

Biologia molecolare

Enzimi di restrizione

Oltre alle mutazioni ci sono anche altri marcatori genetici: **i siti di riconoscimento per enzimi di restrizione**.

Gli enzimi di restrizione sono endonucleasi specifiche, che riconoscono ognuno una sequenza specifica di DNA, lunga da 4 a 8 nucleotidi. Gli enzimi di restrizione proteggono la cellula batterica dai virus degradando il DNA virale. Le sequenze riconosciute dagli enzimi di restrizione, qualora occorrono nel genoma batterico, sono protette dalla degradazione da una metilazione in A o in C; ove queste sequenze si trovino in un DNA estraneo, non sono in genere metilate e vengono quindi tagliate dalle nucleasi di restrizione.

Se una mutazione cade fuori da un gene, non si nota. I siti di riconoscimento per gli enzimi di restrizione sono ravvisabili anche fuori dai geni. Essi ci permettono la mappatura di tratti più o meno estesi di DNA.

Identificando i siti di restrizione, siamo in grado di capire dove gli enzimi di restrizione taglieranno.

Elettroforesi su gel di DNA \Rightarrow la velocità di migrazione è inversamente proporzionale alla dimensione della molecola di DNA. Essa ci permette di quantificare la dimensione di un frammento di DNA tagliato da enzimi di restrizione.

Se muta una (o più) base in un sito di riconoscimento per enzimi di restrizione, ci sarà un taglio in meno, e il frammento di DNA sarà più lungo.

DNA polimerasi I di E. Coli \Rightarrow costituita da una subunità, formata da 3 domini:

- DNA polimerasi
- Esonucleasi $3' \Rightarrow 5'$
- Esonucleasi $5' \Rightarrow 3'$

Se si rimuove il terzo dominio \Rightarrow **frammento di Klenow** \Rightarrow è usato il laboratorio perché molto più veloce, anche se perde la capacità di esonucleasi $5' \Rightarrow 3'$.

Nick translation \Rightarrow serve per sintetizzare filamenti di DNA marcati radioattivamente. E' il $P_i \alpha$ ad essere marcato radioattivamente (i $P_i \beta$ e γ vengono rimossi nella sintesi del legame fosfodiesterico). Si usa la DNAsi I, che forma un nick in $3'-OH$ di un nucleotide. La DNA polimerasi I allunga il nick, rimuovendo i nucleotidi pre-esistenti. Alla DNA polimerasi I si forniscono nucleotidi marcati. Dopo un po', essa si fermerà e lascerà un altro nick (\Rightarrow nick translation), perché non riesce a procedere più di tanto. Il nick verrà poi saldato dalla DNA ligasi.

Trascrizione (procarioti)

RNA polimerasi \Rightarrow 5 subunità:

- $2 \alpha \Rightarrow 40 \text{ kD}$ \Rightarrow la sua estremità C-terminale si può legare ad una sequenza UP posta a monte delle due sequenze di consenso classiche (esamero-35 e Pribnow box); è necessaria per l'assemblaggio del nucleo dell'enzima ($\alpha_2\beta\beta'$)
- $\beta \Rightarrow 150 \text{ kD}$ \Rightarrow compie i legami fosfodiesterici tra i nucleotidi
- $\beta' \Rightarrow 150 \text{ kD}$ \Rightarrow compie i legami fosfodiesterici tra i nucleotidi
- $\sigma \Rightarrow 70 \text{ kD}$ \Rightarrow riconosce il promotore e vi fa legare l'RNA polimerasi

L'enzima di base necessario per la trascrizione, dopo che questa è già iniziata, consta delle prime quattro subunità. La subunità σ è necessaria per iniziare la trascrizione (fa riconoscere e legare alla RNA polimerasi il promotore).

Elettroforesi

- gel di agarosio \Rightarrow per molecole ad alto pM (è un gel a maglie larghe)
- gel di poliacrilammide \Rightarrow per molecole a basso pM (è un gel a maglie strette)

Nell'elettroforesi, la corrente elettrica fa migrare le molecole cariche positivamente verso il polo negativo, e le molecole cariche negativamente verso il polo positivo.

Il DNA, completamente carico negativamente, migra verso il polo positivo.

Per le proteine, siccome ci sono cariche sia positivamente che negativamente, per far migrare tutte le proteine verso il polo positivo le si ricoprono con SDS (detergente anionico). Così si può misurare il pM: le proteine più leggere migrano più velocemente verso il polo positivo, quelle più pesanti meno.

Footprinting \Rightarrow esperimento con cui si capisce come la subunità σ dell'RNA polimerasi riconosce il promotore.

Si prende un tratto di DNA contenente un promotore e lo si mette a contatto con l'RNA polimerasi. Quindi, si usa la DNasi I, che taglia casualmente le varie molecole di DNA. Essa costituirà tutti i possibili segmenti di DNA di varia lunghezza. I tagli, però, mancheranno nella regione in cui la RNA polimerasi ha protetto la molecola di DNA, legandovisi. Questa regione costituisce il promotore.

Il footprinting, più in generale, è utile a determinare le sequenze nucleotidiche riconosciute e legate da proteine che legano il DNA. Innanzitutto, si isola un frammento di DNA puro, marcato ad un'estremità con ^{32}P . Questa molecola viene poi tagliata con una nucleasi o con un reagente che produca tagli casuali a singolo filamento nel DNA. Dopo che la molecola è stata denaturata per separare i suoi due filamenti, i sottoframmenti del filamento marcato così ottenuti sono separati su gel e rivelati mediante autoradiografia. Il profilo delle bande ottenute dal DNA tagliato in presenza di una proteina che lega il DNA viene confrontato con quello ottenuto in sua assenza. Quando la proteina è presente, essa copre i nucleotidi nel sito di legame e protegge i legami fosfodiesterici dal taglio. Come risultato, i frammenti marcati che terminano nel sito di legame verranno a mancare, lasciando un intervallo nel profilo del gel, che viene chiamato "footprint" (orma).

Promotore (procarioti)

- sequenza UP (rara)
- TTGACA (esamero -35: a -35)
- TATAAT (Pribnow box: a -10)

Maggiormente le sequenze di consenso di un gene sono simili a quelle "ideali" (= che hanno per ogni locazione la base più ricorrente), più forte sarà quel promotore.

Se si mutano le sequenze di consenso in modo da farle assomigliare di più a quelle ideali (*mutazioni up*), il promotore diventa più forte (\Rightarrow aumenta la trascrizione); se, invece, le si fanno differire ulteriormente (*mutazioni down*), il promotore diventa più debole (\Rightarrow diminuisce la trascrizione).

Regolazione della trascrizione

1. RNA polimerasi si lega al promotore \Rightarrow complesso binario chiuso
2. RNA polimerasi apre il DNA sul promotore \Rightarrow complesso binario aperto
3. Inizia la trascrizione di piccoli RNA abortivi \Rightarrow complesso ternario aperto
4. Quando uno dei piccoli RNA riesce ad essere allungato, il fattore σ si stacca: finisce la fase di inizio e inizia la fase di allungamento.

Il complesso binario aperto è molto più stabile di quello chiuso. Il passaggio da chiuso ad aperto viene ottenuto mediante un aumento della temperatura.

Il fattore σ dissociato può essere riutilizzato da altre RNA polimerasi.

Ci sono vari tipi di fattori $\sigma \Rightarrow$ in E. Coli il più comune è σ^{70} (pM = 70 kD). Ha varie regioni: la 2 interagisce con l'esamero -10, la 4 con l'esamero -35.

In caso di heat shock, il fattore σ^{70} , che si lega ai promotori dei geni normali, viene sostituito dal fattore σ^{32} , che si lega ai promotori di geni per le proteine da shock da calore (Hsp). Esse sono proteine chaperonine che aiutano le altre

proteine a ripiegarsi correttamente, quando queste si denaturano in seguito a heat shock. Il promotore delle Hsp è diverso da quello dei geni normali.

Terminatori

La trascrizione termina a livello delle **sequenze terminatrici** o **terminatori**.

Ce ne sono due tipi:

- *Intrinseci* \Rightarrow DNA palindromico che forma una struttura a forcina di capelli (*hairpin loop*), seguito da una sequenza ricca di U. Non è necessario un appaiamento perfetto. Le coppie G-C (3 legami H) aumentano la stabilità.
- *Rho-dipendenti* \Rightarrow richiedono il fattore rho \Rightarrow elicasi ATP-dipendente \Rightarrow apre la doppia elica tra RNA e DNA. Rho è una proteina ausiliaria che si lega all'RNA in fase di crescita e raggiunge l'RNA polimerasi quando questa indugia su una sequenza terminatrice. C'è comunque una forcina di capelli, ma manca la sequenza ricca di U.

La sequenza ricca di U nei terminatori intrinseci serve a facilitare il distacco dell'RNA neotrascritto (A-U = 2 legami H).

Antiterminazione \Rightarrow controlla la capacità dell'RNA polimerasi di continuare la trascrizione oltre un terminatore. È operativa sia nei fagi, che negli operoni batterici.

Ad es., i fagi temperati come il fago λ scelgono se intraprendere la via litica o lisogenica tramite l'eventuale utilizzo dell'antiterminazione. Il fago λ infetta i batteri inserendo alcuni suoi geni nel genoma del batterio ospite. Se l'RNA polimerasi batterica si ferma ai terminatori \Rightarrow via lisogenica (il fago rimane quiescente); se l'RNA polimerasi batterica ignora i terminatori (antiterminazione) \Rightarrow via litica (vengono trascritti anche i geni del fago \Rightarrow lisi della cellula ospite).

Nus \Rightarrow proteine che aiutano l'RNA polimerasi a terminare la trascrizione. La più importante è NusA.

Fattore σ \Rightarrow riconosce il *promotore* e vi fa *legare* l'RNA polimerasi

NusA \Rightarrow riconosce il *terminatore* e vi fa *staccare* l'RNA polimerasi

Entrambi sono riciclabili. Sono alternativi: l'uno si può attaccare quando l'altro si è staccato.