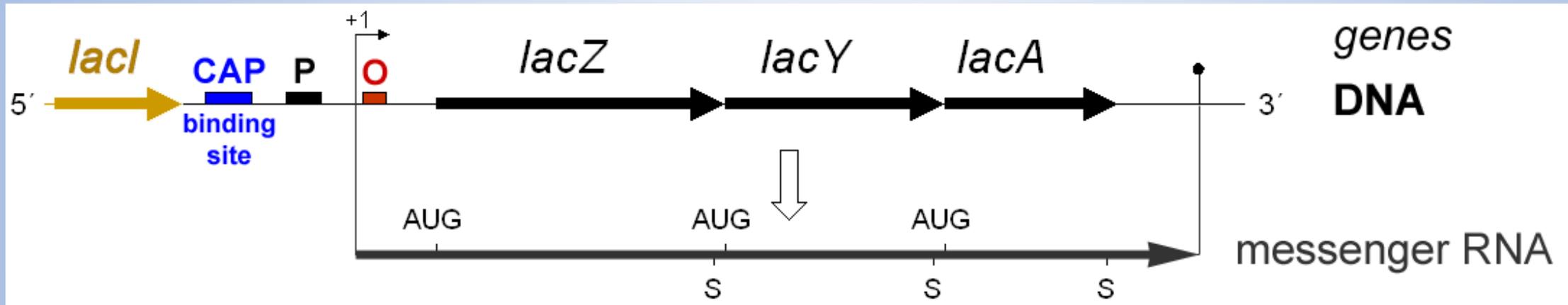
Operone *lac*: controllo positivo o regolazione globale _Proteina CAP (gene Crp)

- In assenza di glucosio (preferito come sorgente di energia) il batterio si adatta attivando uno o più operoni che permettono l'utilizzo di altri zuccheri come il lattosio.
- Questa regolazione si chiama ***Repressione da catabolita*** ed è ***controllata dai livelli di cAMP (adenosina monofosfato 3'-5' ciclico)*** nella cellula e attraverso la proteina **CAP** (attivatrice dei geni catabolici o «catabolite activation protein»), chiamata anche **CRP**.

Attivazione proteina CAP (o CRP) da cAMP



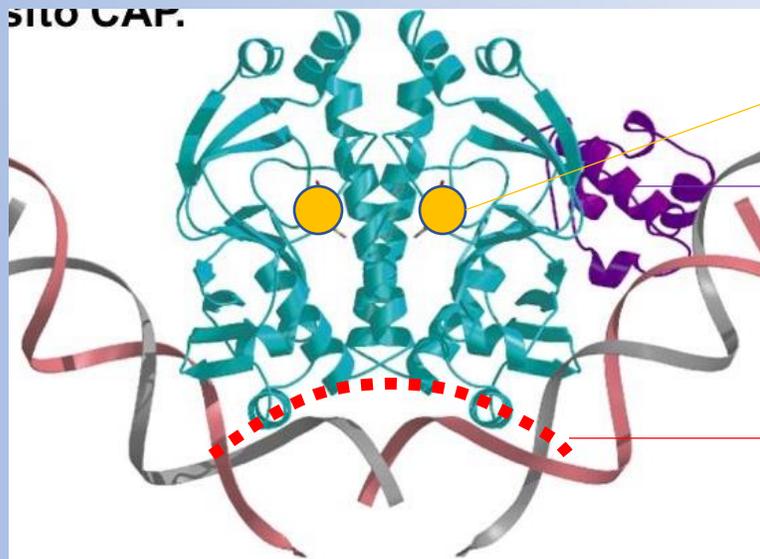
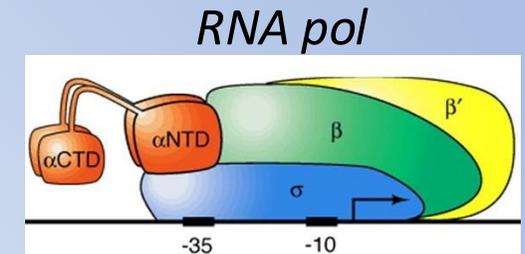
Regolazione da CAP-cAMP_binding site



A monte della sequenza promotore – operatore esiste una sequenza riconosciuta da CAP alla quale si lega solo se la proteina è associata al cAMP

Struttura CAP

- Dimero composto da 2 unità di 22.5 kDa ciascuna
- Ogni monomero è costituito da:
 - un dominio di riconoscimento (motivo elica-giro-elica, HTH) della sequenza bersaglio sul DNA
 - un dominio di attivazione della trascrizione che interagisce con la RNA pol attraverso il dominio C-terminale (α -CTD)



cAMP

α -CTD della RNA pol

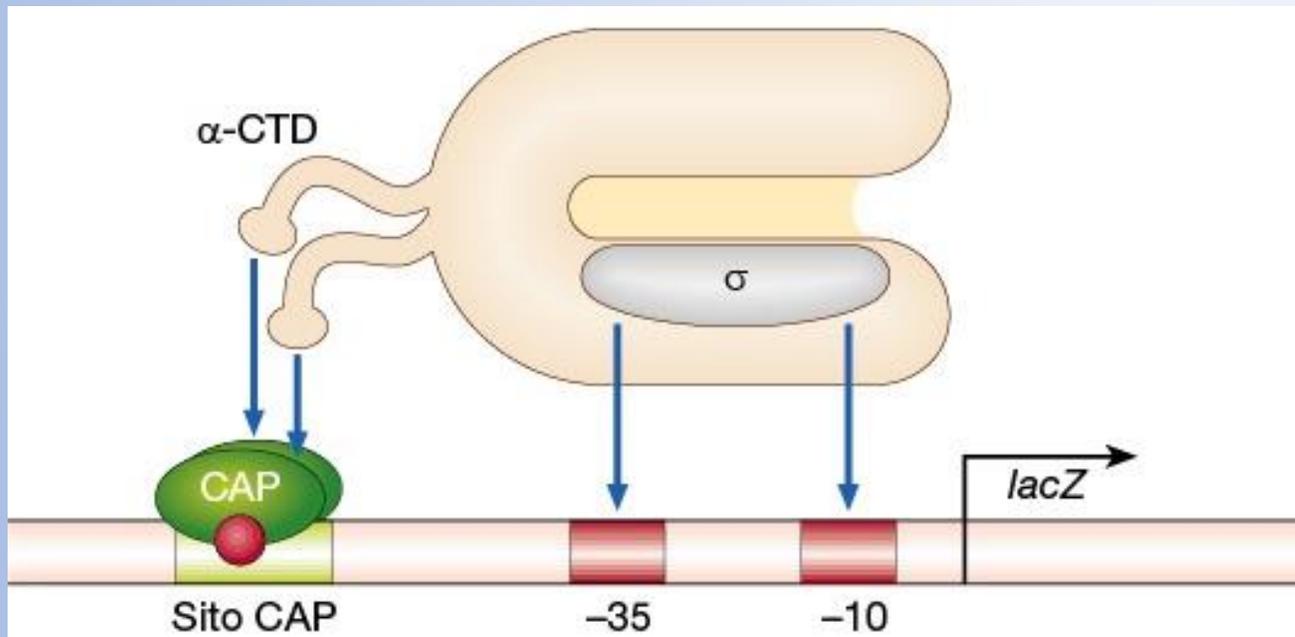
Regione
riconoscimento
sul sito CAP

L'interazione della CAP con il DNA attraverso il motivo HTH **provoca un piegamento della doppia elica di 90° che facilita l'interazione della CAP con la RNA pol**

La proteina CAP si lega al DNA solo dopo attivazione dal cAMP. Questo complesso aumenta la capacità della RNA pol di trascrivere

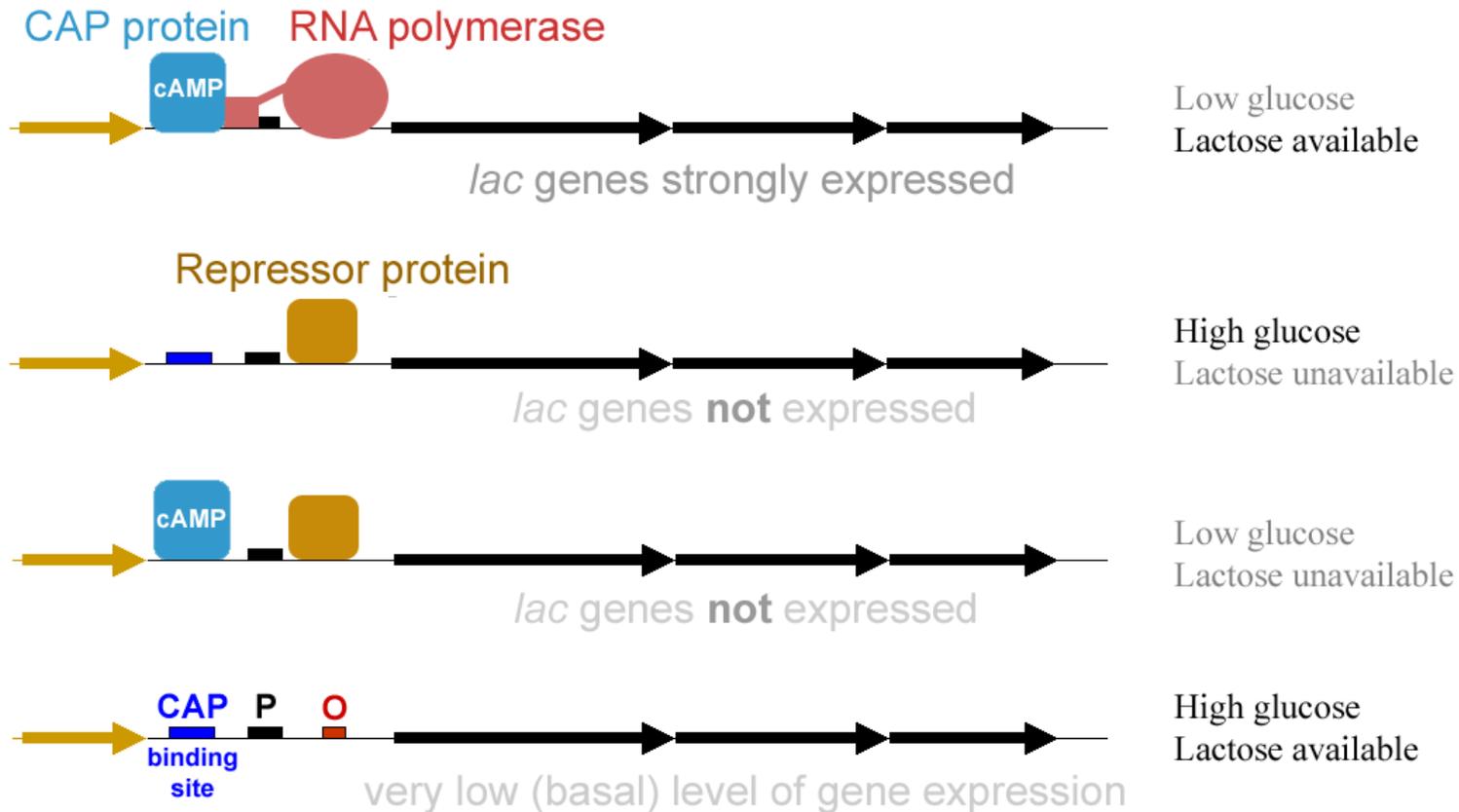
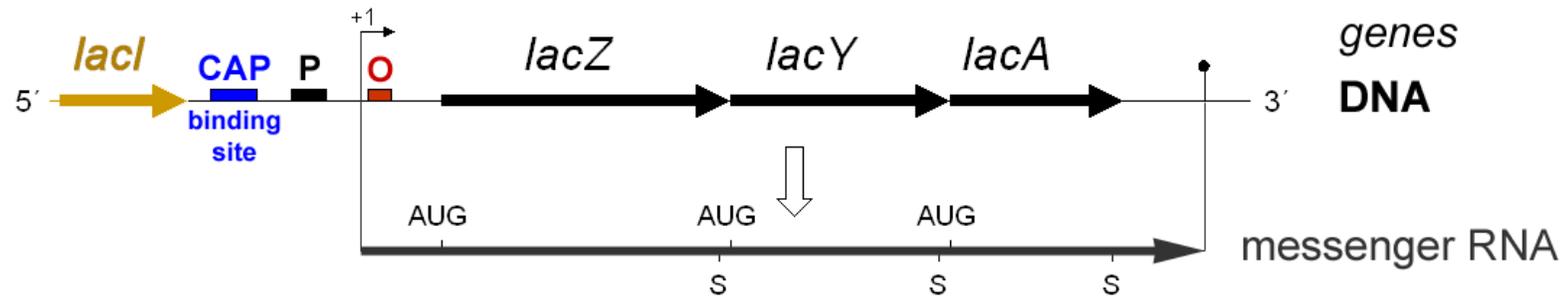
Funzione della proteina CAP

- **Reclutare in modo stabile la RNA pol** in promotori privi della sequenza UP (dove normalmente andrebbe ad interagire il α -CTD) ma che contengono il sito CAP



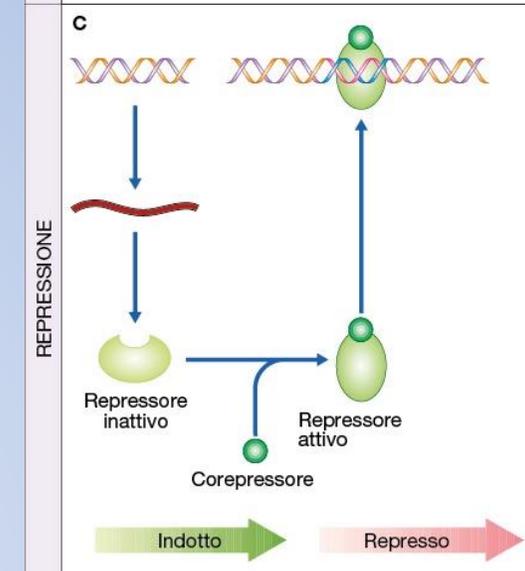
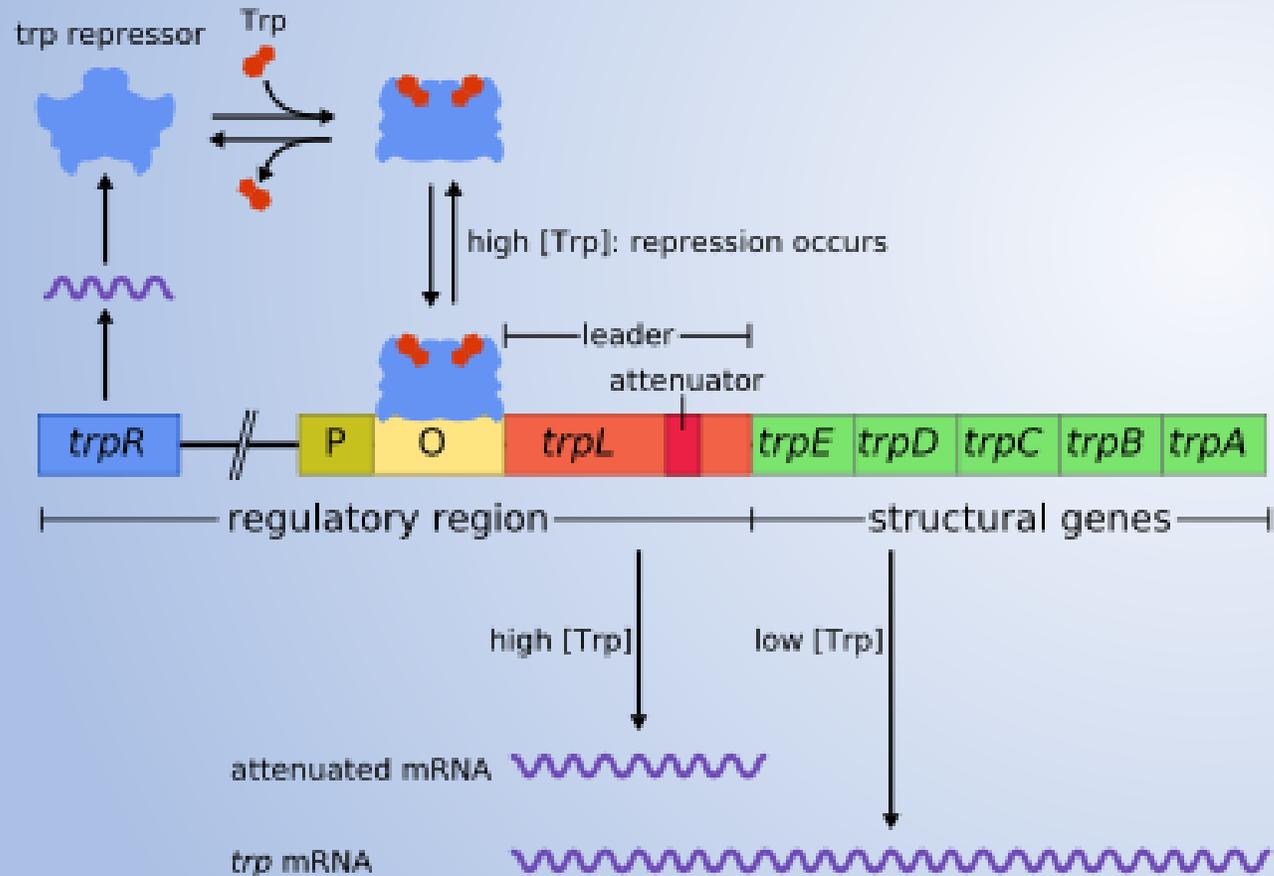
E' la formazione del complesso stabile RNA pol - DNA che determina l'aumento della efficienza di trascrizione

The *lac* Operon and its Control Elements



Operone del *triptofano*

Costituito da un gruppo di **geni che codificano** per una serie di **proteine responsabili della sintesi del triptofano**

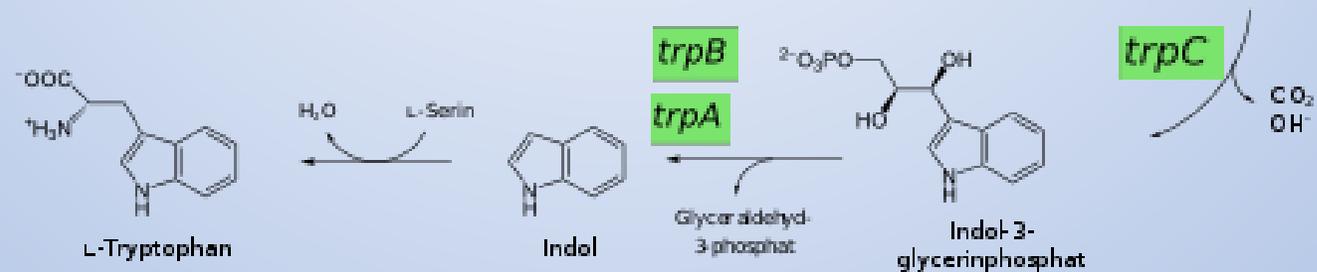
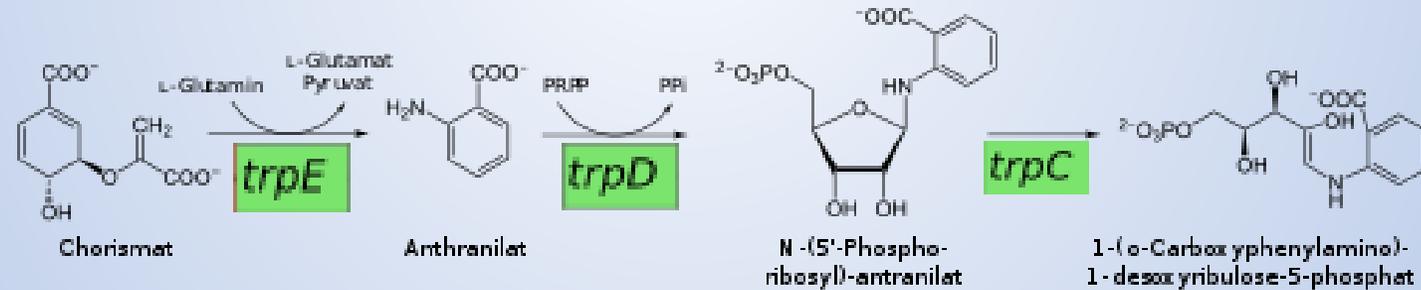
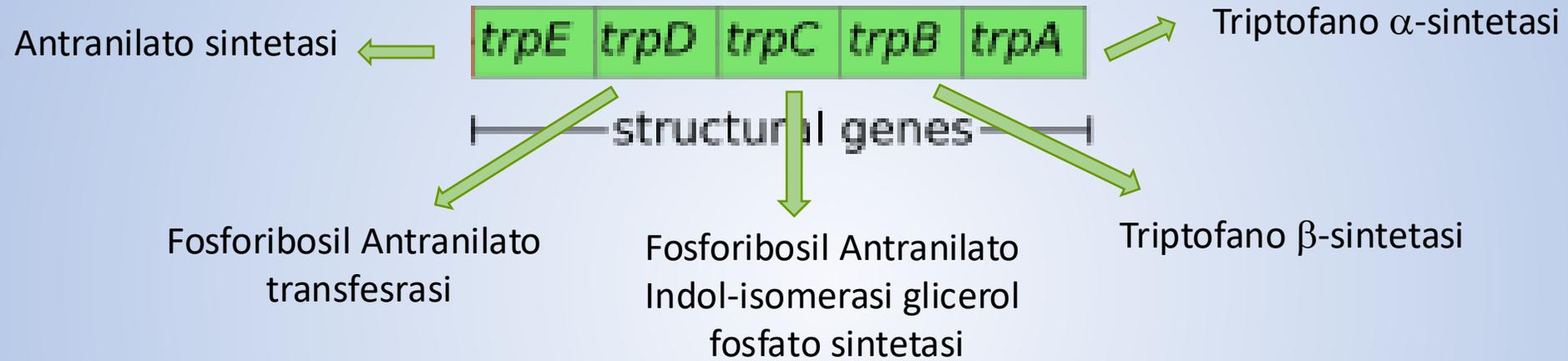


E' un **sistema di repressione**, nel quale è lo stesso aminoacido che reprime l'espressione dei geni.

Il Trp è il co-repressore.

Questo **controllo negativo del operone** è comune negli operoni implicati nella sintesi di enzimi delle vie metaboliche per la sintesi di amminoacidi.

Operone del *triptofano*



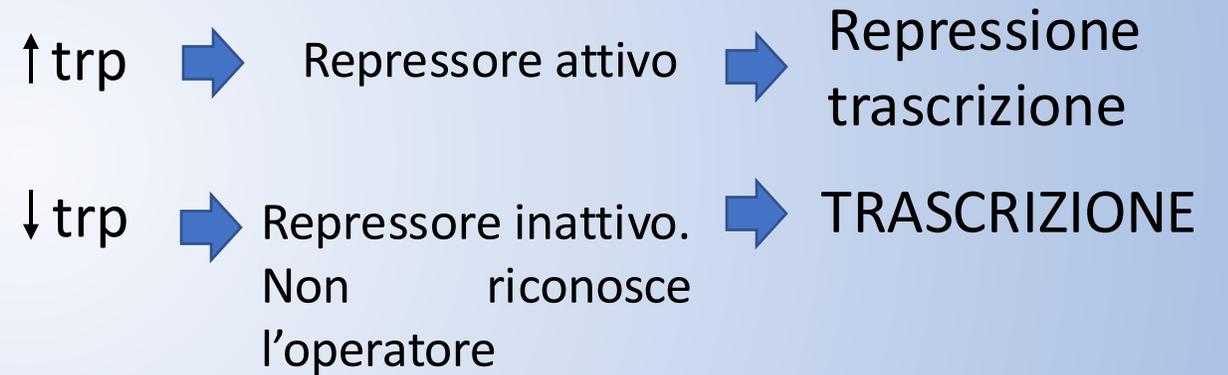
Operone del *triptofano*

2 meccanismi di regolazione:

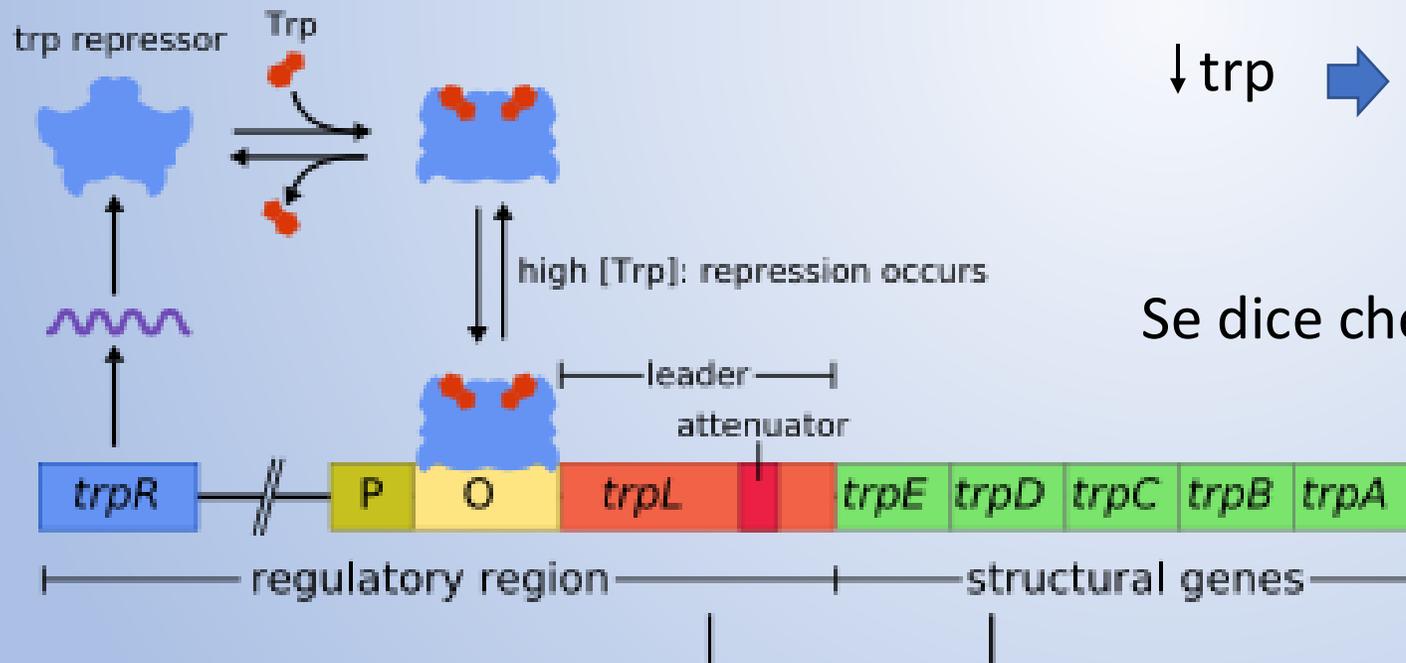
1. All'**inizio** della trascrizione: **controllo negativo**
2. Al **termine** della trascrizione: meccanismo di «**attenuazione**»

Operone *trp*: controllo negativo all'inizio

Regolato negativamente da un **repressore che diventa attivo dopo il legame di una molecola di Triptofano**, che inducendo un cambio conformazionale che permette legare l'operatore

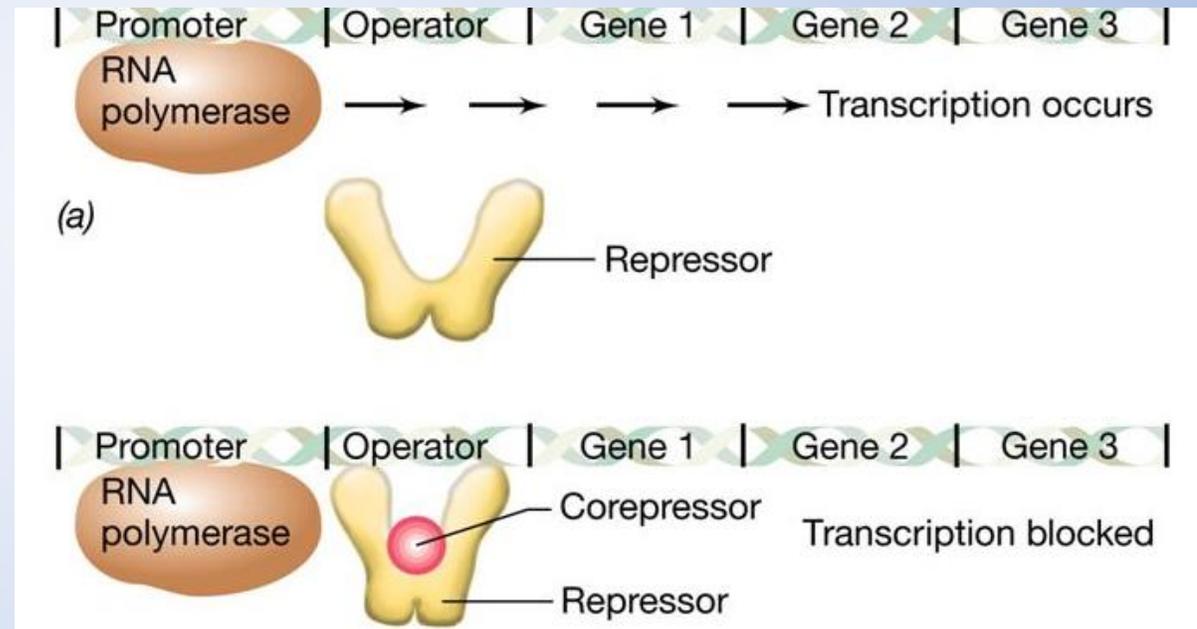


Se dice che il ***trp*** agisce come **Co-repressore**



Operone *trp*: controllo negativo all'inizio

Il **Co-repressore** è il *trp*, che legandosi alla **molecola repressore** codificata dal **gene regolatore** l'attiva. In queste condizioni interagisce con l'operatore e blocca l'avanzamento della RNA pol: **INIBIZIONE TRASCRIZIONE**

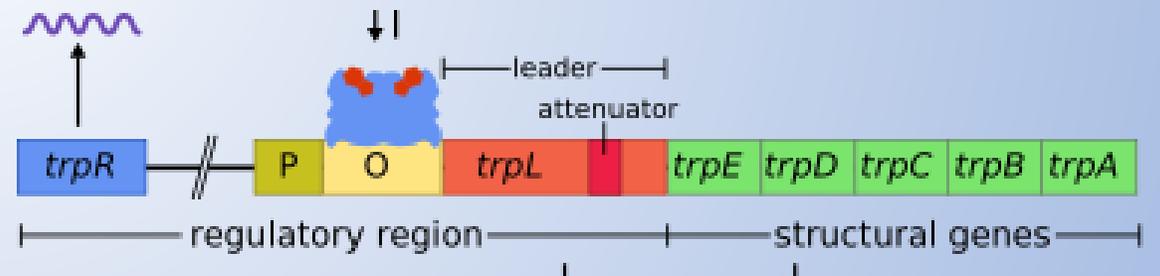
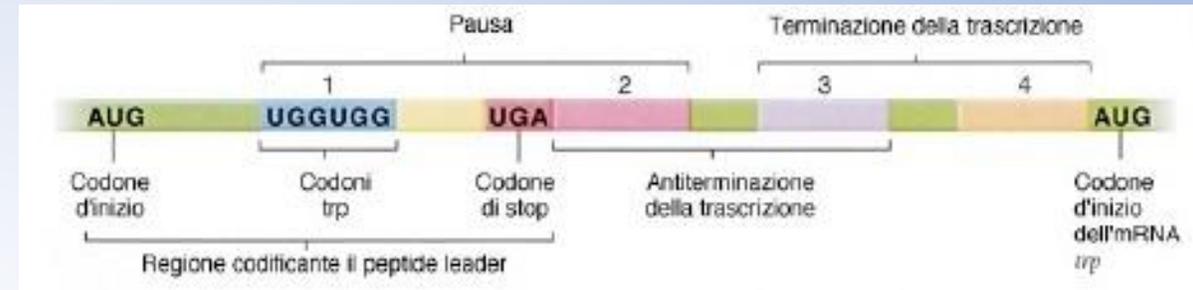


Operone *trp*: controllo negativo alla terminazione o *Attenuazione*

Interruzione prematura della sintesi del mRNA in risposta alla presenza del amminoacido *trp*.

A concentrazione basse di *trp* (ma sufficienti per i processi cellulari) l'RNA pol si ferma dopo approx. 140pb.

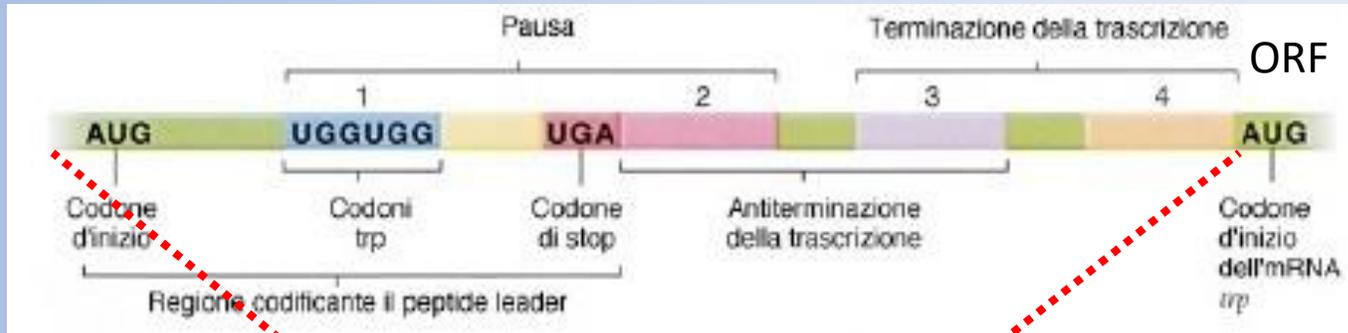
A concentrazioni più basse (limitanti) di *trp* l'RNA pol non si ferma e completa il mRNA per la produzione degli enzimi necessari nella sintesi del *trp*



Questa regolazione si basa sulla creazione di strutture secondarie in una regione adiacente all'operone (sequenza leader, *TrpL*), posizionata prima dei geni strutturali, durante la trascrizione e traduzione in procarioti

Attenuazione: regione trpL o sequenza leader

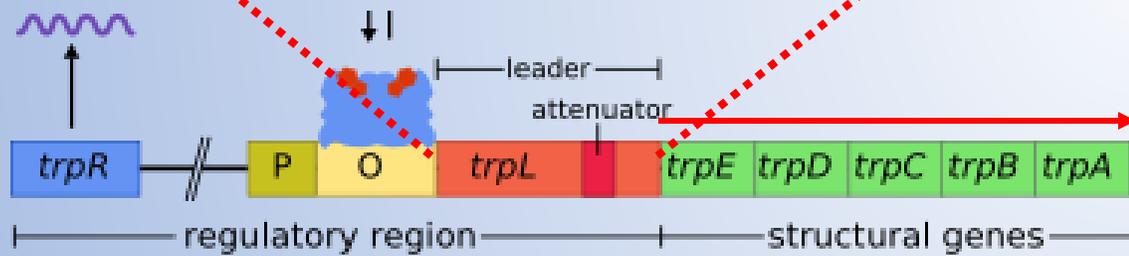
Sequenza leader



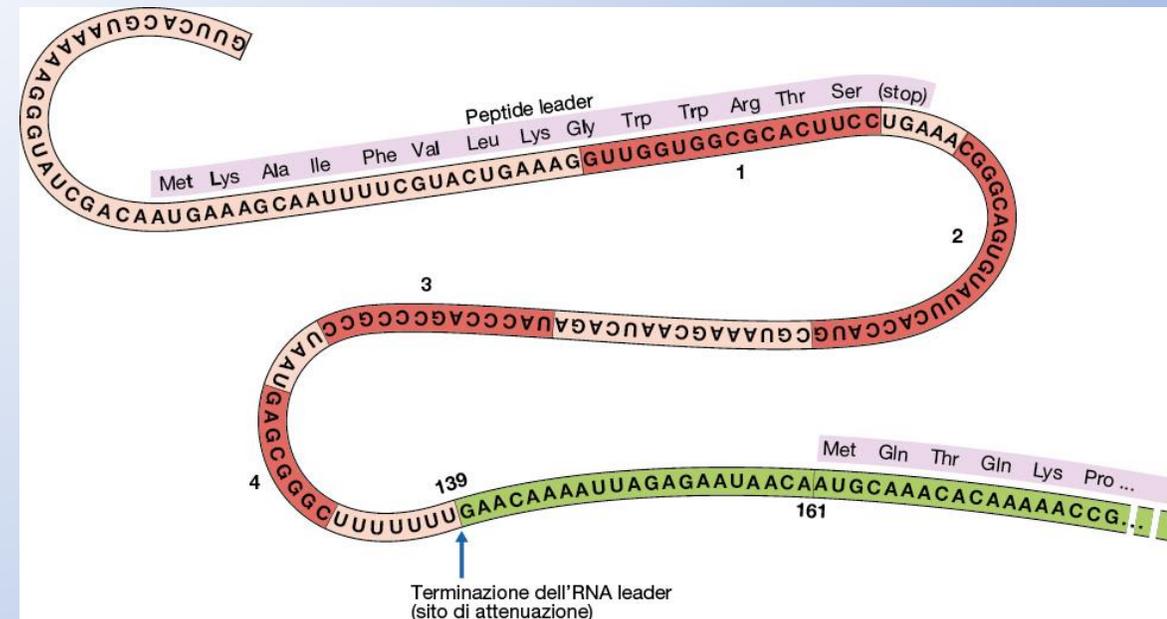
La sequenza leader, posizionata prima dei geni strutturali, è costituita da 161 nt e contiene un codone di inizio, 13 codoni per amminoacidi e un codone di STOP:

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Gly Trp Trp Arg Thr Ser

Codifica per un peptide leader

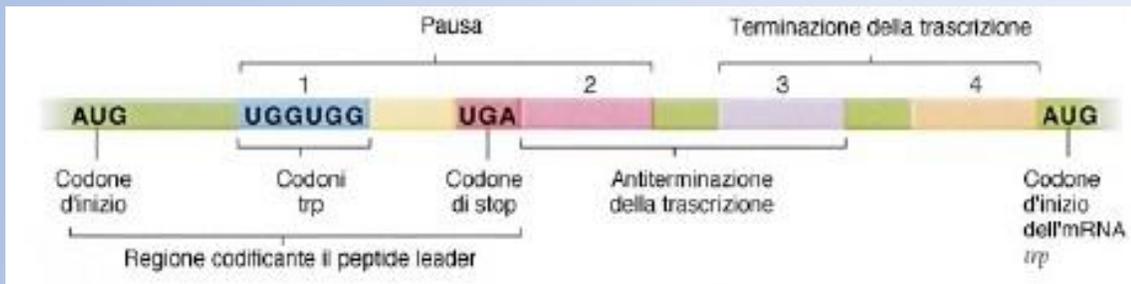


Sovrapposte e a valle di questa sequenza leader esistono **4 sequenze complementari (1-4)** che possono appaiarsi e formare delle strutture alternative



Attenuazione: regione *trpL* o sequenza leader

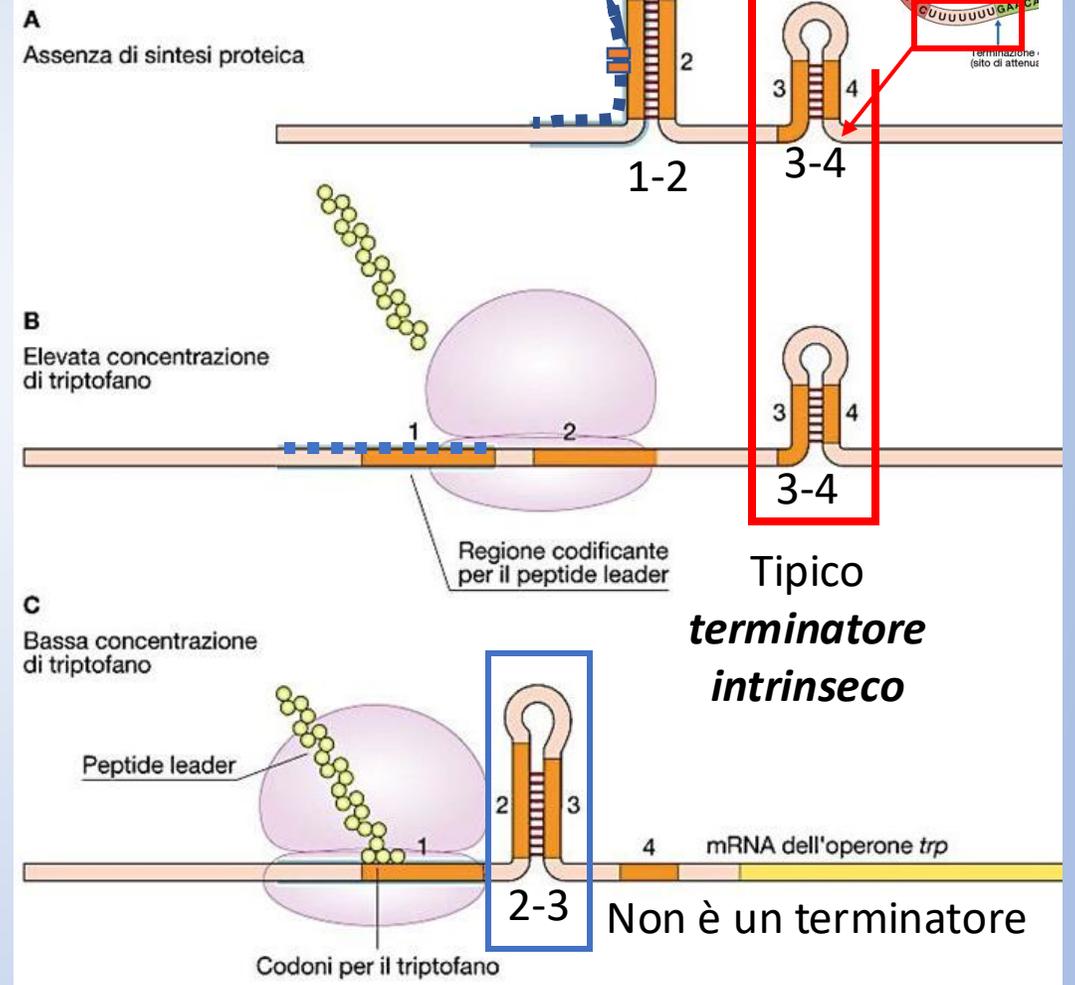
Sovrapposte e a valle di questa sequenza leader esistono **4 sequenze complementari (1-4)** che possono appaiarsi e formare delle strutture alternative



In presenza di **concentrazione *trp*** sufficienti, i ribosomi leggono la ORF della sequenza leader occupando in questo modo anche la sequenza 2 ed evitando il suo appaiamento con il dominio 3. Come conseguenza saranno i domini 3-4 ad appaiarsi formando un tipico terminatore intrinseco e bloccando la trascrizione. Il corto mRNA formato si chiama «attenuato» e verrà eliminato insieme al peptide leader: **NO TRASCRIZIONE E NO TRP BIOSINTESI**

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Gly Trp Trp Arg Thr Ser

mina la formazione delle



Attenuazione: regione trpL o sequenza leader

A **bassa concentrazione di trp** c'è una minore disponibilità dei tRNA carichi di triptofano e il ribosoma si ferma a livello dei codoni per il trp. Questa pausa lascia libero il dominio 2 che formerà una forcina che evita la interazione dei domini 3-4 e il blocco della trascrizione: **TRASCRIZIONE PUO' CONTINUARE**

