

Lezione 8

La Maturazione e Terminazione degli RNA

- Il capping, la poliadenilazione, lo splicing e lo splicing alternativo.
- La terminazione della trascrizione negli eucarioti
- Cenni sullo spliceosoma e gli snRNA.
- I ribozimi.
- Editing dell'RNA (Lezione 9).
- La regolazione della stabilità del messaggero (Deadenilazione e decapucciamento, miRNA ed RNA interference) (Lezione 9).

La Sintesi delle Proteine

- Il meccanismo della traduzione.
- Gli attori della traduzione, mRNA, rRNA e tRNA.
- La sintesi degli aminoacil-tRNA.
- I ribosomi.
- Sintesi e maturazione degli rRNA e dei tRNA.
- Il codice genetico, i codoni e gli anticodoni.
- La ridondanza, la degenerazione, la non ambiguità e l'universalità del codice genetico.
- I fattori di inizio, di elongazione e di terminazione nella traduzione.

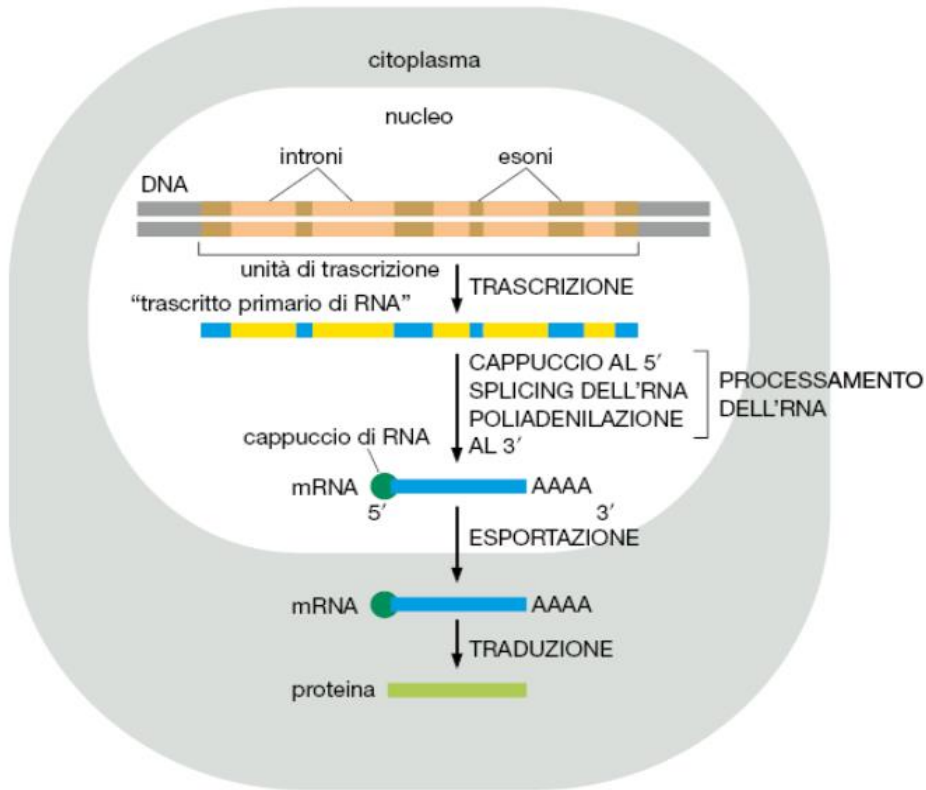
Dove non alternativamente riportato le fonti delle immagini sono:

R. Alessandro et al., Biologia e Genetica, Edises;

B. Alberts et al., Biologia molecolare della cellula, 7e - Zanichelli

Trascrizione ed elaborazione dell'RNA negli eucarioti

(A) EUCARIOTI



- La trascrizione è **solo il primo passo**.
- Servono passaggi aggiuntivi per ottenere un mRNA maturo.

Passaggi principali:

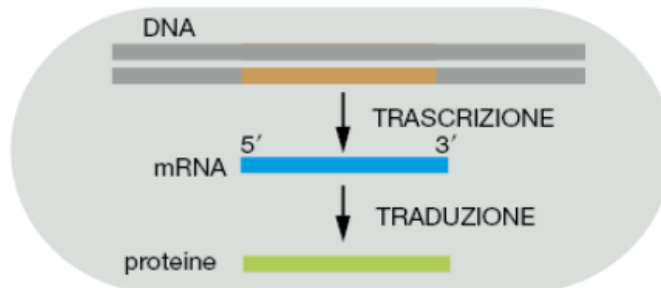
1. **RNA primario (pre-mRNA) con esoni + introni.**
2. **Modifiche obbligatorie: cappuccio 5' + coda poliA 3'.**
3. **Splicing** → rimozione introni e possibilità di alternative splicing.

Risultato: un mRNA pronto per l'**esportazione dal nucleo** e la traduzione.

Accoppiamento trascrizione e maturazione

- Le modifiche **iniziano già durante l'allungamento**.
 - Il cappuccio 5' è aggiunto **non appena** emerge dal complesso.
 - Lo splicing inizia **prima** che la trascrizione sia completata.
- Risultato: in una cellula non si trovano quasi mai **trascritti primari "non modificati"**.

(B) BATTERI



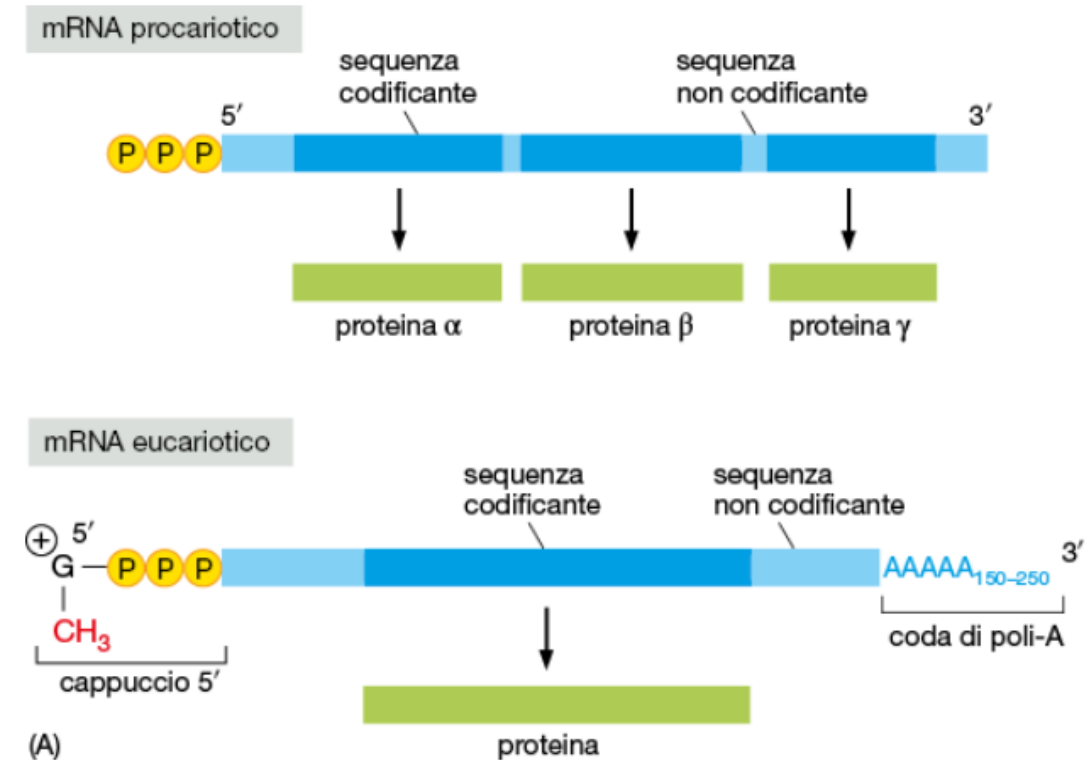
Modifiche delle estremità dell'mRNA eucariote

Estremità 5' → aggiunta di un **cappuccio** (cap):

- 7-metilguanosina legata con insolito legame 5'-5'.
- Ulteriore metilazione sul ribosio in 2'-OH.
- Ruolo: protezione + riconoscimento come “self” contro RNA virali.

Estremità 3' → **poliadenilazione**:

- Taglio del pre-mRNA.
- Aggiunta di una **coda di poliA**.
- Funzione: stabilità, trasporto ed efficienza traduttiva.



Queste modifiche speciali permettono alla cellula di **stabilire se sono presenti entrambe le estremità** di una molecola di mRNA (e perciò **se il messaggio è intatto**) prima di esportare l'RNA dal nucleo per tradurlo in proteina.

CTD: La Coda Carbossi-Terminale della RNA Polimerasi

RNA polimerasi II come “fabbrica”

RNA pol II = **macchina multifunzionale**:

- Trascrive DNA → RNA.
- Porta sulla sua **coda CTD** (C-terminal domain) gli enzimi di modifica.

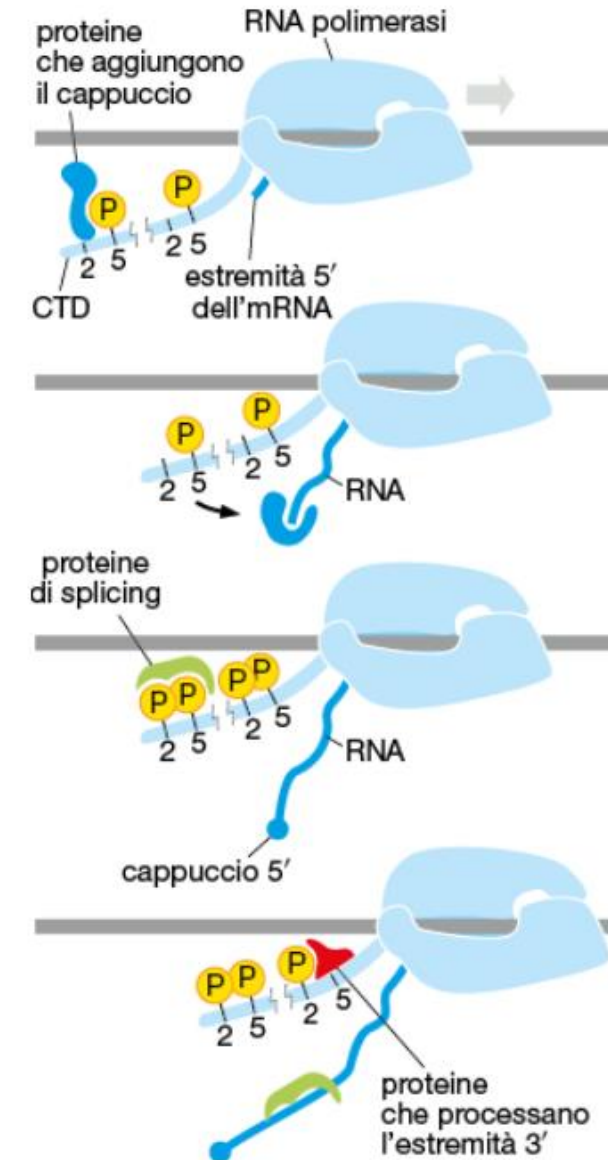
Il CTD funge da **impalcatura** per:

- enzimi di cappuccio,
- proteine di splicing,
- enzimi di poliadenilazione.

Lunghezza CTD: ~10 volte il corpo della polimerasi.

Regolazione tramite fosforilazione del CTD

- CTD = **52 ripetizioni** di un motivo di **7 aa** (con 2 Ser chiave).
- Fosforilazione dinamica regola i processi:
 - **Ser5 fosforilata** → recluta **enzimi per aggiunta cappuccio**.
 - **Ser2 fosforilata** → recluta **proteine di splicing e 3'-end processing**.
- Alla fine: CTD **defosforilato** → **polimerasi pronta per un nuovo ciclo**.



Il Cappuccio come prima modifica del pre-mRNA

Quando avviene:

- Dopo la sintesi di ~20 nucleotidi da parte dell'RNA polimerasi II.

Cos'è:

- Aggiunta di un nucleotide guanilico modificato = **7-metilguanosina (m7G cap)**.

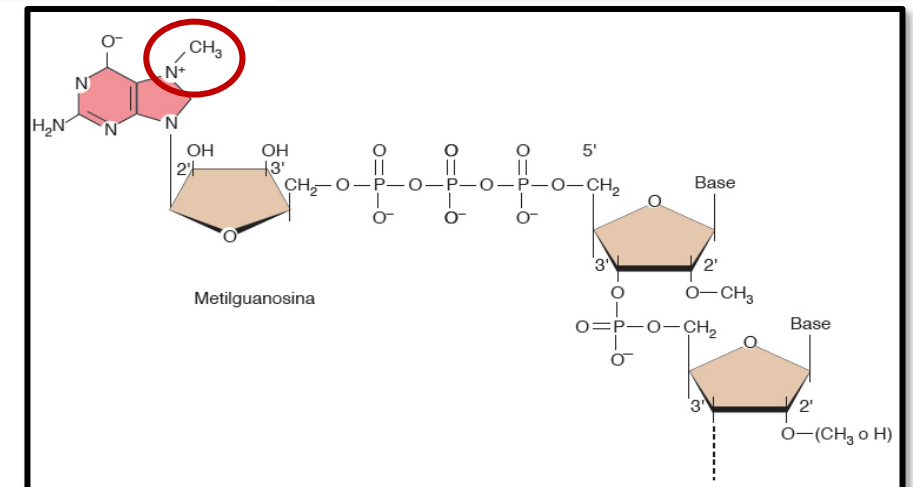
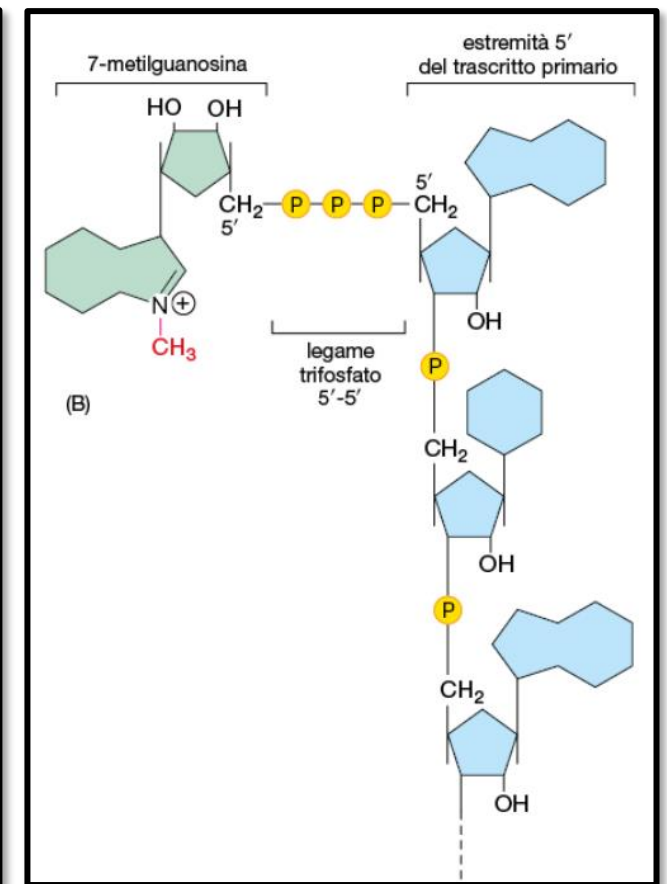
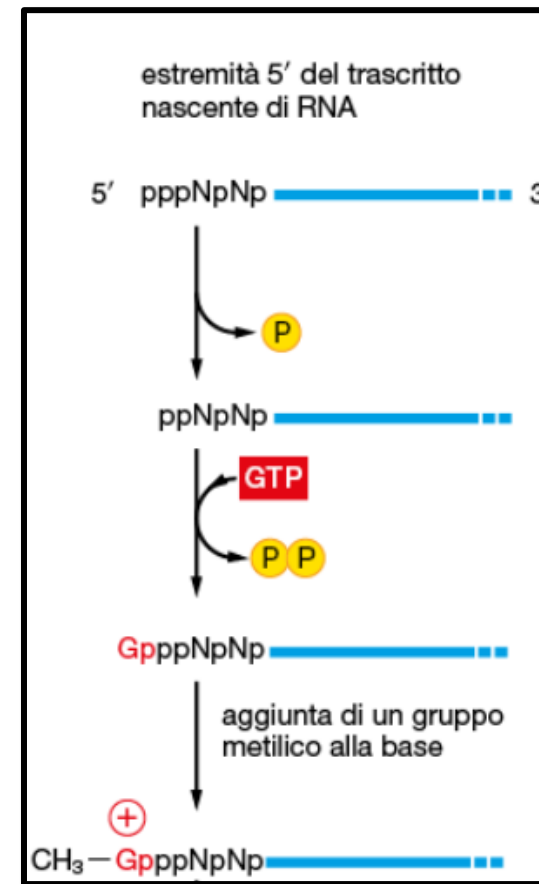
Perché è importante:

- Segnala l'estremità 5' dell'mRNA.
- Distingue gli mRNA da altri RNA cellulari.
- Previene degradazione** da esonucleasi

Meccanismo di aggiunta del cappuccio: Tre enzimi agiscono in successione:

- 1. Fosfatasi** → rimuove un fosfato dall'estremità 5' del trascritto nascente.
- 2. Guanil transferasi** → aggiunge GMP con **legame inverso** (5'-5').
- 3. Metil transferasi** → aggiunge un gruppo metile alla guanosina.

Tutti e **tre gli enzimi si associano al CTD fosforilato su Ser5** della RNA pol II (fosforilazione operata da TFIIF durante l'inizio).



Lo Splicing del pre-mRNA

Lo splicing rimuove gli introni dai **pre-mRNA**.

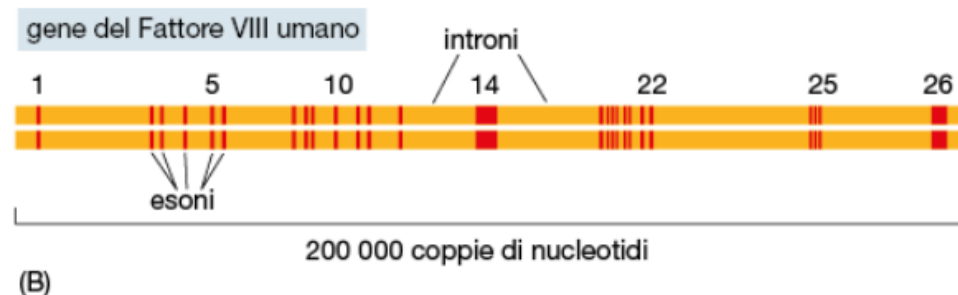
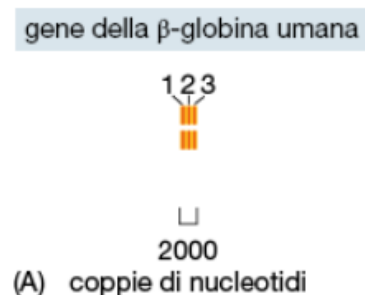
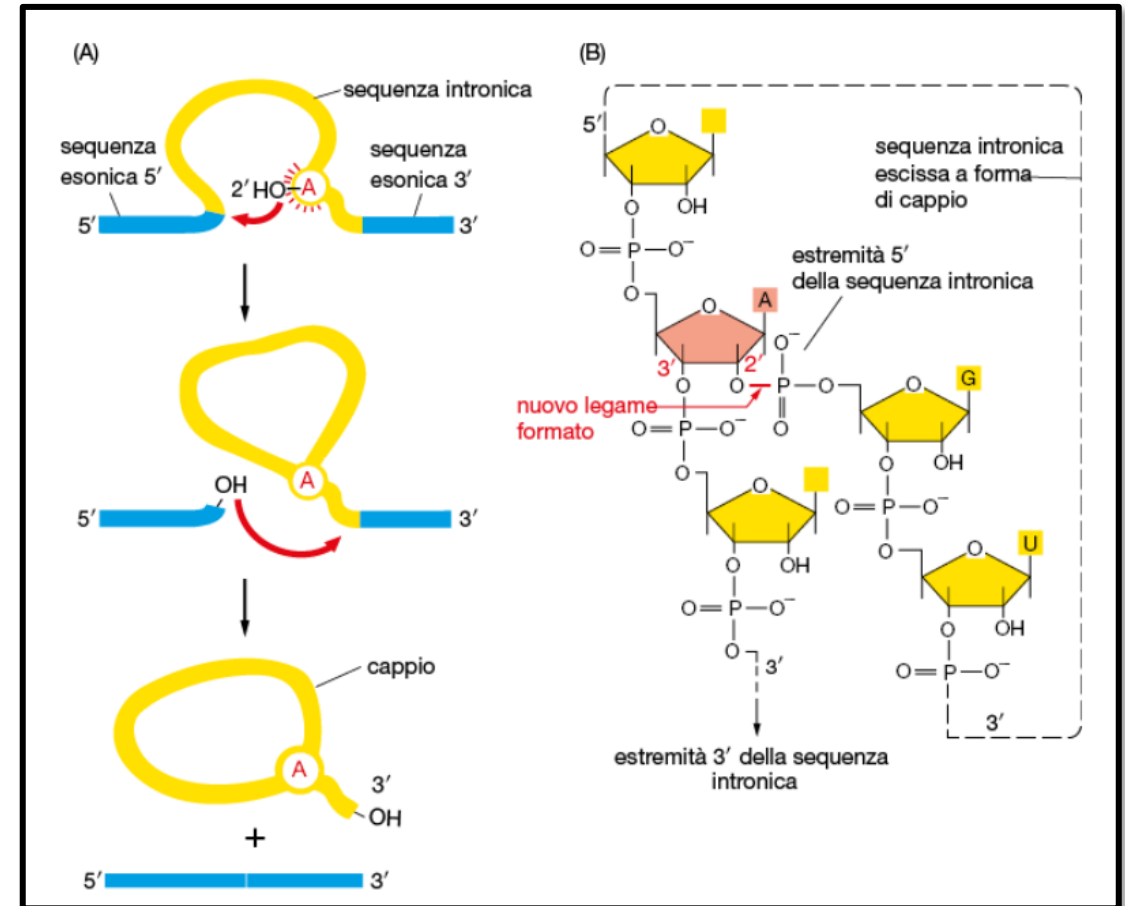
Meccanismo dello splicing

Avviene tramite due **reazioni di transesterificazione**:

1. Un nucleotide A intronico (“punto di ramificazione”) attacca il sito di splicing 5'.
2. L'estremità 3'-OH libera dell'esone attacca il sito di splicing 3'.

• Risultato:

- Esone 1 + Esone 2 uniti.
- L'introne rilasciato come **cappio (lariat)** → poi degradato.



Lo Splicing del pre-mRNA

Sequenze consenso per lo splicing

Lo splicing richiede 3 siti chiave nel pre-mRNA:

- **Sito di splicing 5'** (**GU** invariabile).
- **Punto di ramificazione** (**A** invariabile).
- **Sito di splicing 3'** (**AG** invariabile).

Lo Spliceosoma

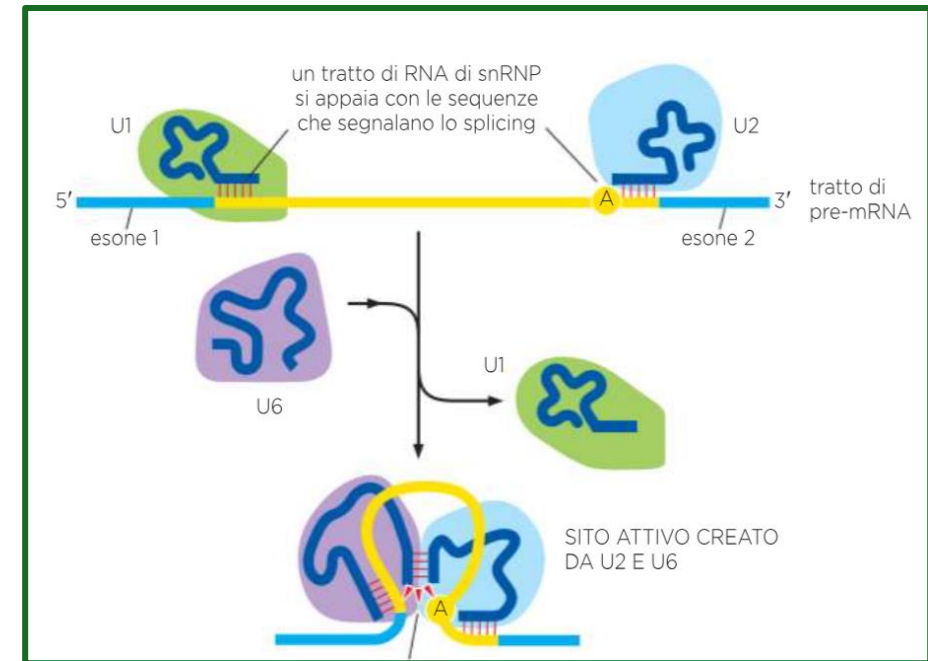
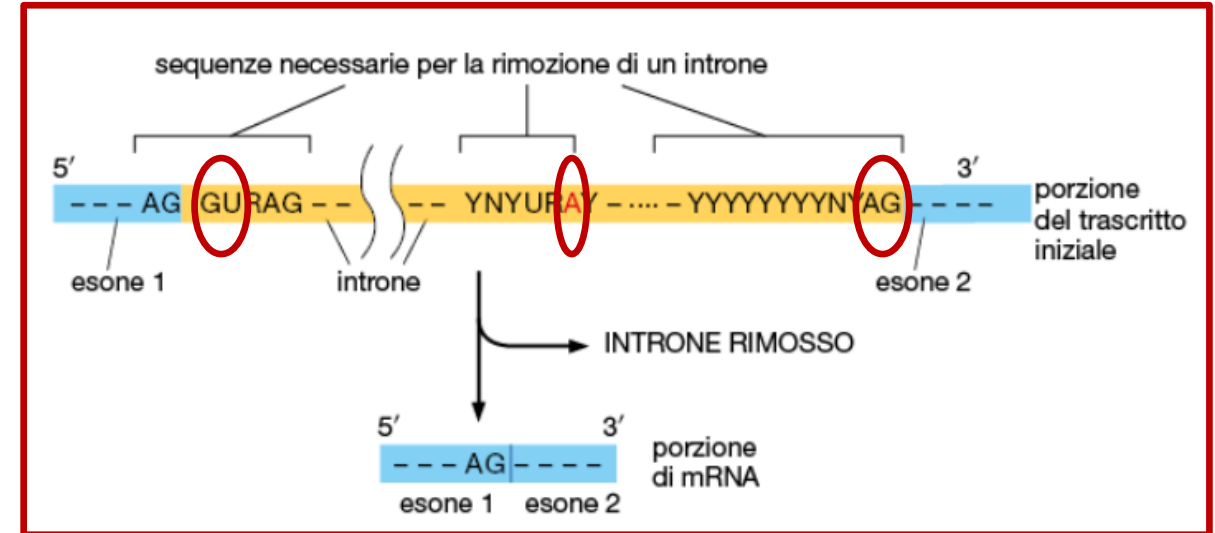
Complesso formato da **snRNA + proteine = snRNP** (*small nuclear ribonucleoprotein*) – si legge = **Snurp**.
snRNA → ricchi di uridina → identificati con **lettera U**

• Principali snRNP: **U1, U2, U4/6, U5**.

• Funzioni chiave:

- **U1** → riconosce il sito **GU**.
- **U2** → riconosce l'adenine (**A**) “branch point” (ramificazione).
- **U5** → riconosce il sito **AG** e unisce gli esoni.

Ogni ciclo richiede riarrangiamenti e **consumo di ATP**.



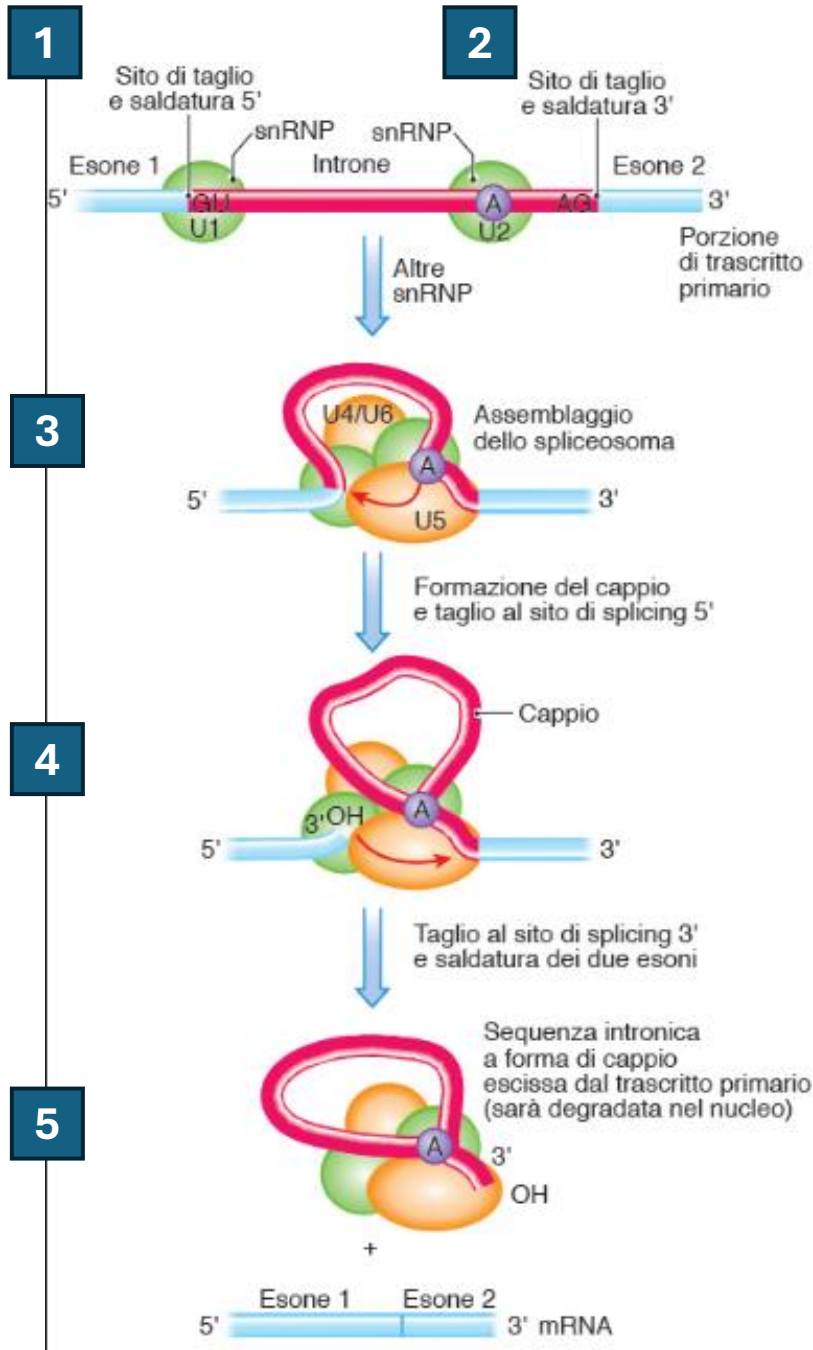
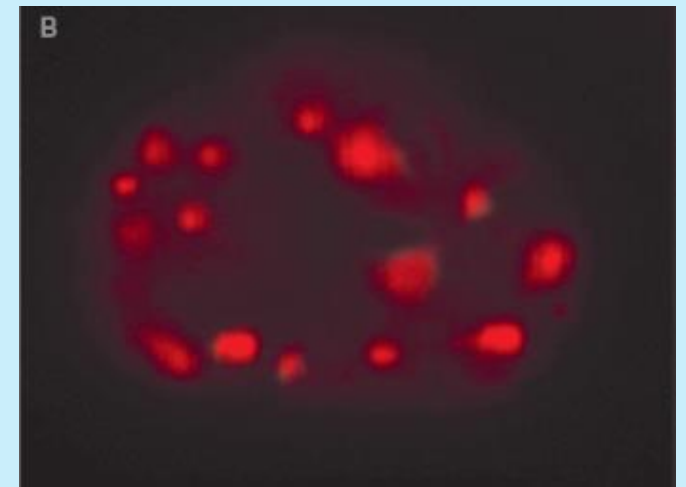
Meccanismo di Splicing del pre-mRNA

1. **U1** riconosce il sito 5' **GU**.
2. **U2** si lega alla **A di ramificazione** dell'introne.
3. **Si forma** una struttura a cappio (**lariat**) → l'estremità 5'P-**GU** dell'introne si lega al 2'OH della **A** di ramificazione.
4. **U5 taglia** al sito 3' **AG** → **unisce gli esoni**.
5. **L'introne a cappio** viene **rilasciato** e degradato.

Proteine Sm e maturazione degli snRNP

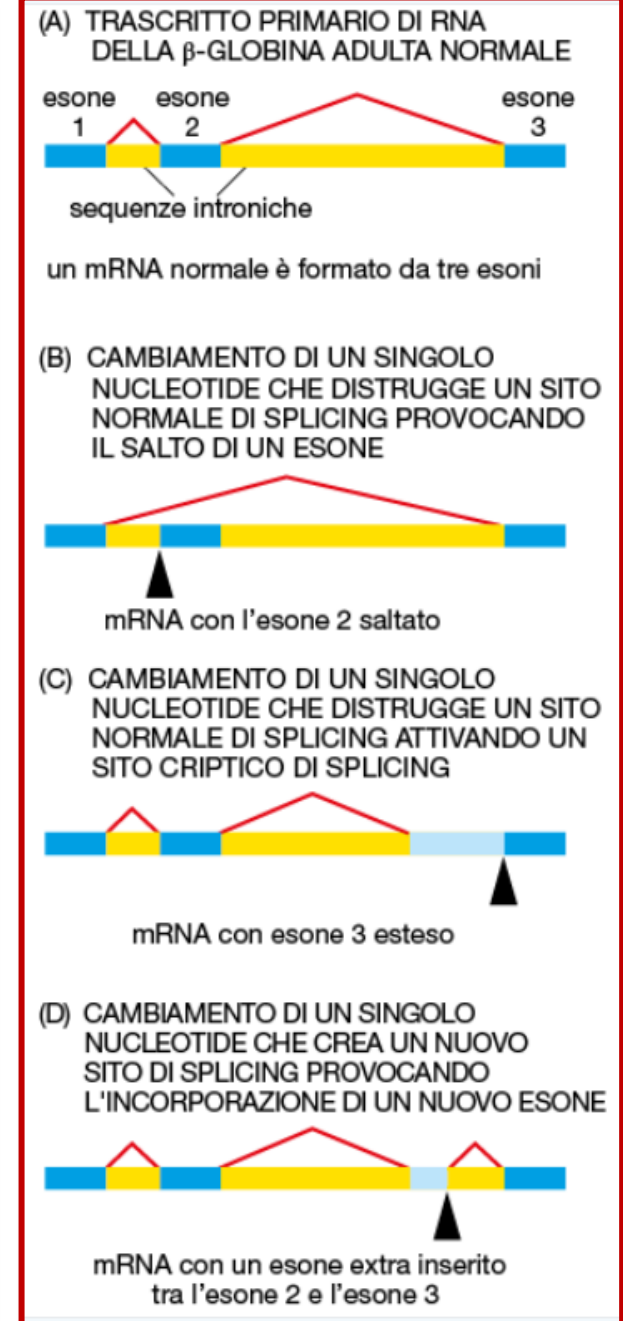
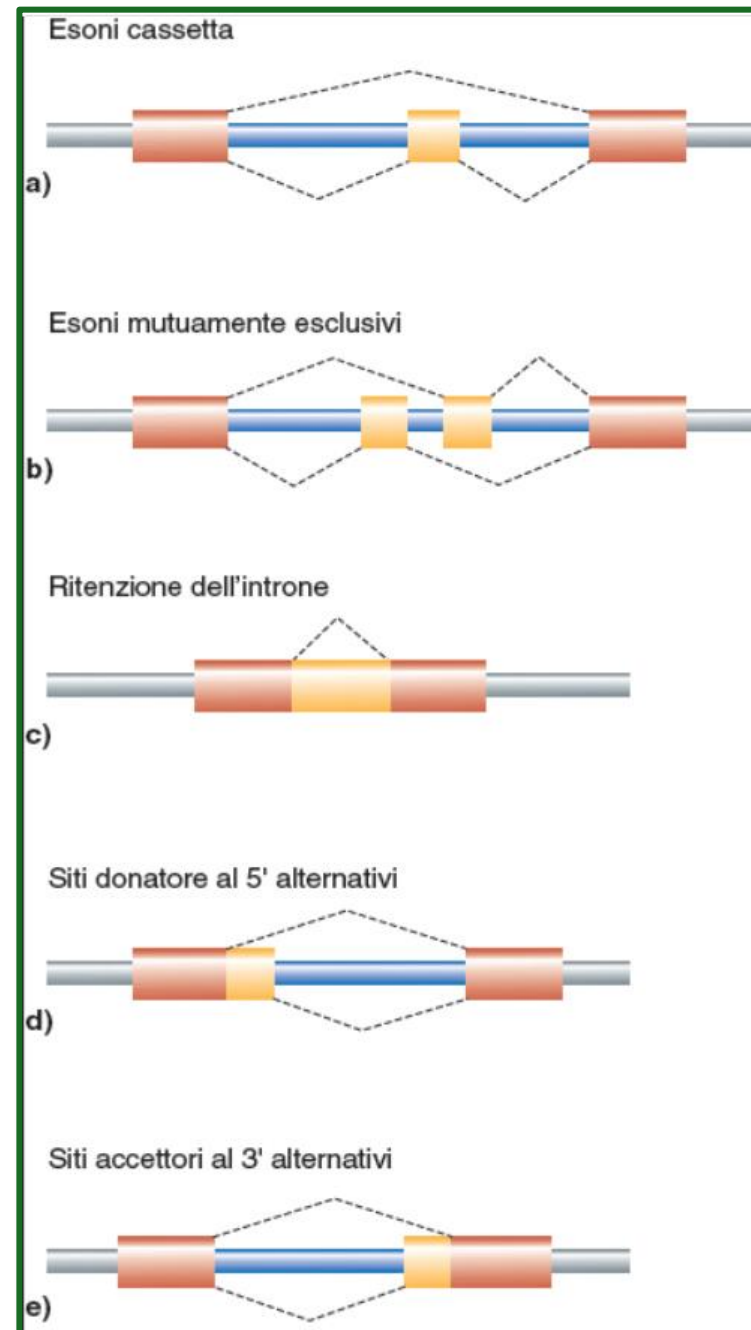
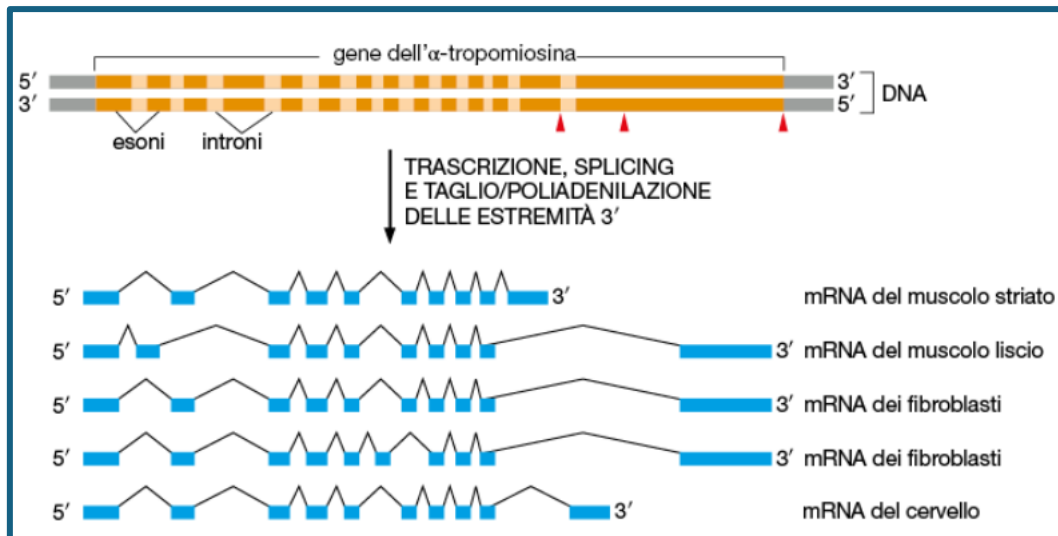
- Le snRNP contengono proteine **Sm**:
 - **Cariche positive** → **stabilizzano l'RNA** a singolo filamento.
 - Assemblaggio nel citoplasma sull'snRNA.
- snRNA:
 - Sintetizzati dall'**RNA pol II**.
 - Subiscono **capping** nel nucleo.
 - Trasportati nel citoplasma → assemblaggio con Sm → **ipermetilazione (m3G cap)**.
 - Re-importati nel nucleo.

Speckles
centri organizzativi per
lo splicing



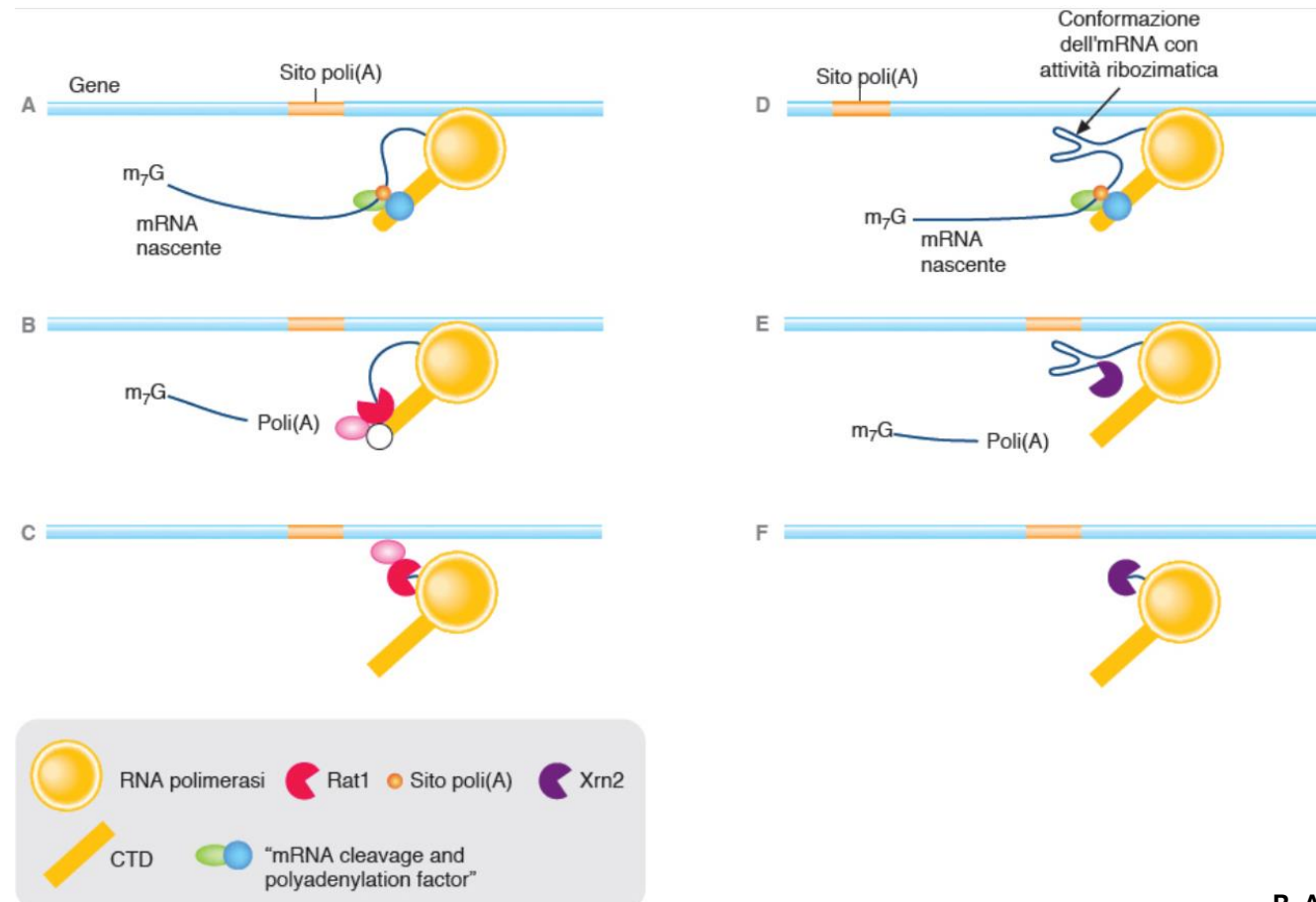
Lo Splicing Alternativo

- Permette la produzione di **trascritti diversi** dallo stesso pre-mRNA.
- Alcuni introni possono essere trattati come esoni → varianti funzionali.
- **Fattori di splicing alternativo:** proteine che guidano lo spliceosoma nel riconoscimento dei **siti alternativi da utilizzare**.



Processamento dell'Estremità 3'

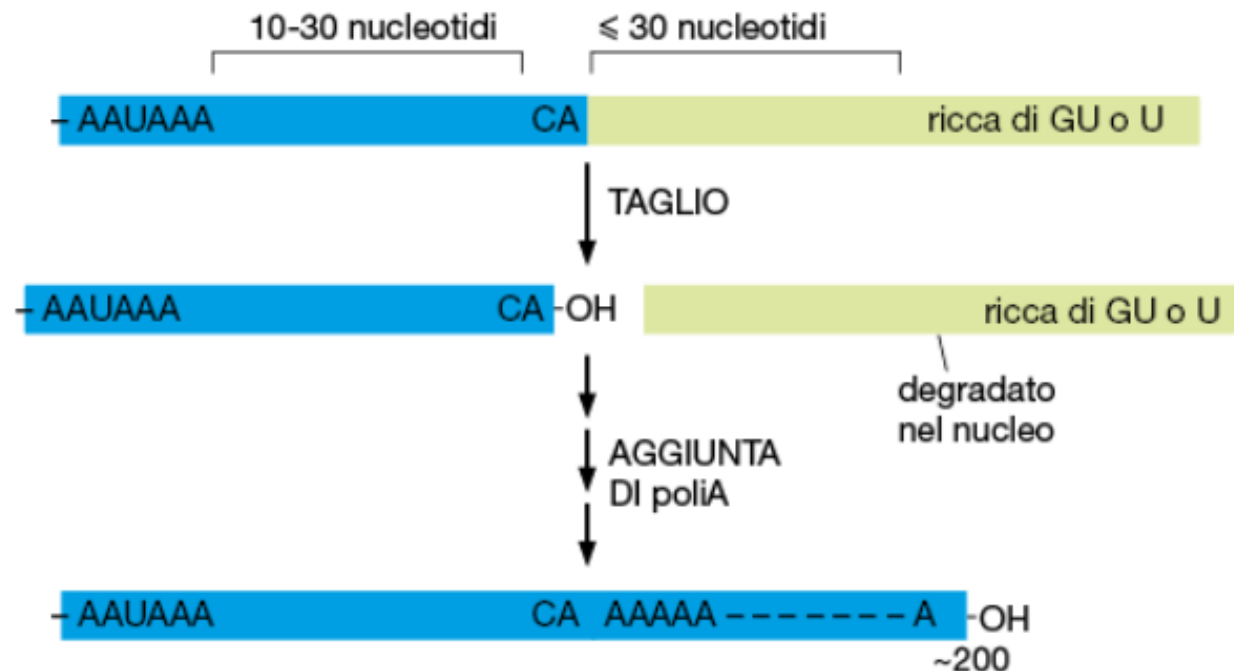
- Dopo l'aggiunta del **cap 5'** e l'inizio dello **splicing**, anche l'estremità 3' del pre-mRNA deve essere processata.
- Questo avviene **quando l'RNA pol II termina la trascrizione** alla fine del gene.
- Coordinamento: la **coda CTD** trasferisce ai trascritti emergenti i fattori necessari per **il taglio** e la **poliadenilazione**.



Segnali di Taglio e Poliadenilazione

L'estremità 3' è definita da **sequenze consenso** codificate nel DNA e trascritte in RNA.

- **AAUAAA** → legato da **CPSF** (**Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor**).
 - **Elemento ricco in GU** → legato da **CstF** (**Cleavage Stimulation Factor**).
 - **CA** → riconosciuto da un terzo **fattore di taglio**.
- Sono sequenze “ottimali”, ma in natura esistono molte varianti.



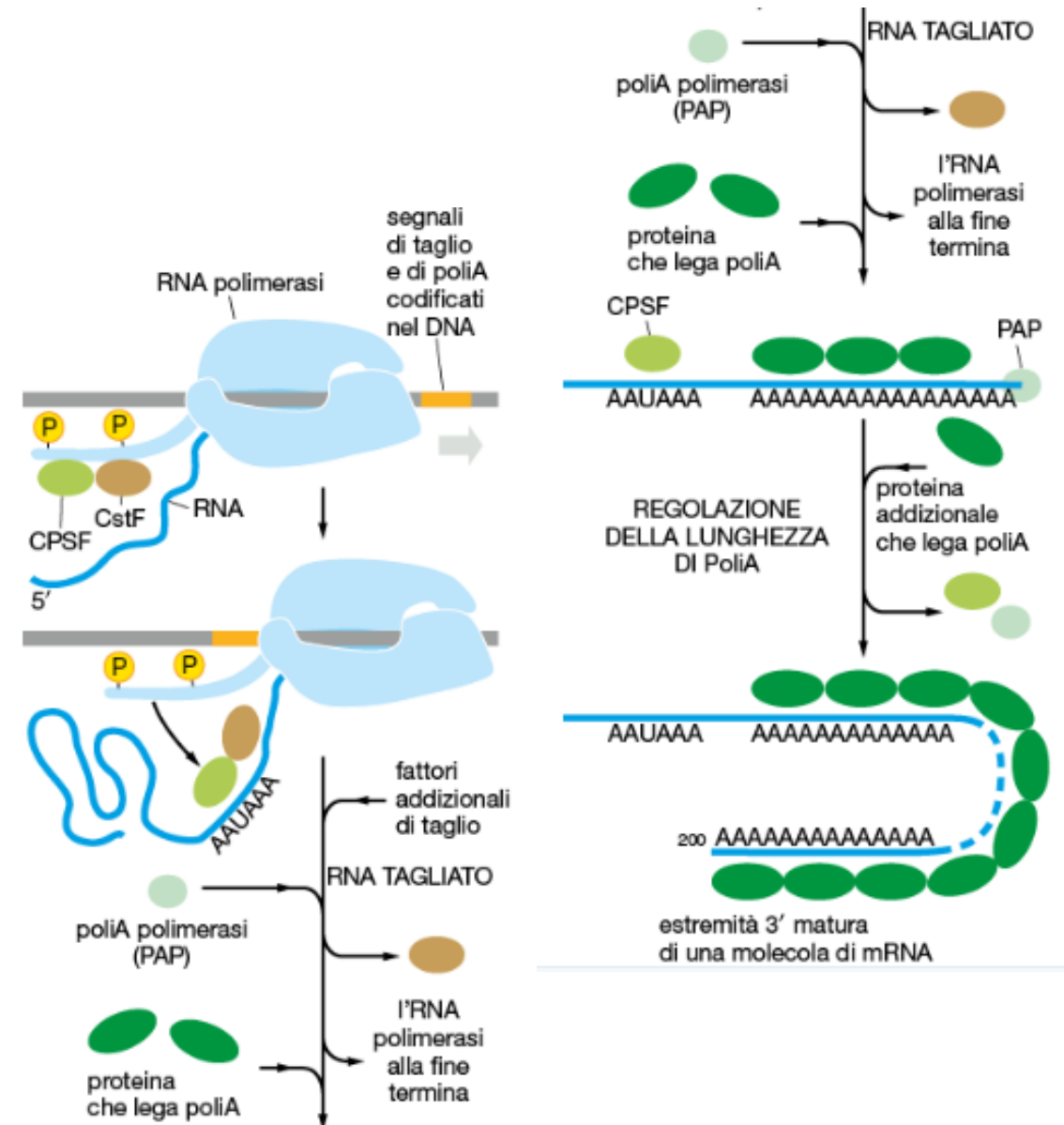
Meccanismo di Taglio e Aggiunta della Coda poliA

- **CPSF e CstF** viaggiano con la **coda CTD** dell'RNA pol II e **vengono trasferiti sull'RNA nascente**.
- Dopo il riconoscimento delle sequenze, complessi proteici:
 - **Tagliano l'RNA** → rilascio dal complesso polimerasico.
 - **PoliA polimerasi (PAP)** aggiunge ~200 nucleotidi A all'estremità 3'.
- La **poliA polimerasi non richiede stampo** → la coda poliA non è codificata nel genoma.

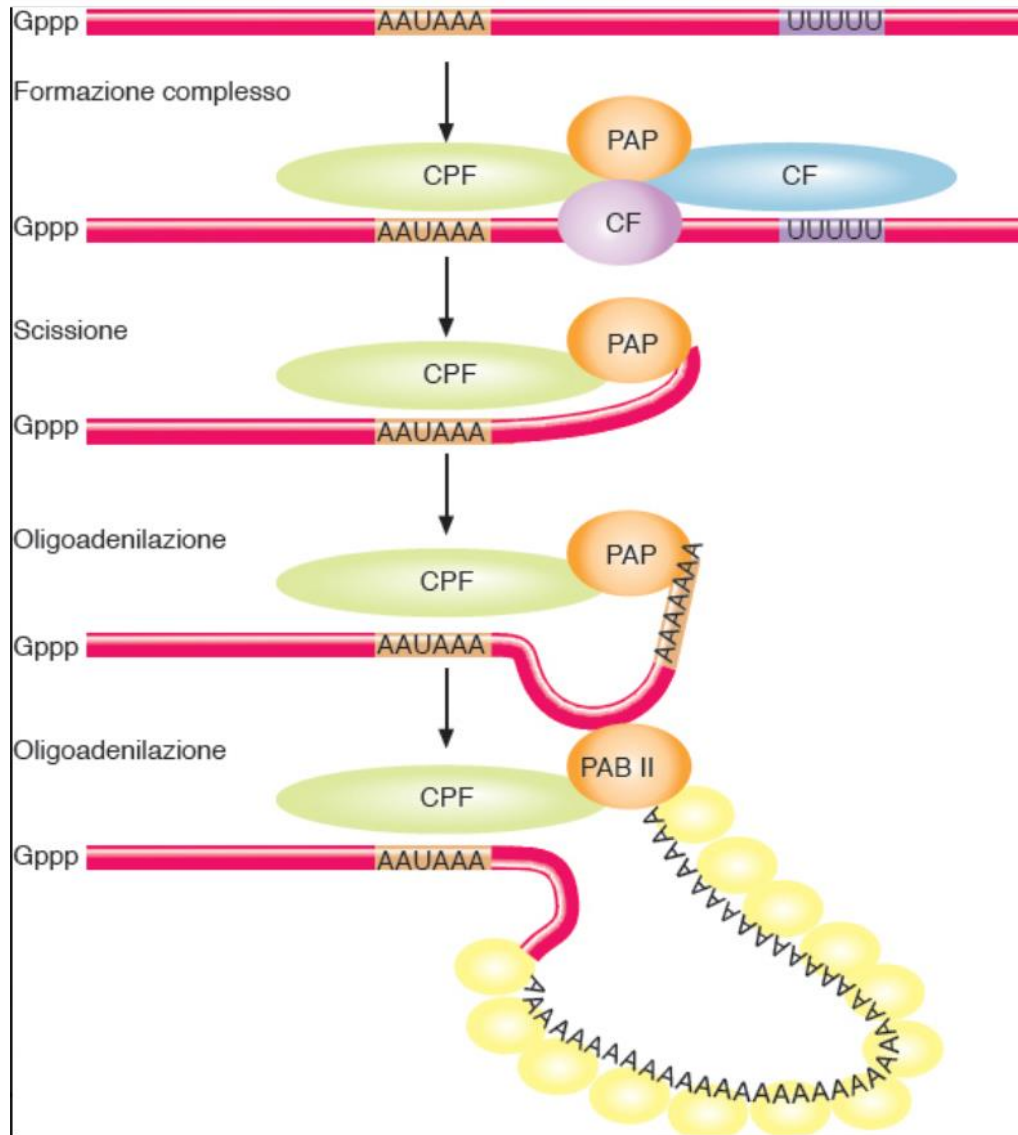
Stabilizzazione della coda poliA

La coda di poliA viene subito rivestita da **proteine leganti poliA**.

- **Stabilizzazione dell'mRNA.**
- La lunghezza della coda è cruciale per:
 - **Stabilità dell'mRNA.**
 - **Efficienza della traduzione.**



Terminazione della Trascrizione



Dopo il taglio, l'**RNA pol II** continua a trascrivere per centinaia di nucleotidi.

Terminazione favorita da due fattori:

1. **Cambiamento conformazionale** della polimerasi → rallenta e riduce la processività.
2. **Degradazione dell'RNA** residuo: un'esonucleasi 5'→3' degrada rapidamente l'RNA **ancora sintetizzato da RNA pol II a valle del sito di taglio**. Quando l'**esonucleasi** raggiunge la **polimerasi**, la destabilizza e favorisce il **distacco dell'enzima** dal DNA → terminazione.

Variabilità nella Trascrizione

Meccanismi:

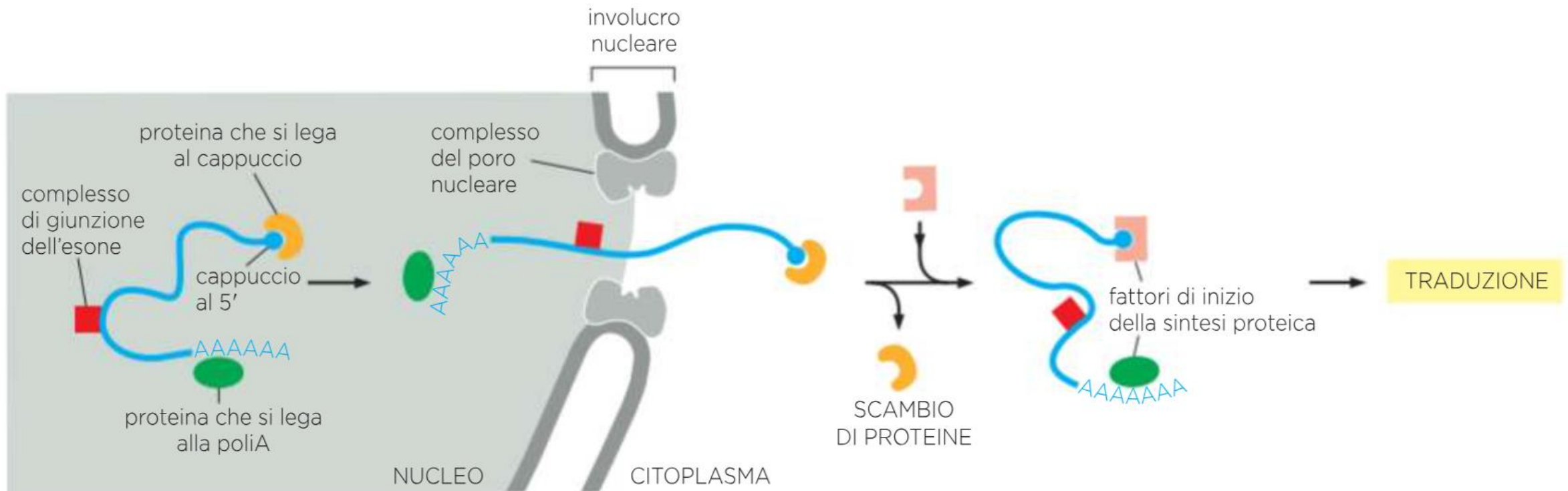
- **Promotori alternativi** → diversi siti di inizio trascrizione.
- **Siti di terminazione alternativi** → trascritti tronchi o varianti.

- **Esempio:** gene GnRH → due trascritti diversi:

- Uno nell'ipotalamo.
- Uno in placenta (da promotore a -579).

Esportazione Selettiva dell'mRNA correttamente Maturato

- Alcune proteine viaggiano con l'mRNA che si muove attraverso il poro, mentre altre rimangono nel nucleo. Alcune delle proteine nucleari perse vengono infine sostituite da versioni citosoliche, come quelle che legano il cappuccio 5'.
- Il recettore di esportazione nucleare degli mRNA è un complesso di proteine che si lega a una molecola di mRNA quando l'mRNA è stato sottoposto correttamente a splicing e poliadenilato.
- Quando l'mRNA viene esportato nel citosol il recettore di esportazione si dissocia dall'mRNA e viene reimportato nel nucleo, dove può essere usato di nuovo.



La Sintesi delle Proteine: Il “problema del codice”

Trascrizione vs Traduzione: crittogramma da decifrare

Trascrizione: messaggio ricopiato con lo stesso linguaggio.

Traduzione: messaggio tradotto in un linguaggio diverso.

La logica del codice genetico

- L'informazione mRNA letta in **triplette di nucleotidi (codoni)**.
- Possibili combinazioni di triplette: $4^3 = 64$ **combinazioni**.
- Proteine: solo **20 amminoacidi**

Caratteristiche del codice genetico

- **Ridondante:** ci sono **più codoni** per lo **stesso aa**.
- **Non ambiguo:** ogni **codone** specifica solo **1 aa**.
- **Universale:** condiviso da quasi **tutti gli organismi**.
- **Privo di spaziatura:** i codoni vengono **letti in sequenza continua**.

codoni		AGA									UUA					AGC					
		AGG									UUG					AGU					
	GCA	CGA						GGA			CUA				CCA	UCA	ACA			GUA	
	GCC	CGC						GGC		AUA	CUC				CCC	UCC	ACC			GUC	UAA
	GCG	CGG	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGG	CAC	AUC	CUG	AAA		UUC	CCG	UCG	ACG		UAC	GUG	UAG
	GCU	CGU	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGU	CAU	AUU	CUU	AAG	AUG	UUU	CCU	UCU	ACU	UGG	UAU	GUU	UGA
ammino-acidi	Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	stop
	A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	

La Sintesi delle Proteine: Cornici di lettura

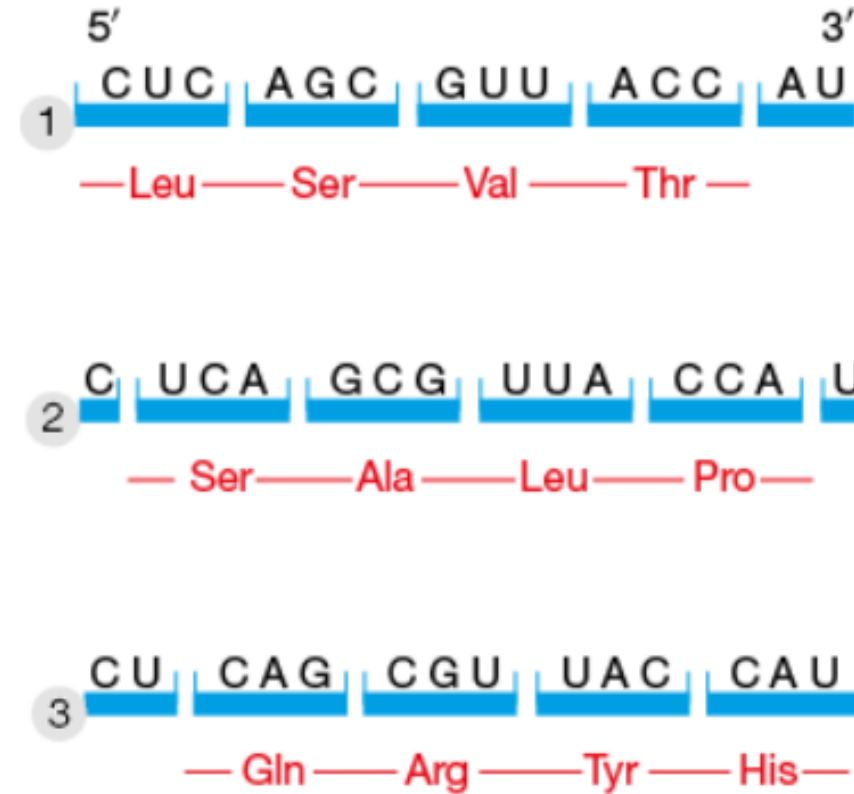
Una **sequenza mRNA** può teoricamente avere **3 reading frame**

Solo **una è quella corretta** → stabilita dal **codone di inizio AUG (ATG sul DNA)**

Il codone AUG

- Codone di inizio traduzione.
- Codone per l'amminoacido **metionina**.
- Garantisce uniformità nell'avvio della sintesi proteica

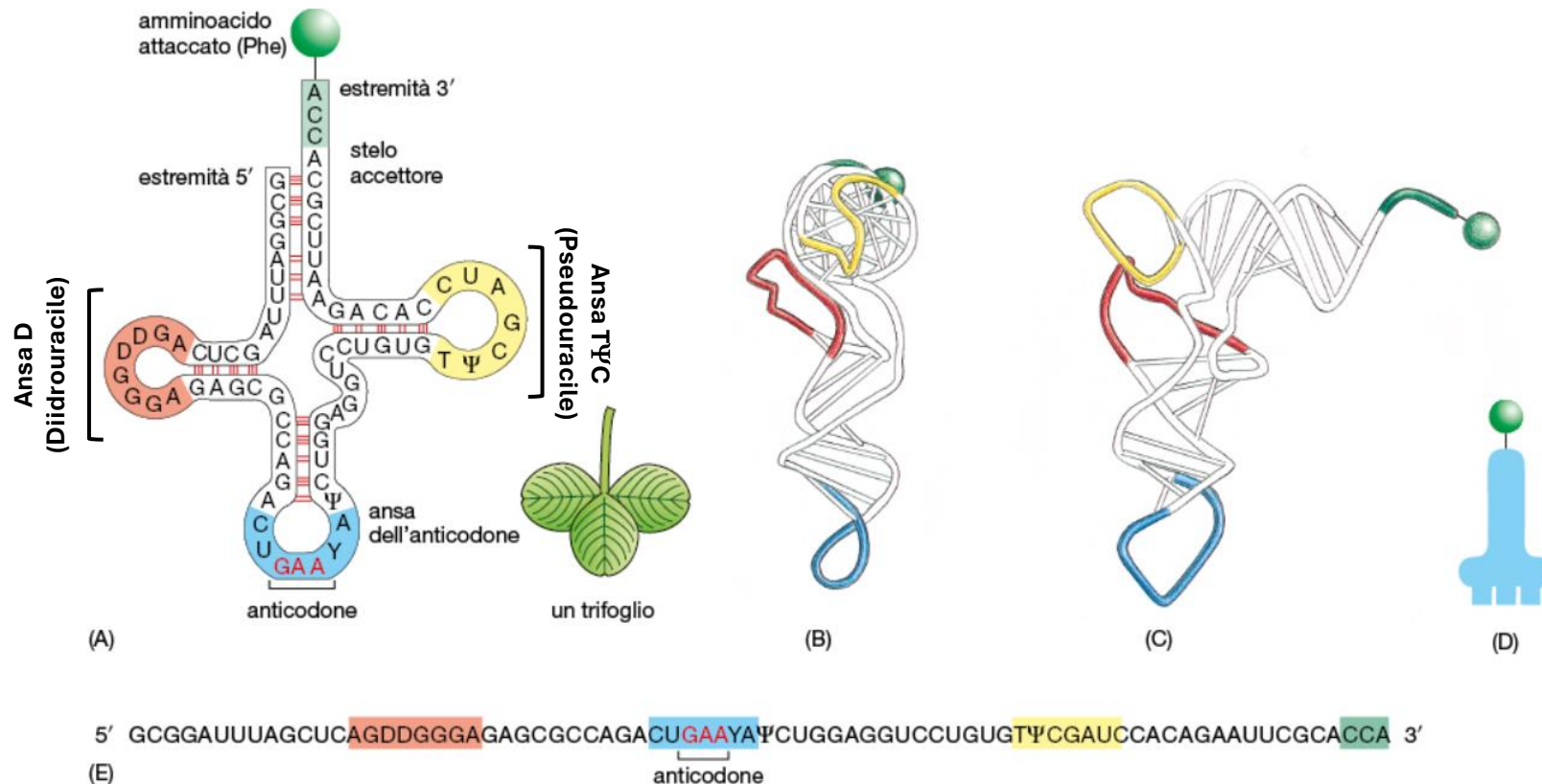
Codoni di stop (UAA, UAG, UGA) segnalano la fine della traduzione.



RNA transfer o tRNA

Problema: i codoni non riconoscono direttamente gli aa

- **Soluzione:** molecole adattatrici = **tRNA** (~80 nt).
- Ogni tRNA riconosce:
 - un **codone dell'mRNA** (anticodone)
 - uno **specifico amminoacido** (legato al 3').



Struttura del tRNA

Ripiegamento → **struttura a trifoglio**
(solo rappresentazione schematica)

– **Dimensioni in altezza
comparabili** tra i vari tRNA

Ulteriore compattamento →
struttura a L (3D reale).

Due regioni funzionali chiave:

1. **Anticodone** (si **appaia** con
il **codone** dell'mRNA).
2. **Estremità 3'** (CCA) dove si
lega l'amminoacido
corrispondente (detta **sito
accettore**)

Contiene **basi modificate** (es.
pseudouridina, diidrouridina).

Maturazione dei tRNA

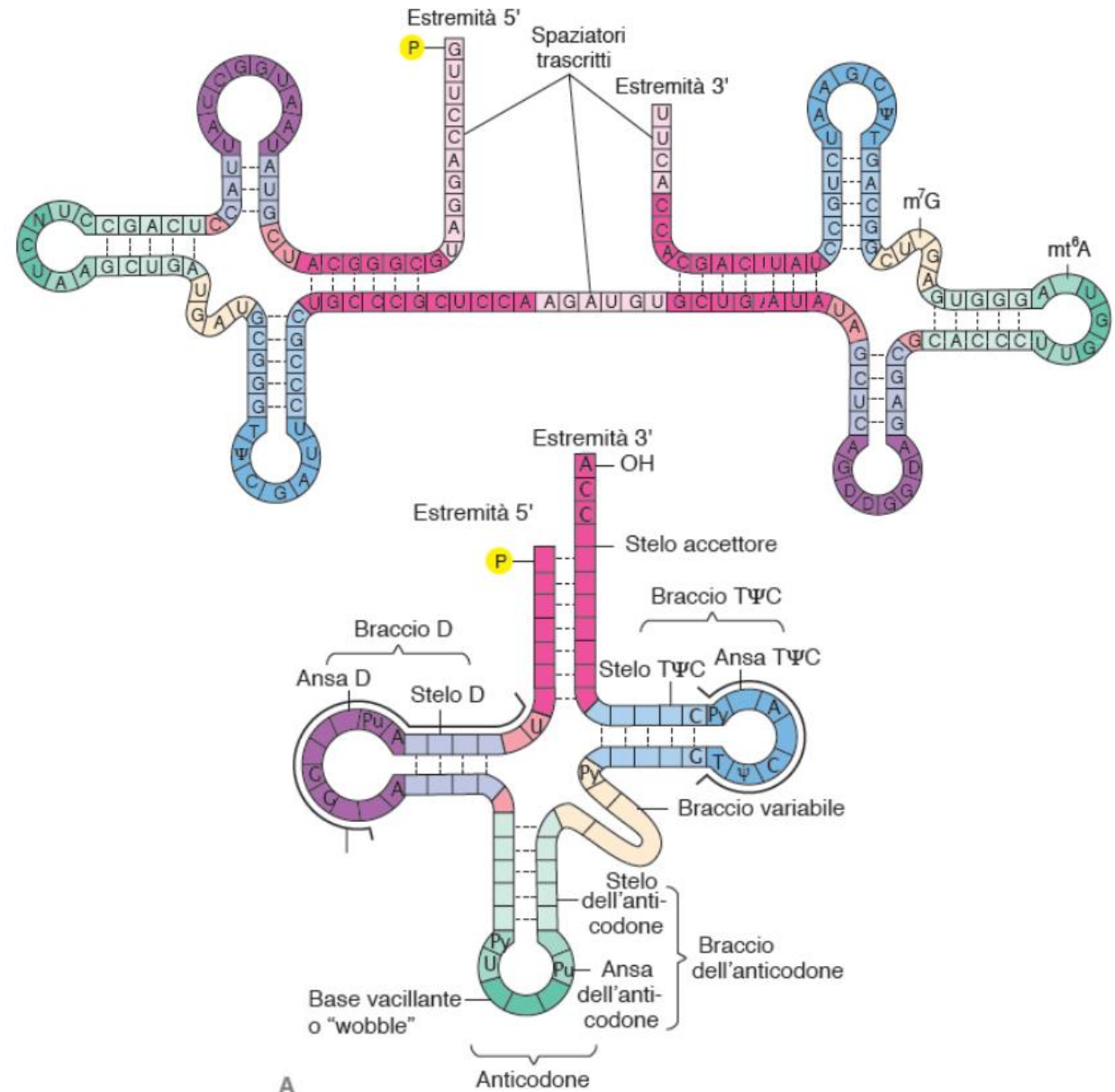
La maggior parte dei **tRNA** proviene da **sequenze di DNA contenenti** l'informazione per **più molecole di tRNA** che possono essere di tipo diverso.

Maturazione dei tRNA

Geni tRNA organizzati in cluster con **spaziatori intergenici non trascritti**.

Modificazioni principali:

- **Rimozione** di sequenze al 5' e 3'.
- **Splicing** di introni (in alcune specie) → mediato solo da **enzimi proteici**.
- **Modifica di basi** (es. ipoxantina, pseudouridina).
- **Aggiunta 5'-CCA-3'** all'estremità 3' → da **tRNA nucleotidil transferasi**.



Problema del Codice Ridondante: le Basi Wobble

La Degenerazione del Codice è sulla terza base, come ipotizzato da Crick nel '66

Più codoni possono specificare lo stesso amminoacido.

- Alcuni amminoacidi hanno più di un tRNA.
- Alcuni tRNA riconoscono più codoni → **wobble**.

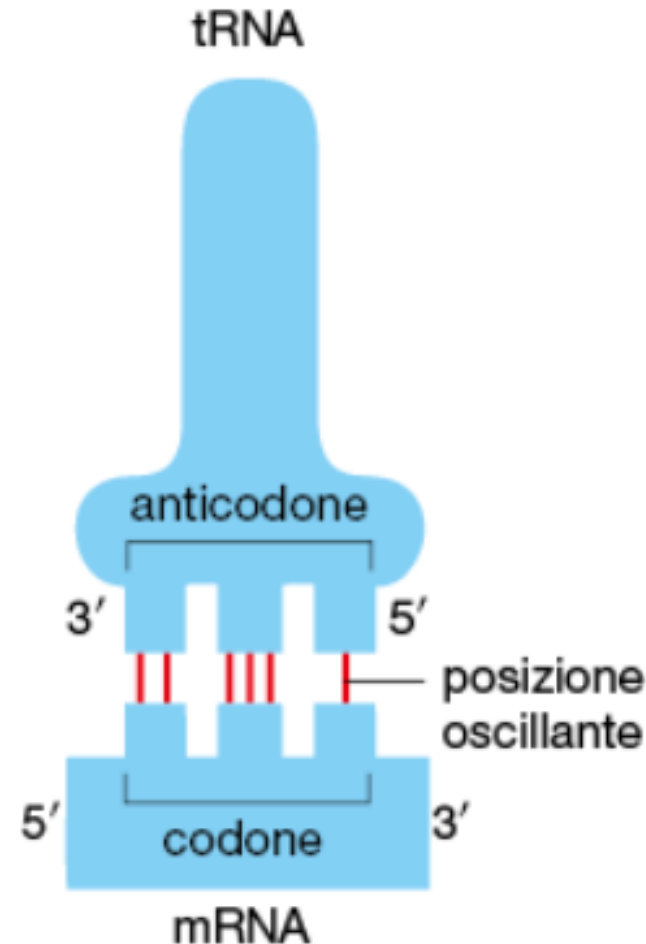
Regola del Wobble

L'appaiamento codone-anticodone è rigido nelle prime **2 posizioni**.

Nella **3^a posizione** è più flessibile (**oscillante**, “**wobble**”) e consente il legame anche ad altre basi.

Ciò accade perché la terza base **si trova all'interno di un'ansa**, **non perfettamente allineata** con il codone

- mantiene fedeltà nella traduzione
- ottimizza il numero di tRNA.



batteri

base oscillante del codone	basi possibili dell'anticodone
U	A, G o I
C	G o I
A	U o I
G	C o U

eucarioti

base oscillante del codone	basi possibili dell'anticodone
U	A, G o I
C	G o I
A	U
G	C

Problema del Codice Ridondante: le Basi Wobble

La Degenerazione del Codice è sulla terza base, come ipotizzato da Crick nel '66

Più codoni possono specificare lo stesso amminoacido.

- Alcuni amminoacidi hanno più di un tRNA.
- Alcuni tRNA riconoscono più codoni → **wobble**.

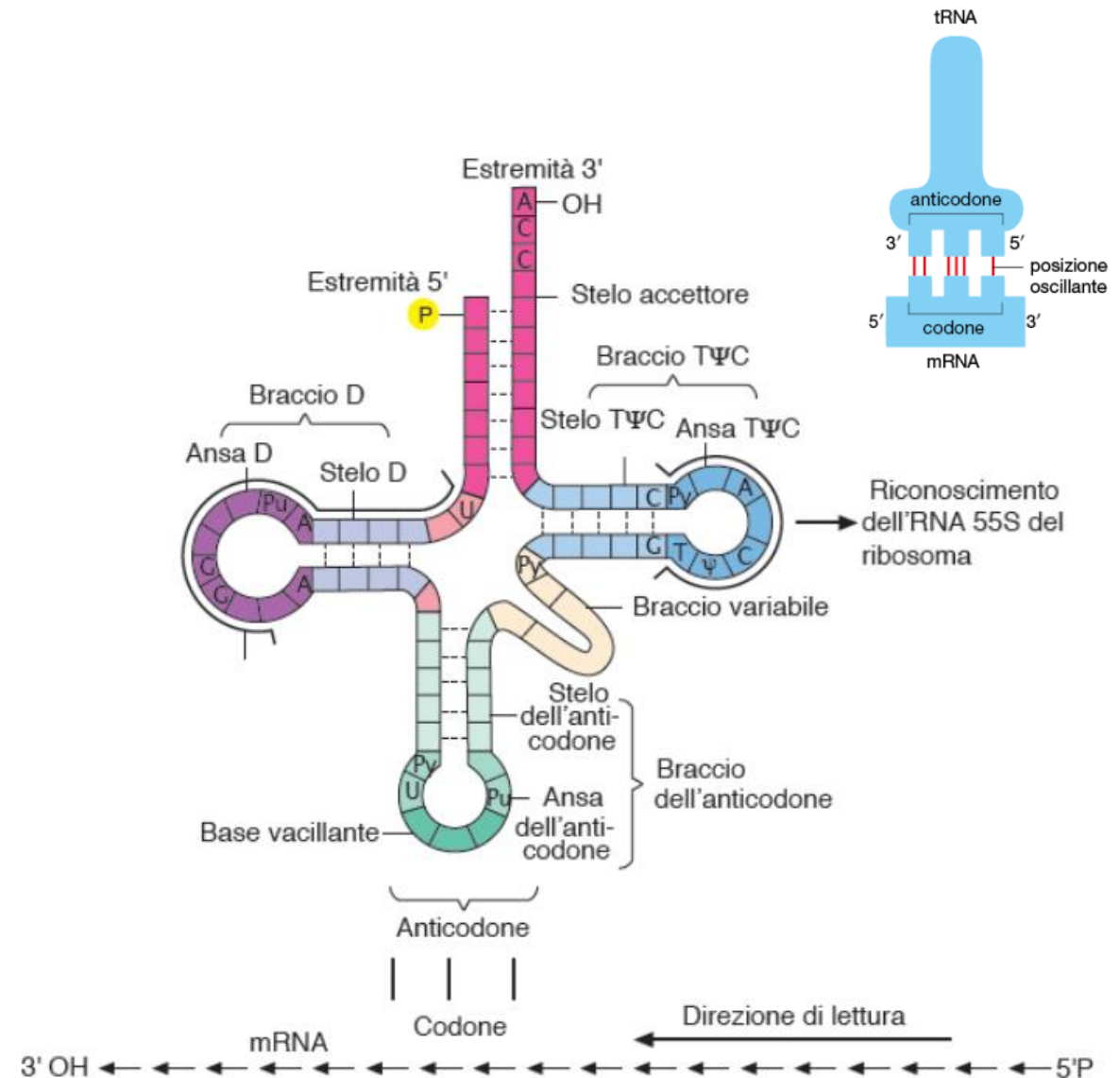
Regola del Wobble

L'appaiamento codone-anticodone è rigido nelle prime **2 posizioni**.

Nella **3^a posizione** è più flessibile (**oscillante**, “**wobble**”) e consente il legame anche ad altre basi.

Ciò accade perché la terza base **si trova all'interno di un'ansa**, **non perfettamente allineata** con il codone

- mantiene fedeltà nella traduzione
- ottimizza il numero di tRNA.



Problema dell'Appaiamento Corretto: Amminoacil-tRNA Sintetasi

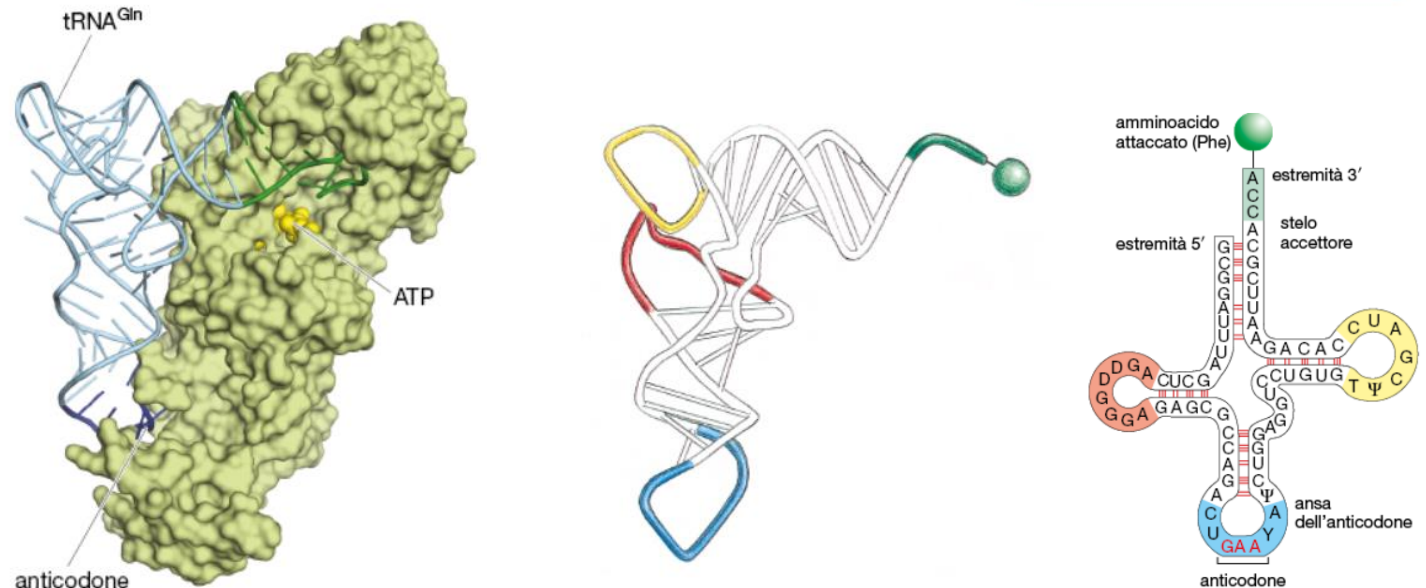
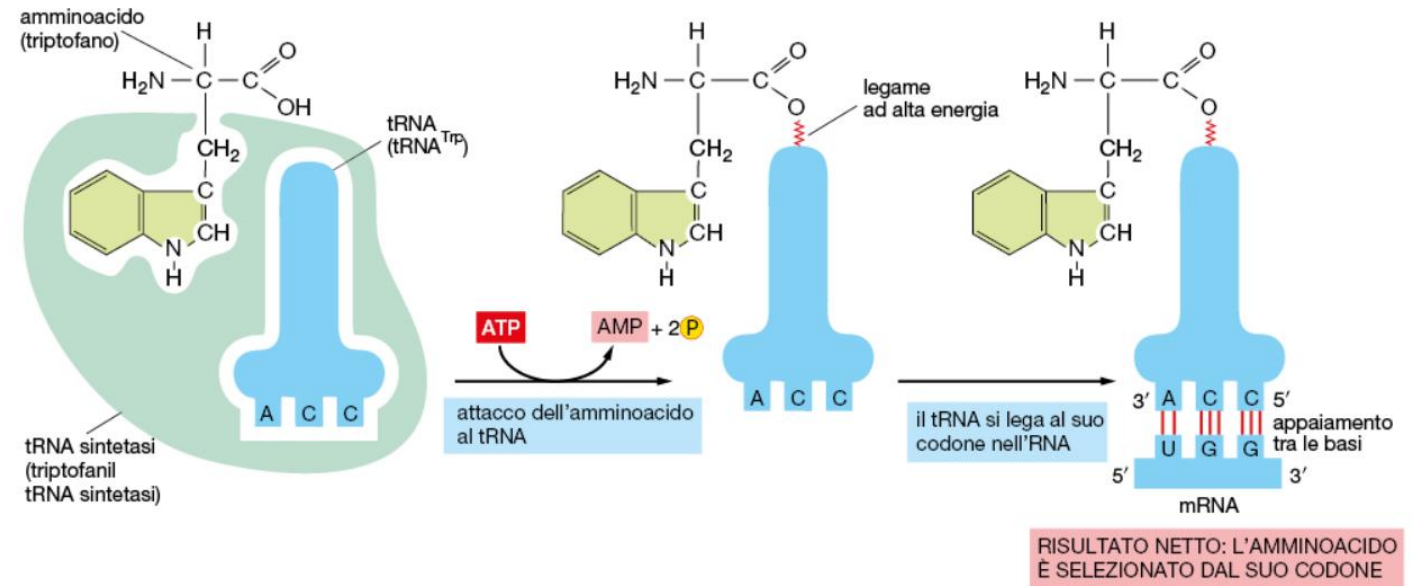
Il problema dell'accoppiamento corretto

- **Ogni tRNA** deve portare **solo il suo aa corretto**.
- Un **Amminoacil-tRNA sintetasi** coniugano aa su tRNA con un legame covalente (**ATP-dipendente**)
- Questa **energia verrà usata nel ribosoma** per la formazione del **legame peptidico**.
- In genere → **20 sintetasi diverse**, una per ciascun aminoacido.

Funzione delle amminoacil-tRNA sintetasi

Riconoscono contemporaneamente:

- **l'amminoacido** corretto.
- **il/i tRNA** appropriato/i.



Il Ribosoma: la Macchina della Sintesi Proteica

Il ribosoma è un **complesso macchinario catalitico** composto da:

- **Proteine** ribosomiali.
- **rRNA**.

Insieme, **rRNA + Proteine**, formano **due subunità**, una **minore ed una maggiore** che insieme formano il ribosoma completo.

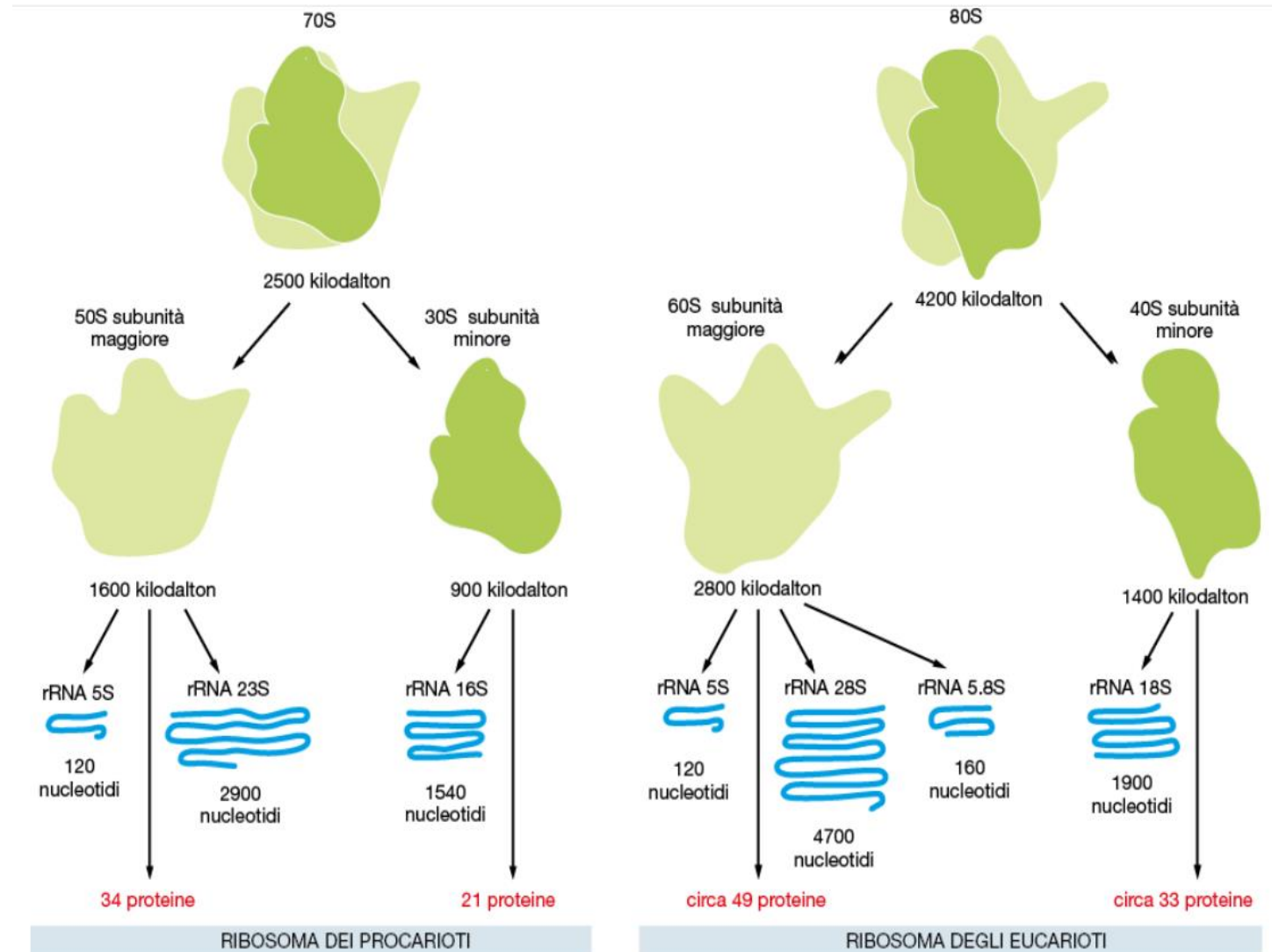
Ribosomi procariotici: ribosoma **70S**.

- **Subunità 30S:** contiene rRNA **16S**.
- **Subunità 50S:** contiene rRNA **23S + 5S**.

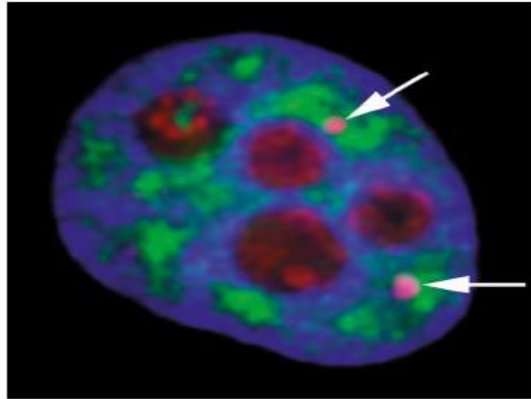
Ribosomi eucariotici: ribosoma **80S**.

- **Subunità 40S:** contiene rRNA **18S**.
- **Subunità 60S:** contiene rRNA **28S + 5,8S + 5S**.

Nota: le unità **Svedberg (S)** non sono additive!



Biogenesi ribosomiale

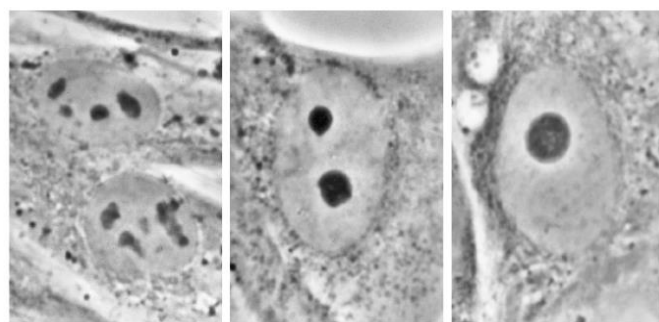
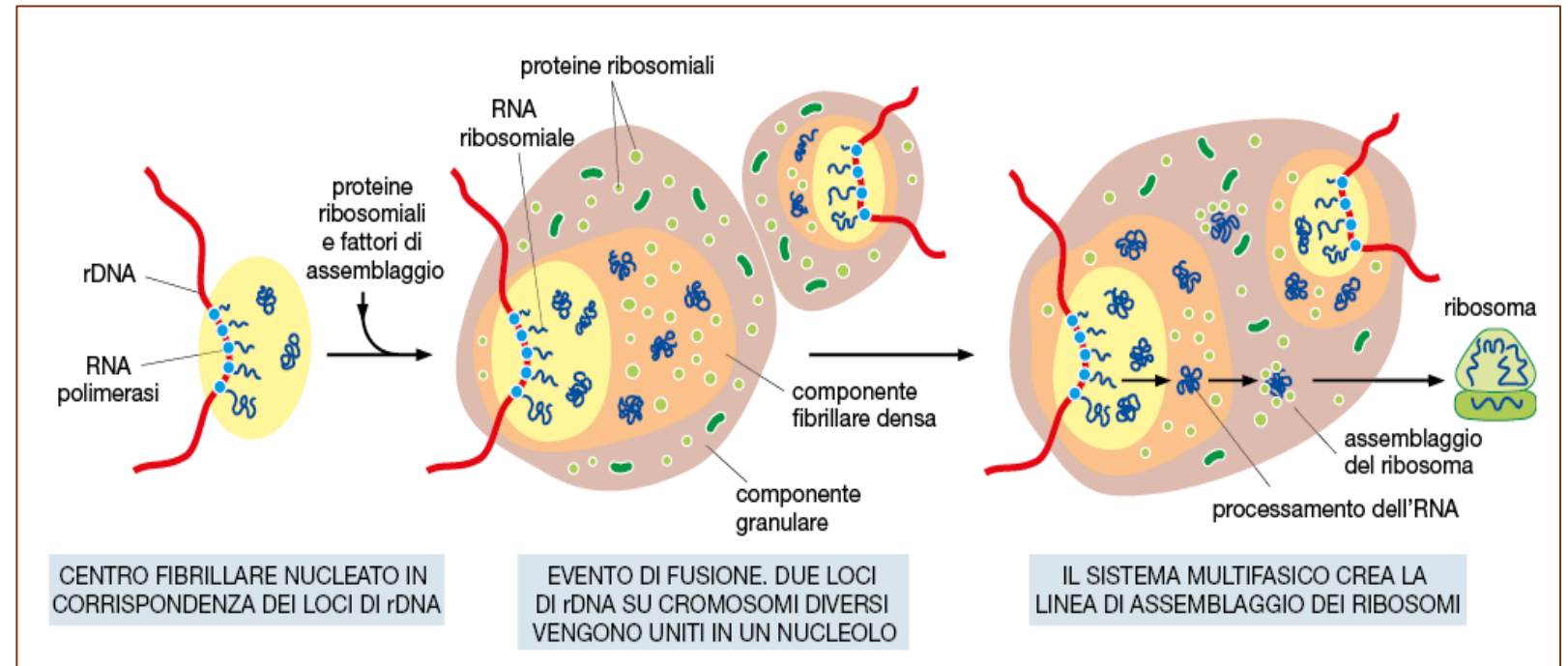
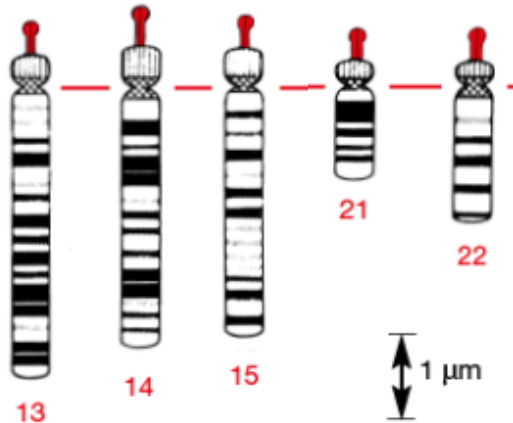


Procarioti:

- Precursore rRNA trascritto insieme a **tRNA**.

Eucarioti:

- Geni localizzati su **cromosomi acrocentrici**
- **rRNA precursore** sintetizzato dal **NOR (organizzatore del nucleolo)**.
- **Maturazione: regione fibrillare** del nucleolo ad opera di **snoRNA**.
- **Assemblaggio: regione granulare** → aggiunta proteine + RNA 5S.



Maturazione degli rRNA

Tipi di rRNA e Processamento del pre-rRNA

Ribosomi eucarioti composti da rRNA maturi + proteine ribosomiali:

- **28S, 18S, 5,8S e 5S** (che è su un **trascritto diverso**, maturato **fuori dal nucleolo**).
- **45-41S precursore** → nella zona fibrillare del **nucleolo**.
- Gli **introni** processati per **self-splicing**

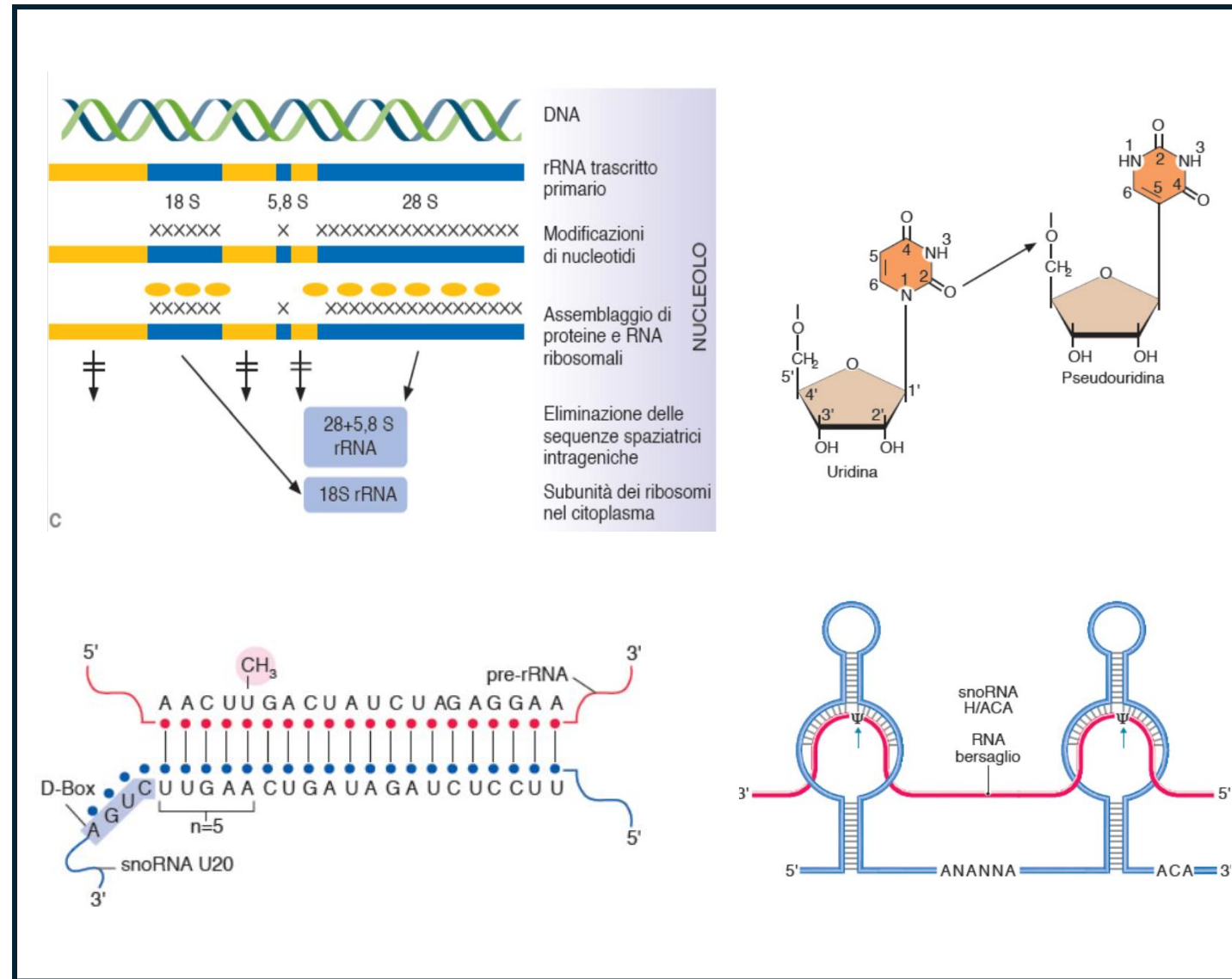
Modificazioni post-trascrizionali rRNA

- **Metilazione** (2'-O-metilazione del ribosio):
- **Pseudouridilazione**: sostituzione di **Uridina** con **Pseudouridina (Ψ)**.

Funzioni: protezione e stabilizzazione della struttura ribosomiale.

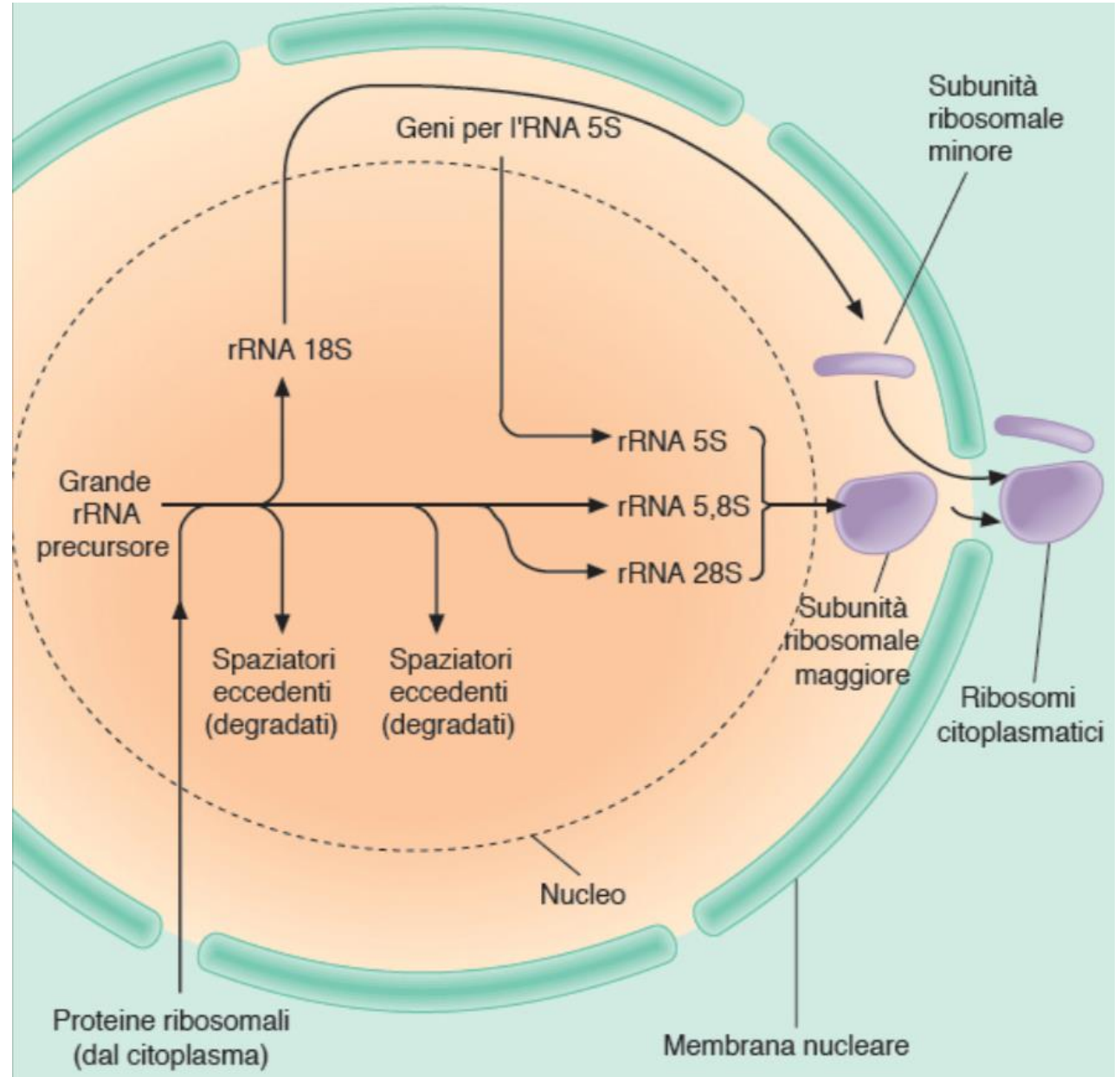
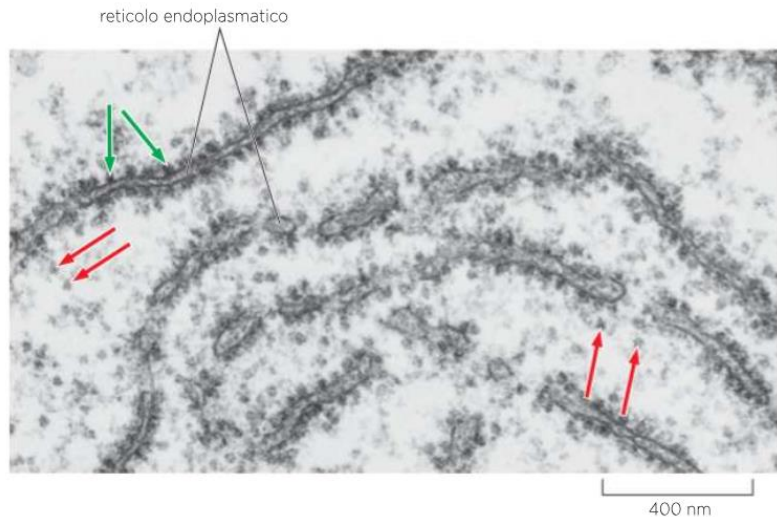
Ruolo degli snoRNA

- **snoRNA (small nucleolar RNA)** → derivano spesso da introni di pre-mRNA.
- **Guida per le modificazioni dell'rRNA**:



Biogenesi ribosomiale

- **rRNA precursore** sintetizzato dal **NOR (organizzatore del nucleolo)**.
- **Maturazione: regione fibrillare** del nucleolo ad opera di **snoRNA**.
- **Assemblaggio: regione granulare** → aggiunta **proteine + RNA 5S**.
- **Traslocazione nel citoplasma:** sia **liberi** che associati a **Reticolo Endoplasmatico (Rugoso)**



I Ribosomi sono Ribozimi

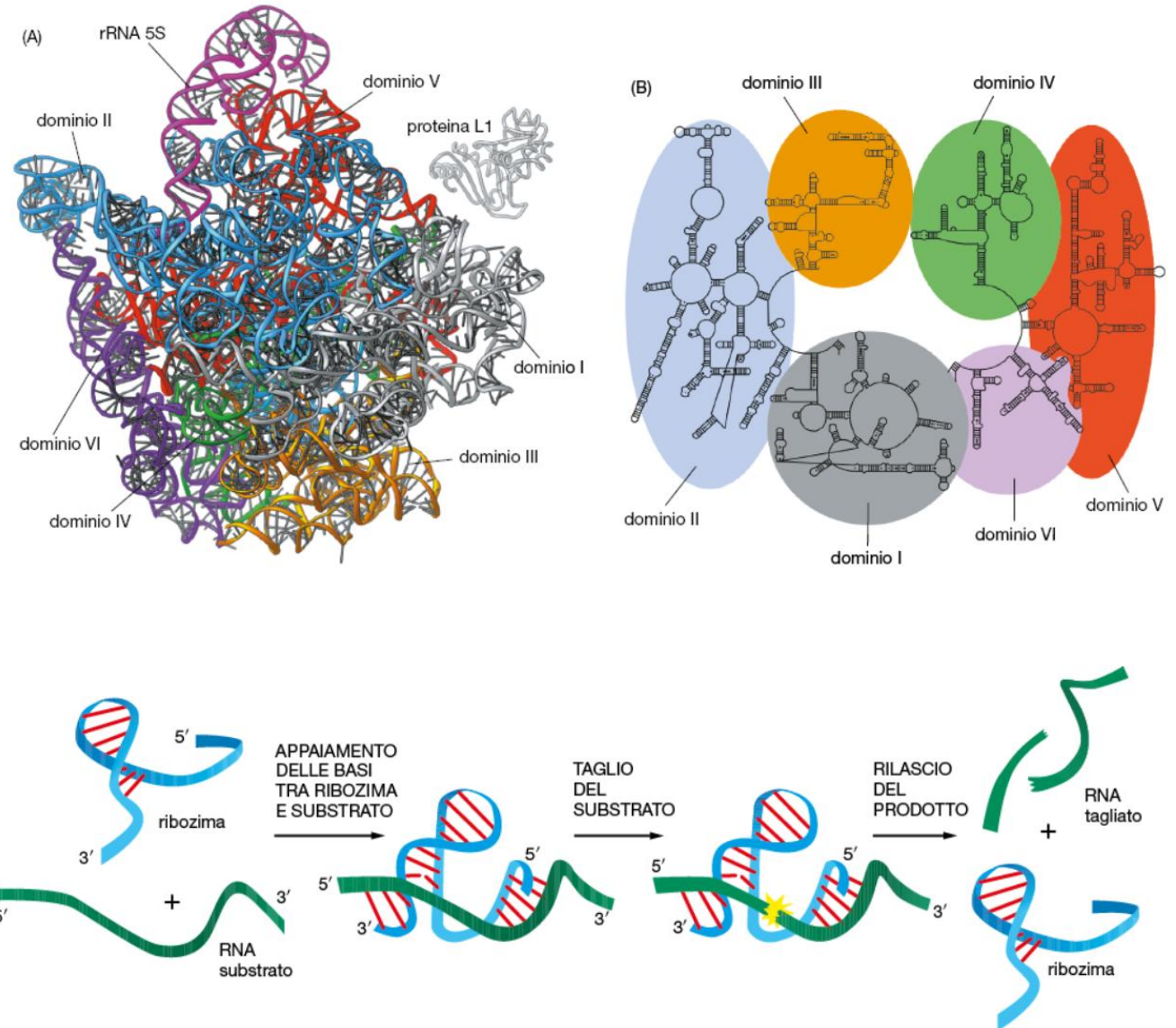
I ribosomi non sono semplici “supporti”: sono **ribozimi**

L'**attività catalitica** del legame peptidico risiede negli **rRNA**

In netto contrasto con le **posizioni centrali** degli **rRNA**, le **proteine** ribosomiali sono generalmente **disposte sulla superficie** e **riempiono gli intervalli** e le cavità dell'RNA ripiegato

La **subunità minore** fornisce una struttura sulla quale i **tRNA** possono essere **adattati accuratamente ai codoni** dell'mRNA

La **subunità maggiore** catalizza la **formazione dei legami peptidici** che uniscono tra loro gli amminoacidi in una catena polipeptidica.



RNA Word: un Mondo a RNA

Il paradosso iniziale

- Interdipendenza proteine $\leftrightarrow$ acidi nucleici $\rightarrow$
 - Le proteine servono per replicare e tradurre l'informazione genetica.
 - Ma le proteine stesse necessitano di un sistema informazionale

L'intuizione di Francis Crick (1968)

- “Il primitivo ribosoma era esclusivamente RNA”.
- “Probabilmente il primo enzima era un RNA capace di autoreplicarsi”.
- base concettuale del **mondo a RNA**.

La scoperta dei ribozimi (anni '80)

- RNA con attività catalitica $\rightarrow$ **ribozimi**.
- Conferma sperimentale dell'ipotesi di Crick.
- RNA = **molecola autonoma**:
 - Informazione + Catalisi.

Transizione verso il DNA

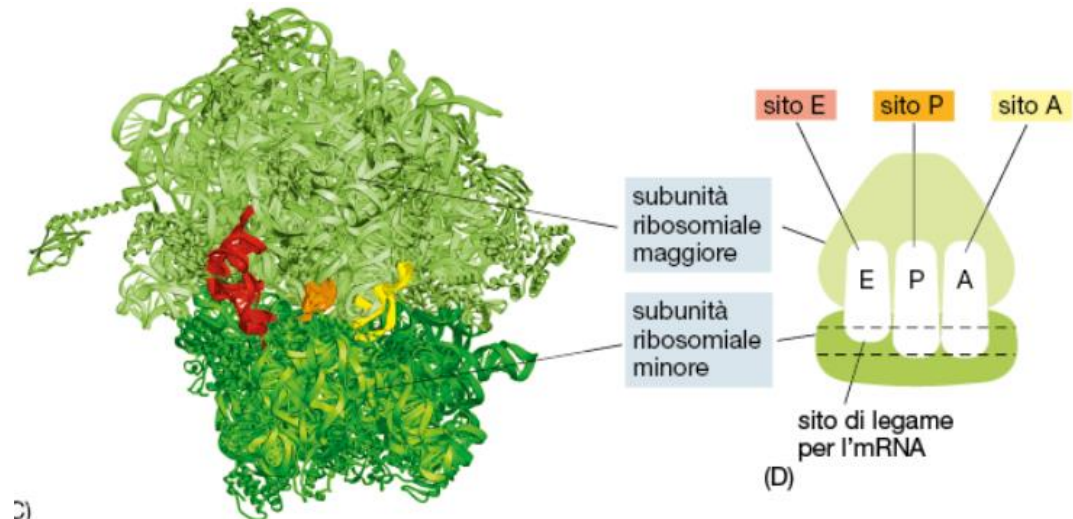
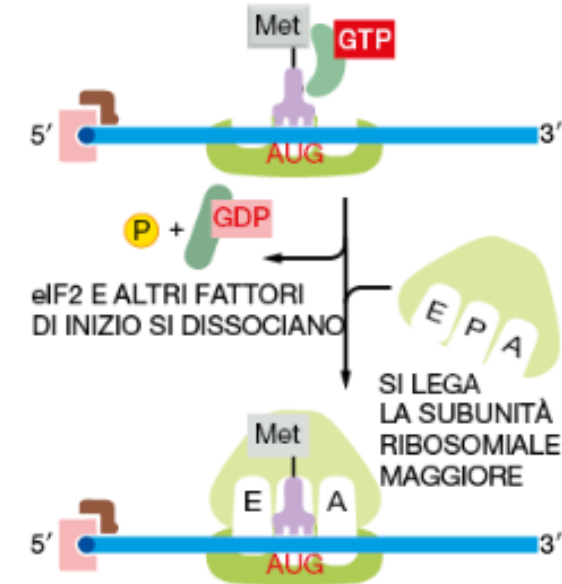
- Dai **ribonucleotidi** $\rightarrow$ formazione dei **desossiribonucleotidi**.
- DNA originato tramite **trascrittasi inversa**.
- DNA = molecola più **stabile** $\rightarrow$ capace di contenere sequenze più lunghe.

La Traduzione delle Proteine: Inizio e Progressione

- Le due **subunità** ribosomiali si **uniscono** vicino al 5' dell'mRNA.
- L'mRNA viene tirato nel ribosoma con un ritmo di **3 nucleotidi alla volta**.
- Traduzione = codoni (mRNA) $\leftrightarrow$ anticodoni (tRNA) $\leftrightarrow$ amminoacidi.
- Alla comparsa di un **codone di stop**:
 - rilascio della proteina finita.
 - separazione delle subunità.

I siti del ribosoma:

- 1** per l'**mRNA**.
- 3** per i **tRNA**:
 - Sito A** (amminoacil-tRNA).
 - Sito P** (peptidil-tRNA).
 - Sito E** (Exit).

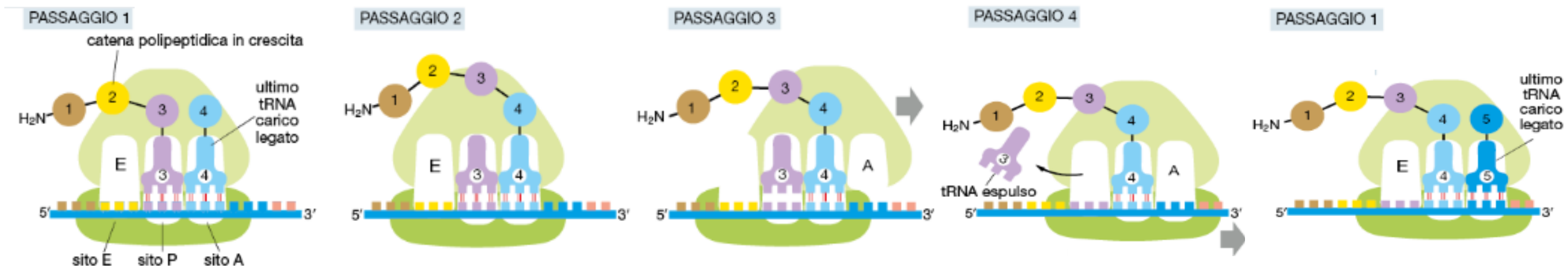


Il ciclo in 4 fasi della traduzione

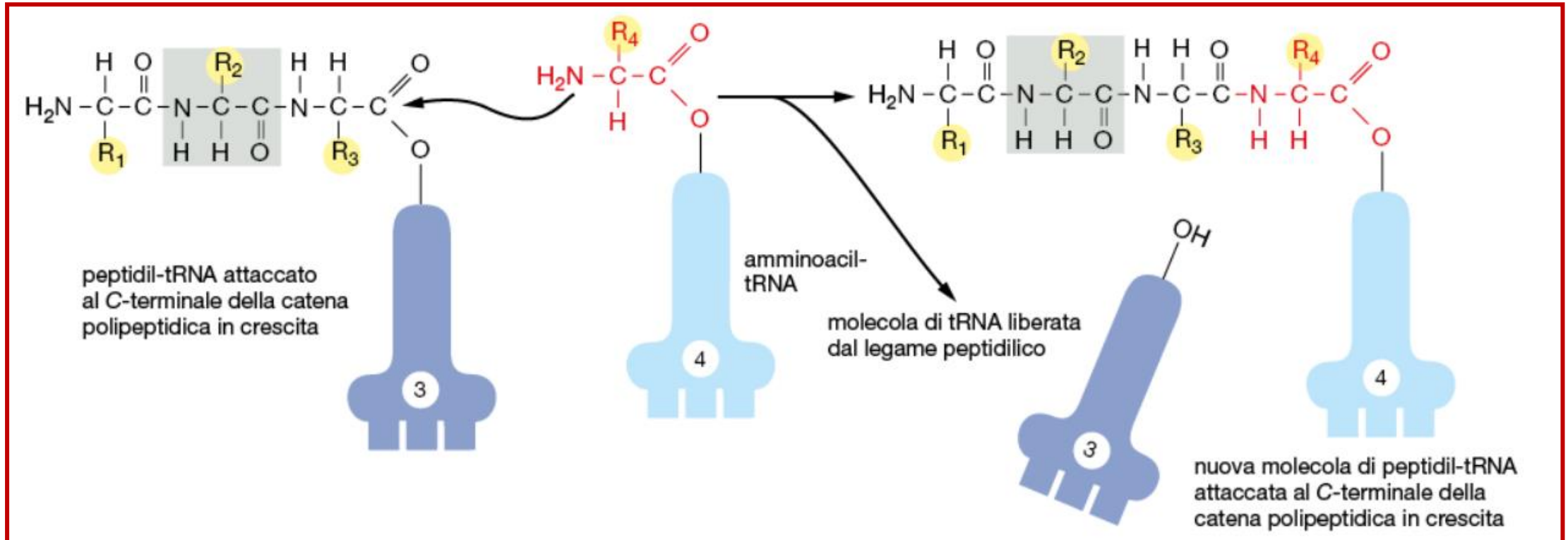
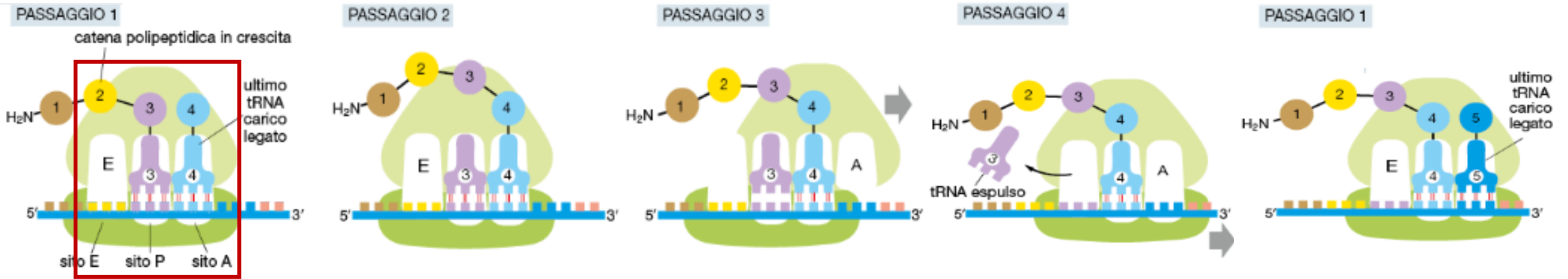
- 1 Legame tRNA:** aminoacil-tRNA entra nel sito A.
- 2 Formazione legame peptidico:** il peptide passa dal tRNA nel sito P al nuovo aa nel sito A. La reazione è catalizzata dalla **peptidil transferasi** (subunità maggiore del ribosoma).
- 3 Traslocazione subunità maggiore:** spostamento degli steli accettori dei tRNA nei siti ibridi.
- 4 Traslocazione subunità minore:** l'mRNA avanza di 3 nt; rilascio del tRNA dal sito E.

Caratteristiche del processo

- La catena cresce sempre da **N-terminale → C-terminale**.
- L'mRNA è letto in direzione **5' → 3'**.
- Il ciclo si ripete → aggiunta progressiva di aminoacidi **fino al codone di stop**.



Gli Amminoacidi sono aggiunti al C-Terminale della Catena in Crescita



Traduzione in Procarioti: Fase ATP-dipendente

Fasi principali:

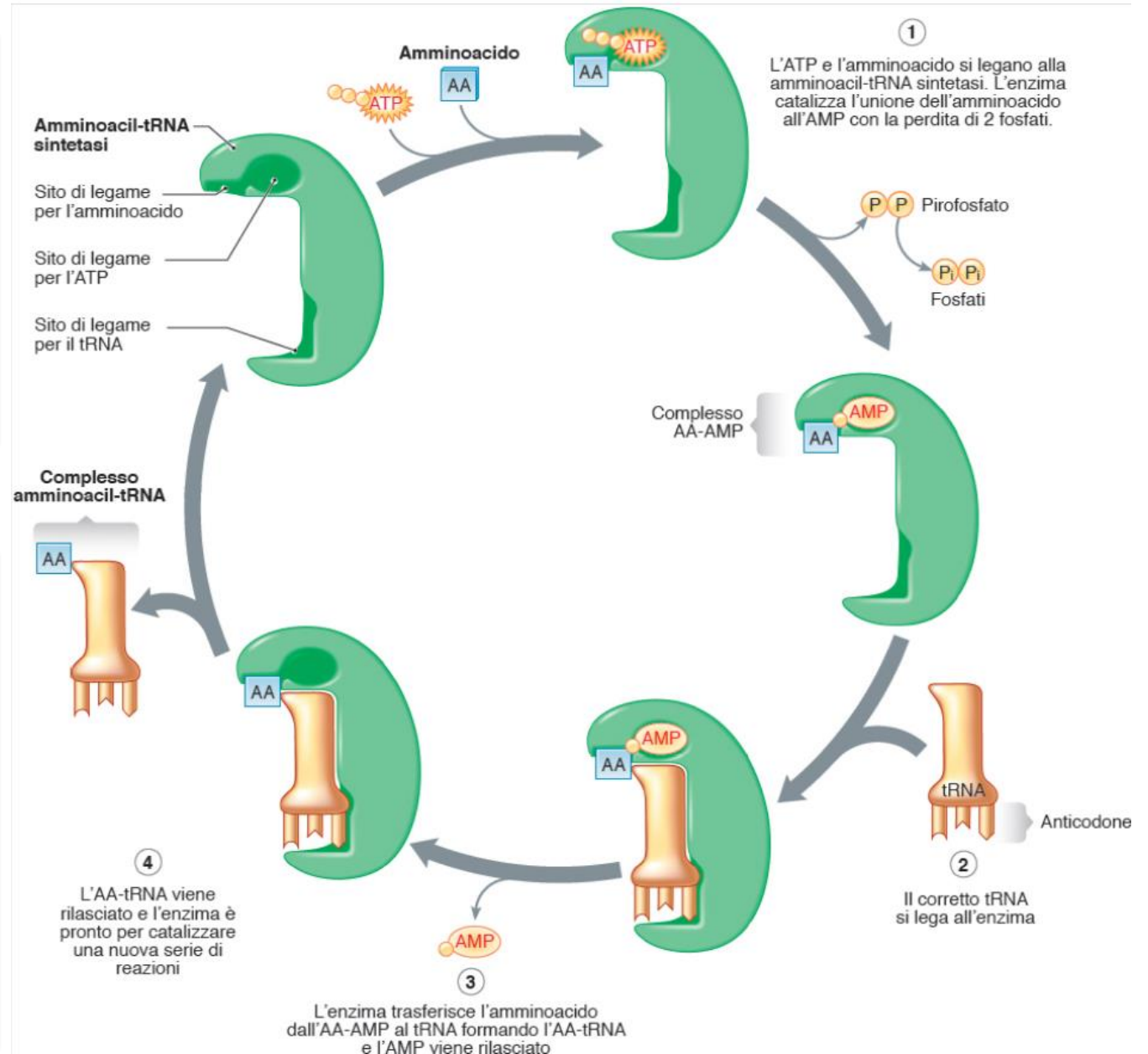
- **Fase ATP-dipendente** - Caricamento aa su tRNA e formazione del Amminoacil-tRNA
- **Fase GTP-dipendente**, suddivisa in:
 - Inizio
 - Allungamento
 - Terminazione

Fase ATP-dipendente

tRNA → formazione del complesso **amminoacido/tRNA** da parte del **Amminoacil-tRNA sintetasi**.

- Generalmente 1 per ciascun amminoacido
- Riconoscimento: l'enzima riconosce **segnali strutturali** specifici nel tRNA.

Risultato: legame estere **altamente energetico**, pronto per la fase successiva.



Traduzione in Procarioti: Fase GTP-dipendente

Problema: individuare sull'mRNA il **sito di inizio** e la giusta **cornice di lettura**.

Codone di inizio: **AUG** (talvolta GUG), circa 30 basi a valle del 5'P.

Sequenza di Shine-Dalgarno (Shine & Dalgarno, 1974):

- 5'-AGGAGGU-3' sull'mRNA.
- Complementare a 3'-UCCUCCA-5' dell'rRNA 16S.
- Garantisce **posizionamento corretto** della **subunità minore (30S)**.

Fattori di inizio (IF):

1-2. IF1 e IF3 → posizionano la **subunità 30S** sull'mRNA.

3-4. IF2 (con GTP) → **porta il tRNA** iniziatore carico con **formil-metionina (fMet)**.

Dopo assemblaggio:

5. Subunità maggiore (50S) si unisce.
IF1, IF2 e IF3 si distaccano.

Ribosoma completo:

- **Sito P:** occupato da tRNA^{fMet}.
- **Sito A:** vuoto.
- **Sito E:** (Exit), pronto a funzionare.

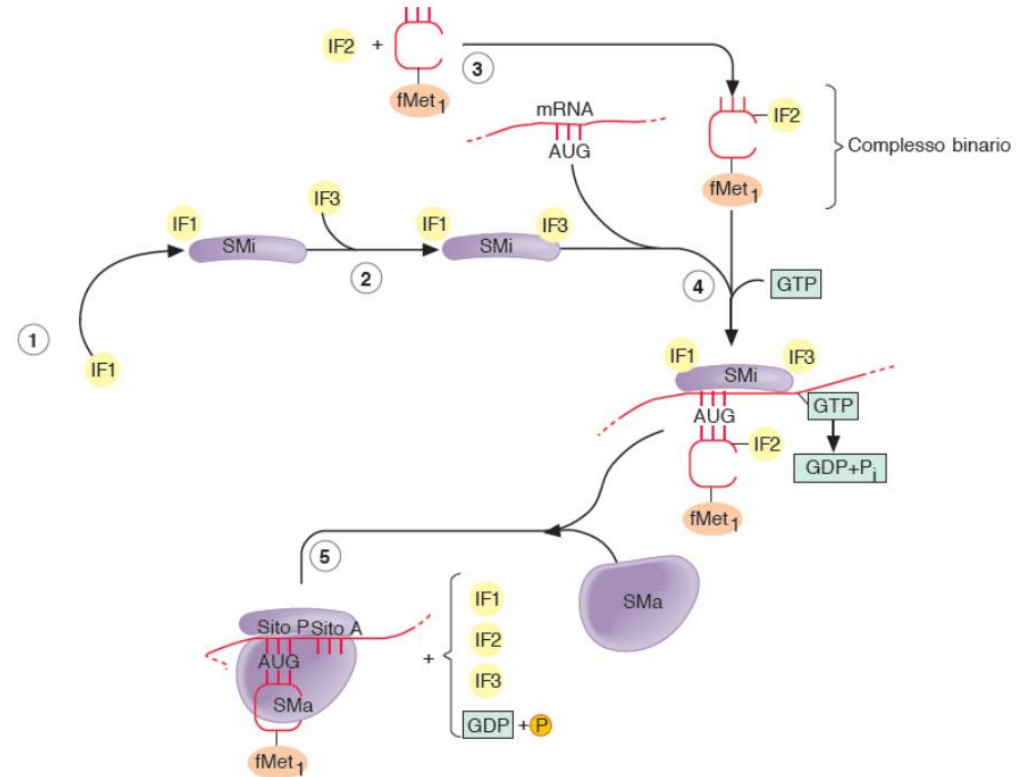


TABELLA 4.5 I fattori di inizio (IF): procarioti.

Fattore	Funzione nella fase di inizio
IF1	Promuove la dissociazione dei ribosomi in subunità separate
IF2	Lega il fMet-tRNA, incrementa il legame del fMet-tRNA alla subunità minore; idrolizza il GTP
IF3	Stabilizza la subunità minore nella forma dissociata, previene la riassociazione delle subunità maggiori e minori; denatura la forcina terminale 3'OH dell'rRNA 16S

Traduzione in Procarioti: Allungamento

Ingresso del nuovo **amminoacil-tRNA** nel **sito A** è mediato da **fattori di allungamento (EF)**:

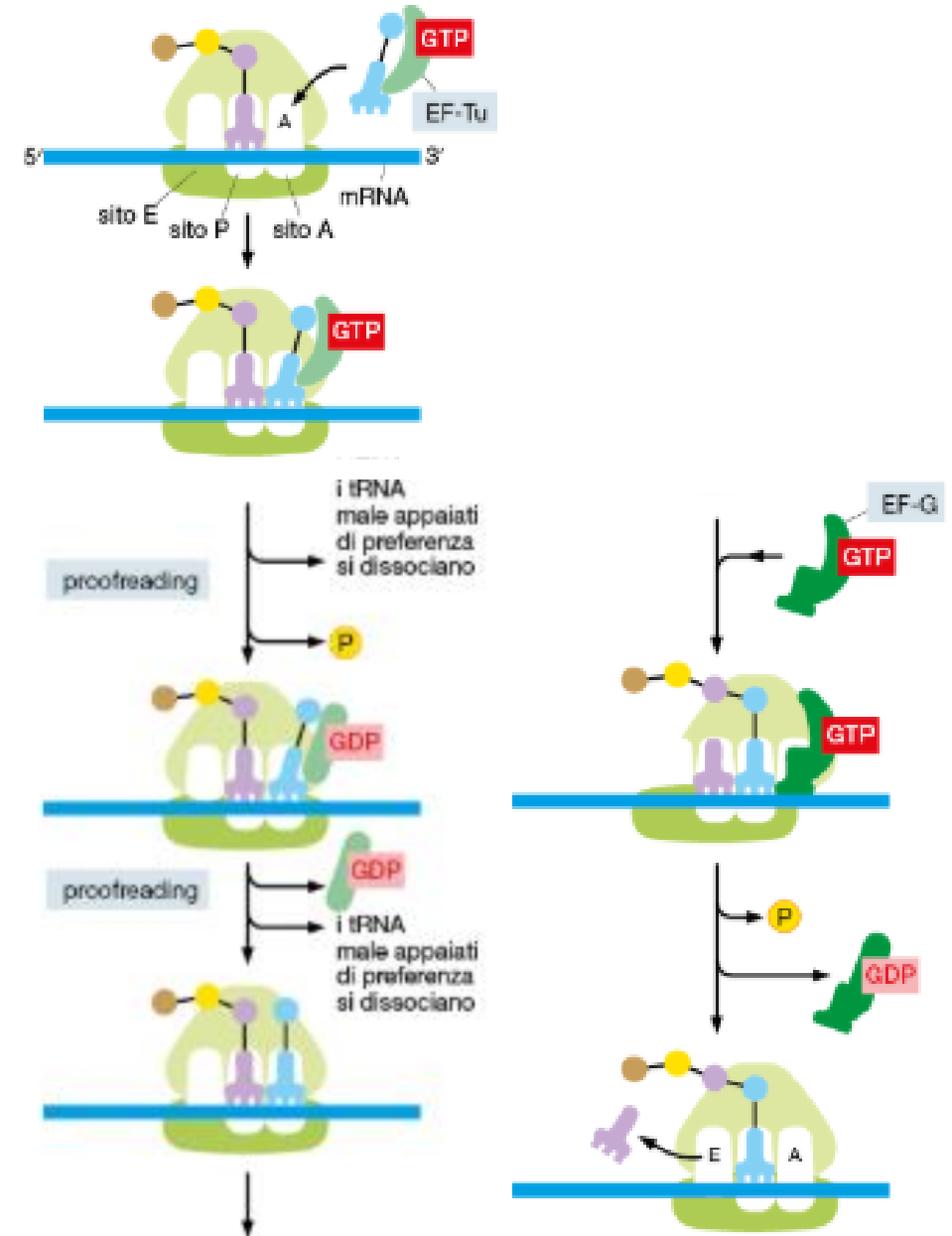
- **EF-Tu** (con **GTP**) porta il tRNA carico nel sito A.
- **EF-Ts** (**non mostrato qui**) rigenera EF-Tu.
- **EF-G** promuove lo “slittamento” (traslocazione) del ribosoma.

Meccanismo:

1. **EF-Tu + GTP** → porta **amminoacil-tRNA** nel **sito A**.
2. **Appaiamento codone-anticodone** stabilizzato da interazioni con **rRNA 16S**.
3. Il **centro peptidil-transferasico** (rRNA 23S e 5S della subunità maggiore) catalizza il **legame peptidico**:
4. **Traslocazione**:
 - **EF-G + GTP** sposta il ribosoma di una tripletta.
 - Sito A → libero.
 - Sito P → tRNA con dipeptide nascente.
 - Sito E → tRNA scarico pronto a uscire.

Nota importante:

- **AUG all’inizio** = riconosciuto da **tRNA^{fMet}**.
- **AUG durante l’allungamento** = riconosciuto da **tRNA^{Met}** (non formilato).



Traduzione in Procarioti: Allungamento

Ingresso del nuovo **amminoacil-tRNA** nel **sito A** è mediato da **fattori di allungamento (EF)**:

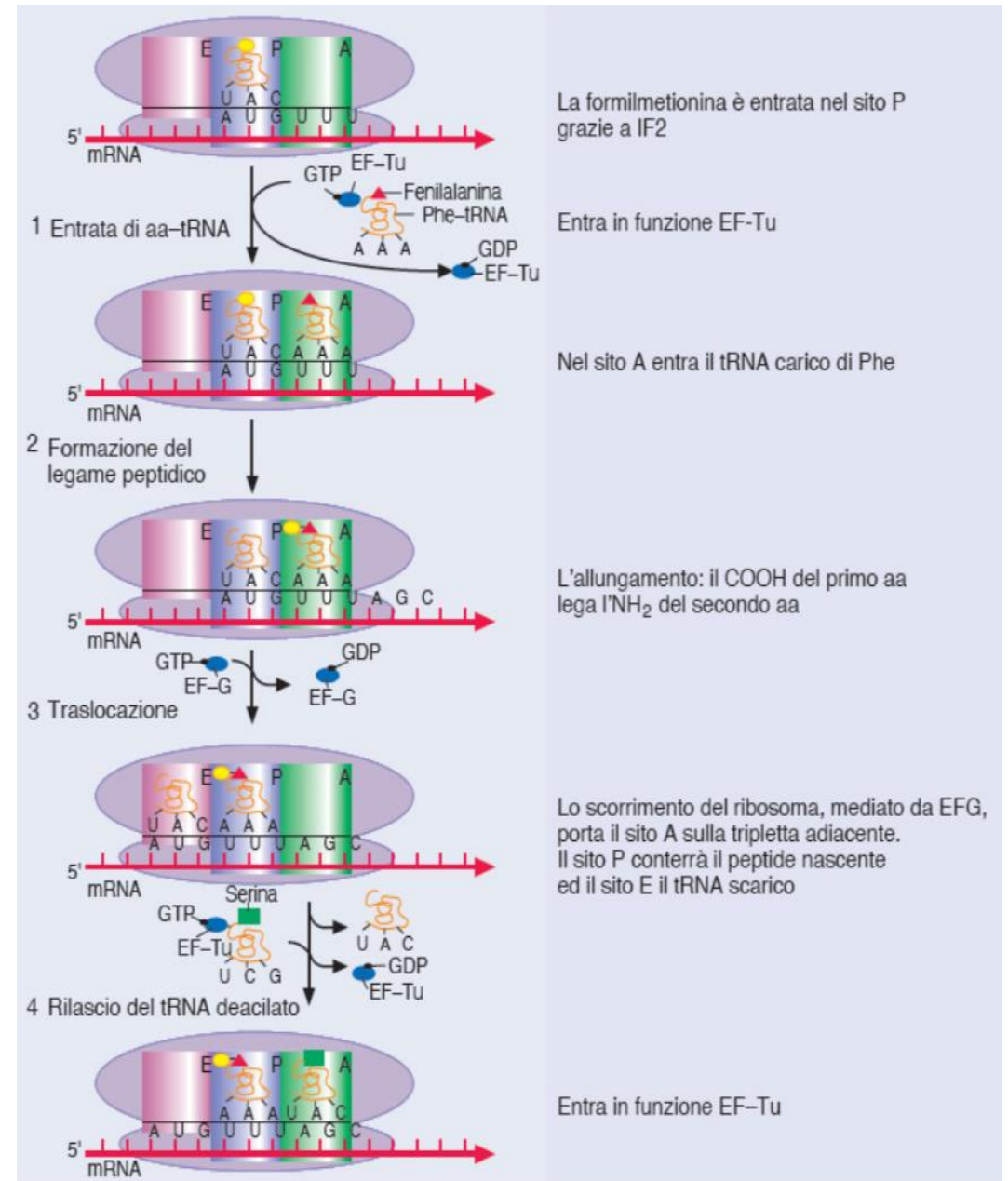
- **EF-Tu** (con GTP) porta il tRNA carico nel sito A.
- **EF-Ts** (**mostrato qui**) rigenera EF-Tu.
- **EF-G** promuove lo “slittamento” (traslocazione) del ribosoma.

Meccanismo:

1. **EF-Tu + GTP** → porta **amminoacil-tRNA** nel **sito A**.
2. **Appaiamento codone-anticodone** stabilizzato da interazioni con **rRNA 5S**.
3. **Il centro peptidil-transferasico** (rRNA 23S e 5S della subunità maggiore) catalizza il **legame peptidico**:
4. **Traslocazione**:
 - **EF-G + GTP** sposta il ribosoma di una tripletta.
 - Sito A → libero.
 - Sito P → tRNA con dipeptide nascente.
 - Sito E → tRNA scarico pronto a uscire.

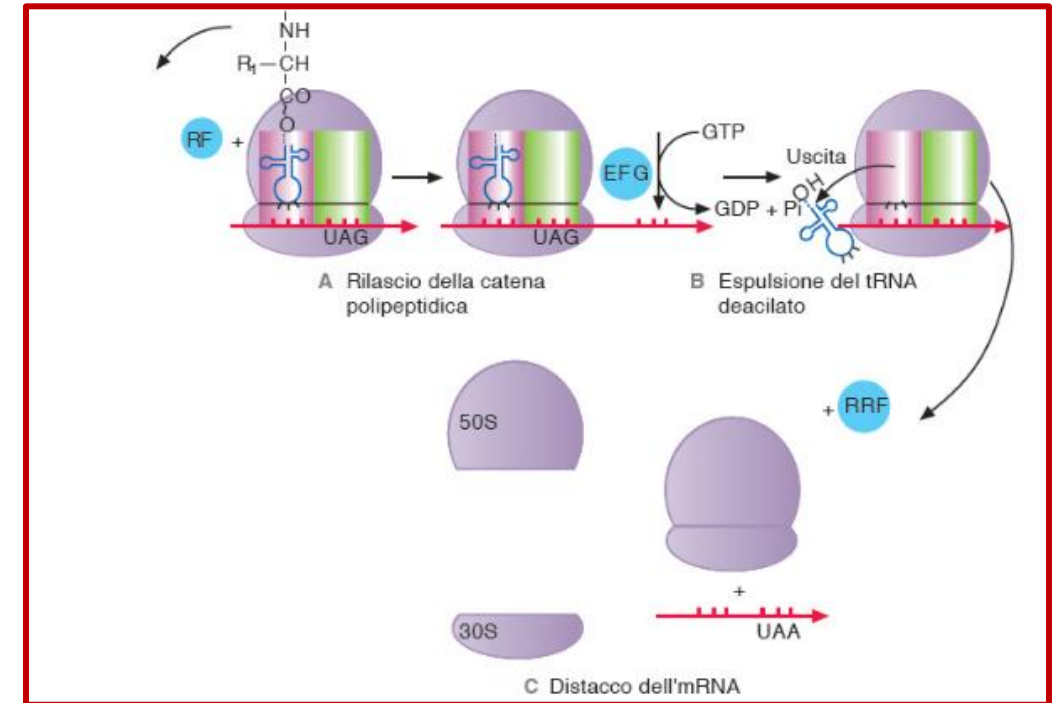
Nota importante:

- **AUG all’inizio** = riconosciuto da **tRNA^{fMet}**.
- **AUG durante l’allungamento** = riconosciuto da **tRNA^{Met}** (non formilato).



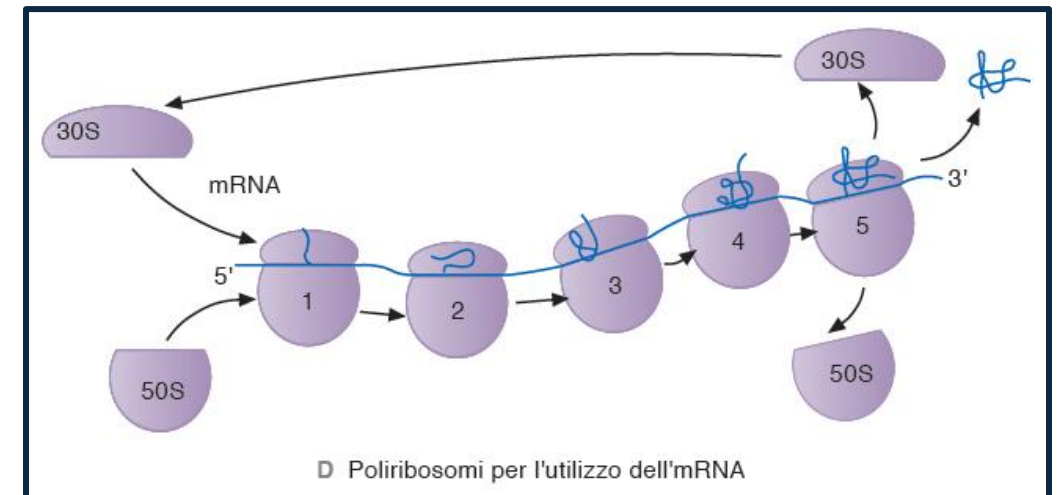
Traduzione in Procarioti: Terminazione della Traduzione

- **Codoni di stop:** UAA, UAG, UGA.
- **Riconosciuti** non da tRNA, ma **da fattori di rilascio (RF1, RF2, RF3).**
- Azione combinata con **EF-G** → la peptidil-transferasi **catalizza l'aggiunta di H₂O invece di un amminoacido** → rilascio della catena polipeptidica.
- **RRF (Ribosome Releasing Factor)** → separa le subunità 30S e 50S.

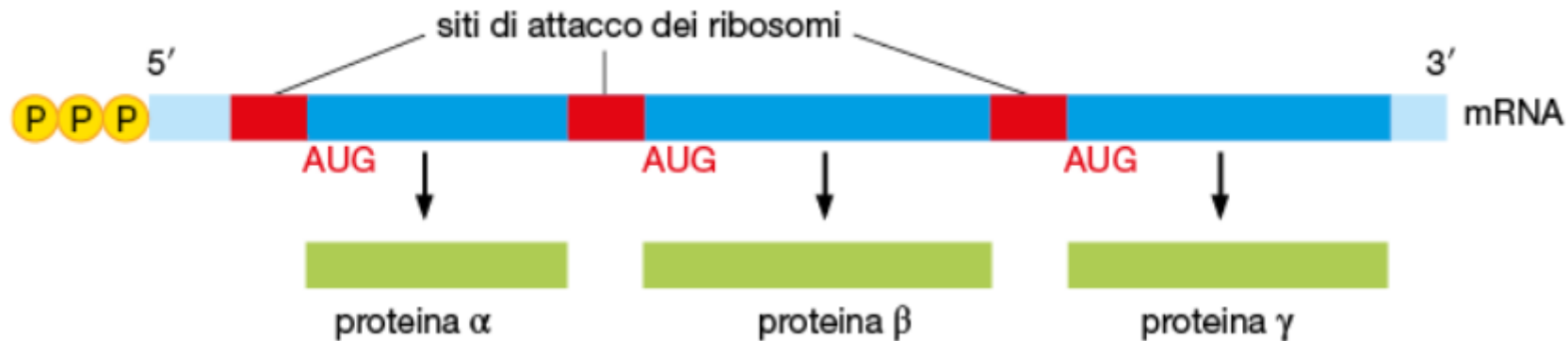


Polisomi (o poliribosomi)

- Un singolo mRNA può essere letto contemporaneamente da più ribosomi.
- Formazione di **polisomi/poliribosomi** → aumentano l'efficienza della sintesi proteica.
- La vita media degli mRNA batterici è breve (poche ore).
- **Vantaggio:** errori di trascrizione hanno effetti solo temporanei.

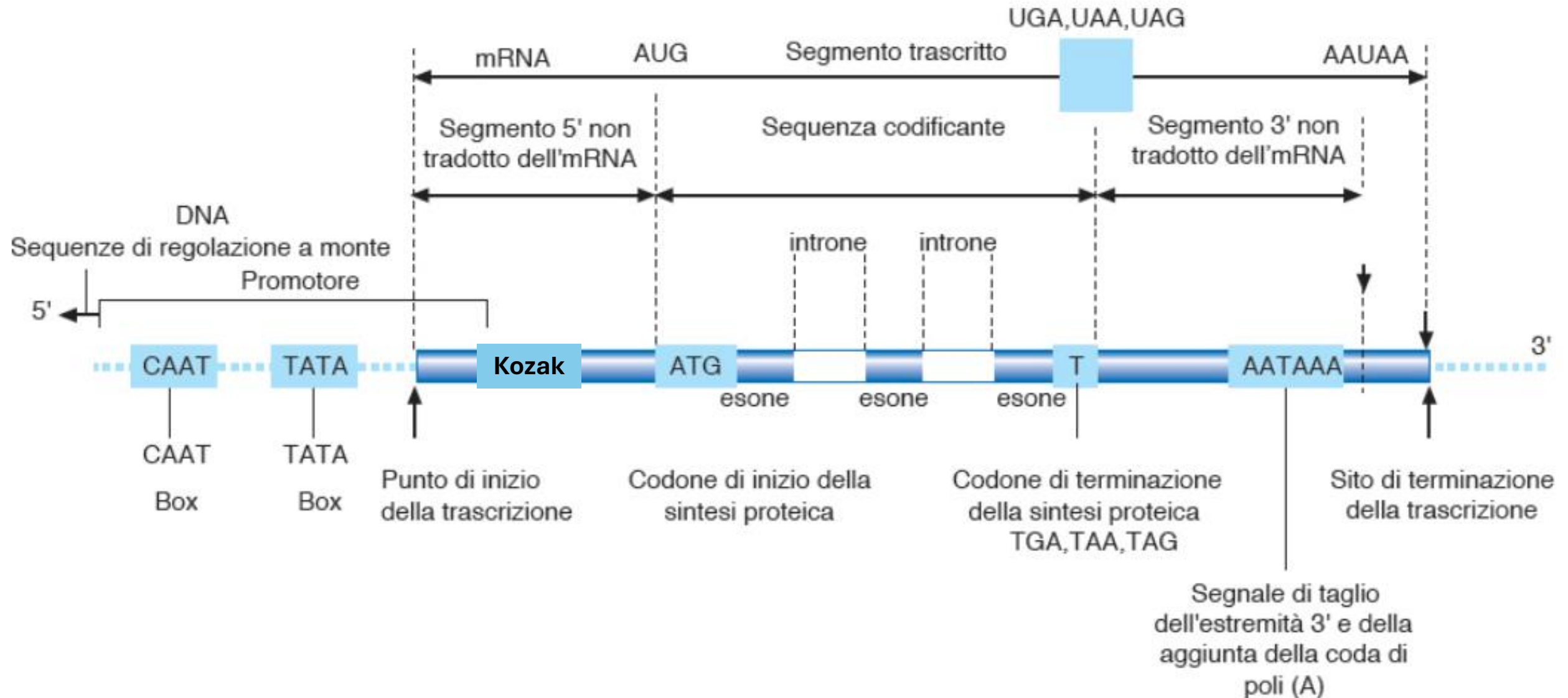


Struttura di una tipica molecola di mRNA nei batteri



A differenza dei ribosomi degli eucarioti, che di norma richiedono un cappuccio all'estremità 5', i **ribosomi dei procarioti iniziano la traduzione** in corrispondenza dei siti di attacco ai ribosomi (sequenze di **Shine-Dalgarno**), che **possono trovarsi in qualunque punto** lungo una molecola di mRNA. Questa proprietà dei ribosomi permette ai batteri di sintetizzare più di un tipo di proteina da una singola molecola di mRNA.

Anatomia Gene Eucariotico



Inizio ed Elongazione della Traduzione negli Eucarioti

Coinvolge un numero maggiore di fattori: **circa 10 fattori di inizio (eIF, eukaryotic initiation factors)**.

L'inizio della traduzione dipende da:

- **Cappuccio 5' (cap)** dell'mRNA.
- **Scanning mechanism** per individuare **l'AUG**
- **Sequenza di Kozak** come segnale di riconoscimento.

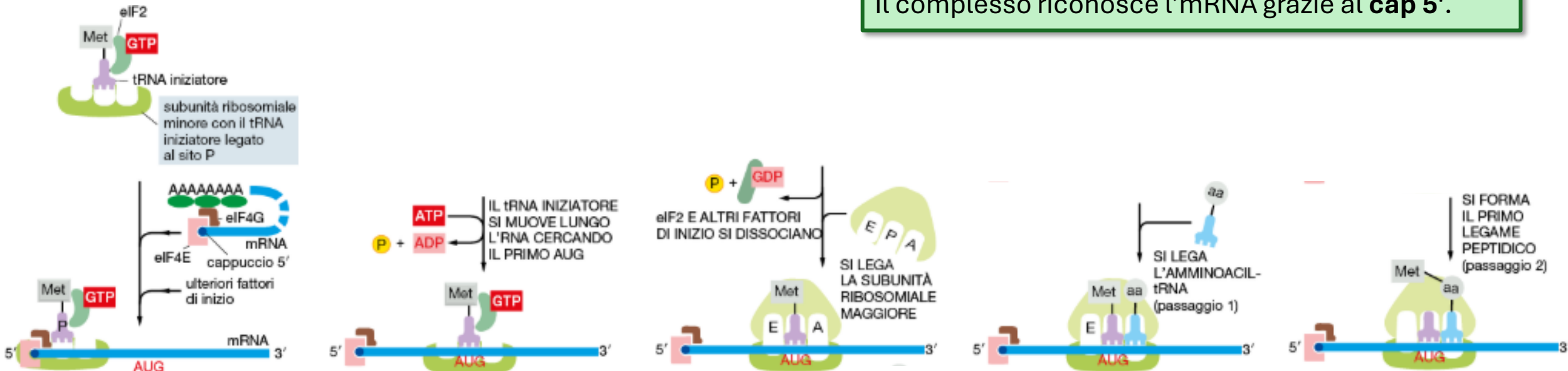
Amminoacido iniziatore: metionina (Met). Due tRNA diversi:

- **tRNA iniziatore (Met-tRNA_i)**.
- **tRNA per l'allungamento (Met-tRNA)**.

Il complesso di inizio comprende:

- Subunità minore del ribosoma (40S).
- Met-tRNA_i.
- Fattori di inizio (eIF).

Il complesso riconosce l'mRNA grazie al **cap 5'**.



Inizio ed Elongazione della Traduzione negli Eucarioti

Scanning mechanism (CAP-dipendente): la subunità minore con **Met-tRNA_i**, una volta **legata al Cap**, scorre (da 5' a 3') lungo l'mRNA.

- Ricerca del **primo codone AUG** situato entro ~100 nucleotidi dal cap.

Regola del primo AUG: la traduzione inizia generalmente dal primo AUG trovato.

- La regione non tradotta a monte del codone di inizio = **5' UTR (Untranslated Region)**.
- Analogo nel 3' = **3' UTR**.

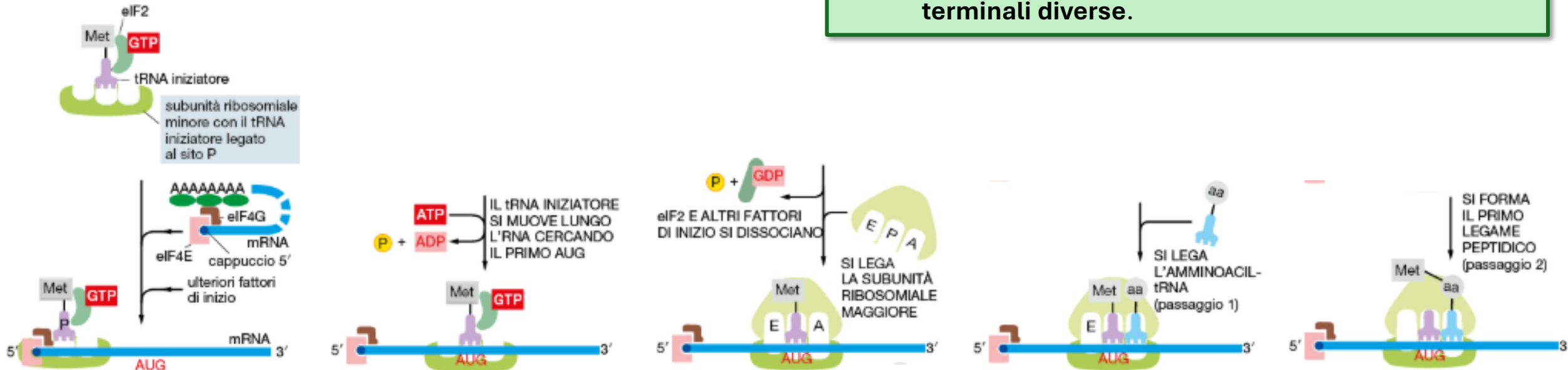
Sequenza di Kozak:

- 5'-GCCGCCA/GCC **AUG** G-3'

Quanto più la sequenza somiglia alla sequenza di Kozak, **tanto più efficiente** è l'inizio della **traduzione**.

Varianti nell'inizio

- Alcuni mRNA eucariotici **privi di cap** o **privi di sequenza di Kozak** → utilizzano siti **IRES (Internal Ribosome Entry Sites)**.
- Possibile uso di **AUG alternativi**: mRNA identici possono produrre proteine con estremità **N-terminali diverse**.



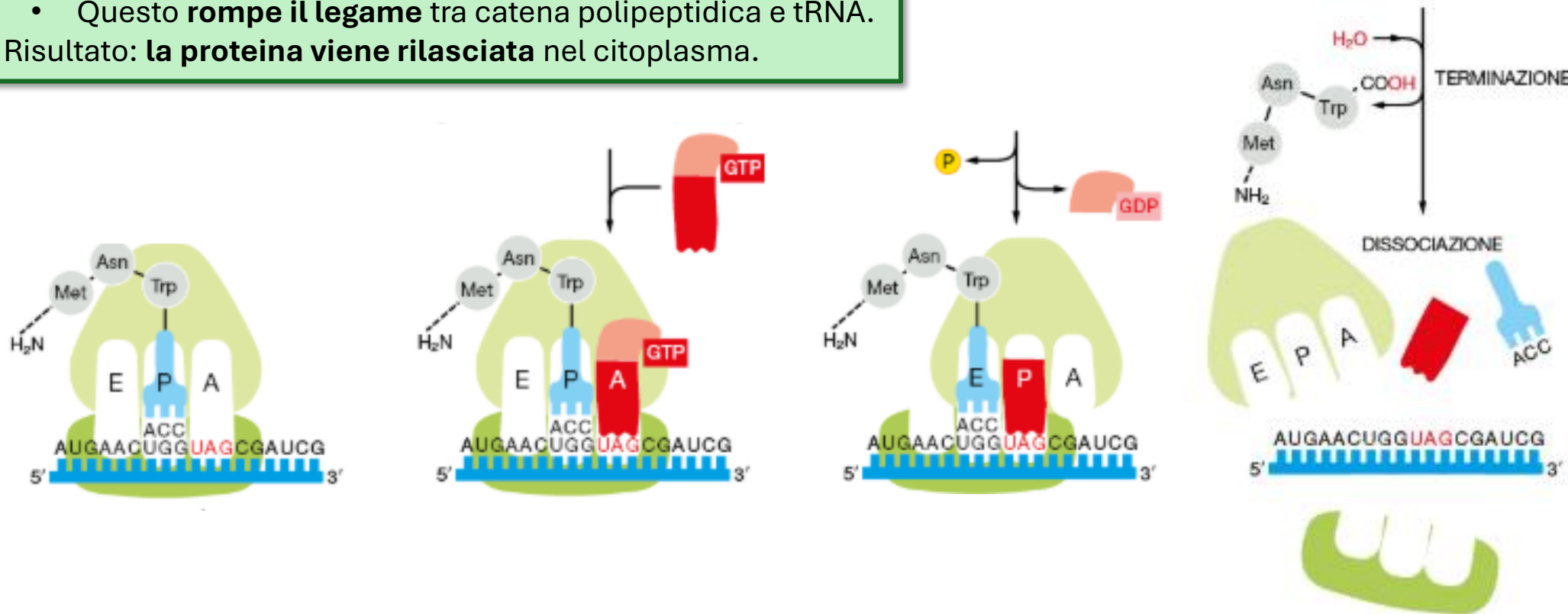
Terminazione della Traduzione negli Eucarioti

Ruolo dei fattori di rilascio

- Si legano al sito A quando compare un **codone di stop**.
- Mimano la forma dei tRNA, ma **non trasportano amminoacidi**.
- Inducono la **peptidil-transferasi** a:
 - Catalizzare l'**aggiunta di H₂O** (anziché un amminoacido).
 - Questo **rompe il legame** tra catena polipeptidica e tRNA.
- Risultato: **la proteina viene rilasciata** nel citoplasma.

Codoni di stop: UAA, UAG, UGA.

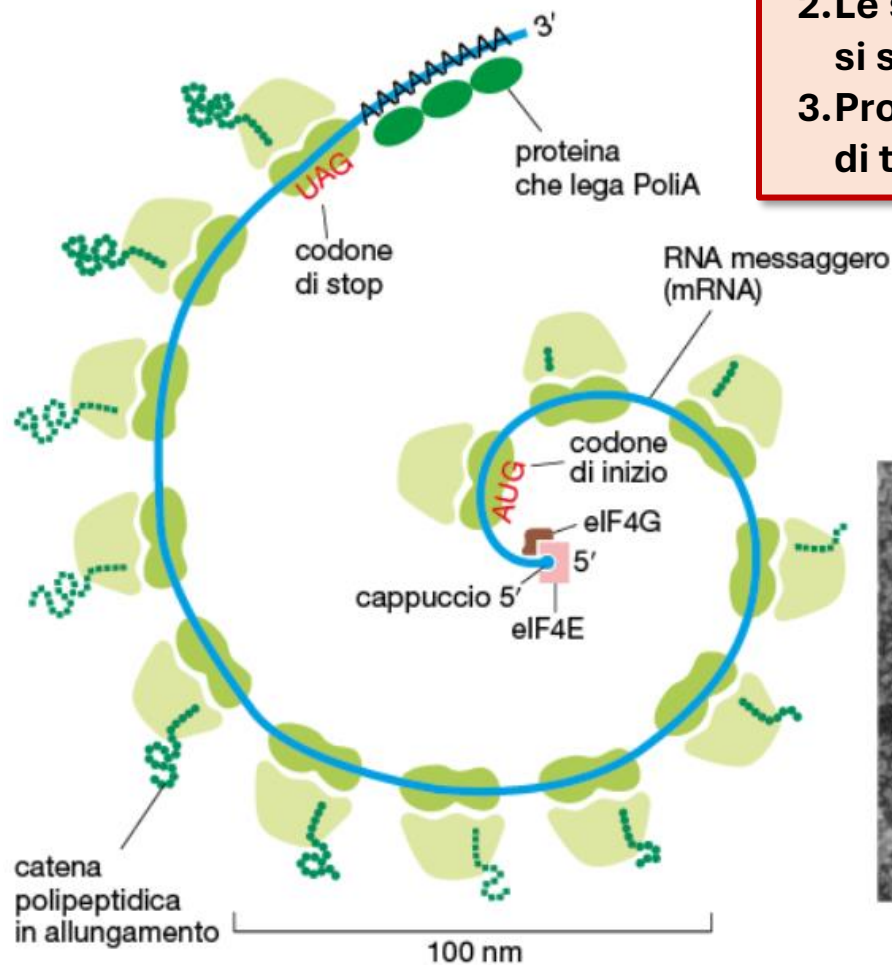
- ✓ Non codificano per amminoacidi.
- ✓ Non riconosciuti da tRNA.
- ✓ Funzione: indicano al ribosoma di **fermarsi**.



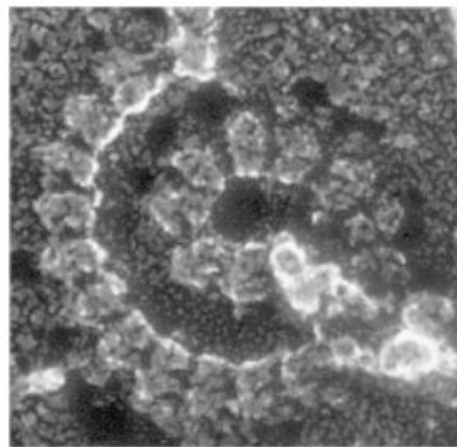
Terminazione della Traduzione negli Eucarioti

Dissociazione del complesso di traduzione

1. **Ribosoma rilascia l'mRNA.**
2. **Le subunità maggiore e minore si separano.**
3. **Pronte a iniziare un nuovo ciclo di traduzione.**



(A)

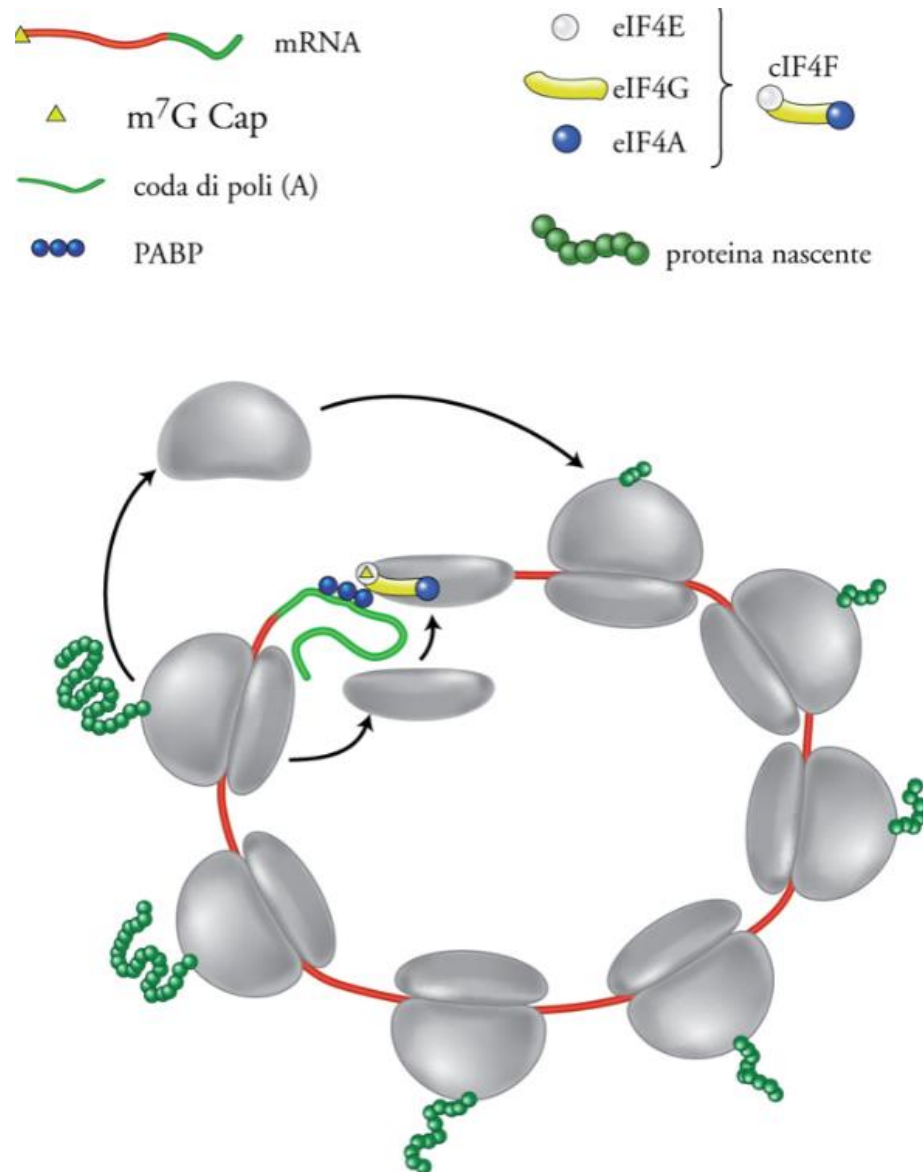


(B)

Polisomi o poliribosomi

- Una molecola di mRNA può essere tradotta **contemporaneamente da più ribosomi**.
- **Nuovi ribosomi si attaccano** appena la sequenza **5'** è libera.
- Struttura: **complessi con 10-20 ribosomi/mRNA**
- Funzione: **aumentano** enormemente la **velocità di sintesi** proteica.
- In una cellula umana media:
 - ~1/3 degli mRNA **senza ribosomi**.
 - La maggior parte: **10-20 ribosomi attivi per mRNA**.
- Tempi di sintesi: da 20 secondi a pochi minuti per proteina.

Circularizzazione dell'mRNA in Eucarioti: CAP-indipendente



PABP (Poly(A) binding protein) è un ulteriore elemento che sembra essere coinvolto nell'inizio della traduzione eucariotica.

PABP è **associata in varie copie alla coda poli(A)** che si trova all'estremità 3' degli mRNA eucariotici. Tuttavia, pur rimanendo legata alla poli(A), **interagisce con il fattore di inizio eIF4F legato all'estremità 5'** dello stesso mRNA.

Il risultato di questa interazione è l'assunzione da parte dell'**mRNA** di una **configurazione circolare** (o ad ansa) in cui i ribosomi che terminano la traduzione al 3' dell'mRNA vengono rilasciati in prossimità del 5'.

Secondo un modello sostenuto da vari autori, la struttura ad ansa dell'mRNA oltre a **stabilizzare la molecola** ne **aumenterebbe l'efficienza** di traduzione

Tuttavia, **la grande maggioranza degli mRNA eucariotici** utilizza il meccanismo di inizio **Cap-dipendente**, che comporta l'assemblaggio della subunità piccola del ribosoma all'estremità 5' dell'mRNA e la scansione fino a trovare il primo codone di inizio AUG

L'Adattamento Indotto ed il Proofreading Cinetico

Le sole differenze nei legami H garantirebbero una specificità relativamente bassa in confronto all'alta precisione che mostra invece l'intero processo di traduzione

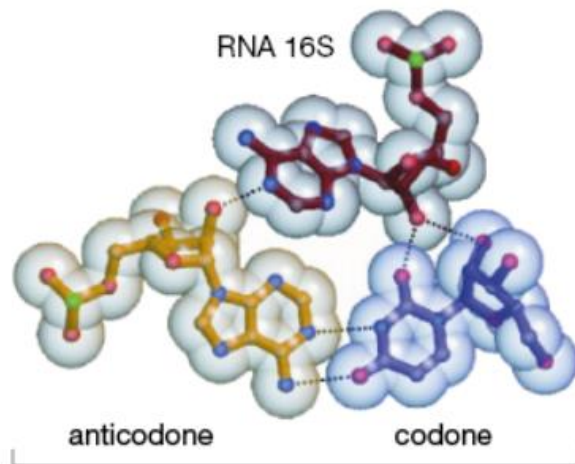
Adattamento indotto.

Nel ribosoma:

- Prima di aggiungere un aa, il **ribosoma si ripiega attorno al codone-anticodone**.
- Solo **se l'appaiamento è corretto**, il ripiegamento si completa, **innesca l'idrolisi di GTP** da parte di **EF-Tu** la reazione procede.

Nella trascrizione (RNA polimerasi):

- Se la geometria è anomala → il nucleotide sbagliato si dissocia.



Proofreading cinetico (kinetic proofreading)

Meccanismo:

- **Dopo l'appaiamento** iniziale, avviene un **passaggio irreversibile** (es. **idrolisi di GTP**).
- Segue una **pausa temporale** durante la quale il tRNA o nucleotide si posiziona per la catalisi.

Appaiamenti sbagliati hanno **più probabilità di dissociarsi** perché **il legame** codone-anticodone scorretto è **più debole e la pausa è più lunga** per appaiamenti errati → maggiore probabilità di distacco.

