

Attività formativa:	Biologia Molecolare dei Procarioti
Modulo didattico:	Biologia Molecolare dei Procarioti
CFU	6
Ore	48
Tipo	Lezioni frontali

TEMA	ORE COMPLESSIVE DI CIASCUN TEMA	CONTENUTI	DURATA (ORE) DI CIASCUN CONTENUTO	TIPO (F= frontale, L= Laboratorio, E=esercitazioni)
Introduzione al Corso	1	Introduzione all'organizzazione del corso e alla modalità di verifica dell'apprendimento. Riepilogo dei concetti di base sulla trascrizione; accenni di chimica del DNA/RNA e nomenclatura; fasi della trascrizione (inizio, elongazione, terminazione).	1	F
Il processo della Trascrizione Batterica	9	Definizione dei componenti di base costituenti l'RNA polimerasi batterica. Identificazione e caratterizzazione funzionale del fattore sigma: specificità e interazioni con il promotore. Caratteristiche delle sequenze del promotore: box -10, box -35. Analisi dello stato di associazione sigma-core e modello del "sigma cycle"; superamento dell'interpretazione rigida del modello del "sigma cycle". Interazioni dell'RNA polimerasi con il DNA nella fase di riconoscimento del promotore.	5	F
		Overview degli eventi che portano all'inizio di trascrizione: I step – riconoscimento del promotore e formazione del complesso chiuso RPc; II step – transizione RPc – RPo o isomerizzazione; III step – formazione del RPo. IV step – inizio della sintesi di RNA/scrunched complex: possibili modelli, dimostrazione sperimentale del ruolo svolto dalla regione linker tra domini s3 e s4; IV step – Transcription Elongation Complex. Analisi dettagliata del fenomeno di "schrunching": presentazione in aula dei research papers che ne hanno dimostrato il meccanismo. Fase di elongazione: considerazioni sul problema della topologia del DNA durante l'elongazione e coinvolgimento delle topoisomerasi; error rate durante la trascrizione e meccanismi di correzione accoppiati alla trascrizione; breve descrizione del meccanismo e del ruolo svolto dal sistema "Transcription-coupled DNA repair". Fase di terminazione: terminatore intrinseco o Rho-indipendente; terminatore Rho-dipendente.	4	F

Meccanismi di Regolazione Trascrizionale nei Procarioti	14	Meccanismi di controllo trascrizionale. 1) forza del promotore; 2) alternative sigma factors (meccanismi di regolazione trascrizionale, traduzionale e post-traduzionale, esempi di regolazione); 3) small ligands (caratteristiche e principali aspetti della regolazione positiva e negativa dell'RNA polimerasi mediata da DksA e guanosina tetra/penta fosfato); 4) regolatori trascrizionali (modulazione dell'attività dei regolatori trascrizionali, meccanismi di attivazione semplice e di repressione semplice, meccanismi complessi di regolazione ed integrazione di diversi segnali ambientali); 5) phase variation (meccanismi genetici ed epigenetici della phase variation); 6) folded chromosome (caratteristiche e funzioni delle "nucleoid associated proteins", ruolo della struttura della cromatina batterica nella regolazione trascrizionale). Network di regolazione trascrizionale nei procarioti: aspetti teorici e approcci sperimentali.	12	F
		Meccanismi che assicurano specificità nelle interazioni proteina-DNA. Considerazioni generali sull'interazione proteina-DNA. Meccanismi di lettura: direct vs indirect readout. Struttura delle DNA binding proteins. Struttura del DNA e variazioni strutturali sequenza-dipendenti: global shape variation e local shape variation. Meccanismi di riconoscimento proteina-DNA: base readout nel major groove; local shape readout; global shape readout. Combinazione di diversi meccanismi di readout.	2	F
RNA Regolativi nei Procarioti	18	Principi generali della regolazione mediata da RNA regolativi. Descrizione delle diverse classi in cui si suddividono gli RNA regolativi. Sequenze al 5'-UTR (regolazione in cis): meccanismo dell'attenuazione trascrizionale; RNA thermometers, riboswitch. RNA regolativi che legano e modulano l'attività di proteine target. Base pairing regulatory RNAs – cis encoded: descrizione delle caratteristiche generali e meccanismi di regolazione che agiscono sulla trascrizione, sulla stabilità del trascritto e sulla traduzione. Base-pairing regulatory RNAs – trans encoded: descrizione delle caratteristiche generali, principali meccanismi di regolazione positiva/negativa, ruolo dell'RNA-chaperone Hfq. Trattazione approfondita del meccanismo d'azione del sRNA SgrS in risposta a stress da accumulo di zuccheri-fosfati.	10	F
		Introduzione del sistema CRISPR/Cas nel contesto dell'Horizontal gene transfer. Scoperta e caratteristiche dei loci CRISPR/Cas. Dimostrazione sperimentale del coinvolgimento del sistema CRISPR/Cas nell'immunità batterica. Struttura dei loci CRISPR/Cas. Breve descrizione del meccanismo d'azione: fase 1 – immunizzazione; fase 2 – immunità; modello per l'espressione ed il processing; modello per interference/targeting; modello per la distinzione del self dal non-self. Descrizione dettagliata delle fasi di adattamento/acquisizione della memoria e dell'espressione dei geni cas e dell'RNA CRISPR in E. coli. Confronto dei diversi meccanismi di processing del precursore pre-crRNA nelle diverse categorie di CRISPR. Analisi approfondita del meccanismo di processing nel CRISPR di tipo 2: ruolo del tracr-RNA e dell'RNAsi III. Analisi del meccanismo di interference nel CRISPR di tipo 2: ruolo della nucleasi Cas9. Descrizione della scoperta, delle principali caratteristiche e del meccanismo di azione delle proteine anti-CRISPR. Principali applicazioni del sistema CRISPR/Cas9.	8	F
Journal Club	6	Ciclo di seminari in cui ciascuno studente presenta un articolo di approfondimento di uno degli argomenti trattati durante il corso.	6	F

