

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"

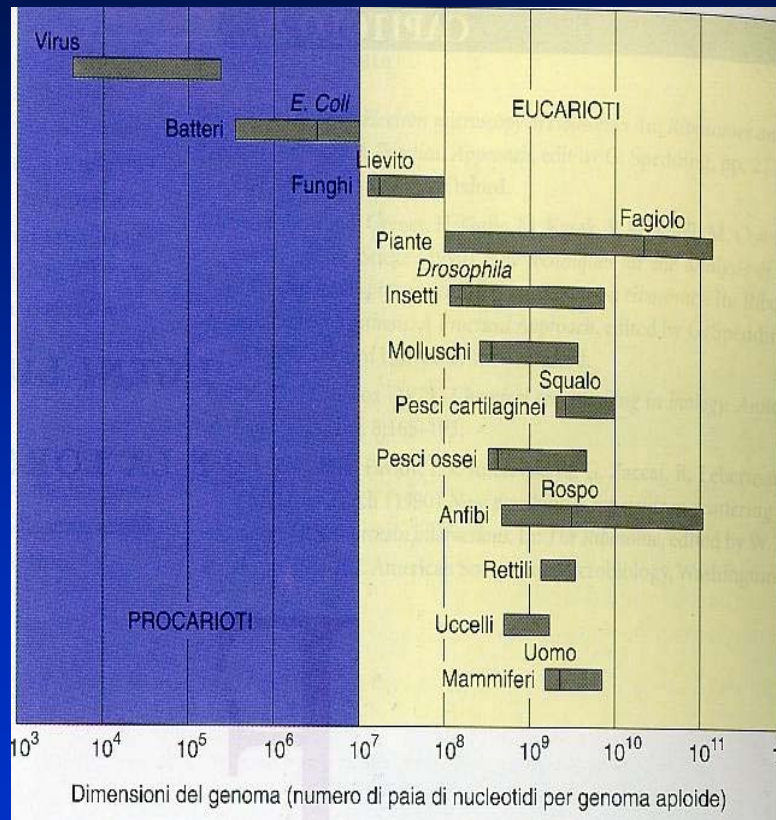
LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEGLI EUCARIOTI

Roberto Giacomini Stuffer

1. I geni e il DNA degli eucarioti
2. La replicazione, la trascrizione e la sintesi proteica degli eucarioti
3. Gli inibitori della replicazione, trascrizione e sintesi proteica

I GENI E 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.

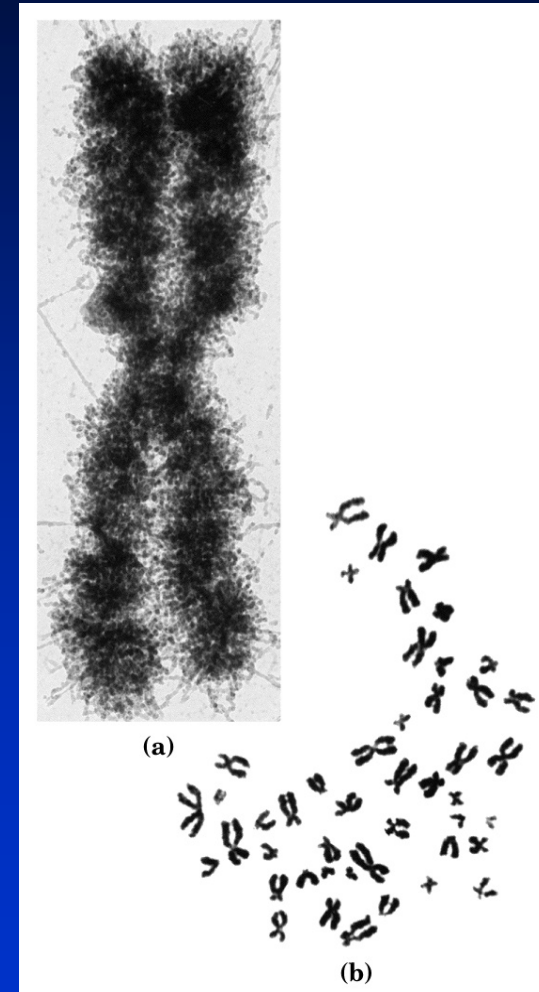
[†]This is the haploid chromosome number for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Wild yeast strains generally have eight (octoploid) or more sets of these chromosomes.

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 delle 23 coppie di cromosomi umani, 22 di cromosomi omologhi (autosomi) e una coppia di cromosomi sessuali (eterosomi, X+Y) hanno una lunghezza che varia fino a **25** volte.



IL GENE



È 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

Essi sono i geni che codificano i polipeptidi o un RNA stabile.

LE SEQUENZE REGOLATIVE

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

LE SEQUENZE RIPETITIVE

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

LE SEQUENZE RIPETITIVE

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

Esempi:

il DNA satellite,

le duplicazioni dei geni funzionali,

gli elementi ALU (nei mammiferi).

II DNA SATELLITE

Presenta ripetizioni multiple in tandem di sequenze molto brevi, per lunghi segmenti di DNA come $(ATAAACT)_n$

solitamente rappresentano il 10-20% del genoma complessivo,

non codificano per proteine e molte non sono trascritte.

II DNA SATELLITE

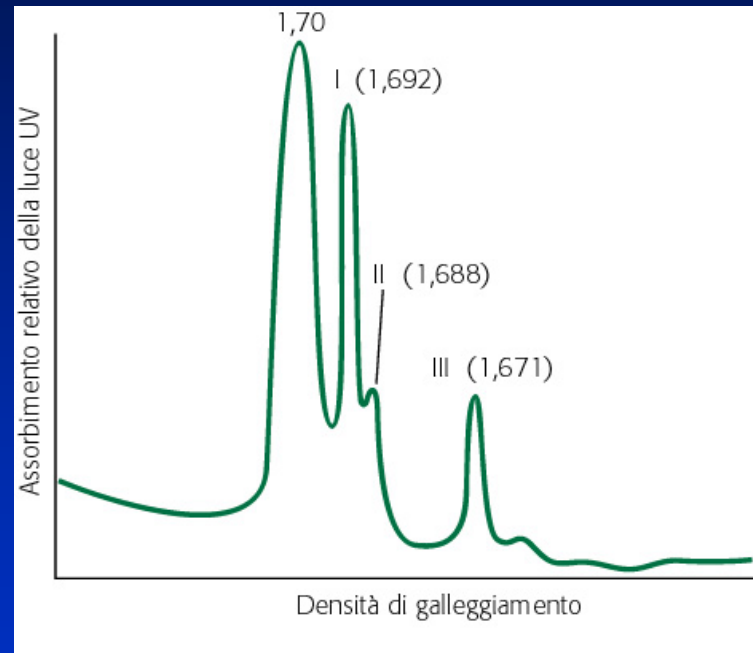
Può avere un ruolo strutturale,

é frequente in prossimità dei centromeri,

può essere un sito di legame per le proteine che legano le fibre del fuso mitotico.

II DNA SATELLITE

Forma **bande satelliti** attorno a quella principale del DNA, negli esperimenti di centrifugazione su gradiente di densità



e viene separato dalla banda principale del DNA, mediante sedimentazione all'equilibrio in gradienti di densità.

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).

GLI ELEMENTI ALU

Sono sequenze di circa **300 coppie di basi**, presenti in centinaia di migliaia di copie,

spesso riflettono la presenza di un sito per l'endonucleasi di restrizione **ALU**,

sono trascritte in modo inefficiente e non vengono tradotte.

GLI ELEMENTI ALU

Il loro significato è incerto,

alcune possono contenere le **origini** per la duplicazione del DNA,

altre sono "**parassiti molecolari**" (non hanno alcuna funzione utile);

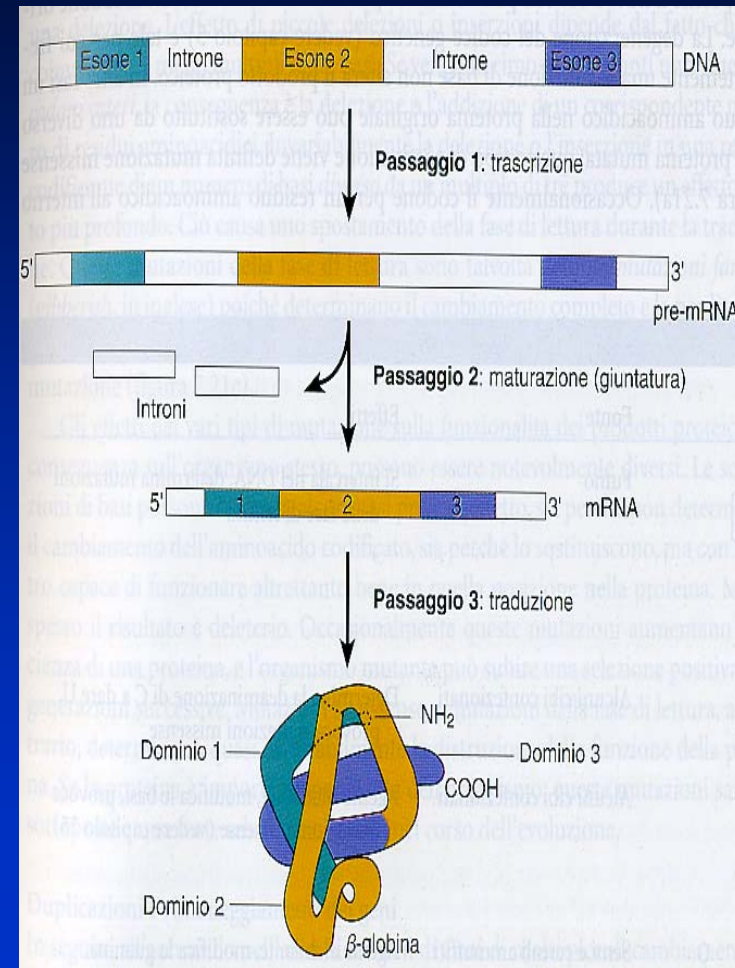
secondo studi recenti, hanno avuto origine da un piccolo RNA (**7SL RNA**), che partecipa al trasporto delle proteine attraverso le membrane biologiche.

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.

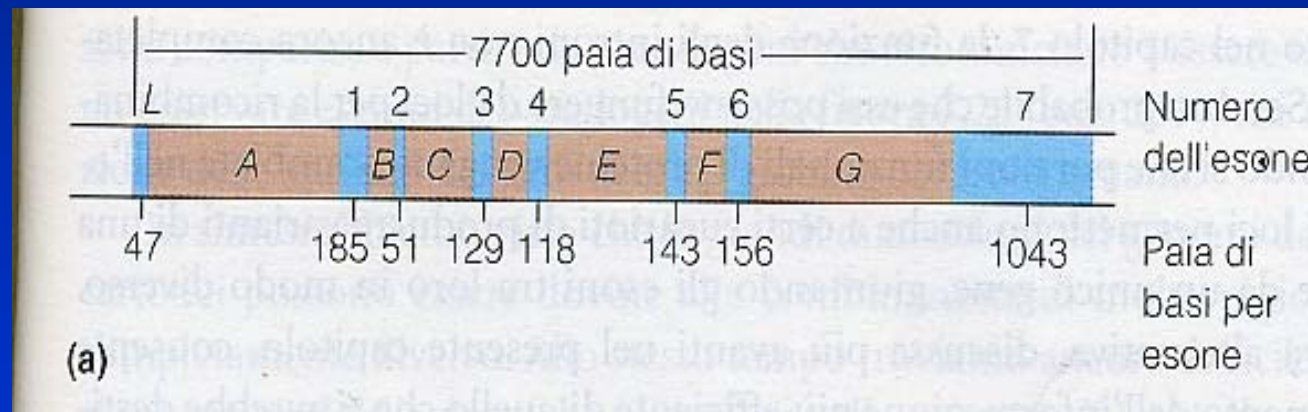
I geni eucariotici sono quindi definiti **discontinui**.



GLI INTRONI E GLI ESONI

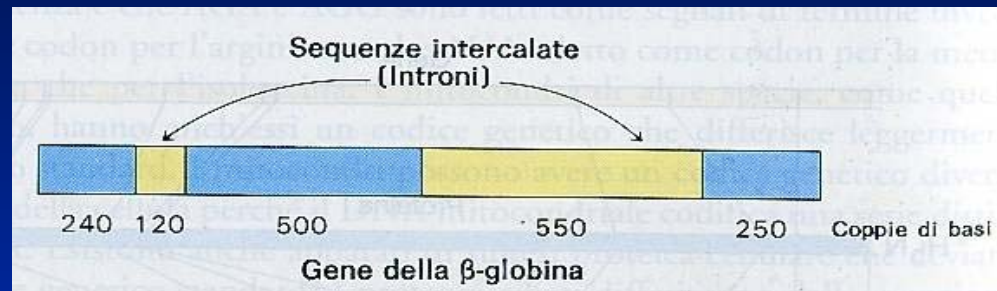
Spesso, nei geni strutturali eucariotici, gli **introni** superano gli **esoni** in lunghezza complessiva;

probabilmente, gli introni, presenti nei geni ancestrali, si sono perduti nell'evoluzione di organismi specializzati in una crescita molto rapida (es. E.coli e lieviti).



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;

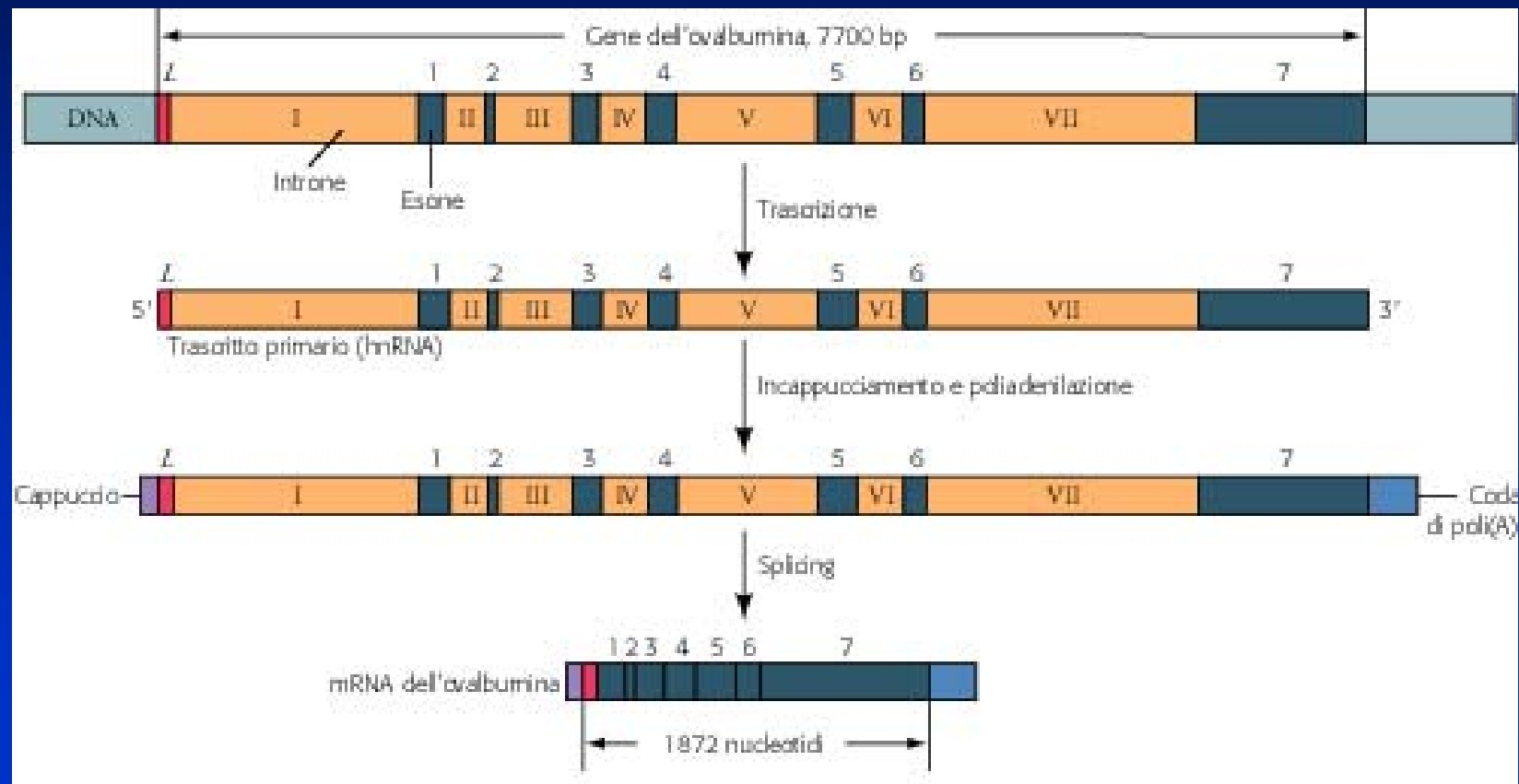
la **funzione** degli introni non è ancora ben compresa,

un introne varia da **50** a **10000** nucleotidi,

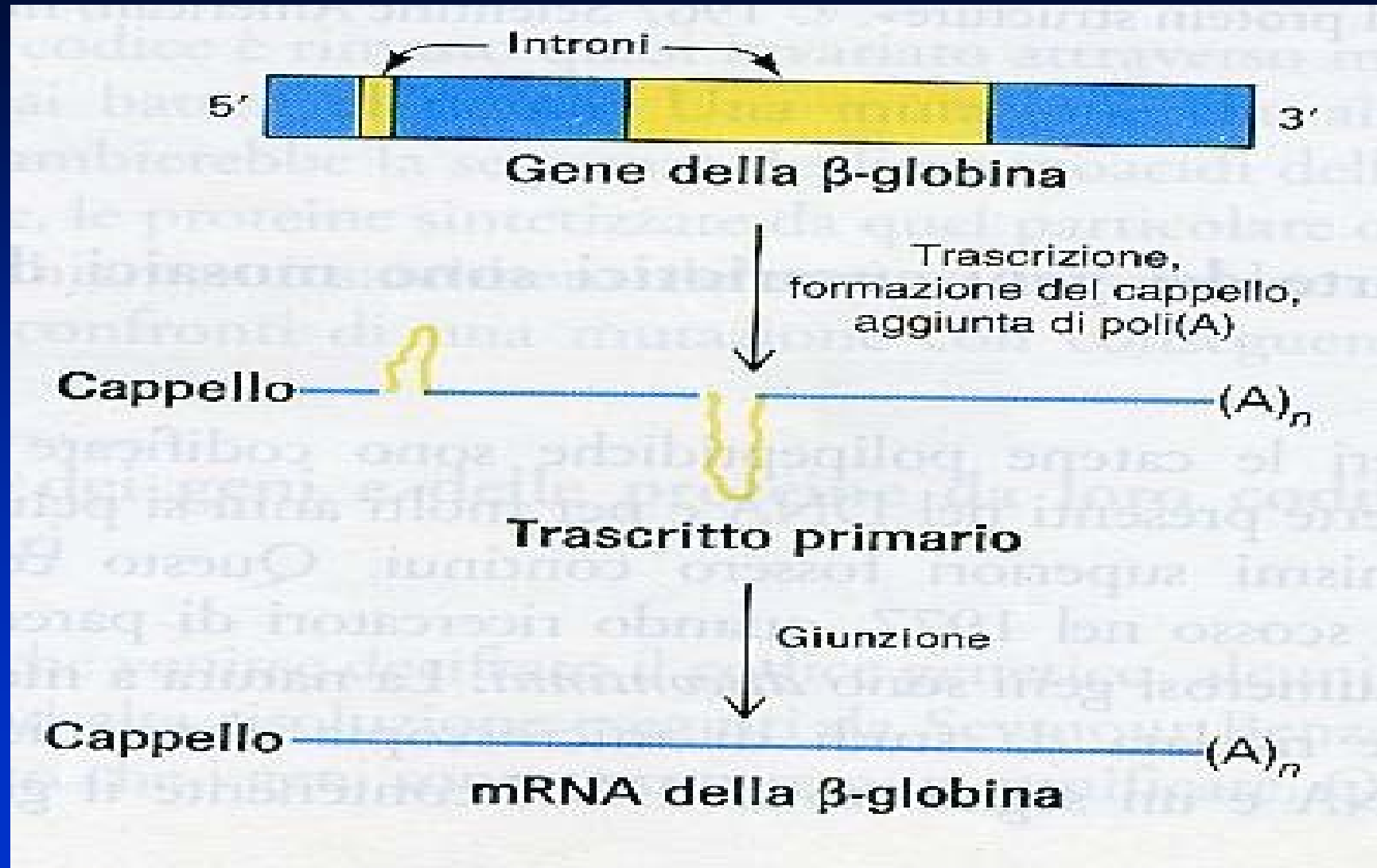
gli **istoni** sono una famiglia di geni eucariotici senza introni.

REGIONI CODIFICANTI E NON CODIFICANTI DEL GENE DELL'OVALBUMINA

Il suo gene contiene 8 esoni inframmezzati da 7 introni.



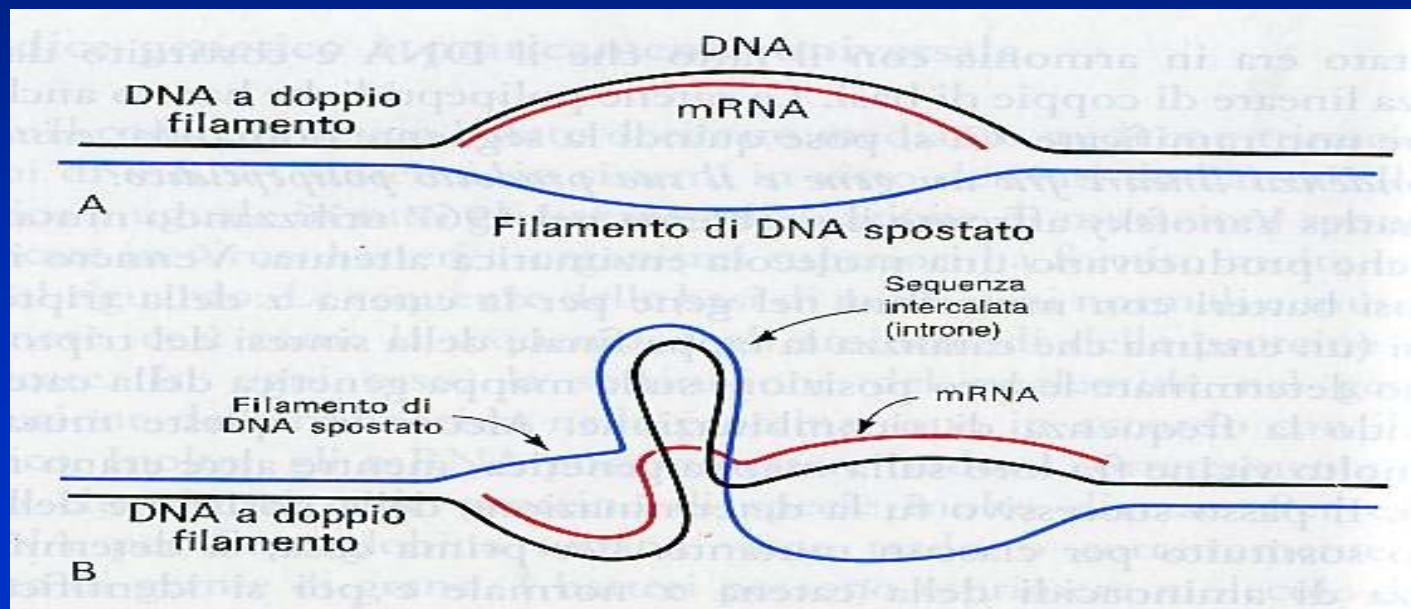
I GENI DISCONTINUI



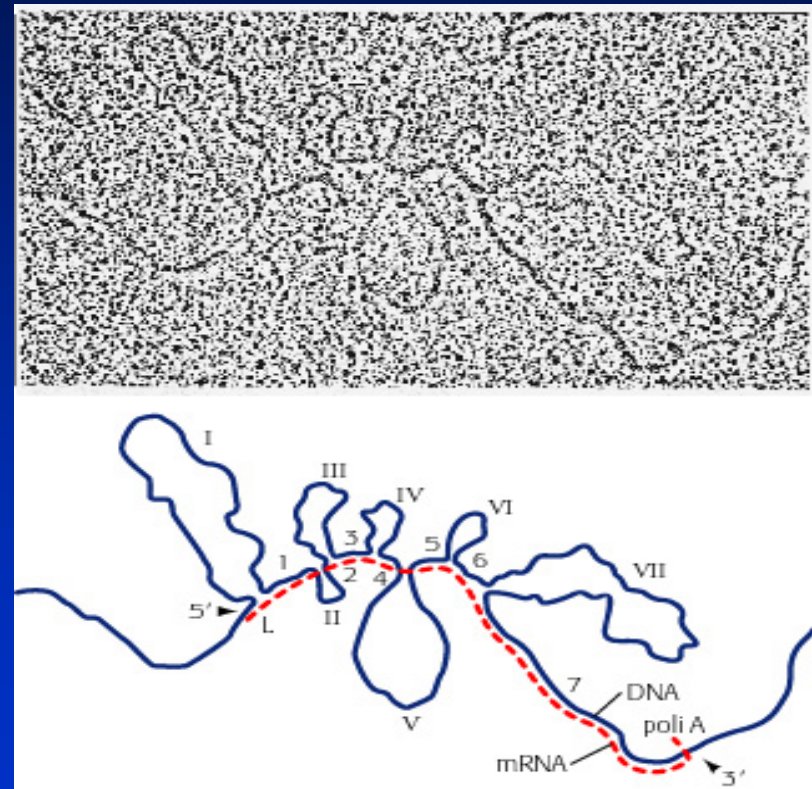
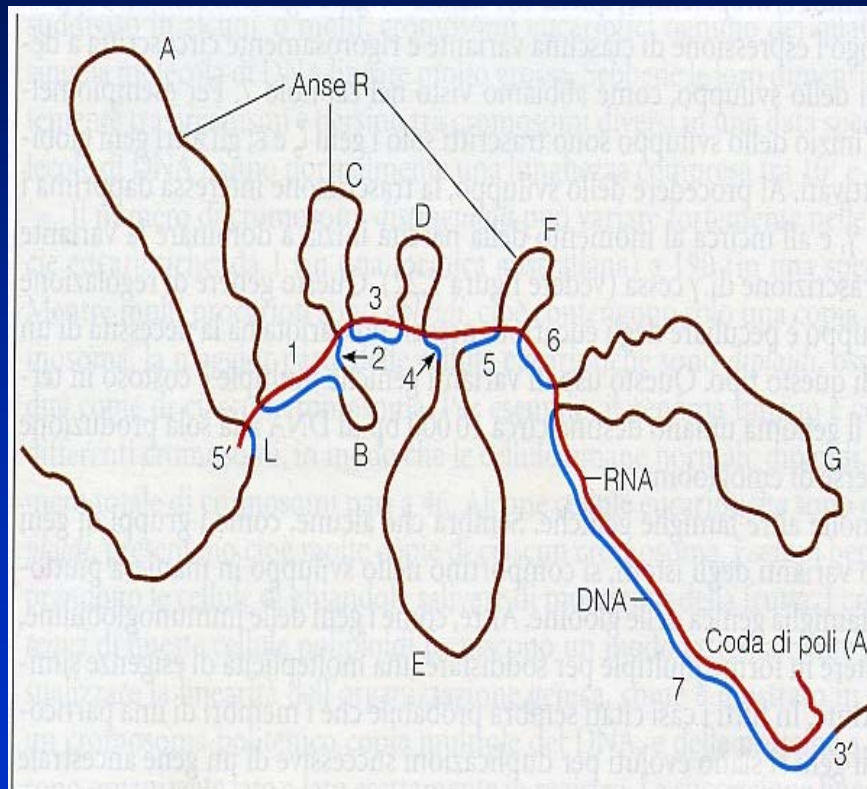
UN GENE CON UNA SEQUENZA INTERCALATA

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**.



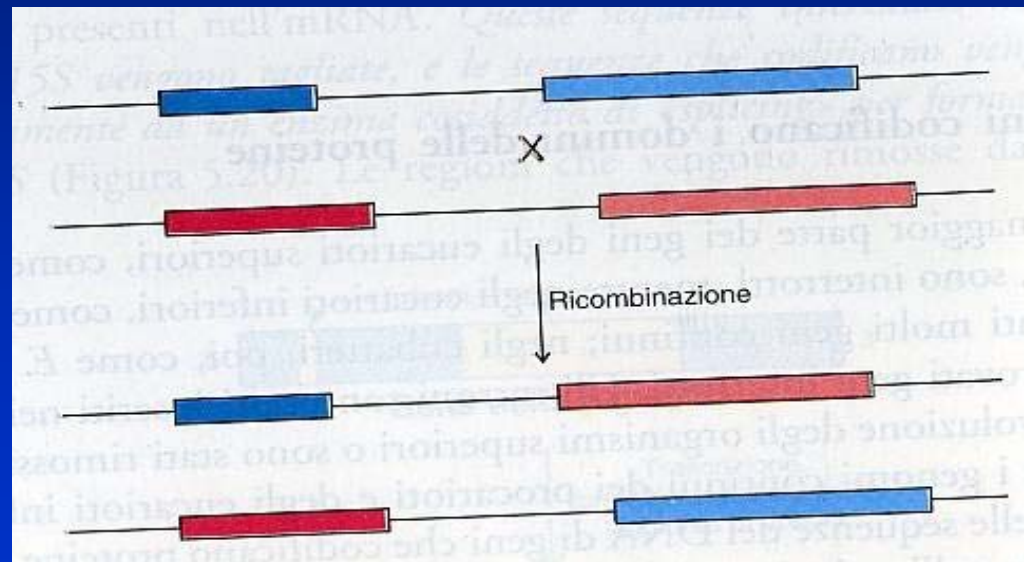
I GENI DISCONTINUI



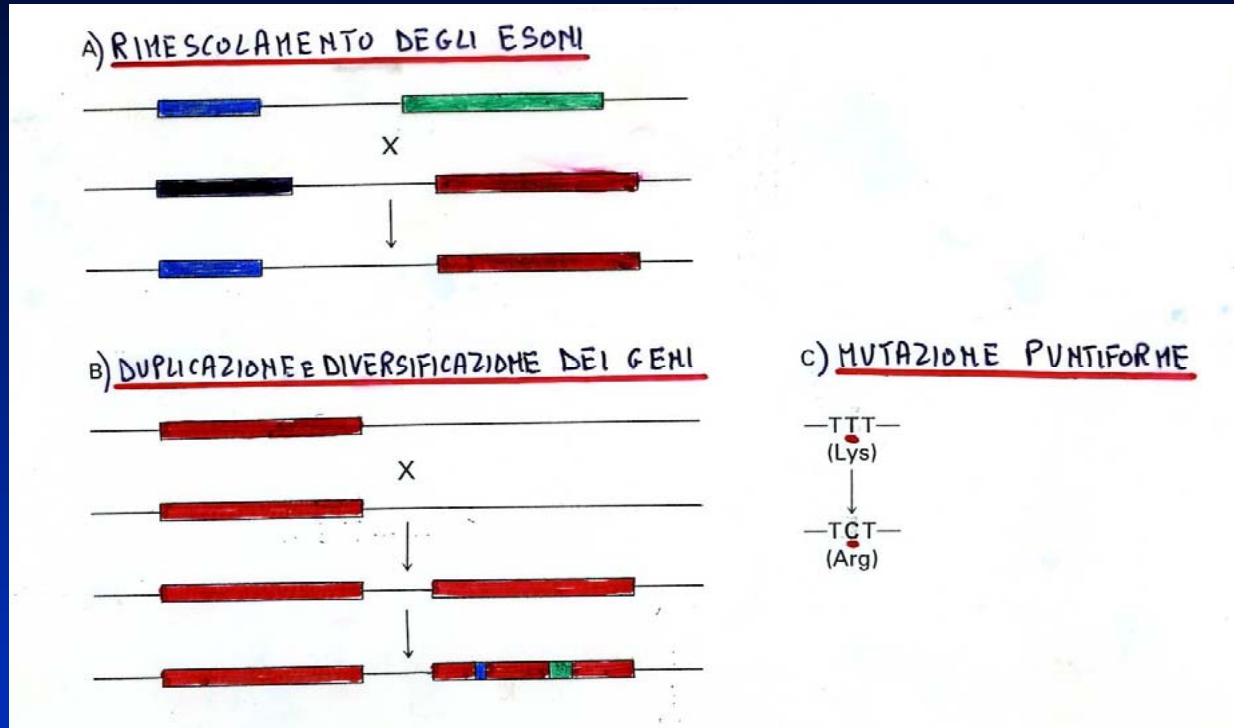
L'EVOLUZIONE DELLE PROTEINE

DURANTE L'EVOLUZIONE, LE NUOVE PROTEINE POSSONO ESSERE SORTE IN SEGUITO A VARI MECCANISMI:

A) il rimescolamento degli esoni può creare nuovi geni.



DURANTE L'EVOLUZIONE, LE NUOVE PROTEINE POSSONO ESSERE SORTE IN SEGUITO A VARI MECCANISMI:



- B) la duplicazione genica permette al gene originale di svolgere la sua normale funzione e al gene duplicato di potersi diversificare,
- C) una mutazione genica puntiforme cambia un singolo nucleotide e può determinare la sostituzione di un amminoacido (con conseguente alterazione genica).

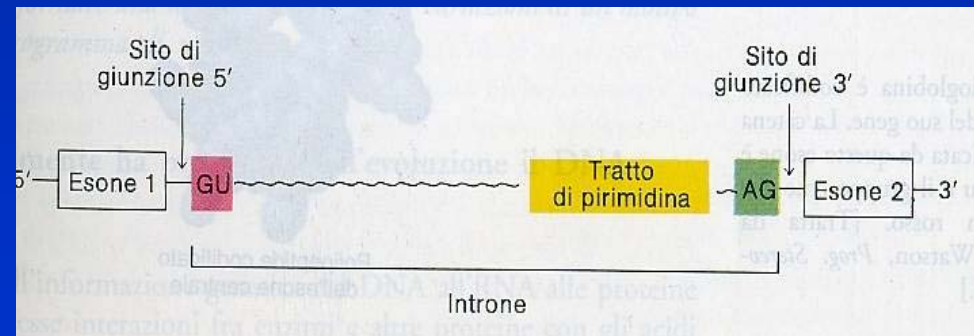
LO SPLICING

LO SPLICING

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

il pre-mRNA viene complessato con piccole particelle nucleari ribonucleoproteiche (**snRNP**);

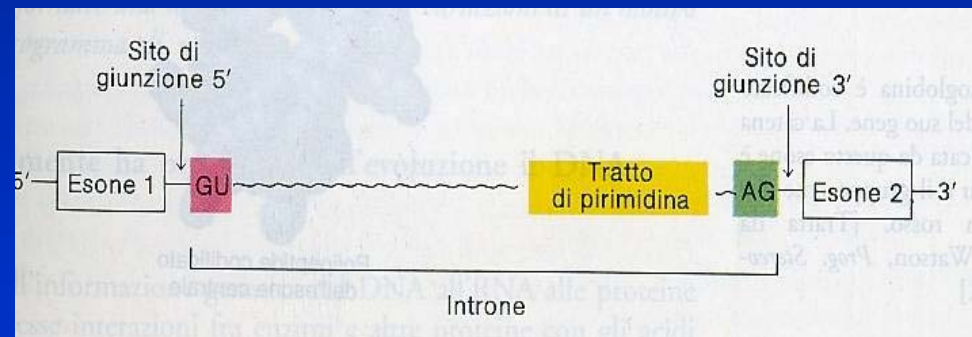
le **snRNP** sono complessi tra piccoli RNA-nucleari (**snRNA**) e speciali enzimi del processo di giuntatura.



LO SPLICING

Il complesso **snRNP-pre-mRNA** é chiamato **spliceosoma** (to splice = giuntare),

in questa struttura avvengono il taglio e la giuntatura necessari per togliere gli introni dal pre-mRNA.



IN BREVE:

lo spliceosoma = pre-mRNA + snRNP,

le snRNP = snRNA + gli enzimi del processo di giuntatura.

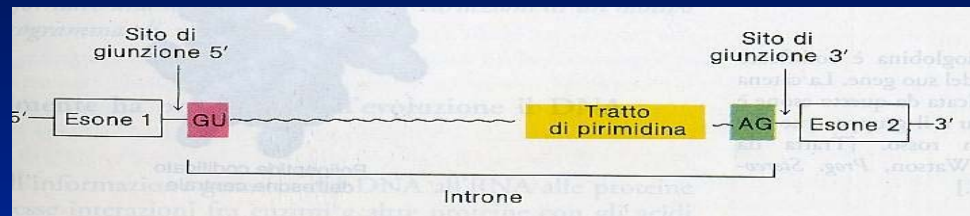
LO SPLICING

Gli **SPLICEOSOMI** sono grandi complessi (60S) costituiti da **snRNP** e da **precursori degli mRNA**.

snRNP	Ruolo
U1	Legame al sito di splicing 5' e poi al 3'
U2	Legame al sito di ramificazione
U4	Legame al sito di splicing 5'
U5	Maschera l'attività catalitica di U6
U6	Catalizza lo splicing

LO SPLICING

Le sequenze intercalate nel trascritto primario vengono tagliate e le sequenze che codificano legate simultaneamente dagli spliceosomi,

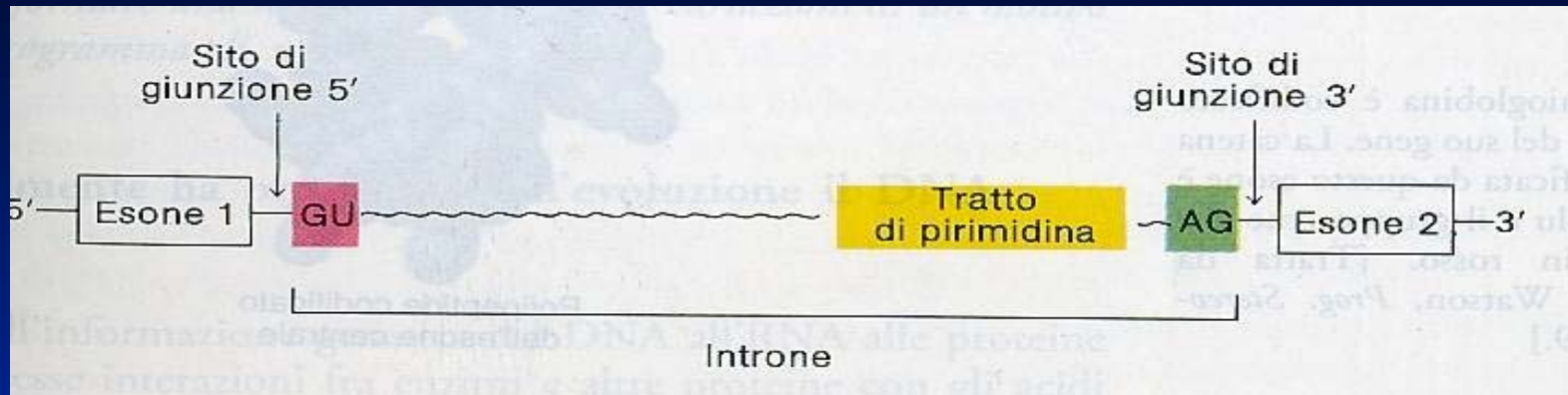


nella formazione dello spliceosoma, gli **snRNA** riconoscono e legano i siti di giunzione introne-esone (siti di splicing), in base a sequenze complementari, che si trovano alle estremità degli introni.

Regione del gene	Esone	Esone
Introne 2 dell'ovalbumina	U A A G G U G A G C	U U A C A G G U U G
Introne 3 dell'ovalbumina	U C A G G U A C A G	A U U C A G U C U G
Introne 1 della β globina	G C A G G U U G G U	C C U U A G G C U G
Introne 2 della β globina	C A G G G U G A G U	C C A C A G U C U C
Introne 1 della immunoglobulina λ_1	U C A G G U C A G C	U U G C A G G G G C
Antigene T precoce dell'SV40	U A A G G U A A A U	U U U U A G A U U C

Sequenze rappresentative nei punti di giuntura

LO SPLICING

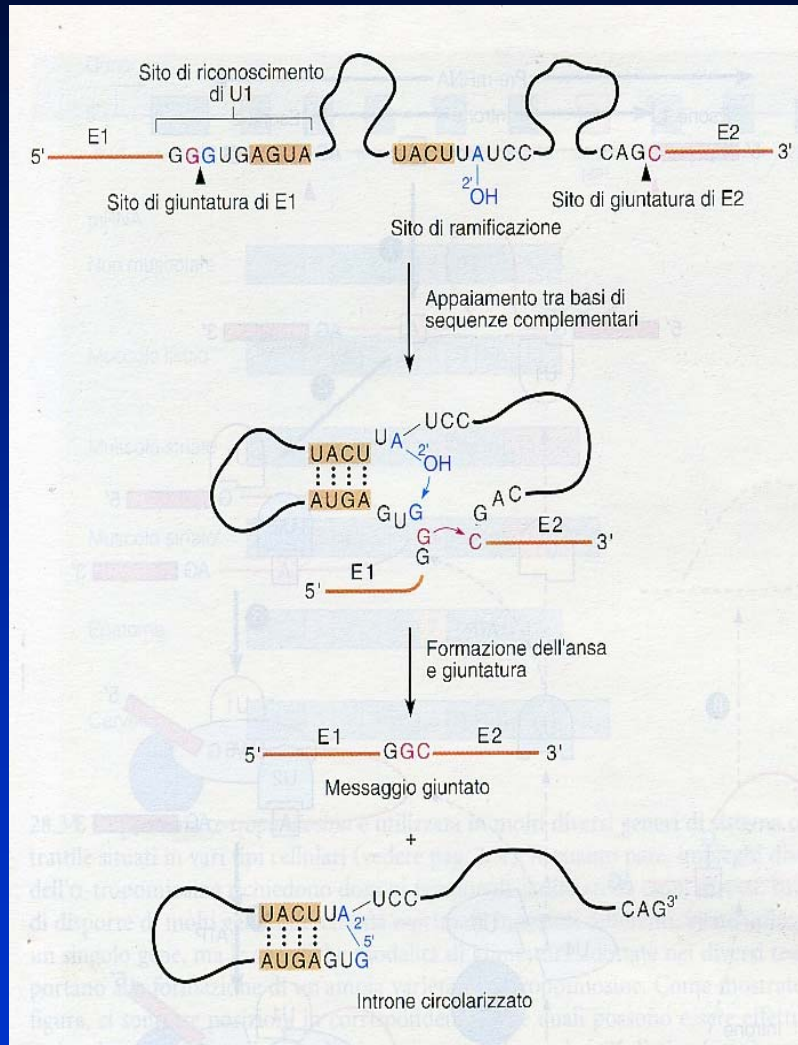


Negli eucarioti, la sequenza di basi azotate di un introne inizia con **GU** e termina con **AG**;

nei vertebrati, la sequenza di consenso all'estremità 5' é: **AGGUAAGU**,

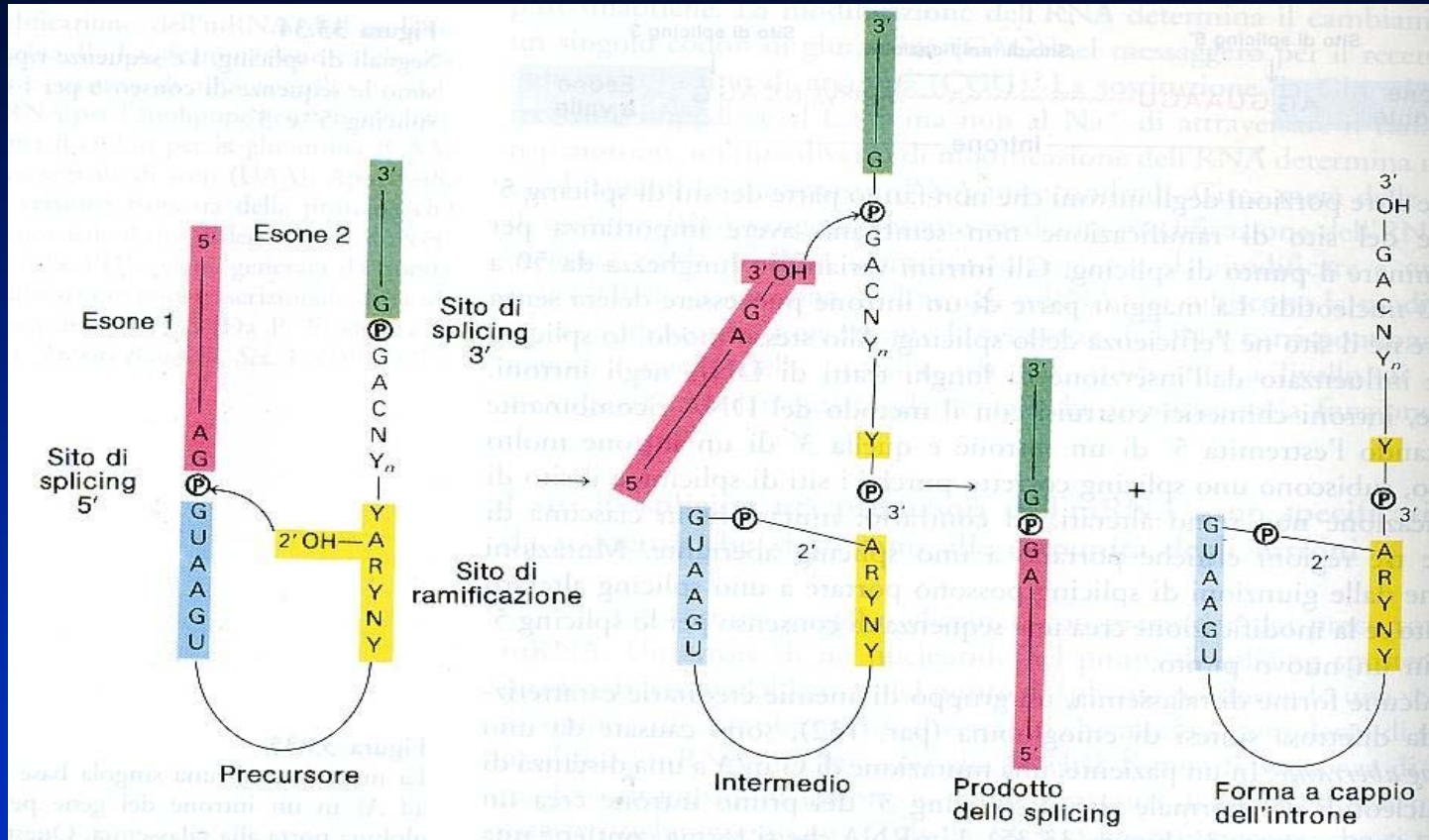
all'estremità 3' sono presenti **10 pirimidine** (U o C) seguite da **una base azotata qualunque**, da **C** e **AG**.

LO SPLICING



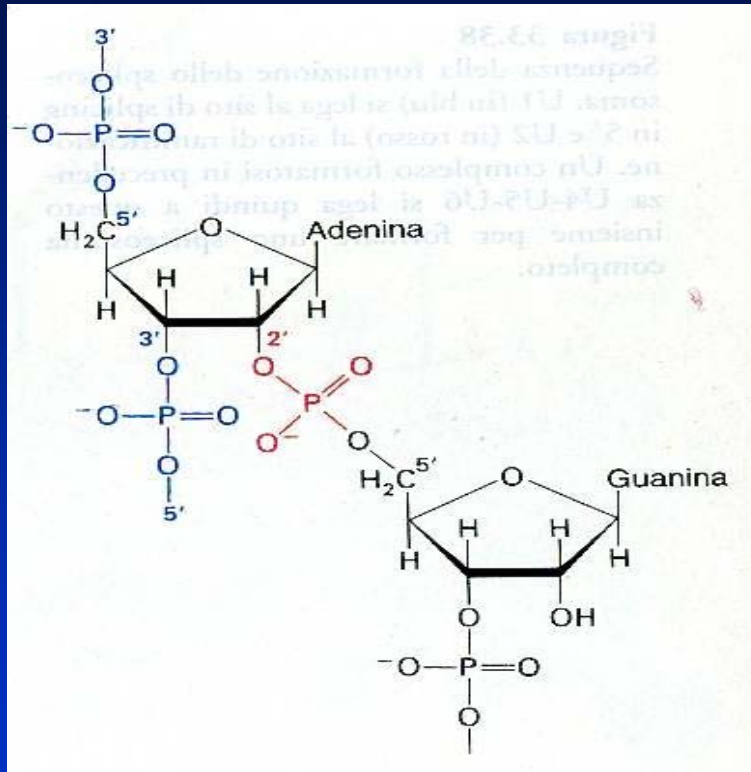
A circa 20-50 nucleotidi dall'estremità 3' del sito di splicing, è presente un **sito di ramificazione** che nei mammiferi ha una varietà di sequenze diverse.

IL MECCANISMO DI SPLICING



- Y=purina
- R=pirimidina
- N=nucleotide (purina o pirimidina)

LA STRUTTURA DEL PUNTO DI RAMIFICAZIONE NELL'INTERMEDIO A CAPPIO DELLO SPLICING



Sito di ramificazione

Estremità 5' dell'introne

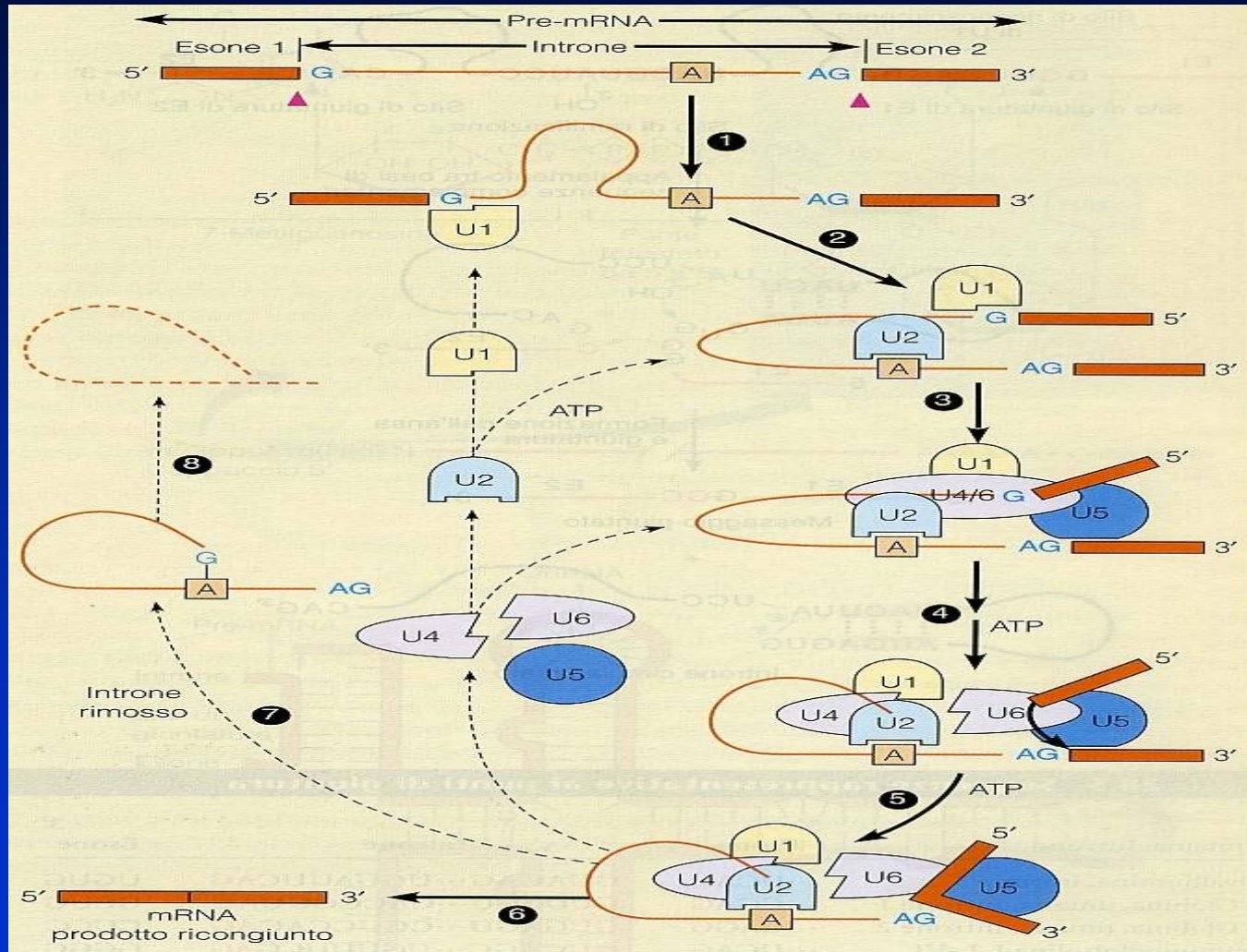
Il residuo di adenilato é unito a 3 nucleotidi da legami fosfodiesteri.

IL MECCANISMO DI SPLICING

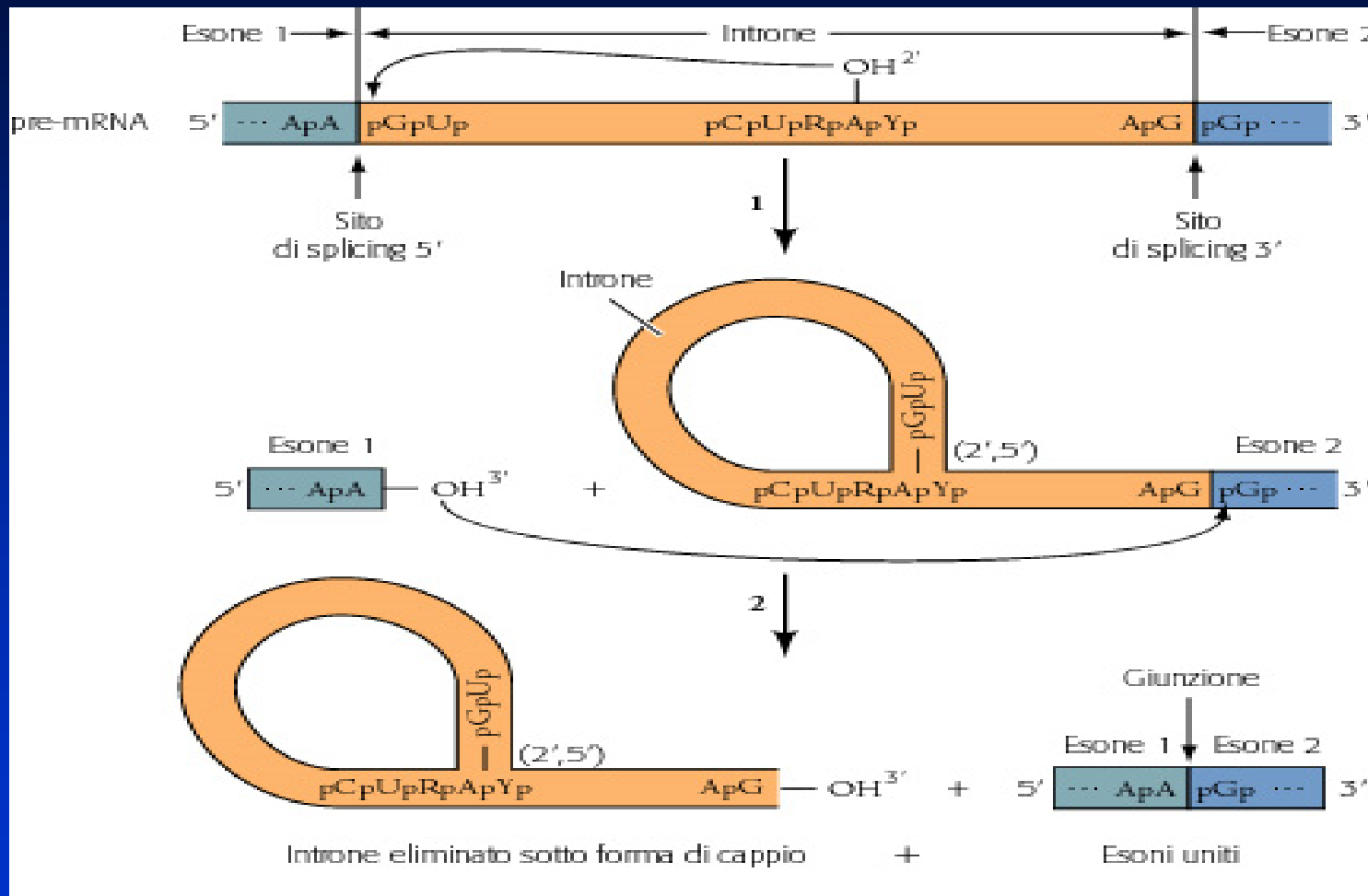
1. Attacco di **snRNP U1** nel **sito G** all'estremità 5' dell'introne,
2. la **snRNP U2** attacca il sito di ramificazione,
3. legame di altre **snRNP**,
4. formazione **dell'ansa a cappio** e unione di due esoni,
5. a giuntatura avvenuta, i prodotti (mRNA ligato ed un introne ad ansa) vengono **rilasciati**,
6. disintegrazione dello spliceosoma, degradazione degli introni e **trasporto** dell'mRNA fuori dal nucleo;

lo splicing avviene attraverso due reazioni di **trans-esterificazione**.

IL MECCANISMO DI SPLICING



IL MECCANISMO DI SPLICING



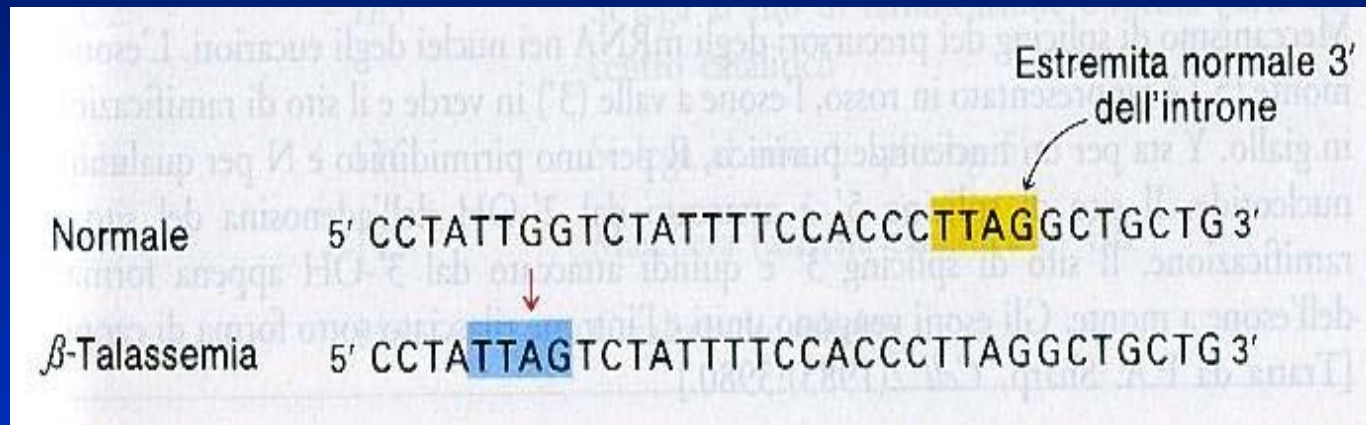


Lo splicing aberrante

È il processo che si verifica quando si hanno mutazioni nei siti di **splicing** o nel sito di **ramificazione**.

LO SPLICING ABERRANTE

Mutazioni lontane dai siti di splicing portano ad uno splicing alterato, **solo** se si crea una sequenza consenso per lo splicing 5' o 3' in un punto diverso;

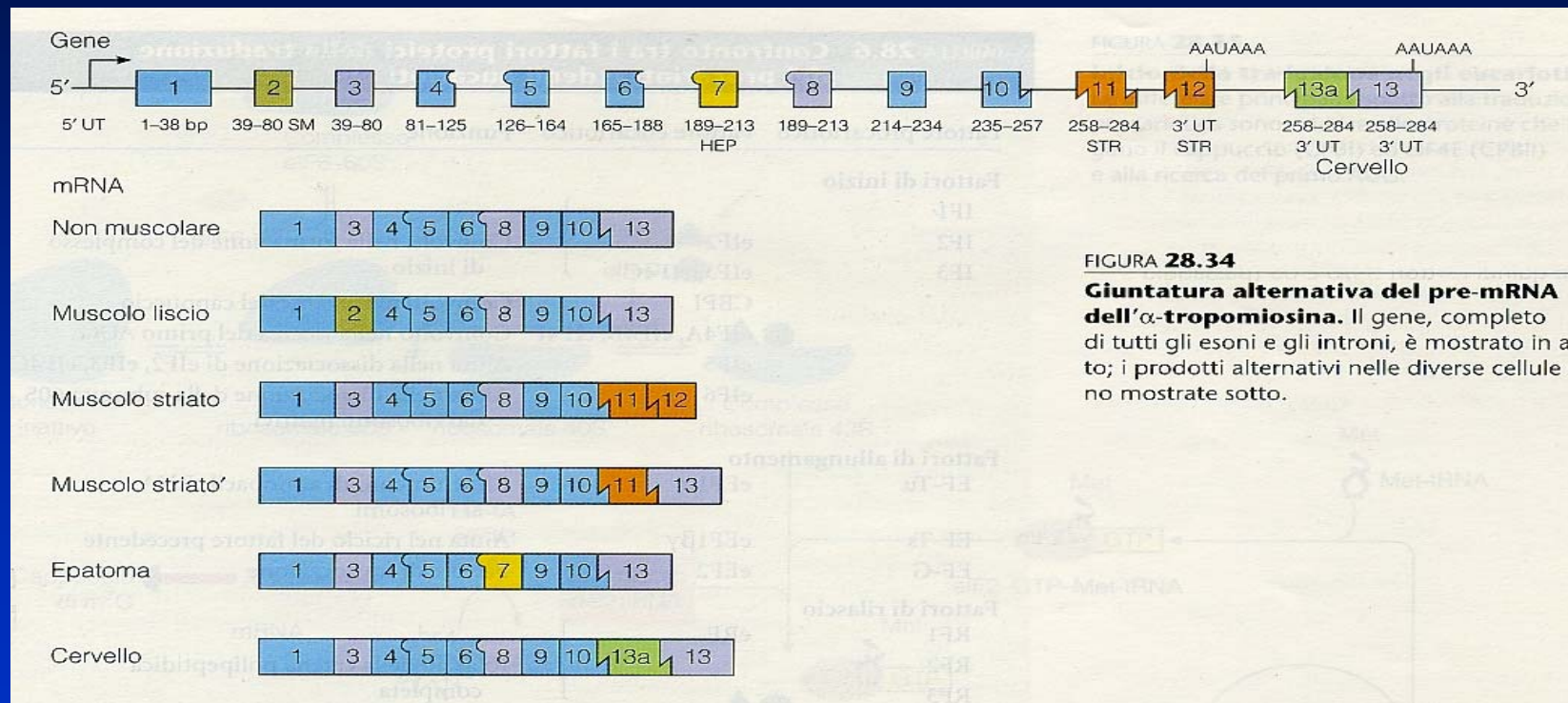


es. la mutazione di una singola base azotata (da G a A) in un introne del gene per la **β -globina** porta alla **talassemia**; questa mutazione genera probabilmente un nuovo sito di splicing **al 3'** che porta a uno splicing aberrante.

Lo splicing alternativo

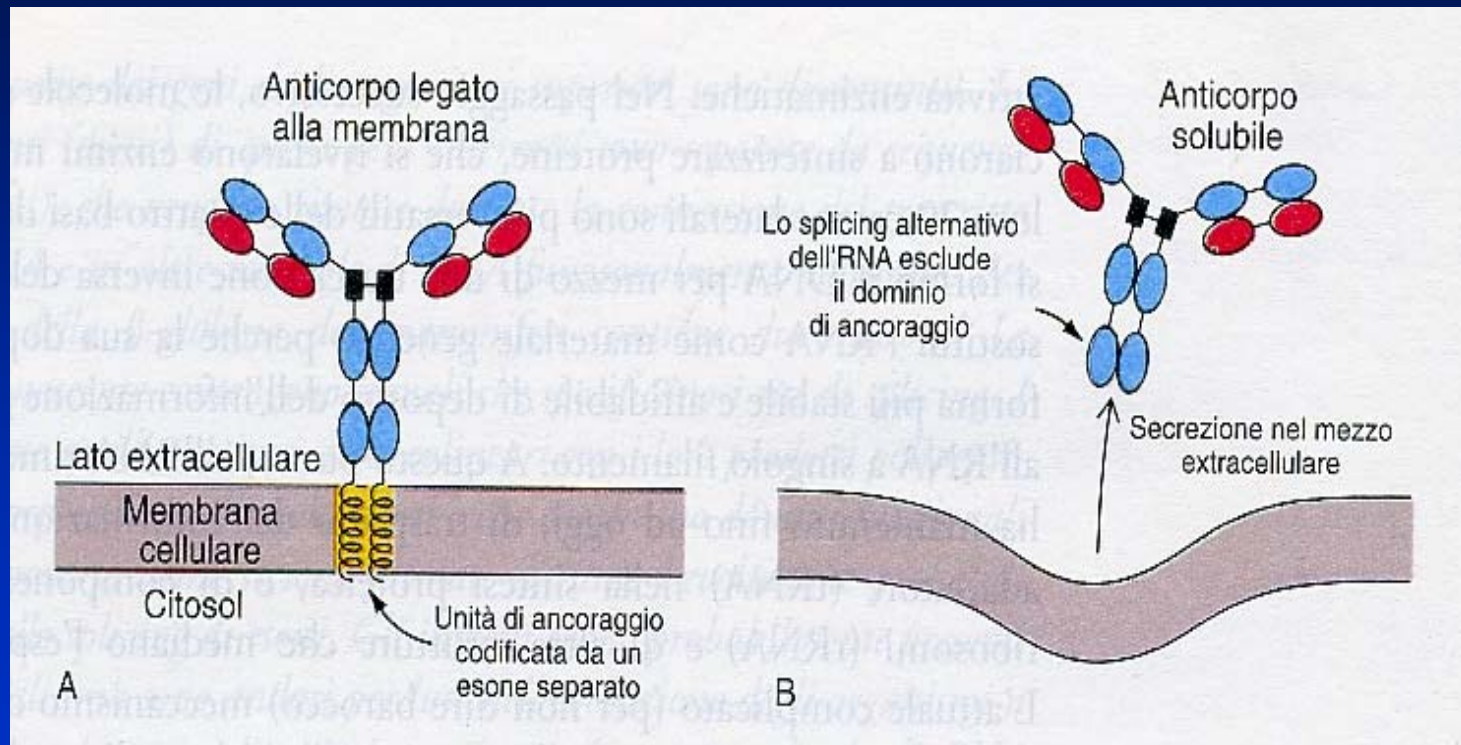
In tessuti differenti o in differenti fasi dello sviluppo, alcuni trascritti genici possono essere ricongiunti in modi diversi, escludendo o includendo alcuni **esoni**. Questo è uno dei vantaggi dei **geni discontinui**, cioè la possibilità di avere una serie di proteine correlate, ricomponendo un RNA nascente **in modi diversi**.

LA α TROPOMIOSINA É UTILIZZATA IN MOLTI DIVERSI GENERI DI SISTEMA CONTRATTILE



La giuntatura alternativa permette ad un unico gene di specificare per molte proteine.

LE CATENE PESANTI DELLE IMMUNOGLOBULINE POSSONO O MENO CONTENERE UN DOMINIO IDROFOBICO DI LEGAME ALLA MEMBRANA.



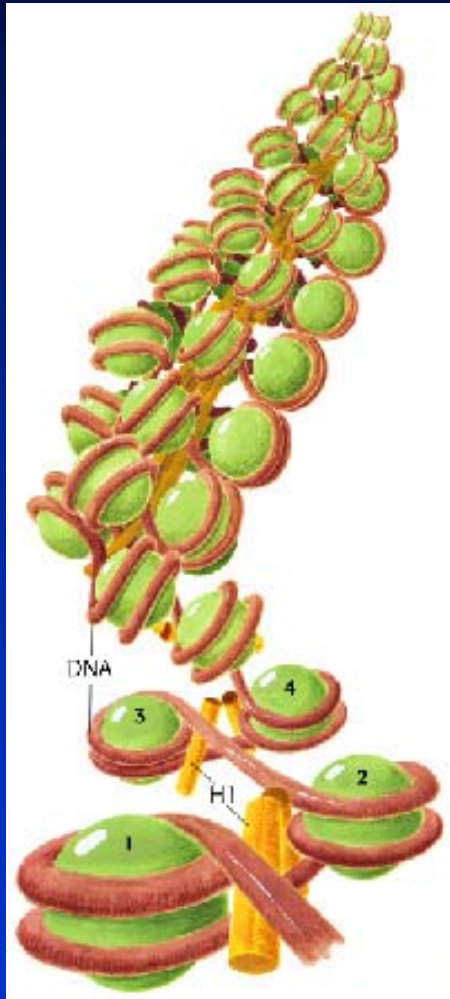
- A) Cellula non stimolata**
- B) Cellula stimolata da un antigene riconosciuto dall'A.C.**

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 sono di 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.

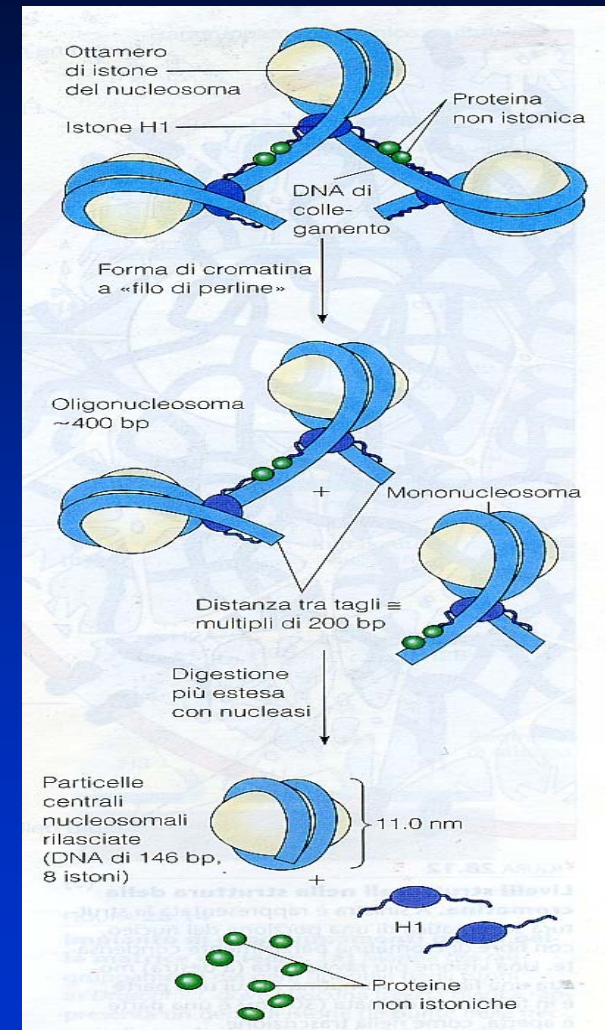
LE PROTEINE NON ISTONICHE

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

polimerasi e 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,

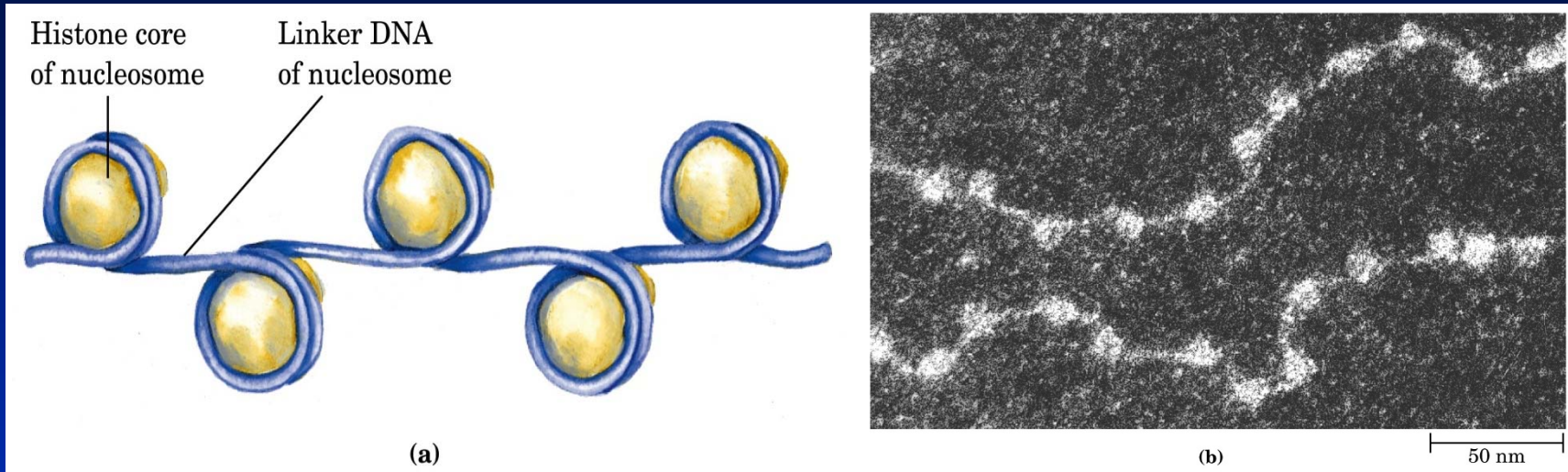
gli istoni subiscono **modificazioni** post-traduzionali di alcune catene laterali.

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 e altre proprietà degli istoni.

LA CROMATINA



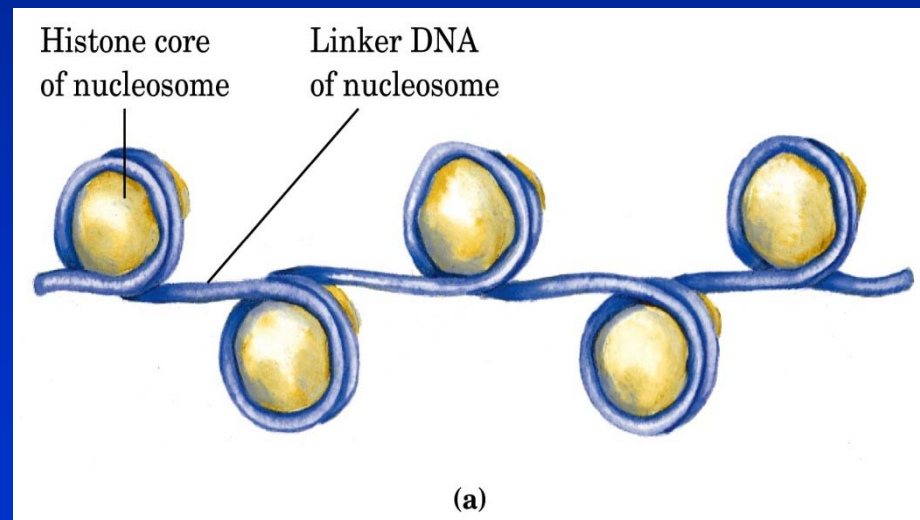
Al microscopio elettronico, le fibre di cromatina hanno un andamento regolare a "collana" con una "perla" (**nucleosoma**) ogni 200 coppie di basi azotate.

LA CROMATINA

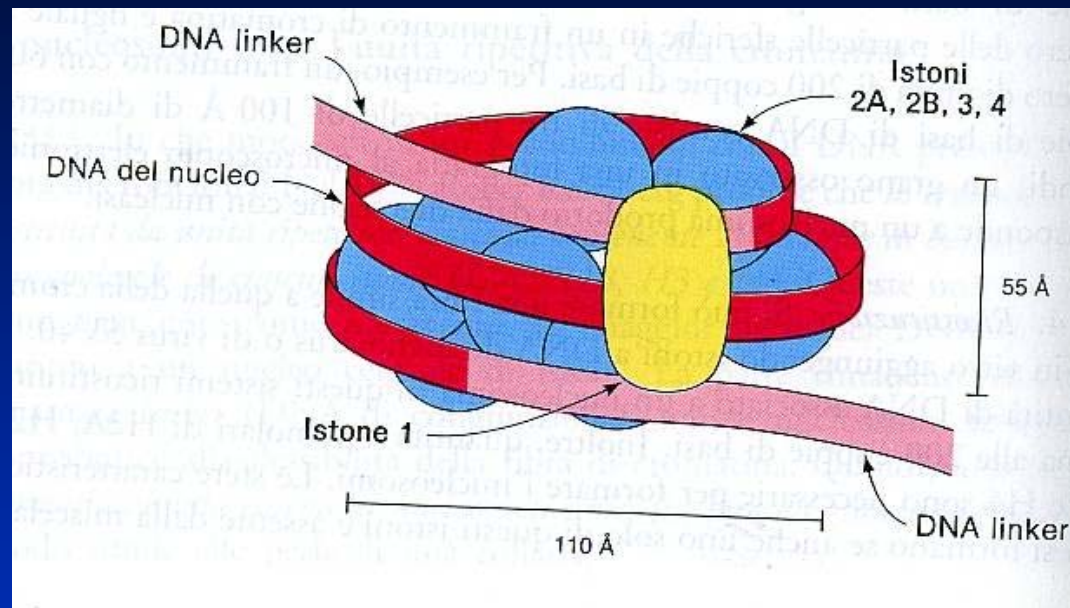
Essa presenta delle unità ripetitive: i **nucleosomi**,

ognuno contiene **8 proteine istoniche**;

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



IL NUCLEO DEL NUCLEOSOMA

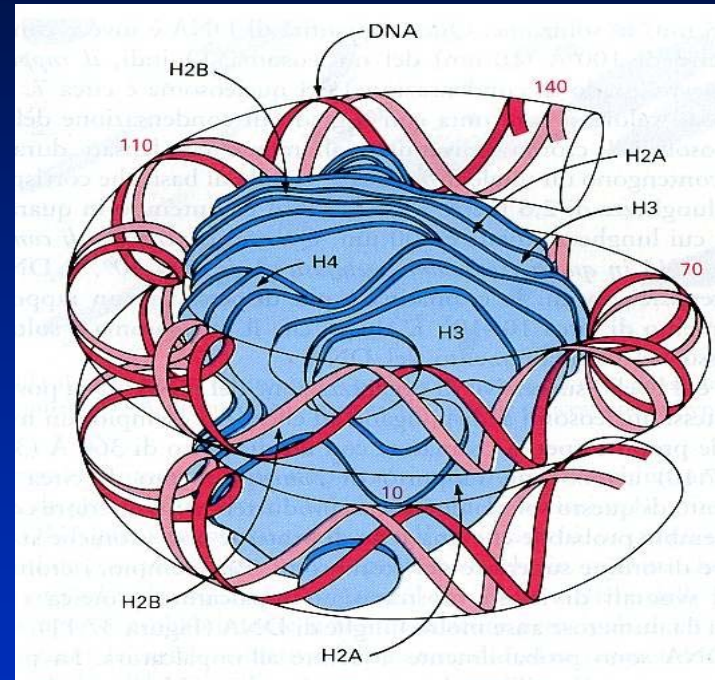


Il DNA del nucleo (**146 coppie di basi**) si avvolge intorno al centro proteico del nucleosoma (contenente ciascuno due copie di H2A, H2B, H3 e H4);

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

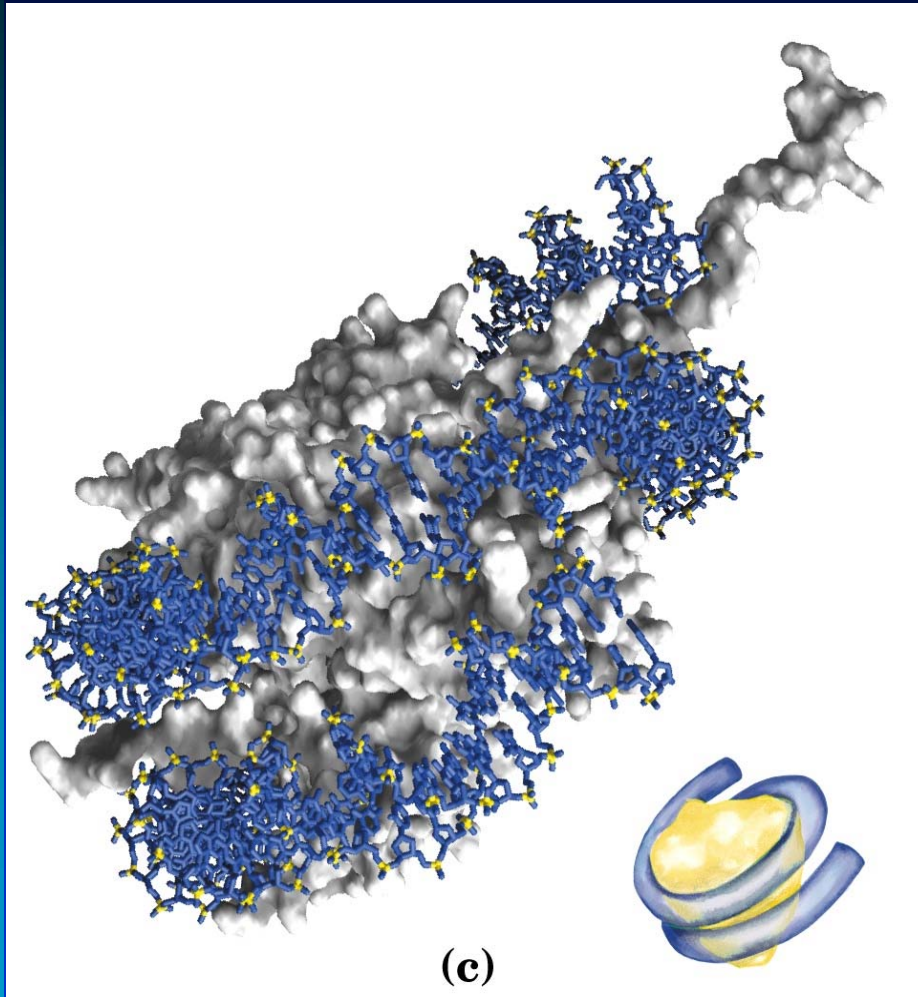
I NUCLEOSOMI SONO LE UNITA ORGANIZZATIVE FONDAMENTALI DELLA CROMATINA

La spaziatura dei nucleosomi é formata da circa **200** coppie di basi azotate, 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**.

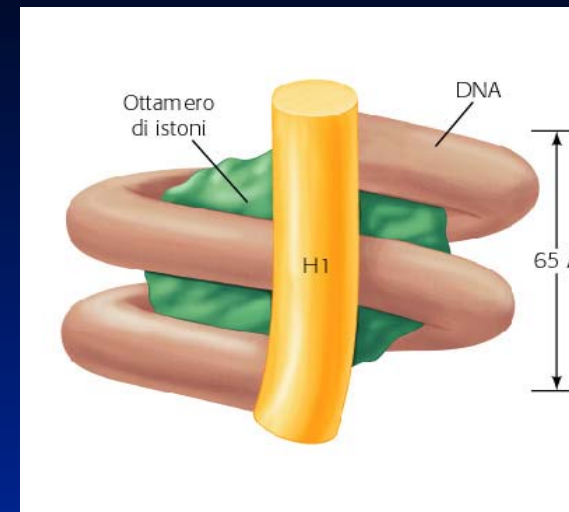
IL NUCLEOSOMA



Il DNA si trova sulla superficie dell'ottamero e compie circa **1,75 giri** di superelica sinistrorsa attorno ad esso,

la struttura dell'ottamero fornisce una **"rampa"** elicoidale sinistrorsa, sulla quale viene legato il DNA.

LE PROTEINE ISTONICHE

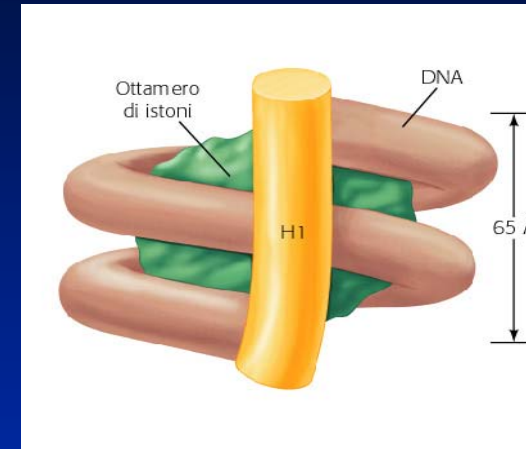
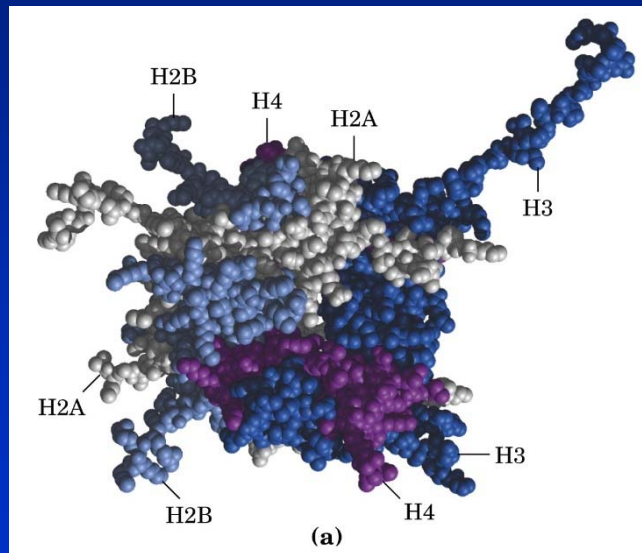


Le sequenze aminoacidiche degli istoni **H3 e H4** sono quasi le stesse in ogni pianta ed animale, quindi, per il ruolo critico, esse sono rimaste simili anche dopo la separazione tra animali e vegetali;

gli istoni **H1, H2A e H2B** presentano un grado minore di omologia di sequenza tra le diverse specie eucariotiche.

LE PROTEINE ISTONICHE

L'istone **H1** 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

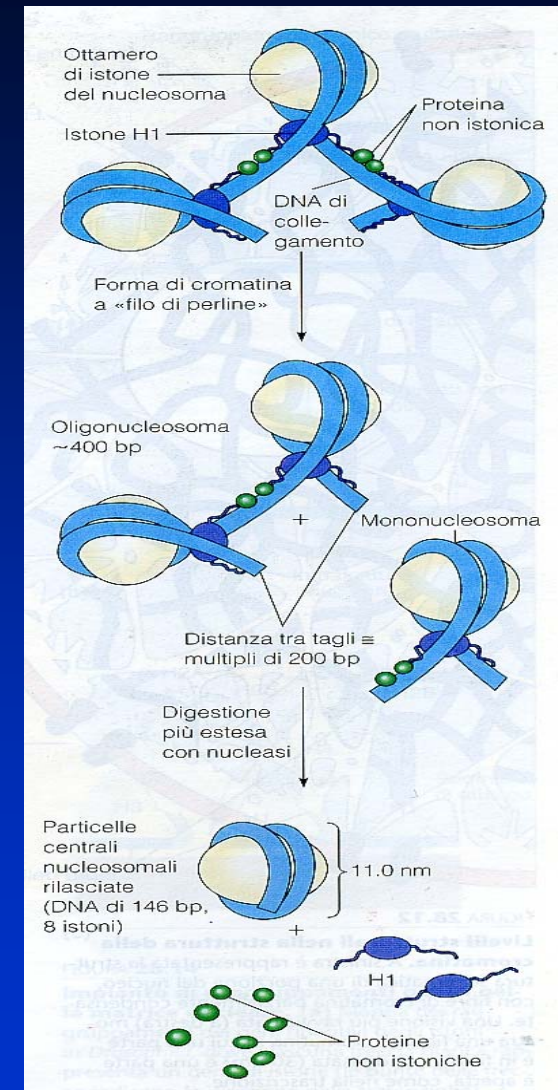
Esso viene rilasciato dai nucleosomi, quando il DNA linker viene degradato dalle **nucleasi**, ottenendo il **nucleo** del nucleosoma,

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

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

é in **singola** copia,

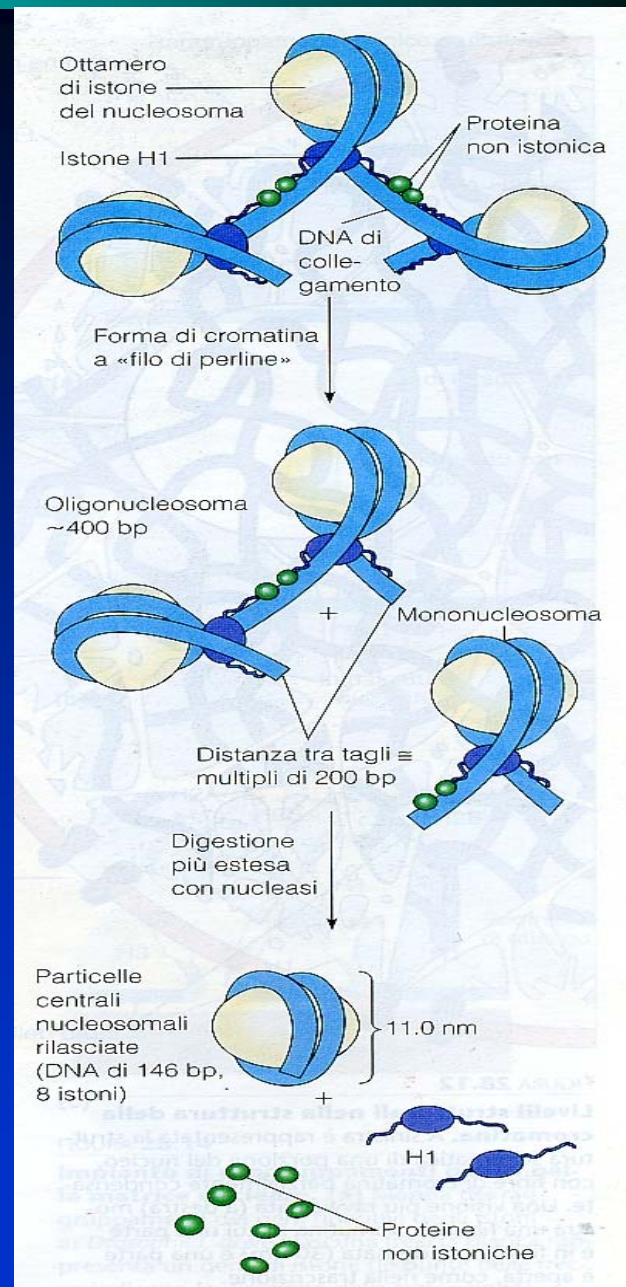
viene **fosforilato** appena prima della mitosi; fa da ponte tra nucleosomi diversi.



GLI ELEMENTI DELLA STRUTTURA DELLA CROMATINA

Una blanda digestione con nucleasi rilascia dapprima i **mononucleosomi**;

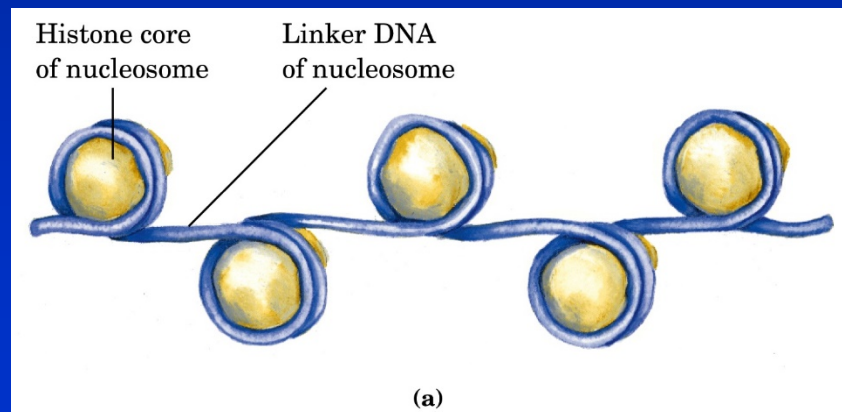
in seguito, con l'ulteriore digestione del DNA di collegamento, vengono rilasciate le proteine non istoniche e l'H1, così si libera la **particella centrale**.



IL NUCLEOSOMA

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

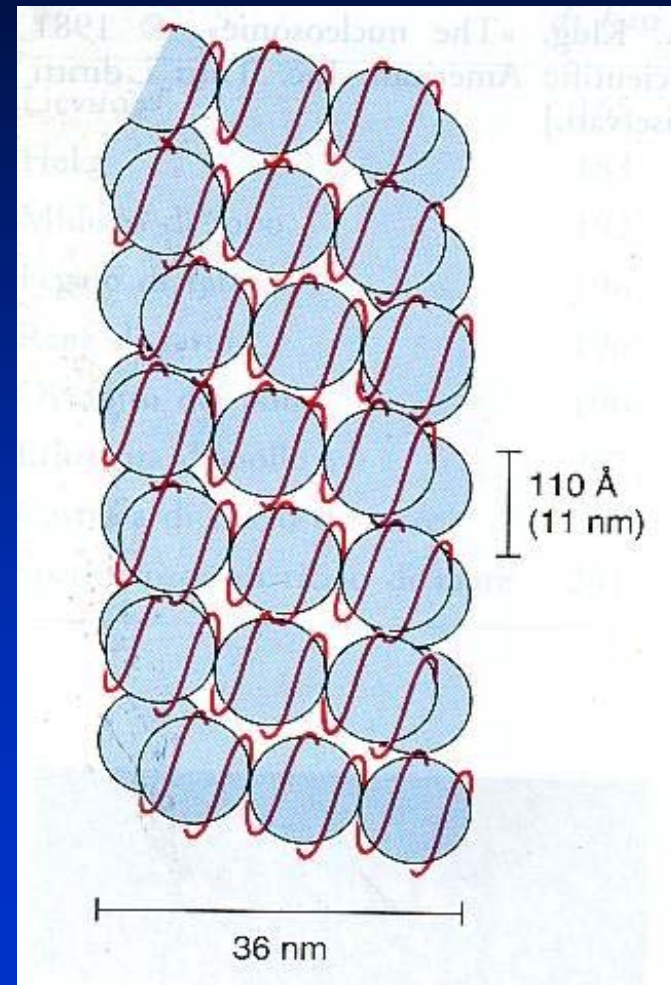
il grado di compattamento del nucleosoma é circa 7.



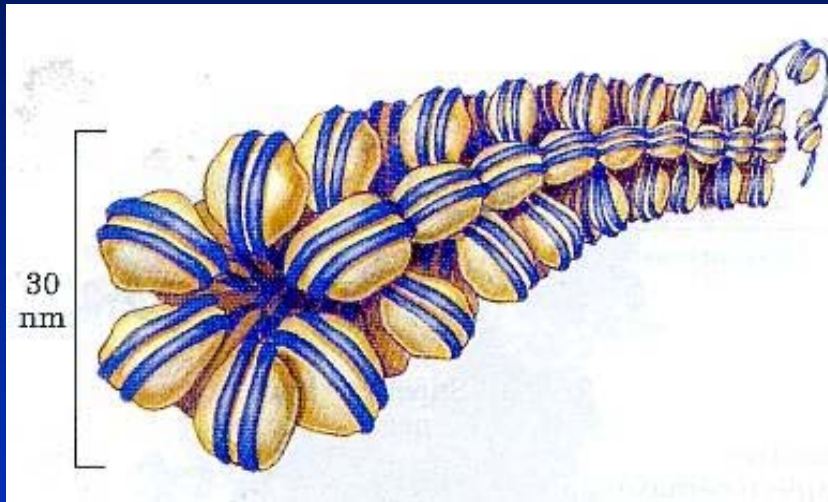
IL MODELLO A SOLENOIDE

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



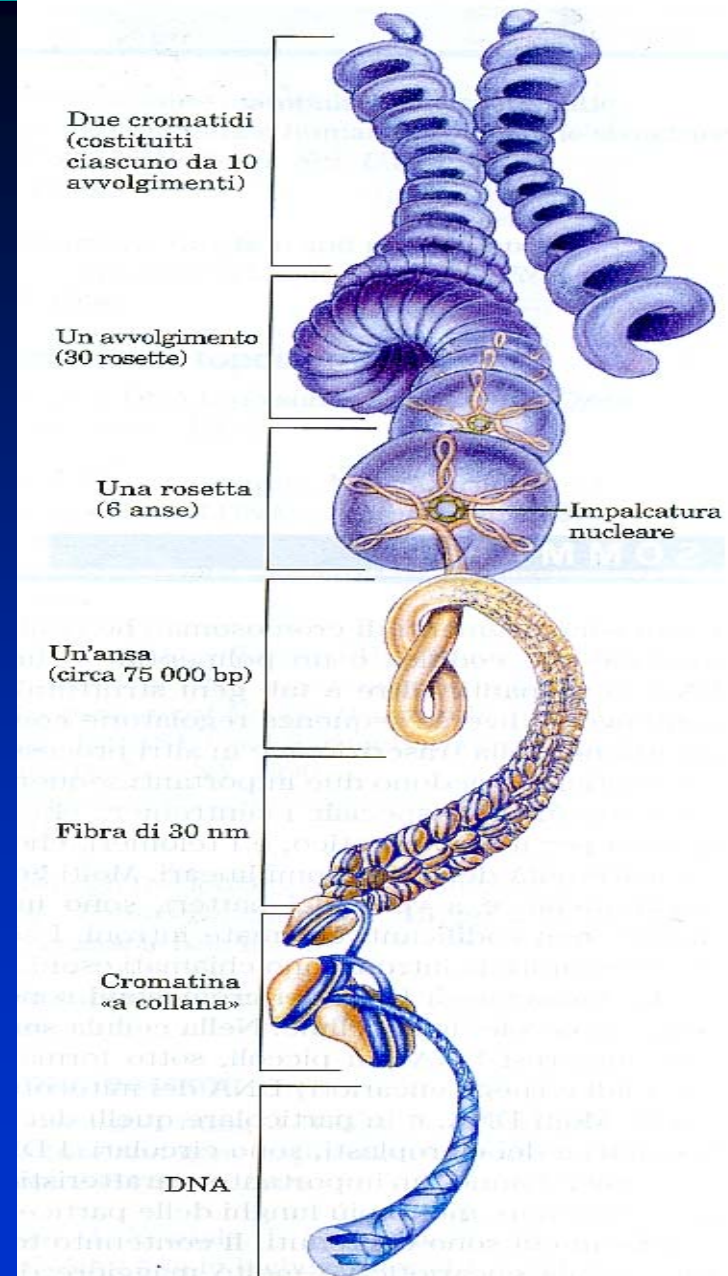
Immagine al M.E. della struttura

LA CROMATINA

I livelli di organizzazione di un cromosoma eucariotico;

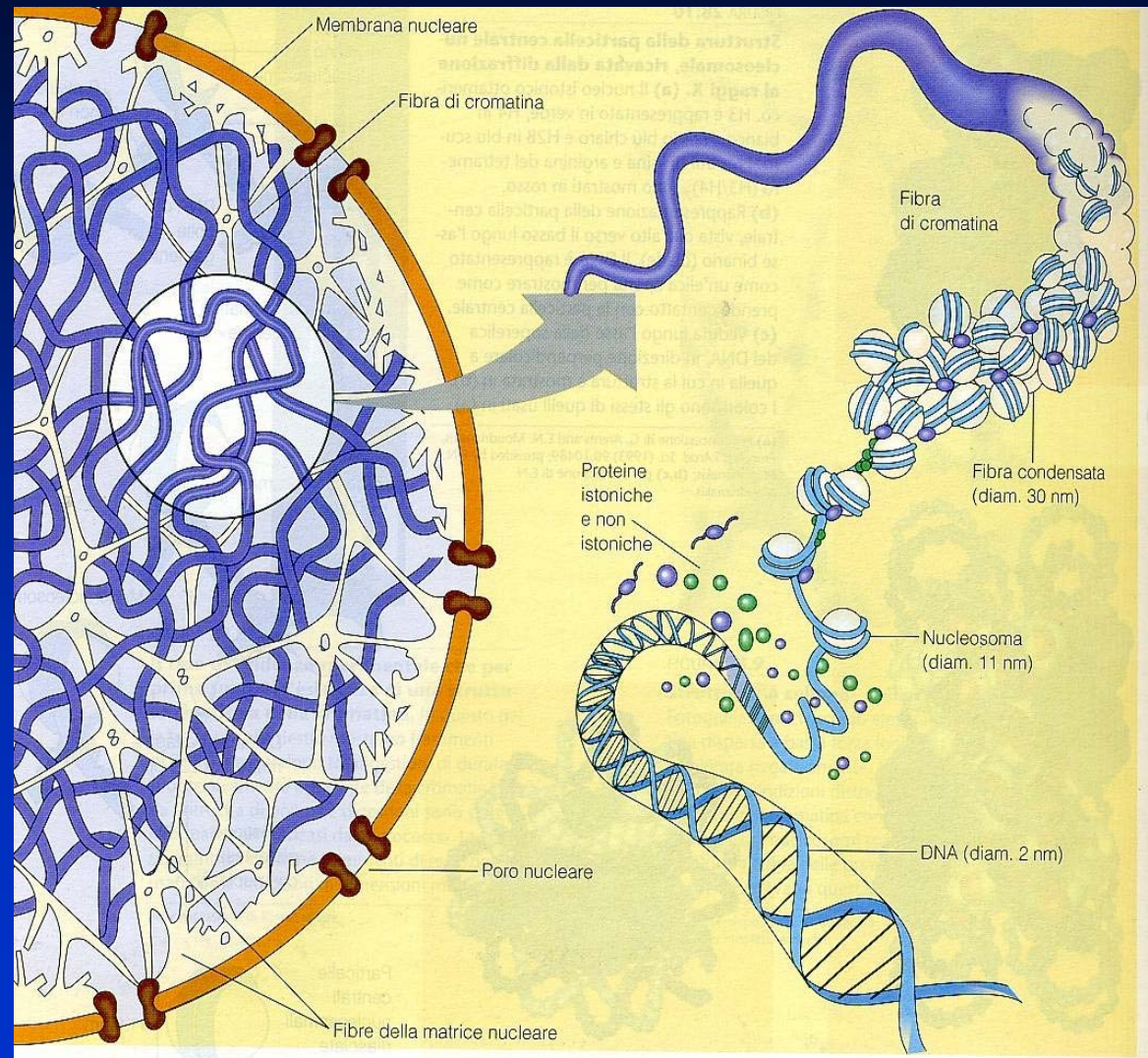
essi sono avvolgimenti, che si sovrappongono ad avvolgimenti già presenti,

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

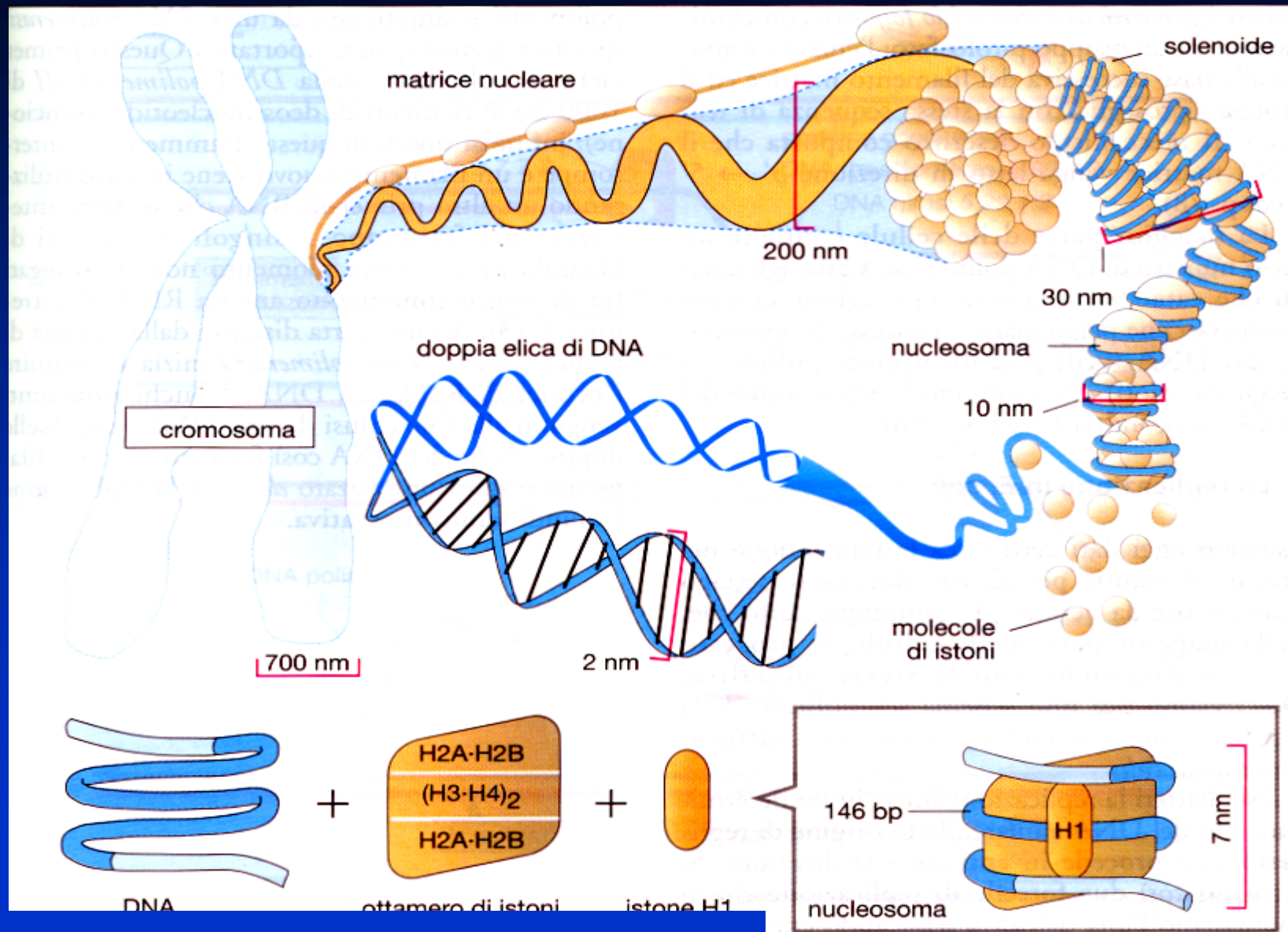


I LIVELLI STRUTTURALI NELLA STRUTTURA DELLA CROMATINA

La fibra di cromatina é mostrata sia in forma condensata (30nm), sia aperta come nella trascrizione.



I LIVELLI STRUTTURALI NELLA STRUTTURA DELLA CROMATINA



LE PRINCIPALI CARATTERISTICHE DEL DNA BATTERICO

IL DNA BATTERICO

Esso 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**;

esso 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 DEL DNA NELLE CELLULE EUCARIOTICHE

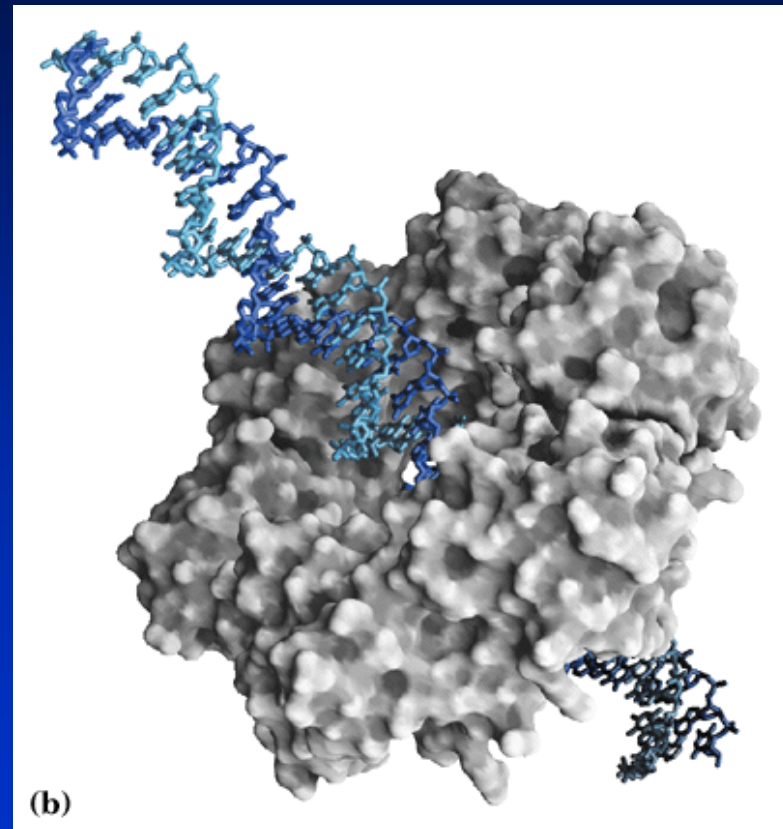
LE CARATTERISTICHE SALIENTI DELLA REPLICAZIONE NEGLI EUCARIOTI

Essa é semiconservativa,

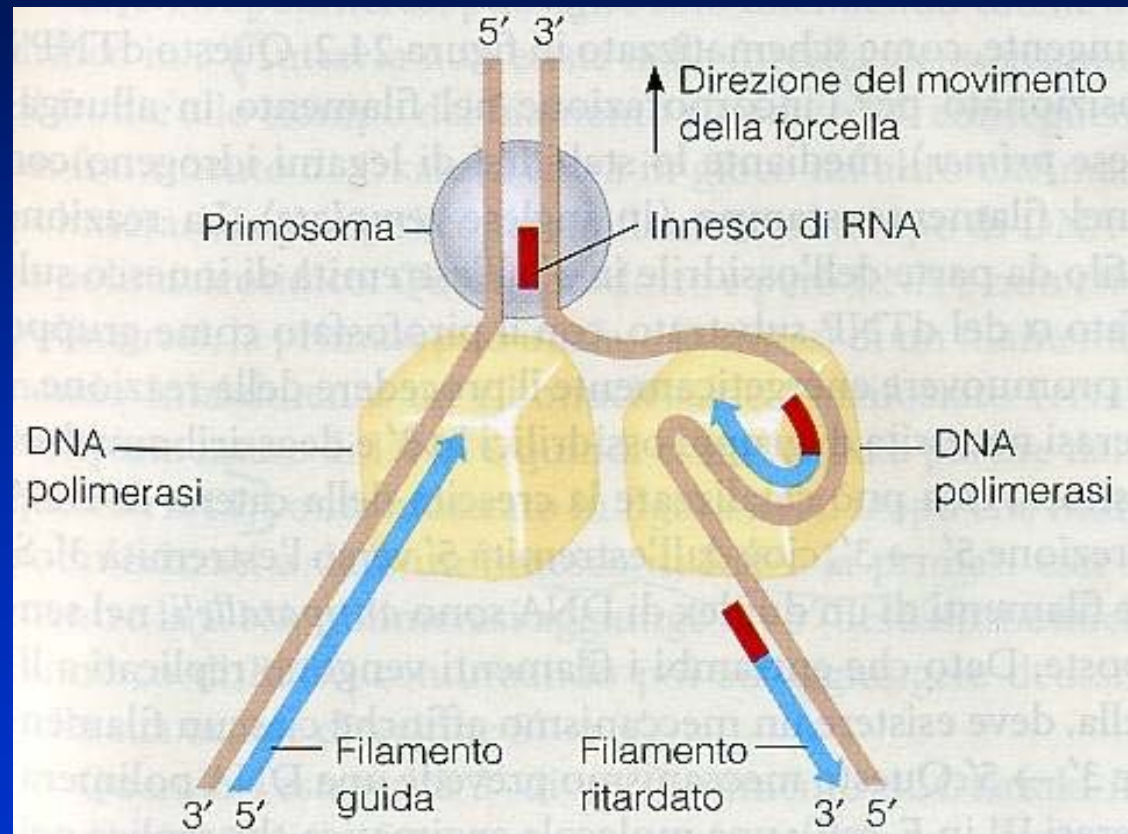
é continua su un filamento e discontinua sull'altro,

necessita del primer,

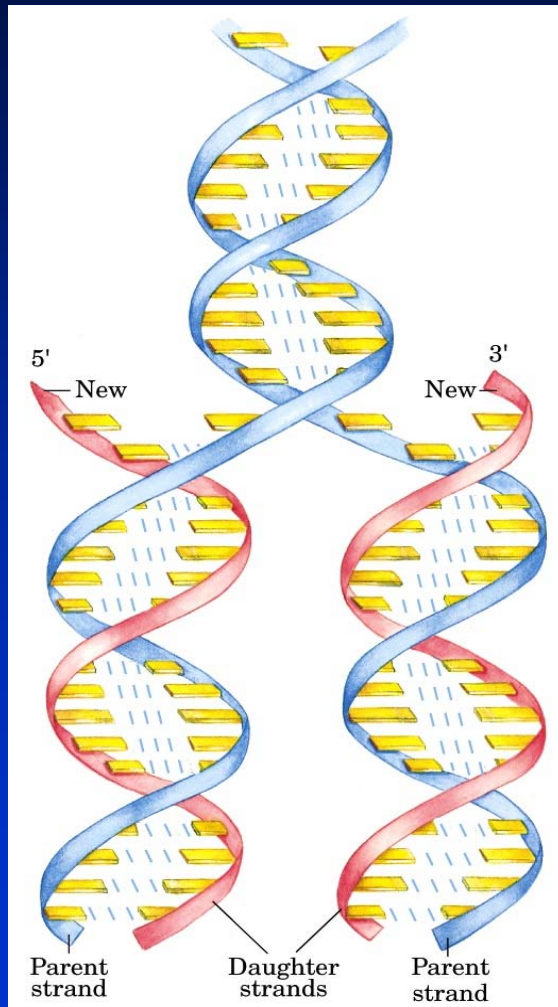
é catalizzata da alcune DNA polimerasi.



RAPPRESENTAZIONE DI UNA FORCELLA REPLICATIVA



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



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

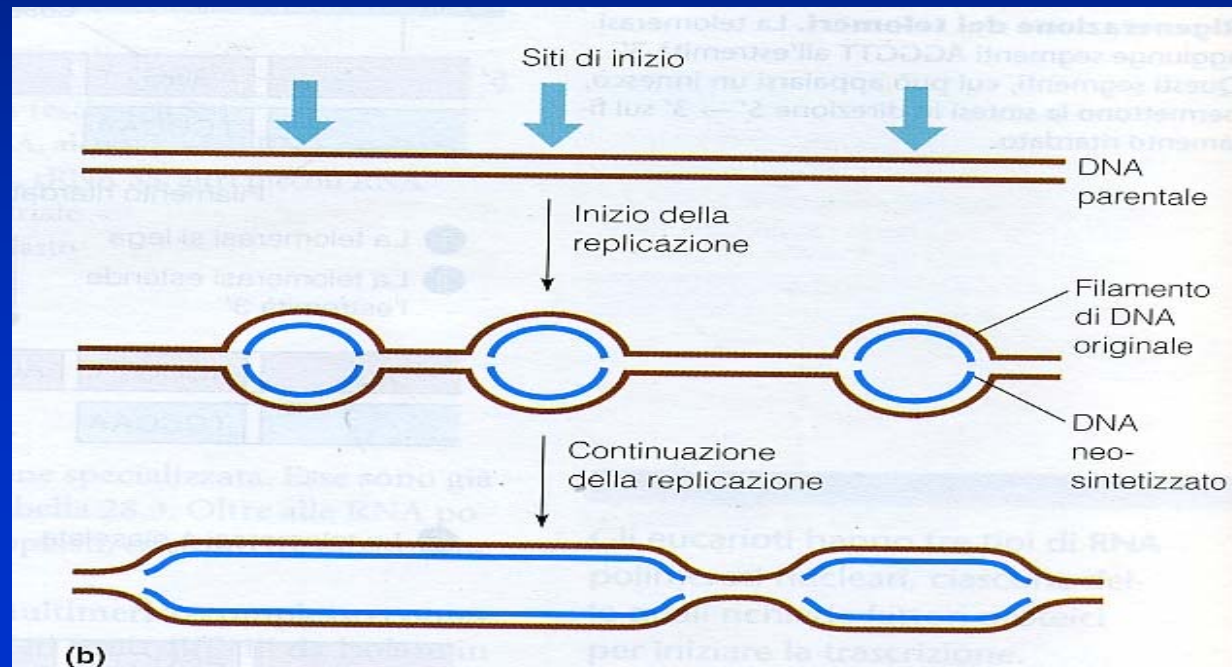
i molti punti di innesco permettono una replicazione rapida dell'intero DNA eucariotico, che è molto grande.

LA REPLICAZIONE NELLE CELLULE EUCARIOTICHE

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.



LE ORIGINI DELLA REPLICAZIONE

Le regioni attive **trascrizionalmente** replicano in anticipo rispetto alle regioni inattive,

probabilmente perché sono **più aperte ed accessibili** ai fattori di inizio del processo replicativo;

l'esatta natura delle origini di replicazione è ancora in parte oscura;

studi sul **lievito** hanno evidenziato sequenze essenziali per la replicazione dei plasmidi in queste cellule, dette sequenze che si replicano autonomamente (**ARS**: Autonomously Replicating Sequences).

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

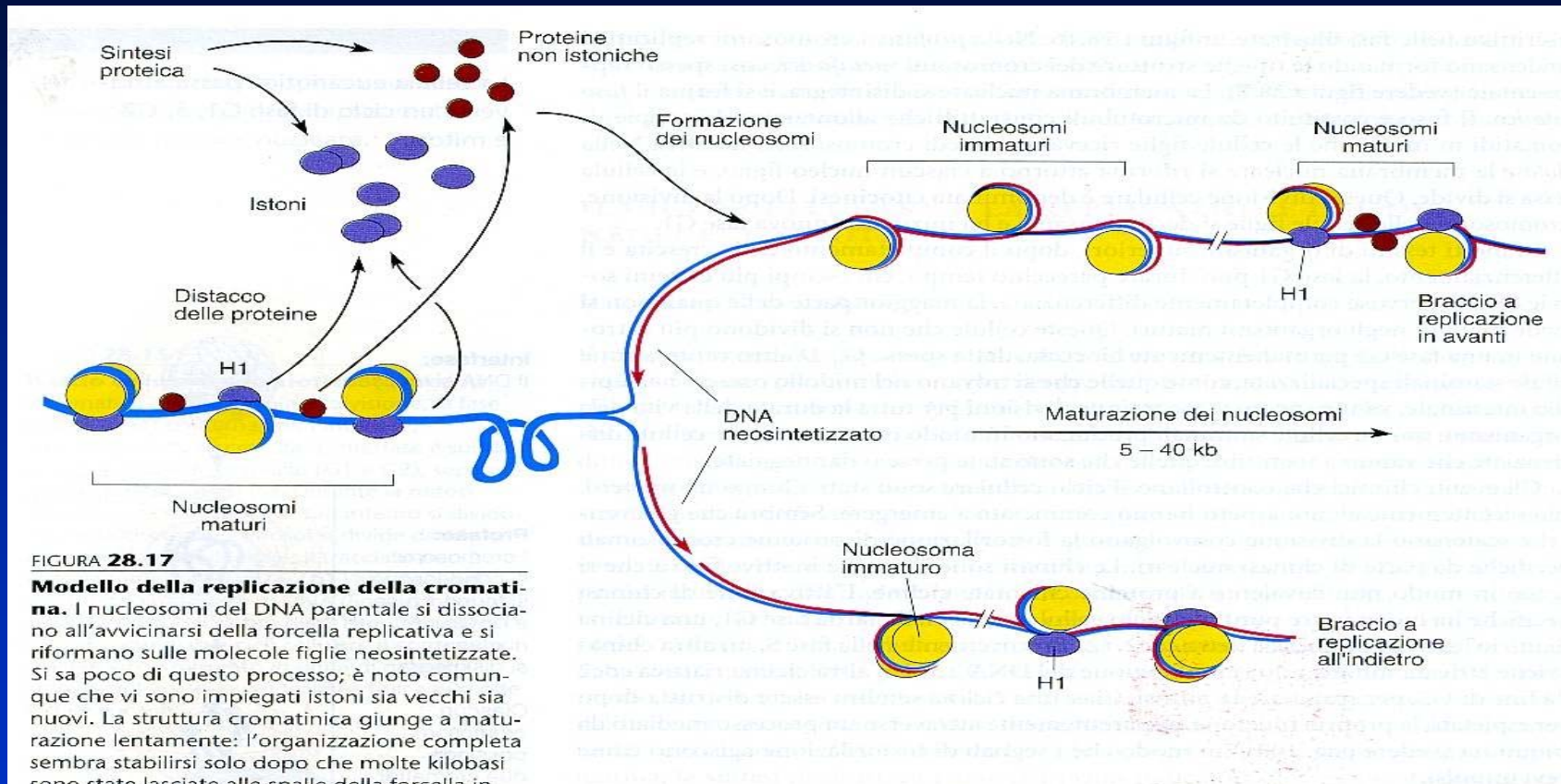


FIGURA 28.17

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 é **smantellata e ricostruita** nelle molecole figlie del DNA;

la velocità della forcella replicativa è **quindi** 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 con localizzazioni e proprietà cinetiche differenti:

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 DEGLI EUCARIOTI

	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 afidicolina	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),

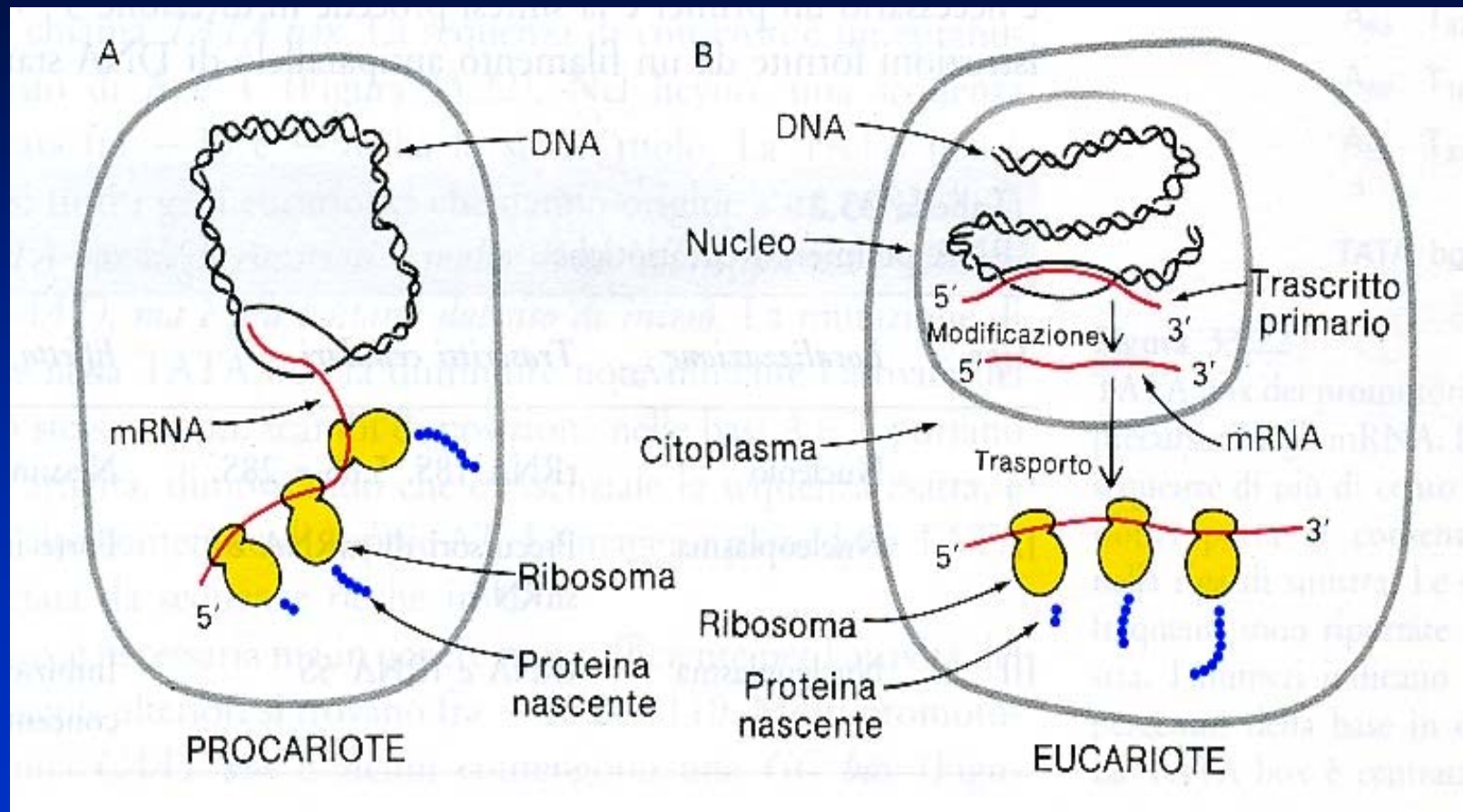
il suo ruolo ricorda quello della subunità β della DNA polim. III di E.coli: aumenta notevolmente la **processività** della polimerasi,

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

LA TRASCRIZIONE NELLE CELLULE EUCARIOTICHE

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

TRASCRIZIONE E TRADUZIONE



LA TRASCRIZIONE NELLE CELLULE EUCARIOTICHE

È un processo **molto** complesso,

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

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

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

LE RNA POLIMERASI DEGLI EUCARIOTI

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

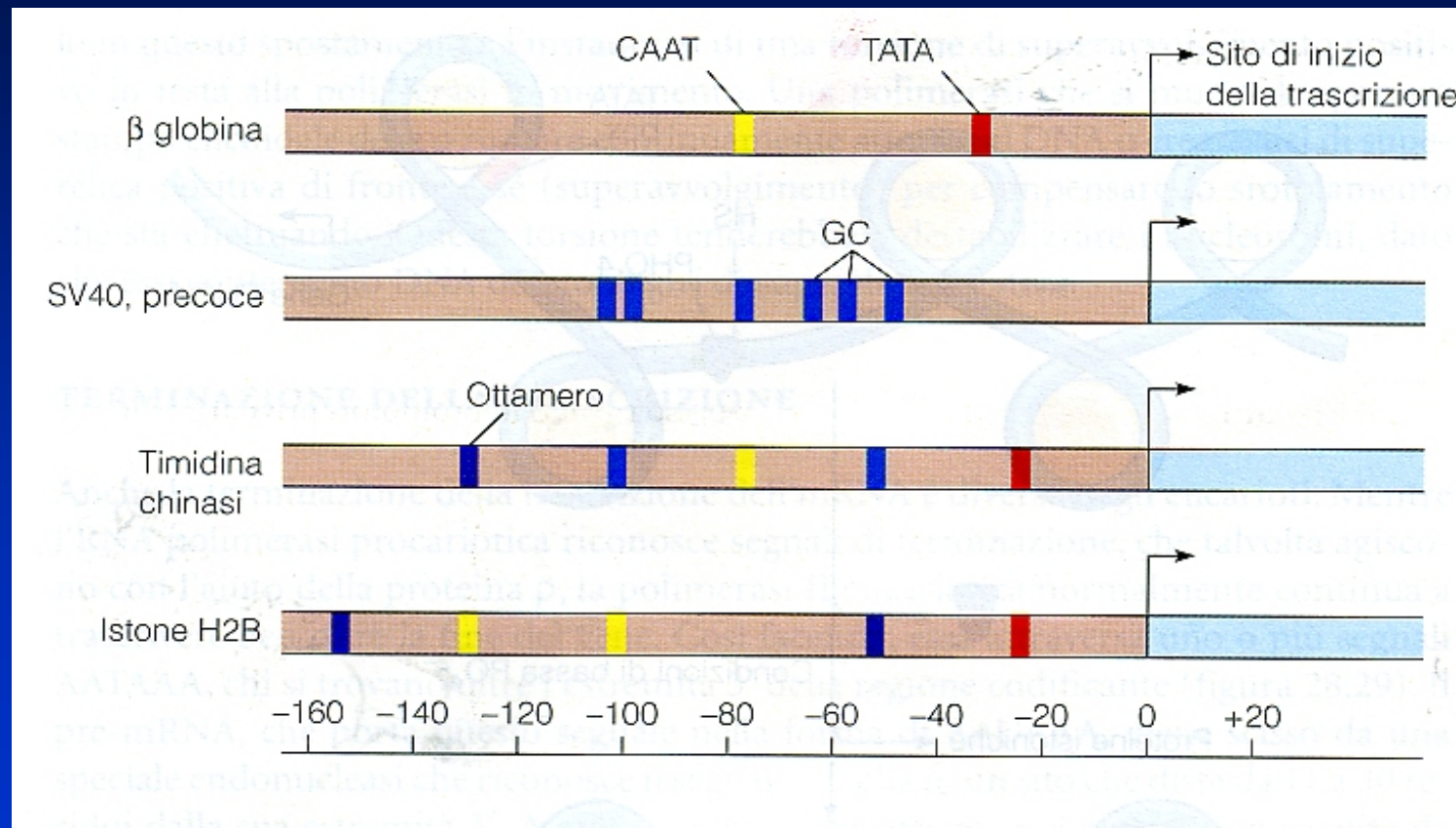
LE RNA POLIMERASI DEGLI EUCARIOTI

La RNA pol. **I** trascrive i principali geni ribosomiali,

la RNA pol. **III** trascrive i geni dei piccoli RNA,

la RNA pol. **II** trascrive i geni strutturali e alcuni geni per i piccoli RNA.

LA STRUTTURA DI ALCUNI TIPICI PROMOTORI EUCARIOTICI



LA TRASCRIZIONE NELLE CELLULE EUCARIOTICHE

Le **RNA polimerasi** richiedono fattori proteici aggiuntivi (**fattori di trascrizione**), per legarsi ai promotori ed iniziare la trascrizione,

essi hanno quindi un ruolo fondamentale nel determinare la **regolazione e selettività** di questo processo.

LA RNA POLIMERASI I

Essa ha **13** subunità (600Kd),

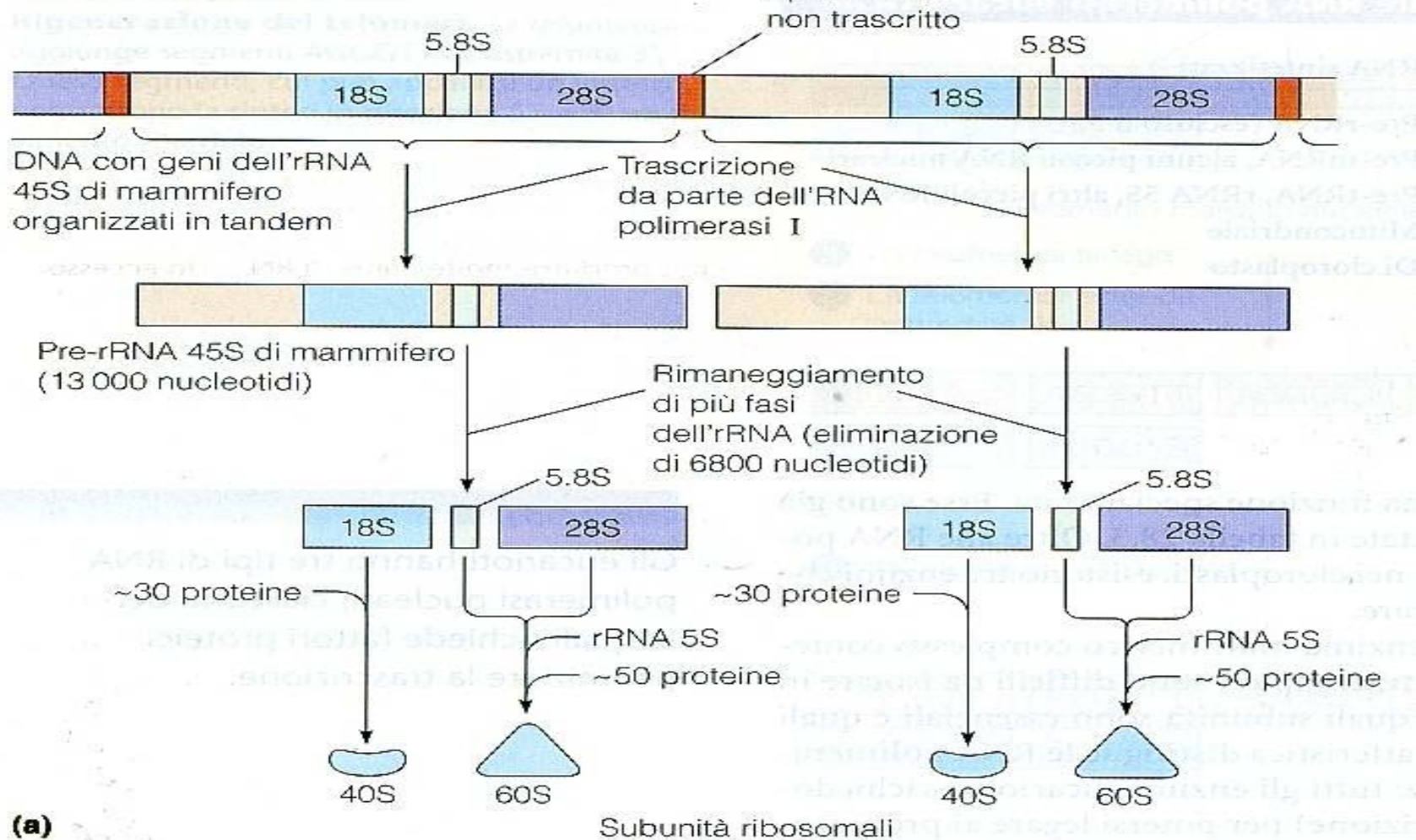
la sequenza del suo promotore **varia** molto da specie a specie,

ha almeno **due** fattori di trascrizione,

sintetizza un solo RNA pre-ribosomiale, contenente i precursori degli
rRNA 18S, 5.8S e 28S.

LA RNA POLIMERASI I TRASCRIVE I PRINCIPALI GENI RIBOSOMIALI

FIGURA 28.19



(a)

LA RNA POLIMERASI III

Essa è la RNA polimerasi più **grande e complessa**,

comprende **14** subunità (700 Kd),

sintetizza i precursori dell'rRNA **5S**, i **tRNA** ed altri **piccoli RNA** citosolici e nucleari,

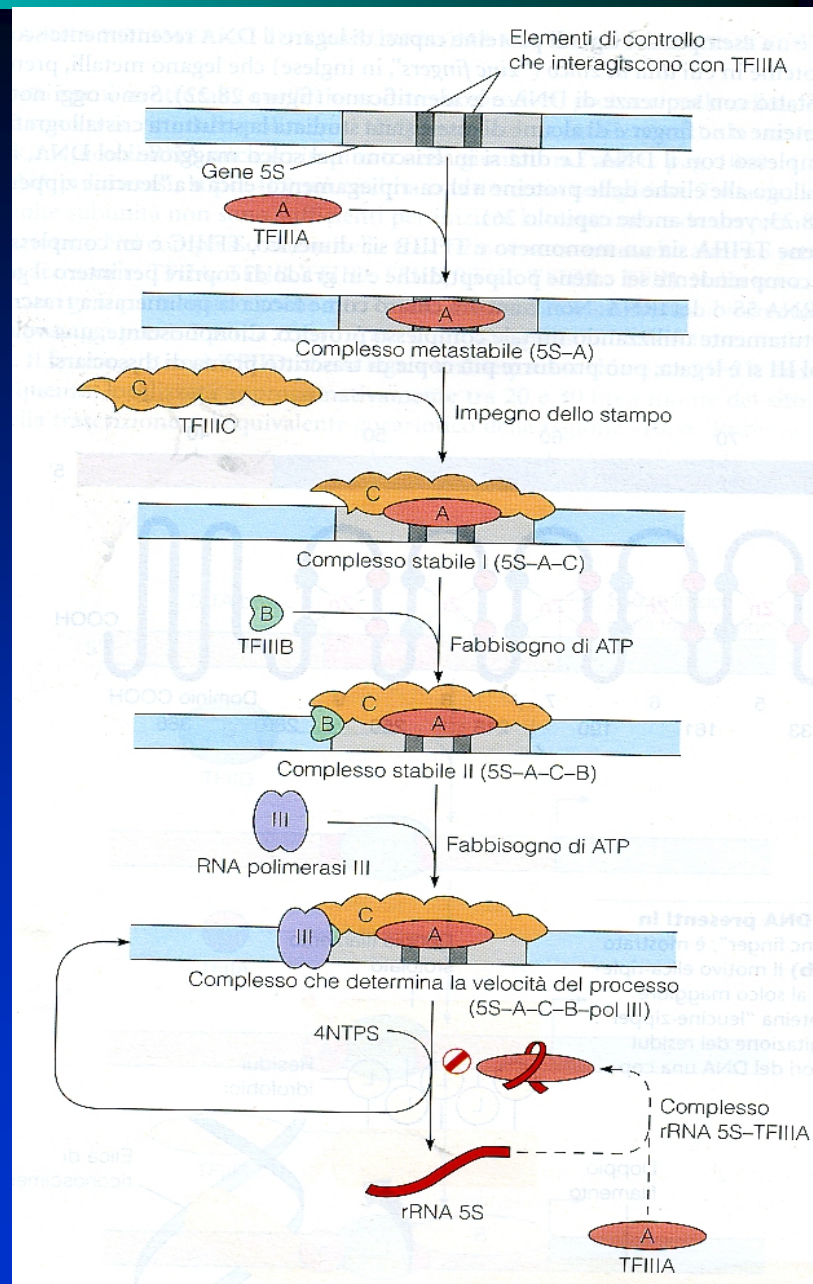
il suo promotore è ben definito.

IL MECCANISMO D'AZIONE DELLA RNA POL. III PER IL GENE DELL'rRNA 5S

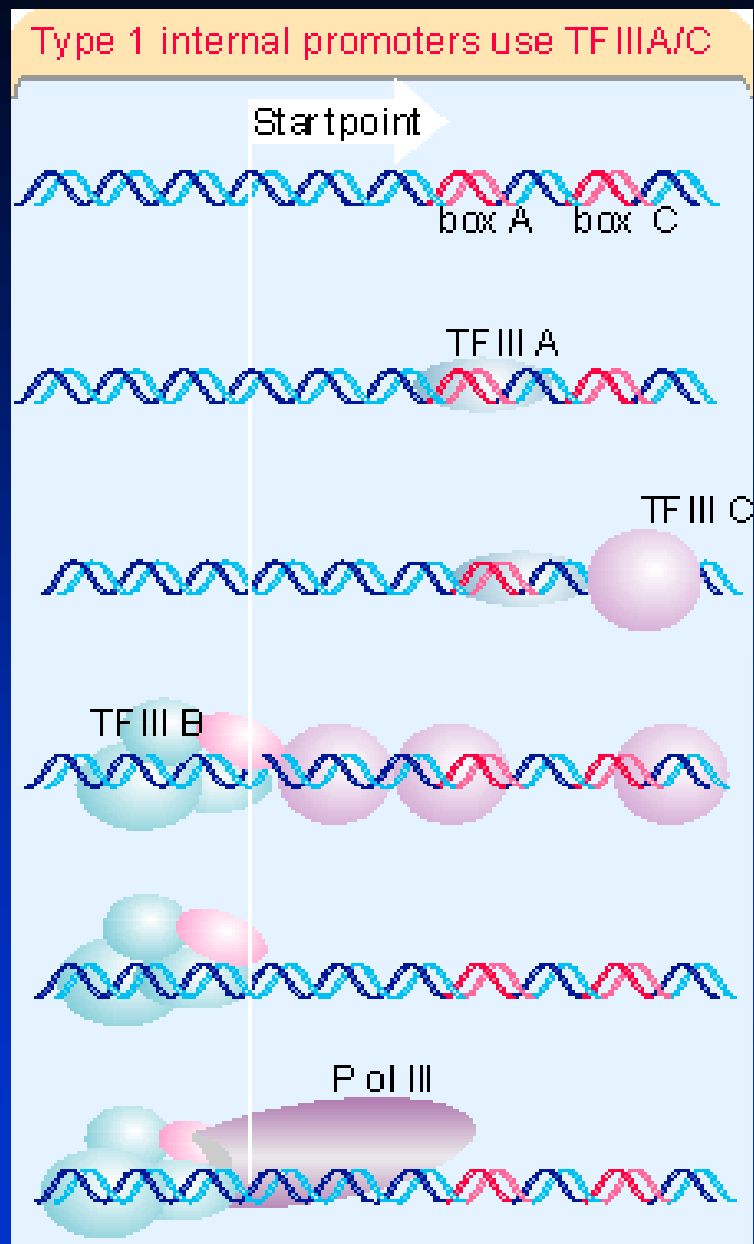
Alcune sequenze necessarie per la regolazione dell'inizio della trascrizione sono **all'interno** del gene stesso, altre sono **prima** del suo sito d'inizio.

Il **TFIIIA** può anche dare luogo ad un complesso con **rRNA 5S**, per limitarne la produzione quando il prodotto è in eccesso;

per l'espressione dei geni dell'rRNA 5S, sono necessari almeno **tre** fattori proteici.



IL MECCANISMO D'AZIONE DELLA RNA POLIMERASI III



LA RNA POLIMERASI III

Anche i geni per l'**rRNA 5S** sono in copie **multiple**,

di solito **non** sono raggruppati in tandem,

non si localizzano in una particolare regione del nucleo,

sono **sparsi** in tutto il genoma;

tutti questi geni trascritti sono piccoli e non vengono tradotti in proteine.

LA RNA POLIMERASI II

Essa è un enzima **multimerico** complesso,

trascrive tutti i **geni strutturali** ed alcuni **piccoli RNA** del processo di splicing;

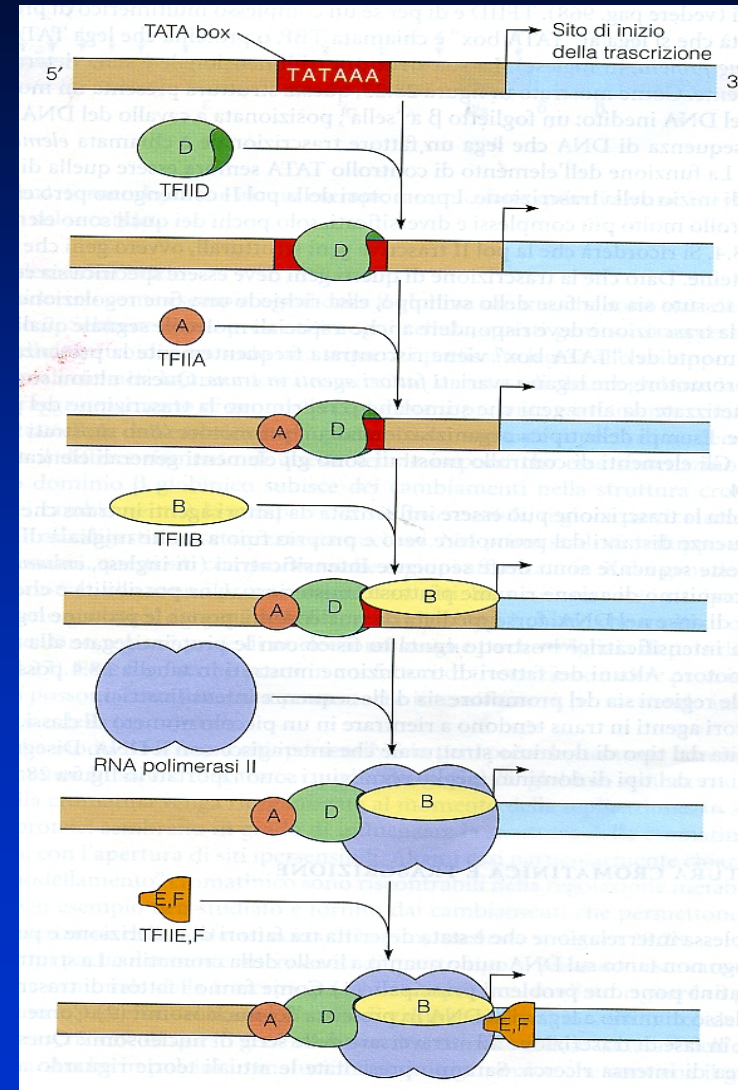
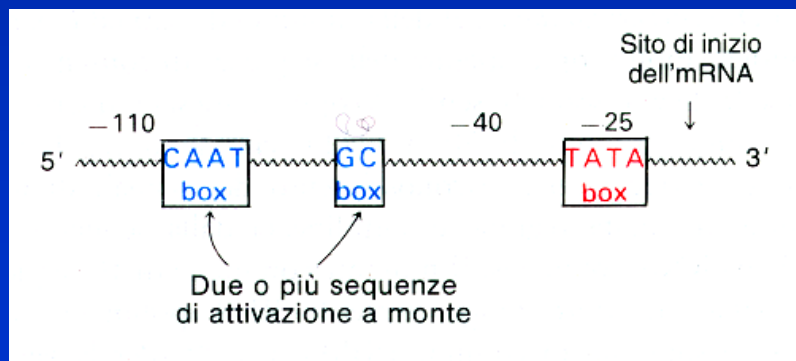
riconosce **migliaia** di promotori (alcuni hanno qualche **omologia di sequenza**),

essi sono siti di legame per i **fattori di trascrizione** modulanti il legame dell'RNA polimerasi al promotore.

I FATTORI DI TRASCRIZIONE

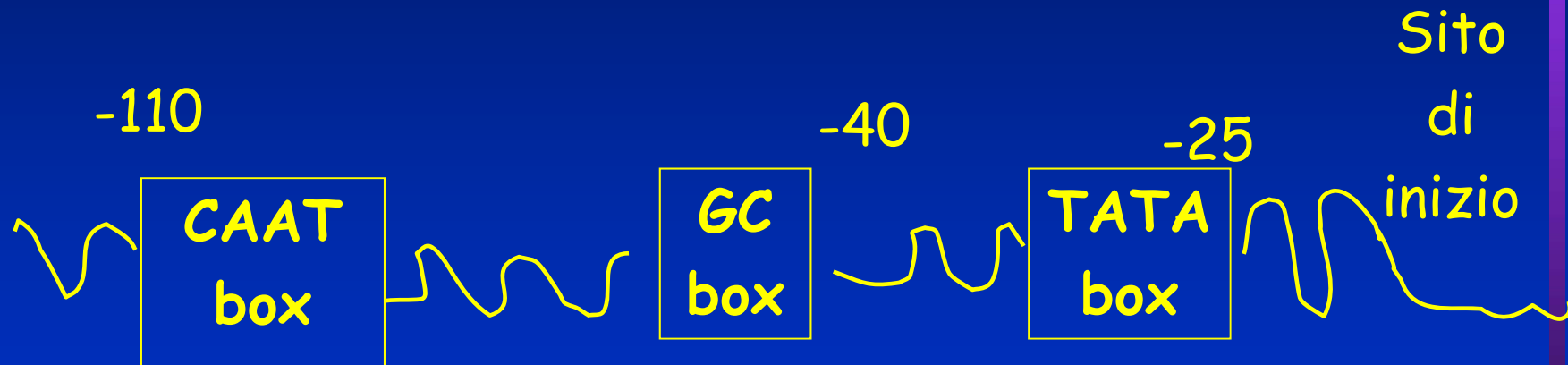
La trascrizione dei geni strutturali é specifica sia al tessuto, sia alla fase di sviluppo, richiede quindi una **fine** regolazione;

i fattori di trascrizione sono proteine che **interagiscono** con i promotori, influenzando la trascrizione del gene in questione.



LE CARATTERISTICHE GENERALI DEI PROMOTORI USATI DALLA RNA POLIMERASI II

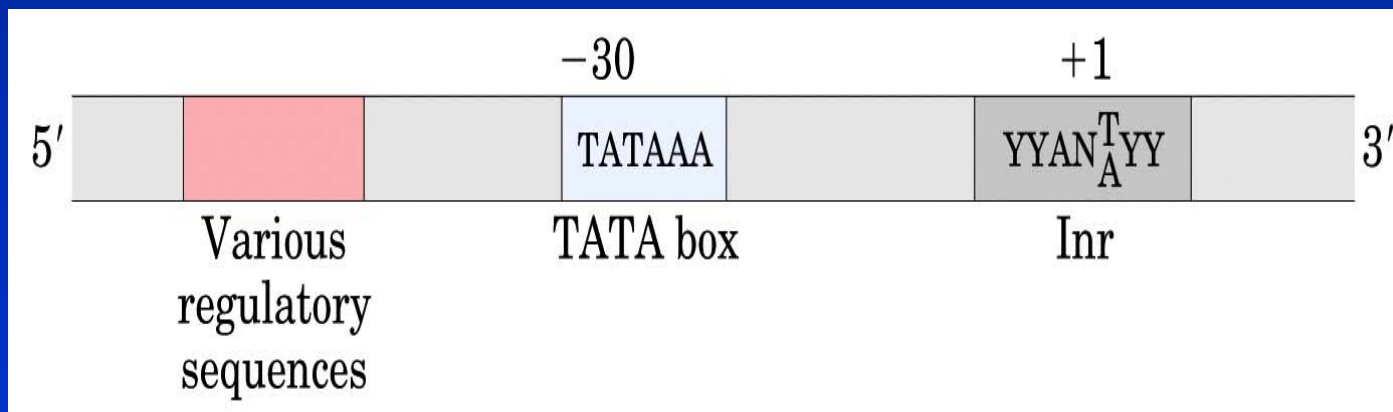
La regione **TATA box** è necessaria ma non sufficiente per funzionare come promotore. Molti promotori di eucarioti hanno infatti una **CAAT box** e una **GC box**, in particolare **GC box** è quasi sempre presente nei geni costitutivi.



LA SEQUENZA "TATA box"

La sequenza di consenso della "TATA box" (Hogness box), centrata a -25 dal sito d'inizio della trascrizione, è la seguente:
5'-TATAAA-3',

la sequenza "TATA box" è l'equivalente eucariotico della regione -10 o "Pribnow box" dei procarioti.



I SITI PROMOTORI

DNA stampo

-35

TTGACA

-10

TATAAT

+1

Regione - 35

Pribnow
box

Avvio
dell'RNA

Sito promotore procariotico

DNA stampo

-75

GGNCAATCT

-25

TATA

+1

Regione CAAT
(Talvolta presente)

Regione TATA
(Hogness box)

Avvio
dell'RNA

Sito promotore eucariotico

I FATTORI DI TRASCRIZIONE DELLA RNA POL.II

Le sue subunità **non** sono sufficienti per iniziare la trascrizione da un promotore eucariotico;

almeno sette diversi fattori di trascrizione intervengono nel processo di inizio della trascrizione:

TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH, TFIIJ.

ALCUNI FATTORI DI TRASCRIZIONE PER L'RNA POLIMERASI II

table 26-1

Proteins Required for Transcription at the RNA Polymerase II Promoters of Eukaryotes

Transcription factor	Number of subunits	Subunit M_r	Functions
Initiation			
RNA polymerase II	12	10,000–220,000	Catalyzes RNA synthesis
TBP (TATA-binding protein)	1	38,000	Specifically recognizes the TATA box
TFIIA	3	12,000, 19,000, 35,000	Stabilizes binding of TFIIB and TBP to the promoter
TFIIB	1	35,000	Binds to TBP; recruits RNA polymerase–TFIIF complex
TFIID	12	15,000–250,000	Interacts with positive and negative regulatory proteins
TFIIE	2	34,000, 57,000	Recruits TFIIH; ATPase and helicase activities
TFIIF	2	30,000, 74,000	Binds tightly to RNA polymerase II; binds to TFIIB and prevents binding of RNA polymerase to nonspecific DNA sequences
TFIIH	12	35,000–89,000	Unwinds DNA at promoter; phosphorylates RNA polymerase; recruits nucleotide-excision repair complex
Elongation*			
ELL [†]	1	80,000	
P-TEFb	2	43,000, 124,000	
SII (TFIIS)	1	38,000	
Elongin (SIII)	3	15,000, 18,000, 110,000	

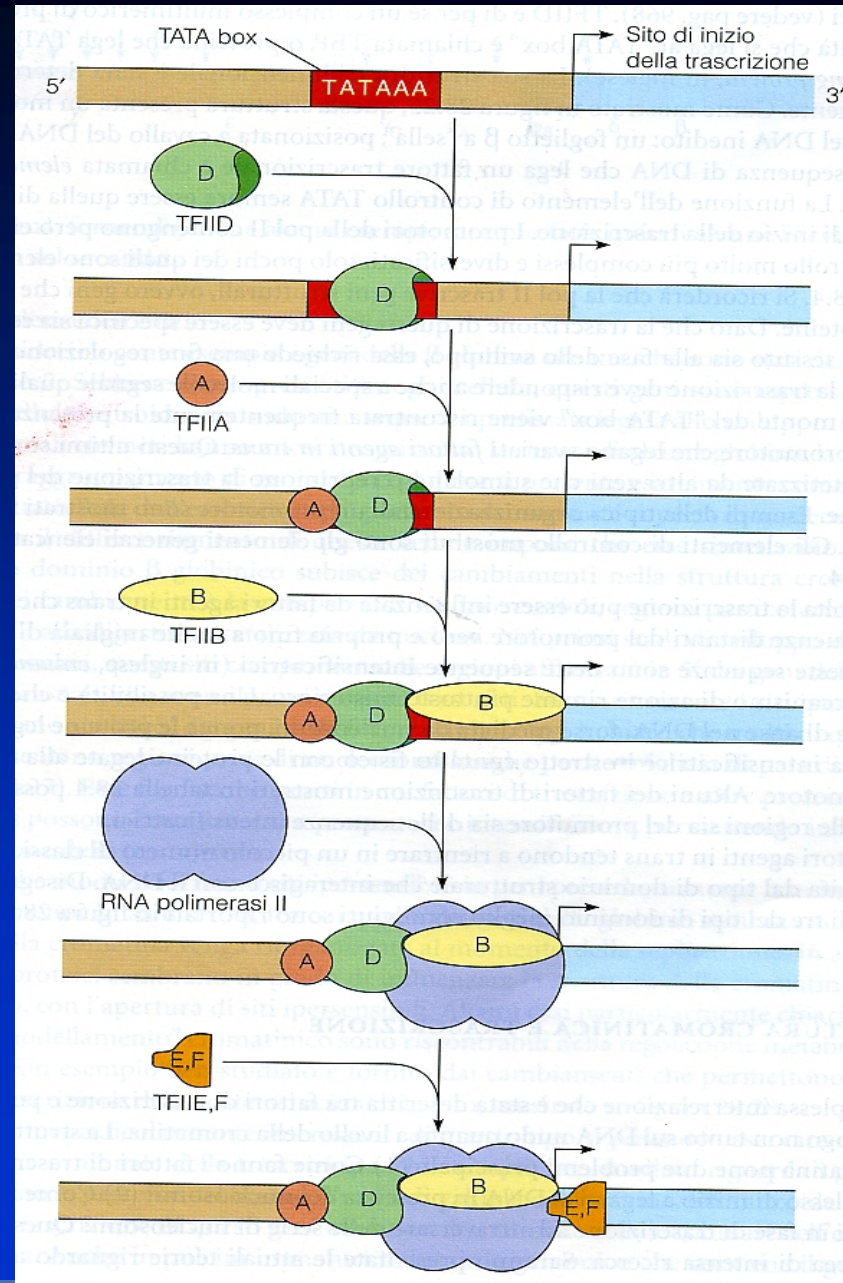
*All elongation factors suppress the pausing or arrest of transcription by the RNA polymerase II – TFIIF complex.

[†]The name is derived from the term eleven-nineteen *lysine-rich leukemia*. The gene for the factor ELL is the site of chromosomal recombination events frequently associated with the cancerous condition known as acute myeloid leukemia.

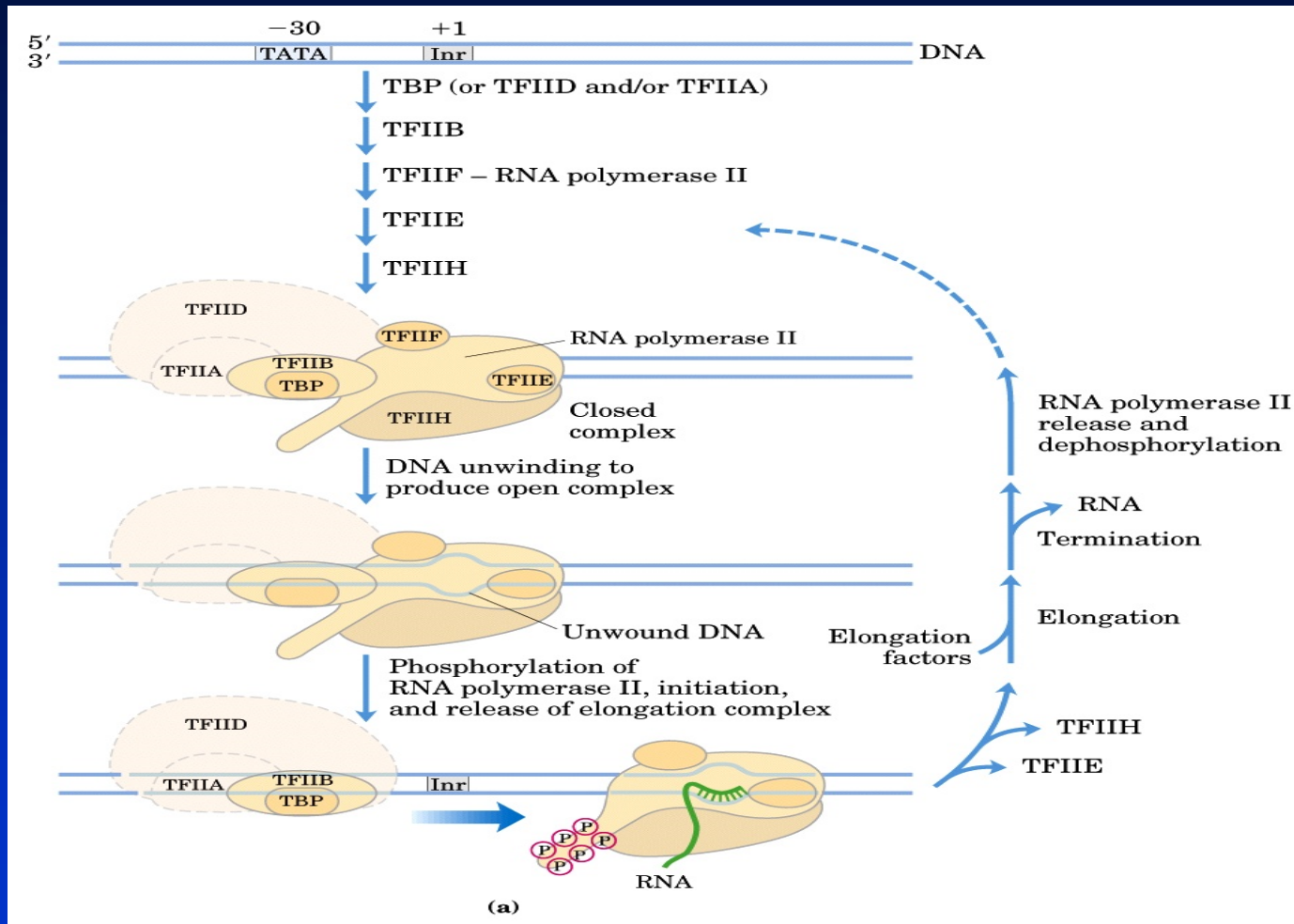
L'RNA POLIMERASI II

La formazione di un complesso di inizio su un promotore della **polimerasi II** contenente una sequenza **TATA**;

il fattore critico è il **TFIID**, che si lega alla sequenza **"TATA box"**.



LA FORMAZIONE DEL COMPLESSO DI INIZIO DELLA TRASCRIZIONE



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,

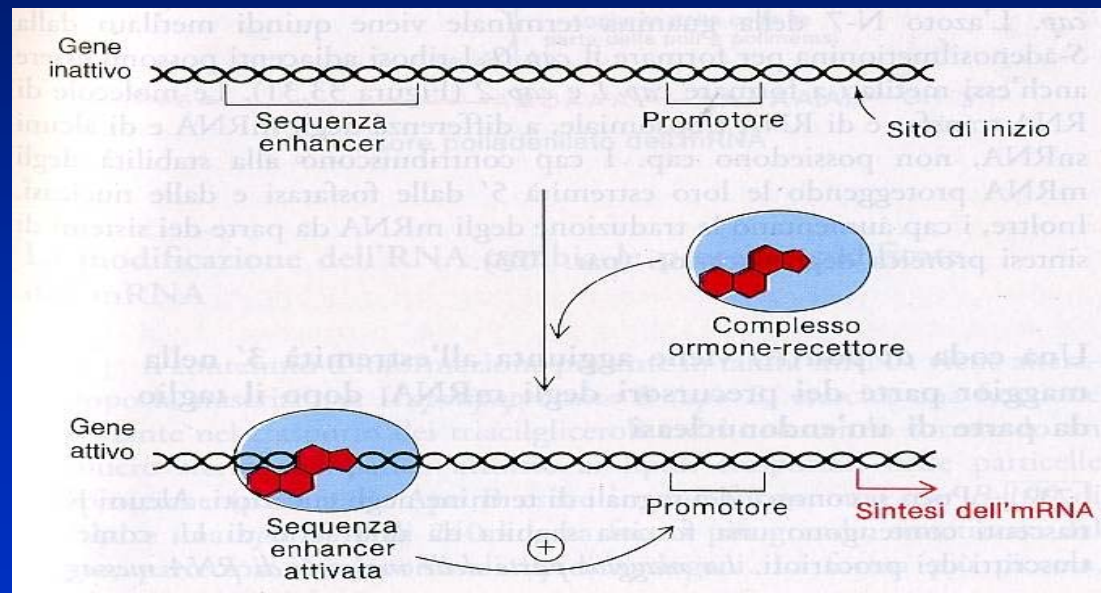
possono **trovarsi** a monte, a valle, o anche all'interno del gene trascritto,

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.

ALCUNI IMPORTANTI ELEMENTI DI CONTROLLO DELLA RNA POL. II E LORO CORRISPONDENTI FATTORI DI TRASCRIZIONE.

Nome della sequenza	Sequenza consenso	Fattore/i di trascrizione	Commento
Promotori e intensificatori generali			
TATA box	TATAAAA	TFIID	TFIID è un complesso di molti fattori
CAAT box	GGCCAATCT	CTF/NF1	Elemento comune
GC box	GGGCGG	SP1	Spesso trovato in promotori privi di TATA
Ottamero	ATTTGCAT	Oct1, Oct5	Oct1, Oct2 contengono omeo domini
Promotori e intensificatori speciali			
HSE	CNNGAANNTCCNNG	Fattore di shock termico	Implicato nella risposta allo shock termico
GRE	TGGTACAAATGTTCT	Recettore di glucocorticoidi	Risposte proteiche a ormoni
TRE	CAGGGACGTGACCGCA	Recettore tiroideo	Risposta proteica a ormoni tiroidei

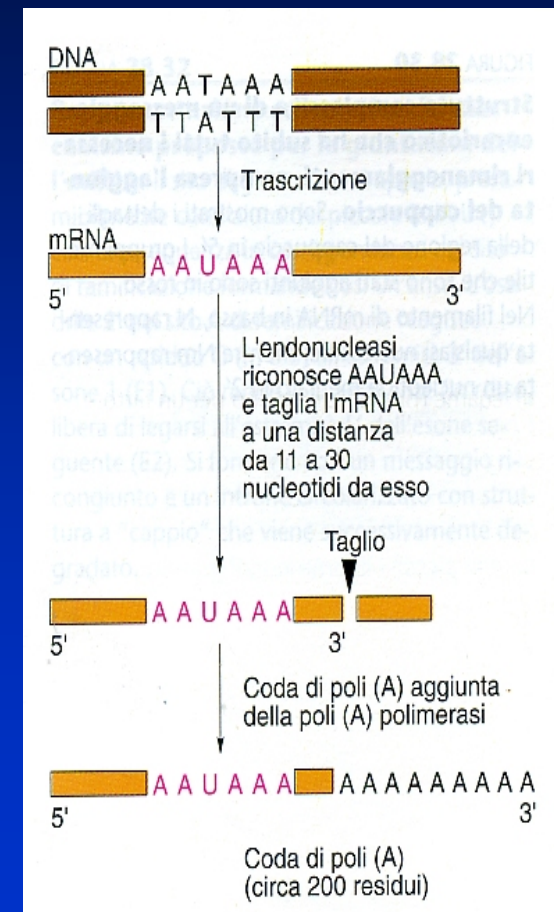
La trascrizione può essere modificata dal legame di fattori in corrispondenza del promotore o di intensificatori da esso distanti.

LA TERMINAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

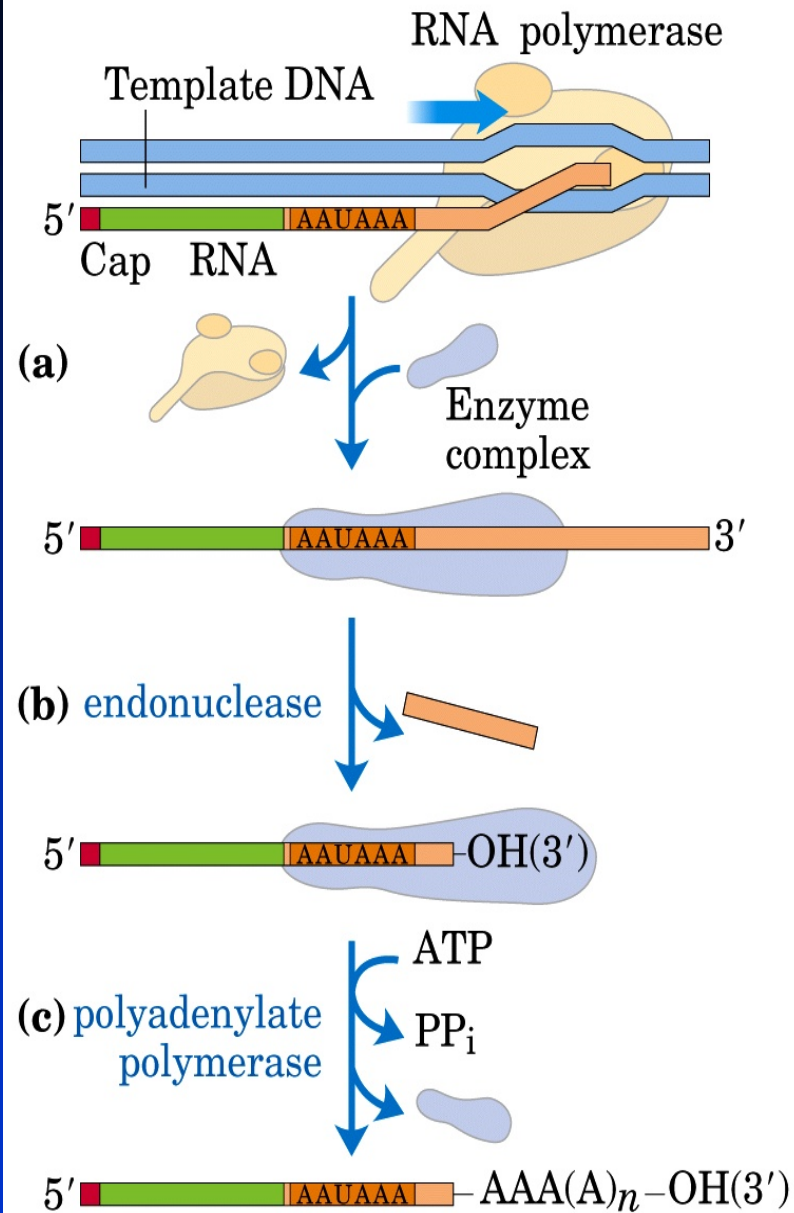
La **RNA polimerasi II** eucariotica normalmente continua a trascrivere **oltre** la fine del gene,

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',

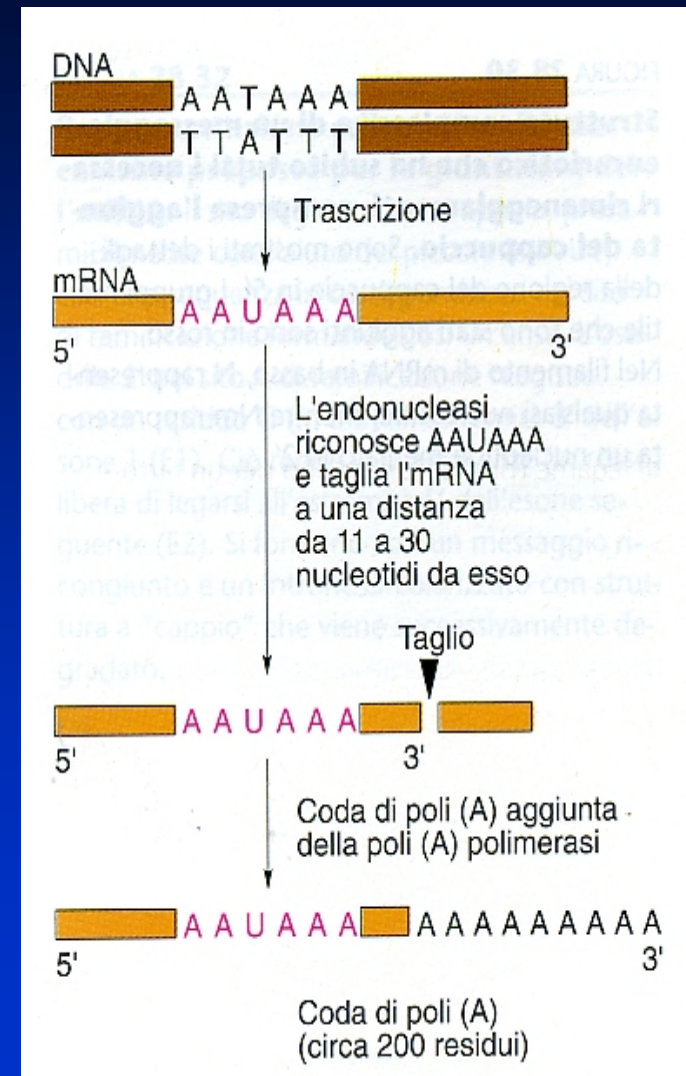
una speciale polimerasi sintetizza una coda di poli(A) lunga circa 200 basi, a partire dal sito di scissione.

RIASSUMENDO:

In prossimità dell'estremità **3'** della maggior parte dei geni eucariotici esiste una sequenza **TTATTT**,

una volta trascritta in **AAUAAA**, essa costituisce **un segnale** per la scissione endonucleasica e l'aggiunta di una coda di poli(A);

la funzione delle code **poli(A)** è solo parzialmente nota e alcuni mRNA (es. quelli per gli istoni) non le hanno.



La MATURAZIONE DELL'mRNA

L'mRNA viene prodotto nel nucleo ed é **esportato** nel citosol per la traduzione;

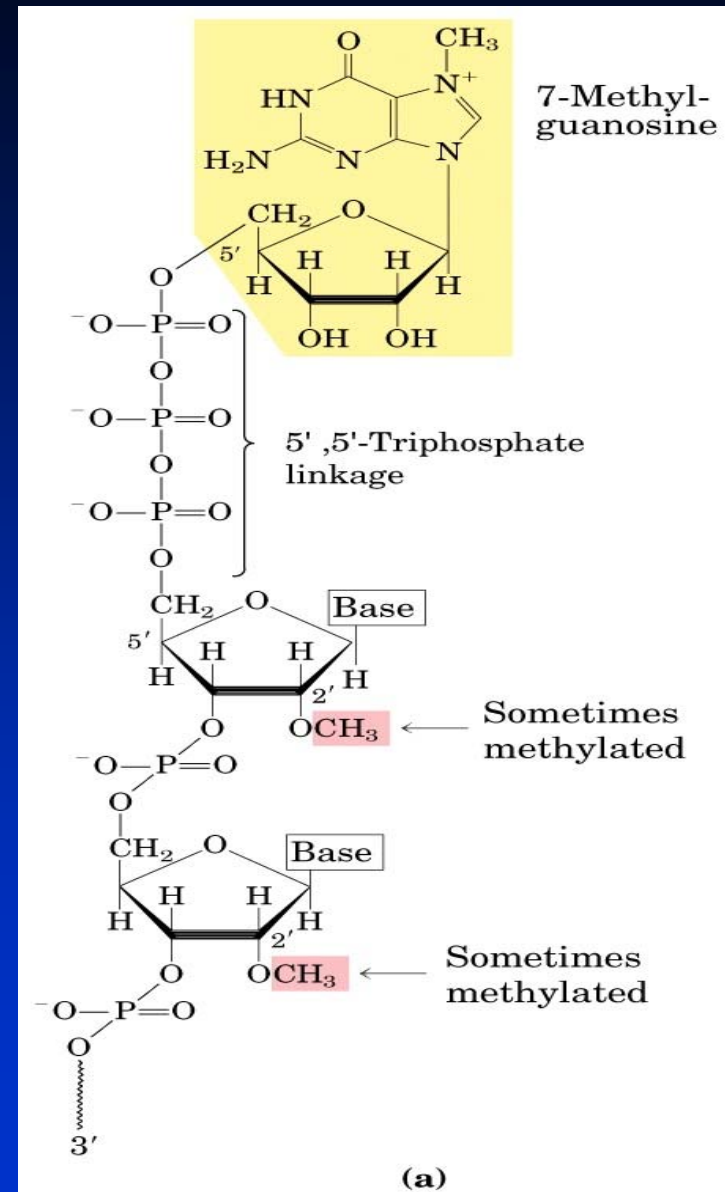
il prodotto iniziale della trascrizione (**pre-mRNA**) subisce il processo di **splicing e altri rimaneggiamenti**, che avvengono mentre l'mRNA è **ancora** nel nucleo.

L'AGGIUNTA DEL CAPPuccio

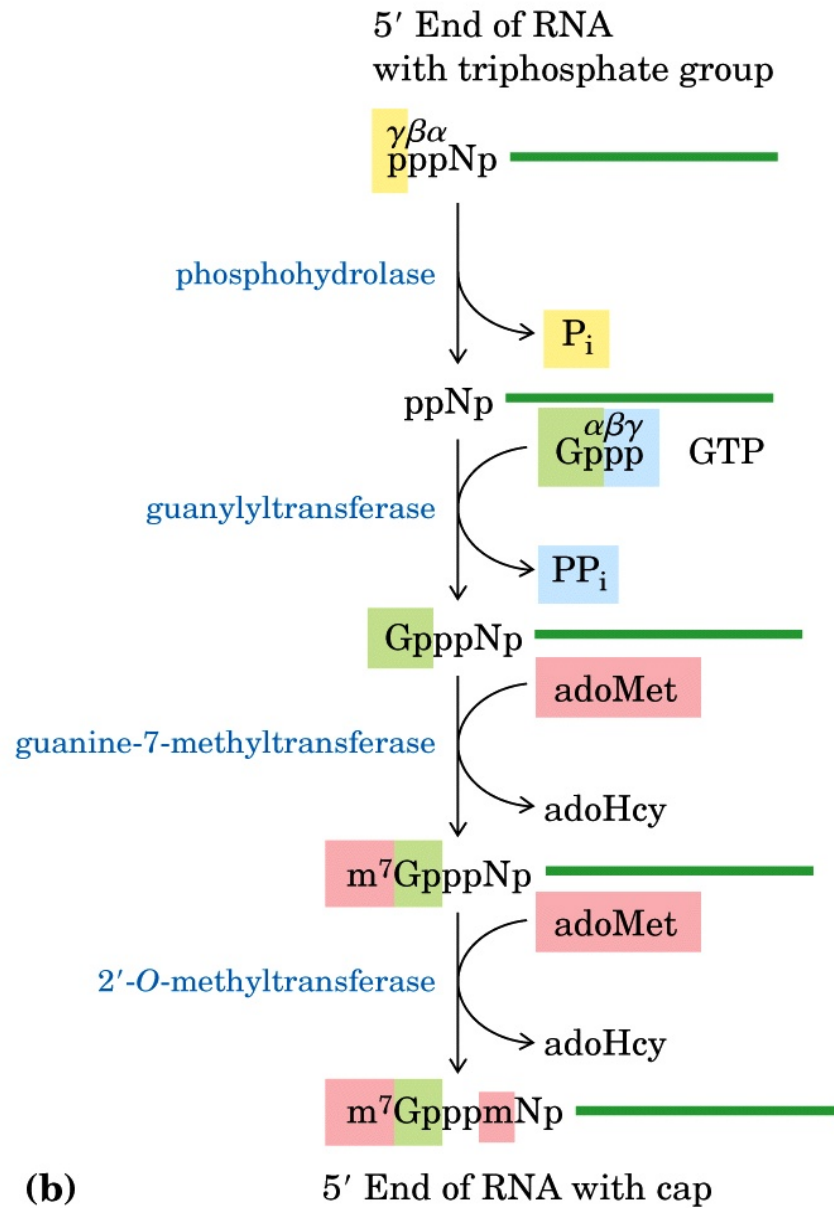
La 7-metilguanossina è unita all'estremità 5' di quasi tutti gli mRNA eucariotici con un inconsueto legame **5',5'-trifosfato**,

con i primi 2 nucleotidi della catena costituisce il **cappuccio (CAP)**;

sono **metilate** la guanina alla posizione N-7 e 1 o 2 gruppi -OH dei nucleotidi del CAP.



L'AGGIUNTA DEL CAPPuccio

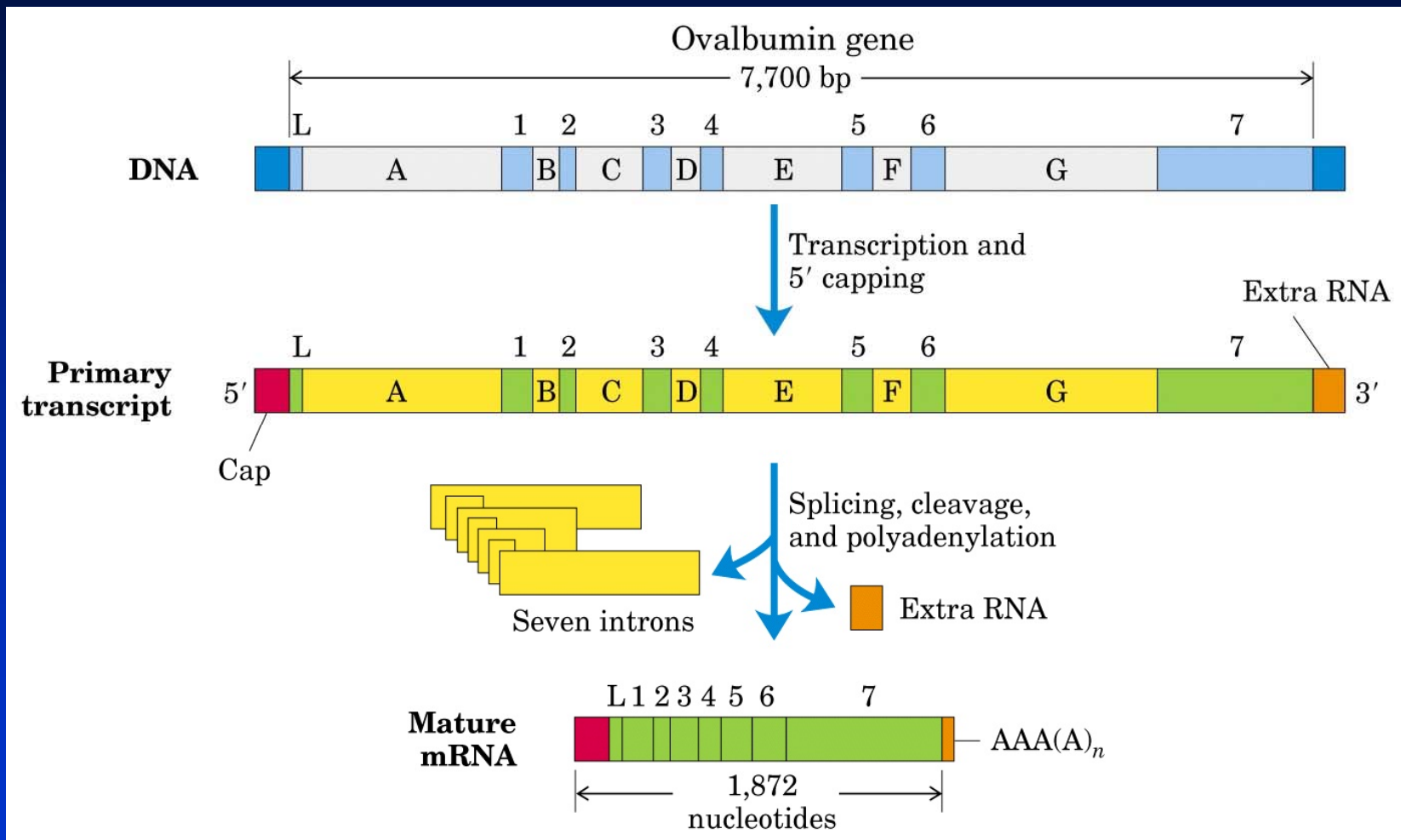


La **formazione** del cappuccio (cap) al 5' prevede quattro o cinque passaggi successivi,

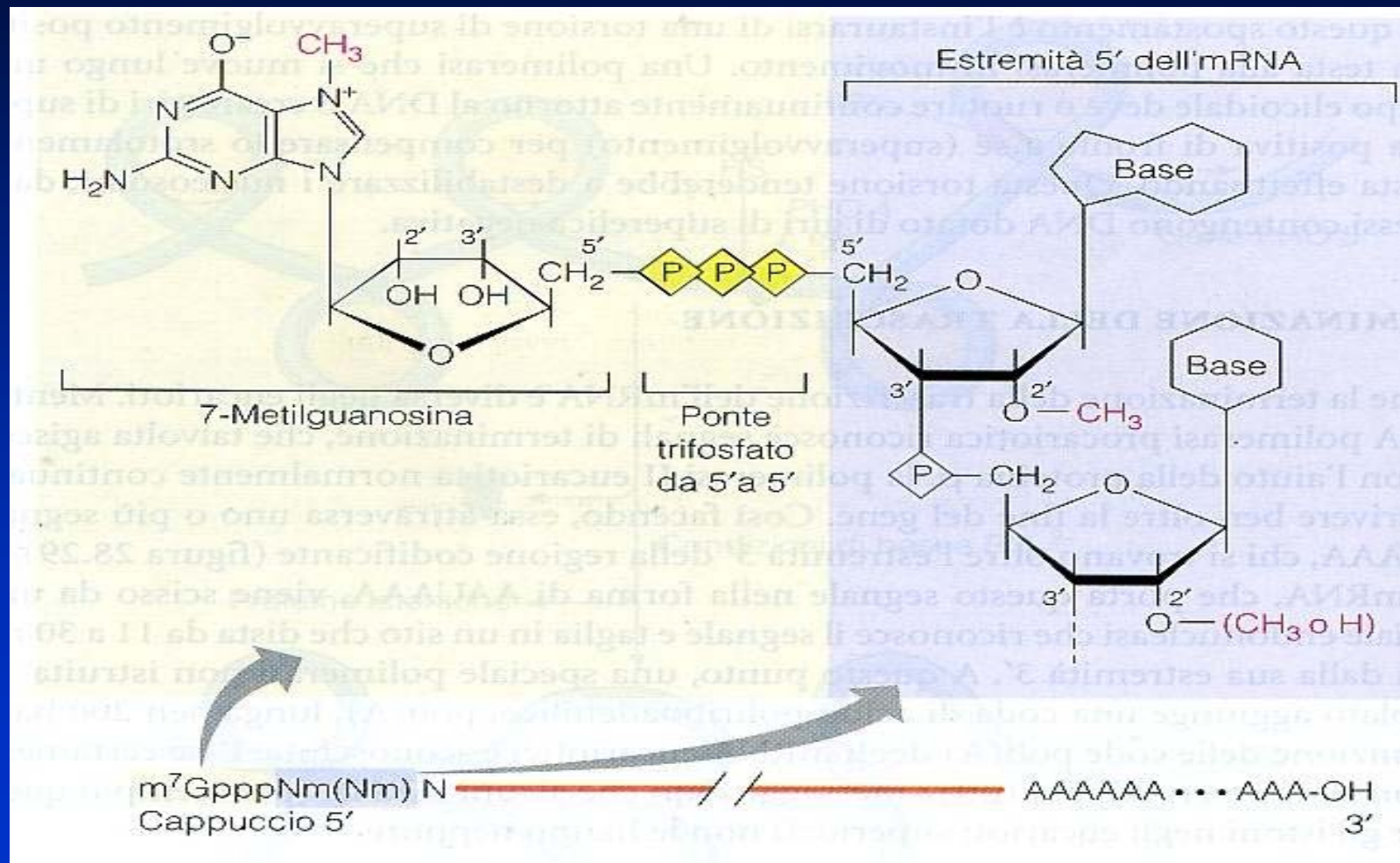
esso serve al **posizionamento** dell'mRNA sul ribosoma per la traduzione e **protegge** l'mRNA dalla degradazione enzimatica.

adoMet = S-adenosil-metionina

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

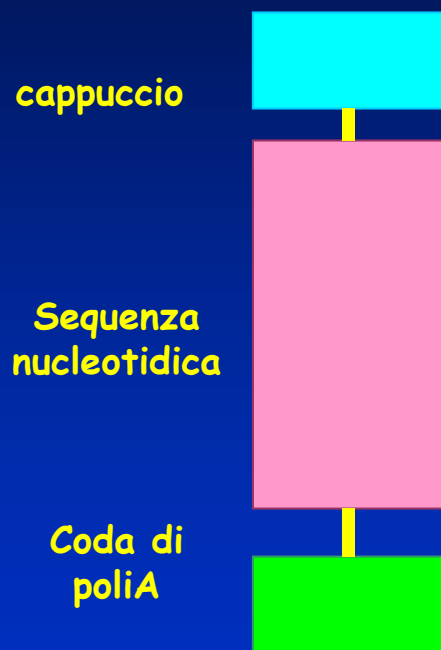


LO SCHEMA COMPLESSIVO DELLE MODIFICAZIONI POST-TRASCRIZZIONALI DI UN mRNA EUCARIOTICO



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 **la stessa** che nei procarioti,

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

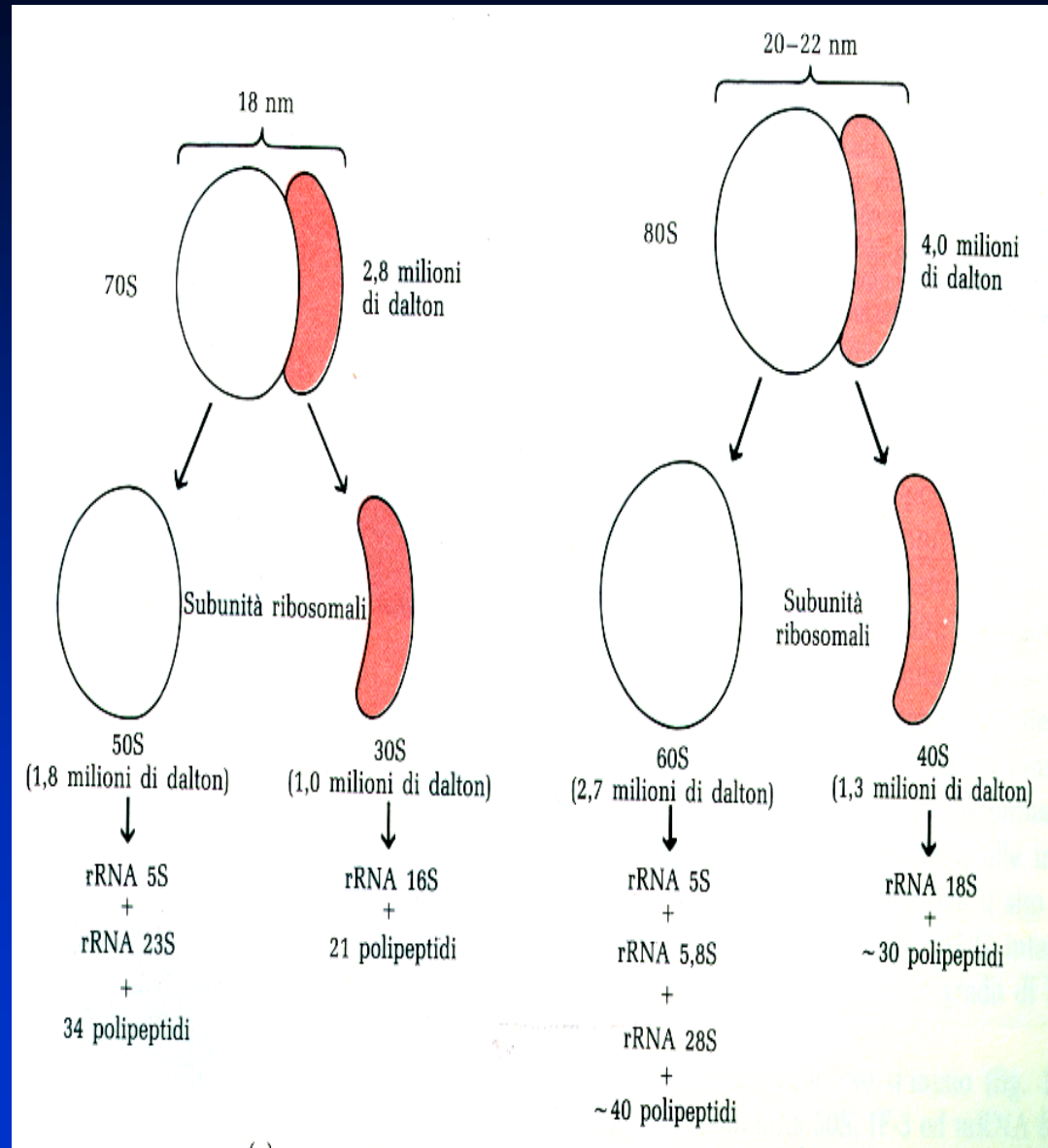
la regolazione è più importante.

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	eIF2	Coinvolti nella formazione del complesso di inizio
IF2		
IF3		
	eIF3, eIF4C	Coinvolti nel legame del cappuccio
	CBP1	
	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

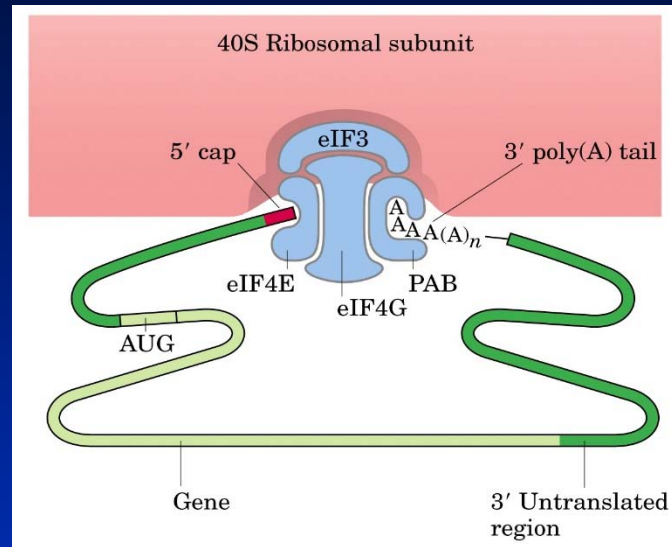
Factor	Function
IF-1	Prevents premature binding of tRNAs to A site
IF-2	Facilitates binding of fMet-tRNA ^{fMet} to 30S ribosomal subunit
IF-3	Binds to 30S subunit; prevents premature association of 50S subunit; enhances specificity of P site for fMet-tRNA ^{fMet}

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

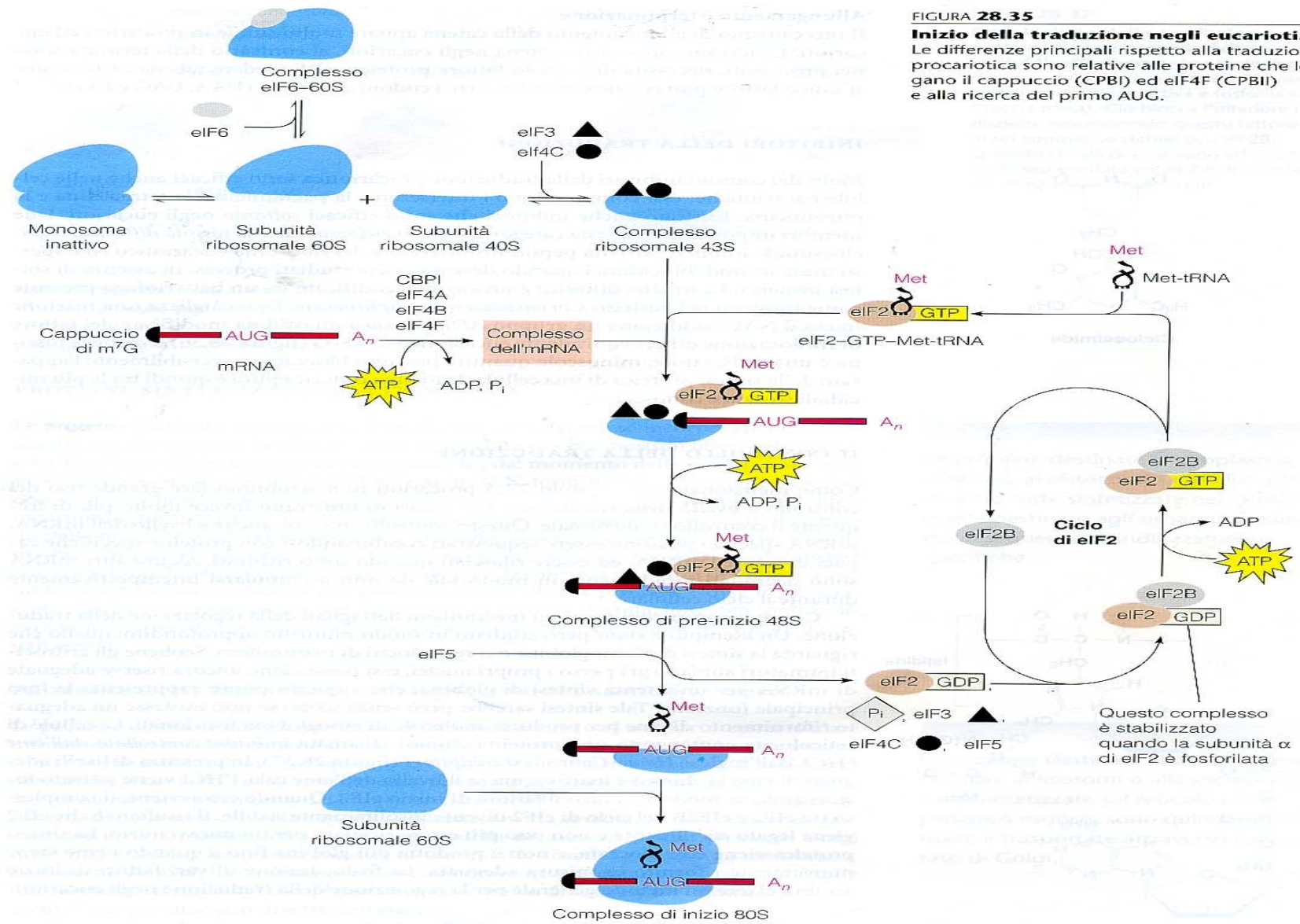


FIGURA 28.35

Inizio della traduzione negli eucarioti.
 Le differenze principali rispetto alla traduzione procariotica sono relative alle proteine che legano il cappuccio (CPBI) 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**.

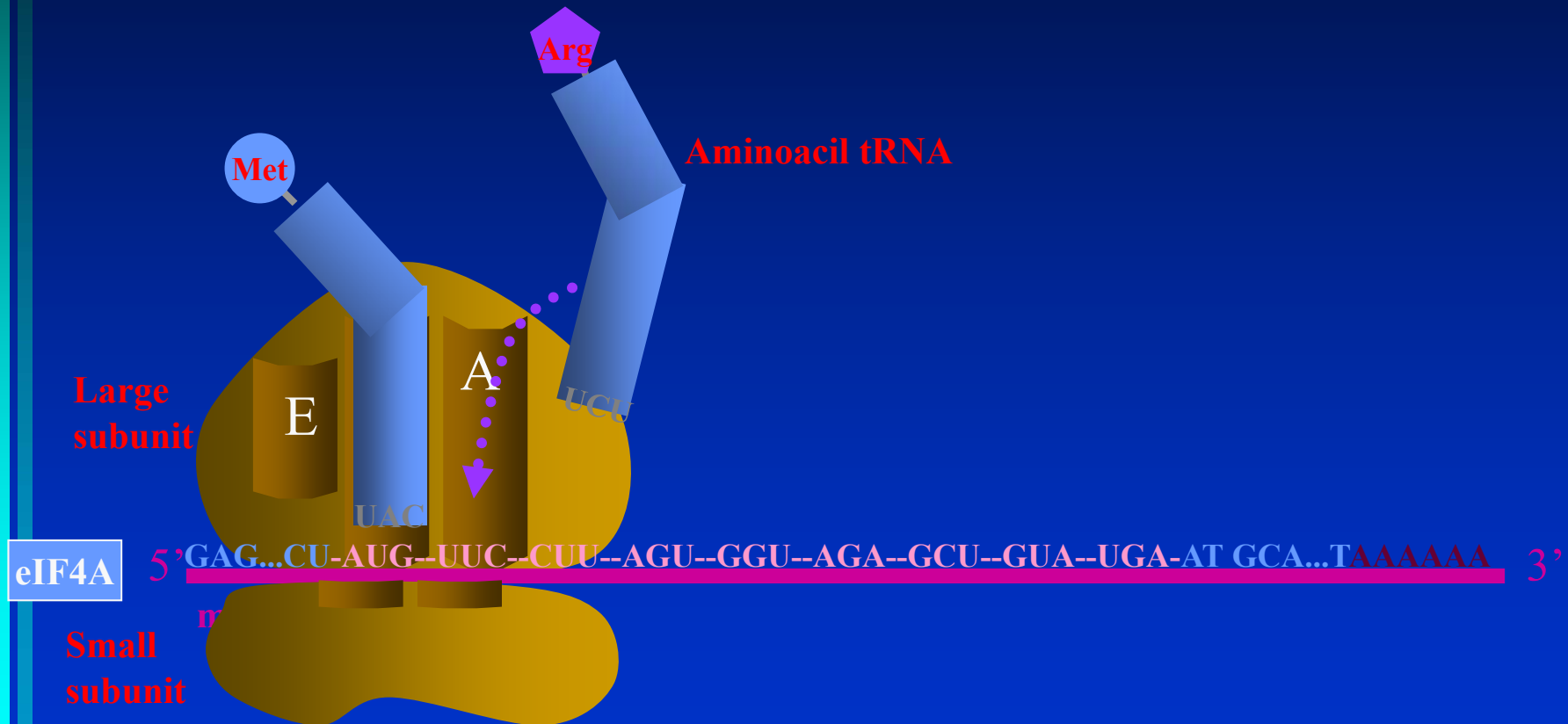
LA SINTESI PROTEICA: L'INIZIO

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

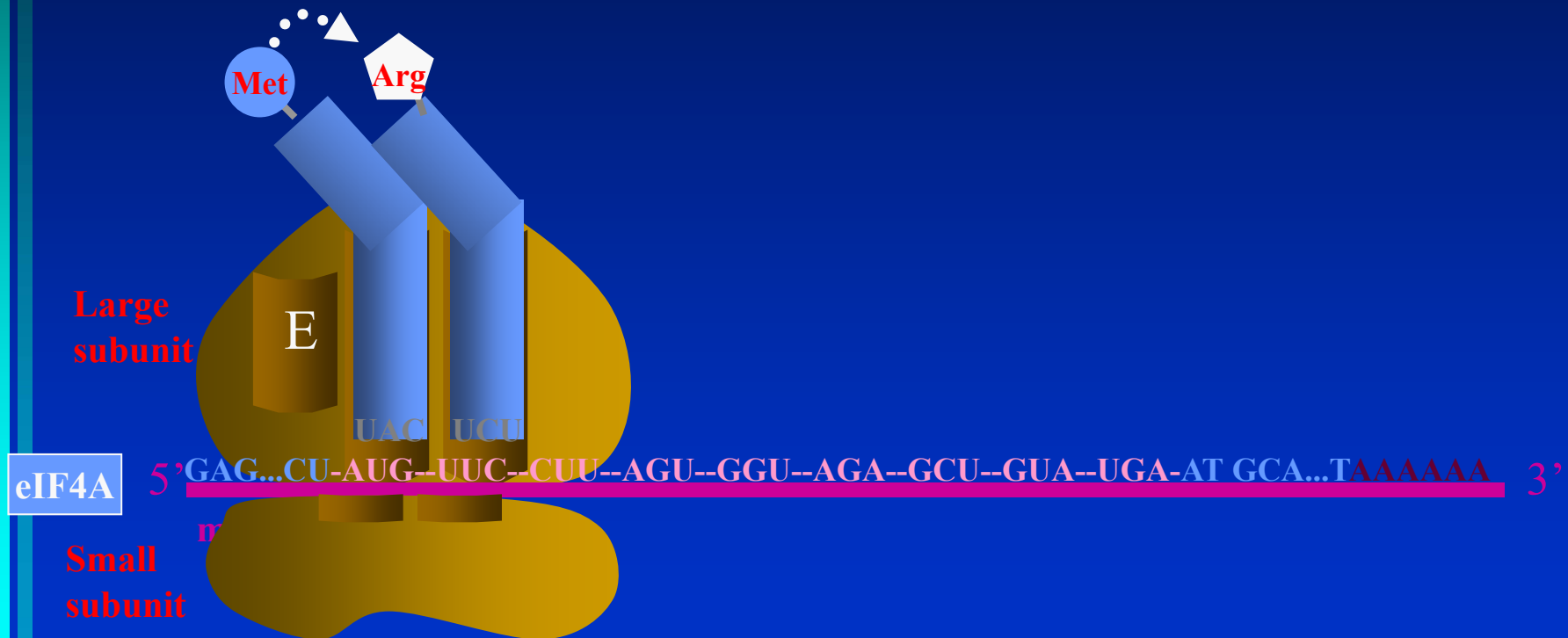
la subunità ribosomiale 40S **scorre** lungo l'mRNA fino al primo **AUG** (la metionina non é formilata),

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

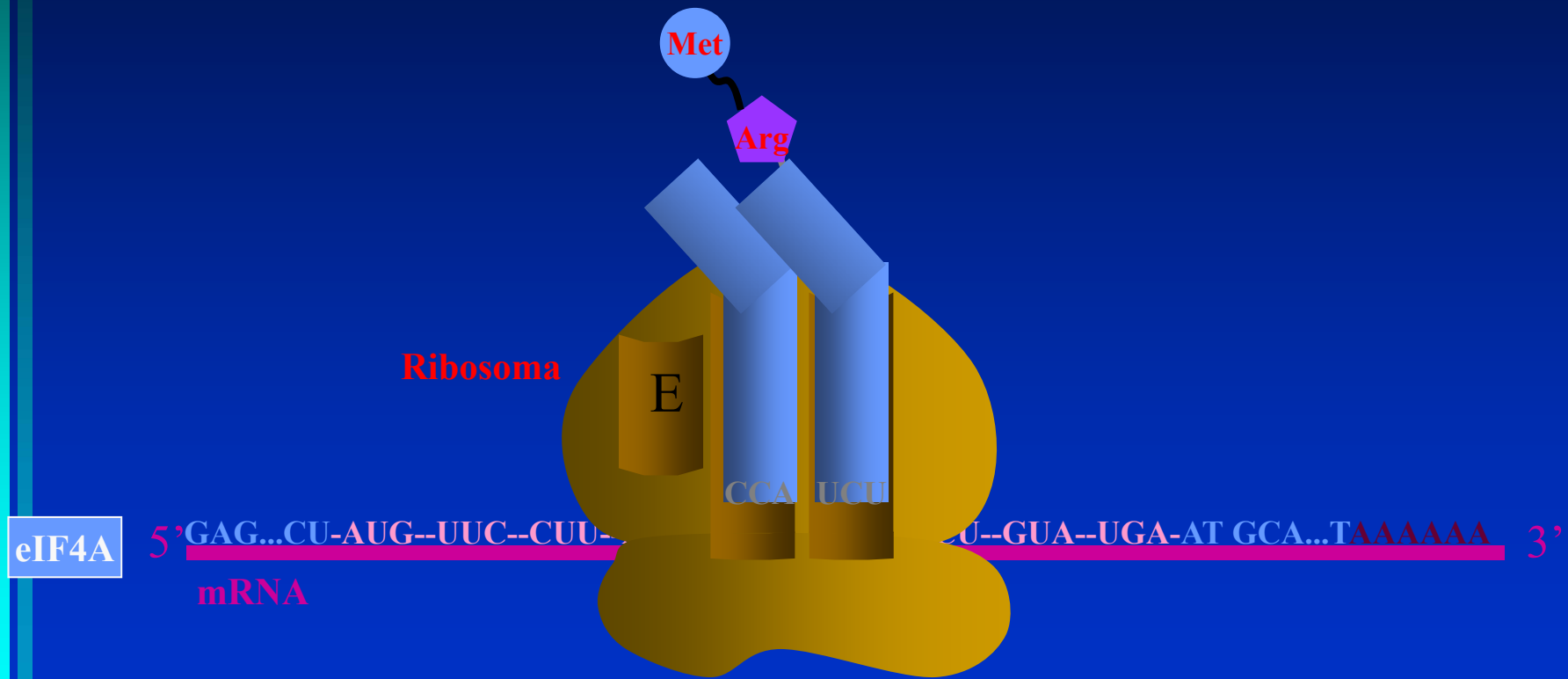
LA SINTESI PROTEICA: L'ALLUNGAMENTO



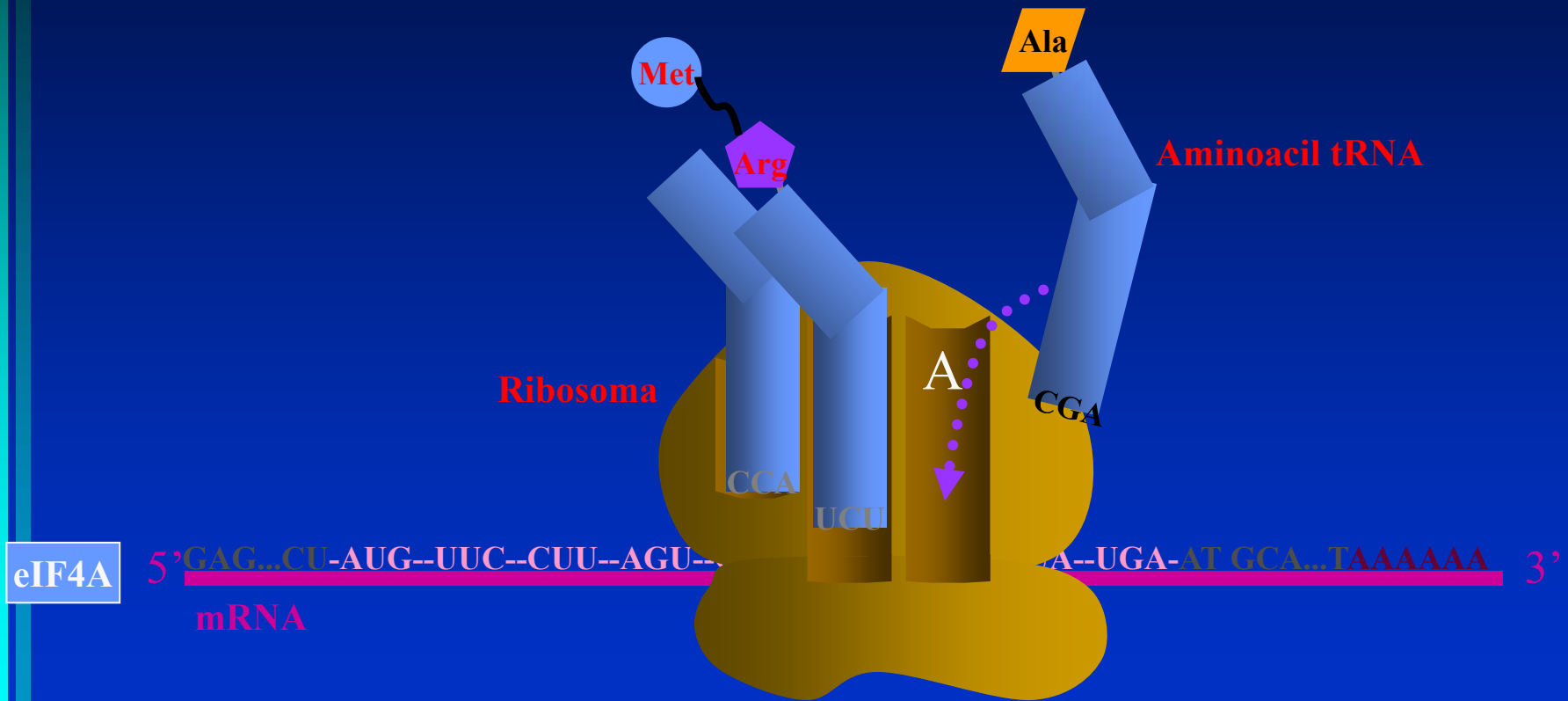
LA SINTESI PROTEICA: L'ALLUNGAMENTO



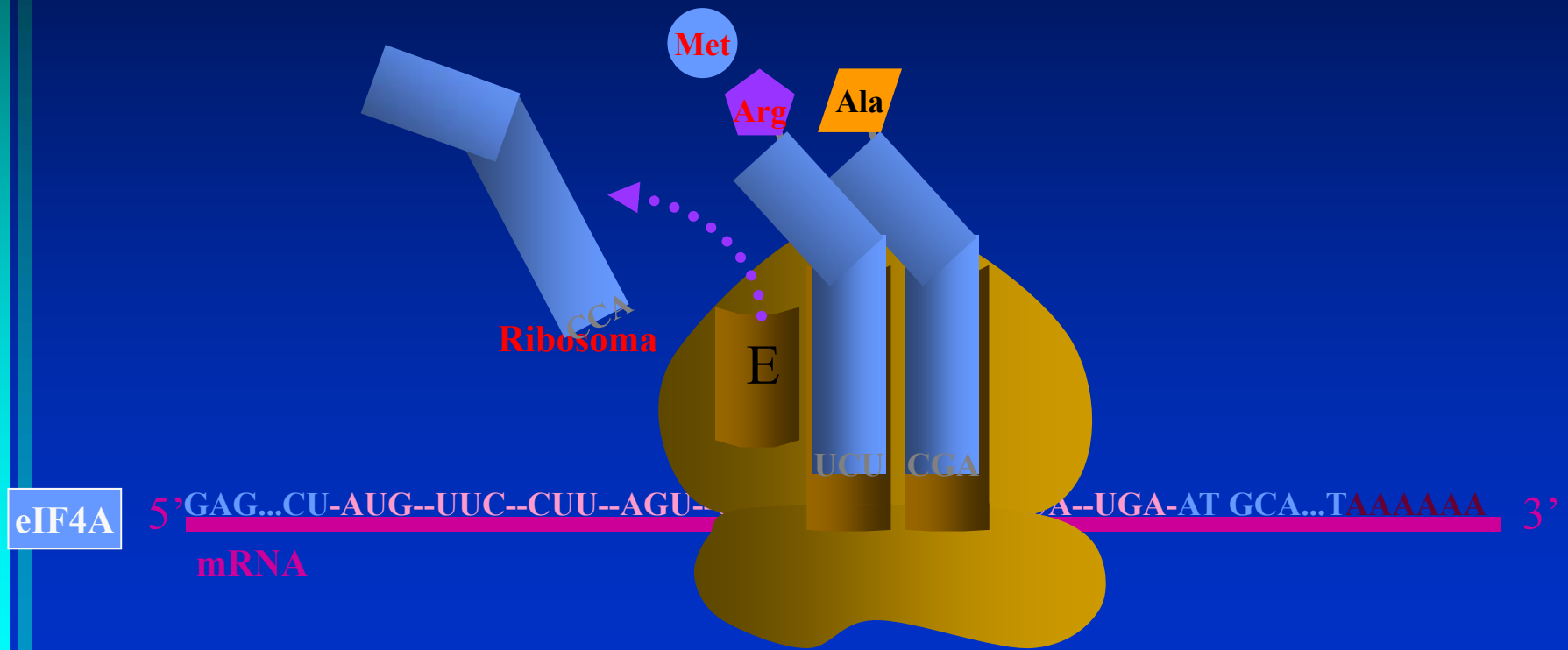
LA SINTESI PROTEICA: L'ALLUNGAMENTO



LA SINTESI PROTEICA: L'ALLUNGAMENTO



LA SINTESI PROTEICA: L'ALLUNGAMENTO



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**) e 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**.

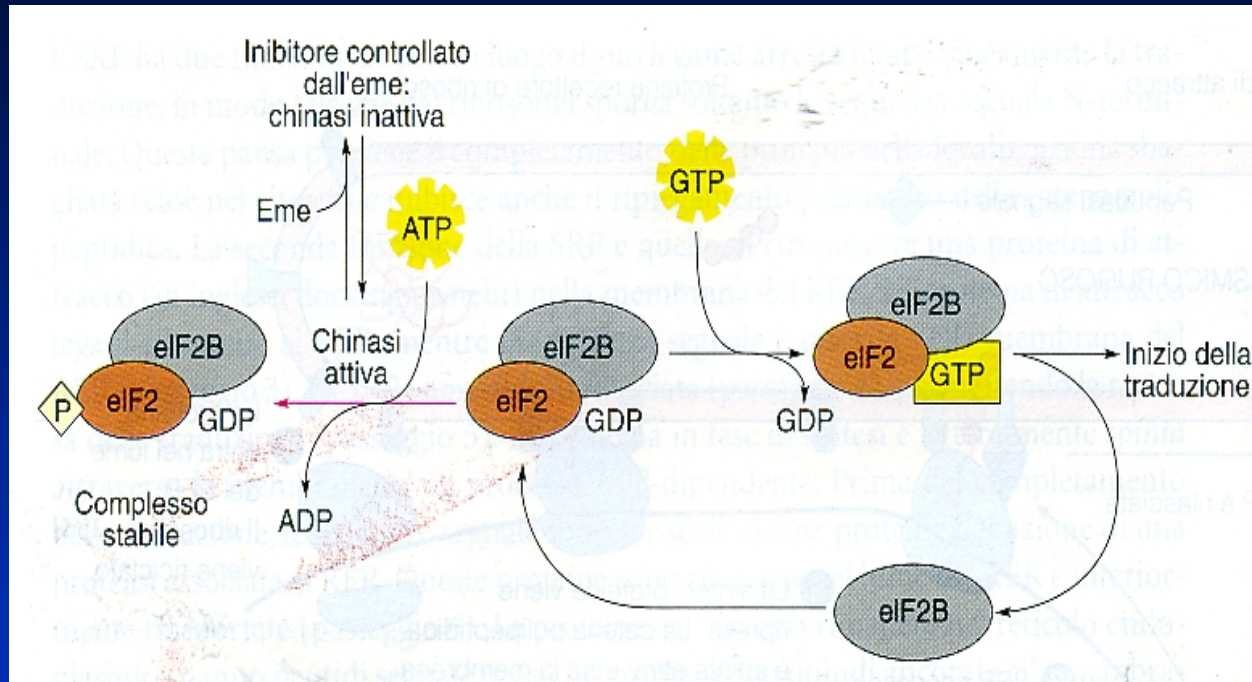
IL CONTROLLO DELLA SINTESI PROTEICA

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.

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

	<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

**GLI INIBITORI DELLA
REPLICAZIONE, DELLA
TRASCRIZIONE E DELLA SINTESI
PROTEICA NEI PROCARIOTI E
NEGLI EUCARIOTI**

GLI INIBITORI DELLA REPLICAZIONE DEL DNA

LA DNA GIRASI

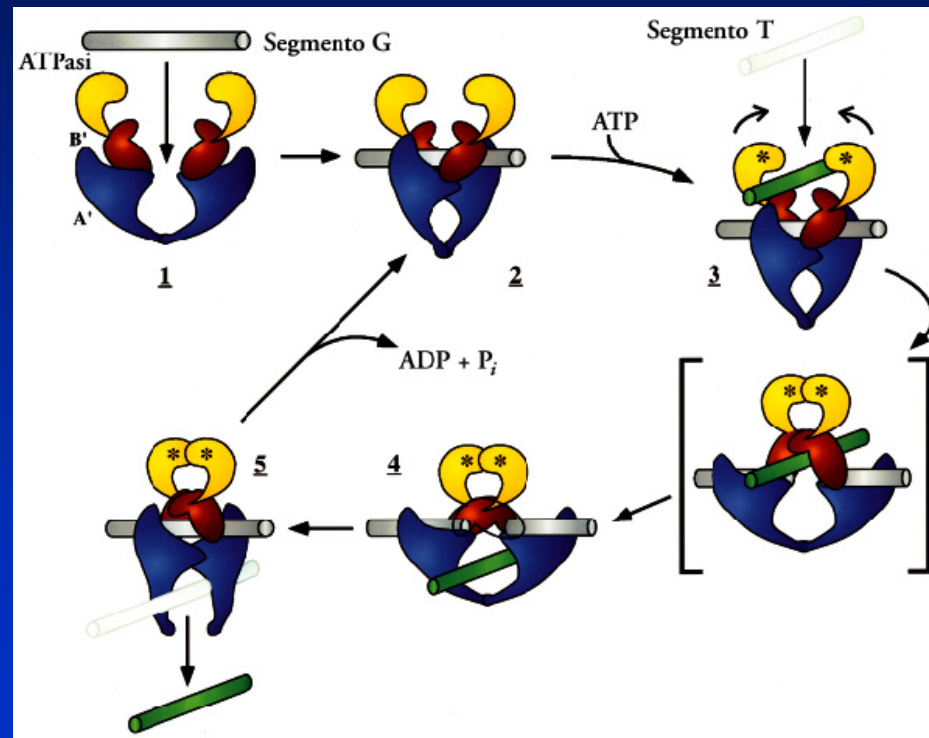
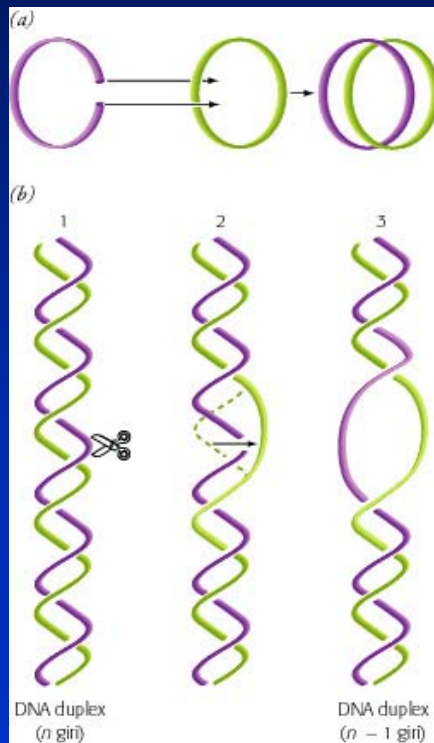
Esso introduce dei **superavvolgimenti negativi** nel DNA con l'idrolisi di ATP,

l'enzima è un tetramero con due subunità **A** e due subunità **B**,

le subunità **A** legano e scindono il DNA, le subunità **B** realizzano la trasduzione dell'energia dovuta all'idrolisi dell'ATP;

esso diminuisce il **numero di legame** del suo substrato di due unità per volta, perché la doppia elica del DNA passa attraverso un taglio di entrambi i filamenti.

I MECCANISMI CATALITICI DELLE GIRASI DI TIPO I E II



$$L = T + W$$

Il numero di legame (L) di una molecola circolare è definito come il numero di volte che un filamento di DNA si avvolge intorno all'altro in direzione destrorsa,

molecole che differiscono soltanto nel numero di legame sono isomeri-topologici o **topoisomeri**;

T (numero di Twisting) è il numero di giri di elica di Watson e Crick,

W (numero di Writhing) è il numero di giri di superelica.

GLI INIBITORI DELLA REPLICAZIONE

L'ACIDO NALIDIXICO (PROC.)

Interferisce con la girasi, che scinde e salda le catene di DNA. Il suo sito di legame è la subunità **A** dell'enzima.

LA NOVOBIOCINA (PROC.)

Si lega alla subunità **B** della **girasi** inibendo l'idrolisi dell'ATP;

mutanti batterici che resistono all'acido nalidixico o alla novobiocina hanno alterazioni strutturali rispettivamente nelle subunità A o B della girasi.

GLI INIBITORI DELLA TRASCRIZIONE DEL DNA

GLI INIBITORI DELLA TRASCRIZIONE

LA RIFAMICINA E LA RIFAMPICINA (PROC.)

Sono entrambi antibiotici,

il primo deriva da un ceppo di **Streptomyces**, il secondo è un suo derivato semisintetico;

inibiscono la sintesi di RNA, legandosi specificatamente alla **subunità β** delle RNA polimerasi batteriche, impedendo l'inizio della trascrizione (bloccando la formazione del primo legame fosfodiesterico).

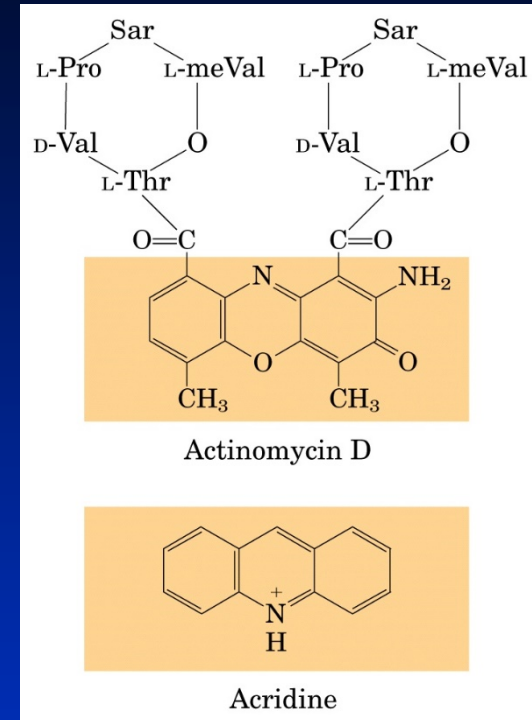
GLI INIBITORI DELLA TRASCRIZIONE

LA ACTINOMICINA-D (PROC. EUC.)

È un antibiotico che deriva da un ceppo diverso di **Streptomyces**,

il suo sistema ad anello triciclico (**fenossazone**) si intercala nel DNA a doppia elica tra appaiamenti **G≡C** consecutivi, deformando il DNA;

questa alterazione locale **impedisce** il movimento dell'RNA polimerasi lungo lo stampo. Di fatto, l'Actinomicina-D altera tutta la doppia catena.



L'ACRIDINA (PROC. EUC.)

Inibisce la sintesi di RNA come la Actinomicina-D.

GLI INIBITORI DELLA TRASCRIZIONE

LA α -AMANITINA (EUC.)

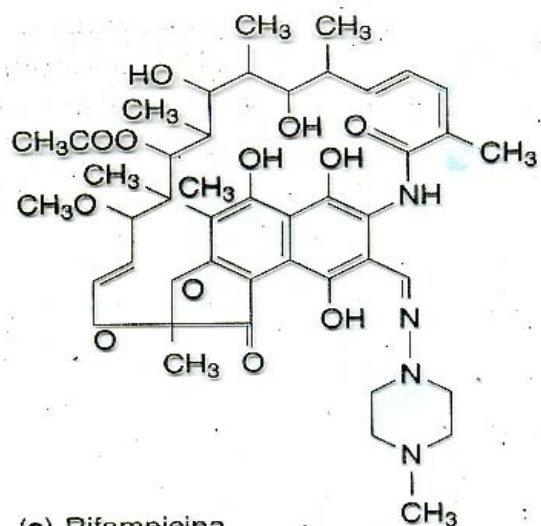
È una tossina prodotta dal fungo velenoso **amanita**,

è un **octapeptide ciclico**;

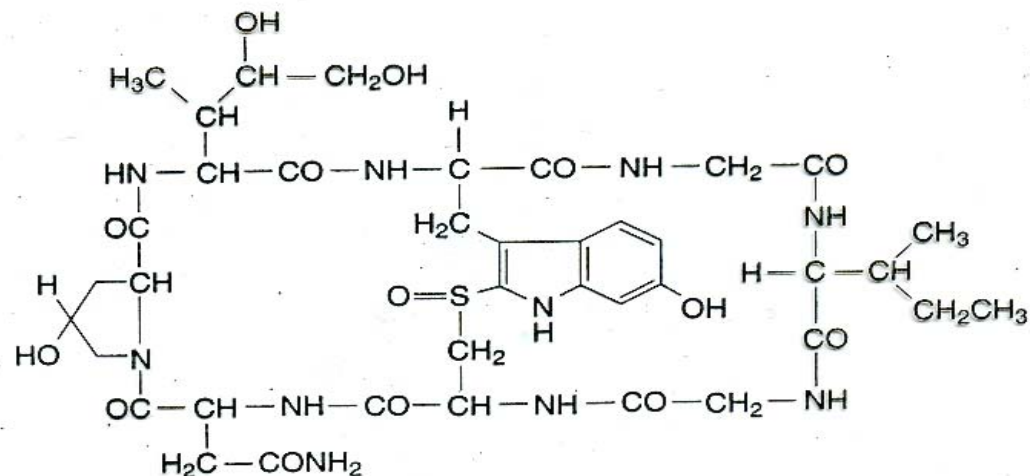
blocca la sintesi di mRNA, inibendo la RNA polimerasi II e, a più alte concentrazioni, la polimerasi III; non ha effetti sulla RNA polimerasi I,

impedendo la formazione di **precursori dell'mRNA**, legandosi saldamente alla RNA polimerasi II.

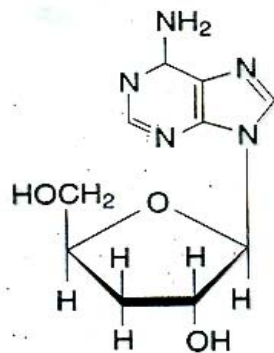
ALCUNI INIBITORI DELLA TRASCRIZIONE



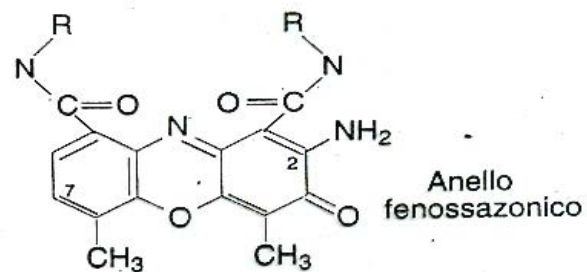
(a) Rifampicina



(b) α -Amanitina



(c) Cordicepina (3'-deossiadenosina)

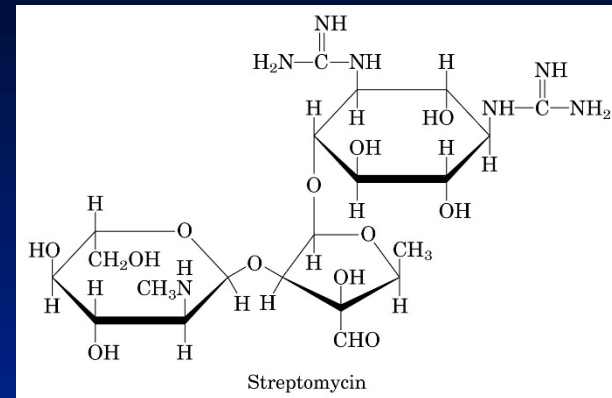


(d) Actinomycin D

GLI INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA

GLI INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA

LA STREPTOMICINA (PROC.)

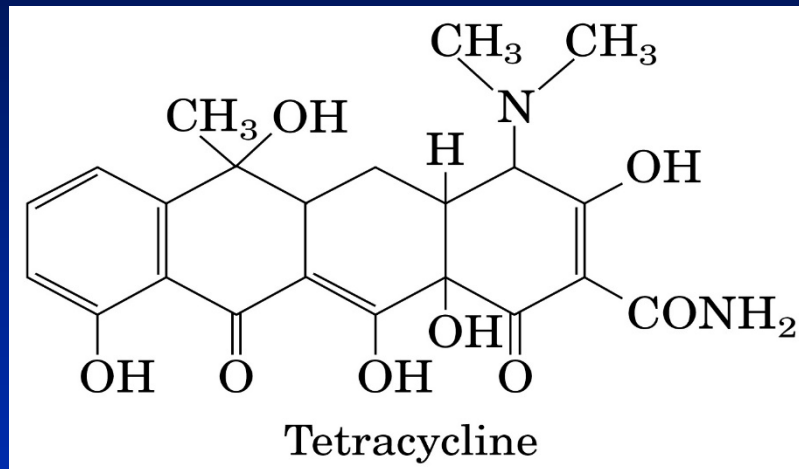


È un **trisaccaride** che interferisce con il legame del **formilmethionil-tRNA** ai ribosomi, impedendo il corretto inizio della sintesi proteica;

a concentrazioni relativamente basse **causa** l'errata lettura del codice genetico, a concentrazioni più alte **inibisce** l'inizio della sintesi proteica,

la proteina **S12 (subunità 30S)**, bersaglio dell'antibiotico, è responsabile della sensibilità alla streptomicina.

GLI INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA



LA TETRACICLINA (PROC.)

Si lega alla subunità 30S del ribosoma e inibisce il legame degli aminoacil-tRNA, bloccando il sito A.

GLI INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA

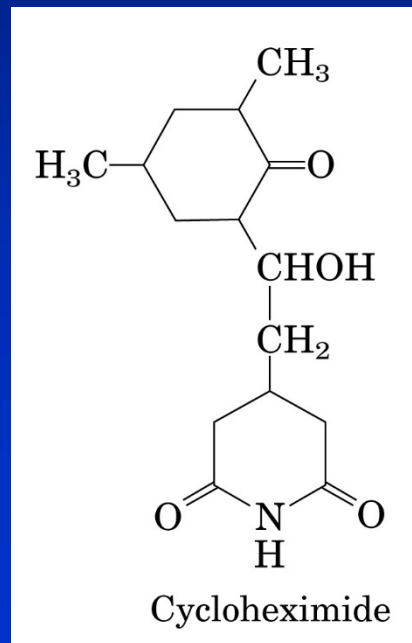
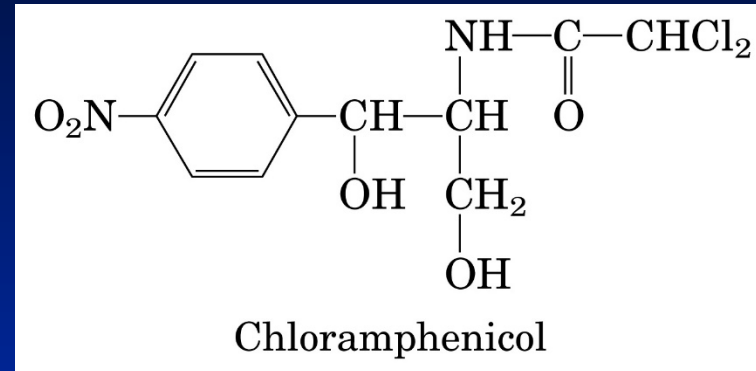
IL CLORANFENICOLO

(PROC.)

ED

IL CICLOESIMIDE

(EUC.)



Inibiscono la **peptidil-transferasi**,
che catalizza il **legame peptidico** tra il
gruppo carbossilico attivato della catena
polipeptidica in fase di crescita e il gruppo
amminico dell'aminoacil-tRNA.

GLI INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA

L'ERITROMICINA (PROC.)

Inibisce la **traslocazione**, legandosi alla subunità 50S;

la traslocazione consiste nell'attuazione di tre movimenti distinti:

- 1) il tRNA scarico lascia il sito P,
- 2) il peptidil-tRNA si muove dal sito A al sito P,
- 3) l'mRNA si sposta di tre nucleotidi.

GLI INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA

LA PUROMICINA (PROC. EUC.)

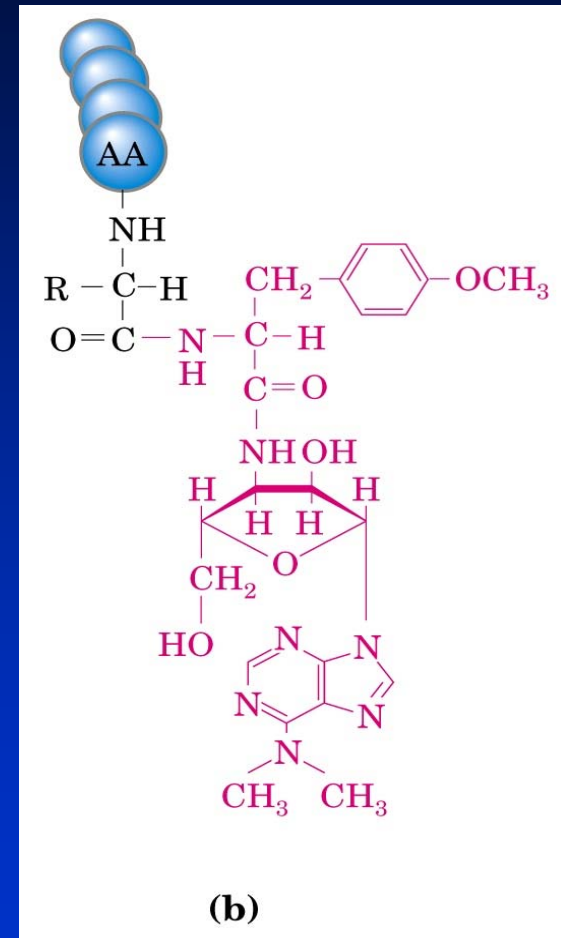
Viene prodotta dalla muffa *Streptomyces Albioniger*,

ha una struttura molto simile all'estremità 3' di un aminoacil-tRNA,

si lega al sito A e partecipa ai passaggi dell'allungamento fino alla formazione della peptidil-puromicina,

ma non si lega al sito P e non trasloca;

essa si dissocia dal ribosoma subito dopo essersi legata all'estremità carbossilica del peptide, causando la prematura terminazione della sintesi del peptide.



GLI INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA

LA TOSSINA DIFTERICA (EUC.)

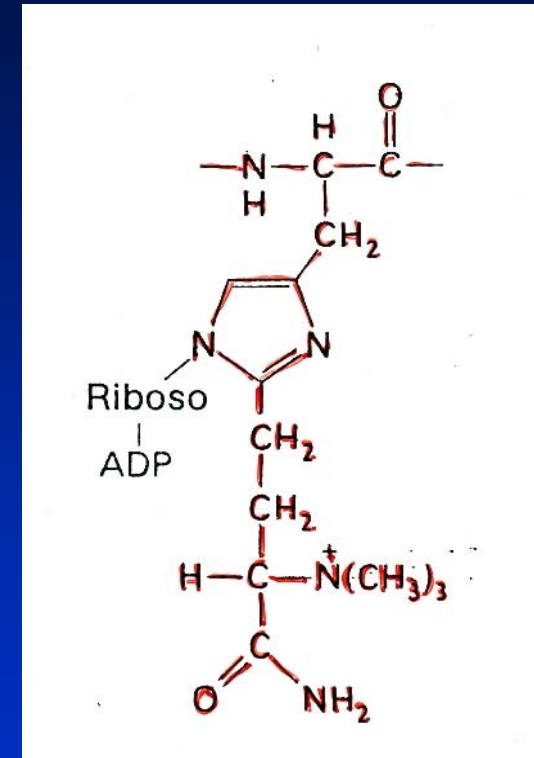
Blocca la sintesi proteica negli eucarioti,

é un enzima codificato da un **batteriofago** presente come lisogeno nel batterio **Corynebacterium Diphtheriae**.

GLI INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA

LA TOSSINA DIFTERICA (EUC.)

Catalizza una reazione in cui il **NAD⁺** aggiunge un gruppo **ADP-ribosio** a un'istidina modificata, la **diftamide**, facente parte del fattore di traslocazione **eEF2**, (l'equivalente eucariotico di EF-G), impedendogli di traslocare la catena polipeptidica in fase di crescita.



La diftamide é una istidina modificata.

GLI INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA

LA TOSSINA DIFTERICA (EUC.)

Essendo **un catalizzatore**, sue minuscole quantità possono bloccare irreversibilmente l'apparato della sintesi proteica di una cellula;

quindi, la tossina pura è tra le **più micidiali** sostanze conosciute.

GLI ANTIBIOTICI INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA

<i>Antibiotico</i>	<i>Azione</i>
Streptomicina (proc.)	Inibisce l'inizio della sintesi proteica (legame ad una proteina della sub. 30S)
Tetraciclina (proc.)	Si lega alla subunità 30S ed inibisce l'attacco degli aminoacil-tRNA
Cloramfenicolo (proc.)	Inibisce la peptidil-transferasi della subunità 50S
Cicloesimide (euc.)	Inibisce la peptidil-transferasi della subunità 60S
Eritromicina (proc.)	Si lega alla subunità 50S ed inibisce la traslocazione
Tossina difterica (euc.)	Blocca la traslocazione (ADP-ribosilazione dell'EF2)
Puromicina (proc. euc.)	Causa terminazione prematura della catena agendo da analogo dell'aminoacil-tRNA