



Università degli Studi di Ferrara
Dipartimento di Scienze della Vita e Biotechnologie
LAUREA TRIENNALE IN BIOTECNOLOGIE



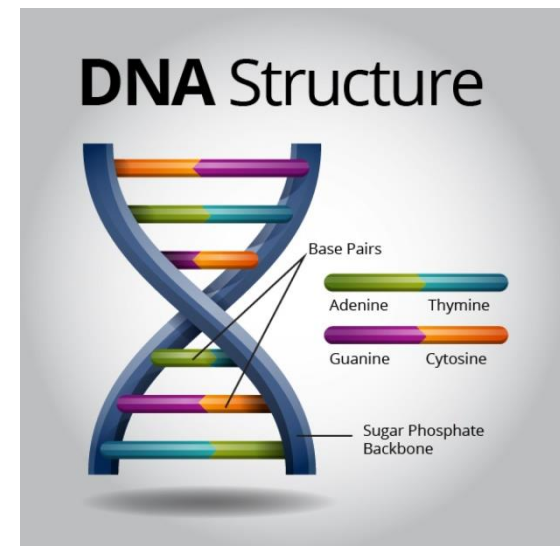
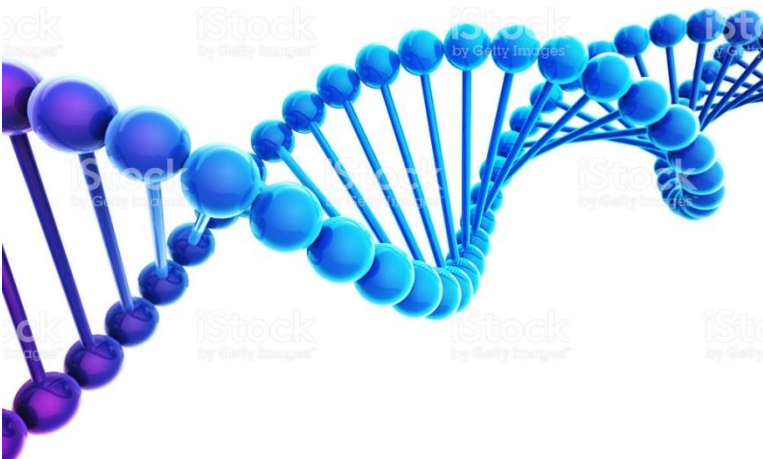
TUTORATO DI BIOLOGIA GENERALE PER BIOTECNOLOGIE ANNO 2018/2019

TUTOR DEL CORSO: ALBERTO VICENZI

E-mail: alberto.vicenzi@student.unife.it

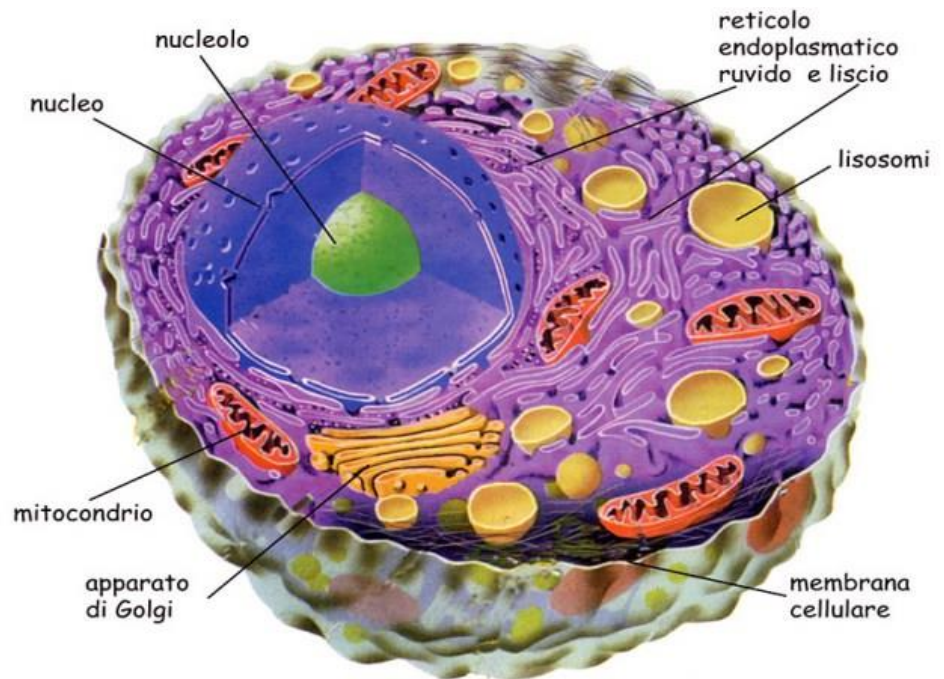
PREMESSA

- L'informazione genetica è conservata nelle sequenze nucleotidiche del DNA.
- Negli eucarioti la maggior parte del DNA di una cellula è localizzato all'interno del **nucleo**.



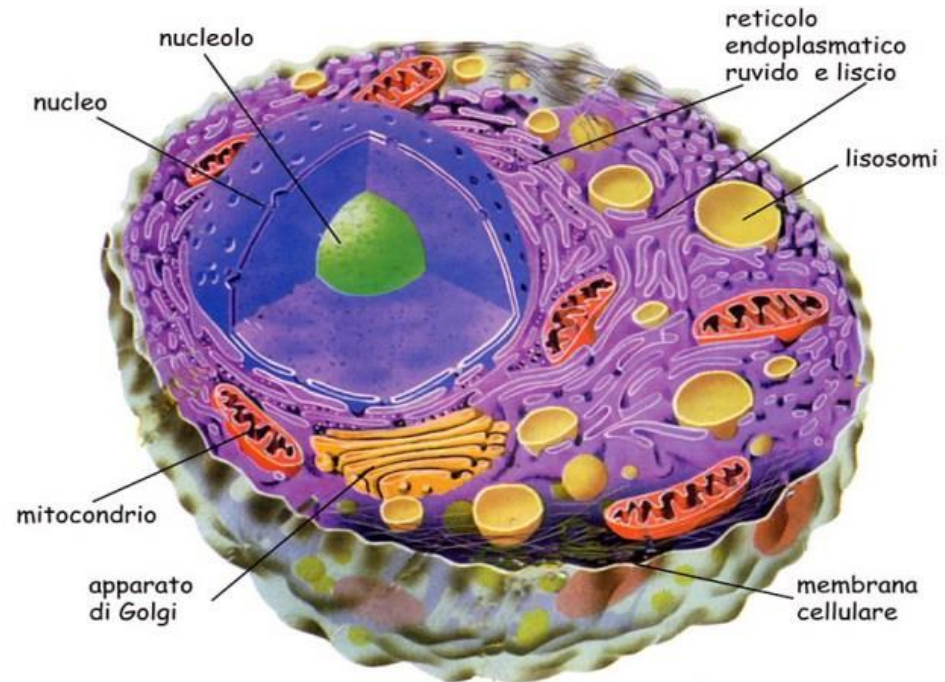
IL NUCLEO

- è circondato da una doppia membrana denominata involucro o membrana nucleare.
- in alcuni punti le due membrane si fondono per formare i **pori nucleari**.
- Questi pori hanno la funzione di far entrare o uscire materiale dal nucleo (comunicazione con il citoplasma).



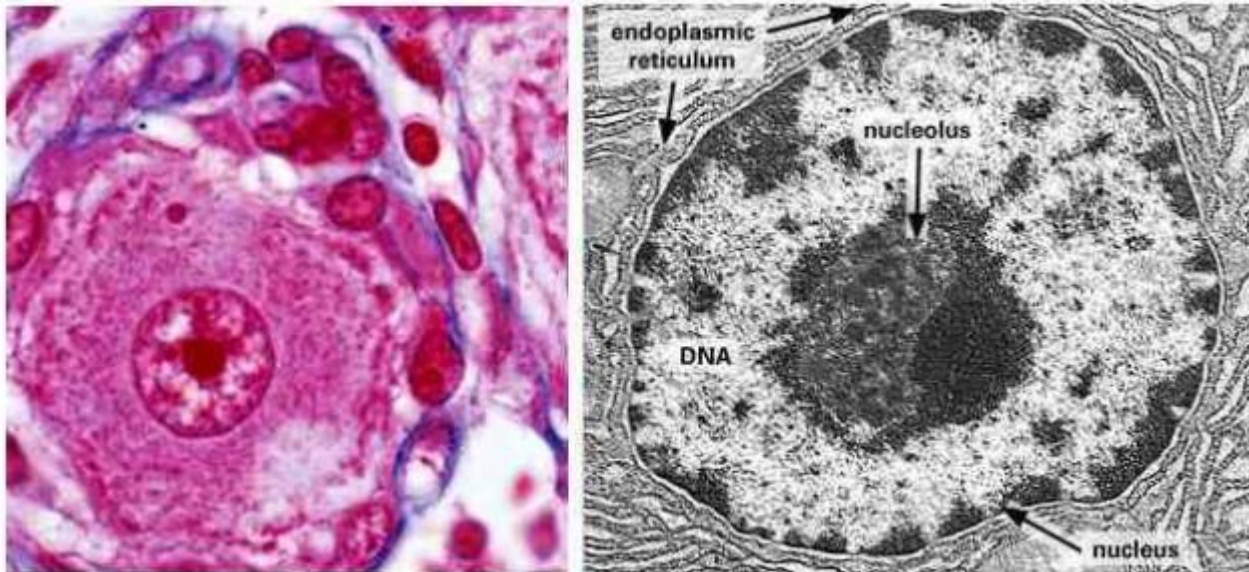
IL NUCLEO

- La membrana nucleare esterna è collegata alla membrana del reticolo endoplasmatico.
- Il nucleo contiene l'informazione genetica sotto forma di DNA.
- Il DNA risulta essere complessato con proteine strutturali gli **istoni**.



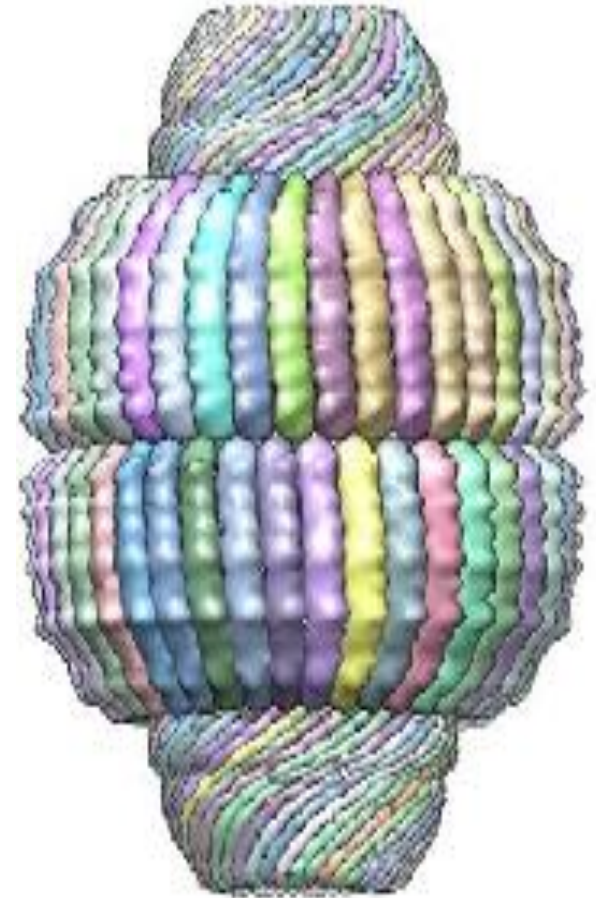
FUNZIONI DEL NUCLEO

controlla la maggior parte delle attività della cellula e gioca un ruolo importante nella replicazione, nell'accrescimento e differenziamento cellulare.



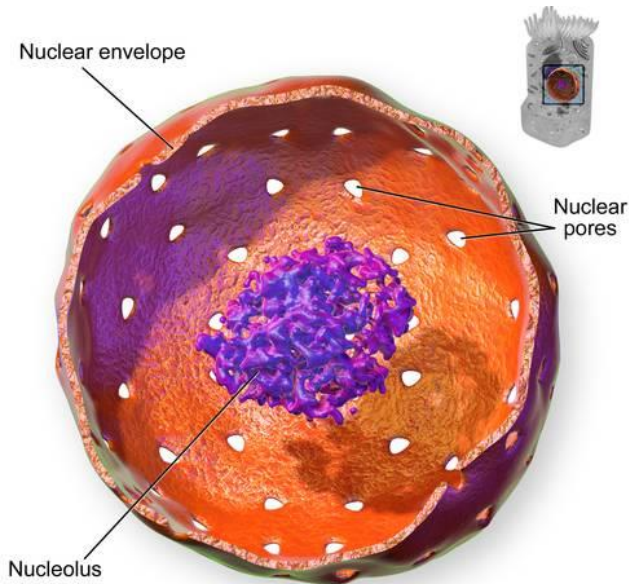
I VAULT

- sono gli organuli scoperti per ultimi (quindi più recentemente).
- Presentano una forma di barile o botticelle **ottagonali** formati per lo più da proteine e qualche RNA → ribonucleoproteina.
- si pensa abbiano funzione legata al **trasporto** di materiale dal nucleo al citoplasma.
- infatti sembra siano associati o si incastrino con i **pori nucleari** dove caricano i materiali che verranno poi trasportati.



NUCLEOLO

Di solito nel nucleo della cellula c'è una regione più scura formata da DNA e RNA denominata **nucleolo** e ha la funzione di produrre rRNA e ribosomi.



LA STRUTTURA DEL DNA

IL DNA

È formato da **due** catene **polinucleotidiche** **antiparallele** avvolte l'una sull'altra nella forma a **doppia elica**.



IL DNA

I 2 filamenti sono detti antiparalleli perché uno presenta un'estremità $5' \rightarrow 3'$ mentre l'altro $3' \leftarrow 5'$



DNA

- È formato da **due** catene **polinucleotidiche antiparallele** avvolte l'una sull'altra nella forma a **doppia elica**.
- Quindi il DNA è costituito da **NUCLEOTIDI!**

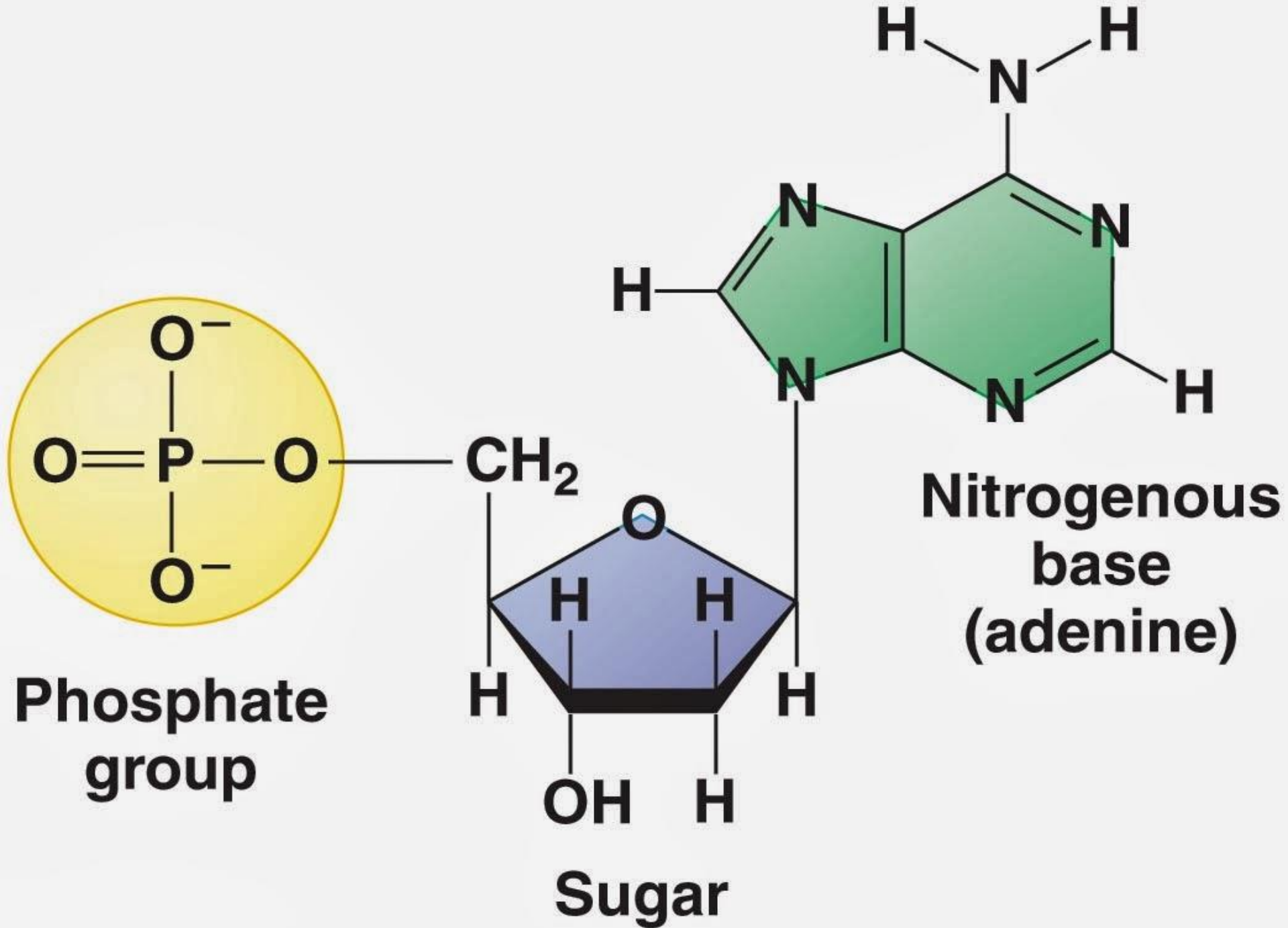
GLI ACIDI NUCLEICI

- Così chiamati perché identificati per la prima volta nel nucleo.
- Gli acidi nucleici sono macromolecole polimeriche formati dall'unione di monomeri: I NUCLEOTIDI.
- Gli acidi nucleici si dividono in DNA ed RNA.

STRUTTURA DEI NUCLEOTIDI

un nucleotide è formato da:

- **Uno zucchero** o monosaccaride a 5 atomi di carbonio (pentoso).
- **Un gruppo fosfato**, che viene indicato con il simbolo P e si lega allo zucchero.
- **Una base azotata**, che corrisponde ad un composto ad anello contenente carbonio idrogeno e azoto, che si lega anch'esso allo zucchero.

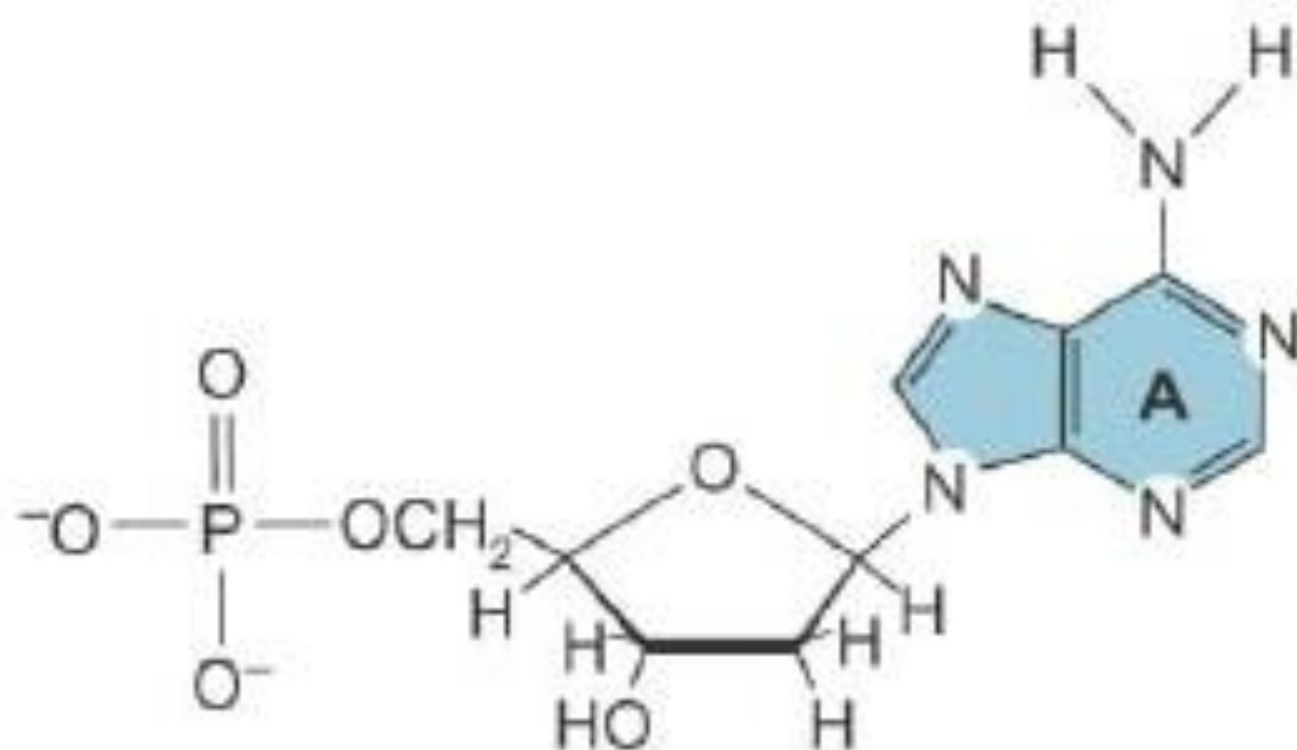


ATTENZIONE!!

- Lo zucchero a 5 atomi di carbonio (pentoso) differisce tra la molecola di DNA e quella di RNA!!

Infatti:

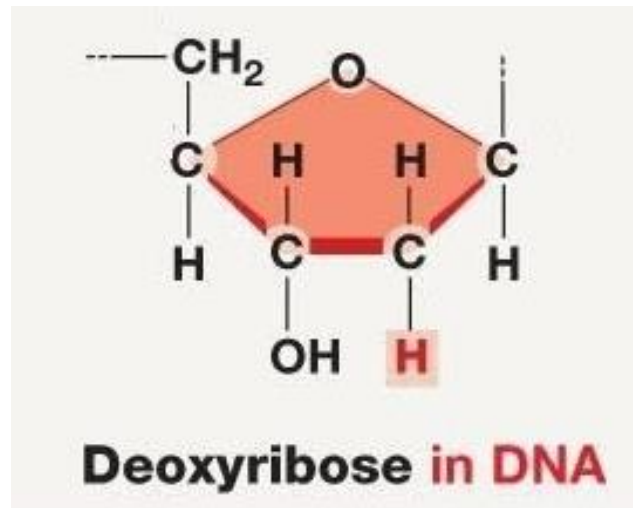
- **L'RNA** possiede come zucchero a 5 atomi di carbonio il **RIBOSIO**.
- **Il DNA** invece come zucchero a 5 atomi di carbonio possiede il **2-DEOSSIRIBOSIO**.

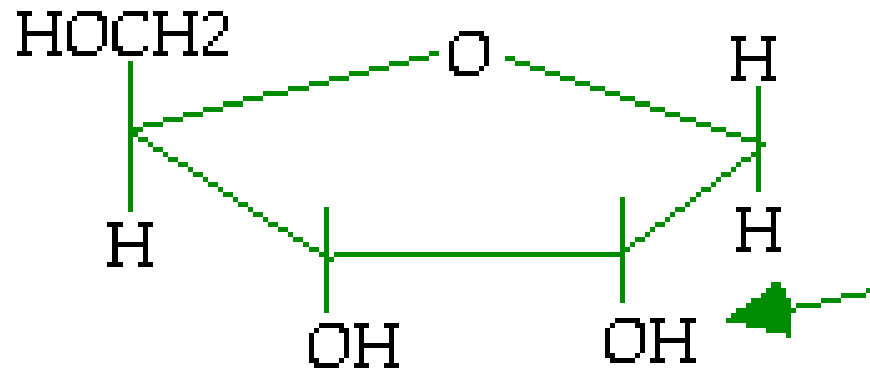


nucleotide (dAMP)

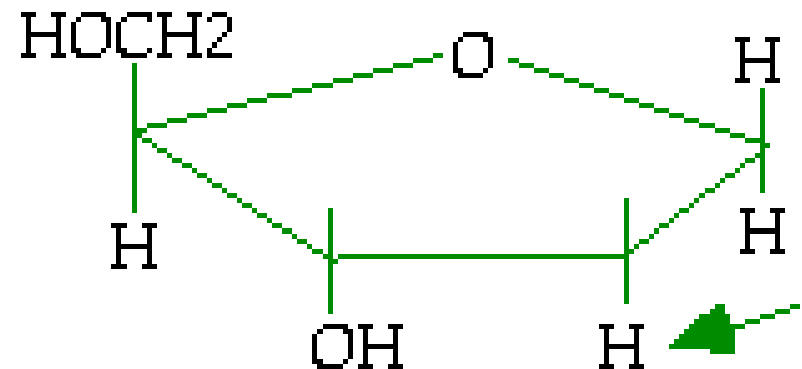
2-DEOSSIRIBOSIO

- Lo zucchero a 5 atomi di carbonio che compone il **DNA** è chiamato **2-DEOSSIRIBOSIO**.
- Perché al carbonio in posizione 2' è **legato un H** al posto del gruppo OH!





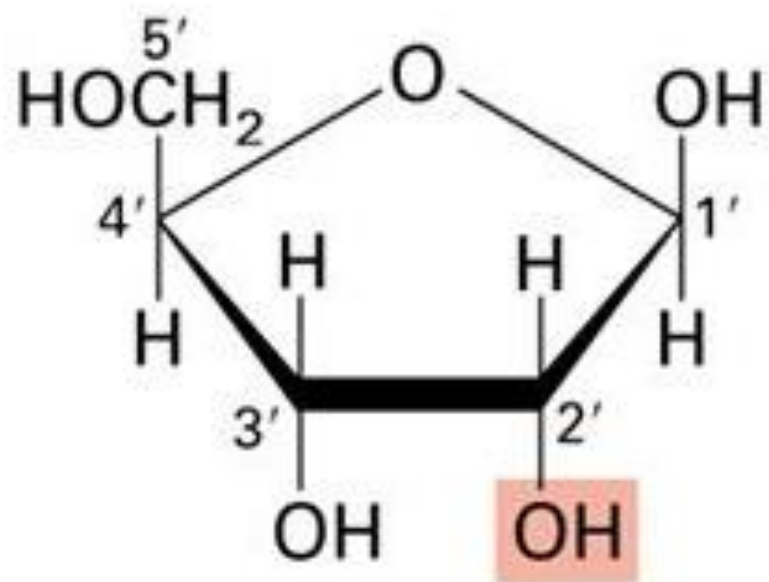
Ribosio



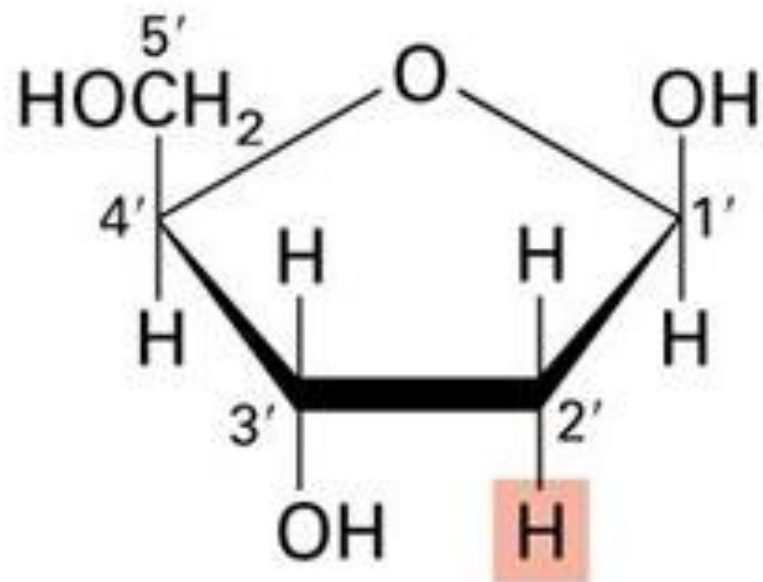
Deossiribosio

LA DIFFERENZA TRA LO ZUCCHERO RIBOSIO E DESOSSIRIBOSIO STA NEL CARBONIO IN POSIZIONE 2'.

NEL RIBOSIO OLTRE AD UN IDROGENO LEGA UN GRUPPO OH, MENTRE NEL DESOSSIRIBOSIO LEGA UN ALTRO IDROGENO!!

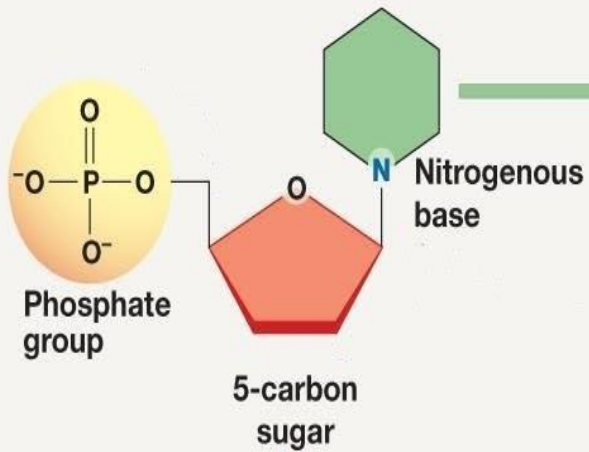


Ribose

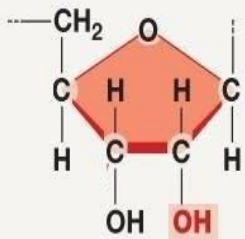


2-Deoxyribose

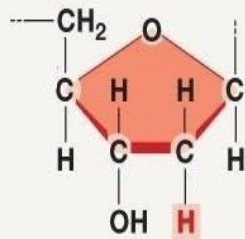
Basic Nucleotide Structure



(b) Sugars

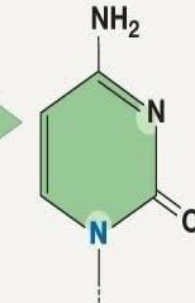


Ribose in RNA

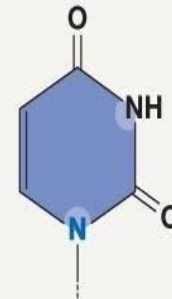


Deoxyribose in DNA

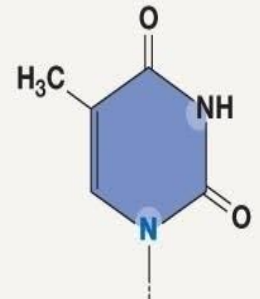
(c) Nitrogenous bases



Cytosine (C)

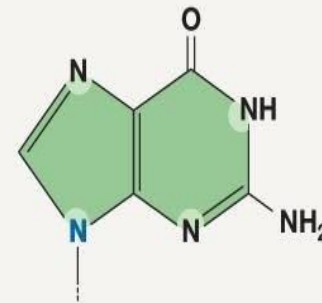


Uracil (U) in RNA



Thymine (T) in DNA

Pyrimidines



Guanine (G)



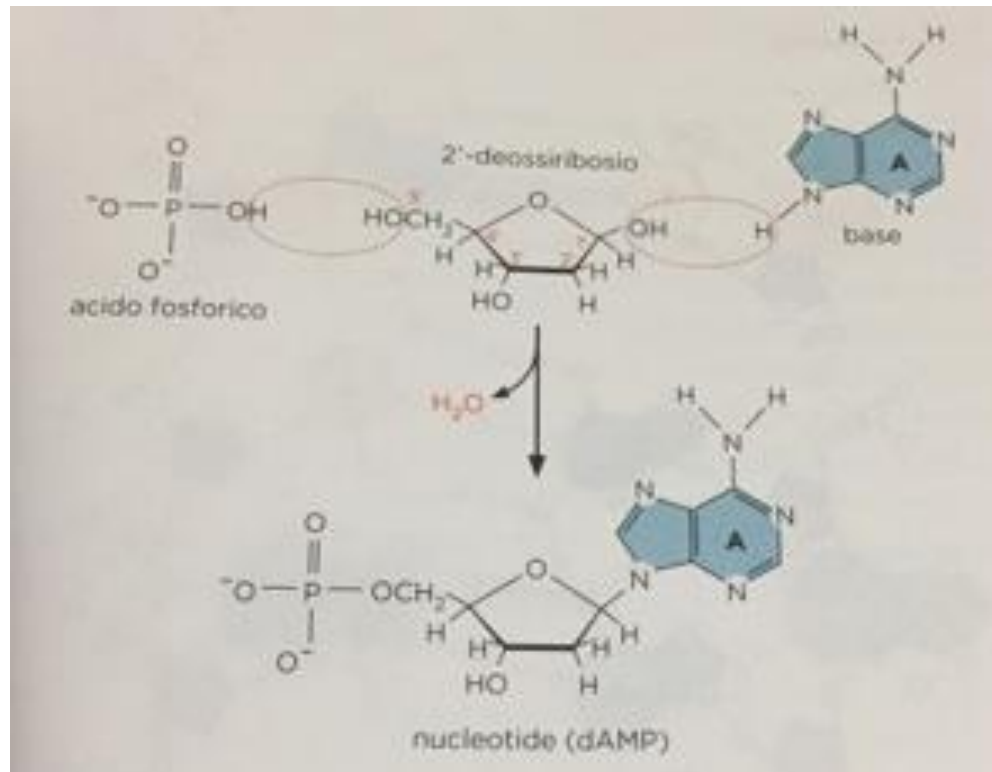
Adenine (A)

Purines

Purines are larger than pyrimidines

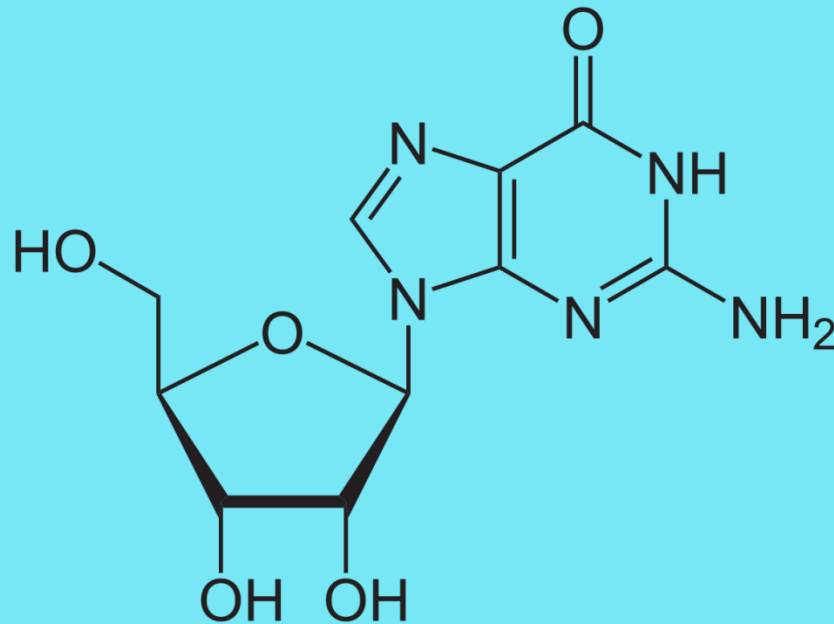
I LEGAMI

- La base azotata si lega al Carbonio in posizione 1' dello zucchero mediante un legame **glicosidico**.
- Il gruppo fosfato si lega al Carbonio in posizione 5' dello zucchero mediante un legame **fosfodiesterico**.



APPROFONDIMENTO

Lo zucchero unito alla sola base azotata mediante un legame N-glicosidico, prende il nome di **NUCLEOSIDE**.



LE BASI AZOTATE

Si suddividono in 2 famiglie:

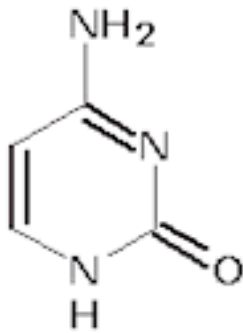
- Le **PIRAMIDINE**: composte da un solo anello eterociclico e sono **TIMINA, CITOSINA e URACILE**.
- Le **PURINE**: composte da due anelli eterociclici e sono **ADENINA e GUANINA**.

Nel **DNA** sono presenti: ADENINA, TIMINA, CITOSINA e GUANINA.

Nell' **RNA** sono presenti ADENINA, URACILE, CITOSINA e GUANINA.

PIRAMIDINE

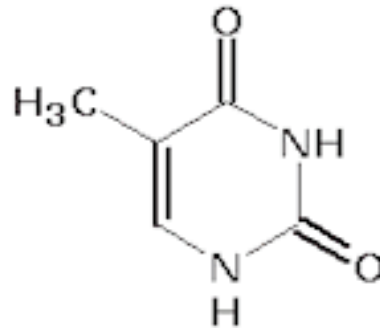
4-aminopyrimidin-
2 (1*H*)-one



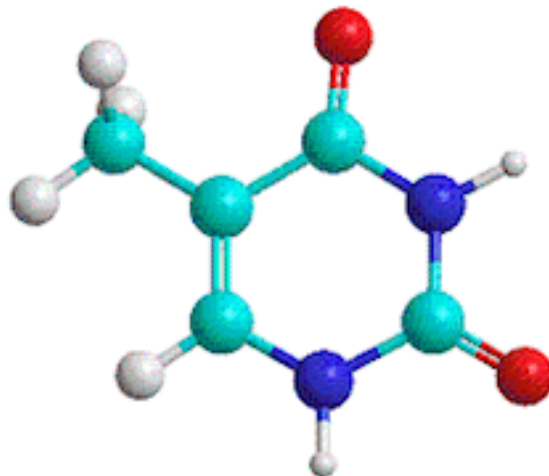
Citosina



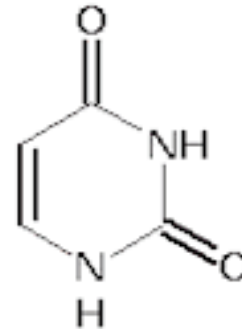
5-methylpyrimidine-
2,4 (1*H*,3*H*)-dione



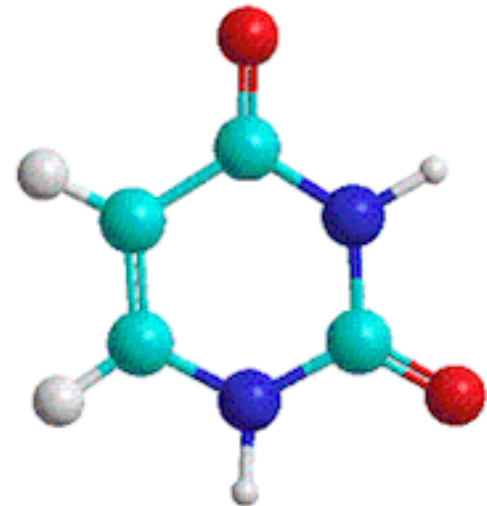
Timina



pyrimidine-2,4
(1*H*,3*H*)-dione

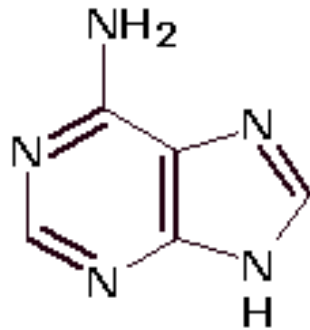


Uracile

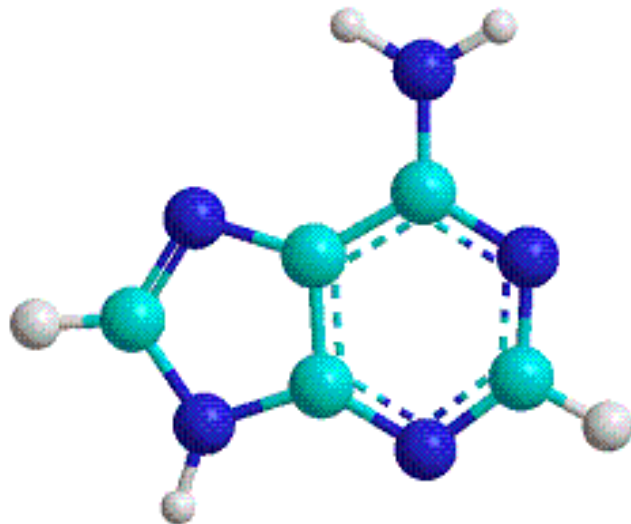


PURINE

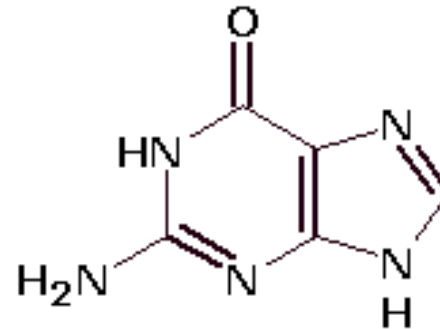
9*H*-purin-6-amine



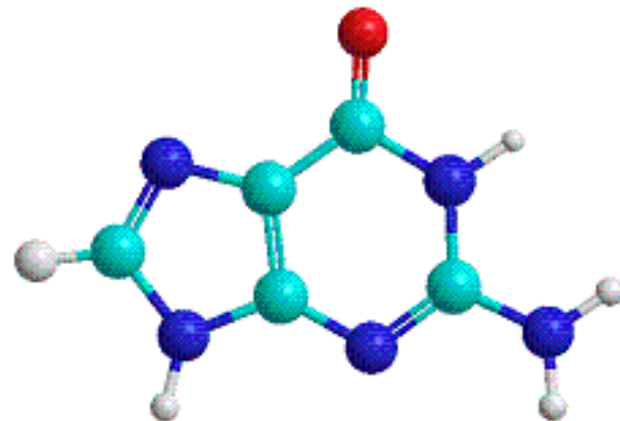
Adenina



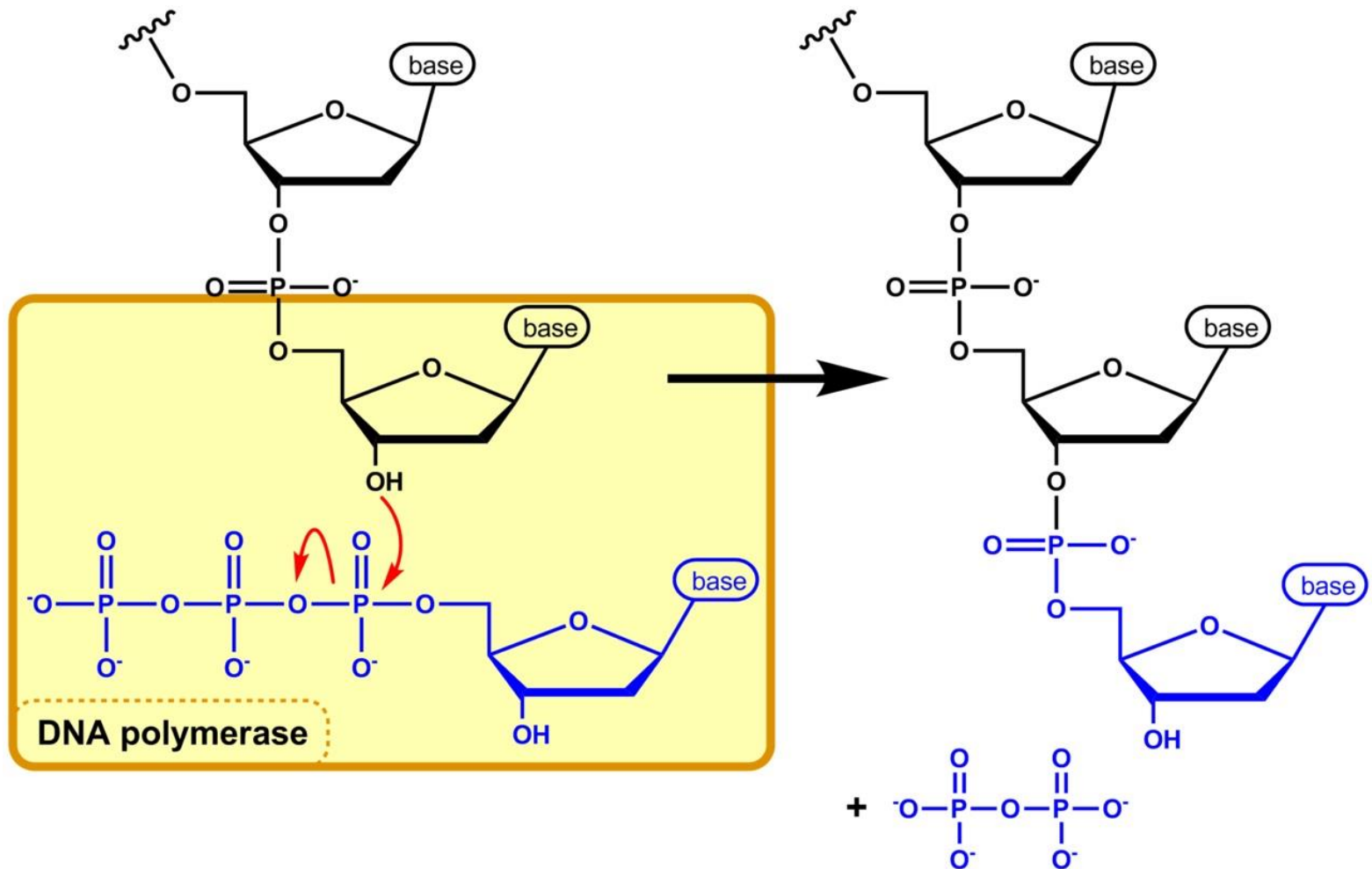
2-amino-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-one



Guanina

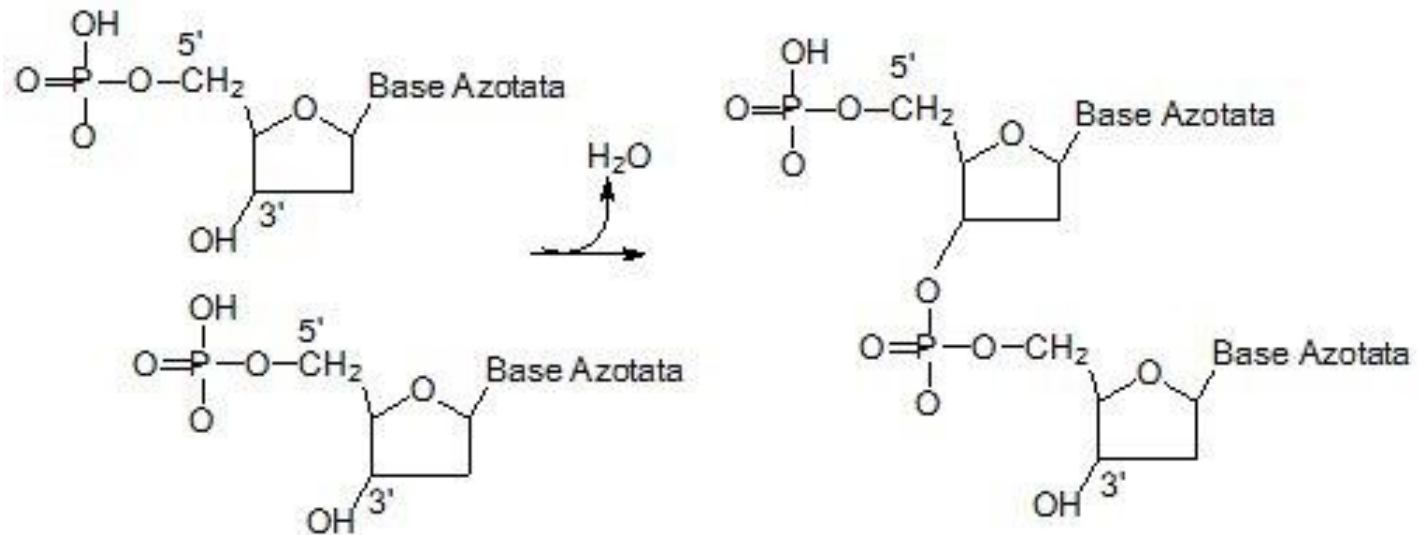


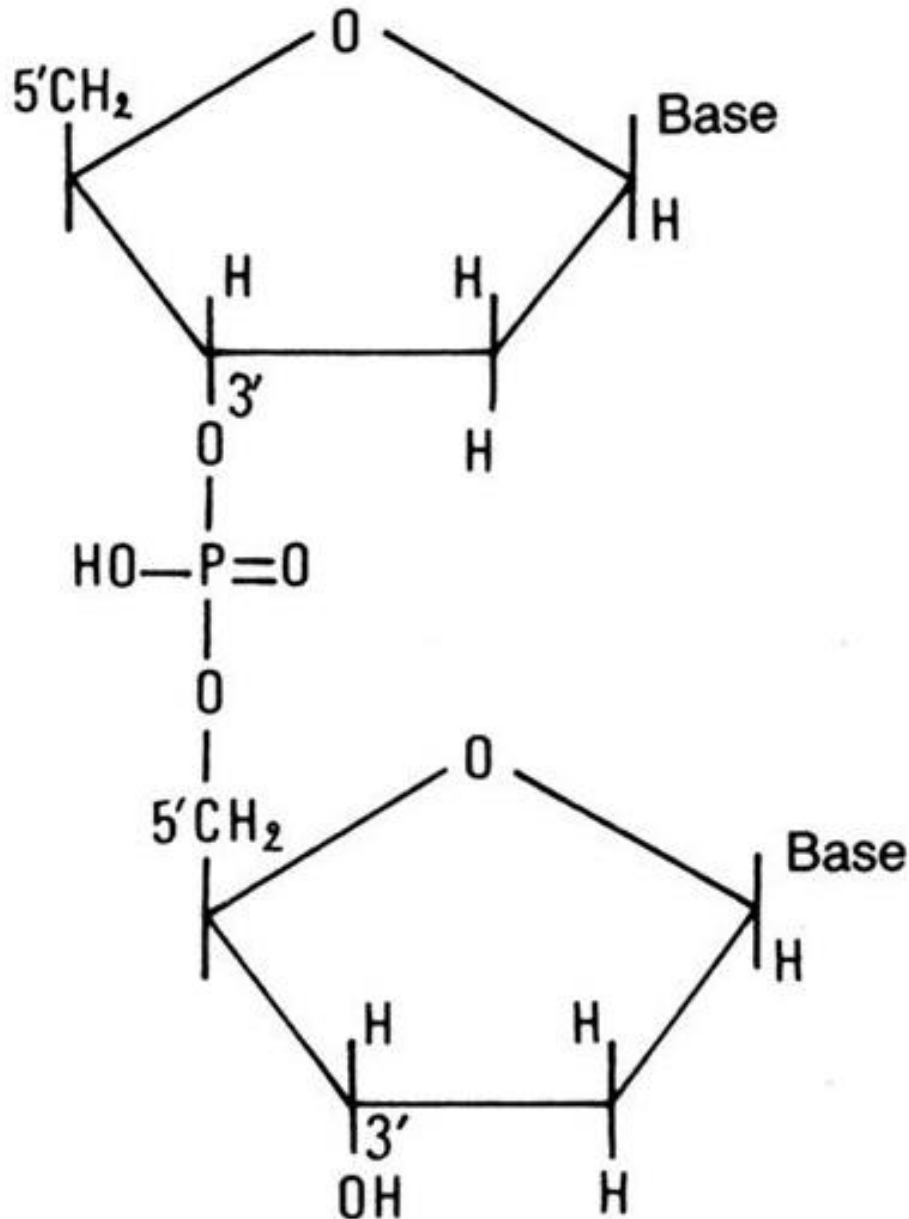
I nucleotidi sono legati gli uni agli altri mediante un legame **FOSFODIESTERICO**, a formare lunghe catene polinucleotidiche.



IL LEGAME FOSFODIESTERICO

Il legame fosfodiesterico si forma tra l'Ossidrile in posizione 3' del 2-DEOSSIRIBOSIO di un primo nucleotide ed il fosfato (P) attaccato al carbonio 5' di un nucleotide adiacente!





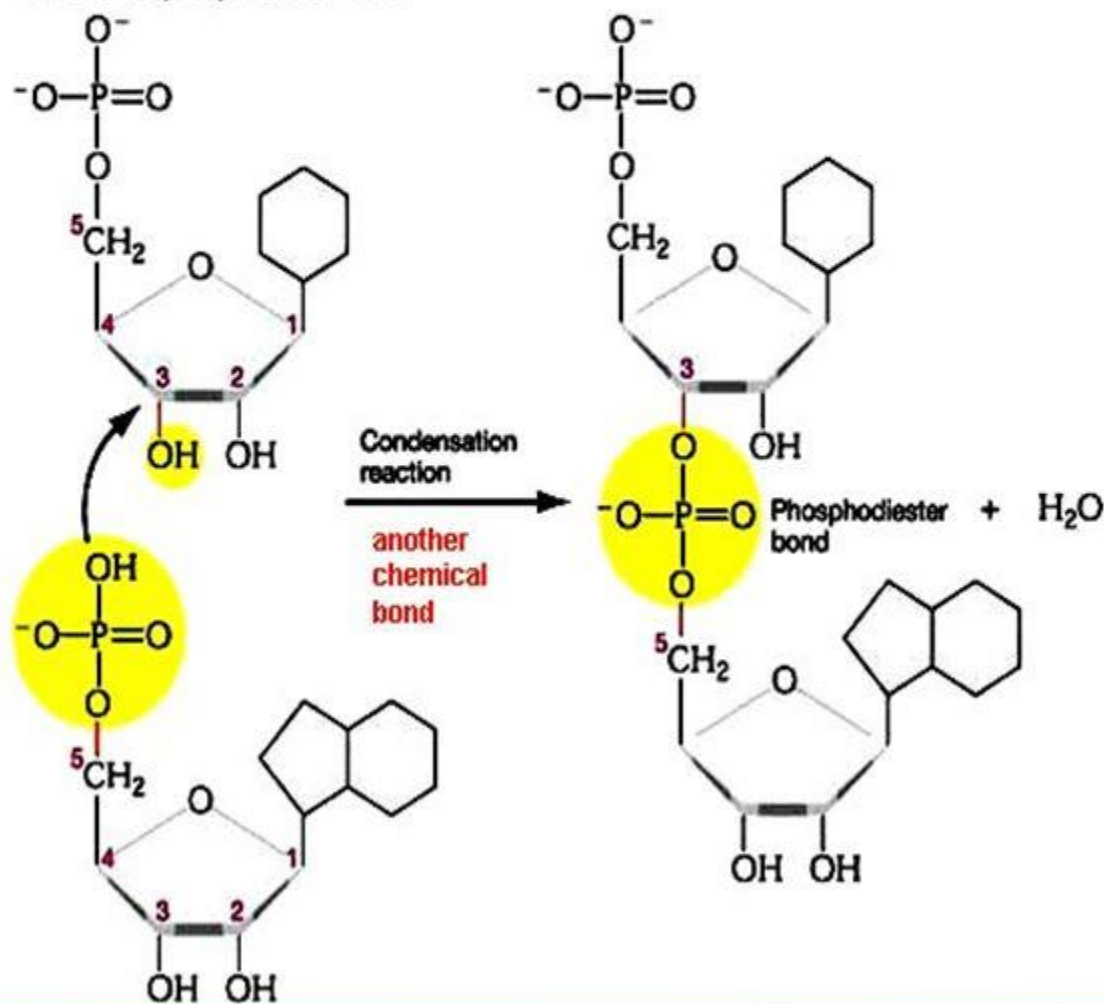
IL LEGAME

FOSFODIESTERICO FORMA
 UNA IMPALCATURA
ZUCCHERO FOSFATO CHE E'
 CARATTERISTICA DEL DNA E
 CORRISPONDE ALLO
SCHELETRO
FOSFODIESTERICO!

NEL MOMENTO IN CUI SI FORMA
 IL LEGAME FOSFODIESTERICO FRA
 2 NUCLEOTIDI ADIACENTI SI
 LIBERA UNA MOLECOLA D'ACQUA

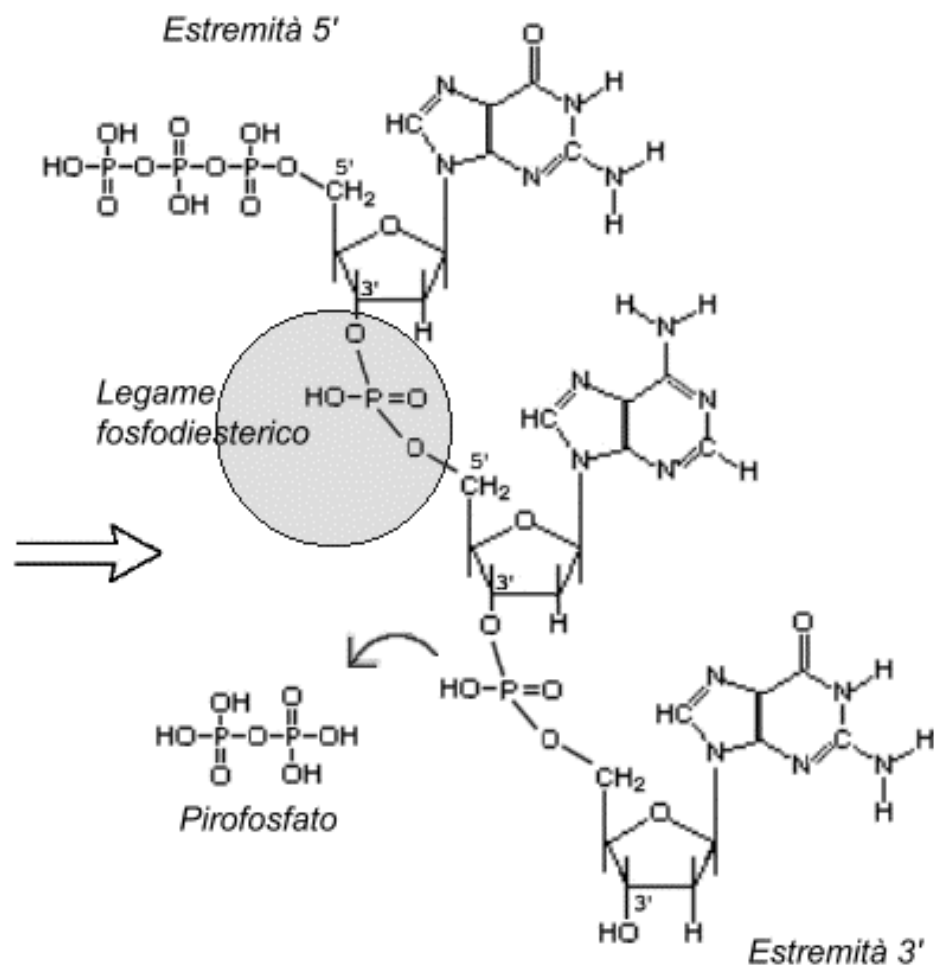
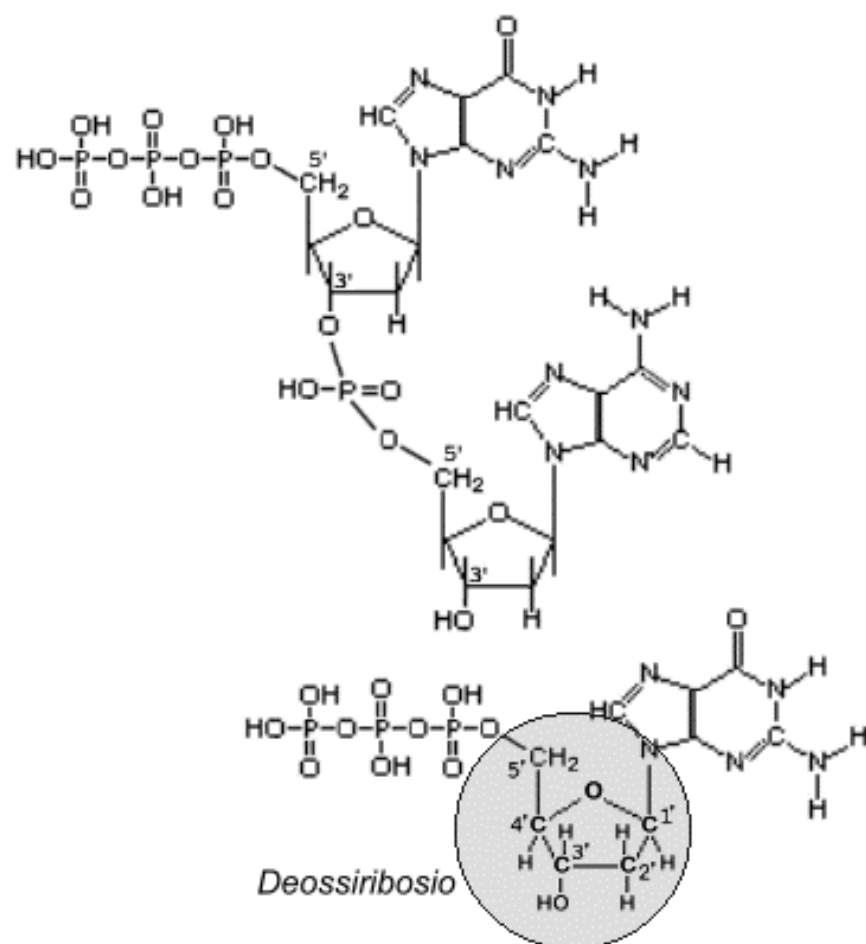
IL LEGAME TRA DUE NUCLEOTIDI: IL LEGAME FOSFODIESTERE

Formation of phosphodiester bond



AVVIENE TRA IL
GRUPPO FOSFATO
E UN **GRUPPO**
OSSIDRILICO DEL
PENTOSO

LE BASI
AZOTATE NON
PARTECIPANO
AL LEGAME



COMPLEMENTARIETA' FRA BASI

- Nel DNA, formato da un doppio filamento di nucleotidi, l'appaiamento delle coppie di basi non è casuale!
- L' ADENINA si appaia solo alla TIMINA mediante 2 legami Idrogeno!
- La GUANINA si appaia solo con la CITOSINA mediante 3 legami idrogeno!

La complementarietà

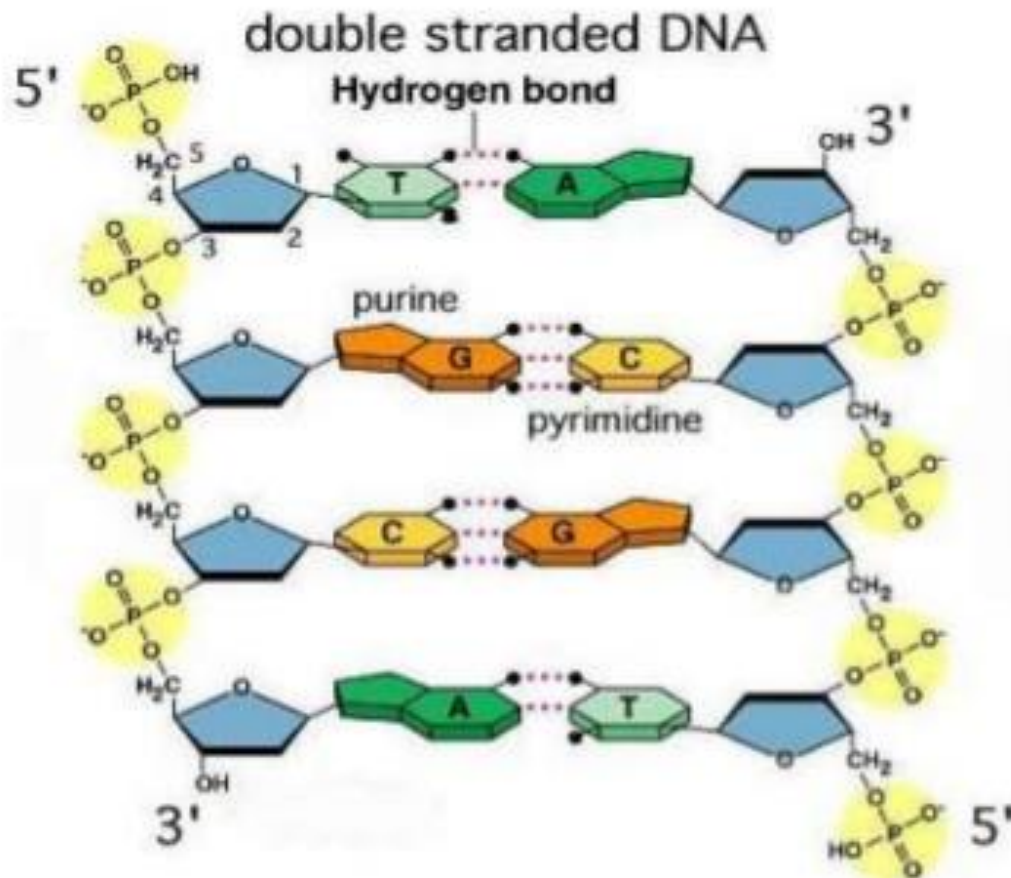


La complementarietà si basa su:

- Dimensioni delle basi
- Numero di legami idrogeno

Appaiamenti canonici di Watson e Crick

La molecola di DNA è costituita da **DUE FILAMENTI «COMPLEMENTARI»**:
le basi azotate si appaiano in modo DEFINITO e sono stabilizzate da
legami H.



Purina

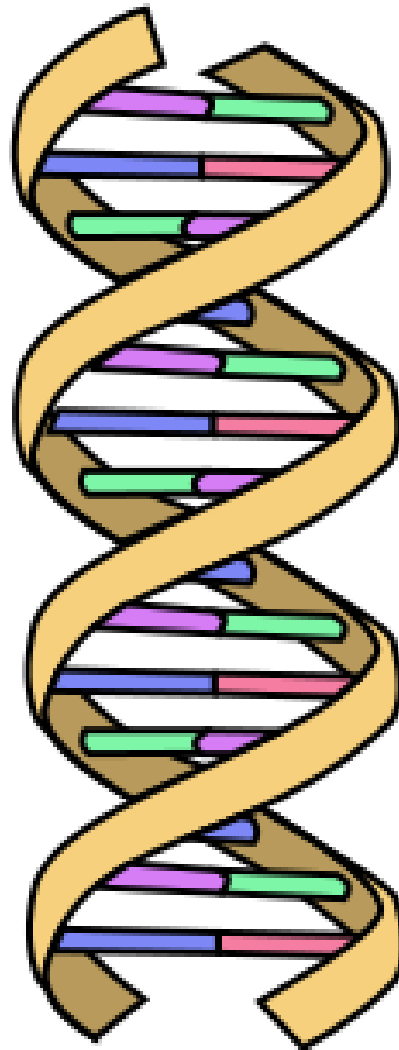


Pirimidina

ADENINA $\leftarrow$ 2 legami H $\rightarrow$ TIMINA

GUANINA $\leftarrow$ 3 legami H $\rightarrow$ CITOSINA

**La distanza tra i due filamenti
è costante**



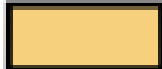
DNA

 = Adenina

 = Timina

 = Citosina

 = Guanina

 = Struttura laterale
(gruppo fosfato
e 2-deossiribosio)

CARATTERISTICHE DEL DNA

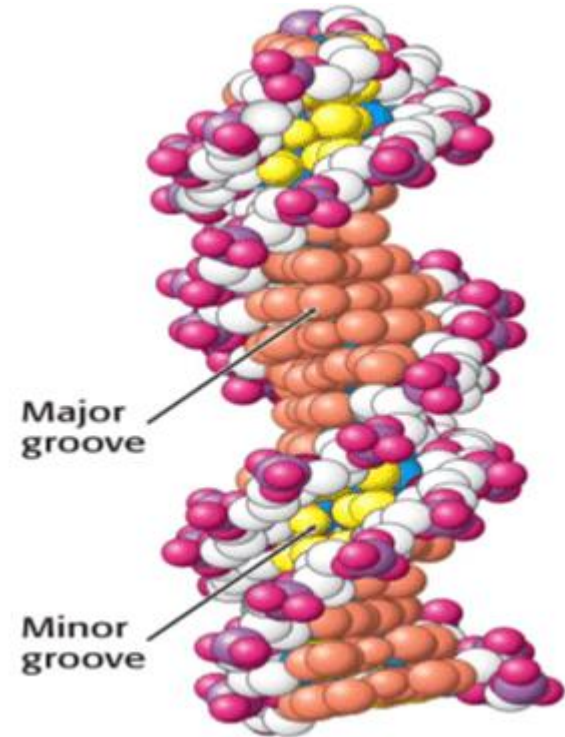
- È formato da **due** catene **polinucleotidiche antiparallele** avvolte l'una sull'altra nella forma a **doppia elica**.
- Quindi il DNA è costituito da **NUCLEOTIDI!**
- Lo zucchero a 5 atomi di carbonio presente nei nucleotidi del DNA è il **2-DEOSSIRIBOSIO**.
- Le basi azotate tipiche del DNA sono: **ADENINA, TIMINA, CITOSINA, GUANINA**.
- Per convenzione le sequenze di DNA sono scritte e lette sempre a partire dall'estremità **5'→3'**
- Il DNA è **carico negativamente** per la presenza dei gruppi fosfati anch'essi carichi negativamente.
- Ciascuna coppia di basi è ruotata rispetto la **precedente di 36°**.
- Per ogni giro d'elica è stata riscontrata la presenza di **circa 10 coppie** di basi.
- Ed il passo d'elica è di 34 Amstrong

ADENINA ← 2 legami H → TIMINA

GUANINA ← 3 legami H → CITOSINA

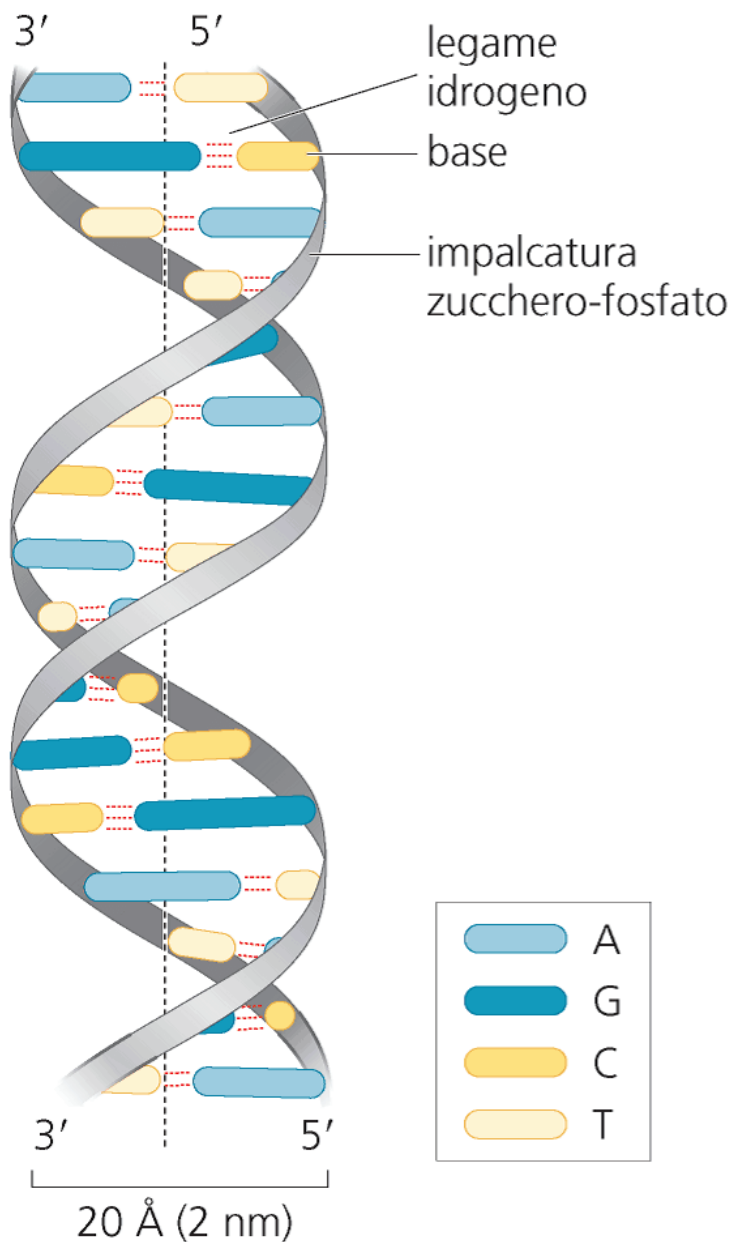
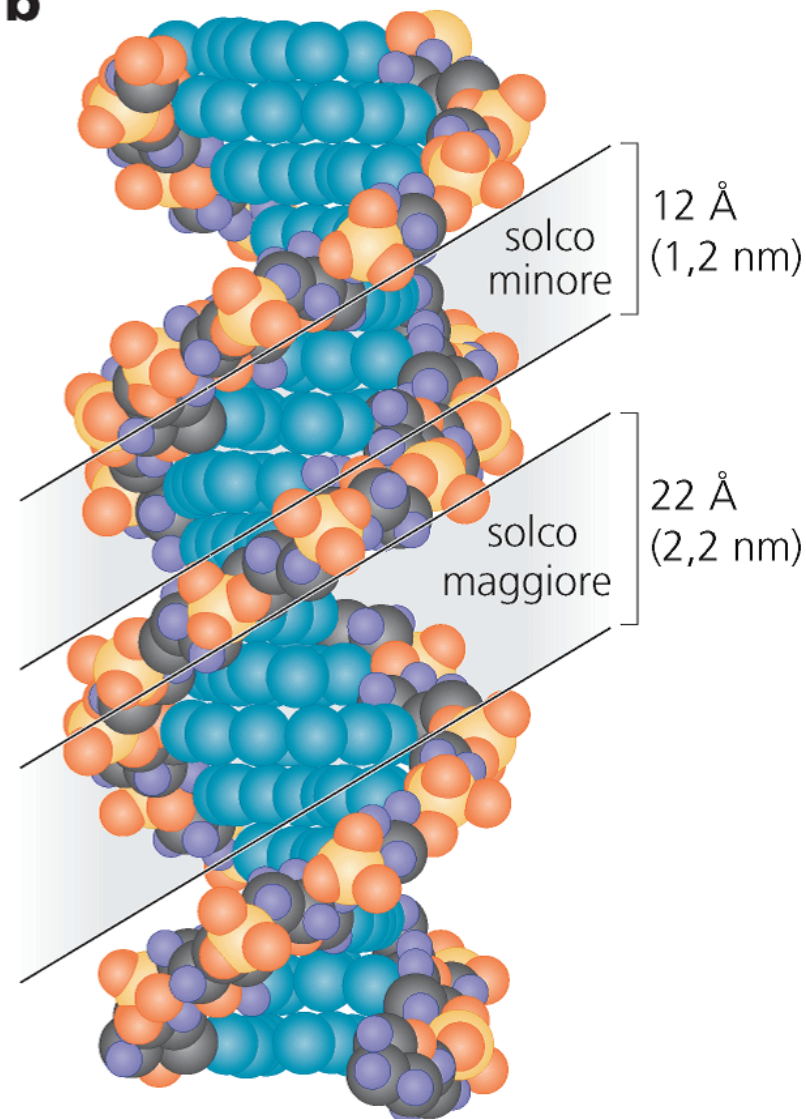
IL DNA

- Presenta 2 solchi:
 - **Uno maggiore** di 22 Amstrong → altamente informativo.
 - **Uno minore** di 12 Amstrong.



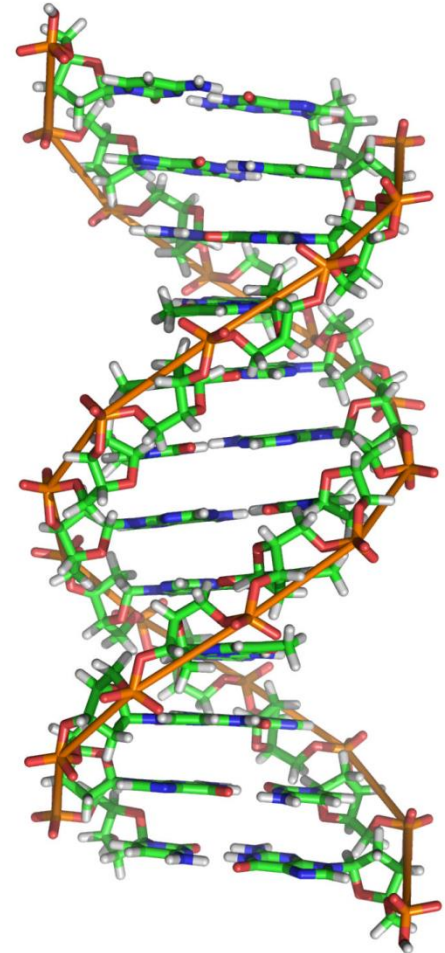
a

1 giro d'elica = $34 \text{ \AA} = \sim 10,5$ coppie di basi

**b**

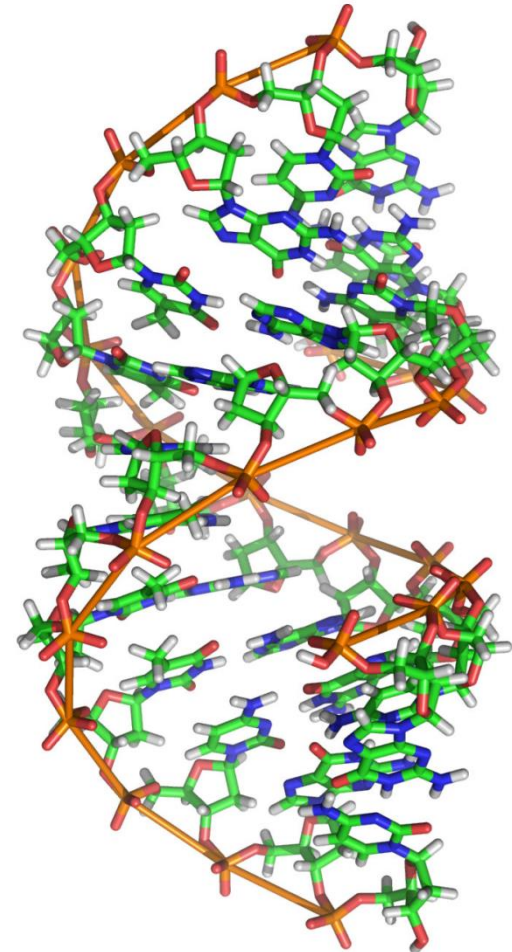
CONFORMAZIONI DEL DNA

- La **forma B** si osserva quando il DNA è in soluzione;
- È quella che si avvicina meglio alla struttura fisiologica;
- Contiene **10 coppie** di basi per giro d'elica;
- ha un ampio solco maggiore ed uno più stretto il solco minore.



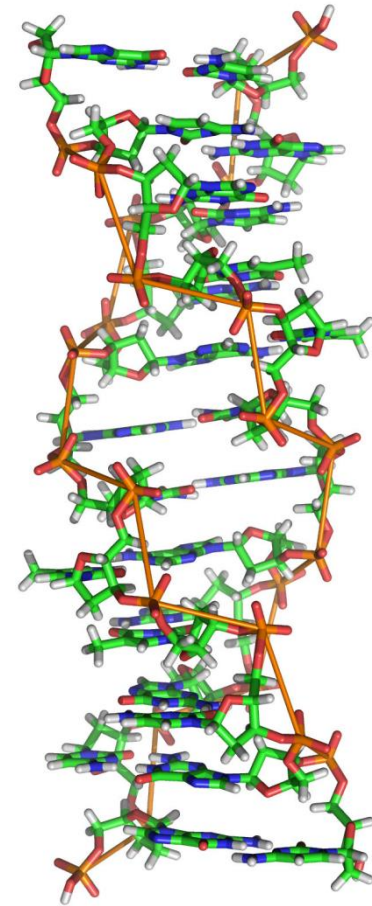
CONFORMAZIONE DEL DNA

- La **conformazione A** si osserva in soluzioni meno acquose:
- Presenta un solco maggiore che è più stretto di quello della forma B, mentre il solco minore è più largo e profondo.
- Presenta 11 coppie di Basi per giro d'elica.
- La forma A è simile al doppio filamento di RNA.



LA CONFORMAZIONE DEL DNA

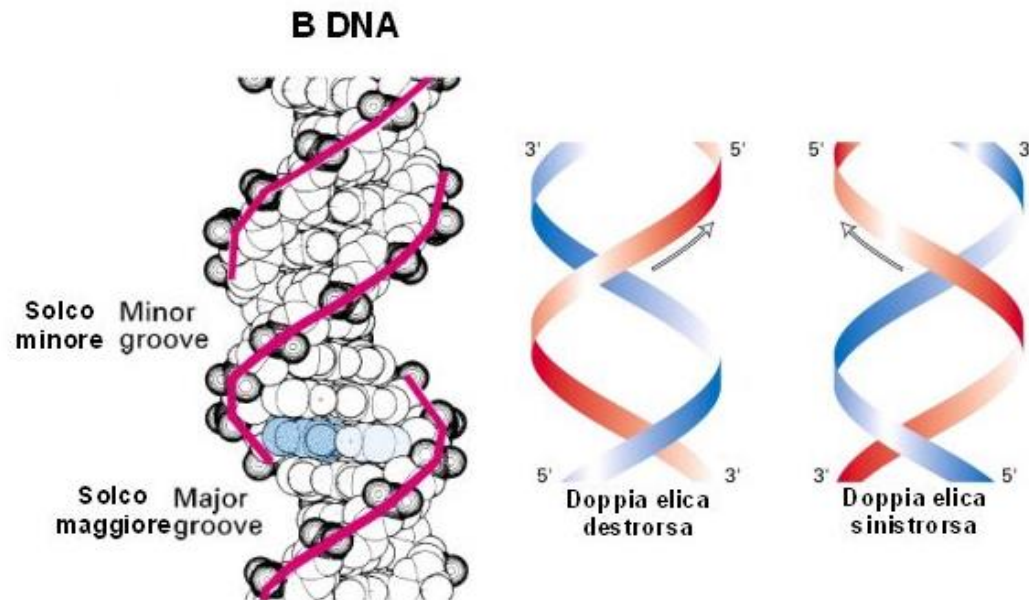
- **La forma Z** presenta un'elica sinistrosa.



APPROFONDIMENTO

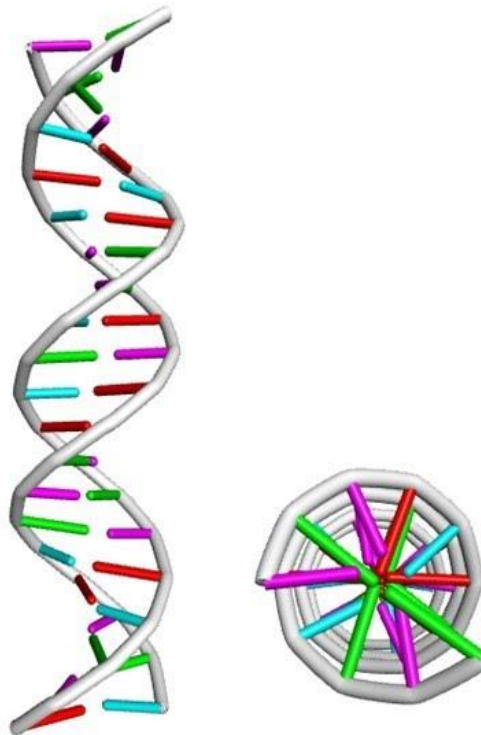
Il DNA normalmente è una doppia elica **destrorsa!**

In natura, i due polimeri hanno struttura secondaria ad elica destrorsa (B-DNA)

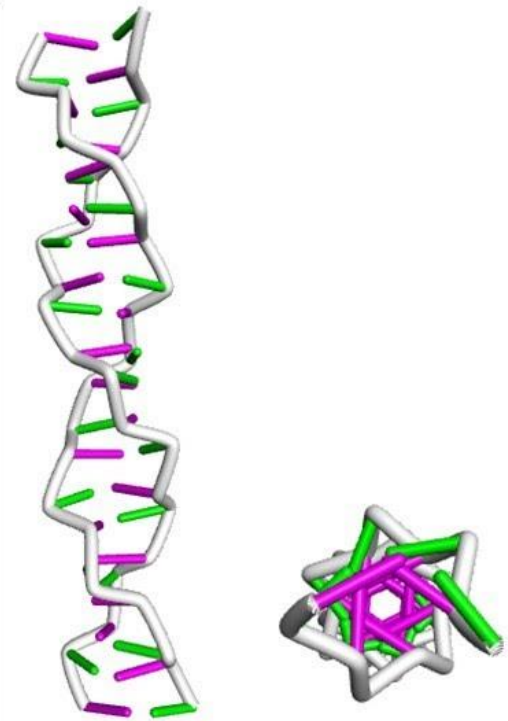




A-DNA



B-DNA



Z-DNA

LA DENATURAZIONE DEL DNA

La **denaturazione del DNA** è il processo per cui l'acido desossiribonucleico a doppio filamento (dsDNA double-stranded **DNA**) si svolge e si separa in due filamenti singoli rompendo i legami idrogeno tra le basi appaiate.

La denaturazione è dovuta:

- **Alle alte temperature;**
- **Quando viene posto in soluzioni con elevato pH.**

La denaturazione è un processo reversibile! Se si ripristinano le condizioni ottimali, i due filamenti si riappaiono.

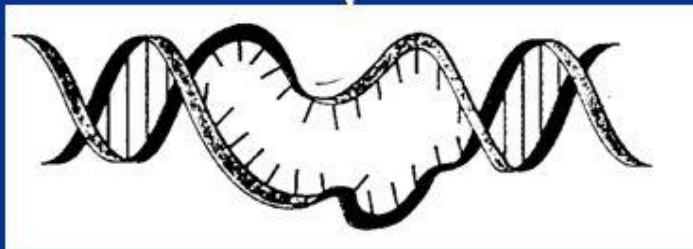
ii). Denaturazione del DNA

DNA a doppio-filamento



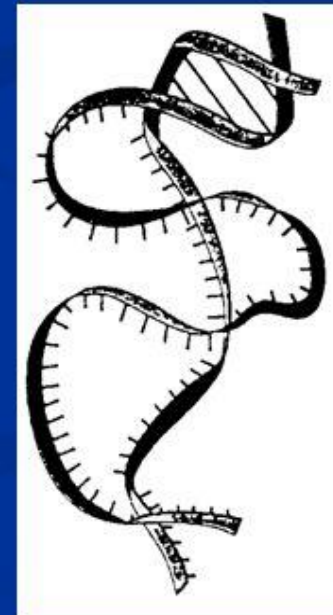
**pH estremi o
alte temperature**

**Regioni ricche A-T
denaturano prima**



**Svolgimento cooperativo
dei filamenti del DNA**

**Separazione dei
filamenti e
formazione di un
singolo-filamento
avvolto a caso**



FUNZIONE DNA

Il DNA contiene l'informazione genetica che codifica per le proteine.



RNA

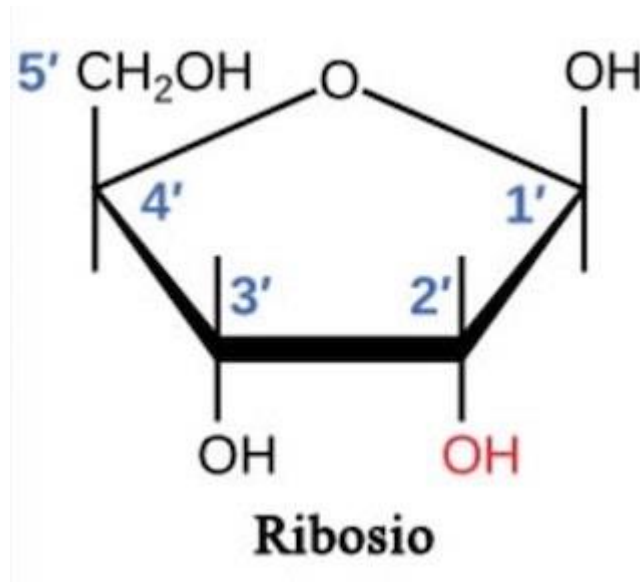
STRUTTURA DELL'RNA

L'RNA si differenzia dal DNA per 3 specifiche caratteristiche:

- Lo zucchero a 5 atomi di carbonio che è il **RIBOSIO**.
- L'RNA contiene l'**URACILE (U)** al posto della timina.
- L'RNA è un **singolo filamento** polinucleotidico.

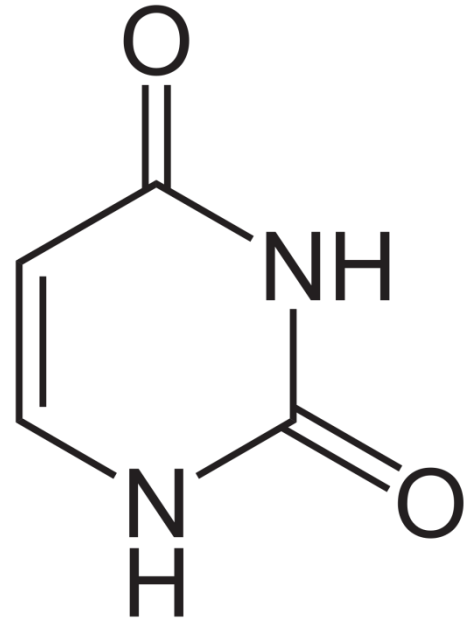
STRUTTURA DELL'RNA

- Il **ribosio** si differenzia dal 2-deossiribosio perché nel carbonio in posizione 2' presenta un **gruppo OH**.



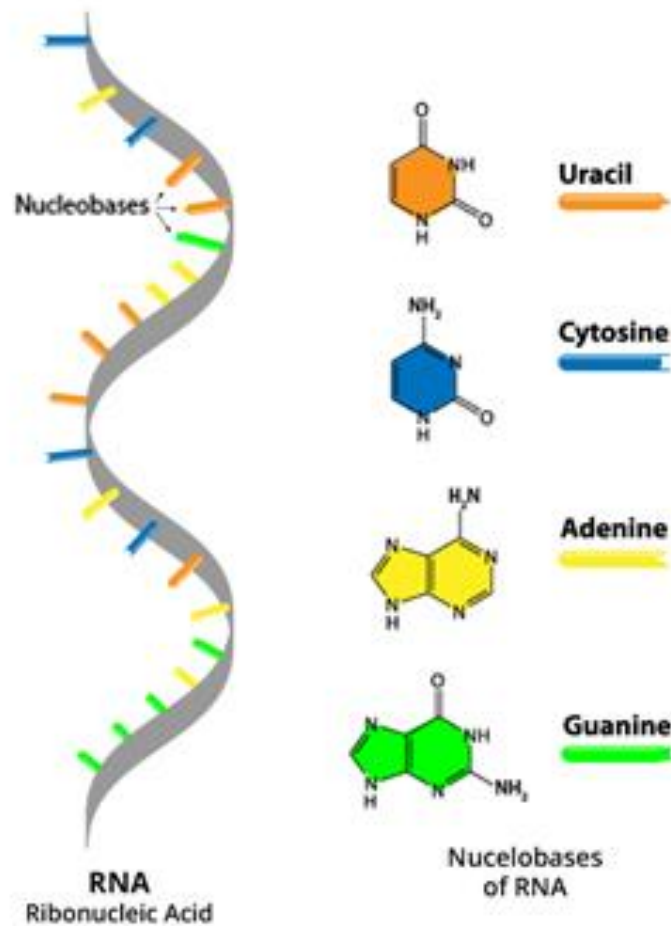
STRUTTURA DELL'RNA

- NELL'RNA è PRESENTE L'URACILE.
- L'uracile si appaia con l'**ADENINA**.
- Nell'RNA
- la timina è **assente!**



Uracile

STRUTTURA RNA



RNA

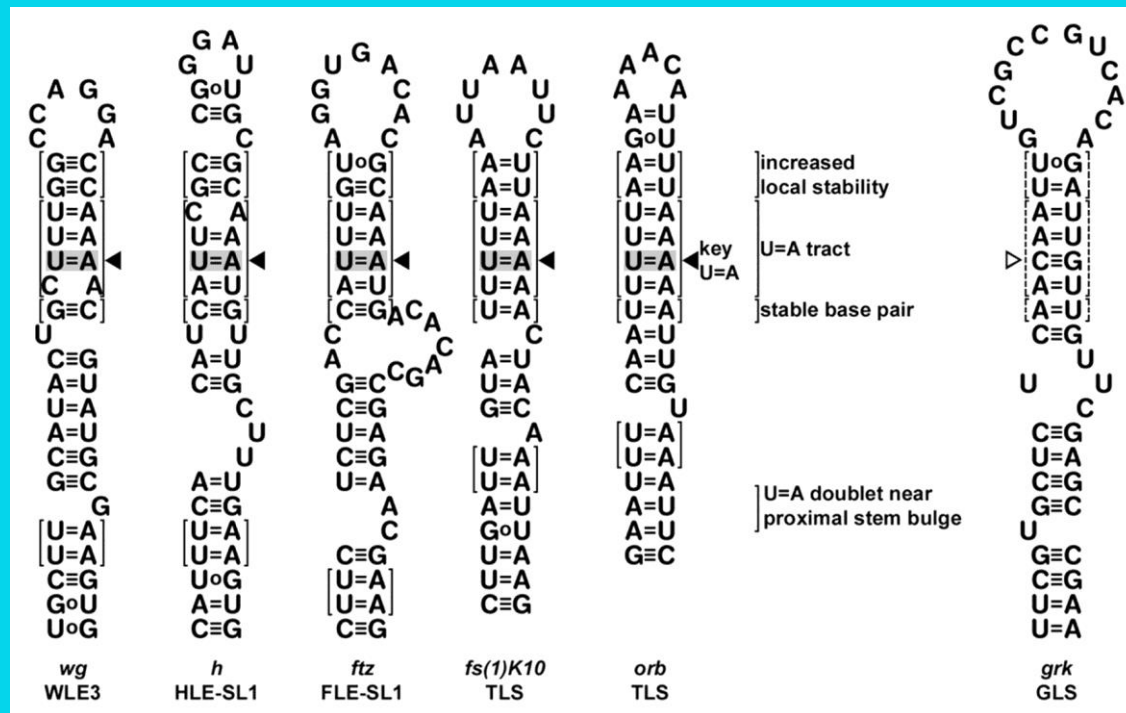
- L'RNA **non** rappresenta il materiale genetico (salvo in qualche virus) e non viene utilizzato come stampo per la sua replicazione.
- L'RNA **funge da intermediario fra gene e sintesi della proteina quando si trova nella sua forma di mRNA.**

DIVERSI TIPI DI RNA

- **RNA messaggero:** trasporta l'informazione genetica contenuta nel DNA, dal nucleo al citoplasma, dove saranno poi prodotte le proteine.
- **RNA transfer:** trasporta gli amminoacidi liberi nel citoplasma ai ribosomi durante la sintesi proteica.
- **RNA ribosomiale:** è un elemento costitutivo dei ribosomi.

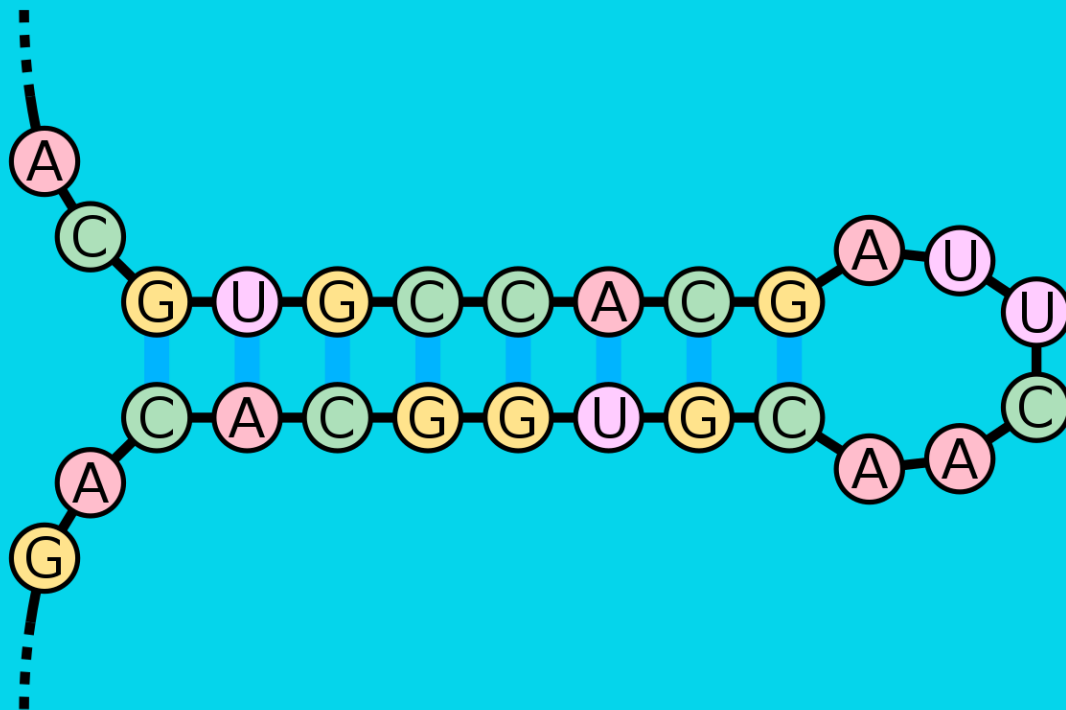
APPROFONDIMENTO

- L'RNA nonostante sia a singolo filamento molte volte può presentare diversi tratti a doppia elica.
- Questo perché il polimero si ripiega su se stesso per formare coppie di basi fra sequenze complementari.



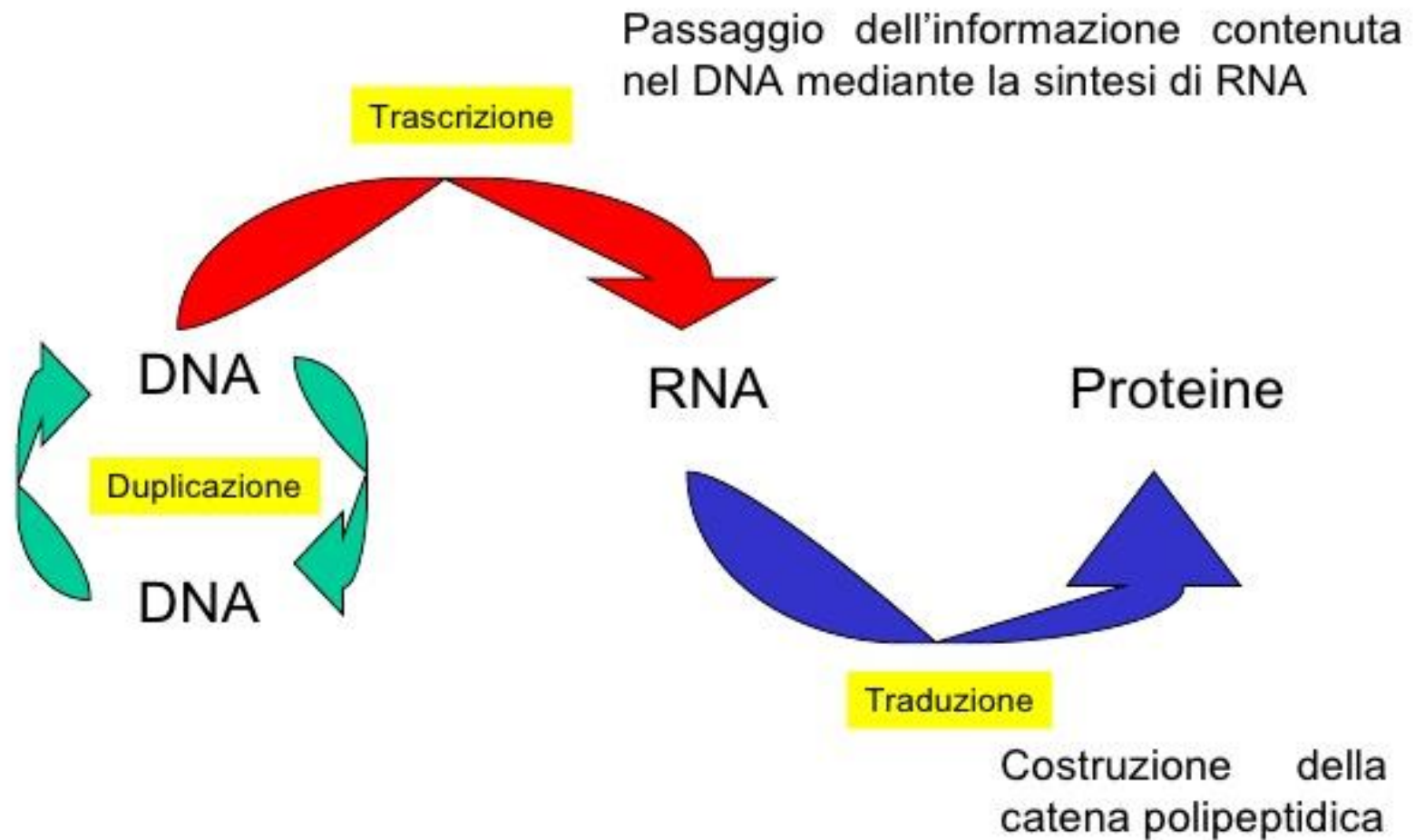
APPROFONDIMENTO

- Se i due tratti di sequenze complementari si trovano vicini l'uno all'altro, l'RNA può assumere una delle varie strutture a stem-loop.

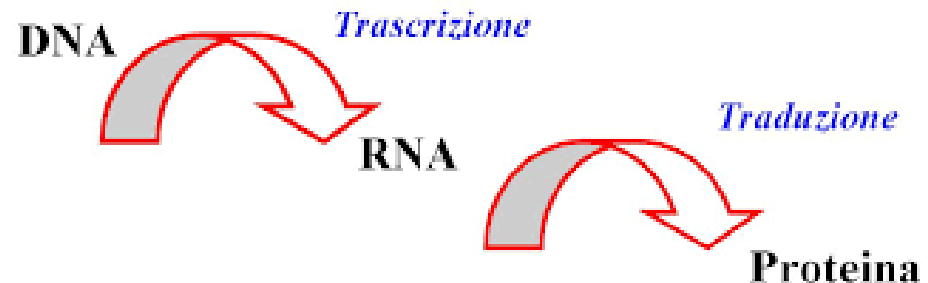


DOGMA CENTRALE

IL “DOGMA CENTRALE” DELLA BIOLOGIA



- Nel nucleo il DNA viene **replicato**.
- Nel nucleo il DNA viene **trascritto** in RNA messaggero.
- Una volta maturo l'RNA messaggero esce dal nucleo e va nel citoplasma.
- Grazie ai **ribosomi** l'RNA messaggero viene **tradotto** in **proteina**!



QUINDI...

- Il DNA funge da stampo per la sua auto-replicazione.
- La sintesi di RNA è diretta da uno stampo di DNA.
- La sintesi delle proteine è diretta da uno stampo di RNA.
- La trascrizione e la traduzione sono eventi unidirezionali.

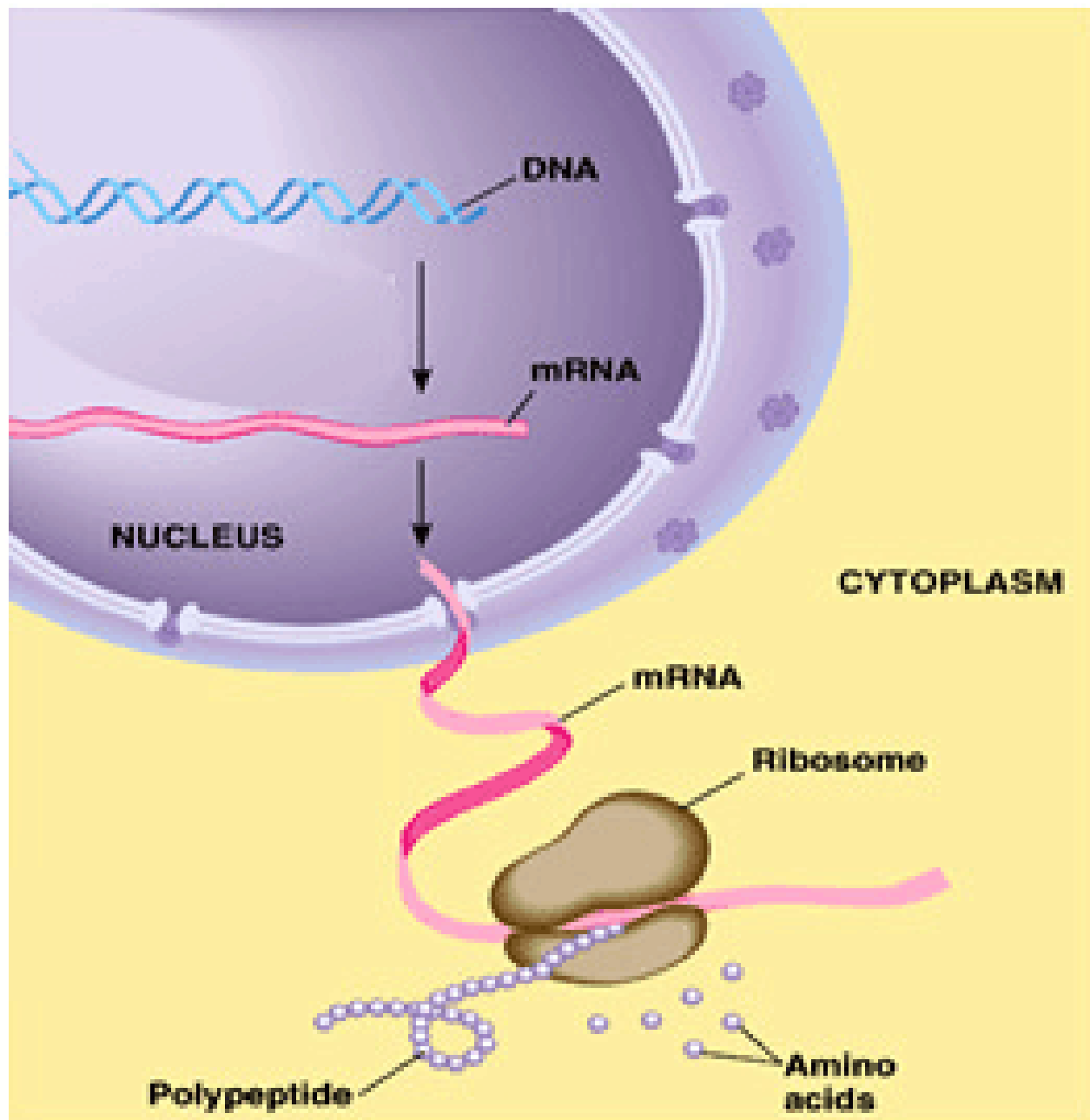
Trascrizione
(sintesi di RNA)

Traduzione
(sintesi di proteine)

DNA → **RNA** → **Proteina**



Replicazione
(sintesi di DNA)



Il dogma centrale della Biologia

Duplicazione

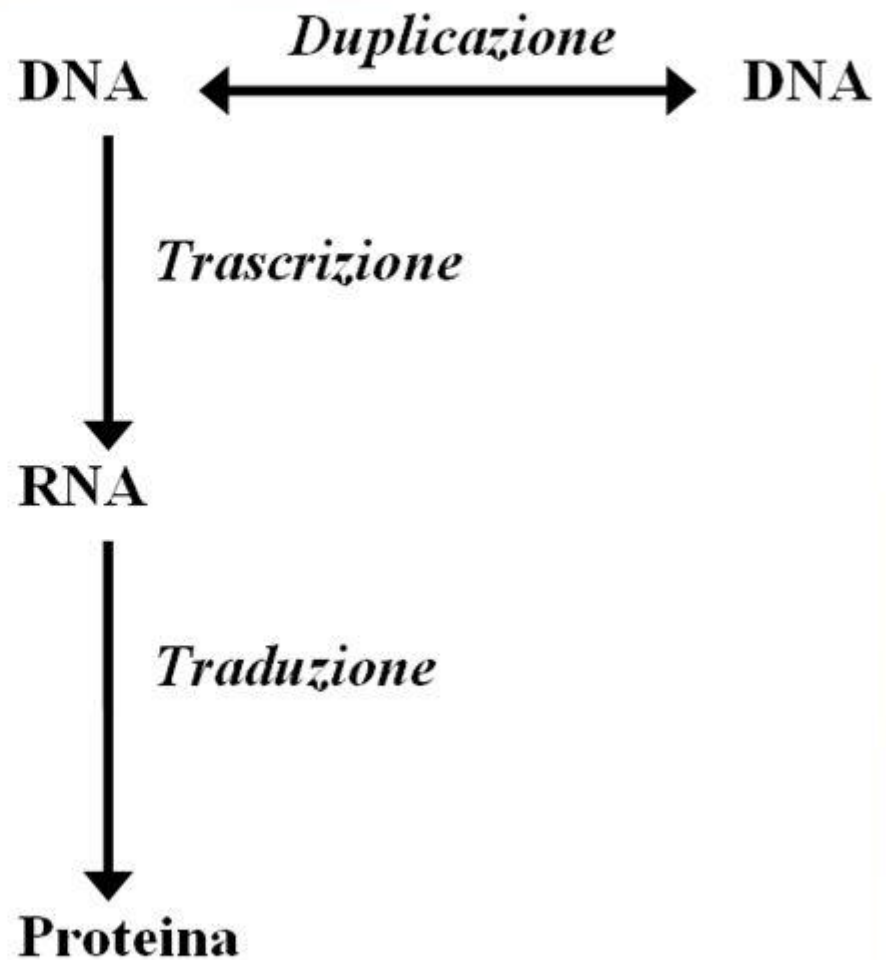
Porta alla formazione di nuove molecole di DNA e al trasferimento di materiale genetico.

Trascrizione

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

Traduzione

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



LA REPLICAZIONE DEL DNA

LA REPLICAZIONE

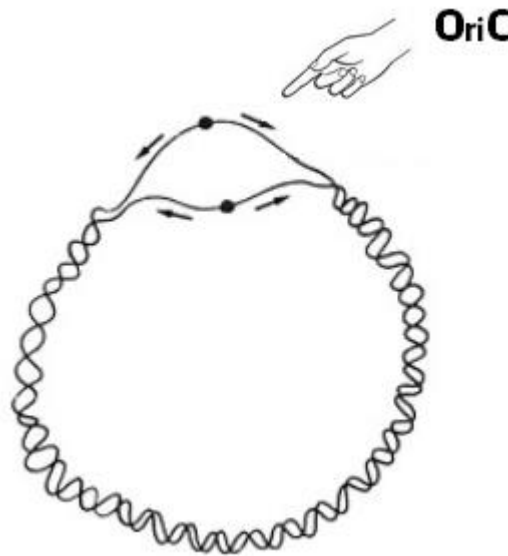
- La **replicazione** (o **uplicazione**) è il meccanismo molecolare attraverso cui viene prodotta una copia del DNA cellulare.
- Ogni volta che una cellula si divide, infatti, l'intero genoma deve essere duplicato per poter essere trasmesso alla progenie.
- L'enzima responsabile della replicazione del DNA è la **DNA polimerasi**
- **LA REPLICAZIONE DEL DNA E' SEMICONSERVATIVA** (un filamento vecchio stampo e uno nuovo neosintetizzato a partire da quello stampo).

LA REPLICAZIONE

- L'inizio della replicazione avviene in un punto specifico, corrispondente a una sequenza di DNA che viene chiamata **origine di replicazione**.
- quindi l'origine di replicazione è il punto specifico di DNA in cui la doppia elica viene denaturata in singoli filamenti e ha inizio la replicazione!

ORIGINE DELLA REPLICAZIONE

- Questo è il cromosoma circolare di **E.Coli**.
- Come vedete il puntino nero indica il punto di origine della replicazione (**OriC**).
- I due filamenti di DNA si separano.

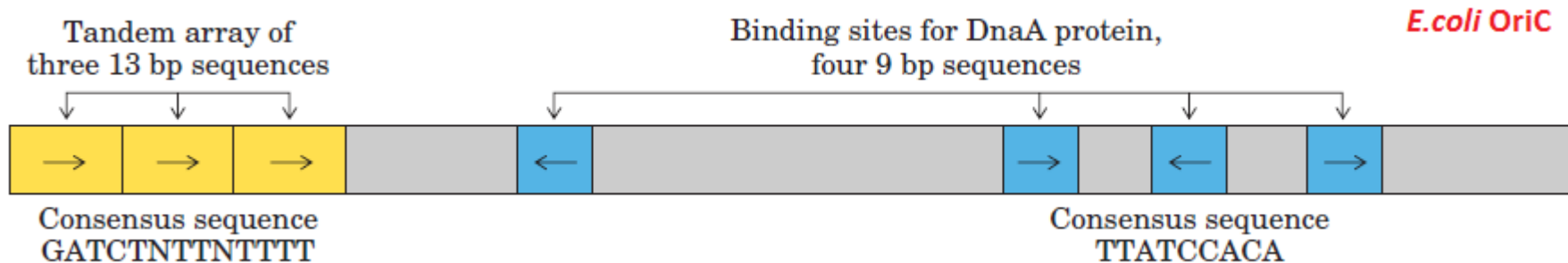


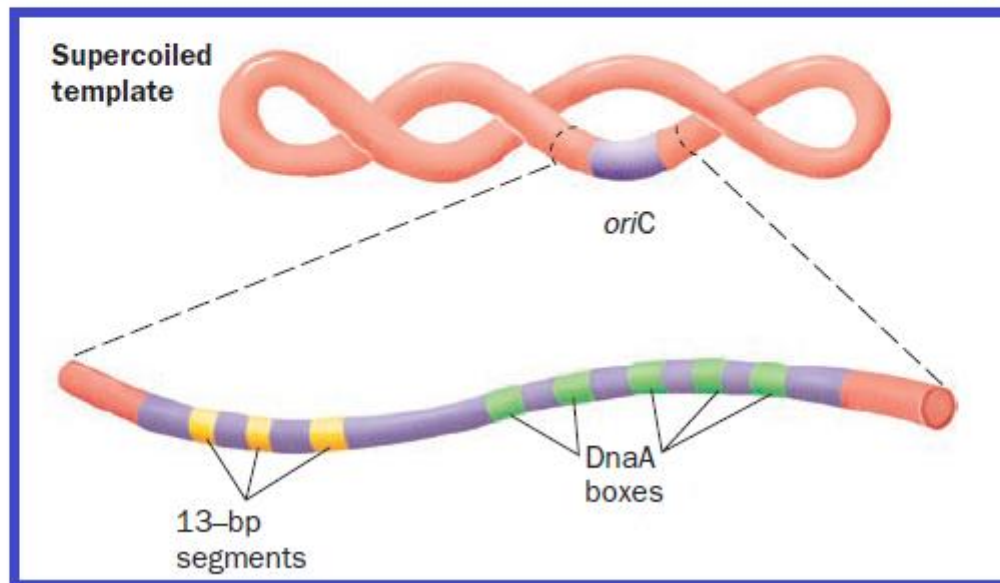
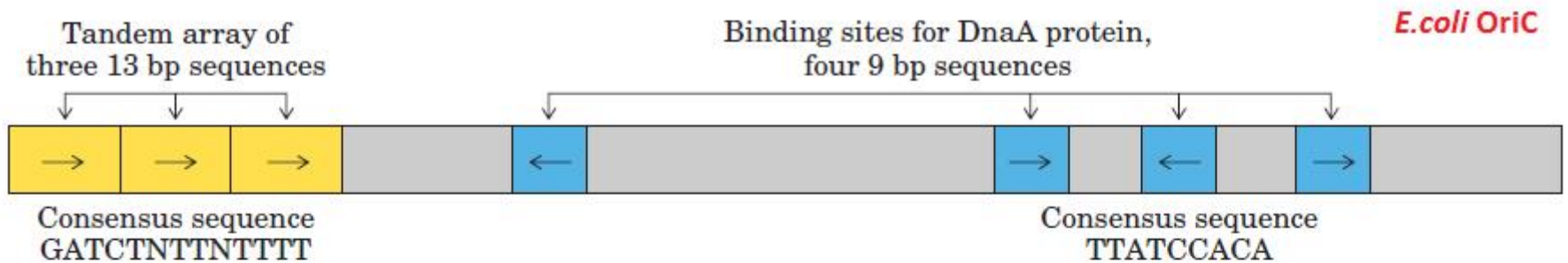
ORIGINE DI REPLICAZIONE

- Solitamente il punto di origine della replicazione in E.Coli è una sequenza ricca di **appaiamenti A=T**.
- Questi sono molto deboli e facili da separare!
- Le **PROTEINE INIZIATRICI** riconoscono l'origine di replicazione ed inducono la denaturazione della regione ricca di appaiamenti A=T.
- La proteina iniziatrice in E.Coli è la **DnaA**.

L'OriC DI E.COLI

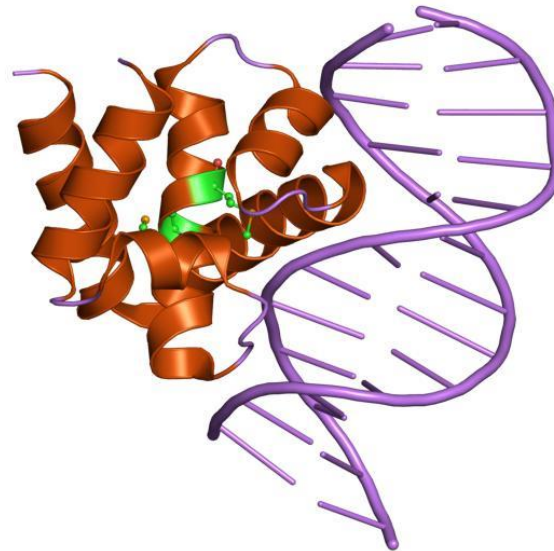
- L'OriC di E.Coli si estende per 245 coppie di basi.
- Contiene:
 - un cluster di tre copie di una sequenza di 13 coppie di basi ricche in A=T;
 - Quattro copie di una sequenza di 9 coppie di basi.





DnaA

La proteina iniziatrice **DnaA** riconosce e lega (in molte copie) le regioni di 9 coppie di basi, determinando la denaturazione della regione con le sequenze di 13 coppie di basi (ricche di A=T).



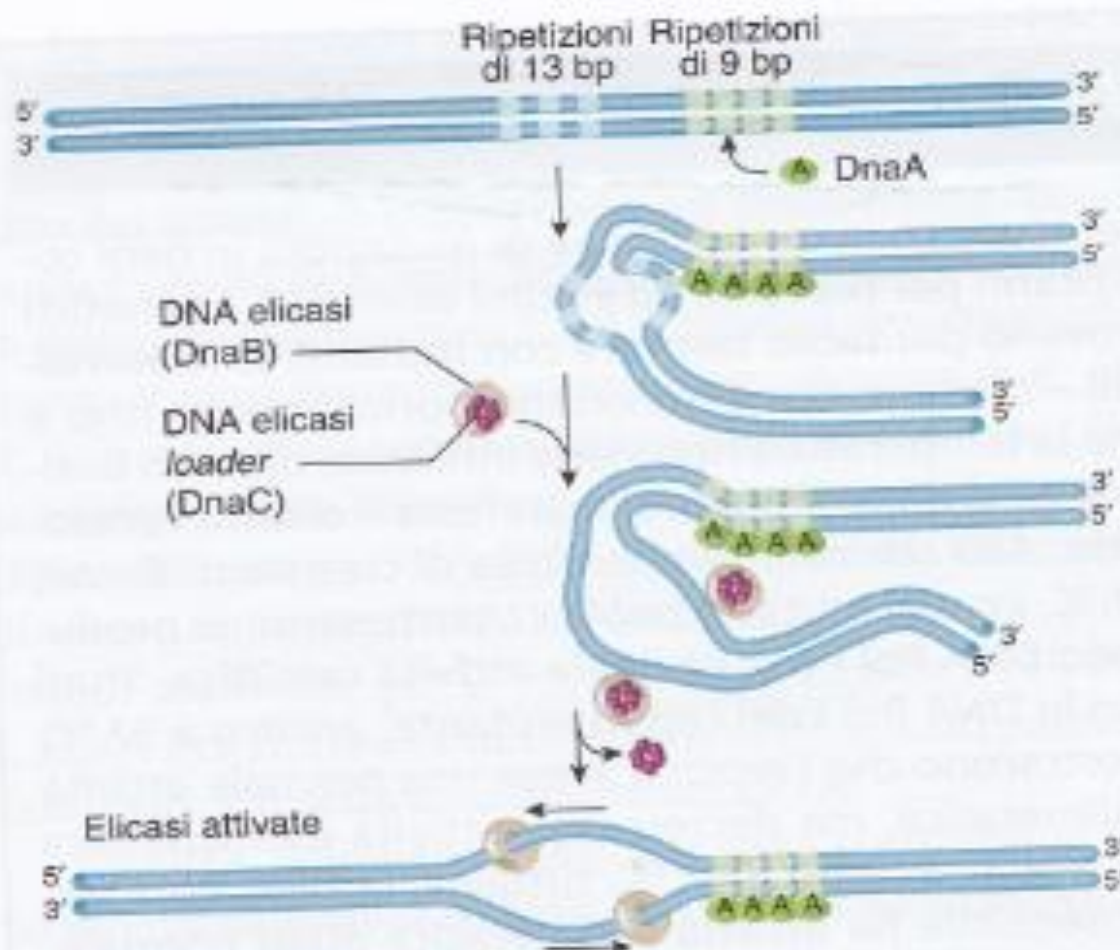
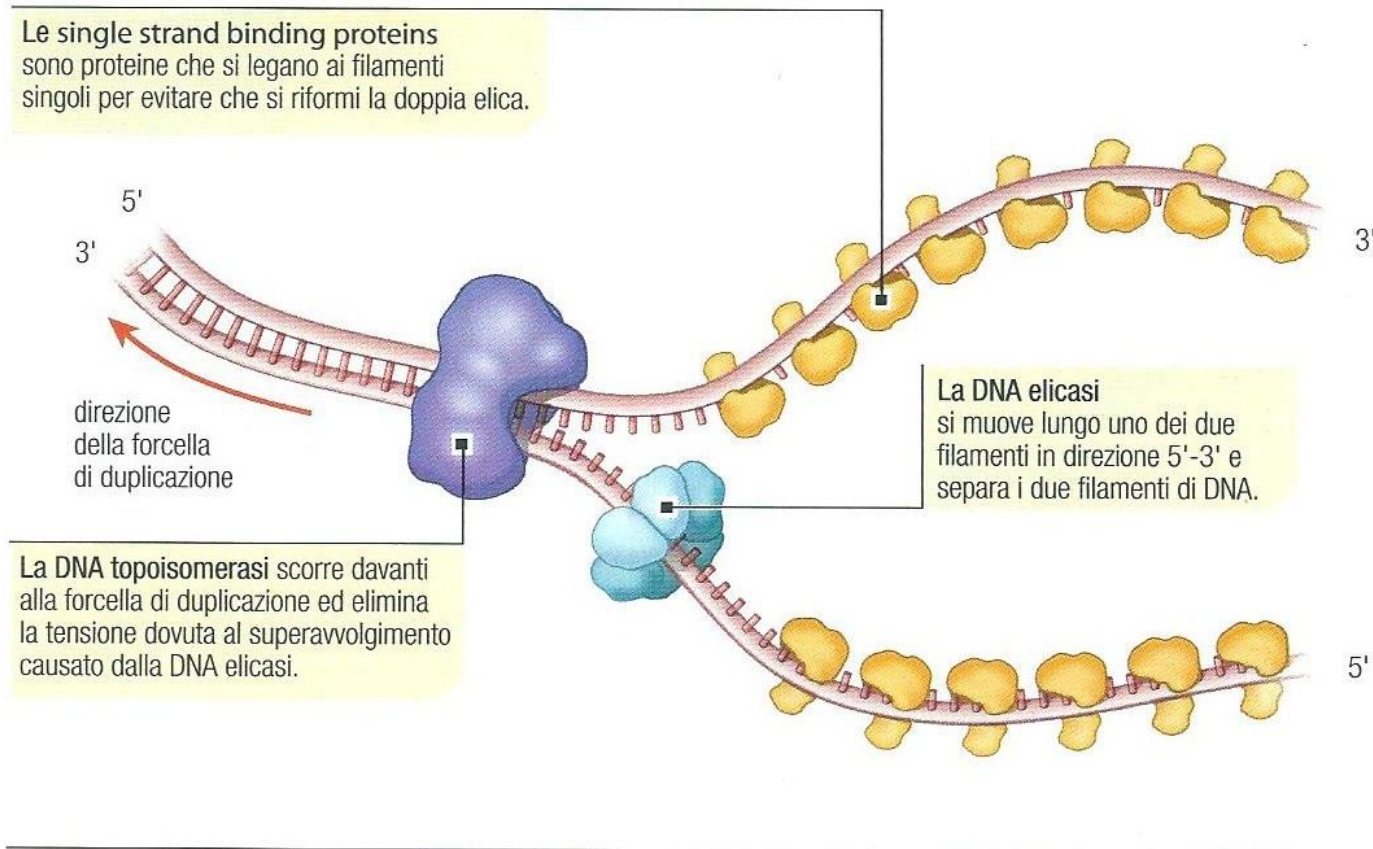


Figura 3.4

Inizio della replicazione in *E. coli*. La proteina iniziatrice DnaA si lega a *oriC* e provoca la denaturazione del DNA. Vengono reclutate la DNA elicasi DnaB e la DNA elicasi loader, che iniziano a svolgere il DNA per formare due forche replicative in configurazione testa a testa.

- Una volta che il punto di origine si è denaturato:
- Sui singoli filamenti di DNA vengono reclutati le **DNA ELICASI**

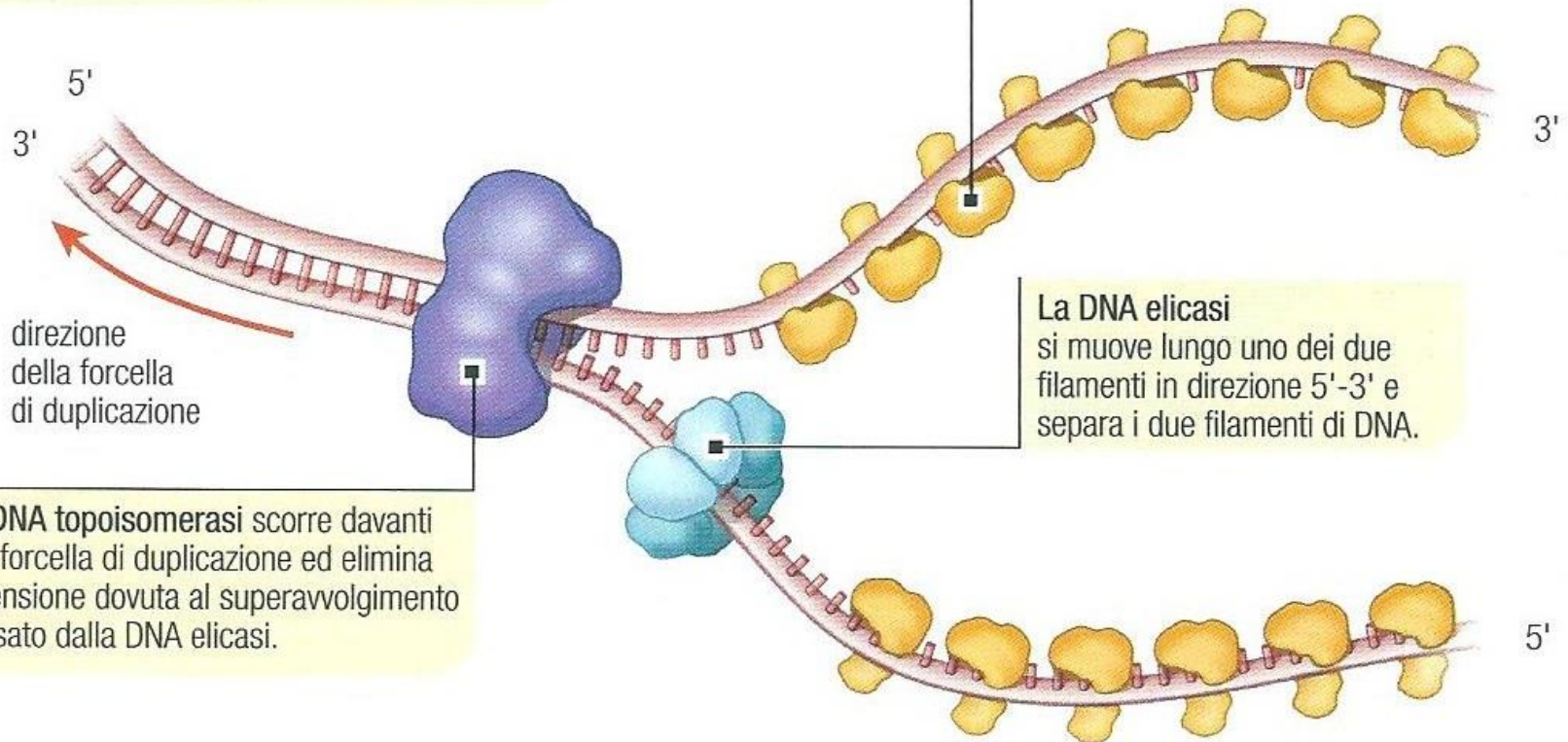


Le proteine che facilitano la formazione e il movimento della forcella di duplicazione.

DNA ELICASI

- Sono proteine **enzimatiche esameriche** formate da 6 subunità che assumono una **conformazione ad anello**.
- Si legano e si muovono lungo **il singolo filamento di DNA** utilizzando l'energia fornita dall'idrolisi dell'ATP.
- Questi enzimi promuovono lo srotolamento e quindi l'apertura della doppia elica mediante rottura dei legami H tra le basi complementari.
- Possono avere polarità $5' \rightarrow 3'$ ma anche $3' \leftarrow 5'$

Le single strand binding proteins sono proteine che si legano ai filamenti singoli per evitare che si riformi la doppia elica.

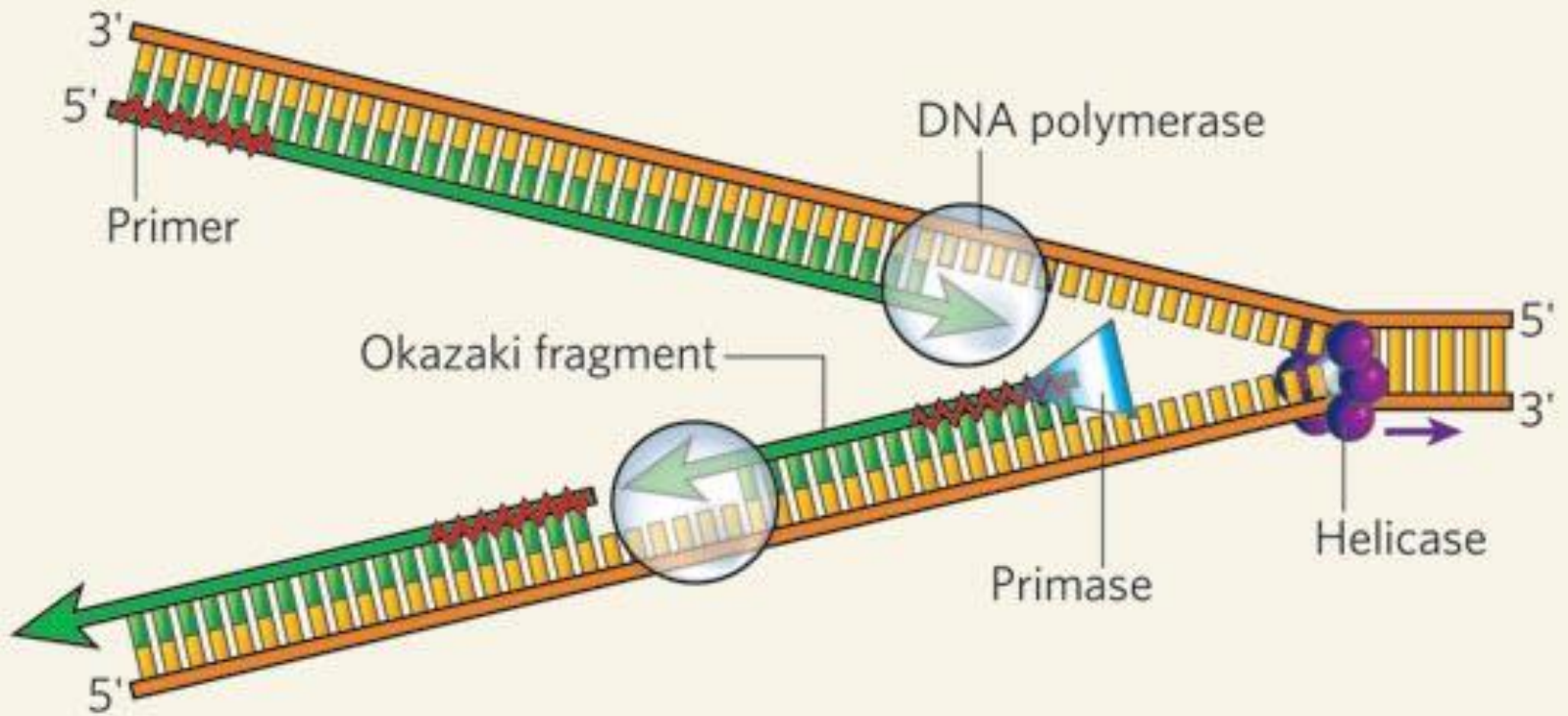


La DNA topoisomerasi scorre davanti alla forcella di duplicazione ed elimina la tensione dovuta al superavvolgimento causato dalla DNA elicasi.

La DNA elicasi si muove lungo uno dei due filamenti in direzione 5'-3' e separa i due filamenti di DNA.

Le proteine che facilitano la formazione e il movimento della forcella di duplicazione.

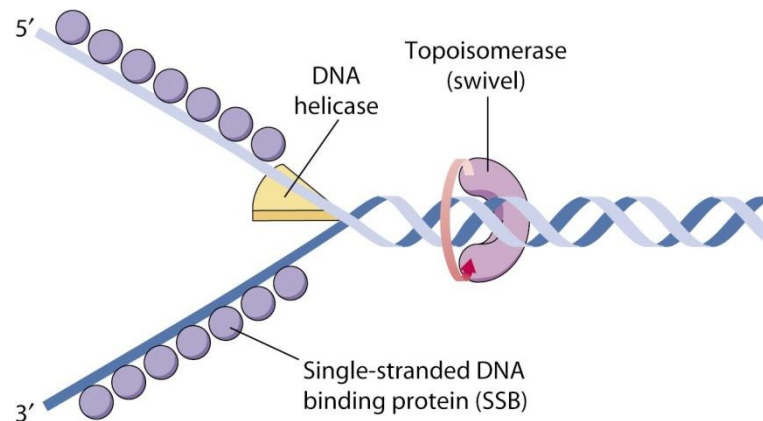
Leading strand



Lagging strand

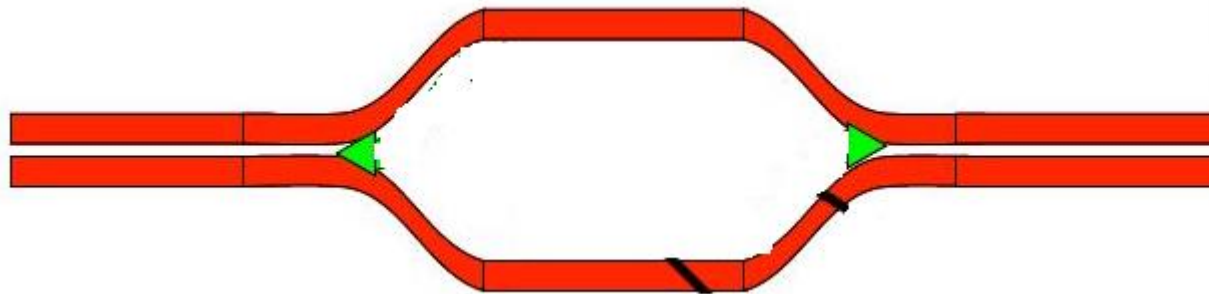
LE PROTEINE SSB

- Per evitare che i filamenti appena separati dalle **elicasi** si riappaiono, intervengono delle proteine SSB che si legano al singolo filamento.
- Queste impediscono al singolo filamento di ri-appaiarsi con quello complementare
- Inoltre fanno assumere al singolo filamento di DNA una conformazione **distesa** che facilita il suo **ruolo di stampo!**



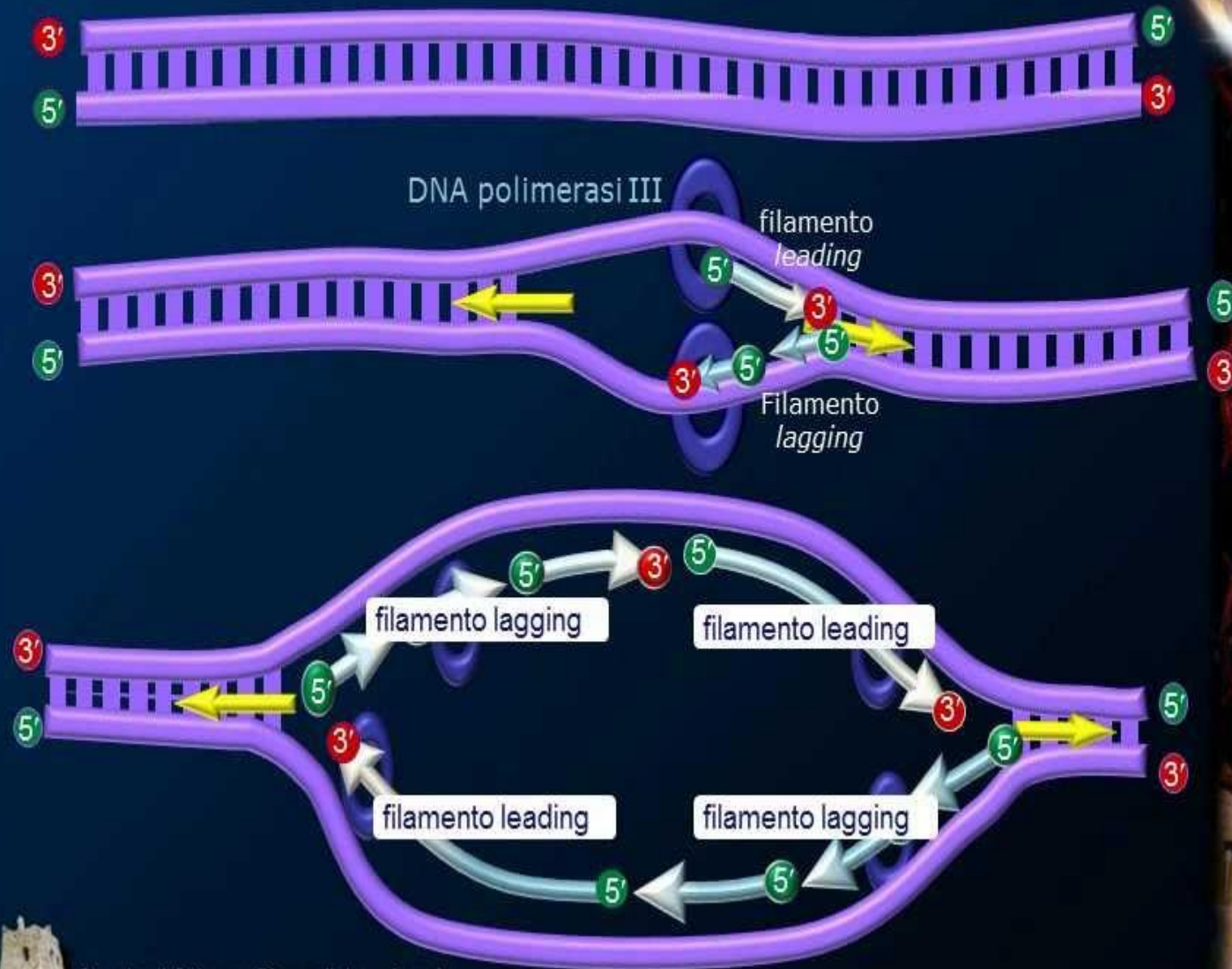
LA BOLLA REPLICATIVA

- Man mano che l'**elicasi** agisce e srotola la doppia elica, il grado di denaturazione del DNA aumenta.
- Si viene quindi a formare la **BOLLA DI REPLICAZIONE!**
- I **filamenti delle singole** eliche srotolate su cui verranno sintetizzate le nuove eliche sono chiamati filamenti **STAMPO!**



Duplicazione del DNA

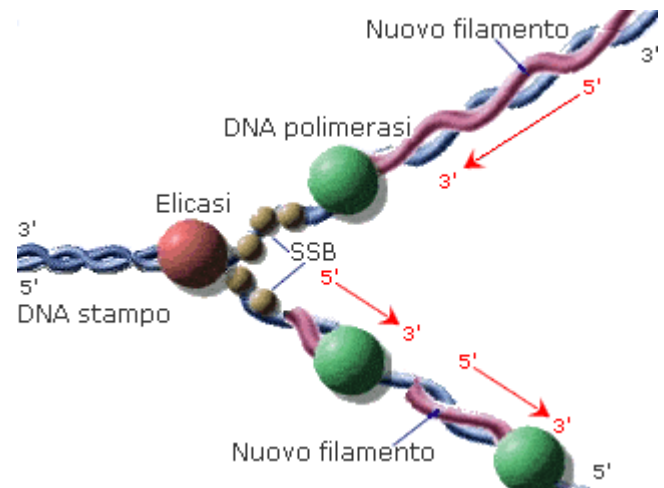
Filamento *leading* e *lagging*



LA FORCELLA REPLICATIVA

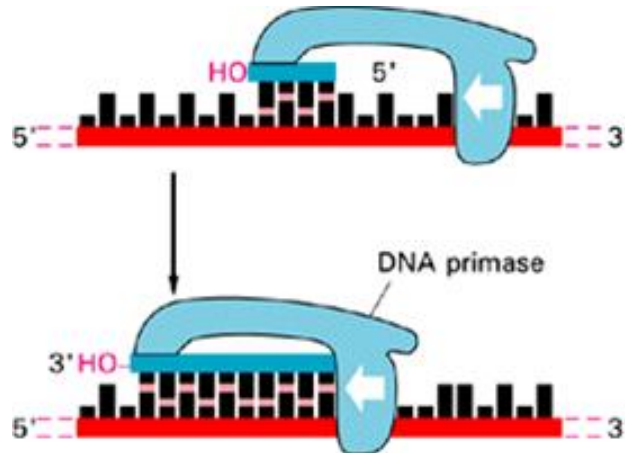
- Quando una molecola di DNA si srotola per esporre i due filamenti stampo a singola elica per la replicazione del DNA, si forma una struttura a forma di **Y chiamata forcella replicativa**.
- In ogni forcella di replicazione vi sono due DNA polimerasi (“dimero”), una per ciascun filamento Entrambe aggiungono nucleotidi in direzione $5' \rightarrow 3'$.

Solitamente sono presenti 2 forche replicative e si parla di replicazione **bidirezionale**.

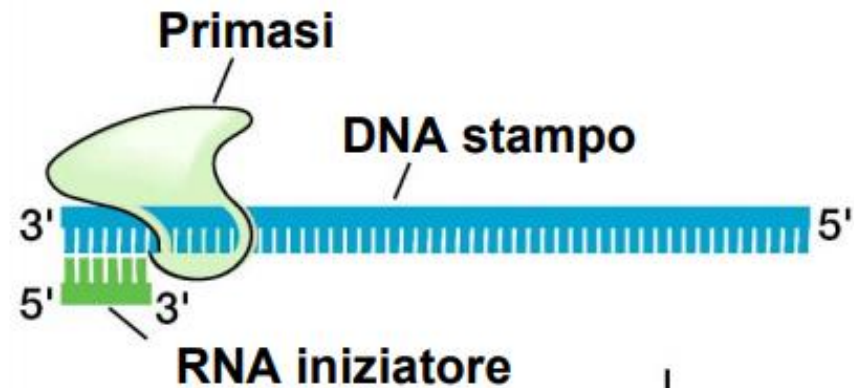


DNA PRIMASI

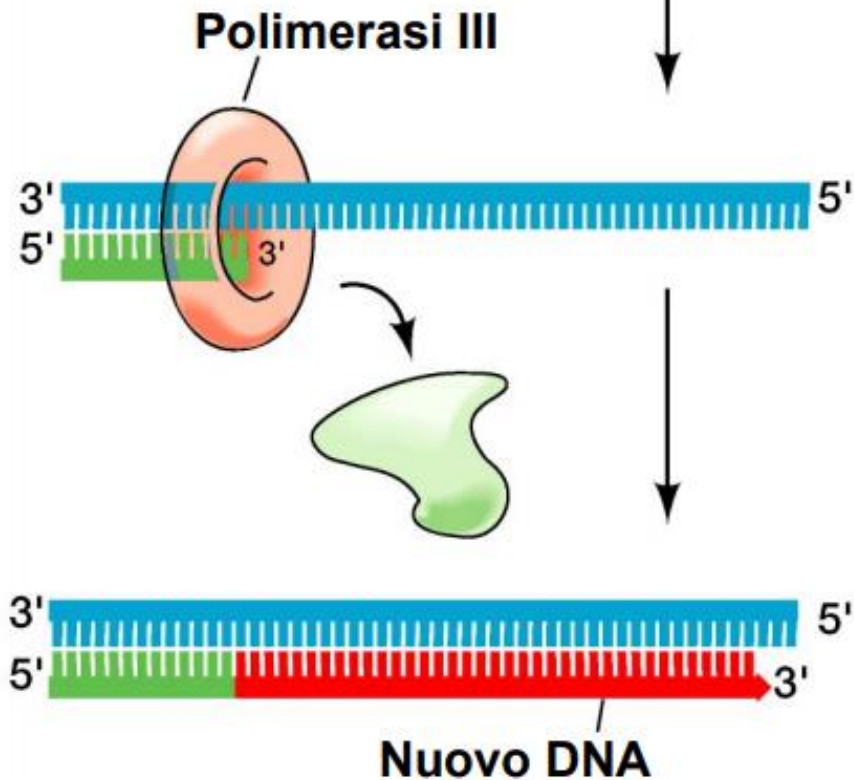
- Successivamente ogni elicasi recluta una **DNA primasi**.
- La DNA primasi consiste in una **RNA polimerasi**.
- Produce quindi un corto filamento di RNA **primer**.
- Questo sarà poi allungato dalla DNA polimerasi!
- Il primer di RNA sarà successivamente rimosso e rimpiazzato con DNA.



1 - L'RNA primasi sintetizza una corta molecola di RNA *primer*.

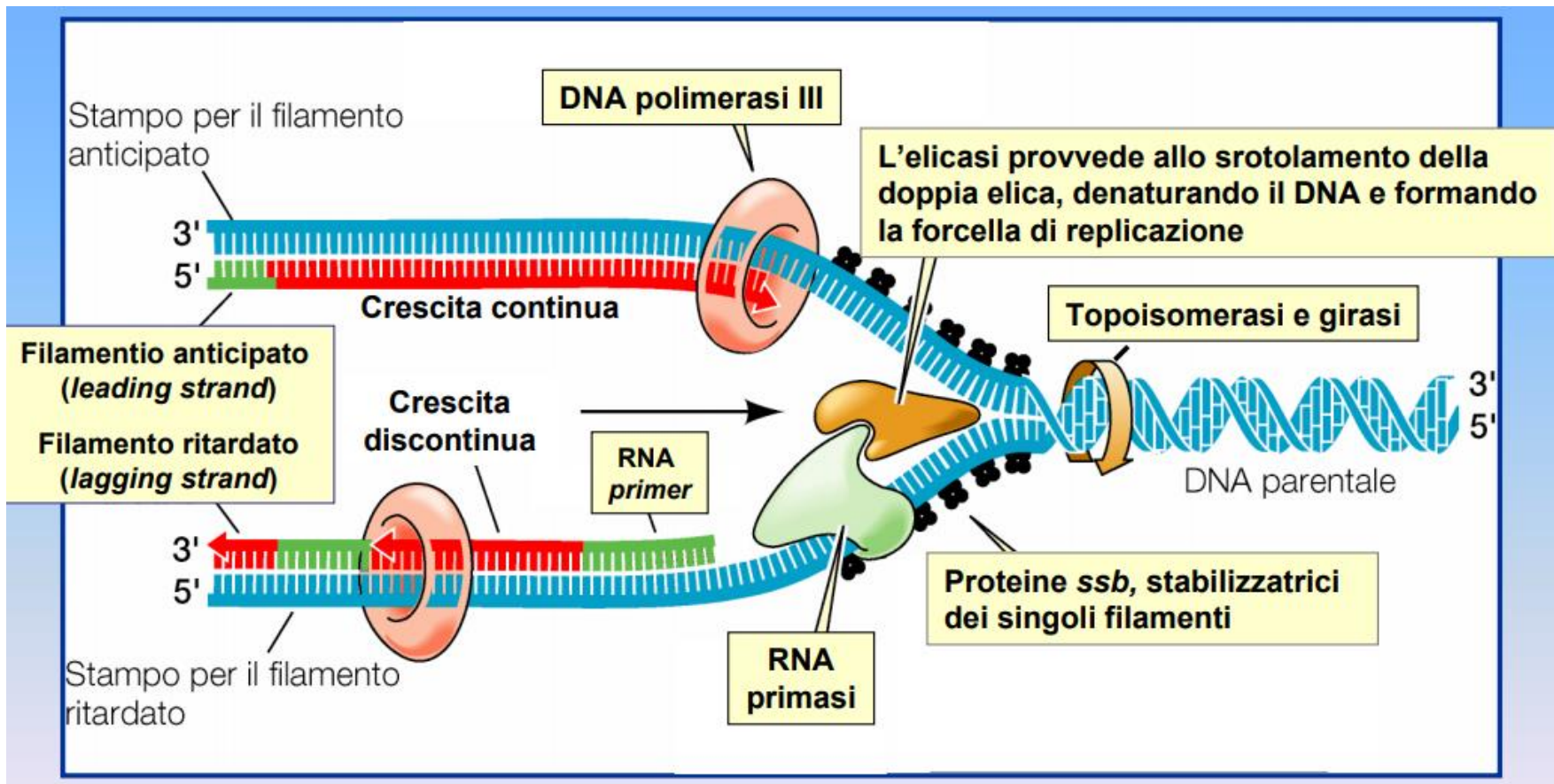


2 - La DNA polimerasi III si lega al *primer* ed inizia a catalizzare la sintesi di nuovo DNA



ATTENZIONE

- L'attività della DNA primasi è **essenziale** affinché si proceda con la replicazione del DNA.
- Questo perché la DNA polimerasi non può iniziare la sintesi di un filamento di DNA , ma può solo catalizzare l'aggiunta di nucleotidi ad un filamento o primer preesistente.



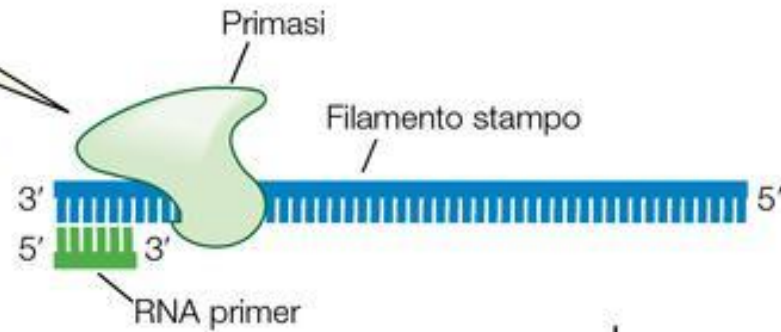
ATTENZIONE!

- **Il filamento stampo** è quello su cui viene sintetizzata la nuova elica seguendo le leggi dell'appaiamento delle basi complementari.
- **Il primer** è un corto segmento di nucleotidi legato al filamento stampo. Serve come substrato per l'azione della DNA polimerasi che allunga il primer e sintetizza una nuova elica di DNA, la cui sequenza è complementare a quella stampo.

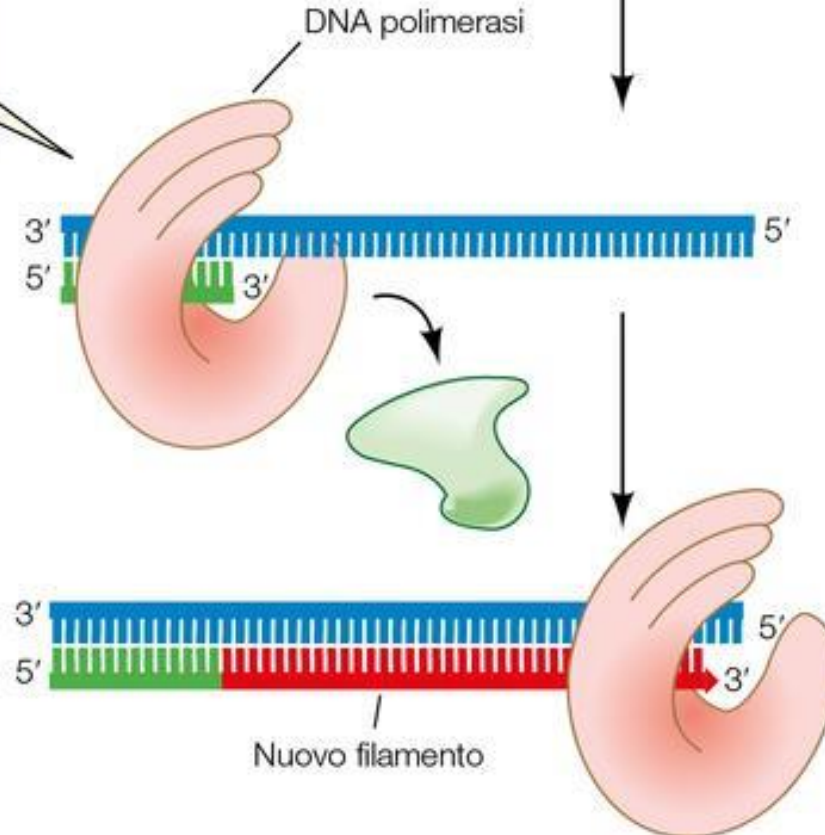
DNA POLIMERASI

- La DNA polimerasi allunga il primer di RNA sempre in **direzione 5'→3'**.
- Catalizza l'aggiunta di **deossinucleotidi**.
- Presenta una forma a mano destra parzialmente chiusa e **possiede 3 domini**:
 - **Il palmo** che contiene il sito attivo.
 - **Le dita** che riconoscono i dNTP ed aiutano il processo di catalisi.
 - **Il pollice** che interagisce con il DNA neosintetizzato e mantiene in posizione corretta l'innesco ed il sito attivo.

- 1** La primasi si lega al filamento stampo e sintetizza un RNA primer.

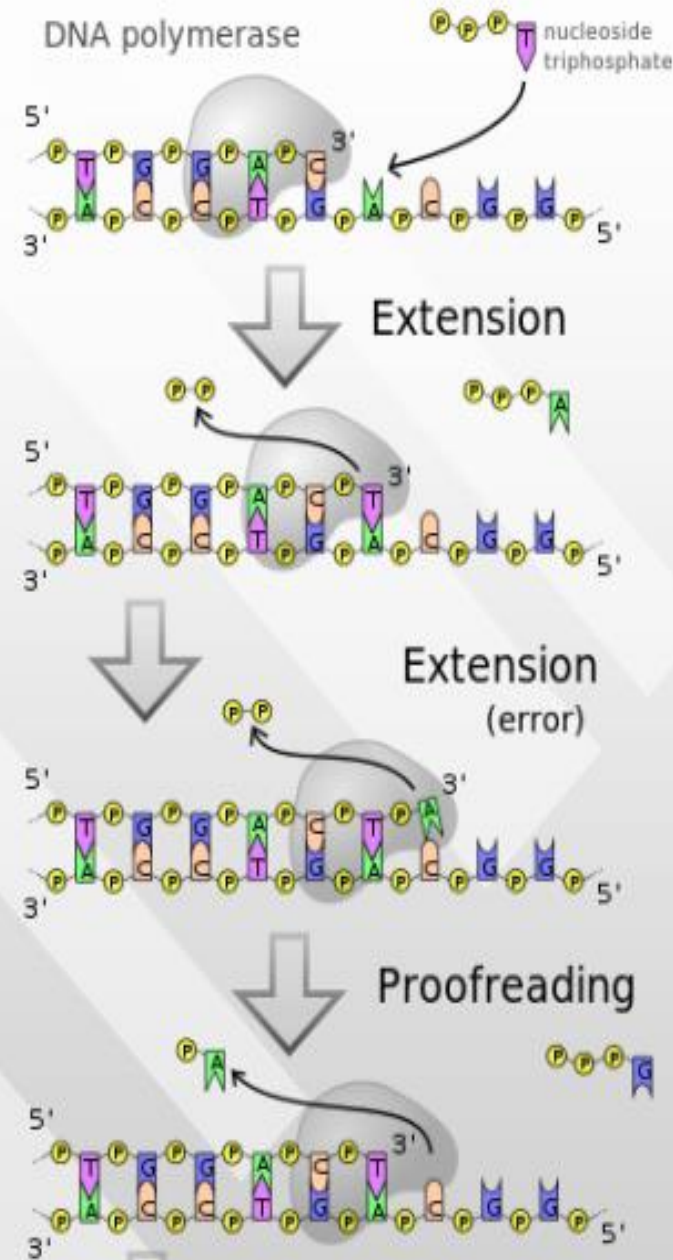


- 2** Quando il primer è completato, la primasi viene rilasciata; la DNA polimerasi si lega e sintetizza nuovo DNA.

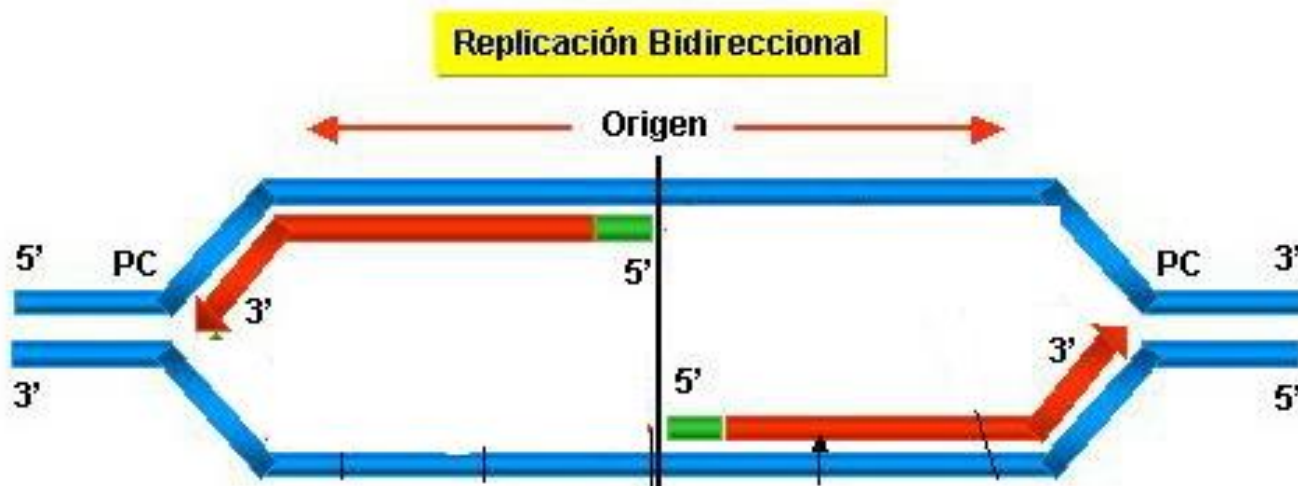


Attività di “correzione di bozze” (“proofreading”) della DNA polimerasi

- La **DNA polimerasi** non copia il DNA in modo perfetto, ma **commette un errore** più o meno **ogni miliardo di basi** copiate
- Alcune DNA polimerasi (non tutte) sono in grado di eseguire la **correzione degli errori** muovendosi all'indietro di una base ed esercitando una **attività esonucleasica in direzione 3'-5'** che taglia la base errata (“proofreading” o “correzione di bozze”)
- Dopo il taglio della base errata, la DNA polimerasi **inserisce la base corretta in direzione 5'-3'** e prosegue nella replicazione

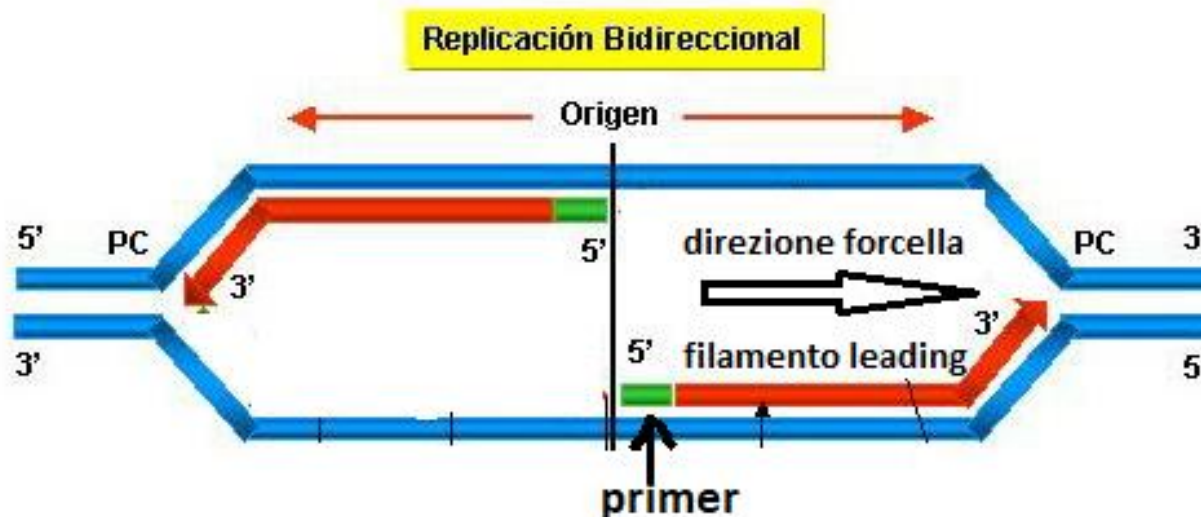


- La DNA primasi produce un primer che sarà allungato in direzione $5' \rightarrow 3'$ dalla DNA polimerasi III.
- **Il DNA è prodotto in direzioni opposte sui due filamenti! Per mantenere la polarità $5' \rightarrow 3'$ della DNA pol III.**



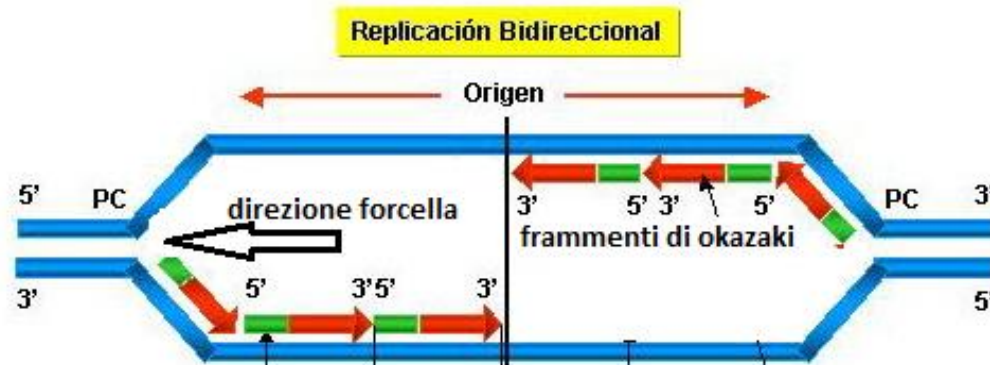
IL FILAMENTO GUIDA

- Il nuovo filamento sintetizzato in direzione della forcella replicativa viene chiamato **guida o leading**.
- Questo filamento è sintetizzato in modo continuo dalla DNA polimerasi III partendo dal primer di RNA.

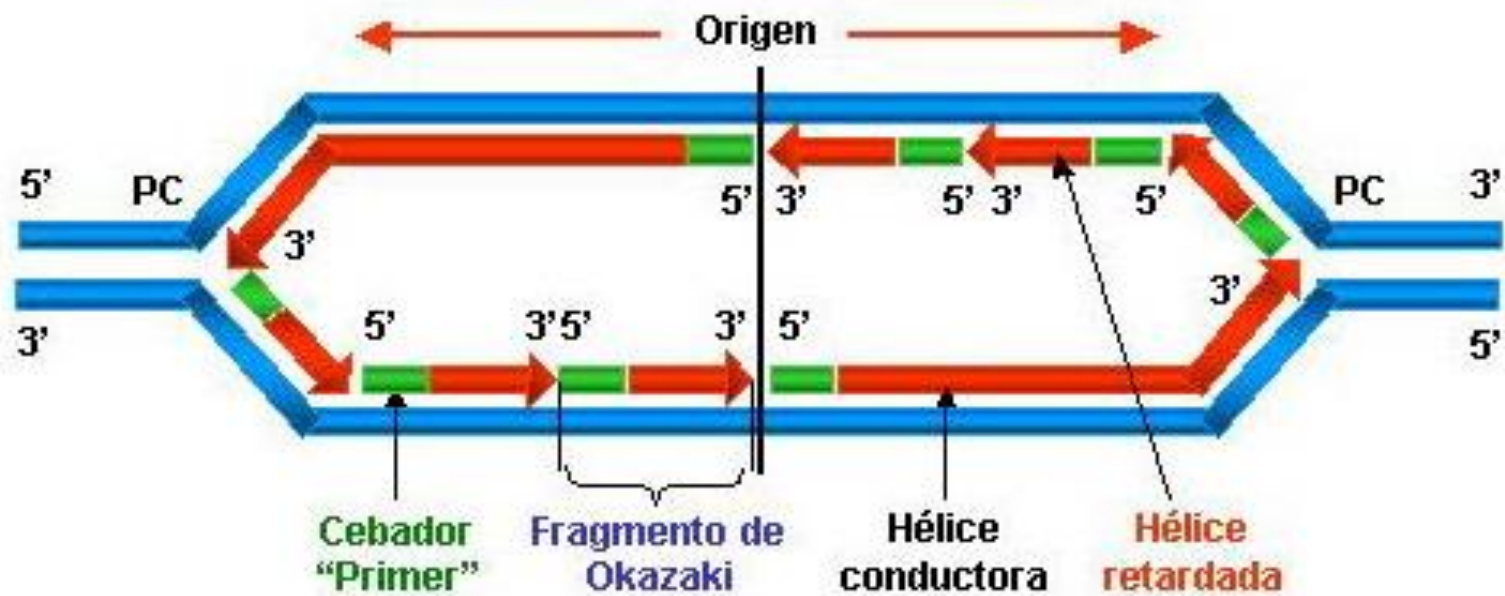


IL FILAMENTO LAGGING

- I filamenti sintetizzati in direzione opposta a quella della forcella prendono il nome di filamenti **discontinui o lagging**.
- Questo è sintetizzato in maniera **discontinua** e richiede più primer di RNA che vengono allungati.
- In alternativa sono anche chiamati **frammenti di Okazaki**.



Replicación Bidireccional



PC = Punto de crecimiento (Horquilla de replicación)

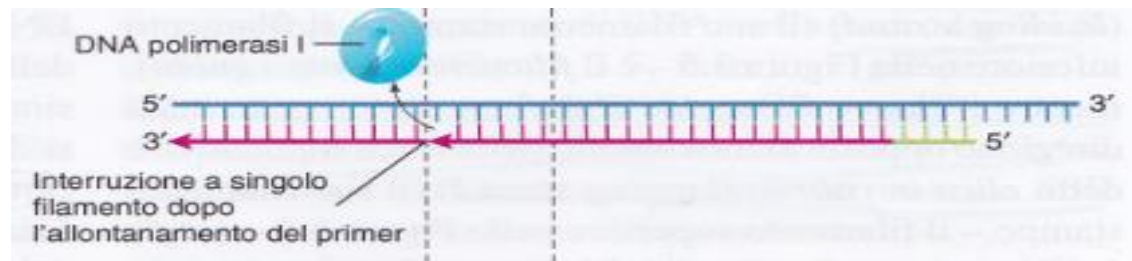
- I frammenti di Okazaki dovranno essere legati insieme per costituire un filamento continuo.
- La loro saldatura richiede l'intervento di una **RNAse H, una DNA pol 1 e una DNA ligasi.**

LA RNAsi H

- È un enzima in grado di riconoscere e rimuovere la maggior parte dei primer.
- In pratica **idrolizza** l'RNA appaiato con il DNA.
- Rimuove tutto il primer **eccetto** il primo ribonucleotide.
- Questo sarà rimosso da **una 5' esonucleasi.**

DNA POL 1

- La DNA Polimerasi I non è l'enzima principale della replicazione, il cui ruolo spetta alla [DNA polimerasi III](#) (nota per questo anche come *replicasi*). Svolge invece:
 - una funzione di riparazione dei danni del DNA, riempiendo brevi regioni a singolo filamento;
 - un ruolo accessorio durante la replicazione, consistente nel sostituire i ribonucleotidi (RNA) con deossiribonucleotidi (DNA), sul [filamento lagging](#), una volta che l'[RNasi H](#) e una esonucleasi hanno rimosso gli inneschi dei [frammenti di Okazaki](#).



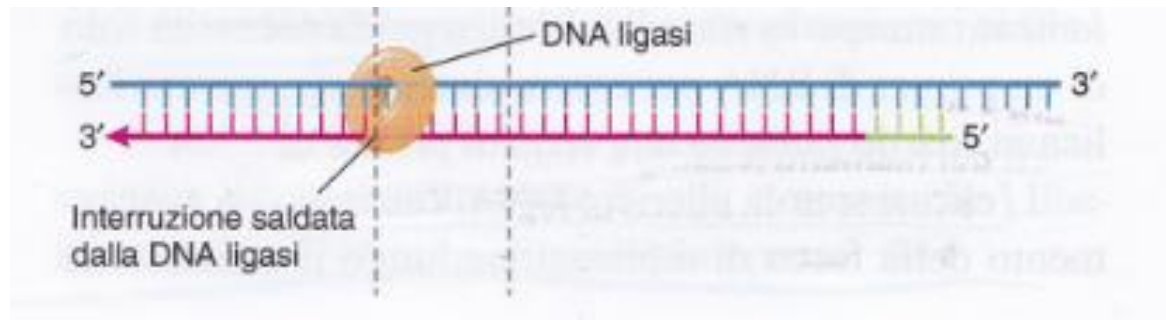
DNA POL 1

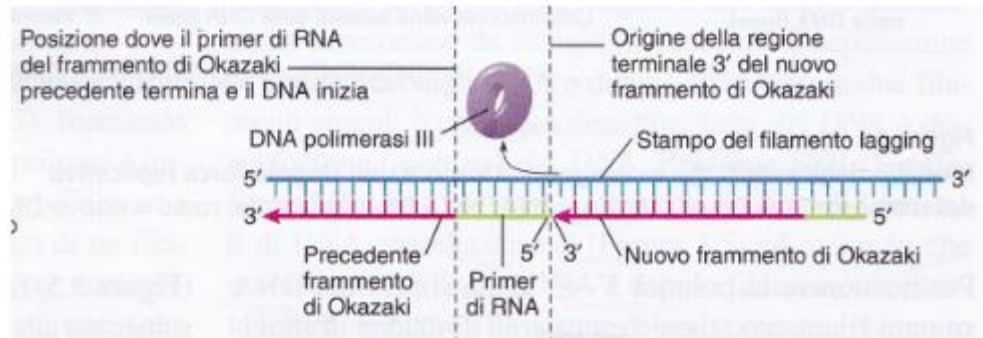
La DNA polimerasi 1 interviene riempiendo lo spazio occupato in precedenza dal primer con deossinucleotidi.

Quando la DNA pol 1 ha sostituito tutti i ribonucleotidi, rimane un'interruzione a singolo filamento fra i nucleotidi adiacenti dei due frammenti di okazaki.

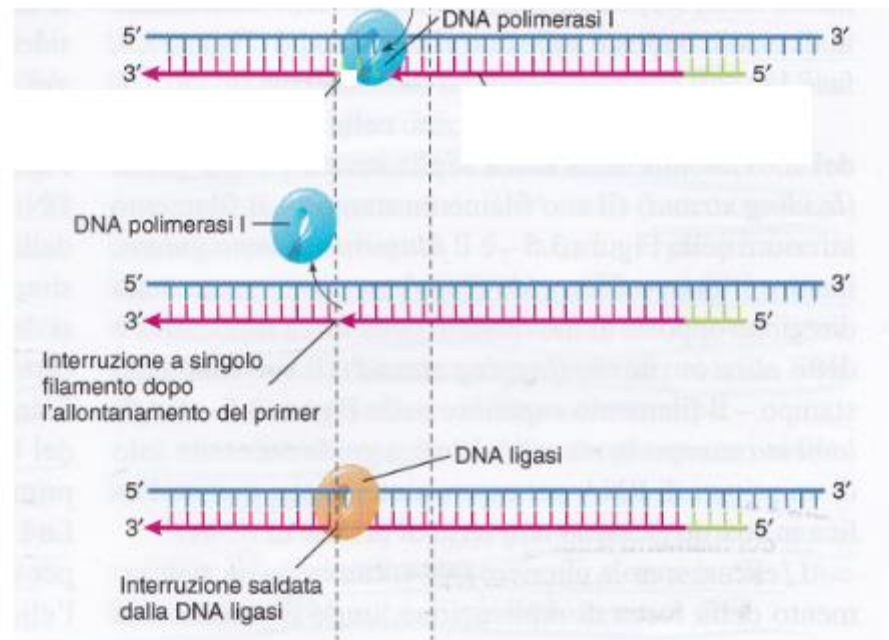
DNA LIGASI

- I frammenti sono uniti dalla DNA ligasi per formare un elica di DNA più lunga.
- La DNA ligasi lega il Nick con consumo di energia ovvero ATP per formare il legame fosfodiesterico.

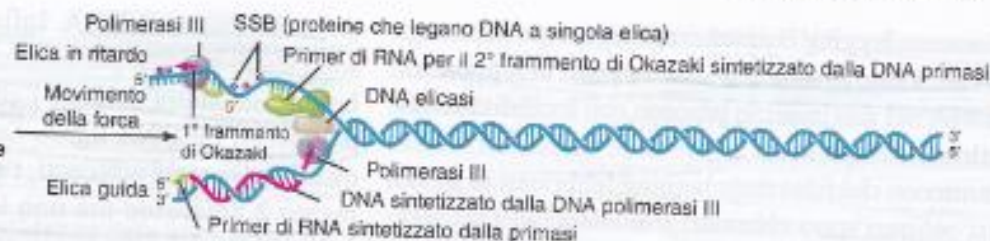




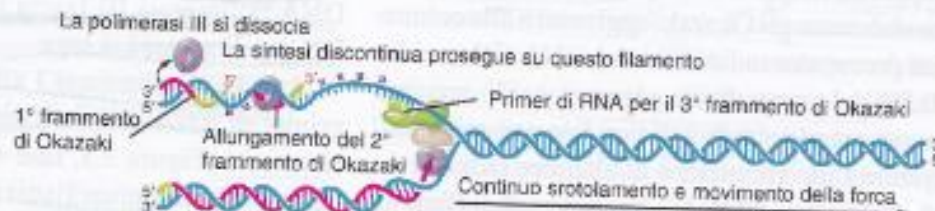
RNAsi H e 5'ESONUCLEASI RIMUOVONO IL PRIMER



- 1** Inizio; il primer di RNA sintetizzato dalla DNA primasi incomincia la replicazione del filamento in ritardo con sintesi del 1° frammento di Okazaki



- 2** Ulteriore srotolamento e allungamento di nuovi filamenti di DNA; viene allungato il 2° frammento di Okazaki



- 3** Il processo continua; il 2° frammento di Okazaki è terminato, il 3° viene sintetizzato; la DNA primasi inizia il 4° frammento



- 4** Il primer è rimosso dalla DNA polimerasi I; rimane un'interruzione a singolo filamento (filamento rosso)



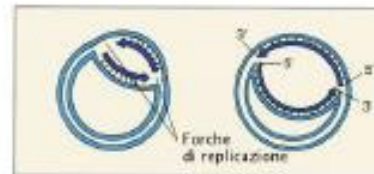
- 5** Giunzione di frammenti di DNA adiacenti a opera della DNA ligasi



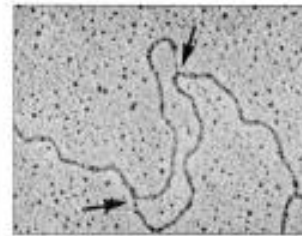
ALCUNE DIFFERENZE

La replicazione del DNA è **bidirezionale** sia nei Procarioti sia negli Eucarioti, ma...

- nei Procarioti vi è un'unica **origine della replicazione** (*ori*) e la 'bolla' di replicazione è una sola
- negli Eucarioti vi sono **fino a 1000 origini della replicazione** e numerose 'bolle' di replicazione



(a)



(b)



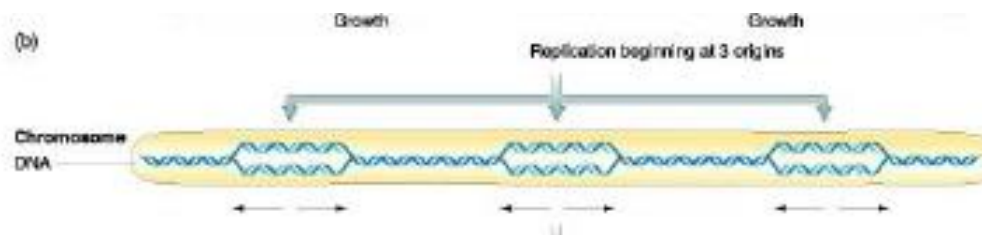
(c)



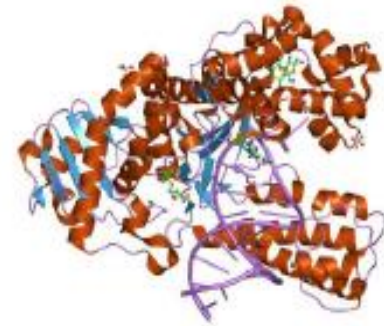
(d)

Figura 11-12 La replicazione del DNA è bidirezionale. I filamenti guida e i filamenti "in ritardo" non sono rappresentati in figura. (a) Il cromosoma circolare di *E. coli* ha una unica origine di replicazione. La sintesi di DNA inizia in un punto e da quello procede in entrambe le direzioni finché le due forche di replicazione si incontrano. (b) La fotografia al microscopio elettronico a trasmissione mostra 2 forche di replicazione (freccie) in un segmento di un cromosoma eucariotico che è stato parzialmente duplicato. (c) Il DNA di un cromosoma eucariotico contiene molte origini di replicazione. La sintesi procede in entrambe le direzioni da ogni origine fino a che "bolle di replicazione" adiacenti non si incontrano (d). (b, per gent. conc. di D.S. Hogness e H.J. Kriegstein).

Negli Eucarioti la replicazione inizia in più punti del cromosoma lineare, in regioni "**ORC**" ("origin recognition complex") a cui si legano altre proteine



DNA polimerasi nei **Procarioti**



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

*L'attività di sintesi del DNA è **SEMPRE** in direzione 5'-3'

DNA polimerasi negli **Eucarioti**



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

*L'attività di sintesi del DNA è **SEMPRE** in direzione 5'-3'

LA TRASCRIZIONE

LA TRASCRIZIONE

- la **trascrizione** è il processo mediante il quale le informazioni contenute nel DNA vengono trascritte enzimaticamente in una molecola complementare di RNA messaggero.
- La produzione di un mRNA mediante la trascrizione di un gene è una fase dell'espressione genica.

LA TRASCRIZIONE

- Il processo della trascrizione è catalizzato da un enzima chiamato **RNA polimerasi** .
- Questo è un esempio di RNA polimerasi DNA-dipendente.
- Perché usa uno stampo di DNA per la sintesi di una catena di RNA.
- Durante la trascrizione l'RNA messaggero viene prodotto in **direzione 5'→3'**
- **Non c'è bisogno di nessun primer. Perché la RNA polimerasi è in grado di iniziare la sintesi di un filamento di RNA.**

LA TRASCRIZIONE NEI BATTERI

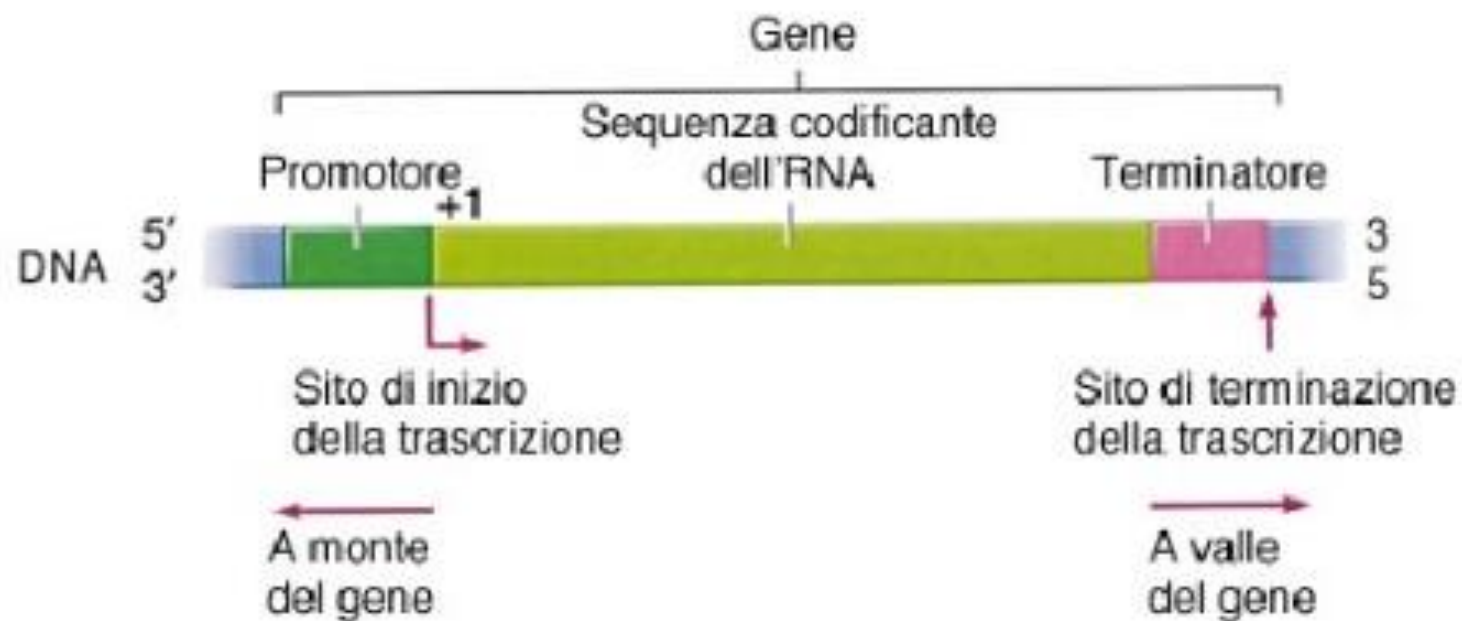
Vi sono 3 fasi:

- **Inizio:** in cui i fattori di trascrizione riconoscono il promotore del gene e reclutano la RNA pol2.
- **Allungamento:** in cui si ha la sintesi dell'mRNA.
- **Terminazione:** si ha quando l'RNA pol2 riconosce il terminatore e si stacca. Il messaggero è prodotto.

STRUTTURA DI UN GENE DI E.COLI

Un gene può esser suddiviso in 3 regioni:

- **IL PROMOTORE:** che si trova a monte del punto di inizio della trascrizione del gene che dovrà esser trascritto.
- **LA SEQUENZA CODIFICANTE:** che codifica per l'mRNA. Quindi è la sequenza di DNA che verrà trascritta dalla RNA pol II.
- **IL TERMINATORE:** sequenza che indica la fine della trascrizione.

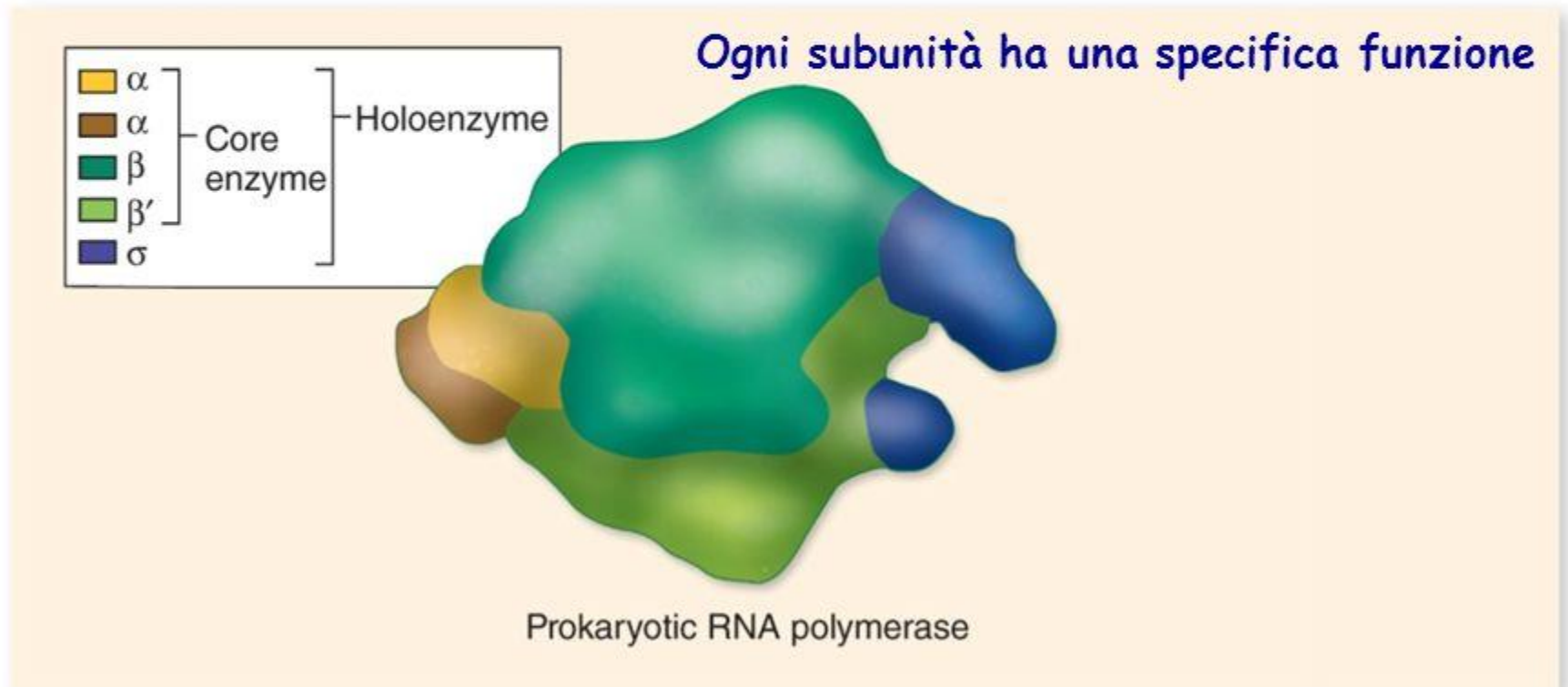


LA RNA POLIMERASI BATTERICA

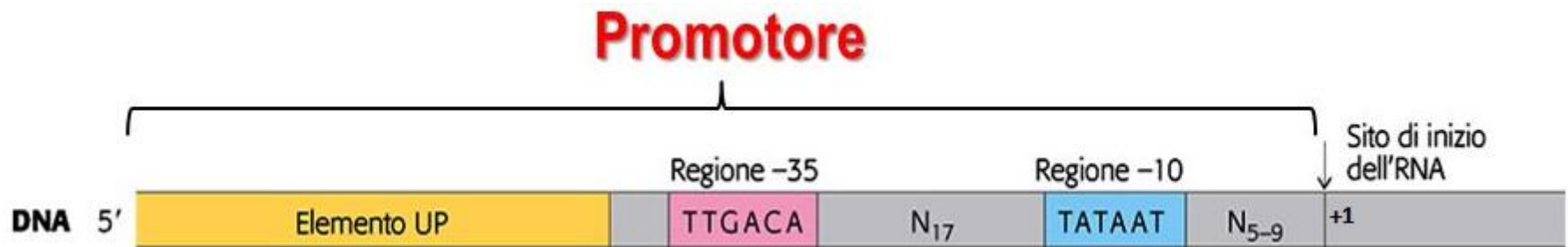
- La macchina trascrizionale nei batteri è rappresentata dalla **RNA polimerasi**.
- L'enzima presenta 2 subunità alfa, una subunità Beta e una B' ed una subunità sigma 70.
- Le subunità alfa 1 e 2 legano il DNA, mentre le subunità Beta si occupano della catalisi dell'RNA (sintesi).
- **Sigma 70** è responsabile del riconoscimento **del Promotore!**

L'RNA polimerasi si lega a specifiche sequenze del promotore per iniziare la trascrizione

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



- All'interno del promotore vi sono due sequenze definite consenso a monte del punto di inizio della trascrizione indicato con +1.
- Le sequenze consenso sono:
 - La prima in -10
 - La seconda in -35



UNA VOLTA CHE SIGMA 70 COMPOSTO A SUA VOLTA DA 4 SUBUNITA' RICONOSCE LE DUE SEQUENZE CONSENSO, GUIDA L'OLOENZIMA RNA POLIMERASI A POSIZIONARSI SUL PROMOTORE!!

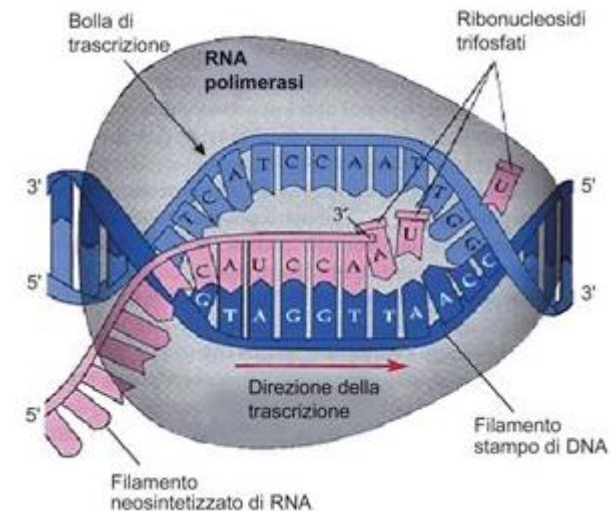
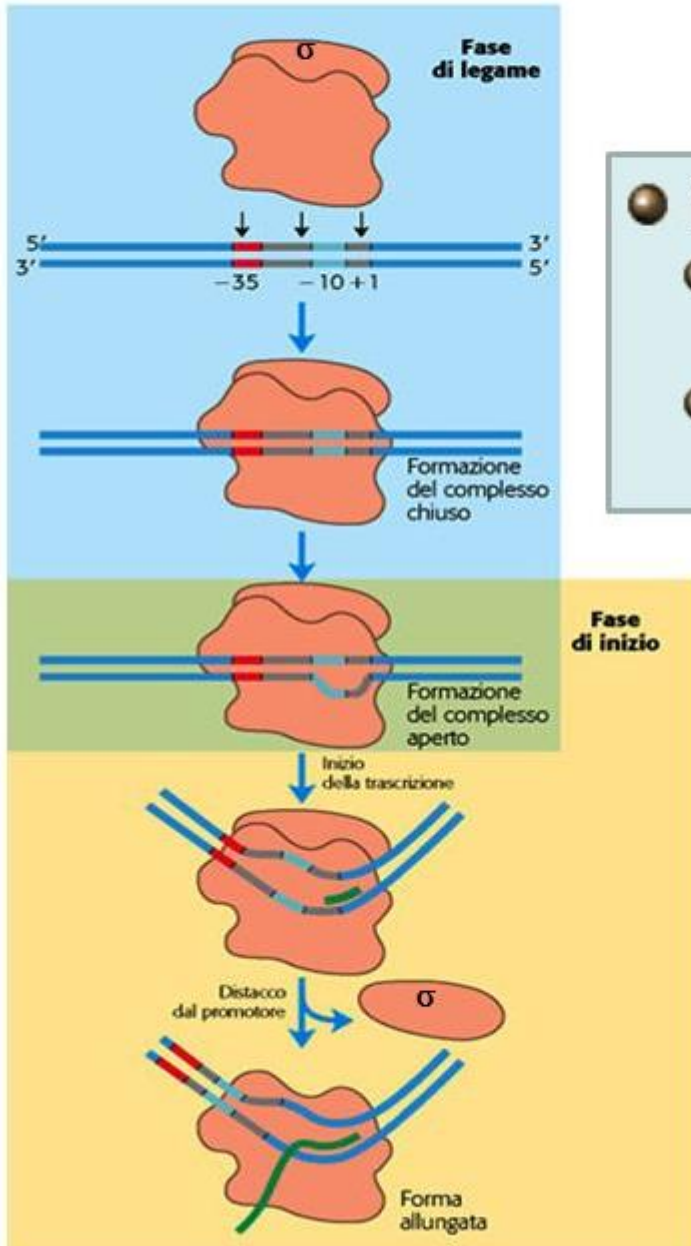
- NEI BATTERI E' PRESENTE UN SOLO TIPO DI RNA POLIMERASI CHE E' IN GRADO DI TRASCRIVERE TUTTE LE CLASSI DI GENI!!!
- QUANDO L'OLOENZIMA SI E' POSIZIONATO SUL PROMOTORE E L'ELICA DI DNA E' ANCORA A DOPPIO FILAMENTO SI PARLA DI COMPLESSO DEL **PROMOTORE CHIUSO**.
- QUESTA RNA POLIMERASI E' IN GRADO DI SROTOLARE LA DOPPIA ELICA IN POSIZIONE -10!
- A QUESTO PUNTO SI PARLA DI **COMPLESSO DEL PROMOTORE** APERTO E SI PASSA ALLA FASE DI ALLUNGAMENTO!

Trascrizione dell'RNA nei procarioti (1)

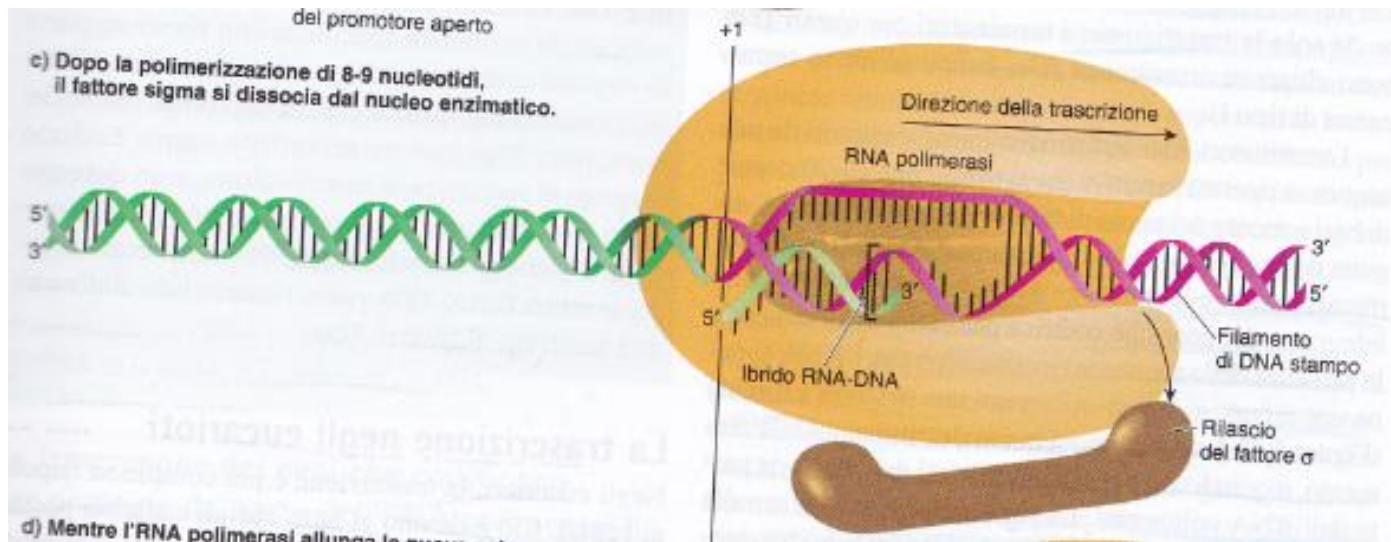
Le fasi della trascrizione (*E. coli*)

- Fase di legame
 - Interazione RNA polimerasi con il promotore (complesso chiuso)
 - Svolgimento del DNA da -10 a +3 o +5 (complesso aperto)

LA SINTESI DELL'RNA AVVIENE IN UNA REGIONE DI DNA CHE È SEPARATA IN SINGOLI FILAMENTI FORMANDO UNA BOLLA DI TRASCRIZIONE!



UNA VOLTA CHE LA SINTESI E' INIZIATA E SI E' INSTAURATA LA FASE DI ALLUNGAMENTO, L'RNA POLIMERASI COMINCIA A MUOVERSI LUNGO IL FILAMENTO DI DNA, SROTOLA LA DOPPIA ELICA E VIENE RILASCIATO IL FATTORE SIGMA!

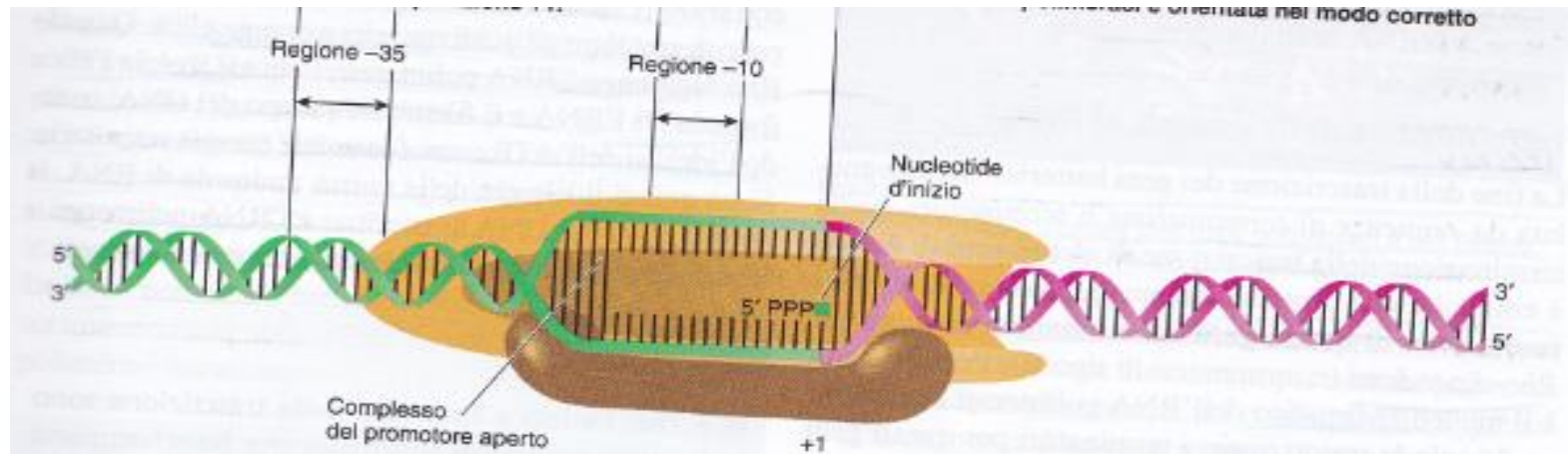


a) Nella fase di inizio, l'oloenzima dell'RNA polimerasi riconosce dapprima la regione -35 del promotore e quindi lo lega interamente.



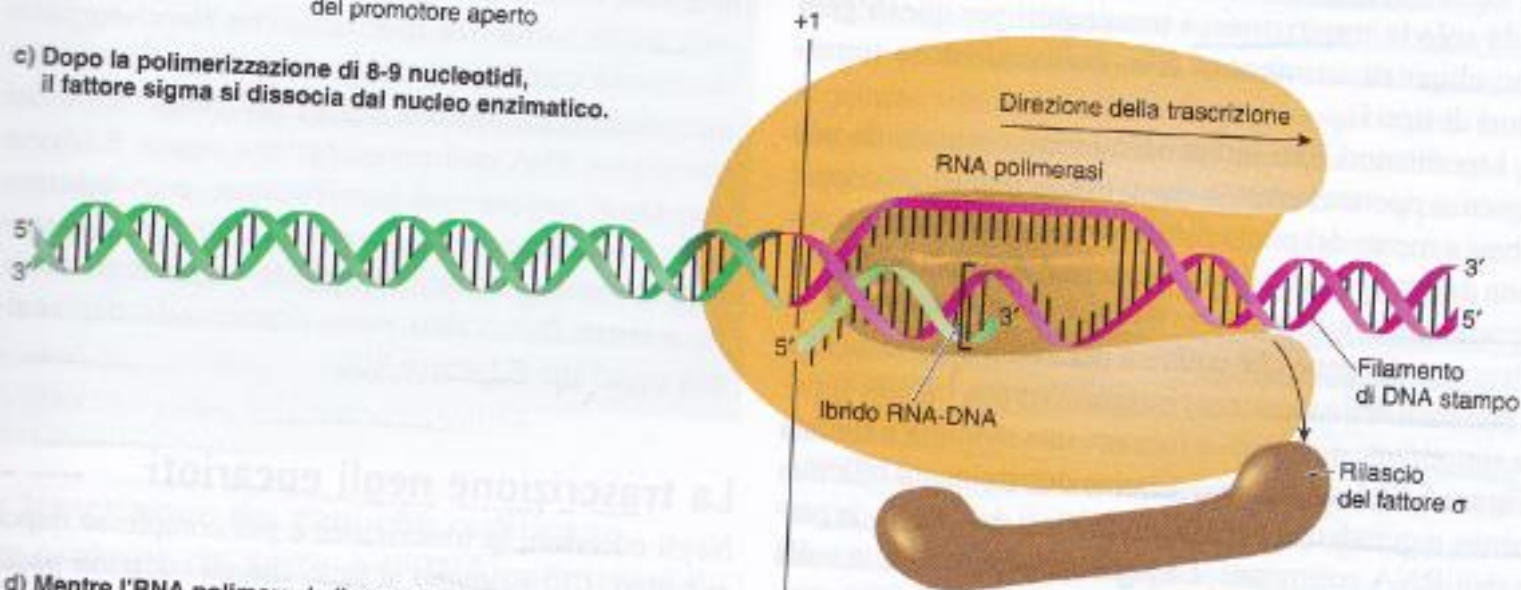
b) Mentre la fase di inizio procede, l'RNA polimerasi si lega più strettamente al promotore a livello della regione -10; lo srotolamento localizzato del DNA in quella regione accompagna l'evento. A questo punto, l'RNA polimerasi è orientata nel modo corretto per iniziare la trascrizione in posizione +1.

Regione -35 Regione -10

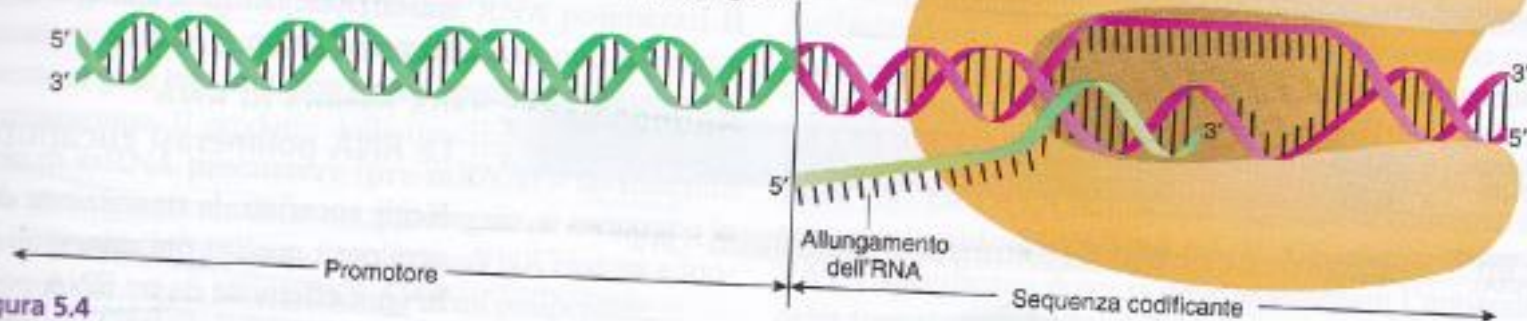


del promotore aperto

- c) Dopo la polimerizzazione di 8-9 nucleotidi, il fattore sigma si dissocia dal nucleo enzimatico.



- d) Mentre l'RNA polimerasi allunga la nuova catena di RNA, l'enzima srotola il DNA a valle, mantenendo una bolla di trascrizione a singolo filamento che si estende per circa 25 paia di basi. Circa 9 basi del nuovo RNA sono legate al DNA a singolo filamento nella bolla di trascrizione, e il rimanente esce dall'enzima sotto forma di filamento singolo.



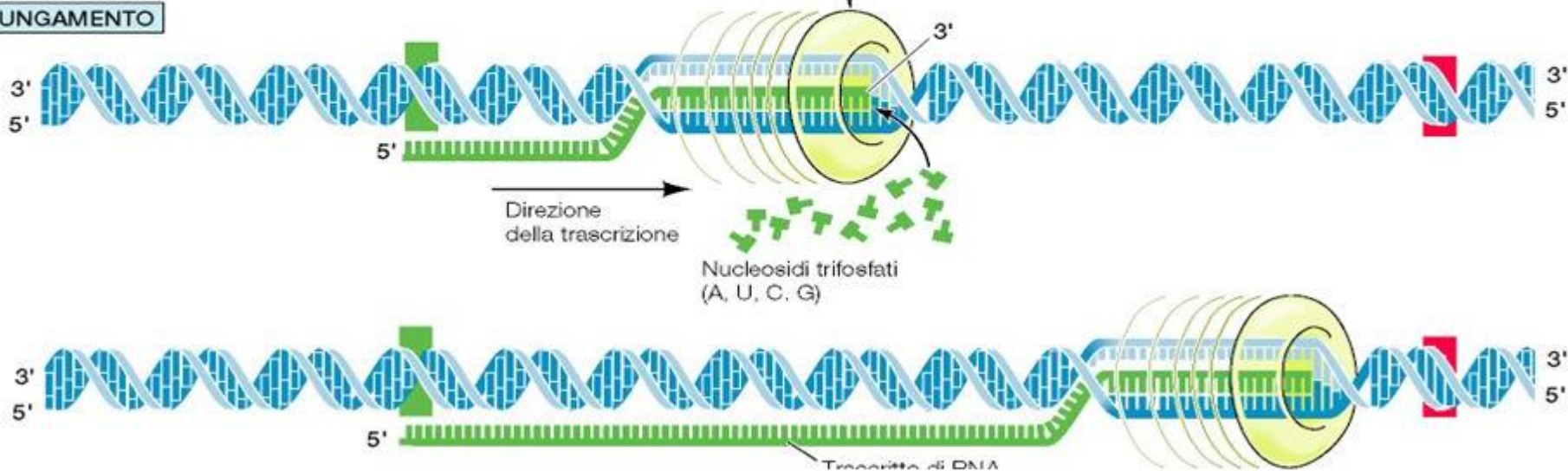
FASE DI ALLUNGAMENTO

- Durante la fase di allungamento il nucleo enzimatico dell'RNA pol si muove srotolando la doppia elica per esporre un nuovo segmento di DNA stampo a singolo filamento.
- Dietro la regione srotolata i due filamenti di DNA riformano la doppia elica.
- Durante questa fase si ha la sintesi di mRNA grazie all'aggiunta di ribonucleotidi da parte dell'RNA pol sulla base dello stampo a singolo filamento di DNA.

2) ALLUNGAMENTO DEL TRASCRITTO

2 L'RNA polimerasi legge il filamento del DNA stampo in direzione 3' → 5' e produce il trascritto di RNA aggiungendo nucleotidi all'estremità 3'.

ALLUNGAMENTO



TERMINAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

Avviene mediante 2 meccanismi:

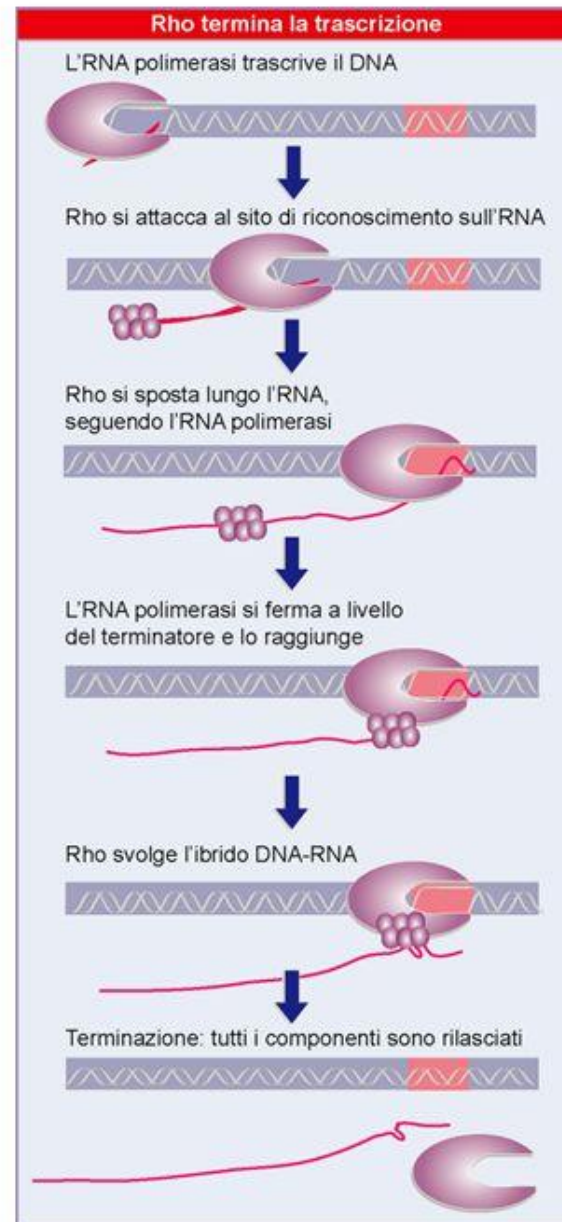
- **RHO dipendente**
- **RHO indipendente**

RHO DIPENDENTE

- Prevede il riconoscimento di una **sequenza RUT** sul messaggero da parte della proteina **esamerica Rho**.
- RHO scorre lungo il filamento di RNA messaggero con consumo di ATP e giunge a contatto con l'RNA pol.
- Rho causa un cambio conformazionale nell'RNA pol e ne promuove il **suo distacco**.

I terminatori Rho-dipendenti
richiedono il legame della RNA
elicasi Rho
alla catena nascente di RNA

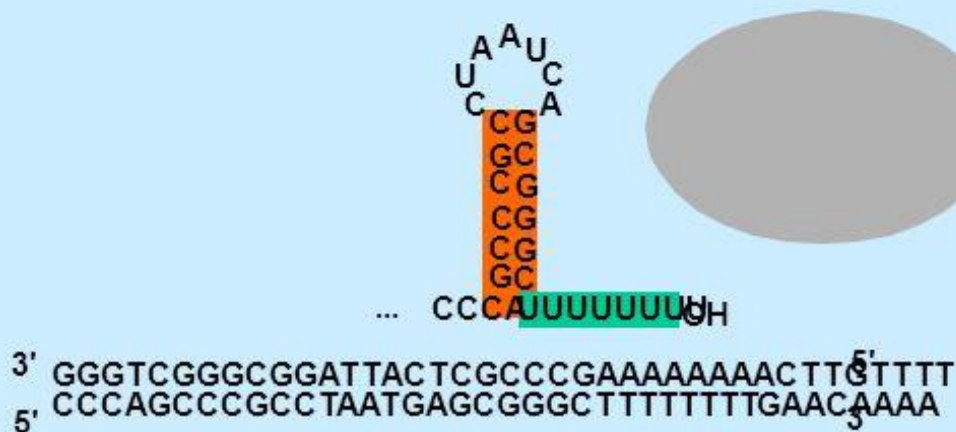
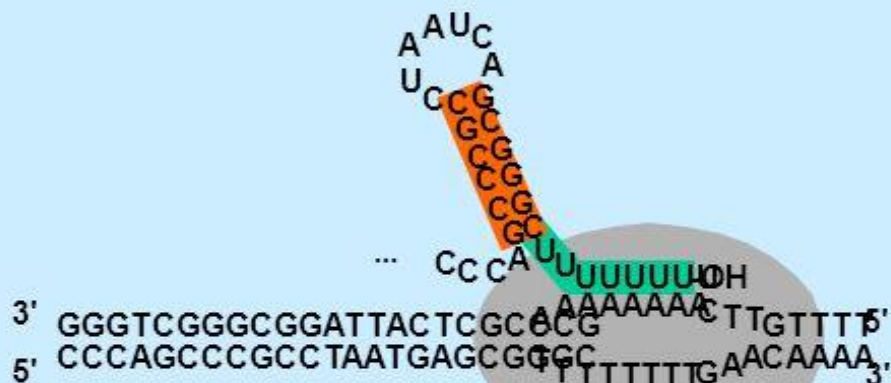
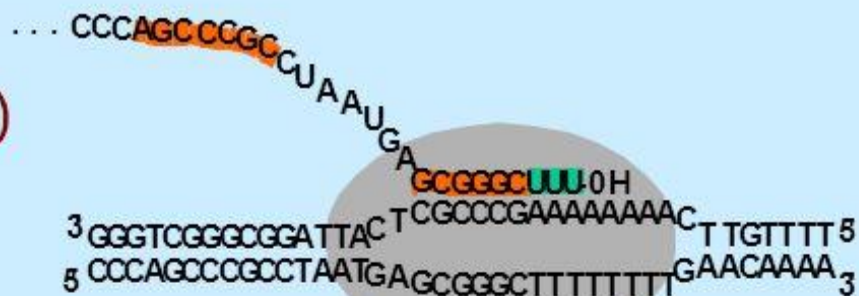
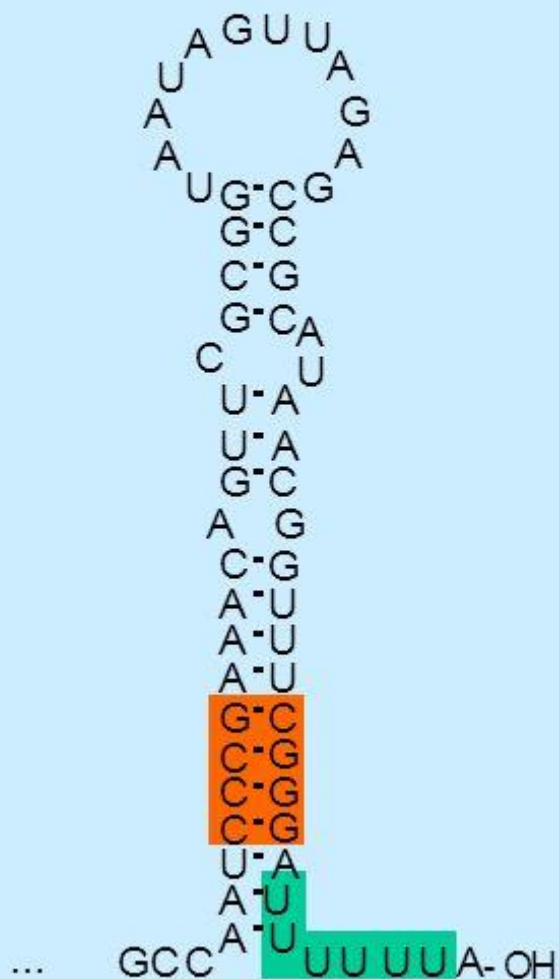
Rho si lega all'RNA su uno specifico
sito di riconoscimento, ma agisce al
3' di questo



RHO INDIPENDENTE

- Si basa sulla formazione di una struttura secondaria sul mRNA.
- Si genera una struttura a forcina che destabilizza l'ibrido DNA-RNA e fa staccare la RNA pol.
- Oppure induce un cambio conformazionale nell'RNA pol che si stacca.

Terminatori intrinseci (terminazione rho indipendente)



Le RNA polimerasi

- Nei procarioti, una sola RNA P si occupa della trascrizione di tutti i geni
- Negli Eucarioti, diverse RNA P catalizzano la sintesi di:
- mRNA, che in seguito verrà tradotto in polipeptide (**RNA P II**)
- rRNA, in segmenti di varie lunghezze che alla fine si aggregano a formare ribosomi (**RNA P I**)
- tRNA, che riconoscono la sequenza dell'mRNA e allineano gli amminoacidi corrispondenti (**RNA P III**)
- **Ridondanza genica** per RNA P I e RNA P III.

ATTENZIONE!

Negli eucarioti l'inizio è differente:

- Sono richiesti tutta una serie di fattori proteici di inizio chiamati **GTF e FT** specifici, che hanno la funzione di riconoscere specifiche sequenze sul promotore (**TATA Box**) , reclutare e posizionare correttamente su di esso la **RNA POLIMERASI II**.
- Il **TFIIH** è colui che srotola la doppia elica in quanto presenta una attività elicastica.
- In seguito alla fosforilazione della CTD della RNA pol II si dà il via al processo di trascrizione e sintesi dell'mRNA.

ATTENZIONE!!

- Nei procarioti, una volta prodotto l'mRNA può essere subito tradotto in proteine!
- Negli eucarioti una volta prodotto l'mRNA, questo dovrà essere processato per poter eliminare gli introni (**SPLICING**) ed inoltre subirà delle modifiche **post-trascrizionali** come l'aggiunta di un **CAP 5'** e la coda di **Poli A in 3'**.

RICORDA :

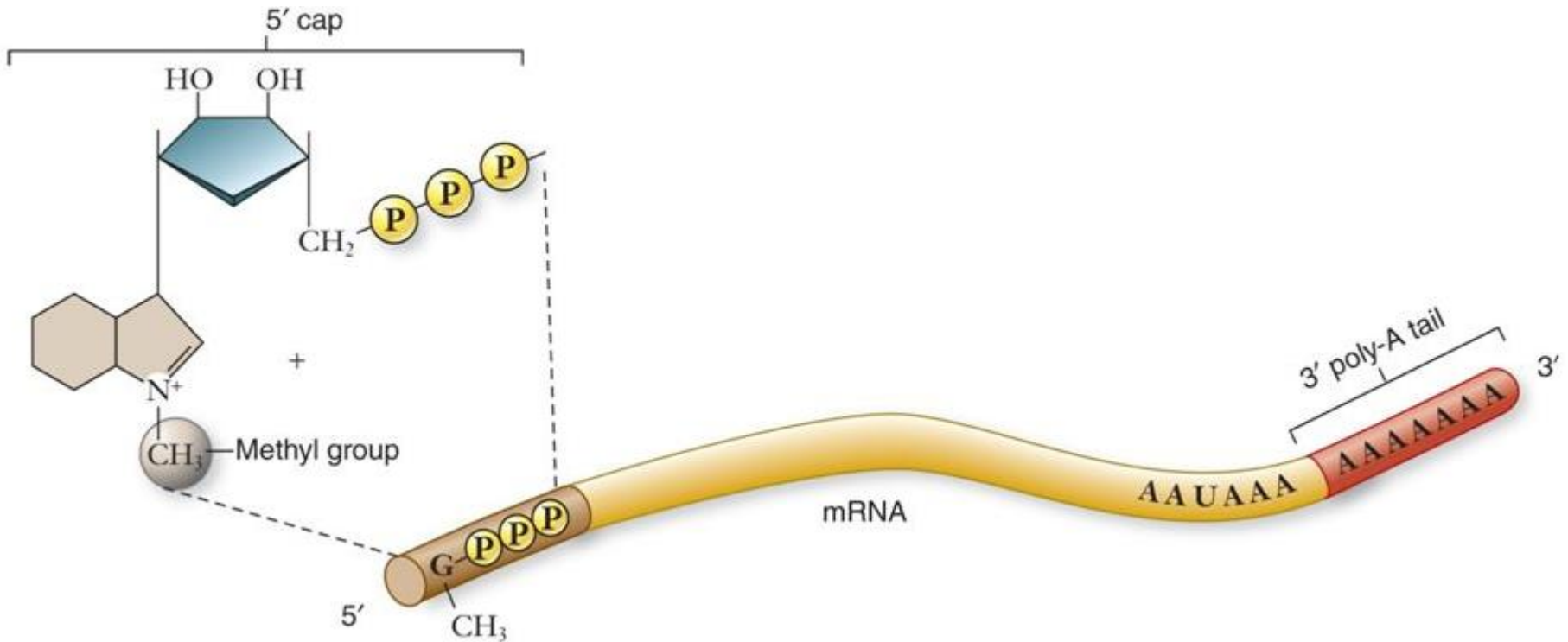
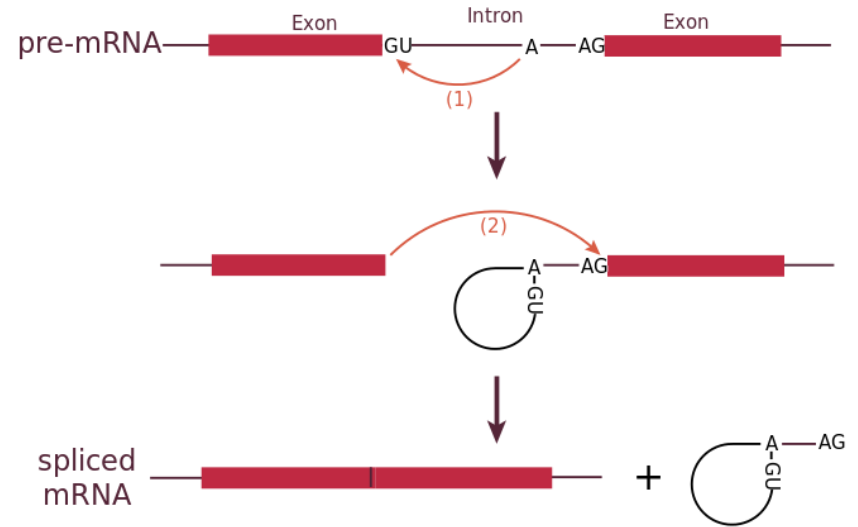
REPLICAZIONE DEL DNA;

TRASCRIZIONE;

AVVENGONO NEL

NUCLEO!!

SPLICING →



DIFFERENZE TRA PROCARIOTI ED EUCARIOTI: LE MODIFICAZIONI POST-TRASCRIZIONALI

- **Procarioti**: mRNA viene trascritto e subito tradotto in proteine, senza alcuna modificazione
- **Eucarioti**: mRNA trascritto nel nucleo viene **modificato** con una serie di reazioni prima di essere esportato nel citoplasma:
 1. **CAPPING**: all'estremità 5'
 2. **TAILING**: all'estremità 3'
 3. **SPLICING**: elimina gli introni

TRADUZIONE O SINTESI PROTEICA

La **sintesi proteica** (detta anche **traduzione**) è il processo biochimico attraverso il quale l'informazione genetica contenuta nel mRNA (RNA messaggero), viene convertita in proteine che svolgono nella cellula un'ampia gamma di funzioni.

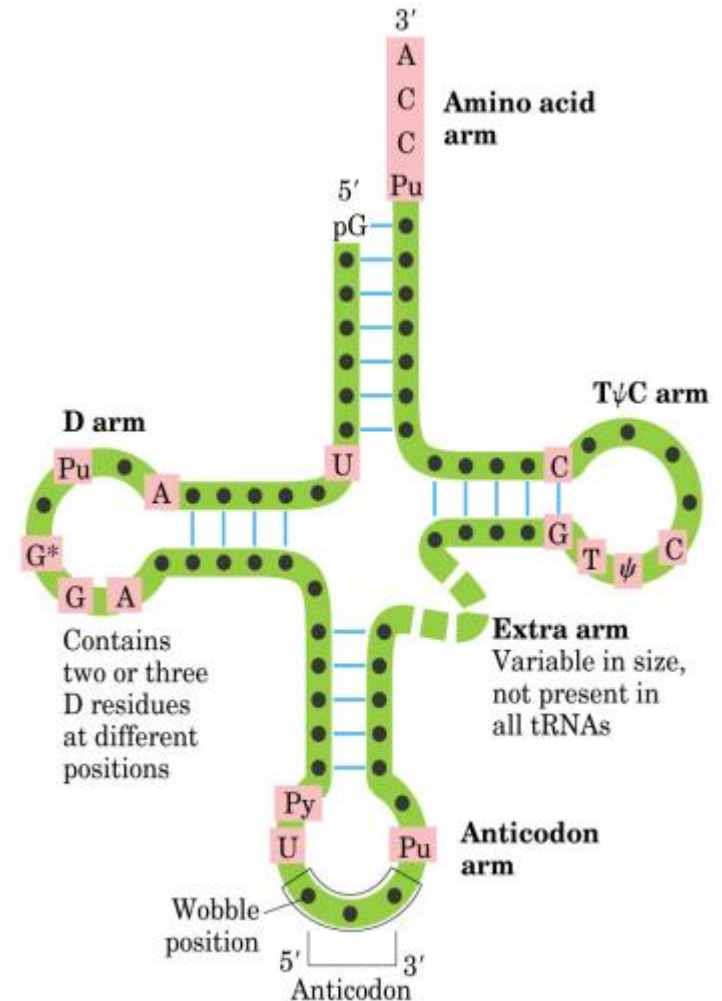
La traduzione o sintesi proteica si svolge nel citoplasma grazie ai **ribosomi**!

LA TRADUZIONE NEI PROCARIOTI

- Si suddivide in 3 fasi:
 - **Inizio:** la subunità minore del ribosoma si associa all'mRNA e poi la subunità maggiore si unisce al complesso.
 - **Allungamento:** si ha la sintesi della proteina.
 - **Terminazione:** si riconosce il codone di stop, la proteina viene rilasciata dal ribosoma ed è prodotta.

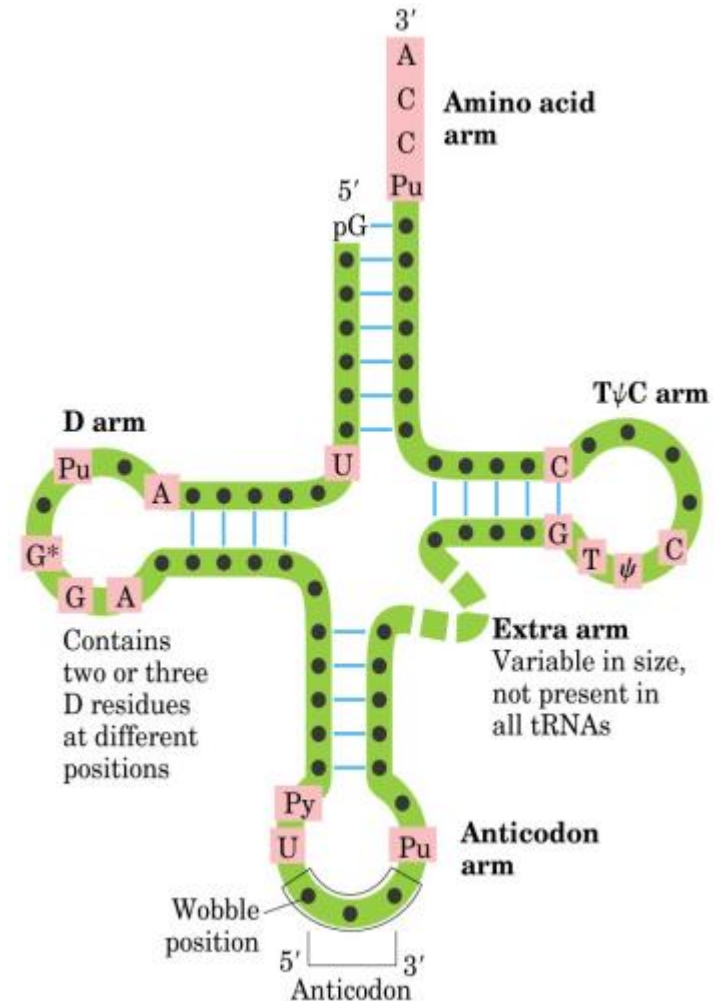
IL tRNA

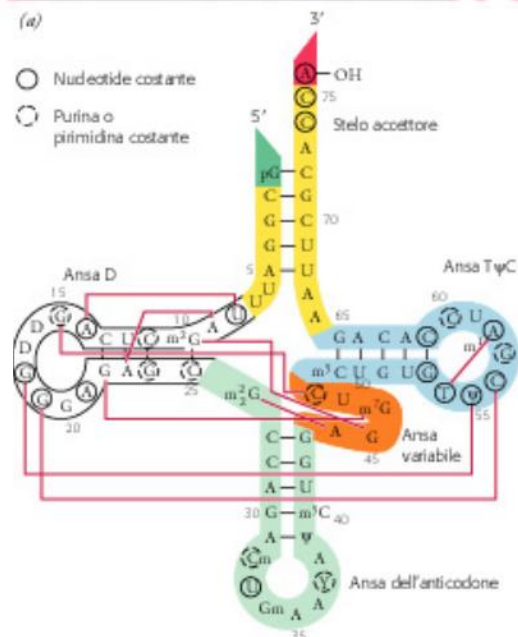
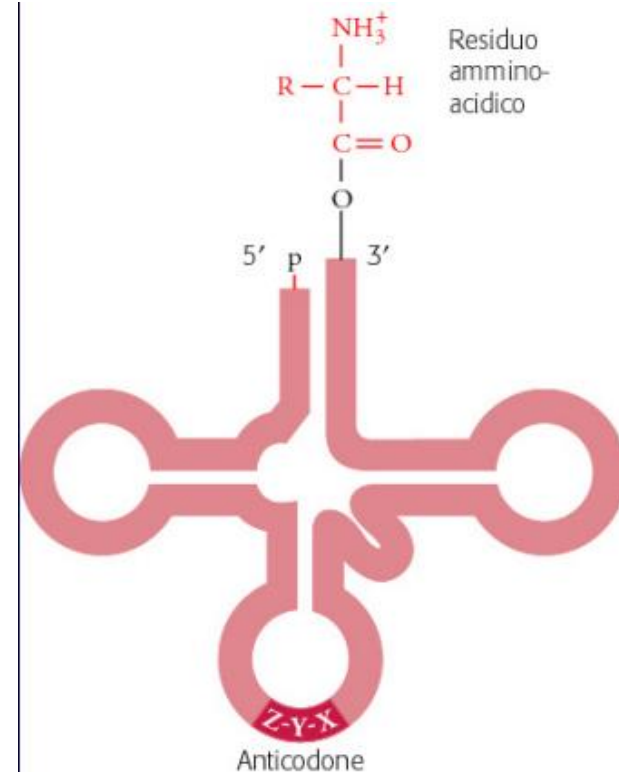
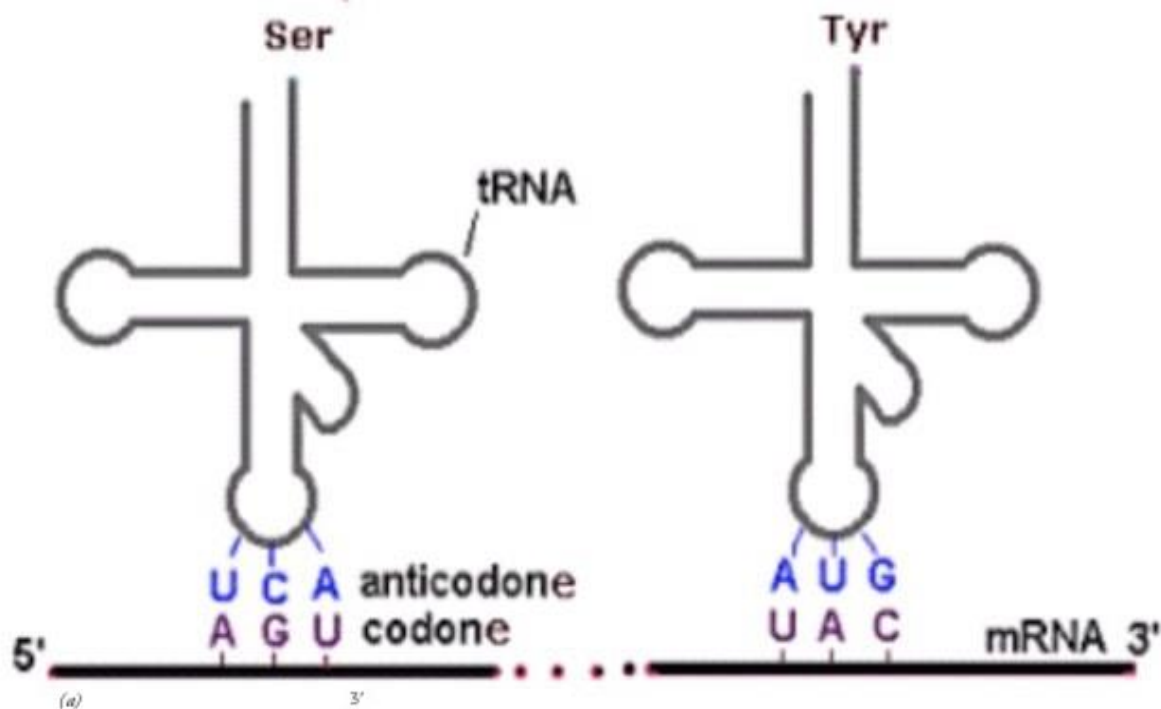
- È una molecola piccola formata da circa 95 ribonucleotidi.
- Ha la funzione di legare e trasportare al ribosoma uno specifico amminoacido.
- I tRNA, a livello dei ribosomi, si appaiono **grazie al loro anticodone al codone complementare sull'mRNA.**



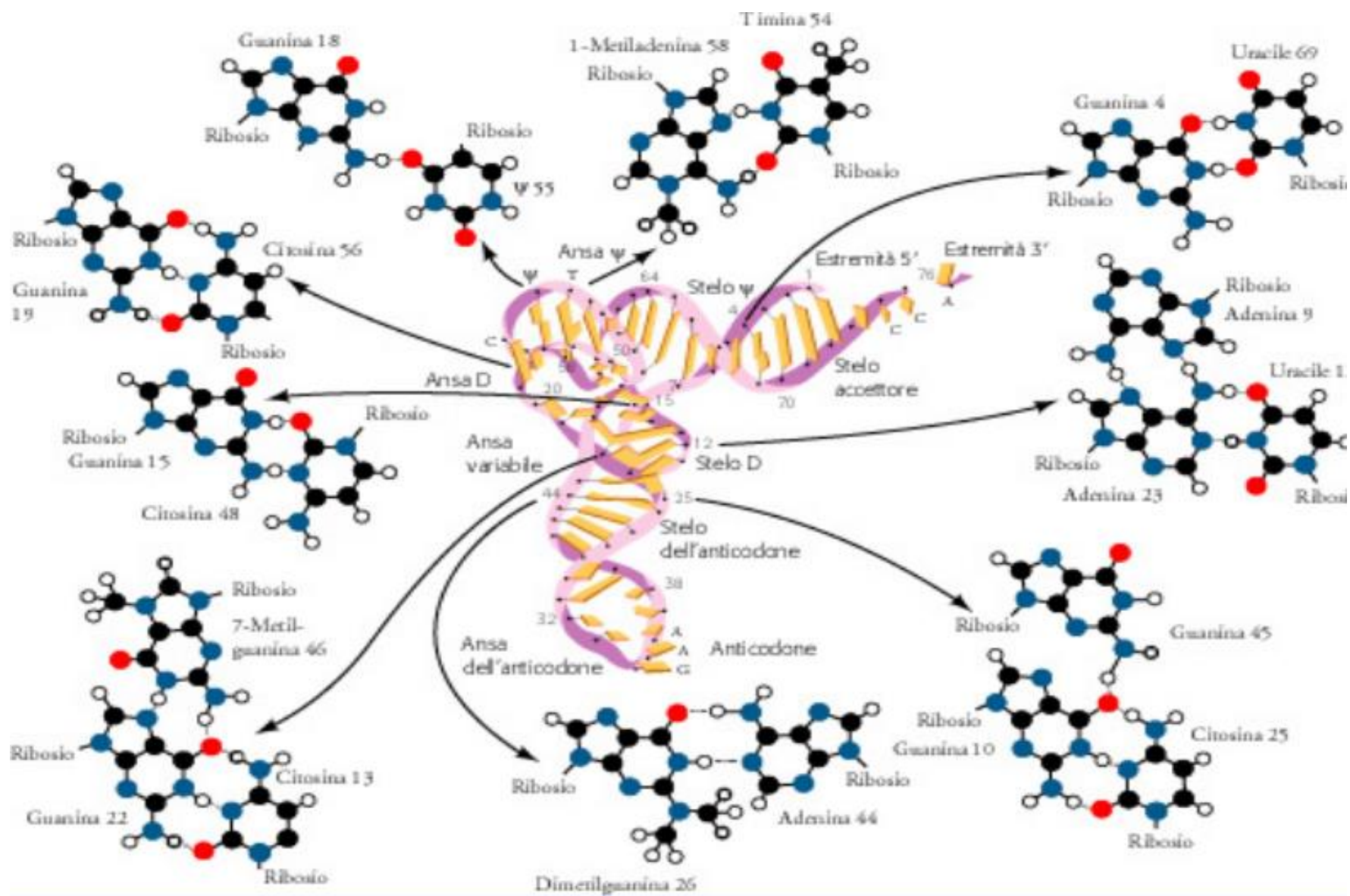
IL tRNA

- Tutti i tRNA hanno una caratteristica sequenza comune CCA all'estremità 3' che leggerà l'amminoacido.
- Presenza di basi modificate come pseudouridina e diidrouridina
→migliorano la funzione del tRNA.



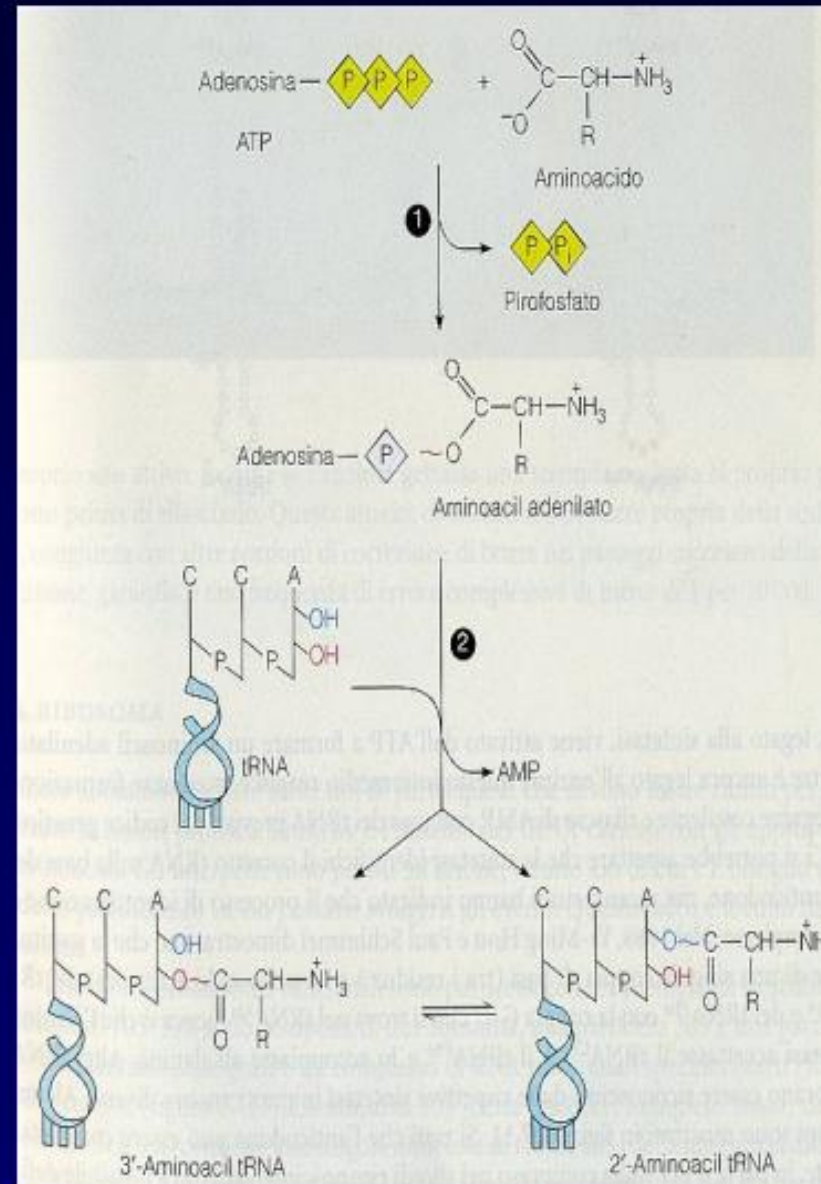


Classica struttura a trifoglio... ma.....



GLI AMMINOACIDI SONO ATTIVATI E LEGATI DA SINTETASI SPECIFICHE A tRNA SPECIFICI

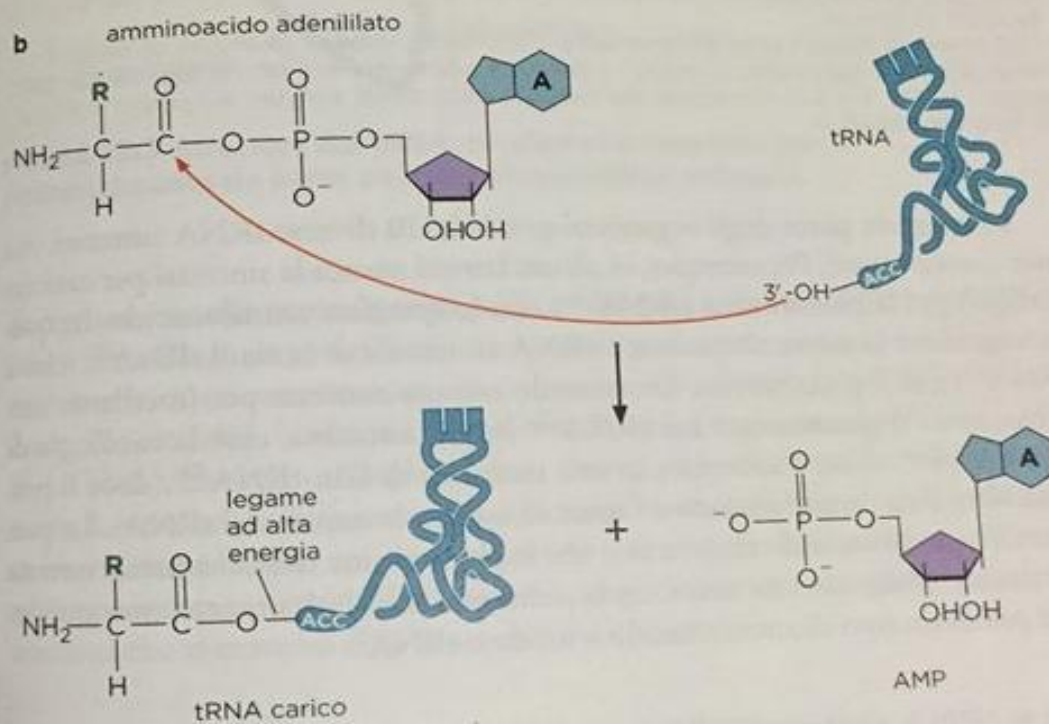
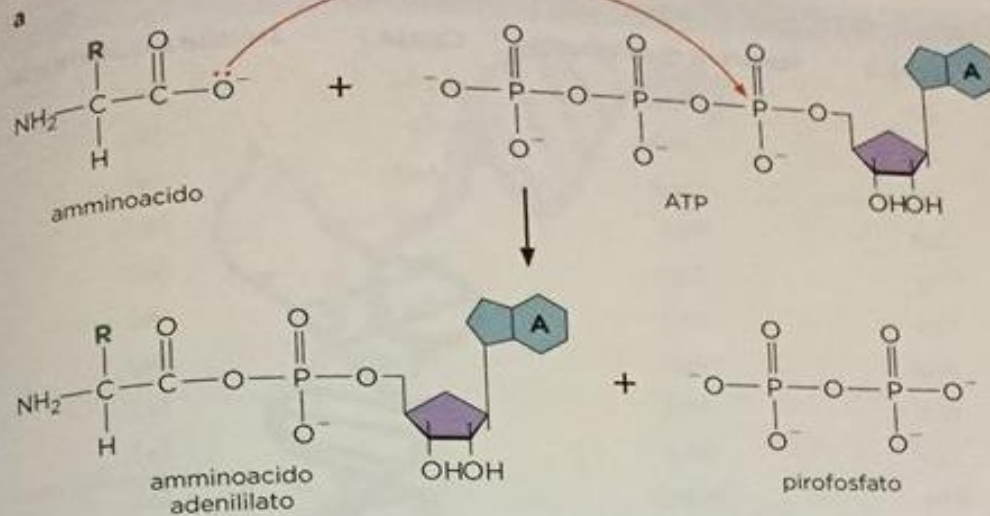
La formazione degli
amminoacil-tRNA
ad opera delle
amminoacil tRNA sintetasi:



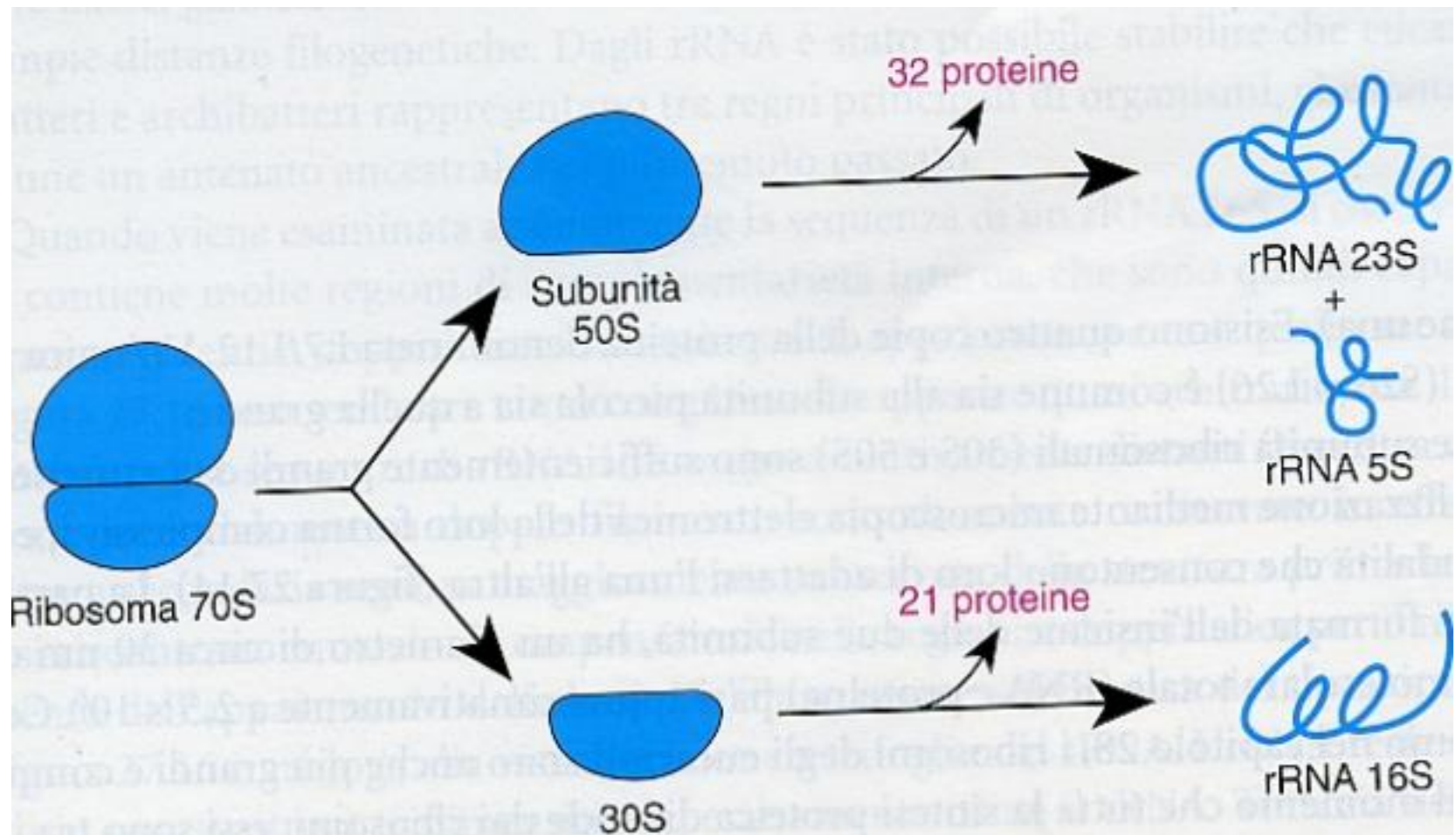
APPROFONDIMENTO

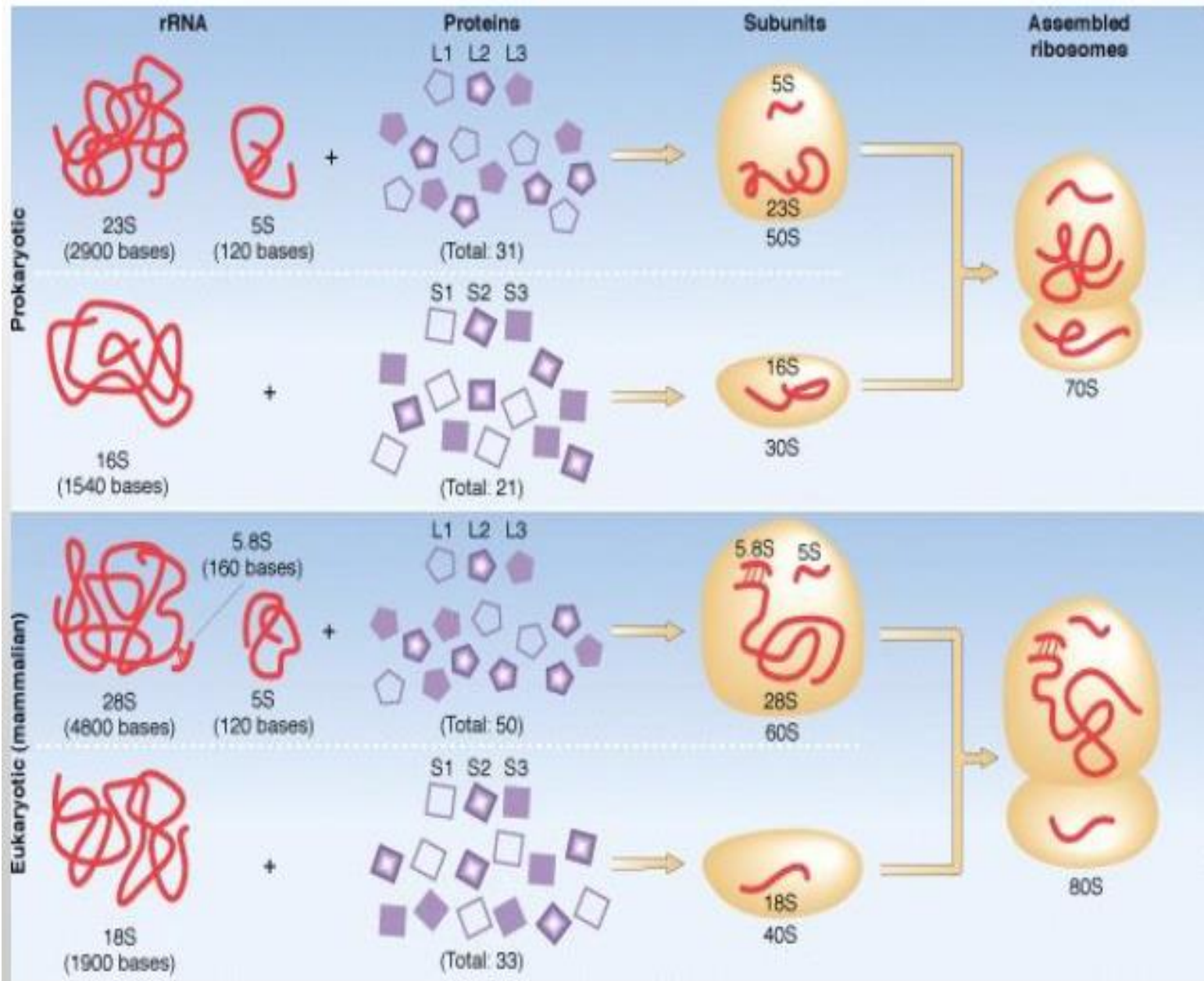
Tutte le amminoacil-tRNA sintetasi attaccano un aa a un tRNA in 2 passaggi:

- ADENILILAZIONE: l'amminoacido reagisce con un ATP e diventa adenililato; con contemporaneo rilascio di PPi.
- il trasferimento dell'aa all'estremità 3' del tRNA.



RIBOSOMA PROCARIOTICO





Prokaryoti
(70 S)

Eucarioti
(80 S)

I TRE SITI DEL RIBOSOMA



IL CODONE DI INIZIO è AUG!!
tRNA

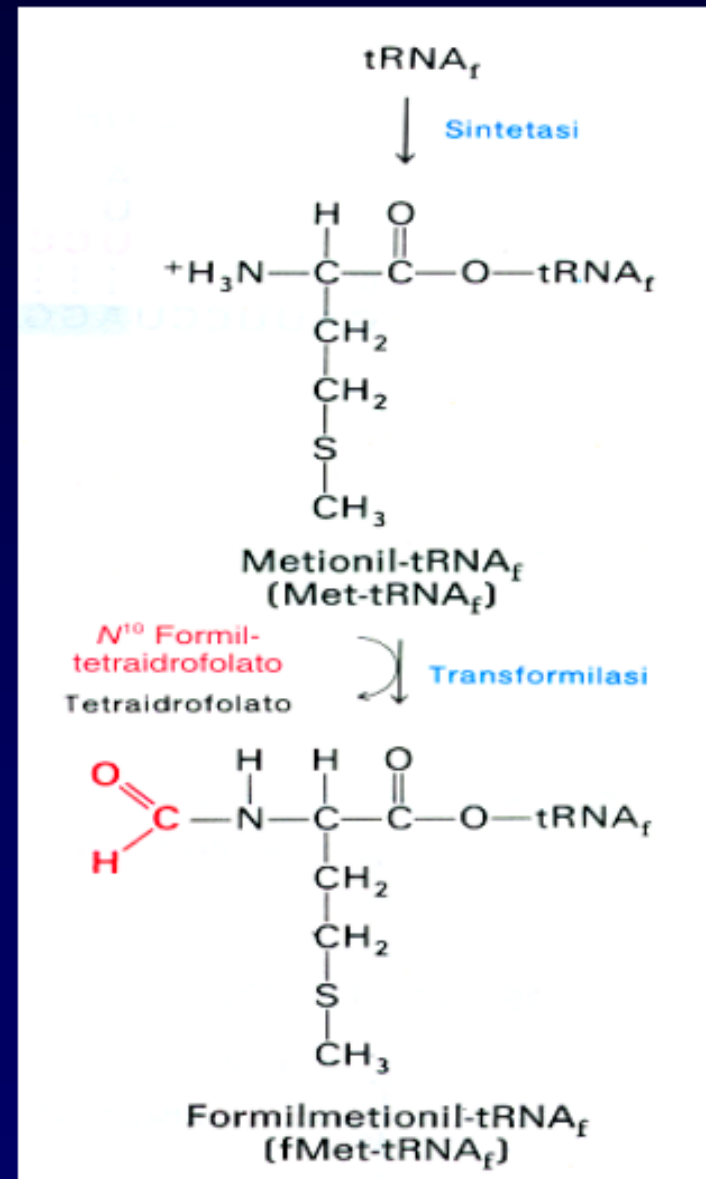
IL Trna INIZIATORE NEI PROCARIOTI E' L'FMET-

LA FORMAZIONE DI FORMILMETIONIL-tRNA_f

Il primo codon tradotto nell'mRNA non inizia immediatamente al terminale 5' e molte molecole di mRNA sono **policistroniche**: codificano per più di una catena polipeptidica;

la sintesi proteica è iniziata da **formilmetionil tRNA**. Questo tRNA_f iniziatore lega la formilmetionina e la porta al ribosoma.

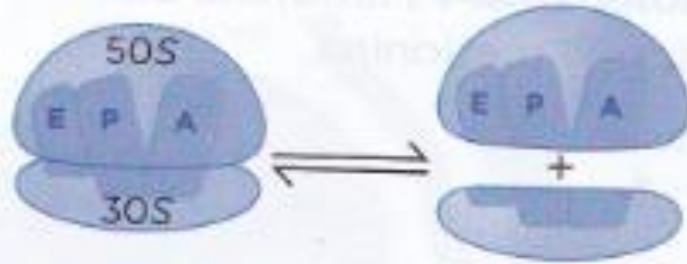
Il codone di inizio è AUG che codifica per una metionina!! Nei procarioti formil-metionina



INIZIO TRADUZIONE PROCARIOTI

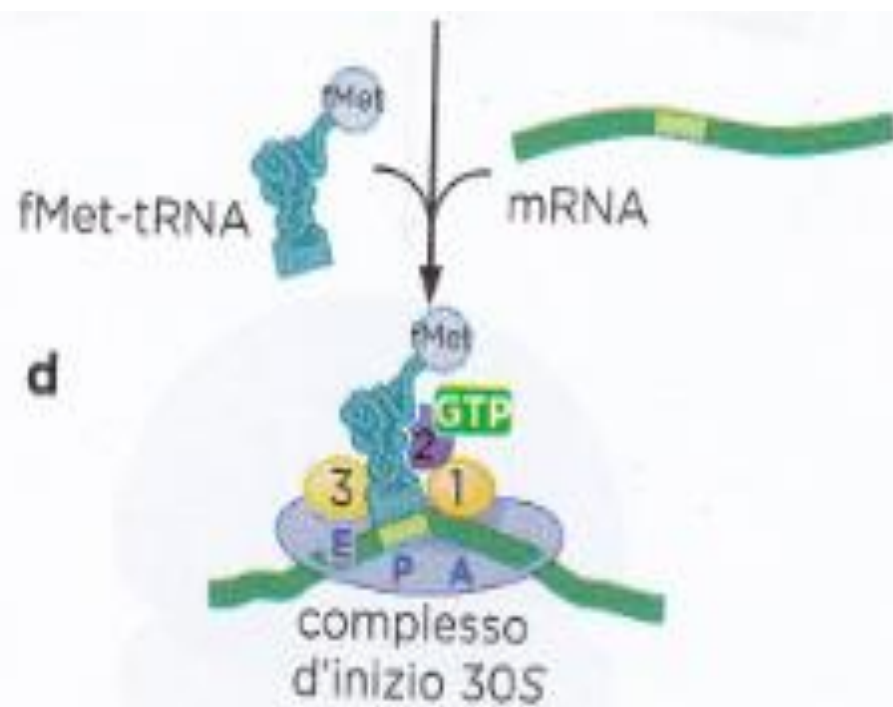
Intervengono 3 fattori di inizio: IF1, IF2, IF3.

- **IF1** evita che i tRNA si leghino alla zona della subunità minore che diventerà parte del sito A.
- **IF2** facilita l'interazione del Fmet-tRNA con la subunità minore ed evita che altri tRNA carichi si leghino alla subunità minore.
- **IF3** impedisce che la subunità minore del ribosoma si associ a quella maggiore.

a**IF3****b****IF2****IF1****GTP****c**

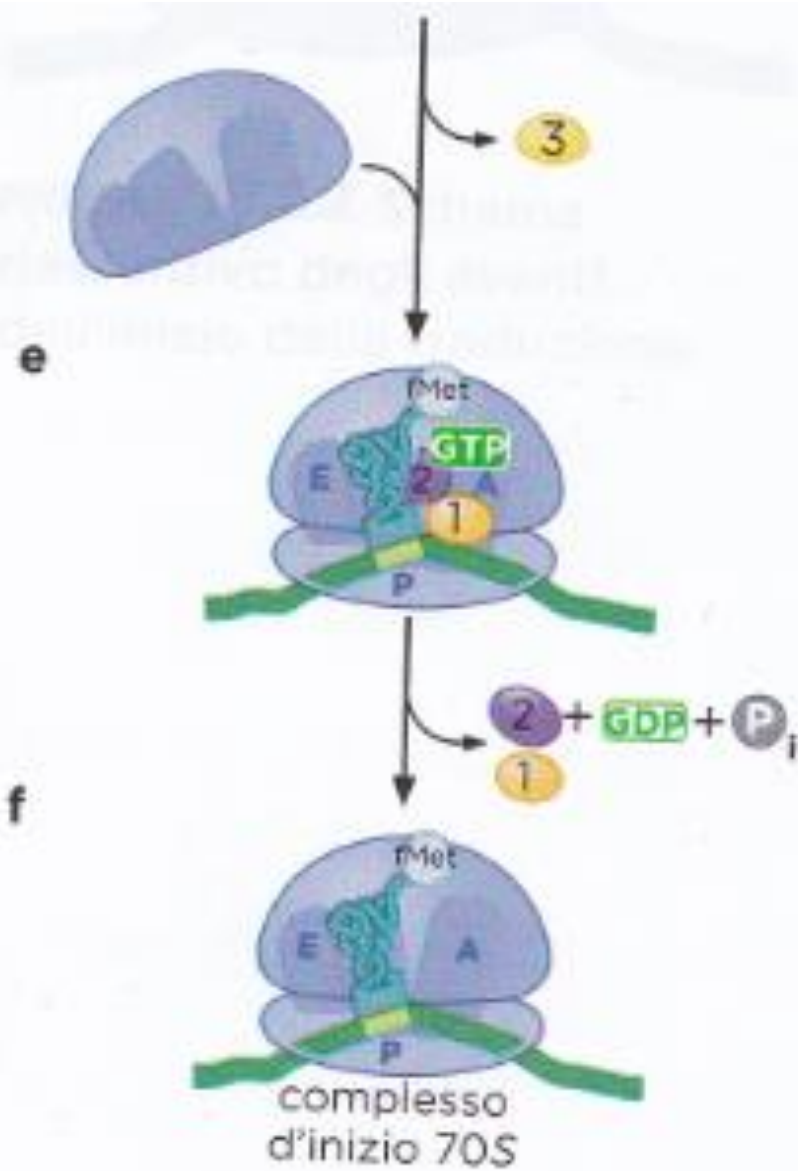
INIZIO TRADUZIONE PROCARIOTI

- Quando tutti e tre i fattori di inizio procariotici sono posizionati:
- L'mRNA si lega alla subunità minore del ribosoma.
- L'rRNA 16S della subunità minore riconosce e si lega alla sequenza complementare presente sull'mRNA.
- L'fMet-tRNA presente sul futuro sito P si appaia grazie al suo anticodone al codone di inizio AUG dell'RNA messaggero.



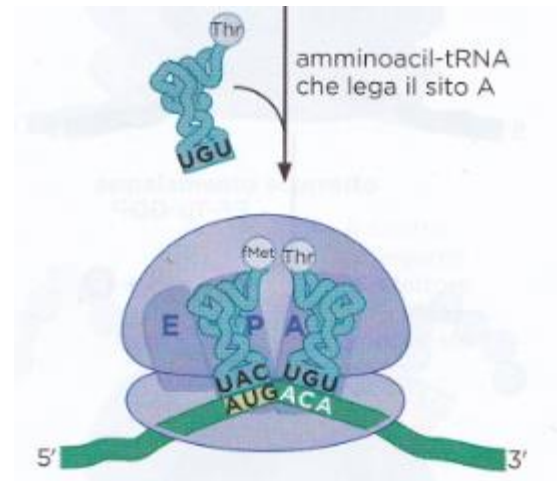
INIZIO TRADUZIONE PROCARIOTI

- Quando l'fMet-tRNA si appaia con il codone di inizio dell'mRNA, la subunità minore cambia la propria conformazione.
- Questo promuove il distacco di IF3.
- La subunità maggiore si associa a quella minore e causa l'idrolisi del GTP presente su IF2.
- IF2-GDP si stacca dal complesso provocando anche il distacco di IF1 e si forma il complesso di inizio 70S.



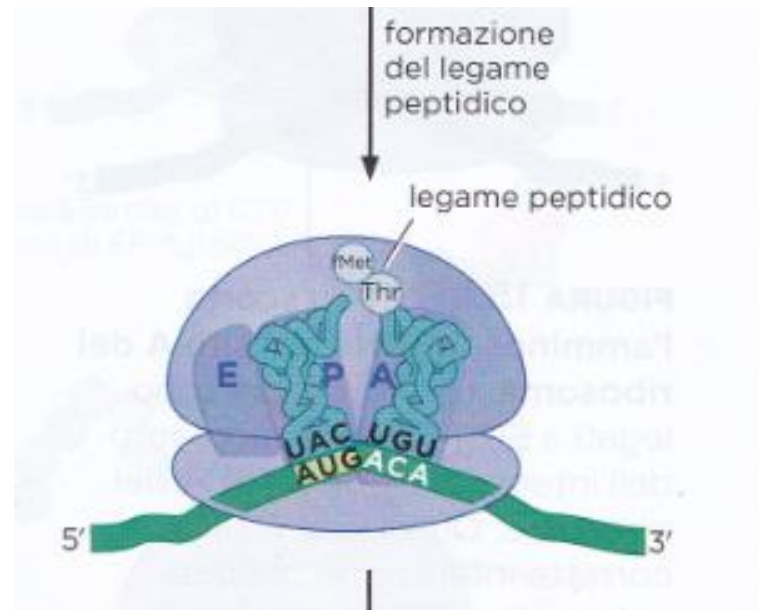
ALLUNGAMENTO

- Il tRNA iniziatore si trova nel sito P del ribosoma.
- Il successivo amminoacil-tRNA viene caricato nel sito A come determinato dal codone presente nel sito.



ALLUNGAMENTO

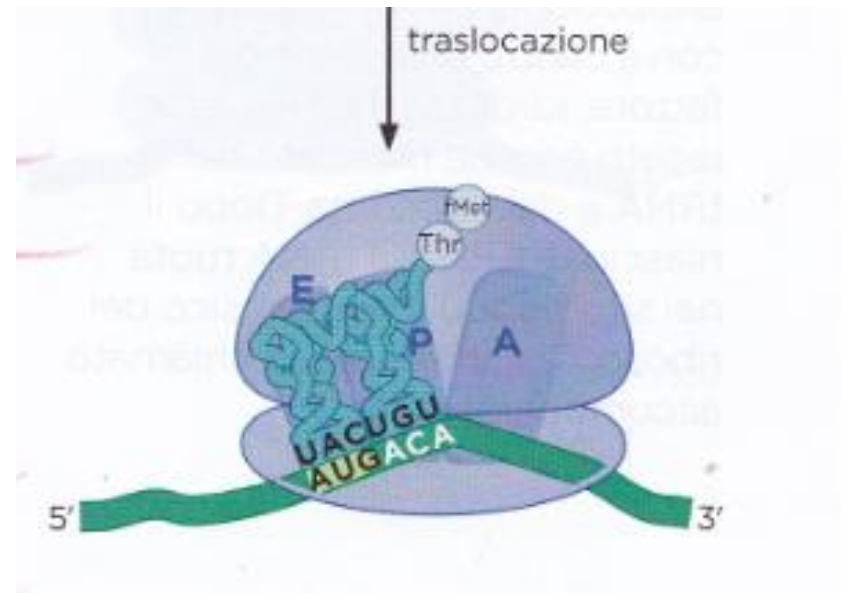
- Si forma un legame peptidico tra l'amminoacil-tRNA presente nel sito A e quello nel sito P.
- La reazione della peptidiltransferasi ha come risultato il trasferimento del peptide dal tRNA nel sito P a quello nel sito A.



ALLUNGAMENTO

- Il peptidil-tRNA presente nel sito A ed il codone ad esso associato devono essere traslocati al sito P, in modo tale che il sito A diventi vuoto per accogliere un nuovo specifico tRNA.
- La traslocazione del ribosoma viene effettuata da un particolare fattore di allungamento detto EF-G

EF-G una volta che ha idrolizzato l'ATP media lo spostamento del ribosoma di una tripletta lungo l'mRNA. Il trna che si troverà nel sito E, è scarico e lascia il ribosoma.

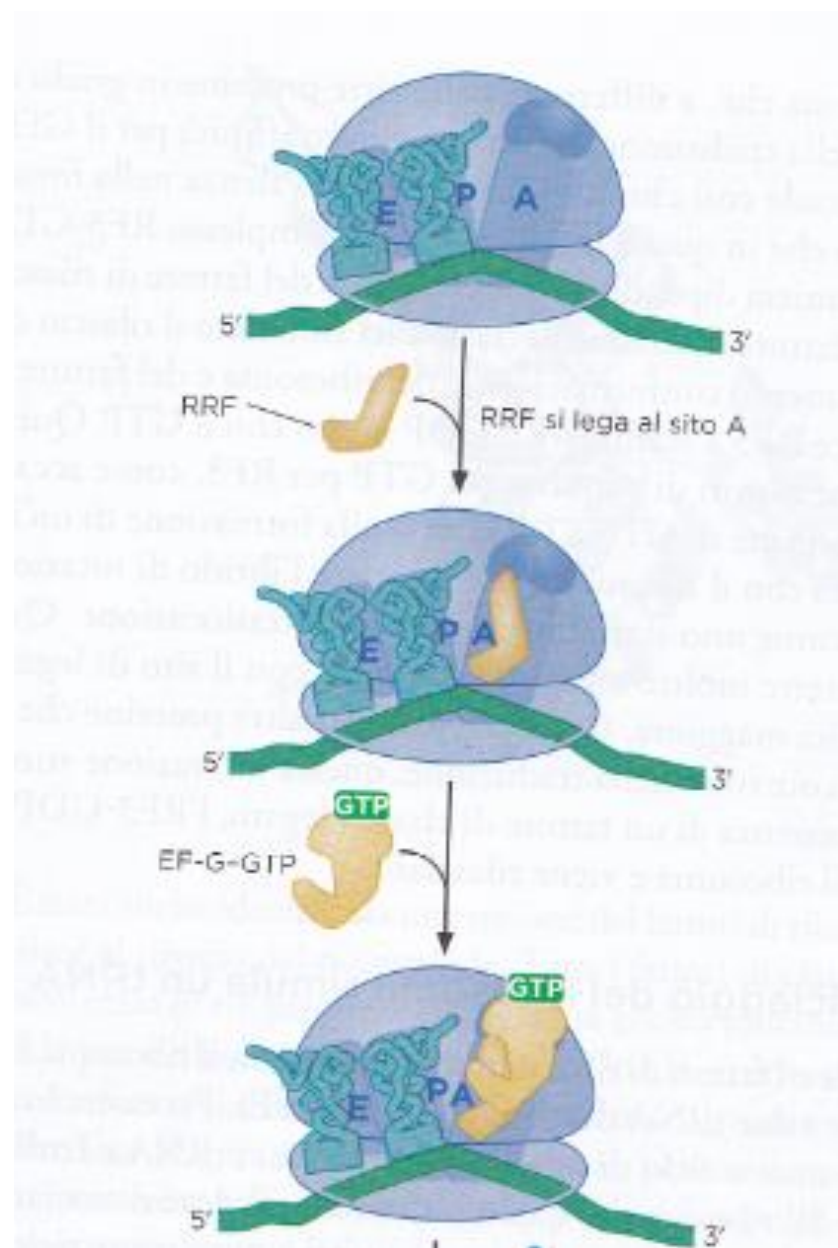


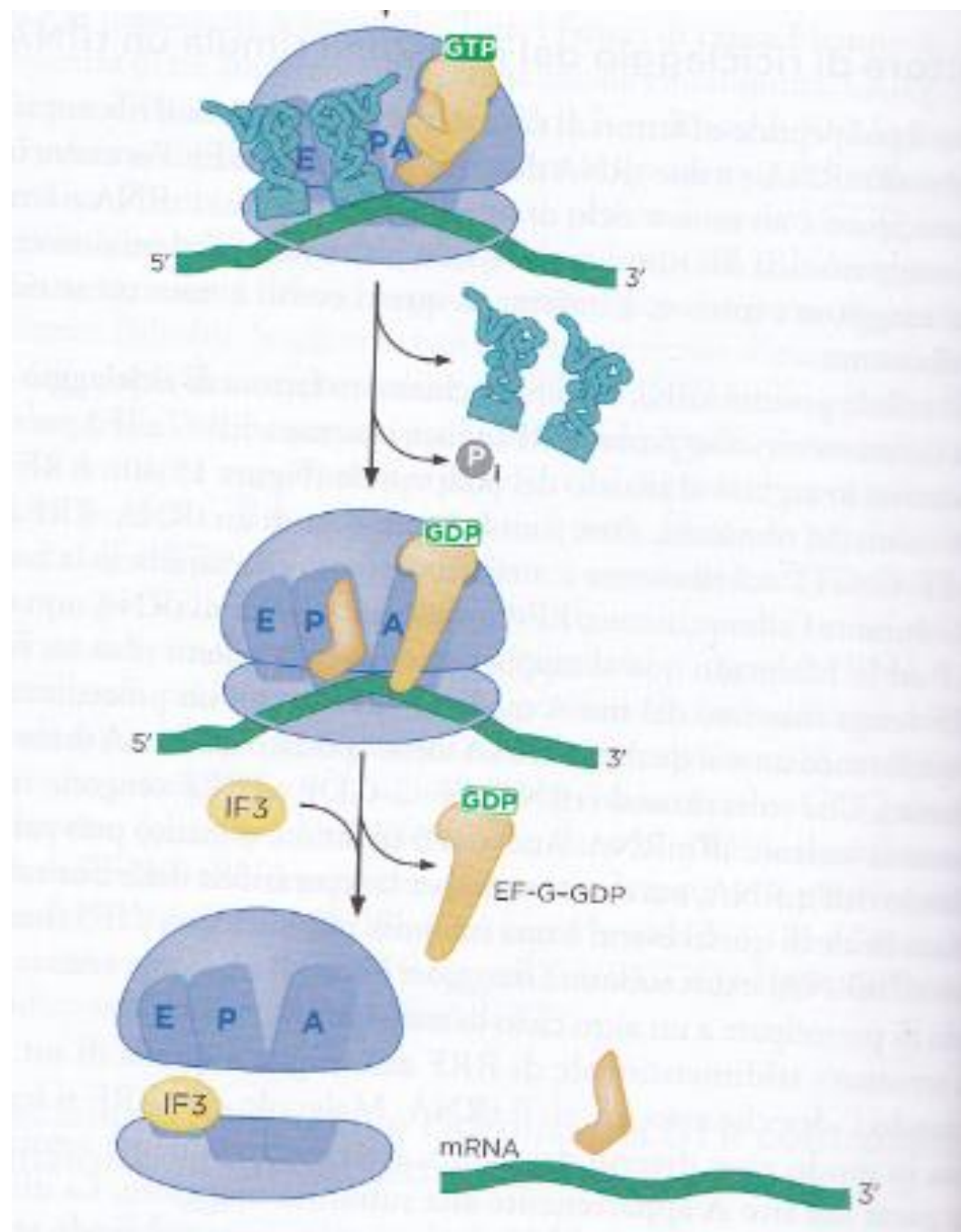
TERMINAZIONE

- Si ha quando uno dei tre codoni di stop o non senso **UAG UGA e UAA** giunge nel **sito A** della subunità maggiore del ribosoma.
- Prevede l'intervento delle proteine di rilascio RF.
 - **RF1** idrolizza il legame tra il peptide ed il tRNA presente nel sito A. in questo modo il peptide viene liberato.
 - **RF2** quando idrolizza il GTP promuove il distacco di RF1 e si avrà poi il distacco delle subunità ribosomiali.

TERMINAZIONE

- Nei procarioti però per il distacco delle subunità ribosomiali interviene il fattore di riciclaggio del ribosoma.
- Questo promuove con EF-G il rilascio dei tRNA scarichi dai siti P ed A del ribosoma.
- In seguito arriva IF3 che si lega alla subunità minore e la dissocia da quella maggiore.



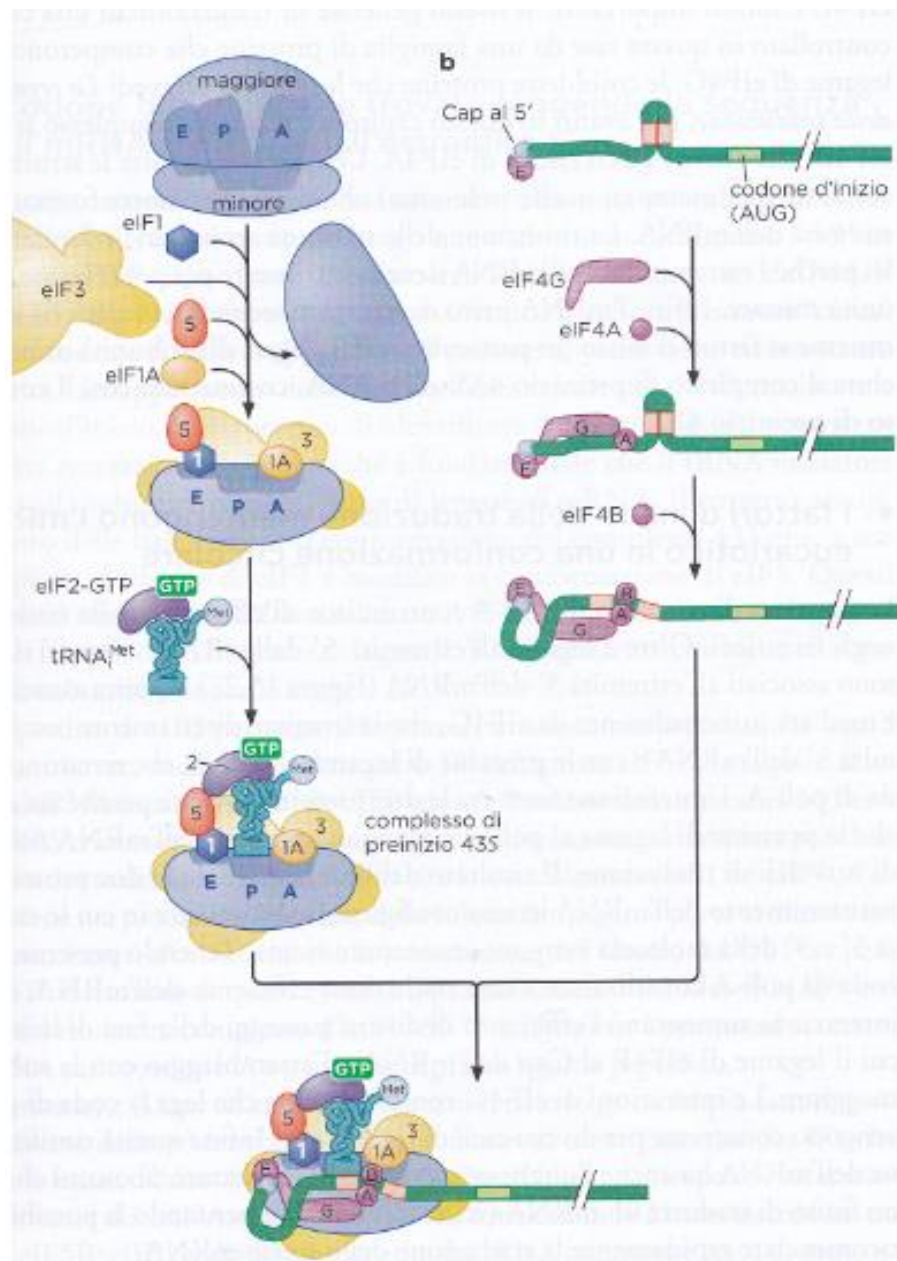


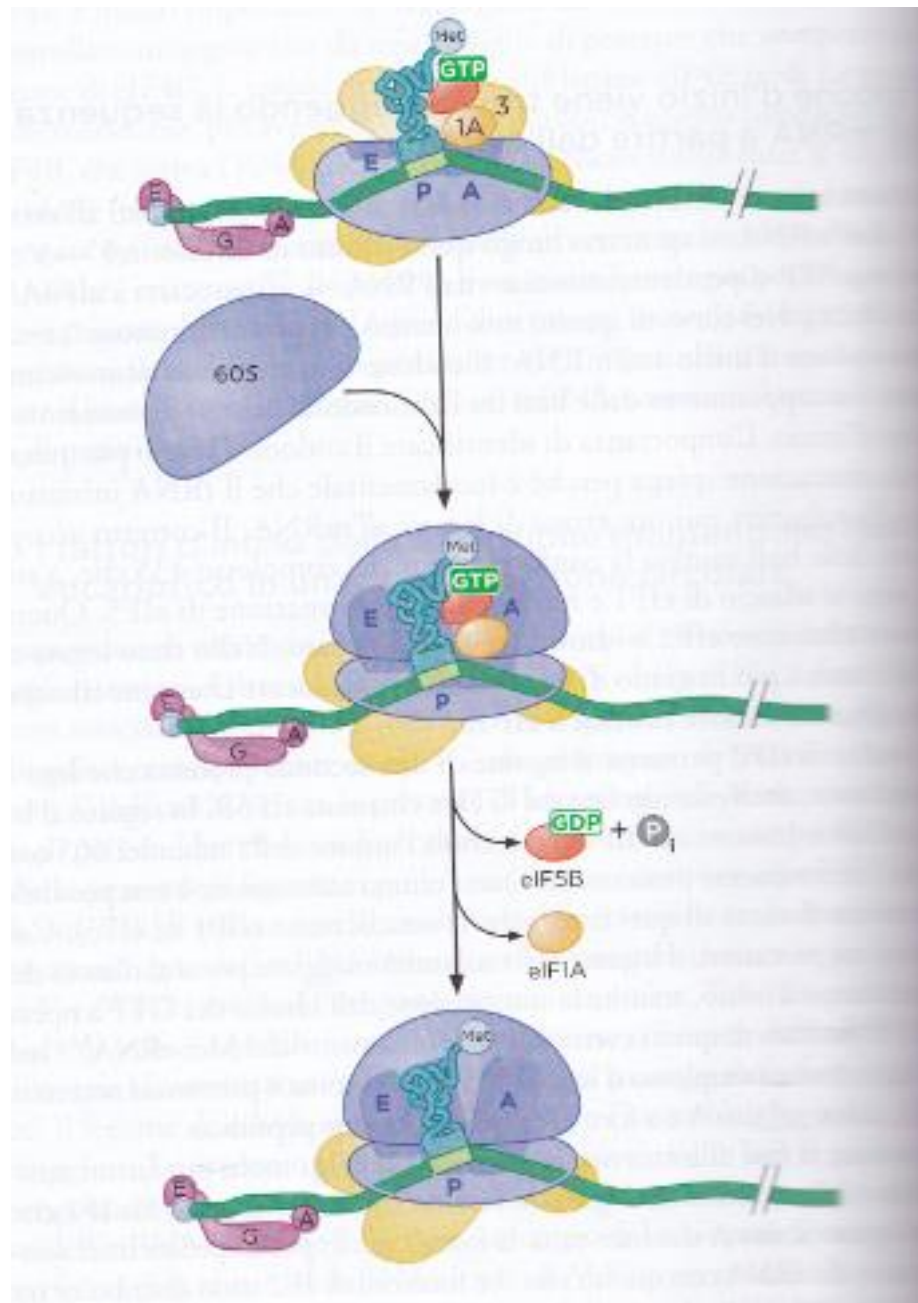
INIZIO NEGLI EUCARIOTI

- I fattori eucariotici **Eif1, Eif1a Eif5** impediscono l'associazione della subunità maggiore ed il legame dei tRNA al sito A.
- Il **tRNA iniziatore è il met-tRNA** e sarà posizionato correttamente **nel sito P da Eif2.**
- **Eif4** riconosce e lega il CAP 5' dell'mRNA e lo posiziona sulla subunità minore del ribosoma.

INIZIO NEGLI EUCARIOTI

- La subunità minore si sposta lungo l'mRNA per cercare il codone di inizio AUG e permettere l'appaiamento con l'anticodone del tRNA iniziatore.
- Una volta riconosciuta la sequenza di inizio, la subunità minore cambia **di conformazione**, **idrolizza il GTP e** promuove il rilascio dei fattori di inizio e l'assemblaggio della subunità maggiore.





GRAZIE PER L'ATTENZIONE!!

VI

**RICORDO CHE POTETE CONTATTARMI
AL SEGUENTE INDIRIZZO:**

alberto.vicenzi@student.unife.it