La traduzione

Introduction

Key-components during translation

- tRNAs
- Aminoacil-tRNA sintetasi
- Ribosoma

The process of translation

- Iniziazione
- Elongazione
- Terminazione

Il codice genetico

La traduzione

Introduction

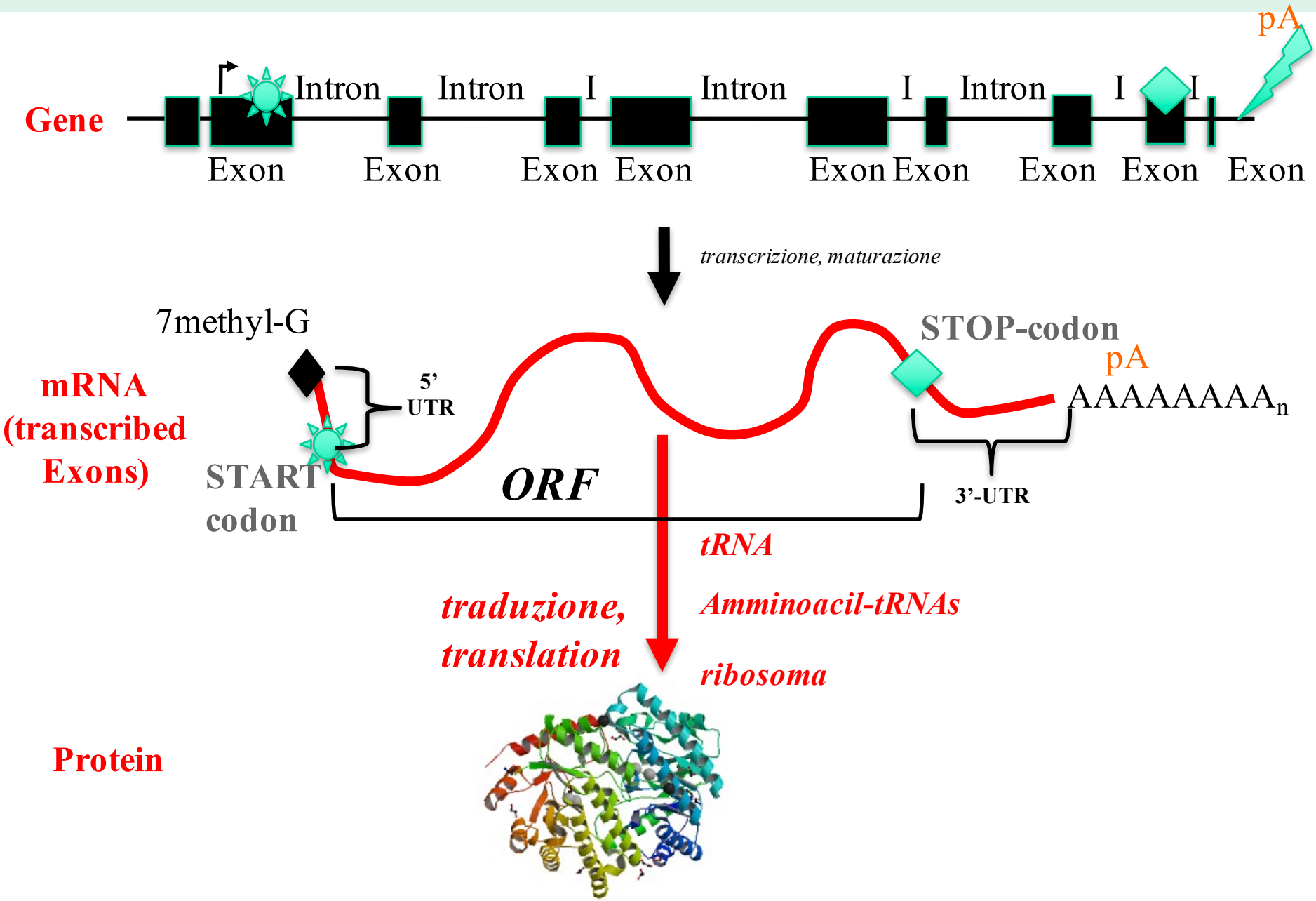
Key-components during translation

- tRNAs
- Aminoacil-tRNA sintetasi
- Ribosoma

The process of translation

- Iniziazione
- Elongazione
- Terminazione

Eucaryotic Transcription - Translation



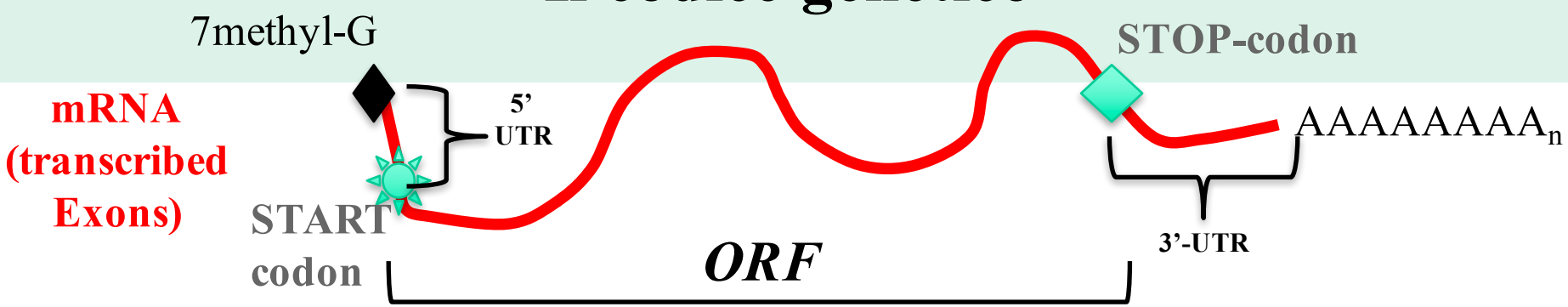
Il codice genetico – The genetic code

mRNA	AAA	GCA	AUU	UUC	GUA	CUG	AAA	GGU	UGG	UGG	CGC	ACU	UCC
Protein	K	A	I	F	V	L	K	G	W	W	R	T	S

Second letter

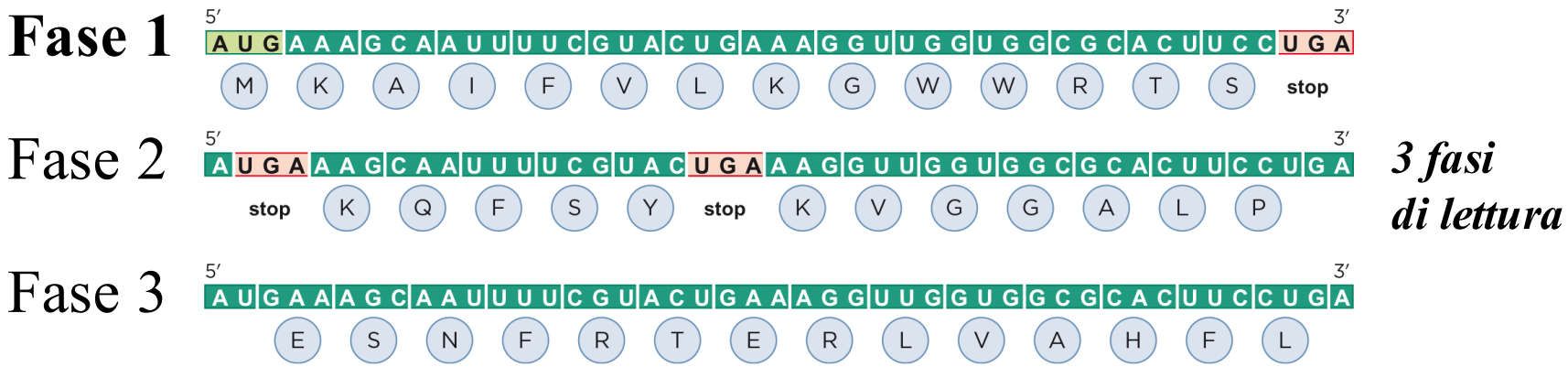
First letter	U	C	A	G	Third letter
U	UUU, UUC } Phe UUA, UUG } Leu	UCU, UCC, UCA, UCG } Ser	UAU, UAC } Tyr UAA Stop UAG Stop	UGU, UGC } Cys UGA Trp UGG Trp	U C A G
C	CUU, CUC, CUA, CUG } Leu	CCU, CCC, CCA, CCG } Pro	CAU, CAC } His CAA, CAG } Gln	CGU, CGC, CGA, CGG } Arg	U C A G
A	AUU, AUC } Ile AUA, AUG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

Il codice genetico



	Procarioti	*Eucarioti*	
Start codon	**AUG** GUG UUG	**AUG**	**Insericie prima aminoacido** **Deficisce la fase di traduzione**
Stop codon	**UAG** **UGA** **UAA**	**UAG** **UGA** **UAA**	**Terminazione della traduzione**

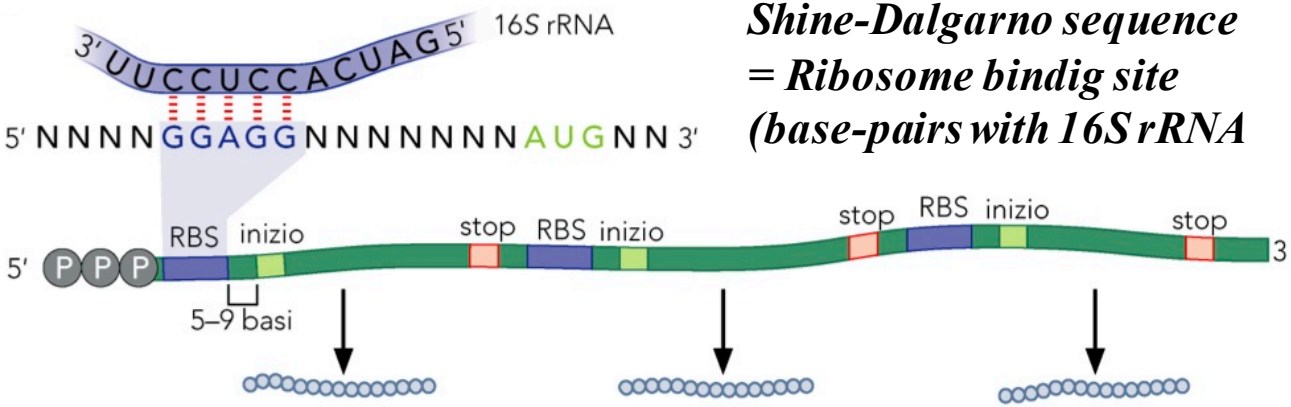
3 reading frames / cornice di lettura per ORF



3 fasi di lettura

Struttura del mRNA

Procarioti



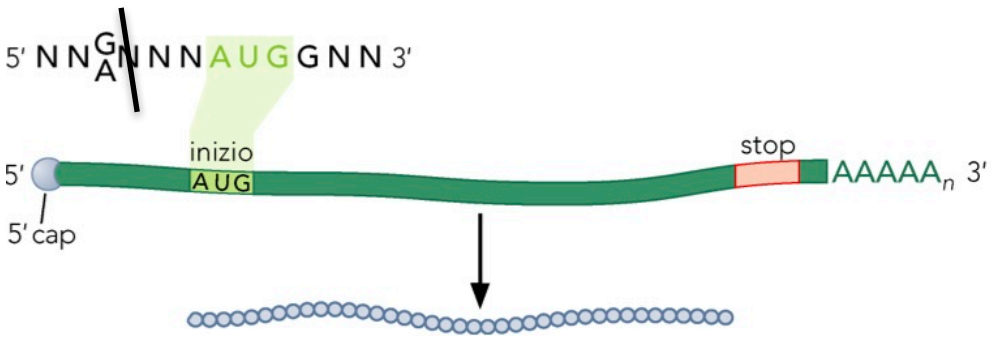
Shine-Dalgarno sequence = Ribosome bindig site (base-pairs with 16S rRNA

Consensus **Shine-Dalgarno**

5′-AGGAGG-3′ -- mRNA
3′-UCCUCC-5′ -- 16S rRNA

Procaryotic mRNAs can be "polycistronic"
(spesso codificano proteine che svogaono funzione corelate)

Eucarioti



5' Cap:
Reclutamento ribosoma; ribosoma "scans" fino a encontrare il codon di inizio

Consensus **Kozak sequence**

5′-G/ANN**AUG**G-3′ — mRNA
(spesso presente, aumenta effcienza della traduzione)

Poli-A:
Reclutamento di fattori per il inizio della traduzione
Aumenta la efficienza della traduzione
Aumenta la stabilita degli mRNA

La traduzione

Introduction

Key-components during translation

- tRNAs
- Aminoacil-tRNA sintetasi
- Ribosoma

The process of translation

- Iniziazione
- Elongazione
- Terminazione

Transfer RNA (tRNA)

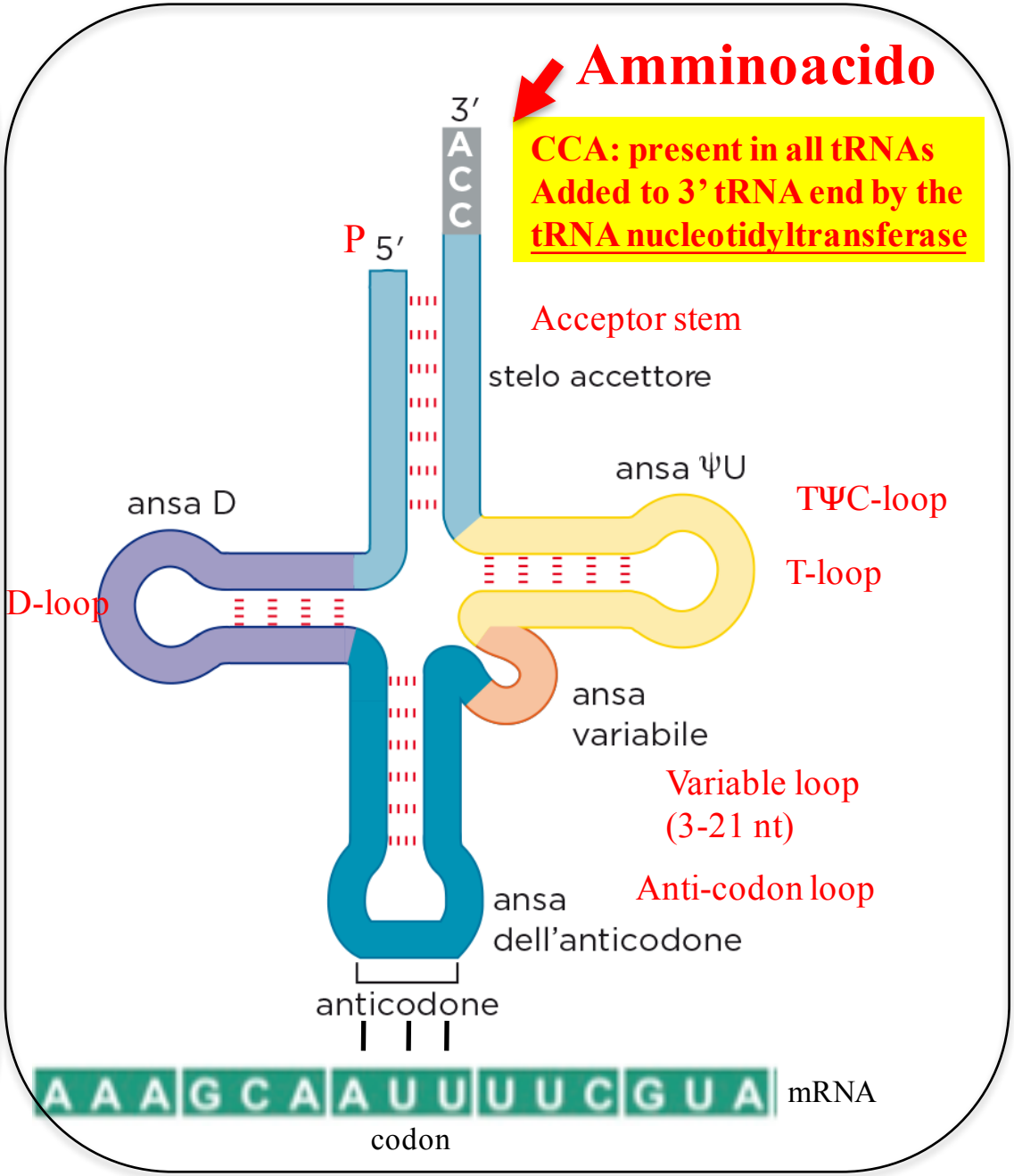
tRNAs sono adattatori tra mRNA e gli amminoacidi

Sono piccoli RNA (di circa 70 – 90 nucleotidi) preposti alla decodifica dei mRNA nel processo della traduzione a livello dei ribosomi, cioè all' associazione a ciascun codone dell' amminoacido pertinente in accordo al codice genetico.

Presentano una struttura secondaria (a trifoglio) e terziaria (a L) omogenea le cui caratteristiche generali servono a farli interagire indistintamente ai siti preposti sul ribosoma (siti A, P, E – vedi oltre).

Vanno incontro a numerose modifiche enzimatiche perlopiù a livello di basi, alcune comuni a tutti, altre specifiche di ciascun tRNA.

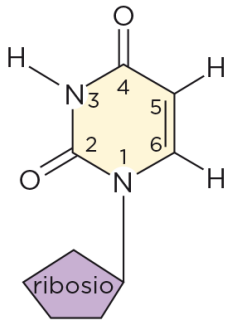
Le differenze tra loro nella struttura primaria e nelle modifiche specifiche consentono a ciascuna amminoacil-tRNA-sintetasi (vedi oltre) di riconoscere solo i tRNA di propria competenza e di legare al loro 3' terminale l' amminoacido appropriato a ciascuno di essi.



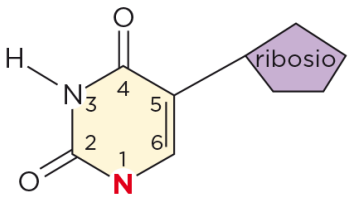
An example: Phenylanaline - transfer RNA (tRNA)

tRNAs contengono basi insolite (<10%)

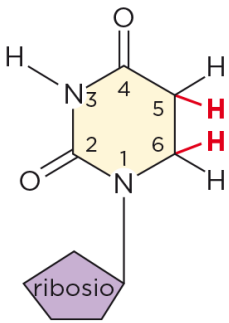
uridina



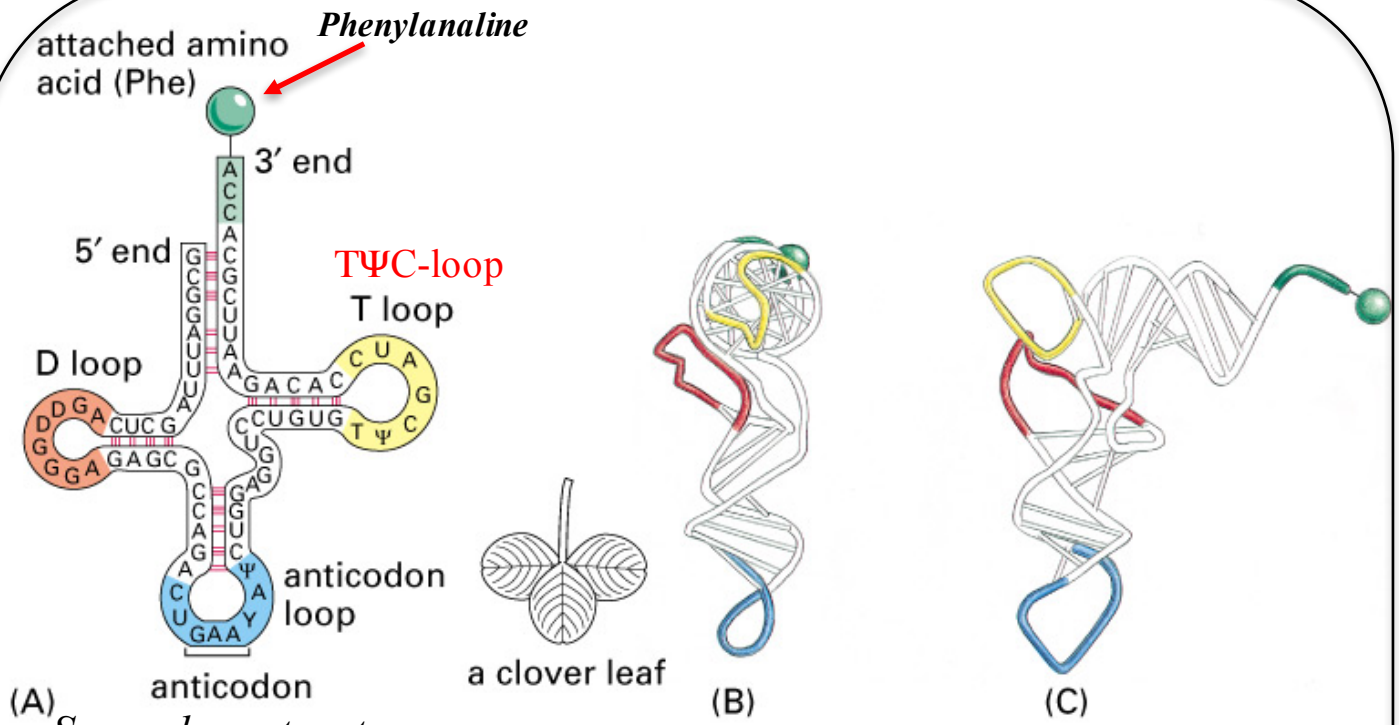
pseudouridina = Ψ



diidrouridina = D



Altre base atipici: ipoxantina timina, metilguanina



Secondary structure (trifoglio)

3D structure: ripiegamento a "L"

5′ GCGGAUUUAGCUCAGDDGGGAGAGCGCCAGACUGAAYAΨCUGGAGGUCCUGUGTΨCGAUCCACAGAAUUCGCACCA 3′

(D)

anticodon

L' anticodone è posto tra una uracile al 5 ' ed una purina al 3'

La traduzione

Introduction

Key-components during translation

- tRNAs
- Aminoacil-tRNA sintetasi
- Ribosoma

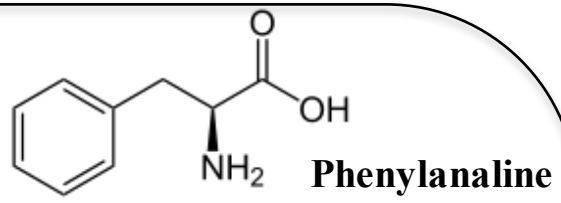
The process of translation

- Iniziazione
- Elongazione
- Terminazione

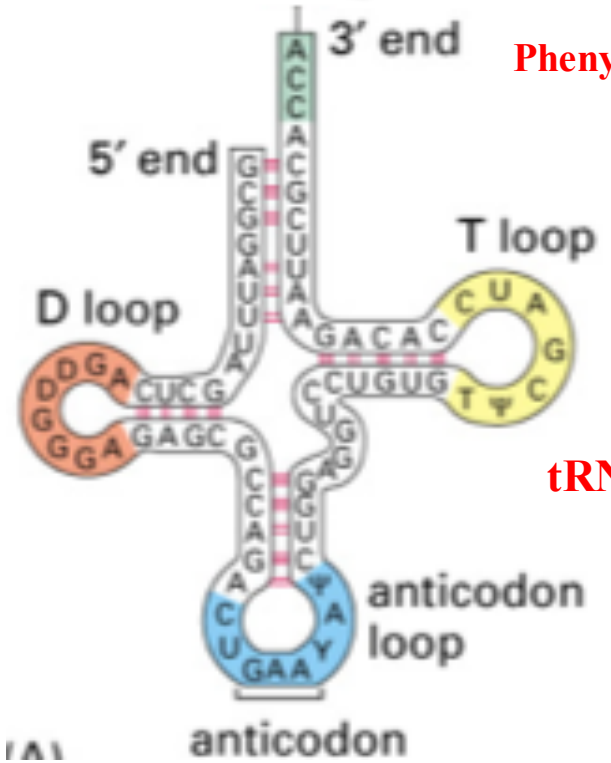
Le amminoacil-tRNA-sintetasi

- *Questi enzimi (in genere uno per ciascuno dei venti amminoacidi utilizzati nella biosintesi proteica) hanno la funzione di legare l'amminoacido di loro pertinenza specificamente ai tRNA preposti al riconoscimento dei codoni relativi a quell'amminoacido.*

- *La reazione avviene in due stadi attraverso un intermedio (l'amminoacil-AMP), e porta a legare l'amminoacido al ribosio 3'terminale del tRNA mediante un legame di tipo estereo.*



Phenylanaline



Phenylalanyl-tRNA sintetase

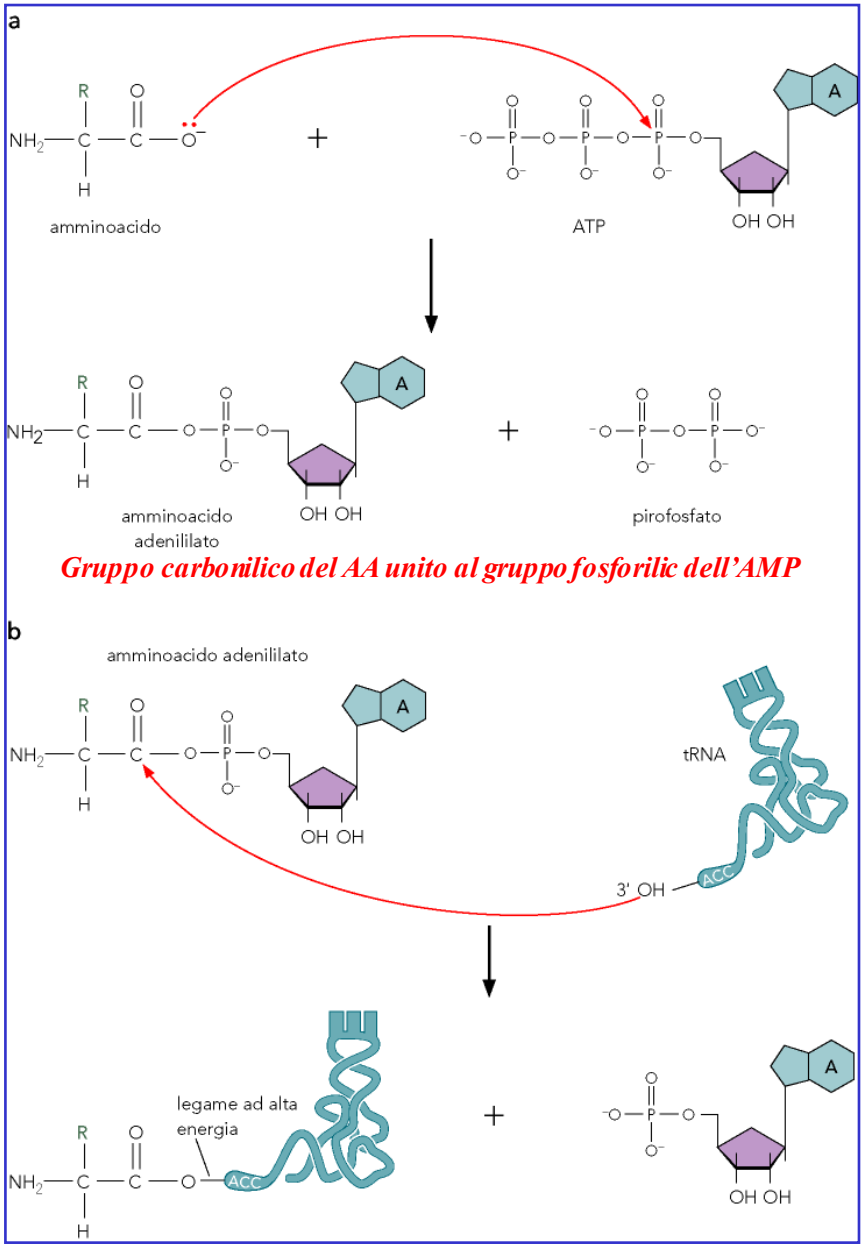
tRNA^{Phe}

3'---CUU---5' mRNA

(Codon for Phe (Phneylalanine))

In cells: 20 amminoacyl-tRNA-sintetasi – 20 AA (in general)

I due passaggi del caricamento dell'amminoacil tRNA



Gruppo carbonilico del AA unito al gruppo fosforilic dell'AMP

Trasferimento dell'amminoacido all'estremita 3' del tRNA (A) attraverso il gruppo ossidrilico in posizione 2' o 3'

Adenilazione dell' amminoacido

- **Aminoacil-tRNA sintetasi: il gruppo carbossile è attivato dal legame a AMP, ed è poi trasferito al 3' terminale di tRNA**
- **Si forma un legame acilico, ad alta energia**
- **Si consuma un ATP**

Trasferimento dell' Amminoacido adenilato al tRNA

Classe I amminoacil-tRNA sintetase: use 2'OH del tRNA 3'terminus

Classe II amminoacil-tRNA sintetase: use 3'OH del tRNA 3'terminus

Amminoacid selection by codon

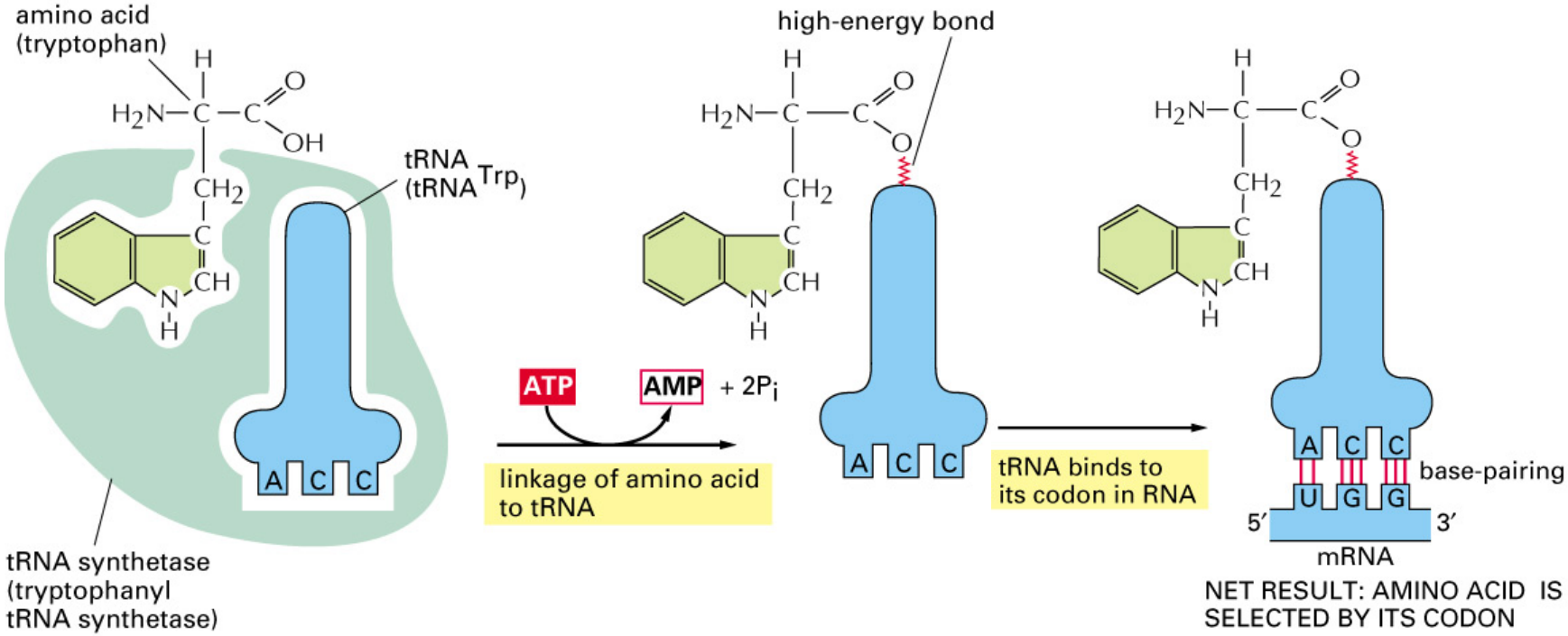


Figure 6–58 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Figure 6–58 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Accuratezza dell' amminoacil-tRNA-sintetasi

1. Recognicion of tRNA by amminoacyl-tRNA synthesase

Second letter

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

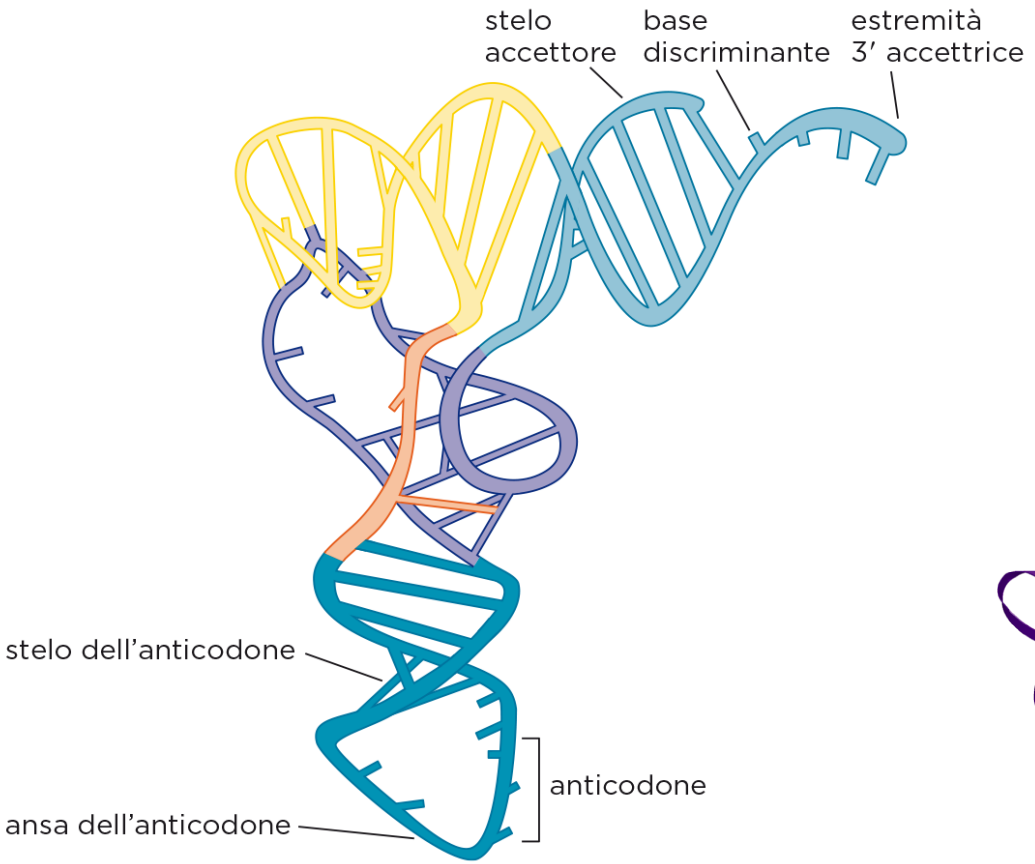
Serin:

- 6 different codons
- several $tRNA^{Ser}$
- 1 serine-tRNA sintetase

Errori 1/1000

Accuratezza dell' amminoacil-tRNA-sintetasi

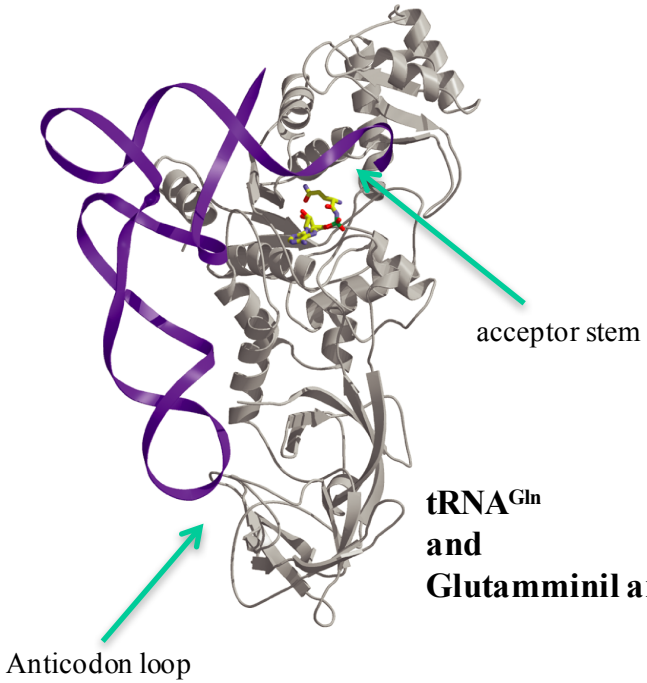
1. Recognicion of tRNA by amminoacyl-tRNA synthesase



Determinanti della specifita sono raggruppati sulla molecola in 2 siti distantei tra loro:

1. **Stelo accettore (acceptor stem)**
   → base discrminante

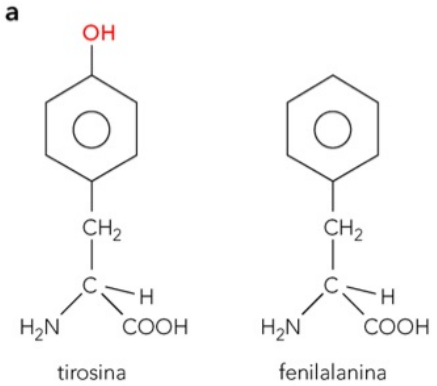
2. **Anti-codon loop (in some but not all tRNAs)**



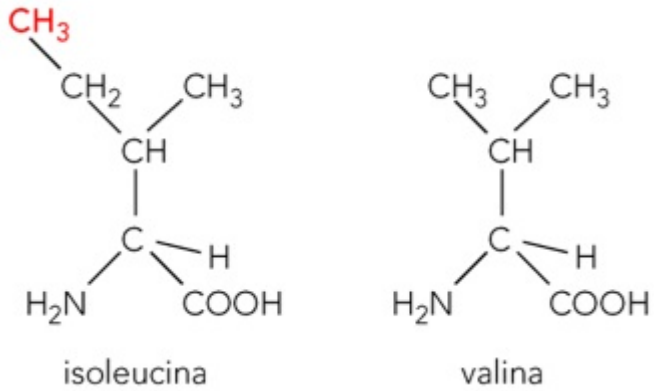
$tRNA^{Gln}$
and
Glutamminil amminoacil-tRNAsintetasi

Accuratezza dell' amminoacil-tRNA-sintetasi

2. Recognicion of correct amminoacid by amminoacyl-tRNA synthesase



gruppi chimichi diversi



Ingombro sterico o better fitting

3. Hydrolytic editing

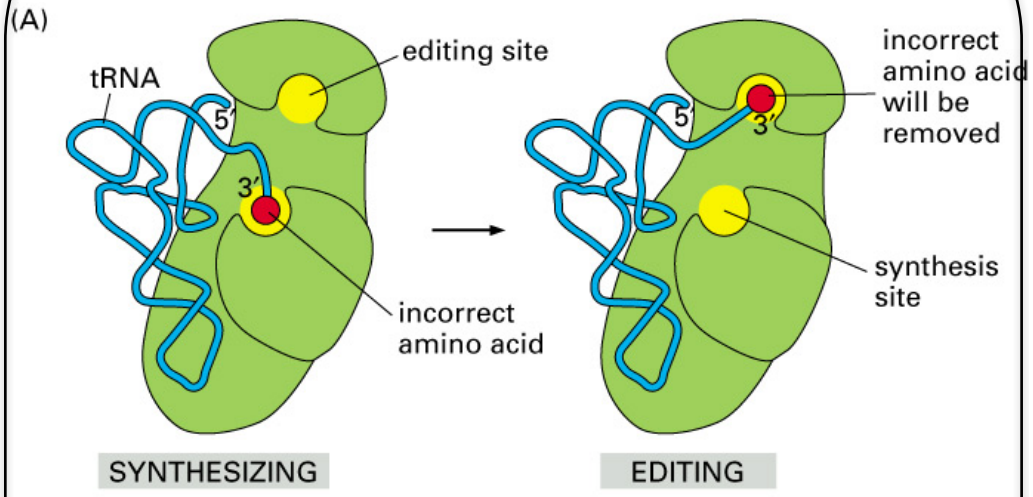


Figure 6–59 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

- Il riconoscimento dell' aa è chimicamente complesso. L' enzima ha tasche per riconoscere i diversi aa
- Alcune tRNA sintetasi hanno un sito di correzione
- Il ribosma non è in grado di riconoscere il carico del tRNA (es: Cys→Ala)

La traduzione

Introduction

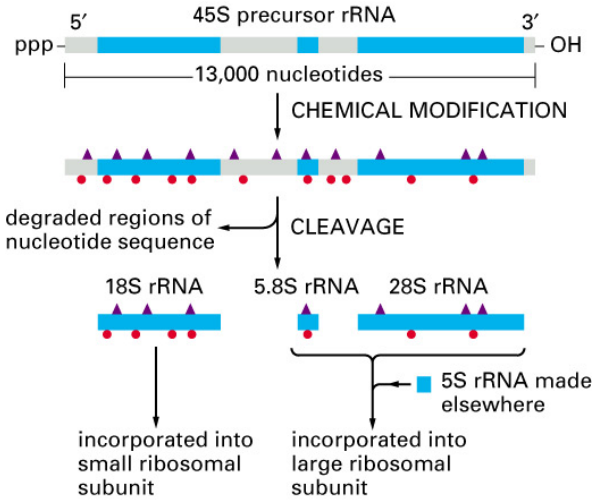
Key-components during translation

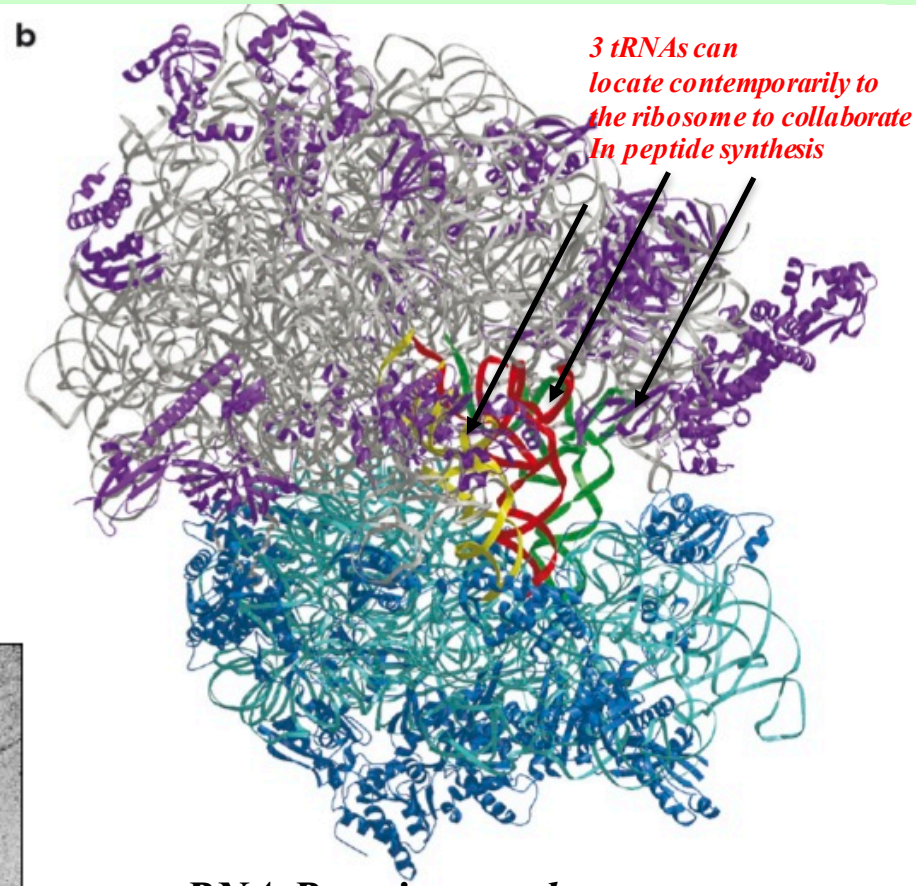
- tRNAs
- Aminoacil-tRNA sintetasi
- Ribosoma

The process of translation

- Iniziazione
- Elongazione
- Terminazione

Purificazione singole subunità ribosomali batterice

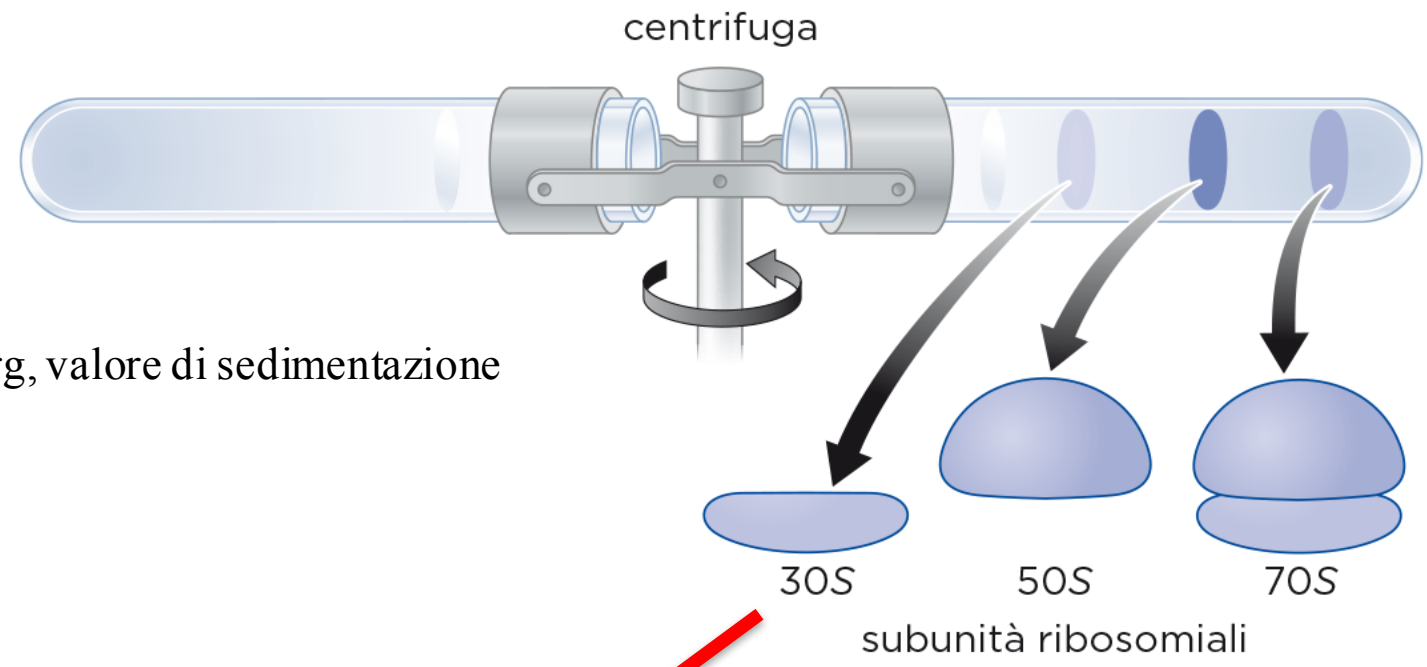




RNA-Protein complex

I ribosomi sono composti da tre (quattro) RNAs e ≈50 (≈80) proteine diverse, con una massa > 2,5 MDa

Purificazione singole subunità ribosomali batterice



S= Svedberg, valore di sedimentazione

subunità minore
= centro di decifrazione:
tRNA carchi leggono I codoni dell'mRNA

Subunità maggiore
= centro peptidiltransferasico:
formazione dei legami peptidici

I ribosomi in procarioti ed eucarioti

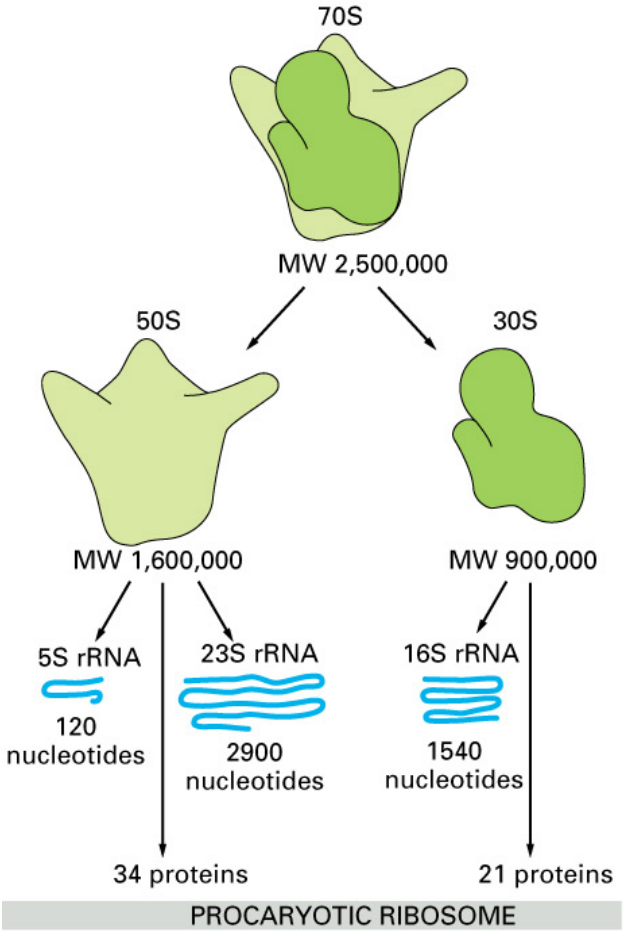


Figure 6–63 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

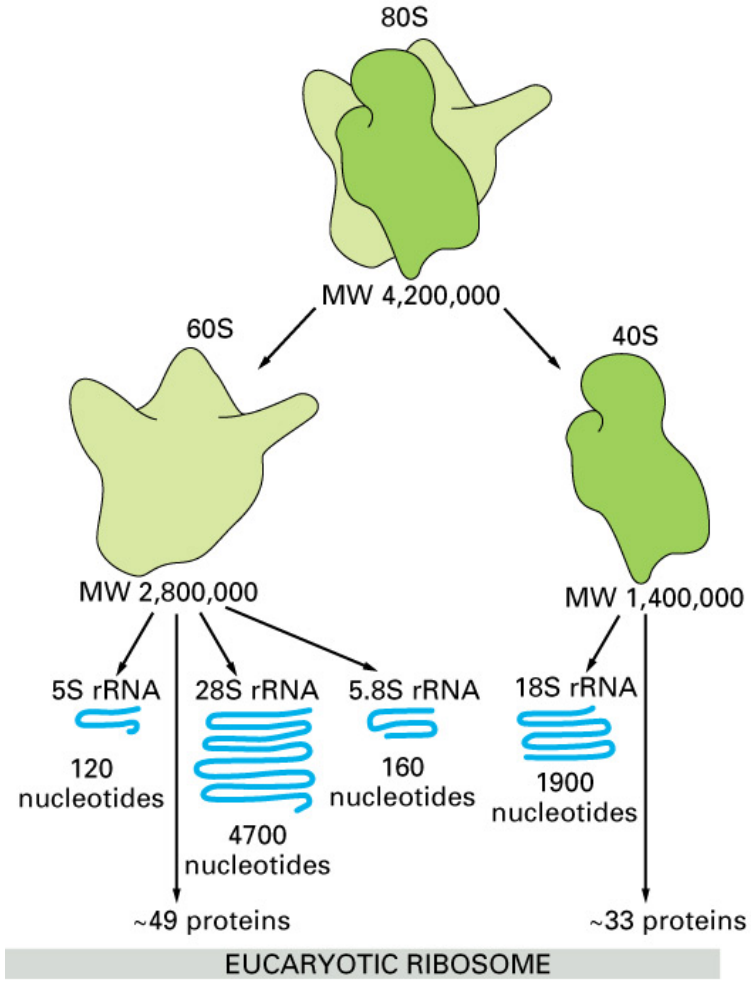
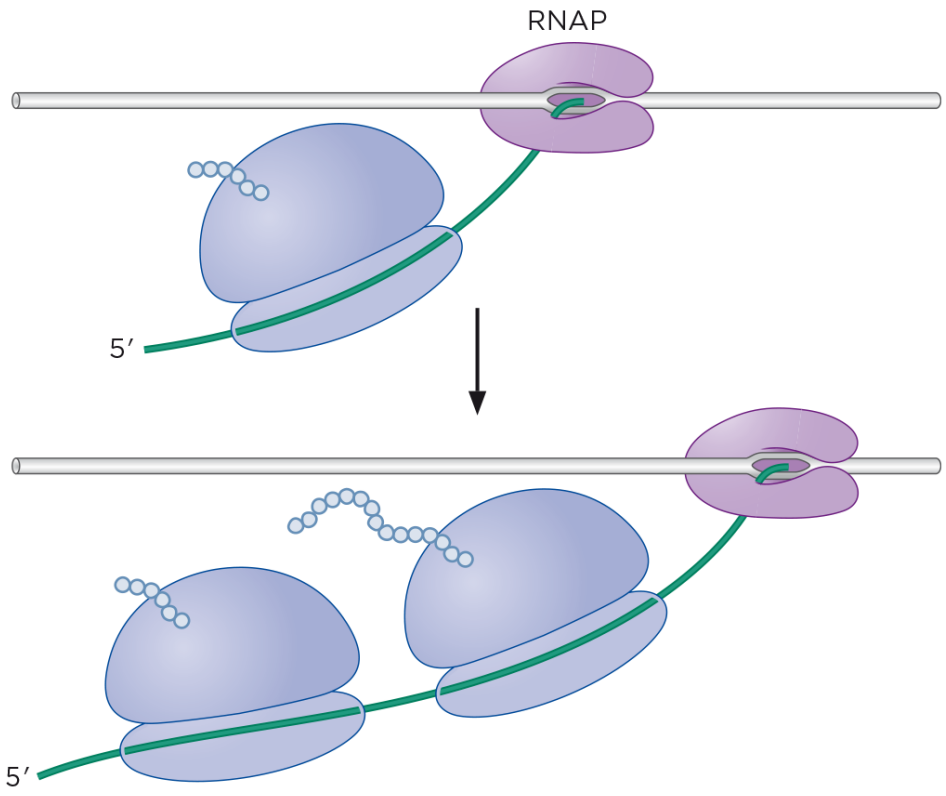


Figure 6–63 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Ribosomi in procarioti ed eucarioti

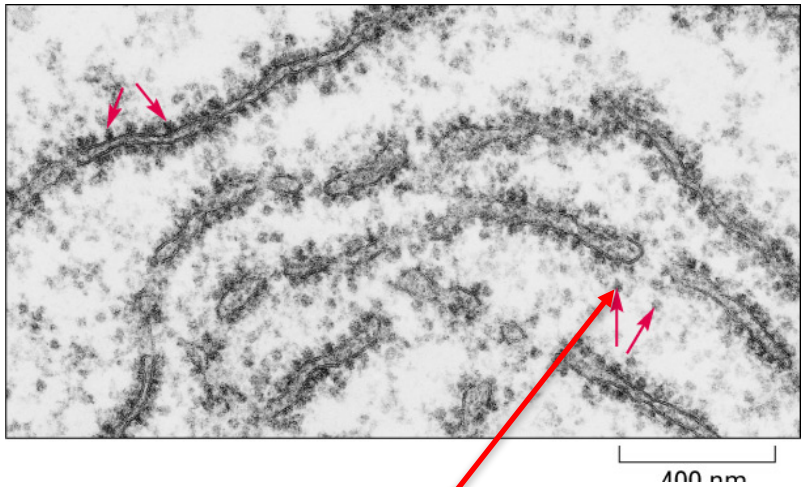
- I ribosomi sono composti da tre (quattro) RNA e ≈50 (≈80) proteine diverse, con una massa > 2,5 MDa
- Nei **procarioti** la velocità di sintesi è di circa 20 aa/sec, quella della trascrizione 50-100 nt/sec. Sono quindi confrontabili e la traduzione riesce a reggere la velocità della trascrizione.



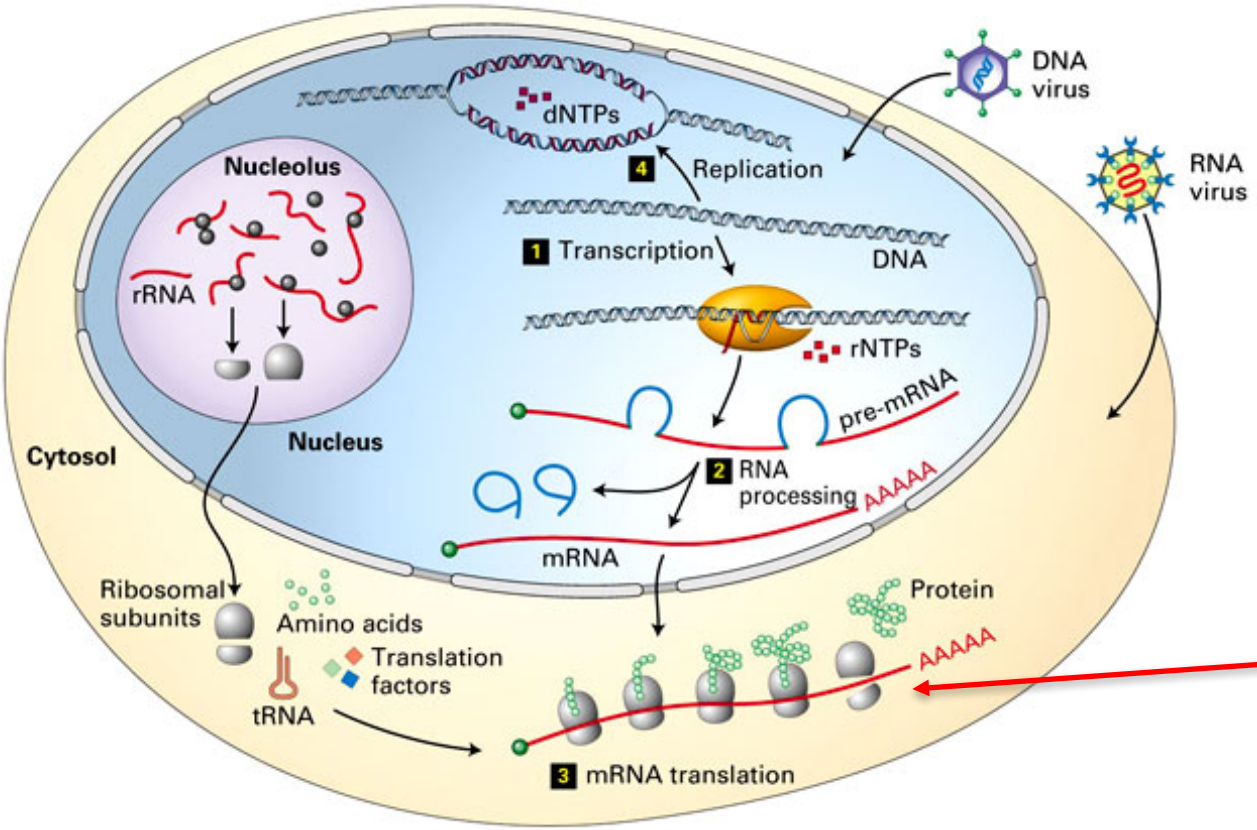
In prokaryotes translation occurs co-transcriptionally

Ribosomi in procarioti ed eucarioti

Negli eucarioti di 2-4 aa/sec, ma la traduzione avviene in un comparto diverso e non c'e' quindi necessità che vadano in parallelo



ribosomes at endoplasmatic reticulum



free ribosomes

Ciclo ribosomiale

1. Minor subunit, mRNA and intiator tRNA form a complex

2. Recruitment of major subunit

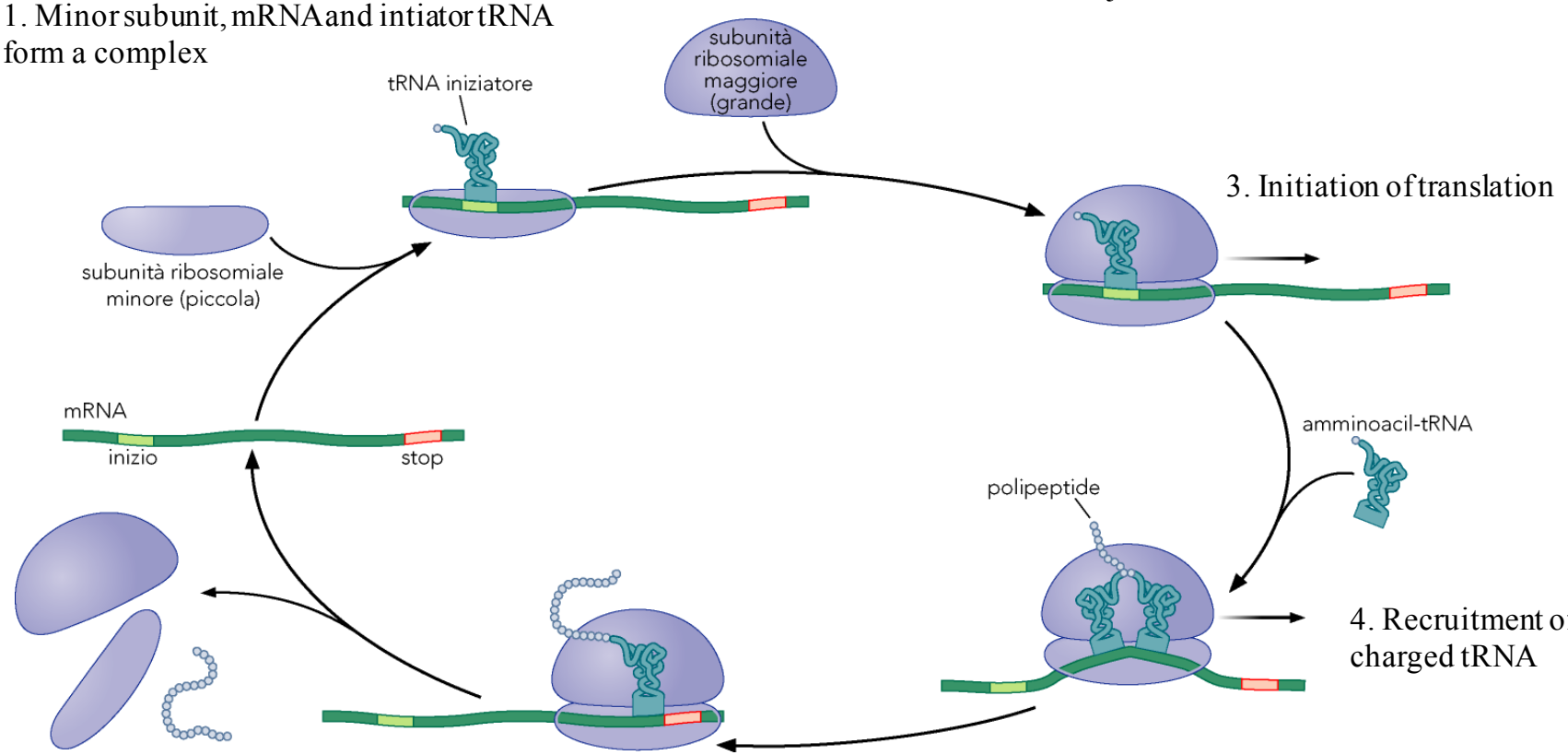
3. Initiation of translation

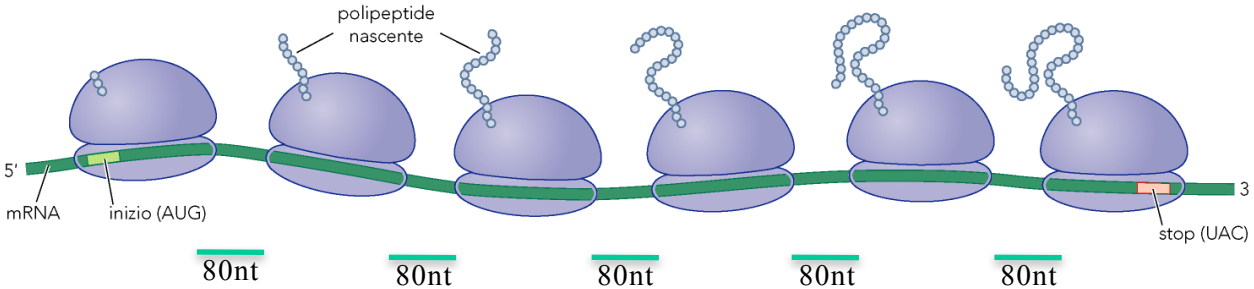
4. Recruitment of second charged tRNA

5. Peptidiltransferase reaction - Elongation

6. Stop-codon – termination of translation

7. Disassembly of Ribosome/mRNA





Polysomes
Polisoma

Ciclo ribosomiale

→La traduzione inizia quando mRNA e tRNA iniziatore si legano alla subunità minore

→Poi viene reclutata la subunità maggiore

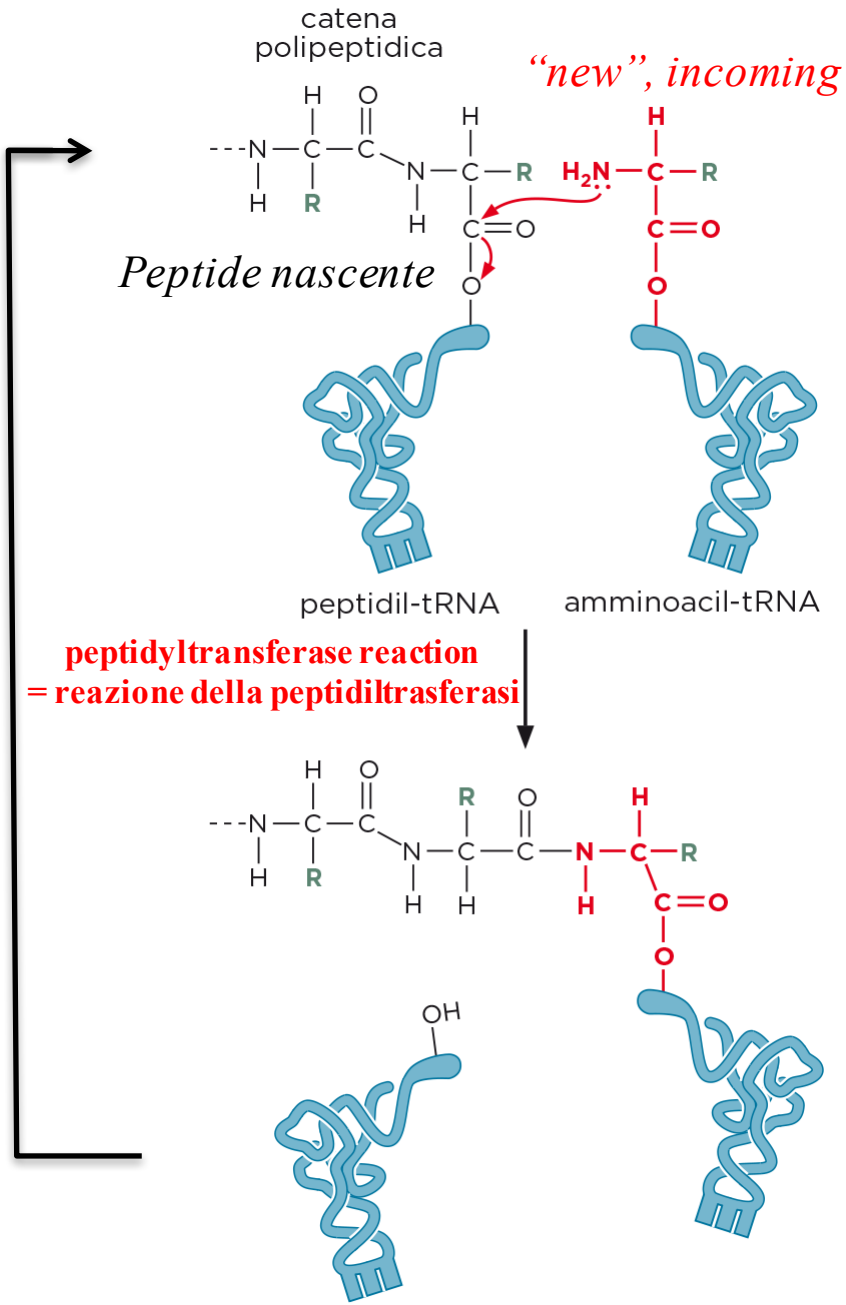
→Poi inizia la sintesi proteica ed il ribosoma scorre sul mRNA

→Quando incontra il codone stop, il peptide viene rilasciato, e le due subunità si dissociano

→Esse sono poi pronte per un nuovo ciclo.

→Un ribosoma è in contatto con circa 30 nt, ma nei poliribosomi sono distanziati circa 80 nt

Peptide synthesis: peptidyltransferase reaction

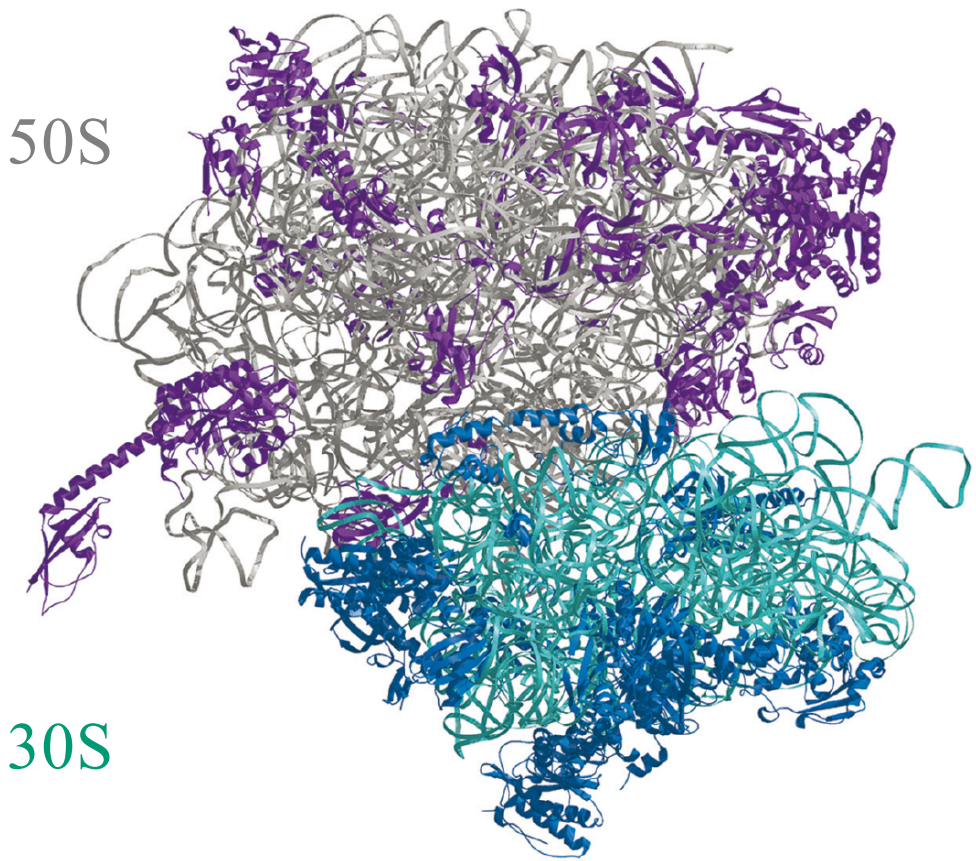


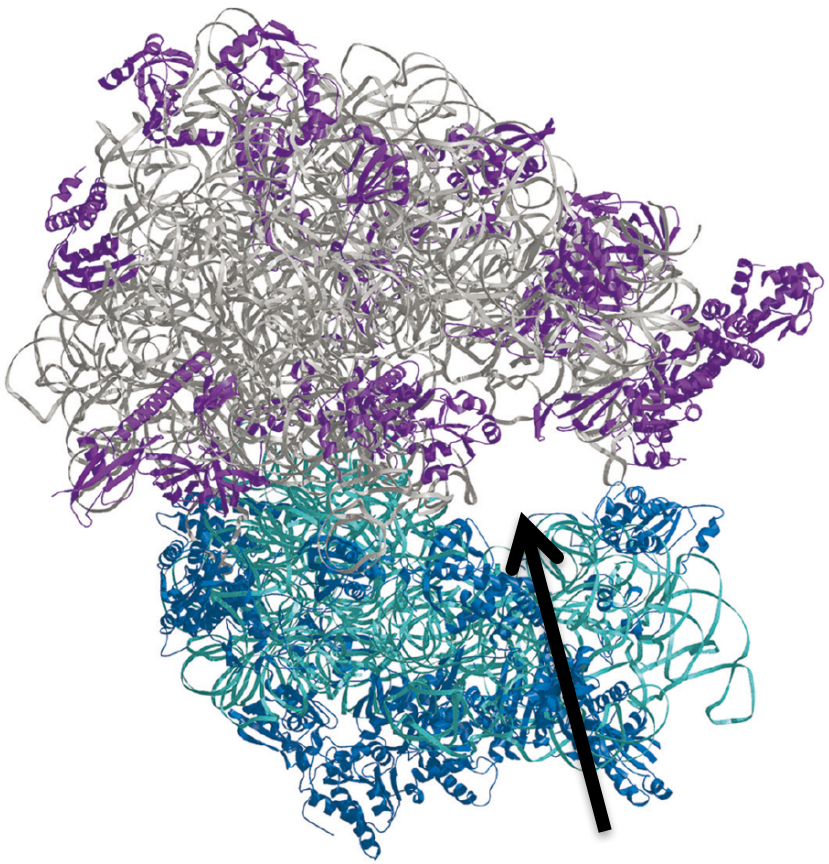
→Carboxy terminus of aminoacid in peptidyl-tRNA is attacked by ammino-terminus of amminoacil tRNA

→Nacent peptide chain is transferred to the amminoacil-tRNA

→Consenqently, amminoacil-tRNA becomes the new peptidil-tRNA

Ribosomes are "RNA machines"





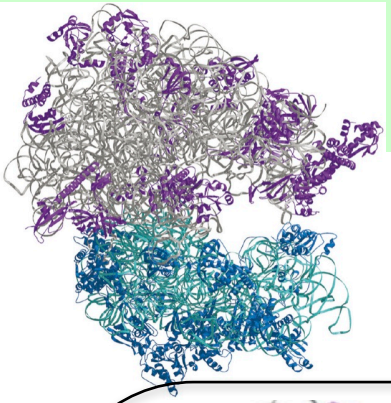
entry site for tRNAs

→ Centro pepidiltrasferasico: quasi esclusivamente RNA

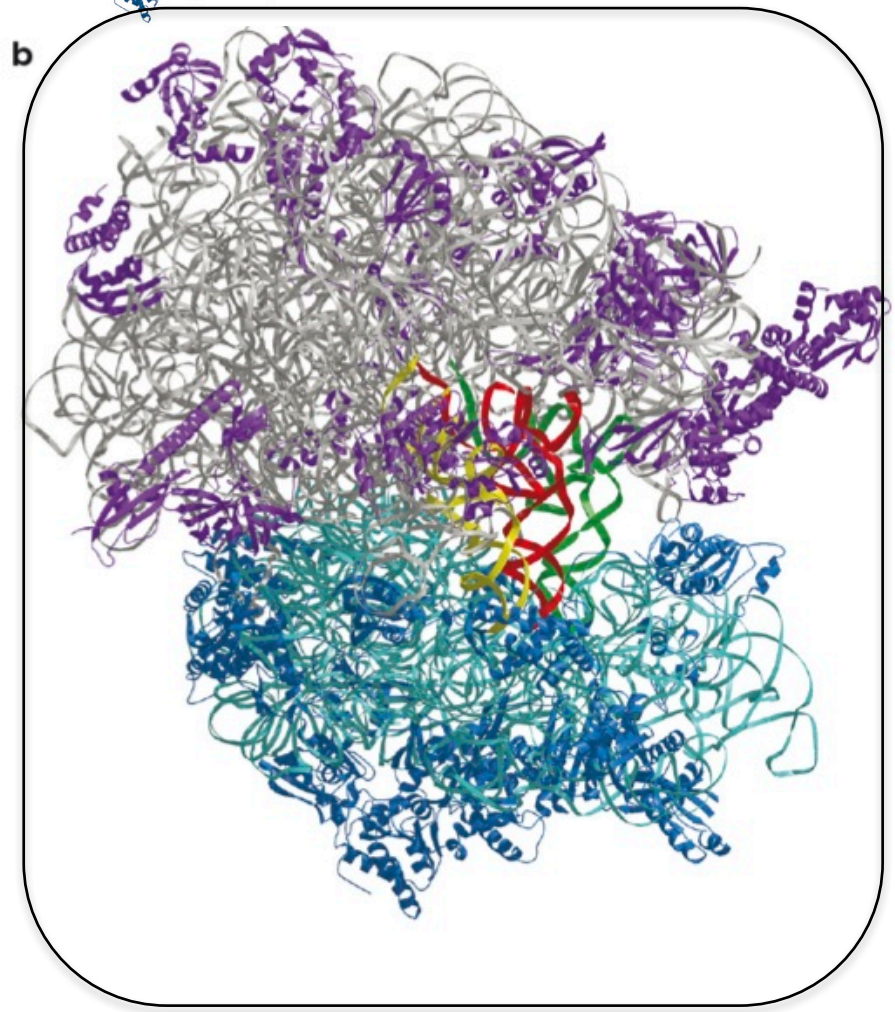
→ Centro decifrazione: anticodon-loop (ansa) dei tRNA carichi e codoni dell'mRNA entrano in contatto con 16S rRNA (16S)

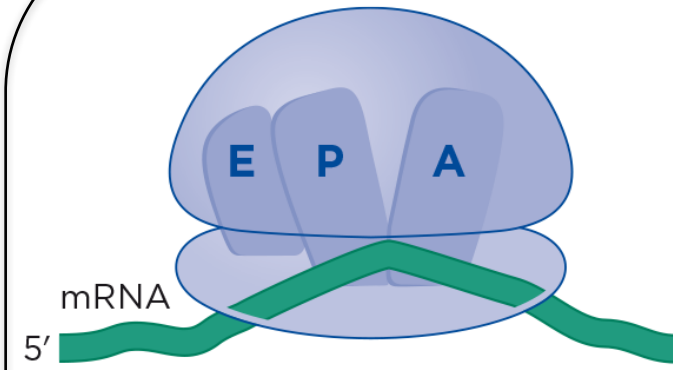
→Maggior parte delle proteine si trova ai margini del ribosoma

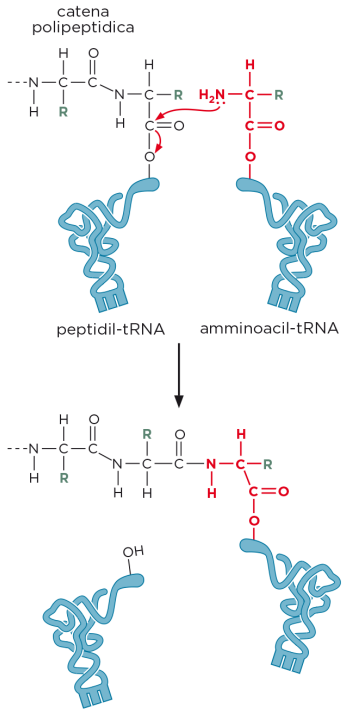
→ original ribosome composed exclusively of RNA, proteins were added during evolution to increase ribosome efficiency



Il ribosoma ha 3 siti di legame per il tRNA



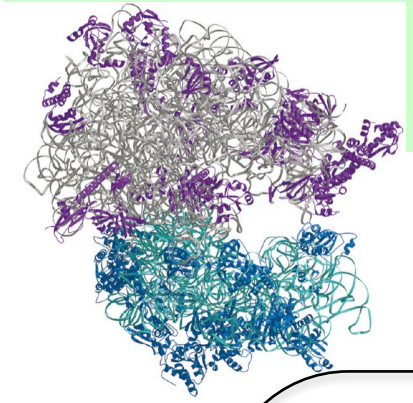




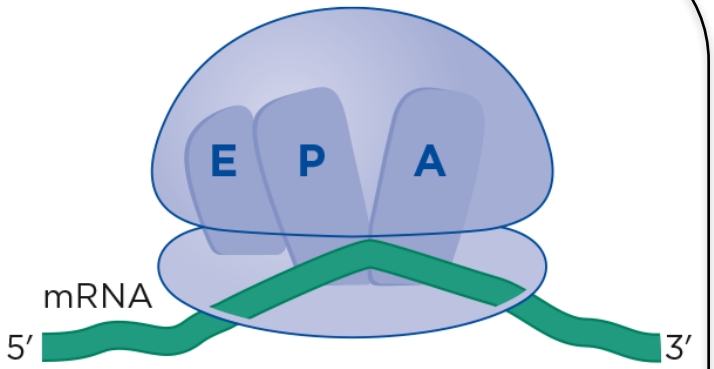
P-site:
Peptidil-tRNA

A-site:
Amminoacil-tRNA

E-site:
Exit
(empty tRNA
will be released)



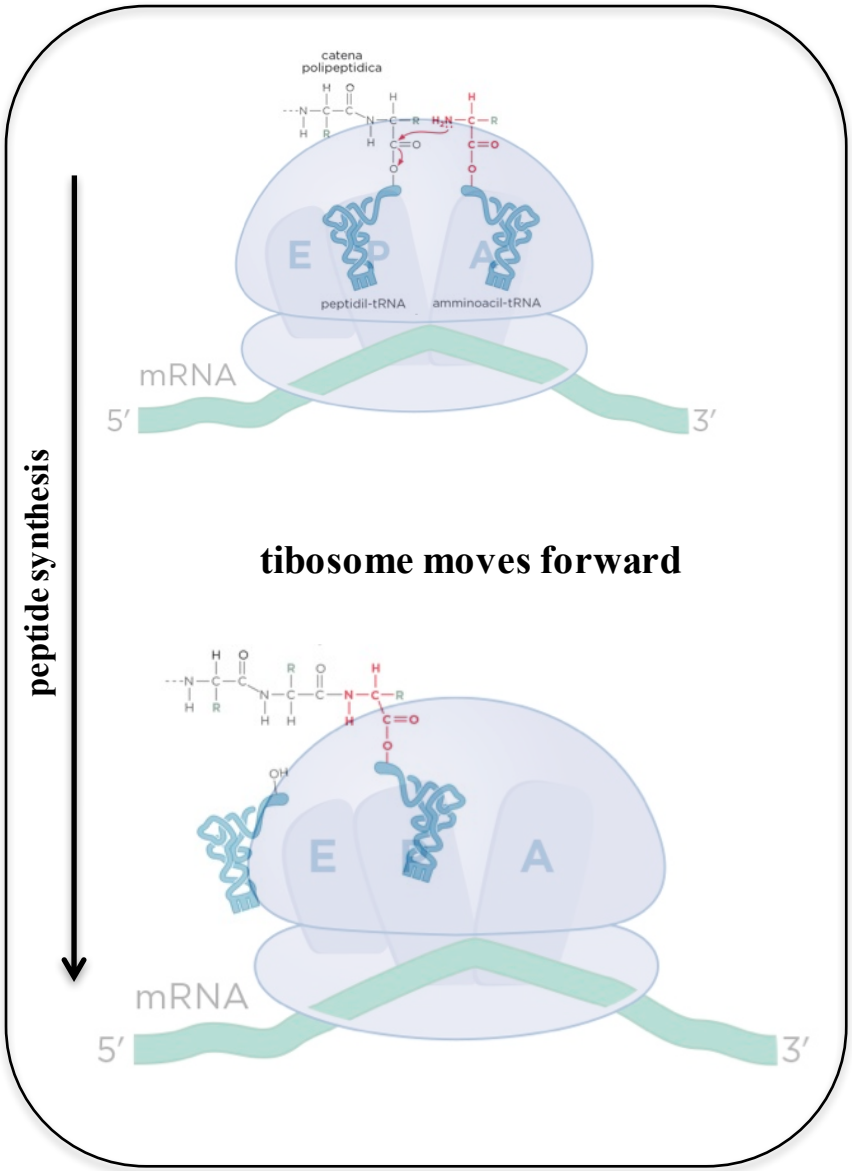
Il ribosoma ha 3 siti di legame per il tRNA



P-site:
Peptidil-tRNA

A-site:
Amminoacil-tRNA

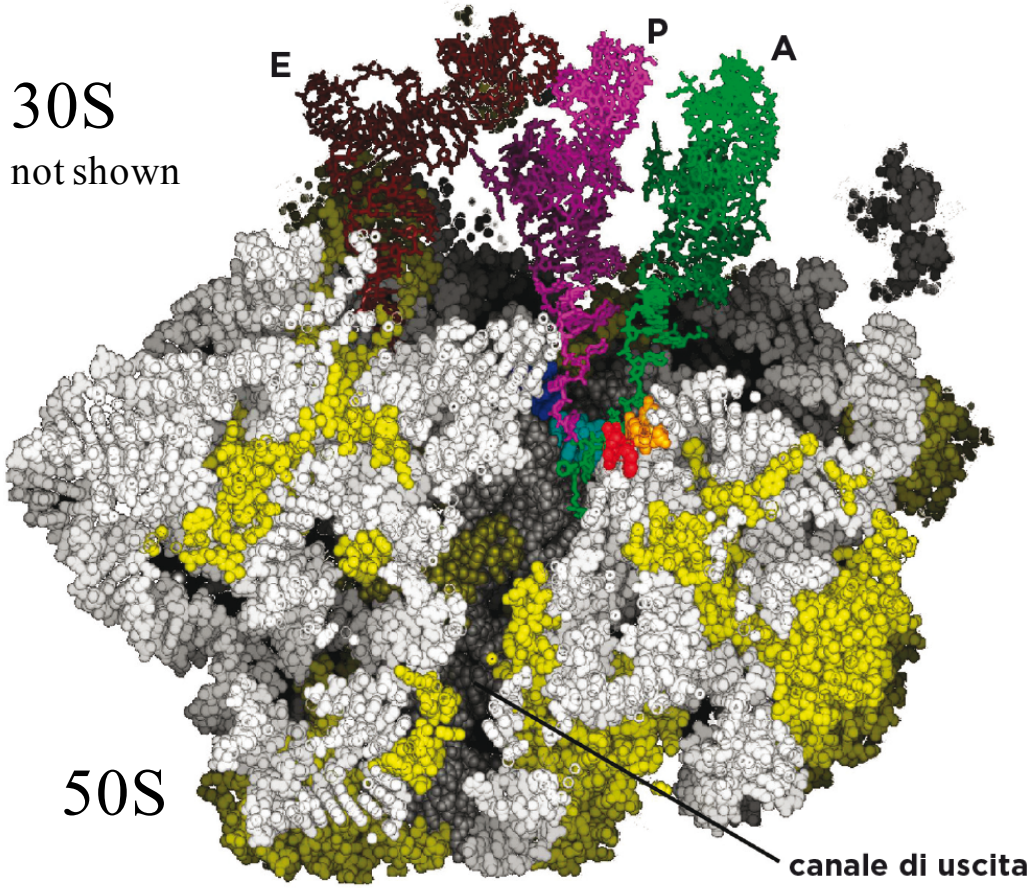
E-site:
Exit
(empty tRNA
will be released)

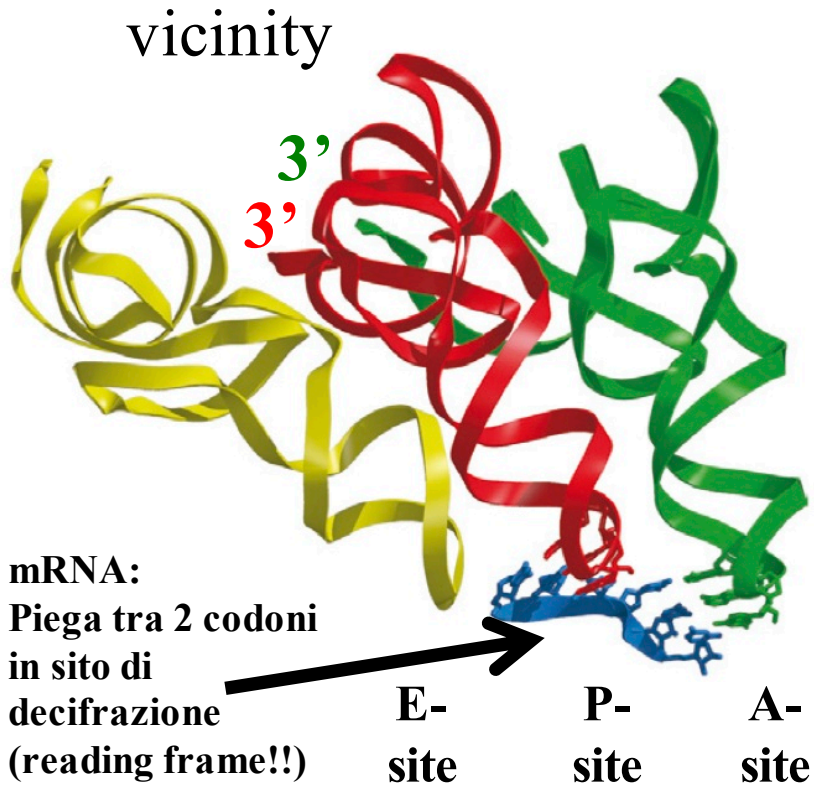


Il ribosoma ha 3 siti di legame per il tRNA

Canali:

→30S subunit:
mRNA entra e esce dal sito di decifrazione atraverso 2 canali
→50A subunit:
Canale di uscite per catena polipeptidica nascente



- I siti sono all' interfaccia tra le due subunità
- I canali per mRNA hanno dimensioni per RNA lineare
- L' RNA tra i due codoni è piegato, per facilitare il reading frame
- Il canali di uscita del peptide permette alfa eliche ma non beta sheet → formazione finale

tre-dimensionale solo quando esce dalla subunita 50S