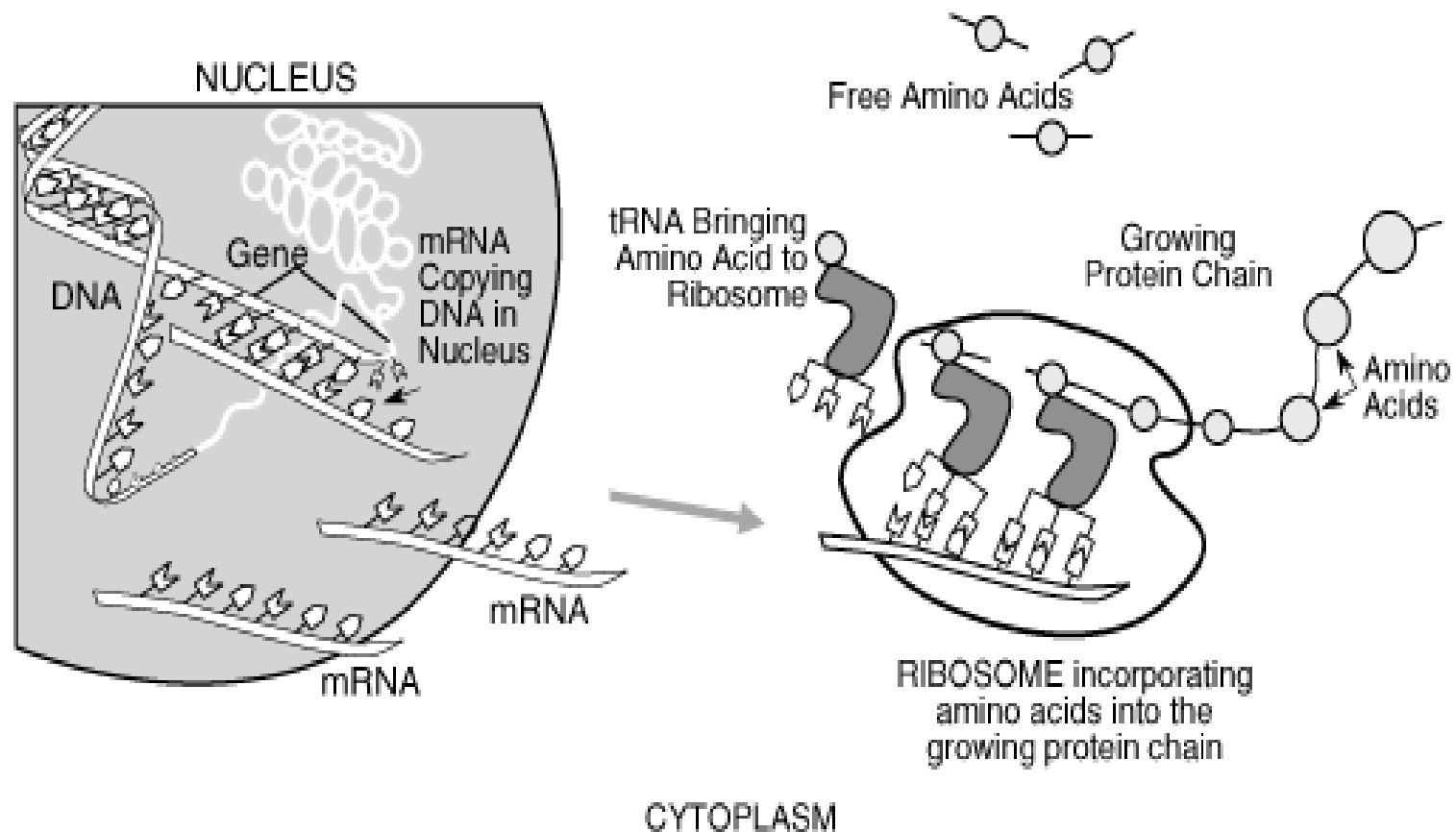
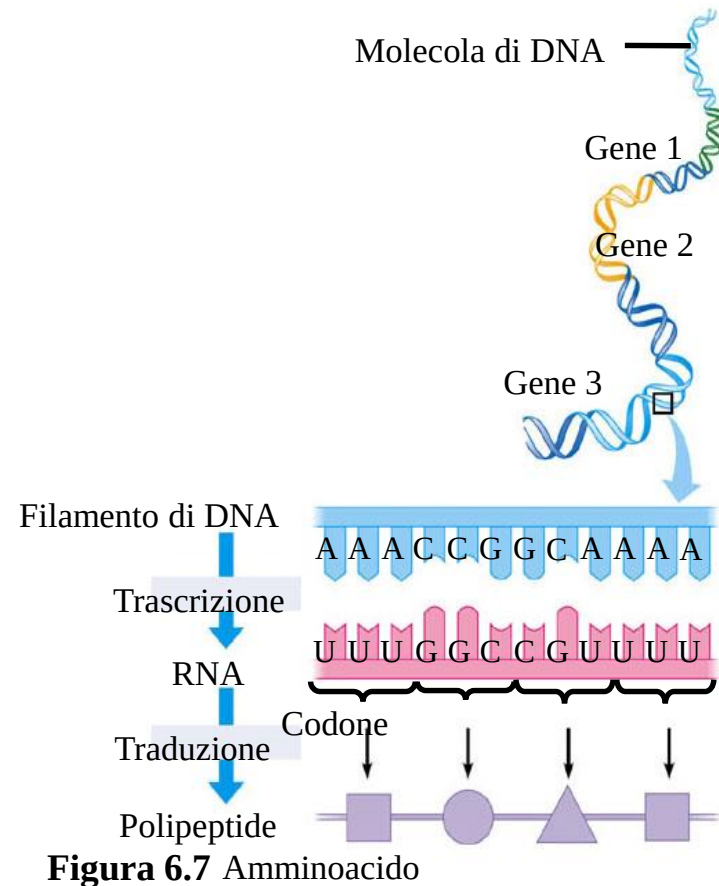


La traduzione avviene nella cellula in strutture chiamate **ribosomi**

ORNL-DWG 91M-17380



- L'informazione genetica viene scritta sotto forma di codoni e tradotta in sequenze di amminoacidi
 - Le «parole» del linguaggio chimico del DNA sono triplette di basi chiamate **codoni**.
 - I **codoni** di un gene contengono le informazioni per la **sequenza** di amminoacidi di una catena polipeptidica.



**Come l'informazione
contenuta nel DNA e quindi
nell'mRNA è utilizzata per
la produzione delle
proteine?**

**A
G
T
C**

LA TRADUZIONE

Consideriamo la sequenza lineare di DNA:

5'-ATGATCAGAATCG.....3'

Quante basi servono per poter definire 20 aminoacidi:

- 1 base (A, T, G, A, T, C,.....) : solo 4^1 aminoacidi
- 2 basi (AT, GA, TC, AG,.....): 4^2 combinazioni = 16 aminoacidi, non basta!
- 3 basi (ATG, ATC, AGA,.....): 4^3 combinazioni = 64 aminoacidi, anche troppi, ma è proprio così!

Il codice genetico:

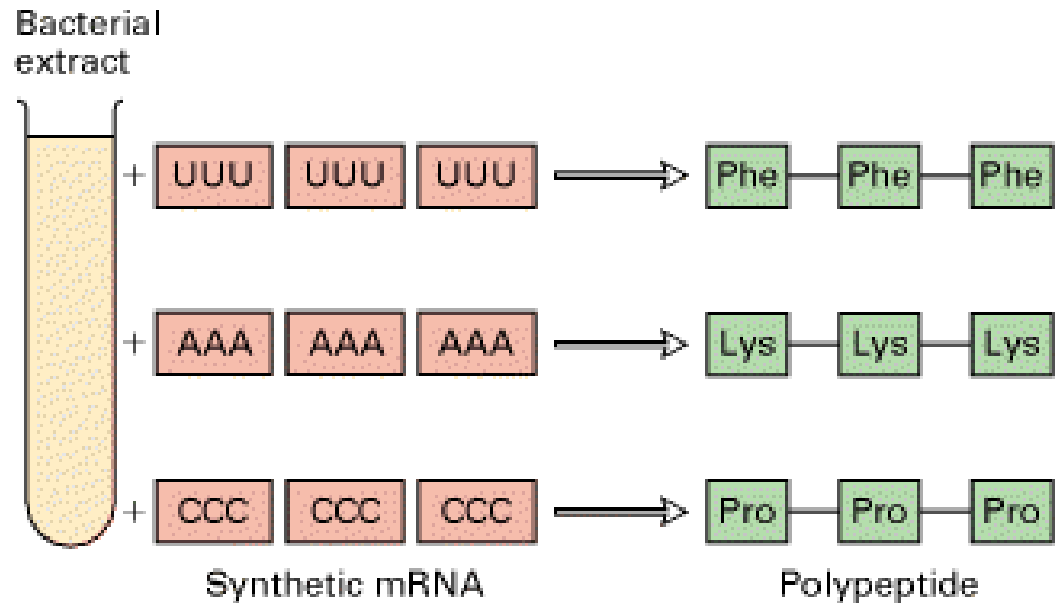
fu decifrato negli anni '60.

Tutti gli organismi hanno essenzialmente lo stesso codice viene perciò definito **universale**.

Il codice genetico è letto interpretando tre basi alla volta, senza sovrapposizioni: ogni gruppo di tre basi viene chiamato tripletta o più propriamente **codone**.

Come il codice genetico venne decodificato.

Sintesi di omo-poliribonucleotidi, ad es. UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU..
traduzione su ribosomi in vitro e determinazione della composizione amminoacidica dei polipeptidi ottenuti.
Risultava, ad es., che poli-U determinava la sintesi di poli-Phe, e quindi UUU codificava per la fenilalanina.



Inoltre sintesi di poliribonucleotidi a sequenza casuale di due monomeri in proporzione diversa, ad es. G e U in rapporto 3:1,
GGUGGGGUGUGGGGGGUUGGGUUGGGGUGUGGGUGGGGGGUGGUUGGUUGGGUGGGGG...
traduzione su ribosomi in vitro e determinazione della composizione amminoacidica dei polipeptidi ottenuti. In tal caso il codone più frequente era GGG e l'amminoacido più abbondante nel polipeptide era la glicina, dunque GGG codificava per la glicina, ecc..

Come il codice genetico venne decodificato.

Sintesi di co-poliribonucleotidi regolari, poli-dimeri, ad es.

ACACACACACACACACACACAC...

o poli-trimeri, ad es. AACACAACAACAACAACAACAACAACAACAAC...

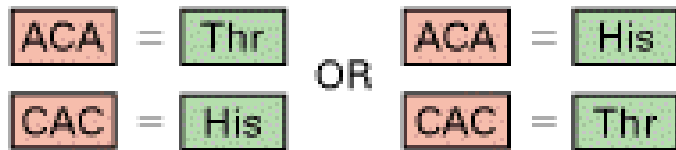
e loro traduzione in vitro.

Nel primo caso si otteneva un copolipeptide alterno regolare, nell'es. Thr-His-Thr-His-Thr-His-..., quindi ACA e CAC codificavano uno per Thr e uno per His.

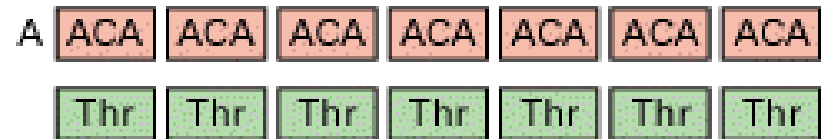
Nel secondo caso tre omopolipeptidi, nell'es. Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-..., Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-..., e Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-..., quindi AAC, ACA, e CAA codificavano uno per Asn, uno per Thr, e uno per Gln.

Parecchi esperimenti incrociati di questo tipo risolsero tutto il codice.

(a)

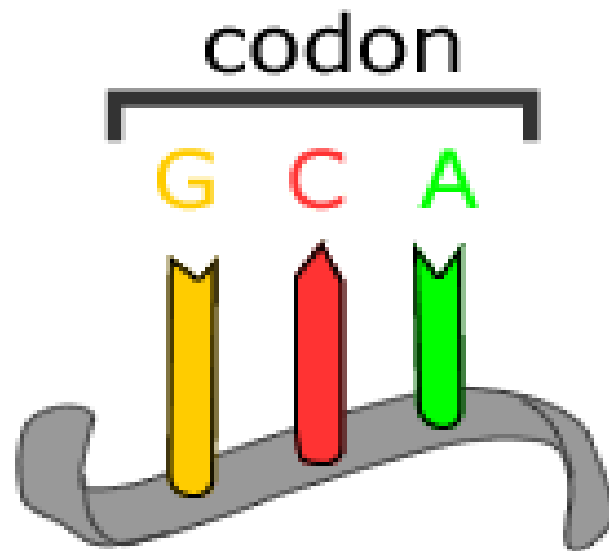


(b)



Codone:

tre basi nucleotitiche del
DNA/mRNA che corrispondono ad
uno specifico aminoacido



1 codon = 1 amino acid

Il codice genetico standard

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

GCA GCC GCG GCU	AGA AGG CGA CGC CGG CGU	GAC AAU	UGC UUG	GAA GAG	CAA GAG	GGA GGC GGG GGU	CAC CAU	AUA AUC AUU CUU	UUA UUG CUA CUC CUU	AAA AAG	AUG	UUC UUU	CCA UCC CCG CCU	AGC AGU UCA UCC UCG UCU	ACA ACG ACU	UGG	UAC UAU	GUA GUC GUG UGA	UAA UAG UGA
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	stop
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V

Il codice genetico è «la stele di Rosetta» della vita

Quasi tutti gli **organismi** (dai batteri alle piante agli animali) **condividono** lo stesso codice genetico.



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

Il codice genetico

- Ben 18 su 20 aminoacidi sono codificati da più di un codone: questa caratteristica del codice genetico è detta **degenerazione**
 - Un singolo cambiamento all'interno di un codone non è di solito sufficiente a causare la codifica di un aminoacido di categoria diversa
 - Ovvero, durante la replicazione/trascrizione del DNA si possono compiere errori che non hanno effetto sulla composizione aminoacidica della proteina
 - Il codice genetico è molto robusto e minimizza le conseguenze dei possibili errori presenti nella sequenza nucleotidica, evitandone il ripercuotersi sulla funzione della proteina codificata

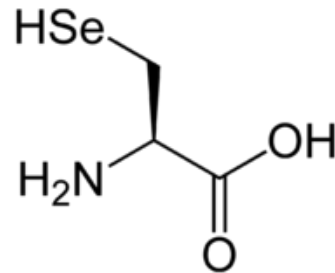
Il codice genetico

UUU UUC	phenyl alanine	UCU UCC UCA UCG	serine	UAU UAC	tyrosine	UGU UGC	cysteine
UUA UUG	leucine			UAA UAG	stop	UGA	stop
						UGG	tryptophan
CUU CUC CUA CUG	leucine	CCU CCC CCA CCG	proline	CAU CAC	histidine	CGU CGC CGA CGG	arginine
AAU AUC AUA	isoleucine	ACU ACC ACA ACG	threonine	AAU AAC	asparagine	AGU AGC	serine
AUG	methionine			AAA AAG	lysine	AGA AGG	arginine
GUU GUC GUA GUG	valine	GCU GCC GCA GCG	alanine	GAU GAC	aspartic acid	GGU GGC GGA GGG	glycine
				GAA GAG	glutamic acid		

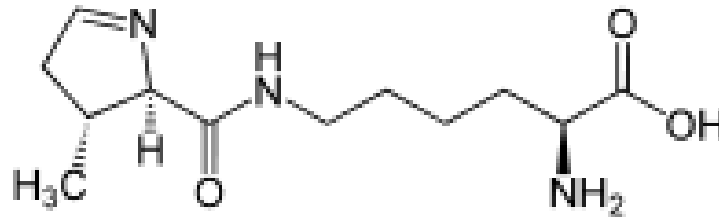
Per un limitato numero di geni batterici, il codone UGA codifica un ventunesimo aminoacido: la selenocisteina. Un ventiduesimo aminoacido, la pirrolisina, è codificata da UAG in qualche specie batterica ed eucariotica

Due α -amminoacidi anomali raramente usati nella sintesi proteica:

1) **Selenocisteina**. Compare sporadicamente in poche proteine sia in procarioti che eucarioti (uomo compreso). E' codificata da **UGA**, che in presenza di una particolare sequenza sul mRNA detta **SECIS**, al seguito dell'UGA o al 3' non tradotto, viene riconosciuto dal suo apposito tRNA anziché da un fattore di terminazione.



2) **Pirrolisina**. E' stata osservata in poche proteine di procarioti. E' codificata da **UAG**, che in presenza di una particolare sequenza sul mRNA detta **PYLIS**, viene riconosciuto dal suo apposito tRNA anziché da un fattore di terminazione.

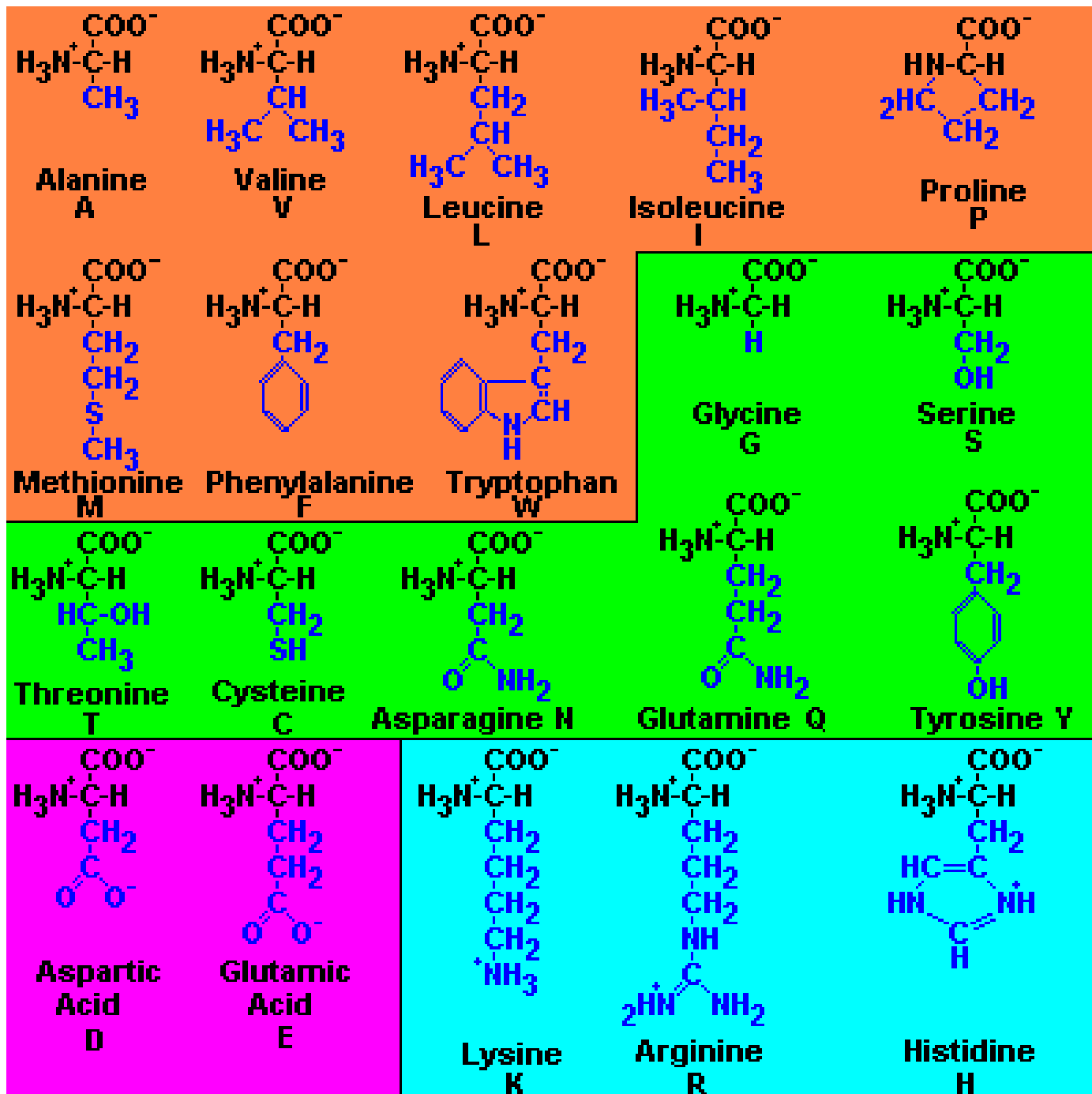


		Second letter					
		U	C	A	G		
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Trp UGG Trp	U	C
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U	C
	A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

The mitochondrial genetic code: one of the few slightly variant minor codes

Il codice genetico

- Gli aminoacidi sono classificati in quattro diverse categorie
 - **Gruppi R non polari, idrofobici**: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano, prolina
 - **Gruppi R polari, idrofilici**: serina, treonina, cisteina, tirosina, asparagina, glutammina
 - **Acidi** (carica elettrica negativa): acido aspartico, acido glutammico
 - **Basici** (carica elettrica positiva): lisina, arginina, istidina



Hydrophobic

Hydrophilic neutral

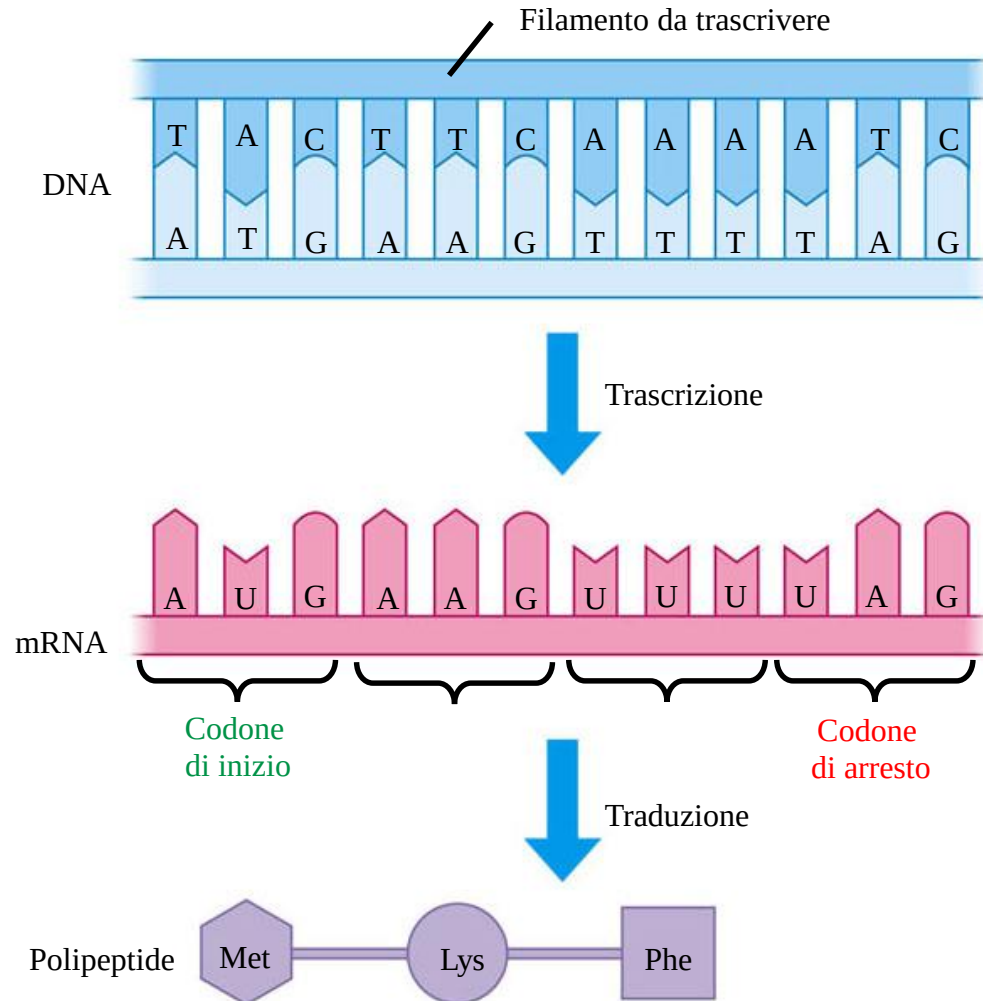
Acidic
and
Basic

Il codice genetico

- La traduzione, ad opera dei ribosomi, avviene a partire da un sito d'inizio, posto sulle copie di RNA di un gene e procede fino al primo codone di stop
- Il codone d'inizio è costituito dalla tripletta AUG (che codifica la metionina), sia negli eucarioti che nei procarioti
- La traduzione è accurata solo quando i ribosomi esaminano i codoni all'interno della cornice di lettura (delimitata da codone d'inizio □ codone di stop)
 - L'alterazione della cornice di lettura di un gene cambia ogni aminoacido posto a valle dell'alterazione stessa e causa solitamente la produzione di una versione troncata della proteina



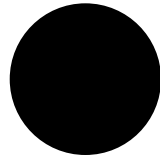
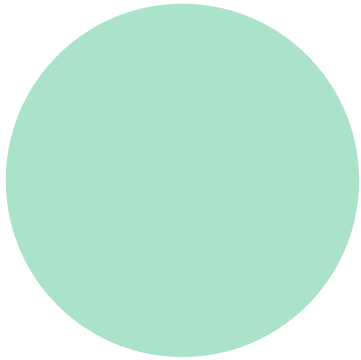
Processo per decifrare l'informazione genetica del DNA



Il codice genetico

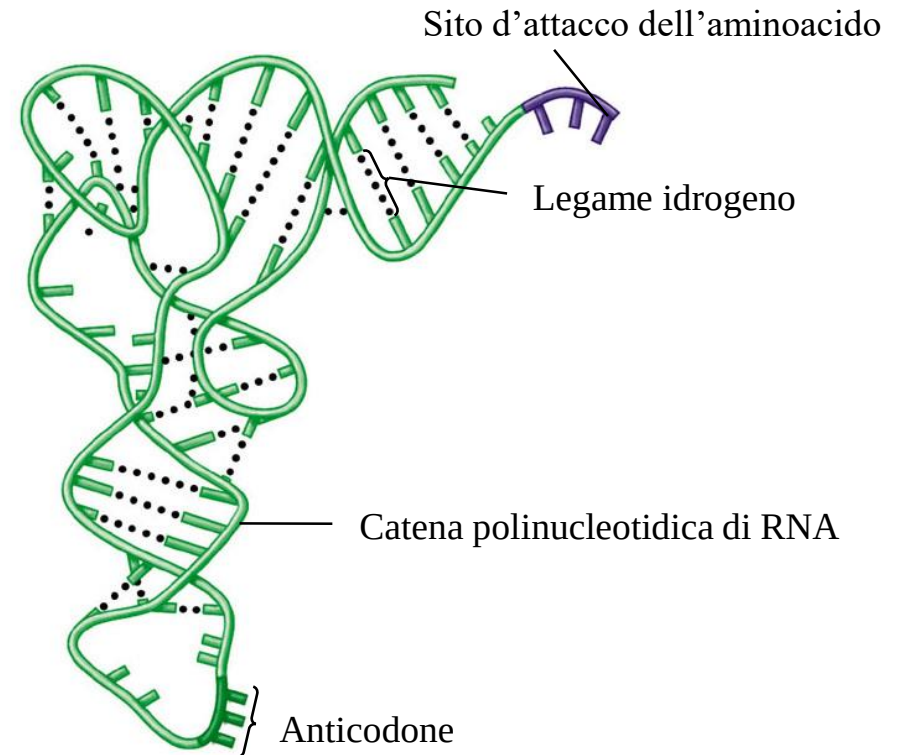
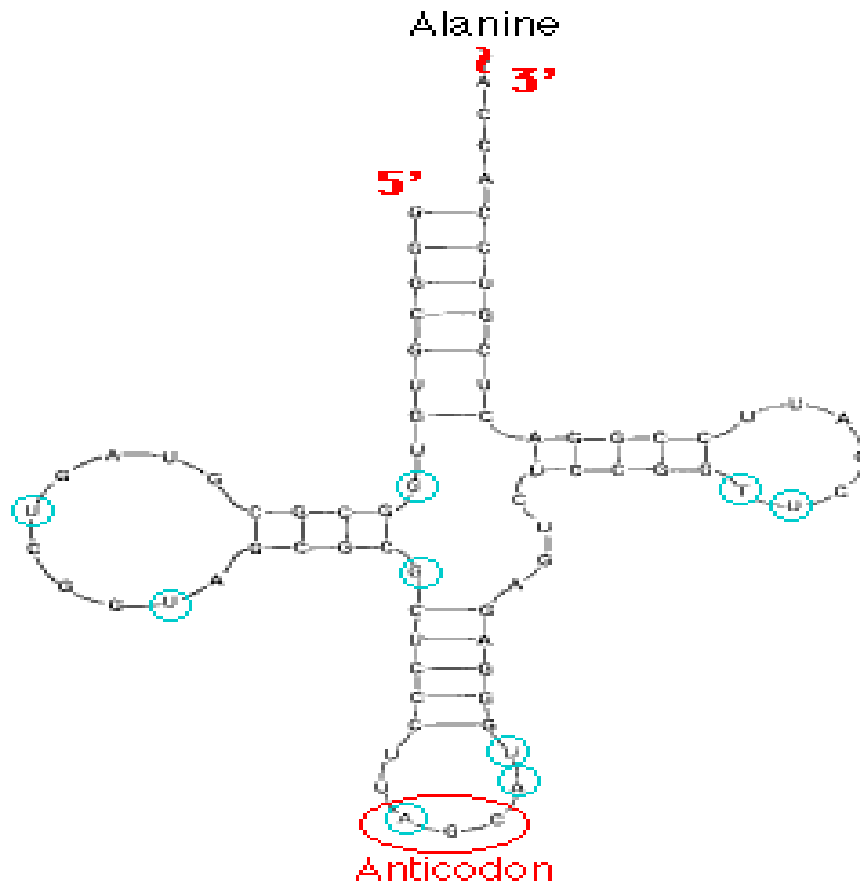
- La maggior parte dei geni codificano per proteine lunghe centinaia di aminoacidi
- Dato che, in una sequenza generate casualmente, i codoni di stop si hanno circa ogni 20 triplette (3 codoni su 64), **le cornici di lettura dei geni presentano solitamente filamenti molto lunghi in cui non si presentano codoni di stop**
- Cornici di lettura aperte (*Open Reading Frame* - ORF): sono una caratteristica distintiva di molti geni procariotici ed eucariotici (senza codoni di stop prematuri)





**Come una particolare
sequenza di nucleotidi è
specifica per un particolare
aminoacido?**

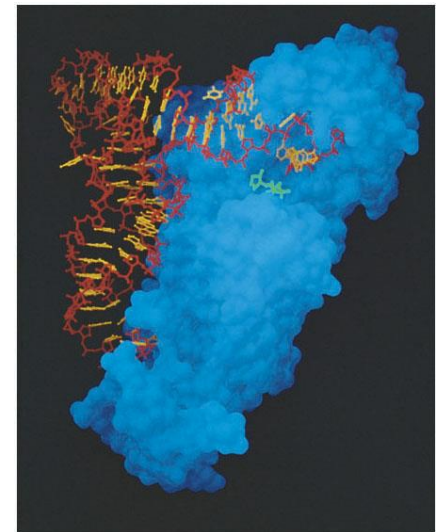
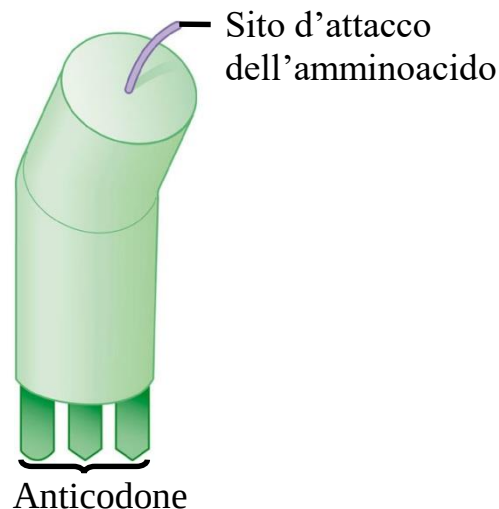
Grazie alla funzione svolta dalla molecola chiamato RNA transfer (RNAt)



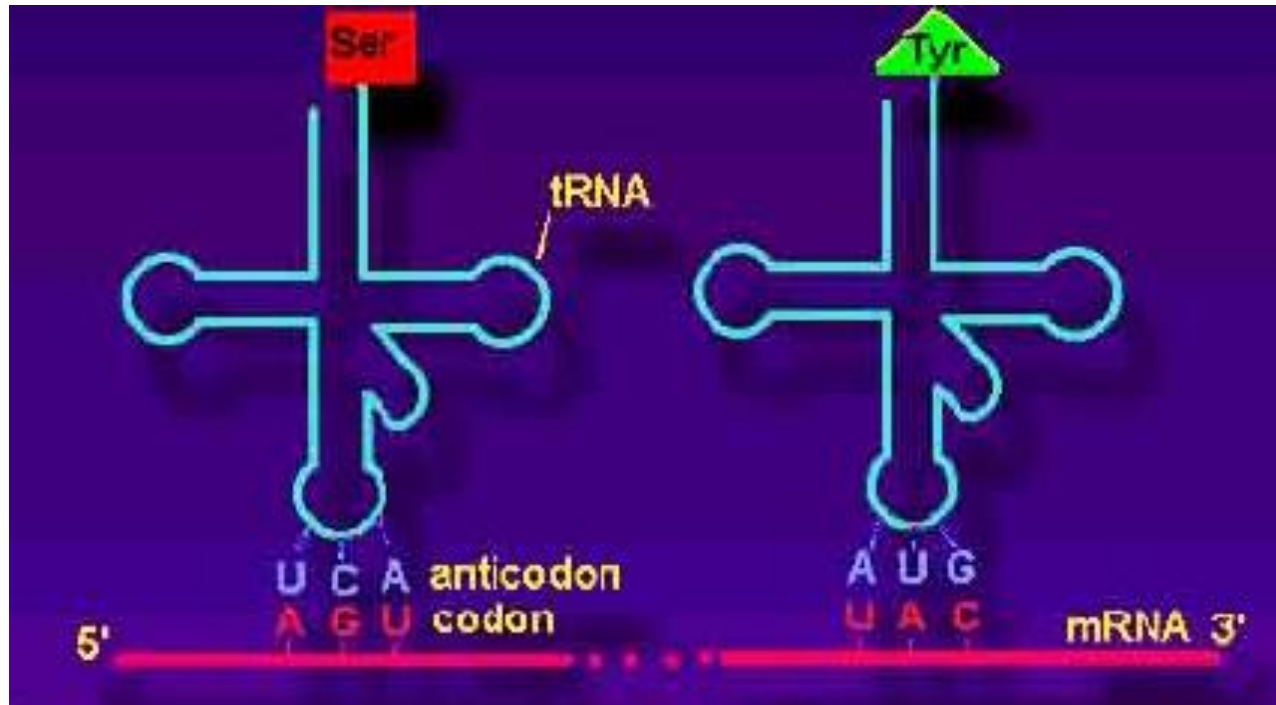
I tRNA

- Sono **piccoli** RNA (di circa 70 – 90 nucleotidi) preposti alla decodifica dei mRNA nel processo della traduzione a livello dei ribosomi, cioè riconoscimento del codone dell'mRNA con il corrispondente **anticodone**.
- 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).
- 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 di riconoscere solo i tRNA di propria competenza e di legare al loro **3'terminale** l'amminoacido appropriato a ciascuno di essi.

- Ogni molecola di tRNA ha un'ansa a filamento singolo, posta a un'estremità, che contiene una speciale tripletta di basi azotate chiamata **anticodone** (complementare a un particolare codone dell'mRNA).
- All'altra estremità c'è invece il sito di attacco di uno specifico amminoacido.



Vi sono tanti tRNA per ciascun aminoacido e per ciascuna tripletta di nucleotidi dell'mRNA (codoni)



L'aminoacido è attaccato all'appropriato tRNA grazie ad un enzima attivante specifico per quell'aminoacido e per quel codone

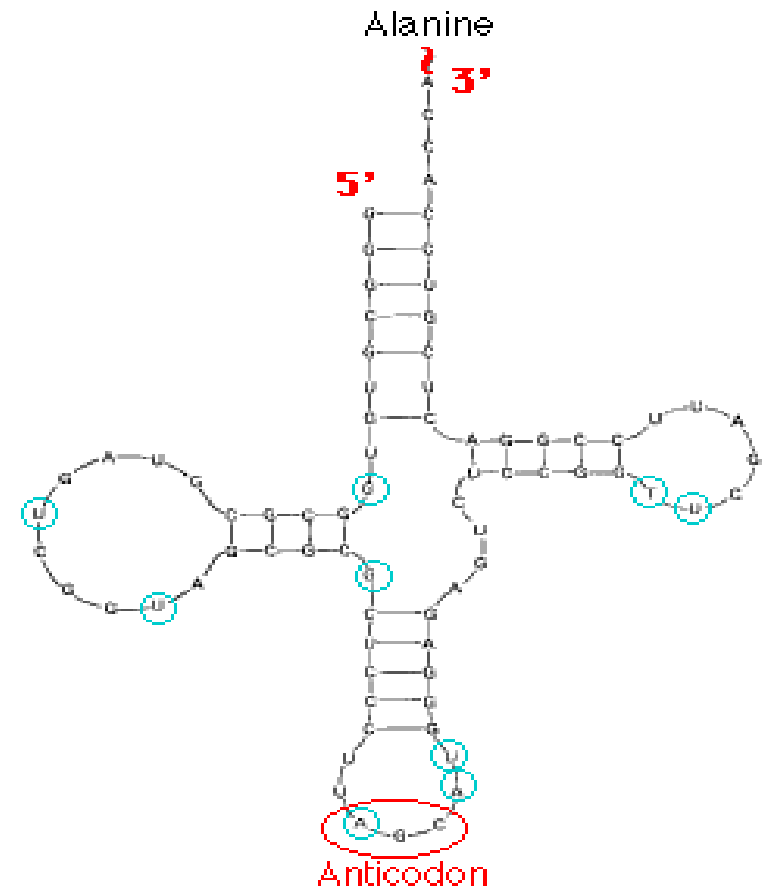
Le amminoacil-tRNA-sintetasi

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 di acilazione avviene in due stadi attraverso un intermedio (l'amminoacil-AMP) che porta a legare l'amminoacido al ribosio 3' terminale del tRNA mediante un legame di tipo esterico.

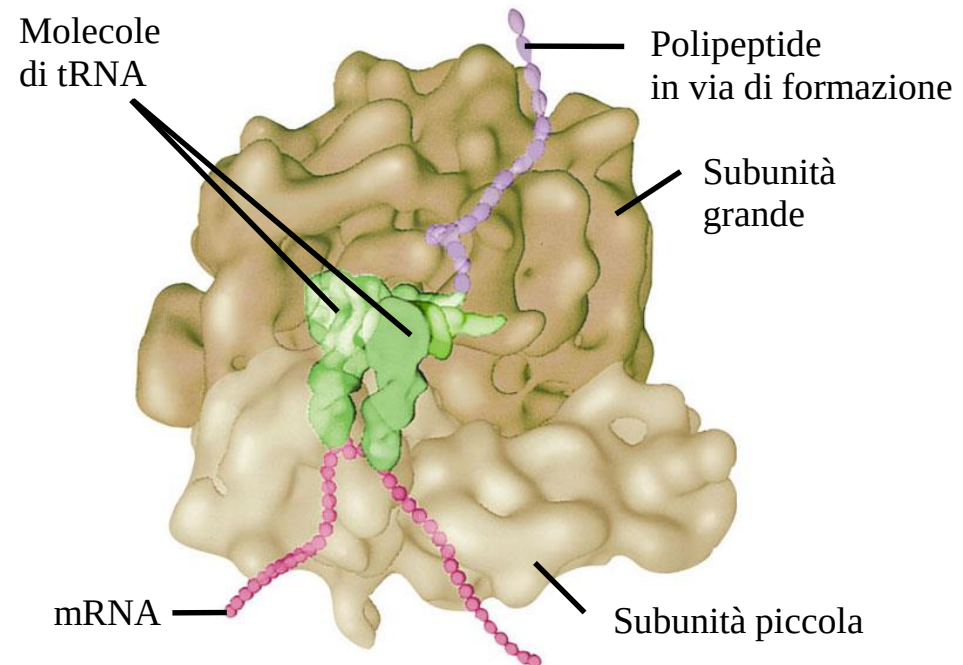
tRNA

Ogni tRNA ha una sequenza di 3 nucleotidi, l'*anticodone*, che può legare la sequenza complementare dell'mRNA



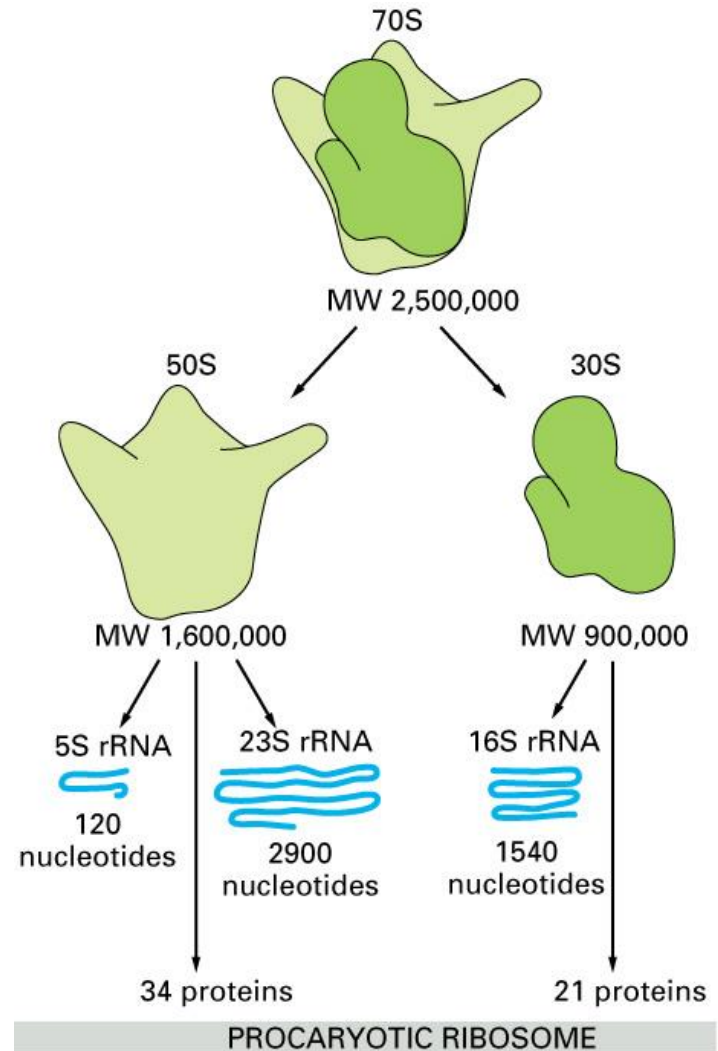
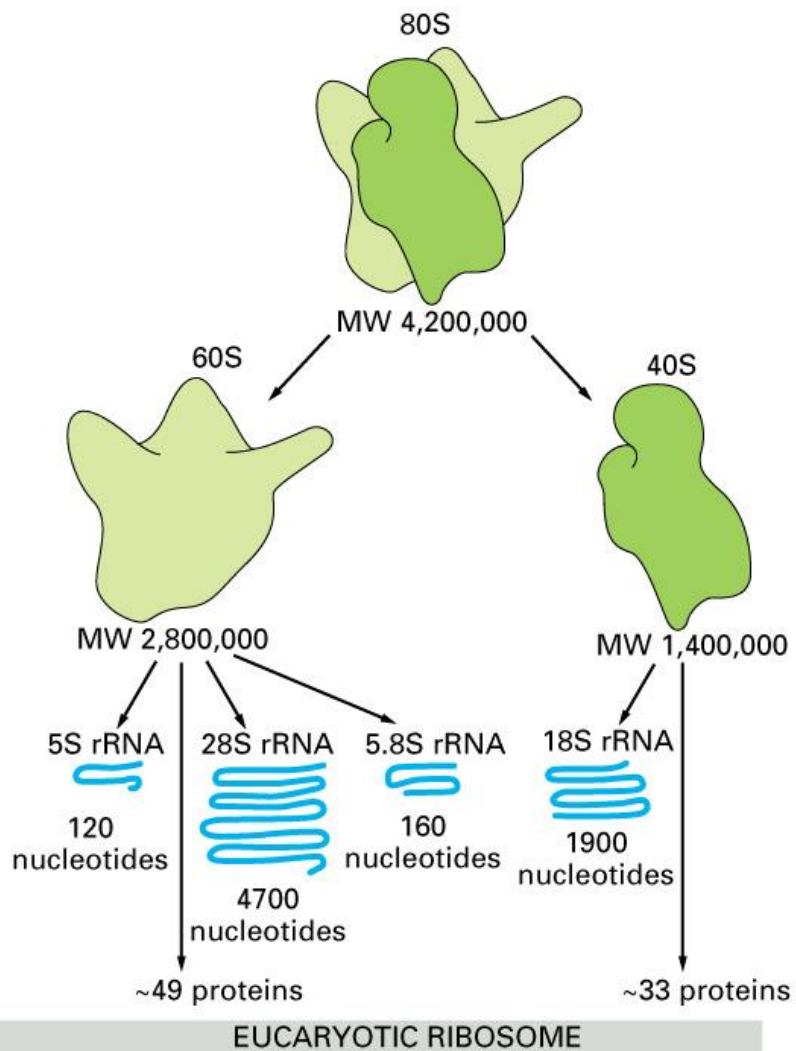
Gli altri attori della traduzione.....

- Un ribosoma è costituito da due subunità, ciascuna formata da proteine e da grandi quantità di **RNA ribosomiale (rRNA)**.



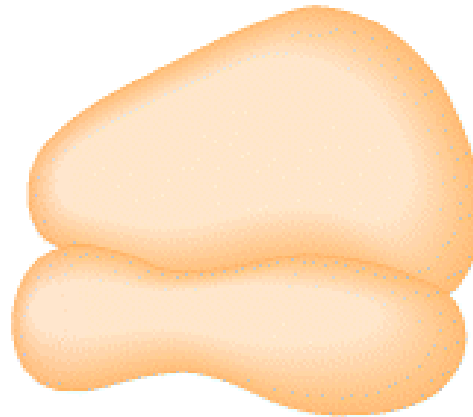
Struttura del ribosoma

- Il ribosoma è il complesso ribonucleoproteico preposto alla biosintesi proteica.
- La sua struttura generale è simile nei procarioti e negli eucarioti, salvo che il ribosoma eucariotico è leggermente più grande ed è costituito da un numero maggiore di componenti.
- Si compone di due subunità (maggiore e minore) che si associano soltanto al momento di iniziare la biosintesi proteica (la traduzione) e si dissociano alla conclusione del processo.



EUKARYOTES

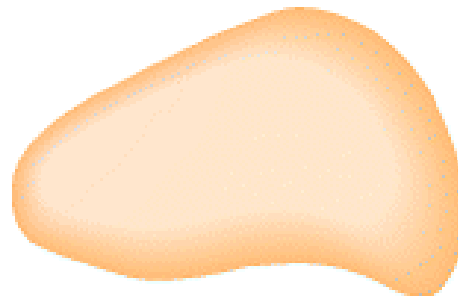
80S



60S

28S rRNA (4718 nucleotides)
5.8S rRNA (160 nucleotides)
5S rRNA (120 nucleotides)

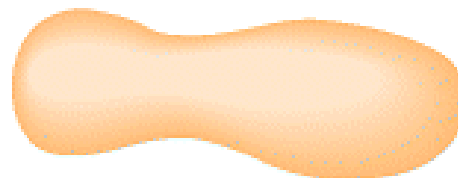
50 proteins



40S

18S rRNA (1874 nucleotides)

33 proteins



BACTERIA

70S

50S

23S rRNA (2904 nucleotides)
5S rRNA (120 nucleotides)

34 proteins

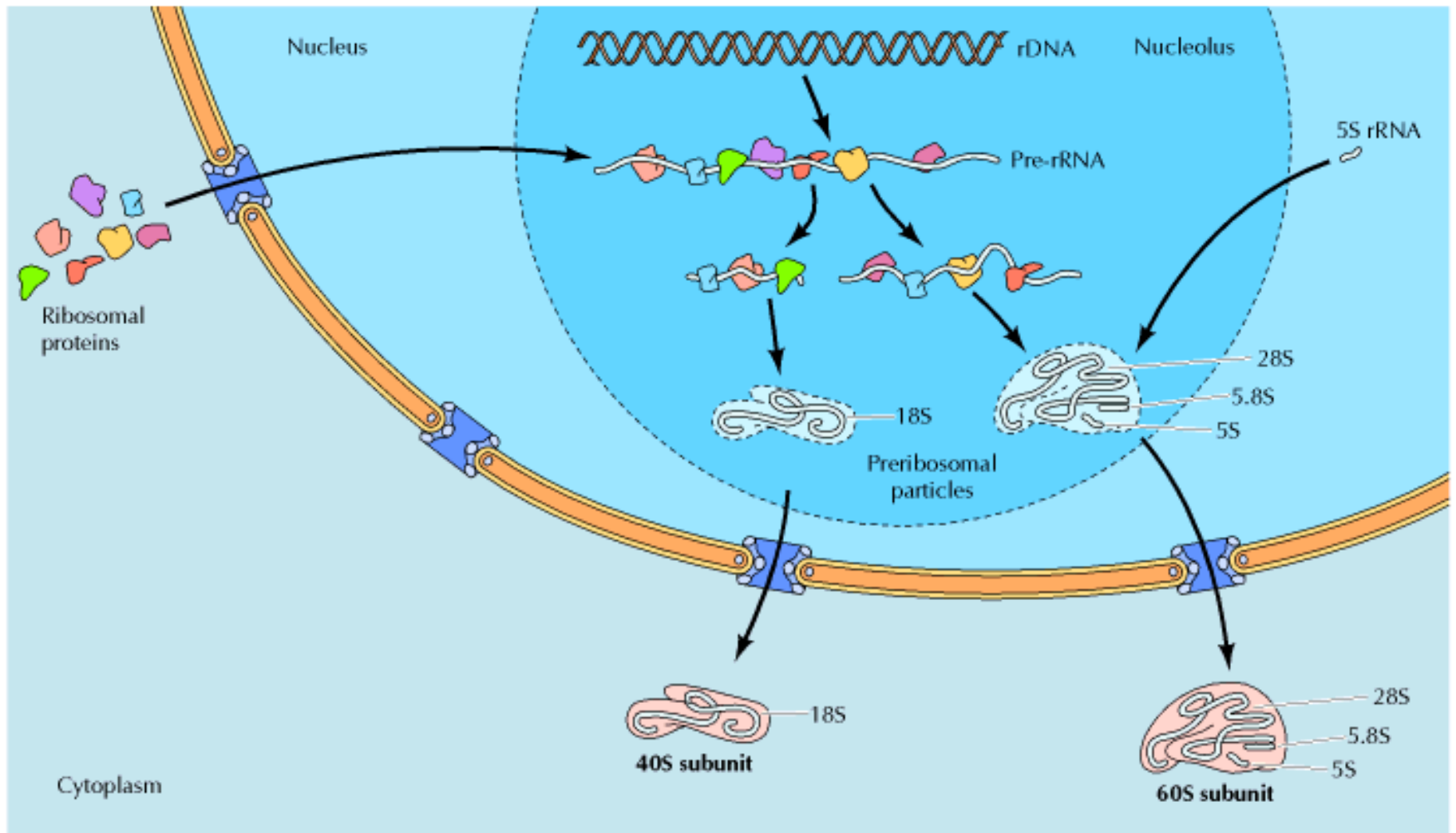
30S

16S rRNA (1541 nucleotides)

21 proteins

+





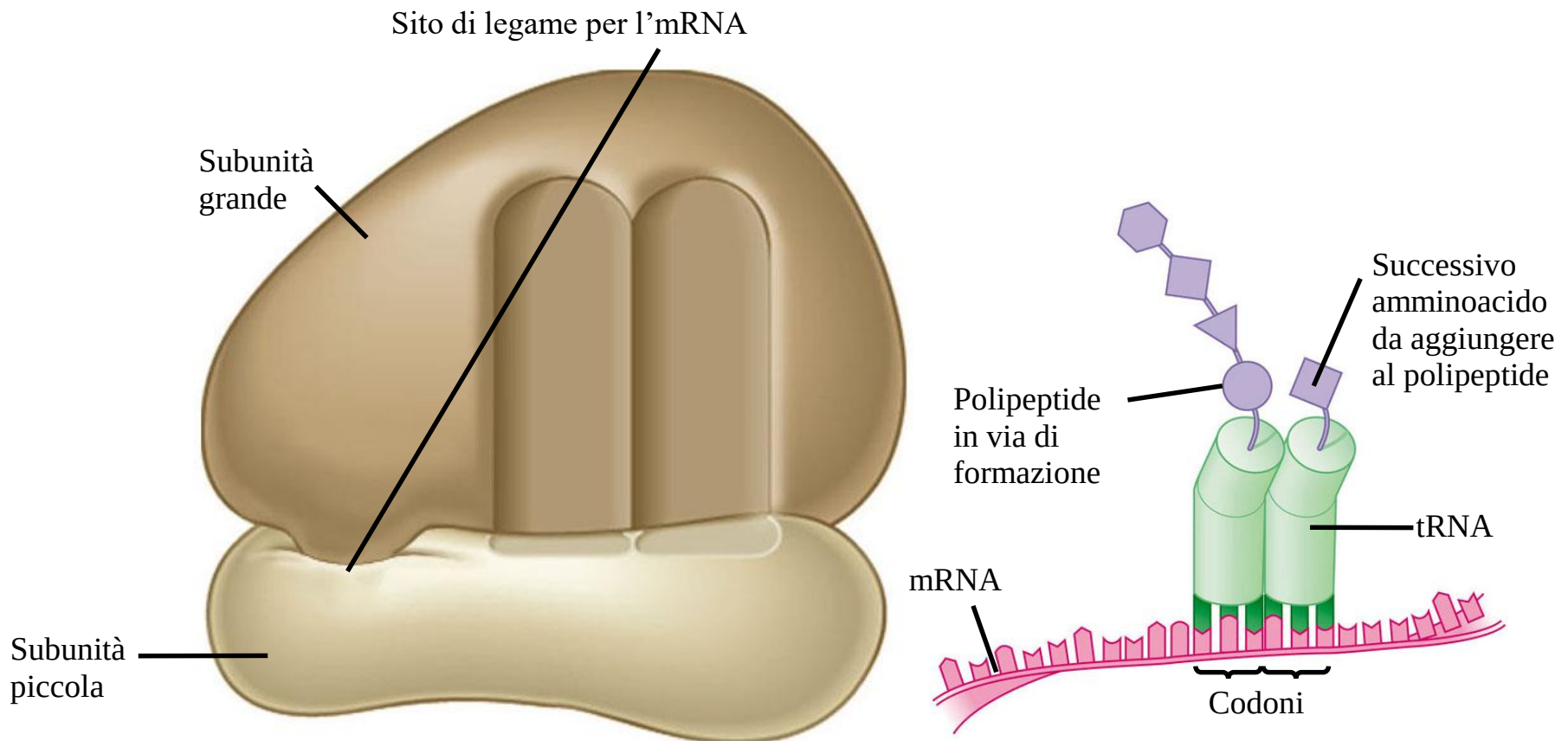
Assemblamento dei ribosomi negli eucarioti avviene nel nucleolo

Il processo della traduzione

Consta di tre momenti:

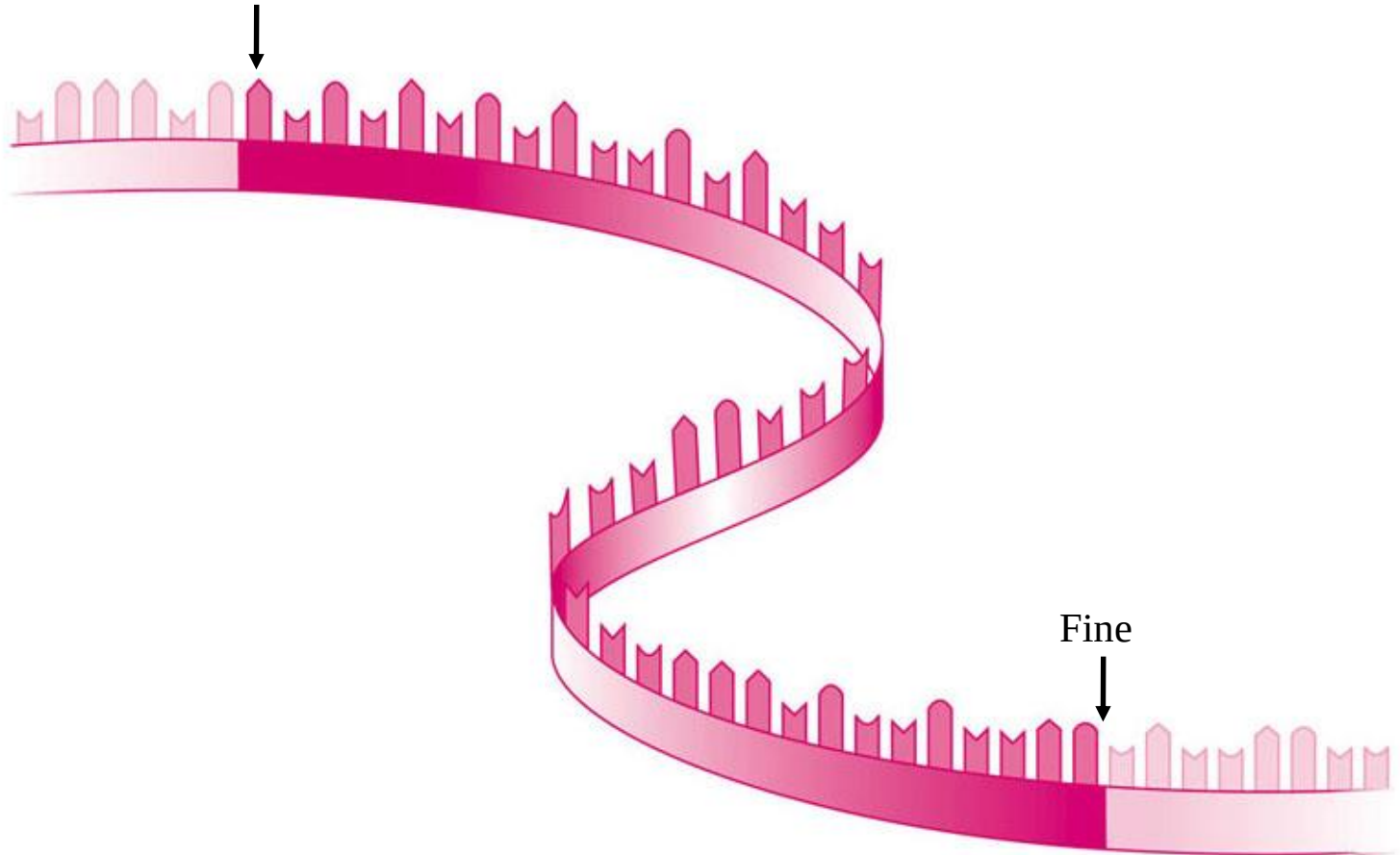
- L'**inizio**, notevolmente diverso tra procarioti ed eucarioti, molto più complesso in questi ultimi.
- L'**allungamento**, molto simile tra procarioti ed eucarioti.
- La **terminazione**, pure simile tra procarioti ed eucarioti.

- Durante la traduzione, le subunità di un ribosoma tengono unite tra di loro le molecole di tRNA e di mRNA.

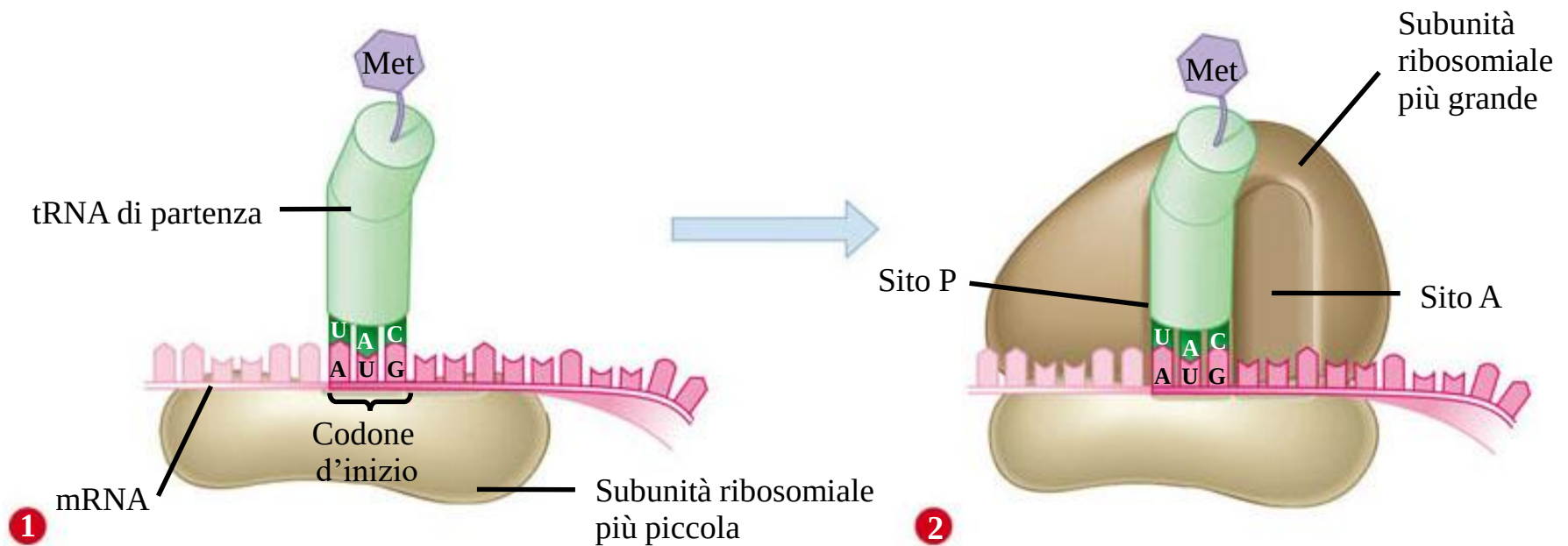


- Un codone d'inizio indica il punto di partenza del messaggio portato dall'mRNA

Inizio del messaggio genetico



Nel processo d'inizio della traduzione, vengono coinvolti l'mRNA, il primo amminoacido attaccato al suo tRNA e le due subunità ribosomiali.

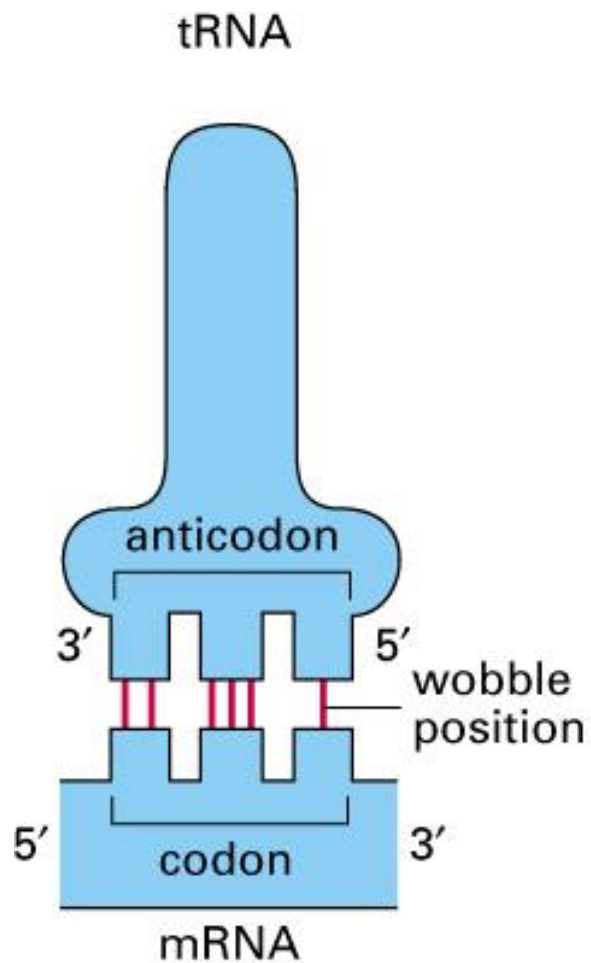


Nella fase di allungamento si aggiungono amminoacidi alla catena polipeptidica fino a quando il codone di arresto termina la traduzione

- Completata la fase d'inizio, al primo amminoacido se ne aggiungono altri, uno alla volta, durante il processo di allungamento. L'mRNA sposta un codone alla volta e il tRNA si appaia ad ogni codone con il suo anticodone complementare, aggiungendo il suo amminoacido alla catena peptidica.
- Il processo di allungamento prevede tre tappe:
 - riconoscimento del codone;
 - formazione del legame peptidico;
 - traslocazione.

Il riconoscimento tra codone e anticodone

- Avviene a livello del ribosoma mediante formazione di un miniduplex antiparallelo tra ciascun codone del mRNA e l'anticodone del tRNA sull'ansa omonima.
- La prima e la seconda base del codone devono appaiarsi rigorosamente “alla Watson-Crick”, mentre la terza può anche derogare da questa regola: il caso più frequente è la formazione di un appaiamento G:U (wobbling), meno frequentemente coinvolge una base modificata dell'anticodone, ad esempio l'ipoxantina, derivata dalla deamminazione enzimatica di un'adenina del tRNA.
- Per cui un dato tRNA può spesso riconoscere due codoni, o più raramente tre. Ciò rende conto del fatto che il numero degli anticodoni può essere (e in genere è) minore del numero dei codoni, che nel codice standard sono 61.
- **Normalmente in questi codoni le prime due basi sono conservate mentre la terza base è variabile; questi appaiamenti con oscillazione alla terza base permettono di adattare i 20 amminoacidi a 61 codoni per mezzo di 31 diverse molecole di tRNA (e non di 61). Tale oscillazione si verifica ancora di più nei mitocondri ove i tRNA sono solo 22.**



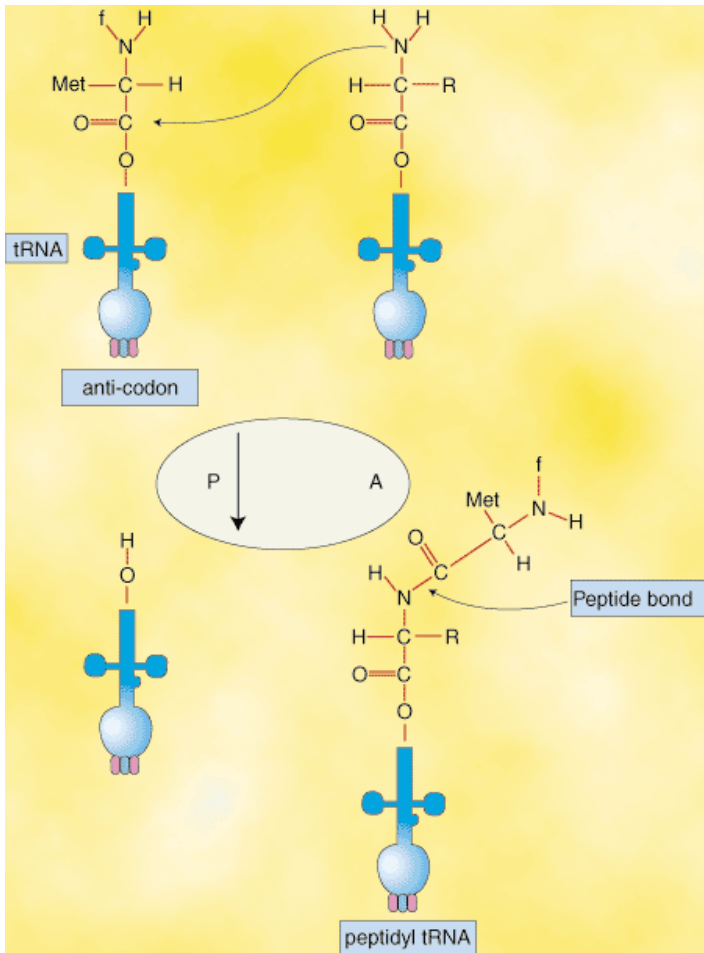
bacteria

wobble codon base	possible anticodon bases
U	A, G, or I
C	G or I
A	U or I
G	C or U

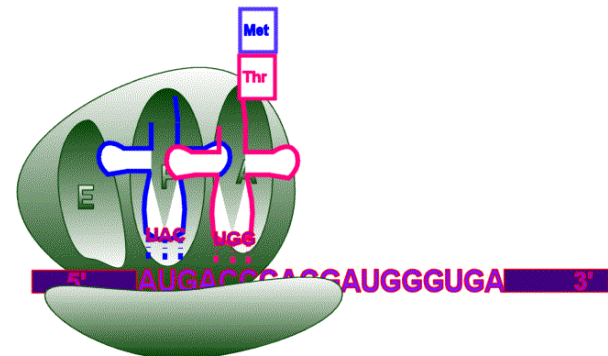
eucaryotes

wobble codon base	possible anticodon bases
U	G or I
C	G or I
A	U
G	C

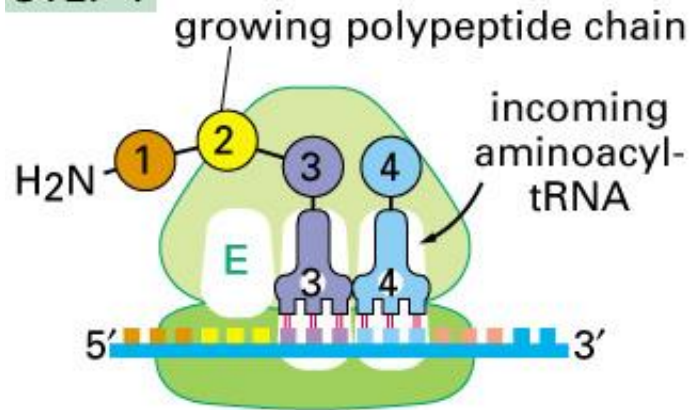
Figure 6-53. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



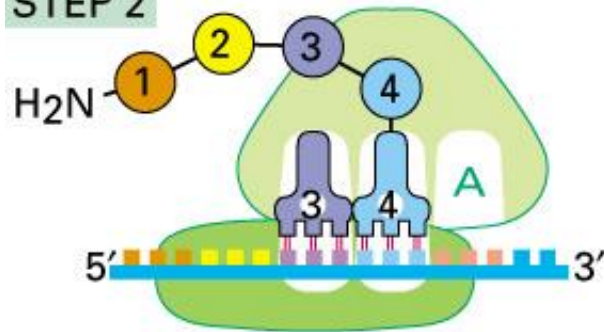
La formazione del legame peptidico avviene per attacco dell'amminogruppo dell'amminoacido entrante (portato dal tRNA nel sito A) al carbonile dell'amminoacido precedente (portato dal tRNA nel sito P), con conseguente trasferimento del polipeptide finora sintetizzato sull'ultimo tRNA. Questo verrà poi traslocato al sito P (di conserva con il mRNA) e il precedente tRNA ormai scarico uscirà transitando per il sito E.



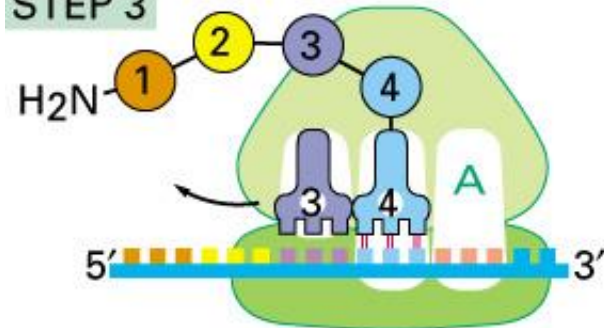
STEP 1



STEP 2



STEP 3



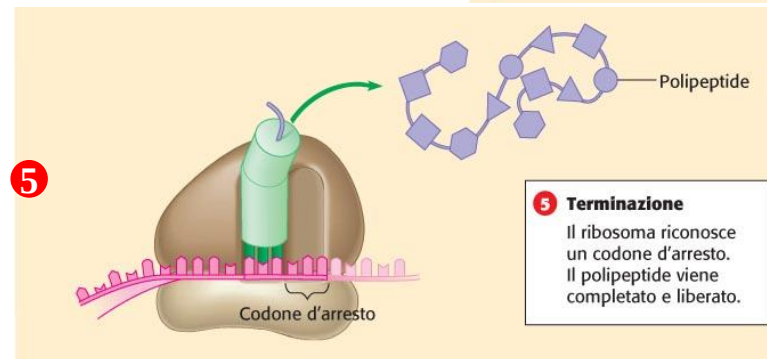
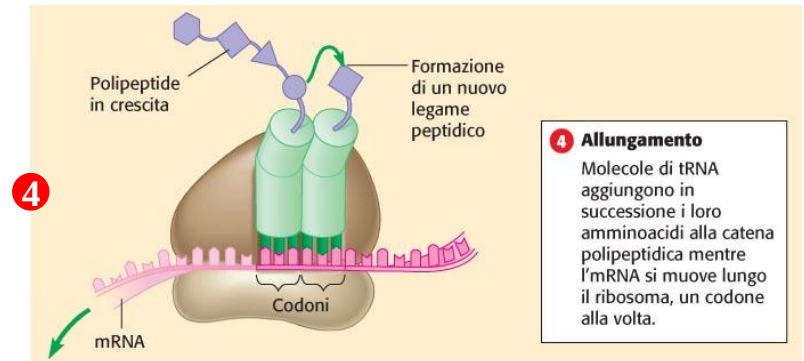
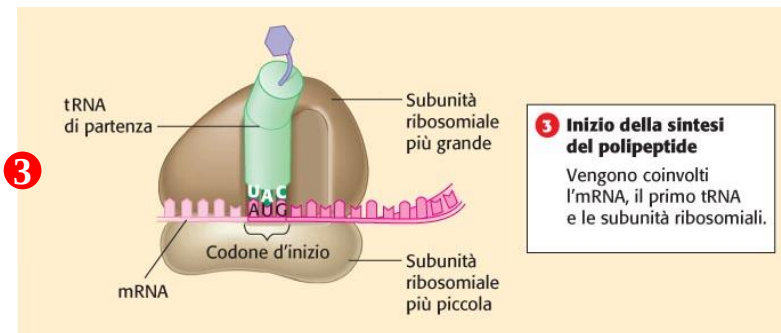
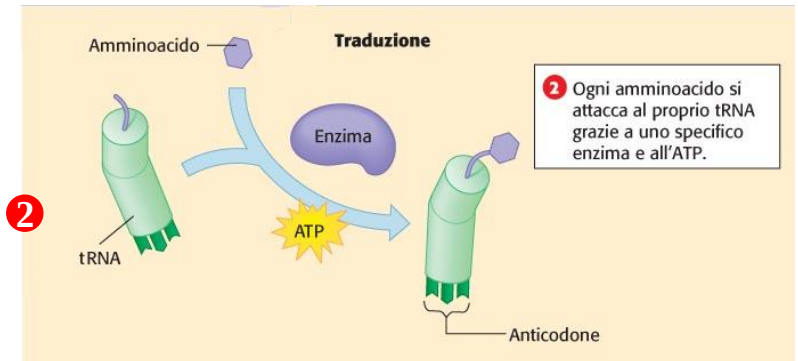
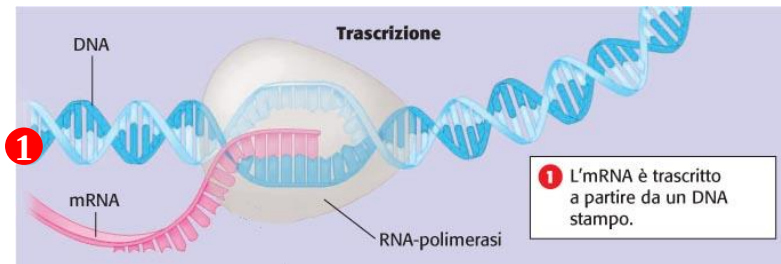
Le proteine vengono sintetizzate in direzione 5'->3' da amino-terminale (primo aa) a carbossi-terminale (ultimo aa)

Meccanismo generale

- Il sito A è dove un nuovo codone è tradotto
- Il sito P è dove alla catena polipeptidica nascente un nuovo aa viene attaccato
- Il sito E è dove il tRNA scarico trasloca per uscire dal ribosoma

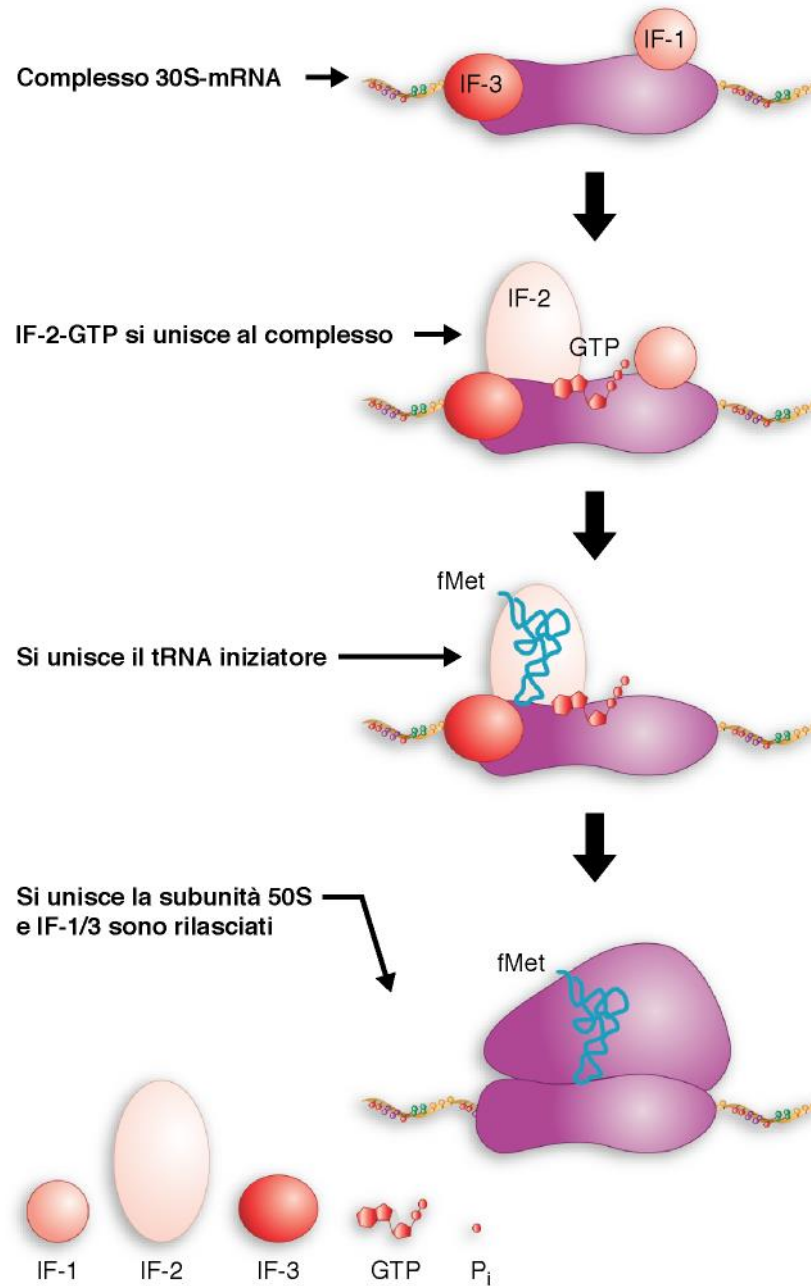
- **Lo spostamento del ribosoma sull'mRNA richiede energia che viene fornita dall'idrolisi del GTP.**
- **Nei batteri ogni ciclo avviene in circa 1/20 di sec il che vuol dire che per sintetizzare una proteina di 300 amminoacidi occorrono 15sec!**
- **La sintesi va avanti fino a che il ribosoma non va a disporre il suo sito A in corrispondenza di uno dei tre codoni non-senso o di arresto (UAG,UGAoUAA) dove nessun amminoacil-tRNA (anticodone) si va a legare.**
- **A questo punto si legano delle proteine chiamate fattori di distacco, viene catalizzata l'aggiunta di una molecola d'acqua al peptidil-tRNA anziché di un amminoacido, l'allungamento termina e la proteina si libera nel citoplasma; l'mRNA si stacca e il ribosoma si separa nelle due subunità.**

Le diverse tappe dalla trascrizione alla formazione di un polipeptide:



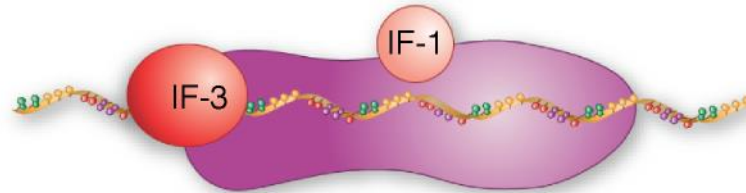
La traduzione nei procarioti

L'inizio è controllato da tre fattori

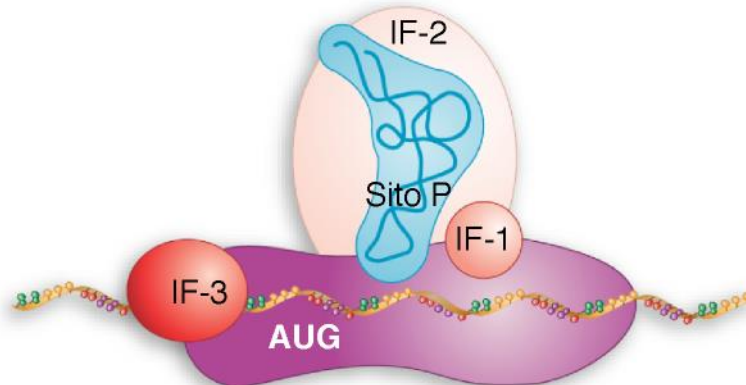


L'inizio richiede fattori speciali e subunità libere

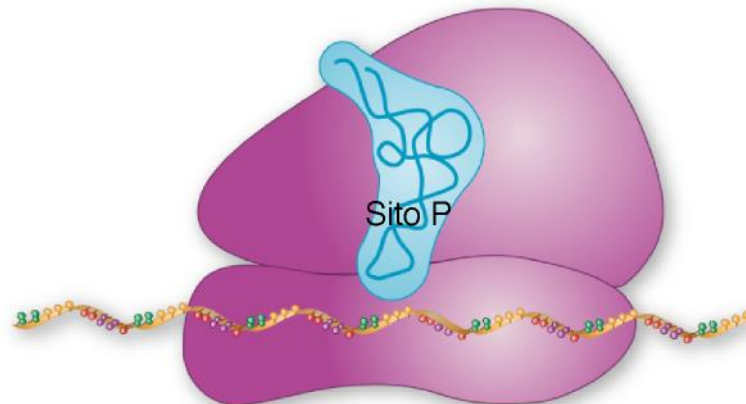
1. La subunità 30S si lega all'mRNA



2. IF-2 porta il tRNA al sito P

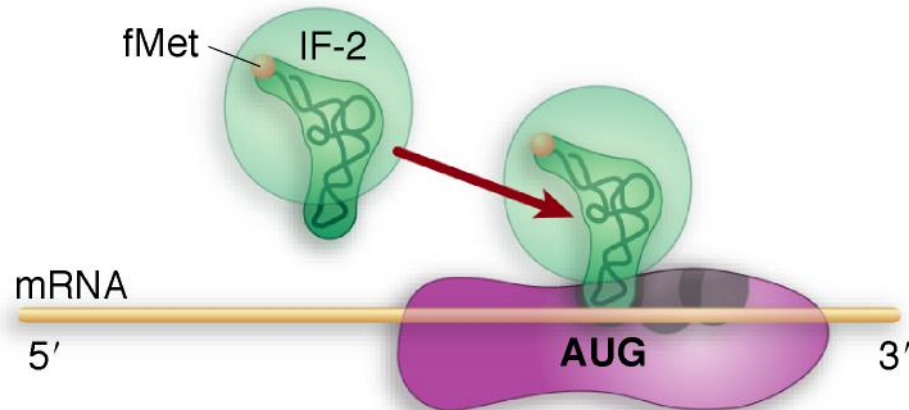


3. I fattori sono rilasciati e si unisce la subunità 50S

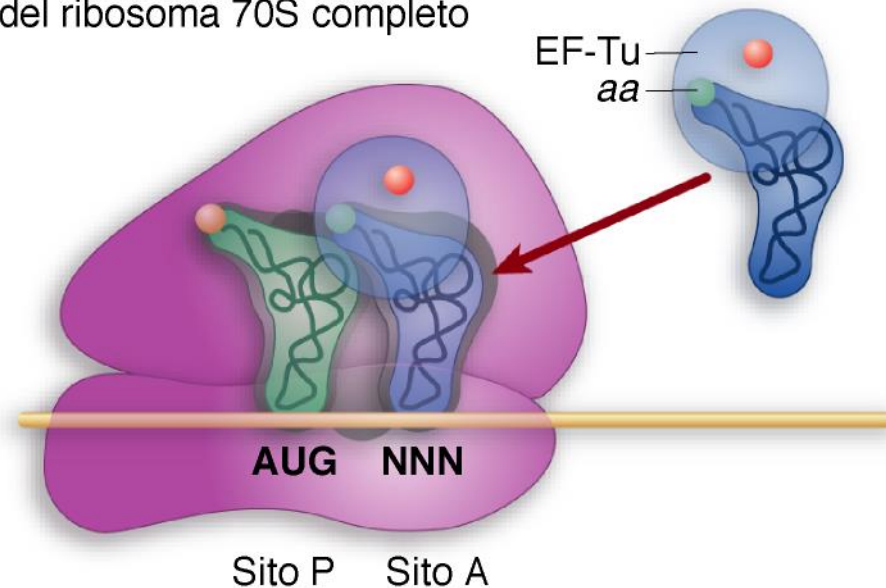


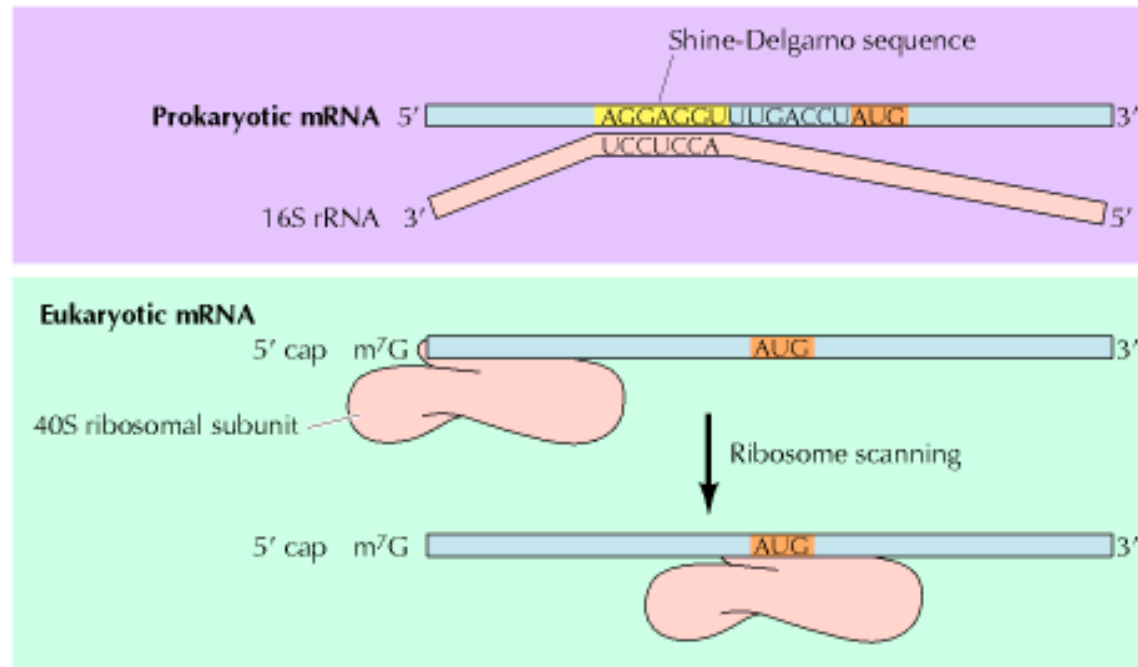
La subunità 30S è responsabile dell'inizio, il ribosoma dell'allungamento

Soltanto l'*fMet-tRNA_f* entra nel sito P parziale sulla subunità 30S legata all'mRNA



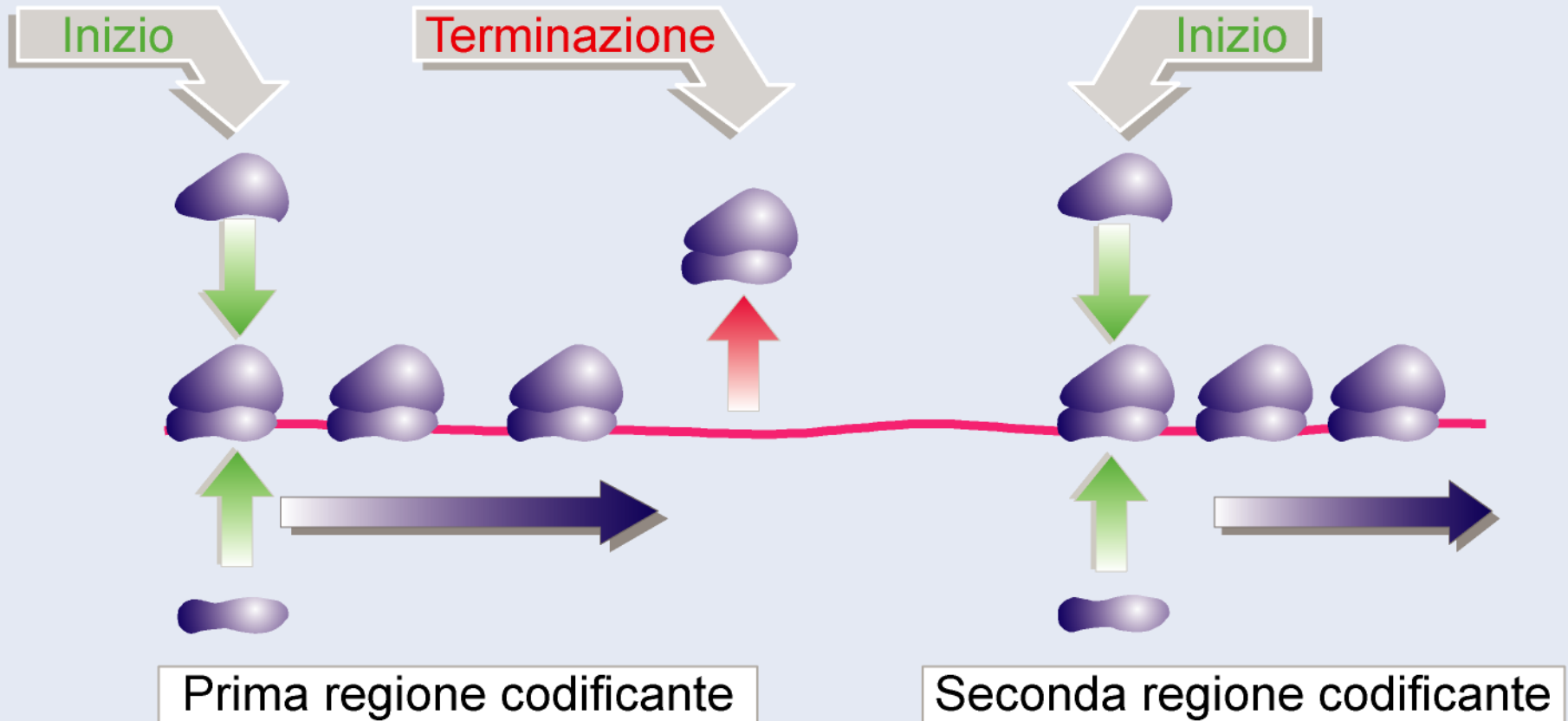
Soltanto un *aa-tRNA* entra nel sito A del ribosoma 70S completo

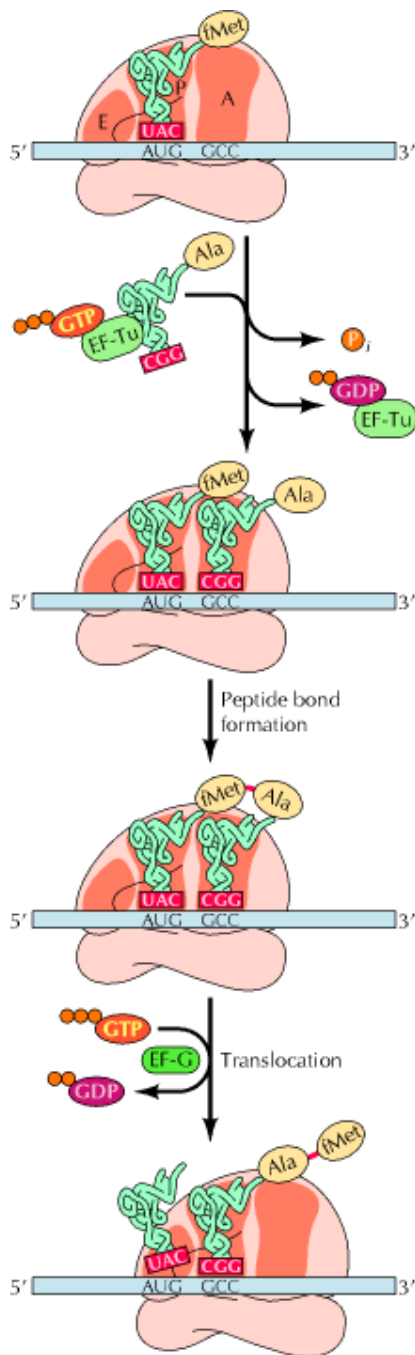




- **Segnali per l'inizio della traduzione.** Il sito di inizio degli mRNA **procariotici** è caratterizzato dalla sequenza di **Shine-Dalgarno** che precede il primo codone della ORF AUG.
- L'appaiamento di basi della Shine-Dalgarno con una sequenza complementare vicino al 3' terminale dell' rRNA 16S, allinea il mRNA sul ribosoma.
- Gli mRNA **eucariotici** invece sono legati dall'estremità 5' alla subunità ribosomiale 40S grazie al **cap di 7-metilguanossina**. Il ribosoma scansiona poi l' mRNA fino a che non incontra il primo codone AUG.

La traduzione di geni multipli su un mRNA inizia in modo indipendente





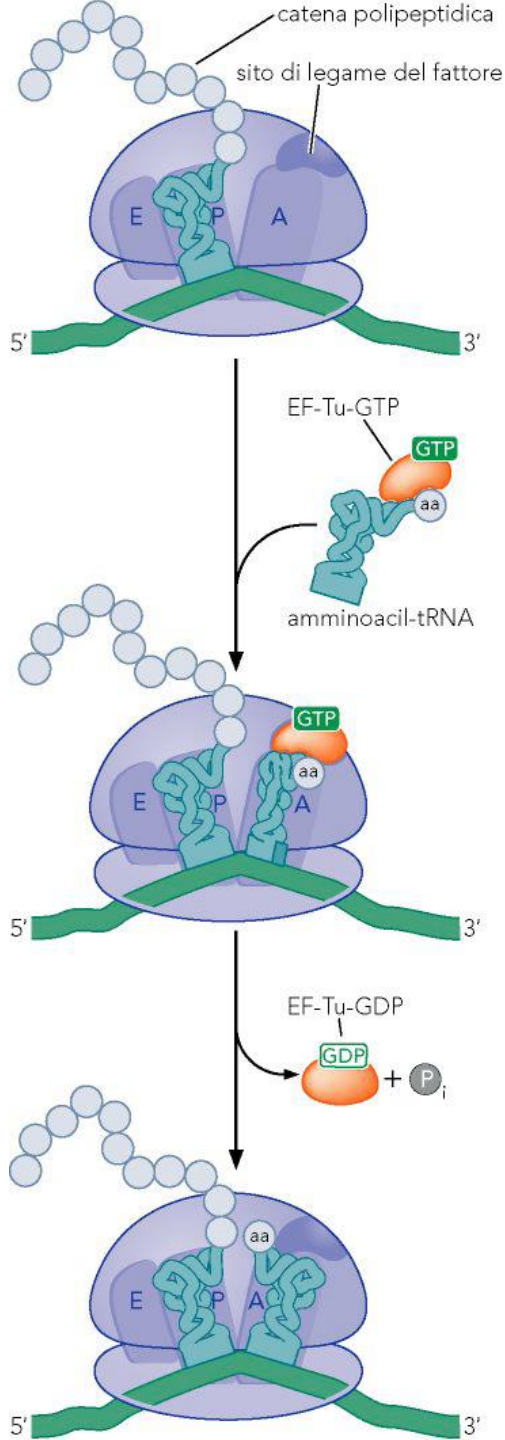
Allungamento nei procarioti

La fase di allungamento include tre eventi chiave:

- 1) l'inserimento del corretto tRNA carico nel sito A;
 - 2) formazione del legame peptidico tra l'amminoacido (sito A) e il peptide (sito P) ad opera della peptidiltransferasi;
 - 3) traslocazione del peptidil-tRNA dal sito A al sito P.
- Questo processo è coadiuvato da due fattori di allungamento e richiede energia fornita dall'idrolisi di GTP.

L'idrolisi del GTP coadiuva il completamento della traslocazione, in quanto EF-G-GDP ha un dominio che mima la struttura del tRNA e legandosi al sito A induce lo spostamento del peptidil-tRNA (associato all'mRNA) e del tRNA deacilato.

Il meccanismo di allungamento è estremamente conservato tra procarioti ed eucarioti.

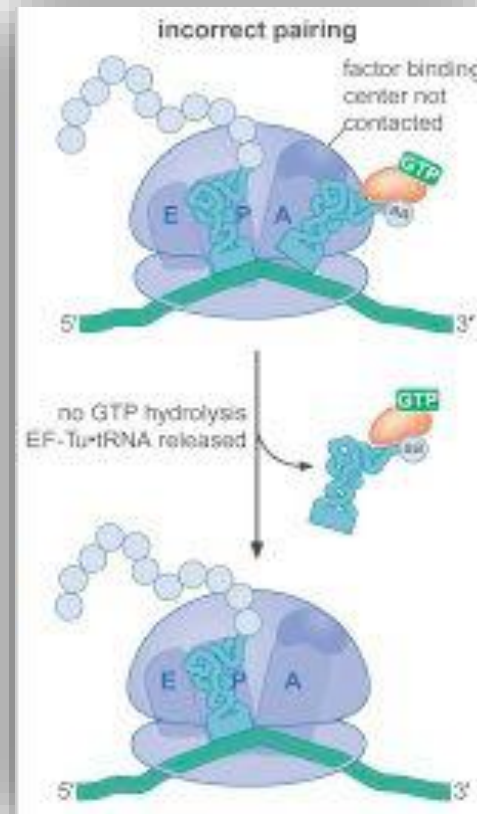


Gli aminoacil-tRNA possono legarsi al ribosoma solo se legati al fattore di allungamento EF-Tu-GTP.

Una volta che sia stato ottenuto il corretto appaiamento codone-anticodone si ha l'idrolisi di GTP, il distacco di EF-Tu-GDP, e può aver luogo la reazione peptidil-transferasica.

La fedeltà del processo di replicazione è molto elevata (10^{-3} e 10^{-4}) e utilizza diversi meccanismi:

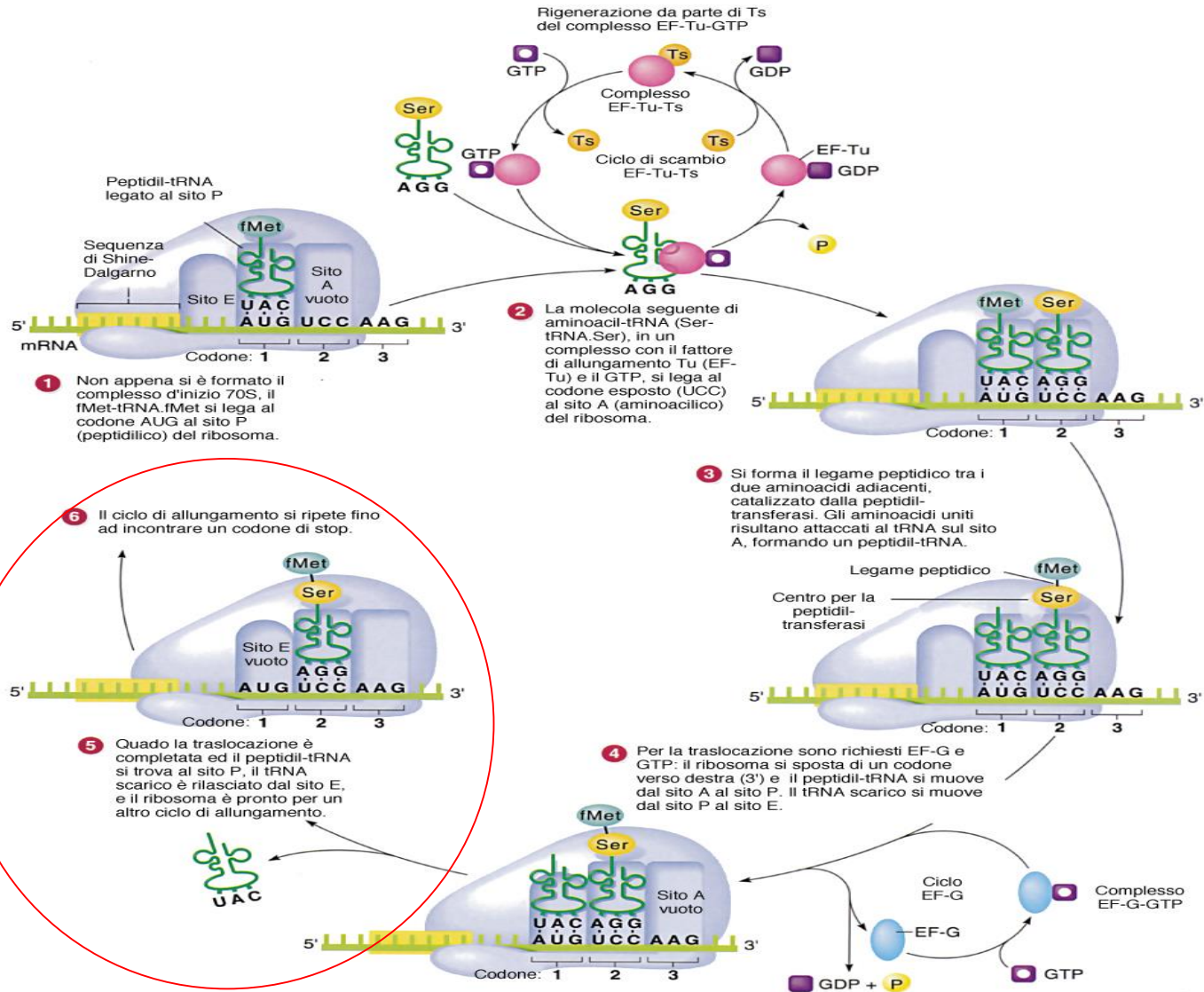
1) interazione tra l'rRNA16S e il solco minore dell'appaiamento codon-anticodone; 2) idrolisi di EF-Tu-GTP meno efficiente in caso di appaiamento errato; iii) rilascio di aminoacil-tRNA non correttamente accomodati nel sito A.

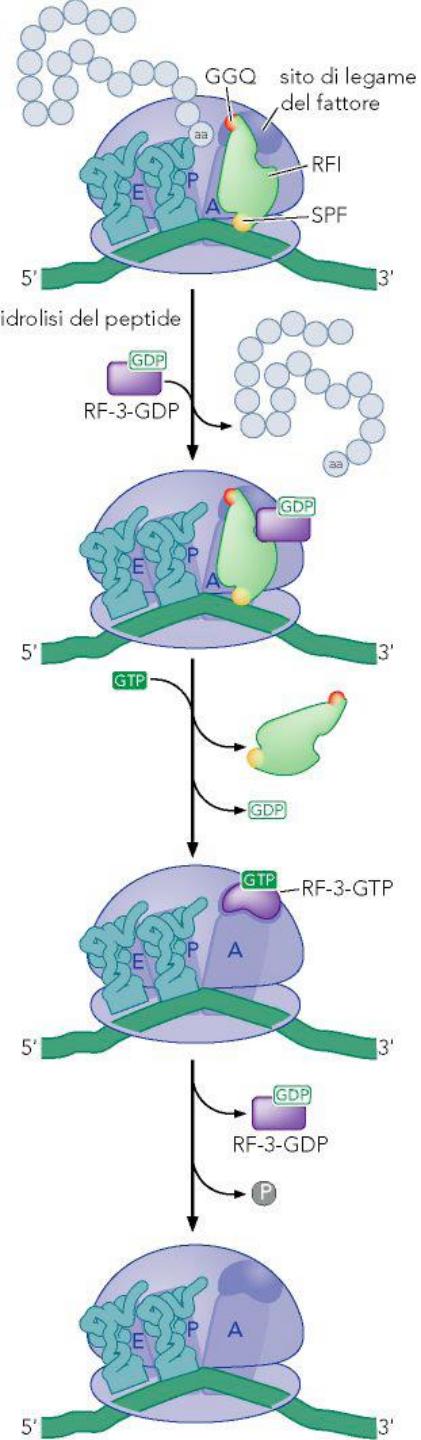


Il ciclo si ripete tante volte quanti sono gli aa che devono essere legati

Figura 6.15

Stadio di allungamento della traduzione nei procarioti.





TERMINAZIONE

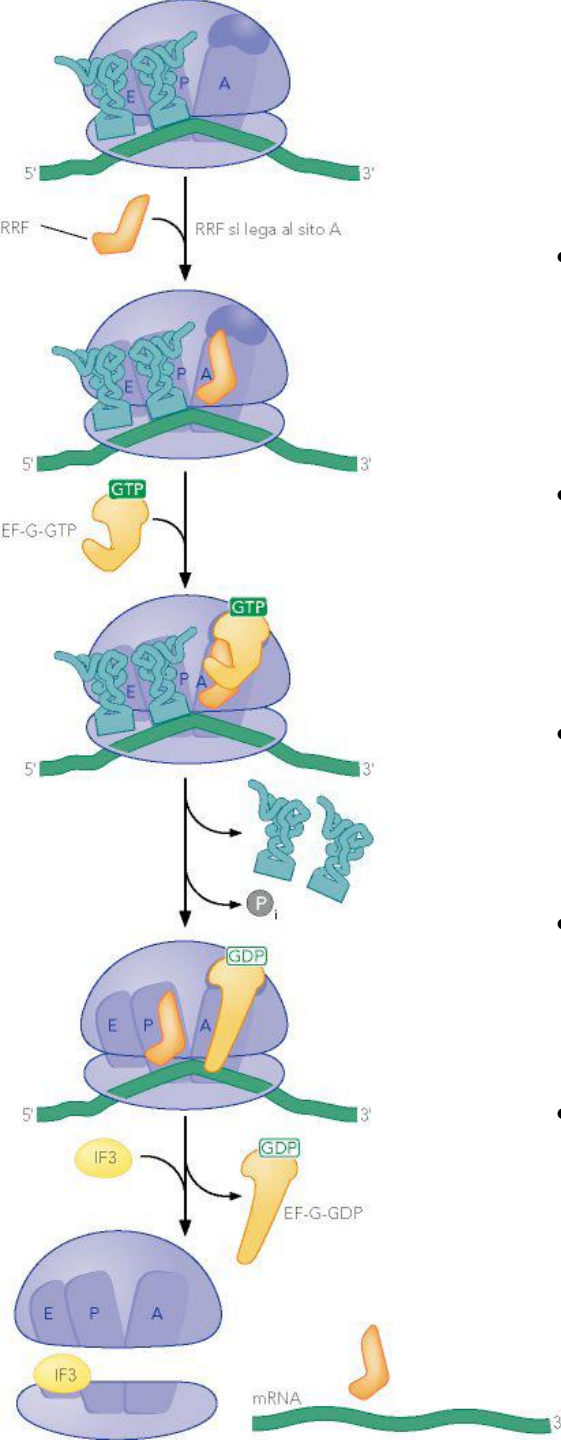
-Quando sul sito A si trova un codone di STOP, a cui non corrisponde nessun tRNA, la sintesi si arresta.

-Inoltre esistono fattori di rilascio che si legano al sito A impedendo comunque l'attacco dei tRNA.

-La catena polipeptidica si stacca dall'ultimo tRNA grazie ad un enzima (idrolasi) con consumo di una molecola di GTP.

-Le due subunità ribosomiali si disassemblano.

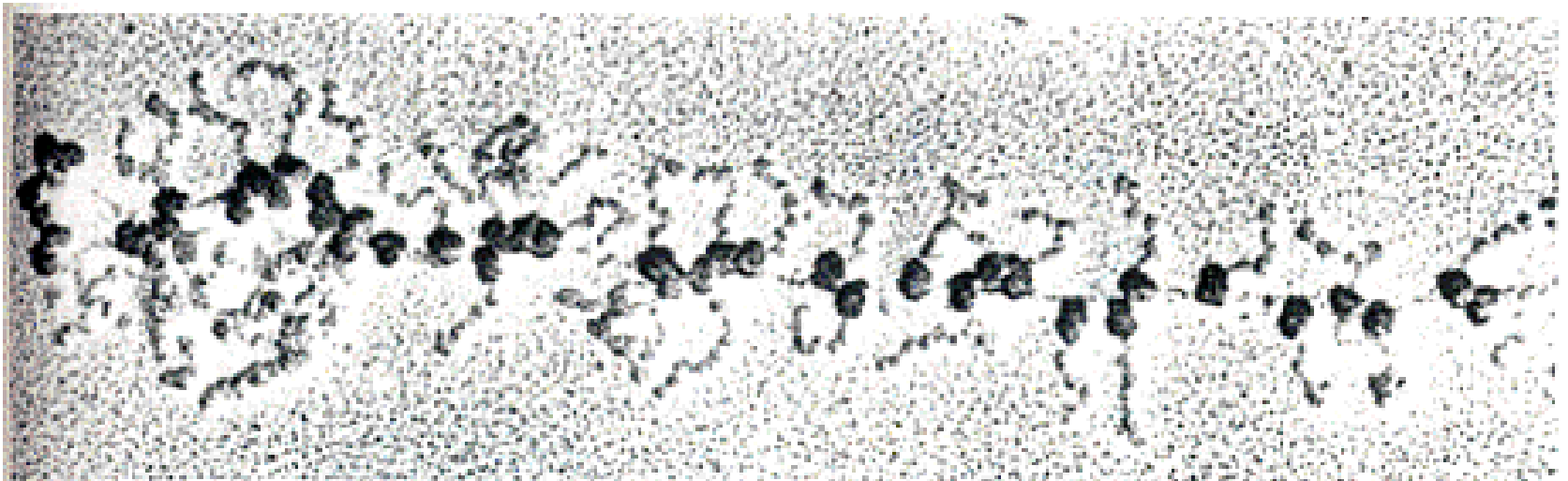
Dopo l'idrolisi del legame del peptidil-tRNA il fattore di rilascio di classe I viene rimosso dal ribosoma ad opera di un fattore di classe II (RF3 o eRF3). RF3-GDP si lega al ribosoma in presenza di RF1. Il rilascio idrolitico del peptide induce uno scambio GDP-GTP, con formazione di RF3-GTP che avendo maggiore affinità per il ribosoma produce il rilascio di RF1. Infine, l'idrolisi di GTP induce anche il rilascio di RF3-GDP.



- Perché il ribosoma possa essere utilizzato in un nuovo ciclo di traduzione si deve avere il rilascio dei 2 tRNA deacilati (nel sito P e nel sito E), il rilascio dell'mRNA e la dissociazione delle due subunità del ribosoma.
- Questo processo richiede l'intervento di un fattore di riciclaggio (**RRF, ribosome recycling factor**) che agisce insieme a EF-G e IF3 per completare il riciclaggio del ribosoma.
- RRF, assumendo una struttura 3D simile a quella di un tRNA, si lega al sito A nella regione della subunità maggiore del ribosoma.
- Il successivo legame di EF-G-GTP stimola il rilascio dei tRNA deacilati mediante l'idrolisi di GTP e la traslocazione di RF dal sito A al sito P.
- Infine, il legame di IF3 induce la dissociazione delle due subunità ribosomiali, di RRF e dell'mRNA.



- L'assenza di codoni di stop su mRNA tronchi o mutati potrebbe portare allo stallo dei ribosomi impegnati nella loro traduzione. In questo caso la dissociazione del ribosoma dall'mRNA è resa possibile dall'intervento di molecole chimeriche costituite in parte da tRNA ed in parte da mRNA (tmRNA) denominato RNA SsrA.
- L'RNA SsrA è una molecola di 457 nt che all'estremità 3' possiede una regione simile ad un tRNA_{Ala}. Tale somiglianza consente il caricamento di Ala e il legame di EF-Tu-GDP.
- Il tmRNA si sostituisce all'mRNA, nell'apposito canale nel ribosoma, e continua la traduzione fino a che non viene raggiunto un codone di stop sul tmRNA.
- La proteina tronca presenta all'estremità 10 Ala, e questa marcatura la indirizza all'immediata degradazione da parte di specifiche proteasi cellulari.



5 ribosomes
reading same RNA
sequentially

Growing
polypeptide
chains

Complete
polypeptide

(Initiator
codon)

AUG

5'

UAG

Stop codon

3' mRNA

30S

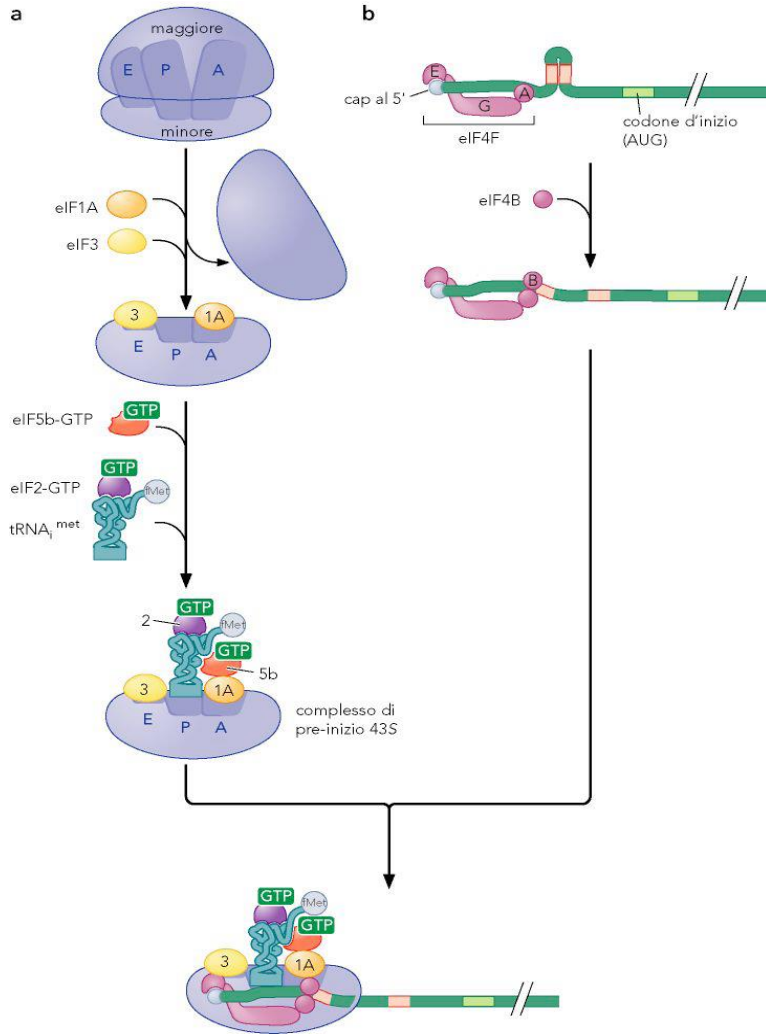
50S

tRNA

Ribosome movement



Traduzione negli eucarioti

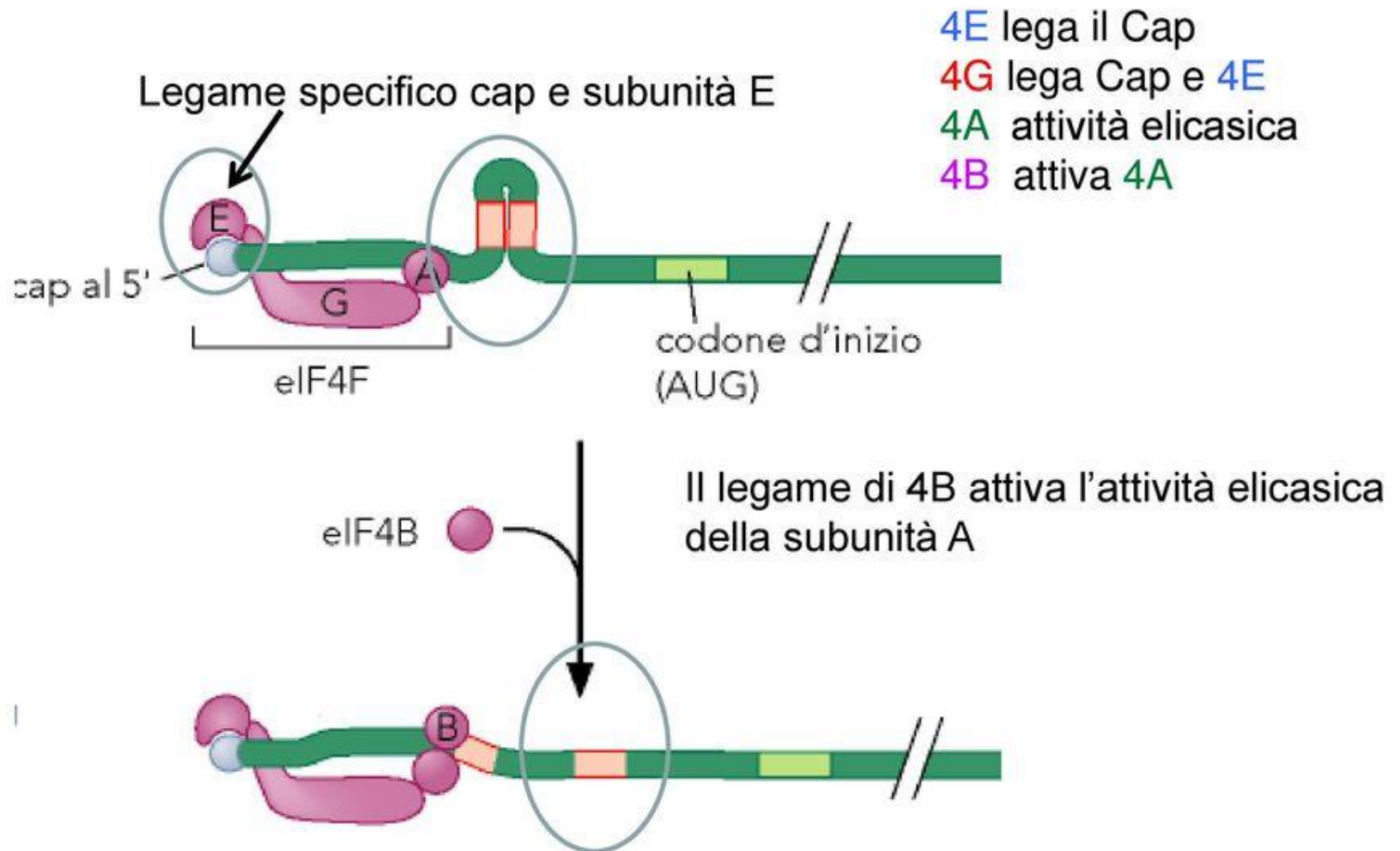


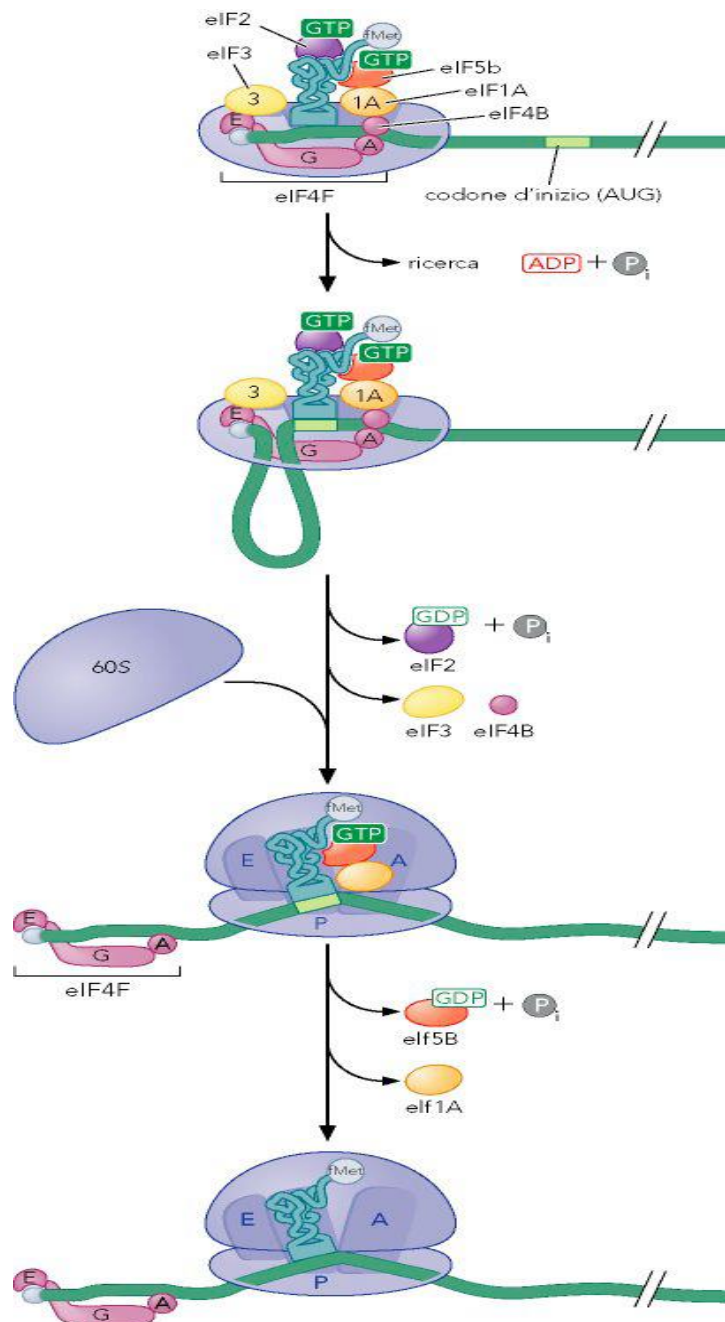
L'inizio della traduzione negli eucarioti adotta un meccanismo simile a quello dei procarioti. **Il cambiamento più rilevante riguarda la modalità di riconoscimento dell'mRNA e del codone iniziatore.**

La subunità minore si lega al cap e scorre lungo l'mRNA sino a quando non trova il codone iniziatore. Tale processo richiede molti fattori proteici (più di 30) compresi quelli già descritti nei procarioti. Il tRNA iniziatore, carico con **Metionina**, si lega alla subunità minore prima dell'mRNA. Il fattore eIF5B-GTP (analogo di IF2) media il corretto posizionamento del tRNA iniziatore nel sito P, formando il **complesso di preinizio 43S**.

Il complesso 43S si lega al cap dell'mRNA mediante l'interazione tra IF3 e eIF4F.

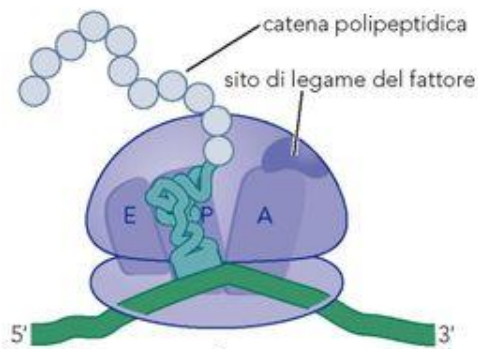
Il riconoscimento dell'mRNA in eucarioti è mediato dal fattore eIF4





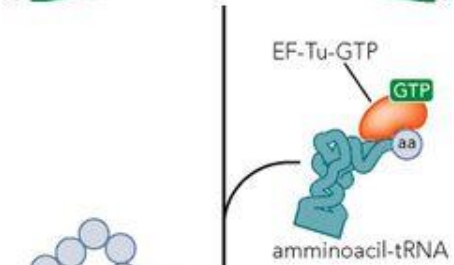
Lo scanning dell'mRNA, che utilizza l'energia fornita dall'idrolisi di ATP, termina quando il tRNA iniziatore si posiziona correttamente in corrispondenza del codone di inizio. Il corretto riconoscimento induce il distacco di eIF2 e eIF3, che permette l'associazione della subunità maggiore.

Il legame della subunità maggiore porta a sua volta al distacco dei rimanenti fattori di inizio (eIF5B e eIF1A) formando il complesso di pre-inizio 80S dove il Met-tRNA_{Met} è correttamente posizionato nel sito P, e il sito A è libero e può accogliere gli altri tRNA carichi per proseguire la traduzione.

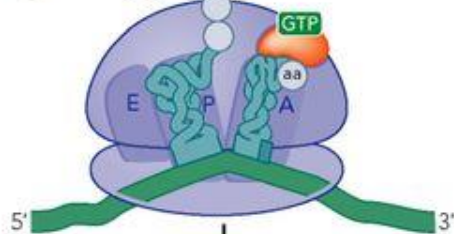


La fase di allungamento

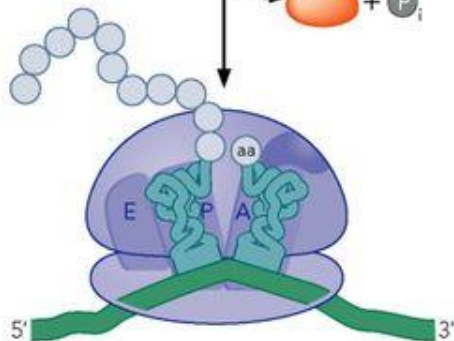
Il meccanismo di allungamento è estremamente conservato tra procarioti ed eucarioti.



1) l'inserimento del corretto tRNA carico nel sito A ad opera del fattore EF-Tu legato a GTP;



2) formazione del legame peptidico tra l'amminoacido (sito A) e il peptide (sito P) ad opera della **peptidiltransferasi**

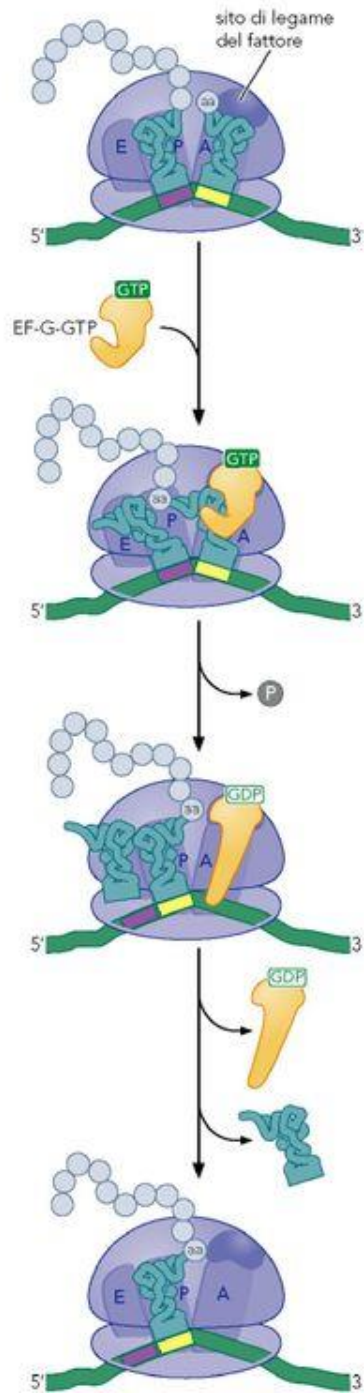


Si forma il legame peptidico

Traslocazione

Una volta formato un nuovo legame peptidico deve aver luogo la traslocazione nella quale:

- a) il tRNA deacilato deve spostarsi nel sito E
- b) il peptidil-tRNA deve spostarsi dal sito A al sito P
- c) l'mRNA deve spostarsi di tre nucleotidi per esporre il successivo codone.



Fattori di terminazione

procarioti

eucarioti

RF1
riconoscimento UAA,
UAG

eRF1
Riconoscimento UAA,
UAG e UGA

RF2
riconoscimento UGA,
UAA

RF3
GTPase

eRF3
GTPase

RRF
rilascio

Termine della traduzione

La traduzione termina quando uno dei tre codoni di stop entra nel sito A del ribosoma.

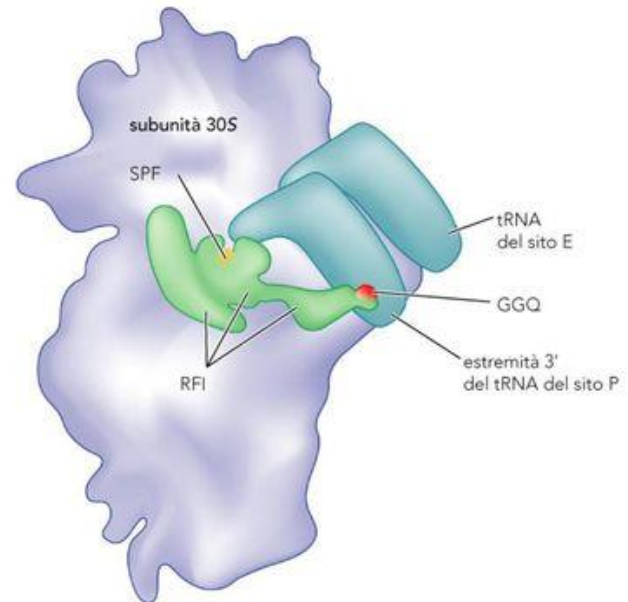
I codoni di stop vengono riconosciuti da proteine dette fattori di rilascio (RF, *releasing factors*) che determinano il rilascio della catena polipeptidica.

I fattori di classe I riconoscono i codoni di stop e innescano l'idrolisi della catena polipeptidica.

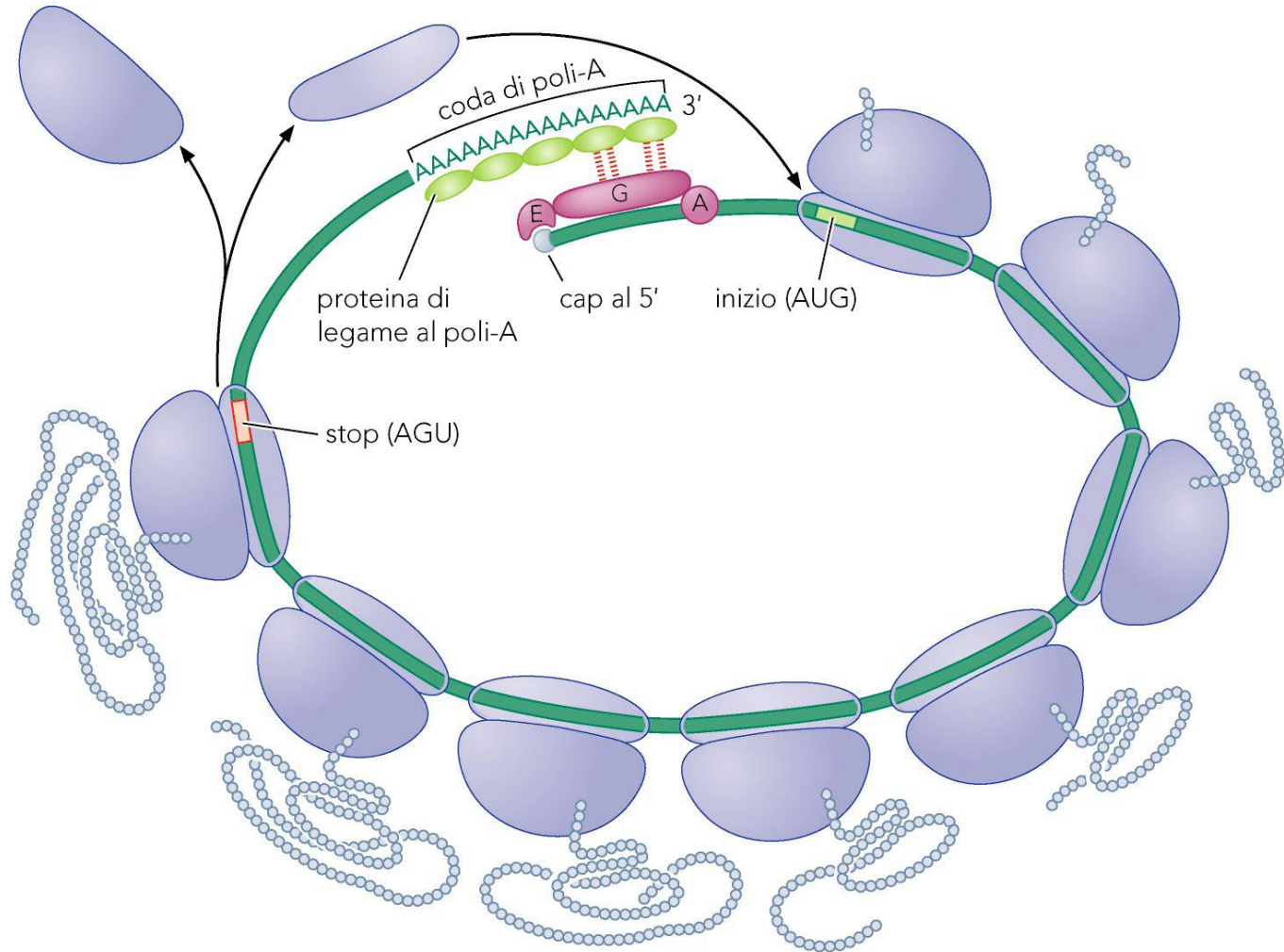
I fattori di classe II (regolati da GTP) stimolano la dissociazione dei fattori di classe I dal ribosoma.

Classe I Procarioti: RF1 (UAG, UAA), RF2 (UGA)
Eucarioti: eRF1 (UAG, UAA, UGA)

Classe II Procarioti: RF3
Eucarioti: eRF3



L'interazione tra la **polyA-binding protein** e i fattori di inizio mantiene l'mRNA in una conformazione circolare che aumenta l'efficienza della traduzione.



Procarioti

Inizio

IF-1, IF-2, IF-3

Allungamento EF-Tu, EF-Ts, EF-G

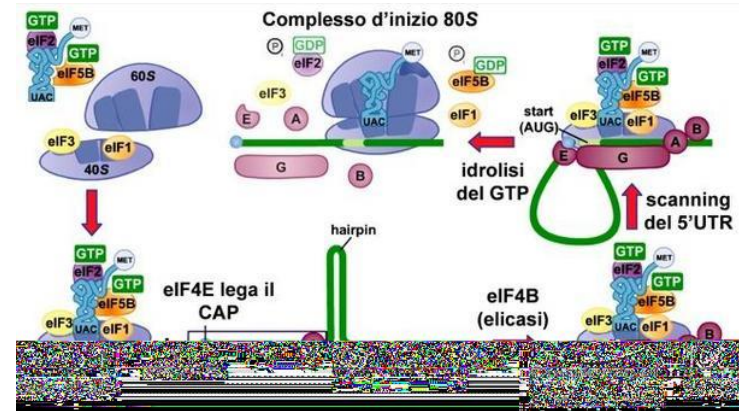
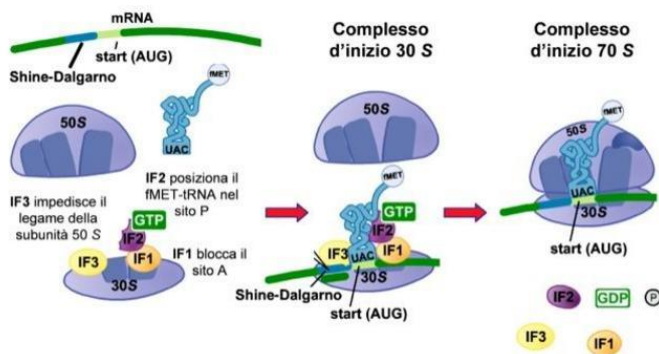
Terminazione RF-1, RF-2, RF-3

Eucarioti

eIF-1, eIF-1A, eIF-2,
eIF-2B, eIF-3, eIF-4A,
eIF-4B, eIF-4E, eIF-4G,
eIF-5

eEF-1 α , eEF-1 $\beta\gamma$, eEF-2

eRF-1, eRF-3



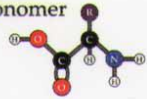
Principali differenze tra procarioti ed eucarioti

- 1) Fase di inizio regolata da una decina di fattori
- 2) Aminoacido iniziatore è la Met (e non la f-Met). **Esistono due Met-tRNA diversi: uno che riconosce il codone di inizio e l'altro che riconosce i codoni successivi**
- 3) Non c'è una Sequenza Shine-Dalgarno: la subunità minore del ribosoma dopo aver riconosciuto il 5'cap, inizia uno scanning della molecola di mRNA fino ad incontrare l'AUG (dopo in media 100 nt dall'inizio)
- 4) Mancando la sequenza Shine-Dalgarno, a livello degli mRNA eucariotici l'AUG viene individuato poiché all'interno di una sequenza (GCCGCCA/GCCAUGG) detta di **Kozak**
- 5) Gli mRNA eucariotici sono **monocistronici**, mentre quelli dei procarioti **policistronici**
- 6) I Fattori di rilascio sono 3 nei Procarioti contro 1 (eRF3) degli Eucarioti

La conoscenza approfondita delle differenze dei processi molecolari coinvolti nella traduzione dei procarioti ed eucariotici ha portato alla produzione di molecole antibiotiche quanto più selettive possibile e pertanto meno tossiche per le cellule eucariotiche! (Es: Antibiotici Eritromicina e Streptomicina)

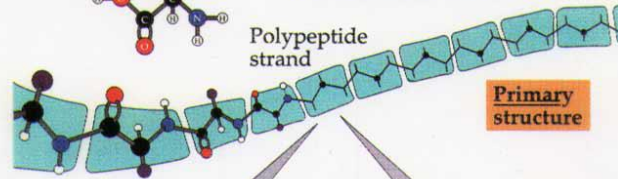
The Four Levels of Protein Structure

The amino acid monomer



 represents the side chain of the amino acid and is different on each of the 20 amino acids.

Polypeptide strand

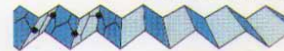


Primary structure

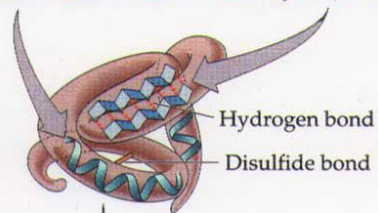
α Helix



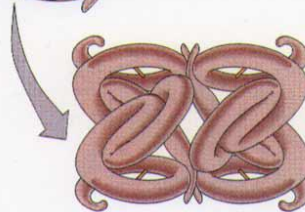
β -Pleated sheet



Secondary structure



Tertiary structure



Quaternary structure

Proteins Fold as They are Translated on the Ribosome

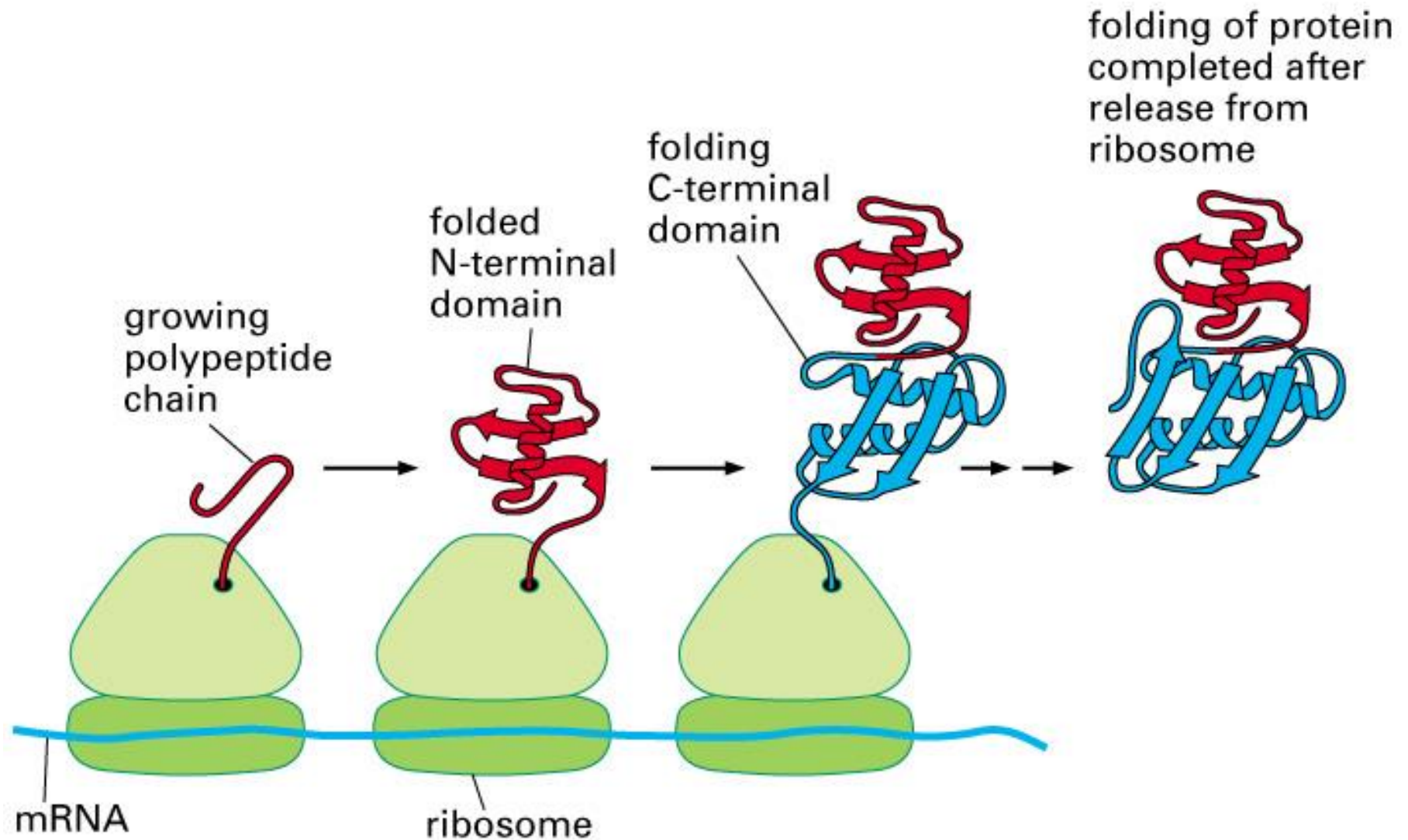
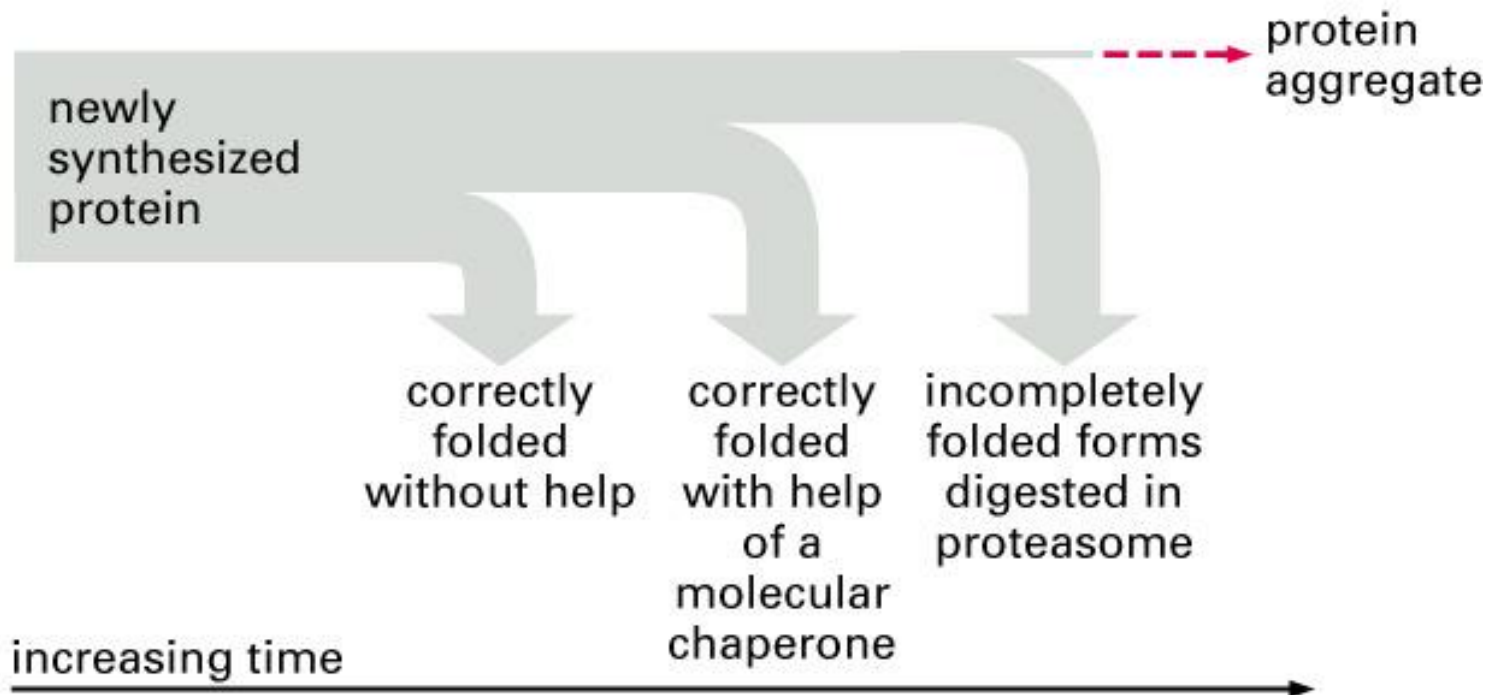
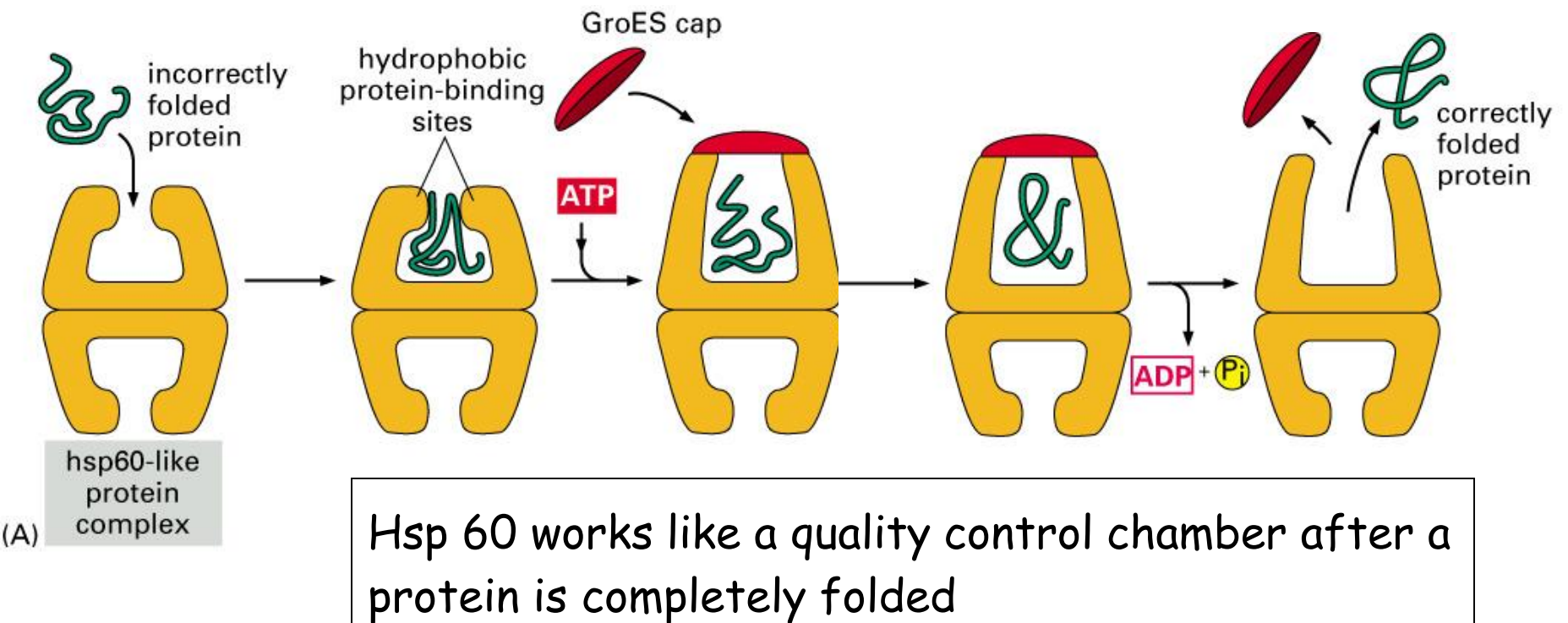
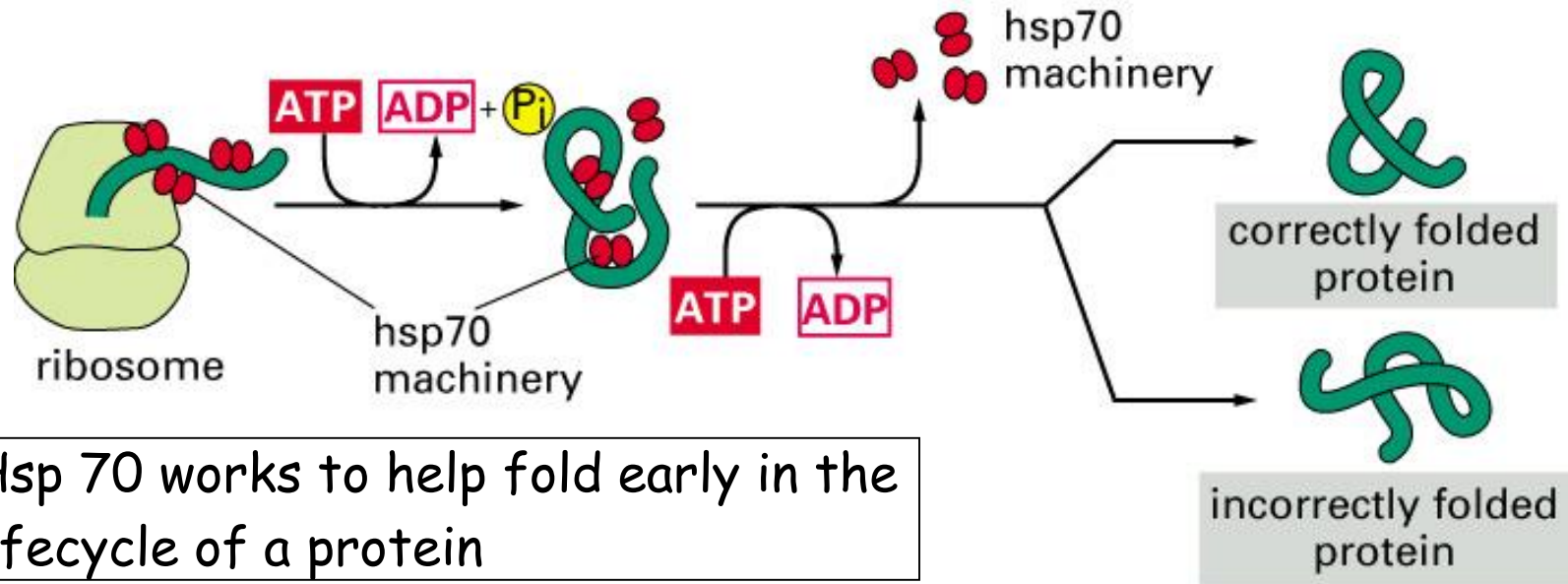
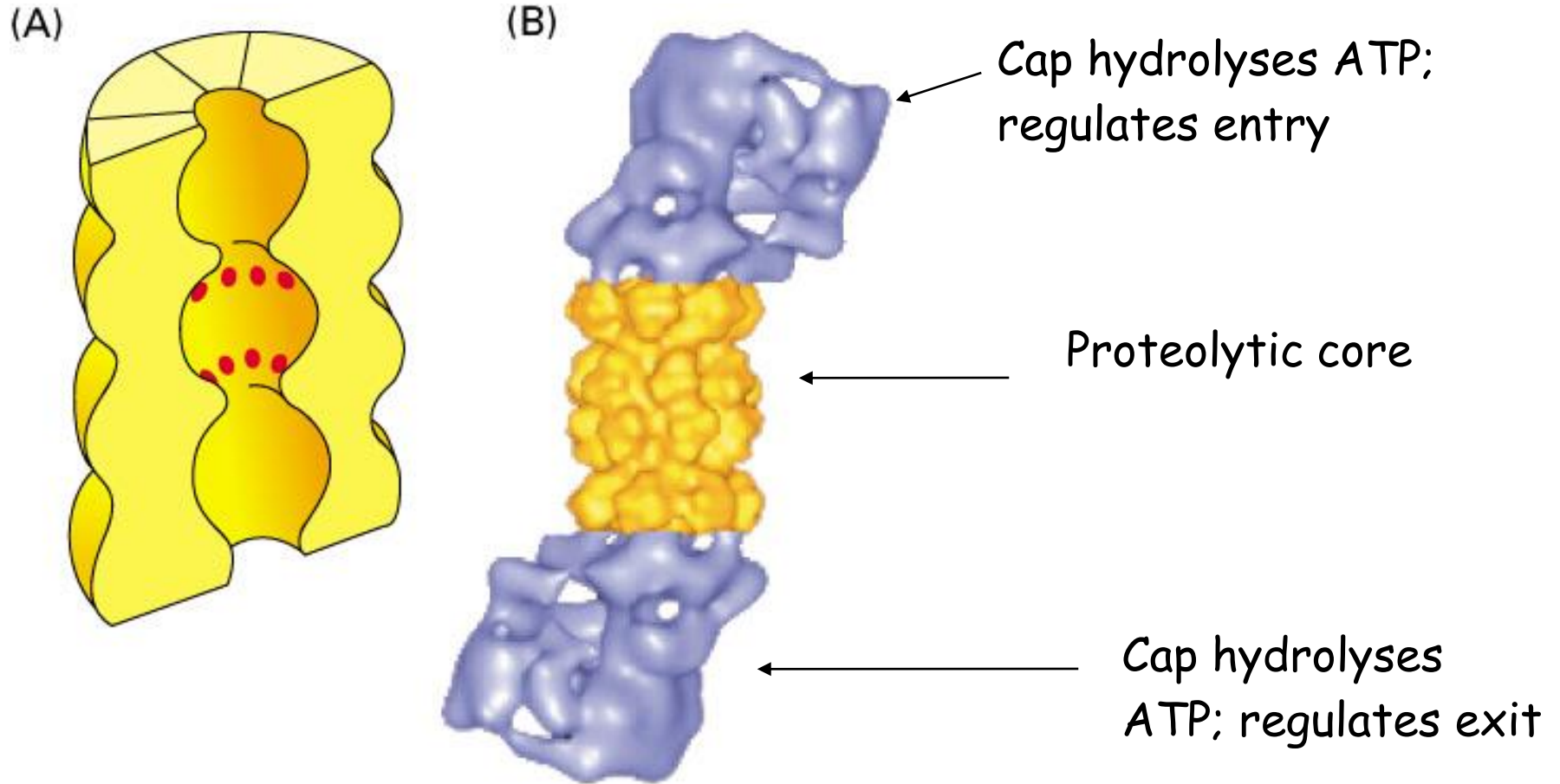


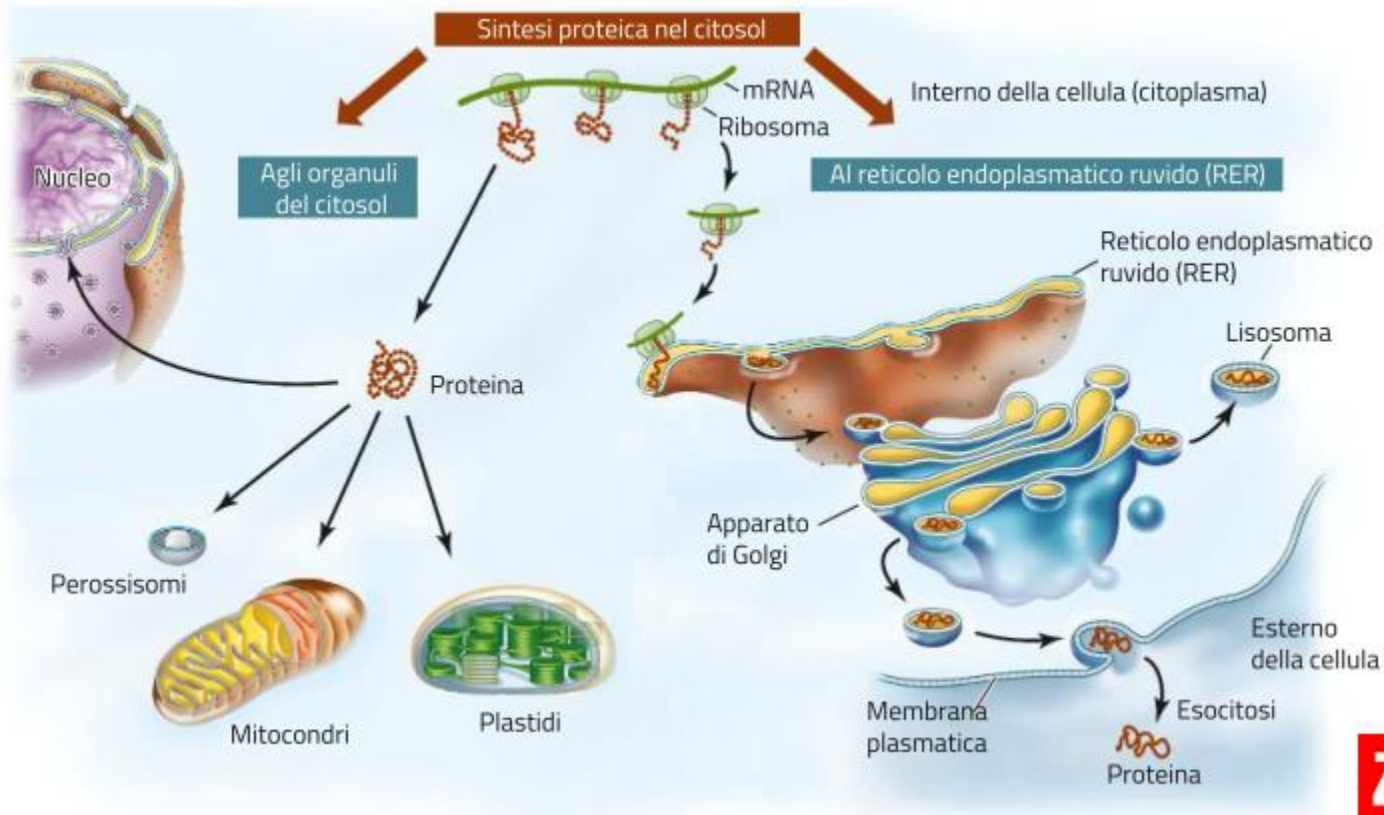
Figure 6-81. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



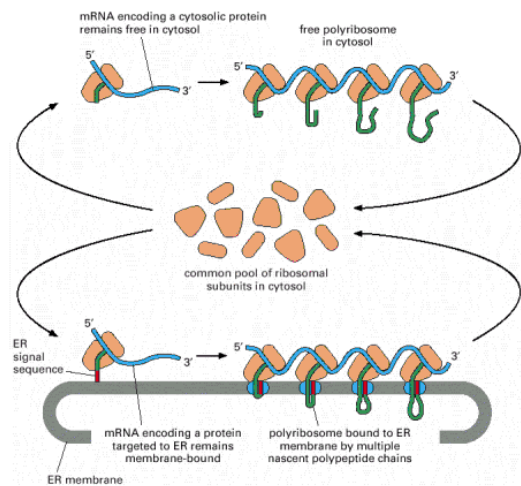




Proteasomes are a major mechanism by which cells regulate the concentration of particular proteins and degrade misfolded proteins.

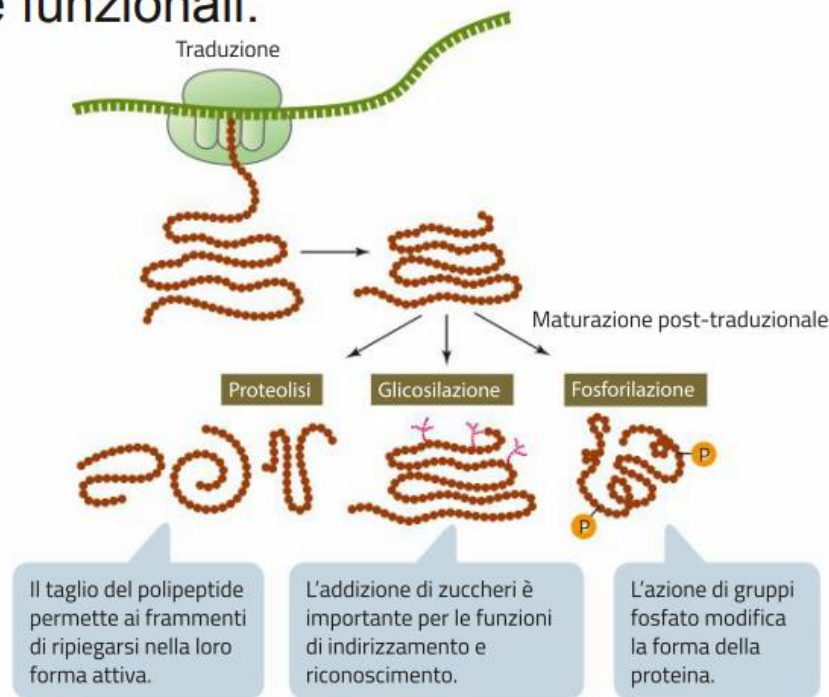


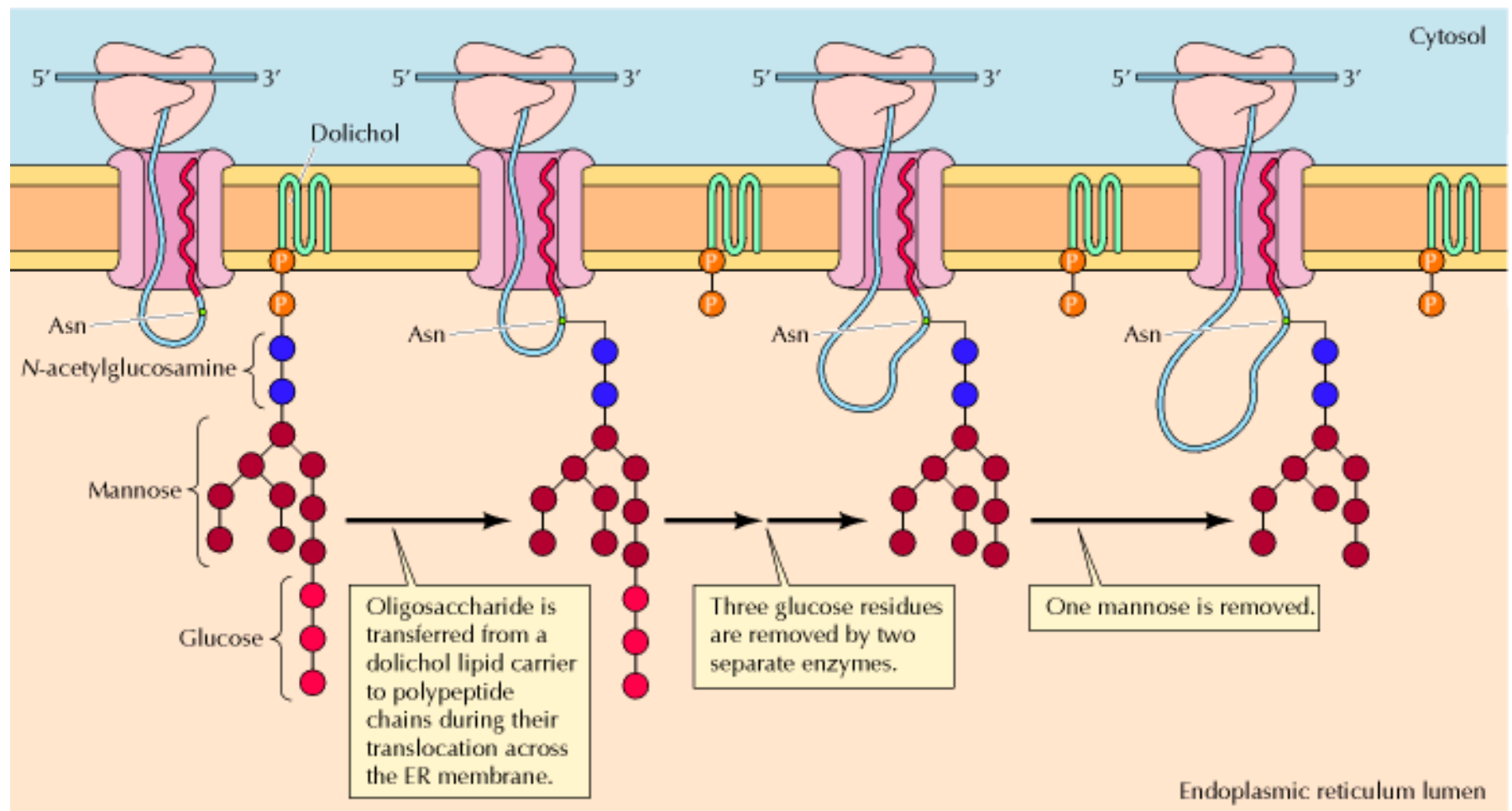
ZANICHELLI



Alcuni esempi di modifiche co- e post-traduzionali di proteine

La maggioranza dei polipeptidi devono essere modificati dopo la traduzione per poter diventare proteine funzionali.





Protein N-glycosylation in the endoplasmic reticulum.

From eukaryotic gene to its protein product

