

1. Descrivere la trascrizione nei procarioti.

La trascrizione è il processo che permette di ottenere, a partire da DNA, i vari tipi di RNA. Perché questo avvenga il DNA deve essere aperto e interviene l'RNA polimerasi per generare l'RNA. A questo punto l'RNA fuoriesce e il DNA può essere nuovamente riassembleto. Il processo è molto diverso tra procarioti e eucarioti. Nei primi abbiamo tre fasi: inizio, allungamento e terminazione. La fase d'inizio impone che la doppia elica di DNA venga aperta, in modo che una delle due catene possa essere letta. La catena presenta al suo interno una regione che si chiama promotore, cui si lega l'RNA polimerasi, i geni da trascrivere e le sequenze introniche. Il promotore ha due sequenze, -10 e -35, cui si lega in modo stabile l'RNA polimerasi attraverso il suo fattore sigma. Una volta che l'RNA polimerasi si è legata in modo stabile e si è formata la bolla di trascrizione, può iniziare la trascrizione. A livello della RNA polimerasi c'è un sito all'interno del quale vengono convogliati i nucleotidi necessari per la sintesi dell'RNA. Questi nucleotidi sono nella loro forma trifosfata e solo successivamente vengono rimossi due fosfati, in modo da poter essere inseriti a livello della catena. Nella fase di allungamento abbiamo l'aggiunta di nucleotidi da parte della RNA polimerasi, così che l'RNA in formazione si allunga. L'allungamento avviene in direzione 5' - 3' in relazione al filamento neosintetizzato. La bolla di trascrizione viene aperta a valle e chiusa a monte mentre l'RNA polimerasi avanza. La terminazione avviene a livello di sequenze specifiche del DNA, chiamate terminatori. Questi terminatori possono essere di due tipi: terminatori intrinseci e terminatori rho dipendenti. Nel primo caso abbiamo che la sequenza è tale per cui si forma una forcina, che destabilizza l'RNA polimerasi che quindi si stacca. Nel secondo caso c'è bisogno di un fattore aggiuntivo, una proteina Rho, un ATPasi il cui ruolo è permettere il distacco della RNA polimerasi e quindi la terminazione della trascrizione.

2. Trascrizione negli eucarioti

La trascrizione negli eucarioti è più complessa rispetto a quella dei procarioti. Abbiamo qui la presenza di tre polimerasi, a differenza dell'unica RNA polimerasi che interviene nella trascrizione dei procarioti. Nei procarioti, inoltre, abbiamo un solo fattore che permette di iniziare la trascrizione, mentre negli eucarioti abbiamo ben 6 fattori di trascrizione (TFII). Negli eucarioti, inoltre, abbiamo attivatori, repressori, co-attivatori, co-repressori e un complesso mediatore. Negli eucarioti, inoltre, abbiamo promotori multipli.

Ogni tipo di RNA polimerasi negli eucarioti è dedicata alla sintesi di un particolare tipo di RNA: l'RNA polimerasi I è utilizzata per la sintesi dell'RNA ribosomiale 28 S, 18 S e 5.8 S; l'RNA polimerasi II per l'mRNA, i snRNA, snoRNA e miRNA; l'RNA polimerasi III per la sintesi di tRNA e di rRNA 5 S. Ci sono poi altre forme minori di RNA polimerasi. I fattori di trascrizione sono diversi e servono per l'inizio e il proseguimento della trascrizione. Il primo fattore di trascrizione che si lega al DNA è il TFIID, che a sua volta è formato da due subunità: TBP e TAFs. TBP sta per TATA binding protein: è quella proteina che si va a legare al box TATA, un box conservato a livello di DNA. Subito dopo si legano TFIIA e TFIIB, che si vanno a legare a TFIID, saldando ulteriormente il legame con il DNA. A questo punto arriva l'RNA polimerasi, insieme al fattore TFIIF. Si legano quindi anche TFIIH, con attività elicastica, e TFIIIE. Tutti questi fattori, insieme all'RNA polimerasi formano il complesso d'inizio della trascrizione. Una volta che l'inizio della trascrizione è avvenuto, parte di questi fattori si distaccano, e rimangono solo TFIID e TFIIH.

A distanza rispetto al gene da trascrivere abbiamo delle sequenze enhancer e silencer che possono incidere sulla velocità di trascrizione. Gli enhancer e i silencer legano attivatori e repressori, che a loro volta, attraverso un complesso mediatore e attraverso co-attivatori e co-repressori, vanno a influire sui fattori di trascrizione e quindi sulla trascrizione. Abbiamo quindi una modulazione più fine di quella che avviene nei procarioti, con una quantità di trascritto che varia in base all'esigenza cellulare.

A seconda del tipo di polimerasi, abbiamo diversi tipi di promotore. Inoltre, non possiamo più parlare di singoli promotori, ma dobbiamo parlare di complessi di promotori: ogni promotore è fatto da più sequenze che interagiscono tra di loro per fare sì che la trascrizione di avvii.

3. Descrivere la traduzione

La traduzione è quel processo per cui dall'mRNA si ottengono le proteine. Fanno parte di questo processo, oltre che i tRNA e l'rRNA, anche alcuni enzimi chiamati amminoacil-tRNA sintetasi, i fattori di traduzione specifici per ciascuna delle fasi ed energia sotto forma di GTP o ATP. La prima fase è l'attivazione degli amminoacidi, che consiste nel legame ad un semplice amminoacido di una certa quantità di energia, fornita da GTP: l'amminoacil-tRNA sintetasi lega il GTP e l'amminoacido. In seguito all'idrolisi del GTP, lega il GMP all'amminoacido, formando un amminoacil-GMP. In un terzo sito attivo dell'enzima si lega un tRNA e l'enzima, rilasciando GMP, forma un legame ad alta energia tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido e il gruppo idrossilico 2' o 3' dell'adenina del braccio accettore del tRNA. Subito dopo c'è la **fase d'inizio**, leggermente diversa tra procarioti e eucarioti. Parliamo prima dei procarioti. L'inizio avviene quando il

ribosoma non è ancora assemblato: la subunità minore è legata ai fattori IF1 e IF3 che mantengono dissociate le due subunità. Il tRNA, nel frattempo, è legato a fattori IF2, ognuno dei quali è portatore di un pacchetto di energia sotto forma di GTP. Questo aminoacil-tRNA lega la subunità minore: è il complesso di pre-inizio. A questo punto il complesso di pre-inizio individua l'mRNA: si forma il complesso d'inizio 30S. Questo complesso d'inizio scorre lungo l'mRNA fino a trovare la sequenza di Shine-Dalgarno e, quindi, la corretta tripletta AUG che segna l'inizio della traduzione. A questo punto, abbiamo il rilascio di un IF2, sotto forma di idrolisi del GTP, e questo consente il legame tra subunità: è il complesso d'inizio 70S. Il ribosoma presenta tre tasche, A, P ed E. Il primo tRNA si lega al sito P e porta la metionina formilata (modifica che consente di fermare il gruppo amminico). Negli eucarioti ci sono alcune differenze: ci sono molti più fattori che contribuiscono a formare il complesso d'inizio 43S; la metionina non è formilata, ma esiste un tRNA specifico d'inizio; la sequenza che consente il riconoscimento dell'AUG d'inizio è la sequenza di Kozak e si ha una circolarizzazione dell'mRNA che consente un rapido riciclo del ribosoma per la traduzione dello stesso mRNA. La **fase di allungamento** è molto simile tra procarioti ed eucarioti e prevede l'intervento di altri aminoacil-tRNA, che portano insieme a loro fattori EF1, portatori di una quantità di energia sotto forma di GTP. L'amminoacido si lega al sito A, viene spesa l'energia del GTP e l'amminoacido presente sul primo tRNA si sposta sul tRNA appena entrato (reazione peptidil transferasica), iniziando a formare un peptide. A questo punto interviene un EF2, che si lega in coda al ribosoma e, sfruttando l'energia dell'idrolisi, spinge il ribosoma spostando il peptide nel sito P e il tRNA vuoto nel sito di uscita. Questo avviene con cicli ripetuti. L'ultima fase è quella di **terminazione**: EF2 spinge il ribosoma e lo porta su una tripletta non senso. Rimane a questo punto solo il tRNA del sito P (quello del sito E viene rimosso) e nel sito A si lega un fattore di rilascio, che induce il rilascio della catena polipeptidica dal tRNA attraverso idrolisi del legame. Si ha la dissociazione di tutti i componenti. L'ultima azione è il taglio della metionina, il primo amminoacido che è stato inserito: questo amminoacido serve solo come segnale per iniziare la traduzione.

4. Cos'è il saggio del doppio ibrido?

È una tecnica per individuare ed analizzare interazioni proteina-proteina sfruttando l'attività trascrizionale. Il dominio di legame al DNA di un fattore di trascrizione (DBD) è fuso alla proteina X. Tale proteina ibrida è in grado di legarsi in corrispondenza della sequenza di DNA riconosciuta dal DBD che si trova in prossimità di un gene reporter, ma, mancando di un dominio di attivazione trascrizionale (AD), non è in grado di attivarne la trascrizione. Analogamente, una proteina di fusione costituita dalla proteina Y legata all'AD dello stesso o di un altro fattore di trascrizione, non sarà in grado di attivare la trascrizione del gene reporter, in quanto incapace di legarsi al DNA. Tuttavia, se la proteina di fusione X interagisce con la proteina di fusione Y, l'interazione fisica delle due proteine è in grado di ricostruire un fattore trascrizionale attivo in cui l'azione combinata di DBD e AD è resa possibile dall'interazione di X con Y. Il doppio ibrido può essere applicato alla ricerca di interattori sconosciuti di una specifica proteina.

5. Descrivere il parametro densità di superelica, calcola la densità di superelica di una molecola circolare, DNA B lungo 2400 pb con 12 superavvolgimenti negativi. Come sarà dal punto di vista topologico e dei superavvolgimenti questa molecola di DNA?

Lk e ΔLk dipendono dalla lunghezza del DNA. Per paragonare il grado di superelicità di due molecole di DNA con lunghezza diversa, quindi, è meglio utilizzare un altro parametro: la densità di superelica. Questa è definita come $\Delta Lk/Lk_0$. Se σ è negativo il DNA è più lasco, mentre se è positivo è più compatto. La molecola di DNA circolare è normalmente superavvolta con un valore di σ pari a circa -0,06.

$$W = -12$$

$$T = 2400/10,5 = 228,57$$

$$Lk = 228,57 - 12 = 216,57$$

$$\Delta Lk = 216,57 - 228,57 = -12$$

$$\sigma = -12/228,57 = -0,05$$

Questo significa che il 5% di giri negativi sono stati aggiunti: il DNA è più lasco.

6. Regolazione a livello dei promotori PR, PL e PRM di Cro e il repressore lambda

La regione di controllo è formata dal gene Cro, dal gene cl e dai tre promotori. Il repressore lambda e Cro controllano in modo mutuamente esclusivo la trascrizione nella regione di controllo: se c'è espressione di Cro non c'è espressione di cl e viceversa. Importante per questo tipo di regolazione è che ci siano tre promotori. PR e PL sono promotori forti, che hanno alta affinità per la polimerasi e non hanno bisogno di fattori aggiuntivi per iniziare la trascrizione dei propri geni a valle. PR induce inizialmente la trascrizione di Cro, mentre PL induce la trascrizione di N. PRM è un promotore debole,

così che ha bisogno di un attivatore (cI) per essere attivato. In queste condizioni, appena il fago infetta la cellula, la polimerasi non inizia la trascrizione di cI, ma legandosi a PR e PL induce la sintesi di Cro e di N. La sintesi di Cro porta il fago verso il ciclo litico, mentre se viene espresso cI si va verso il ciclo lisogenico. Quando il fago inietta il proprio genoma a livello della cellula batterica, quindi, la prima cosa che si attiva è il ciclo litico, appunto perché PR è un promotore forte e induce subito la sintesi del gene precoce immediato cro, con produzione della proteina cro. Non si lega invece a PRM, che è un promotore debole con funzione di mantenere la trascrizione di cI: il repressore non viene trascritto e il batterio rimane nel ciclo litico. Ci sono diversi operatori che si sovrappongono a PR e PRM e a cui si legano cI e Cro. Legandosi a questi operatori queste proteine si comportano come repressori. I due non hanno la stessa affinità per i tre promotori: Cro ha maggiore affinità per OR3, mentre cI per OR1. Il fatto che si leghino con diversa affinità alla regione di controllo, consente di regolare in modo mutuamente esclusivo la trascrizione. Quando il repressore è legato a OR1 e OR2, la molecola in OR2 ha funzione attivatrice reclutando la polimerasi a livello di PRM e inducendo la propria sintesi. Se, tuttavia, i livelli di repressore si alzano troppo, interviene un'autoregolazione negativa, poiché anche il sito OR3 sarà occupato da cI e questo reprimerà il promotore PRM. Nello stesso tempo, il repressore, legandosi a OR1 e OR2 impedisce il legame della RNA polimerasi sul promotore PR, spegnendo la trascrizione di Cro e di tutti i geni a valle. Anche Cro regola la trascrizione a livello della regione di controllo: la proteina va a legarsi a OR3, verso cui ha maggiore affinità, impedendo alla polimerasi di trascrivere dal promotore PRM e inibendo così la trascrizione del repressore. Se i livelli di Cro sono troppo elevati, questo si va a legare anche a OR3, inibendo la trascrizione a partire da PR e, quindi, la propria sintesi.

7. Descrivere brevemente il processamento del tRNA nei procarioti e la principale differenza in eucarioti.

Sia nei procarioti che negli eucarioti, i tRNA vengono trascritti sotto forma di precursori che dovranno subire dei processi di maturazione per generare i tRNA funzionali. Nei procarioti, l'RNA precursore può contenere una o più molecole di tRNA oppure sia molecola di tRNA che di rRNA. La prima fase, quindi, consiste qui nell'ottenere molecole di RNA monocistrone. Entra in gioco quindi una RNasi III che è un endonucleasi che genera le molecole di pre-mRNA. Questo passaggio non è necessario negli eucarioti, dove gli RNA precursori sono generalmente monocistronici. I pre-tRNA eucariotici e procariotici contengono estremità più estese sia al 5' che al 3' che devono essere rimosse. L'estremità 5' del tRNA maturo viene generata ad opera di una endonucleasi RNasiP. La formazione dell'estremità 3' varia: nei procarioti richiede un taglio endonucleolitico a valle della tripletta CCA che, diversamente dagli eucarioti, è già presente nel precursore e l'azione successiva di una varietà di esonucleasi. Nei pre-tRNA eucarioti abbiamo al 3' estensioni di 5-15 nt, mentre non c'è la tripletta terminale 3'-CCA-5'. Abbiamo quindi un taglio endonucleolitico all'estremità 3' da parte di una RNasi o di una RNasi Z, seguita dall'aggiunta del trinucleotide CCA da parte di una transferasi. Inoltre, se presenti, vengono rimossi eventuali introni. La maturazione viene conclusa con modificazioni dei nucleotidi.

8. Perché i soppressori amber possono essere infettati?

Perché hanno una mutazione a livello dell'anticodone del tRNA che riconosce il codone di STOP prematuro, inserisce un amminoacido al suo posto e permette di continuare con la sintesi proteica.

9. Descrivere l'assemblaggio dei ribosomi

Nei procarioti: i fattori IF1 e IF3 legano la subunità 30S libera e impediscono che si associ alla subunità 50S, mantenendola così disponibile per il legame con l'mRNA. La subunità 30S con il fattore iFE si lega all'mRNA sul sito d'inizio della trascrizione, riconosciuto mediante appaiamento di basi tra l'estremità 3' dell'rRNA 16S e la sequenza di Shine-Dalgarno. In corrispondenza dell'emisito P si lega anche IF2-GTP, a cui poi si unisce il tRNA iniziatore, completando così la formazione del cosiddetto complesso d'inizio 30S. Il rilascio dei fattori IF1 e IF3 permette il legame della subunità 50S; il successivo rilascio anche di IF2 con idrolisi di GTP porta al complesso d'inizio 70S. Negli eucarioti si ha l'interazione del complesso di pre-inizio 43S (costituita dalla subunità piccola del ribosoma, diversi fattori di inizio e il complesso ternario contenente il tRNA con la metionina) con il complesso eIF4/mRNA, che risulta nella formazione del complesso d'inizio 48S, in cui l'estremità 5' dell'mRNA è legata alla subunità 40S del ribosoma. Successivamente, il processo di scansione porta la subunità ribosomale 40S con i fattori associati fino al codone AUG d'inizio. L'unione della subunità ribosomale 60S e il rilascio di tutti i fattori, portano alla formazione del complesso d'inizio 80S.

10. Descrivere i processamenti dell'RNA

Il processamento è il meccanismo attraverso il quale l'RNA precursore dà luogo ad un RNA maturo, cui corrisponde una specifica funzione. Per generare gli rRNA maturi vengono escisse delle parti in eccesso dei loro precursori grazie a tagli endonucleolitici, eventualmente seguiti da un'azione di rifinitura con esonucleasi.

Negli organismi eucarioti l'rRNA è trascritto dal DNA nel nucleolo come un precursore contenente differenti molecole di RNA. Per ottenere rRNA maturi deve essere processato e questo avviene attraverso snoRNA associati a proteine. Ci sono reazioni di metilazione, pseudouridilazione e taglio che portano all'rRNA 18S, 5.8S e 28S. L'rRNA 5S, invece, deriva da un altro cromosoma.

[Per processamento mRNA e tRNA guardo altre domande].

11. Spiegare la regolazione positiva e negativa dell'operone Lac

L'operone Lac comprende i geni per la galattosidasi, per la permeasi e per l'acetilasi. Questo è soggetto a due tipi di regolazione:

- uno specifico (o negativo): si attua come risposta alla mancanza di glucosio;
- uno generalizzato (o positivo): si attua come risposta ad una carenza energetica della cellula.

Regolazione specifica: il gene regolatore in trans porta alla sintesi costitutiva del repressore, che in condizioni normali, in cui il glucosio (substrato preferito) è presente, è attivo. Quando il glucosio manca e è necessario operare la scissione del lattosio a galattosio e glucosio, l'allolattosio, un analogo strutturale del lattosio, si lega al repressore. Questo porta ad un cambio conformazionale, che porta il repressore a staccarsi dal promotore. L'RNA polimerasi, quindi, può ora accedere al promotore e trascrivere i geni per il metabolismo del lattosio in modo da ricavare lo zucchero di cui ha bisogno.

Regolazione globale: se il glucosio e il lattosio sono presenti contemporaneamente, trovandosi a scegliere, la cellula preferisce consumare prima tutto il glucosio a sua disposizione, per iniziare poi a usare il lattosio. Il glucosio è più facile da degradare e fornisce rese energetiche maggiori. Se però è presente anche il lattosio esso induce la trascrizione dei geni dell'operone Lac (rimuovendo il repressore). In queste condizioni si osserva una debolissima trascrizione dei geni di questo operone (repressione da catabolita). Il suo promotore è infatti un promotore debole, con bassa affinità per la RNA polimerasi. Per stabilizzare la RNA polimerasi sul promotore è necessaria la proteina CAP, che per potersi legare al sito CAP adiacente al promotore e reclutare la polimerasi deve essere attivata dal cAMP, che viene sintetizzato ad opera dell'adenilato ciclasi. La sua concentrazione è inversamente proporzionale a quella di glucosio, così che quando i livelli di glucosio diminuiscono, aumenta di pari passo la concentrazione del cAMP. Questo si lega alla CAP e la attiva. Questa si lega al sito CAP, vicino al promotore. In questo modo si aumenta enormemente la trascrizione di questi operoni inducibili.

12. Spiegare i meccanismi di regolazione nell'operone trp

Per quanto riguarda l'operone trp abbiamo due tipi di controllo:

- uno all'inizio;
- uno alla fine (meccanismo di attenuazione).

Per quanto riguarda il controllo all'inizio: quando è presente trp, questo si lega al repressore costitutivamente trascritto, ne provoca il cambio di conformazione e lo attiva: viene repressa la trascrizione dei geni. Questo è necessario perché un eccesso di trp porta ad un'intossicazione della cellula.

Meccanismo di attenuazione: questa regolazione si basa sulla creazione, durante la trascrizione e traduzione, di strutture secondarie in una regione dell'operone (sequenza leader, trpL) posizionata prima dei geni strutturali e dopo l'operatore. La sequenza leader è costituita da 161 nt e contiene una breve ORF, ovvero un codone d'inizio seguito da 13 codoni per amminoacidi, di cui 2 per il trp adiacenti. Sovrapposte a valle ci sono delle sequenze complementari che possono appaiarsi e formare delle strutture a forcina:

- l'appaiarsi della regione 2 e 3 risulta in un antiterminatore;
- l'appaiamento tra la regione 3 e 4 porta ad un segnale di terminazione della trascrizione.

Non essendoci una membrana nucleare nei batteri, trascrizione e traduzione sono appaiate: la traduzione avviene subito a valle. Quando il trp è in condizioni basse ma sufficienti, il ribosoma è in grado di portare avanti la traduzione del peptide leader fino al codone di stop UGA che si trova tra la sequenza 1 e la sequenza 2. Procedendo fino a questo punto, i ribosomi si estendono sopra la regione 2 e le impediscono di appaiarsi. Di conseguenza, a livello dell'mRNA leader si forma una forcina tra la sequenza 3 e la sequenza 4, che è un terminatore della trascrizione. L'RNA polimerasi viene quindi rilasciata e si è prodotto un mRNA attenuato, che viene eliminato insieme al peptide leader. Si interrompe

così la trascrizione del trp, che è già abbondante nella cellula. Nel caso, invece, in cui ci sia bassa concentrazione di trp, i ribosomi si bloccano a livello dei due trp adiacenti (non ci sono tRNA disponibili), che fanno parte della regione 1. Questa pausa consente alla sequenza 2 di appaiarsi con la sequenza 3, prima che venga trascritta la sequenza 4. Non essendo la forcina 2-3 un terminatore della trascrizione, la trascrizione continua e possono essere sintetizzati gli enzimi necessari per il metabolismo del trp.

13. Cosa sono i ribozimi?

I ribozimi sono piccole molecole di RNA con funzione catalitica. Essi possono effettuare dei tagli idrolizzando il legame fosfodiesterico, creando un fosfato ciclico 2'-3' all'estremità 3' e un OH all'estremità 5'. Questa molecola non può essere utilizzata per aggiungere ulteriori nucleotidi, in quanto non c'è un 3'OH libero. Come conseguenza, se questo mRNA tagliato si trova libero, non legato a proteine, verrà degradato. Ci sono diversi tipi di ribozimi, un esempio dei quali è fornito dagli enzimi "hammer head", che partecipano al processing di piccoli genomi di RNA appartenenti a viroidi patogeni delle piante.

14. Spiegare come avviene la replicazione a livello dei telomeri

La replicazione avviene a partire da dei primer a RNA che forniscono il 3'OH di cui la DNA polimerasi ha bisogno per aggiungere nucleotidi. Questi primer vengono poi degradati e sostituiti dalla polimerasi I. Tuttavia, il primer terminale rimosso dall'estremità 5' del filamento lagging, non può essere sostituito: non c'è un 3'OH libero che consente l'aggiunta di nucleotidi. Man mano che la cellula si replica questo gap si fa sempre più grande, fino a che non si arriva alla regione codificante (ad ogni ciclo di replicazione vengono così persi 50-150 nt). La perdita di nucleotidi porta ad un'estremità sporgente il 3', che nell'uomo ha una sequenza (5'-TTAGGG-3'). Alcuni organismi risolvono questo problema attraverso un meccanismo di ricombinazione. Nella maggior parte dei casi, tuttavia, c'è l'intervento delle telomerasi. Queste sono enzimi composte da due elementi:

- un elemento TERT (Telomerase Reverse Transcriptase): è la componente dell'enzima che ha attività di trascrittasi inversa;
- una componente TERC (Telomerase RNA component): è una molecola di RNA con sequenza complementare rispetto a quella telomerica (3'-TTAGGG-5').

La telomerasi, quindi, si appaia con la sua componente TERC all'estremità 3' sporgente. La sua componente TERT copia la sequenza, allungandola di un'unità. La traslocazione e il successivo posizionamento consente l'aggiunta di numerose unità della sequenza telomerica ripetuta. Per procedere alla ricostruzione del telomero interviene la primasi, che ha ora a disposizione uno stampo più lungo.

15. Descrivere la composizione di un promotore classico

Il promotore è un tratto di DNA posto a monte della sequenza codificante, sulla quale l'RNA polimerasi può attaccarsi per cominciare la trascrizione. Il promotore nei procarioti è unico ed è posto ad una distanza di -10/-35 -10 0 -35 significa che si trovano 10 o 35 nt a monte rispetto al TSS, che ha valore +1. Anche questo sito d'inizio della trascrizione fa parte del promotore classico. Il promotore può essere diviso in più zone:

- sequenza consenso a -35 (TTGACA);
- sequenza consenso -10 (TATAAT);
- sequenza intermedia di 19 pb;
- sito d'inizio della trascrizione.

Le regioni da 6 pb sono quelle cui fa aggancio l'RNA polimerasi. Il fatto che siano ricche in A e T le rende facilmente denaturabili per formare il complesso aperto.

16. Descrivere il nucleotide e nucleoside dell'RNA

L'RNA è una catena polinucleotidica, cioè un polimero lineare di nucleotidi.

I nucleotidi sono costituiti da tre componenti: uno zucchero pentoso, una base azotata e uno o più gruppi fosfato. Lo zucchero, nel caso dell'RNA, è il ribosio, che presenta un gruppo OH in posizione 2'. Le basi azotate che si trovano nell'RNA sono di due tipi: purine, a doppio anello eterociclico, e pirimidine, a singolo anello. Le purine sono adenina e guanina, le pirimidine sono citosina e uracile. Ciascuna base è legata al C1' attraverso un legame glicosidico che interessa l'N1 delle pirimidine o l'N9 delle purine. Zucchero più base formano i nucleosidi, che prendono il nome di adenosina, guanosina, citidina, timidina e uridina.

Ai nucleosidi possono poi essere legati uno o più gruppi fosfato e, in tal caso, prendono il nome di nucleotidi: questi sono chiamati acido adenilico, acido guanilico, ecc. Infatti, il gruppo fosfato conferisce una valenza acida alla molecola.

Inoltre, considerati come molecole indipendenti, i nucleotidi possono contenere un solo gruppo fosfato, due oppure tre. In particolare, i nucleotidi che vengono utilizzati come substrato per la sintesi del DNA e dell'RNA hanno tre gruppi fosfato legati in serie sulla posizione 5' dello zucchero. In questo caso i gruppi fosfato vengono indicati, a partire da quello legato direttamente allo zucchero, come α , β e γ .

17. Descrivere cosa sono Lk e Lk0 e come variano l'uno rispetto all'altro quando il DNA è superavvolto positivamente e negativamente.

Lk, o linking number, è il numero di volte che un filamento deve passare attraverso l'altro (aperto in un solo punto) in modo da essere completamente separati e richiusi come filamenti singoli. Nel caso in cui la doppia molecola sia nel suo stato completamente rilassato si parla di Lk0. Lk e Lk0 sono collegati dalla relazione $\Delta Lk = Lk - Lk0$. Quando ΔLk è pari a zero significa che Lk e Lk0 corrispondono e il DNA si trova nella sua forma rilassata; quando ΔLk è maggiore di zero, Lk è maggiore di Lk0 e il DNA è superavvolto positivamente; quando ΔLk è minore di zero abbiamo superavvolgimenti negativi. Quando il DNA è superavvolto positivamente, esso risulta più compatto, mentre quando è superavvolto negativamente tende spontaneamente ad aprirsi.

18. Topoisomerasi: definizione e funzione. Differenze fra topoisomerasi tipo I e -II.

Le topoisomerasi sono degli enzimi che creano un taglio (o più) transiente sul DNA per tenere sotto controllo lo stato topologico del DNA, aiutando la doppia elica o il singolo filamento ad aprirsi (se necessario) e tornare alla conformazione DNA B. È un meccanismo controllato dall'enzima stesso, che rimane covalentemente attaccato a uno o due filamenti di DNA. L'azione delle topoisomerasi modifica il Lk della molecola di DNA circolare covalentemente chiusa. Il taglio sul DNA avviene grazie ad una reazione di transesterificazione tra il gruppo OH di una tirosina esposta nella topoisomerasi e lo scheletro fosfato del DNA. Una volta che questa tirosina si è legata rimane attaccata ad una delle estremità del filamento in modo covalente, mentre rimane legata in un modo non covalente all'altra estremità. In questo modo riesce a controllare il passaggio di un filamento attraverso l'altro. Dopo la modificazione topologica controllata che riduce o aumenta il Lk, avviene la reazione inversa nella quale il gruppo OH libero del filamento tagliato attacca il legame Tyr - DNA e ripristina la continuità del DNA. Le topoisomerasi si classificano in base al numero di filamenti di DNA che sono tagliati durante la reazione catalitica di transesterificazione:

- Topoisomerasi di tipo I: l'enzima induce una singola rottura su uno dei filamenti della doppia elica passando l'altro singolo filamento attraverso. Questi enzimi sono in genere monomeri e ad ogni ciclo variano il numero di legame di una sola unità. Non richiedono energia (ATP);
- Topoisomerasi di tipo II: l'enzima introduce un taglio sfalsato su entrambi i filamenti di DNA (non nel singolo filamento), permettendo il passaggio della doppia elica attraverso la rottura che poi viene rilegata. Inducono una variazione del Lk di due unità. Possono essere omodimeriche o multimeriche e richiedono energia (ATP) per poter funzionare.

19. Topoisomerasi di tipo I. Cosa sono, come agiscono e risultato della loro azione sul DNA.

Le **Topo - I** introducono un'interruzione transitoria solo su un singolo filamento della molecola e variano il Lk di una sola unità. Creano il taglio tramite una reazione di transesterificazione tra il gruppo OH della tirosina e il gruppo fosfato del DNA: si lega ad una estremità, permette al filamento di aprirsi grazie ad un cambiamento conformazionale e va ad interagire in modo non covalente con l'altra estremità del DNA. Praticamente un filamento di DNA passa attraverso l'altro, la topoisomerasi si richiude e poi lo libera con una reazione inversa rispetto a quella di transesterificazione. L'energia che usa è quella del superavvolgimento del DNA, anche se gli eventi di rottura e rilegazione non la richiedono: non ha bisogno di ATP per funzionare.

Le Topo-I si possono distinguere in due tipi diversi:

- **Topo -IA:** durante la reazione si legano alla estremità 5' del filamento tagliato;
- **Topo -IB:** durante la reazione si legano all'estremità 3' del filamento tagliato.

L'essere di tipo IA o IB comporta una differenza anche nel meccanismo di rotazione o di passaggio di un filamento rispetto all'altro: nel tipo IA abbiamo quello che viene chiamato "strand passage", che comporta che la Topo apra un singolo filamento, allarghi l'interruzione e faccia passare attraverso di essa l'altro filamento. Nel tipo IB quello che succede è che l'enzima introduce una singola rottura su uno dei filamenti della doppia elica, permettendo la rotazione su se stesso del filamento intatto per un numero variabile di giri: è quella che viene chiamata "strand rotation" o

“rotazione controllata”.

Ci sono topo IA e IB in diversi organismi:

- Tipo IA: Topo I e III di batteri e archeobatteri, Topo III di eucarioti, girasi inversa;
- Tipo IB: Topo I eucariota, Topo poxvirus, Alcune batteriche.

Le Topo IA possono catenare o la decatenare i filamenti di DNA.

20. Topoisomerasi di tipo II. Cosa sono, come agiscono (meccanismo) e risultato della loro azione sulla molecola del DNA.

Le Topo II creano delle interruzioni transitorie su entrambi i filamenti di DNA, modificando il Lk di 2. Questi enzimi sono caratterizzati da due cancelli, un cancello N in alto e un cancello C in basso. Hanno bisogno di energia che consente l'apertura del cancello N e la chiusura dello stesso. Vengono tagliati entrambi i filamenti della molecola di DNA e questo comporta che ci sono due tirosine che si legano covalentemente con l'estremità 5'. Il meccanismo è chiamato “a doppio cancello”: abbiamo il cancello N aperto e pronto ad accogliere il segmento T (*transport*, filamento da trasportare). Il segmento G (*gate*) è già inserito nella topoisomerasi. Questo cancello N deve poi chiudersi: il legame con due molecole di ATP permette il cambio di conformazione che chiude il cancello N con il segmento T dentro.

A questo punto il segmento G deve aprirsi, in modo da fare passare attraverso di esso il segmento T da trasportare. Nel momento in cui si apre attraverso una reazione di transesterificazione passa il segmento T, si richiude il cancello N e si apre il cancello C facendo passare il frammento T che abbiamo trasportato. L'idrolisi dell'ATP cambia la conformazione della topo II, taglia il segmento G permettendo il passaggio del segmento T e provocando l'apertura del cancello C.

Anche le Topo – II possono catenare o decatenare due molecole di DNA circolare.

21. Spiegare la fase di inizio ed allungamento durante la replicazione del DNA in procarioti (fino a legame dei frammenti creati)

1. Il primo evento molecolare consiste nel riconoscimento di OriC da parte della proteina DnaA. L'origine minima di replicazione di E.coli contiene 4 ripetizioni di 9 pb e 3 ripetizioni di 13 pb. DnaA inizialmente si attacca alle ripetizioni di 9 pb: la proteina si lega in modo cooperativo formando una specie di nucleo centrale proteico intorno al quale si avvolge il DNA di OriC. Successivamente DnaA si lega anche alle 3 ripetizioni di 13 pb facilitando la denaturazione localizzata del DNA in quella regione e permettendo l'assemblaggio di altre proteine replicative;
2. Il passaggio successivo consiste nel caricamento di **DnaB** e **DnaC** a livello della bolla di denaturazione creatasi nella regione di oriC dando origine a un complesso proteico, chiamato **complesso di pre-innesco** della sintesi del DNA. DnaB possiede un'attività elicasica, per cui consumando ATP è in grado di separare i due filamenti di DNA. DnaC stabilizza l'esamero che è il DnaB nella forcella di replicazione. Lo svolgimento del DNA genera una tensione torsionale del DNA che è risolta dalle topoisomerasi;
3. La bolla di denaturazione creatasi nella regione dell'origine tende a rinaturare: per evitare ciò, il DNA a singolo filamento originatosi per azione della DnaA e dell'elicasi viene stabilizzato dal legame della proteina **SSB** (“single strand binding protein”) alla regione di ssDNA. SSB ha un'affinità maggiore per il DNA a singolo filamento. Essa interagisce con il DNA in modo cooperativo;
4. Tutte le DNA polimerasi necessitano di un'estremità 3'OH pre-formata per poter aggiungere i nucleotidi successivi. In E.coli e negli eucarioti gli inneschi che forniscono il 3'OH che può essere allungato dalla DNA polimerasi sono corte molecole di RNA complementari alla catena da replicare; tali molecole funzionano da primer sia per far partire la sintesi continua ad un'origine del filamento leading, sia per iniziare la sintesi di tutti i frammenti di Okazaki sul filamento ritardato. La **DNA primasi** di E.coli è costituita da un singolo polipeptide e la sintesi degli RNA primer costituisce il primo effettivo evento di sintesi nella replicazione;
5. Arriva la DNA polimerasi III: il complesso γ carica sul DNA le due copie della subunità β . Ciascuna copia della subunità β forma un omodimero a forma di anello all'interno del quale passa il filamento da replicare. Il passaggio all'interno di β consente di mantenere la DNA polimerasi vicina al filamento durante l'operazione di polimerizzazione. Una volta caricate le due subunità β , si assemblano sul DNA i due nuclei catalitici. I due nuclei catalitici replicano contemporaneamente il filamento leading e il filamento lagging della doppia elica e i nucleotidi sono aggiunti nella direzione 5' \rightarrow 3'. Questo concetto è solo apparentemente in contrasto con il fatto che avendo due filamenti con polarità opposta i due nuclei catalitici dovrebbero anch'essi muoversi in direzioni opposte. Il primer con l'estremità 3' recluta la polimerasi che può aggiungere nucleotidi senza interruzione: la sintesi del DNA nel filamento leading va nella direzione della forcella e avviene in modo continuativo fino alla fine dello stampo. Il filamento lagging, che ha polarità opposta, è replicato in frammenti di Okazaki. Il meccanismo è sempre lo stesso: la polimerasi si lega al primer e comincia ad aggiungere nucleotidi. La replicazione del lagging strand continua finché la polimerasi non trova l'estremità 5' del primer successivo, già sintetizzato. Questo provoca il distacco del complesso catalitico e β dal DNA. Il complesso γ

rimane associato al nucleo catalitico che agisce sul filamento ritardato. Esso carica un nuovo complesso β sul primer così da iniziare la sintesi di un nuovo frammento di Okazaki. Il complesso γ serve sia per caricare che per scaricare β e questo consente il riciclo del nucleo catalitico della polimerasi. La replicazione di questo secondo filamento rimane indietro e questo porta alla formazione di un ripiegamento (ansa) del filamento stesso. L'ansa fornisce lo stampo per la sintesi del filamento ritardato. Questo è il **modello a trombone**;

6. Nel DNA complementare replicato non possono essere inglobati i piccoli frammenti di RNA sintetizzati dalla primasi: questi vengono principalmente rimossi dall'attività esonucleotidica 5' \rightarrow 3' della DNA polimerasi I che, mentre elimina gli RNA primer, è in grado di riempire i gap che essa stessa genera. La polimerasi I è in grado di polimerizzare nella stessa direzione, anche se più lentamente. I nick, ovvero le interruzioni che rimangono tra i diversi frammenti di Okazaki, sono saldati dall'azione della DNA ligasi;

22. Spiegare la fase di allungamento e terminazione durante la replicazione del DNA in procarioti (dalla creazione dell'innesco)

7. Il genoma di E.coli è costituito da un unico replicone: la sintesi del DNA inizia da OriC formando così due forcelle di replicazione che procedono bidirezionalmente. Quando le due forcelle di replicazione si incontrano termina la replicazione. La **terminazione della replicazione** di E.coli è controllata da ripetizioni di una breve sequenza di 23 pb, chiamata **ter**. Le sequenze ter sono posizionate circa a 180° rispetto a OriC e le diverse sequenze fanno terminare l'una o l'altra delle due forcelle di replicazione. Queste sequenze sono posizionate seguendo direzioni opposte rispetto alla replicazione che devono bloccare, essendo chiamate "clockwise" o "counterclockwise". La prima bloccherà la replicazione del filamento sintetizzato nel senso orario, mentre il secondo bloccherà il filamento sintetizzato in senso antiorario. Per impedire il movimento delle forcelle di replicazione le sequenze ter devono legare una proteina chiamata TBP ("Ter Binding Protein") o Tus. Essa permette che la replicazione possa continuare per una forcella di replicazione, ma nel sito in cui devono bloccare la replicazione, effettivamente la bloccano. Lo stesso vale per l'altra forcella: la proteina tus permette la replicazione del filamento che segue il senso della replicazione delle ter sulle quali sono posizionate, ma blocca la replicazione del filamento che arriva in senso opposto. Nell'ultimo sito ter saranno queste proteine tus che interagiscono con la elicasi e le impediscono di continuare ad aprire la doppia elica. Come risultato le forcelle si bloccano in una regione contenente due Tus con orientamento opposto e le molecole sono catenate. Durante la terminazione della replicazione è necessaria anche l'azione di una DNA topoisomerasi IV per separare fisicamente le due molecole di DNA circolari che si sono originate.

23. Descrivere l'esperimento chiamato "Bomba di Avery". Cosa dimostra?

24. Descrivere le diverse combinazioni di operone-regolazione.

Esistono due **tipi di operoni**:

- Inducibili: la trascrizione viene indotta grazie all'aggiunta di una molecola segnale, chiamata induttore;
- Reprimibili: la trascrizione viene repressa grazie a una molecola segnale, chiamata co-repressore.

La regolazione degli operoni avviene con due **meccanismi**:

- Controllo negativo: l'elemento in trans blocca la trascrizione legandosi all'operatore in cis;
- Controllo positivo: l'elemento in trans induce la trascrizione legandosi all'operatore in cis.

In un operone inducibile a controllo negativo l'elemento in trans induce la sintesi di una molecola che inibisce la trascrizione: è un repressore. Il repressore è trascritto e sintetizzato in modo costitutivo: essendo sempre presente andrà a legarsi alla regione per la quale ha affinità, l'operatore. Quando si aggiunge l'induttore nel mezzo di cultura, esso si lega al repressore e ne cambia la conformazione, non permettendo più il legame con la regione operatore. Si attiva così la trascrizione. In questo caso è induzione perché la trascrizione viene indotta e controllo negativo perché quello che viene sintetizzato in trans è un repressore. In un operone inducibile a controllo positivo quello che viene prodotto in trans è un attivatore, che però non è attivo. Nel momento in cui si aggiunge nel mezzo di cultura l'induttore, questo si lega all'attivatore e lo rende attivo. Esso si può quindi legare al DNA, stabilizzare l'RNA polimerasi e indurre la trascrizione. È un operone inducibile perché abbiamo l'induzione della trascrizione, a controllo positivo perché nel gene in trans viene prodotto un attivatore.

Esistono anche gli **operoni reprimibili**, i quali possono avere controllo negativo o positivo. Il risultato è sempre la repressione della trascrizione. In un operone reprimibile a controllo negativo l'elemento in trans produce un repressore inattivo. Quando viene aggiunto il corepressore, il repressore diventa attivo, si lega al DNA e reprime la trascrizione.

Negli operoni a repressione con controllo positivo l'elemento in trans dell'operone trascrive per un attivatore attivo. Quando metto il corepressore nel mezzo di cultura dei miei batteri, questo si lega all'attivatore e lo disattiva, in modo tale che non può più stabilizzare l'RNA polimerasi e si inibisce la trascrizione.

25. Spiega brevemente le caratteristiche fisico-chimiche del RNA che permettono che possa assumere delle conformazioni secondarie e terziarie. Qual è la polarità del RNA e perché viene così definita?

L'RNA è una singola catena polinucleotidica perché l'OH in posizione 2' dello zucchero crea un ingombro sterico tale per cui non può assumere una conformazione a doppia elica del tipo B come il DNA. Un vantaggio è che può assumere altrettante conformazioni, portando alla formazione di strutture secondarie. Questo è reso possibile dal fatto che:

- Le basi, non essendo appaiate, possono ruotare liberamente attorno al legame fosfodiesterico e glicosidico, esponendo residui che in altre condizioni sarebbero nascosti;
- le basi sono più accessibili e possono interagire tramite diverse interazioni, che non sono solo W-C.

Sequenze diverse consentono così la formazione di strutture costituite da anse, forcine o gemme. Un'altra caratteristica è che le basi possono subire delle modificazioni e questo consente di aumentare la possibilità di legami non canonici. La molecola ha polarità 5' - 3' e viene così definita in base alle sue estremità: da una parte c'è un nucleotide che ha un 5' libero, mentre il carbonio 3' è impiegato nel legame fosfodiesterico con il nucleotide adiacente. Dall'altra la molecola termina con un 5' impegnato nel legame fosfodiesterico con il nucleotide adiacente, mentre il carbonio 3' è libero.

26. Descrivere brevemente gli eventi che portano alla maturazione dell'mRNA

Nei procarioti l'RNA prodotto alla fine della trascrizione è praticamente maturo. Negli eucarioti, invece, c'è bisogno di modifiche chimiche a livello di basi azotate e ribosio perché risulti maturo. La maturazione dell'mRNA avviene nel nucleo e prevede i seguenti passaggi:

- Creazioni di un cap all'estremità 5' ("capping"): aggiunta della 7-metilguanosina (m7G), con la finalità di proteggere (da esoribonucleasi) e permettere l'aggancio al ribosoma. Il fatto che ci sia questo CAP-5' aumenta l'efficienza di splicing e traduzione e facilita il trasporto al citoplasma. Questo step avviene nelle prime fasi della trascrizione, quando il trascritto raggiunge i 20-40 nt;
- Aggiunta di una coda poli-A in 3': tra i 5 e i 30 nt a monte del sito di taglio dell'mRNA (dove finisce il trascritto dell'mRNA) c'è una sequenza di nt che funziona da segnale per la poliadenilazione, ovvero per l'aggiunta di una codina poli-A. Quando il trascritto viene portato al citoplasma, la codina poli-A verrà degradata da RNAsi, la cui azione è in parte compensata da poli-A polimerasi;
- Eliminazioni degli introni ("splicing"): avviene a livello degli introni, in modo da eliminare le sequenze non codificanti. Il pattern di splicing è determinato dall'azione cooperativa dei diversi attivatori e repressori e la loro localizzazione all'interno di introni ed esoni. Anche la conformazione del pre-mRNA e le modifiche epigenetiche possono regolare il processo di splicing;
- Altre modificazioni post trascrizionali ("editing"): processo che porta alla modificazione di una o più posizioni della sequenza nucleotidica mediante due meccanismi: conversione di una base azotata in un'altra e inserzione/delezione di nucleotidi. Questo porta alla formazione di varianti di RNA.

Una volta che questo è avvenuto l'mRNA si trasferisce al citoplasma per continuare la maturazione.

Il primo trascritto che si forma durante la trascrizione può essere chiamato trascritto primario o hnRNA (= "heterogeneous nuclear RNA").

27. Descrivere i siti di legame per il tRNA all'interno del ribosoma

Il ribosoma procariotico ha al suo interno 3 siti di legame:

- Sito A (aminoacilico o accettore): lega il tRNA amminoacetilato, ovvero il tRNA con l'amminoacido caricato;
- Sito P (peptidilico): lega il tRNA che è già entrato e sul quale si è legato la catena polipeptidica in formazione;
- Sito E (exit): lega il tRNA scaricato, che ha lasciato l'amminoacido sulla catena polipeptidica nascente ed è pronto per essere rilasciato.

A e P occupano due emisiti: un emisito sulla subunità minore e uno sulla maggiore. E, invece, è presente solo sulla subunità maggiore. Il tRNA entra nel sito A dove il suo anticodone viene appaiato con il codone dell'mRNA; si posiziona

poi sul sito P, dove l'amminoacido trasportato si lega alla catena peptidica nascente; infine si porta sul sito E, dove viene rilasciato.

28. Spiegare il processo mediato da terminatori intrinseci. In quale processo cellulare avviene?

La trascrizione termina con sequenze specifiche chiamate terminatori. Questi fanno sì che l'RNA pol si stacchi, si liberi l'RNA trascritto e la doppia elica si riappaia. I terminatori intrinseci (o rho-indipendenti) non hanno bisogno in questo di fattori aggiuntivi. La sequenza di un terminatore intrinseco è caratterizzata dalla presenza nel DNA di sequenze palindromiche ricche in G-C e seguite da un tratto di 8-9 nt ricco in A-T (determina una stringa poli-U sul RNA). Quando l'RNA pol trova e trascrive la sequenza terminatore, l'RNA trascritto assume, nella regione ricca in G-C, una struttura a forcina che blocca e destabilizza il complesso di allungamento e ne provoca la dissociazione in corrispondenza della sequenza di U, dove i legami sono più deboli.

29. Spiega la differenza tra il complesso aperto e chiuso nella fase d'inizio della trascrizione

L'RNA polimerasi scorre sul DNA fino al punto in cui incontra il promotore. Inizialmente, nella "fase di legame", il dominio $\sigma 1$ maschera le regioni $\sigma 4$ e $\sigma 2$, che sono quelle che consentono il legame specifico dell'RNA polimerasi sul promotore. Questo viene definito complesso chiuso e non consente ancora di iniziare la trascrizione: il legame con il DNA è ancora debole e reversibile. Quando, però, l'oloenzima è completo, c'è un cambio di conformazione che permette lo spostamento di $\sigma 1$, liberando gli altri domini σ . $\sigma 4$ si lega alla regione -35 del promotore e questo stabilizza l'oloenzima sul DNA; $\sigma 2$ si lega alla regione -10 e induce un cambiamento conformazionale del complesso enzima-DNA, cosa che permette l'inizio della trascrizione. Questo è quello che viene definito complesso aperto. Avviene, quindi l'apertura del DNA e la formazione della bolla di trascrizione.

30. Cosa sono le ribonucleoproteine nucleari eterogenee? Quale funzione svolgono?

Le hnRNP sono complessi di proteine e RNA presenti nel nucleo durante la trascrizione e la successiva fase di modifica del pre-mRNA. La presenza di proteine legate al pre-mRNA serve come segnale che il pre-mRNA stesso non è ancora completamente processato e, quindi, non pronto per essere trasportato al citoplasma. Dopo lo splicing, le proteine rimangono legate agli introni e fanno sì che vengano degradati. Le hnRNP sono anche responsabili del rafforzamento o dell'inibizione dei siti di splicing, rendendo tali siti più o meno accessibili allo spliceosoma.

31. Spiega brevemente cosa sono il cropping e il dicing

Sono due processi che portano alla maturazione i precursori dei miRNA. I miRNA, infatti, sono generati da grandi precursori, denominati miRNA primari (pri-miRNA). Questi sono trascritti dalla RNA pol II e quindi subiscono i processi di capping, splicing e poliadenilazione. Vengono poi sottoposti a un processo di maturazione sia a livello nucleare, denominato cropping, che a livello citoplasmatico, denominato dicing. Questi processi vengono operati rispettivamente dai complessi DROSHA e DICER, entrambi appartenenti alla classe delle RNAsi III. Il cropping rimuove tratti extra di sequenza alle estremità 5' e 3' del pri-miRNA e genera una struttura a forcina di lunghezza pari a 60-100 nt, denominata pre-miRNA e caratterizzata da una sporgenza costituita da una coppia di basi. Il pre-miRNA viene successivamente traslocato nel citoplasma dal sistema esportina-5/Ran-GTP attraverso il poro nucleare. Nel dicing viene formato il miRNA duplex attraverso la rimozione del loop del pre-miRNA. Successivamente viene selezionato uno dei due filamenti complementari del miRNA duplex, che costituisce il miRNA attivo. L'altro filamento viene eliminato.

32. Cosa fanno le aminoacil-tRNA sintetasi? Quante ce ne sono? Cosa sono i tRNA isoaccettori?

Le aa-tRNA sintetasi sono una classe di enzimi che catalizza il processo di caricamento degli amminoacidi sui corrispondenti tRNA, attivando così i tRNA. Per farlo catalizzano la formazione di un legame acilico ad alta energia tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido e il gruppo idrossilico in posizione 2' o 3' della adenosina che costituisce l'estremità 3' del tRNA.

In genere nella cellula ci sono 20 differenti tipi di aa-tRNA sintetasi, una per ciascun tipo di amminoacido. Mentre ogni aa-tRNA sintetasi riconosce un solo specifico amminoacido, essa riconosce tutti i tRNA sui quali questo amminoacido può essere caricato, cioè i cosiddetti tRNA isoaccettori. Esistono infatti più tRNA per amminoacido (teoria del vacillamento, il terzo nt di ogni codone non è decisivo per la correlazione tRNA- amminoacido). Il riconoscimento del tRNA corretto è mediato da diverse basi distribuite sul tRNA: c'è una sull'anticodone, una sul braccio accettore e una base adiacente al CCA. Queste regioni qui sono quelle che determinano il riconoscimento specifico dell'amminoacido grazie alle sintetasi. Per questo si dice che la specificità e accuratezza della traduzione dipende da questi enzimi che mediano il riconoscimento specifico del tRNA con l'amminoacido e l'mRNA.

33. Spiega la sintesi abortiva e il processo in cui avviene

La sintesi abortiva avviene nella fase d'inizio della trascrizione. Per iniziare la trascrizione non è necessario un innesco e solitamente l'inizio è in corrispondenza di un'adenina, suggerendo una particolare affinità per questa. Quando si forma la bolla di trascrizione, l'RNA polimerasi sintetizza, senza staccarsi dal promotore, un frammento di RNA che viene rilasciato prima di raggiungere i 9 nt di lunghezza e viene eliminato. Questa sintesi abortiva è ripetuta più volte, fino a che supera la lunghezza di 9 nt: solo quando il frammento raggiunge questa lunghezza l'ibrido DNA/RNA è abbastanza stabile da continuare la polimerizzazione. Ci sono tre modelli per spiegare l'avanzamento della RNA pol e cosa succede quando non si ottiene l'ibrido DNA-RNA:

1. **Passaggio transiente:** l'enzima avanza sintetizzando un corto frammento abortivo (<9 nt) e poi indietreggia al punto di partenza sul promotore;
2. **A brucco:** la polimerasi, che secondo questo modello ha una struttura flessibile, si allunga e si contrae sul DNA durante la sintesi abortiva;
3. **Accartocciamento** ("scrunch"): l'enzima è fermo 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. Questa ipotesi è sostenuta da dati recenti.

34. Cos'è la sequenza Kozac?

Negli eucarioti, la sequenza Kozac è una corta sequenza di mRNA riconosciuta dalla subunità ribosomiale 40S mentre questa scansiona l'mRNA a partire dal cap al 5'. Solo dopo che è avvenuto il legame tra la subunità ribosomiale 40S e tale sequenza, la subunità ribosomiale maggiore può completare il complesso d'inizio consentendo l'avvio della [sintesi proteica](#); all'interno della sequenza di Kozac è contenuto il codone d'inizio AUG, codificante per la [metionina](#). Senza questa sequenza l'efficienza di sintesi proteica è molto bassa.

35. Cos'è la sequenza di Shine-Dalgarno?

Per iniziare la traduzione è necessario che il complesso d'inizio si assembli sull'mRNA in corrispondenza del codone d'inizio, che in genere è un codone AUG. Il vero codone AUG di inizio viene selezionato nei procarioti grazie alla presenza della sequenza di Shine-Dalgarno (AGGAGG) che precede, 7 nt a monte, il codone d'inizio AUG. Essa è complementare all'estremità 3' dell'RNA 16S, che è un costituente della subunità 30S del ribosoma. La subunità minore, quindi, complementa con questa sequenza S-D e si assembla il complesso d'inizio nella posizione corretta. Solo i veri AUG d'inizio sono preceduti da questa sequenza. Gli altri AUG, per metionine interne o che si trovano nelle due fasi di lettura chiuse, non la presentano e non sono utilizzate per iniziare la sintesi proteica.

36. Spiegare quale è l'utilità della "Polymerase Chain Reaction" o PCR e i diversi cicli necessari. Descrive brevemente l'evento molecolare che avviene ad ogni step della reazione.

La PCR permette di selezionare ed amplificare, da una preparazione mista di DNA, un particolare tratto di interesse, producendone un grandissimo numero di copie. Per potere amplificare dobbiamo conoscere o la sequenza del tratto di interesse o di tratti vicini al tratto di DNA di interesse. In sostanza si tratta di una replicazione in vitro del frammento di DNA ottenuta mediante una DNA polimerasi e due oligonucleotidi lunghi 20-30 nt che fungono da inneschi (primer) per la replicazione e che sono responsabili della specificità dell'amplificazione.

Oltre a ciò è necessario anche un termociclatore, una macchina che imposta delle temperature diverse in base alla fase della replicazione in cui si trova il nostro preparato. I passaggi principali della PCR sono:

- Step 1: denaturazione del DNA. La molecola di DNA va aperta in modo che i primers possano apparirsi;
- Step 2: fase di annealing. Si ha associazione dei primer ai filamenti di DNA;
- Step 3: fase di allungamento. Si ha sintesi da parte della polimerasi.

Questo ciclo viene ripetuto numerose (25-40) volte e viene preceduto da una denaturazione (step 0) e seguito da un'ulteriore fase di allungamento (step 4), per essere sicuri che tutto il processo sia concluso.

Ciascuna fase avviene ad una temperatura diversa, motivo per cui è necessario il termociclatore. Questo va programmato in modo tale da ottenere un certo numero di cicli, ciascuno dei quali ha diverse temperature per i diversi step. Normalmente sono degli step molto brevi. Un esempio di ciclo di amplificazione è il seguente:

- denaturazione: 30 secondi a 95° per denaturare il DNA;
- annealing: 30 secondi a 40-60°C per favorire l'associazione specifica degli inneschi;

- sintesi: due minuti a 72°C, che è la temperatura ottimale per la Taq polimerasi;
- allungamento finale: 5-10 minuti, a 72°C.

I parametri (temperatura, tempi e concentrazioni) di queste tre reazioni possono essere variati per tenere conto di vari fattori, tra cui la quantità di materiale di partenza, la presenza di sequenze simili a quella di interesse la composizione in basi degli inneschi, ecc. Finito il ciclo di amplificazione la macchina porta il preparato ad una temperatura di 4°C, alla quale viene conservato il DNA.

37. Descrivere l'utilità della "Polymerase Chain Reaction" e gli elementi necessari perchè la reazione avvenga.

La PCR permette di selezionare e di amplificare un particolare tratto che ci interessa di un DNA producendo un altissimo numero di copie. La PCR è quindi una reazione di replicazione in vitro di un frammento specifico di DNA. In una reazione di polimerizzazione in vitro, al buffer di reazione bisogna aggiungere:

- DNA di interesse del quale dobbiamo conoscere almeno le sequenze adiacenti al DNA che vogliamo amplificare;
- deossinucleotidi trifosfato (dNTPs): sono molto sensibili, così che devono essere conservati in ghiaccio;
- primers lunghi 20-30 nt: in vitro sono delle sequenze di DNA (mentre in vivo sono di RNA). Essi forniscono l'estremità 3'OH che serve alla DNA polimerasi per aggiungere i nucleotidi;
- DNA polimerasi (Taq polimerase poichè è termoresistente): catalizza la formazione di un legame fosfodiesterico rispettando la complementarità del filamento stampo. Le DNA polimerasi in vitro sono molto più resistenti e molto più efficienti;
- un termociclatore.

Il meccanismo prevede la formazione di un legame fosfodiesterico tra il fosforo α del dNTP e l'estremo 3'OH del primer che si appaia con il filamento stampo.

38. Descrivere cosa sono gli istoni, la loro struttura e la loro rilevanza nella organizzazione del materiale genetico.

Il compattamento del DNA dipende strettamente dall'interazione della doppia elica con gli istoni, formando il primo livello di organizzazione del DNA: il nucleosoma. Le proteine istoniche sono accomunate dalla dimensione piuttosto limitata (varia da 11 kDa dell'H4 a 28 kDa dell'H1) e dall'abbondanza di residui basici di arginina e lisina, presenti in quantità diverse nelle diverse classi di istoni (dal 15% al 29%). Gli istoni sono suddivisi in 5 classi: H1, H2A, H2B, H3 e H4. Le loro sequenze amminoacidiche hanno subito minime variazioni durante l'evoluzione. Tale conservazione è òlegata al ruolo di queste proteine: interagiscono con il DNA, molecola che è identica, nelle sue caratteristiche chimiche chimiche e di organizzazione tridimensionale, nei diversi eucarioti. Gli istoni H2A, H2B, H3 e H4 sono noti come istoni del core del nucleosoma, mentre H1 come istone linker. Tutti gli istoni della particella del core presentano un motivo strutturale comune: il ripiegamento istonico. Questo è costituito da 3 ripiegamenti ad alfa elica connessi da due anse. Questa porzione è particolarmente importante per la formazione di dimeri, necessari per il nucleosoma. Ciascun istone presenta poi una coda N-terminale, che nel nucleosoma maturo si estende all'esterno del core. Queste sono sedi di modificazioni post traduzionali che controllano aspetti della cromatina. L'H1 presenta maggiore variabilità. La sua struttura primaria è costituita da un dominio globulare centrale e da due lunghe code alle estremità. Non fa parte del core, ma si posiziona al di sopra della struttura del nucleosoma, stabilizzando l'interazione del DNA e legando 20-80 nt del DNA linker. Il dominio globulare interagisce con il DNA all'entrata e all'uscita del nucleosoma, mentre le code, interagendo con il DNA linker, ne neutralizzano le cariche elettriche. H1 è presente in una quantità dimezzata rispetto a quella degli altri istoni.

39. Descrivere la composizione completa del Nucleosoma

Il nucleosoma è il primo livello di compattazione del DNA e l'unità fondamentale della cromatina. Esso è costituito da un tratto di DNA associato ad un ottamero di proteine istoniche, che consiste in due copie degli istoni H2A, H2B, H3 e H4. La digestione di una preparazione di DNA da nucleo interfascico con nucleasi, la separazione del DNA da proteine e l'elettroforesi, consente di verificare che la cromatina è costituita da una struttura ripetuta. L'ottamero di istoni costituisce il core (o nucleo) del nucleosoma, a forma di cilindro appiattito del diametro di 10 nm. Intorno a questo cilindro il DNA compie circa 2 giri (1,8), tanto che i punti di entrata e uscita risultano vicini. La forte interazione tra DNA e core è mediata da circa 140 legami a H. Quasi tutti i legami si instaurano con gli atomi di ossigeno a livello del solco minore solo 7 a livello del solco maggiore. Da qui la conclusione che l'interazione è forte ma non sequenza specifica. Al core del nucleosoma, ma all'esterno, si associa l'istone H1, che quindi è presente in quantità pari alla metà di quella degli altri istoni. Questo è conosciuto come istone linker. Digestioni più prolungate hanno consentito di identificare che

147 pb sono la dimensione fissa del DNA associato al nucleosoma, mentre il DNA linker ha una dimensione compresa tra le 8 e le 80 pb, così che la cromatina, così che la cromatina, dipanata e rilassata al massimo, presenta una struttura a collana di perle. Le dimensioni del tratto di DNA legato al nucleosoma sono strettamente conservate e la diversità dell'unità monomerica è data dalla variabilità nelle dimensioni della regione linker. L'H1, pur non facendo parte del core del nucleosoma, contribuisce anch'esso alla struttura della cromatina interagendo con il DNA linker e inducendo una maggiore adesione del DNA all'ottamero istonico. Le proteine istoniche, che interagiscono con il DNA carico negativamente, sono fortemente basiche, essendo costituite per il 20% da arginina e lisina. La natura basica degli istoni maschera le cariche negative dei fosfati, consentendo un avvicinamento fisico altrimenti impossibile.

40. In un gel di agarosio al 1%, come saranno distribuiti durante la corsa elettroforetica un plasmide aperto linearizzato, superavvolto o rilassato?

Molecole di DNA si separano per elettroforesi anche in base alla loro struttura: a parità di dimensioni, un plasmide superavvolto corre di più poiché è più compatto; un plasmide rilassato migra più lentamente poiché è più ingombrante e fa fatica a muoversi all'interno dei pori del gel; infine un plasmide lineare aperto va ad una velocità che si colloca a metà rispetto alle altre due forme (è quello che troviamo come prodotto di PCR, per esempio).

41. Spiegare cosa sono gli enzimi di restrizione e la loro classificazione in funzione della sequenza bersaglio e delle estremità formate.

Sono endonucleasi, enzimi litici che tagliano il doppio filamento di DNA in corrispondenza di sequenze specifiche (sono state scoperte grazie ai batteriofagi). Ne esistono centinaia diversi classificabili in due categorie:

- tipo I, riconoscono una sequenza specifica di DNA ma tagliano in posizioni non specifiche ad una certa distanza dalla sequenza specifica. Sono per questo imprevedibili. Non sono utili in ingegneria genetica;
- tipo II, riconoscono una sequenza specifica e tagliano il DNA all'interno della stessa (= sito di taglio). Sono utili in ingegneria genetica. (Se si trovano in batteri diversi ma tagliano la stessa sequenza si parla di isoschizomeri). Solitamente questi enzimi riconoscono una sequenza di 4-6 nt, anche se ci sono alcuni enzimi, chiamati rare cutter, che riconoscono sequenze più lunghe. Dalla lunghezza della sequenza dipende la frequenza di taglio.

Solitamente riconoscono delle sequenze palindromiche. Ci sono ER che tagliano entrambi i filamenti nello stesso punto, generando estremità piatte (blunt ends) e altri che effettuano un taglio obliquo, lasciando estremità sporgenti al 3' o al 5' (sticky ends).

42. Descrivere cosa sono il TWIST, ROLL e TILT. Cosa determinano nella molecola di DNA?

A causa delle reazioni di impilamento e ai gradi di flessibilità che hanno i legami chimici dei nucleotidi, il parallelismo tra le due coppie di nucleotidi adiacenti non è mai perfetto. La posizione relativa delle basi, quindi, è catalogata in diversi parametri, che determinano i piegamenti e le curvature del DNA. Tre di questi parametri sono proprio il Twist, il Roll e il Tilt. Il twist rappresenta l'angolo tra due coppie di nucleotidi rispetto all'asse centrale della doppia elica; il roll è l'inclinazione, dovuta alle forze di repulsione, rispetto all'asse della coppia A-T o C-G; il tilt è l'angolo che si forma, sempre per repulsione, rispetto all'asse dello scheletro zucchero-fosfato. Queste posizioni relative influenzano la forma stessa del DNA, che può diventare curvo in base alle ripetizioni di particolari sequenze.

43. Che tipo di sequenza è il DNA ripetitivo in tandem all'interno del genoma eucariotico? Classificazione e breve descrizione

Se noi guardiamo il genoma umano, possiamo vedere che il 98% è costituito da regioni non codificanti. Questo è composto da regioni intergeniche (75%) e da introni, promotori e pseudogeni. Tra le regioni intergeniche possiamo distinguere le regioni uniche e quelle ripetitive. Queste ultime si distinguono a loro volta in Genome wide (o ripetizioni intersparse) e DNA ripetitivo in tandem. Il DNA ripetitivo in tandem è rappresentato da quelle regioni di DNA caratterizzate da sequenze di nucleotidi ripetute una di seguito all'altra. Queste sequenze vengono anche definite "sequenze intergeniche ripetute in tandem" e possono essere di diverso tipo:

- DNA satellite: altamente ripetitivo. Sono ripetizioni in tandem di una breve sequenza. Non sono trascritti e si trovano in regioni eterocromatiniche del DNA (soprattutto nel centrosoma);
- DNA microsatellite e DNA minisatellite: poco o mediamente ripetitivi. In particolare, i microsatellite sono costituiti da 1 a 10 pb, ripetuti in tandem 10-30 volte; i minisatellite sono sequenze che vanno dalle 11 alle 100 pb ripetute fino a 20 kpb. Le sequenze di DNA microsatellite presentano un elevato polimorfismo all'interno della popolazione.

44. Equazione di Fuller: cosa definisce? scriverla e descrivere i diversi parametri che la compongono.

L'equazione di Fuller descrive le possibili conformazioni spaziali della molecola di DNA a doppia elica circolare covalentemente chiusa, ovvero la topologia del DNA e il grado di superavvolgimento. È definita dalla formula $Lk = Tw + Wr$, dove Lk rappresenta il numero di legame che è il numero totale di volte con cui un filamento si incrocia su un altro in una molecola chiusa di DNA. In altre parole, è il numero di volte che un filamento deve passare attraverso l'altro in modo da essere completamente separati e richiusi come singoli filamenti. Il numero di legame è composto da Tw (twist), che è il numero di avvolgimento, ovvero il numero di giri della doppia elica rispetto all'asse centrale e da Wr (writhe) o numero di superavvolgimento, che esprime il numero di volte che l'asse centrale della doppia elica incontra se stesso formando superavvolgimenti. Può avere valori positivi o negativi in base al verso di avvolgimento.

45. Descrivere la teoria del vacillamento o tentennamento a livello codone-anticodone.

Per la metà degli amminoacidi si osserva che ciascuno di essi è codificato da codoni diversi che variano solo nella terza base della tripletta, suggerendo che quest'ultima base non è necessaria nella codificazione dell'amminoacido o serve soltanto a distinguere tra purine e pirimidine. La decodificazione del messaggio genetico viene fatta dai tRNA, che con i loro anticodoni riconoscono, per appaiamento di basi complementari, i codoni. Ci si potrebbe aspettare che fossero necessari 61 diversi tRNA per riconoscere i 61 codoni, anche se gli amminoacidi da codificare sono solo 20. La degenerazione del codice genetico in terza posizione, però, insieme al principio generale della parsimonia, suggeriva che in genere nel riconoscimento codone-anticodone siano implicati solo due appaiamenti di basi. Non sarebbe quindi coinvolto nessun appaiamento specifico tra la terza base del codone e la prima dell'anticodone. Fu quindi proposta da Crick la teoria del vacillamento, per cui nell'appaiamento codone-anticodone nel sito di decodificazione del ribosoma, l'ansa dell'anticodone del tRNA presenta una leggera deformità strutturale. Come conseguenza, nelle prime due posizioni del codone vale la solita regola di appaiamento A – U, C – G, nella terza posizione è possibile, oltre a questo, anche un appaiamento anomalo G – U (o del tipo U,C o A con il ribonucleotide modificato inosina). La deformità fa sì che le prime due basi creino degli appaiamenti stabili, mentre la terza rimane più esposta, più libera di vacillare, e fa sì che le interazioni con la terza base dell'mRNA possano formarsi anche con appaiamenti non canonici. Questo fenomeno, quindi, può spiegare da un lato la degenerazione del codice genetico in terza posizione e dall'altro la necessità di un numero di tRNA inferiore a 61.

46. Che tipo di sequenza è il DNA ripetitivo intersperso all'interno del genoma eucariotico? Classificazione e breve descrizione

Le regioni non codificanti del genoma umano rappresentano il 98% del DNA. Questo è composto da regioni intergeniche (75%) e dagli introni, promotori e pseudogeni (23%). Nelle regioni intergeniche possiamo distinguere tra sequenze uniche e sequenze ripetute. All'interno di queste ultime sono presenti le ripetizioni in tandem, che includono le regioni satellite, e le ripetizioni intersparse (o genome wide). Per quanto riguarda queste ultime, si tratta di elementi trasponibili, in grado di spostarsi nel genoma, che non contribuiscono alla funzione del genoma. Queste regioni ripetitive sono di due tipi:

- classe 1 o retrotrasposoni: le sequenze vengono trasposte attraverso un intermediario a RNA, che grazie all'attività di una trascrittasi inversa produce DNA che verrà poi integrato. I LINES (Long Interspersed Nuclear Elements, 21% del genoma umano) sono lunghi 5000 pb e sono elementi autonomi in quanto codificano per tutti gli elementi necessari per la propria trasposizione (un promotore per la RNA pol II, 1 ORF che codifica per la proteina che lega il proprio DNA quando viene trascritto e 1 ORF che ha attività di trascrittasi inversa e esonucleasica. I più abbondanti sono gli L-1. I SINES (Short Interspersed Nuclear Elements, 13%) sono lunghi 80-400pb. Non codificano per alcuna molecola funzionale e per spostarsi hanno dipendono da retrotrasposoni autonomi (L1). I più abbondanti sono gli Alu. Gli LTR (Long Terminal Repeat, 8%) contengono sequenze di DNA ripetute ai lati di una regione codificante.
- classe 2 o trasposoni a DNA. Non usano intermediari a RNA e non dipendono dalla cellula ospite. Si propagano con meccanismo replicativo (nuova copia si integra in un'altra posizione del genoma, raddoppia il nr di trasposoni) o conservativo (produce enzima trasposasi che taglia il trasposone e lo sposta, il nr di trasposoni rimane uguale).

47. Descrivere brevemente come è organizzata l'informazione genetica nei procarioti a differenza degli eucarioti. Definisci i concetti: operone e policistronico.

I genomi procarioti sono in genere costituiti da un singolo cromosoma circolare di piccole dimensioni. Questi genomi si trovano in forma di uno o più ammassi abbastanza compatti, chiamati nucleoidi, all'interno della cellula (no membrana), e appaiono ancorati in un punto alla superficie interna della membrana cellulare (mesosoma). Il nucleotide è composto per l'80% da DNA e il restante 20% da proteine e RNA. Tra le proteine, sono state isolate proteine associate al nucleotide (NAPs), che sono implicate nella organizzazione del cromosoma. In alcuni casi si osserva la presenza di plasmidi. Nel genoma dei procarioti i geni sono per lo più organizzati in operoni. Un operone è un gruppo di geni adiacenti trascritti insieme in una singola molecola di mRNA, che per questo motivo viene definito policistronico. Nella maggior parte dei casi i geni di un operone, oltre ad essere disposti sequenzialmente nel genoma, sono anche correlati funzionalmente, in quanto codificano per proteine implicate in una comune via metabolica. L'RNA che si forma negli eucarioti, invece, è prevalentemente monocistronico, così che una sequenza codificante corrisponde ad un mRNA. Un operone è costituito da un'unica sequenza promotore, una sequenza operatore che regola l'espressione dei geni strutturali, i geni strutturali e un gene regolatore che regola per la trascrizione. Con questa organizzazione si riduce al massimo l'utilizzo di sequenze non codificanti.

48. Descrivere i tipi di superavvolgimenti dal punto di vista della composizione e topologia.

Esistono due tipi di superavvolgimenti della doppia elica: planctonemici e toroidali. Quello che vediamo nel DNA nudo si chiama avvolgimento plectonemico. È il DNA che si avvolge su se stesso. I superavvolgimenti di questo tipo sono generati a partire da forze topologiche o torsionali intrinseche al DNA. Può essere positivo, se avviene nello stesso verso della doppia elica (destrorsa), o negativo, se avviene in senso opposto. Gli avvolgimenti positivi conferiscono stabilità e proteggono dalla denaturazione, compattando la molecola. Il superavvolgimento negativo, avendo senso opposto rispetto al DNA destrorso causa una diminuzione delle costrizioni topologiche, consentendo al DNA di subire delle aperture. L'avvolgimento che si ha quando il DNA è avvolto intorno all'ottamerone istonico si chiama avvolgimento toroidale.

49. Regolazione da parte di CIII e CII sui promotori PRE e PRM e livelli di CI e Cro per entrata in ciclo litico o lisogenico

Il ciclo litico è a sua volta regolato da due geni, da cII e cIII. CII è un attivatore della trascrizione per promotori deboli, CIII è una proteina che protegge CII dalla degradazione proteolitica. CII è fondamentale per decidere se si va verso il ciclo lisogenico oppure no. cII si trova a valle del gene Cro e viene descritto con questo verso destra a partire dal promotore PR, mentre cIII è a valle del gene N ed è trascritto verso sinistra a partire da PL.

Uno dei promotori deboli su cui agisce cII è PRE, che si trova a valle di cII, orientato verso sinistra: promuove la sintesi delle prime molecole di repressore cI. PRM, poi, è responsabile del mantenimento di questo repressore codificato da cI. Esso non può iniziare la sintesi del repressore stesso, in quanto è un promotore debole e ha bisogno di un attivatore per reclutare la polimerasi. L'attivazione del promotore PRM esclude la funzione di ogni altro promotore lambda.

Andiamo ora a vedere il **meccanismo** che induce il fago a scegliere tra il ciclo litico e quello lisogenico. Subito dopo l'infezione inizia la trascrizione dei geni precoci immediati N e cro a partire da PL e PR. Questa prima attivazione dà il via al ciclo litico. Se, però, durante la fase tardiva, del ciclo litico, viene attivata la trascrizione del gene cI a partire dal promotore PRE, può essere attivato il ciclo lisogenico. Questo promotore manca della sequenza -35, cosa che rende indispensabile il ruolo di cII come transattivatore positivo: ha bisogno di cII per legare la RNA pol e stabilizzarla nella regione dove manca la sequenza -35. Quindi, se la proteina cII è presente in quantità elevate, il fago andrà verso la lisogenia, mentre se non sarà abbondante e in grado di produrre abbastanza repressore, il fago andrà verso il ciclo litico. La sequenza degli eventi, quindi, prevede che: cII è trascritto in un secondo momento rispetto a cro. Aumentando cII si stimola il legame della RNA pol in un promotore a valle, che è il Pre, che fa sì che inizi la trascrizione nel filamento opposto del gene cI. Si ha quindi una sintesi iniziale di cI, che è bassa. cI ha però un'affinità molto alta per l'operatore, così che bastano poche molecole per portare all'attivazione della sintesi di ulteriore cI a partire dal promotore Prm. Se aumentano i livelli di cI è inibita la trascrizione di Cro e porta il fago verso il ciclo lisogenico. Le condizioni di crescita del batterio sono quelle che decidono quale delle due vie di sviluppo intraprendere. Infatti, quando i batteri sono sani, lambda tende ad intraprendere la via litica, dove le particelle fagiche possono infettare altre cellule sane. Quando le cellule sono deboli e crescono lentamente il fago tende ad integrarsi e aspettare tempi migliori. CII, infatti, è molto instabile e viene degradata da una proteasi specifica chiamata FtsH, codificata da E.coli. La capacità di cII di indurre il ciclo lisogenico dipende dalla velocità con la quale viene degradata dalla proteasi. Se le cellule crescono bene, le proteasi sono più abbondanti, cII scarseggerà e il fago proseguirà nel ciclo litico, altrimenti il contrario. La proteina CIII è anch'essa bersaglio di FtsH. È un bersaglio primario di proteasi: quando ci sono sia CII che CIII, le proteasi preferiscono attaccare la seconda.

CII attiva anche altri due promotori necessari alla crescita lisogenica: Pi e PAQ, dei quali il primo regola la trascrizione del gene int, che serve a promuovere la ricombinazione sito-specifica per l'integrazione. L'altro promotore, Paq, si trova all'interno del gene Q. Quando questo promotore si lega a cII induce la sintesi di un RNA antisense, che silenzia la sintesi

di Q (antiterminatore) e la trascrizione si blocca a questo livello. Non si possono quindi formare tutte le proteine che servono per la formazione delle particelle virali, quali quelle della testa e della coda. Questo significa andare verso il ciclo lisogenico.

50. Descrivere l'esperimento che dimostra la replicazione semiconservativa del DNA.

L'esperimento di Meselson e Stahl dimostra che il DNA si replica in modo semiconservativo e non conservativo o dispersivo.

Per questo esperimento hanno sfruttato il diverso comportamento del DNA in un gradiente di cloruro di Cesio (CsCl). Più pesante è il DNA, più questo si sposta verso il fondo della provetta con gradiente. Normalmente un DNA con isotopi di azoto-15 è più pesante di DNA con N-14 e quindi forma una banda che va verso il fondo. Per dimostrare la replicazione semiconservativa hanno fatto replicare batteri con DNA contenente isotopi N-15 (generazione 0) in un liquido di coltura con isotopi N-14. Il DNA dei batteri prodotti (generazione 1) si posizionava nel gradiente di CsCl formando una banda a metà tra il DNA con soli N-14 e quello con soli N-15. Se la replicazione avvenisse in modo conservativo il DNA della generazione 1 avrebbe dovuto posizionarsi nel gradiente in due bande distinte (metà DNA con N-15 e uno con N-14). In realtà la generazione 1 presentava un filamento ereditato dai batteri N-15 e uno di nuova sintesi con N-14 prelevato dal liquido di coltura. Con un'ulteriore replicazione si formano due bande nel gradiente: una a metà come nella generazione 1 e una in basso come la generazione 0. Se la replicazione fosse dispersiva le bande sarebbero casuali perché ogni filamento sarebbe con peso diverso a seconda di quanta doppia elica originale fosse stata ereditata. Di conseguenza l'unico modello compatibile è la replicazione semiconservativa.

51. Descrivere l'Esperimento di Griffith. Cosa dimostra?

L'esperimento di Griffith del 1928 portò a scoprire il "principio trasformante". Egli stava lavorando con due ceppi di *S.pneumoniae*: ceppo Rough (R) senza capsula e non infettivo e ceppo Smooth (S) dotato di capsula e in grado di dare la polmonite. La capsula, infatti, difende dalle sistema immunitario dell'ospite. Quando il ceppo S viene inattivato alzando la temperatura e poi iniettato nei topi, perde l'effetto patogeno. Tuttavia, quando il ceppo S inattivato viene mescolato con il ceppo R e i due sono iniettati insieme nei topi, questi contraggono la polmonite e muoiono. Isolando i batteri dal sangue di questi topi morti, Griffith scoprì che il ceppo R, normalmente non patogeno, acquisisce la capsula. G. ipotizzò che qualcosa del ceppo S inattivo penetrasse nel ceppo R, convertendolo in virulento. Lui chiamò questo qualcosa "principio trasformante".

52. Descrivere l'Esperimento del frullatore. Cosa dimostra?

L'esperimento del frullatore fu un esperimento svolto nel 1952 da Hershey e Chase per dimostrare la natura del "principio trasformante" identificato nel 1928 dall'esperimento di Griffith. Sfruttarono per l'esperimento il fago T2, composto unicamente da un capsido proteico e DNA al suo interno. Quando un fago infetta un batterio, vi inietta il materiale genetico, mentre il capsido proteico rimane all'esterno della cellula infettata. I due scienziati marcarono radioattivamente il DNA di una colonia di fagi con ^{32}P e le proteine del capsido di un'altra colonia di fagi con ^{35}S . Subito dopo l'infezione dei batteri con i fagi marcati nel brodo di coltura, questo venne frullato con un normale frullatore, provocando il distacco del capsido fagico vuoto. Questo consentì di dimostrare che il DNA marcato con il fosforo si trovava solo nelle cellule dei batteri, ma non nel supernatante, mentre le proteine marcate con zolfo si trovavano nel supernatante ma non nelle cellule. Questo esperimento dimostrò che il DNA è il materiale genetico del fago.

53. Regolazione di Int e Xis per la entrata nel ciclo lisogenico o nel ciclo litico

L'integrazione e l'escissione del fago dipendono da due proteine: int (integrasi) e xis (escissionasi). Per l'integrare il suo genoma in quello dell'ospite e, quindi, avviare il ciclo lisogenico, il fago deve produrre livelli elevati di int e livelli quanto più possibile bassi di xis. La proteina CII, agendo sul promotore P_i , attiva la trascrizione che poi si arresta in un sito di terminazione a valle di int. Questo promotore è all'interno di Xis, così l'mRNA sintetizzato contiene al 5' solo parte della sequenza codificante di xis, cui segue l'intera sequenza codificante di int. Questo risulta in un'alta produzione di int. Una certa quantità di xis e di int sono prodotte anche a partire dal promotore P_L , ma l'efficienza di P_i rende comunque più alti i livelli di int. In queste condizioni, in cui ho molta più integrasi che escissionasi, è favorita l'integrazione nel DNA batterico e si va quindi verso il ciclo lisogenico. Nel caso della crescita litica il fago deve produrre alti livelli di Xis. Qui CII non è molto attivo e quindi il messaggero preponderante sarà quello prodotto a partire da P_L , che comprende le sequenze codificanti sia per xis che per int. Per effetto di p_N , che agisce da antiterminatore, la trascrizione che parte da questo promotore continua oltre i terminatori di N e di int e la polimerasi trascrive in un unico mRNA anche la regione sib, che forma una forcina. Questa forcina viene riconosciuta da una RNasi III, che la degrada a partire dall'estremità più vicina a int. Si produce così più xis che int e si va verso il ciclo litico. Questo fenomeno è detto retroregolazione ed è un controllo post trascrizionale. Dopo esposizione a radiazioni UV di un batterio lisogenico, viene indotta la fase litica.

Bisogna produrre grandi quantità sia di xis che di int per poter fuggire da una cellula danneggiata. Poiché Pi è inattivo per mancanza di CII, viene usato PL, ce produce un mRNA contenente sia xis che int, ma non sib. Il processo di integrazione, mediante i siti di ricombinazione attP e attB, infatti, separa sib da int, in modo da garantire le condizioni per l'escissione quando necessario. In questa condizione abbiamo molto xis e molto int e in queste condizioni la formazione delle particelle virali è garantita, in quanto ci sono molte molecole fuori dal DNA batterico.

54. Cosa sono le DNA ligasi?

Le ligasi sono enzimi in grado di riunire frammenti di DNA precedentemente tagliati, utilizzando l'energia dell'ATP e catalizzando la formazione del legame diesterico. Quando ci troviamo in presenza di frammenti di DNA con estremità sporgenti, le DNA ligasi possono unirli solamente se sono stati tagliati con lo stesso enzima di restrizione, o con enzimi di restrizione ma che lasciano le stesse estremità coesive. Frammenti con estremità coesive sono legati tra loro più fortemente che non frammenti con estremità piatte. Per quanto riguarda gli estremi piatti, questi possono essere legati anche se sono stati generati da enzimi di restrizione diversi. In questo caso non si ricostruisce la sequenza nucleotidica originaria.