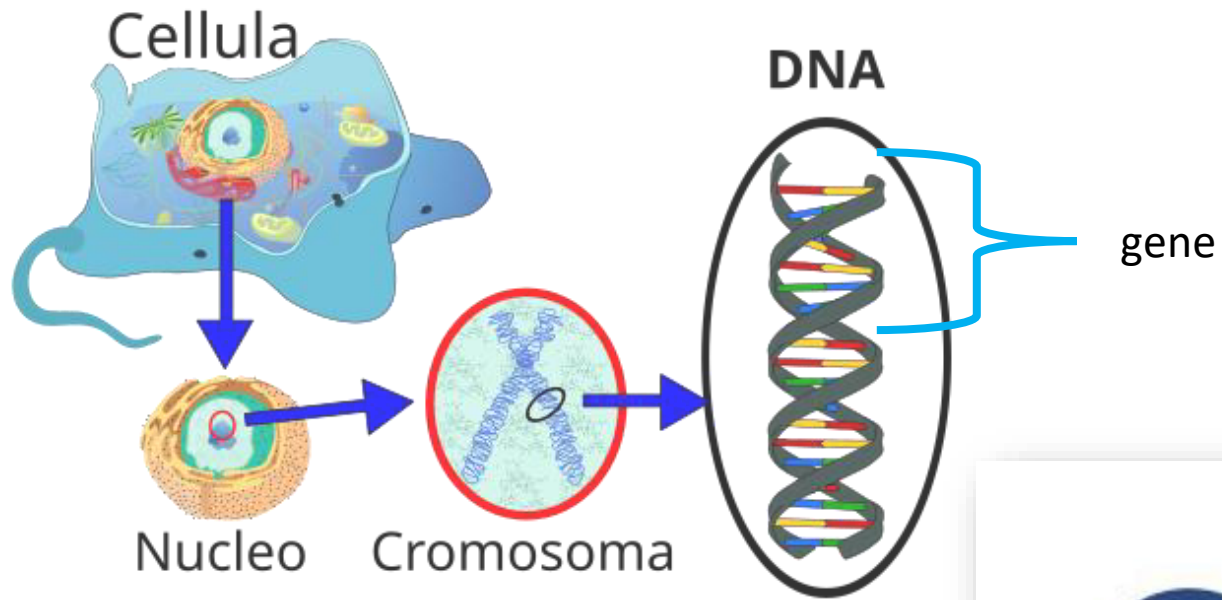
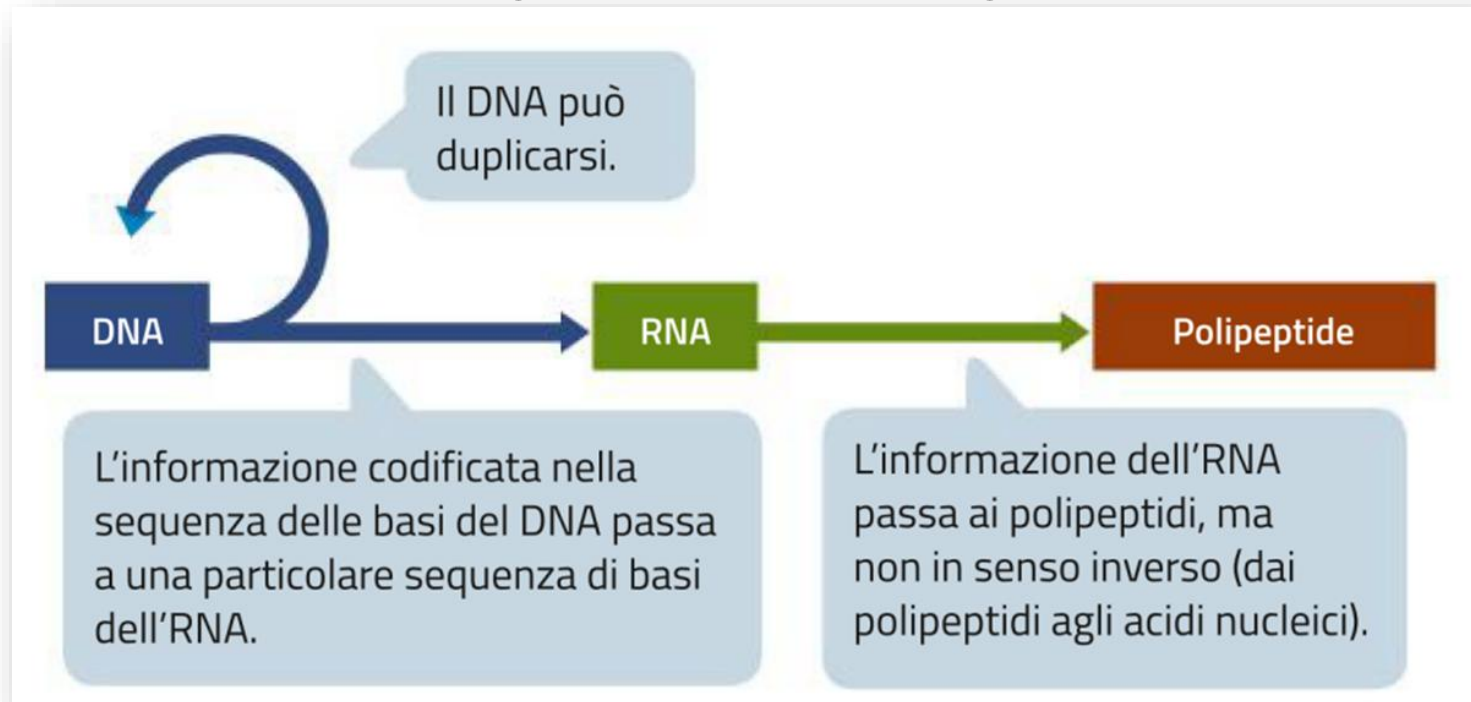


Informazione genetica: come si
passa dal DNA alla proteina?



Il dogma centrale della biologia

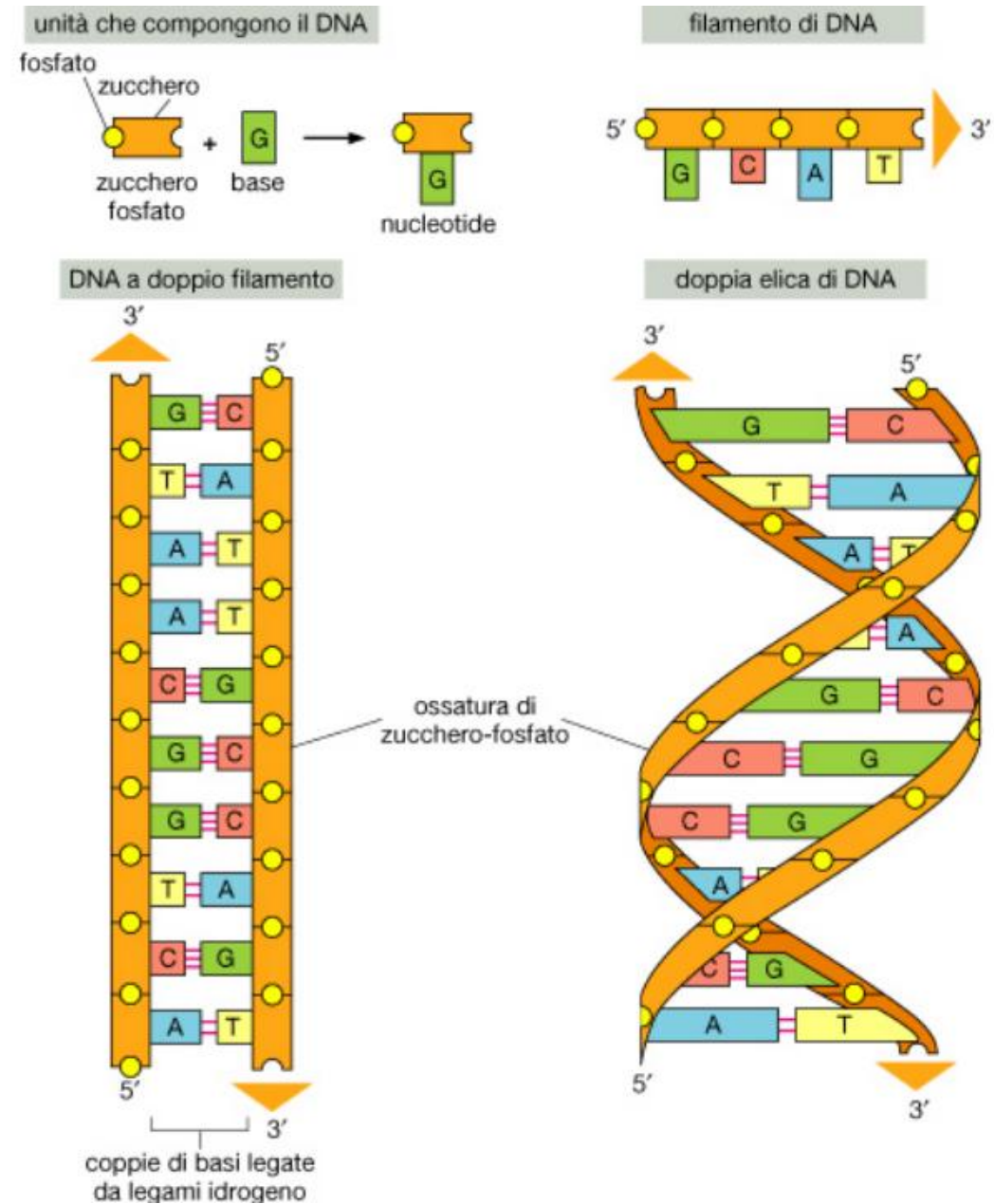


- I meccanismi che rendono possibile la vita **dipendono dalla struttura stessa del DNA.**

Doppio filamento

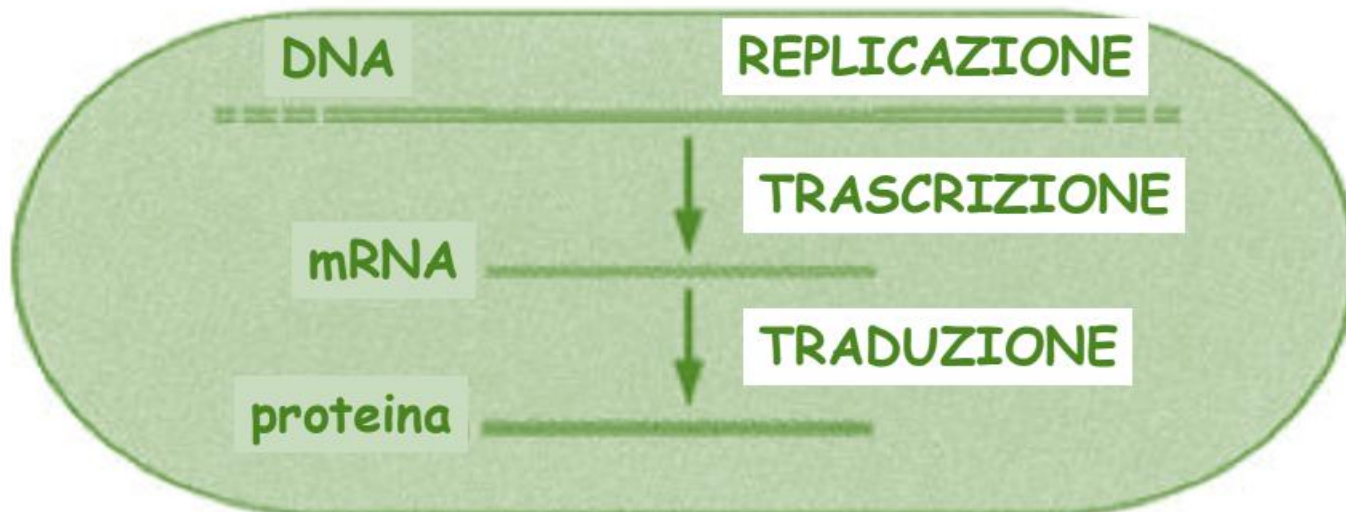
Nucleotide

Un singolo filamento è costituito da nucleotidi uniti da legami zucchero-fosfato. Le unità zucchero-fosfato sono asimmetriche e danno all'ossatura una direzionalità definita o polarità. Questa direzionalità guida i processi molecolari che permettono di «leggere» l'informazione.



- I legami tra le coppie di basi sono deboli in confronto ai legami zucchero-fosfato e questo permette ai due filamenti di DNA di separarsi senza che l'ossatura si rompa. **Ciascun filamento può servire da stampo per generare un nuovo filamento complementare a se stesso.**
- Ma le basi sono universali: il DNA è il depositario dell'informazione e la polimerizzazione su stampo è il modo in cui questa informazione è copiata in tutto il mondo vivente.

- Le cellule viventi conservano l'informazione ereditaria sotto forma di molecole di a doppio filamento di DNA- lunghe catene polimeriche accoppiate senza ramificazioni, formate dagli stessi quattro tipi di monomeri.
- I monomeri (nucleotidi) hanno nomi derivati da un alfabeto di 4 lettere: A,T,G,C e sono attaccati insieme in una lunga sequenza lineare che codifica l'informazione genetica.



L'INFORMAZIONE E' IN CODICE:
AD OGNI TRIPLETTA DI NUCLEOTIDI
CORRISPONDE UN AMMINOACIDO

Le molecole di DNA contengono le specifiche di migliaia di proteine

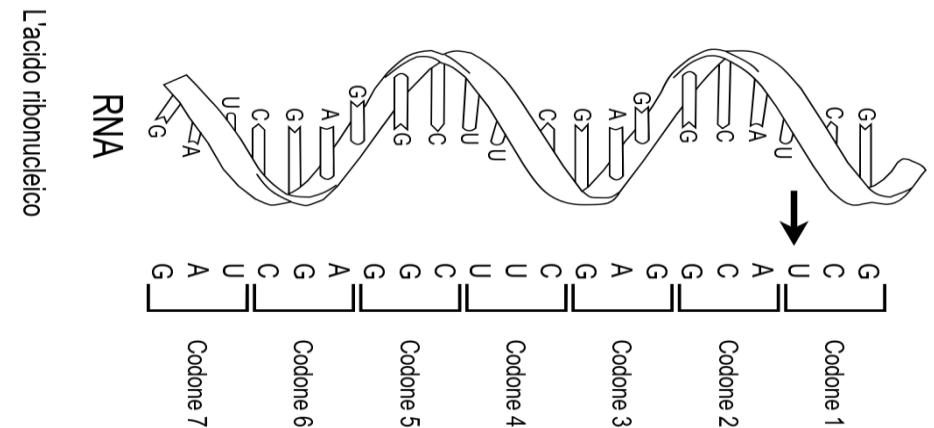
- Singoli segmenti del DNA sono trascritti in molecole di mRNA separate e ciascun segmento codifica per una proteina diversa.
- Ognuno di questi segmenti rappresenta un GENE
- Dallo stesso segmento di DNA (gene) possono derivare diverse molecole di RNA grazie a delle modifiche (si creano delle versioni di RNA alternative)

- Nel codice genetico:

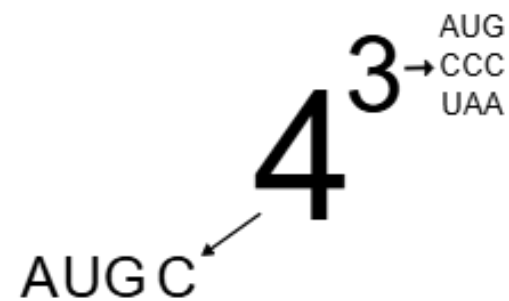
CODONE = SEQUENZA DI TRE NUCLEOTIDI

Il codice genetico è ridondante

- è costituito da triplette
- alcuni amminoacidi sono codificati da più triplette
- include 61 codoni per gli amminoacidi e tre codoni di stop (64 possibili combinazioni)
- è degenerato
- è universale



		seconda lettera					
		U	C	A	G		
prima lettera	U	UUU] fenilalanina	UCU]	UAU] tirosina	UGU] cisteina	U	terza lettera
		UUC]	UCC] serina	UAC]	UGC]	C	
		UUA] leucina	UCA]	UAA] fine STOP	UGA] fine STOP	A	
		UUG]	UCG]	UAG]	UGG] triptofano	G	
	C	CUU]	CCU]	CAU] istitina	CGU]	U	
		CUC] leucina	CCC] prolina	CAC]	CGC] arginina	C	
		CUA]	CCA]	CAA] glutamina	CGA]	A	
		CUG]	CCG]	CAG]	CGG]	G	
	A	AUU]	ACU]	AAU] asparagina	AGU] serina	U	
		AUC] isoleucina	ACC] treonina	AAC]	AGC]	C	
		AUA]	ACA]	AAA] lisina	AGA] arginina	A	
		AUG] START metionina *	ACG]	AAG]	AGG]	G	
	G	GUU]	GCU]	GAU] acido aspartico	GGU]	U	
		GUC] valina	GCC] alanina	GAC]	GGC] glicina	C	
		GUA]	GCA]	GAA] acido glutamico	GGA]	A	
		GUG]	GCG]	GAG]	GGG]	G	



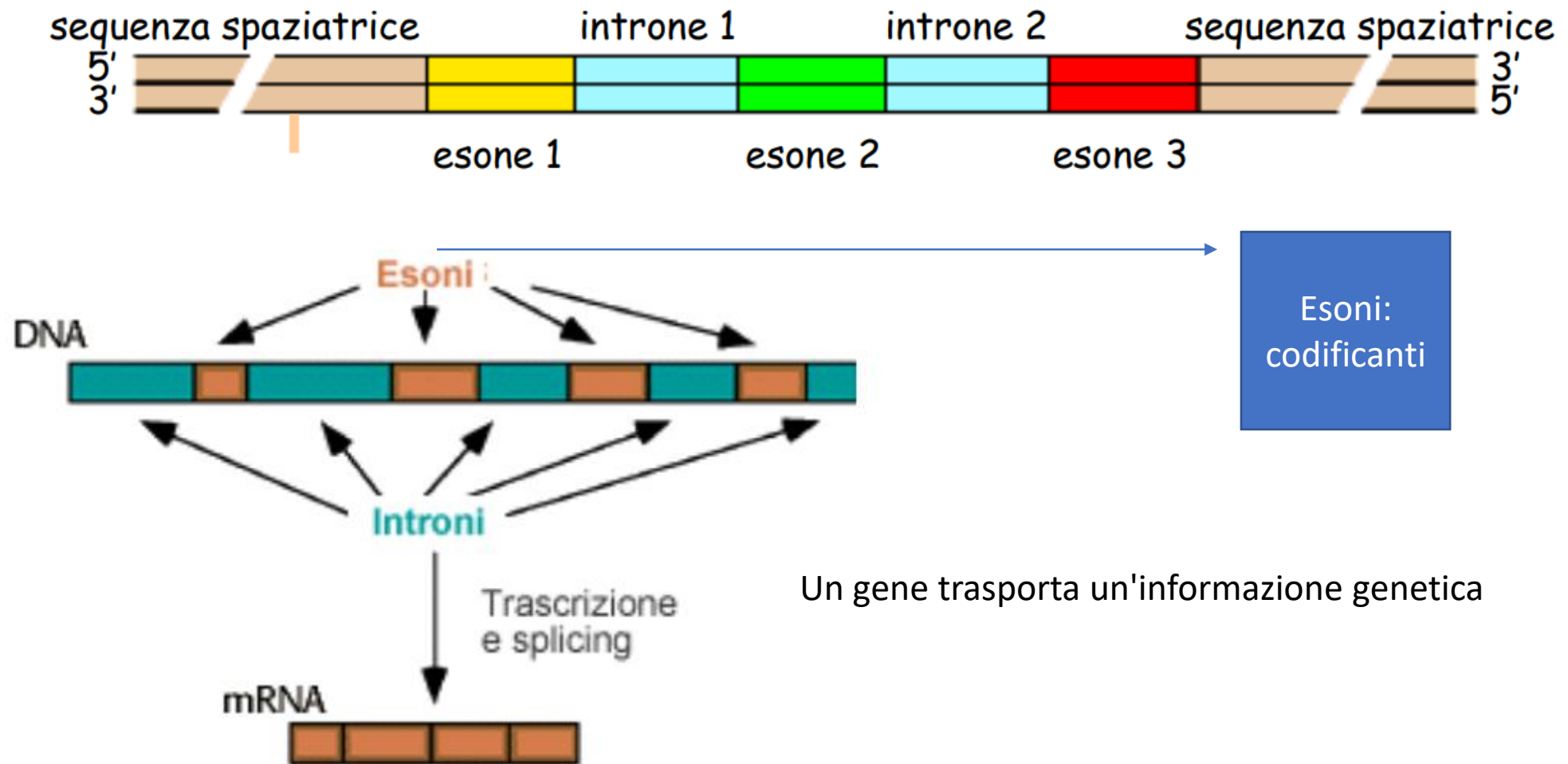
- | | |
|-------------------|-------------------|
| 1 - alanina | 11 - leucina |
| 2 - arginina | 12 - lisina |
| 3 - asparagina | 13 - metionina |
| 4 - ac. aspartico | 14 - fenilalanina |
| 5 - ac. glutamico | 15 - prolina |
| 6 - cisteina | 16 - serina |
| 7 - glicina | 17 - treonina |
| 8 - glutamina | 18 - tirosina |
| 9 - istidina | 19 - triptofano |
| 10 - isoleucina | 20 - valina |

Amminoacidi non polari (idrofobi)

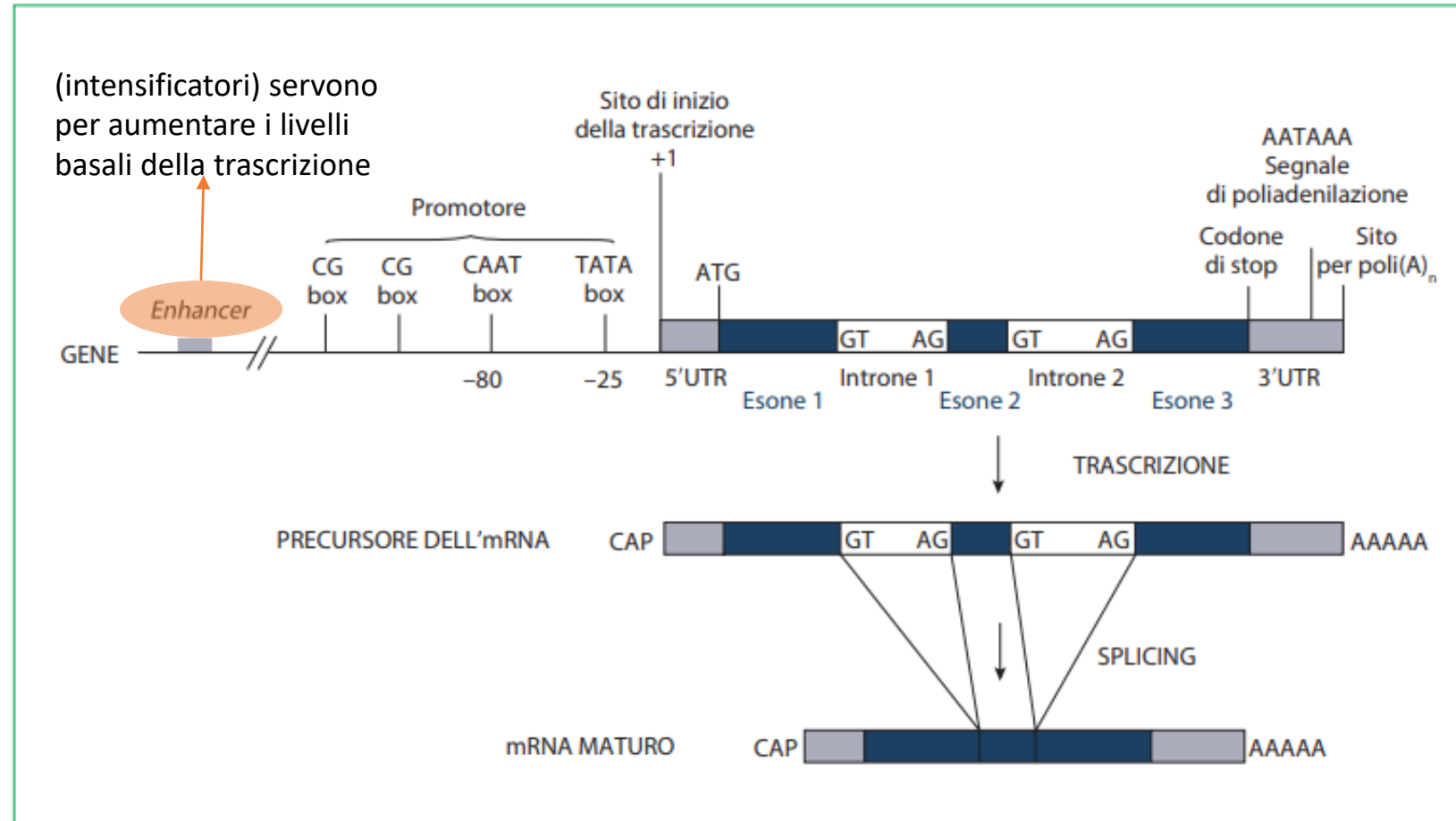
Amminoacidi polari (idrofil)

Amminoacidi ionici (molto idrofili)

Un gene è una sequenza nucleotidica di DNA che codifica la sequenza primaria di un prodotto genico finale, che può essere o un RNA strutturale o catalitico, oppure una proteina.



Struttura esoni-introni



(UnTranslated Region)

UTR: questa regione viene trascritta ma non tradotta - è importante per l'efficienza della traduzione in quanto facilita il legame dell'mRNA ai ribosomi

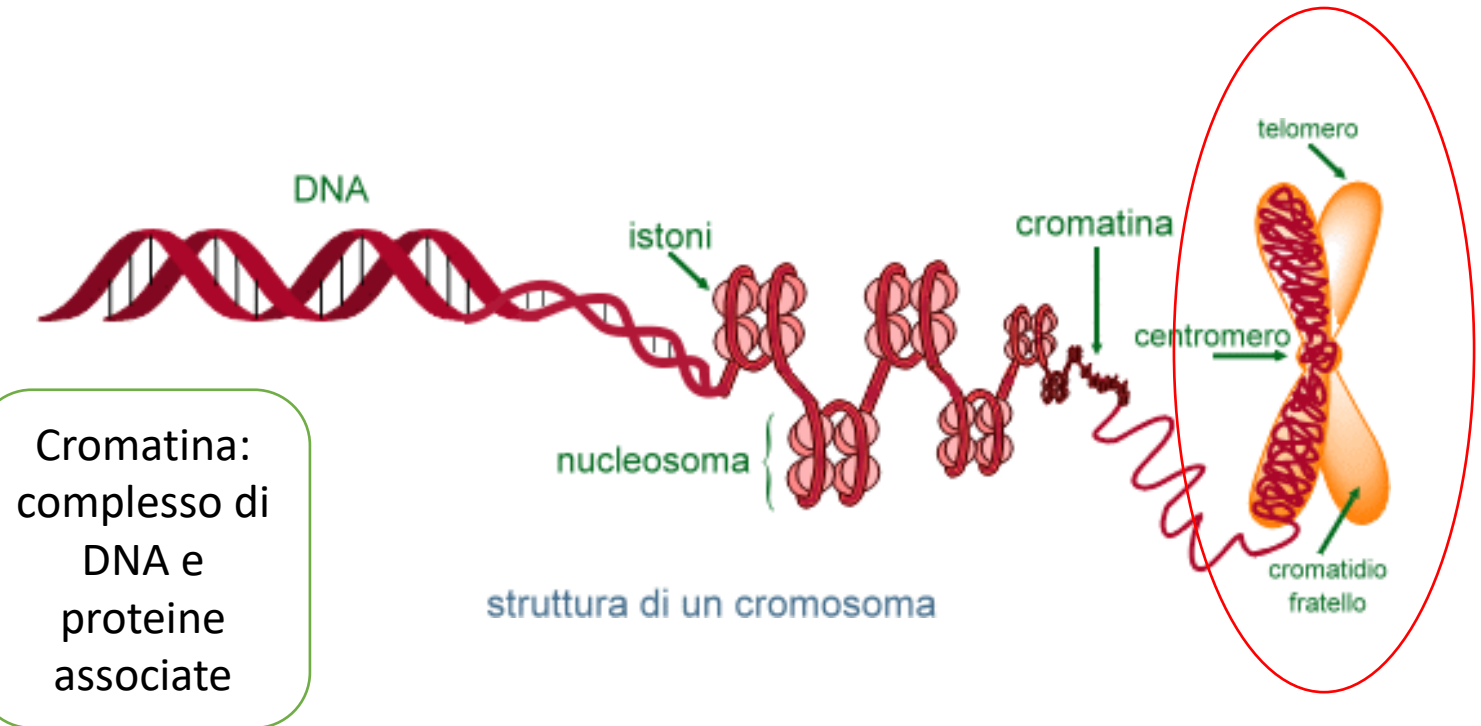
Quasi tutti gli introni cominciano con il dinucleotide GT (sito donatore di splicing) e terminano con AG (sito accettore di splicing)

GENOMA: l'intero insieme del materiale genetico di un organismo, che contiene le istruzioni per le sue caratteristiche e funzioni

Il DNA cromosomico e il suo compattamento nella fibra di cromatina

- La funzione più importante del DNA è quella di portare l'informazione
- Il DNA nucleare negli eucarioti è diviso in cromosomi

CROMOSOMA: singola molecole di DNA estremamente lunga associata a proteine che ripiegano e impacchettano il sottile filamento di DNA in una struttura più compatta.



Cromatina:
complesso di
DNA e
proteine
associate

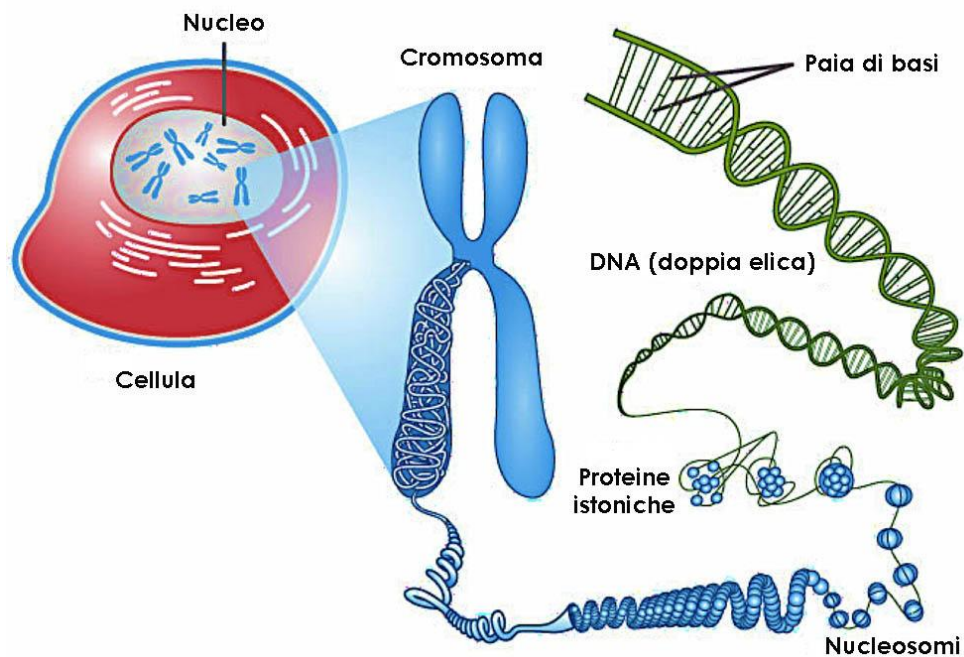
I genomi eucariotici sono grandi

- Gli eucarioti hanno più geni dei procarioti.

MA:

L'informazione genetica è ibrida. In virtù della teoria endosimbiontica, dobbiamo distinguere l'informazione contenuta nel nucleo (DNA nucleare) da quella contenuta nei mitocondri e cloroplasti.

In una cellula umana, il genoma mitocondriale consiste soltanto di 16 569 coppie di nucleotidi e codifica per 13 proteine, due rRNA e 22 tRNA. Molti geni contenuti nei mitocondri si sono spostati nel DNA nucleare, che infatti contiene molti geni che svolgono funzioni essenziali all'interno del mitocondrio.



I cromosomi contengono lunghe stringhe di geni, che sono le unità funzionali dell'ereditarietà.

Il genoma è organizzato in cromosomi: ogni specie ha il suo numero di cromosomi.

TUTTAVIA:

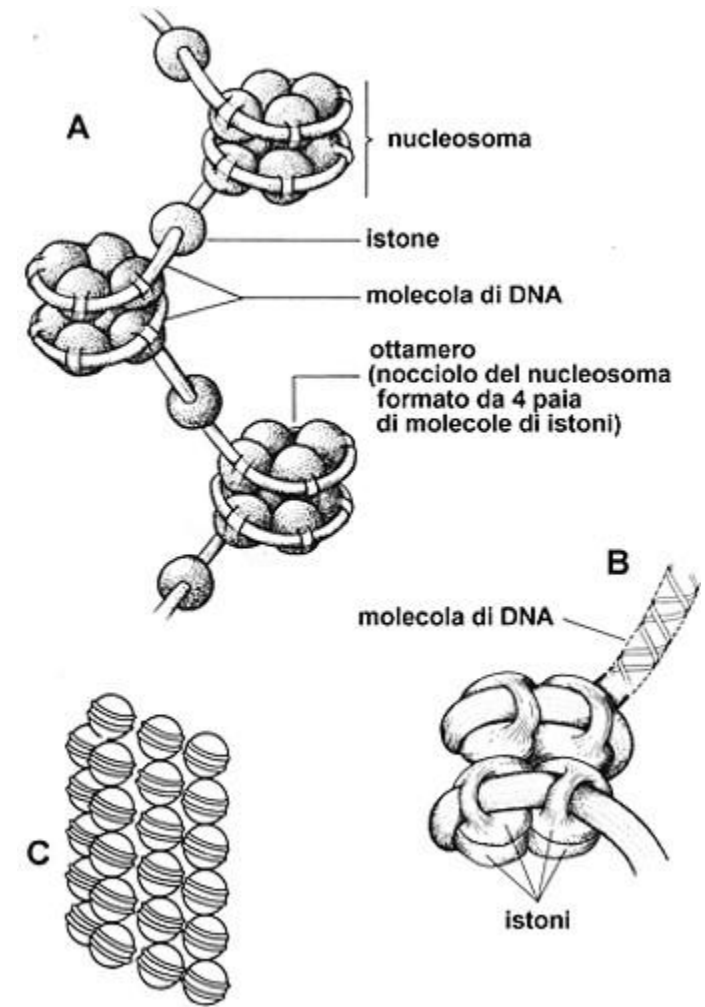
I genomi contengono anche molto DNA non codificante

SPECIE	N° DI CROMOSOMI	N° DI GENI	PAIA DI BASI (bp)	DENSITÀ DI GENI
Uomo	46 (23 paia)	30-35.000	~3,1 miliardi	1/50.000 bp
Topo	40	23-30.000	~2,7 miliardi	1/50.000 bp
<i>F. rubripes</i> (pesce)	44	30-31.000	365 milioni	1/10.000 bp
<i>D. melanogaster</i> (moscerino)	8	~14.000	137 milioni	1/13.000 bp
<i>A. thaliana</i> (pianta)	10	~25.000	120 milioni	1/5000 bp
<i>C. elegans</i> (nematode)	12	19.000	97 milioni	1/5000 bp
<i>A. gambiae</i> (zanzara)	6	~14.000	289 milioni	1/10.000 bp
<i>Plasmodium falciparum</i>	14	5300	23 milioni	1/4000 bp
<i>S. cerevisiae</i> (lievito)	32	6200	12 milioni	1/2000 bp
<i>E. coli</i> (batterio)	1 circolare	5000	4,1 milioni	1/800 bp

- *Il compattamento dei cromosomi è dinamico:* è compiuto in modo da permettere un rapido accesso secondo necessità al DNA.
- L'unità base della struttura dei cromosomi eucariotici è il nucleosoma, cioè un complesso di DNA e proteine che rappresenta il primo livello di compattazione.

Il compattamento è essenziale per vari motivi:

- contenimento nel ristretto spazio cellulare
- protezione da possibili danni
- maggiore stabilità per una corretta espressione dell'informazione
- efficiente trasmissione alle cellule figlie
- organizzazione strutturale di ordine superiore, che facilita l'espressione genica e la
- ricombinazione omologa, che genera la diversità individuale.

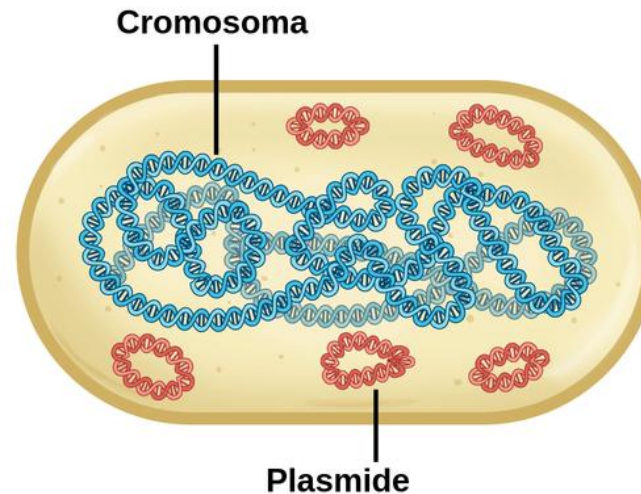


I cromosomi sono associati a:

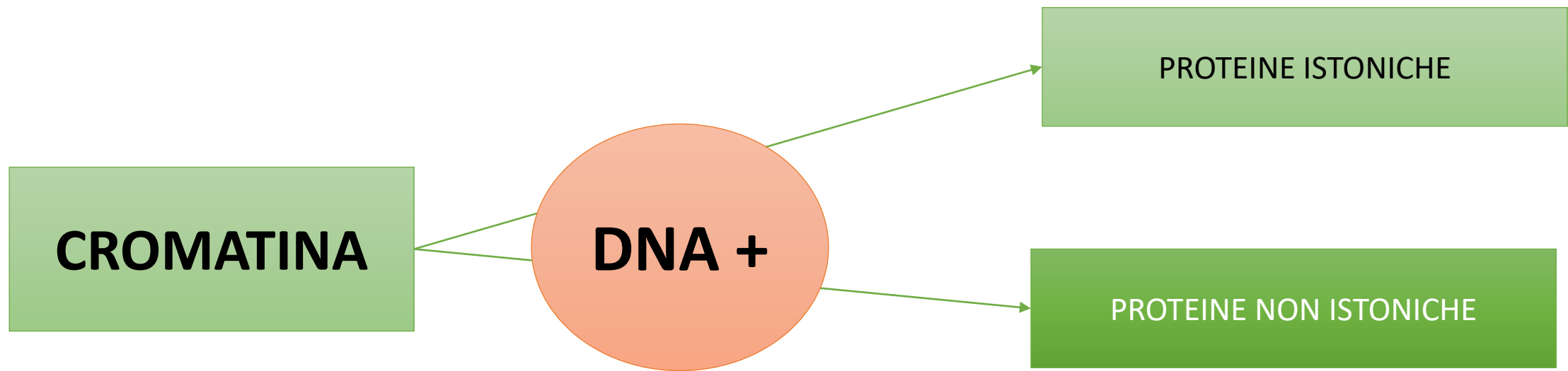
- Proteine coinvolte nel compattamento
- Proteine necessarie per i processi di replicazione, espressione genica e riparazione.

Il complesso DNA-proteine prende il nome di *cromatina*

CONFRONTIAMO COI BATTERI:



I batteri non dispongono di un compartimento nucleare specializzato, dunque portano i geni su una singola molecola di DNA che di solito è circolare. Il DNA può essere associato a proteine che compattano e condensano il materiale ma è un discorso DIVERSO!!!!

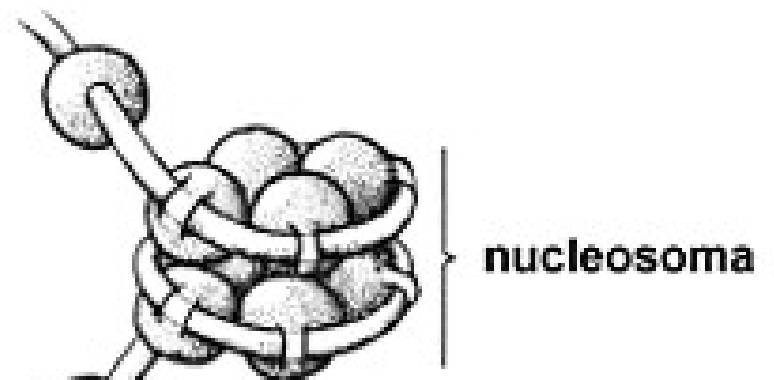


Gli istoni sono responsabili del primo livello di base dell'organizzazione cromosomica: **IL NUCLEOSOMA**

Il nucleosoma è una struttura a forma di sferetta che impacchetta il DNA in una cellula eucariote.

Consiste di un nucleo formato da quattro coppie di istoni, attorno al quale si avvolgono due spire di doppia elica di DNA della lunghezza, variabile da specie a specie, di 166-250 paia di basi.

L'avvolgimento attorno al nucleo del nucleosoma contribuisce al compattamento della molecola del DNA e quindi ne diminuisce l'ingombro in lunghezza.



Istoni

- Ciascuna particella centrale del nucleosoma consiste di un complesso di 8 proteine istoniche:

➤ 2 H2A

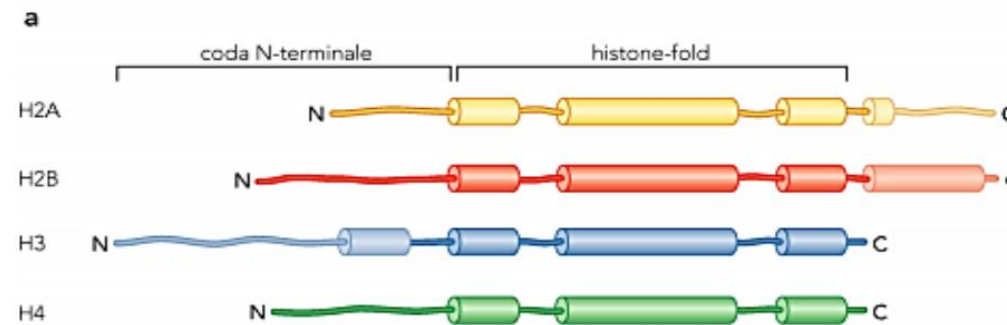
➤ 2 H2B

➤ 2 H3

➤ 2 H4

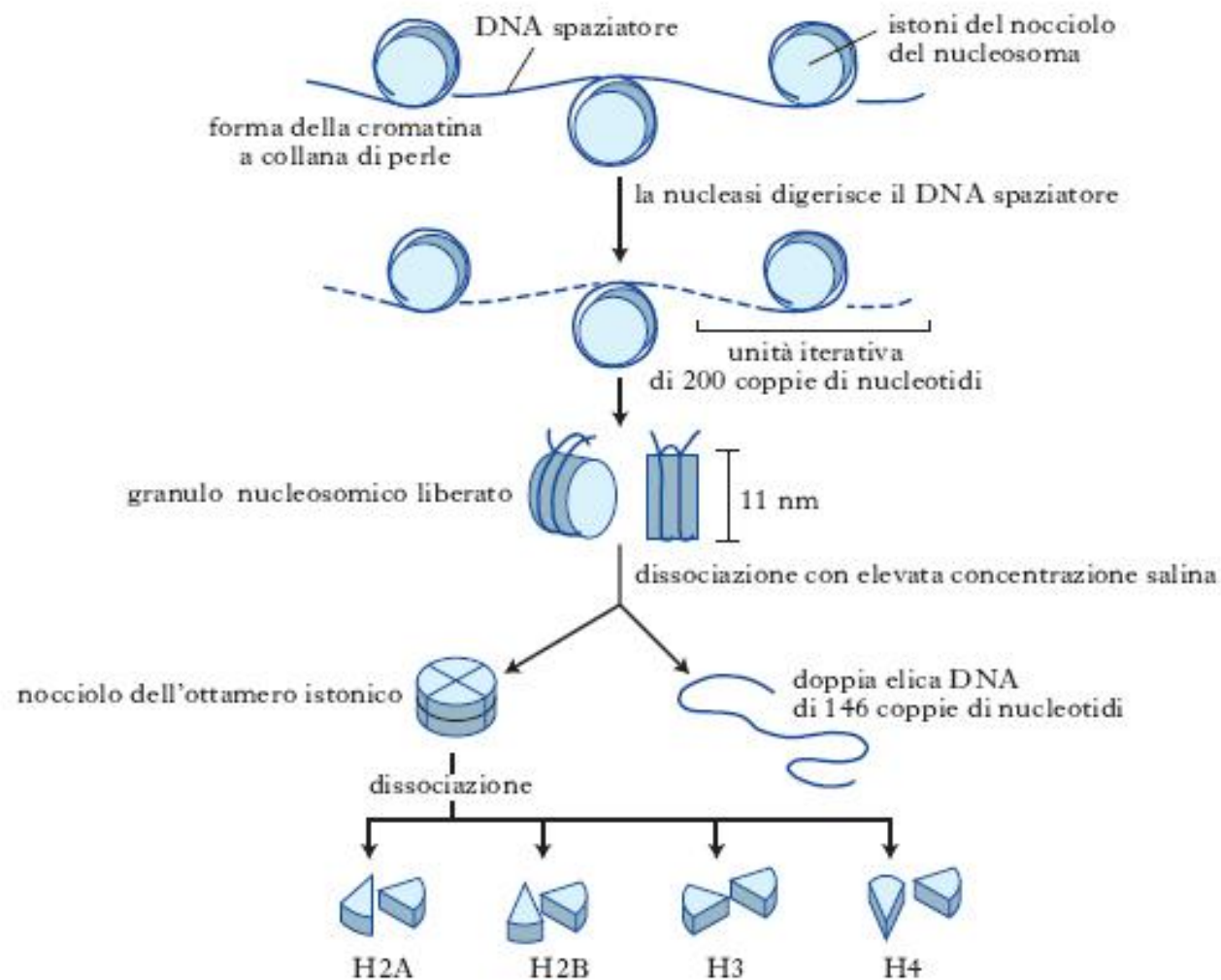
- Si forma cioè un OTTAMERO (nucleo proteico) attorno al quale si avvolge il DNA doppio filamento.

L'istone H1 è invece definito come istone linker: una singola molecola di H1 si lega a ciascun nucleosoma, entrando in contatto col DNA e con le proteine. Partecipa al compattamento del DNA



Ciascun istone contiene una coda N-terminale, che è soggetta a diverse modifiche in grado di controllare la struttura della cromatina e una regione di ripiegamento istonico.

Alta % di aminoacidi basici, Lys e Arg: facilitano il legame alla molecola di DNA carica negativamente

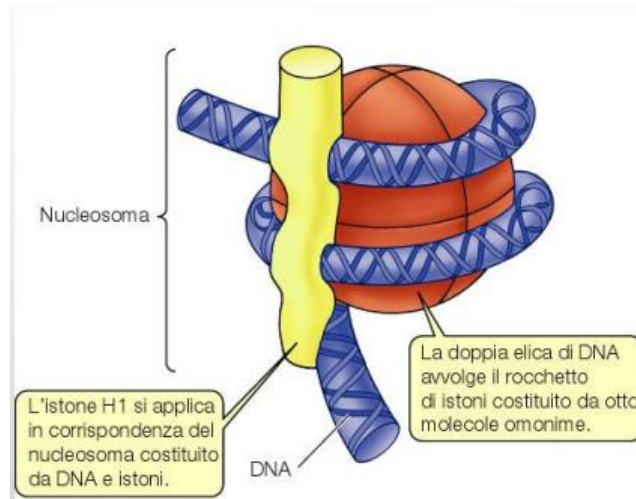
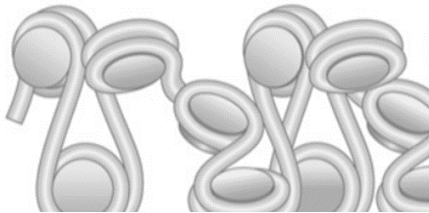


Il DNA si estende come un filo continuo che si ripiega per avvolgere gruppi di istoni, determinando l'aspetto a collana di perle che ha la cromatina al microscopio elettronico. Le perle della collana costituiscono i nucleosomi, che possono essere separati l'uno dall'altro mediante digestione con enzimi (**nucleasi**) che degradano solo il DNA non protetto. I complessi DNA-istoni che si ottengono dopo la digestione enzimatica sono particelle discoidali che contengono 8 molecole di istoni disposte in coppia e chiamate H2A, H2B, H3, H4

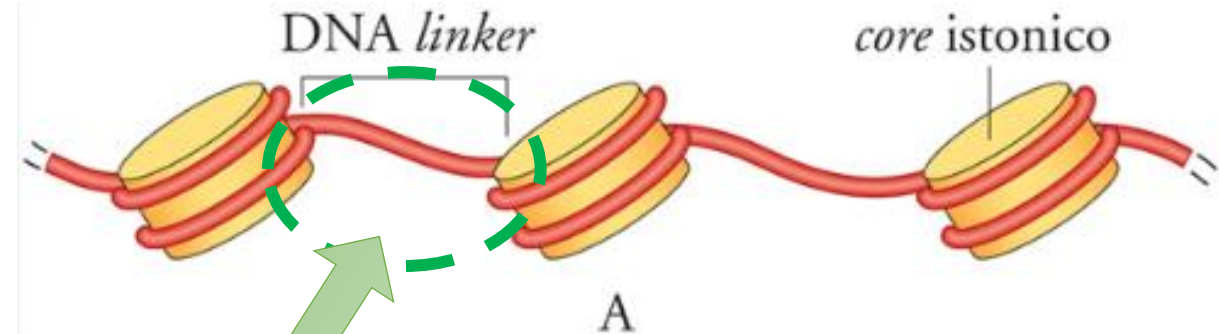
Nucleosoma

- Contiene un nucleo proteico composto da 8 molecole di istoni
- Il DNA è avvolto intorno al nucleo
- Ciascuna particella centrale è separata dalla successiva da una porzione di DNA linker
- I nucleosomi si ripetono a intervalli di 200 coppie di nucleotidi
- I nucleosomi a loro volta si compattano generando schiere regolari in cui il DNA risulta più condensato.
- Si forma una fibra da 30 nm che rappresenta il 2° livello di compattazione.

zig-zag



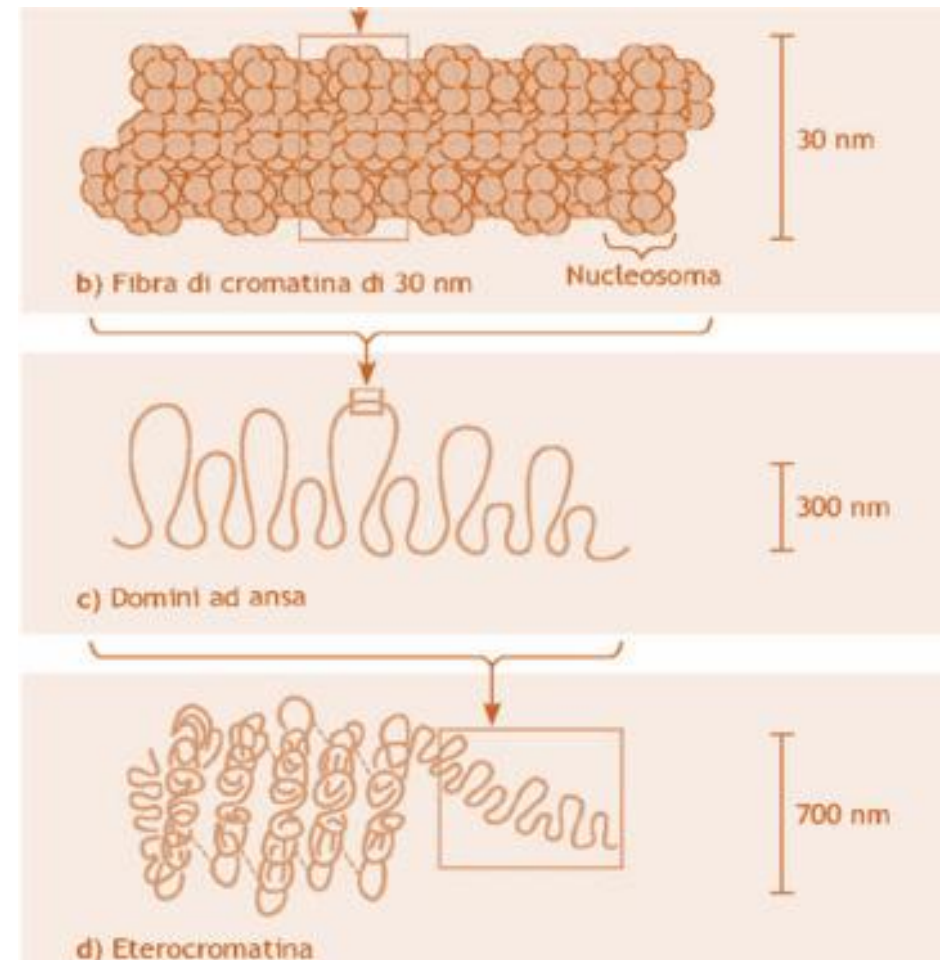
Il DNA è avvolto attorno a un ottamero costituito da 2 copie ciascuno degli istoni H2A, H2B, H3 e H4

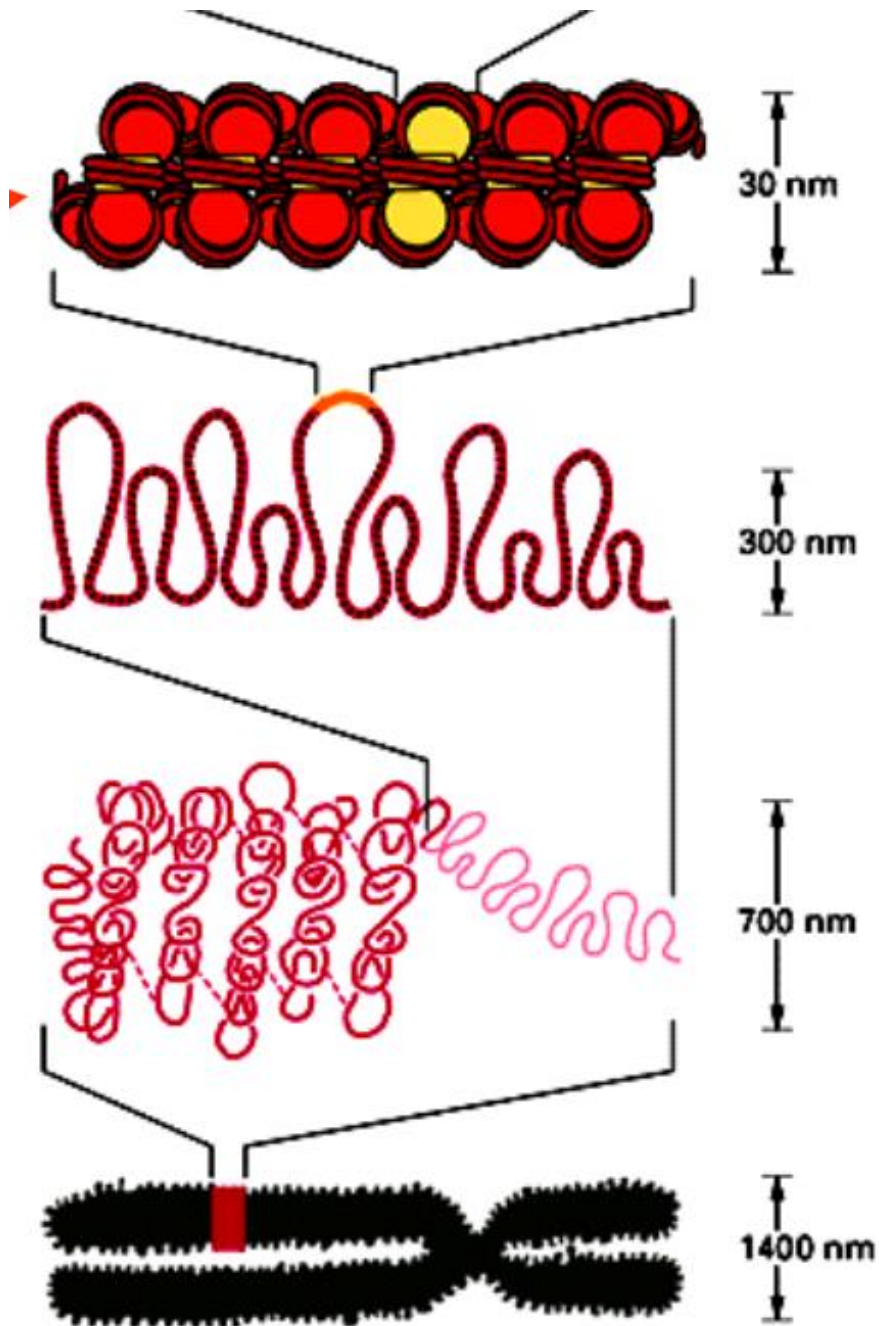


L'enzima nucleasi digerisce il DNA linker rilasciando il nucleo proteico

Le fibre di cromatina si ripiegano in anse

- La fibra da 30 nm forma delle anse (35-85 Kb) ancorate a una
L'avvolgimento del DNA intorno agli istoni creerebbe una tensione tale da premettere il superavvolgimento.





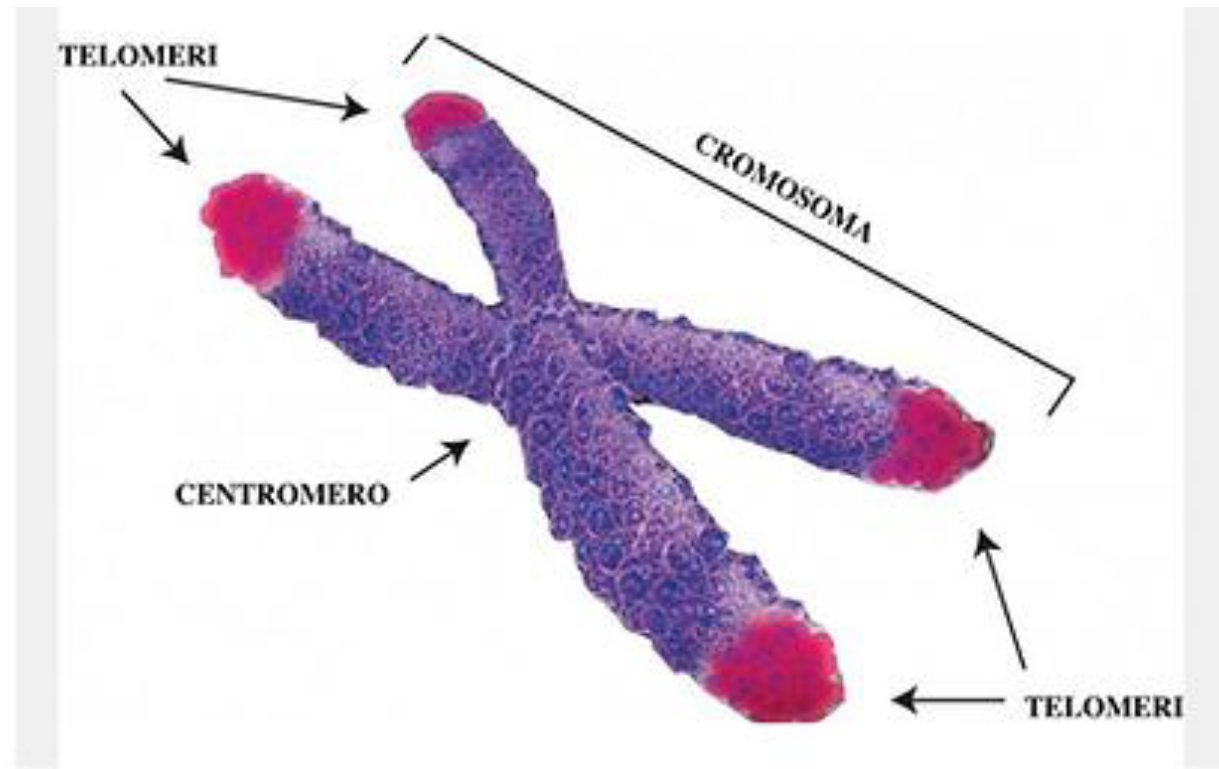
- Nonostante il grado di compattamento della cromatina, la sua struttura deve essere altamente dinamica per permettere alla cellula di accedere al DNA.
- La strategia per cambiare reversibilmente strutture locali di cromatina utilizza complessi di rimodellamento della cromatina spinti da ATP.

FIBRE DI CROMATINA RIPIEGATA IN ANSE

La cromatina si compatta in unità strutturali distinte, dette cromosomi organizzazione superelicoideale del DNA

CROMOSOMA MITOTICO INTERO

Il cromosoma deve possedere:

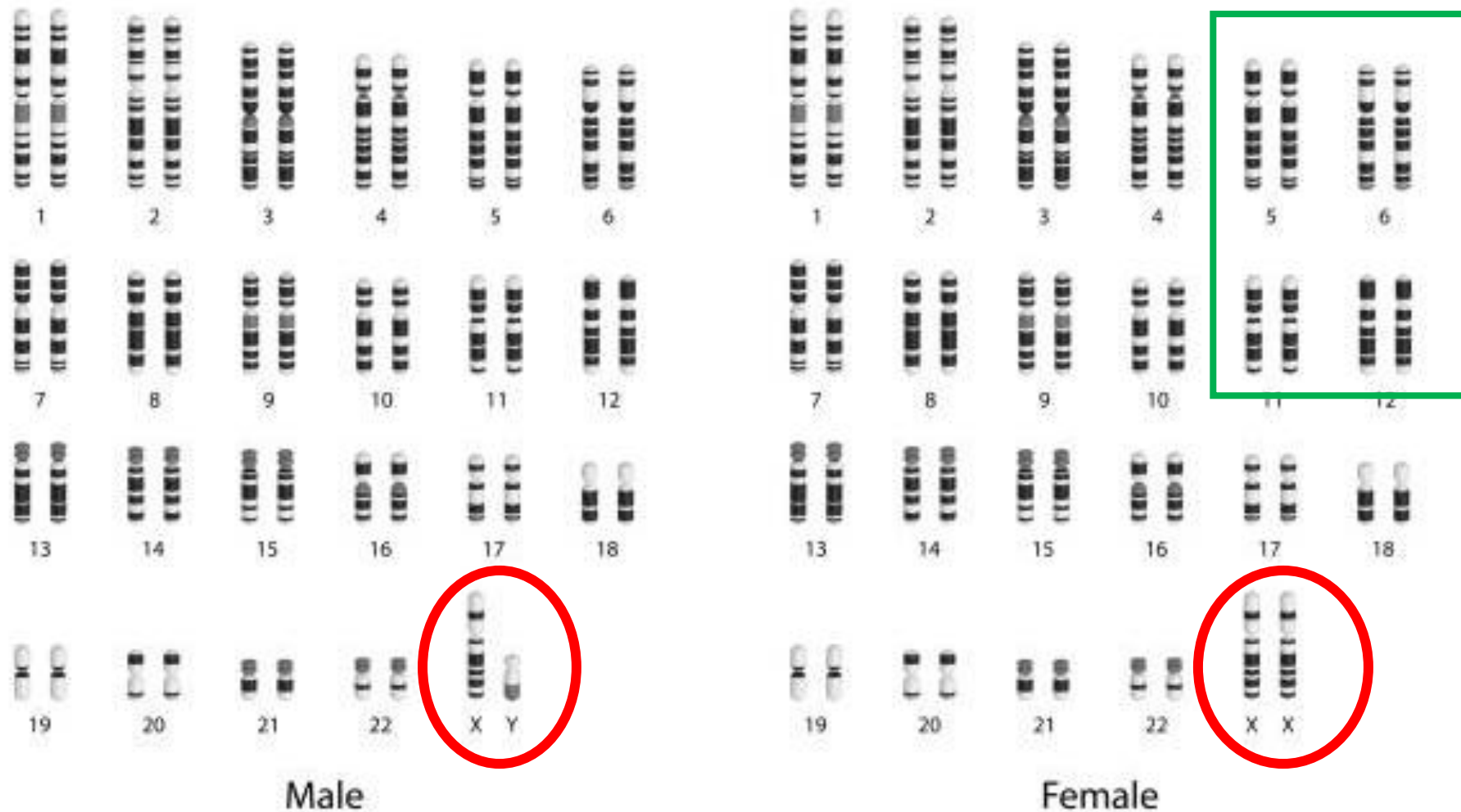


CENTROMERO

TELOMERI

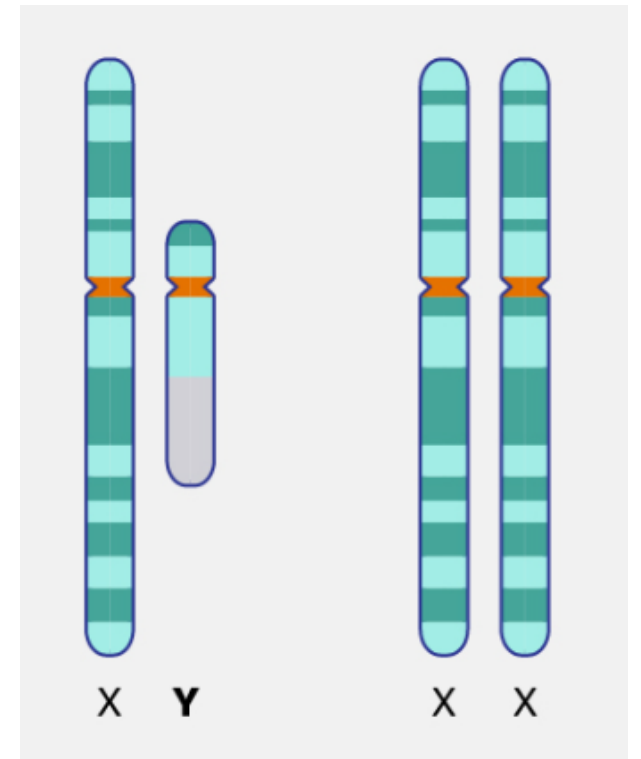
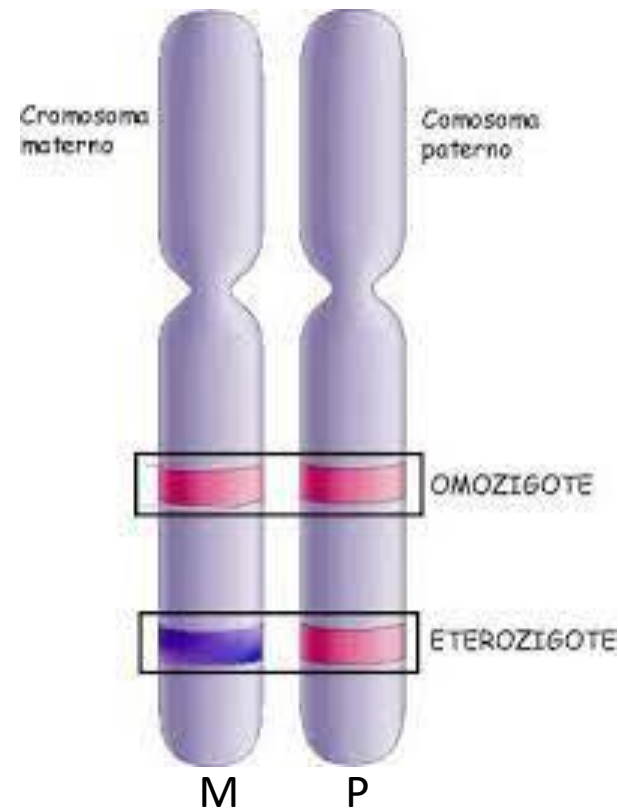
ORIGINI DI
REPLICAZIONE

L'immagine di 46 cromosomi umani durante la mitosi è detta **CARIOTIPO**
(23 coppie: 22+1)



Schemi di
bandeggio dei
cromosomi
ottenuti con il
colorante Giemsa

- Ciascuna cellula umana contiene **2 copie di ciascun cromosoma**, una ereditata dalla madre, una ereditata dal padre
- I cromosomi paterno e materno di una coppia sono definiti omologhi. L'unica coppia di cromosomi non omologhi è composta dai cromosomi sessuali nei maschi, in cui un cromosoma Y è ereditato dal padre e un X dalla madre.
- Ciascuna cellula umana contiene un totale di **46 cromosomi**: 22 coppie comuni a maschi e femmine e una coppia di cromosomi sessuali (23: 22+1).
- I cromosomi umani possono essere distinti grazie a tecniche di ibridazione che si basano sull'uso di sonde di riconoscimento

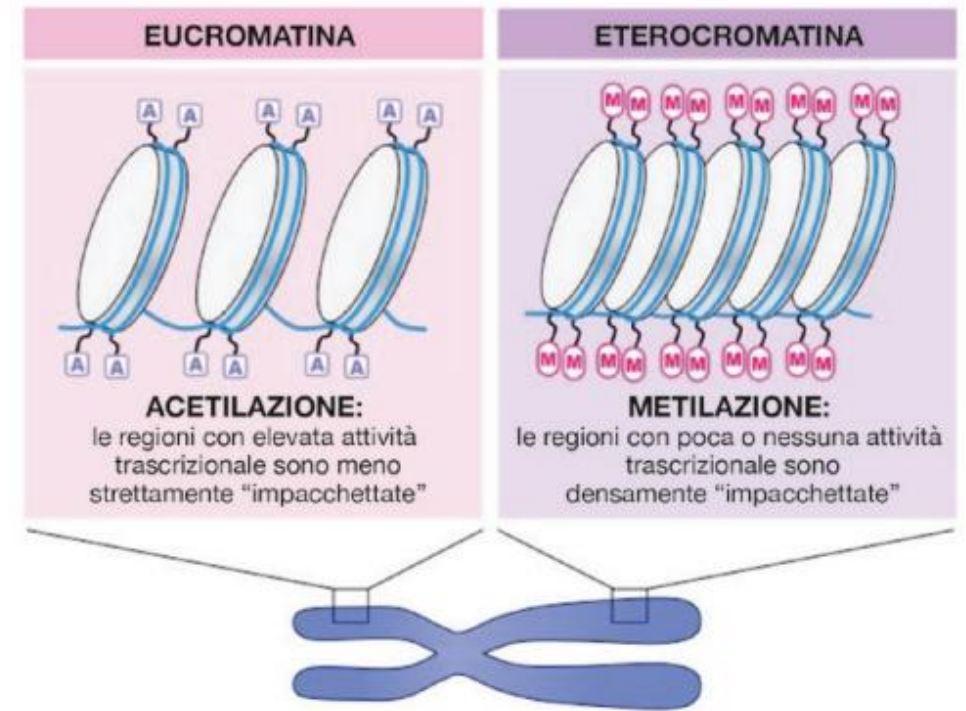


- I cromosomi sono costituiti da cromatina, che consiste di fibre contenenti DNA e proteine. Quando una cellula non è in divisione, la cromatina si trova sotto forma di lunghi filamenti. Durante la divisione le fibre di cromatina si condensano e si rendono visibili come strutture distinte.

L'**euromatina** e l'**eterocromatina** sono due forme di cromatina, il complesso di DNA e proteine nel nucleo delle cellule eucariotiche, che si distinguono per il grado di condensazione e l'attività trascrizionale.

L'euromatina è meno condensata, trascrizionalmente attiva e permette l'espressione genica.

L'eterocromatina è altamente condensata, trascrizionalmente inattiva e blocca l'accesso ai fattori di trascrizione. Esistono due tipi di eterocromatina: costitutiva (sempre inattiva, es. centromeri e telomeri) e facoltativa (inattiva in modo reversibile, come il **cromosoma X inattivato nelle femmine dei mammiferi**)



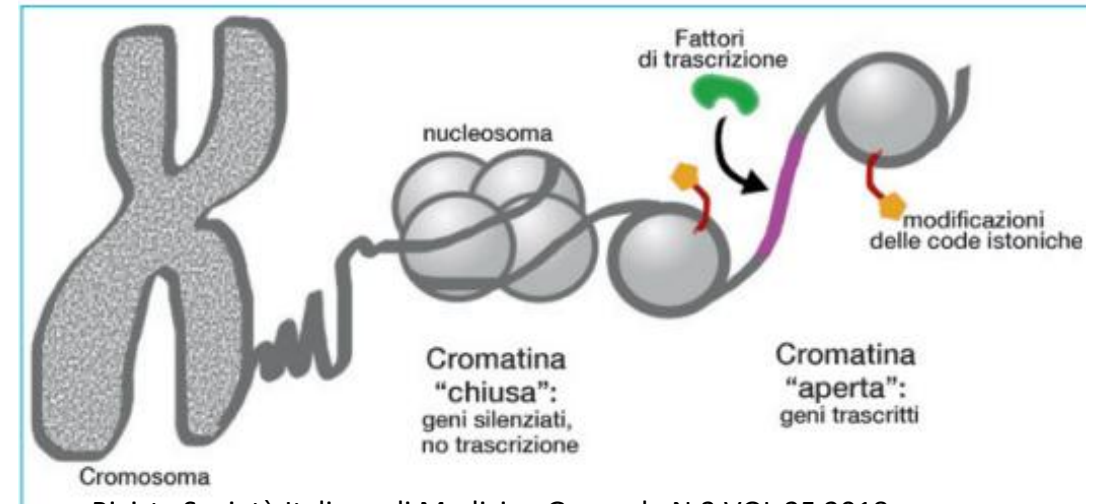
Meccanismi di regolazione epigenetica

- **Metilazione del DNA**

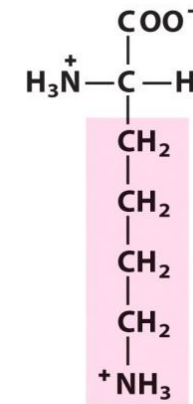
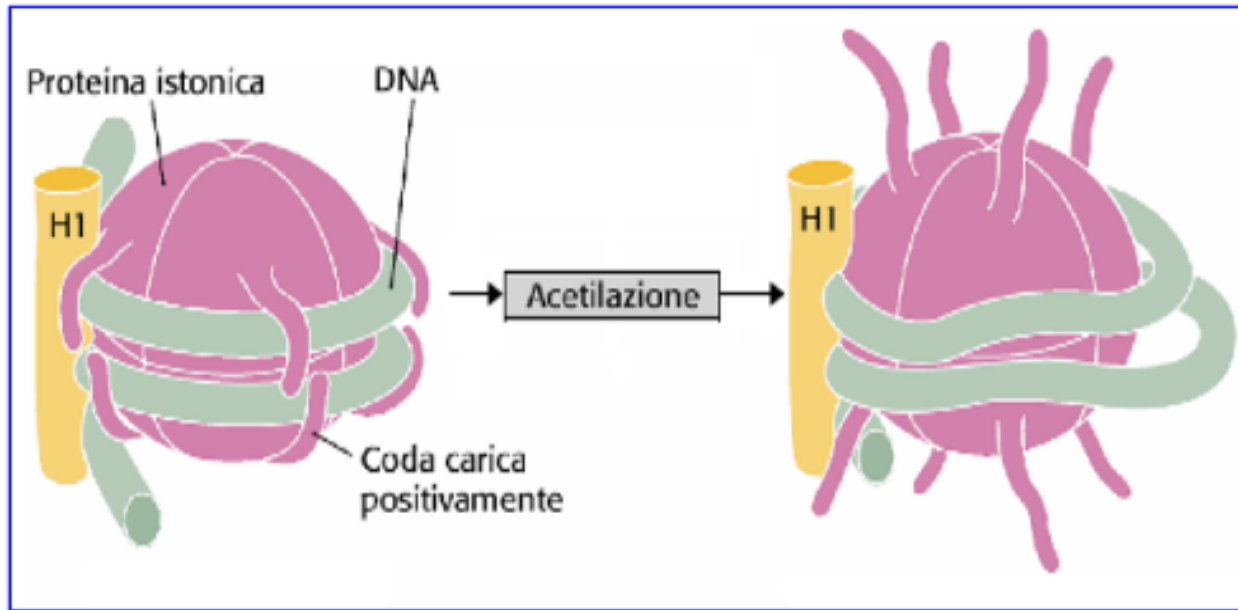
aggiunta di un gruppo metile al carbonio 5 della citosina a dare la 5-metilcitosina, una base azotata modificata, che conserva la caratteristica di appaiarsi con la guanina. In generale, il significato della metilazione delle citosine dei promotori dei geni è quello di silenziarli, inibendo la trascrizione. La metilazione del DNA è maggiormente presente nelle zone di cromatina condensata (*eterocromatina*), normalmente non trascritta.

- **Modifiche delle code istoniche**

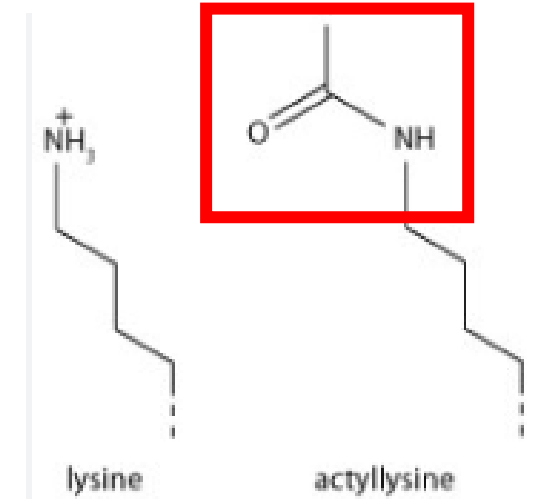
Gli istoni, proteine basiche che, in ottameri, costituiscono i nucleosomi attorno ai quali il DNA è avvolto, possiedono delle code che protrudono oltre la struttura globulare del nucleosoma. Modificazioni come l'acetilazione e la metilazione delle code, in residui amminoacidici specifici di specifici istoni, hanno significato attivante o inibente la trascrizione.



Rivista Società Italiana di Medicina Generale N.3 VOL.25 2018



Lysine



In genere, la cromatina trascrizionalmente attiva è caratterizzata da un alto livello di acetilazione degli istoni H3 e H4 a livello dei residui di lisina delle code N-terminali.

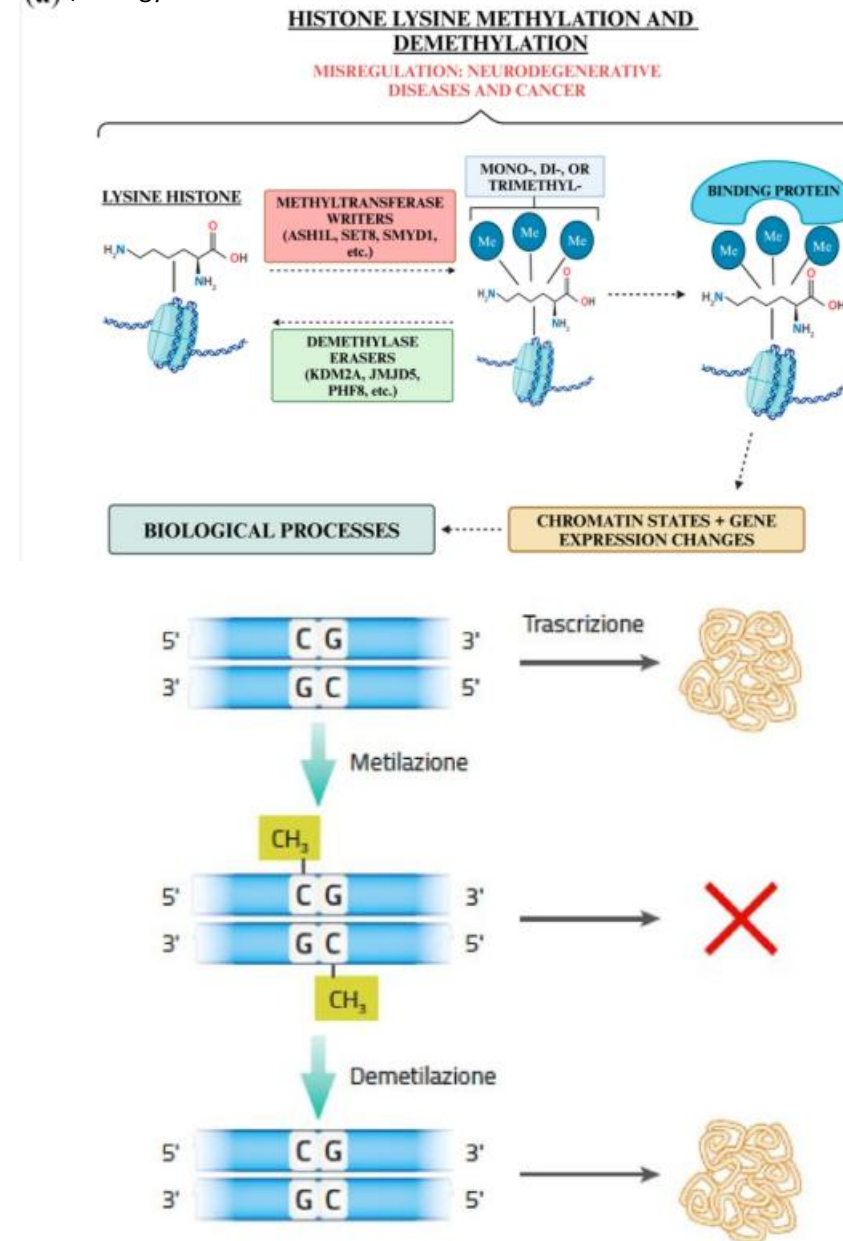
L'acetilazione della lisina o dell'arginina, che tende ad allentare la struttura della cromatina perché **rimuove la carica positiva di questo amminoacido** (conseguentemente il DNA, carico negativamente, aderirà meno strettamente agli istoni) avviene per opera dell'istone acetil-transferasi (HAT, histone acetyl transferase). La loro deacetilazione è eseguita dalle deacetilasi (HDAC).

La metilazione del residuo di lisina in posizione 4 dell'istone H3 (H3-K4) è tipicamente presente nella cromatina attiva, mentre la metilazione del residuo di lisina in posizione 9 (H3-K9) è tipica della cromatina compatta e inattiva.

La **modificazione epigenetica più studiata riguarda lo stesso DNA e consiste nella metilazione delle citosine, tipica delle regioni non trascritte e dei promotori di geni trascrizionalmente inattivi (silenziati)**. Specifiche DNA metiltransferasi (DNMT) sono in grado di aggiungere un gruppo metile in posizione 5' dell'anello pirimidinico della citosina, a patto che questa sia seguita da una guanina, ovvero che faccia parte di un dinucleotide CG che viene indicato come CpG.

Le proteine che riconoscono e si legano al DNA metilato sono le proteine **MBD** (Methyl-Binding Proteins), che includono ad esempio MECP2, MBD1, MBD2 e MBD4. Queste proteine si legano ai dinucleotidi CpG metilati e **reclutano altre attività enzimatiche che modificano la struttura della cromatina, chiudendola e rendendo il gene inaccessibile**.

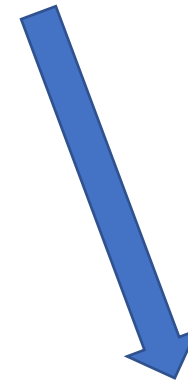
*metiltransferasi (HMT, Histone MethylTransferase)



Nelle cellule dei mammiferi, un cromosoma X viene inattivato nelle femmine (XX) attraverso un processo chiamato inattivazione del cromosoma X, che avviene precocemente durante lo sviluppo embrionale. Questo processo, casuale e permanente nella maggior parte delle cellule somatiche, crea un mosaico genetico dove cellule diverse hanno un X diverso attivo, compensando così il diverso numero di cromosomi X tra i sessi e prevenendo un eccesso di geni del X. **Il cromosoma inattivato si condensa in una struttura chiamata corpo di Barr.**

Il corpo di Barr si forma all'interno delle sole cellule somatiche, e **non nei gameti** dove invece c'è un solo cromosoma sessuale.

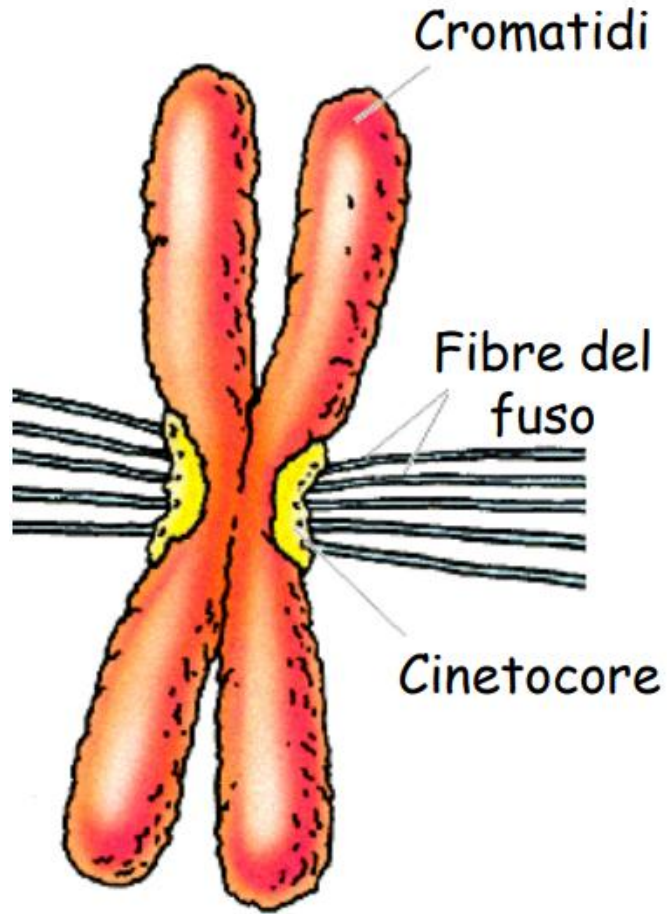
Questo DNA inattivato è composto da *eterocromatina facoltativa*, non accessibile per la trascrizione, e con un alto grado di condensazione dovuto alla presenza di particolari proteine. Tra queste **gli istoni**, proteine basiche che nel caso della cromatina compatta risultano ipoacetilati. Si dice facoltativa in quanto il cromosoma X si inattiva solo dopo una determinata fase dello sviluppo.



VI RISUONA?

conformazione aperta (attiva) o
compatta (inattiva)

Cromosoma umano



Quando posso vedere i cromosomi compattati in questo modo?



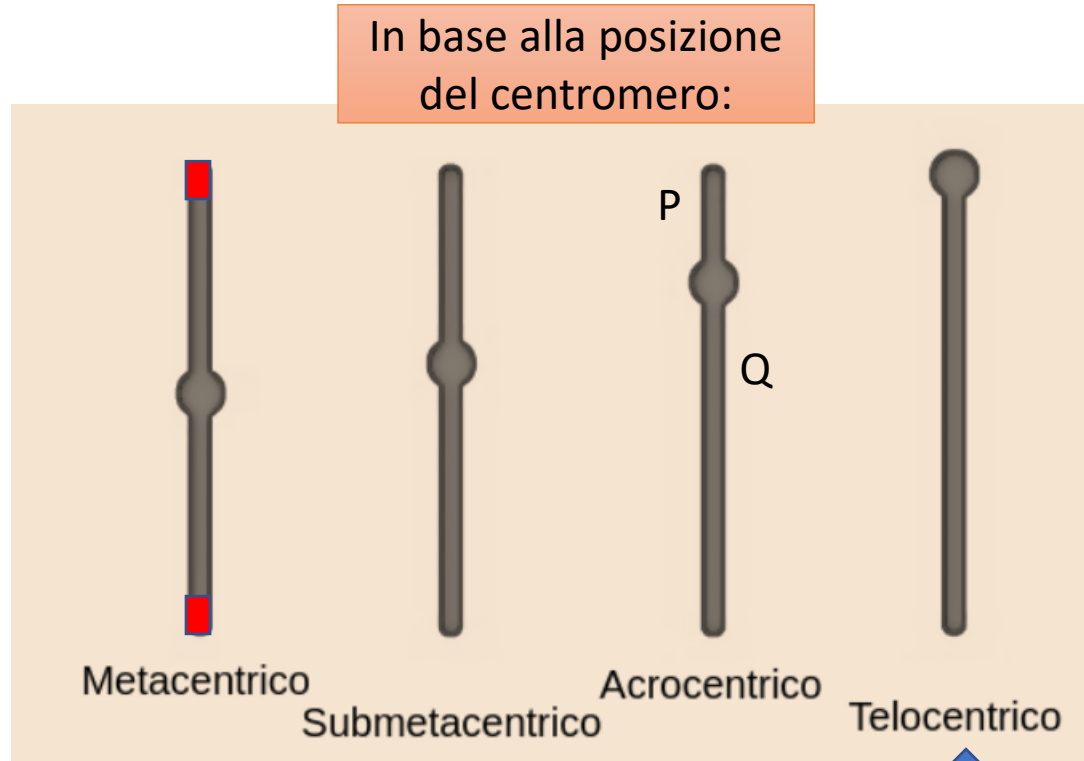
Quando il DNA è nel massimo della sua compattazione



Nella metafase (UNA FASE DEL CICLO CELLULARE)

La mitosi è la divisione di un nucleo cellulare in due nuclei figli geneticamente identici, a meno che non siano intervenute mutazioni. Osservando al microscopio ottico è possibile distinguere le diverse fasi della mitosi: profase, metafase, anafase, telofase. Mitoi e citodieresi costituiscono la cosiddetta fase mitotica del ciclo cellulare.

Ogni cromosoma in metafase consiste di due cromatidi fratelli, legati al centromero. Il telomero fa riferimento alle sequenze di ripetizione specializzate del DNA localizzate all'estremità dei cromosomi. Il centromero divide un cromosoma in un braccio corto (p; petit) e un braccio lungo (q; queque).



CENTROMERO: È costituito da DNA altamente ripetuto rappresentato da una serie di ripetizioni in tandem di DNA alfa satellite quindi fortemente eterocromatico.

TELOMERO: Il telomero è la regione terminale del cromosoma, composta di DNA altamente ripetuto, che non codifica. Ha un ruolo determinante nell'evitare la perdita di informazioni durante la duplicazione dei cromosomi.

Nell'uomo, la sequenza ripetuta nei telomeri è composta di sei nucleotidi 5'-TTAGGG-3'

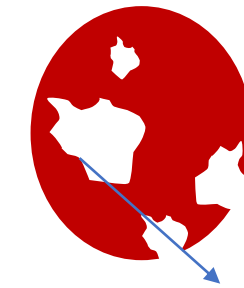
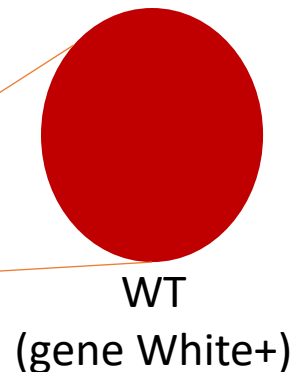
↑
Gli esseri umani non possiedono questo tipo di cromosoma.

Ereditarietà epigenetica

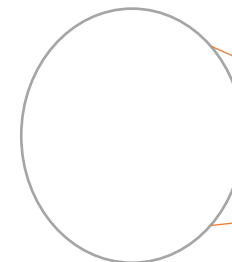
- Alcuni tipi di struttura della cromatina possono essere ereditati; la struttura può essere trasmessa direttamente da una cellula ai suoi discendenti.
- Quindi, la memoria cellulare che ne risulta si basa **sulla struttura ereditata dalla cromatina** e non sul cambiamento della sequenza del DNA.

Variegatura da effetto di posizione

- Il fenomeno della variegatura da effetto di posizione fornisce una buona prova dell'ereditarietà diretta di forme condensate della cromatina da una generazione cellulare all'altra
- Esiste un processo di memoria cellulare epigenetica che è cruciale per il mantenimento della complessa serie di diversi stati cellulari richiesti da organismi pluricellulari complessi.
- Quando i geni dell'eucromatina si muovono in vicinanza dell'eterocromatina, mostrano un'espressione a mosaico, cioè la variegatura da effetto di posizione (osservata per la prima volta in *Drosophila*).
- In pratica, si può avere silenziamento di geni normalmente attivi se questi subiscono un effetto di posizione, ossia se il segmento cromosomico in questione trasloca nelle vicinanze di un tratto di eterocromatina.
- La nuova configurazione può essere ereditata da tutte le cellule figlie



Gene White vicino
all'eterocromatina

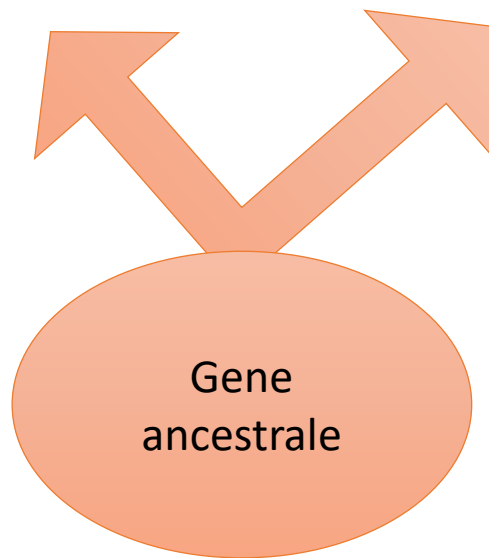


mutazione
(gene White-)



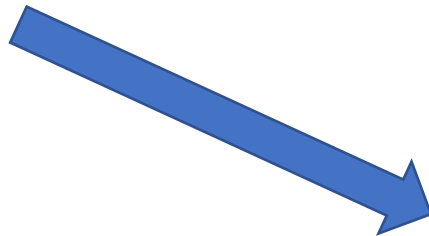
Come evolvono i genomi?

- Geni con funzioni simili possono trovarsi in organismi diversi.
- Le loro sequenze nucleotidiche risultano conservate (GENI OMOLOGHI).
- I geni omologhi sono geni simili nella loro sequenza nucleotidica e nella loro funzione a causa di un antenato comune.
- Nel corso dell'evoluzione, le varie copie di uno stesso gene possono subire mutazioni diverse, dando origine a un gruppo di geni strettamente affini, definiti complessivamente **famiglia genica**.



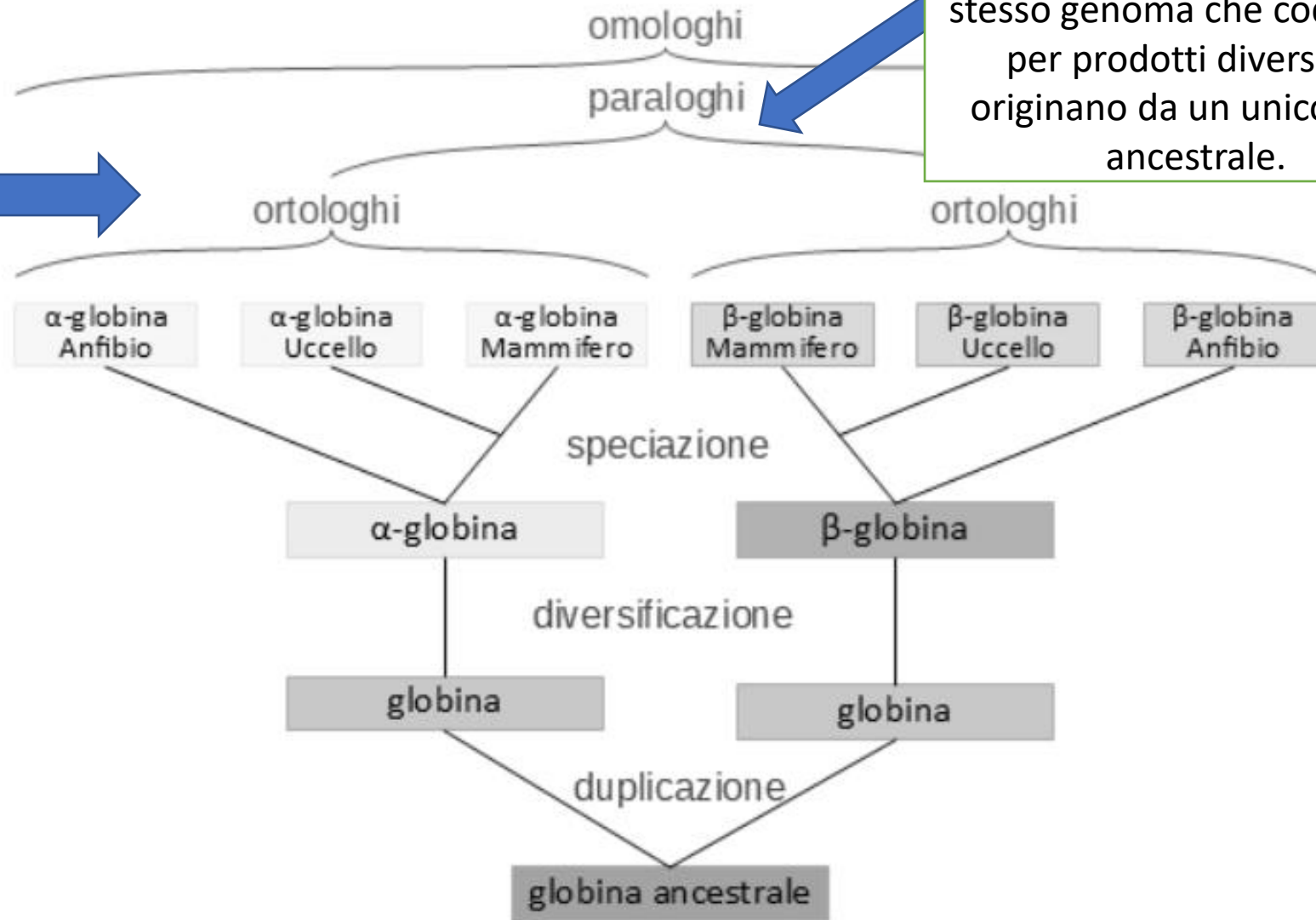
Il confronto tra genomi

- Regioni conservate: le regioni del genoma che sono rimaste simili. Comprendono anche sequenze di DNA regolatrici o a funzione non nota.
- Regioni non conservate: la sequenza del DNA non è generalmente cruciale per la funzione



Si parte dal presupposto che sia molto più probabile che le regioni che vengono conservate sia quelle con una funzione importante

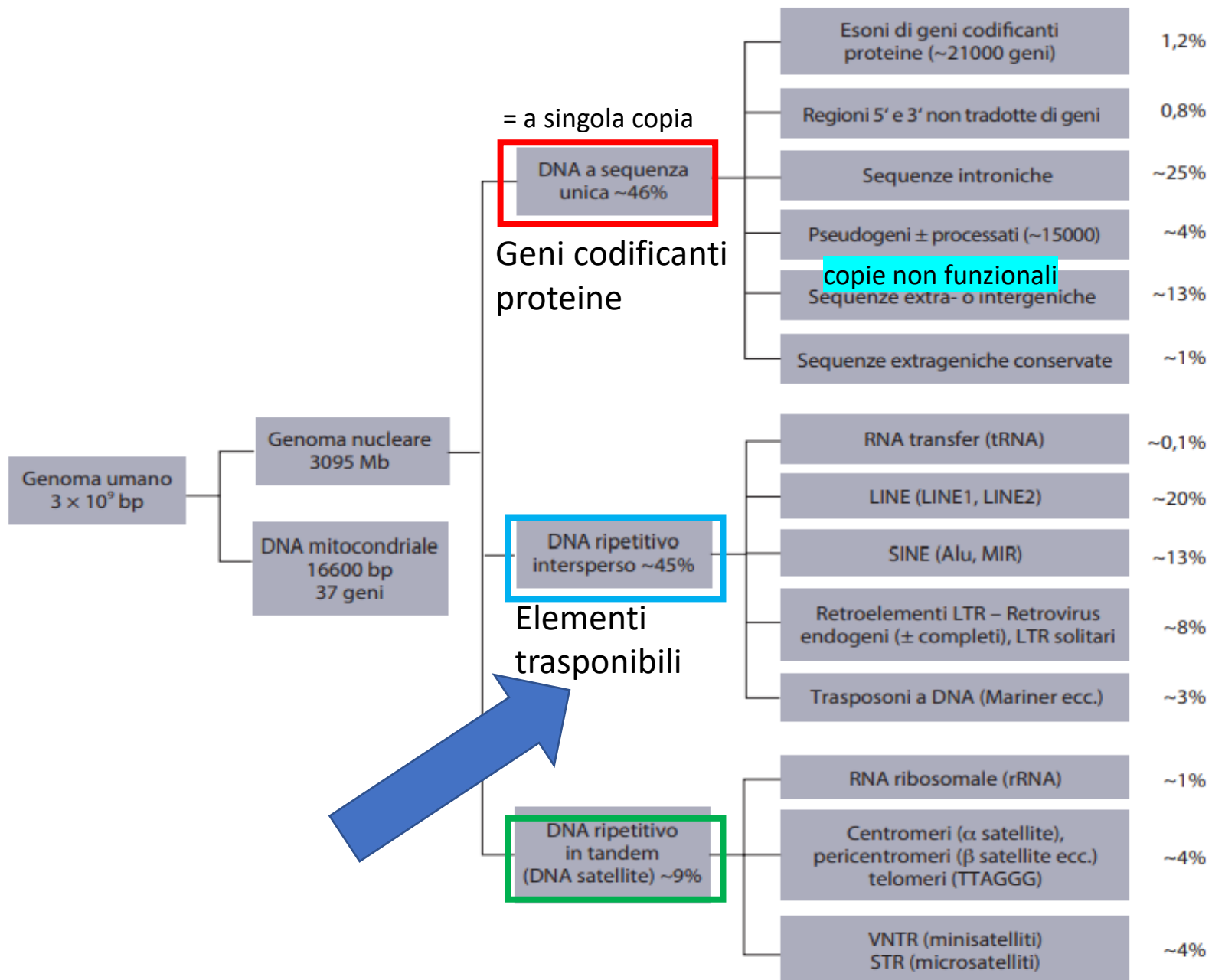
si sono separati
non per un
evento di
duplicazione ma
in seguito a
speciazione
(separazione
delle specie)



geni presenti all'interno dello
stesso genoma che codificano
per prodotti diversi ma
originano da un unico gene
ancestrale.

Allora come agisce l'evoluzione?

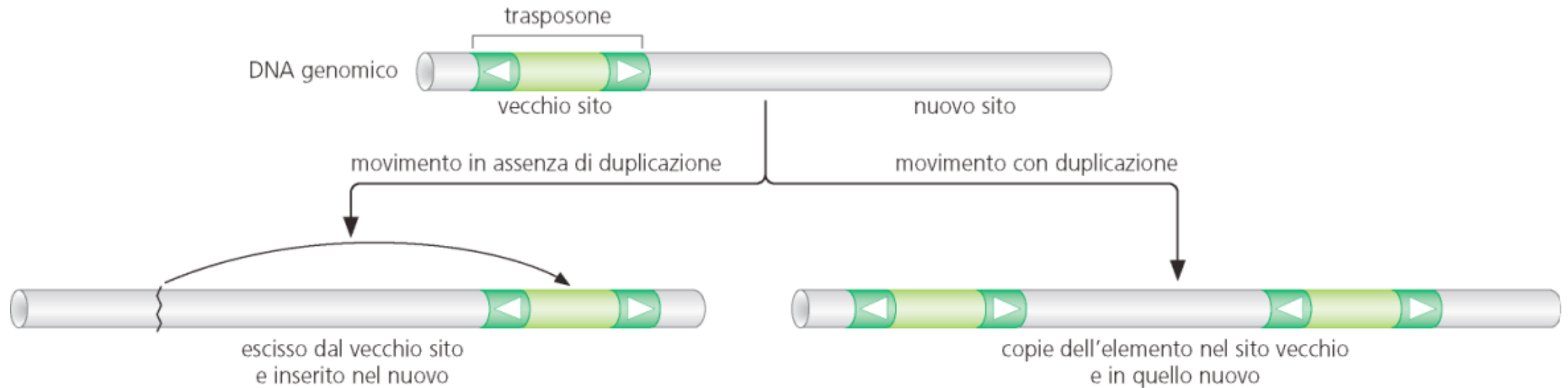
- La maggior parte dei cambiamenti genetici è causata semplicemente errori o incidenti durante i meccanismi di replicazione o riparazione che però non compromettono la sopravvivenza dell'individuo.
- **Errori** nella replicazione, riparazione del DNA, possono portare a quelle che vengono definite **MUTAZIONI PUNTIFORMI**, come la sostituzione di una coppia di basi con un'altra, o a **riarrangiamenti** genomici su larga scala come delezioni, duplicazioni, inversioni, traslocazioni di DNA da un cromosoma a un altro.
- Oltre a questi errori, il genoma contiene **elementi mobili di DNA** che sono una fonte importante di cambiamenti genomici.



Il Progetto Genoma Umano, iniziato nel 1990 da un consorzio internazionale di laboratori di ricerca, si proponeva nella sua fase iniziale di ottenere il sequenziamento completo dei circa **3 miliardi di nucleotidi** che compongono il corredo aploide dei 23 cromosomi umani.

- Gli elementi genetici mobili comprendono i trasposoni che si muovono soltanto all'interno di una singola cellula (e dei suoi discendenti), e quei virus i cui genomi si possono integrare nel genoma delle loro cellule ospiti.
- Esistono 3 classi di trasposoni: **trasposoni a DNA**, i **retrotrasposoni** similretrovirali e i retrotrasposoni non retrovirali.
- Molte delle nuove disposizioni di sequenze di DNA hanno creato la variazioni genetica cruciale per l'evoluzione di cellule e organismi.
- trasposoni: sequenze parassite di DNA che colonizzano i genomi e possono diffondersi al loro interno. In questo processo possono distruggere la funzionalità o regolare geni preesistenti, e talvolta creare geni nuovi che si sviluppano dalla fusione degli stessi trasposoni con segmenti genici.
- Quasi la metà del genoma umano consiste di reperti riconoscibili di eventi di trasposizione.

Una sequenza di DNA che può muoversi da una posizione all'altra del genoma è detta trasposone



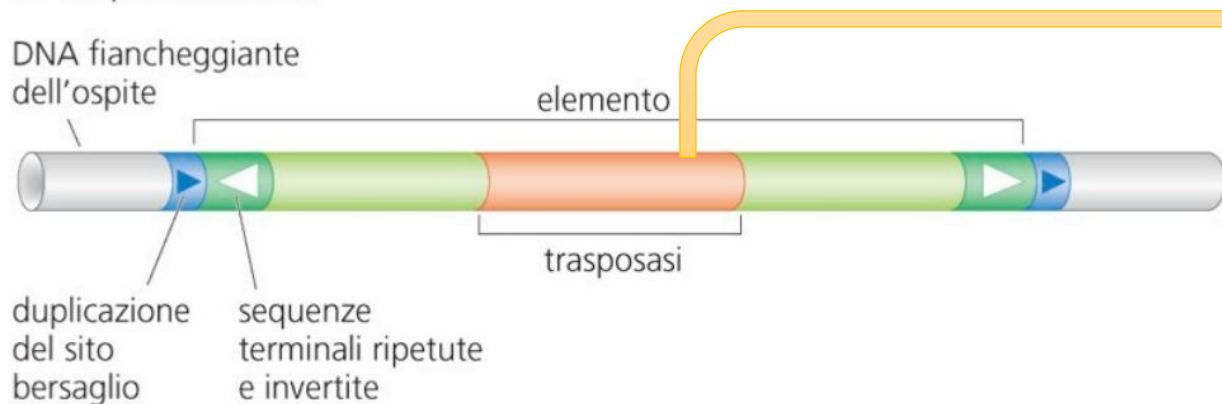
Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, 6/E, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2009

Sono elementi di DNA definito mobile, ovvero sequenze di acidi nucleici in grado di spostarsi autonomamente da una parte all'altra del genoma

Elementi trasponibili-generalità

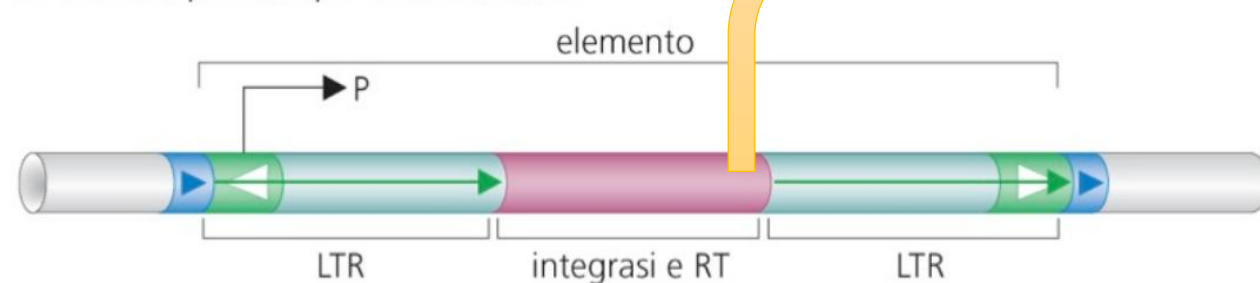
- **Trasposoni a DNA:** portano sia delle sequenze di DNA (invertite e ripetute da 25 a centinaia di pb) che servono come siti per la ricombinazione sia geni che codificano proteine che partecipano alla ricombinazione come la trasposasi (integrasi) ma anche altre proteine (resistenza ad antibiotici).
- **Retrotrasposoni** tipo virus/retrovirus: Siti per ricombinasi all'interno di sequenze LTR. Integrasi (trasposasi) + **trascrittasi inversa** (RT).
- **Retrotrasposoni poli-A:** Senza ripetizioni terminali invertite. Sequenza 5'UTR, 3'UTR e poli-A. ORF1 codifica per RNA binding protein. ORF2 fattore con attività Trascrittasi inversa ed endonucleasica.

a trasposoni a DNA



I trasposoni a DNA codificano per una trasposasi che determina l'escissione del trasposone dal cromosoma e ne catalizza l'inserzione in una nuova posizione cromosomica

b retrotrasposoni tipo virus/retrovirus



Un RNA trascritto a partire dal retrotrasposone va incontro a trascrizione inversa in DNA, grazie all'intervento di una trascrittasi codificata dal retrotrasposone. La copia di DNA è inserita in una nuova posizione del genoma.

c retrotrasposoni poli-A



Tipi di elementi trasponibili nel genoma umano

Elemento	Trasposizione	Struttura	Lunghezza	Numero di copie	Frazione del genoma
LINE	Autonoma		1–5 kb	20 000–40 000	21%
SINE	Non autonoma		100–300 bp	1 500 000	13%
Trasposoni a DNA	Autonoma		2–3 kb	300 000	3%
	Non autonoma		80–3000 bp		



Gli elementi non autonomi possono spostarsi solo con l'aiuto di un elemento autonomo che sia presente da qualche parte del genoma

- Gli elementi trasponibili sono molto frequenti nel genoma umano arrivando a costituirne quasi la sua metà. La maggior parte di questi elementi può essere suddivisa in due grandi gruppi:
- Elementi nucleari dispersi lunghi (**LINE**, dall'inglese long interspersed nuclear elements), trasposti nel sito bersaglio mediante **retrotrasposizione**, utilizzando la trascrittasi inversa il cui gene è contenuto nella loro sequenza.
- Elementi nucleari dispersi corti (**SINE**, dall'inglese short interspersed nuclear elements), con caratteristiche strutturali identiche ai LINE ma non dotati del gene che codifica la trascrittasi inversa, e quindi probabilmente trasposti **grazie alla trascrittasi inversa codificata da altri LINE**. Le sequenze Alu (così chiamate poiché al loro interno contengono il sito di legame per l'enzima di restrizione Alu), circa un milione nel genoma umano, sono un esempio di SINE più diffuse.

DNA ripetitivo in tandem

Circa il 9-10% del genoma umano è composto da regioni di DNA altamente ripetitivo, ossia composto da centinaia (e a volte migliaia) di unità ripetute in tandem di lunghezza variabile. Storicamente, questo DNA è noto come **satellite**, in quanto si dispone in bande distinte da quella principale se il DNA viene centrifugato in un gradiente di densità.

SATELLITE

Nei primati, il **centromero** è costituito da monomeri ripetuti in tandem, ognuno dei quali è approssimativamente lungo 171 bp. La ripetizione dei monomeri costituisce il DNA alfa satellite (o alfoide)

MINISATELLITE

Il DNA telomerico consiste di centinaia di copie di un motivo ripetuto in tandem, ricco in T e G, che nell'uomo e in altri vertebrati è 5'-TTAGGG-3'.

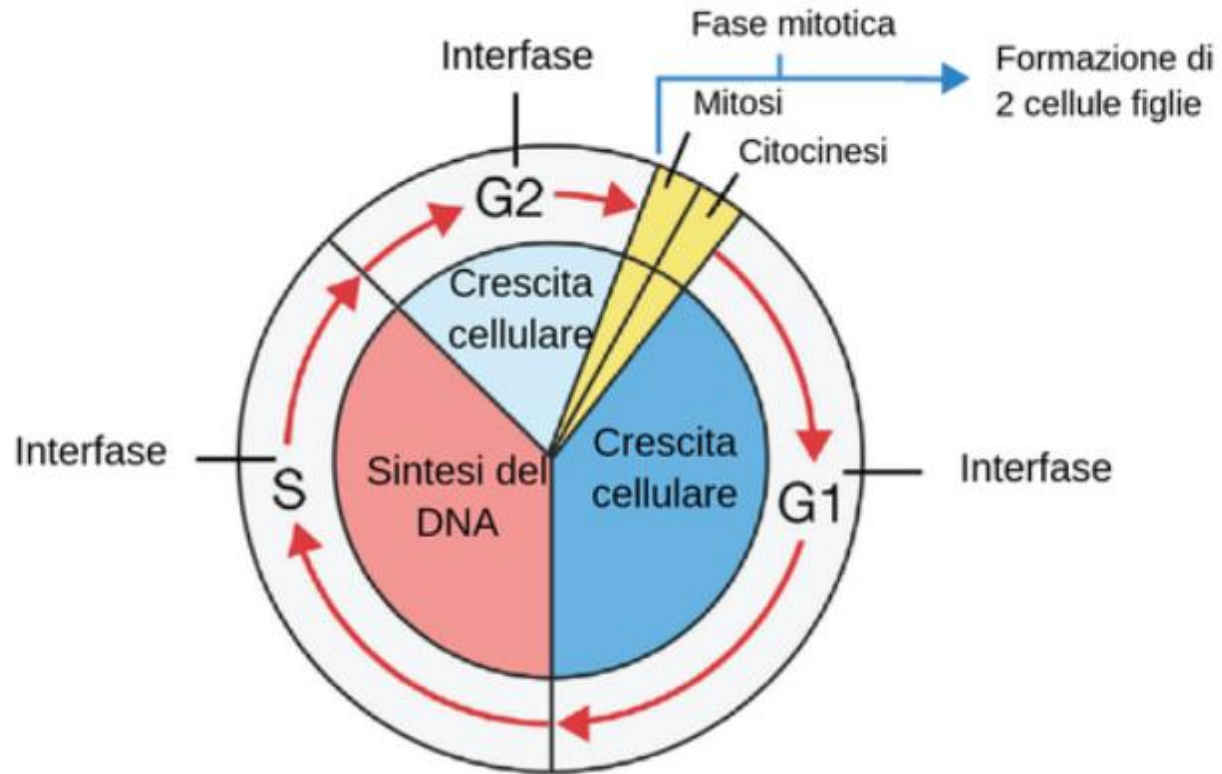
Il DNA telomerico identifica le estremità dei cromosomi e impedisce l'accorciamento dei cromosomi ad ogni evento di replicazione.

MICROSATELLITE

In un microsatellite l'unità ripetuta è generalmente breve, solitamente da 1 a 6 paia di basi). varia da individuo a individuo (Utilizzati nel DNA fingerprint (STR – short tandem repeats)

I microsatelliti, ed in particolare le ripetizioni di triplette sono associati a varie malattie genetiche (sindrome x fragile)

Replicazione: tutti gli organismi devono replicare il loro DNA con accuratezza prima delle divisioni cellulari



<https://theory.labster.com/it/cell-cycle/>

La replicazione del DNA avviene durante la fase S del ciclo cellulare

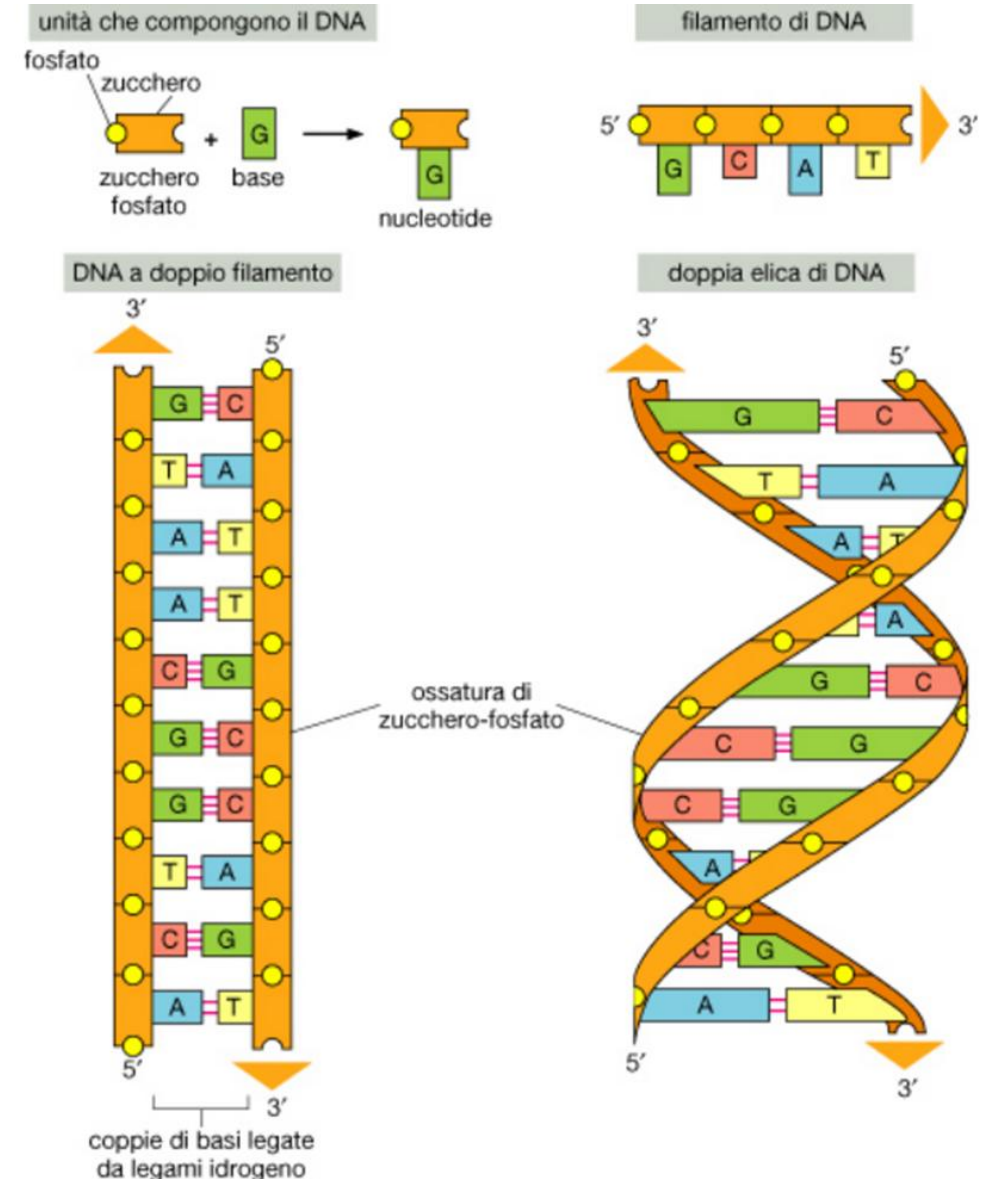
Ripassiamo

Il DNA è un polimero composto da nucleotidi.

- Ogni nucleotide è formato da:
 - una molecola di zucchero (desossiribosio);
 - un gruppo fosfato;
 - una base azotata (adenina, guanina, citosina, timina).

complementarietà

antiparallelismo



In aggiunta:

- Considerare la regola di Chargaff

A+G

=

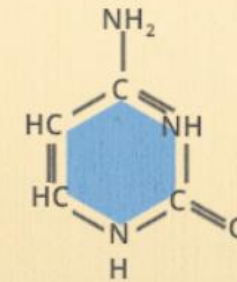
T+C

PURINE

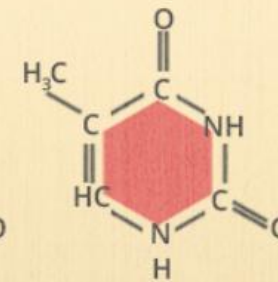
=

PIRIMIDINE

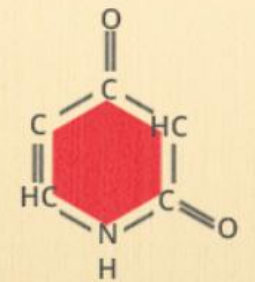
Pirimidine



Citosina (C)

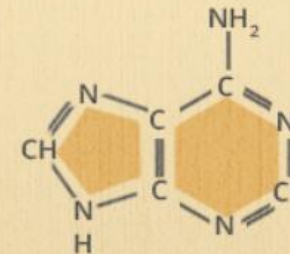


Timina (T)

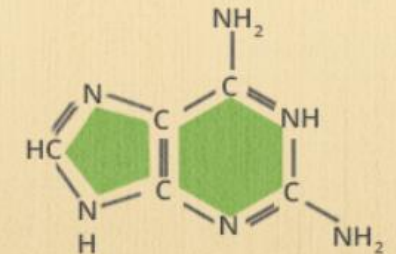


Uracile (U)

Purine



Adenina (A)

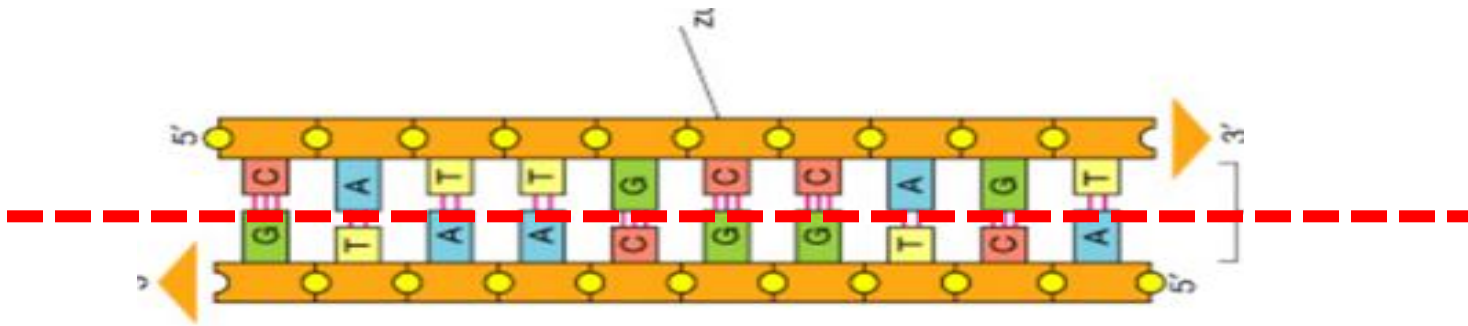


Guanina (G)

<https://theory.labster.com/it/nucleotides/>

La doppia elica agisce da stampo per la propria duplicazione

- Per copiare la sequenza nucleotidica di un filamento di DNA complementare



Il nucleotide A si appaierà solo con...?
Il nucleotide G si appaierà solo con...?

La replicazione del DNA ha
una natura
SEMICONSERVATIVA

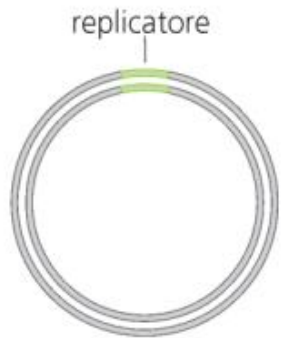
Questo processo molecolare porta
alla formazione di due molecole
di DNA identiche

La sintesi del DNA inizia a livello di «origini» di replicazione

- Quindi l'origine di replicazione corrisponde alla posizione in cui l'elica del DNA viene aperta per la prima volta.
- I cromosomi batterici hanno in genere 1 origine di replicazione
- I cromosomi eucariotici contengono origini multiple di replicazione



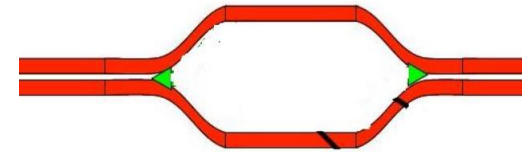
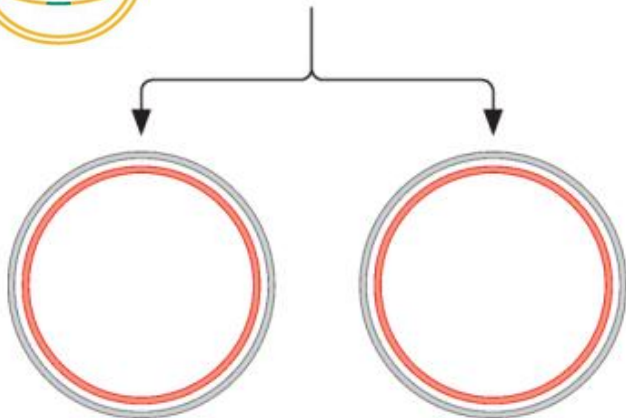
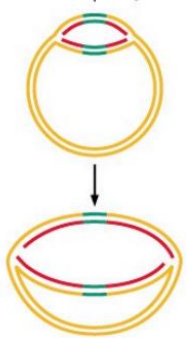
Perché?



In *E. coli* l'interazione della proteina iniziatrice con l'origine di replicazione è regolata con grande precisione. Le forcelle di replicazione procedono in direzioni opposte fino a che s'incontrano a circa metà strada sul cromosoma.



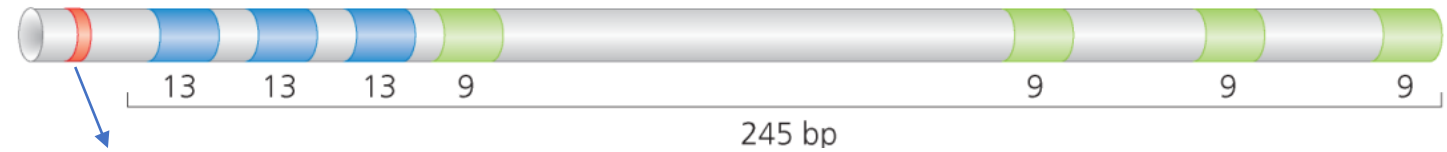
proteine iniziatrici (DnaA)



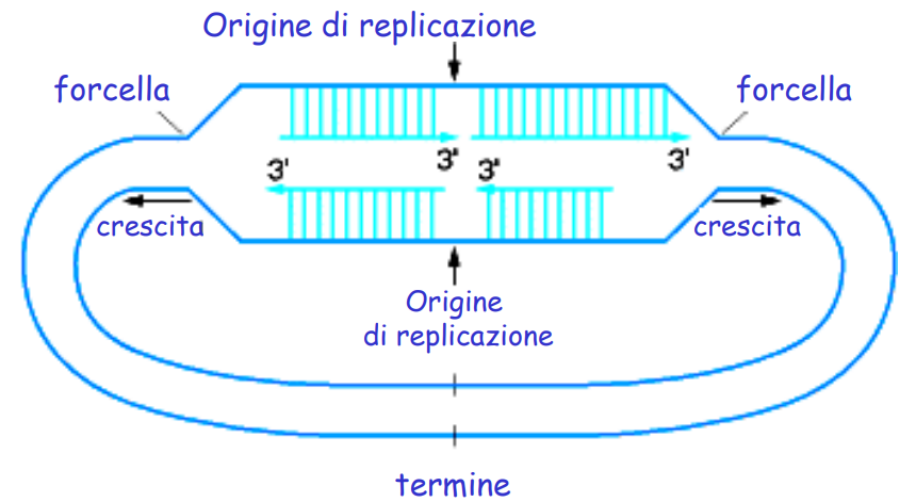
Man mano che l'**elicasi** agisce e srotola la doppia elica, il grado di denaturazione del DNA aumenta.

- Si viene quindi a formare la **BOLLA DI REPLICAZIONE**

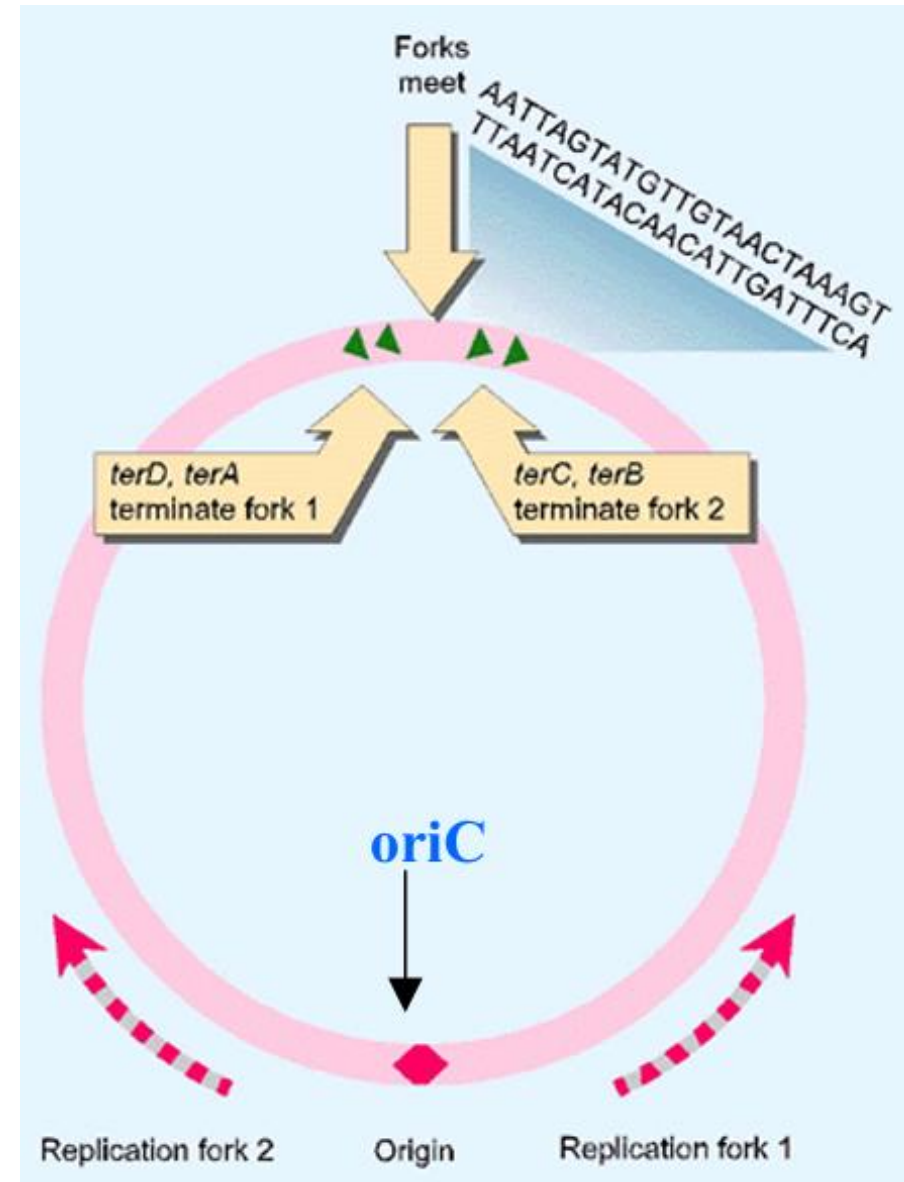
oriC (*E. coli*) L'origine minima di E.Coli e' lunga solo 245 bps



origine di replicazione di *E. coli* (ricca di appaiamenti A=T più facili di denaturare)

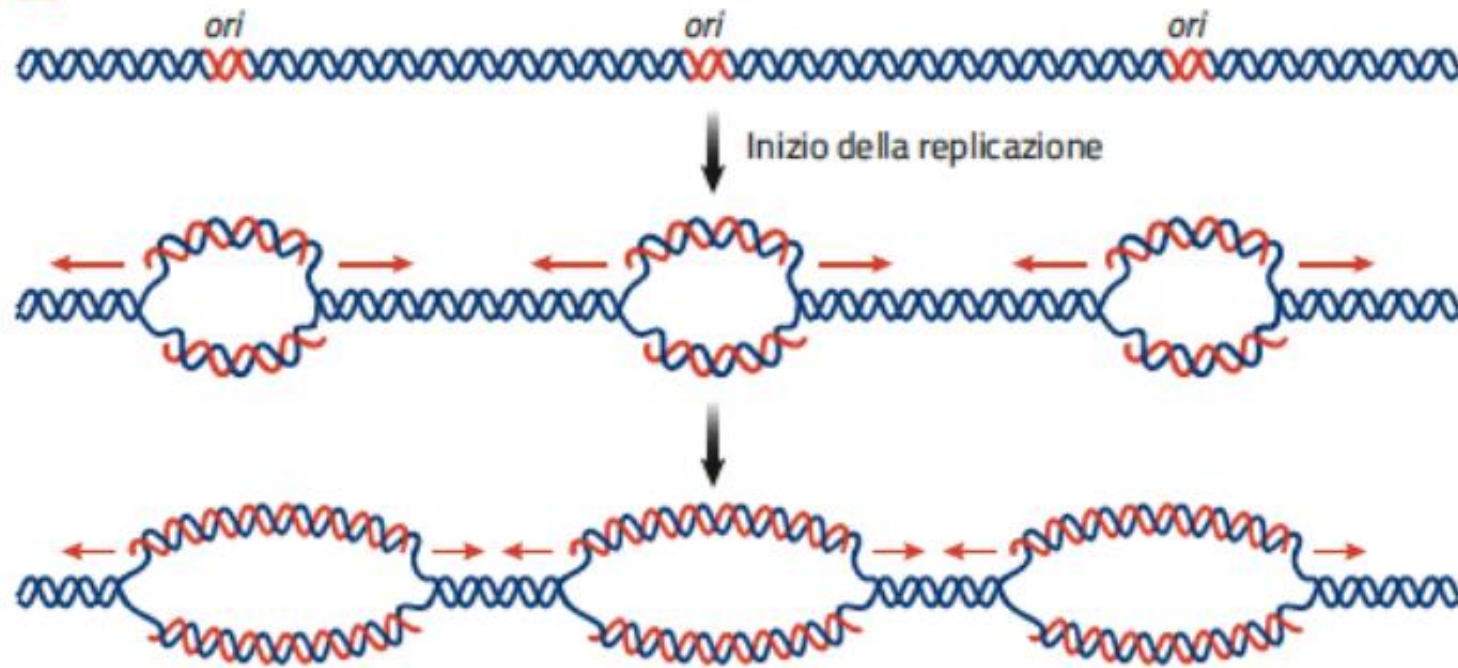


- L'unità di DNA in cui avviene una azione singola di replicazione si chiama "REPLICONE"
- è definito dalla presenza di elementi di controllo che sono:
 - 1) una origine di replicazione, ossia un punto in cui ha inizio la replicazione
 - 2) una terminazione, un sito a livello del quale si ha la fine del processo
- Il cromosoma batterico rappresenta un singolo REPLICONE



Nei cromosomi eucariotici sono presenti molti REPLICONI

B *ori* multipli nel cromosoma eucariotico



Contengono
origini di
replicazione
multiple.

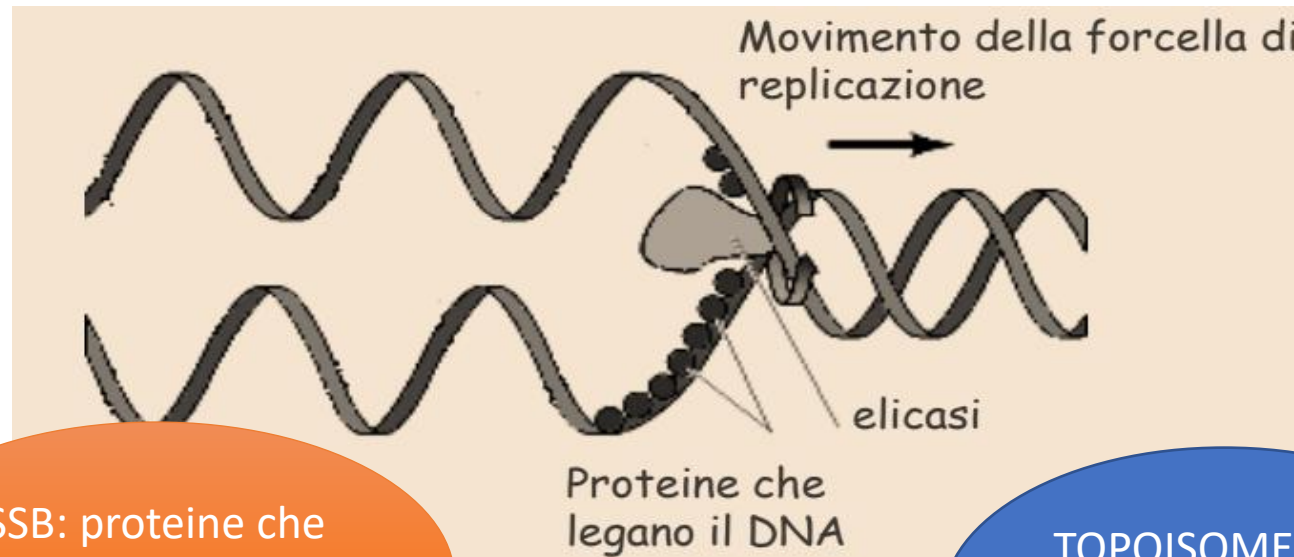
Le forcelle
si muovono
in direzioni
opposte.

La replicazione del DNA è un processo guidato da enzimi

Il processo replicativo del DNA prevede che i filamenti della doppia elica vengano slegati e distanziati



ELICASI



SSB: proteine che legano il DNA a singolo filamento

TOPOISOMERASI:
impediscono al
DNA aggrovigliarsi

Topoisomerasi
di tipo I

Topoisomerasi
di tipo II

Macchina replicatrice

- **DNA polimerasi**: sintetizza il nuovo DNA usando come stampo uno dei due filamenti originali
- catalizza l'aggiunta di nucleotidi all'estremità 3' di una catena di DNA in allungamento, formando legami fosfodiesteri tra l'OH legato al C3' dell'ultimo nucleotide già unito alla catena in allungamento e il gruppo fosfato legato al C5' del nucleotide aggiuntivo.
- è incapace di dare inizio a un filamento di DNA totalmente nuovo
- Alcune DNA polimerasi fanno attività di proofreading (correzione di bozze)

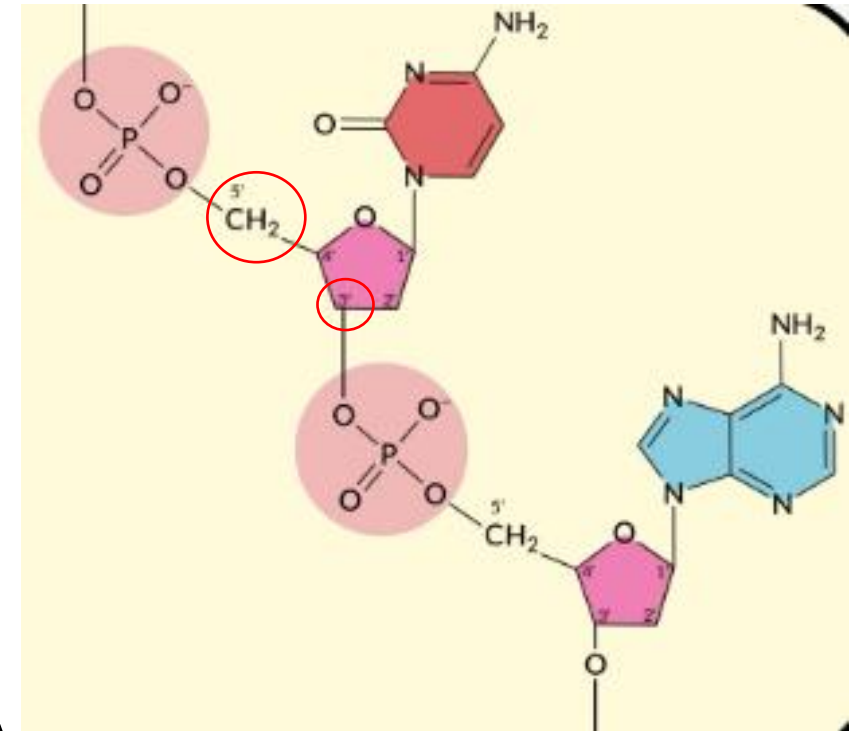


TABLE 12-1 Properties of DNA Polymerases

<i>E. coli</i>	I	II	III
Polymerization: $5' \rightarrow 3'$	+	+	+
Exonuclease activity:			
$3' \rightarrow 5'$	+	+	+
$5' \rightarrow 3'$	+	—	—
Synthesis from:			
Intact DNA	—	—	—
Primed single strands	+	—	—
Primed single strands plus single-strand-binding protein	+	—	+
In vitro chain elongation rate (nucleotides per minute)	600	?	30,000
Molecules present per cell	400	?	10–20
Mutation lethal?	+	—	+

Enzima	Funzione	Attività esonucleasica
DNA pol I	Riparo del DNA e replicazione	$5'-3'$ e $3'-5'$
DNA pol II	Riparo del DNA	$3'-5'$
DNA pol III	Complesso multimerico, principale enzima della replicazione	$3'-5'$
DNA pol IV e V	Sintesi da translesione (TLS)	No

Negli eucarioti abbiamo 5 diversi tipi di polimerasi

TABLE 12-1 Properties of DNA Polymerases					
Mammalian Cells ^a	α	$\beta^{\dagger}$	γ	δ	ϵ
Polymerization: $5' \rightarrow 3'$	+	+	+	+	+
Exonuclease proofreading activity: [†] $3 \rightarrow 5'$	—	—	+	+	+
Synthesis from:					
RNA primer	+	—	—	+	?
DNA primer	+	+	+	+	+
Associated DNA primase	+	—	—	—	—
Sensitive to aphidicolin (inhibitor of cell DNA synthesis)	+	—	—	+	+
Cell location:					
Nuclei	+	+	—	+	+
Mitochondria	—	—	+	—	—

Enzima	Funzione	Attività esonucleasica *
DNA pol α	Allungamento degli RNA primer	No
DNA pol β	Riparo del DNA	No
DNA pol γ	Replicazione del DNA mitocondriale	3'-5'
DNA pol δ	Principale enzima della replicazione	3'-5'
DNA pol ϵ	Replicazione del DNA (filamento guida)	3'-5'
DNA pol η	Sintesi da translesione (TLS)	No

Tutte le DNA polimerasi hanno 2 proprietà fondamentali:

1. Sintetizzano DNA soltanto in **direzione 5'-3'**, aggiungendo dNTP al gruppo 3'OH libero di una catena in crescita
2. Necessitano di un **primer** e non sono in grado di iniziare una nuova catena utilizzando solamente il filamento stampo

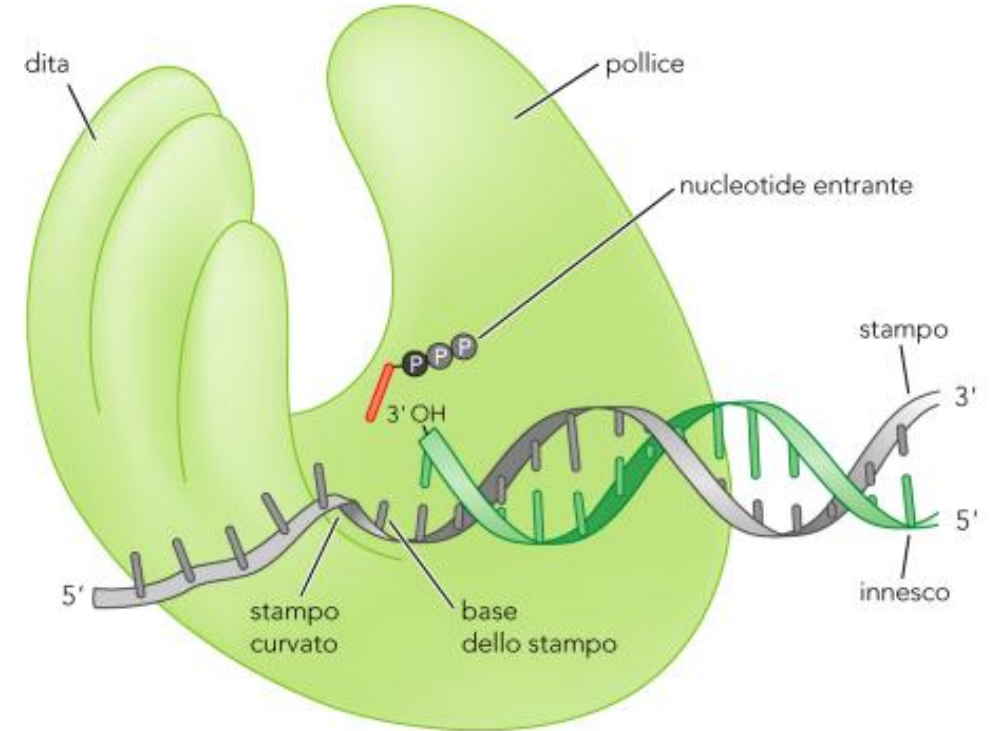


Il primer di RNA sarà successivamente rimosso e rimpiazzato con DNA

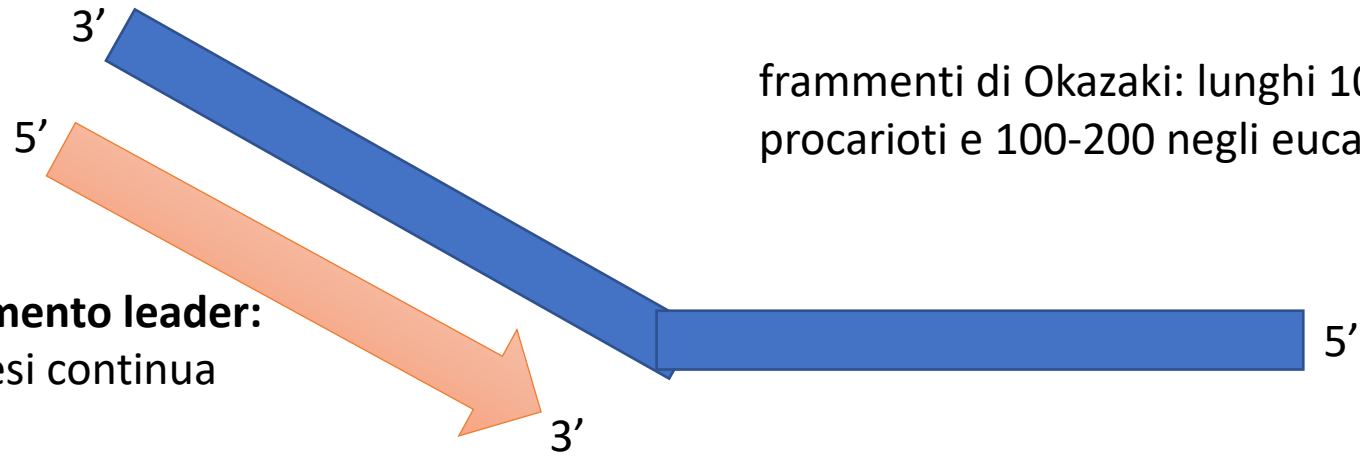
DNA Polimerasi

- Presenta una forma a mano destra parzialmente chiusa e possiede 3 domini:
 - Il palmo che contiene il sito attivo.
 - Le dita che riconoscono i dNTP ed aiutano il processo di catalisi.
 - Il pollice che interagisce con il DNA neosintetizzato e mantiene in posizione corretta l'innesco ed il sito attivo.

Alcune DNA polimerasi (non tutte) sono in grado di eseguire la correzione degli errori muovendosi all'indietro di una base ed esercitando una attività esonucleasica in direzione 3'-5' che taglia la base errata ("proofreading" o "correzione di bozze") Dopo il taglio della base errata, la DNA polimerasi inserisce la base corretta in direzione 5'-3' e prosegue nella replicazione



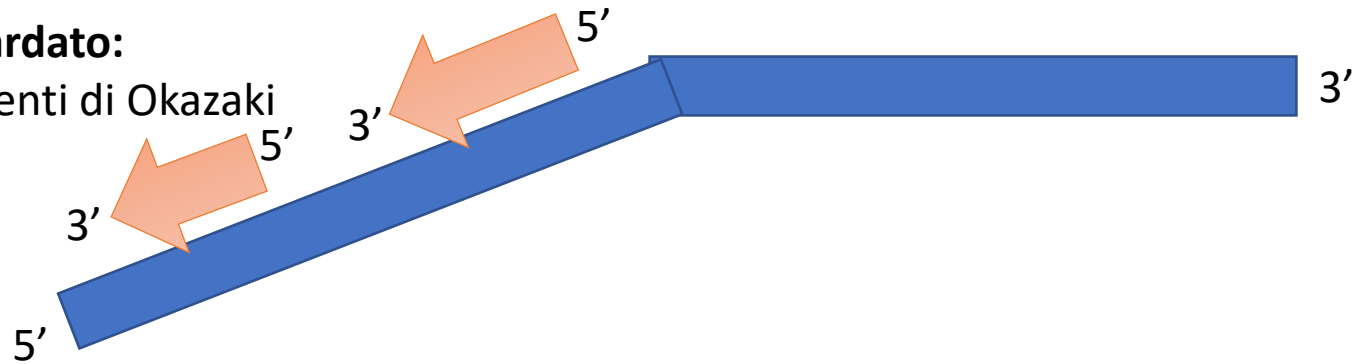
La direzione di sintesi è...?



frammenti di Okazaki: lunghi 1000-2000 nucleotidi nei procari e 100-200 negli eucarioti.

Filamento ritardato:

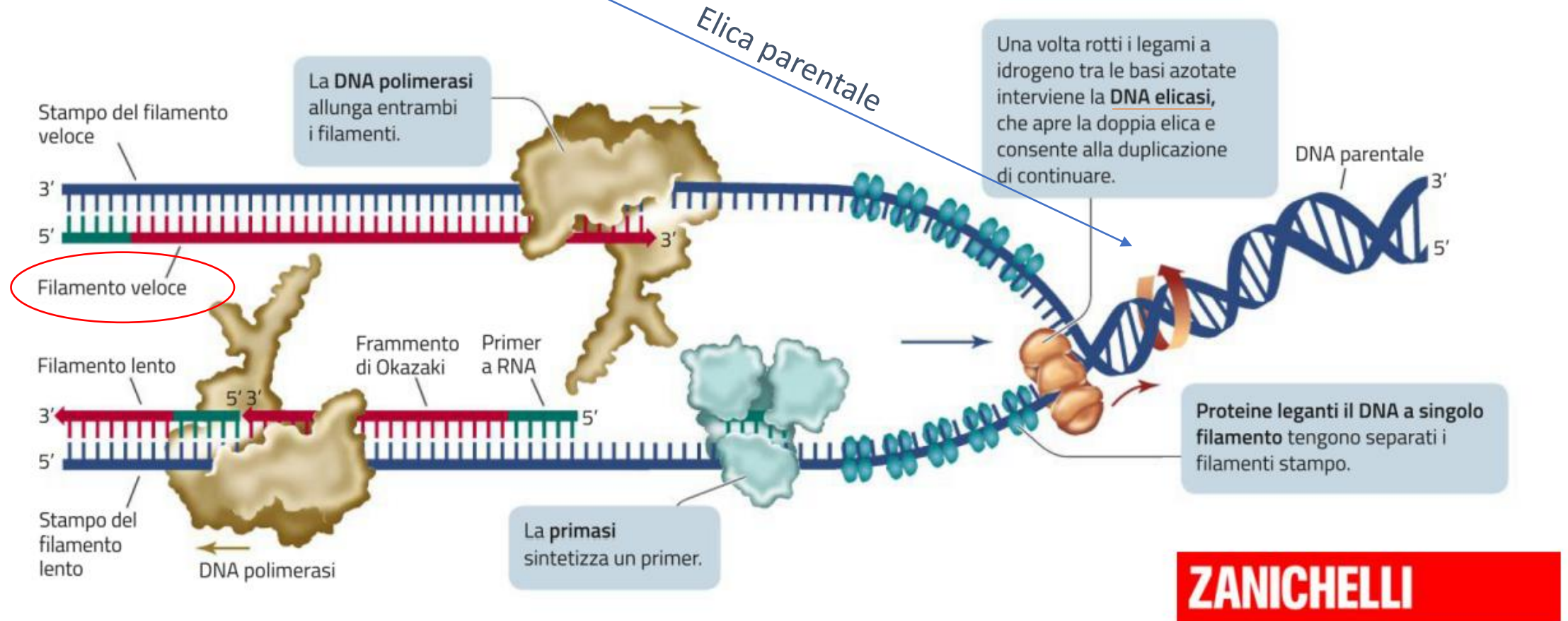
Sintesi frammenti di Okazaki



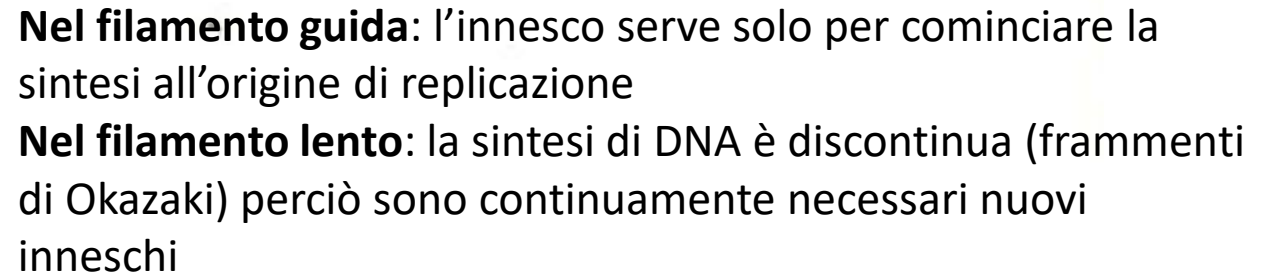
La replicazione del DNA NON avviene nella stessa direzione
....su entrambi i filamenti!!!!

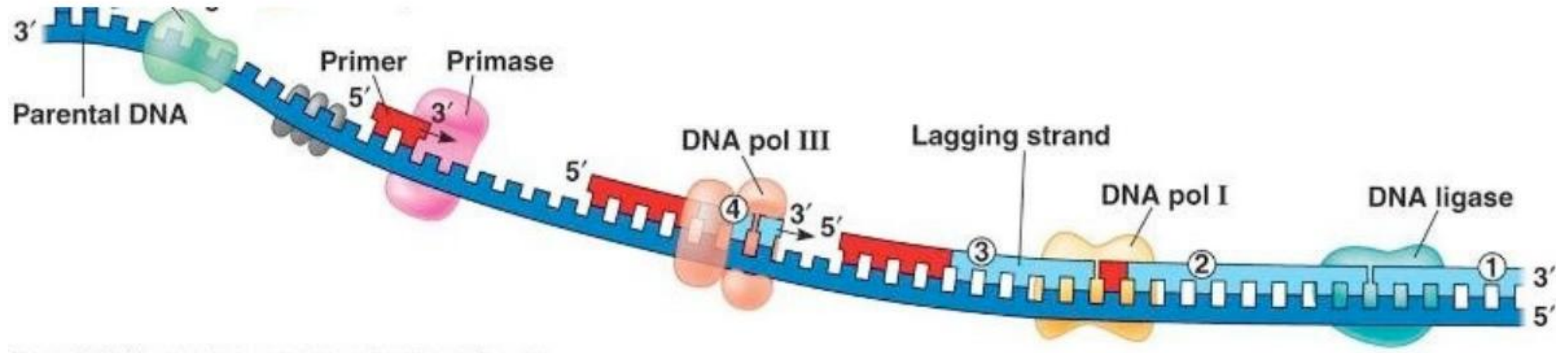
Molecole
«figlie»

Una zona attiva di replicazione crea una struttura a forma di Y nota come *forcella di replicazione*, che ha una struttura asimmetrica.



primer di RNA per avviare la sintesi del DNA





I frammenti di Okazaki dovranno essere legati insieme per costituire un filamento continuo.

- La loro saldatura richiede l'intervento di una RNasi H, una **DNA pol 1** e una DNA ligasi.

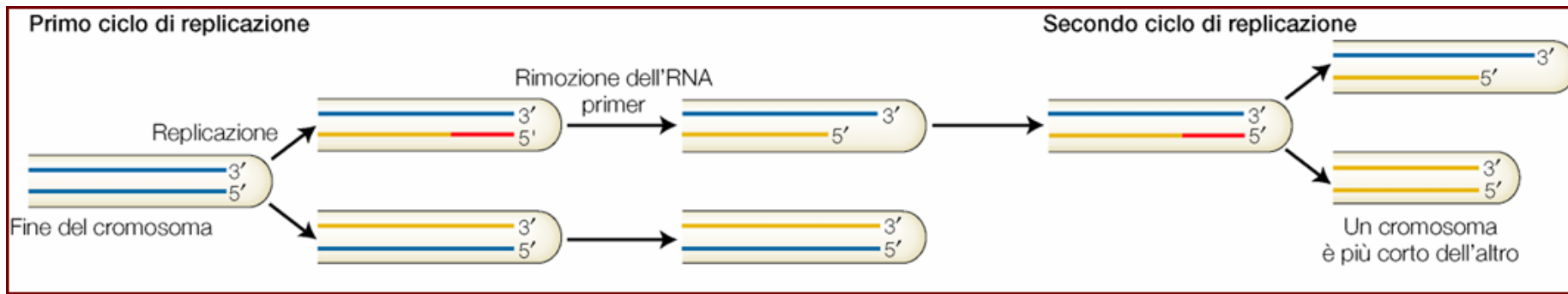


sostituire i ribonucleotidi (RNA) con deossiribonucleotidi (DNA), sul filamento lagging, una volta che l'RNasi H e una esonucleasi hanno rimosso gli inneschi dei frammenti di Okazaki

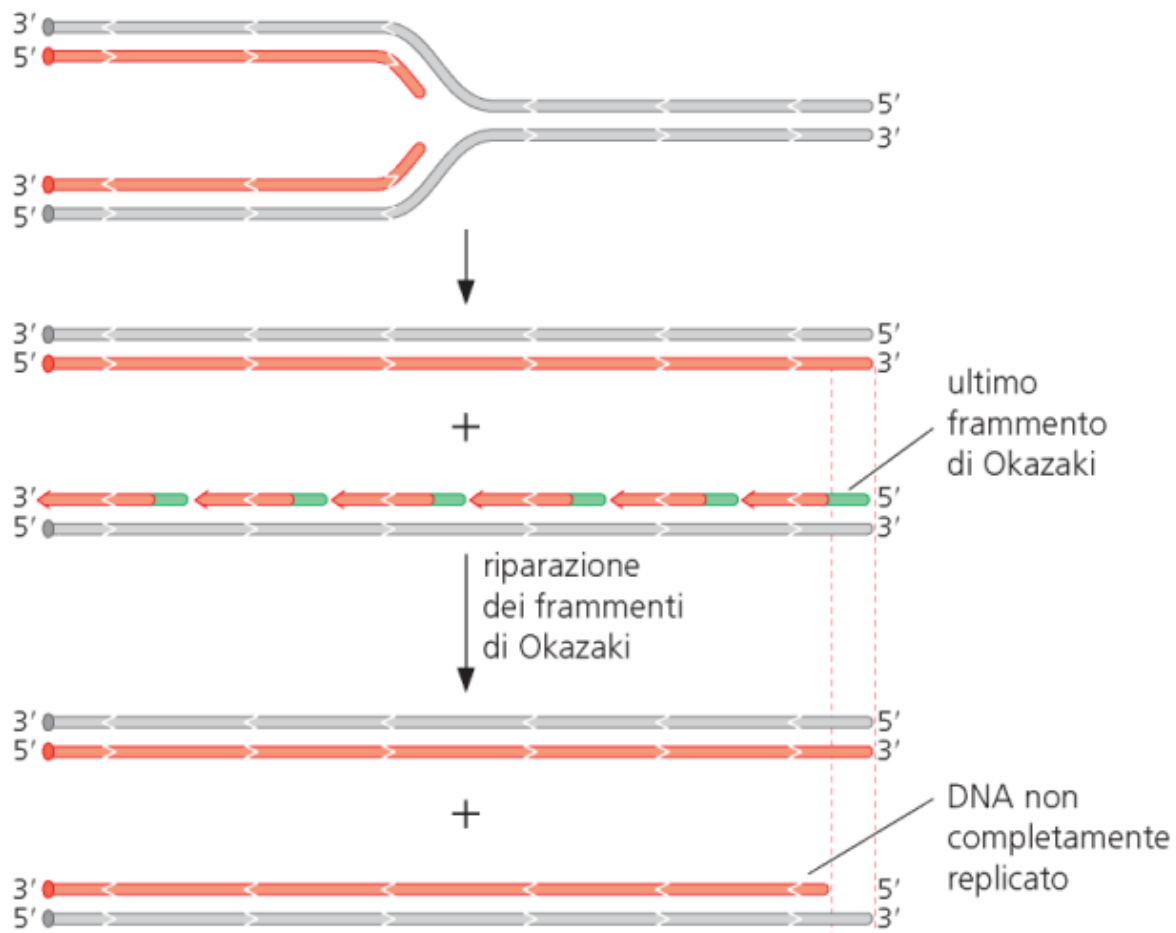
Replisoma

- La DNA polimerasi fa parte di un complesso nucleoproteico detto replisoma.
- Nel replisoma ci sono due classi di proteine che aprono la doppia elica ed evitano che si avvolga di nuovo: **elicasi e topoisomerasi**.
- Le elicasi rompono i legami idrogeno che tengono insieme i due filamenti, circondano il DNA e aprono la doppia elica.
- I superavvolgimenti che si formano in altre regioni, parallelamente allo svolgimento alla forcella replicativa, vengono rimossi dalle topoisomerasi, tra cui la DNA girasi.

Negli eucarioti il replisoma deve anche smontare i nucleosomi parentali e riassemblarli nelle molecole figlie. Ciò avviene distribuendo casualmente gli istoni vecchi alle molecole figlie e fornendo al replisoma nuovi istoni in associazione con la proteina fattore 1 di assemblaggio della cromatina (CAF-1)



La necessità di avere un innesco crea il problema della replicazione delle estremità terminali.

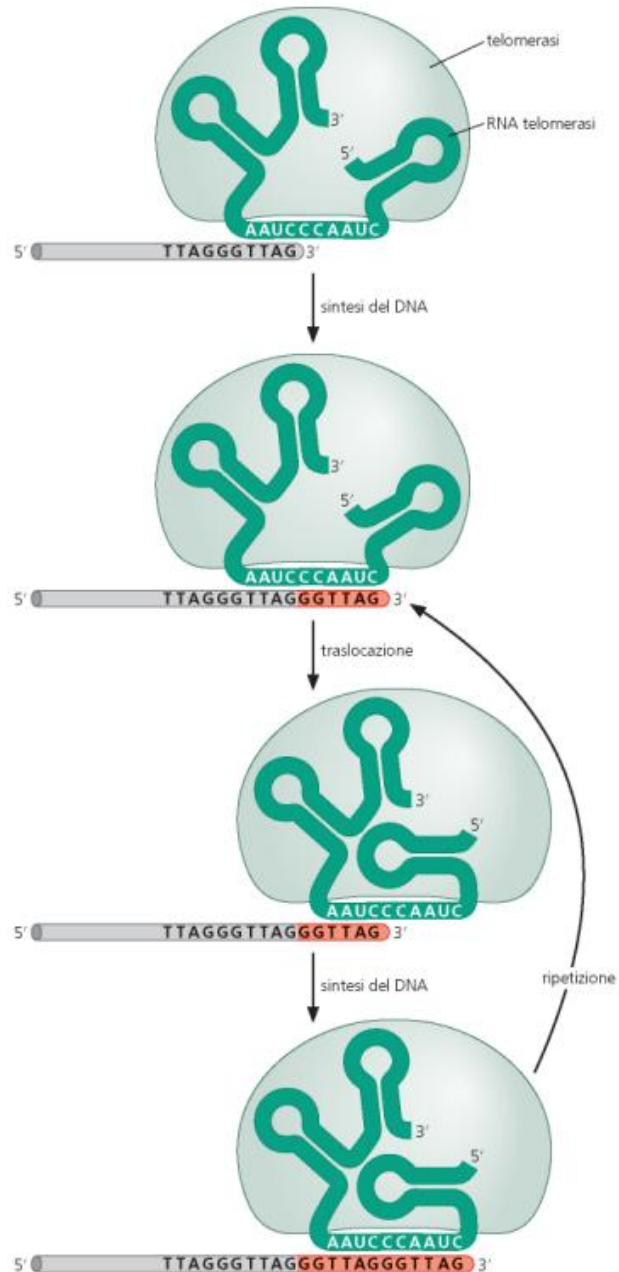


Importanza dei telomeri

- **Il telomero è la regione terminale del cromosoma**, da cui deriva il nome stesso, **composta di DNA altamente ripetuto**, che non codifica per alcun prodotto proteico.

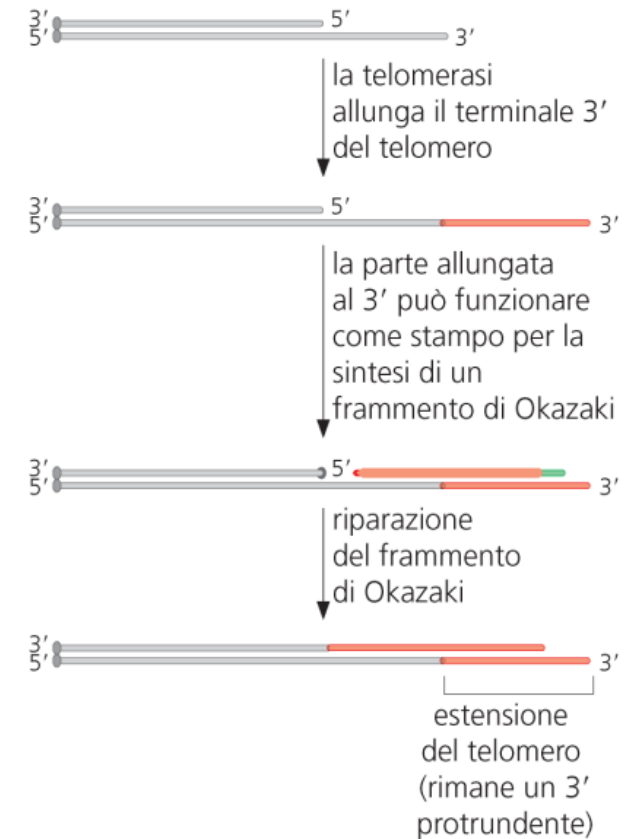
EVITA la perdita di informazioni durante la duplicazione dei cromosomi. La DNA polimerasi, infatti, non è in grado di replicare il cromosoma fino alla sua terminazione; se non ci fossero i telomeri, che quindi vengono accorciati ad ogni replicazione, la replicazione del DNA comporterebbe in ogni occasione una significativa perdita di informazione genetica

I cromosomi di un essere umano si differenziano dal cromosoma circolare degli eubatteri perché presentano telomeri alle estremità



La TELOMERASI è una DNA polimerasi (RNA-dipendente) (o trascrittasi inversa, o retrotrascrittasi). Si tratta dunque di un enzima in grado di sintetizzare DNA come le consuete DNA polimerasi. Tuttavia, a differenza di queste ultime, è in grado di utilizzare l'RNA come stampo di partenza.

Nei vertebrati la sequenza di nucleotidi nei telomeri è TTAGGG.



I telomeri fungono da “orologio mitotico” controllando la morte e la senescenza cellulare

- Nelle cellule umane, il telomero si accorcia leggermente ogni volta che avviene una divisione cellulare. Dopo un elevato numero di replicazioni i telomeri diventano pericolosamente corti, con conseguenti rischi di instabilità genomica e di variazioni potenzialmente cancerogene nel DNA. Un telomero corto funge da segnale affinché la cellula smetta di dividersi ed entri in uno stato chiamato senescenza.
- I telomeri si accorciano in modo naturale di pari passo col normale processo di invecchiamento, ma possono accorciarsi più velocemente del dovuto a causa di stili di vita non salutari come un'alimentazione non equilibrata. La lunghezza dei telomeri può quindi essere utilizzata come un indicatore dello stato di salute e di rischio per l'insorgenza di patologie. La presenza di un limite al numero di divisioni cellulari, dovuto all'accorciamento dei telomeri, fu individuato per la prima volta da Leonard Hayflick. Tali osservazioni lo portarono ad avanzare l'ipotesi di un ben preciso **numero massimo di mitosi, che fu appunto definito limite di Hayflick.**

Riprendiamo il gene

gene procariotico

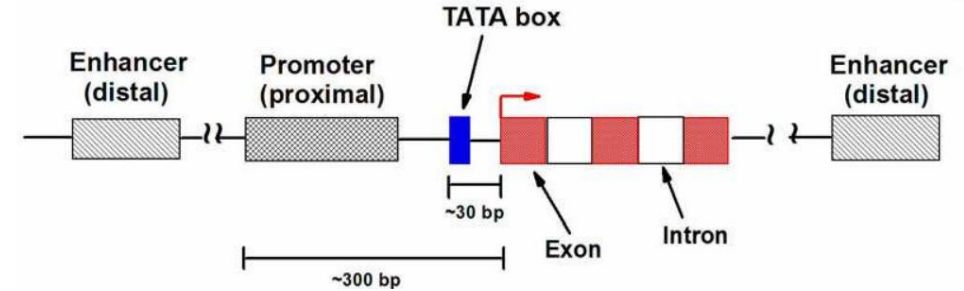


1. Promotore: regioni a monte delle sequenza codificante su cui si legano fattori di trascrizione e di repressione e determinano l'arrivo della RNA polimerasi.

2. Regioni non codificanti (UTR): posti a monte (5') e a valle (3') del gene, lo delimitano e contengono i siti di attacco dei ribosomi (RBS) e i segnali per terminare la trascrizione.

3. Regione codificante, dove è contenuta l'informazione per la proteina.

gene eucariotico



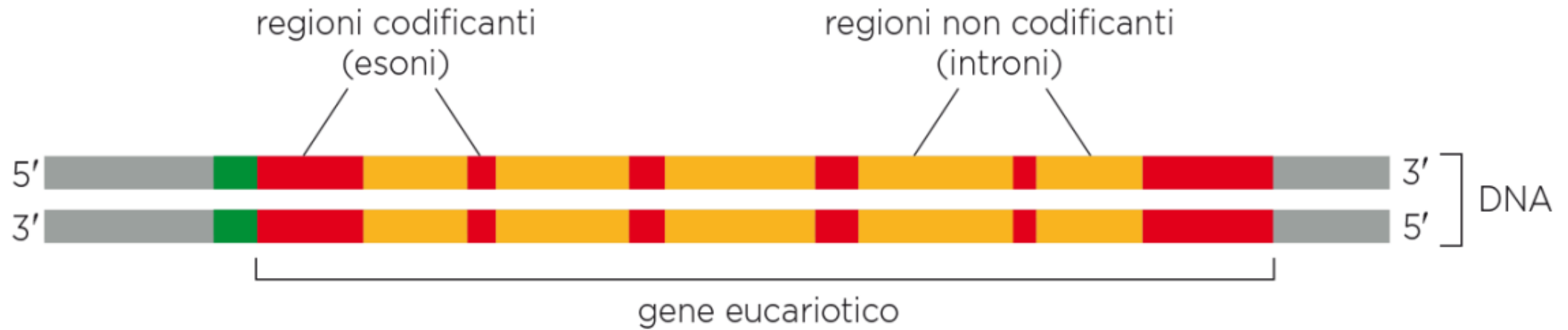
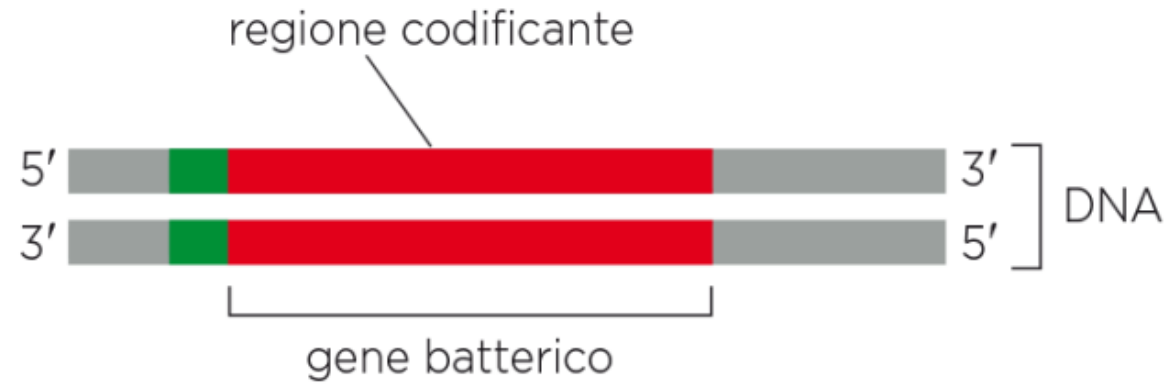
1. Esoni: porzioni del gene che contengono la sequenza codificante per la proteina.

2. Introni: porzioni del gene che interrompono gli esoni e che non contengono informazioni per la codifica. Costituiscono la maggior parte del gene.

3. TATA box: quattro basi a cui si lega la RNA polimerasi II e da cui inizia a svolgere il DNA per trascriverlo.

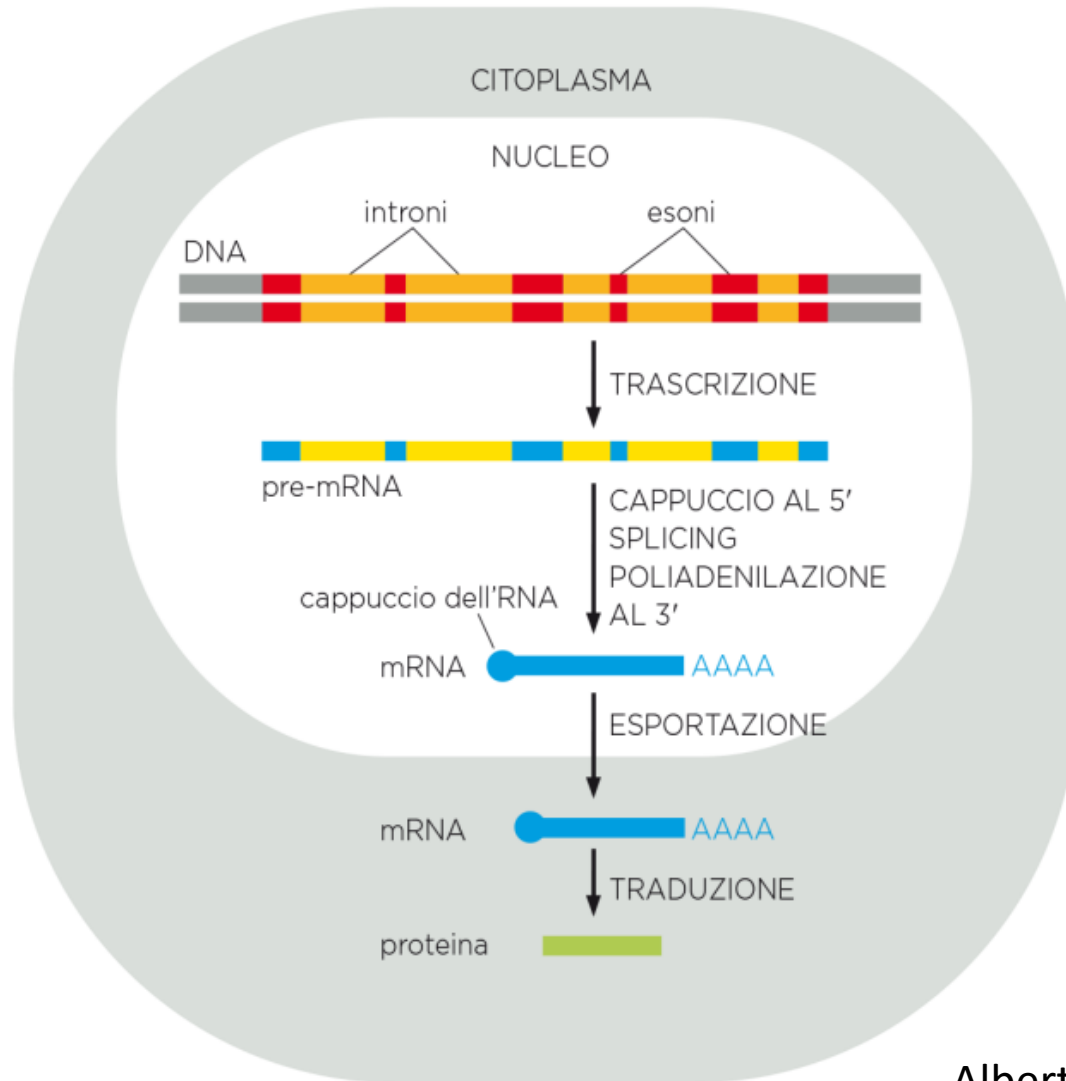
4. Promotori: regioni a monte delle sequenza codificante a cui si legano i fattori di trascrizione, che a loro volta chiamano la RNA polimerasi.

5. Enhancers: posti a monte e/o a valle del gene, potenziano/favoriscono l'azione dei promotori guidando dei particolari ripiegamenti nel DNA.

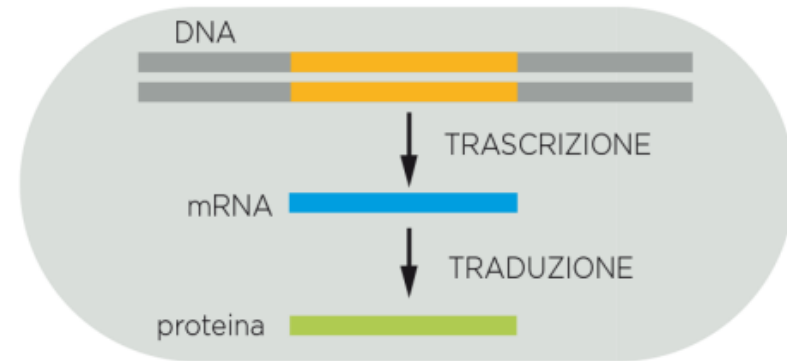


Il gene eucariotico è discontinuo. Le parti codificanti (ESONI) sono interrotte da lunghe sequenze non codificanti (INTRONI)

(A) EUCARIOTI



(B) PROCARIOTI



Nei procarioti, l'RNA neo-sintetizzato e' immediatamente disponibile per la sintesi delle proteine.

Trascrizione

Il primo passaggio della lettura delle informazioni contenute nel gene è rappresentato dalla sintesi di molecole di RNA.

Nelle cellule procariotiche ed eucariotiche, la sintesi di RNA è diretta dal DNA

- La trascrizione richiede uno stampo a DNA, i corretti ribonucleotidi trifosfati (ATP, GTP, CTP e UTP) e una RNA polimerasi.
- La trascrizione del DNA si svolge in tre tappe: inizio, allungamento e terminazione.

Rivediamo brevemente l'RNA

L'RNA è un polimero lineare composto da 4 tipi di subunità nucleotidiche unite insieme da legami fosfodiesterici che differisce dal DNA per 3 aspetti:

- 1) I nucleotidi dell'RNA sono ribonucleotidi e contengono il ribosio come zucchero
- 2) Contiene la base uracile al posto della timina del DNA (U si appaia con A mediante legami idrogeno)
- 3) Mentre il DNA lo troviamo come elica a doppio filamento, l'RNA è a singolo filamento (si possono però ripiegare a dare particolari conformazioni)

Le cellule contengono tre tipi principali di RNA:

- L'RNA messaggero (mRNA), costituito da un singolo filamento, è un trascritto di sequenze di DNA e trasporta l'informazione genetica ai ribosomi.
- L'RNA ribosomiale (rRNA), principale costituente dei ribosomi.
- L'RNA di trasporto o RNA transfer (tRNA), di piccole dimensioni, con la funzione di trasportare gli amminoacidi durante la sintesi proteica.

- **piccoli RNA nucleari** (snRNA): con le proteine snRNP sono importanti nel meccanismo dello splicing dell'mRNA;

- **micro RNA** (miRNA): piccoli RNA coinvolti in meccanismi di regolazione. Inibiscono la traduzione di determinati RNA messaggeri.

La trascrizione produce una molecola di RNA a singolo filamento complementare al filamento del DNA

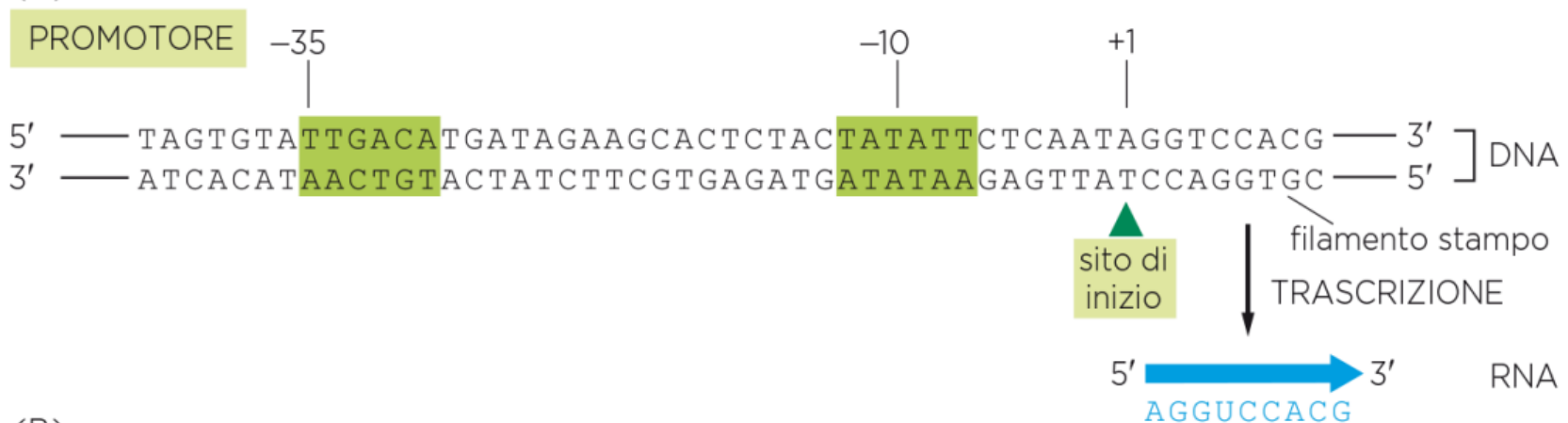
La trascrizione avviene in tre fasi:

- **inizio:** avviene in corrispondenza di sequenze del DNA dette promotori, alle quali si lega l'RNA polimerasi.
- **allungamento:** avviene grazie all'enzima RNA polimerasi.
- **terminazione:** avviene in corrispondenza di sequenze di DNA dette di terminazione.

ENZIMA: RNA POLIMERASI
SUBSTRATI: nucleotidi trifosfati

L' RNA polimerasi riceve le «istruzioni» da segnali presenti nel DNA

(A)

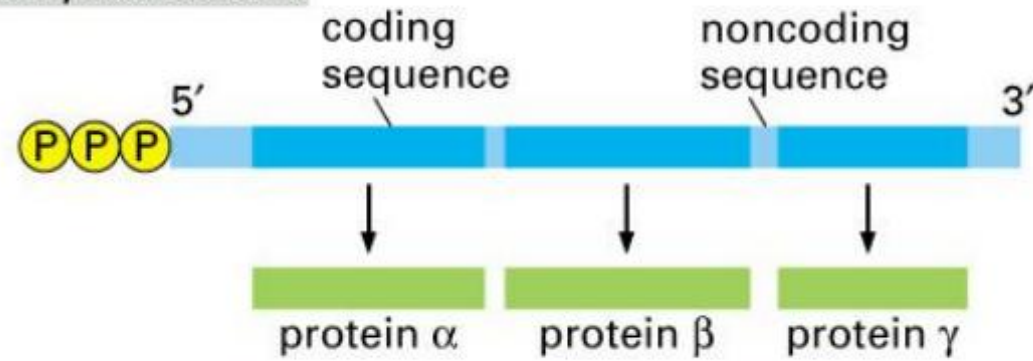


(B)

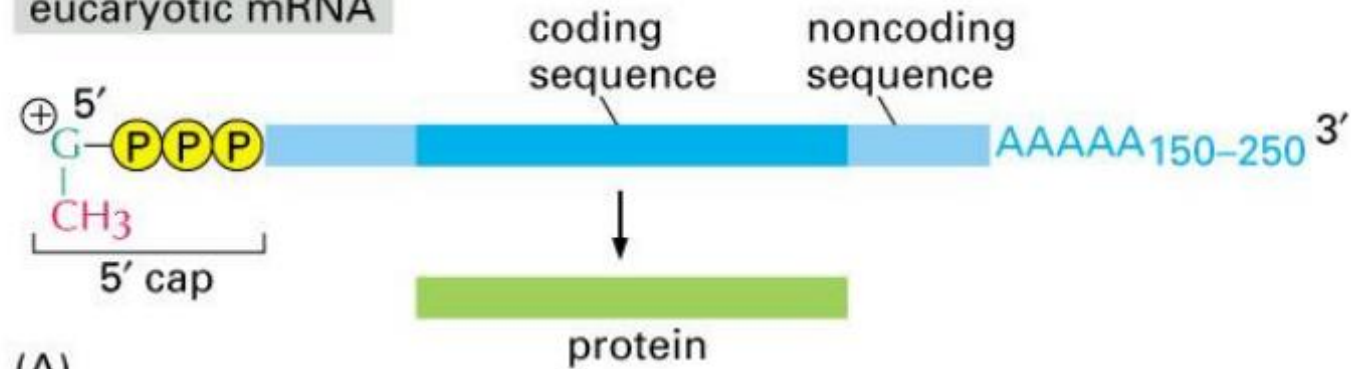


Per ogni gene (o, nei procarioti, per ogni serie di geni) c'è almeno un promotore. I promotori sono importanti sequenze di controllo che «dicono» all'RNA polimerasi tre cose: da dove far partire la trascrizione, quale filamento del DNA trascrivere e in quale direzione procedere.

procaryotic mRNA

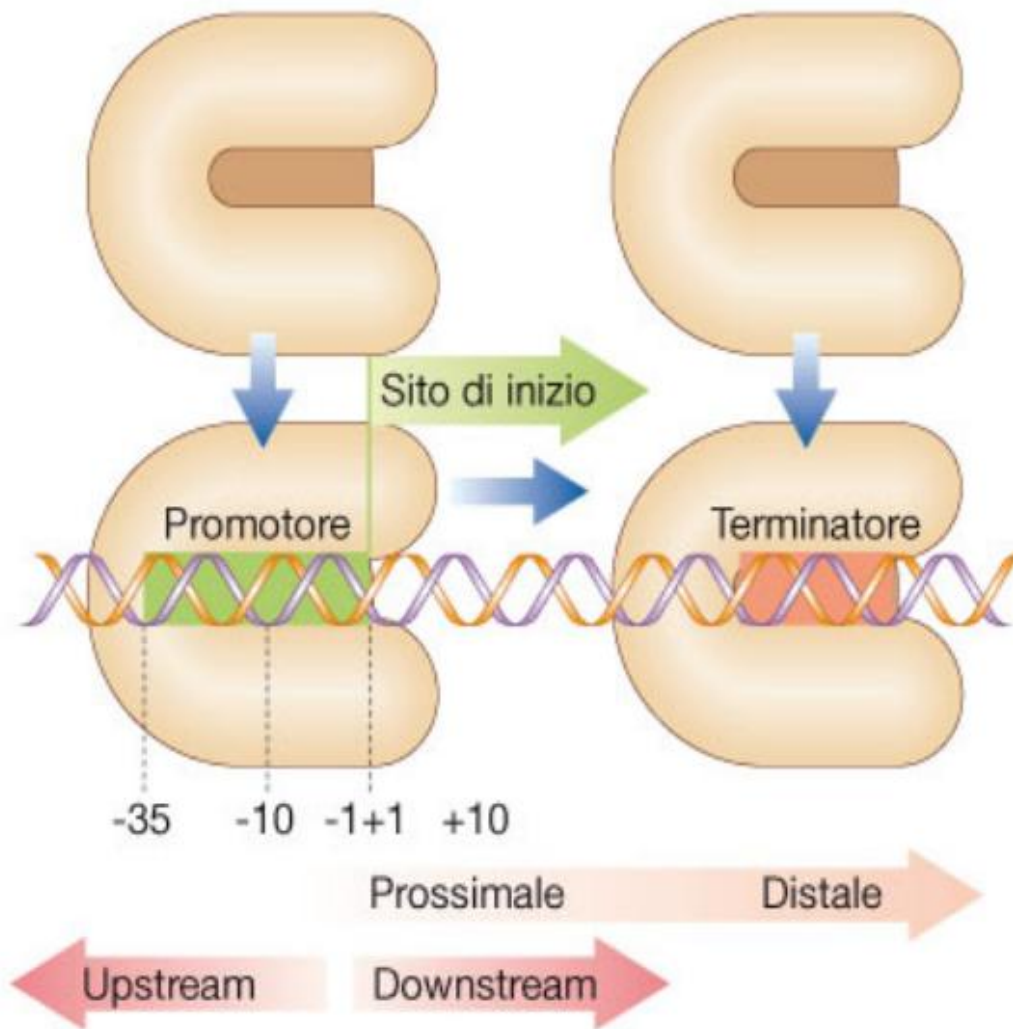


eucaryotic mRNA



(A)

Figure 6–22 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

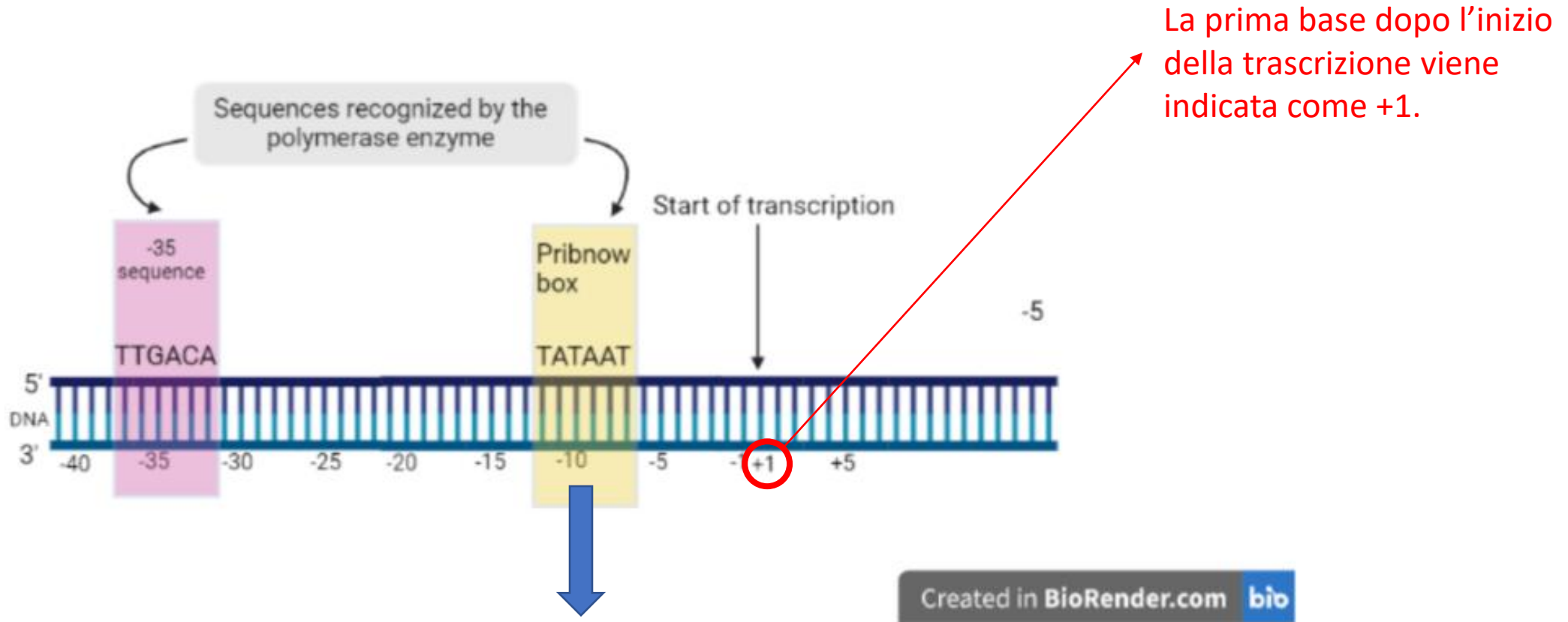


La RNA pol si lega a particolari sequenza sul DNA dette **promotori**, situate all'inizio del gene. La trascrizione procede fino a una particolare sequenza detta **terminatore**.

Il tratto di DNA dal promotore al terminatore, espresso come una singola molecola di RNA viene detta **unità di trascrizione**.

Le sequenze di DNA che precedono il punto d'inizio della trascrizione sono dette "a monte" (upstream), mentre quelle che seguono sono dette "a valle" (downstream)

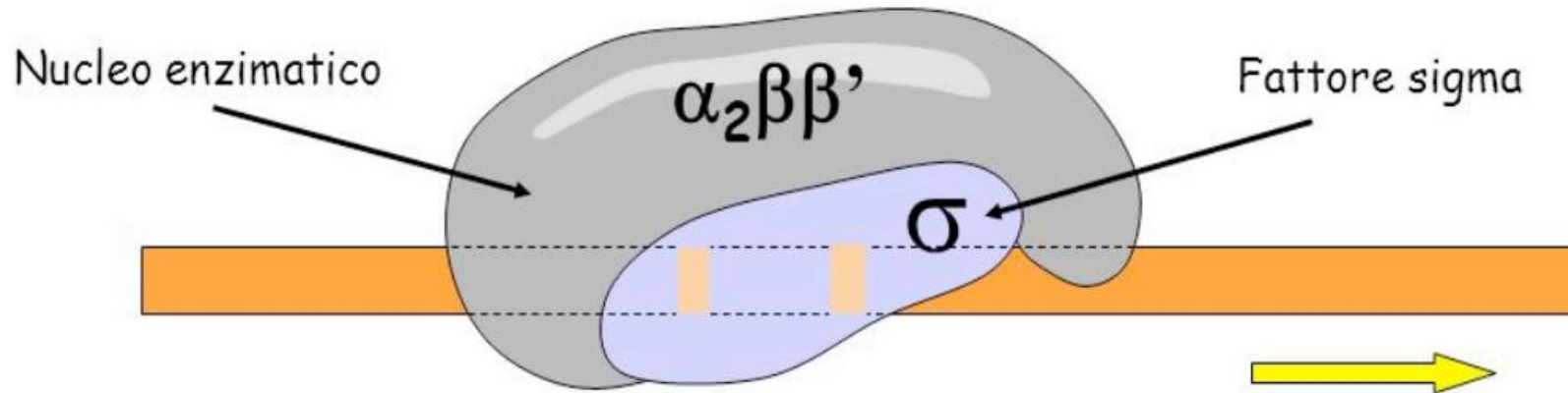
- Promotore nei procarioti



Il fattore sigma riconosce in particolare delle sequenze che fanno parte del cosiddetto pribnow box

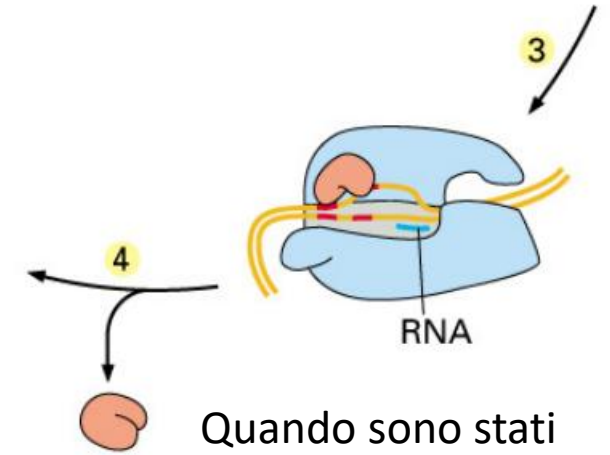
Nei procarioti:

L'RNA polimerasi batterica in forma attiva, chiamata oloenzima, è formata dall'unione del nucleo enzimatico (core) e dal fattore sigma (σ).



il fattore σ riconosce il sito di inizio della trascrizione (regione del promotore), lo lega e innesca la denaturazione del DNA per formare la bolla di trascrizione

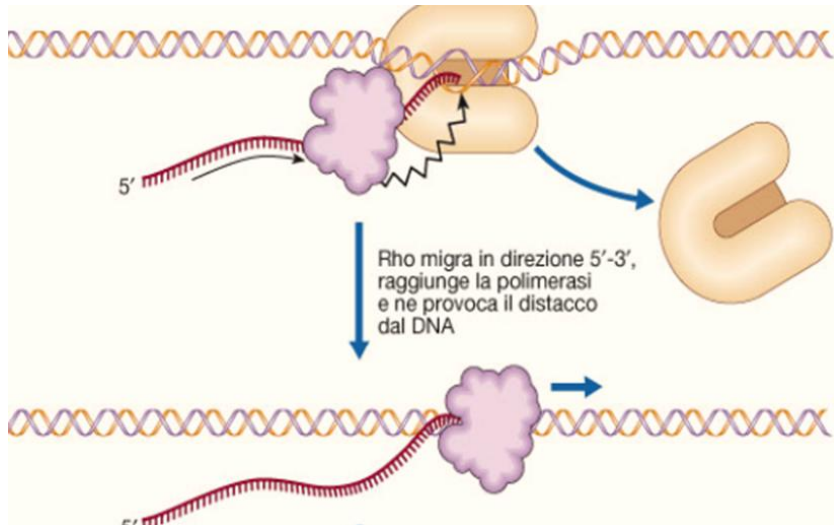
*senza consumo di ATP: diverso da elicasi



Quando sono stati incorporati circa 10 nn, il fattore σ si dissocia

La fase di elongazione procede fino a che la RNA pol incontra un secondo segnale nel DNA, il terminatore, che induce l'arresto della polimerasi con rilascio del DNA stampo e dell'RNA neo-sintetizzato (fase di terminazione)

La terminazione avviene in siti distinti e può prevedere la formazione di una struttura a forcina (terminatori intrinseci) oppure proteine (terminazioni Rho-dipendenti)



Struttura a forcina

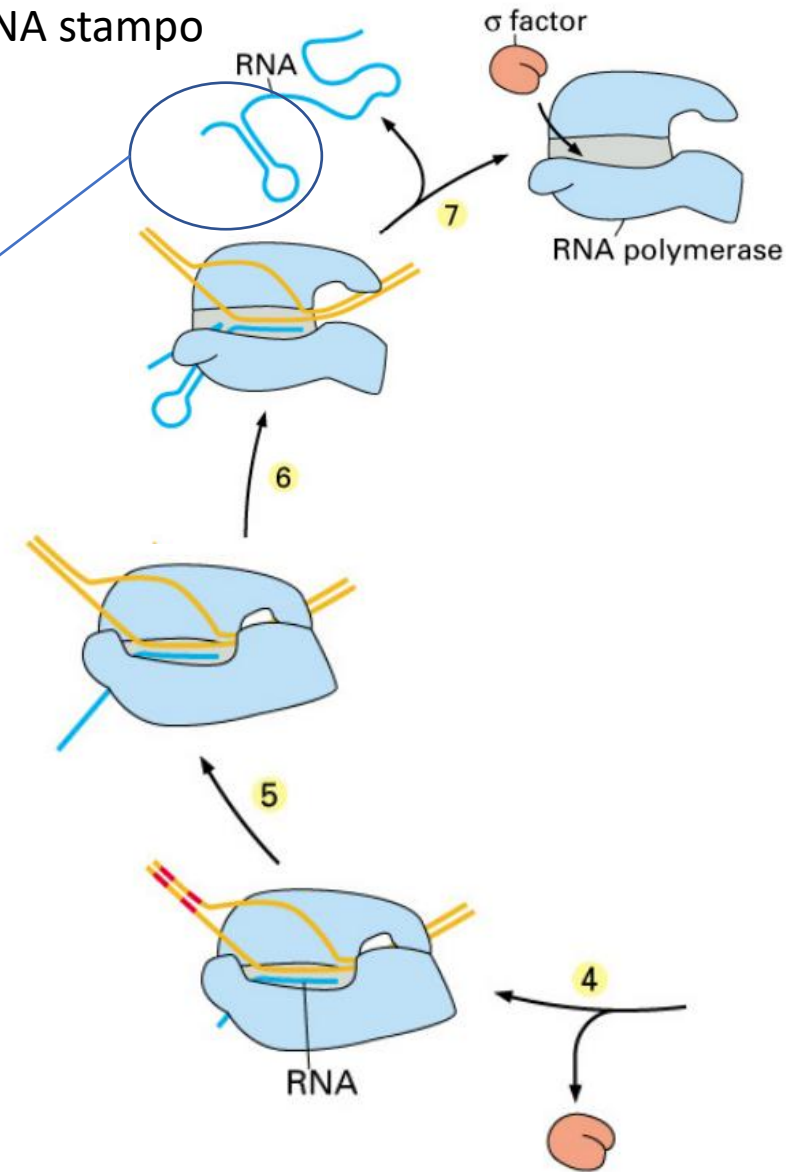
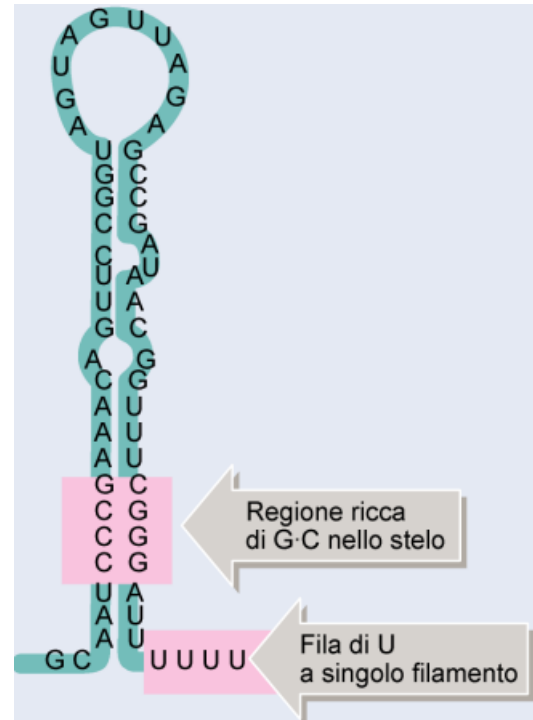
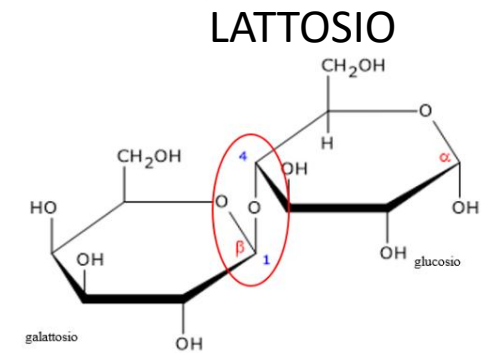
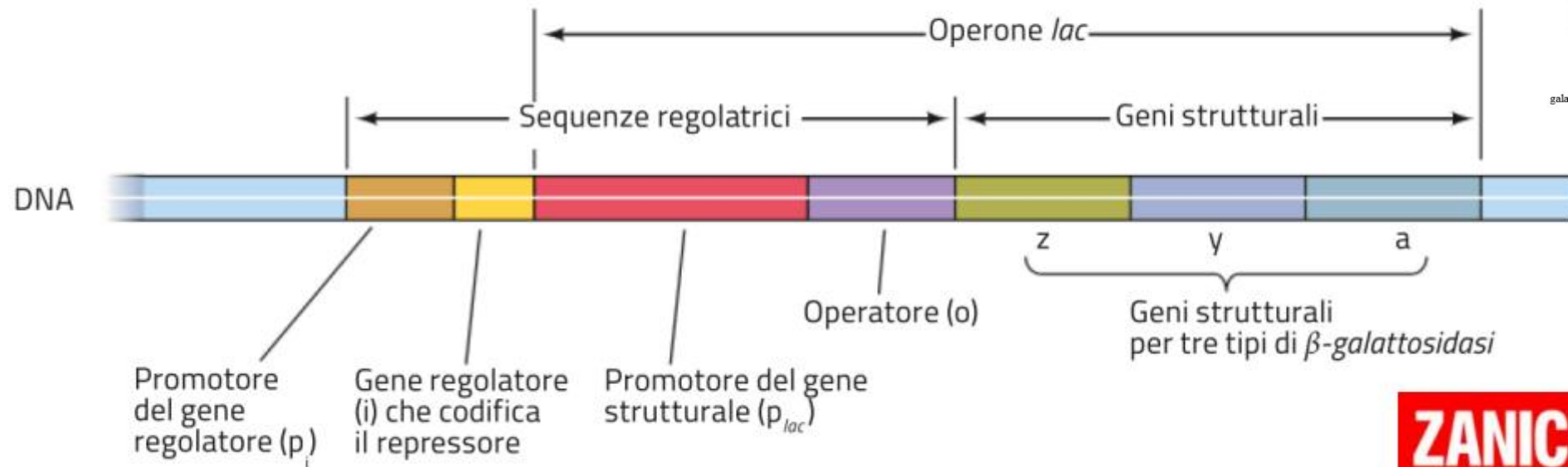


Figure 6-10 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Regolazione della trascrizione: operone lac



geni in successione controllati da un unico promotore

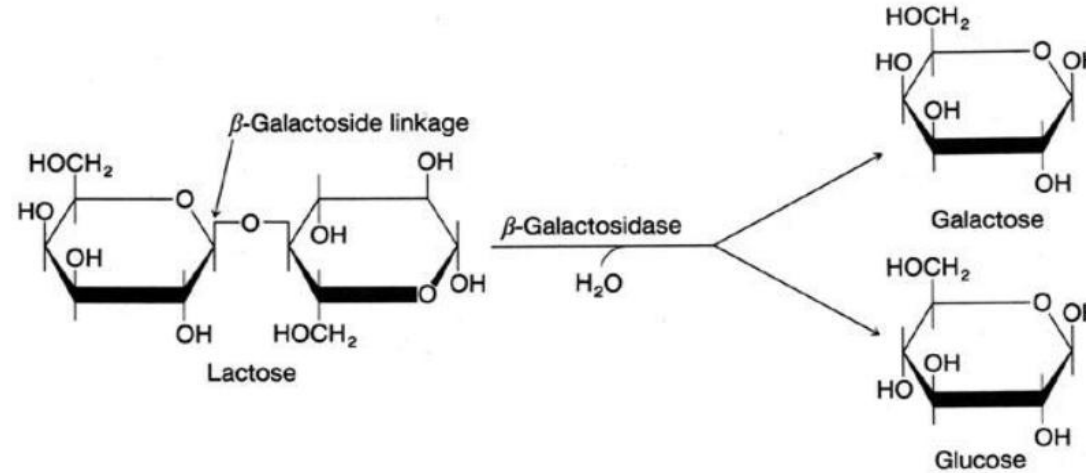


ZANICHELLI

L'operone viene definito inducibile: il substrato (lattosio) funziona da induttore e fa partire la trascrizione

L'OPERONE da origine ad un singolo RNA messaggero che viene detto **POLICISTRONICO**, perchè codifica più di una proteina (CISTRONE è l'unità genetica più piccola che codifica un solo peptide).

1) beta galattosidasi

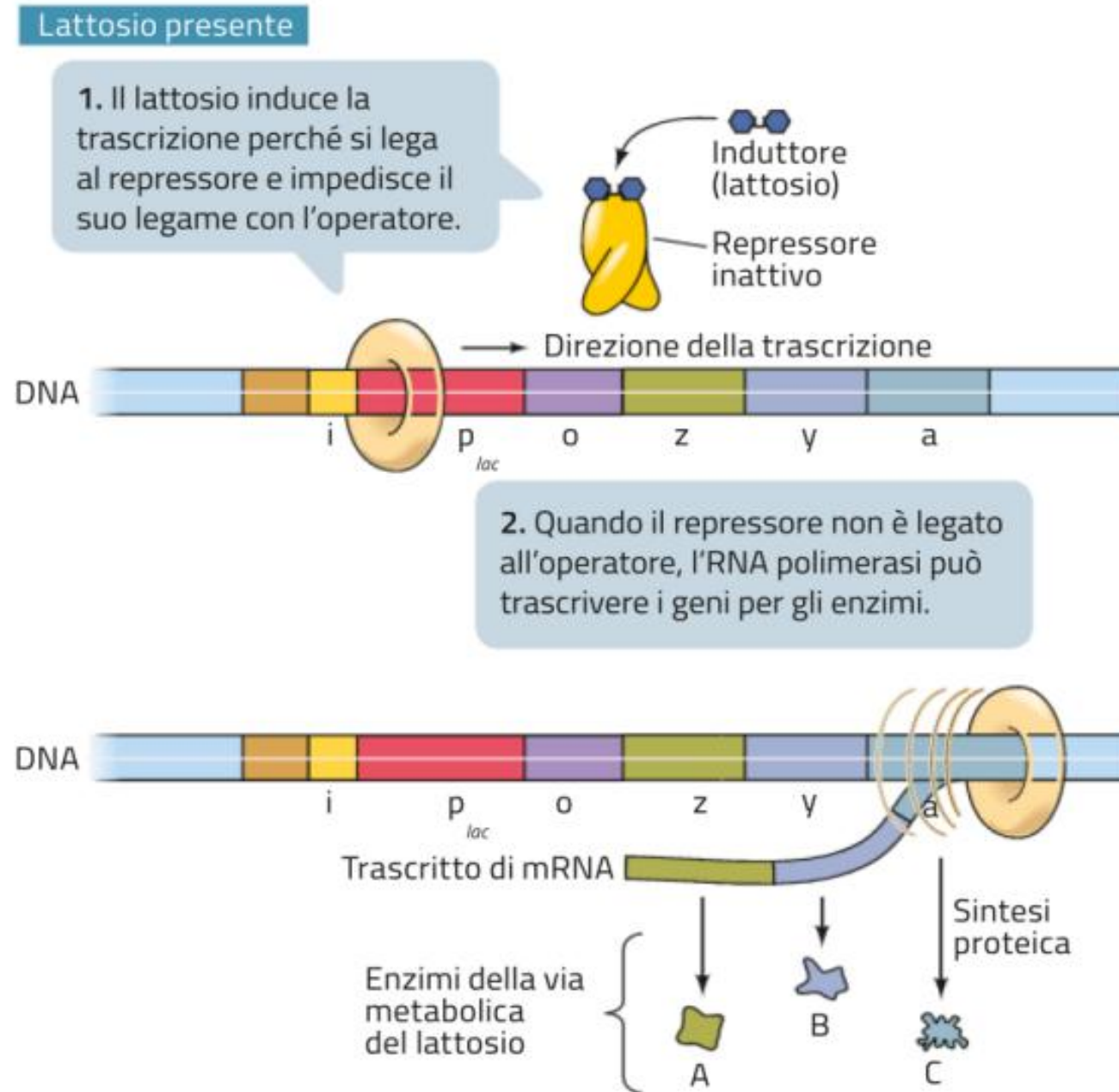


2) galattoside acetil transferasi

3) lattosio permeasi

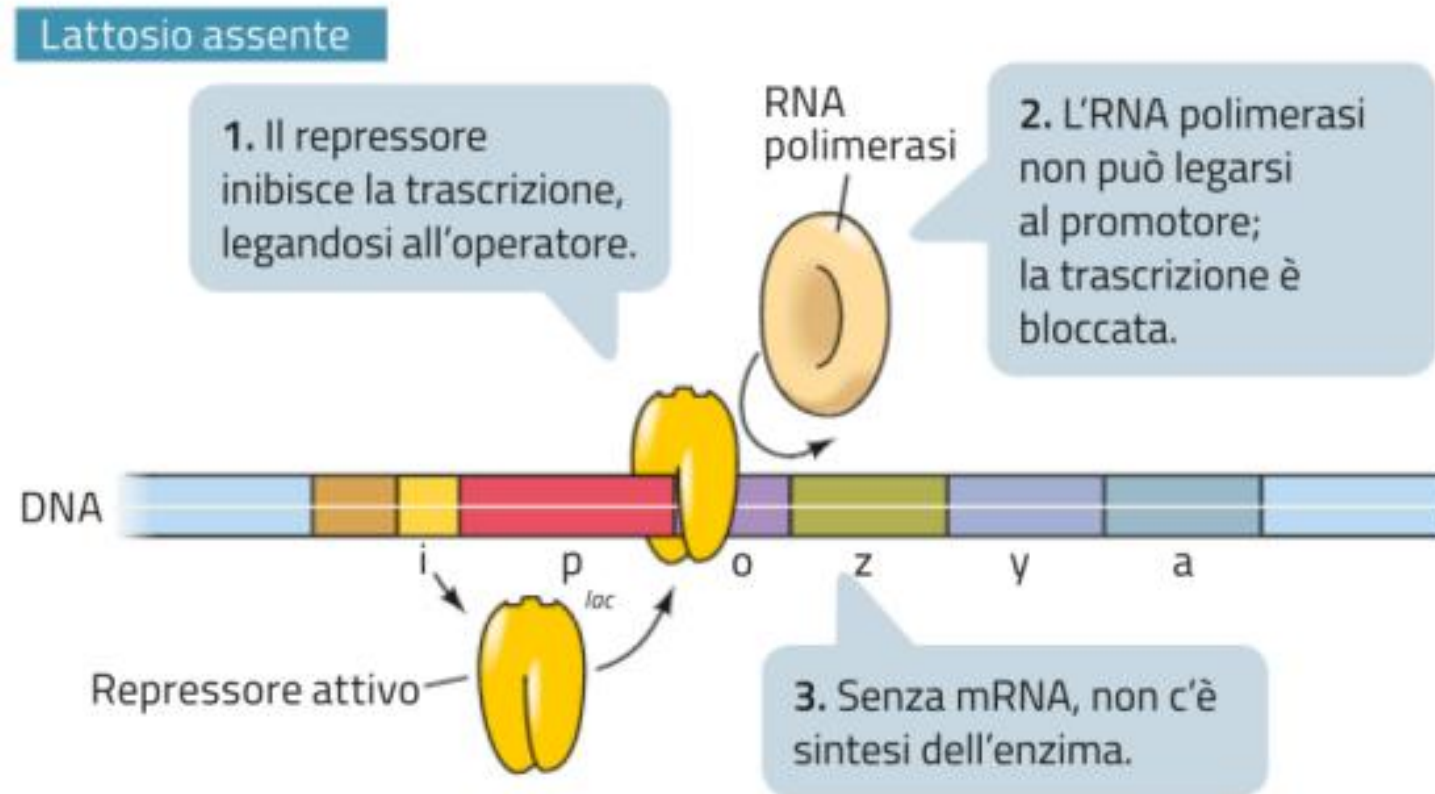
nei Procarioti uno stesso promotore controlla l'espressione di più geni che codificano per proteine funzionalmente correlate. Nell'operone lac, uno stesso promotore permette la trascrizione dei geni che codificano per enzimi che permettono ai batteri di metabolizzare il lattosio. Quindi, nei Procarioti si parla di mRNA policistronici. Negli Eucarioti generalmente un unico promotore controlla l'espressione di un solo gene; si parla infatti di mRNA monocistronici

Scenario 1: presenza di lattosio



Scenario 2: assenza di lattosio

Il repressore si lega al sito operatore impedendo alla RNA polimerasi di trascrivere i geni dell'operone



Dove?	Nel citoplasma
Quante RNA polimerasi?	Una sola RNA pol, che sintetizza i 3 tipi di RNA (mRNA, rRNA, tRNA)
Quali fattori sono richiesti all'inizio?	L'inizio non richiede particolari fattori di trascrizione
	Le unità trascrizionali contengono uno o più geni (messaggeri policistronici)

Trascrizione negli eucarioti

Rna polimerasi

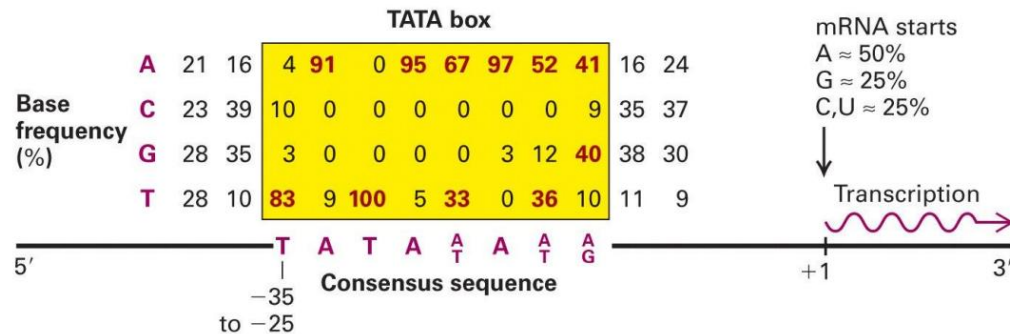
RNA pol I	Trascrive tutti i geni rRNA (meno 5S rRNA)
RNA pol II	Trascrive tutti i geni strutturali (tutti mRNA), alcuni geni snRNA, miRNA
RNA pol III	Trascrive tutti i geni tRNA, il gene 5s rRNA, alcuni miRNA

La RNA polimerasi si sposta lungo il filamento stampo del DNA in direzione 3'→5', producendo il trascritto di RNA per addizione sequenziale dei nucleotidi sull'estremo 3' dell'RNA in crescita.

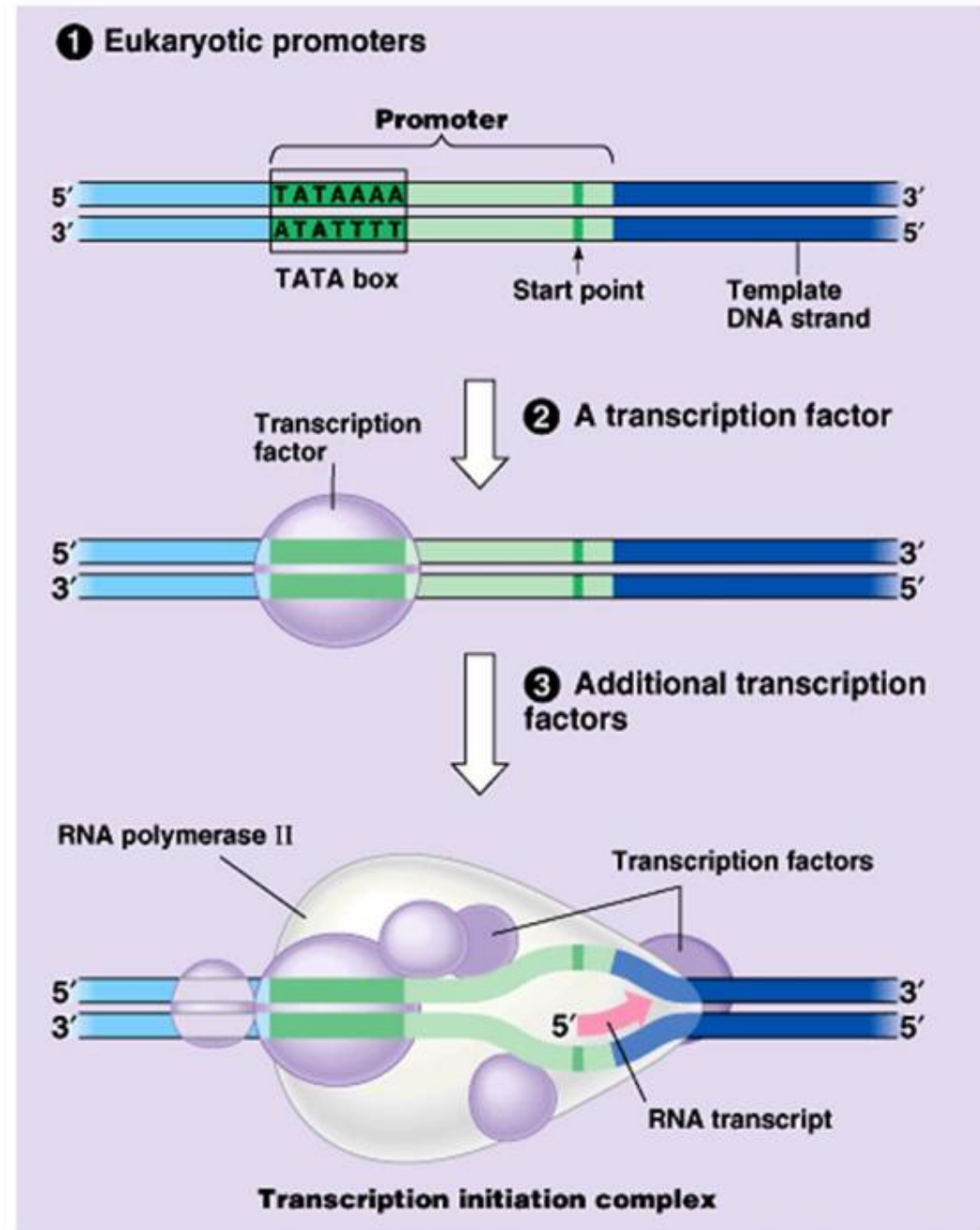
RNA messaggero (mRNA): porta l'informazione per la sintesi delle proteine;

- **RNA ribosomali (rRNA):** costituiscono, insieme a specifiche proteine, i ribosomi in cui avviene la sintesi proteica;
- **RNA transfer (tRNA):** RNA di trasporto degli aminoacidi. Necessari per tradurre l'informazione contenuta nell'mRNA nel corrispondente amminoacido della nascente proteina;
- **piccoli RNA nucleari (snRNA):** con le proteine snRNP sono importanti nel meccanismo dello splicing dell'mRNA;
- **micro RNA (miRNA):** piccoli RNA coinvolti in meccanismi di regolazione. Inibiscono la traduzione di determinati RNA messaggeri.

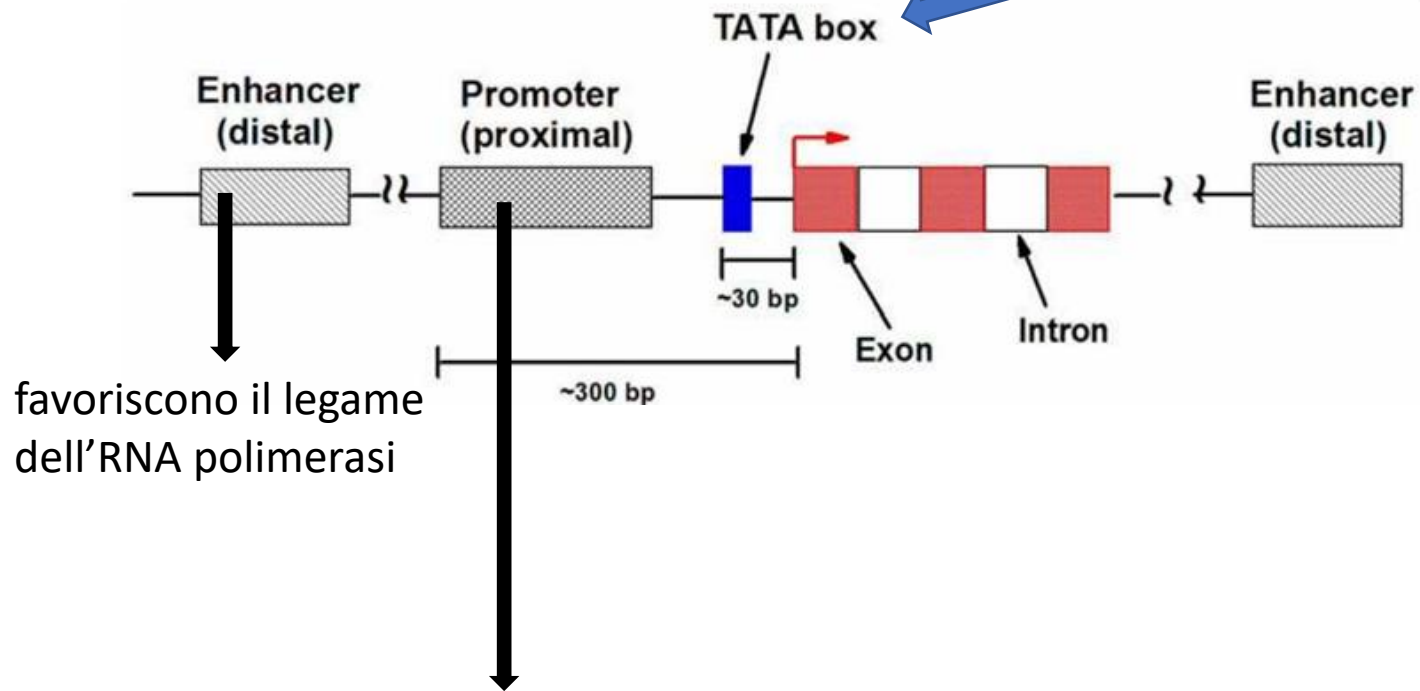
Negli eucarioti i promotori dei geni sono riconosciuti da fattori generali di trascrizione la cui funzione è di attirare il nucleo centrale della RNA polimerasi II, in modo tale che esso si posizioni correttamente in corrispondenza del sito d'inizio della trascrizione per avviare la sintesi dell'RNA



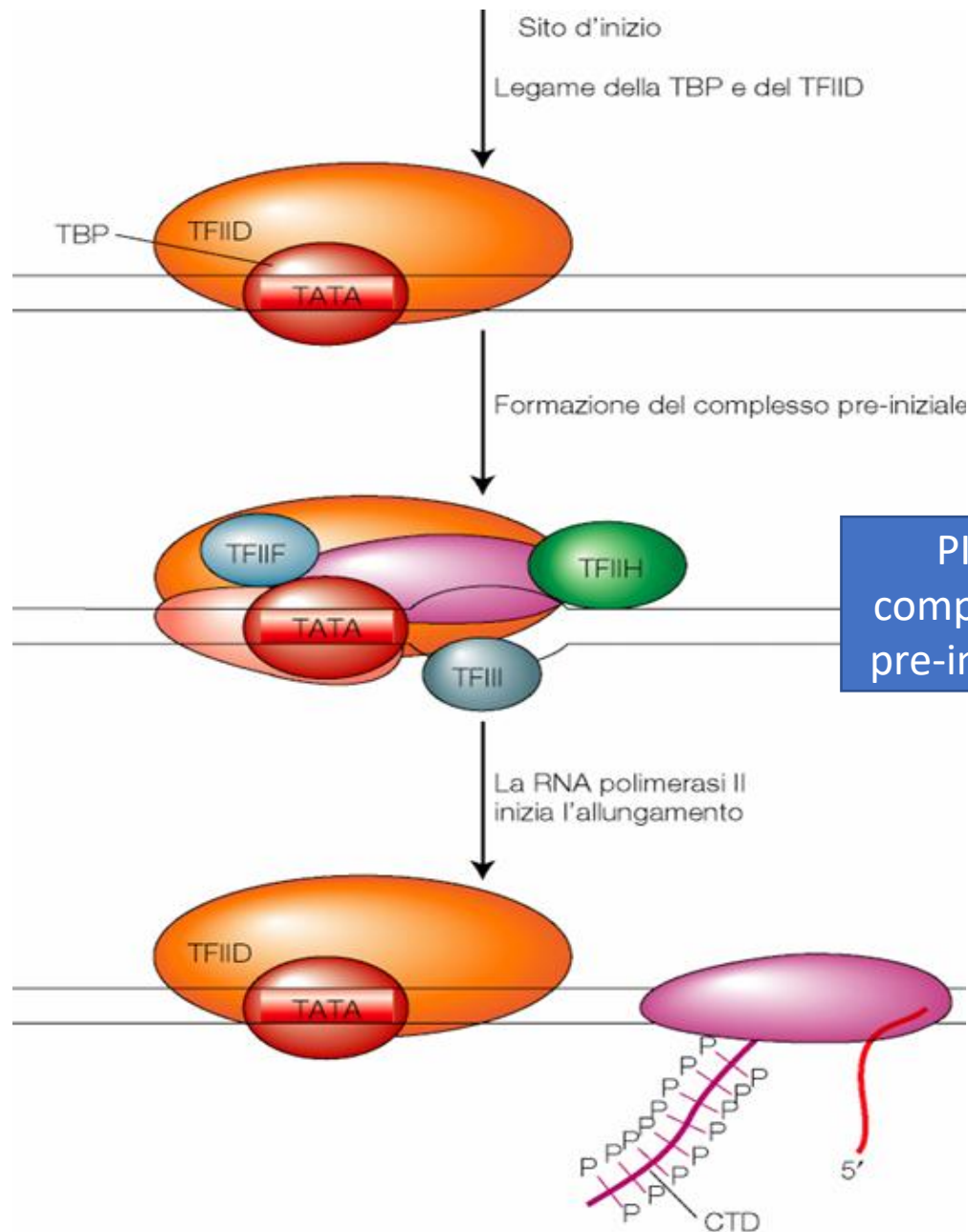
Cinque fattori generali della trascrizione (GTFs)



Struttura del gene

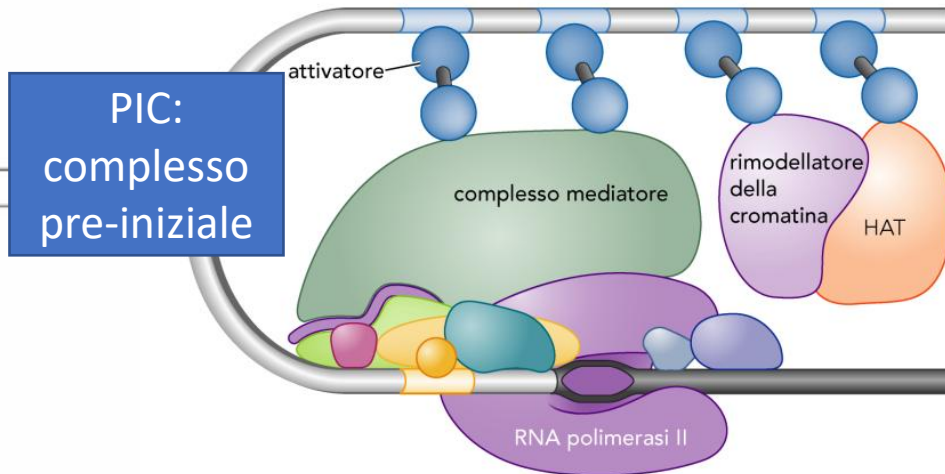


Sono specifiche sequenze di DNA (sequenze consenso) localizzate a monte del sito di inizio della trascrizione a cui si lega la RNA polimerasi per iniziare la sintesi di RNA (legame coadiuvato da proteine chiamate fattori di trascrizione)



Inizio trascrizione negli eucarioti:

- Legame della TBP
- La TBP richiama altri fattori di trascrizione e la RNA polimerasi al sito d'inizio della trascrizione



- La trascrizione parte dopo la fosforilazione del dominio con coda carbossilica (CTD) della RNA polimerasi I

L'RNA polimerasi degli eucarioti non è in grado di legarsi semplicemente al promotore e di iniziare a trascrivere; essa infatti si lega al DNA soltanto *dopo* che sul cromosoma si sono associate varie proteine regolatrici dette ***fattori di trascrizione***

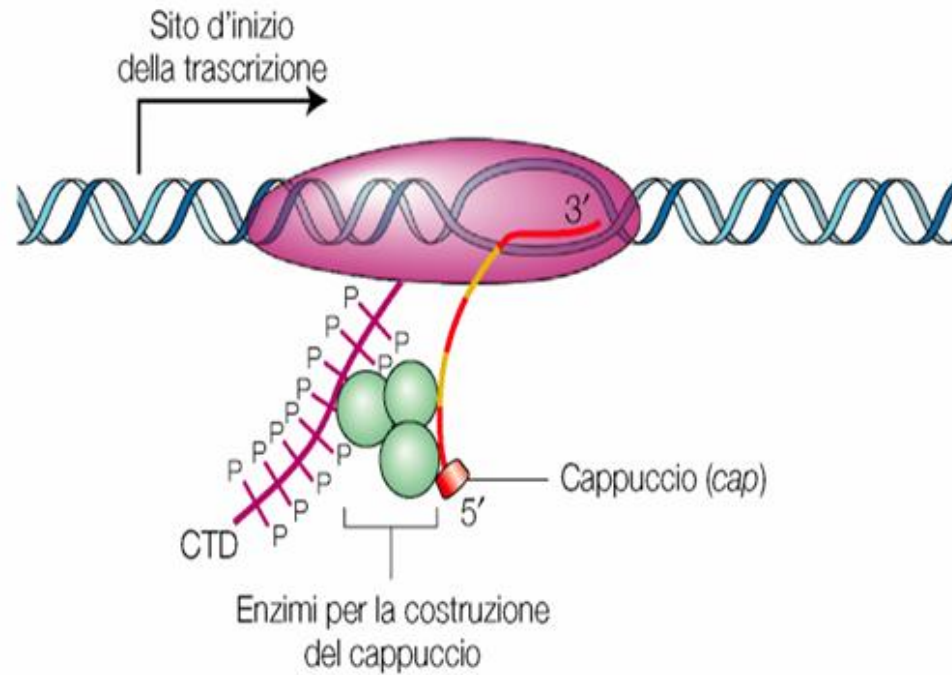
- un regolatore è elemento trans attivo (diffusibile): RNA pol, fattori di trascrizione, miRNA ecc. agisce su qualunque copia del suo bersaglio
- il sito di legame (bersaglio) sul DNA/RNA è elemento cis attivo (promotore, operatore, enhancer ecc.) ha effetto solo sul DNA adiacente



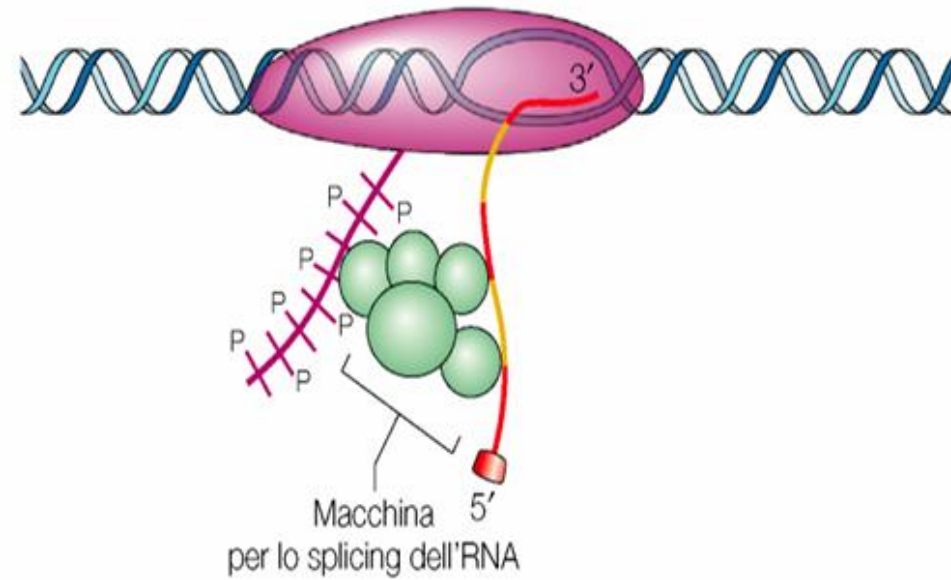
Elemento CIS-AGENTE: regola l'espressione di una unità trascrizionale adiacente situata sulla medesima molecola di DNA

La fosforilazione reversibile degli amminoacidi del CTD crea i siti di legame per i vari enzimi e per i fattori necessari alla sintesi del cappuccio e allo splicing

(a) Formazione del cappuccio (capping)



(b) Splicing



Processamento dell'mRNA

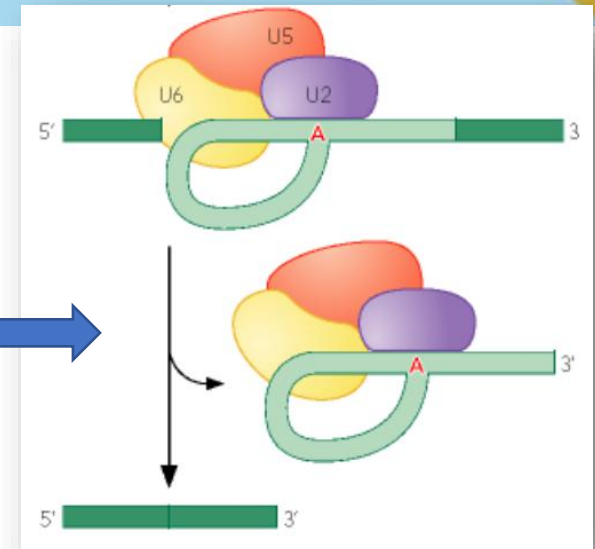
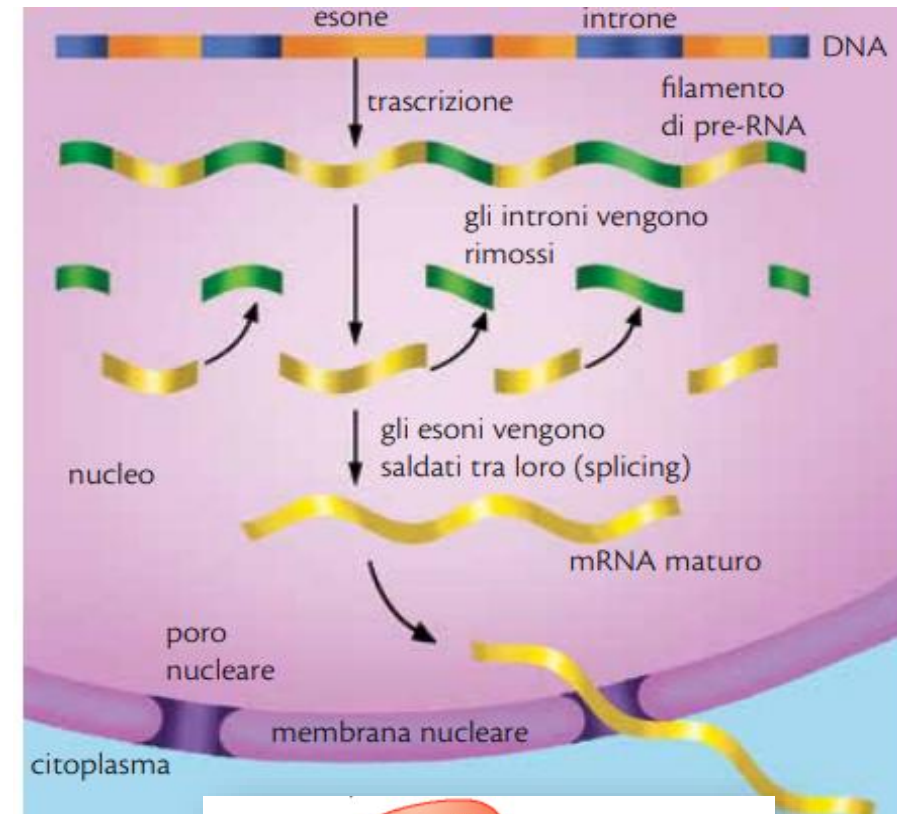


- Capping
- Poliadenilazione
- Splicing

Gli esoni vengono trascritti insieme agli introni, formando un pre-RNA, da cui vengono successivamente rimossi gli introni, per formare un mRNA "maturo", costituito dai soli esoni saldati tra loro.

La rimozione degli introni e la giustapposizione degli **esoni** avviene attraverso un processo definito **splicing dell'RNA**, in cui intervengono particolari ribonucleoproteine nucleari (cioè molecole fatte di RNA e proteine) chiamate **snRNP**.

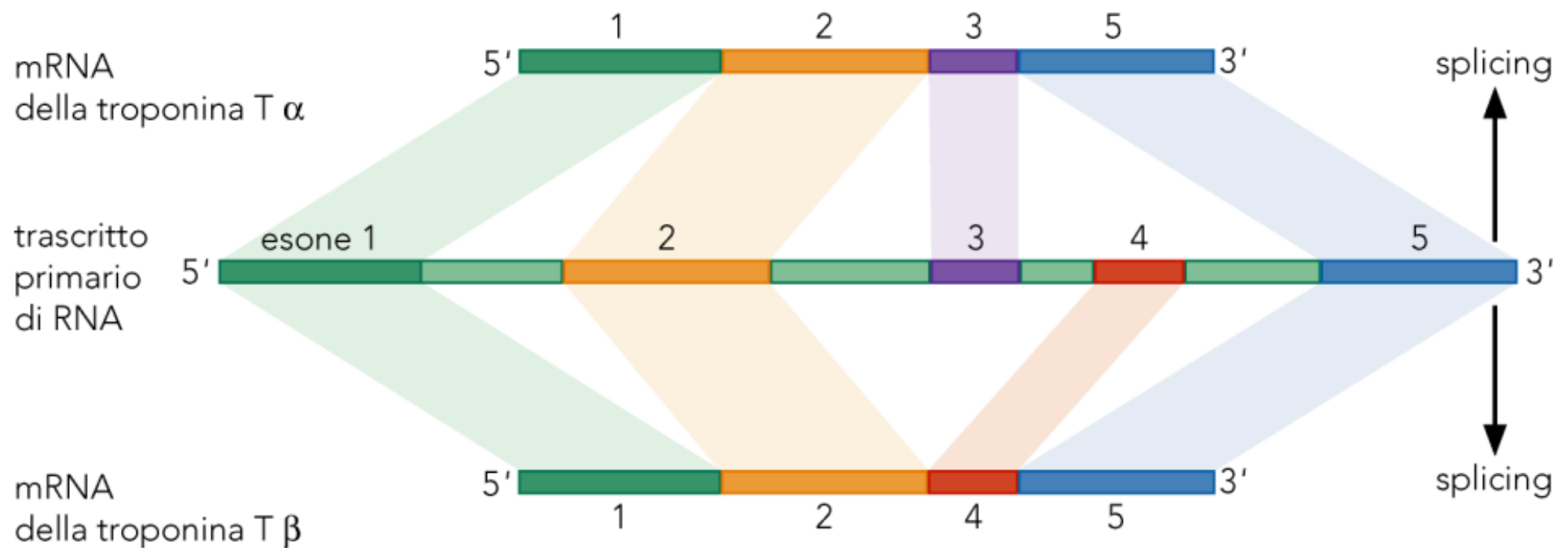
Usando energia fornita dall'ATP, si aggiungono alcune proteine e si forma un voluminoso complesso RNA-proteine, definito **spliceosoma**. Questo complesso taglia il pre-mRNA, elimina gli introni e ricuce tra loro le estremità degli esoni, producendo l'mRNA maturo.



Splicing alternativo

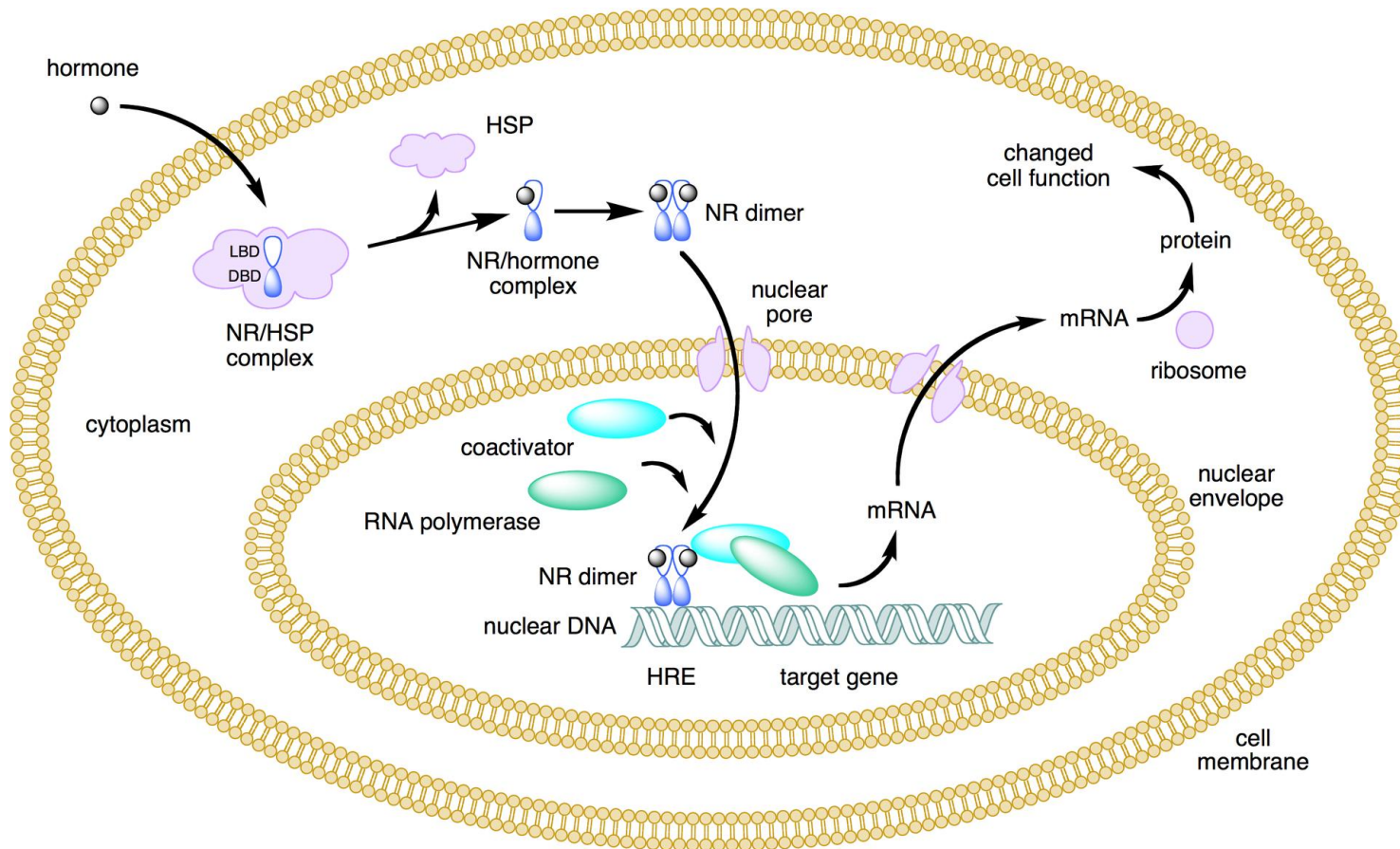
Uno stesso gene può produrre diversi mRNA per splicing alternativo grazie all'intervento di attivatori e repressori

Es: splicing del gene della troponina T



Risposta ormonale

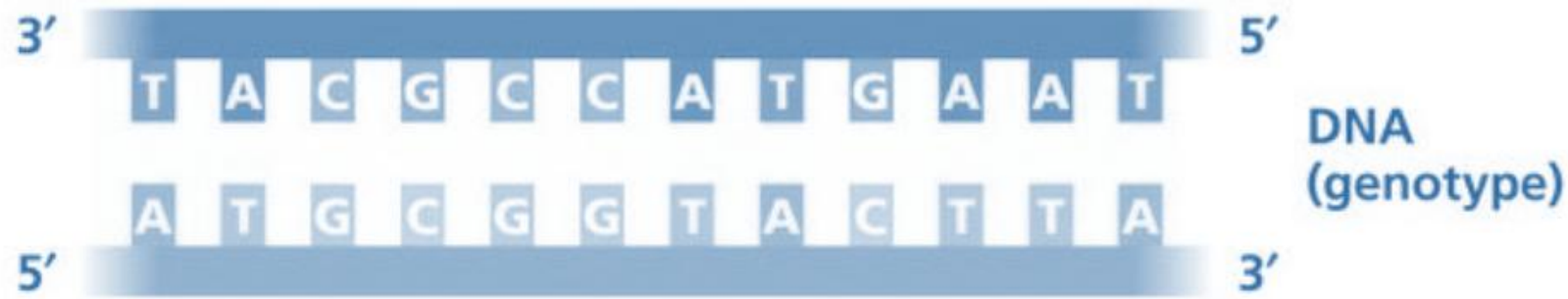
L'espressione genica indotta da un ormone è mediata da specifiche sequenze sul DNA, chiamate elementi HRE (elementi di risposta all'ormone)



La caratteristica tipica dei recettori nucleari, non riscontrabile in altre strutture recettoriali, è quella di interagire direttamente con specifiche sequenze di DNA, chiamate HRE (Hormone responding element), in modo da modularne l'espressione genica

Traduzione

Il processo di traduzione determina la sintesi di proteine



↓ Transcription

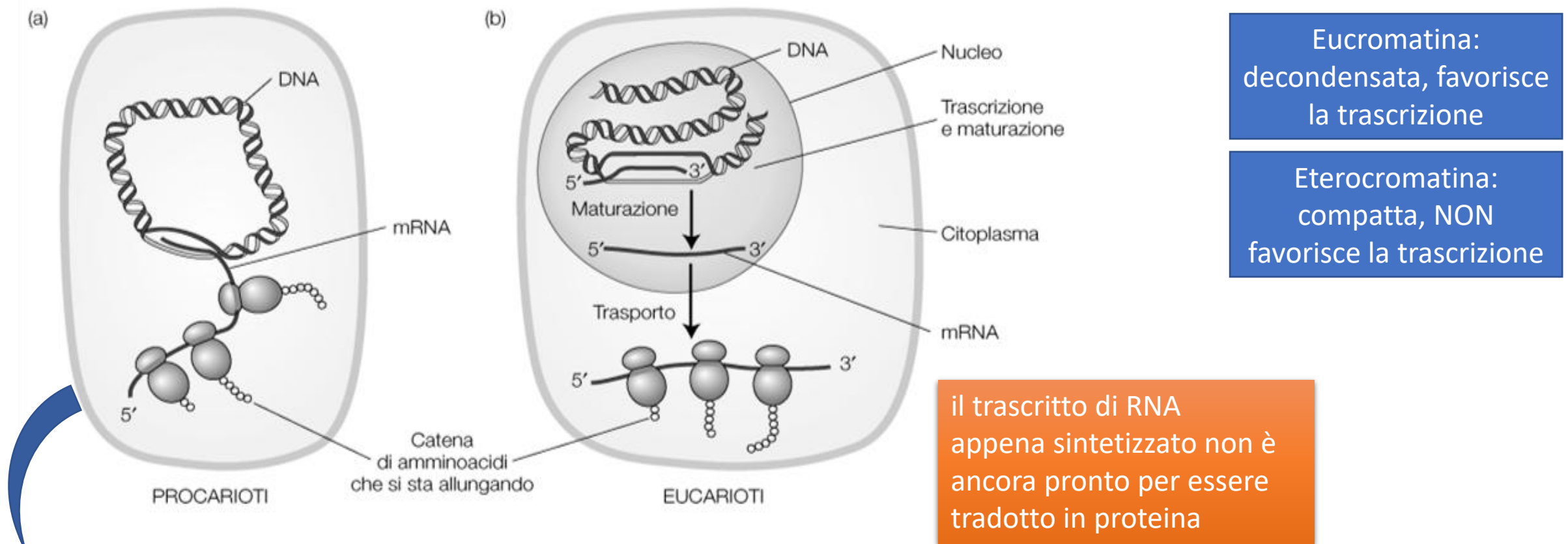


↓ Translation
by ribosomes



l'informazione genetica
contenuta
nell'RNA messaggero
(mRNA) viene decodificata
per sintetizzare proteine
specifiche

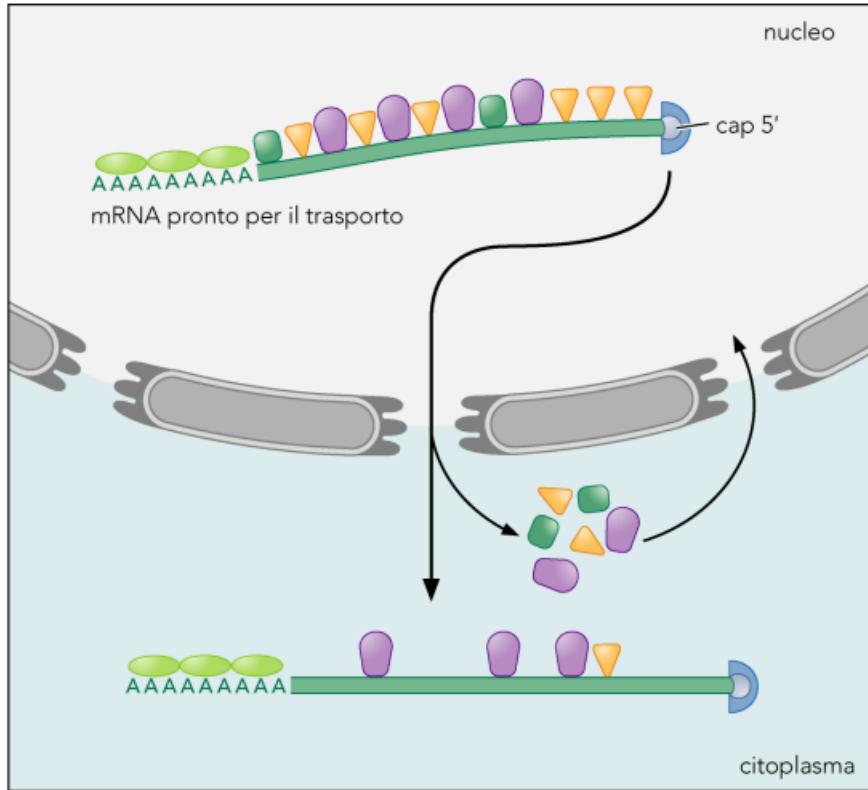
La trascrizione negli eucarioti è più complessa perché il DNA è compattato nella cromatina e nucleosomi.



Gli mRNA interagiscono con i ribosomi ancora prima di essere completamente trascritti, cosicché la trascrizione di un mRNA e la sua traduzione sono processi accoppiati.

Invece negli eucarioti gli mRNA vengono trascritti e maturati all'interno del nucleo, per passare successivamente nel citoplasma dove possono interagire con i ribosomi per la sintesi proteica

Gli mRNA modificati con successo sono guidati attraverso i complessi dei pori nucleari (NPC)



Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

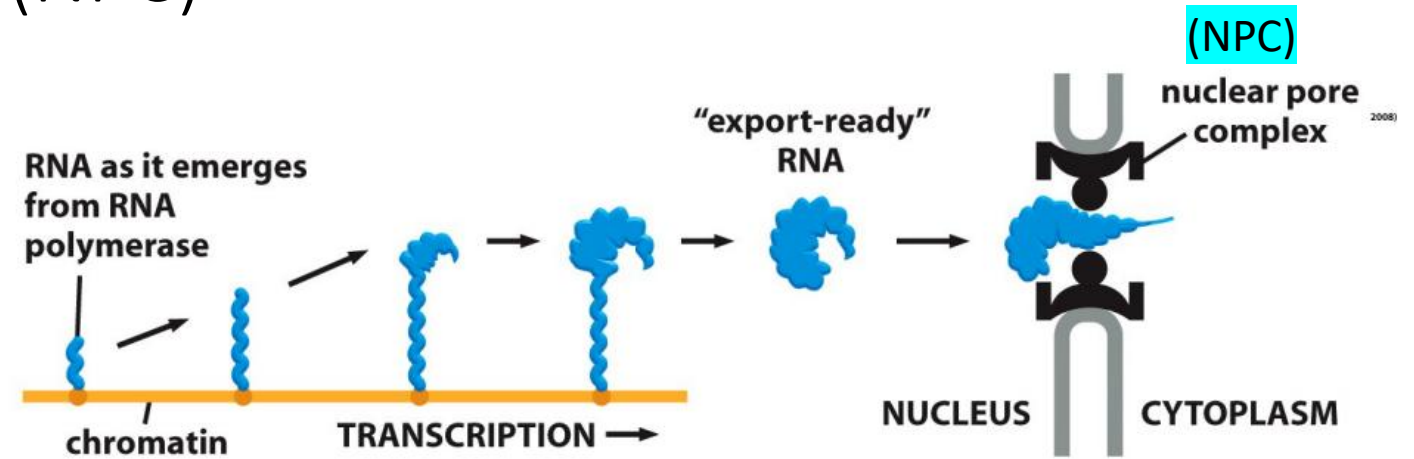
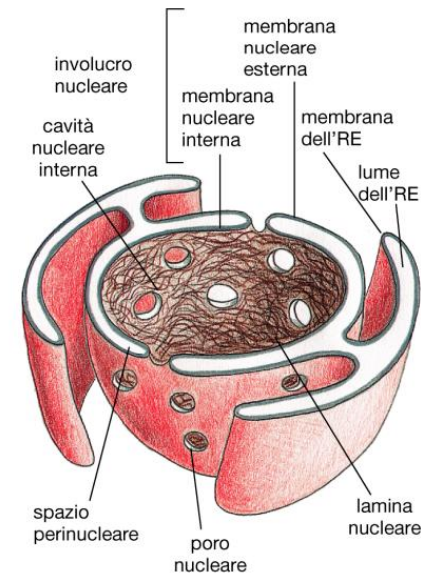


Figure 6-39a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



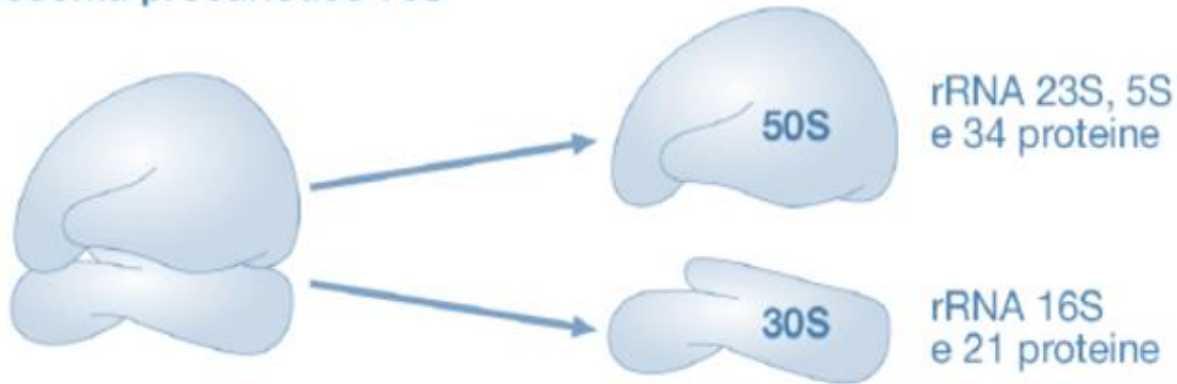
I ribosomi sono i siti della sintesi proteica

rRNA +
proteine

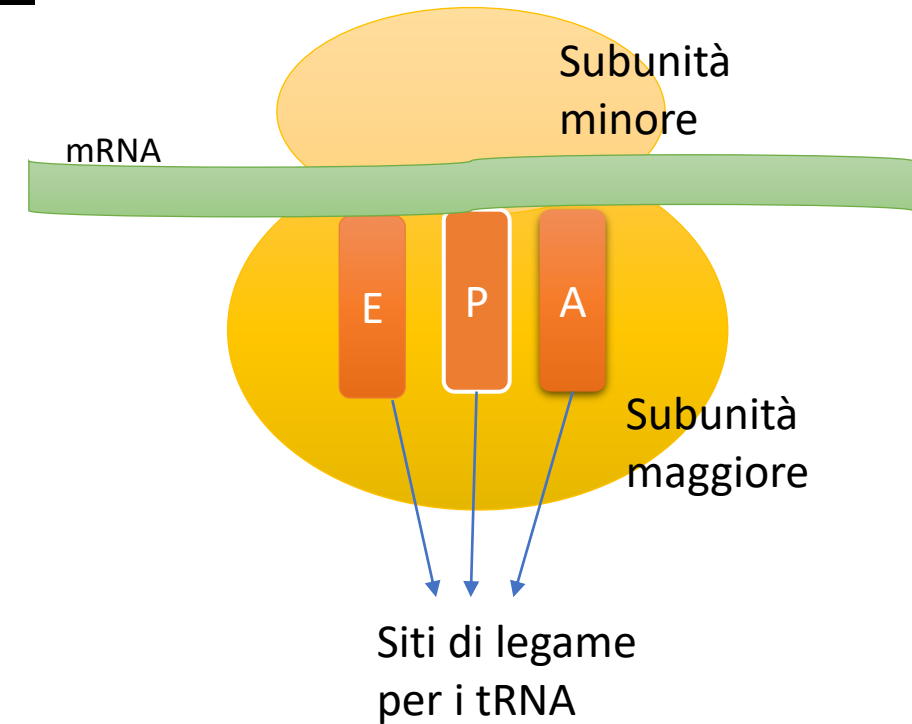
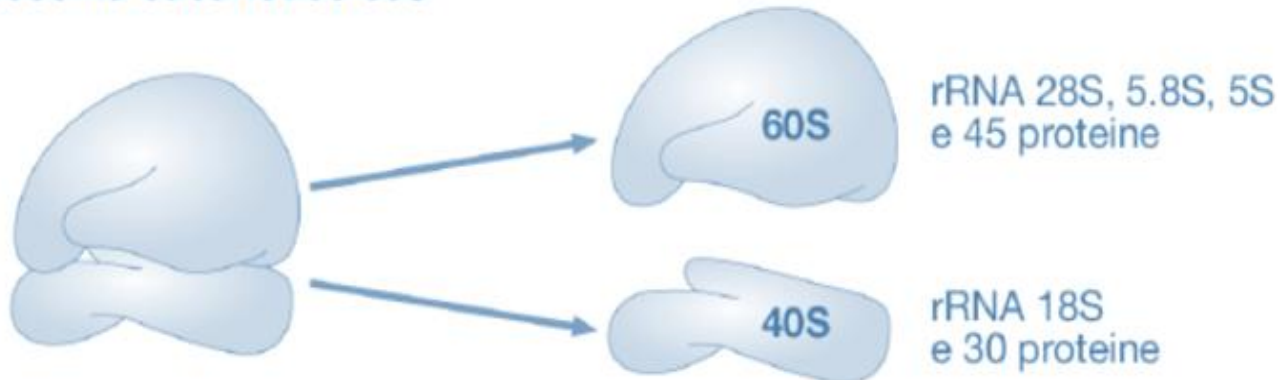
2 subunità

traduzione
degli mRNA

Ribosoma procariotico 70S



Ribosoma eucariotico 80S



sito A (amminoacidico): lega il tRNA amminoacilato (cioè portante un amminoacido) in ingresso,
sito P (peptidico): lega l'ultimo tRNA entrato, che porta la catena peptidica nascente
sito E (exit): lega il tRNA ormai scarico che deve essere rilasciato

Il nucleolo è una fabbrica che produce ribosomi: E' il sito di trascrizione e modificazione degli rRNA e di assemblaggio delle subunità dei ribosomi

Il nucleolo è la struttura più evidente del nucleo della cellula eucariotica quando lo si osserva al microscopio ottico.

- È il sito di modificazione degli rRNA e del loro assemblaggio nelle subunità dei ribosomi
- Non è circondato da una membrana
- È un ampio aggregato di macromolecole e comprende: geni per gli rRNA, rRNA precursori e maturi, enzimi, proteine ribosomiali e ribosomi parzialmente assemblati.

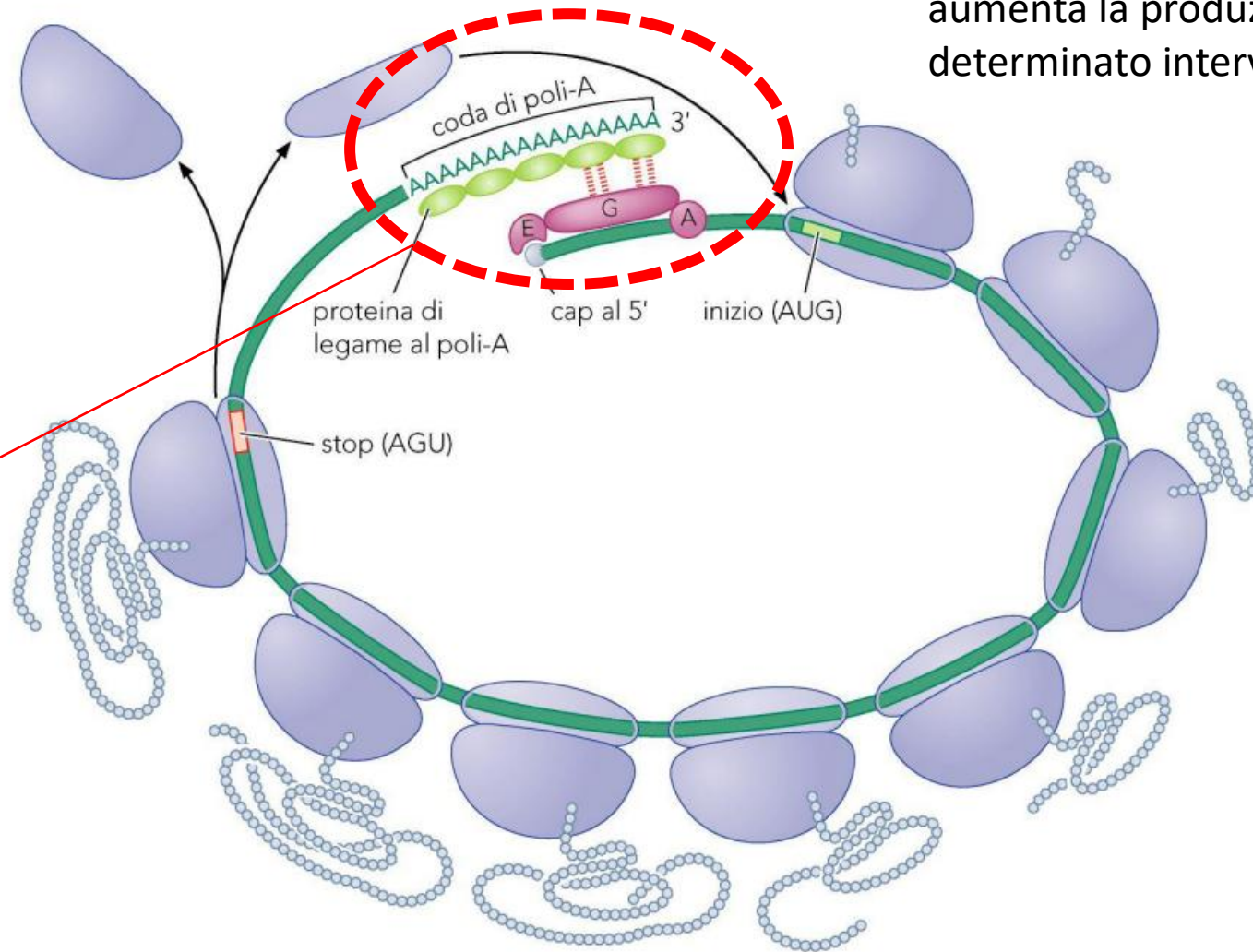
L'interazione tra la polyA-binding protein e i fattori di inizio mantiene l'mRNA in una conformazione circolare che aumenta l'efficienza della traduzione.

Parecchi ribosomi possono posizionarsi su una stessa molecola di mRNA. Questo aumenta la produzione di proteine in un determinato intervallo di tempo.

POLISOMA:

un complesso di ribosomi associati allo stesso mRNA

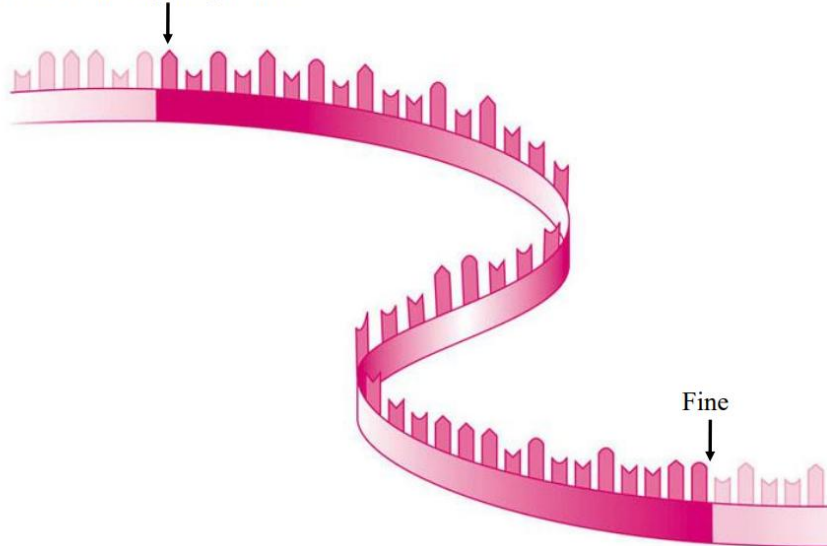
Negli eucarioti le estremità 5' e 3' sono modificate ed interagiscono



- Il codice genetico è senza sovrapposizioni (i ribosomi procedono di tripletta in tripletta)
- 3 basi codificano per un amminoacido; queste triplette sono chiamate **codoni**
- Il codice è letto a partire da un punto fisso iniziale e prosegue fino alla fine della sequenza codificante. Infatti una singola *mutazione frameshift* in qualsiasi punto della sequenza codificante altera la lettura dei codoni nel resto della sequenza
- Il codice è degenerato, nel senso che alcuni amminoacidi sono specificati da più di un codone

AUG: codone d'inizio

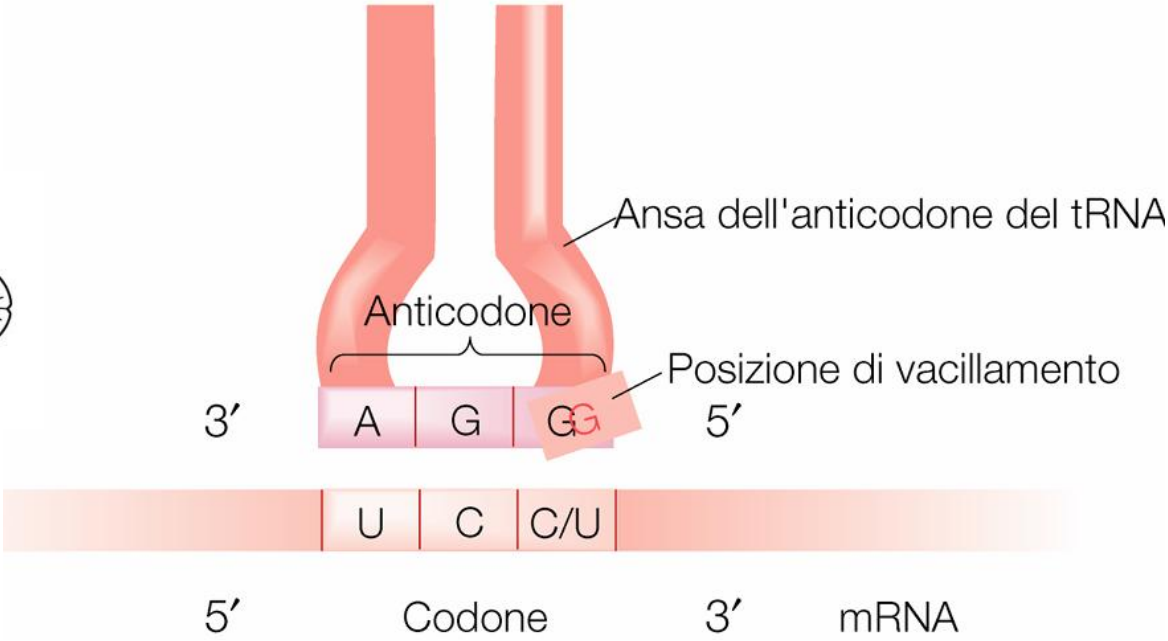
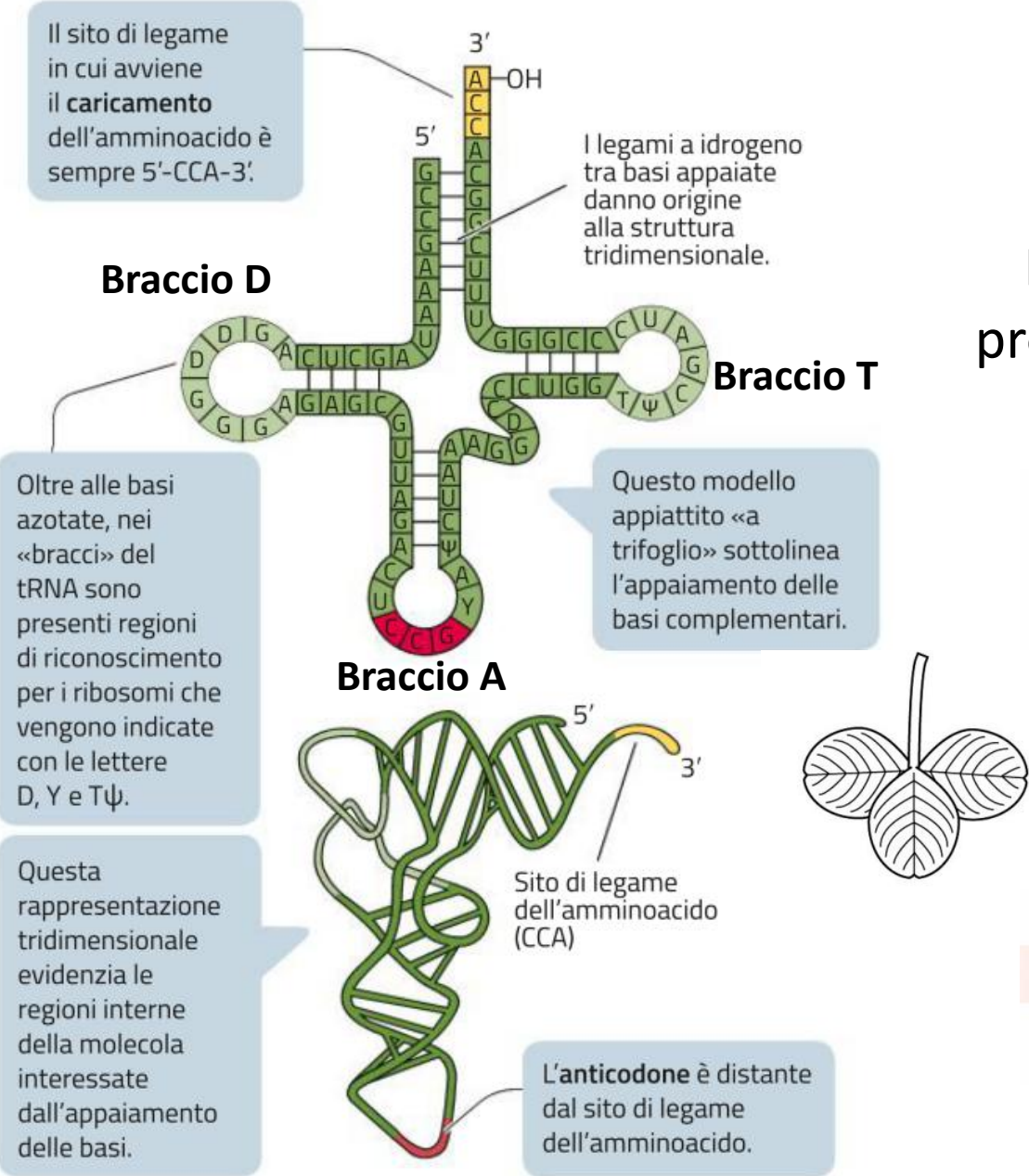
Inizio del messaggio genetico



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

Il tRNA trasporta gli amminoacidi

La traduzione del messaggio genetico in proteina si basa su riconoscimento codone - anticodone



L'ORF è una regione "aperta" per la traduzione, in quanto il ribosoma può leggerla progressivamente, convertendo i codoni in amminoacidi, fino a incontrare un codone di stop.



= **tratti codificanti dei geni**

Per i geni che codificano proteine, queste regioni sono riconoscibili in base ai codoni di inizio e di stop della **traduzione**.

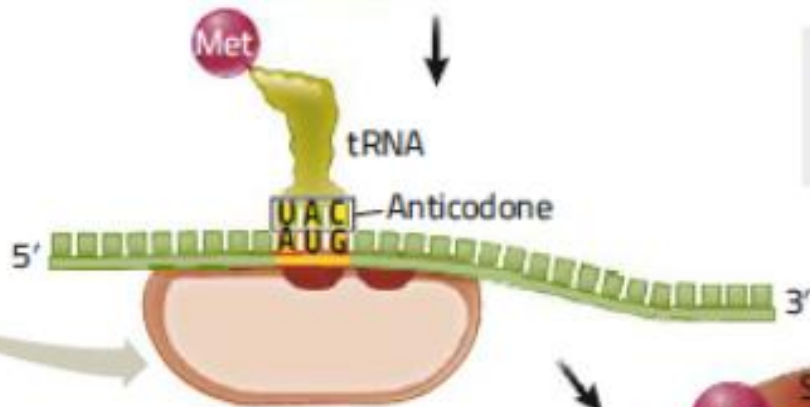
Fasi della traduzione

- L'inizio, notevolmente diverso tra procarioti ed eucarioti, molto più complesso in questi ultimi.
- L'allungamento, simile tra procarioti ed eucarioti.
- La terminazione, simile tra procarioti ed eucarioti.

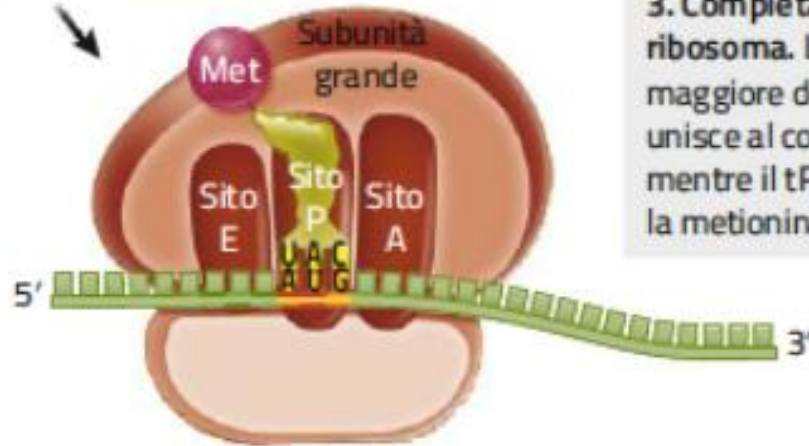
Inizio



1. Riconoscimento dell'mRNA. La subunità minore del ribosoma si lega alla sua sequenza di riconoscimento sull'mRNA.



2. Formazione del complesso d'inizio. Il tRNA caricato con la metionina si lega sul codone d'inizio AUG, completando così il complesso d'inizio.

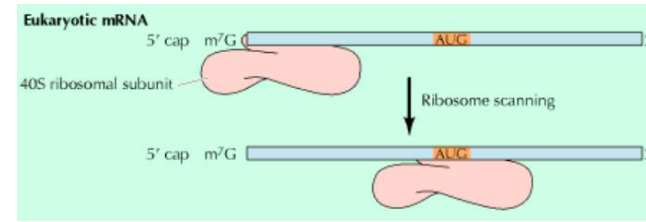
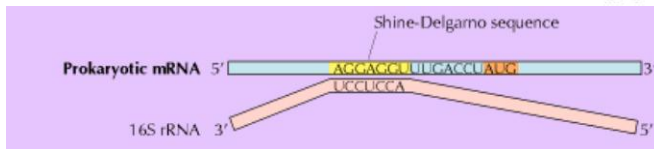
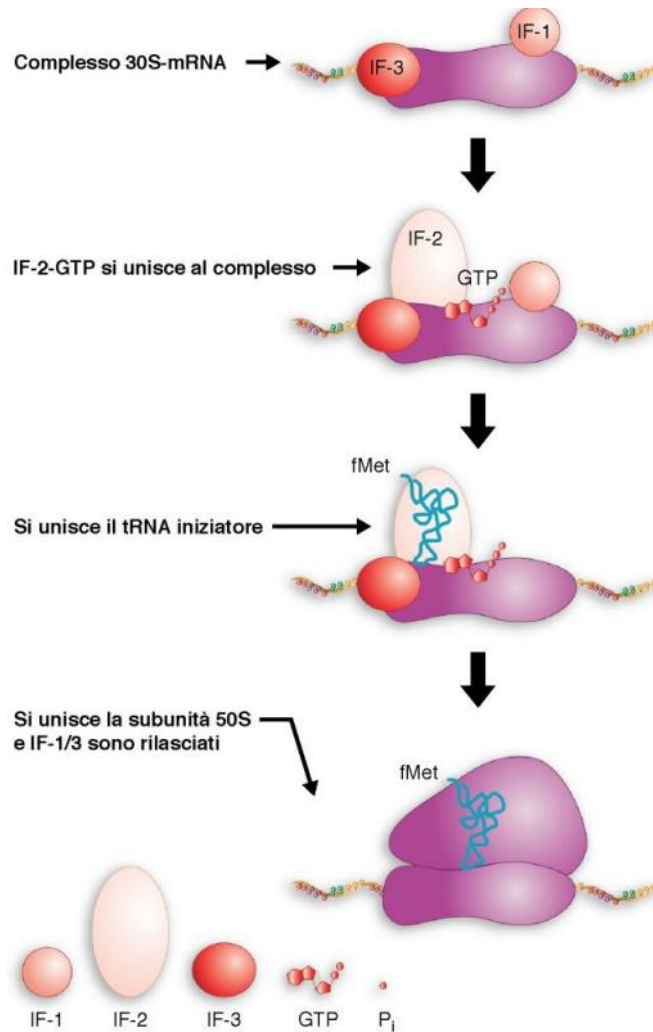


3. Completamento del ribosoma. La subunità maggiore del ribosoma si unisce al complesso d'inizio, mentre il tRNA caricato con la metionina occupa il sito P.

Fase di inizio (procarioti)

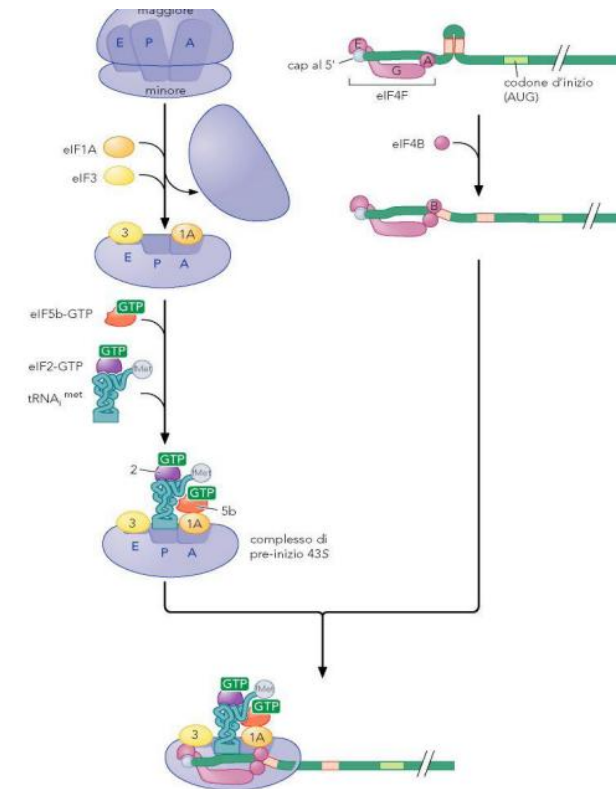
Il sito di inizio degli mRNA procariotici è caratterizzato dalla sequenza di **Shine-Dalgarno** che precede il primo codone della ORF AUG.

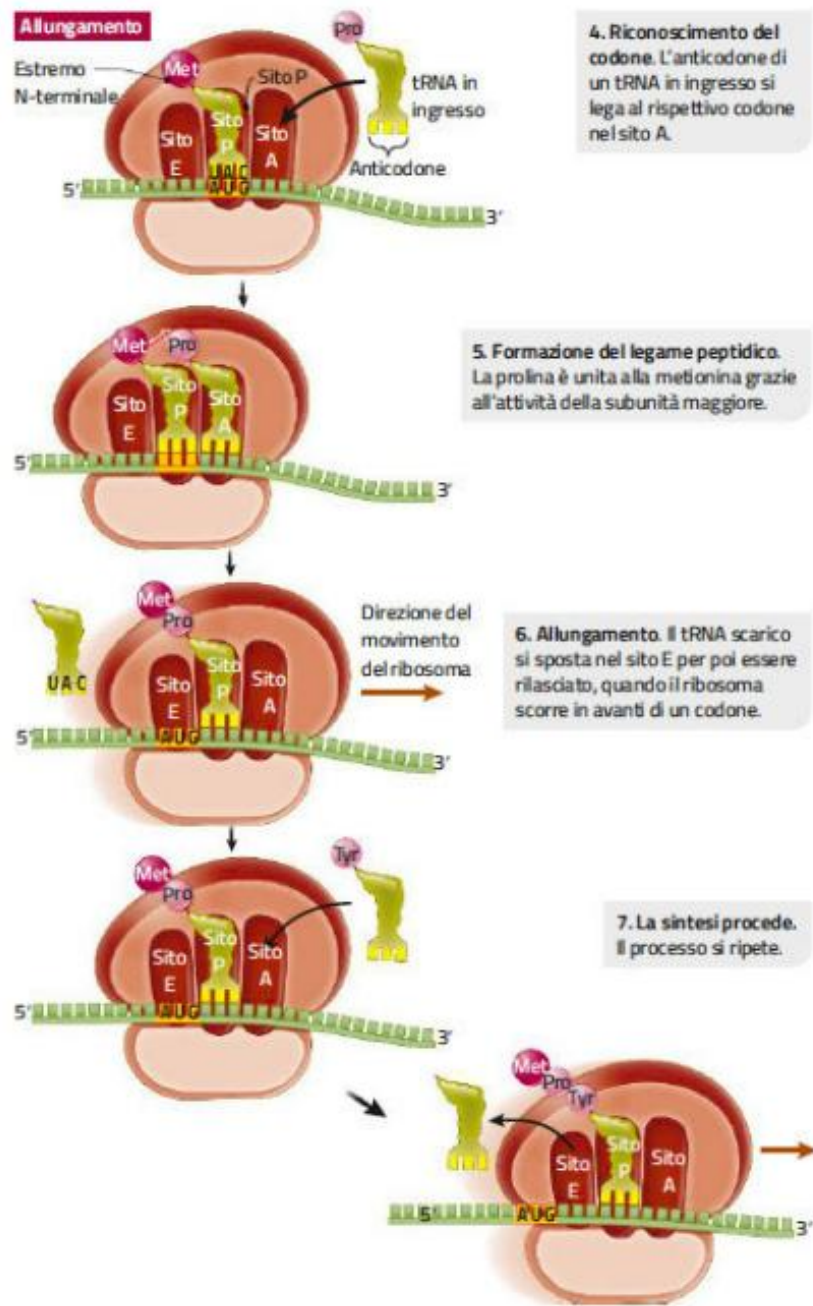
L'appaiamento di basi della Shine-Dalgarno con una sequenza complementare vicino al 3' terminale dell'rRNA 16S, allinea l'mRNA sul ribosoma.



Gli mRNA eucariotici invece sono legati dall'estremità 5' alla subunità ribosomiale 40S grazie al cap di 7-metilguanosa. Il ribosoma scansiona poi l'mRNA fino a che non incontra il primo codone AUG.

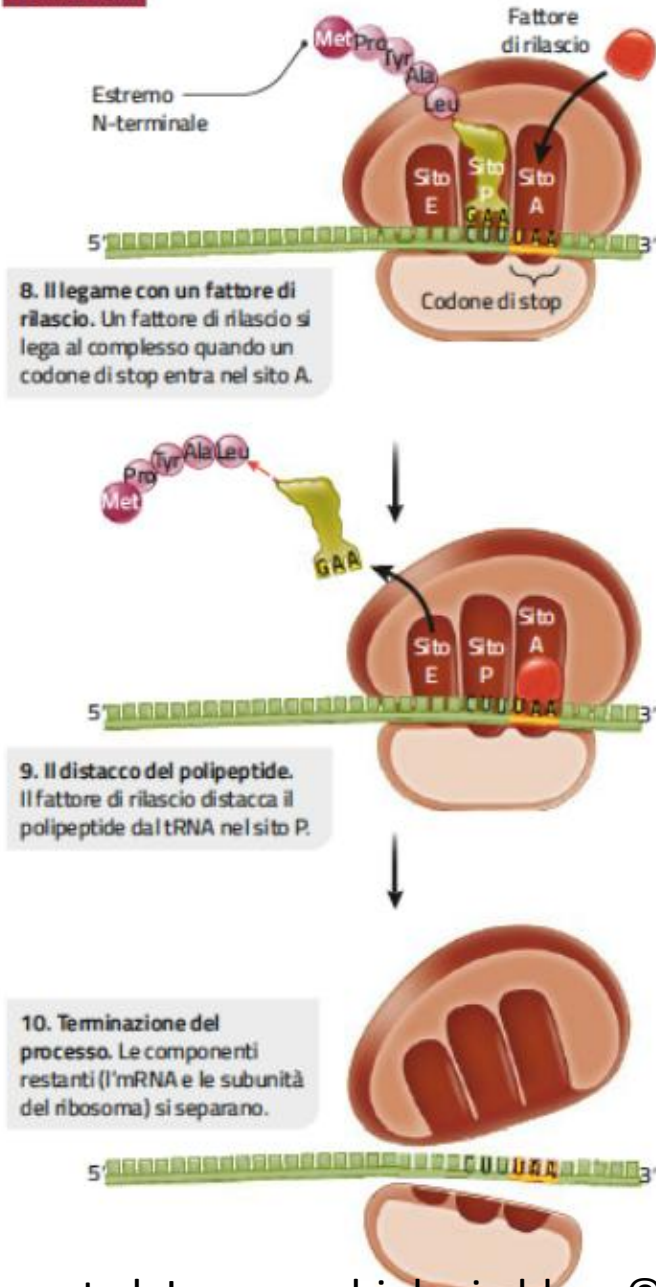
Fase di inizio (eucarioti)





- 1) Inserimento del corretto tRNA carico nel sito A
 - 2) formazione del legame peptidico tra l'amminoacido (sito A) e il peptide (sito P) ad opera della peptidiltransferasi;
 - 3) traslocazione del peptidil-tRNA dal sito A al sito P. Questo processo è coadiuvato da due fattori di allungamento e richiede energia fornita dall'idrolisi di GTP.
- L'idrolisi del GTP coadiuva il completamento della traslocazione, in quanto EF-G-GDP ha un dominio che mima la struttura del tRNA e legandosi al sito A induce lo spostamento del peptidil-tRNA (associato all'mRNA) e del tRNA deaccilato.

Terminazione



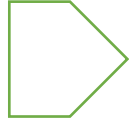
Quando sul sito A si trova un codone di STOP, a cui non corrisponde nessun tRNA, la sintesi si arresta.

I codoni di stop vengono riconosciuti da proteine dette fattori di rilascio (**RF, releasing factors**) che determinano il rilascio della catena polipeptidica. I fattori di classe I riconoscono i codoni di stop e innescano l'idrolisi della catena polipeptidica. I fattori di classe II (regolati da GTP) stimolano la dissociazione dei fattori di classe I dal ribosoma. Classe I Procarioti: RF1 (UAG, UAA), RF2 (UGA) Eucarioti: eRF1 (UAG, UAA, UGA) Classe II Procarioti: RF3 Eucarioti: eRF3

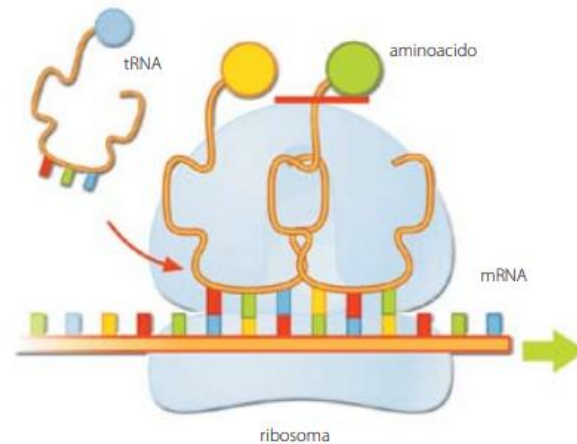
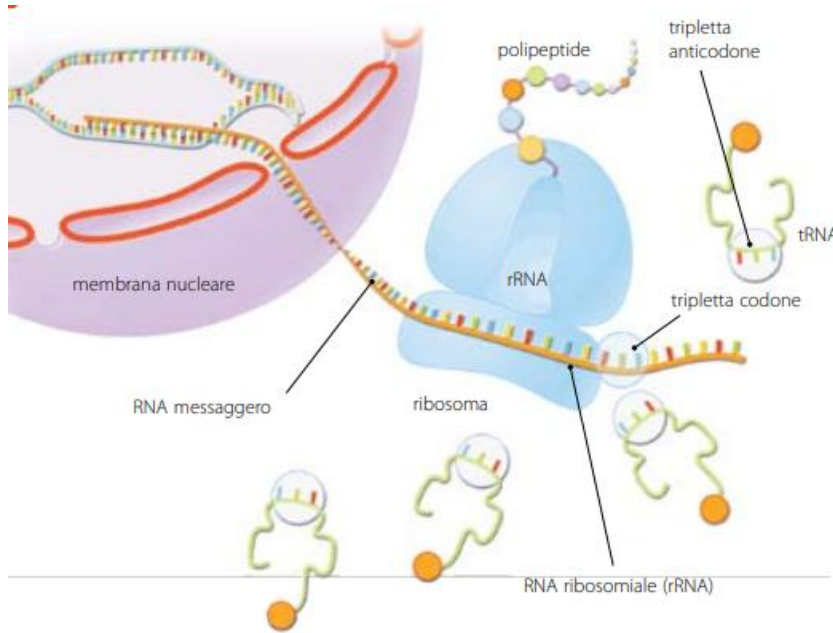
Caratteristica	Procarioti	Eucarioti
Inizio traduzione	Regolata da pochi fattori (meno complessa)	Regolata da ~10 fattori di inizio
Aminoacido iniziatore	f-Met (formil-metionina)	Met (metionina); esistono 2 tRNA: uno per AUG di inizio, l'altro per AUG interni
Riconoscimento sito di inizio	Sequenza Shine-Dalgarno vicino all'AUG	Nessuna Shine-Dalgarno; riconoscimento del 5' cap , poi scanning fino al primo AUG
Sequenza di riconoscimento	Shine-Dalgarno (AGGAGG)	Sequenza di Kozak (GCCGCC(A/G)CCAUGG)
Struttura mRNA	Policistronico (un mRNA → più proteine)	Monocistronico (un mRNA → una proteina)
Fattori di rilascio (terminazione)	3 fattori (RF1, RF2, RF3)	1 principale (eRF3)

Quindi...

Ogni proteina è costituita da una o più lunghe catene di aminoacidi legati in una precisa sequenza



Le proteine vengono prodotte nel citoplasma, da organuli speciali chiamati **ribosomi**. I ribosomi leggono l'RNA messaggero e a ogni gruppo di 3 nucleotidi (tripletta detta codone) devono procurarsi l'aminoacido corrispondente, che viene trasportato da un altro tipo di RNA (tRNA). Esistono diversi tRNA di trasporto, uno per ogni tipo di aminoacido trasportato. Ogni tipo di tRNA ha da un lato una tripletta di nucleotidi, detta anticodone, che deve combaciare con la tripletta dell'RNA messaggero; dall'altro lato ha invece l'aminoacido corrispondente. I tRNA si allineano lungo l'mRNA, disponendo così nella giusta sequenza gli aminoacidi che trasportano.



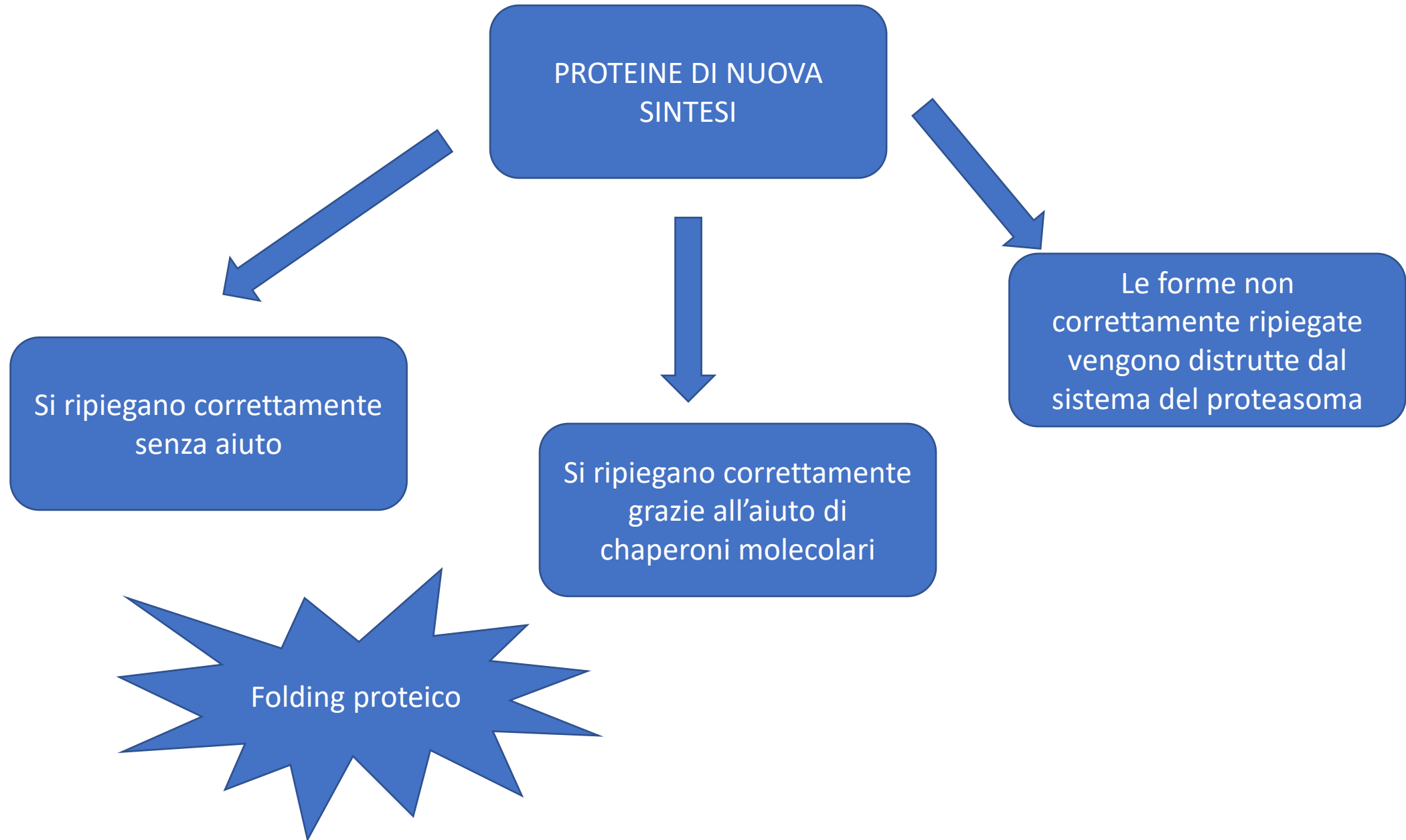
PROTEINE DI NUOVA
SINTESI

Si ripiegano correttamente
senza aiuto

Si ripiegano correttamente
grazie all'aiuto di
chaperoni molecolari

Le forme non
correttamente ripiegate
vengono distrutte dal
sistema del proteasoma

Folding proteico



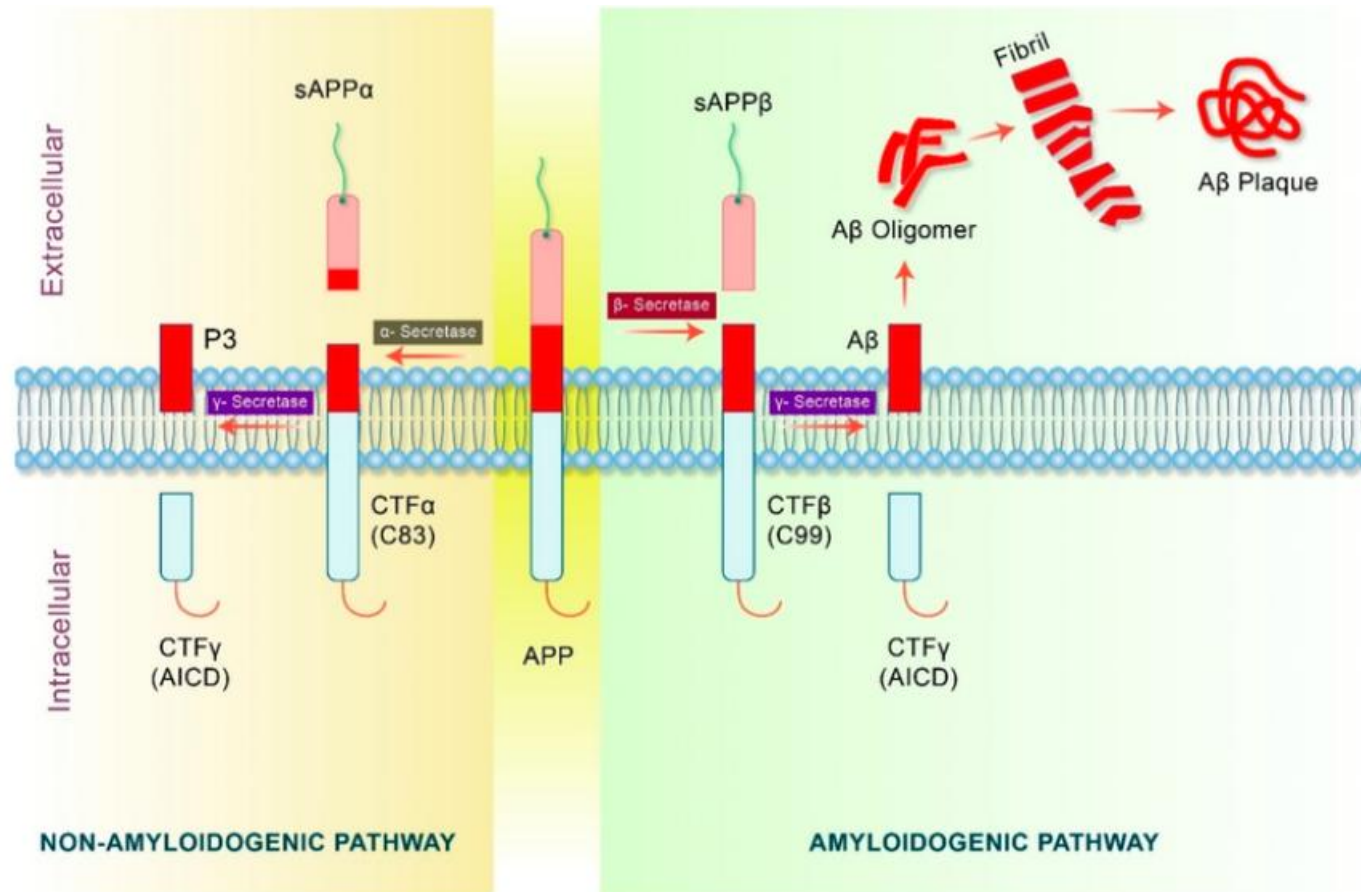
Dopo la produzione, al fine di raggiungere la propria funzionalità finale, le proteine assumono una complessa struttura tridimensionale

- I chaperoni sono proteine che guidano le altre proteine durante il corretto processo di ripiegamento.
- Molti chaperoni sono chiamati proteine da "shock termico" (HSP Heat Shock Protein) perché sono sintetizzati in grande quantità quando le cellule sono esposte ad un forte calore. Una temperatura eccessiva destabilizza le proteine e rende i ripiegamenti errati più frequenti. Così, quando la temperatura si alza troppo, le cellule hanno bisogno di un aiuto extra con le loro proteine. (Es: HSP-60, HSP-70...)
- Prevengono l'aggregazione di proteine non correttamente ripiegate.
- Aiutano le proteine a raggiungere compartimenti cellulari specifici

Quali sono i rischi dei ripiegamenti errati?

- Le proteine avvolte in modo errato spesso hanno gli amminoacidi apolari in superficie, invece che nascosti al sicuro nel loro interno. Queste porzioni idrocarburiche apolari si legano fortemente con porzioni simili su altre proteine e formano grandi aggregati. Gli aggregati casuali portano le **cellule alla morte**: malattie come l'anemia falciforme, il morbo della mucca pazza, e il morbo di Alzheimer sono causate da **aggregazioni innaturali di proteine** che formano fibrille che ostacolano la vita cellulare.

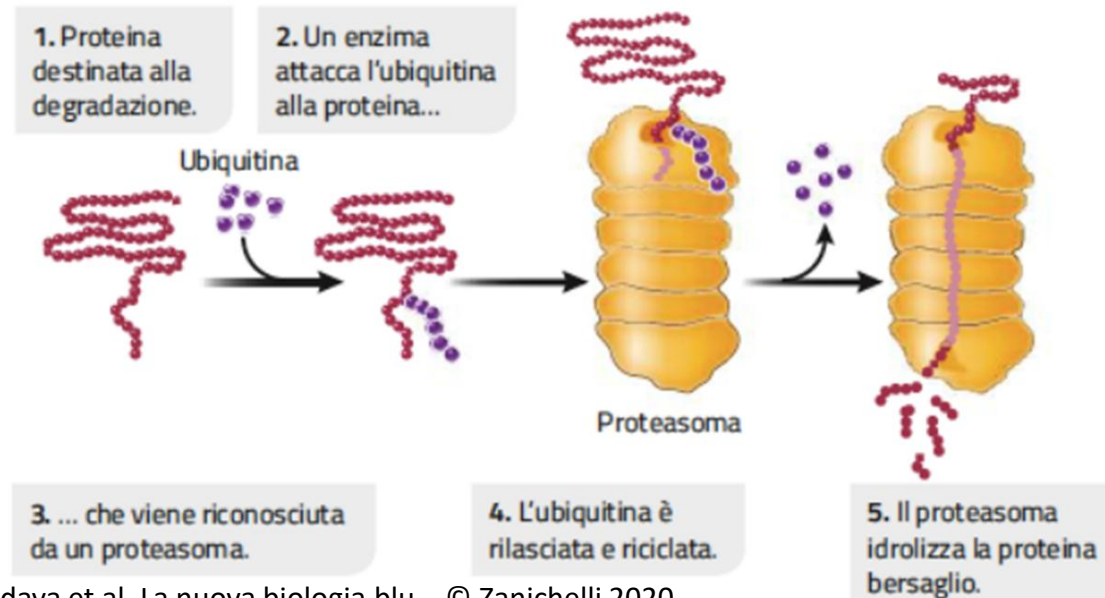
Un legame con le malattie neurodegenerative



Nella via non amiloidogena, l'APP viene scissa dall' α -secretasi per formare due frammenti, un frammento α C-terminale intracellulare (CTF α), C83, e un frammento extracellulare, la proteina precursore dell'amiloide solubile α (sAPP α). La scissione del frammento C83 tramite la γ -secretasi produce un breve frammento peptidico, P3, e un dominio intracellulare dell'APP. Nella via amiloidogena, l'APP viene scissa dalla β -secretasi che produce una proteina precursore dell'amiloide solubile β (sAPP β) e un frammento β C-terminale (CTF β) o frammento C99. Il frammento C99 viene scisso dalla γ -secretasi per produrre A β e il frammento γ C-terminale (CTF γ) o AICD. A β forma ulteriormente oligomeri di A β che successivamente portano alla formazione di fibrille e placche neurotossiche di A β extracellulari.

Proteasomi

- I proteasomi sono complessi enzimatici che degradano le proteine danneggiate o non necessarie
- Il sistema ubiquitina-proteasoma è un sistema conservato dai lieviti a mammiferi e porta alla distruzione di proteine incapaci di ripiegarsi correttamente o proteine regolatrici.
- In pratica, la proteina bersaglio forma un legame con l'ubiquitina (proteina ubiquitaria di 76 residui), che «indirizza» la stessa al proteasoma. Alla catena iniziale di ubiquitina se ne attaccano altre, formando un complesso **poliubiquitinico**.
- Il complesso proteina-poliubiquitina si lega al proteasoma che possiede un cilindro cavo capace di utilizzare l'energia liberata dall'ATP per staccare l'ubiquitina, che viene riciclata, e denaturare la proteina bersaglio. La proteina da degradare viene quindi digerita da tre diverse proteasi che la riducono in piccoli frammenti peptidici e amminoacidi liberi.



PRIONI

non contengono acidi nucleici, ma sono composti interamente da proteine

I prioni e i loro precursori normali hanno la stessa sequenza amminoacidica e sono codificati dagli stessi geni: differiscono solamente nella conformazione molecolare, ovvero nel modo in cui tali componenti proteici sono ripiegati.

La forma cellulare non patogena viene definita PrP^c

La forma patogena viene definita PrP^{sc}

<i>Caratteristiche</i>	<i>PrP^c</i>	<i>PrP^{sc}</i>
Detergenti Proteasi K Struttura Cervello normale Cervello con scrapie Degradazione	Solubile Sensibile α eliche Presente + Rapida (5 ore)	Forma fibrille Resistente Foglietti β Assente +++ Lenta (> 24 ore)

Tabella 1 - Malattie da prioni o TSE.

<i>Malattie animali</i>	<i>Malattie umane</i>
Scrapie Encefalopatia trasmissibile del visone Malattia devastante del cervo e dell'alce Encefalopatia spongiforme felina Encefalopatia spongiforme bovina (BSE)	Kuru Malattia di Creutzfeldt-Jacob (CJD): sporadica, familiare, iatrogena, nuova variante Malattia di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) Insonnia familiare (IF)