

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO
CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE

CORSO MONODISCIPLINARE DI
BIOCHIMICA (6 CFU)

Roberto Giacomini Stuffer

IL CORSO MONODISCIPLINARE DI
"BIOCHIMICA"
È SUDDIVISO IN DUE UNITÀ DIDATTICHE:

- A) LE MOLECOLE BIOLOGICHE
- B) ENZIMOLOGIA ED ELEMENTI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

L'UNITÀ DIDATTICA "LE MOLECOLE BIOLOGICHE"
COMPRENDE:

- 1) I LIPIDI
- 2) I CARBOIDRATI
- 3) GLI AMMINOACIDI E LE PROTEINE
- 4) LE PROTEINE DEL CONNETTIVO
- 5) LA MIOGLOBINA E L'EMOGLOBINA

L'UNITÀ DIDATTICA "ENZIMOLOGIA ED ELEMENTI
DI BIOLOGIA MOLECOLARE" COMPRENDE:

- 1) ENZIMOLOGIA
- 2) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEI PROCARIOTI
- 3) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEGLI EUCARIOTI
- 4) L'EVOLUZIONE

UNITÀ DIDATTICA
"ENZIMOLOGIA ED ELEMENTI DI BIOLOGIA
MOLECOLARE"

BIOTEC.

UNITÀ DIDATTICA "ENZIMOLOGIA ED ELEMENTI DI BIOLOGIA MOLECOLARE"

LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEI PROCARIOTI

Roberto Giacomini Stuffer

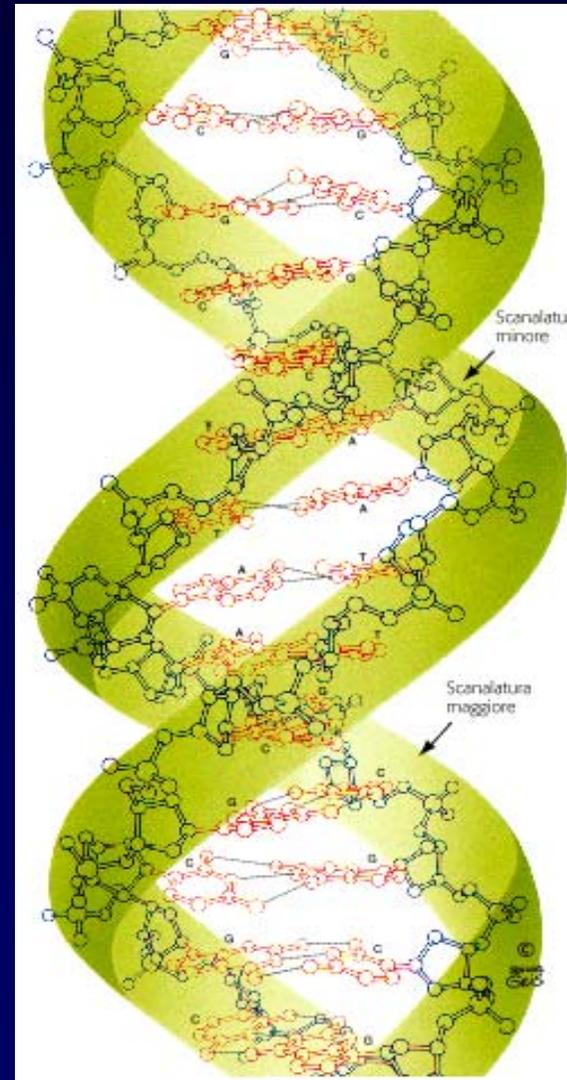
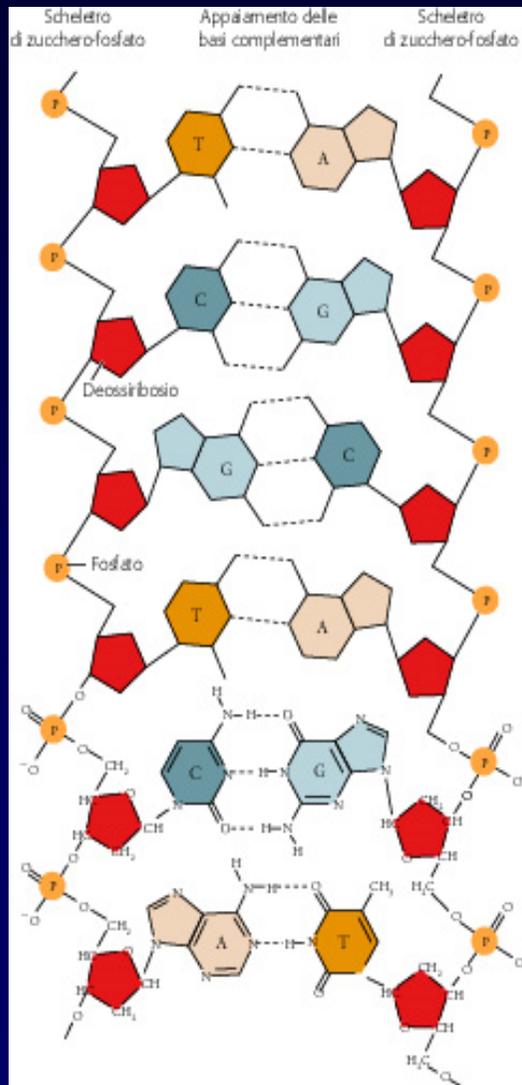
1. Gli acidi nucleici
2. La replicazione del DNA
3. La sintesi dell'RNA
4. La sintesi proteica

GLI ACIDI NUCLEICI

GLI ACIDI NUCLEICI

Sono i costituenti più fondamentali e importanti delle cellule, custodiscono e trasferiscono l'informazione genetica, regolano la produzione di proteine e le loro funzioni.

LA STRUTTURA DEL DNA



GLI ACIDI NUCLEICI

Esistono due tipi di acidi nucleici:

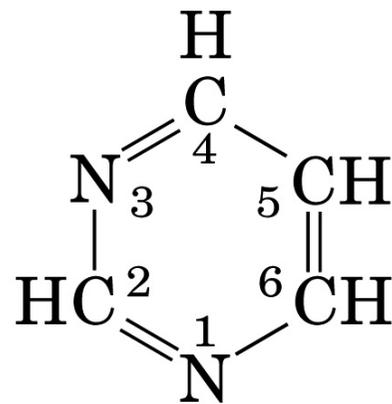
l'acido ribonucleico (RNA),
l'acido deossiribonucleico (DNA);

ciascuno di essi è una catena polimerica con unità monomeriche simili, unite da legami covalenti,

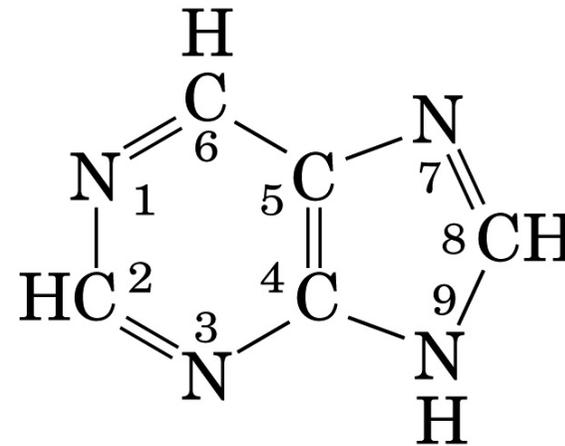
l'RNA ha come zucchero il ribosio,
il DNA ha il 2-deossiribosio;

le basi degli acidi nucleici sono di due tipi: purine e pirimidine.

LE BASI AZOTATE



Pyrimidine



Purine

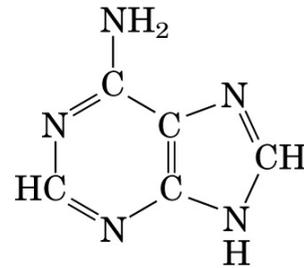
(b)

Le basi portano l'informazione genetica.

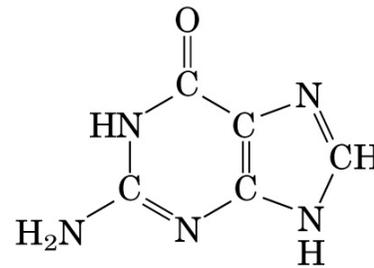
LE BASI AZOTATE



Le purine:
Adenina
Guanina.

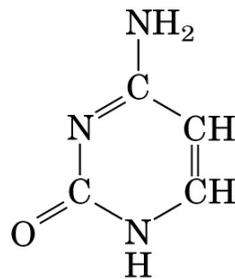


Adenine

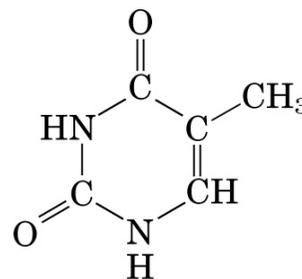


Guanine

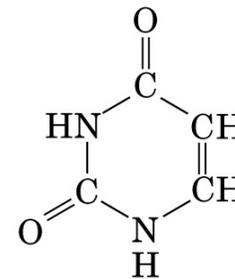
Purines



Cytosine



Thymine
(DNA)



Uracil
(RNA)

Pyrimidines

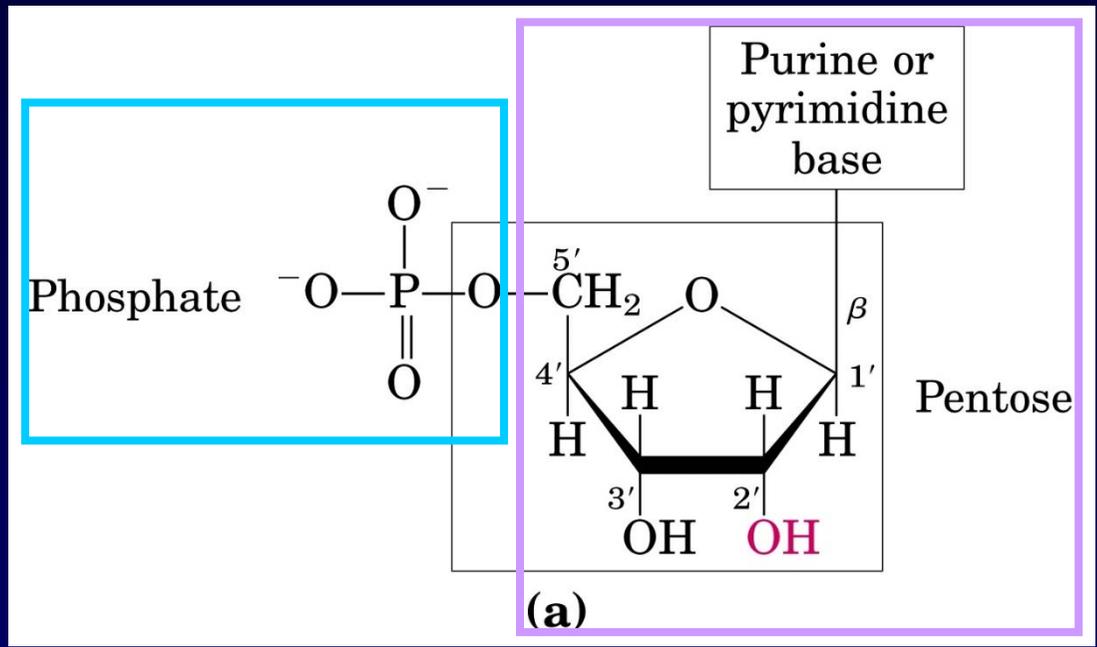
Le pirimidine:
Citosina
Timina
Uracile.



I NUCLEOSIDI



base azotata + zucchero



I NUCLEOTIDI



base azotata + zucchero + fosfato

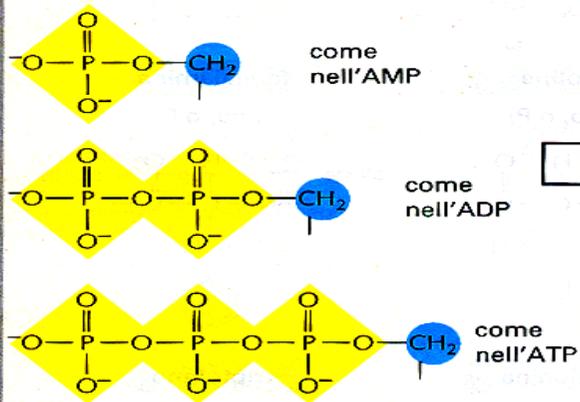
NUCLEOSIDI E NUCLEOTIDI

- Un nucleoside é formato da una base e da uno zucchero,
- un nucleotide é un estere fosforico di un nucleoside,
- il composto si chiama nucleoside 5-fosfato o 5' nucleotide;
- gli zuccheri ed i gruppi fosfato hanno un ruolo strutturale,
- le basi azotate portano l'informazione genetica.

NUCLEOSIDI E NUCLEOTIDI

FOSFATI

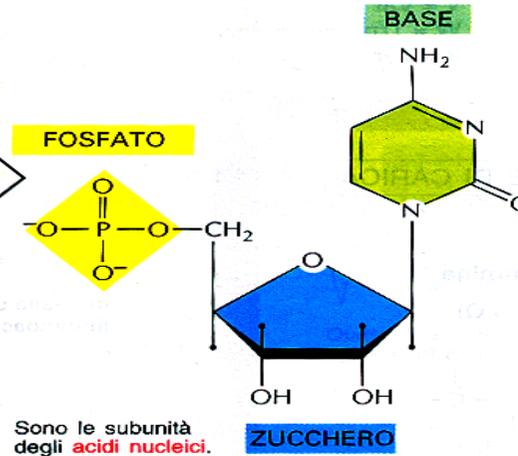
I fosfati sono normalmente uniti al gruppo ossidrilico in C5 del ribosio o del deossiribosio. Sono comuni i mono-, i di- e i trifosfati.



Il fosfato rende un nucleotide carico negativamente.

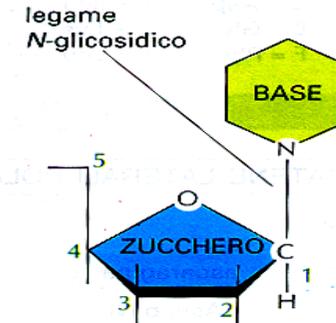
NUCLEOTIDI

Un nucleotide consiste di una base contenente azoto, uno zucchero a 5 atomi di carbonio e uno o più gruppi fosfato.



Sono le subunità degli **acidi nucleici**.

LEGAME FRA BASE E ZUCCHERO

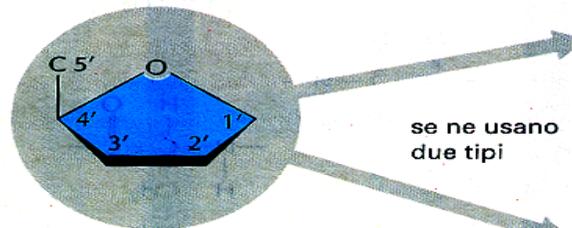


La base è legata allo stesso atomo di carbonio (C1) usato nei legami zucchero-zucchero.

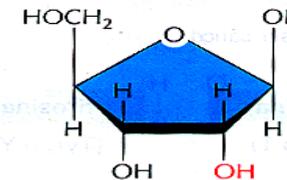
ZUCCHERI

PENTOSIO

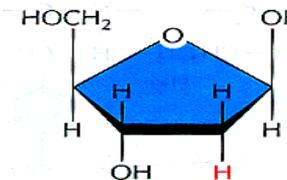
uno zucchero a 5 atomi di carbonio



se ne usano due tipi



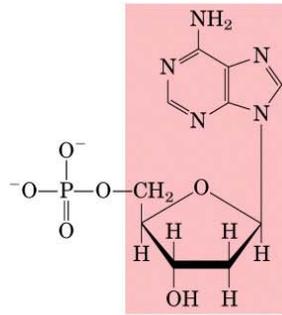
β-D-RIBOSIO
usato nell'acido ribonucleico



β-D-2-DEOSSIRIBOSIO
usato nell'acido deossiribonucleico

Ciascun carbonio numerato dello zucchero di un nucleotide è seguito da un segno primo ('); si parla quindi di «carbonio 5 primo» ecc.

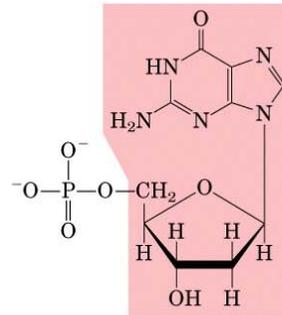
DNA: I DEOSSIRIBONUCLEOTIDI



Nucleotide: Deoxyadenylate
(deoxyadenosine
5'-monophosphate)

Symbols: A, dA, dAMP

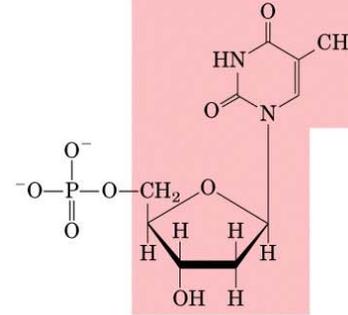
Nucleoside: Deoxyadenosine



Nucleotide: Deoxyguanylate
(deoxyguanosine
5'-monophosphate)

Symbols: G, dG, dGMP

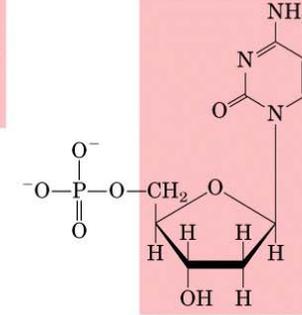
Nucleoside: Deoxyguanosine



Nucleotide: Deoxythymidylate
(deoxythymidine
5'-monophosphate)

Symbols: T, dT, dTMP

Nucleoside: Deoxythymidine



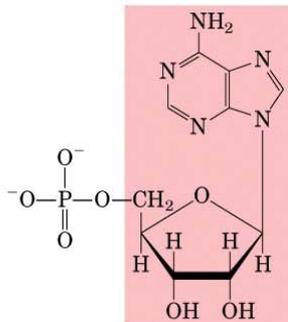
Nucleotide: Deoxycytidylate
(deoxycytidine
5'-monophosphate)

Symbols: C, dC, dCMP

Nucleoside: Deoxycytidine

(a) Deoxyribonucleotides

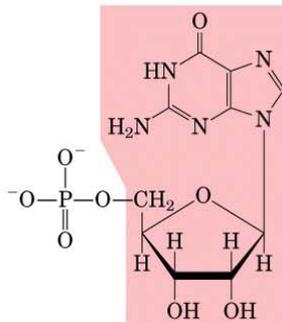
RNA: I RIBONUCLEOTIDI



Nucleotide: Adenylate (adenosine
5'-monophosphate)

Symbols: A, AMP

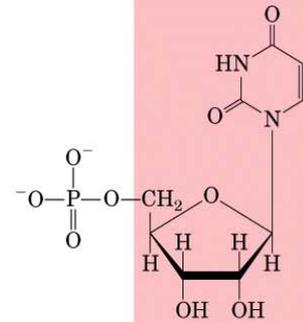
Nucleoside: Adenosine



Nucleotide: Guanylate (guanosine
5'-monophosphate)

Symbols: G, GMP

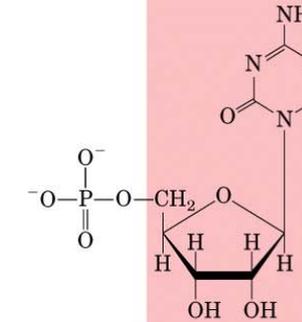
Nucleoside: Guanosine



Nucleotide: Uridylate (uridine
5'-monophosphate)

Symbols: U, UMP

Nucleoside: Uridine



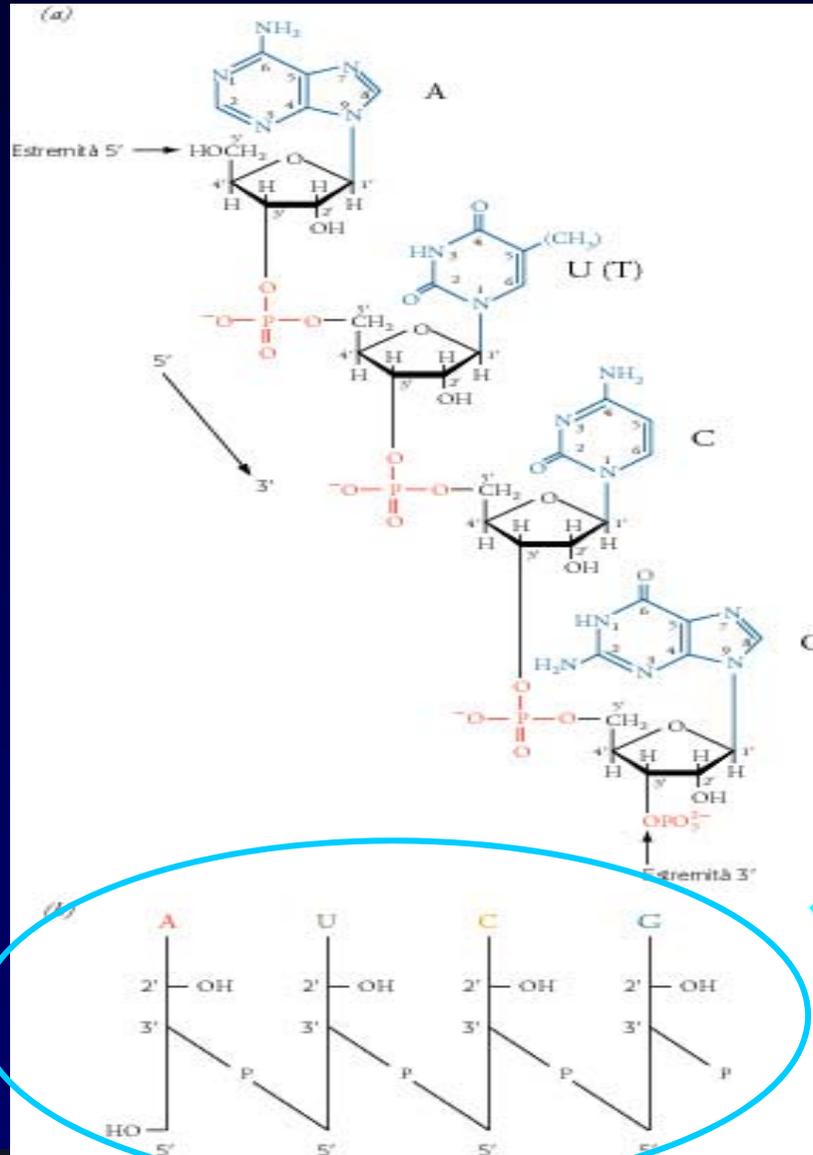
Nucleotide: Cytidylate (cytidine
5'-monophosphate)

Symbols: C, CMP

Nucleoside: Cytidine

(b) Ribonucleotides

LA RAPPRESENTAZIONE DELLA SEQUENZA NUCLEOTIDICA



La catena ha una polarità.

La linea nera verticale indica lo zucchero,

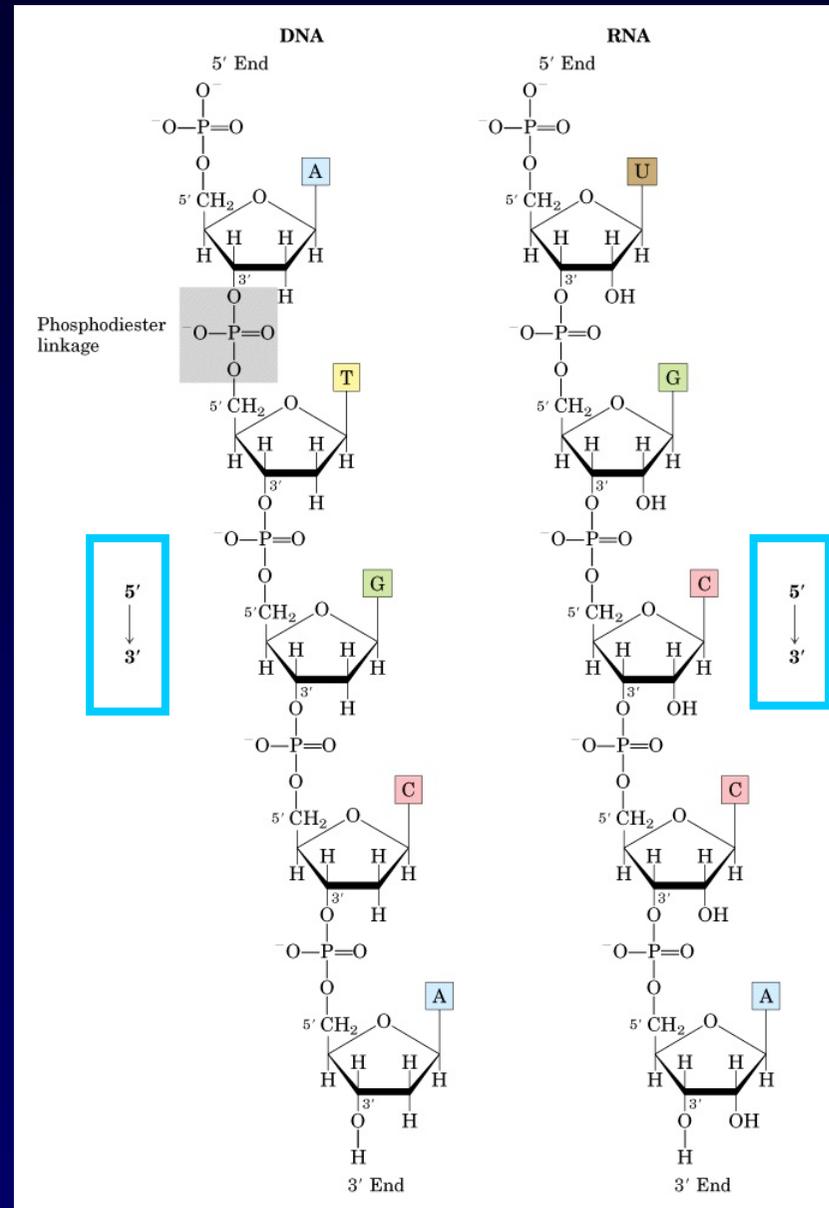
A, G, T, C indicano le basi,

P, nella linea diagonale, indica il legame fosfodiester.

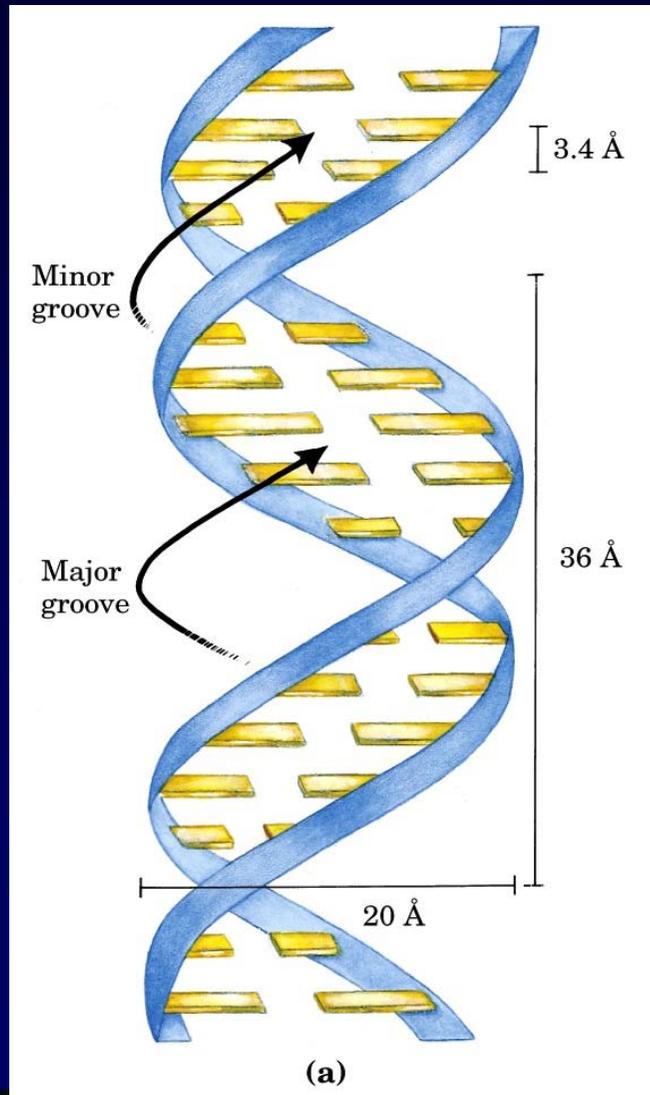
DNA ed RNA

Nel DNA e nell'RNA i ponti fosfodiesterici legano le unità nucleotidiche,

lo scheletro covalente (pentosi e gruppi fosforici) ha caratteristiche fortemente polari, mentre le basi sono non polari ed idrofobiche.



LA STRUTTURA DEL DNA: IL MODELLO DI WATSON E CRICK (1953)



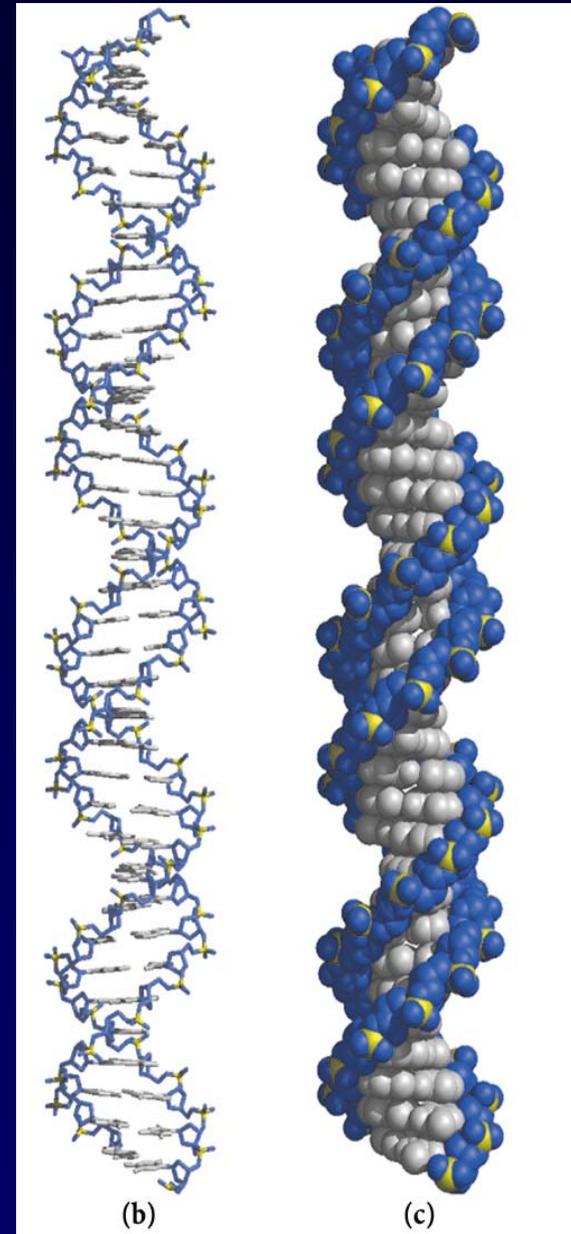
Il DNA è una doppia elica con due filamenti antiparalleli,

ogni giro di elica è costituito da 10 coppie di basi,

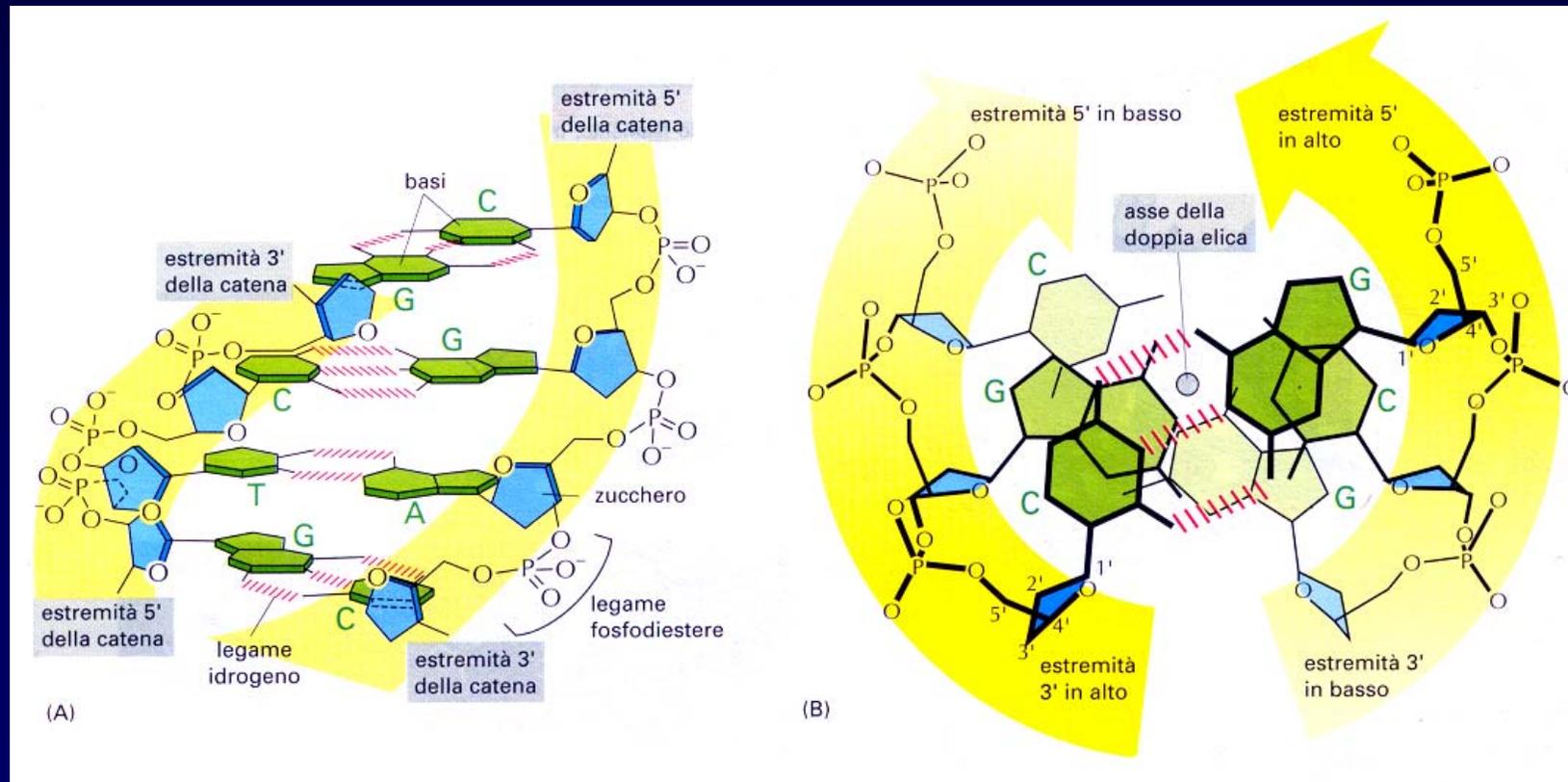
le due catene sono complementari l'una all'altra.

LA STRUTTURA DEL DNA

- 1) Le due eliche sono avvolte attorno ad un asse comune e le catene corrono in direzioni opposte,
- 2) il piano delle basi è perpendicolare all'asse dell'elica,
- 3) il diametro del DNA è di 20\AA ,
- 4) le catene sono unite da legami H,
- 5) la doppia elica è destrorsa.

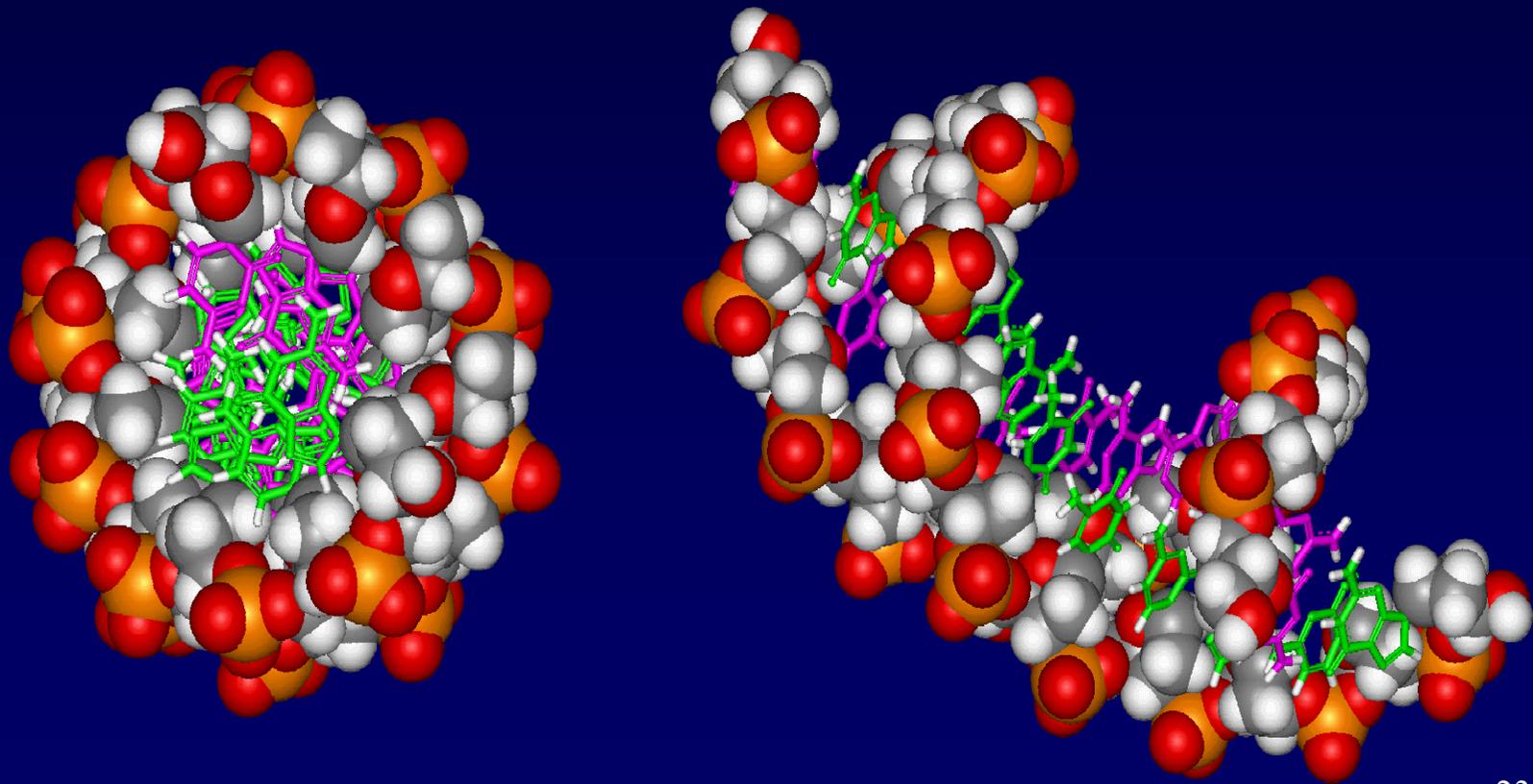


LE BASI SI TROVANO ALL'INTERNO DELL'ELICA, MENTRE I FOSFATI SONO ALL'ESTERNO; IL PIANO DEGLI ZUCCHERI È QUASI PERPENDICOLARE A QUELLO DELLE BASI.



LA STRUTTURA DEL DNA

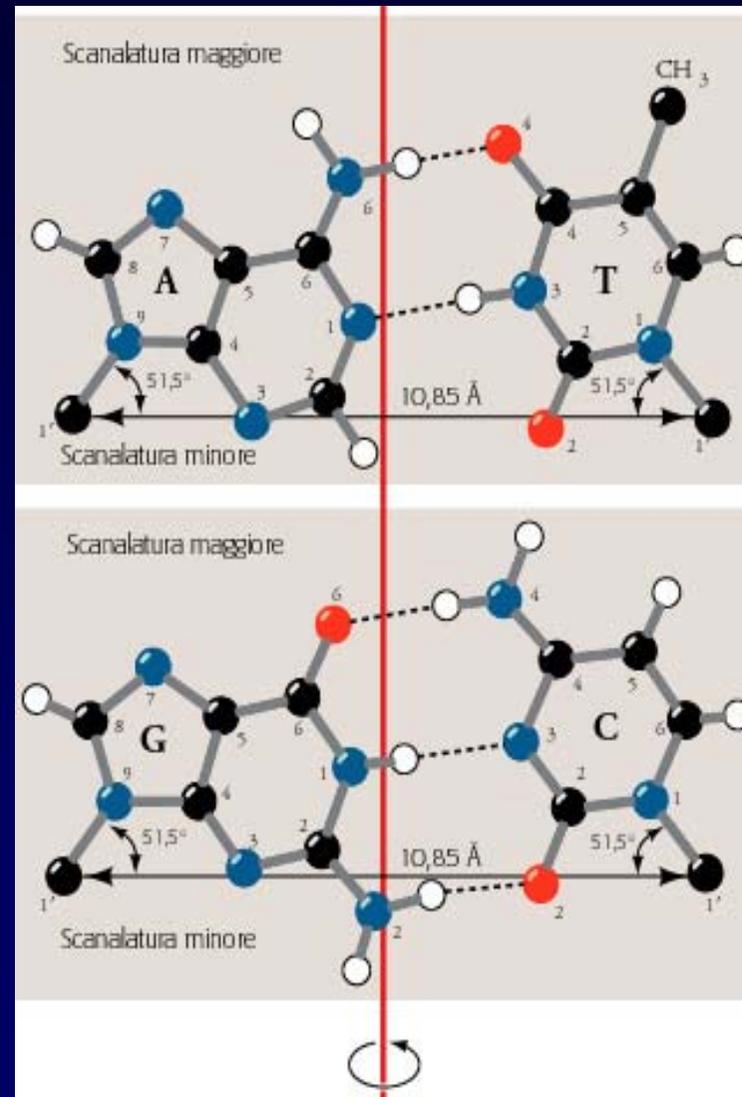
(Watson and Crick 1953)



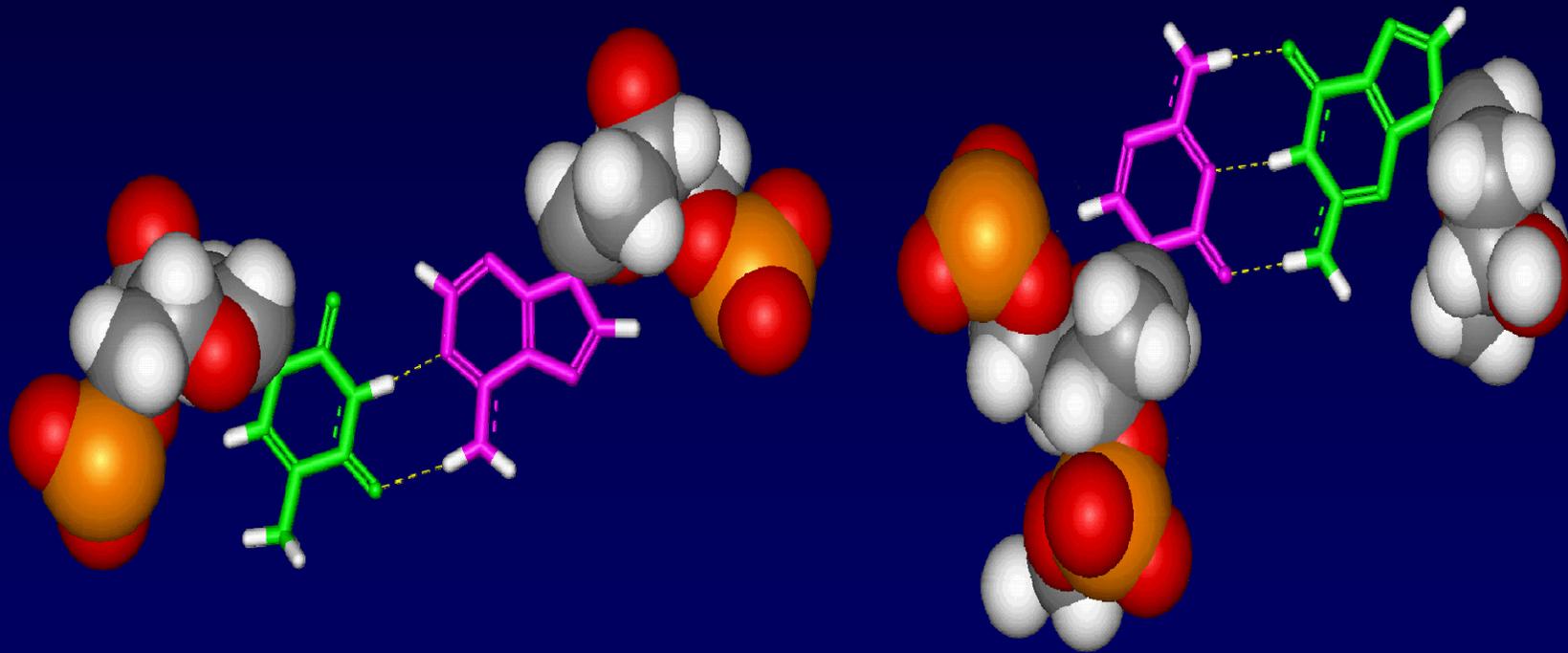
I LEGAMI H TRA LE BASI AZOTATE

adenina-timina:
2 legami H

citosina-guanina:
3 legami H



L'APPAIAMENTO DELLE BASI AZOTATE



A-T

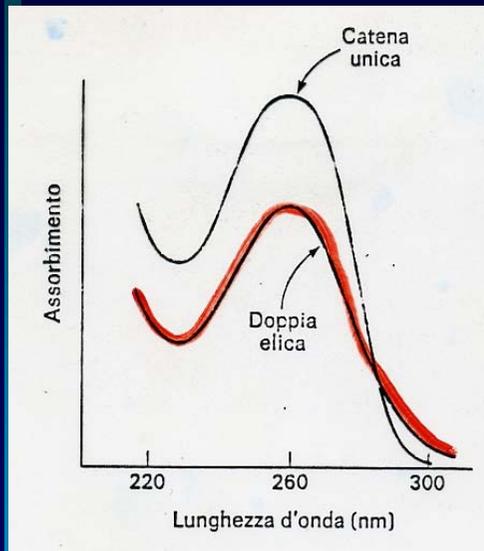
G-C

LE REGOLE DI CHARGAFF

- 1) I campioni di DNA isolati da tessuti diversi della stessa specie hanno la stessa composizione in basi,
- 2) la composizione in basi del DNA varia da una specie all'altra,
- 3) la composizione in basi del DNA in una data specie non cambia con l'età dell'organismo, il suo stato nutrizionale o per variazioni del suo ambiente di vita,
- 4) in tutti i DNA $A = T$ e $C = G$, quindi $A+G = T+C$, la somma delle purine é uguale alla somma delle pirimidine.

LA DOPPIA ELICA PUO' FONDERE REVERSIBILMENTE

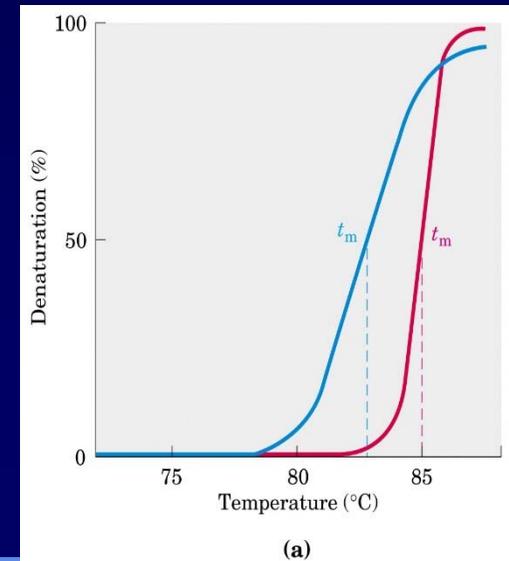
L'EFFETTO IPERCROMICO



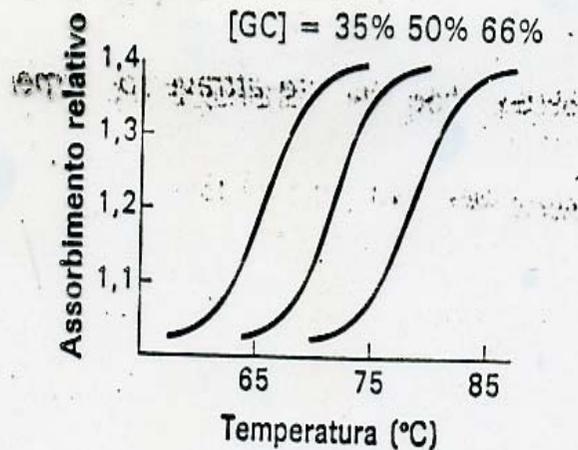
L'assorbimento della luce a 260 nm di una soluzione di DNA aumenta quando la doppia elica fonde in filamenti singoli.

La temperatura di fusione (T_m) è la temperatura alla quale la metà del DNA è denaturato.

T_m



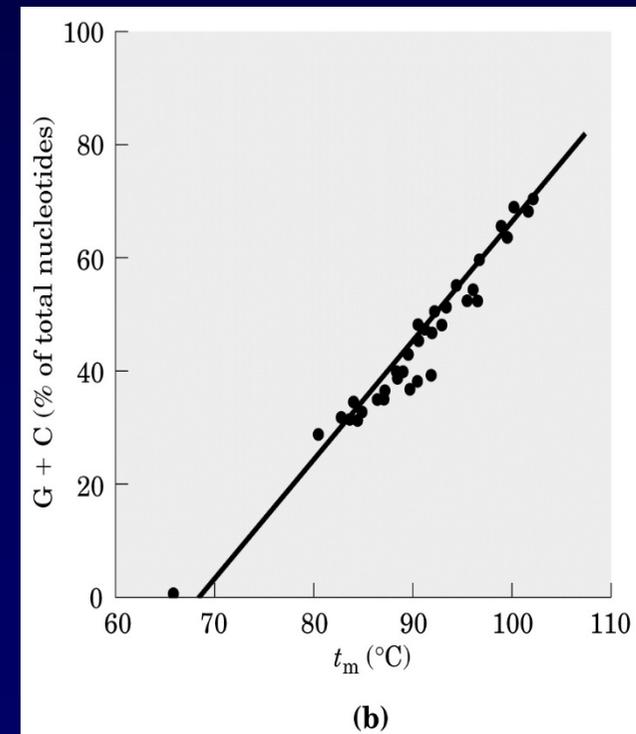
LE CURVE DI FUSIONE DEL DNA



La temperatura di fusione (T_m) di una molecola di DNA aumenta in proporzione alla % di GC presente nella molecola.

Le coppie GC sono più stabili delle coppie AT, poiché formano **tre** legami H e non **due**;

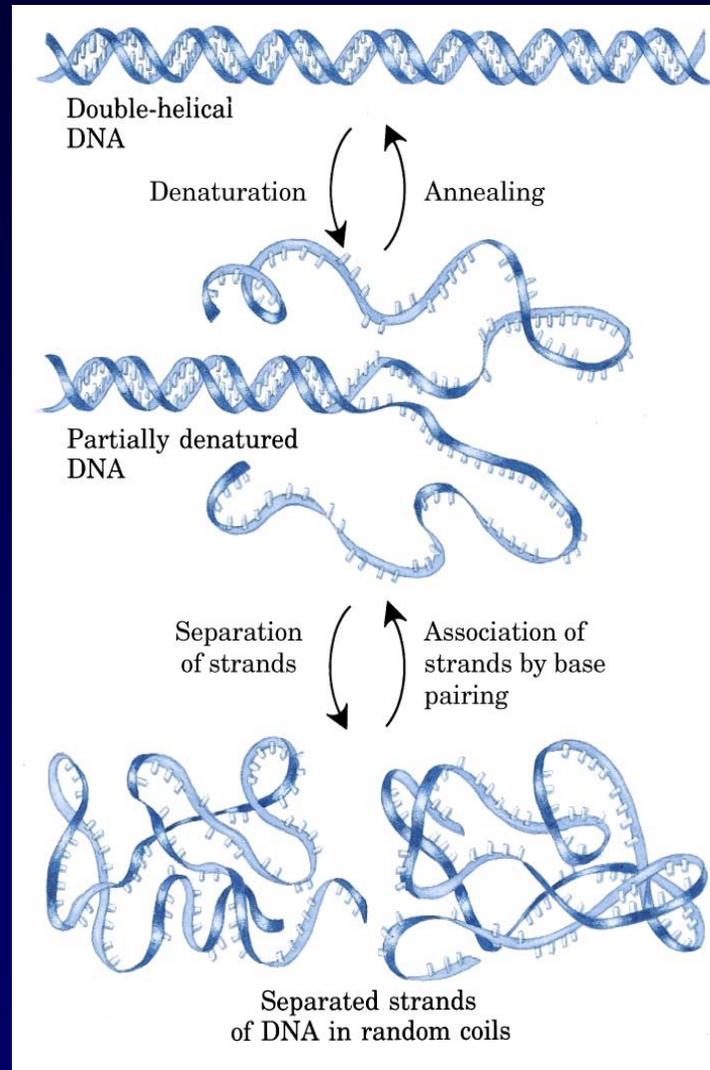
la **transizione** avviene bruscamente, essendo la doppia elica una struttura altamente cooperativa.



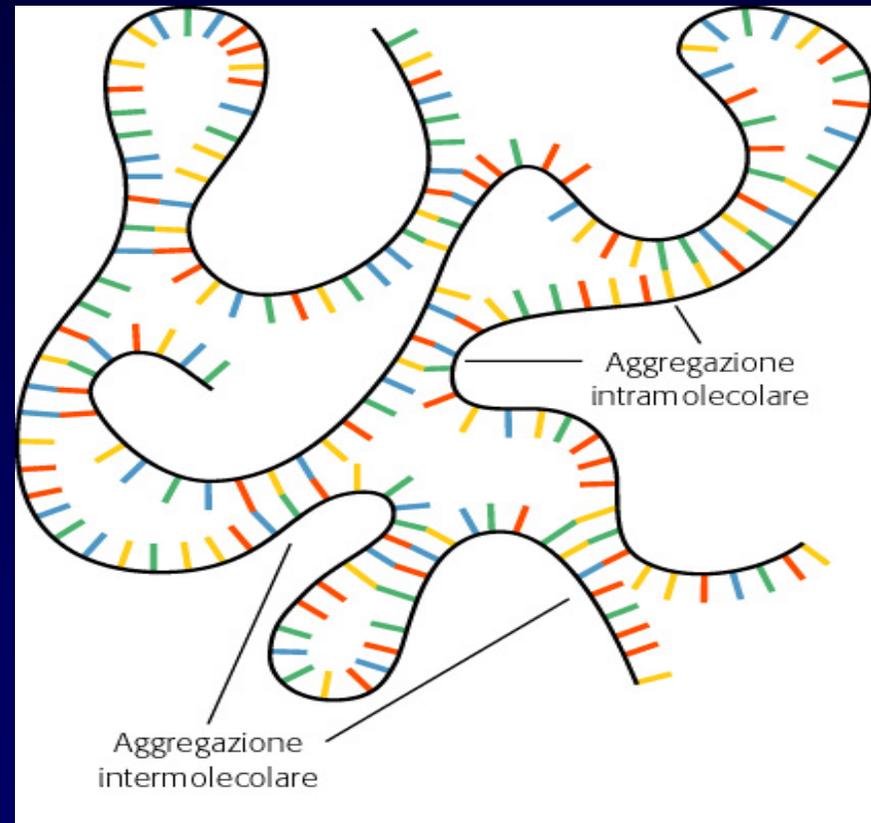
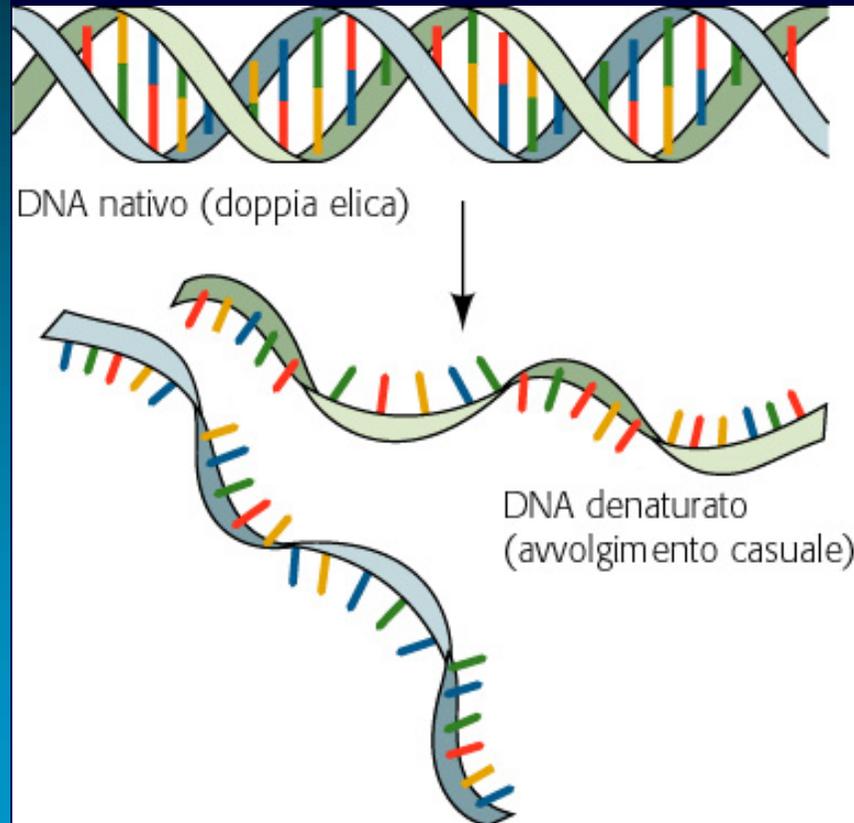
La T_m del DNA

La T_m del DNA di molte specie varia linearmente con il contenuto in GC, passando da 77°C a 100°C , per un aumento delle coppie GC dal 20% al 78%.

GLI STADI DELLA DENATURAZIONE (SVOLGIMENTO) REVERSIBILE DEL DNA E DELLA SUA RINATURAZIONE (ANNEALING)



LA DENATURAZIONE E LA PARZIALE RINATURAZIONE DEL DNA



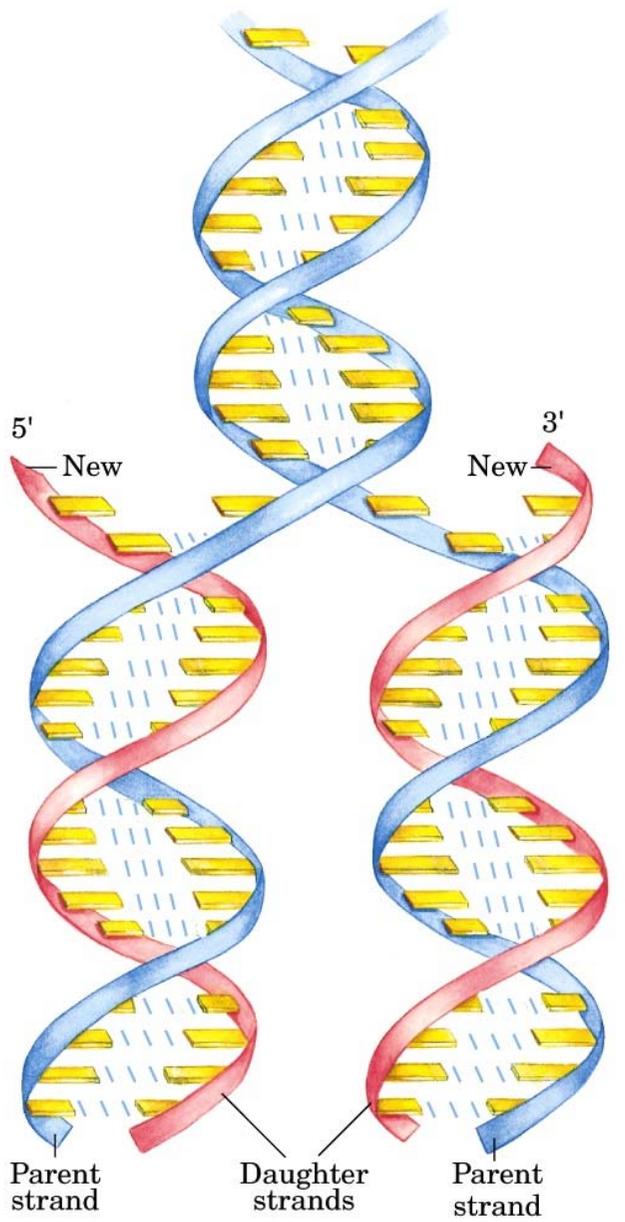
LE MOLECOLE DI DNA SONO MOLTO LUNGHE ANCHE NELLE CELLULE PIÙ SEMPLICI, PERCHÉ DEVONO CODIFICARE UN GRANDE NUMERO DI PROTEINE.

Dimensioni di molecole di DNA

<i>Organismo</i>	<i>Coppie di basi (in migliaia, o kb)</i>	<i>Lunghezza (μm)</i>
Virus		
Polioma o SV40	5,1	1,7
Fago λ	48,6	17
Fago T2	166	56
Virus vaccinico	190	65
Batteri		
Micoplasma	760	260
<i>E. coli</i>	4000	1360
Eucarioti		
Lievito	13500	4600
<i>Drosophila</i>	165000	56000
Uomo	2900000	990000

LA REPLICAZIONE DEL DNA SUGGERITA DA WATSON E CRICK

La natura semiconservativa della
replicazione del DNA.

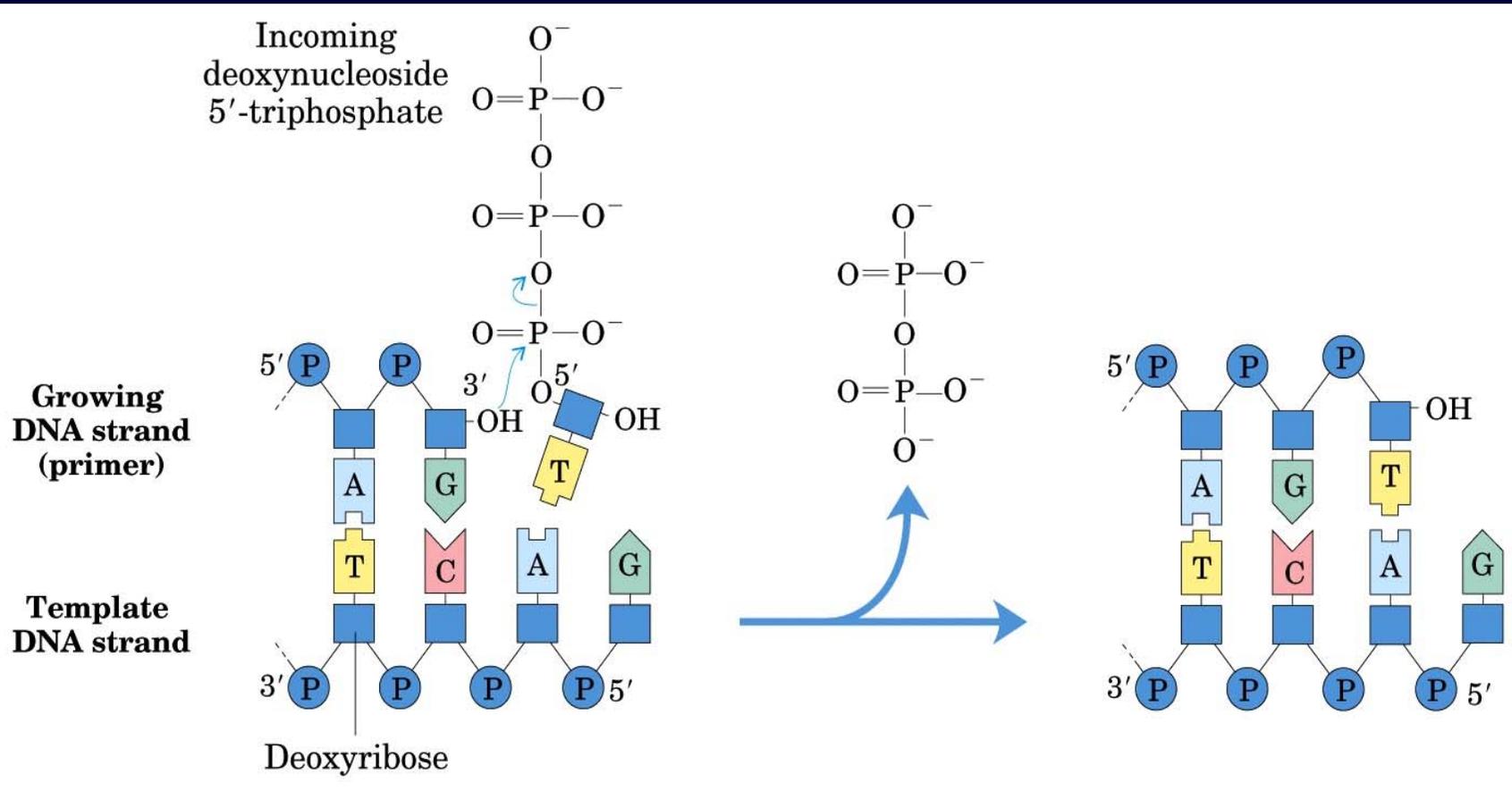


Ciascun filamento funge da stampo per
un nuovo filamento complementare;
quando la replicazione è completata, ci
saranno due molecole figlie di DNA a
doppia elica, ciascuna identica nella sua
sequenza alla molecola parentale.

Meselson e Stahl dimostrarono che il DNA si
replica in modo semiconservativo.

LA SINTESI DEL DNA

Kornberg - 1958



La reazione di allungamento del DNA è catalizzata dalle DNA polimerasi.

LA SINTESI DEL DNA

Le DNA polimerasi

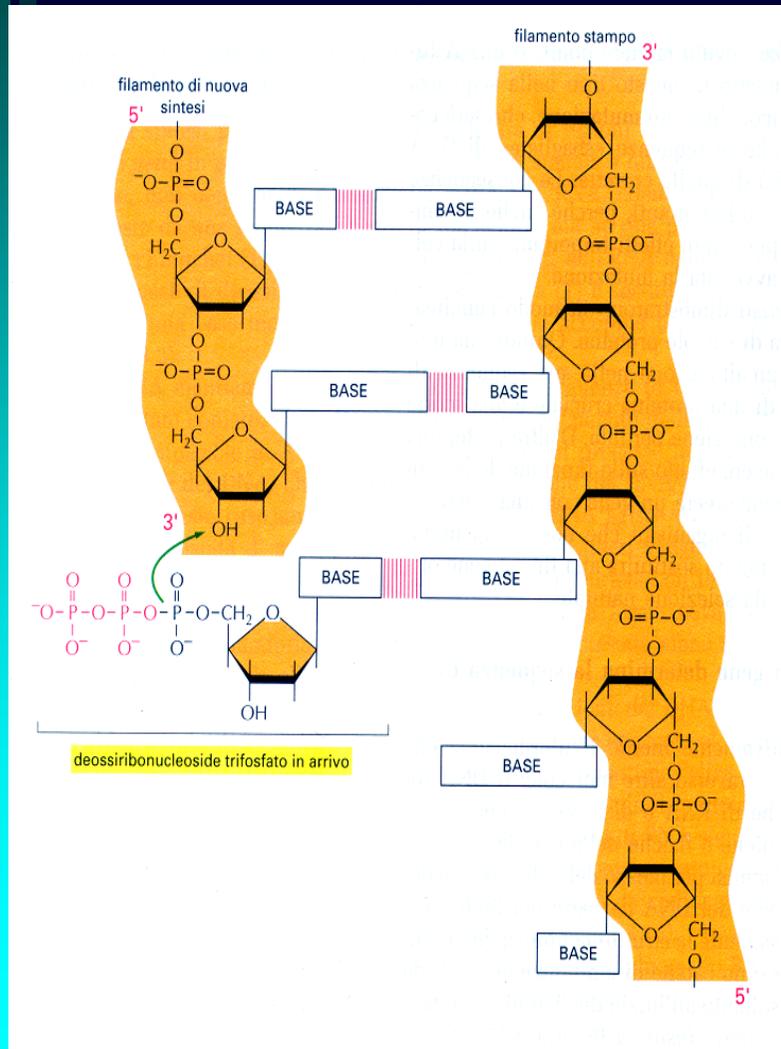
catalizzano la reazione di sintesi in direzione 5'→3';

sono necessari:

quattro deossiribonucleosidi 5'-trifosfati,
ioni magnesio (Mg^{2+}),
una catena primer (iniziatrice) con un gruppo 3'-OH libero,
uno stampo di DNA;

é aggiunto un **singolo** deossiribonucleotide alla catena, **per volta**.

LA SINTESI DEL DNA



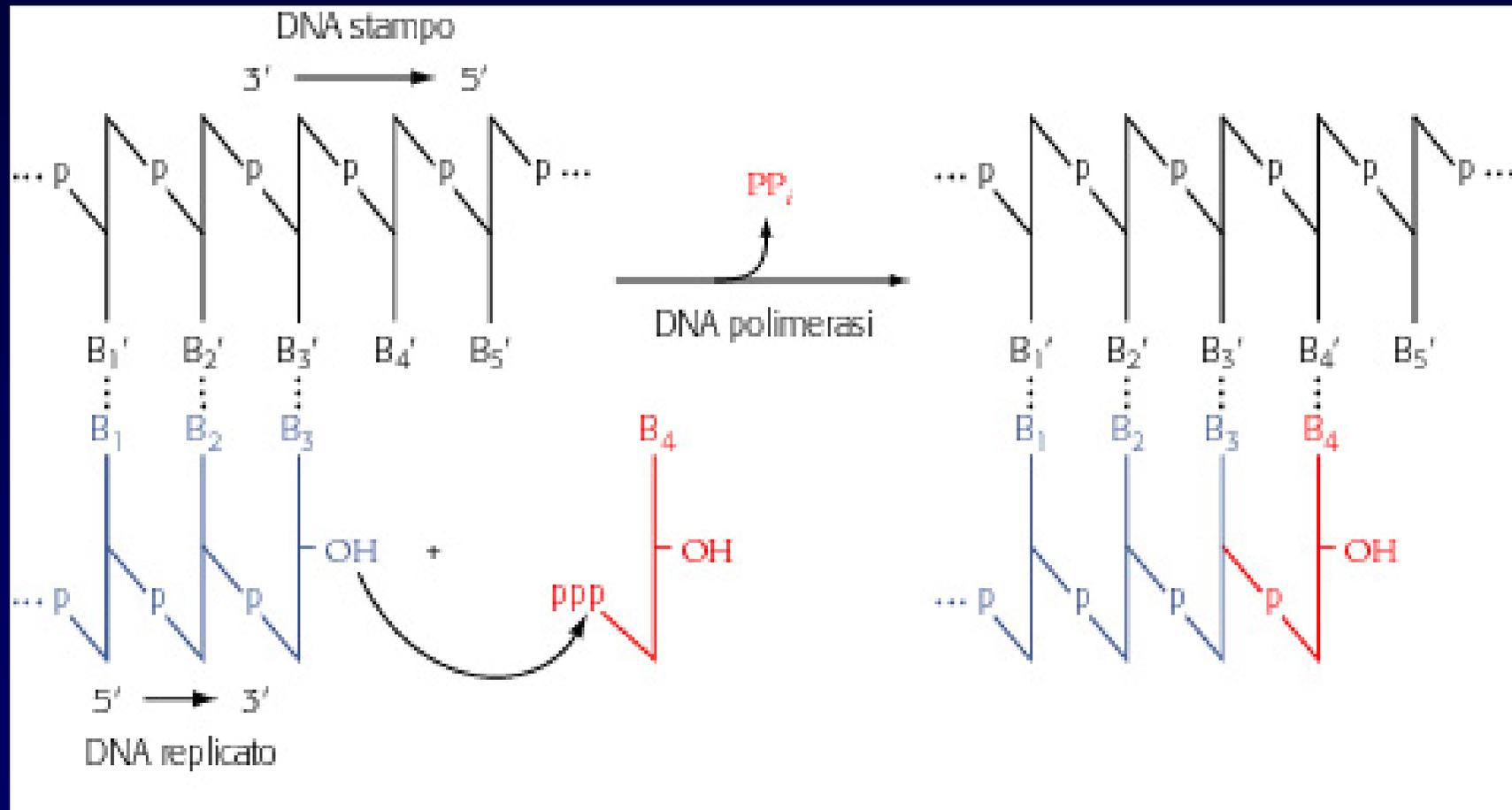
La reazione catalizzata consiste nell'unione nucleofila del terminale 3-OH' del primer all'atomo di fosforo più interno di un deossiribonucleoside trifosfato, per formare un ponte fosfodiesterico con rilascio di PP_i.

L'allungamento della catena di DNA procede in direzione 5'→3'.

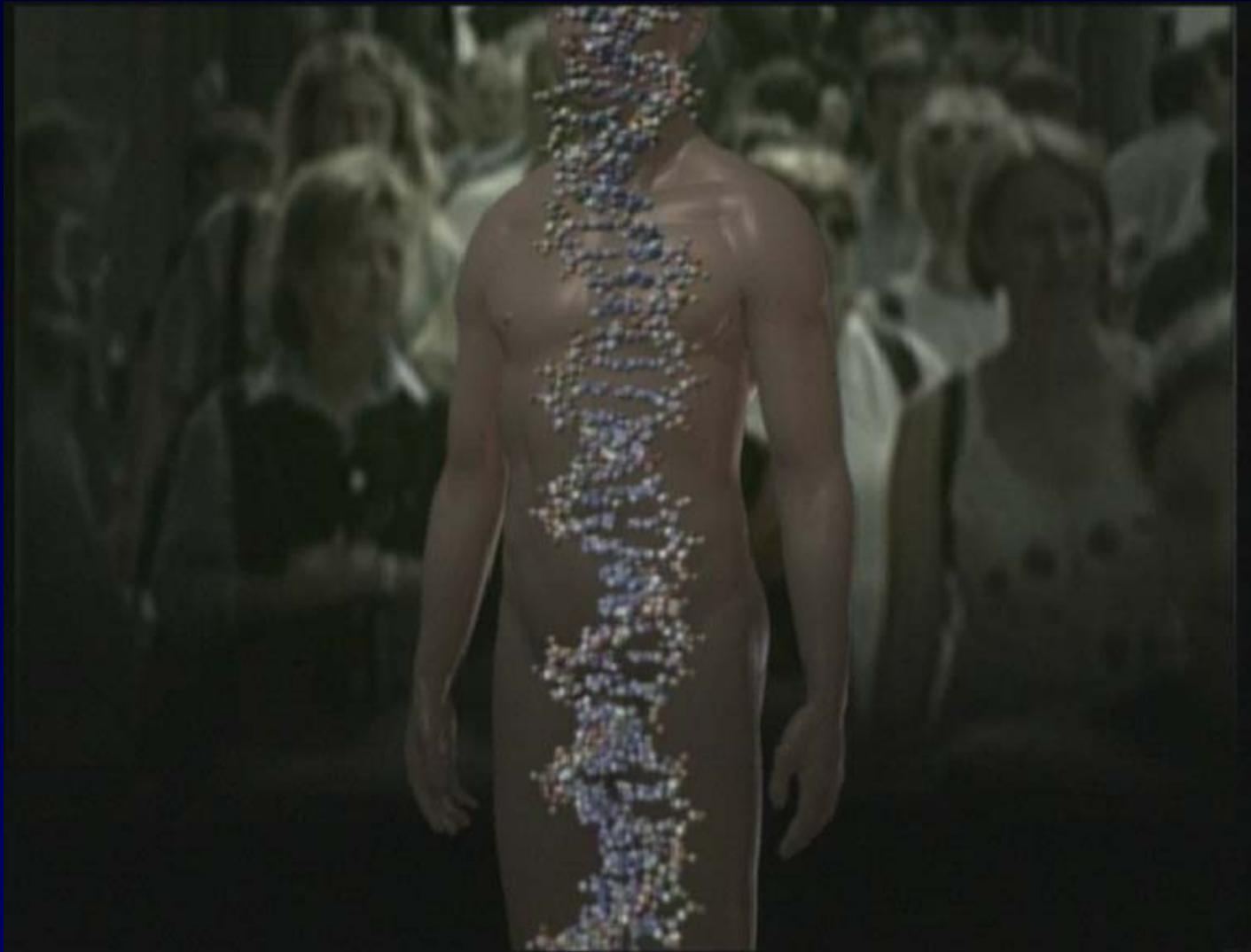
La sintesi avviene solo dopo l'appaiamento complementare delle basi (enzima diretto dallo stampo).

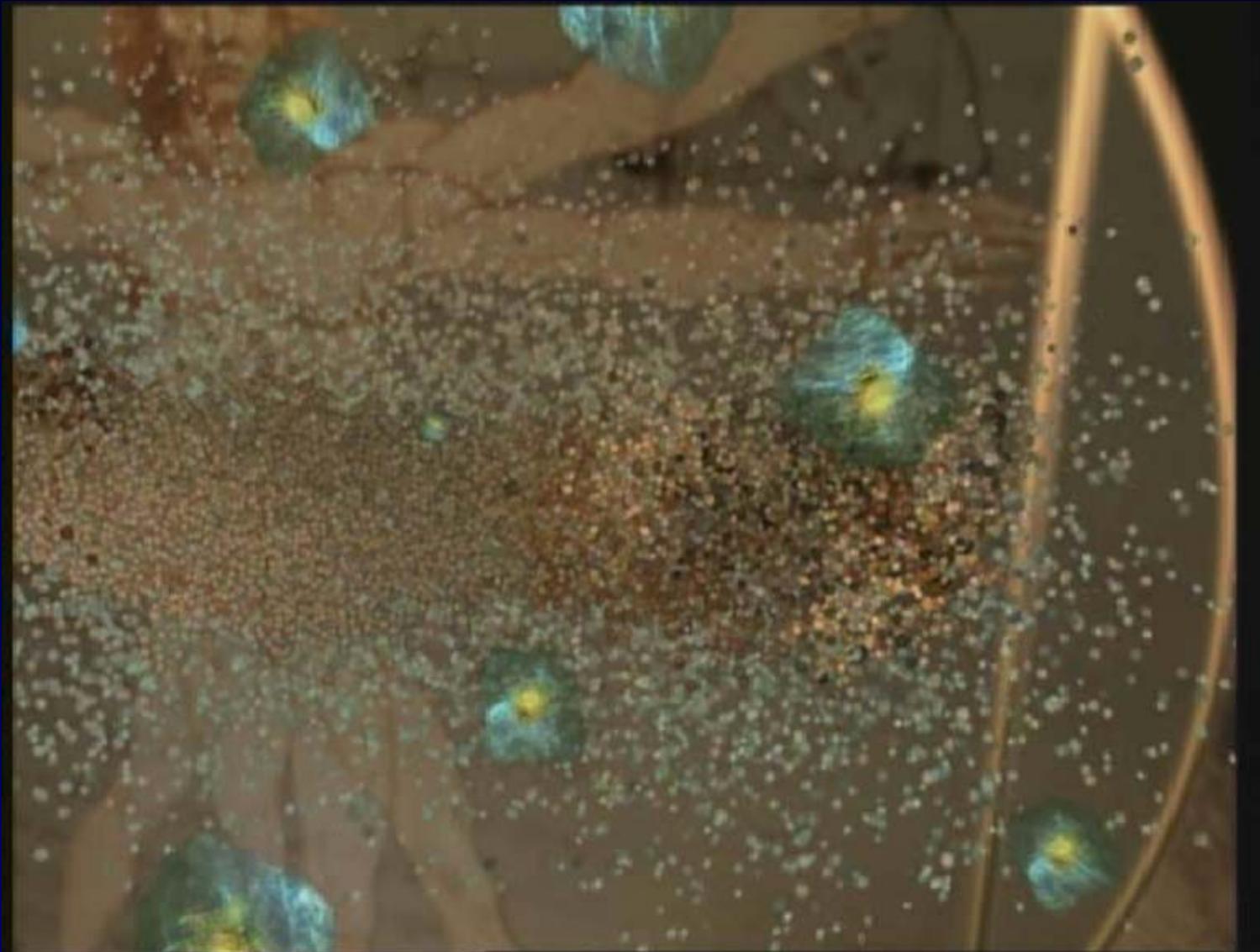
La reazione è spinta da una pirofosfatasi inorganica.

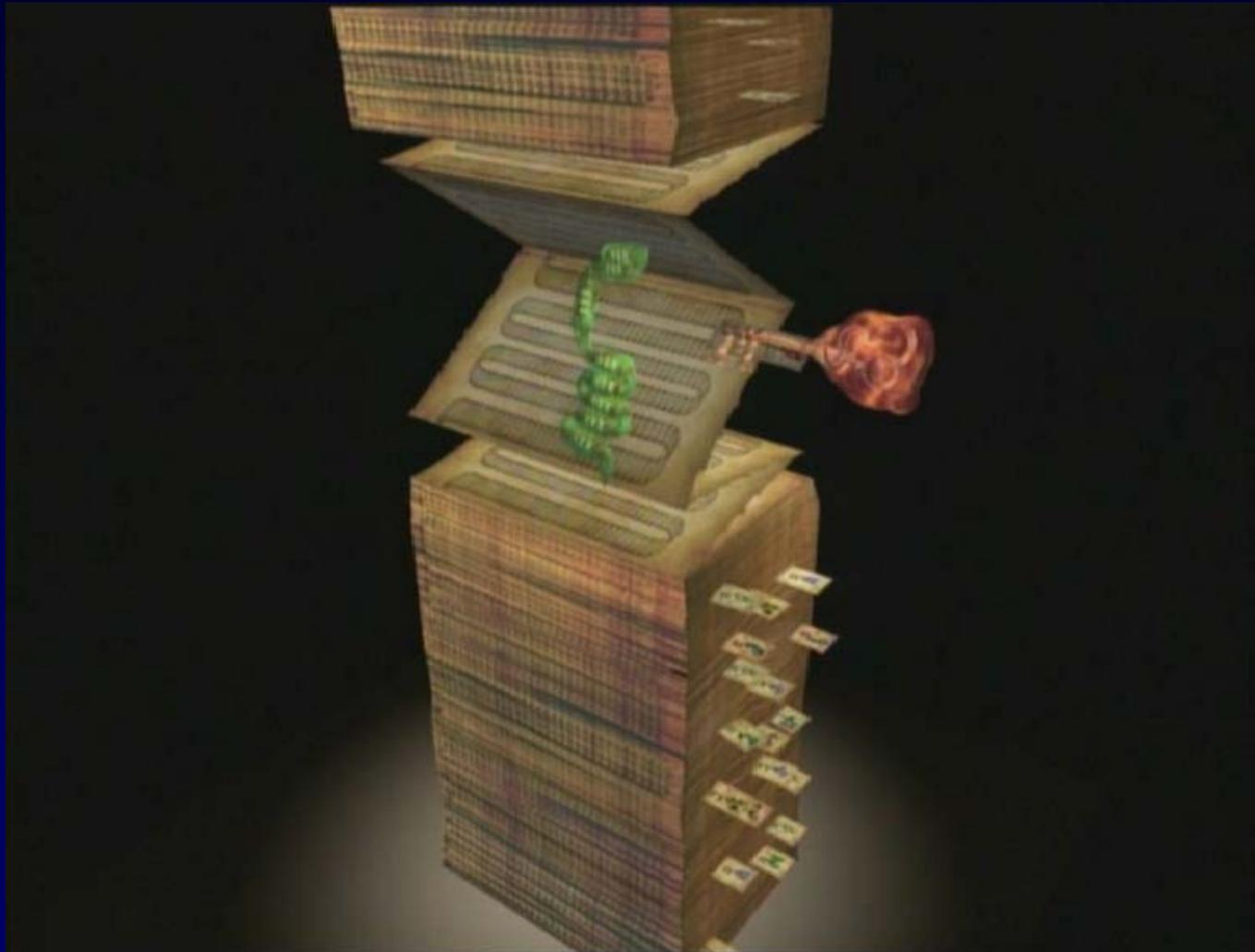
LA SINTESI DEL DNA



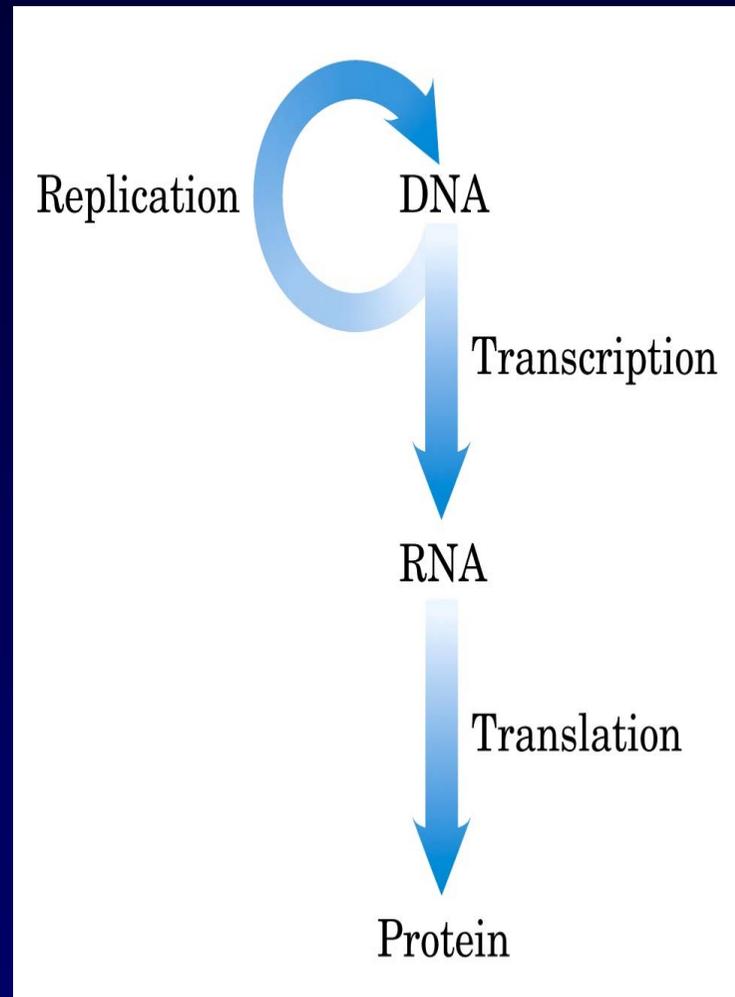
IL FLUSSO DELL'INFORMAZIONE GENETICA







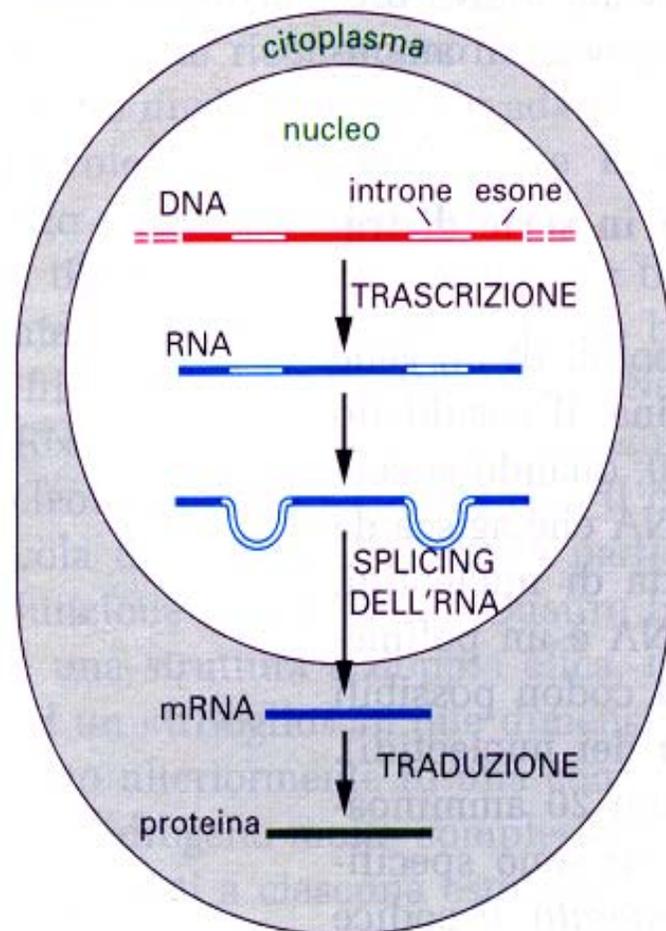
IL FLUSSO DELL'INFORMAZIONE GENETICA



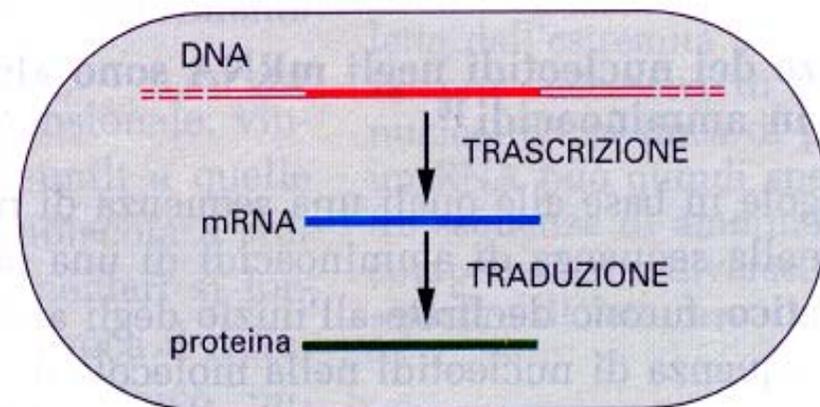
Il DNA conserva e trasmette l'informazione genetica.

Il DNA non è lo stampo diretto per la sintesi proteica, che utilizza invece stampi di RNA.

EUCARIOTI

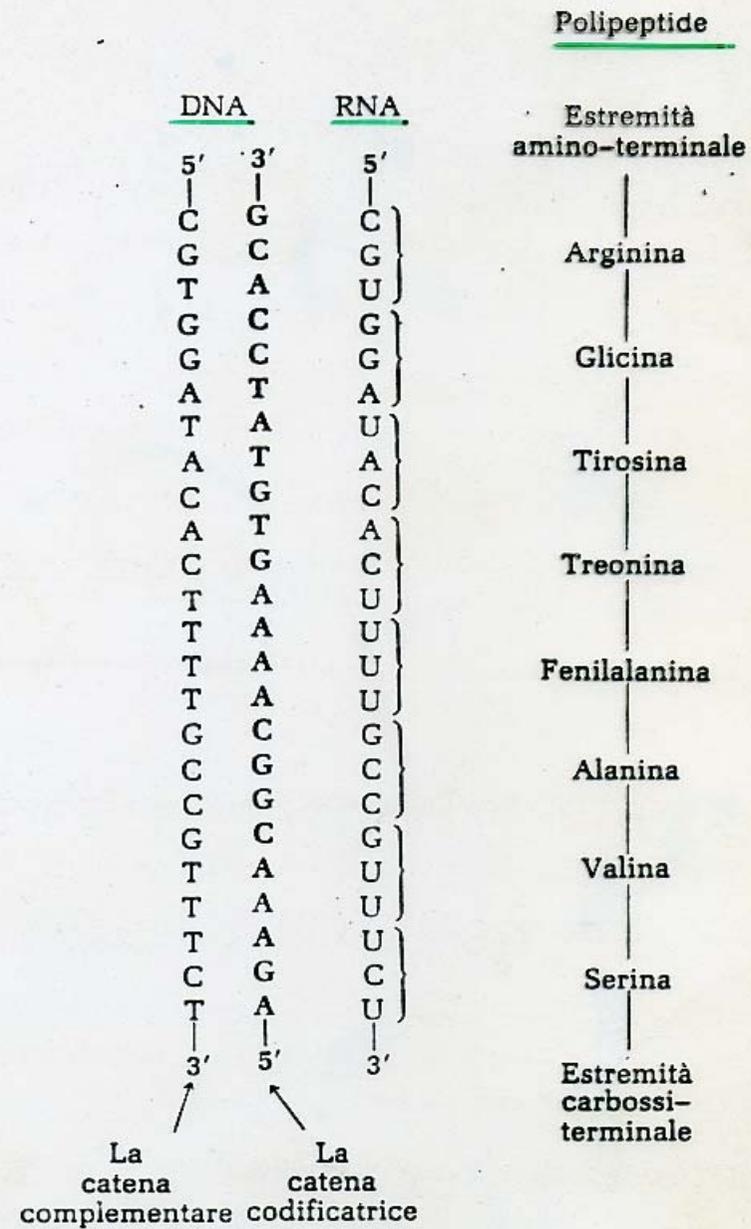


PROCARIOTI



II FLUSSO DELL'INFORMAZIONE GENETICA

LA RELAZIONE TRA LA
SEQUENZA DI BASI
NEL DNA,
IL TRASCRITTO DI
mRNA E LA SEQUENZA
DI AMMINOACIDI DI
UNA PROTEINA.



IL FLUSSO DELL'INFORMAZIONE GENETICA

Esiste una relazione tra la sequenza di basi del DNA (e del trascritto di mRNA) e la sequenza degli aminoacidi in una proteina,

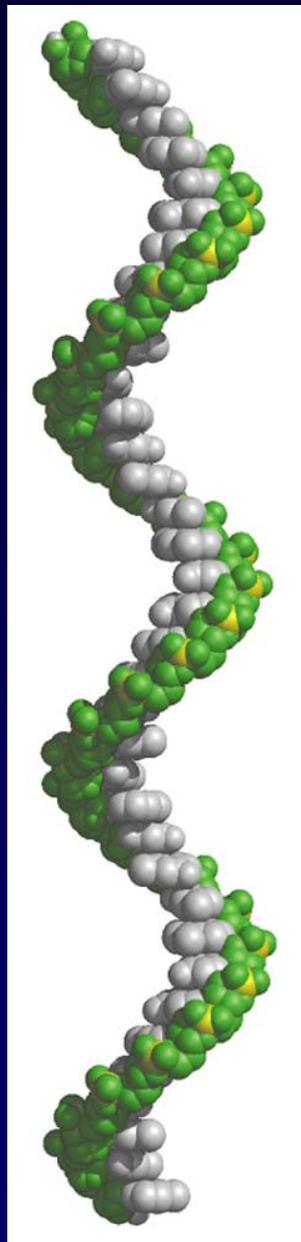
una sequenza di tre basi (**codon**) codifica per un aminoacido,

i codon vengono letti sequenzialmente sull'mRNA da molecole di **tRNA**, che servono da adattatori nella sintesi proteica,

la sintesi delle proteine avviene nei **ribosomi**.

IL CODICE GENETICO

		Second letter of codon							
		U		C		A		G	
First letter of codon (5' end)	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
		AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	



L'RNA

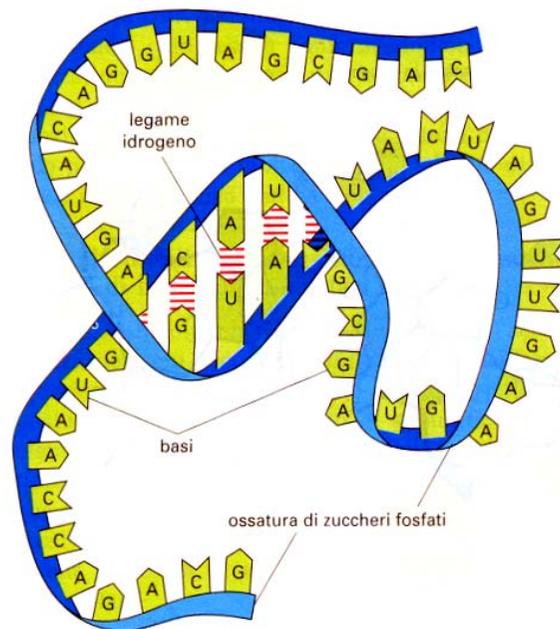
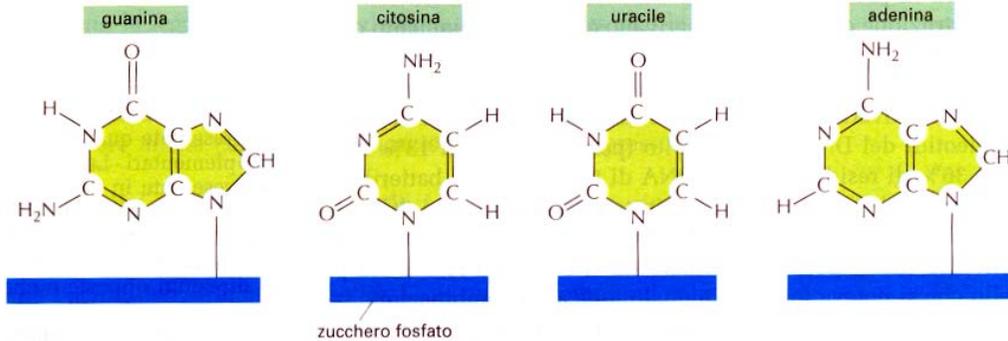
Le molecole di RNA sono generalmente a singolo filamento, ma molte contengono regioni a doppia elica (ripiegamento a forcina),

nelle cellule di E.coli esistono tre classi principali di RNA:

- RNA messaggero (mRNA),
- RNA ribosomiale (rRNA) (23S, 16S, 5S),
- RNA transfer (tRNA),

lo zucchero ribosio é al posto del deossiribosio (DNA),
la base uracile é al posto della base timina (DNA).

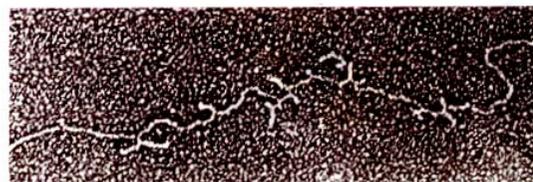
L'RNA



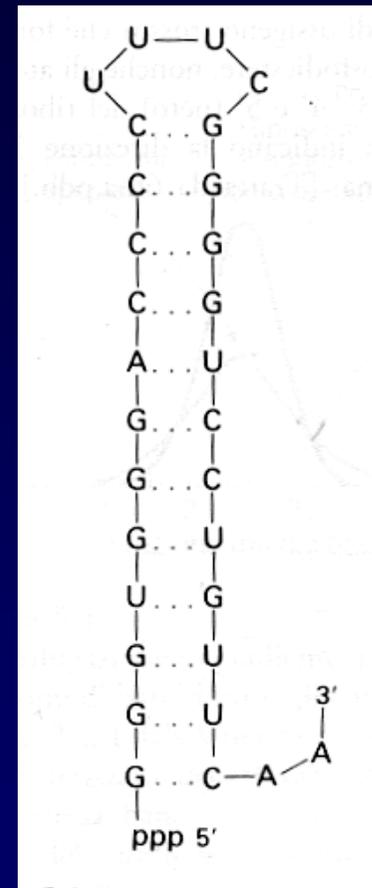
SINGOLO FILAMENTO DI RNA

L'RNA è a singolo filamento, ma contiene piccole regioni locali in cui le basi si accoppiano in modo complementare per un processo di ripiegamento casuale. Le regioni in cui le basi sono accoppiate si possono vedere al microscopio elettronico come ramificazioni della catena.

FOTOGRAFIA AL MICROSCOPIO ELETTRONICO DELL'RNA

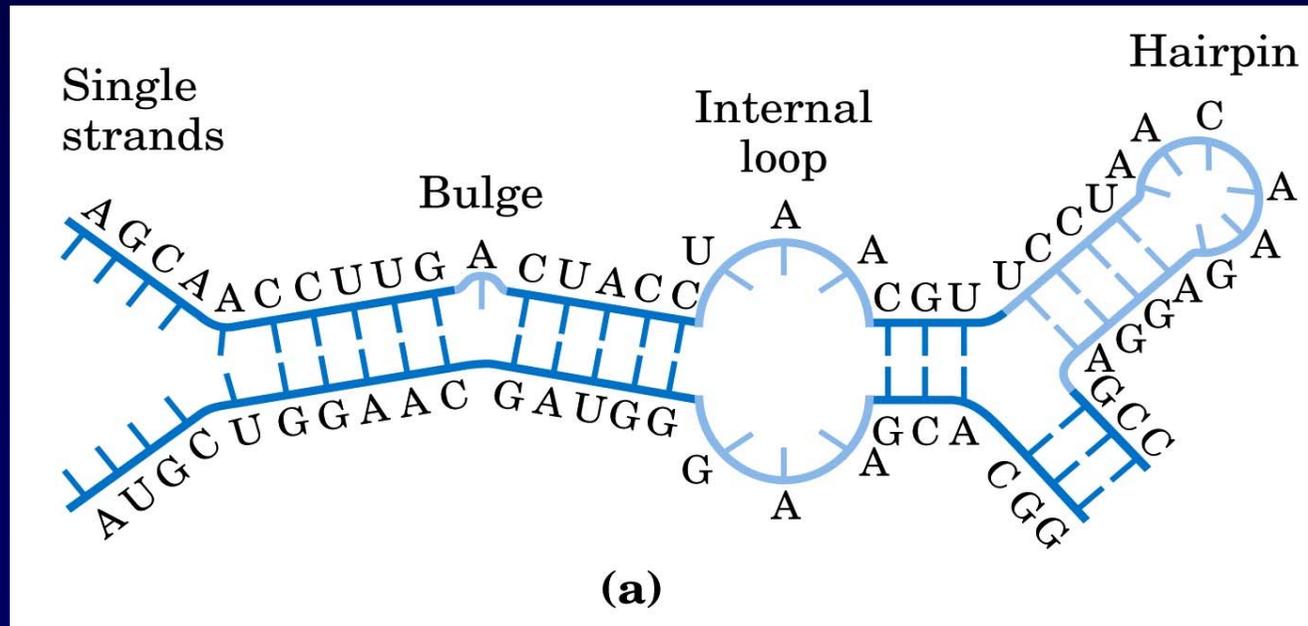


(Fornita da Peter Wellauer.)



L'RNA

Nei procarioti, tutti gli RNA cellulari sono sintetizzati da una RNA polimerasi, che prende istruzioni da stampi di DNA (trascrizione).



L'RNA MESSAGGERO (mRNA)

(Jacob e Monod 1961)

L'mRNA é un polinucleotide,

é molto eterogeneo nelle dimensioni e nella composizione,

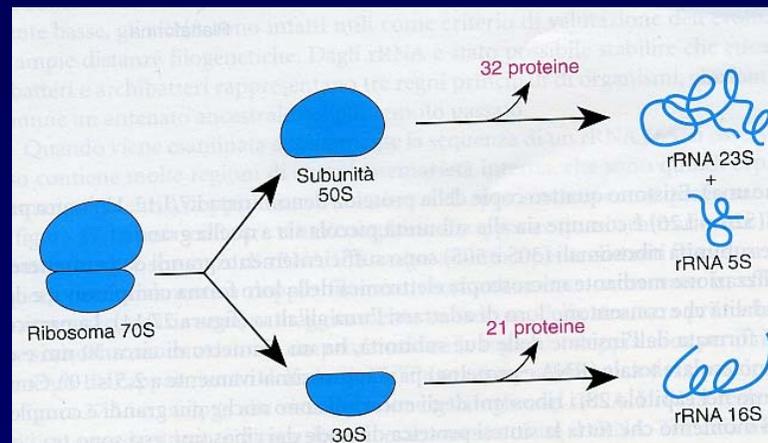
si associa in modo transitorio ai ribosomi,

viene sintetizzato e degradato molto rapidamente.

L'RNA RIBOSOMIALE (rRNA)

L'rRNA è il componente principale dei ribosomi e svolge un ruolo sia catalitico sia strutturale nella sintesi proteica.

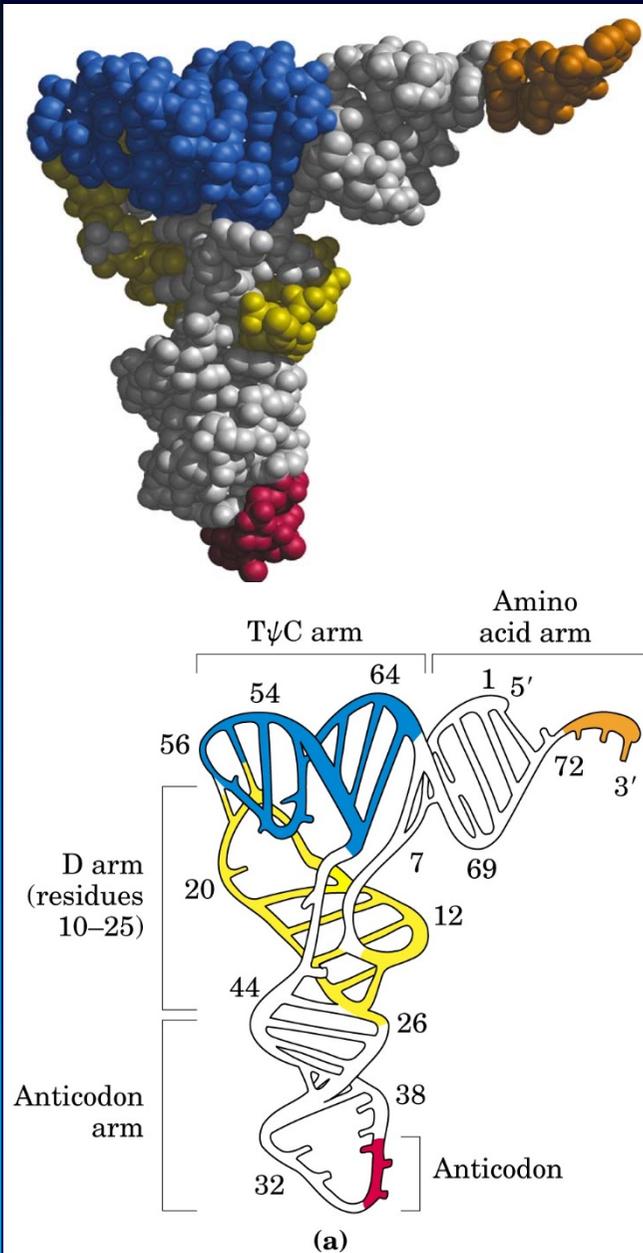
I ribosomi sono strutture non specializzate, dove si sintetizzano le proteine dettate dagli mRNA, con i quali si trovano associati.



L'RNA TRANSFER (tRNA)

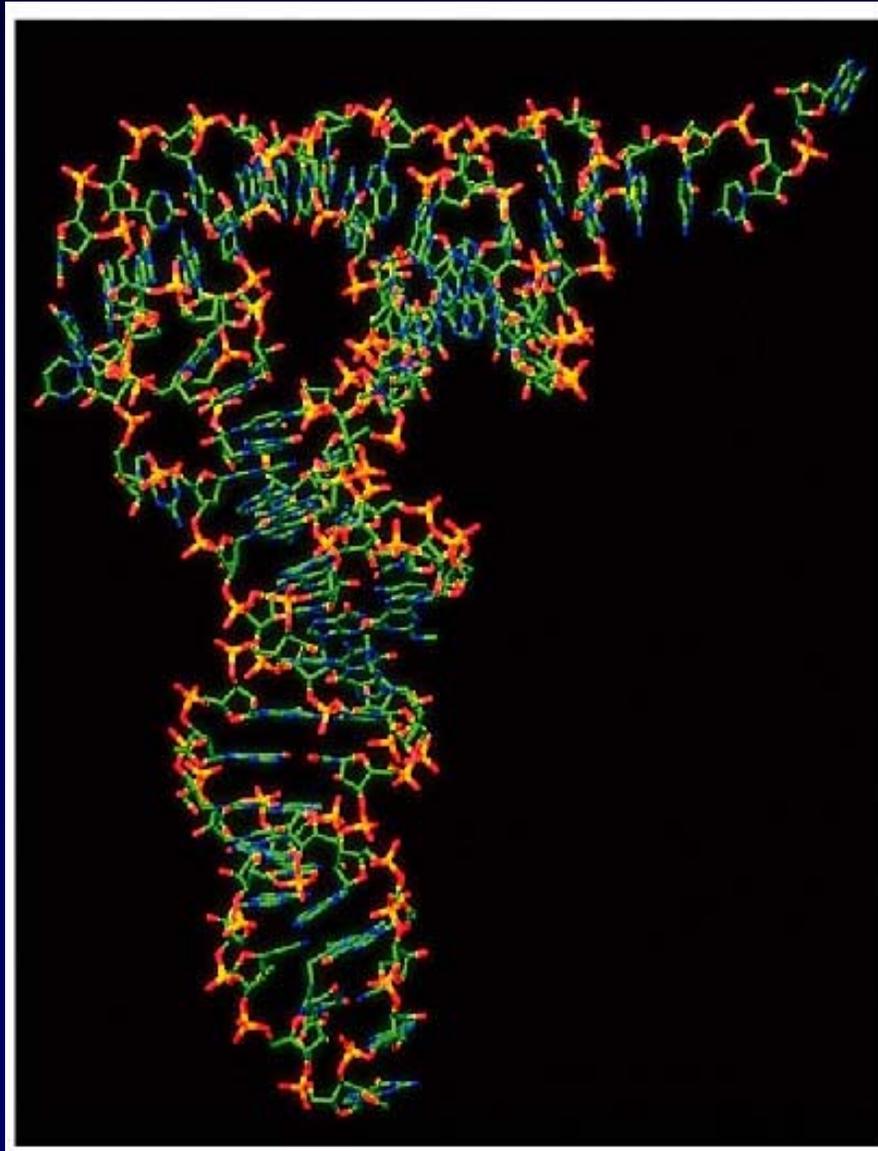
Il tRNA porta la forma attivata degli aminoacidi ai ribosomi, nella sequenza determinata dallo stampo di mRNA.

Esiste almeno un tRNA per ciascuno dei 20 aminoacidi.

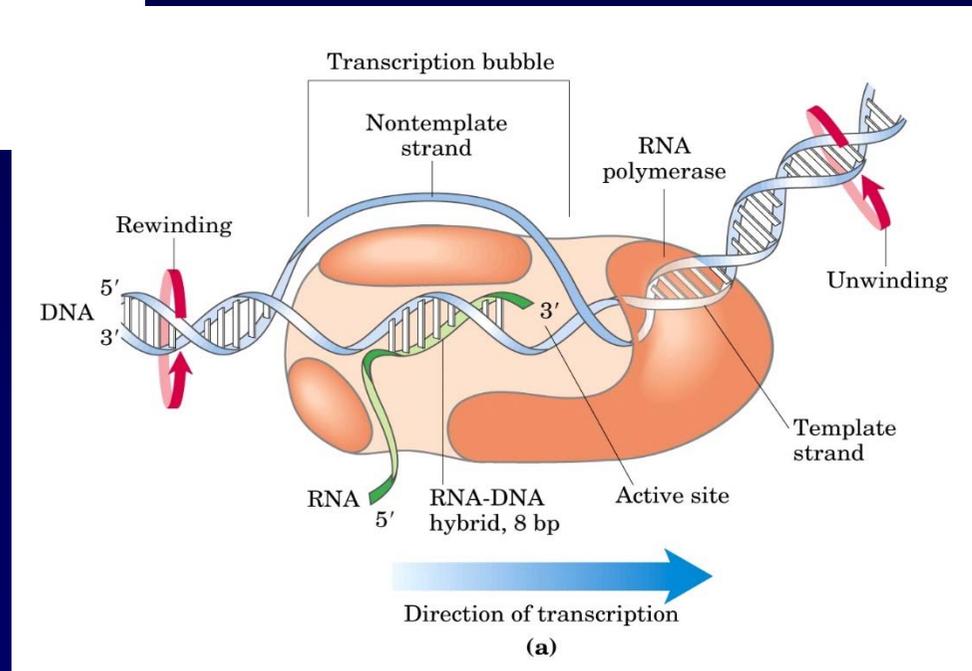
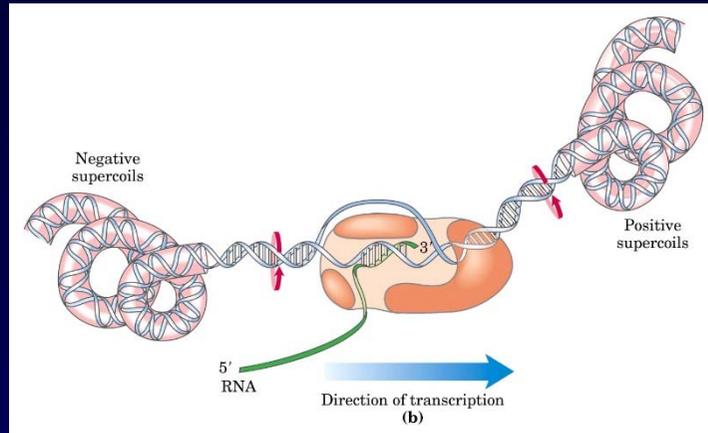


Il tRNA per l'alanina del lievito é costituito da circa 75 nucleotidi.

LA STRUTTURA AI RAGGI X Di UN tRNA



LA SINTESI DELL'RNA

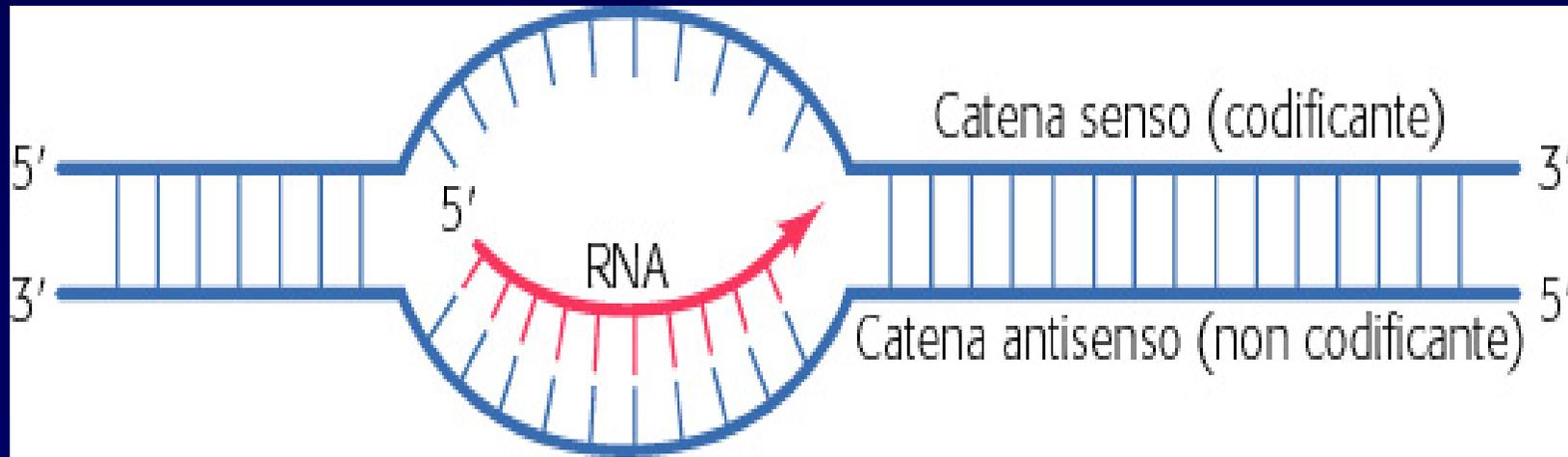


LA SINTESI DELL'RNA

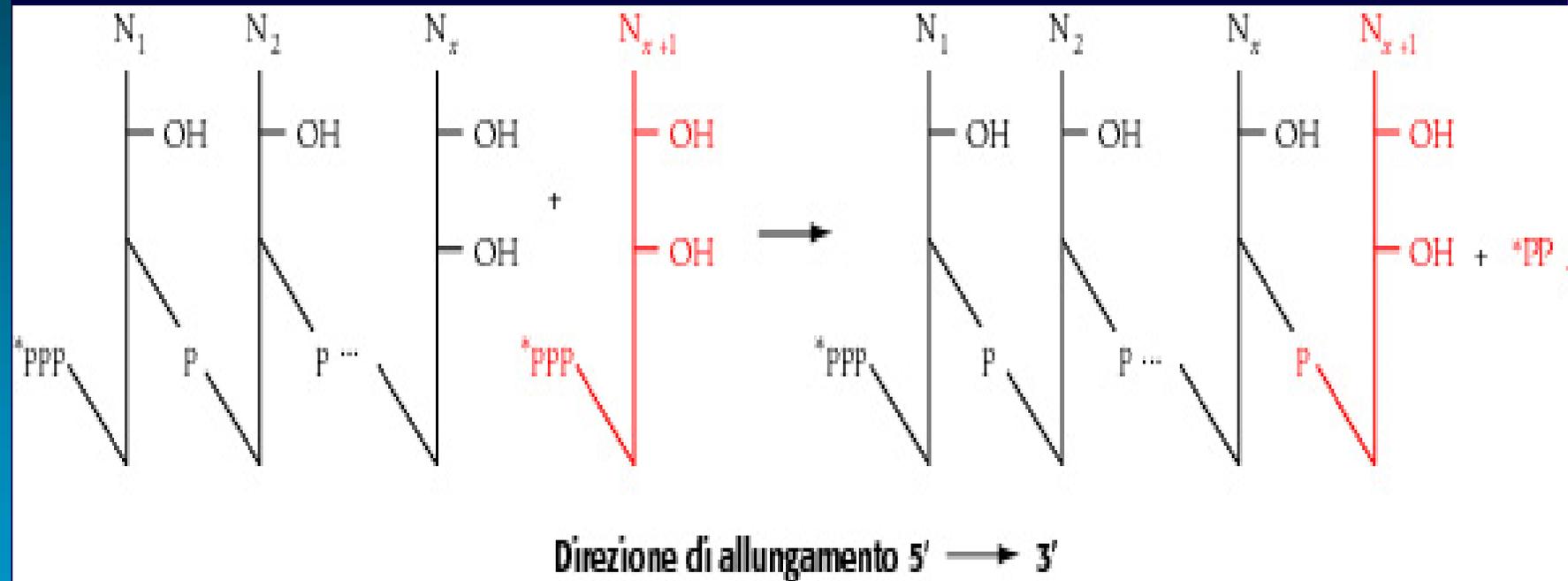
Le RNA polimerasi

catalizzano la reazione di sintesi in direzione $5' \rightarrow 3'$;
necessitano per la reazione di:

- quattro ribonucleosidi 5'-trifosfato,
- ioni bivalenti (Mg^{2+} , Mn^{2+}),
- uno stampo di DNA.



LA SINTESI DELL'RNA



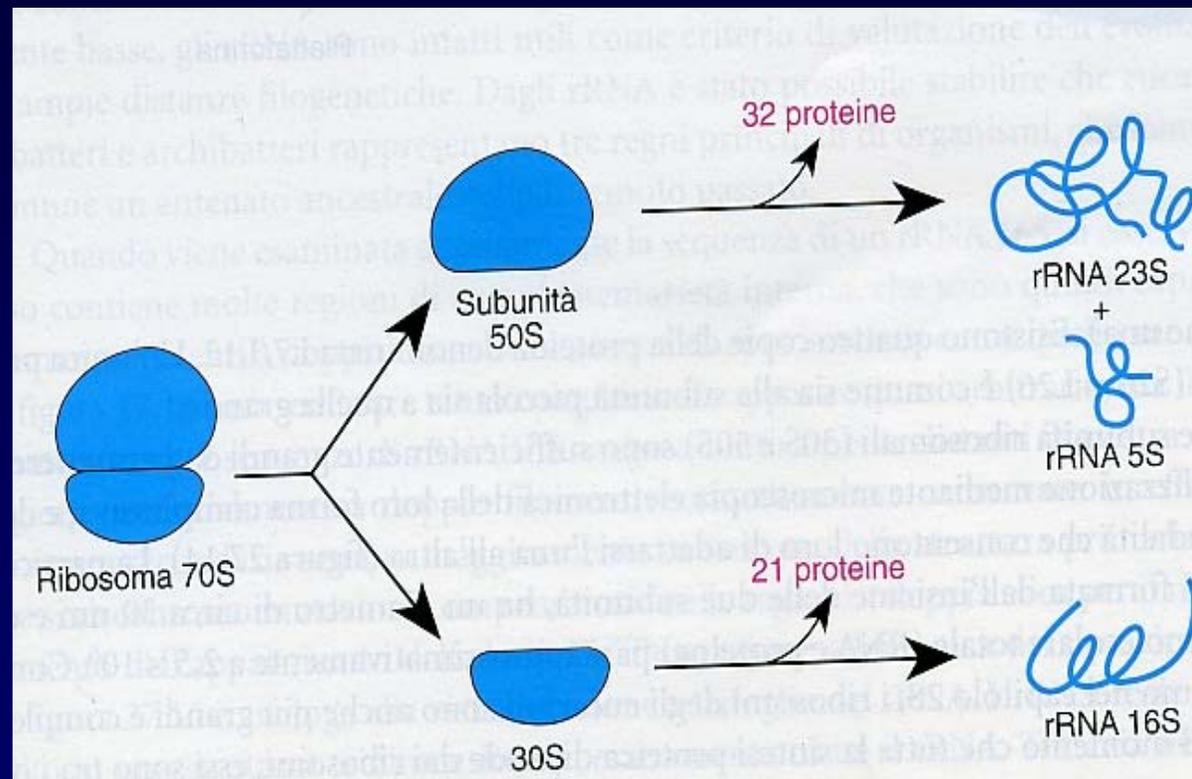
LA SINTESI DELL'RNA

La RNA polimerasi non richiede un primer,

in *E. coli* tutti gli RNA cellulari (mRNA, tRNA e rRNA) sono sintetizzati dalla stessa RNA polimerasi,

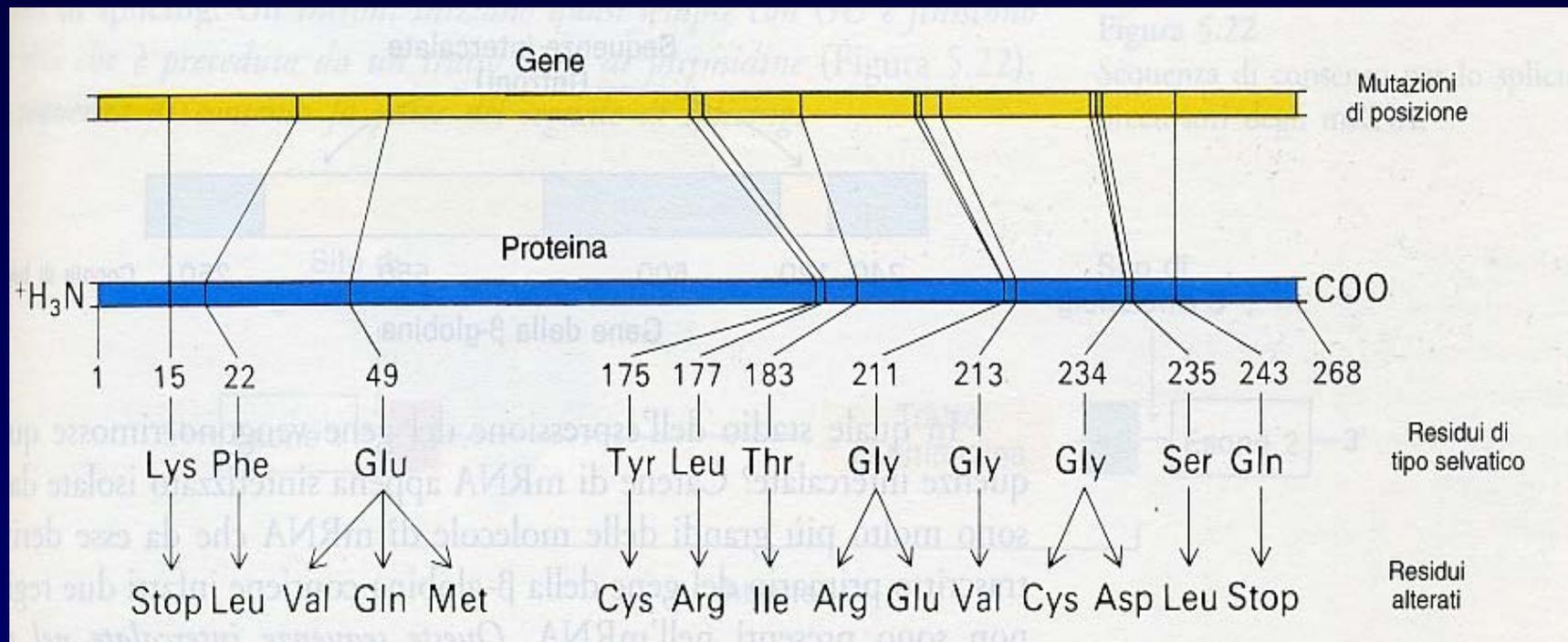
la trascrizione é la copiatura del filamento di DNA in una molecola complementare di RNA.

LA SINTESI PROTEICA AVVIENE NEI RIBOSOMI



C'È COLINEARITÀ (CORRISPONDENZA LINEARE) TRA UN GENE ED IL SUO PRODOTTO POLIPEPTIDICO

Uno studio dei mutanti di E.coli che possedevano delle mutazioni nel gene della catena α della triptofano sintetasi (Yanofsky 1967) mostra



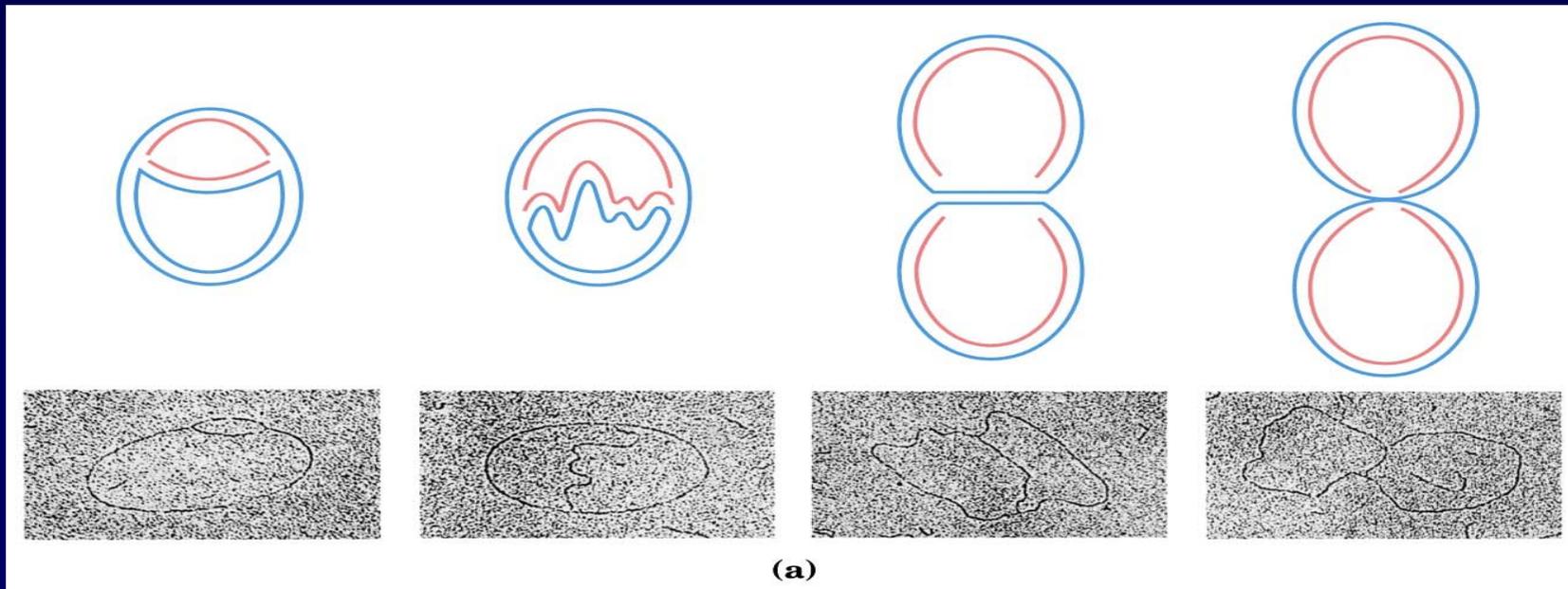
che l'ordine dei mutanti sulla mappa genetica è identico a quello delle corrispondenti sostituzioni nella sequenza degli amminoacidi nella proteina corrispondente.

LA REPLICAZIONE DEL DNA NEI PROCARIOTI

IL DNA DEI BATTERI E DI MOLTI VIRUS A DNA É UNA DOPPIA ELICA CIRCOLARE

La replicazione avviene in modo bidirezionale: si formano due forcelle di replicazione che prendono origine dallo stesso punto e si allontanano da esso in entrambe le direzioni, contemporaneamente, fino ad incontrarsi;

le due molecole figlie si separano ed ognuna di esse contiene una catena vecchia ed una nuova.

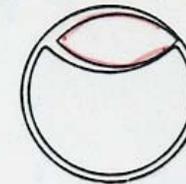


LA REPLICAZIONE DEL DNA IN E. COLI

La replicazione inizia nel sito **oriC**.

Si formano due forcelle di replicazione, che si muovono contemporaneamente in senso contrario, fino ad incontrarsi nel punto opposto (punto 3).

REPLICAZIONE DEL CROMOSOMA DI E. COLI



Disegno schematico di un DNA circolare in fase di replicazione (le nuove catene sono colorate).

(a)

Modello unidirezionale

Origine



Iniziale

Movimento della forcella



Durante la replicazione

Modello bidirezionale

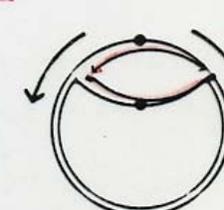
Origine

oriC →



Iniziale

Movimenti delle forcelle

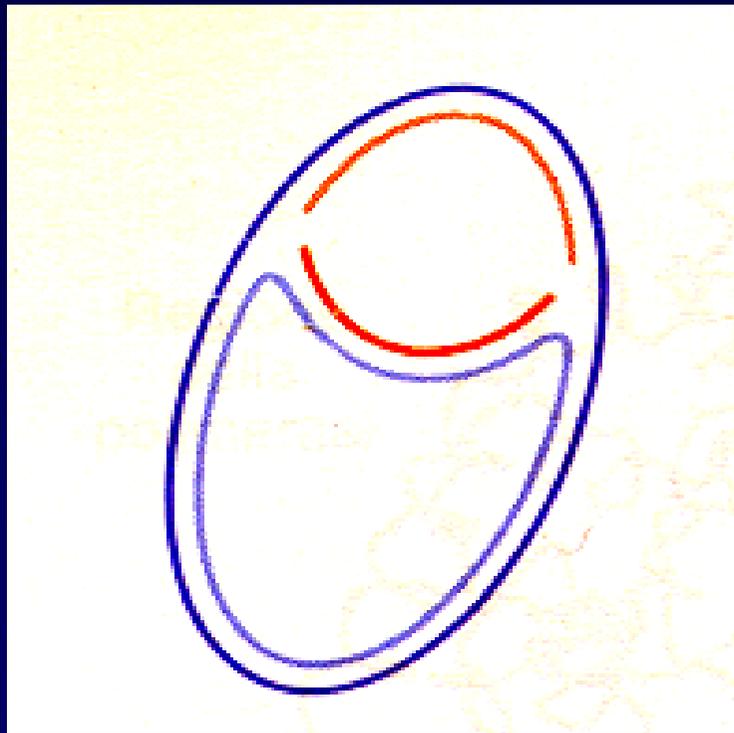


Durante la replicazione.

(b)

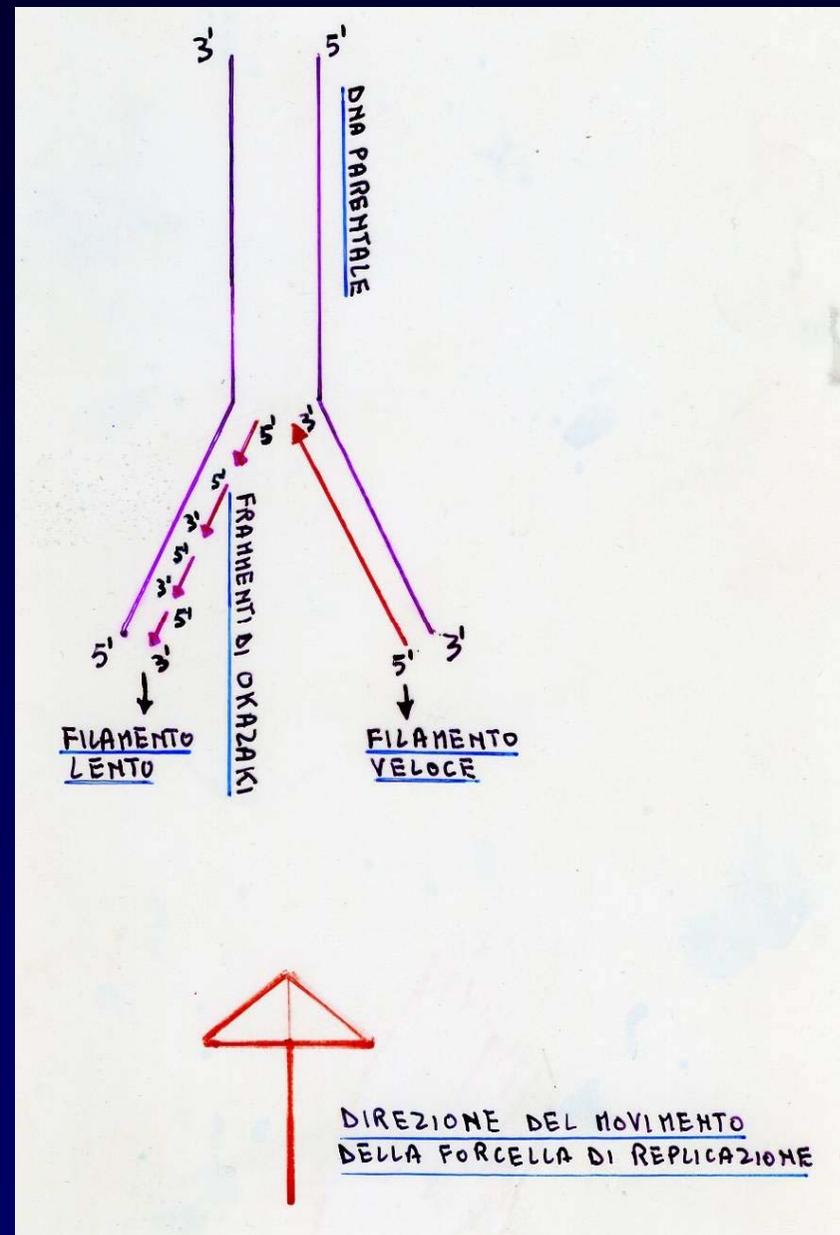
LA STRUTTURA THETA (θ)

Essa é una forma che assume la molecola circolare di DNA durante la duplicazione.

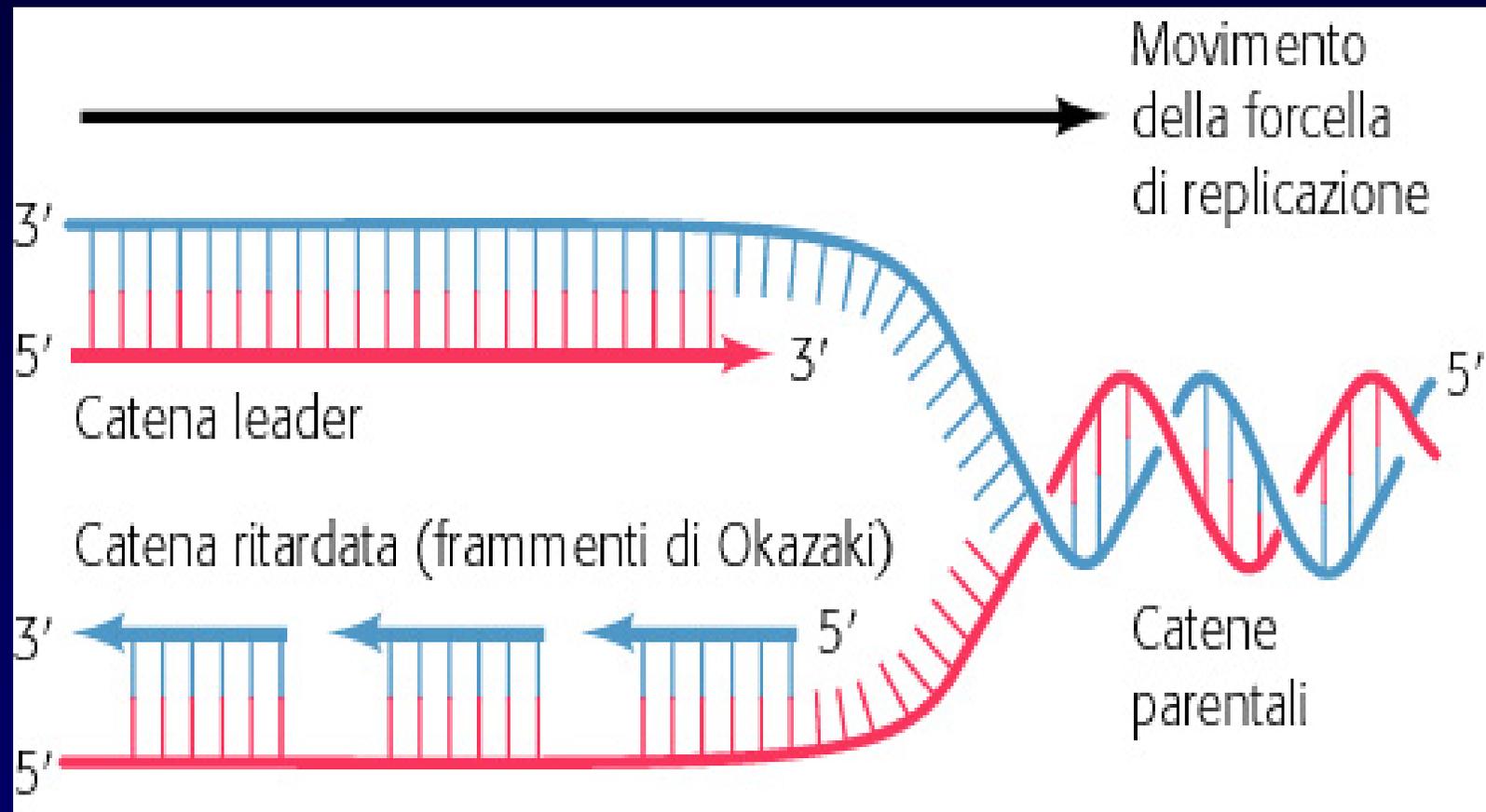


LA REPLICAZIONE DEL DNA IN E. COLI

- La sintesi del nuovo DNA è strettamente accoppiata allo svolgimento del DNA parentale.
- Un sito di svolgimento e di sintesi simultanea si chiama forcella di replicazione.



RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DI UNA FORCELLA DI REPLICAZIONE (SITO DI SVOLGIMENTO E SINTESI SIMULTANEI)

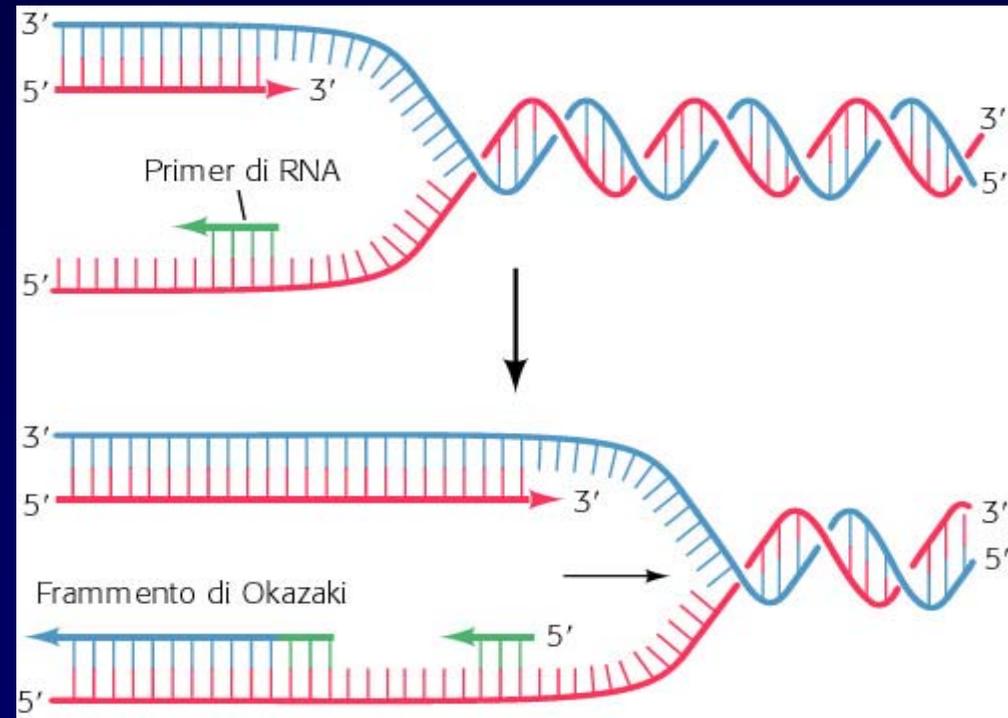


LA REPLICAZIONE DEL DNA

La sintesi del DNA è discontinua:
un filamento viene sintetizzato in frammenti ed uno in modo continuo.

La catena di comando viene sintetizzata in modo continuo.

La catena lenta viene sintetizzata in direzione opposta alla direzione della forcella come insieme di frammenti (frammenti di Okazaki) lunghi 1000-2000 nucleotidi, che successivamente verranno uniti.



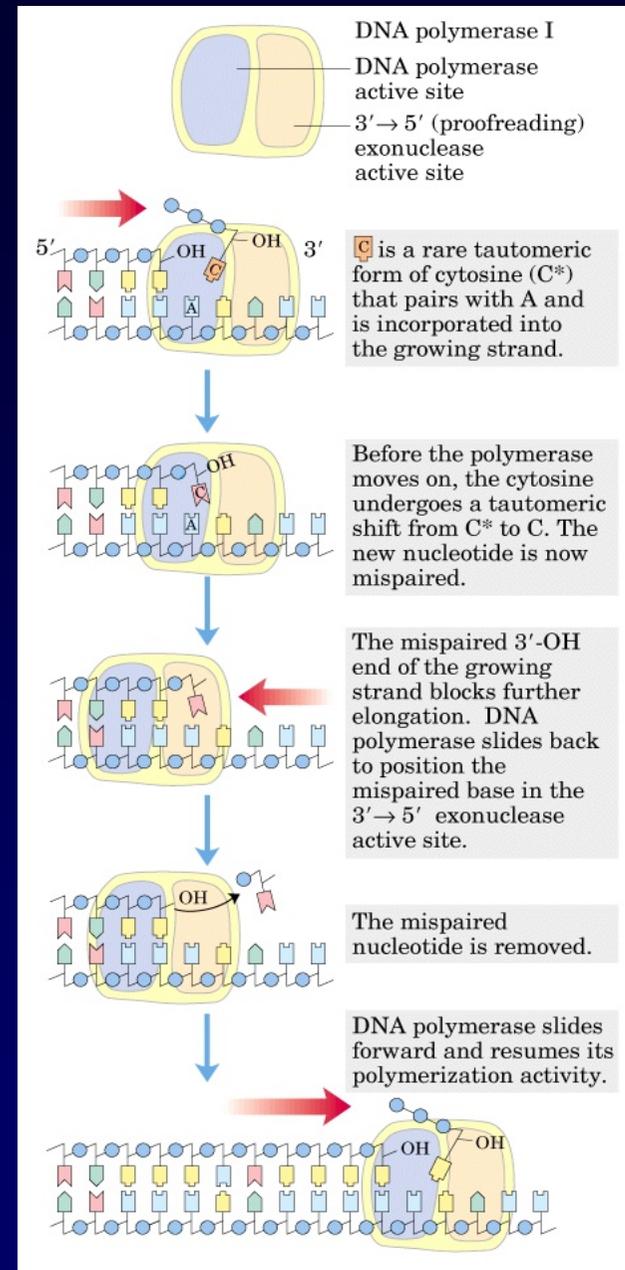
LE DNA POLIMERASI IN *E. COLI*

Caratteristiche	Polimerasi I	Polimerasi II	Polimerasi III
Gene strutturale	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC</i>
Peso molecolare	103 000	90 000	130 000
Numero di molecole per cellula	400	100	10
V_{max} , nucleotidi/secondo	16-20	2-5	250-1000
3' esonucleasi	Sì	Sì	No ^a
5' esonucleasi	Sì	No	No
Processività	3-200	10 000	500 000
Fenotipo mutante	UV ^s MMS ^s	No	<i>dna^{ts}</i>
Funzione biologica	Riparazione del DNA, excisione degli inneschi di RNA	Riparazione SOS del DNA?	Allungamento replicativo della catena

LA DNA POLIMERASI I

E' un monomero di 103 kD.

é un enzima moderatamente processivo (~20 passaggi di polimerizzazione prima di dissociarsi), ha un'alta fedeltà.

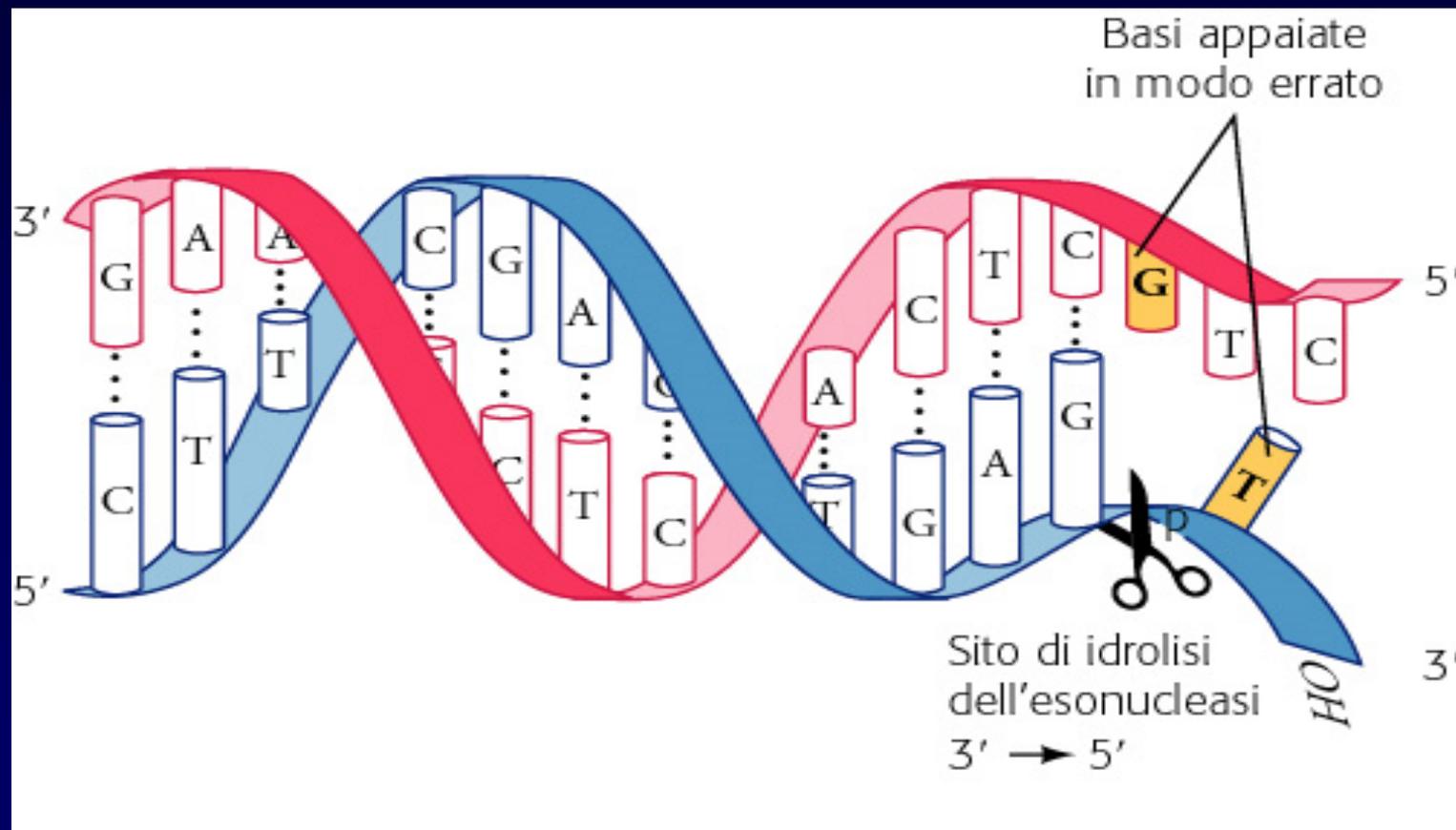


LA DNA POLIM. I HA TRE ATTIVITA' ENZIMATICHE IN UNA SINGOLA CATENA POLIPEPTIDICA

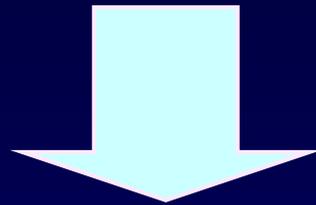
- 5'→3' POLIMERASI
- 5'→3' ESONUCLEASI
- 3'→5' ESONUCLEASI

Nella DNA pol I sono quindi presenti tre siti attivi, in una singola catena polipeptidica.

L'ATTIVITA' ESONUCLEASICA 3'→5' DELLA DNA POLIMERASI I



L'ATTIVITÀ ESONUCLEASICA 3'→5'

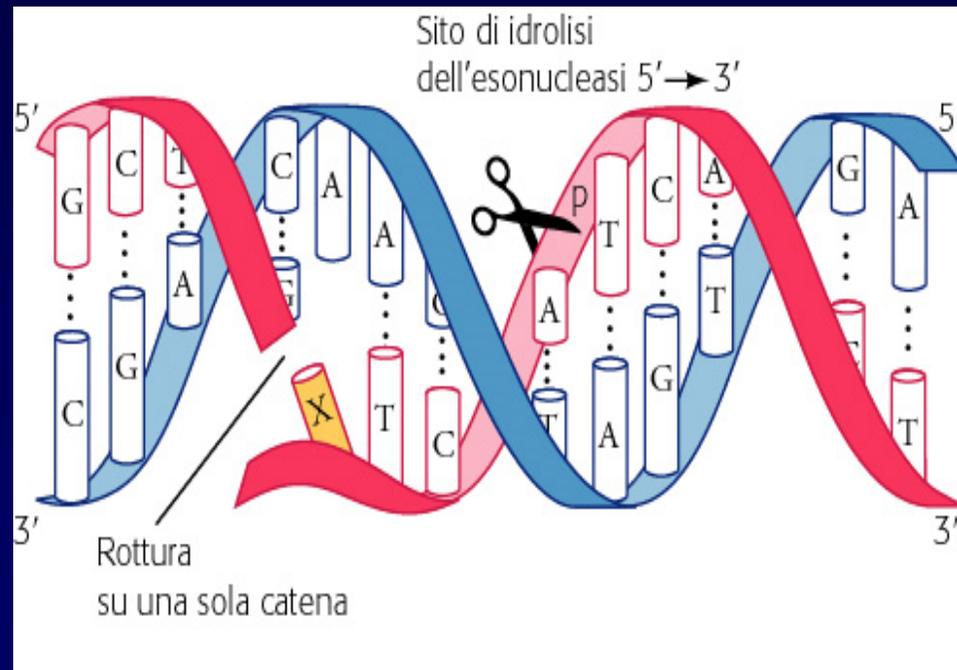


Questa attività di correzione aumenta molto l'accuratezza della replicazione.

L'ATTIVITA' ESONUCLEASICA 5'→3' DELLA DNA POLIMERASI I

L'attività esonucleasica 5'→3' è aumentata dalla sintesi concomitante di DNA.

Tale attività rimuove l'RNA primer e partecipa alla rimozione di dimeri di pirimidina formati dall'esposizione del DNA alla luce ultravioletta.



LA DNA POLIMERASI III

Ha un ruolo fondamentale nell'allungamento della catena,

il complesso della DNA polimerasi III è caratterizzato da:
processività (molte migliaia di legami fosfodiesteri),
potere catalitico (1000 nucleotidi al secondo),
fedeltà.

LA DNA POLIMERASI III

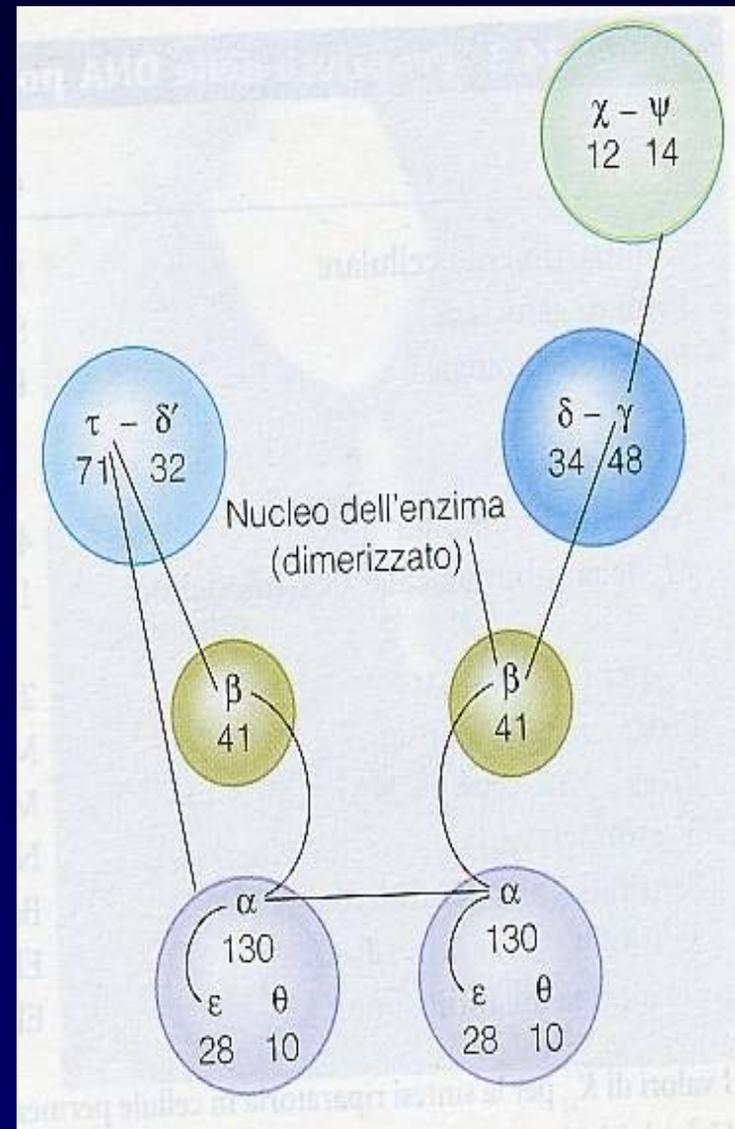
Essa (~900Kd) ha dieci tipi di catene polipeptidiche.

Le subunità $\alpha, \varepsilon, \theta$ formano un nucleo cataliticamente attivo ma non processivo.

La subunità α ha attività catalitica,

la subunità ε ha attività 3'→5' esonucleasica,

la subunità β contribuisce all'alto grado di processività, forse agganciando il nucleo allo stampo, assieme alla subunità τ .



LA DNA POLIMERASI III

Subunità della DNA polimerasi III di *E. coli*

Subunità	Numero di subunità per oloenzima	M_r delle subunità	Gene	Funzione della subunità
α	2	132 000	<i>polC (dnaE)</i>	Attività polimerasica
ϵ	2	27 000	<i>dnaQ (mutD)</i>	3' → 5' (proofreading) esonucleasica
θ	2	10 000	<i>holE</i>	Legame stabile allo stampo; dimerizzazione delle subunità centrali
τ	2	71 000	<i>dnaX</i>	
γ	2	52 000	<i>dnaX*</i>	Complesso che lega la pinza, costituito dalle subunità β sul filamento lento per ogni frammento di Okazaki
δ	1	35 000	<i>holA</i>	
δ'	1	33 000	<i>holB</i>	
χ	1	15 000	<i>holC</i>	
ψ	1	12 000	<i>holD</i>	
β	4	37 000	<i>dnaN</i>	Funziona come una pinza scorrevole per ottimizzare la processività

Nucleo della polimerasi

GLI ASPETTI COMUNI DELLE DNA POLIMERASI I, II E III

Catalizzano la sintesi di DNA in direzione $5' \rightarrow 3'$,

hanno bisogno di uno stampo e di un primer (innesco) con $3'$ -OH libero,

hanno l'attività esonucleasica $3' \rightarrow 5'$.

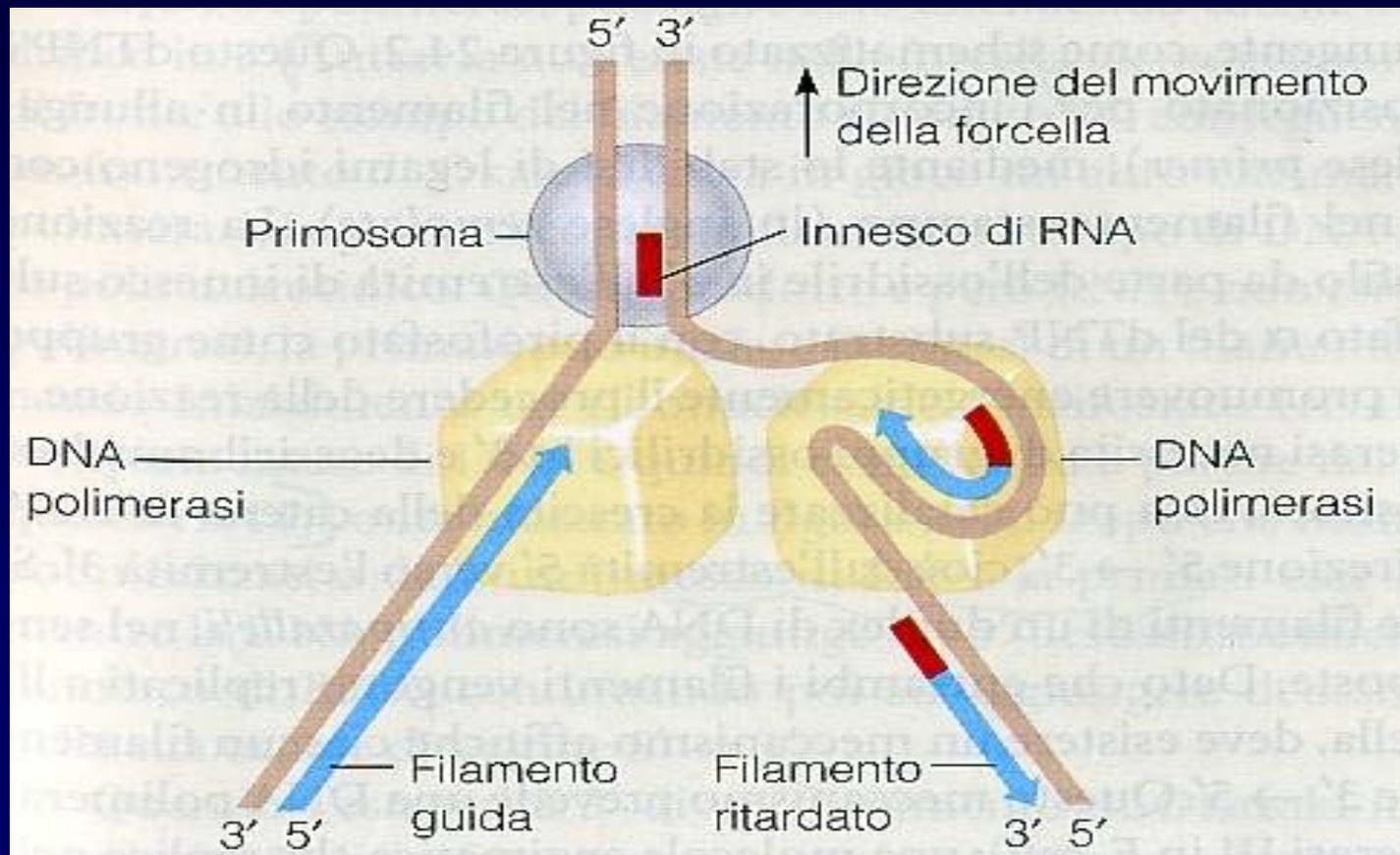
LE DNA POLIMERASI I, II E III

La DNA pol III sintetizza la maggior parte del nuovo DNA,

la DNA pol I elimina il primer e riempie le interruzioni,

la DNA pol II partecipa alla riparazione del DNA, ma non è necessaria per la replicazione.

LE FASI PRINCIPALI DELLA REPLICAZIONE DEL DNA



LE FASI DELLA REPLICAZIONE

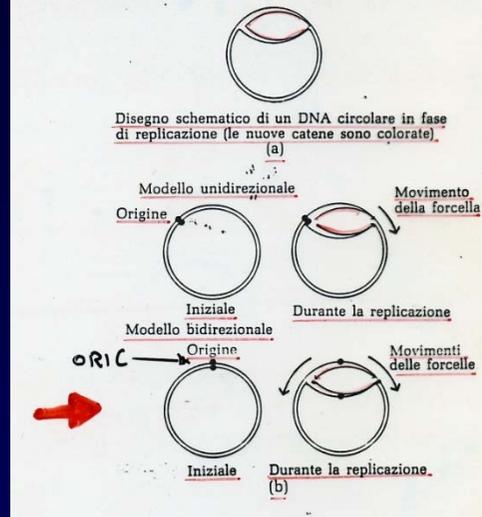
1. **INIZIO:** apertura dello stampo e sintesi del primer
2. **ALLUNGAMENTO:** sintesi
3. **TERMINAZIONE.**

LE PROTEINE NECESSARIE PER LA REPLICAZIONE IN *E. COLI*

Proteine necessarie per iniziare la replicazione all'origine di *E. coli*

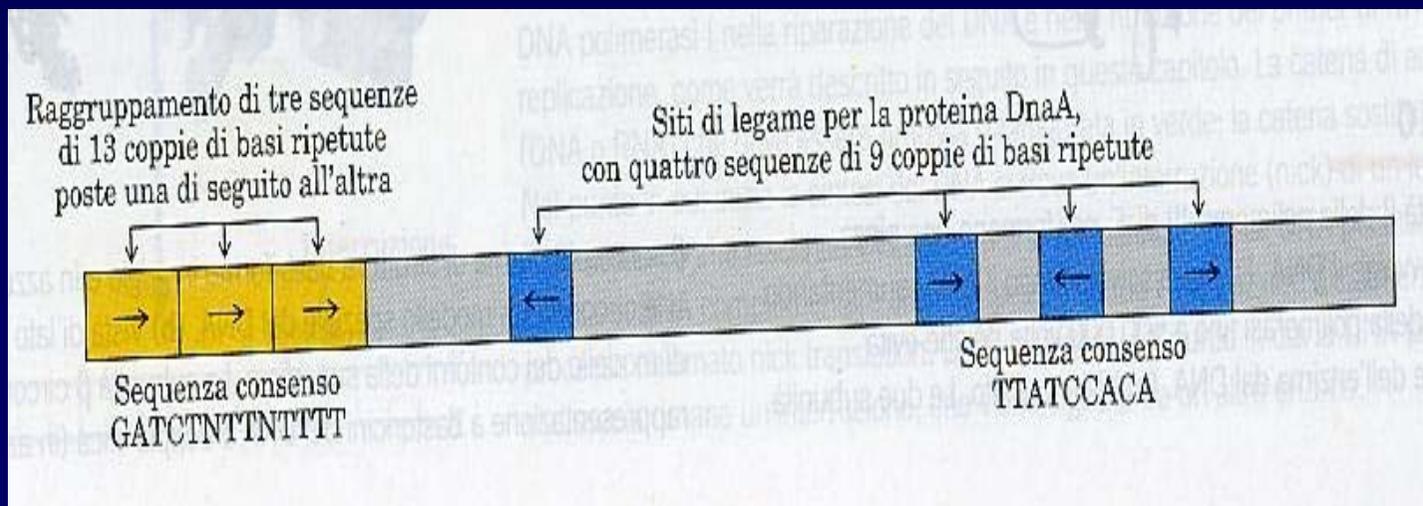
Proteina	M,	Numero di subunità	Funzione
Proteina DnaA	52 000	1	Riconosce l'origine della sequenza; apre il duplex in siti specifici all'origine
Proteina DnaB (elicasi)	300 000	6*	Disavvolge il DNA
Proteina DnaC	29 000	1	Necessaria per il legame di DnaB all'origine
HU	19 000	2	Proteina istone-simile; proteina che apre il DNA; promuove l'inizio
Primasi (proteina DnaG)	60 000	1	Sintetizza i primer di RNA
Proteina che si lega al DNA a catena singola (SSB)	75 600	4*	Si lega al DNA a singola elica
RNA polimerasi	454 000	5	Facilita l'attività della DnaA
DNA topoisomerasi II (DNA girasi)	400 000	4	Rilascia la tensione torsionale generata dallo svolgimento del DNA
Dam metilasi	32 000	1	Metila le sequenze (5')GATC in <i>oriC</i>

REPLICAZIONE DEL CROMOSOMA DI E. coli



L'INIZIO

La replicazione inizia con l'apertura del sito **oriC** (245 coppie di basi).

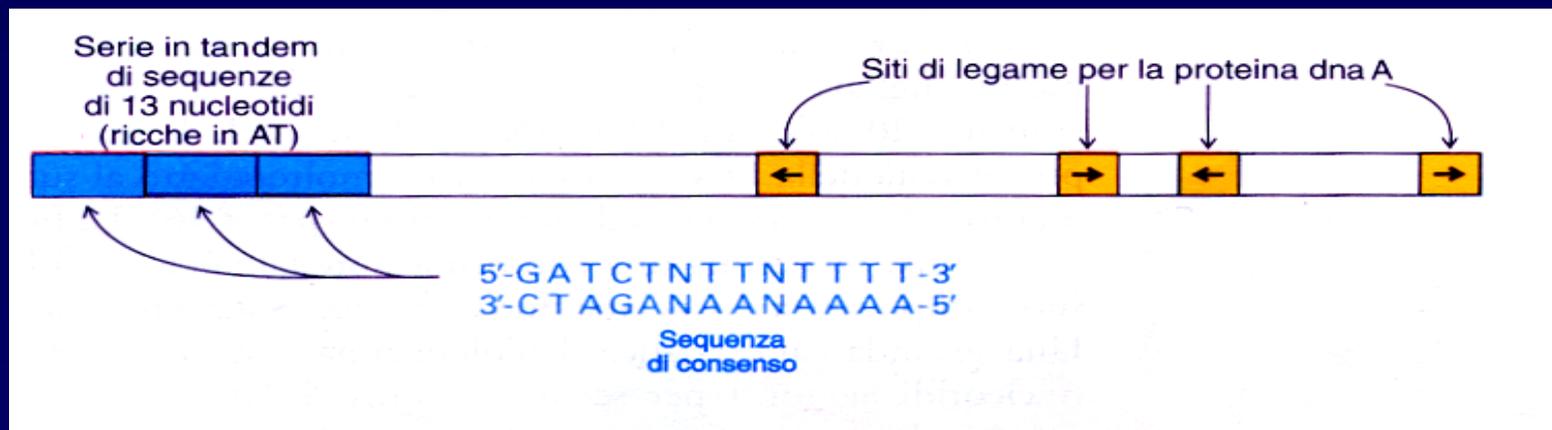


IL SITO oriC

E' costituito da una disposizione in tandem di **tre** sequenze di tredici basi quasi identiche. Questi frammenti sono ricchi di appaiamenti AT che facilitano la separazione dell'elica,

ciascuna sequenza inizia con **GATC** e presenta una metilazione a livello dell'adenina (importante per controllare il momento dell'inizio della replicazione),

il legame della proteina **dnaA** a quattro siti su oriC, vicino alle tre sequenze, dà inizio all'apertura dello stampo di DNA ed alla sintesi di un primer.



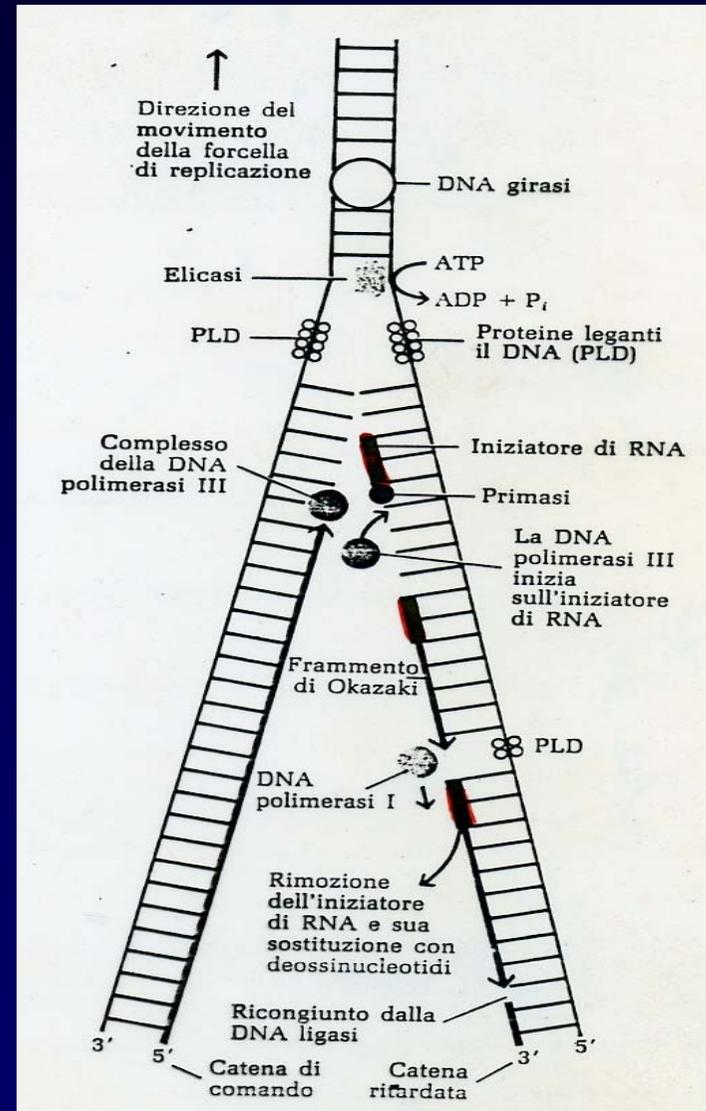
L'INIZIO

Il complesso **Dna A, B, C** apre la doppia elica,
in particolare, la **Dna B** (elicasi) catalizza
la sua apertura (favorita da **ATP**),

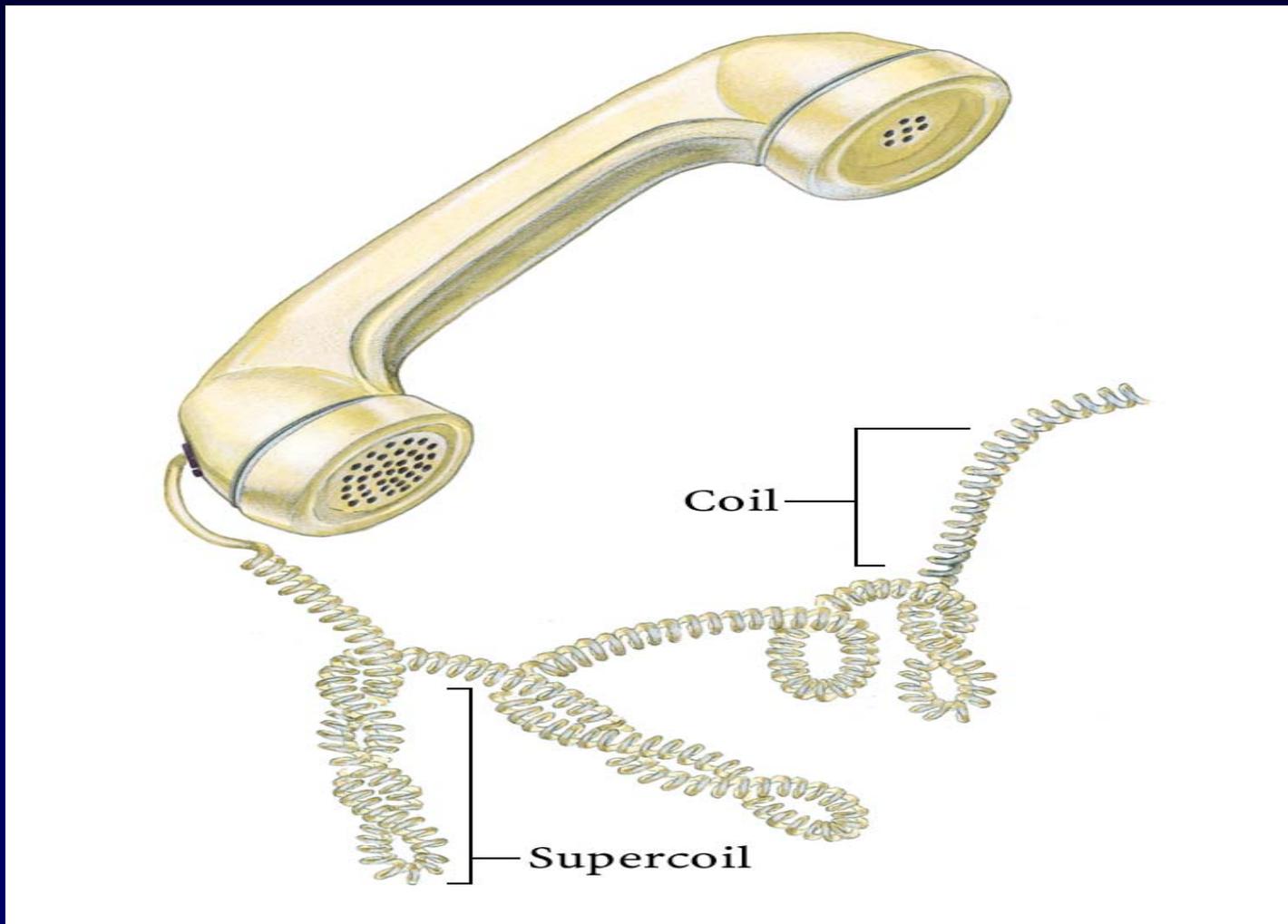
la **proteina SSB** stabilizza la porzione di
DNA a singolo filamento svolta,

l'apertura del DNA all'origine porterebbe
a un superavvolgimento positivo del DNA
circolare; questo é impedito della **DNA
girasi**, che introduce superavvolgimenti
negativi;

viene sintetizzato il **primer di RNA**.



I SUPERAVVOLGIMENTI



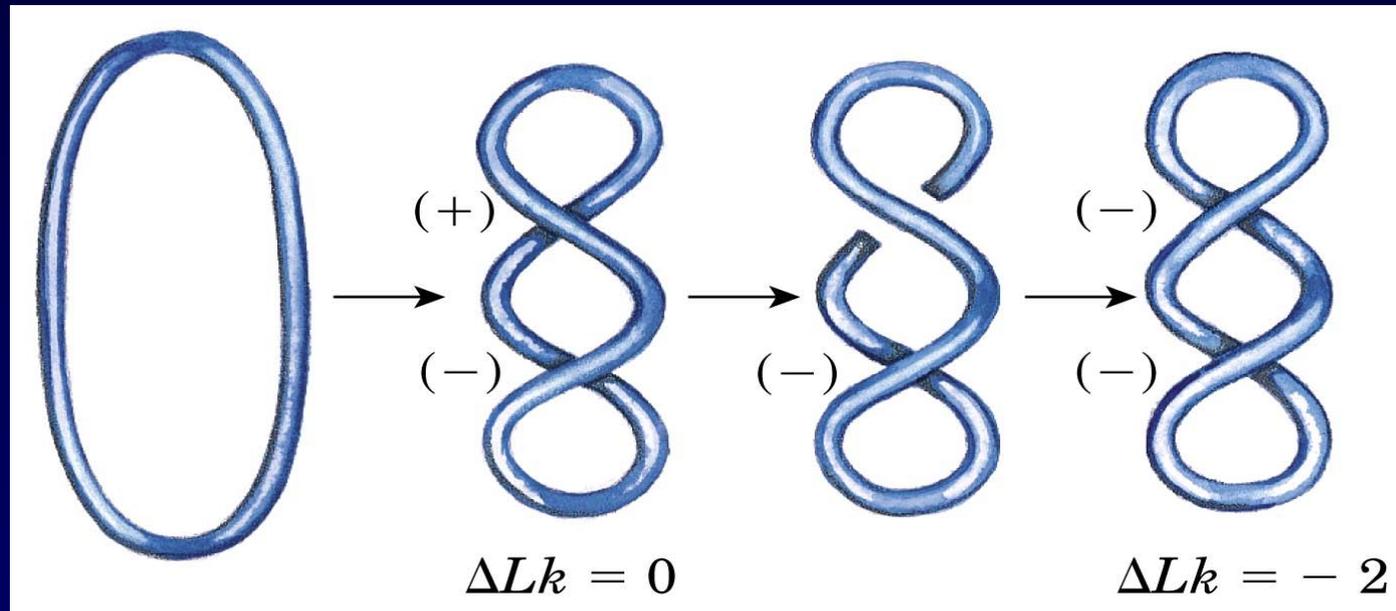
I SUPERAVVOLGIMENTI

Superavvolgimento significa avvolgimento di qualcosa già avvolto



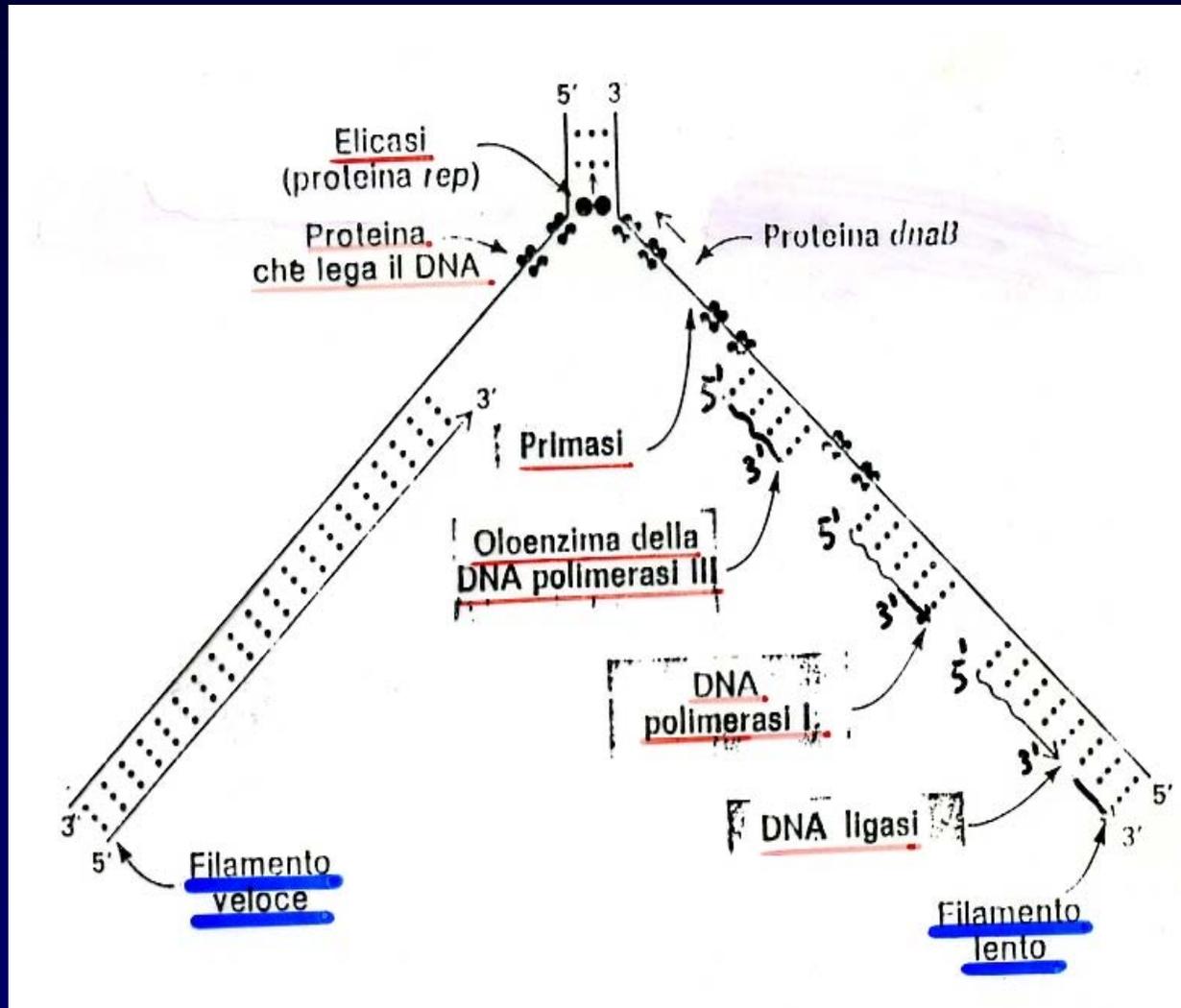
LA DNA GIRASI

L'enzima riduce la tensione a monte della forcella, rompendo temporaneamente i due filamenti di DNA, con rotazione dei filamenti di DNA e successiva risaldatura,



altrimenti lo svolgimento dei filamenti diventerebbe energeticamente impossibile.

LO SCHEMA DEGLI EVENTI ENZIMATICI A LIVELLO DELLA FORCELLA DI REPLICAZIONE



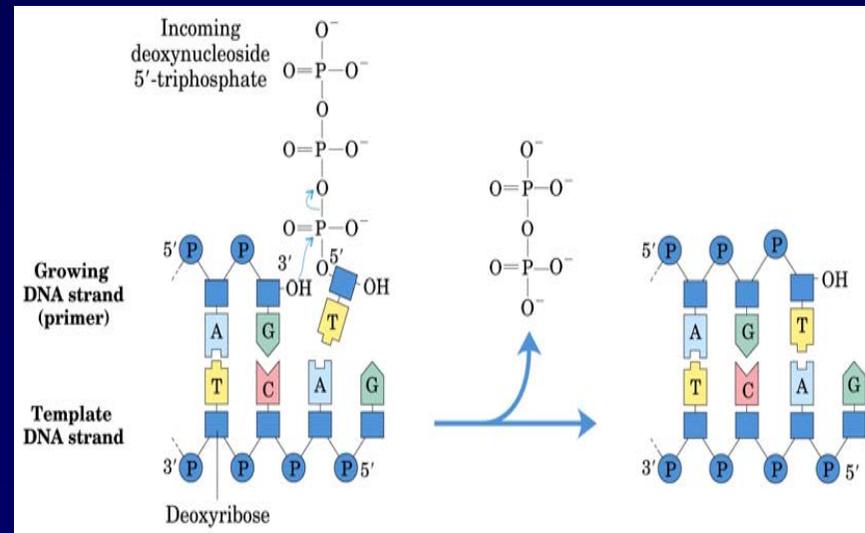
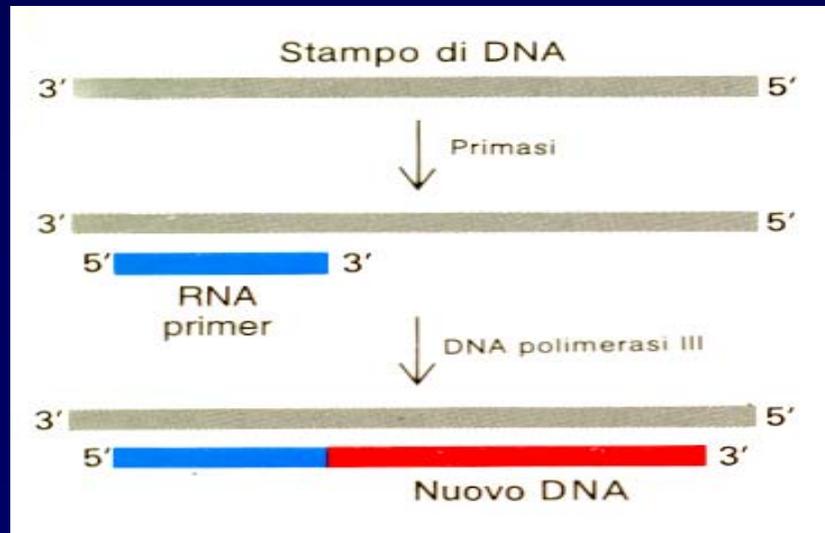
LE PROTEINE NECESSARIE PER LA REPLICAZIONE IN E.COLI

<i>Proteina</i>	<i>Ruolo</i>	<i>Dimensioni (kd)</i>	<i>Molecole per cellula</i>
Elicasi (proteina dnaB)	Inizia lo svolgimento della doppia elica	300	20
Primasi	Sintetizza gli RNA primer	60	50
SSB	Stabilizza regioni a singolo filamento	74	300
DNA girasi	Introduce superavvolgimenti negativi	400	250
DNA polimerasi III oloenzima	Sintetizza il DNA	~ 900	20
DNA polimerasi I	Rimuove il primer e riempie le interruzioni	103	300
DNA ligasi	Unisce le estremità del DNA	74	300

L'ALLUNGAMENTO

La DNA polimerasi estende la catena a partire da un gruppo 3'-OH libero; poiché non esiste alcun gruppo funzionale di questo tipo di fronte allo stampo, è l'enzima primasi (RNA polimerasi) che inizia la sintesi,

essa posiziona un ribonucleoside 5'-trifosfato (rNTP) di fronte alla sua base complementare di DNA e quindi estende la catena.

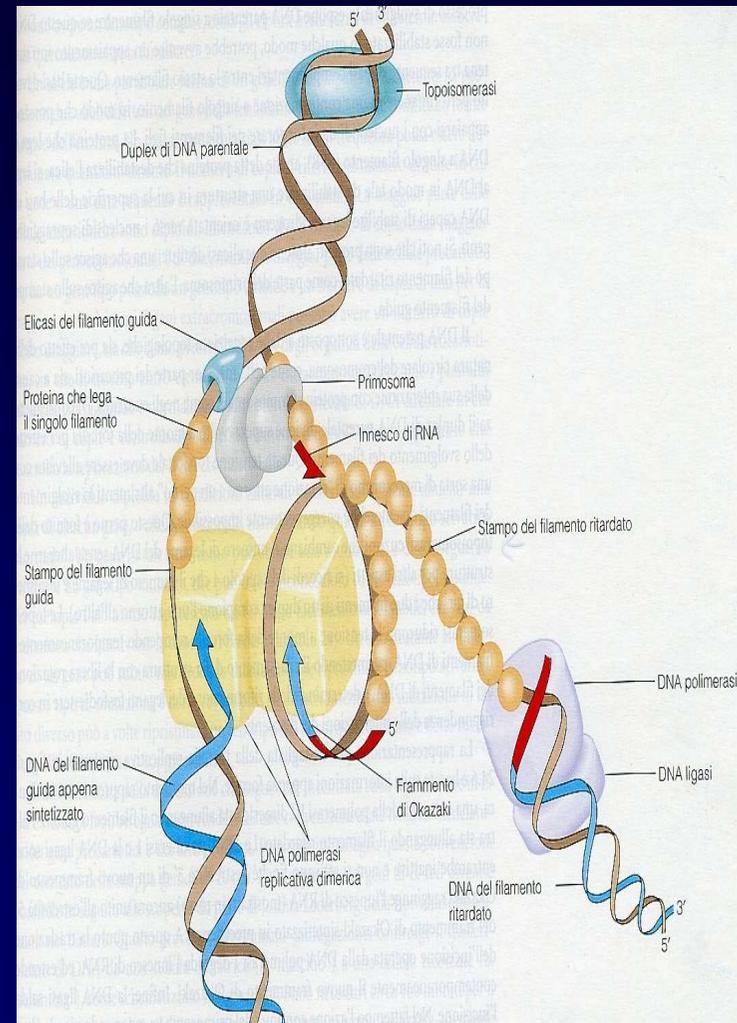


L'ALLUNGAMENTO

- Le **RNA polimerasi** possono iniziare le catene senza primer, perché non esaminano la coppia di basi precedente;

l'RNA primer é a bassa fedeltá, perché **manca** dell'attività **3'→5'** esonucleasica,

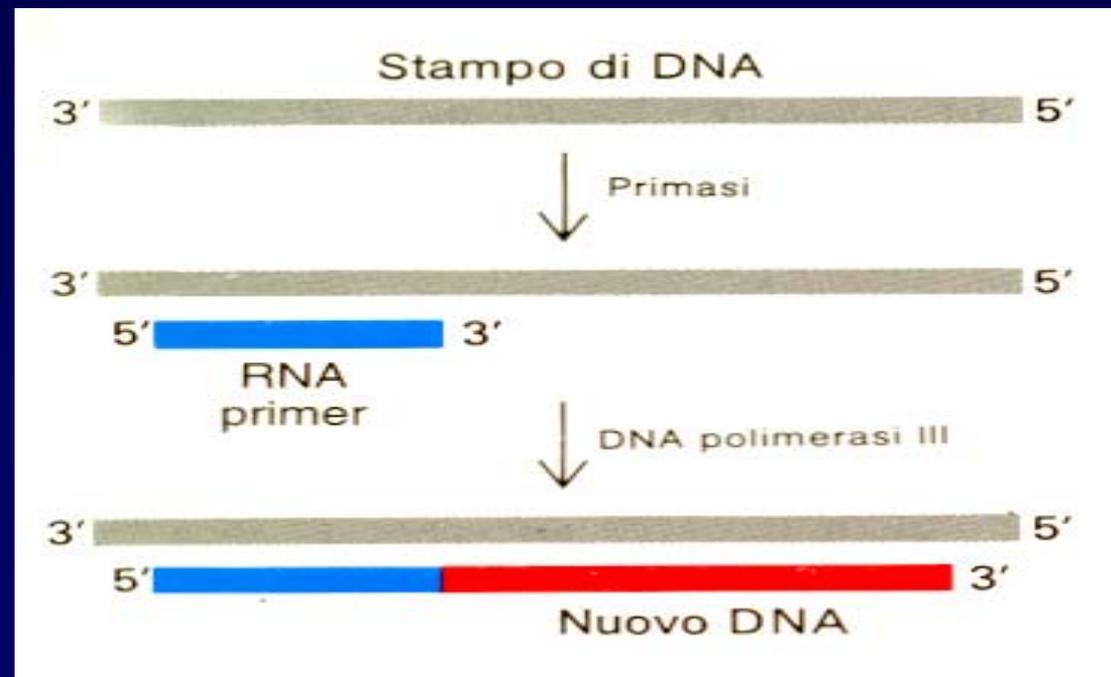
dopo che alcuni (~5) ribonucleotidi sono stati polimerizzati per dare un innesco di RNA (primer), la **primasi** esce di scena.



L'ALLUNGAMENTO

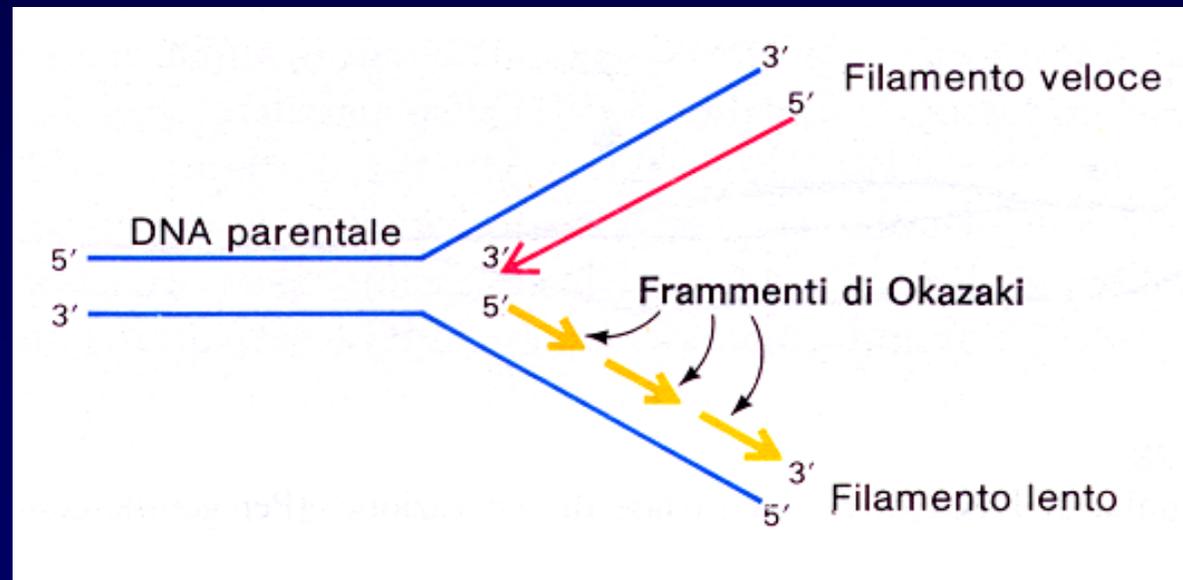
A questo punto, la DNA polimerasi III inizia a sintetizzare il DNA aggiungendo i deossiribonucleotidi all'estremità 3' dell'innesco,

l'RNA primer viene rimosso dalla attività 5' → 3' esonucleasica della DNA polim. I.



L'ALLUNGAMENTO

Il filamento lento viene sintetizzato in frammenti, mentre il filamento guida é sintetizzato in continuo dalla DNA polimerasi III che non si stacca, se non al termine della duplicazione.

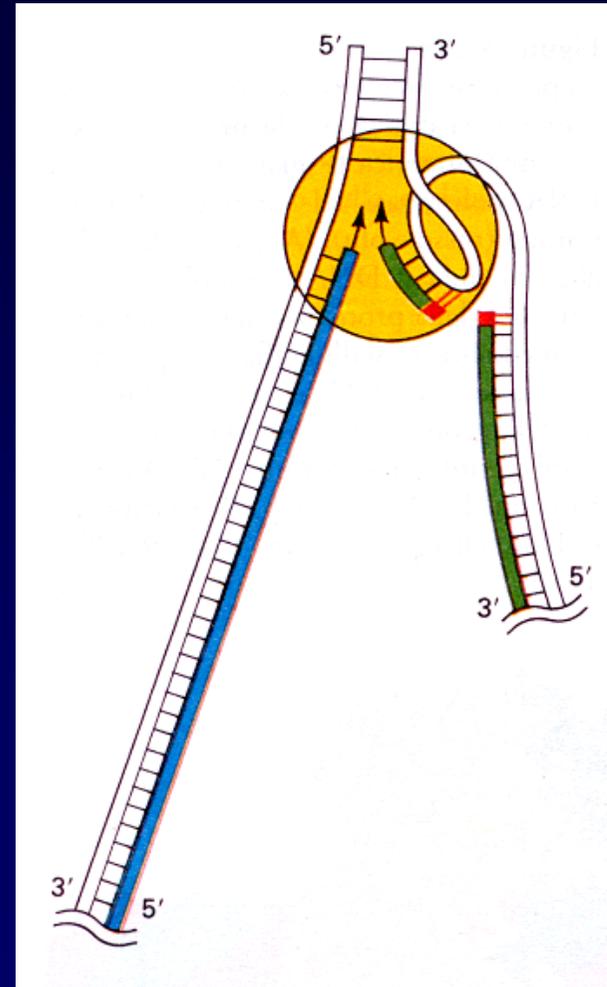


SINTESI CONTEMPORANEA DEL FILAMENTO LENTO E DEL FILAMENTO VELOCE DA PARTE DELLA DNA POLIMERASI III

A livello del filamento lento, si forma un **anello** che permette la corretta sintesi di entrambi i filamenti figli da parte della DNA polimerasi III,

l'anello permette la sintesi del filamento lento,

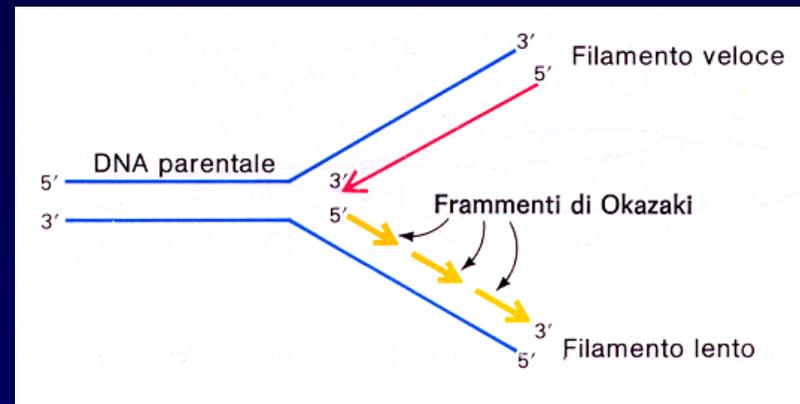
la sintesi discontinua del filamento lento permette una crescita effettiva della catena in direzione $3' \rightarrow 5'$.



LA SINTESI DEL FILAMENTO LENTO

La DNA polimerasi III dopo aver sintetizzato circa 1000 nucleotidi, completando quindi la sintesi di un frammento di Okazaki, si stacca dallo stampo,

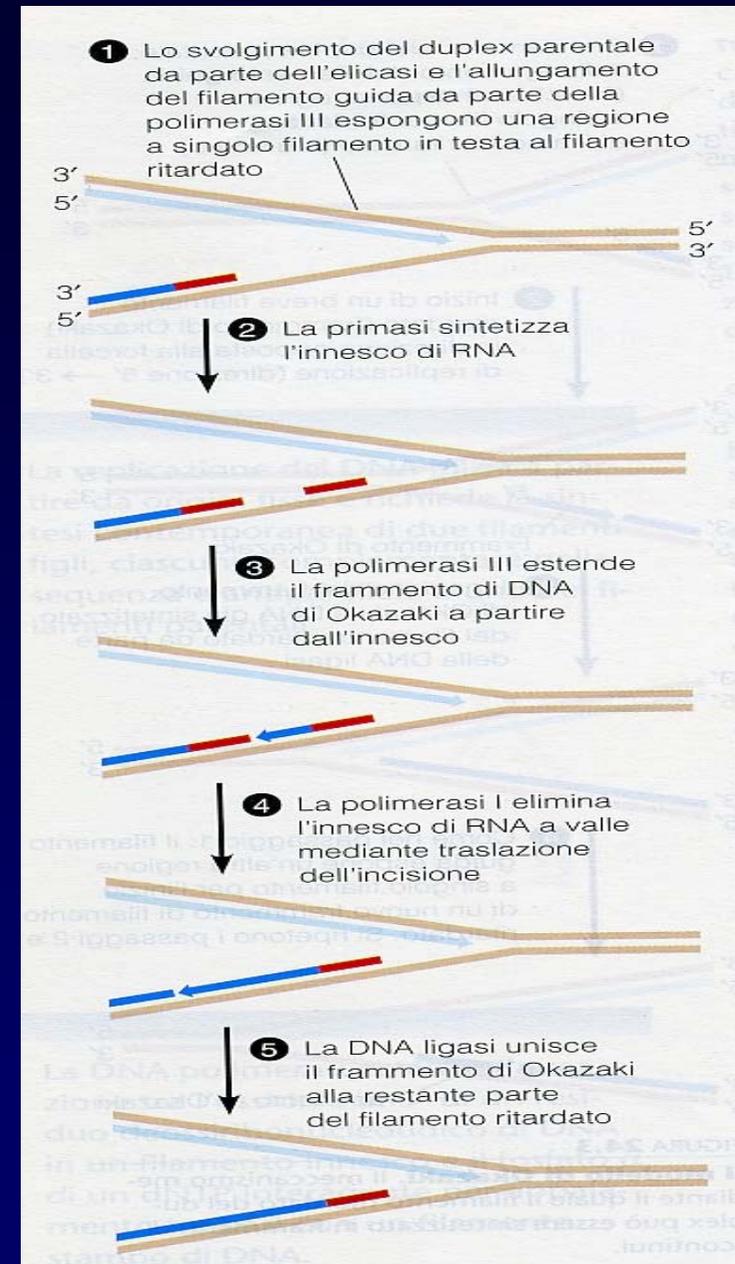
essa permette la formazione di un nuovo anello, dove la primasi sintetizzerà un altro primer, per iniziare la formazione di un altro frammento di Okazaki.



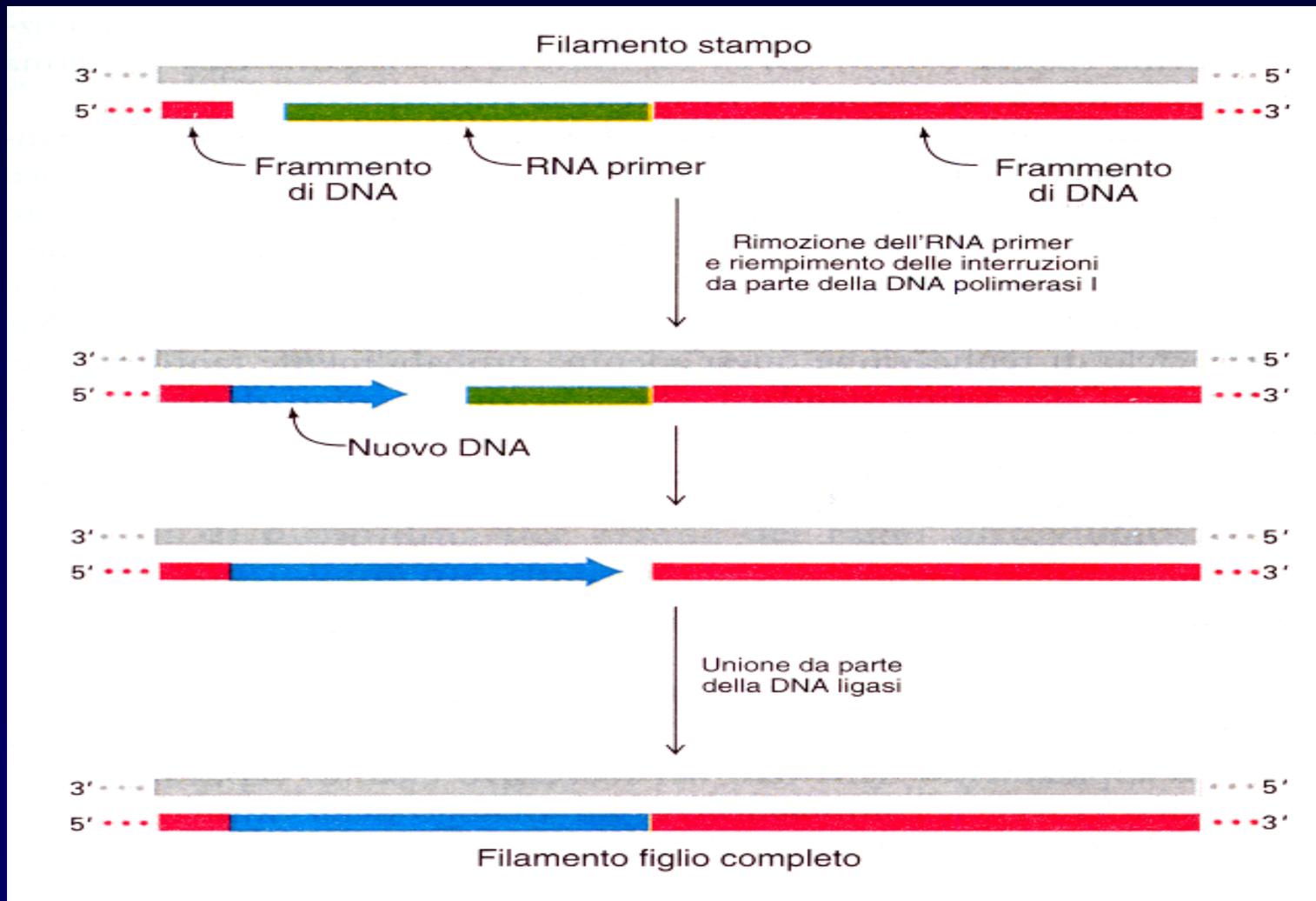
IL MECCANISMO DI SINTESI DEL FILAMENTO LENTO

IL MODELLO DI OKAZAKI

La sintesi di ciascun frammento di Okazaki del filamento ritardato é iniziata dalla sintesi di un corto innesco di **RNA**, che viene quindi esteso dalla **DNA polimerasi III**.

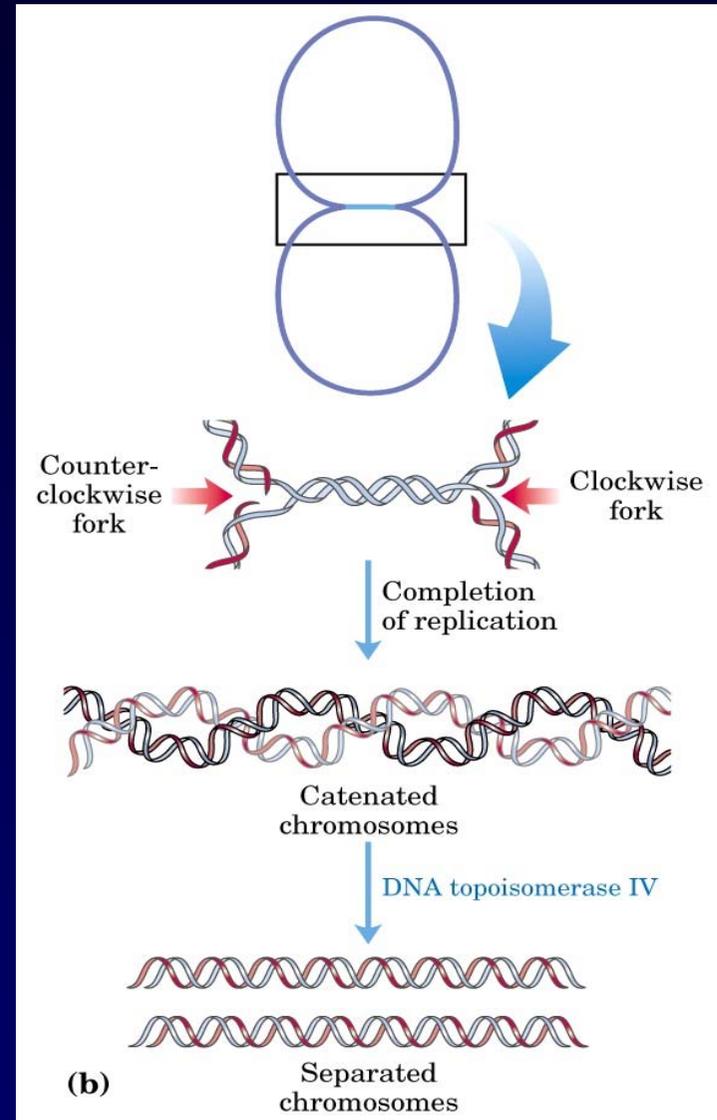


IL MECCANISMO DI SINTESI DEL FILAMENTO LENTO



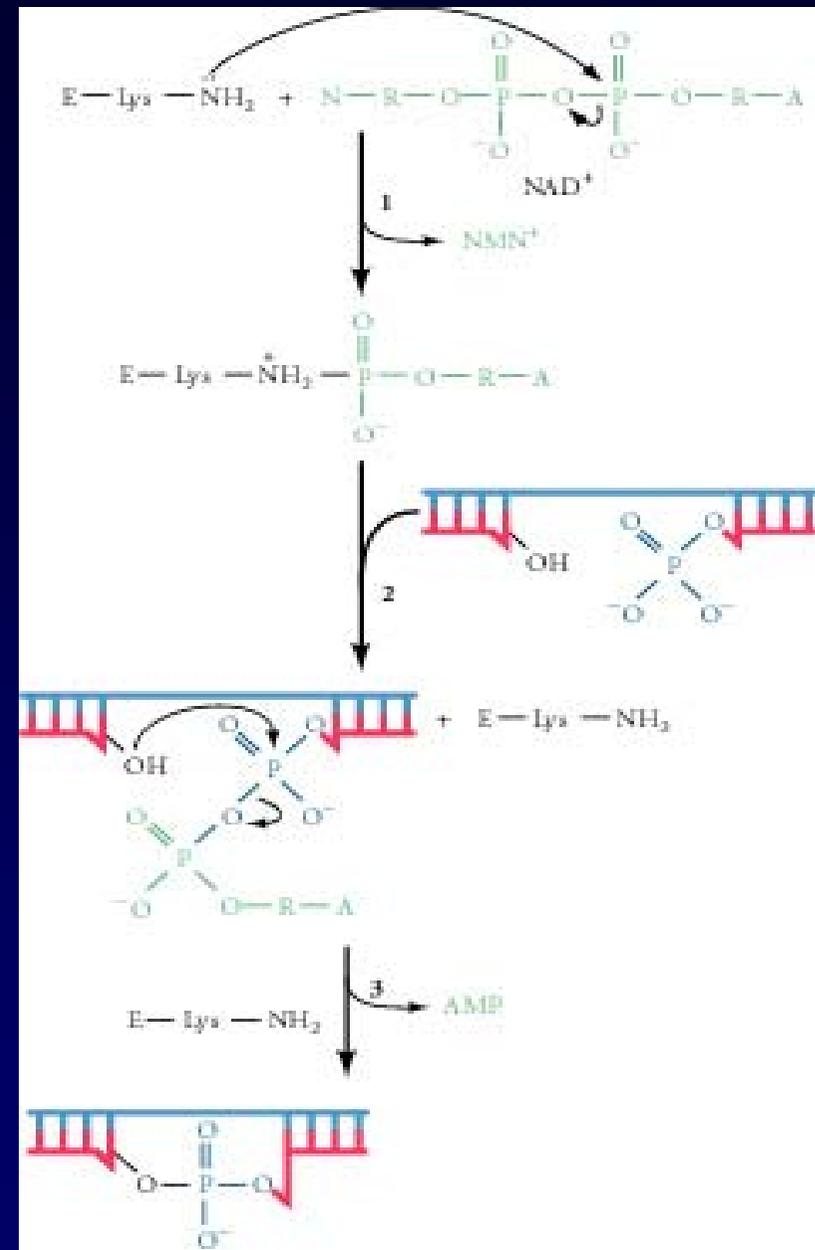
LE FASI DELLA REPLICAZIONE

LA TERMINAZIONE



LA TERMINAZIONE

La DNA ligasi di E.coli unisce i frammenti del filamento lento del DNA, che diventa continuo.



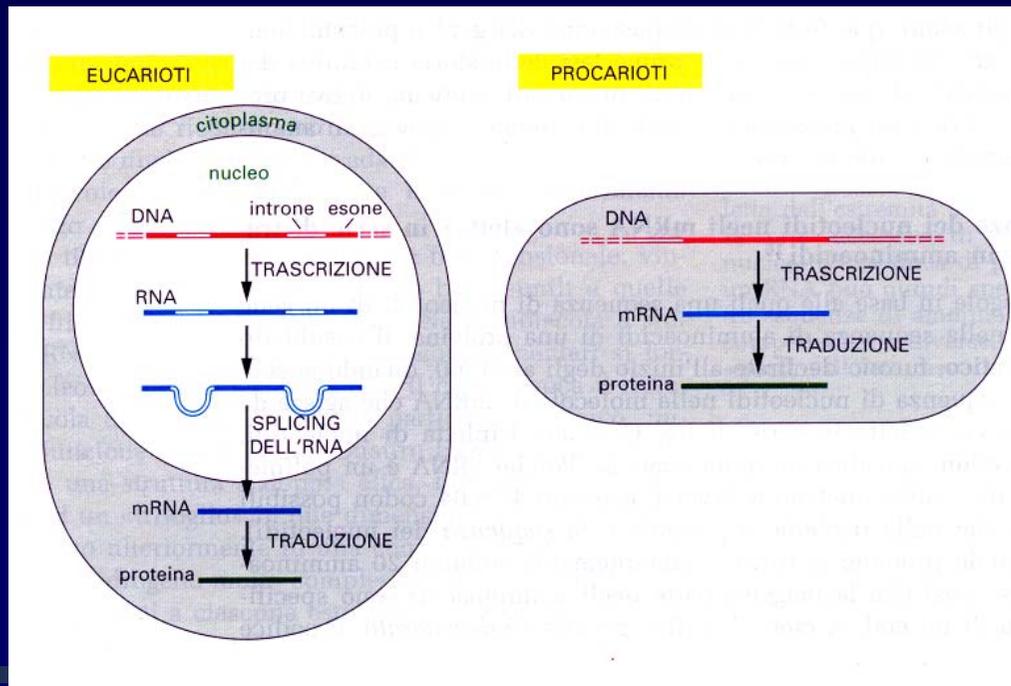
LA SINTESI DELL'RNA NEI PROCARIOTI

IL FLUSSO DELL'INFORMAZIONE GENETICA

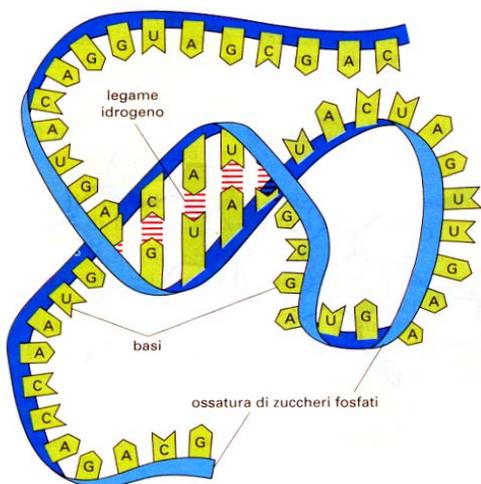
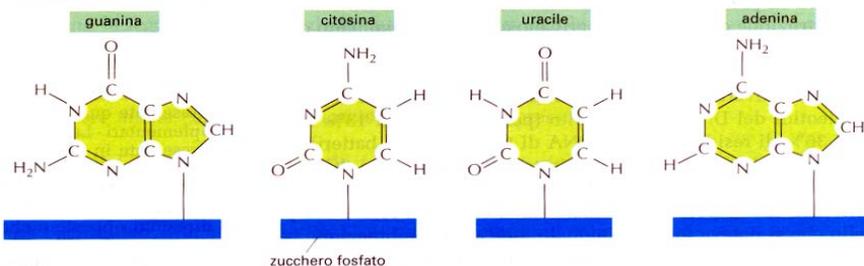
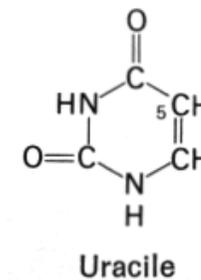
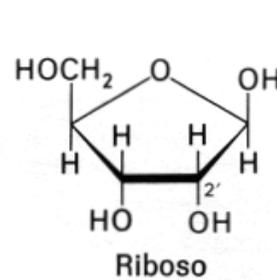
DNA → RNA → PROTEINE

Trascrizione

Traduzione



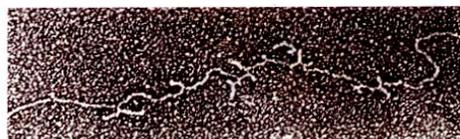
LA STRUTTURA DELL'RNA



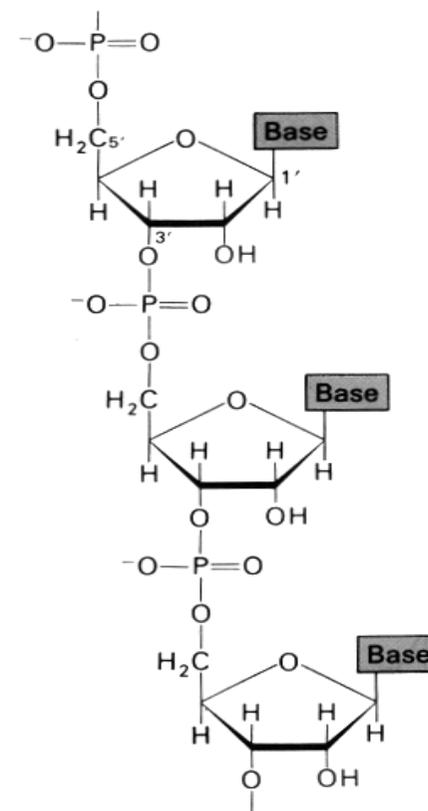
SINGOLO FILAMENTO DI RNA

L'RNA è a singolo filamento, ma contiene piccole regioni locali in cui le basi si accoppiano in modo complementare per un processo di ripiegamento casuale. Le regioni in cui le basi sono accoppiate si possono vedere al microscopio elettronico come ramificazioni della catena.

FOTOGRAFIA AL MICROSCOPIO ELETTRONICO DELL'RNA



(Fornita da Peter Wellauer.)

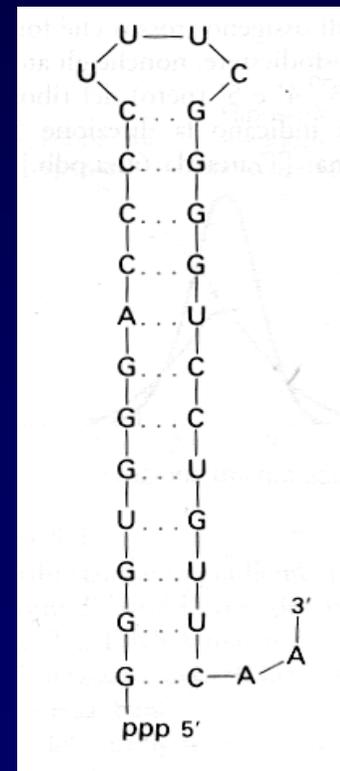


LE CARATTERISTICHE DELL'RNA

Le molecole di RNA sono in genere a **singolo filamento** eccetto in alcuni virus.

La concentrazione di **adenina** è diversa da quella di **uracile**; così come la quantità di **guanina** è diversa da quella di **citocina**.

Solo alcune regioni sono a doppia elica (**RIPIEGAMENTI A FORCINA**), ma possono avere appaiamenti imperfetti.



LE SPECIE DI RNA

LE CELLULE CONTENGONO DIVERSI TIPI DI RNA

- L'**RNA messaggero (mRNA)** è lo stampo per la sintesi proteica. Ogni molecola di mRNA viene prodotta per ciascun gene o gruppo di geni,
 - L'**RNA transfer (tRNA)** porta una forma attivata degli amminoacidi ai ribosomi per la formazione dei legami peptidici, in una sequenza determinata dallo stampo di mRNA. Il tRNA è la più piccola delle molecole di RNA (~25kDa),
 - L'**RNA ribosomiale (rRNA)** è il componente principale dei ribosomi e svolge un ruolo sia catalitico sia strutturale nella sintesi proteica;
- infine, negli Eucarioti vi sono anche piccole molecole di RNA nucleare (**snRNA**) e citoplasmatiche con diversa funzione (**splicing**).

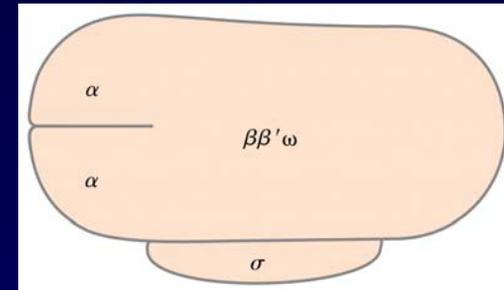
LE MOLECOLE DI RNA IN E. COLI

<i>Tipo</i>	<i>Quantità relativa (%)</i>	<i>Coefficiente di sedimen- tazione (S)</i>	<i>Massa (kd)</i>	<i>Numero di nucleotidi</i>
RNA ribosomiale (rRNA)	80	23	$1,2 \times 10^3$	3700
		16	$0,55 \times 10^3$	1700
		5	$3,6 \times 10^1$	120
RNA transfer (tRNA)	15	4	$2,5 \times 10^1$	75
RNA messaggero (mRNA)	5		Eterogeneo	

L'RNA POLIMERASI (~450Kd)

L'RNA polimerasi catalizza la sintesi di mRNA, rRNA e tRNA.

Esso è un enzima multimerico
costituito dalle subunità α_2 , β , β' , σ , ω .



La molecola priva della subunità sigma (σ) è detta **nucleo** dell'enzima.

La subunità σ trova il promotore, promuove la sintesi e subito dopo si dissocia.

LA COMPOSIZIONE IN SUBUNITÁ DELLA RNA POLIMERASI DI *E. COLI*

Subunità	M_r	Numero per molecola di enzima	Funzione
α	36 500	2	Inizio della catena, interazione con proteine regolatrici
β	151 000	1	Inizio della catena e allungamento
β'	155 000	1	Legame del DNA
σ	70 000	1	Riconoscimento del promotore
ω	11 000	1	Sconosciuta

Il nucleo dell'enzima contiene il sito catalitico e la subunità β lega i ribonucleosidi trifosfato.

I COMPITI SVOLTI DALL'RNA POLIMERASI

- 1) Cerca i siti di inizio (i siti promotori),
- 2) svolge un breve tratto di DNA a doppia elica,
- 3) sceglie il ribonucleoside trifosfato corretto e catalizza la formazione di un legame fosfodiesterico,
- 4) riconosce i segnali di termine,
- 5) interagisce con attivatori e repressori proteici.

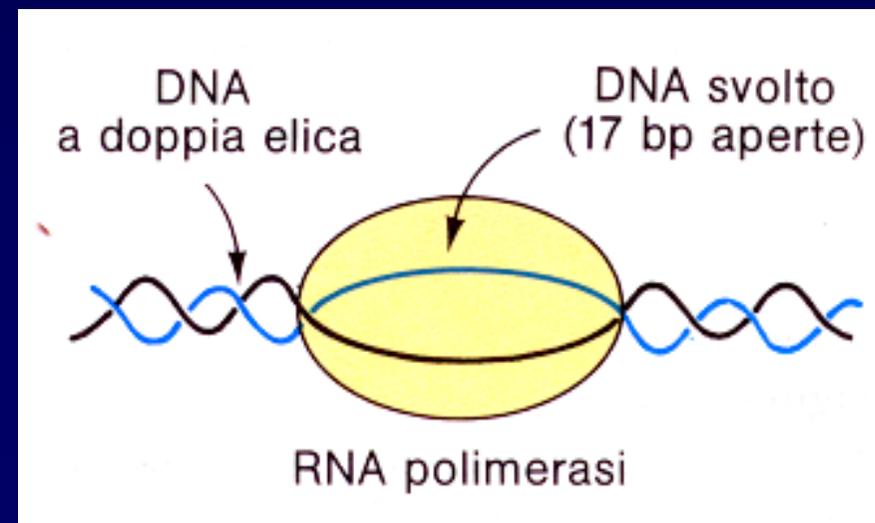
LA SINTESI DI RNA DA PARTE DELL'RNA POLIMERASI IN E.COLI AVVIENE IN TRE STADI

1) **INIZIO**: ricerca sul DNA da parte della subunità σ (sigma) dei siti di inizio ove sono presenti i promotori senza svolgere la doppia elica.

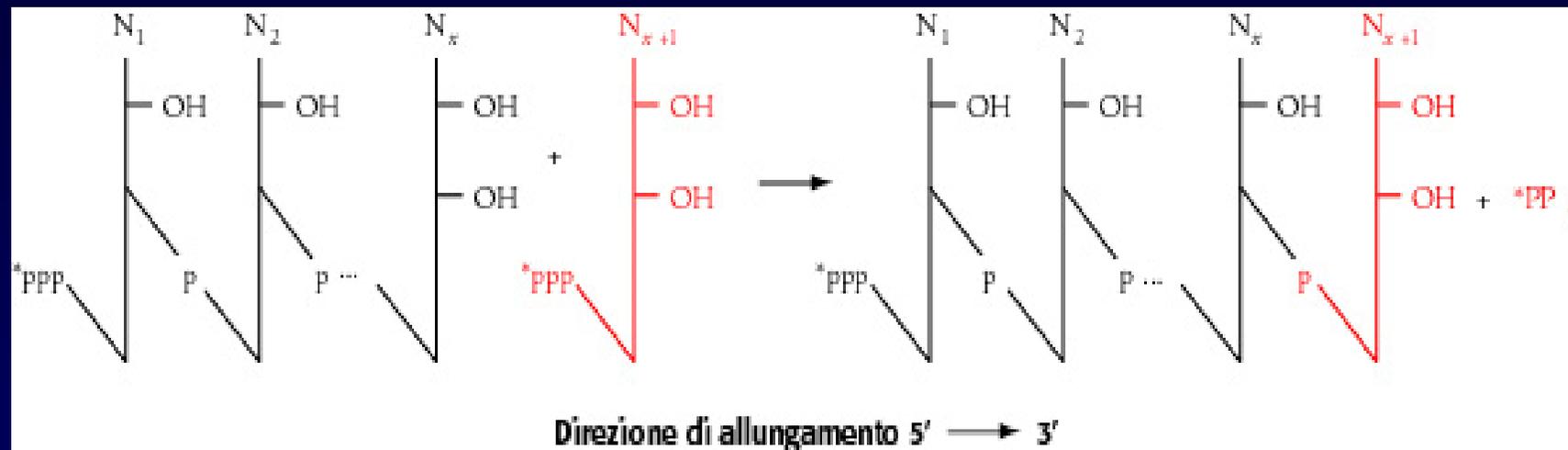
2) **ALLUNGAMENTO**: svolge un breve tratto di DNA a doppia elica per produrre uno stampo a singolo filamento da cui prendere istruzioni. Questo tratto corrisponde ad un segmento di 17 coppie di basi cioè a 1.6 giri di elica di DNA. L'RNA polimerasi è totalmente processiva.

3) **TERMINE**: riconosce i segnali di termine che specificano il punto in cui il trascritto deve finire.

Interagisce con repressori o attivatori proteici che modulano la velocità di trascrizione. L'espressione dei geni è infatti regolata soprattutto a livello della trascrizione.



LE CATENE DI RNA INIZIANO CON pppG O pppA



Non é necessario un primer,
i filamenti si allungano in direzione 5'→3'.

(5') CGCTATAGCGTTT(3')

DNA nontemplate (coding) strand

(3') GCGATATCGCAA(5')

DNA template strand

(5') CGCUAUAGCGUUU(3')

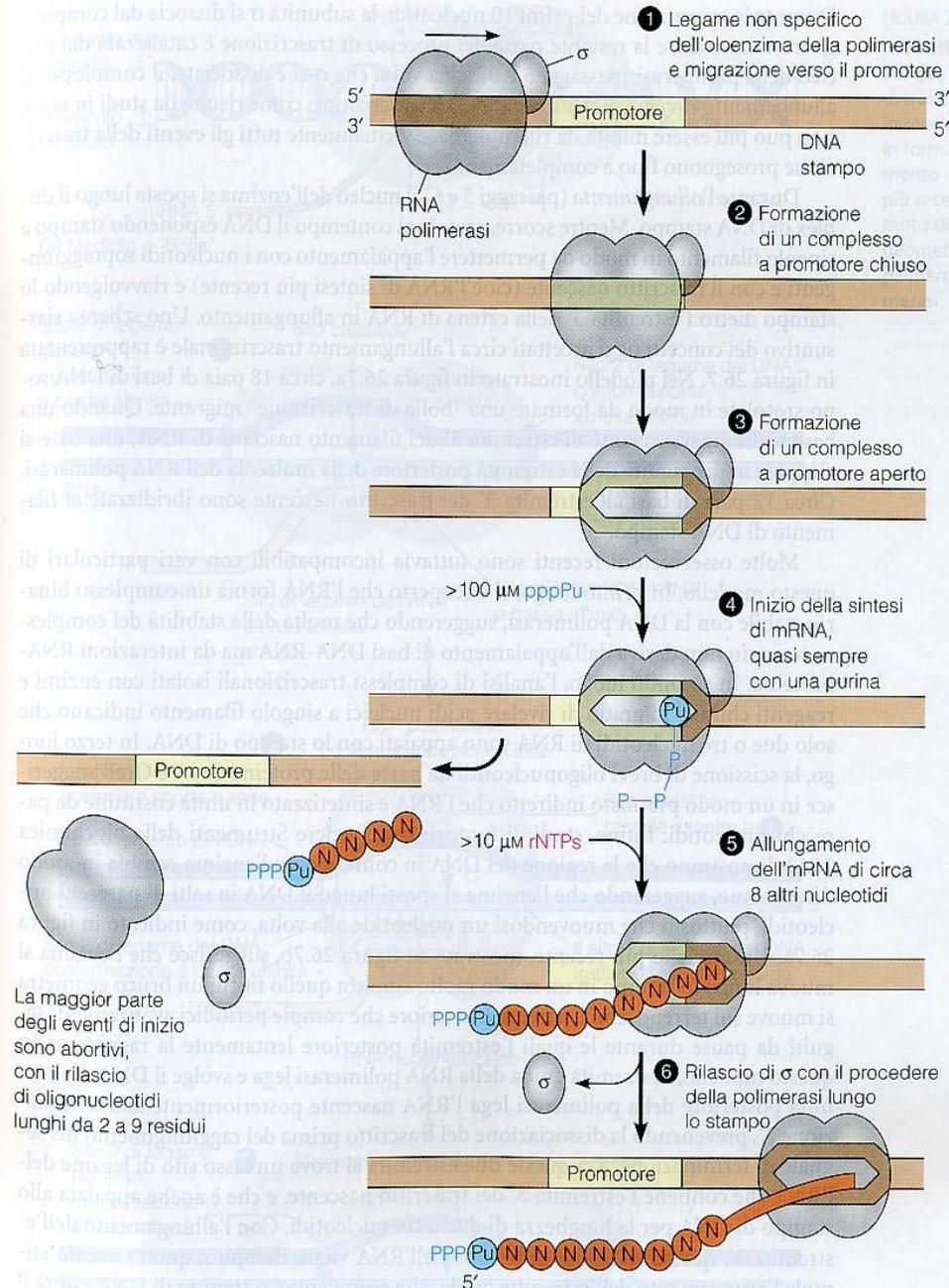
RNA transcript

La sequenza del filamento codificante (**filamento senso**) ha la stessa sequenza dell'RNA trascritto, fatta eccezione per la **T** al posto di **U**.

La sequenza del filamento stampo (**filamento antisenso**) è complementare alla sequenza dell'RNA trascritto.

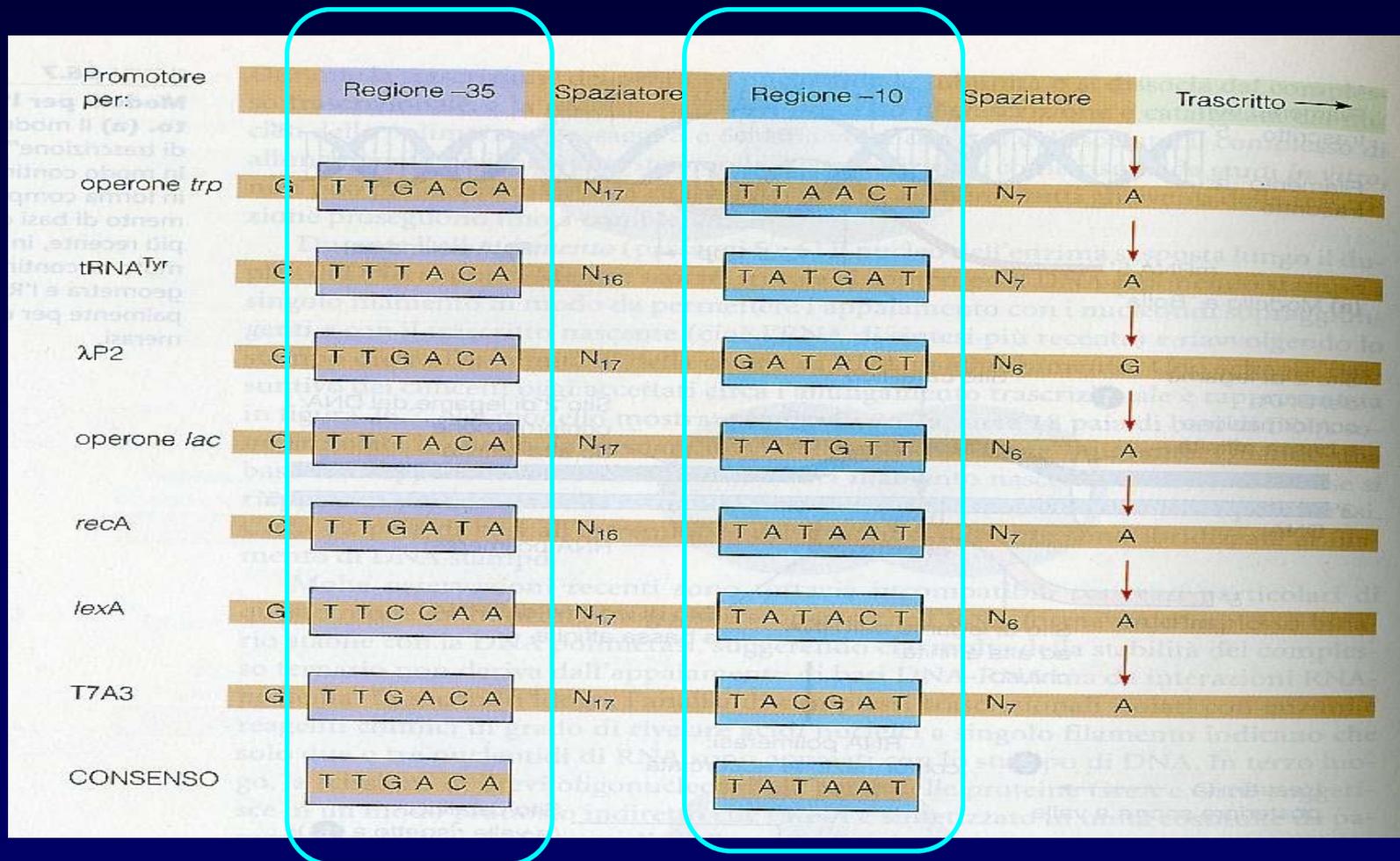
LA FASE D'INIZIO DELLA TRASCRIZIONE

La trascrizione inizia con interazioni sequenza-specifiche tra l'RNA polimerasi ed un sito promotore.



La maggior parte degli eventi di inizio sono abortivi, con il rilascio di oligonucleotidi lunghi da 2 a 9 residui

La trascrizione inizia a livello dei **siti promotori** presenti sullo stampo di DNA situati a monte dei geni, a cui si lega l'RNA polimerasi.



LE SEQUENZE DI ALCUNI PROMOTORI DI E. COLI.

Operone	Regione -35	Regione -10 (Pribnow box)	Sito di inizio (+1)
<i>lac</i>	ACCCAGGC TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG	TATGTTGTGTGGA	ATTGTGAGCGG
<i>lacI</i>	CCATCGAATGGCGCAAAACCTTTCGCGGTATGG	CATGATAGCGCCCG	GAAAGAGAGTC
<i>galP2</i>	ATTTATTCCATGTCACACTTTTCGCATCTTTGT	TATGCTATGGTTA	TTTCATACCAT
<i>araBAD</i>	GGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTC	TACTGTTTCTCCATA	ACCCGTTTTTT
<i>araC</i>	GCCGTGATTATAGACACTTTTGTTACGCGTTTT	TGTCATGGCTTTGG	TCCCGCTTTG
<i>trp</i>	AAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACTAG	TAACTAGTACGCA	AAGTTCACGTA
<i>bioA</i>	TTCCAAAACGTGTTTTTTGTTGTTAATTCGGTG	TAGACTTGTAAC	ACCTAAATCTTT
<i>bioB</i>	CATAATCGACTTGTAACCAAATTGAAAAGATT	TAGGTTTACAAGTCT	TACACCGAAT
<i>tRNA^{Tyr}</i>	CAACGTAACACTTTACAGCGGCGCGTCATTTGA	TATGATGCGCCCC	GCTTCCCGATA
<i>rrnD1</i>	CAAAAAAATACTTGTGCAAAAAATTGGGATCCC	TATAATGCGCCTCC	GTTGAGACGA
<i>rrnE1</i>	CAATTTTTCTATTGCGGCCGCGGAGAACTCCC	TATAATGCGCCTCC	ATCGACACGG
<i>rrnA1</i>	AAAATAAATGCTTGACTCTGTAGCGGGAAGGCG	TATTATGCAC	ACCCCGCGCGCTG

Sequenza consenso:	Regione -35	Regione -10	Sito di inizio
	T T G A C A ... 16-19 bp ...	T A T A A T ... 5-8 bp ...	A
	69 79 61 56 54 54	77 76 60 61 56 82	C 51 T
			55 G 48
			42

LA FASE D'INIZIO DELLA TRASCRIZIONE

La frequenza con cui ciascun gene viene trascritto in E.coli é in gran parte determinata dalla somiglianza della sequenza del suo promotore a determinate sequenze consenso, le quali hanno la massima affinità per l'RNA polimerasi.

I PROMOTORI FORTI

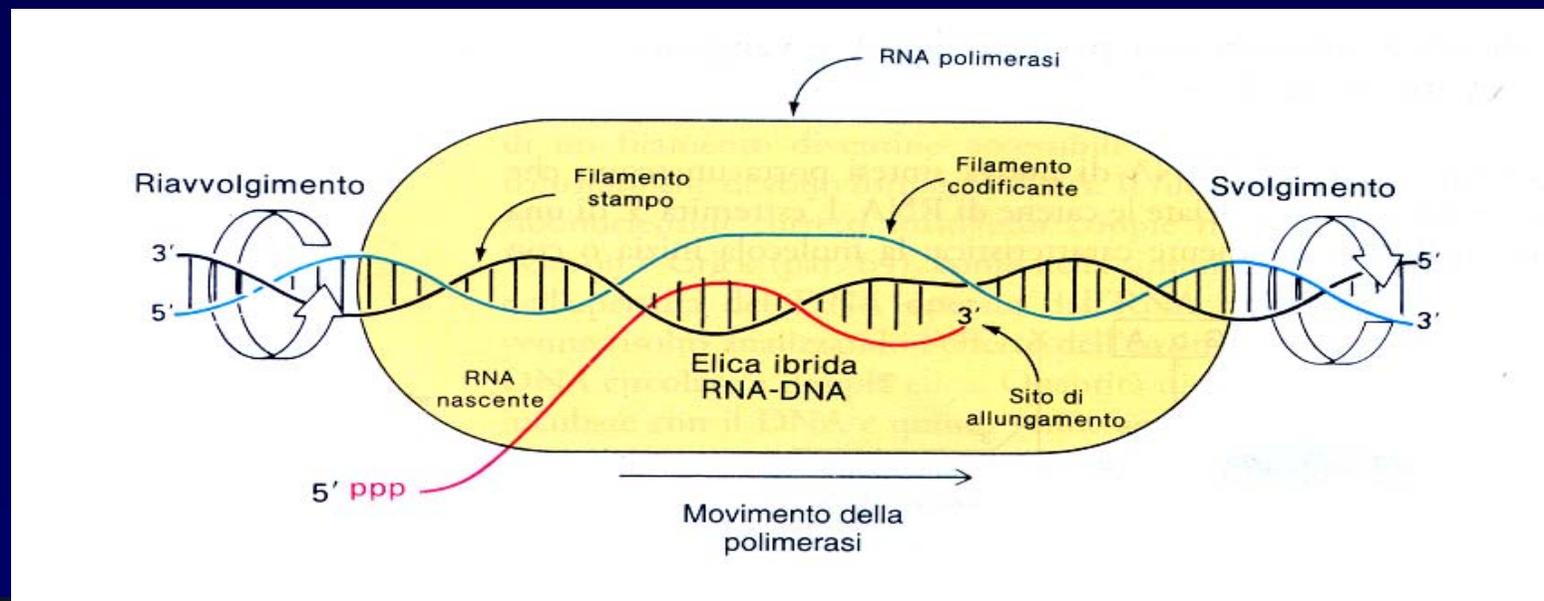
Essi fanno avvenire frequenti trascrizioni ed hanno le sequenze molto simili a quelle di consenso.

LE PROTEINE REGOLATRICI

Esse si legano sia alle sequenze del DNA sia dell'RNA polimerasi ed influenzano la frequenza di trascrizione di molti geni.

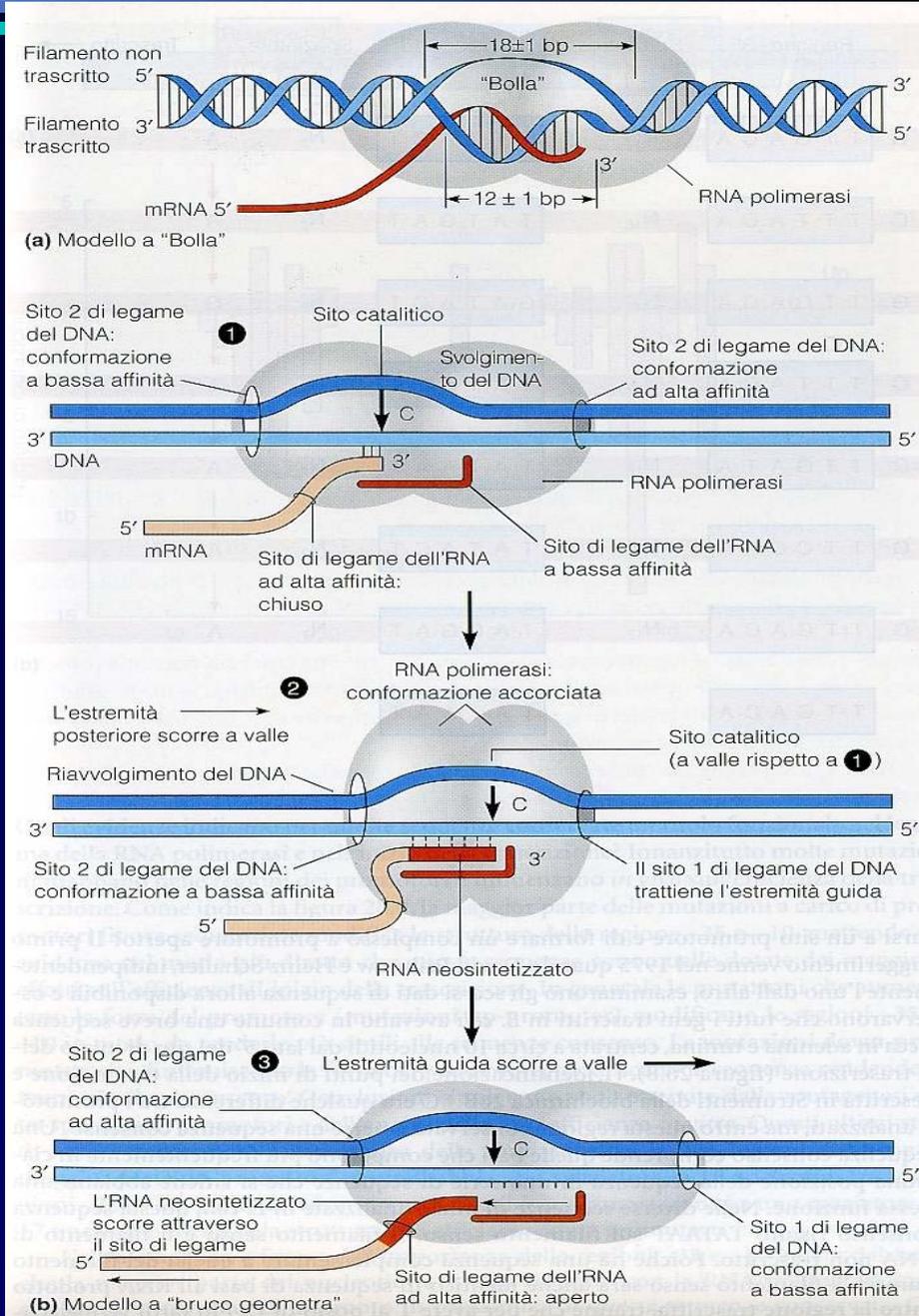
L'ALLUNGAMENTO AVVIENE A LIVELLO DI BOLLE DI TRASCRIZIONE CHE SI MUOVONO LUNGO LO STAMPO DI DNA

- Dopo la formazione del primo legame fosfodiesterico, l'enzima perde la subunità σ ed il nucleo dell'enzima si associa con maggiore stabilità allo stampo di DNA svolto;
- l'RNA di nuova sintesi forma un **elica ibrida (12 bp)** temporanea con il DNA che funge da stampo corrispondente a circa un giro di elica di DNA;
- la lunghezza dell'ibrido RNA-DNA rimane costante durante la sintesi che avviene con **velocità di 50 nucleotidi al secondo**.



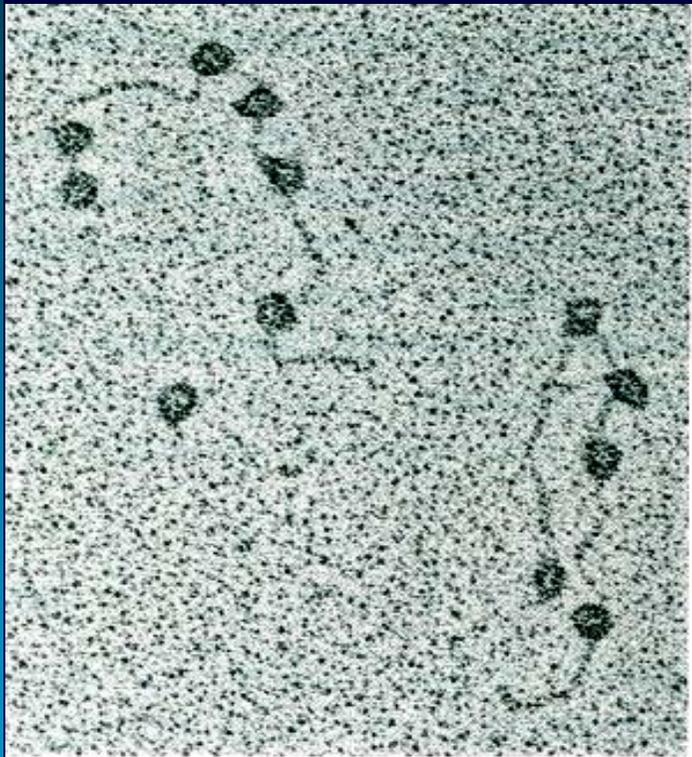
a) Modello tradizionale in cui la "bolla di trascrizione", formata dalla RNA polimerasi, avanza in modo continuo ed il trascritto si appaia con le basi dello stampo.

b) Modello "a bruco geometra" in cui la RNA polimerasi avanza in modo discontinuo ed il trascritto forma interazioni con la polimerasi.



L'RNA POLIMERASI NON CORREGGE GLI ERRORI

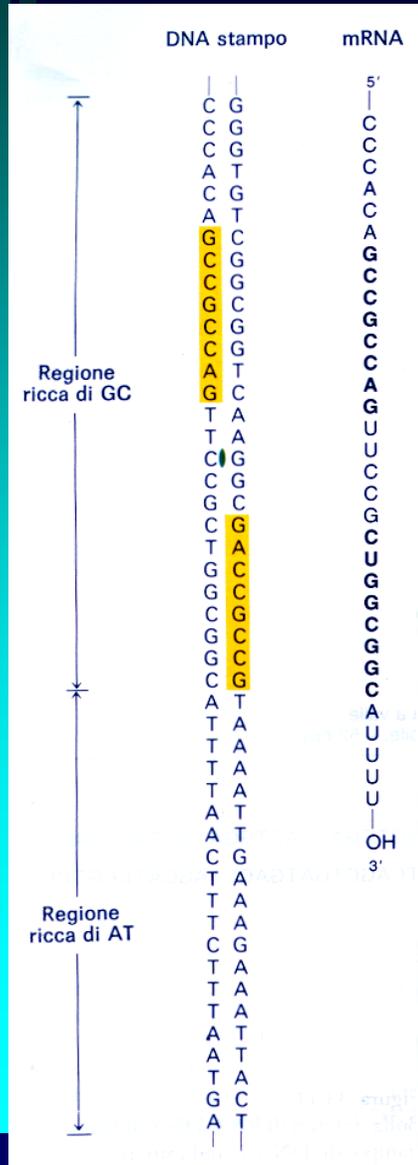
- L'RNA polimerasi non ha attività nucleasica. La fedeltà della trascrizione è molto minore di quella della replicazione;



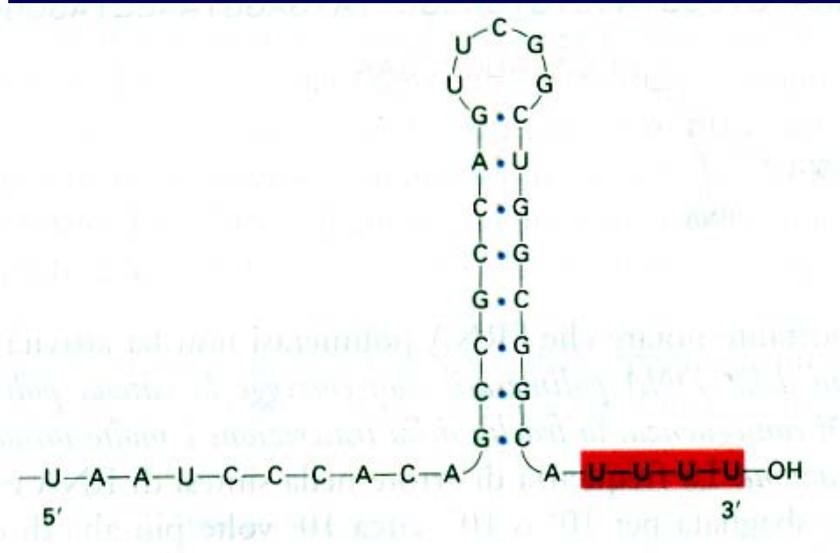
- la frequenza di errore nella sintesi di RNA è nell'ordine di una base errata per 10^4 - 10^5 ;

- la maggior frequenza di errori viene tuttavia tollerata perché per la maggior parte dei geni vi è la sintesi di molti trascritti di RNA per ogni generazione.

UNA FORCINA DI RNA DETERMINA LA TERMINAZIONE DELLA TRASCRIZIONE



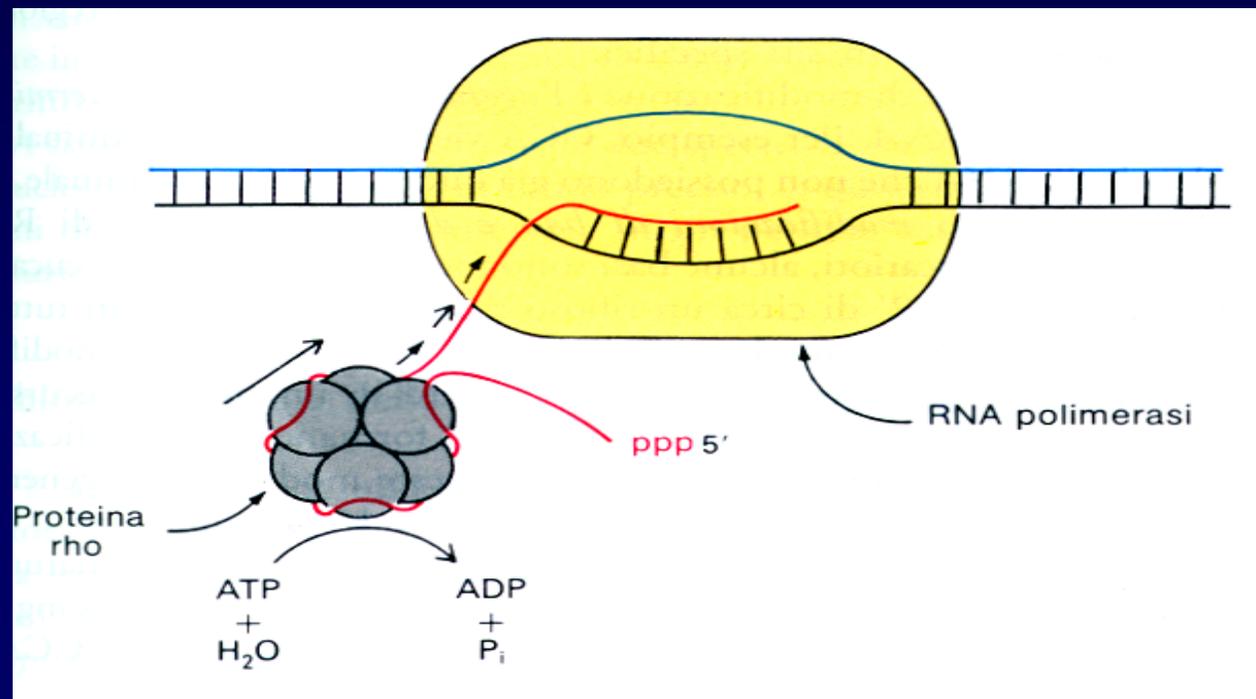
- Nella fase finale della trascrizione, si blocca la formazione di legami fosfodiesterici, l'ibrido DNA-RNA si dissocia, la regione svolta del DNA si ravvolge, l'RNA polimerasi si stacca dal DNA ed il fattore σ si riassocia al nucleo dell'enzima,
- il segnale di **STOP** più frequente è una regione palindromica ricca di GC seguita da una regione ricca in AT,
- l'mRNA trascritto di questo DNA palindromico è complementare a se stesso e forma una struttura a forcina,



questa forcina stabile è seguita da quattro o più residui di U. Il trascritto termina a livello di questa sequenza o subito dopo, poiché l'elica ibrida diventa instabile.

ALCUNE PROTEINE SONO COINVOLTE NELLA FASE DI TERMINAZIONE

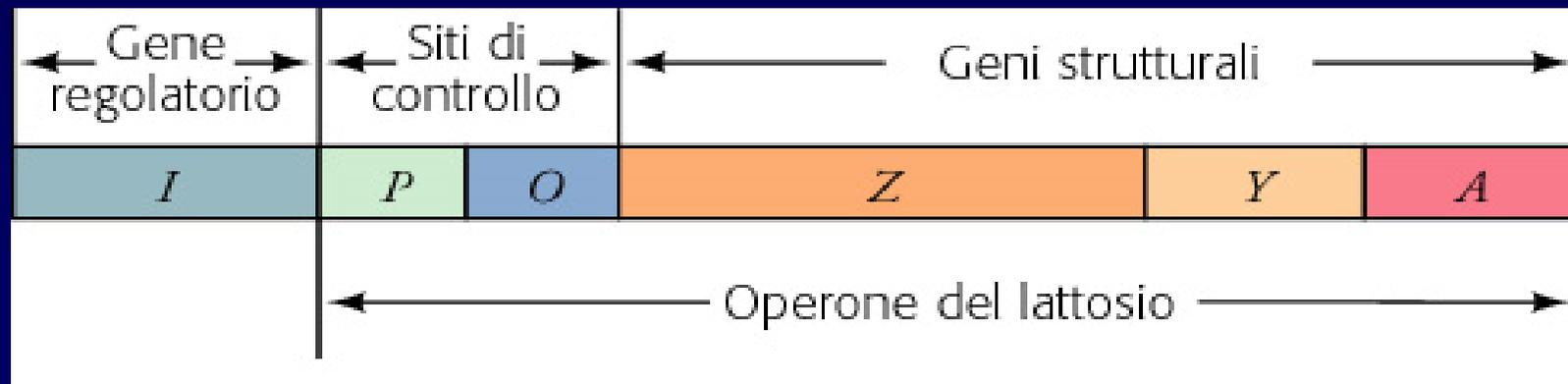
La proteina ρ (rho) è un esamero che si lega solo all'RNA a singolo filamento (72 nucleotidi) con conseguente idrolisi di ATP. Questa reazione le permette di muoversi lungo l'RNA nascente verso la bolla di trascrizione, spezzando a questo livello la catena ibrida RNA-DNA e rimuovendo l'RNA. Essa è pertanto una **elicasi DNA-RNA (ATP-dipendente)** che viene attivata quando la RNA polimerasi è in fase di stazionamento.



L'mRNA POLIGENICO DI UNA CELLULA PROCARIOTICA

Nei genomi dei procarioti, i geni che codificano per proteine correlate sono spesso organizzati in gruppi che vengono trascritti insieme (**operoni**).

Negli eucarioti, invece, la maggior parte dei geni che codificano per proteine, **i geni strutturali**, sono trascritti uno alla volta.



mRNA, tRNA e rRNA

Nei procarioti, i precursori del tRNA e dell'rRNA sono tagliati e modificati chimicamente dopo la trascrizione, invece le molecole di mRNA subiscono pochissime modificazioni.

Molte di esse vengono tradotte durante la trascrizione.

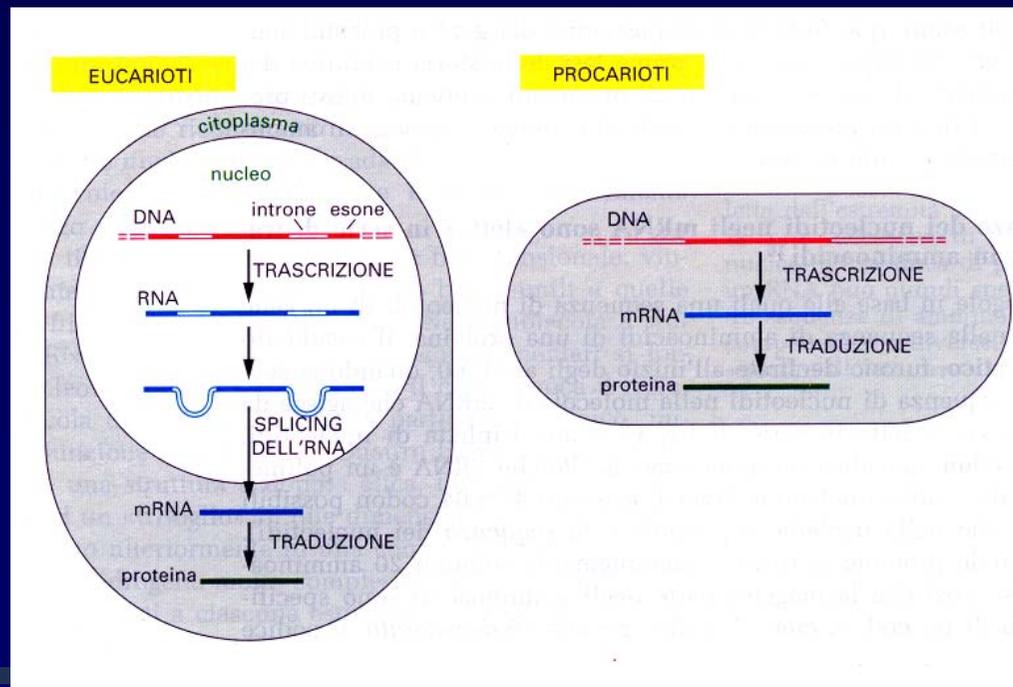
LA SINTESI PROTEICA NEI PROCARIOTI

IL FLUSSO DELL'INFORMAZIONE GENETICA

DNA → **RNA** → **PROTEINE**

Trascrizione

Traduzione



LA SINTESI PROTEICA

Esso é un processo mediato dall'azione coordinata di:

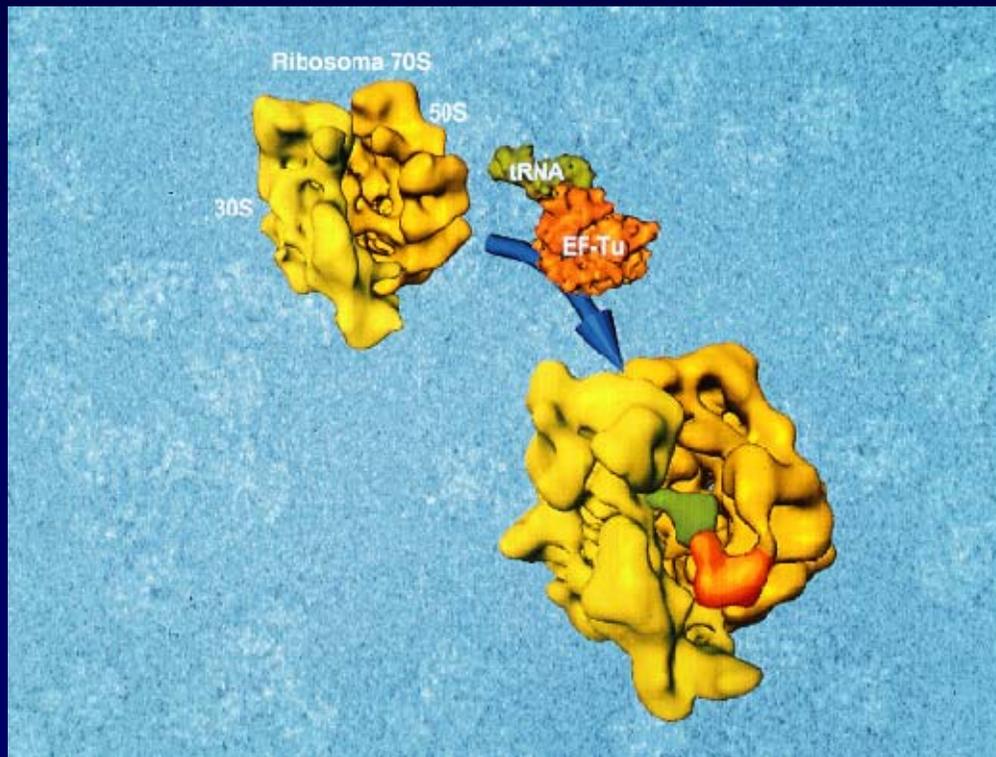
mRNA,

tRNA,

ribosomi,

enzimi attivanti,

fattori proteici.

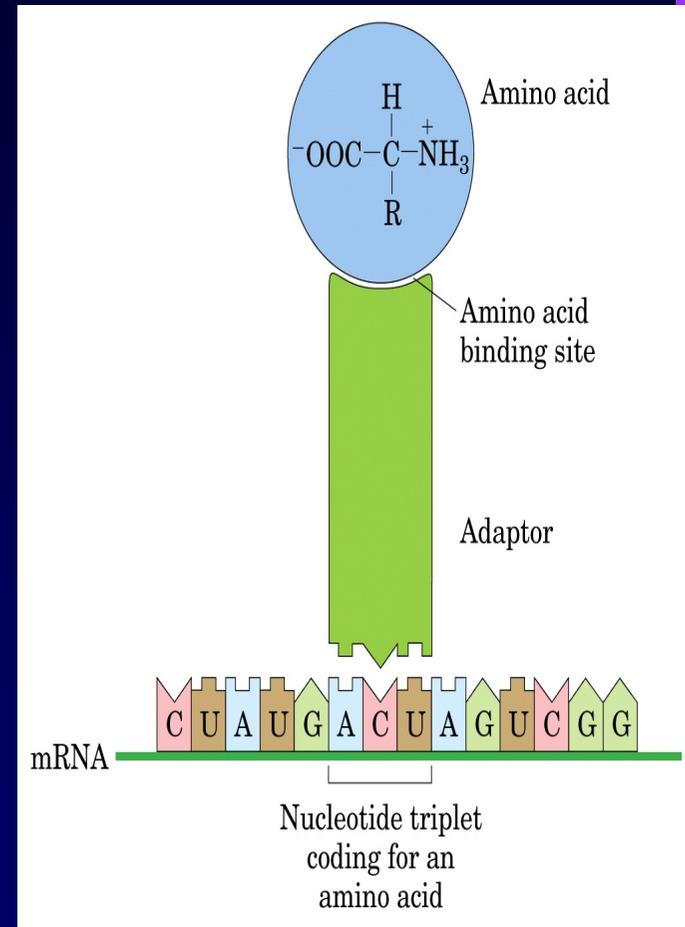


Il tRNA

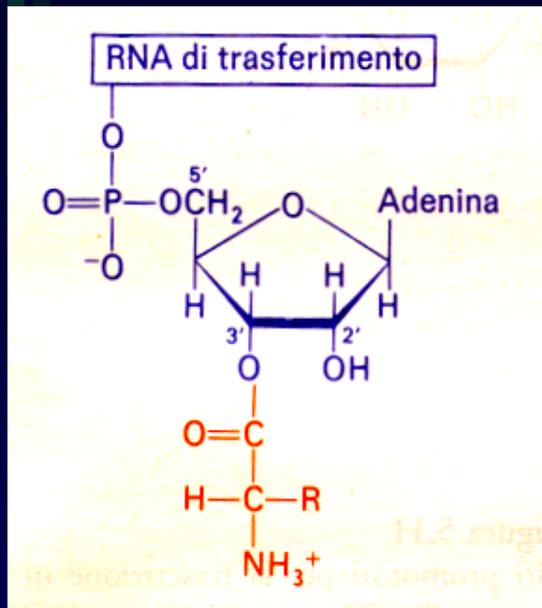
Il tRNA ha la funzione di **adattatore** nella sintesi proteica,

esso presenta un sito di legame per l'amminoacido ed un sito di riconoscimento per lo stampo (mRNA),

il codon è riconosciuto dall'anticodon del tRNA e non dall'amminoacido attivato.



L'RNA TRANSFER È L'ADATTATORE NELLA SINTESI PROTEICA

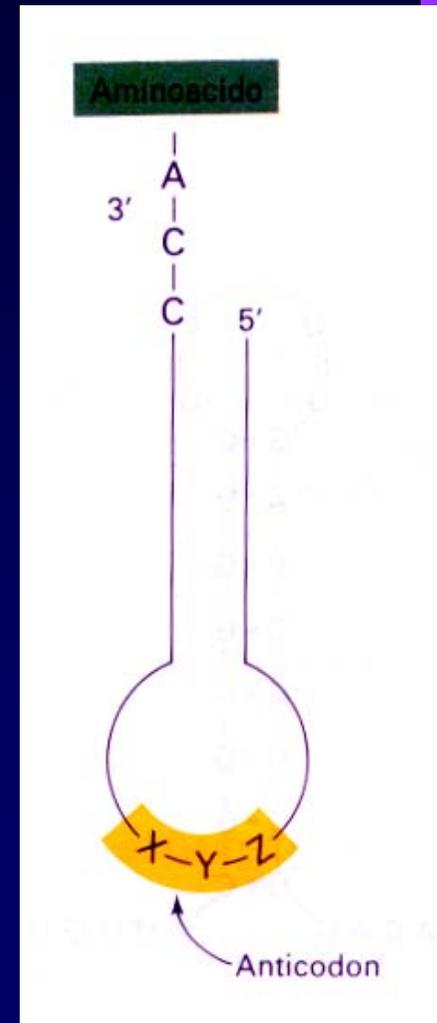


- Il tRNA contiene un sito di attacco per l'amminoacido ed un sito di riconoscimento per il filamento stampo dell'mRNA,

- il tRNA lega un amminoacido specifico in forma attivata il cui gruppo carbossilico è esterificato al 3'- o 2'- al terminale 3' della catena di tRNA dove è presente un sito di attacco -CCA,

- il legame di un tRNA ad un aminoacido è catalizzato da un enzima specifico: la aminoacil-tRNA-sintetasi che catalizza l'esterificazione favorita dall'idrolisi di ATP. Esiste almeno una sintetasi per ognuno dei 20 aminoacidi,

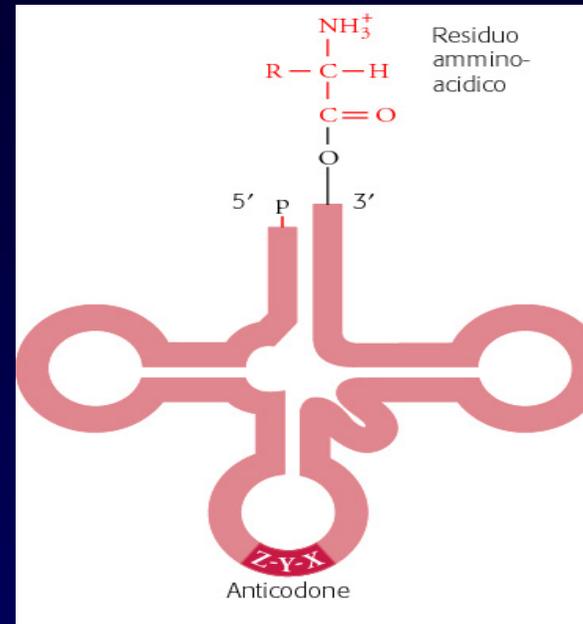
- il sito di riconoscimento sul tRNA è detto ANTICODON, una sequenza di tre basi che riconosce una sequenza complementare sullo stampo di mRNA chiamata CODON.



LE CARATTERISTICHE DEI tRNA

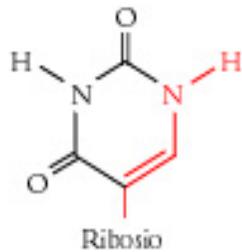
Sono catene singole,
presentano molte basi insolite,
il terminale 5' è fosforilato,
la sequenza al 3' è CCA,
la metà dei nucleotidi è appaiata a formare doppie eliche,
l'ansa dell'anticodon è costituita da sette basi:

5'-pirimidina-pirimidina-**X-Y-Z**-purina modificata-base variabile-**3'**.

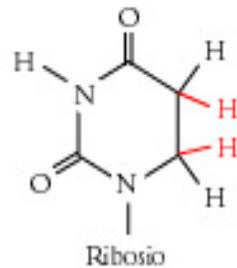


LE BASI INSOLITE PRESENTI NEL tRNA

Derivati dell'uracile

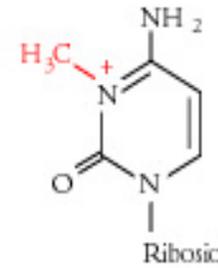


Pseudouridina (ψ)

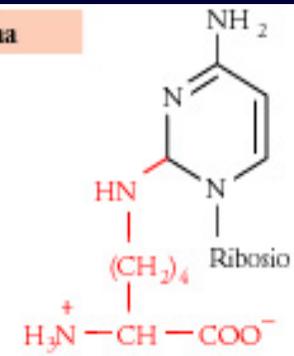


Diidrouridina (D)

Derivati della citosina

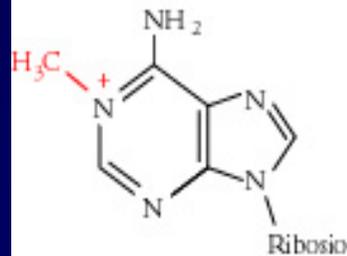


3-Metilcitosina (m^3C)

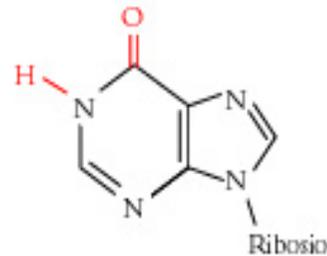


Lisidina (L)

Derivati dell'adenina

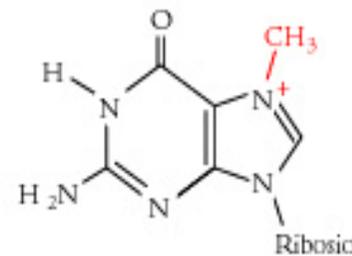


1-Metiladenosina (m^1A)

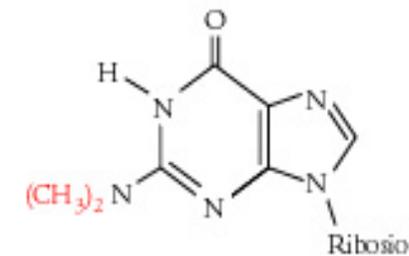


Inosina (I)

Derivati della guanina



N^7 -Metilguanossina (m^7G)



N^2,N^2 -Dimetilguanossina (m_2^2G)

LA STRUTTURA TRIDIMENSIONALE DEL tRNA

La struttura a quadrifoglio del tRNA assume una forma di L (struttura terziaria) simile ad un trapano elettrico,

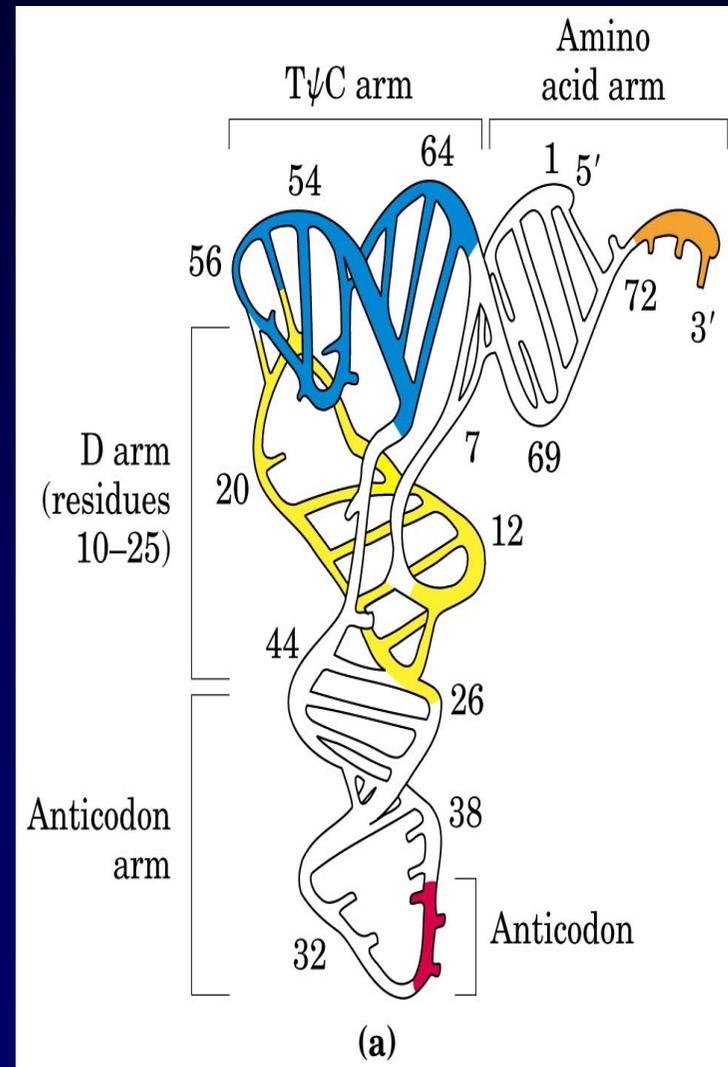
ci sono due segmenti a doppia elica,

nei segmenti non ad elica si formano interazioni idrofobiche tra anelli aromatici adiacenti,

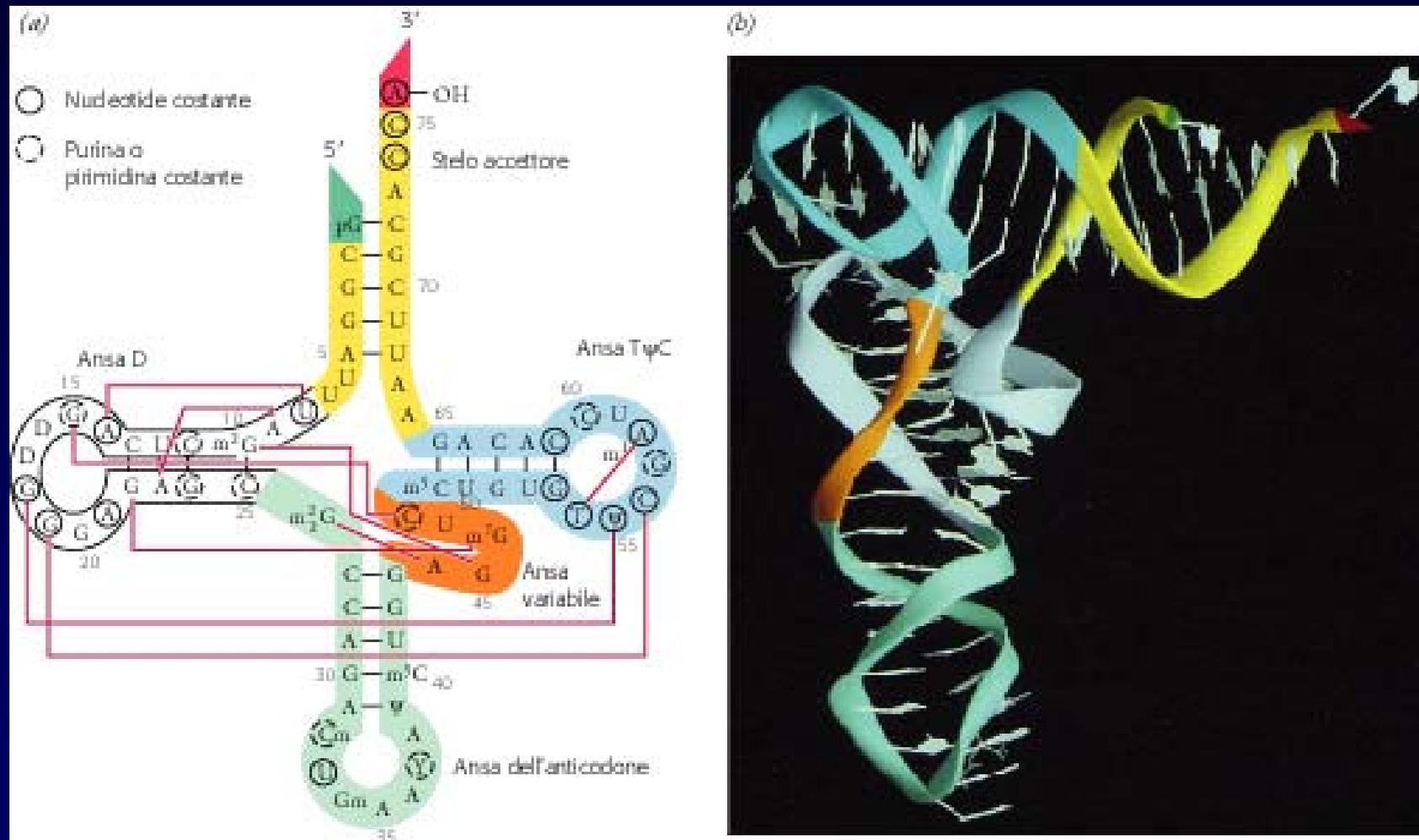
il terminale CCA e l'ansa dell'anticodon sono alle due estremità della molecola,

a seconda del momento funzionale, la regione del terminale CCA e quella adiacente possono cambiare conformazione.

il tRNA per la fenilalanina del lievito



LA STRUTTURA DEL tRNA



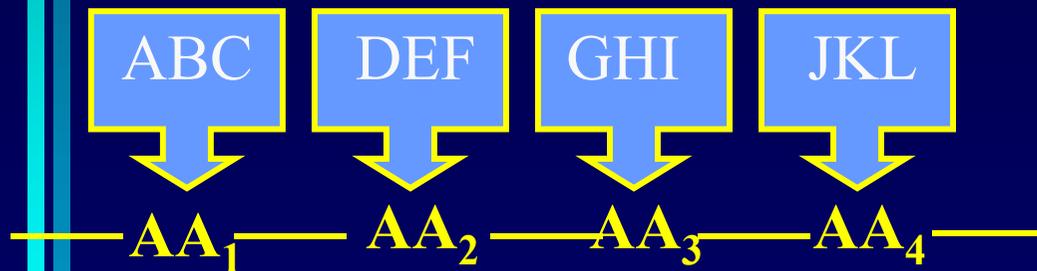
IL CODICE GENETICO

A) Numero di basi per unità del codice:

Un codice a 1 base potrebbe specificare solo quattro tipi di aminoacidi. Un codice a due basi potrebbe specificare sedici tipi di aminoacidi ($4^2=16$), mentre un codice a tre basi specificherebbe per 64 tipi di aminoacidi ($4^3=64$). Esperimenti genetici hanno dimostrato che un aminoacido è codificato da un gruppo di tre basi che prende il nome di CODON,

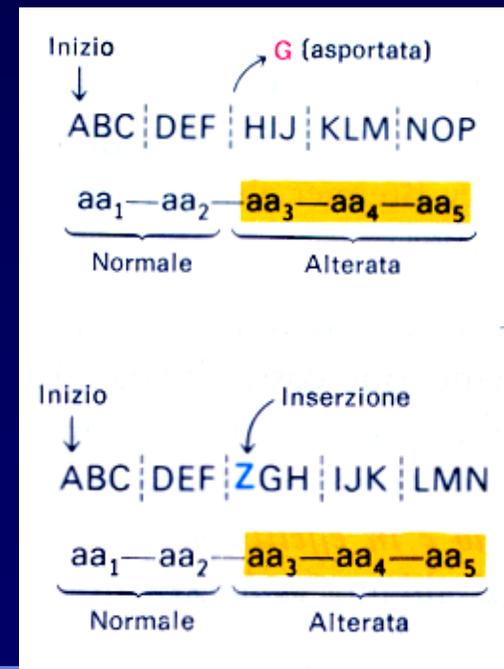
B) Sovrapposizione del codice:

Studi su organismi mutanti dimostrarono che le alterazioni colpiscono in genere solo un aminoacido. Quindi il codice genetico non è sovrapposto,

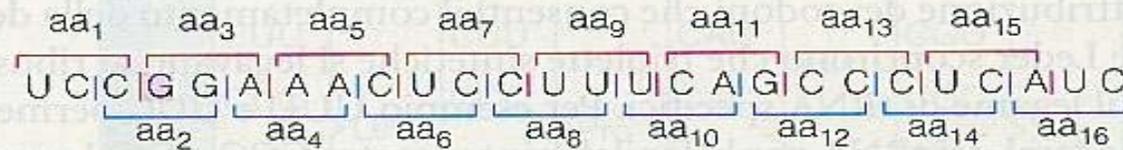


C) lettura corretta del gruppo basi,

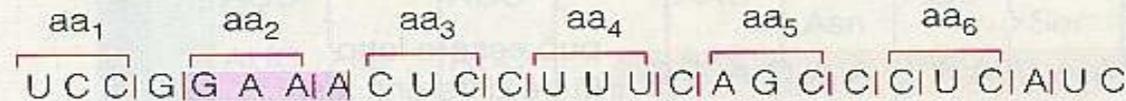
D) degenerazione del codice genetico: da studi biochimici è noto che 61 triplette delle 64 possibili codificano per aminoacidi, quindi esiste più di una tripletta per ogni AA.



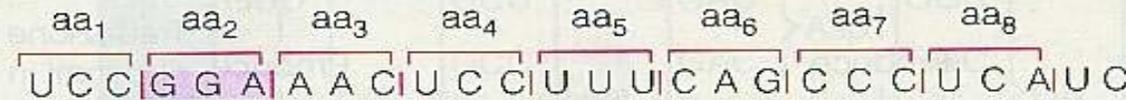
TRE TIPI POSSIBILI DI CODICE GENETICO



- (a)** Codice sovrapposto. In questo caso dovrebbero esistere regolarità statistiche tra residui aminoacidici adiacenti. Mutazioni puntiformi (in rosso) sarebbero in grado di cambiare due residui.



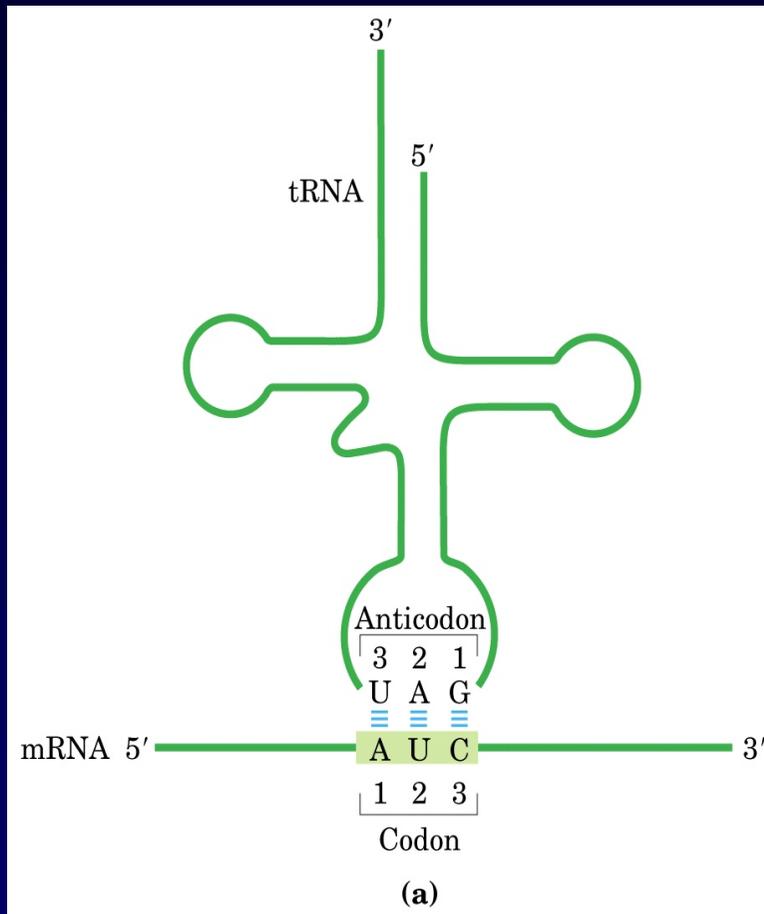
- (b)** Codice punteggiato. Le delezioni di quattro nucleotidi (o multipli di quattro) dovrebbero ripristinare la fase di lettura.



- (c)** Codice non punteggiato. Le delezioni di tre nucleotidi (o multipli di tre) dovrebbero ripristinare la fase di lettura. Il codice ha in realtà questa forma.

Il codice genetico é un codice a triplete non sovrapposte, privo di punteggiatura.

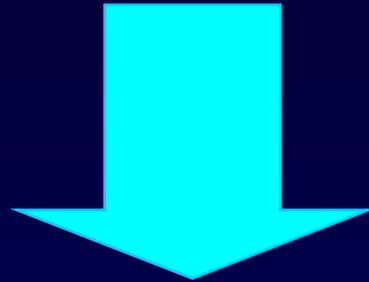
LA SINTESI PROTEICA



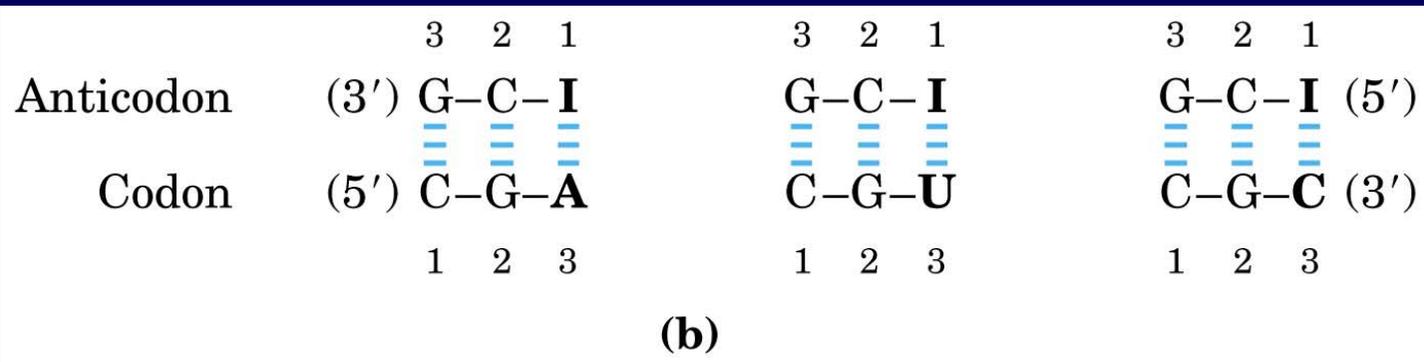
L'mRNA riconosce l'anticodon e non l'amminoacido legato al tRNA.

Un codon sull'mRNA forma coppie di basi con l'anticodon del tRNA.

L'IPOTESI DELL'OSCILLAZIONE



Alcuni tRNA vengono riconosciuti da più di un codon, perché l'appaiamento della terza base di un codon è talvolta **meno discriminante** delle prime due.



L'IPOTESI DELL'OSCILLAZIONE

Codon che differiscono in una delle due prime basi devono essere riconosciuti da tRNA diversi.

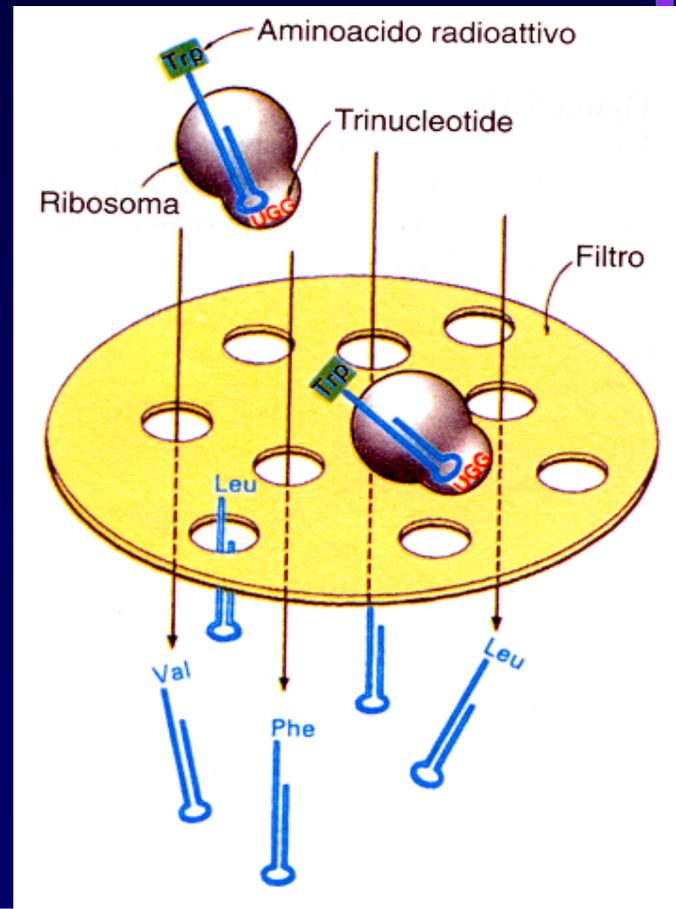
La prima base di un anticodon indica il numero di codon letti da una particolare molecola di tRNA:

Base in posizione 5' nell'anticodone		Base in posizione 3' nel codone
G	si appaia con	C o U
C	si appaia con	G
A	si appaia con	U
U	si appaia con	A o G
I	si appaia con	A, U o C

I TRINUCLEOTIDI INDUCONO L'UNIONE DI MOLECOLE SPECIFICHE DI tRNA AI RIBOSOMI (NIREMBERG, KHORANA 1964)

- Mediante tecniche enzimatiche e chimiche, furono sintetizzati tutti i 64 trinucleotidi e per ogni nucleotide fu controllato a quale tRNA (ciascuno dei quali corrispondente ad un aminoacido) si legava;

- Khorana sintetizzò polinucleotidi con sequenza definita che permisero la completa decifrazione del codice genetico. In particolare, egli fu in grado di definire le sequenze dei tre codon che non specificano alcun aminoacido e sono detti pertanto segnali di STOP: UAG, UAA e UGA.



IL CODICE GENETICO

prima posizione (estremità 5') ↓	seconda posizione				terza posizione (estremità 3') ↓
	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

- Gli AA più frequenti nelle proteine sono codificati da più di una tripletta (**CODICE DEGENERATO**), soltanto **Trp** e **Met** sono codificati da una sola tripletta.

- Codon che specificano lo stesso AA sono detti **sinonimi**.

- Il numero di sinonimi per ciascun AA è correlato con la sua frequenza di comparsa nelle proteine.

- La maggior parte dei sinonimi differisce soltanto **nell'ultima base** della tripletta.

- La degenerazione **minimizza** gli effetti deleteri delle mutazioni.

- Il codice genetico é **universale**.

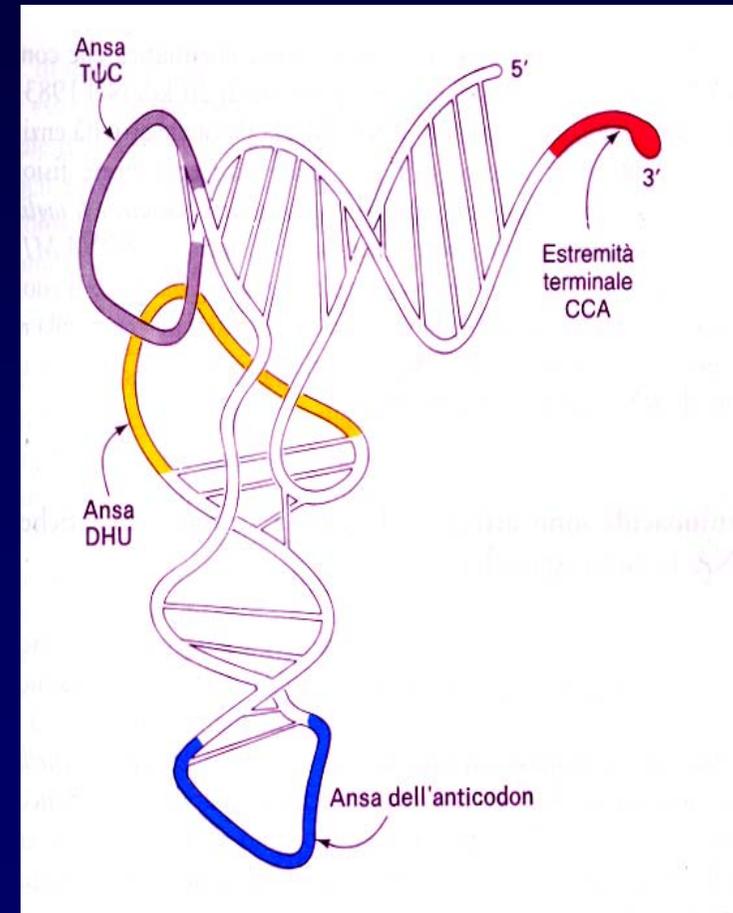
LA TRADUZIONE

Caratteristiche comuni a tutte le molecole di tRNA:

A) Sono costituiti da **singole catene** (~ 25 kDa) contenenti da 73 a 93 ribonucleotidi,

B) contengono da 7 a 15 **basi diverse** dalle convenzionali per molecola: esse sono derivati metilati o dimetilati di A, U, C e G. Queste alterazioni **impediscono** la formazione di alcune coppie di basi e attribuiscono un carattere idrofobico ad alcune regioni del tRNA,

C) il terminale 5' dei tRNA (in genere pG) è **fosforilato**. Il terminale 3' è sempre **CCA** e l'aminoacido attivato si lega al gruppo ossidrilico 3' dell'**adenosina terminale**.



L'AMMINOACIL-tRNA SINTETASI

table 27-8

Two Classes of Aminoacyl-tRNA Synthetases*

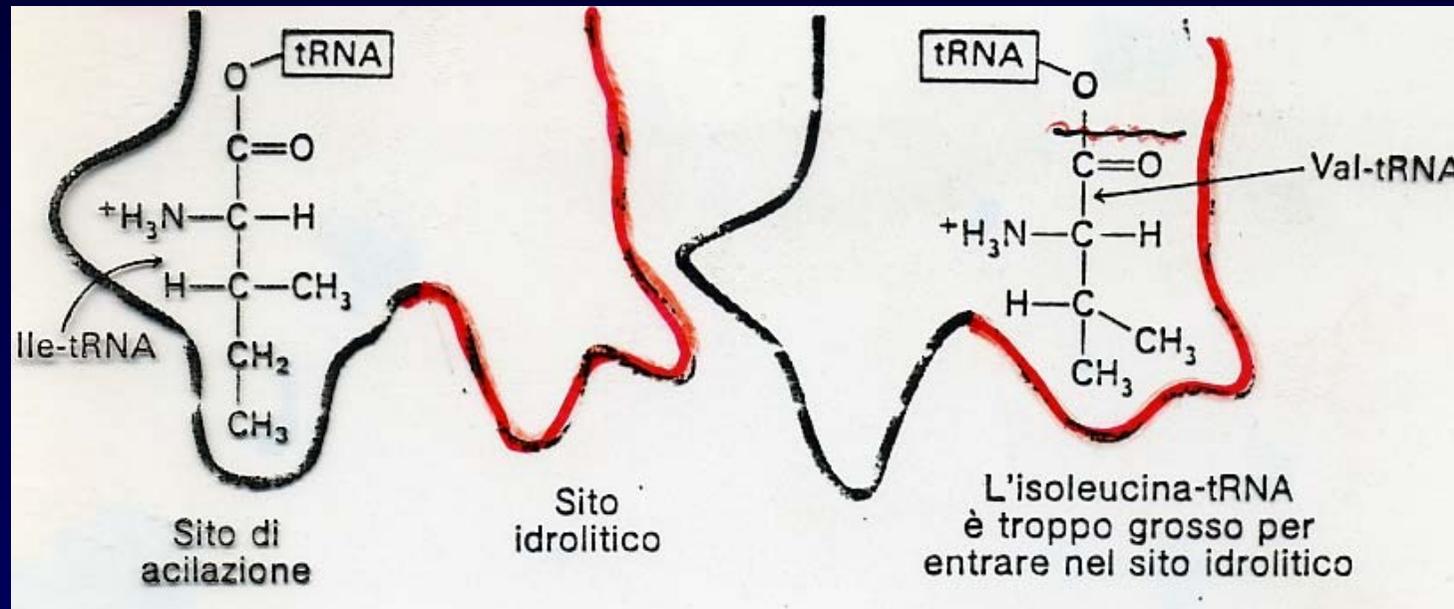
Class I	Class II
Arg	Ala
Cys	Asn
Gln	Asp
Glu	Gly
Ile	His
Leu	Lys
Met	Phe
Trp	Pro
Tyr	Ser
Val	Thr

*Here, Arg represents arginyl-tRNA synthetase, and so forth. The classification applies to all organisms for which tRNA synthetases have been analyzed and is based on protein structural distinctions and on the mechanistic distinction outlined in Figure 27-16.

L'amminoacil-tRNA sintetasi è un enzima condensante;

per ciascun amminoacido esiste almeno un enzima attivante specifico ed almeno un tRNA specifico.

IL MECCANISMO DI CONTROLLO DOPPIO DELLE SINTETASI PERMETTE DI RIGETTARE AMMINOACIDI CHE SONO PIÙ PICCOLI O PIÙ GRANDI DI QUELLO GIUSTO

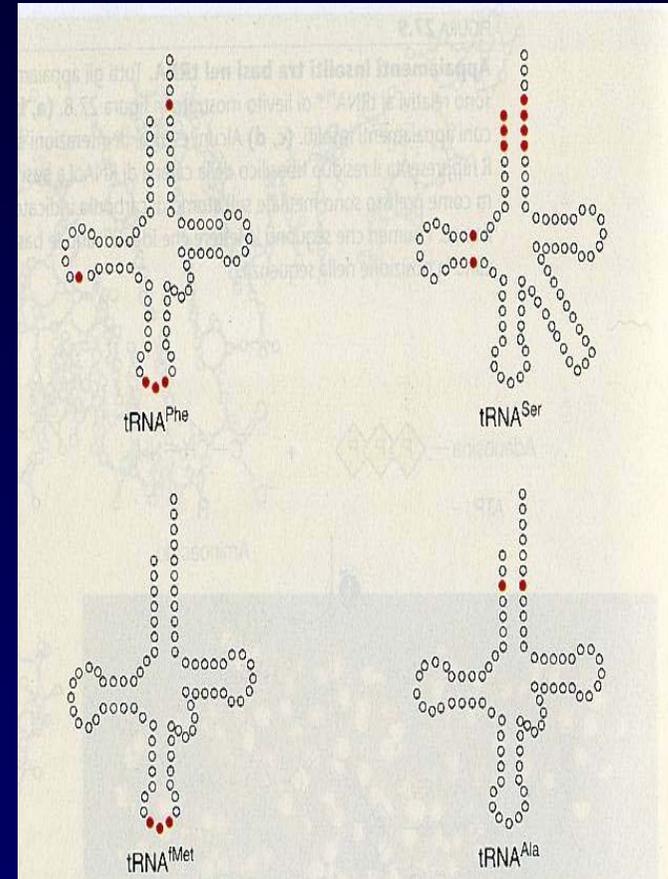


Il **sito di sintesi** non accetta aminoacidi più grandi di quello corretto,
il **sito idrolitico** distrugge intermedi attivati con dimensioni più piccole della specie corretta;
la correzione **costa** molto in termini di tempo e di energia.

LE SINTETASI RICONOSCONO I LORO tRNA ATTRAVERSO:

- 1) l'ansa dell'anticodon,
- 2) frammenti specifici di tRNA riconosciuti dalle sintetasi corrispondenti;

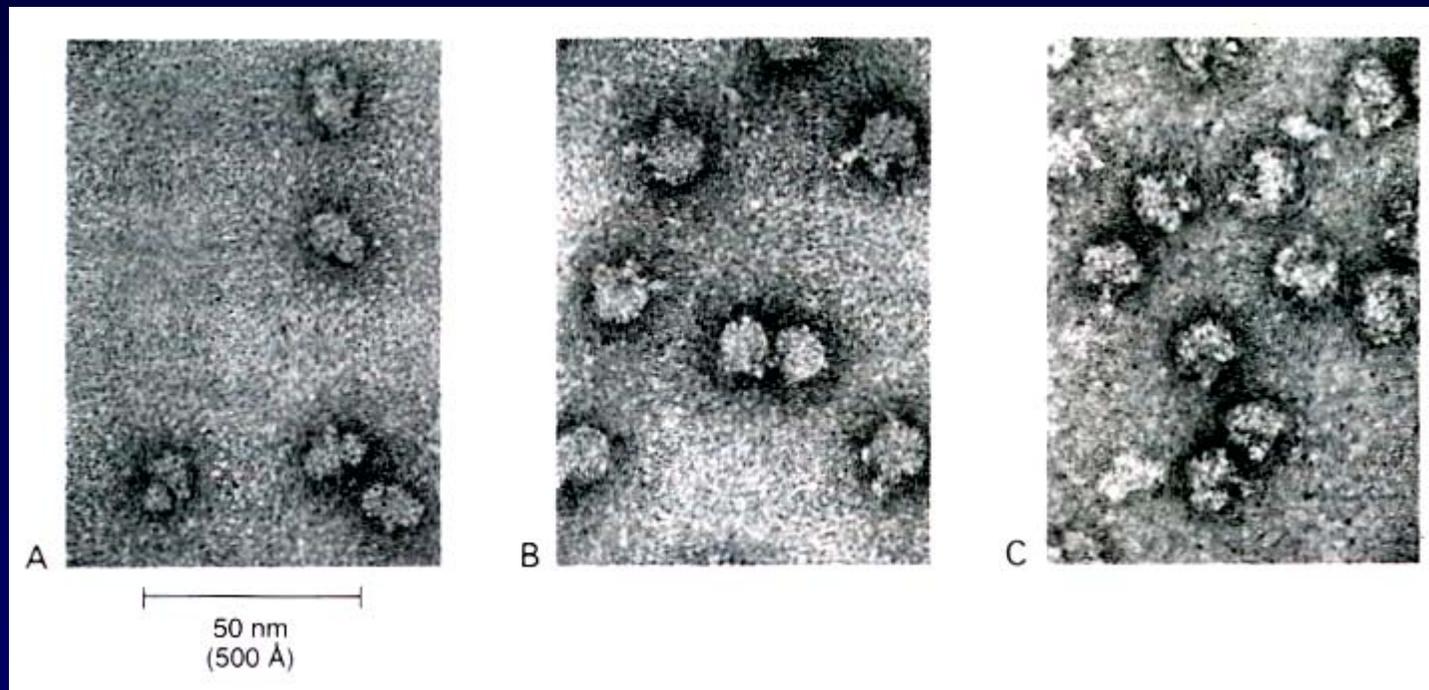
non è comunque possibile definire regole semplici e sempre valide.



Principali "elementi di identificazione" in 4 tRNA

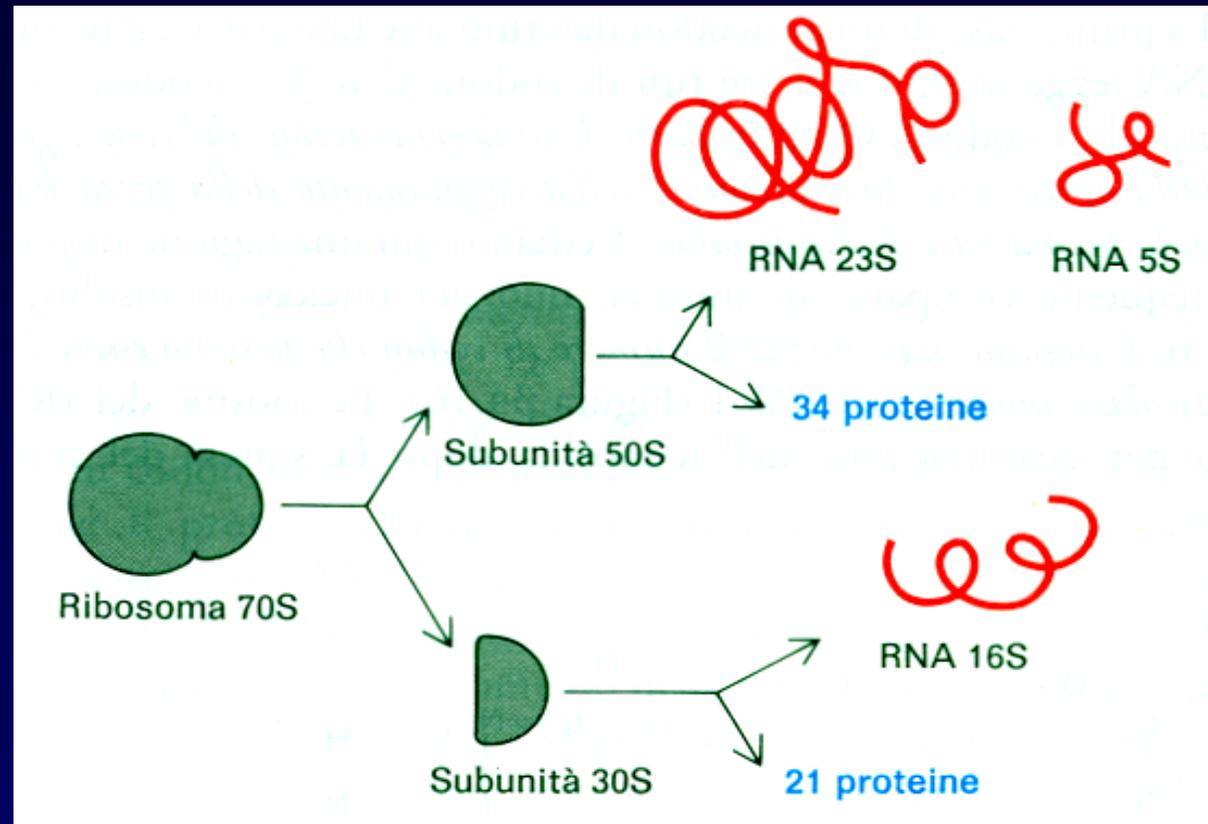
LA STRUTTURA DEI RIBOSOMI DEI PROCARIOTI

I ribosomi sono complessi molecolari in grado di **coordinare** tRNA, mRNA e catalizzare la formazione di legami peptidici per dare luogo alla sintesi di proteine,



un ribosoma di *E. coli* è una molecola ribonucleoproteica con massa di 2.700 kd e diametro di 200 Å e coefficiente di sedimentazione 70S.

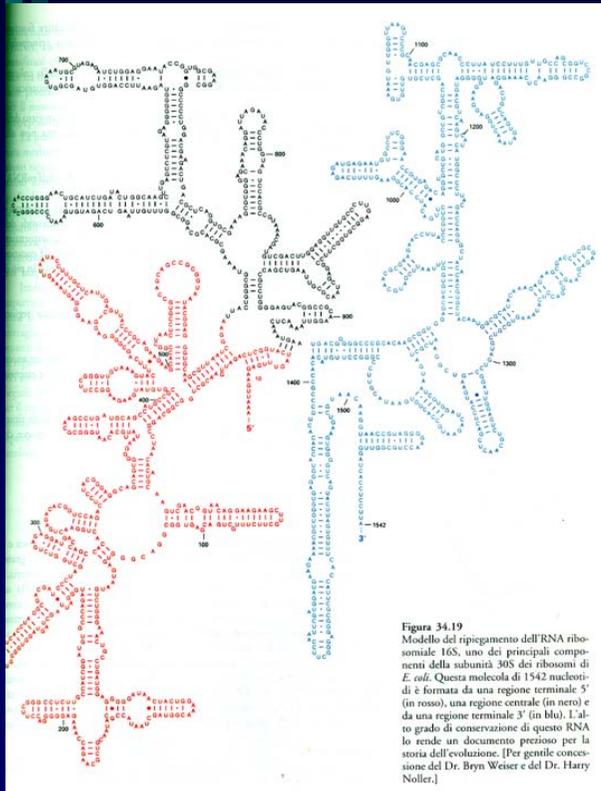
LA STRUTTURA DEI RIBOSOMI DEI PROCARIOTI



Il ribosoma si può dissociare in una subunità grande (50S) e in una piccola (30S). Esse possono essere ulteriormente dissociate nelle proteine e negli RNA che le costituiscono.

Gli rRNA formano circa i 2/3 della massa di questi grossi aggregati molecolari.

GLI rRNA SVOLGONO UN RUOLO FONDAMENTALE NELLA SINTESI PROTEICA



A) La rottura di un solo legame dell'rRNA 16S inibisce totalmente la sintesi proteica,

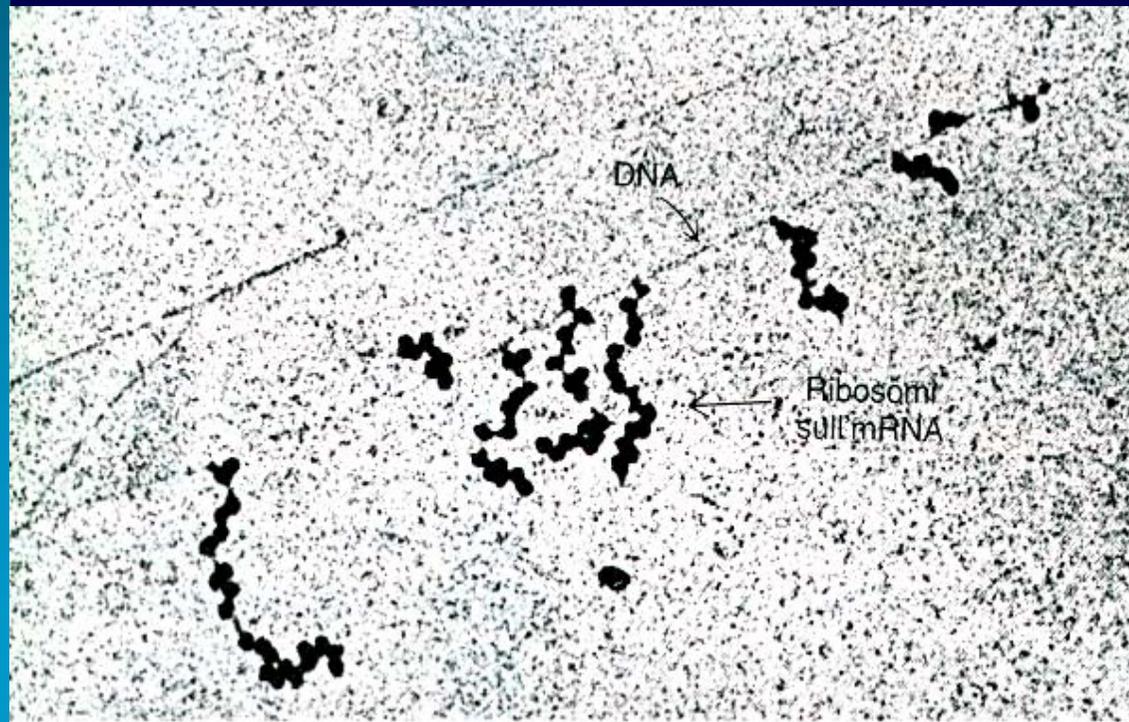
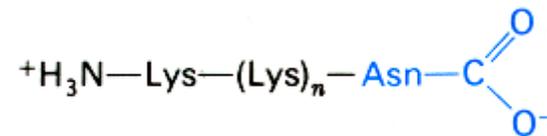
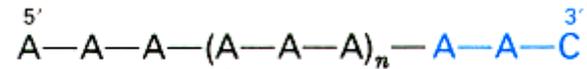
B) la rimozione di alcune proteine riduce l'attività ribosomiale, senza perdita della sua funzione,

C) è una sequenza dell'rRNA 16S a scegliere il sito di inizio dell'mRNA,

D) ribosomi quasi totalmente privati di proteine catalizzano la formazione di legami peptidici; l'RNA 23S è essenziale per questa attività,

E) gli antibiotici che inibiscono la sintesi proteica interagiscono con l'rRNA piuttosto che con le proteine ribosomiali.

LA DIREZIONE DI CRESCITA DELLA CATENA POLIPEPTIDICA È DAL TERMINALE AMMINICO VERSO QUELLO CARBOSSILICO. L'mRNA È TRADOTTO IN DIREZIONE 5'→3'

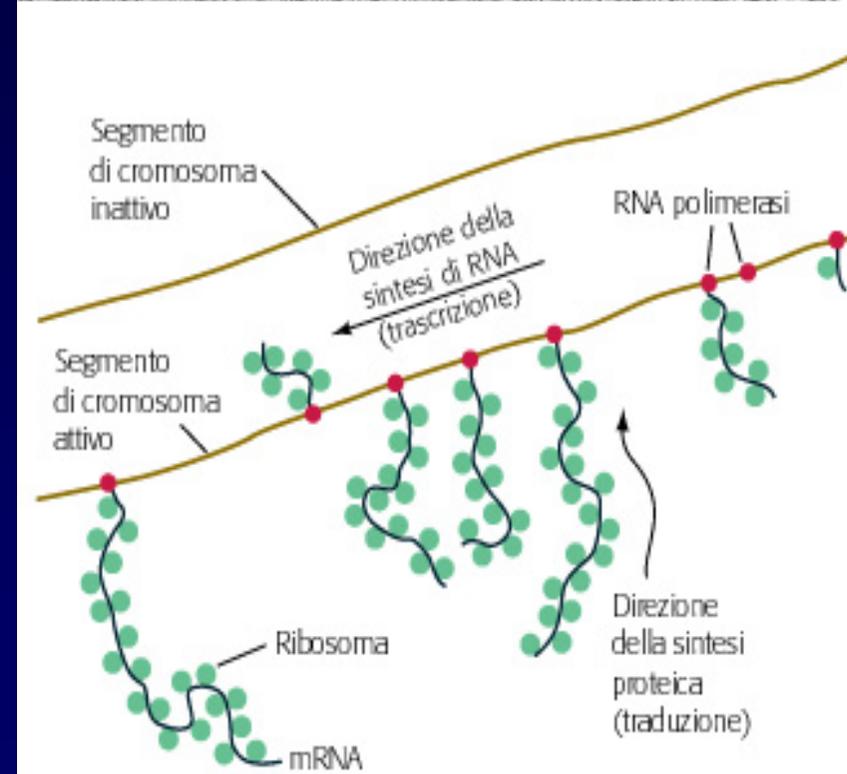
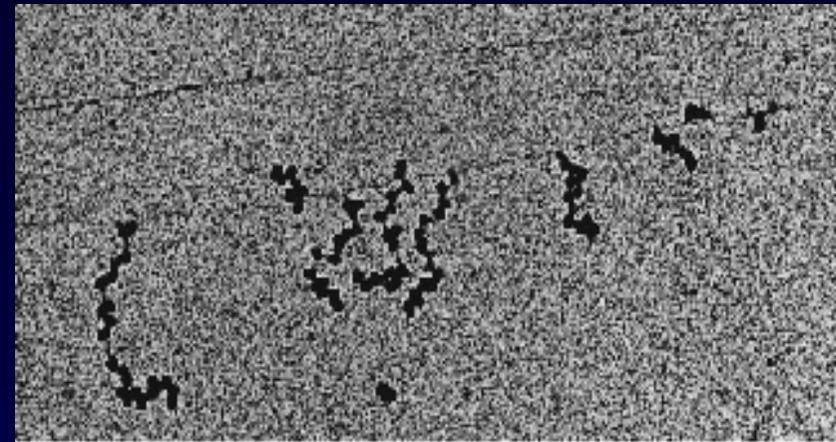


Questo consente nei procarioti che la traduzione e la trascrizione possano essere spazialmente e temporalmente accoppiate.

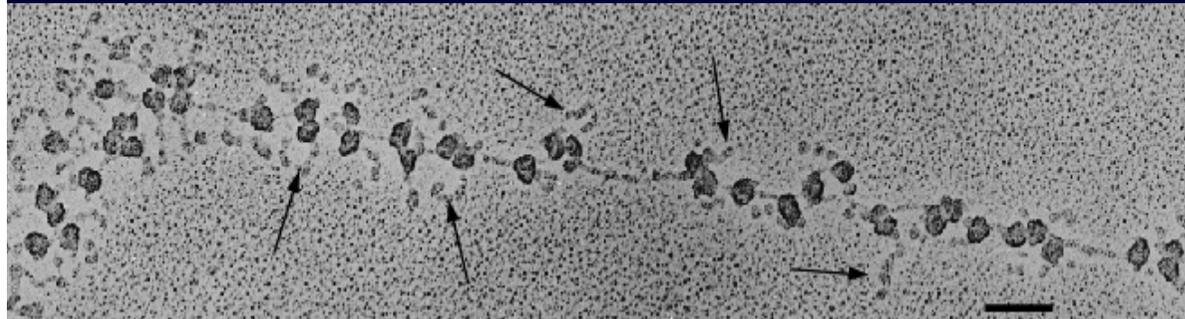
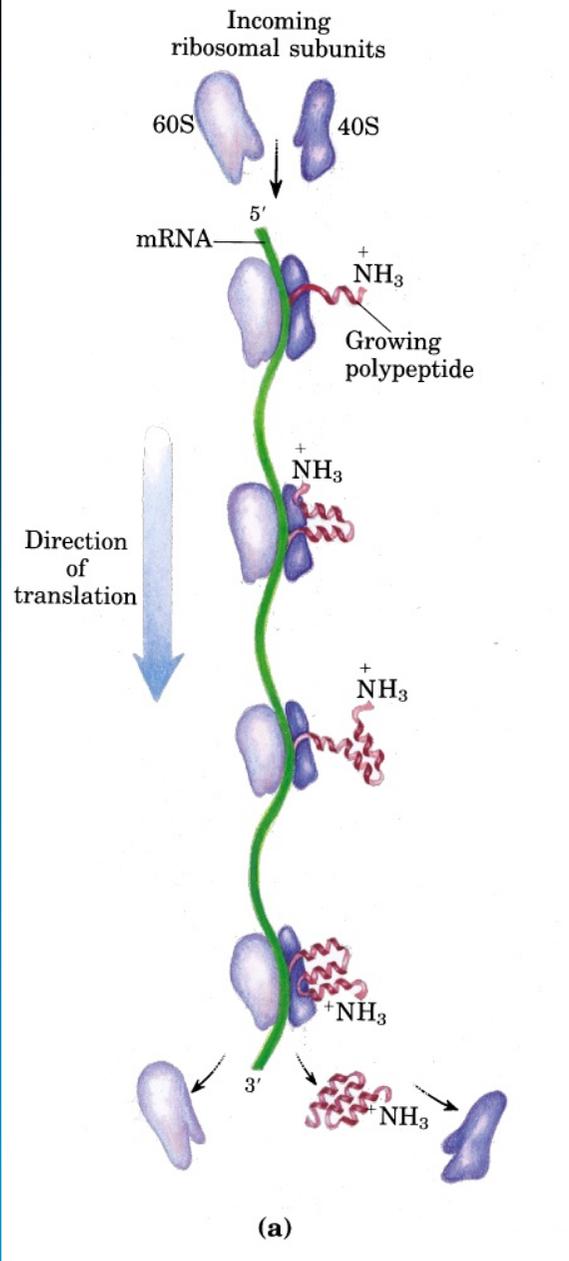
I POLIRIBOSOMI

L'mRNA è tradotto in direzione $5' \rightarrow 3'$.

Nei procarioti, la trascrizione e la traduzione sono strettamente accoppiate.



IL POLIRIBOSOMA



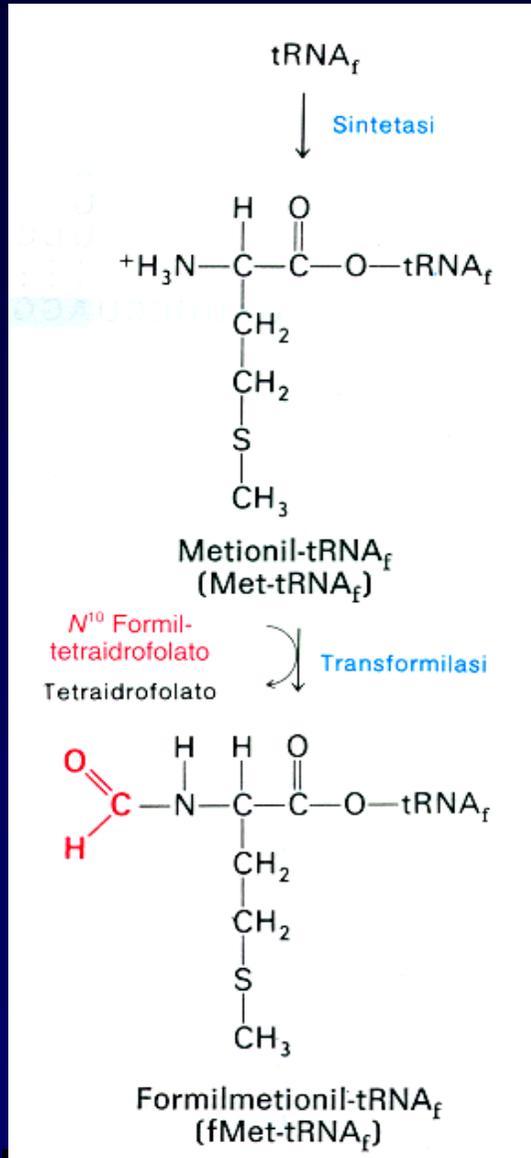
Nell'immagine, molti ribosomi traducono simultaneamente una molecola di mRNA,

se la direzione della traduzione fosse opposta a quella della trascrizione, solo l'RNA completamente sintetizzato potrebbe essere tradotto.

La traduzione prevede tre passaggi:
INIZIO, ALLUNGAMENTO, TERMINE,
 ciascuno adjuvato da specifici fattori proteici.

Fattore	Numero approssimativo per ribosoma nella cellula	Lega GTP?	Ruolo
Inizio			
IF1	1/7	No	Promuove la dissociazione del ribosoma 70S
IF2	1/7	Sì	Aiuta l'attacco del tRNA di inizio
IF3	1/7	No	Come IF1
Allungamento			
EF-Tu	~10	Sì	Trasporta il tRNA nel sito A
EF-Ts	1	Sì	Partecipa alla ricarica di EF-Tu con GTP
EF-G	1	Sì	Necessario per la traslocazione
Terminazione			
RF1	1/20	No	Fattore di rilascio (UAA, UAG)
RF2	1/20	No	Fattore di rilascio (UAA, UGA)
RF3	?	Sì	Una GTPasi che promuove il rilascio

L'INIZIO DELLA SINTESI PROTEICA



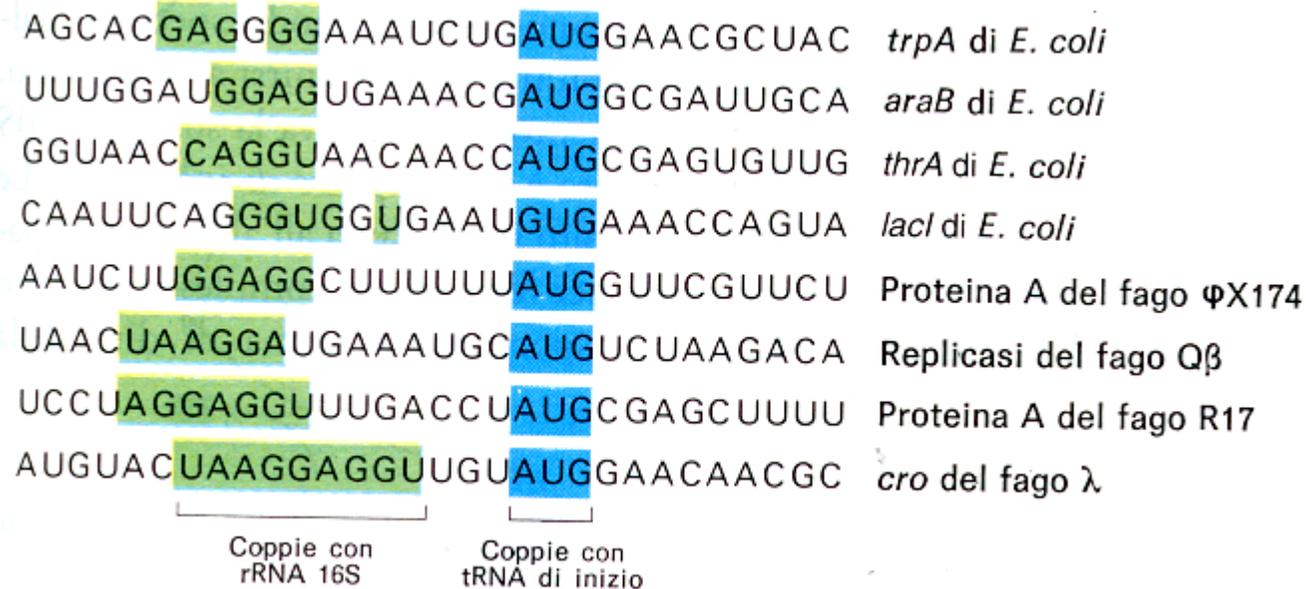
Nei procarioti, il primo codon tradotto nell'mRNA non inizia immediatamente al terminale 5' e molte molecole di mRNA sono **policistroniche**: codificano per più di una catena polipeptidica;

la sintesi proteica nei batteri è iniziata da **formilmetionil tRNA**. Questo tRNA_f iniziatore porta la formilmetionina al ribosoma.

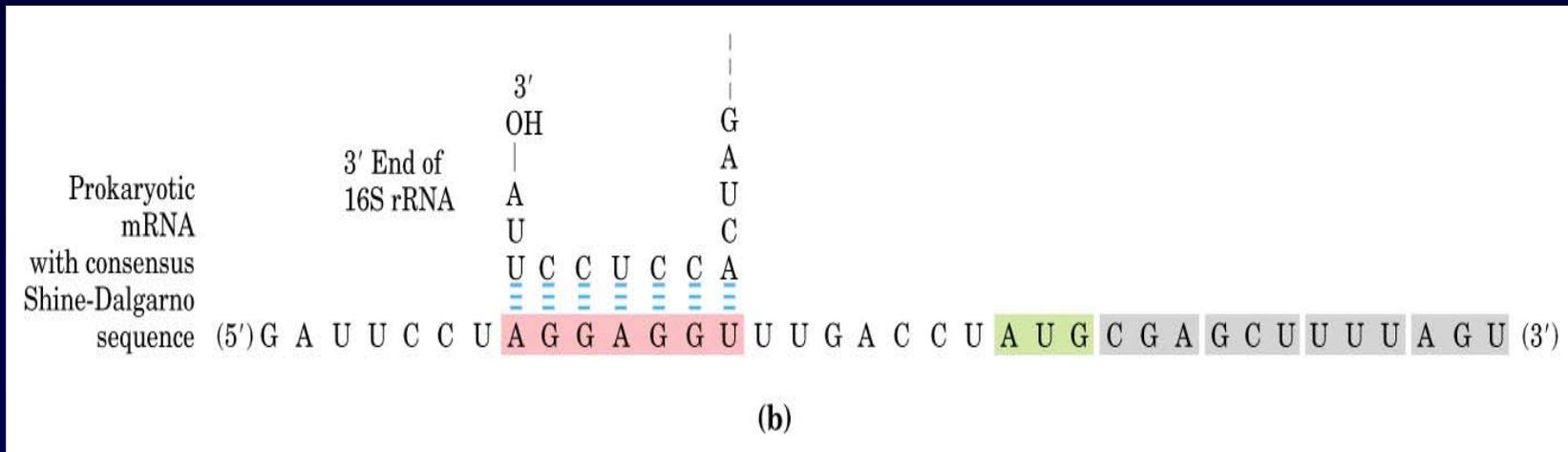
IL COMPLESSO DI INIZIO 30S

I codon di inizio nell'mRNA dei procarioti sono **AUG** (metionina) e molto meno frequentemente **GUG** (valina).

L'accoppiamento del codon di inizio dell'mRNA con l'anticodon del fMet tRNA di inizio e l'appaiamento di alcune basi dell'mRNA (sequenza ricca di purine, 10 nucleotidi a monte del sito di inizio) con l'estremità 3' dell'RNA 16S della subunità ribosomiale 30S determinano il punto di inizio della sintesi proteica.



IL COMPLESSO DI INIZIO 70S



L'accoppiamento delle basi avviene tra la regione ricca in purine (sequenza di Shine-Dalgarno) nel sito di inizio di un mRNA ed il terminale 3' dell'rRNA 16S (da 3 a 9).

Una subunità ribosomiale 50S si unisce quindi a questo complesso per formare un complesso d'inizio 70S, in cui l'fMET-tRNA_f occupa il sito P (peptidilico) del ribosoma.

I TRE SITI DEL RIBOSOMA

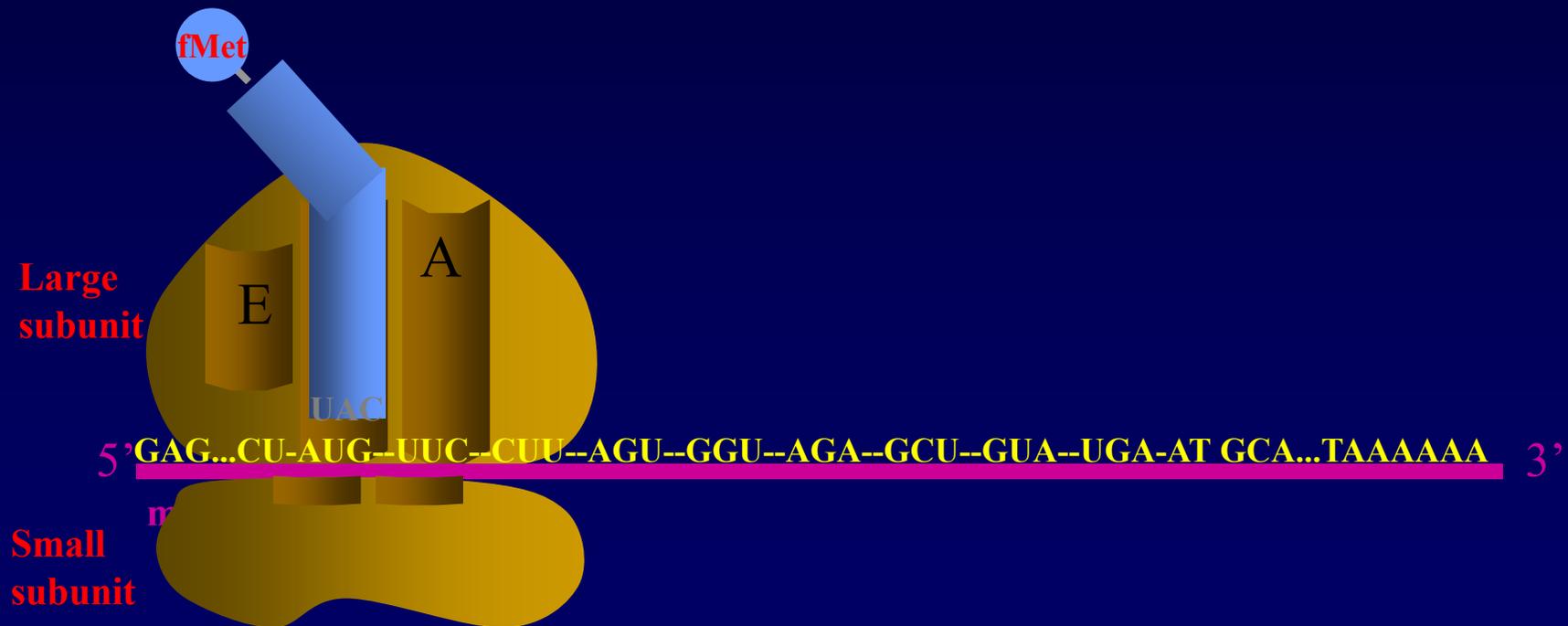
Large
subunit



5'GAG...CU-AUG--UUC--CUU--AGU--GGU--AGA--GCU--GUA--UGA-AT GCA...TAAAAAA 3'

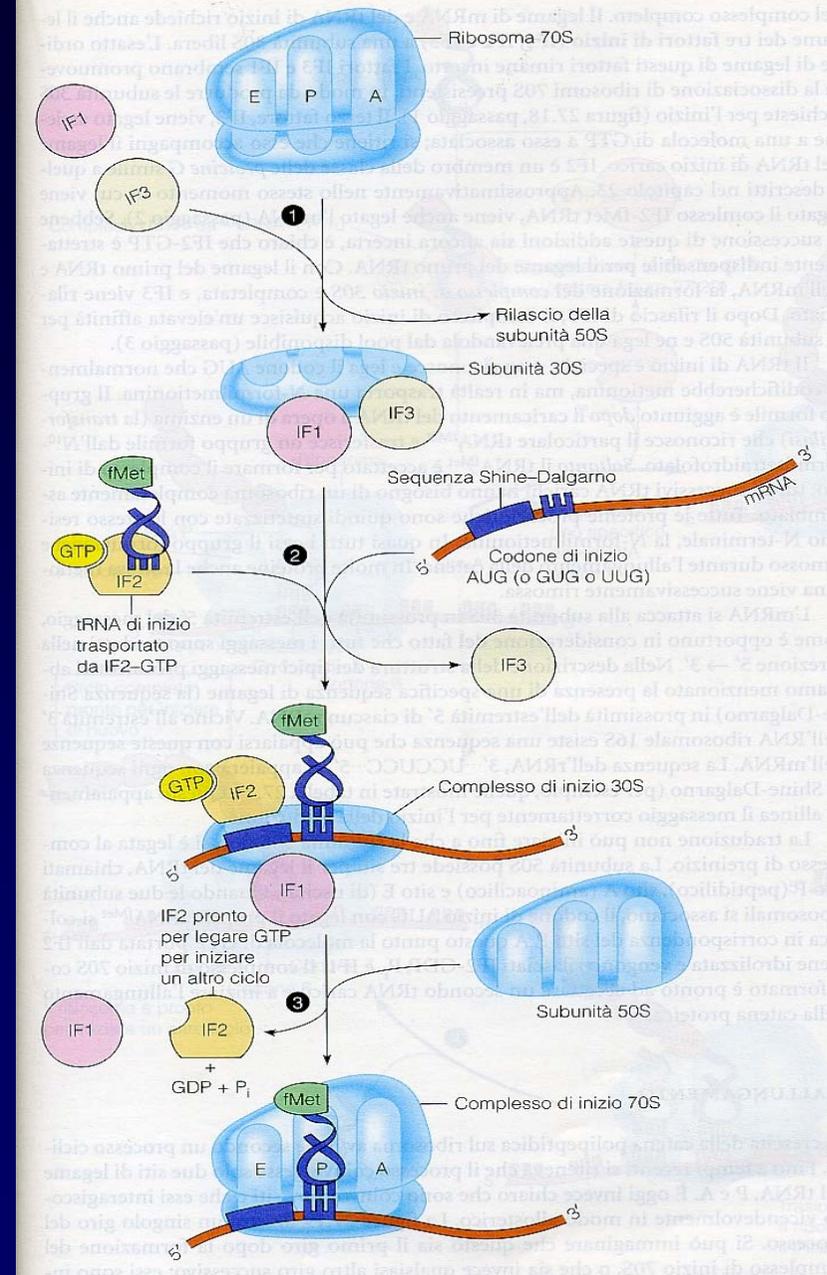
Small
subunit

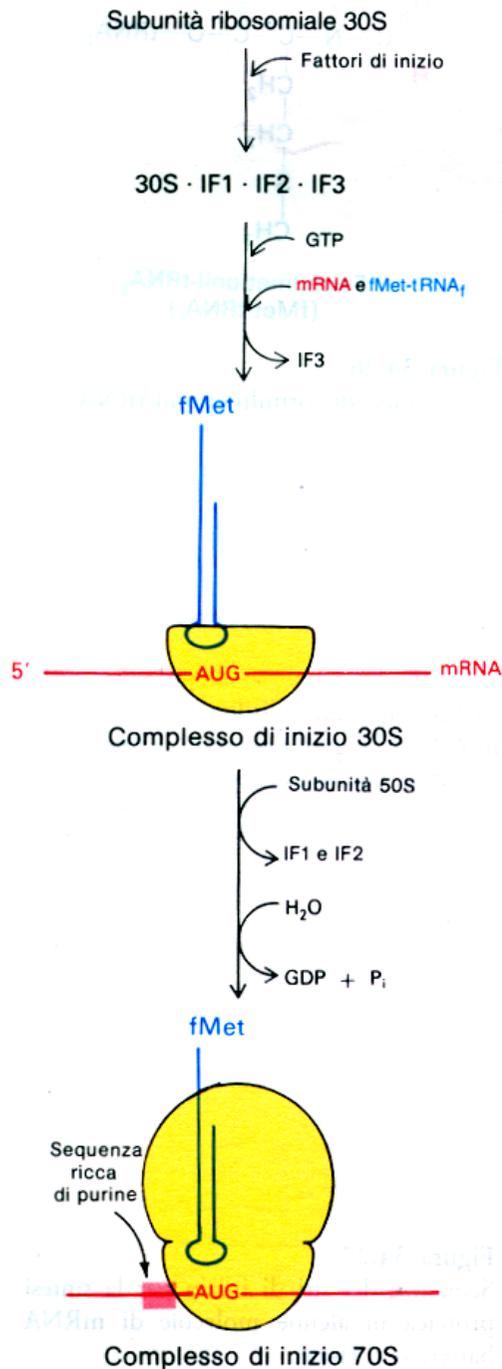
LA FASE DI INIZIO DELLA SINTESI PROTEICA



L'INIZIO

Nella fase d'inizio, il corretto attacco dell'mRNA al ribosoma é determinato dal legame della **sequenza di Shine-Dalgarno** ad una **sequenza sull'rRNA 16S** del ribosoma.





L'INIZIO DELLA SINTESI PROTEICA

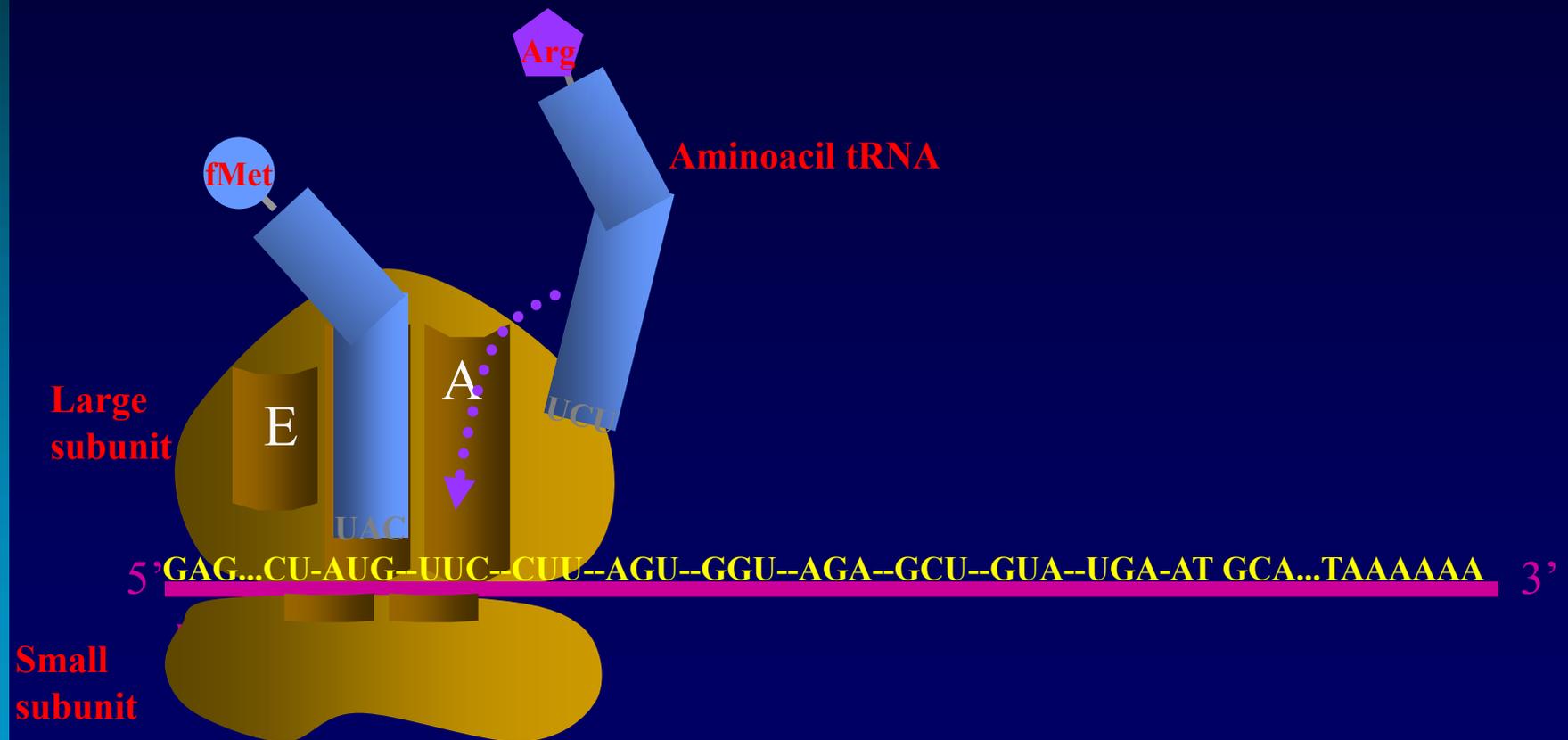
Tre fattori di inizio proteici (IF1, IF2 e IF3) sono essenziali per l'inizio della sintesi proteica. La subunità ribosomiale 30S forma un complesso con questi tre fattori.

IF2 promuove il legame del complesso metionina formilata-tRNA al ribosoma 30S e richiede GTP.

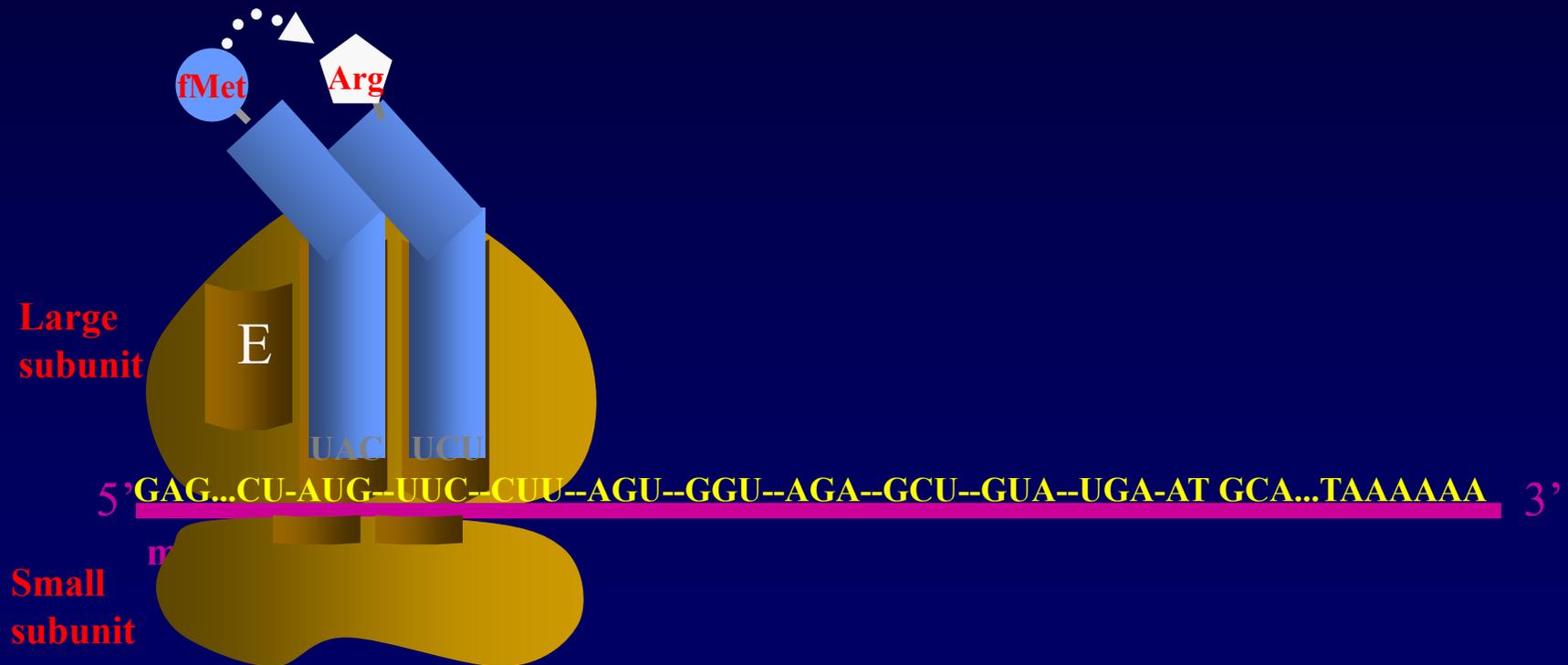
Il legame del GTP consente all'mRNA ed al tRNA iniziatore di legarsi al complesso con rilascio di IF3 e conseguente associazione della subunità 50S.

Successivamente l'idrolisi del GTP porta al rilascio di IF1 e IF2 con formazione del complesso 70S pronto per la fase di allungamento della sintesi proteica. La molecola di fMET-tRNA_f occupa il sito P (peptidilico) sul ribosoma, mentre gli altri due siti il sito A (aminoacilico) e il sito E (di uscita) sono vuoti.

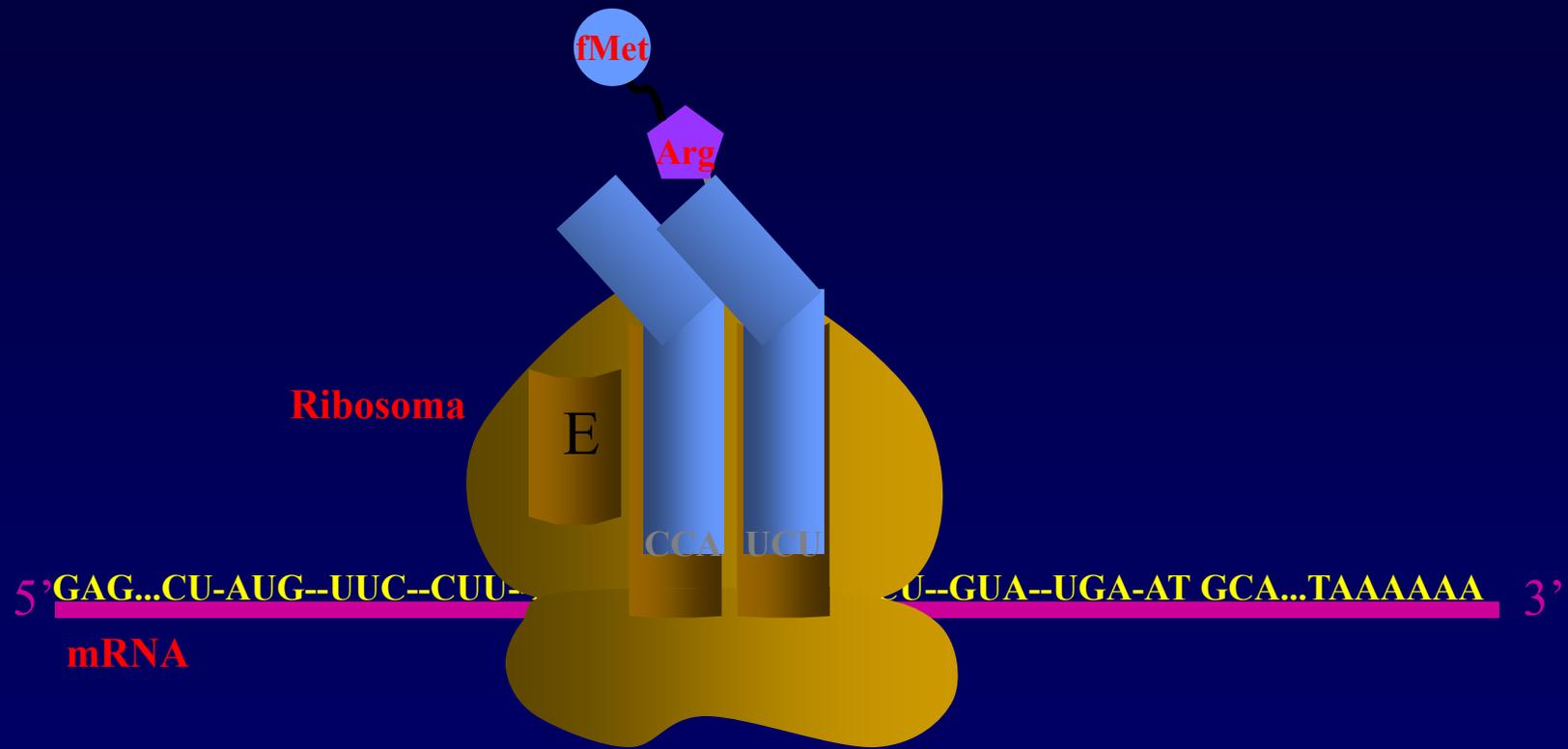
L'ALLUNGAMENTO



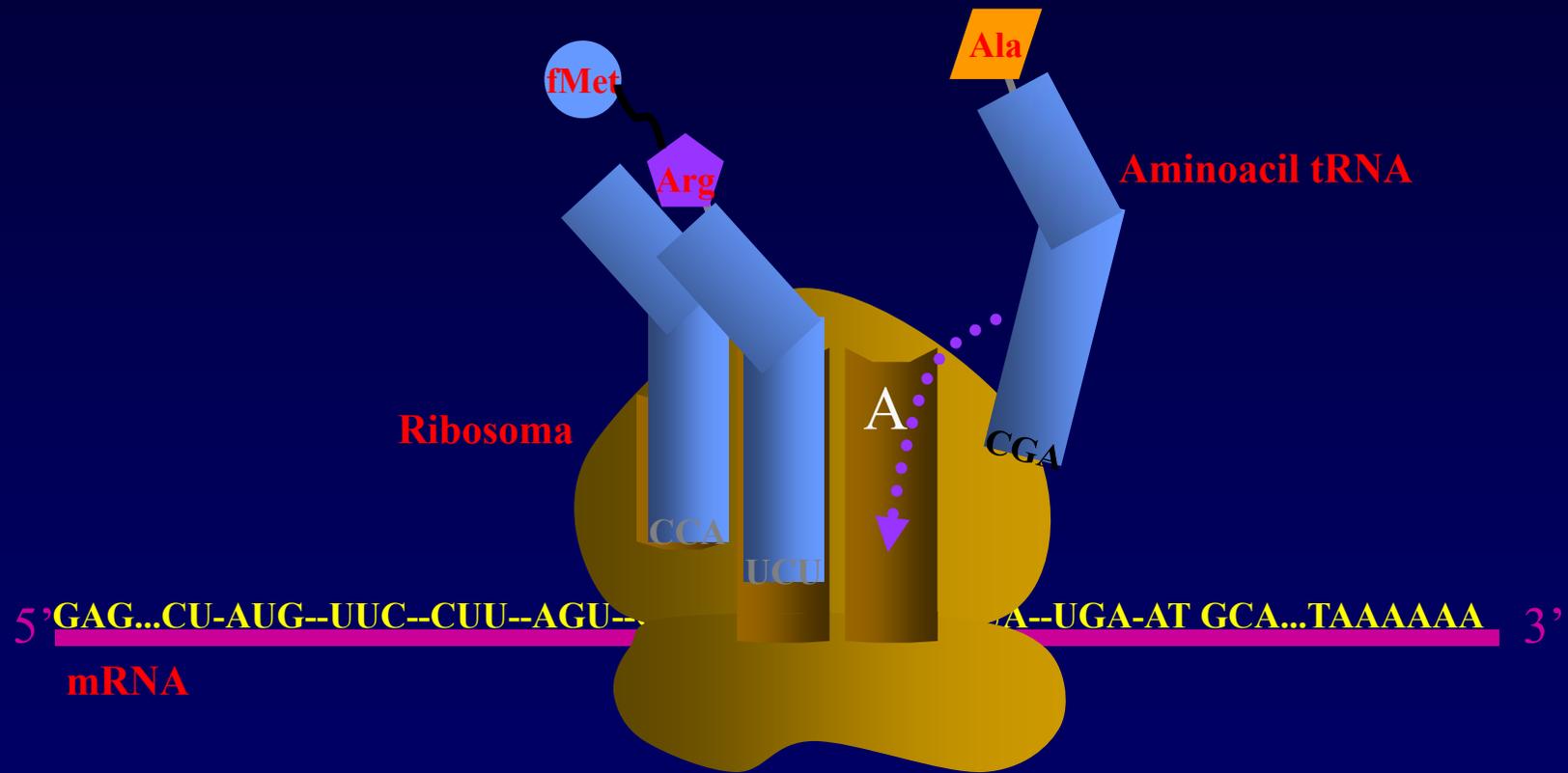
L'ALLUNGAMENTO



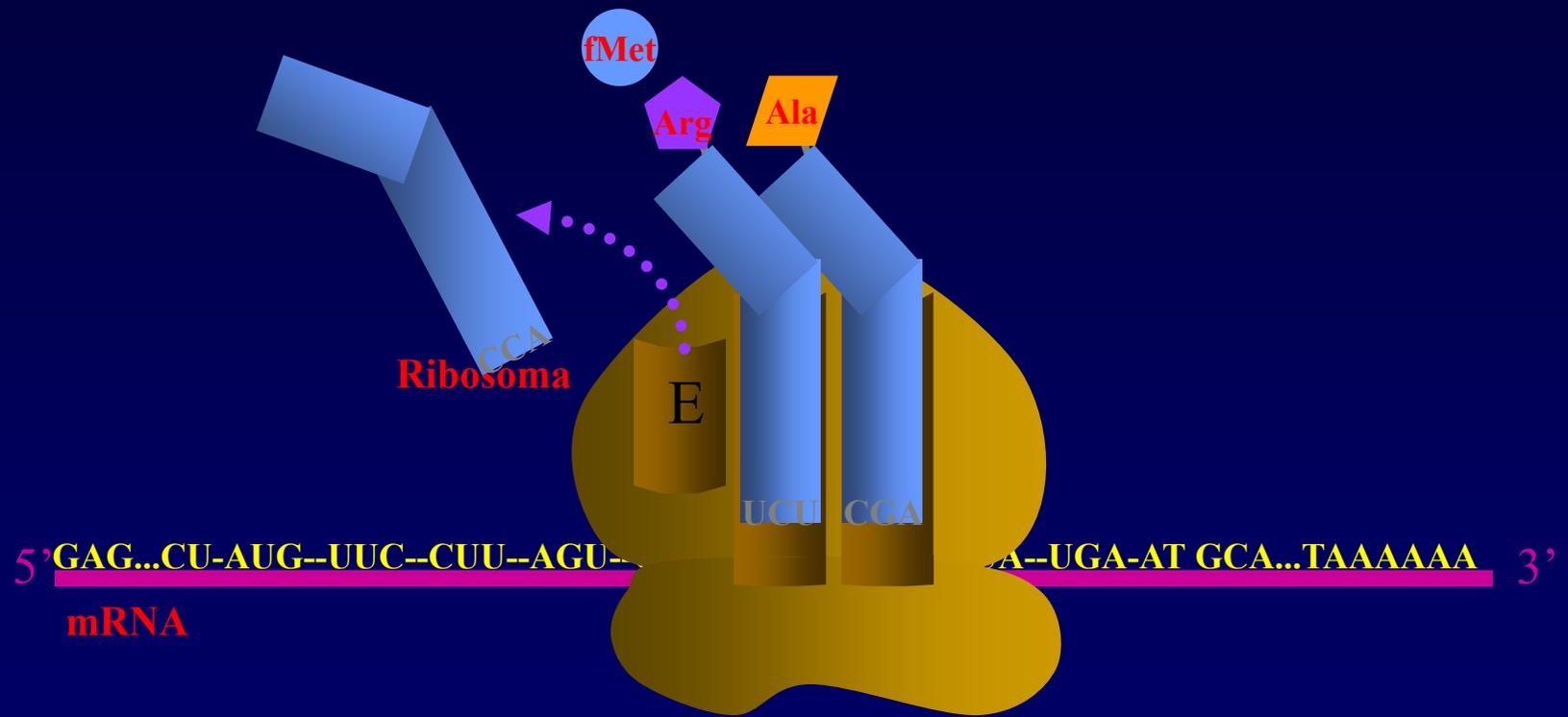
L'ALLUNGAMENTO



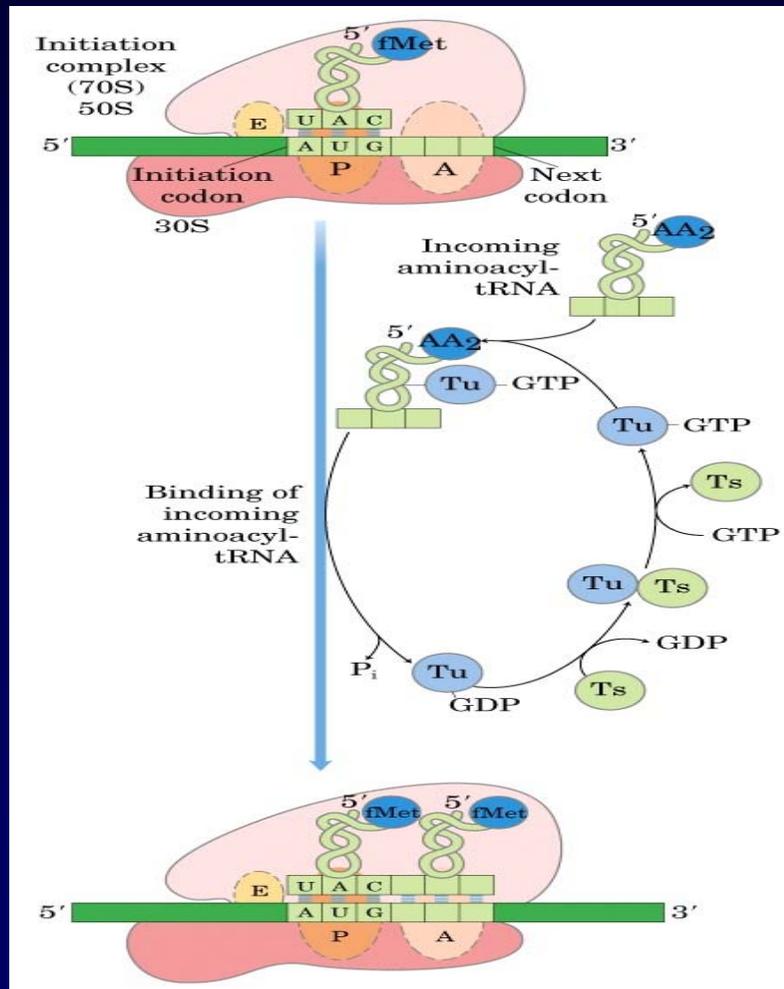
L'ALLUNGAMENTO



L'ALLUNGAMENTO



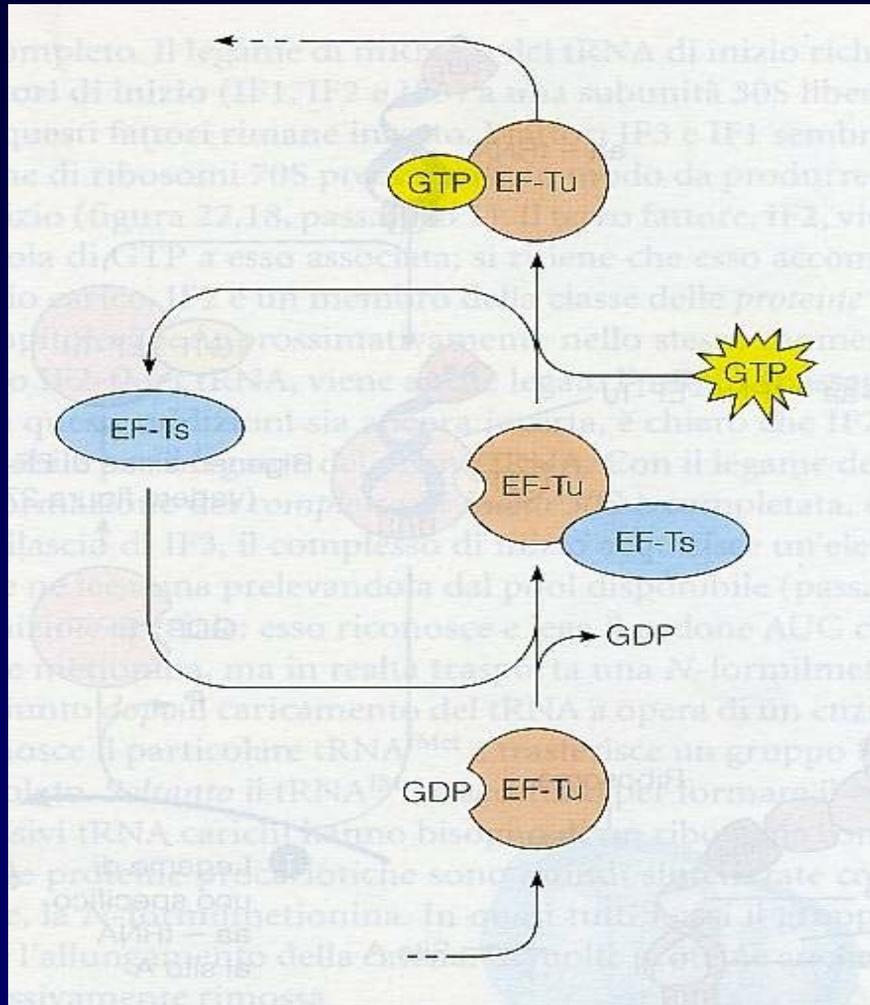
IL CICLO DI REAZIONE DEL FATTORE DI ALLUNGAMENTO Tu (EF-Tu)



L'EF-Tu (una proteina di 42 Kd) porta l'aminoacil-tRNA appropriato al sito A (aminoacilico), per cominciare la fase di allungamento, con la formazione del primo legame peptidico.

L'idrolisi del GTP, legato a questa proteina, porta alla dissociazione di EF-Tu dal ribosoma, facendo intervenire un secondo fattore di allungamento EF-Ts, che induce la dissociazione del GDP.

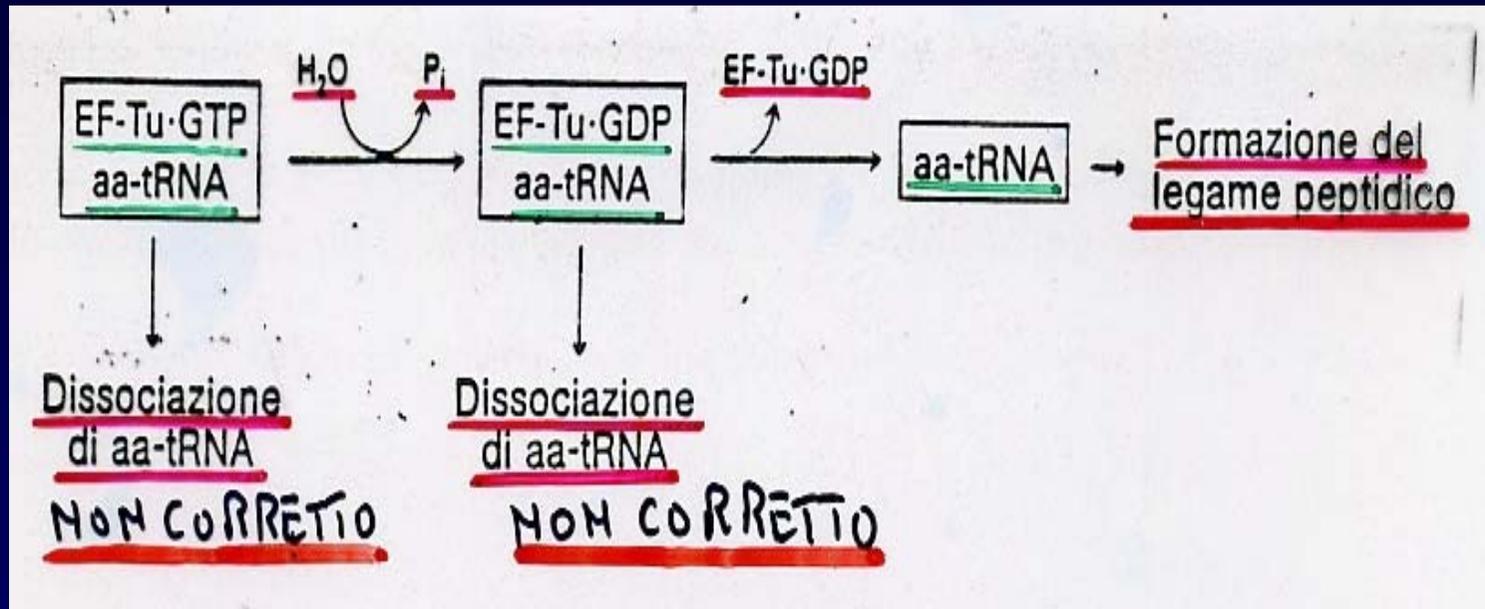
IL CICLO DI REAZIONE DEL FATTORE DI ALLUNGAMENTO Tu (EF-Tu)



Il legame del fattore **EF-Ts** a **EF-Tu** permette anche il legame di un nuovo **GTP**, per preparare **EF-Tu** ad un nuovo ciclo.

La velocità della **GTPasi** di **EF-Tu** determina la frequenza di errore ed il ritmo della sintesi proteica.

LA FEDELTÀ DELLA SINTESI PROTEICA

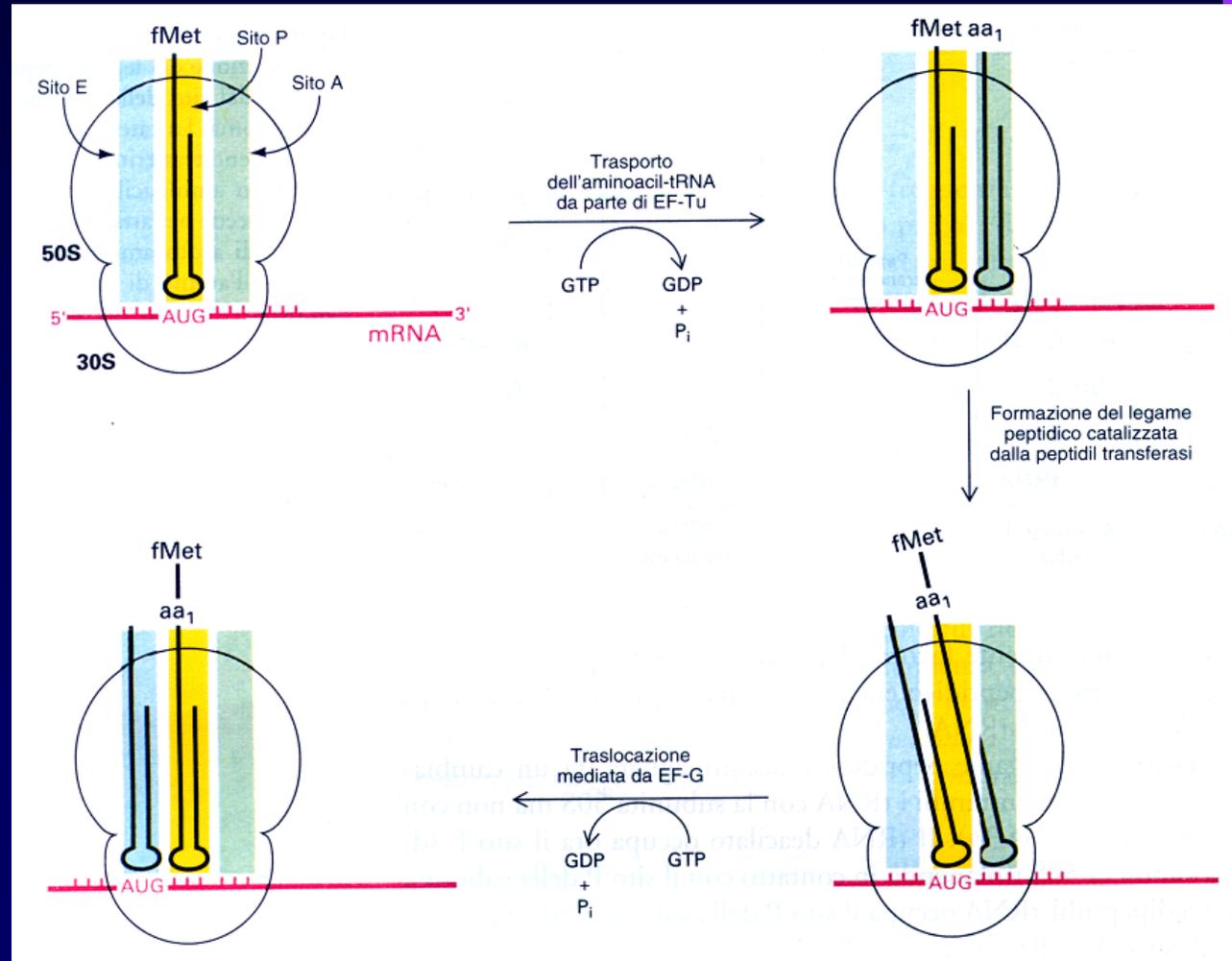


La correzione dell'amminoacil tRNA che occupa il sito A avviene prima e dopo l'idrolisi del GTP legato a EF-Tu.

IL CICLO DI ALLUNGAMENTO DELLA SINTESI PROTEICA

La fase successiva del ciclo di allungamento è la traslocazione mediata da un **fattore EF-G**;

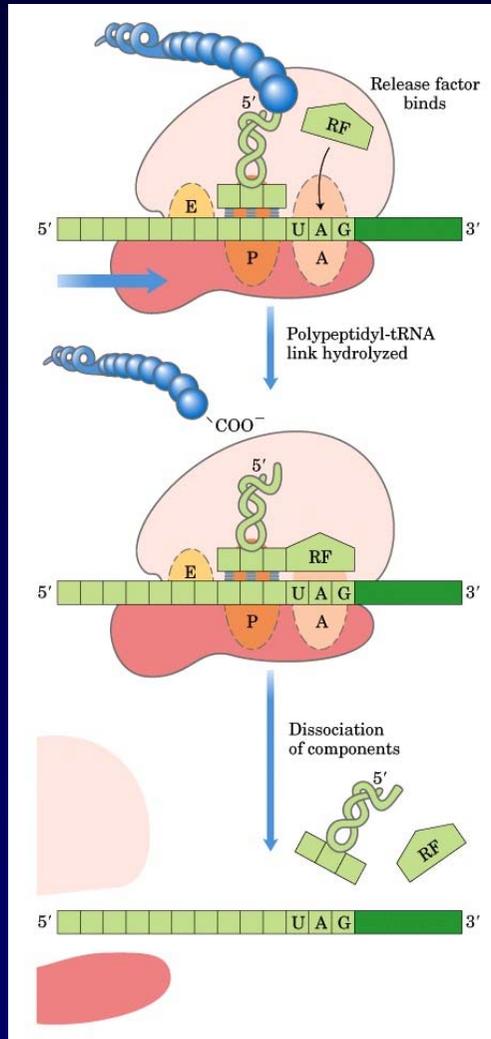
il **tRNA scarico** lascia il sito P della subunità 30S e va al sito E, il **dipeptidil-tRNA** si sposta dal sito A della subunità 30S al sito P della stessa subunità e l'**mRNA avanza** di tre nucleotidi in modo da porre il **codon successivo** nella posizione giusta per essere letto.



IL CICLO DI ALLUNGAMENTO DELLA SINTESI
PROTEICA CONSISTE QUINDI DI TRE MOMENTI:

- 1) l'attacco dell'aminoacil-tRNA
- 2) la formazione del legame peptidico
- 3) la traslocazione.

LA TERMINAZIONE



La sintesi proteica è terminata da fattori di rilascio che riconoscono i codoni di stop **UAA**, **UAG** o **UGA**,

anche l'**RNA 16S** ha un ruolo chiave, particolarmente nella lettura del codon di stop **UGA**,

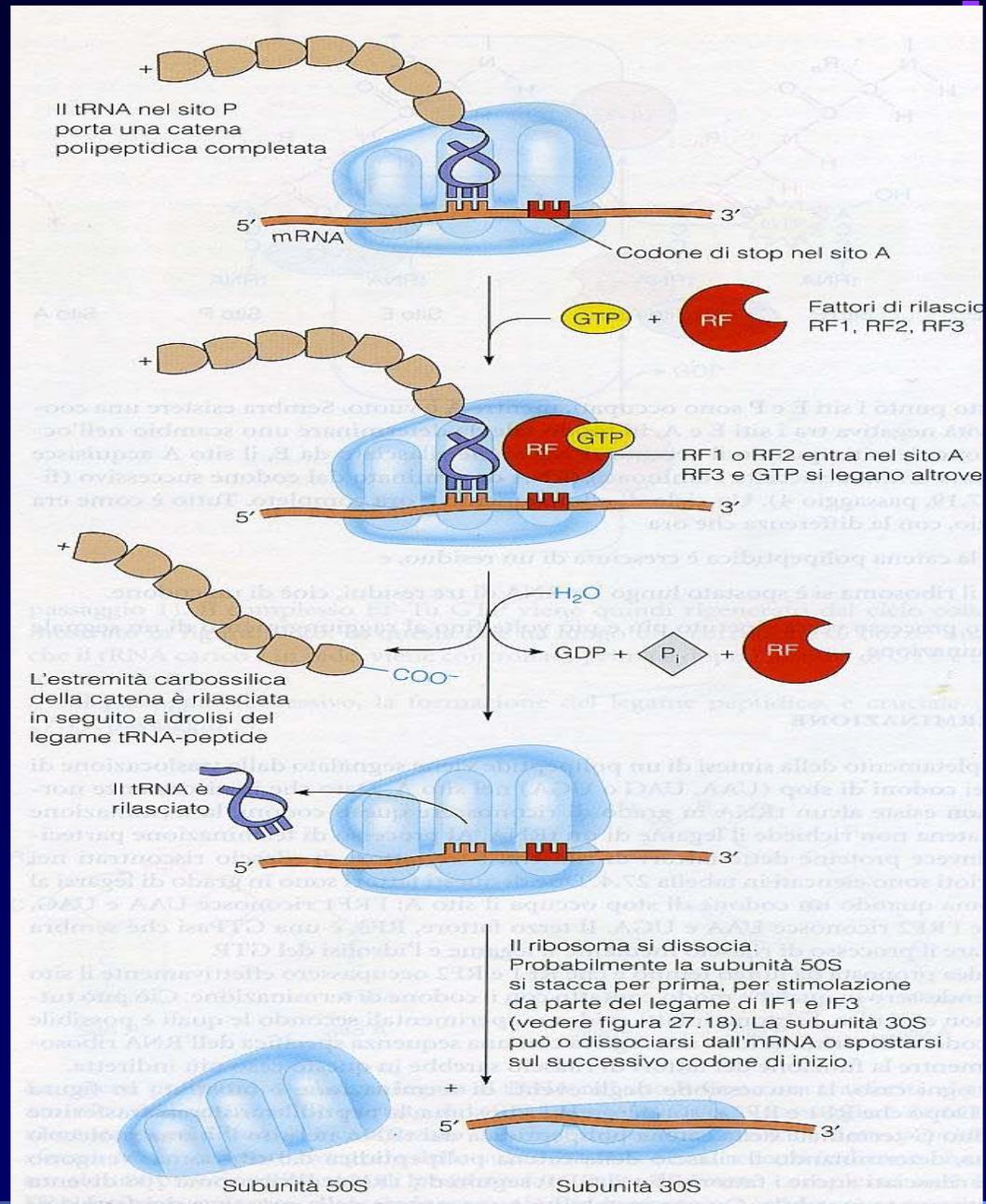
si ha l'**idrolisi** del legame tra il polipeptide ed il tRNA,

i fattori di rilascio coinvolti sono **RF1** (per UAA e UAG) o **RF2** (per UAA e UGA).

LA TERMINAZIONE

I fattori di rilascio agiscono sulla peptidil transferasi, affinché l'accettore del peptide attivato sia l'acqua invece del gruppo aminico, idrolizzando il legame fra il polipeptide e il tRNA nel sito P.

Al termine della sintesi, la catena polipeptidica lascia il ribosoma, seguita dal tRNA e dall'mRNA ed il ribosoma si dissocia nelle due subunità costituenti (50S e 30S).



IL TERMINE DELLA SINTESI PROTEICA

- La sintesi proteica è terminata da fattori di rilascio proteici (RF1 e RF2) che riconoscono i codon di stop. Anche l'RNA 16S svolge un ruolo chiave nella terminazione in particolare nella lettura dei codon di stop UGA,
- i fattori di rilascio agiscono sulla peptidil transferasi in modo che l'accettore del peptide attivato sia l'acqua invece del gruppo aminico idrolizzando il legame fra il polipeptide e il tRNA nel sito P;
- al termine della sintesi, la catena polipeptidica lascia il ribosoma seguita dal tRNA e dall'mRNA ed il ribosoma si dissocia nelle due subunità costituenti (50S e 30S).

LE CATENE POLIPEPTIDICHE SUBISCONO AVVOLGIMENTI E MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI

1. Modificazioni amino- e carbossi-terminali
2. Perdita delle sequenze di segnale
3. Fosforilazione degli amminoacidi con gruppi -OH
4. Reazioni di carbossilazione
5. Metilazione di gruppi R
6. Attacco di catene di carboidrati
7. Aggiunta di gruppi prostetici
8. Formazione di ponti disolfuro.

RIASSUNTO: LE FASI DELLA SINTESI PROTEICA

STADIO I: le amminoacil-tRNA sintetasi attaccano il corretto aminoacido al tRNA

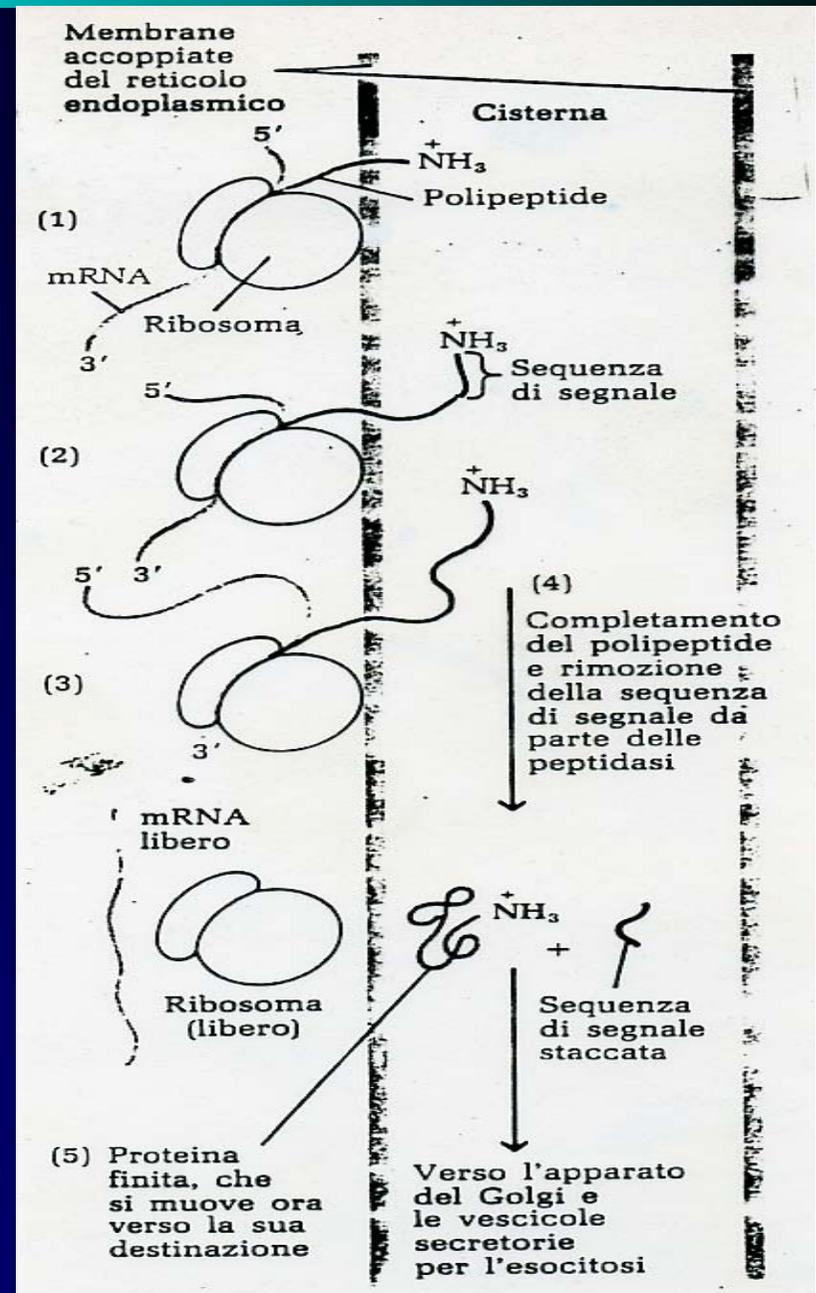
STADIO II: un aminoacido specifico inizia la sintesi

STADIO III: i legami peptidici si formano durante la fase di allungamento

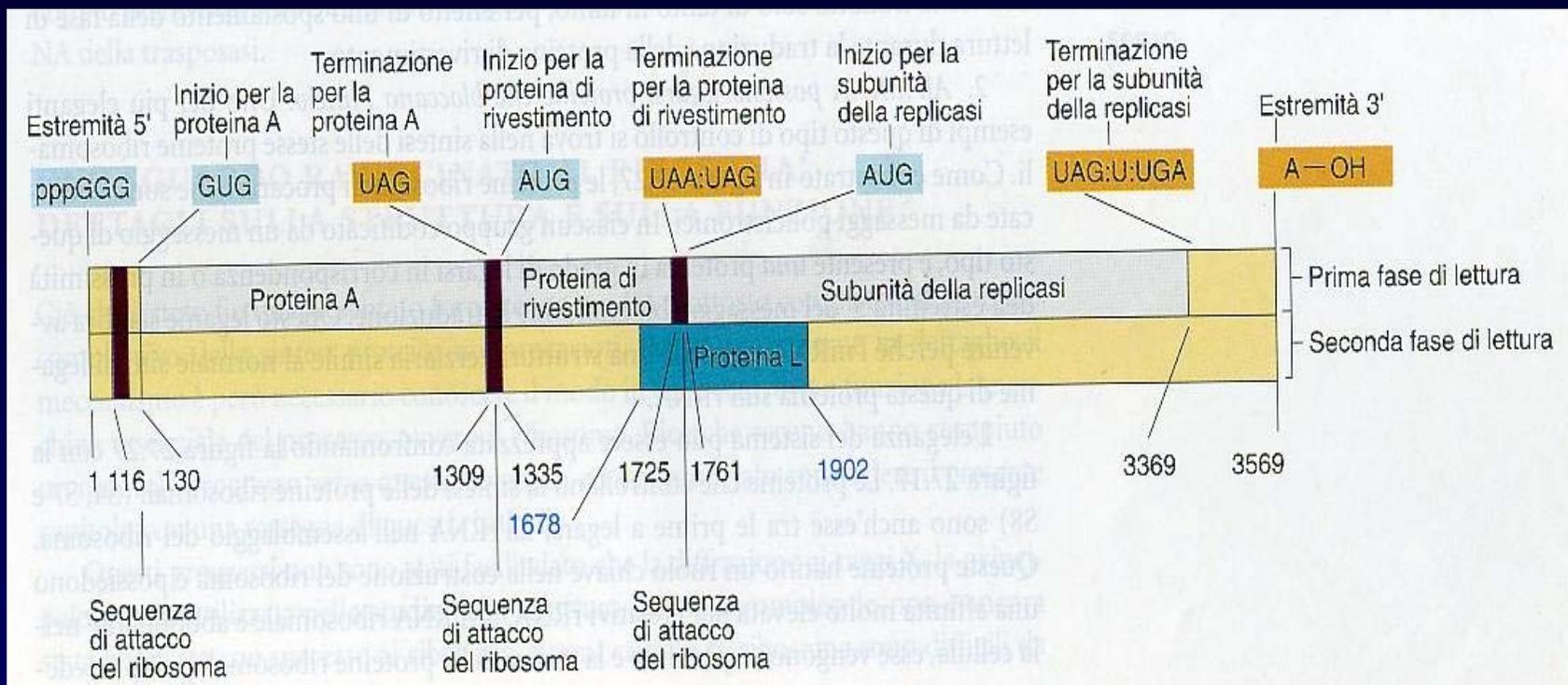
STADIO IV: la terminazione della sintesi polipeptidica necessita di un segnale di stop

STADIO V: le catene polipeptidiche neosintetizzate vanno incontro a ripiegamenti e modificazioni

LE FASI DELLA SINTESI DI UNA PROTEINA CHE DEVE USCIRE DALLA CELLULA



LA REGOLAZIONE DELLA TRADUZIONE



Quando la traduzione è regolata, generalmente lo è a livello dello stadio di inizio, mediante la struttura dell'mRNA o attraverso il legame all'mRNA di proteine o di RNA.