

**FLUSSO DELL'INFORMAZIONE E
REGOLAZIONE
DELL'ESPRESSIONE GENICA**

Lezione scorsa -Il DNA è una doppia elica formata da due filamenti appaiati secondo il principio di appaiamento delle basi azotate complementari : A si appaia a T con due legami idrogeno e G a C si appaiano con tre legami idrogeno

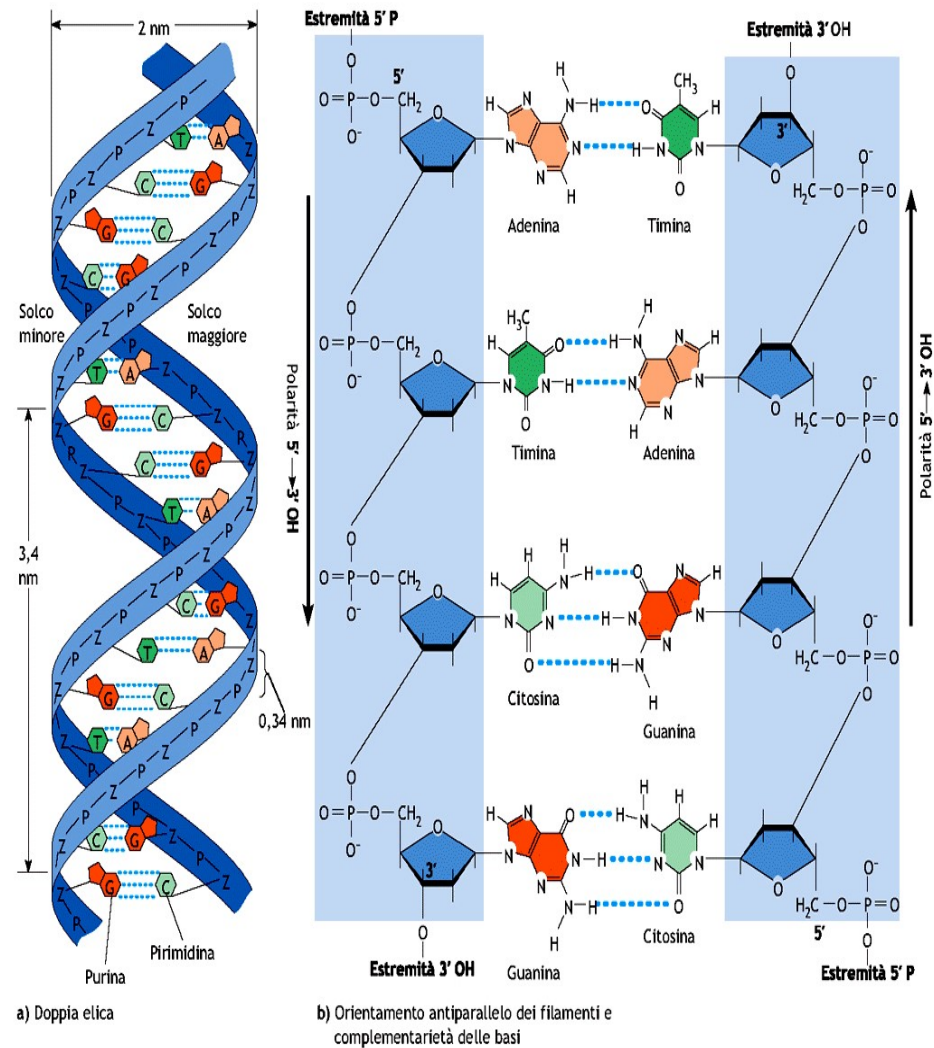
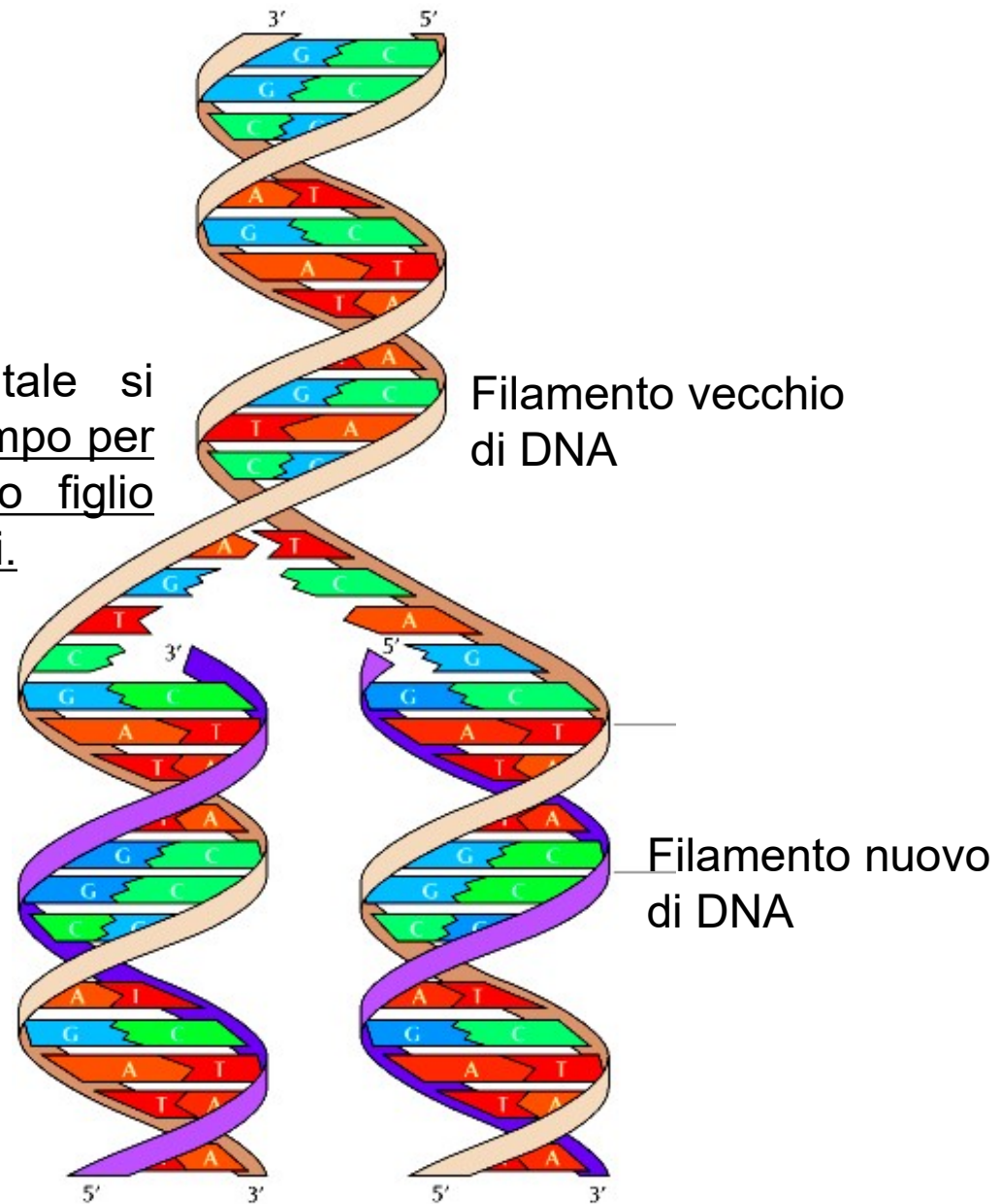


Figura 1.51 Le due eliche del DNA sono complementari e antiparallele. I legami idrogeno che si instaurano fra le basi complementari sono indicati dalle linee tratteggiate in blu. Gli accoppiamenti canonici nel DNA prevedono le coppie A=T e C=G. Nei tratti a doppia elica dell'RNA, la coppia A=T è sostituita dalla coppia A=U. Inoltre, le due eliche (che hanno polarità 5'P → 3'OH) decorrono in direzione opposta (antiparallelismo).

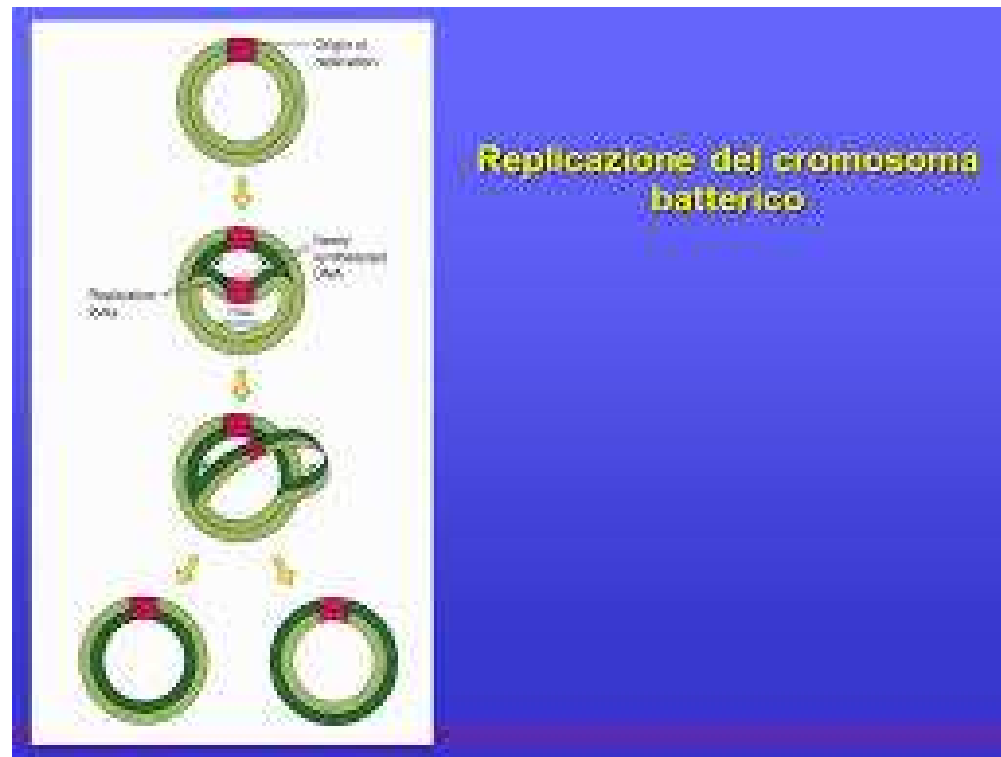
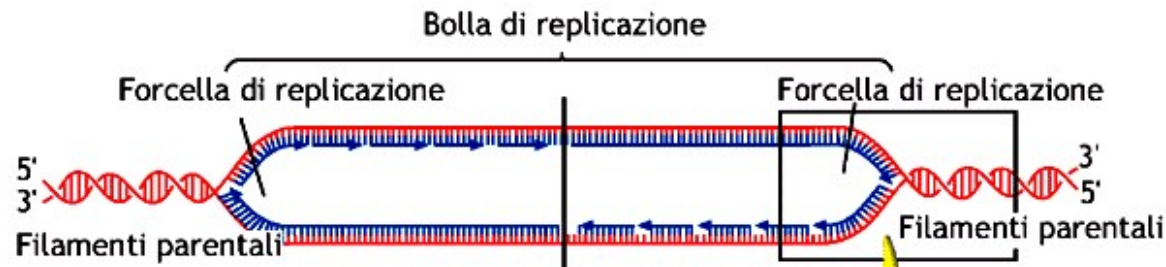
Replicazione del DNA avviene secondo una modalità di tipo semiconservativo

I due filamenti di DNA parentale si separano e ciascuno serve da stampo per la sintesi di un nuovo filamento figlio mediante accoppiamento delle basi.

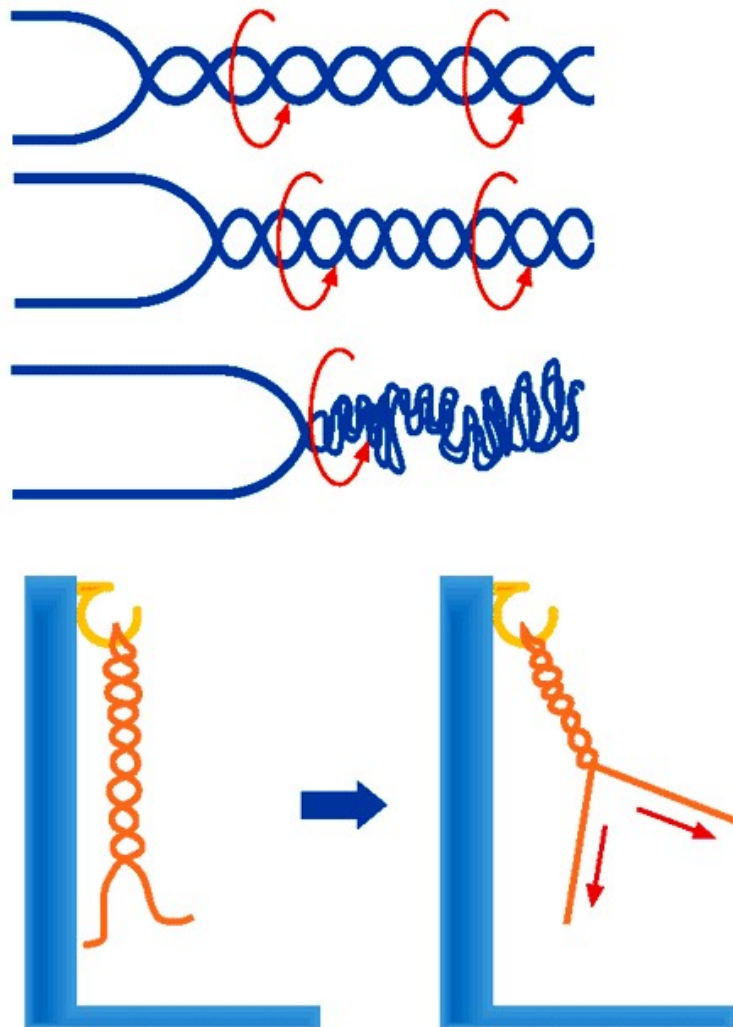


Replicazione del DNA nei procarioti: inizio

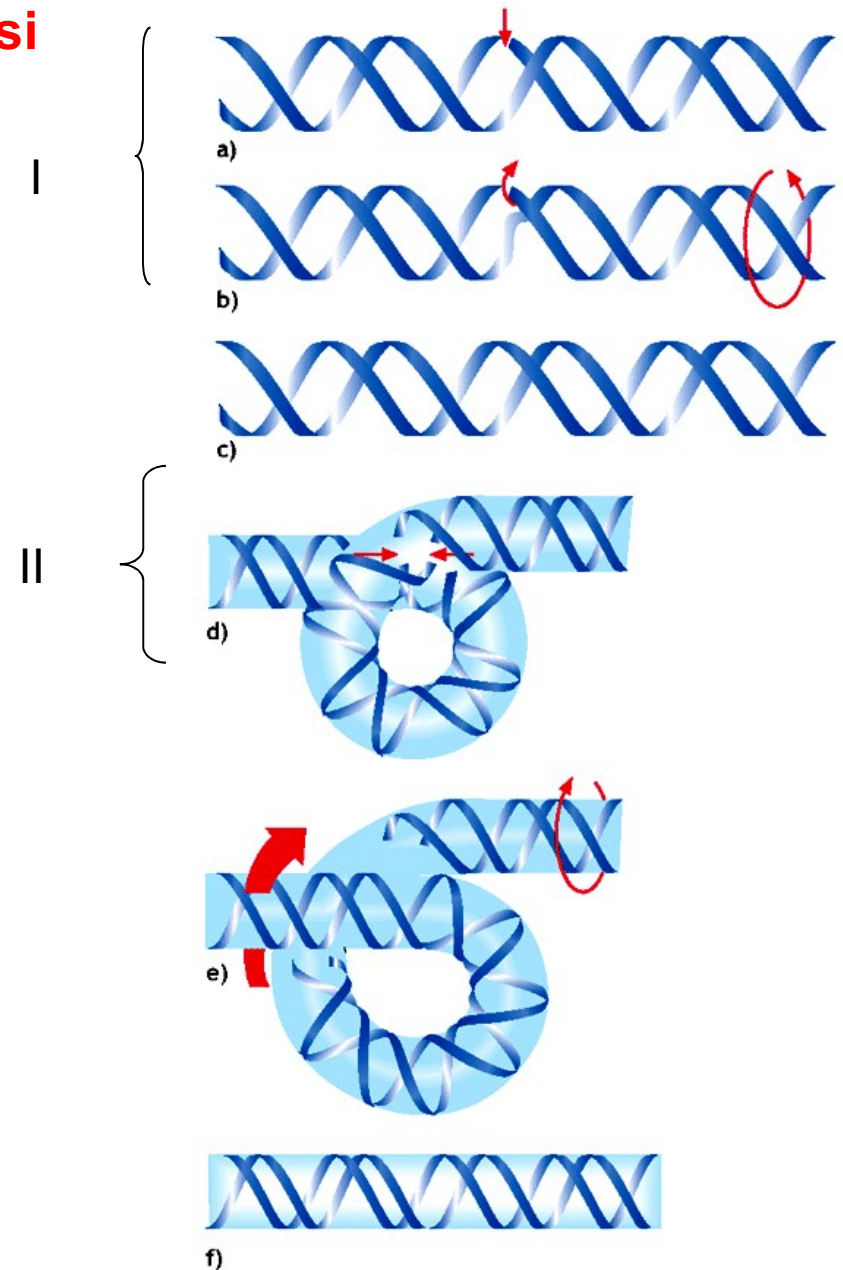
- Inizio della replicazione in **oriC** riconosciuta dalla **proteina DnaA** e procede nelle due direzioni opposte fino al completamento della sintesi dei nuovi filamenti.
- L'interazione richiama l'**elicasi** in un sito adiacente ricco di AT interazione **necessaria per apertura della doppia elica**.



Replicazione del DNA: topoisomerasi

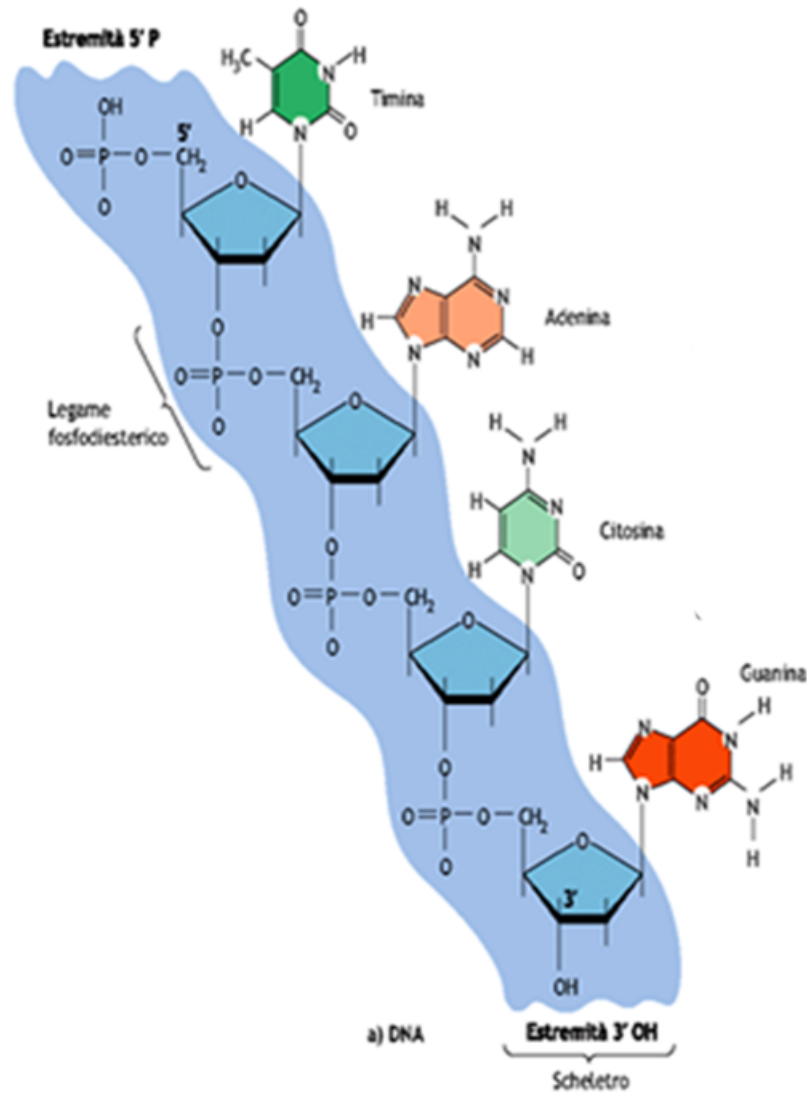


■ **Figura 4.6** Il procedere della forcella di replicazione provoca un movimento di torsione della molecola del DNA e quindi il suo superavvolgimento come quando si vuole svolgere una corda a due capi con una delle estremità attaccata ad un uncino.



■ **Figura 4.7 (a-b-c)** L'azione della topoisomerasi I: l'enzima introduce un singolo taglio, in seguito la molecola viene risaldata. **(d-e-f)** L'azione della topoisomerasi II: l'enzima introduce una rottura in entrambi i filamenti, in seguito la molecola viene risaldata.

Tutte le DNA polimerasi note hanno due proprietà fondamentali in comune che hanno implicazioni fondamentali per la replicazione del DNA:



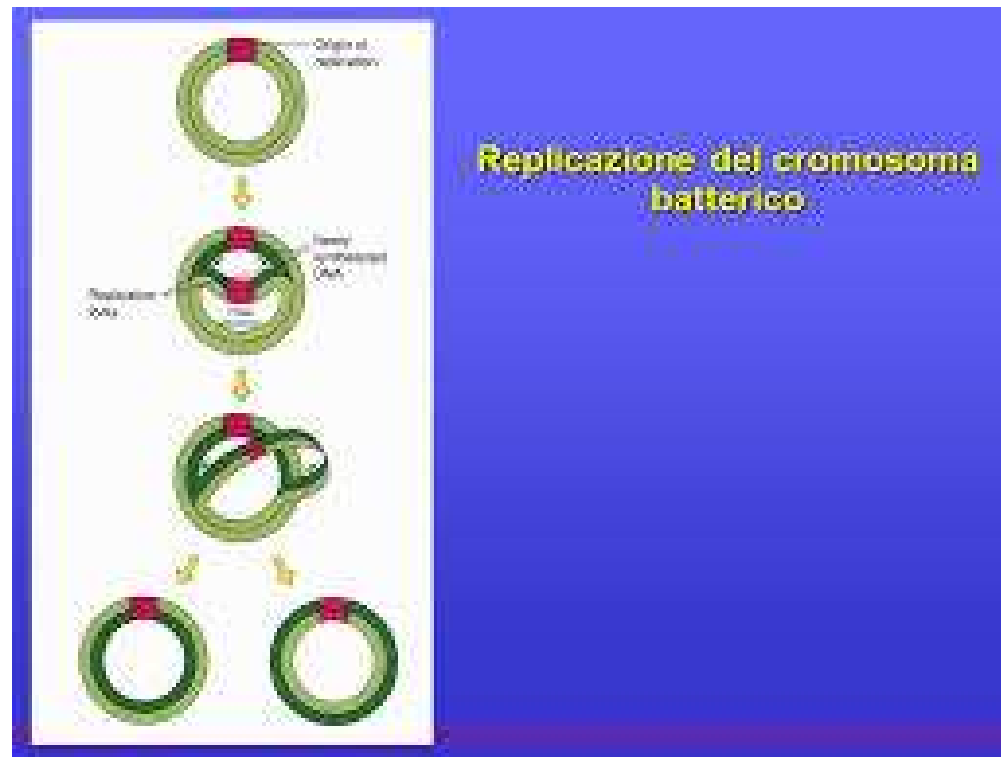
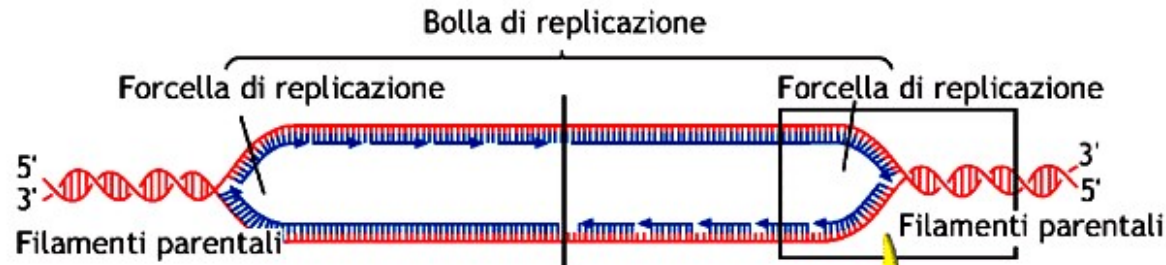
1. Tutte le polimerasi **sintetizzano DNA soltanto in direzione 5'-3'**, aggiungendo **dNTP al gruppo 3'** ossidrilico di una catena in crescita.
2. Le DNA polimerasi possono aggiungere un nuovo deossiribonucleotide soltanto ad un filamento primer preformato che forma legami idrogeno con lo stampo e **non sono capaci di iniziare la sintesi di DNA catalizzando la polimerizzazione di dNTP liberi.**

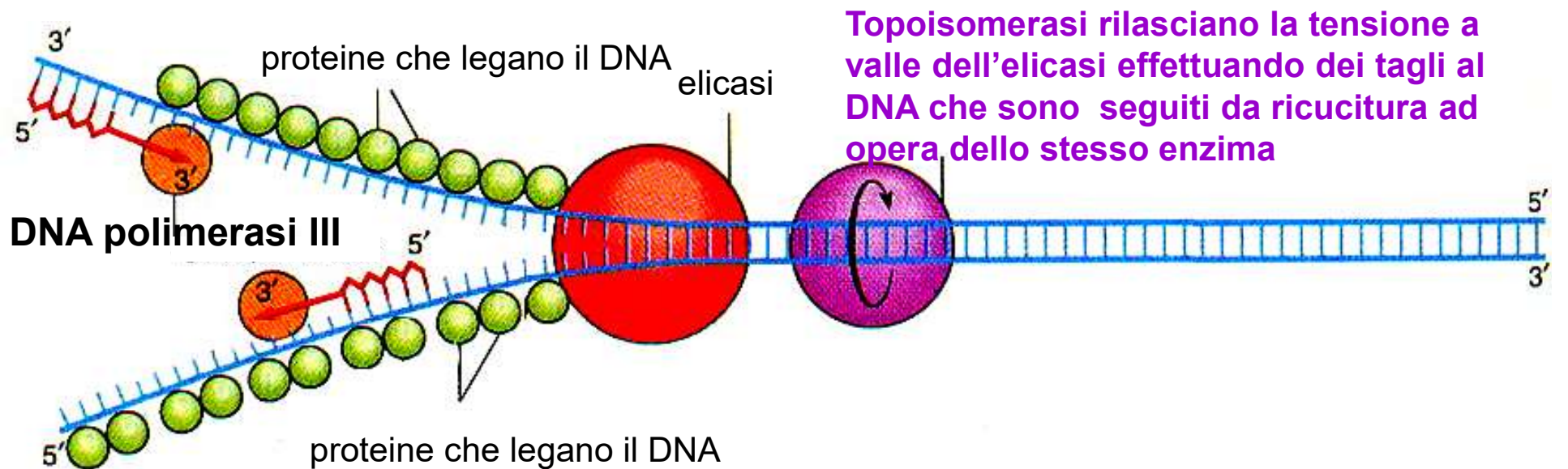
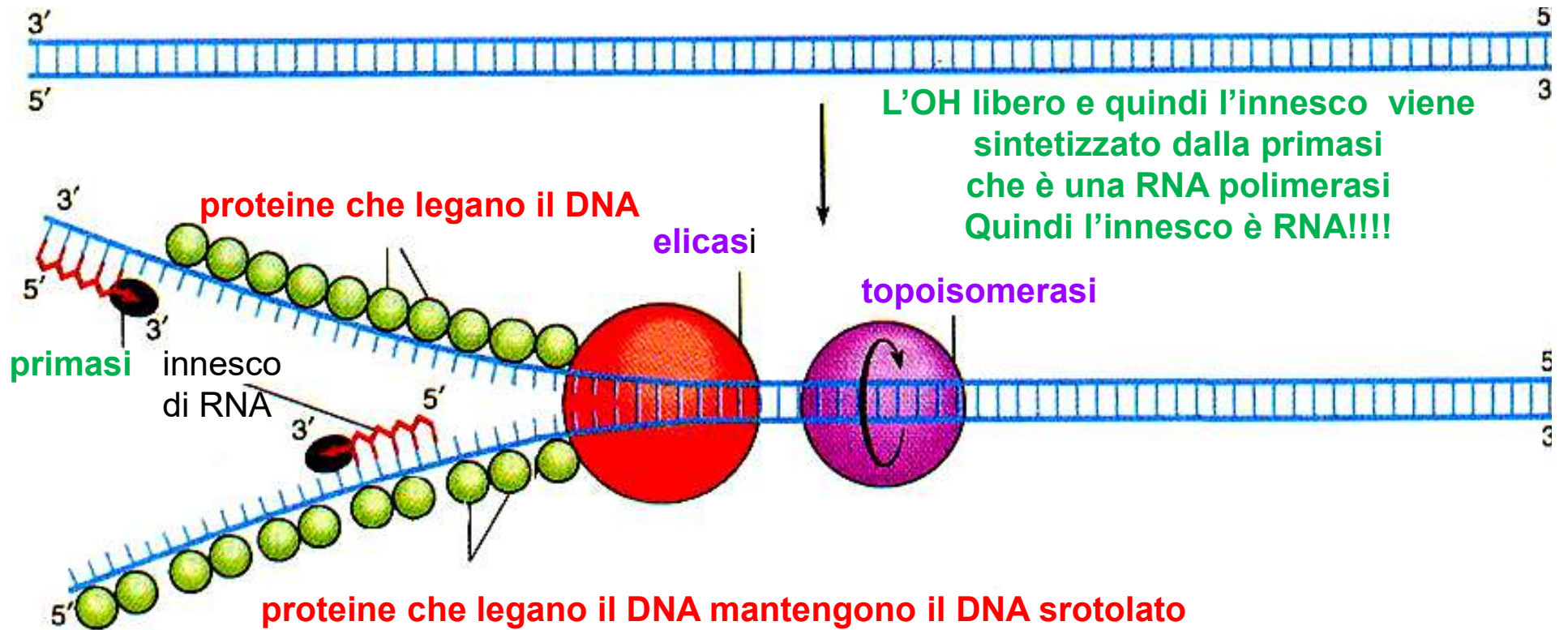
La DNA polimerasi catalizza la sintesi di un nuovo filamento di DNA

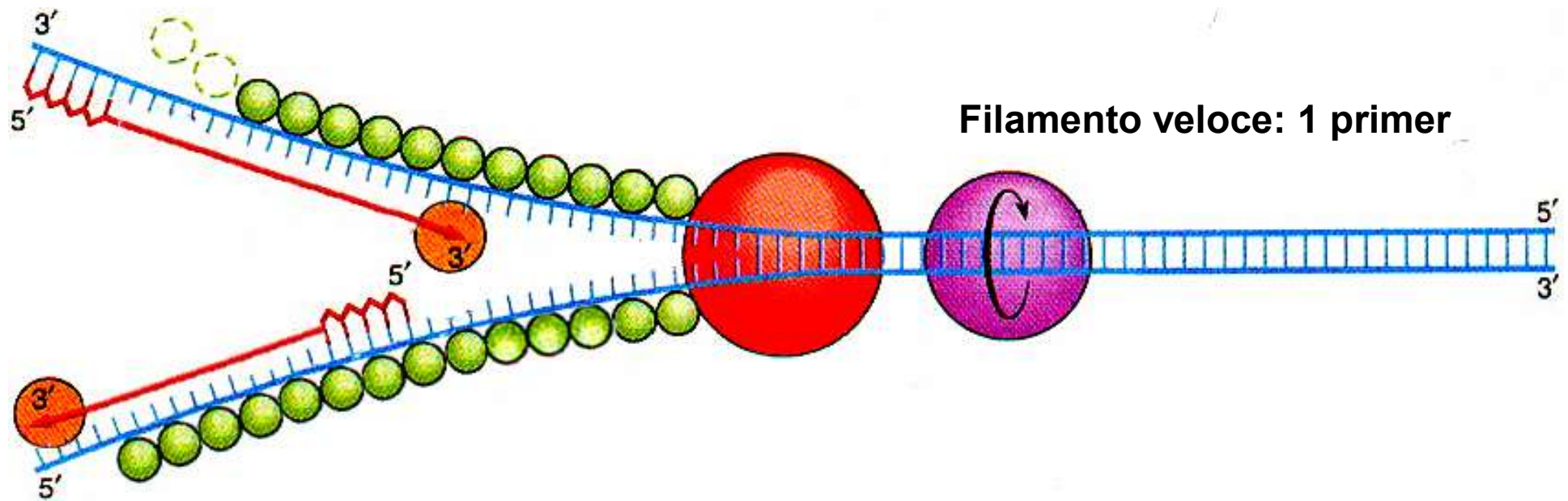
DNA Polimerasi procariotiche ed eucariotiche			
Enzimi	Direzione della sintesi	Attività esonucleasica	Funzioni possibili
Procariotici			
Polimerasi I	5' → 3'	5' → 3' 3' → 5'	riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco; riparazione del DNA
Polimerasi II	5' → 3'	3' → 5'	riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco; riparazione del DNA
<u>Polimerasi III</u>	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della replicazione
Eucariotici			
<u>Polimerasi α</u>	5' → 3'	5' → 3'	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi δ); riparazione del DNA
Polimerasi β	5' → 3'	nessuna	riparazione del DNA
Polimerasi γ	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della repl. nei mitocondri e cloroplasti
<u>Polimerasi δ</u>	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi α)
Polimerasi ε (epsilon)		5' → 3'	3' → 5' riparazione del DNA; può cooperare con le Polimerasi α e δ nei meccanismi principali della replicazione

Replicazione del DNA nei procarioti: inizio

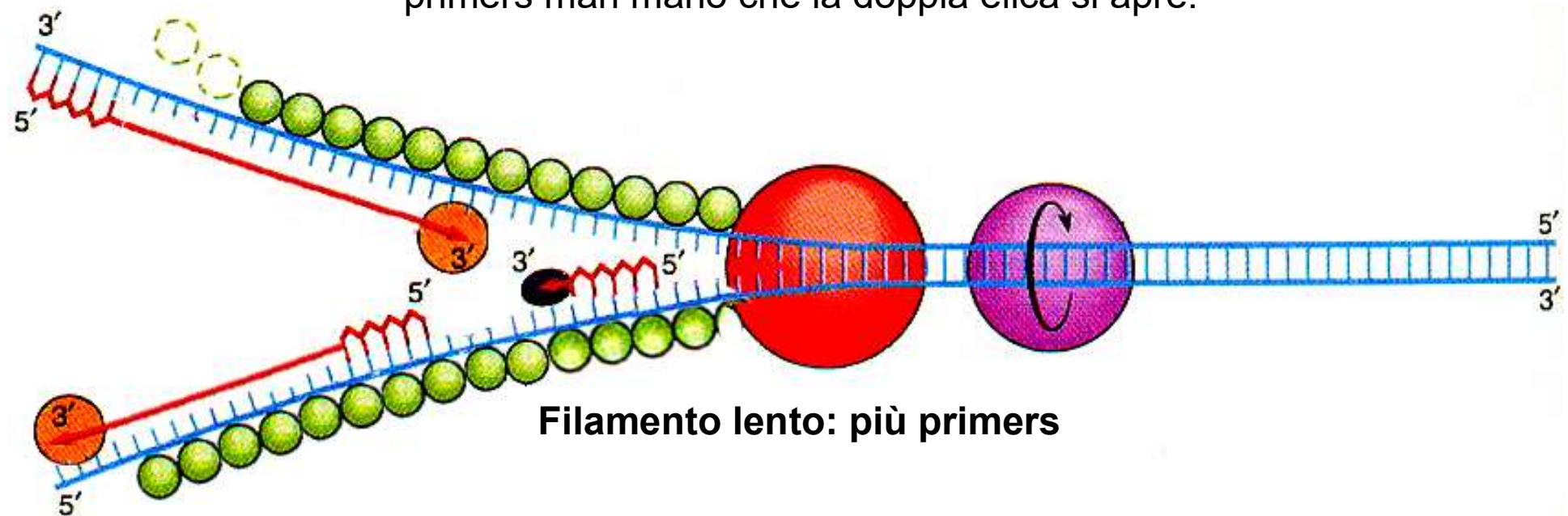
- Inizio della replicazione in **oriC** riconosciuta dalla **proteina DnaA** e procede nelle due direzioni opposte fino al completamento della sintesi dei nuovi filamenti.
- L'interazione richiama l'**elicasi** in un sito adiacente ricco di AT interazione **necessaria per apertura della doppia elica**.



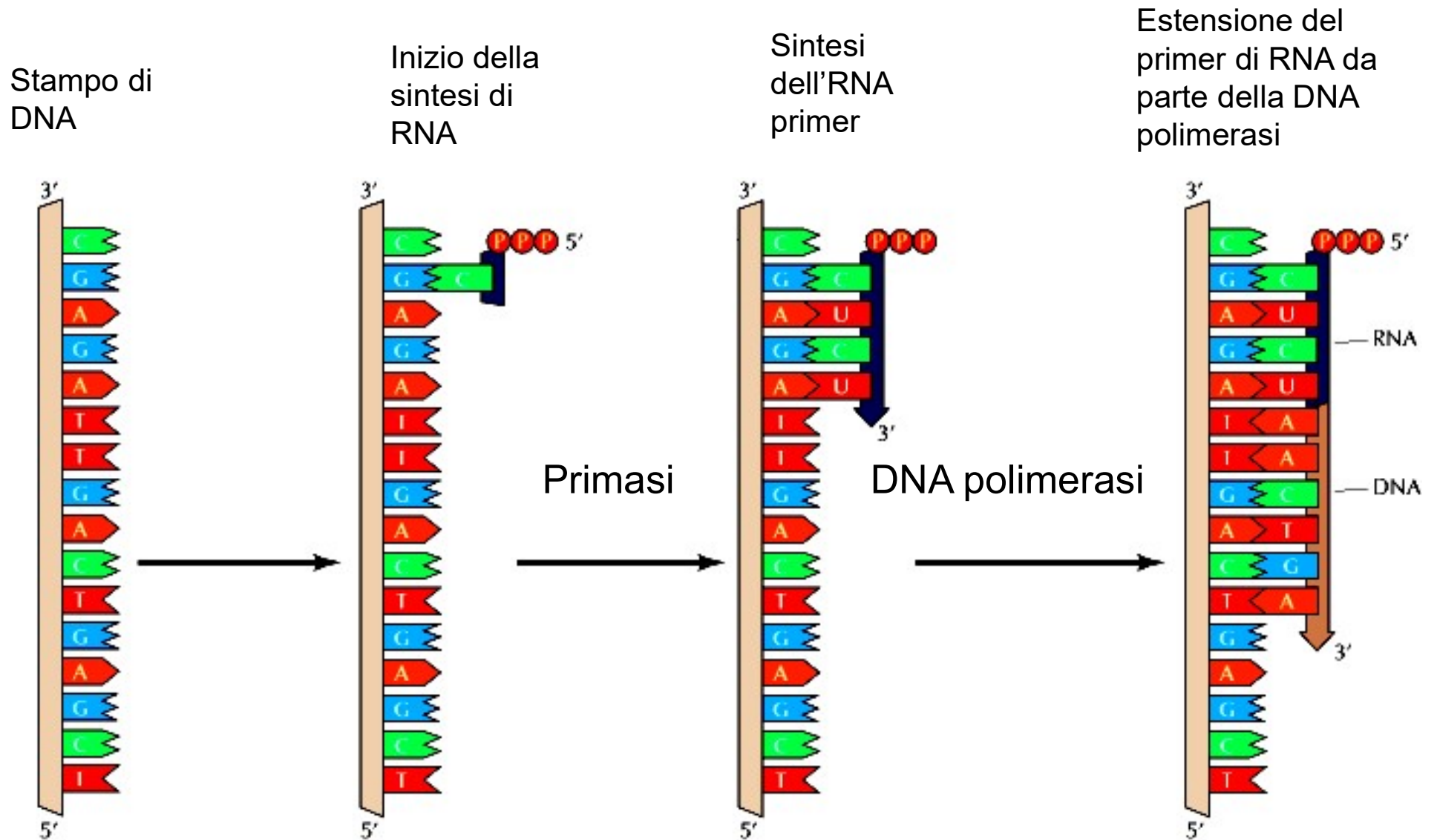




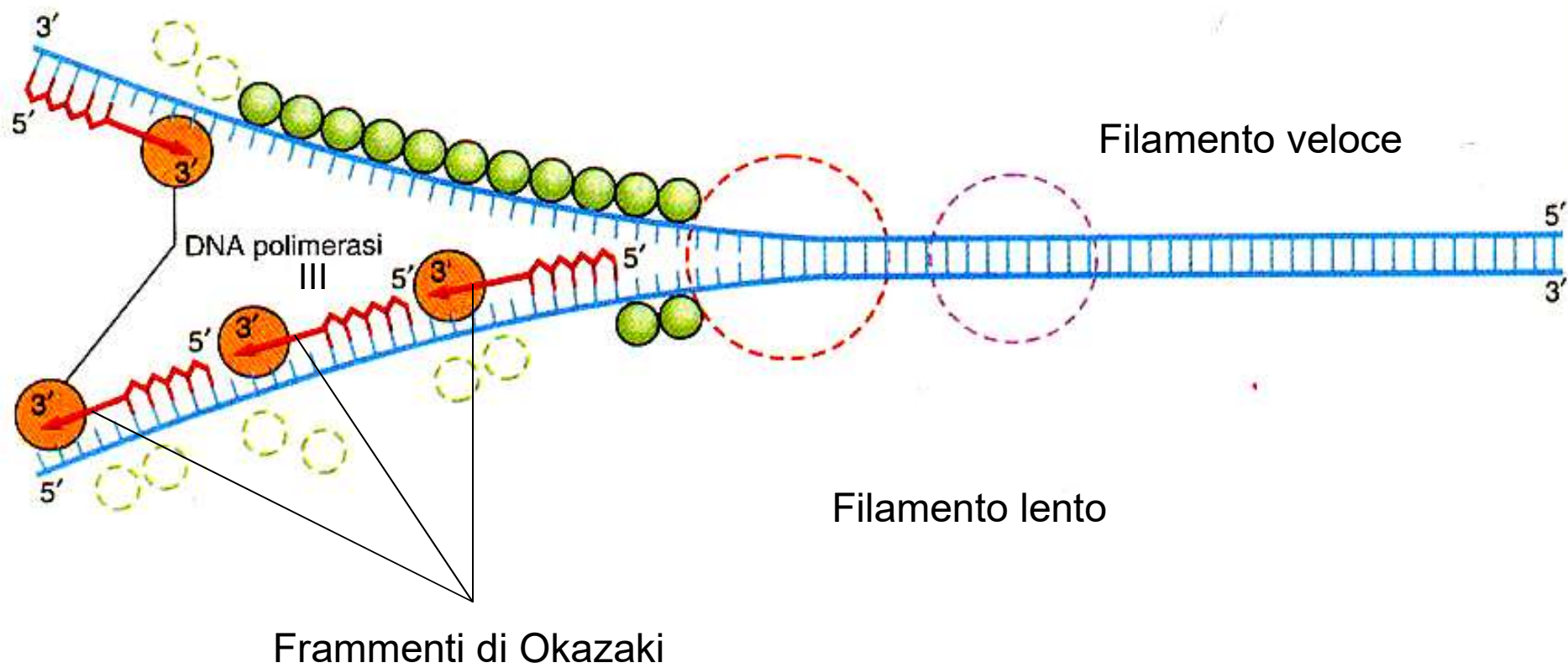
Il filamento veloce o leading e il filamento lento o lagging vengono sintetizzati con diverse velocità perchè nel lagging è necessaria la sintesi di nuovi primers man mano che la doppia elica si apre.

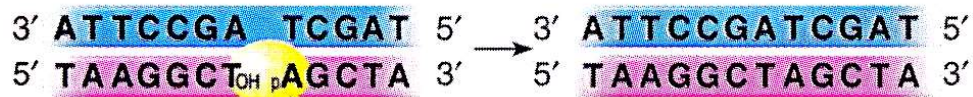


Quando il DNA si srotola, **la DNA primasi sintetizza un breve innesco di RNA** composto da **circa 5-10 nucleotidi**



I corti inneschi di RNA sono utilizzati come punto di partenza per la replicazione da parte della DNA polimerasi III. I filamenti di nuova sintesi sul filamento lento sono chiamati frammenti di Okazaki.



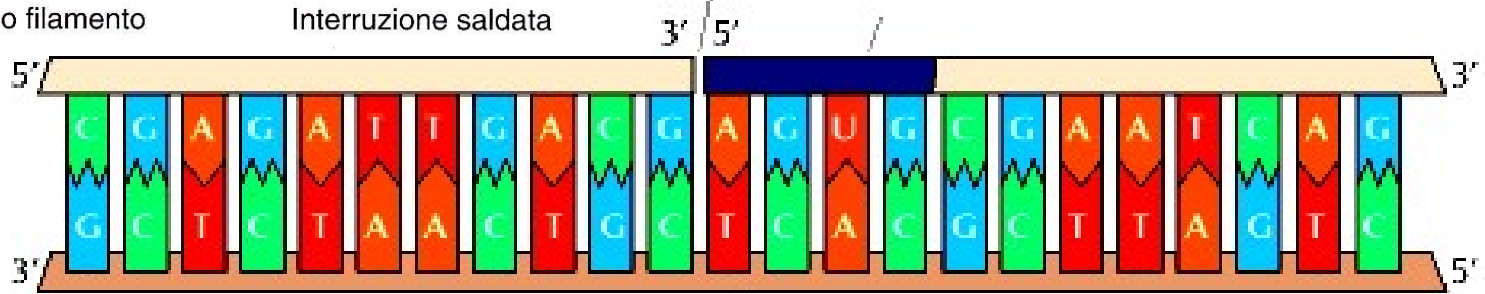


La DNA ligasi salda le interruzioni sul filamento neoformato

DNA ligasi
Interruzione a singolo filamento

Interruzione saldata

RNA primer



Polimerasi I

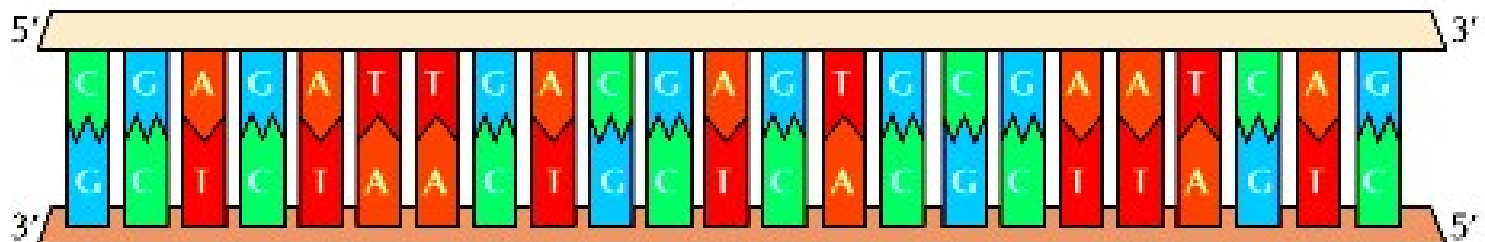
Rimozione dell'RNA da parte dell'esonucleasi 5'-3'

Riempimento dell'interruzione con DNA



ligasi

Unione dei frammenti di DNA



Enzimi coinvolti della duplicazione del DNA (batteri)

- Elicasi
- Topoisomerasi
- Primasi
- Polimerasi III
- Polimerasi I
- Ligasi

2: Le DNA polimerasi coinvolte sono la alfa e la delta

■ **Figura 4.15 Sintesi di frammenti di Okazaki sulla lagging chain.** La leading chain è sintetizzata in modo continuo dal PCNA e dalla polimerasi δ (omesso per semplicità della figura).

Formazione del primer e sintesi di DNA

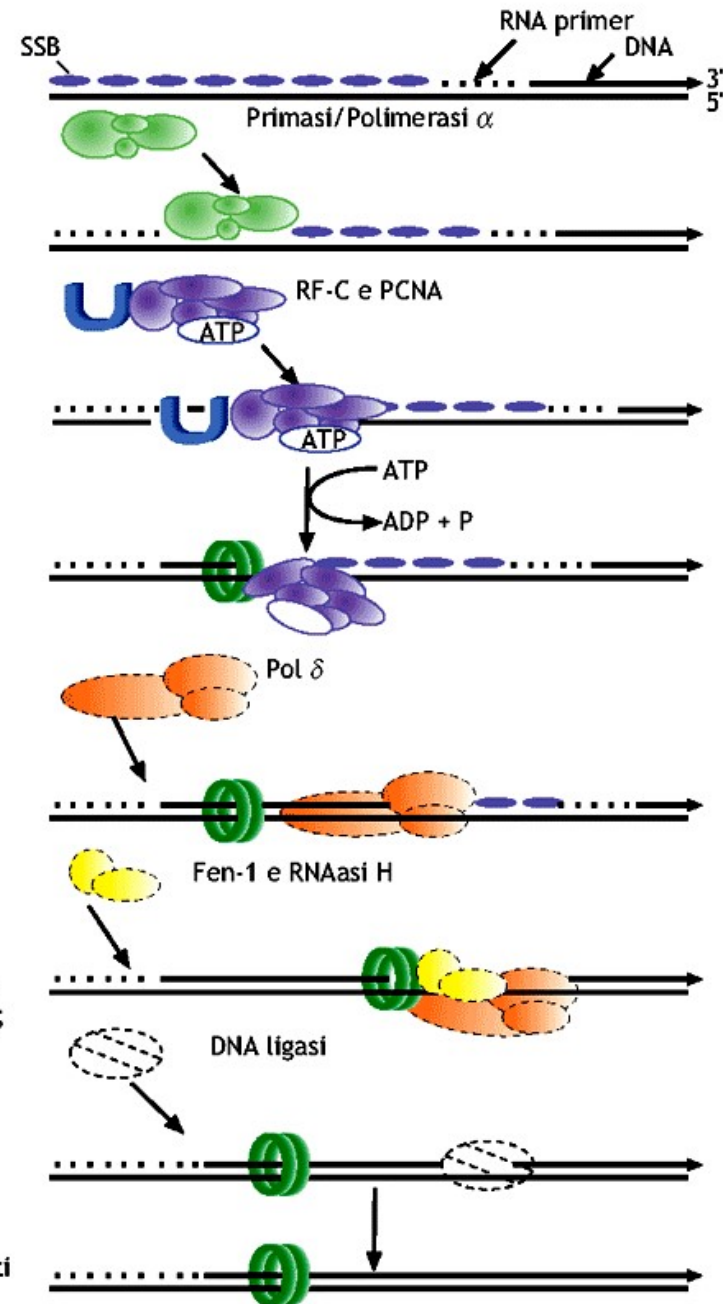
Il complesso primasi/polimerasi viene spazzato dal PCNA

Assemblaggio del PCNA intorno al primer

Legame della polimerasi δ e sintesi del DNA

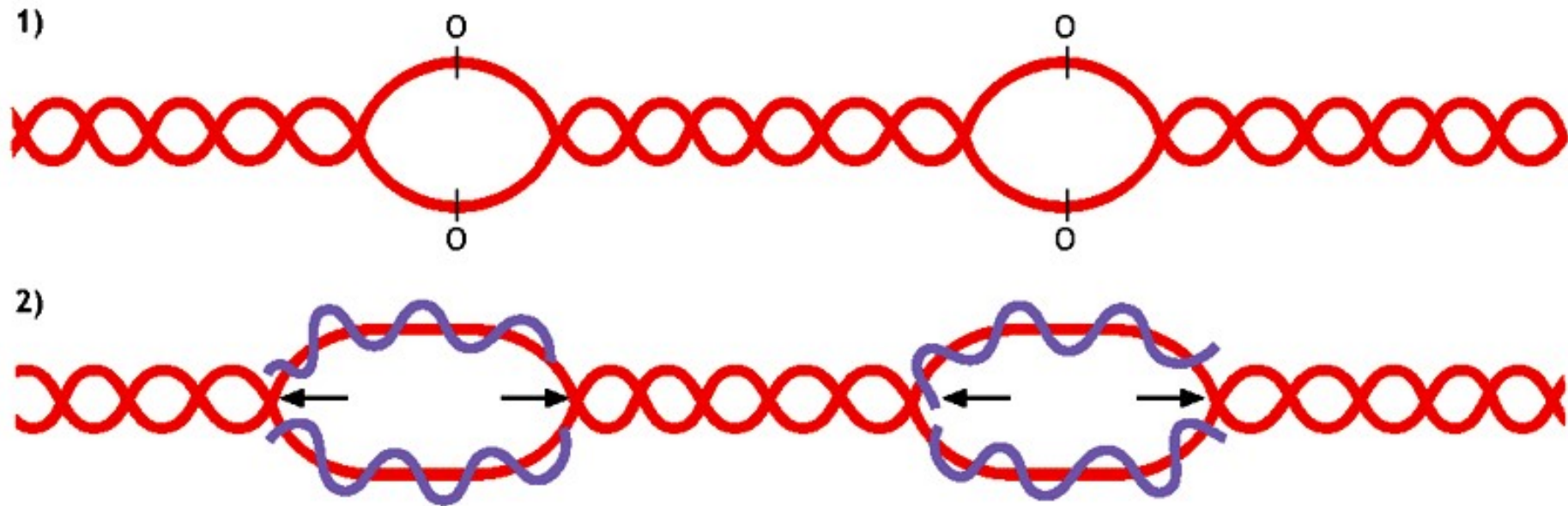
Rimozione dell'RNA primer da parte di Fen-1 e dell'RNAasi H; il vuoto lasciato dal primer viene riempito

Congiungimento dei frammenti da parte della ligasi



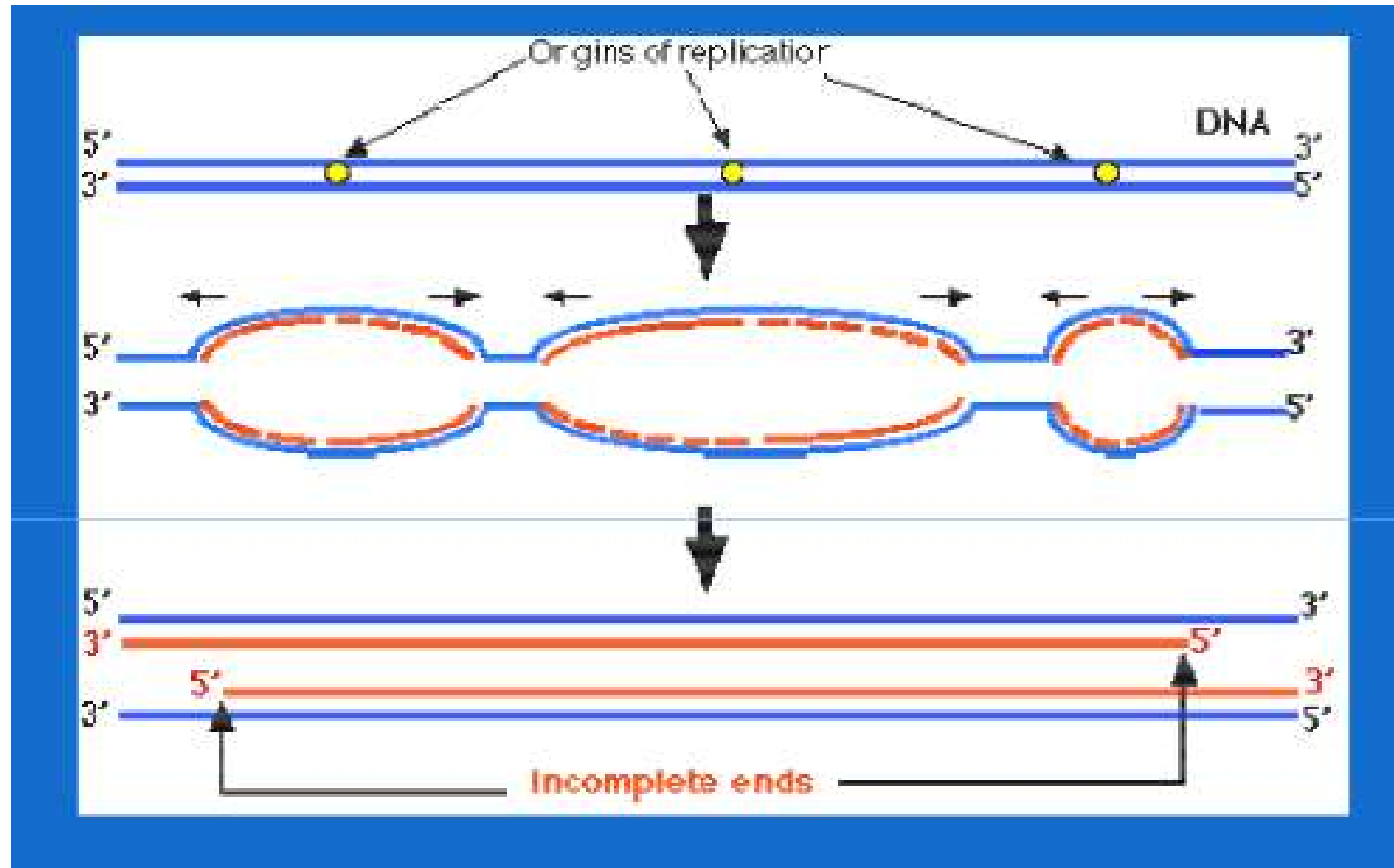
Differenze nella replicazione del DNA negli eucarioti

1) A causa delle dimensioni diverse del DNA ci sono più forcelle di replicazione

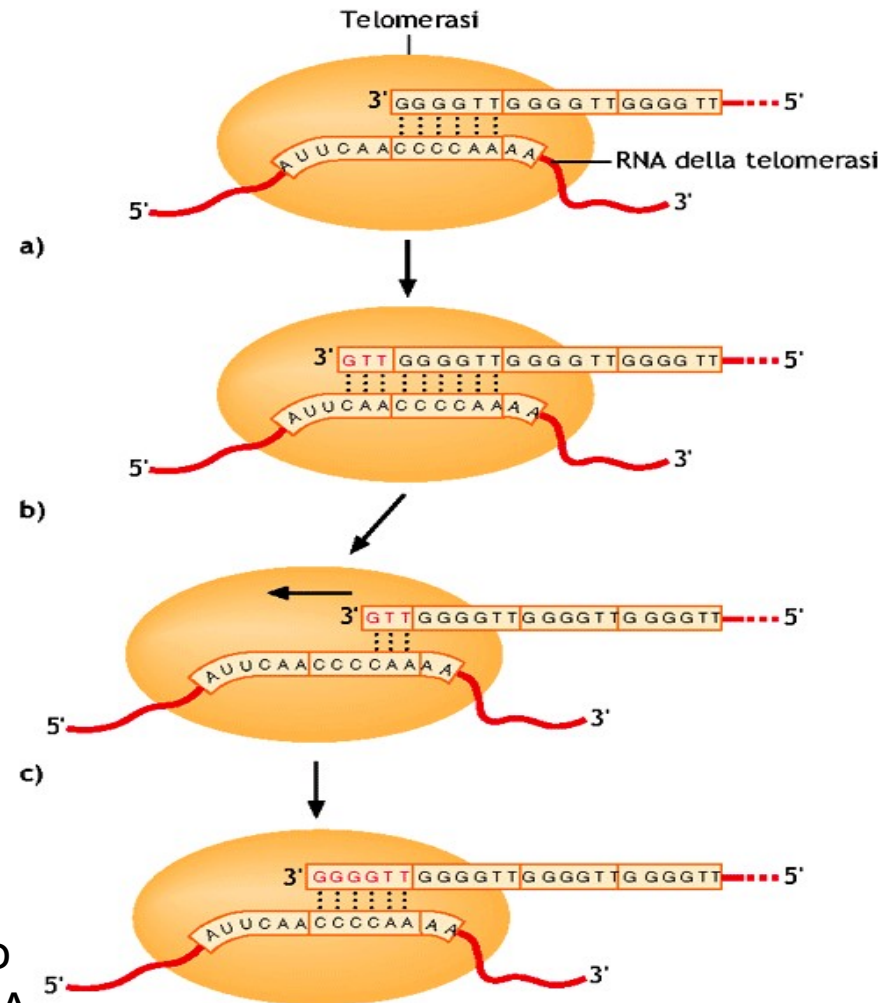
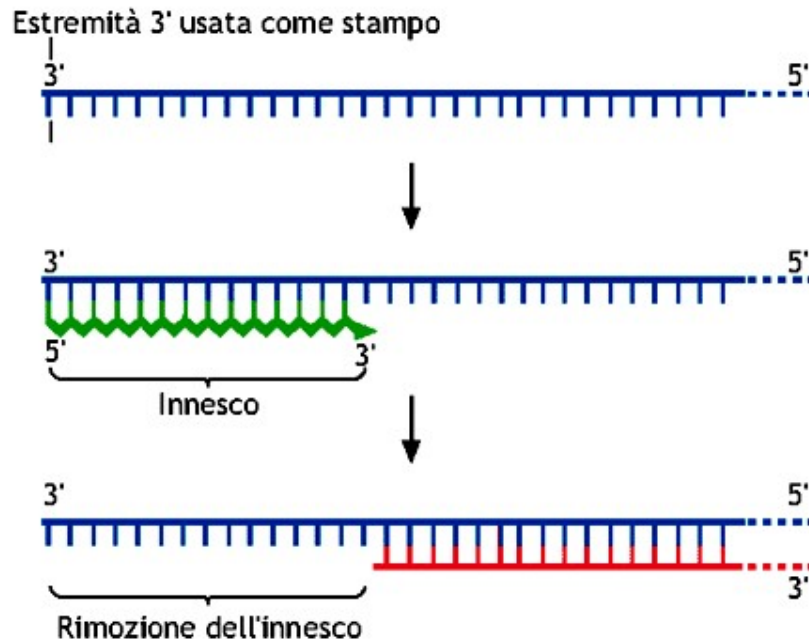


■ **Figura 4.14** Replicazione del cromosoma degli eucarioti mediante molteplici forcelle di replicazione. **1)** In punti diversi del cromosoma, distanti circa 30.000-40.000 paia di basi, in corrispondenza delle origini di replicazione (O) si aprono i due filamenti, formando le “bolle di replicazione”. **2)** Si formano due forcelle di replicazione che procedono in senso centrifugo rispetto all’origine di replicazione, fino ad incontrarsi.

Problema negli eucarioti: l'accorciamento del filamento lento dovuta alla linearità dei cromosomi negli eucarioti



Eucarioti : La telomerasi previene l'accorciamento del filamento lento dovuta alla linearità dei cromosomi negli eucarioti

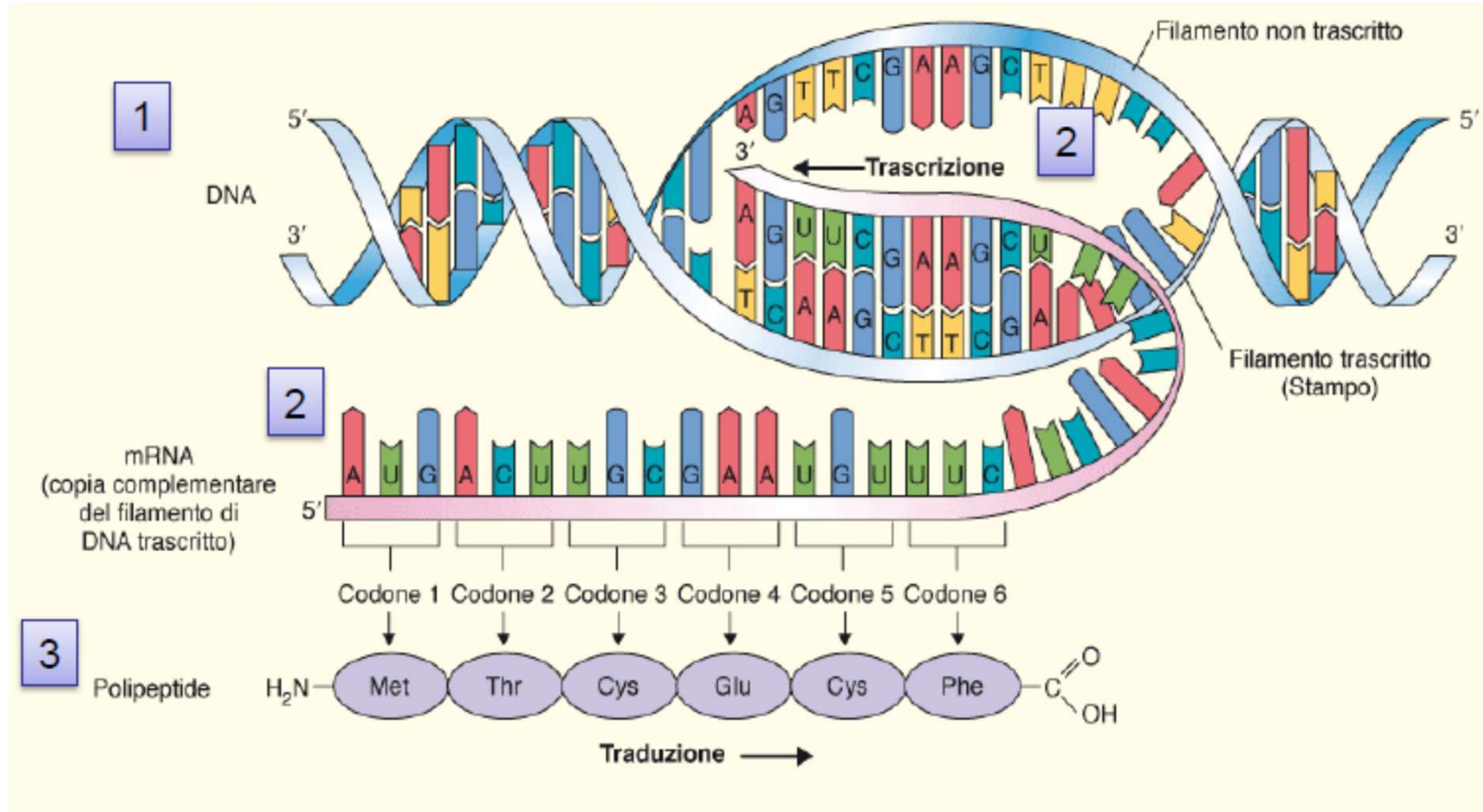


La telomerasi è costituita da

- 1) un RNA complementare al filamento singolo
- 2) da trascrittasi inversa che lo copia in DNA, allungando così il filamento singolo

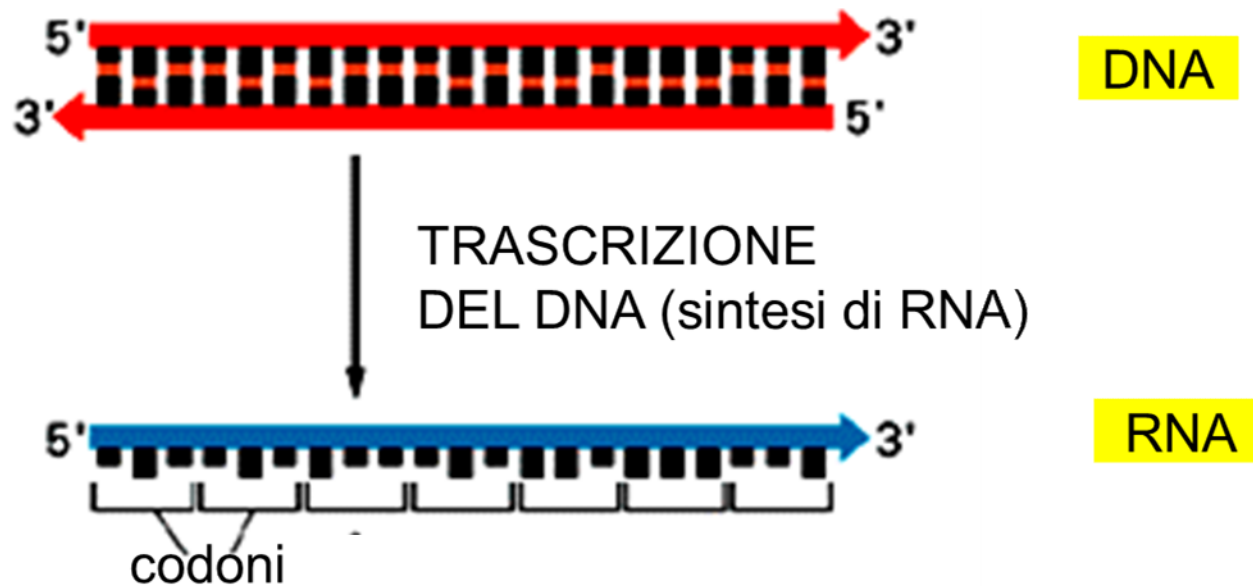
Figura 4.19 La componente TERC (RNA) della telomerasi serve da stampo per la sintesi del DNA telomeric. (a) RNA della telomerasi lega la sequenza telomeric e (b) vengono subito aggiunti tre nucleotidi di DNA, TTG, usando come stampo la molecola di RNA. La telomerasi, poi, scivola verso la fine della sequenza telomeric (c) in modo che le sue triplette AAC si appaiano con le triplette TTG neosintetizzate. (d) Il ciclo di allungamento continua.

La TRADUZIONE avviene sia in procarioti che eucarioti è il processo con cui l'informazione genetica presente in un mRNA viene utilizzata per la sintesi di una catena polipeptidica



La trascrizione

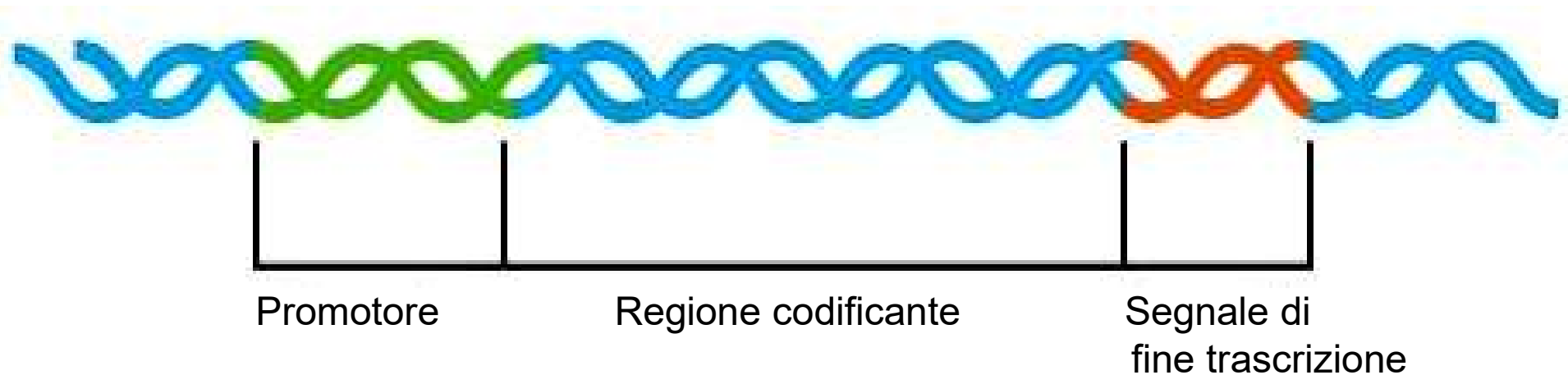
La trascrizione, cioè la formazione di uno specifico RNA a partire da uno specifico DNA, richiede uno stampo di DNA, i corretti ribonucleotidi trifosfati (ATP, GTP, CTP e UTP) che fanno da substrato e un enzima chiamato RNA polimerasi. La trascrizione non produce soltanto mRNA; questo stesso processo è responsabile della sintesi del tRNA e dell'RNA ribosomiale (rRNA). Come i peptidi, anche tutti questi RNA sono codificati da geni specifici



IL GENE

Il primo passaggio della lettura di una parte necessaria delle istruzioni genetiche di una cellula è quello di copiare una porzione particolare della sequenza nucleotidica del suo DNA – un gene – in una sequenza nucleotidica di RNA. L'informazione del DNA, anche se copiata in un'altra forma chimica, è ancora scritta essenzialmente nello stesso linguaggio del DNA – il linguaggio di una sequenza nucleotidica. Da cui il nome trascrizione.

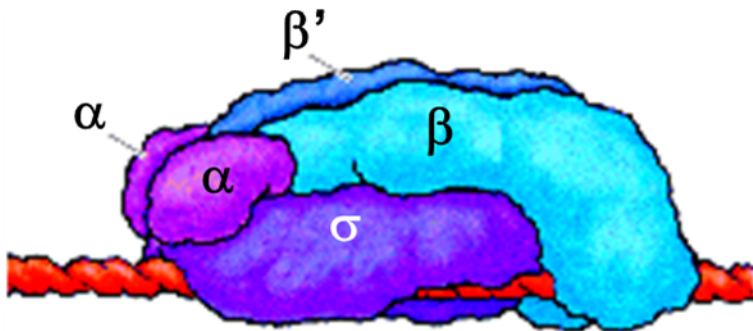
In termini molecolari un **GENE** può essere definito come un segmento di DNA che viene espresso per ottenere un prodotto funzionale, corrispondente o ad una molecola di RNA (es. RNA ribosomiali o RNA transfer) o ad un polipeptide.



La sequenza di DNA a cui si lega la RNA polimerasi per iniziare la trascrizione di un gene si chiama **promotore** e il riconoscimento avviene grazie alle sequenze a -10 e -35

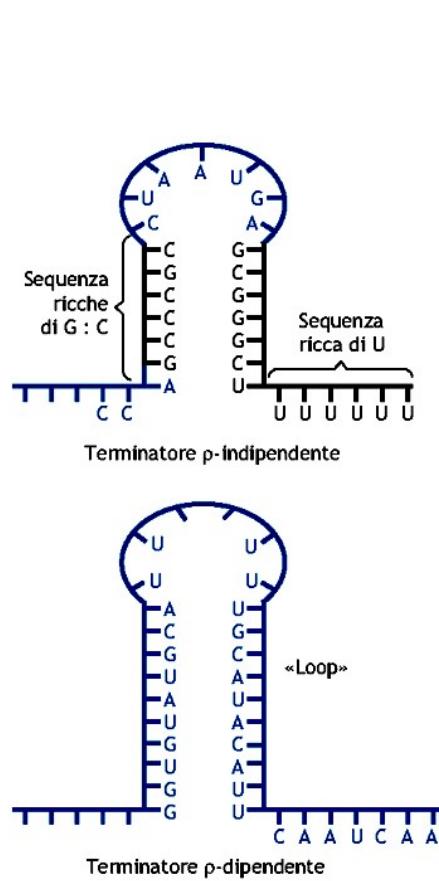


Nei procarioti c'è un'unica RNA polimerasi che riconosce il promotore grazie all'aiuto della subunità σ

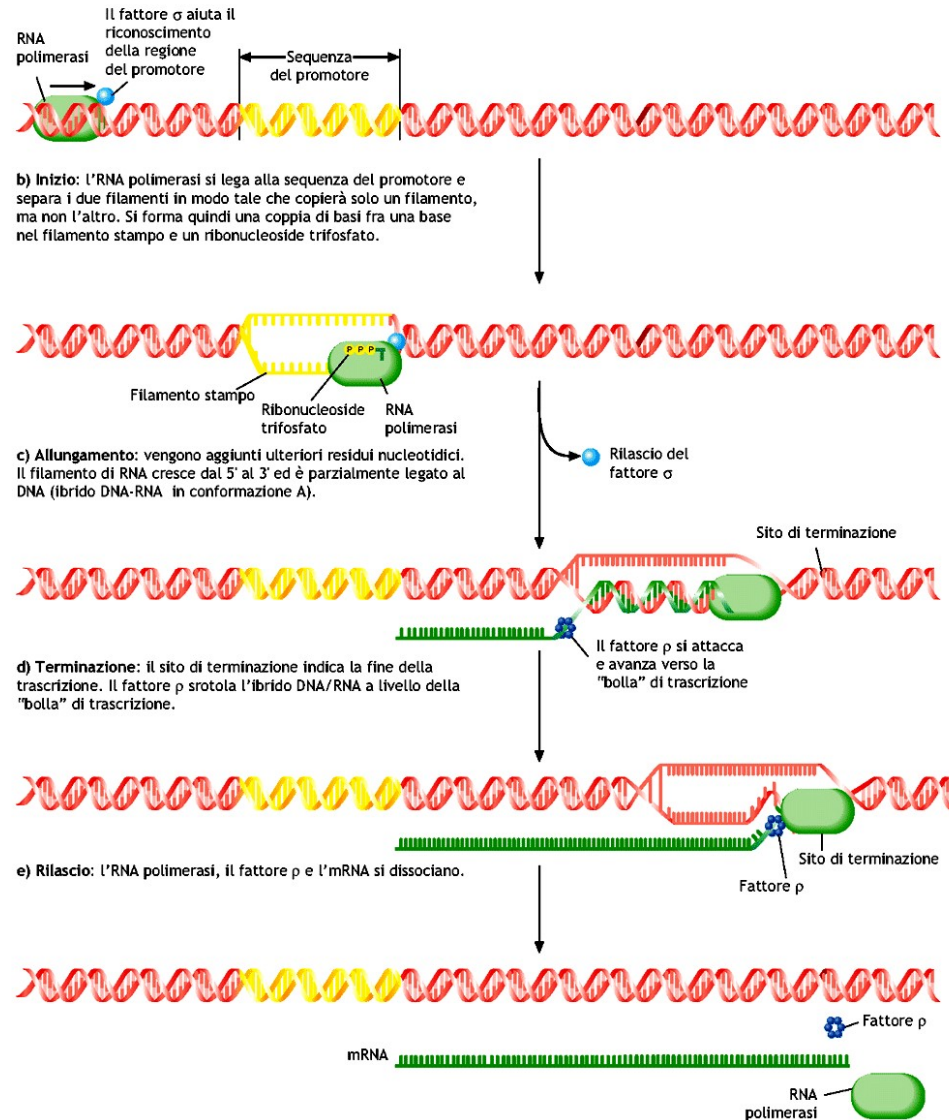


l'enzima completo consiste di 5 subunità: 2 α , 1 β , 1 β' e 1 σ .
La subunità σ è attaccata in modo relativamente debole e può essere dissociata dalle altre subunità che costituiscono il nucleo della polimerasi

La terminazione della trascrizione : implica il distacco delle catene di RNA dovuto a una certa struttura del RNA e che nei procarioti può richiedere o meno una proteina specifica chiamata con la lettera greca ρ



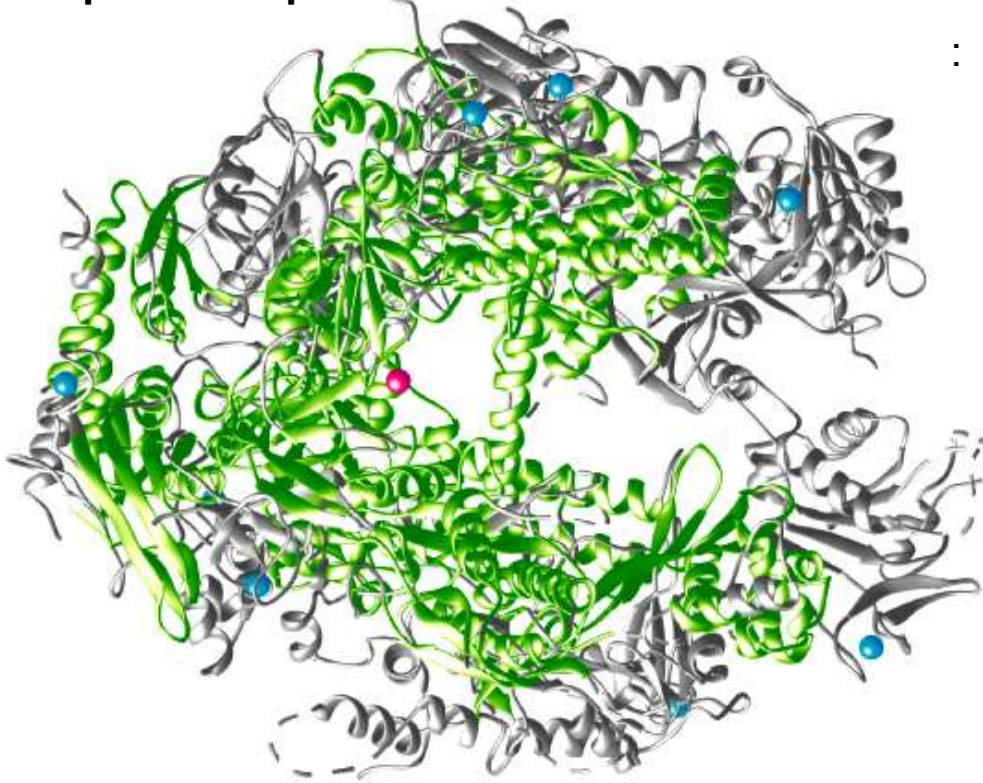
■ **Figura 4.28** La terminazione della trascrizione mediante formazione di loop nelle molecole di mRNA.



■ **Figura 4.27** La trascrizione nei batteri.

Trascrizione negli eucarioti

Sebbene il meccanismo della trascrizione del DNA sia simile nei procarioti e negli eucarioti, il macchinario è considerevolmente più complesso negli eucarioti. Negli eucarioti ci sono tre tipi di RNA polimerasi:



1. RNA polimerasi I:

sintetizza i grossi RNA ribosomali (28S, 18S, 5,8S).

2. RNA polimerasi II:

trascrive i geni il cui RNA verrà tradotto in proteine, geni di snoRNA e alcuni geni di snRNA.

3. RNA polimerasi III:

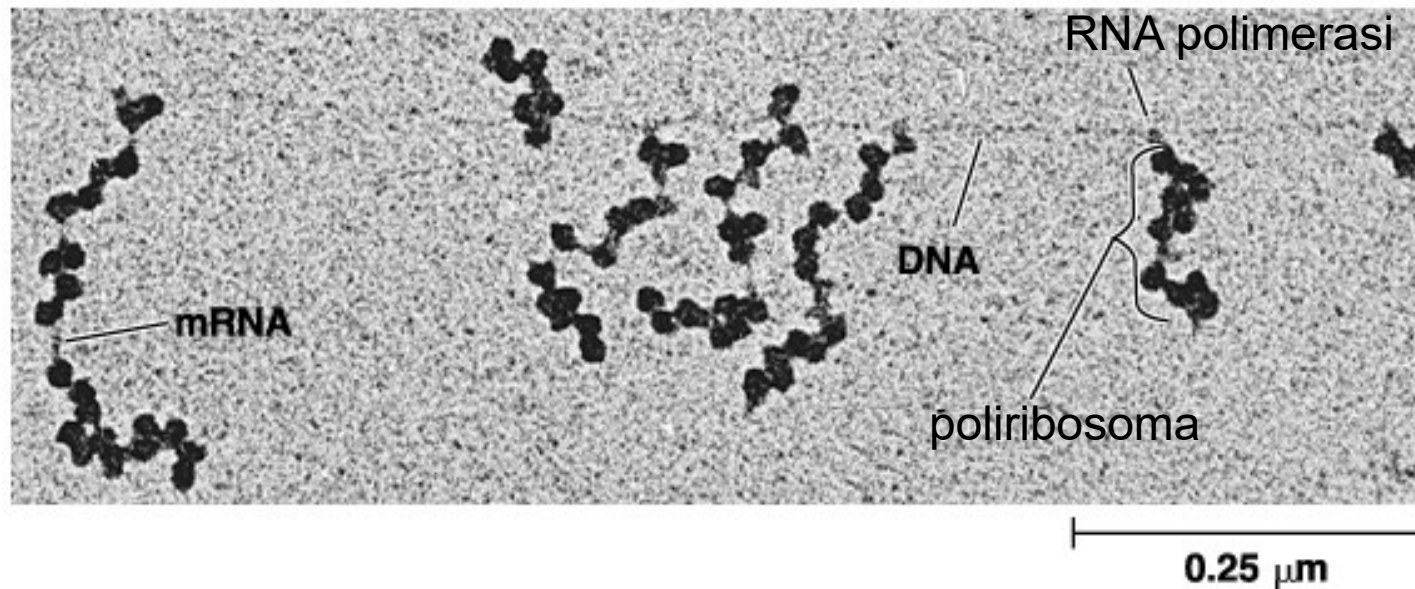
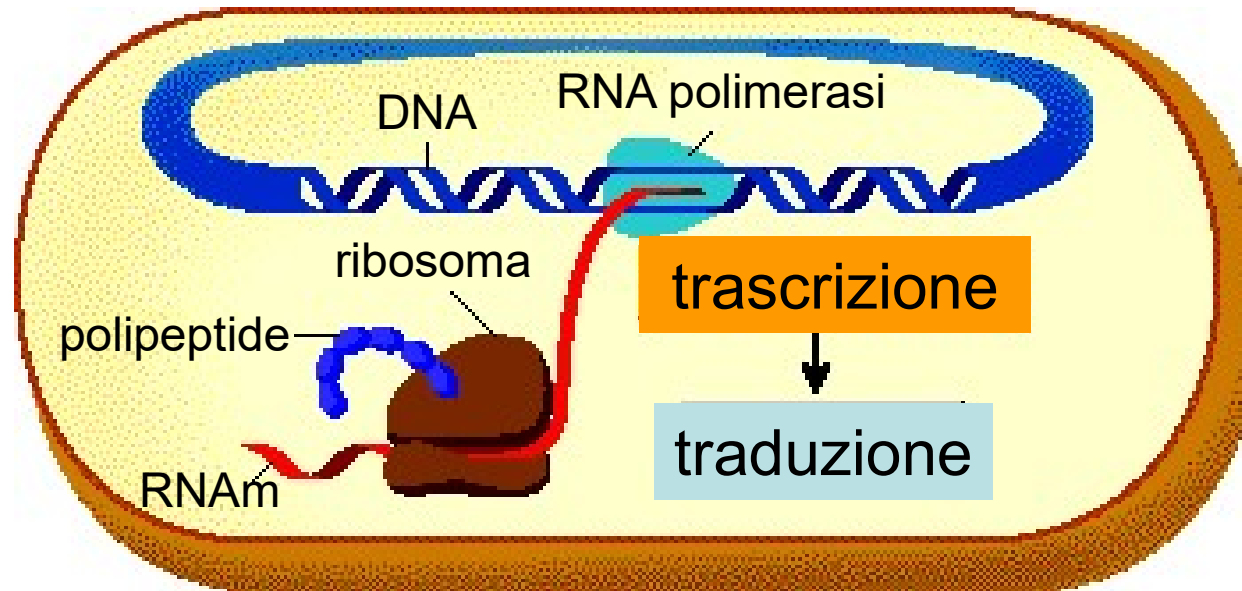
sintetizza una varietà di RNA piccoli e stabili come l'RNA ribosomale 5S, gli RNA transfer e alcuni geni di snRNA.

Una distinzione importante tra la RNA polimerasi batterica e la RNA polimerasi II degli eucarioti è che

(1) l'enzima eucariotico per iniziare la trascrizione necessita di proteine di inizio che devono legarsi al promotore prima che si possa legare l'enzima. Queste proteine si chiamano **fattori generali della trascrizione (TFIIB, D, E, F, H)**

(2) L'inizio della trascrizione eucariotica deve tenere conto del compattamento del DNA nei nucleosomi e in forme di ordine superiore di struttura della cromatina, **quindi altre proteine attivatrici e di rimodellamento della cromatina sono necessarie.**

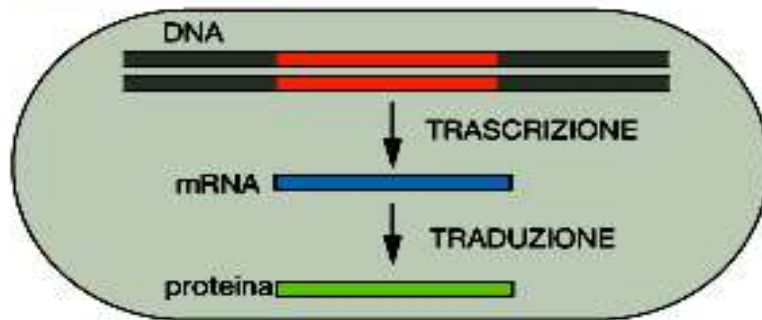
L'RNAm appena sintetizzato nei procarioti è immediatamente Tradotto in proteina nei ribosomi



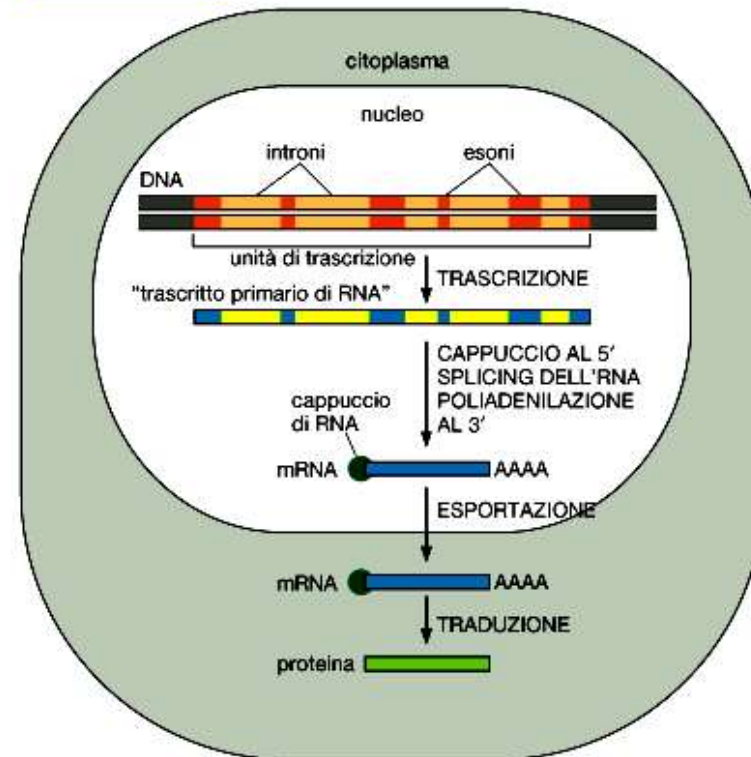
L'RNA eterogeneo nucleare è il prodotto della trascrizione negli eucarioti subisce tre modificazioni prima di diventare RNAm ed essere esportato nel citoplasma

- Le modificazioni al 5' e 3' permettono alla cellula di stabilire se sono presenti entrambe le estremità di una molecola di RNA (e perciò se il messaggero è intatto) prima di esportare l'RNA dal nucleo per tradurlo in proteina.
- Inoltre la modificazione al 5' consente l'interazione con il ribosoma per la traduzione dell'RNAm
- Lo splicing dell'RNA fornisce agli eucarioti superiori la capacità di sintetizzare parecchie proteine diverse dallo stesso gene.

(B) PROCARIOTI



(A) EUCARIOTI



Maturazione dell' RNA eterogeneo nucleare

Cap. 5'

1. Cappuccio= 7-metil guanosina

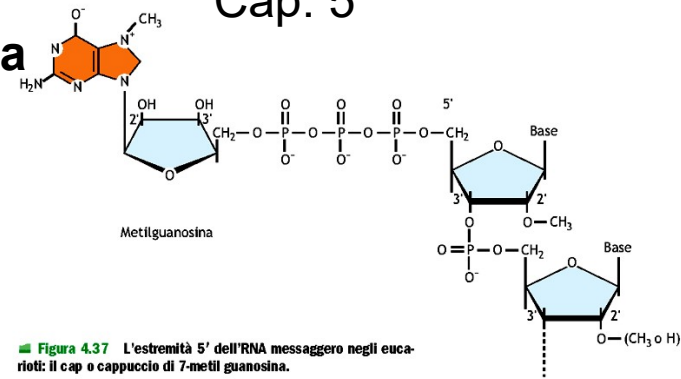


Figura 4.37 L'estremità 5' dell'RNA messaggero negli eucarioti: il cap o cappuccio di 7-metil guanosina.

2. Splicing: rimozione degli introni

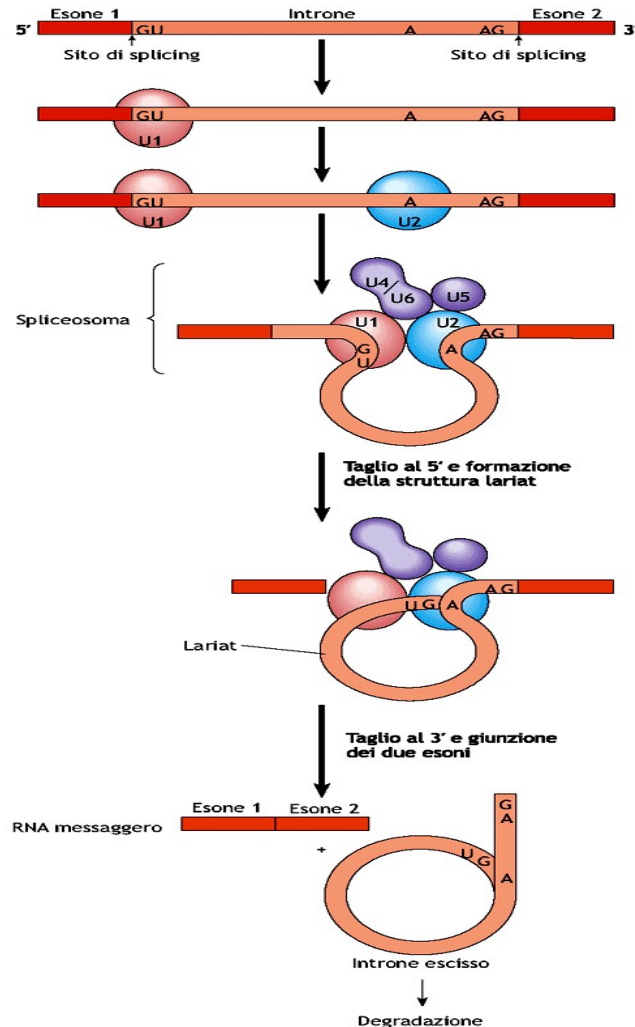
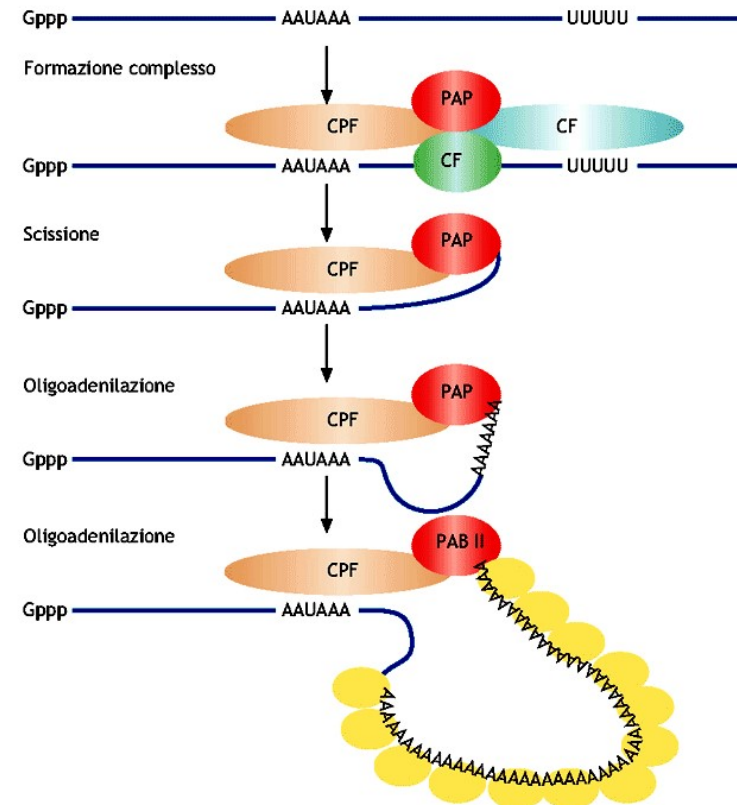


Figura 4.39 Processo di splicing. Formazione e funzionamento dello spliceosoma.

3. Coda di A: Poliadenilazione 3'



Il codice genetico stabilisce la corrispondenza fra sequenza di nucleotidi nell'RNA e la sequenza di aa nelle proteine

Caratteristiche del codice genetico

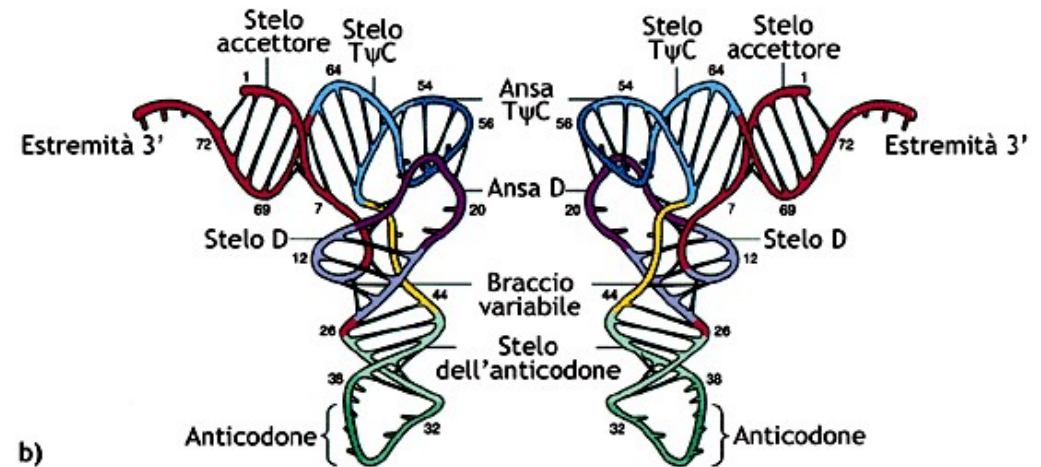
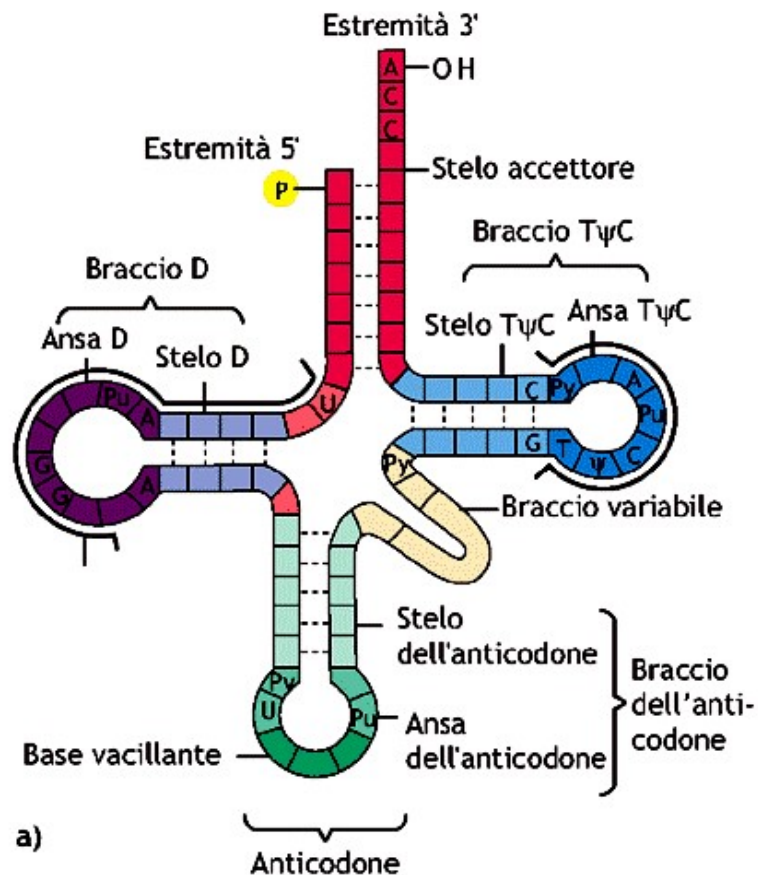
- Triplette
- Continuo
- Degenero
- Universale

AUG = metionina
 UAA = sempre stop
 UAG = stop o pirrolisina
 UGA = stop o selenocisteina

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

■ Figura 4.46 Corrispondenza tra codoni ed amminoacidi.

Apparato di traduzione: tRNA



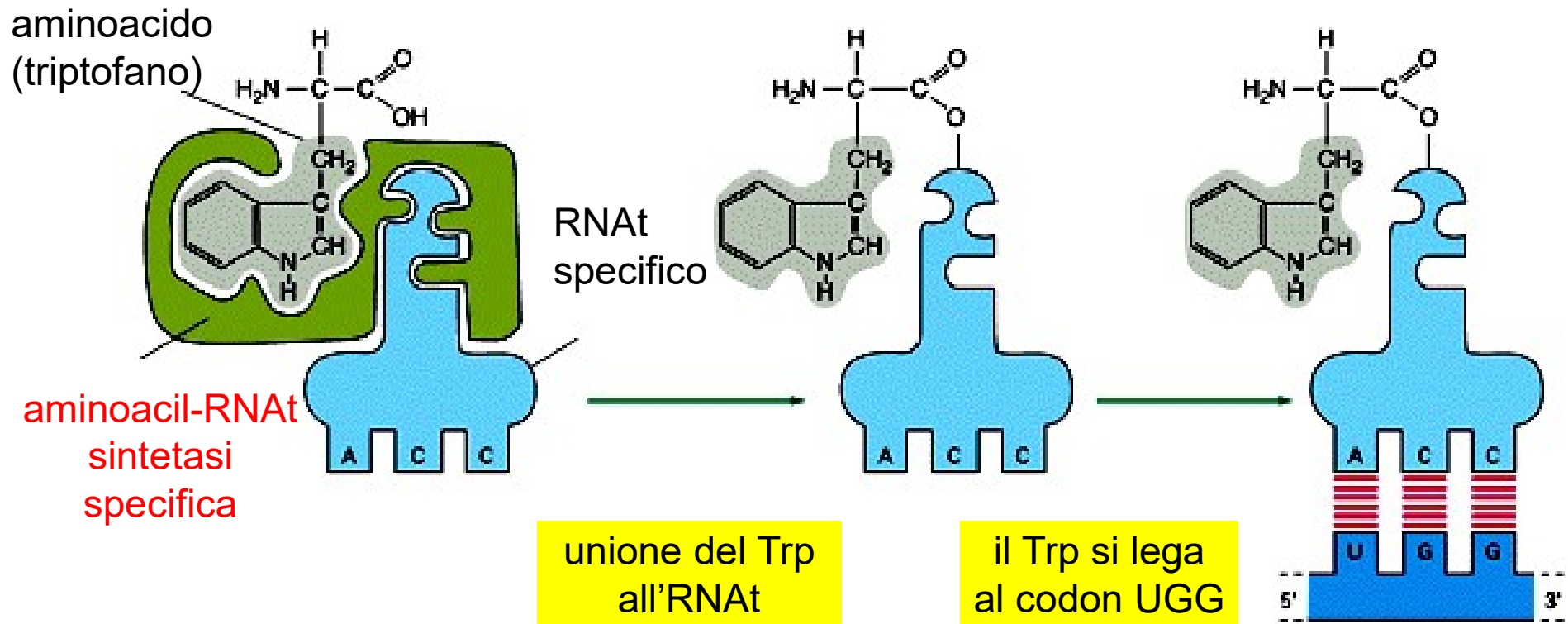
■ **Figura 4.54** (a) Struttura del tRNA detta "a trifoglio". (b) Ricostruzione della struttura tridimensionale di due tRNA.

Ci sono più triplette per un amminocido

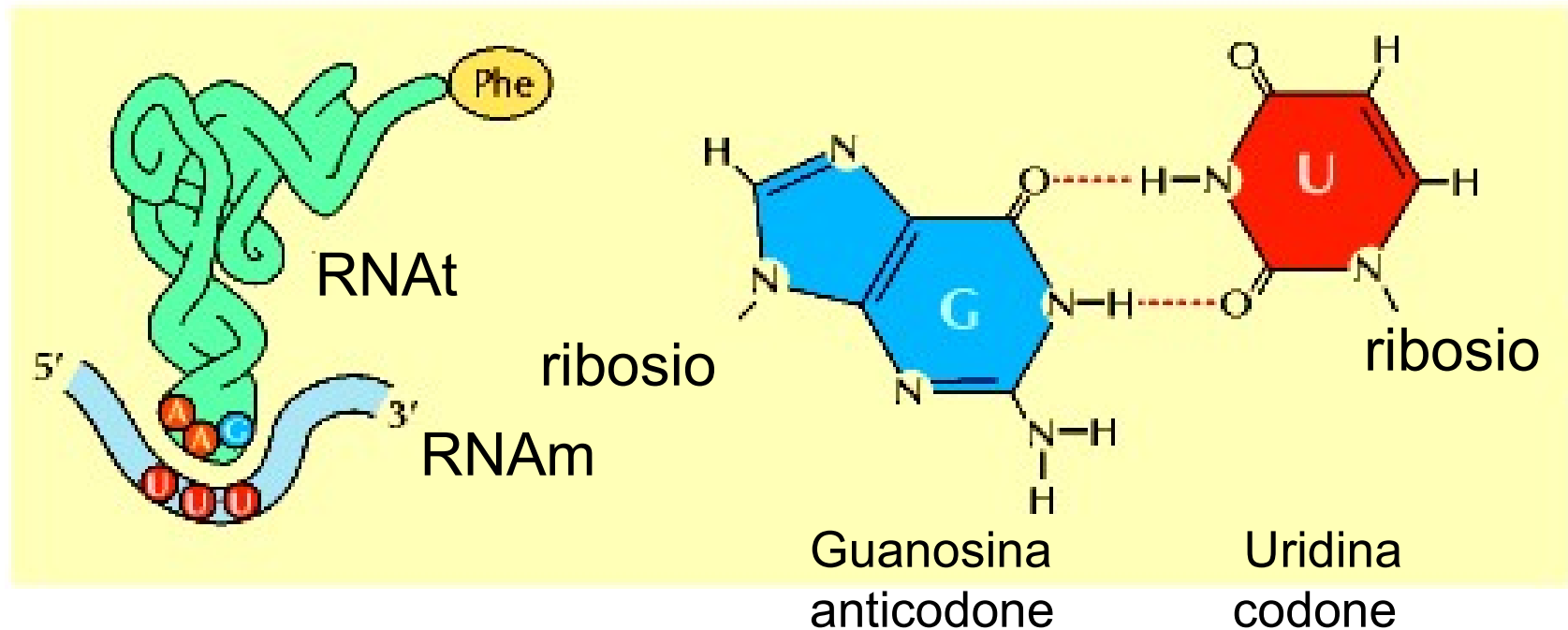
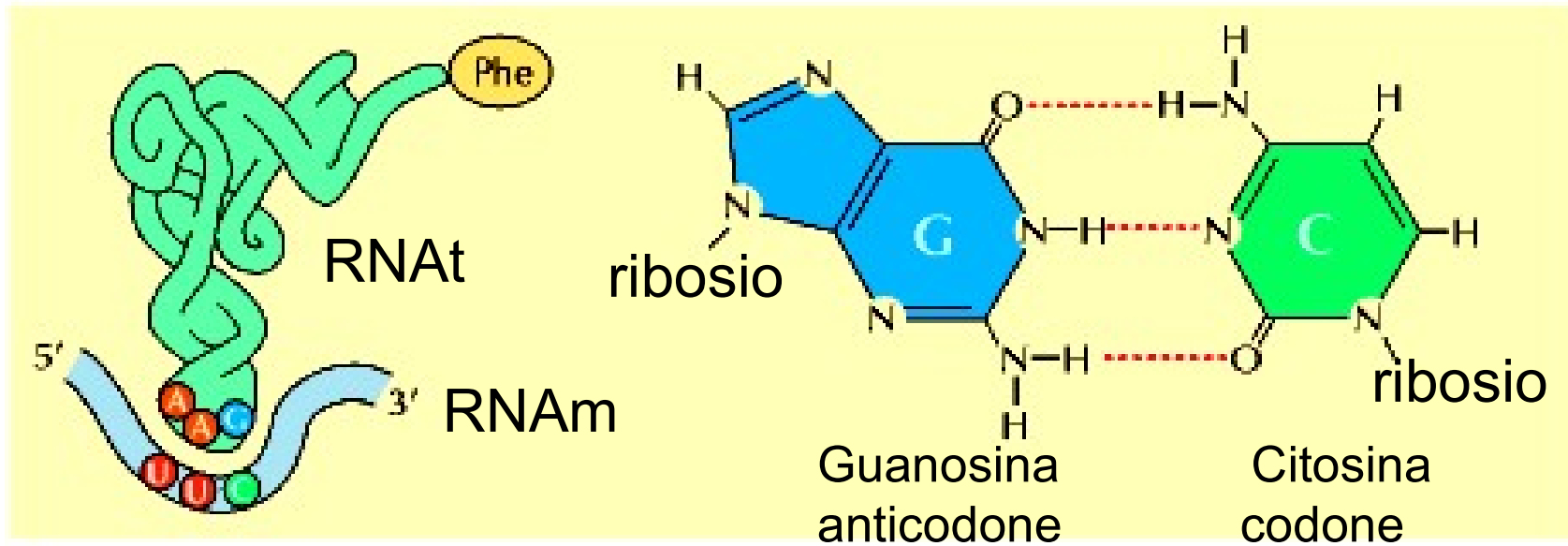
- Più tRNA che legano uno stesso amminoacido ma hanno diversi anticodoni
- Uno specifico tRNA si lega a più codoni

Traduzione nei procarioti

1) Fase ATP dipendente: legame dell'amminoacido al suo tRNA (attivazione dell'amminoacido) ad opera di un enzima.



Appaiamento standard tra codone e anticodone (sopra)
Appaiamento non standard del fenilalanina RNAt (sotto)

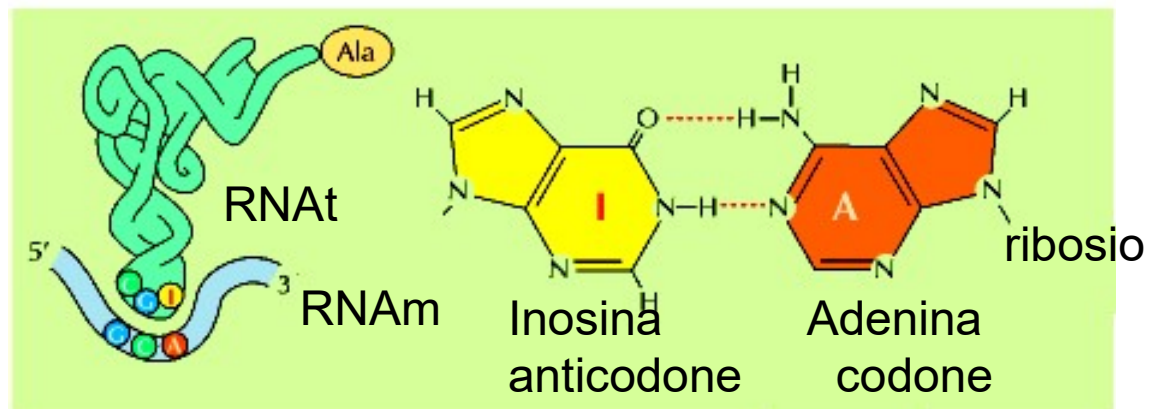
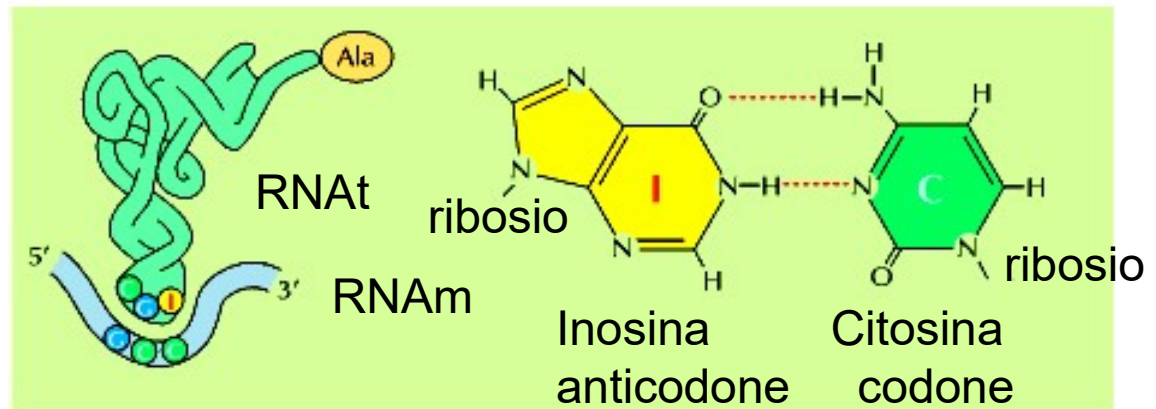


Appaiamento non standard tra codone e anticodone

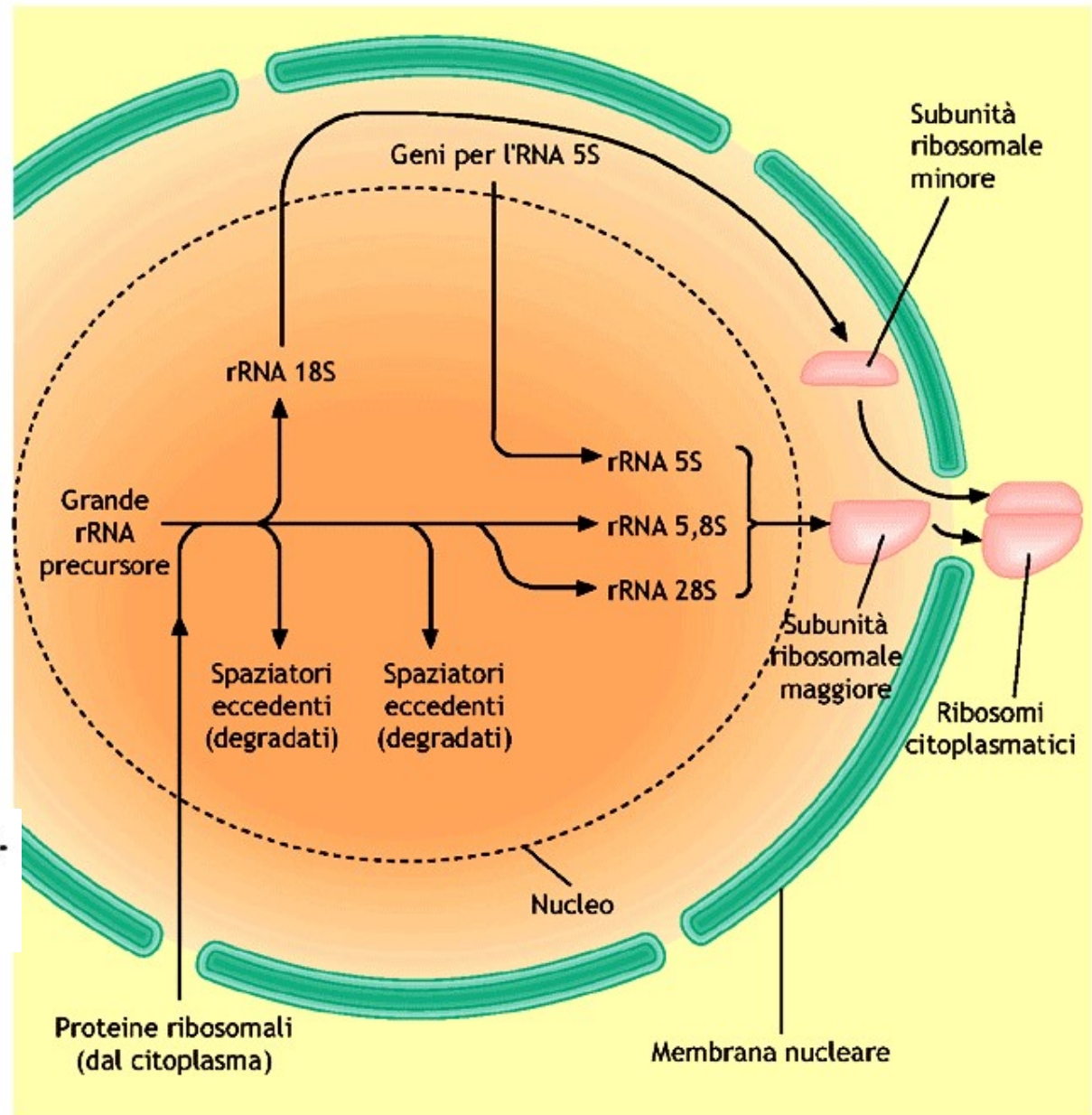
Appaiamento non standard dell'alanina RNAt

Modificazione della guanosina in inosina degli anticodoni di parecchi tRNA durante la maturazione.

L'inosina può appaiarsi con C, U o A nella terza posizione, così che il suo utilizzo nell'anticodone permette ad un singolo tRNA di riconoscere tre diversi codoni negli stampi di mRNA.

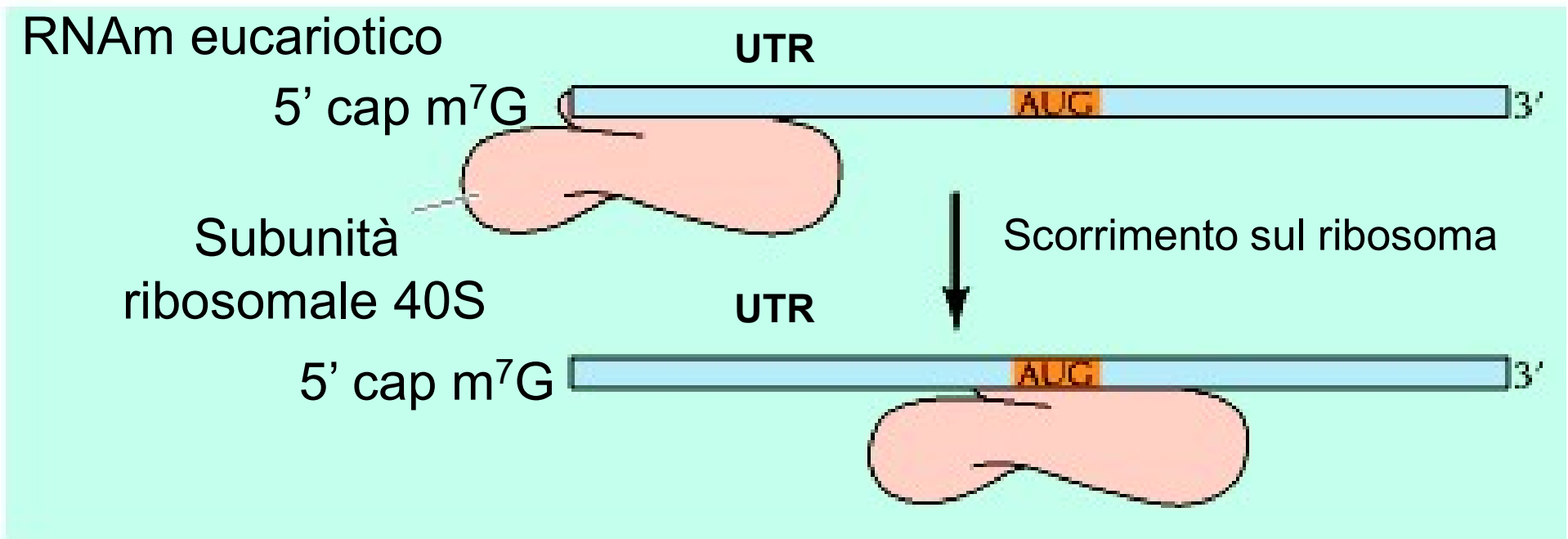
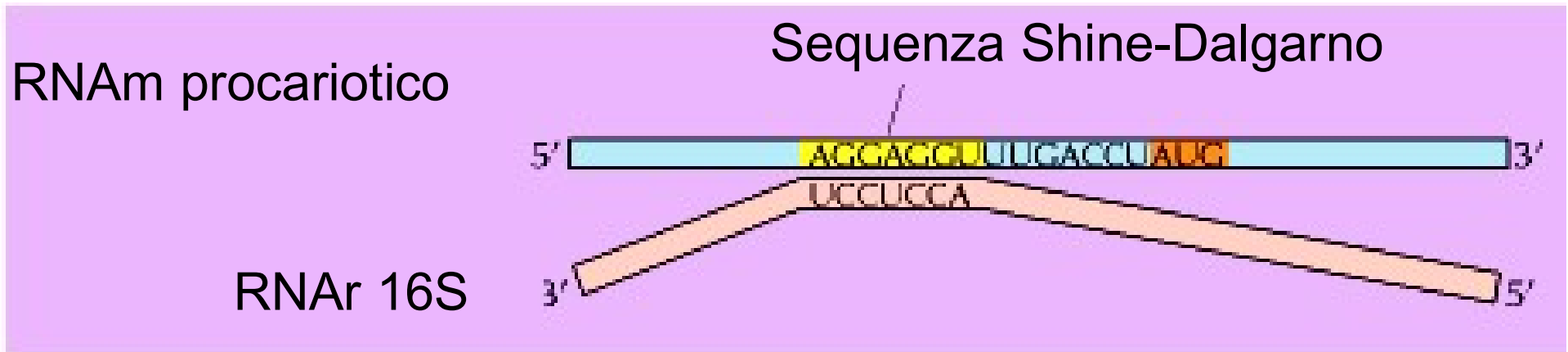


La traduzione negli eucarioti e nei procarioti richiede l'intervento dei ribosomi



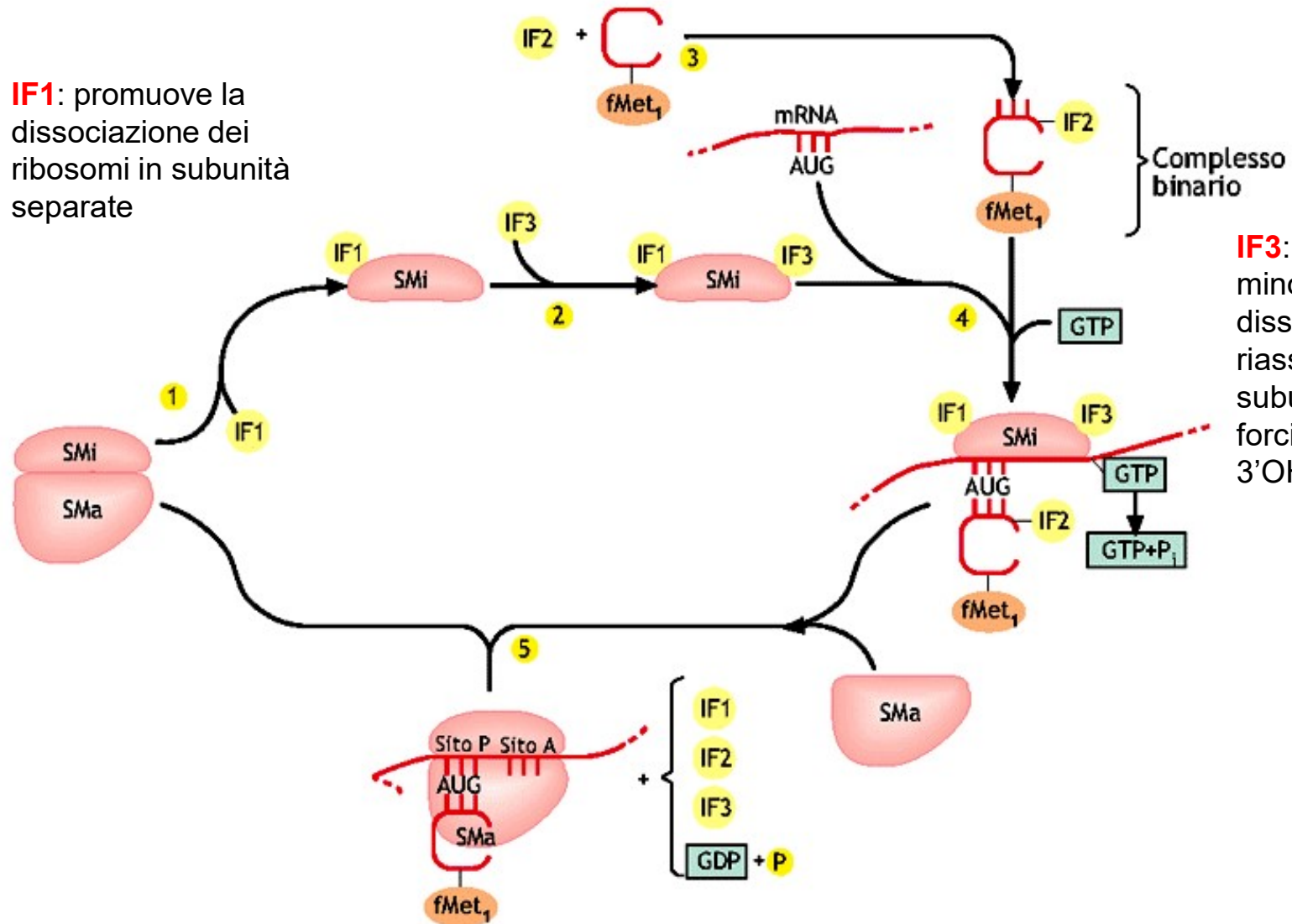
■ **Figura 4.53** Trascrizione e maturazione dell'rRNA.

2= Allineamento dell' RNAm alla subunità minore dei ribosomi



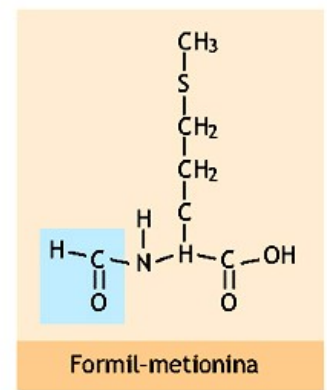
IF1: promuove la dissociazione dei ribosomi in subunità separate

IF2: lega fMet-tRNA e lo porta alla sub minore del ribosoma; idrolizza GTP



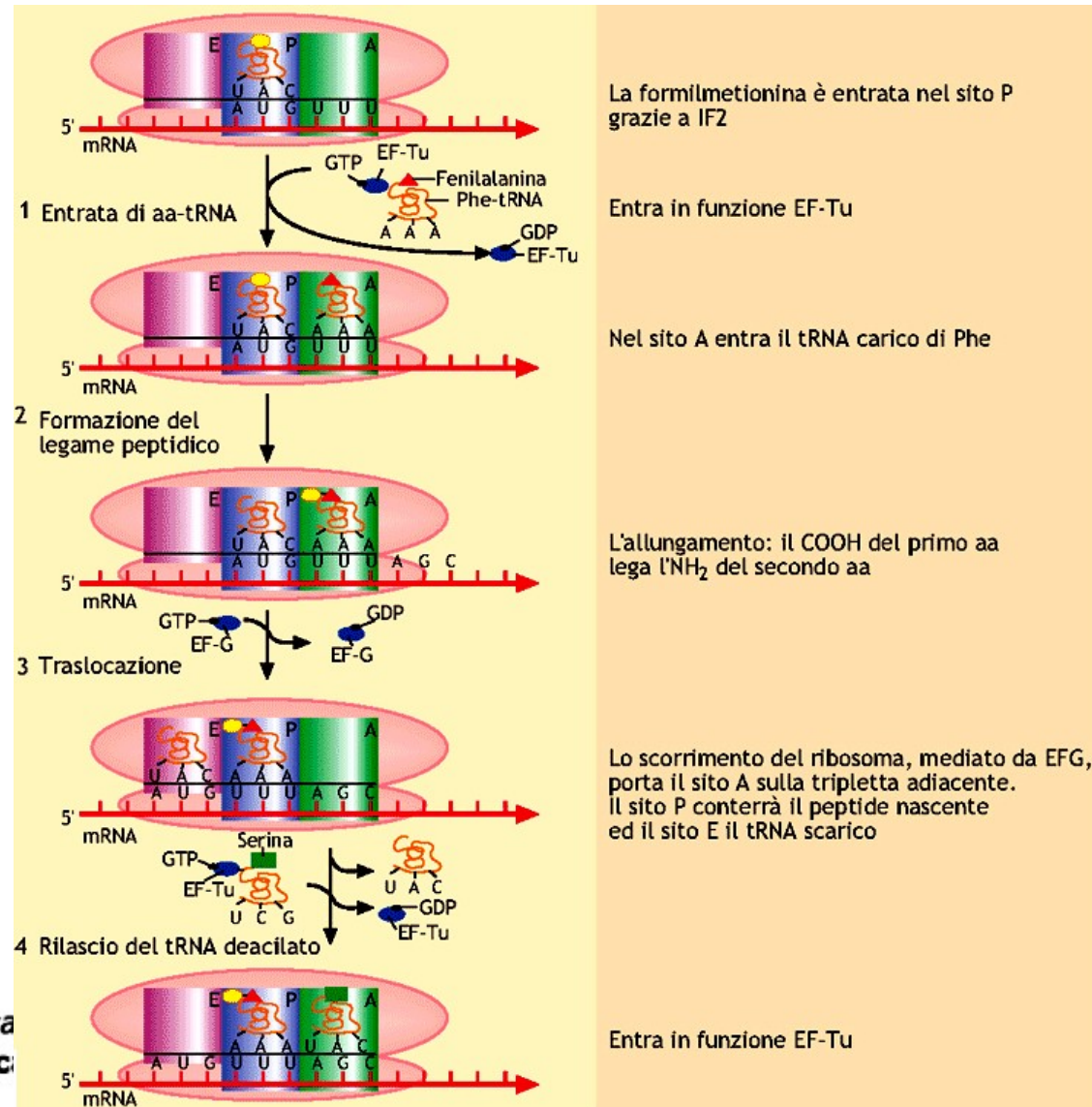
Complesso binario

IF3: stabilizza la sub minore nella forma dissociata; previene la riassociazione delle 2 subunità; denatura la forcina terminale 3'OH dell'rRNA 16S

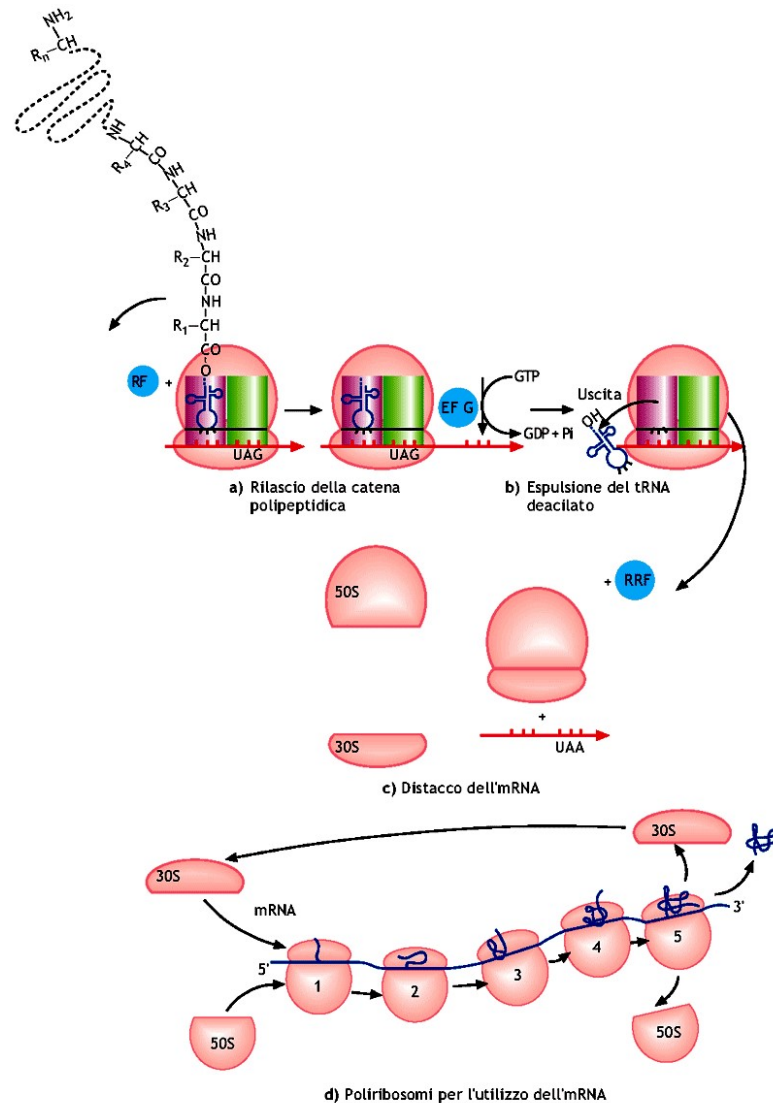


Formula della formilmetionina.

3) Fasi GTP dipendenti: Riconoscimento del primo codone AUG interazione con la subunità maggiore e allungamento



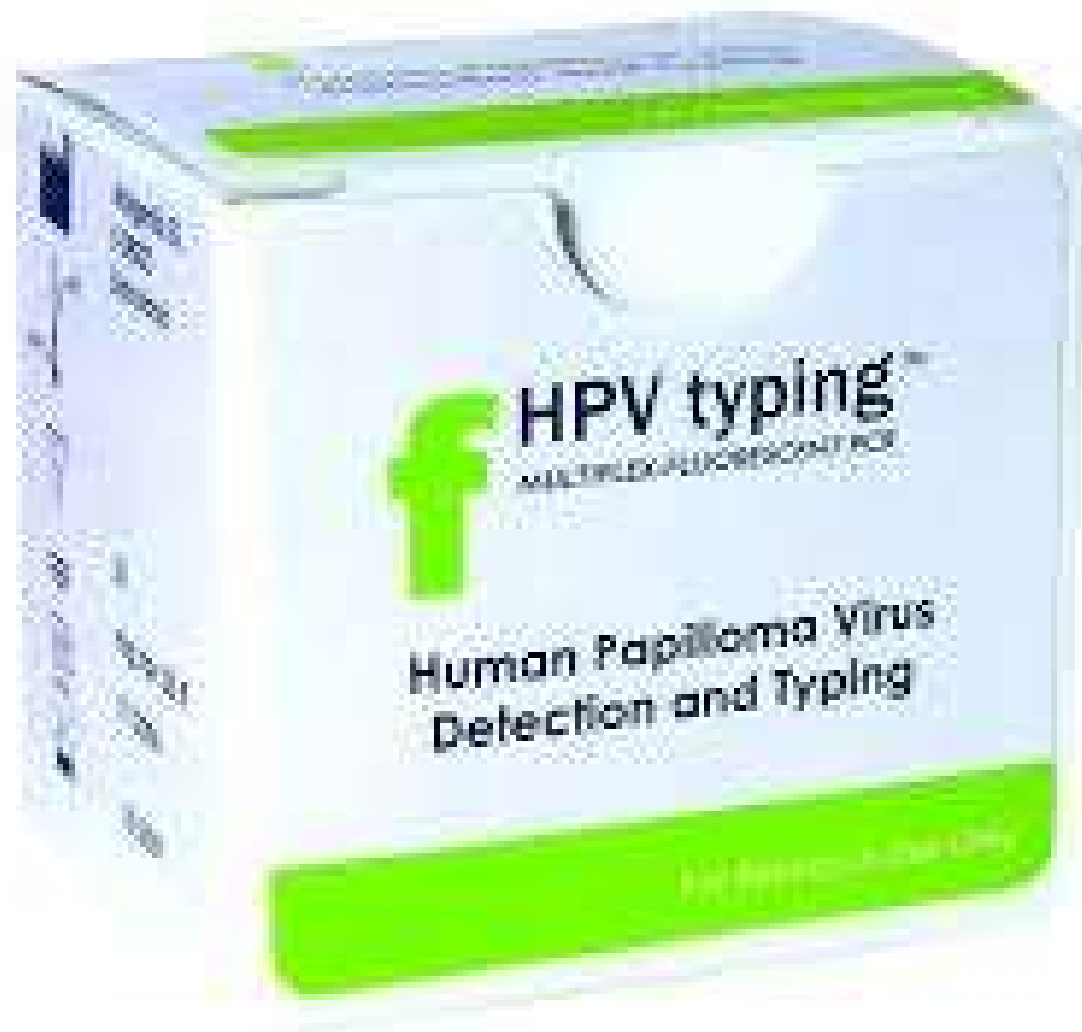
4) Fase GTP dipendente: Termine della traduzione quando nel ribosoma nel sito A arriva un codone di stop. Un fattore proteico rilascerà la proteina dai ribosomi.



■ **Figura 4.65** Fase di termine della sintesi proteica. Il sito E è omissso per semplificare l'immagine.

SUPPLEMENTARI

**Test per identificare sequenze del virus HPV che causa cancro della cervice uterina
(si basa sulla PCR)**

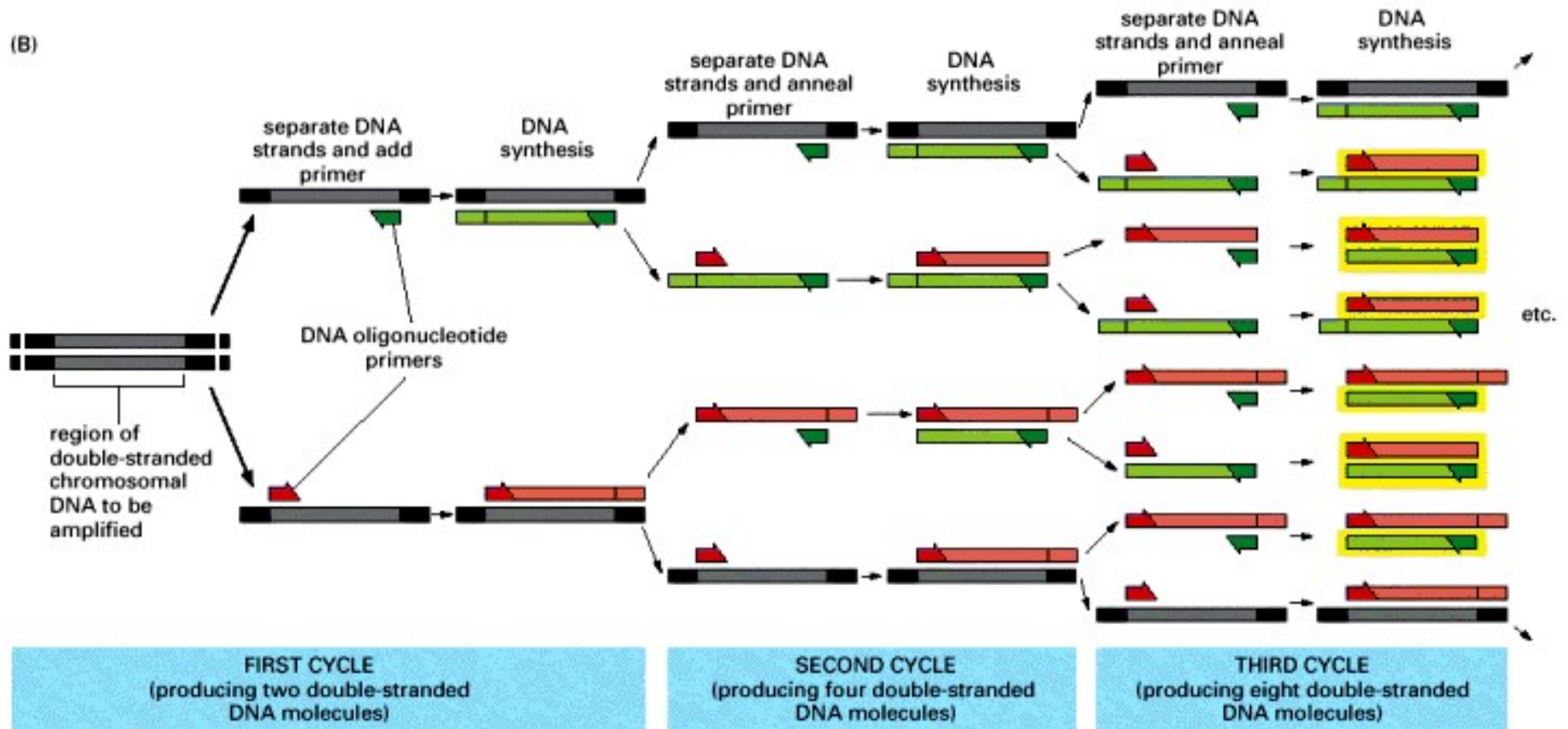
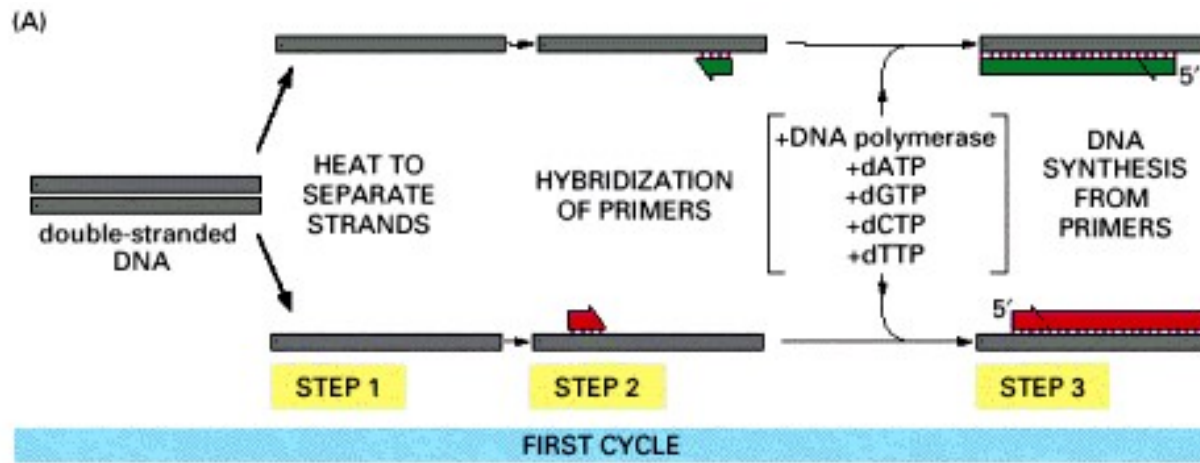


La PCR- polymerase chain reaction



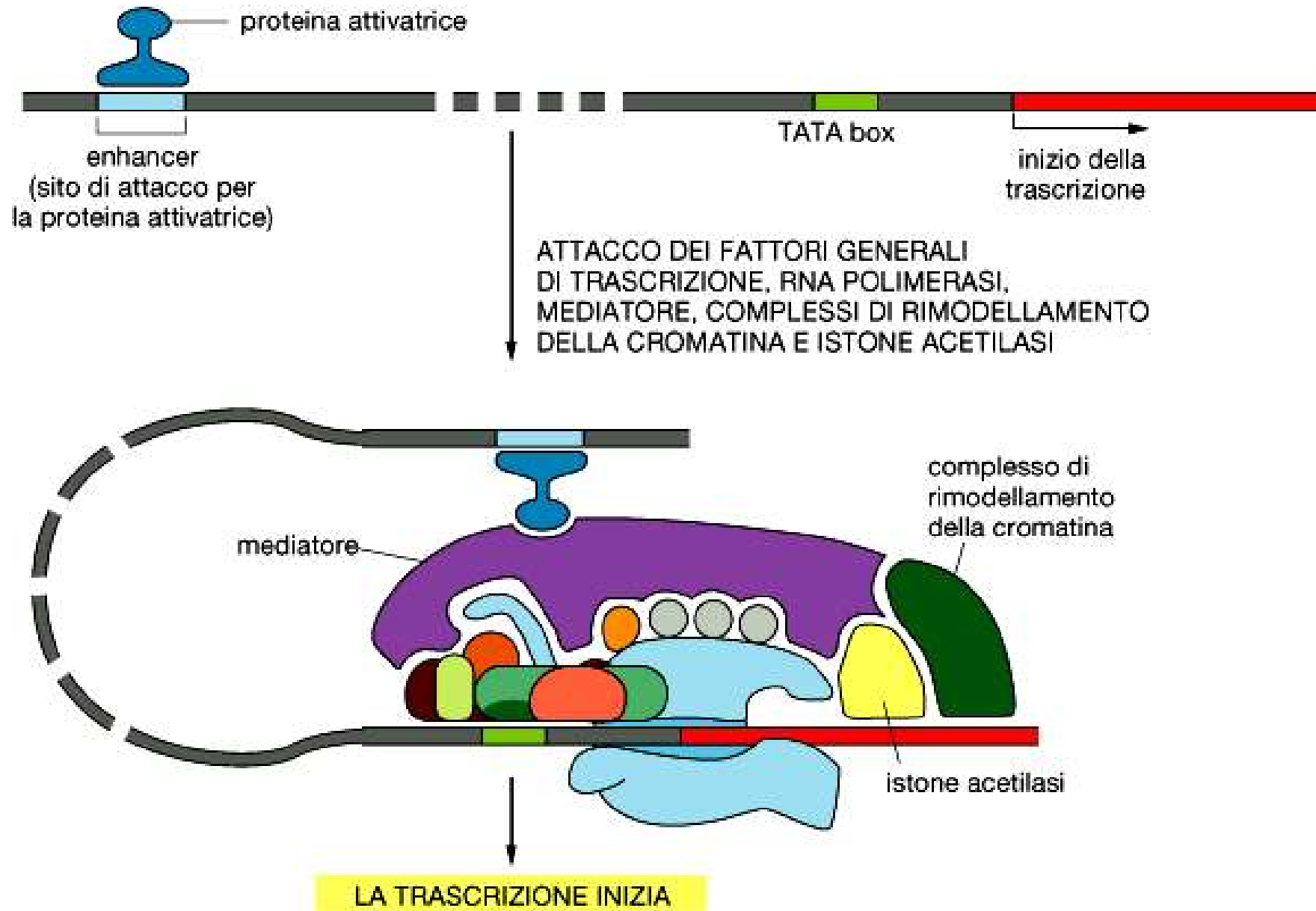
La Taq polimerasi è stata isolata dai batteri termofili

PCR: Polymerase Chain Reaction



Trascrizione del DNA negli eucarioti

La polimerasi II richiede anche proteine attivatrici, mediatrici e di modificazione della cromatina



Le cause principali del cancro sono da ricercarsi in fattori ambientali e stili di vita (dieta, fumo, attività fisica)

Gli studi epidemiologici hanno permesso di identificare diversi fattori ambientali che possono favorire il cancro: il fumo è una causa accertata di cancro ai polmoni.

Diversi agenti di natura chimica, fisica e biologica sono carcinogeni

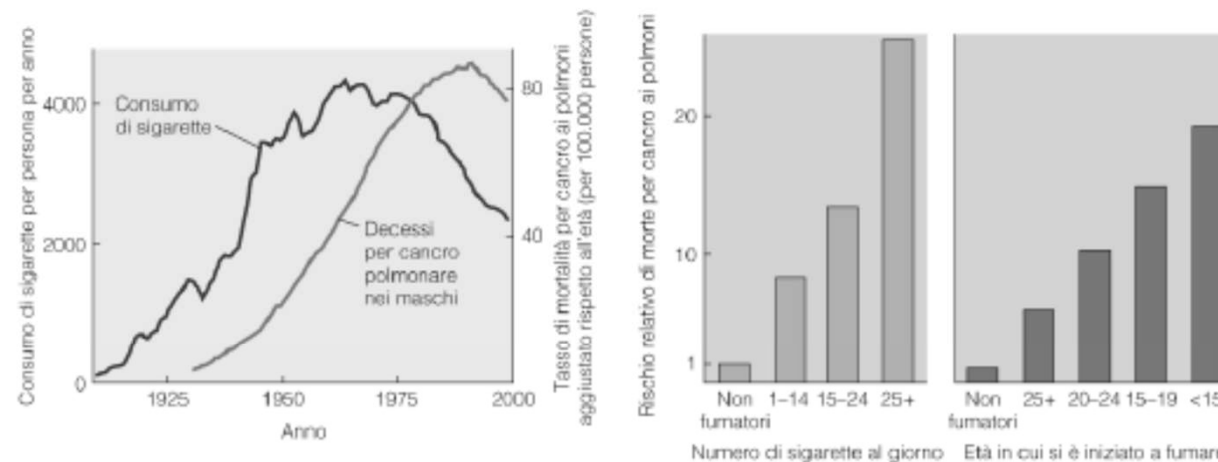


Figura 24-7 **Fumo di sigarette e cancro ai polmoni.** Il grafico sulla sinistra mostra che un aumento del consumo di sigarette negli Stati Uniti durante la prima metà del XX secolo è stato seguito da un incremento esplosivo delle morti causate dal cancro ai polmoni. È trascorso un periodo di tempo

di 25 anni tra l'aumento del tasso di consumo di sigarette ed il successivo incremento dei decessi per cancro, che corrisponde al tipico lasso di tempo richiesto per lo sviluppo della maggior parte dei cancri umani in seguito all'esposizione ad un agente cancerogeno. Gli istogrammi sulla

destra mostrano che le frequenze di cancro ai polmoni aumentano in funzione del numero di sigarette fumate al giorno, e che coloro che fumano da molto tempo sviluppano il cancro ai polmoni più frequentemente di coloro che fumano da poco tempo.



***“microRNAs in the
Genesis
of Human Cancers”
Carlo M. Croce, M.D***

La mancata espressione di un miRNA può portare a stati patologici attraverso la disregolazione dei livelli fisiologici di una certa proteina

Un approccio terapeutico quindi è quello di somministrare il microRNA assente

Rimozione dei primers: Dopo aver svolto la loro funzione gli inneschi vengono rimossi da parte della DNA polimerasi I che ha attività esonucleasica 5'-3' e i "gap" (spazi) lasciati dalle rimozioni vengono riempiti dalla stessa polimerasi.

