2. Natura del materiale genetico:

le basi chimiche dell'ereditarietà

CARATTERISTICHE DEL MATERIALE GENETICO

1) *Dare informazioni* → fenotipo

- Indicazione precisa → proteine (sequenza di aminoacidi)

2) Essere *trasmesso*

- Deve potersi duplicare senza errori per molte generazioni, per mantenere costanti le caratteristiche (fenotipo) di quella cellula e/o di quella specie

3) *Essere un materiale chimico stabile*

- Il DNA è una molecola che vive a lungo. Viene trasmessa fedelmente per milioni di generazioni mantenendo così le informazioni in modo utile**.**

4) *Evolversi*

- Deve avere la capacità di cambiare (*mutazioni*) e di mantenere stabilmente questi cambiamenti.
- Questa capacità spiega la diversità tra le specie e l'evoluzione delle varie specie nel tempo.

GENOTIPO → **FENOTIPO**

(DNA) **(proteine)**

Definizioni

- **Acidi nucleici:** molecole che codificano l'informazione genetica.
  DNA, RNA

- **Genoma:** insieme delle sequenze di DNA di un organismo

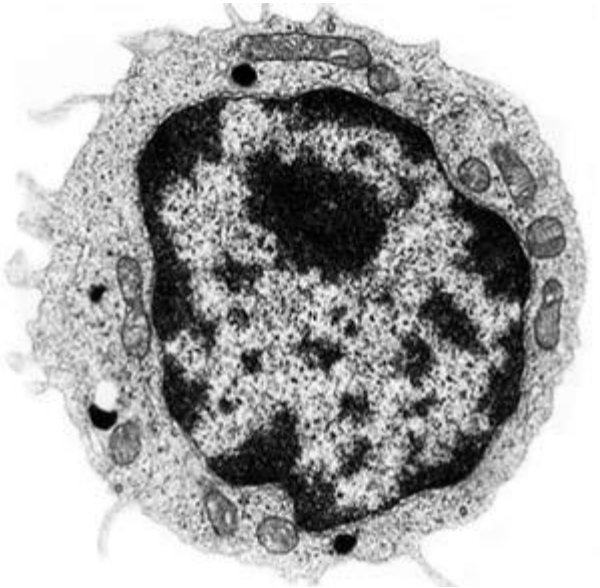
- **Codice genetico:** è lo schema attraverso cui la cellula traduce una sequenza di basi (codoni o triplette di basi) in una sequenza di AA

- **Gene:** *segmento di DNA che codifica per una catena polipeptidica*

Acido nucleico



- Scoperto nel 1869 da Miescher
- Trovato come un precipitato che si forma quando estratti nucleari sono stati trattati con acido.
- Composto da C, N, O, e un alto contenuto di P
- Comunemente presente nei nuclei cellulari da cui il nome acido nucleico



- Un globulo bianco ha dimensioni di circa 10 µm
- la maggior parte del suo volume è occupato dal nucleo (immagine al microscopio elettronico a trasmissione).

La ricerca del materiale genetico

- All'inizio del Novecento fu dimostrato che i **cromosomi sono i portatori dell'informazione genetica.**
- Cromosomi: proteine e ACIDI NUCLEICI
- In un primo momento gli scienziati propendevano per le proteine come materiale genetico:
  - Le proteine erano molto abbondanti nelle cellule e costituite da 20 AA diversi
  - Il DNA è costituito da **quattro diversi nucleotidi :**

    era ritenuto una molecola troppo semplice ed inadatta a contenere le informazioni ereditarie

- A partire dalla fine degli anni venti del Novecento una serie di esperimenti condussero alla definitiva identificazione del DNA quale materiale genetico

Esperimento di Griffith (1928) su *Streptococcus pneumoniae* o pneumococco



Fotografia al microscopio elettronico che mostra singoli batteri



Colonie di batteri del ceppo S (liscio e virulento)

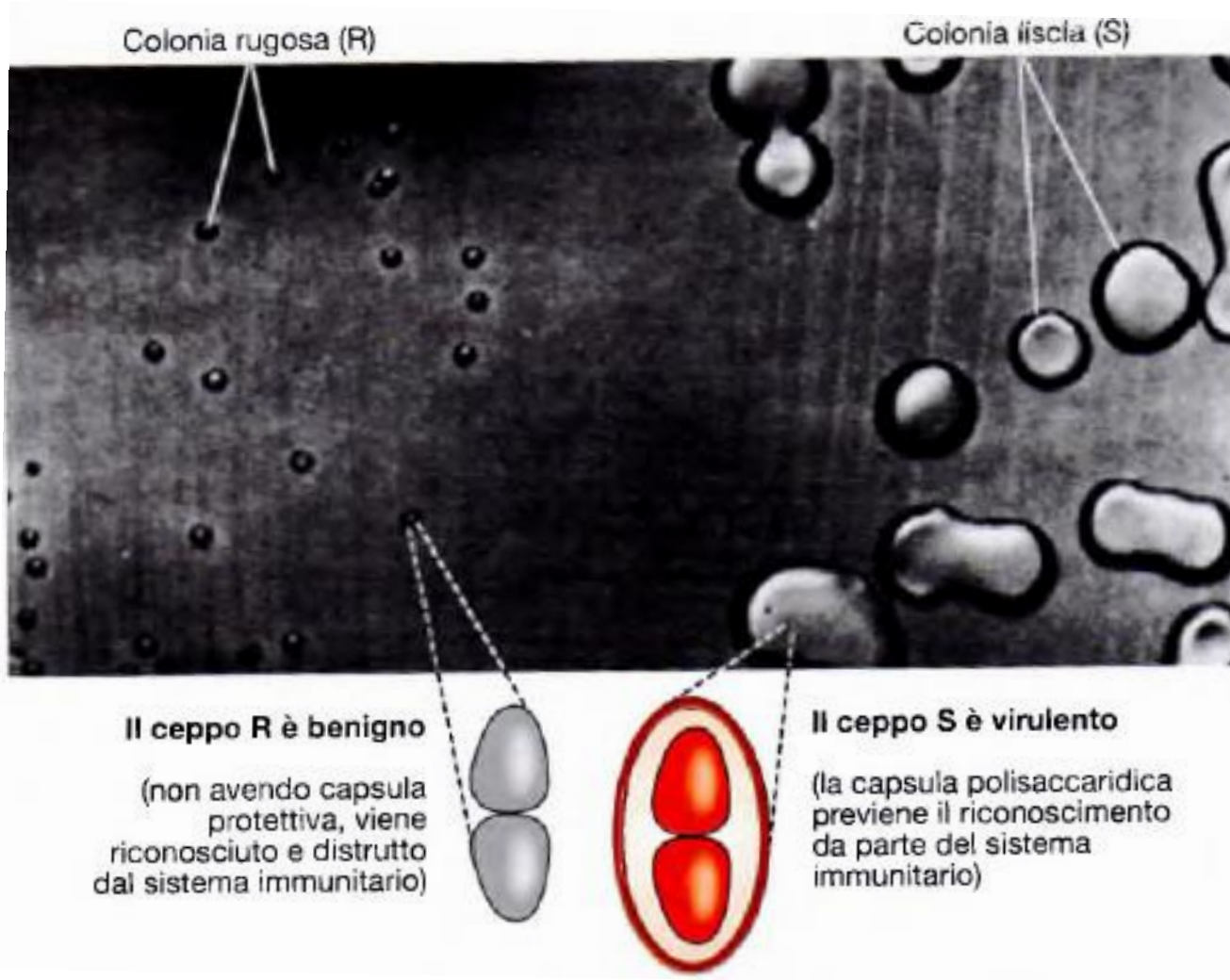


Colonie di batteri del ceppo R (rugoso e non virulento)

- Esistono diverse variante del ceppo S (IIS e IIIS) che presentano rispettivamente un involucro di tipo II e III.
- Se una cellula del tipo IIS muta in una cellula di tipo R, quest'ultima può retromutare solo nel tipo IIS.

Il batterio *Streptococcus pneumonie*

- I due ceppi di *Streptococcus pneumoniae:*
  - il ceppo R (rough, rugoso)
  - il ceppo S (smooth, liscio).

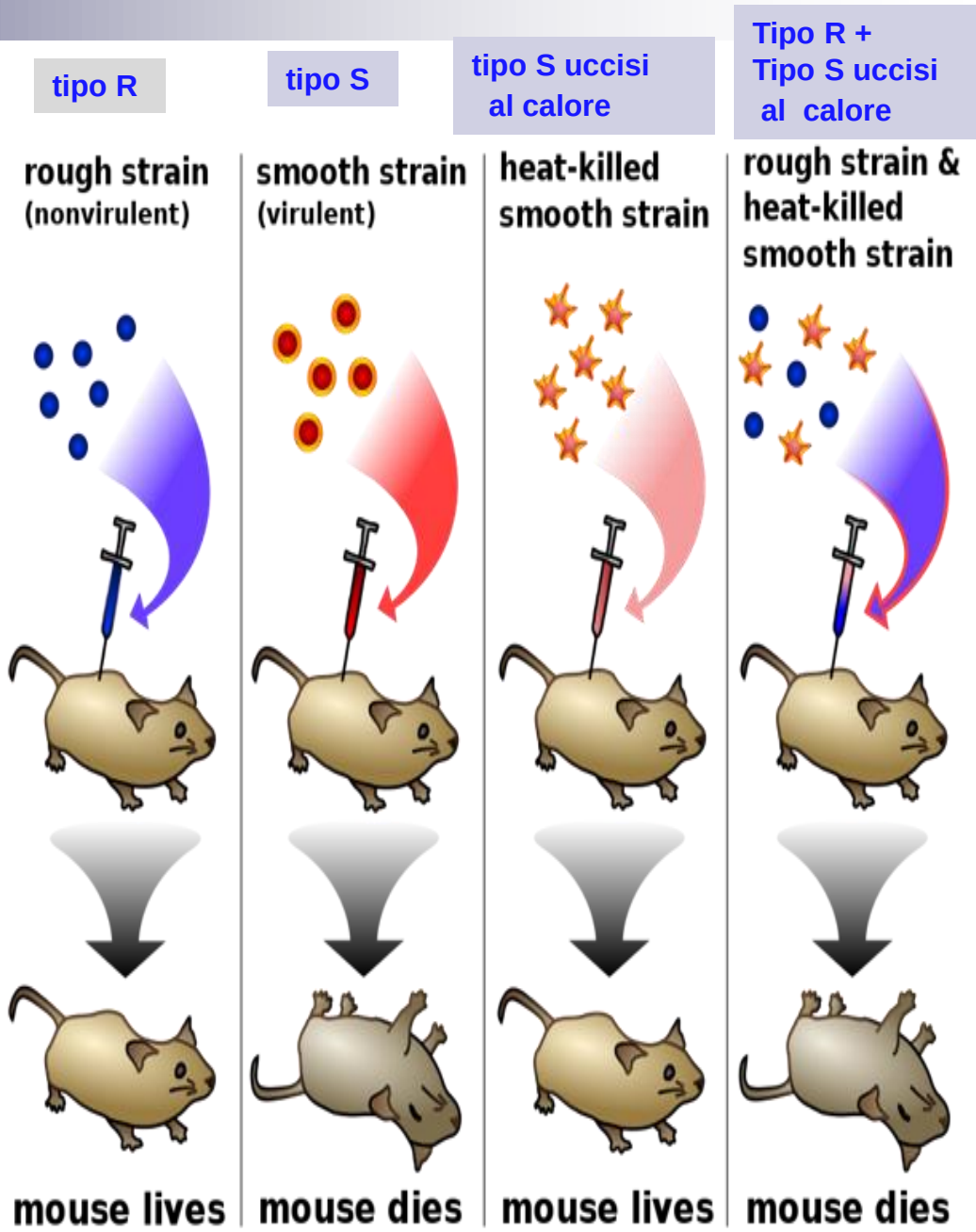


UDPGdh+ --> UDPGdh-;
Capsulati-- > acapsulati



Frederick Griffith
Esperimenti

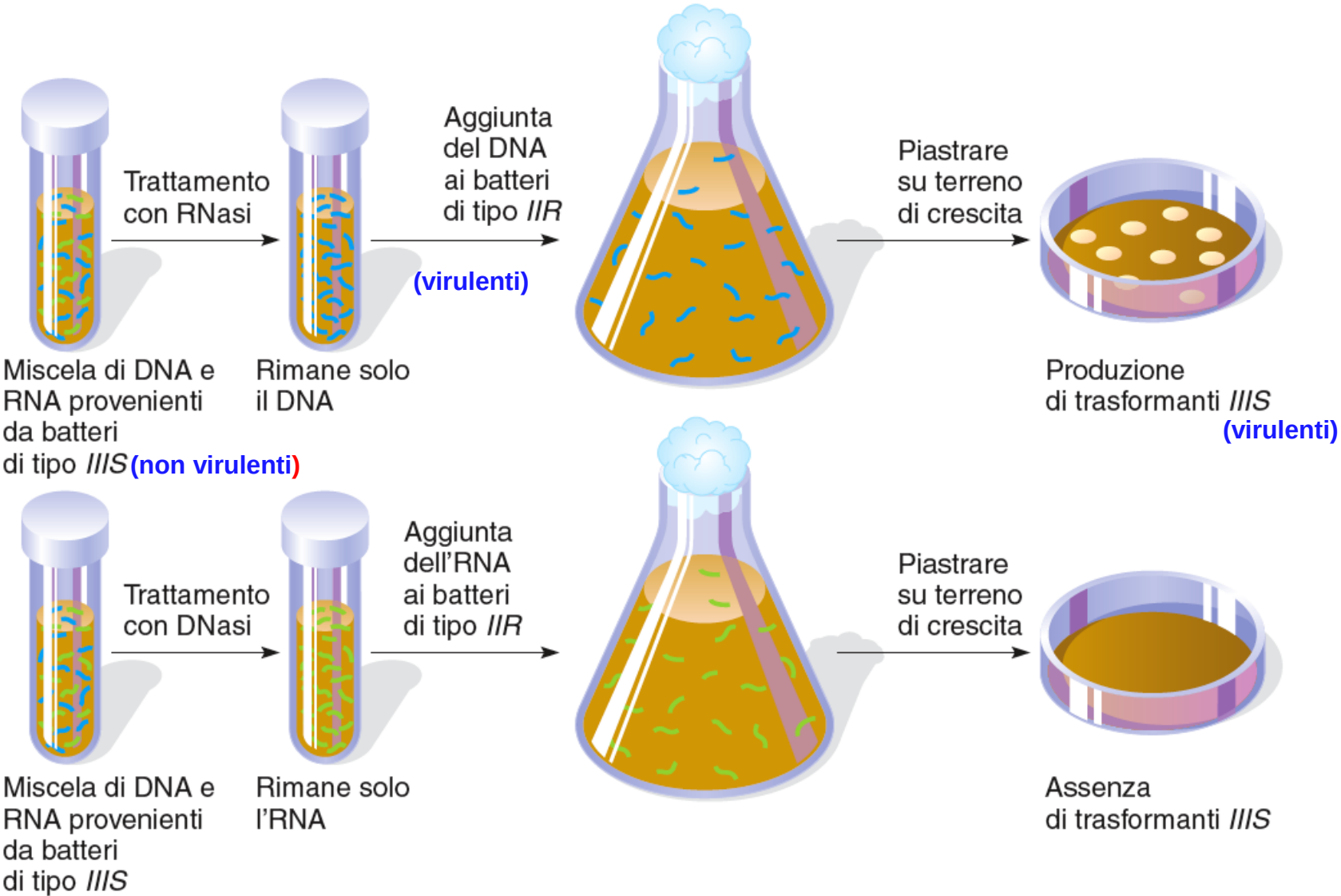
“fattore transformante”



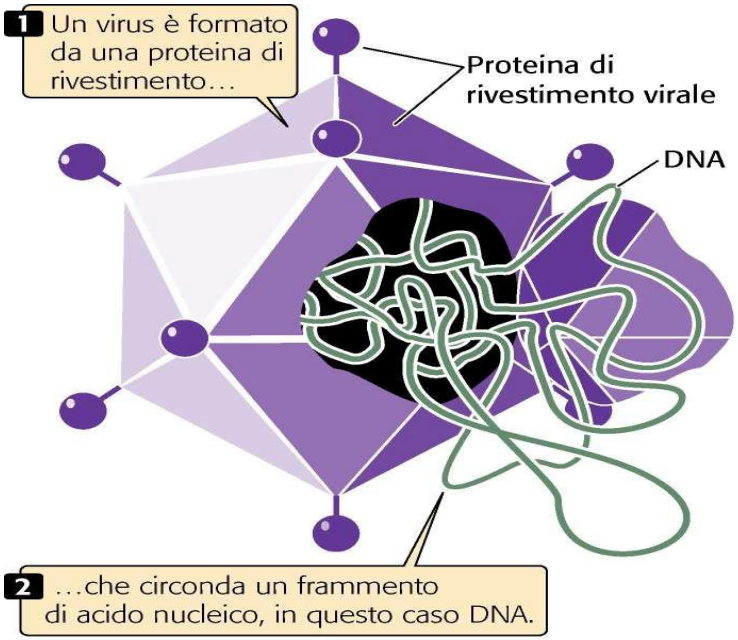
Streptococcus pneumoniae

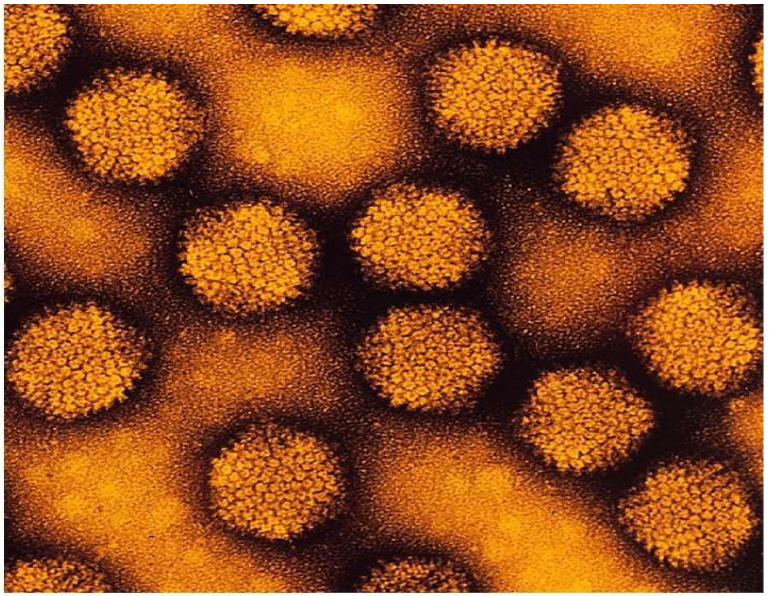
➢ **Il DNA conserva l’informazione genetica**

Esperimento che dimostrò che il principio trasformante. è DNA e non RNA (Avery, MacLeod, McCarty, 1944)



L’esperimento di Hershey-Chase (1952)





Adenovirus

Hershey



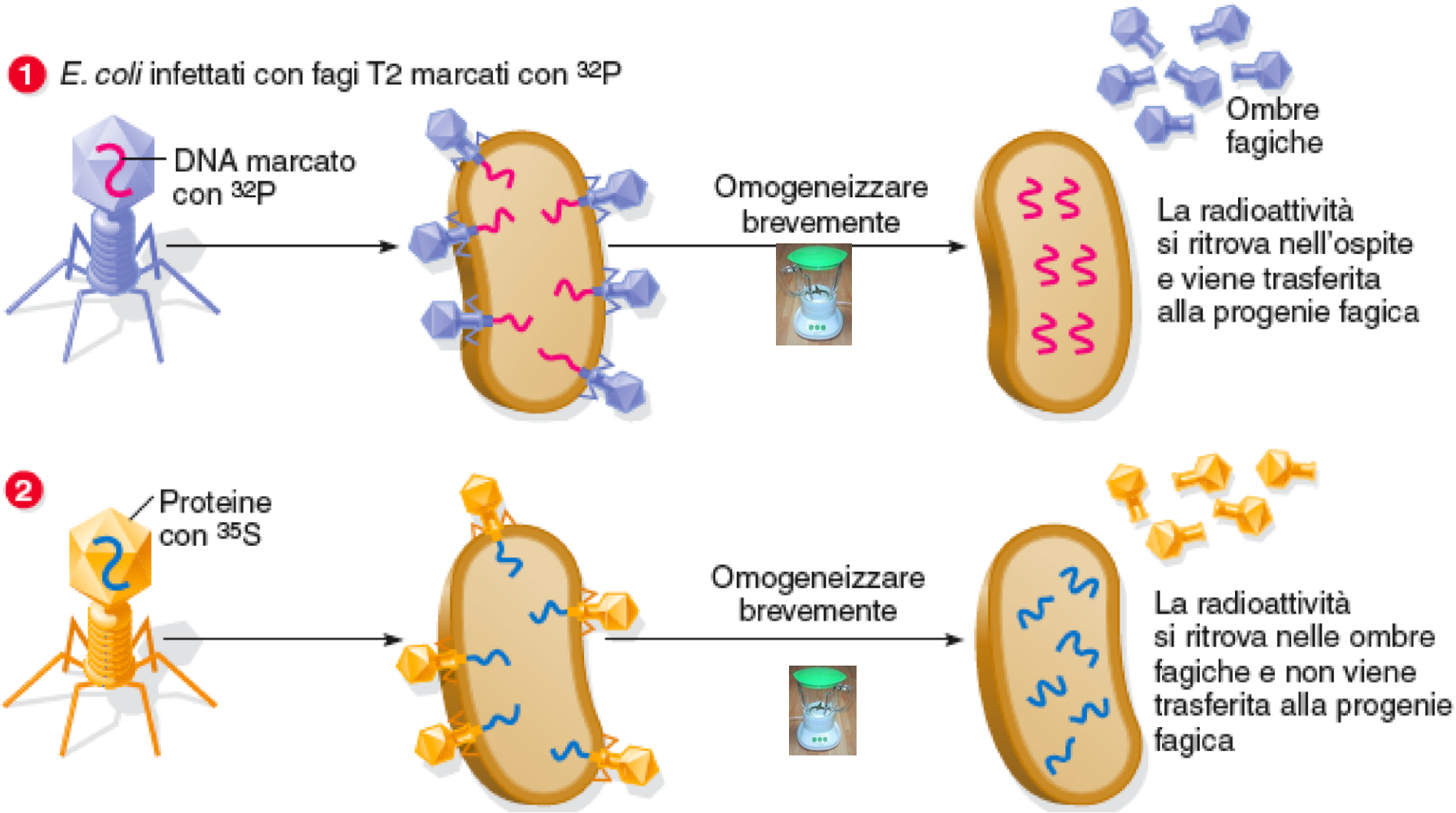
Chase





L'esperimento che dimostrò che il DNA è il materiale genetico di T2

- **Il DNA contiene P ma non S, le proteine contengono S ma non P.**



Rapporti quantitativi fra le basi del DNA (Chargaff, 1950)

Tabella 2.2 Composizione in basi del DNA da vari organismi

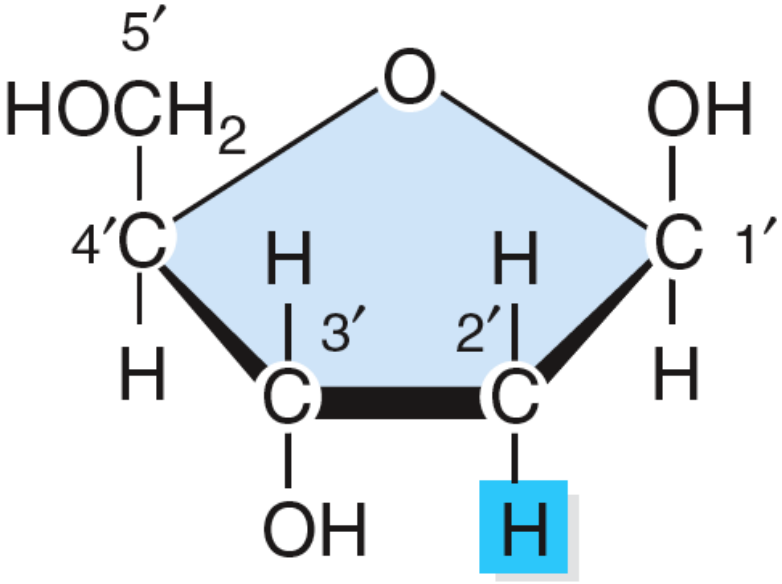
	Percentuale della base nel DNA				Rapporti		
Origine del DNA	A	T	G	C	A/T	G/C	(A + T) / (G + C)
Uomo (sperma)	31,0	31,5	19,1	18,4	0,98	1,03	1,67
Mais (*Zea mays*)	25,6	25,3	24,5	24,6	1,01	1,00	1,04
Drosophila	27,3	27,6	22,5	22,5	0,99	1,00	1,22
Nucleo di *Euglena*	22,6	24,4	27,7	25,8	0,93	1,07	0,88
Escherichia coli	26,1	23,9	24,9	25,1	1,09	0,99	1,00

- **La quantità di ADENINA è sempre uguale alla quantità di TIMINA;**
- **la quantità di CITOSINA è sempre uguale alla quantità di GUANINA.**
- **In tutte le molecole di DNA la somma dei residui purinici è uguale**
- **alla somma dei residui pirimidinici (A+G = T+C)**

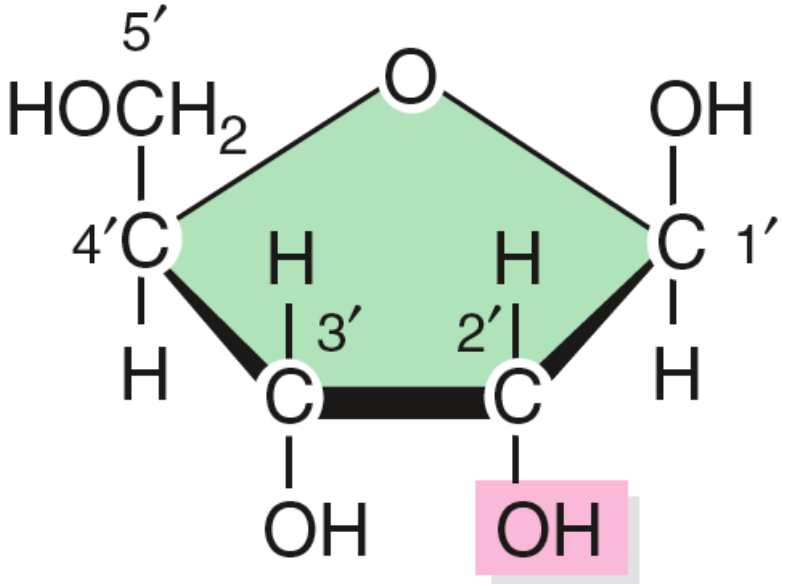
La composizione del DNA e dell'RNA

- Il DNA e l'RNA sono costituiti da nucleotidi.
- Ogni nucleotide è costituito da un pentoso, da una base azotata e da un gruppo fosfato.

ZUCCHERI PENTOSI

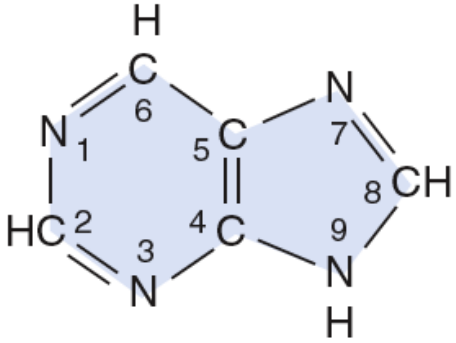


Desossiribosio

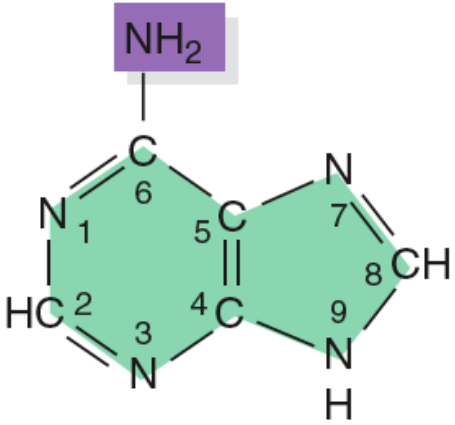


Ribosio

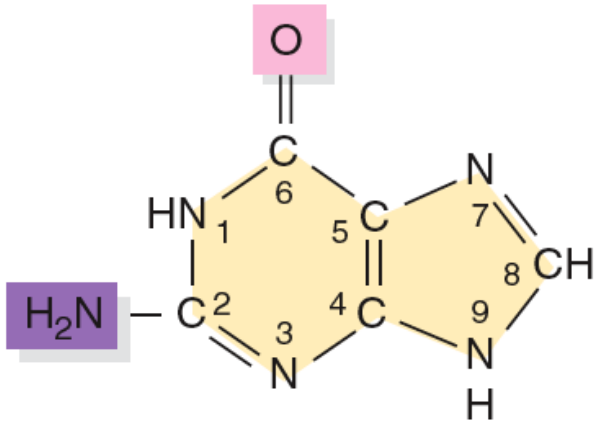
BASI AZOTATE



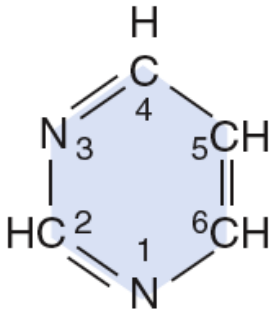
Purina
(composto progenitore)



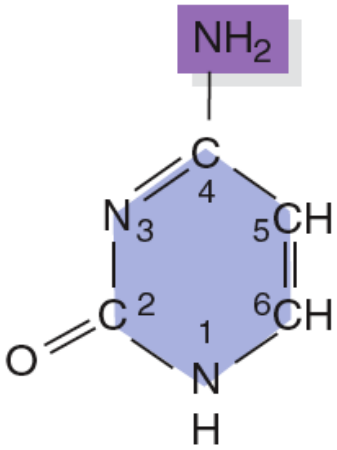
Adenina (A)



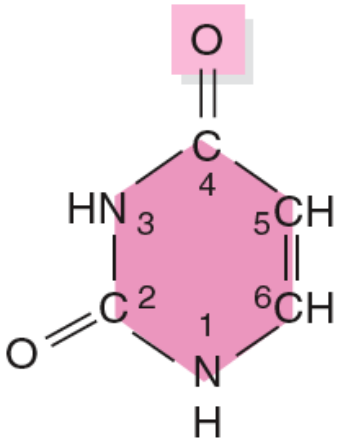
Guanina (G)



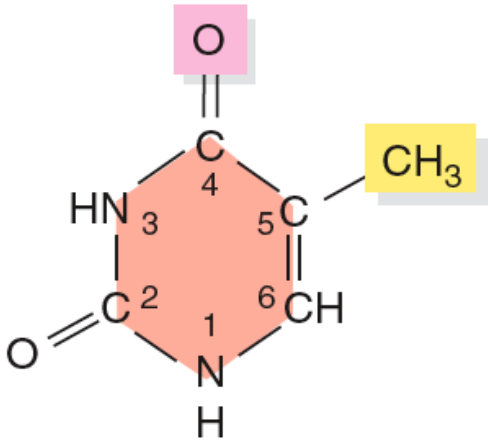
Pirimidina
(composto progenitore)



Citosina (C)

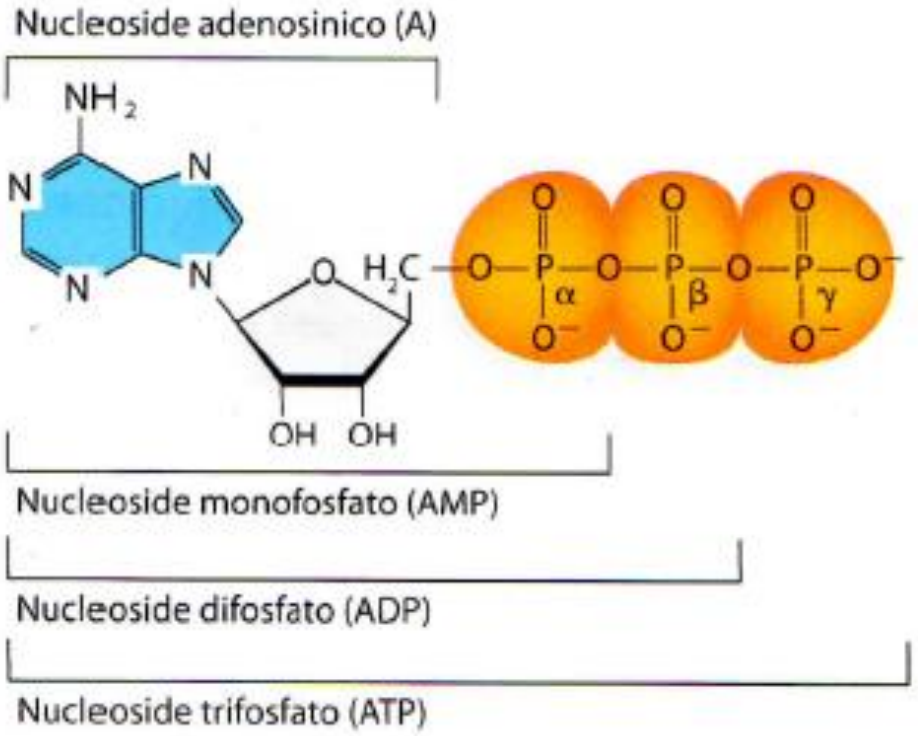


Uracile (U)
(nell'RNA)

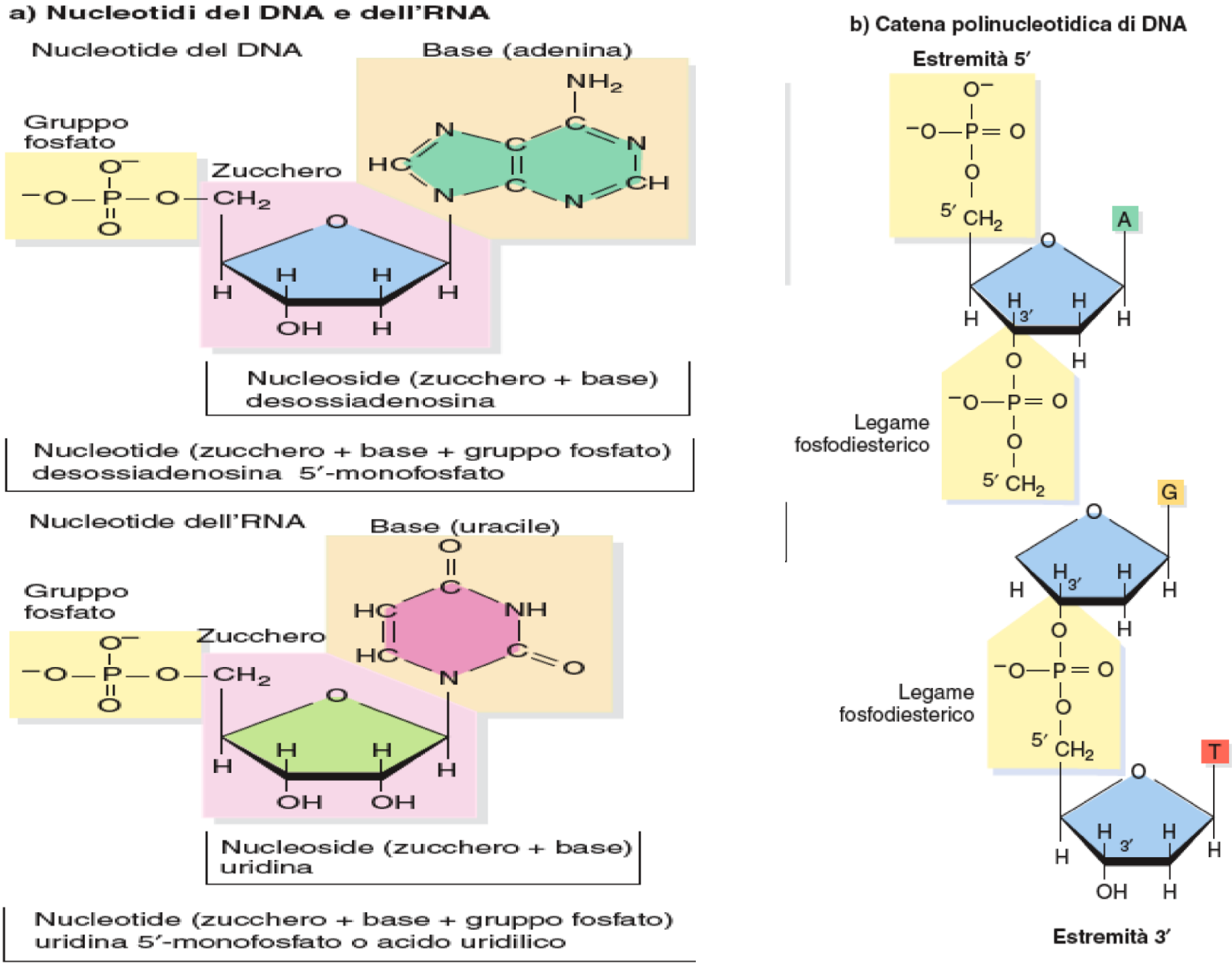


Timina (T)
(nel DNA)

Nomenclatura per i nucleotidi



- Il gruppo fosfato legato covalentemente al 5'-ossidrile di un nucleoside potrebbe avere uno o più fosfati aggiuntivi;
- ne derivano molecole denominate mono-, di- e trifosfato.
- A partire dal fosfato più vicino al ribosio, i tre fosfati sono detti α, β, γ.

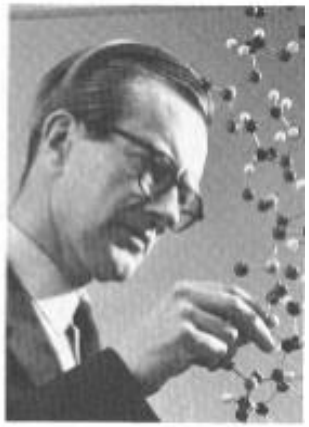

a) Nucleotidi del DNA e dell'RNA
Nucleotide del DNA
Base (adenina)
Gruppo fosfato
Zucchero
Nucleoside (zucchero + base)
desossiadenosina
Nucleotide (zucchero + base + gruppo fosfato)
desossiadenosina 5′-monofosfato
Nucleotide dell'RNA
Base (uracile)
Gruppo fosfato
Zucchero
Nucleoside (zucchero + base)
uridina
Nucleotide (zucchero + base + gruppo fosfato)
uridina 5′-monofosfato o acido uridilico
b) Catena polinucleotidica di DNA
Estremità 5′
Legame fosfodiesterico
Legame fosfodiesterico
Estremità 3′

La struttura fisica del DNA

Struttura del DNA

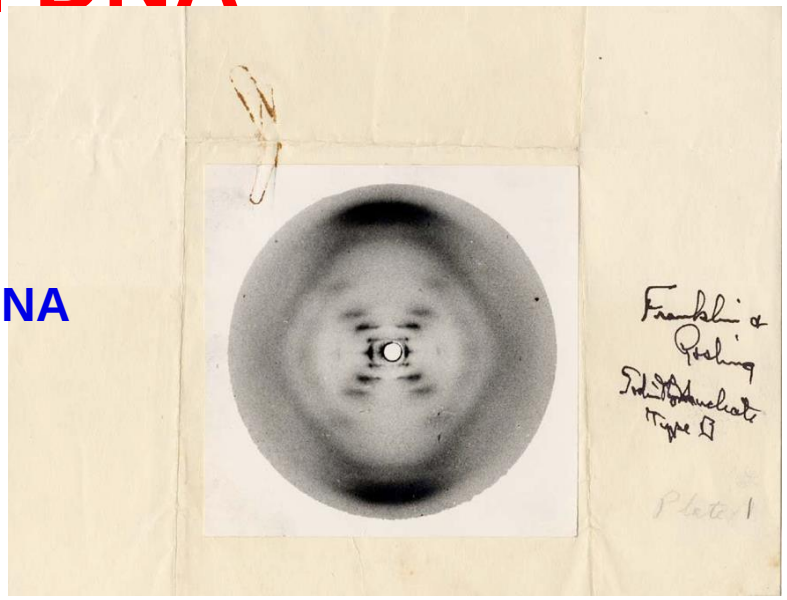


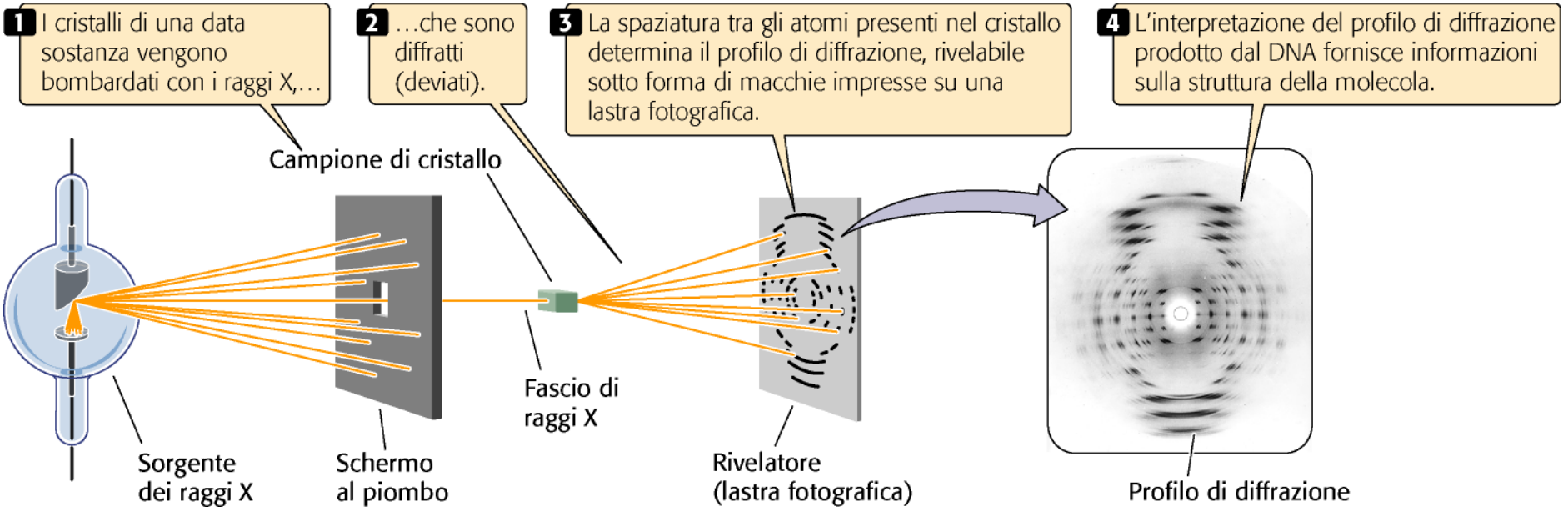
R. Franklin



M. Wilkins

Diffrazione ai raggi X del DNA

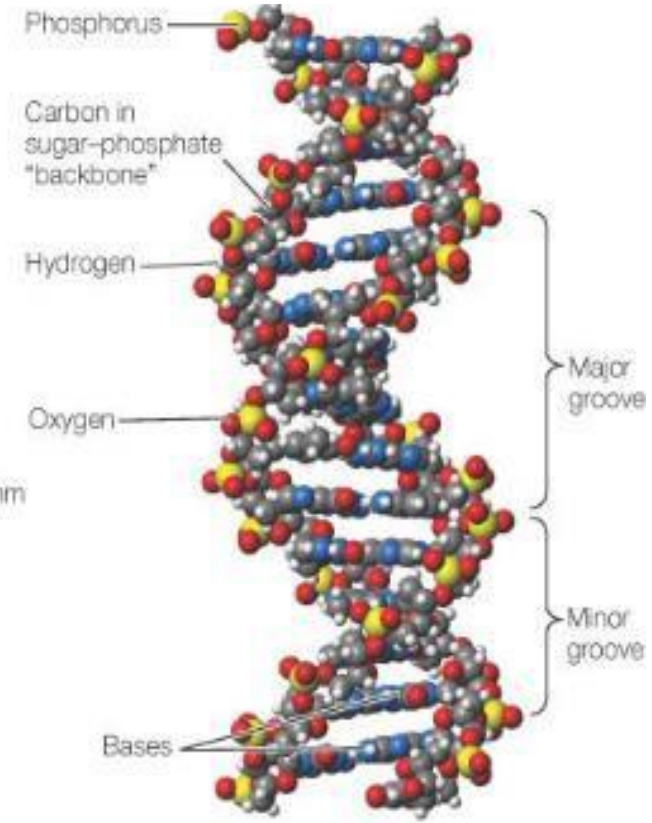




La sua struttura è stata determinata da Watson e Crick nel 1953.



(A)



- L’**RNA:** costituito da un unico filamento polinucleotidico.

- Il **DNA:** una doppia elica, nella quale i due poli-nucleotidi si avvolgono a spirale uno sull’altro
→ Legami a idrogeno

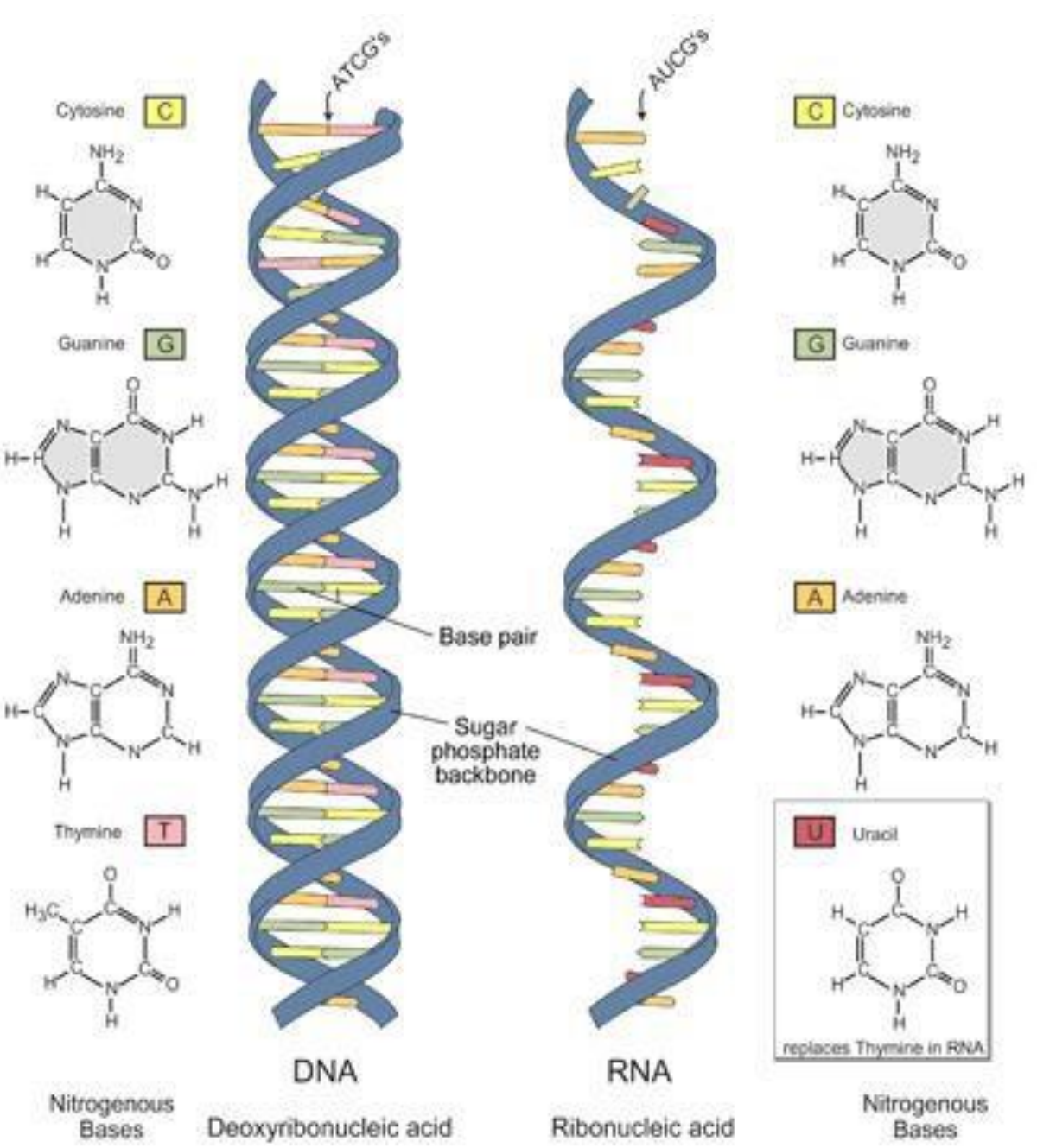
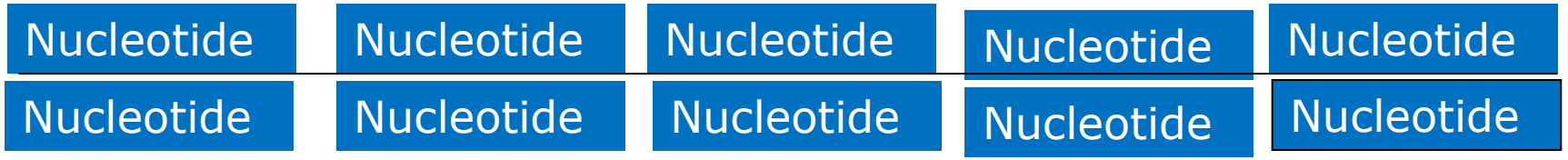


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

DNA e RNA sono polinucleotidi

- DNA e RNA sono polinucleotidi.
- Sono formati da molecole più piccole chiamate nucleotidi.
- DNA è formato da due filamenti di nucleotidi:

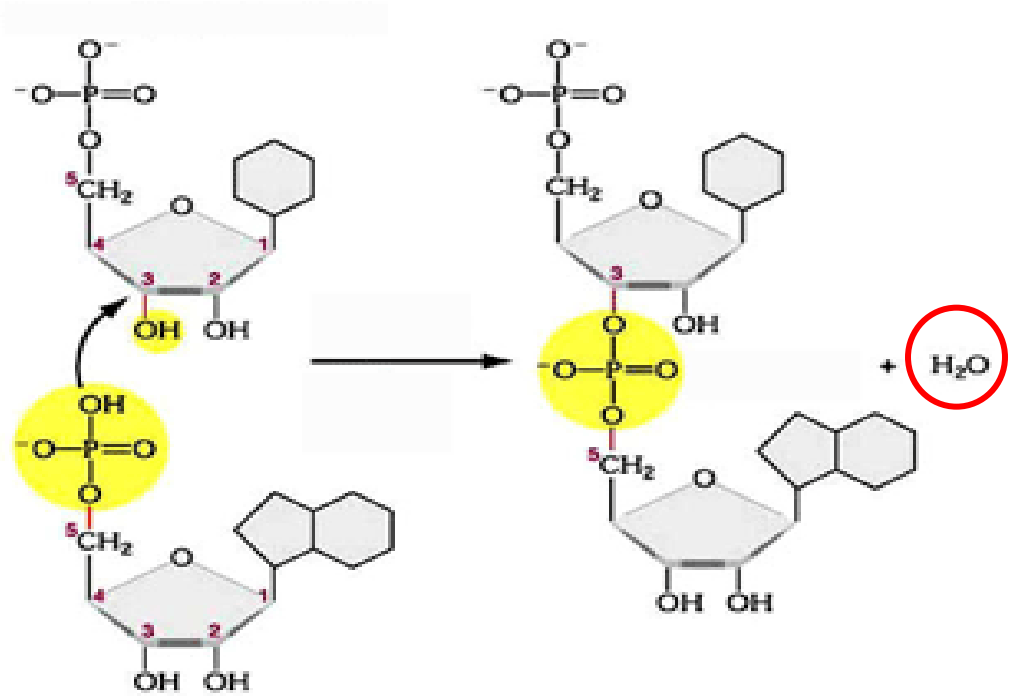
Nucleotide



- RNA è formato da un singolo filamento:



- Come i polisaccaridi e i polipeptidi, anche un polimero di **acido nucleico** (**polinucleotide**) si forma per condensazione dei suoi monomeri:
- lo zucchero di un nucleotide si lega al gruppo fosfato del nucleotide successivo con un legame fosfodiesterico.

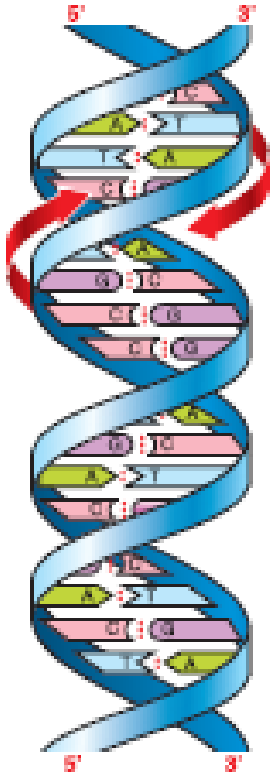


Legame fosfodiesterico. Nella figura è mostrata la reazione di condensazione fra due nucleotidi che porta alla formazione del legame fosfodiesterico.

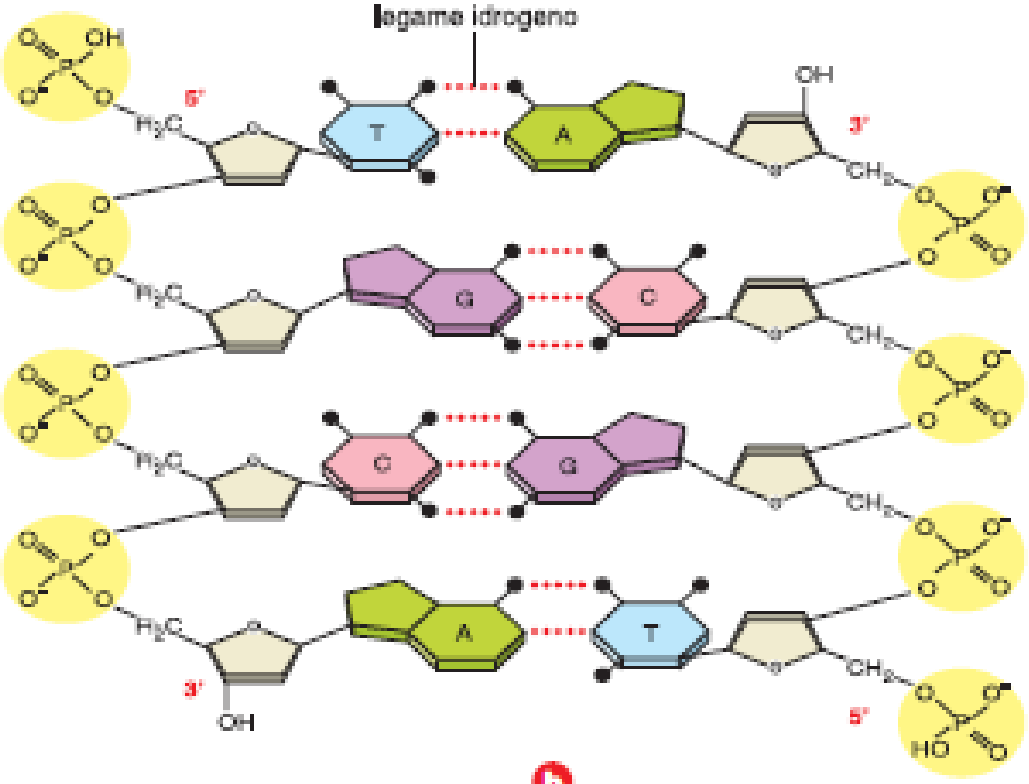
Polimerizzazione mediante condensazione.

In una molecola di DNA

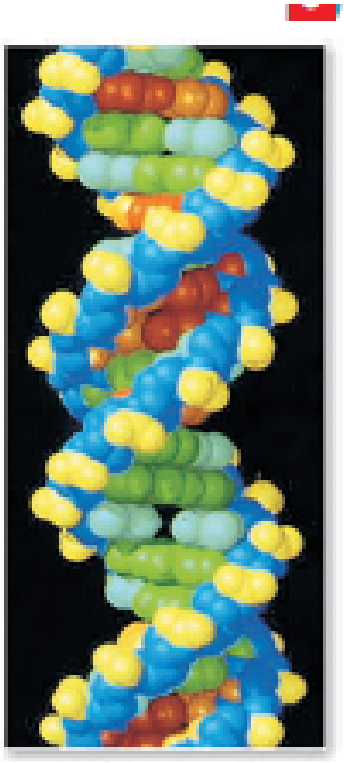
due filamenti antiparalleli con sequenza nucleotidica complementare accoppiati in una doppia elica destrogira con 10 nucleotidi per giro.



a. Modello schematico, cosiddetto a nastro, di un segmento di DNA.



b. Struttura chimica del DNA. Gli scheletri di "zucchero-fosfato"dei due filamenti hanno una direzione e un verso perché ciascun gruppo fosfato si lega con un atomo di C in posizione 3' di una molecola di zucchero e con quello in posizione 5' della molecola successiva. **Ogni filamento ha quindi un'estremità 5', che termina con un gruppo fosfato, e un'estremità 3' che termina con un gruppo OH.** Nella doppia elica i due filamenti hanno andamento antiparallelo: perciò l'estremità 5' di un filamento si trova sempre di fronte all'estremità 3' dell'altro.



c. Modello molecolare di DNA realizzato al computer.

Replicazione semiconservativa

- I due filamenti di DNA parentale si separano;
  - ciascuno serve da **stampo** per la sintesi di un nuovo filamento **complementare**
  - la sua sequenza è dettata dalla specificità dell'accoppiamento delle basi

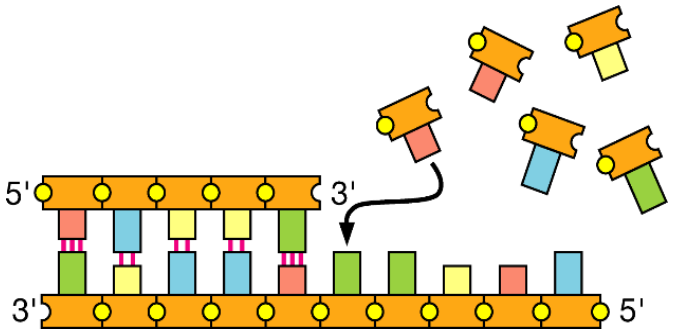
- **Replicazione Semiconservativa:**
  - un filamento di DNA parentale viene conservato in ogni molecola figlia di DNA



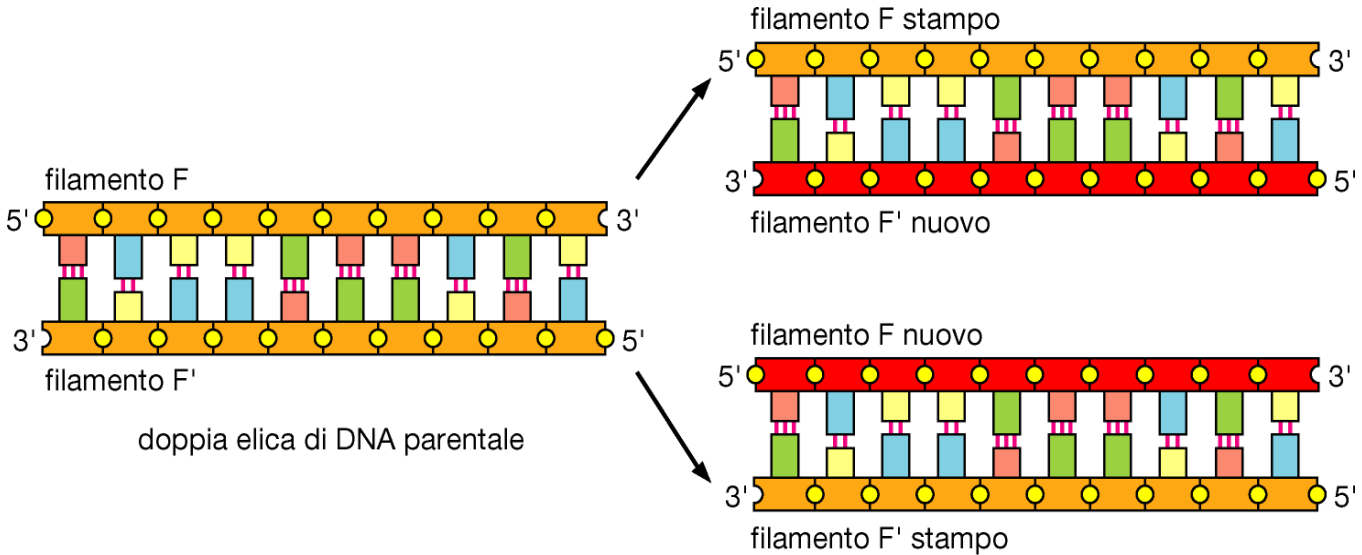
Replicazione nei Procarioti

La replicazione semiconservativa del DNA

- Ogni filamento di DNA contiene una sequenza nucleotidica esattamente **complementare** a quella del filamento opposto: per questo **ognuno di essi può fare da stampo** per la sintesi di un altro filamento complementare.

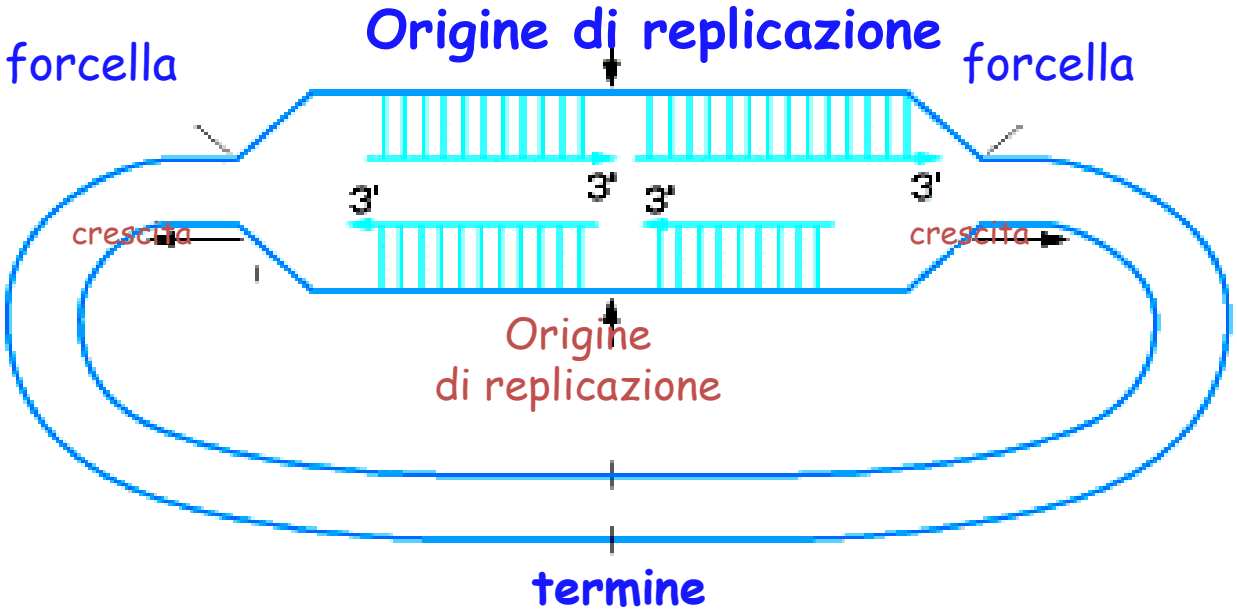


Se si indicano i due filamenti come **F** e **F'**, il filamento **F** funge da stampo per un nuovo filamento **F'**, mentre **F'** fa da stampo per un nuovo filamento **F**.



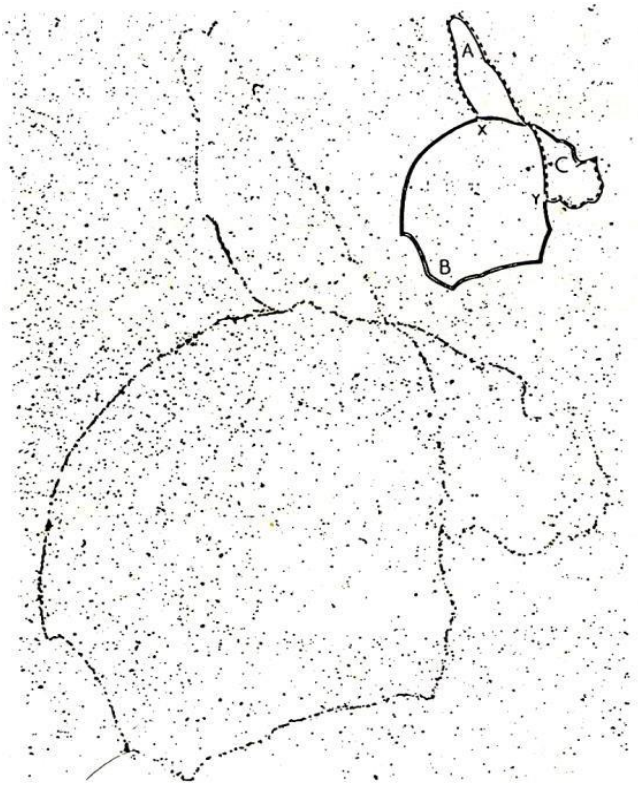
Origini di replicazione

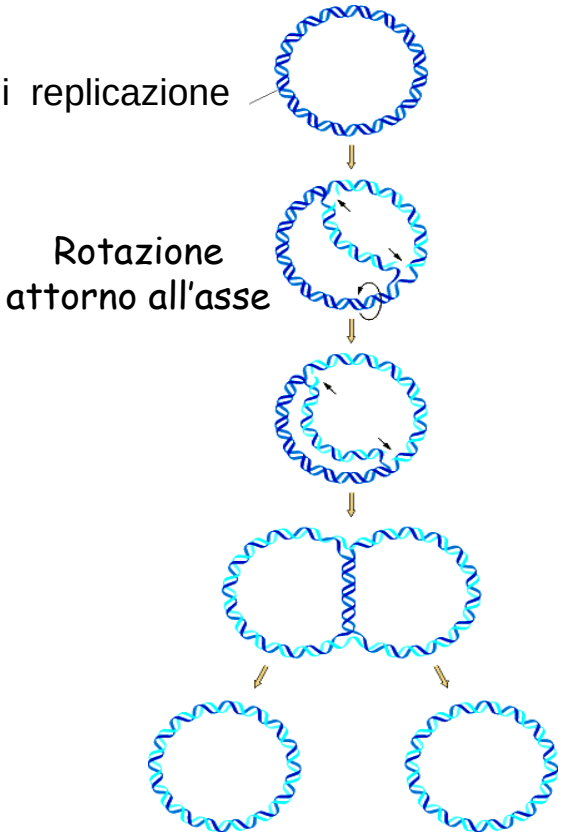
- Il processo replicativo del DNA viene innescato da **proteine iniziatrici** che si legano al DNA
- queste distanziano le catene rompendo i legami idrogeno tra le basi in modo che **le basi disaccoppiate** si possano utilizzare da stampo



- **Genoma batterico**: una molecola circolare: 1 origine di replicazione
- **Genoma umano**: 10 000 origini di replicazione

Origini di replicazione





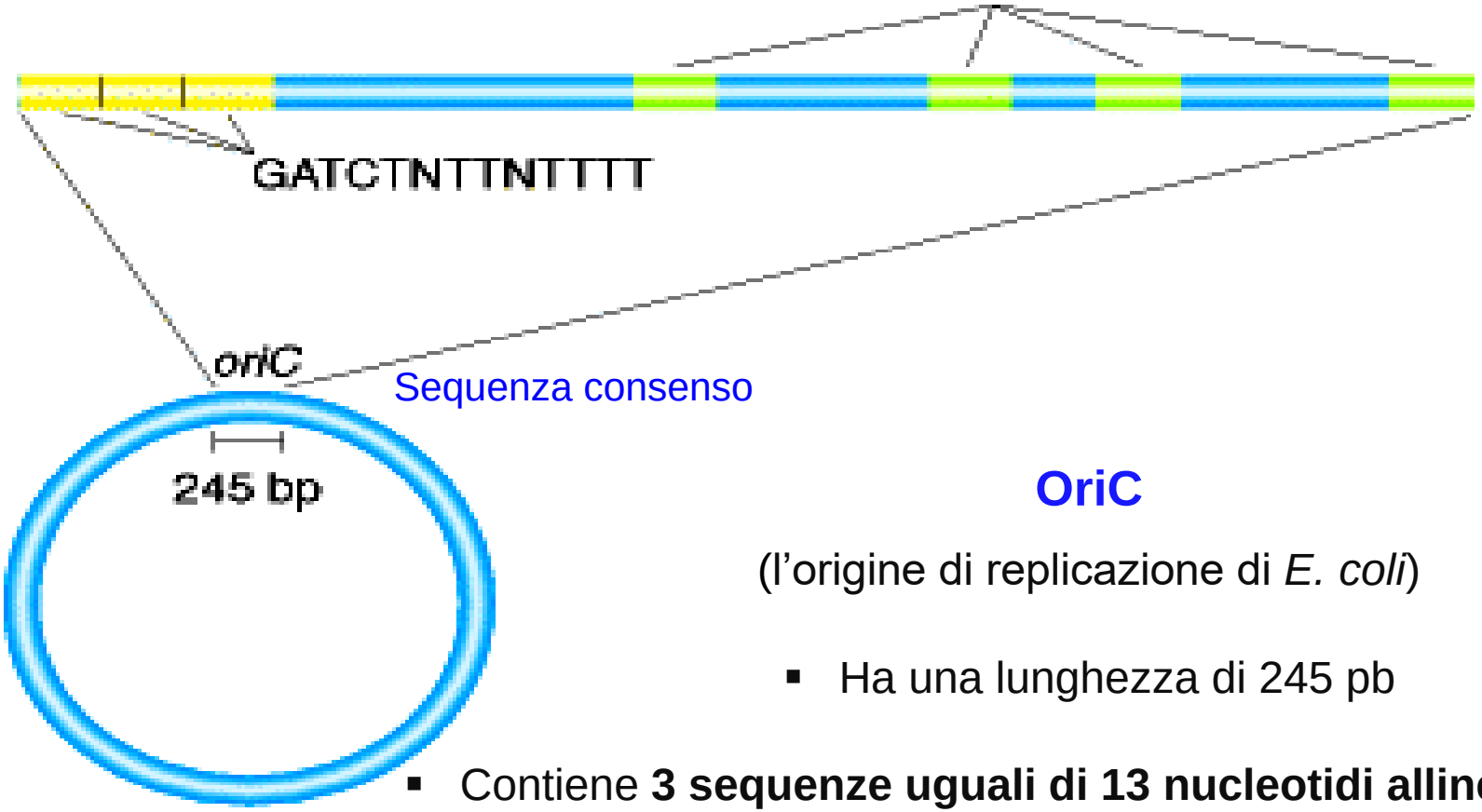
- Il genoma batterico contiene 2 **forcelle di replicazione**, che rappresentano le regioni di sintesi attiva del DNA

- A livello di ciascuna forcella i filamenti parentali del DNA si separano e vengono sintetizzati due filamenti figli

Origini di replicazione

- **Sono caratterizzate da una particolare seq nt**

Siti di legame per la proteina iniziatrice
3 sequenze di 13 nucleotidi allineati in tandem



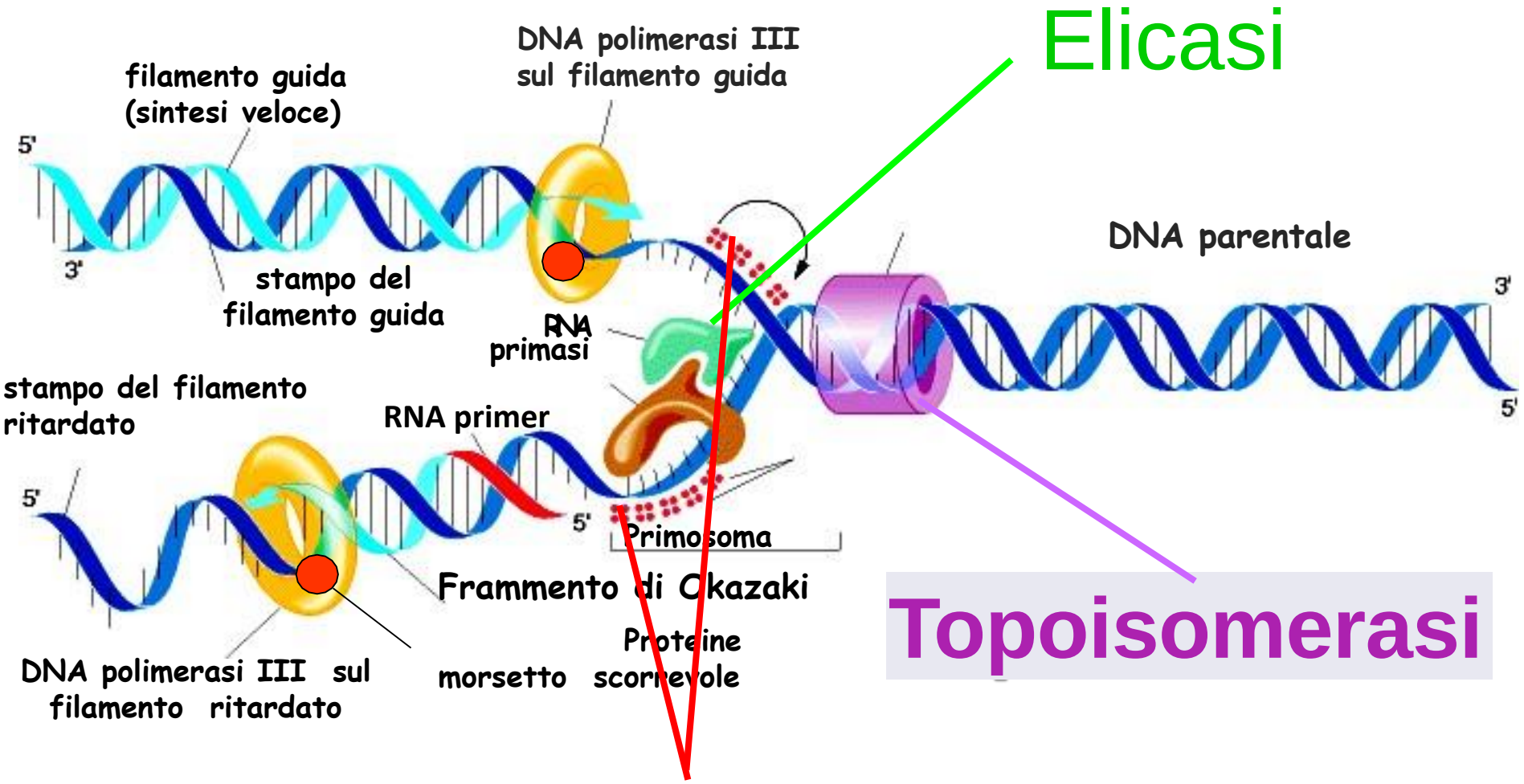
Sequenza consenso

OriC

(l'origine di replicazione di *E. coli*)

- Ha una lunghezza di 245 pb
- Contiene **3 sequenze uguali di 13 nucleotidi allineati** in tandem
- Contiene 4 siti di legame per la proteina iniziatrice (DnaA)

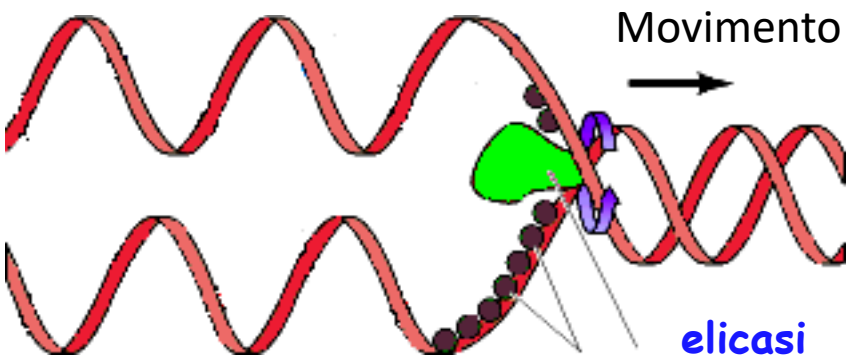
COMPLESSO ENZIMATICO



Proteine che legano il DNA a singolo filamento

Svolgimento del DNA: le elicasi

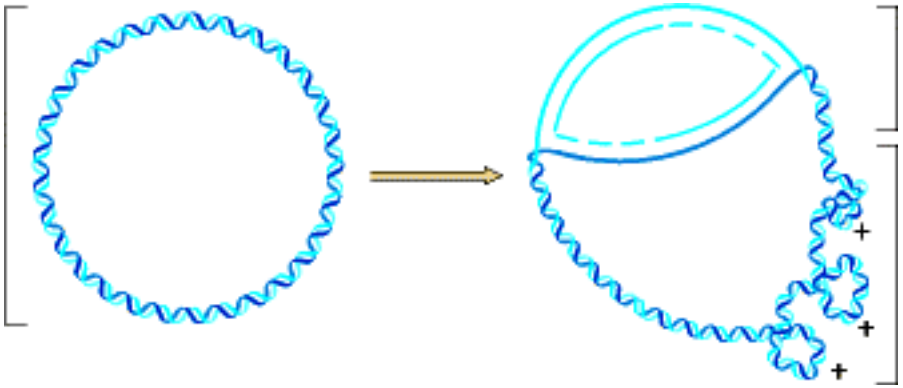
- Il processo replicativo del DNA prevede che i filamenti della doppia elica vengano slegati e distanziati.
- Questo implica che la doppia elica debba subire uno srotolamento.
- Lo srotolamento dipende dall'enzima **elicasi c**he utilizza una molecola di ATP per ogni giro di elica svolto
- Le **elicasi c**atalizzano lo svolgimento del DNA parentale davanti alla forcella di replicazione.



I filamenti nucleotidici separati vengono stabilizzati dalle proteine che legano il DNA a singolo filamento

Le TOPOISOMERASI

Stampo di DNA circolare saldato covalentemente



Esistono 2 tipi di topoisomeasi:

Topoisomerasi di tipo I:

tagliano

solo un filamento di DNA

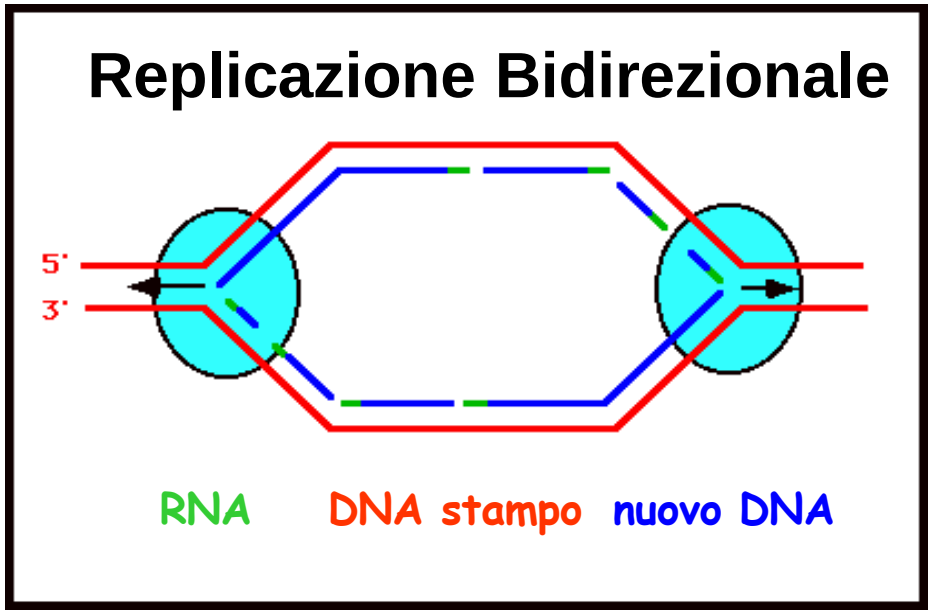
Topoisomerasi di tipo II:

tagliano simultaneamente

entrambi i filamenti di DNA

FORCELLA REPLICATIVA

Forcella di replicazione



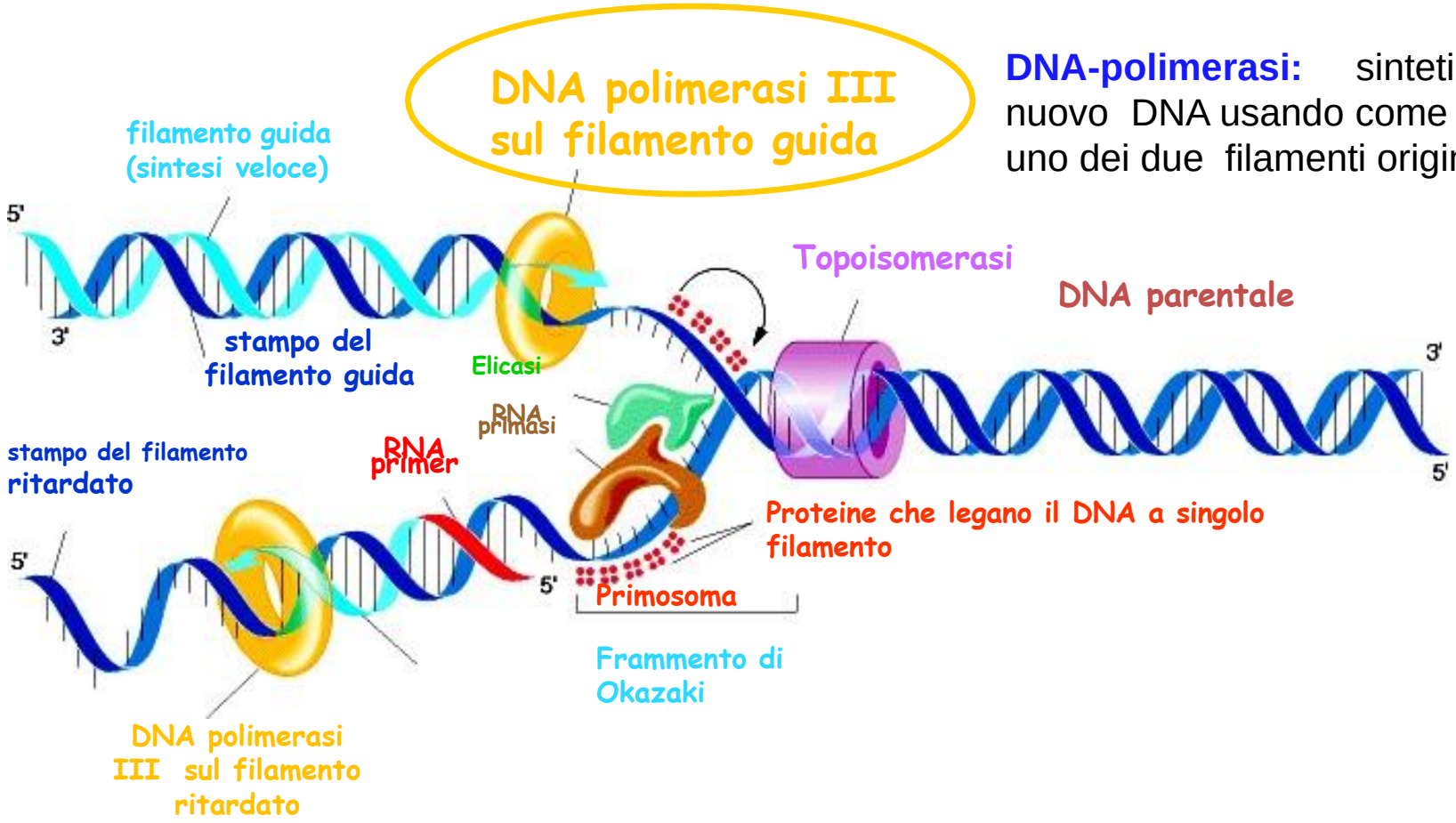
- Sul DNA che si replica si distinguono delle **biforcazioni a Y** dette **forcelle di replicazione**
- In questi punti la macchina replicatrice si sta muovendo lungo il DNA, aprendo i due filamenti della doppia elica e utilizzando ciascun filamento parentale come stampo per formare un nuovo filamento figlio

➢ Replicazione bidirezionale:

- ad ogni origine di replicazione si formano due forcelle replicative;
- queste scorrono in direzioni opposte rispetto all'origine aprendo man mano il DNA



Macchina Replicatrice



DNA-polimerasi: sintetizza il nuovo DNA usando come stampo uno dei due filamenti originali

- Una volta legata a una origine di replicazione
- la **proteina iniziatrice comincia ad aprire** la doppia elica,
- attirando un altro gruppo di proteine che costituiscono **il complesso enzimatico** deputato alla replicazione del DNA

Replicazione del genoma di *E. coli*

PRIMOSOMA

- Unità funzionale all'interno del complesso replicativo

✓ Complesso enzimatico costituito da Elicasi (DnaB) e da Primasi (DnaG)



- L'elicasi separa la doppia elica del DNA a livello della forcella di replicazione e
- si sposta lungo il filamento stampo lento nella direzione 5'-3'

POLIMERASI

- **I procarioti** possiedono 5 tipi di DNA polimerasi:

- **DNA polimerasi I**: implicata nella riparazione del DNA e nella rimozione degli inneschi dei frammenti di Okazaki.

- **DNA polimerasi II**: indotta da danni al DNA per riparazione incline all'errore.

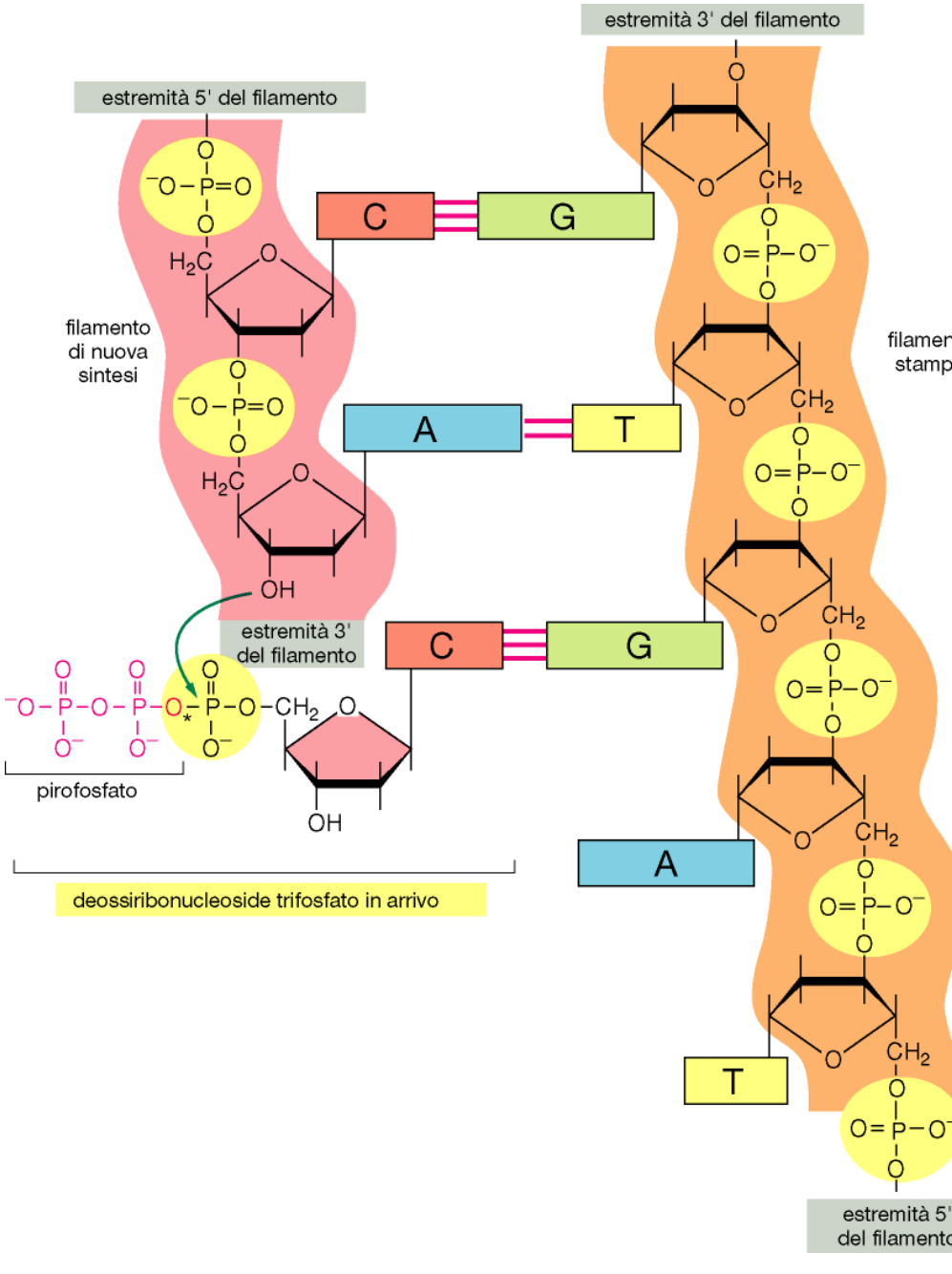
- **DNA polimerasi III**: **l'enzima principale per la replicazione,**

  - **ha** attività polimerasica 5'->3' ed esonucleasica 3'->5‘(proof-reading).
  - Attiva sia nella sintesi del filamento leading, sia in quella dei frammenti di Okazaki.

- **DNA polimerasi IV e DNA polimerasi V**: coinvolte nella riparazione incline all'errore

Reazione di allungamento della catena di DNA catalizzata dalla polimerasi

- I nucleotidi entrano inizialmente come **nucleotidi trifosfati ricchi di energia,** apportando in questo modo l'energia necessaria per la polimerizzazione.
- Infatti l'**idrolisi** di un legame fosfoanidride nel *nucleoside trifosfato*, con liberazione del *pirofosfato Ppi*, rende disponibile l'energia e la DNA polimerasi vi accoppia la condensazione, legando il monomero nucleotidico alla catena in crescita.
- Il pirofosfato viene idrolizzato ulteriormente a fosfato inorganico Pi; ciò rende la reazione del tutto irreversibile

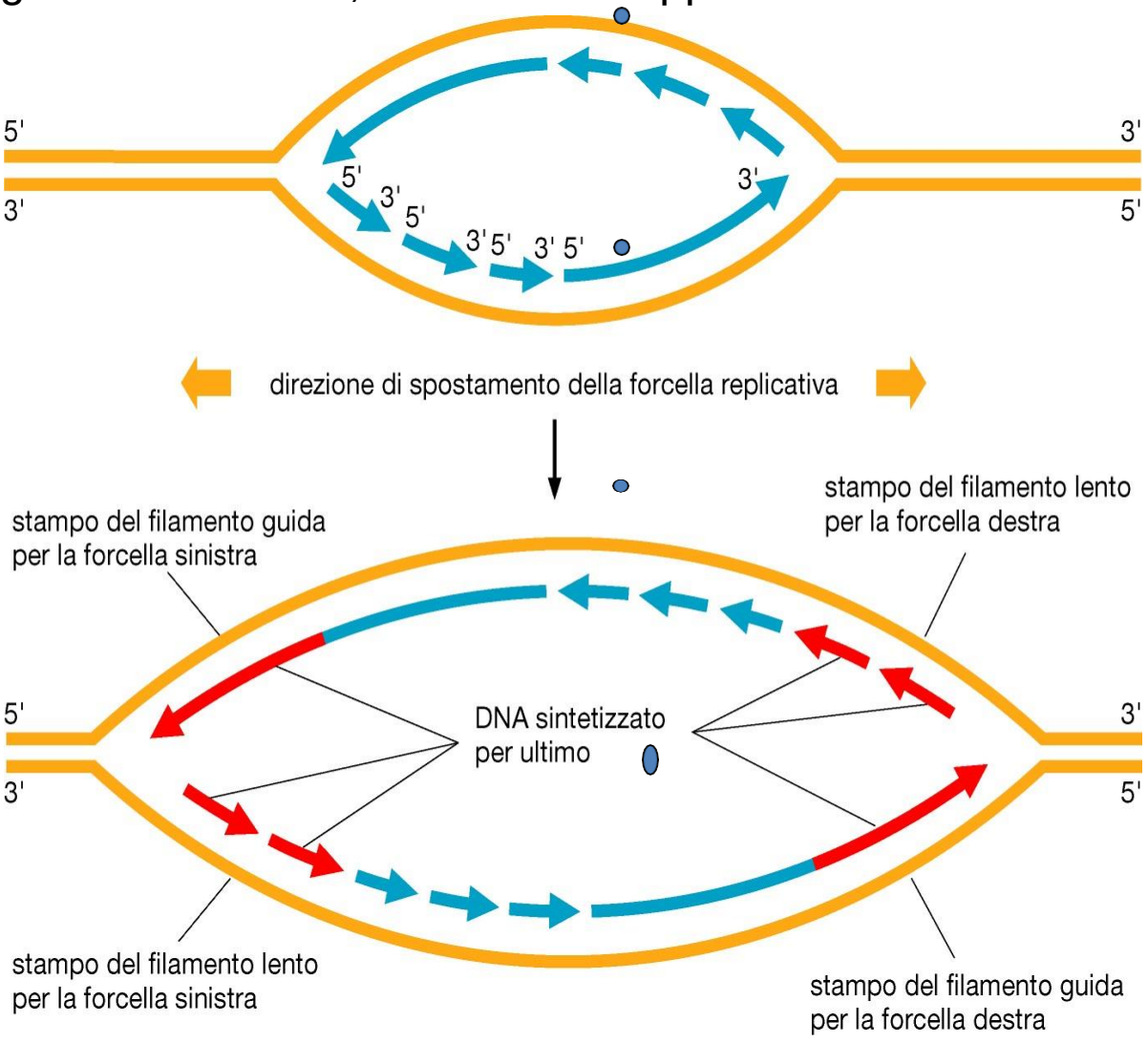


La forcella replicativa è asimmetrica

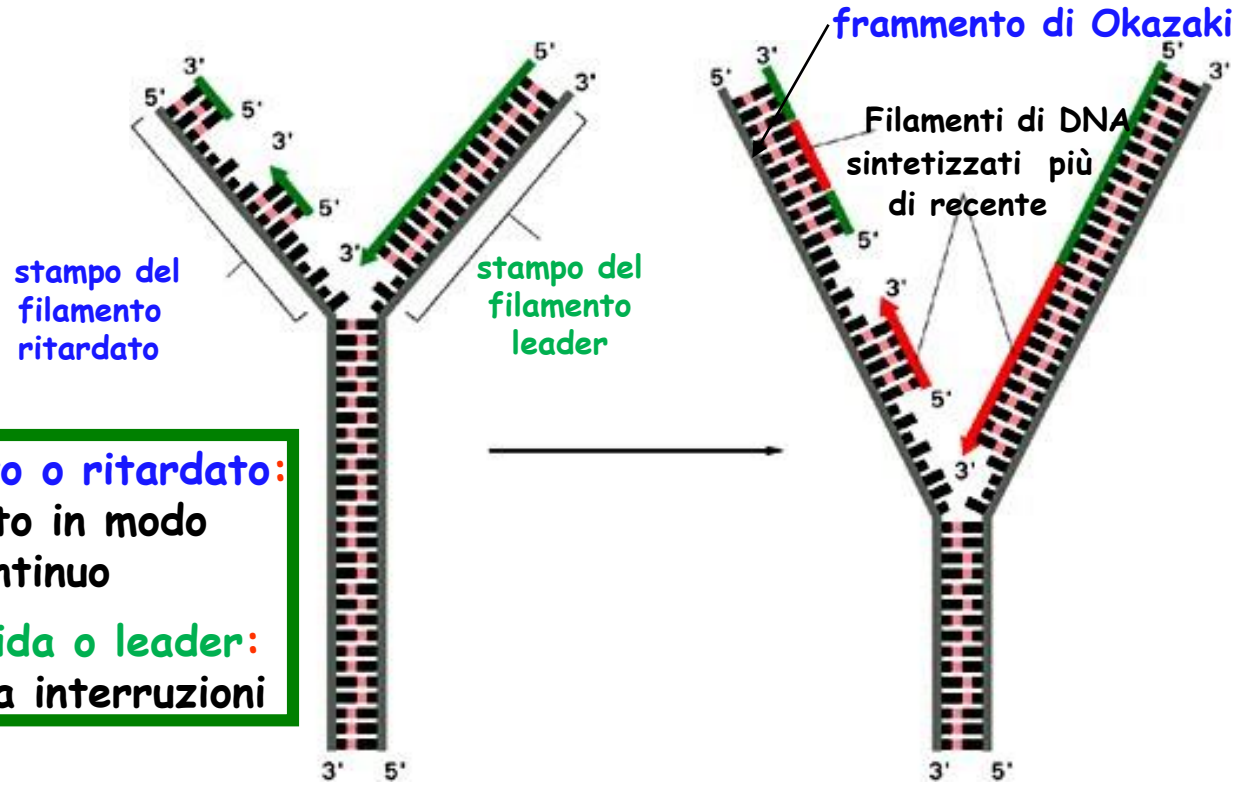
- Il meccanismo di polimerizzazione **5'→3'** pone un problema alla forcella replicativa.
- Lo scheletro Z-P di ogni filamento ha una sua direzionalità, dovuta al modo in cui ogni residuo di zucchero si lega al successivo, e che nella doppia elica i due filamenti decorrono con **polarità opposte**

-un filamento viene sintetizzato su uno stampo che va **da 3' a 5'**

- l'altro filamento si forma su uno stampo che va in verso opposto, **da 5' a 3'.**



Frammenti di Okazaki

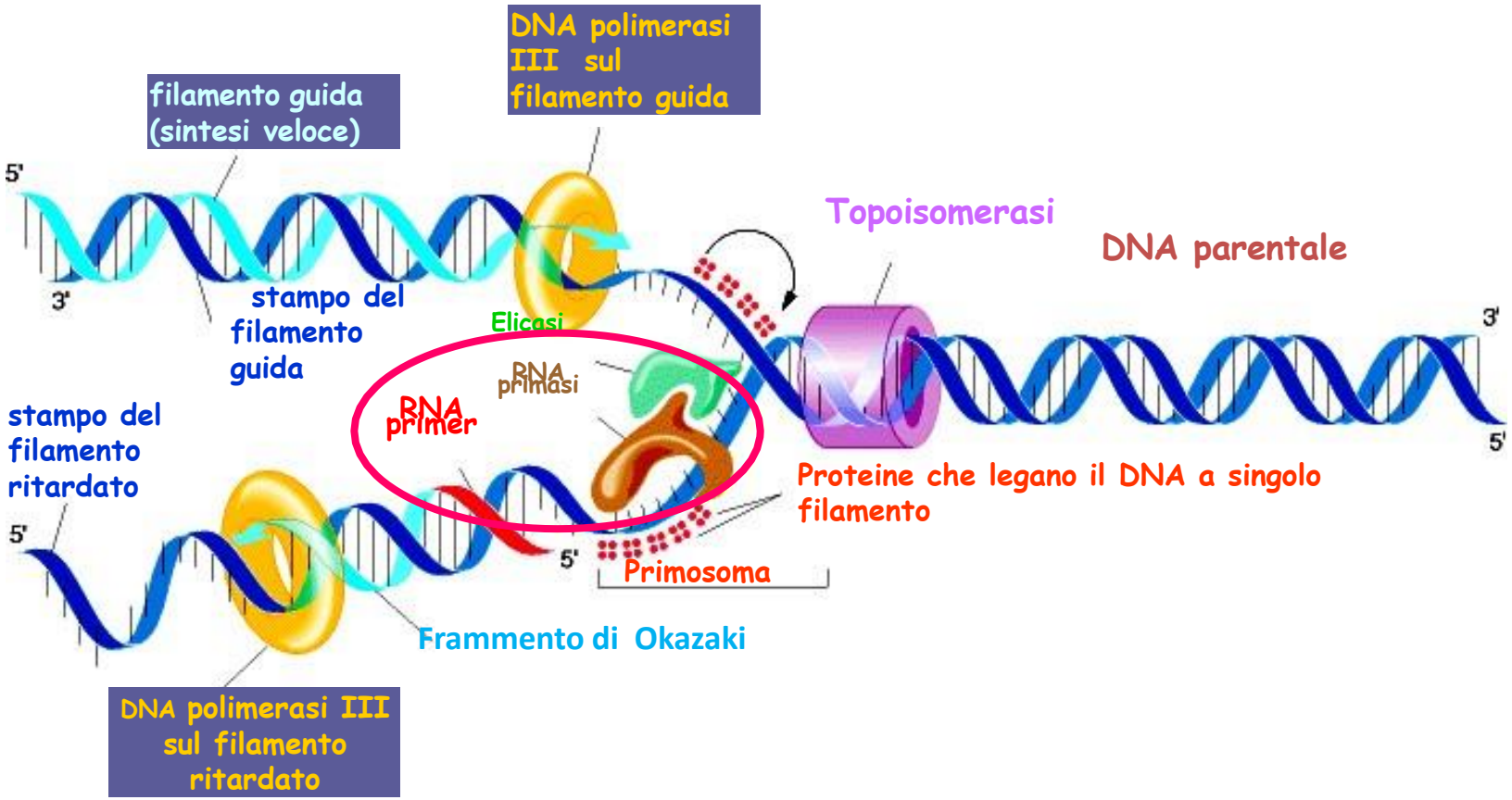


- **Filamento lento o ritardato:** sintetizzato in modo discontinuo
- **Filamento guida o leader:** cresce senza interruzioni

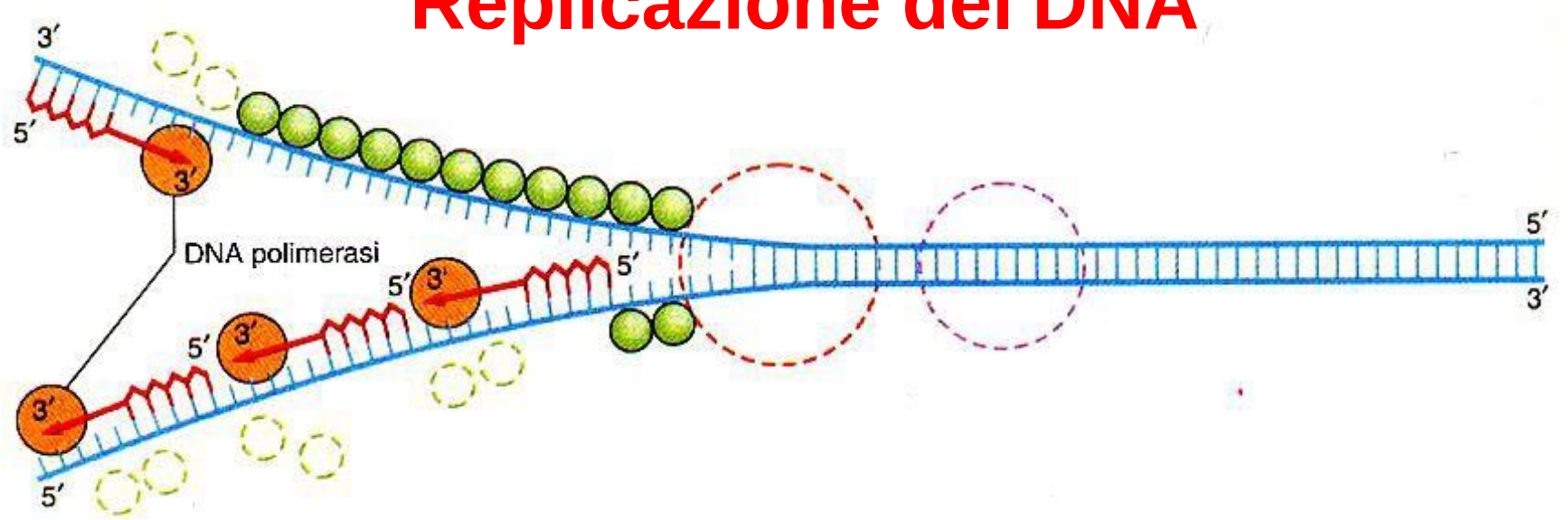
- **In realtà il filamento di DNA che deve allungarsi all'estremità 5' viene sintetizzato in modo discontinuo, in brevi tronconi successivi dalla DNA polimerasi che si muove all'indietro rispetto alla forcella, quindi in direzione 5'-3' per ogni troncone**
- Questi pezzi detti **frammenti di Okazaki**, vengono **ricuciti** in seguito formando un filamento nuovo continuo

PRIMASI e PRIMER

Macchina Replicatrice



Replicazione del DNA



- **Filamento guida**: l'innesco serve solo per cominciare la sintesi all'origine di replicazione
- **Filamento lento**: la sintesi di DNA è discontinua perciò sono continuamente necessari nuovi inneschi

✓ Quando alla forcella replicativa si espone un nuovo tratto di basi libere, vengono sintetizzati nuovi inneschi a RNA disseminati lungo il filamento lento;

✓ la DNA polimerasi aggiunge un deossiribonucleotide all'estemità 3' di questo innesco, dando inizio a un filamento di DNA e **allungandolo finchè non si imbatte nell'innesco a RNA successivo**

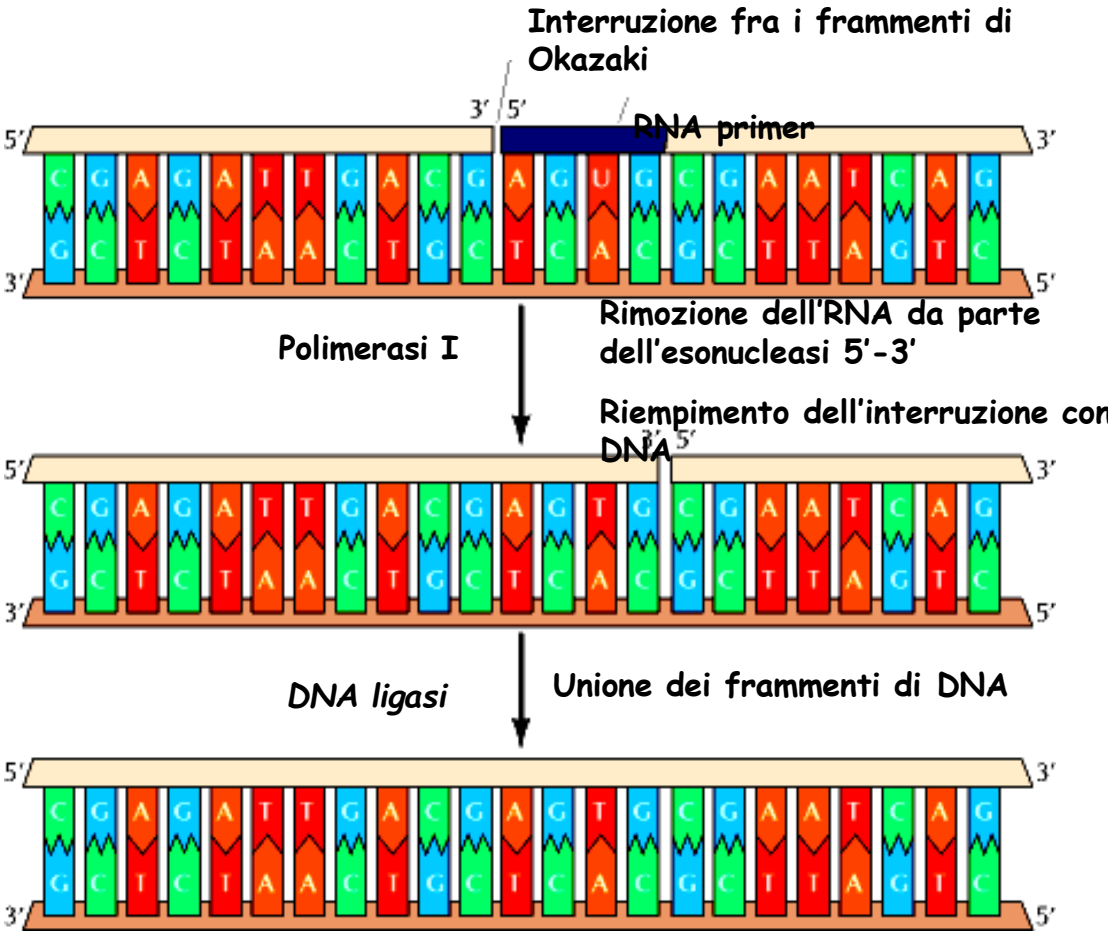
Rimozione del primer e unione dei frammenti di Okazaki

- Per trasformare in un filamento continuo tutti i frammenti separati costruiti sul filamento lento, intervengono altri 3 enzimi:

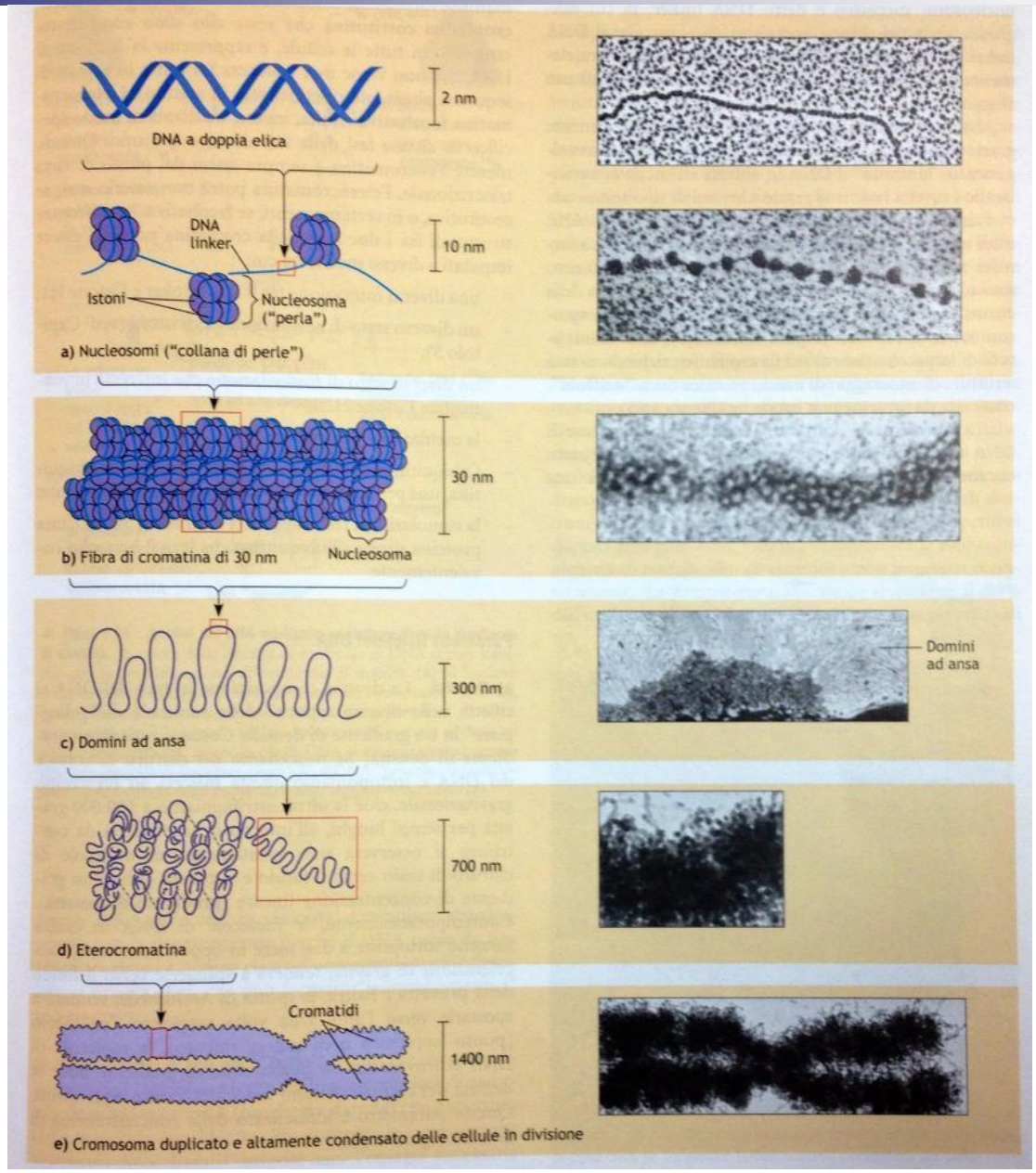
1. **Nucleasi**: degrada gli inneschi a RNA

2. **Polimerasi riparativa**: sostituisce DNA all'RNA, usando come innesco il frammento di Okazaki adiacente

3. **DNA ligasi**: unisce il P in 5' di un frammento con l'OH in 3' del seguente.
   Richiede ATP o NADH



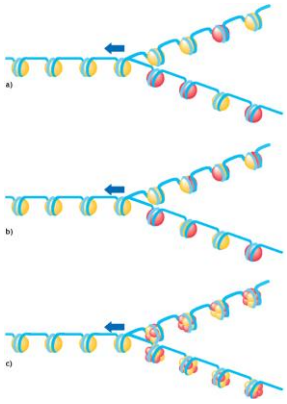
REPLICAZIONE NEGLI EUCARIOTI

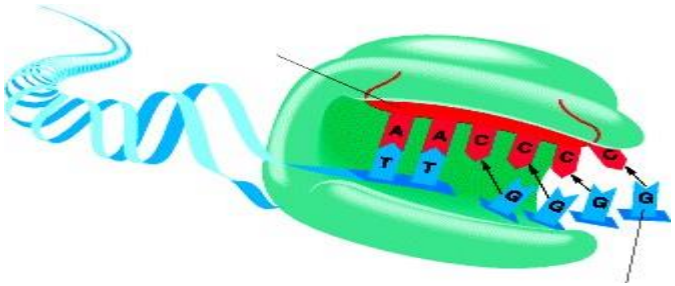

2 nm
DNA a doppia elica
DNA linker
10 nm
Istoni
Nucleosoma ("perla")
a) Nucleosomi ("collana di perle")
30 nm
b) Fibra di cromatina di 30 nm
Nucleosoma
300 nm
Domini ad ansa
c) Domini ad ansa
700 nm
d) Eterocromatina
Cromatidi
1400 nm
e) Cromosoma duplicato e altamente condensato delle cellule in divisione

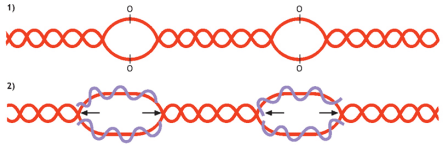
Replicazione negli eucarioti

- I principi generali che sono alla base del processo di duplicazione del DNA sono rispettati anche per la cellula eucariotica, ma nascono alcune problematiche da risolvere:

1. **Dimensione dei cromosomi**
2. **Presenza dei nucleosomi**
3. **Telomeri**

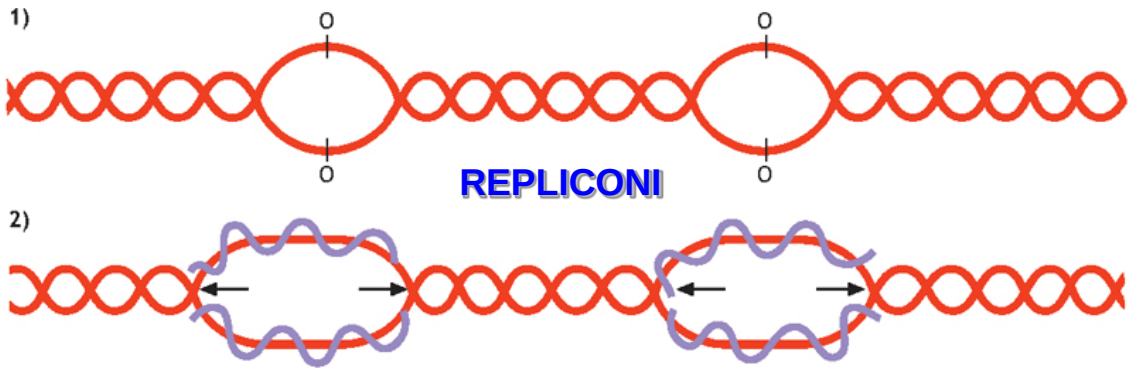






1. **Dimensione dei cromosomi**

I cromosomi presentano una lunghezza ragguardevole:



- Cromosoma di E.coli: $2X10^6$ bp Cromosoma umano: $3.5\ X10^9$ bp
- **Velocità di duplicazione negli eucarioti è 10 volte inferiore che nei procarioti**

- **Stratagemma:** l'apertura della doppia elica avviene in più punti detti **REPLICONI,** lungo il cromosoma
- In ciascun replicone le forcelle di replicazione procedono allontanandosi in direzione opposta l'una dall'altra; in tal modo ogni forcella incontrerà le forcelle adiacenti

2. Presenza dei nucleosomi

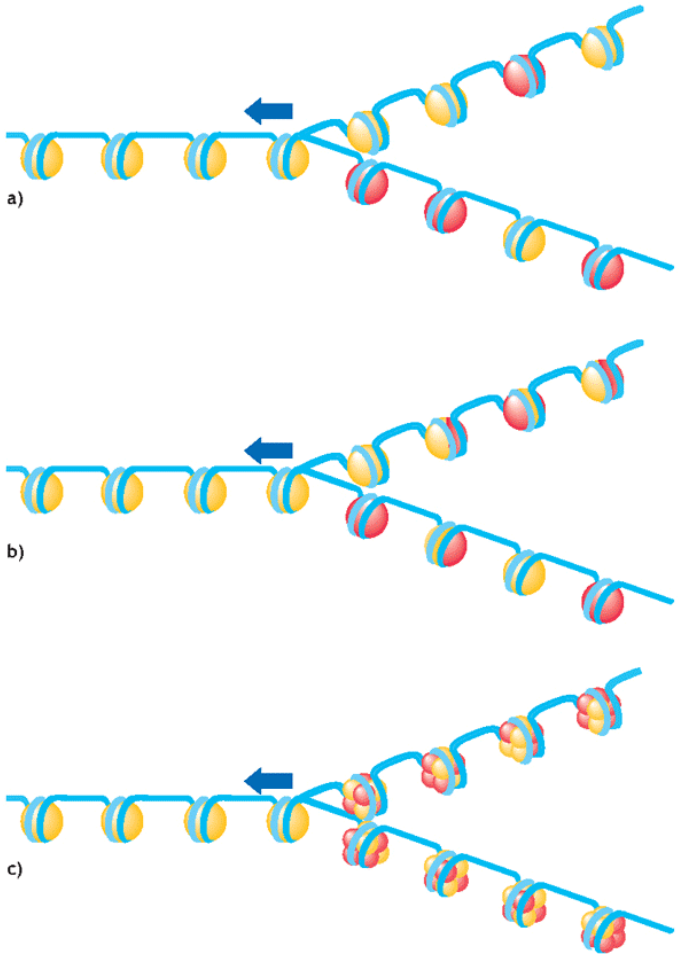
- Durante la replicazione possiamo considerare gli istoni come divisi in 2 categorie: quelli che costituivano i vecchi ottameri ed istoni di nuova sintesi.

3 ipotesi:

1. **conservativo:** gli ottameri vecchi conservano la loro identità, così ottameri nuovi e vecchi si distribuiscono in modo casuale fra i due doppi filamenti (più accreditata)

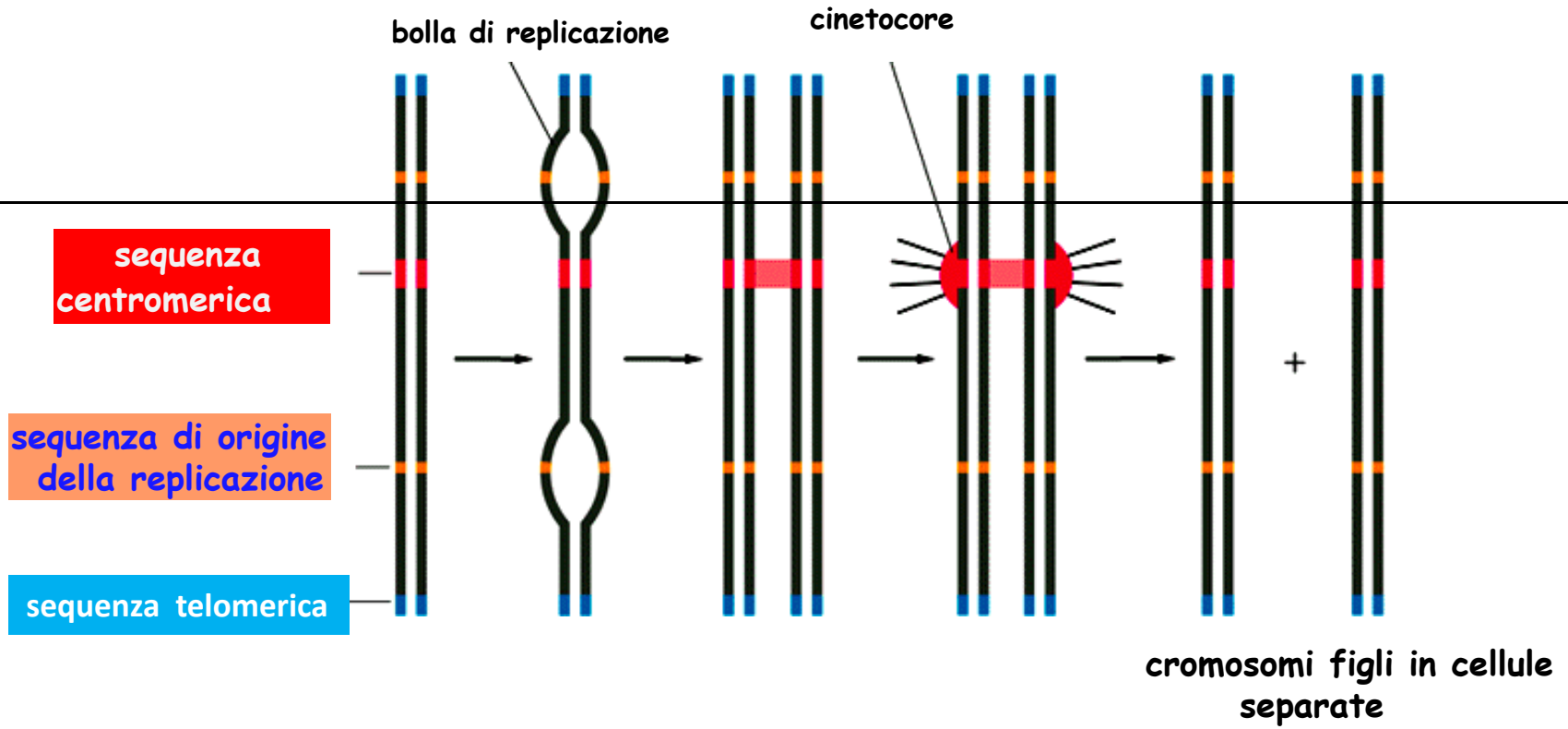
   2.semiconservativo: ogni ottamero è costituito da un tetramero vecchio e da uno nuovo

   3.dispersivo: gli ottameri sono costituiti da istoni vecchi e nuovi a caso

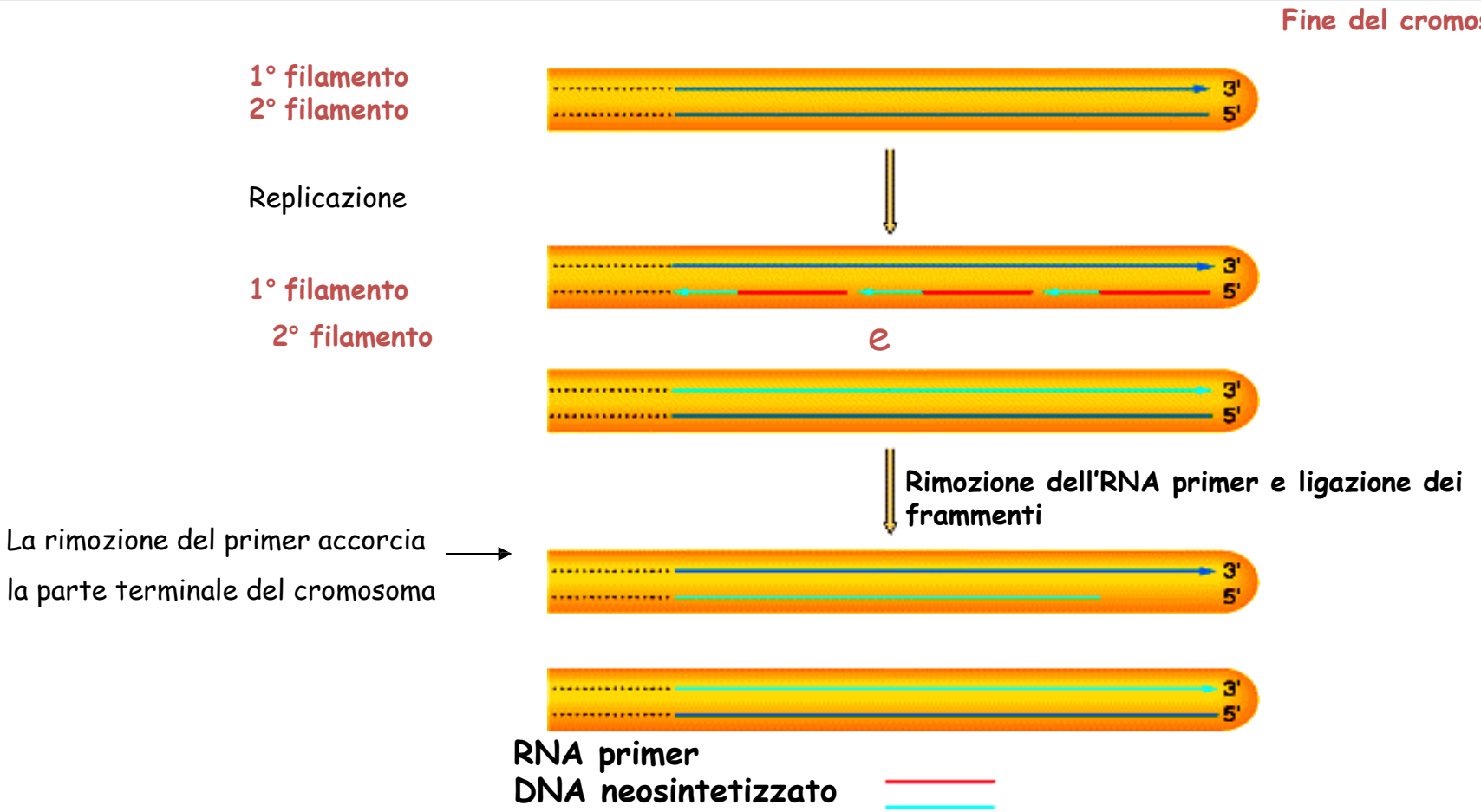


3. Presenza dei Telomeri

- Sono sequenze di DNA alle estremità dei cromosomi e consistono in sequenze ripetute di DNA a semplice sequenza.
  - Nell'uomo la sequenza ripetuta è **AGGGTT.**



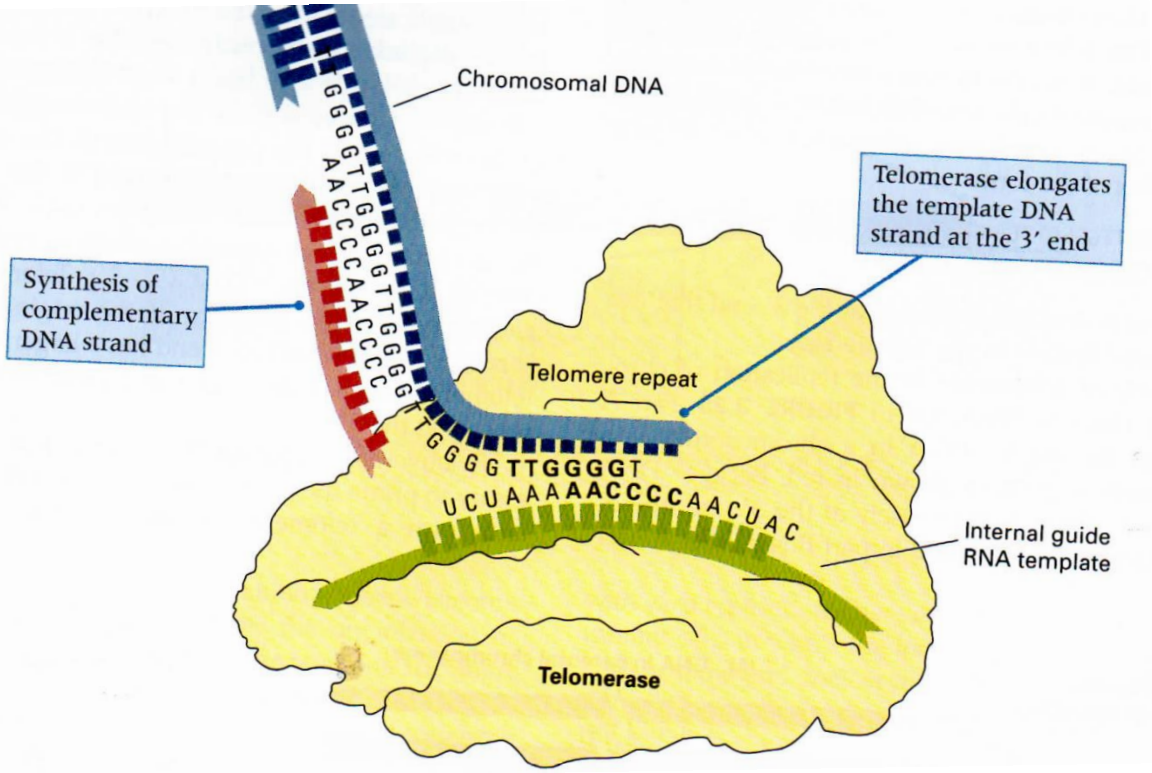
Il problema della replicazione alla fine dei cromosomi



- Quando la forcella replicativa raggiunge l'estremità del cromosoma la **macchina replicatrice incontra una difficoltà nella sintesi del filamento lento**: non c'è posto per collocare l'innesco a **RNA necessario x iniziare l'ultimo frammento d**i Okazaki, proprio in cima alla molecola lineare di DNA.
- Ogni volta che una molecola di DNA si replica **potrebbe andarne perduto un pezzetto** dal-l'estremità.

La telomerasi

- Nei procarioti il problema non esiste perchè la molecola di DNA è circolare.
- Negli eucarioti il problema si risolve grazie a speciali **sequenze terminali**, incorporate nei telomeri.
- Queste sequenze ripetitive telomeriche **richiamano al cromosoma un enzima** chiamato **telomerasi,**
- Questo enzima **aggiunge copie multiple della stessa sequenza di DNA** in fondo al cromosoma, producendo un tratto di DNA supplementare e consentendo di completare il filamento lento



- La Telomerasi contiene **una breve sequenza di RNA** che utilizza come stampo per sintetizzare la sequenza di DNA al terminale 3’

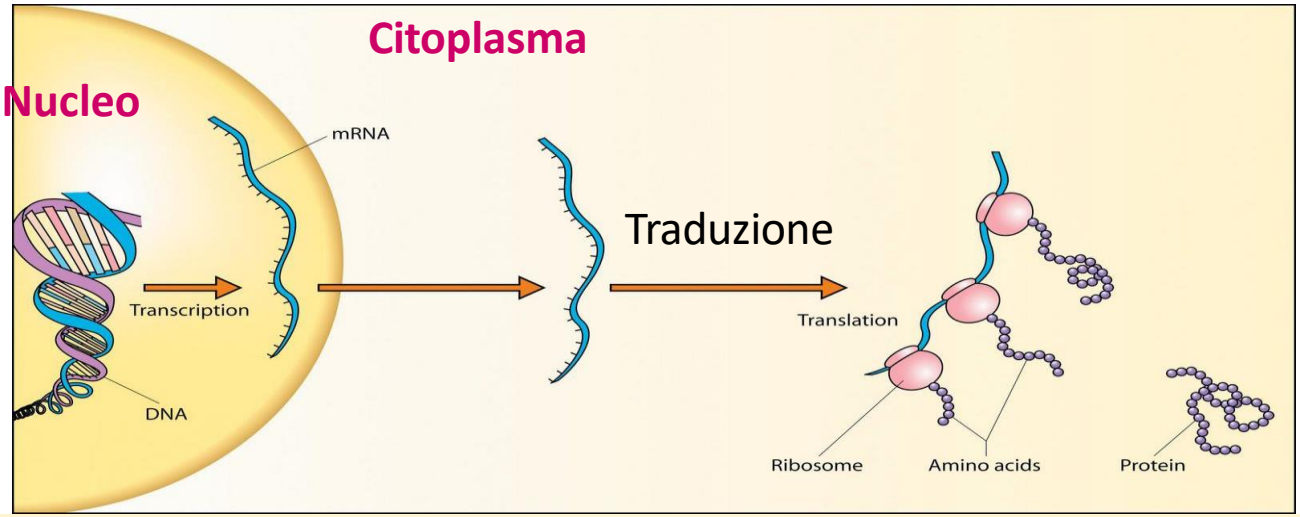
Flusso dell'Informazione Genica

A grandi linee il processo che, partendo dal DNA, porta alla sintesi delle proteine consiste di due fasi:

- una **fase di trascrizione** in cui il DNA copia o trascrive il proprio messaggio in una molecola di RNA (mRNA);
- una **fase di traduzione** in cui l'RNA (mRNA) "trascritto" si trasferisce dal nucleo al citoplasma dove un adeguato "macchinario", costituito da
  - tRNA,
  - rRNA
  - ribosomi,

  lo traduce nel linguaggio delle proteine basato sugli amminoacidi

Il processo, che prende il nome di espressione genica, può essere così schematizzato:



DNA → trascrizione → RNA → traduzione → proteine

(nucleo) (citoplasma)

GENOTIPO

(informazione ereditaria contenuta nel DNA)



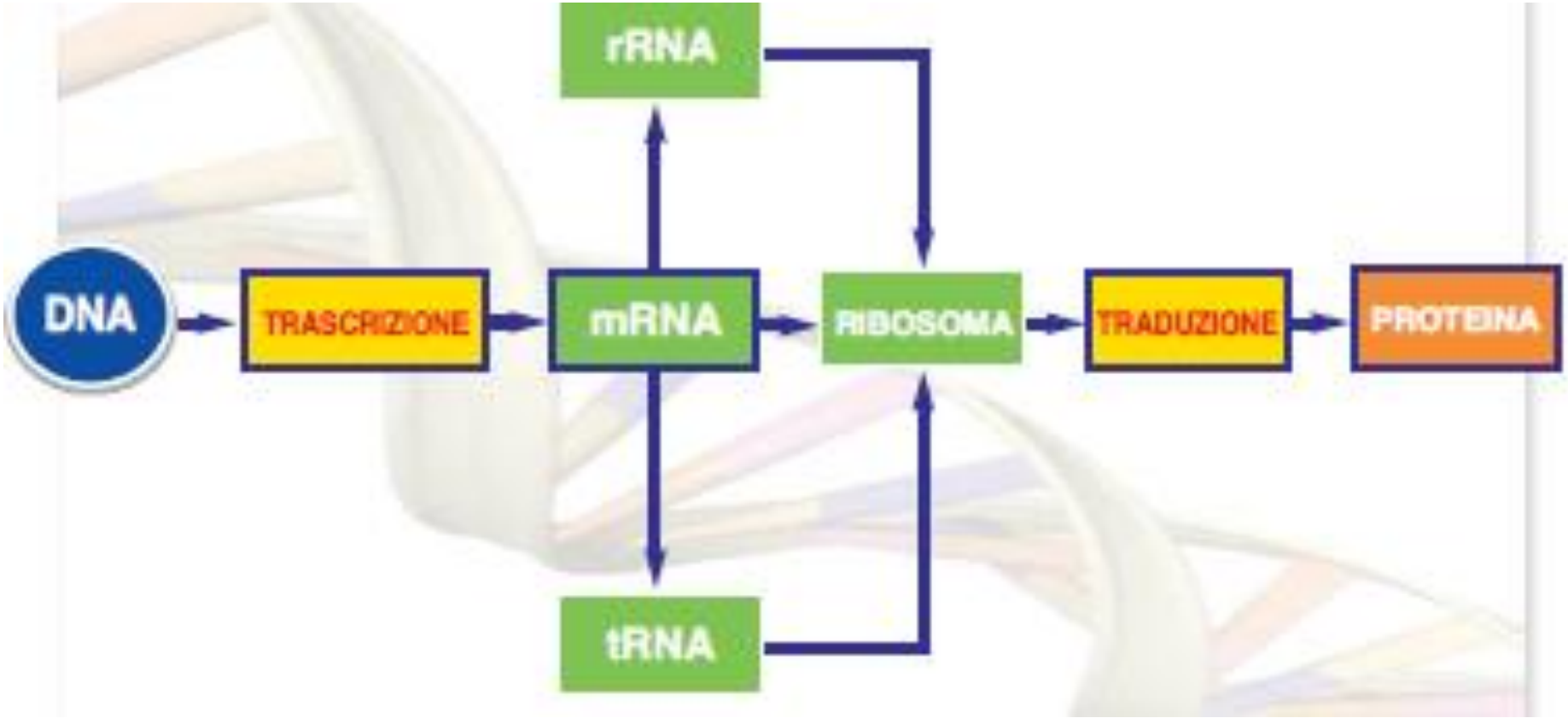
SINTESI PROTEICA

FENOTIPO

(caratteristiche specifiche dell'organismo)

Il dogma centrale della biologia molecolare

- L'espressione genica si realizza quindi attraverso un **flusso di informazioni** che va dal DNA all'RNA, alle proteine.
- Questa sequenza, che è universalmente valida, tranne alcune rare eccezioni, è stata definita da Crick il dogma centrale della biologia molecolare



Quale dei 2 filamenti viene trascritto?

- **ELICA SENSO**
  Filamento uguale all'mRNA ma non partecipa alla trascrizione



- **ELICA ANTISENSO**
  Filamento stampo: complementare all'mRNA
  è quello su cui lavora l'RNA pol



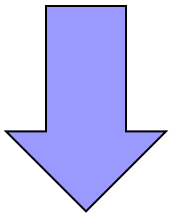
mRNA



CODONI.

- Le “parole” più brevi dell’RNA che rappresentano gli AA sono le **triplette di base o codoni**

Il passaggio di informazioni dal gene alla proteina si basa su un codice di triplette: **CODICE GENETICO.**



- ✓ Il primo codone venne decifrato nel 1961 dal biologo americano Marshall Nirenberg:

- ✓ Sintetizzò una molecola di RNA artificiale unendo in sequenza di nucleotidi identici (contenenti tutti U);
- ✓ mise poi il poli-U in una provetta contenente ribosomi e altre sostanze necessarie alla sintesi proteica.
- ✓ Il poli-U venne così tradotto in un polipeptide contenente un unico tipo di aminoacido: la fenilalanina (Phe).

IL CODICE GENETICO

1st letter	Second Letter: U		Second Letter: C		Second Letter: A		Second Letter: G		3rd letter
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	Stop	UGA	Stop	A
	UUG		UCG		UAG	Stop	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

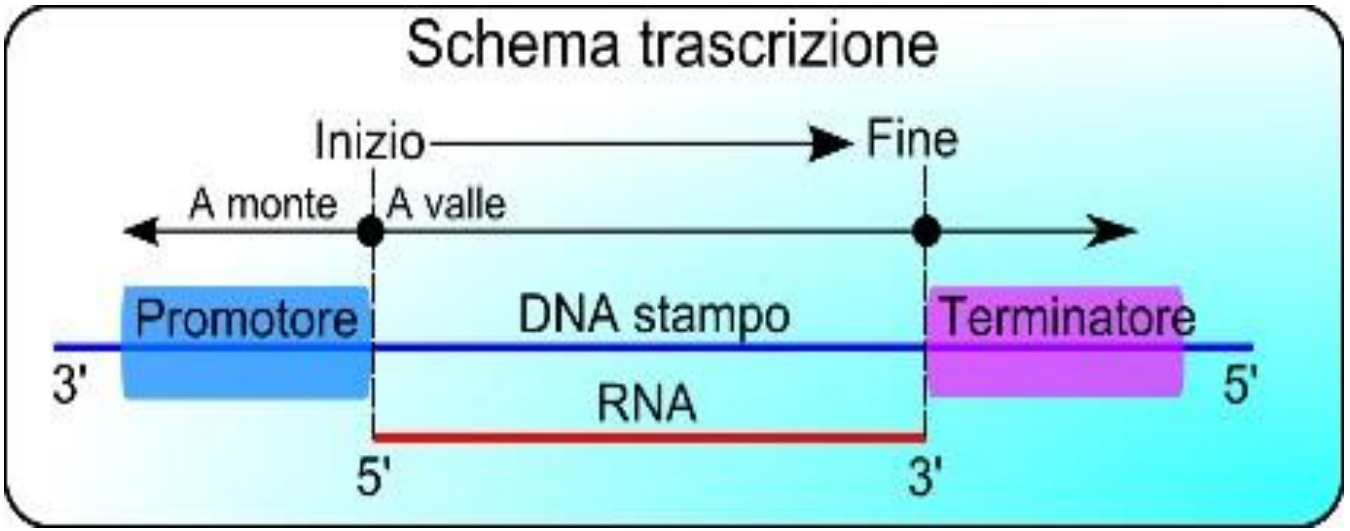
TRASCRIZIONE

DNA → mRNA

La trascrizione del DNA avviene nel nucleo delle cellule.

- Come nella duplicazione i due filamenti di DNA devono essere prima separati in corrispondenza della sequenza da trascrivere.
- I nucleotidi della nuova molecola di RNA si appaiono per omologia al filamento stampo di DNA formando *legami idrogeno*;
- nell'RNA abbiamo però <u>al posto della T la U</u> che si appaia con la A.

- I singoli nucleotidi verranno poi uniti dall'enzima **RNA-polimerasi**.



RNA polimerasi

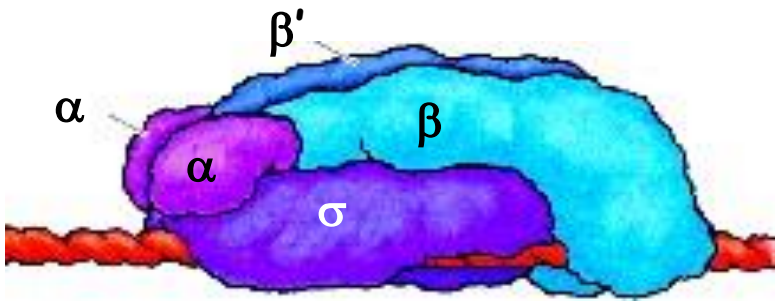
- Enzima responsabile della sintesi di RNA.
- Catalizza la polimerizzazione di ribonucleotidi-5'-trifosfato diretta da uno stampo di DNA.
- La *RNApol* di E. coli è un enzima complesso composto da catene polipeptidiche multiple.
- L'enzima intatto consiste di 5 subunità:

2 subunità α

1 subunità β

1 subunità β'

1 subunità σ



La **subunità σ** è attaccata in modo debole e può essere dissociata dalle altre subunità che costituiscono il nucleo della polimerasi

PROMOTORE e TERMINATORE

Nei procarioti

Esistono siti di inizio e di fine trascrizione

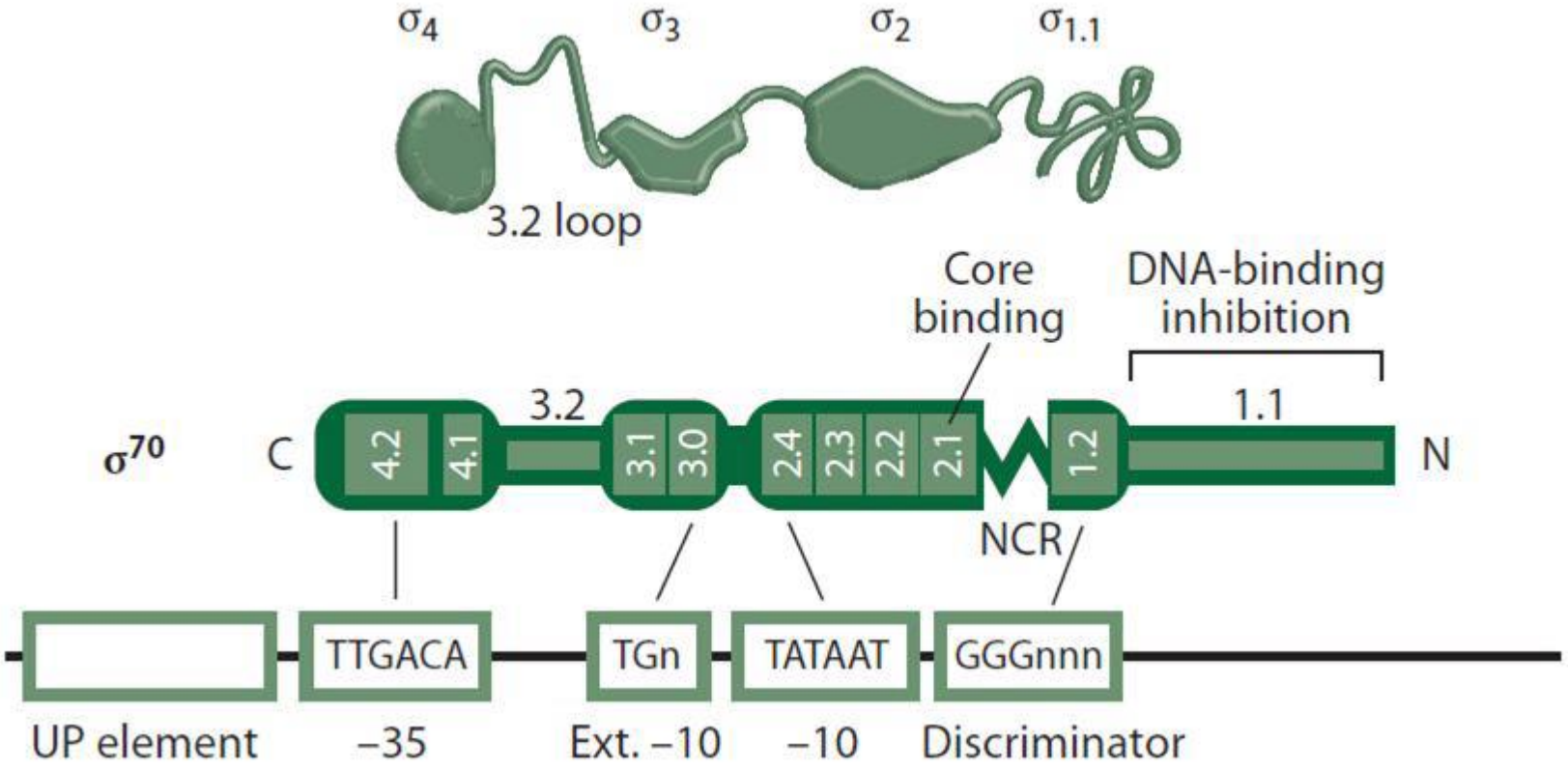
La sequenza di DNA cui si lega la RNA polimerasi per iniziare la trascrizione di un gene si chiama **PROMOTORE**.



Promotore procariotico

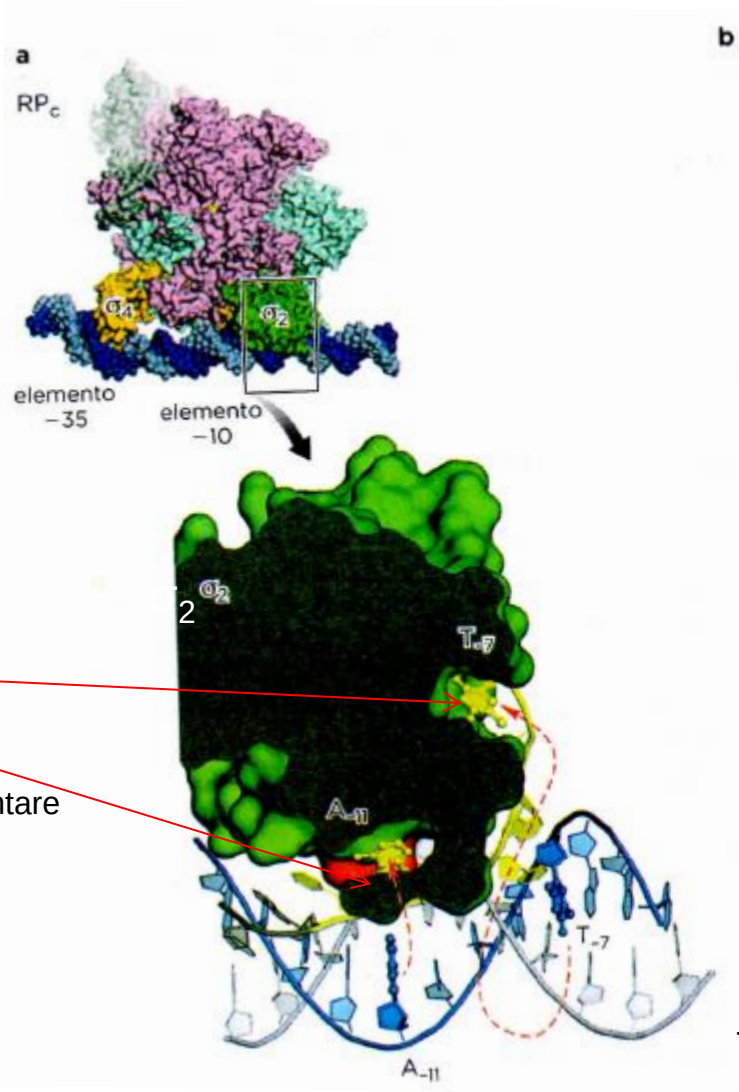
- Contiene due serie di sequenze che sono simili in una varietà di geni.
- Queste sequenze comuni contengono 6 nt ciascuna e si trovano approssimativamente 10 e 35 basi a monte del sito di inizio della trascrizione
- e sono chiamate **elementi –10** e **–35**, dalla loro posizione relativa al sito di inizio della trascrizione, che è definito come la posizione +1.

Rappresentazione schematica della subunità σ^{70} e delle interazioni delle porzioni che la costituiscono con le sequenze di un generico promotore batterico

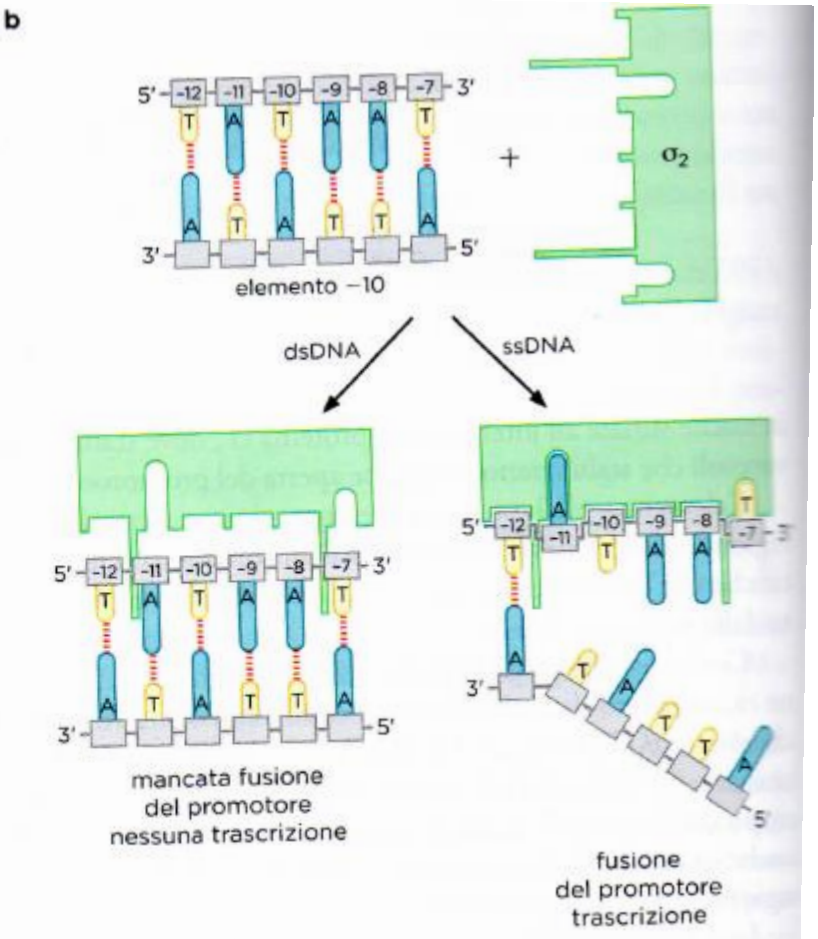


Sono indicate le sequenze consenso del discriminatore e degli elementi -10, -10 esteso e -35 (adattata da Österberg et al, 2011).

Riconoscimento e fusione dell'elemento -10 da parte della regione 2 di σ.



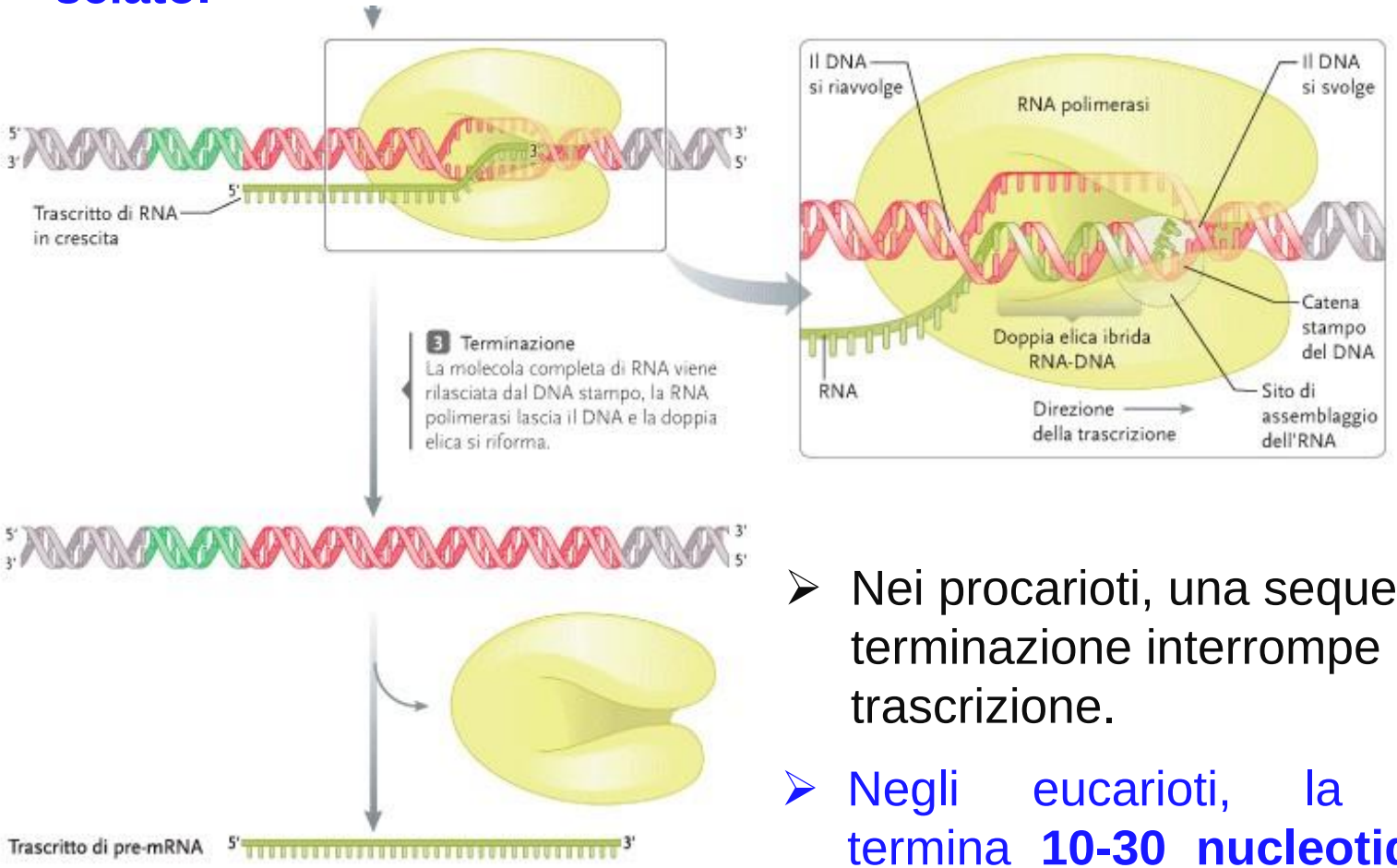
tasche che legano ciascuna una base ribaltata del filamento complementare allo stampo dell'elemento -10.



Differenti modelli: DNA scrunching, traduzione e rotazione di RNAP proposti per il meccanismo di inzio & selezione sito inizio trascrizione

Fine della trascrizione

- **L'RNA polimerasi si stacca e l'RNA copia del DNA (trascritto) è rilasciato.**



- Nei procarioti, una sequenza di terminazione interrompe la trascrizione.
- Negli eucarioti, la trascrizione termina **10-30 nucleotidi più tardi** sulla **sequenza di poliadenilazione**.

Due tipi di terminatori

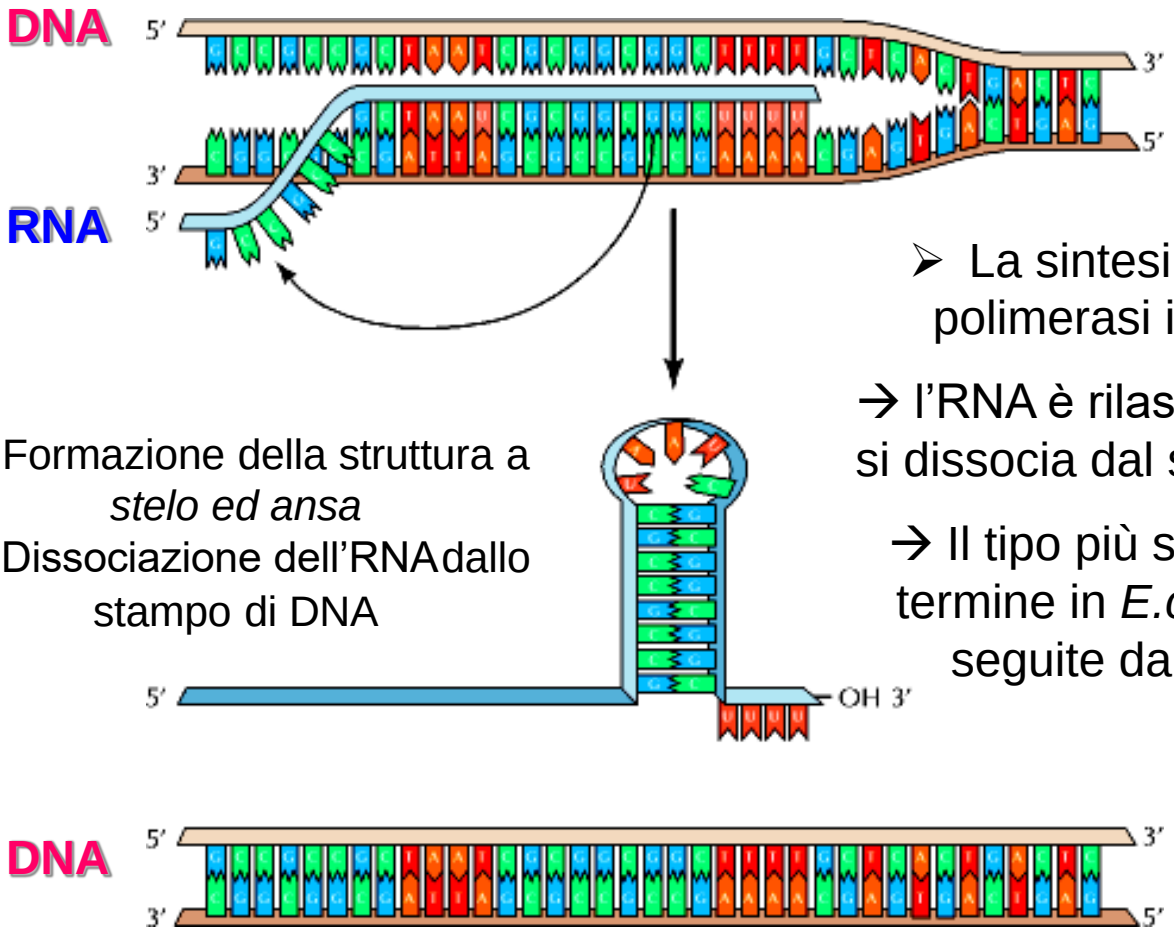
- In E. coli esistono due diversi tipi di terminatori:
  - Terminatori intrinseci

    Un nucleo dell'enzima può terminare la trascrizione a livello di questi siti in assenza di altri fattori.
  - Terminatori rho-dipendenti

    Necessitano di un ulteriore fattore, il fattore rho, perché la trascrizione termini.
- Il fattore rho è una proteina che assiste l'RNA polimerasi di E. coli nella terminazione della trascrizione a livello dei terminatori rho-dipendenti.

PROMOTORE e TERMINATORE

Nei procarioti



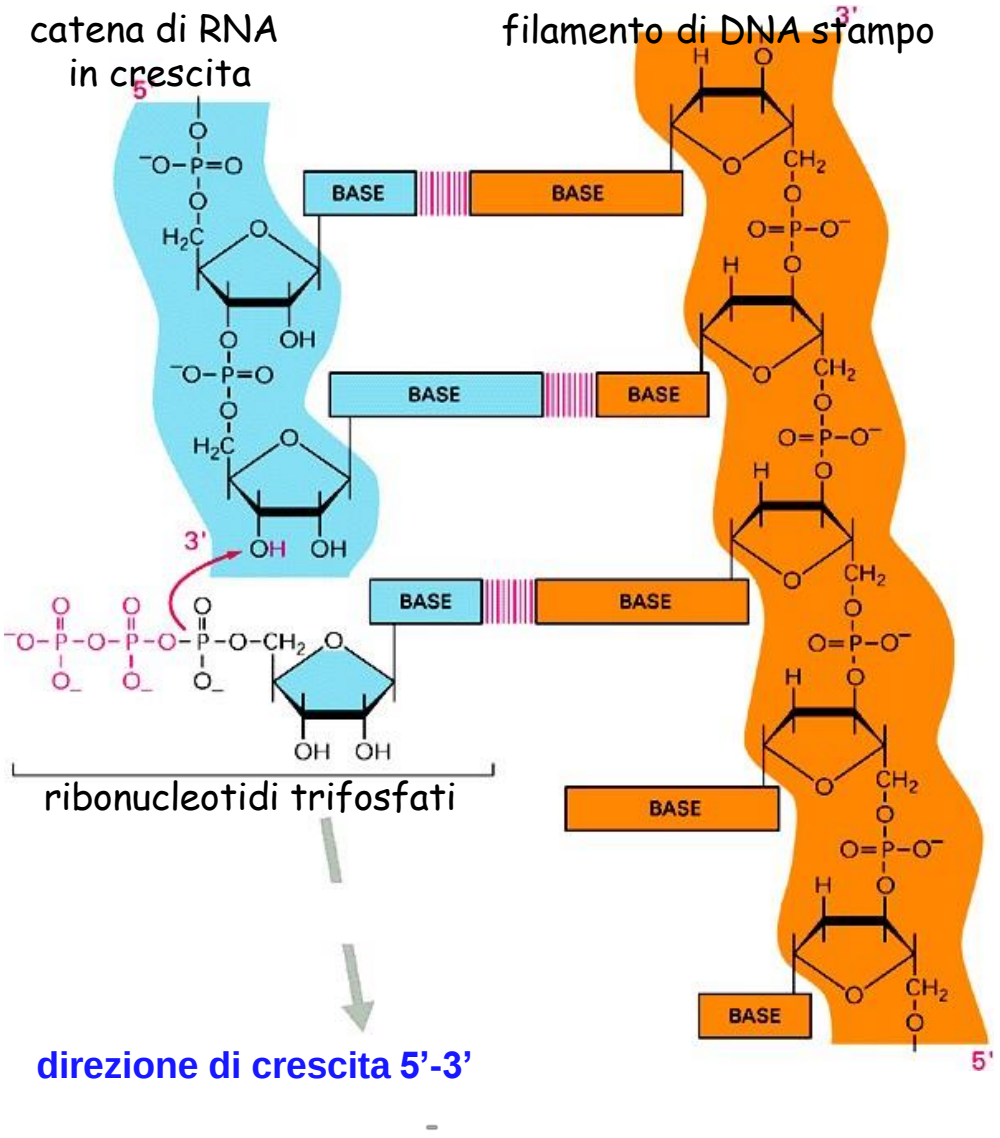
- Formazione della struttura a *stelo ed ansa*
- Dissociazione dell'RNA dallo stampo di DNA

- La sintesi di RNA continua fino a che la polimerasi incontra un **segnale di termine**

→ l'RNA è rilasciato dalla polimerasi e l'enzima si dissocia dal suo stampo di DNA.

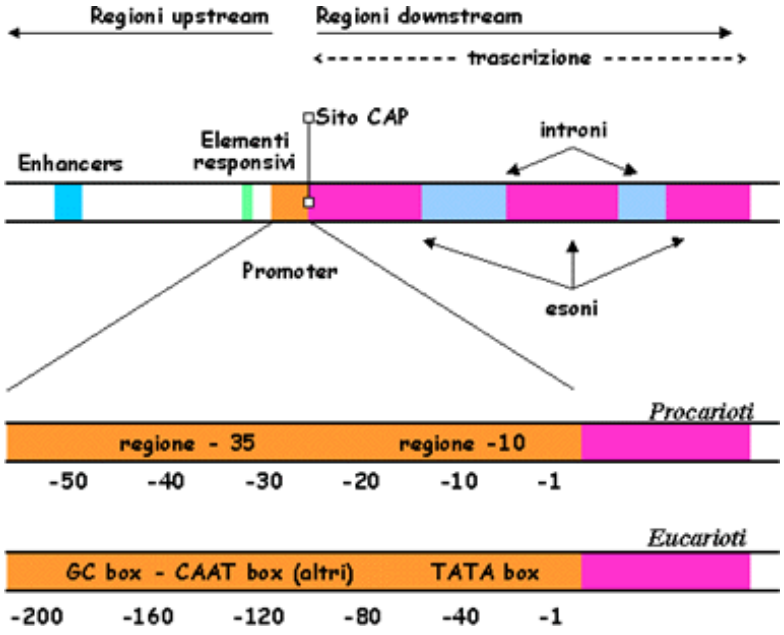
→ Il tipo più semplice e comune di segale di termine in *E.coli* è una serie di ***CG ripetute*** seguite da una sequenza di **AAAAAA**

La reazione di allungamento



Differenze tra procarioti ed eucarioti: Promotore eucariotico

- Le sequenze più comuni nei promotori eucariotici sono le seguenti:



a) TATA box
si trova a –25-30 e assomiglia all'elemento –10 dei procarioti

b) CAAT box
si trova a –80

c) GC box
(sequenze consenso GGGCGG)

- L'espressione dei geni eucariotici è controllata soprattutto a **livello dell'inizio** della trascrizione da proteine che si legano a sequenze regolatici specifiche e che modulano l'attività della RNA pol
- Esistono **specifici fattori di trascrizione** che riconoscono specificamente queste sequenze e le legano stimolando la trascrizione

Differenze tra procarioti ed eucarioti

- **Negli eucarioti il meccanismo della trascrizione è simile ai procarioti ma il macchinario è più complesso.**

- Negli eucarioti ci sono 3 tipi di RNA polimerasi (enzimi complessi costituiti da 8-14 subunità):

  - **RNA polimerasi I**: sintetizza rRNA
  - **RNA polimerasi II** sintetizza mRNA (proteine)
  - **RNA polimerasi III**: sintetizza rRNA e tRNA

- Funzioni diverse → Riconoscono promotori diversi
- L' ***RNA polimerasi II*** degli eucarioti per iniziare la trascrizione necessita di **proteine di inizio** che devono legarsi al promotore prima che si possa legare l'enzima
- La RNA pol II è coadiuvata da una serie di proteine denominate **Fattori di Trascrizione**
- per l' ***RNA pol II***: **TFIIA – TFIIB – TFIID – TFIIE – TFIIF – TFIIH**

Controllo della trascrizione

Interazione di proteine regolatrici con sequenze specifiche di DNA

- Le sequenze regolatrici sono chiamate elementi di controllo che possono agire da
  - **attivatori** o da **inibitori** della trascrizione

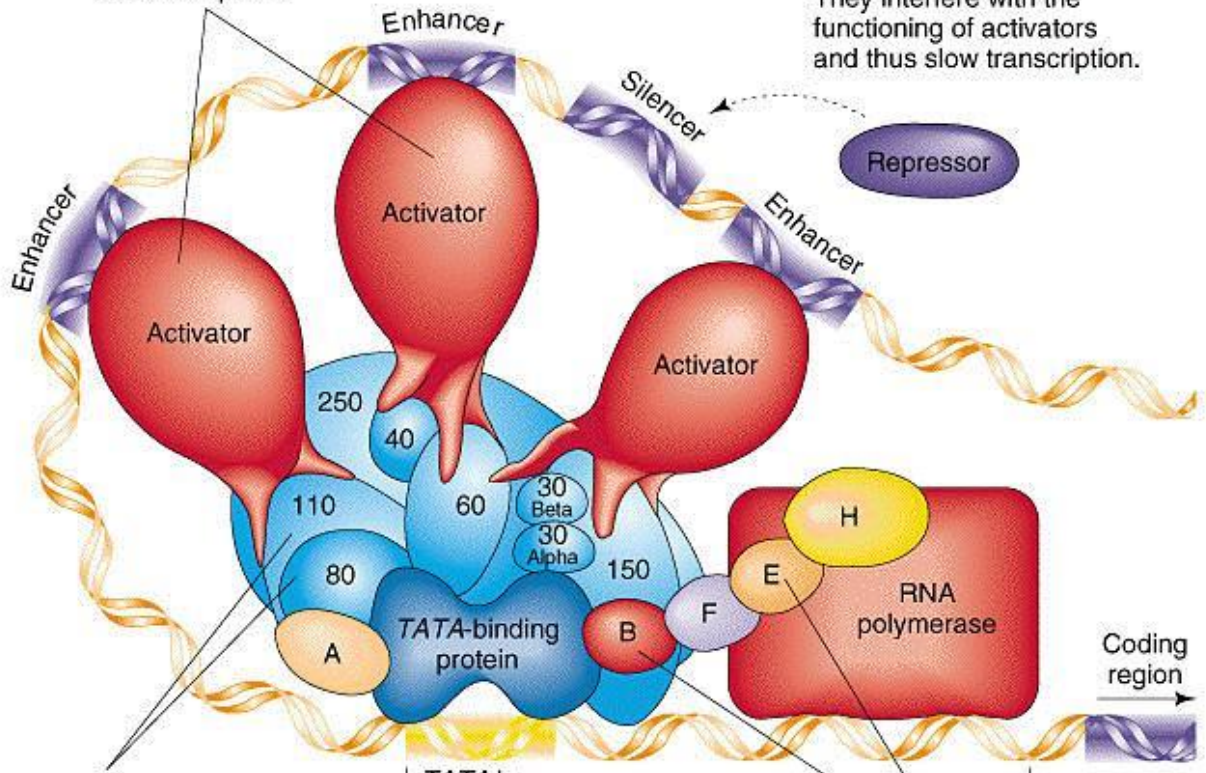
- **Enhancer:** sequenze regolatrici poste molto più lontano dal sito di inizio della trascrizione.

- Come i promotori, gli enhancer *funzionano legando fattori di trascrizione* che regolano poi la RNA pol.

- Una funzione degli enhancer è quella di *regolare l'espressione tessuto-specifica* di alcuni particolari geni nei tipi cellulari appropriati:
  - l'enhancer può essere attivo in alcuni tipi di cellule ed in altri no.

Activators
These proteins bind to genes at sites known as *enhancers.* Activators help determine which genes will be switched on, and they speed the rate of transcription.

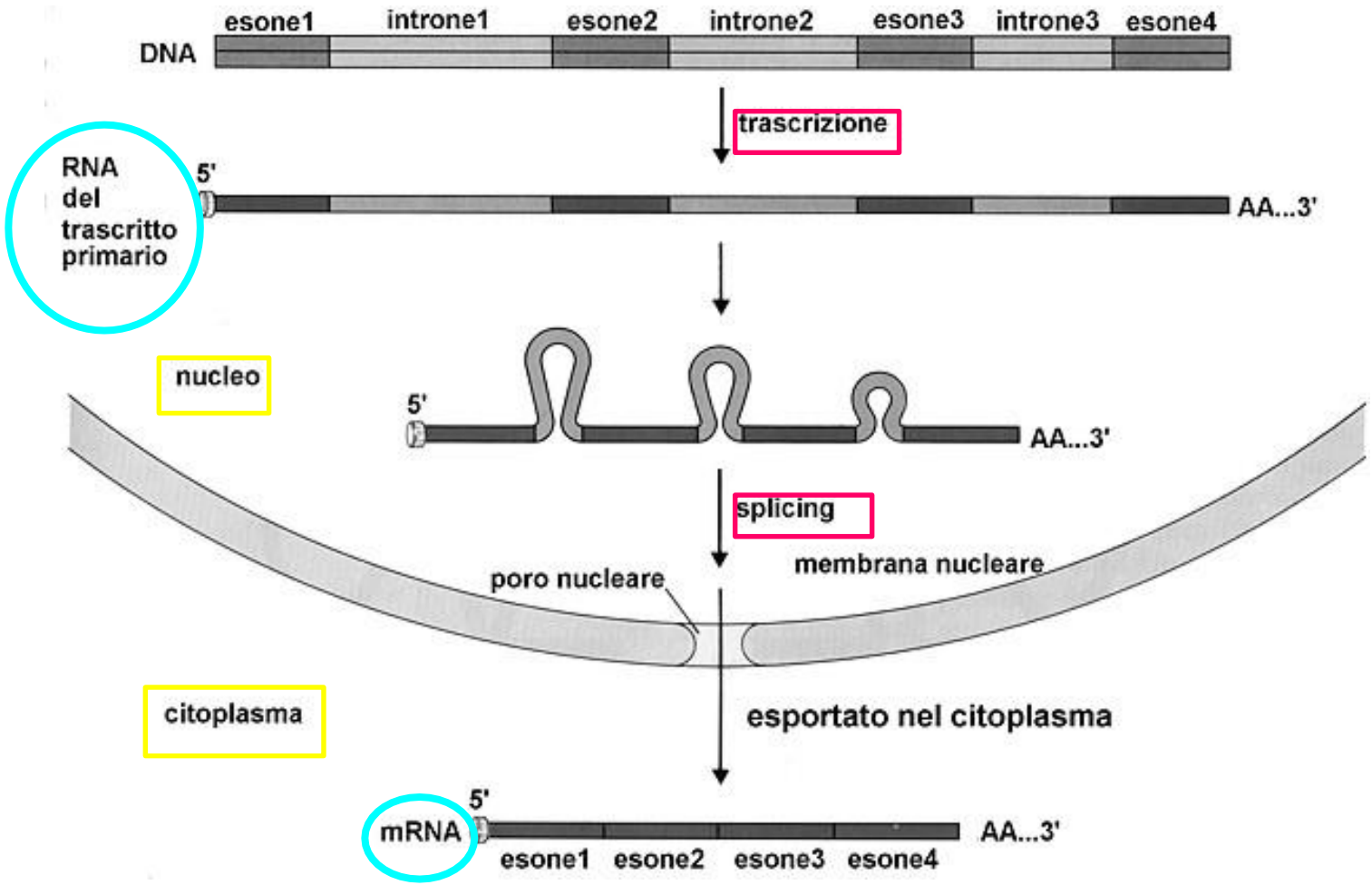
Repressors
These proteins bind to selected sets of genes at sites known as *silencers.* They interfere with the functioning of activators and thus slow transcription.



Coactivators
These "adapter" molecules integrate signals from activators and perhaps repressors and relay the results to basal factors.

Basal transcription factors
In response to injunctions from activators, these factors position RNA polymerase at the start of the protein-coding region of a gene and send the enzyme on its way.

Maturazione dell'RNA



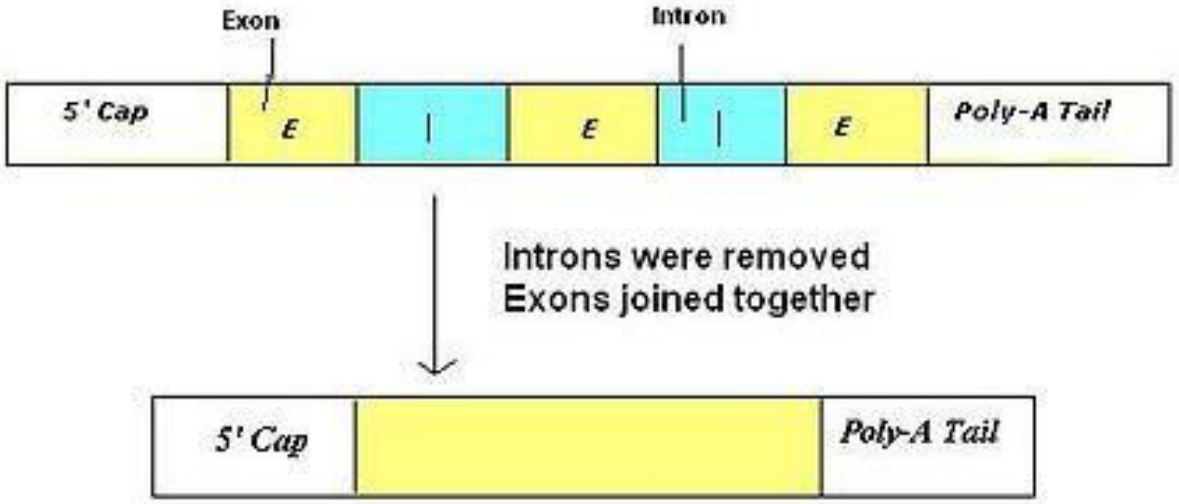
La maturazione dell'mRNA è una serie di processi chimici che trasformano una molecola di pre-mRNA (trascritto primario) in mRNA .

- La maturazione dell'mRNA differisce molto tra gli eucarioti ed i procarioti.

- L'mRNA procariotico è già maturo dopo la trascrizione e non richiede di essere controllato, tranne che in alcuni casi.
- Il pre-mRNA eucariotico invece richiede diversi passaggi.
- Le **tappe della maturazione** sono:
  - ✓ **Splicing;**
  - ✓ **Metilazione;**
  - ✓ **Capping;**
  - ✓ **Poli-A.**

Splicing

- E' il processo mediante il quale il pre-mRNA viene modificato per la rimozione di alcuni tratti di sequenze non codificanti chiamate introni; i tratti restanti che includono le sequenze per la codifica delle proteine sono chiamati esoni.
- Lo splicing è praticato di solito da complessi RNA-proteina chiamati ***spliceosomi***.



Capping

- Aggiunta di un "cappuccio" di **7-metil guanosina** al residuo 5’-terminale della catena.
- Questa modificazione è importante per:
  - riconoscimento e l'aggancio appropriato dell'mRNA al ribosoma
  - altri processi essenziali, come lo splicing ed il trasporto
  - rende più stabile l'mRNA

Poliadenilazione

- E’ il *legame covalente* di un **filamento di adenina** ad una molecola di mRNA.
- La coda di poli-A all'estremità 3' terminale aiuta la stabilità dell'mRNA, proteggendolo dalle esonucleasi.
- É importante per:
  - la terminazione della trascrizione
  - il trasporto dell'mRNA fuori dal nucleo cellulare e la traduzione

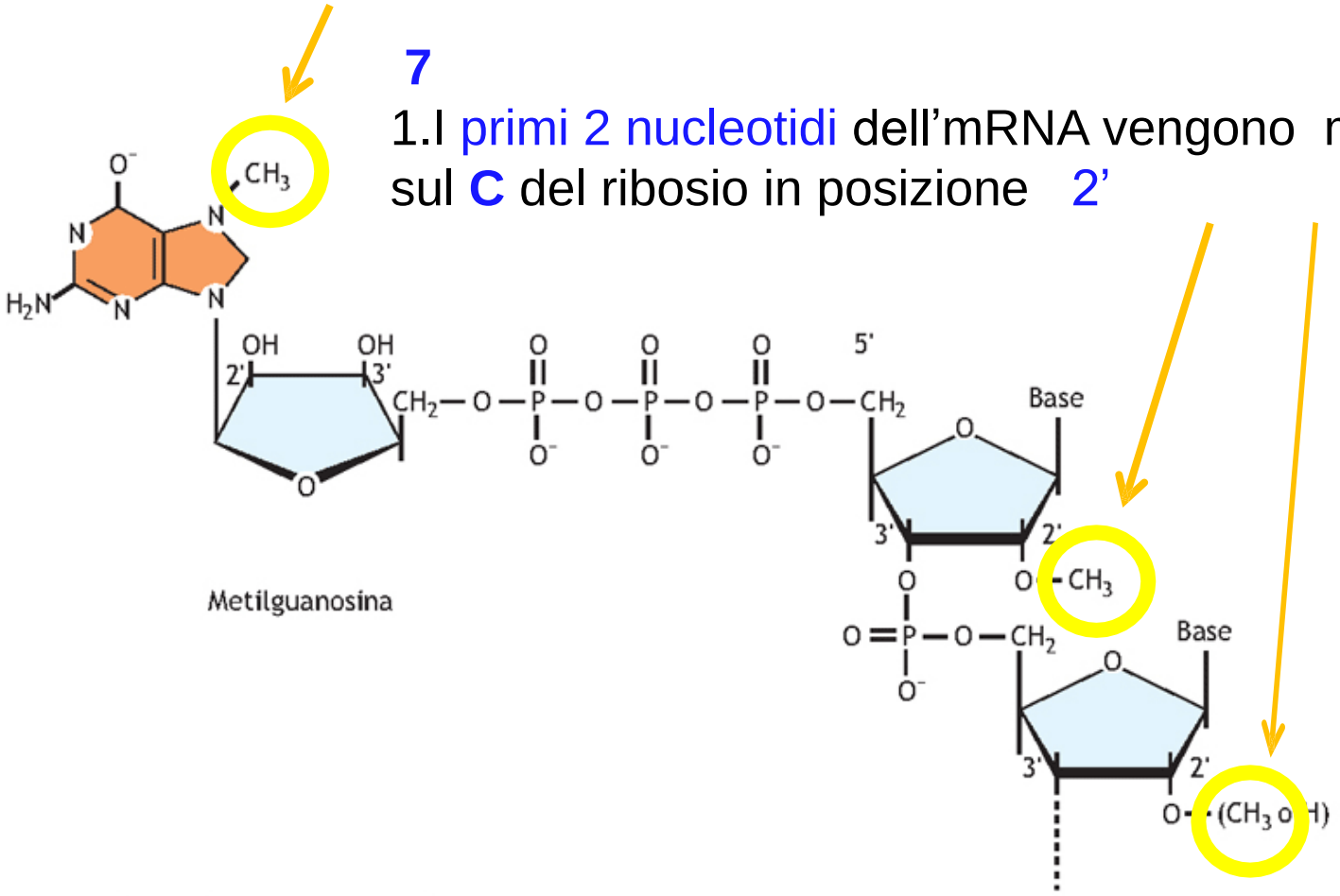
- Questa reazione è catalizzata dalla **poli-A polimerasi**.

Metilazione

1.Il cap 5’ viene **metilato sull’azoto** in posizione

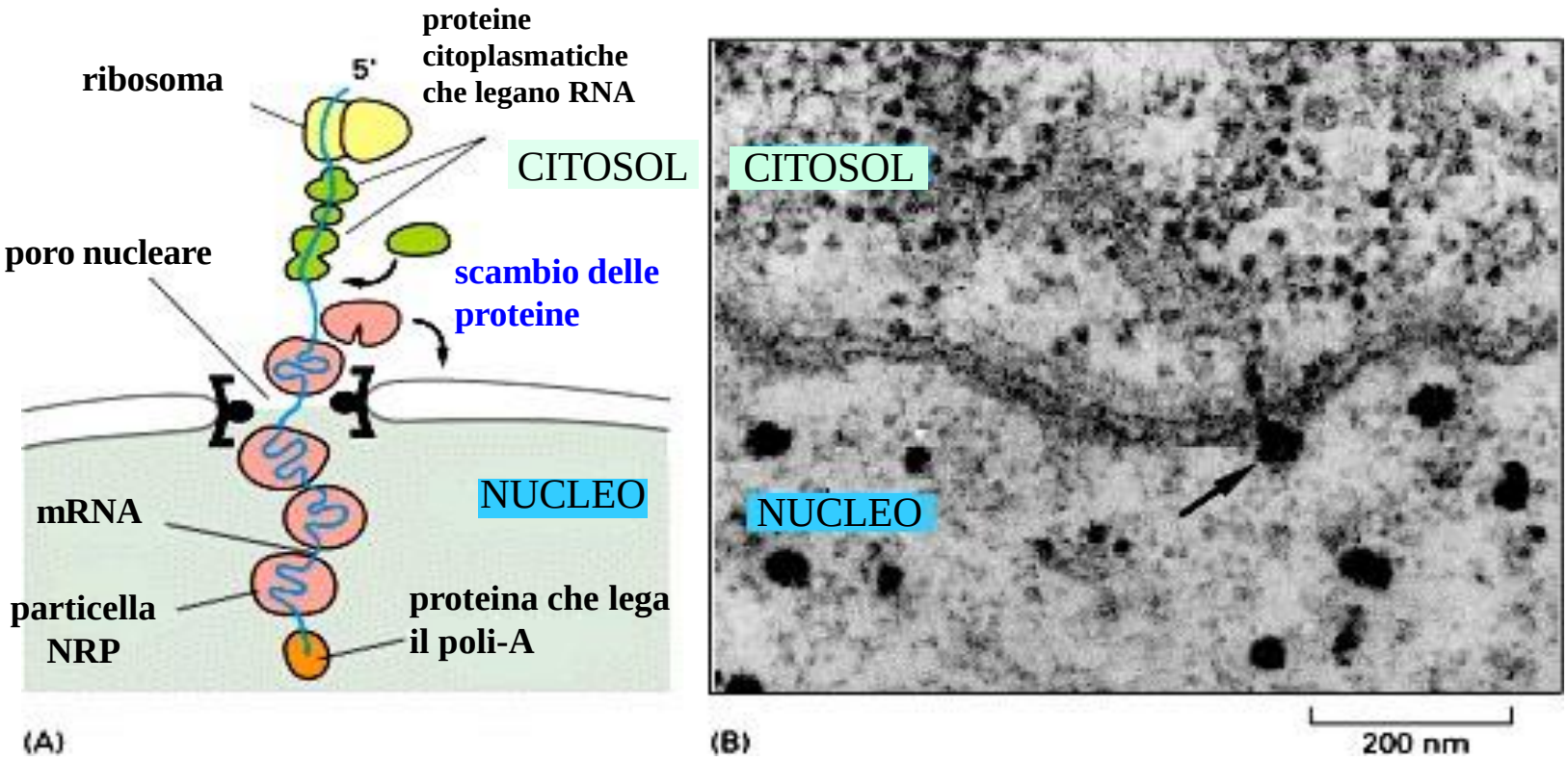
7

1.I primi 2 nucleotidi dell’mRNA vengono metilati sul **C** del ribosio in posizione 2’



Funzione: conferisce al messaggero ulteriore stabilità

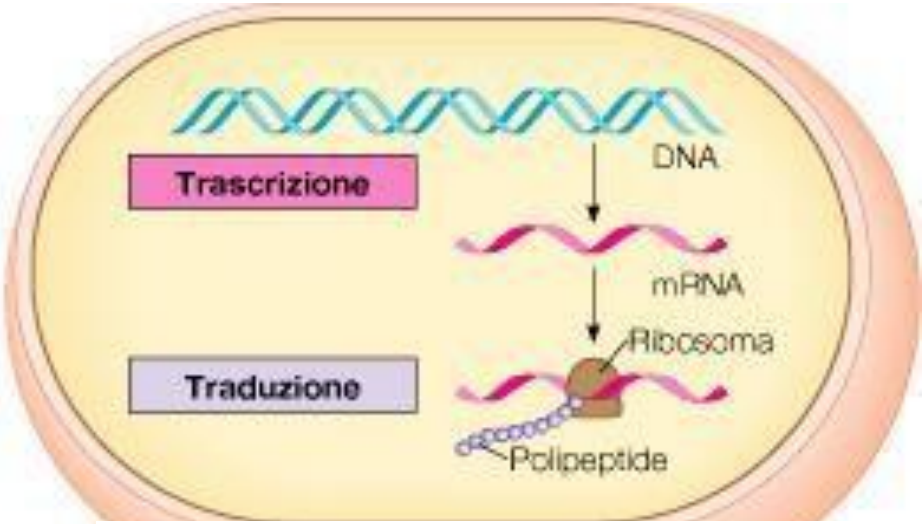
Trasporto dell'mRNA al citoplasma



- La sintesi e la maturazione dell'mRNA eucariotico avvengono all'interno del nucleo.
- L'**mRNA** maturo viene *riconosciuto da determinate proteine di trasporto*, che lo discriminano da RNA non maturi o danneggiati o frammenti di RNA o introni excisi e lo traghettano selettivamente verso il citosol attraverso i pori nucleari

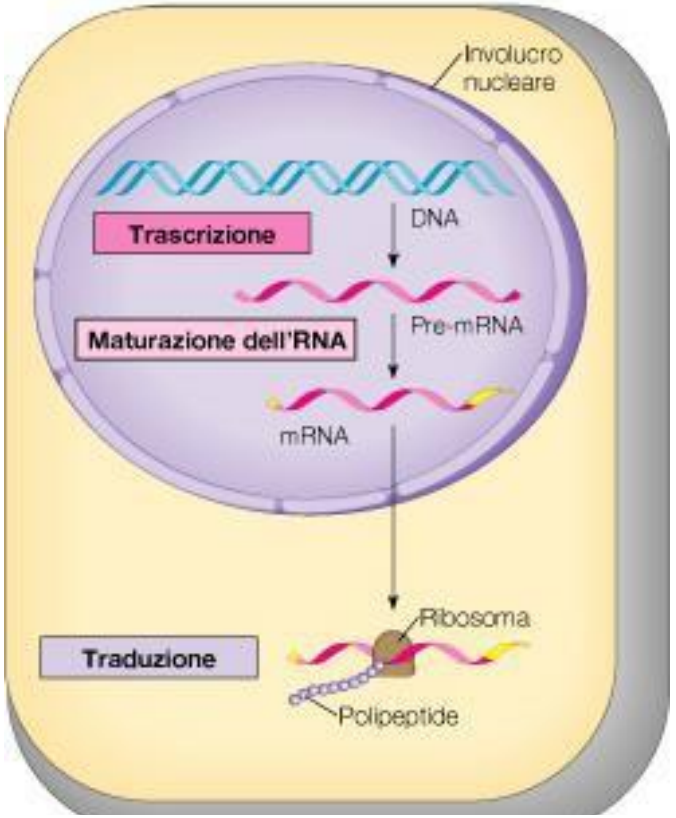
TRADUZIONE

Il trasferimento dell'informazione dal DNA alle proteine



CELLULA PROCARIOTICA

(a) Cel
l'mRNA prodotto dalla trascrizione è immediatamente tradotto senza subire ulteriori modificazioni.



CELLULA EUCARIOTICA

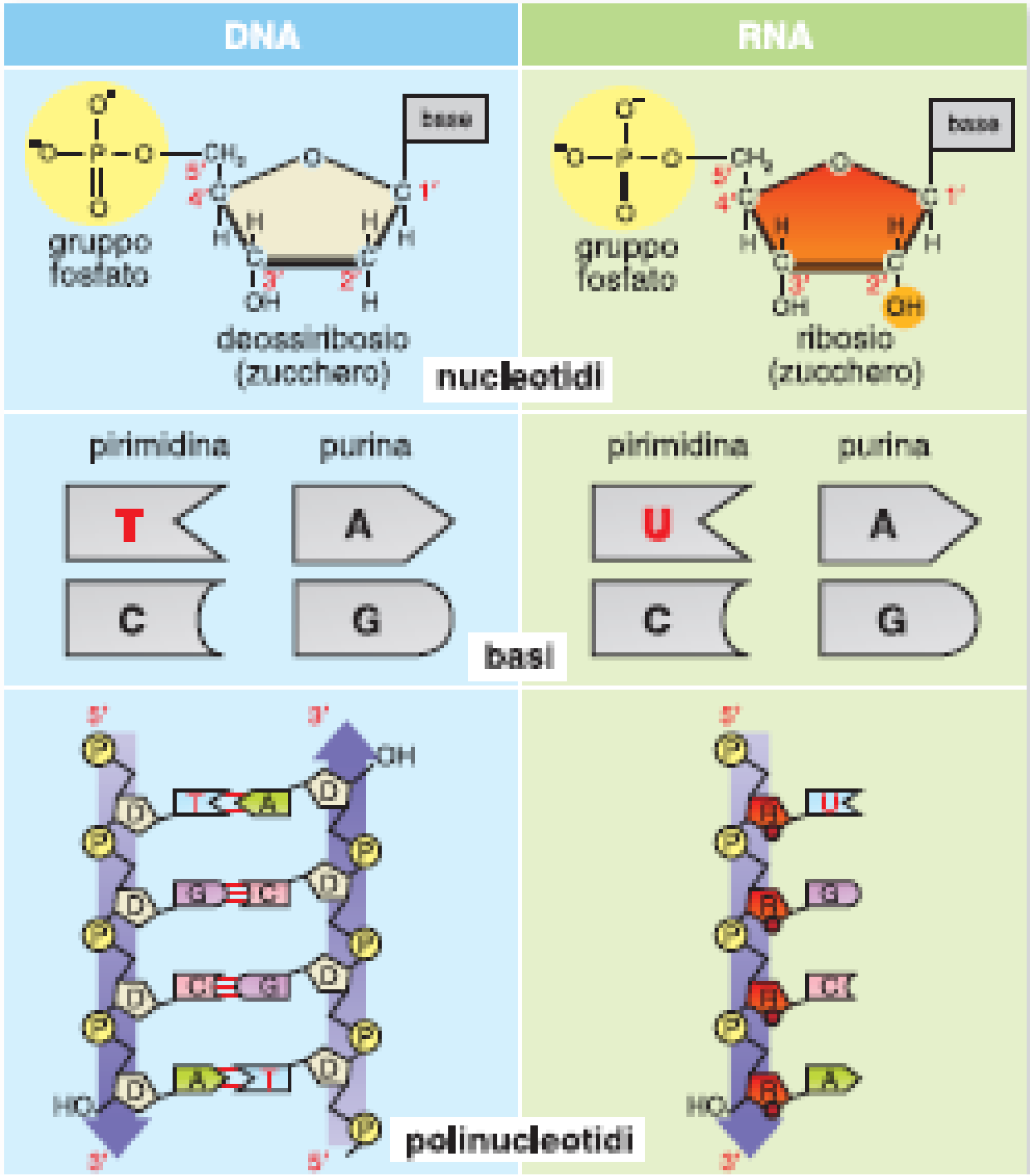
di abbandonare il nucleo come mRNA.

La traduzione

- Avviene nel citoplasma delle cellule.
- È la ***conversione dal linguaggio degli acidi nucleici* a quello delle *proteine*** e richiede l'intervento di diverse molecole:
  - ✓ *mRNA* che porta le istruzioni per la proteina
  - ✓ RNA di trasporto (*tRNA*) che agisce da "interprete"
  - ✓ Ribosomi: organuli in cui avviene la sintesi proteica
  - ✓ *Enzimi* e *fattori proteici*
  - ✓ *ATP* e *amminoacidi*

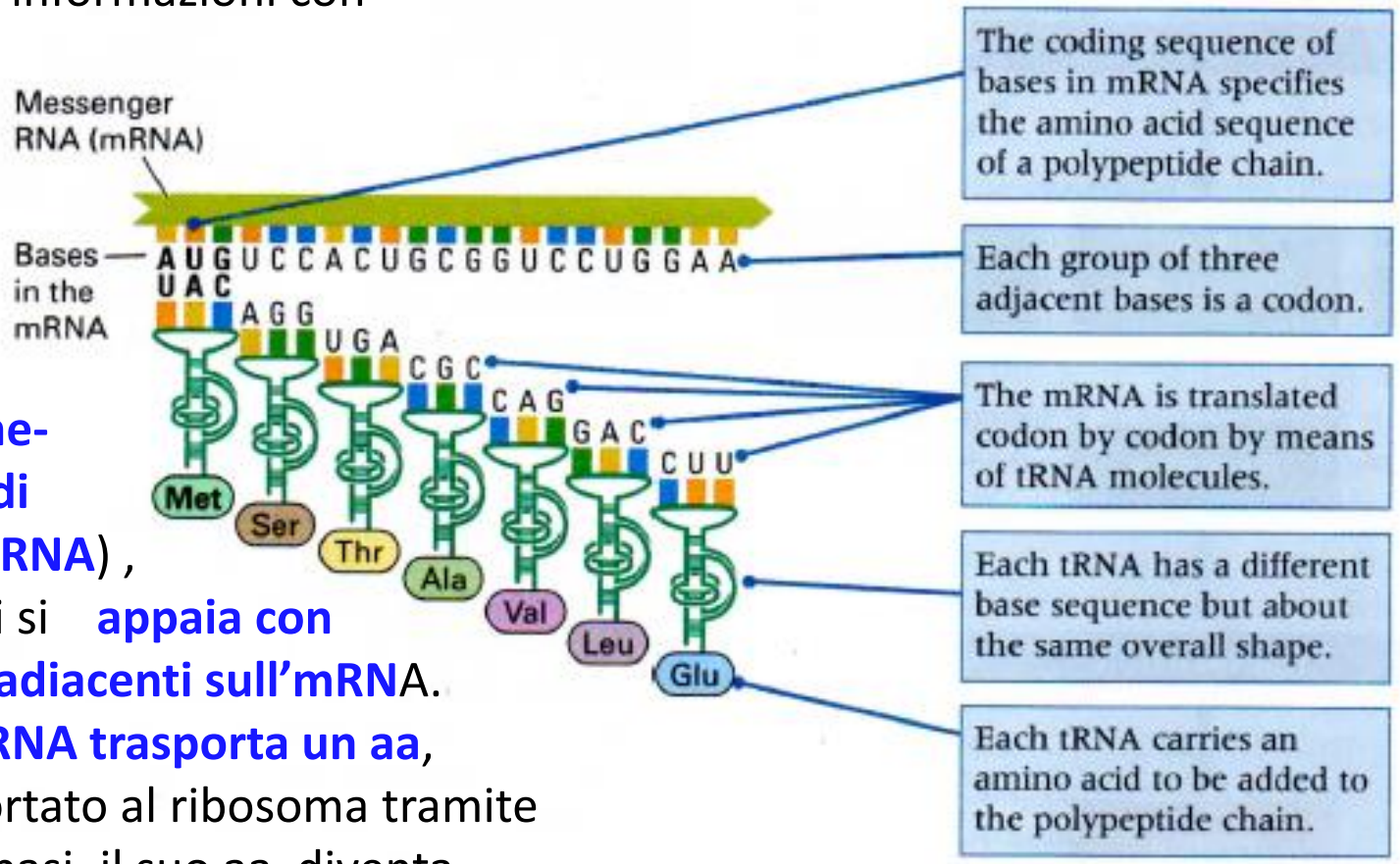
L'RNA: il tramite fra il DNA e le proteine

Le differenze tra RNA e DNA.



Una molecola di RNA dirige la sintesi di una catena polipeptidica

- Il ruolo dell' mRNA nella traduzione è diretto a svolgere le informazioni contenute in una sequenza di basi ad un ribosoma dove esso è tradotto in una catena polipeptidica.
- La traduzione è **mediata da molecole di RNA di trasporto (tRNA)**,
- ciascuno di questi si **appaia con un gruppo di 3 basi adiacenti sull'mRNA**.
- Inoltre, **ciascun tRNA trasporta un aa**, quando questo è portato al ribosoma tramite appaiamento dellle basi, il suo aa diventa la parte terminale in crescita della catena polipeptidica.



IL CODICE GENETICO

mRNA: 4 tipi di *nucleotidi* → **proteine**: 20 tipi di *aminoacidi*

- La traduzione non può avvenire facendo corrispondere direttamente 1 nt dell'RNA a 1 aa della pt.
- Almeno 3 nt devono essere usati per codificare ciascun aa

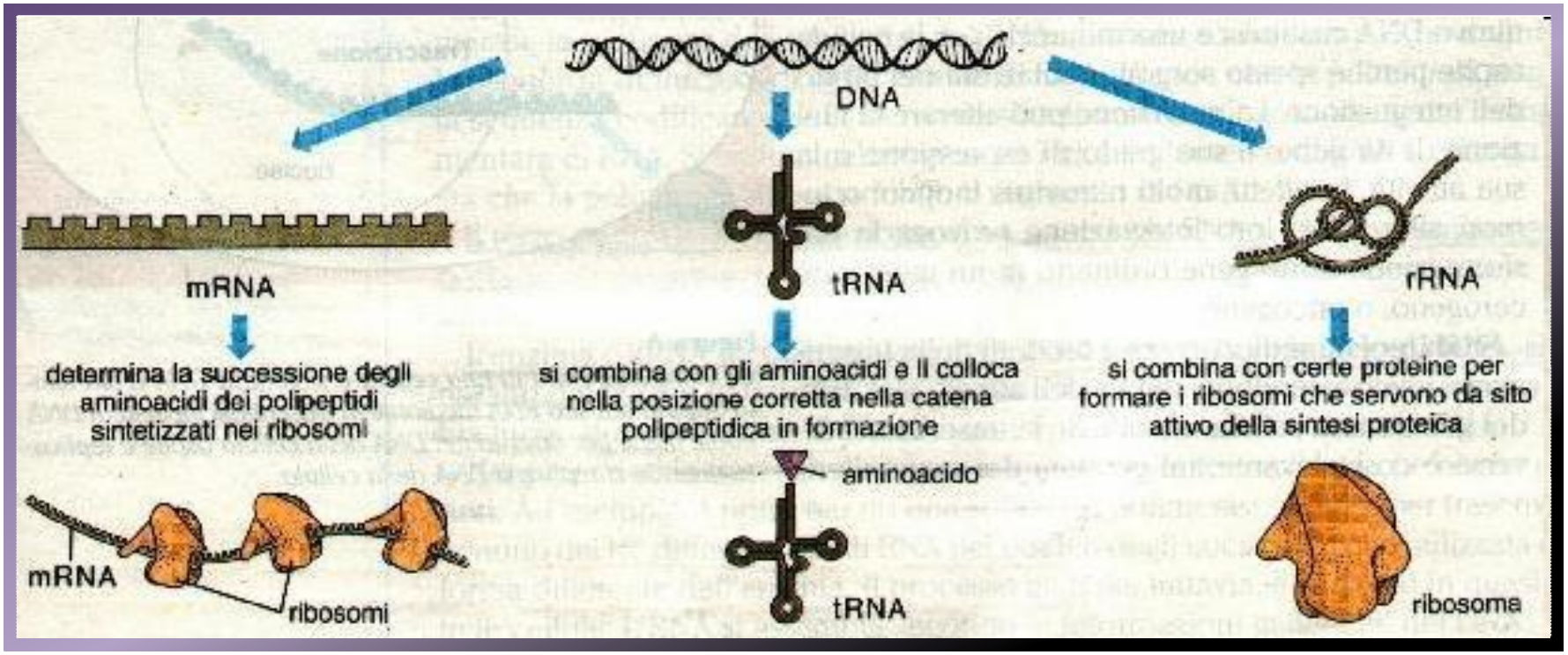
nt per codone	codoni
1	4
2	4^2=16
3	4^3=64

1st letter	Second Letter: U		Second Letter: C		Second Letter: A		Second Letter: G		3rd letter
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	Stop	UGA	Stop	A
	UUG		UCG		UAG	Stop	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

Diversi tipi di RNA

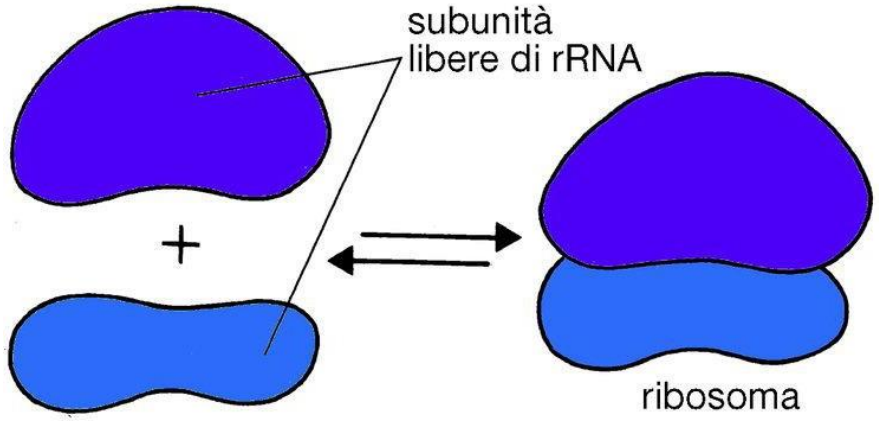
- **RNA informazionali** che vengono trascritti a partire dai geni e quindi codificano per le sequenze amminoacidiche delle proteine: **mRNA**

- **RNA funzionali** che non vengono tradotti in polipeptidi ma svolgono la loro funzione come RNA: **tRNA** e **rRNA**



Ribosomi

- La traduzione avviene *nei ribosomi*.
- I ribosomi sono costituiti da **due subunità** (una grande ed una piccola), ciascuna formata
  - da **proteine e**
  - **rRNA** (RNA ribosomiale).
- Nella subunità minore è presente il sito di legame per l'mRNA; In quella maggiore i siti di legame per i tRNA.

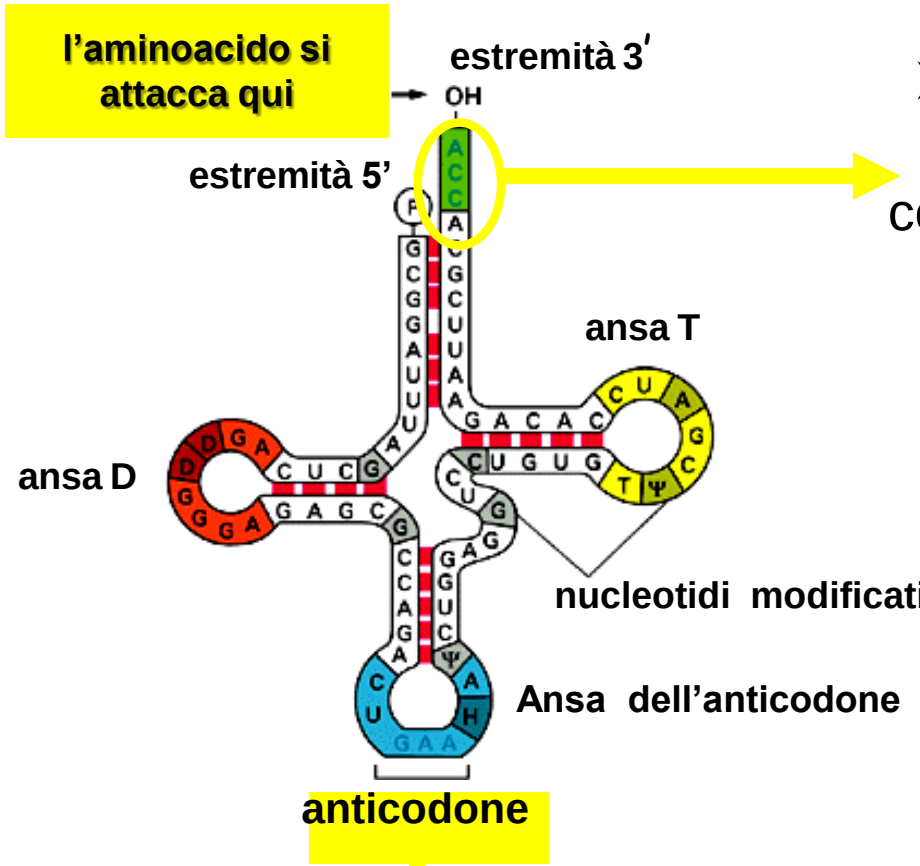


Sito **A:** ospita il tRNA che porta con se l'aa da aggiungere alla catena.

Sito **P**: ospita il tRNA a cui è legata la catena polipeptidica in crescita.

Sito **E**: ospita il tRNA in uscita.

RNA transfer (tRNA)



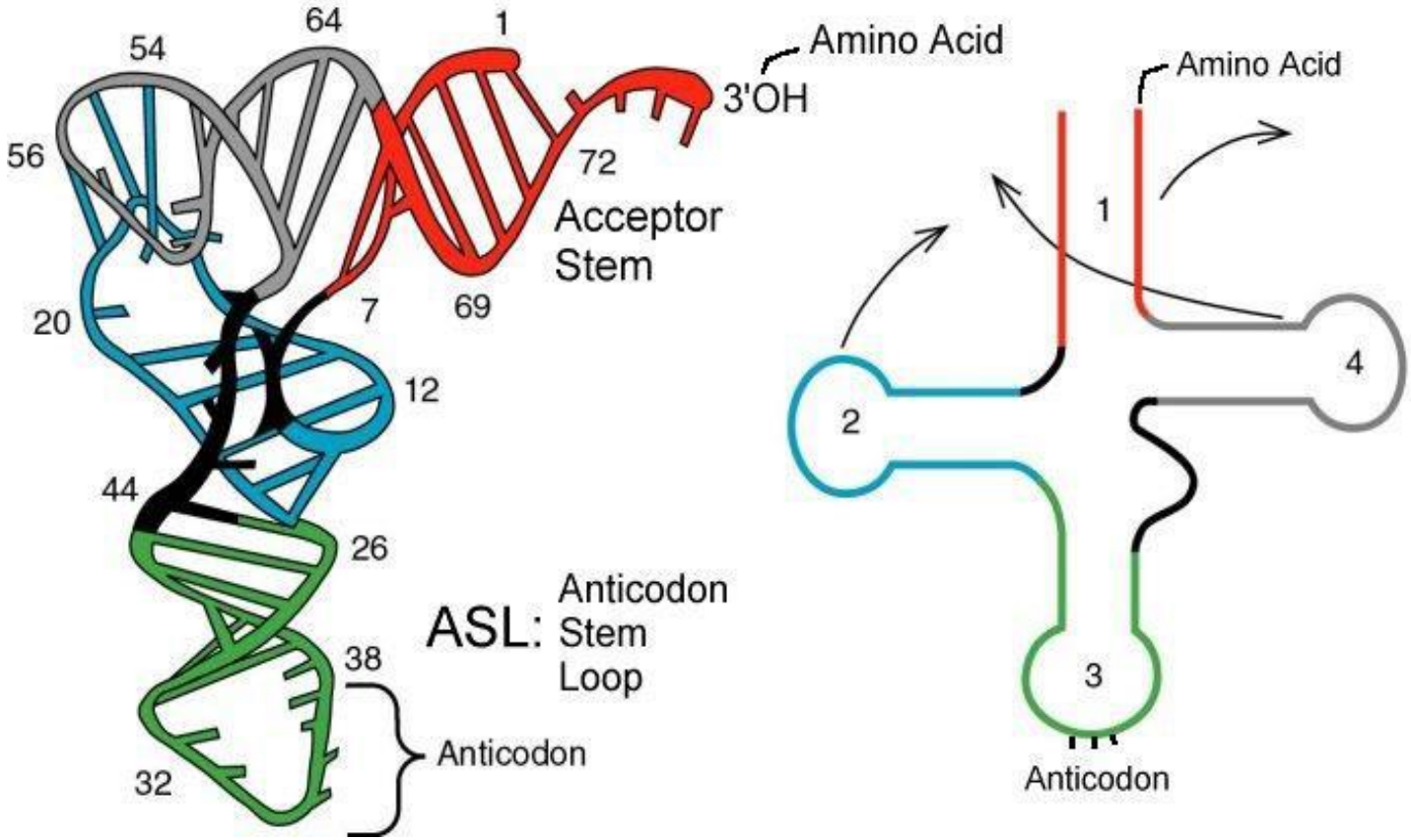
- Tutti i *tRNA* hanno la sequenza ***CCA*** in 3' e gli aa sono attaccati covalentemente al ribosio dell'adenosina terminale
- I tRNA sono lunghi più o meno **70-80 nt**
  - hanno una caratteristica **struttura a trifoglio**
  -prodotta dall'accoppiamento complementare di basi fra regioni diverse della molecola.

- Lo stampo di *mRNA* viene riconosciuto dall'ansa dell'anticodone, posta all'altra estremità del *tRNA* ripiegato:
- Questo si lega al codone appropriato per appaiamento complementare delle basi

RNA transfer (tRNA)

- **adattatori che allineano ciascun aa con il codon corrispondente sullo stampo di mRNA**
- *Durante la traduzione…*

l'anticodone del tRNA riconosce il codone dell'mRNA per omologia tra le basi.

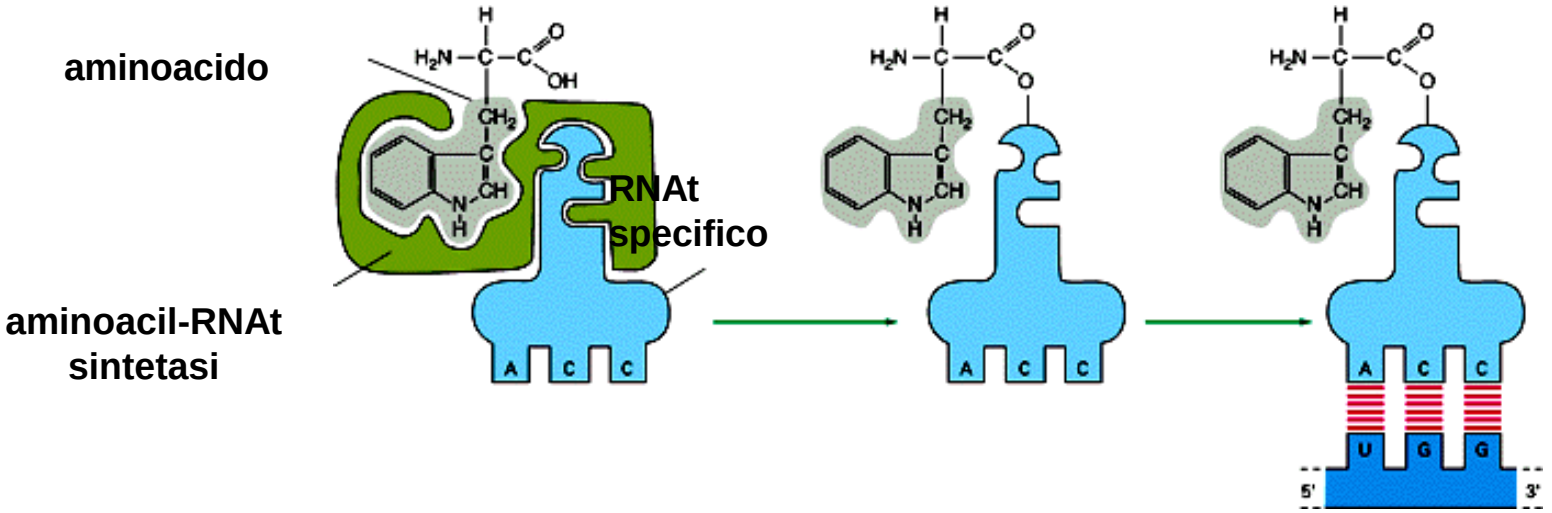


Attacco degli aa ai tRNA

- La struttura del legame aminoacil-tRNA:
  - L'estremità *COOH dell'aminoacido* forma un *legame estere* con il *3'OH libero del ribosio* dell'adenosina terminale che fa parte del (CCA).

- Questo è mediato da un gruppo di enzimi chiamati **aminoacil-tRNA-sintasi.**

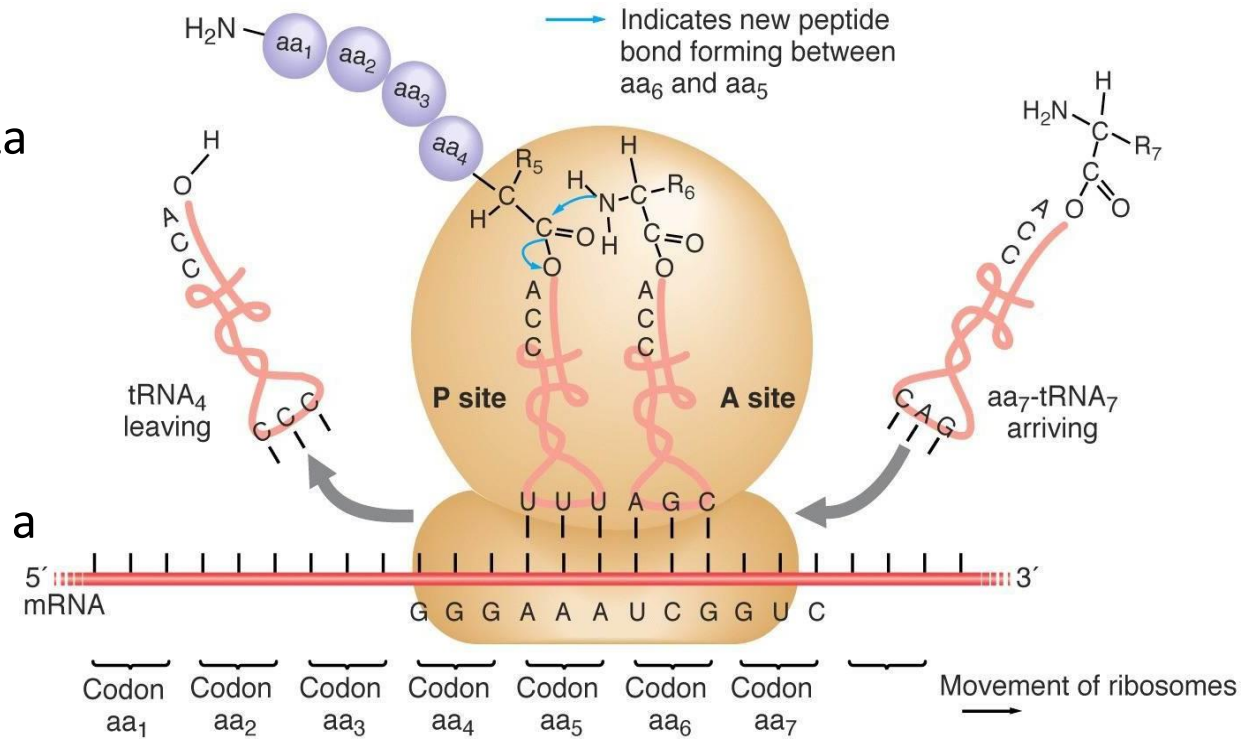
  - **Ognuno di essi riconosce il tRNA corretto a cui deve essere attaccato l'aa.**



La traduzione: il processo di sintesi proteica

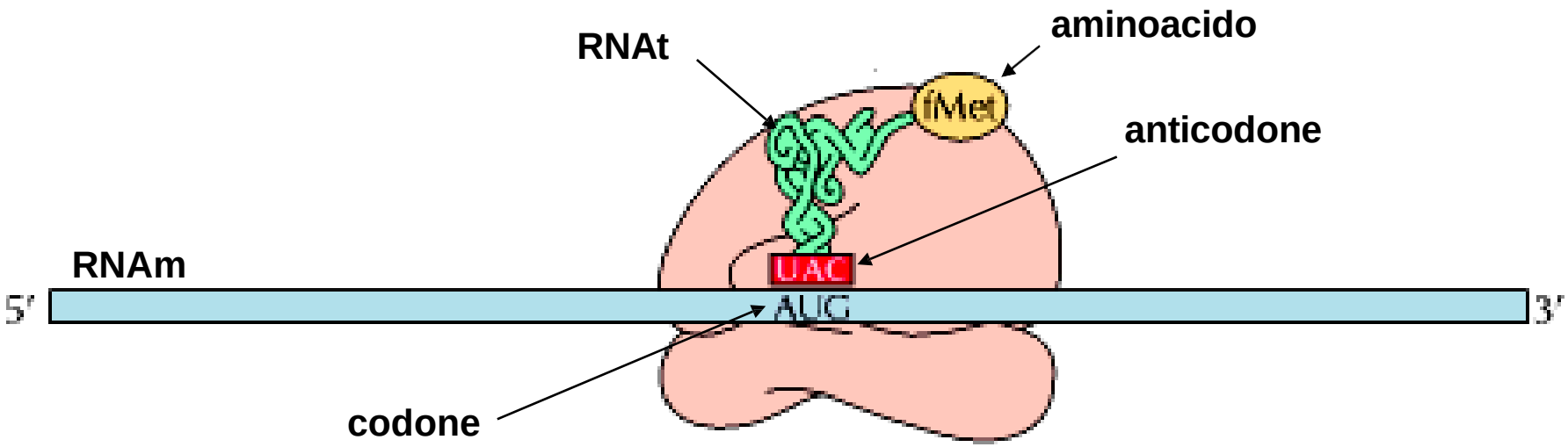
➢ La molecola di mRNA trascritta dal DNA è più lunga del vero e proprio messaggio da tradurre e sequenze di nucleotidi presenti alle due estremità del messaggero non fanno parte del messaggio ma **aiutano l'mRNA ad attaccarsi al ribosoma.**

- L'mRNA si lega alla subunità minore del ribosoma;
- uno speciale tRNA di partenza si lega al codone specifico (codone d'inizio);
- Il tRNA di partenza trasporta l'amminoacido **Met** (metionina).
- La subunità maggiore si lega a quella piccola formando il ribosoma funzionale;
- il tRNA di partenza si colloca nel sito P della subunità maggiore



La traduzione: il processo di sintesi proteica

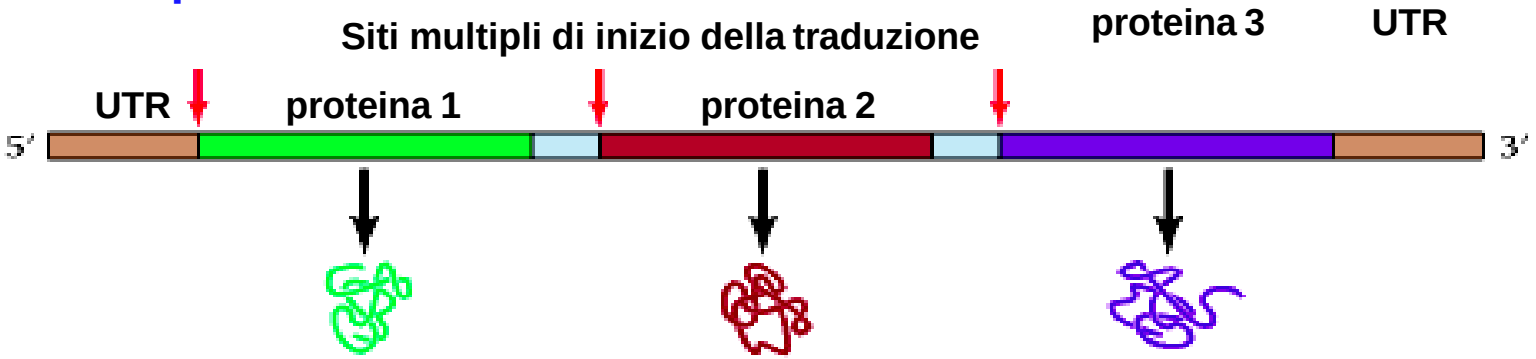
- ✓ Gli *mRNA* sono letti in direzione 5'-3'
- ✓ Le *proteine* sono sintetizzate dall'N-term al C-term



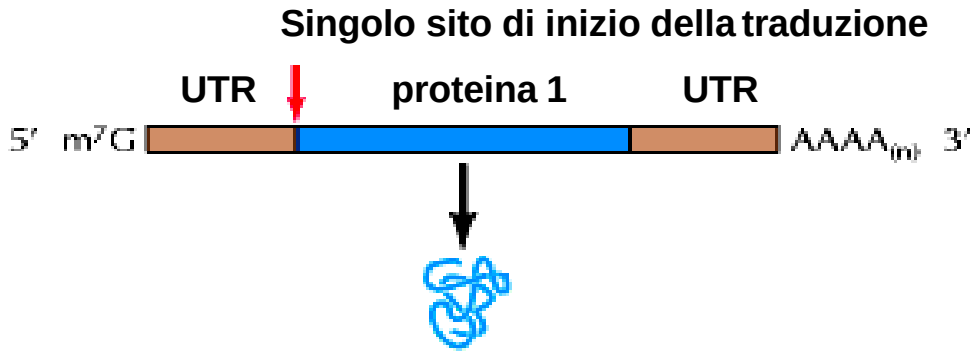
La traduzione: organizzazione mRNA

- La traduzione non inizia semplicemente all'estremità 5' dell'mRNA, ma in siti di inizio specifici.
- Le porzioni terminali 5' degli mRNA procariotici ed eucariotici sono pertanto **sequenze non codificanti**, chiamate **5'UTR**.
- Tutti gli mRNA terminano con seq **3'UTR**

- **mRNA procariotico**



- **mRNA eucariotico**



- mRNA procariotici: codificano polipeptidi multipli e si chiamano ***policistronici***
- mRNA eucariotici sono ***monocistronici***

Traduzione negli eucarioti

- Più complicato e richiede almeno 10 fattori di inizio della traduzione

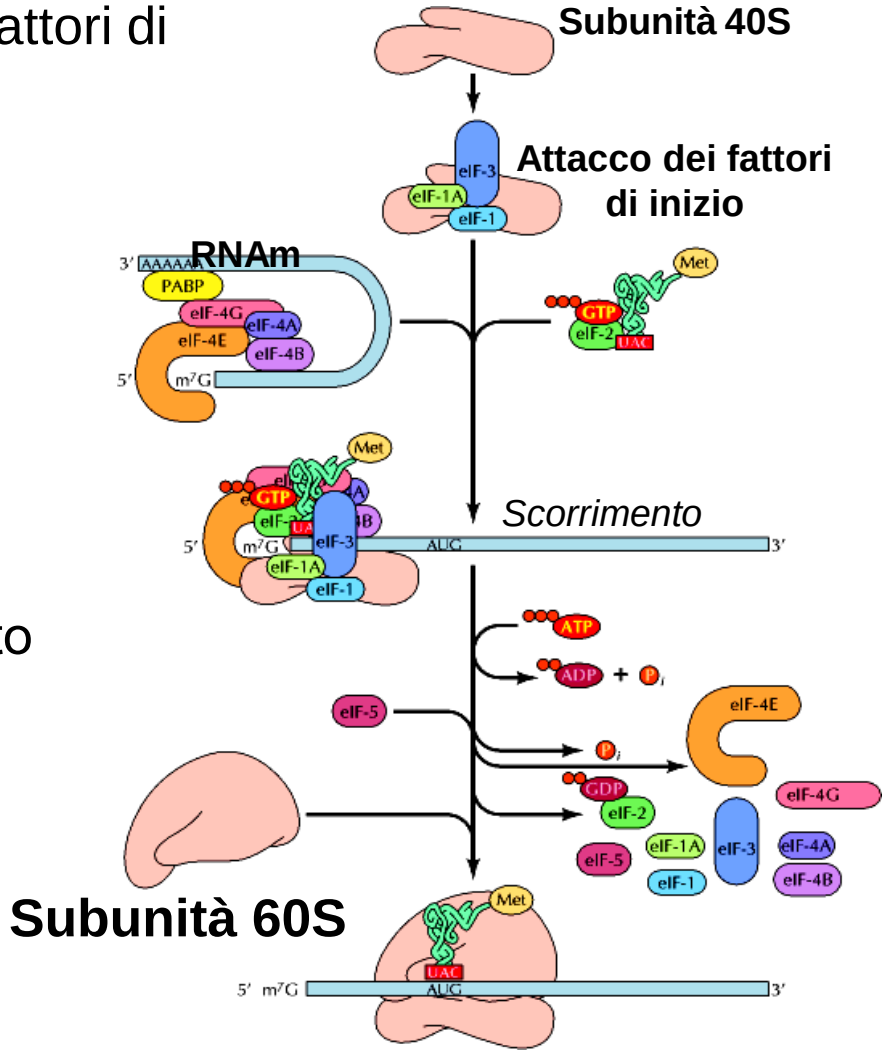
1.Una serie di fattori di inizio riconosce il 5'cap dell'mRNA e lo porta al ribosoma

2.Subunità minore + metionil tRNA + fattori: scorrono sull'mRNA per identificare il codone di inizio AUG

3.Raggiunto l'AUG di inizio, viene idrolizzato il **GTP**

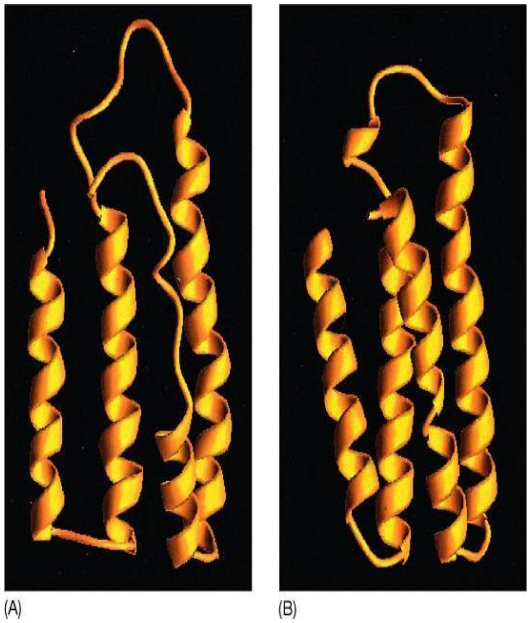
4. Rilasciati i fattori di inizio

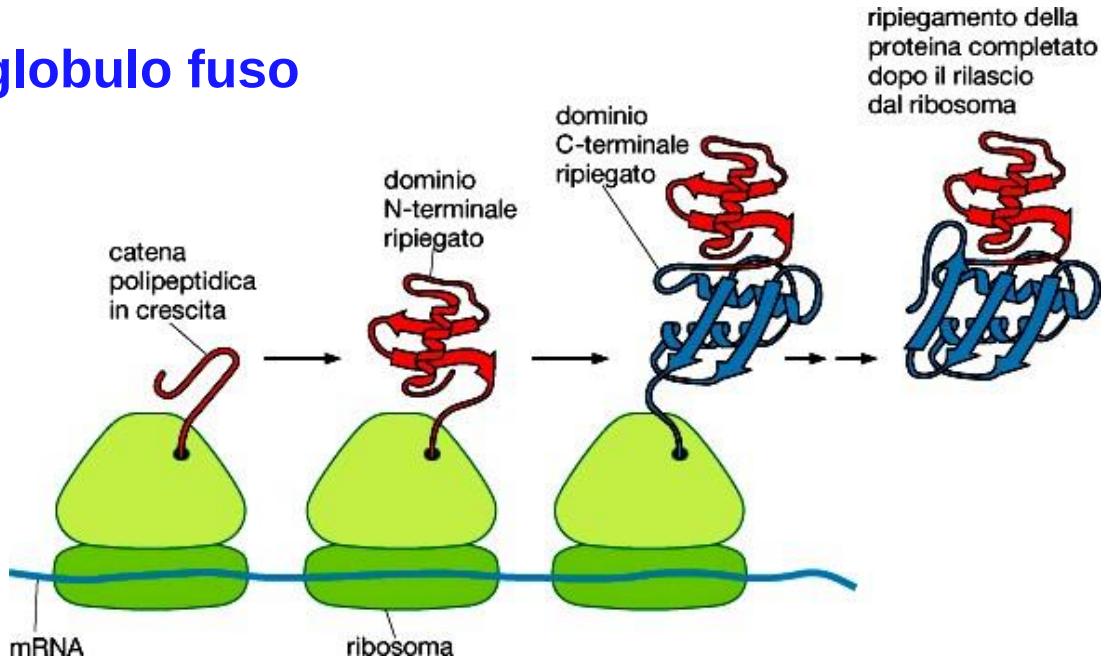
5.La subunità maggiore si lega a quella minore per formare il complesso di inizio



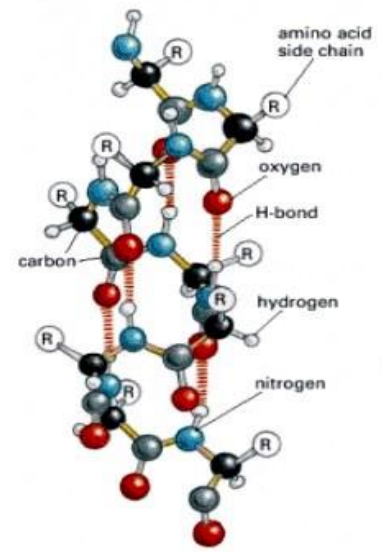
Produzione di una proteina matura funzionale

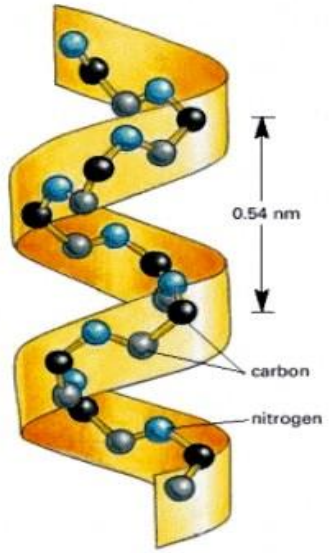
- Una volta che il dominio proteico emerge dal ribosoma, forma una struttura compatta che contiene la maggior parte della struttura secondaria finale (α eliche e β foglietti) allineata più o meno nel modo giusto.
- Questa struttura è chiamata **globulo fuso**



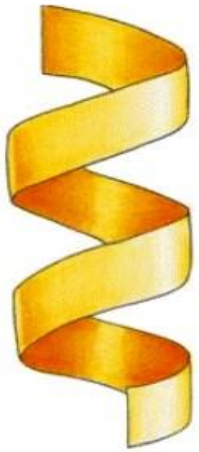


- Il completamento del ripiegamento della proteina è mol più lento e porta ad aggiustamenti di catene laterali;
-questi alla fine formano la struttura terziaria corretta ed avviene quando il ribosoma rilascia l'estremità C-terminale della proteina.

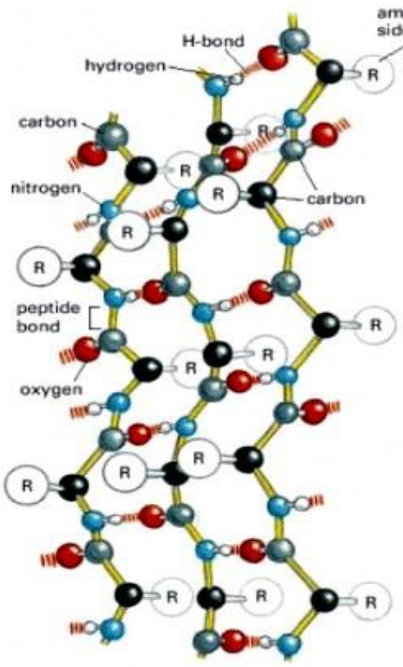


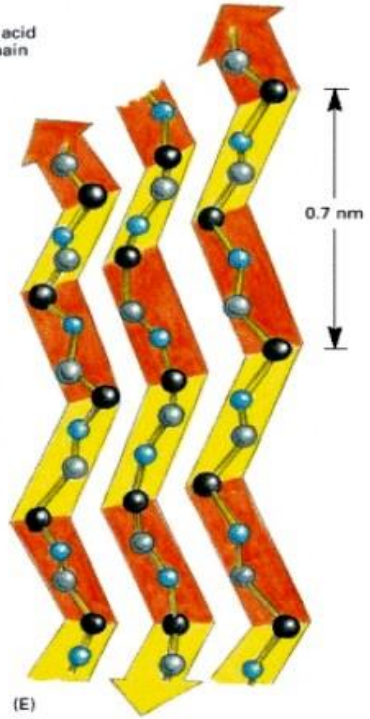


α elica

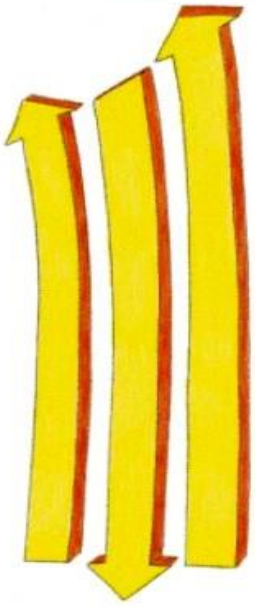


LE CATENE DI AMINOACIDI SI ORGANIZZANO NELLO SPAZIO IN DUE MODI PRINCIPALI:**α ELICA E β FOGLIETTO.**





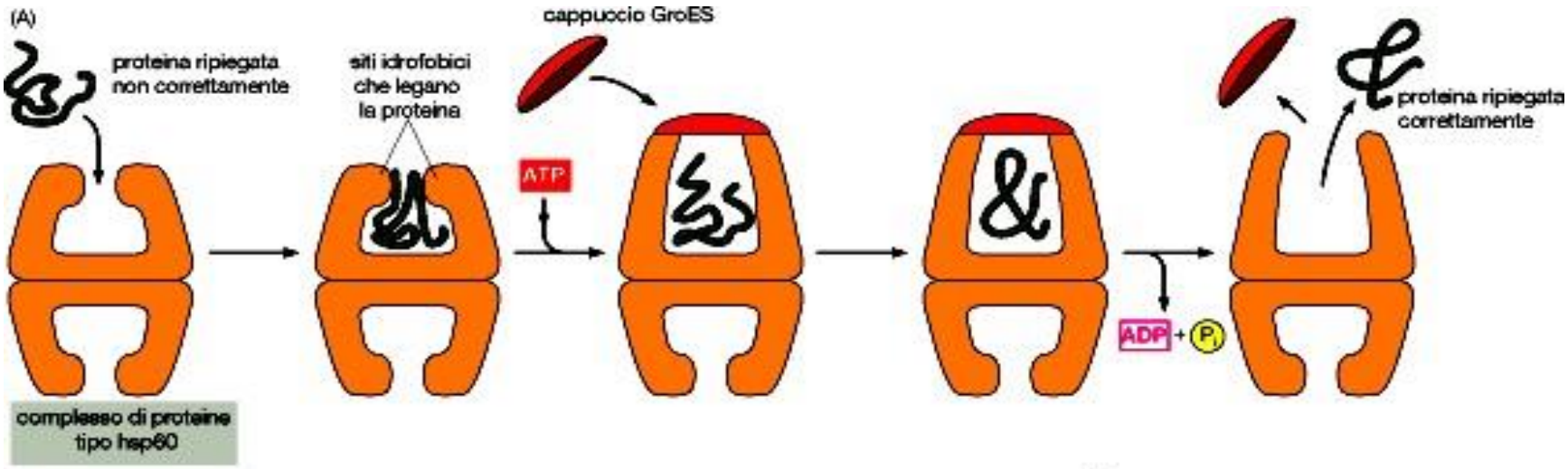
β foglietto

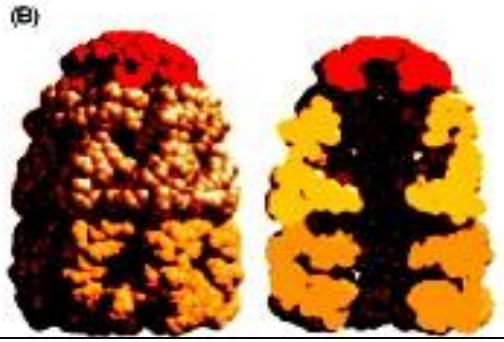


A FAR RIPIEGARE LA CATENA IN UN MODO O NELL'ALTRO SONO **LEGAMI H** CHE SI FORMANO TRA AMINOACIDI NON DIRETTAMENTE LEGATI DAL LEGAME PEPTIDICO

Chaperoni molecolari

- Aiutano a guidare il ripiegamento di molte proteine.
- Agiscono sulle proteine dopo che sono state completamente sintetizzate e ne impediscono l'aggregazione fornendo loro un ambiente favorevole in cui tentare di ripiegarsi.

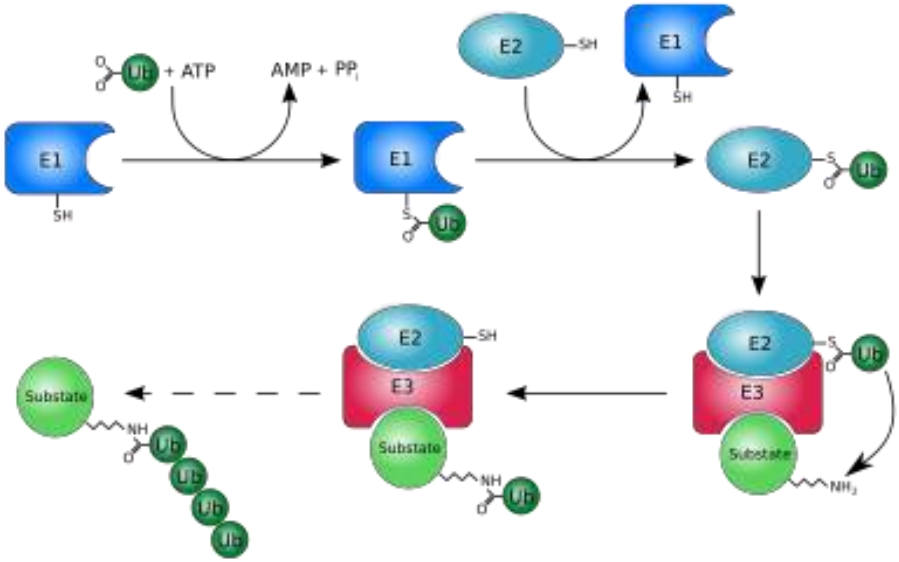


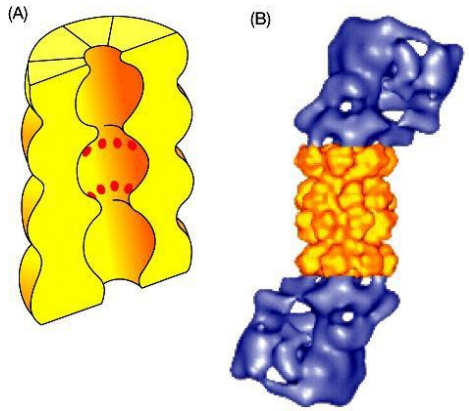


Ubiquitinizzazione e Proteosoma

- Le proteine che
- **non riescono a ripiegarsi o ad assemblarsi** in modo appropriato
- *vengono marcate* in modo specifico per la distruzione tramite l'attacco covalente di copie multiple di una piccola proteina chiamata **ubiquitina**.

- Sulle proteine così marcate agisce il **proteasoma**: l'apparato finale di distruzione delle proteine negli eucarioti





CONTROLLO DELL'ESPRESSIONE DEI GENI NEGLI EUCARIOTI

- In un organismo tutte le cellule contengono lo stesso DNA, ma le differenze tra le diverse cellule differenziate dipende da un sofisticato controllo dell'espressione genica



Figura 2.7 **Le forme delle cellule possono essere le più svariate.** Schema che rappresenta diverse forme di alcune cellule eucariotiche.

Proteine housekeeping

Proteine specifiche di ciascun tipo cellulare

- Quasi tutte le cellule specializzate di un organismo pluricellulare hanno la capacità di modificare il quadro di espressone genica in risposta a messaggi extracellulari.
- Tuttavia ogni tipo di cellula risponde a suo modo allo stesso segnale extracellulare