

Modulo 7

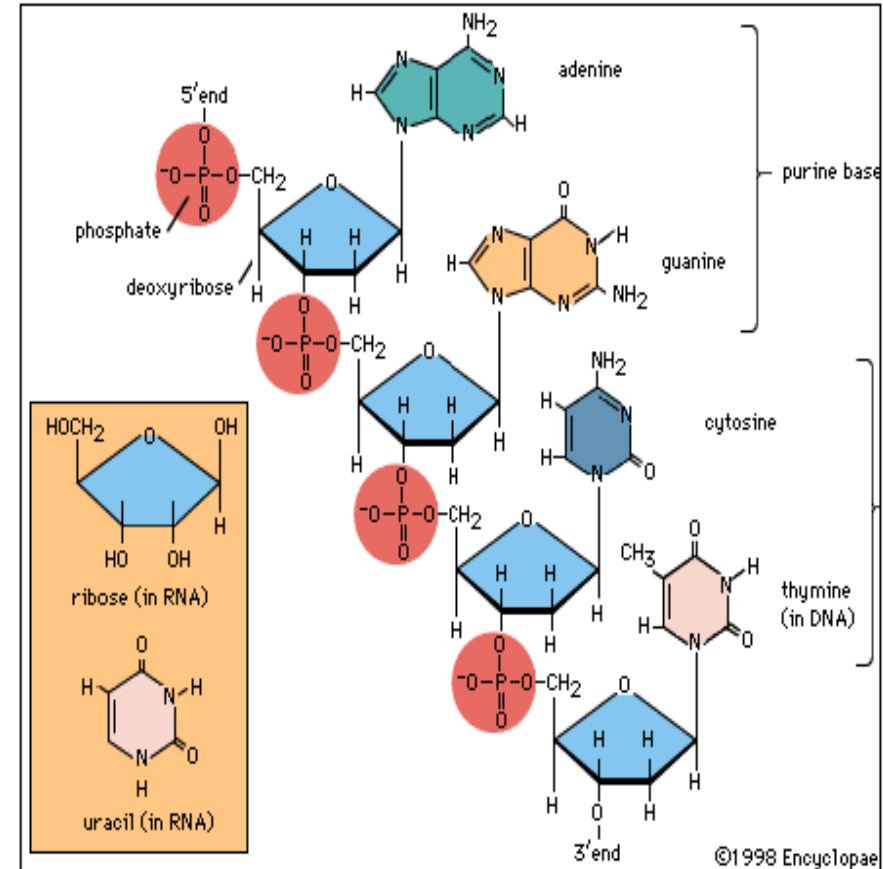
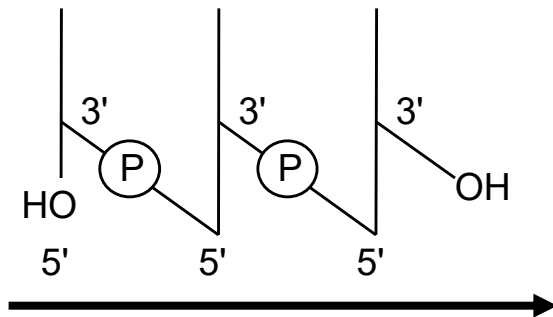
Gli Acidi Nucleici

2024-25

DNA e RNA: struttura 1ª

► DNA/RNA – struttura 1°

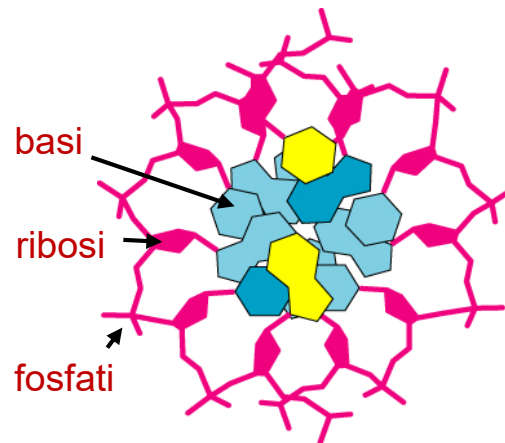
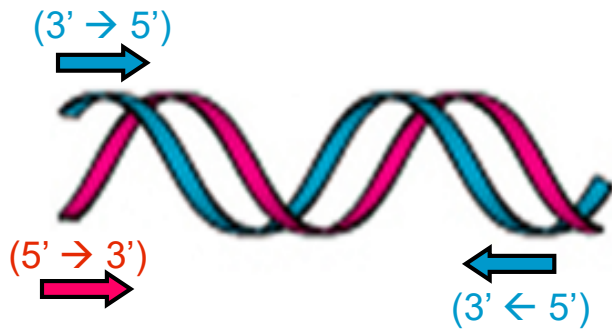
- sequenza di residui (**nucleotidi**) composti da **basi azotate** (pirimidine o purine) **legate al *D*-ribosio (RNA) o al desossiribosio (DNA)** connessi da legami 3',5'-fosfodiesteri



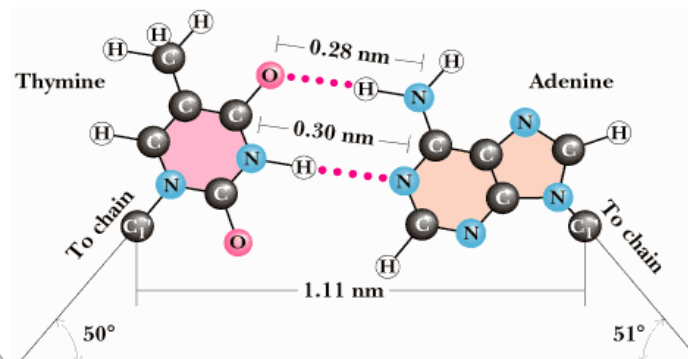
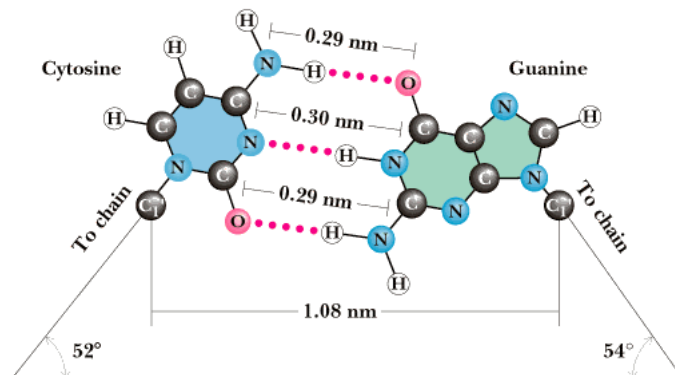
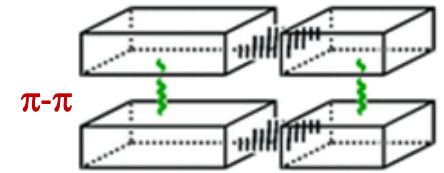
- le catene polinucleotidiche **hanno una direzione** - per convenzione va dal carbonio 5' del ribosio al carbonio 3' (**5' → 3'**)

DNA : struttura 2^a

- La struttura 2° è una doppia elica destrorsa con le due catene orientate in modo antiparallelo con asse comune
- il piano delle basi è perpendicolare all'asse – i ribosi e gruppi fosfato sono esterni, e le basi interne all'elica.
- le basi interagiscono in maniera SPECIFICA (G:C e A:T; appaiamento WC) mediante legami-H (questa specificità determina i processi di replicazione/traduzione) assieme ad interazioni idrofobiche e interazione π - π .



legami-H, idrofobici

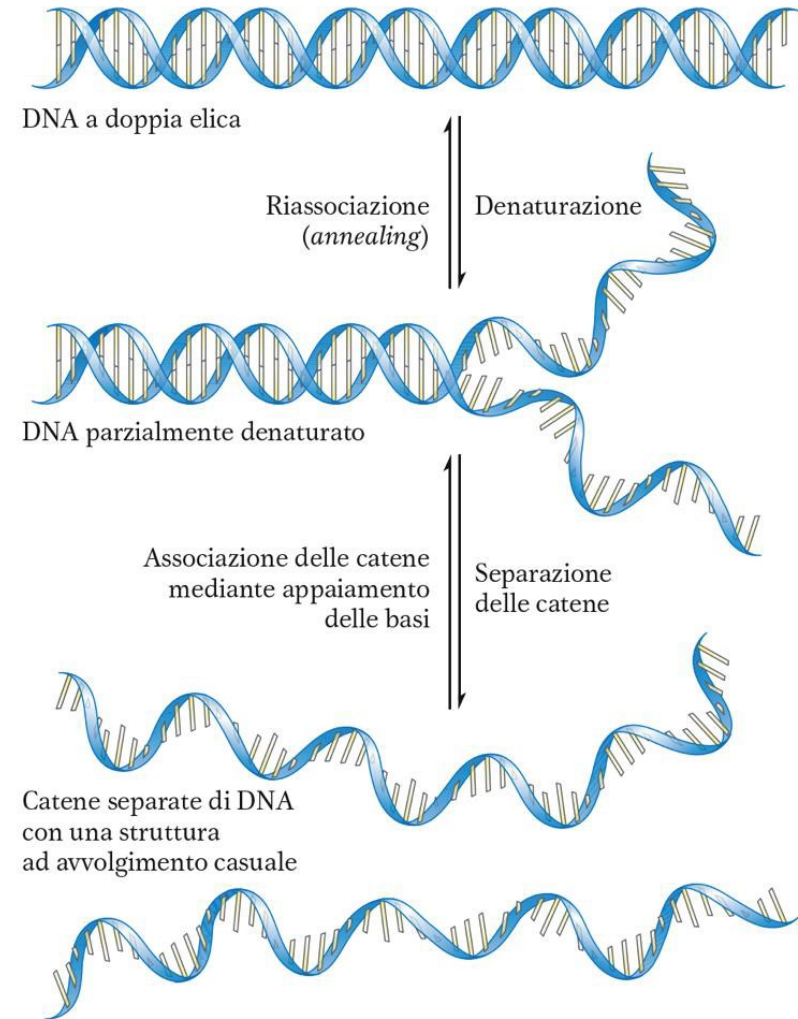
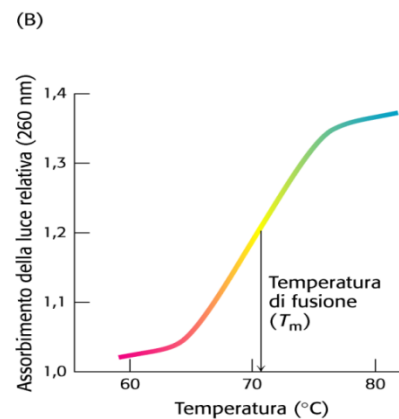
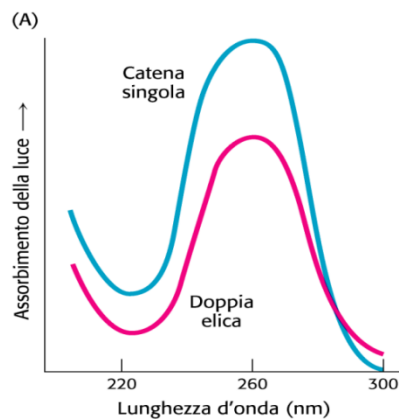


appaiamento di basi
secondo Watson-Crick

DNA : struttura 2^a (cont.)

► Il *folding* del DNA in doppia elica è un processo cooperativo e reversibile

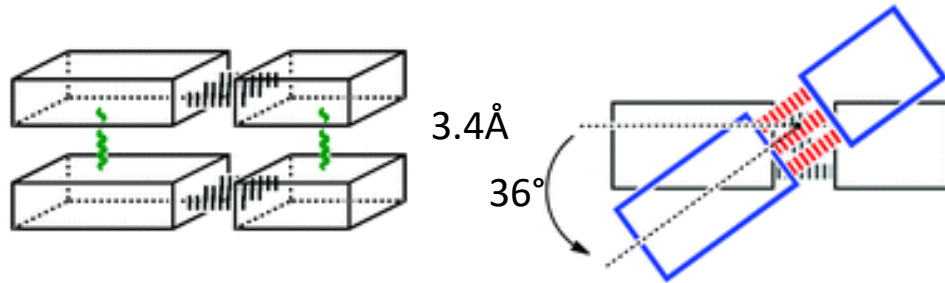
- la **rottura dei legami-H** tra le paia di basi permette la **denaturazione** del DNA e avviene per aumento di temperatura (non fisiologico) o per un processo enzimatico (fisiologico)
- le basi nel DNA denaturato (**ssDNA**) assorbono la luce più intensamente che nel dsDNA (**effetto ipercromico**) e questo può essere utilizzato per seguire la denaturazione
- La temperatura al punto medio di della fusione è nota *melting temp temperature* (T_M).



DNA : struttura 2ª (cont.)

► La doppia elica destrorsa ha una struttura dinamica

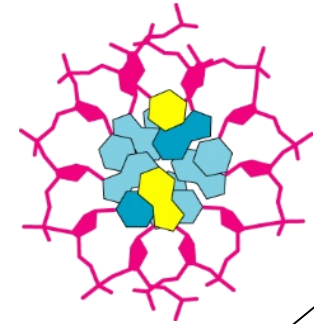
- la configurazione più comune (B-DNA) ha una doppia elica con diametro $\sim 20\text{\AA}$ e le basi sono impilate a $\sim 3.4\text{\AA}$ di distanza, con torsione (base-pair twist) di 36° , 1 giro/10 res.



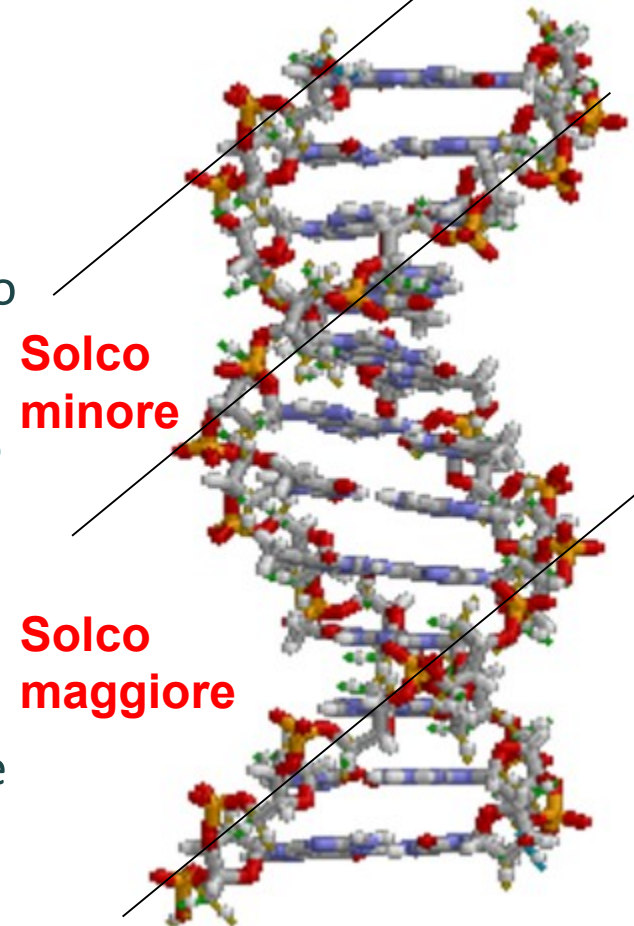
- la struttura è dinamica e cambia configurazione a seconda delle condizioni (A-DNA è più tozza, Z-DNA è sinistrogira)

► la doppia elica presenta due scanalature avvolte attorno all'asse (i solchi)

- il **solco maggiore** e il **solco minore** sono foderati dagli atomi sui lati esterni delle basi
- questo permette **interazioni non covalenti** con le proteine che legano al DNA e che possono **riconoscere specifiche sequenze di basi**



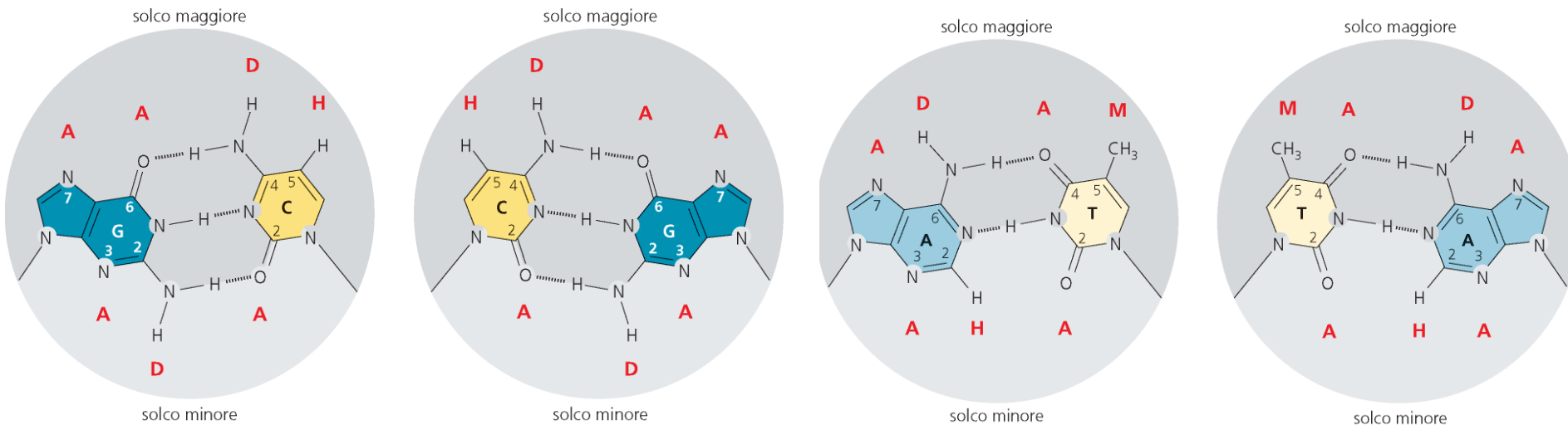
B - DNA



DNA : i solchi

► Caratteristiche dei solchi maggiore e minore

- gli angoli che si formano tra i legami glicosidici della coppia di basi con le rispettive unità di ribosio sono di circa 120° (formerà il solco minore) sull'altro lato (240°) si formerà il solco maggiore
- i lati delle basi che si affacciano nei solchi maggiore e minore creano un sistema di donatori ed accettori di idrogeno e superfici di van der Waals
- molte proteine che legano al DNA sono in grado di riconoscere specifici pattern di questi donatori/accettori e agiscono in prossimità di quelle sequenze



A: accettore legame H D: donatore legame H M: gruppo metilico H: idrogeno non polare

DNA : il codice genetico

► L'appaiamento di basi Watson-Crick e il codice genetico

- una sequenza di basi determina quale residuo amminoacidico è codificato
- ci sono **20 AA** ma solo **4 basi**; un codice genetico basato su singole basi codificherebbe per solo **4 AA**, e se basato su doppiette di basi solo per **16 AA**
- Il codice genetico si basa quindi su **triplette di basi** (noti come **codoni**) che permette $4^3 = 64$ **diversi codoni**; c'è **ridondanza** nel codice genetico.
- Il codice genetico è **universale** e cambia di pochissimo nei diversi organismi; solo i mitocondri hanno un codice lievemente diverso.

1ª base (5')		2ª base		3ª base (3')
	U	C	A	G
	Phe	Ser	Tyr	Cys
U	Phe	Ser	Tyr	Cys
	Leu	Ser	Stop	Stop
	Leu	Ser	Stop	Trp
	Leu	Pro	His	Arg
C	Leu	Pro	His	Arg
	Leu	Pro	Gln	Arg
	Leu	Pro	Gln	Arg
	Ile	Thr	Asn	Ser
A	Ile	Thr	Asn	Ser
	Ile	Thr	Lys	Arg
	Met	Thr	Lys	Arg
	Val	Ala	Asp	Gly
G	Val	Ala	Asp	Gly
	Val	Ala	Glu	Gly
	Val	Ala	Glu	Gly

Esempi:

UUU o UUC = codoni per Phe

UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC = codoni per Ser

AUG = codone per Met ma per START

UAA,UAG,UGA = codoni STOP

Ridondanza: 3° posiz. > 1° posiz. Mai in 2°

6 codoni per L,R,S 4 codoni per V, P, T, A, G

3 codoni per I e Stop 1 codone per Start/M, W

2 codoni per F,Y,N,K,D,E,Q,C

DNA : leggere il codice genetico

- I codoni di start e stop definiscono la sequenza di un gene - la *cornice di lettura* (*reading frame*)

GUCGCCCCAUGGGGCGUGAUUAUACAGCCCGCUUAACGCCAU

Val Ala ProTrp --- --- ---

Ser Pro His

Arg Pro Met Gly Arg Asp Ile Gln Pro Gly Stop

1ª base (5')	2ª base			3ª base (3')
	U	C	A	G
	Phe	Ser	Tyr	Cys
U	Phe	Ser	Tyr	Cys
	Leu	Ser	Stop	Stop
	Leu	Ser	Stop	Trp
	Leu	Pro	His	Arg
C	Leu	Pro	His	Arg
	Leu	Pro	Gln	Arg
	Leu	Pro	Gln	Arg
	Ile	Thr	Asn	Ser
A	Ile	Thr	Asn	Ser
	Ile	Thr	Lys	Arg
	Met	Thr	Lys	Arg
	Val	Ala	Asp	Gly
G	Val	Ala	Asp	Gly
	Val	Ala	Glu	Gly
	Val	Ala	Glu	Gly

- mutazioni nella sequenza del gene (variazione genotipica) possono avere, o non avere un'effetto sulla sequenza proteica (effetto fenotipico)

GUCGCCCCAUGGGUCGUGAUUAGACAGCCCGCUUAACGCCAU

Met **Gly** Arg Asp **Arg** Gln Pro Gly Stop

Mutazioni puntiformi
sinonima / non sinonima
(missense)

GUCGCCCCAUGGGGCGUGAUUAUAUAGCCCGCUUAACGCCAU

Met Gly Arg Asp Ile **Stop**

stop prematuro
(nonsense)

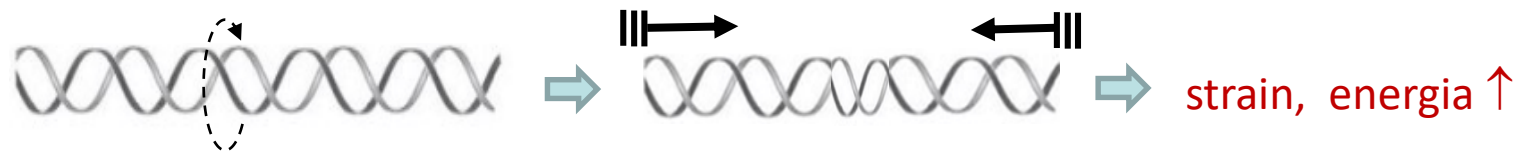
GUCGCCCCAUGGGGGUGAUUAUACAGCCCGCUUAACGCCAU

Met Gly Val Ile Cys Ser Pro Leu Asn Ala.....

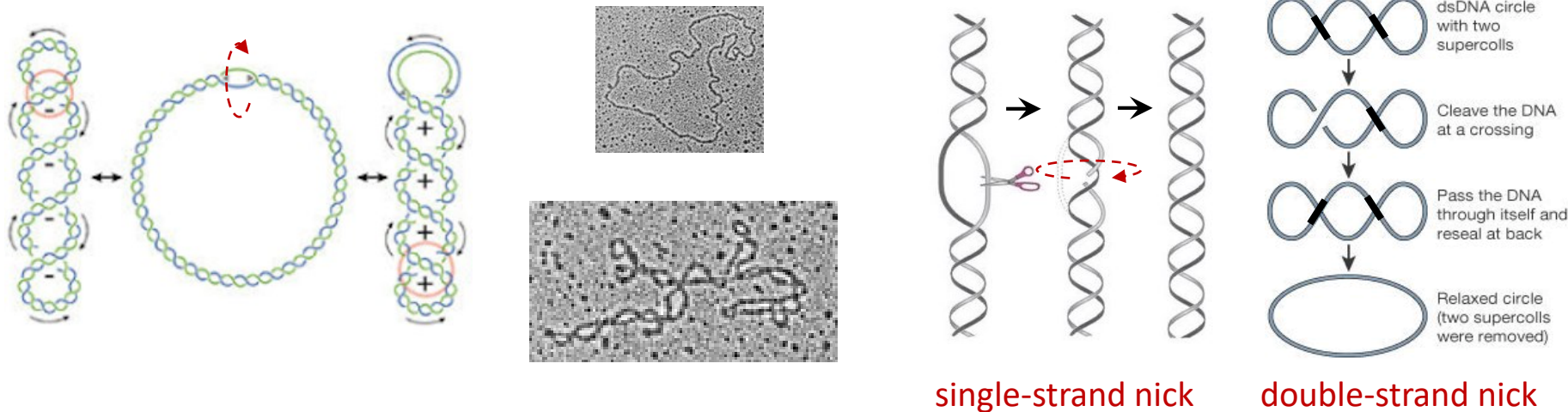
inserzione/delezione
slitta la cornice di lettura

► La doppia elica può adottare strutture a più alto livello

- Se le molecole di DNA sono molto lunghe, o sono circolari (es. cromosomi procariotici, plasmidi), questo impedisce il disavvolgimento/avvolgimento locale della doppia elica



- se sovra- o sotto-avvolte (normale ≈ 10 res./giro) ciò causa **strain** che viene ridotto formando strutture topologiche superiori (**super-avvolte**), ma questo altera interazioni con altre molecole
- Il **super-avvolgimento** può essere **negativo** e **positivo** (dipende dal senso d'avvolgimento)



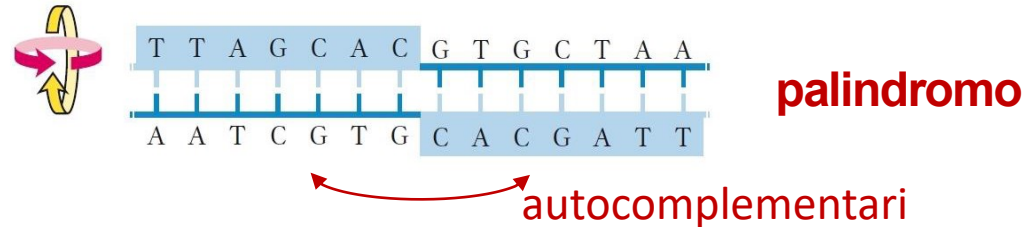
- Specifici enzimi, le **topoisomerasi** possono variare il grado di super-avvolgimento effettuando tagli transienti a livello di uno o di entrambe i filamenti di DNA, permettendoli di rilassare.

DNA : struttura 3^a

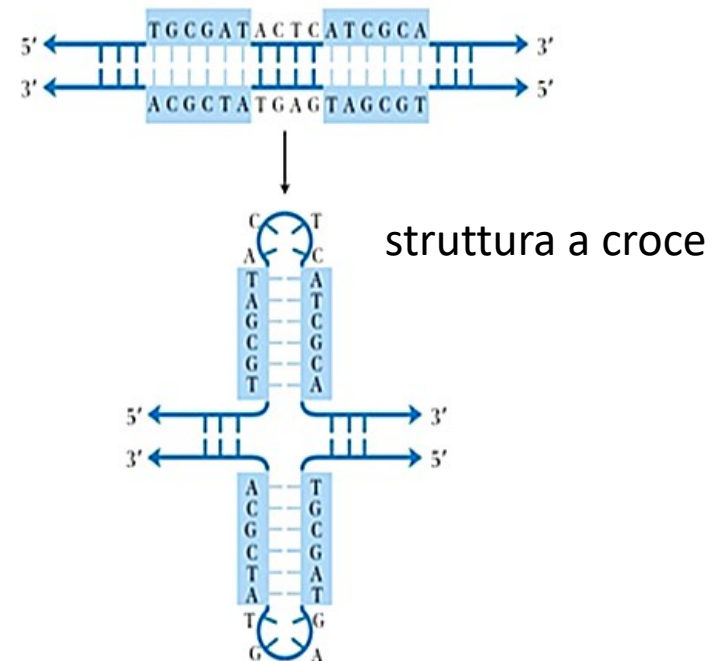
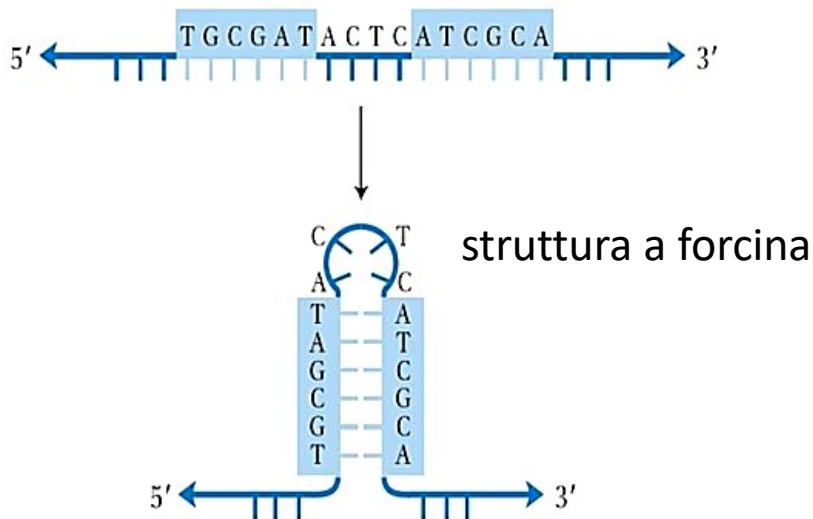
► Alcune particolari sequenze di DNA inducono varianti strutturali

- Le **sequenze palindromiche** sono successioni di sequenze di **basi ripetute ed invertite**; danno luogo a **ripetizioni speculari e simmetriche** su ogni catena

rotazione di 180 °C attorno all'asse orizzontale
e 180 °C attorno all'asse verticale



- Le sequenze palindromiche sono **auto-complementari** e pertanto in grado formare appaiamenti **intra-catena** formando **strutture a forcina** se è coinvolta una sola catena (es nell'RNA), oppure **a croce** se sono coinvolte e



DNA: replicazione semiconservativa

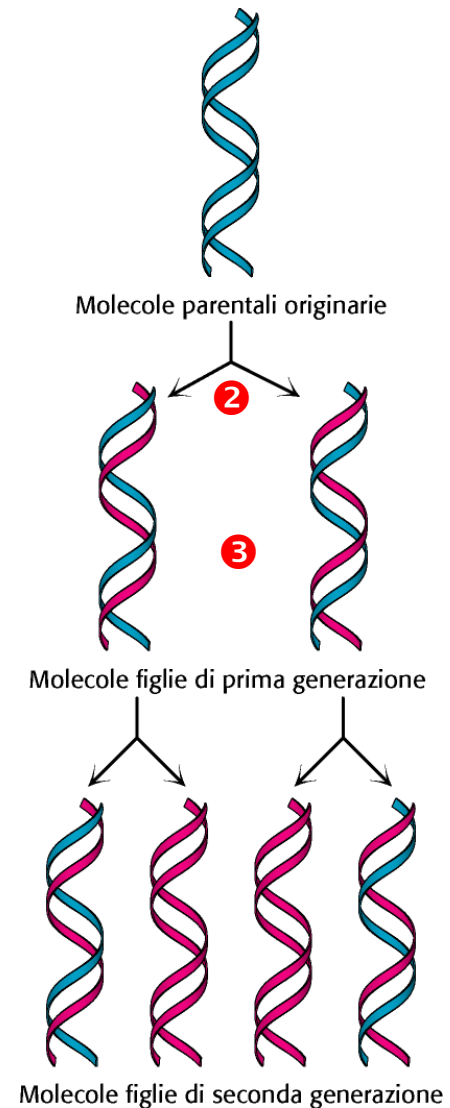
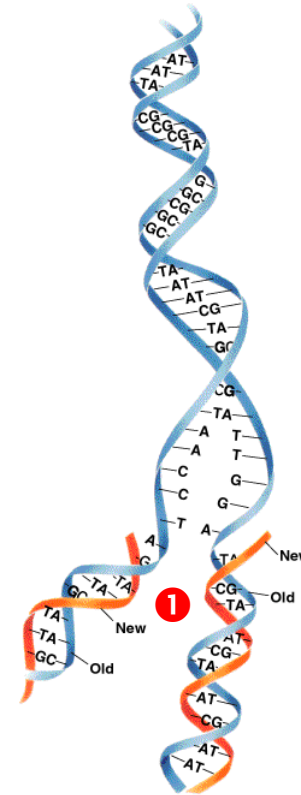
► La replicazione del DNA ha una natura semiconservativa

- i cromosomi sono lunghe sequenze formate da un u filamento di dsDNA
- variano in grandezza da ~3 milioni di basi nei batteri 50 - 250 milioni di basi negli eucarioti
- l'organizzazione a doppia elica con filamenti complementari antiparalleli facilita la replicazione
- Il meccanismo di copiatura dell'DNA coinvolge:

1) **srotolamento** dei due filamenti

2) entrambi i filamenti fungono da stampo per la **sintesi** di un nuovo filamento complementare a quello parentale

3) sono **prodotte** due molecole identiche di ds DNA ciascuna con un filamento parentale e un filamento **nuovo** (replicazione semiconservativa)



RNA: struttura e funzione

► RNA di diverso tipo hanno diverse strutture e funzioni

- gli RNA non sono materiale genetico che viene duplicato ma **sono copiati da tratti di DNA**
- **ogni tipo di RNA ha una specifica funzione e svolgono diverse funzioni** nella sintesi proteica o nella sua regolazione:

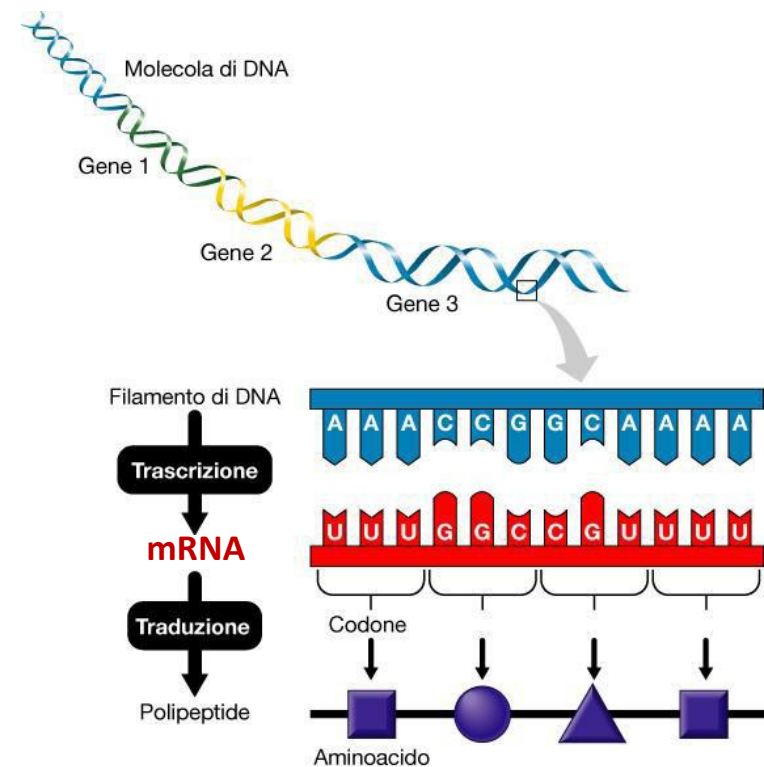
mRNA - funzione di **intermediario** dell'informazione genetica (copia del gene)

tRNA - funzione di **raccordo** (trasporta il corretto AA corrispondente ad un codone)

rRNA - funzione **strutturale e catalitica** nei ribosomi dove forma strutture 4° con subunità proteiche

sRNA - funzione strutturale e catalitica nei **spliceosomi** che processano l'RNA trascritto a mRNA maturo negli eucarioti (rimozione di sequenze introniche non-codificanti)

RNA regolatori - miRNA, siRNA, snRNA, ncRNA hanno funzioni di regolazione nell'espressione genica.



RNA: struttura 3a

► RNA DI TRANSFER (tRNA)

- **molecole adattatrici** che contengono una sequenza (tripletta di residui nota come **anticodone**) **complementare** alla **tripletta del codone** che lo codifica nell'mRNA

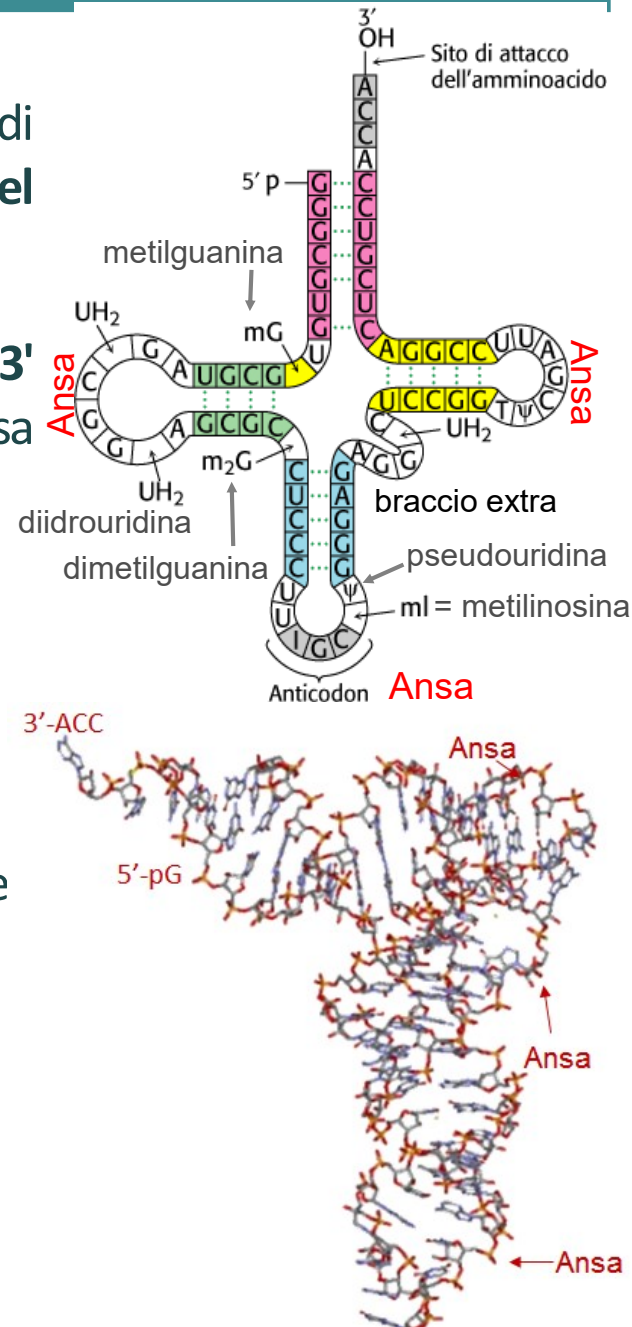
- **topologia a trifoglio**, con terminali 3' e 5' vicini; il **terminale 3'** porta l'**amino acido** legato all'OH 3' del ribosio, mentre l'ansa centrale del trifoglio porta la **dell'anticodone**).

- ha una **forma ad «L»** e la singola catena di 73 - 93 nucleotidi si ripiega in modo che ca. la metà formano **tratti a doppia elica**

- questi tratti corrispondono agli **steli** ■ ■ ■ ■ nella topologia a trifoglio e le zone a singolo filamento corrispondono alle **anse**

- contiene diverse **basi non canoniche**, derivate da A, U, C e G, che formano **appaiamenti non-WC**; al 5' si trova un G fosforilata e al 3' la tripletta |C|C|A| con l'AA legato all'OH di A

- l'**ansa dell'anticodone** è composta da 7 residui; i **tre residui centrali** sono **complementari alla tripletta codone** del mRNA.



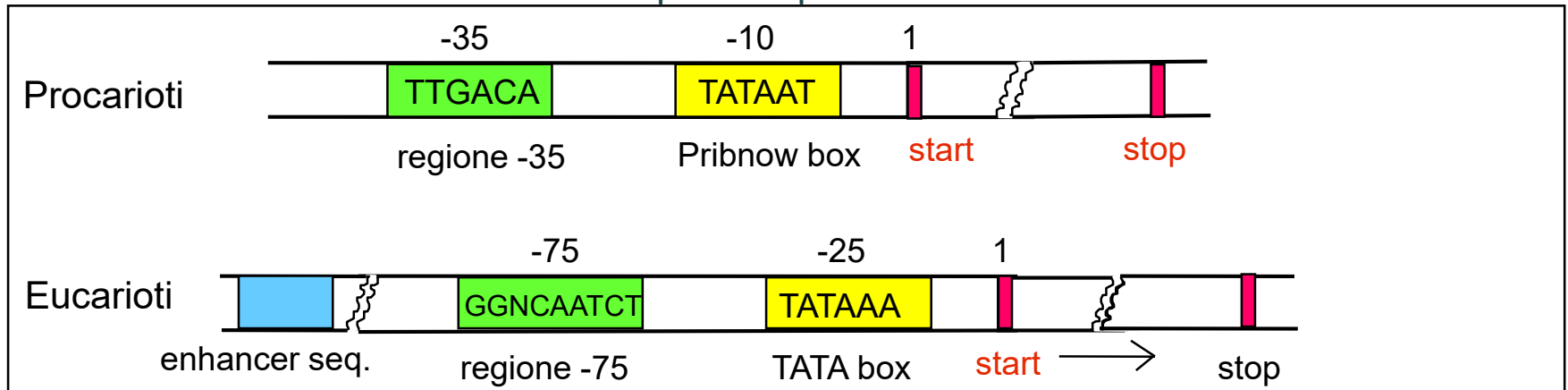
flusso dell'informazione genetica – il Dogma Centrale

- Il flusso di informazione genetica va dal DNA al mRNA ai ribosomi.

DNA → mRNA → Proteina

- La **Replicazione** = duplicazione del DNA (due molecole identiche)
- La **Trascrizione** = DNA → mRNA con sequenza identica (T → U)
- La **Traduzione** = sequenza nucleotidica (mRNA) → sequenza amminoacidica

- le sequenze dei geni e delle proteine che codificano sono **COLINEARI**.
- **trascrizione** inizia nella vicinanza di specifiche sequenze conservate, i cosiddetti "**SITI PROMOTORI**" e termina a livello di sequenze specifiche note come "**SITI TERMINATORI**"



Upstream promotor

Core promotor

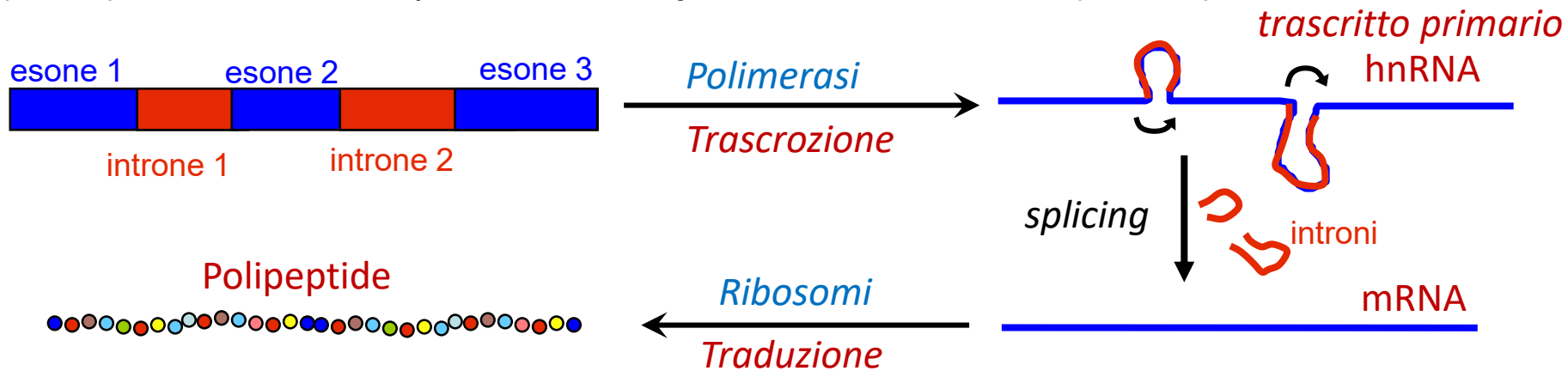
gene

Terminator sites

- la **Trascrizione** è governata dai specifici segnali di **start** e **stop** presenti nel gene → mRNA;
- la **Traduzione** è governata da specifiche sequenze che precedono il **segnale start** e legano l'apparato riboproteico (ribosoma) per iniziarla lì, mentre il **segnale stop** è riconosciuto da proteine note come **fattori di rilascio**, che staccano l'mRNA dal ribosoma.

flusso dell'informazione genetica – il dogma centrale

- Negli eucarioti, i geni sono discontinui: sono formati da diverse **sequenze codificanti (esoni)**, intercalate alle quali ci sono **sequenze non codificanti (introni)**

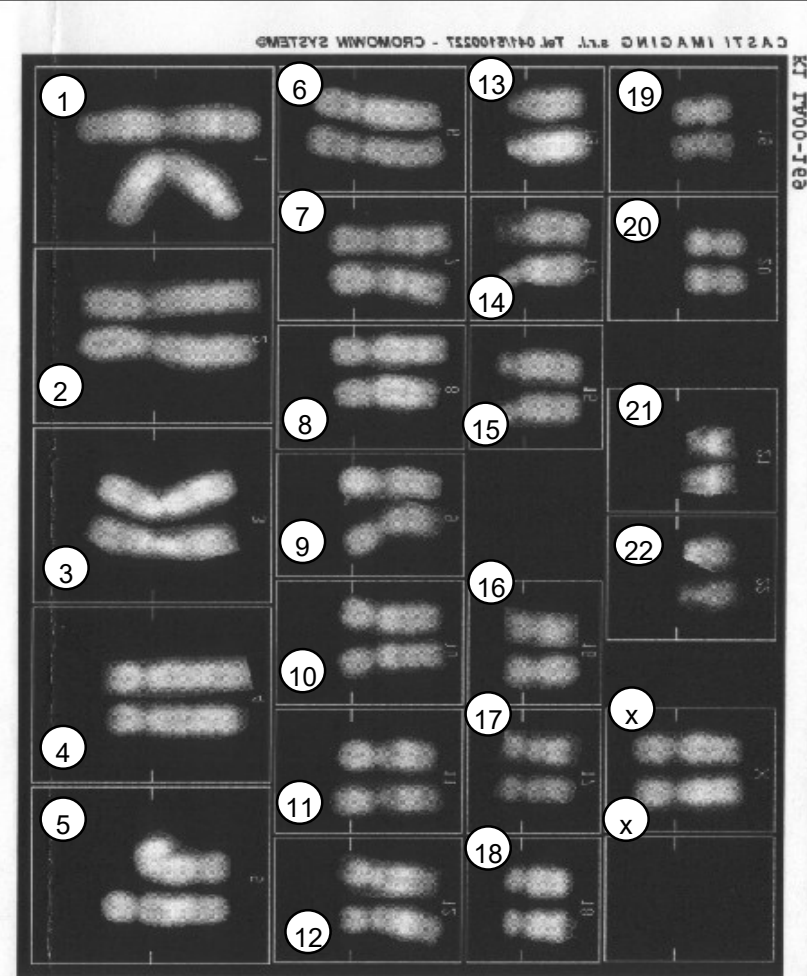
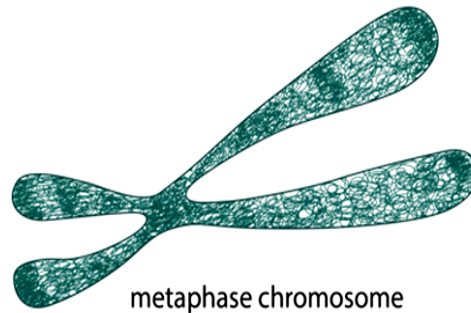
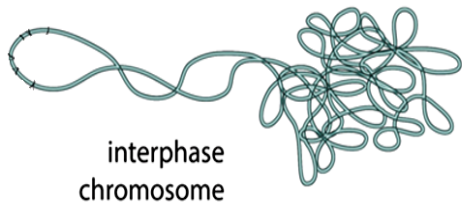


- l'RNA inizialmente trascritto è una **copia esatta dell'intero gene con introni ed esoni** (*RNA nucleare eterogeneo, hnRNA o pre-mRNA*)
- gli introni sono rimossi (**splicing**) da **complessi riboproteici** noti come **Spliceosomi** e l'RNA ricongiunto come catena unicamente codificante (**mRNA maturo**)
- è un processo **co-trascrizionale** e gli **Spliceosomi** riconoscono **specifici segnali intronici** e rimuovono gli introni precisamente ricucendo l'**mRNA maturo** con **solo la sequenza codificante**.
- un **esone spesso corrisponde ad un dominio strutturale o funzionale** nella proteina; durante l'evoluzione proteine con **nuove funzioni** si possono sviluppare per **ricombinazione alternativa di esoni** che codificano elementi strutturali discreti (**splicing differenziato**)
- lo **splicing differenziato (alternative splicing)** genera proteine correlate ricomponendo l'RNA nascente in diverse maniere (aumenta la **diversità genica**)

struttura del cromosoma nel uomo

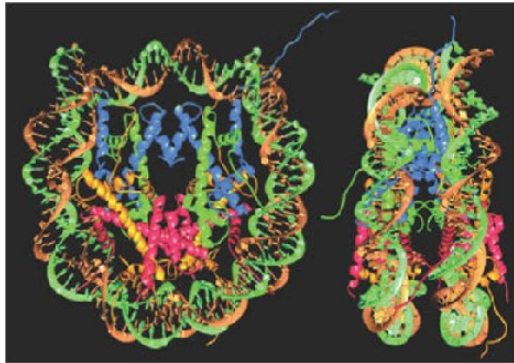
► il materiale genetico umano è organizzato in 23 paia di cromosomi

- ciascun cromosoma è formato da una **lunghissimo dsDNA** (>2m in totale ma con spessore di solo 20 Å), **impaccato nel nucleo** della cellula (5 - 10 μm).
- per ottenere questo grado di impaccamento il **DNA è avvolto attorno** a complessi proteici con diversi livelli di complessità
- qui vediamo la struttura di cromosomi durante la **metafase**, quando la cellula si sta dividendo e sono nella **forma più compatta**; i geni non sono accessibili a questo grado di impaccamento
- nell'**interfase** (quando la cellula si è divisa ed è **diventata attiva**, sono impaccati in modo più lasco

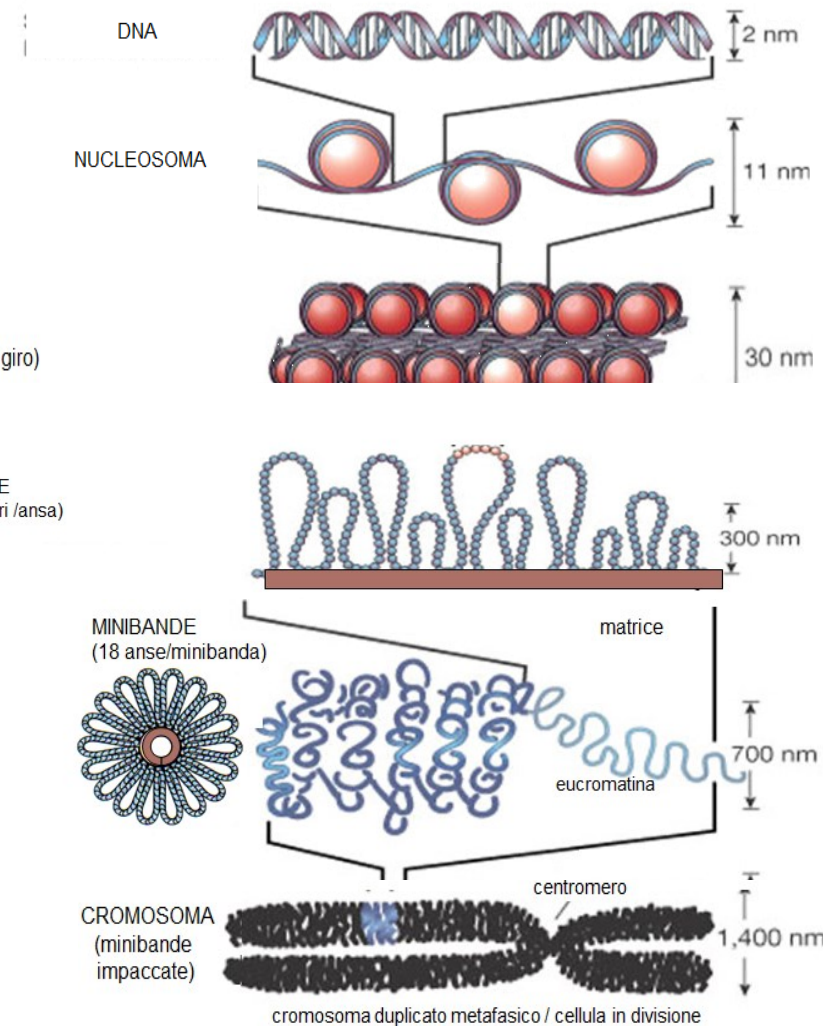


struttura del cromosoma (cont.)

- 5 diversi tipi di proteine basiche, gli **istoni**, formano l'ottamero del **nucleosoma** attorno al quale si avvolge inizialmente il doppio filamento di DNA (2 giri), formando una super-elica sinistrogira.



- i nucleosomi si impaccano a forma di **solenioide** (6 per giro) e formano un **filamento**
- Il filamento si organizza attorno al complesso proteico della **matrice** (a mo' di **anse**).
- ~20 anse si dispongono in una **minibanda** che forma una sezione del cromosoma.



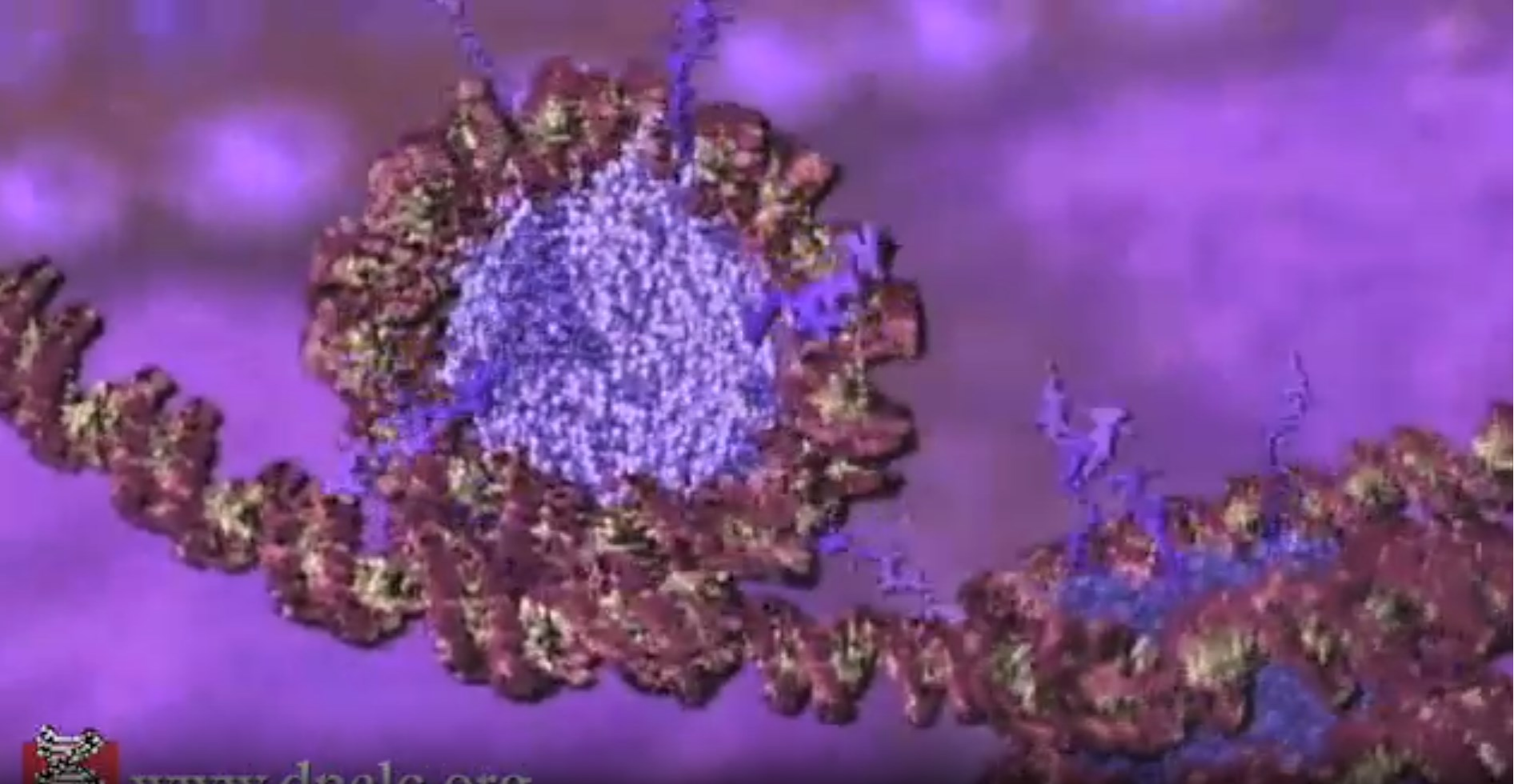
nucleosoma → ca. 200 bp

solenioide → ca. 1200 bp

ansa → 60-150 kb,

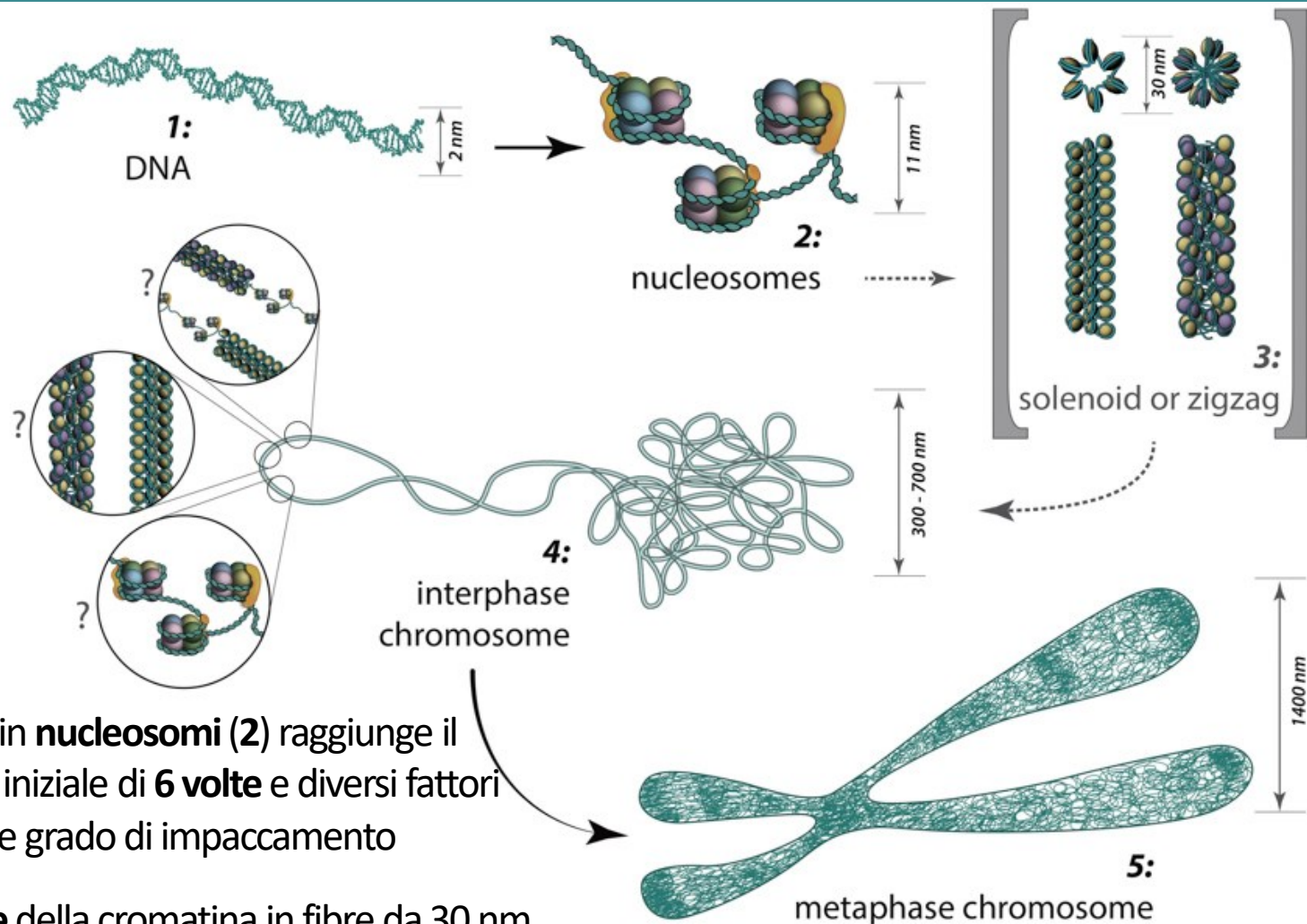
minibanda → 1-3 megabasi

cromosoma tipico → 10^6 minibande.



https://moodle2.units.it/pluginfile.php/562699/mod_resource/content/2/how_dna_is_packaged_adv.mp4

struttura del cromosoma (cont.)



Il ripiegamento del DNA in **nucleosomi (2)** raggiunge il **livello di compattazione** iniziale di **6 volte** e diversi fattori determinano il successivo grado di impaccamento

Ulteriore condensazione della cromatina in fibre da 30 nm (solenoidale) (3) è suggerita da dati in vitro ma deve ancora essere comprovata in vivo.

Durante l'interfase, la cromatina è ripiegata in domini di $300-700\text{ nm}$, che insieme costituiscono un **territorio cromosomico (4)**. La struttura e l'organizzazione della cromatina all'interno di un territorio cromosomico è controversa con proposte di solo **nucleosomi**, loro organizzazione a **solenoidale** o a **zigzag**, o ibridi di questi.

Enzimi che agiscono sul DNA

► il DNA può essere facilmente deformato e modificato

- i solchi maggiore e minore espongono **siti di riconoscimento specifici** per la formazione di **legami-H multipli** fra le basi e catene laterali delle proteine che agiscono sul DNA.

- **4 tipi di enzimi** agiscono sul DNA:

Nucleasi (idrolisi del legame fosfodiesterico in oligonucleotidi)

Ligasi (formazione del legame fosfodiesterico fra due oligonucleotidi)

Topoisomerasi (Girasi, Elicasi) (variazione dei superavvolgimenti)

Polimerasi (polimerizzazione mediante la condensazione di nucleotidi)

- questi enzimi spesso si **agganciano e scorrono lungo la molecola** di DNA come su una rotaia (**diffusione 1D**) finchè non raggiungono un sito di riconoscimento, dove si fermano ed iniziano la loro attività

► Le ***Nucleasi***

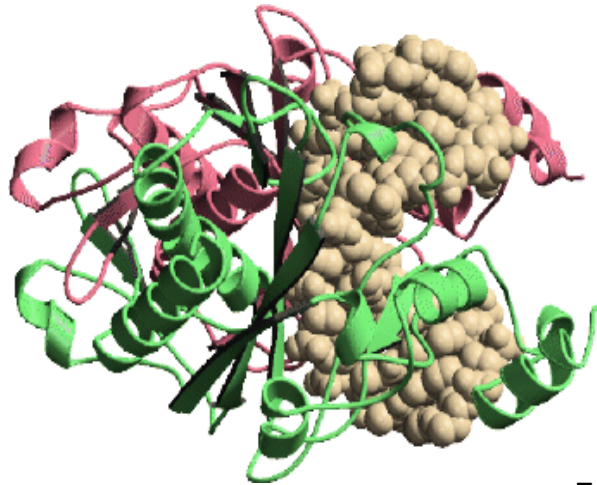
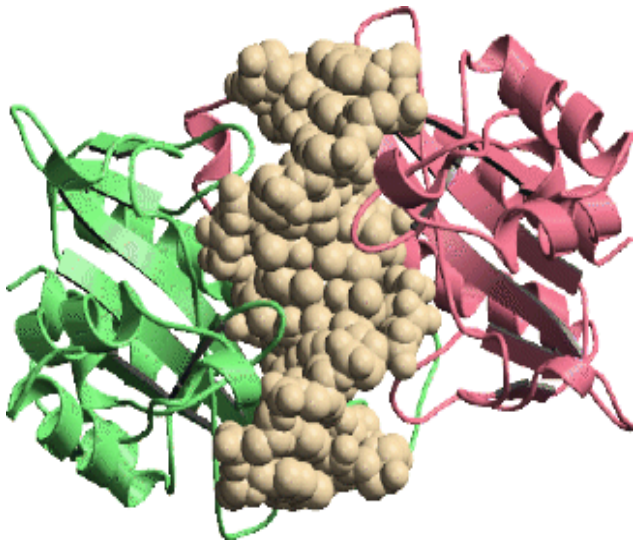
- idrolizzano il legame fosfodiesterico in una catena di DNA (***DNAasi***) o di RNA (***RNAasi***)

Endonucleasi - tagliano una catena all'interno

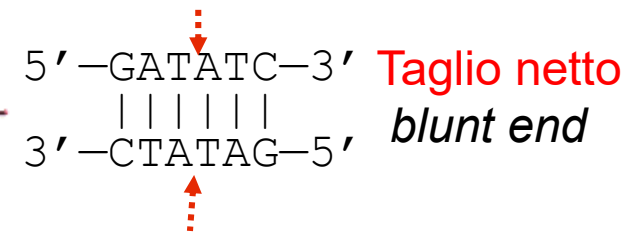
Esonucleasi - staccano nucleotidi dalle estremità della catena

Enzimi che agiscono sul DNA: *Endonucleasi* di restrizione

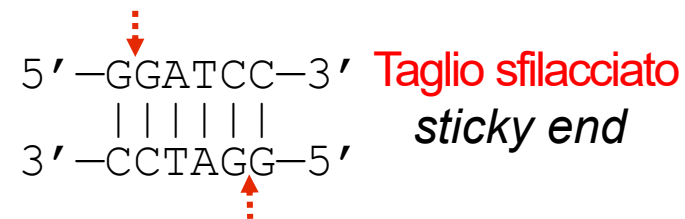
- sistema di difesa batterico contro virus (fagi); agiscono solo su DNA di origine esogena mentre il DNA endogeno è protetto mediante metilazione delle basi.
- **3 tipi:** **I** aspecifiche; **II** specifiche per sequenze palindromiche e non necessitano ATP; **III** specifiche per sequenze invertite e necessitano ATP



Sito di taglio di *EcoRV*
(*E. coli* Restrict. Endonucl. V, TIPO II)



Sito di taglio di *BamH1*
(*Bacillus megaterium*, TIPO II)

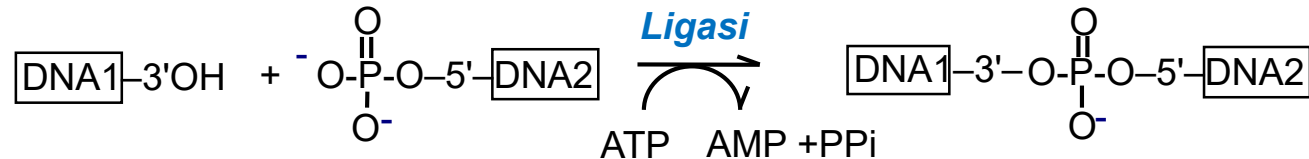


- Sono **proteine omodimeriche** simmetriche che riconoscono un bersaglio simmetrico.
- sondano il solco maggiore scorrendo lungo il doppio filamento di DNA fermandosi in corrispondenza al sito palindromico (riconoscono uno specifico pattern di basi).
- sia l'enzima che il DNA subiscono **mutamenti conformazionali** - il DNA si piega, poi avviene il taglio; necessitano Mg^{++} per funzionare

Enzimi che agiscono sul DNA: *Ligasi*

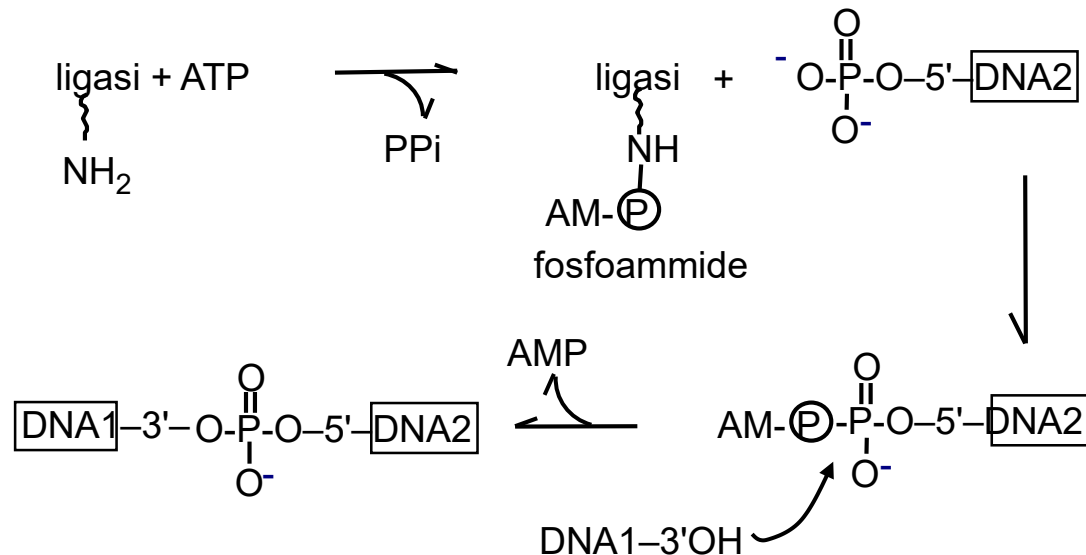
► *Ligasi* sono enzimi che congiungono catene di DNA

- catalizzano la **formazione di un legame fosfodiesterico** fra un ossidrile al 3' di un frammento con il fosfato sul 5' di un altro



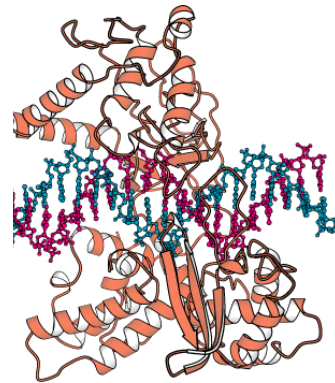
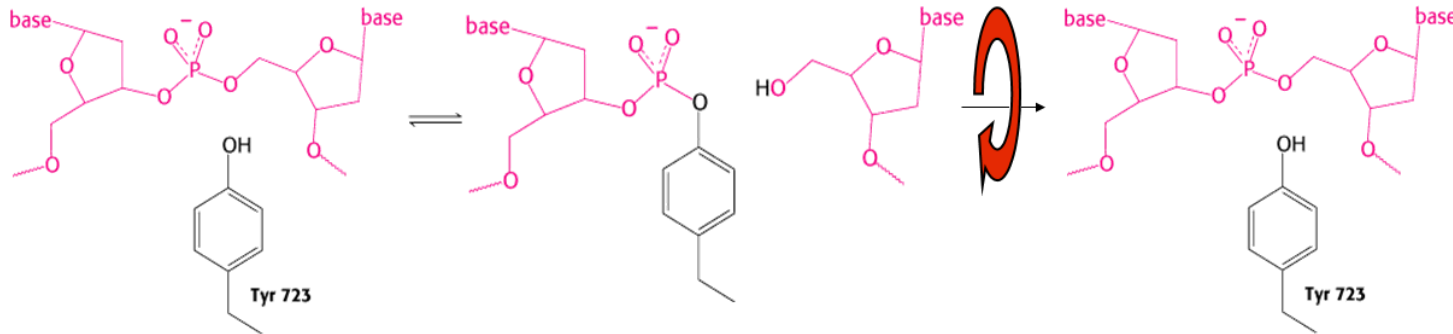
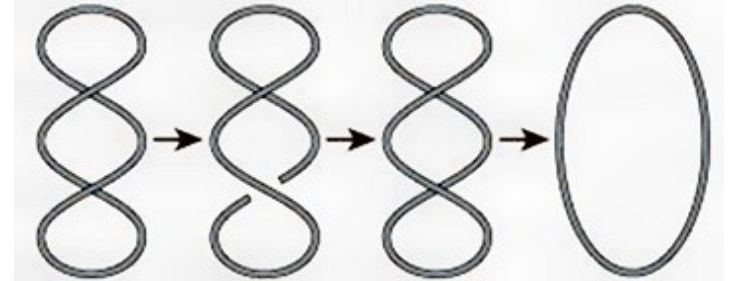
- **agiscono su dsDNA**, chiudendo rotture su una delle due catene; ATP è usato come attivatore dagli eucarioti, NAD^+ dai batteri $\text{==} \text{--} \rightarrow \text{==}$

- si forma un intermedio nel quale una unità di AMP si lega al fosfato 5' di un frammento e lo attiva per la formazione del legame con OH sul 3' dell'altro frammento.



Enzimi che agiscono sul DNA: *Topoisomerasi*

- **tipo I:** rilassano DNA superavvolto **tagliando solo un filamento**, e permettendo lo srotolamento dell'altro (processo energeticamente favorevole che **non richiede l'idrolisi di ATP**), poi **ricongiungono il filamento tagliato** (riducono localmente lo *strain* per tratti di doppia elica sovra- o sotto-avvolti)
- **tipo II (*girasi*)** **tagliano entrambe i filamenti** e permettono il **passaggio di un altro tratto** di doppia elica attraverso il taglio, aggiungendo **superavvolgimenti negativi** (processo che **richiede ATP**)
- per entrambe i tipi, durante il taglio si forma un **legame fosfoesterico transiente** con una tirosina enzimatica ed è liberato l'OH 5', che poi attacca la fosfotirosina dopo lo srotolamento

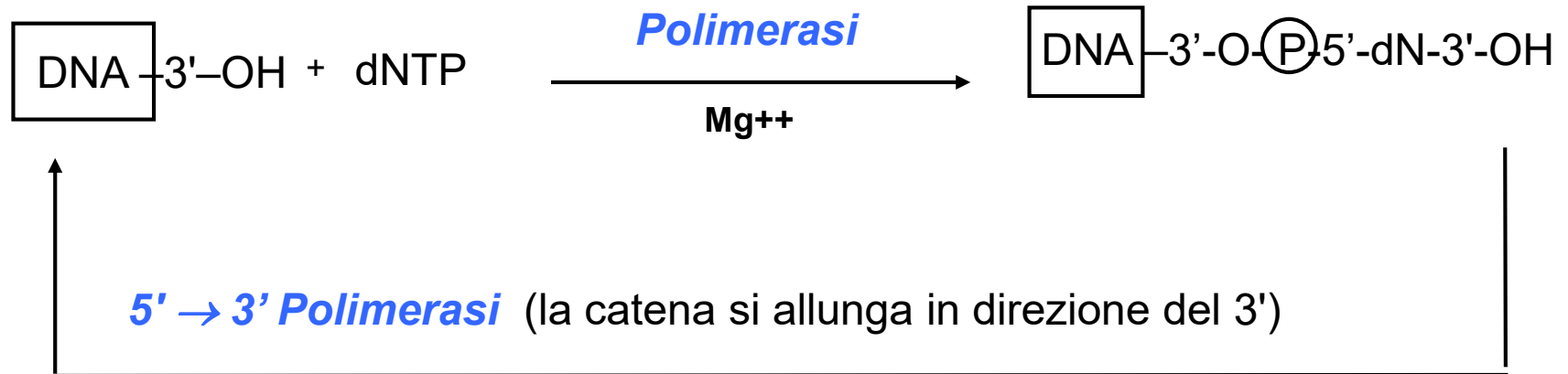


- Le *topoisomerasi* e *girasi* sono necessarie durante la replicazione o trascrizione del DNA, per evitare **crisi topologiche** a monte e/o a valle del DNA localmente disavvolto.
- la *girasi* batterica è bersaglio di **antibiotici** (*novobiocina*, *acido nalidixico*, *ciprofloxacina*) e la *topoisomerasi* di tipo I umana è bersaglio per l'**agente antitumorale camptotecina**

Enzimi che agiscono sul DNA: *Polimerasi*

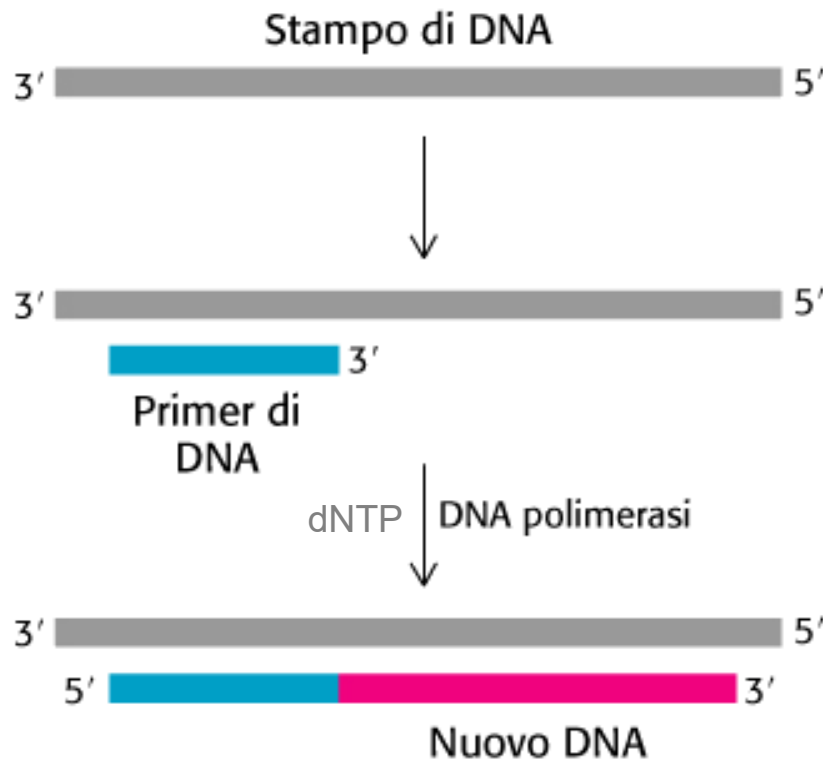
► *DNA Polimerasi* sono coinvolte nella sintesi del DNA durante la replicazione.

- *DNA Polimerasi I* di *E.coli*: sintetizza singoli filamenti di DNA utilizzando mono desossinucleotidi trifosfato (dNTP = dATP, dGTP, dCTP o (d)TTP)



- è un enzima **processivo**, che aggiunge in media 20 dN prima di staccarsi (un enzima **distributivo** si lega e stacca ad ogni ciclo).
- mostra anche due distinte **attività di idrolasi**, una che agisce su, e stacca, basi appena introdotte e male appaiate (non W-C) come **meccanismo di auto-correzione**. L'idrolisi avviene in senso opposto alla polimerizzazione (*3' → 5' esonucleasi*). L'altra serve per completare l'opera di replicazione ed agisce in direzione opposta (*5' → 3' esonucleasi*).

Enzimi che agiscono sul DNA: *DNA polimerasi I*



- la *DNA polimerasi I* richiede un **filamento stampo** (a catena singola di DNA) sul quale agire, e **sintetizza una catena esattamente complementare allo stampo** (appaiamento Watson-Crick corretti fra la base entrante e quella dello stampo)
- richiede anche una **catena primer** (che può essere DNA o RNA) con un **terminale 3'-OH libero** sulla quale innestare il primo dNTP (NB: le *DNA polimerasi* richiedono un primer, le *RNA polimerasi* non richiedono primer).
- Si lega alla catena stampo al **sito di origine** della sintesi.

► Caratteristiche della *DNA Polimerasi*:

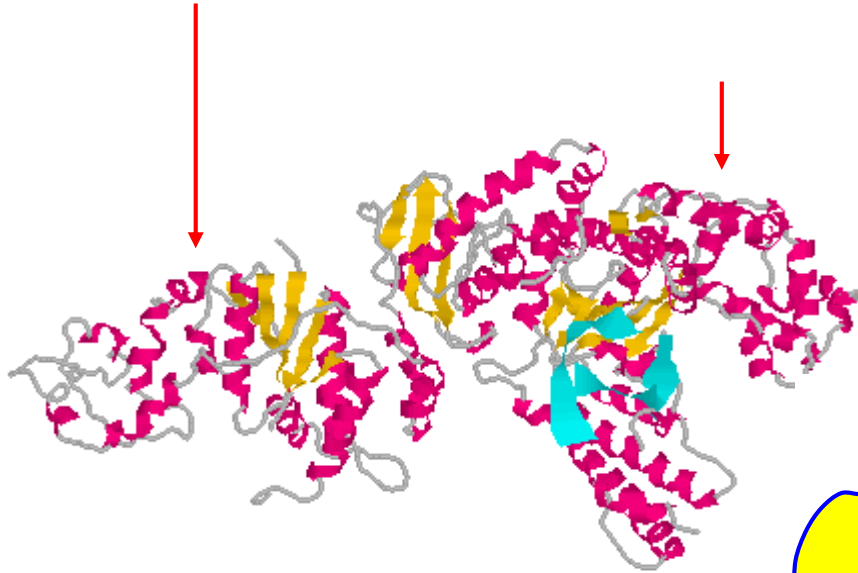
- 1) **raramente inserisce basi male appaiate** (dominio *5'→3' Polimerasi* molto fedele)
- 2) **controlla l'appaiamento** dopo ogni accoppiamento (funzione di **editing**)
- 3) **elimina residui con basi appaiate incorrettamente** (dominio *3'→5' Esonucleasi*)
- 4) **rimuove la sequenza primer** alla fine della sintesi utilizzando l'attività di *5'→3' Esonucleasi*

Enzimi che agiscono sul DNA: DNA polimerasi I

► *DNA Polimerasi*: Meccanismo di editing

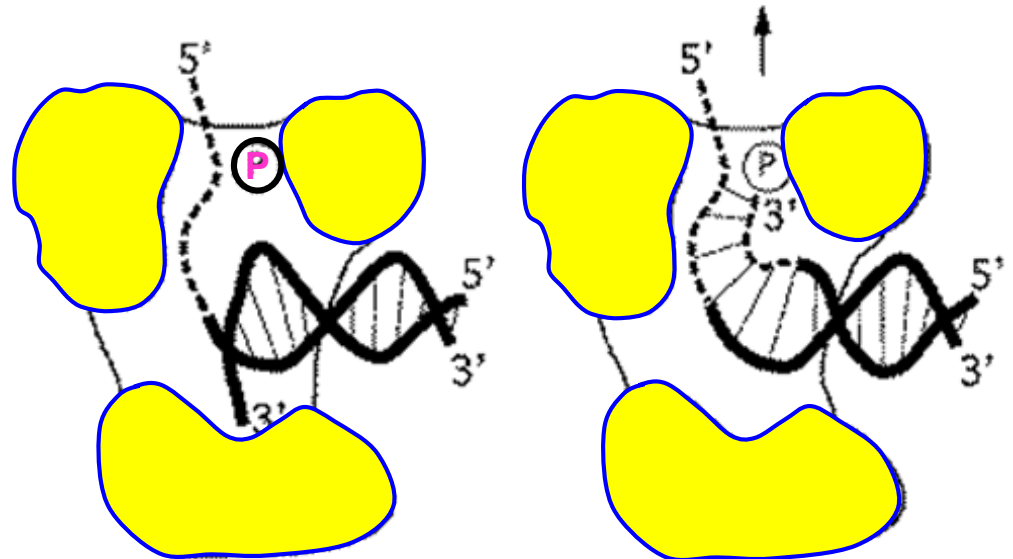
- riunisce le **tre attività catalitiche** in una struttura relativamente piccola e a **singola catena**
- la tripsina taglia la *Polimerasi* in due subunità autonomamente attive:

5'→3'-esonucleasi dal dominio N-terminale

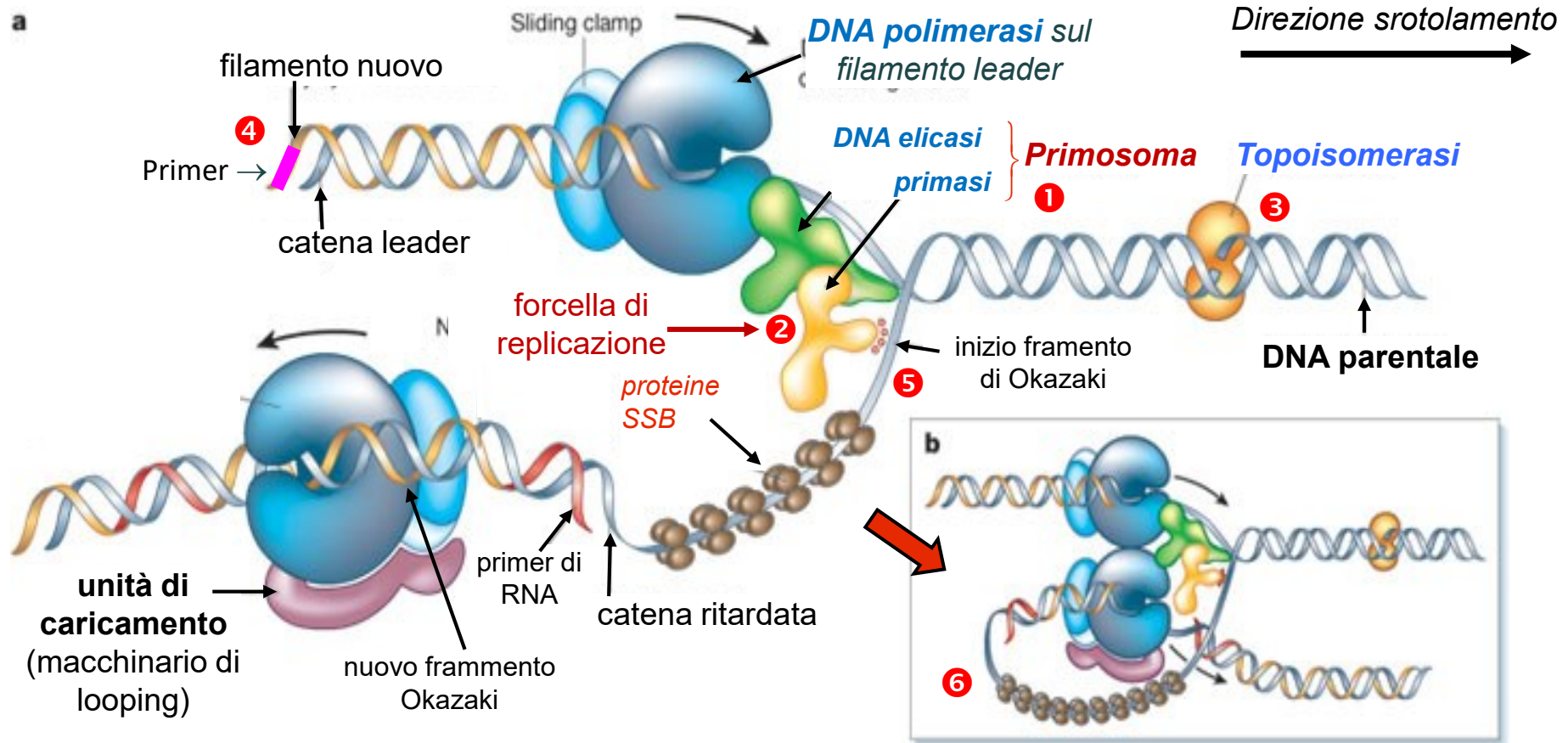


asi (frammento di Klenow) dal C-terminale

il sito attivo del dominio *3'→5' esonucleasi* è molto vicino a quello della *Polimerasi*, e permette lo **scanning** per la correzione del DNA nascente, senza che la catena di DNA si debba staccare dall'enzima (**elevata processività**)



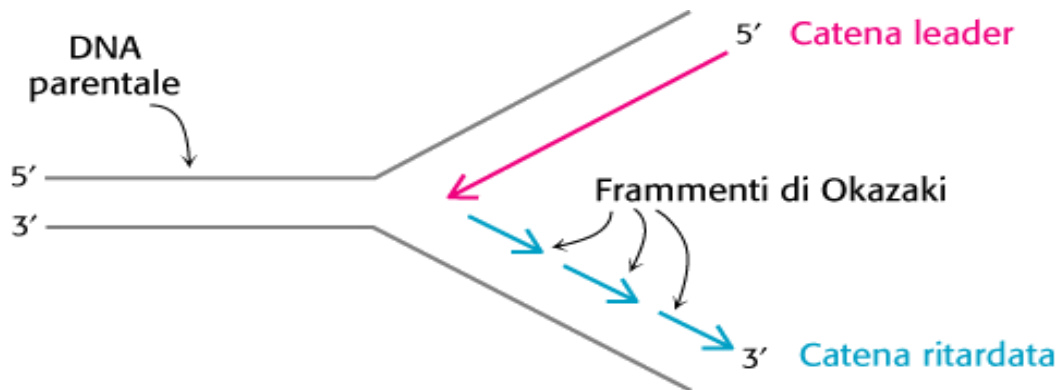
Replicazione: *DNA polimerasi III oloenzima* (es. *DNA Pol III* E.coli)



- 1** *Polimerasi* si associa al complesso del *primosoma* (*Elicasi* + *Primasi*) ai siti d'origine della duplicazione
- 2** la **replicazione** inizia con l'apertura del dsDNA (*Elicasi*) e si forma la **forcella di replicazione**
- 3** *Topoisomerasi* (*Girasi*) associate al complesso risolvono “**crisi topologiche**” a monte della forcella.
- 4** *Primasi* (*RNA polimerasi*) inserisce un primer sul filamento con direzione $3' \rightarrow 5'$ e su questa catena la sintesi procede correttamente in direzione $5' \rightarrow 3'$ (catena **leader** o **veloce**)
- 5** aggiunge primer sull'altra catena ma in questo caso la sintesi non può procedere ($3' \rightarrow 5'$), e richiede un complesso processo di 'looping' **6** a livello dell'altro lobo della Polimerasi III (catena **ritardata** o **lenta**)

Replicazione: *DNA polimerasi III* (cont.)

- la replicazione è svolta da un **unico oloenzima** (*Polimerasi III*) che utilizza primer di RNA aggiunti dalla *Primasi* (essendo *RNA polimerasi* non richiede un primer per aggiungerlo).
- **entrambe i filamenti fungono da stampo**, e la replicazione procede **nella direzione di srotolamento** del dsDNA (effettuato dall'*Elicasi*).
- Si svolge in modo ininterrotto per la **catena leader** ($3' \rightarrow 5'$) procedendo in direzione antiparallela ($5' \rightarrow 3'$)
- Il processo di looping è invece necessario **per orientare brevi tratti della catena ritardata** in direzione $3' \rightarrow 5'$. Quindi, **la sintesi lungo la catena ritardata procede a tratti**.



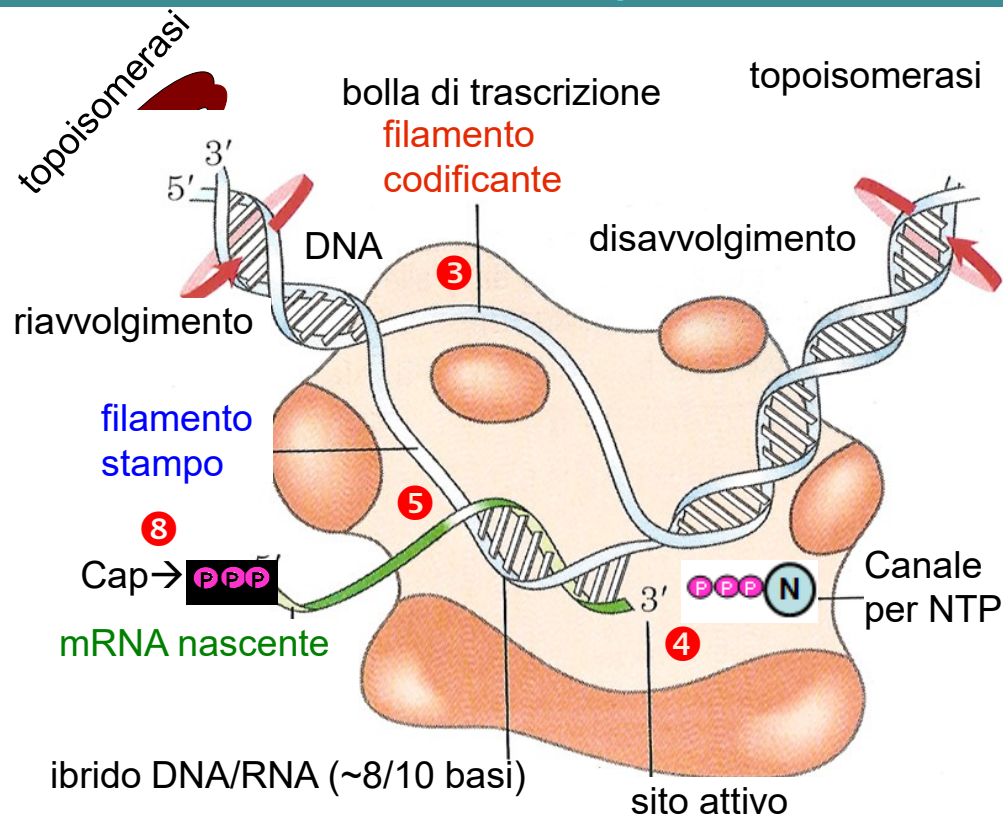
La *Polimerasi III* è un enzima **altamente processivo**. Quando inizia la sintesi non si stacca fino a quando non completa l'opera

- **Replisoma**: complesso multimerico con molte subunità di diverso tipo; le due subunità della *Polimerasi* con le loro **pinze**, le *Girasi*, *Elicasi*, *Primasi*, ecc. con il quale collaborano *SSBP* (mantengono il DNA in forma ss)
- All'interno delle **due subunità a pinza** della *Polimerasi* scorrono i filamenti di DNA portandoli a contatto con i siti catalitici per la **condensazione** e **l'editing** (*Esonucleasi* $3' \rightarrow 5'$) ed il **macchinario di looping** necessario per il filamento lento. Ha una **sovrastuttura dimerica asimmetrica**.
- La *Polimerasi I* è poi necessaria per completare il processo, riempiendo il tratto fra i frammenti di Okasaki e rimuovendo i primer a RNA inseriti dal *Primisoma*; una *Ligasi* poi cuce i frammenti assieme



https://www.youtube.com/watch?v=bee6PWUgPo8&ab_channel=DNALearningCenter

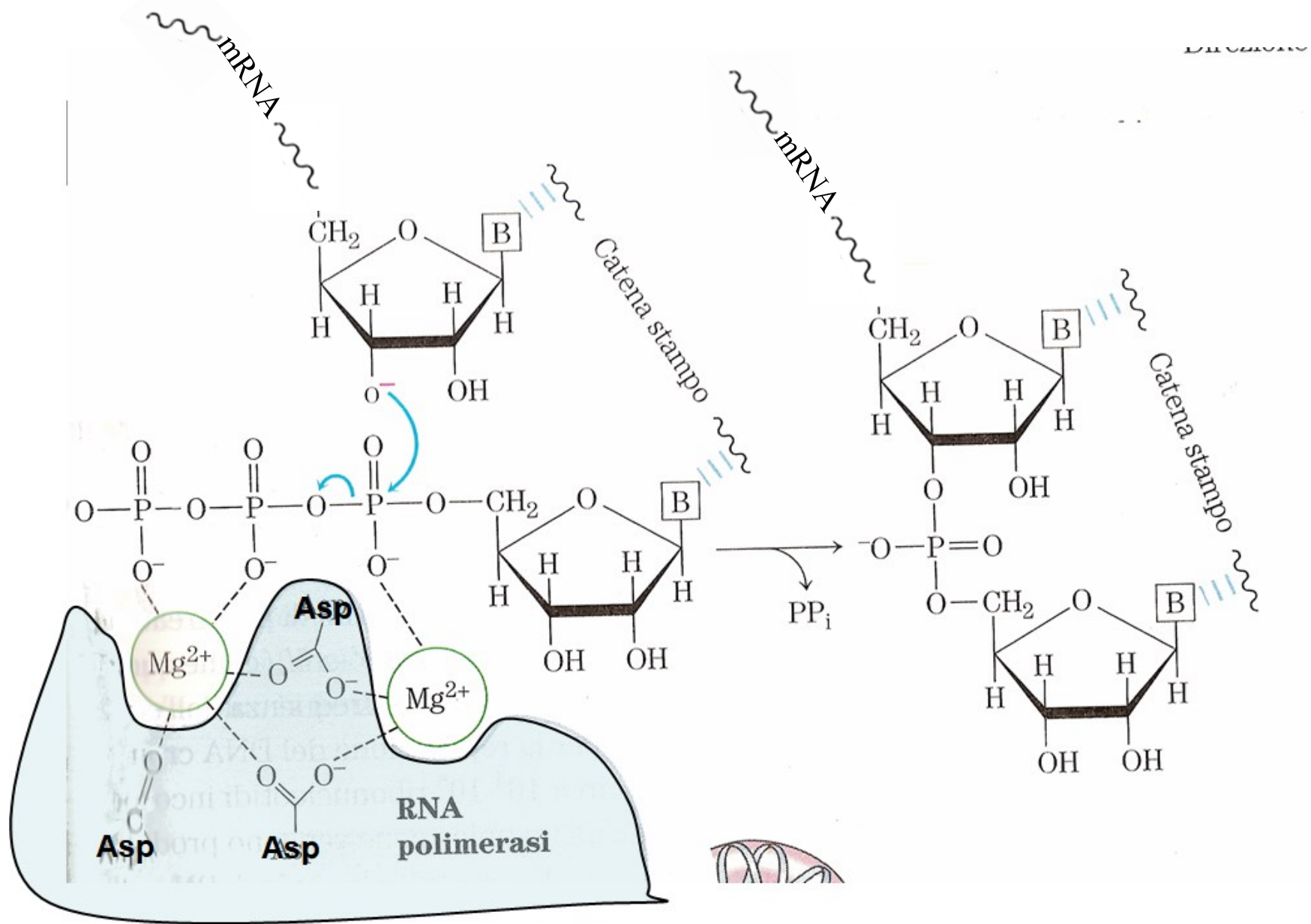
TRASCRIZIONE: *RNA polimerasi*



- 1 l'enzima cerca i siti di inizio del gene sul DNA (**siti promotori**, scheda 14)
- 2 a monte dello **Start codon** si forma un complesso multiproteico composto da **fattori di trascrizione di tipo II (TFII)**
- 3 srotola un breve tratto di doppia elica (**transcription bubble**, ca. 17 residui) con l'ausilio di una **Elicasi**, esponendo un tratto della **catena stampo**
- 4 la sintesi di RNA procede utilizzando i corretti NTP con azione **completamente processiva**, abbastanza fedele (**no editing**)
- 5 forma un tratto di **doppia elica ibrida** (DNA/RNA, ~8 residui) che poi si apre

- 6 ai segnali di terminazione dopo lo **Stop codon** si stacca del tutto;
- 7 l'attività di **RNA Pol**, oltre che dai **TFII**, è regolata anche per fosforilazione
- 8 (a) all'inizio della sintesi dell'mRNA viene aggiunto il 'Cap' al 5'; (b) gli **introni** sono **rimossi co-trascrizionalmente** dagli **Spliceosomi**; (c) dopo lo STOP viene aggiunta una **coda di poly(A)** al 5' del mRNA **NB**: senza questi attributi l'mRNA non esce dal nucleo
- 9 negli eucarioti sono presenti diverse **RNA polimerasi**; **tipo I** (per rRNA), **tipo II** (per mRNA ed sRNA) e tipo III (per rRNA e tRNA)
- 10 **RNA polimerasi** batteriche sono il bersaglio per la **rifampicina** e l'**actinomicina**

RNA polimerasi: MECCANISMO D'AZIONE





The RNA polymerase unzips a small portion of the DNA helix, exposing the bases on each strand.

www.dnalc.org

https://www.youtube.com/watch?v=SMtWvDbfHLo&ab_channel=DNALearningCenter

Le Polimerasi come strumenti di ricerca

► Amplificazine del DNA e librerie di cDNA

- **AMPLIFICAZIONE:** *DNA polimerasi* di *Thermophilus aquaticus* (ultra termostabile) viene usata per amplificare il DNA perché **non si denatura** a temperature che denaturano dsDNA appena replicato. Permettendo molti cicli di replicazione/denaturazione nella cosiddetta ***Polymerase chain reaction* o PCR**. Fondamentale per la ricerca e la forensica. **Richiede un primer**.
- **LIBRERIE di CDNA:** l'**mRNA** presente in una cellula in un dato momento **rappresenta tutti i geni che sono in fase di trascrizione** in quel momento (**trascrittoma**), che sarebbe utile esplorare.
- però **non sono molecole sufficientemente stabili**: non si prestano ad essere raccolte, isolate ed utilizzate per lo studio del trascrittoma.
- può essere **riconvertito a DNA**, in laboratorio, utilizzando le ***Trascrittasi inverse***; retrotrascrivendo l'**mRNA** cellulare si producono librerie di **DNA copia o cDNA** (molto **più stabile**)
- Inoltre, i cDNA presentano solo **DNA codificante (privo di introni**, a differenza del DNA genomico)
- Sono molto utili per studiare le attività cellulari, specialmente utilizzando microarray (**DNA Chip**)

POLIMERASI	STAMPO	PRODOTTO	PRIMER	NUCLEOTIDE
<i>DNA polimerasi</i>	DNA	DNA	DNA o RNA	dNTP
<i>RNA polimerasi</i>	DNA	RNA	-	NTP
<i>Trascrittasi inversa</i>	RNA	DNA	RNA o tRNA	dNTP

I RIBOSOMI E LA TRDUZIONE: Biosintesi di proteine

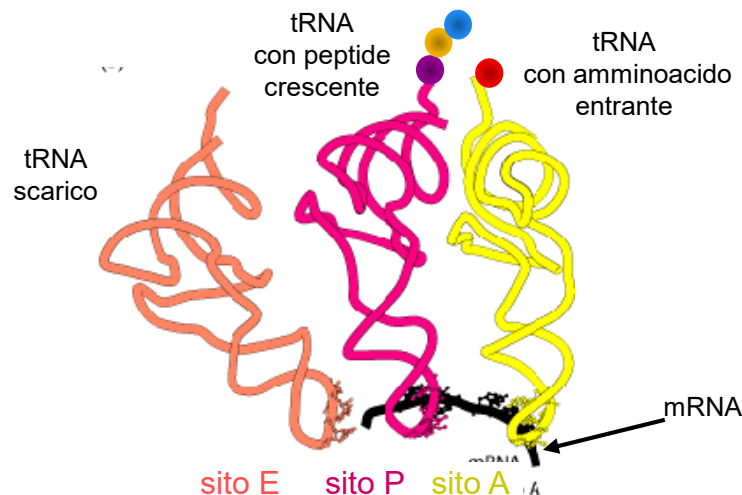
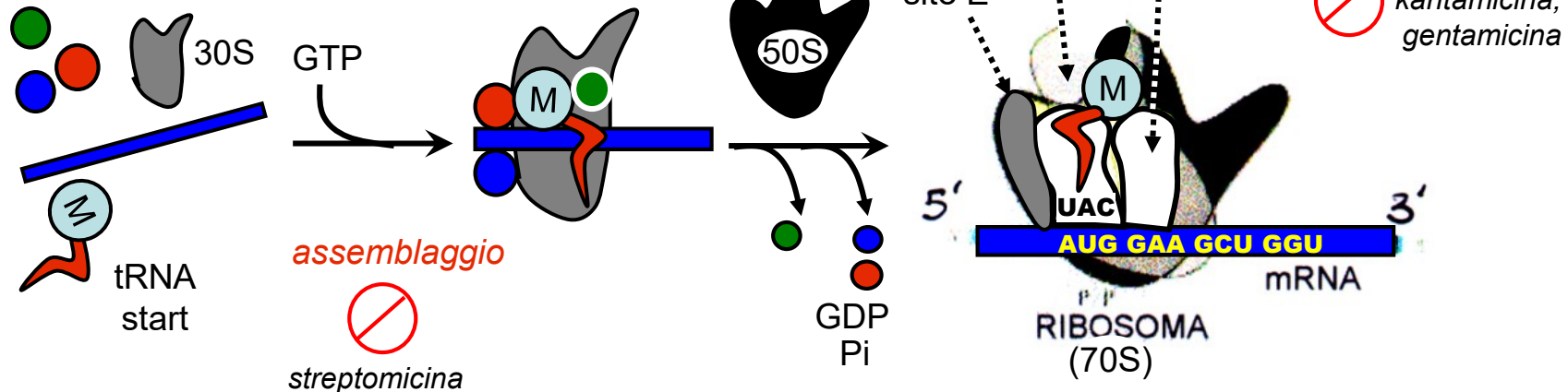
► La biosintesi di proteine è svolta dai **Ribosomi** con un'architettura caratteristica.

- Sono organizzati in due **Subunità** principali:

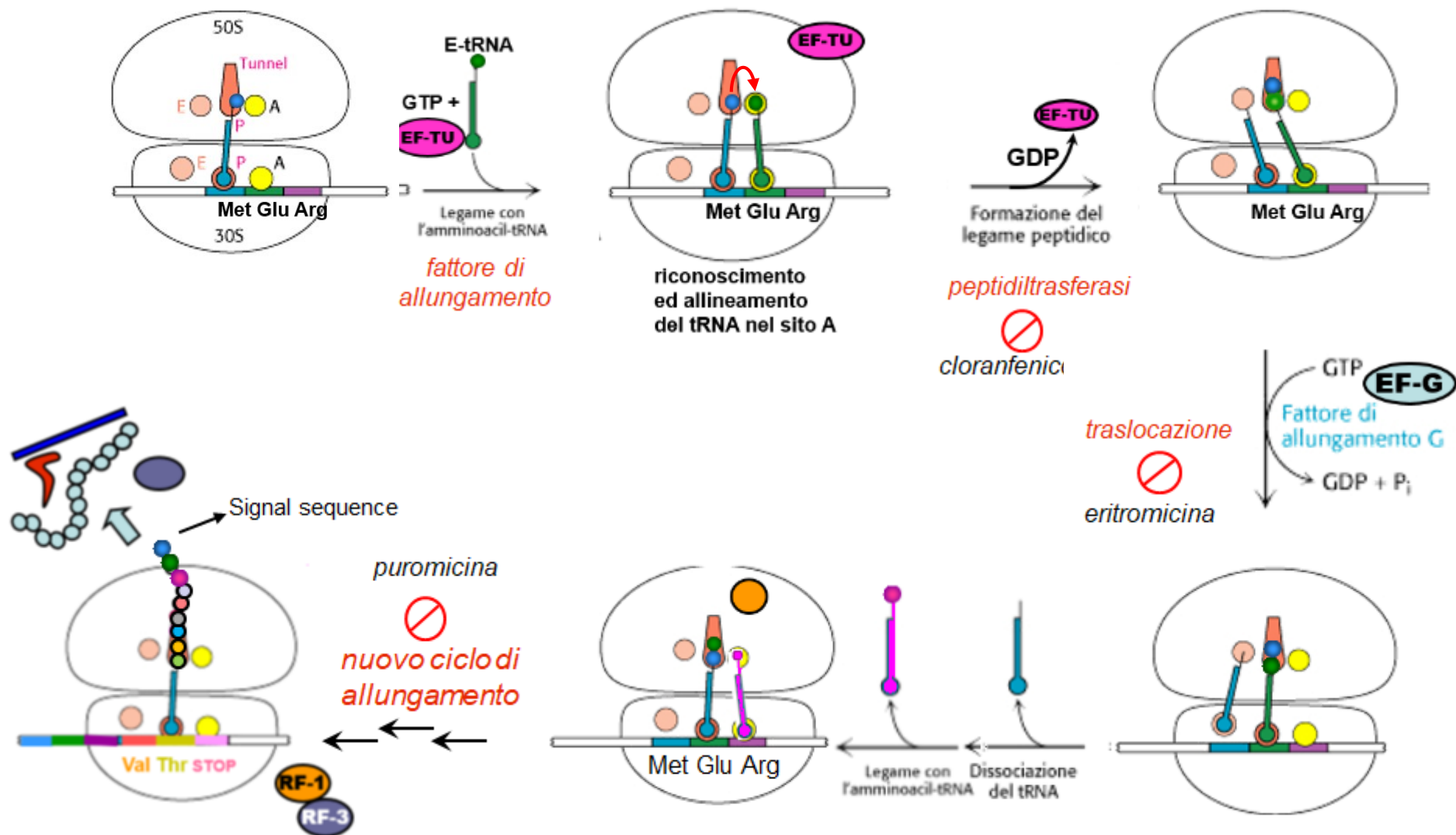
Subunità piccola (30S in *E. coli* / 40S Eucarioti) - 21/33 catene proteiche, 1 catena di rRNA

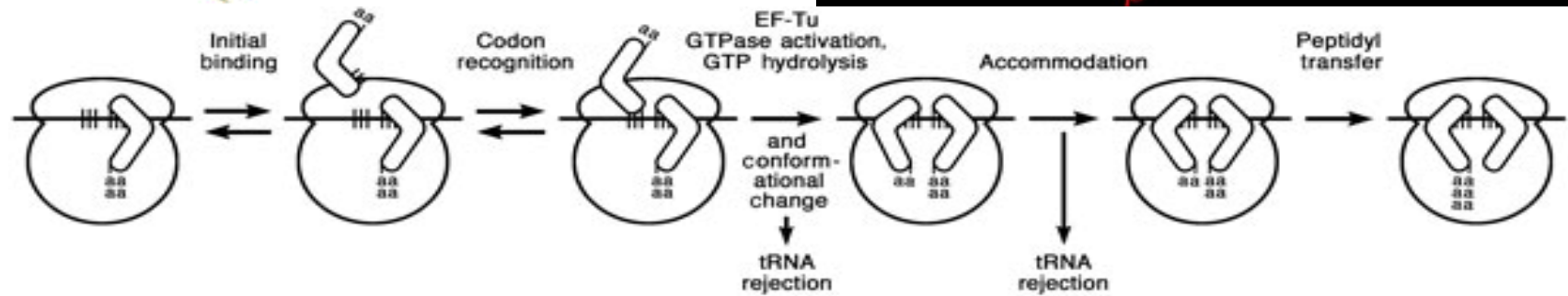
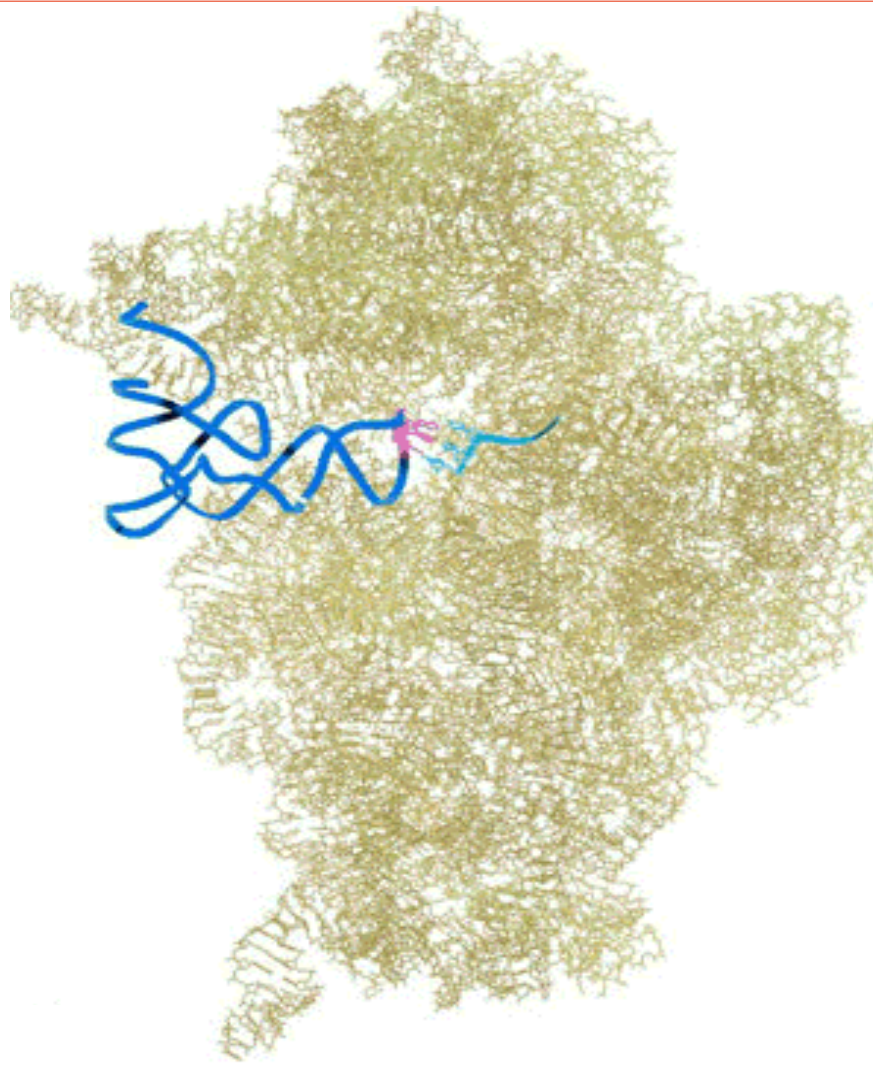
Subunità grande (50S/60S) - 31/49 catene proteiche, 2/3 catene di rRNA.

IF-1,2,3 (**fattori d'iniziazione**)



I RIBOSOMI E LA TRDUZIONE: Biosintesi di proteine







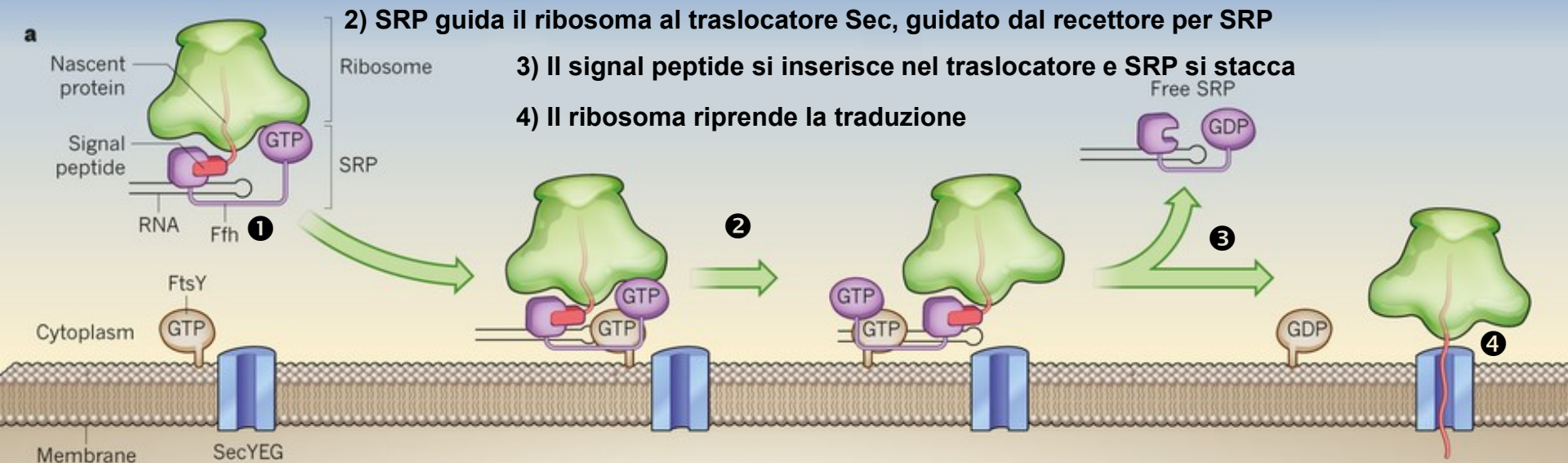
https://www.youtube.com/watch?v=TfYf_rPWUdY&ab_channel=DNALearningCenter

1) Il «signal recognition particle» (SRP) si lega al peptide segnale e arresta la traduzione

2) SRP guida il ribosoma al traslocatore Sec, guidato dal recettore per SRP

3) Il signal peptide si inserisce nel traslocatore e SRP si stacca

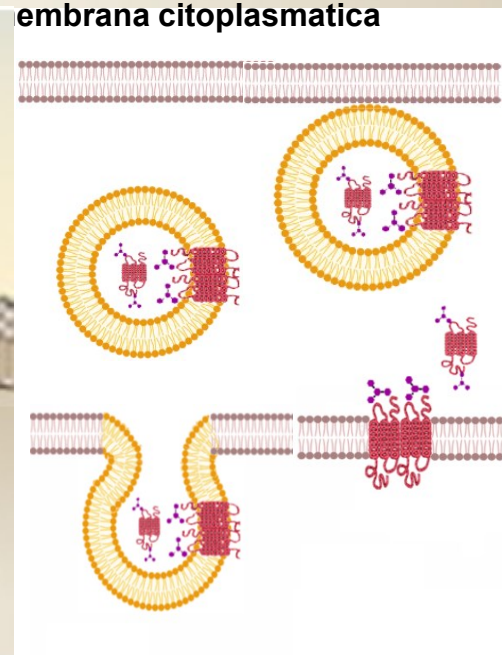
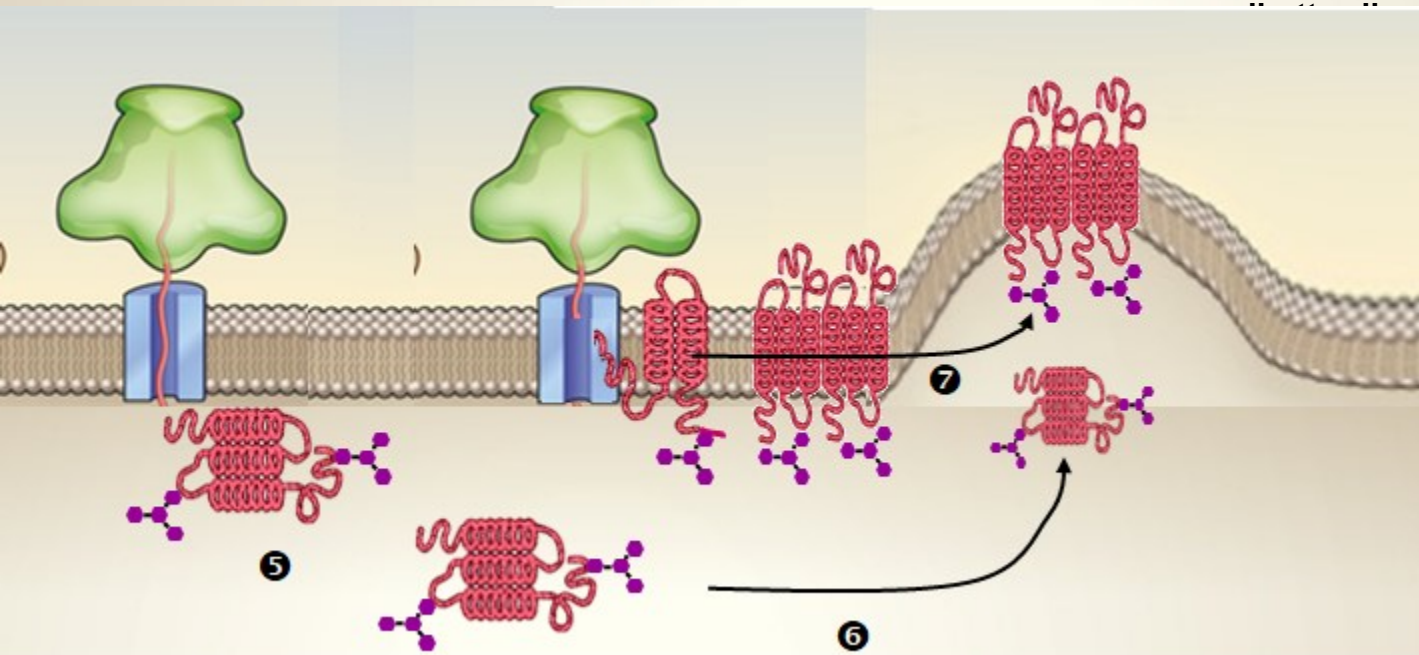
4) Il ribosoma riprende la traduzione



5) Proteine idrosolubili traslocano nel lumen del ER dove vanno incontro a PTM (ponti disolfuro, glicosidazioni, ecc.)

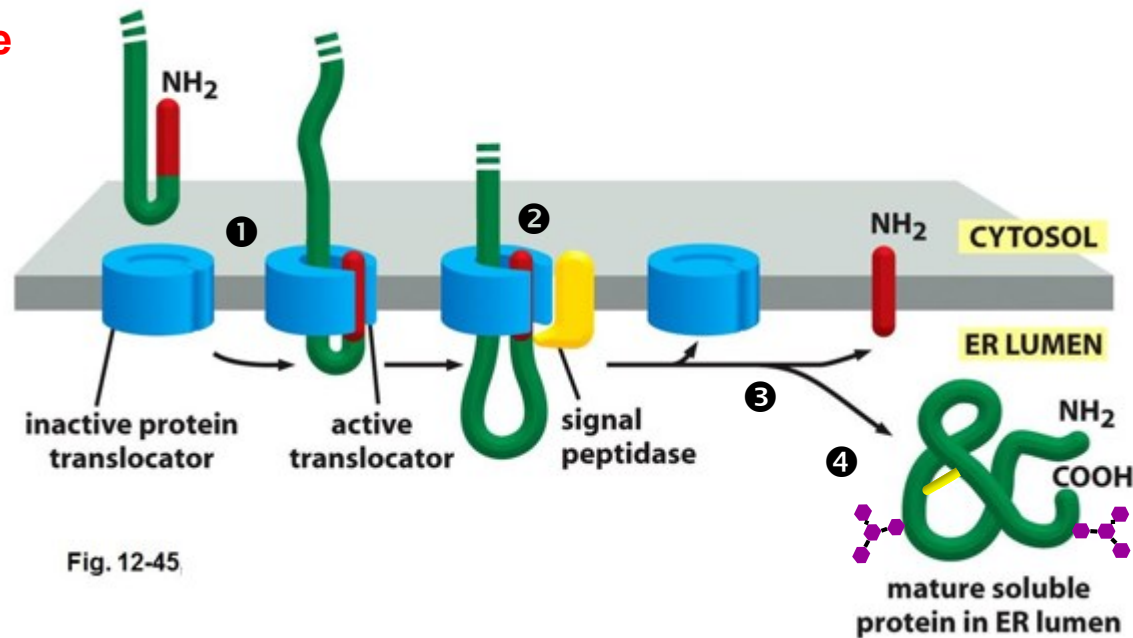
6) Poi sono inserite in vescicole che si staccano dall'ER e sono veicolate tramite l'apparato di Golgi

7) Le proteine di membrana sono inserite direttamente nella membrana a livello delle sequenze TM e poi nelle vescicole membrana citoplasmatica



Proteine solubili non citoplasmatiche

- 1) Il *signal peptide* guida la catena nascente in Sec
- 2) Il *signal peptide* rimane legato a Sec mentre il resto della catena trasloca
- 3) l'enzima *signal peptidase* associato a Sec rimuove il peptide segnale
- 4) La catena si ripiega e va incontro a PTM



Proteine di membrana

- 1) Il *signal peptide* guida la catena nascente in Sec
- 2) Il *signal peptide* rimane legato a Sec mentre il resto della catena trasloca
- 3) Il primo segmento TM entra in SEC
- 4) l'enzima *signal peptidase* associato a Sec rimuove il peptide segnale
- 5) Il segmento TM passa attraverso un varco laterale in Sec ed entra nella membrana
- 6) Questo si ripete per ogni successivo segmento TM

