

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

Il dogma centrale della Biologia

Duplicazione

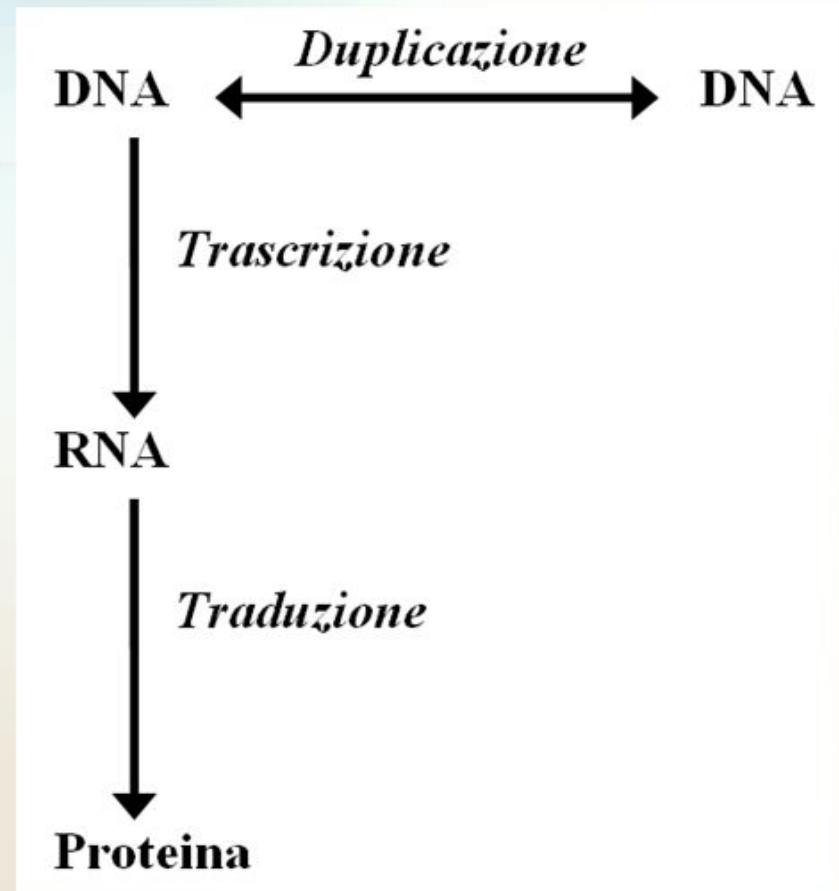
Porta alla formazione di nuove molecole di DNA e al trasferimento di materiale genetico.

Trascrizione

L'informazione contenuta nel DNA passa alle molecole di RNA.

Traduzione

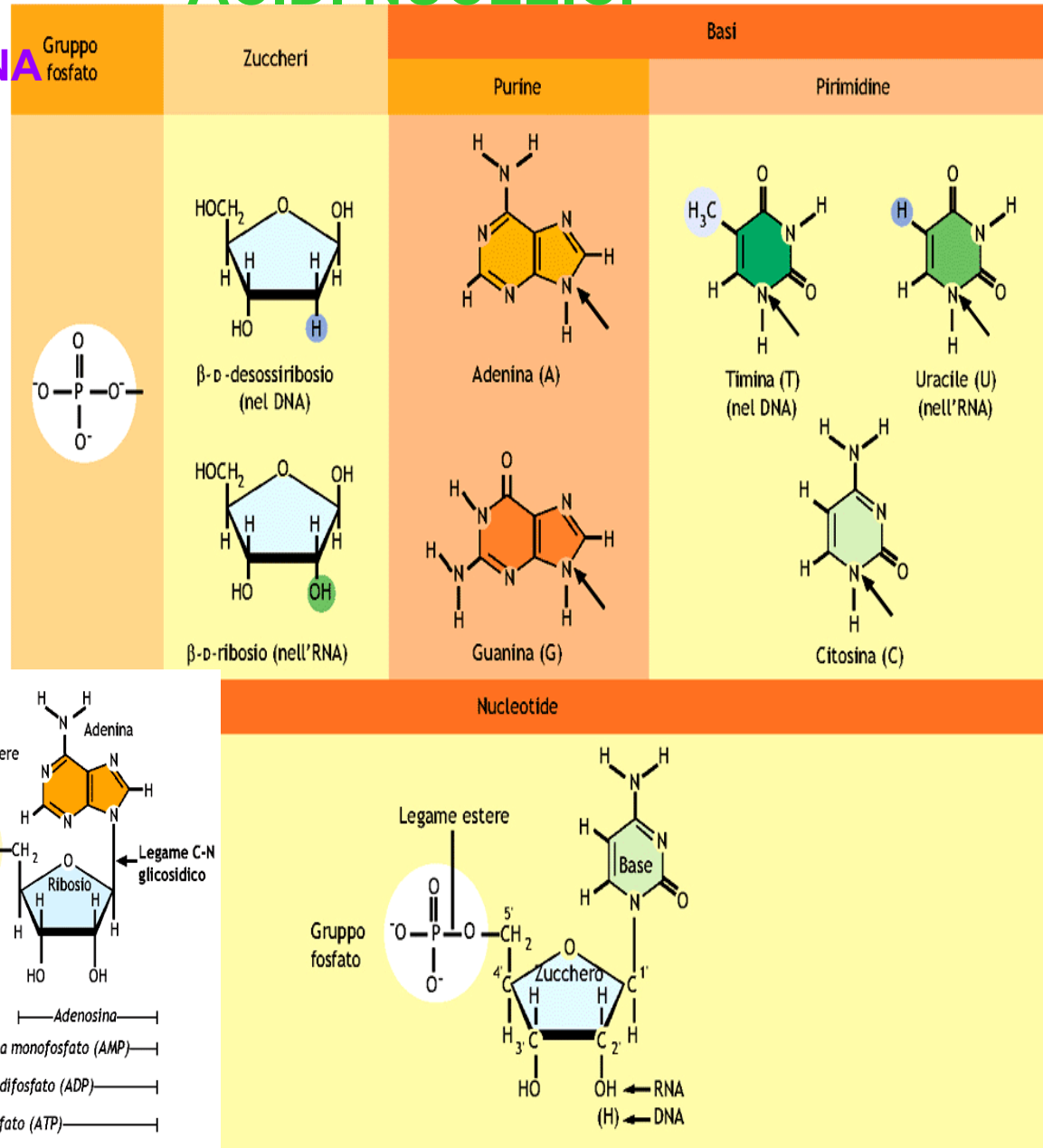
Processo finale in cui dall'RNA si arriva alla sintesi delle proteine.



ACIDI NUCLEICI

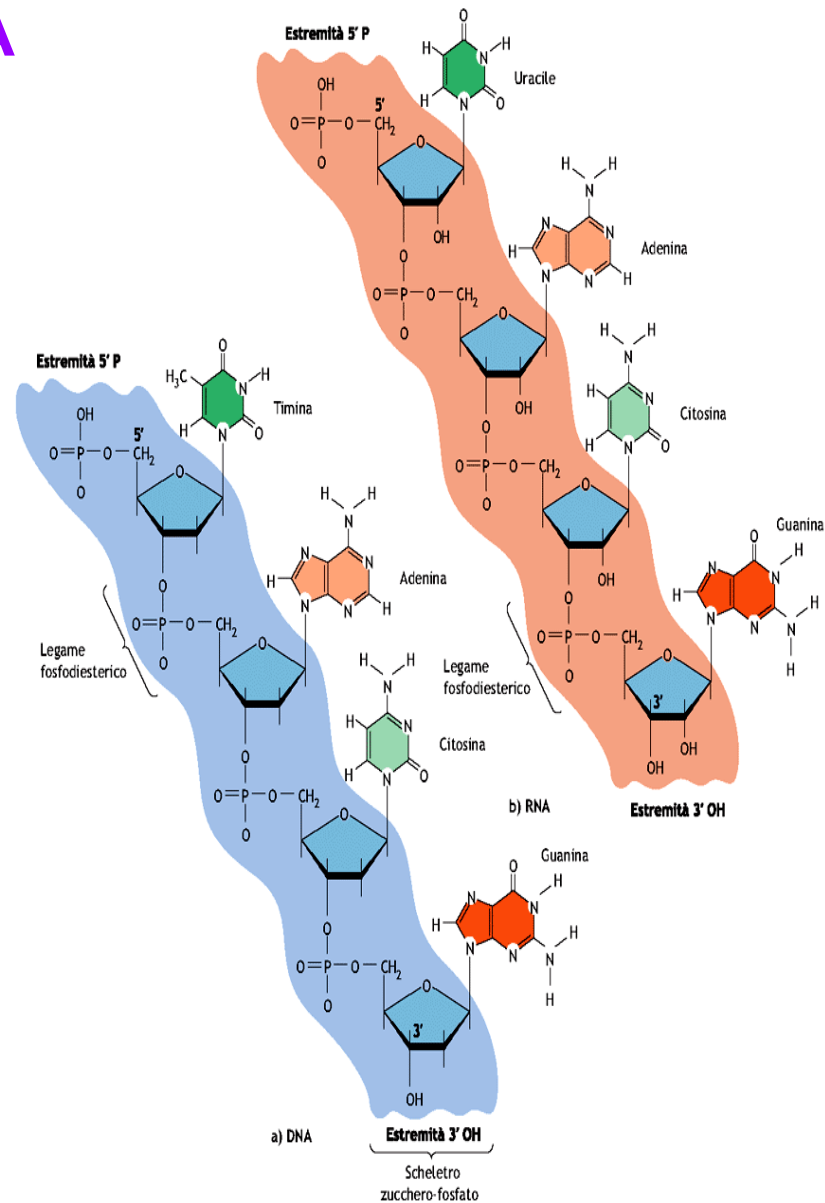
DNA ed RNA

DNA ed RNA sono polimeri di **nucleotidi** che sono costituiti da **basi puriniche e pirimidiniche** legate a **zuccheri fosforilati**.



ACIDI NUCLEICI

DNA ed RNA



■ **Figura 1.50** Costruzione di una singola elica. Gli acidi nucleici sono costituiti da catene lineari di nucleotidi uniti fra loro grazie ad un ponte fosfodiesterico che si instaura tra l'estremità 3'OH del primo nucleotide e l'estremità 5'P del secondo. Un polinucleotide così costituito ha, per convenzione, una polarità 5'P → 3'OH. Sia nel DNA che nell'RNA, lo scheletro è rappresentato dal regolare alternarsi di molecole di zucchero e di acido fosforico, da cui sporgono le basi azotate.

DNA

ACIDI NUCLEICI

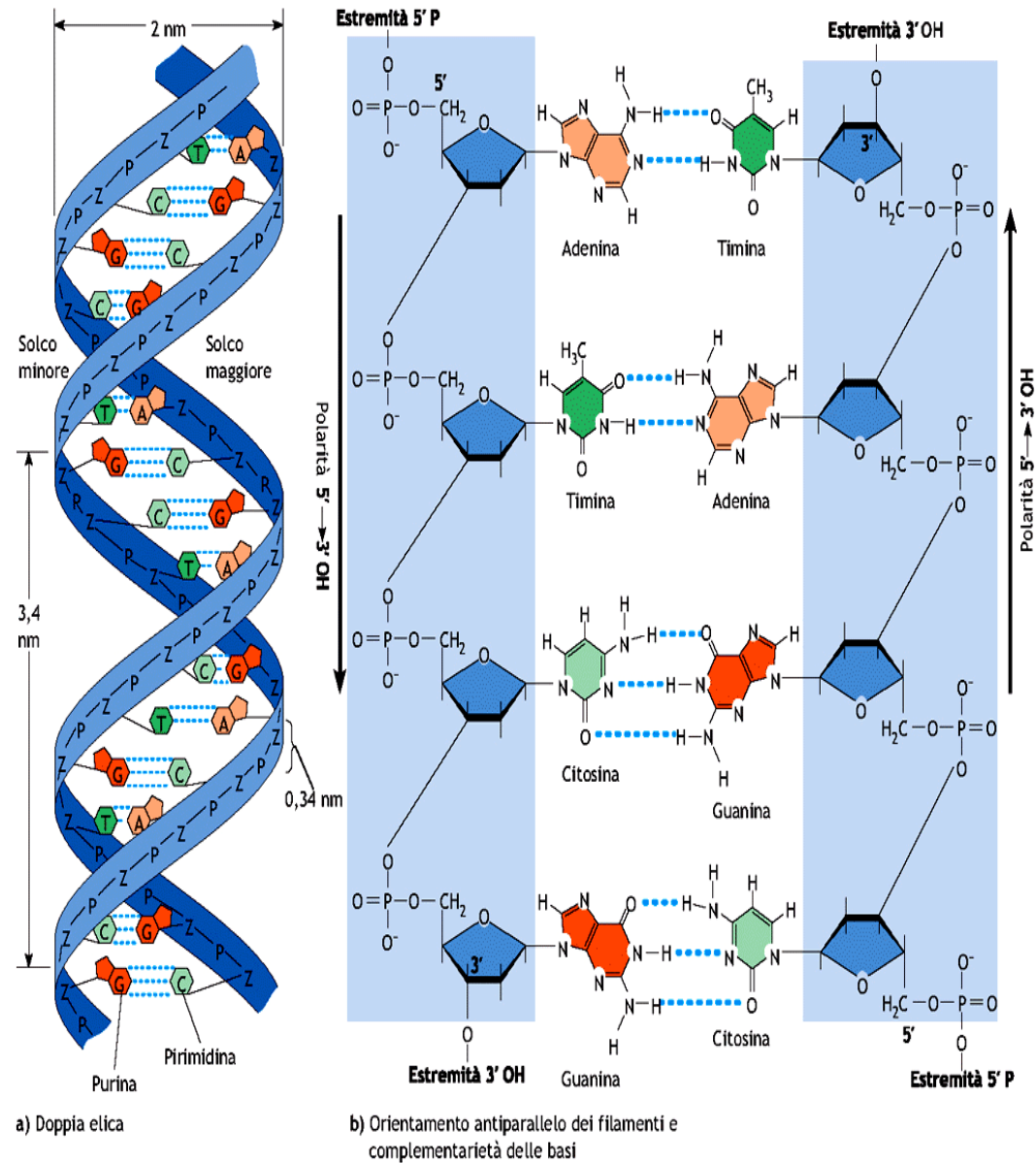
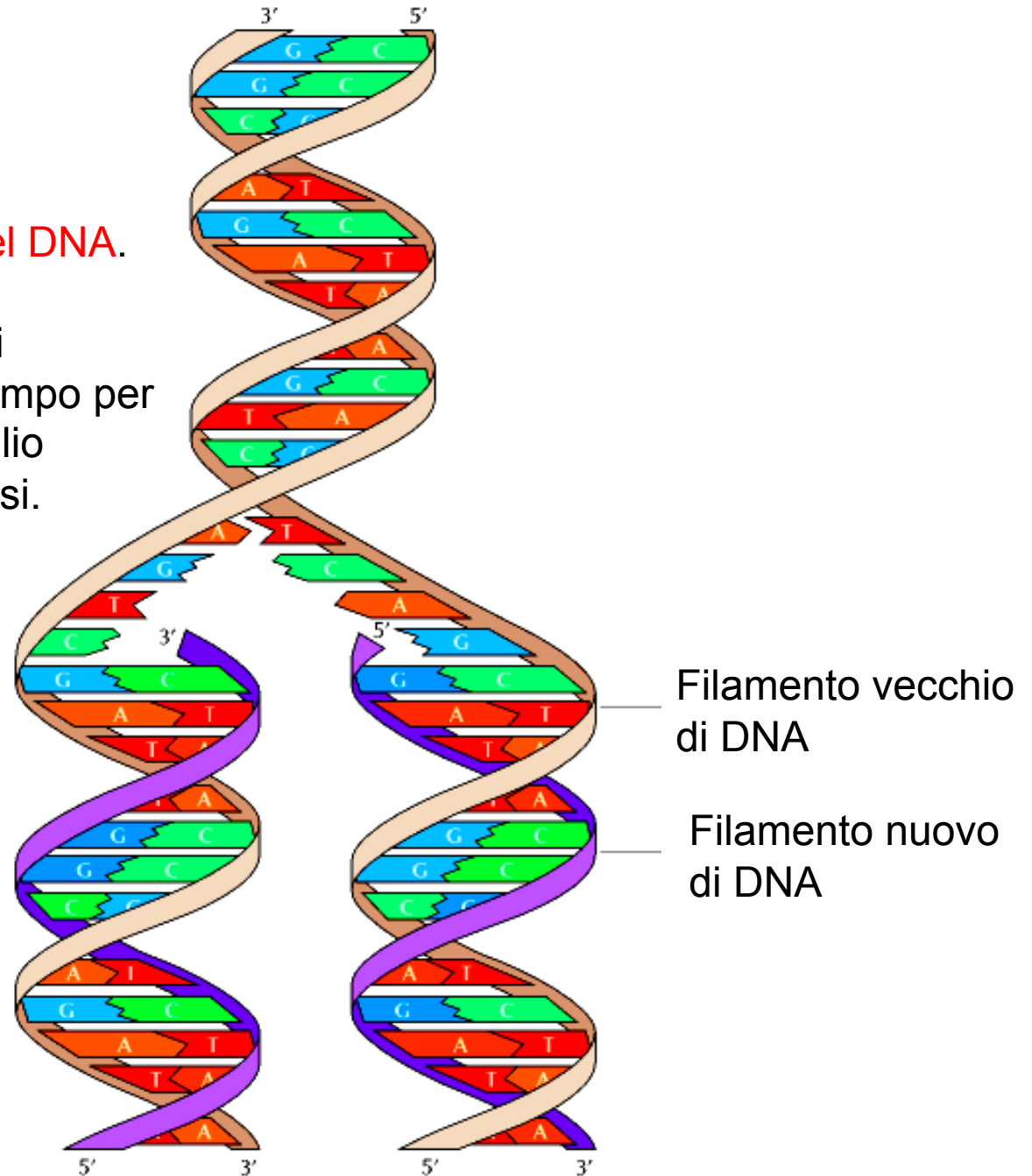


Figura 1.51 Le due eliche del DNA sono complementari e antiparallele. I legami idrogeno che si instaurano fra le basi complementari sono indicati dalle linee tratteggiate in blu. Gli accoppiamenti canonici nel DNA prevedono le coppie A=T e C=G. Nei tratti a doppia elica dell'RNA, la coppia A=T è sostituita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

Replicazione del DNA

Replicazione semiconservativa del DNA.

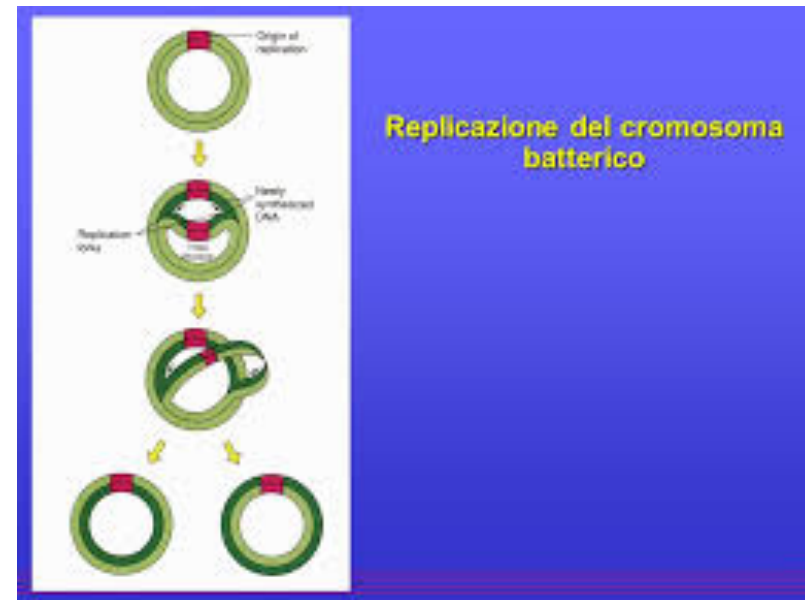
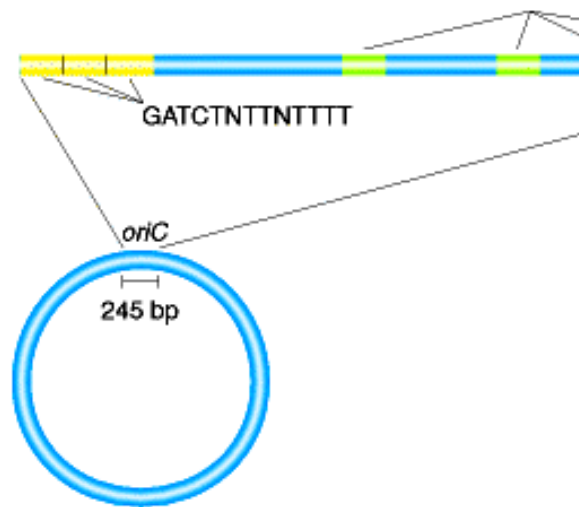
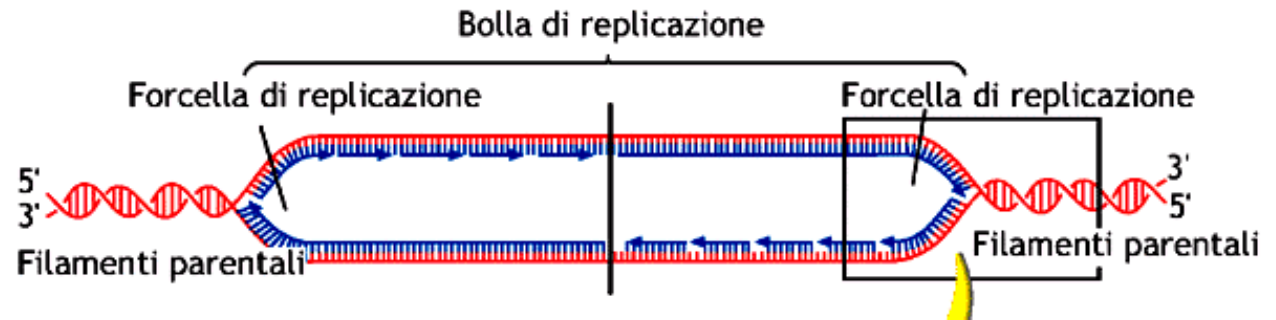
I due filamenti di DNA parentale si separano e ciascuno serve da stampo per la sintesi di un nuovo filamento figlio mediante accoppiamento delle basi.



Replicazione del DNA

Nei Procarioti

1. Inizio della replicazione in *oriC* riconosciuta dalla proteina **DnaA**. L'interazione richiama l'**elicasi** in un sito adiacente ricco di AT: **apertura della doppia elica**.



Replicazione del DNA

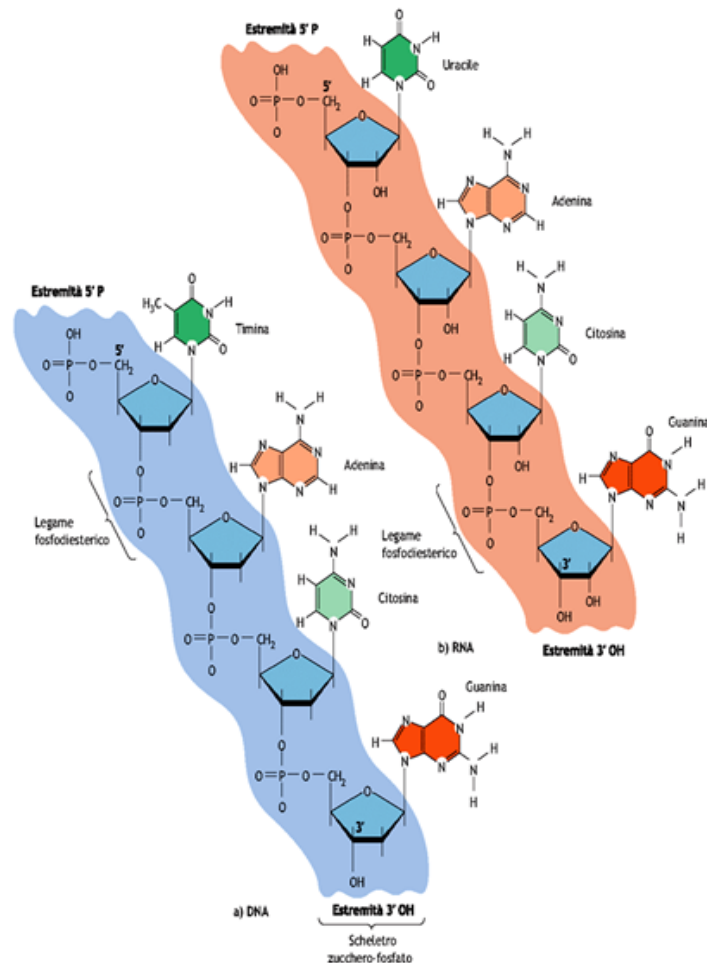
Caratteristiche generali

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

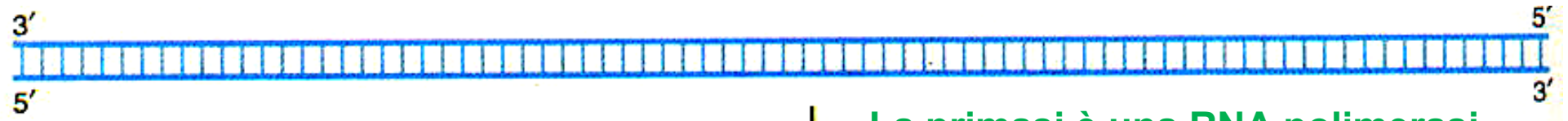
Caratteristiche generali



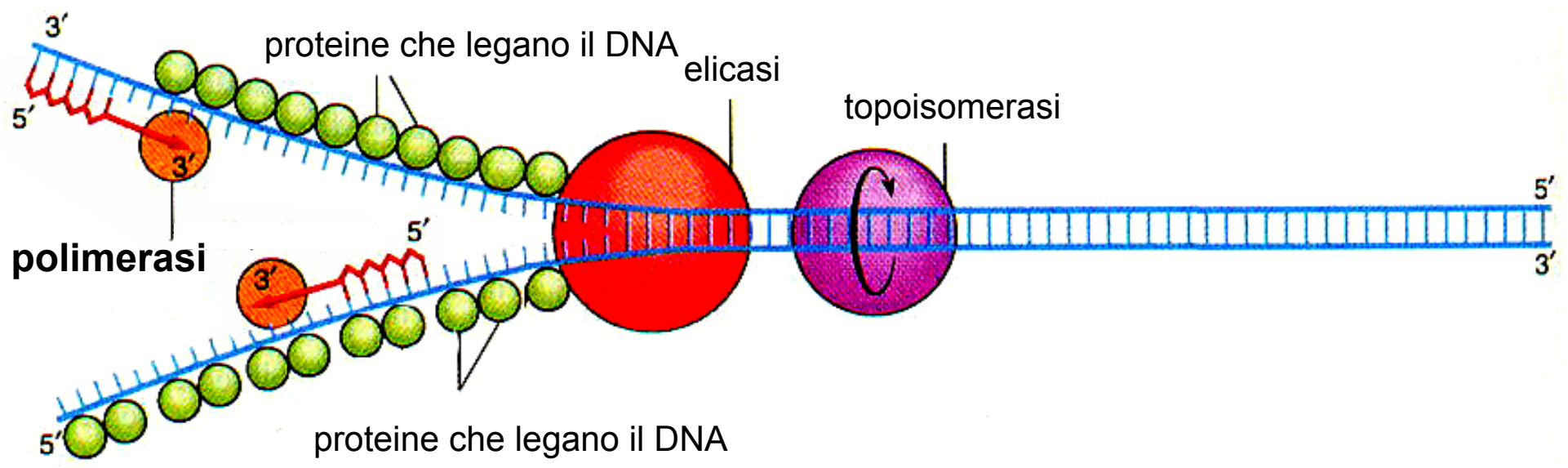
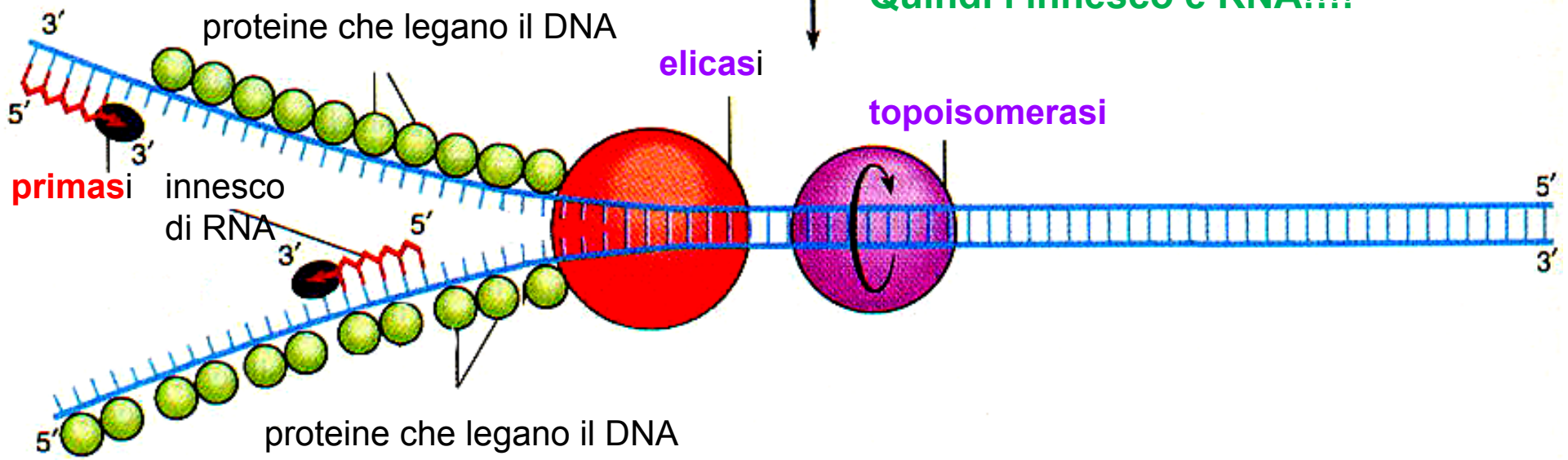
■ **Figura 1.50** Costruzione di una singola elica. Gli acidi nucleici sono costituiti da catene lineari di nucleotidi uniti fra loro grazie ad un ponte fosfodiesterico che si instaura tra l'estremità 3' OH del primo nucleotide e l'estremità 5' P del secondo. Un polinucleotide così costituito ha, per convenzione, una polarità 5' P → 3' OH. Sia nel DNA che nell'RNA, lo scheletro è rappresentato dal regolare alternarsi di molecole di zucchero e di acido fosforico, da cui sporgono le basi azotate.

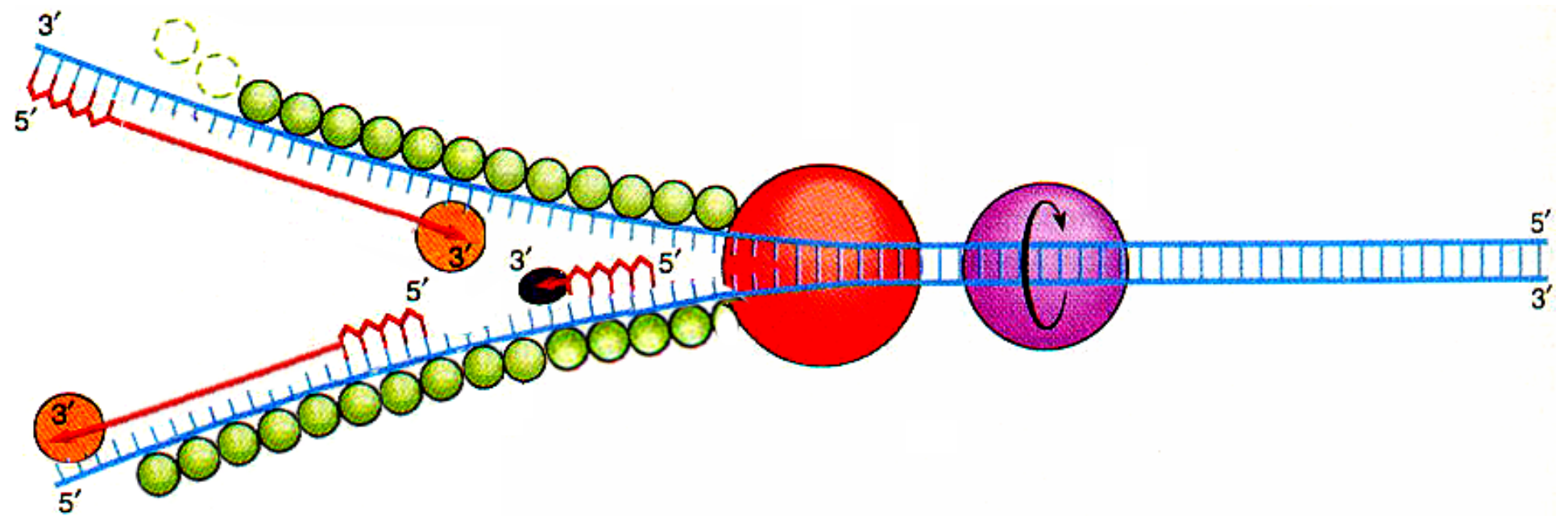
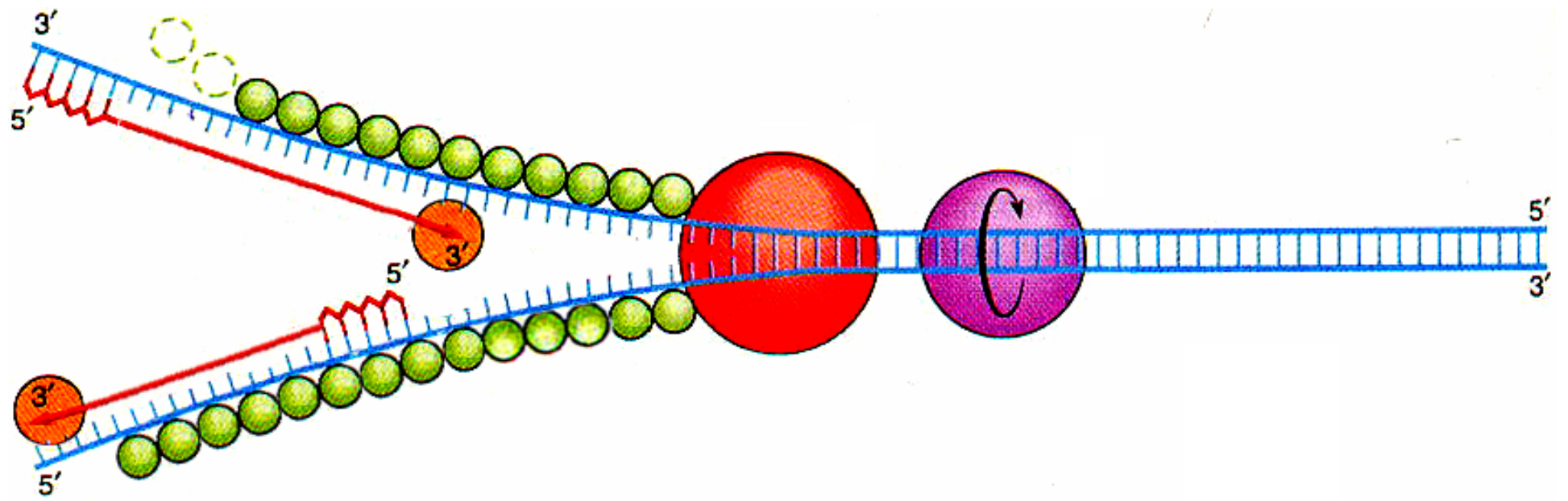
Tutte le DNA polimerasi note hanno due proprietà fondamentali in comune che hanno implicazioni fondamentali per la replicazione del DNA:

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 primasi è una RNA polimerasi
Quindi l'innescò è RNA!!!!





2. Sintesi del primer

Replicazione del DNA

La DNA primasi

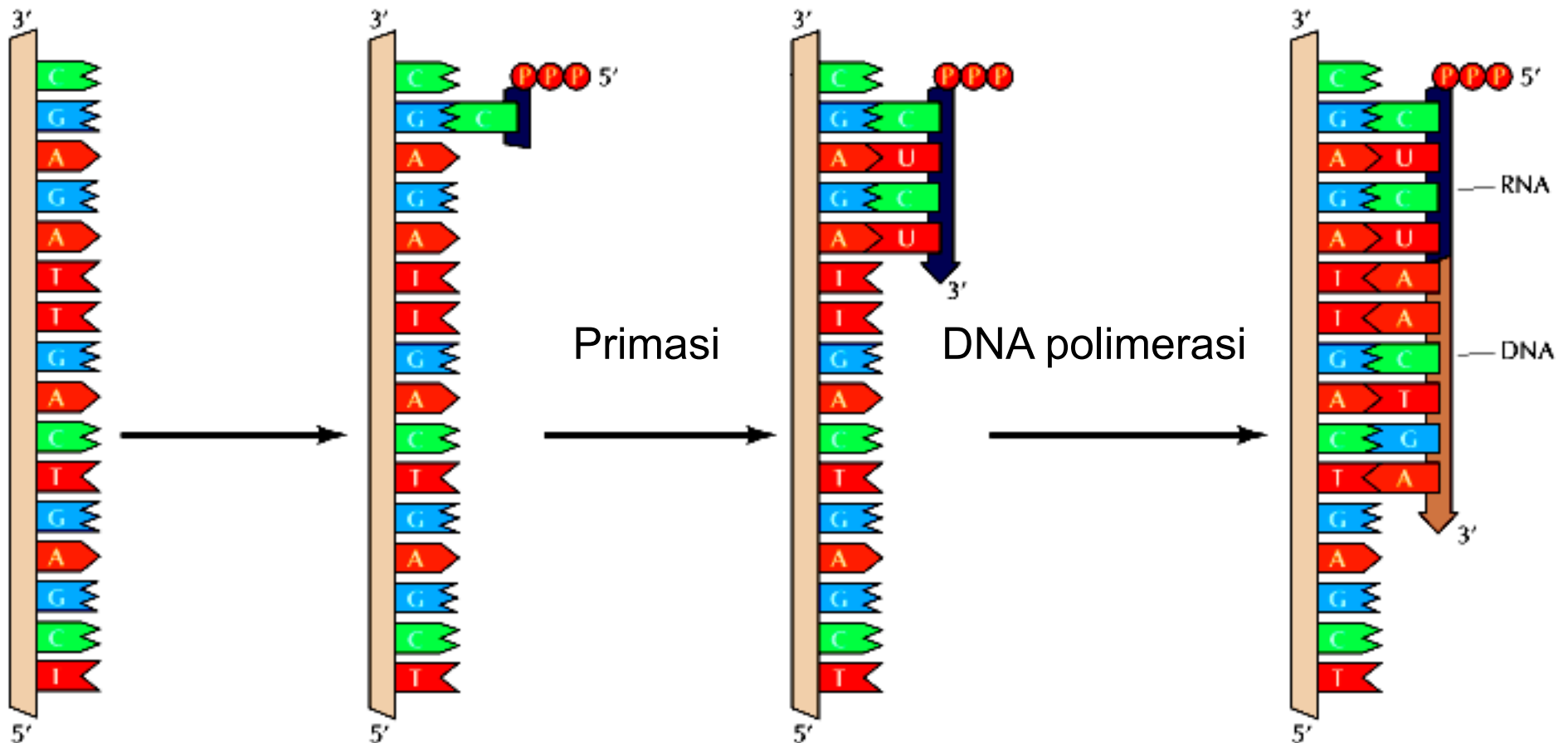
Quando il DNA si srotola, **la DNA primasi sintetizza un breve innesco di RNA** composto da circa **5-10 nucleotidi**

Stampo di DNA

Inizio della sintesi di RNA

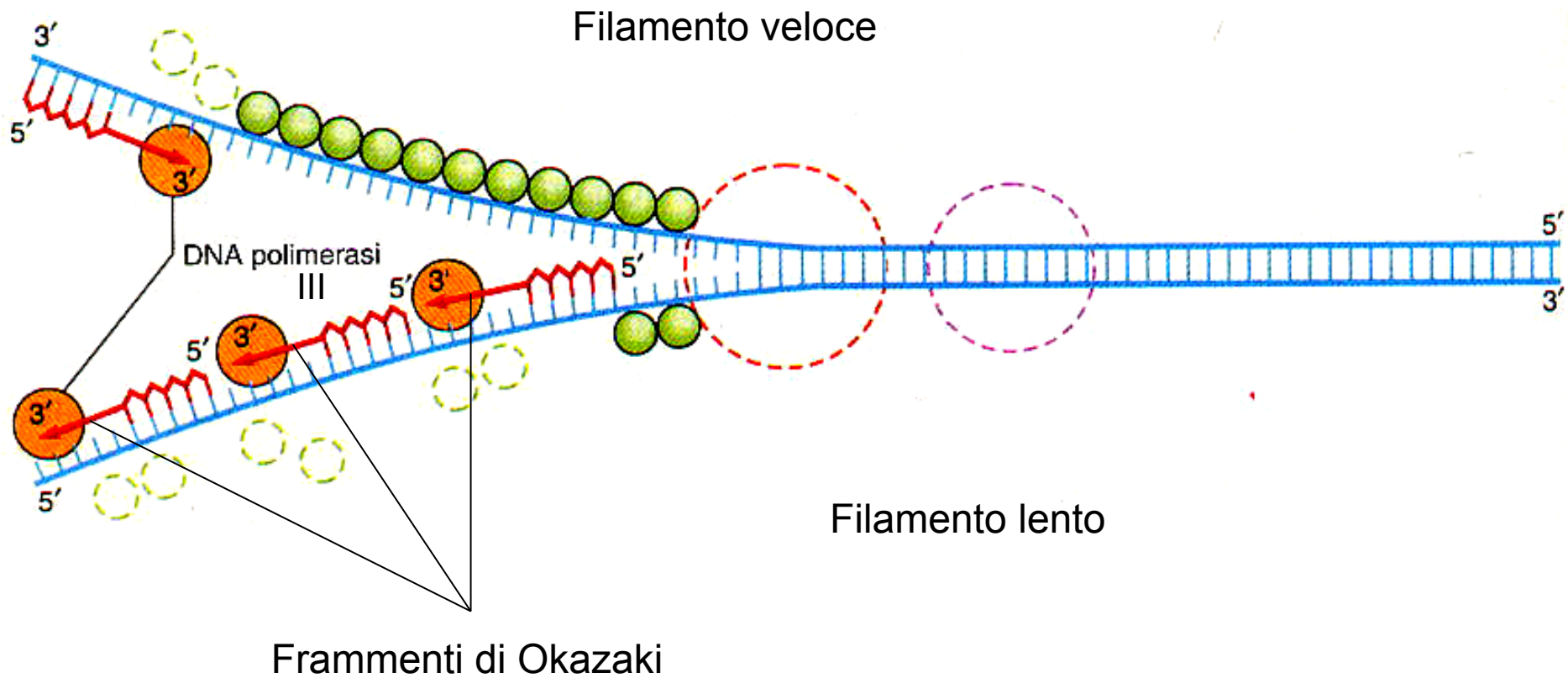
Sintesi dell'RNA primer

Estensione del primer di RNA da parte della DNA polimerasi



Replicazione del DNA

I corti inneschi di DNA sono utilizzati come punto di partenza per la replicazione da parte della DNA polimerasi.



4. Rimozione dei primer **Replicazione del DNA**

Dopo aver svolto la loro funzione gli inneschi vengono rimossi da parte di polimerasi che hanno **attività esonucleasica 5'-3'** e i "gap" lasciati dalle rimozioni vengono riempiti dalla stessa polimerasi.

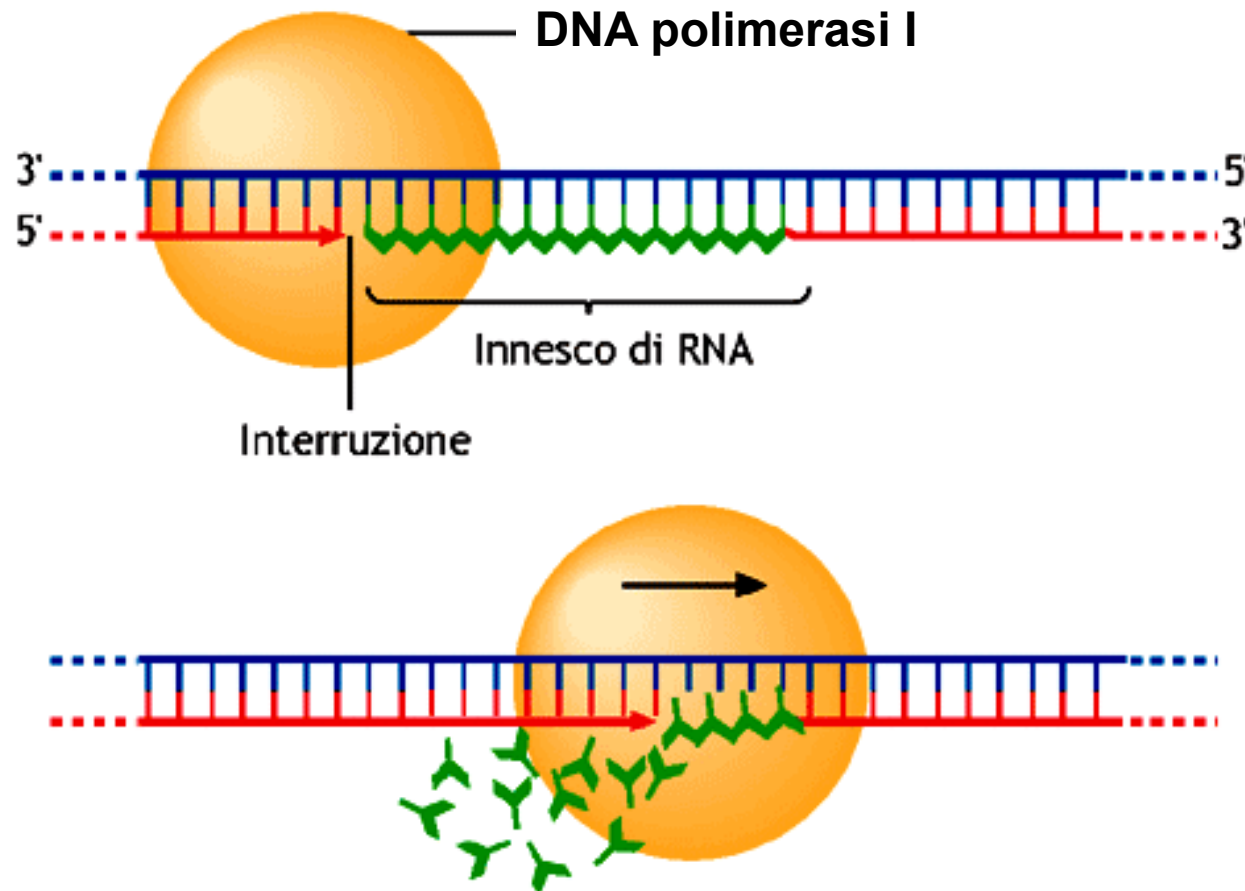
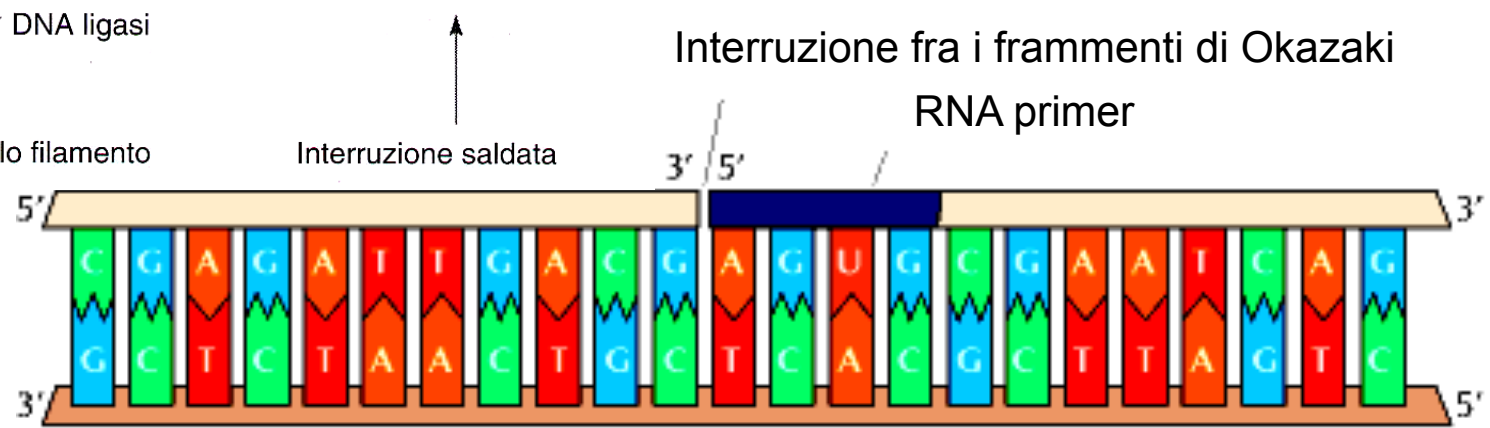
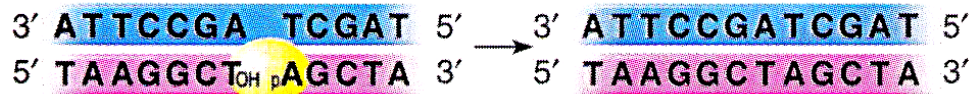


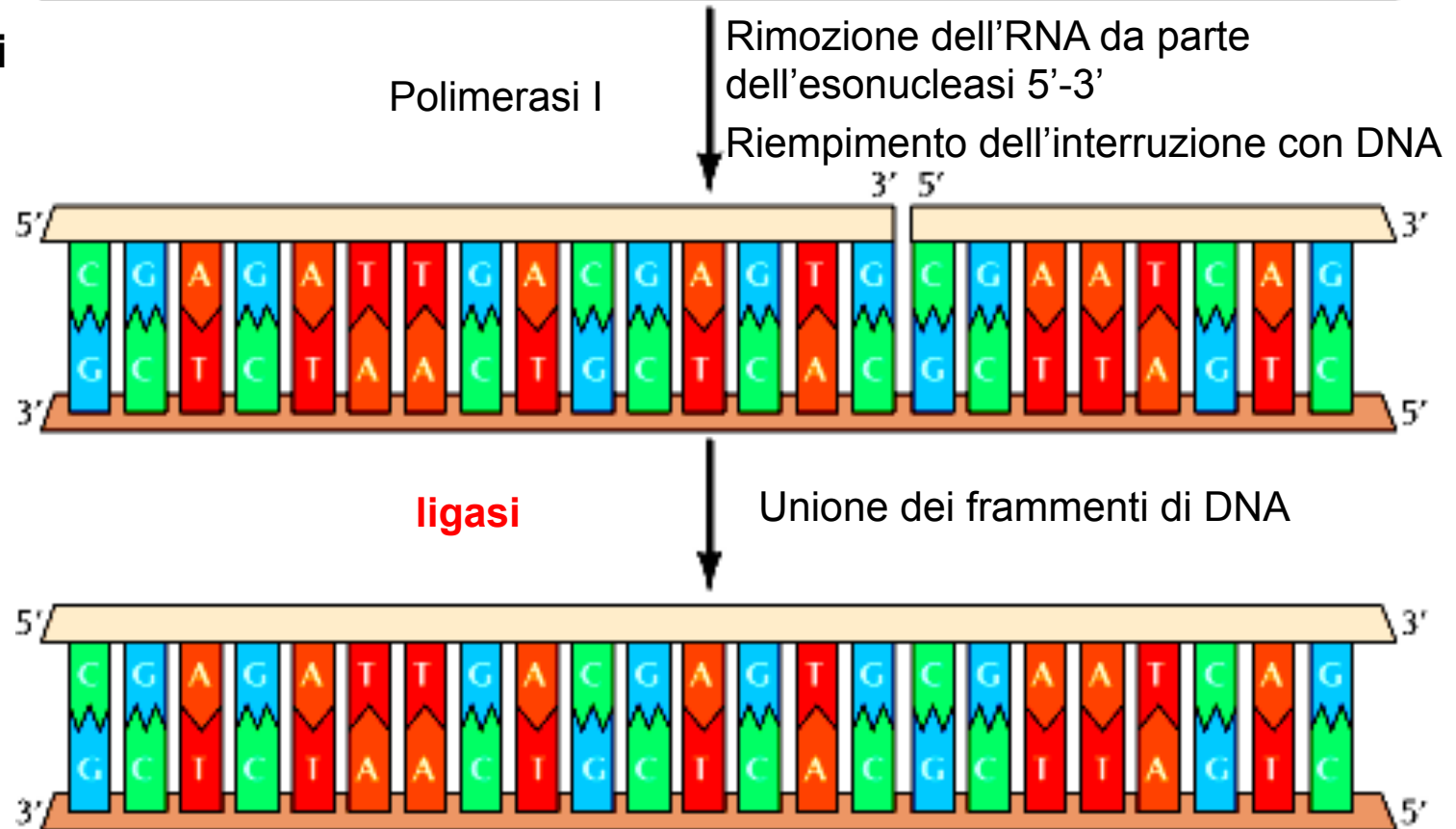
Figura 4.9 Innesco di RNA per l'inizio della replicazione del DNA. L'innesco sarà rimosso dall'attività esonucleasica della DNA polimerasi I. La ligasi, infine, salderà i frammenti.

Replicazione del DNA

La rimozione dell'innescio



5. DNA ligasi



Enzimi coinvolti della duplicazione del DNA (batteri)

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

Replicazione del DNA

Negli eucarioti

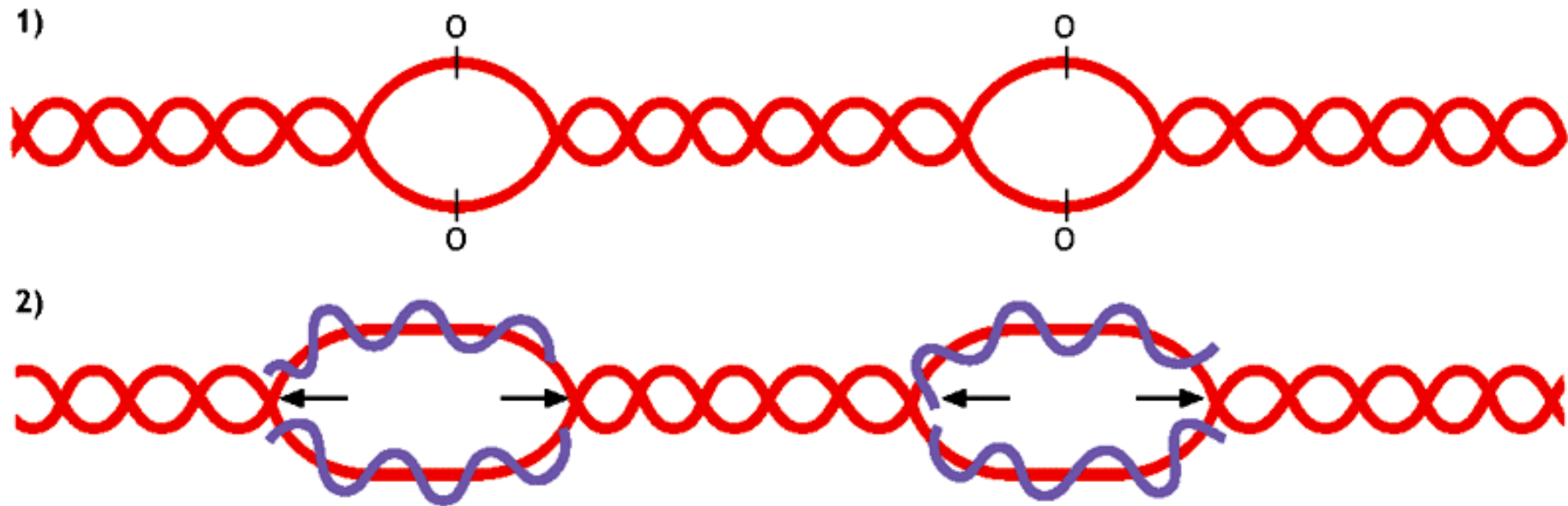


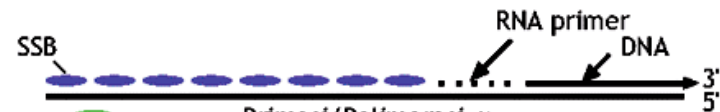
Figura 4.14 Replicazione del cromosoma degli eucarioti mediante molteplici forcelle di replicazione. **1)** In punti diversi del cromosoma, distanti circa 30.000-40.000 paia di basi, in corrispondenza delle origini di replicazione (O) si aprono i due filamenti, formando le “bolle di replicazione”. **2)**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

Replicazione del DNA

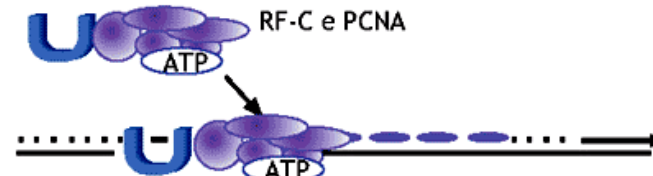
Negli eucarioti

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).

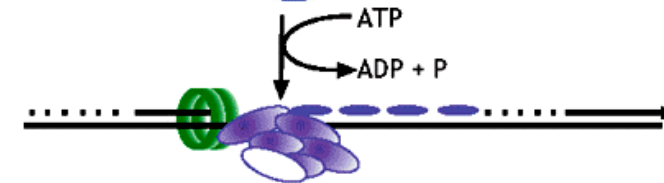
Formazione del primer e sintesi di DNA



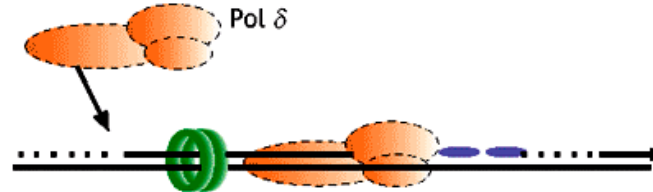
Il complesso primasi/polimerasi viene spiazzato dal PCNA



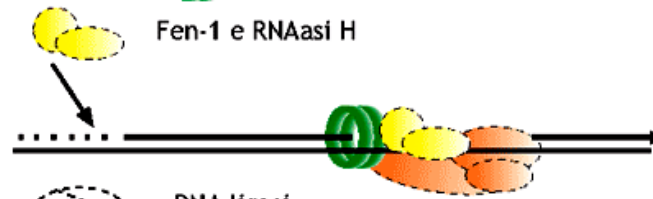
Assemblaggio del PCNA intorno al primer



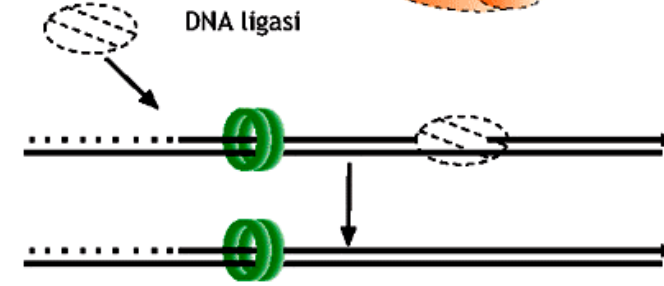
Legame della polimerasi δ e sintesi del DNA



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



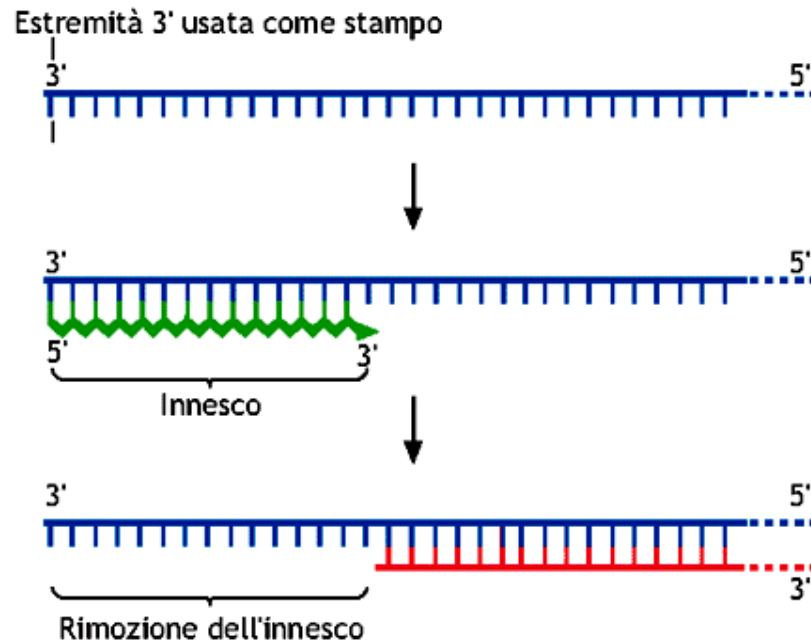
Congiungimento dei frammenti da parte della ligasi



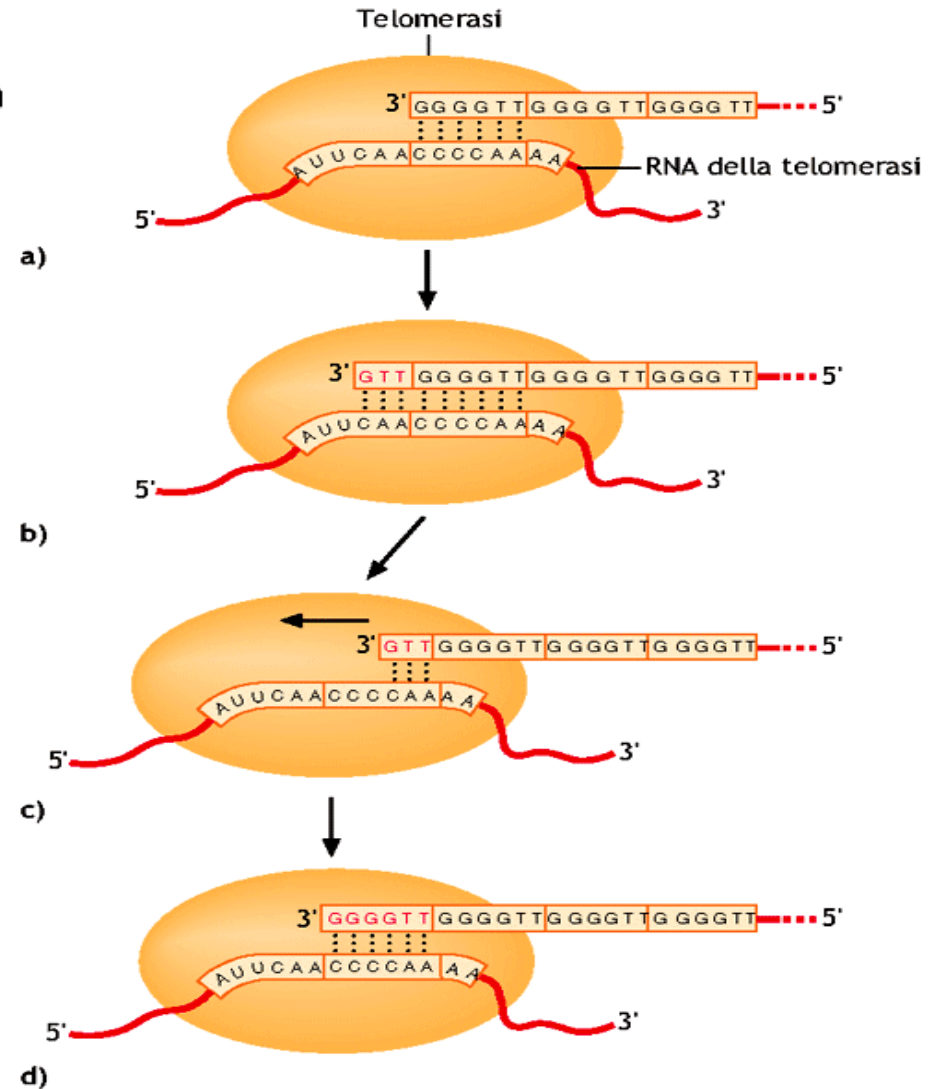
Replicazione del DNA

Negli eucarioti

■ **Figura 4.17** Il problema della replicazione dei telomeri: dopo la rimozione dell'innesco chi riempie il "gap"?



nell'uomo AGGGTT



■ **Figura 4.19** La componente TERC (RNA) della telomerasi serve da stampo per la sintesi del DNA telomerico. (a) RNA della telomerasi lega la sequenza telomerica 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 telomerica (c) in modo che le sue triplette AAC si appaiano con le triplette TTG neosintetizzate. (d) Il ciclo di allungamento continua.

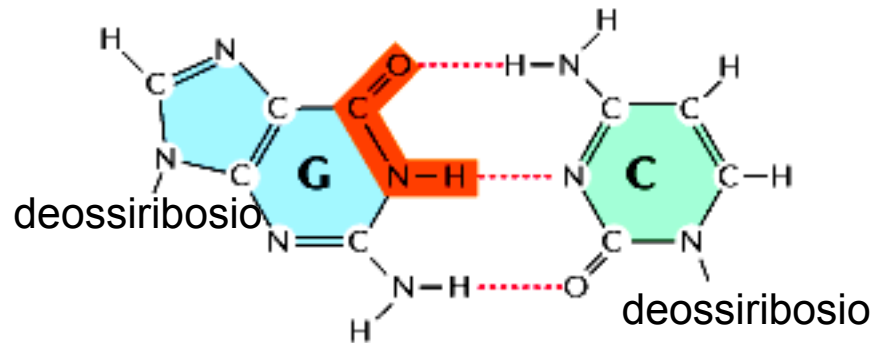
MUTAZIONI DNA !!!!

REAZIONI CHIMICHE SPONTANEE FREQUENTI

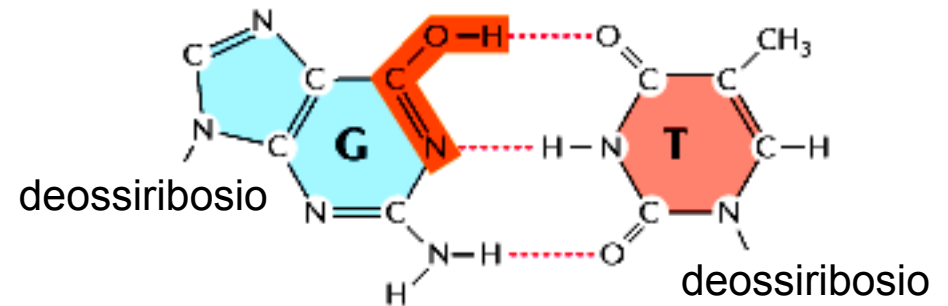
L'accuratezza della replicazione del DNA è critica per la riproduzione cellulare, e le stime del tasso di mutazione dei diversi geni indicano che la frequenza di errori durante la replicazione corrisponde solamente una base sbagliata ogni **10^9 - 10^{10} nucleotidi** incorporati.

Il grande margine di fedeltà raggiunto dipende largamente dall'attività della DNA polimerasi (attività **esonucleasica** e **proofreading** = correttore di bozze).

Appaiamento G-C normale



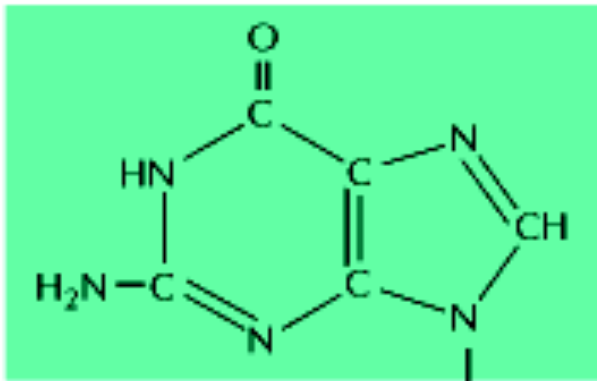
La forma tautomerica rara di G si accoppia con T



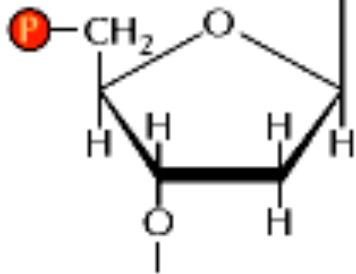
MUTAZIONI DNA !!!!

DEPURINAZIONE

Guanina



Catena di DNA

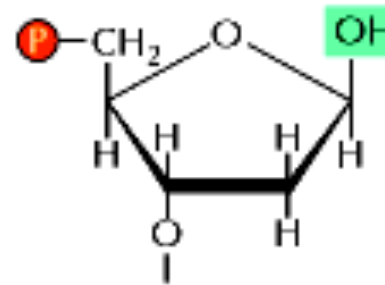


dGMP = deossiguanosina monofosfato

Danneggiamento spontaneo del DNA.

Ci sono due forme principali di danneggiamento spontaneo del DNA: deaminazione di adenina, citosina e guanina (A) e depurinazione (perdita di basi puriniche) dovuta al taglio del legame fra basi puriniche e il deossiribosio, che lascia un sito apurinico (AP) nel DNA (B).

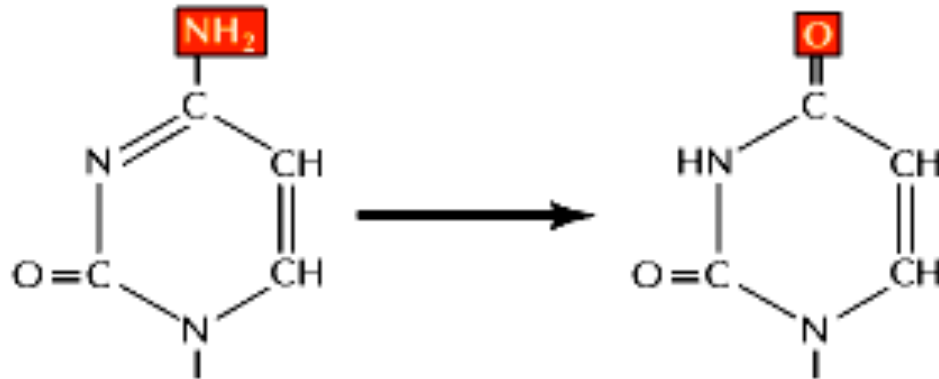
Catena di DNA



Sito AP

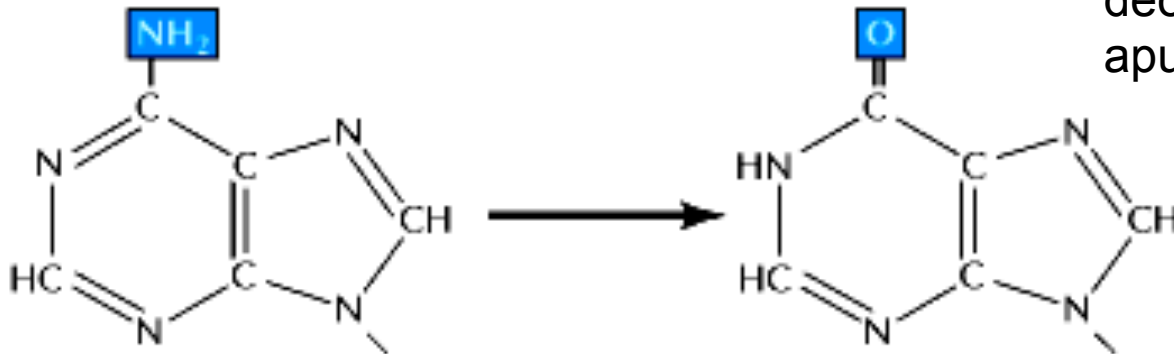
MUTAZIONI DNA !!!!

DEAMINAZIONE



Citosina

Uracile



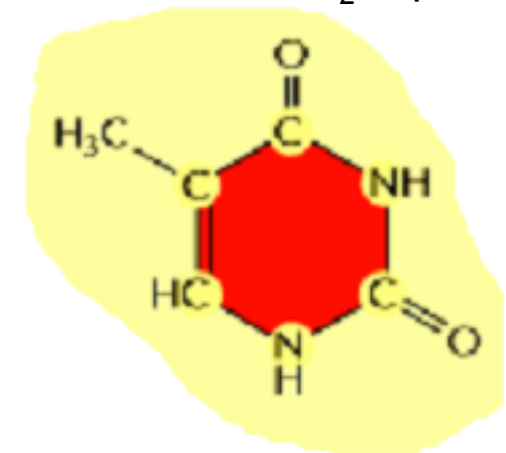
Adenina

Ipoxantina

Danneggiamento spontaneo del DNA.

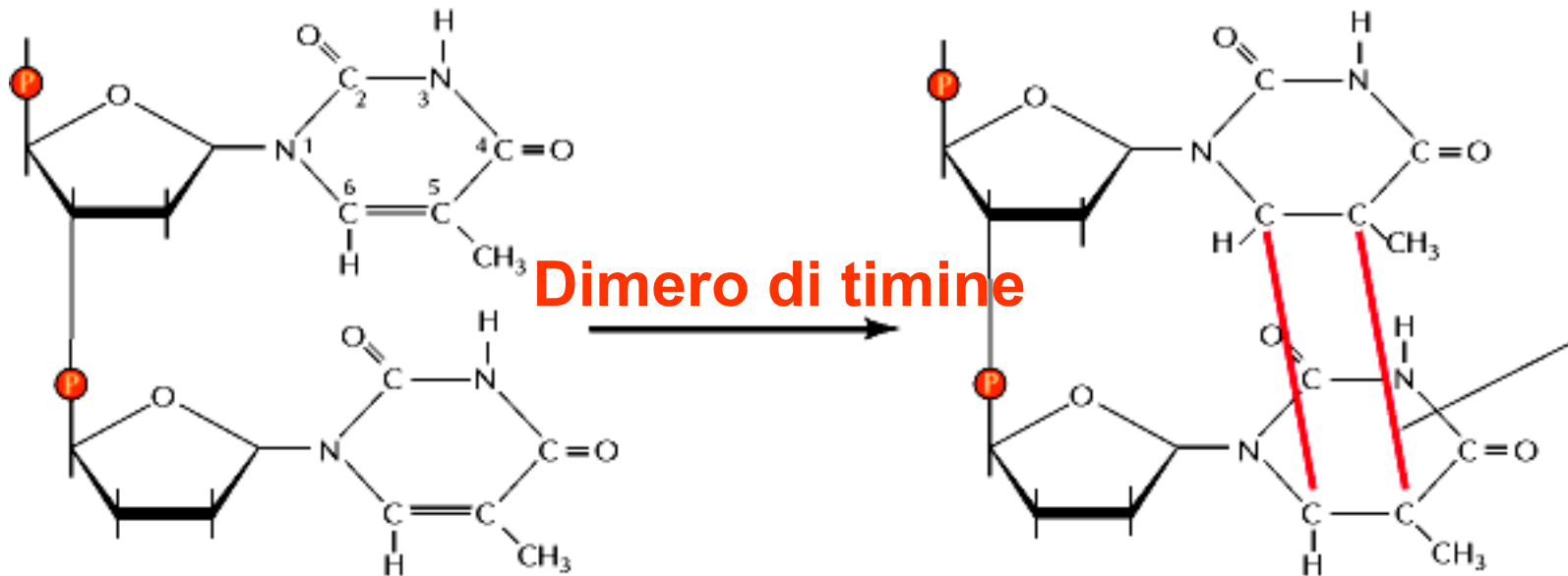
Ci sono due forme principali di danneggiamento spontaneo del DNA: deaminazione di adenina, citosina e guanina (A) e depurinazione (perdita di basi puriniche) dovuta al taglio del legame fra basi puriniche e il deossiribosio, che lascia un sito apurinico (AP) nel DNA (B).

Timina: non ha un NH₂ esposto

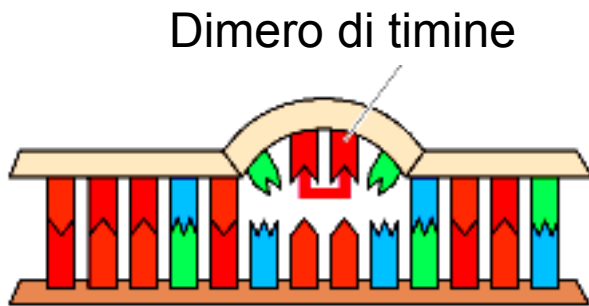


MUTAZIONI DNA !!!!

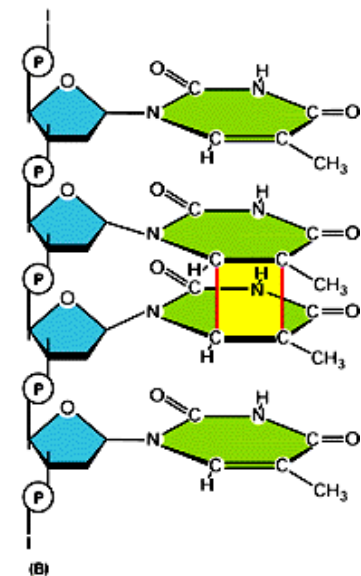
Danneggiamento del DNA indotto dalle radiazioni UV



Timine adiacenti nel DNA



La formazione di tali dimeri distorce la struttura della catena del DNA e blocca la replicazione o la trascrizione attraverso il sito danneggiato, pertanto la loro riparazione è strettamente correlata con la capacità delle cellule di sopravvivere all'irraggiamento U.V.

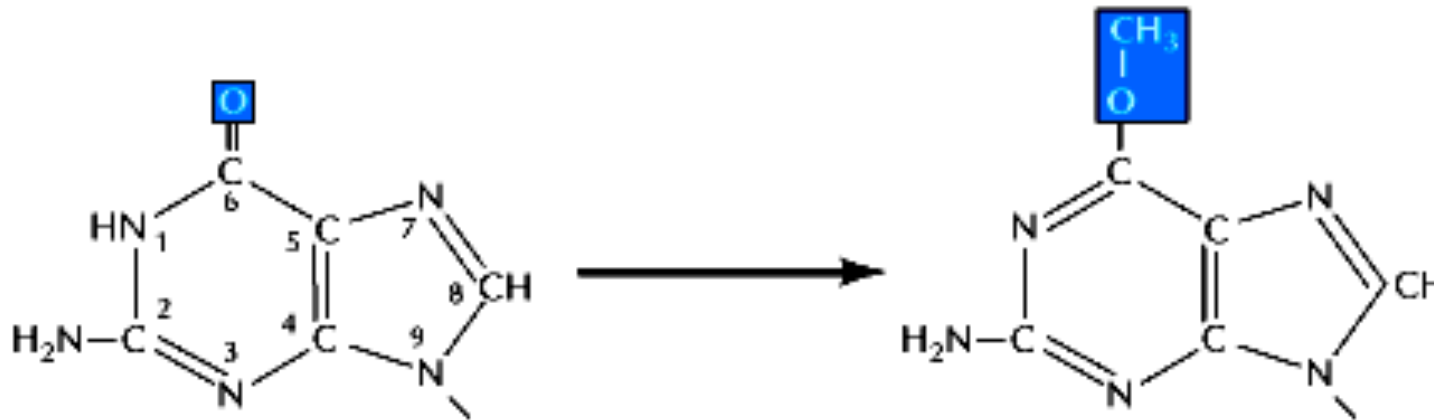


MUTAZIONI DNA !!!!

ALCHILAZIONE:

è l'aggiunta di gruppi metilici o etilici (da parte di agenti alchilanti) a varie posizioni sulle basi del DNA che vengono quindi chimicamente modificate.

Un tipo di lesione particolarmente grave è la metilazione in posizione O⁶ della guanina, perché il prodotto, la O⁶-metilguanina, forma appaiamenti complementari **di basi con la timina invece che con la citosina**.



Guanina

O⁶-metilguanina

Replicazione del DNA

Attività esonucleasica della DNA polimerasi III: “la correzione di bozze”

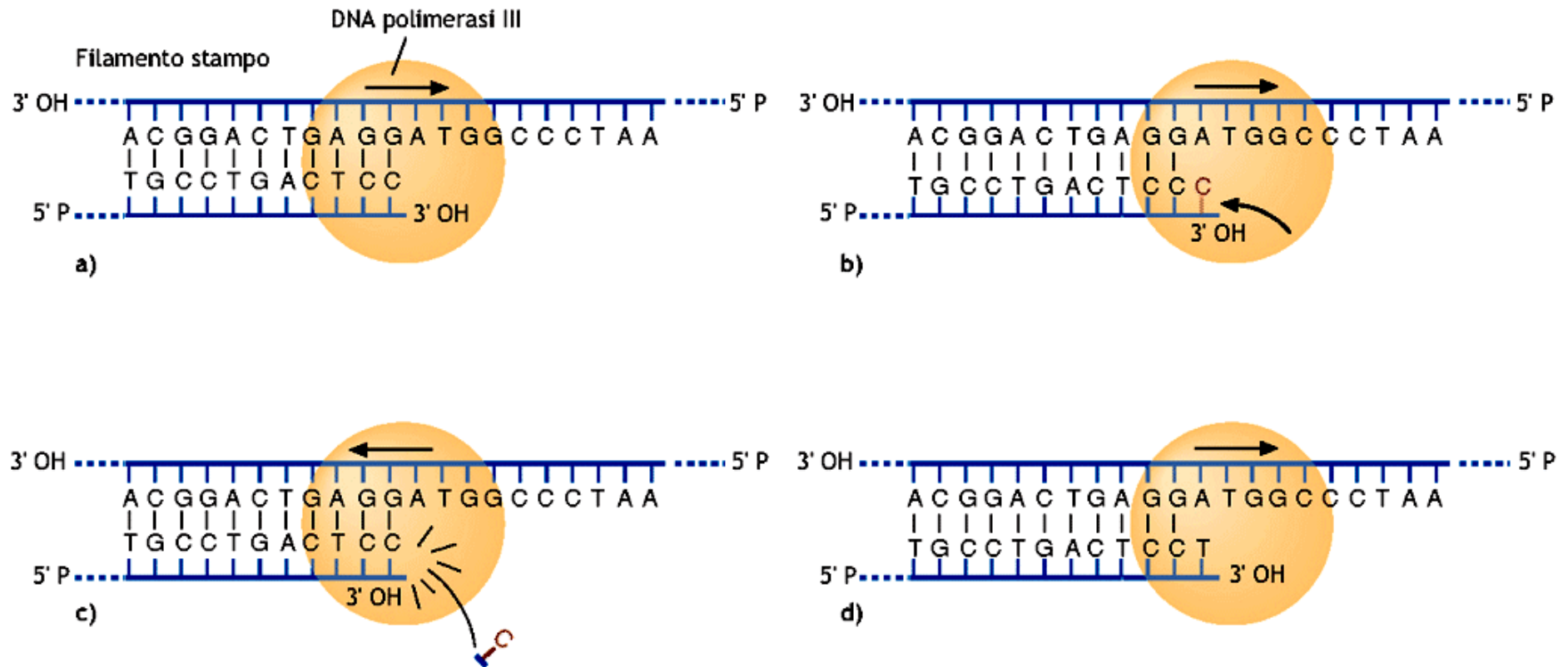


Figura 4.13 a) L'enzima sintetizza dall'estremo 5'P all'estremo 3'OH. b) Viene aggiunto un nucleotide errato. c) L'enzima innesca l'attività esonucleasica 3'OH → 5'P. d) L'enzima riprende la sua attività polimerasica.

Replicazione del DNA

Riparazione del DNA

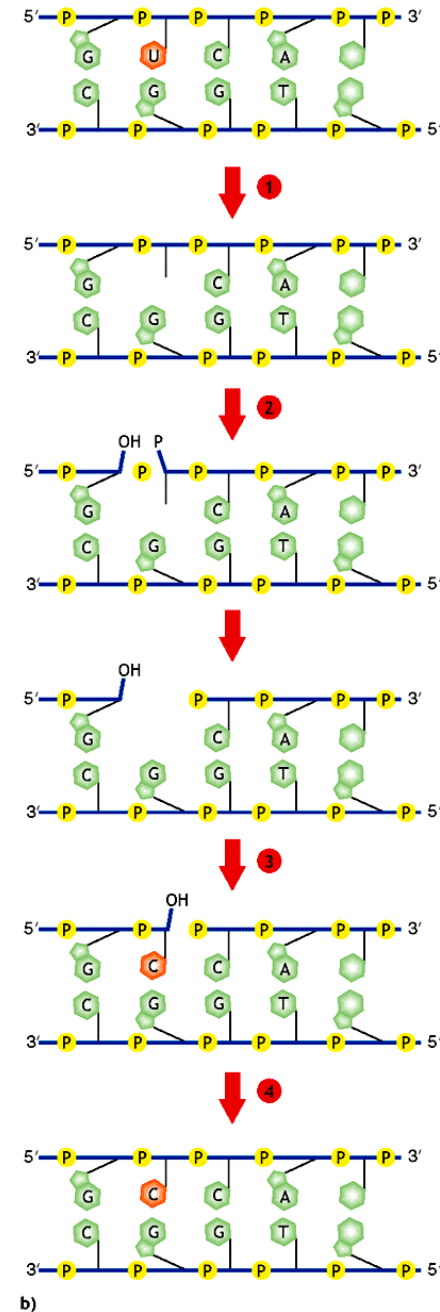
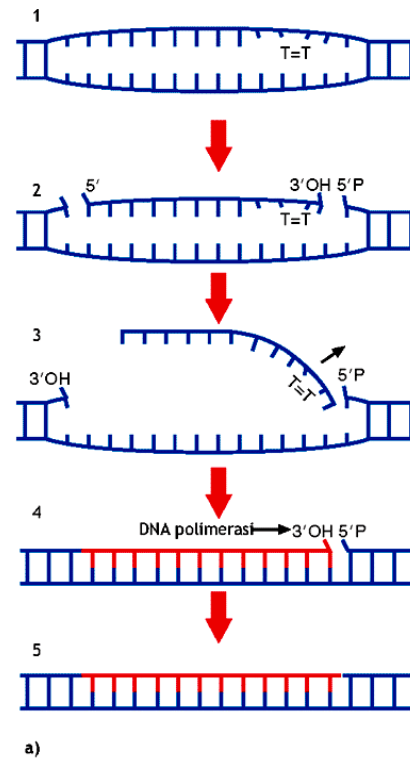
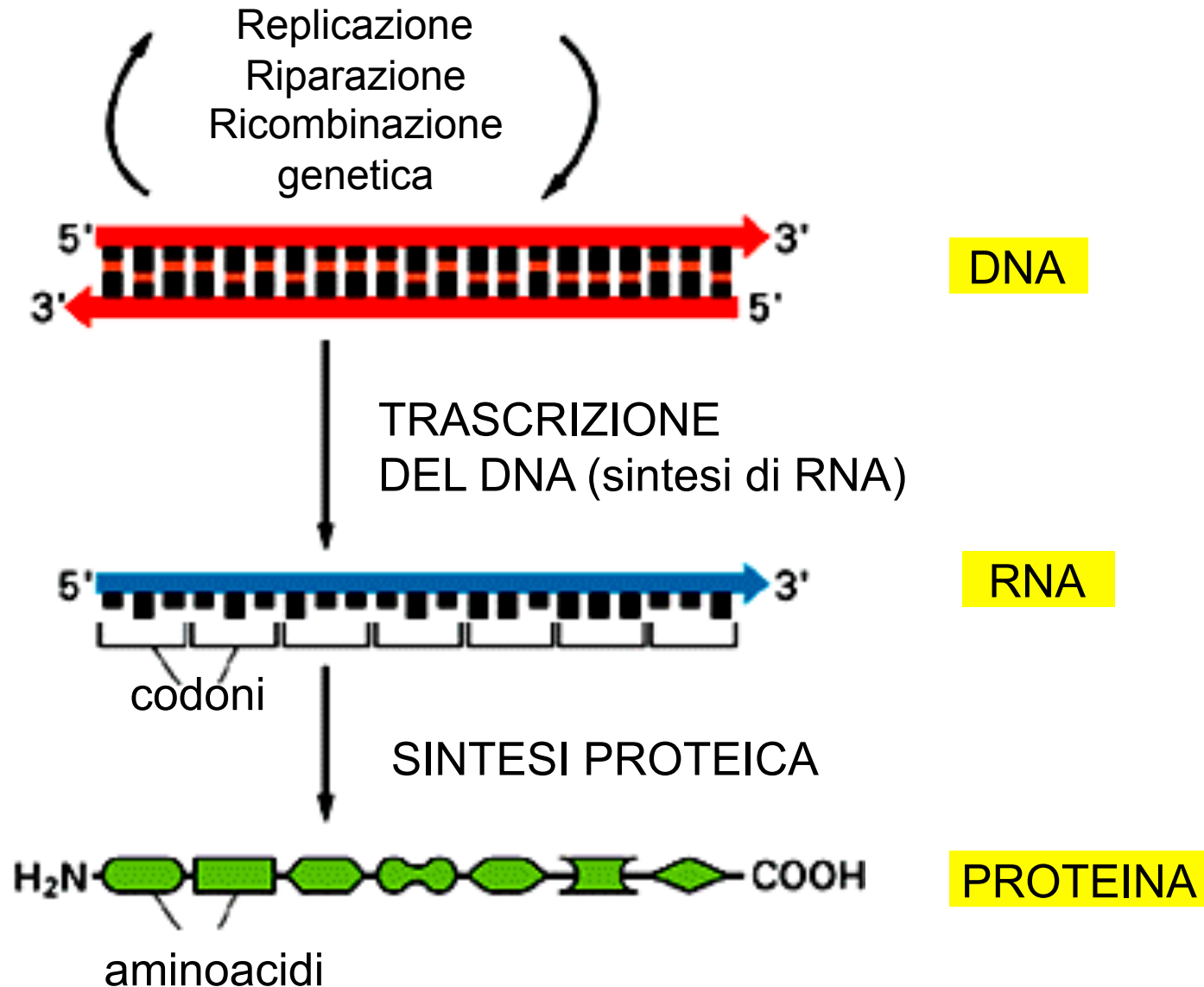


Figura 4.22 (a) **Riparazione per escissione:** riconosciuto il danno (1), si operano due tagli, a monte e a valle (2), l'estremo 3'OH viene utilizzato dalla DNA polimerasi (α e/o ϵ) per duplicare lo stampo (3-4). Alla fine interviene la DNA ligasi per saldare il filamento riparato (5). (b) **Riparazione per escissione di basi:** una glicosilasi rimuove la base "errata" (1). Questo sito (apurinico o apirimidinic) viene riconosciuto da una endonucleasi specifica che taglia il filamento danneggiato (2). Interviene poi, nei batteri, la DNA pol I che sintetizza un breve frammento (3) che viene poi saldato (4).

Trascrizione e maturazione degli RNA

Caratteristiche generali della trascrizione

Il flusso dell'informazione genetica è da DNA a RNA a proteine. Tutte le cellule, dai batteri all'uomo, esprimono la loro informazione genetica in questo modo – un principio così fondamentale da essere chiamato il **dogma centrale** della biologia molecolare.

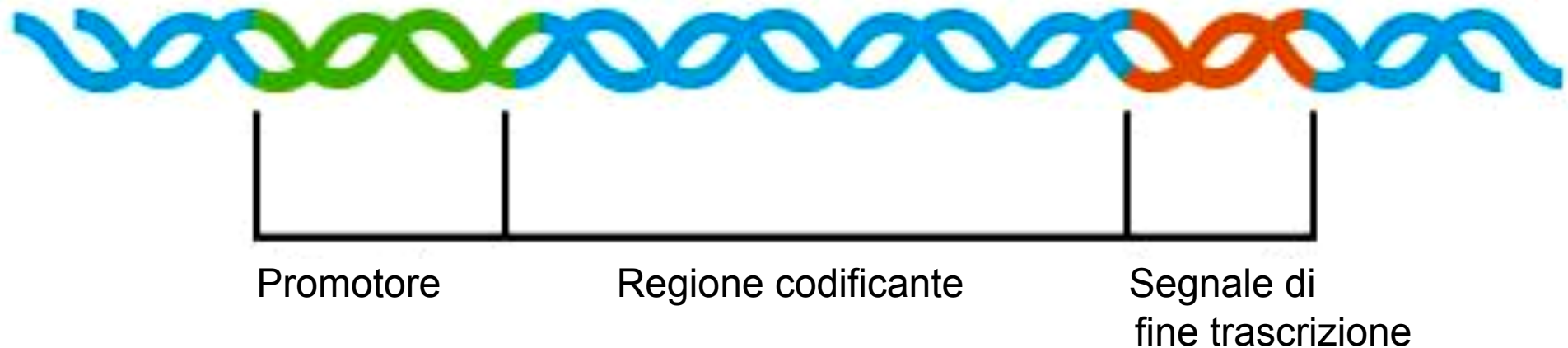


Trascrizione e maturazione degli RNA

Caratteristiche generali della trascrizione

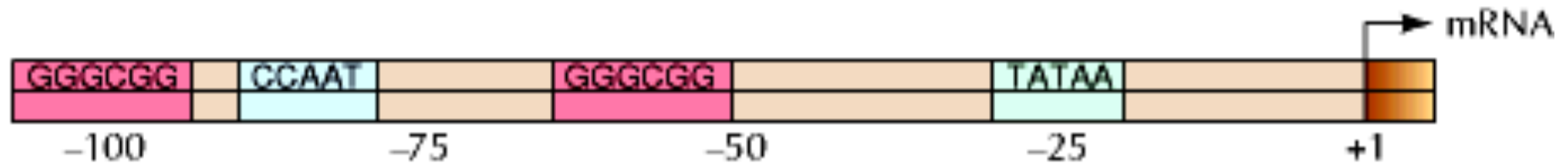
Il primo passaggio della lettura di una parte necessaria delle istruzioni genetiche di una cellula è quello di copiare una porzione particolare della sequenza nucleotidica del suo DNA – un gene – in una sequenza nucleotidica di RNA. L'informazione del DNA, anche se copiata in un'altra forma chimica, 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.

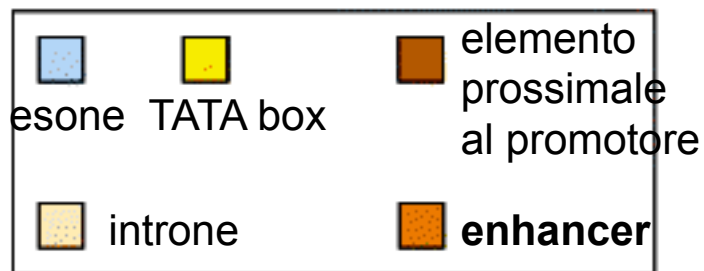
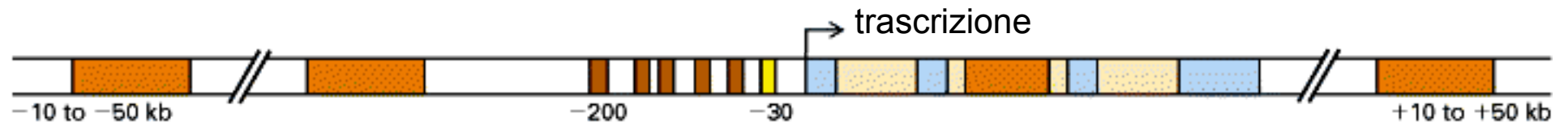


Trascrizione e maturazione degli RNA

Negli eucarioti

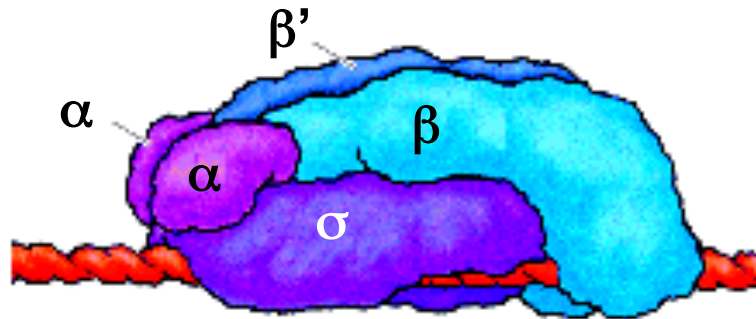


Promotore eucariotico. Il promotore del gene della timidina chinasi di herpes simplex virus (HSV) contiene 3 sequenze a monte del TATA box che sono necessari per una efficiente trascrizione: 1 CCAAT box and 2 GC boxe (sequenze consenso GGGCGG).



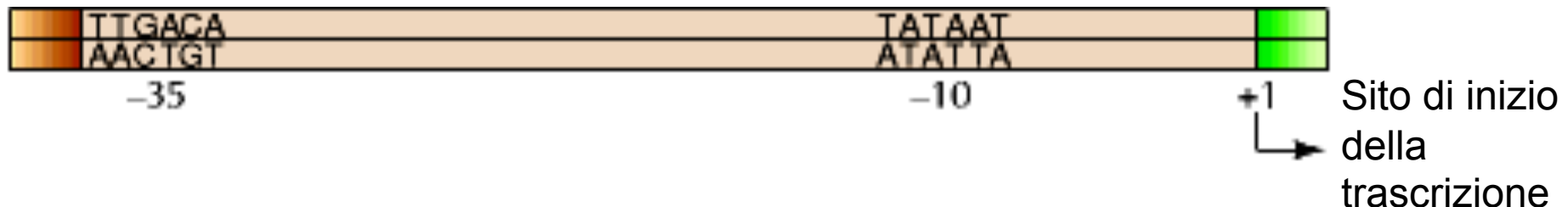
Trascrizione e maturazione degli RNA

Nei procarioti



Una sola RNA polimerasi:

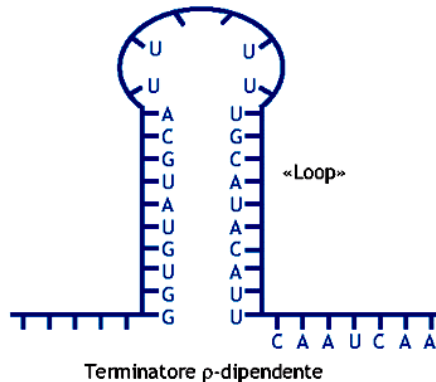
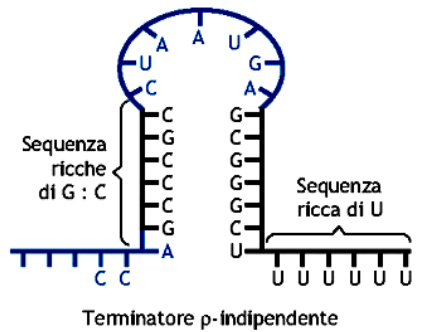
l'enzima completo consiste di 5 subunità: 2 α , 1 β , 1 β' e 1 σ . La subunità σ è attaccata in modo relativamente debole e può essere dissociata dalle altre subunità che costituiscono il nucleo della polimerasi



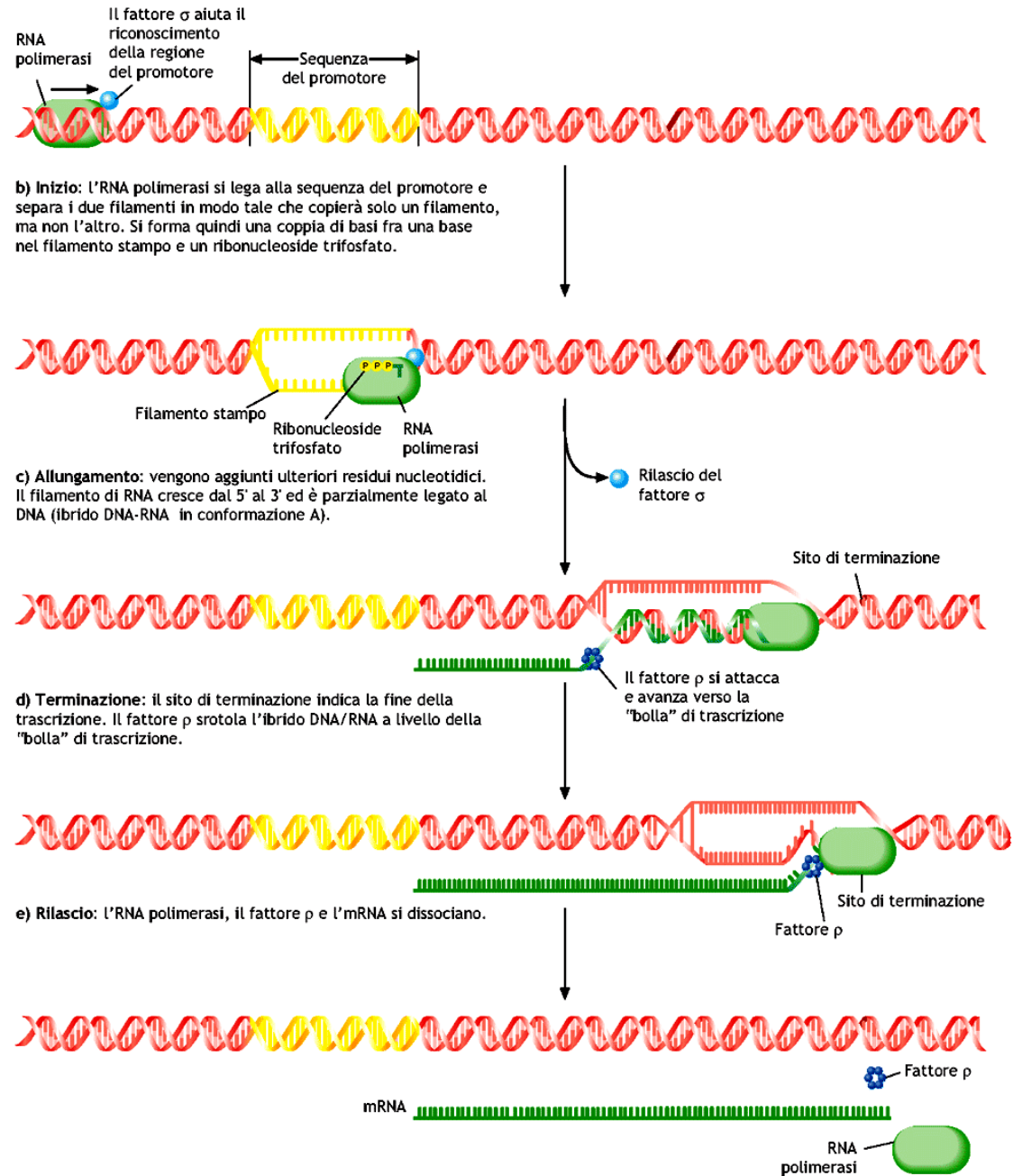
La sequenza di DNA a cui si lega la RNA polimerasi per iniziare la trascrizione di un gene si chiama **promotore**

Trascrizione e maturazione degli RNA

Nei procarioti



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

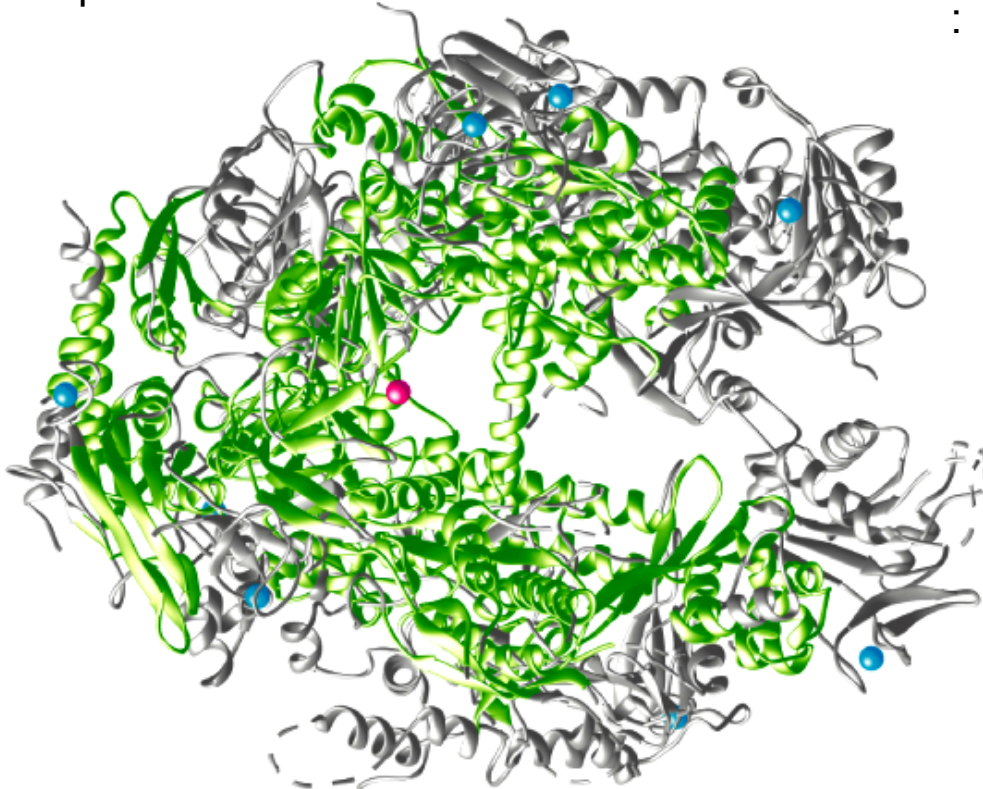


■ **Figura 4.27** La trascrizione nei batteri.

Trascrizione e maturazione degli RNA

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.

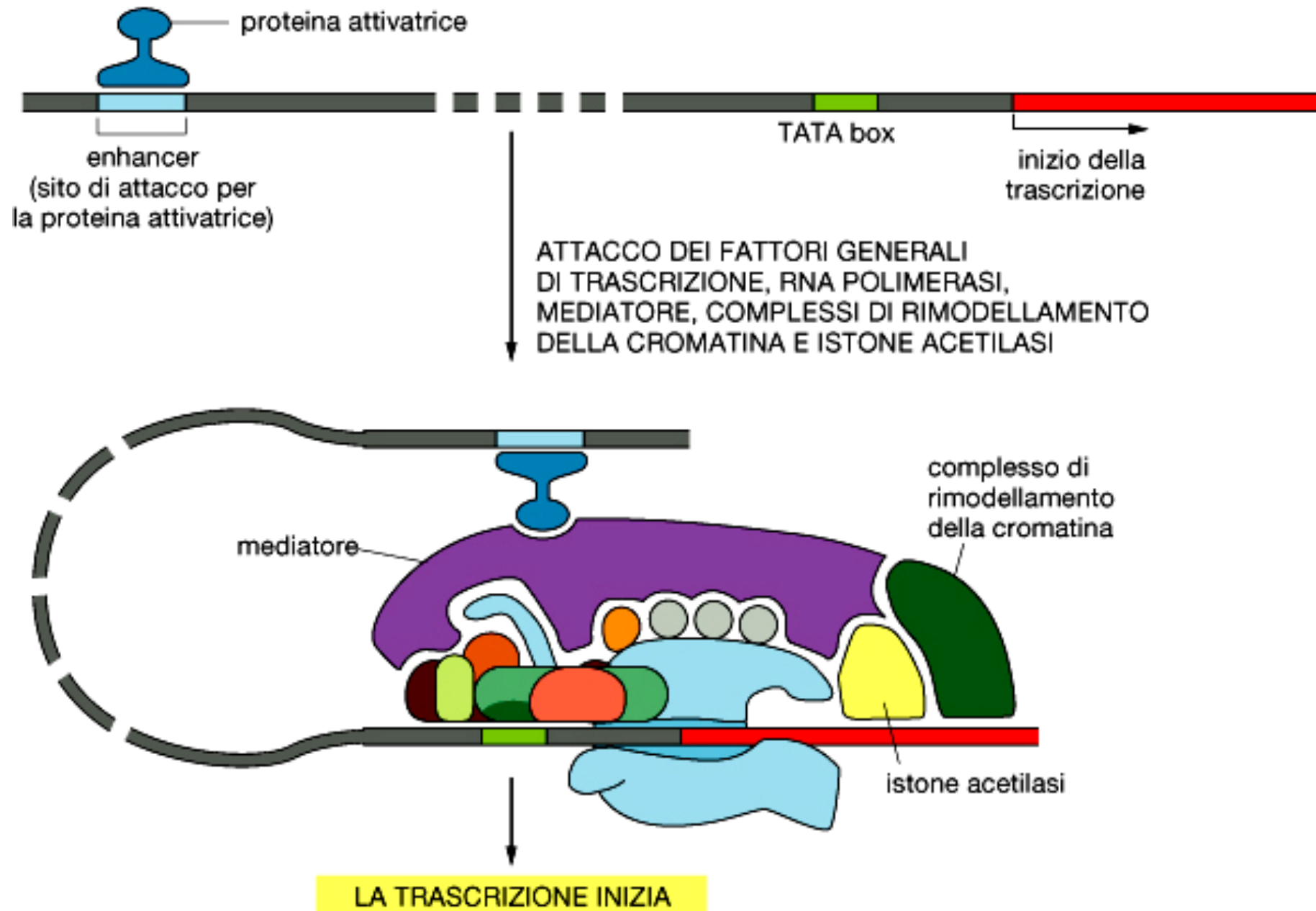
Una distinzione importante tra la **RNA polimerasi batterica** e la **RNA polimerasi II** degli eucarioti è che

(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.

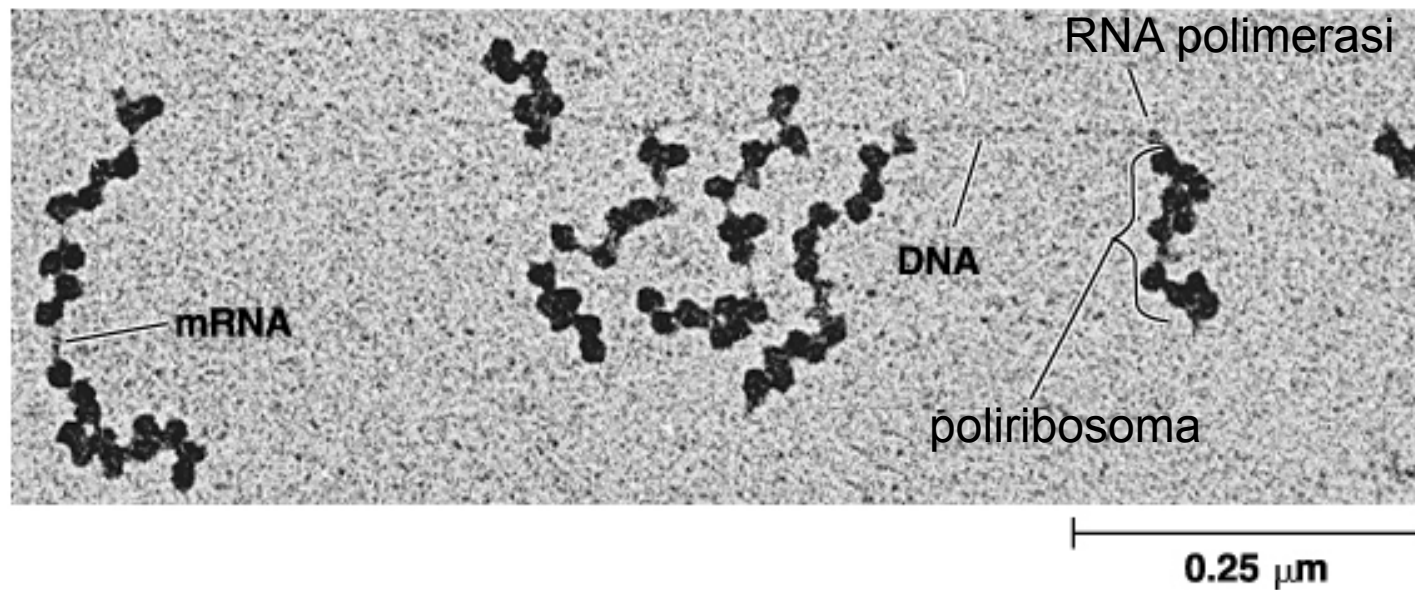
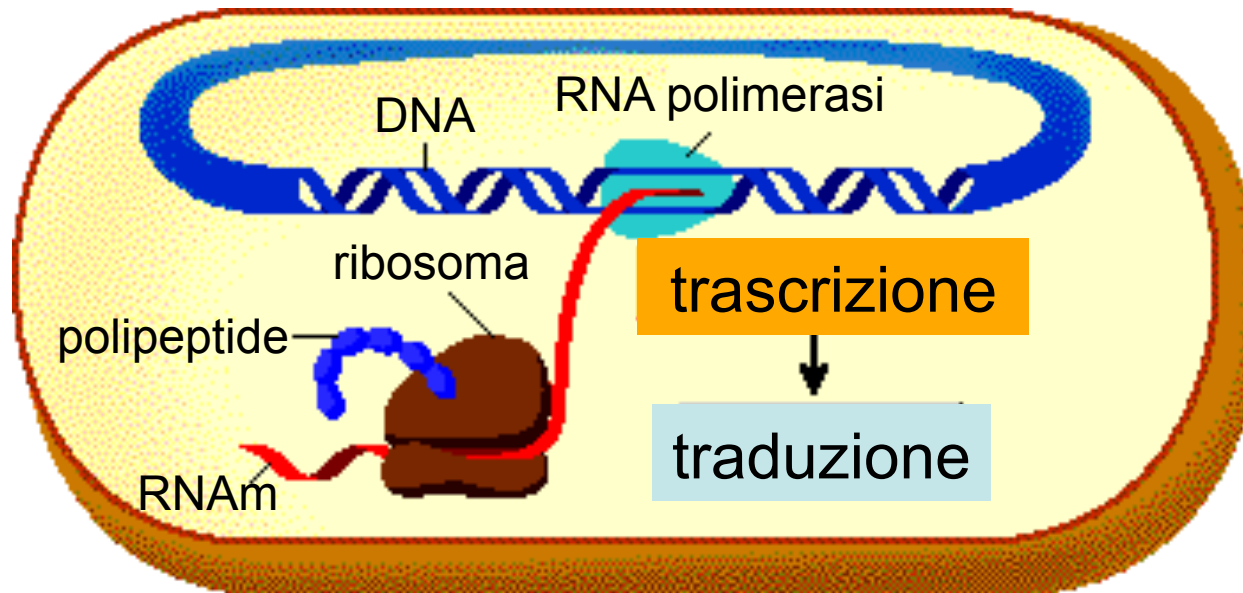
(2) L'inizio della trascrizione eucariotica deve tenere conto del **compattamento del DNA nei nucleosomi** e in forme di ordine superiore di struttura della cromatina, caratteristiche assenti nei cromosomi dei batteri.

Trascrizione del DNA negli eucarioti

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

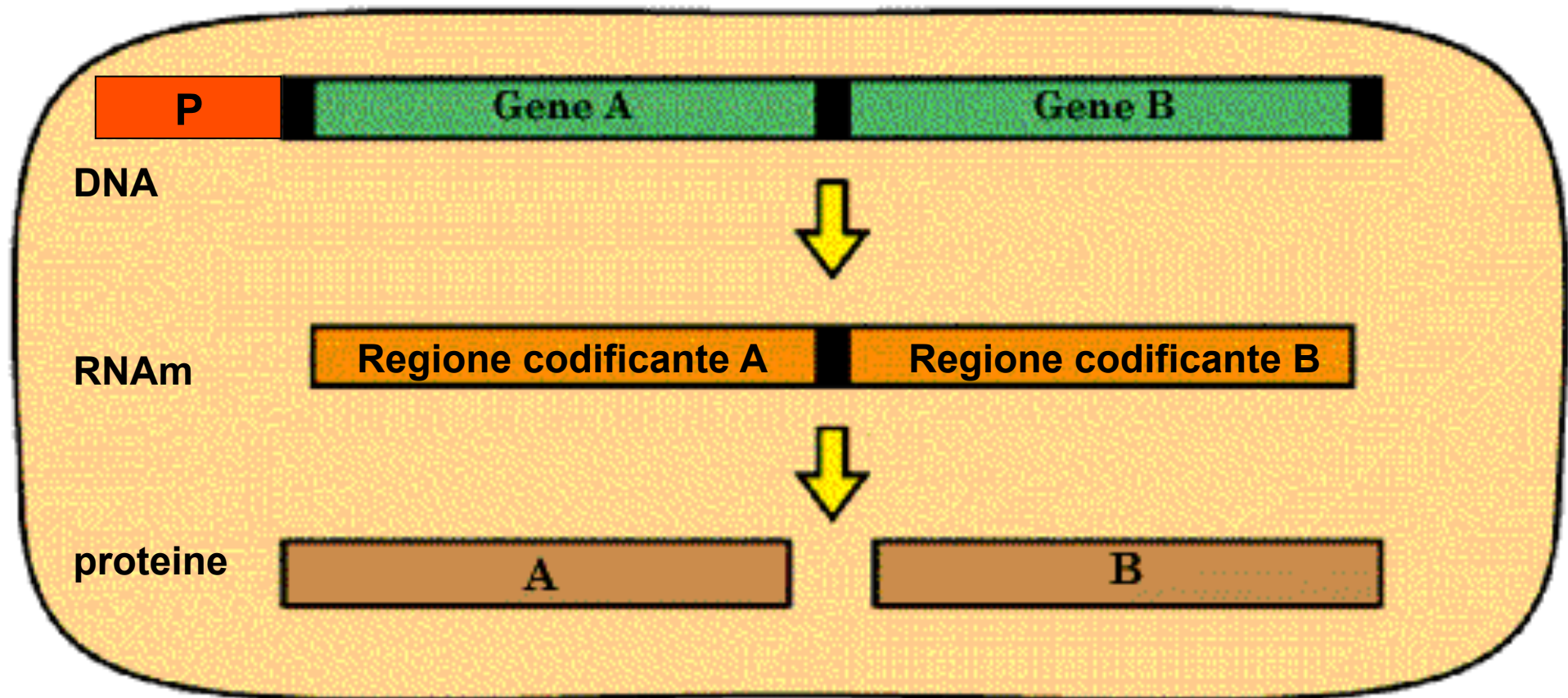


La trascrizione nei procarioti



L'RNAm dei procarioti è policistronico

Nei procarioti più geni si trovano sotto il controllo di un unico promotore a formare i cosiddetti operoni. Questi geni, in genere, codificano proteine necessarie in una specifica via metabolica come la biosintesi di un amminoacido o il catabolismo del glucosio. Ne consegue che l'RNAm trascritto da un operone procariotico è policistronico cioè codifica più proteine da un singolo trascritto.

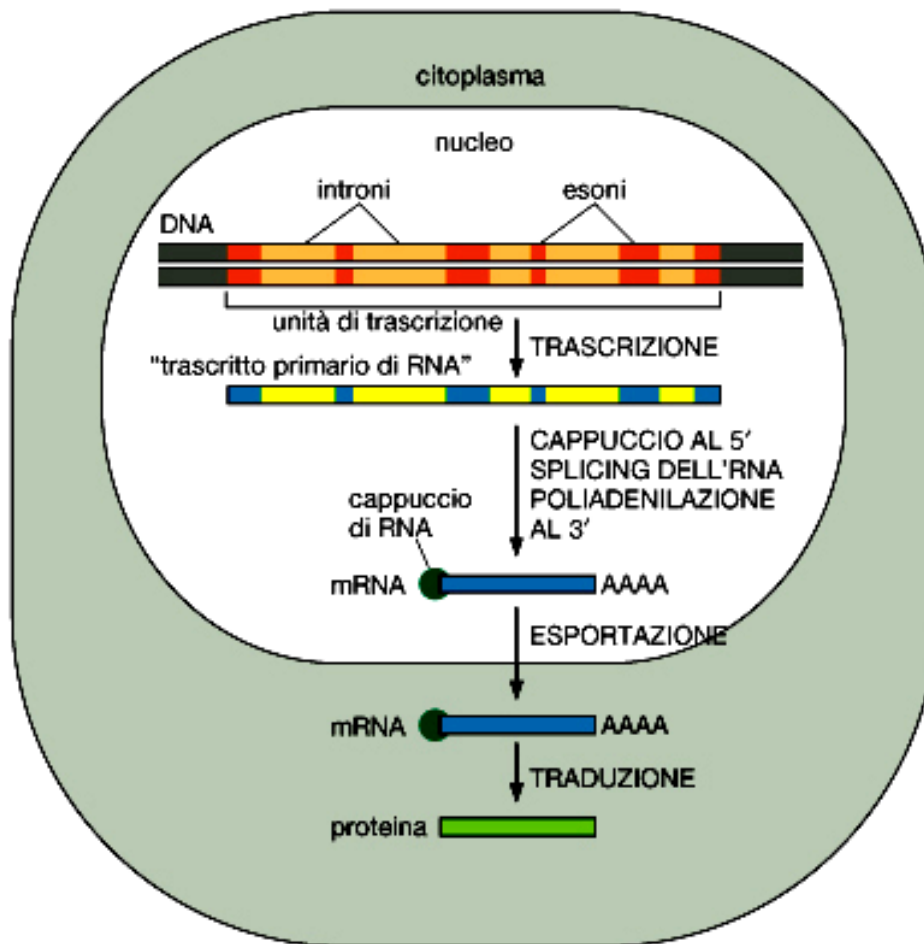


Negli eucarioti **Trascrizione e maturazione degli RNA**

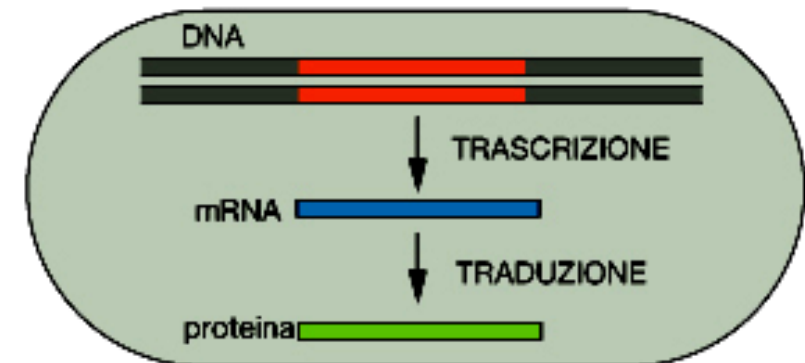
L'allungamento della trascrizione negli eucarioti è strettamente accoppiato alla modificazione dell'RNA

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. Lo splicing dell'RNA fornisce agli eucarioti superiori la capacità di sintetizzare parecchie proteine diverse dallo stesso gene.

(A) **EUCARIOTI**



(B) **PROCARIOTI**



Trascrizione e maturazione degli RNA

Cap. 5'

1. Cappuccio= 7-metil guanosina

2. Splicing: rimozione degli esoni

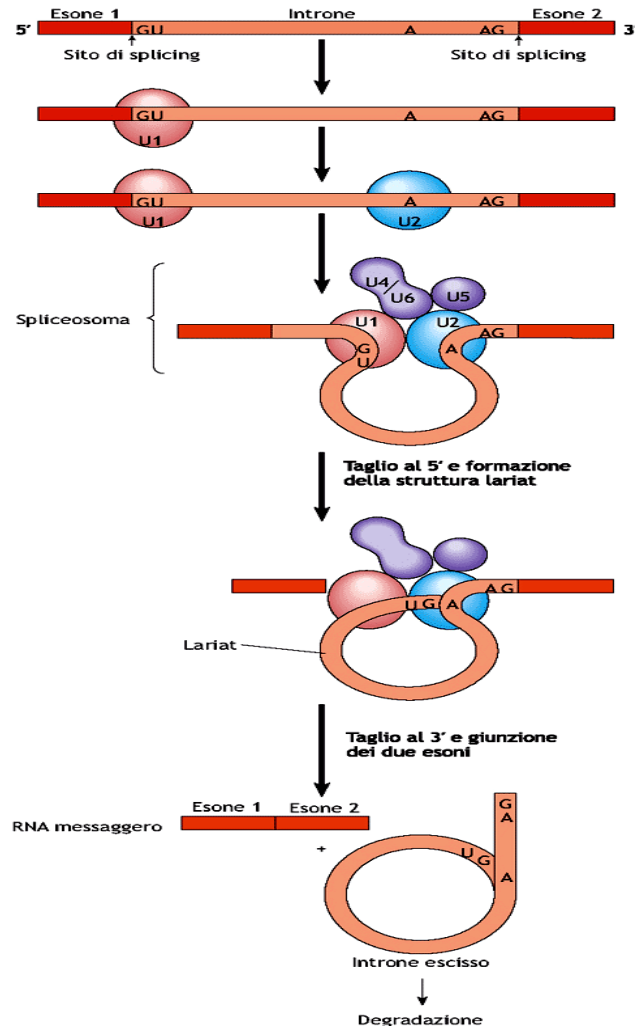


Figura 4.39 Processo di splicing. Formazione e funzionamento dello spliceosoma.

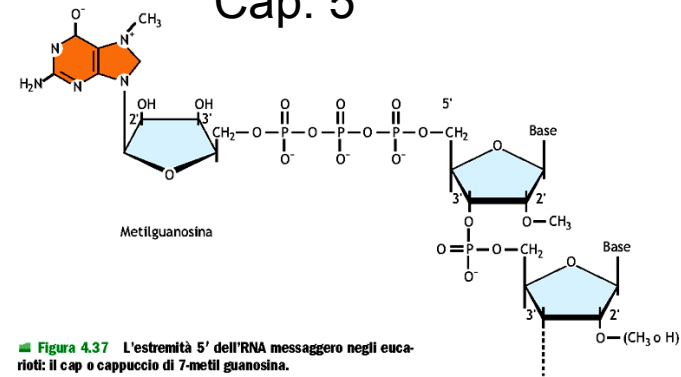
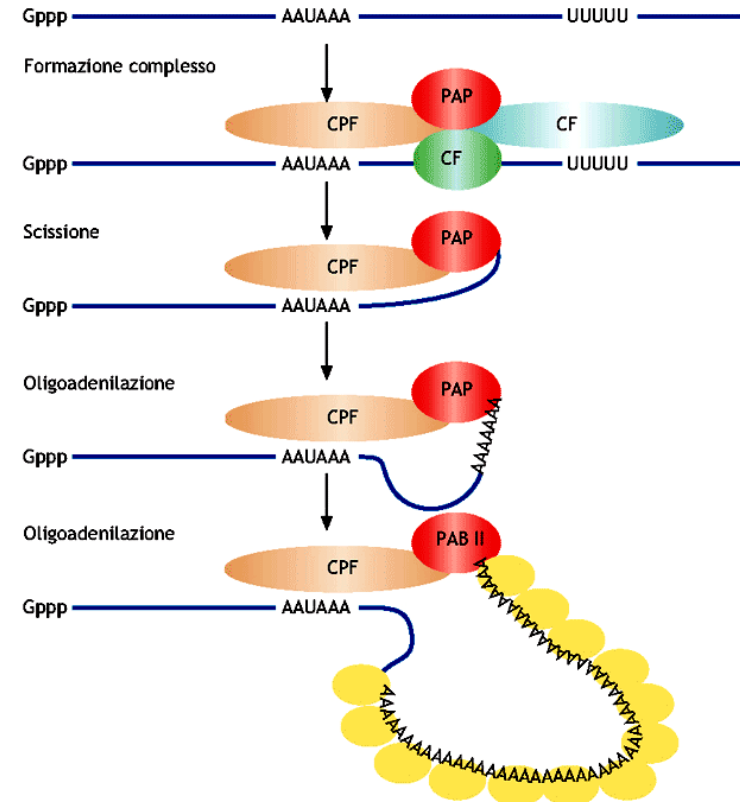


Figura 4.37 L'estremità 5' dell'RNA messaggero negli eucarioti: il cap o cappuccio di 7-metil guanosina.

3. Coda di A: Poliadenilazione 3'



Trascrizione e traduzione

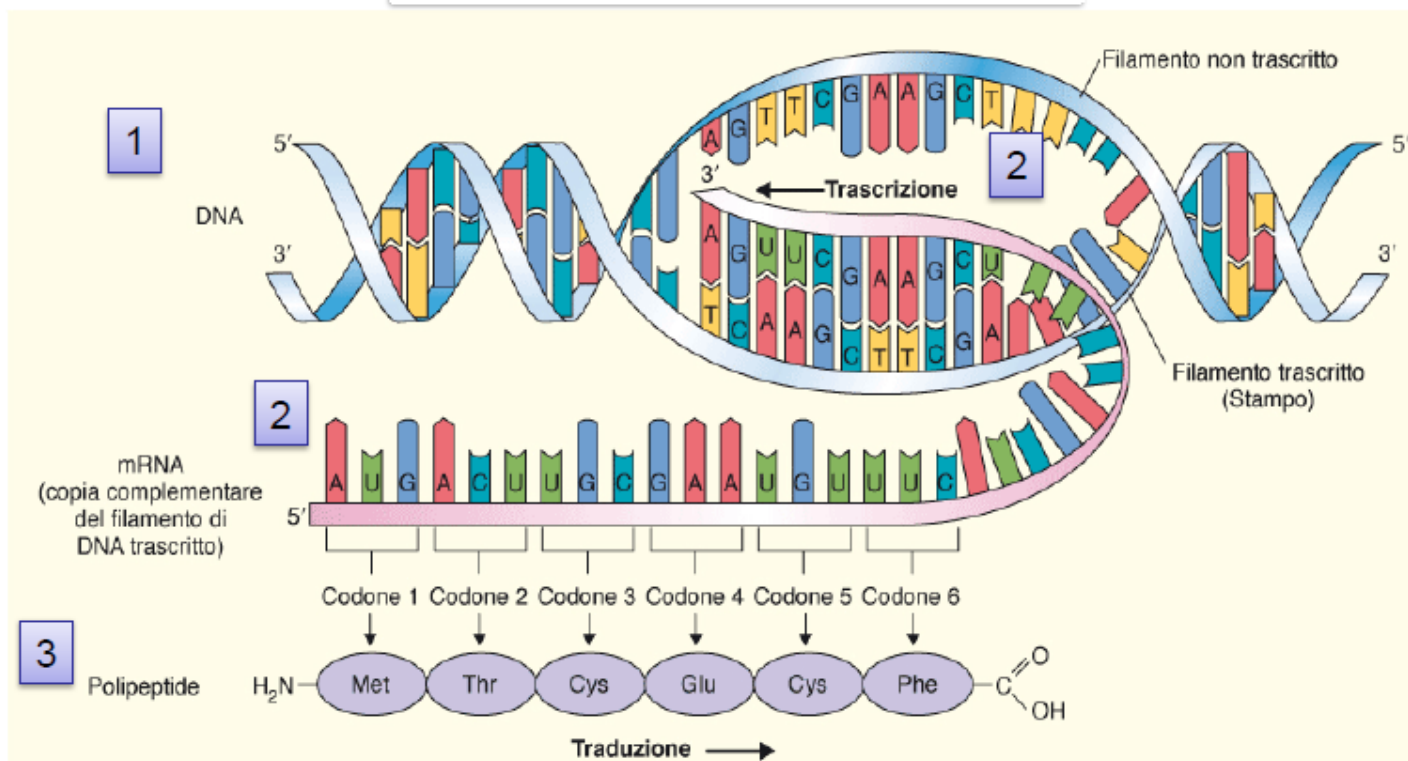


FIGURA 13-4 Una visione d'insieme della trascrizione e della traduzione

Nella trascrizione, viene sintetizzato un RNA messaggero che è la copia complementare di uno dei due filamenti del DNA, il filamento stampo. L'mRNA porta l'informazione genetica sotto forma di gruppi di tre basi, chiamati codoni, ognuno dei quali specifica un aminoacido. I codoni dell'RNA messaggero sono tradotti uno dopo l'altro, così da

specificare la sequenza lineare degli aminoacidi nella catena polipeptidica. La traduzione richiede tRNA e ribosomi (*non mostrati*). La figura rappresenta la trascrizione e la traduzione nei batteri. Negli eucarioti, la trascrizione avviene nel nucleo, mentre la traduzione si verifica nel citoplasma.

Apparato di traduzione: tRNA

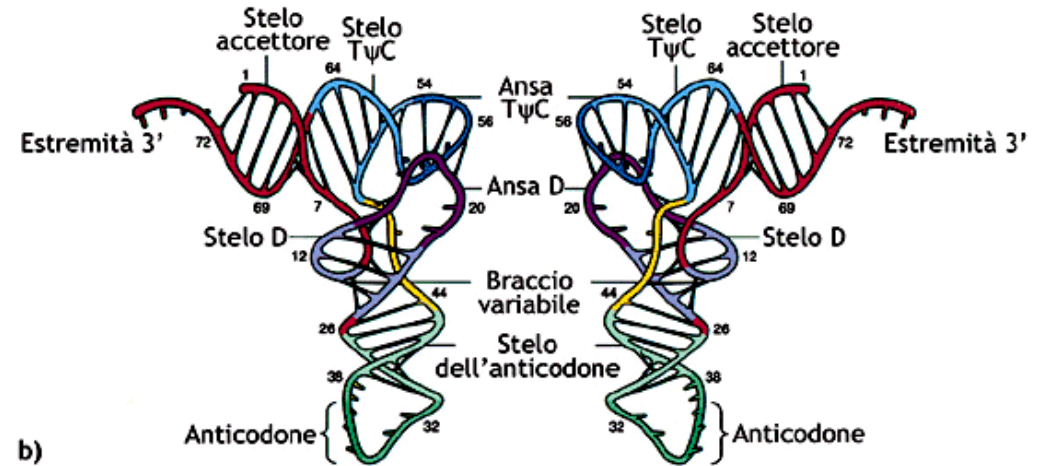
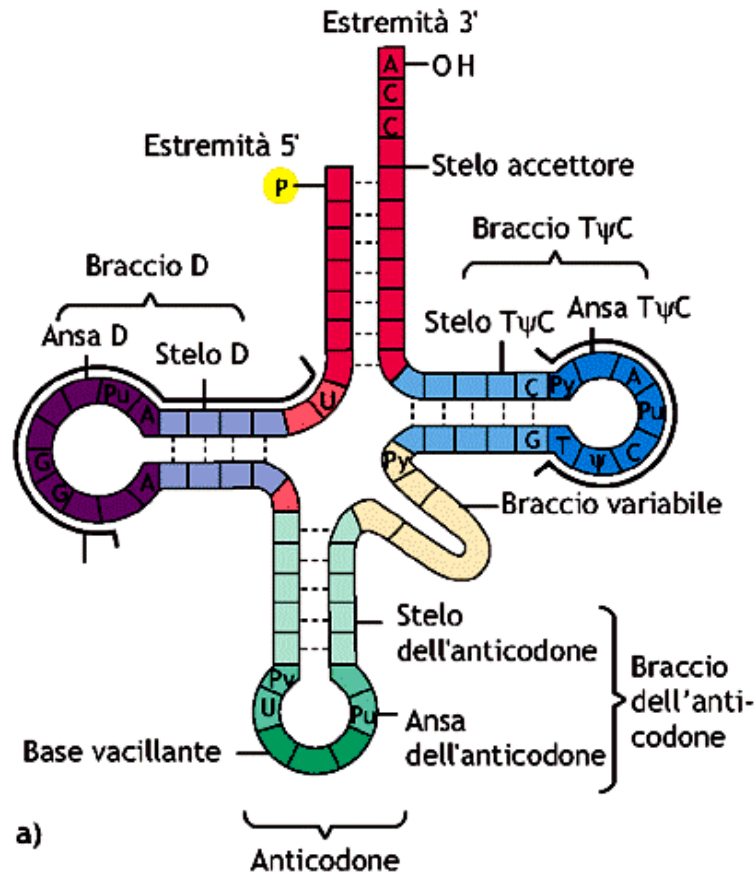


Figura 4.54 (a) Struttura del tRNA detta "a trifoglio". (b) Ricostruzione della struttura tridimensionale di due tRNA.

Proprietà del codice genetico

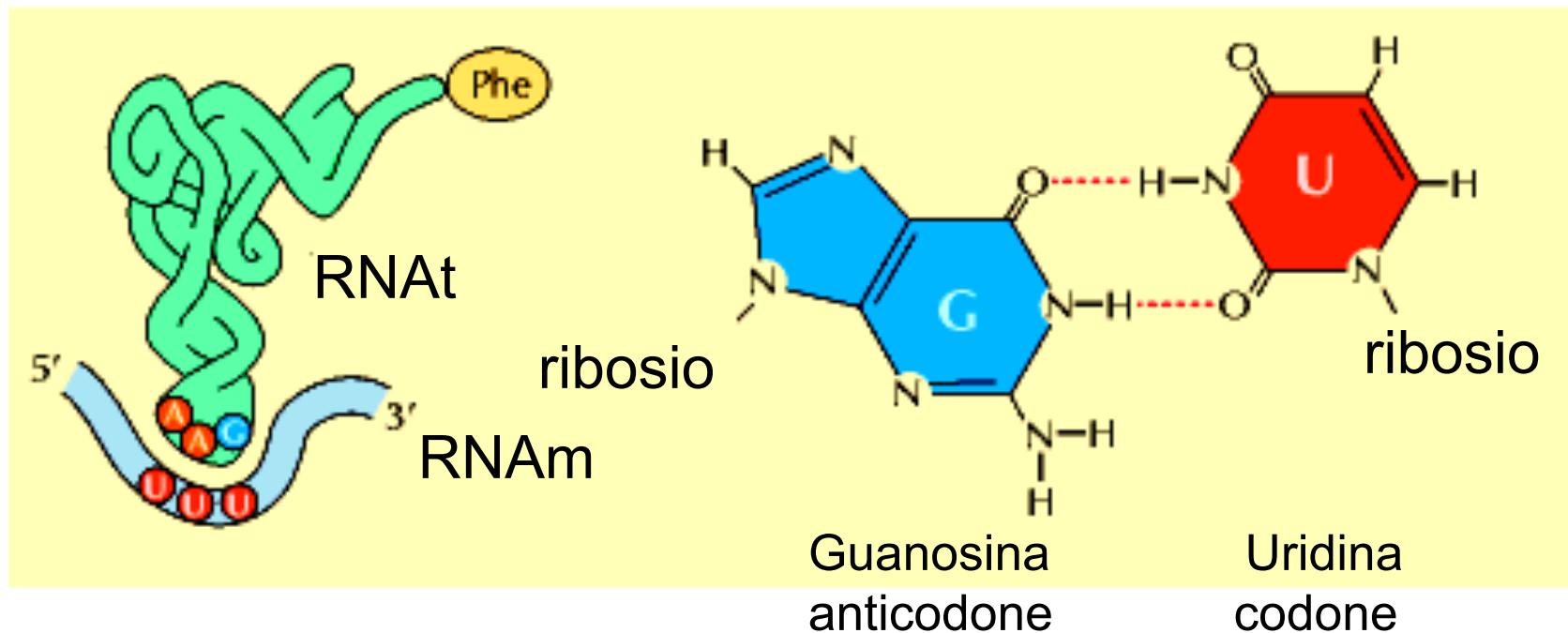
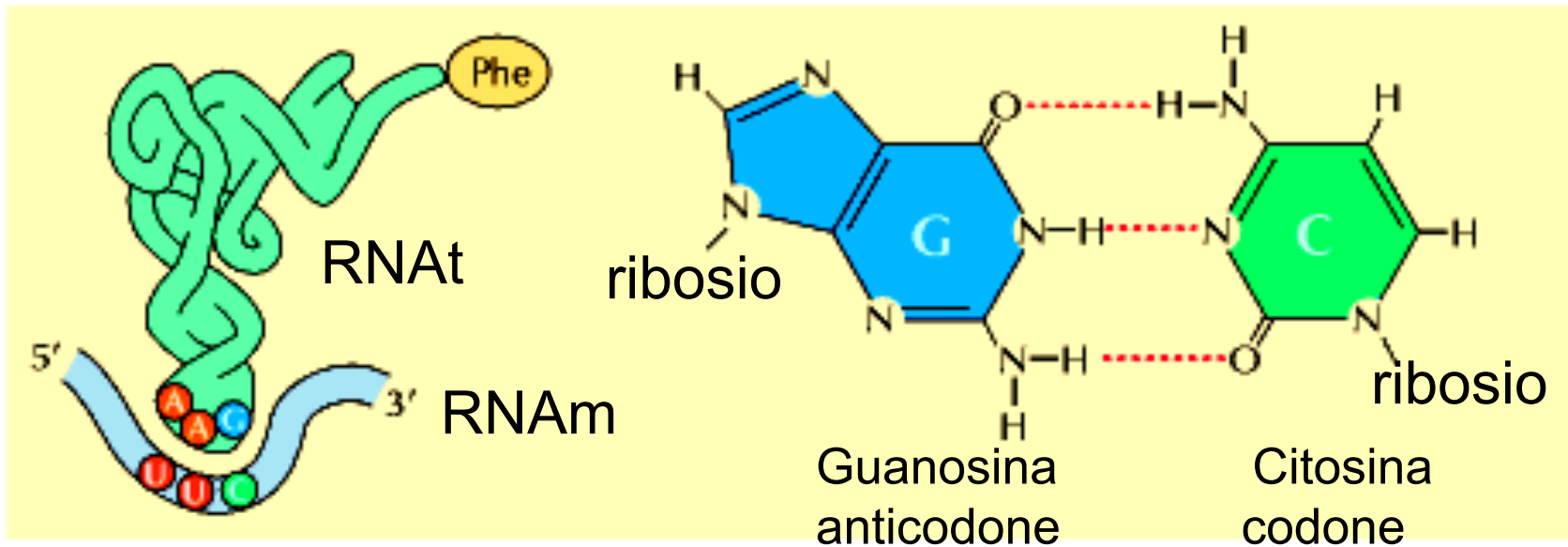
- 64 codoni
- 61 codoni codificano per 20 aminoacidi quindi più codoni uno stesso aminoacido (degenerato)
- 3 codoni indicano lo stop
- 1 tRNA ha un solo anticodone e lega un solo aminoacido:
come si risolve questo problema?

		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	A	G
	C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	U	C	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	A	G
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	U	C	A	G
						Terza base del codone			

■ **Figura 4.46** Corrispondenza tra codoni ed aminoacidi.

macchina biosintetica di *Escherichia coli*, di aminoacidi marcati radioattivamente e di omopolimeri composti da

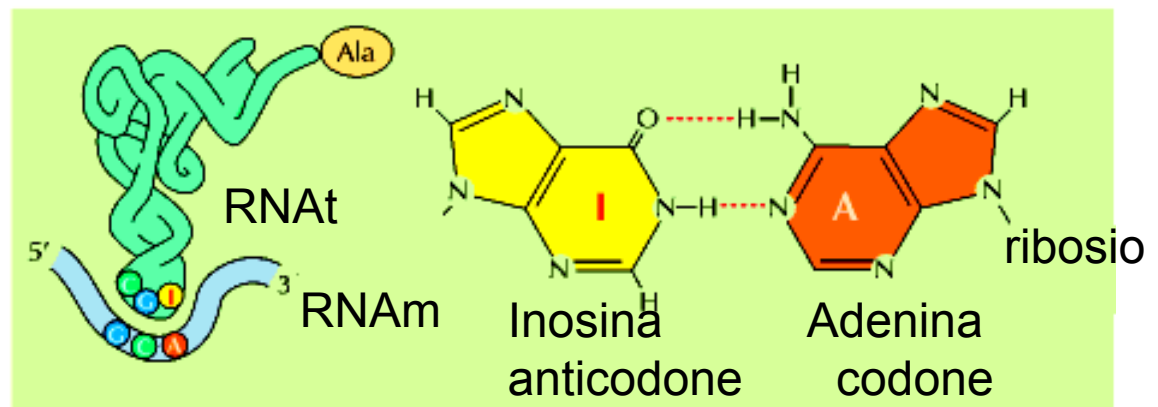
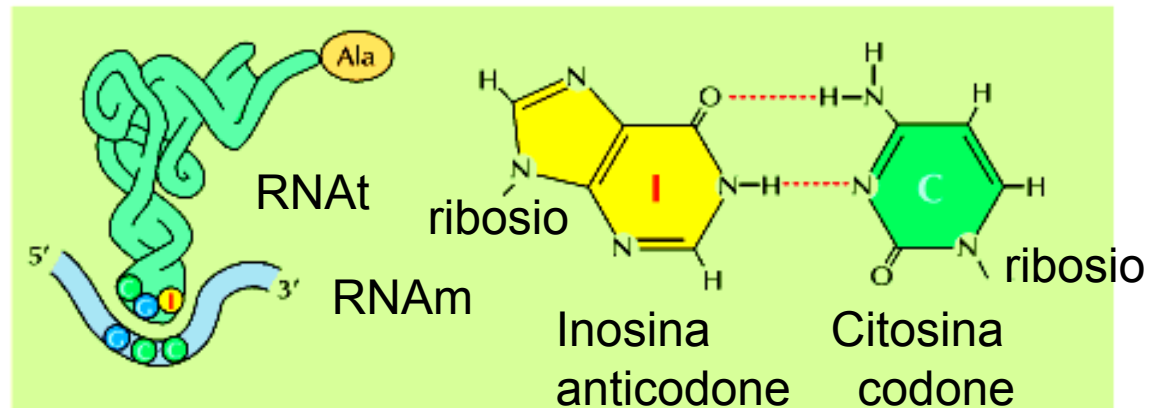
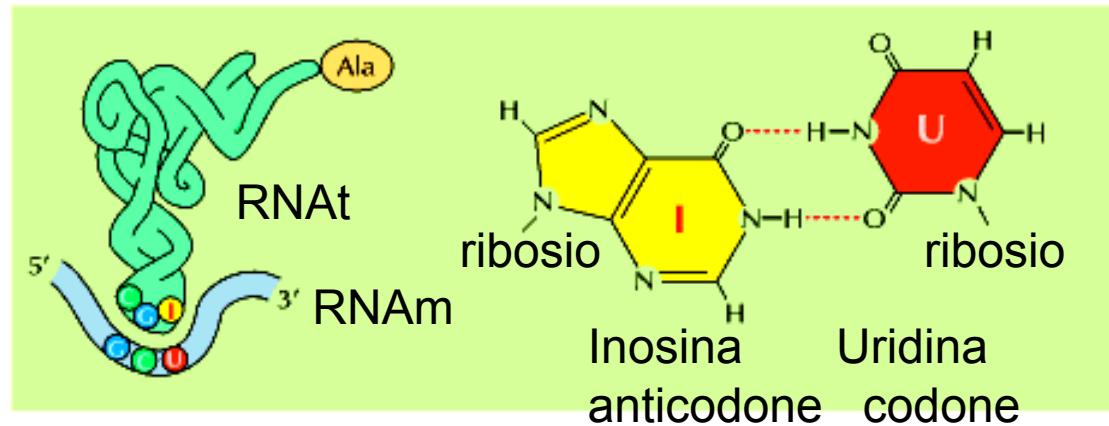
Appaiamento standard tra codone e anticodone (sopra)
Appaiamento non standard del fenilalanina RNAt (sotto)



Appaiamento non standard tra codone e anticodone

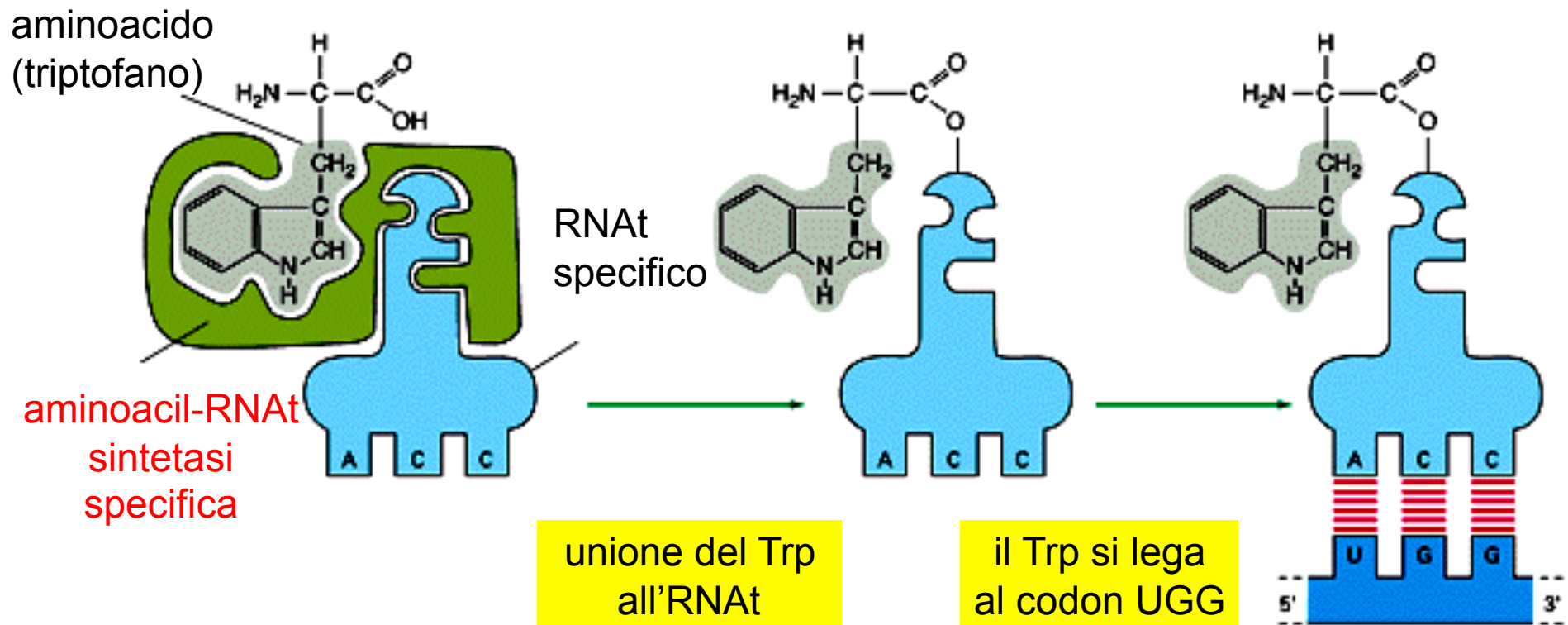
Appaiamento non standard dell'alanina RNAt

L'appaiamento rilassato delle basi nella terza posizione è causato in parte dalla formazione di coppie di basi G-U, in parte dalla 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.

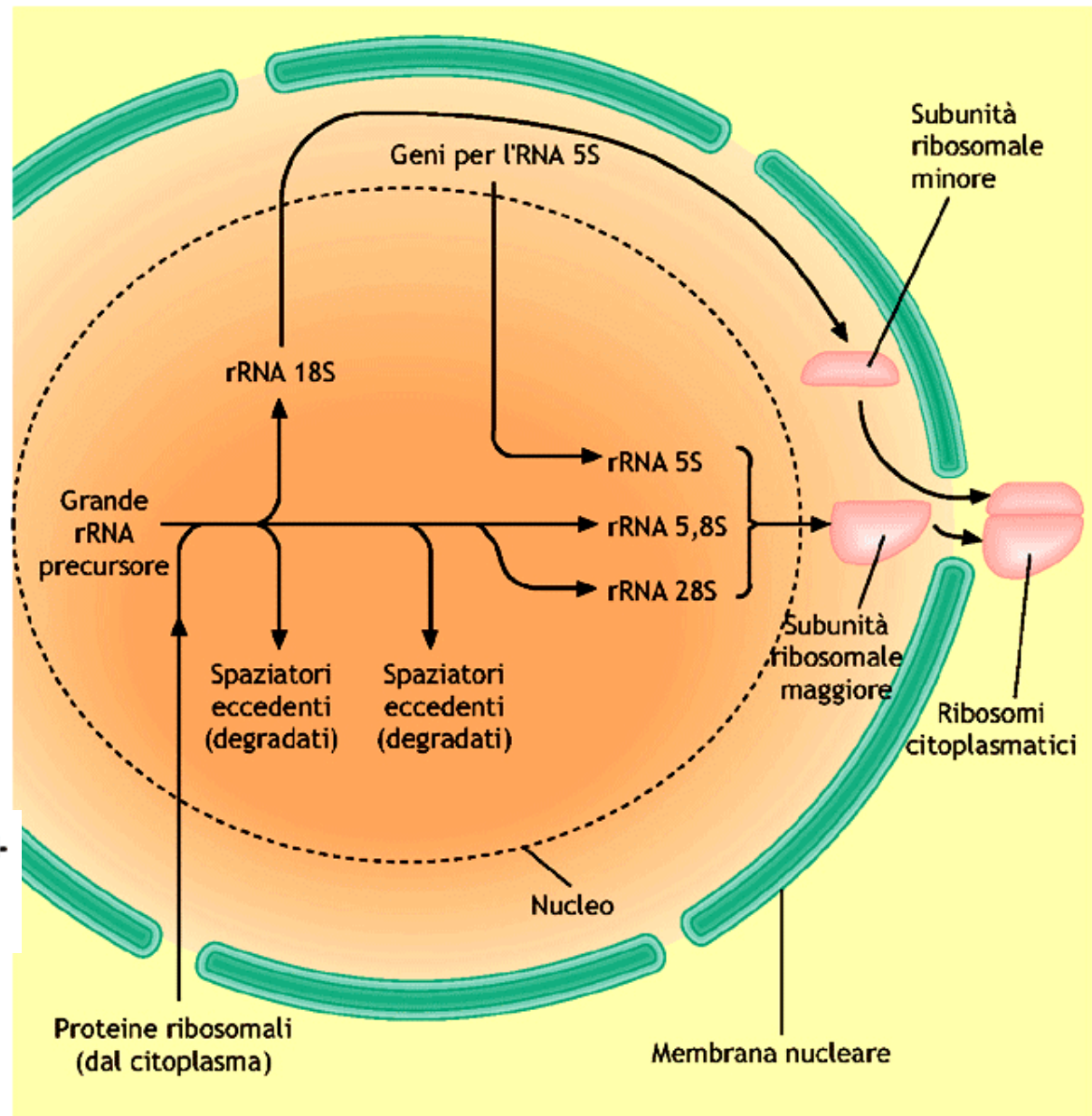
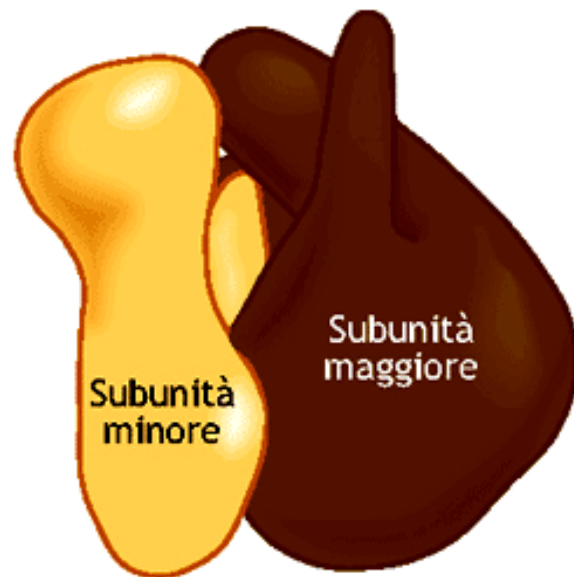


Traduzione nei procarioti

1. Fase ATP dipendente: attivazione dell'amminoacido



Apparato di traduzione: ribosomi



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

Sequenze di allineamento ai ribosomi

RNAm procariotico

Sequenza Shine-Dalgarno



RNAr 16S

RNAm eucariotico

UTR

5' cap m⁷G

AUG 3'

Subunità
ribosomale 40S

Scorrimento sul ribosoma

UTR

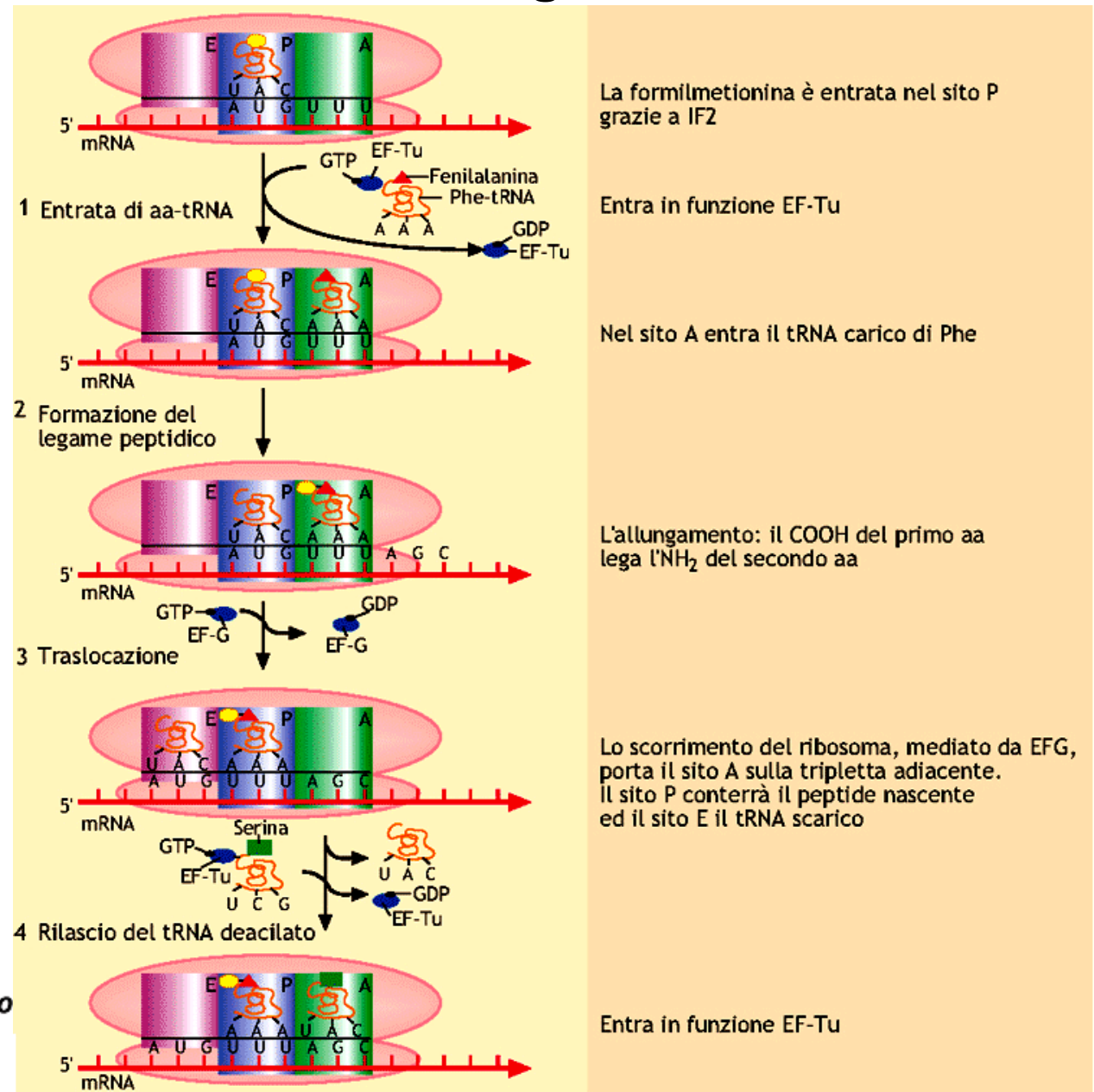
5' cap m⁷G

AUG 3'



Traduzione nei procarioti

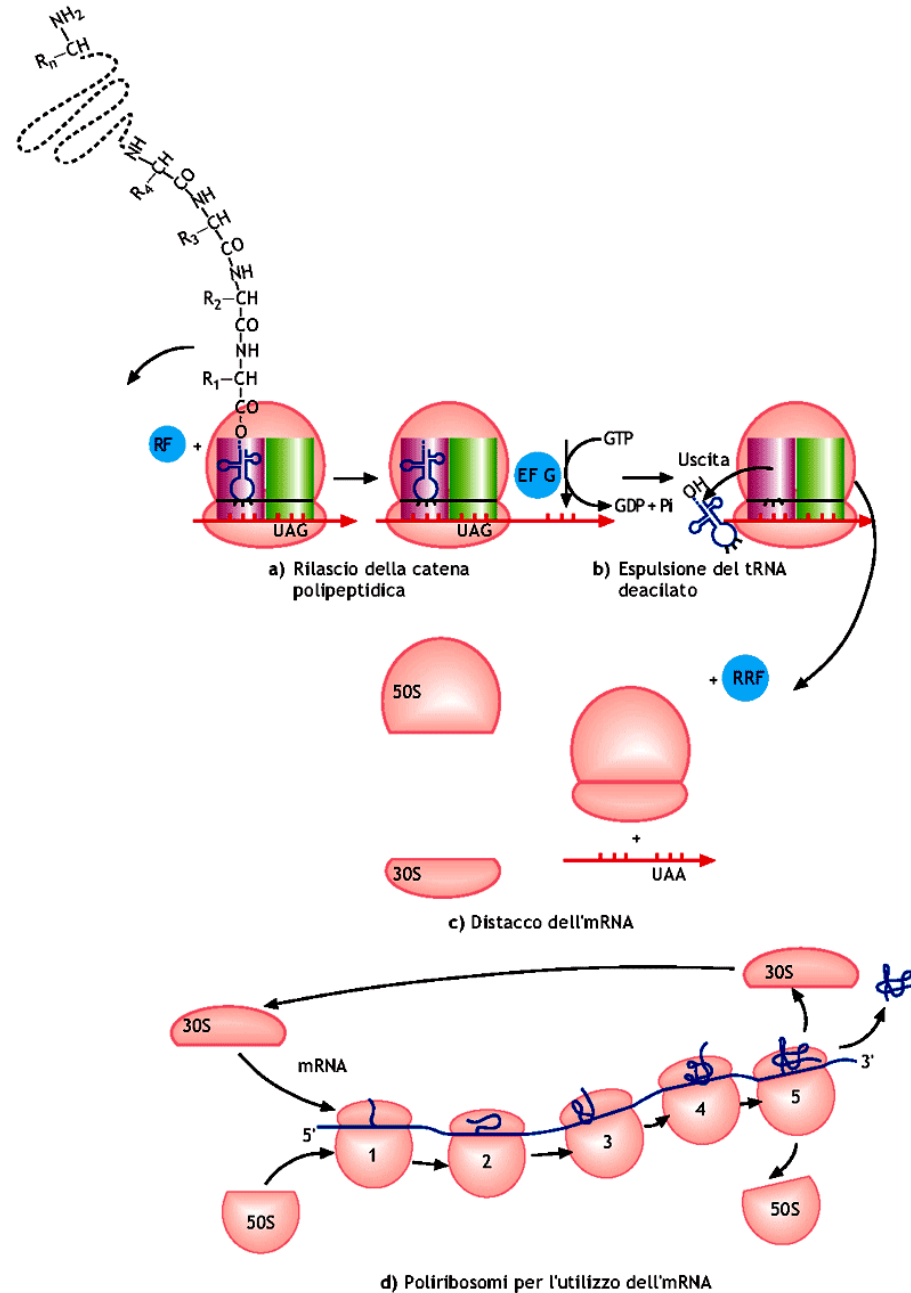
2 . Fasi GTP dipendenti: Inizio e allungamento



La struttura del codice genetico e la traduzione

Traduzione nei procarioti

2. Fase GTP dipendente: Termine



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