

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA

CORSO INTEGRATO: FISICA, CHIMICA
E PROPEDEUTICA BIOCHIMICA (10 CFU)

MODULO:
PROPEDEUTICA BIOCHIMICA ED ELEMENTI DI
BIOLOGIA MOLECOLARE (4 CFU)

Roberto Giacomini Stuffer

IL MODULO

"PROPEDEUTICA BIOCHIMICA ED ELEMENTI DI
BIOLOGIA MOLECOLARE" (4 CFU)

È SUDDIVISO IN DUE UNITÀ DIDATTICHE:

A) UNITÀ DIDATTICA

"PROPEDEUTICA ALLA BIOCHIMICA" (2 CFU)

B) UNITÀ DIDATTICA

"BIOLOGIA MOLECOLARE" (2 CFU)

L'UNITÀ DIDATTICA "PROPEDEUTICA ALLA BIOCHIMICA" 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 "BIOLOGIA MOLECOLARE" COMPRENDE:

- 6) LE MEMBRANE BIOLOGICHE
- 7) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEI PROCARIOTI (A)
- 8) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEI PROCARIOTI (B)
- 9) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEGLI EUCARIOTI
- 10) LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

UNITÀ DIDATTICA
"BIOLOGIA MOLECOLARE" (2 CFU)

VET.
UNITÀ DIDATTICA "BIOLOGIA MOLECOLARE"

LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEI PROCARIOTI (II PARTE)

Roberto Giacomini Stuffer

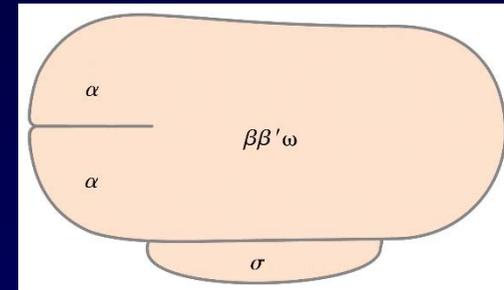
1. La sintesi dell'RNA
2. La sintesi proteica

LA SINTESI DELL'RNA NEI PROCARIOTI

L'RNA POLIMERASI (~450Kd)

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

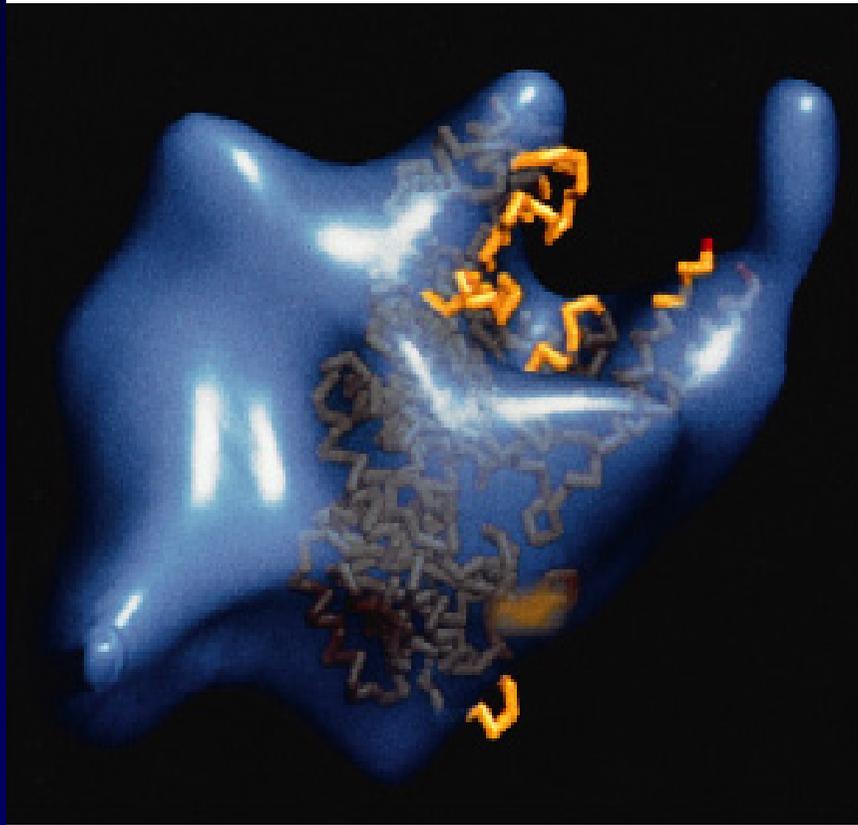
Esso è un enzima multimerico costituito dalle subunità α_2 , β , β' , σ , ω .



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.

L'RNA POLIMERASI



(a)



(b)

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.

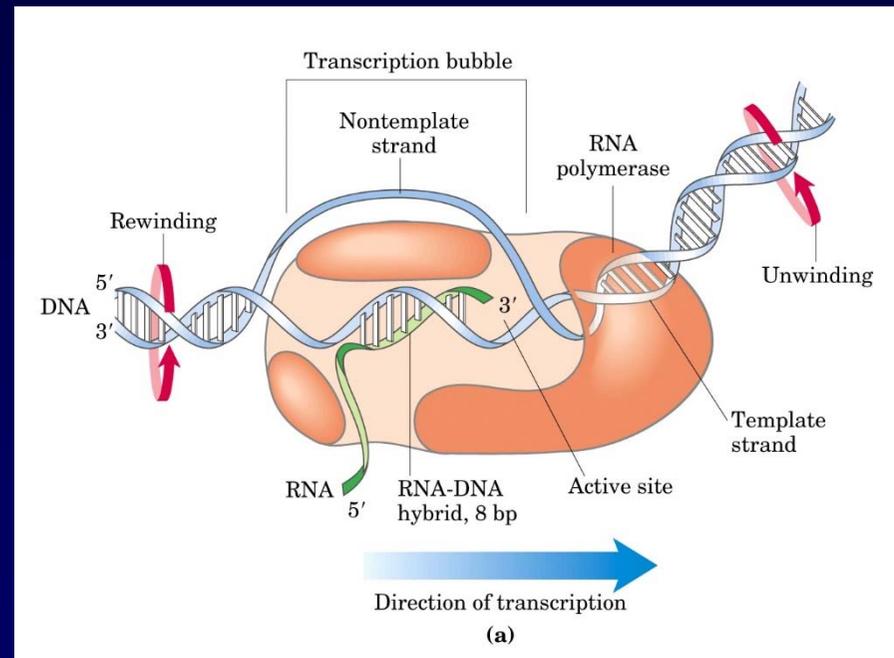
I COMPITI SVOLTI DALL'RNA POLIMERASI

- 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.

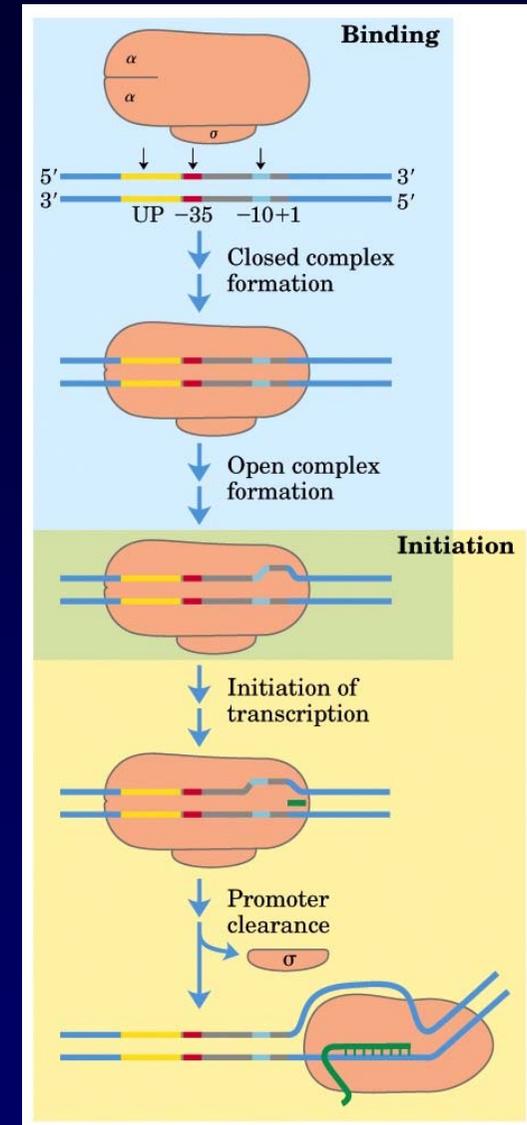
LA SINTESI DELL'RNA

Le fasi della sintesi dell'RNA sono:

1. INIZIO
2. ALLUNGAMENTO
3. TERMINE.

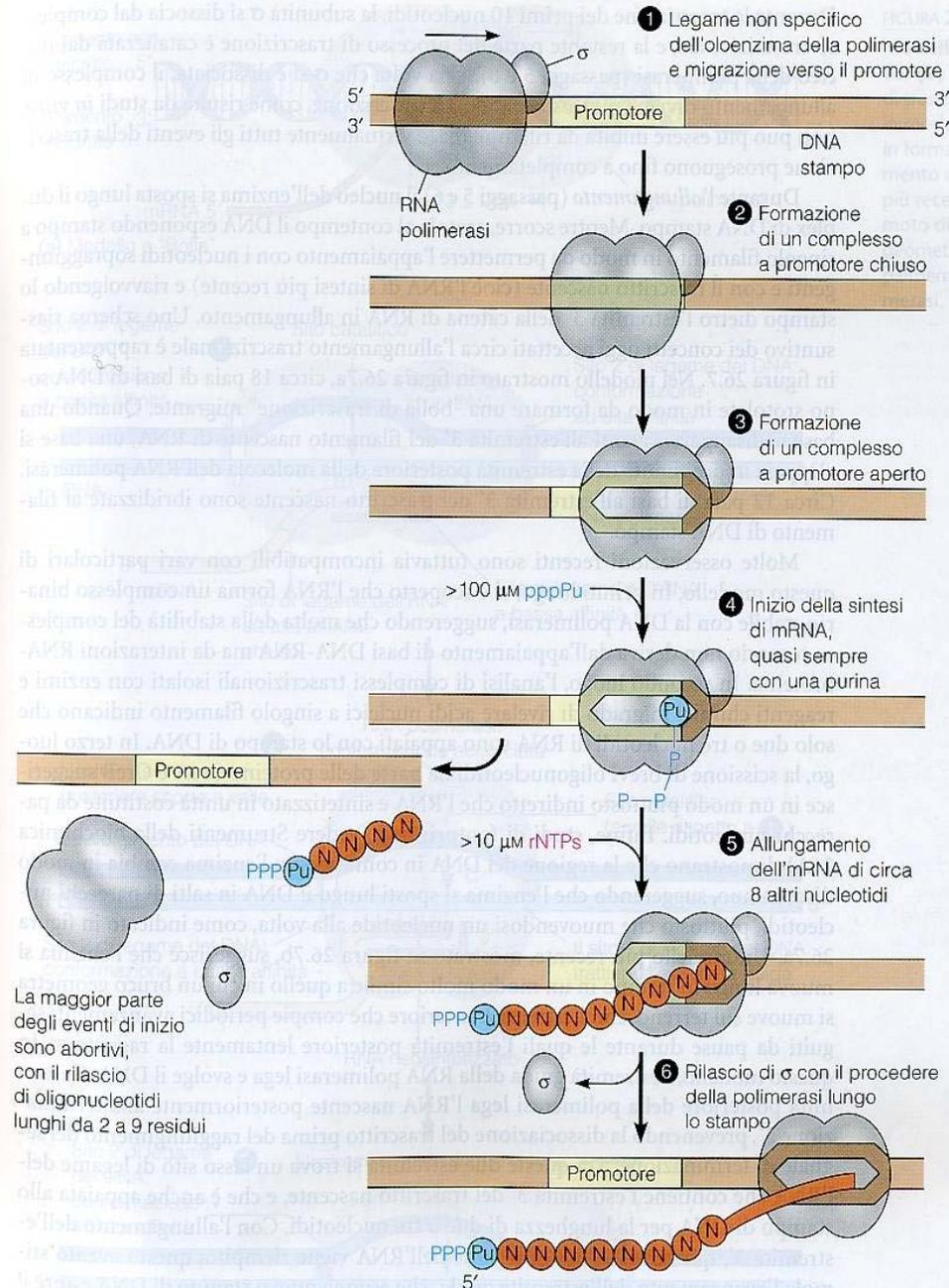


L'INIZIO DELLA TRASCRIZIONE DA PARTE DELLA RNA POLIMERASI DI E.COLI

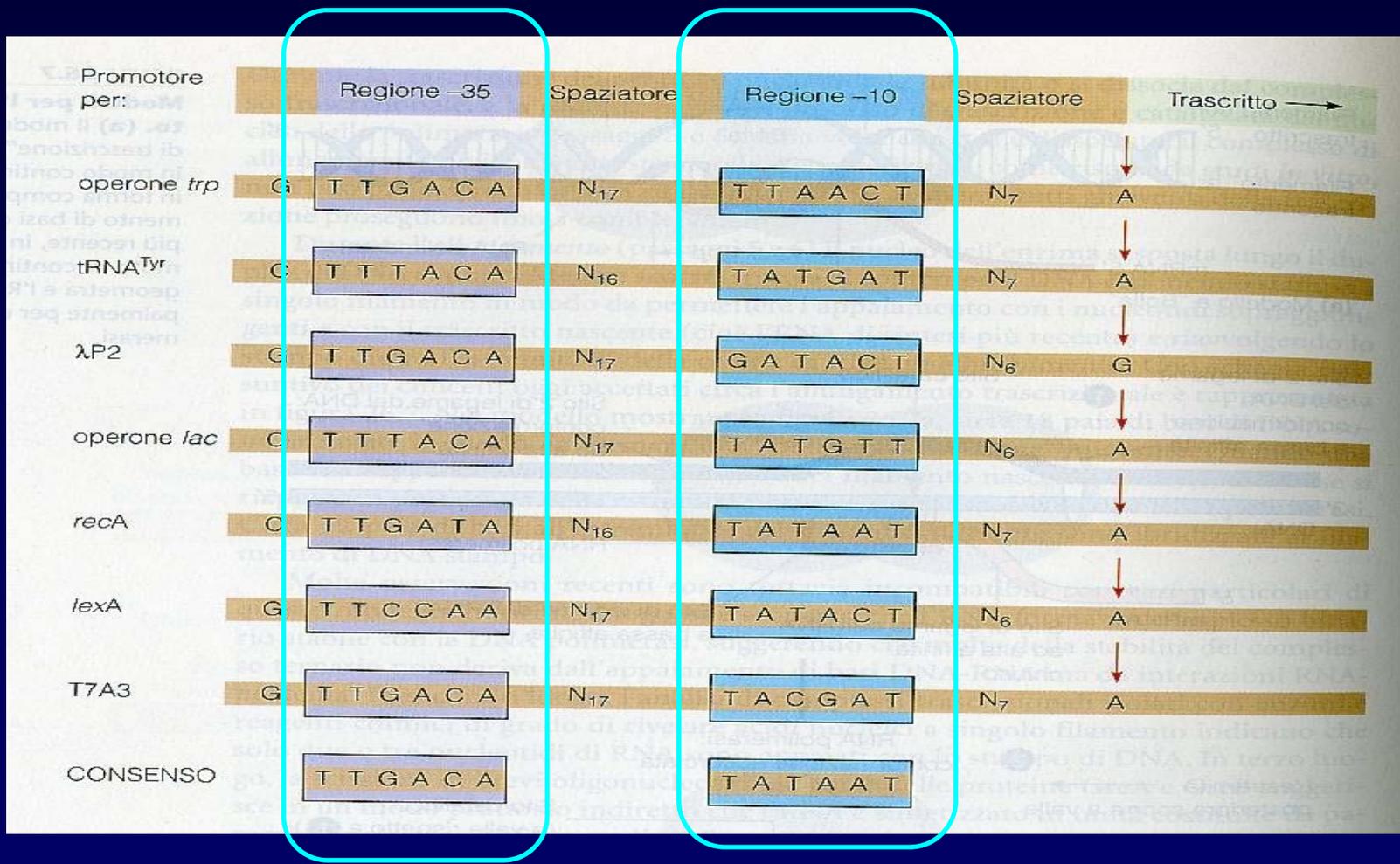


LA FASE D'INIZIO DELLA TRASCRIZIONE

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



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.



SEQUENZE DI DIVERSI PROMOTORI INDIVIDUATI IN *E. COLI*

	UP element	-35 Region	Spacer	-10 Region	Spacer	RNA start
Consensus sequence	NNAAA ^{AA} -A _{TT} -T _T TTTTNNA ^A AAANNN	TTGACA	N ₁₇	TATAAT	N ₆	+1
<i>rrnB</i> P1	AGAAAATTATTTTAAATTCCT	GTGTCA	N ₁₆	TATAAT	N ₈	A
<i>trp</i>		TTGACA	N ₁₇	TTAACT	N ₇	A
<i>lac</i>		TTTACA	N ₁₇	TATGTT	N ₆	A
<i>recA</i>		TTGATA	N ₁₆	TATAAT	N ₇	A
<i>araBAD</i>		CTGACG	N ₁₈	TACTGT	N ₆	A

Esistono siti di legame sul DNA anche per altre proteine che hanno funzione regolatoria.

(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 dell'**U**.

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

LE SEQUENZE DI CATENE SENSO 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>	CATAATCGACTTGTAACCAAAATTGAAAAGATT	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 ⁴⁸
			G ⁵⁵ 42

LA SEQUENZA CONSENSO

Una sequenza consenso comprende quelle basi che compaiono più frequentemente in ciascuna posizione della sequenza, in una serie di sequenze che si ritiene abbiano la stessa funzione.

Es. nella sequenza **PRIBNOW Box** di *E.coli*, questa sequenza consenso è risultata essere **TATAAT**, sul filamento senso.

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 affinita per l'RNA polimerasi.

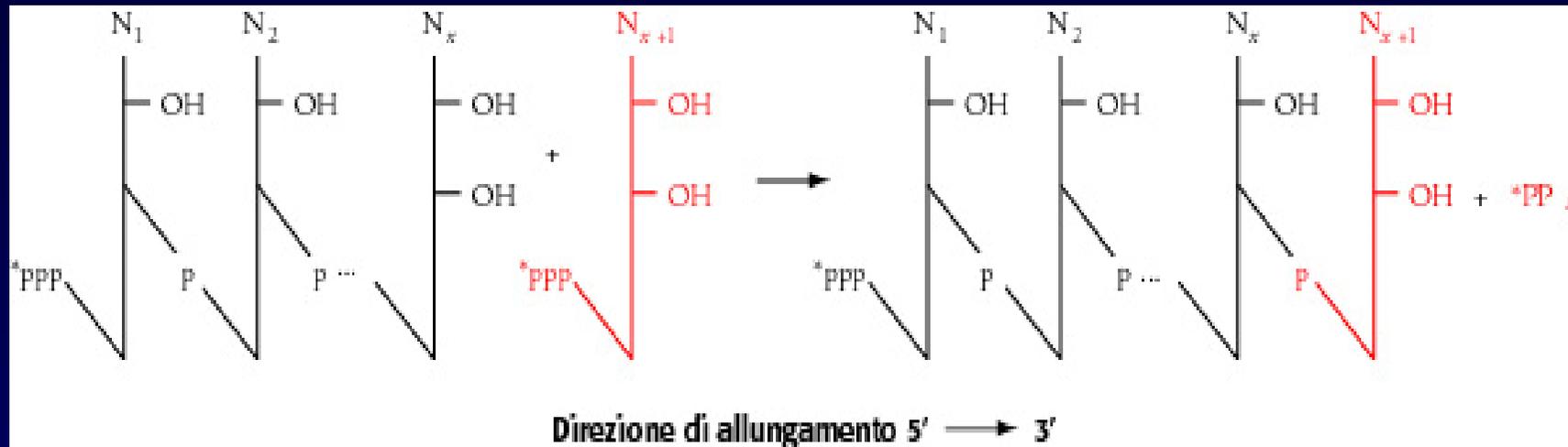
I PROMOTORI FORTI

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

LE PROTEINE REGOLATRICI

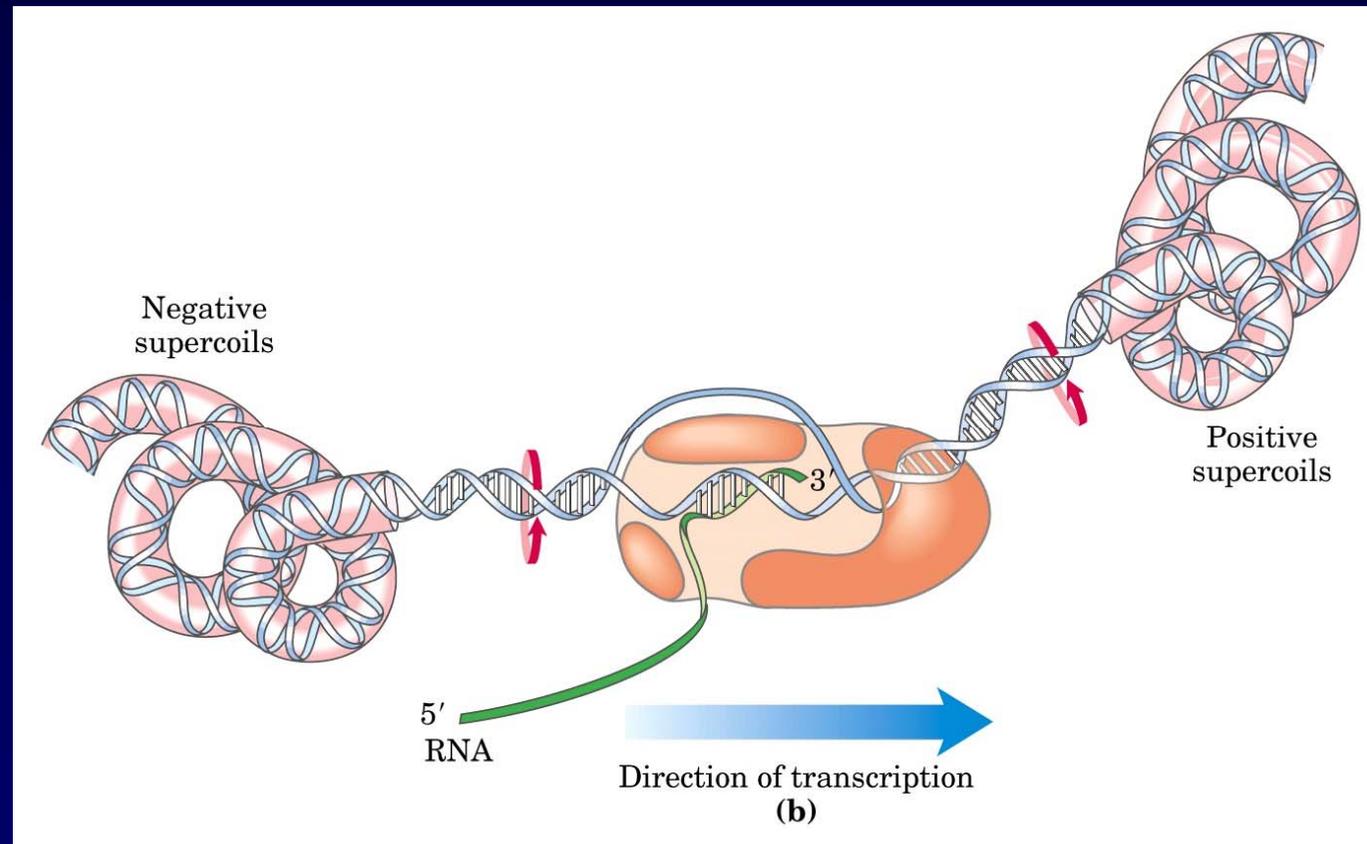
si legano sia alle sequenze del DNA sia dell'RNA polimerasi e influenzano la frequenza di trascrizione di molti geni.

LE CATENE DI RNA INIZIANO CON pppG o pppA



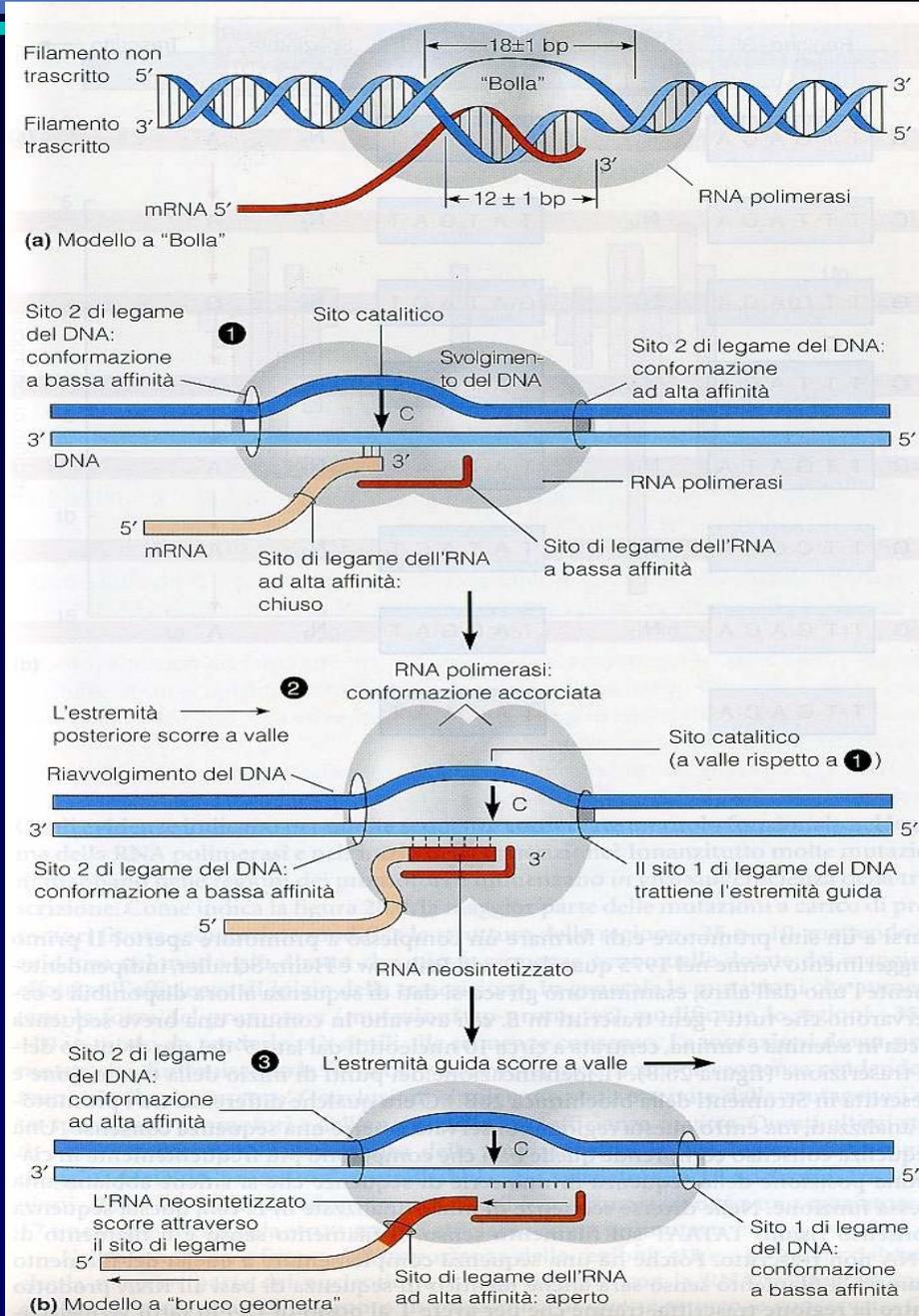
Non é necessario un primer,
i filamenti si allungano in direzione 5' \rightarrow 3'.

LA FASE DI ALLUNGAMENTO NELLA SINTESI DELL'RNA IN *E. COLI*

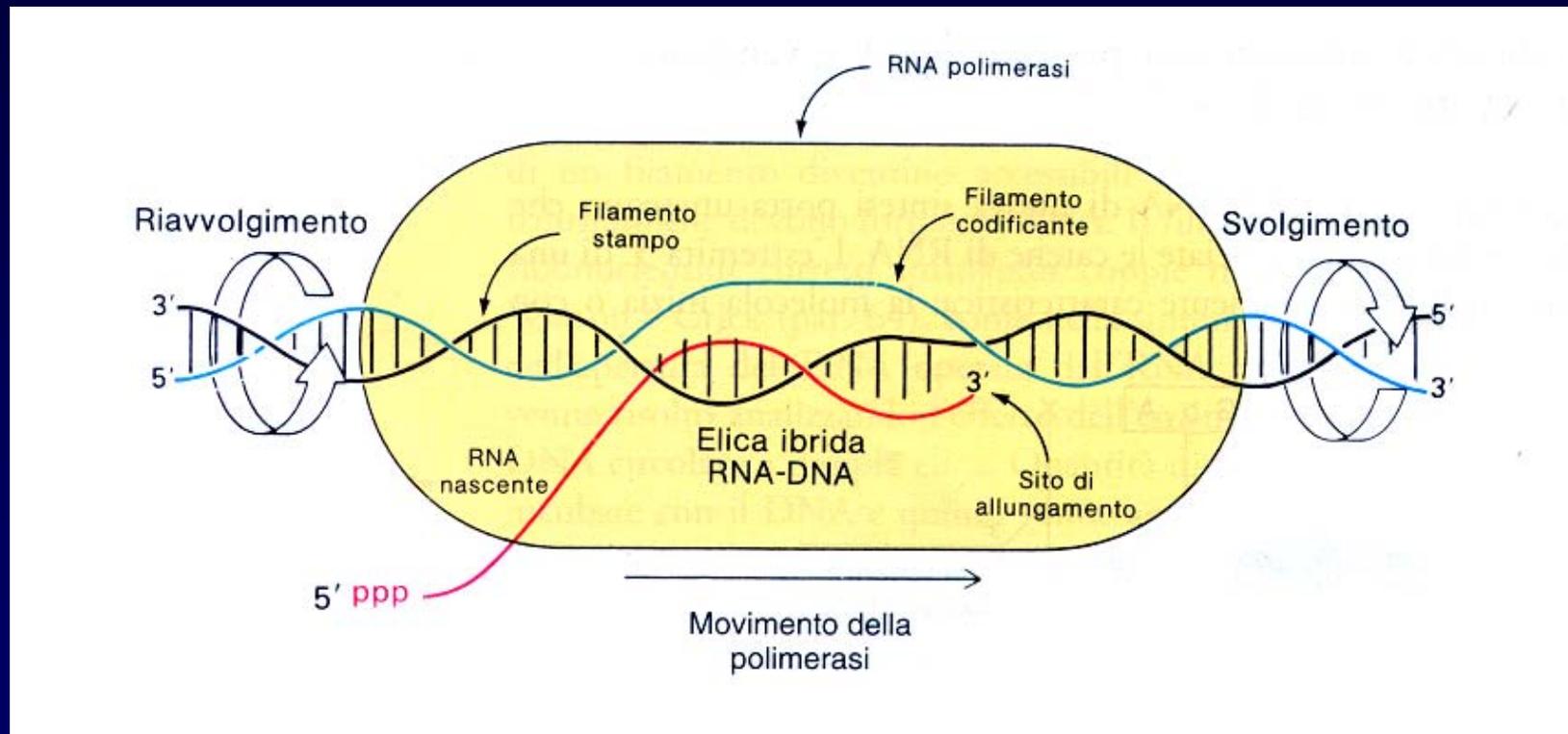


a) Modello tradizionale in cui la "bolla di trascrizione", formata dalla RNA polimerasi, avanza in modo continuo e il trascritto si appaia con le basi dello stampo.

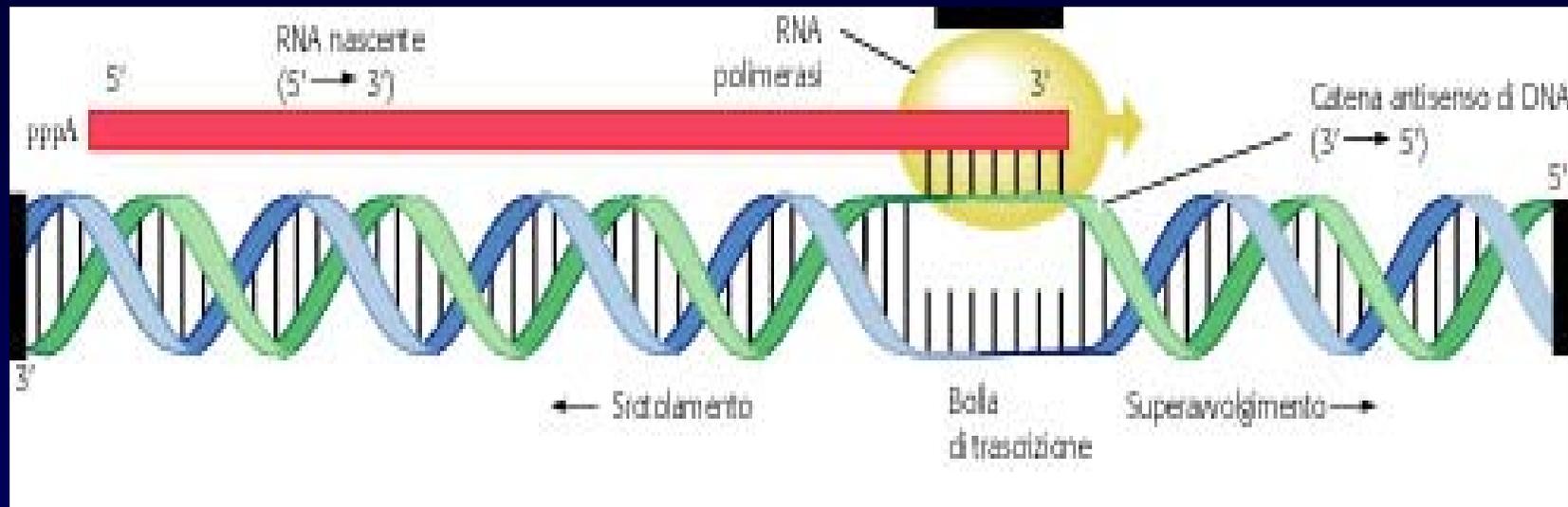
b) Modello "a bruco geometra" in cui la RNA polimerasi avanza in modo discontinuo e il trascritto forma interazioni con la polimerasi.



LA BOLLA DI TRASCRIZIONE



LA BOLLA DI TRASCRIZIONE



La fase di allungamento inizia dopo la formazione del **primo** legame fosfodiesterico,

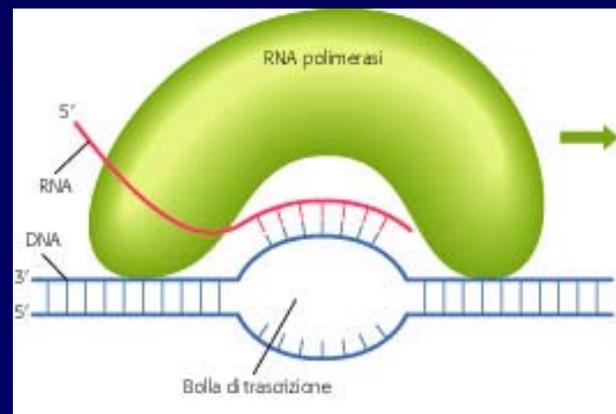
la velocità di trascrizione é di **50** nucleotidi al secondo.

LA BOLLA DI TRASCRIZIONE

La bolla di trascrizione avviene subito dopo la formazione del primo legame fosfodiesterico,

la perdita del fattore sigma fa legare il nucleo dell'enzima più saldamente allo stampo di DNA,

l'elica RNA-DNA è lunga circa 12 coppie di basi.

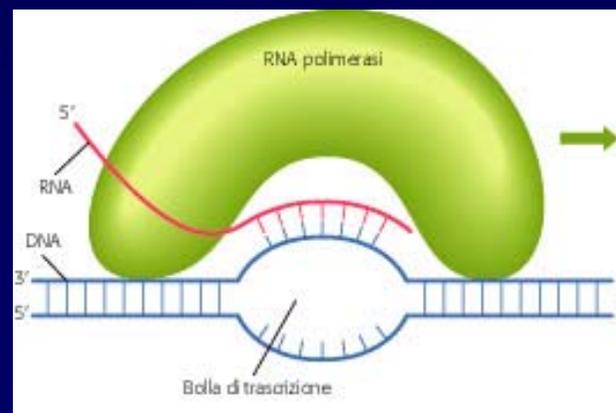


LA BOLLA DI TRASCRIZIONE

Il nucleo dell'enzima contiene un sito catalitico di legame anche per l'altro filamento,

l'RNA polimerasi svolge circa **17** coppie di basi dello stampo di DNA (quasi 2 giri dell'elica), prima di iniziare la trascrizione,

il DNA viene riavvolto dietro l'enzima alla stessa velocità con la quale viene svolto davanti all'RNA polimerasi.



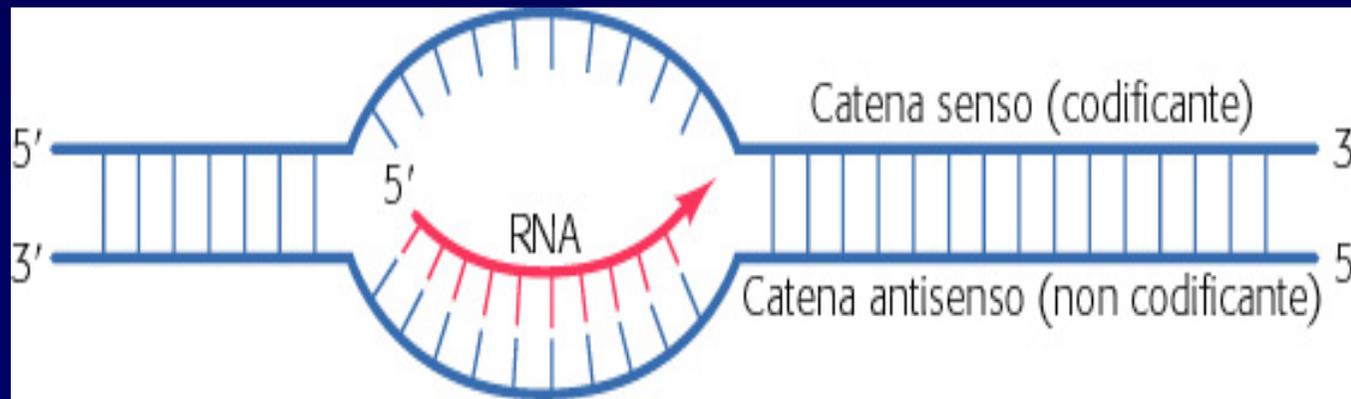
LA BOLLA DI TRASCRIZIONE

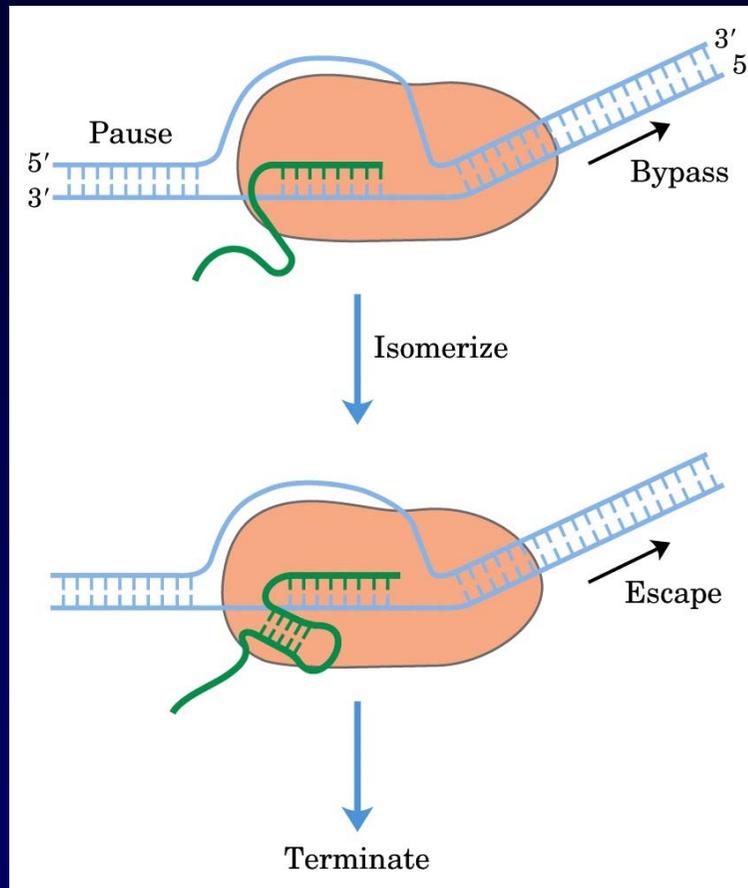
L'enzima manca dell'attività nucleasica,

la frequenza di errore è circa 10^5 superiore a quella della sintesi di DNA,

questo è tollerato, perché la maggior parte dei geni è trascritta molte volte, per ogni generazione;

quando raggiunge un segnale di stop, l'RNA polimerasi si stacca.

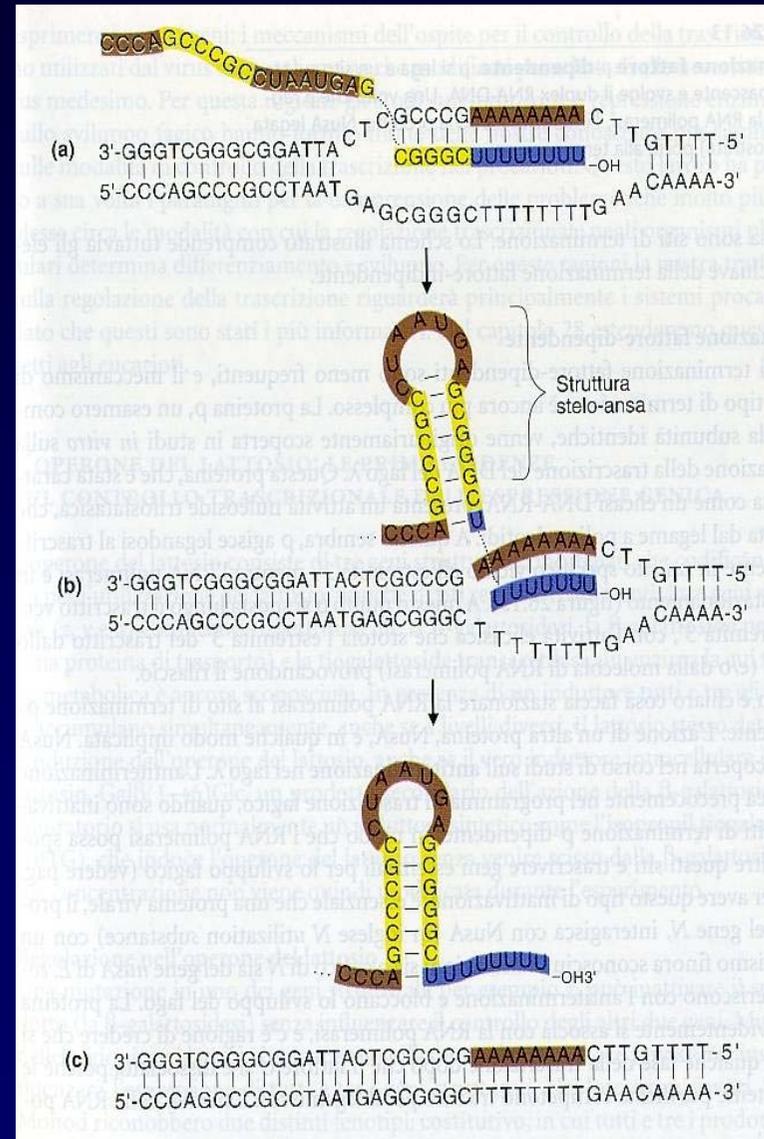




IL MODELLO PER IL TERMINE DELLA TRASCRIZIONE ρ -INDIPENDENTE IN *E. COLI*

IL TERMINE DELLA SINTESI DELL'RNA

Le sequenze del DNA promuoventi la terminazione **fattore indipendente** comprendono una successione di residui di **A** (tra 4 e 8) ed una regione a forma **stelo-ansa**.



IL TERMINE DELLA SINTESI DELL'RNA

La sequenza palindromica, complementare a se stessa, determina questa struttura. L'RNA polimerasi si ferma quando incontra una forcina di questo tipo, poiché l'elica ibrida diventa instabile.



La forcina é seguita da una sequenza di poliU (in E.coli).

IL TERMINE DELLA SINTESI DELL'RNA

Si blocca la formazione di legami fosfodiesteri,

l'ibrido DNA-RNA si dissocia,

il DNA si riavvolge al suo complementare,

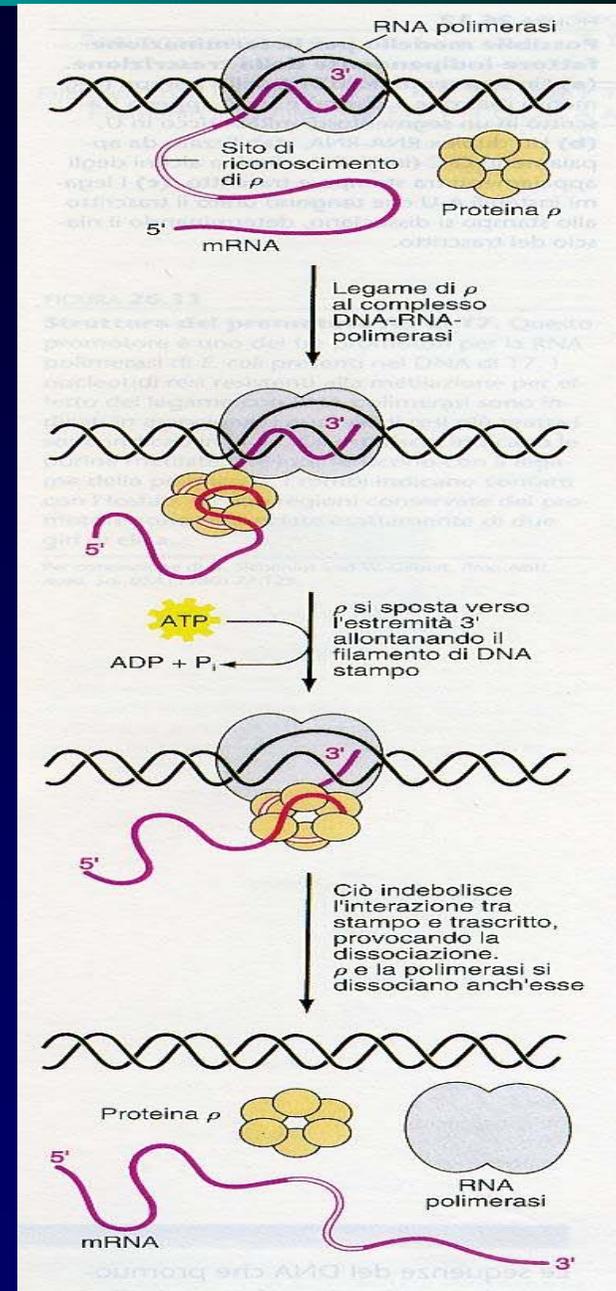
l'RNA polimerasi si dissocia dallo stampo,

la subunità σ si riunisce al nucleo.

LA TERMINAZIONE FATTORE DIPENDENTE

Nella terminazione fattore dipendente
interviene la proteina **rho**.

Essa agisce da RNA-DNA elicasi,
svolgendo il duplex **stampo-trascritto** e
facilitando il rilascio del trascritto
stesso.

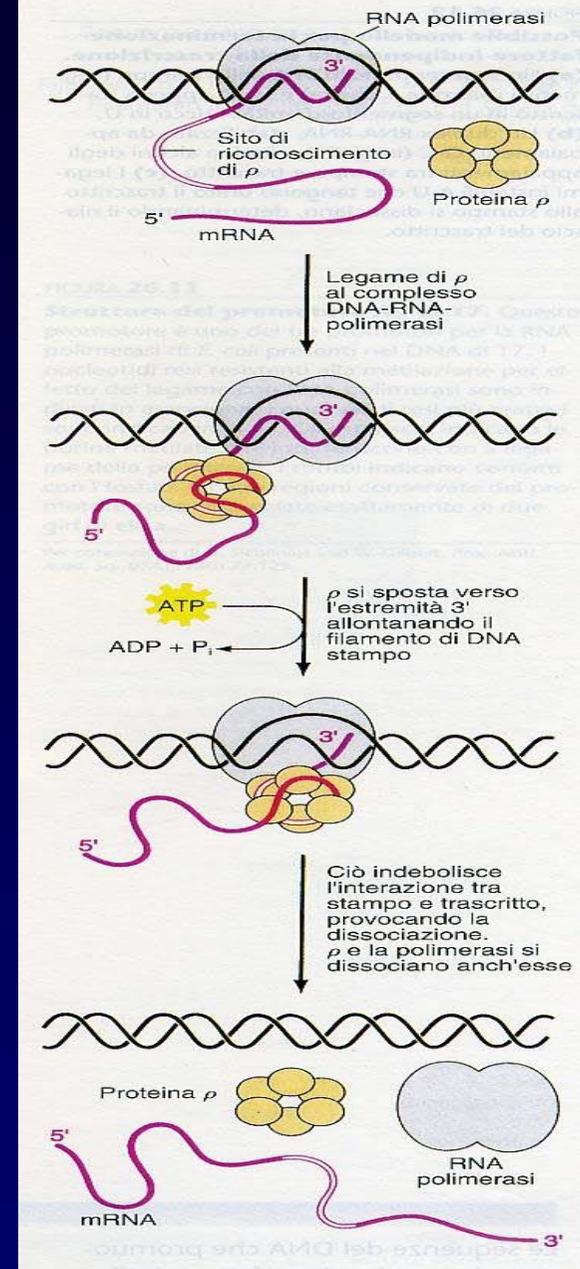


LA PROTEINA RHO

Essa è un esamero (46 kD),

entra in contatto con 72 nucleotidi di RNA;

quindi, interagisce con sequenze che si trovano sull'RNA nascente (cioè a singolo filamento).

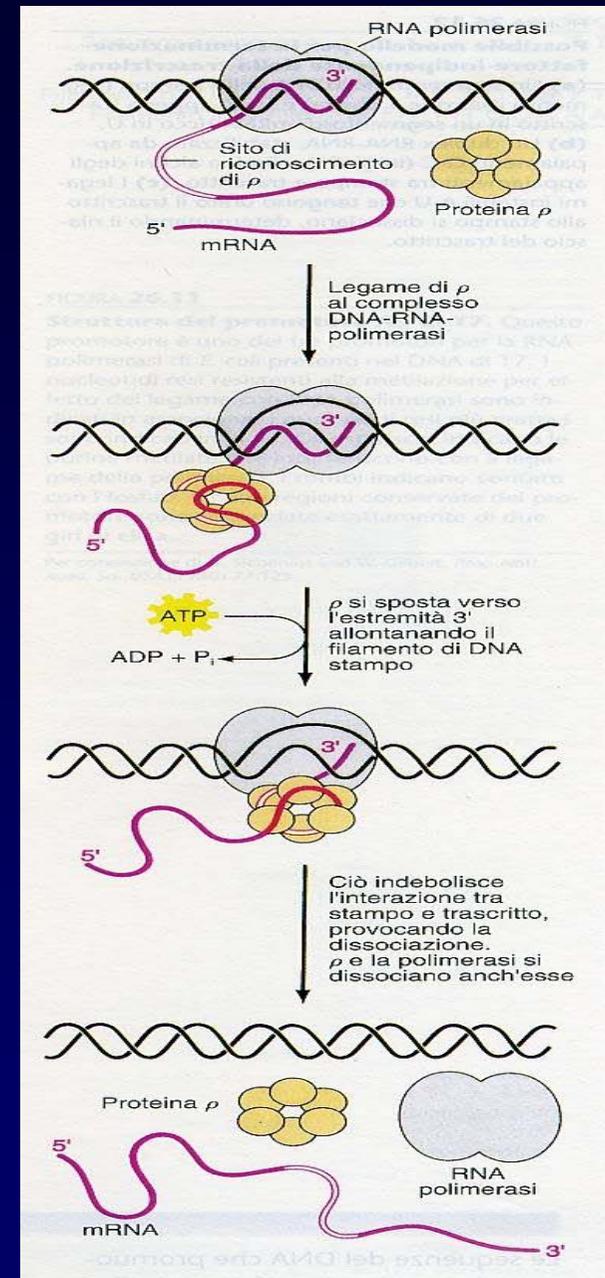


LA PROTEINA RHO

Essa si muove verso la bolla di trascrizione (attività ATPasica),

spezza la catena ibrida DNA-RNA, rimuovendo l'RNA;

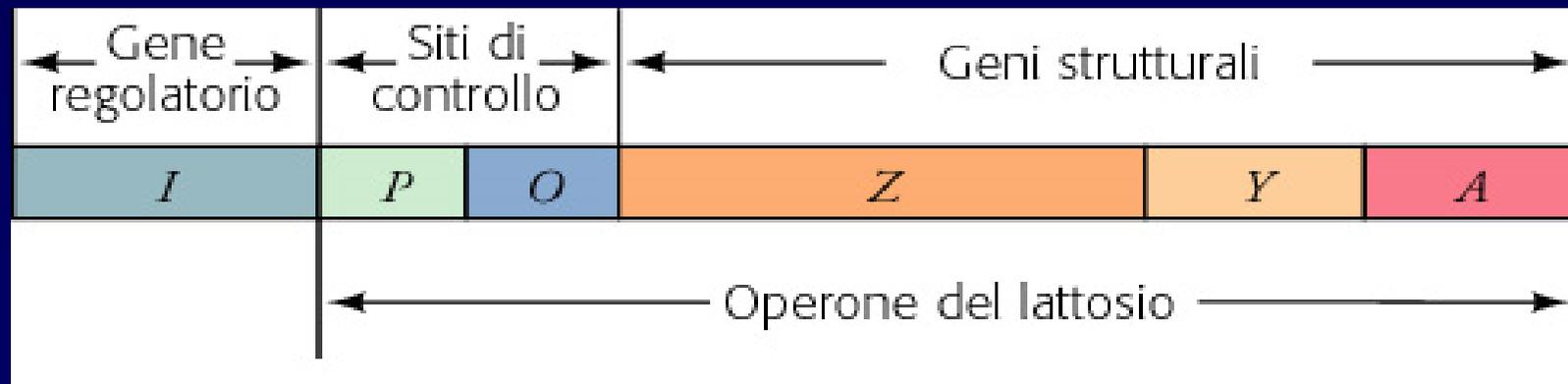
è quindi una **elicasi DNA-RNA** (ATP-dipendente), attivata quando la RNA polimerasi è in fase di stazionamento.



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

LA SINTESI PROTEICA

E' un processo mediato dall'azione coordinata di:

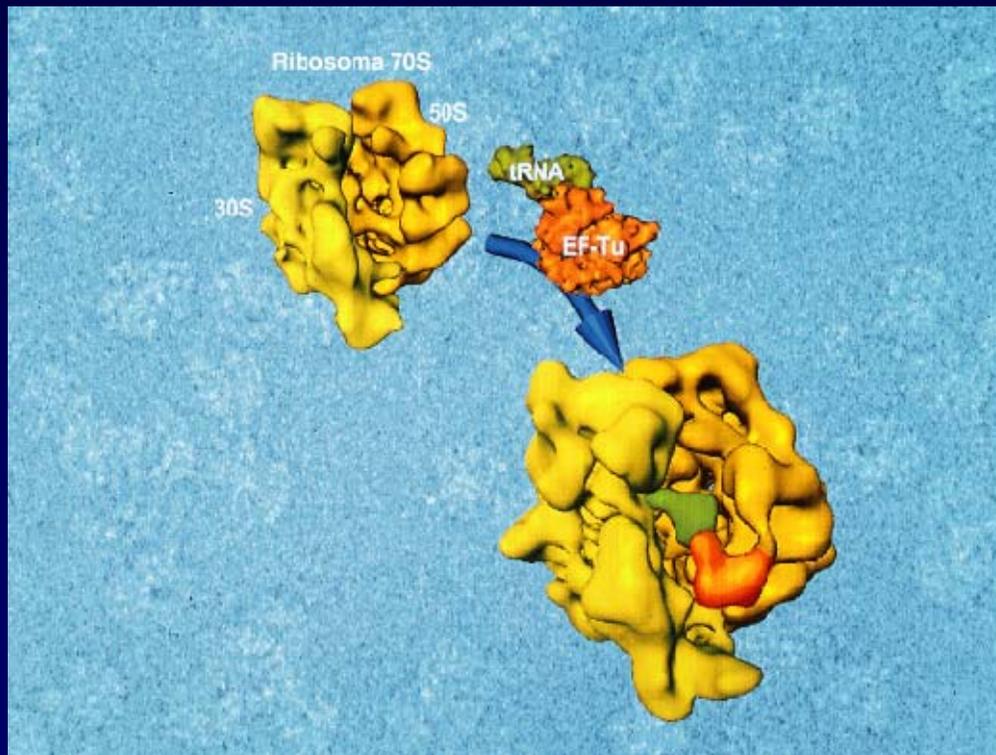
mRNA,

tRNA,

ribosomi,

enzimi attivanti,

fattori proteici.



LA SINTESI PROTEICA

Essa avviene in tre passaggi:

1. INIZIO

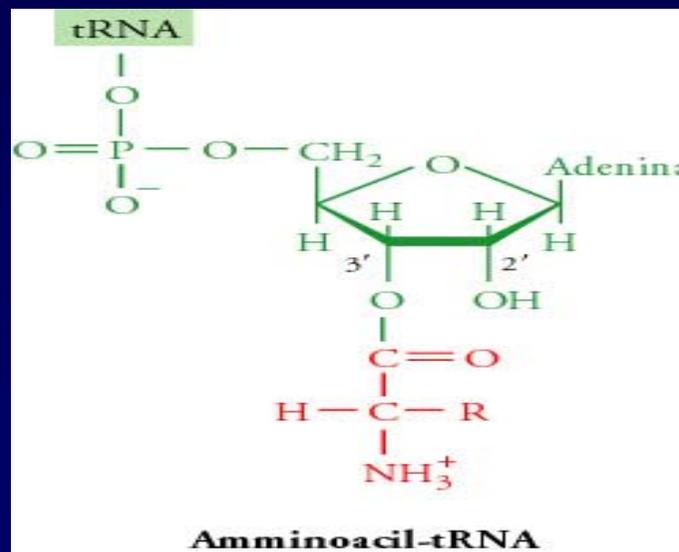
1. ALLUNGAMENTO

2. TERMINE

LA SINTESI PROTEICA

La traduzione inizia con l'attivazione (ATP dipendente) degli aminoacidi da parte delle **amminoacil-tRNA sintetasi**;

esse legano il gruppo carbossilico di un aminoacido al gruppo ossidrilico 2' o 3' dell'unità di adenosina del terminale 3' del tRNA.

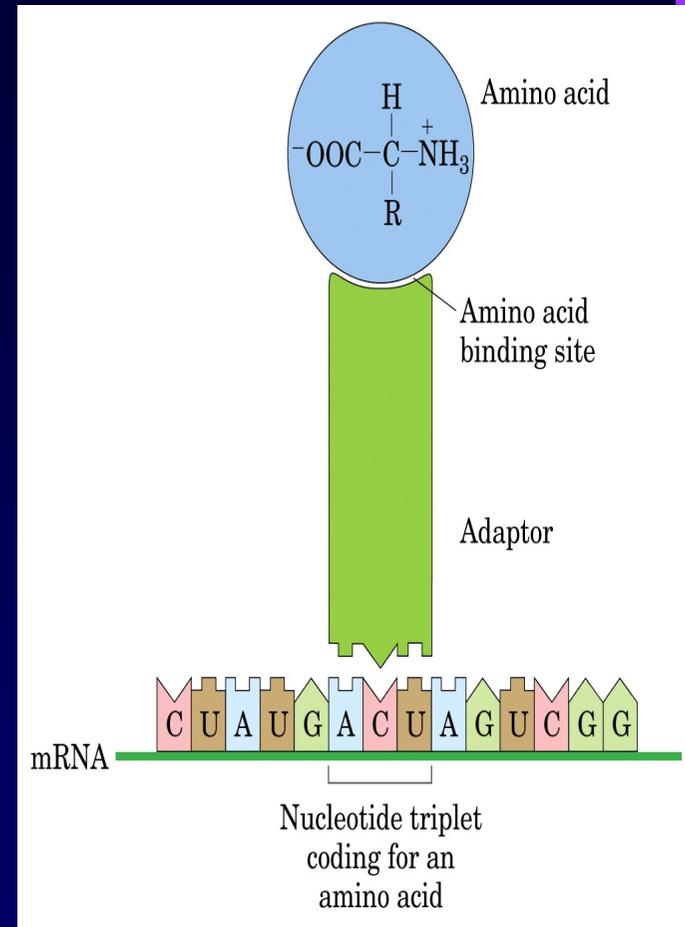


Il tRNA

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.



LE CARATTERISTICHE DEI tRNA

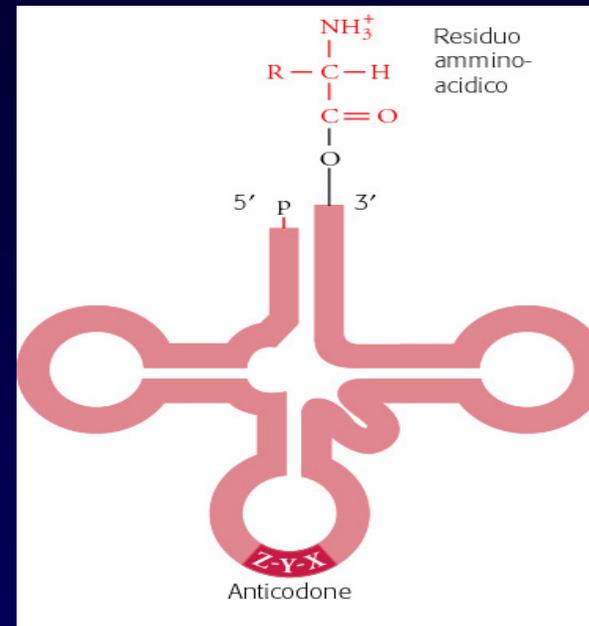
Sono catene singole,
presentano molte basi azotate insolite,
il terminale 5' è fosforilato,

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 azotate:

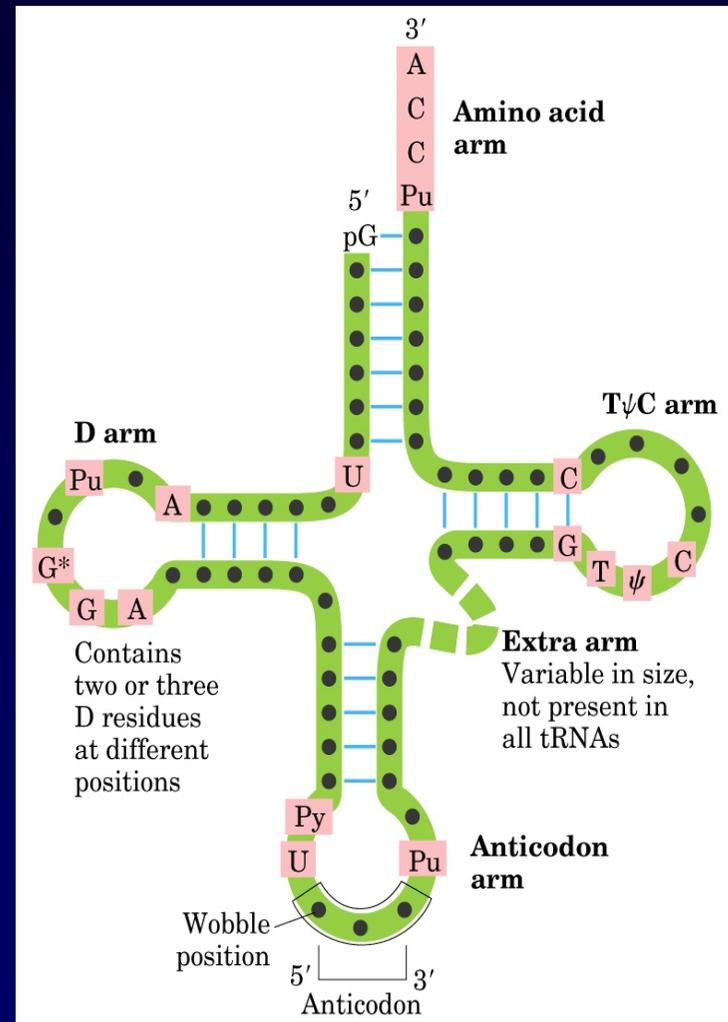
5'-pirimidina-pirimidina-X-Y-Z-purina modificata-base azotata variabile-3'.



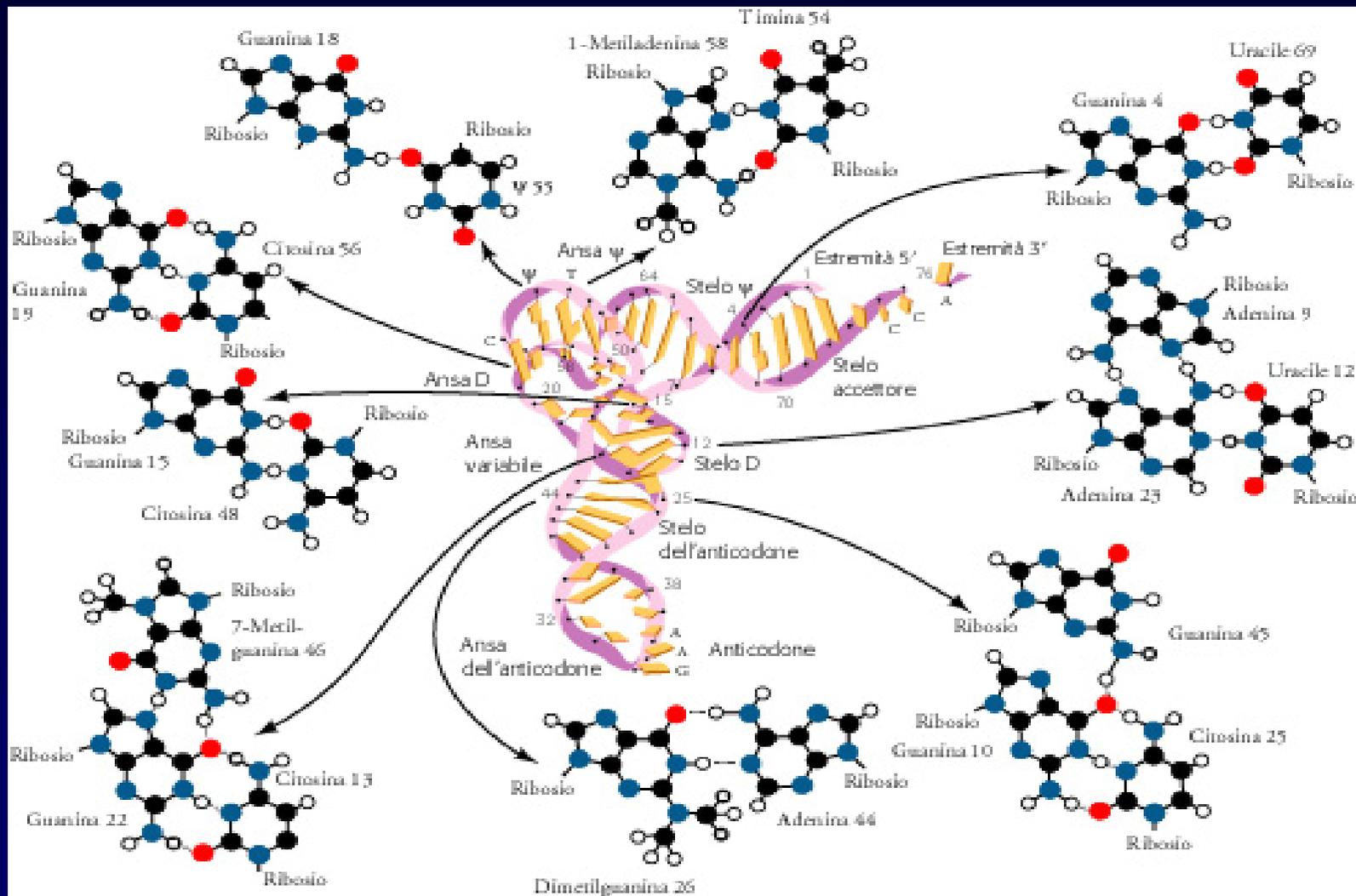
LA STRUTTURA DEL tRNA

I tRNA hanno un profilo a quadrifoglio, in cui la metà dei residui sono appaiati con formazione di legami idrogeno,

la metilazione di alcune basi impedisce l'accoppiamento delle stesse e conferisce idrofobicità ad alcune regioni del tRNA.

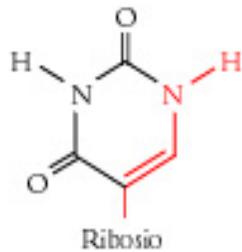


LA STRUTTURA DEL tRNA

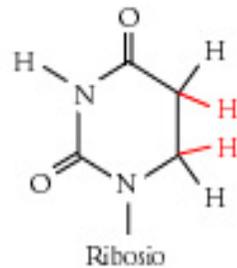


LE BASI AZOTATE INSOLITE PRESENTI NEL tRNA

Derivati dell'uracile

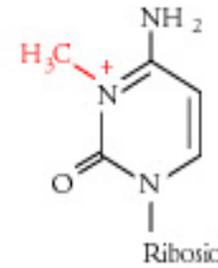


Pseudouridina (ψ)

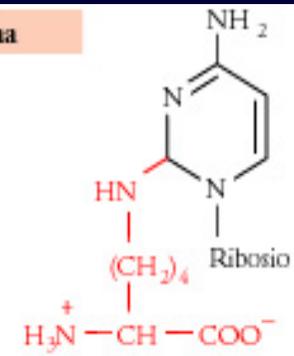


Diidrouridina (D)

Derivati della citosina

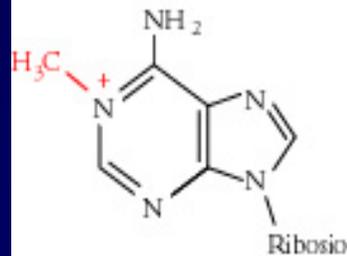


3-Metilcitosina (m^3C)

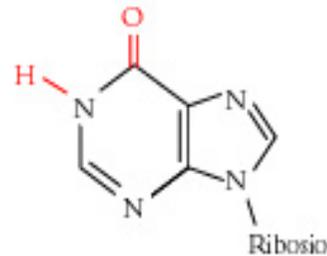


Lisidina (L)

Derivati dell'adenina

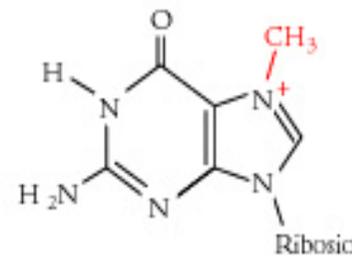


1-Metiladenosina (m^1A)

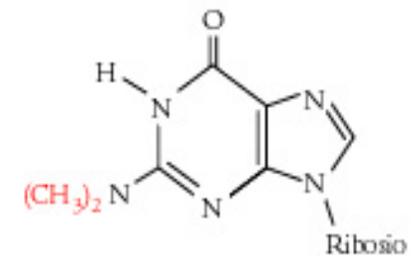


Inosina (I)

Derivati della guanina



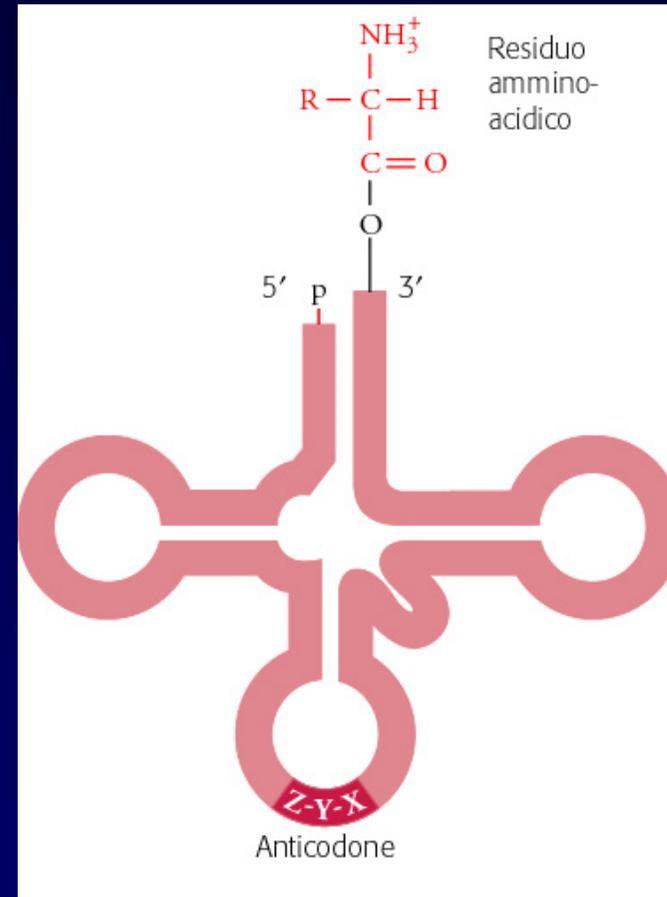
N^7 -Metilguanossina (m^7G)



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

IL tRNA É UNA MOLECOLA ADATTATRICE

Infatti, esso riconosce sia l'enzima che catalizza l'attacco dell'amminoacido corretto, sia il codon dell'mRNA.



LA STRUTTURA TRIDIMENSIONALE DEL tRNA

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

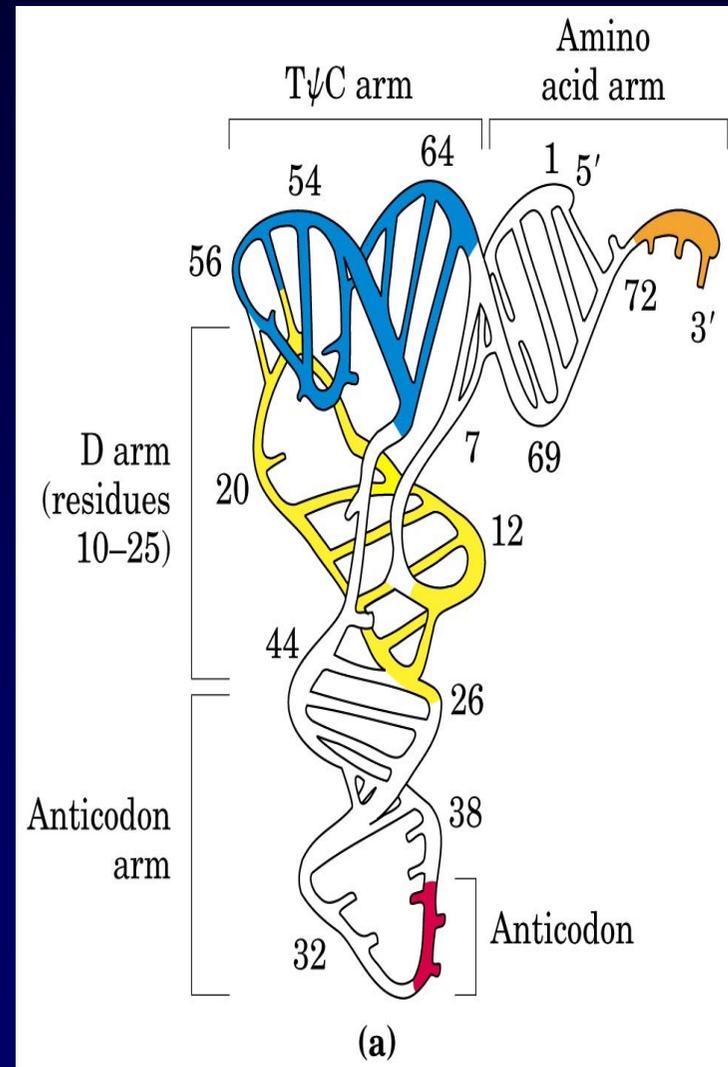
ci sono due segmenti a doppia elica,

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

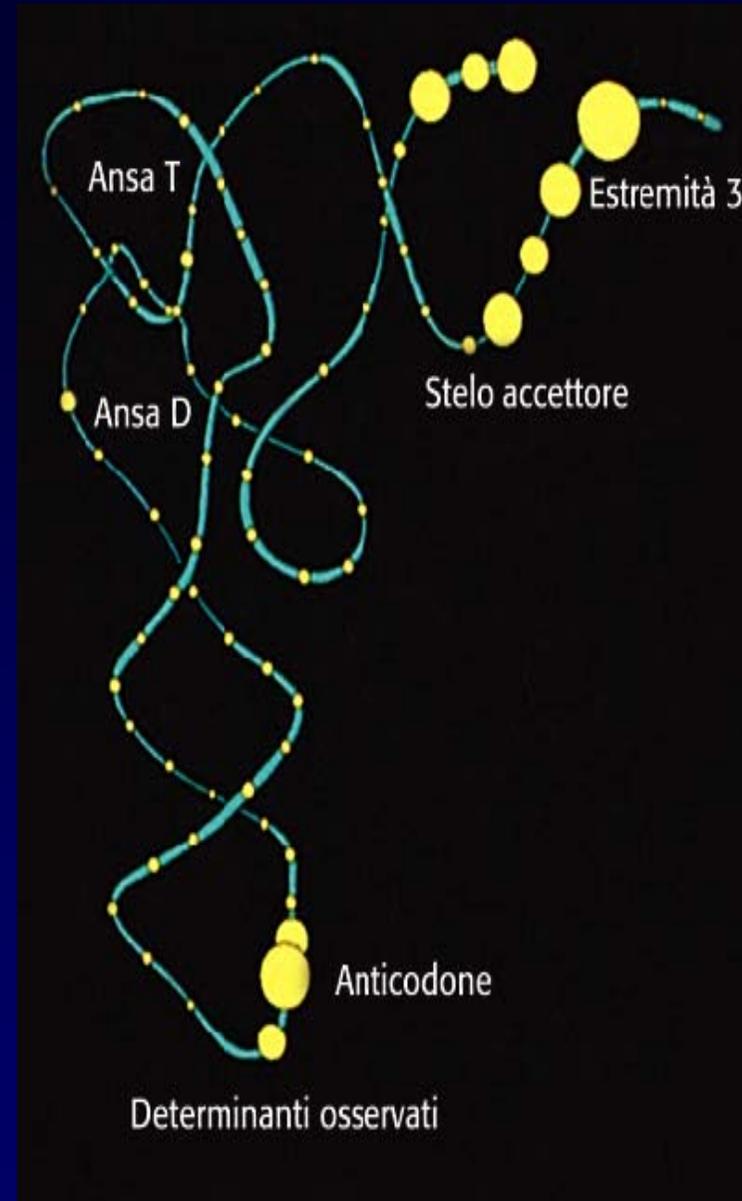
il terminale CCA e l'ansa dell'anticodon sono alle due estremità della molecola,

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

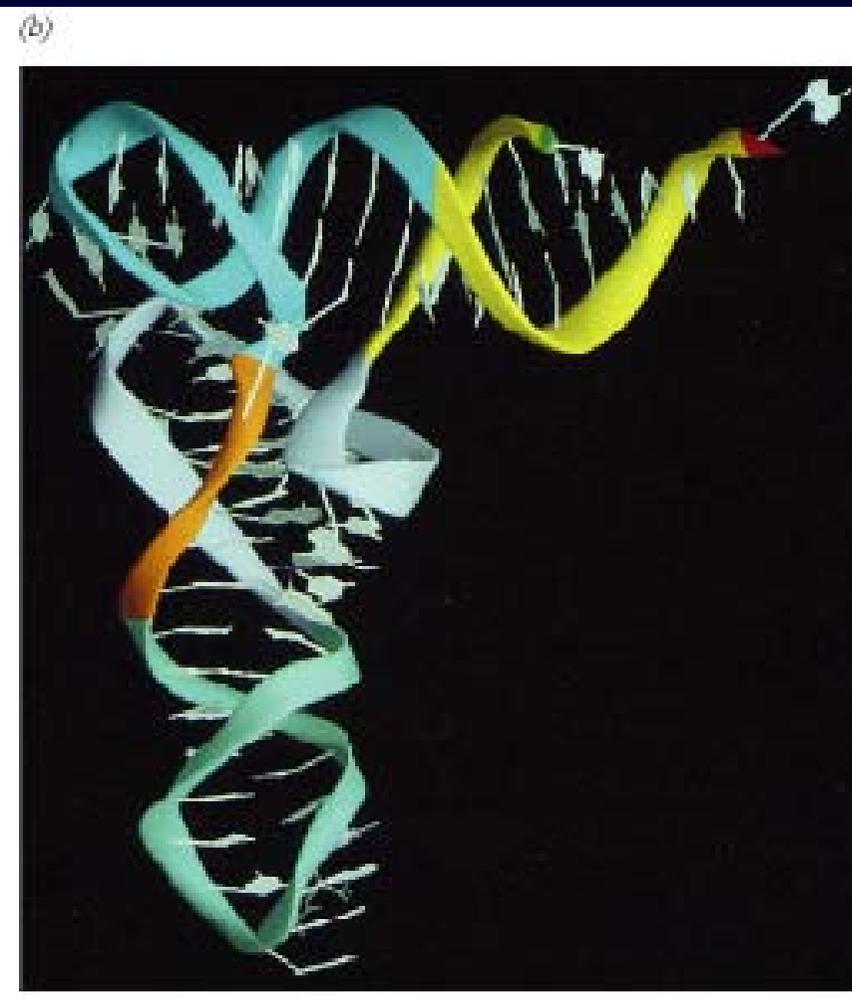
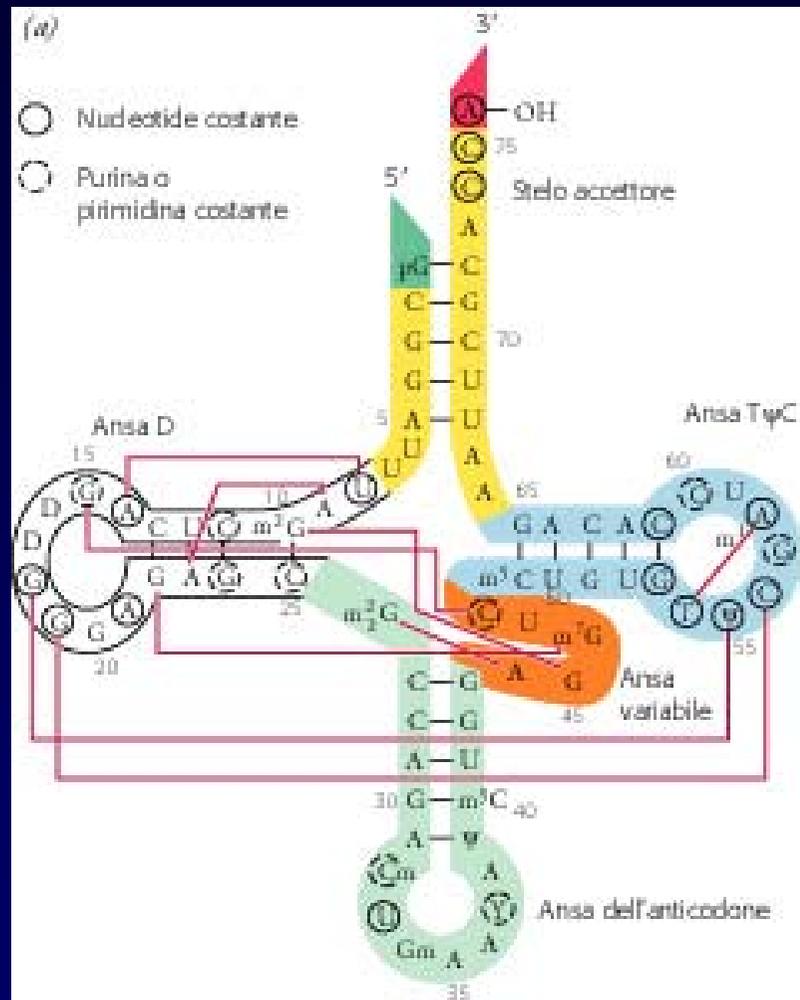
il tRNA per la fenilalanina del lievito



LA STRUTTURA AD L DEL tRNA



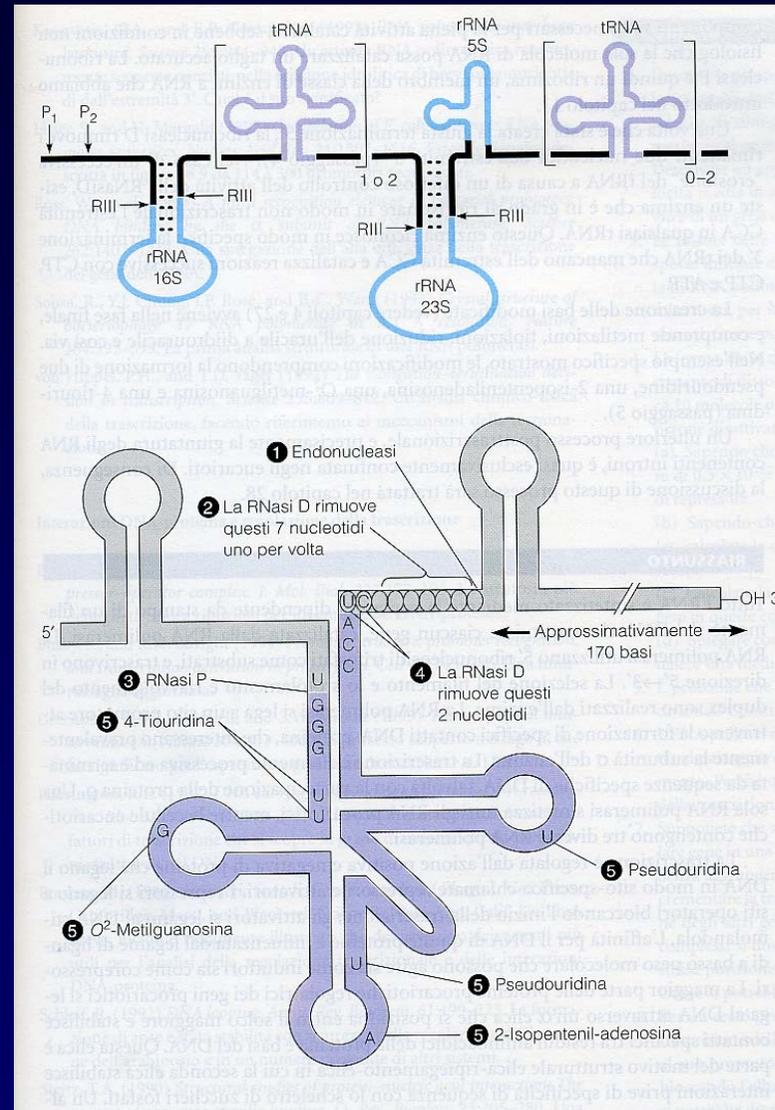
LA STRUTTURA DEL tRNA



LA FORMAZIONE DEL tRNA

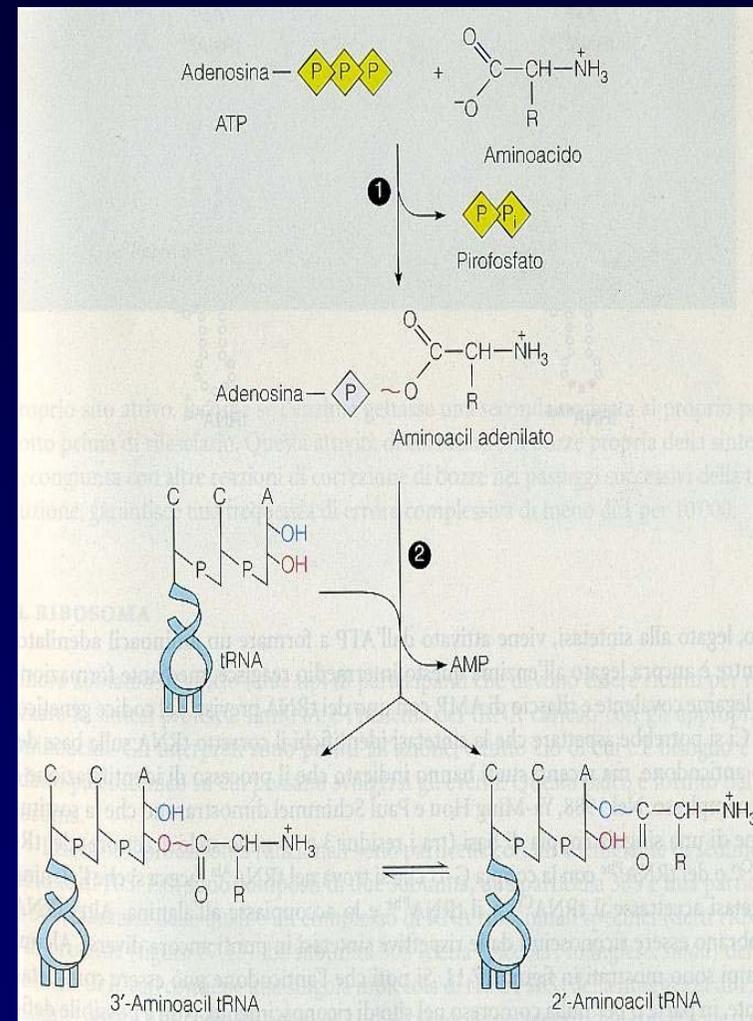
I trascritti batterici subiscono un riarrangiamento post-trascrizionale, con scissioni da parte di endonucleasi ed esonucleasi,

le molecole di tRNA si formano attraverso il taglio di trascritti primari, ad opera della ribonucleasi P.

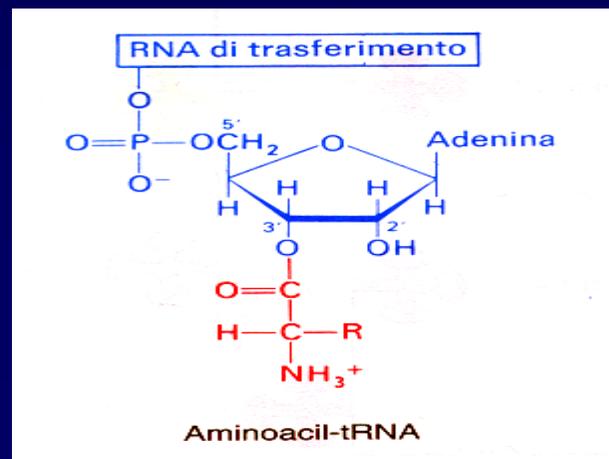
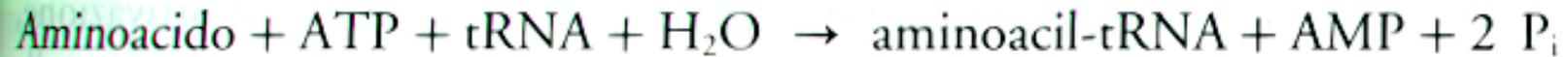
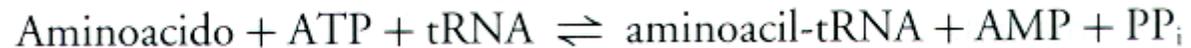
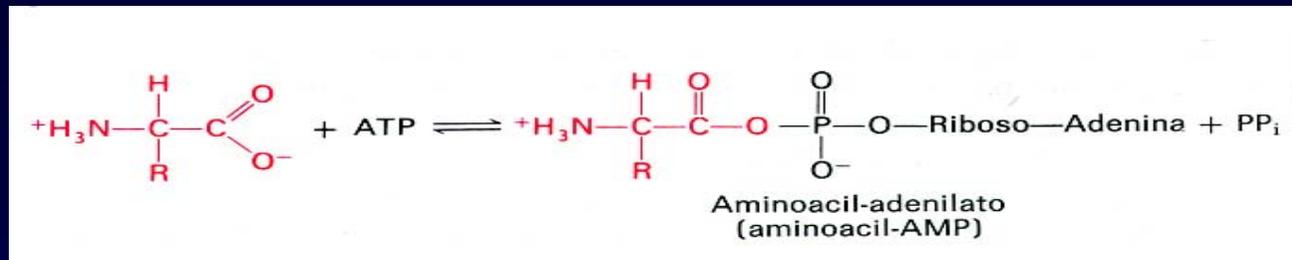


GLI AMMINOACIDI SONO ATTIVATI E LEGATI DA SINTETASI SPECIFICHE A tRNA SPECIFICI

La formazione degli
amminoacil-tRNA
ad opera delle
amminoacil tRNA sintetasi:

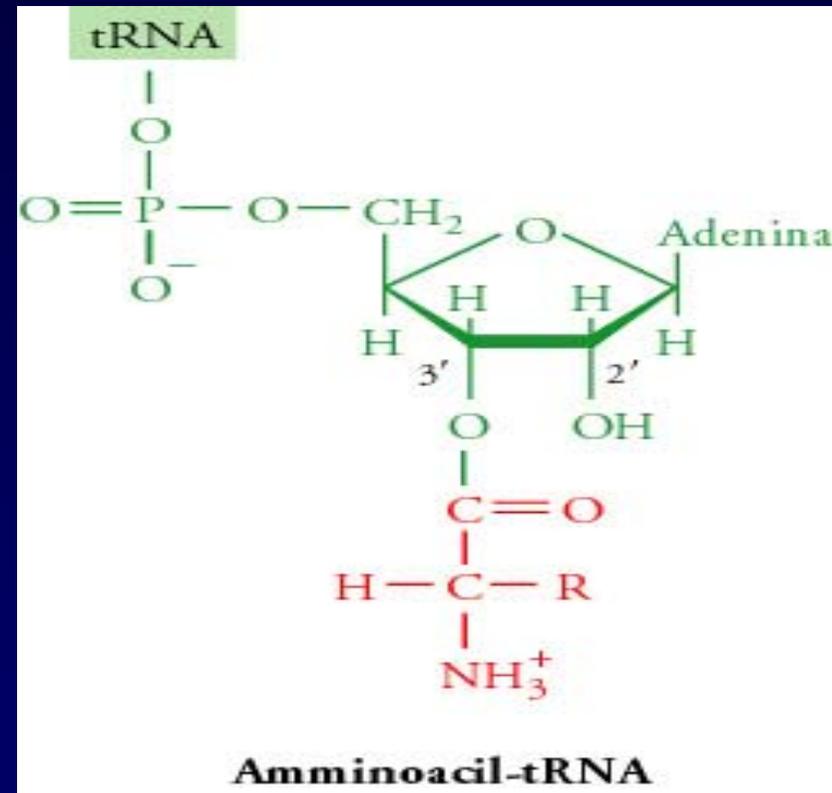


L'ATTIVAZIONE DEGLI AMMINOACIDI



L'AMMINOACIL-tRNA

L'amminoacido può reagire sia con il gruppo ossidrilico 2', sia con il 3';
sembra in grado di passare dall'uno all'altro di questi siti.



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;

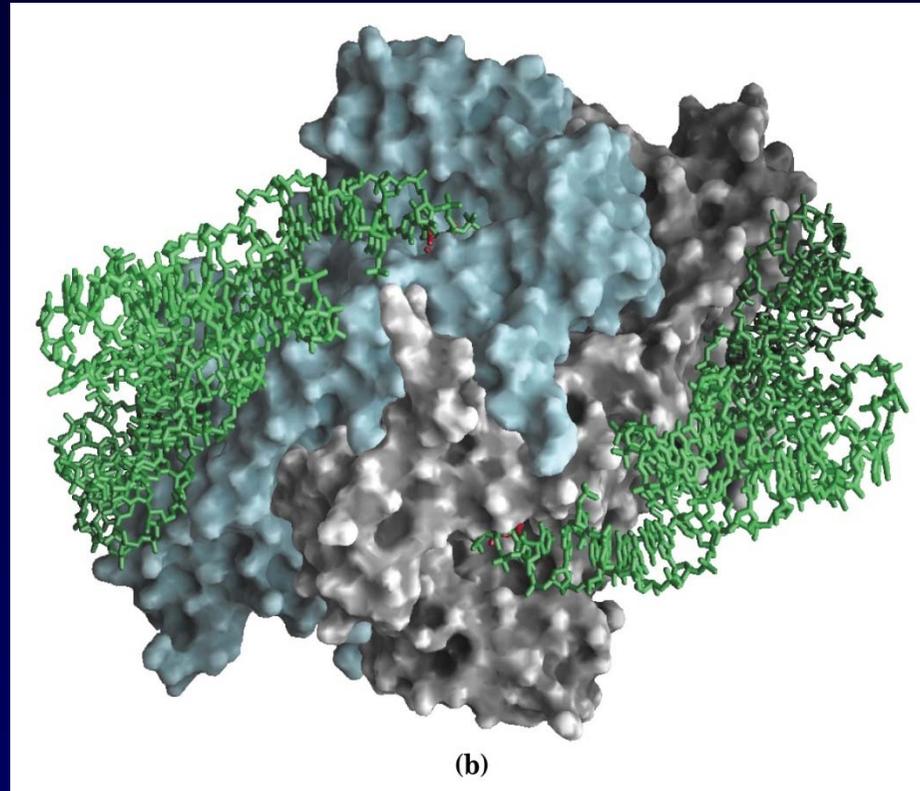
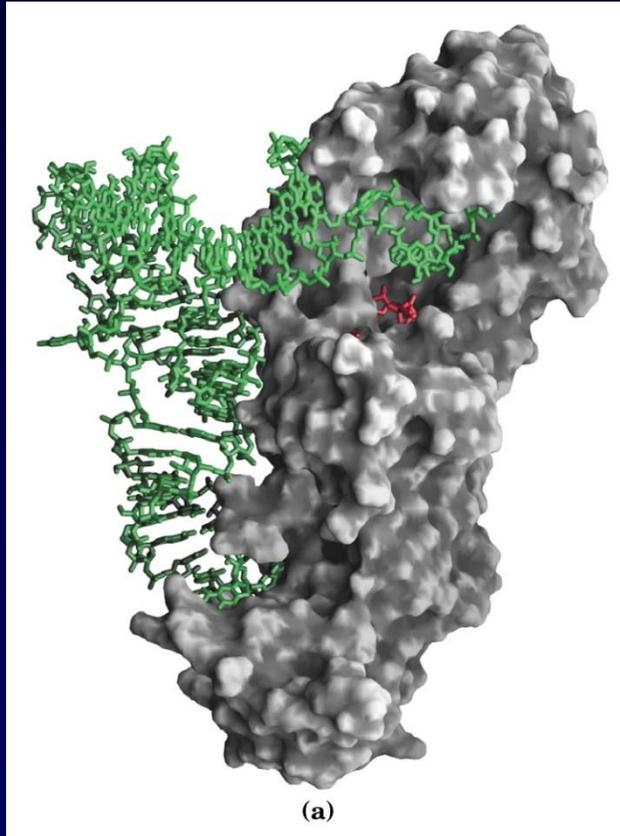
per ciascun amminoacido esiste almeno un

enzima attivante specifico

ed almeno un

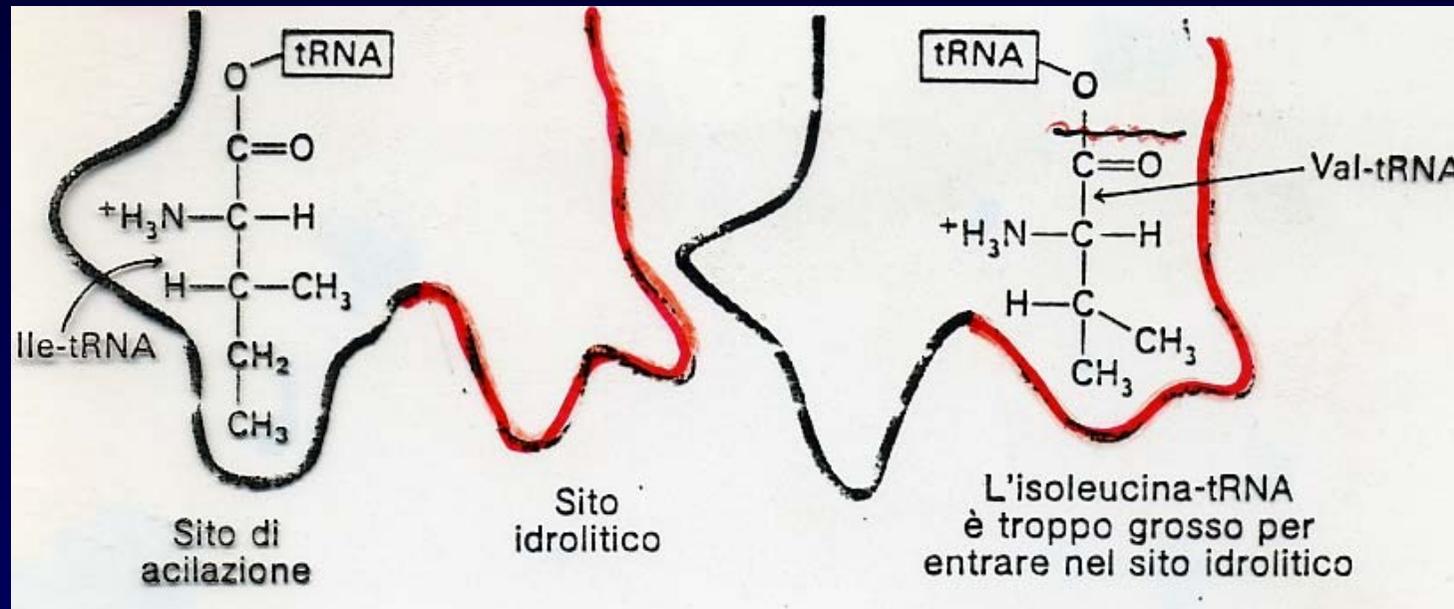
tRNA specifico.

L'AMMINOACIL-tRNA SINTETASI



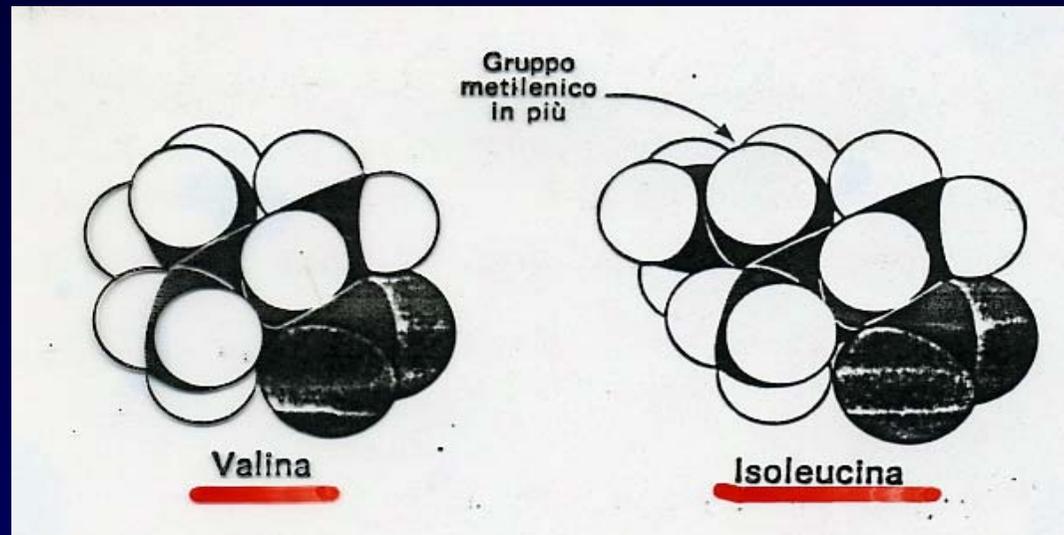
Amminoacil-tRNA sintetasi complessate con tRNA (verde) e ATP (rosso):
a) Gln-tRNA sintetasi di E.coli (enzima monomero)
b) Asp-tRNA sintetasi di lievito (enzima dimerico)

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.

LA FEDELTÀ DELLA SINTESI PROTEICA

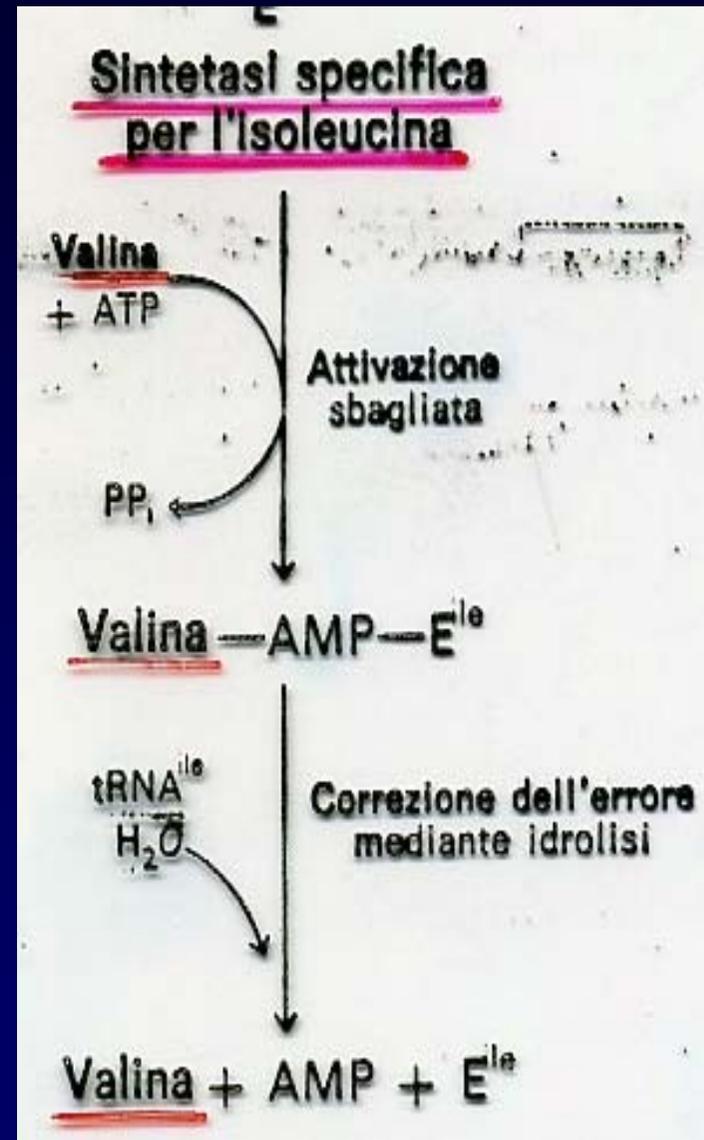


La **fedeltà** della sintesi proteica dipende dall'alta specificità delle aminoacil-tRNA sintetasi.

L'amminoacil-tRNA sintetasi **corregge** i suoi errori.

LA FEDELTA' DELLA SINTESI PROTEICA

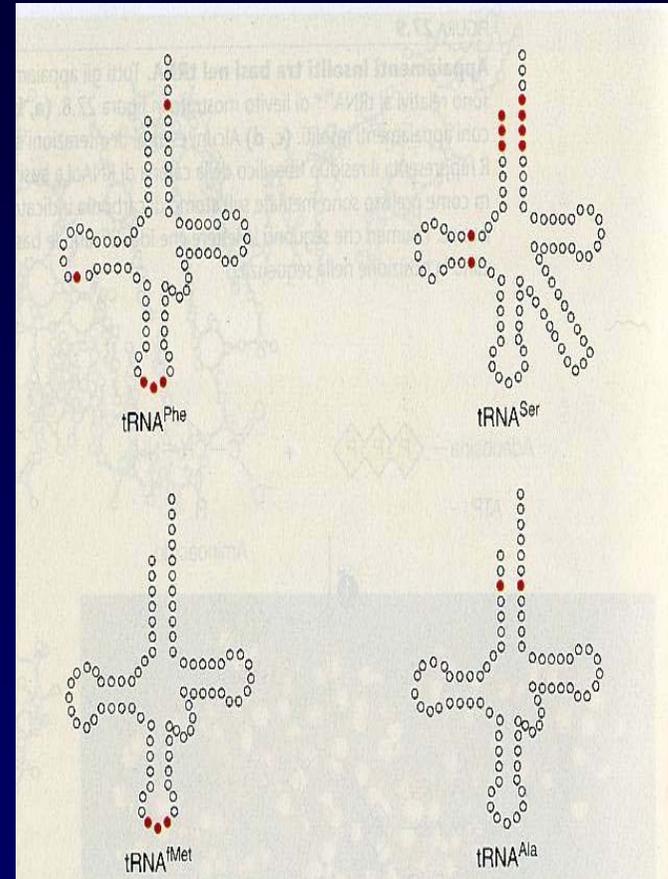
La correzione degli errori
mediante idrolisi di un
amminoacil-AMP non corretto.



LE SINTETASI RICONOSCONO I LORO tRNA ATTRAVERSO:

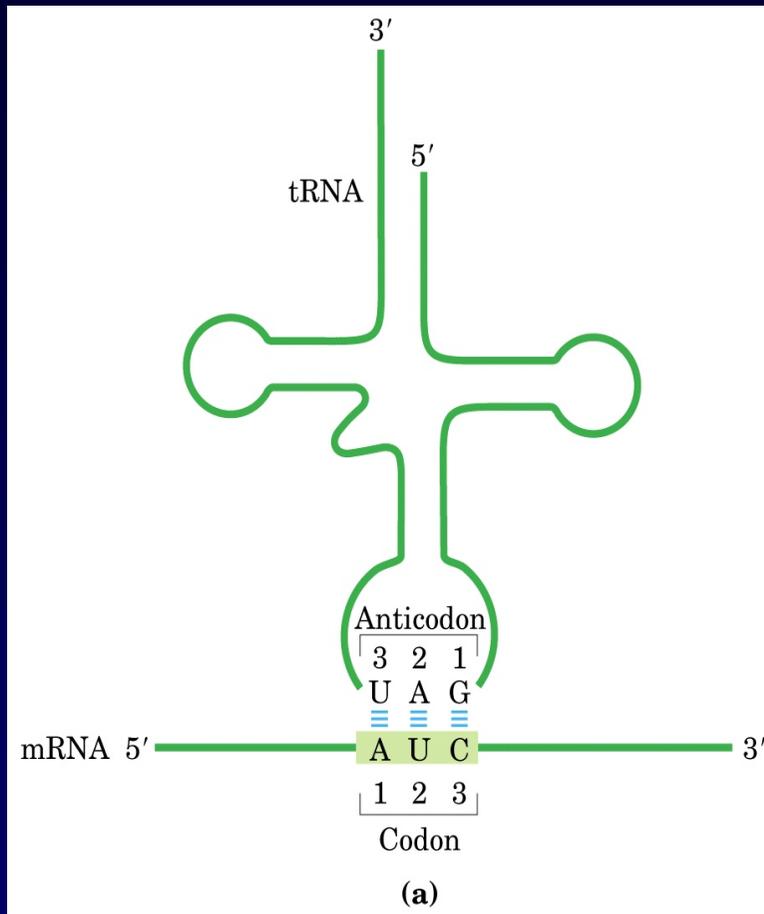
- 1) l'ansa dell'anticodon,
- 2) frammenti specifici (es. una microelica di 24 nucleotidi nel caso del tRNA^{ALA}) riconosciuti dalle sintetasi corrispondenti;

non è comunque possibile definire regole semplici e sempre valide.



Principali "elementi di
identificazione" in 4 tRNA

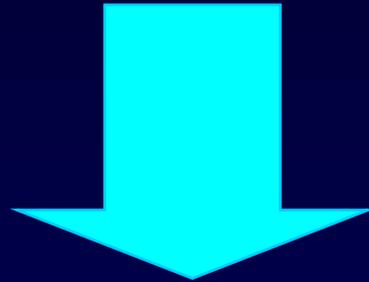
LA SINTESI PROTEICA



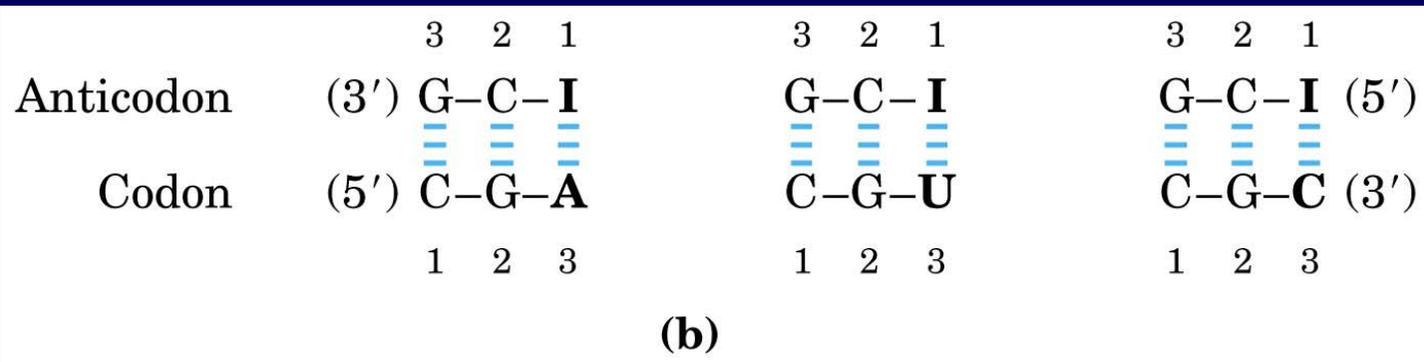
L'mRNA riconosce l'anticodon e non l'amminoacido legato al tRNA.

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

L'IPOTESI DELL'OSCILLAZIONE



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



L'IPOTESI DELL'OSCILLAZIONE

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

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

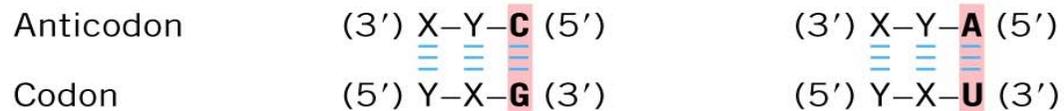
Base in posizione 5' nell'anticodone		Base in posizione 3' nel codone
G	si appaia con	C o U
C	si appaia con	G
A	si appaia con	U
U	si appaia con	A o G
I	si appaia con	A, U o C

LA BASE OSCILLANTE DETERMINA QUANTI CODONI POSSONO ESSERE RICONOSCIUTI DA UN tRNA.

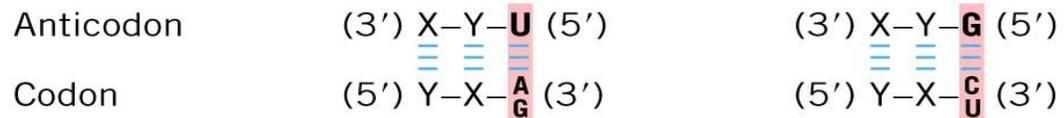
table 27-5

How the Wobble Base of the Anticodon Determines the Number of Codons a tRNA Can Recognize*

1. One codon recognized:



2. Two codons recognized:



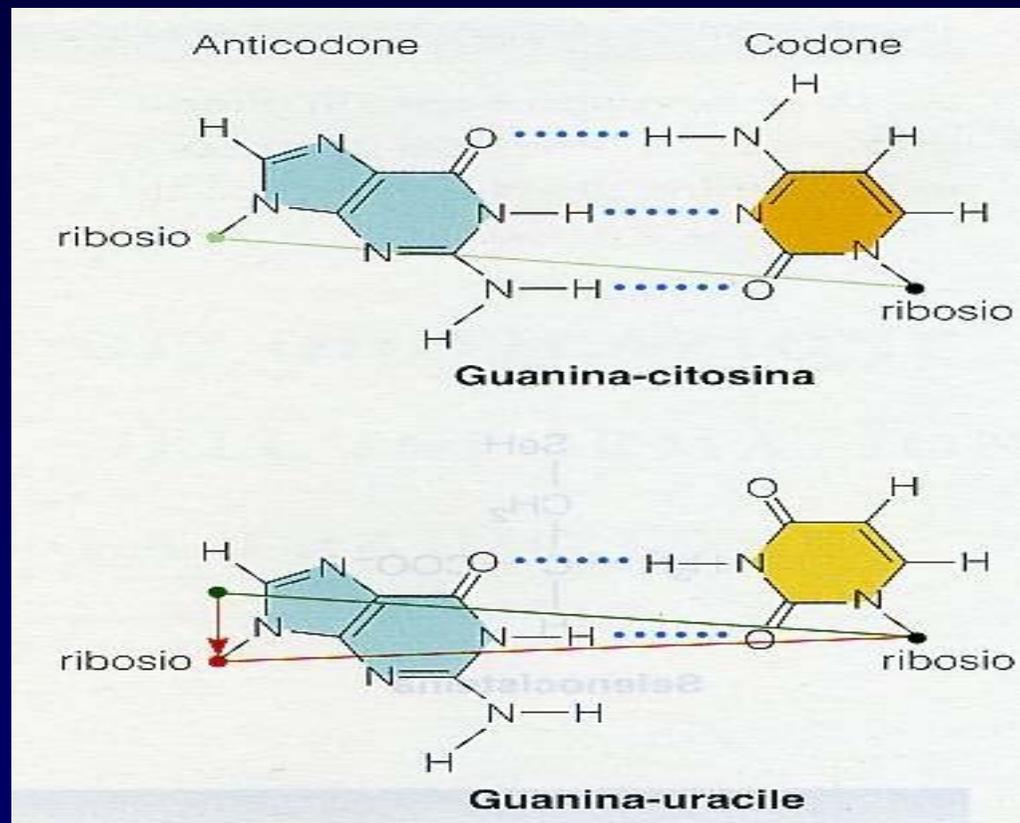
3. Three codons recognized:



*X and Y denote complementary bases capable of strong Watson-Crick base pairing with each other. The bases in the wobble positions—the 3' position of codons and 5' position of anticodons—are shaded in red.

IL CODICE É RIDONDANTE

Infatti molti codoni possono corrispondere a singoli amminoacidi, attraverso l'oscillazione nella posizione 5' dell'anticodone.



IL CODICE GENETICO

é un codice a tre basi

Codice a aminoacidi specificati

1 base	→	4
2 basi	→	16
3 basi	→	64

il codice non è sovrapposto,

61 triplette specificano amminoacidi, le restanti 3 indicano la fine della catena;

esso é degenerato, perché per la maggior parte degli amminoacidi esiste più di una parola di codice.

IL CODICE GENETICO

<i>Prima posizione (terminale 5')</i>	<i>Seconda posizione</i>				<i>Terza posizione (terminale 3')</i>
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

IL CODICE GENETICO

Il codice non è ambiguo: un codon designa un solo aminoacido,

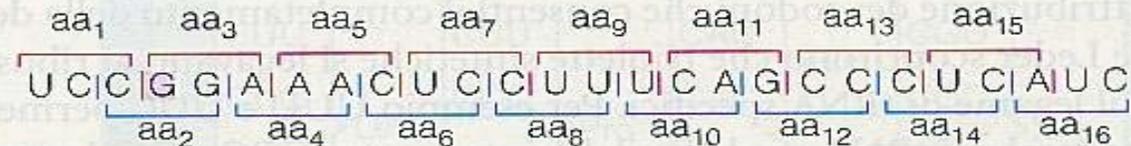
codon che specificano lo stesso aminoacido sono chiamati sinonimi.

La degenerazione minimizza l'effetto deleterio delle mutazioni.

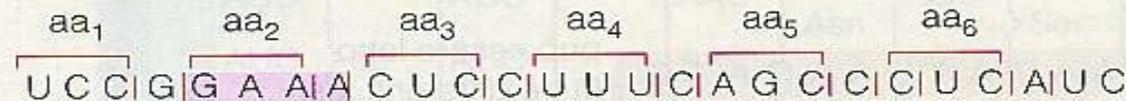
Solo triptofano e metionina sono codificati da una sola tripletta.

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

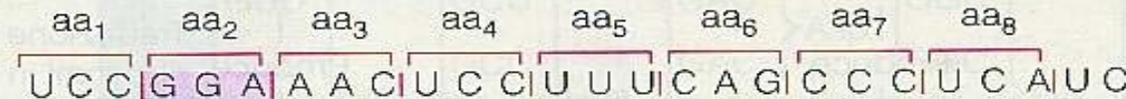
I TRE TIPI POSSIBILI DI CODICE GENETICO



(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.



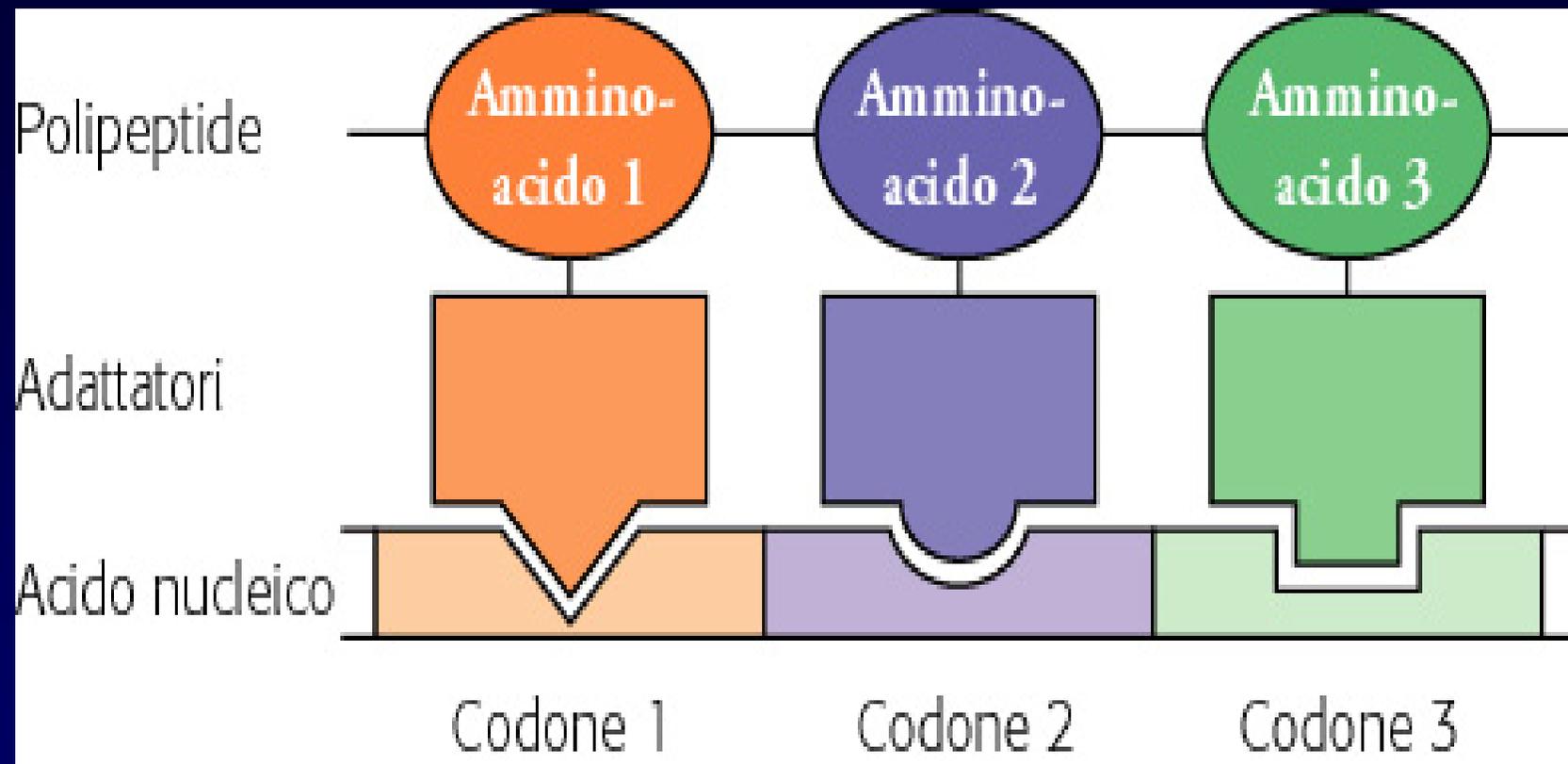
(b) Codice punteggiato. Le delezioni di quattro nucleotidi (o multipli di quattro) dovrebbero ripristinare la fase di lettura.



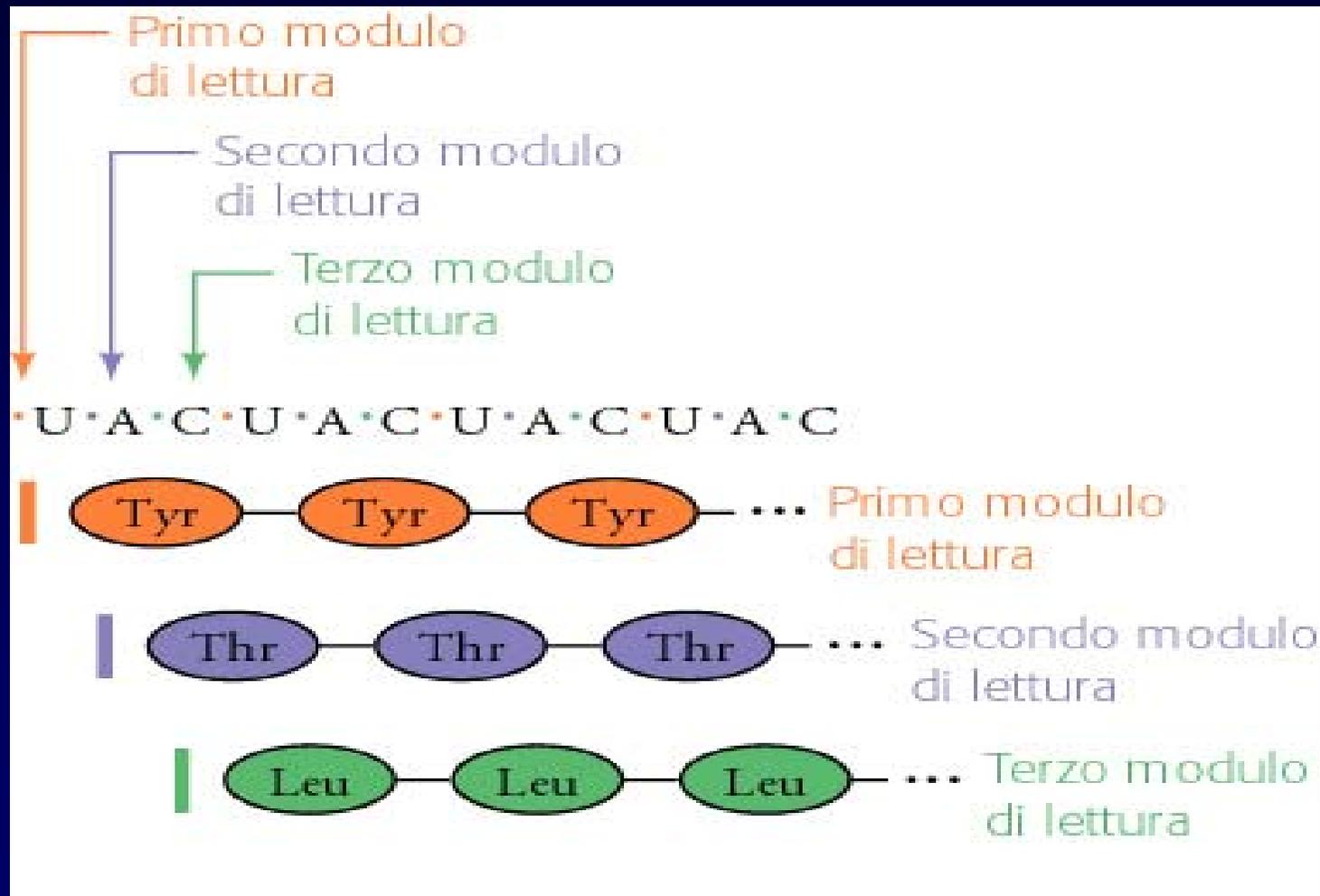
(c) Codice non punteggiato. Le delezioni di tre nucleotidi (o multipli di tre) dovrebbero ripristinare la fase di lettura. Il codice ha in realtà questa forma.

Il codice genetico é un codice a triplette non sovrapposte, privo di punteggiatura (c).

IL CODICE GENETICO È PRIVO DI PUNTEGGIATURA



I TRE POTENZIALI MODULI DI LETTURA DI UN mRNA



IL CODICE GENETICO

La tripletta **AUG** (o **GUG**) indica l'inizio della catena,

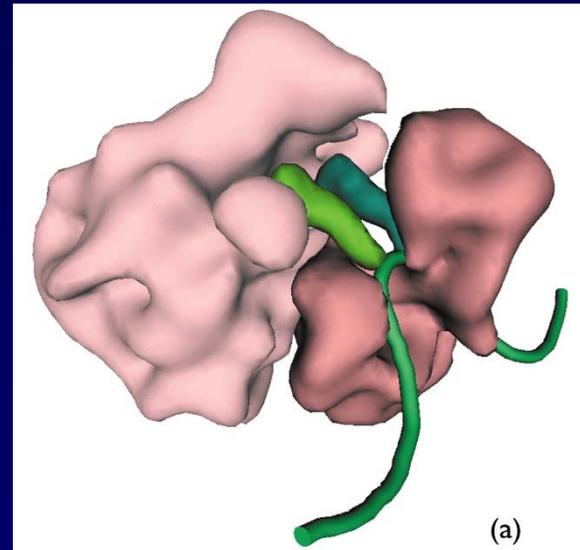
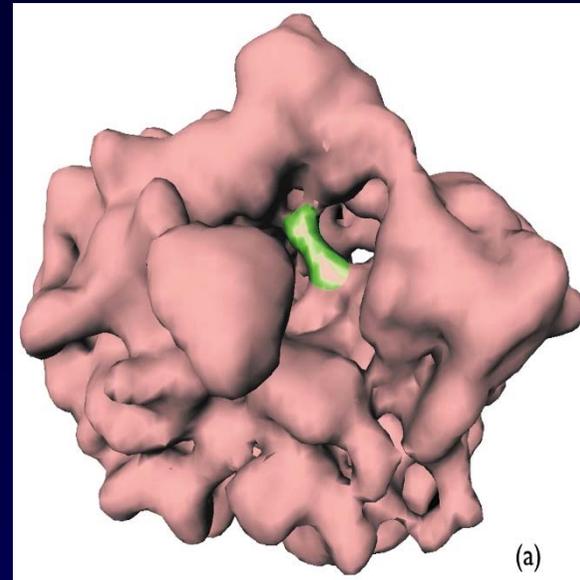
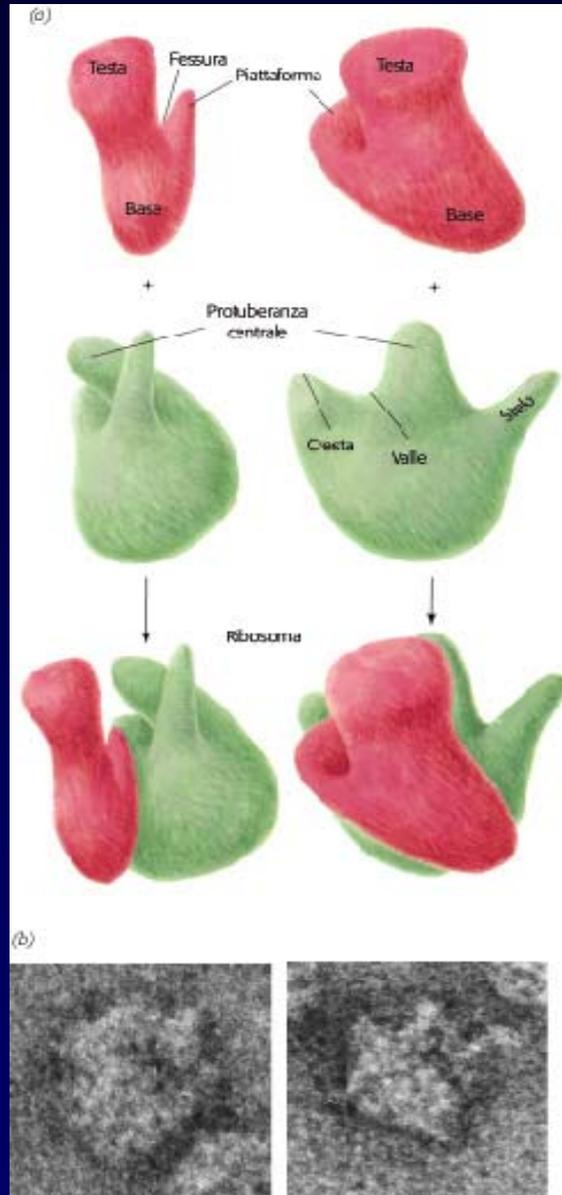
le triplette **UAA**, **UAG** e **UGA** indicano la fine della catena,

le triplette di inizio e di stop sono riconosciute da proteine specifiche chiamate **fattori d'inizio e di rilascio**.

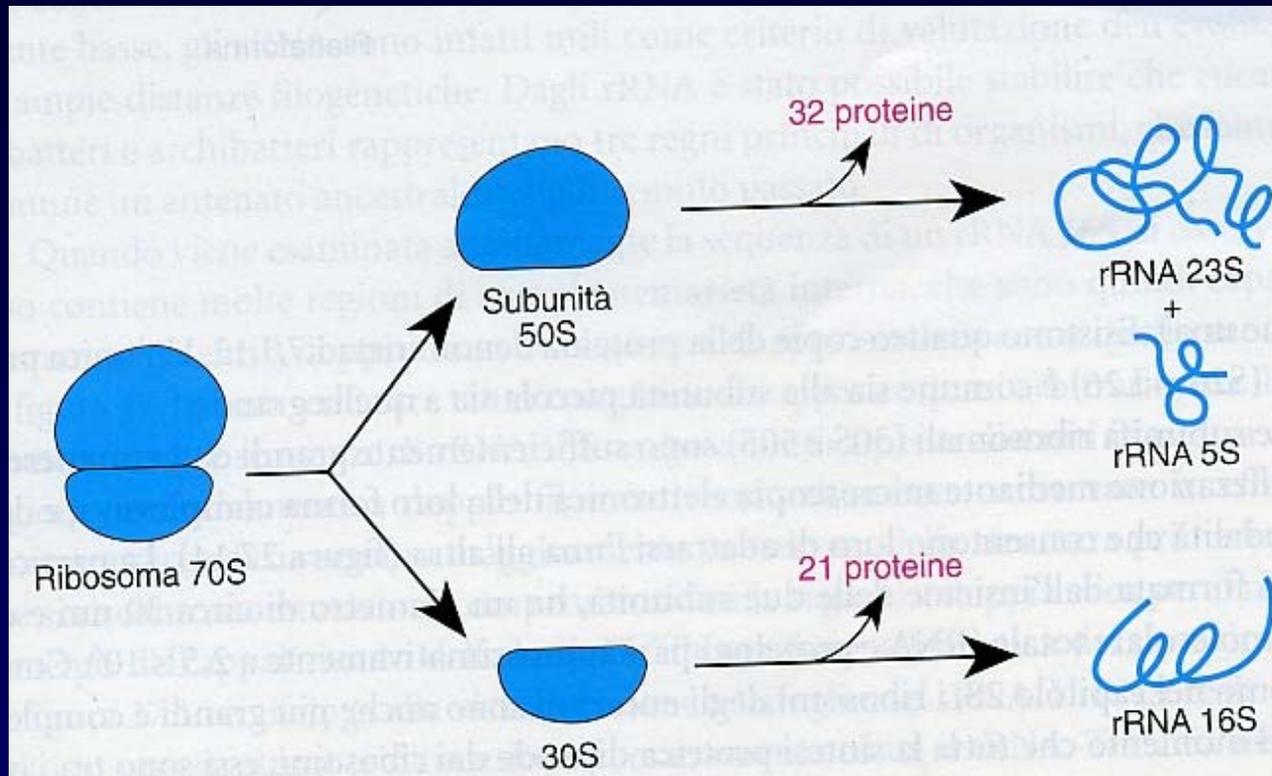
LE MODIFICAZIONI DEL CODICE GENETICO

Codone	Uso normale	Uso alternativo	Sedi in cui si verifica l'uso alternativo
AGA AGG	Arg	Stop, Ser	Alcuni mitocondri animali, alcuni protozi
AUA	Ile	Met	Mitocondri
CGC	Arg	Trp	Mitocondri di piante
CUU CUC CUA CUG	Leu	Thr	Mitocondri di lievito
AUU GUG UUG	Ile Val Leu	Inizio (fMet)	Alcuni procarioti ^a
UAA UAG	Stop	Glu	Alcuni protozoi
UGA	Stop	Trp Selenocisteina	Mitocondri, micoplasm <i>E. coli</i> ^a

I R I B O S O M I



I RIBOSOMI



In essi avviene la sintesi proteica.

Sono formati da una subunità maggiore e da una minore, ciascuna costituita per 1/3 da proteine e per 2/3 da rRNA.

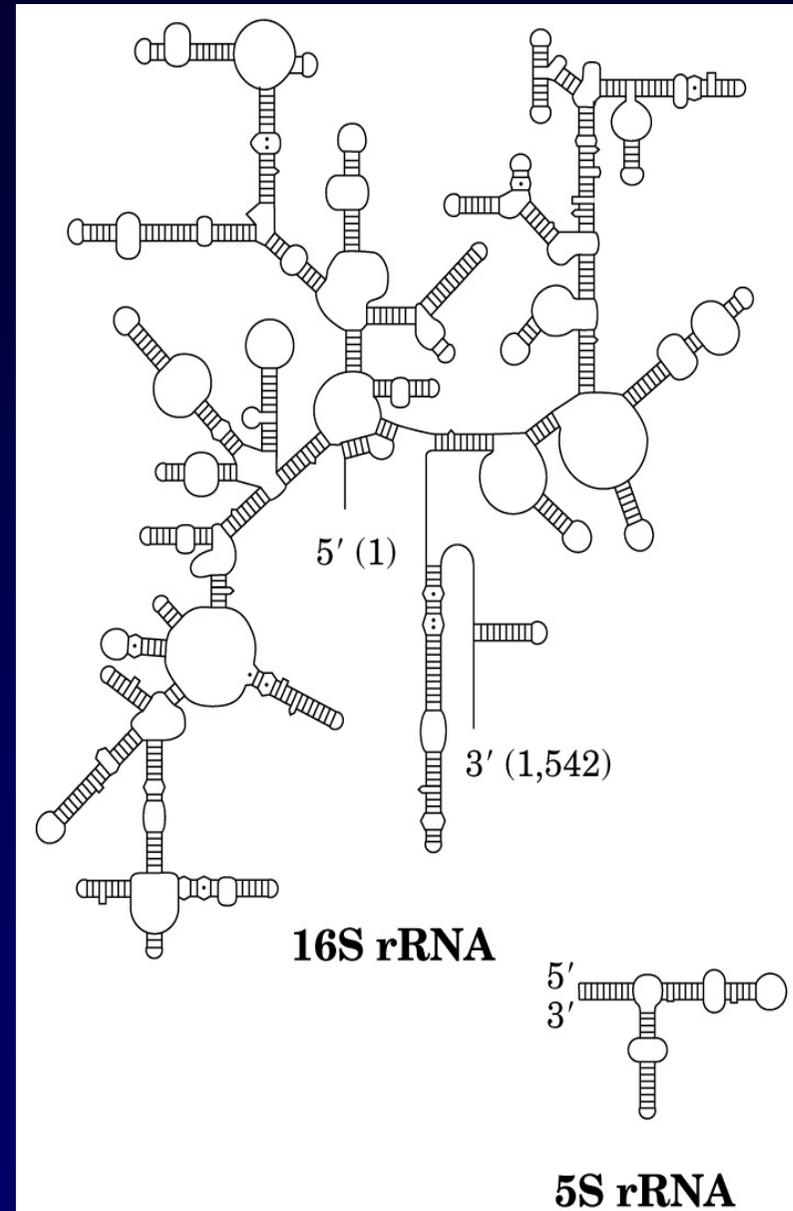
Una cellula di E.coli contiene circa 15000 ribosomi.

I RIBOSOMI

L'rRNA costituisce circa i 2/3 della massa dei ribosomi, con presenza di brevi regioni a doppia elica,

i tre rRNA (5S, 16S, 23S) svolgono attive funzioni nella sintesi proteica e probabilmente sono i regolatori principali del processo,

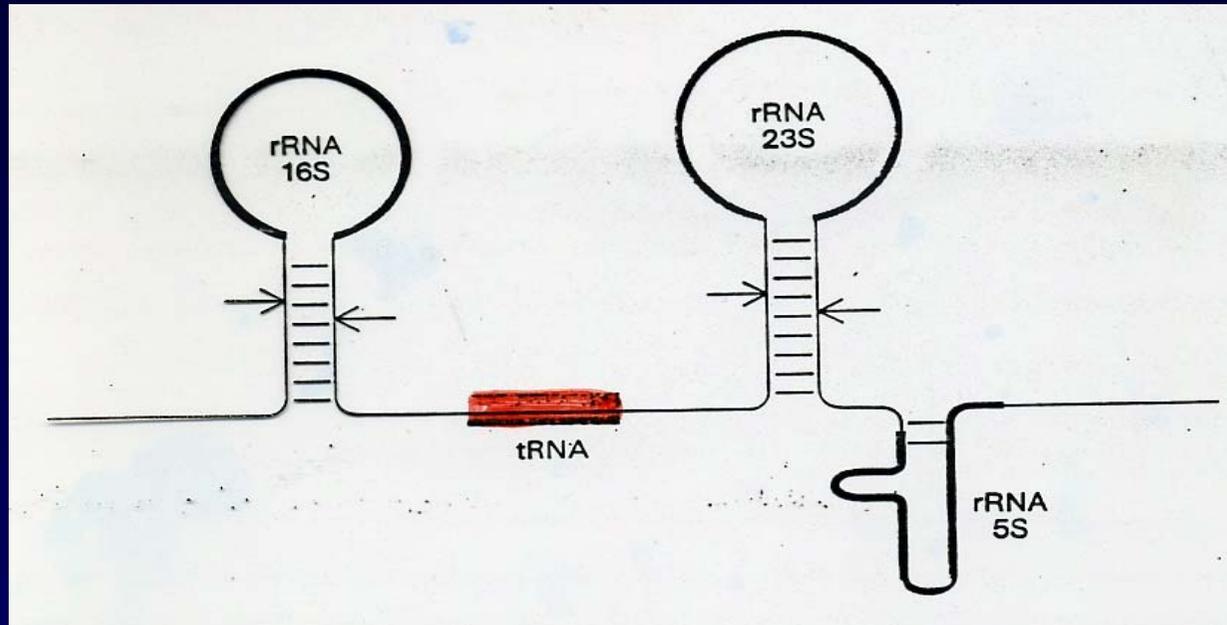
si pensa che le proteine svolgano principalmente un ruolo di impalcatura molecolare.



IL RUOLO FONDAMENTALE DEGLI rRNA NELLA SINTESI PROTEICA

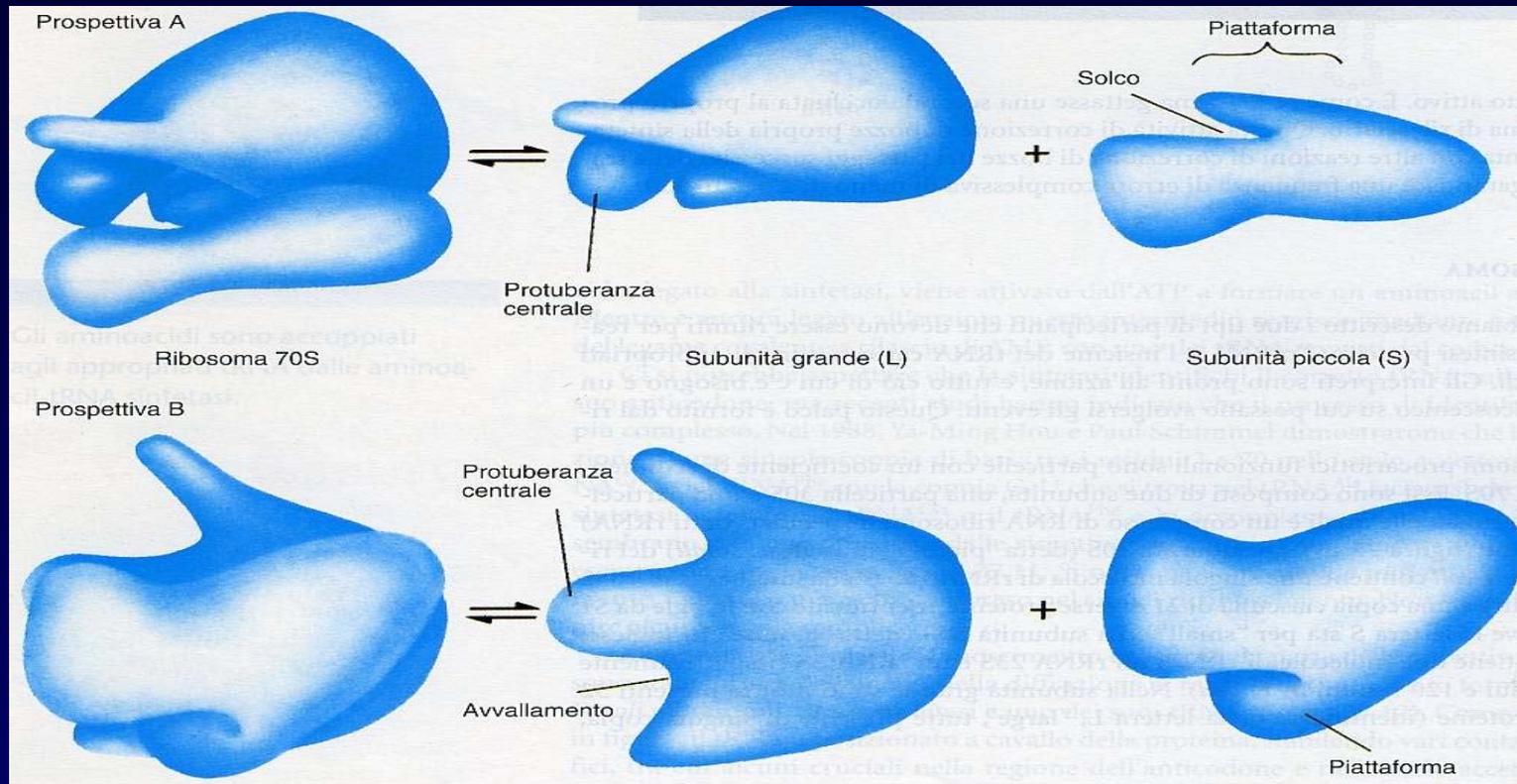
- A) La rottura di un solo legame dell'rRNA 16S inibisce totalmente la sintesi proteica,
- B) la rimozione di alcune proteine riduce l'attività ribosomiale, senza perdita della funzione,
- C) è una sequenza dell'rRNA 16S a scegliere il sito di inizio dell'mRNA,
- D) ribosomi quasi totalmente privi di proteine catalizzano ancora la formazione di legami peptidici, mentre l'rRNA 23S (enzima peptidil transferasi) è essenziale per questa attività,
- E) gli antibiotici inibenti la sintesi proteica interagiscono con l'rRNA piuttosto che con le proteine ribosomiali.

IL TRASCRITTO PRIMARIO DELL'RNA RIBOSOMIALE



L'RNA precursore é tagliato dalla **ribonucleasi III**.
Ulteriori modificazioni avvengono dopo l'attacco a questi frammenti delle proteine ribosomiali.

L'ANATOMIA GENERALE DEL RIBOSOMA

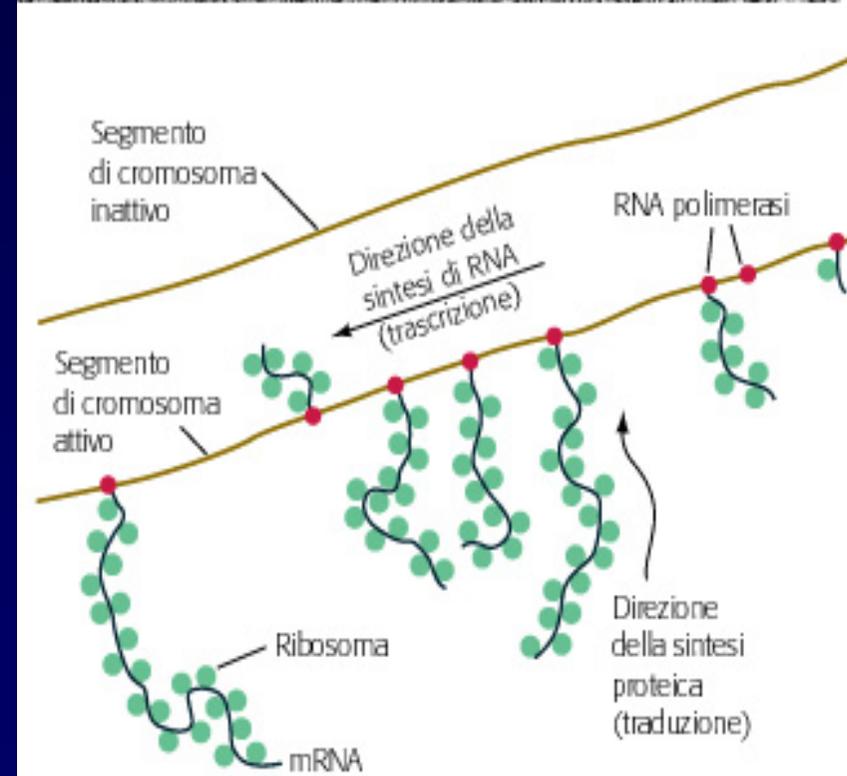
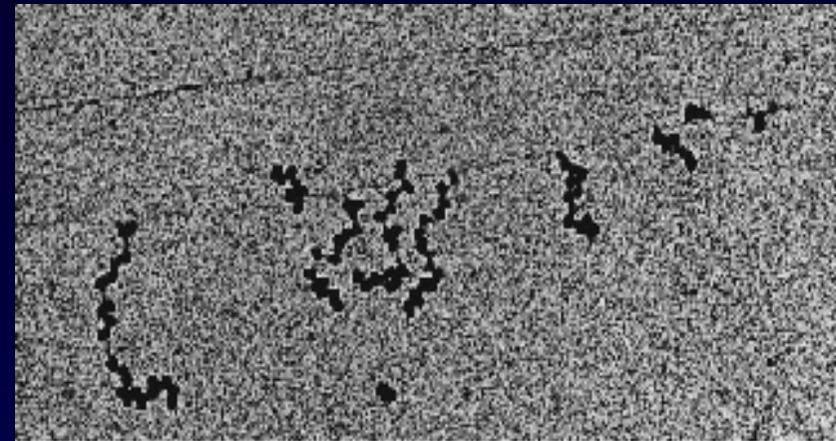


Nell'autoassemblaggio non é possibile utilizzare RNA di specie diversa.
Il processo di costruzione é ordinato e procede per stadi successivi.

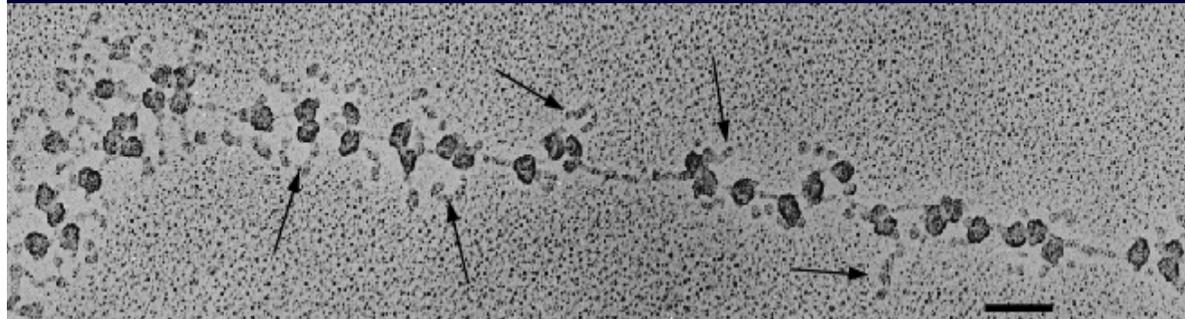
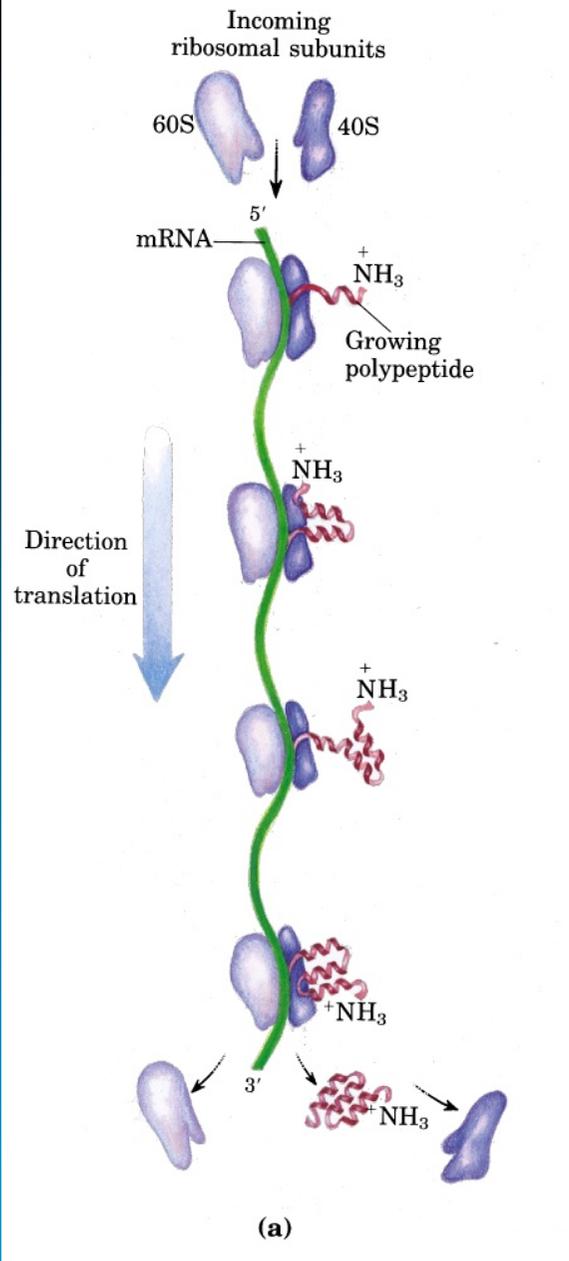
I RIBOSOMI

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 è adiuato 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

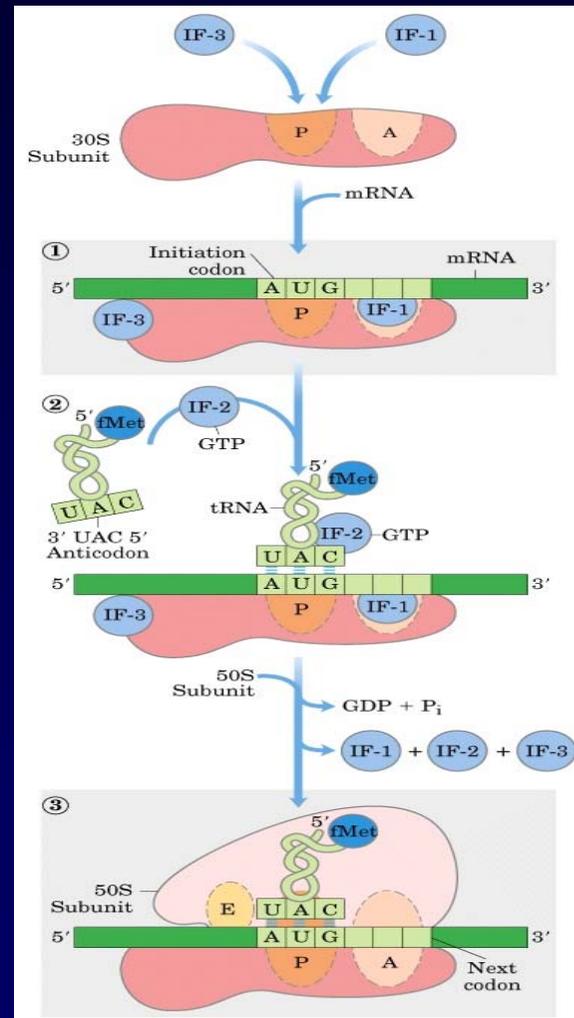
I FATTORI DELLA SINTESI PROTEICA

table 27-6

Components Required for the Five Major Stages of Protein Synthesis in *E. coli*

Stage	Essential components
1. Activation of amino acids	20 amino acids 20 aminoacyl-tRNA synthetases 20 or more tRNAs ATP Mg ²⁺
2. Initiation	mRNA N-Formylmethionyl-tRNA Initiation codon in mRNA (AUG) 30S ribosomal subunit 50S ribosomal subunit Initiation factors (IF-1, IF-2, IF-3) GTP Mg ²⁺
3. Elongation	Functional 70S ribosome (initiation complex) Aminoacyl-tRNAs specified by codons Elongation factors (EF-Tu, EF-Ts, EF-G) GTP Mg ²⁺
4. Termination and release	Termination codon in mRNA Polypeptide release factors (RF ₁ , RF ₂ , RF ₃) ATP
5. Folding and posttranslational processing	Specific enzymes, cofactors, and other components for removal of initiating residues and signal sequences, additional proteolytic processing, modification of terminal residues, and attachment of phosphate, methyl, carboxyl, carbohydrate, or prosthetic groups

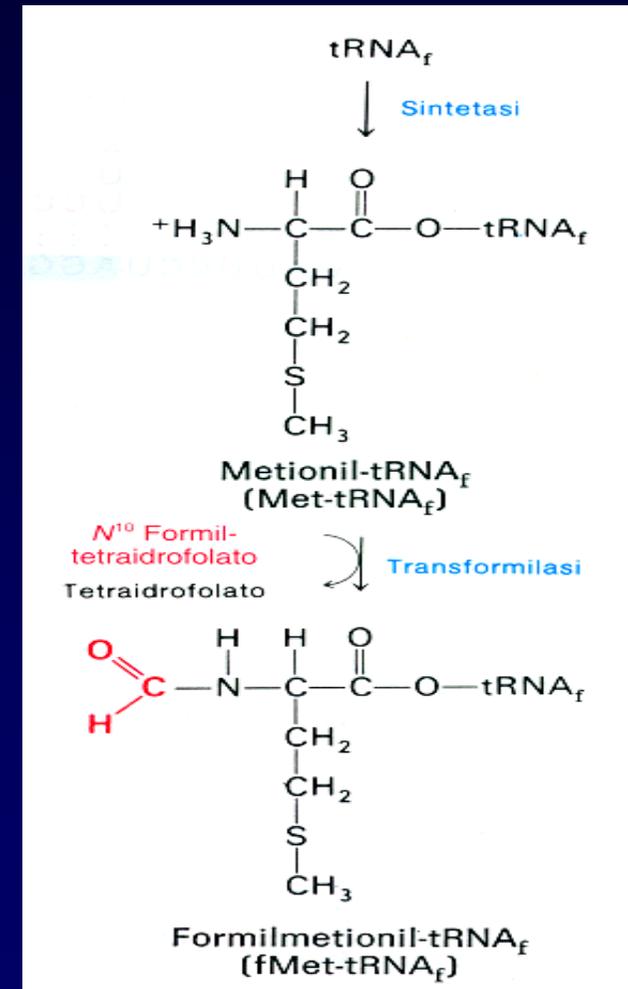
L'INIZIO



LA FORMAZIONE DI FORMILMETIONIL-tRNA_f

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;

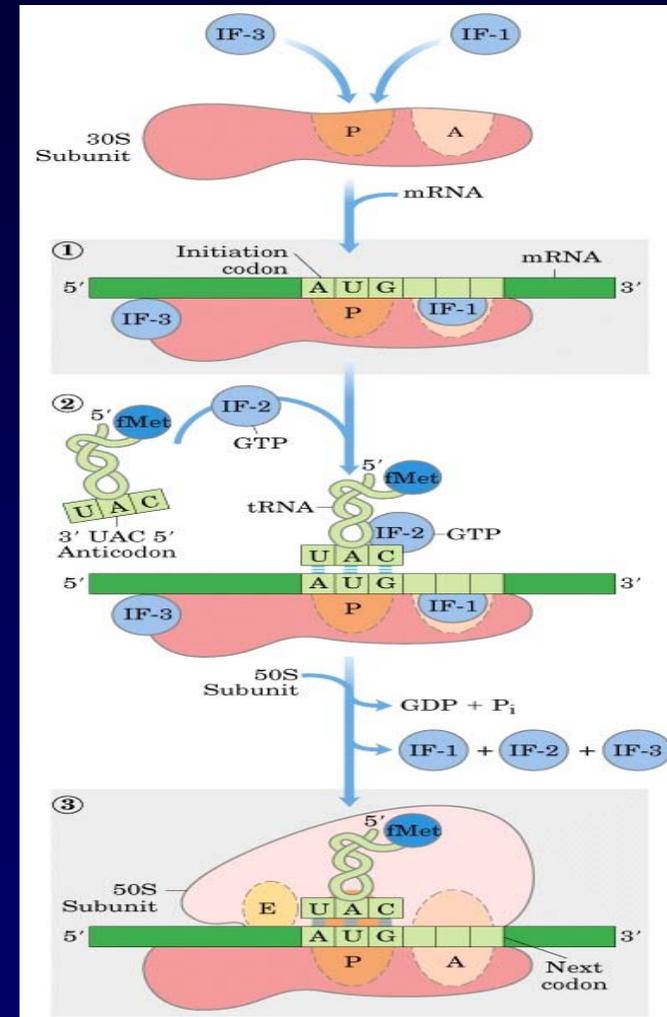
la sintesi proteica è iniziata da **formilmetionil tRNA**. Questo tRNA_f iniziatore lega la formilmetionina e la porta al ribosoma.



IL COMPLESSO DI INIZIO 30S

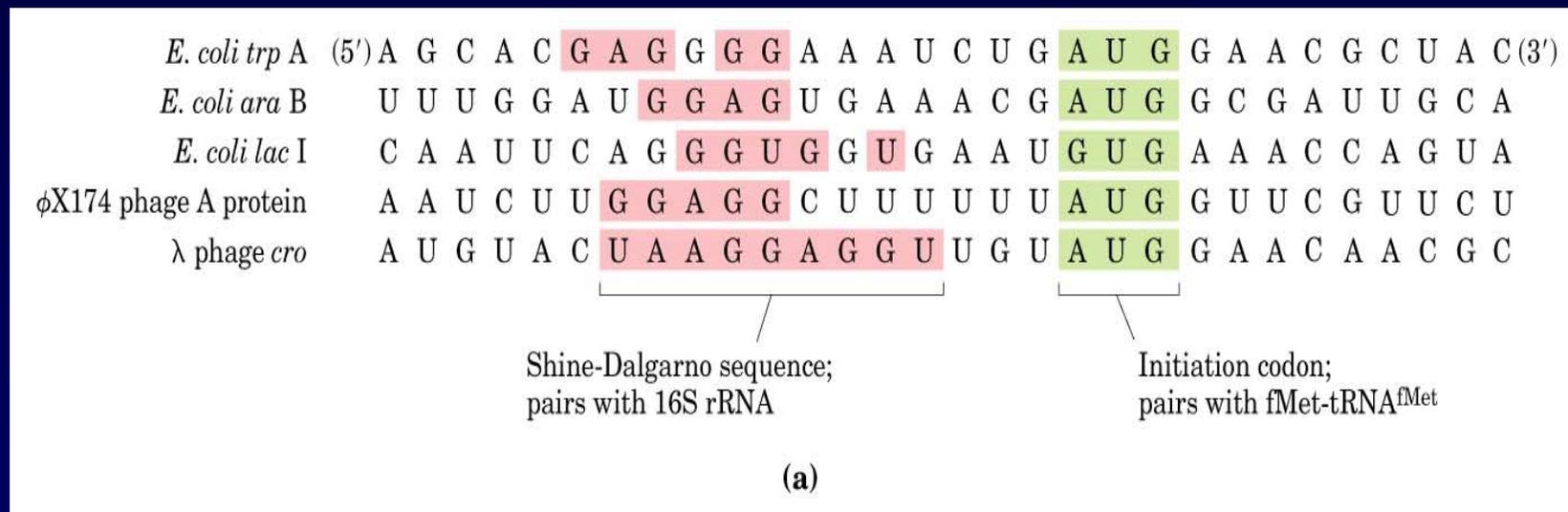
mRNA, formilmetionil-tRNA^f e la subunit  ribosomiale 30S si uniscono per formare il complesso di inizio 30S.

Esiste un segnale d'inizio sull'mRNA.



L'INIZIO

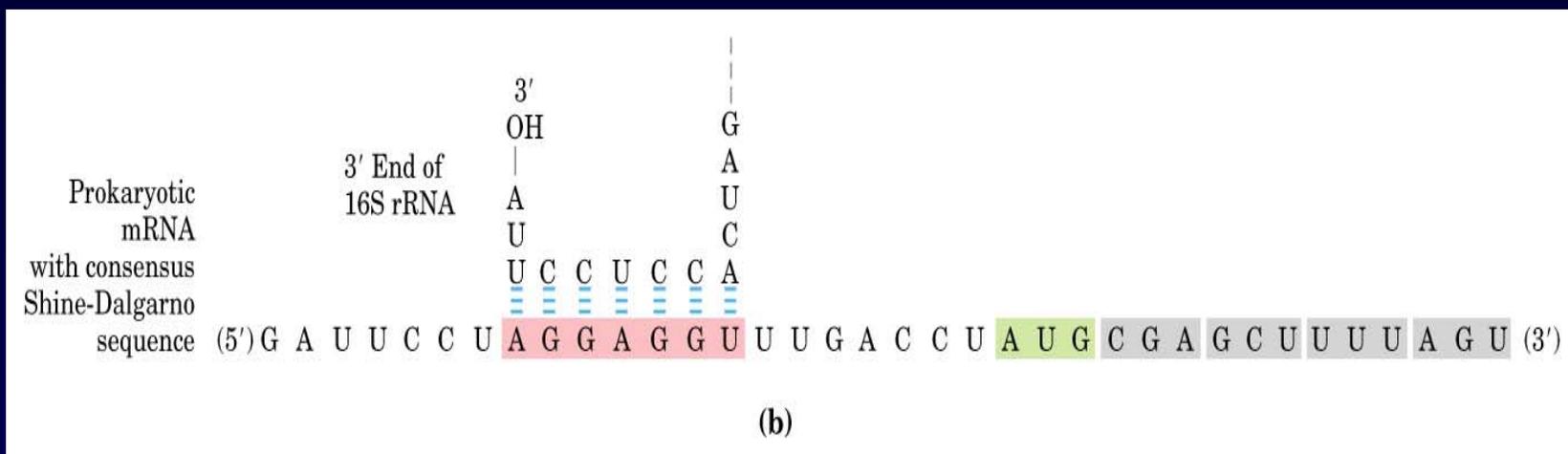
Il segnale di inizio della sintesi sull'mRNA è **AUG** (formilmetionina) preceduto da molte basi azotate che si appaiano con l'rRNA 16S.



Questa sequenza ricca di purine è chiamata **sequenza di Shine-Dalgarno**.

Molto meno frequentemente, il codon d'inizio sull'RNA è **GUG** (valina).

L'INIZIO



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

Una subunità ribosomiale 50S si unisce 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

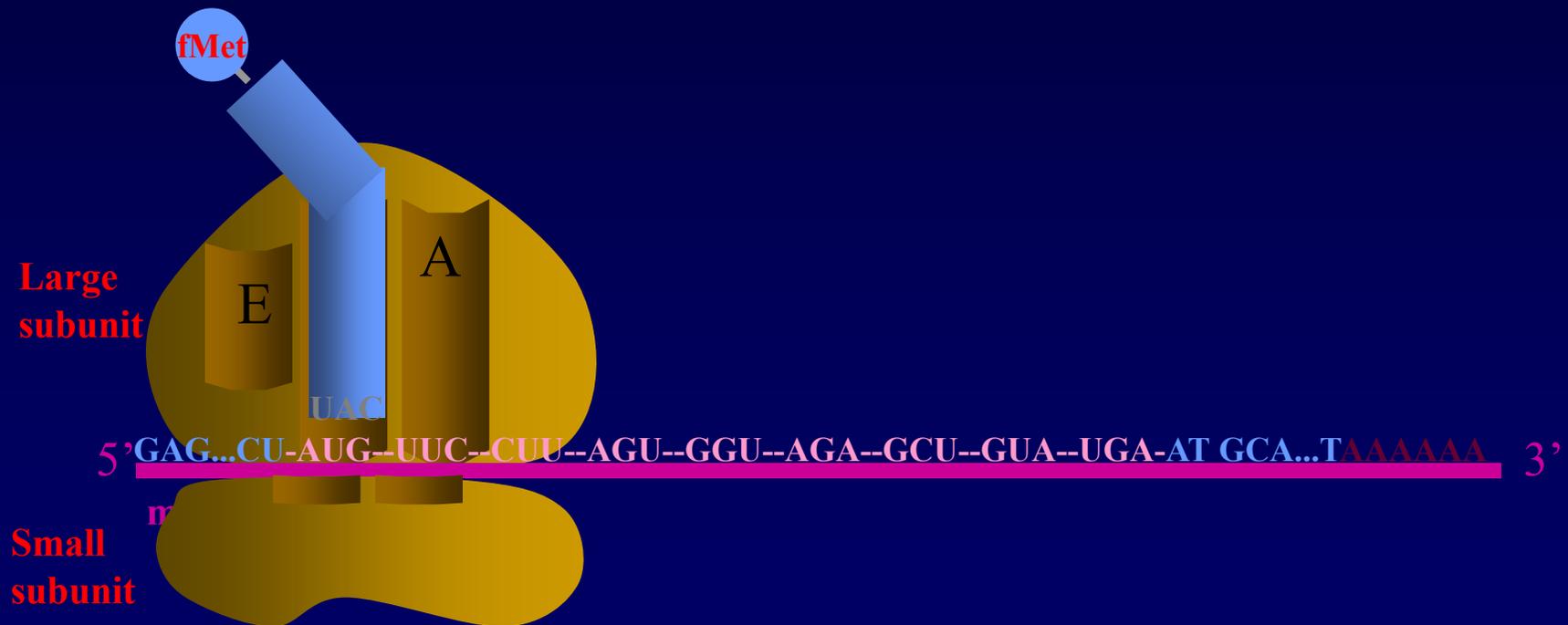
Large subunit



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



LA FASE DI INIZIO DELLA SINTESI PROTEICA

I tre fattori di inizio proteici sono:
IF1, IF2 e IF3.

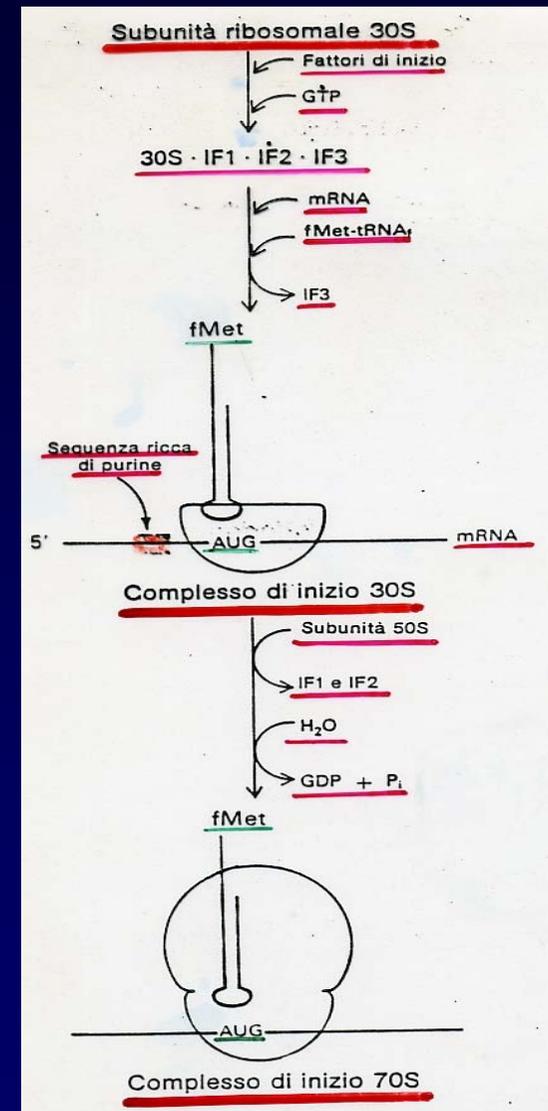
La subunità ribosomiale **30S** forma un complesso con essi,

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

il legame del **GTP** consente all'**mRNA** e al tRNA iniziatore di legarsi al complesso con il rilascio di **IF3** e l'associazione della subunità **50S**,

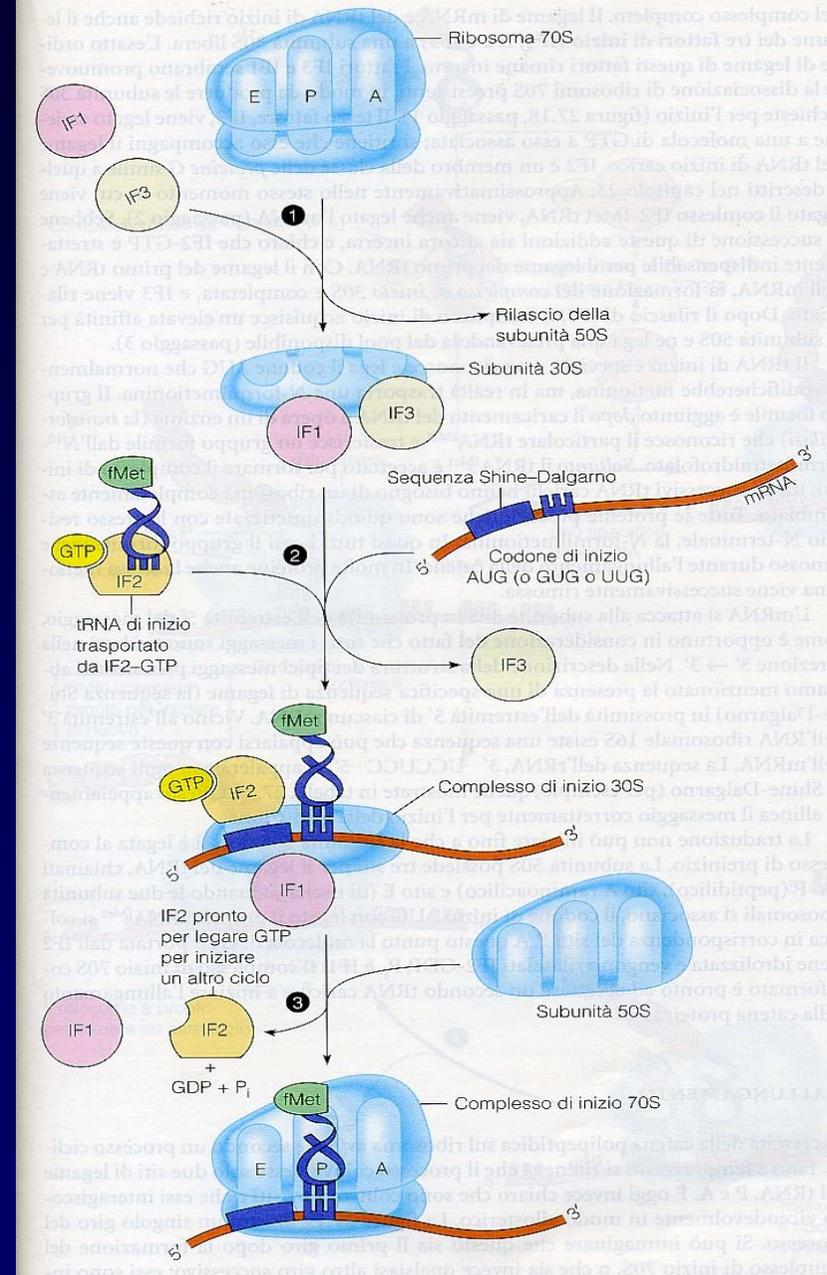
l'idrolisi del **GTP** porta al rilascio di **IF1 e IF2**, con la formazione del **complesso 70S** pronto per la fase di allungamento della sintesi proteica,

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.

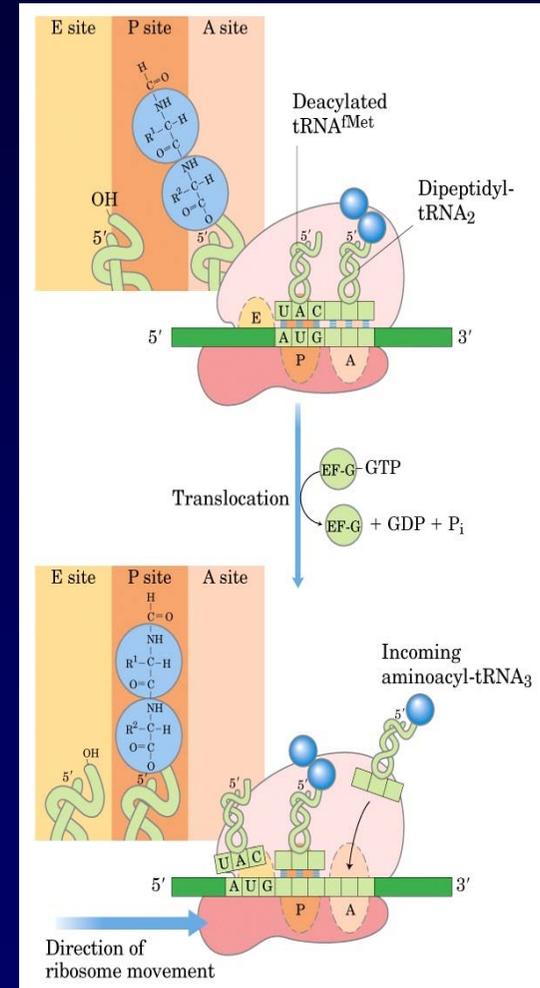
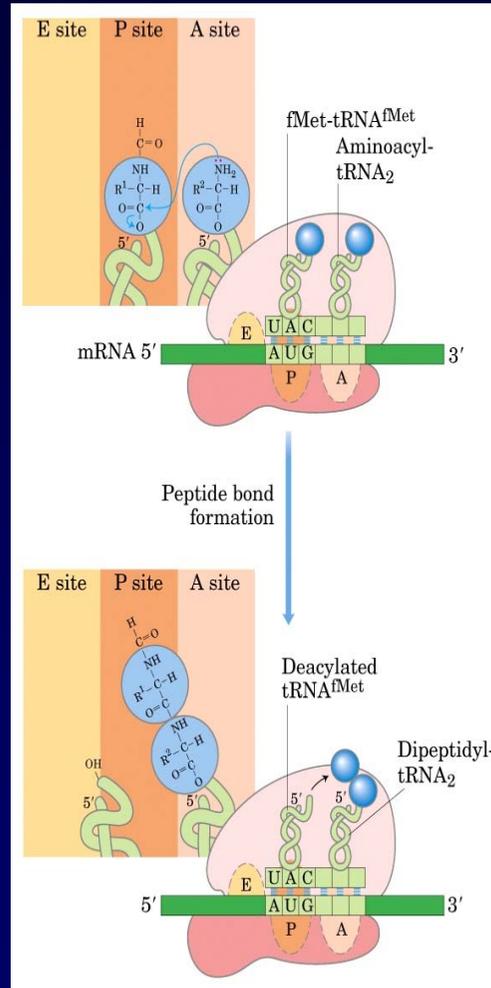
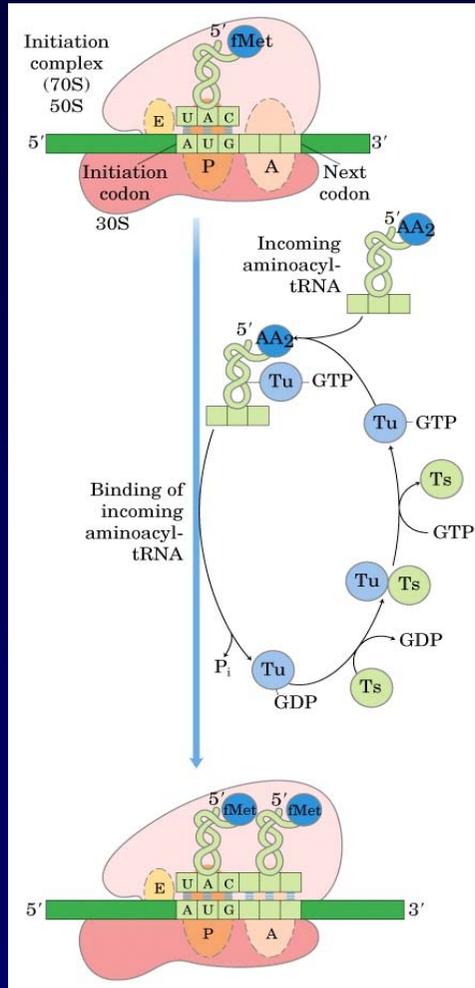


L'INIZIO

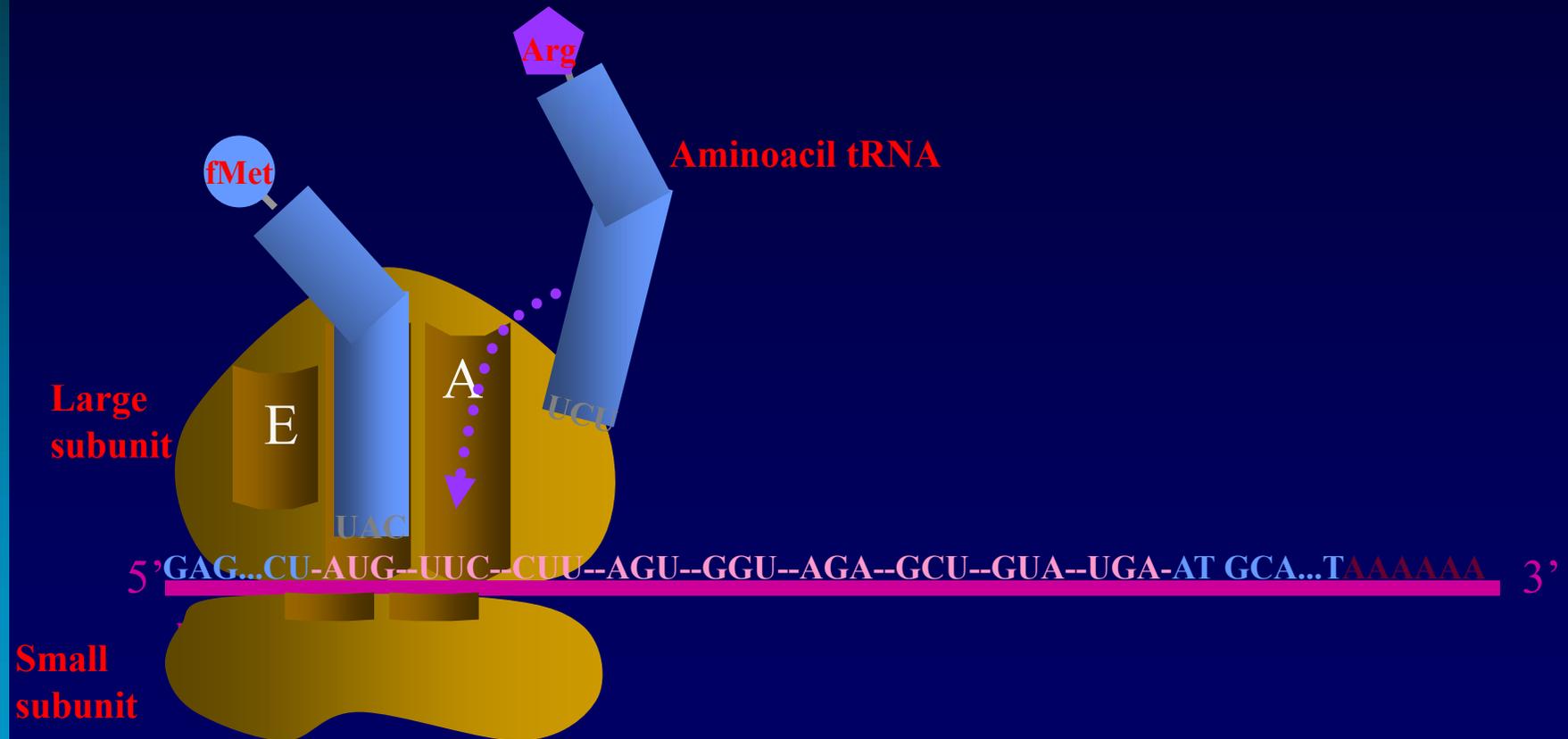
Nella fase d'inizio, il corretto attacco dell'mRNA al ribosoma é determinato dal legame della **sequenza di Shine-Dalgarno** ad una **sequenza sull'rRNA 16S** del ribosoma.



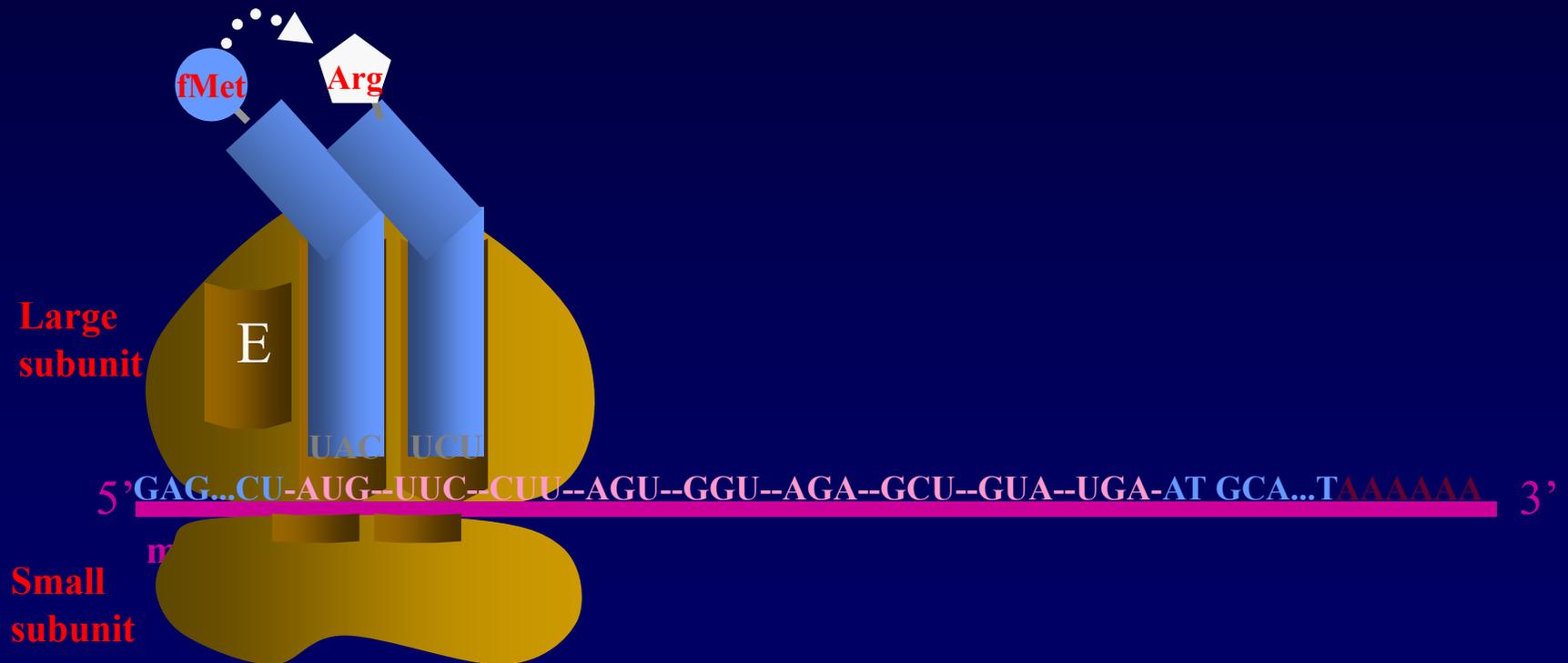
L'ALLUNGAMENTO



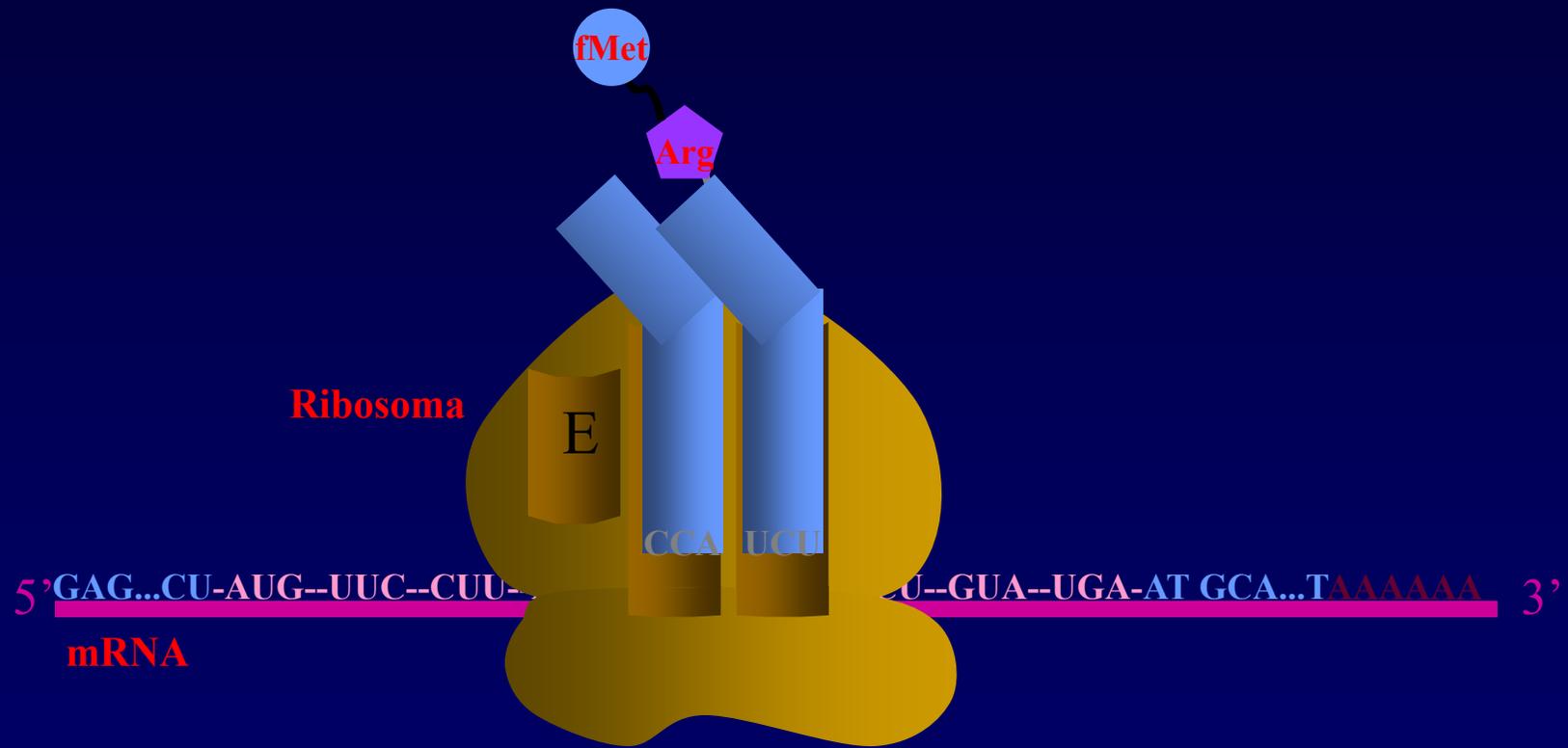
L'ALLUNGAMENTO



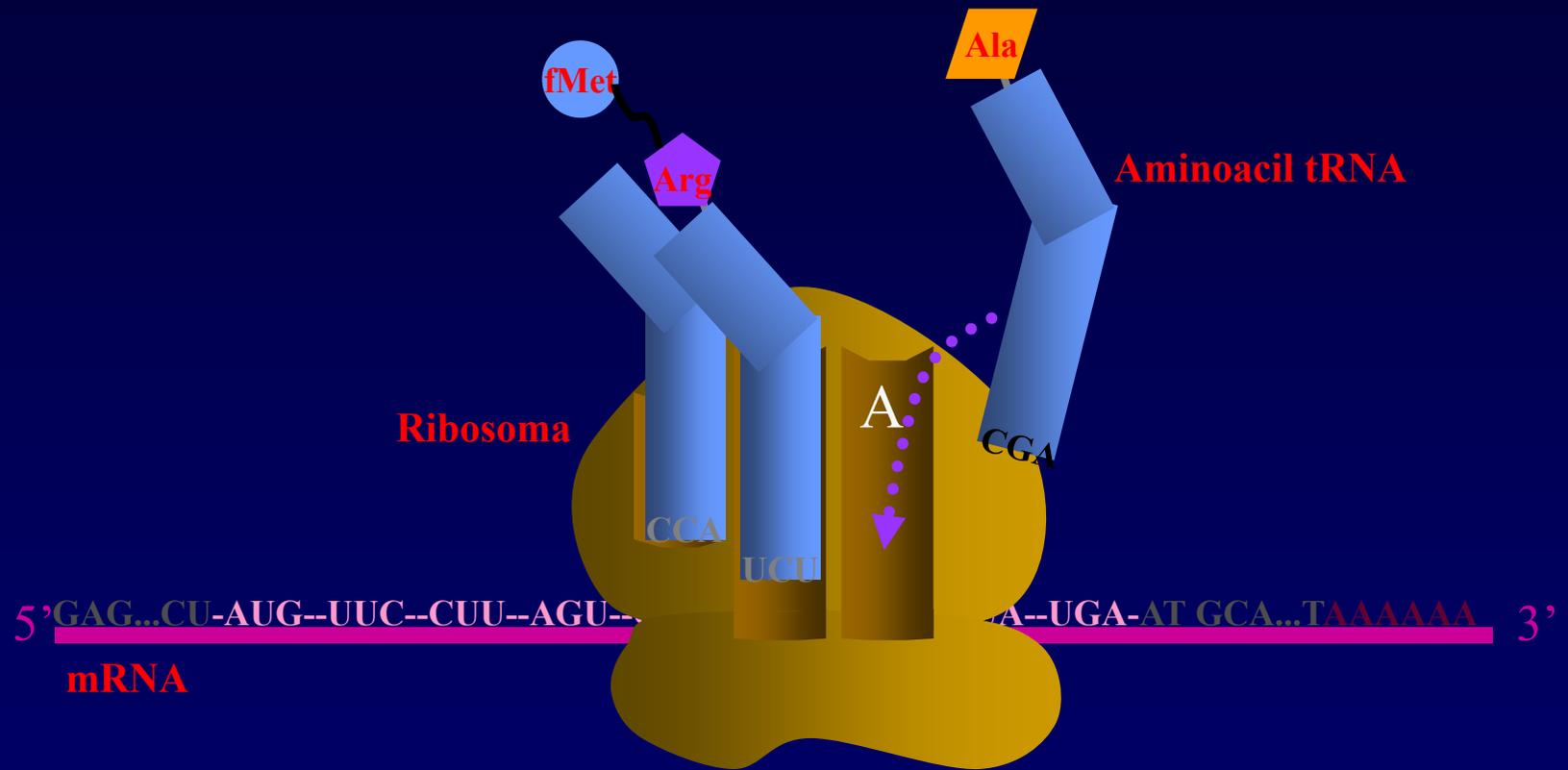
L'ALLUNGAMENTO



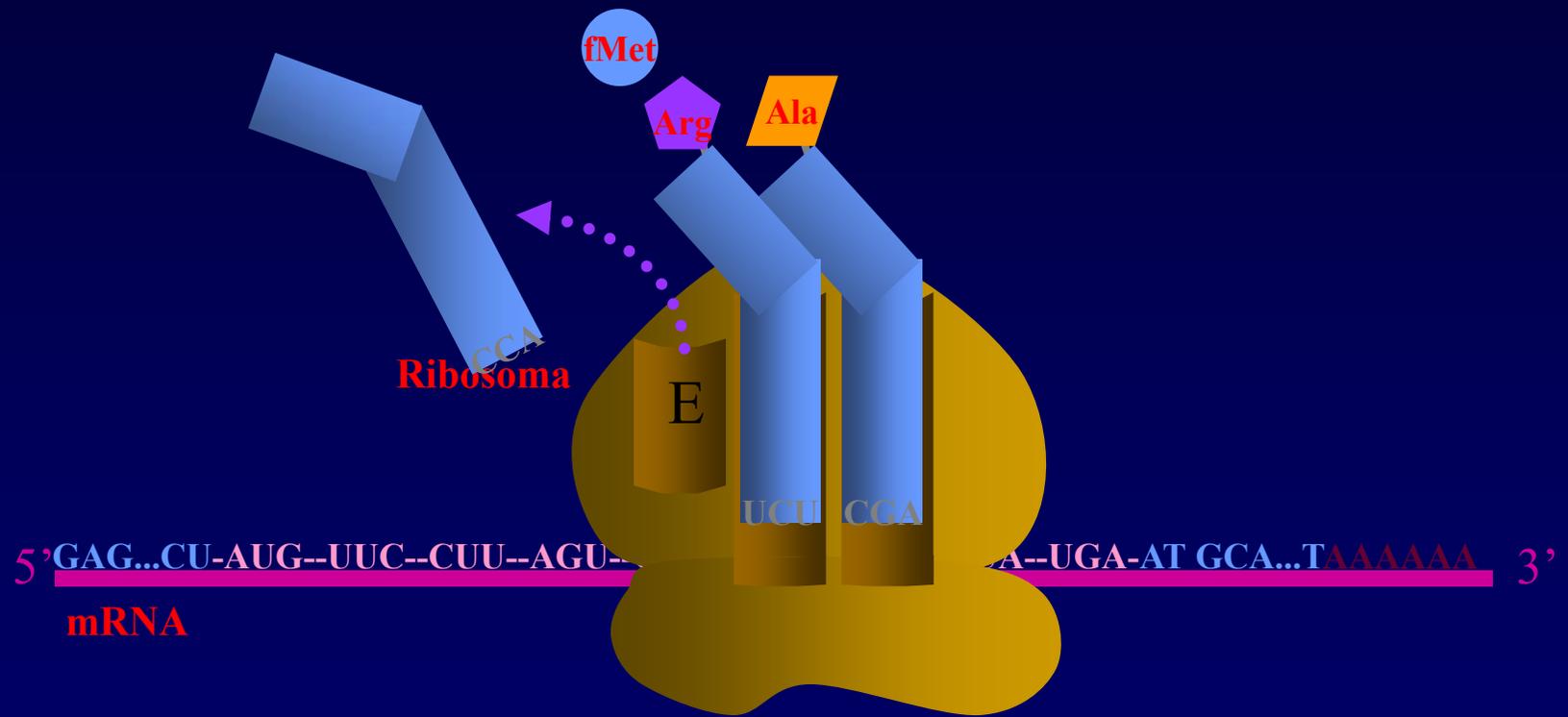
L'ALLUNGAMENTO



L'ALLUNGAMENTO



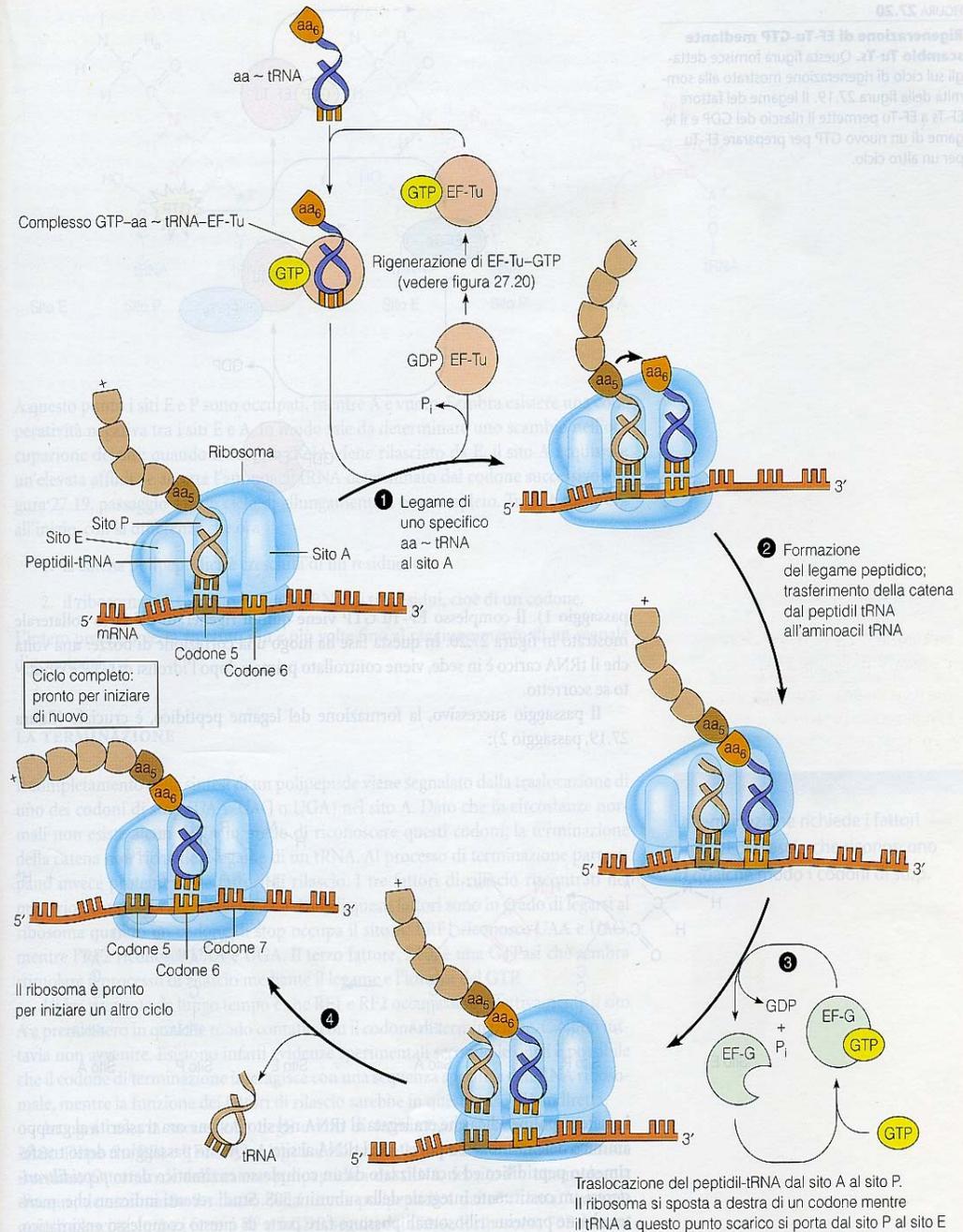
L'ALLUNGAMENTO



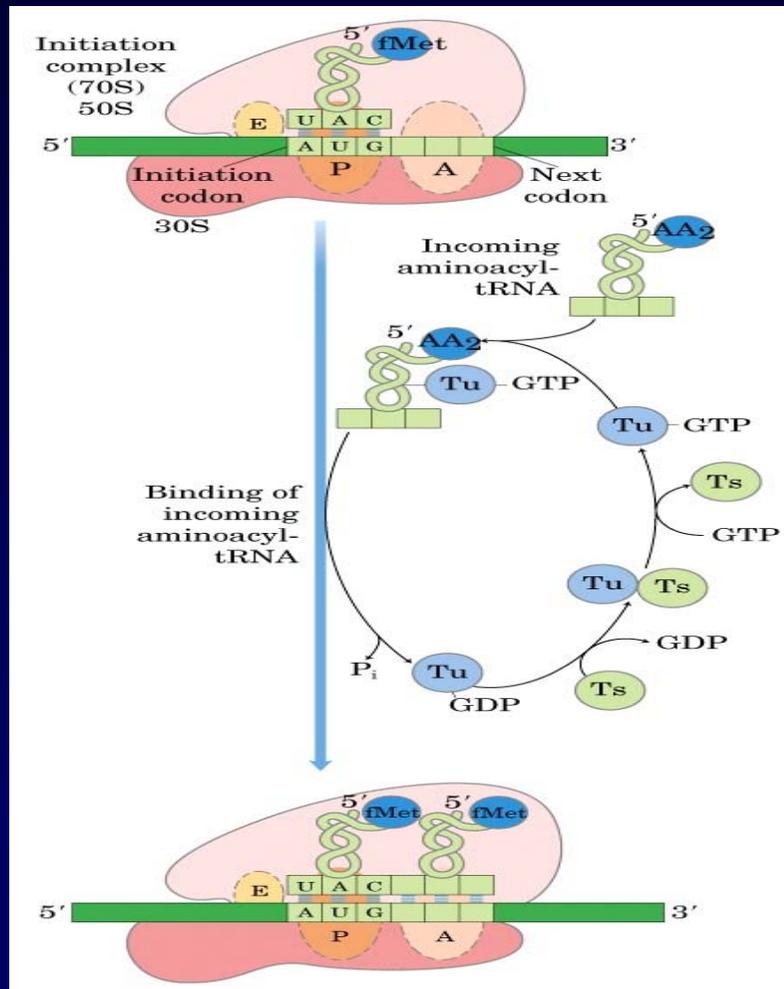
L'ALLUNGAMENTO

La catena polipeptidica nascente nel **sito P** viene trasferita all'aminoacil tRNA appena giunto nel **sito A**.

La traslocazione sposta quindi quest'ultimo tRNA nel **sito P** e il precedente nel **sito E**.



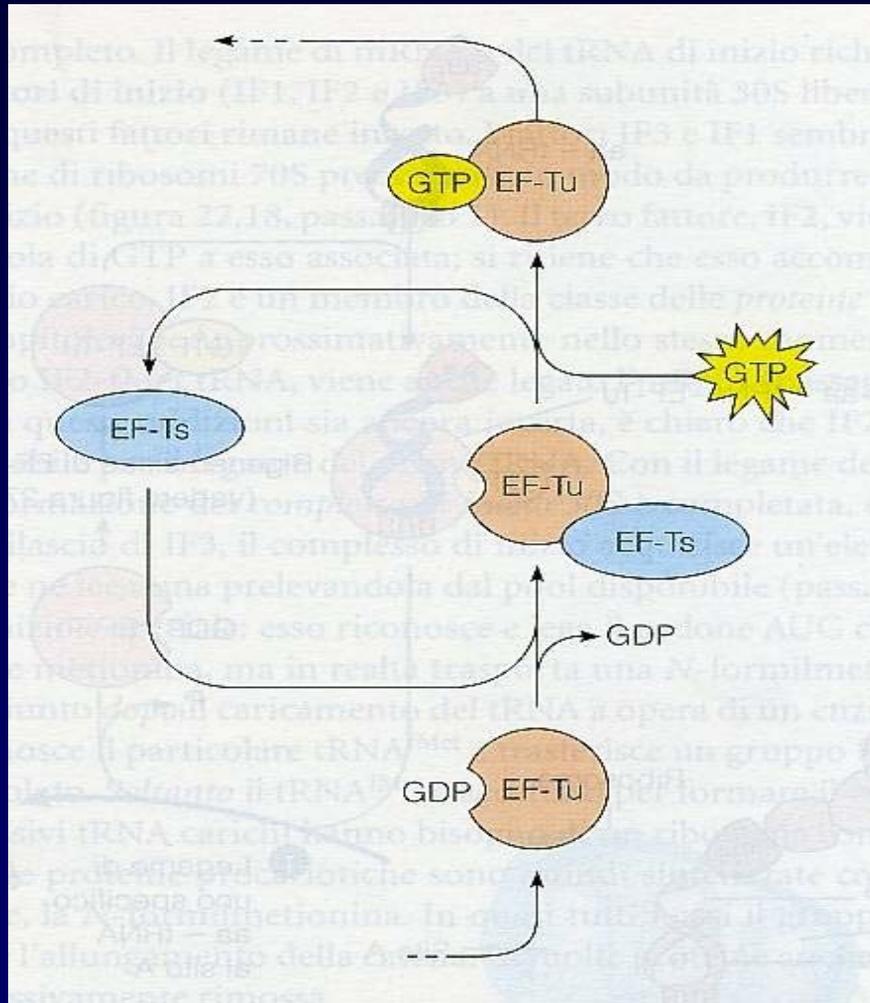
IL CICLO DI REAZIONE DEL FATTORE DI ALLUNGAMENTO Tu (EF-Tu)



L'EF-Tu 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.

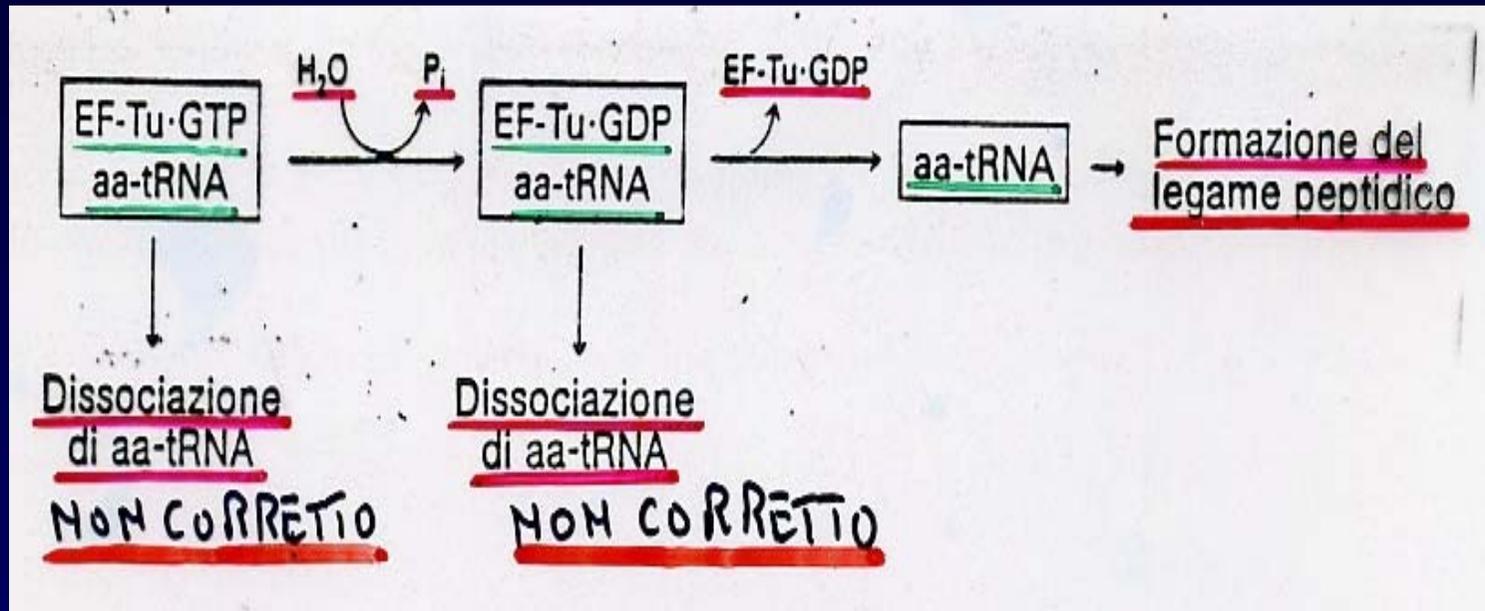
IL CICLO DI REAZIONE DEL FATTORE DI ALLUNGAMENTO Tu (EF-Tu)



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.

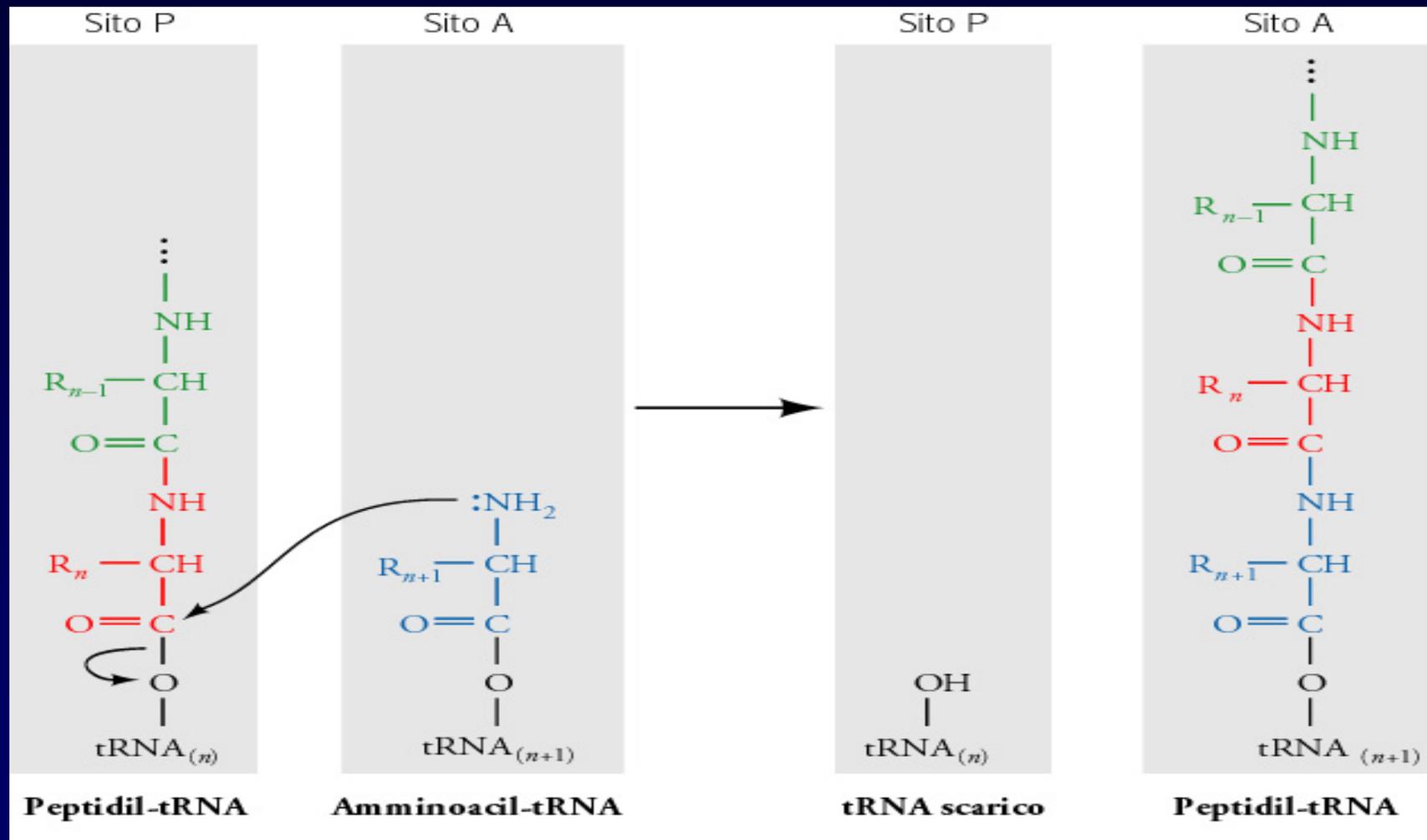
La velocità della GTPasi di EF-Tu determina la frequenza di errore e il ritmo della sintesi proteica.

LA FEDELTÀ DELLA SINTESI PROTEICA

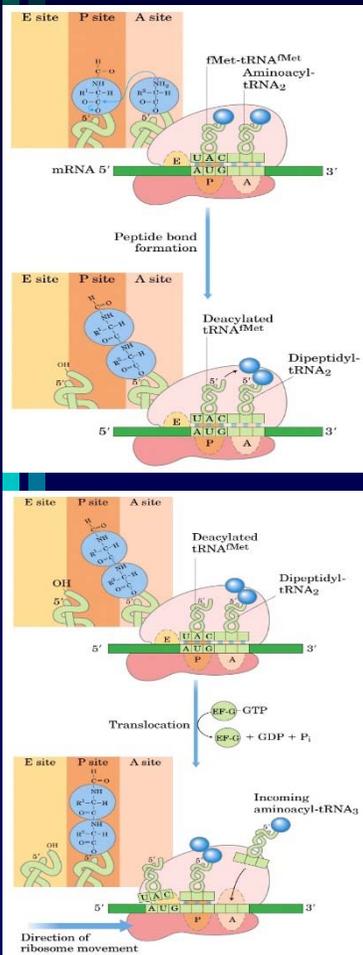


La correzione dell'amminoacil tRNA che occupa il sito A avviene prima e dopo l'idrolisi del GTP legato a EF-Tu.

La formazione del **legame peptidico** é tra il gruppo carbossilico attivato della catena polipeptidica in fase di crescita e il gruppo amminico dell'aminoacil-tRNA, tramite l'enzima **peptidil transferasi** (RNA 23S della subunit  50S).



LA TRASLOCAZIONE



Dopo la formazione del legame peptidico, si ha la traslocazione:

1) il tRNA scarico lascia il sito P per il sito E (di uscita),

2) il peptidil-tRNA si muove dal sito A al sito P,

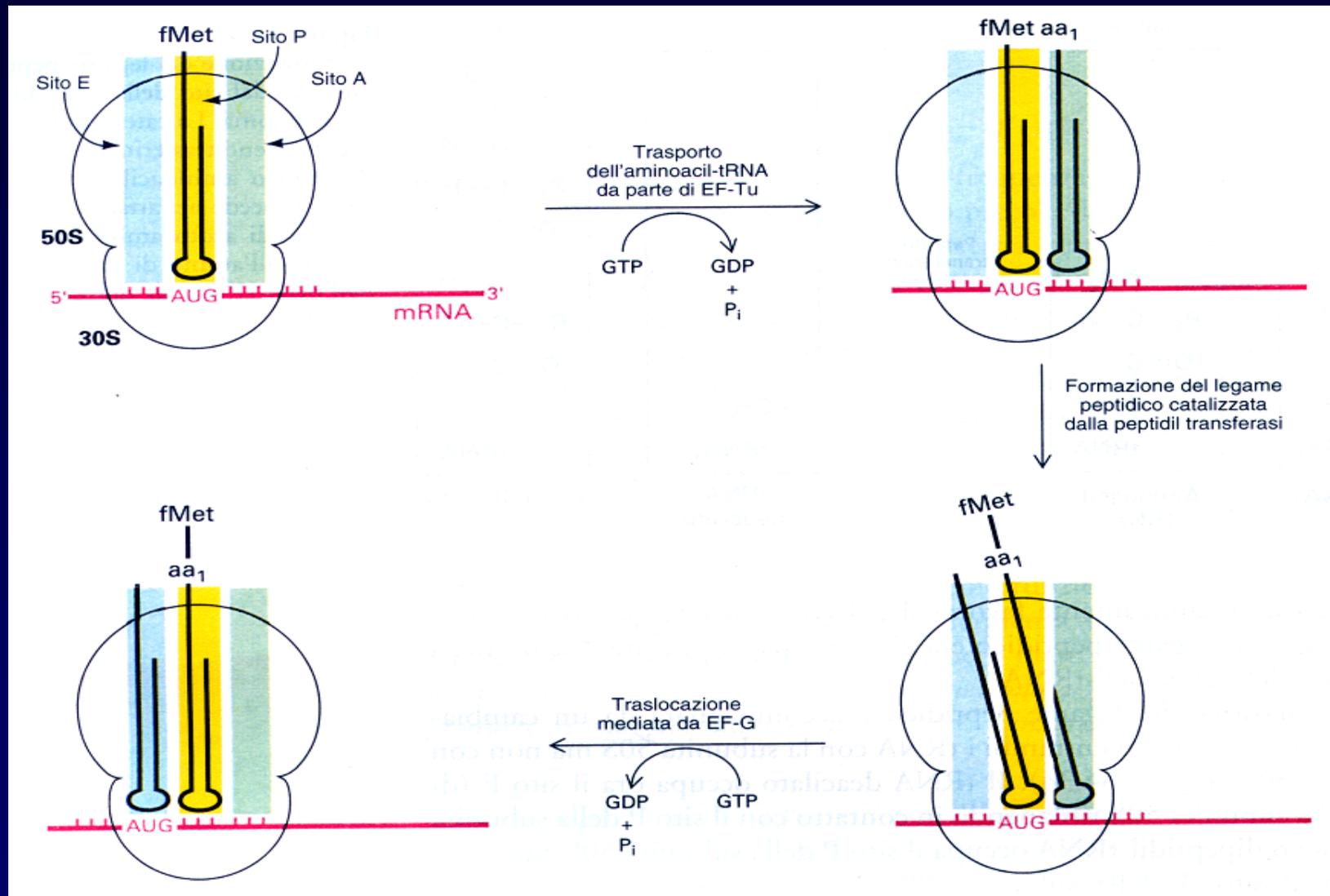
3) L'mRNA si sposta di tre nucleotidi, in modo da porre il codon successivo nella posizione giusta per essere letto;

EF-G é il fattore di allungamento della traslocazione.

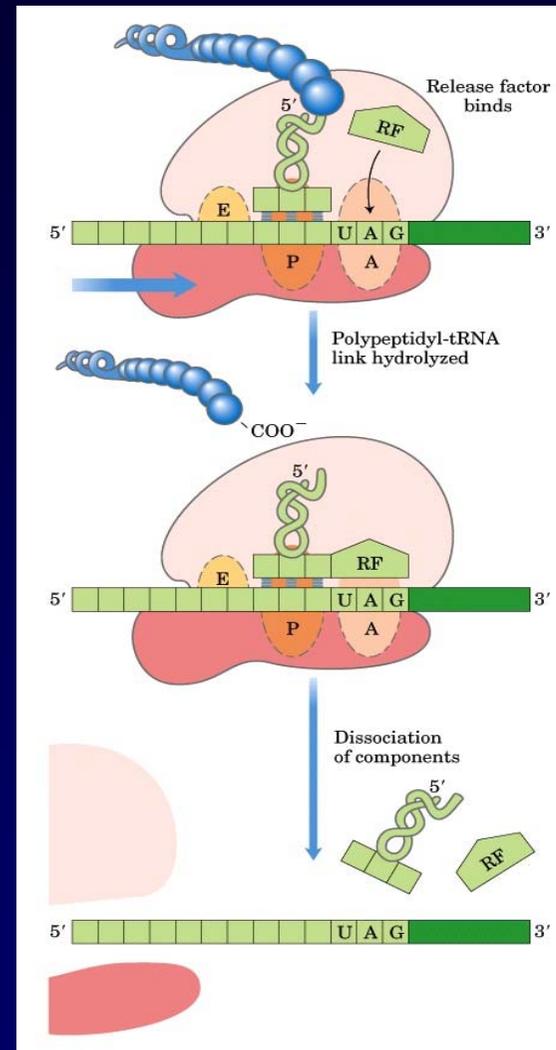
IL CICLO DI ALLUNGAMENTO DELLA SINTESI
PROTEICA CONSISTE QUINDI DI TRE MOMENTI:

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

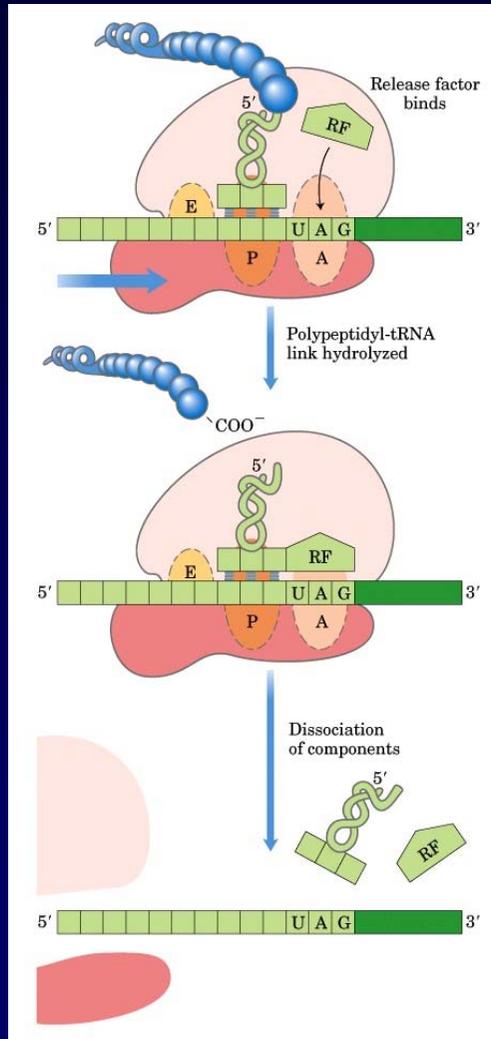
IL CICLO DI ALLUNGAMENTO



LA TERMINAZIONE



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**,

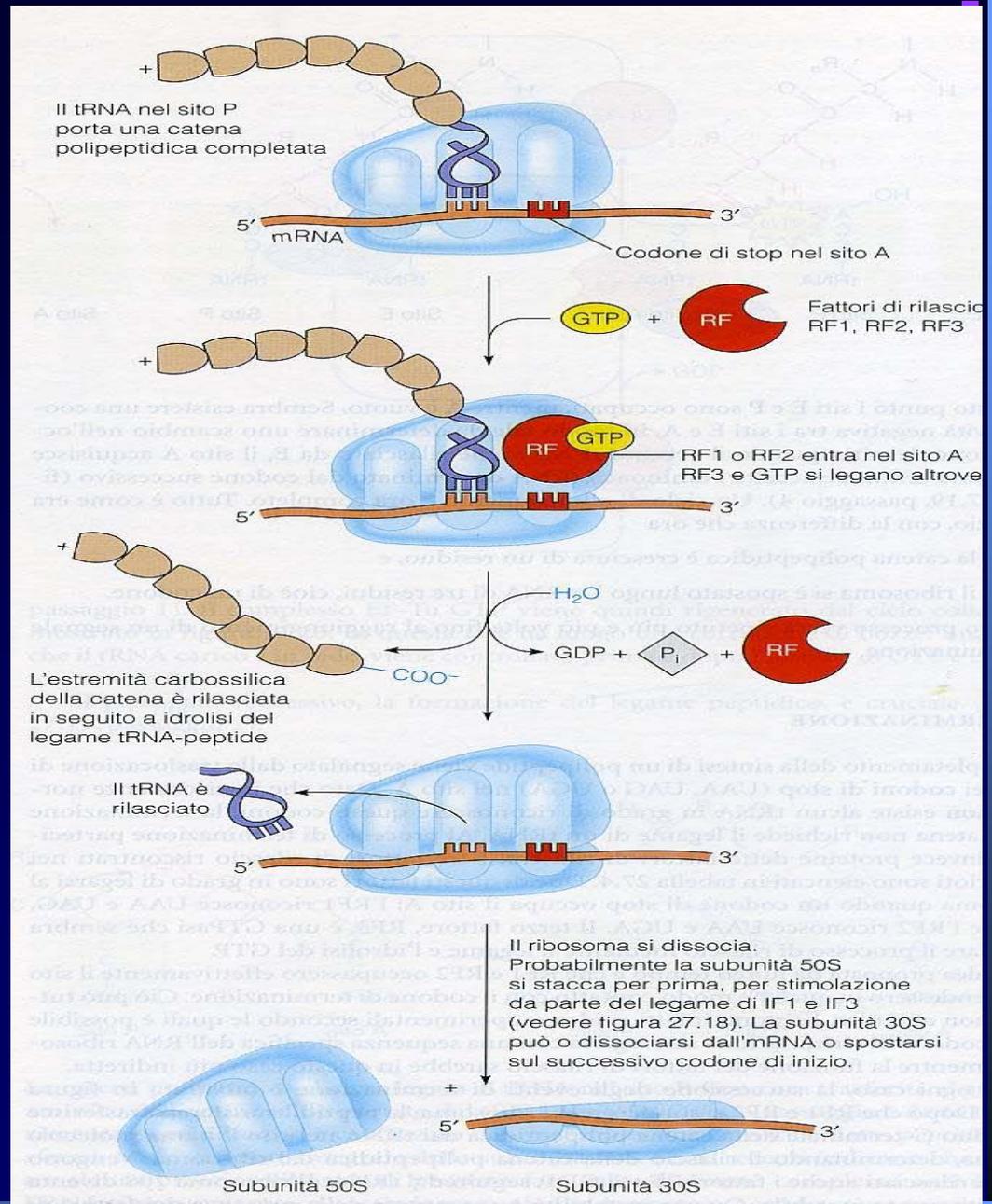
si ha l'**idrolisi** del legame tra il polipeptide ed il tRNA,

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

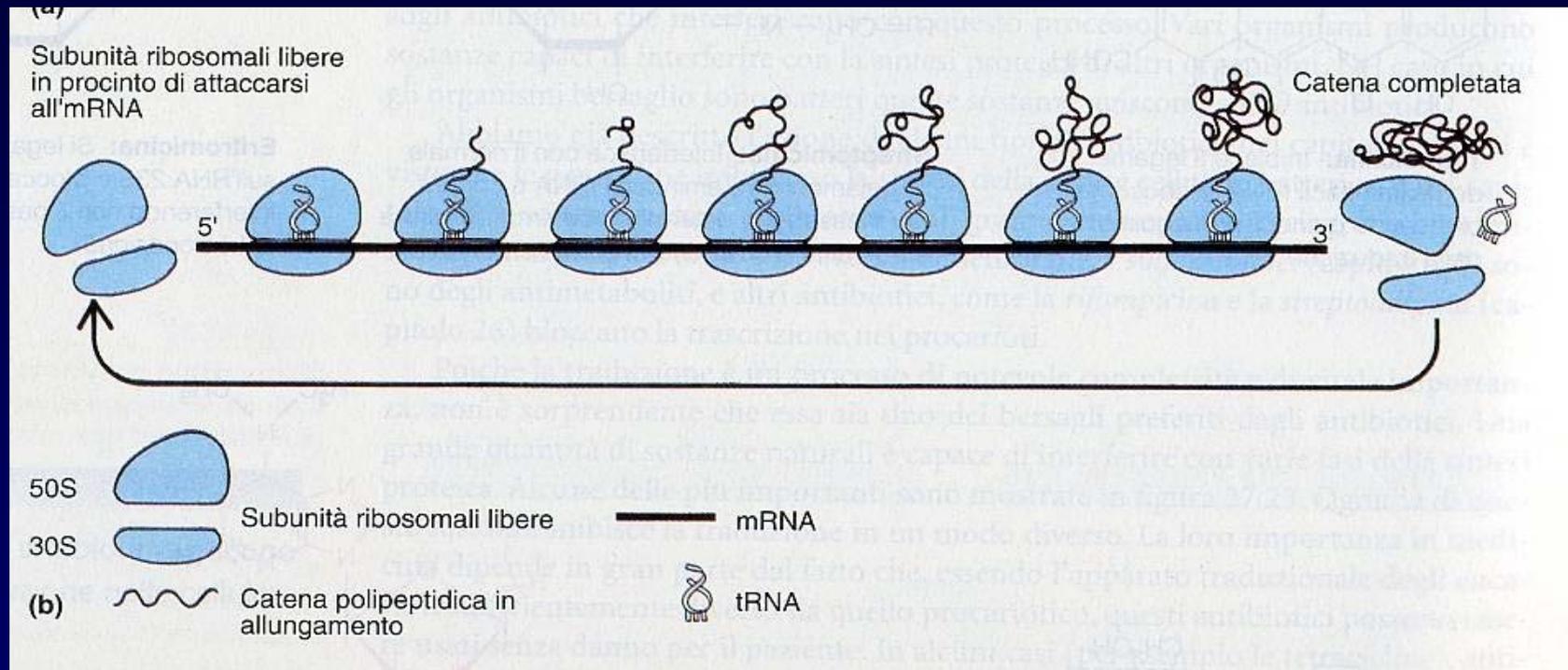
LA TERMINAZIONE

I fattori di rilascio agiscono sulla **peptidil transferasi**, affinché l'acceptore del peptide attivato sia l'**acqua** invece del gruppo amminico, **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 e il ribosoma si **dissocia** nelle due subunità costituenti (50S e 30S).



I POLIRIBOSOMI



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.

LE FASI DELLA SINTESI PROTEICA

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

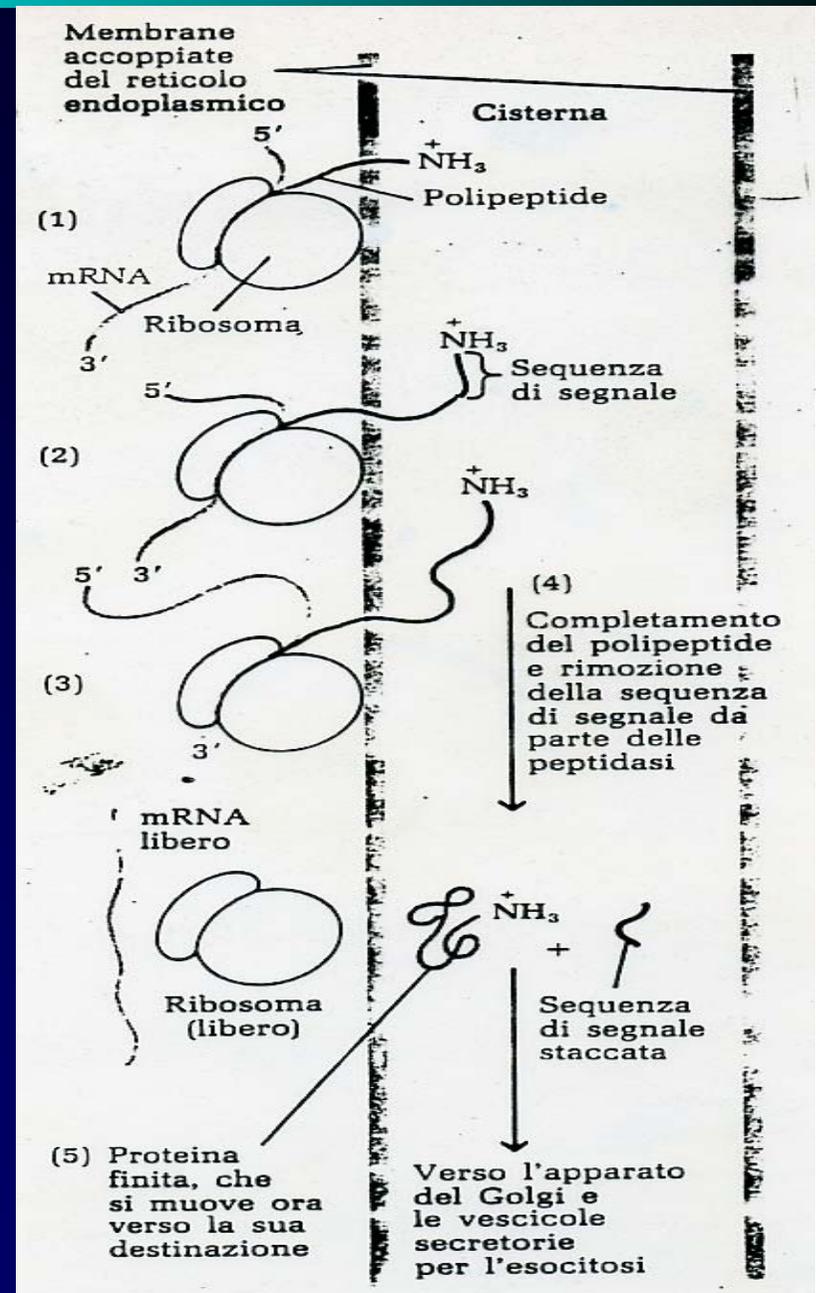
STADIO II: un aminoacido specifico inizia la sintesi

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

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

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

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

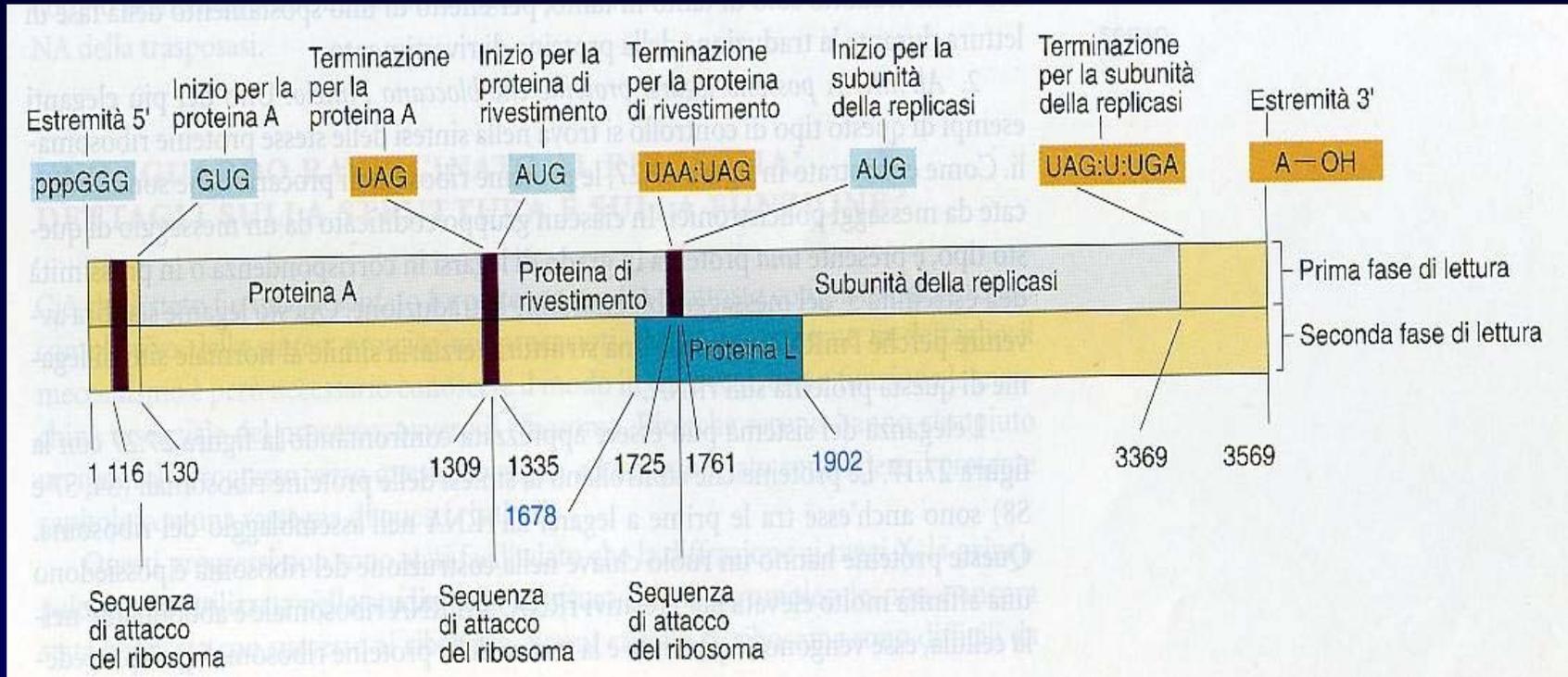


LA FEDELTA' DELLA SINTESI PROTEICA

Accuratezza della sintesi proteica

<i>Frequenza di inserzione di un aminoacido sbagliato</i>	<i>Probabilità di sintetizzare una proteina senza errori</i>		
	<i>Numero di aminoacidi</i>		
	<i>100</i>	<i>300</i>	<i>1000</i>
10^{-2}	0,364	0,049	0,000
10^{-3}	0,915	0,840	0,368
10^{-4}	0,990	0,970	0,905
10^{-5}	0,999	0,997	0,990

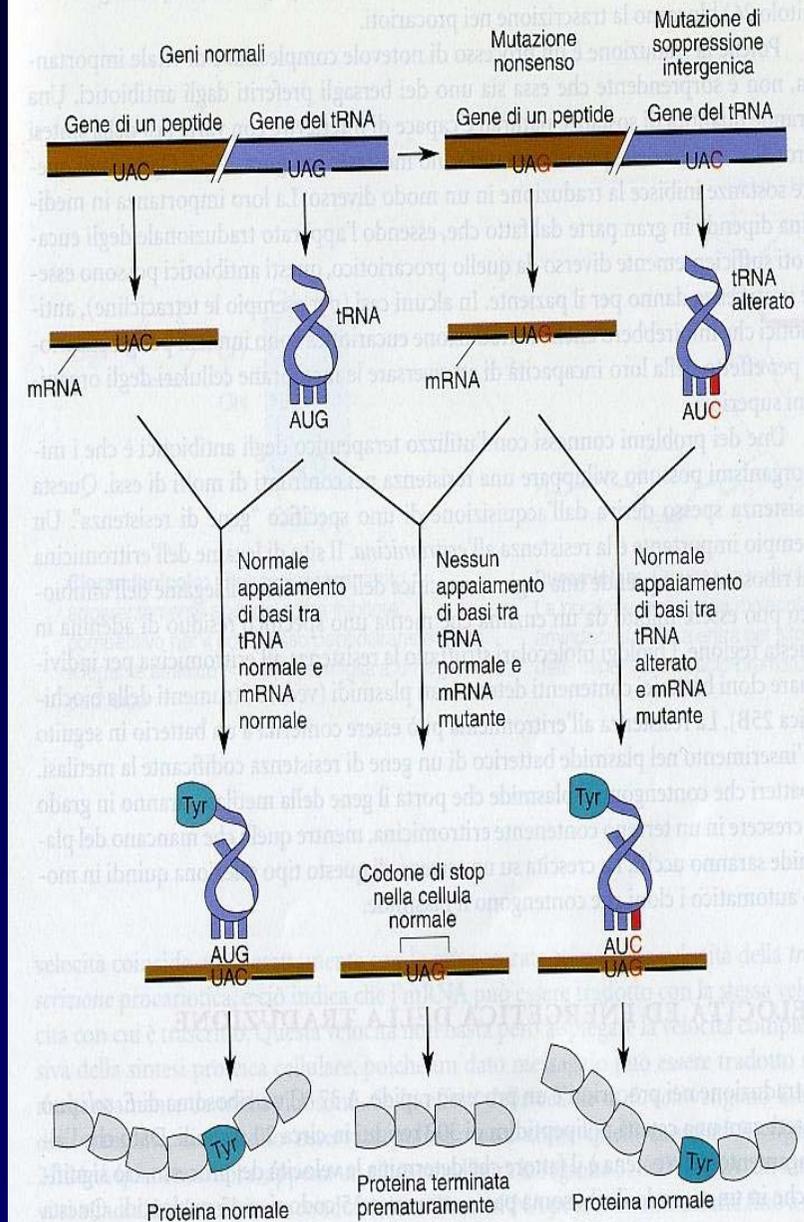
LA REGOLAZIONE DELLA TRADUZIONE



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.

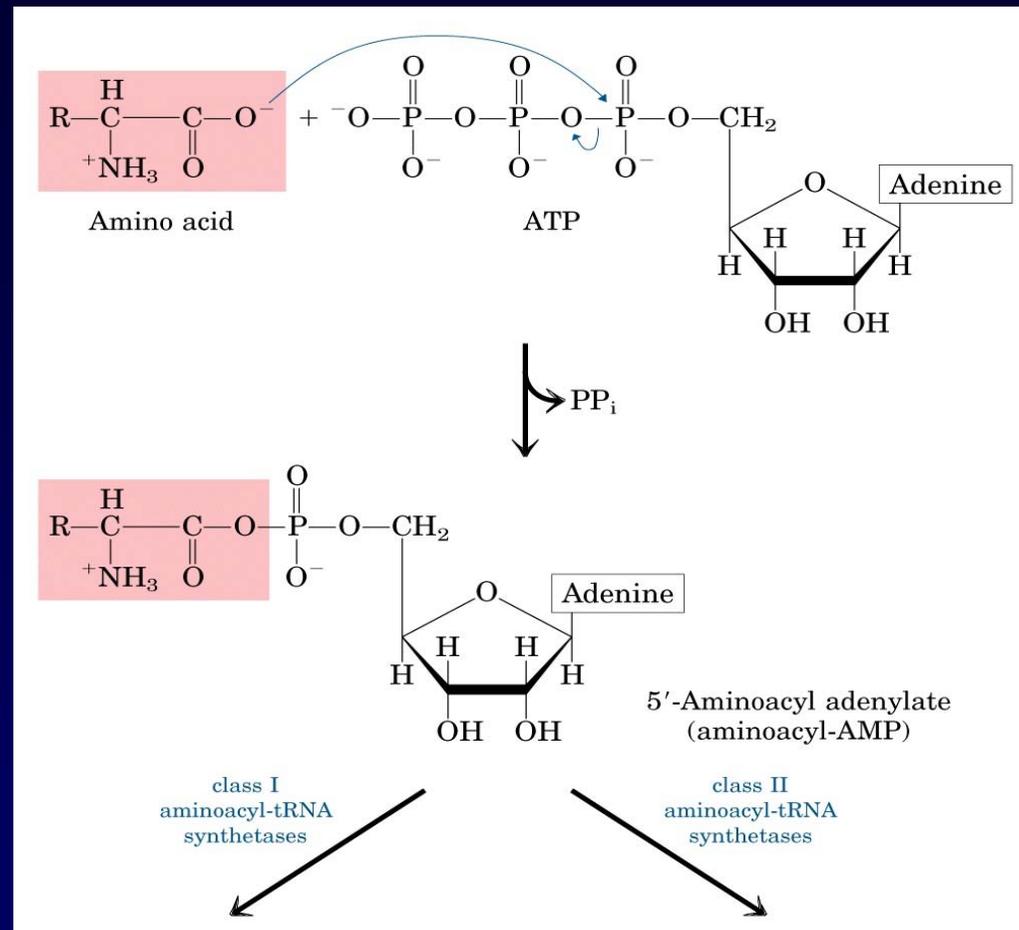
GLI EFFETTI DELLE MUTAZIONI NON SENSO

- 1) Essi possono determinare una terminazione prematura della sintesi proteica.
- 2) Essi possono essere soppressi da mutazioni di soppressione in cui un tRNA muta in modo da riconoscere un codone di stop e inserisce un amminoacido in sua corrispondenza.



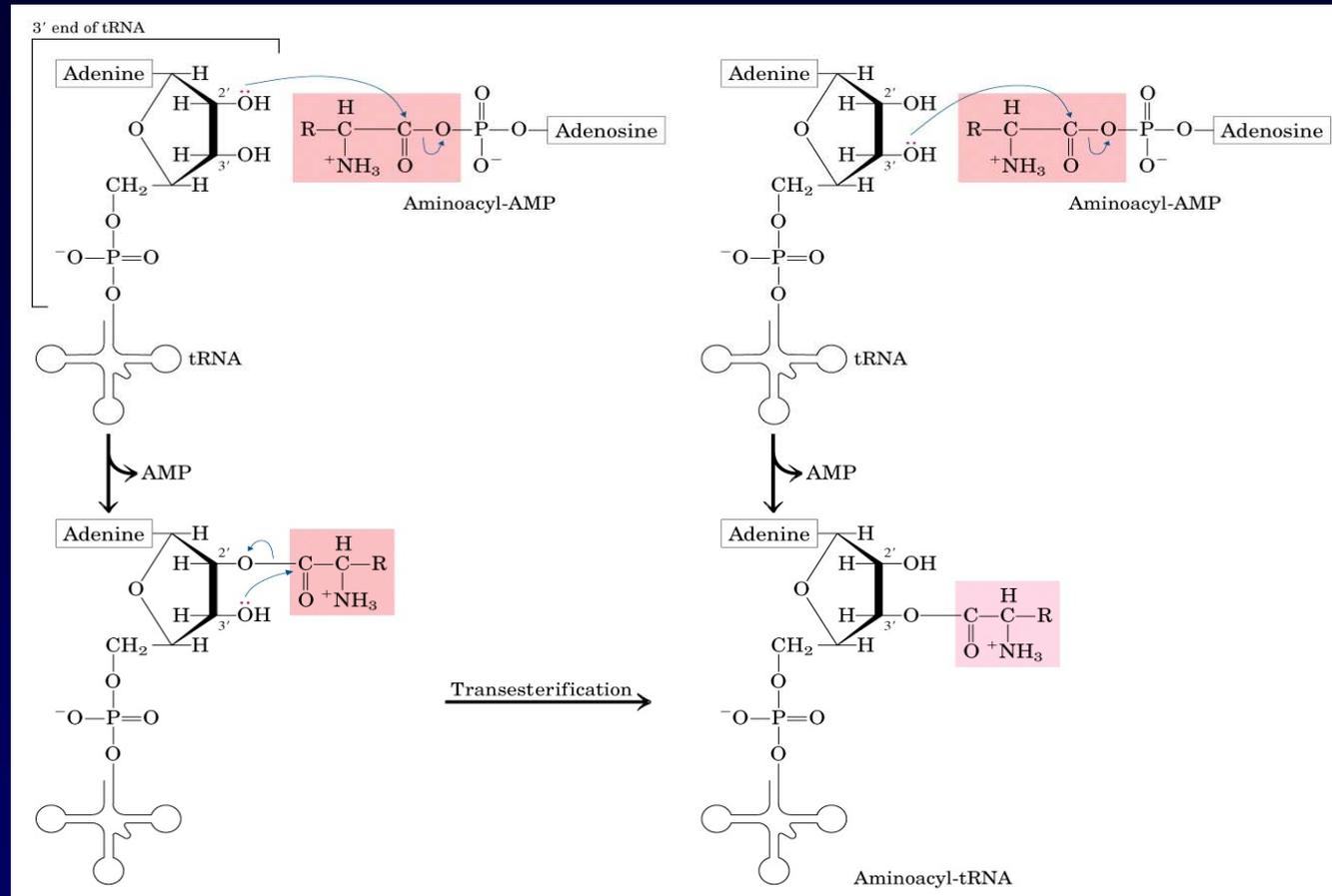
RIASSUMENDO:

LA FORMAZIONE DEGLI AMMINOACIL-tRNA



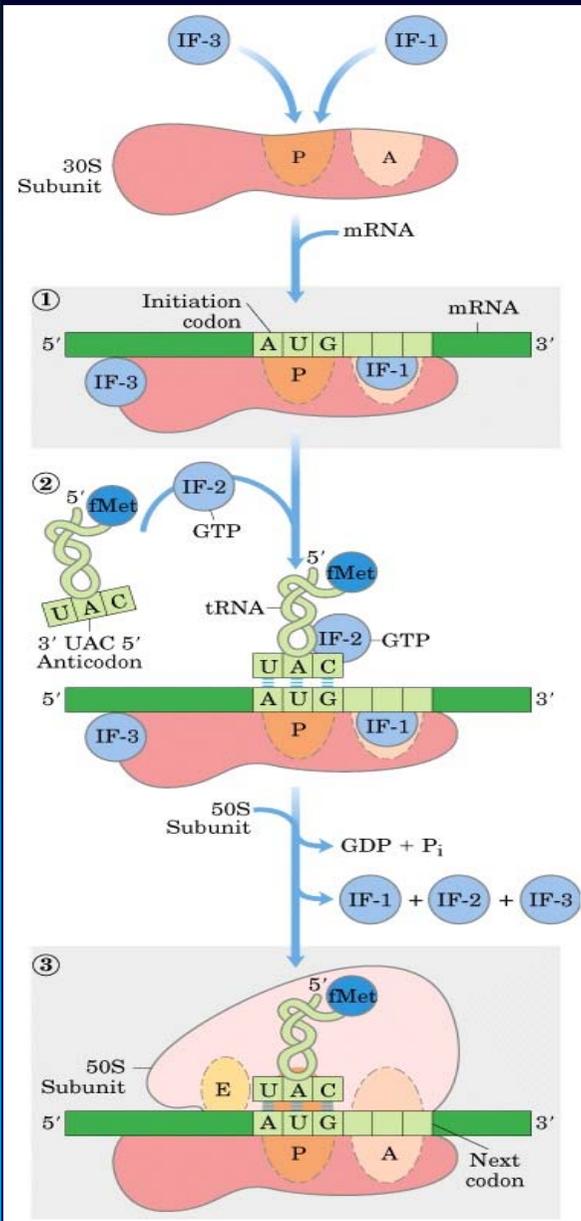
1. Un amminoacido viene attivato, formando l'amminoacil-adenilato.

LA FORMAZIONE DEGLI AMMINOACIL-tRNA



2. L'amminoacido attivato viene trasferito al tRNA corrispondente; tutto il processo è mediato dall'enzima **aminoacil-tRNA sintetasi** (enzima condensante).

LA FORMAZIONE DEL COMPLESSO DI INIZIO

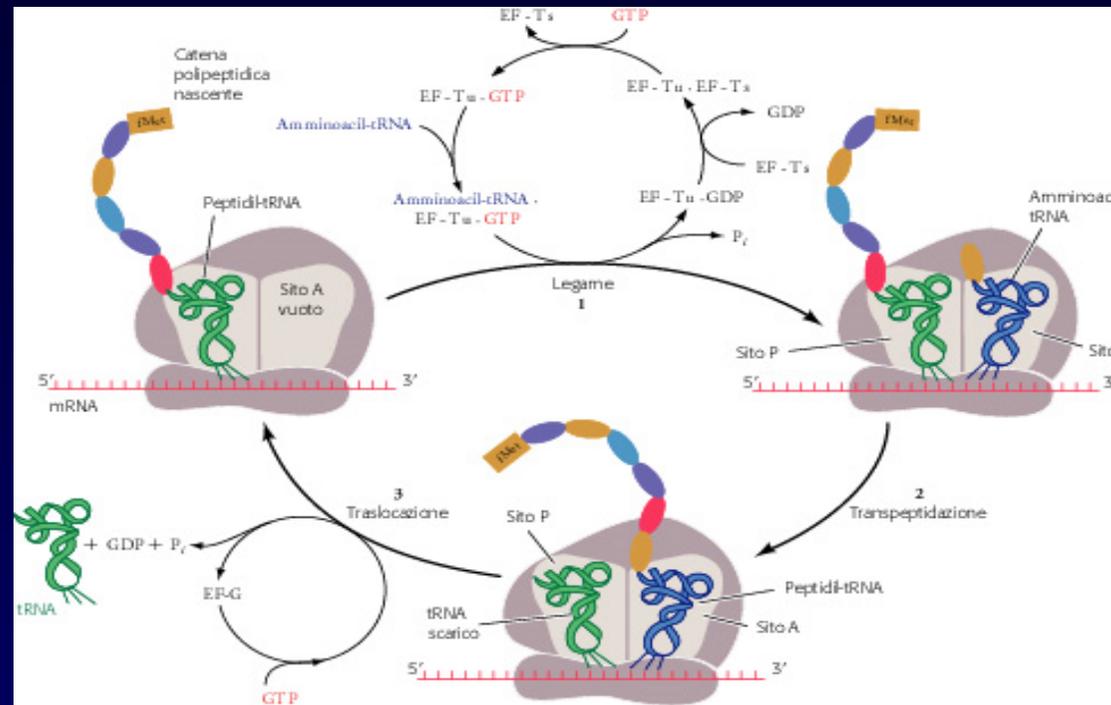


mRNA, formilmetionina-tRNA e la subunità ribosomiale 30S si uniscono a formare il complesso di inizio,

L'fMET-tRNAf occupa il sito P (peptidilico) del ribosoma,

successivamente si lega anche la subunità ribosomiale 50S.

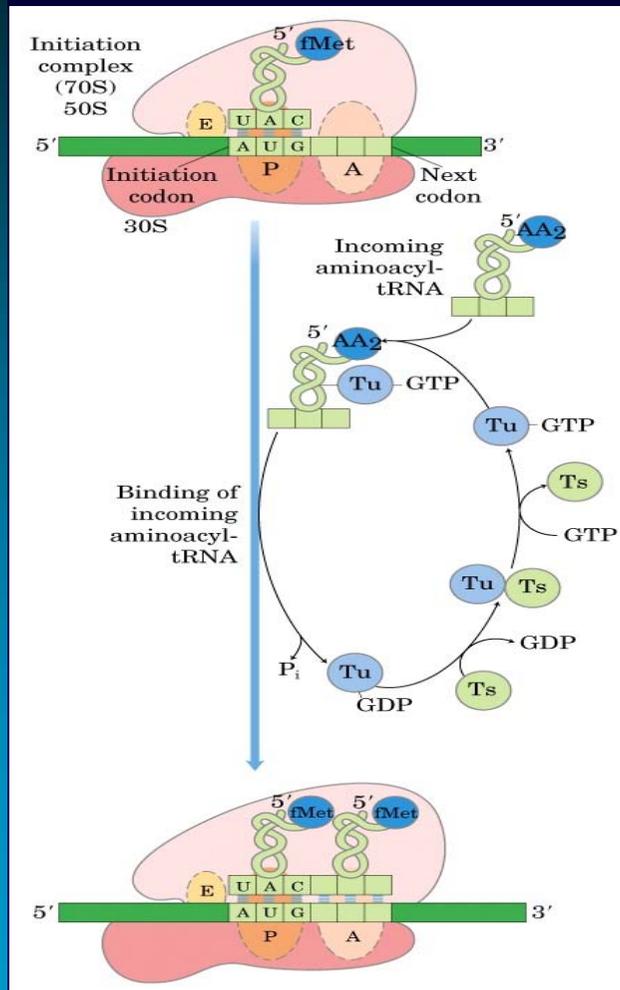
LA FASE DI ALLUNGAMENTO DELLA SINTESI PROTEICA



La catena polipeptidica nascente nel **sito P** viene trasferita all'amminoacil-tRNA appena giunto nel **sito A**;

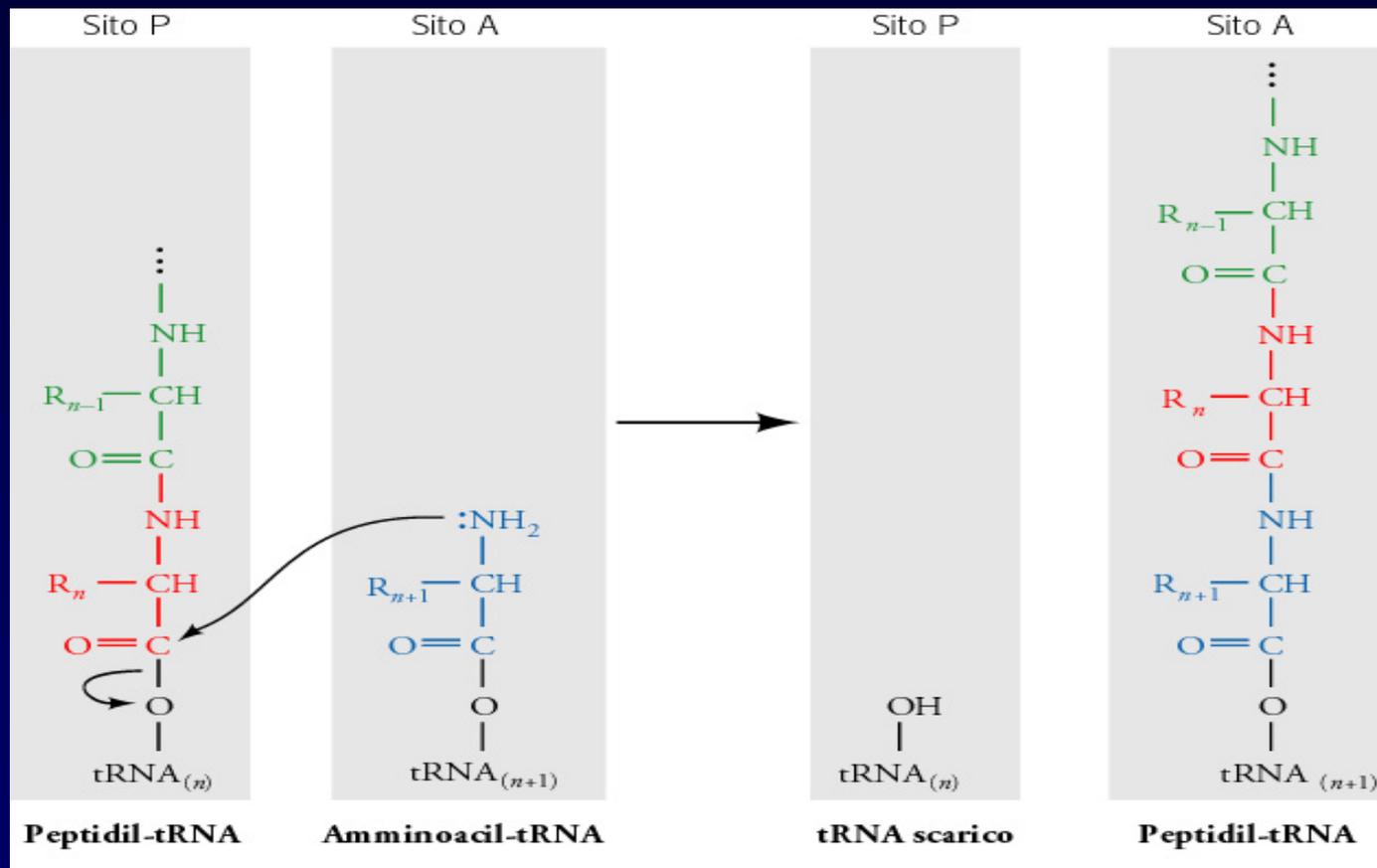
la traslocazione sposta quest'ultimo tRNA nel **sito P** ed il precedente nel **sito E**.

LA FASE DI ALLUNGAMENTO DELLA SINTESI PROTEICA

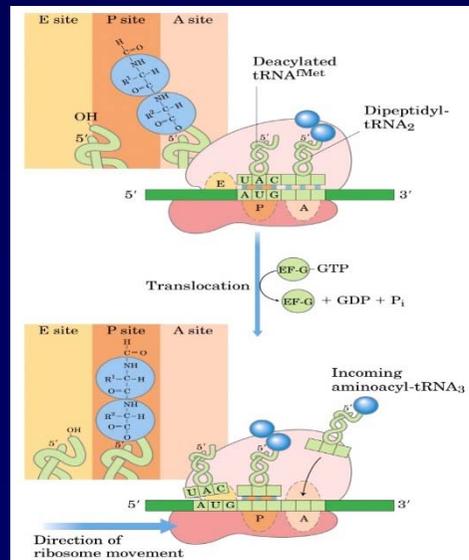
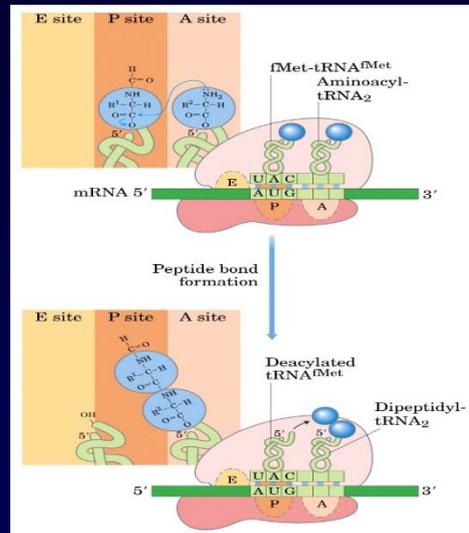


L'EF-Tu porta l'amminoacil-tRNA appropriato al sito A (aminoacilico) per cominciare la fase di allungamento con la formazione del primo legame peptidico.

LA FASE DI ALLUNGAMENTO DELLA SINTESI PROTEICA



LA FASE DI ALLUNGAMENTO DELLA SINTESI PROTEICA



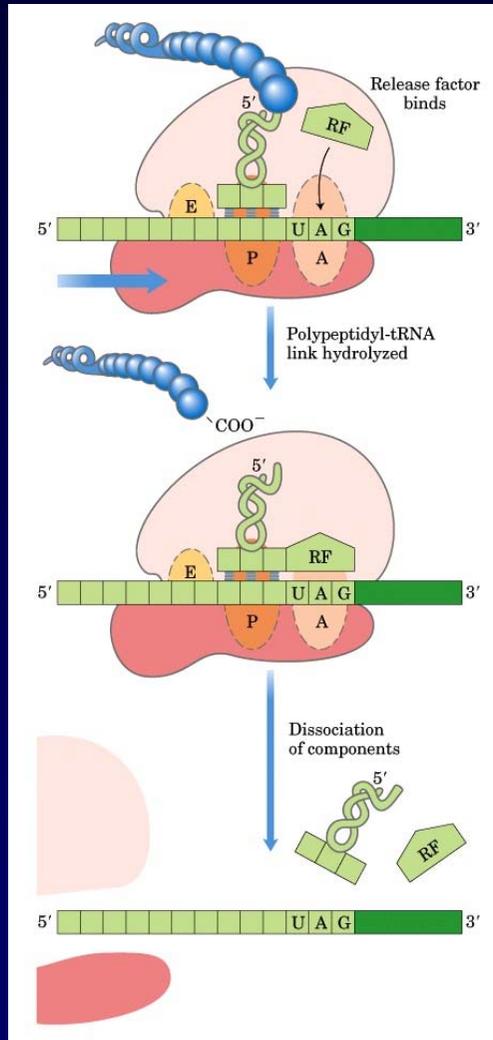
Dopo la formazione del legame peptidico si ha la traslocazione:

il tRNA scarico lascia il sito P per il sito E,

il peptidil-tRNA si muove dal sito A al sito P,

l'mRNA si sposta di tre nucleotidi.

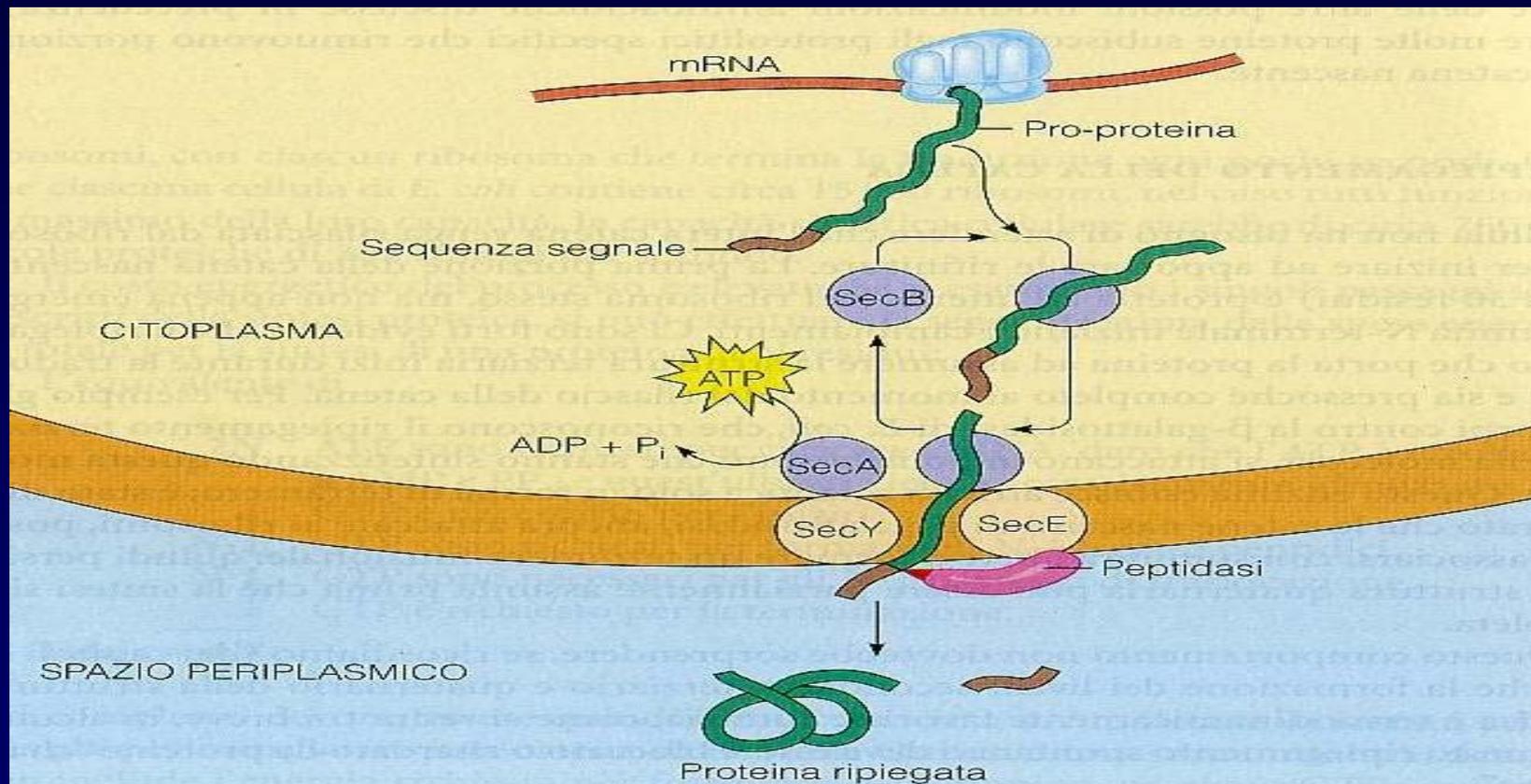
LA FASE DI TERMINAZIONE DELLA SINTESI PROTEICA



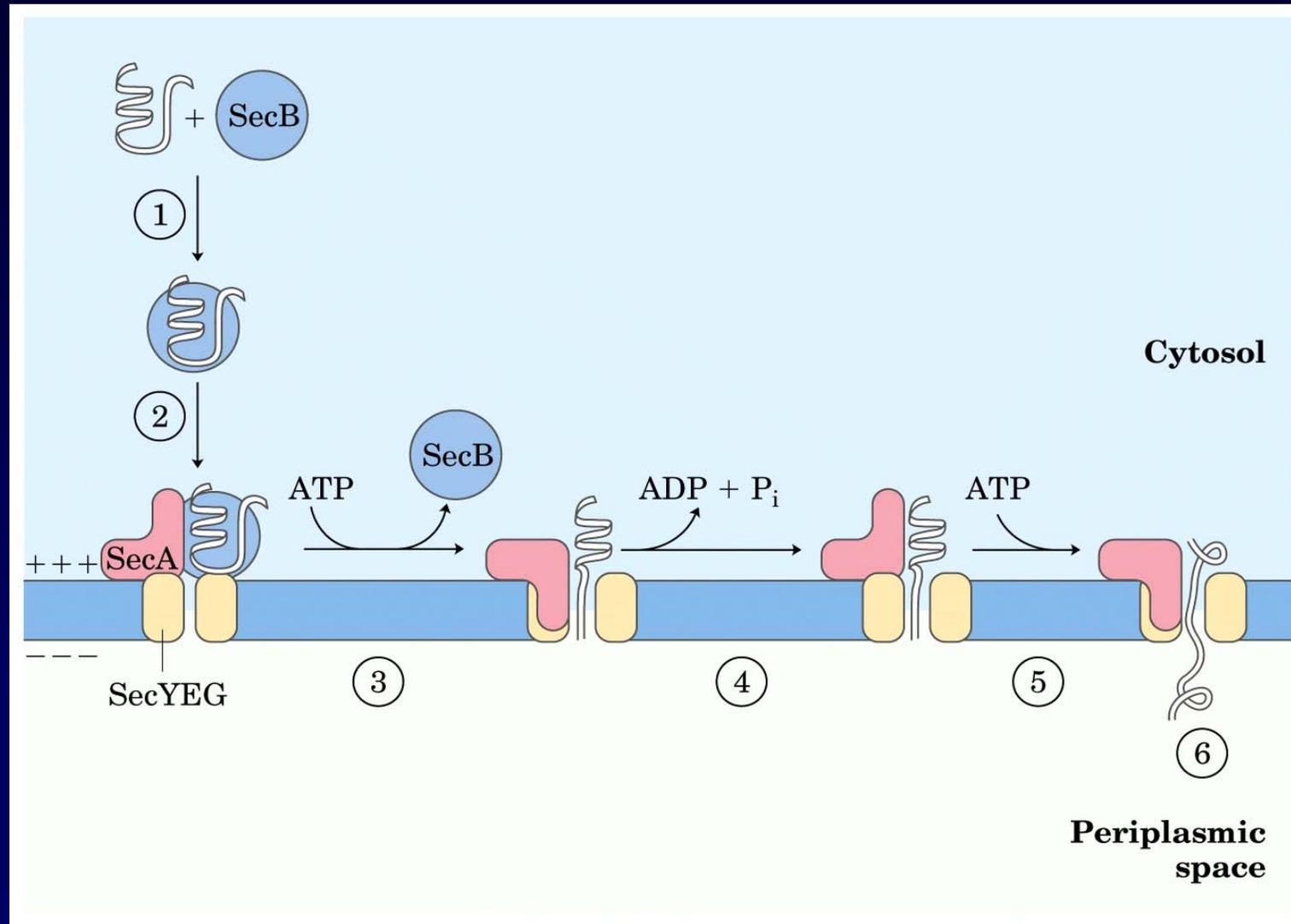
La sintesi proteica è terminata da fattori di rilascio, che riconoscono i codon di stop **UAA, UAG o UGA,**

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

LA TRADUZIONE È IMMEDIATAMENTE SEGUITA DA VARI TIPI DI RIMANEGGIAMENTO DELLA PROTEINA, COMPRESI IL RIPIEGAMENTO DELLA CATENA, LA MODIFICAZIONE COVALENTE ED IL TRASPORTO.



UN MODELLO PER L'ESPORTAZIONE DI PROTEINE NEI BATTERI



I COMPONENTI NECESSARI NELLE 5 PRINCIPALI FASI DELLA SINTESI DEI POLIPEPTIDI NELL'E.COLI

<i>Stadio</i>	<i>Componenti necessari</i>
● 1. Attivazione degli aminoacidi	20 aminoacidi 20 aminoacil-tRNA sintetasi 20 o più RNA di trasferimento ATP Mg ²⁺
● 2. Inizio della catena polipeptidica	RNA messaggero N-Formilmethionil-tRNA Codon di inizio sull'mRNA (AUG) Subunità ribosomale 30S Subunità ribosomale 50S GTP Mg ²⁺
● 3. Allungamento	Fattori di inizio (IF-1, IF-2, IF-3) Ribosoma 70S funzionante (complesso di inizio) Gli aminoacil-tRNA specificati dai codon Mg ²⁺ Fattori di allungamento (Tu, Ts e G) GTP
● 4. Terminazione	Peptidil transferasi ATP Codon di termine sull'mRNA Fattori di rilascio per i polipeptidi (R ₁ , R ₂ ed S)
● 5. Avvolgimento e modificazioni post sintetiche	Enzimi specifici e cofattori per la rimozione dei residui di inizio e delle sequenze di comando iniziali, la modificazione dei residui terminali, l'attacco dei gruppi prostetici degli enzimi, e la modificazione covalente di specifici gruppi R di aminoacidi mediante il legame di gruppi fosforici, metilici, carbossilici o di carboidrati