

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"

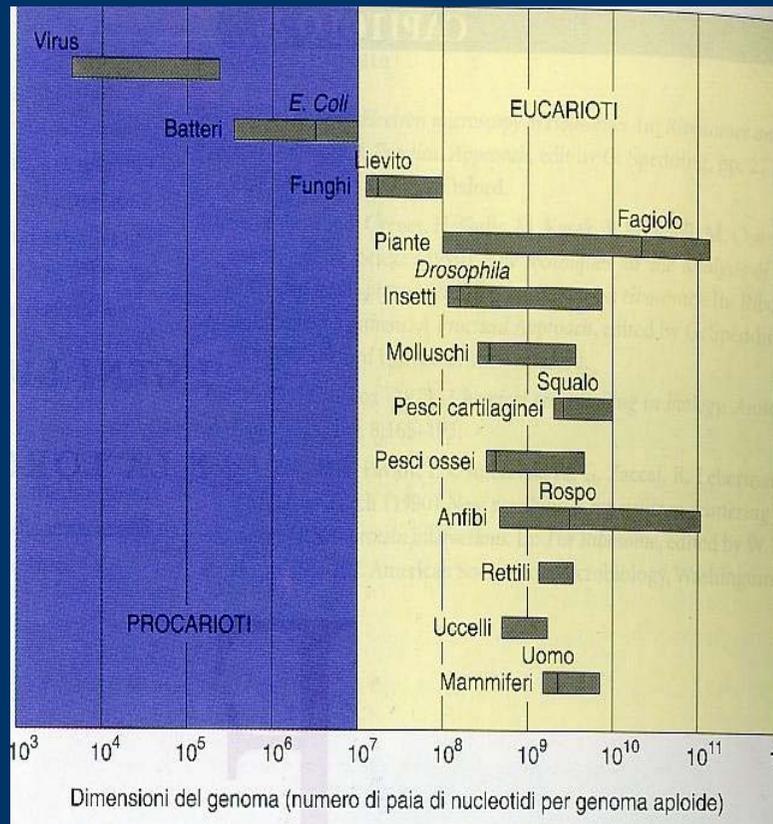
LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEGLI EUCARIOTI E L'EVOLUZIONE

Roberto Giacomini Stuffer

1. I geni ed il DNA degli eucarioti
2. La replicazione, la trascrizione e la sintesi proteica degli eucarioti
3. L'evoluzione

I GENI ED IL DNA DEGLI EUCARIOTI

IL GENOMA DEGLI EUCARIOTI



La lunghezza del DNA di una cellula umana è di circa **2 metri** (il DNA di E.coli è **1.7mm**).

Il materiale genetico eucariotico è suddiviso in cromosomi, il cui numero diploide è tipico di ciascuna specie.

IL NUMERO NORMALE DI CROMOSOMI IN DIVERSI ORGANISMI

table 24-2

Normal Chromosome Number in Some Organisms*

Bacteria	1	Honeybee (female)	32
Fruit fly	8	Fox	34
Red clover	14	Cat	38
Garden pea	14	Mouse	40
Yeast	16 [†]	Rat	42
Maize (corn)	20	Rabbit	44
Frog	26	Human	46
Hydra	30	Chicken	78

*The diploid chromosome number is given for all eukaryotes except yeast.

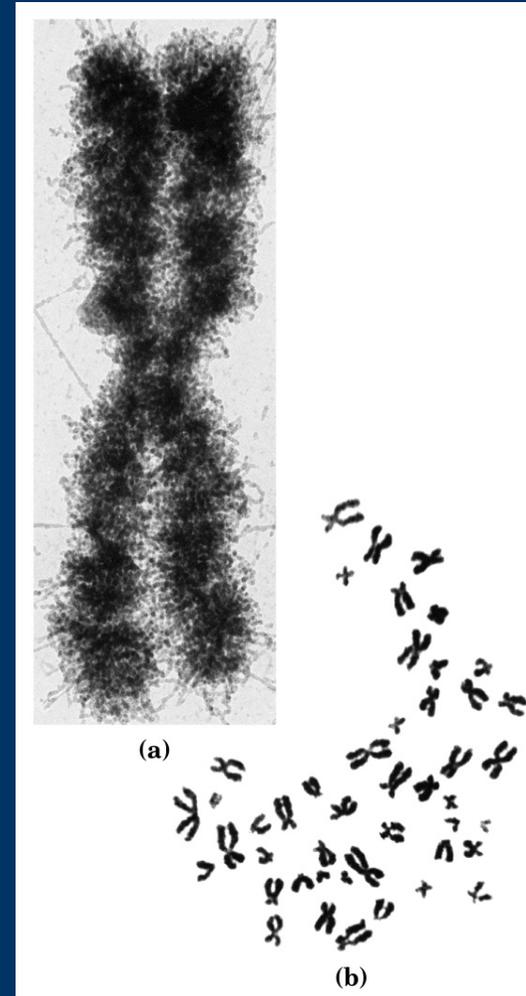
[†]This is the haploid chromosome number for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Wild yeast strains generally have eight (octoploid) or more sets of these chromosomes.

IL GENOMA DEGLI EUCARIOTI

Ogni cromosoma è una singola molecola di **DNA** a doppia elica, contenente un insieme caratteristico di geni,

uno dei più piccoli cromosomi umani è lungo **~30 mm** (~15 volte maggiore del DNA di E.coli);

le molecole di DNA dei 24 cromosomi umani (22+X+Y) hanno una lunghezza che varia fino a **25** volte.



IL GENE

E' la **porzione di cromosoma** che determina o influenza un singolo carattere o fenotipo (proprietà visibile).

La sua definizione molecolare é: la **sequenza di DNA** che codifica una catena polipeptidica o gli RNA stabili (tRNA e rRNA).

Il DNA è costituito da:

1. geni strutturali
2. sequenze regolative

I GENI STRUTTURALI
codificano i polipeptidi o un RNA stabile.

LE SEQUENZE REGOLATIVE

- 1) indicano l'inizio e la fine dei geni strutturali,
- 2) sono i punti di partenza per la replicazione,
- 3) partecipano all'avvio o al blocco della trascrizione dei geni strutturali.

LE SEQUENZE RIPETITIVE

I batteri hanno solitamente un cromosoma per cellula,
ogni cromosoma contiene, di norma, solo una copia di un dato gene
(solo quelli per gli rRNA sono ripetuti diverse volte).

LE SEQUENZE RIPETITIVE

Il DNA degli **eucarioti**, più complesso di quello dei procarioti, contiene molte sequenze di basi ripetute.

Esempi:

il DNA satellite,

le duplicazioni dei geni funzionali,

gli elementi ALU (nei mammiferi).

LE DUPLICAZIONI DEI GENI FUNZIONALI

Esse permettono di avere livelli elevati di trascritti altamente necessari, es.:

i geni per tRNA (spesso sono centinaia di copie),

i geni per rRNA (sono fino a migliaia di copie),

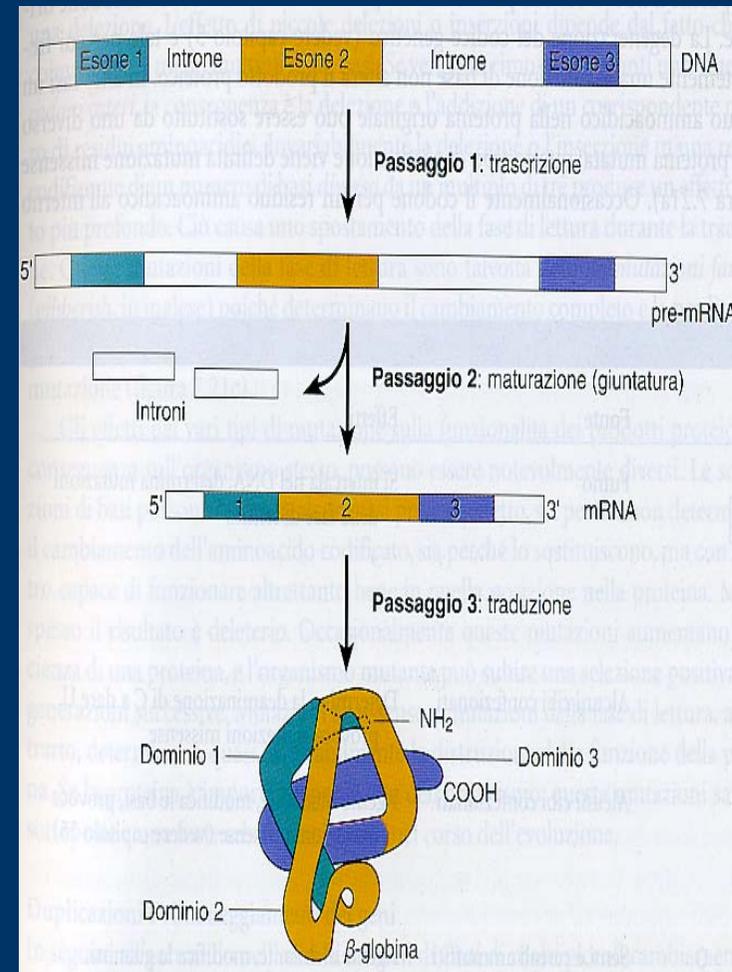
i geni per gli istoni (formano la cromatina assieme al DNA).

I GENI EUCARIOTICI SONO DISCONTINUI

Gli **esoni** sono i segmenti codificanti di un gene, gli **introni** sono le sequenze trascritte, ma non tradotte;

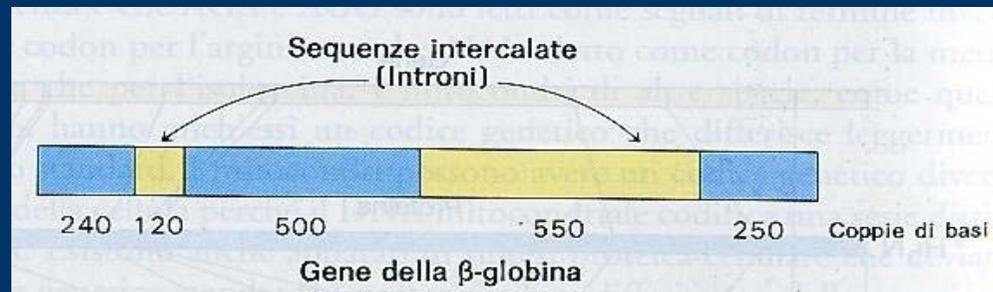
quindi, la maggior parte dei geni sono **"mosaici"** di introni ed esoni.

I geni eucariotici sono quindi definiti **discontinui**.



GLI INTRONI E GLI ESONI

Molti esoni codificano le unità strutturalmente e funzionalmente distinte delle proteine (es. l'esone centrale della β -globina);



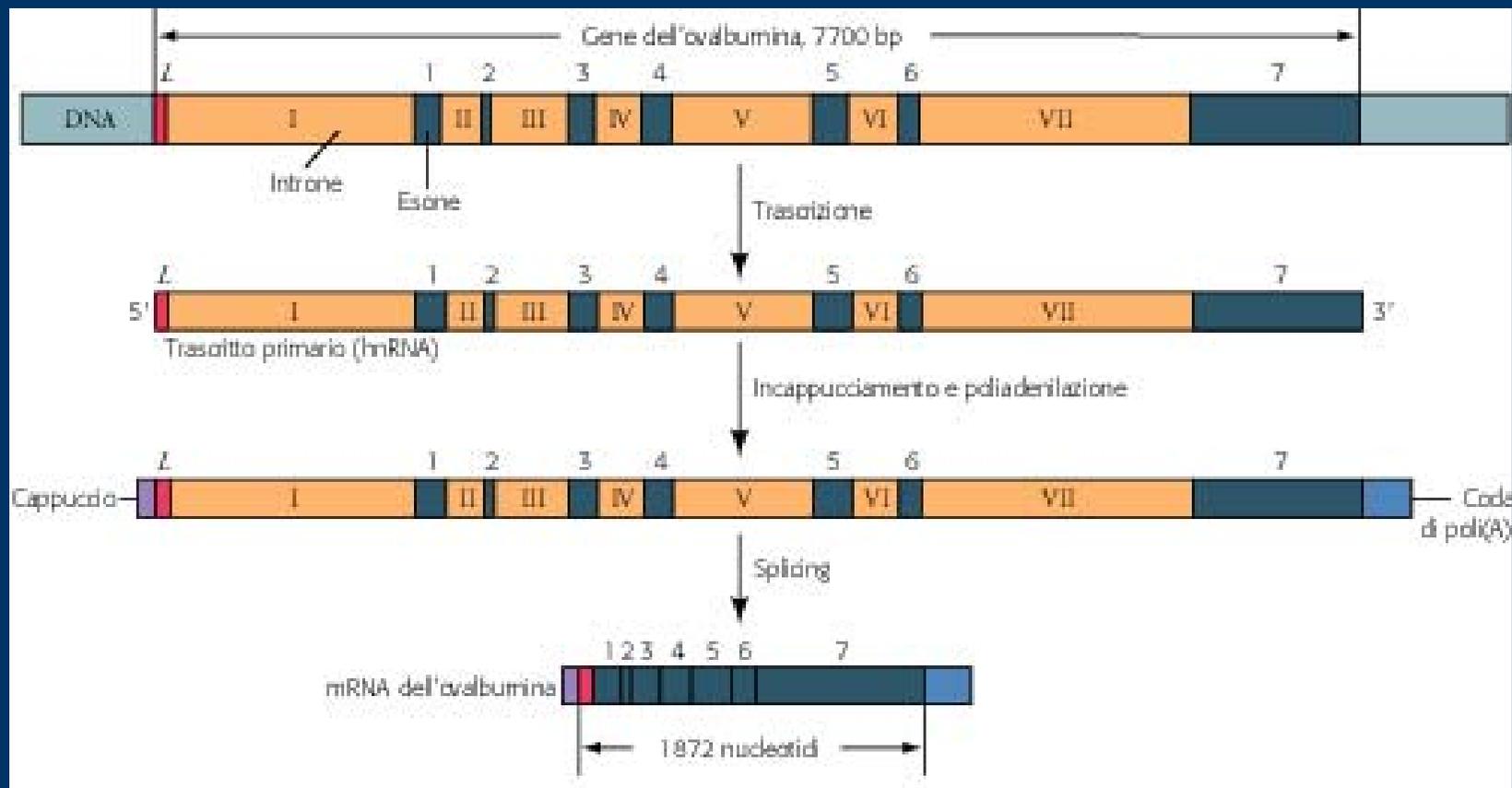
un singolo **esone** può codificare un intero **dominio** di una proteina;

la **funzione** degli introni non è stata ancora ben compresa,

gli **istoni** sono una famiglia di geni che sembra non abbia introni.

REGIONI CODIFICANTI E NON CODIFICANTI DEL GENE DELL'OVALBUMINA

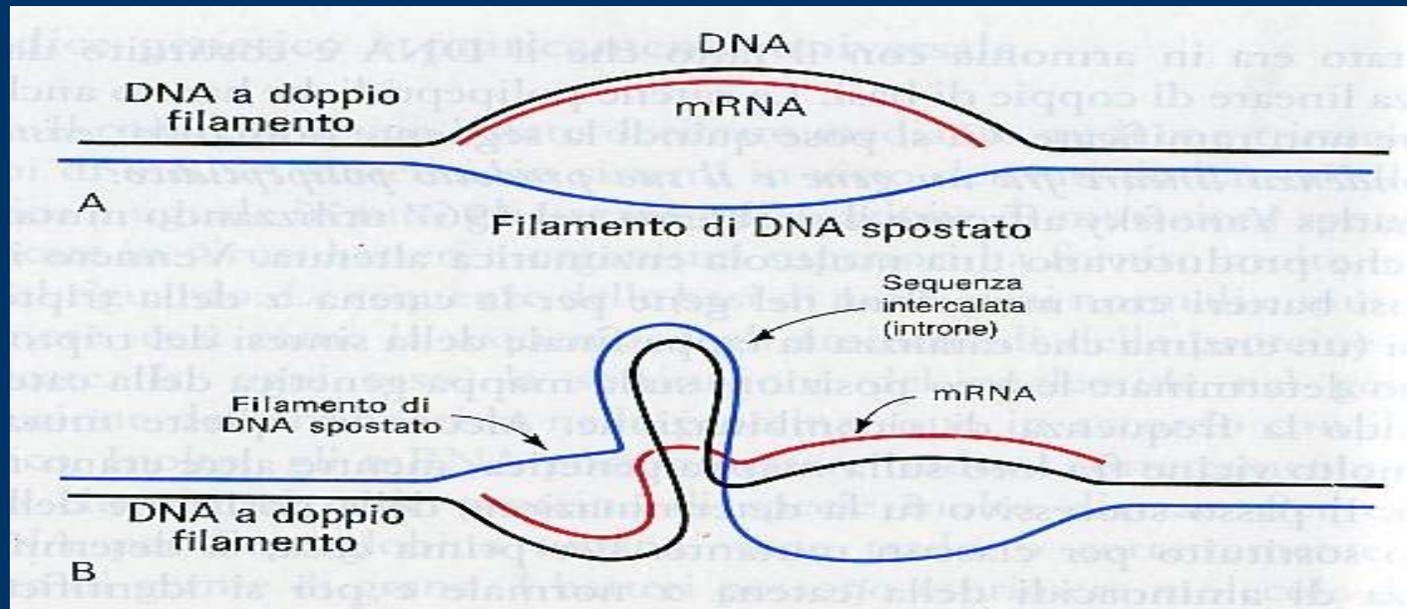
Il suo gene contiene 8 esoni inframmezzati da 7 introni.



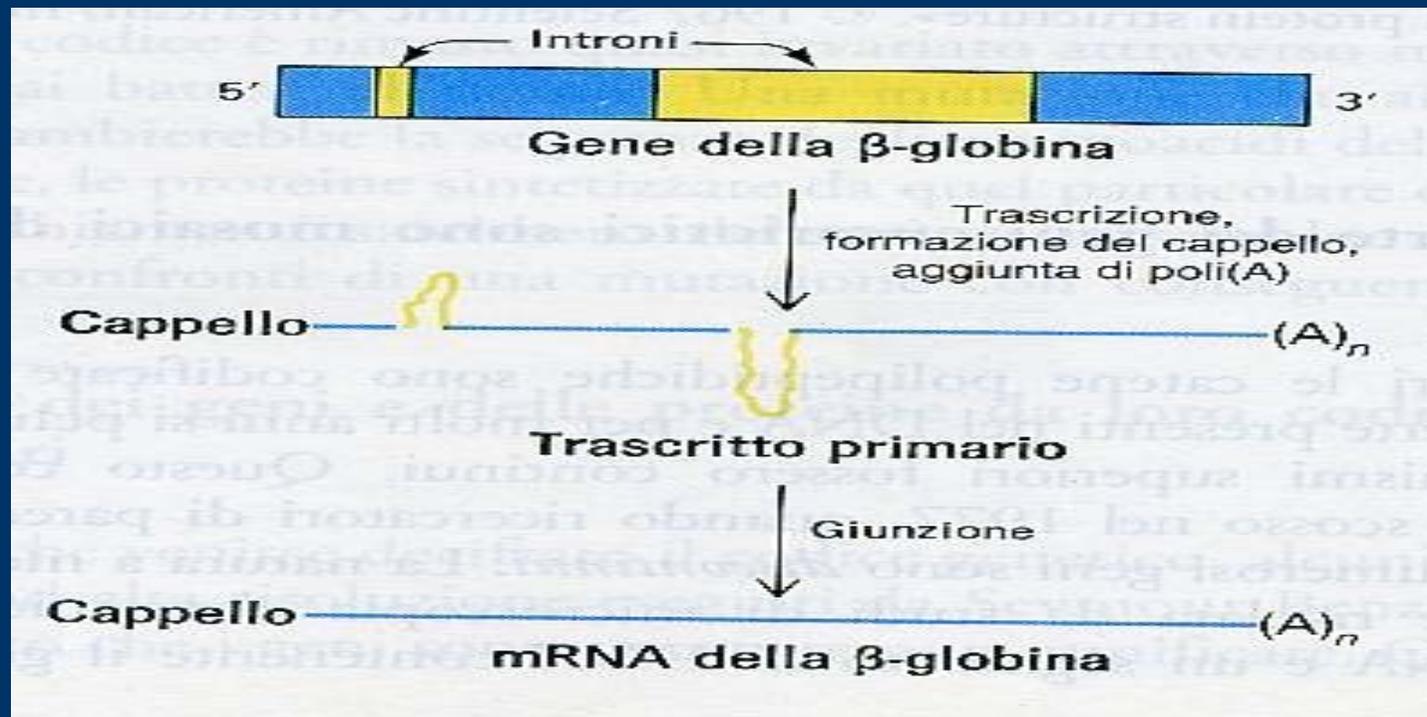
UN GENE CON UNA SEQUENZA INTERCALATA

L'ibrido DNA-RNA

Il DNA genomico si appaia all'mRNA lungo gli esoni, mentre gli introni vengono esclusi e formano le cosiddette **anse R**.

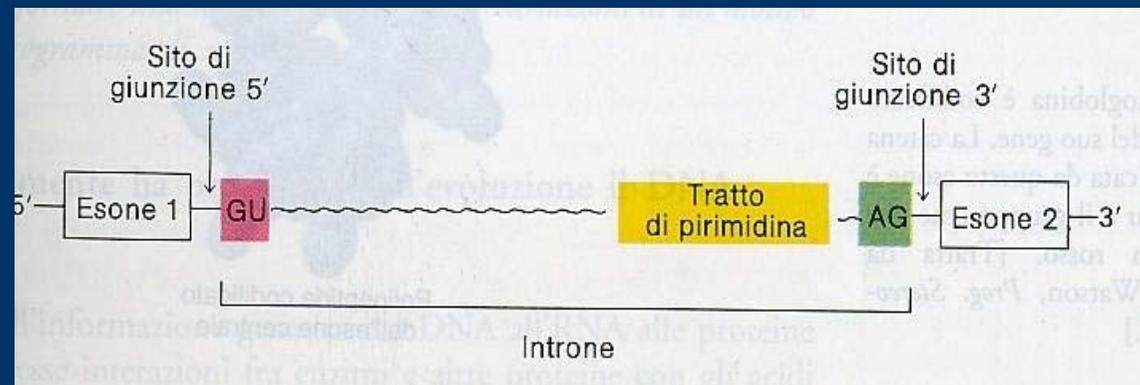


I GENI DISCONTINUI



LO SPLICING

Il trascritto primario eucariotico (**pre-mRNA**) contiene introni ed esoni;



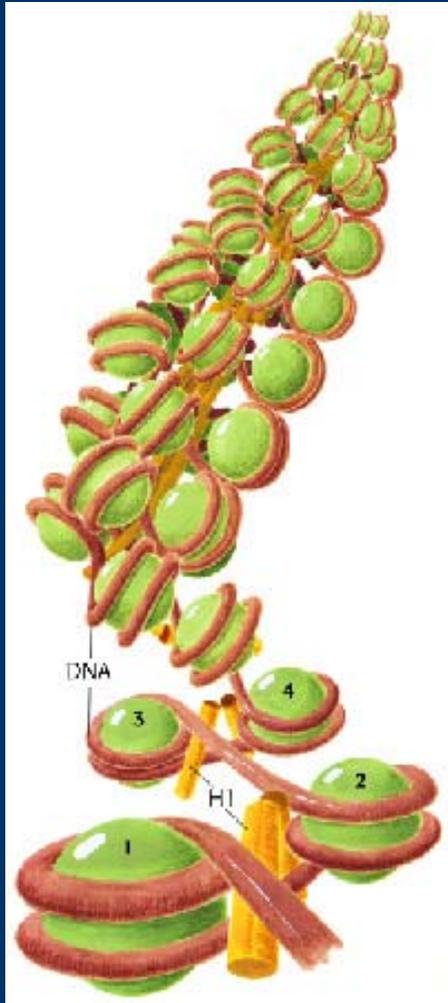
le sequenze intercalate (**introni**) nel trascritto primario vengono tagliate e le sequenze che codificano (**esoni**) sono legate simultaneamente da grandi complessi chiamati **spliceosomi**; (to splice = giuntare).

LA CROMATINA

LA CROMATINA

È il **materiale filamentoso** dei cromosomi eucariotici,
è costituita da DNA associato a istoni ed altre proteine,
nell'interfase **è disperso** e riempie la maggior parte del nucleo,
nella divisione nucleare **si condensa** nei cromosomi compatti.

LA CROMATINA



Le proteine che legano il DNA rientrano in due classi:

1) La classe principale, gli **istoni**, comprende 5 tipi di proteine basiche (da 11 a 21 Kd):

H1 (é associato al DNA di collegamento),

H2A, H2B, H3 e H4 (due copie di ciascuno formano la struttura nucleosomiale),

2) la seconda classe è costituita da un gruppo molto più eterogeneo di proteine chiamate **proteine non istoniche**.

LE PROTEINE ISTONICHE

table 24-3

Types and Properties of Histones

Histone	Molecular weight	Number of amino acid residues	Content of basic amino acids (% of total)	
			Lys	Arg
H1*	21,130	223	29.5	1.3
H2A*	13,960	129	10.9	9.3
H2B*	13,774	125	16.0	6.4
H3	15,273	135	9.6	13.3
H4	11,236	102	10.8	13.7

*The sizes of these histones vary somewhat from species to species. The numbers given here are for bovine histones.

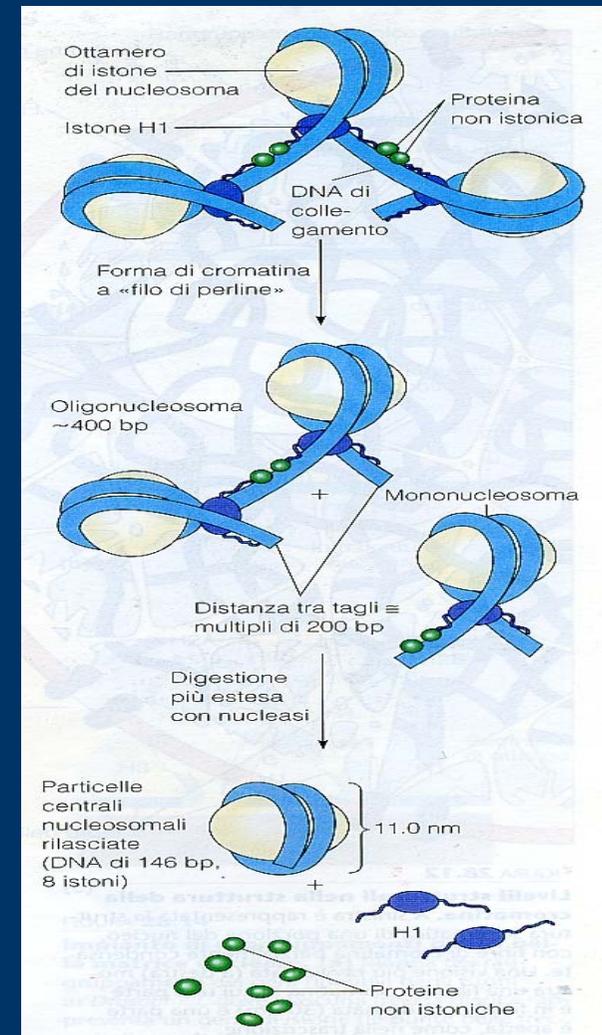
LE PROTEINE NON ISTONICHE

Le proteine non istoniche sono sul DNA di collegamento (DNA linker) e possono essere suddivise in:

polimerasi ed altri enzimi nucleari,

proteine con funzione di recettori ormonali,

proteine regolatrici di vario tipo.



LA CROMATINA

I cromosomi contengono **istoni** e **DNA** in quantità approssimativamente uguale,

sali o acidi diluiti **dissociano** gli istoni dal DNA,

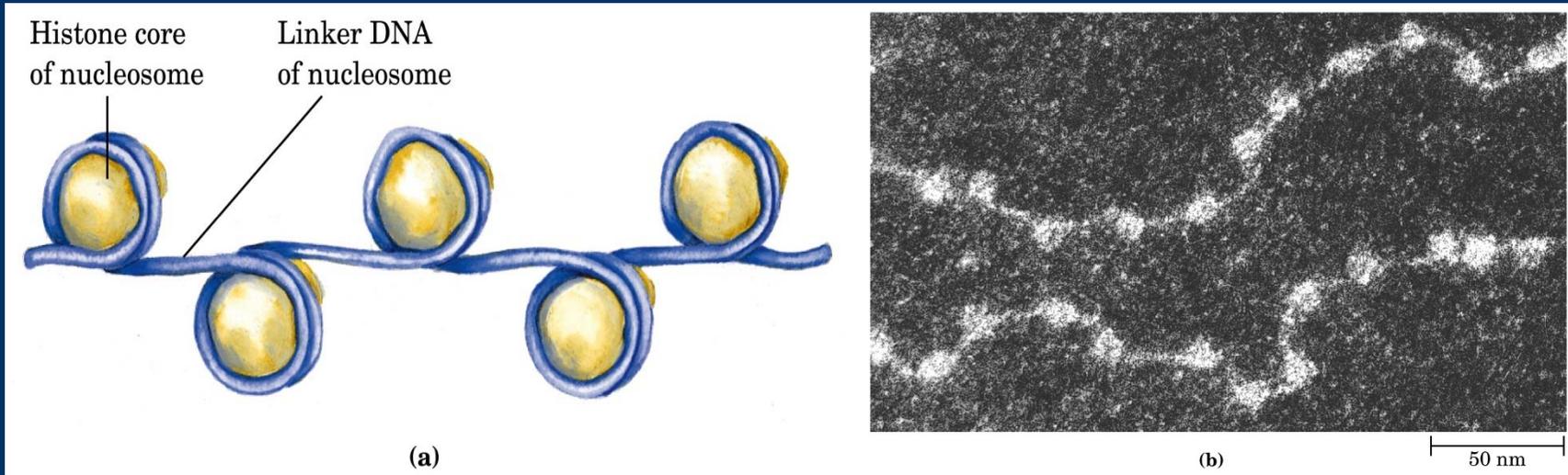
gli istoni subiscono **modificazioni** post-traduzionali di alcune catene laterali.

LA CROMATINA

Le modificazioni covalenti reversibili (acetilazioni, metilazioni, ADP-ribosilazioni, fosforilazioni, ecc.) influenzano il compattamento del DNA e la disponibilità ad essere replicato e trascritto;

infatti, esse **cambiano** la carica elettrica, la forma ed altre proprietà degli istoni.

LA CROMATINA



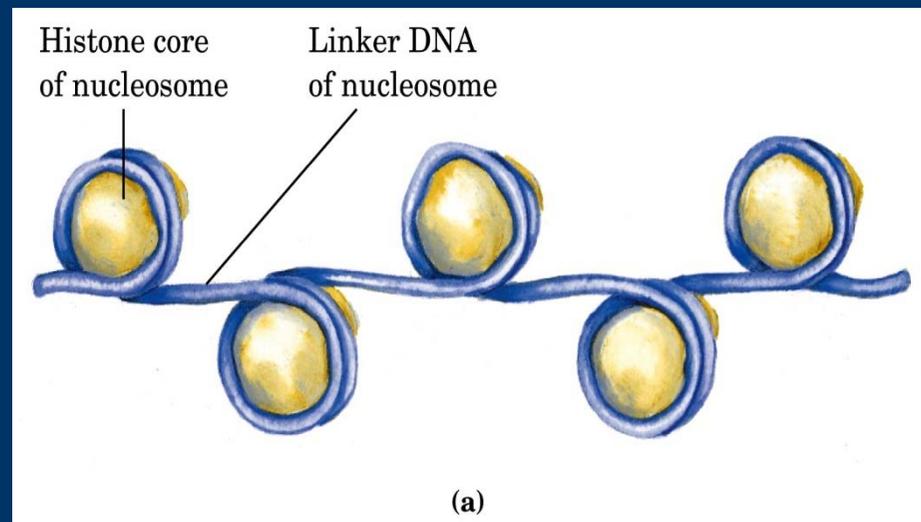
Al microscopio elettronico le fibre di cromatina hanno un andamento regolare a "collana", con una "perla" (**nucleosoma**) ogni 200 coppie di basi.

LA CROMATINA

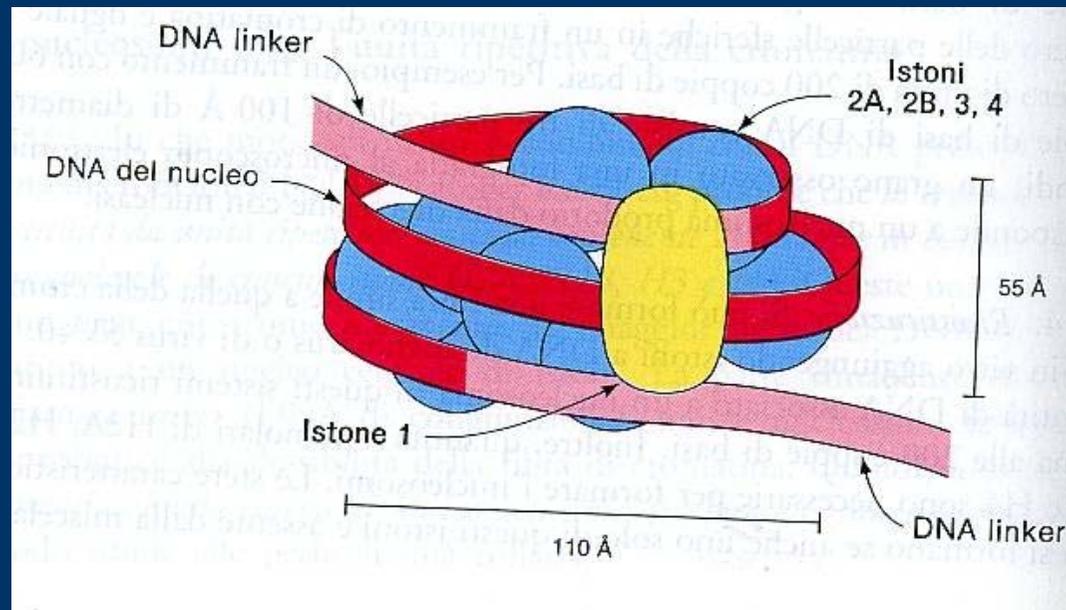
Essa è costituita da unità ripetitive: i **nucleosomi**,

ognuno contiene **8 proteine istoniche**;

due nucleosomi adiacenti sono collegati da **DNA linker**, che contribuisce alla flessibilità della fibra.



IL NUCLEO DEL NUCLEOSOMA

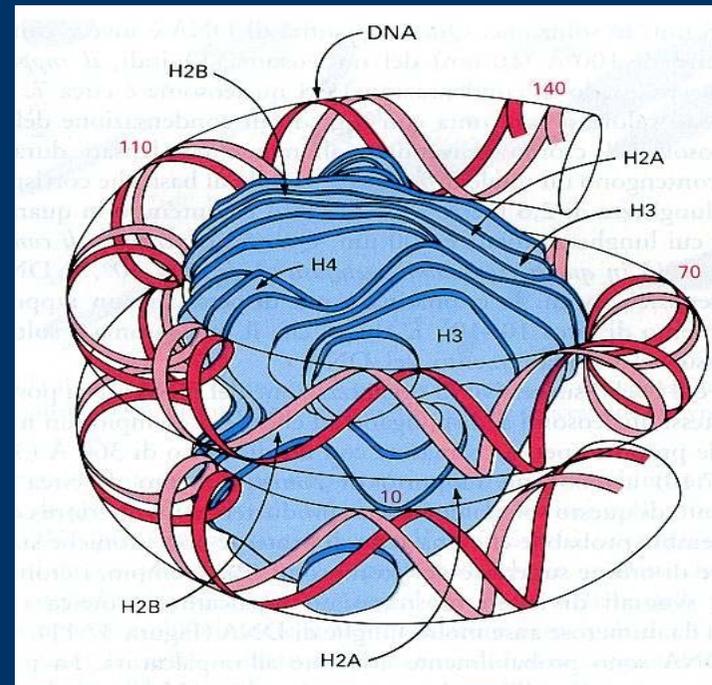


Il DNA del nucleo (146 coppie di basi) si avvolge intorno al centro proteico del nucleosoma (contenente ciascuno due copie di H2A, H2B, H3 e H4);

la **spaziatura** dei nucleosomi lungo il DNA definisce un'unità ripetitiva.

I NUCLEOSOMI SONO LE UNITA ORGANIZZATIVE FONDAMENTALI DELLA CROMATINA

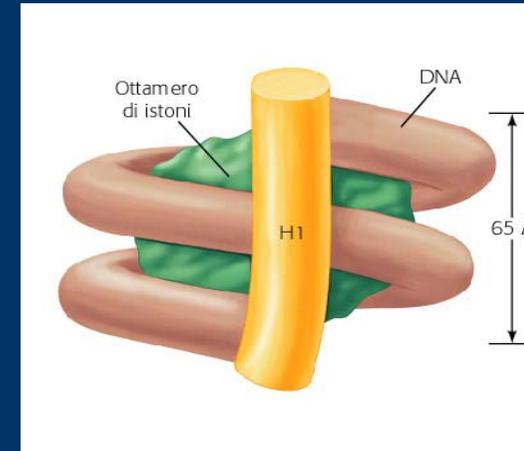
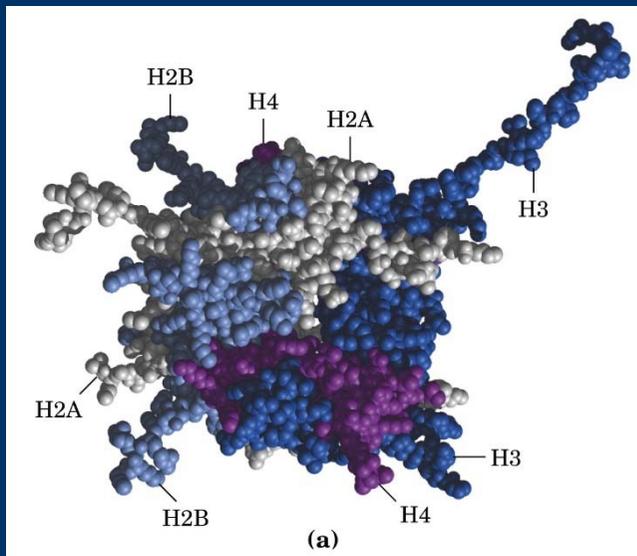
La spaziatura dei nucleosomi é formata da circa **200** coppie di basi, di cui **146** sono legate strettamente attorno al nucleo istonico e le rimanenti collegano i nucleosomi (DNA linker).



Gli istoni **H3** e **H4** occupano il centro del nucleosoma; i dimeri **H2A-H2B** si trovano ad entrambe le due estremità del tetramero **H3-H4**.

LE PROTEINE ISTONICHE

L'istone **H1**, in singola copia, si associa al DNA di collegamento aiutando la formazione di strutture di ordine superiore.



Gli istoni **H2A**, **H2B**, **H3** ed **H4** (in duplice copia) formano una struttura nucleosomiale.

L'ISTONE H1

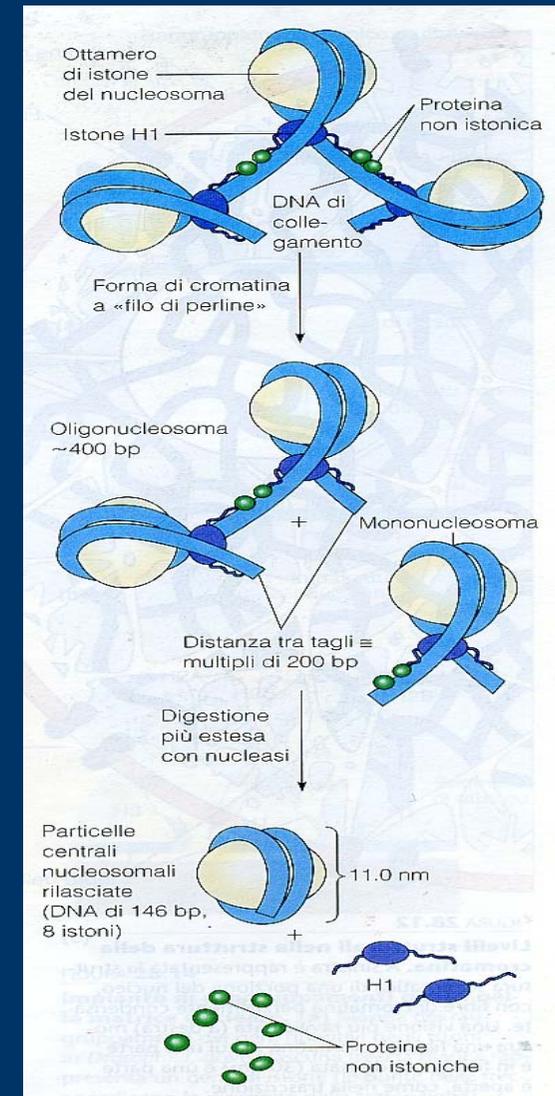
Viene rilasciato dai nucleosomi, quando il DNA linker viene degradato dalle **nucleasi**, ottenendo il **nucleo** del nucleosoma,

l'**H1** è al suo esterno, **vicino** al DNA linker

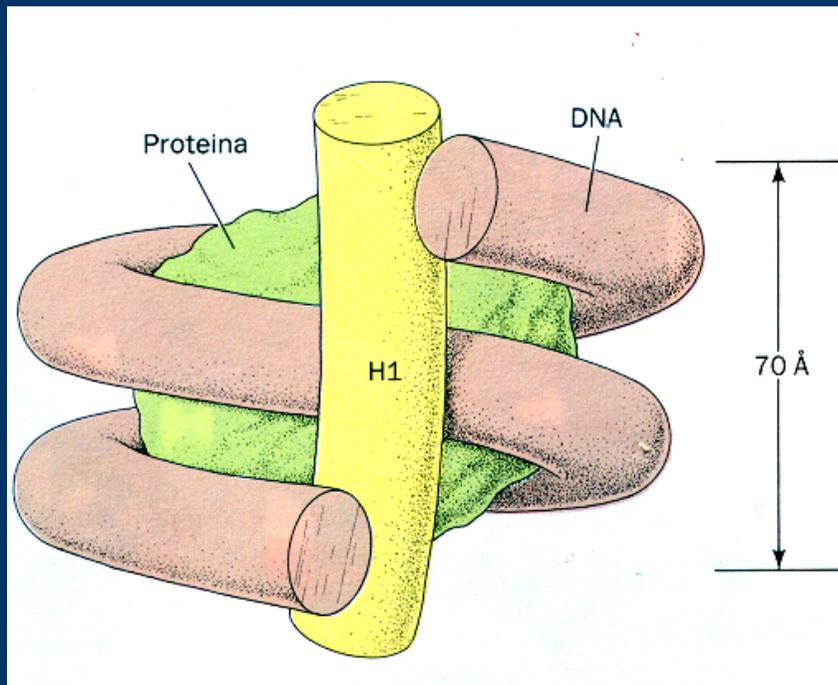
ed interagisce con le subunità **H2A** del nucleo,

é in **in singola copia**,

viene **fosforilato** appena prima della mitosi; fa da ponte tra nucleosomi diversi.

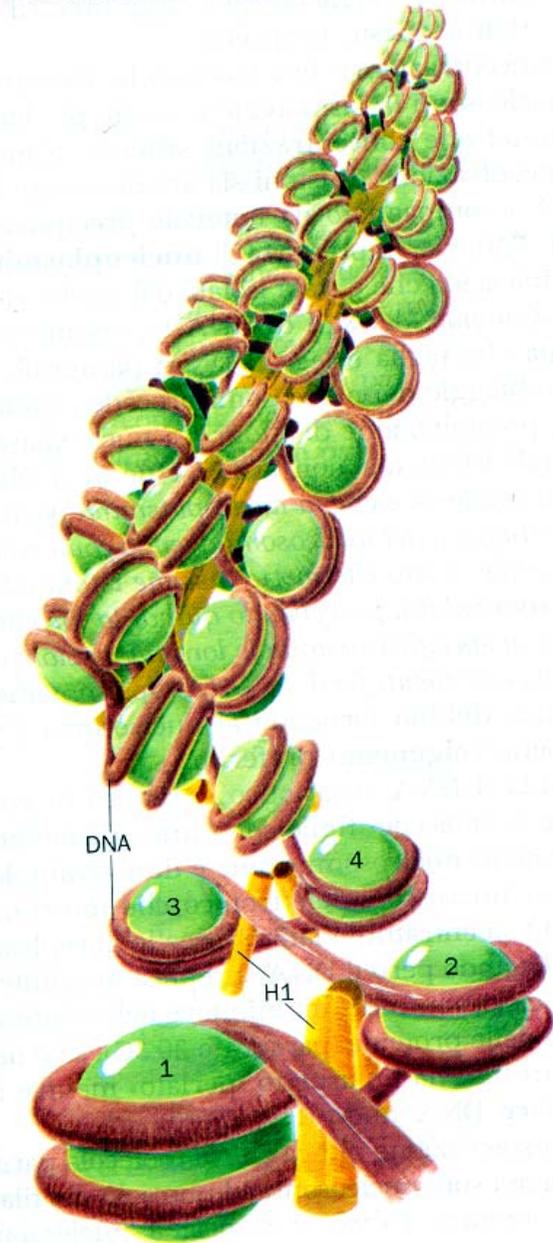


GLI ISTONI



Istone	Numero di residui	Peso molecolare (kD)	% Arg	% Lys	UEP* (x10 ⁻⁶ anni)
H1	215	23,0	1	29	8
H2A	129	14,0	9	11	60
H2B	125	13,8	6	16	60
H3	135	15,3	13	10	330
H4	102	11,3	14	11	600

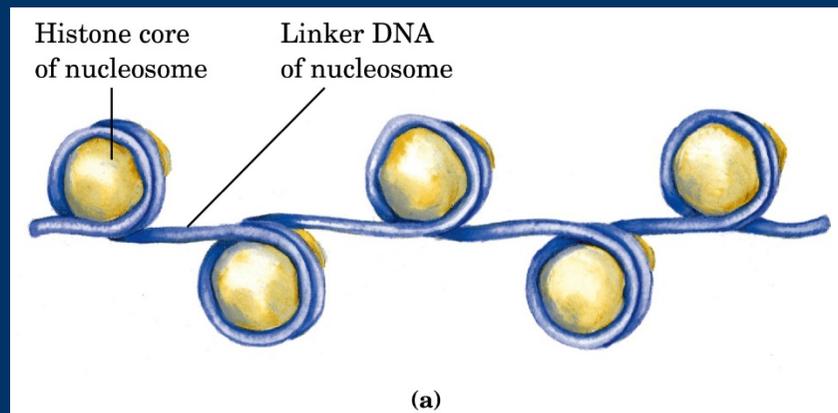
* Unità di Periodo Evoluzionario: il tempo necessario alla sequenza amminoacidica di una proteina per cambiare dell'1% dopo che due specie si sono staccate (paragrafo 6.3B).



IL NUCLEOSOMA

La formazione del nucleosoma rappresenta il primo stadio nella condensazione del DNA;

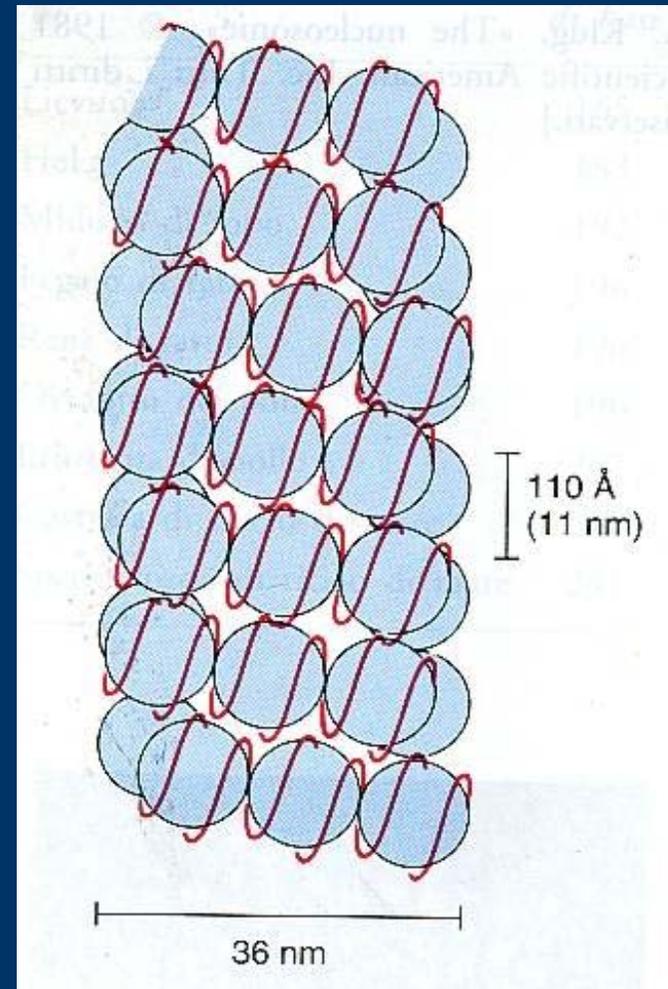
il grado di compattamento del nucleosoma é circa 7.



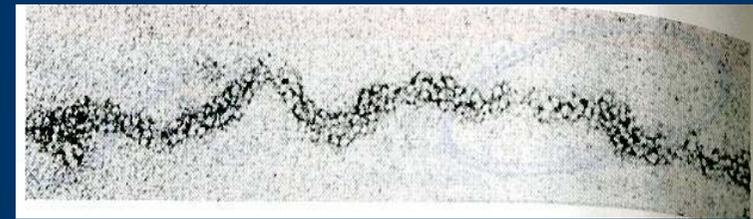
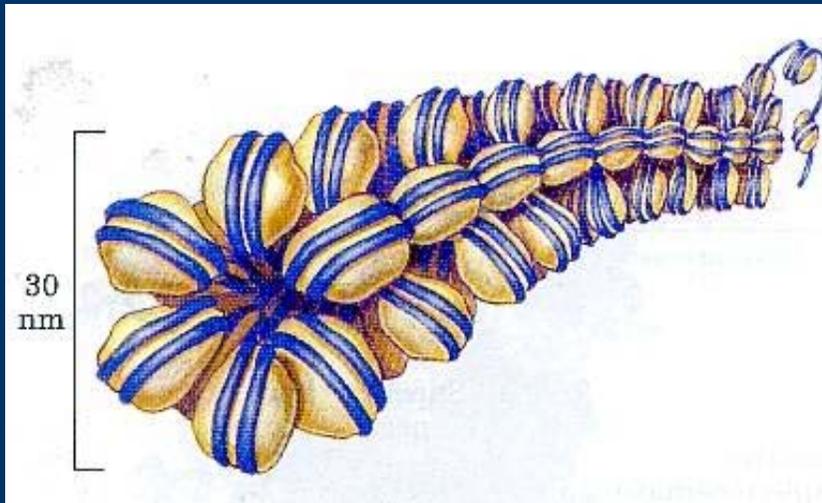
IL MODELLO A SOLENOIDE

I nucleosomi si dispongono ad **elica** (6 nucleosomi per giro dell'elica),

la fibra fornisce al DNA una compattezza di circa **100 volte**.



LA STRUTTURA DELLA FIBRA DI CROMATINA



- Impacchettamento dei nucleosomi nella fibra

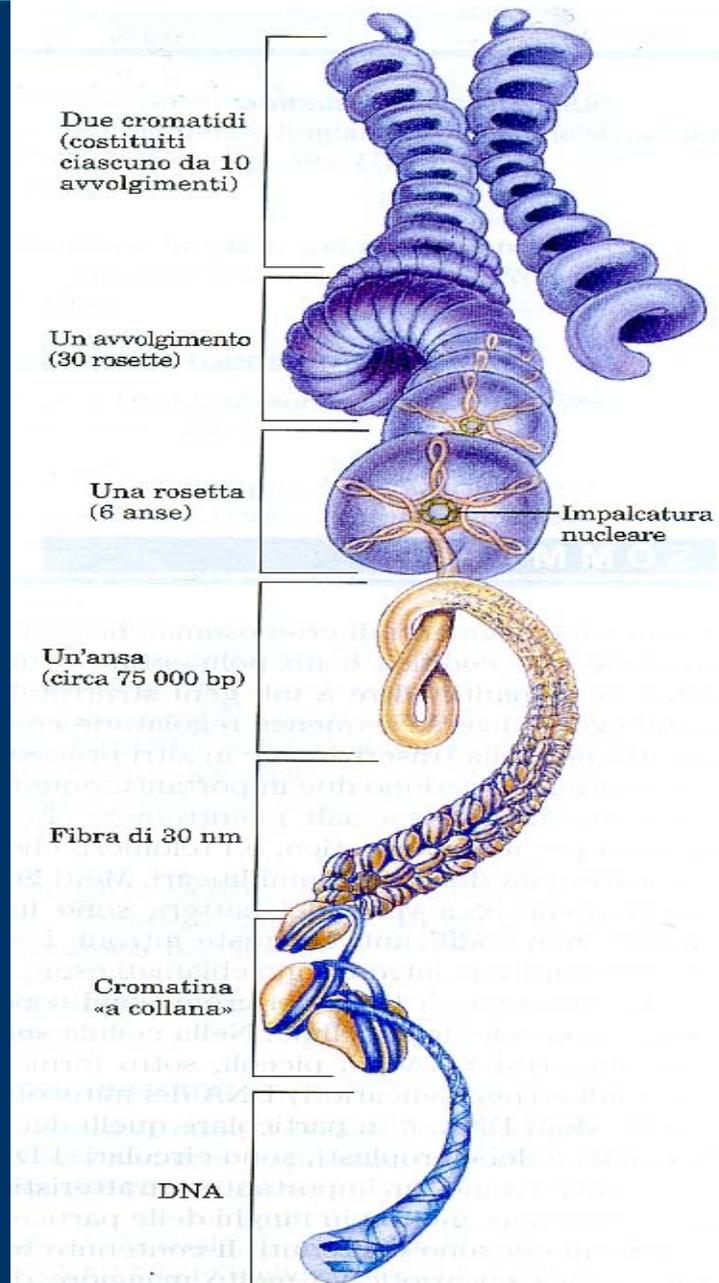
Immagine al M.E. della struttura

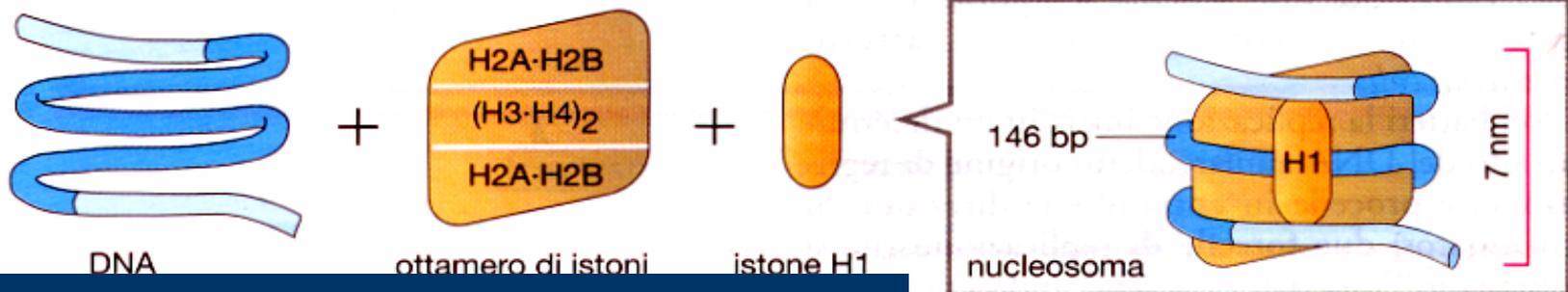
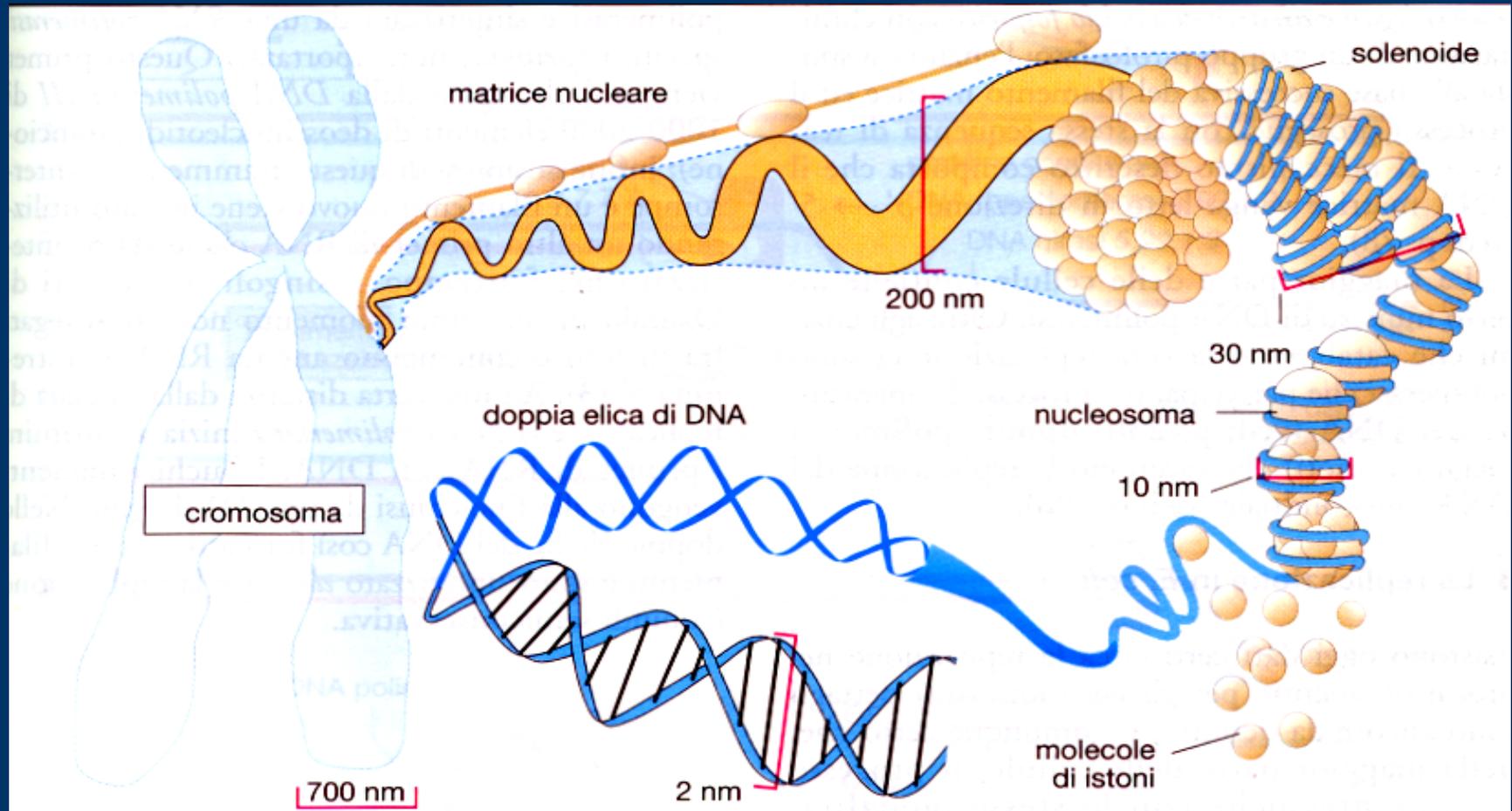
LA CROMATINA

I livelli di organizzazione di un cromosoma eucariotico;

essi sono avvolgimenti, che si sovrappongono ad avvolgimenti già presenti,

probabilmente, una serie di **proteine non istoniche** stabilizza le strutture di ordine superiore ai nucleosomi.





LE PRINCIPALI CARATTERISTICHE DEL DNA BATTERICO

IL DNA BATTERICO

È **altamente** organizzato, ha una struttura terziaria molto compatta,

il DNA di E.coli ha una **sola** molecola a doppia elica circolare,

la cellula è lunga circa **2 μm** , il suo DNA è di **1.7 mm**,

è compattato in una struttura chiamata **nucleoide**, che occupa un'ampia frazione del volume della cellula.

IL DNA BATTERICO

Il DNA **non** è circondato da membrana nucleare,

pare esistere una **impalcatura** che organizza il cromosoma in una serie di regioni ad ansa;

proteine **HU** (tipo istoni) sono in abbondanza, si legano e si dissociano dal DNA nell'arco di pochi minuti, quindi manca una struttura stabile e regolare,

la **struttura dinamica** é dovuta dalla necessità di accesso rapido all'informazione genetica.

**LA REPLICAZIONE, LA
TRASCRIZIONE E LA
SINTESI PROTEICA NEGLI
EUCARIOTI**

LA REPLICAZIONE NELLE CELLULE EUCARIOTICHE

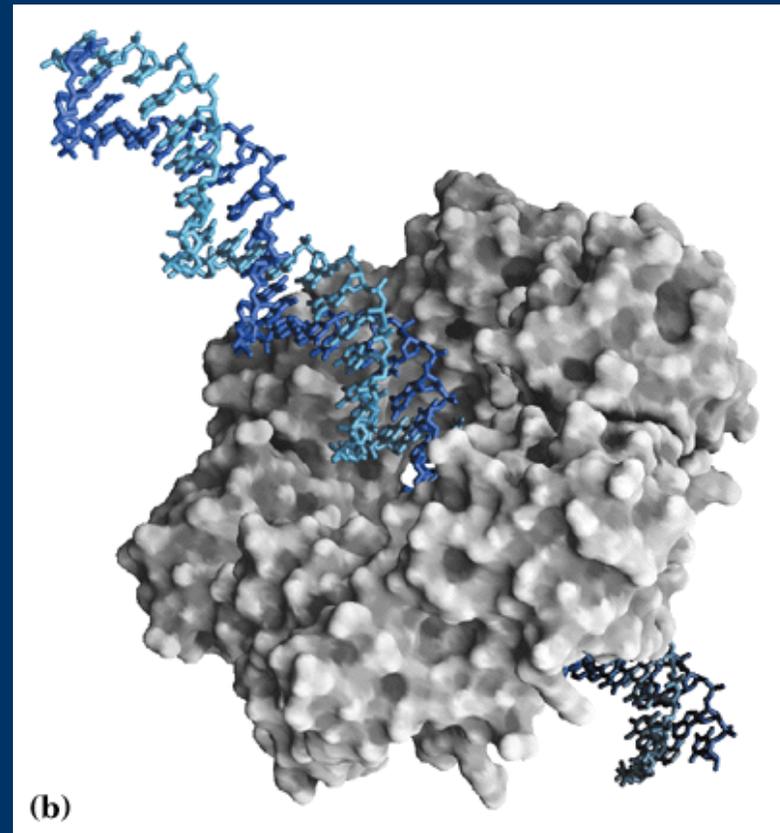
LE CARATTERISTICHE SALIENTI DELLA REPLICAZIONE NEGLI EUCARIOTI

Essa é semiconservativa,

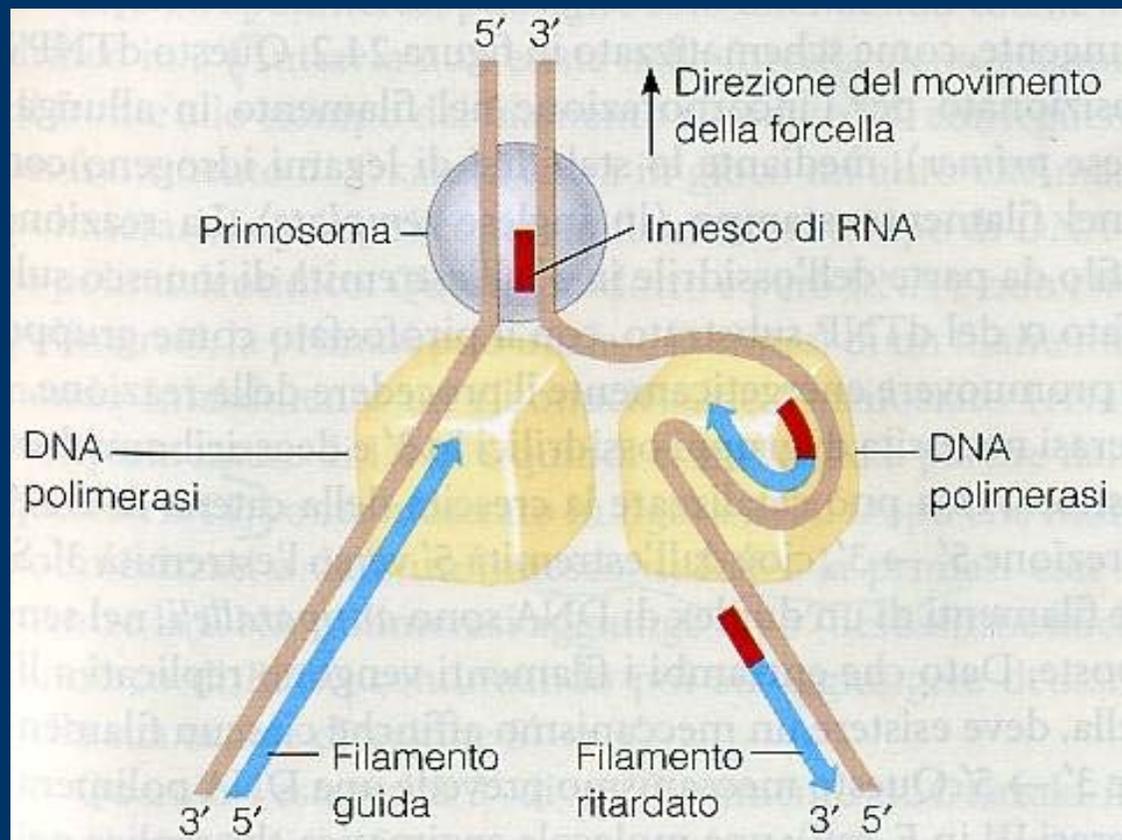
é continua su un filamento e discontinua sull'altro,

necessita del primer,

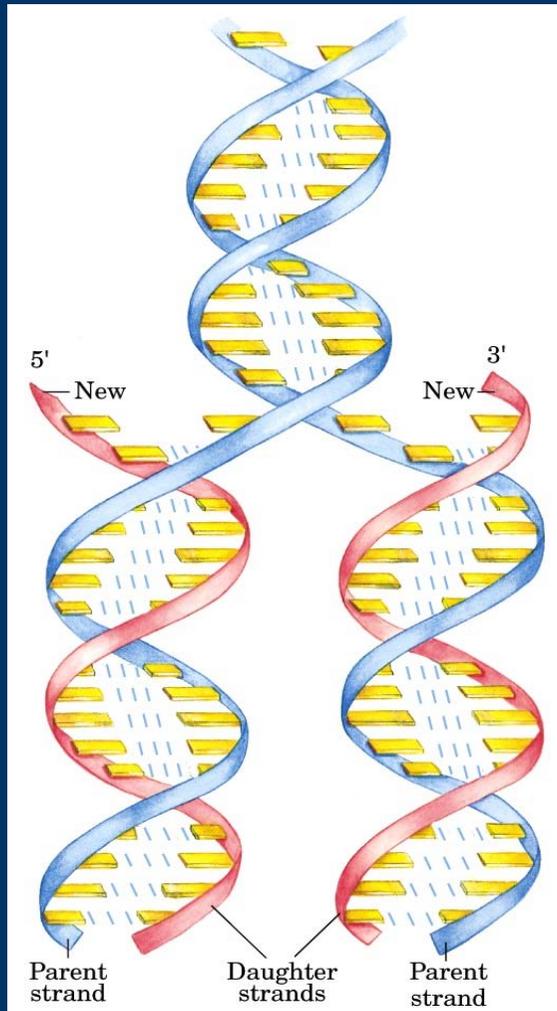
é catalizzata da alcune DNA polimerasi.



LA RAPPRESENTAZIONE DI UNA FORCELLA REPLICATIVA



LA REPLICAZIONE NELLE CELLULE EUCARIOTICHE È PIÙ COMPLESSA RISPETTO A QUELLA DEI PROCARIOTI



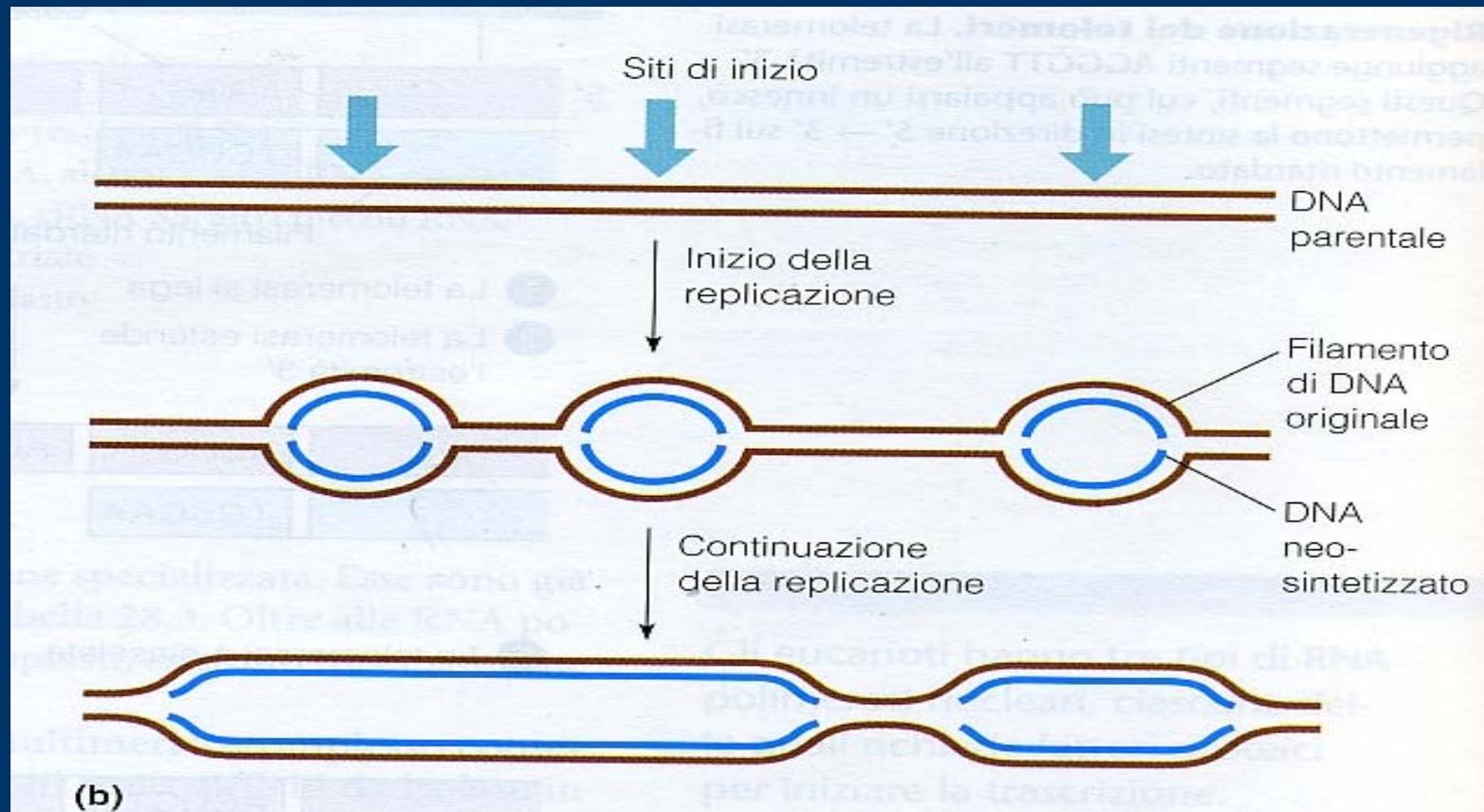
La replicazione negli eucarioti procede bidirezionalmente, a partire da origini multiple che distano da **30'000** a **300'000** coppie di basi tra loro,

l'impiego di **molti punti di innesco** permette una replicazione rapida dell'intero DNA eucariotico, che è molto grande.

L'ATTIVAZIONE DI CIASCUN PUNTO D'INIZIO GENERA DUE FORCHE DI REPLICAZIONE DIVERGENTI.

Le forme ad occhio, espandendosi, si fondono a formare le molecole figlie;

un cromosoma di lievito contiene circa 400 siti d'inizio.



I NUCLEOSOMI DEL DNA PARENTALE SI DISSOCIANO ALL'AVVICINARSI DELLA FORCELLA REPLICATIVA E SI RIFORMANO SULLE MOLECOLE FIGLIE NEOSINTETIZZATE

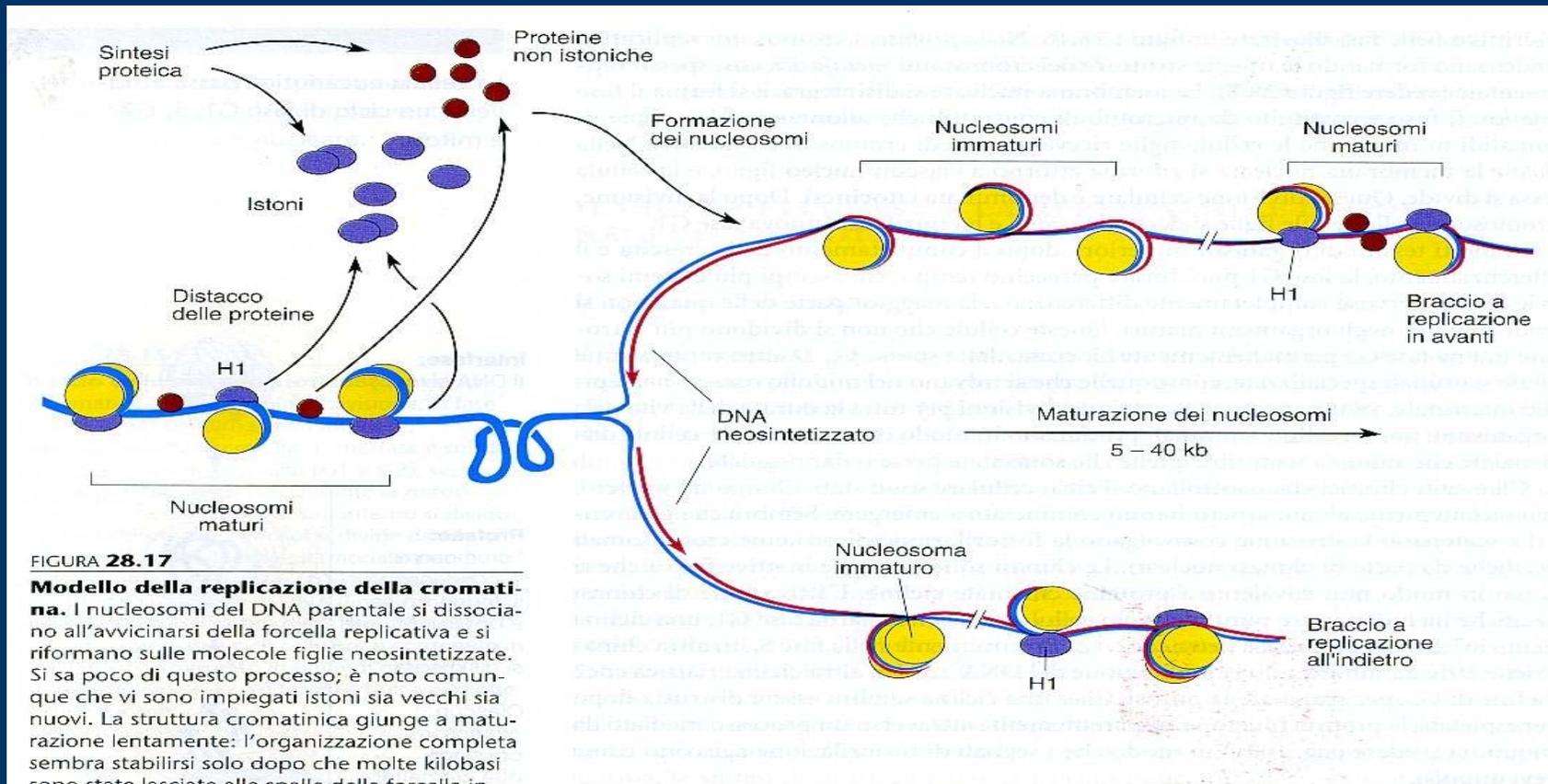


FIGURA 28.17

Modello della replicazione della cromatina. I nucleosomi del DNA parentale si dissociano all'avvicinarsi della forcella replicativa e si riformano sulle molecole figlie neosintetizzate. Si sa poco di questo processo; è noto comunque che vi sono impiegati istoni sia vecchi sia nuovi. La struttura cromatinica giunge a maturazione lentamente: l'organizzazione completa sembra stabilirsi solo dopo che molte kilobasi sono state lasciate alle spalle della forcella in

Sono utilizzati **istoni** sia vecchi sia nuovi, la struttura cromatinica matura **lentamente**: i nucleosomi maturi sono formati a **molte kilobasi** di distanza dalla forcella in movimento.

LA DISSOCIAZIONE E L'ASSEMBLAGGIO DEI NUCLEOSOMI

L'apparato replicativo procede attraverso la struttura nucleosomiale che deve essere **smantellata e ricostruita** nelle molecole figlie del DNA,

per questo motivo, la velocità della forcella replicativa è circa **10** volte più bassa negli eucarioti rispetto ai procarioti;

istoni vecchi e nuovi sono **distribuiti** in entrambi i filamenti figli.

L'ASSEMBLAGGIO DEI NUCLEOSOMI

Negli ottameri dei filamenti figli (costituiti da istoni vecchi e nuovi) i tetrameri $(H3/H4)_2$ e i dimeri $H2A/H2B$ tendono a rimanere intatti,

il rimescolamento **non** é quindi del tutto casuale;

un tipico cromosoma di mammifero contiene approssimativamente 10^8 paia di basi,

in ognuno le **origini della replicazione** sono parecchie migliaia.

Le DNA POLIMERASI EUCARIOTICHE

Sono presenti **cinque** diverse DNA polimerasi:

α , δ , ϵ replicano il DNA cromosomiale,

β ripara il DNA e si dissocia dallo stampo, dopo ogni inserimento di nucleotide,

γ replica il DNA mitocondriale.

LE DNA POLIMERASI EUCARIOTICHE

	α	β	γ	δ	ϵ
Sito	nucleo	nucleo	Mitocondrio	nucleo	nucleo
Primasi associata	si	no	no	no	no
Funzione	Rep. filamento lento	Riparaz. DNA	Rep. DNA mit.	Rep. filamento guida	Rep.
N° subunità	4	1	4	2	?
K_M	2-5	10	0.5	2-4	?
3'-5' esonucleasica	no	no	si	si	si

LE DNA POLIMERASI DEGLI EUCARIOTI

	α	β	γ	δ	ϵ
Processività (intrinseca)	moderata	bassa	elevata	bassa	elevata
Processività con PCNA	moderata	bassa	elevata	elevata	elevata
Sensibilità a 2'-3'-ddNTP	bassa	elevata	elevata	bassa	moderata
Sensibilità a arabinosil-CTP	elevata	bassa	bassa	elevata	?
Sensibilità a afidilcolina	elevata	bassa	bassa	elevata	elevata

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA).

LE DNA POLIMERASI DEGLI EUCARIOTI

La polimerasi α ha l'attività primasica in una sua subunità;

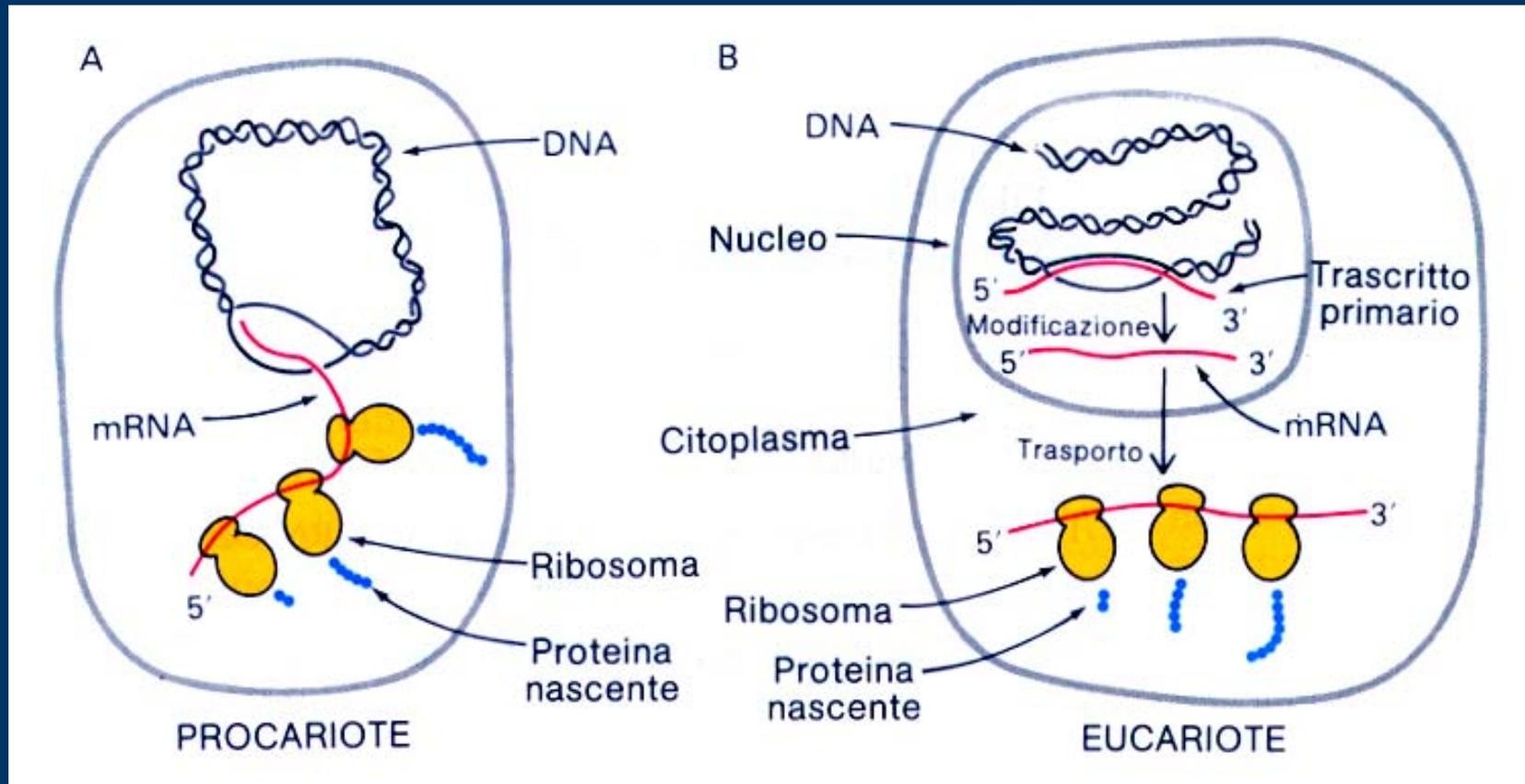
la polimerasi δ richiede una proteina aggiuntiva chiamata **Antigene Nucleare delle Cellule Proliferanti** (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA),

il suo ruolo ricorda quello della subunità β della DNA polim. III di E.coli: aumenta notevolmente la **processività** della polimerasi,

probabilmente é la **principale polimerasi** del filamento guida.

LA TRASCRIZIONE NELLE CELLULE EUCARIOTICHE

LA TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI



La separazione spaziale e temporale della trascrizione e della traduzione consente agli eucarioti di regolare l'espressione genica in modo molto più fine e coordinato.

LA TRASCRIZIONE NELLE CELLULE EUCARIOTICHE

Essa é un processo **molto** complesso,

c'è una netta **discriminazione** tra ciò che deve e non deve essere trascritto;

é **programmata** in modo preciso durante lo sviluppo,

vi partecipano diverse **RNA polimerasi multimeriche**, ognuna con una funzione specializzata.

LE RNA POLIMERASI EUCARIOTICHE

POLIMERASI	LOCALIZZAZIONE	RNA SINTETIZZATI
I	Nucleo	Pre-rRNA (escluso il 5S)
II	Nucleo	Pre-mRNA, piccoli snRNA
III	Nucleo	Pre-tRNA, rRNA 5S, altri piccoli RNA
MITOCONDRIALE	Mitocondrio	Mitocondriale
DI CLOROPLASTO	Cloroplasto	Di cloroplasto

LE RNA POLIMERASI EUCARIOTICHE

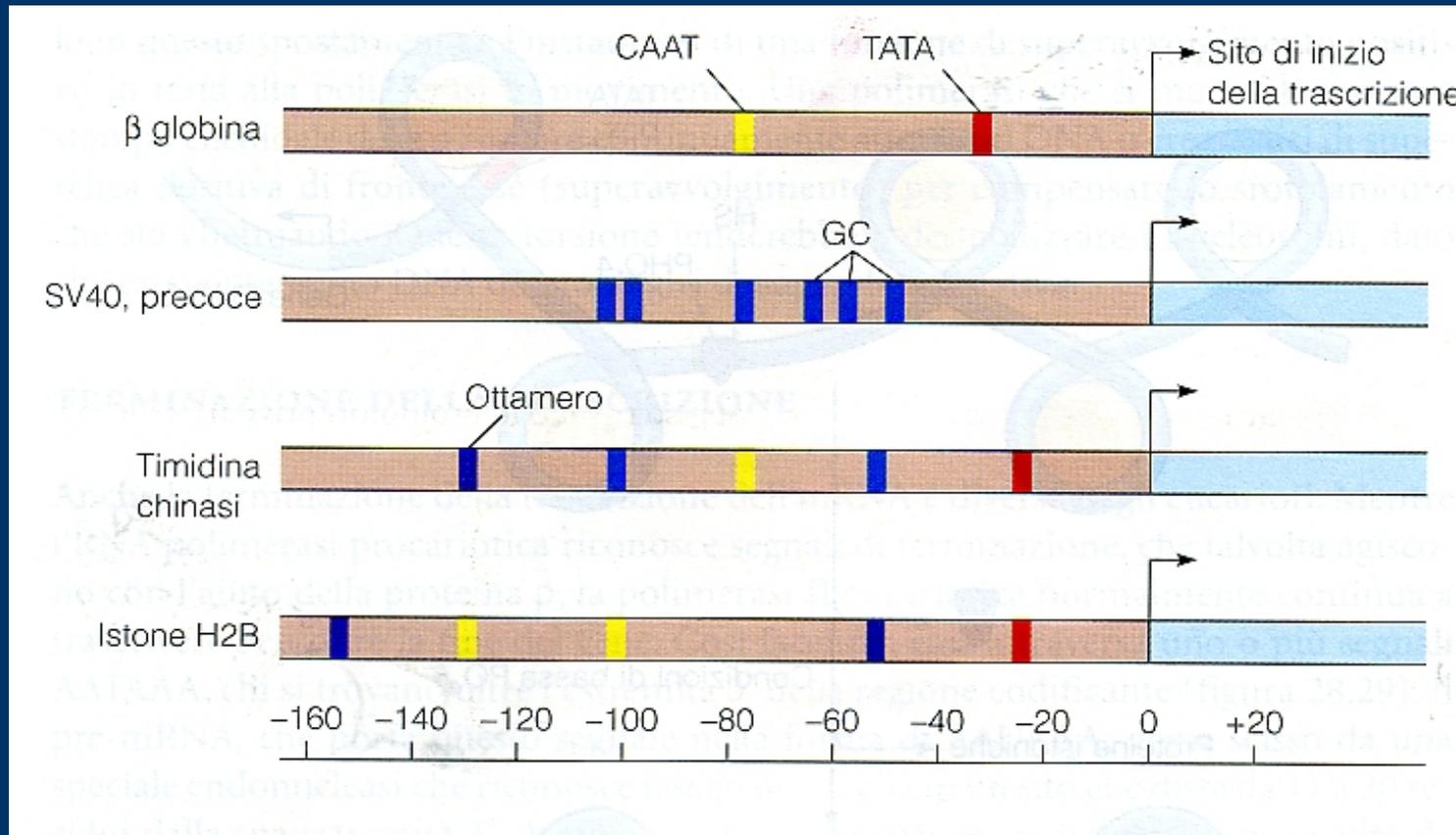
La RNA pol. I trascrive i principali geni ribosomiali,

la RNA pol. II trascrive i geni strutturali ed alcuni geni per i piccoli RNA,

la RNA pol. III trascrive i geni dei piccoli RNA;

ciascuna di esse richiede propri fattori di trascrizione.

LA STRUTTURA DI ALCUNI TIPICI PROMOTORI EUCARIOTICI

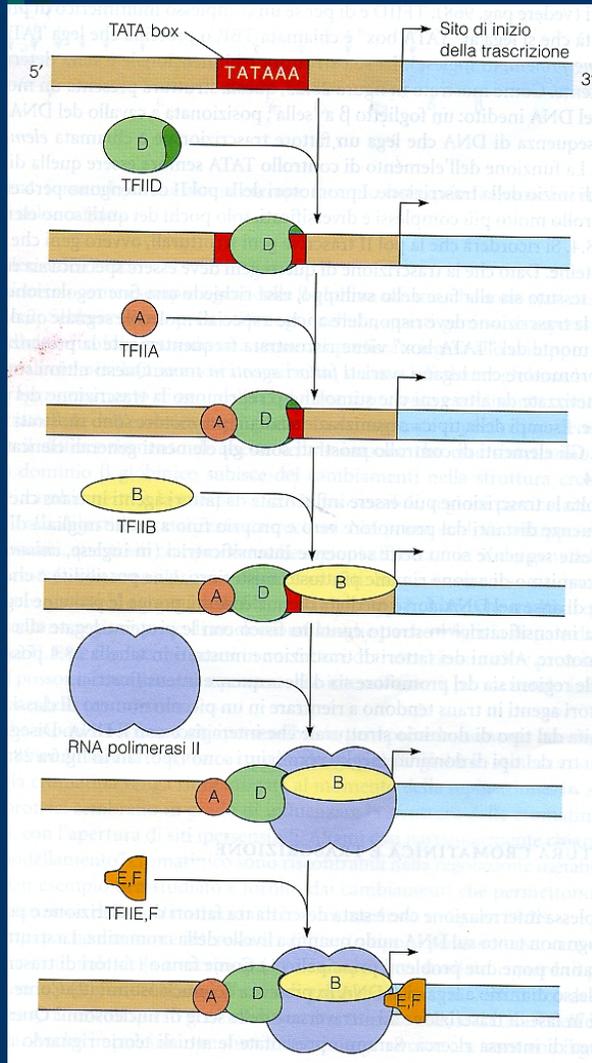
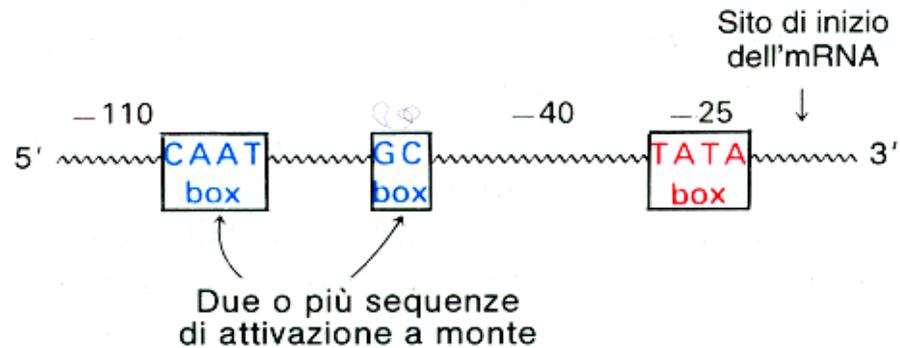


I FATTORI DI TRASCRIZIONE

Tutti gli enzimi richiedono fattori proteici aggiuntivi (**fattori di trascrizione**), per potersi legare ai promotori ed iniziare la trascrizione,

questi fattori hanno quindi un ruolo fondamentale nel determinare la **selettività** di questo processo.

I PROMOTORI EUCARIOTICI ED I FATTORI DI TRASCRIZIONE



La regione **TATAbox** è necessaria ma non sufficiente per funzionare come promotore. Molti promotori di eucarioti contengono infatti una **CAATbox** e una **GCbox**, in particolare **GCbox** è quasi sempre presente nei geni costitutivi.

I fattori di trascrizione sono necessari all'inizio della trascrizione da parte delle RNA polimerasi. Ad es. vi sono almeno sette **TFII** (D, A, B, E, F, H, J) che legano la TATAbox e formano un complesso con la RNA polimerasi II chiamato **apparato trascrizionale di base**.

LE SEQUENZE STIMOLATRICI (ENHANCER)

Le sequenze enhancer influenzano **fortemente** l'attività di molti promotori eucariotici, ma **non** sono promotori,

non è importante la loro distanza e l'orientamento rispetto al sito di inizio della trascrizione,

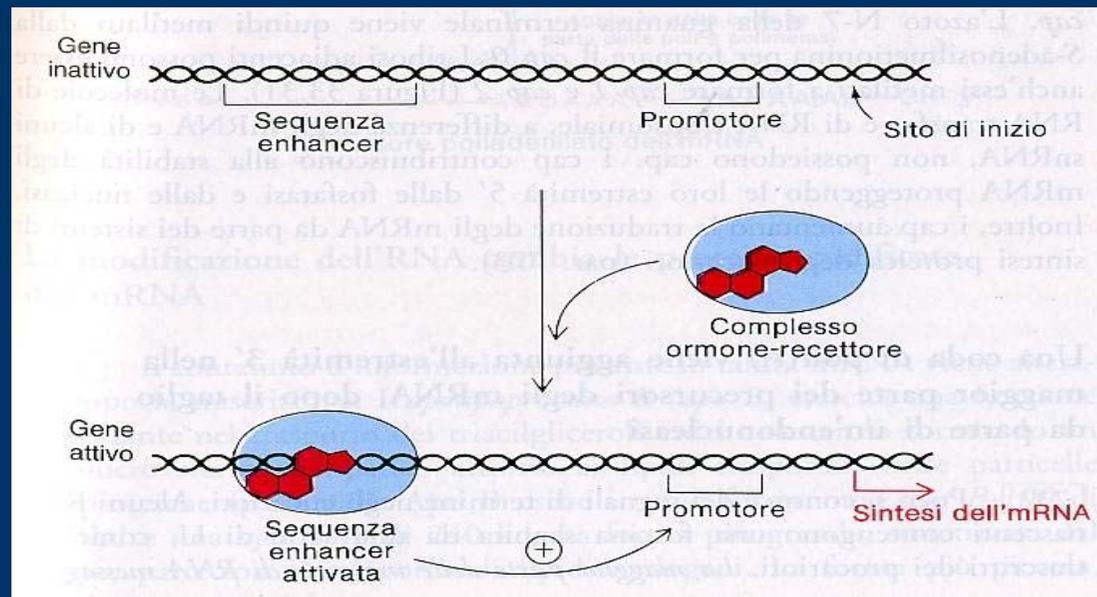
possono **trovarsi** a monte, a valle, o anche all'interno del gene trascritto,

esse sono efficaci sia che si trovino sul **filamento stampo**, sia su quello che **codifica**,

ad esse **si legano** diversi fattori di trascrizione ed altre proteine.

LE SEQUENZE ENHANCER

Esse hanno, ad esempio, un ruolo fondamentale nella mediazione degli ormoni steroidei come i **glucocorticoidi** (che aumentano la gluconeogenesi e la sintesi del glicogeno); l'ormone si lega ad un recettore proteico solubile.



Questo complesso riconosce sequenze enhancer mettendole in grado di stimolare la trascrizione di geni che rispondono a questi ormoni. L'**azione** di queste sequenze richiede proteine che sono espresse **solo** in alcune cellule.

LE SEQUENZE ENHANCER

La formazione di **un'ansa**, mediata da proteine regolatrici, pone le proteine della sequenza enhancer vicine a quelle della regione del promotore,

gli enhancer agiscono da **punto d'attacco** per la costruzione di complessi d'inizio per **l'RNA polimerasi II** e permette loro di accedere a geni specifici;

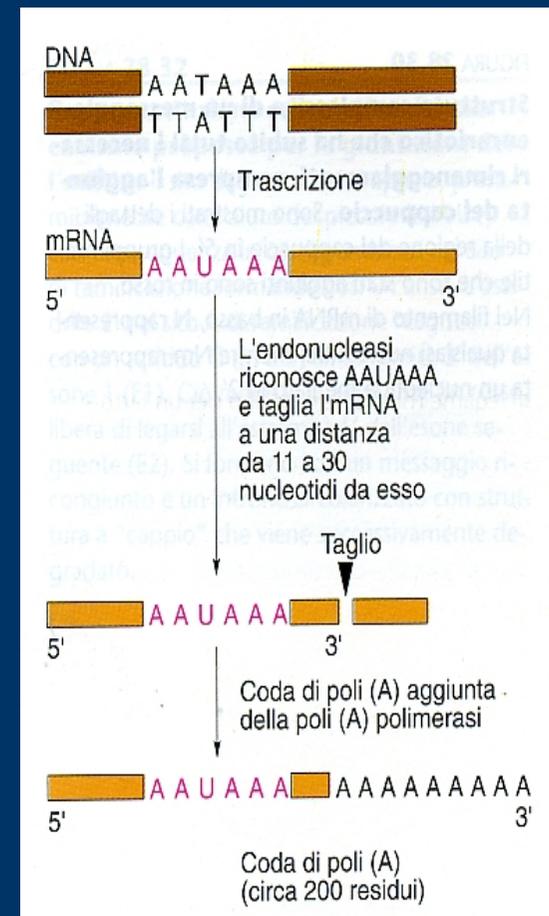
i fattori di trascrizione e le altre proteine che si legano a queste sequenze possono essere considerati **parole d'ordine** che aprono in modo cooperativo **serrature multiple**, permettendo **all'RNA polimerasi** di accedere a geni specifici.

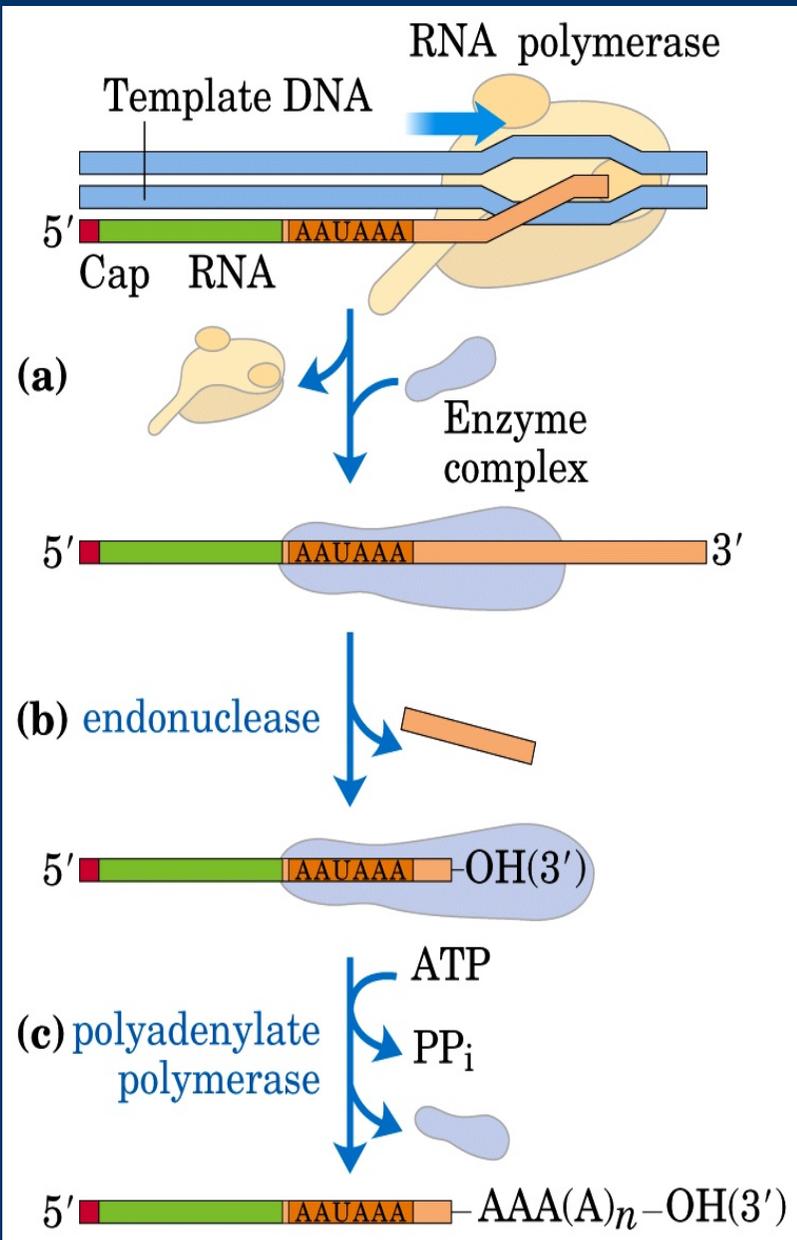
LA TERMINAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

La RNA polimerasi II eucariotica normalmente continua a trascrivere **oltre** la fine del gene,

così, attraversa uno o più segnali che si trovano oltre l'estremità 3' della regione codificante;

il pre-mRNA, che porta anch'esso il segnale, viene scisso da una speciale **endonucleasi**.





LA TERMINAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

L'endonucleasi riconosce le sequenze segnale, stimola la scissione e la regolazione della lunghezza della coda di poli(A):

l'RNA viene scisso in una posizione che dista 10-30 nucleotidi da AAUAAA in direzione 3',

una speciale polimerasi sintetizza una coda di poli(A) lunga circa 200 basi, a partire dal sito di scissione.

LA MATURAZIONE DELL'mRNA

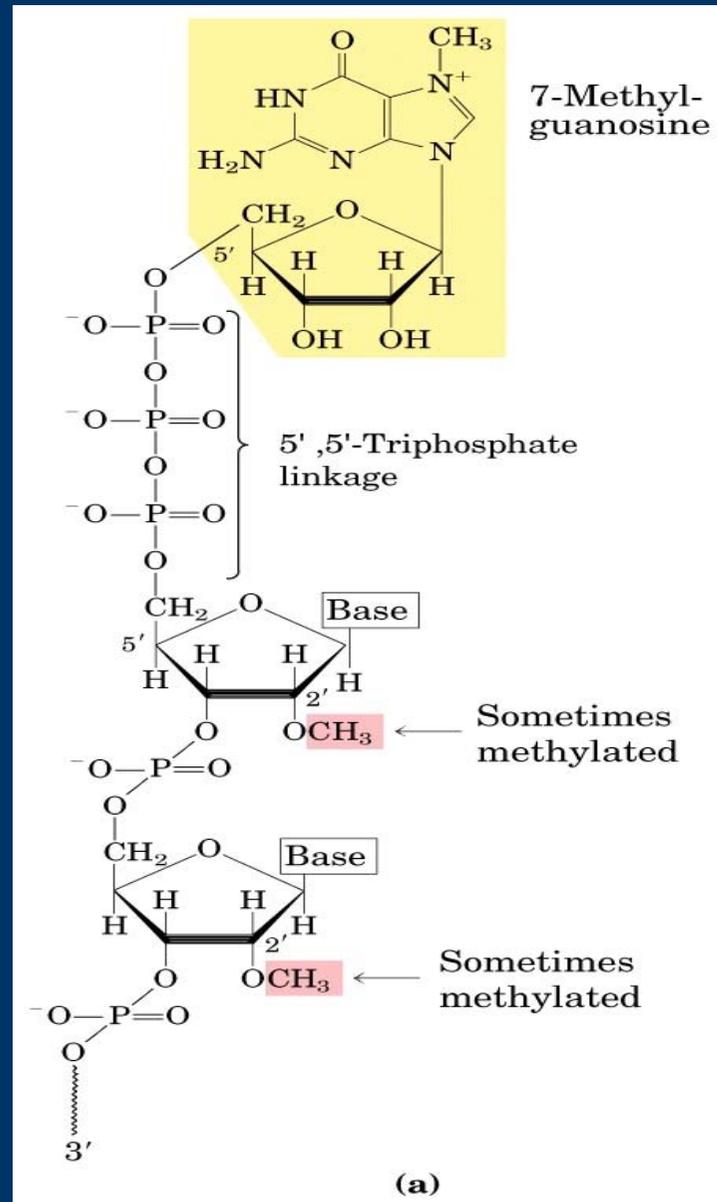
Negli eucarioti, l'mRNA viene prodotto nel nucleo e deve essere **esportato** nel citosol per la traduzione;

il **pre-mRNA** deve subire il processo di **splicing** ed altri **rimaneggiamenti** che avvengono mentre l'mRNA è **ancora** nel nucleo.

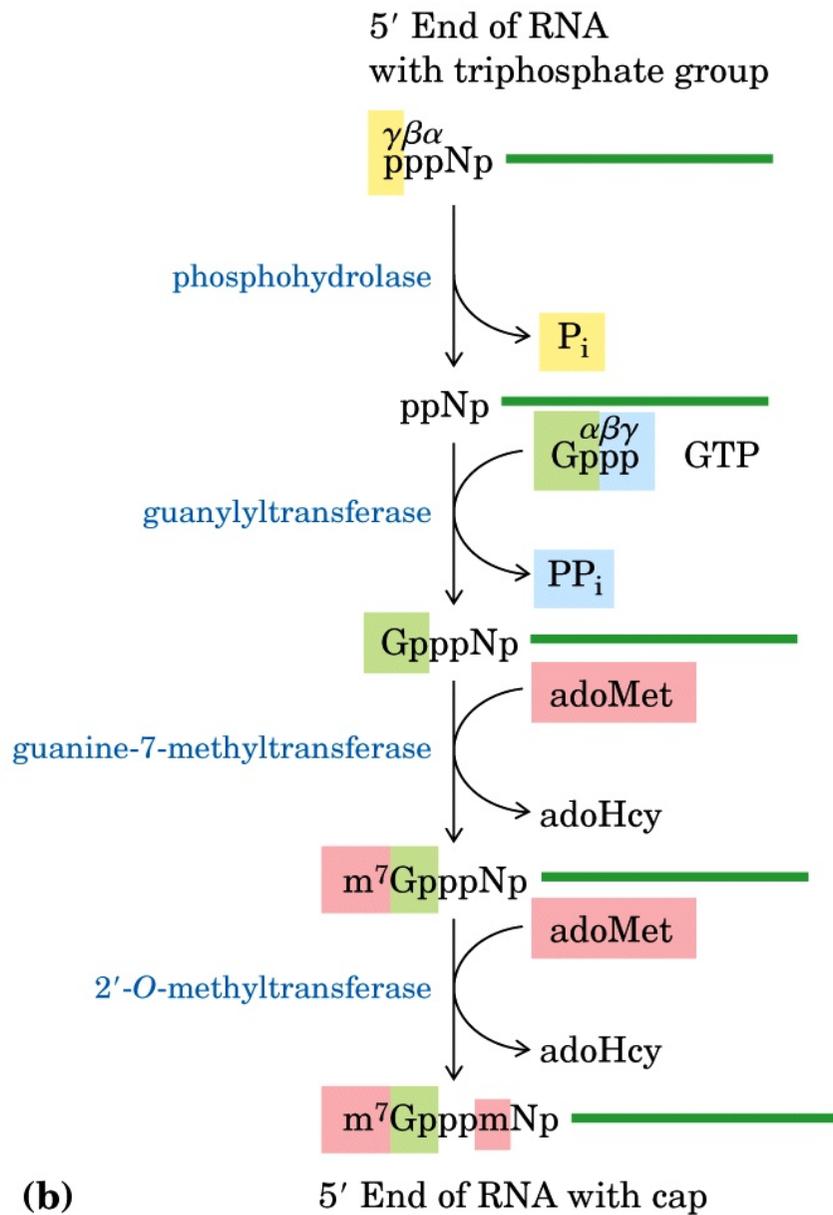
L'AGGIUNTA DEL CAPPuccio

La 7-metilguanosa viene unita all'estremità 5' di quasi tutti gli mRNA eucariotici,

assieme ai primi 2 nucleotidi della catena costituisce il **cappuccio (CAP)**.



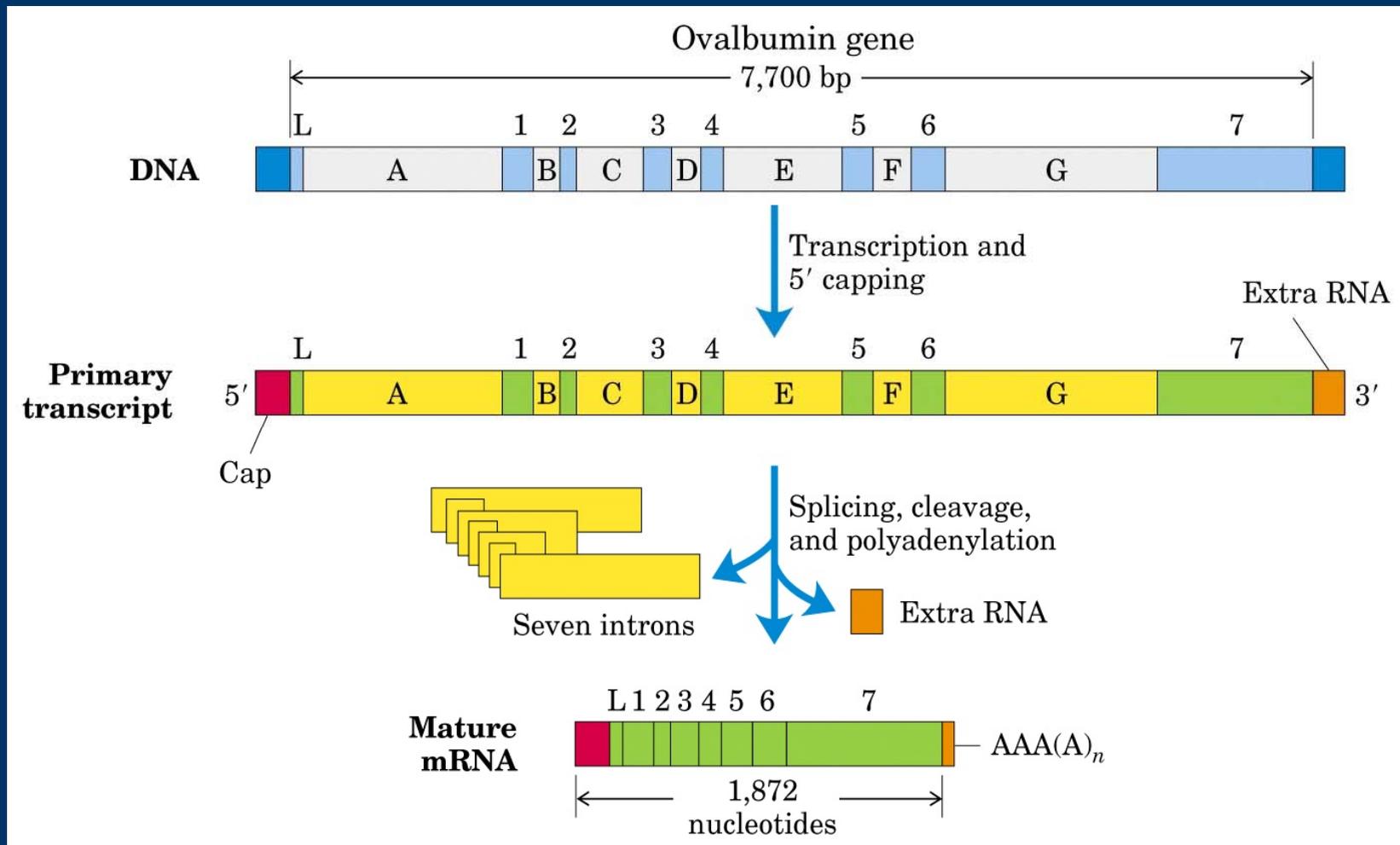
L'AGGIUNTA DEL CAPPuccio



Il cap serve al **posizionamento** dell'mRNA sul ribosoma per la traduzione e probabilmente contribuisce a **proteggere** l'mRNA dalla degradazione enzimatica.

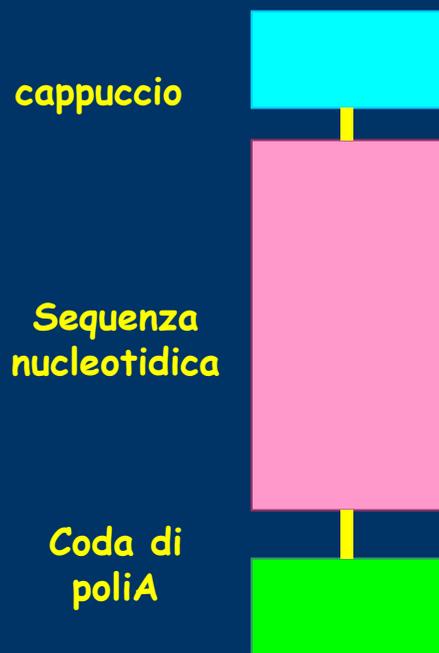
adoMet = S-adenosil-metionina

LO SCHEMA COMPLESSIVO DELLE MODIFICAZIONI POST-TRASCRIZIONALI DI UN mRNA EUCARIOTICO



LE MODIFICAZIONI POST-TRASCRIZIONALI

La struttura di un mRNA eucariotico maturo é ottenuto dopo i seguenti riarrangiamenti:



splicing

aggiunta di una coda di poliA
(all'estremitá 3'),

aggiunta di un cappuccio
(all'estremitá 5').

LA SINTESI PROTEICA NELLE CELLULE EUCARIOTICHE

LE DIFFERENZE NELLA SINTESI PROTEICA TRA PROCARIOTI ED EUCARIOTI

La traduzione dell'mRNA in proteina negli eucarioti è sostanzialmente **lo stesso** che nei procarioti,

l'inizio è però più complesso e richiede **più fattori proteici**,

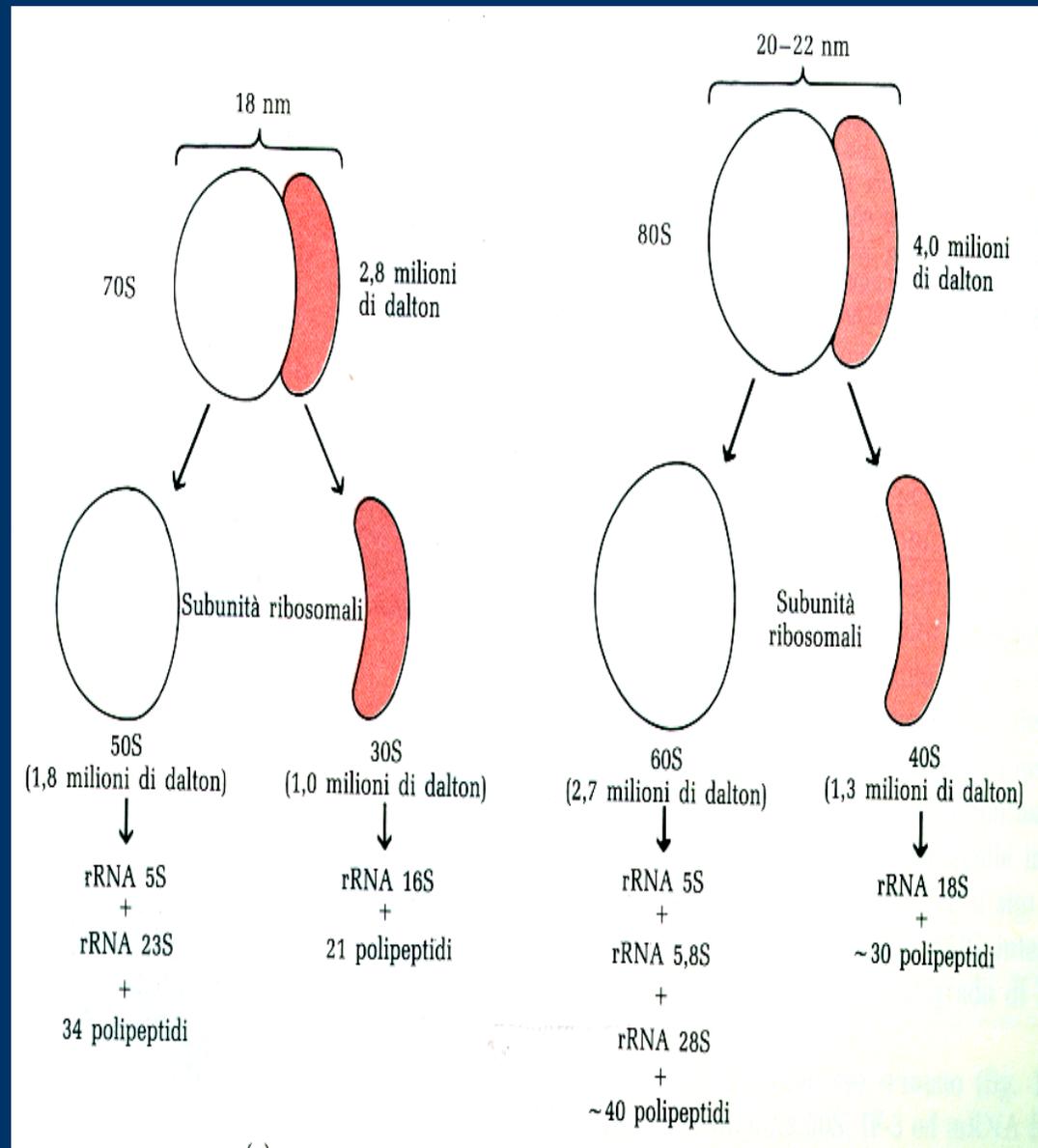
la regolazione è più importante.

LE DIFFERENZE NELLA SINTESI PROTEICA TRA PROCARIOTI ED EUCARIOTI

I RIBOSOMI

I ribosomi eucariotici sono costituiti da una subunità **60S** e una **40S** associate a formare un grande complesso **80S**.

L'**rRNA 18S** è omologo all'**rRNA 16S** dei procarioti, così come il **5S** e il **28S** sono la controparte del **5S** e del **23S** dei procarioti.



LE DIFFERENZE NELLA SINTESI PROTEICA TRA PROCARIOTI ED EUCARIOTI

I FATTORI PROTEICI

Il fattore di inizio **eIF2** porta MET-tRNA_i alla subunità ribosomiale 40S.

L'**EF2** degli eucarioti media la traslocazione guidata dall'ATP in modo molto simile all'**EF-G** dei procarioti.

Fattore procariotico	Fattore eucariotico	Funzione
Fattori di inizio		
IF1		Coinvolti nella formazione del complesso di inizio
IF2	eIF2	
IF3	eIF3, eIF4C	
	CBP1	Coinvolti nel legame del cappuccio
	eIF4A, eIF4B, eIF4F	Coinvolto nella ricerca del primo AUG
	eIF5	Aiuta nella dissociazione di eIF2, eIF3, eIF4C
	eIF6	Aiuta nella dissociazione della subunità 60S dai ribosomi inattivi
Fattori di allungamento		
EF-Tu	eEF1 α	Rifornimento di aminoacil tRNA ai ribosomi
EF-Ts	eEF1 $\beta\gamma$	Aiuta nel riciclo del fattore precedente
EF-G	eEF2	Fattore di traslocazione
Fattori di rilascio		
RF1	eRF	Rilascio della catena polipeptidica completa
RF2		
RF3		

LE DIFFERENZE NELLA SINTESI PROTEICA TRA PROCARIOTI ED EUCARIOTI

table 27-9

Protein Factors Required for Initiation of Translation in Bacterial and Eukaryotic Cells

Bacterial

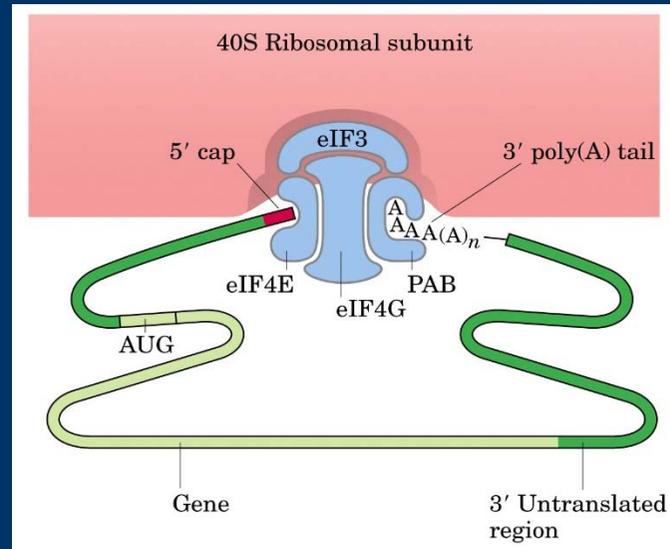
Factor	Function
IF-1	Prevents premature binding of tRNAs to A site
IF-2	Facilitates binding of fMet-tRNA ^{fMet} to 30S ribosomal subunit
IF-3	Binds to 30S subunit; prevents premature association of 50S subunit; enhances specificity of P site for fMet-tRNA ^{fMet}

Eukaryotic

Factor*	Function
eIF2	Facilitates binding of initiating Met-tRNA ^{Met} to 40S ribosomal subunit
eIF2B, eIF3	First factors to bind 40S subunit; facilitate subsequent steps
eIF4A	RNA helicase activity removes secondary structure in the mRNA to permit binding to 40S subunit; part of the eIF4F complex
eIF4B	Binds to mRNA; facilitates scanning of mRNA to locate the first AUG
eIF4E	Binds to the 5' cap of mRNA; part of the eIF4F complex
eIF4G	Binds to eIF4E and to poly(A) binding protein (PAB); part of the eIF4F complex
eIF5	Promotes dissociation of several other initiation factors from 40S subunit as a prelude to association of 60S subunit to form 80S initiation complex
eIF6	Facilitates dissociation of inactive 80S ribosome into 40S and 60S subunits

*The prefix "e" identifies these as eukaryotic factors.

LA SINTESI PROTEICA: L'INIZIO



L'inizio richiede **9 proteine** (alcune multimeriche) invece delle sole **3** necessarie nei procarioti; sono coinvolte anche proteine che legano il cap (**CBP**).

alcuni fattori d'inizio si legano alle subunità ribosomiali, altri all'mRNA,

il fattore d'inizio **eIF4A**, un complesso di proteine, riconosce la struttura a cappuccio dell'estremità 5' dell'mRNA e vi si lega.

LA SINTESI PROTEICA: L'INIZIO



LA SINTESI PROTEICA: L'INIZIO

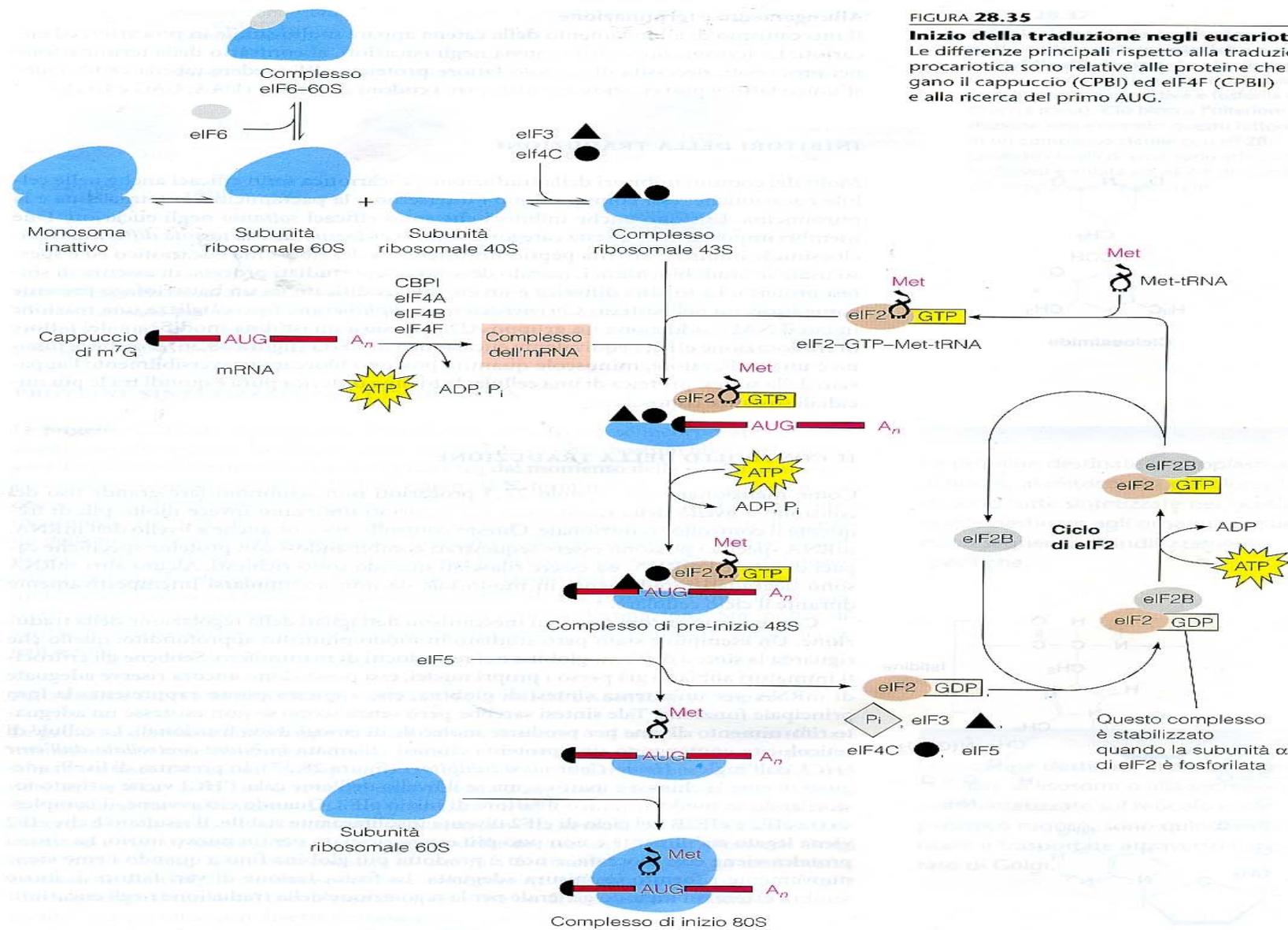


FIGURA 28.35

Inizio della traduzione negli eucarioti.
Le differenze principali rispetto alla traduzione procariotica sono relative alle proteine che legano il cappuccio (CPB1) ed eIF4F (CPBII) e alla ricerca del primo AUG.

LA SINTESI PROTEICA: L'INIZIO

eIF2, il principale fattore d'inizio, forma un complesso con il primo tRNA,

esso viene alla fine riciclato tramite uno scambio ciclico **GDP-GTP**, chiamato **ciclo di eIF2** (che richiede il fattore **IF2B**);

il codon di inizio è **AUG**.

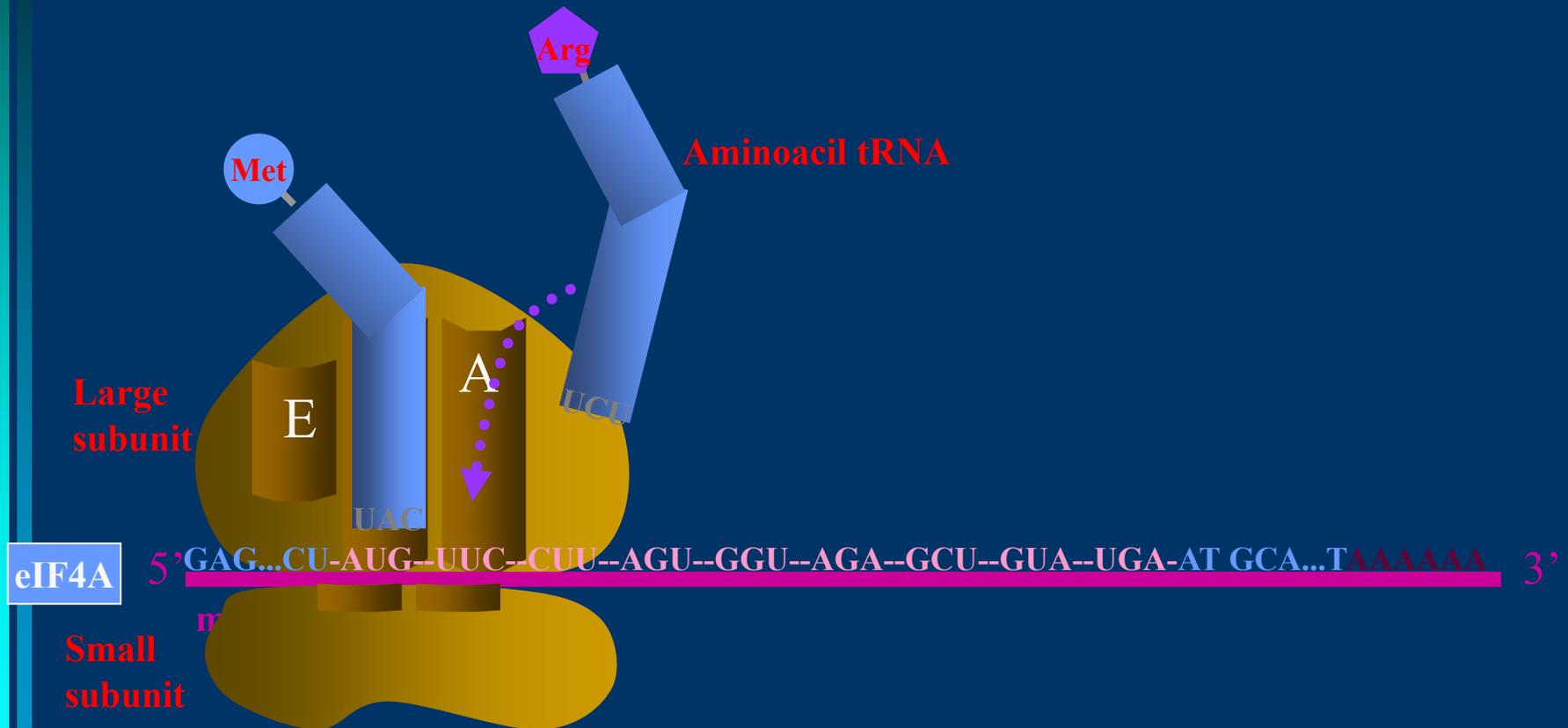
LA SINTESI PROTEICA: L'INIZIO

L'mRNA viene **allineato** correttamente sulla subunità **40S** tramite il cappuccio in 5',

la subunità ribosomiale 40S **scorre** lungo l'mRNA fino al primo **AUG** (la metionina non é formilata),

sono rilasciati i fattori di inizio, viene ad aggiungersi la subunità 60S ed **inizia** la traduzione.

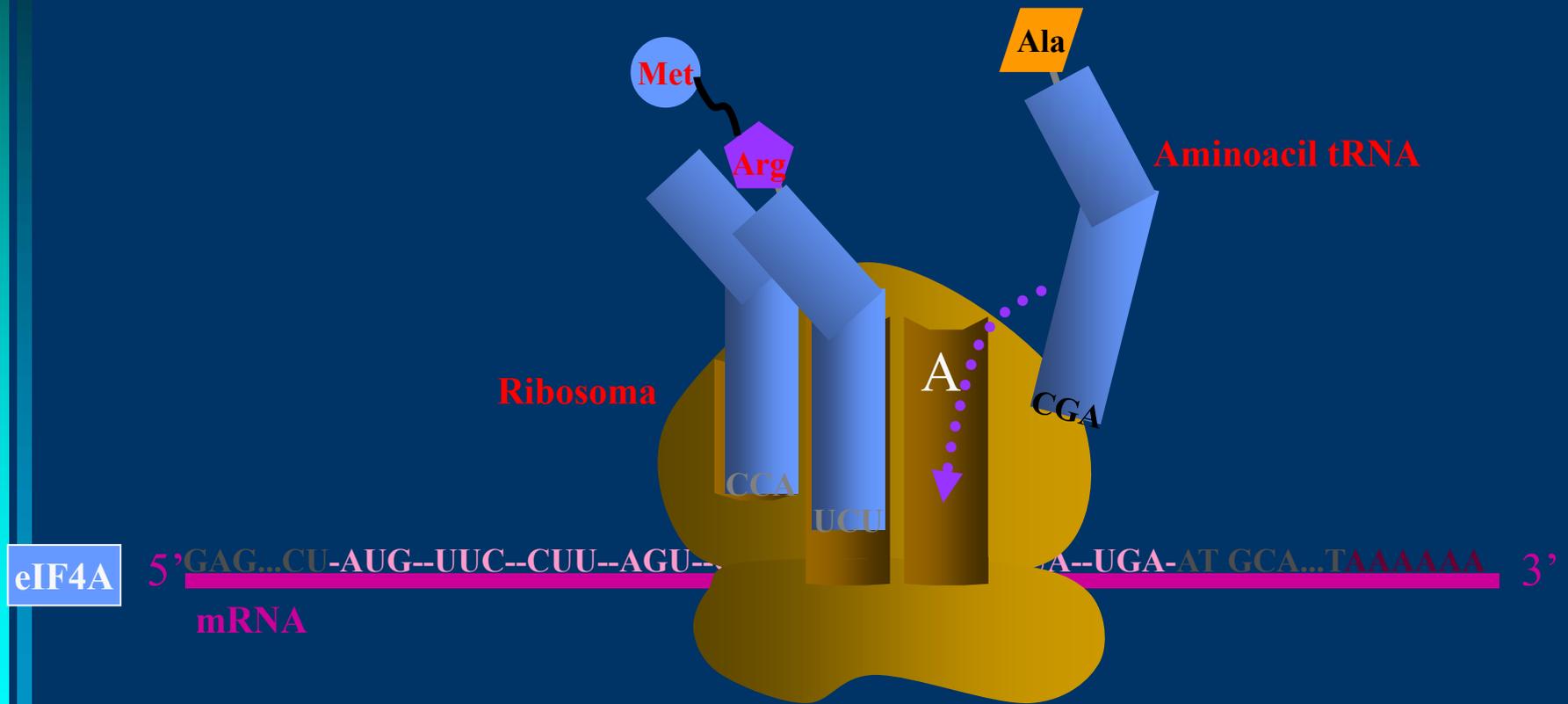
LA SINTESI PROTEICA: L'ALLUNGAMENTO



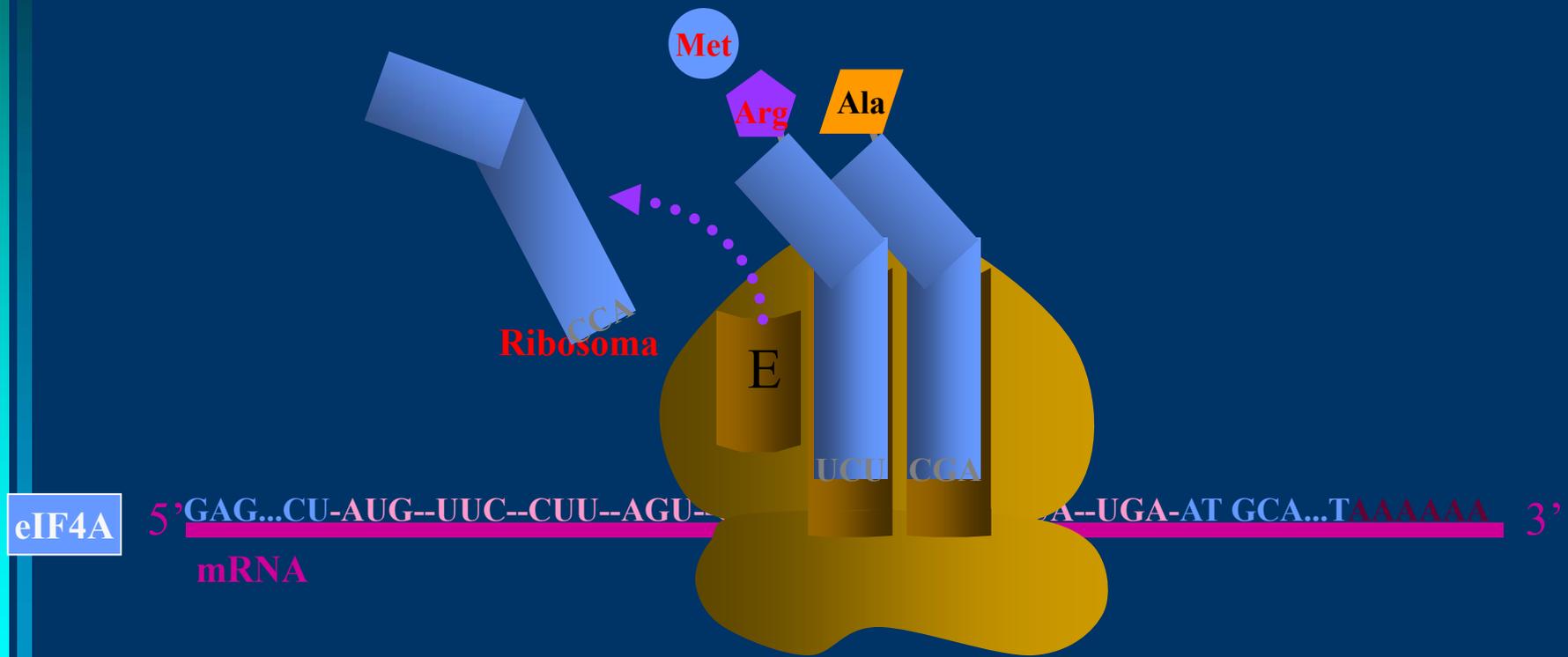
LA SINTESI PROTEICA: L'ALLUNGAMENTO



LA SINTESI PROTEICA: L'ALLUNGAMENTO



LA SINTESI PROTEICA: L'ALLUNGAMENTO



LA SINTESI PROTEICA: L'ALLUNGAMENTO E LA TERMINAZIONE

L'allungamento della catena appare **molto simile** nei procarioti ed eucarioti,

negli eucarioti vi sono due fattori di allungamento **EF1 α** e **EF1 $\beta\gamma$** ,
(corrispondenti a **EF-Tu** e **EF-Ts**) ed un fattore **EF2** per la traslocazione
(corrispondente a **EF-G**);

la terminazione necessita di un solo fattore: **eRF**,

esso riconosce tutti e tre i codoni di arresto: **UAA, UAG, UGA**.

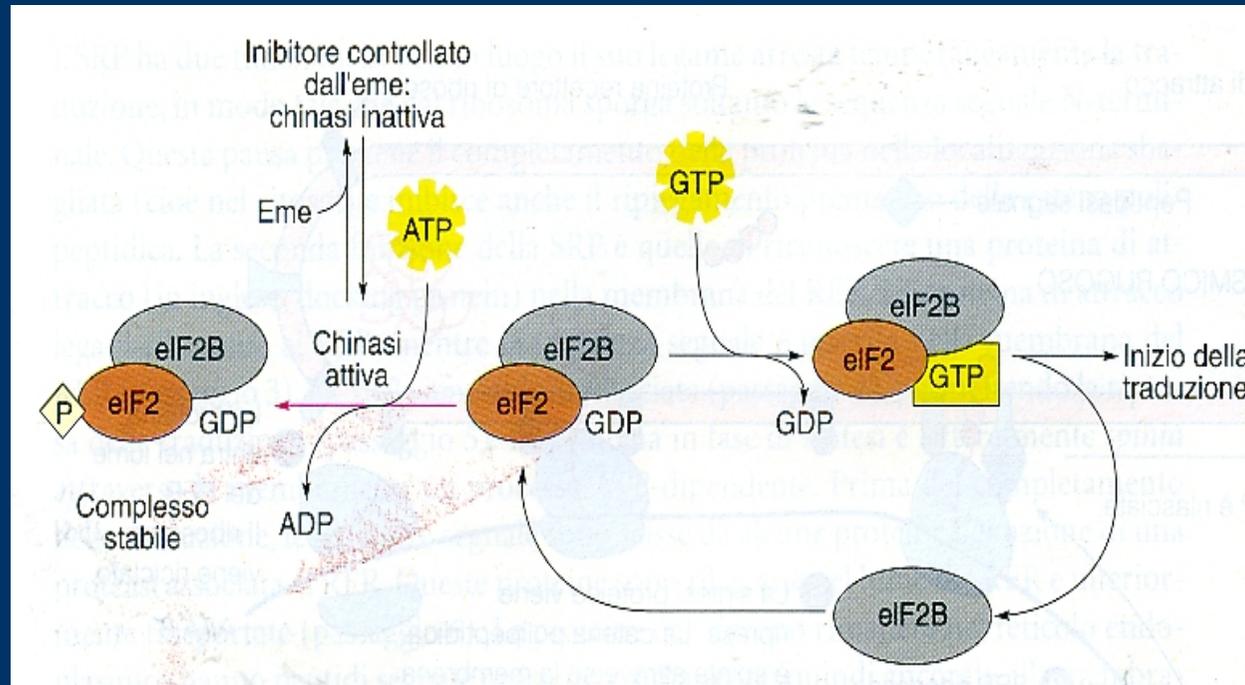
IL CONTROLLO DELLA SINTESI PROTEICA

Negli eucarioti può avvenire a livello dell'**mRNA** mediante:

- il **sequestro** degli mRNA da parte di specifiche proteine ed il rilascio quando essi siano richiesti,
- la **rapida degradazione** di alcuni altri mRNA;

la **fosforilazione** dei vari fattori d'inizio pare un metodo generale per la regolazione della traduzione negli eucarioti (**es.**: la sintesi della **Hb** nei reticolociti di mammifero).

LA REGOLAZIONE DELLA SINTESI PROTEICA DELLA GLOBINA NELLE CELLULE ERITROPOIETICHE AD OPERA DEI LIVELLI DI EME



Se i livelli di eme diminuiscono, la chinasi, sotto controllo dell'eme, diviene attiva e fosforila eIF2, ciò blocca l'ulteriore traduzione, sequestrando questo fattore in un complesso stabile con eIF2B, quando i livelli di eme sono adeguati, la chinasi è inibita ed l'eIF2 è disponibile per l'inizio della traduzione.

L'EVOLUZIONE

LA TEORIA EVOLUTIVA DELLA CELLULA

Essa afferma che "tutti gli organismi e tutte le cellule che li costituiscono sono derivati da una cellula progenitrice in seguito ad una evoluzione per selezione naturale",

ciò richiede la presenza di **due** processi essenziali:

il verificarsi di una **variazione** (mutazione) casuale nell'informazione genetica, trasmessa da un individuo ai suoi discendenti,

una **selezione** che favorisce quell'informazione genetica variata che aiuta chi la possiede a sopravvivere ed a propagarsi;

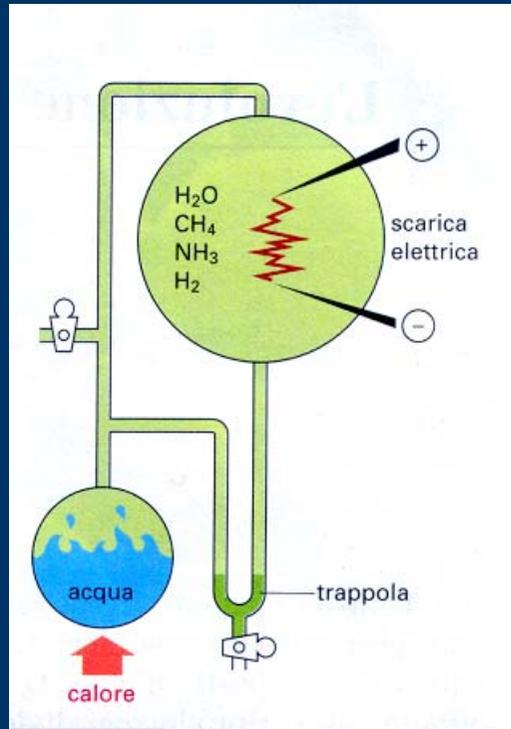
l'evoluzione è un principio fondamentale per descrivere scientificamente la grande varietà degli organismi viventi.

L'EVOLUZIONE MOLECOLARE

LA PRODUZIONE DI MOLECOLE ORGANICHE SEMPLICI

- **3-4 miliardi di anni fa**, la terra era un luogo ricco di eruzioni vulcaniche, lampi, piogge torrenziali,
- **non esisteva** O_2 libero e non era presente lo strato di ozono che assorbisse le radiazioni UV del sole;
- in queste condizioni, **l'atmosfera** era ricca di **molecole reattive** (oltre che di H_2O , CH_4 , NH_3 , H_2 , ecc.) e lontana dall'equilibrio chimico.

LA PRODUZIONE DI MOLECOLE BIOLOGICHE SEMPLICI IN CONDIZIONI PREBIOTICHE (MILLER E UREY 1953)

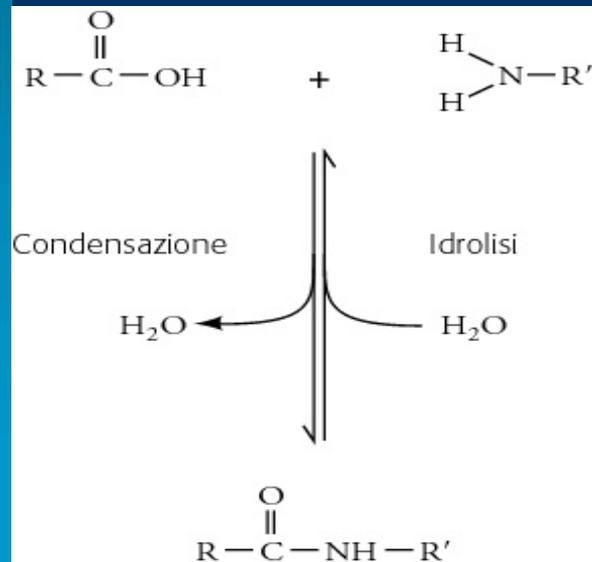


HCHO	formaldeide
HCOOH	acido formico
HCN	acido cianidrico
CH ₃ COOH	acido acetico
NH ₂ CH ₂ COOH	glicina
CH ₃ CHCOOH OH	acido lattico
NH ₂ CHCOOH CH ₃	alanina
NH — CH ₂ COOH CH ₃	sarcosina
NH ₂ — C — NH ₂ O	urea
NH ₂ CHCOOH CH ₂ COOH	acido aspartico

Scaldando miscele di gas come CO_2 , CH_4 , NH_3 e H_2 in H_2O in presenza di scariche di energia e radiazioni UV, questi reagiscono formando **piccole molecole organiche**: amminoacidi, zuccheri, purine e pirimidine necessarie per formare i nucleotidi.

L'EVOLUZIONE CHIMICA

Acile	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{R} \end{array}$	Carbossilico	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{OH} \end{array}$	Ossidrilico	$-\text{OH}$
Amidico	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{NH}- \end{array}$	Pirofosforico (difosforico)	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \quad \\ -\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	Imminico	$\begin{array}{c} > \text{C}=\text{NH} \end{array}$
Amminico	$-\text{NH}_2$	Etere	$-\text{C}-\text{O}-\text{R}$	Fosforico	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Carbonilico	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}- \end{array}$	Etere	$\text{R}-\text{O}-\text{R}'$	Sulfidrilico	$-\text{SH}$

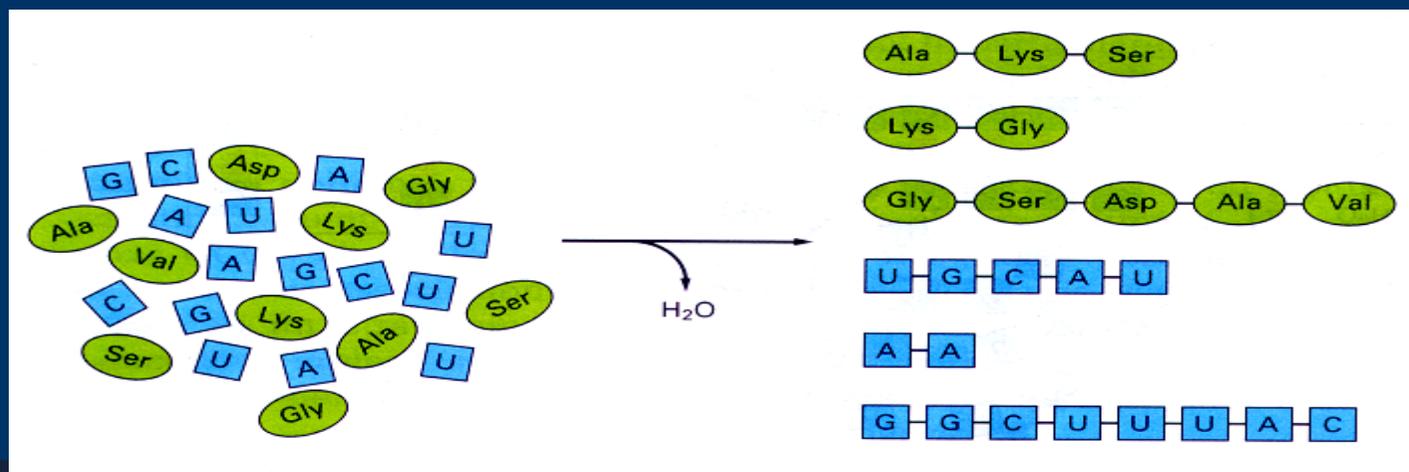


La presenza di **diversi gruppi funzionali** in una molecola molto grande, aumenta la versatilità di quella molecola che acquisisce proprietà chimiche non possibili per i composti semplici.

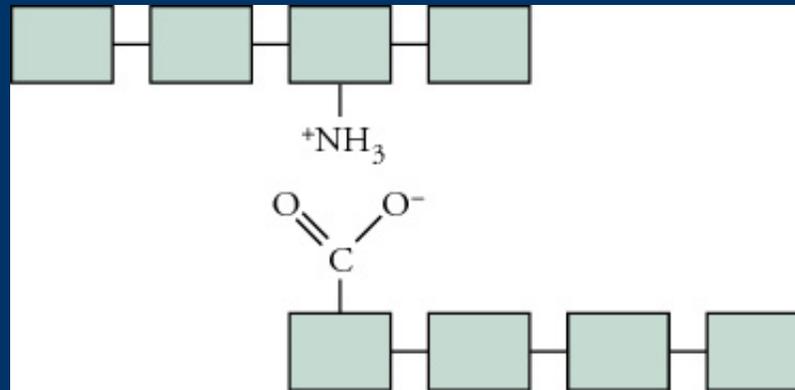
LE MOLECOLE ORGANICHE SEMPLICI SI POSSONO ASSOCIARE PER FORMARE I POLIMERI

Un **amminoacido**, mediante opportune reazioni chimiche, si può unire ad un altro, formando un **legame peptidico**, mentre **due nucleotidi** si possono unire insieme mediante un **legame fosfodiester**:

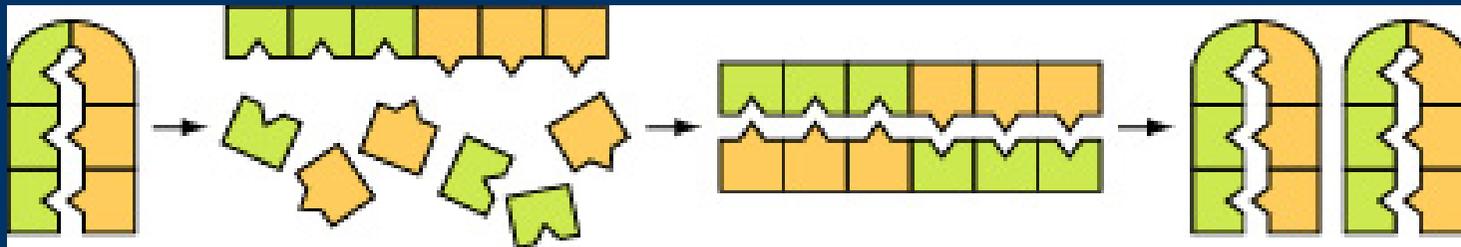
la ripetizione di queste reazioni porta a **polimeri** noti rispettivamente come polipeptidi (**polimeri di amminoacidi: proteine**) e polinucleotidi, sotto forma di acidi ribonucleotidici (**RNA**) e deossiribonucleotidici (**DNA**).



LA REPLICAZIONE MEDIANTE LA COMPLEMENTARIETÀ

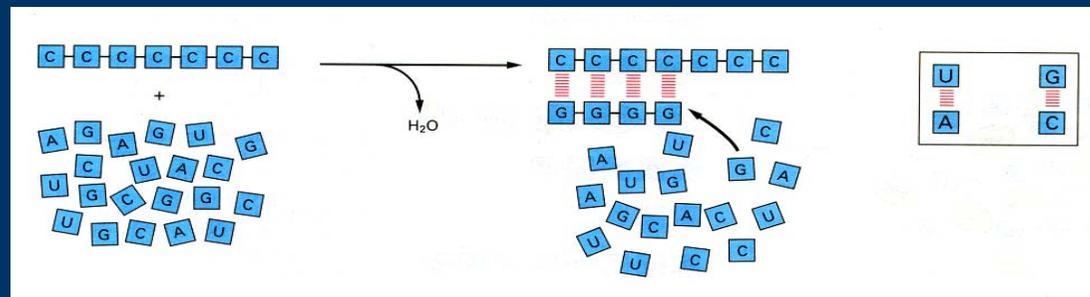


L'accoppiamento specifico tra gruppi funzionali complementari consente a una macromolecola di replicare o copiare se stessa, dirigendo la costruzione di una nuova molecola, a partire da unità complementari semplici.

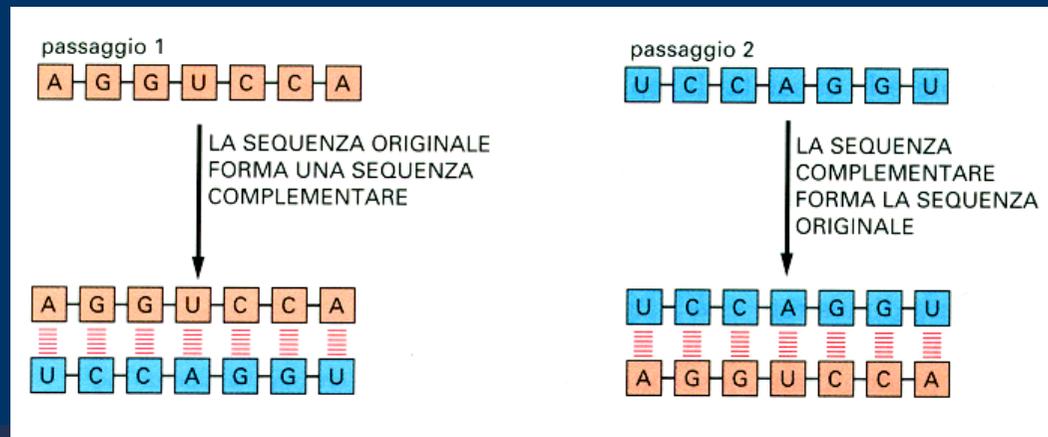


I POLINUCLEOTIDI HANNO LA CAPACITÀ DI DIRIGERE LA PROPRIA SINTESI

I polinucleotidi hanno limitate capacità catalitiche, ma possono dare origine a **copie esatte** della loro sequenza;



questa capacità dipende dall'**accoppiamento complementare** delle subunità nucleotidiche, che permette ad un polinucleotide di agire **da stampo** per la formazione di un nuovo filamento.

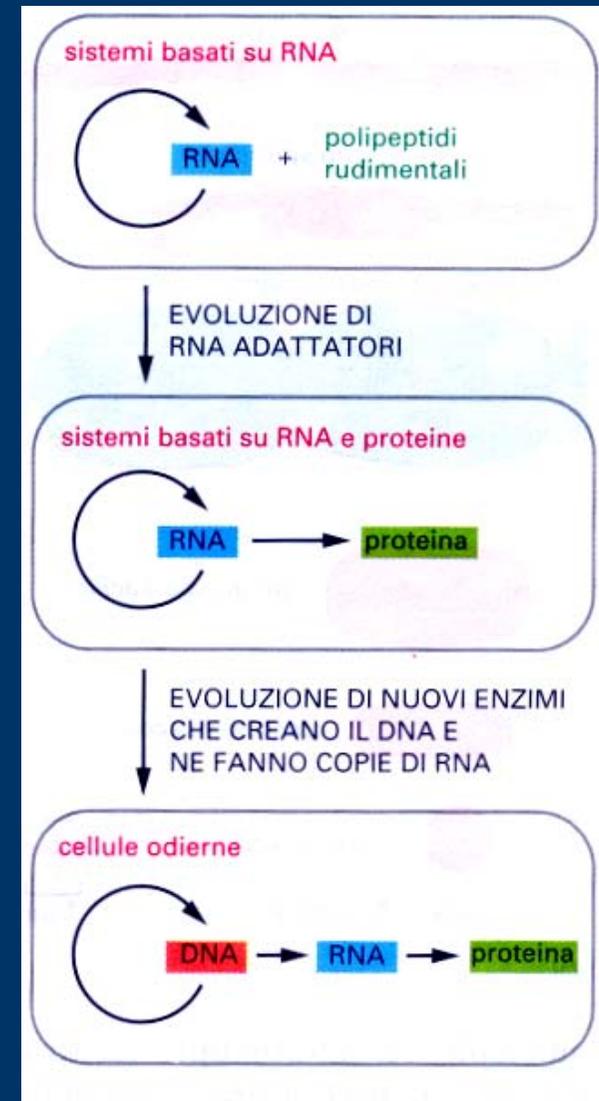


TUTTE LE CELLULE ODIERNE USANO IL DNA COME MATERIALE EREDITARIO

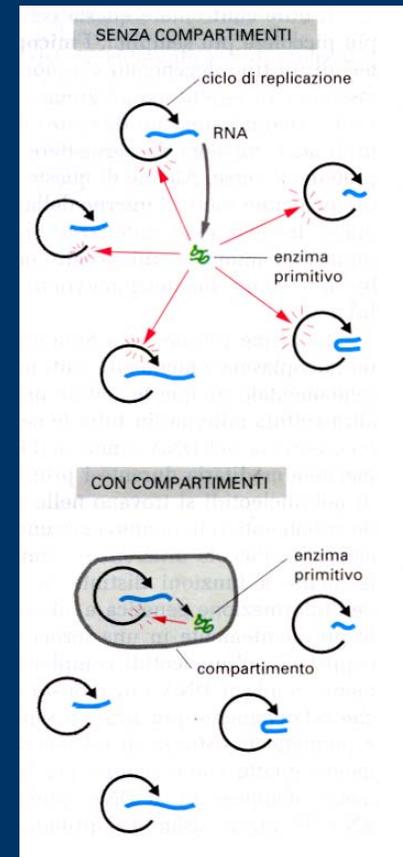
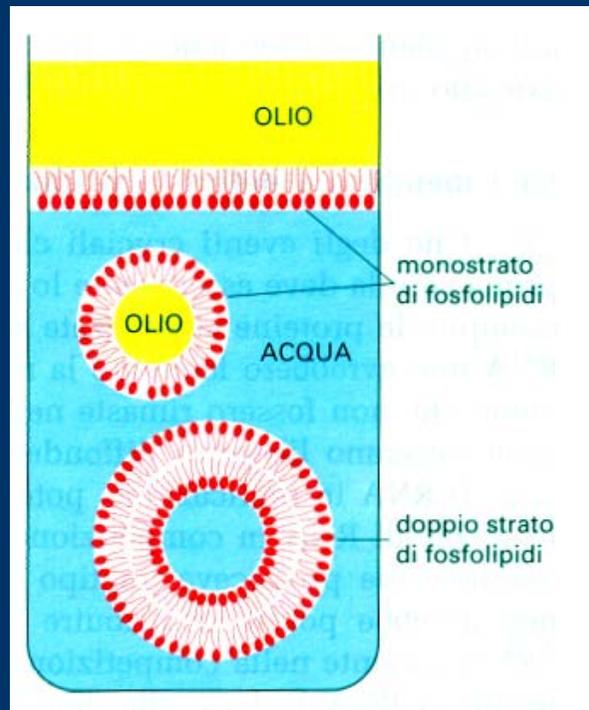
Il DNA agisce come deposito permanente dell'informazione genetica,

l'RNA precedette il DNA nell'evoluzione, riunendo capacità genetiche e catalitiche; in seguito il DNA assunse le funzioni genetiche primarie e le proteine divennero i catalizzatori principali, mentre l'RNA rimase soprattutto come l'intermediario che li connetteva;

il DNA può contenere un'informazione genetica maggiore di quella che può essere mantenuta stabilmente nell'RNA.

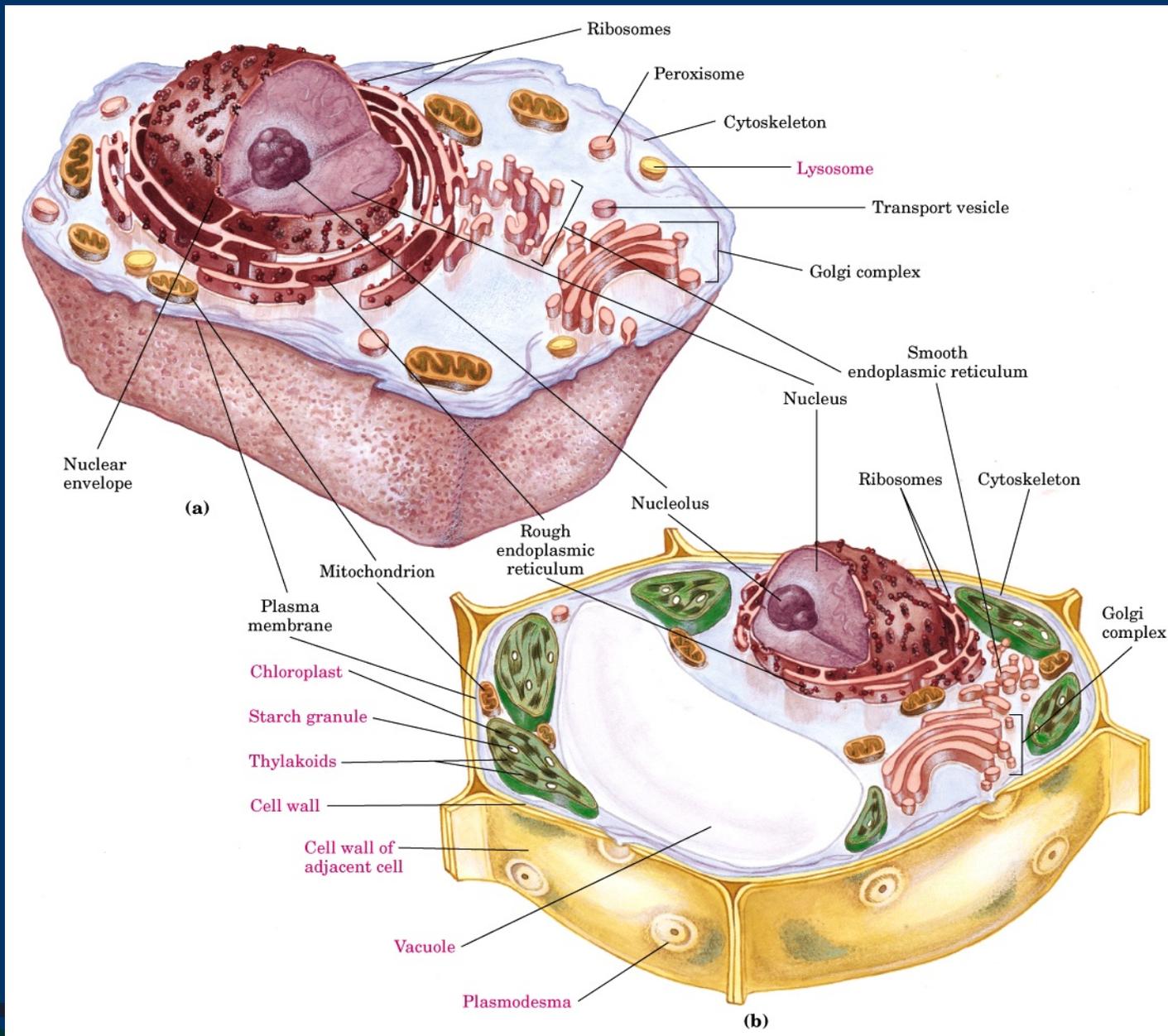


LO SVILUPPO DELLA MEMBRANA CELLULARE

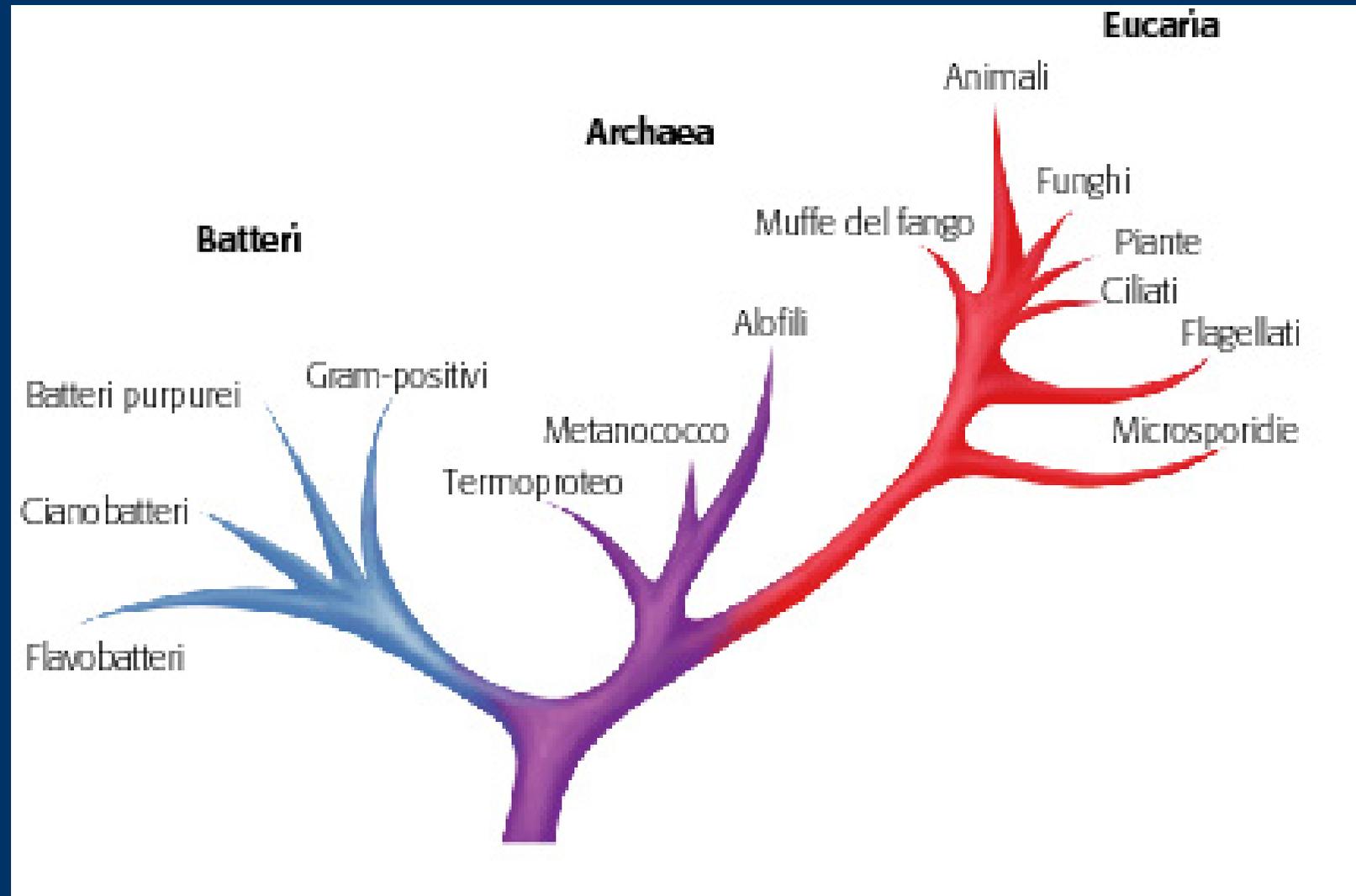


Con la **compartimentalizzazione**, risulta possibile la selezione di molecole di **RNA**, in base alla loro capacità di guidare la sintesi di nuove proteine.

LA COMPARTIMENTALIZZAZIONE CELLULARE



L'EVOLUZIONE DEGLI ORGANISMI



I PROCARIOTI	GLI EUCARIOTI
DNA "nudo"	DNA strettamente legato a istoni
Geni continui	Geni discontinui (esoni ed introni)
Replicazione monocentrica del DNA (due forcelle replicative)	Replicazione multicentrica del DNA (migliaia di forcelle replicative)
Assenza di sequenze ripetitive nel DNA	Presenza di sequenze ripetitive nel DNA
DNA-polimerasi I, II, III	DNA-polimerasi α , β , γ , δ , ϵ
mRNA policistronici subito maturi e tradotti mentre vengono trascritti	mRNA monocistronici che originano da trascritti primari nucleari (hnRNA) e che subiscono processi di riarrangiamento e maturazione prima di raggiungere i ribosomi

DIFFERENZE FRA ORGANISMI PROCARIOTI ED EUCARIOTI

	<i>Procarioti</i>	<i>Eucarioti</i>
Organismi	batteri e cianobatteri	protisti, funghi, piante e animali
Dimensioni cellulari	generalmente da 1 a 10 μm di dimensioni lineari	generalmente da 5 a 100 μm di dimensioni lineari
Metabolismo	anaerobio o aerobio	aerobio
Organelli	pochi o nessuno	nucleo, mitocondri, cloroplasti, reticolo endoplasmatico, ecc.
DNA	DNA circolare nel citoplasma	molecole molto lunghe di DNA lineare contenenti molte regioni non codificanti; circondate da un involucro nucleare
RNA e proteine	RNA e proteine sintetizzate nello stesso compartimento	RNA sintetizzato ed elaborato nel nucleo; proteine sintetizzate nel citoplasma
Citoplasma	assenza di citoscheletro: niente flussi citoplasmatici, endocitosi e esocitosi	citoscheletro composto da filamenti proteici; flussi citoplasmatici; endocitosi e esocitosi
Divisione cellulare	cromosomi separati mediante attacco alla membrana plasmatica	cromosomi separati da un fuso di citoscheletro
Organizzazione cellulare	in genere unicellulare	in genere multicellulare, con differenziamento di molti tipi cellulari

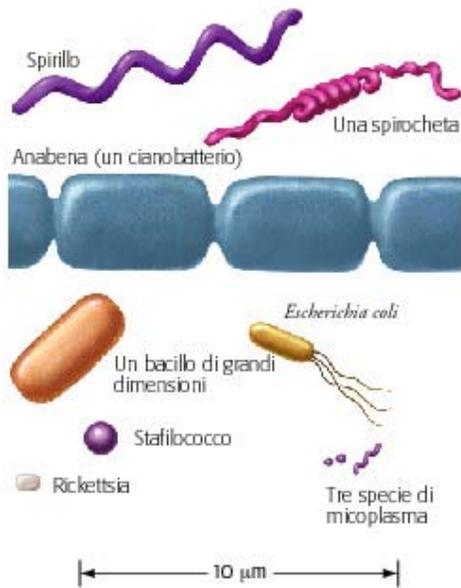


table 3-5

Molecular Components of an *E. coli* Cell

	Percentage of total weight of cell	Approximate number of different molecular species
Water	70	1
Proteins	15	3,000
Nucleic acids		
DNA	1	1
RNA	6	>3,000
Polysaccharides	3	5
Lipids	2	20
Monomeric subunits and intermediates	2	500
Inorganic ions	1	20

