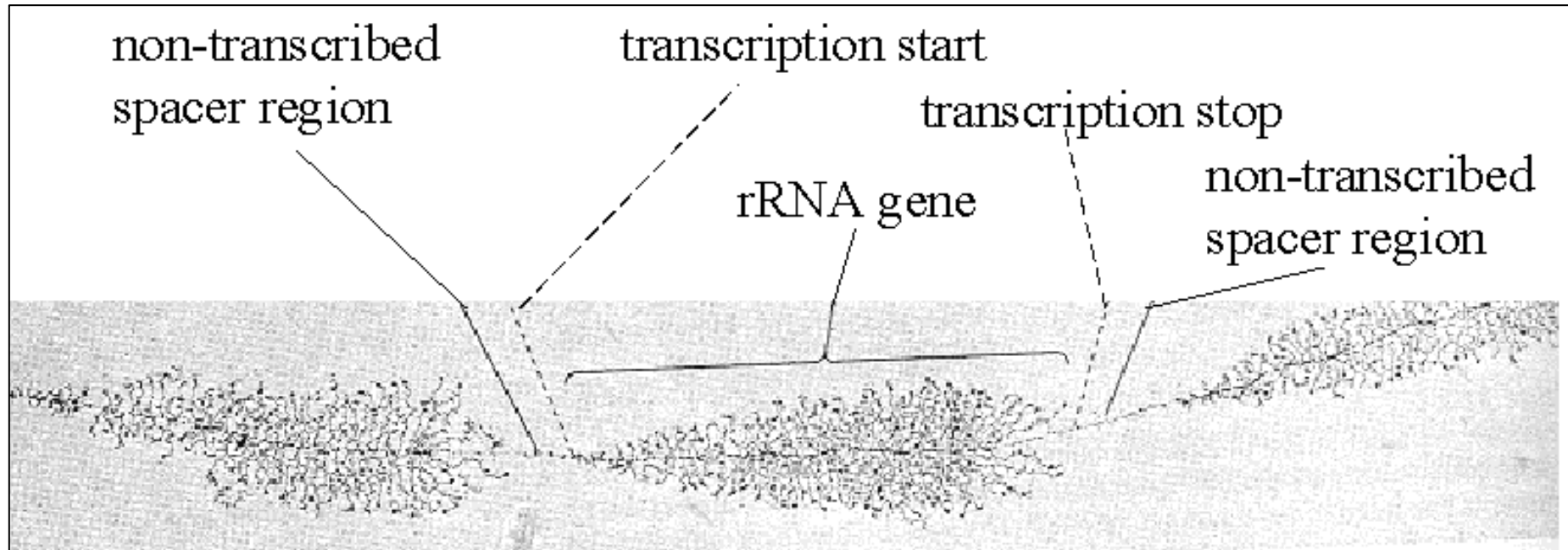


# **Travaux dirigés de Biologie Moléculaire**

**7**

**semaine 9**

# Electron micrograph of transcription



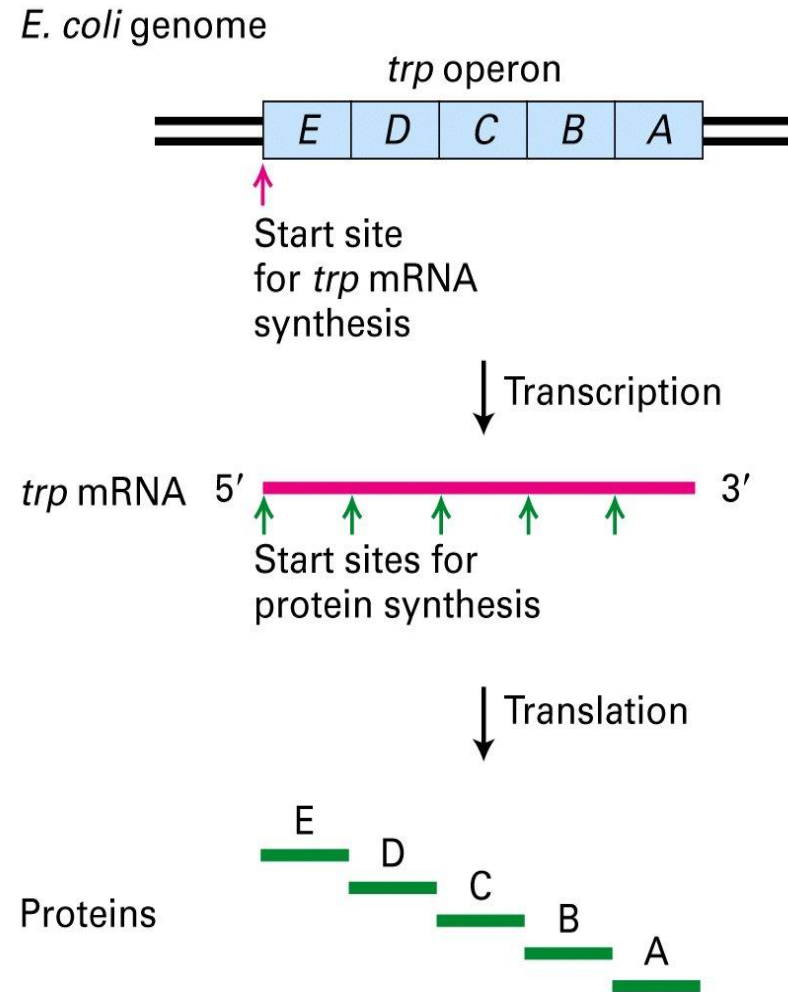
## Exercice n°21 : transcription *in vitro*

---

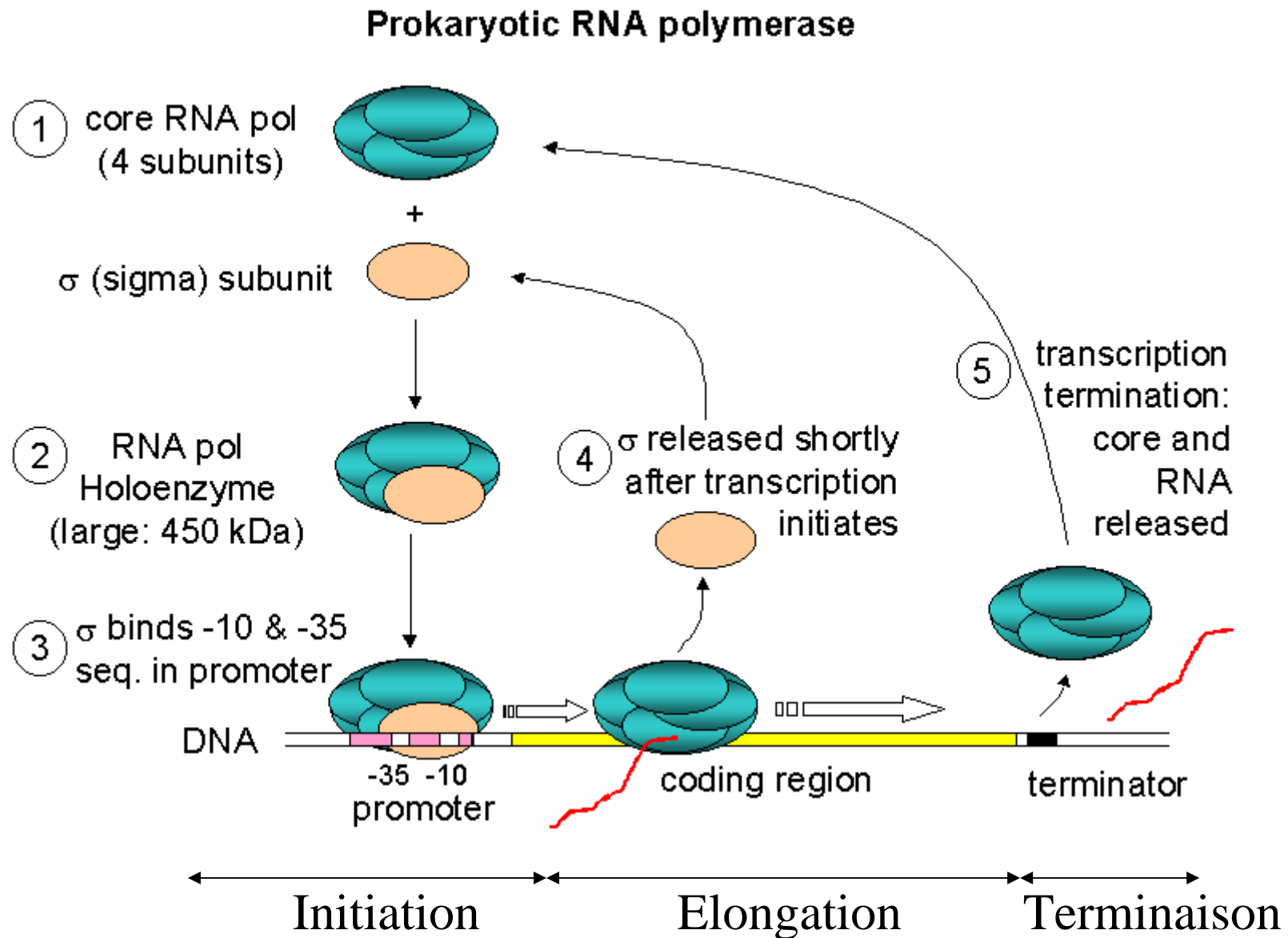
### RNA polymerase/transcription and DNA polymerase/replication

	RNA pol	DNA pol
<b>Template</b>	dsDNA is better	ss/dsDNA
<b>Require primer</b>	No	Yes
<b>Initiation</b>	promoter	origin
<b>elongation</b>	40 nt/ sec	900 bp/sec
<b>terminator</b>	Synthesized RNA	Template DNA

# Transcription et traduction procaryotes

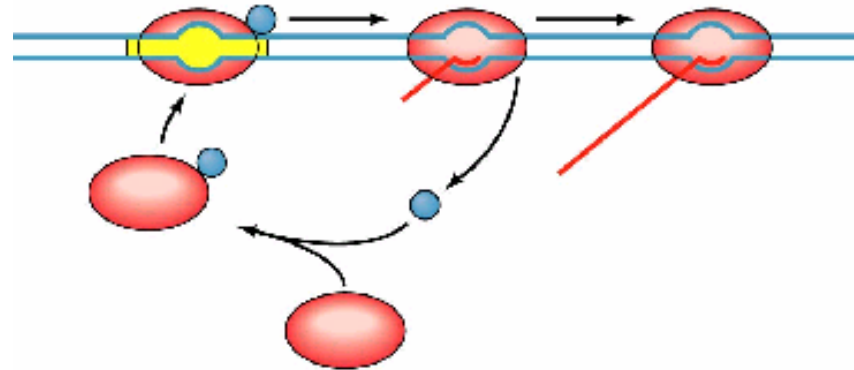


# Prokaryotic transcription



## Le cycle du facteur $\sigma$

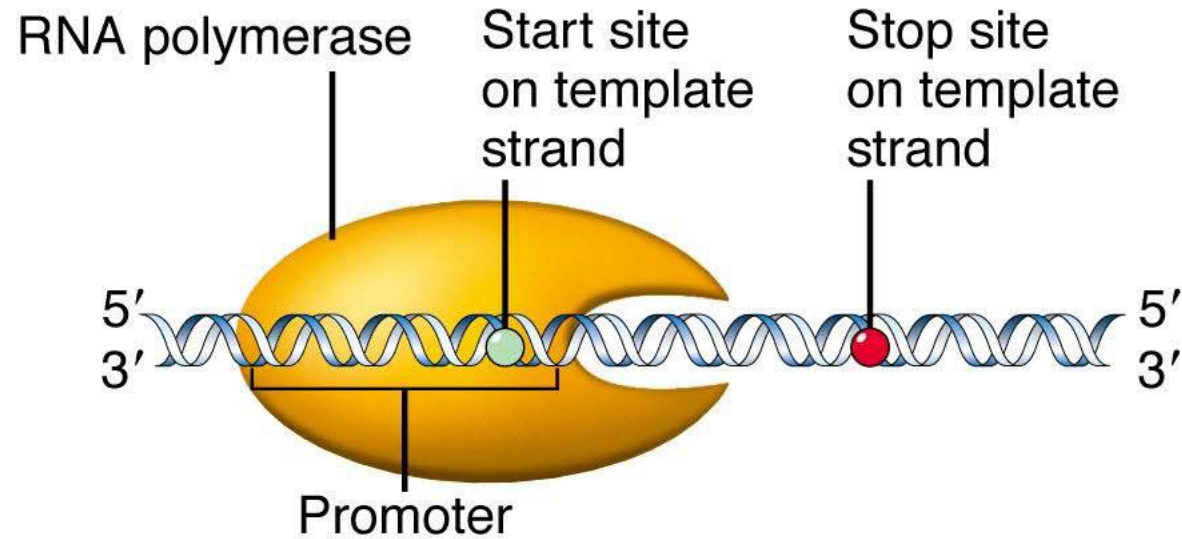
---



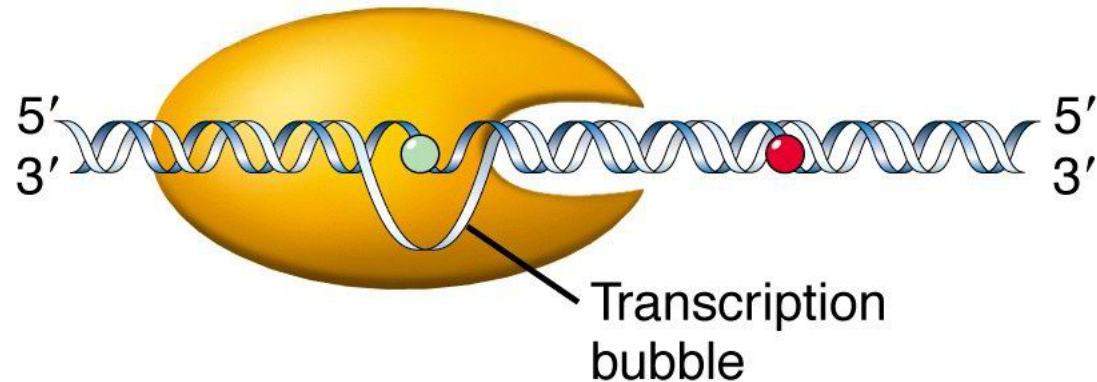
Le facteur  $\sigma$  ● est associé de manière transitoire à l'ARN polymérase ● ; il se dissocie de la polymérase dès que la transcription entre dans sa phase d'élongation puis rejoint le core-enzyme de l'ARN polymérase pour initier un nouveau cycle de transcription

## INITIATION

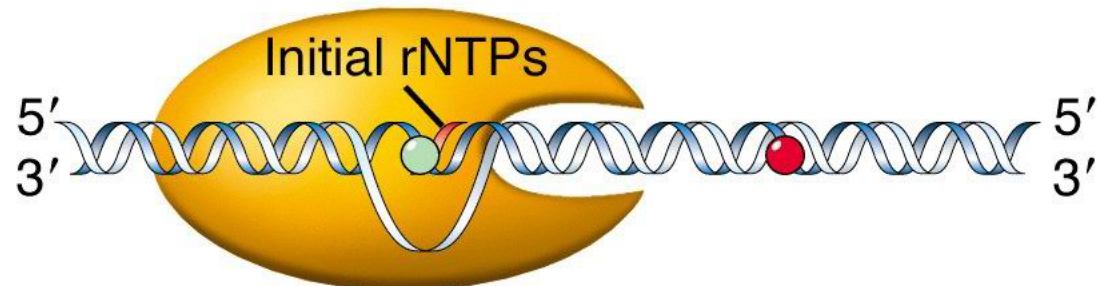
- 1** Polymerase binds to promoter sequence in duplex DNA. "Closed complex"



- 2** Polymerase melts duplex DNA near transcription start site, forming a transcription bubble. "Open complex"

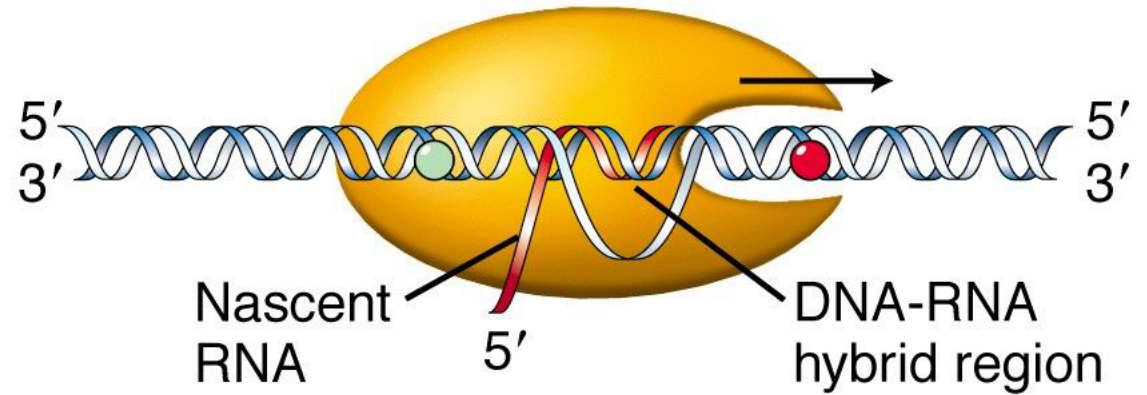


- 3** Polymerase catalyzes phosphodiester linkage of two initial rNTPs.



## ELONGATION

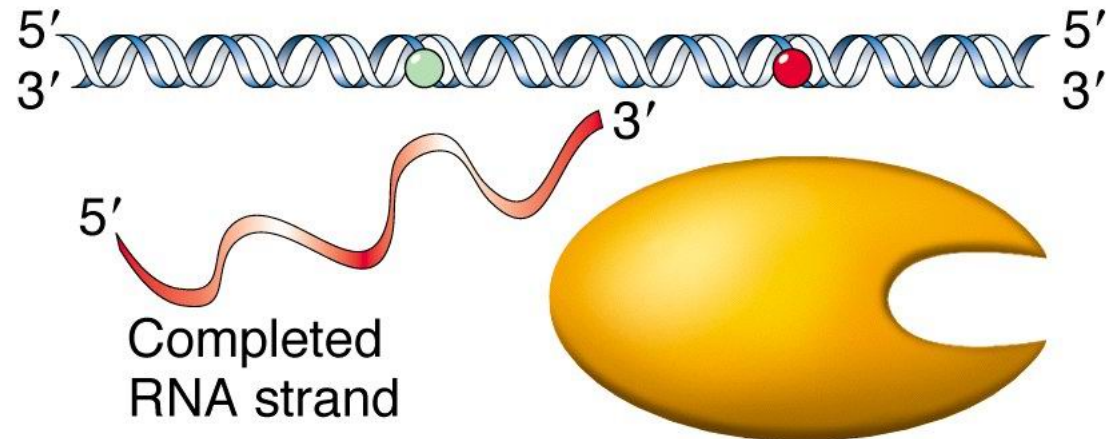
- 4** Polymerase advances  $3' \rightarrow 5'$  down template strand, melting duplex DNA and adding rNTPs to growing RNA.





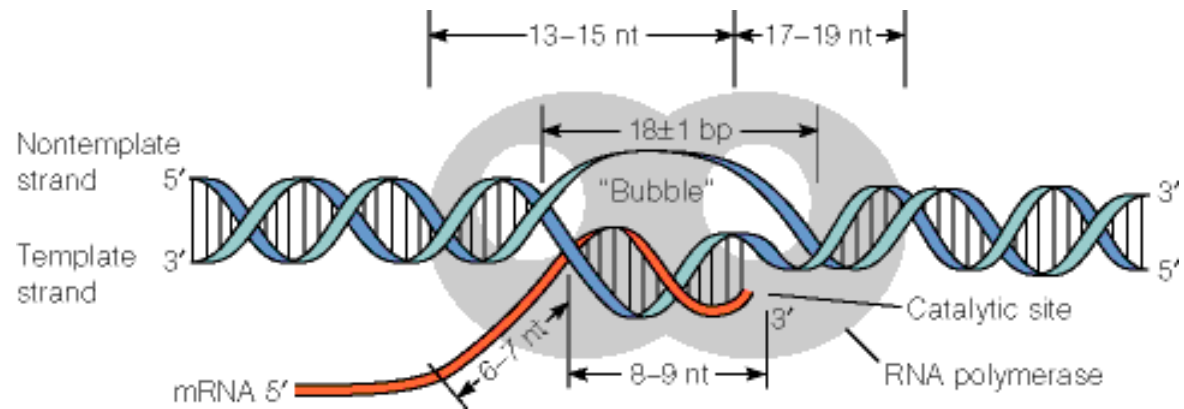
## TERMINATION

- 5 At transcription stop site, polymerase releases completed RNA and dissociates from DNA.



# La bulle de transcription

---

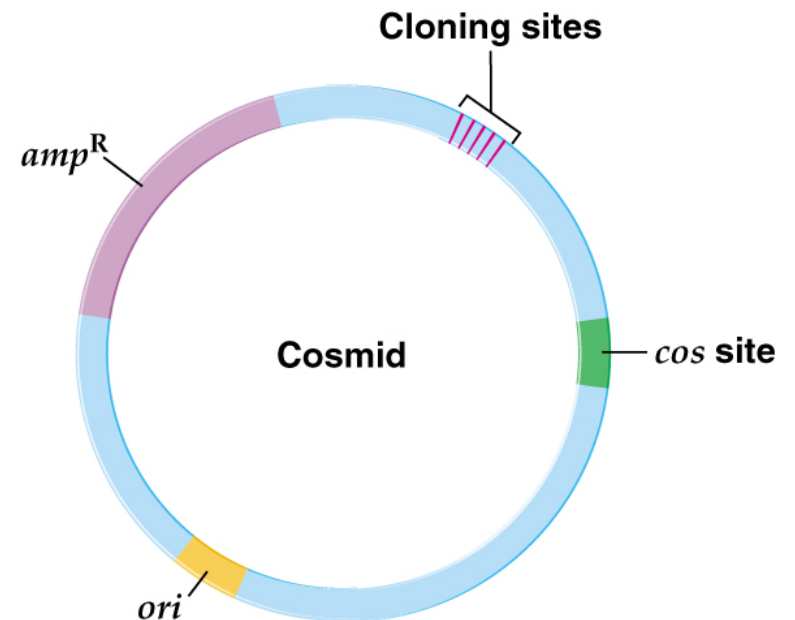


## Exercice n°21

---

### Cosmide

1. Présente les caractéristiques d'un plasmide (max. taille totale 10 kpb) et d'un phage (inserts de 20 kpb)
2. N'existe pas naturellement
3. Renferme la séquence *ori* d'*E. coli*
4. Renferme des séquences de sélection  $amp^R$
5. Présente des sites de restriction
6. Renferme les sites *cos* du phage  $\lambda$  ce qui permet son empaquetage dans le phage  $\lambda$  et son introduction dans *E. coli* par infection (avec des inserts de 37-52 kb).



## Exercice n°21

---

**Expérience menée** : synthèse d'une quantité donnée d'ARN pendant un temps donné pour un phénomène (transcription d'une matrice) qui se déroule plusieurs fois pendant le temps considéré (plusieurs initiations de la transcription) ;

### **HYPOTHESE**

la quantité d'ARN synthétisé variera si on joue

1- soit sur le nombre de fois où le phénomène aura lieu pendant le temps de l'expérience,

2- soit sur la vitesse à laquelle il se déroule.

## Exercice n°21

---

1- la fréquence de l'initiation est accrue: il y a plus de polymérase qui vont transcrire l'ADN en un temps donné : activation de promoteurs présents sur la matrice.

2- la vitesse globale de la transcription est accrue ; c'est l'étape d'élongation qui est affectée :

ceci peut être dû

soit à une augmentation de la vitesse intrinsèque de la synthèse d'ARN

soit à une augmentation de la vitesse de progression par diminution des pauses effectuées par la polymérase au cours de la transcription.

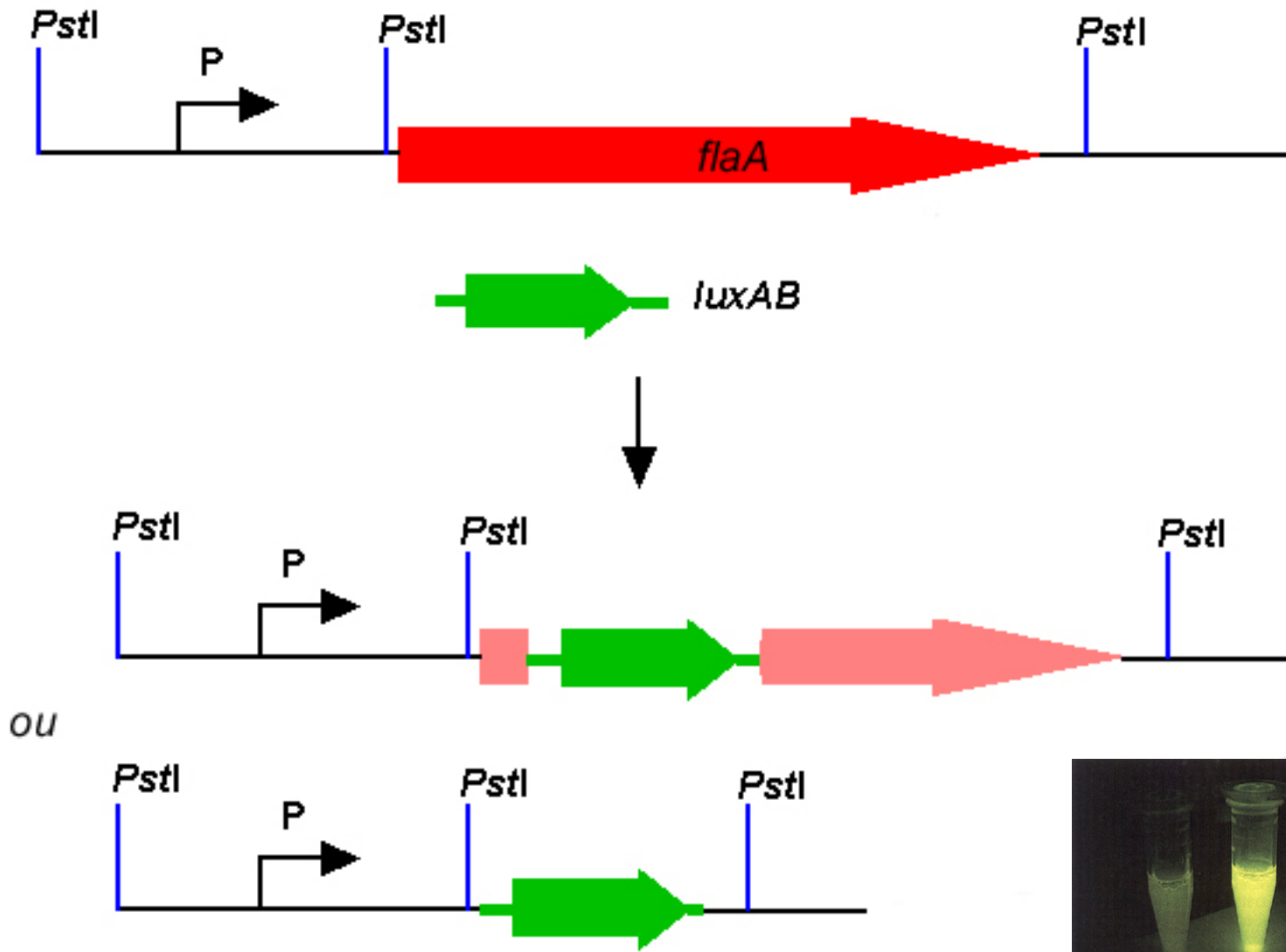
3- l'étape de terminaison est modifiée. Arrêt de la synthèse d'ARN

La protéine P jouerait sur la structure des terminateurs intrinsèques:

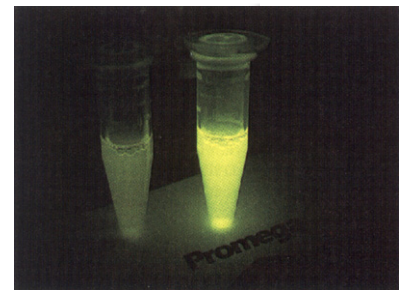
- elle déstructure la boucle en épingle à cheveux de l'ARNm. La transcription se poursuit donc au-delà du point de terminaison; il n'y a donc pas de pauses de l'ARN pol au niveau de cette région; l'hybride ARN-ADN ne se défait pas.

- elle couvre les « signaux » de terminaison rho-dépendants, se positionnant au niveau de l'ADN là où l'ARN pol pause ou/et recouvrant les éléments de séquence riche en C du messager empêchant la protéine  $\rho$  de s'y fixer (l'activité ATPasique de  $\rho$  est inhibée).

# Exercice n°22 : gène rapporteur (reporter gene)



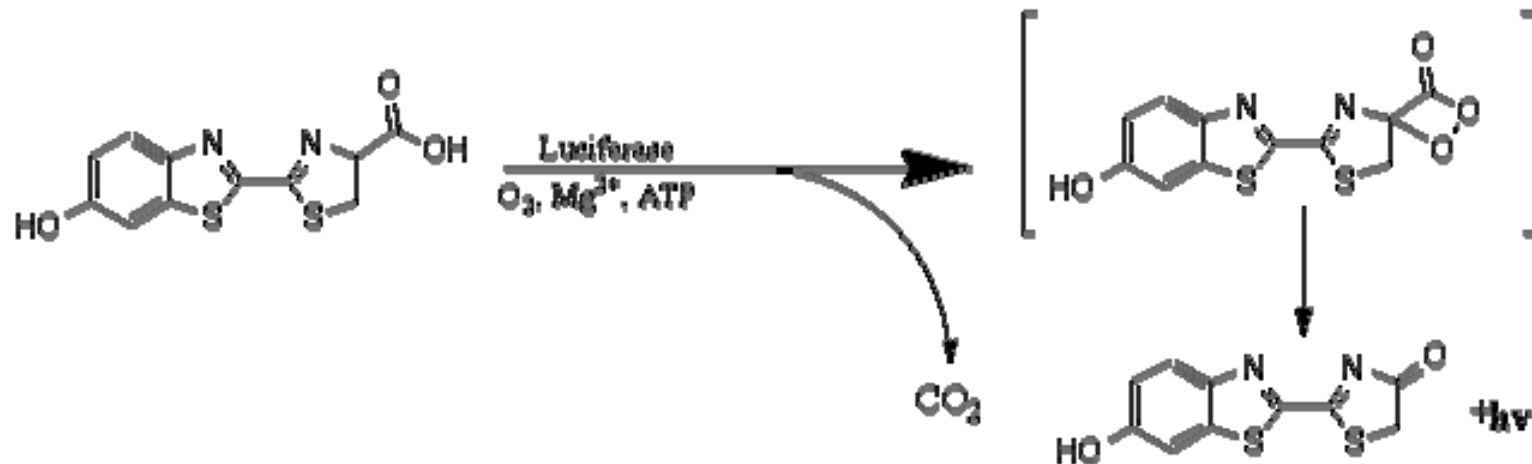
ou



Chez le ver luisant (ou luciole), l'**ATP** est utilisé dans un ensemble de réactions qui **transforment l'énergie chimique en énergie lumineuse**.

A partir de plusieurs milliers de vers luisants ramassés par des enfants près de Baltimore, William McElroy et coll, ont isolé les principaux composés biochimiques impliqués :

**la luciférine**, un acide carboxylique complexe, et **la luciférase**, une enzyme.



La formation d'un flash lumineux nécessite l'**activation de la luciférine** par une réaction enzymatique utilisant l'ATP, au cours de laquelle se produit un **clivage pyrophosphorique** de l'ATP ce qui forme du **luciféryl-adénylate**. Ce composé subit alors l'action de l'**oxygène moléculaire** et de la **luciférase**, ce qui provoque une **décarboxylation oxydative** de la luciférine en **oxy-luciférine**. Cette réaction qui possède des étapes intermédiaires est accompagnée d'émission de **lumière**.

La luciférine est ensuite **régénérée** à partir de l'oxy-luciférine par une série de réactions.

**Au laboratoire,**

- la **luciférine et la luciférase purifiées** sont utilisées pour mesurer les **faibles quantités d'ATP** fournies par l'intensité du flash lumineux produit. Des quantités d'ATP de l'ordre de quelques **picomoles** (10<sup>-12</sup> mol) peuvent ainsi être mesurées.

-Le **gène de la luciférase** est également utilisé en tant que gène **reporteur**. Ce gène peut être contrôlé par un promoteur eucaryote dont on mesure la force après transfection dans une cellule eucaryote en culture.

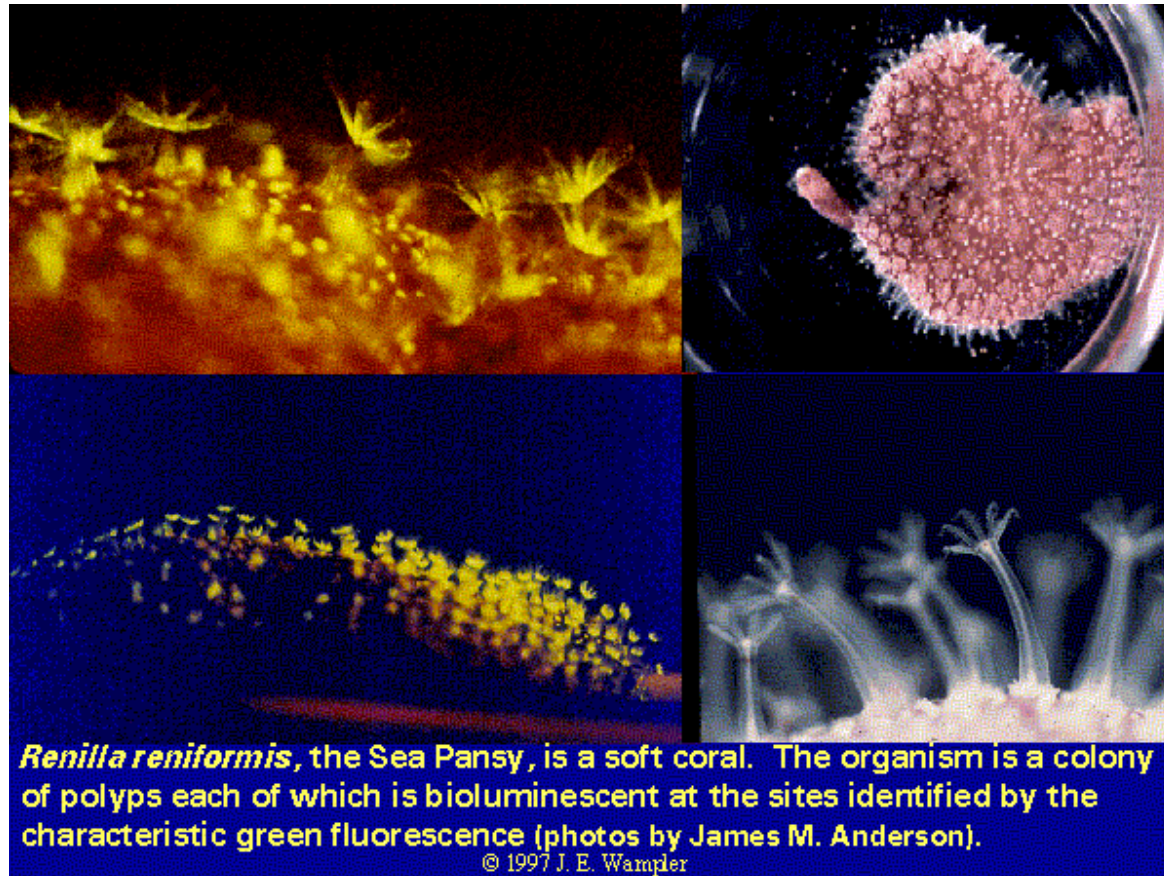
L'appareil utilisé s'appelle un **luminomètre**.



# Bioluminescence

---

## *Renilla reniformis*



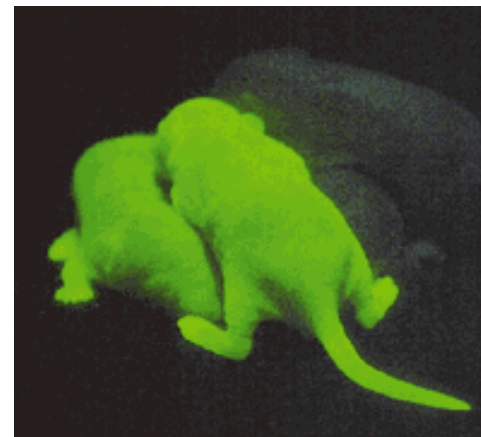
# GFP : molécule fluorescente verte (méduse)

---



Poisson-zèbre (Zebrafish)  
utilisé pour les études sur le  
développement (1 œuf-> 1  
poisson : 3j!)

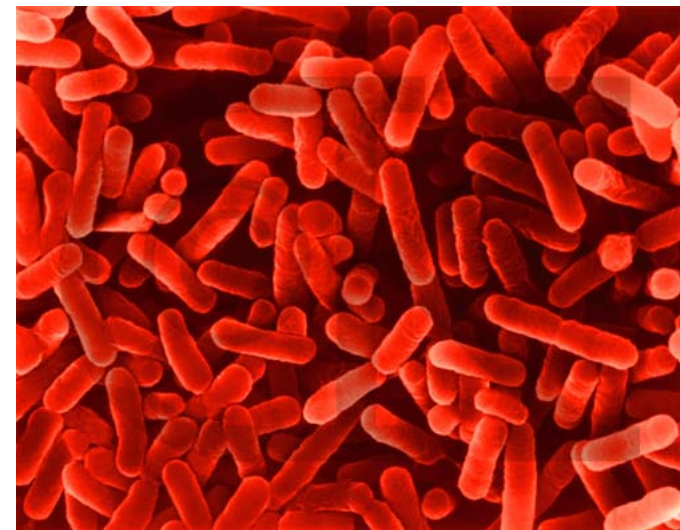
Souris verte...  
GFP couplée à une protéine  
épithéliale



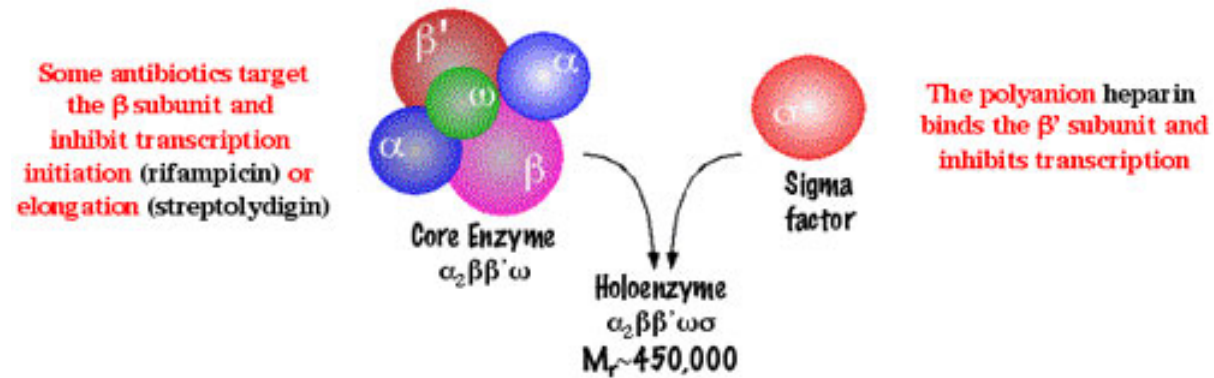
## *Legionella pneumophila* et La maladie du légionnaire ou légionellose

---

- 1<sup>ère</sup> fois décrite en 1976, lors d'une épidémie de pneumonie survenue à l'occasion d'un congrès de l'American Legion (à Philadelphie)
- survient à la suite de l'inhalation d'une bactérie, et provoque une pneumonie associée à une fièvre élevée
- taux de mortalité : env. 10%
- affecte les personnes dont les défenses immunitaires sont affaiblies
- bactérie responsable : *Legionella pneumophila* ; bactérie vivant en milieu humide (tours de refroidissement des systèmes de climatisation)

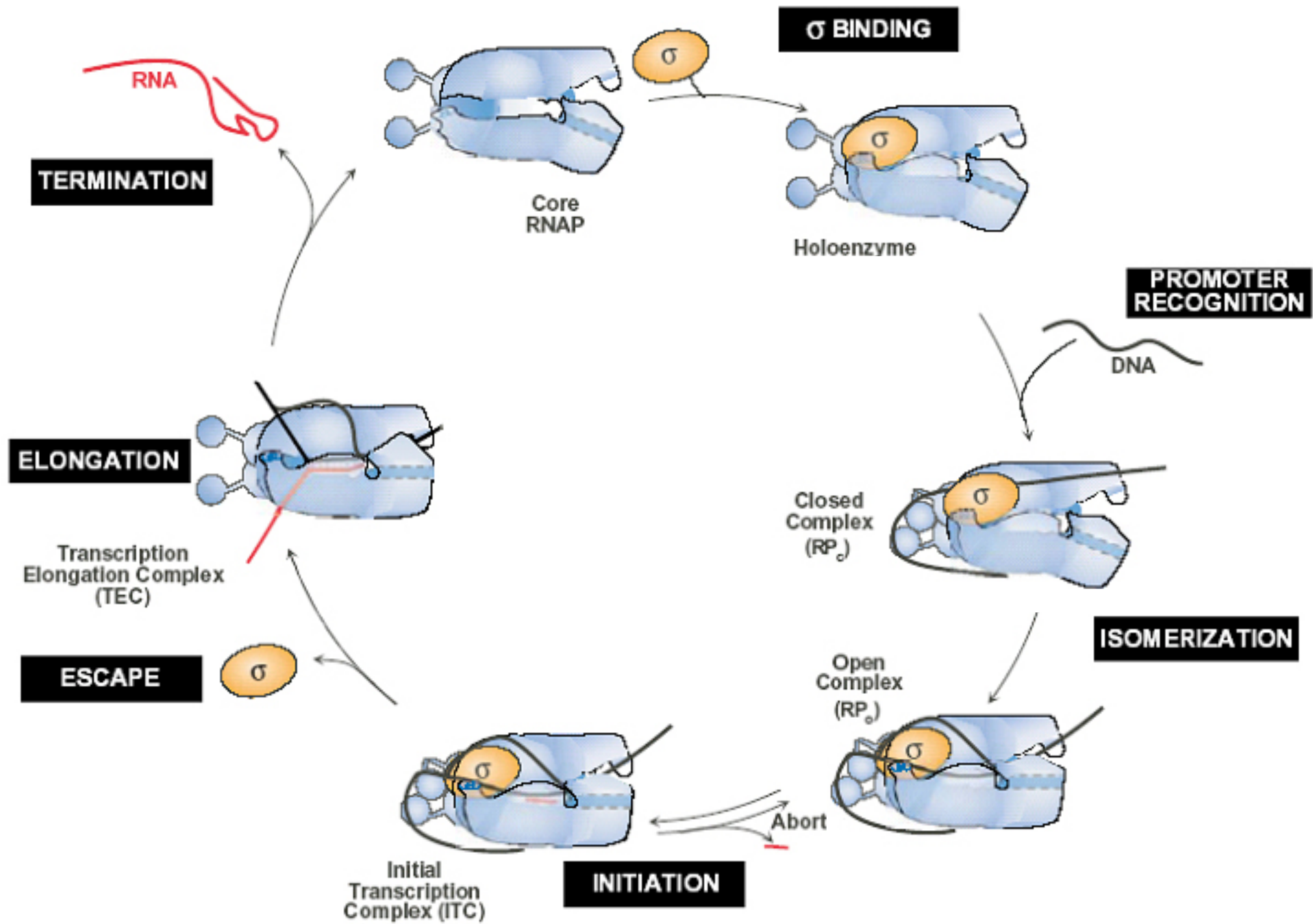


# Ex. 22, question 1: nature du complexe d'initiation de transcription



RNAP subunits	Gene Name	Polypeptide MW	# in Enzyme	Function
$\beta'$ (beta')	<i>rpoC</i>	155,000	1	PNA binding
$\beta$ (beta)	<i>rpoB</i>	151,000	1	Catalytic site
$\sigma$ (sigma)	<i>rpoD</i>	70,000	1	Promoter recognition
$\alpha$ (alpha)	<i>rpoA</i>	36,500	2	Promoter binding, enzyme assembly
$\omega$ (omega)	-	11,000	1	?
<b>Factors</b>				
$\rho$ (rho)	<i>rho</i>	46,000	6	Termination
NusA	<i>nusA</i>	69,000	1	Elongation, termination



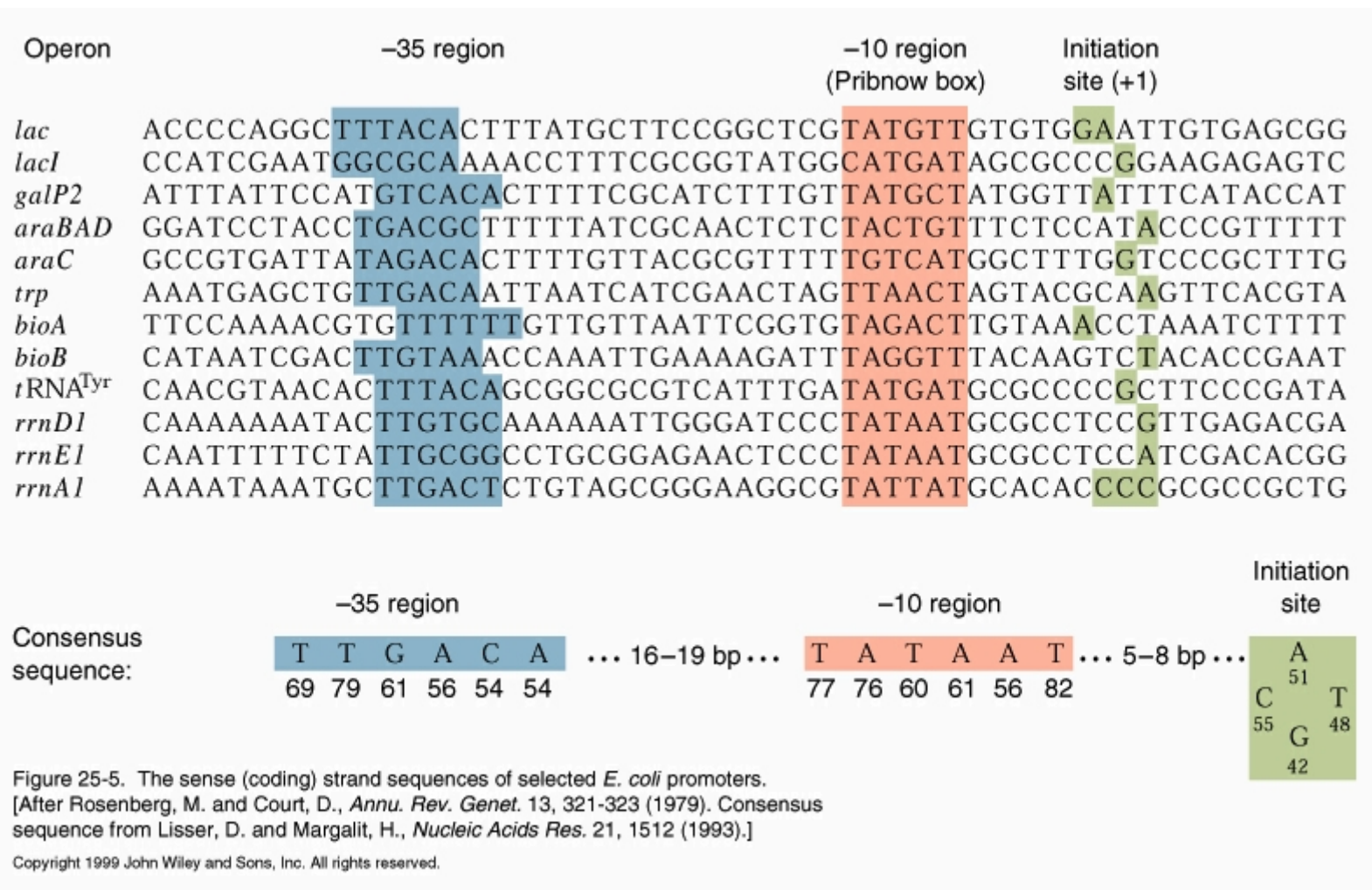


5' -----not transcribed | transcribed----- 3'

g	c	t	t	A	C	A	T	T
-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5

← Upstream      Downstream →

transcription →



(cf cours)

Questions 2 et 3

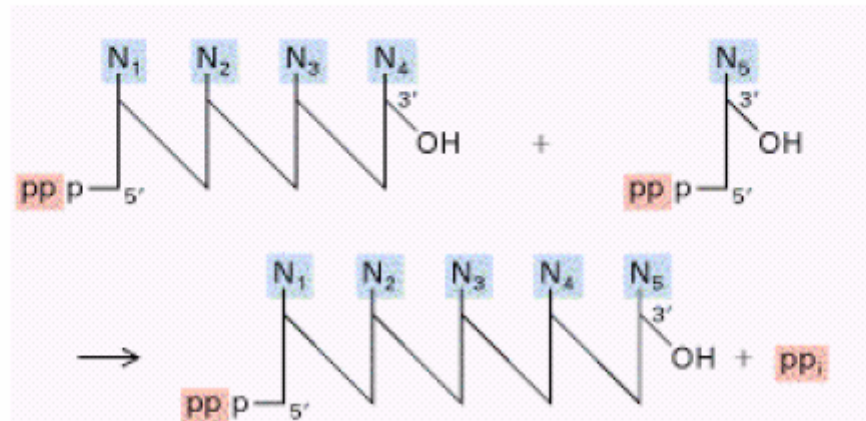


## Ex. 22, question 4 : ARN polymérase

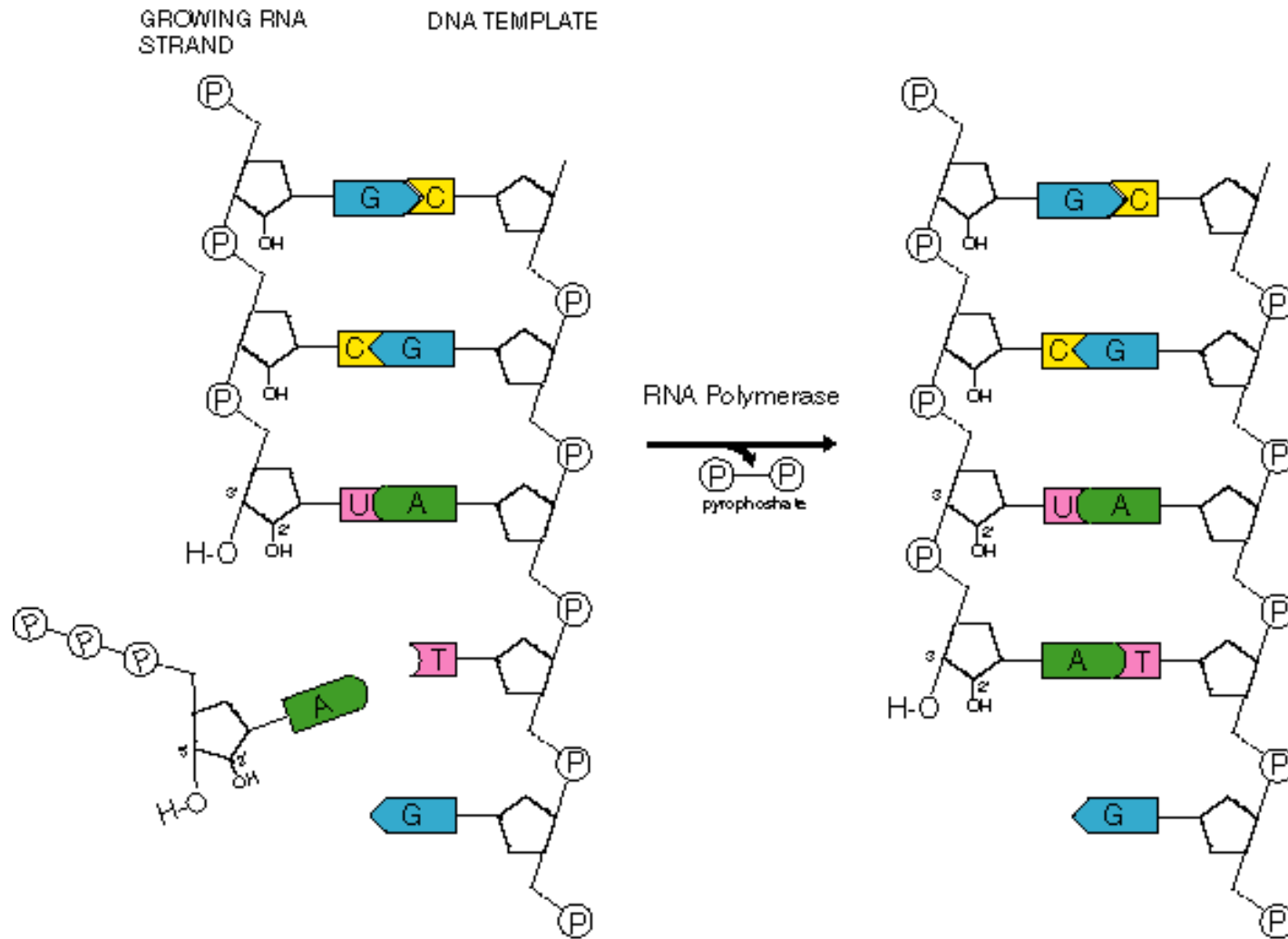
---

L'élongation de la chaîne d'ARN procède par l'addition séquentielle de nucléotides

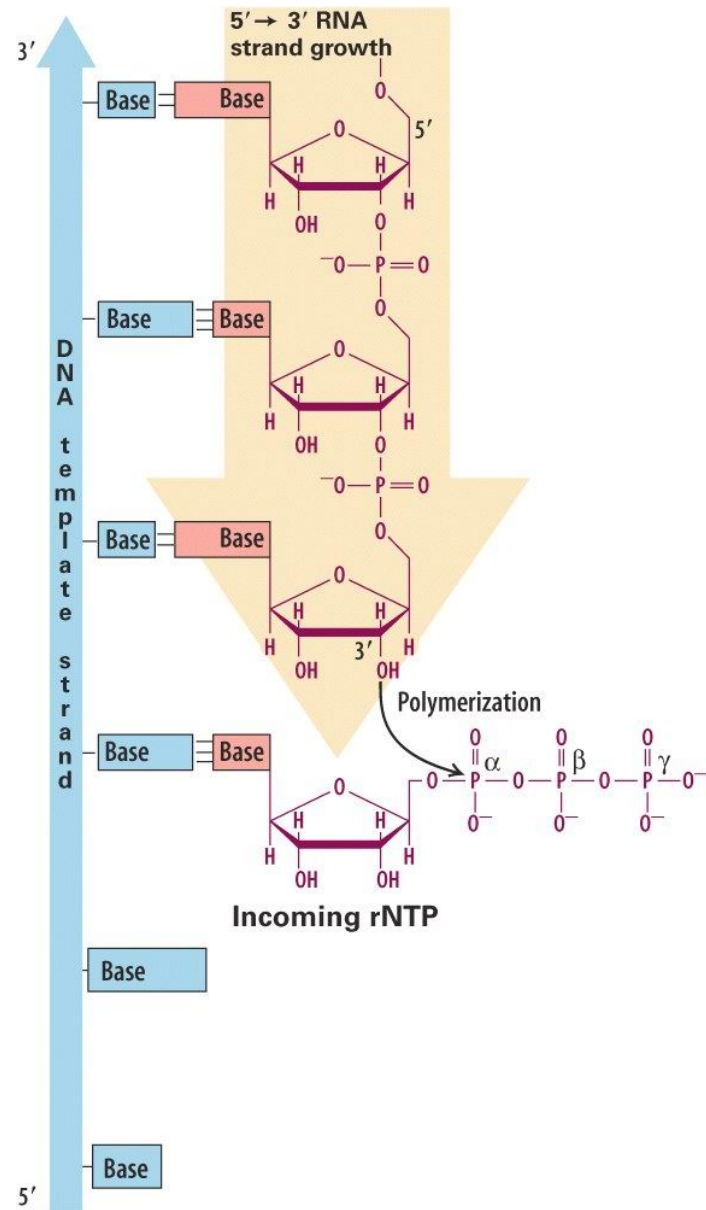
1. L'élongation procède dans la direction 5' → 3'.
2. L'addition d'un nucléotide résulte en la libération d'un groupement pyrophosphate (PPi).

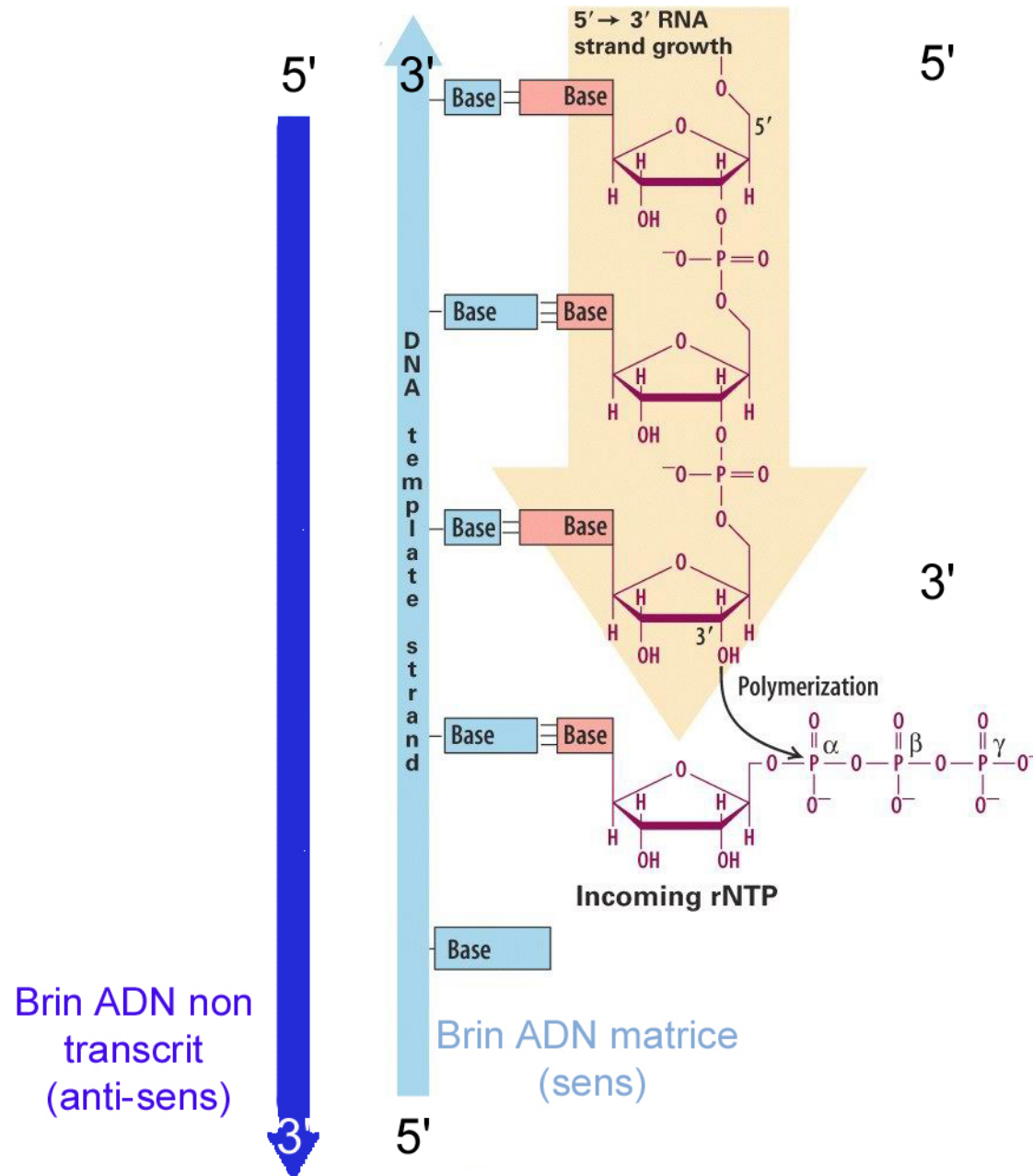


# Ex. 22, question 4



# ARN Polymérase





## Questions 5, 6, 7

**“The alternative sigma factor sigma 28 of Legionella pneumophila restores flagellation and motility to an Escherichia coli fliA mutant”**

par Heuner K, Hacker J, et Brand BC

*J Bacteriol.* (1997) Jan;179(1):17-23