

LA TRASCRIZIONE

Il **dogma centrale della biologia molecolare** afferma che l'informazione genetica fluisce continuamente dal DNA all'RNA alle proteine. Quindi il DNA contiene le informazioni genetiche per la produzione di una catena polipeptidica, quindi di proteine.

Queste informazioni vengono copiate (trascritte) dall'RNA e poi servono per la sintesi della proteina.

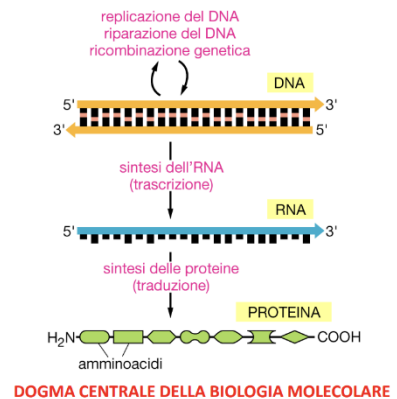
Il flusso di informazioni è monodirezionale: quindi si produce un RNA messaggero tramite il processo di trascrizione e poi avviene il processo di sintesi proteica o traduzione.

TRASCRIZIONE: processo mediante il quale l'informazione contenuta in una sequenza di DNA (gene) viene copiata in una sequenza complementare di RNA dall'enzima **RNA polimerasi**.

Si chiama trascrizione perché anche se cambia la forma chimica (da DNA a RNA), comunque l'informazione è sempre trascritta nello stesso linguaggio che sono i nucleotidi.

Il comportamento di una cellula è determinato non solo dai geni che vengono ereditati (quindi dal DNA e da tutta l'informazione genetica) ma anche da quali geni vengono espressi in un determinato momento. Se il processo di trascrizione è un processo abbastanza semplice, al contrario quello di regolazione genica è più complicato.

L'insieme di tutte le molecole di RNA che vengono prodotte dalla cellula in un particolare momento o in una particolare condizione metabolica viene definita **TRASCRITTOMICA**.



REPLICAZIONE vs TRASCRIZIONE

ANALOGIE	DIFFERENZE
Apertura e despiralizzazione della doppia elica del DNA; esposizione delle basi presenti sul filamento che fa da stampo per la sintesi dell'RNA	Le molecole di RNA prodotte nella trascrizione sono a filamento singolo , complementare a uno solo dei filamenti di DNA
I ribonucleotidi si aggiungono uno alla volta	Il nuovo filamento di RNA si stacca dal DNA stampo , spiazzato dall'elica di DNA che va ricostituendosi
La sequenza nucleotidica della nuova catena di RNA viene determinata per appaiamento complementare sullo stampo di DNA	Le molecole di RNA sono molto più corte delle molecole di DNA: <ol style="list-style-type: none"> 1. DNA di cromosoma umano: 250 milioni di nucleotidi; 2. RNA: max poche migliaia di nucleotidi e molti sono assai più corti.
Quando l'appaiamento è soddisfacente, il ribonucleotide appena arrivato si lega covalentemente alla catena in crescita tramite una reazione chimica catalizzata da enzimi appositi	La RNA polimerasi non necessita di un primer

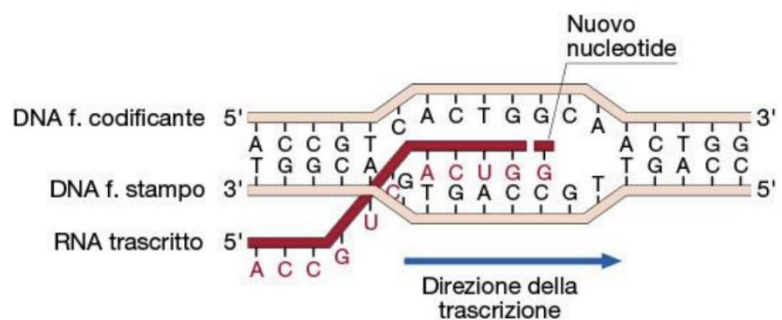
- La sintesi dell'RNA è una tappa fondamentale dell'espressione dell'informazione genica;
- La trascrizione produce non solo l'RNA messaggero (**mRNA** che serve come stampo per la sintesi proteica), ma tutti i tipi di molecole di RNA, stabili e a breve emivita: **tRNA** (intermedio essenziale tra l'informazione del DNA e quella contenuta nelle proteine), **rRNA** (componente essenziale dei ribosomi dove avviene la sede di sintesi proteica) ed RNA non codificanti (**ncRNA** che sono implicati nella regolazione dell'espressione genica avendo funzioni catalitiche, strutturali ma soprattutto di regolazione);
- Nelle cellule eucariotiche i trascritti primari di RNA, in particolare i pre-mRNA, sono modificati estensivamente per diventare molecole di **RNA mature**, pronte a svolgere la loro funzione biologica.

Il processo avviene nel citoplasma dei Procarioti e nel nucleo degli Eucarioti e richiede:

1. Uno dei due filamenti del DNA che funge da stampo (**filamento stampo o antisense**);
2. La **RNA polimerasi** che è l'enzima principale del processo di trascrizione;
3. I **nucleotidi trifosfati**.

Quale dei due filamenti viene trascritto?

Abbiamo la molecola di DNA a doppio filamento e distinguiamo in essa un filamento che prende il nome di filamento stampo che è il filamento complementare all'RNA messaggero. Quindi la sequenza dell'RNA che viene trascritto sarà complementare a quella del filamento stampo (o antisense orientato in direzione 3'-5'), l'altro filamento invece prenderà il nome di filamento codificante (o senso)



che ha la stessa sequenza dell'RNA messaggero. Quindi avremo: un filamento stampo o antisense, un filamento codificante o senso e alla fine la sequenza dell'RNA che è: **complementare a quella del filamento stampo e identica a quella del filamento codificante** (ovviamente con al posto della Timina l'Uracile).

Il filamento codificante quindi è uguale all'RNA trascritto ma non partecipa al processo di trascrizione.

Il filamento stampo viene letto in direzione 3'-5' perché l'RNA polimerasi sintetizza sempre in direzione 5'-3' però non è sempre lo stesso per ogni gene poiché geni diversi posti sullo stesso cromosoma potranno avere come filamento stampo filamenti diversi del DNA.

Quindi l'RNA polimerasi sintetizza sempre in direzione 5'-3' e quale dei filamenti fungerà da stampo dipende dall'orientamento in cui si posiziona l'enzima polimerasi sul quel tratto di DNA. Quindi un filamento può essere di senso per alcuni tratti e di antisense per altri tratti. Non è sempre il filamento 3'-5' che viene usato come stampo ma dipende dall'RNA polimerasi.

TRASCRIZIONE NEI PROCARIOTI:

1. Inizio
2. Allungamento
3. Terminazione

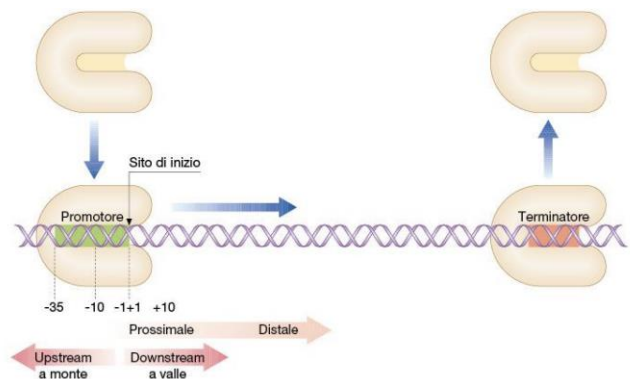
L'RNA polimerasi riconosce nella fase di inizio un promotore, inizia la trascrizione e estende il trascritto fino alla fase di terminazione.

UNITA' DI TRASCRIZIONE:

L'unità di trascrizione è una sequenza di DNA trascritta in un singolo RNA.

Un'unità di trascrizione è delimitata dal **promotore** e dal **terminatore** (quindi inizia con il promotore e termina con il terminatore). Nei procarioti un'unità di trascrizione può comprendere più di un gene, invece negli eucarioti un promotore è solo per un singolo gene.

Il punto di inizio della trascrizione (**TSS**: viene indicato con +1) divide la regione in sequenze "a monte" a sinistra del sito di inizio della trascrizione (**upstream**) in cui le basi sono numerate con valori negativi, e sequenze "a valle" a destra del sito di inizio della trascrizione (**downstream**) in cui le basi sono numerate con valori positivi. In quest'ultima distinguiamo anche una zona più vicina al promotore che viene detta zona prossimale e una più lontana che viene detta zona distale.



PROMOTORE:

E' la sequenza di DNA cui si lega l'RNA polimerasi per poi iniziare il processo di trascrizione.

E' una sequenza specifica del DNA che viene riconosciuta dalla RNA polimerasi e determina dove la sintesi del mRNA inizia e quale filamento del DNA debba essere utilizzato come stampo.

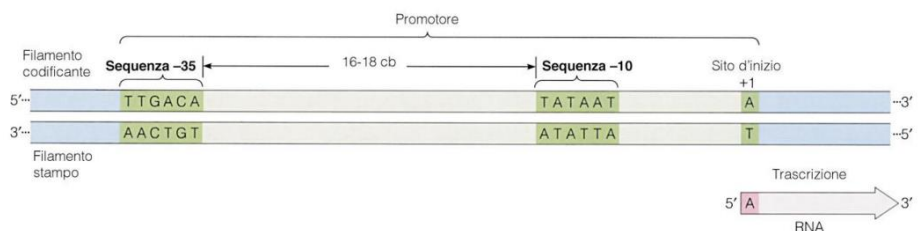
I promotori quindi sono delle sequenze che dicono principalmente all'RNA polimerasi tre cose: dove iniziare la trascrizione, quale filamento di DNA leggere e la direzione da prendere dal sito di inizio.

I promotori batterici hanno due sequenze consenso: sequenze di DNA formata dalle basi che, in ciascuna delle varie posizioni, compaiono con maggiore frequenza in frammenti di DNA molto simili.

I promotori batterici quindi hanno due sequenze consenso cioè due siti di legame specifici cui si legherà l'enzima RNA polimerasi. Queste due sequenze sono separate da 17-19 paia di basi e sono a monte del sito di inizio (quindi hanno valori negativi) e sono: una sequenza a -10 (chiamato sequenza TATAAT o Pribnow box) una sequenza a -35 che rappresenta il sito di denaturazione dove si aprirà la doppia elica.

I promotori batterici hanno due sequenze distinte. Queste sequenze contengono 6 nt ciascuna e si trovano approssimativamente 10 e 35

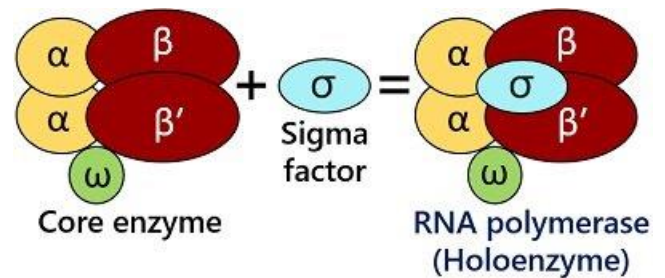
basi a monte del sito di inizio della trascrizione e sono chiamate elementi -10 e -35, dalla loro posizione relativa al sito di inizio della trascrizione che è definito come la posizione +1.



- Più le regioni del promotore assomigliano alle sequenze consenso, maggiore è la forza del promotore;
- La frequenza relativa di inizio della trascrizione è indicata come **forza del promotore** ed è correlata all'affinità dell'RNA polimerasi per la regione del promotore;
- Alcuni promotori forti dei geni rRNA di E.Coli contengono anche un elemento aggiuntivo più a monte, detto **elemento UP**, che ne aumenta la capacità di attrarre l'RNA Polimerasi.

RNA POLIMERASI:

- Principale enzima responsabile della sintesi di RNA;
- Catalizza la polimerizzazione di ribonucleotidi-5'-trifosfato da uno stampo di DNA (non necessita di un primer)
- In una cellula di E.Coli sono presenti circa 1.500-5.000 molecole di RNA Polimerasi;
- La struttura dell'RNA Polimerasi batterica comprende un **core** dell'enzima (ovvero il nucleo centrale) e un fattore di trascrizione detto **fattore sigma**;
- L'insieme delle due parti forma la versione completa dell'enzima detta **oloenzima**.



CORE: parte dell'oloenzima che contiene il sito catalitico e quindi catalizza la polimerizzazione. Ha una dimensione di 400kDa ed è formato da 5 subunità:

- 2 subunità α
- 1 subunità β
- 1 subunità β'
- 1 subunità ω

Il core ha la forma simile alla chela di un granchio (pinze β e α) che afferra lo stampo di DNA. All'interno delle pinze si forma un sito catalitico che ospita il filamento del DNA.

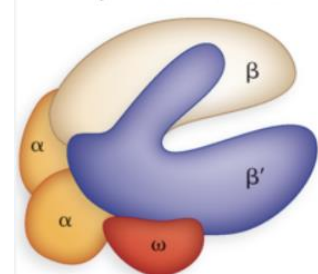
Se analizziamo il core dell'enzima vediamo che a sua volta si divide in altri quattro moduli funzionali che si chiamano: core, mensola, pinza e mandibola. Tra il core e la mensola si formano due canali: nel primo (più grande) passa il DNA quindi gli acidi nucleici e contiene inoltre due ioni di magnesio (per aumentare la capacità nucleofila del 3'OH per fare avvenire la reazione, mentre l'altro magnesio serve per stabilizzare le cariche negative del fosfato e quindi per il pirofosfato che viene rilasciato), il secondo (più piccolo) conduce i nucleotidi trifosfato (in questa zona arrivano proprio i nucleotidi trifosfato).

Il core dell'enzima ha una forte affinità per la maggior parte del DNA e in assenza del fattore σ può innescare la sintesi a partire da un punto qualsiasi del DNA stampo.

L'enzima RNA polimerasi si attacca al filamento di DNA e lo scorre, quindi si lega a tutto il filamento del DNA però in maniera aspecifica (non sa qual è il punto preciso dove iniziare la trascrizione). Questa informazione è data dal fattore σ . Quindi per diminuire questo legame non specifico dell'RNA al DNA è necessario l'intervento del fattore sigma.

Quindi il core dell'enzima è il sito attivo catalitico dove avviene la polimerizzazione, però la stessa subunità che fa parte dell'enzima che è il fattore σ , è quello che si lega in maniera transitoria, labile all'enzima però è quello che lo dirige verso i siti specifici del DNA. Quindi il fattore σ che è legato agli RNA polimerasi è la subunità necessaria per il legame specifico dell'RNA polimerasi.

(a) Nucleo centrale della RNA polimerasi batterica



FATTORE SIGMA: necessario per il legame specifico dell'RNA polimerasi.

Il fattore sigma è coinvolto ed è responsabile del riconoscimento del promotore, perché l'RNA polimerasi si lega a tutto il filamento del DNA però poi chi riconosce il promotore è il fattore sigma.

- Si dividono in due famiglie: σ^{54} e σ^{70} (la più abbondante e con affinità di legame più elevata per il core dell'RNA polimerasi)
- I fattori σ batterici svolgono tre funzioni chiave:
 1. Indirizzano l'oloenzima delle RNA polimerasi su promotori specifici;
 2. Separano il DNA a doppio filamento nella regione -10 del promotore e lo stabilizzano nella forma di "complesso aperto" a singolo filamento;
 3. Interagiscono con altri fattori di trascrizione.

Il ruolo di σ è quello di dirigere l'RNA polimerasi sui promotori, legandosi alle sequenze -35 e -10 e in questo modo sono responsabili del corretto inizio della trascrizione di un gene.

In assenza di σ la polimerasi si lega in modo NON specifico al DNA con bassa affinità.

Infatti il legame di σ è quasi come se facesse chiudere le pinze e in questo modo iniziare il processo di trascrizione.

INIZIO DELLA TRASCRIZIONE

La RNA polimerasi si lega al DNA in corrispondenza del promotore e "copia" il filamento di DNA stampo a partire dal sito di inizio della trascrizione. La polimerasi si lega alle sequenze -10 e -35 però la trascrizione parte dal sito di inizio +1.

Come fa l'RNA polimerasi a trovare un promotore?

Questa fase si chiama fase esplorativa: quindi per iniziare il promotore scorre lungo il filamento del DNA stampo fino a quando non trova la sequenza TATA box (-10 e -35) e a questo punto vi si lega e sappiamo che da lì inizia la trascrizione.

Quindi abbiamo le "chele" che fanno entrare nel canale il DNA; l'RNA polimerasi scorre e nel momento in cui il fattore σ riconosce queste sequenze vi si lega, le chele si chiudono, trattengono il filamento del DNA e a questo punto inizia.

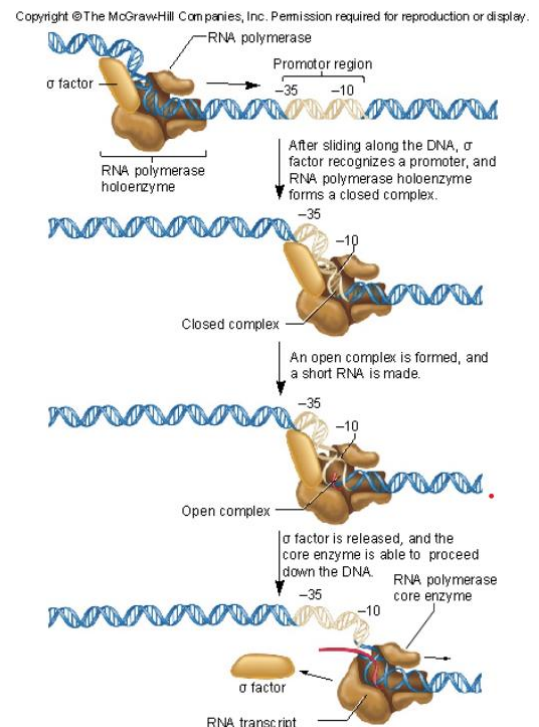
L'inizio della trascrizione comprende in realtà cinque passaggi fondamentali:

1. **Esplorazione del DNA, riconoscimento e legame:** l'oloenzima dell'RNA polimerasi si lega al promotore alle sequenze -35 e -10 e si ha la formazione del complesso di preinizio del promotore chiuso;
2. **Complesso di preinizio del promotore chiuso:** si chiama chiuso perché ancora il DNA si trova a doppio filamento e quindi non è stato ancora svolto;
3. **Complesso di preinizio del promotore aperto:** a questo punto si apre il doppio filamento, si svolgono circa 12-24 paia di basi perché si forma il complesso di preinizio del promotore aperto (aperto perché il complesso ha cambiato la struttura e i due filamenti si sono separati). In questo caso abbiamo che nella fase di inizio è l'RNA polimerasi che ha attività elicasi, cioè l'RNA polimerasi stessa rompe i due filamenti, quindi si lega al promotore, provoca l'apertura della doppia elica e si viene a creare una zona denaturata in cui ci sono questi filamenti aperti che viene chiamata **bolla di trascrizione** che fornisce all'enzima il filamento stampo. A differenza dell'elicasi l'RNA polimerasi non ha bisogno dell'idrolisi dell'ATP per aprire i due filamenti.

L'avanzamento della bolla provoca delle tensioni nella doppia elica, quindi si formano man mano che avanza verso destra dei superavvolgimenti positivi che vengono poi compensati dalle topoisomerasi, dalle girasi e a sinistra dai superavvolgimenti negativi. Quindi intervengono le topoisomerasi che allentano le tensioni e riportano la topologia originaria del DNA.

Quindi a questo punto abbiamo formato il complesso di preinizio del promotore aperto e ha inizio la trascrizione ovvero quando vengono introdotti i nucleotidi trifosfati; quindi si svolgono, il DNA può essere copiato e inizia la prima fase di polimerizzazione senza bisogno di un primer (quindi inizia de novo a polimerizzare, cioè ad aggiungere nucleotidi).

4. **Trascrizione abortiva:** a questo punto interviene la quarta fase che viene detta trascrizione abortiva. In questa fase vengono prodotti dei trascritti di RNA corti (lungi massimo 2-15 nucleotidi) questo perché l'RNA non riesce a trascrivere dei lunghi segmenti a causa dell'ingombro che c'è (si pensa che la subunità σ blocca l'ingresso del canale) e quindi non si possono sintetizzare dei frammenti molto lunghi (quindi vengono prodotti piccoli frammenti di RNA)
5. **Evasione del promotore:** a questo punto abbiamo la quinta fase di inizio che è l'evasione del promotore in cui avviene una rottura dell'interazione tra il fattore σ e il core dell'enzima. Quindi il fattore sigma si dissocia dal core, la polimerasi si allontana e passa dalla modalità di inizio trascrizione a quella di allungamento. Quindi nel momento in cui σ a questo punto viene rilasciato, si dissocia dall'enzima e l'allungamento avviene con una maggiore velocità e quindi avviene la vera e propria trascrizione.



RICAPITOLANDO:

1. Esplorazione del DNA in cui la polimerasi si lega in modo non specifico al DNA e migra lungo la molecola;
2. Legame di σ alle sequenze -10 e -35 del promotore e si forma il complesso del promotore chiuso perché il DNA è ancora a doppio filamento;
3. La polimerasi svolge il DNA intorno al sito di inizio, circa 12-14 paia di basi e si passa da un complesso chiuso a un complesso aperto con la separazione dei filamenti di DNA (che si srotola di circa 12-14 pb);
4. Inizio della trascrizione e in questa fase si ottengono dei corti frammenti di RNA di circa 9 pb attraverso il processo di trascrizione abortiva (a causa del contatto troppo stretto con il promotore (quindi con il fattore σ) non si possono formare frammenti lunghi).
5. Continua l'allungamento della catena di RNA in modo più veloce: A questo punto viene rilasciata la subunità σ e quindi l'RNA polimerasi può formare dei trascritti più lunghi, il fattore σ si stacca dal promotore e la polimerasi lascia il promotore, si muove lungo lo stampo e continua l'allungamento in modo più veloce.

ALLUNGAMENTO DELLA TRASCRIZIONE

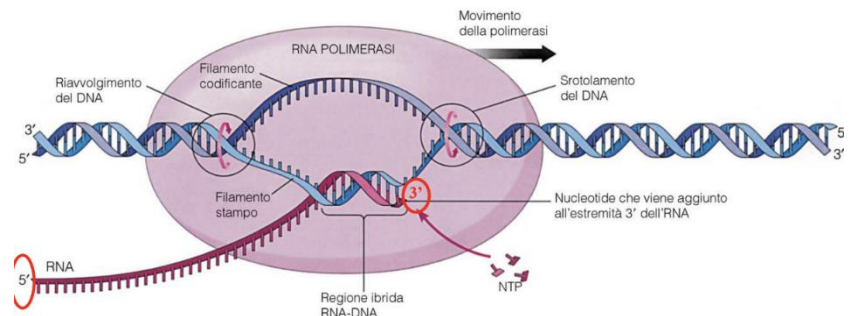
La trascrizione va avanti, vengono aggiunti i nucleotidi e si forma una regione ibrida di DNA/RNA di 9-12 pb (la direzione è verso destra). Quindi l'aggiunta di ribonucleotidi è un meccanismo simile a quello già visto svolto dalla DNA polimerasi (polimerizzazione del DNA). Il sito catalitico dell'RNA polimerasi ha due siti: un sottosito che viene chiamato sottosito di legame del substrato in cui il nucleotide trifosfato in ingresso si lega alla polimerasi e un sottosito di legame del prodotto in cui si posiziona l'estremità 3' della catena in crescita, quindi abbiamo due siti.

Quindi abbiamo il 3'OH del nucleotide che si va a legare sul fosfato in α del ribonucleotide trifosfato, si libera la molecola di trifosfato e il magnesio in questa fase è molto importante perché serve per aumentare l'attacco nucleofilo del primo OH e stabilizzare le cariche negative del pirofosfato che si viene a staccare. Quindi si forma questo legame fosfodiester tra un nucleotide e l'altro. Ovviamente la trascrizione, come la replicazione, ha sempre la direzione 5'-3'OH.

Ricordiamo che nell'RNA si trova l'uracile al posto della timina, perciò il filamento di mRNA ottenuto è identico al filamento non trascritto, ma con U al posto di T.

Durante l'allungamento la polimerasi rimane associata allo stampo (si sposta man mano avanti), quindi completata l'aggiunta di un nucleotide si sposta avanti e il risultato è che si crea una bolla con 9-12 paia di basi al centro. Quindi apre di un nucleotide, aggiunge un nucleotide e avvolge dietro di un nucleotide.

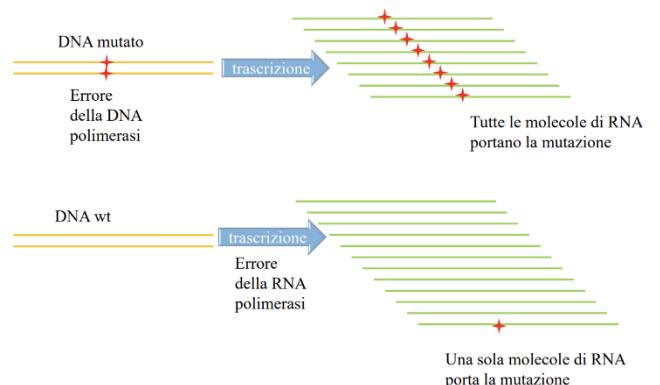
Nei batteri la velocità di sintesi è di circa 50-100 nt al secondo. L'RNA polimerasi procede a singhiozzo, facendo pause di oltre un secondo, importanti perché facilitano l'accoppiamento della trascrizione con la traduzione e il corretto ripiegamento dell'RNA.



EFFETTO DI ERRORI DELLE POLIMERASI: l'RNA polimerasi di E.Coli sintetizza RNA con un altro livello di fedeltà. La sua bassa frequenza di errori è dovuta a un meccanismo di proof-reading simile a quello della DNA polimerasi.

Quindi se l'enzima si rende conto di aver incorporato un nucleotide sbagliato torna indietro, lo elimina e lo sostituisce con quello corretto. Il problema è che mentre la DNA polimerasi aveva due siti (uno catalitico di polimerizzazione e l'altro di attività esonucleasica), l'RNA polimerasi non ha due siti distinti, quindi l'attività di correzione di bozze è meno fedele rispetto a quella della DNA polimerasi.

Nella DNA polimerasi abbiamo un errore su 10 milioni, invece, nella RNA polimerasi 1 errore su 10 mila.



TERMINAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

In questa fase troviamo delle sequenze specifiche che vengono chiamate **sequenze di terminazione** che determinano l'arresto della trascrizione.

Il core dell'RNA polimerasi continua a muoversi lungo il DNA fino a quando non raggiunge un segnale di stop detto anche sequenza di terminazione, dove la trascrizione si ferma, l'RNA è rilasciato dalla polimerasi e l'enzima si dissocia dal suo stampo di DNA.

Nei batteri esistono due tipi di terminatori:

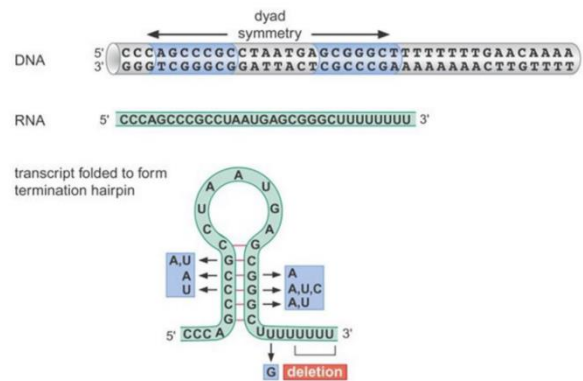
1. Rho-indipendente
2. Rho-dipendente

1) Struttura di un terminatore intrinseco (Rho-Indipendente)

Il terminatore presenta due sequenze ripetute e invertite. Esse sono seguite, sul filamento stampo, da una sequenza di numerose A. Quindi abbiamo una sequenza ripetuta e invertita ricca di citosine e guanine, e una coda di poli A. Quando avviene la trascrizione l'RNA polimerasi trascrive questa sequenza di terminazione e dato che presenta simmetria si appaiano e hanno la tendenza a formare una forcina (un'ansa). Questa forcina si suppone causi la terminazione perché impedisce che l'RNA vada avanti.

Le adenine fanno sì che si formino degli appaiamenti A-U, che danno origine ad un'elica meno stabile di altre, quindi si destabilizza il complesso di allungamento, fa terminare la trascrizione (in corrispondenza delle sequenze di U) e si rilascia il trascritto.

L'RNA trascritto assumerà la struttura di un terminatore, cioè una forcina di terminazione seguita da una stringa di U.



2) Struttura di un terminatore Rho-dipendente

Ha una struttura simile al precedente ma non ha una catena ricca di adenine.

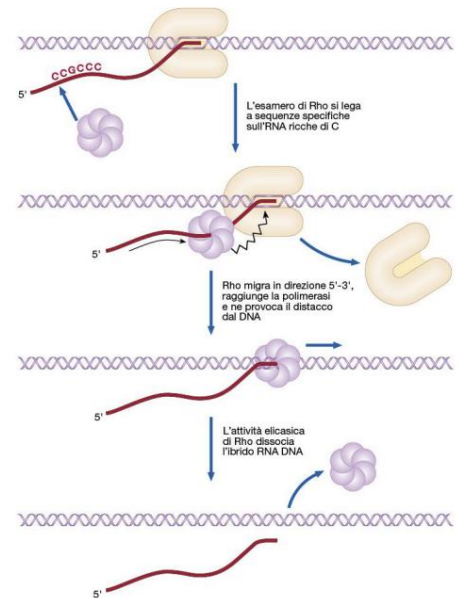
A livello del DNA il terminatore Rho-dipendente è costituito da due brevi sequenze ripetute e invertite, precedute, a una distanza variabile, dalla sequenza **Rut**, ricca in C, sul filamento codificante.

Questa struttura Rho-dipendente è controllata dalla capacità della proteina Rho di accedere all'RNA messaggero, cioè di legarsi a questa sequenza. Conseguentemente, l'RNA nascente presenterà la sequenza Rut seguita, a una certa distanza, da una breve forcina.

Rho leggerà in modo specifico la sequenza di 80-90 nt ricca in C chiamato sito utilizzato da Rho, o sito Rut.

Modello per la terminazione Rho-dipendente:

- Il fattore Rho, ha un dominio di legame all'RNA e un dominio ATPasico;
- Il fattore Rho si lega alla sequenza terminatore sull'RNA sintetizzata dall'RNA polimerasi;
- Una volta legato, Rho con l'attività ATPasica idrolizza ATP e usa questa energia per separare l'RNA dall'RNA polimerasi e dallo stampo a DNA.



ACCOPPIAMENTO TRASCRIZIONE/TRADUZIONE

Nei procarioti il trascritto viene subito tradotto in proteina. Quindi partendo dall'RNA messaggero si producono più copie di quest'ultimo che vengono utilizzate dai ribosomi per produrre la proteina.

In genere la struttura costituita da un RNA messaggero a cui si legano più ribosomi viene detta **polisoma**.

Quindi nei procarioti abbiamo questo accoppiamento trascrizione/traduzione (che avvengono quasi simultaneamente), invece negli eucarioti questo non avviene.

