



GIORNATE DI ORIENTAMENTO PROFESSIONALE

Prof. Marina Piscopo

Dipartimento di Biologia (stanza 2F17(studio)-
2F21(laboratorio))

3 piano-Dipartimento di Biologia

marina.piscopo@unina.it

081-679081 (studio) 081-679094 (laboratorio)

BIOLOGIA MOLECOLARE E LABORATORIO



TRASCRIZIONE

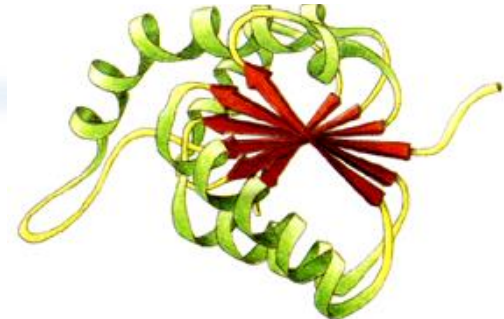
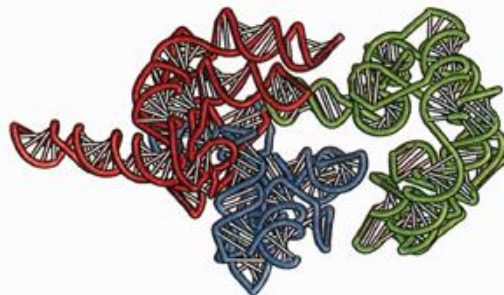
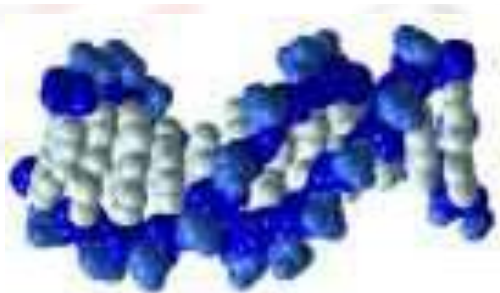
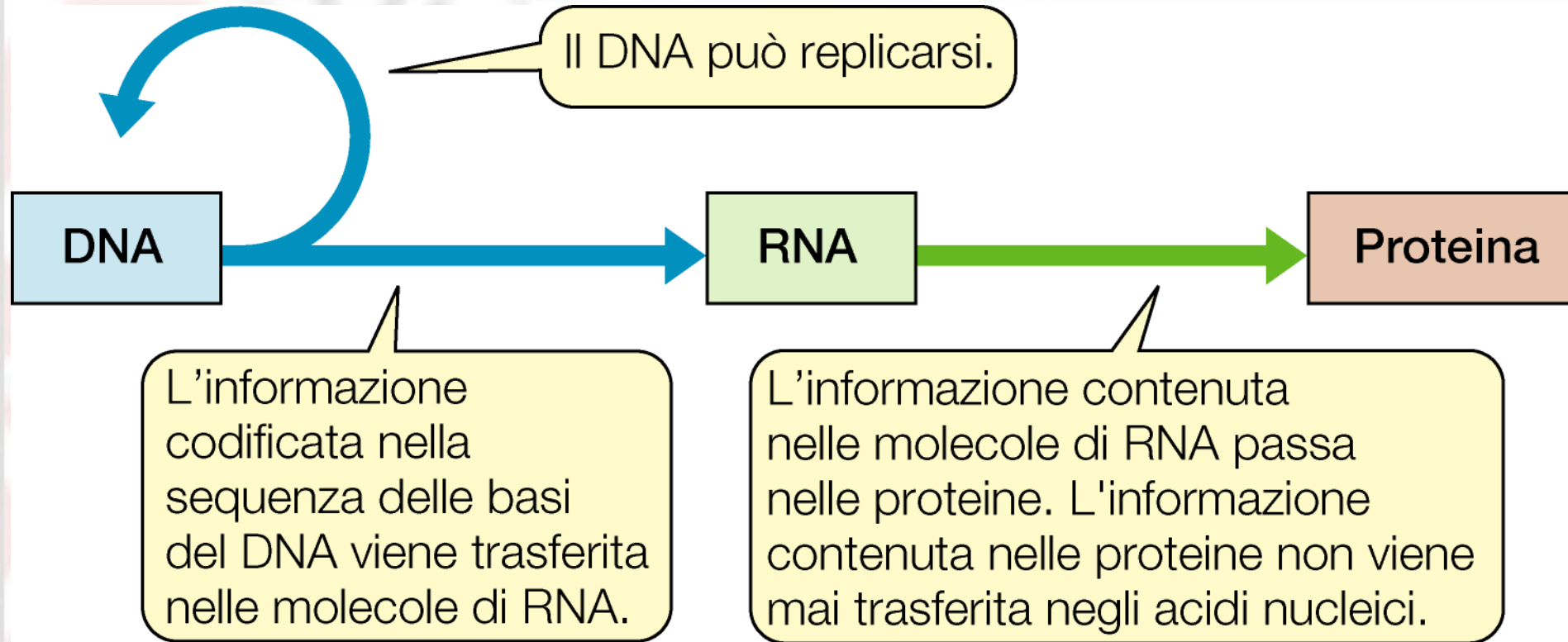
SINTESI PROTEICA

**REGOLAZIONE DELLA
ESPRESSIONE GENICA IN
PROCARIOTI ED EUCARIOTI**



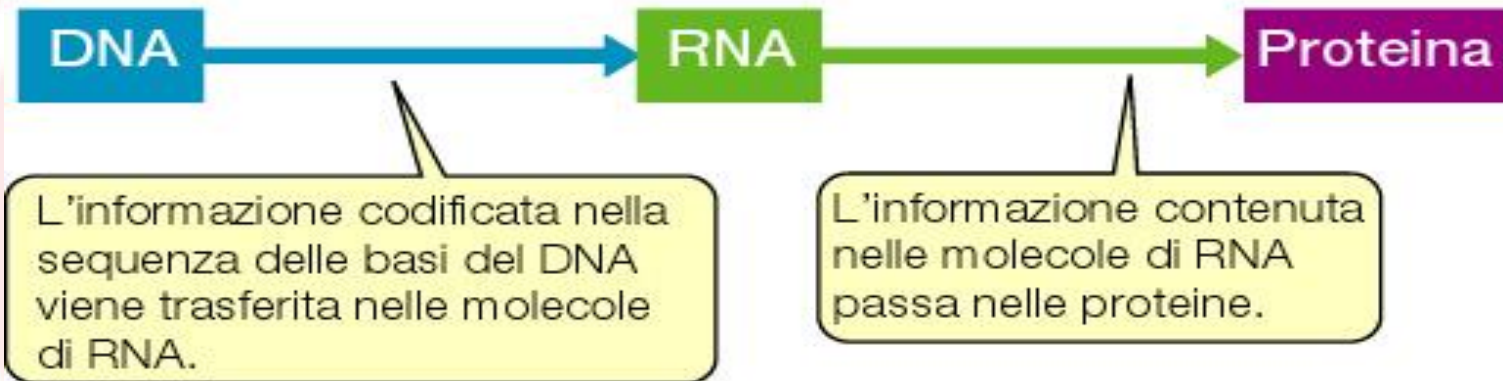
TRASCRIZIONE

Il Dogma Centrale della Biologia

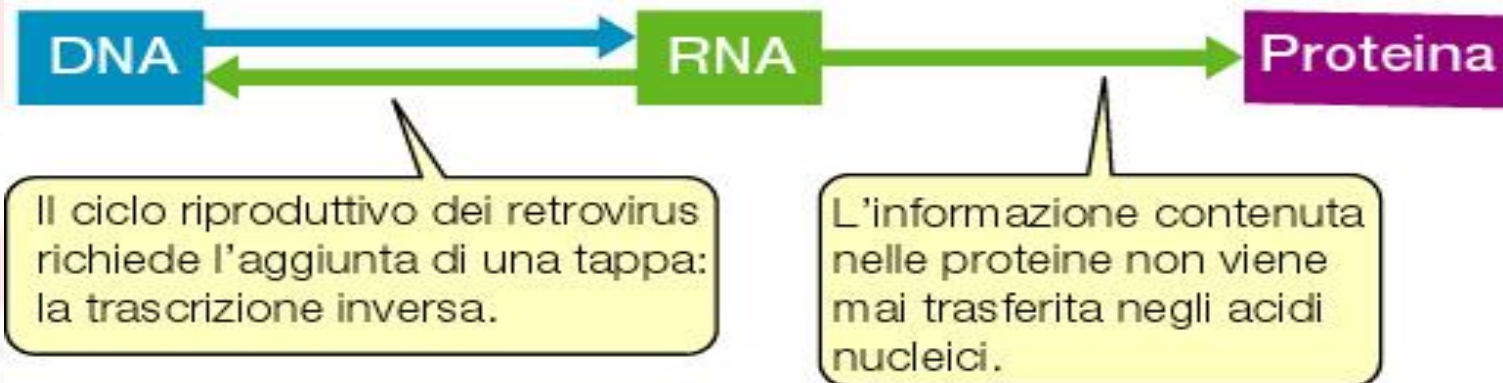


Dogma della Biologia

(a)



(b)



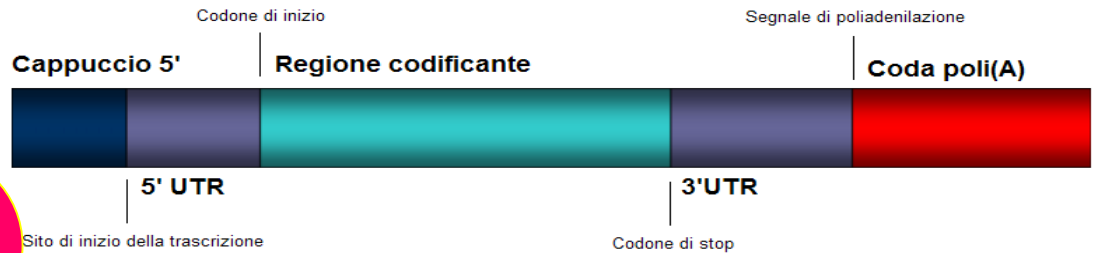
DNA → RNA → Proteina

TRASCRIZIONE

SINTESI PROTEICA

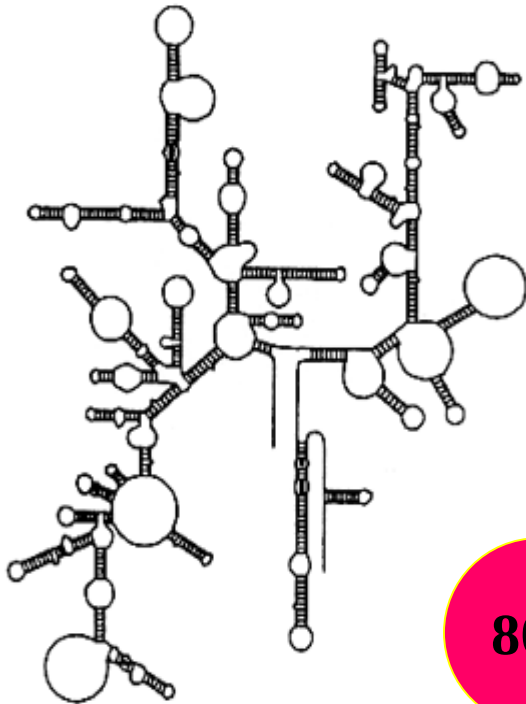
RNA

RNA messaggero (mRNA)



5%

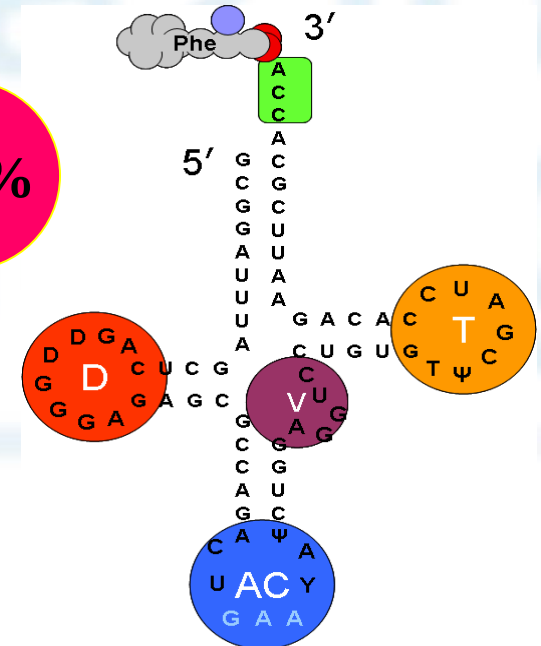
RNA ribosomiale (rRNA)



80%

RNA transfer (tRNA)

15%



TRASCRIZIONE

La trascrizione è il processo di sintesi di un filamento di RNA messaggero, transfer o ribosomiale a partire da un tratto di DNA, che viene usato come stampo.

**La sintesi di RNA
richiede uno stampo
di DNA e procede da**

5' --> 3'

**E' mediata dalla
RNA polimerasi**

DNA

5' – ATTGGGCGCGATGGTTTATAGATCTACCCATAGTCTGC – 3'
3' – TAACCCGCGCTACCAAATATCTAGATGGGTATCAGACG – 5'

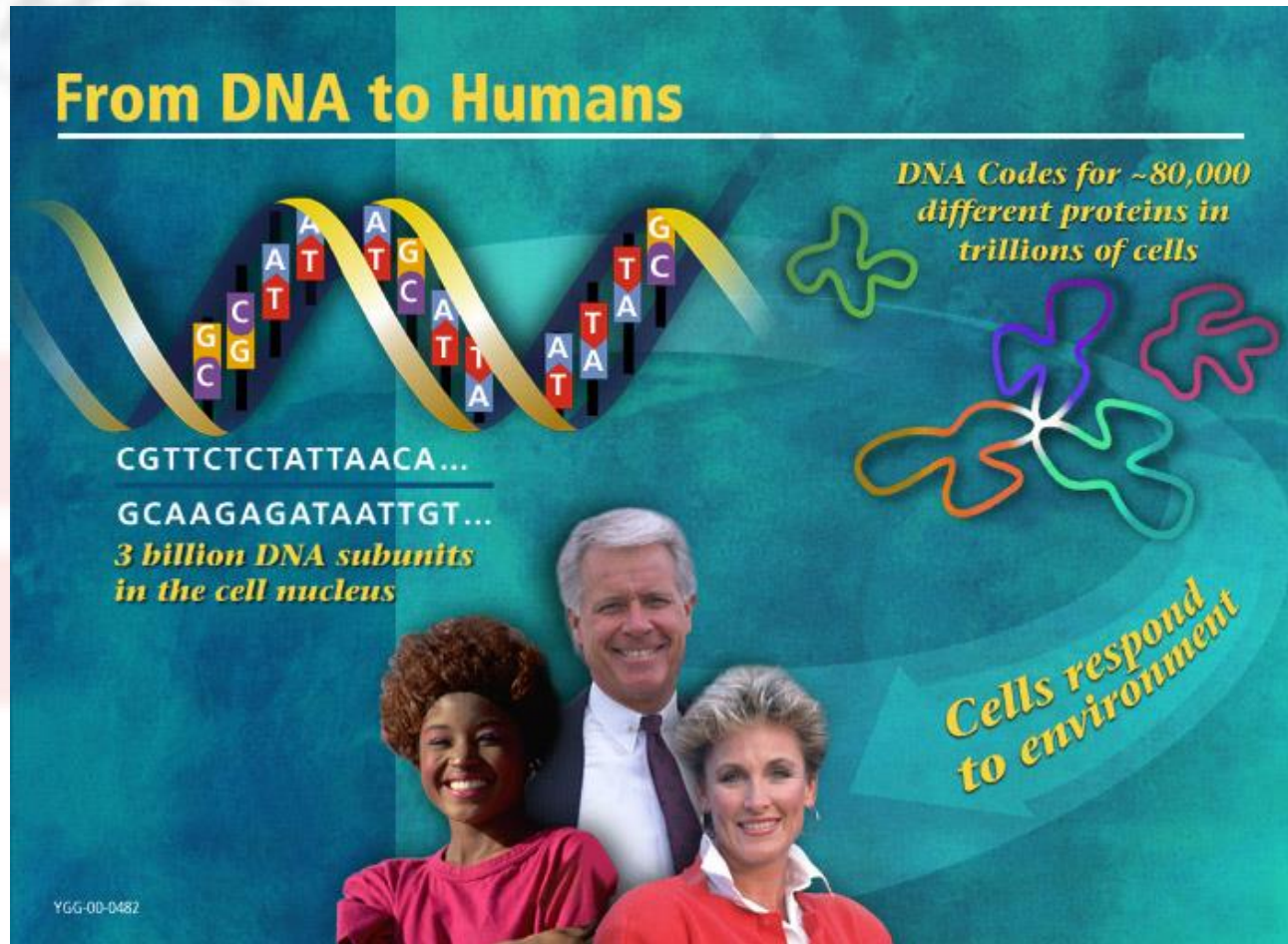
**La sintesi di RNA utilizza come stampo il
filamento inferiore**

RNA risultante simile al filamento superiore

RNA

5' – AUUGGGCGCGAUGGUUUAUAGAUCUACCCAUAAGUCUGC – 3'

Come puo' il DNA influire sul fenotipo di un organismo????



Attraverso un processo definito espressione genica, che consiste in una serie di eventi attraverso cui l'informazione contenuta nel DNA viene decodificata e utilizzata per la sintesi delle proteine. Queste influiscono sul fenotipo in modi diversi.

Tappe dell'espressione genica

- **Trascrizione:** l'informazione contenuta nel DNA viene trascritta in RNA che funge da intermediario tra DNA e proteine
- **Sintesi proteica** L'informazione trascritta nell'mRNA viene convertita nella sequenza di aminoacidi di una proteina

Le istruzioni necessarie per il funzionamento della cellula (e di tutto l'organismo) sono contenute nel DNA, che si trova nel nucleo

Le informazioni sono sottoforma di geni, ciascuno dei quali contiene le istruzioni per costruire un proteina

La **proteina** che viene costruita può avere funzioni specifiche ad esempio **strutturale** o di **trasporto** come l'actina del citoscheletro o l'emoglobina

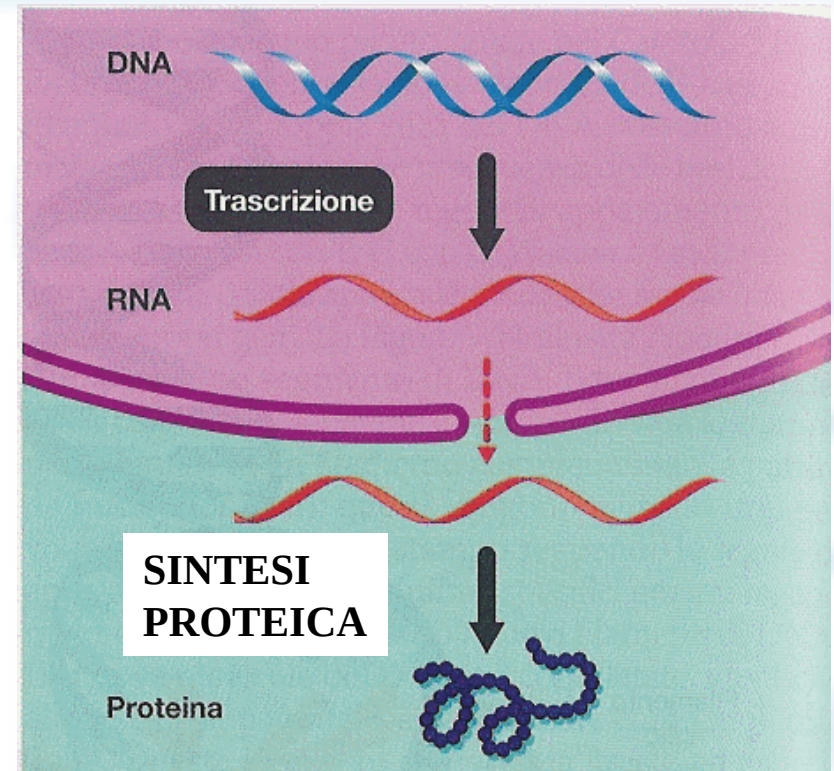
Oppure può essere un **enzima** e andare a determinare quale via metaboliche seguirà un certo processo

Oppure può avere funzione di **segnale** e andare ad esempio a controllare la produzione di un'altra proteina

In ogni caso perché un gene possa esprimersi nel fenotipo ***deve sempre passare attraverso la produzione di una specifica proteina***

Poiché le istruzioni si trovano nel nucleo e il macchinario per costruire le proteine si trova nel citoplasma (i Ribosomi) occorrono:

1. un sistema per trascrivere il DNA e portare fuori le informazioni dal nucleo
2. un sistema per tradurre la sequenza di basi in sequenza di amminoacidi



Entrambe queste funzioni sono svolte dall'altro tipo di acido nucleico, l'RNA

Ci sono nella cellula tre diverse categorie di RNA

Tutti si originano per trascrizione del DNA

L'RNA ribosomico (o ribosomale), rRNA è un costituente dei Ribosomi

L'RNA messaggero o mRNA trascrive il DNA e porta l'informazione fuori dal nucleo

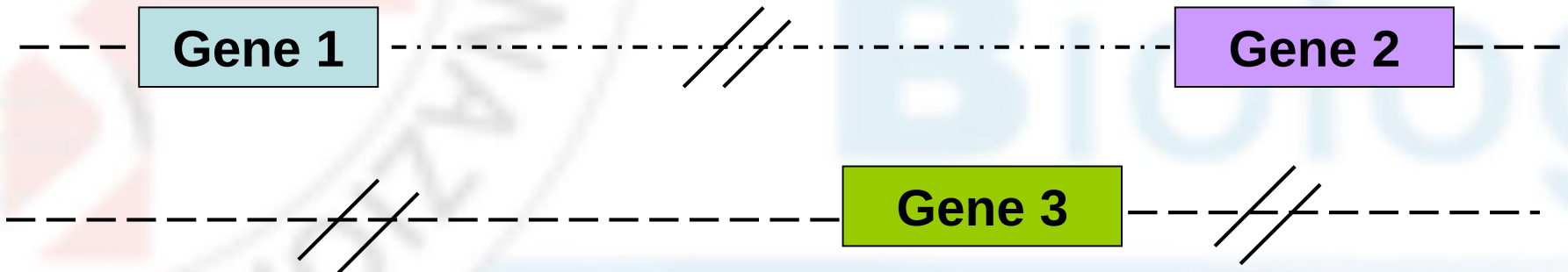
L'RNA transfert o tRNA trasporta gli aminoacidi sui ribosomi secondo la sequenza scritta nel mRNA

* Benchè tutte le cellule somatiche di un organismo abbiano lo stesso identico patrimonio genetico, non tutti i geni si **esprimono** in tutte le cellule. Ciò spiega il perché i globuli rossi producano emoglobina e i neuroni il loro neurotrasmettitore e non viceversa (ma ci sono migliaia di altre differenze nei geni espressi tra due cellule di tessuti diversi). All'interno della stessa cellula un gene può essere espresso in un momento e non in un altro

Nei procarioti i singoli geni sono separati da brevi sequenze non codificanti



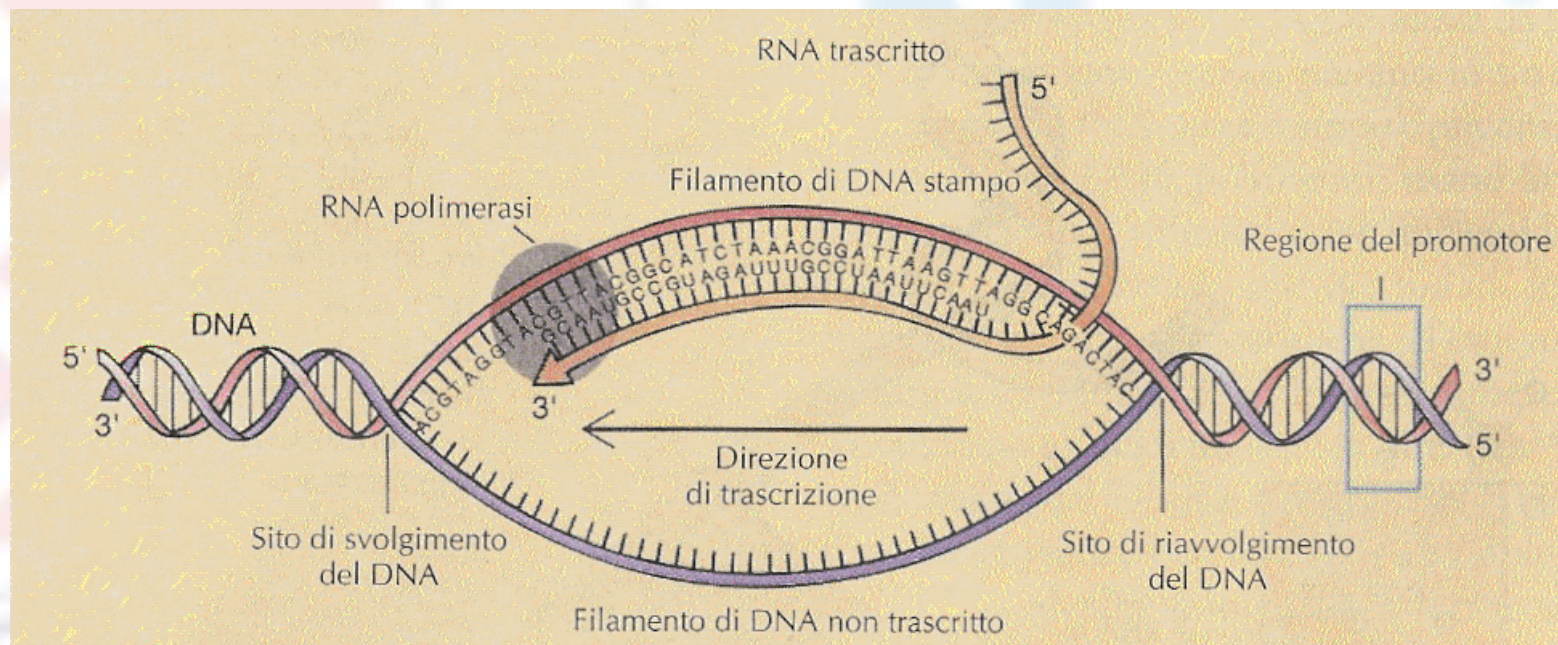
Negli eucarioti i singoli geni sono separati da lunghissime sequenze non codificanti



La trascrizione

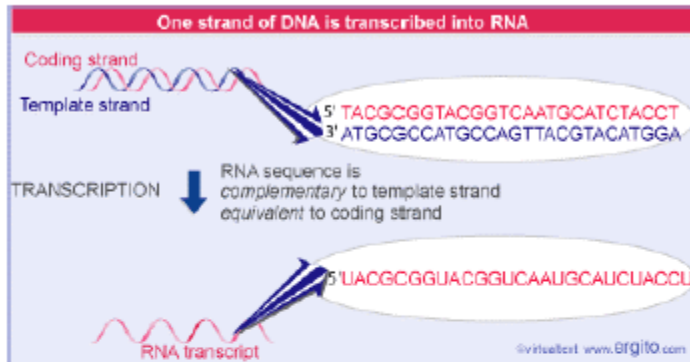
Il processo di espressione di un gene inizia con la sintesi dell'**RNA messaggero**, processo che si chiama **trascrizione** di un gene

Come nel caso della replicazione, il **DNA deve aprirsi** (si separano le basi azotate) per permettere la copia dei filamenti. In realtà uno solo dei due filamenti viene utilizzato come stampo (filamento codificante)

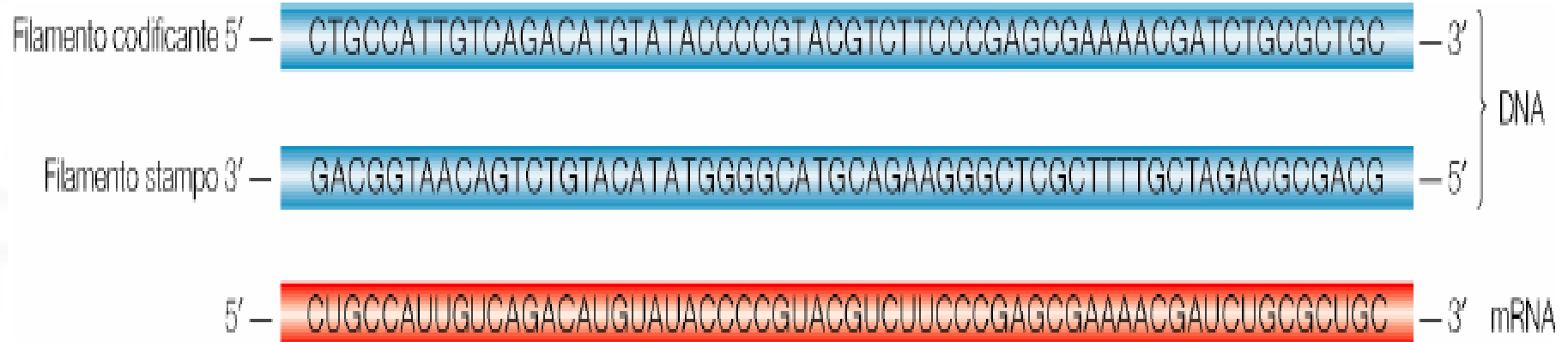


Questa volta l'enzima implicato è la **RNA Polimerasi**

Concetti base



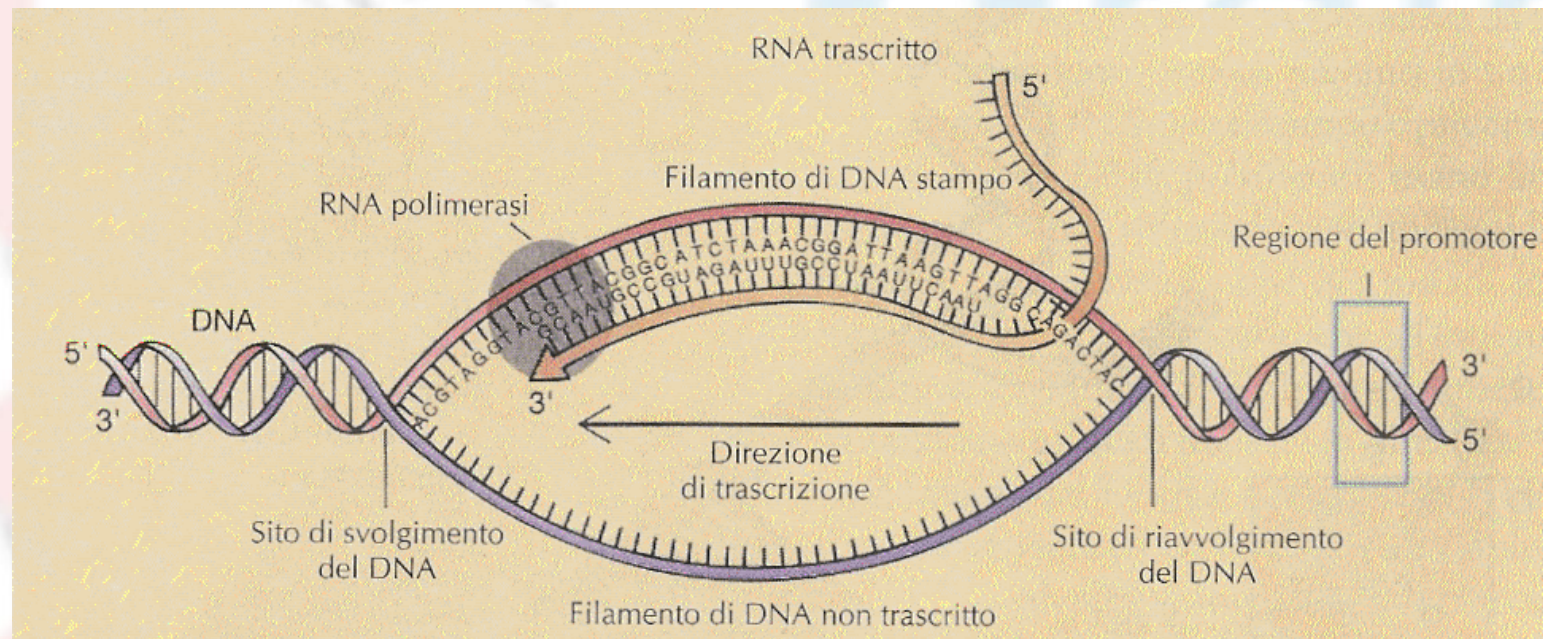
- La trascrizione comporta la sintesi di una catena di RNA che ha la stessa sequenza di un filamento di una doppia elica di DNA.
- Il filamento di DNA identico in sequenza all'RNA è chiamato **filamento codificante**
 - il filamento codificante è ovviamente complementare all'altro filamento, che funge da stampo per la sintesi dell'RNA, ed è chiamato per questa ragione **filamento stampo** o **filamento non-codificante**.



- Trascrizione: copia selettivamente solo alcune porzioni del genoma → 1-100-1000 copie
- Replicazione: deve copiare tutto il genoma una volta ad ogni divisione cellulare
- La scelta di quale regione deve essere trascritta e in quale quantità è un processo regolato
- (cellula muscolare e neurone)
- Una cellula batterica trascrive un gruppo diverso di geni a seconda del terreno di coltura in cui cresce

Come fa la RNA Polimerasi a sapere dove inizia e dove finisce un gene?

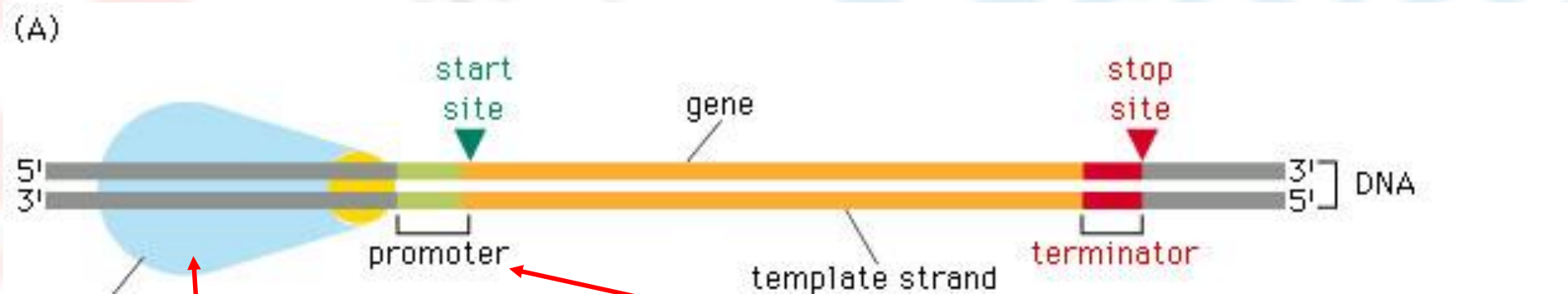
La **RNA polimerasi** inizia la trascrizione dopo essersi legata ad una regione del gene specifica che si chiama **promotore**.



La trascrizione procede a partire dalla estremità 5' in direzione 3'

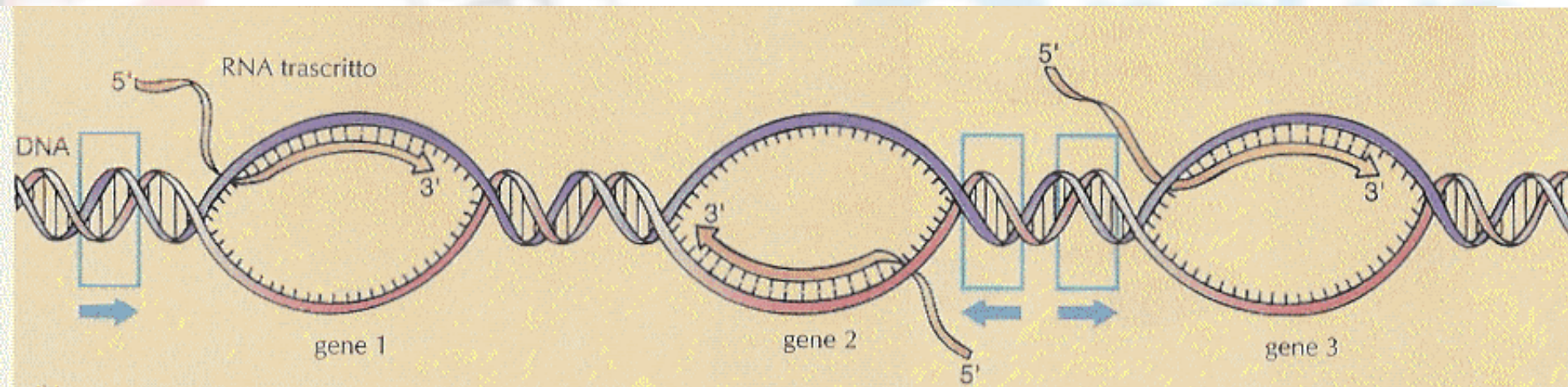
Normalmente c'è un promotore per ciascun gene (negli eucarioti). Nei procarioti invece un singolo promotore può controllare la trascrizione di più geni, quando ad esempio le proteine prodotte sono enzimi coinvolti nello stesso processo

Inizio della trascrizione

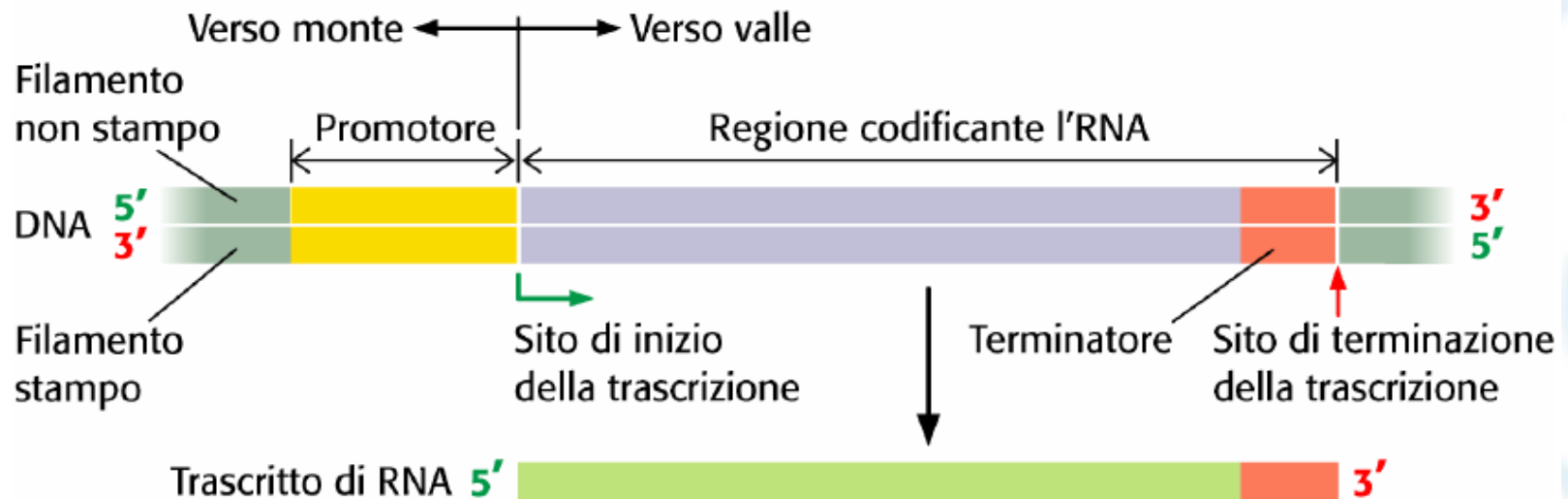


la **RNA polimerasi** si lega al DNA in corrispondenza del **promotore** e “copia” il filamento di DNA stampo a partire dal sito di inizio della trascrizione

Per ciascuno gene uno solo dei due filamenti viene utilizzato come stampo (**filamento codificante**). Ma lo stesso filamento non funge da stampo per tutti i geni

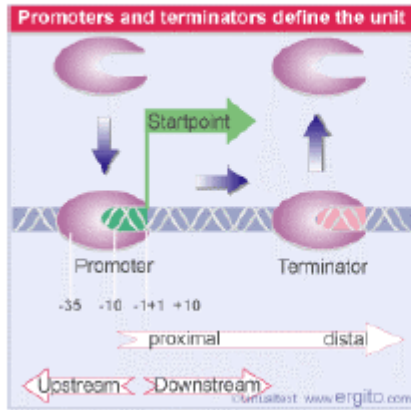


L'unità di trascrizione



Il promotore è la regione del DNA che segnala:

1. quale dei due filamenti di DNA deve essere trascritto
2. qual è la direzione della trascrizione
3. qual è il sito di inizio della trascrizione



Concetti base

- Le regioni più vicine al promotore sono descritte come **prossimali**, mentre quelle più lontane sono descritte come **distali**.
- Le sequenze precedenti al punto di inizio sono definite **sequenze a monte**; quelle dopo il punto di inizio (cioè all'interno della sequenza trascritta) sono definite **sequenze a valle**.
- Per convenzione, le sequenze vengono scritte in modo che la trascrizione proceda da sinistra (a monte) a destra (a valle). Ciò equivale a scrivere l'RNA nella solita direzione 5'→3'.

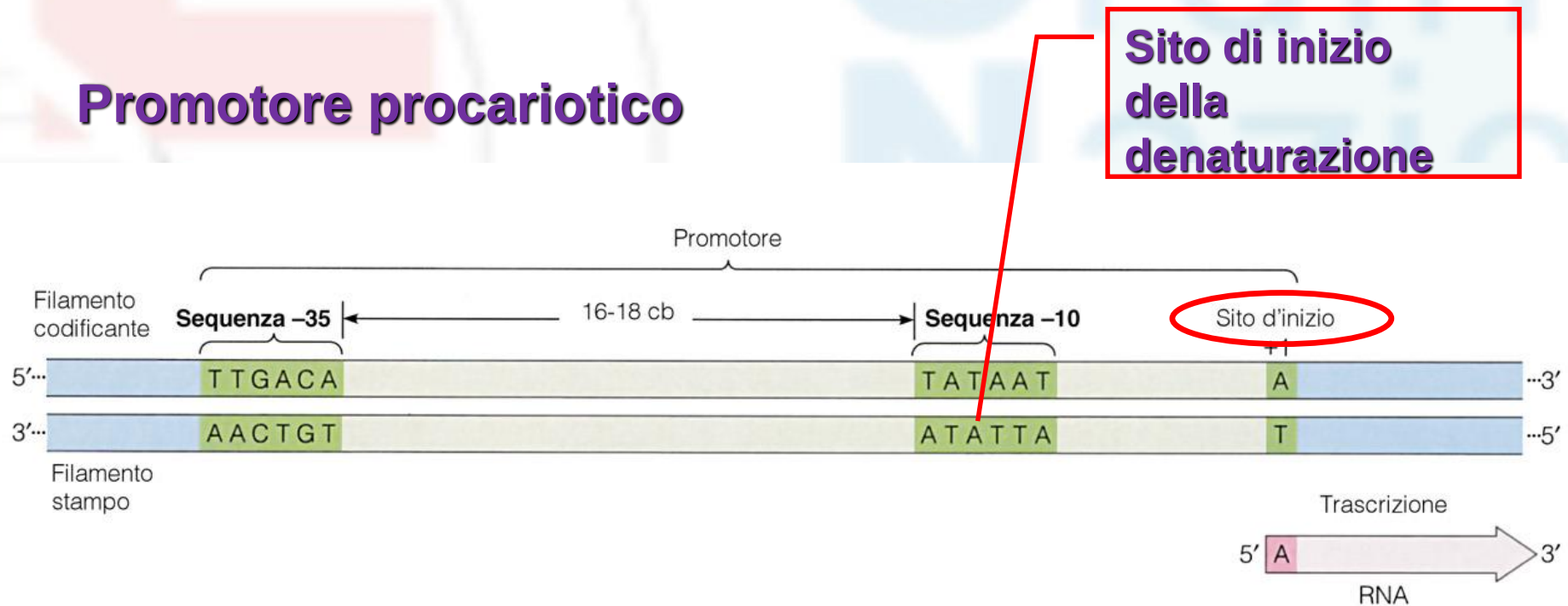
Le posizioni delle basi sono numerate in entrambe le direzioni a partire dal punto di inizio, al quale è assegnato il valore +1, e i numeri vanno poi aumentando verso valle. Procedendo verso la regione a monte, le posizioni sono numerate a partire da -1, ed aumentano allontanandosi dal punto di inizio. Il numero 0 non è assegnato a nessuna base.

Il prodotto della trascrizione è chiamato **trascritto primario**: è una molecola di RNA che si estende dal sito di inizio al terminatore, che inizia con l'estremità 5' originale e che termina con l'estremità 3' originale. Il trascritto primario è sempre molto instabile.

Il promotore

è una sequenza specifica del DNA che viene riconosciuta dalla RNA polimerasi e determina DOVE la sintesi del mRNA inizia e QUALE filamento del DNA debba essere utilizzato come stampo.

Promotore procariotico



1 L'inizio della sintesi dell'RNA non richiede un innesco.



2 I nuovi nucleotidi sono aggiunti all'estremità 3' della molecola di RNA.



3 Il DNA si svolge nella parte avanzata della bolla di trascrizione...



4 ...e poi si riavvolge.

$V=40$ NUCLEOTIDI/SEC

Procarioti: RNA polimerasi si lega direttamente al promotore

Eucarioti: fattori di trascrizione legano il promotore prima dell' RNA polimerasi

Le RNA Polimerasi

I Batteri posseggono una RNA polimerasi

- relativamente semplice

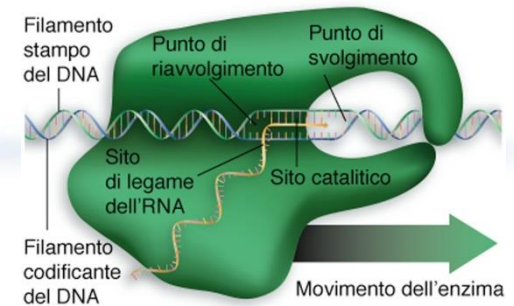
Gli Archaea posseggono una RNA polimerasima

- è più complessa
- ha caratteristiche funzionali simili a quelle degli *Eucaria*

gli *Eucaroti* hanno tre RNA polimerasi

- Pol I : RNA ribosomali
- Pol II : RNA messaggeri
- Pol III: tRNA e piccoli RNA

Nella cellula eucariotica esistono altre RNA polimerasi : l'RNA polimerasi mitocondriale e l'RNA polimerasi dei cloroplasti



*** Nei PROCARIOTI esiste una sola RNA polimerasi che trascrive i vari tipi di RNA:**

rRNA → RNA ribosomale

mRNA → proteine

tRNA → RNA di trasferimento

**** Negli EUCARIOTI esistono tre RNA polimerasi distinte:**

RNA polimerasi I → rRNA

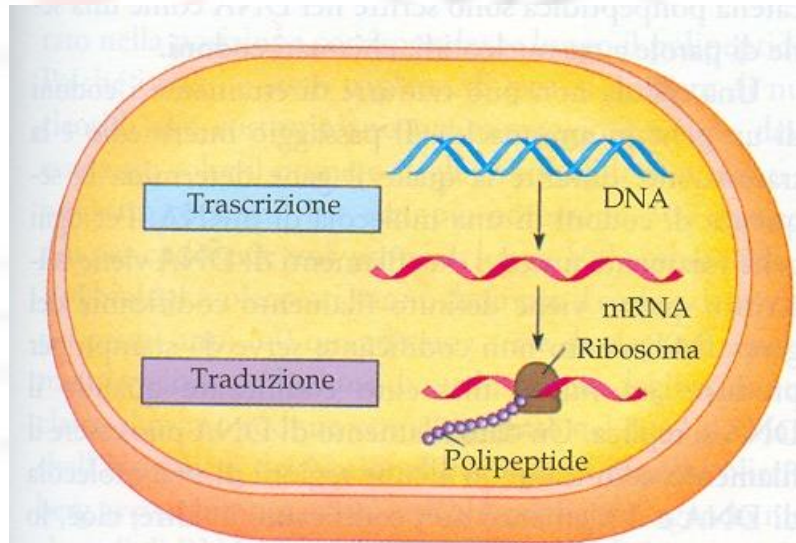
RNA polimerasi II → mRNA

RNA polimerasi III → tRNA

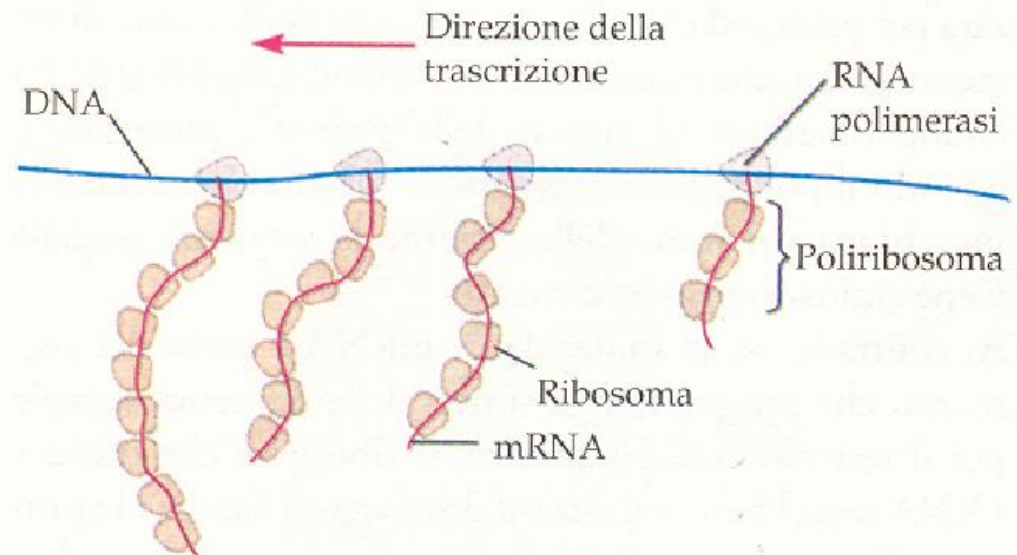
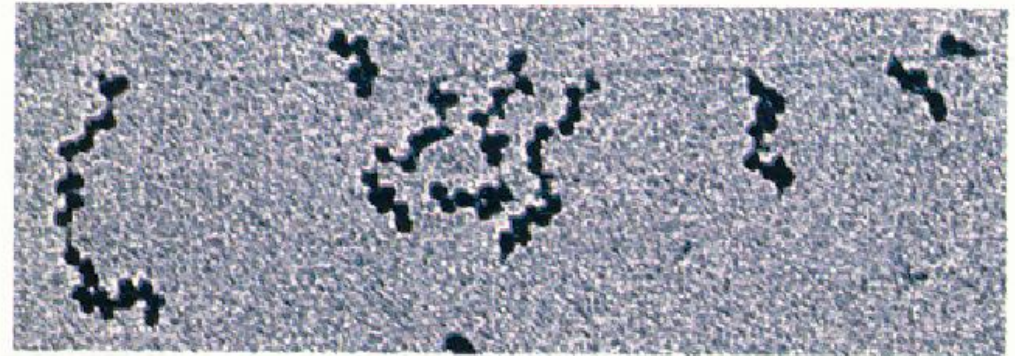
ma questa non è la sola differenza....

Nei procarioti il trascritto viene subito tradotto in proteina

...

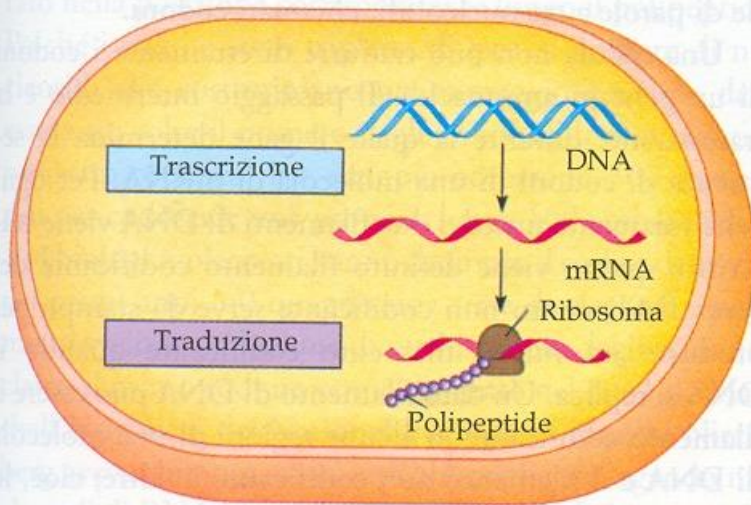


(a) Cellula procariotica

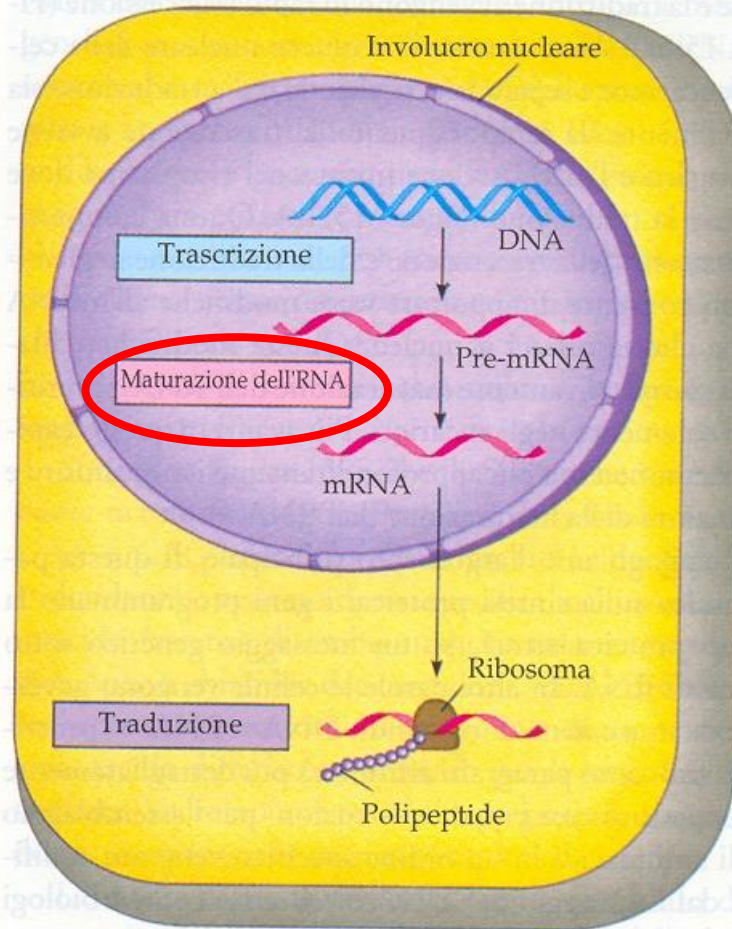


...

nel nucleo delle cellule eucariotiche invece avviene un complicato processo di MATURAZIONE prima che il trascritto venga esportato nel citoplasma e tradotto.



(a) Cellula procariotica



(b) Cellula eucariotica

Dal nucleo al citoplasma

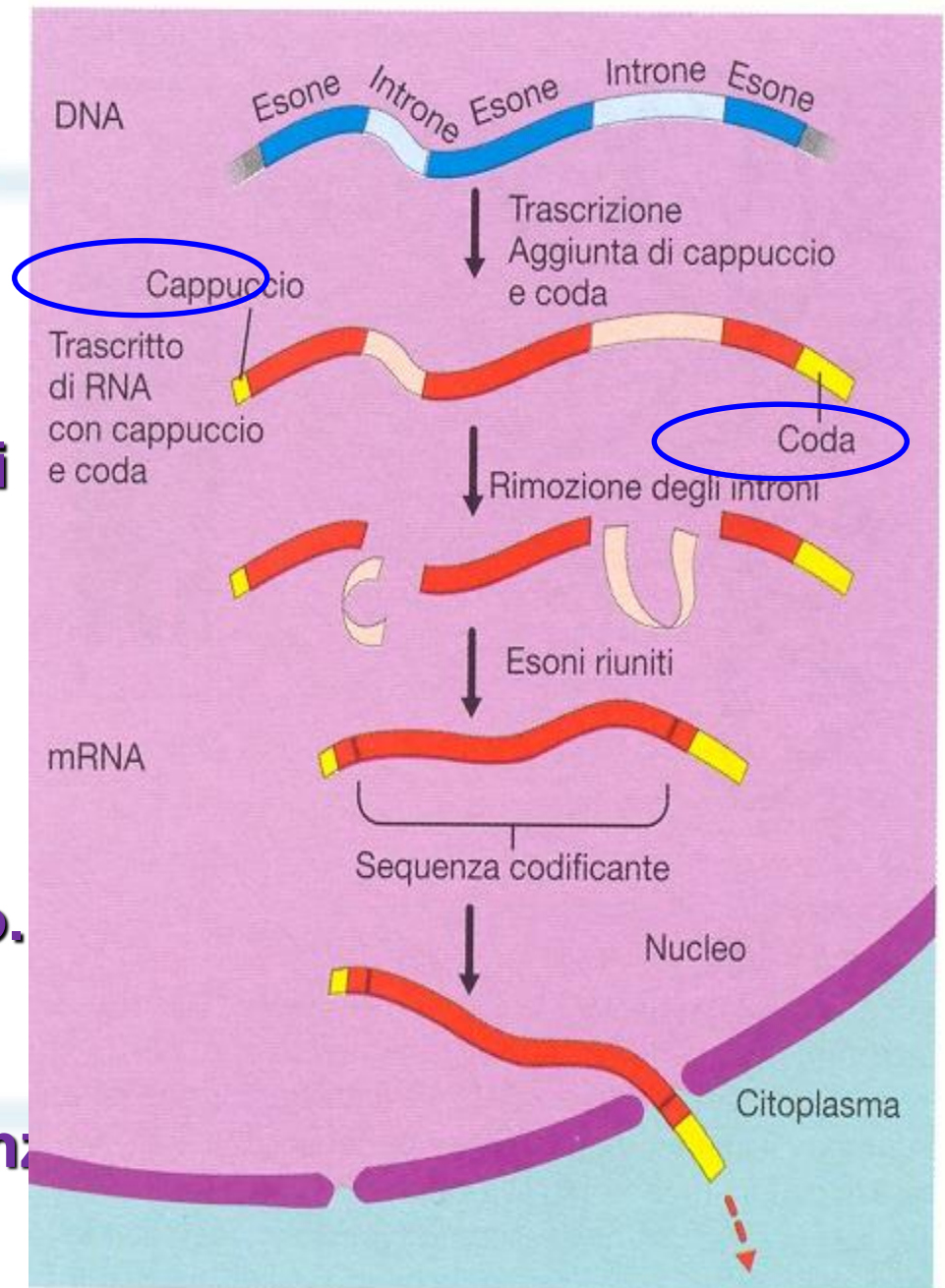


← pori nucleari

linfocita visto
al M.E. dopo
criofrattura

Dal nucleo dove avviene la trascrizione, gli RNA messaggeri maturi passano attraverso i pori nucleari nel citoplasma, dove vengono tradotti

Nei geni degli eucarioti le sequenze codificanti per proteine (esoni) sono interrotte da sequenze non codificanti (introni). Il trascritto primario, prima di abbandonare il nucleo, viene sottoposto ad un processo di taglio e ricucitura (splicing): gli introni vengono eliminati e gli esoni riuniti uno all'altro. La molecola di mRNA maturo che esce dal nucleo sarà costituita da una sequenza codificante continua



Le 4 fasi della trascrizione



- **Riconoscimento dello stampo**
 - comincia con il legame della RNA polimerasi al DNA a doppio filamento, con formazione di un “complesso chiuso”; poi i filamenti di DNA vengono separati, formando un “complesso aperto”: la bolla di trascrizione è creata grazie ad uno srotolamento locale che comincia nel sito legato dalla RNA polimerasi.
- **Inizio della trascrizione**
 - sintesi del primo legame nucleotidico nell’RNA; l’enzima resta sul promotore mentre sintetizza i primi 9 legami nucleotidici. La fase di inizio è resa più lunga dal succedersi di eventi abortivi, nei quali l’enzima sintetizza brevi trascritti (<9 basi), li rilascia e ricomincia la sintesi. La fase di inizio termina quando l’enzima riesce ad estendere la catena e lascia il promotore. *La sequenza di DNA necessaria per il legame della polimerasi allo stampo e per l’effettuazione della reazione di inizio definisce il promotore.*
- **Elongazione**
 - l’enzima si muove lungo il DNA ed estende la catena di RNA. Muovendosi, l’enzima srotola la doppia elica esponendo una nuova porzione dello stampo a singolo filamento. I nucleotidi vengono aggiunti all’estremità 3’ della catena nascente di RNA, formando un ibrido DNA-RNA nella regione srotolata. Alle spalle della regione srotolata, il filamento stampo si riappaia con il filamento codificante, riformando la doppia elica e spiazzando la catena di RNA.
- **Terminazione**
 - riconoscimento di un punto nel quale l’enzima cessa di aggiungere nucleotidi alla catena di RNA in crescita: dopo l’aggiunta dell’ultima base, l’ibrido DNA-RNA si dissocia, la bolla di trascrizione collapsa riformando la doppia elica, l’enzima e l’RNA si dissociano dal DNA. La sequenza di DNA che innesca questa reazione è chiamata **terminatore**.

RNA polimerasi di *E.coli* è un'enzima costituito da piu' subunità oloenzima

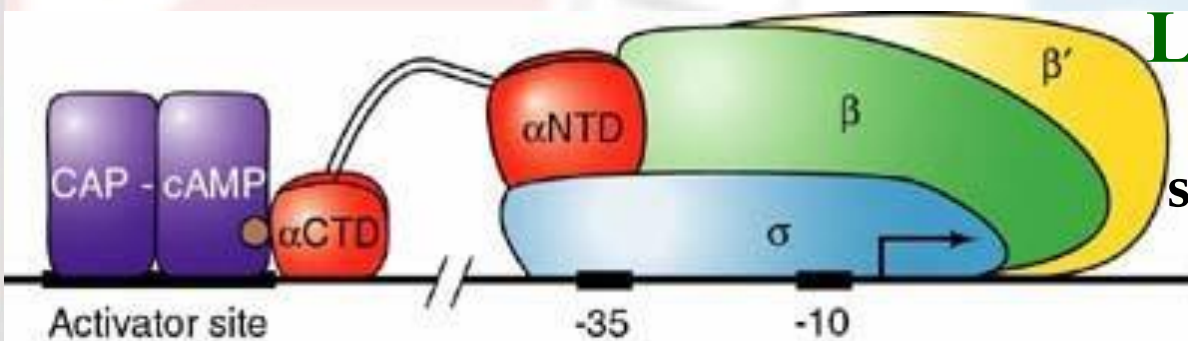
β (155 kD)



costituiscono il **core catalitico**

β' (160 kD)

La subunità α (40 kD) è richiesta per l'assemblaggio del core dell'enzima, per il riconoscimento del promotore e per l'interazione con effettori (attivatori o repressori).



La subunità σ (32-90 kD)

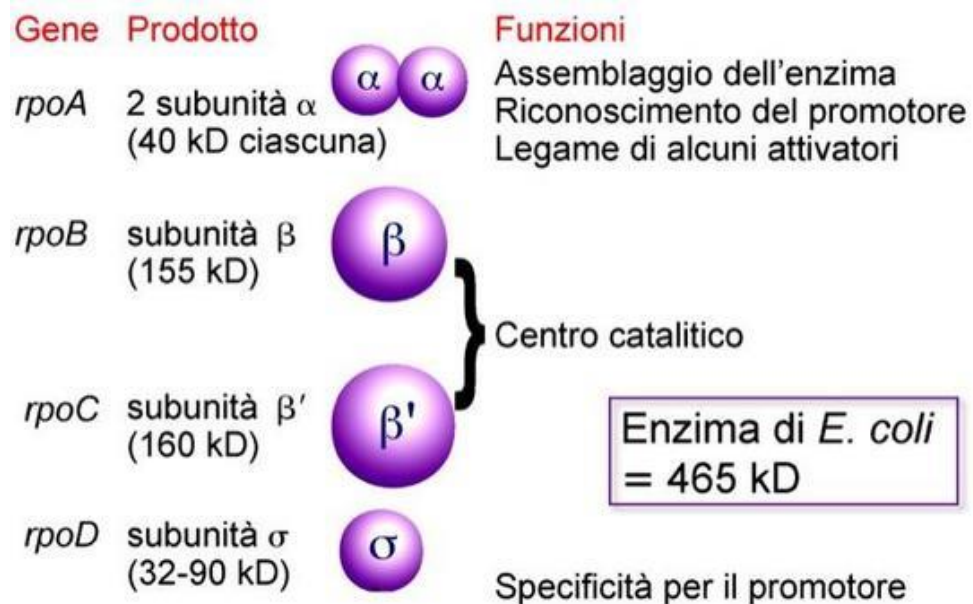
Esistono diversi tipi di σ specifiche per gruppi diversi di geni da trascrivere

La presenza di σ fa aumentare l'affinità dell'enzima x il DNA

LE SUBUNITA' DELLA RNA POLIMERASI BATTERICA

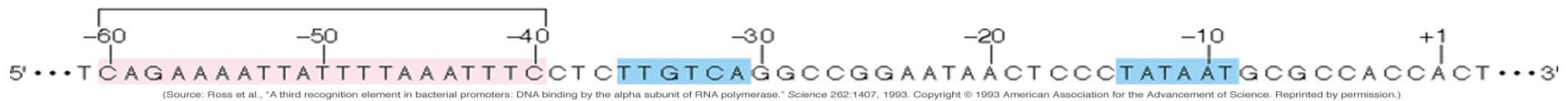
L'enzima completo o **oloenzima** ha una composizione $\alpha 2\beta\beta'\sigma$. • Il **nucleo enzimatico** (enzima “**core**”) ha una composizione $\alpha 2\beta\beta'$. • La subunità α è necessaria per l'assemblaggio del nucleo enzimatico, ha un ruolo secondario nel riconoscimento del promotore e partecipa nell'interazione della polimerasi con alcuni fattori di regolazione.

- La subunità σ (chiamato anche **fattore σ**) ha un ruolo specifico nel riconoscimento delle sequenze del promotore.
- Le subunità β e β' formano il centro catalitico. Il canale nel quale passa il DNA è formato dall'interfaccia tra le due subunità. Sia il filamento stampo che il filamento codificante interagiscono con le due subunità nella regione della bolla di trascrizione: in questa maniera l'enzima stabilizza i due filamenti separati. Anche la catena di RNA interagisce con le due subunità nella regione della bolla di trascrizione.
- L'antibiotico rifampicina blocca la trascrizione della RNA polimerasi batterica legandosi alla subunità β a 12 Å di distanza dal sito attivo, impedendo l'uscita della catena di RNA in allungamento.



SUBUNITÀ alpha

La subunità alpha mediante il **dominio C terminale** riconosce e lega l'elemento UP e questo determina un legame molto stretto tra polimerasi e promotore

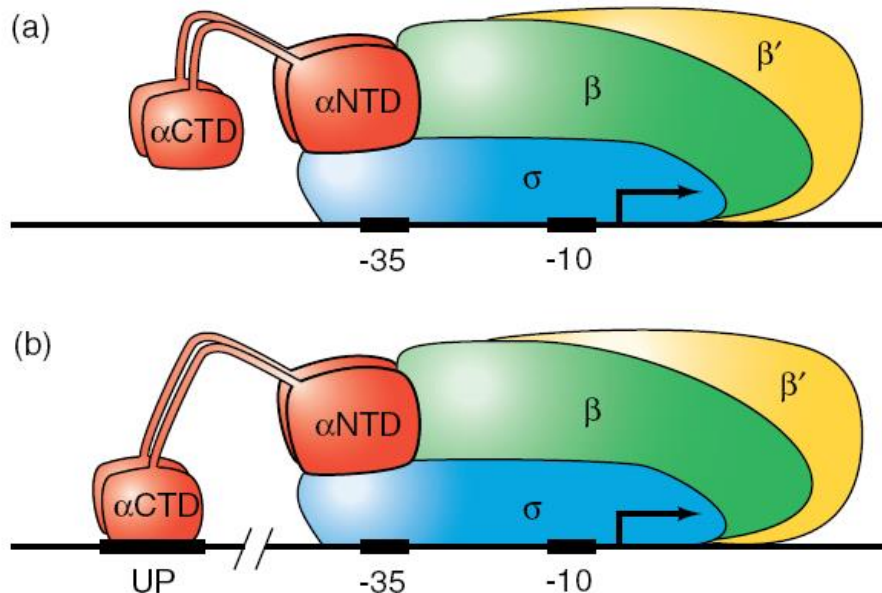


ELEMENTO UP

Sequenza ricca di A-T.

Interagisce con la subunità α della RNA polimerasi.

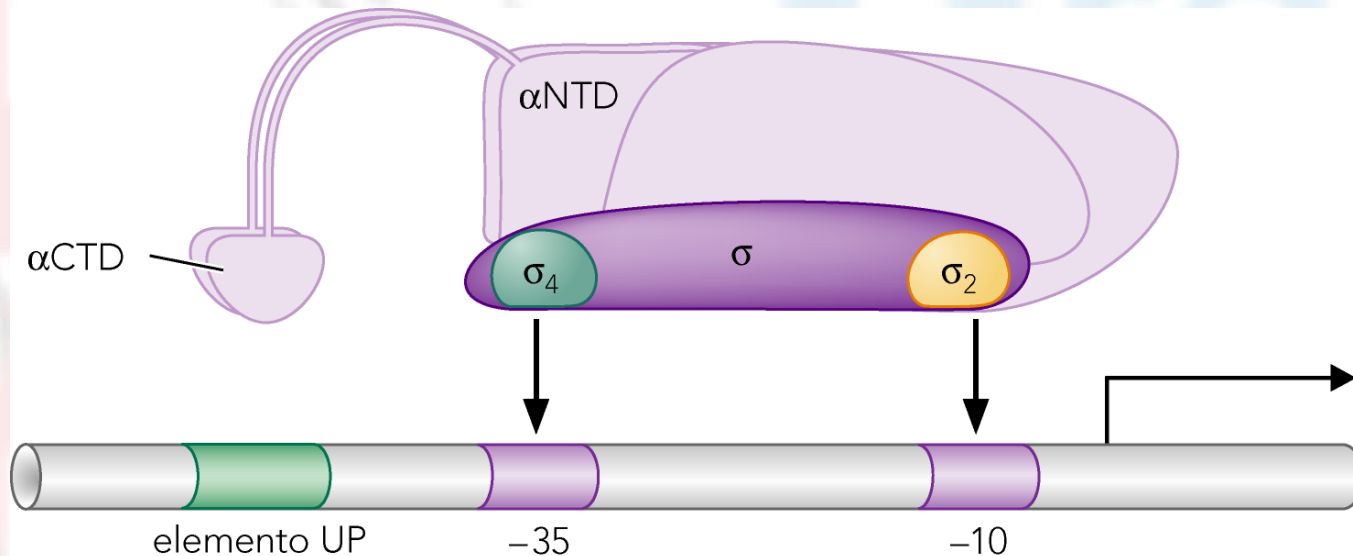
Si trova tipicamente nei promotori che sono molto espressi, quali quelli dei geni per gli rRNA.



SUBUNITÀ sigma

SIGMA CONTROLLA IL RICONOSCIMENTO DEL PROMOTORE

La subunità sigma contiene regioni che riconoscono in modo specifico gli elementi a -35 e a -10



due α eliche della regione 4 di sigma prendono contatto con la regione -35

L' α elica coinvolta nel riconoscimento della regione -10 interagisce con le basi del filamento non stampo in maniera da stabilizzare il DNA aperto

FORZA DI UN PROMOTORE

n. trascritti dati
in un dato tempo

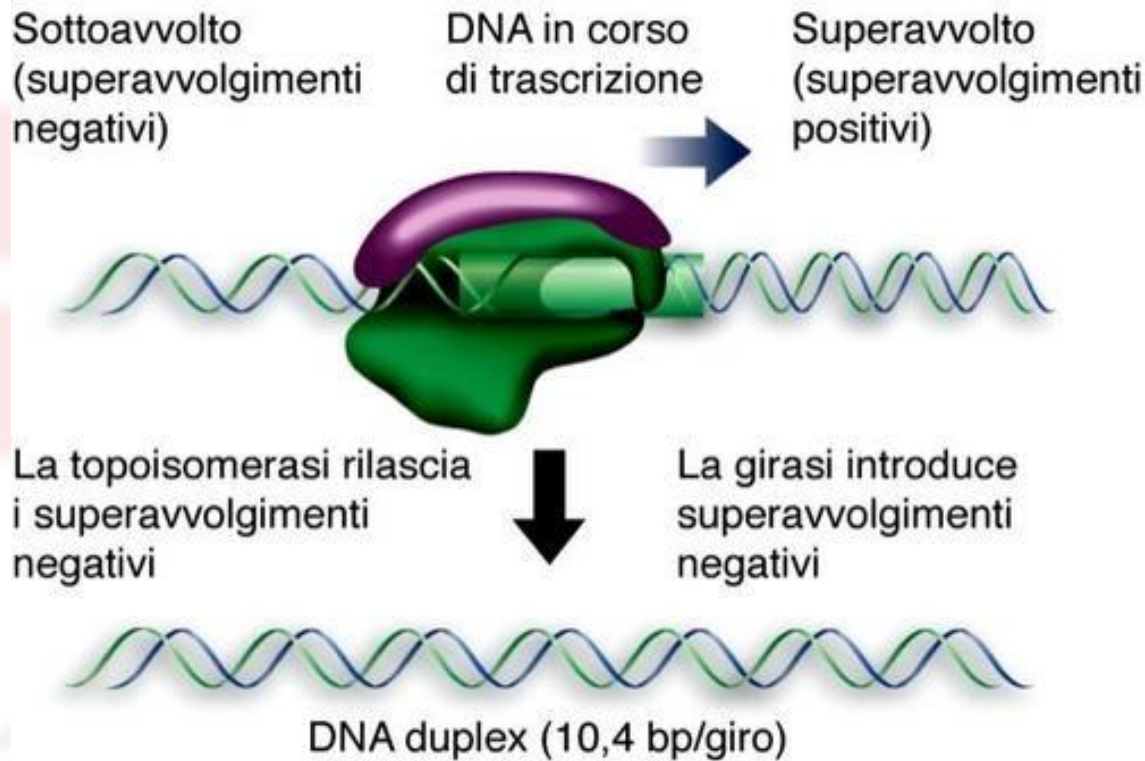
I PROMOTORI SONO ETEROGENEI →

Alcuni geni hanno
bisogno di essere
espressi piu' di altri

I promotori con la sequenza piu' vicina alla sequenza
consenso sono piu' forti di quelli con sequenze divergenti

- Affinità della polimerasi per il promotore
- Efficienza di isomerizzazione
- Da quanto prontamente la polimerasi puo' evadere dal promotore

Trascrizione e superavvolgimenti del DNA





La trascrizione negli eucarioti

GLI ENZIMI DELLA TRASCRIZIONE EUCARIOTICI

L'enzima che sintetizza RNA copiando DNA e' una **RNA polimerasi DNA-dipendente**.

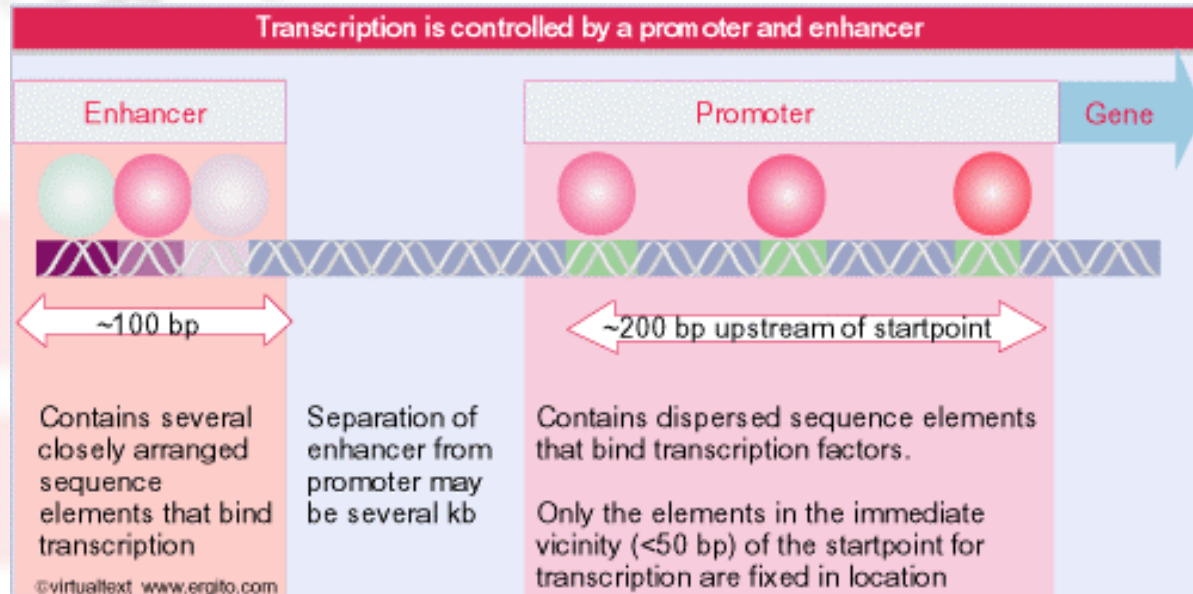
Negli Eucarioti esistono tre diverse RNA polimerasi, che trascrivono categorie distinte di geni:

- RNA polimerasi I -> rRNA 28S, 18S, 5,8S
- RNA polimerasi II -> RNA cod. polipeptidi, snRNA, miRNA
- RNA polimerasi III -> rRNA 5S, tRNA, + altri piccoli RNA

L'enzima **RNA polimerasi** trascrive il DNA ma non e' in grado, da sola, di iniziare il processo di trascrizione, ne' di scegliere l'esatto **sito d'inizio della trascrizione (TSS)**

Il promotore eucariotico

L'inizio della trascrizione negli eucarioti necessita di RNA polimerasi e fattori di trascrizione.



i fattori di trascrizione riconoscono il promotore e creano una struttura riconosciuta dall'enzima.

La presenza dei siti intensificatori (enhancer) invece stimola l'inizio. Queste sequenze si possono trovare anche a grande distanza dal sito di inizio, e sono il bersaglio per la regolazione dell'espressione tessuto specifica o temporale.

- La regolazione negli eucarioti è positiva.

Le RNA polimerasi eucariotiche

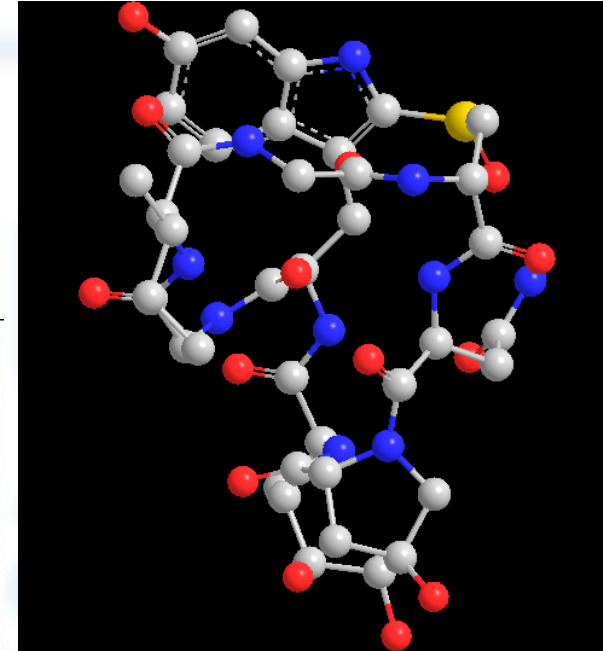
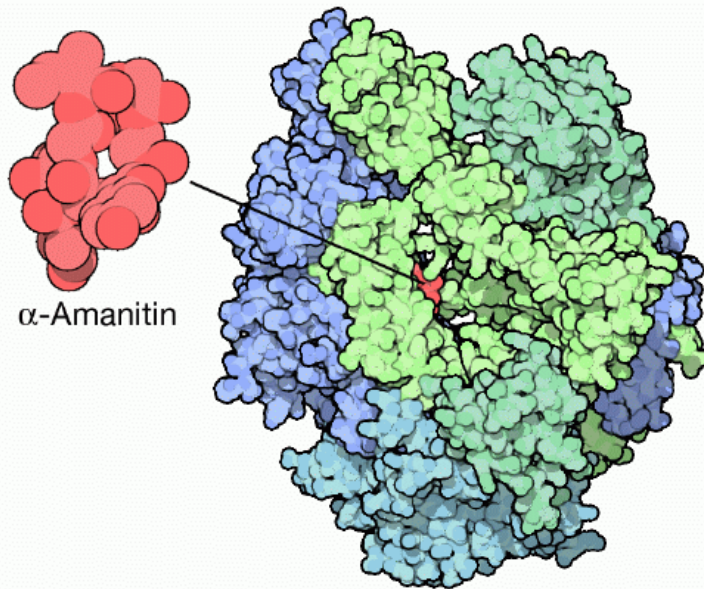
Diversa sensibilità delle RNA pol nei confronti della α -amanitina

	RNA pol I	RNA pol II	RNApol III
α -amanitina	Non sensibile	+++ [10^{-9} - 10^{-8} M]	++ [10^{-5} M]

Alfa amanitina inibisce le RNA pol eucariotiche



Polipeptide biciclico



L'avvelenamento con le amanitine è caratterizzato da un lungo periodo di latenza (dalle 6 alle 48 ore, in media 6-15 ore) durante il quale il paziente non accusa alcun sintomo.

Localizzazione delle RNA polimerasi

RNA pol I	RNA pol II	RNA pol III
nucleolo	nucleoplasma	nucleoplasma

Quali sono le funzioni delle tre RNA polimerasi?

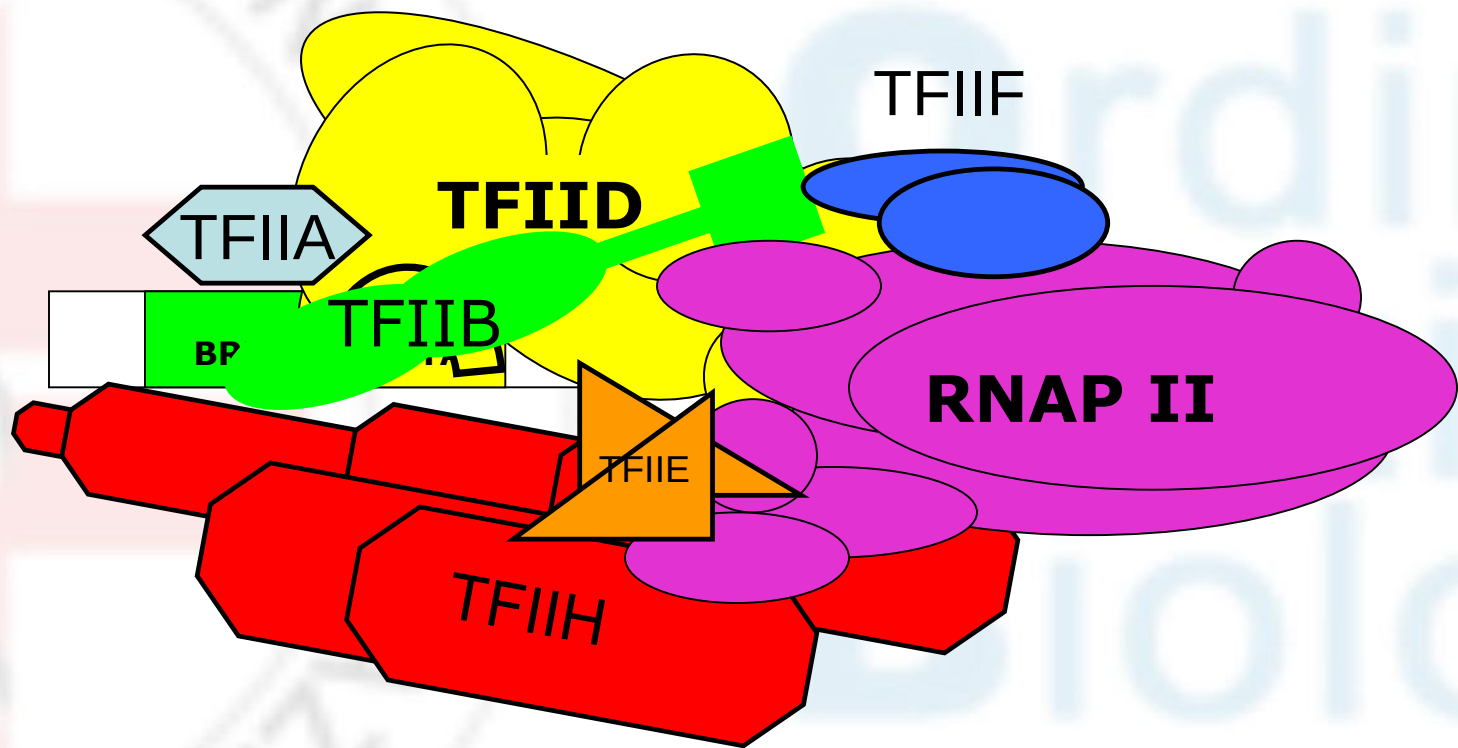
RNA pol I	RNA pol II	RNA pol III
• Precursore RNA ribosomali (rRNA)	• mRNA • small nuclear RNA (snRNA) • Small nucleolar RNA (snoRNA) • microRNA	• tRNA • 5 S rRNA • snRNA (U₆) • Altri piccoli RNA

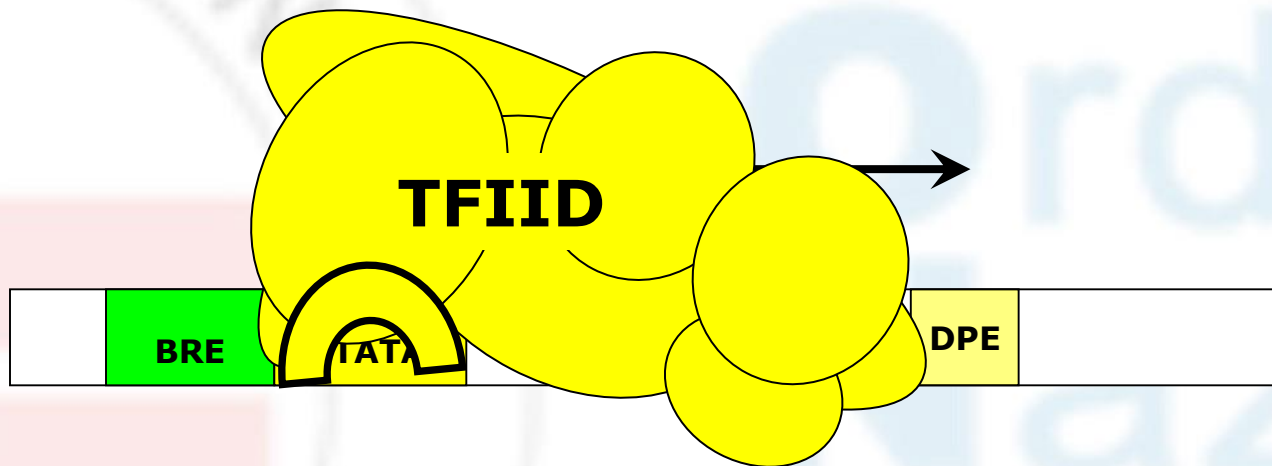
Inoltre nella cellula eucariotica esistono altre RNA polimerasi :

- Mitocondri [simile a RNA pol del fago T7]
- Cloroplasti [simile a RNA pol batterica]

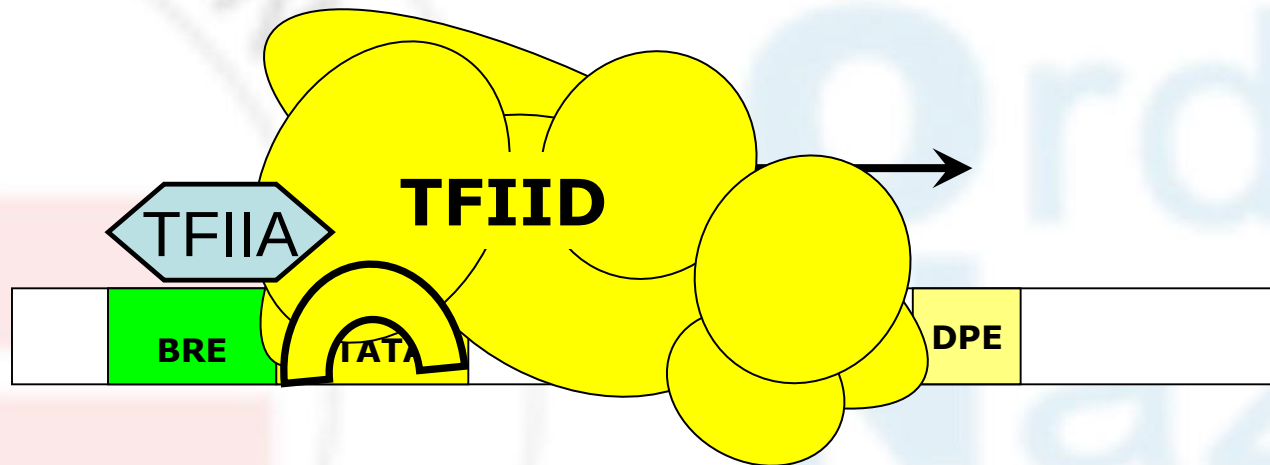
Le RNA polimerasi eucariotiche sono enzimi di dimensioni notevoli (>500 kD, composte da piu' di 10 subunità - Valori espressi in kDa

RNA pol I	II	III	
190	220	160	Simili a β' e β
135	150	128	
-	-	82	
49	-	-	
43	-	53	
40	44.5	40	α
-	-	37	
34.5	32	34	
-	-	31	
27	27	27	
23	23	23	
19	16	19	
14.5	14.5	14.5	
14	-	-	
-	12.6	-	
12.2		11	
10	10	10	



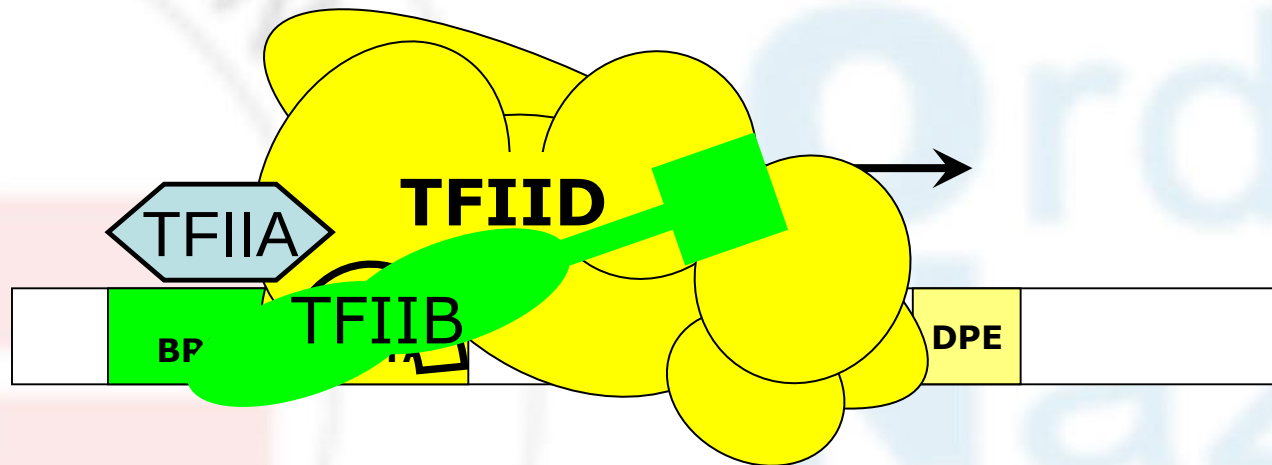


TFIIA



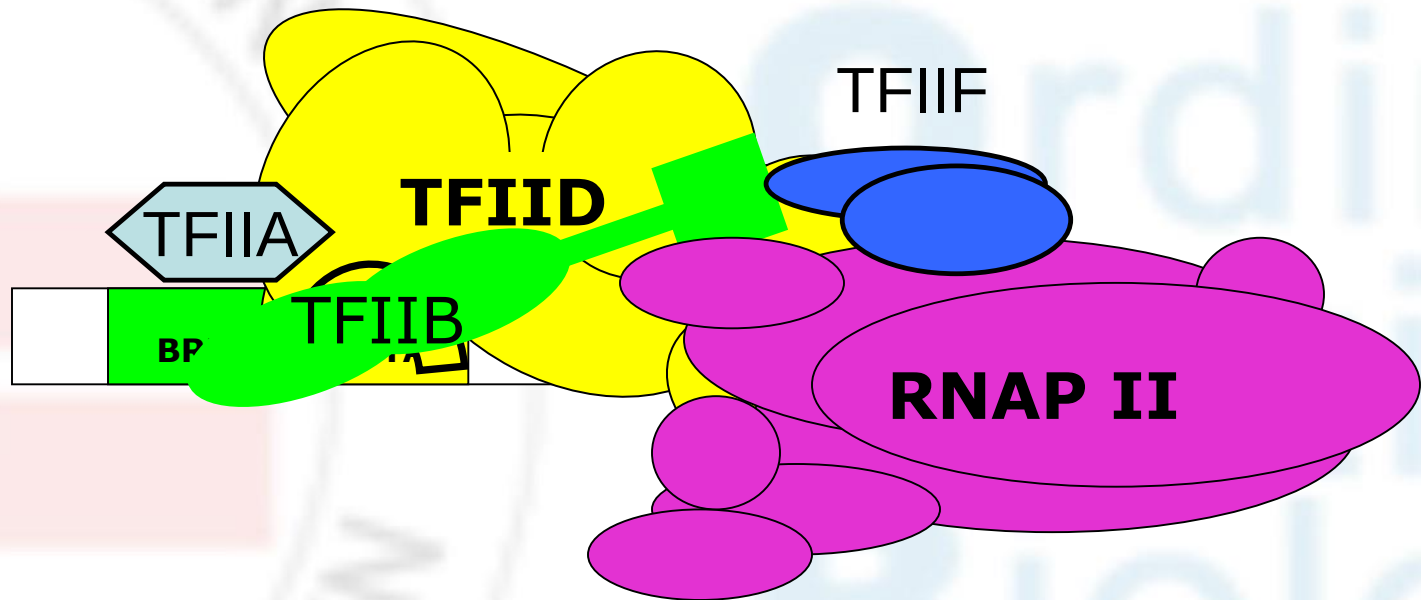
- aumenta e stabilizza il legame di TBP al DNA
- interagisce con vari attivatori gene specifici
Aiutandoli a legarsi ai vari TAF

TFIIB



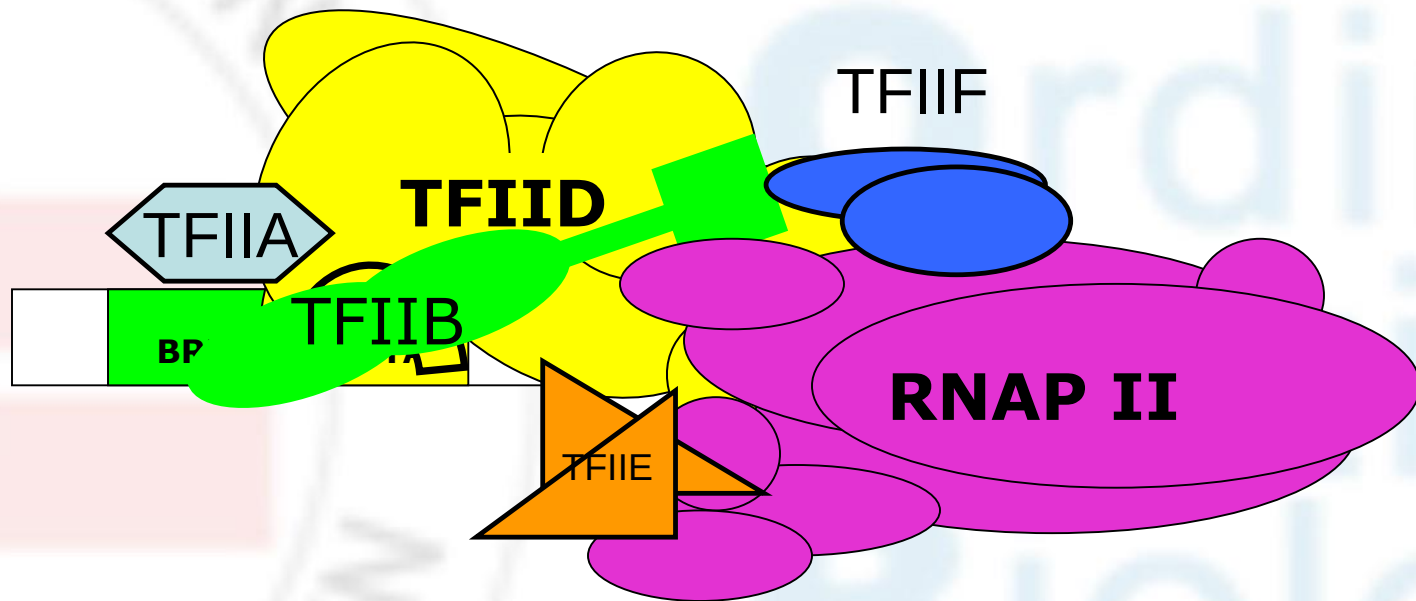
- si lega a TBP e richiama la polimerasi
- Partecipa alla selezione del sito d'inizio e Stabilisce la direzione

TFIIF



Stabilizza il complesso di preinizio e induce
Una torsione nel DNA

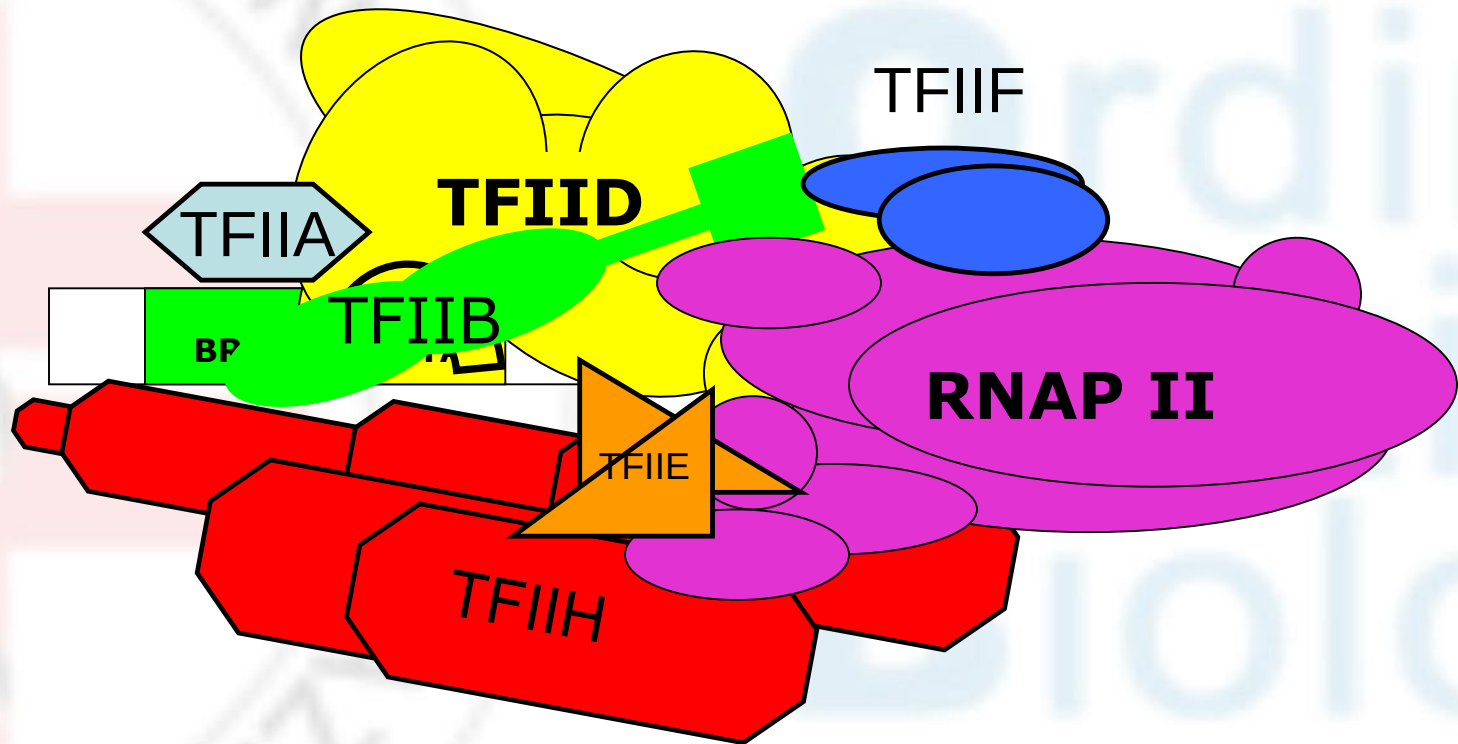
TFIIE



Attira una elicasi ed insieme srotolano il Promotore.

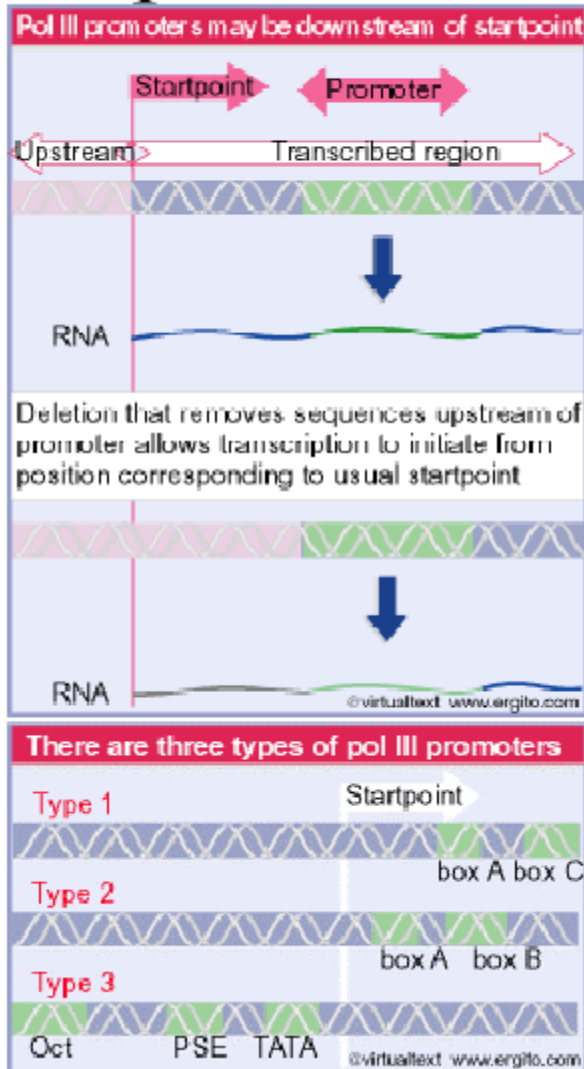
Stimola l'attività chinasi di TFIIH

TFIIH

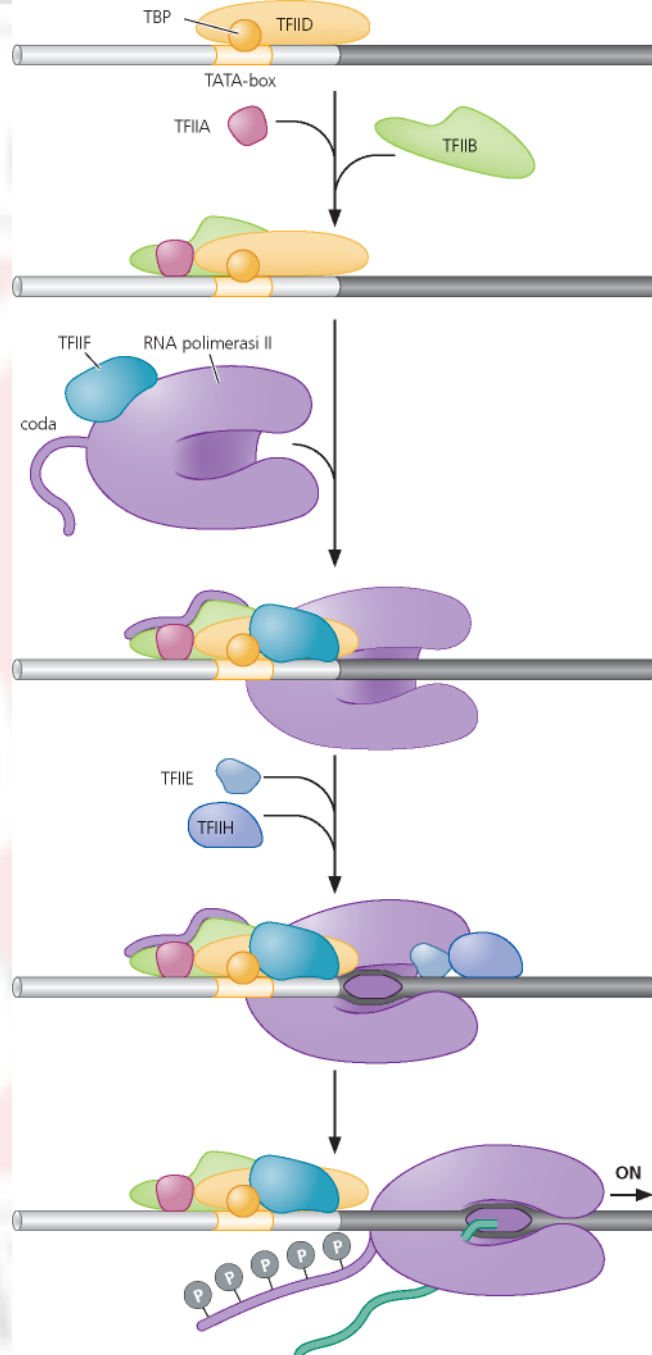


Fosforila una delle subunita' della polimerasi dando l'avvio alla trascrizione

I promotori della RNA polimerasi III



- I promotori dei geni dell'RNA ribosomale 5S e dei tRNA sono **interni**
 - per il gene dell'RNA ribosomale 5S il promotore si estende da +55 a +80.
- Questo è stato determinato mediante analisi di delezione.
- Successive analisi mutazionali hanno identificato due sottotipi
 - tipo 1, contenente box A e box C;
 - tipo 2, contenente box A e box B.
- Il promotore del piccolo RNA nucleare U6 ha una struttura più canonica
 - tipo 3, contenente tre elementi conservati, Oct, PSE e TATA nella regione a monte.

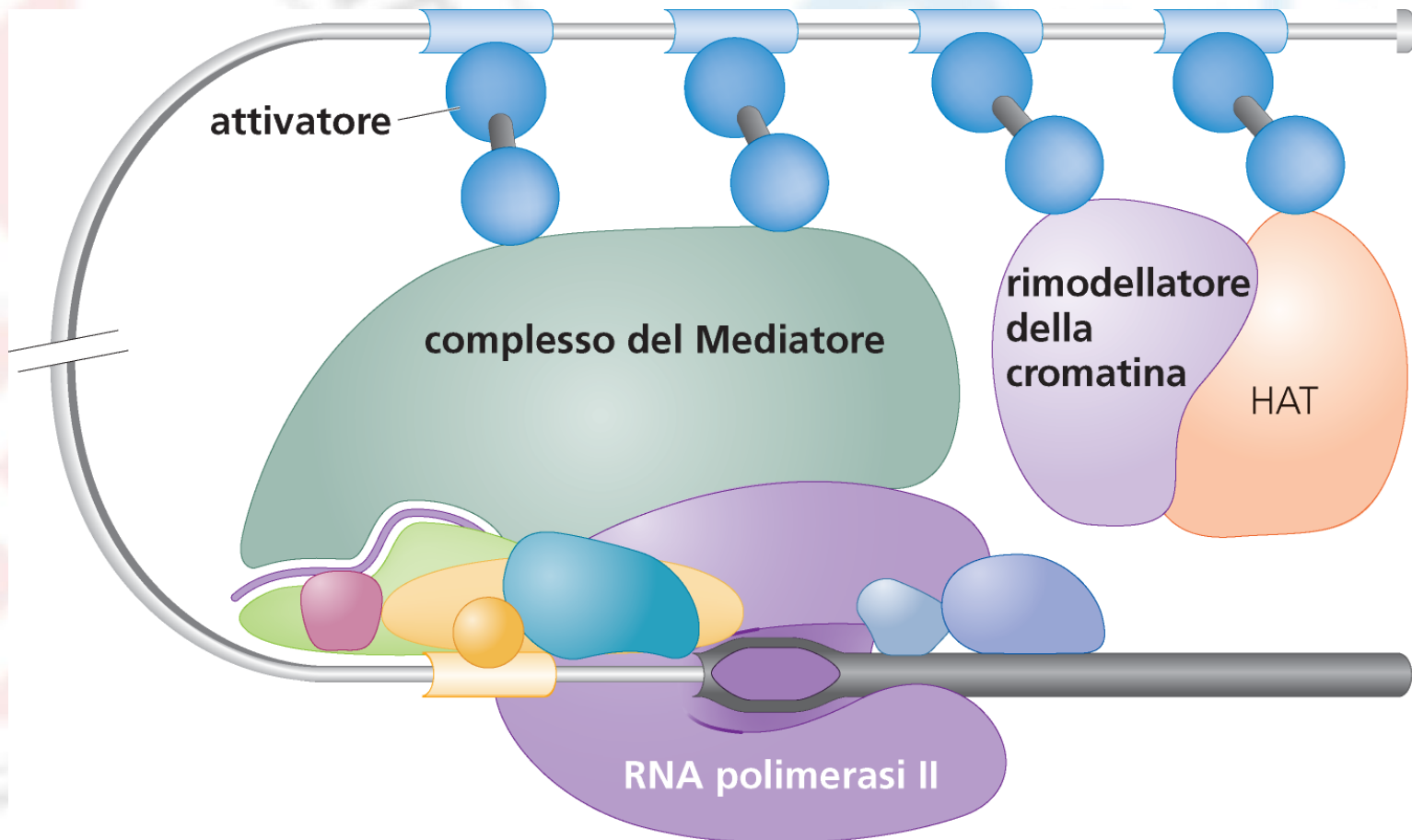


DIFFERENZE CON I PROCARIOTI

- L'APERTURA DEL DNA DEL PROMOTORE RICHIEDE ATP ED E' MEDIATA DA TFIIF
- IL DISTACCO DAL PROMOTORE RICHIEDE IDROLISI DI ATP E FOSFORILAZIONE DELLA POLIMERASI (CTD)

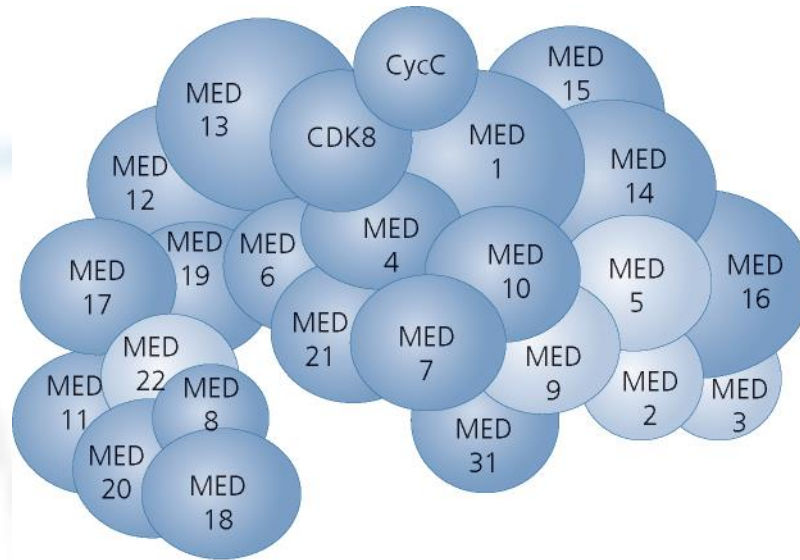
LA FOSFORILAZIONE AIUTA LA POLIMERASI A LIBERARSI DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE UTILIZZATI PER L'INIZIO

IN VIVO L'INIZIO DELLA TRASCRIZIONE RICHIEDE ALTRE PROTEINE

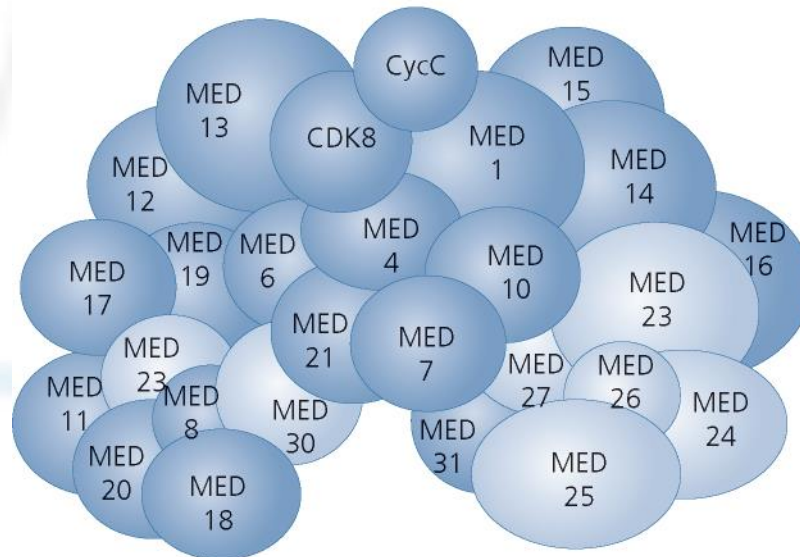


+ GRANDE DELLA POLIMERASI

Esistono varie forme di mediatore (ciascuna contenente diversi gruppi di subunità) probabilmente coinvolte nella regolazione di gruppi diversi di geni e che rispondono a gruppi diversi di regolatori

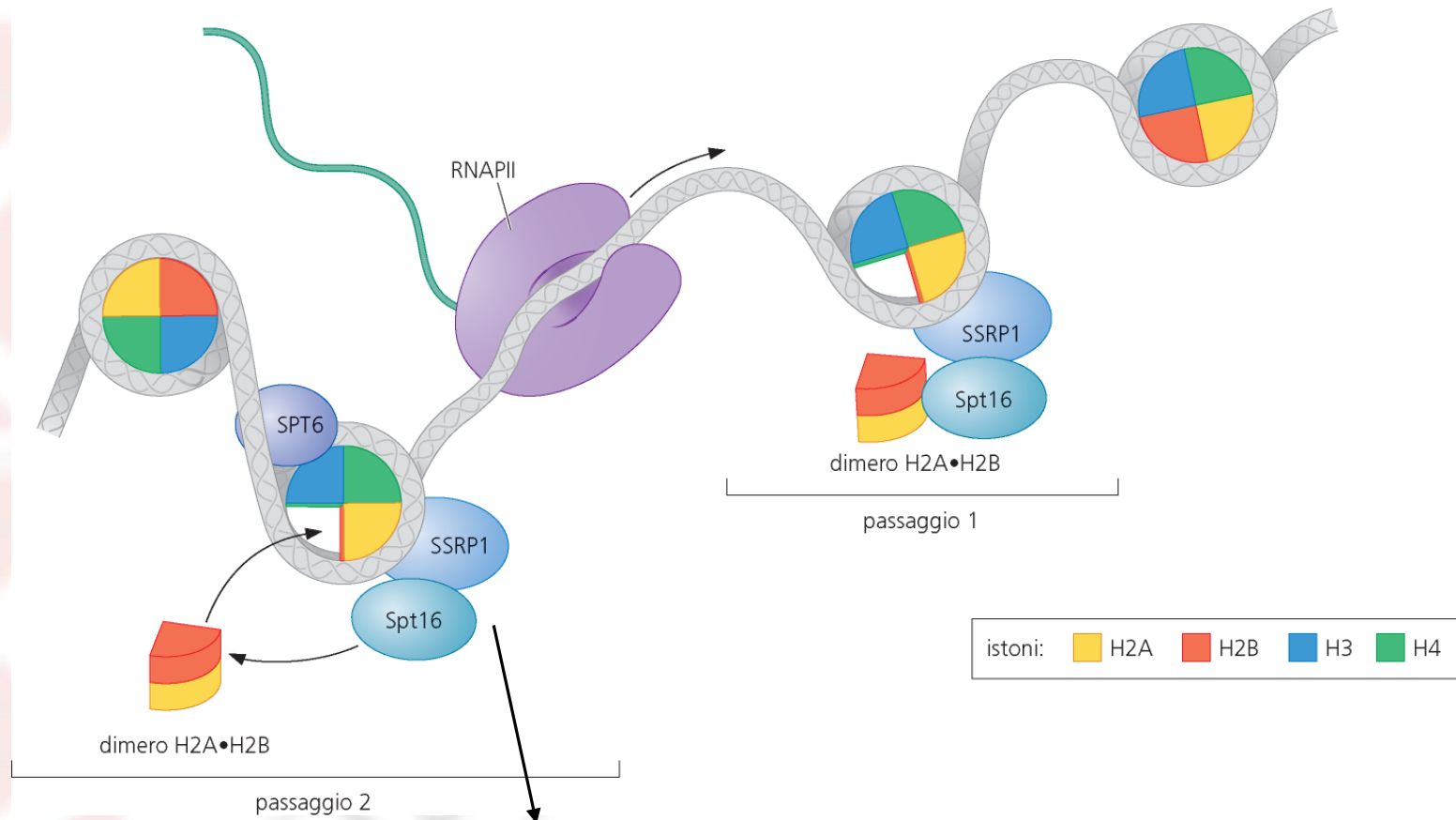


Mediatore del lievito



Mediatore umano

Le polimerasi in fase di allungamento devono risolvere il problema dell'incontro con gli istoni



FACT mantiene l'integrità della struttura cromatinica attraverso cui si muove l'enzima

MATURAZIONE DELL'RNA

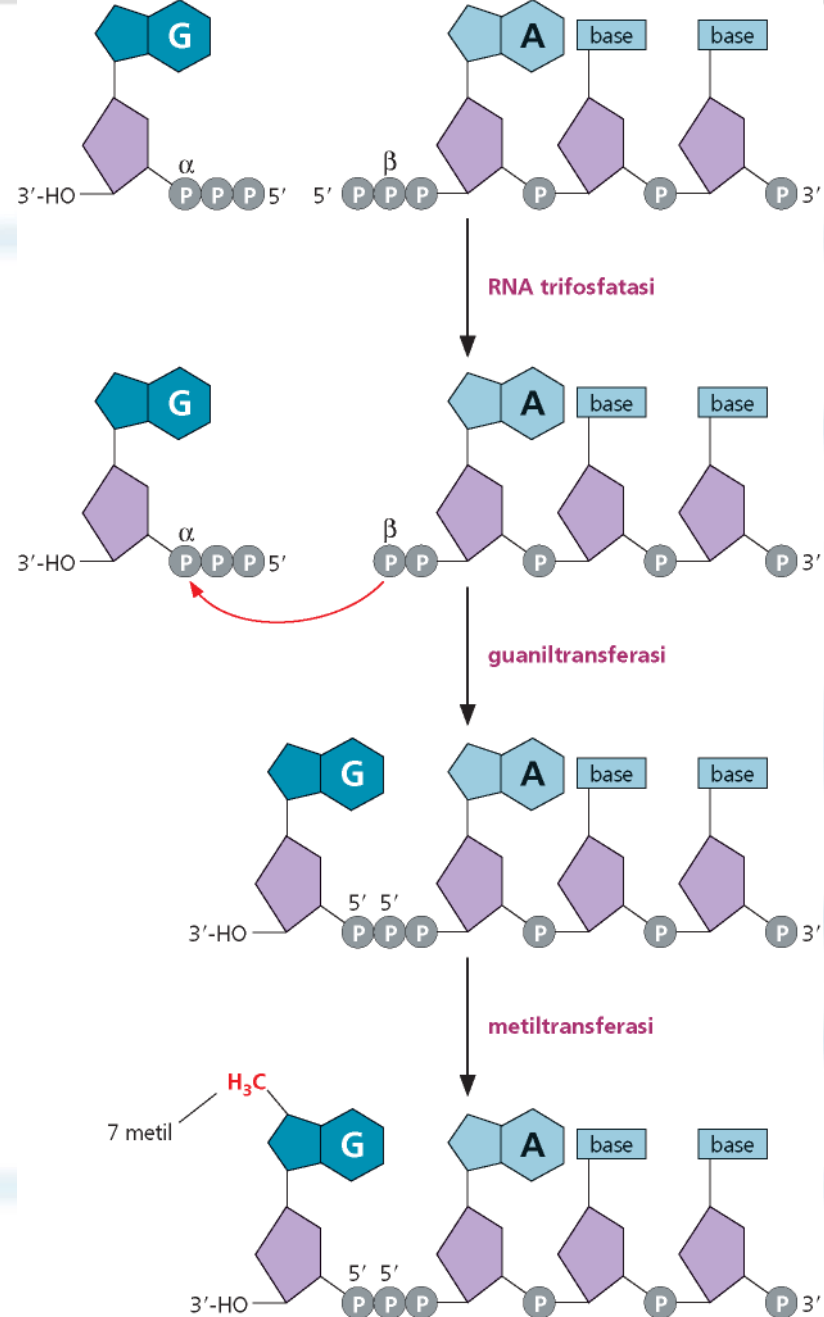
dal trascritto primario al messaggero maturo

MODIFICAZIONI PRINCIPALI

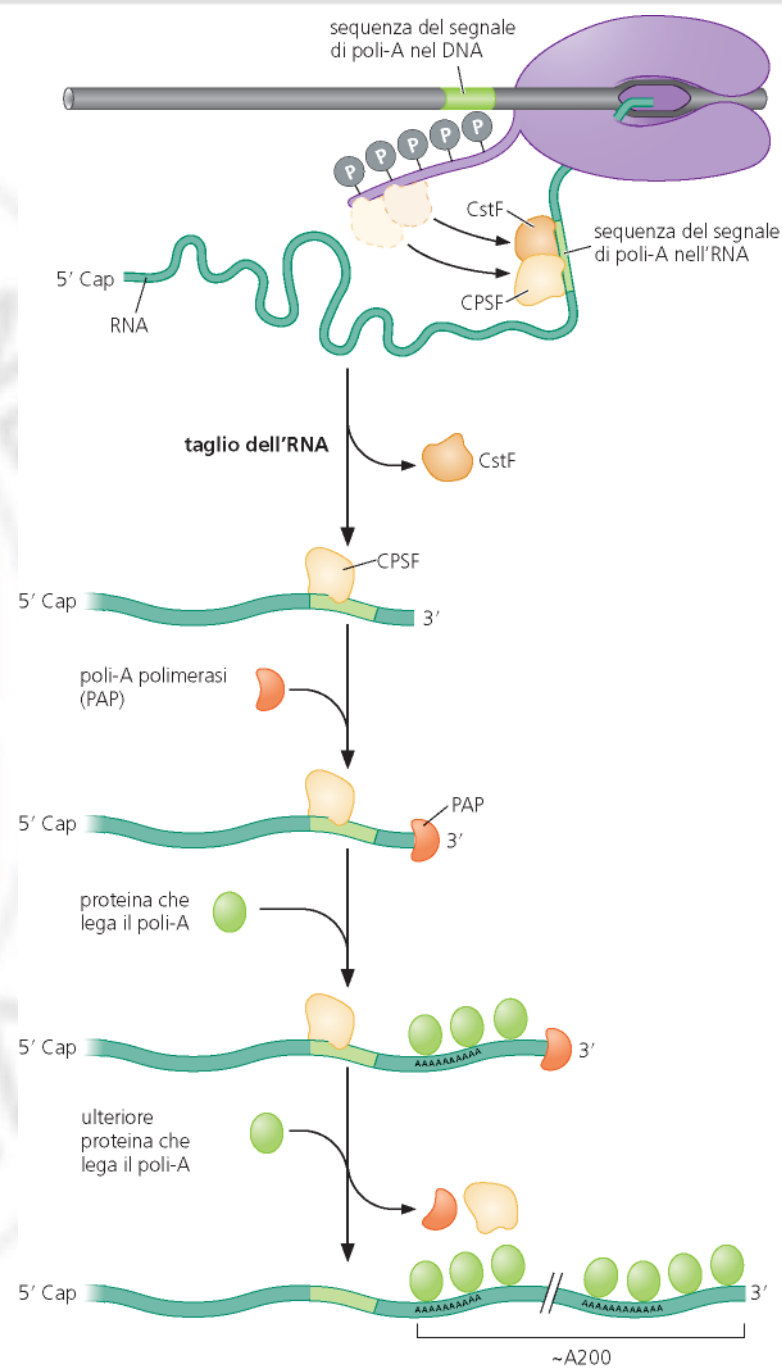
- Aggiunta di una **guanosina modificata all'estremità' 5' con un legame 5'-5'** che forma un gruppo terminale detto **CAP**, necessario al legame dell'mRNA ai ribosomi ed all'inizio della sintesi proteica.
- Aggiunta di una sequenza di adenosine (**coda di poli-A all'estremità' 3'** del trascritto, con funzione stabilizzante del messaggero.
- **Rimozione delle regioni introniche** mediante **splicing**, processo che consiste nel taglio delle regioni introniche e nella giunzione degli elementi esonici, a formare l'mRNA maturo.

**L'RNA subisce il capping
non appena esce dal canale
di uscita dell' RNA presente
sulla polimerasi**

**Defosforilazione Ser 5
dissociazione macchinario
capping e fosforilazione
Ser 2 reclutamento
macchinario splicing**



Il CTD recluta
anche gli enzimi
necessari per la
poliadenilazione





SINTESI PROTEICA

Cos'è la sintesi proteica

- La sintesi proteica è il processo che porta alla formazione delle proteine utilizzando le informazioni contenute nel DNA.
- Si tratta di un processo piuttosto complesso in cui intervengono vari “attori”
- Nelle sue linee fondamentali questo processo è identico in tutte le forme di vita, sia eucarioti che procarioti

Dove avviene

- nel citoplasma o nel reticolo endoplasmatico ruvido

La sintesi proteica

La sintesi proteica richiede:

- ***RNA messaggero;***
- ***ribosomi formati per 2/3 da RNA ribosomiale e 1/3 da proteine;***
- ***RNA transfer***



**TRADUZIONE NON
E' SINONIMO DI
SINTESI PROTEICA**

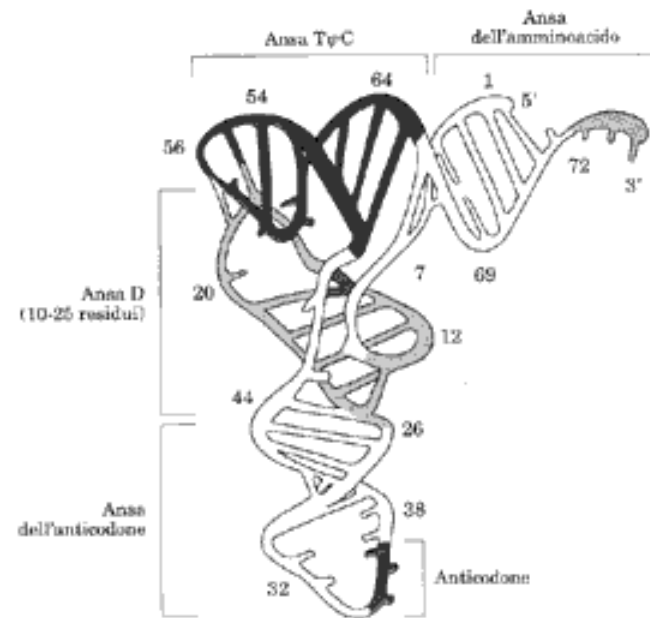
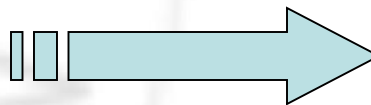
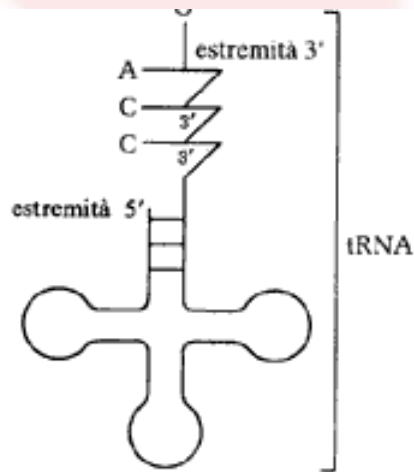
Gli “attori” – L’RNA

Nella sintesi proteica interviene l’RNA, presente in 3 forme diverse:

- l’RNA messaggero (mRNA)*
- l’RNA ribosomale (rRNA)*
- l’RNA transfer (tRNA)*

L'RNA transfer

L'RNA transfer (tRNA) è un RNA che viene rappresentato bidimensionalmente come un trifoglio...



...mentre la struttura tridimensionale è decisamente più complessa

Gli “attori” – Amminoacidi

La sintesi proteica richiede anche gli amminoacidi, cioè i “mattoncini” che, assemblati in sequenza, costituiranno le proteine

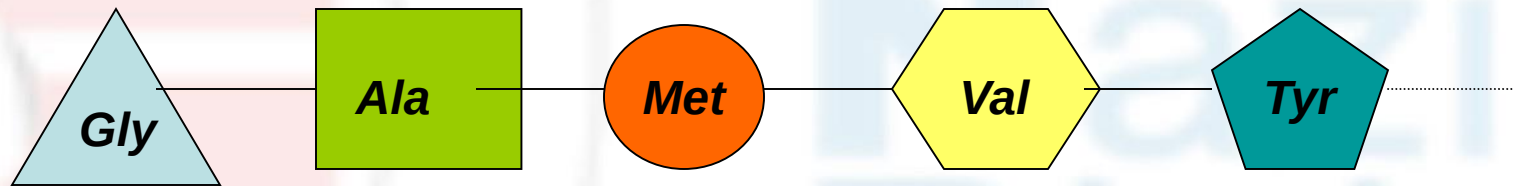
Gli “attori” – Amminoacidi

Tutte le nostre proteine sono costituite da solo 20 tipi di amminoacidi, un po' come tutte le parole del nostro vocabolario sono formate utilizzando 21 lettere dell'alfabeto

Ala	Alanina	Gly	Glicina	Met	Metionina	Ser	Serina
Cys	Cisteina	His	Istidina	Asn	Asparagina	Thr	Treonina
Asp	Acido aspartico	Ile	Isoleucina	Pro	Prolina	Val	Valina
Glu	Acido glutammico	Lys	Lisina	Gln	Glutamina	Trp	Triptofano
Phe	Fenilalanina	Leu	Leucina	Arg	Arginina	Tyr	Tirosina

Gli “attori” – Amminoacidi

Una sequenza di amminoacidi, come questa...

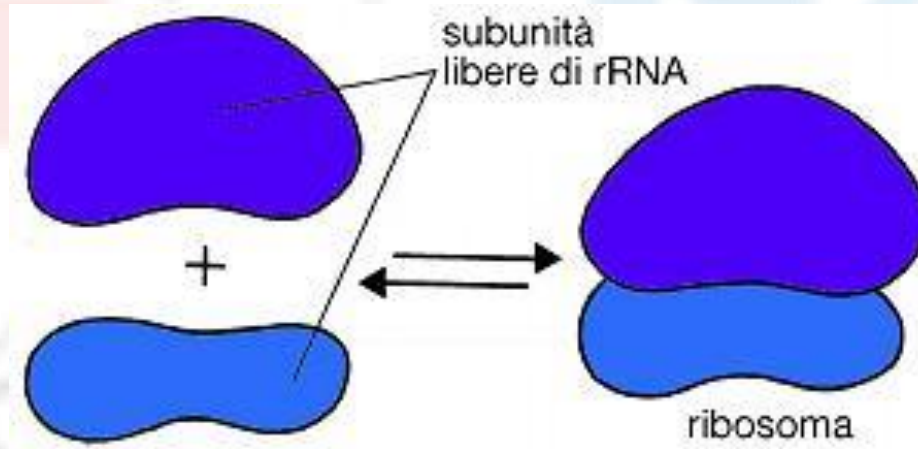


... è un polipeptide.

***Le proteine sono polipeptidi
generalmente molto lunghi e con un
organizzazione anche molto complessa.***

Gli “attori” – Ribosomi

Le “fabbriche” cellulari di proteine sono i ribosomi, piccoli organuli costituiti da due subunità

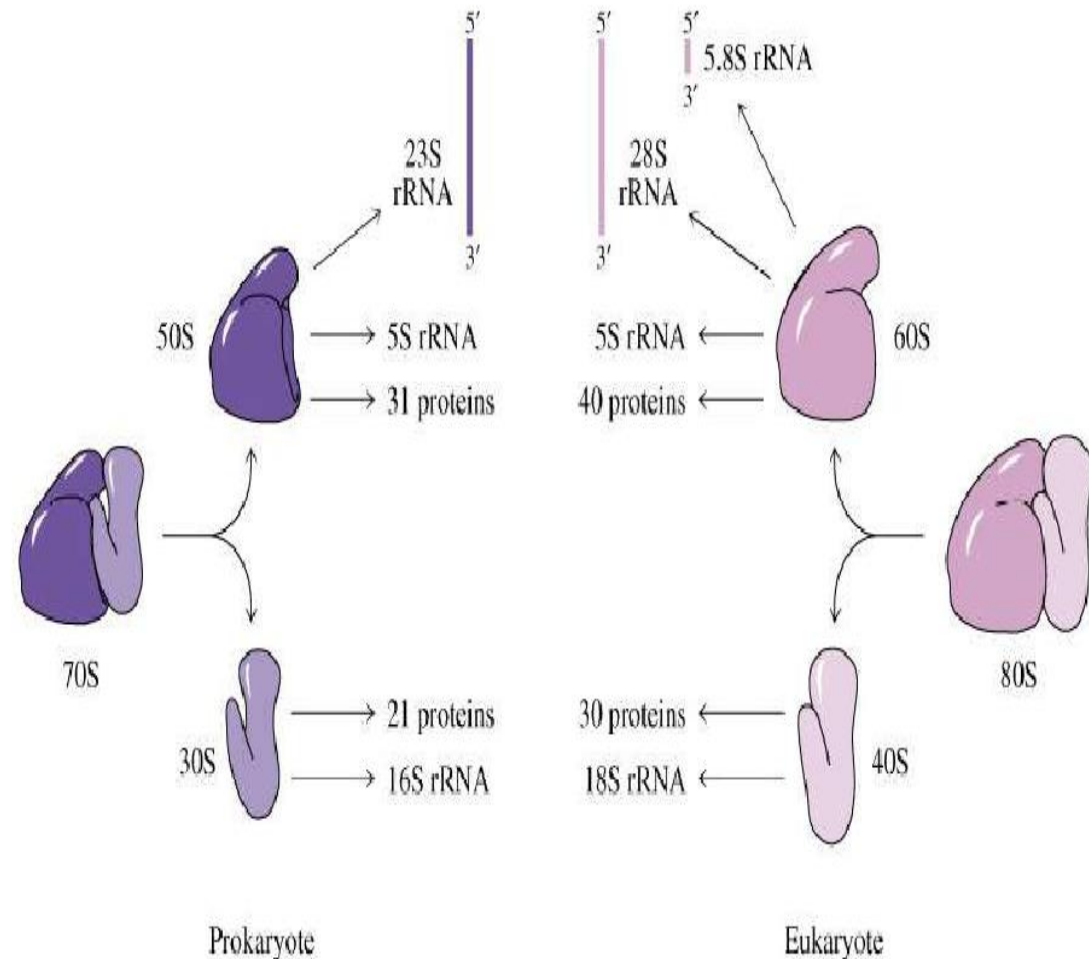
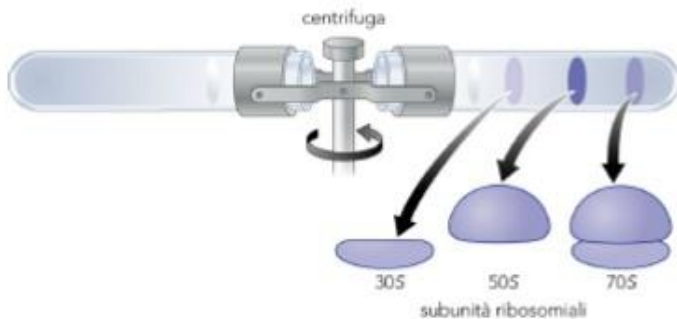


I ribosomi, come detto, sono costituiti da rRNA e proteine

I RIBOSOMI NEI PROCARIOTI E NEGLI EUCARIOTI

Il ribosoma è costituito da due subunità, che si associano in modo reversibile. La subunità maggiore è responsabile dell'attività catalitica (peptidil-transferasica), mentre la subunità minore è deputata alla decifrazione dei codoni sull'mRNA. Le componenti del ribosoma sono denominate in base alla loro velocità di sedimentazione in ultracentrifuga.

I ribosomi di mitocondri e cloroplasti sono simili a quelli batterici ma leggermente più piccoli.

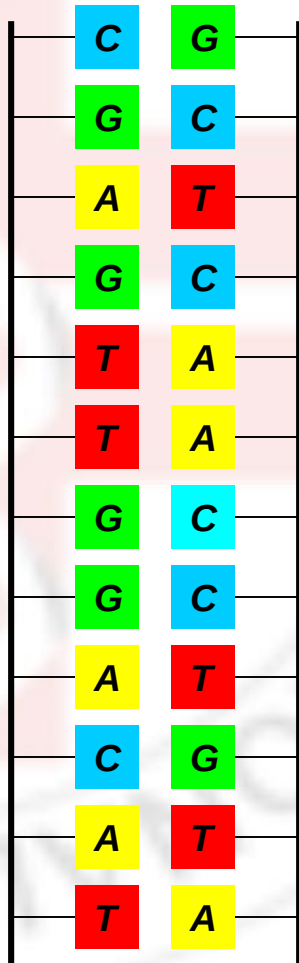


Procarioti: 20 aa/sec

Eucarioti; 2-4 aa/sec

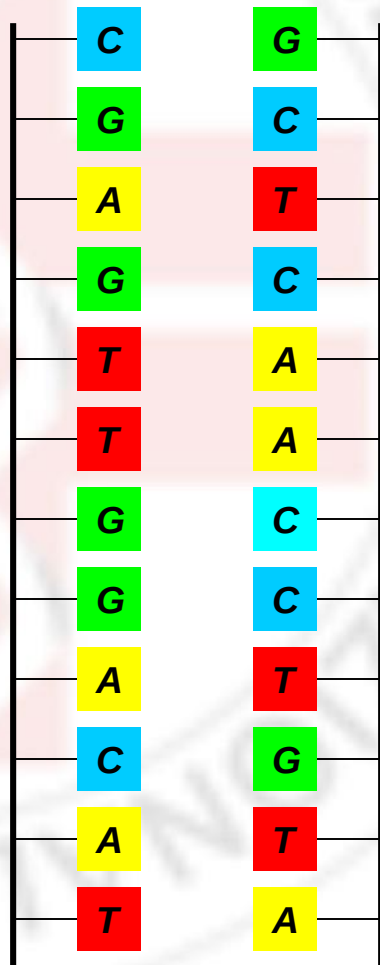
Le due subunità si associano in modo reversibile.

La trascrizione



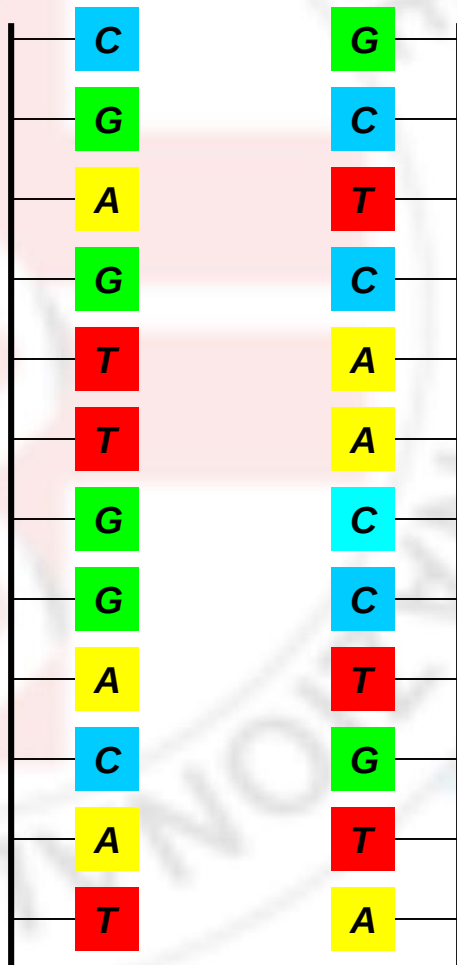
*Ad esempio,
prendiamo una
porzione di DNA
come quella
mostrata a
sinistra*

La trascrizione



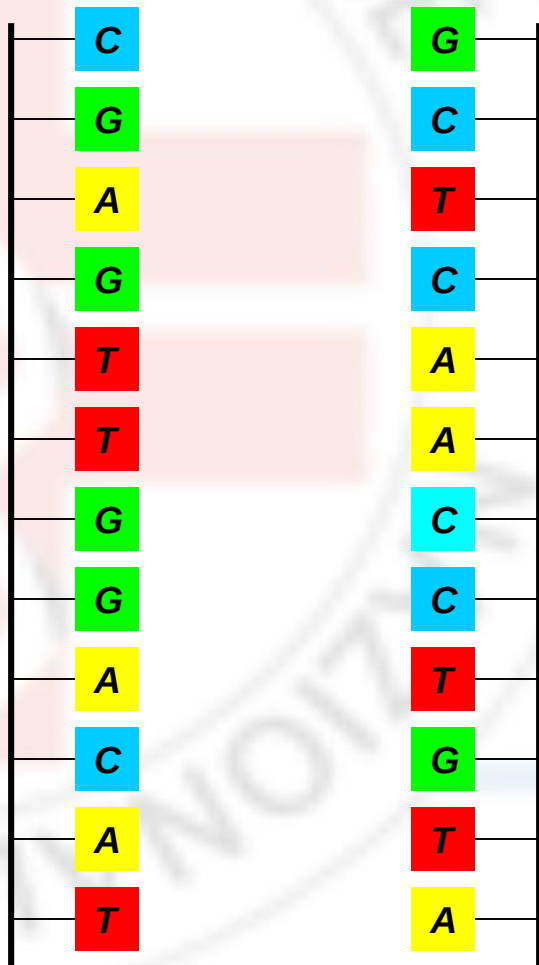
*Ad esempio,
prendiamo una
porzione di DNA
come quella
mostrata a
sinistra*

La trascrizione



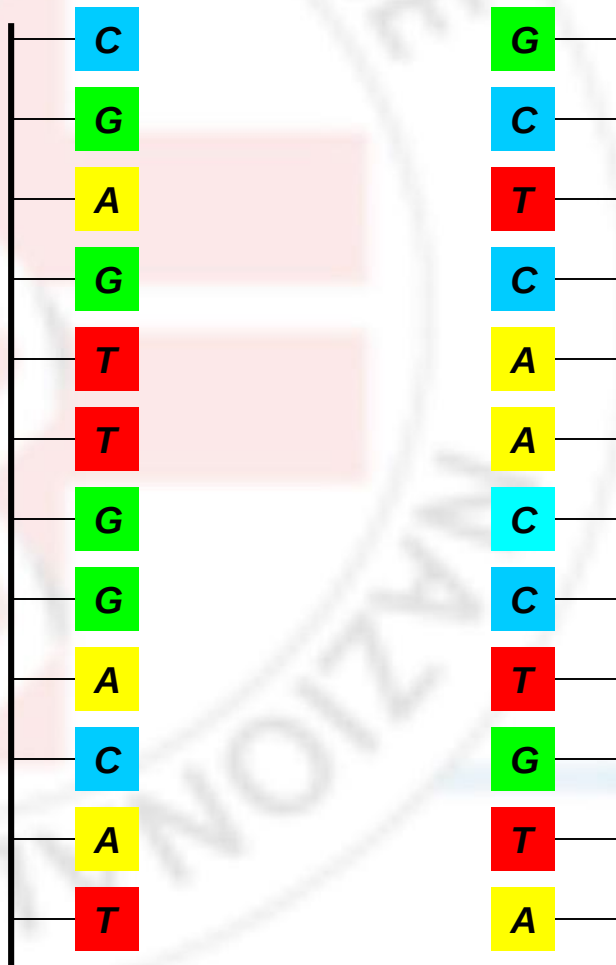
*Ad esempio,
prendiamo una
porzione di DNA
come quella
mostrata a
sinistra*

La trascrizione



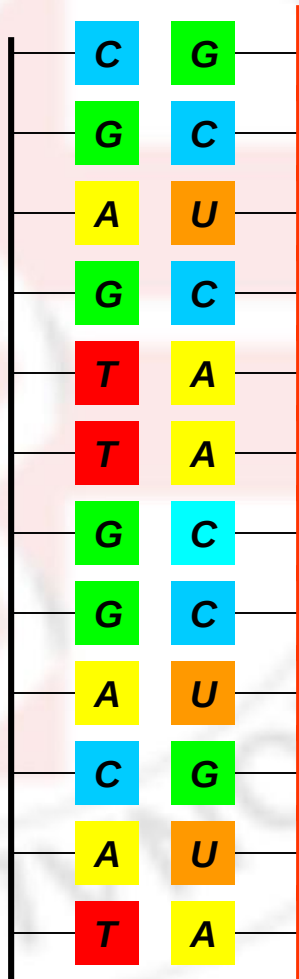
*Ad esempio,
prendiamo una
porzione di DNA
come quella
mostrata a
sinistra*

La trascrizione



Dopo la separazione dei due filamenti, l'RNA polimerasi comincia ad assemblare la catena complementare di mRNA...

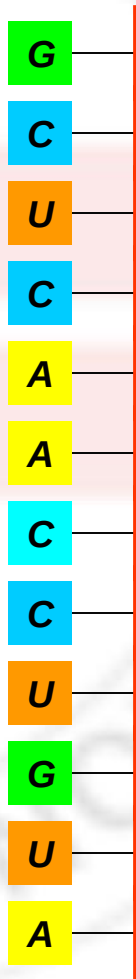
La trascrizione



*... utilizzando
come stampo uno
dei filamenti e
secondo la
complementarietà
delle basi.*

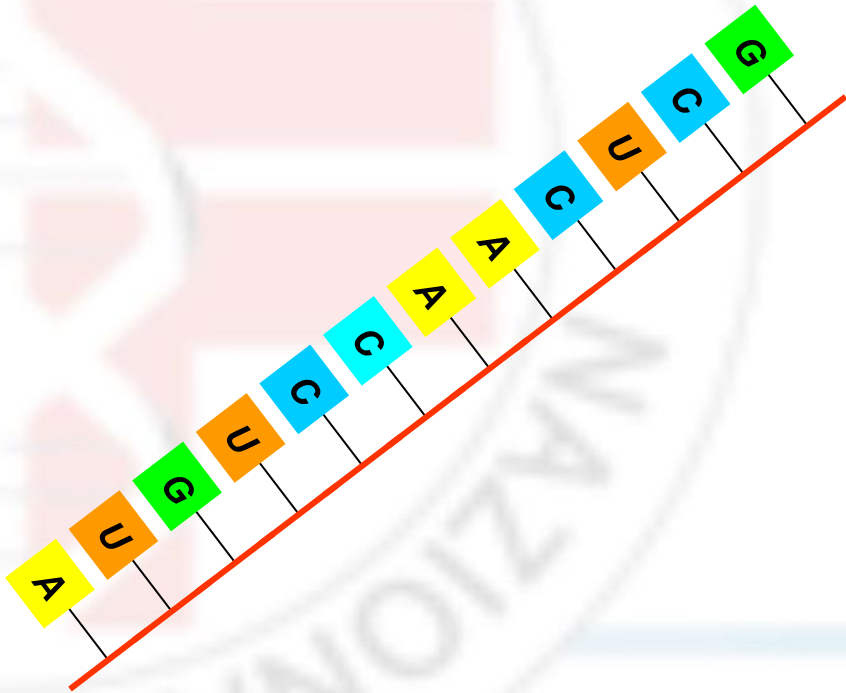
La trascrizione

*... La catena di
RNA messaggero
così formata...*



La trascrizione

*... La catena di
RNA messaggero
così formata...*



La trascrizione

... sarà una sorta di impronta “in negativo” del gene da cui si è originato...



RNA messaggero

... e migrerà verso i ribosomi, portando le istruzioni per la sintesi delle proteine.

Il macchinario responsabile della sintesi proteica è tra i più conservati nel corso dell'evoluzione

mRNA

tRNA

aminoacil-tRNA sintetasi

ribosoma.

Gli mRNA vengono letti in direzione 5' → 3' e la proteina viene prodotta dall'N terminale al C-terminale.

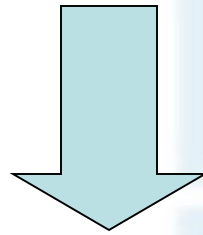
Ogni amminoacido è specificato da un codone nell'mRNA secondo un codice quasi universale.

I tRNA fungono da adattatori che caricano, ad opera della specifica aminoacil-tRNA sintetasi, l'aminoacido corrispondente al codone da essi riconosciuto sull'mRNA.

Il ribosoma, un grande complesso ribonucleoproteico realizza la sintesi delle proteine unendo gli aminoacidi portati dai tRNA.

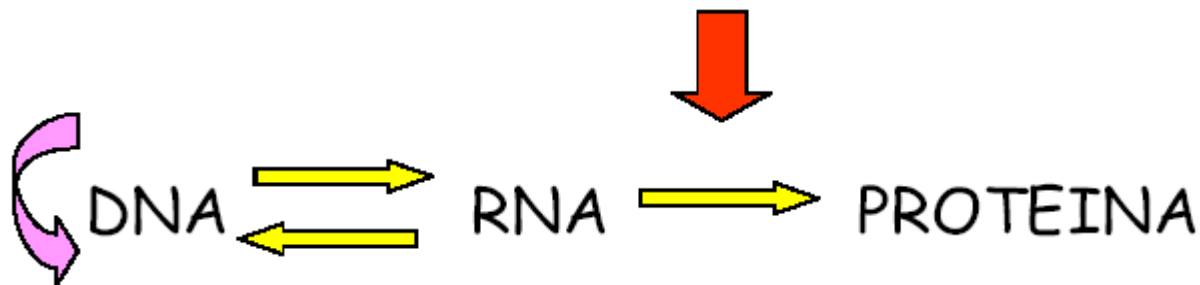
Il codice genetico

Ma come si fa a passare dal “linguaggio” degli acidi nucleici (che utilizza 4 “lettere”)...



... al “linguaggio” delle proteine (che utilizza 20 “lettere”)?

Il "dogma centrale" della biologia molecolare
(F. Crick 1958)



4 nucleotidi
A, T, C, G

20 aminoacidi

Tre nucleotidi per codone

- **1 nucleotide -> 1 aminoacido NO**
(solo 4 aminoacidi)
- **2 nucleotidi -> 1 aminoacido (4^2)**
NO (solo 16 aminoacidi)
- **3 nucleotidi -> 1 aminoacido SI e'**
possibile (4^3) 64 aminoacidi (piu'
che sufficienti per 20 aminoacidi
ECCESSO?

Codice Genetico

E' l'insieme dei codici a tripletta nel DNA (o nell'RNA) che codifica gli amminoacidi delle proteine

È a triplette

Viene letto in modo continuo

È degenerato

Ha segnali di inizio e di fine

L'anticodone "vacilla" (wobbling)

È (quasi) universale

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Il codice genetico è **degenerato**: un amminoacido può essere codificato da più di un codone.

Codoni che codificano per uno stesso amminoacido sono detti **sinonimi**.

TABELLA 1.2 ABBREVIAZIONI DEGLI AMMINOACIDI

Amminoacido	Abbreviazioni	
	A tre lettere	Ad una lettera
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Acido aspartico	Asp	D
Cisteina	Cys	C
Acido glutammico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Istidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

TABELLA 1.3 ESEMPI DI DEVIAZIONI DAL CODICE GENETICO STANDARD

Organismo	Codone	Dovrebbe codificare per	Attualmente codifica per
(A) Genomi mitocondriali			
Mammiferi	UGA	Stop	Trp
	AGA, AGG	Arg	Stop
	AUA	Ile	Met
<i>Drosophila</i>	UGA	Stop	Trp
	AGA	Arg	Ser
	AUA	Ile	Met
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	UGA	Stop	Trp
	CUN	Leu	Thr
	AUA	Ile	Met
Funghi	UGA	Stop	Trp
Mais	CGG	Arg	Trp
(B) Genomi nucleari e procariotici			
Diversi protozoi	UAA, UAG	Stop	Gln
<i>Candida cylindracea</i>	CUG	Leu	Ser
<i>Micrococcus</i> sp.	AGA	Arg	Stop
	AUA	Ile	Stop
<i>Euplotes</i> sp.	UGA	Stop	Cys
<i>Mycoplasma</i> sp.	UGA	Stop	Trp
	CGG	Arg	Stop
(C) Riassegnazioni dei codoni dipendente dal contesto			
Vari	UGA	Stop	Selenocisteina
Archeobatteri	UAG	Stop	Pirrolisina

Abbreviazioni: N, qualsiasi nucleotide.

Degeneracy of the Genetic Code

Amino acid	Number of codons
Ala	4
Arg	6
Asn	2
Asp	2
Cys	2
Gln	2
Glu	2
Gly	4
His	2
Ile	3
Leu	6
Lys	2
Met	1
Phe	2
Pro	4
Ser	6
Thr	4
Trp	1
Tyr	2
Val	4

Codone di inizio

- AUG → eucarioti
- AUG, GUG, UUG → procarioti
- FUNZIONE

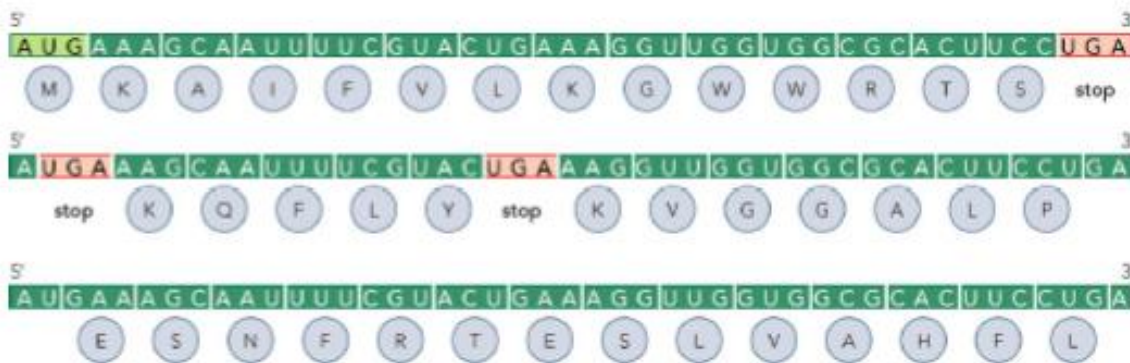
CODIFICARE IL PRIMO aa

DEFINIRE LA FASE DI LETTURA DEI CODONI SUCCESSIVI

i codoni vengono letti in direzione 5'→3'

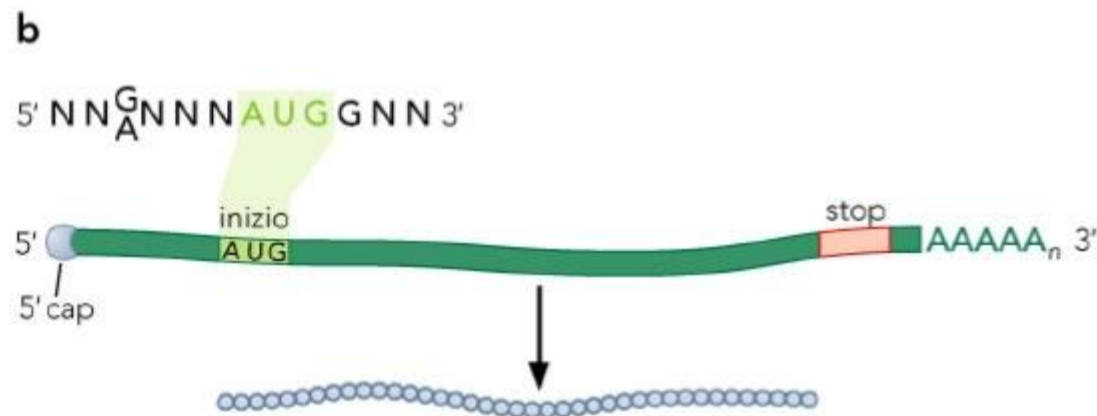
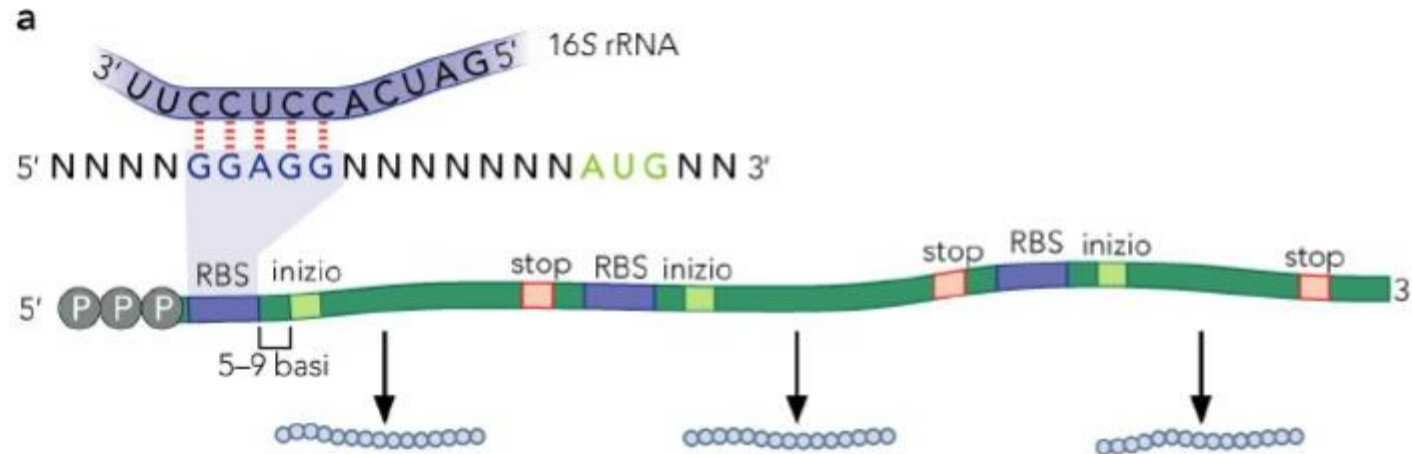
i codoni non si sovrappongono

La porzione di mRNA che codifica per una proteina è detta ORF (open reading frame), ed è costituita da una serie di triplette che inizia con un codone di inizio e termina con un codone di stop.



mRNA procariotici ed eucariotici

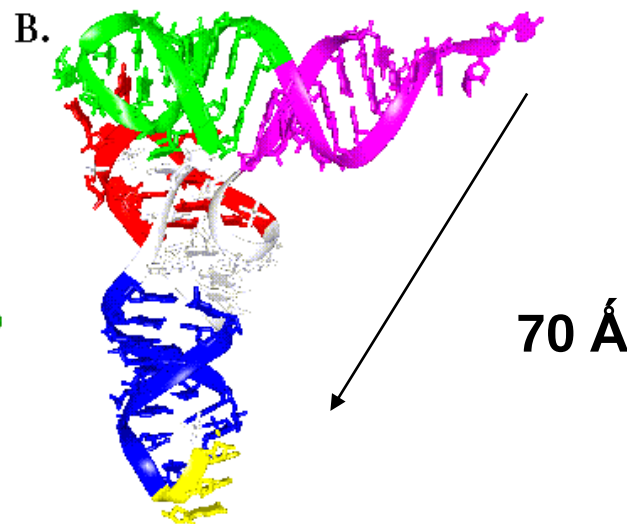
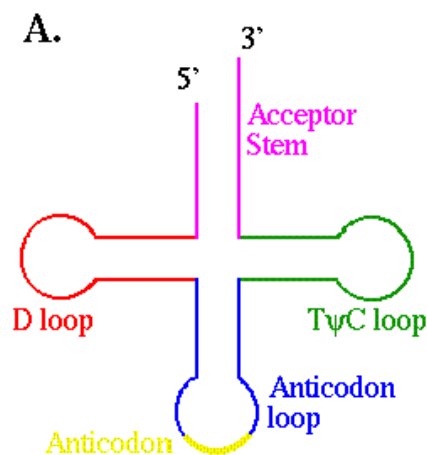
Gli mRNA procariotici (a) normalmente contengono più ORF e per questo vengono detti policistronici. Al contrario gli mRNA eucariotici (b) contengono un solo ORF (monocistronici).



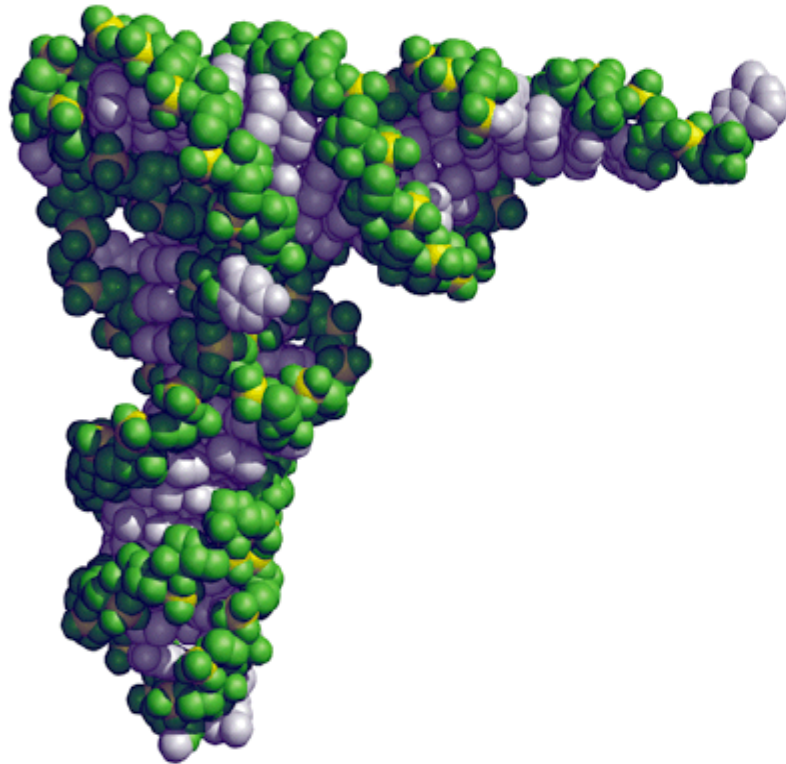
RNA Transfer (tRNA)

Classe di molecole di RNA, ognuna delle quali si combina covalentemente con uno specifico amminoacido

adattatori tra i codoni e gli amminoacidi.



- A. struttura secondaria del tRNA
B. struttura terziaria del tRNA



- **struttura conservata**

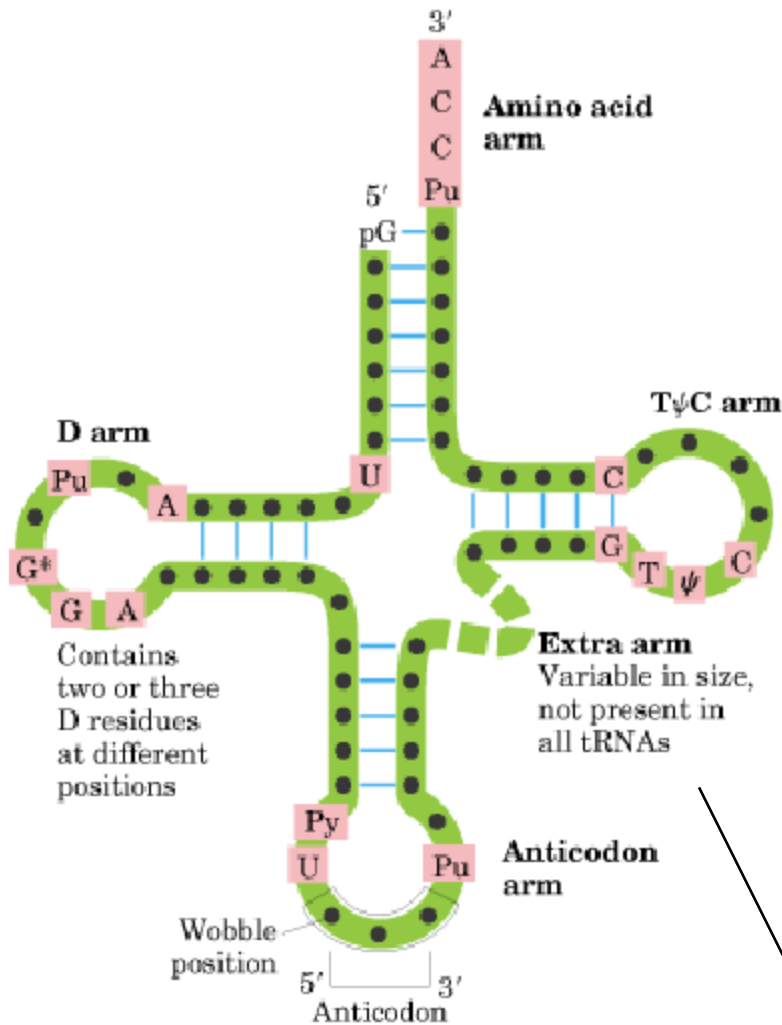
- **lunghezza compresa tra 75 e 95 nt.**

- **Possono riconoscere più di un codone e contengono basi insolite, prodotte da modificazioni enzimatiche post-trascrizionali**

Anche mitocondri e cloroplasti contengono tRNA particolari, di dimensioni più ridotte.

Le cellule contengono almeno un tipo di tRNA per ciascun **aa**, per cui sono necessari almeno 32 tRNA per riconoscere tutti i codoni degli **aa** (alcuni riconoscono più di un codone).

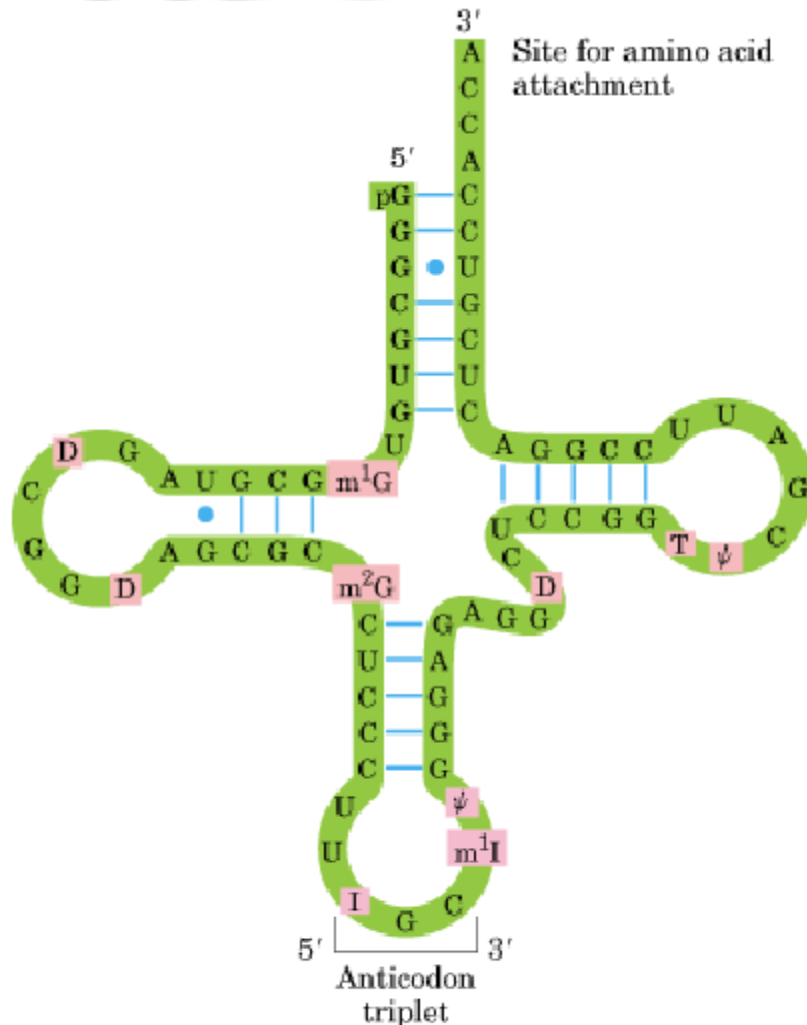
Struttura generale, a trifoglio, di tutti i tRNA



Due regioni sono di importanza fondamentale per la funzione di adattatore svolta dal tRNA:

- 1) L'*ansa dell'amminoacido*, o *estremità AA*, che trasporta un amminoacido specifico, legato mediante un legame estere tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido e il gruppo ossidrilico 2' o 3' del residuo di adenosina all'estremità 3' del tRNA.
- 2) L'*ansa dell'anticodone*, che contiene l'anticodone.
- 3) L'*ansa D*, o della *diidrouridina*, che contiene l'inusuale nucleotide diidrouridina.
- 4) L'*ansa T ψ C*, che contiene *ribotimidina* (T), di solito assente negli RNA, e *pseudouridina* (ψ).

Le ultime due anse contribuiscono alle interazioni che influenzano il ripiegamento della molecola di tRNA.

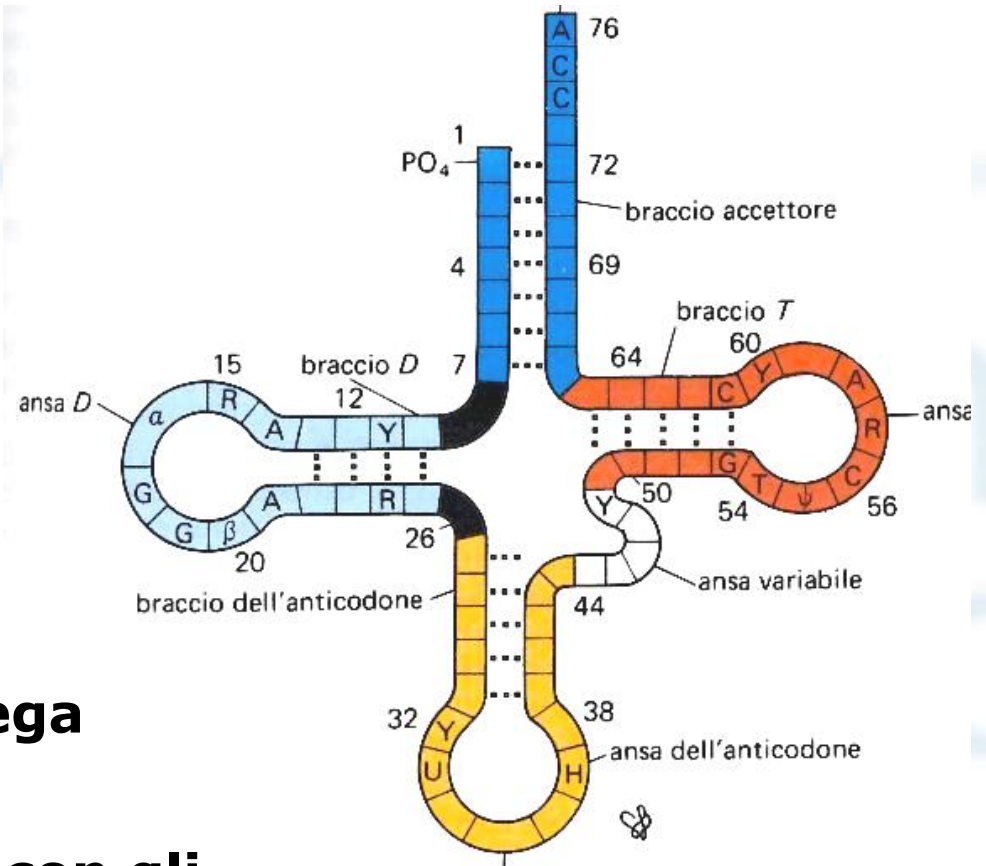


Il tRNA dell'alanina di lievito (tRNA^{Ala}) contiene 76 residui nucleotidici, 10 dei quali con basi modificate (

- *m¹G*: 1-metilguanosina;
- *D*: 5,6-diidrouridina;
- *m²G*: *N*²-dimetilguanosina;
- *I*: Inosina;
- *m¹I*: 1-metilinosina;
- *ψ*: pseudouridina;
- *T*: ribotimidina).

L'anticodone (IGC) riconosce tre codoni dell'alanina (GCA, GCU, GCC).

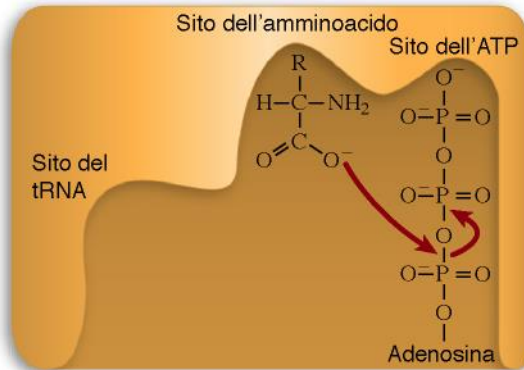
T, I, mG non essenziali ma cellule che mancano di queste basi hanno velocità di crescita ridotte. Le basi modificate migliorano la fz del tRNA.



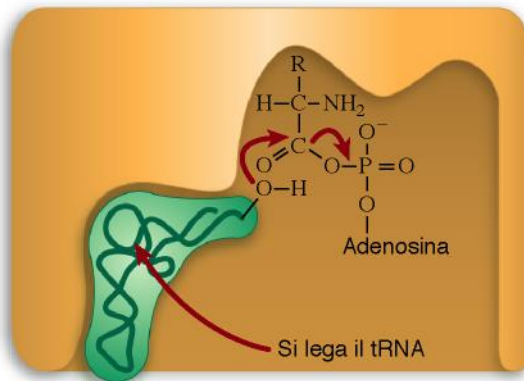
- **Braccio accettore:** lega l'aminoacido
- **Ansa D:** interazione con gli amminoaci-tRNA-SINTETASI
- **Anticodon:** riconoscere la tripletta dell'mRNA
- **Ansa T:** legare il Ribosoma

La reazione di caricamento sfrutta l'ATP

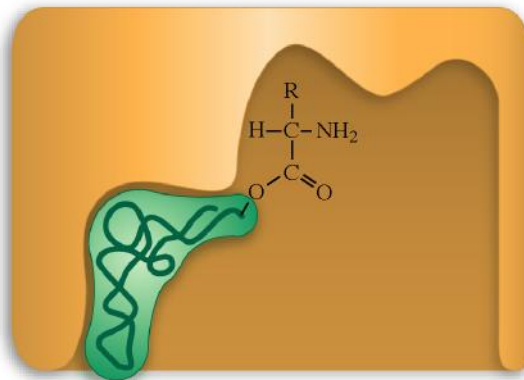
La sintetasi ha tre siti di legame



L'amminoacido e l'ATP formano amminoacil-AMP



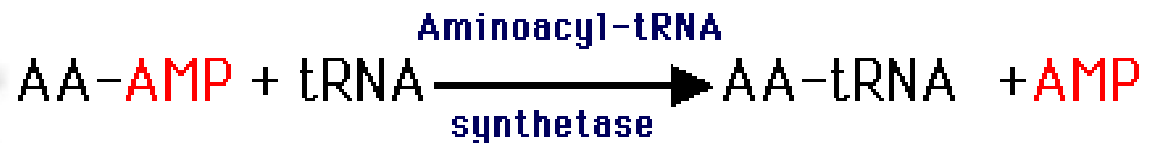
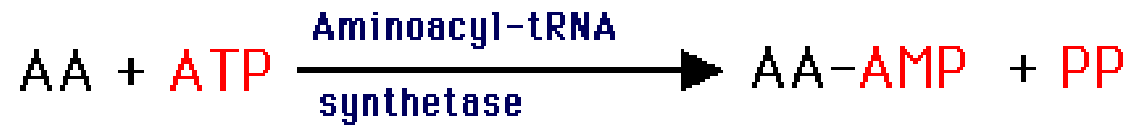
Il tRNA è caricato con l'amminoacido



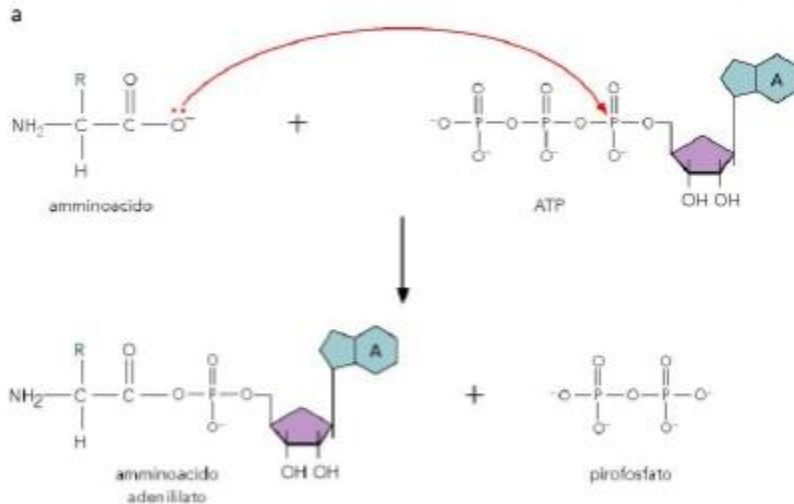
TRADUZIONE

IL LEGAME TRA IL tRNA E
L'AMINOACIDO CORRISPONDENTE
VIENE STABILITO DALLE

AMINOACIL tRNA SINTETASI



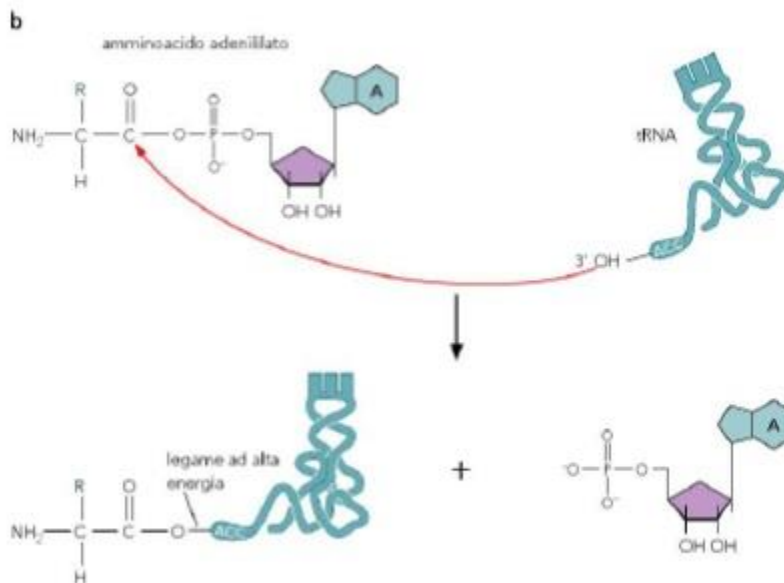
Formazione dell'amminoacil-tRNA



La formazione dell'amminoacil-tRNA avviene in due fasi:

1) **adenililazione** dell'amminoacido;

2) trasferimento dell'amminoacido adenilato al tRNA (caricamento del tRNA) e **formazione di un legame acilico** ad alta energia.

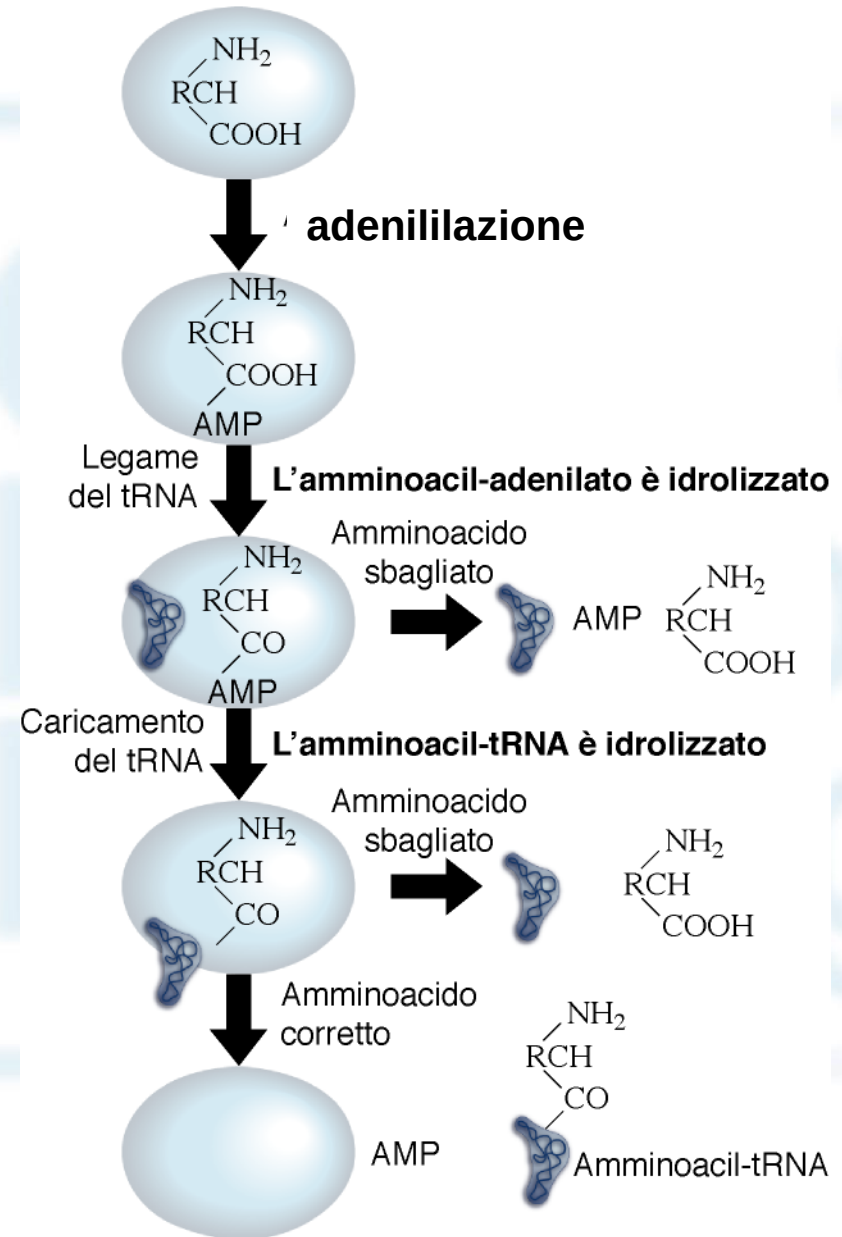


La prima reazione è spostata verso destra dall'idrolisi del pirofosfato. Esistono due classi di tRNA sintetasi: i) quelle di classe I legano l'amminoacido al 2'-OH dell'estremità 3' del tRNA; ii) quelle di classe II legano l'amminoacido all'estremità 3'-OH.

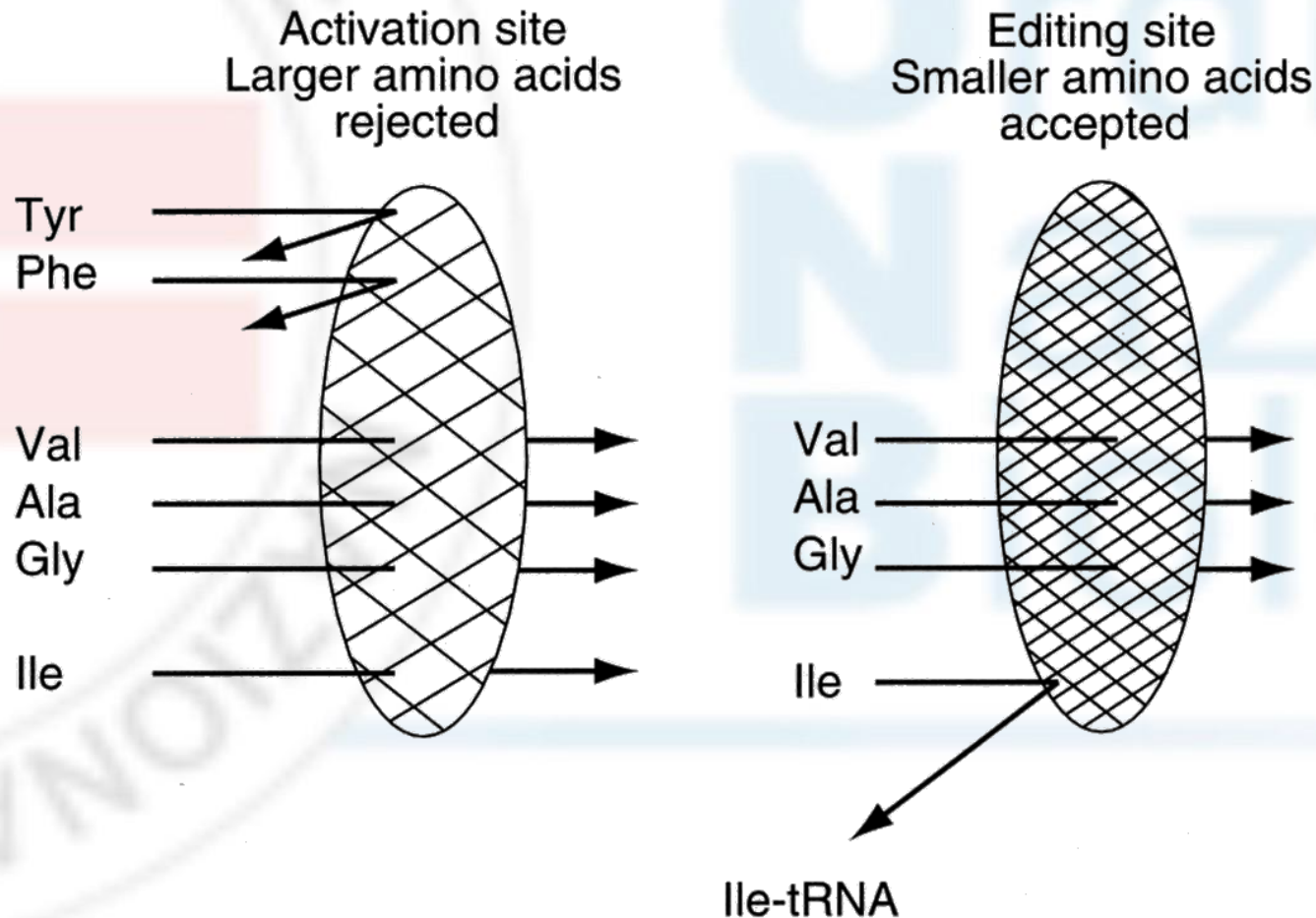
L'energia rilasciata dalla rottura del legame acilico viene impiegata nella formazione del legame peptidico che lega tra loro gli aa

Il riconoscimento dell'a.a. corretto da parte della a.a.-tRNA sintetasi è verificato con un meccanismo di "correzione di bozze" innescato dal legame con il giusto tRNA:

- un cambiamento conformazionale può causare l'idrolisi dell' a.a.-adenilato
- il trasferimento dell'a.a. sul tRNA può essere seguito da idrolisi

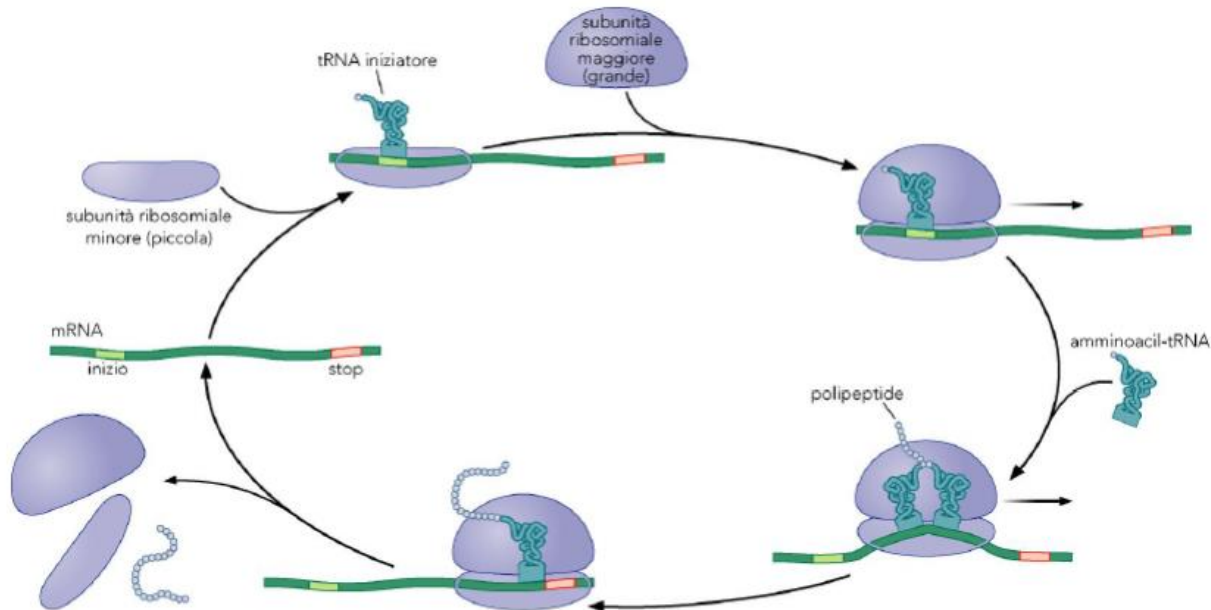


Analogia tra il processo di selezione operato dalle aminoacil-tRNA sintetasi e un meccanismo di selezione a “doppio setaccio”



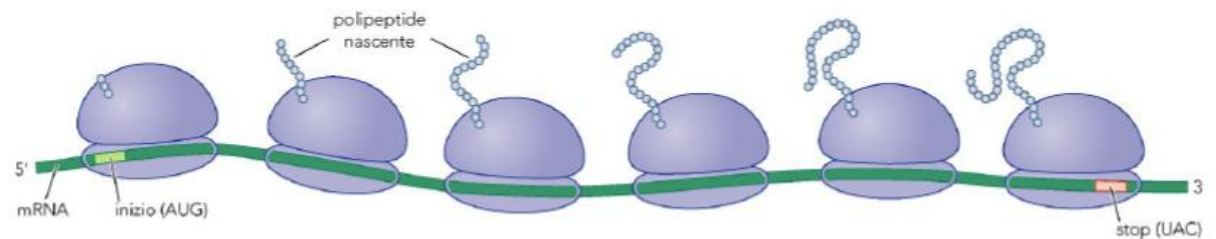
Il ciclo del Ribosoma

La subunità maggiore e minore si associano e dissociano ad ogni ciclo di traduzione.



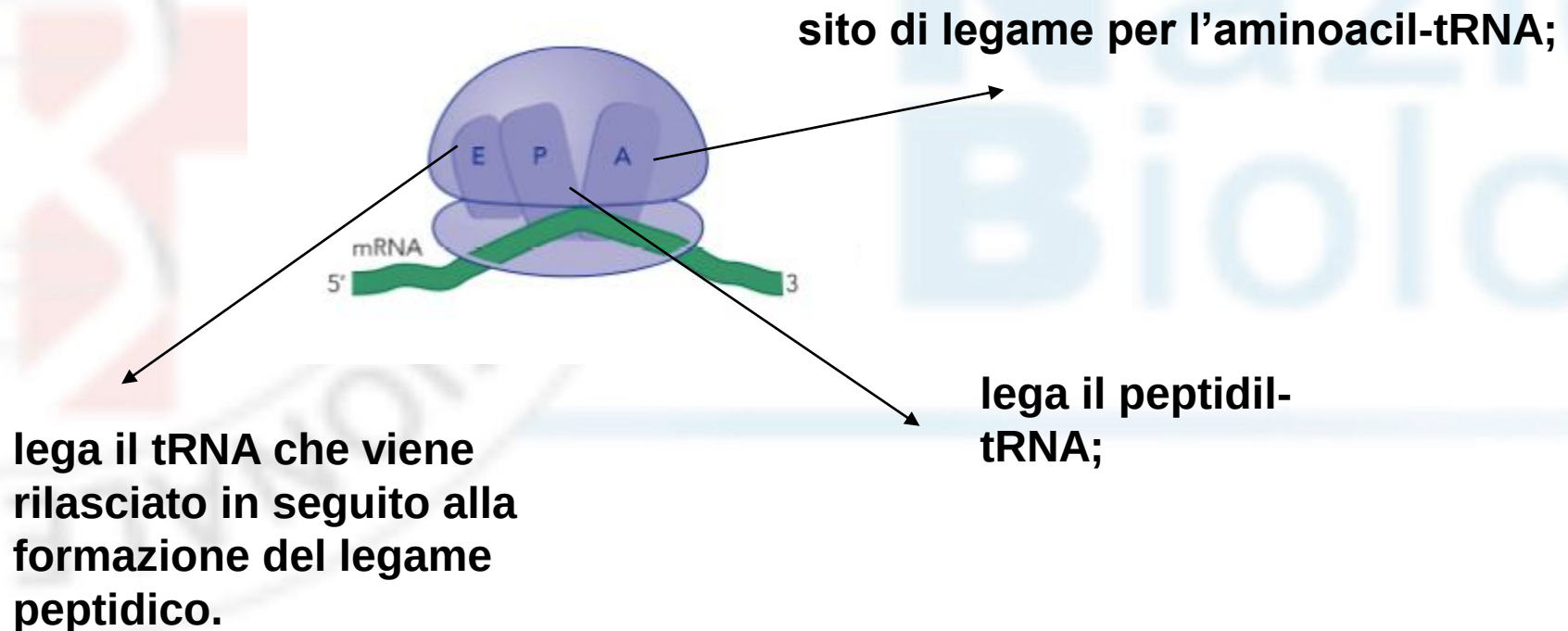
Il polisoma

Ciascun mRNA può essere tradotto simultaneamente da più ribosomi. Un mRNA associato a più ribosomi viene detto polisoma (o poliribosoma). Questo fa sì che nonostante gli mRNA non rappresentino più del 5% dell'RNA totale in una cellula, la maggior parte dei ribosomi sia impegnata nella traduzione (una cellula di *E. coli* contiene circa 15.000 ribosomi).



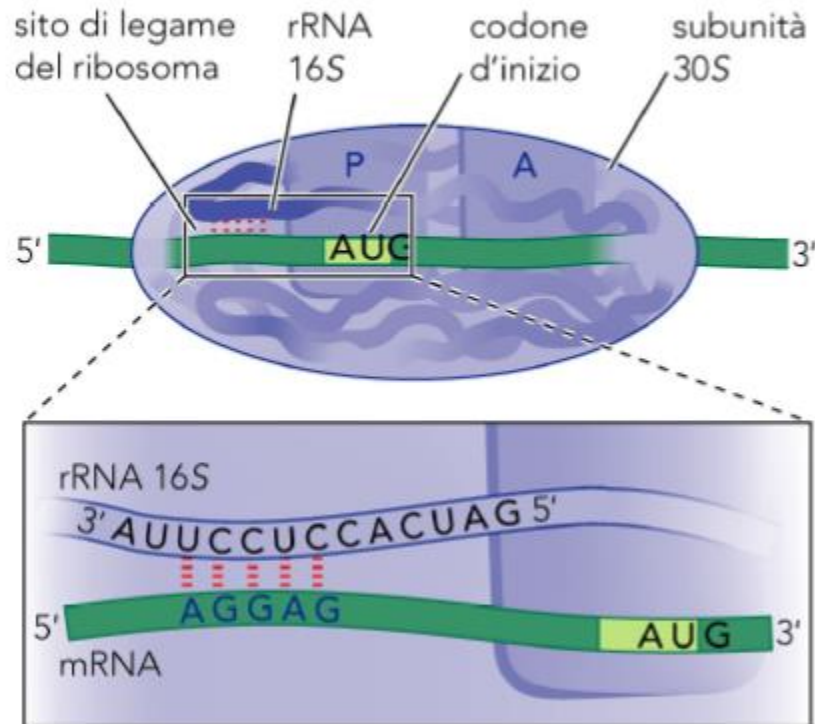
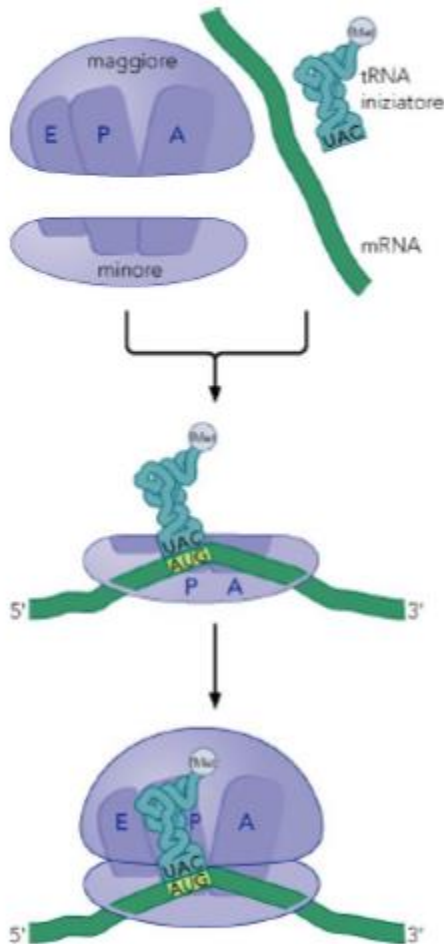
NEI PROCARIOTI

Il ribosoma ha tre siti di legame per il tRNA



INIZIO DELLA SINTESI PROTEICA

L'inizio della traduzione richiede che: 1) i ribosoma si associ all'mRNA; 2) un tRNA carico si posizioni nel sito P; 3) **il ribosoma sia posizionato correttamente sul sito di inizio.**



Nei **procarioti**, il legame dell'rRNA 16S con la sequenza SD posiziona il codone iniziatore sul sito P. Successivamente si ha l'associazione della subunità maggiore.

SD= SHINE-DALGARNO

Inizio in procarioti

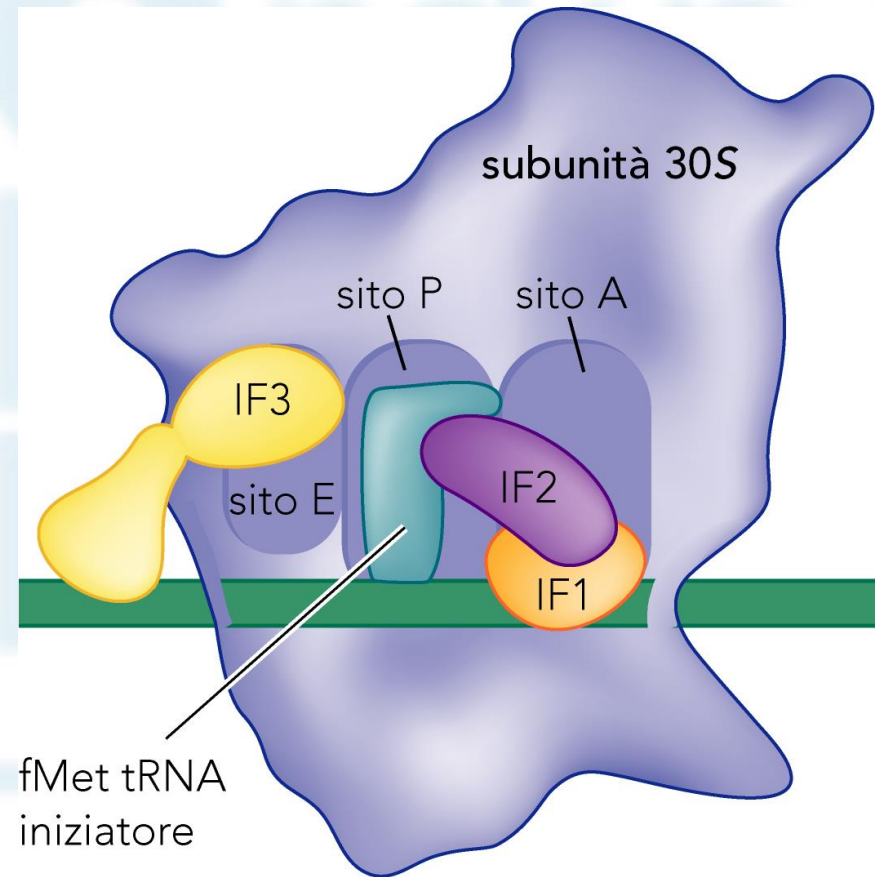
Intervengono tre **Iniziation Factors**: **IF1, IF2 e IF3**

IF1 blocca il sito A,

IF2 aumenta la specificità del legame con tRNA iniziatore

IF3 inibisce l'associazione con la subunità maggiore

• **L'esatto posizionamento del ribosoma sul codone di inizio è cruciale perché ciò fissa la fase di lettura per la traduzione dell'mRNA**



INIZIO DELLA SINTESI PROTEICA

L'inizio della traduzione nei batteri richiede 3 fattori di inizio, chiamati IF-1, IF-2 e IF-3.

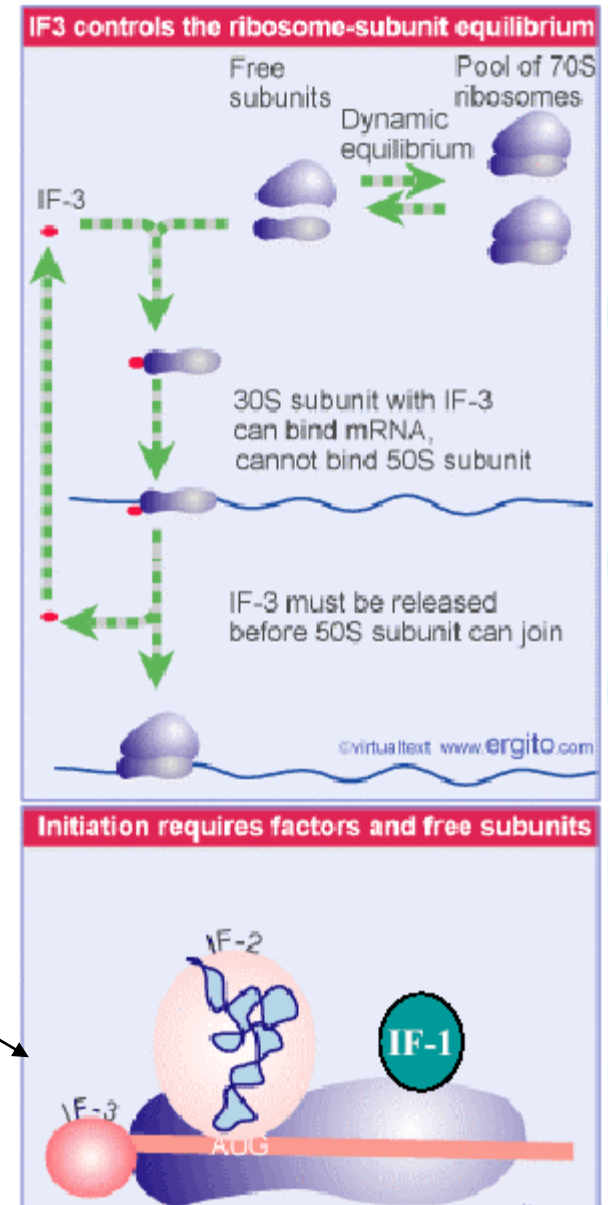
La subunità 30S ha bisogno di IF-3 per legarsi al mRNA al sito di inizio della traduzione.

- IF-2 lega il **tRNA iniziatore** e controlla il suo legame alla subunità 30S.
- IF-1 si lega all'emisito A ed impedisce agli amminoacil-tRNA di entrarvi.

previene l'associazione della subunità maggiore del ribosoma.

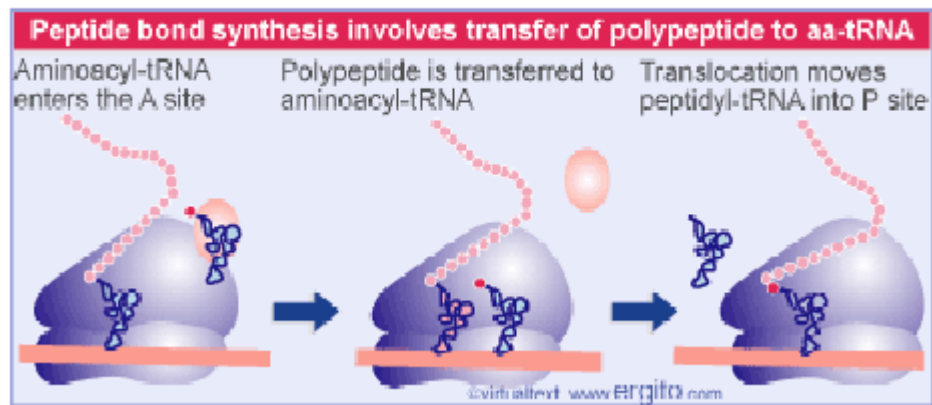
**correttamente posizionati l'mRNA e tRNA iniziatore → cambiamento conformazionale subunità minore
rilascio IF3**

associazione della subunità maggiore



Il legame della subunità maggiore stimola l'attività GTPasica di IF2 che si trasforma in IF2•GDP, e abbandona il ribosoma insieme a IF1. Si forma in questo modo il ribosoma integro (70S) dove il sito A è ora accessibile ai tRNA carichi.

L'amminoacil-tRNA entra nel sito A

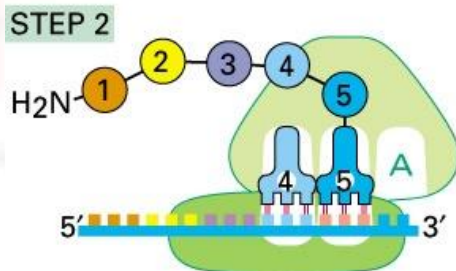
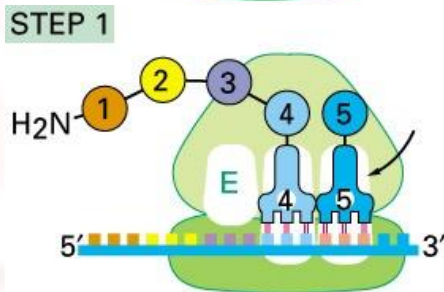
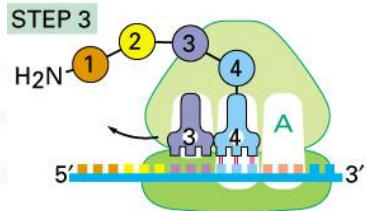
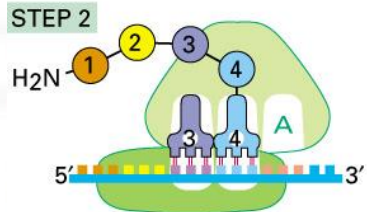
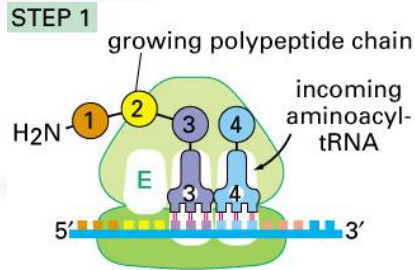


INIZIO DELLA SINTESI PROTEICA NEI PROCARIOTI

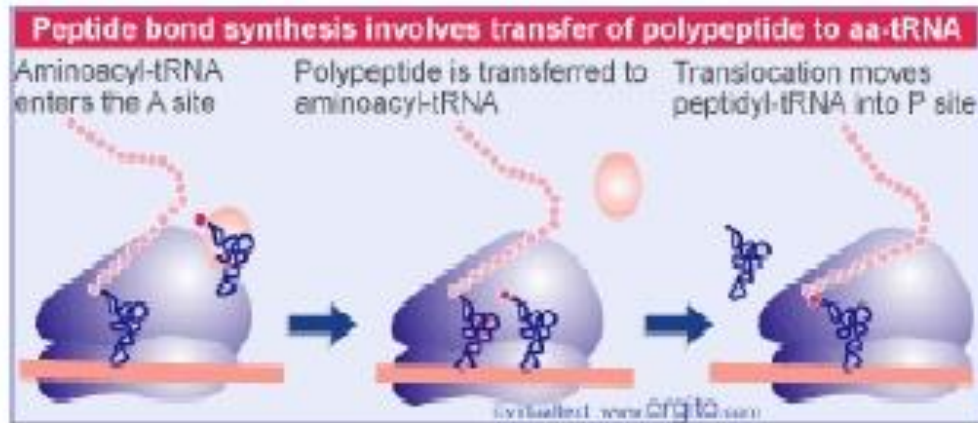
- legame subunità 30S / IF3**
- riconoscimento del mRNA (sequenza Shine-Dalgarno)**
- legame IF2 / fMet-tRNA**
- fMet-tRNA nel sito P**
- rilascio IF3**
- l'assemblaggio del ribosoma**
- idrolisi del GTP**
- rilascio IF2 – IF1**
- ribosoma integro (70S) dove il sito A è ora accessibile ai tRNA carichi**

Sintesi proteica

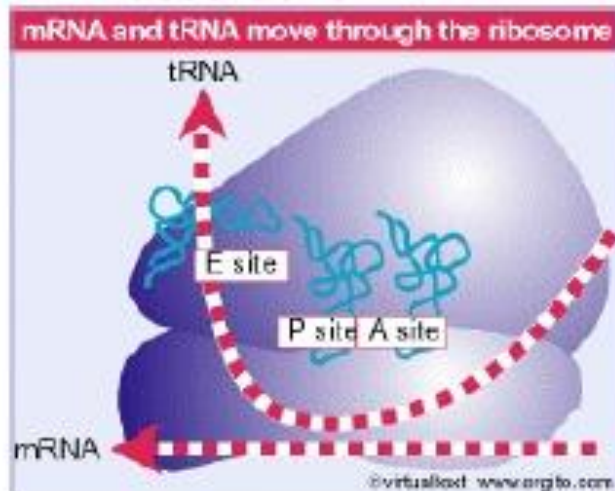
- L'allungamento prevede l'entrata del tRNA nel sito A,
- Il trasferimento del peptide dal sito P ad A
- La traslocazione ai siti E e P
- L'uscita da E e la entrata in A



L'amminoacil-tRNA entra nel sito A



Il flusso dei tRNA



Le 3 fasi della sintesi delle proteine

- Inizio
- elongazione
- terminazione

Protein synthesis has 3 stages

Initiation 30S subunit on mRNA binding site is joined by 50S subunit and aminoacyl-tRNA binds



Elongation Ribosome moves along mRNA and length of protein chain extends by transfer from peptidyl-tRNA to aminoacyl-tRNA

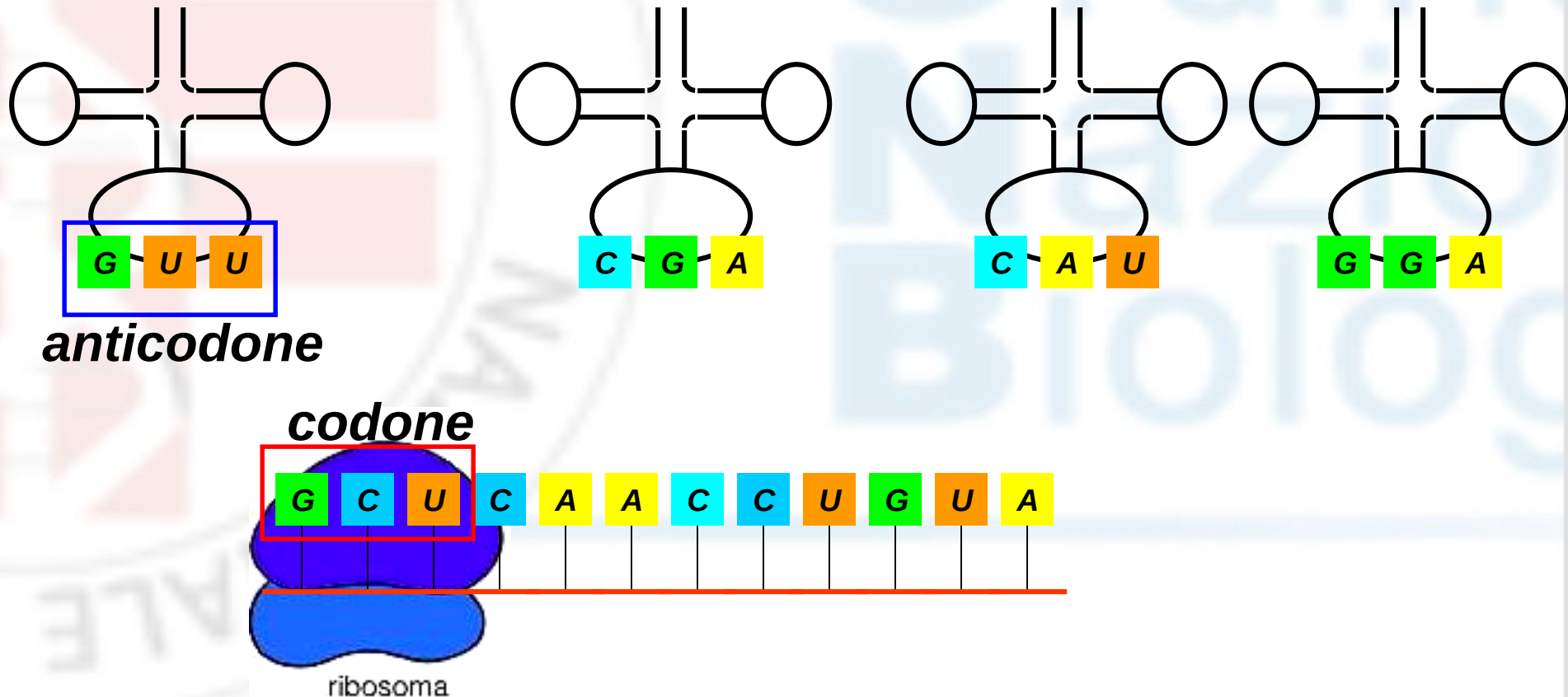


Termination Polypeptide chain is released from tRNA, and ribosome dissociates from mRNA

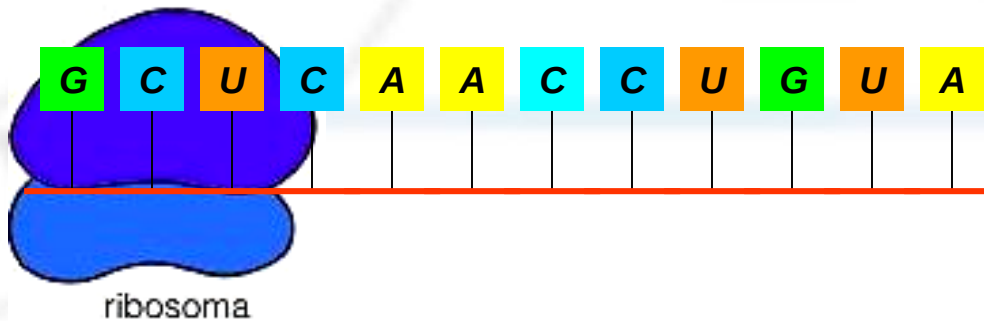
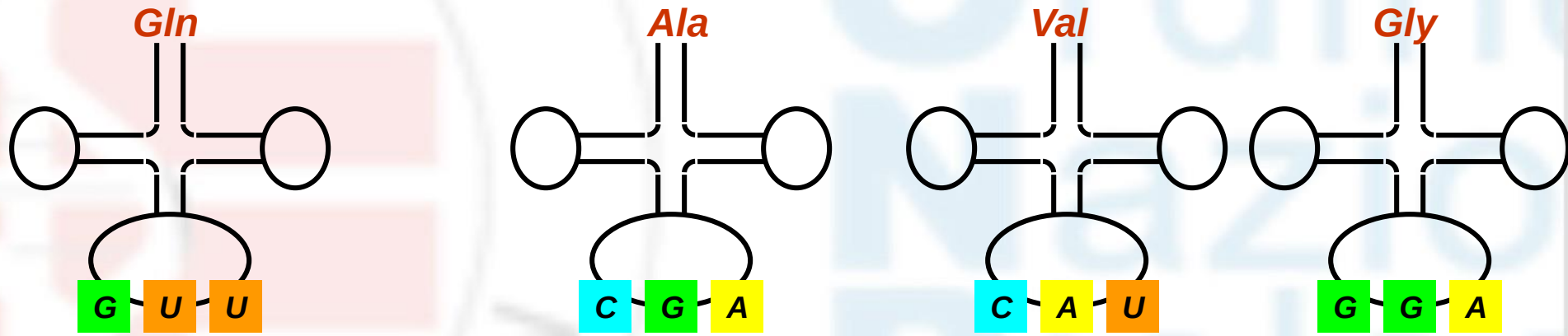


La sintesi proteica

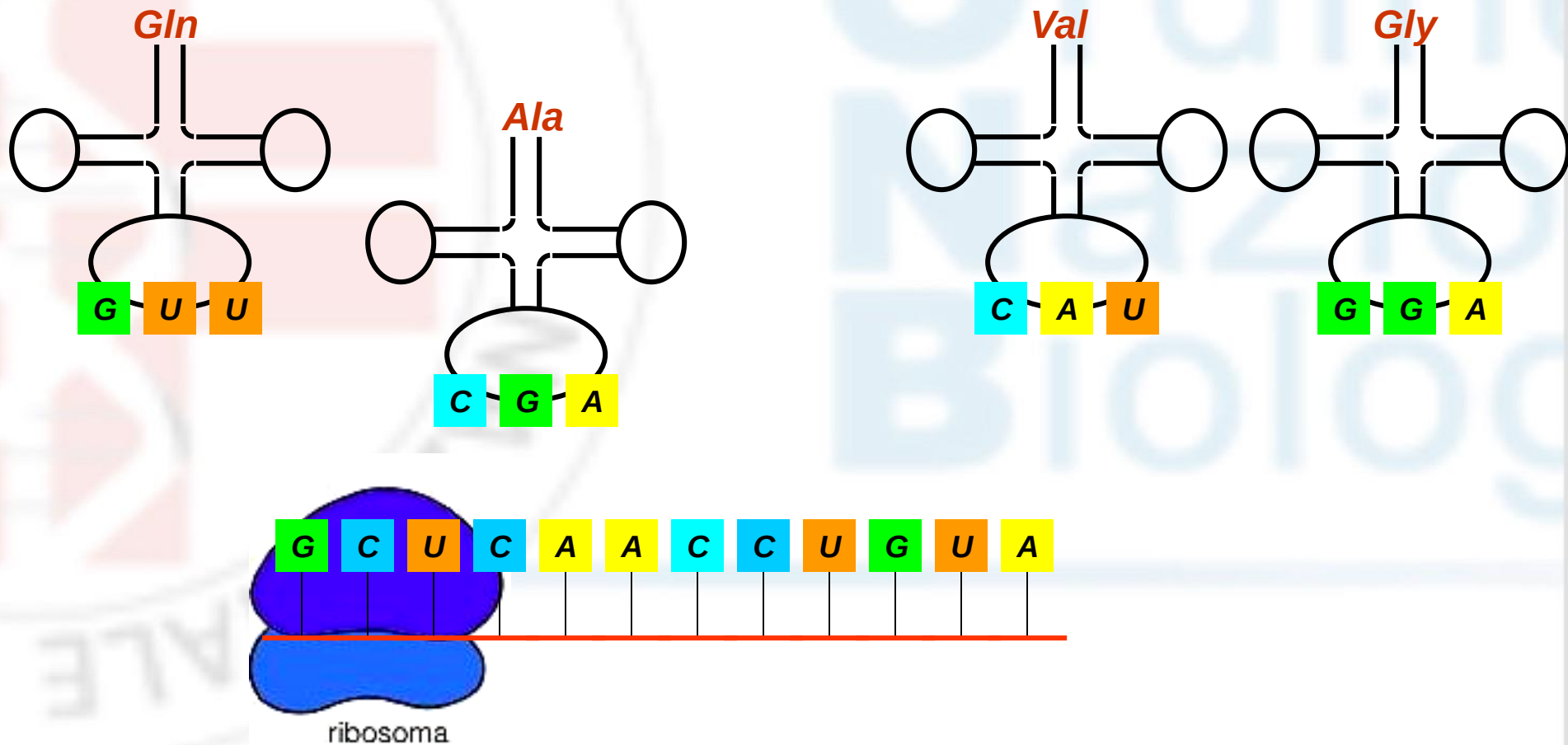
Successivamente su ogni codone si attaccherà il tRNA con l'anticodone complementare, portandosi dietro un amminoacido.



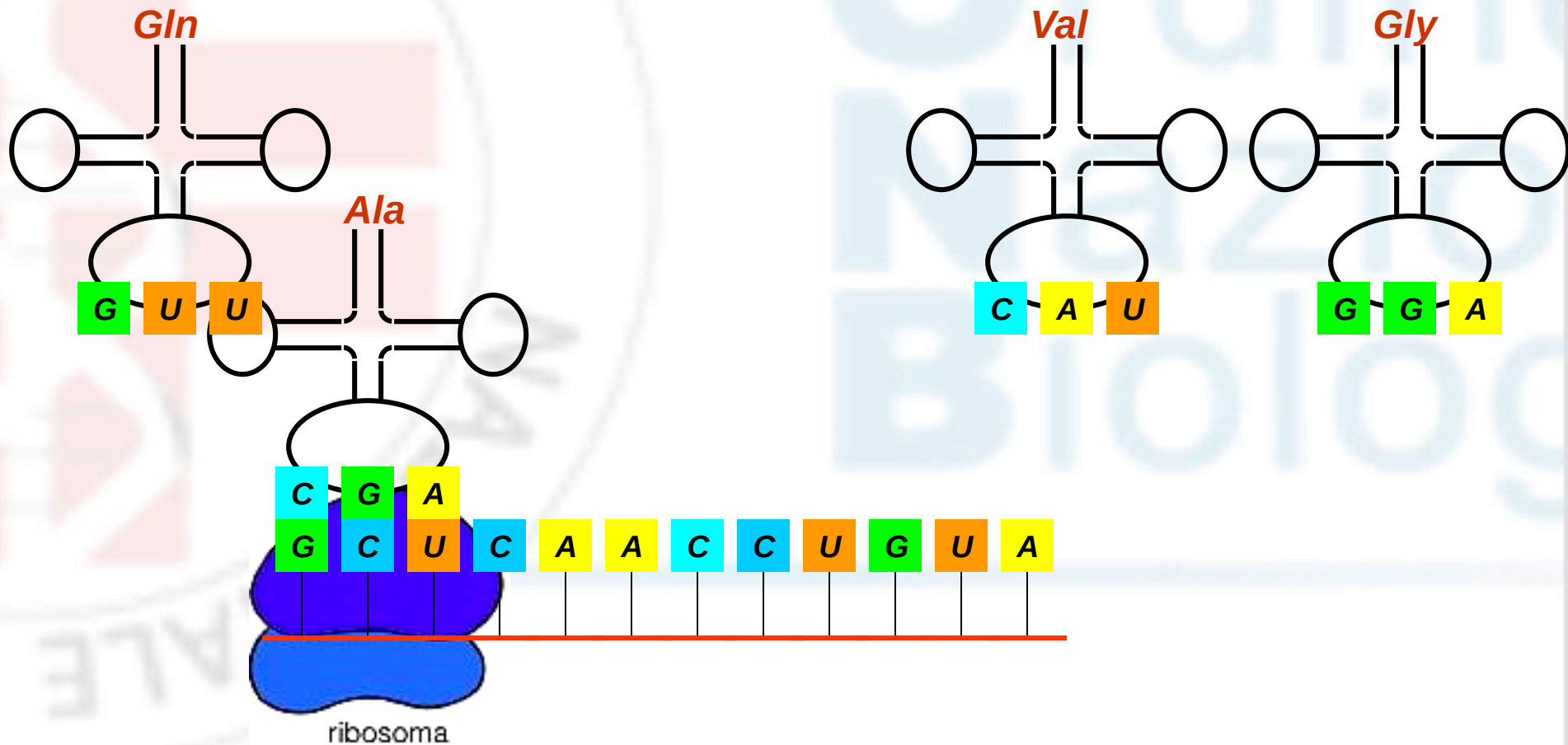
La sintesi proteica



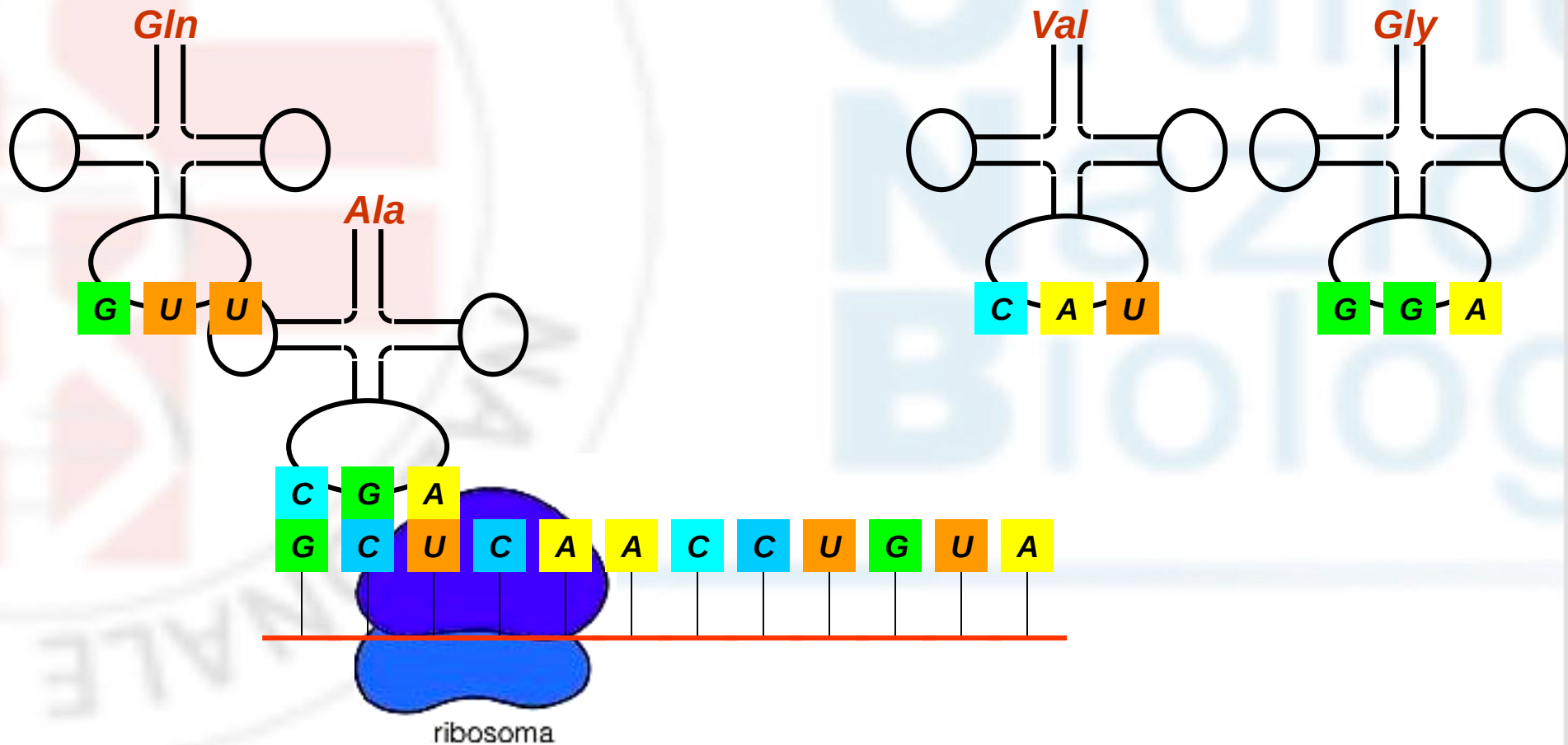
La sintesi proteica



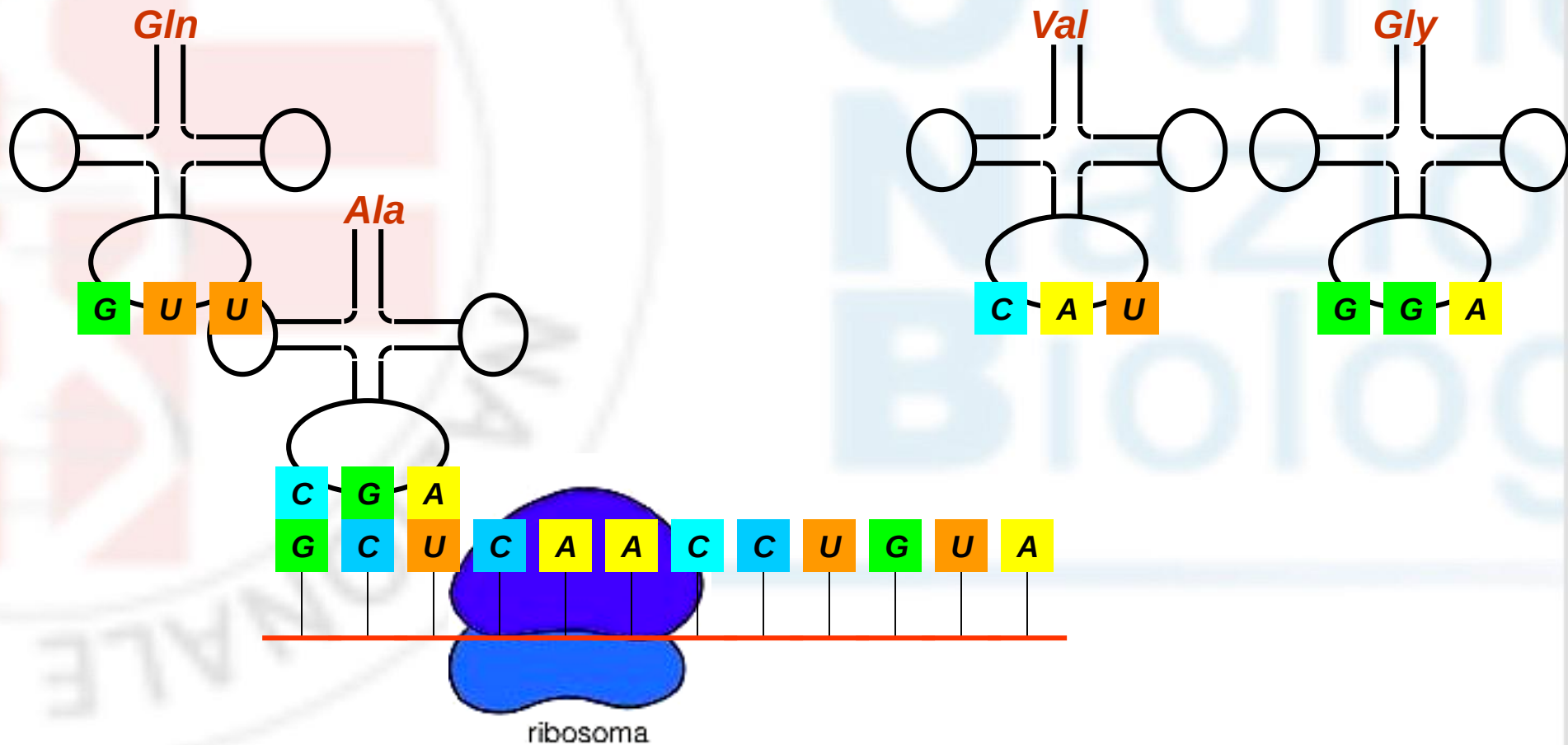
La sintesi proteica



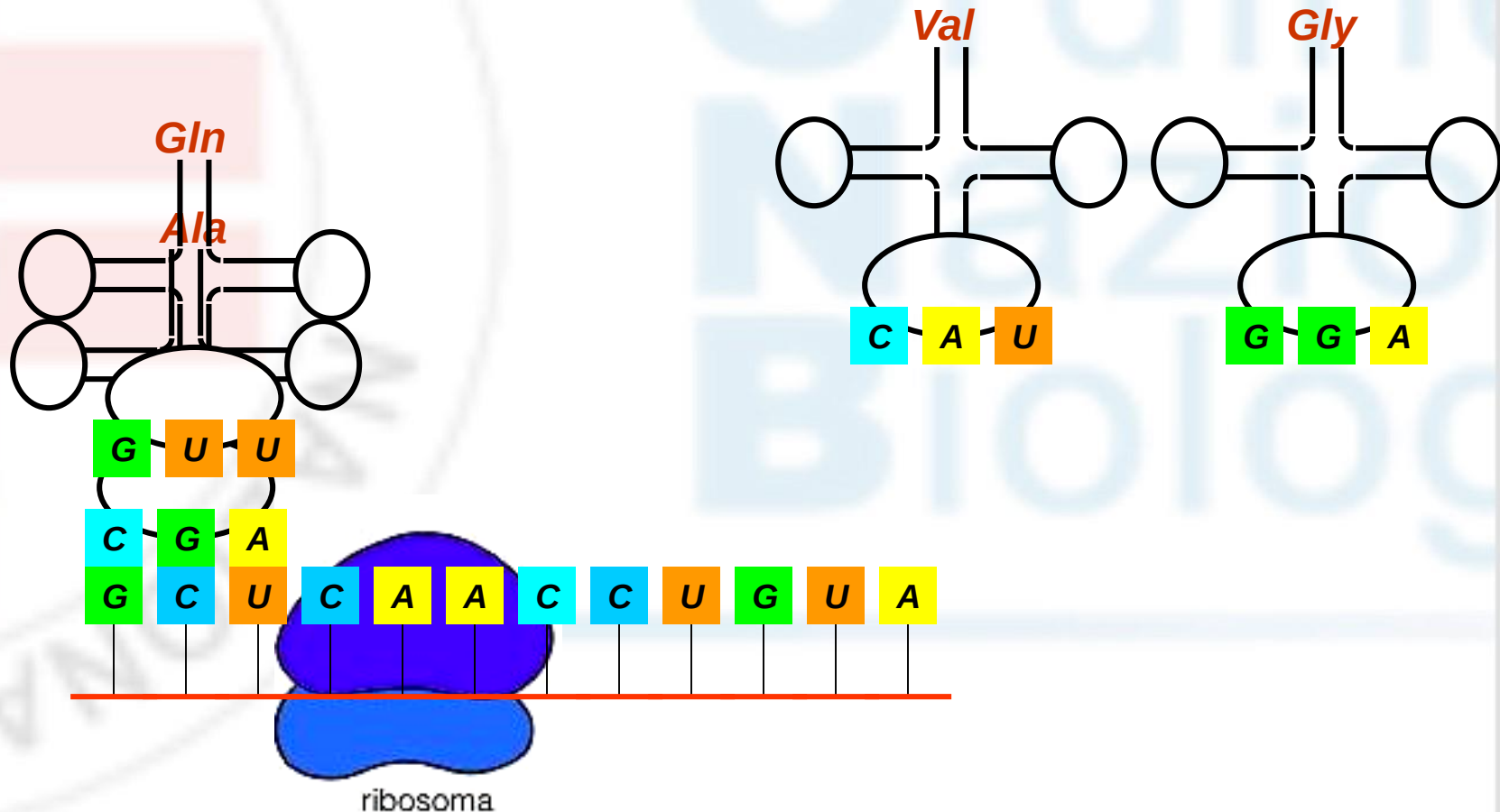
La sintesi proteica



La sintesi proteica

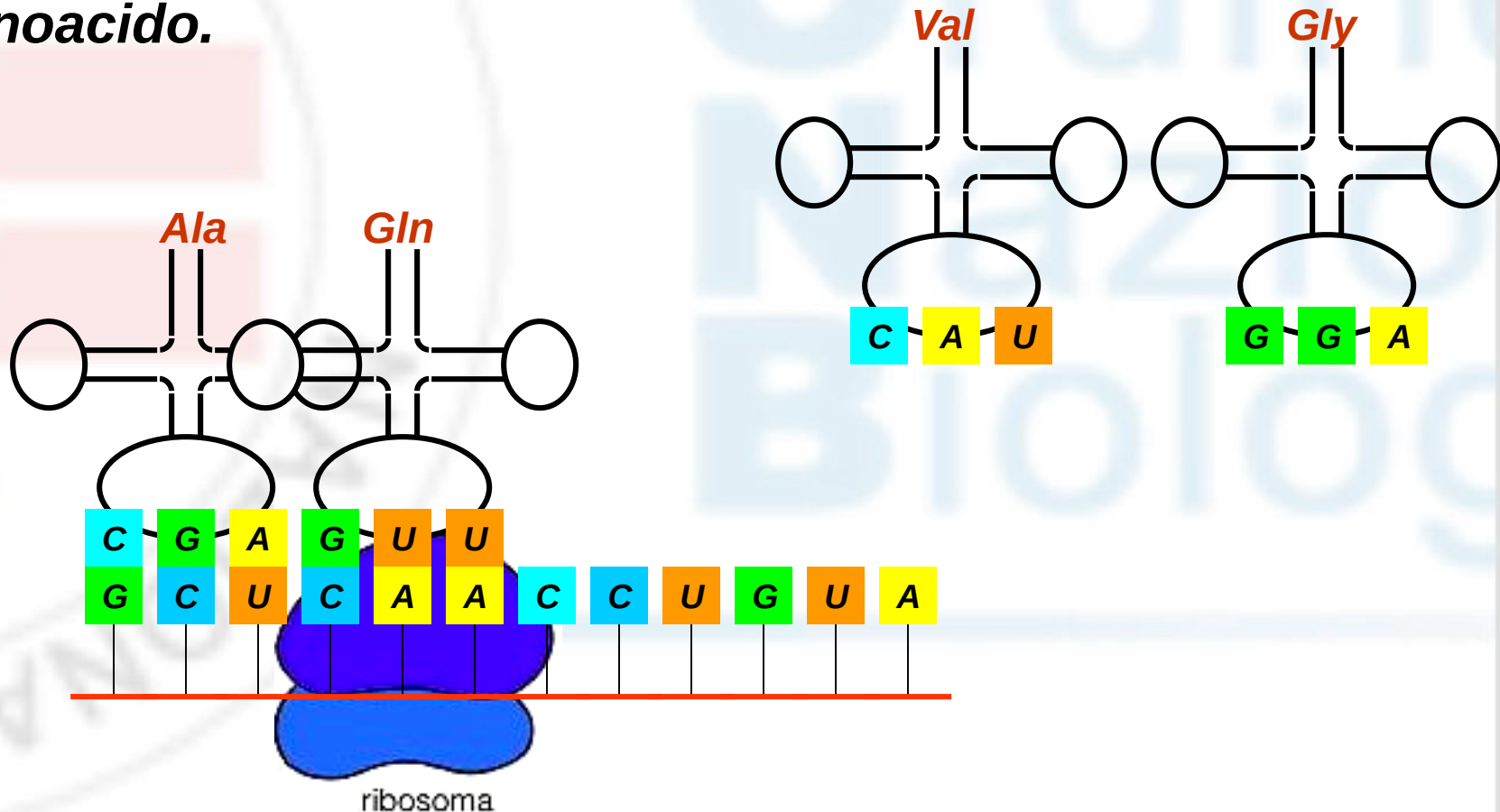


La sintesi proteica



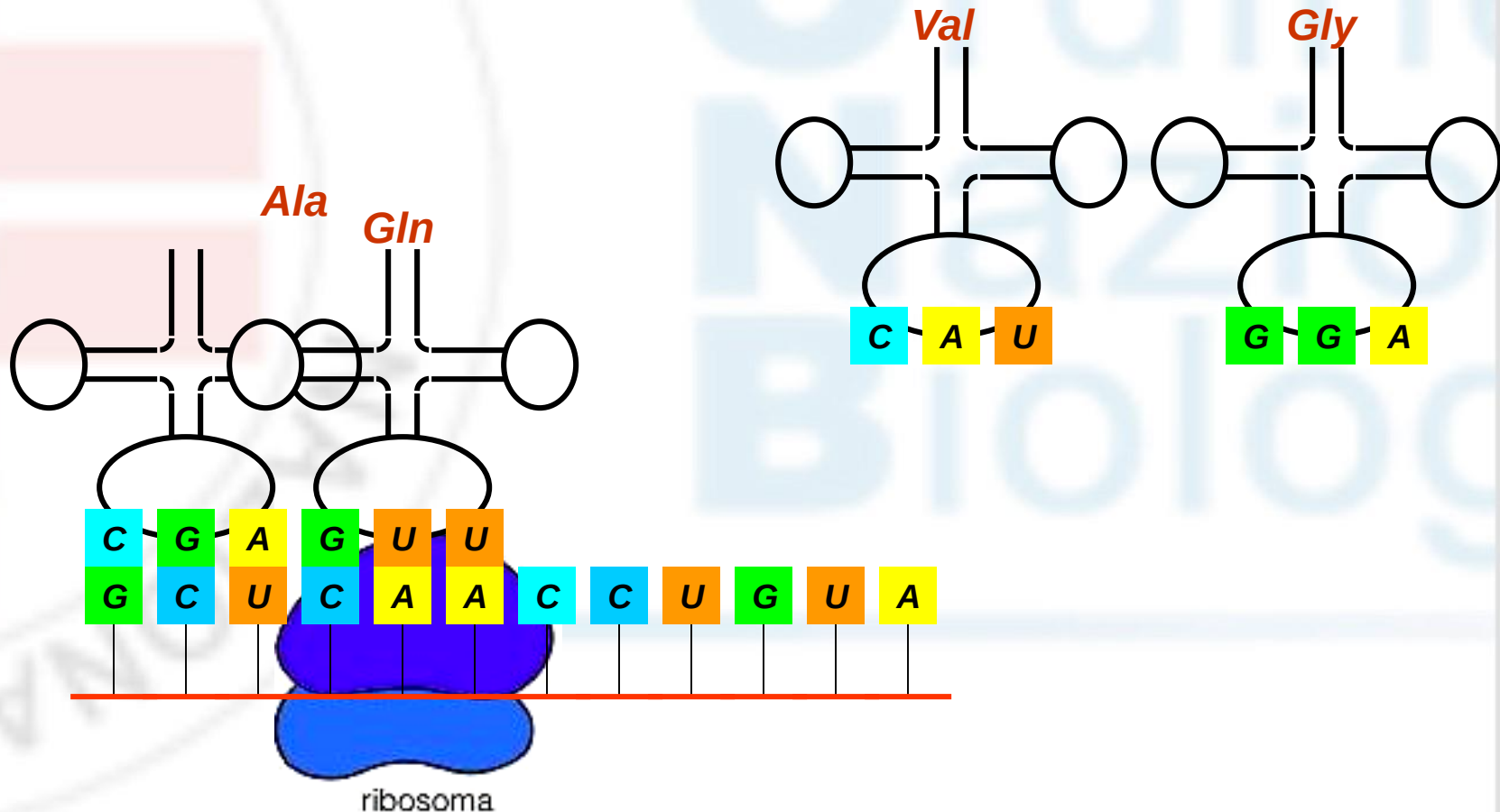
La sintesi proteica

Successivamente su ogni codone si attaccherà il tRNA con l'anticodone complementare, portandosi dietro un amminoacido.



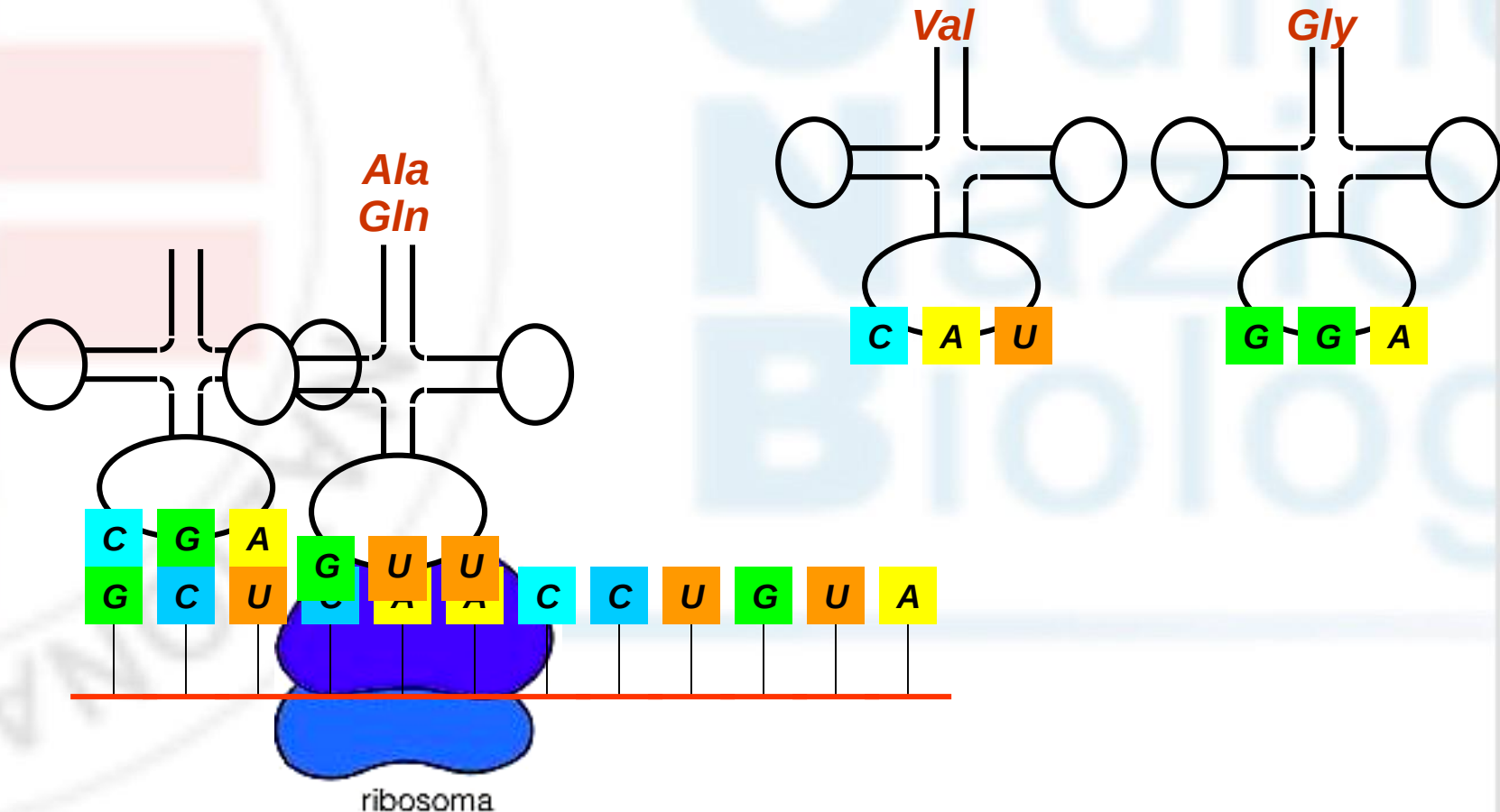
La sintesi proteica

L'amminoacido del primo tRNA si lega poi a quello del secondo...



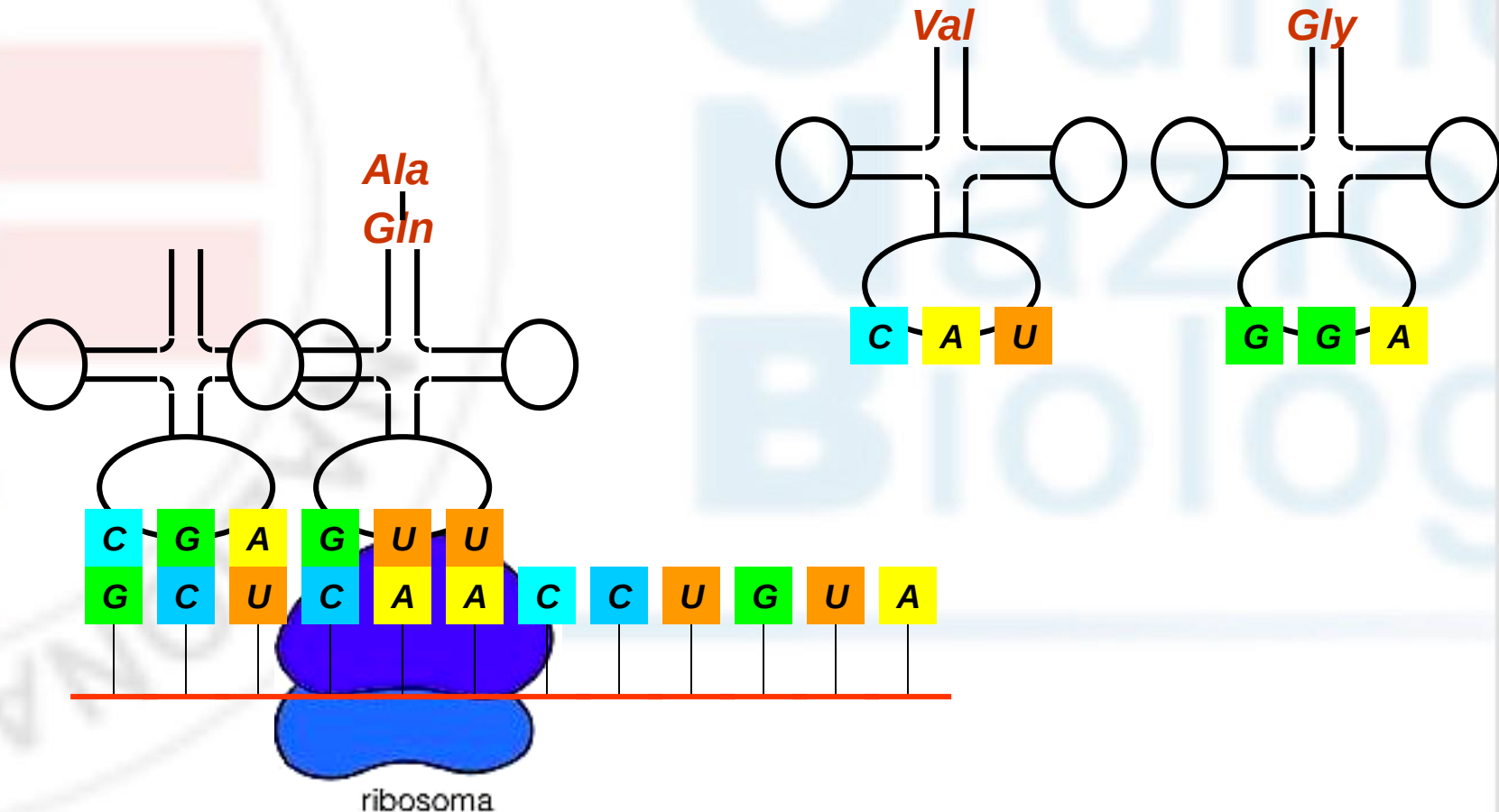
La sintesi proteica

L'amminoacido del primo tRNA si lega poi a quello del secondo...



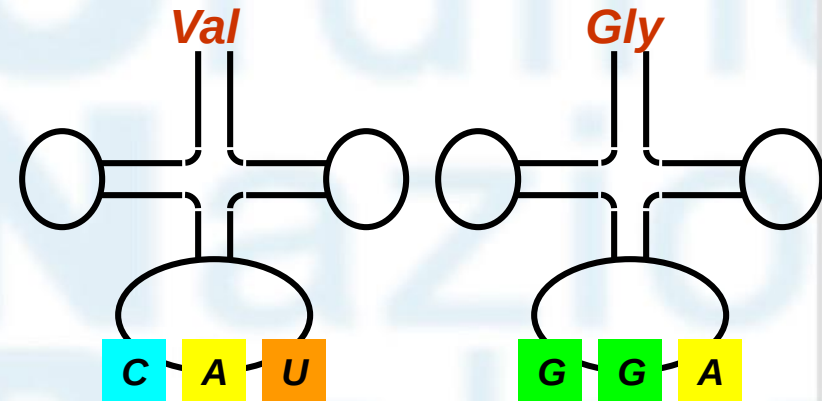
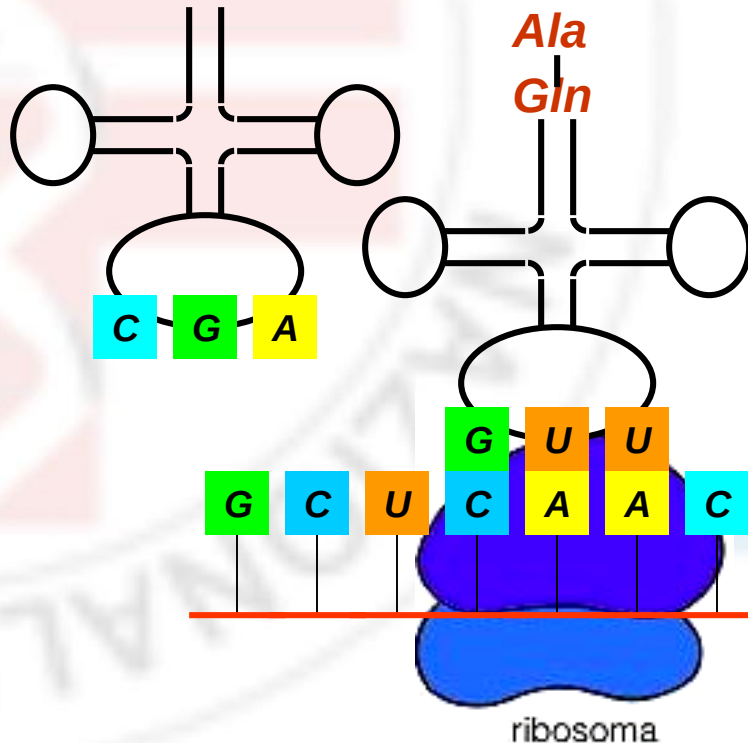
La sintesi proteica

L'amminoacido del primo tRNA si lega poi a quello del secondo...



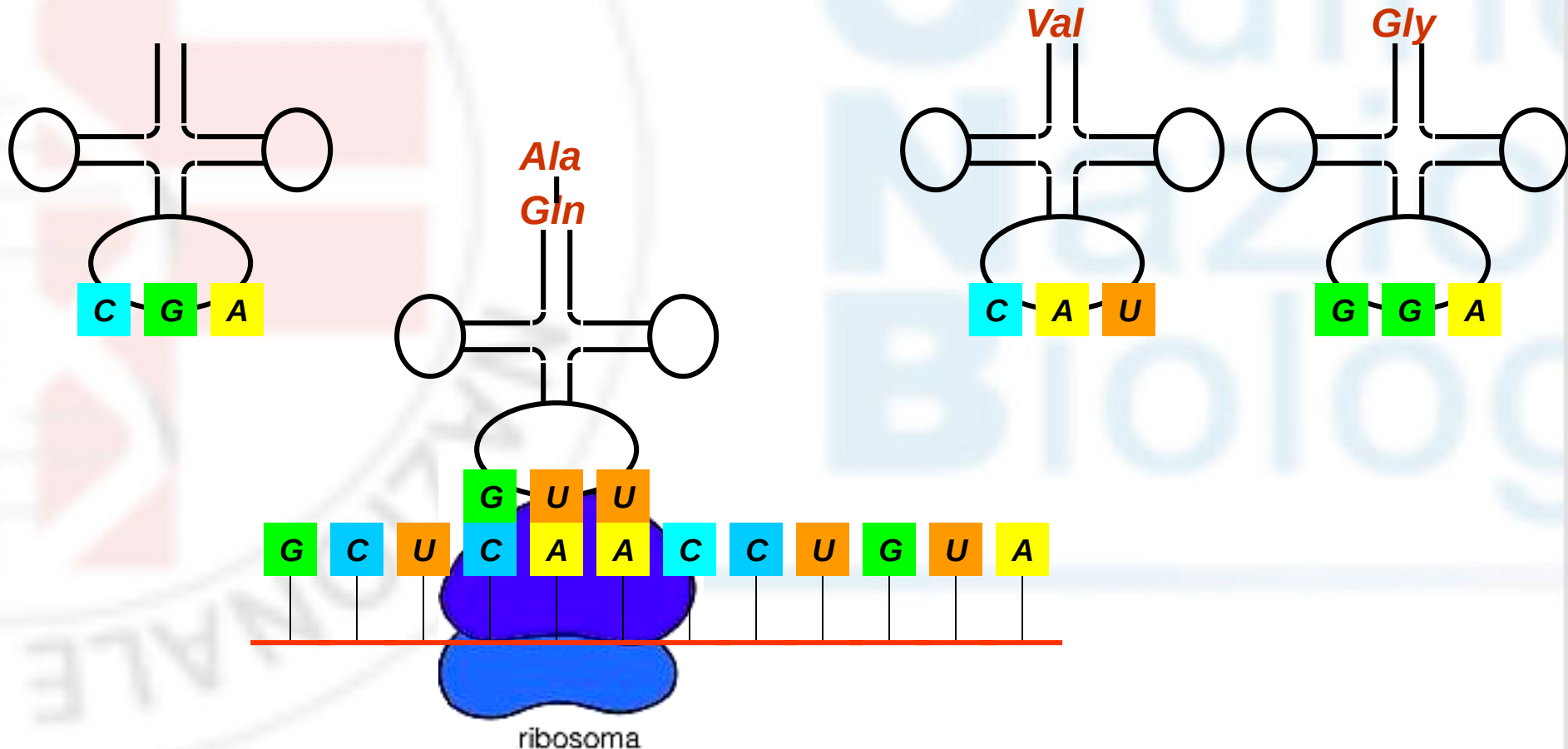
La sintesi proteica

... il primo tRNA si allontana...



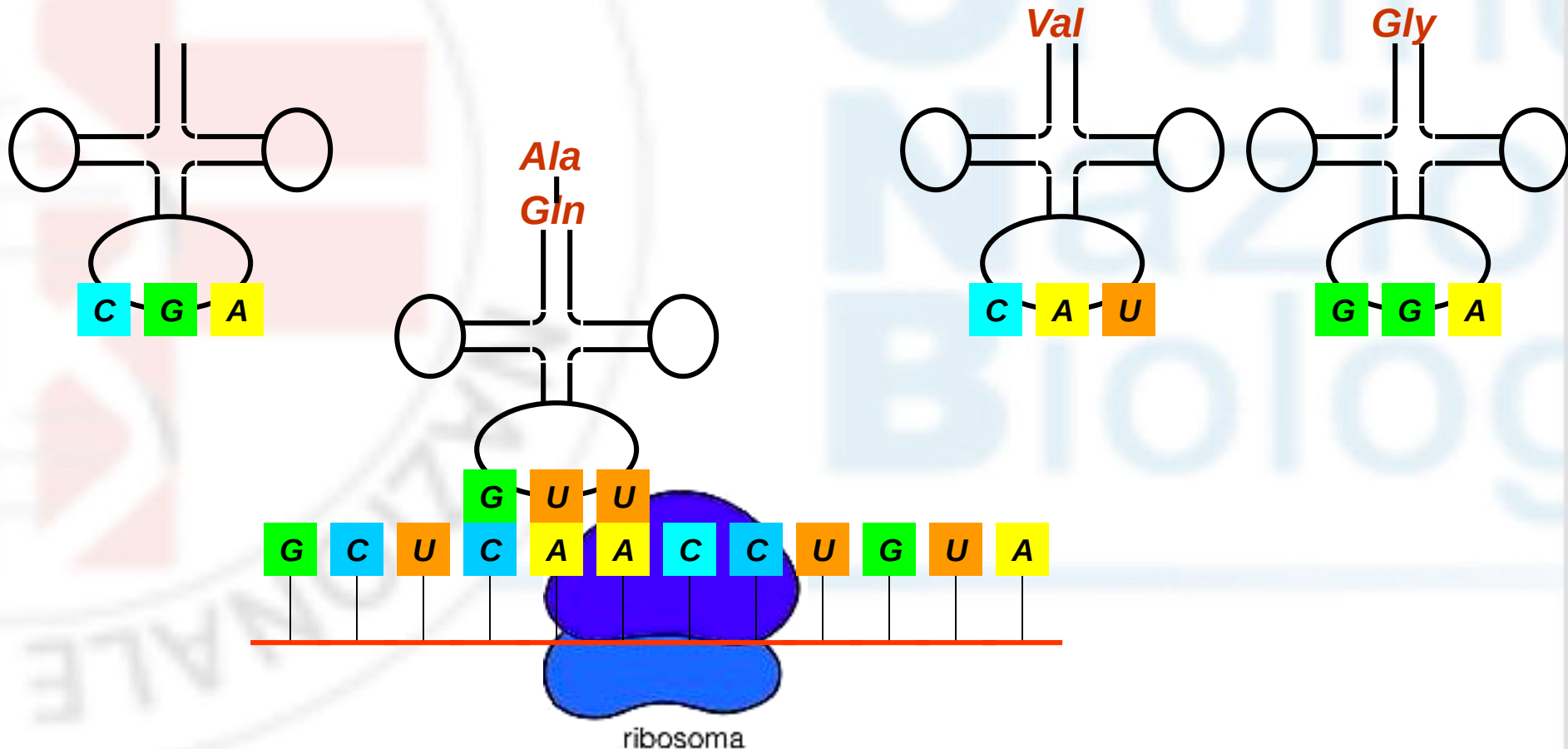
La sintesi proteica

... il primo tRNA si allontana...



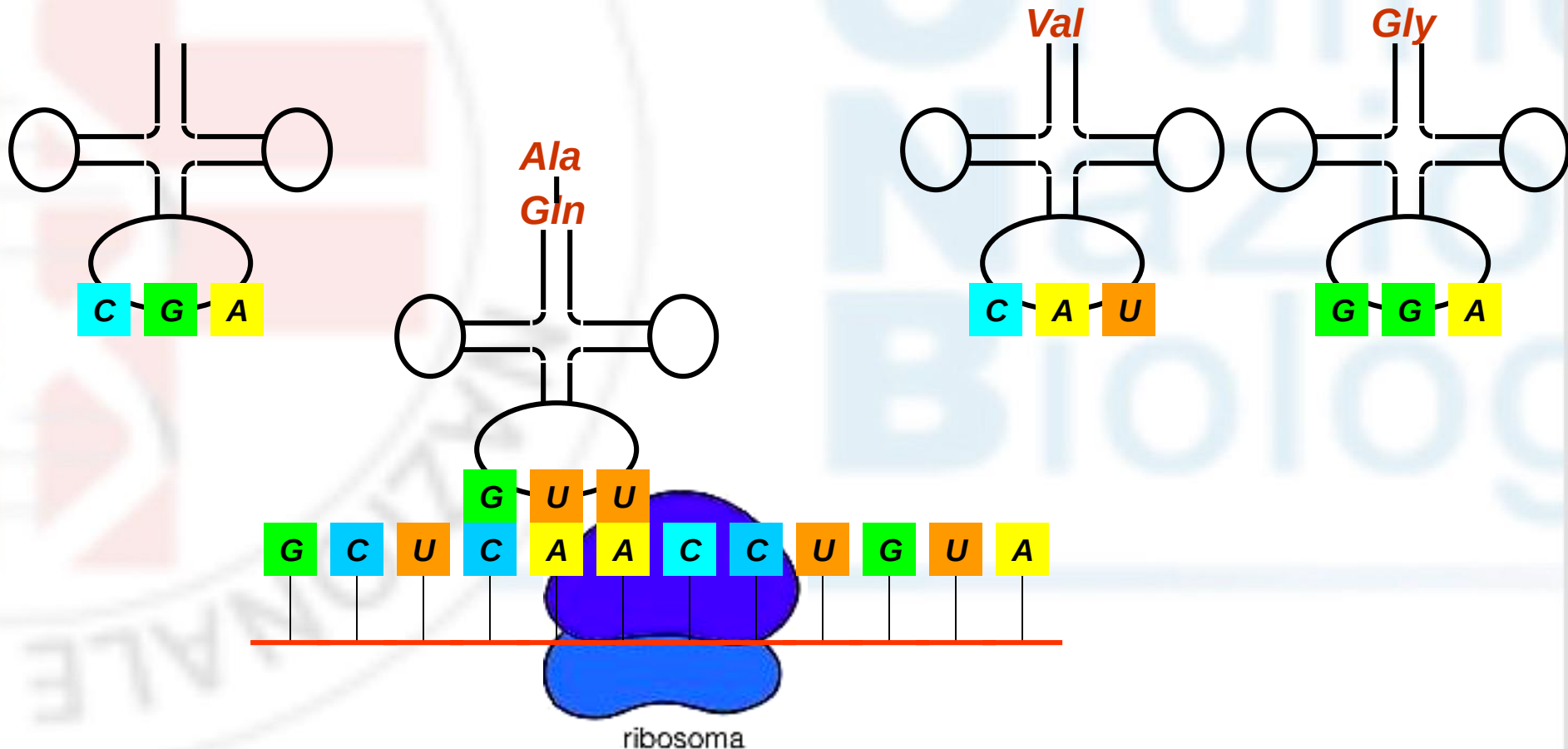
La sintesi proteica

... il primo tRNA si allontana...



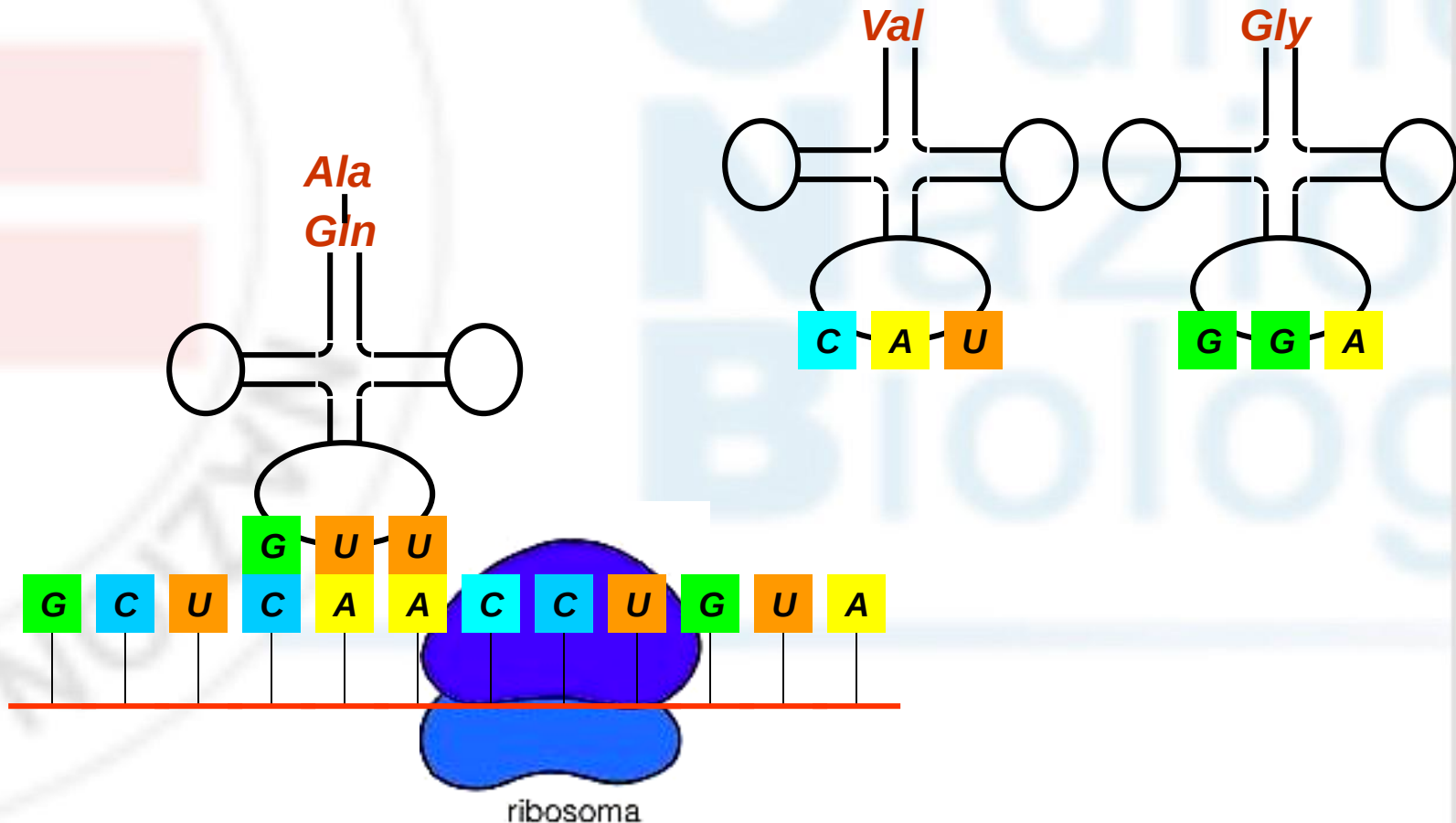
La sintesi proteica

... e un nuovo tRNA si attacca all'RNA messaggero



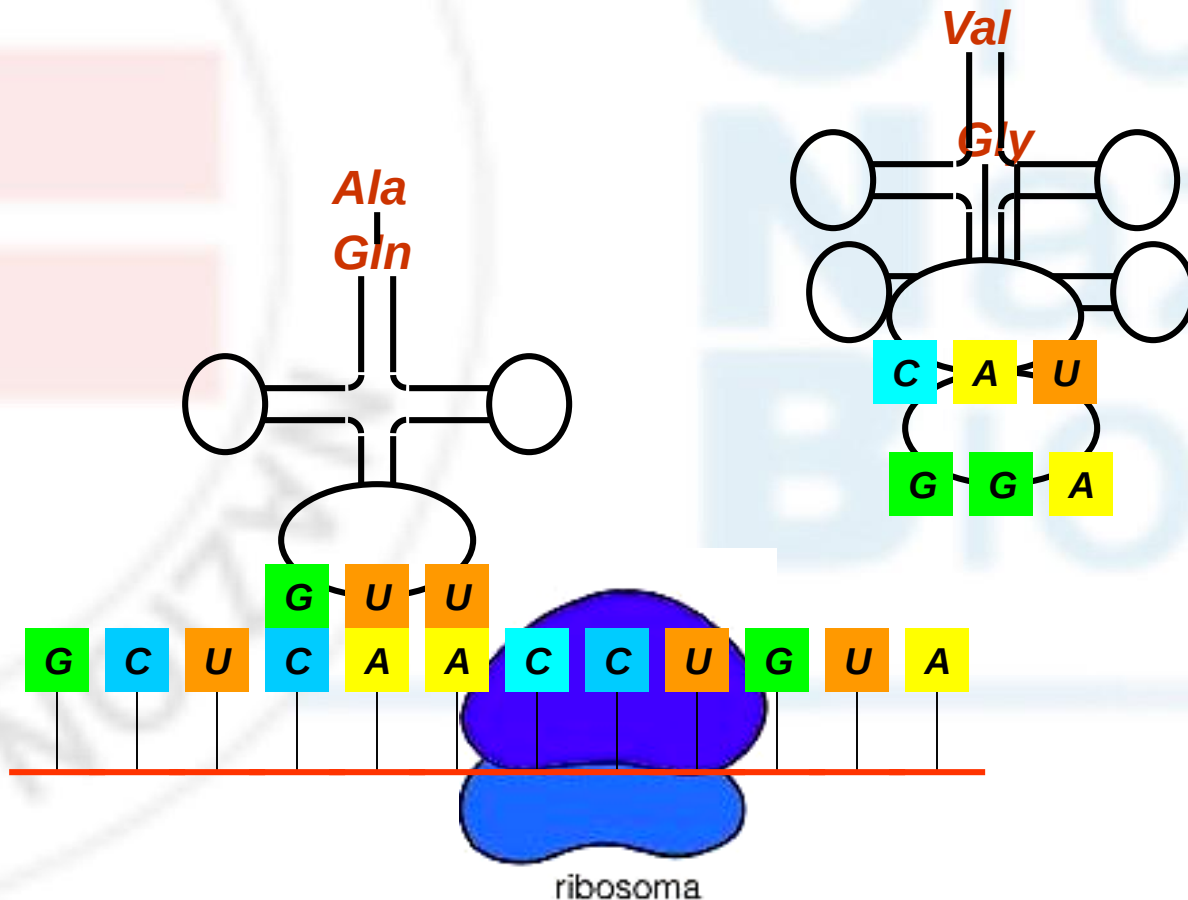
La sintesi proteica

... e un nuovo tRNA si attacca all'RNA messaggero



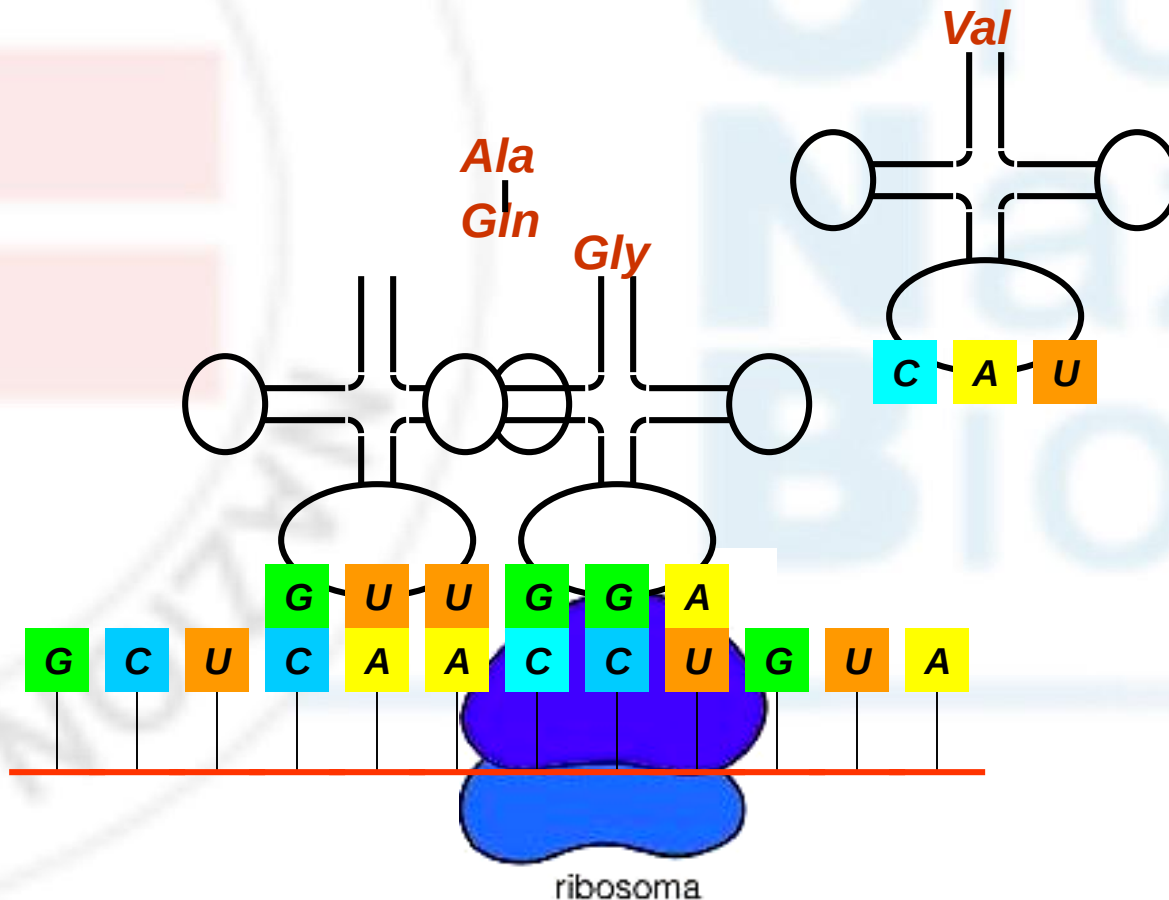
La sintesi proteica

... e un nuovo tRNA si attacca all'RNA messaggero



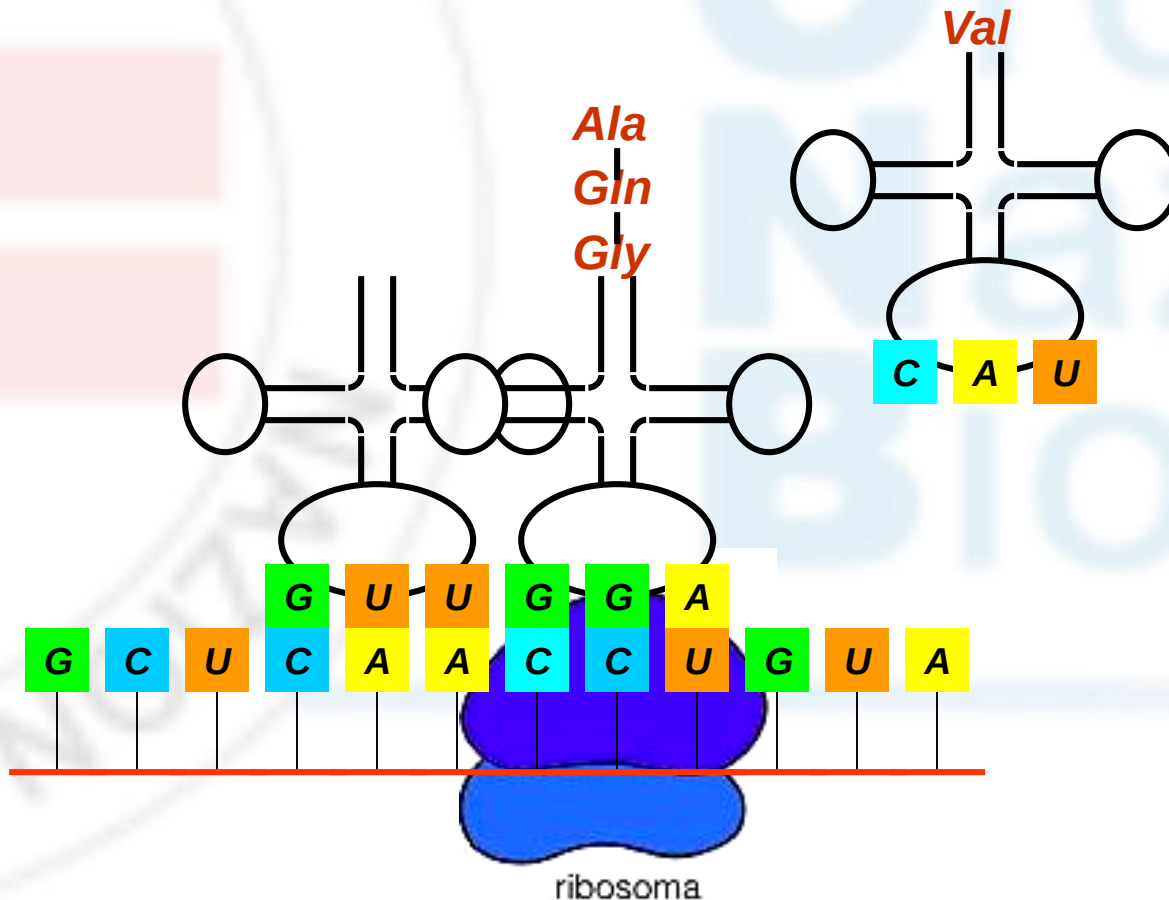
La sintesi proteica

... e così via.



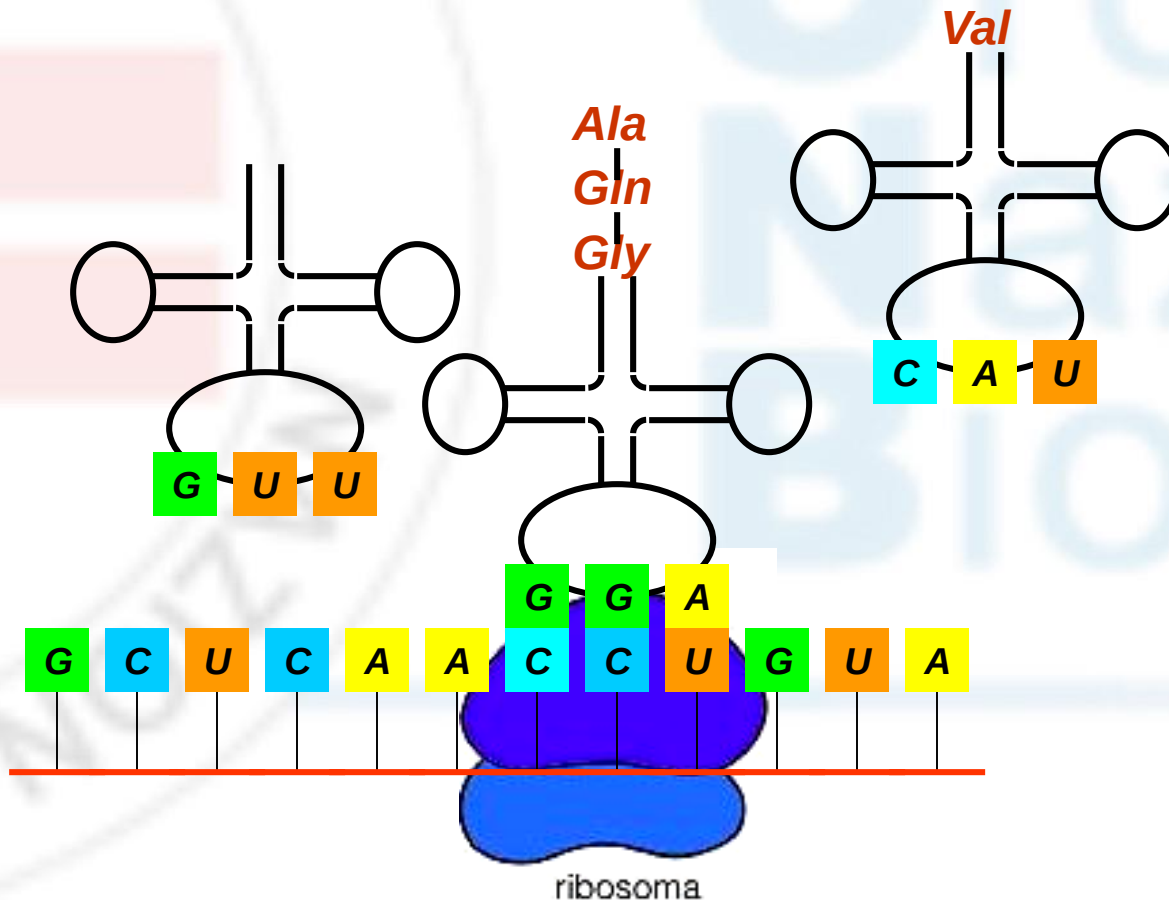
La sintesi proteica

... e così via.



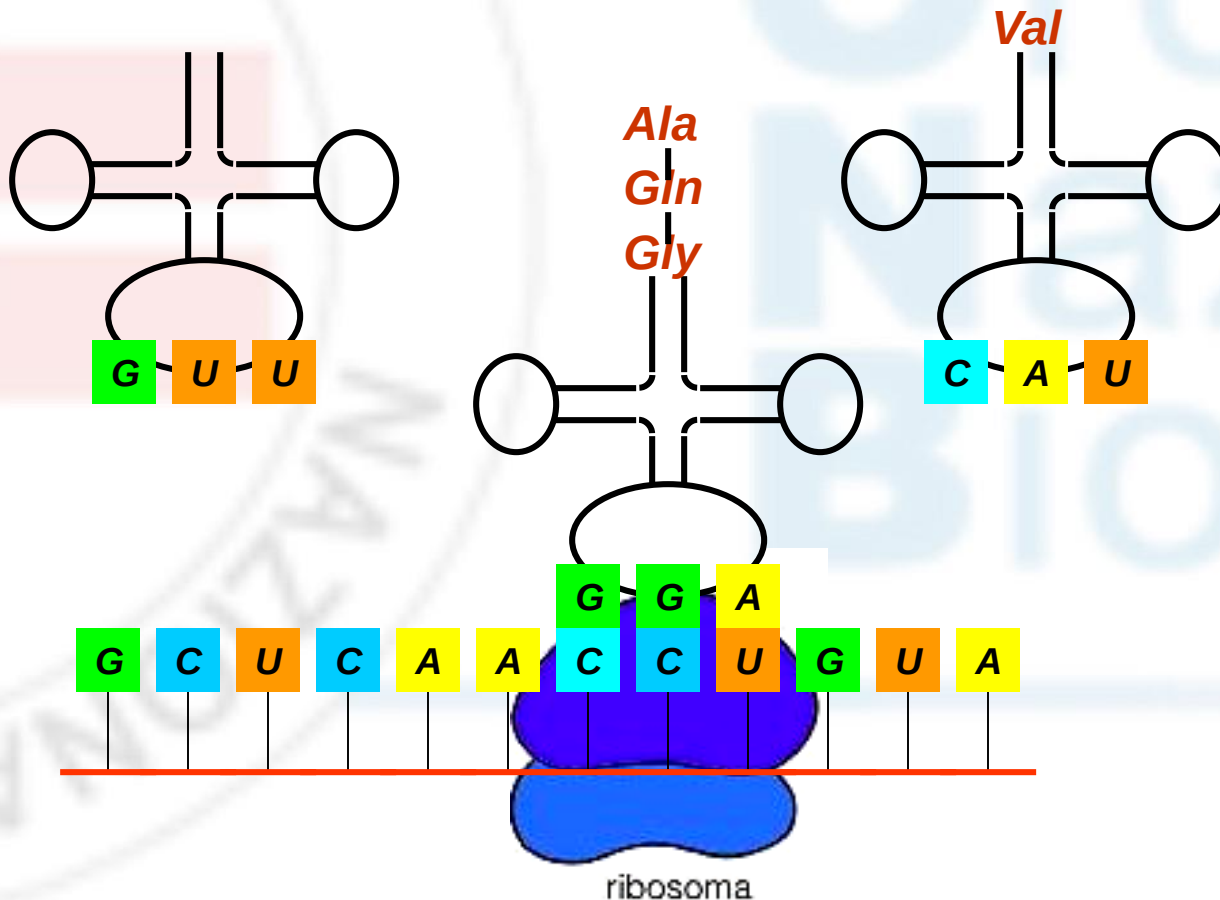
La sintesi proteica

... e così via.



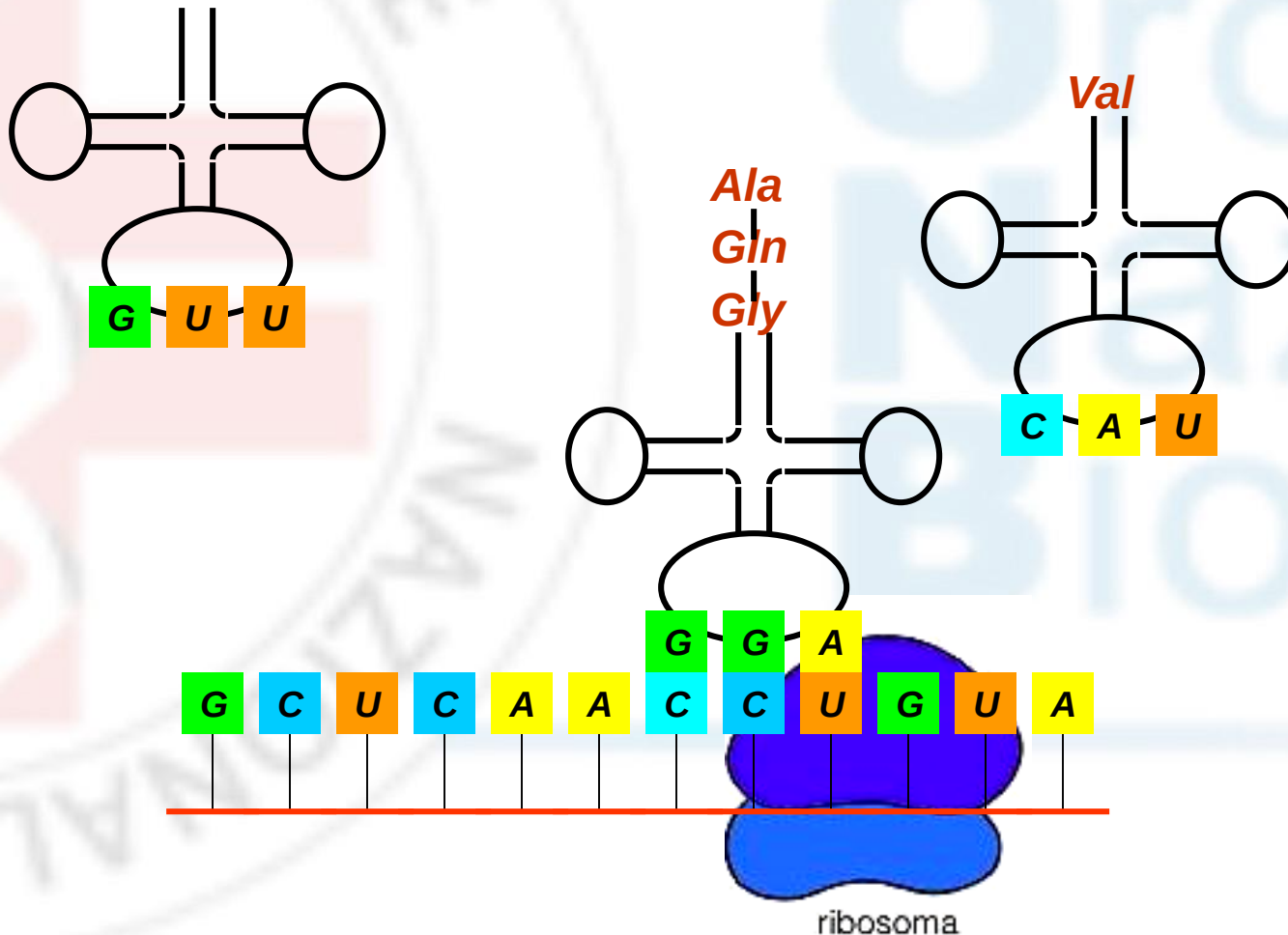
La sintesi proteica

... e così via.



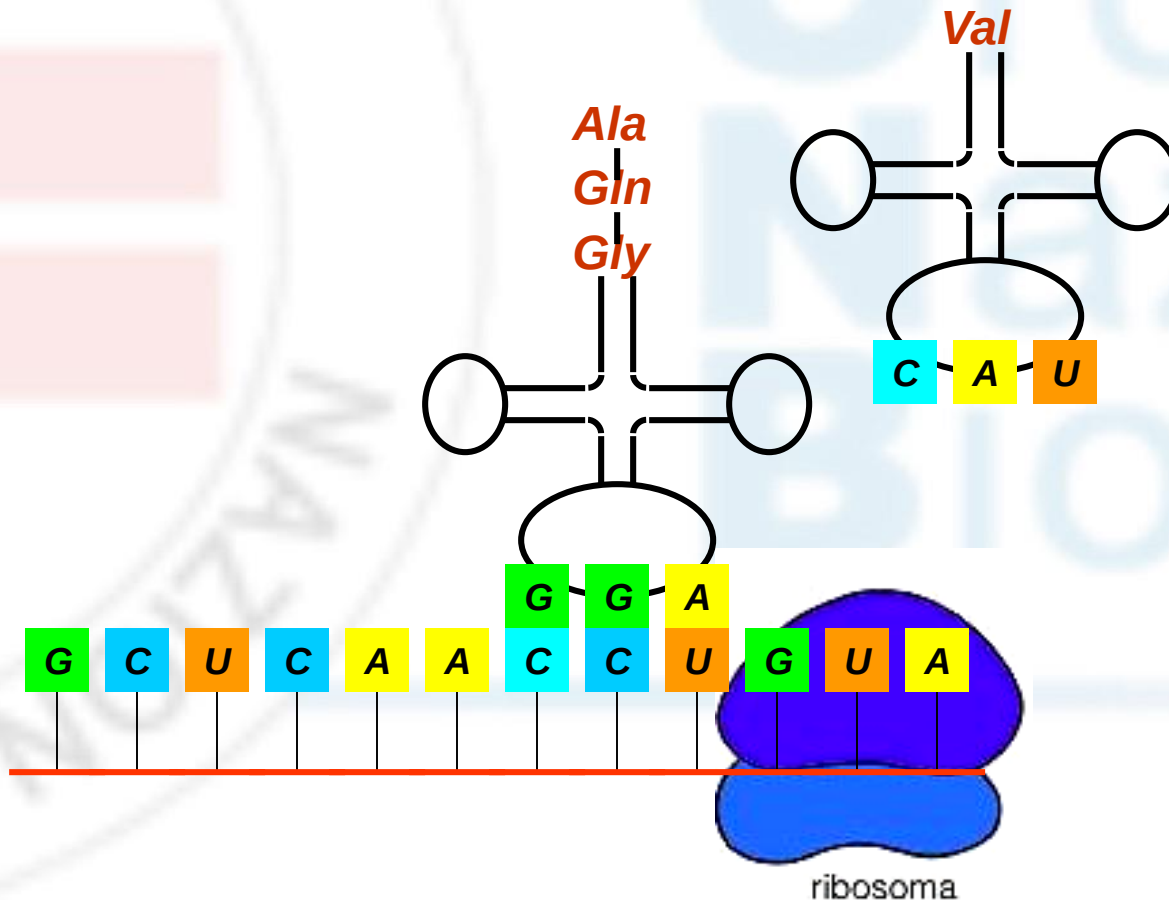
La sintesi proteica

... e così via.



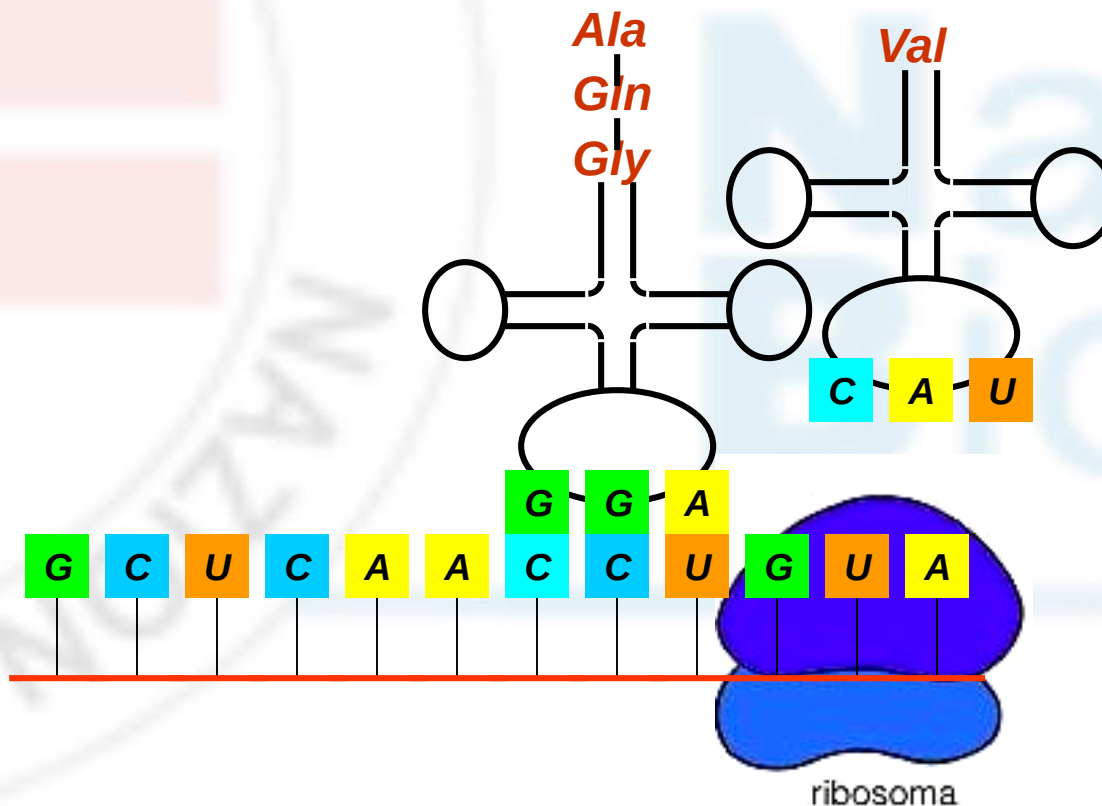
La sintesi proteica

... e così via.



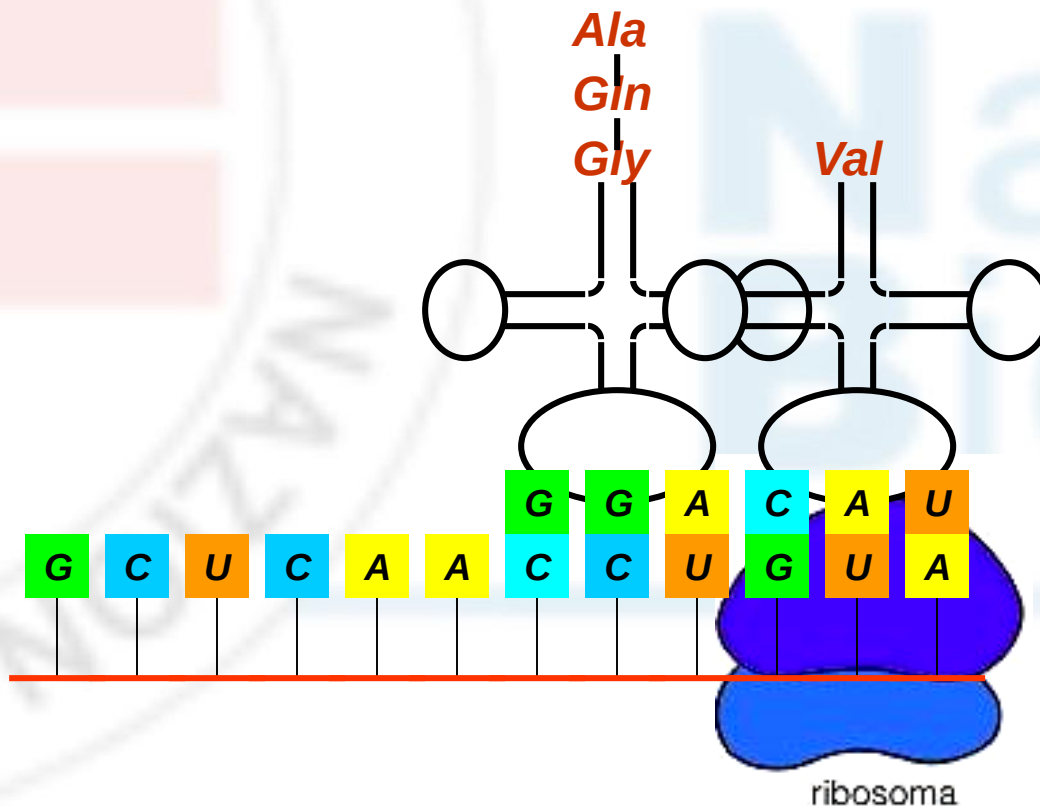
La sintesi proteica

... e così via.



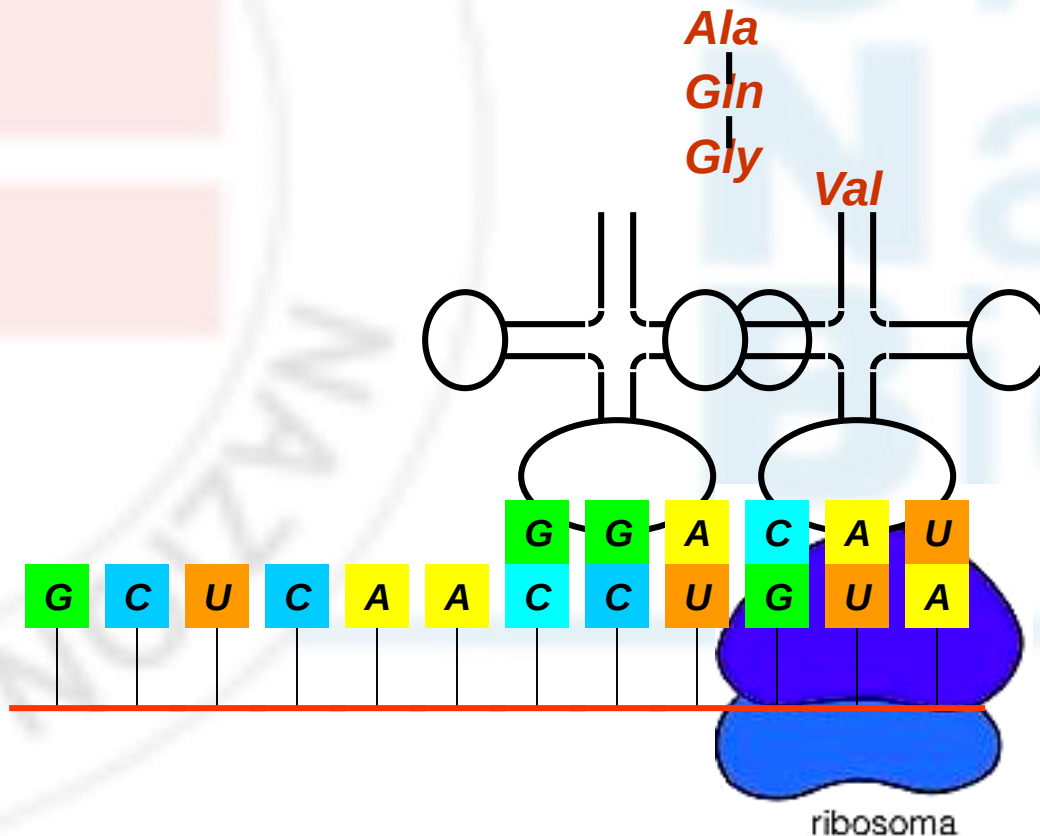
La sintesi proteica

... e così via.



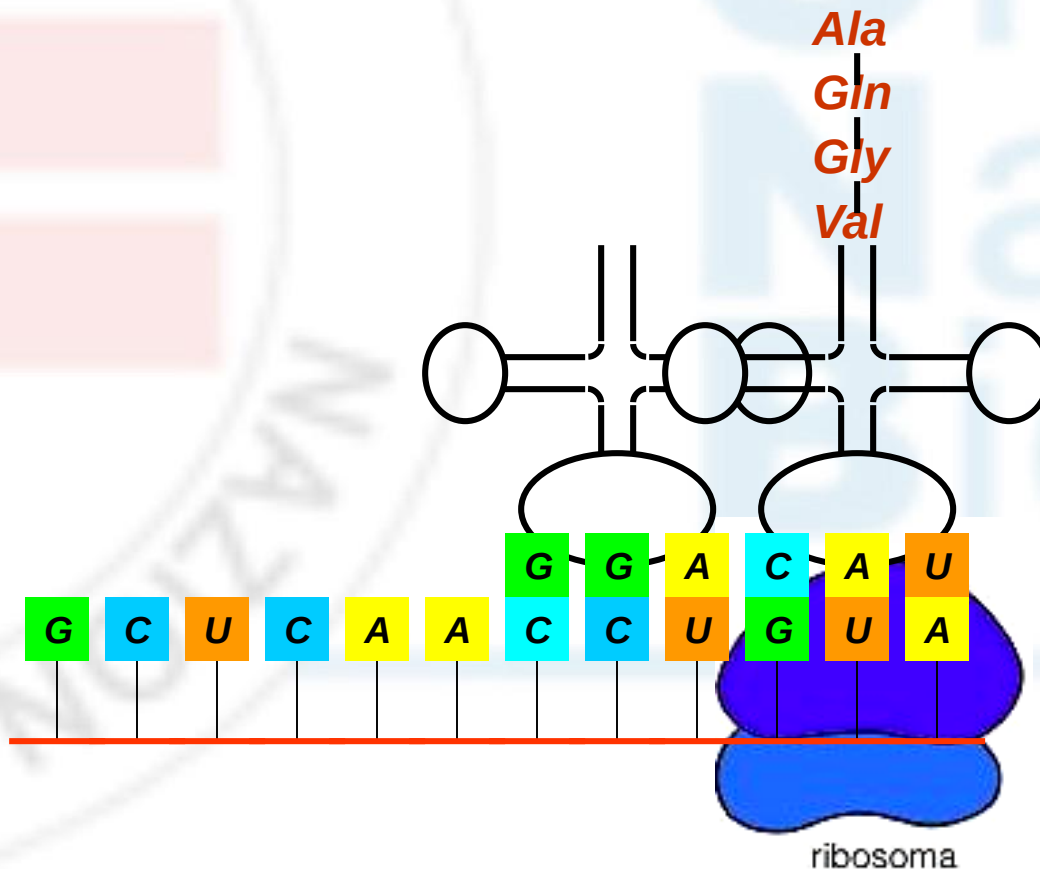
La sintesi proteica

... e così via.



La sintesi proteica

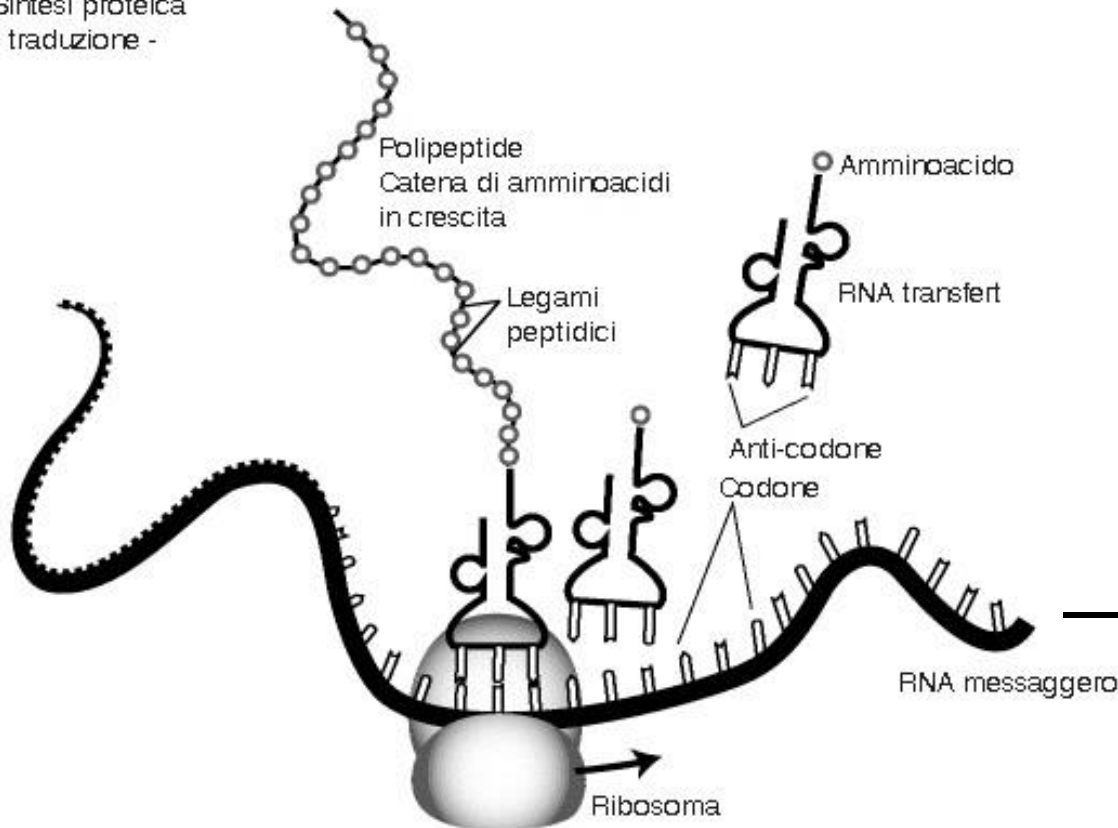
... e così via.



La sintesi proteica

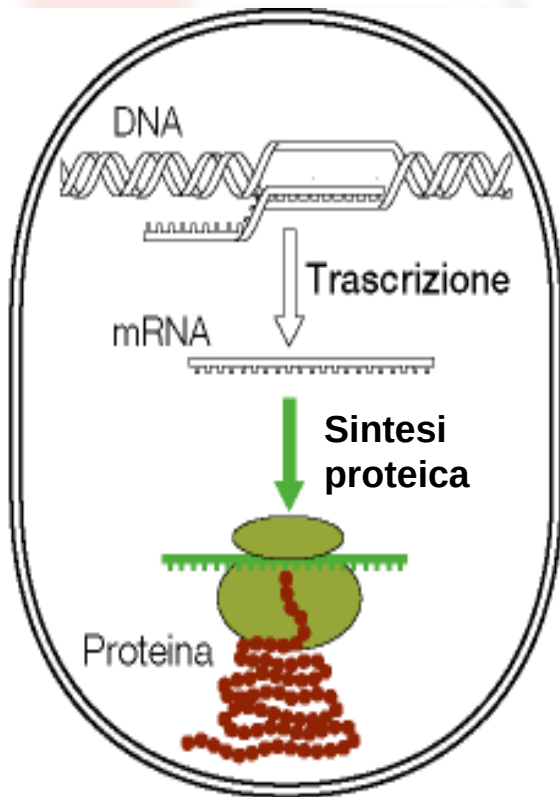
In questo modo si viene a costruire un polipeptide sempre più grande finché non si arriva ad un codone di stop e la sintesi si interrompe.

Sintesi proteica
- traduzione -

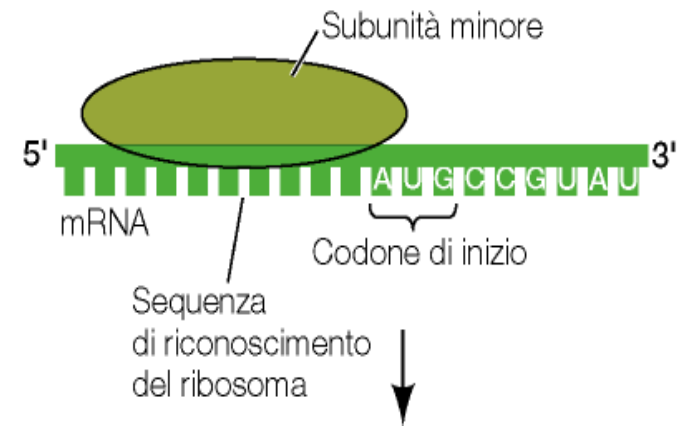


Sintesi proteica

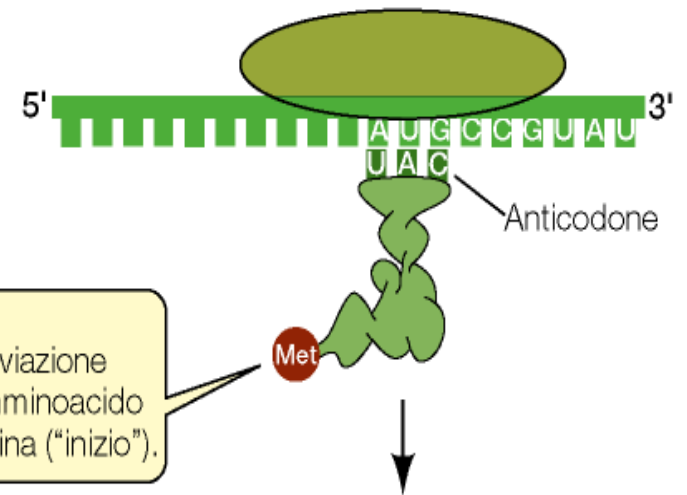
INIZIO



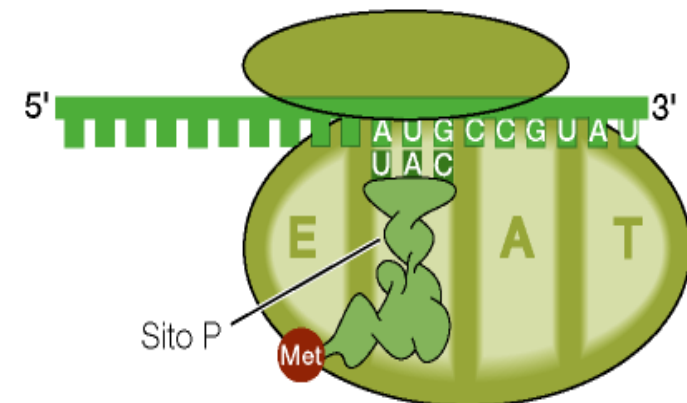
1 La subunità minore del ribosoma si lega alla sequenza di riconoscimento sull'mRNA.



2 Il tRNA caricato con la metionina si lega al codone di inizio AUG, completando la formazione del complesso di inizio.

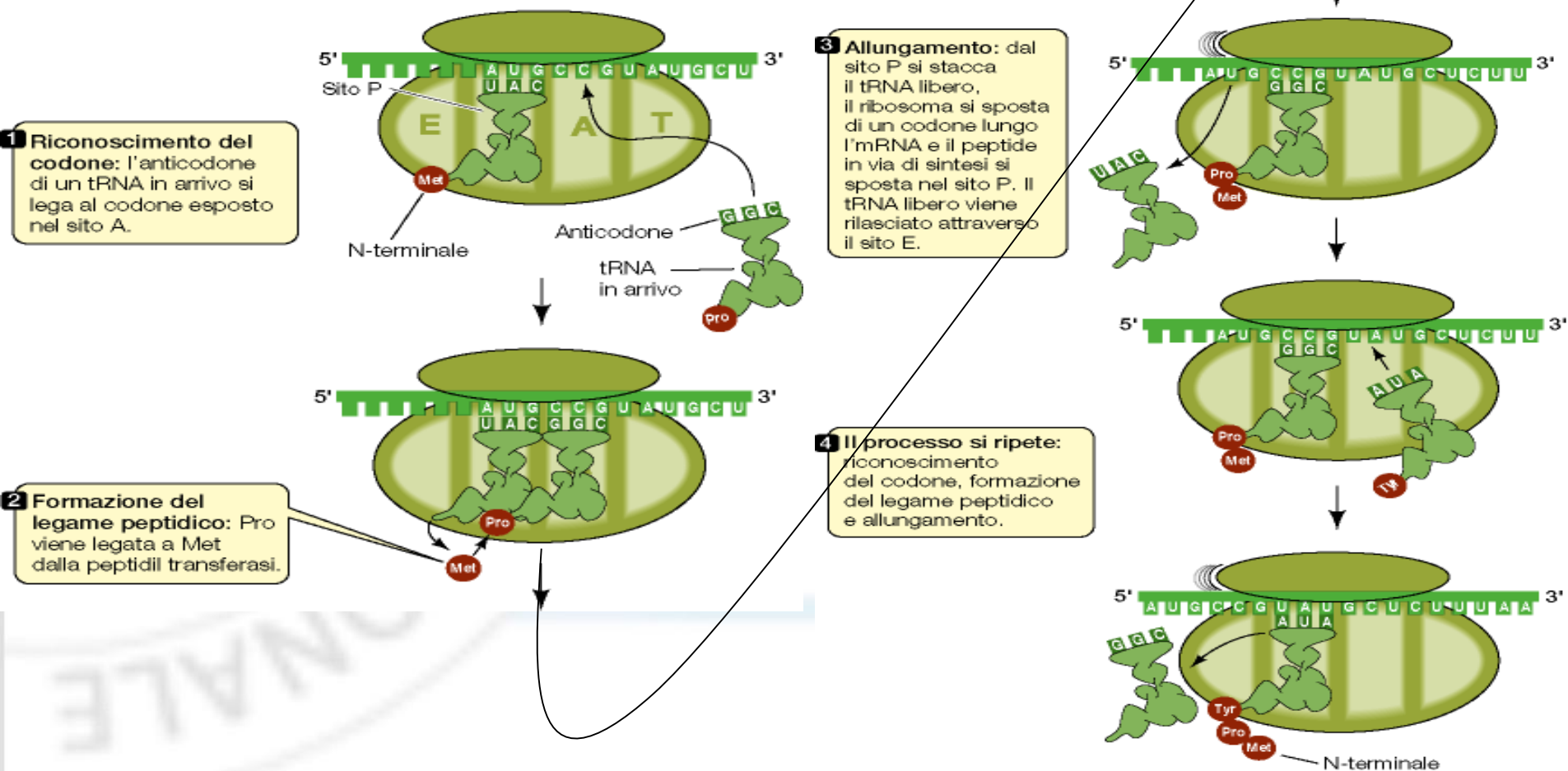


3 La subunità ribosomica maggiore si unisce al complesso di inizio, in modo che il tRNA caricato con la metionina viene a occupare il sito P.



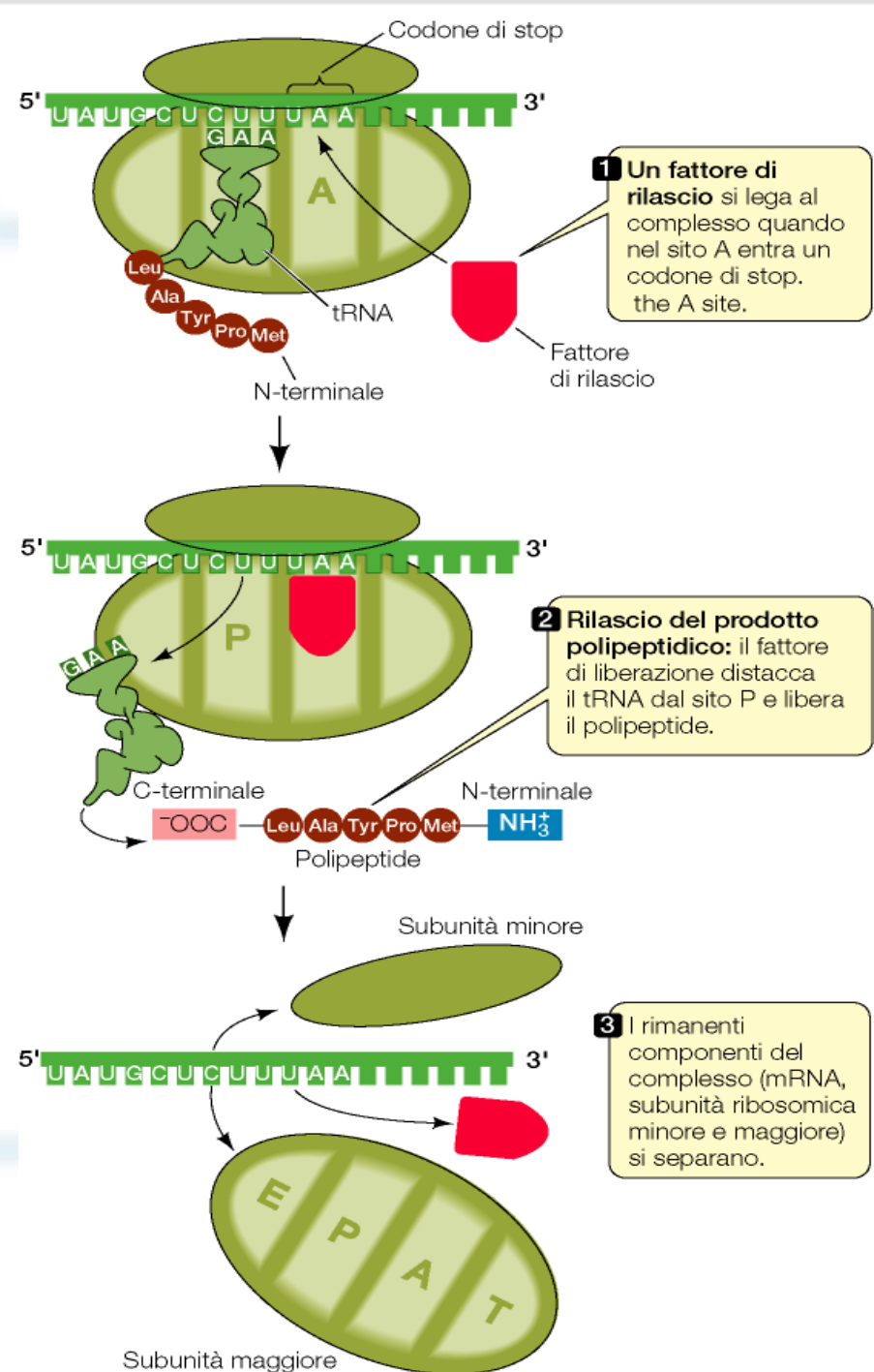
Sintesi proteica

ALLUNGAMENTO



Sintesi proteica

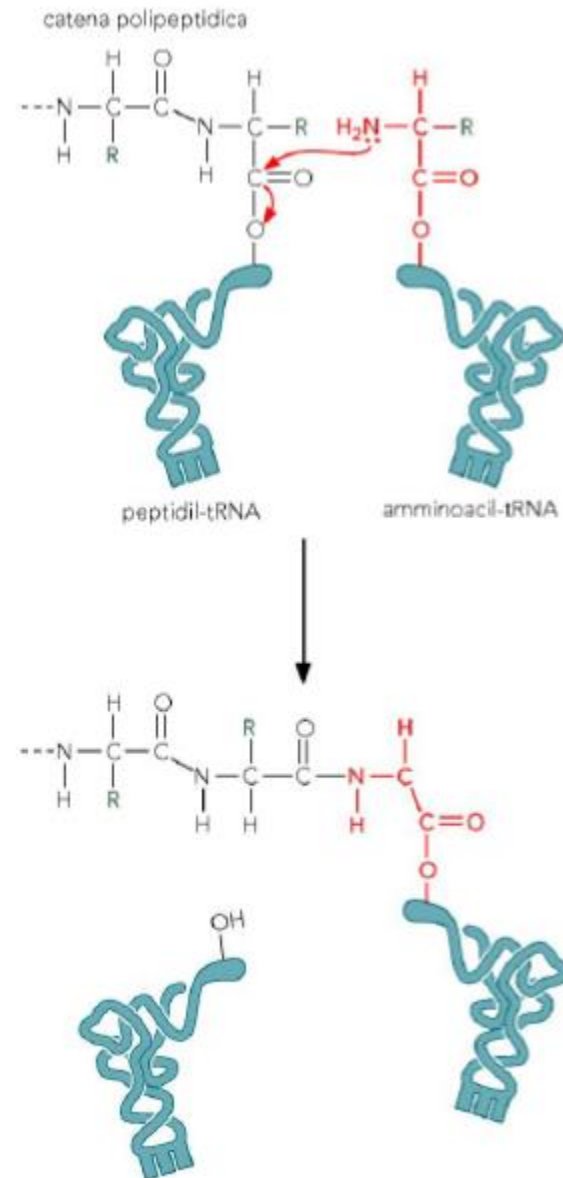
TERMINAZIONE



La reazione peptidil-transferasica

La reazione chimica catalizzata dal ribosoma è la formazione del legame peptidico. Questo avviene mediante il trasferimento della catena polipeptidica nascente da un tRNA all'altro. Il trasferimento è reso possibile dal fatto che il peptidil-tRNA e l'amminoacil-tRNA sono posizionati uno vicino all'altro nel ribosoma.

La formazione del legame peptidico non richiede energia.



IL RIBOSOMA E' UN RIBOZIMA

Figure 6.20 Peptide bond formation takes place by reaction between the polypeptide of peptidyl-tRNA in the P site and the amino acid of aminoacyl-tRNA in the A site.

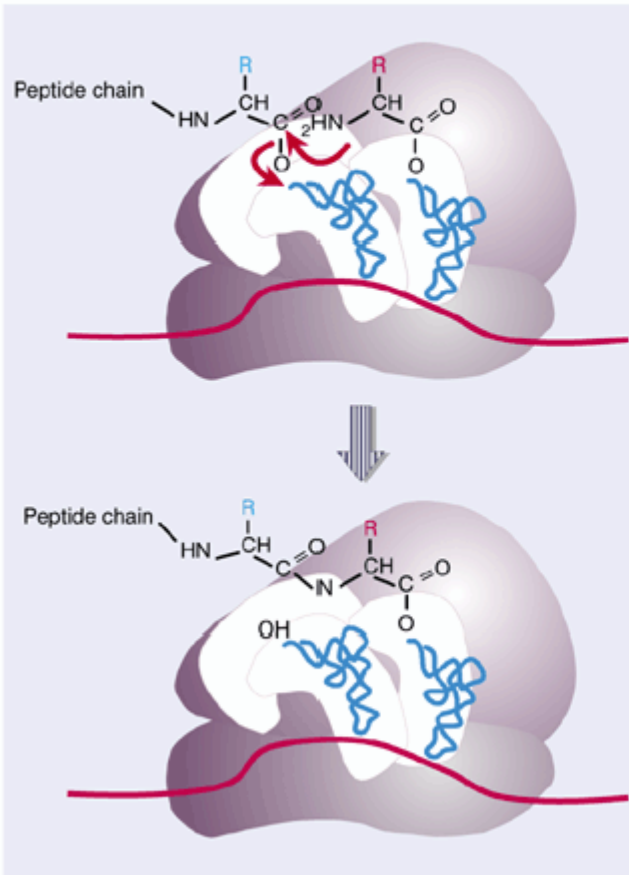
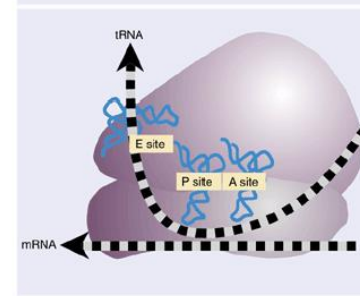


Figure 6.5 tRNA and mRNA move through the ribosome in the same direction.



Sito A: sito aminoacilico
Sito P: sito peptidilico

La formazione del legame peptidico è catalizzata dall'enzima **peptidil transferasi**.

Questa attività enzimatica è svolta dal rRNA 23S della subunità maggiore del ribosoma.

INIZIO DELLA SINTESI PROTEICA NEGLI EUCARIOTI

simile a quello dei procarioti

modalità di riconoscimento dell'mRNA e del codone iniziatore.

Il tRNA iniziatore, carico con Metionina, si lega alla subunità minore del ribosoma prima dell'mRNA. Il fattore eIF5B•GTP (analogo di IF2) media il corretto posizionamento del tRNA iniziatore nel sito P, formando il complesso di pre-inizio 43S.

Il complesso 43S si lega al cap dell'mRNA mediante l'interazione tra IF3 e eIF4F e scorre lungo l' mRNA sino a quando non trova il codone iniziatore (più di 30 fattori proteici)

inizio negli eucarioti

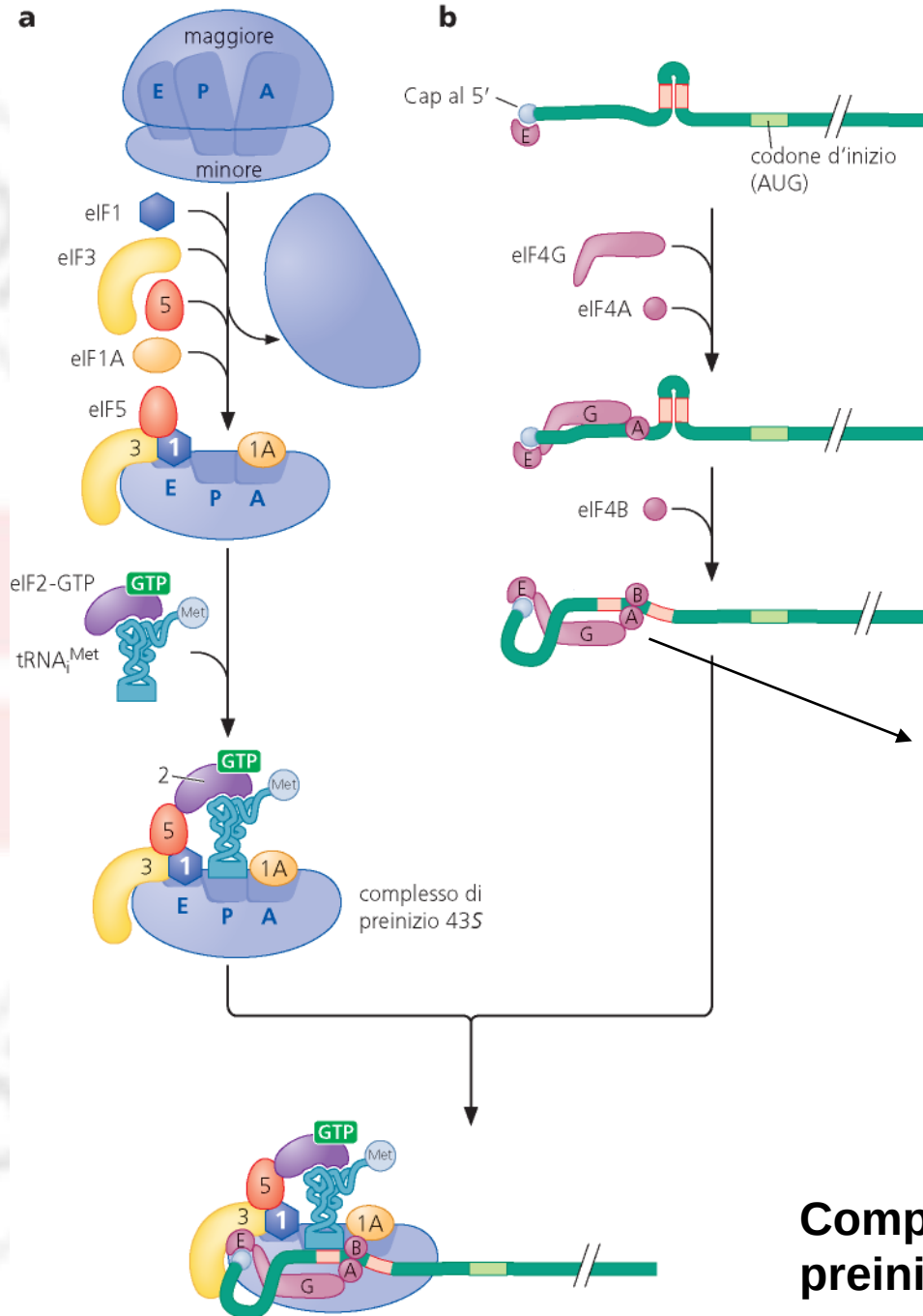
La subunità minore associata al tRNA iniziatore lega il Cap

Scorre il mRNA fino a trovare AUG nel contesto giusto (sequenza Kozak 5'-G/ANNAUGG-3')

Intervengono 30 proteine, tra cui eucariotic Initiation Factors (eIF3, eIF4, eIF5B)

Una elicasi abolisce la strutture secondarie dell'mRNA

IF1 IF3

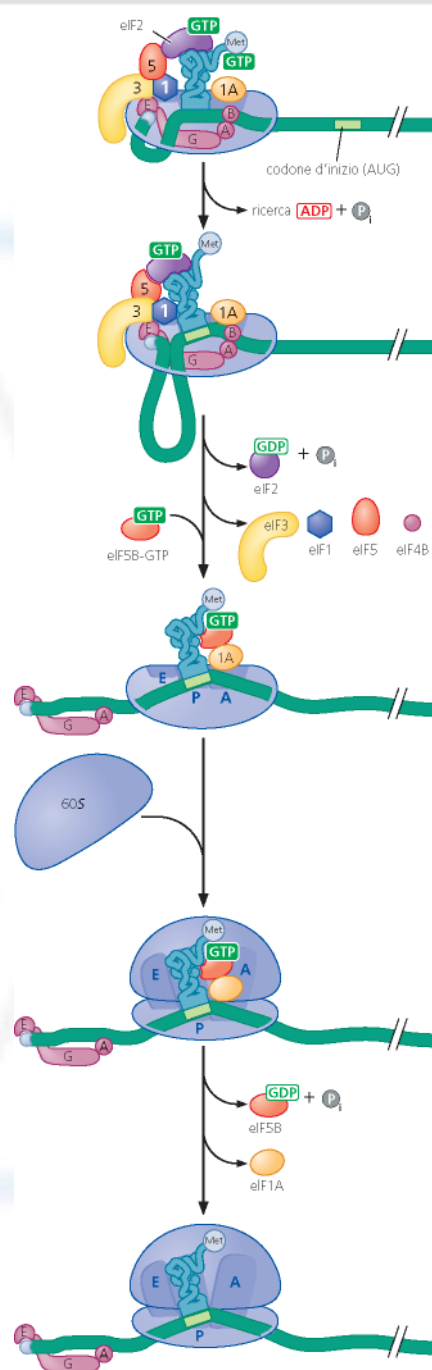


Il livello generale di sintesi proteica è controllato in questa fase da competitori di eIF4G

elicasi

Complesso di preinizio 48S

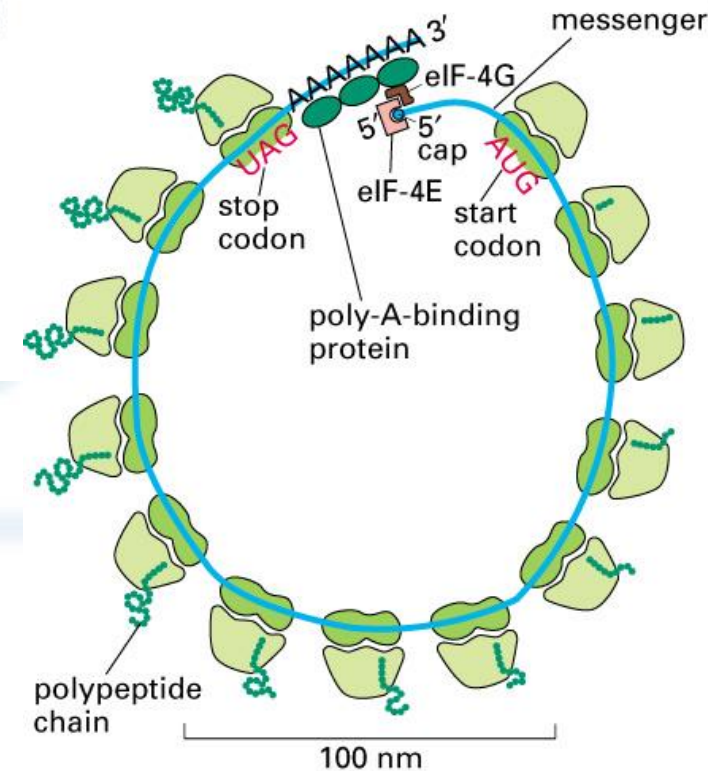
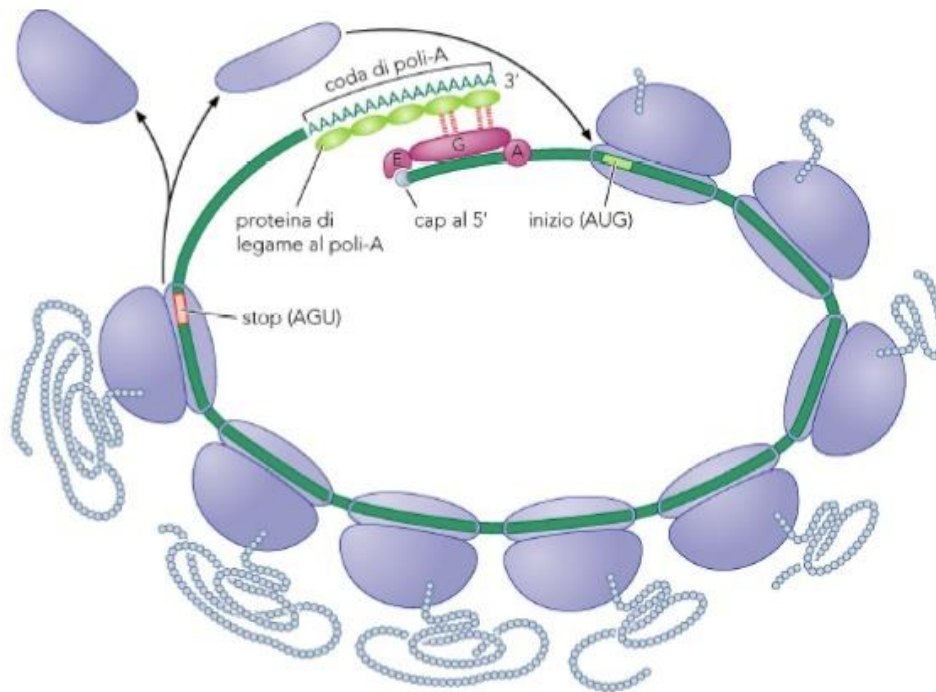
**La subunità minore
cerca il codone
d'inizio**



Complesso di inizio 80 S

Circolarizzazione polyA-dipendente dell'mRNA

L'interazione tra la **polyA-binding protein** e i fattori di inizio mantiene l'mRNA in una conformazione circolare che aumenta l'efficienza della **Sintesi proteica**



mRNA procariotici ed eucariotici

Nei procarioti, la sequenza di Shine-Dalgarno (Ribosome Binding Site) consente il corretto posizionamento del ribosoma sull'mRNA. In assenza di RBS in mRNA policistronici si ha accoppiamento della traduzione con ORF sovrapposti (5'-AUGA-3').

AGCAC	GAGGGG	AAAUCUG	AUG	GAACGCUAC	<i>E. coli trpA</i>
UUUGGAU	GGAGU	UGAAACG	AUG	GCGAUUGCA	<i>E. coli araB</i>
GGUAAC	CAGGU	AACAACC	AUG	CGAGUGUUG	<i>E. coli trnA</i>
CAAUUCAG	GGUGG	UGAAU	GUG	AAAACCAGUA	<i>E. coli lacI</i>
AAUCUU	GGAGG	CUUUUUU	AUG	GUUCGUUCU	φX174 phage A protein
UAACU	AAGGA	UGAAU	GCAUG	UCUAAGACA	Qβ phage replicase
UCCU	AGGAGG	UUGACCU	AUG	CGAGCUUUU	R17 phage A protein
AUGUAC	UAGGAGGU	UGU	AUG	GAACAACGC	λ phage <i>cro</i>
	Shine-Dalgarno sequence		Translation start site		

Negli eucarioti, il legame del ribosoma all'mRNA richiede il 5' cap (7-metil guanosina) e la coda di poly-A. Il ribosoma effettua quindi una scansione dell'mRNA fino ad incontrare il codone iniziatore nel corretto contesto nucleotidico (Kozak consensus).

5'-G/ANNAUGG-3'



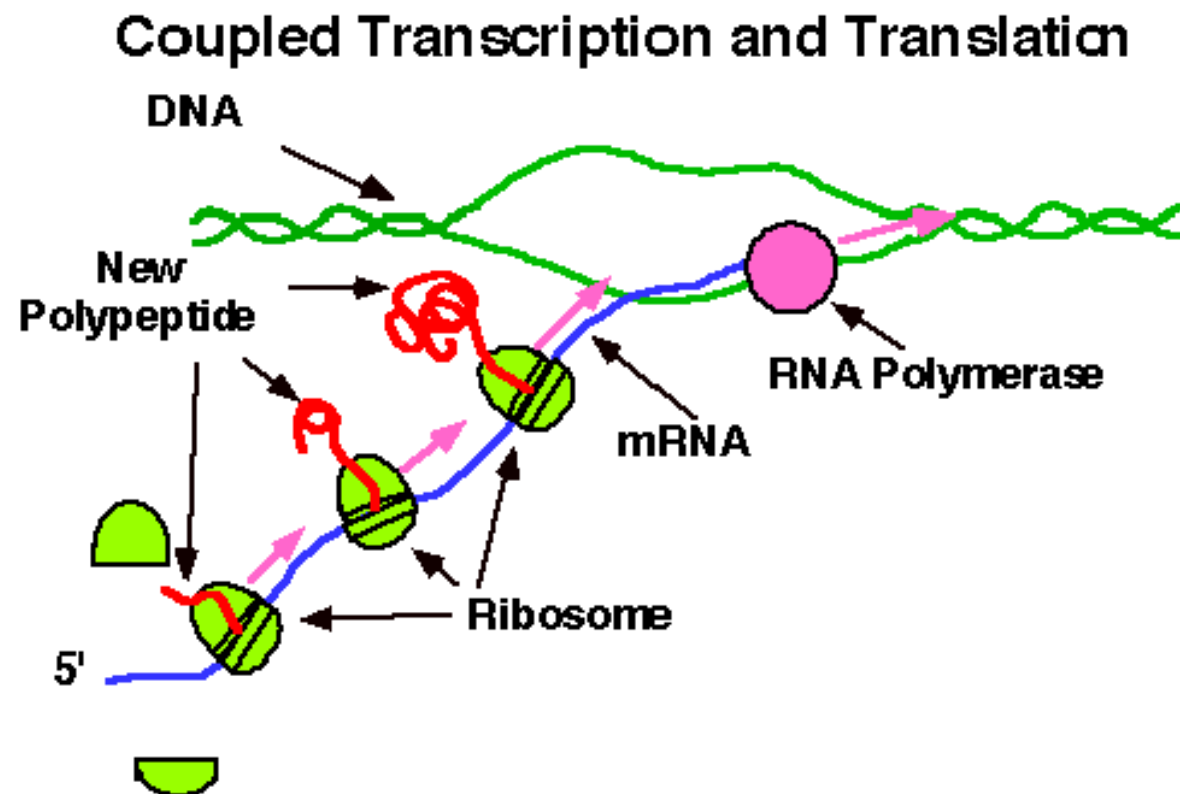
Presente in alcuni mRNA dove interagisce con il tRNA iniziatore

Molti antibiotici inibiscono specifiche fasi della **Sintesi proteica**

La Sintesi proteica nei procarioti che negli eucarioti, viene realizzata attraverso una serie ordinata di eventi, dove il completamento di quello precedente è necessario per l'inizio di quello successivo. Naturalmente, se in qualche modo viene bloccato o inibito uno di questi eventi, l'intero processo si blocca. Il 40% degli antibiotici conosciuti ha come bersaglio l'apparato della **Sintesi proteica**

Antibiotico	Cellule bersaglio	Bersagli molecolari	Conseguenze
tetraciclina	batteri	sito A (30S)	inibisce il legame dell'amminoacil-tRNA
cloramfenicolo	batteri	sito della peptidiltransferasi (50S)	impedisce l'attività peptidiltransferasica
puromicina	cellule procaritiche ed eucariotiche	sito A (50S)	terminatore (funge da accettore del peptide)
cicloesimmide	cellule eucariotiche	sito della peptidiltransferasi (60S)	impedisce l'attività peptidiltransferasica

Nei batteri la trascrizione e **Sintesi proteica** si svolgono contemporaneamente





REGOLAZIONE DELLA ESPRESSIONE GENICA IN PROCARIOTI ED EUCARIOTI

Controllo dell'espressione genica nei procarioti

Geni costitutivi

Geni regolati

Geni inducibili (es. operone Lac)

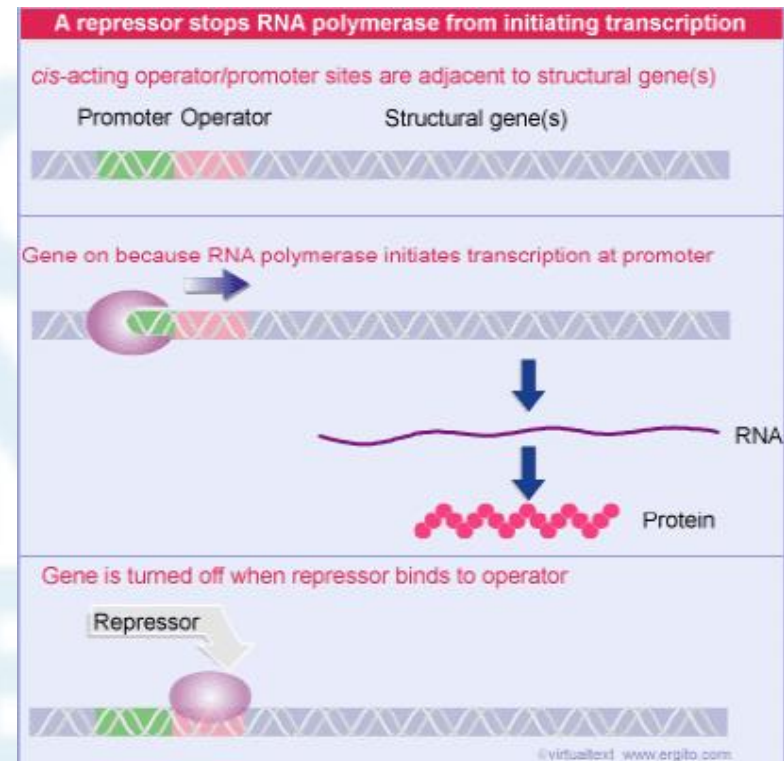
Geni reprimibili (es. operone Trp)

Nella regolazione genica le cellule batteriche devono soddisfare due condizioni:

1. Devono poter attivare o inattivare in modo reversibile la trascrizione di ogni specifico gene o gruppo di geni.
2. Devono essere capaci di riconoscere le condizioni ambientali che richiedono l'attivazione o la repressione di determinati geni

Regolazione negativa

- La regolazione negativa è il modo classico di regolare l'espressione genica nei batteri. Nella regolazione negativa una proteina repressore impedisce ad un gene di essere espresso.
- Nello “stato basale” il gene è espresso grazie al riconoscimento diretto del suo promotore da parte della RNA polimerasi.
- Vicino al promotore c'è un altro sito cis-agente, chiamato operatore, che è il sito bersaglio del repressore.
- Quando il repressore lega l'operatore, la RNA polimerasi non può iniziare la trascrizione e di conseguenza, *non c'è espressione genica*.



Regolazione positiva

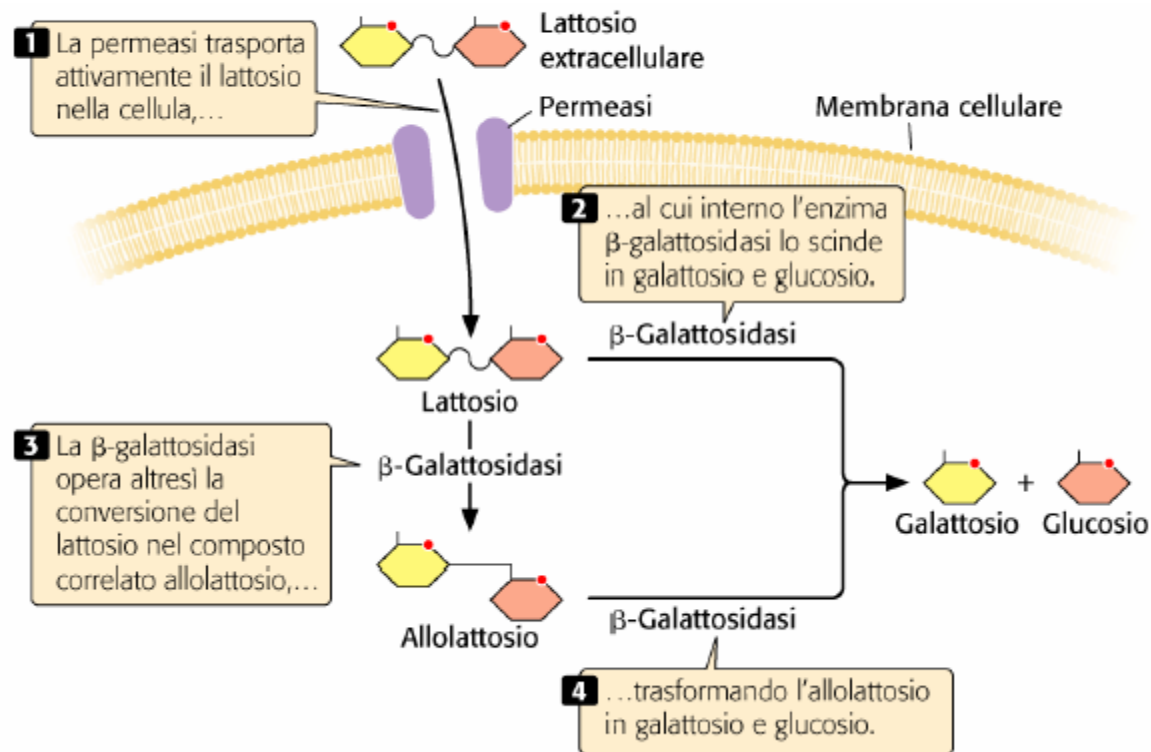
La regolazione positiva viene utilizzata anche dai batteri, ma è la maniera di gran lunga più frequente con cui gli eucarioti regolano l'espressione dei loro geni. • Un fattore di trascrizione è necessario per aiutare la polimerasi ad iniziare la trascrizione.

- Nello stato basale il gene è inattivo e la polimerasi non può iniziare la trascrizione al promotore.
- Uno o più fattori trans-agenti hanno il loro sito bersaglio nelle vicinanze del promotore, ed il loro legame permette alla polimerasi di iniziare la trascrizione.

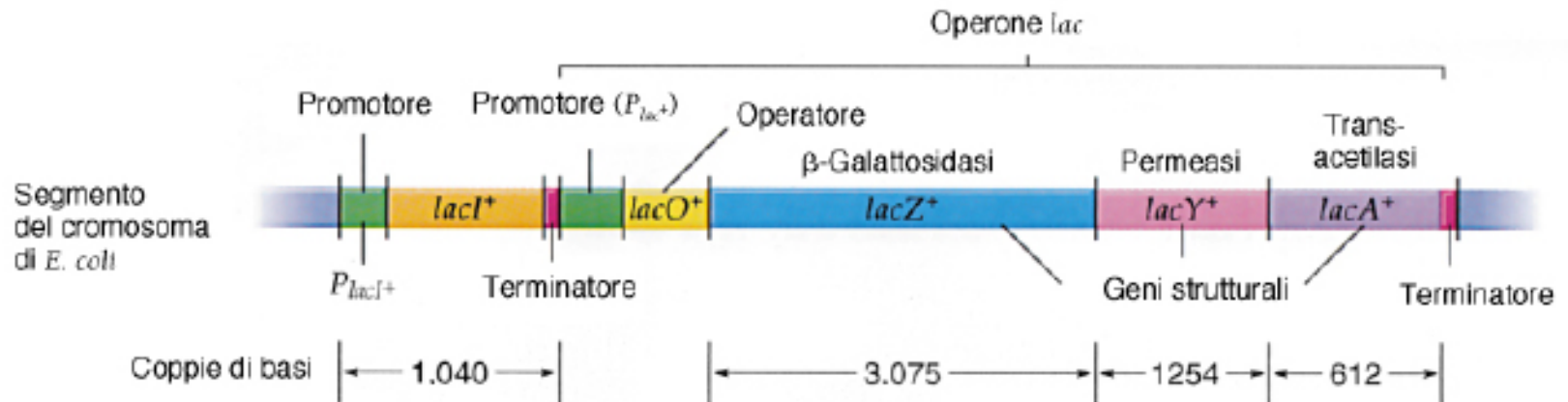
- In entrambi i tipi di regolazione, delle proteine trans-agenti riconoscono delle sequenze cis-agenti.

Una differenza importante tra l'organizzazione genica dei procarioti e quella degli eucarioti è che i geni dei batteri sono organizzati in gruppi (clusters), mentre quelli degli eucarioti sono singoli. Il raggruppamento dei geni permette il controllo coordinato dei geni raggruppati da un solo promotore.

Il metabolismo del lattosio



L'operone *lac* di *E. coli*

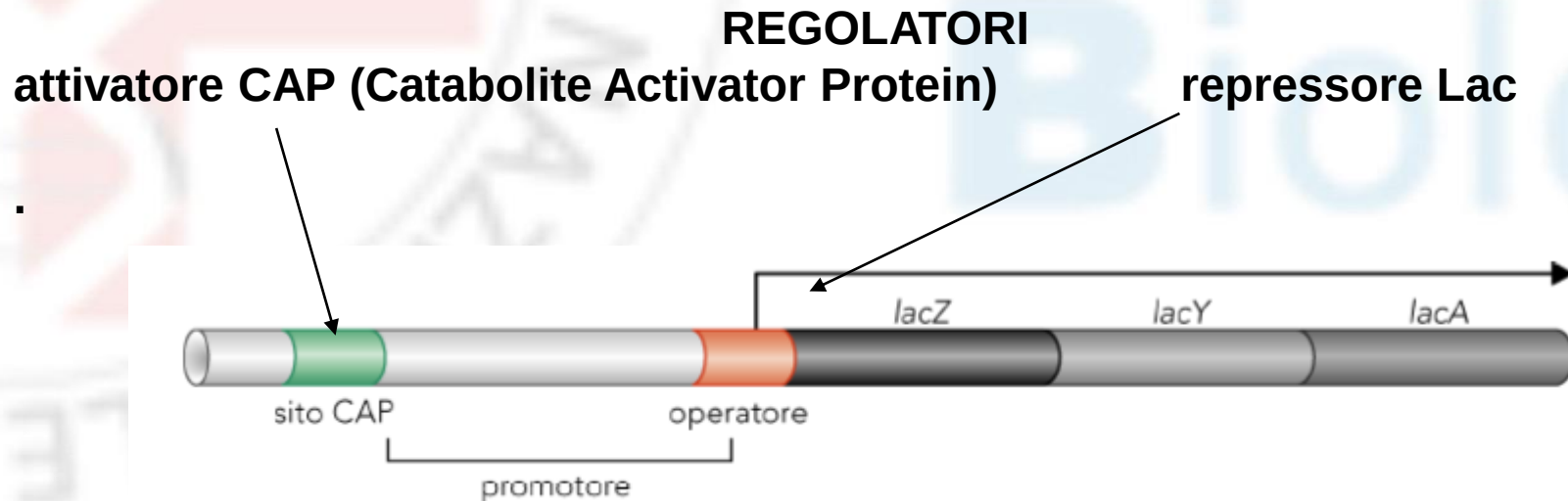


Un operone è una singola unità di trascrizione che comprende una serie di geni strutturali e le relative sequenze di regolazione della trascrizione

***LacZ* → β -galattosidasi (enzima che scinde il lattosio in glucosio e galattosio)**

***lacY* → lattosio permeasi (facilita l'ingresso del lattosio nella cellula)**

***lacA* → tiogalattoside transacetilasi (libera la cellula dai tiogalattosidi tossici che vengono importati dal prodotto di *lacY*).**



Induzione: sintesi di enzimi in risposta alla comparsa di un substrato specifico

Cellule di *E. coli*, in assenza di lattosio, contengono poche molecole di β -galattosidasi (<5)

In presenza di lattosio , nel giro di pochi minuti, vengono sintetizzate fino a 5000 molecole di β -galattosidasi (5-10% delle proteine totali)

La molecola che causa la produzione dell'enzima capace di metabolizzarla è chiamata **induttore**

La capacità di agire da induttore è altamente specifica. Molecole strutturalmente affini al lattosio possono agire da induttori della β -galattosidasi ma non vengono metabolizzate: una molecola con questa caratteristica è chiamata **induttore gratuito** (IPTG)

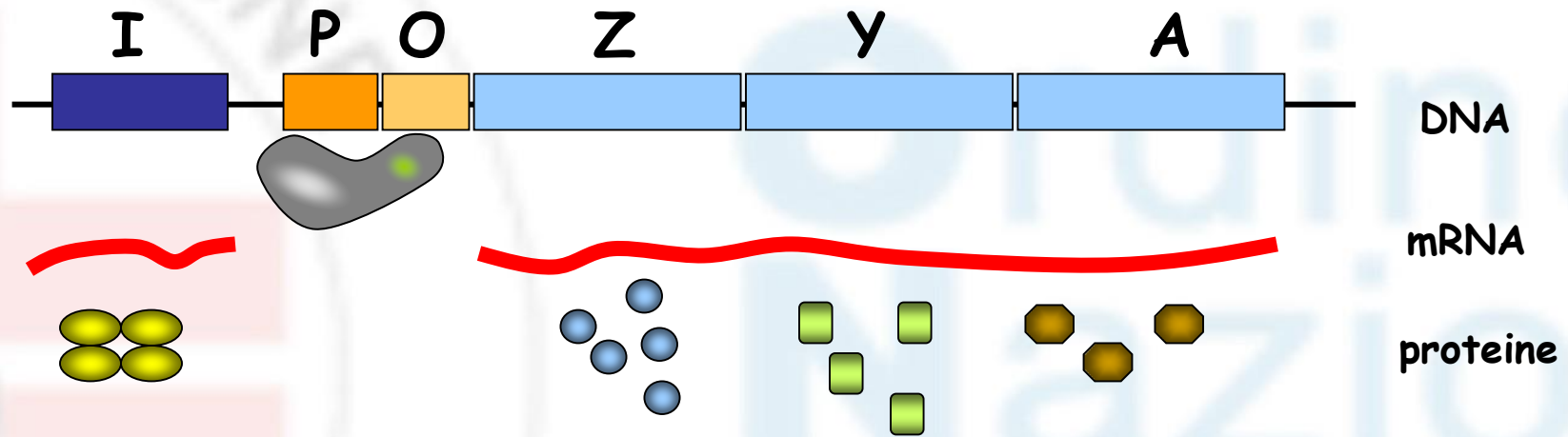
Se l'induttore è rimosso la sintesi degli enzimi si blocca

Il repressore dell'operone Lac

Il repressore dell'operone lac è una proteina con due siti legame: un sito per il legame dell'induttore e un sito per il legame dell'operatore

Il repressore dell'operone lac è una proteina **allosterica** poiché il legame con l'induttore causa una transizione **allosterica** ossia il passaggio da una conformazione ad un'altra che abbassa l'affinità del repressore per l'operatore

L'operone lac



Geni strutturali

lacZ: β -galattosidasi

lacY: β -galattoside permeasi

lacA: β -galattoside transacetilasi

mRNA policistronico

regolazione coordinata: tutti i geni si esprimono

all'unisono

Il gene regolatore *lacI* codifica per la proteina regolatrice (repressore)

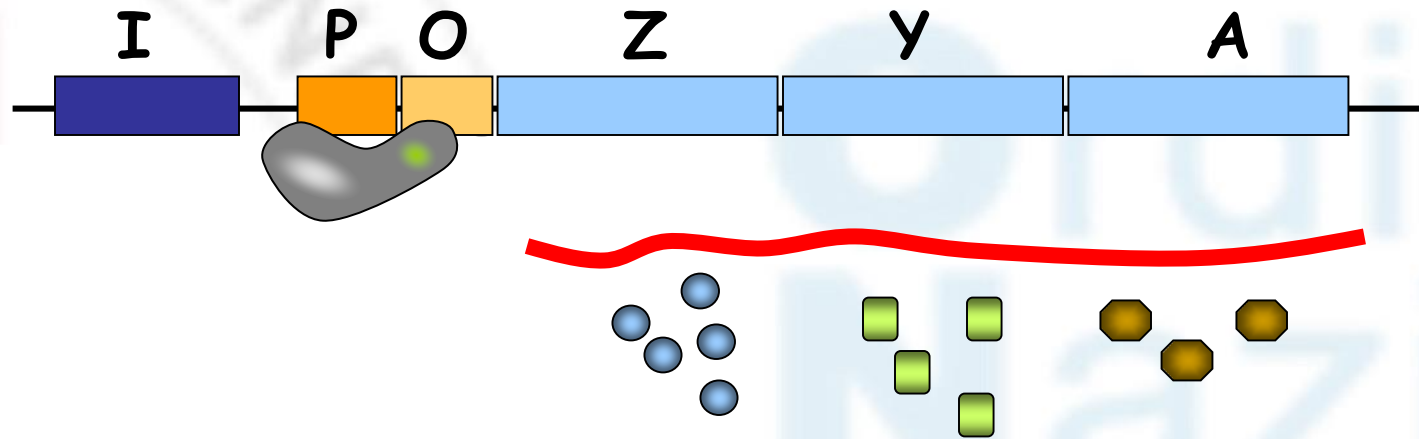


L'operone lac è sottoposto a **regolazione negativa**

In presenza della proteina regolatrice è bloccata la trascrizione dei geni strutturali.

La proteina regolatrice prende il nome di **repressore**

In che modo l'operone lac risponde all'induttore?



Il repressore ha **due** siti di legame: un sito per il legame all'operatore e il secondo per il legame dell'induttore

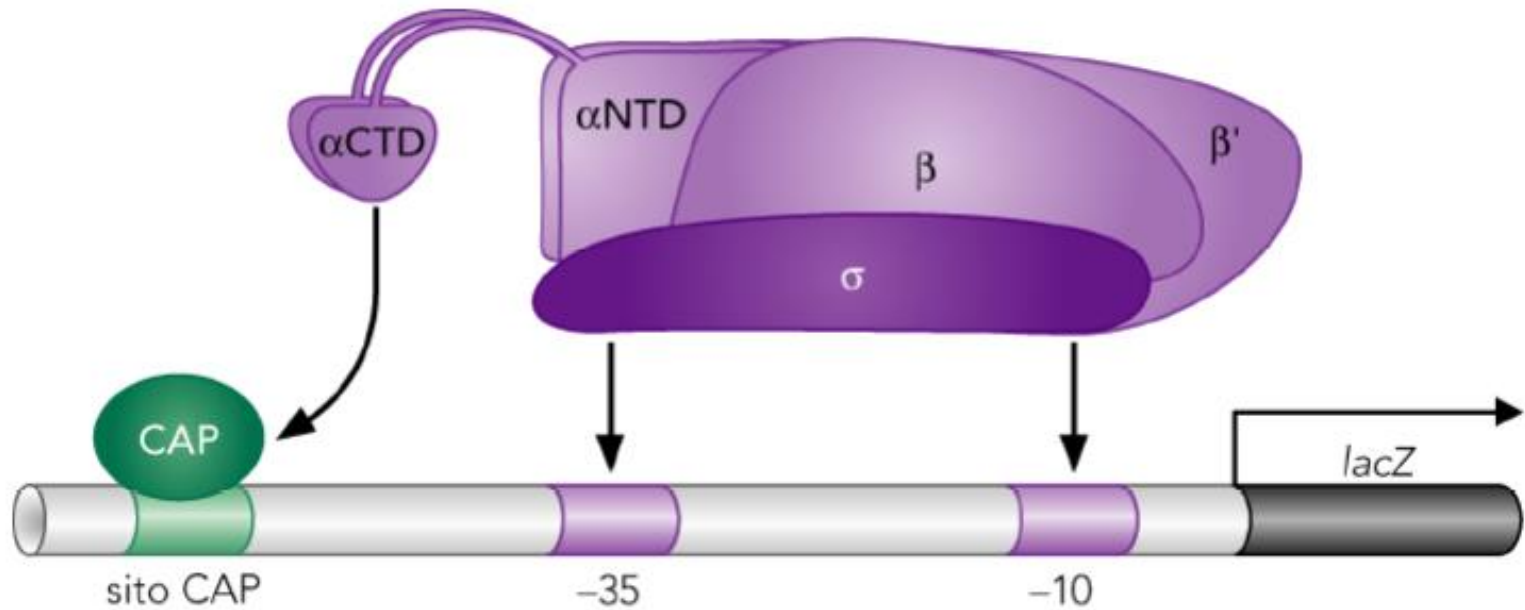
Quando il repressore lega l'induttore subisce una modificazione conformazionale che porta ad una diminuita affinità per il sito operatore (esempio di **controllo allosterico**)

Repressione da catabolita

- Quando un batterio cresce in un mezzo contenente **glucosio** come risorsa di energia, la sintesi di enzimi catabolici non correlati viene inibita
- In presenza di diverse fonti di energia, il batterio sceglie per prima quella più facilmente utilizzabile
- Gli enzimi per il catabolismo del glucosio sono costitutivi
- Circa 300 geni di *E. coli* sono regolati mediante repressione da catabolita

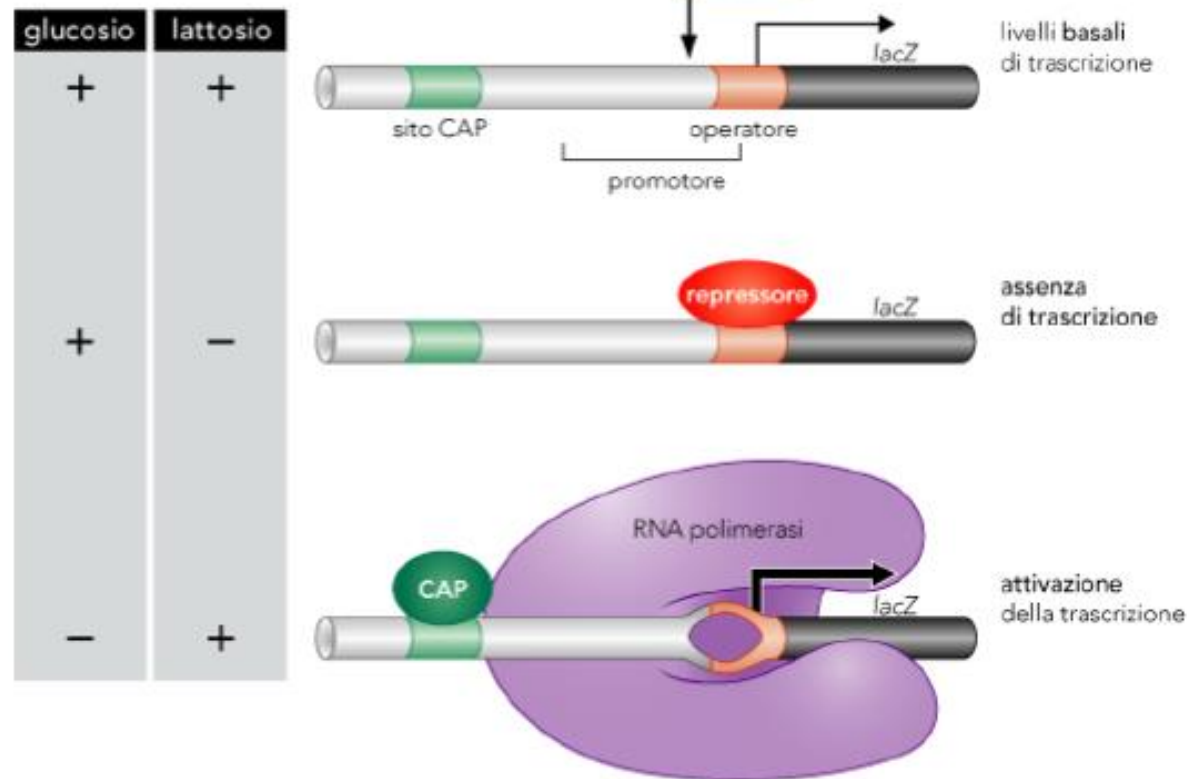
CAP si lega al DNA e attiva la RNA polimerasi

L'attivatore CAP contiene un sito in grado di mediare il legame al DNA ed un altro sito, che interagendo con il dominio α -CTD, attiva la RNA polimerasi. Il sito CAP in qualche modo mima l'elemento UP dei promotori batterici.



L'operone *lac*

L'attività della proteina CAP e del repressore dipende dalle concentrazioni cellulari di glucosio (CAP) e lattosio (repressore).



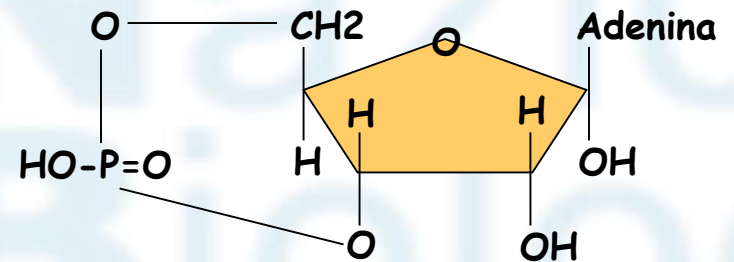
La molecola effettrice della repressione da catabolita è **AMP ciclico**

ATP



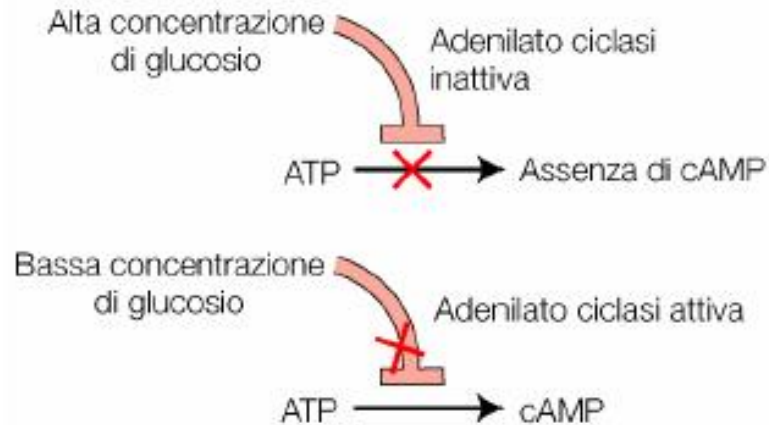
Adenilato ciclastasi

AMP ciclico



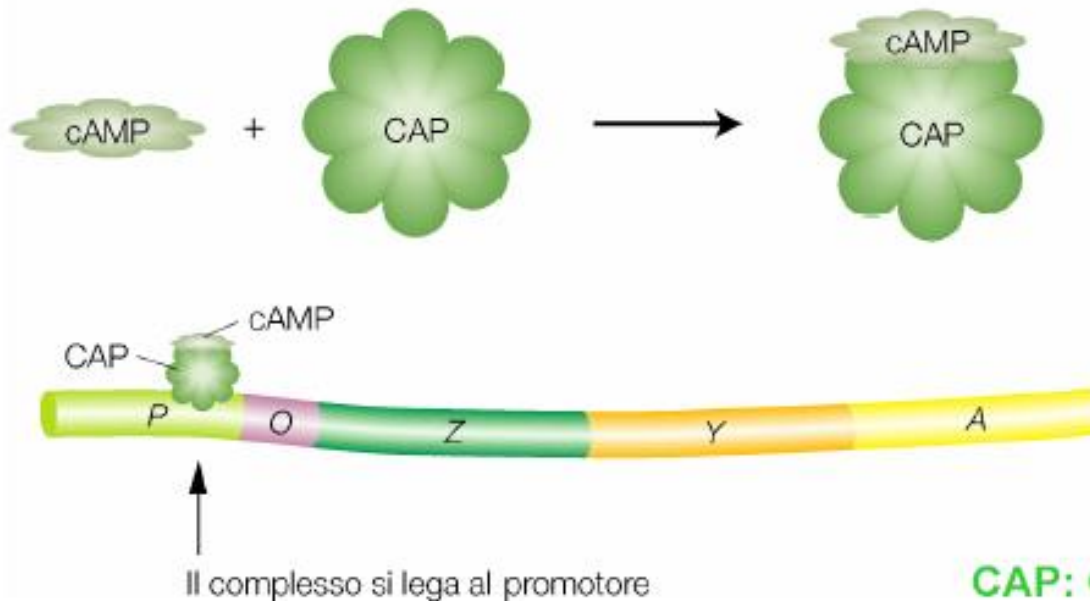
Il glucosio inibisce l'attività dell'adenilato ciclastasi e il livello di cAMP

(a) **La concentrazione di glucosio regola la concentrazione del cAMP**



**Controllo positivo
del lac operon
Repressione da
cataboliti**

(b) **Il complesso cAMP-CAP attiva la trascrizione**



CAP: Catabolite Activator Protein

Differenze della regolazione genica fra procarioti ed eucarioti

- Dimensione e complessità del genoma
- Compartimentazione del genoma
- Organizzazione strutturale del genoma
- Stabilità dell'mRNA
- Modificazione post-traduzionale delle proteine
- Turnover delle proteine

La regolazione dell'espressione genica

- Nei procarioti:
 - un'espressione genica selettiva permette alle cellule di risparmiare energia
 - La regolazione avviene prevalentemente a livello trascrizionale
- Negli eucarioti:
 - l'espressione genica selettiva permette alle cellule di svolgere ruoli specializzati
 - La regolazione avviene a vari livelli

La regolazione dell'espressione genica



Tutte le cellule di un organismo multicellulare possiedono tutti i geni della propria specie; tuttavia solo una piccolissima frazione è attiva in ogni cellula; per esempio, in una cellula delle isole del pancreas è attivo il gene per l'insulina, non quelli per l'emoglobina (attivi nelle cellule del midollo osseo, progenitrici dei globuli rossi) o per la pepsina (attivi nelle cellule della mucosa gastrica)

Durante lo sviluppo embrionale di un organismo multicellulare, le cellule destinate a costituire i diversi tessuti e organi attivano in momenti precisi i geni che codificano le proteine che stimolano o inibiscono la proliferazione cellulare e quelle caratteristiche del tessuto in formazione (per esempio osseina per le ossa, cheratina per la pelle)

Anche gli organismi unicellulari hanno bisogno di attivare alcuni geni solo in particolari circostanze (per esempio la presenza di un nutrimento che richiede particolari enzimi) per non sprecare l'energia e le molecole necessarie

Le cellule tumorali hanno perduto, anche in seguito a mutazioni somatiche, la capacità di regolare l'espressione genica relativa alle proteine che controllano la proliferazione cellulare

Dunque nelle prossimità dei geni ci devono essere recettori in grado di percepire segnali provenienti dall'ambiente esterno e veicolati all'interno della cellula; tali recettori devono quindi segnalare ai geni se trascrivere o no, in funzione dei segnali provenienti dall'esterno

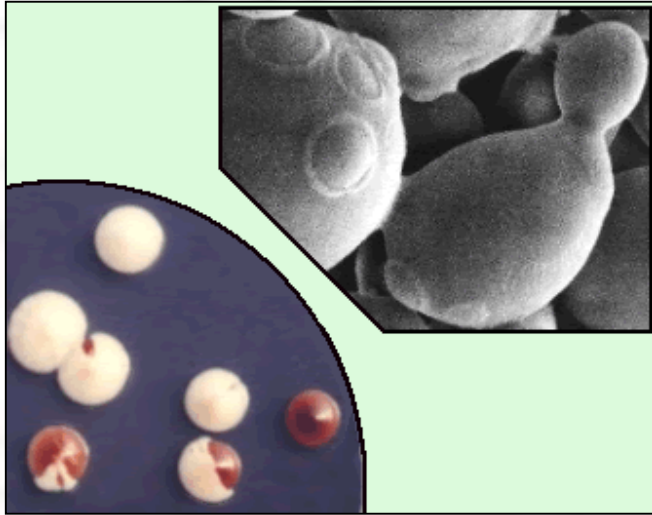
ESPRESSIONE DEL GENOMA UMANO NELLE CELLULE DIFFERENZIATE

Tutte le cellule di un organismo hanno lo stesso corredo genomico (~40000 geni)

L'espressione genica tessuto specifica determina il fenotipo morfo-funzionale dei tipi cellulari e tissutali

In ogni cellula differenziata ed in ogni particolare momento dello sviluppo è attivo solo un sottoinsieme di geni

Saccharomyces cerevisiae



È il primo genoma eucariotico ad essere stato sequenziato

Genoma di circa 13Mbp

Codifica circa 6000 proteine

Caenorhabditis elegans



È il primo animale il cui genoma è stato sequenziato

Genoma di circa 100 Mbp

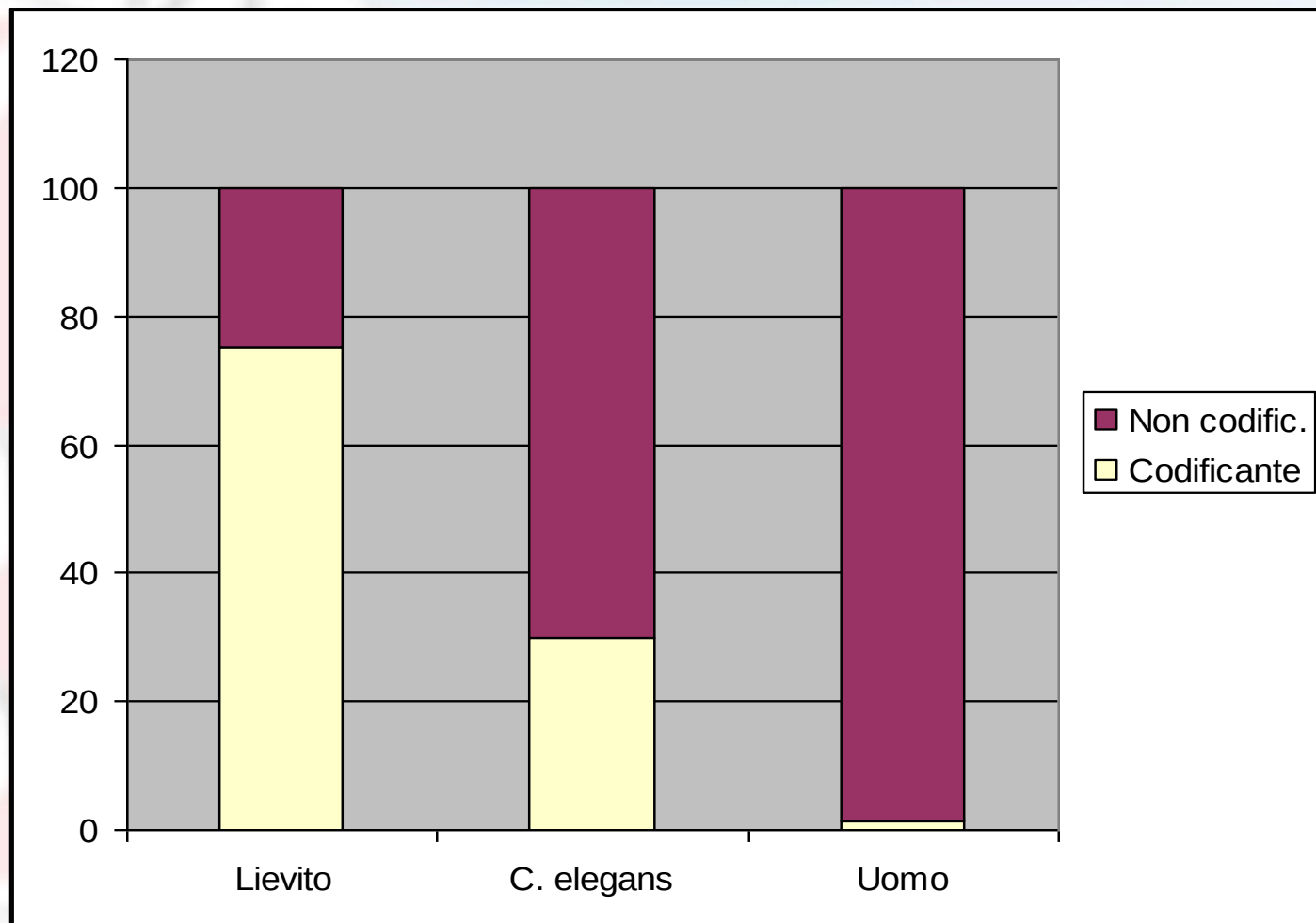
Codifica circa 19000 proteine

Homo sapiens

Genoma di oltre 3000 Mbp

Codifica 30000-40000 proteine







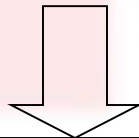
**Per realizzare una
struttura complessa non
servono necessariamente
tanti pezzi diversi, ma
serve un progetto.**

Cellula umana contiene circa 30000 geni



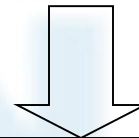
Geni per proteine

Ogni cellula in un determinato momento esprime solo una piccola parte di questo potenziale (~ 5000 geni)

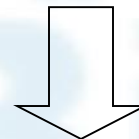


Geni housekeeping

specifici
metabolismo
biosintesi
membrana
istoni
ribosomali



Geni tessuto -



**DIFFERENZIAMENTO
CELLULARE**

**A QUESTA ESPRESSIONE SELETTIVA NON CORRISPONDE (IN
GENERE) UNA VARIAZIONE DEL CONTENUTO DI DNA**

- a seconda delle combinazioni di geni che sono attivi in ciascuna cellula: differenziamento cellulare (tipi di proteine diverse)
- specifica struttura e funzione.

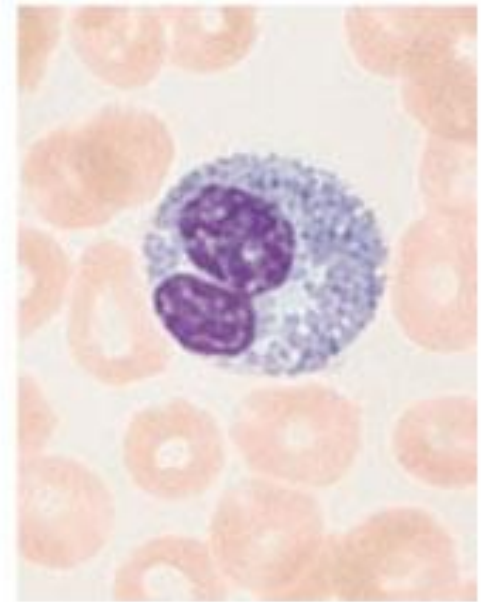
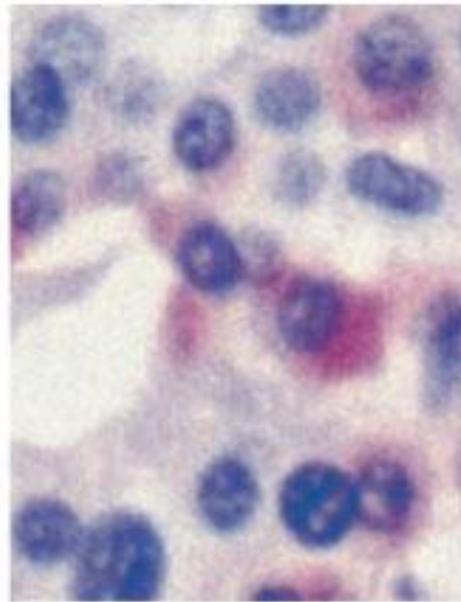
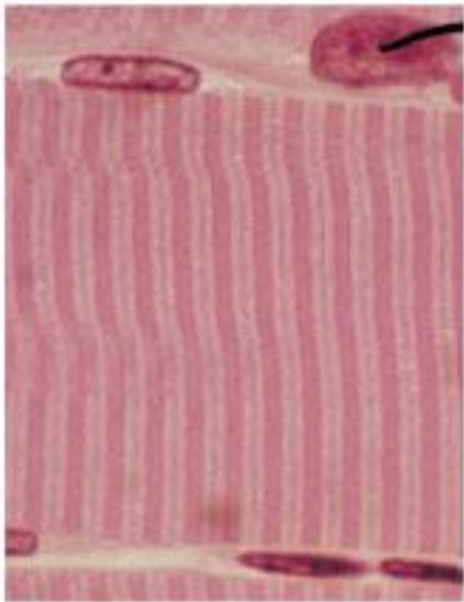


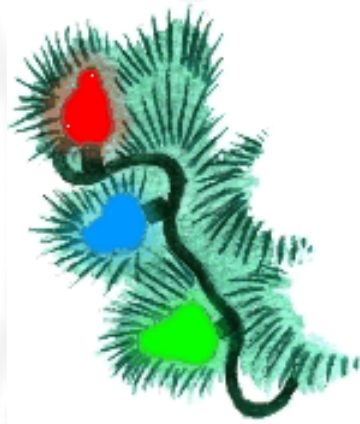
Figura 11.2

Cellule muscolari

Cellule del pancreas

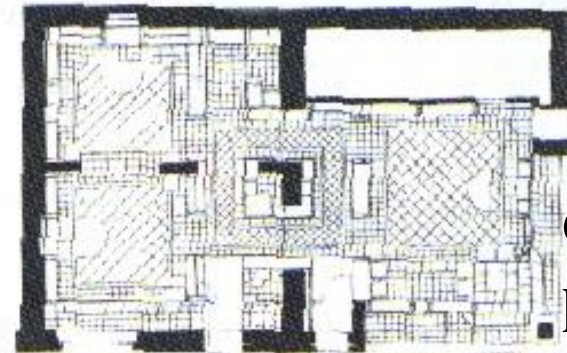
Cellule del sangue

Immagine mentale della attivazione dei geni lungo il DNA:
I geni lungo il DNA sono come “luci di Natale” lungo la matassa dei fili: si accendono e si spengono ad intermittenza e con una intensità che va da MASSIMA luminosità a MINIMA luminosità e può essere modulata cioè regolata



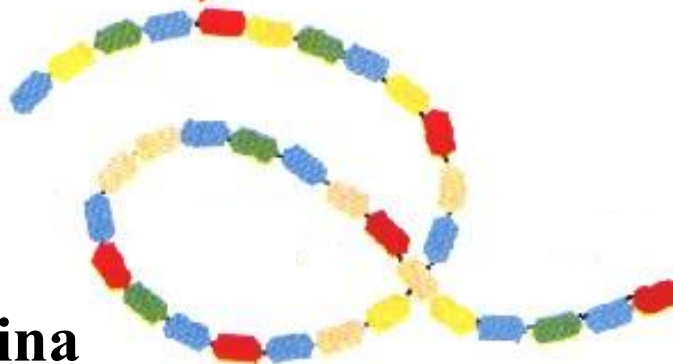
ESPRESSIONE DELLA INFORMAZIONE BIOLOGICA

DNA



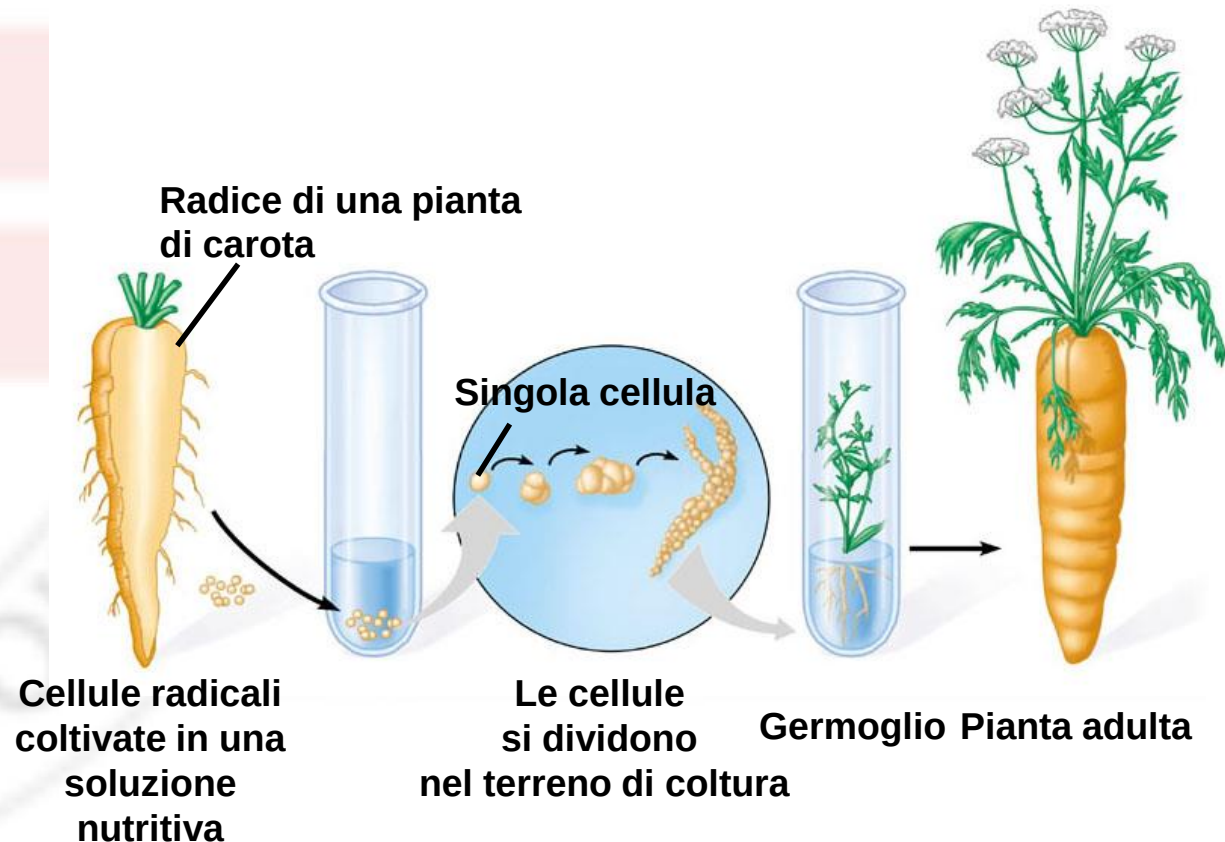
dal
progetto

proteina



alla
costruzione

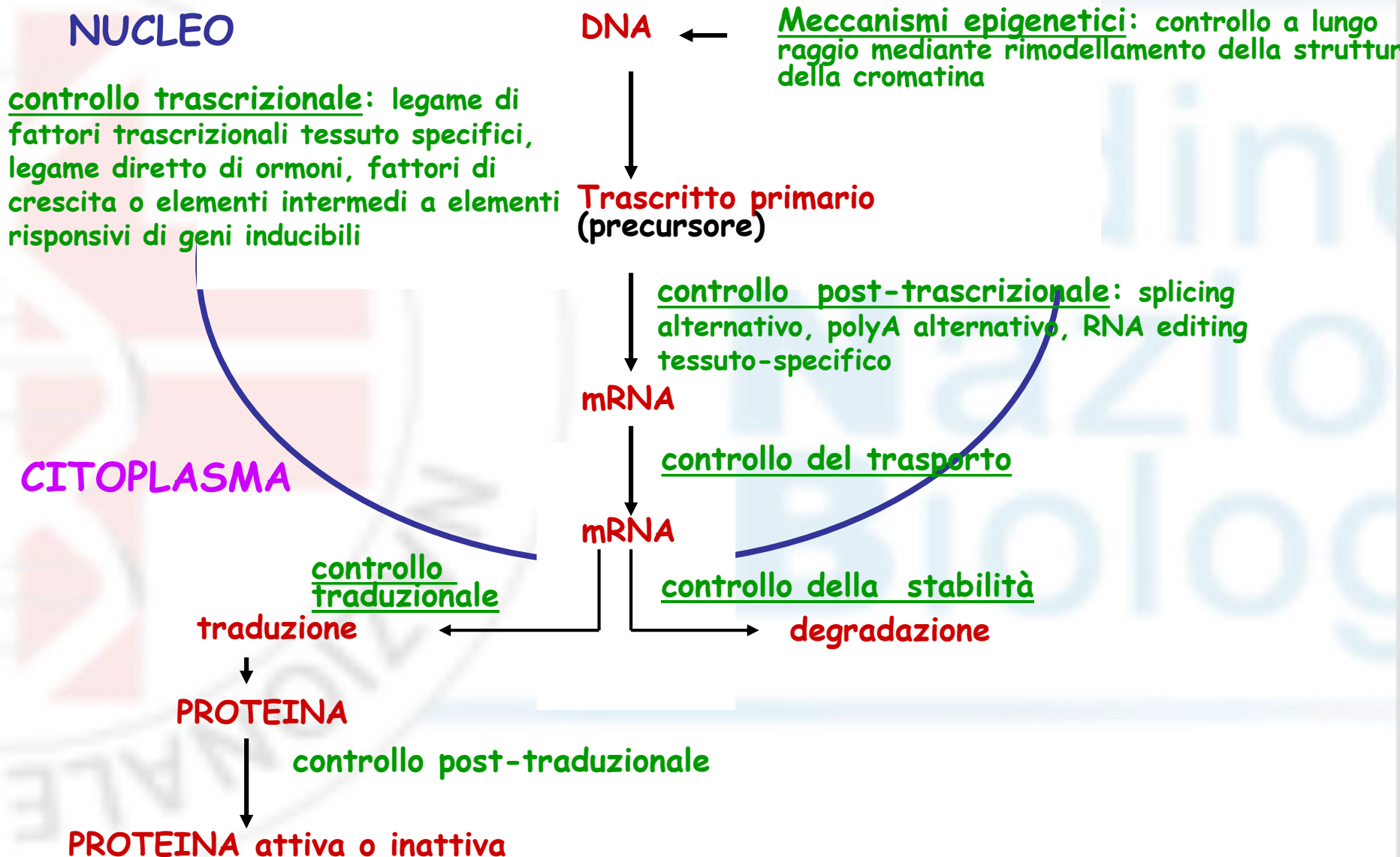
- Le cellule differenziate possono conservare tutto il loro potenziale genetico
- Le cellule differenziate esprimono solo una piccola percentuale dei loro geni.



La regolazione dell'espressione genica può avvenire a più livelli:

- **•Stato della Cromatina**
- **•Trascrizione**
- **•Post-trascrizione**
- **•Traduzione**
- **•Post-traduzionale sull'attività delle proteine**

Esistono molteplici livelli di regolazione dell'espressione genica negli eucarioti





Grazie per l'attenzione