

109FA Biochimica II e Biologia Molecolare

Modulo 1 Biochimica

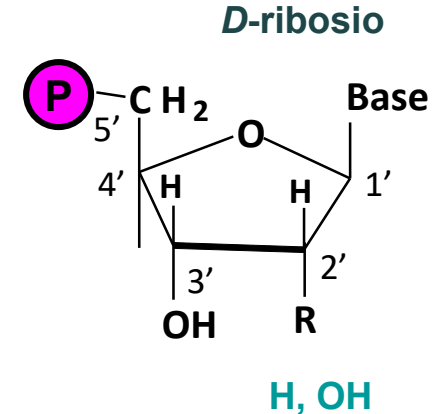
Gli acidi nucleici e loro processi biologici

A. Tossi atossi@units.it

2023-24

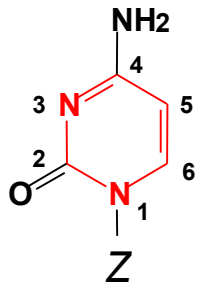
GLI ACIDI NUCLEICI SONO COMPOSTI DA NUCLEOTIDI

- ▶ I nucleosidi sono composti da *D*-ribosio legato ad una base azotata
- ▶ I nucleotidi sono nucleosidi **fosforilati**
 - il **carbonio anomerico** è in posizione 1'
 - la base forma un **legame N-glicosidico** con il carbonio anomerico
 - i **fosfati** possono essere in posizione 5' (più comune), 3' o 2'
 - la posizione 2' è **desossi** nei nucleotidi che compongono il DNA
- ▶ Le **basi azotate** sono molecole eteroaromatiche

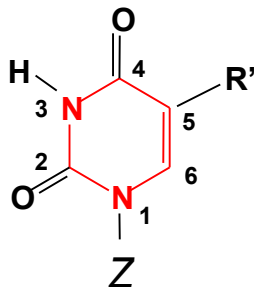


Pirimidine

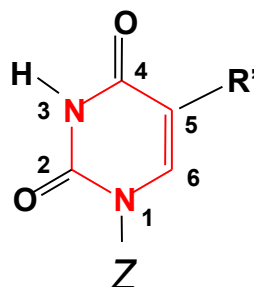
Citosina (C)



Timina (T)
(DNA)

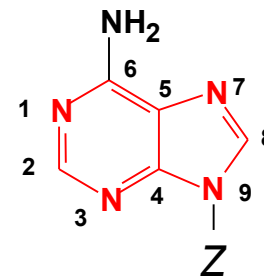


Uracile (U)
(RNA)

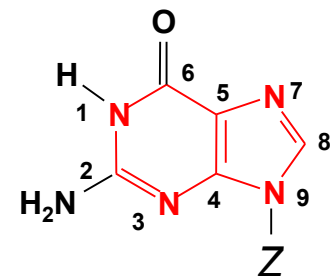


Purine

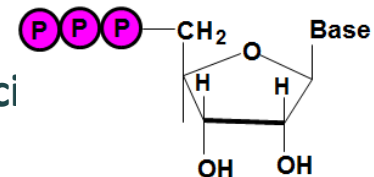
Adenina (A)



Guanina (G)



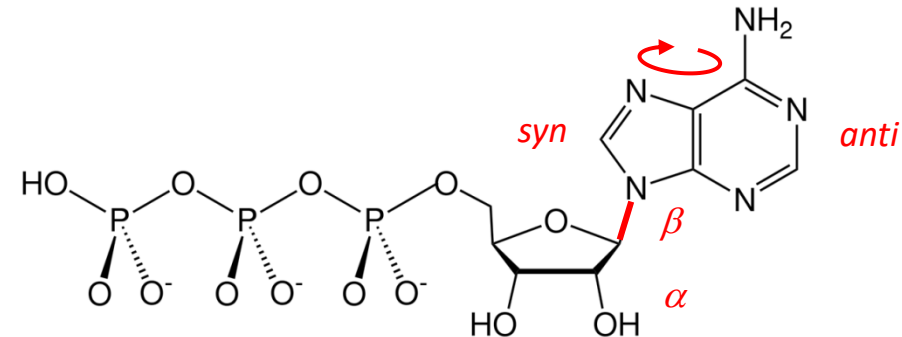
- ▶ ATP, GTP, CTP e UTP → RNA, ed hanno anche **importanti ruoli metabolici**
dATP, dGTP, dCTP e TTP (d sottinteso) → DNA



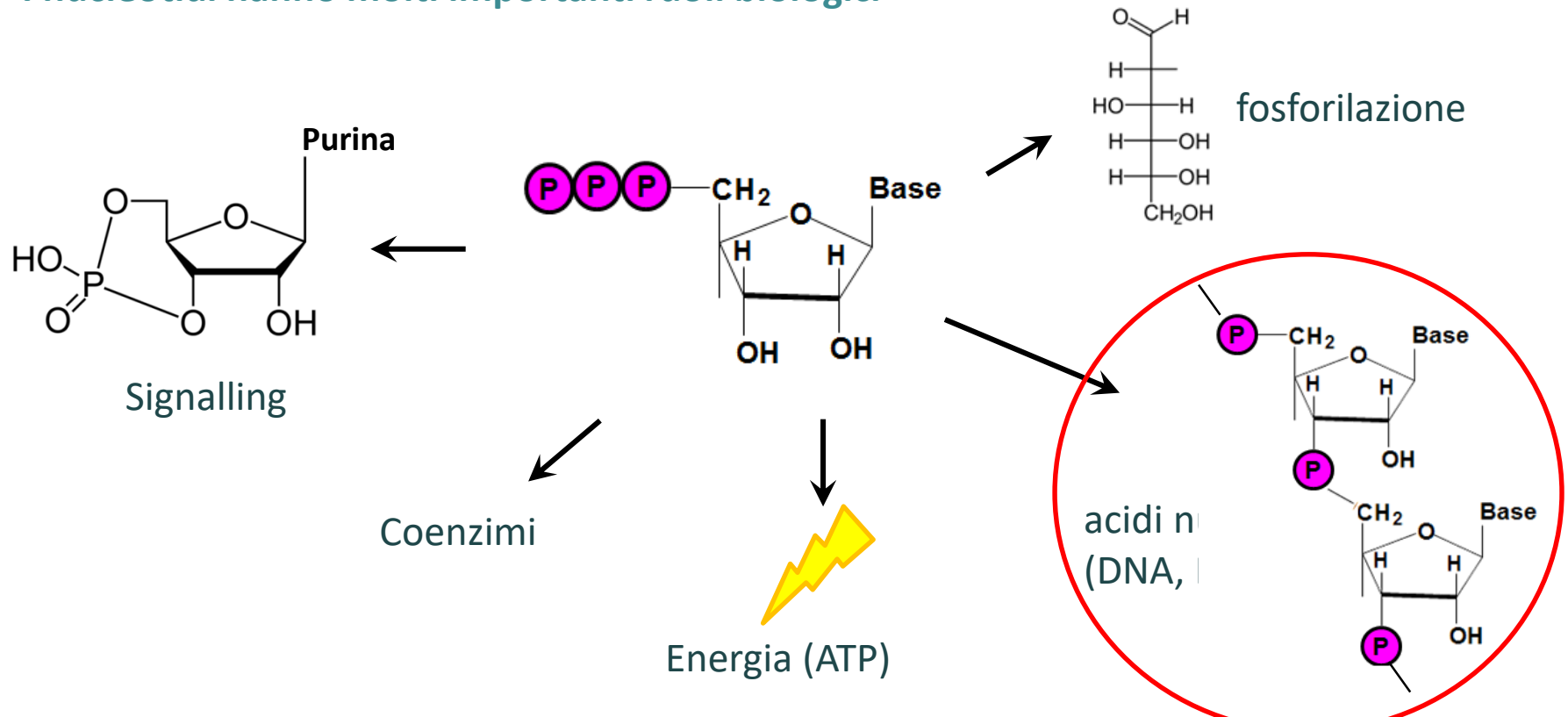
NUCLEOTIDI: aspetti strutturali e funzionali

► Legame N-glicosidico fra base e zucchero

- **configurazione anomERICA β**
- la base preferisce adottare la **conformazione *anti*** per ragioni di ingombro sterico



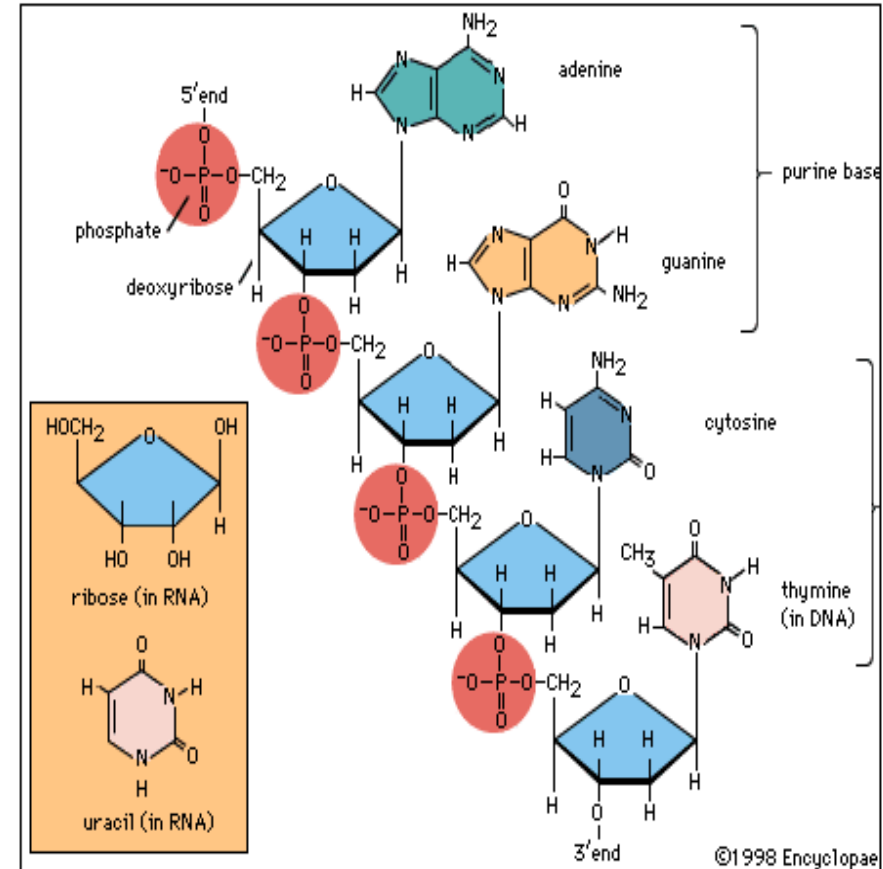
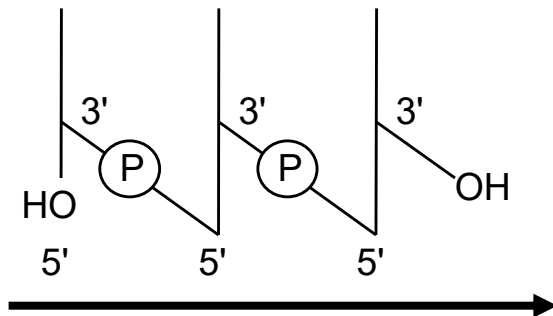
► I nucleotidi hanno molti importanti ruoli biologici



DNA e RNA: struttura 1^a

► DNA/RNA – struttura 1°

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



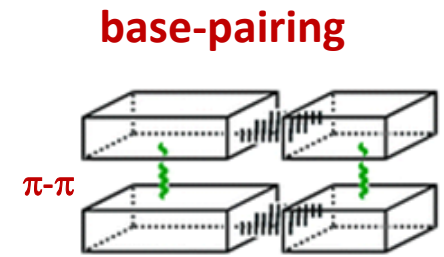
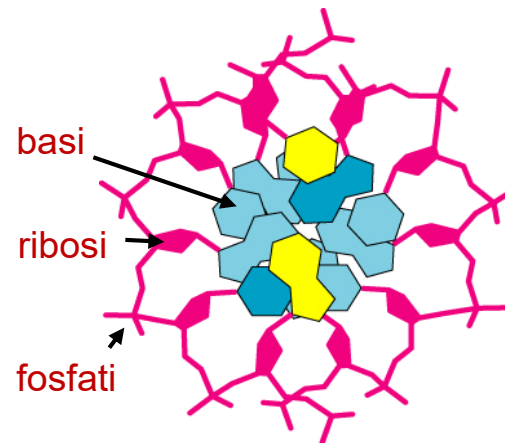
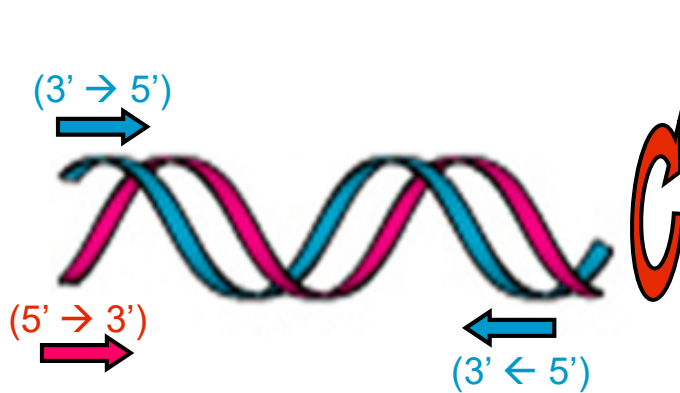
- le catene polinucleotidiche **hanno una direzione** - per convenzione va dal carbonio 5' del ribosio al carbonio 3'

(5' → 3')

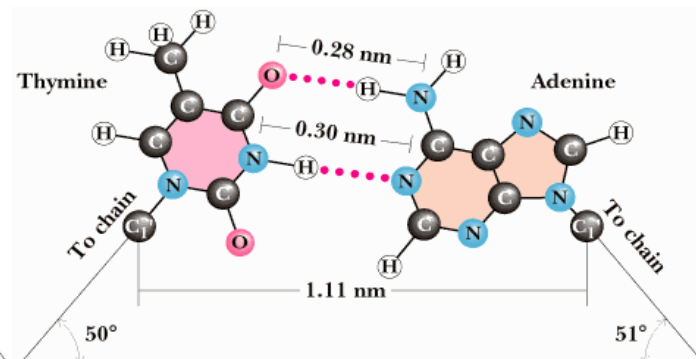
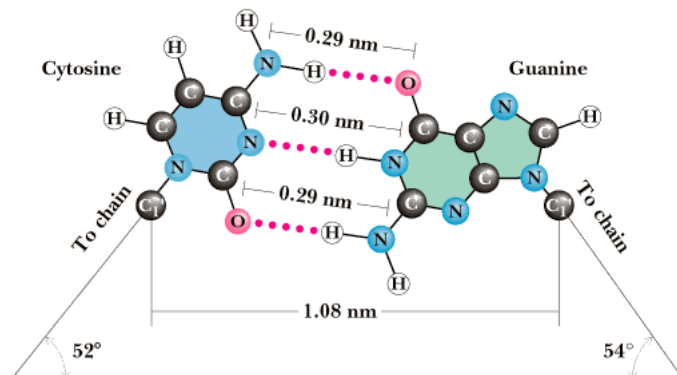
DNA : struttura 2^a

► 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** (interazioni idrofobiche, interazione π - π e legami-H).
- le basi interagiscono all'interno dell'elica in **maniera SPECIFICA** (G:C e A:T; **appaiamento WC**) mediante legami-H (**questa specificità determina i processi di replicazione/traduzione**)



legami-H, idrofobici, π -stacking

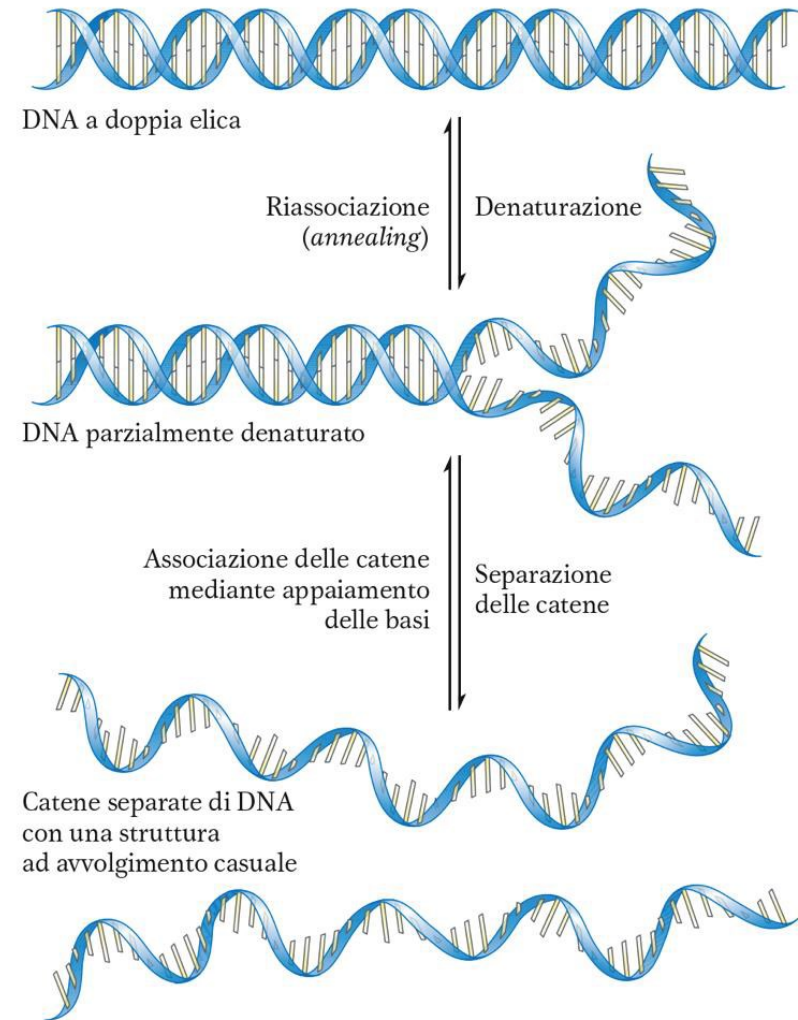
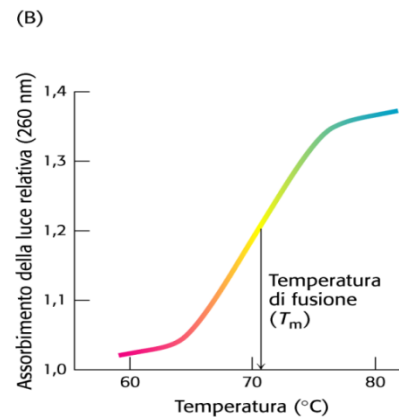
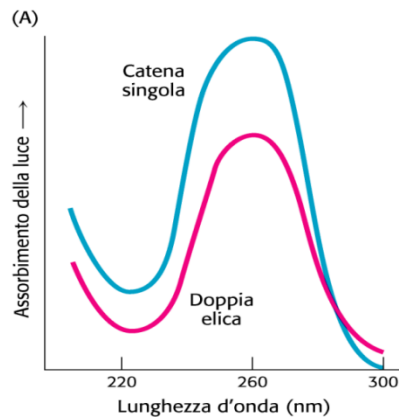


base-pairing secondo Watson-Crick

DNA : struttura 2^a (cont.)

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

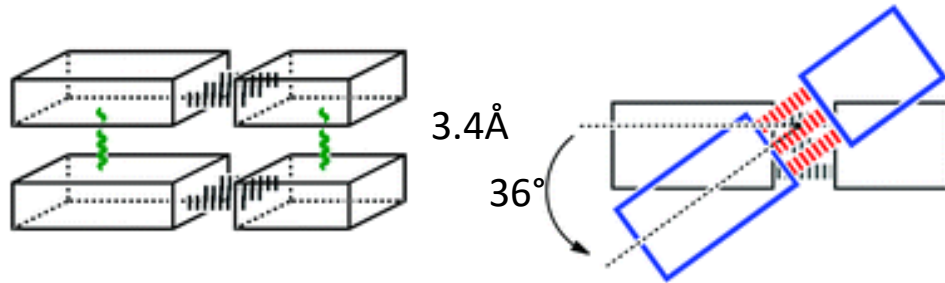
- la **rottura dei legami-H** tra le paia di basi permette la **denaturazione** del DNA e avviene per aumento di temperatura (non fisiologico) o per un processo enzimatico (fisiologico)
- le basi nel DNA denaturato (**ssDNA**) assorbono la luce più intensamente che nel dsDNA (**effetto ipercromico**)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



DNA : struttura 2ª (cont.)

► La doppia elica destrorsa ha una struttura dinamica

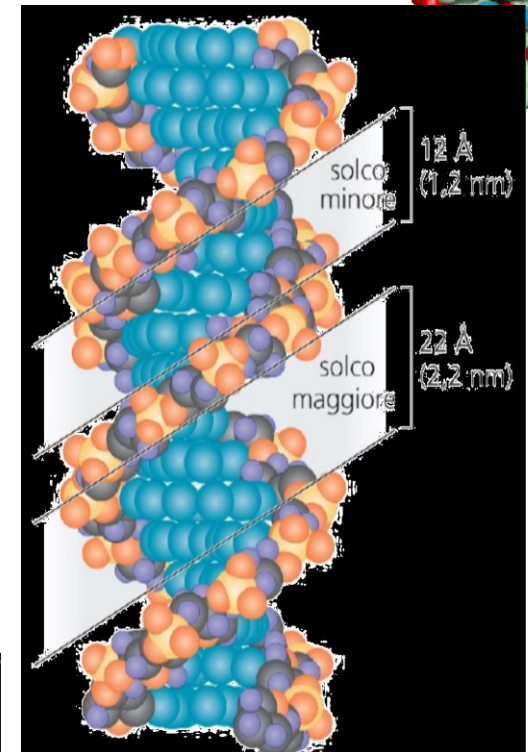
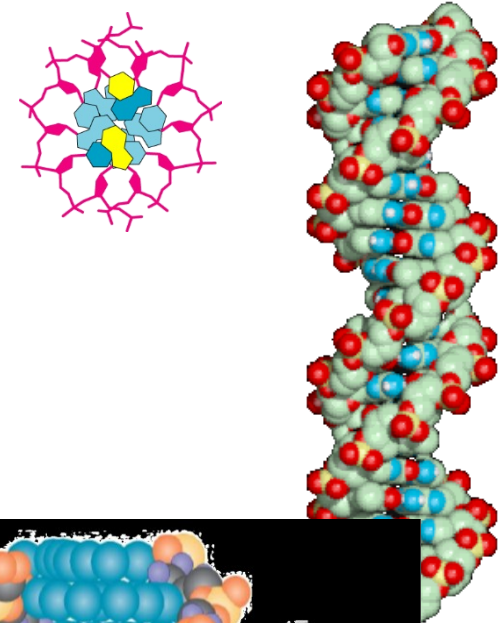
- la configurazione più comune (B-DNA) ha una doppia elica con diametro $\sim 20\text{\AA}$ e le basi sono impilate a $\sim 3.4\text{\AA}$ di distanza, con torsione (base-pair twist) di 36° , 1 giro/10 res.



- 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)

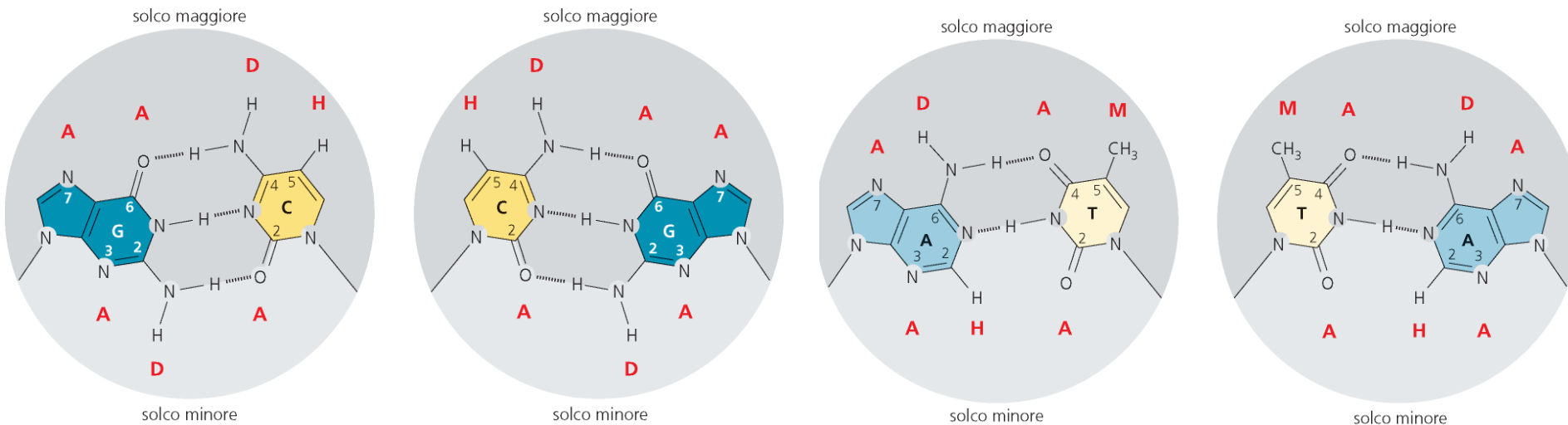
- il **solco maggiore** e il **solco minore** sono foderati dagli atomi sui lati esterni delle basi
- questo permette **interazioni non covalenti** con le proteine che legano al DNA e che possono **riconoscere specifiche sequenze di basi**



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

- ci sono **20 AA** ma **4 basi**; un codice genetico basato su singole basi codificherebbe per solo 4, uno basato su doppiette solo per 16
- Il codice genetico si basa su **triplette di basi** (noti come **codoni**) che permette $4^3 = 64$ diverse unità di informazione; 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	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Esempi: UUU o UUC = codoni per Phe

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

AUG = codone per Met ma è anche il codone di START

UAA, UAG, UGA = codoni STOP

Ridondanza: 6 x L, R, S 4 x V, P, T, A, G 3 x I, Stop 2 x F, Y, N, K, D, E, Q, C 1 x Start, M, W

DNA : leggere il codice genetico

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

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)

GUCGCCCCAUGGGGUCGUGAUAGACAGCCCGCUUAACGCCAU

Met Gly Arg Asp Arg Gln Pro Gly Stop

Mutazioni puntiforme

sinonima / non sinonima
(missense)

GUCGCCCCAUGGGGCGUGAUUAUAGCCCGCUUAACGCCAU

Met Gly Arg Asp Ile Stop

stop prematuro
(nonsense)

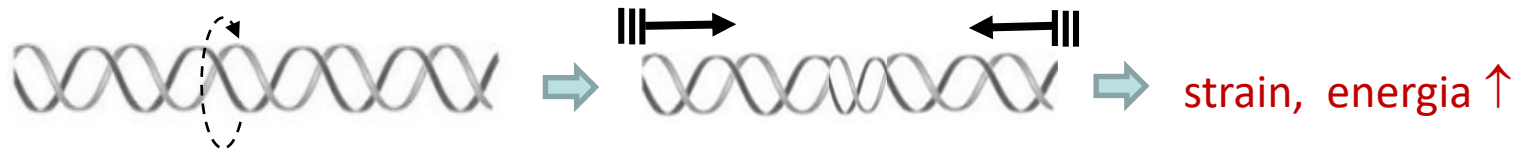
GUCGCCCCAUGGGGGUGAUUAUACAGCCCGCUUAACGCCAU

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

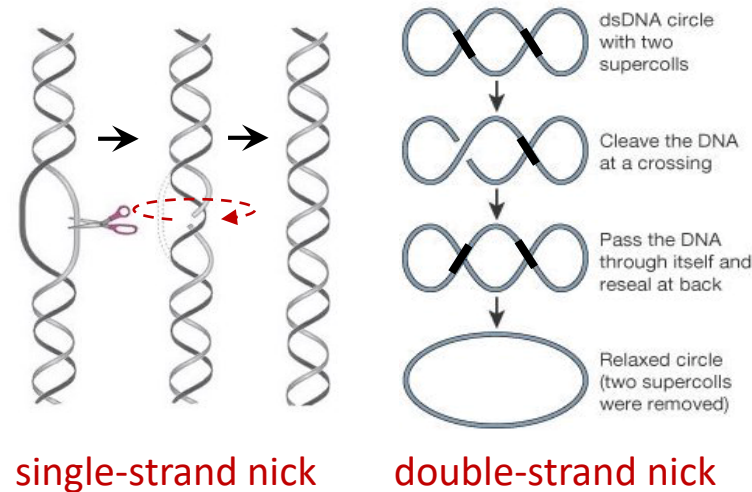
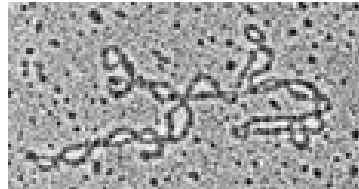
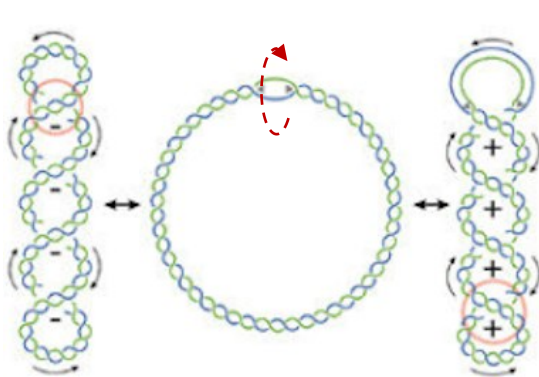
inserzione/Delezione
slitta la cornice di lettura

► La doppia elica può adottare strutture a più alto livello

- Le molecole di DNA possono essere lineari e molto lunghe, o circolari (es. cromosomi procariotici, plasmidi) e questo impedisce il disavvolgimento/avvolgimento locale



- se sovra- o sotto-avvolte (normale ≈ 10 res./giro), serve **rilassare lo strain** formando strutture topologiche superiori (**strutture super-avvolte**), che altera l'interazione con altre molecole
- Il super-avvolgimento può essere negativo e positivo (dipende dal senso d'avvolgimento)



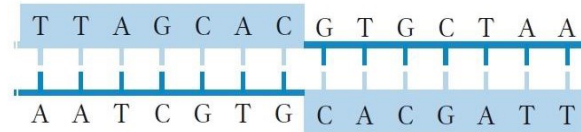
- Specifici enzimi, le **topoisomerasi** possono variare il grado di super-avvolgimento effettuando tagli transienti a livello di uno o di entrambe i filamenti di DNA

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

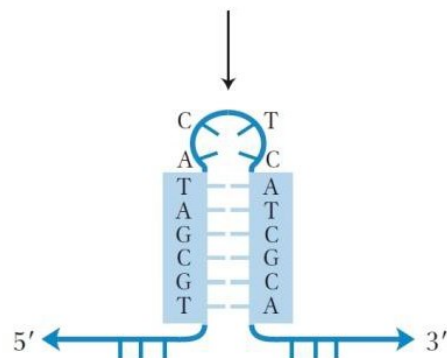
rotazione di 180 °C attorno all'asse orizzontale e 180 °C sull'asse verticale



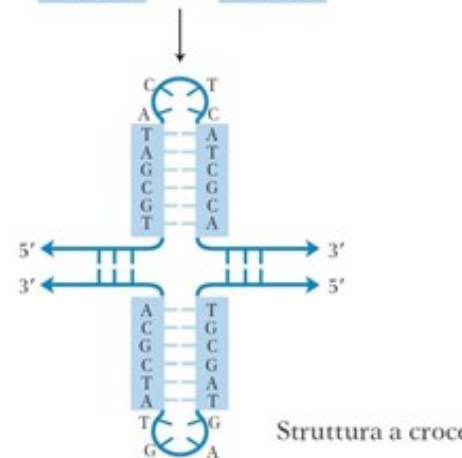
palindromo

autocomplementari

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



Struttura a forcina



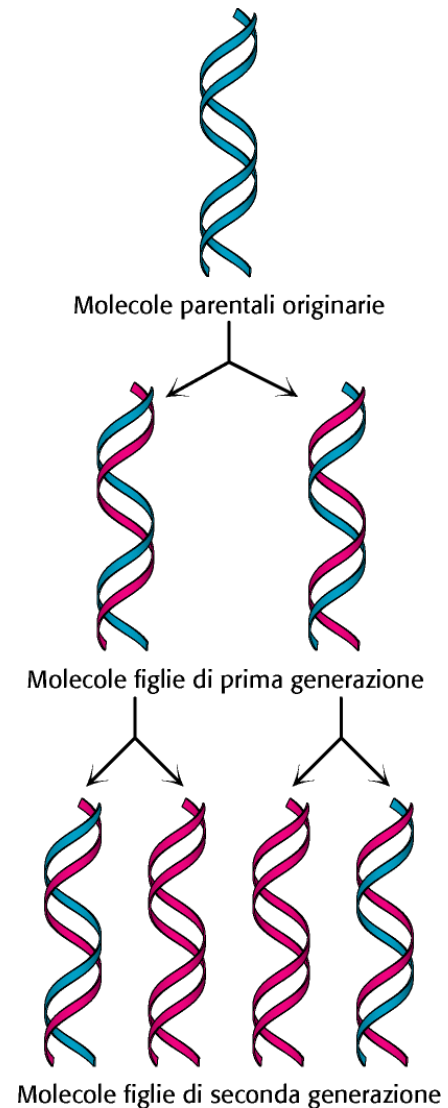
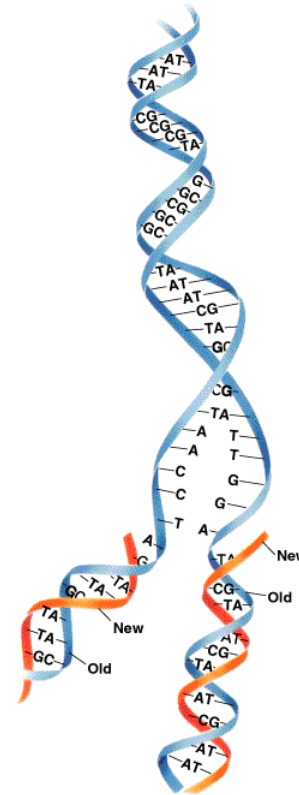
Struttura a croce

DNA: replicazione semiconservativa

► La replicazione di 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)

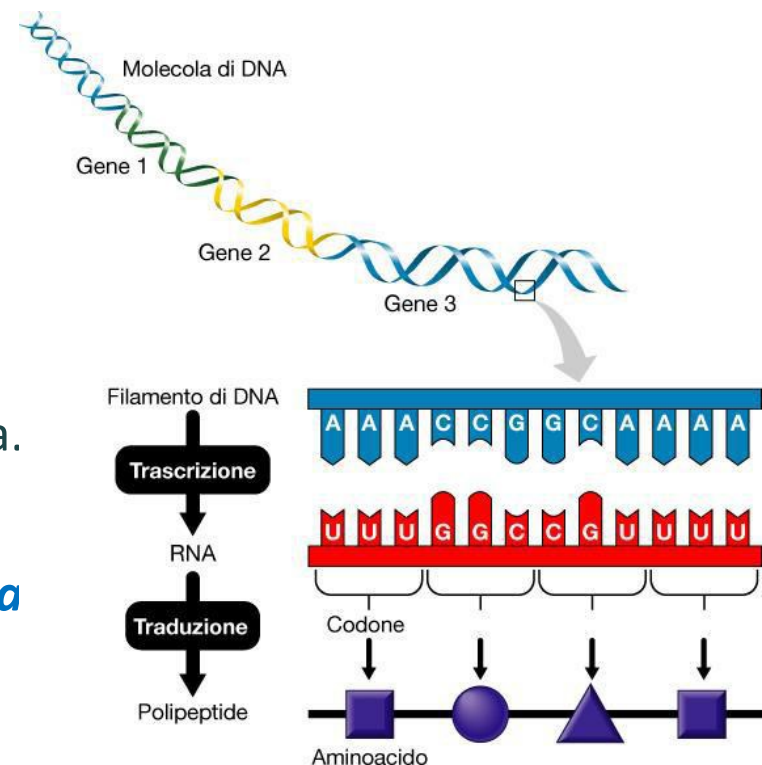
tRNA - funzione di raccordo (trasporta il corretto AA corrispondente ad un codone)

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

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

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

Vedere scheda sul sito Moodle del corso per una lista più completa



► RNA DI TRANSFER (tRNA)

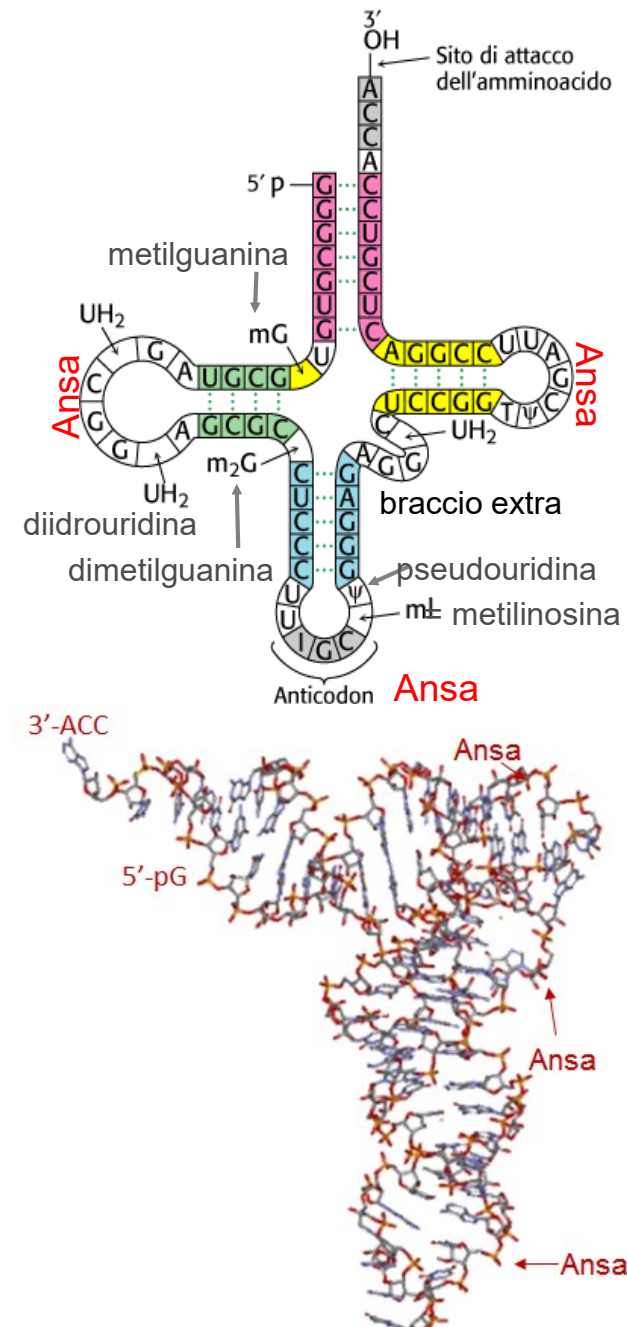
- **molecole adattatrici** che contengono una sequenza (tripletta di residui nota come **anticodone**) complementare alla tripletta del codone che lo codifica

- hanno una **topologia a trifoglio**, dove i terminali 3' e 5' sono vicini e **terminale 3' porta l'amino acido** legato al 2' o 3' del ribosio, mentre l'ansa centrale del trifoglio porta la tripletta che riconosce il codone nell'mRNA (**ansa del anticodone**).

- ha una **forma ad «L»** e la singola catena di 73 - 93 nucleotidi che si ripiega in modo che ~ la metà formano **tratti a doppia elica** che corrispondono agli steli nella topologia a trifoglio e le **zone a singolo filamento corrispondono alle anse**

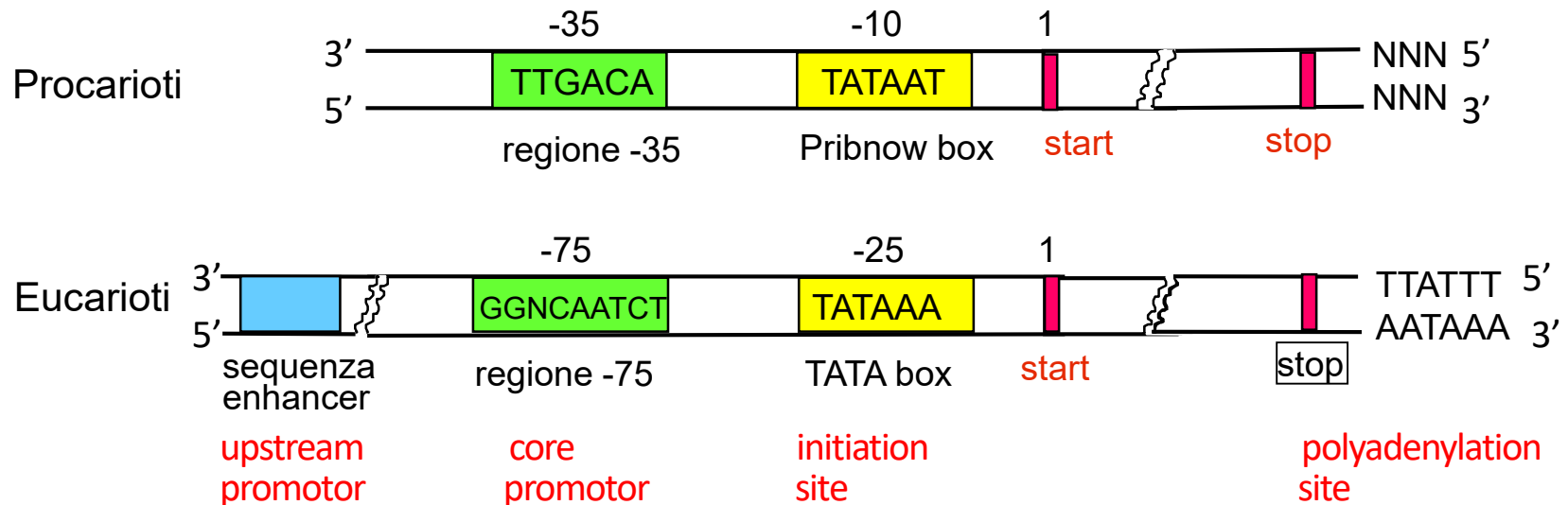
- contiene diverse **basi inusuali**, derivate da A, U, C e G, che formano **appaiamenti non-WK** e al 5' si trova un G fosforilata e al 3' la tripletta CCA con l'AA legato ad A

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



Flusso dell'informazione genetica – il Dogma Centrale

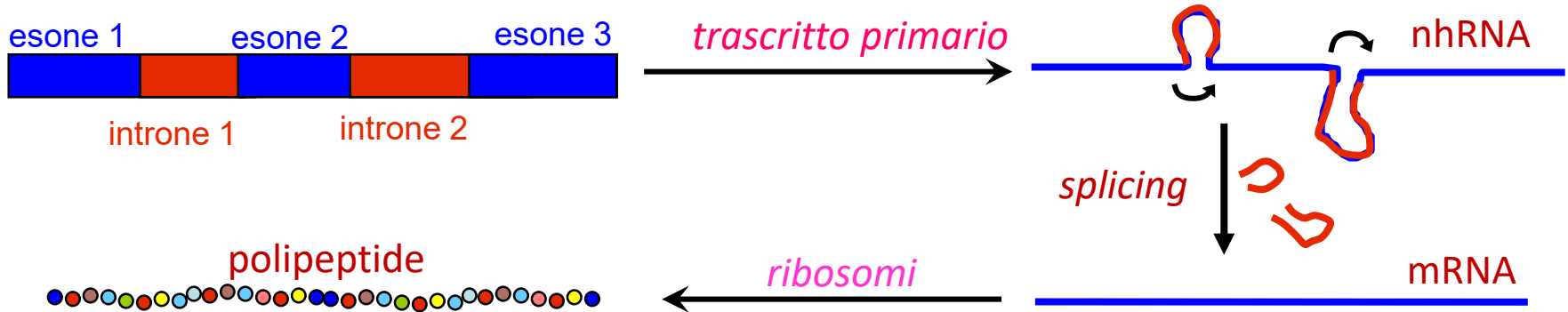
- ▶ Il flusso di informazione genetica va dal DNA al mRNA ai ribosomi.
 - La **replicazione** = **uplicazione del DNA** (due molecole identiche)
 - La **trascrizione** = **DNA → mRNA** (con sequenza identica ma T → U)
 - La **traduzione** = **mRNA → polipeptide** (sequenza nucleotidica → amminoacidica)
- le sequenze dei geni e delle proteine che codificano sono **COLINEARI**.
- la **trascrizione** inizia nella vicinanza di specifiche sequenze conservate, i cosiddetti "**SITI PROMOTORI**" e termina a livello di sequenze specifiche note come "**SITI TERMINATORI**"



- la **traduzione** è governata dai **specifici segnali di start e stop** presenti nel mRNA; i segnali *start* sono preceduti da specifiche sequenze che legano l'apparato proteico necessario per la traduzione mentre i segnali *stop* sono riconosciuti da proteine note come fattori di rilascio, che staccano l'RNA 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)**

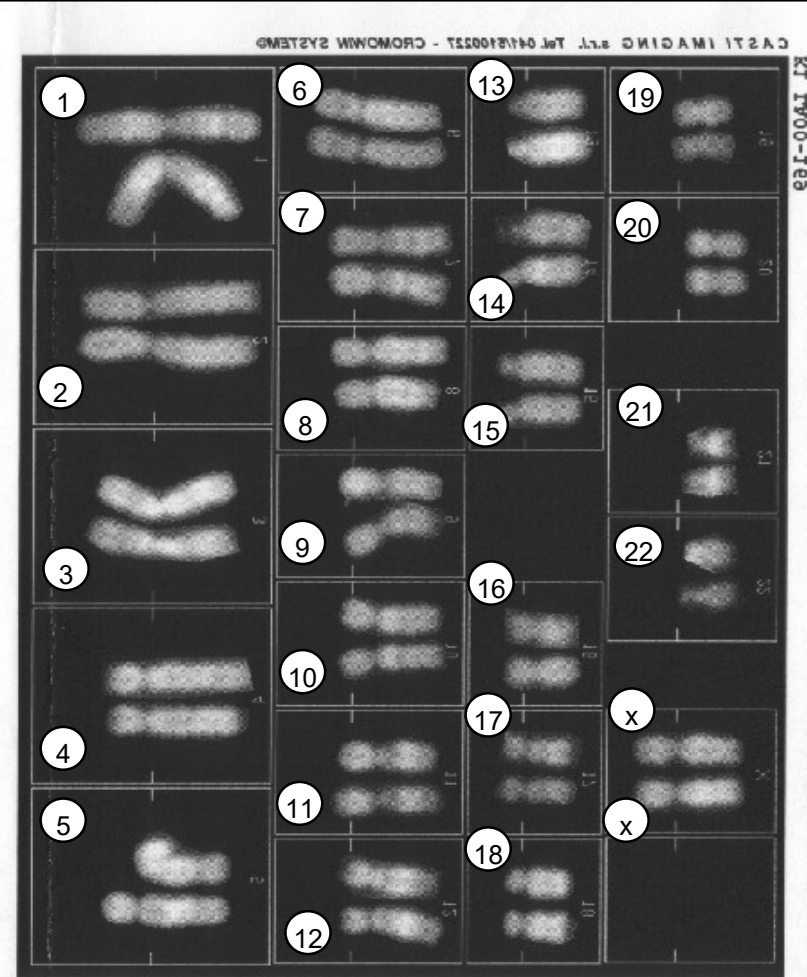
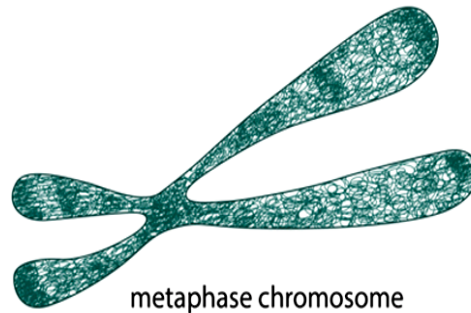
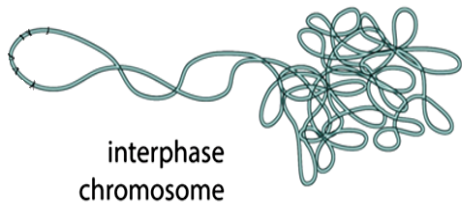


- l'**RNA inizialmente trascritto** è una **copia esatta dell'intero gene** con introni ed esoni (RNA nucleare eterogeneo, **nhRNA**)
- gli introni sono rimossi (**splicing**) da complessi proteina/RNA noti come **spliceosomi** e l'RNA ricongiunto come catena unicamente codificante (maturo, mRNA)
- è un processo **co-trascrizionale** e i **spliceosomi** riconoscono **specifici segnali intronici** e rimuovono gli introni 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 di esoni** che codificano elementi strutturali discreti
- lo **splicing differenziato (alternative splicing)** di mRNA genera proteine correlate ricomponendo l'RNA nascente in diverse maniere (aumenta la **diversità genica**)

struttura del cromosoma nel uomo

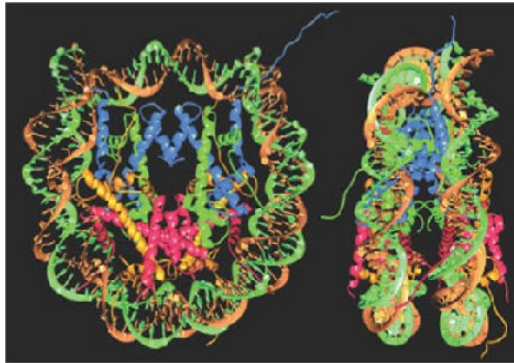
► il materiale genetico umano è organizzato in 23 paia di cromosomi

- 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

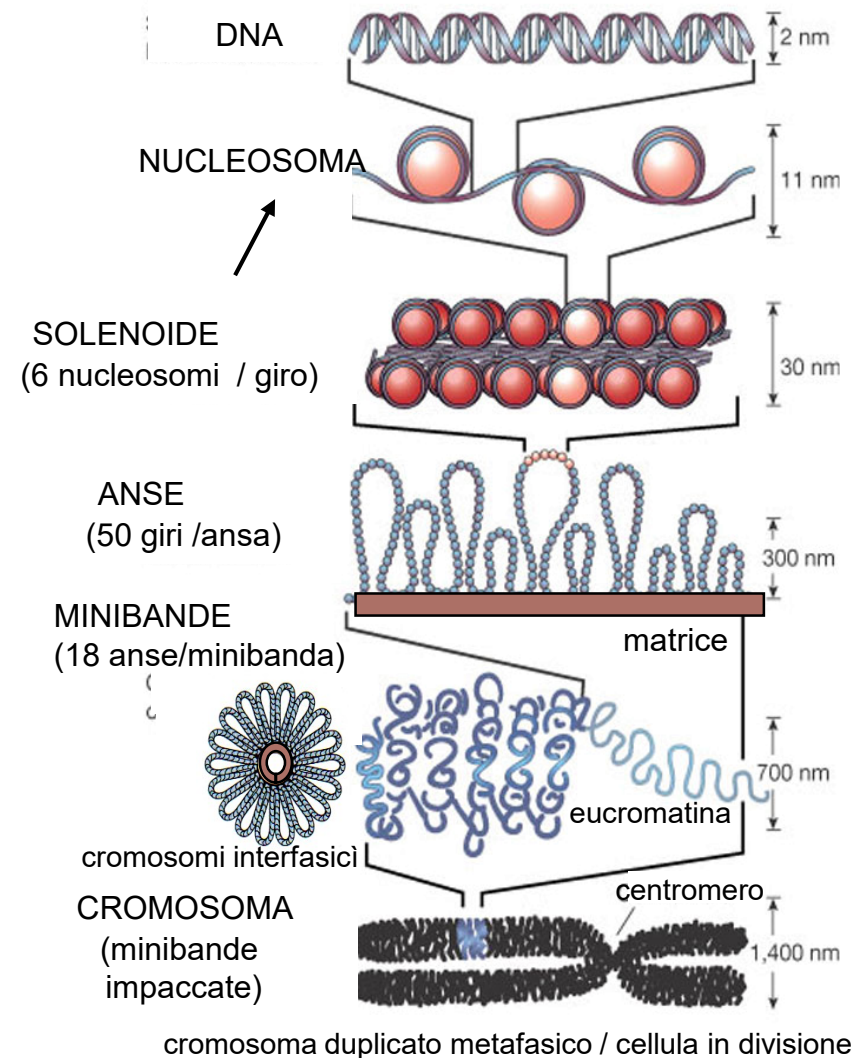


struttura del cromosoma (cont.)

- 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**
- questo 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 solenoide → ca. 1200 bp ansa → 60-150 kb,
minibanda → 1-3 megabasi cromosoma tipico → 10^6 minibande.

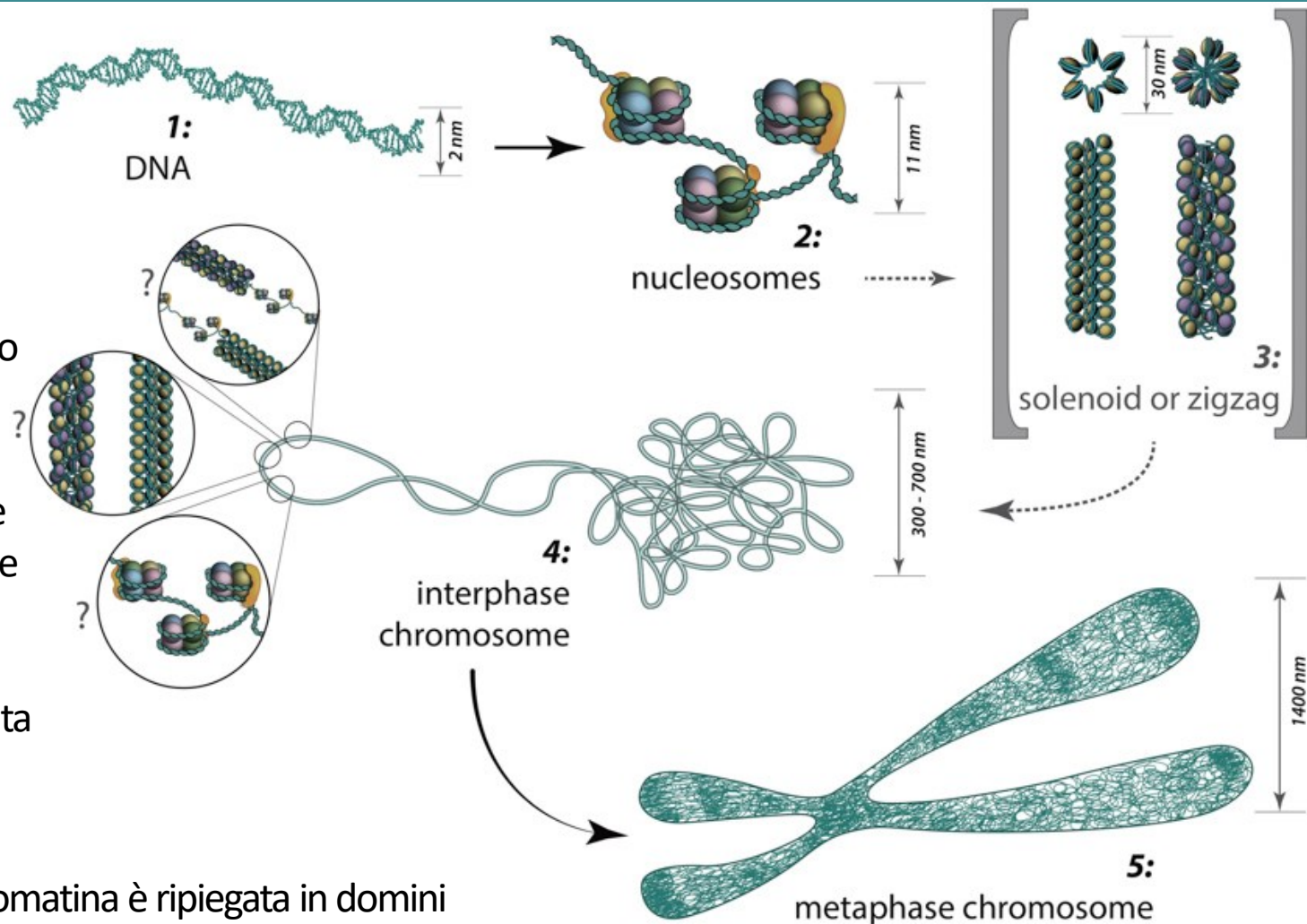
struttura del cromosoma (cont.)

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

- Ulteriore condensazione della cromatina nelle fibre da 30 nm (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 nm (4); insieme costituiscono un **territorio cromosomico**.

- La struttura e l'**organizzazione** dei circuiti cromatinici all'interno di un **territorio cromosomico** rimane **oggetto di dibattiti** ed è stata proposta l'esistenza sotto forma di solenioide, o zigzag (2), o nucleosomi, o un ibrido 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 di 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

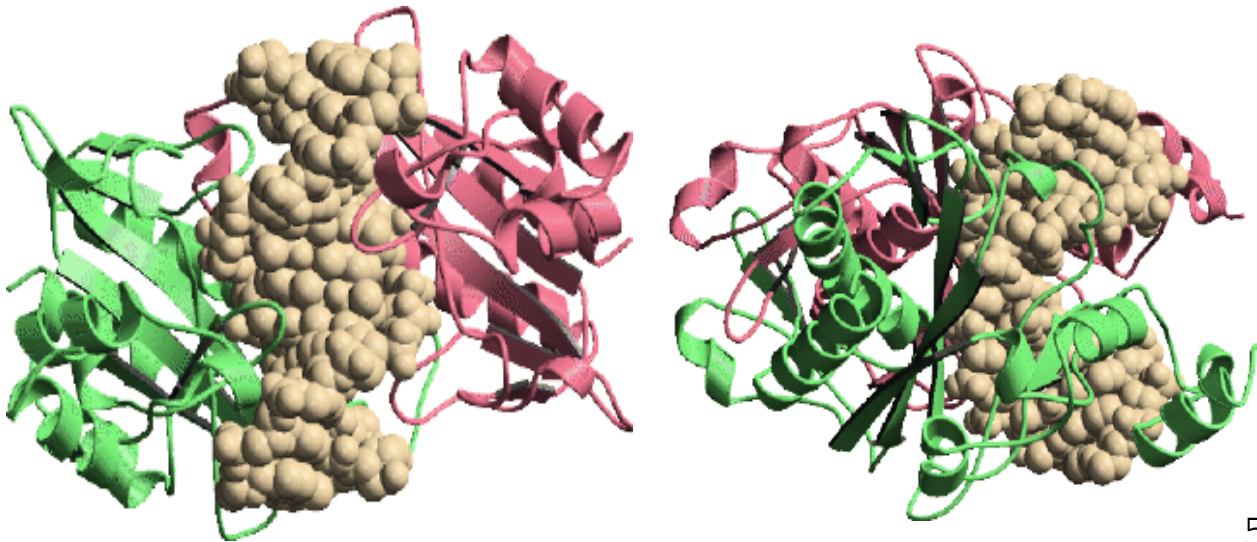
- idrolizzano il legame fosfodiesterico in una catena di DNA (**DNA_{si}**) o di RNA (**RNA_{si}**)

endonucleasi - tagliano una catena all'interno

esonucleasi - staccano nucleotidi dalle estremità della catena

Enzimi che agiscono sul DNA: Endonucleasi di restrizione

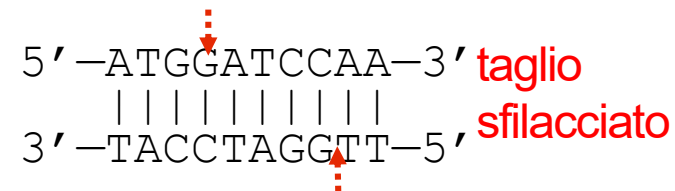
- **sistema di difesa batterico** contro virus (fagi); agiscono solo su DNA di origine esogena mentre il DNA endogeno è protetto mediante metilazione delle basi.
- sono di **3 tipi**: 1) **I** aspecifici; 2) **II** specifici per sequenze palindromiche e non necessitano ATP; 3) **III** specifici per sequenze invertite e necessitano ATP



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

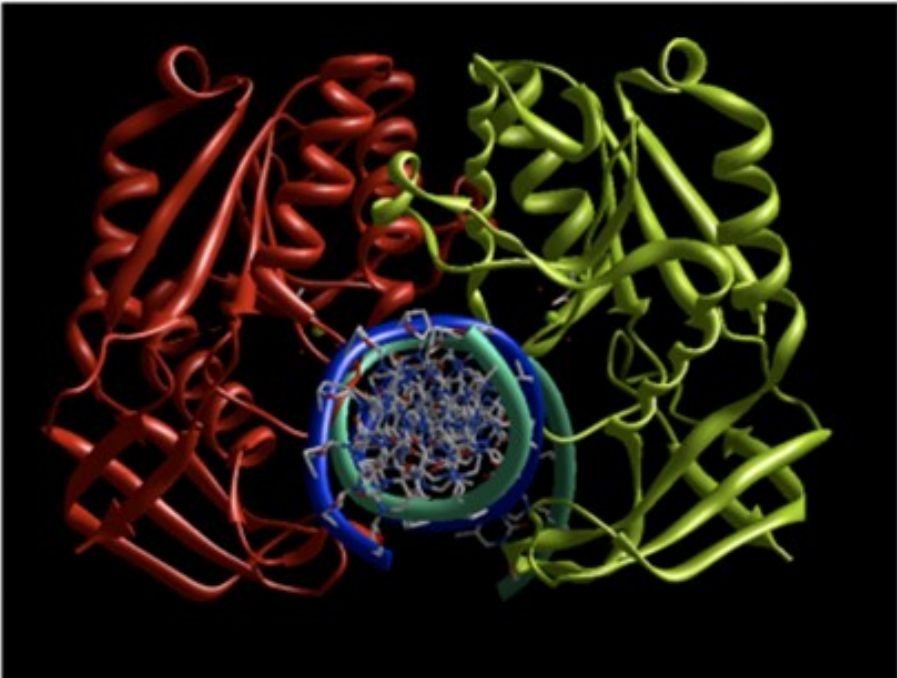
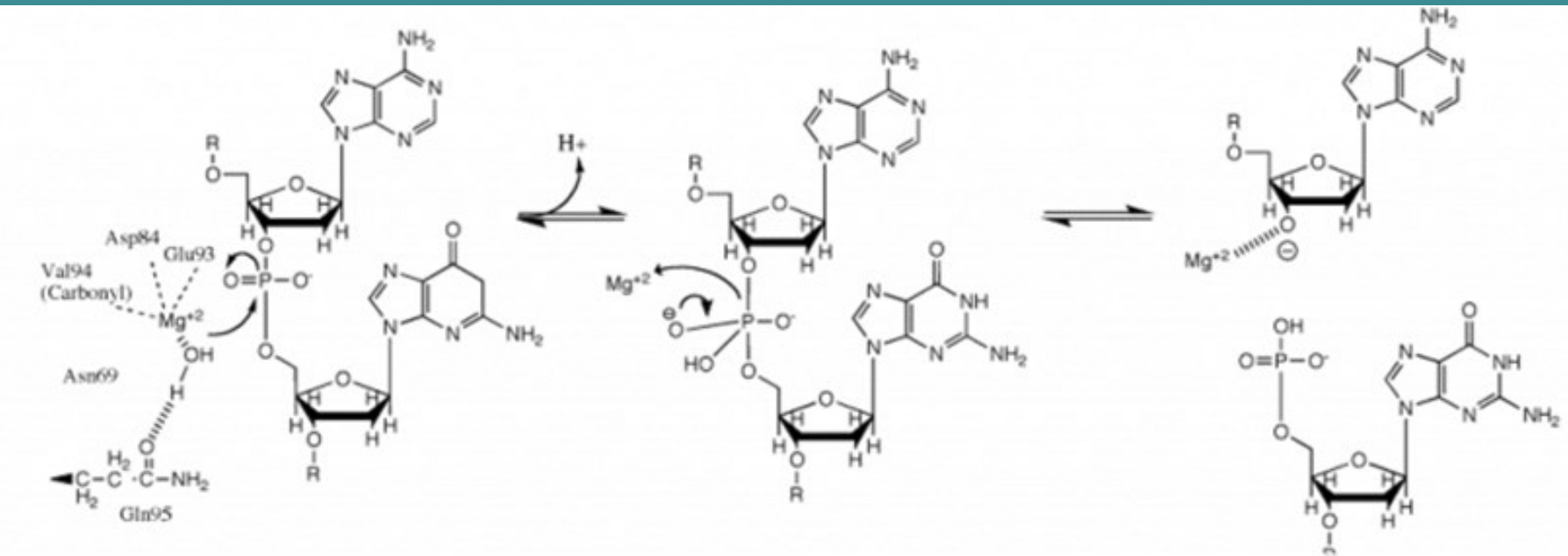


Sito di taglio di BamH1
(*B. megaterium*) TIPO II

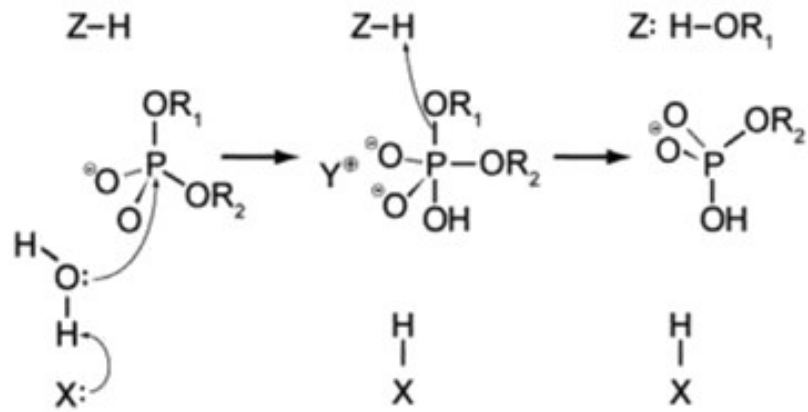


- Sono **proteine omodimeriche** simmetriche che riconoscono un bersaglio simmetrico.
- **sondano il solco maggiore scorrendo lungo il doppio filamento** di DNA fermandosi in **corrispondenza al sito palindromico** (riconoscono uno specifico pattern di basi).
- sia l'enzima che il DNA subiscono mutamenti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

Endonucleasi di restrizione - meccanismo



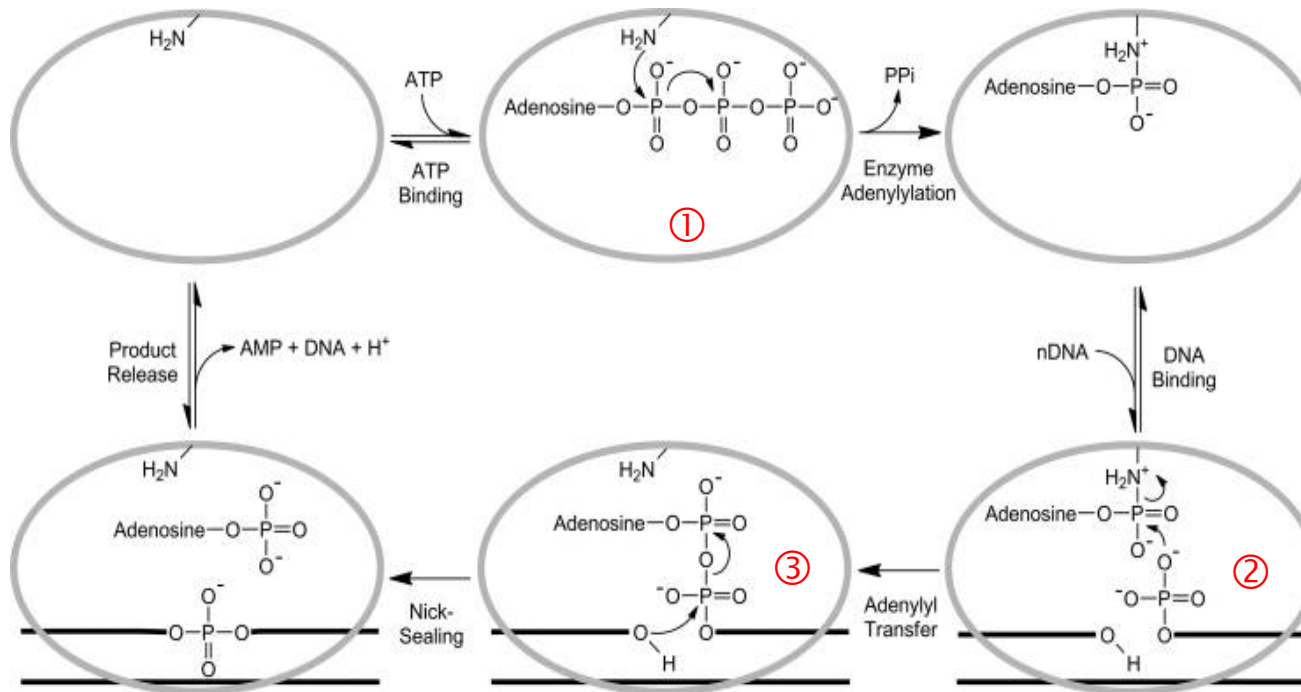
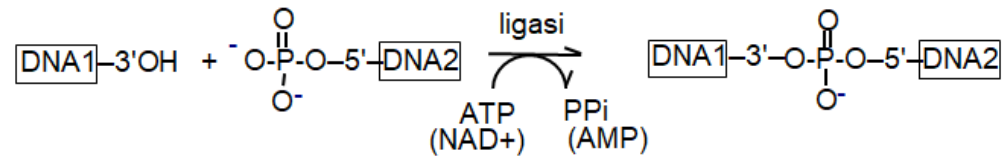
Type II Restriction Endonuclease, *Bg/II*



Enzimi che agiscono sul DNA: Ligasi

► LIGASI - 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

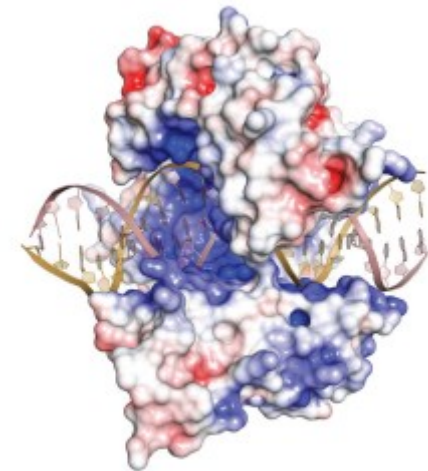


- **agiscono su dsDNA**, chiudendo rotture su una o entrambe delle due catene;

- **Attivatore** (eucarioti: ATP batteri: NAD⁺)

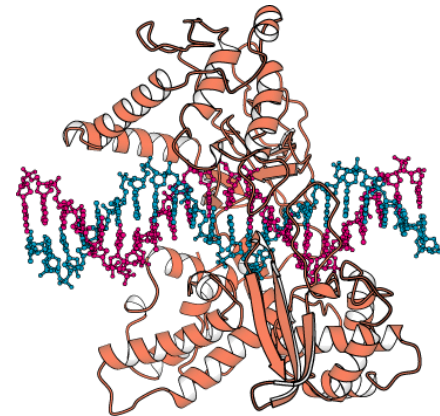
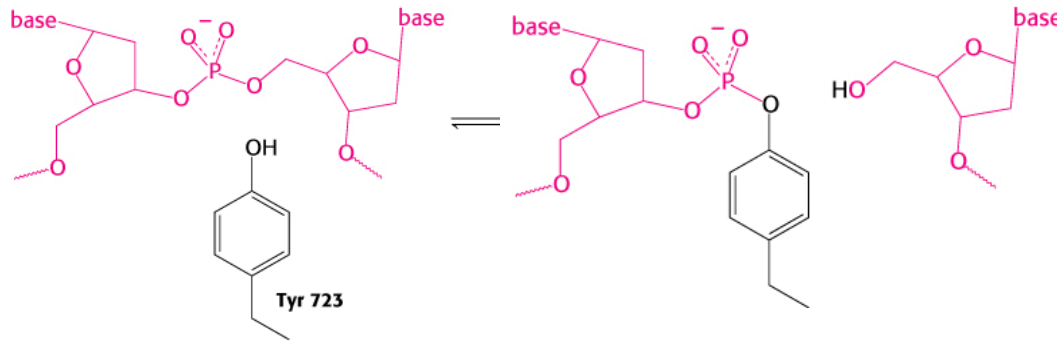
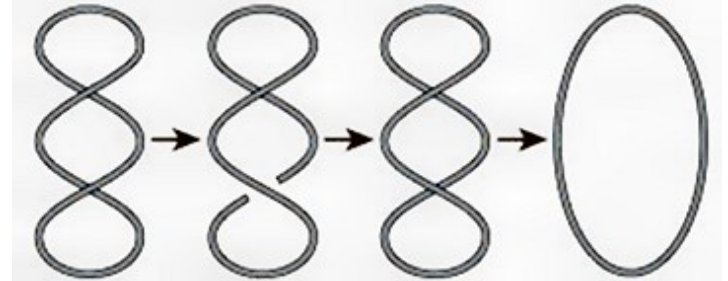
(1) **formazione intermedio:** AMP legato a gruppo amminico dell'enzima

- (2) **Trasferimento di AMP** al fosfato 5' del frammento di DNA tagliato
- (3) **Attivazione P 5'** per legame con OH 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.



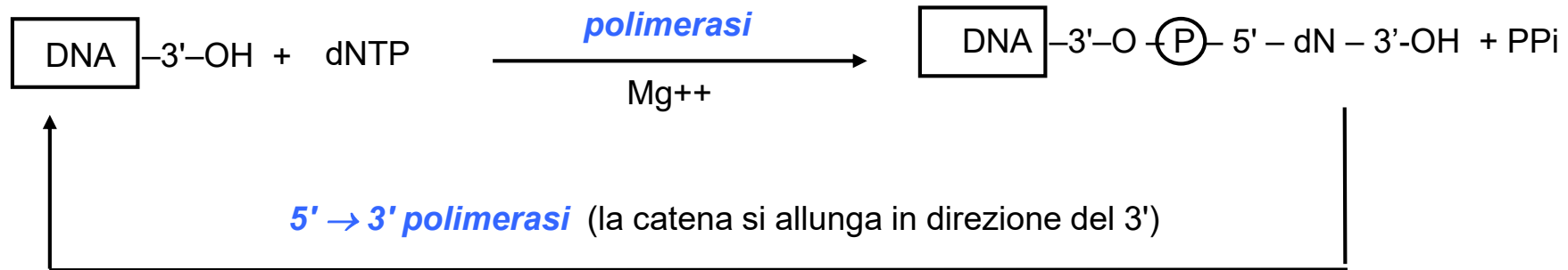
- Le topoisomerasi e girasi sono necessarie durante la replicazione o trascrizione del DNA, per evitare **crisi topologiche** a monte e/o a valle del DNA localmente disavvolto.
- la girasi batterica è bersaglio di **antibiotici** (novobiocina, acido nalidixico, ciprofloxacina) e la topoisomerasi di tipo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

Enzimi che agiscono sul DNA: DNA polimerasi

► Le polimerasi: enzimi coinvolti nella sintesi del DNA durante la replicazione/trascrizione.

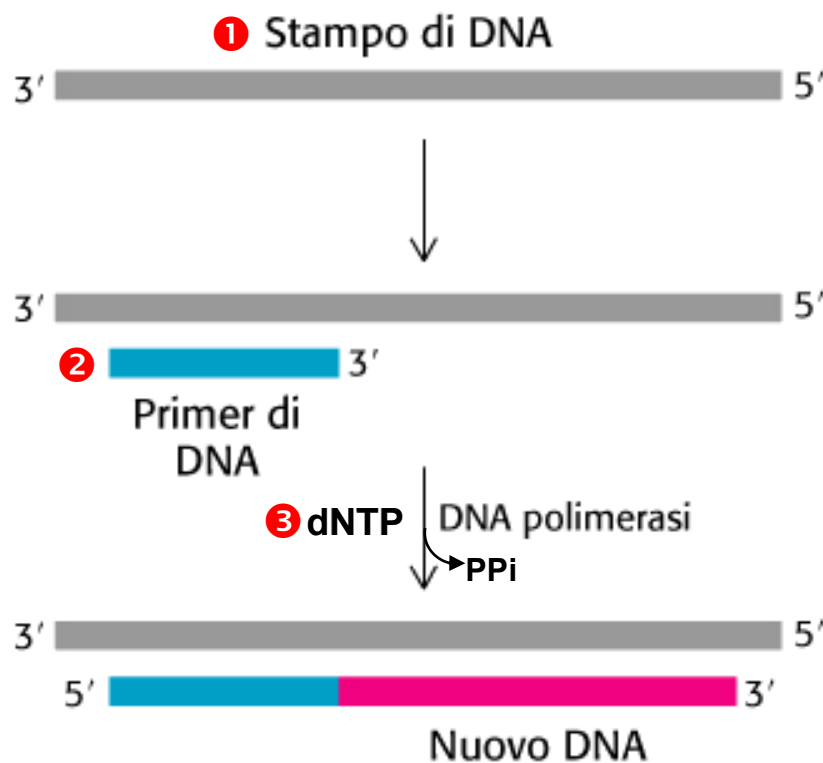
Esempio: DNA POLIMERASI I di E. coli:

- sintetizza singoli filamenti di DNA utilizzando desossinucleotidi trifosfati (dNTP = dATP, dGTP, dCTP o dTTP - nucleotidi attivati)



- è un **enzima processivo** che aggiunge in media 20 residui prima di staccarsi (NB: un **enzima distributivo** si lega e si stacca ad ogni ciclo).
- mostra **tre attività catalitiche**:
 - **attività polimerasica** ($5' \rightarrow 3'$ polimerasi)
 - **due distinte attività idrolasiche** ($3' \rightarrow 5'$ idrolasi e $5' \rightarrow 3'$ idrolasi)
 - > la prima agisce su basi male appaiate (non W-C) come **meccanismo di auto-correzione**.
(rimuove basi incorrettamente appaiate)
 - > la seconda serve per completare l'opera di replicazione della *DNA polimerasi III*

DNA polimerasi I (cont.)



- DNA polimerasi I necessita:

1) Di un **FILAMENTO STAMPO** (catena singola di DNA) sul quale agire) - sintetizza una catena **esattamente complementare** allo stampo (mediante corretto appaiamento W-C fra base entrante e base dello stampo

2) catena **PRIMER** (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 lo richiedono**).

3) **dNTP** come mattoncini molecolari per costruire la nuova catena di DNA

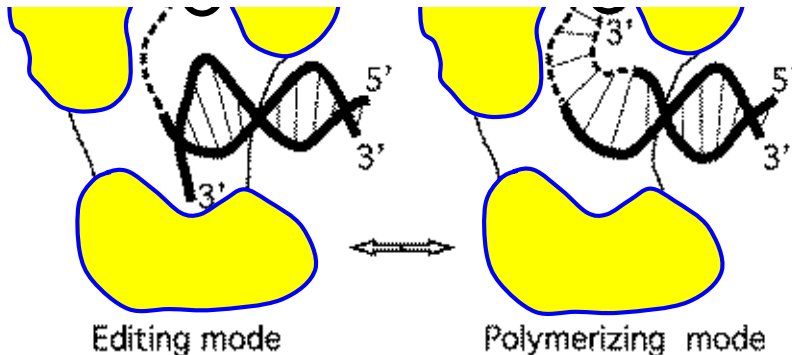
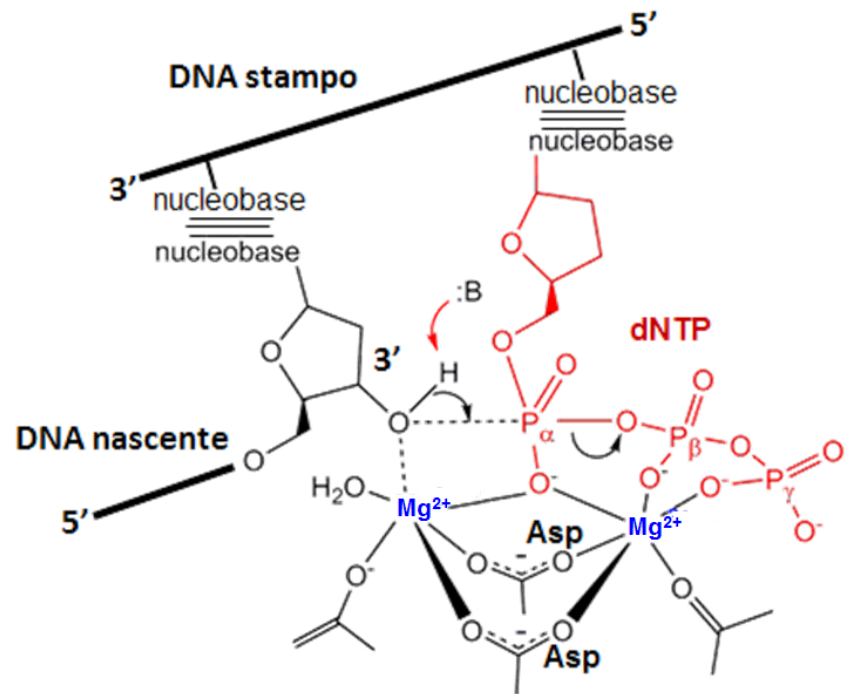
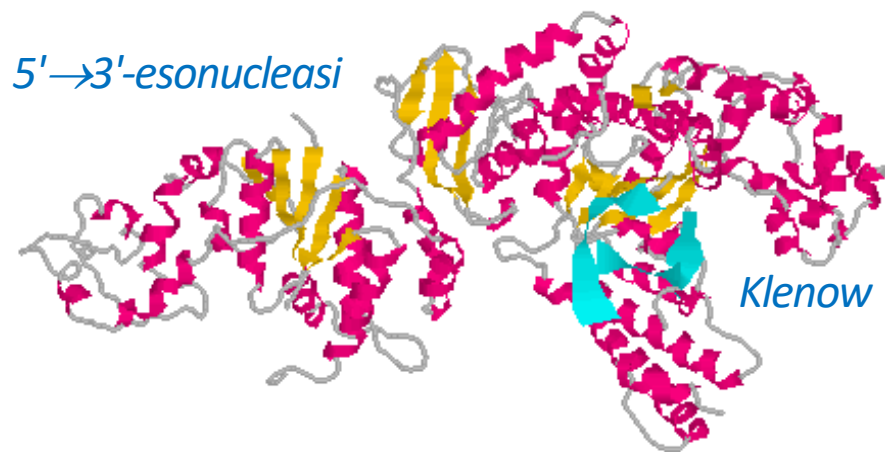
- La DNA polimerasi si lega alla catena stampo in prossimità del primer e :
 - **raramente inserisce basi male appaiate** (attività $5' \rightarrow 3'$ polimerasi molto fedele)
 - **controlla l'appaiamento** dopo ogni accoppiamento
 - **elimina residui con basi incorrettamente appaiate** (con l'attività $3' \rightarrow 5'$ esonucleasica)
 - **completa l'opera** della DNA polimerasi III (con l'attività $5' \rightarrow 3'$ esonucleasica, rimuovendo il primer inserito da quest'ultima) (vedi Slide 29)

DNA polimerasi I (cont.)

► Meccanismo d'azione e di editing

- *DNA polimerasi I* riunisce le tre attività catalitiche in una **singola catena polipeptidica**.
- la *Tripsina* la scinde in **due subunità autonomamente attive**, con la *5'→3'-esonucleasi* nel dominio N-terminale. L'altro frammento contiene la *3'→5' esonucleasi* e *5'→3' polimerasi* (frammento di Klenow).

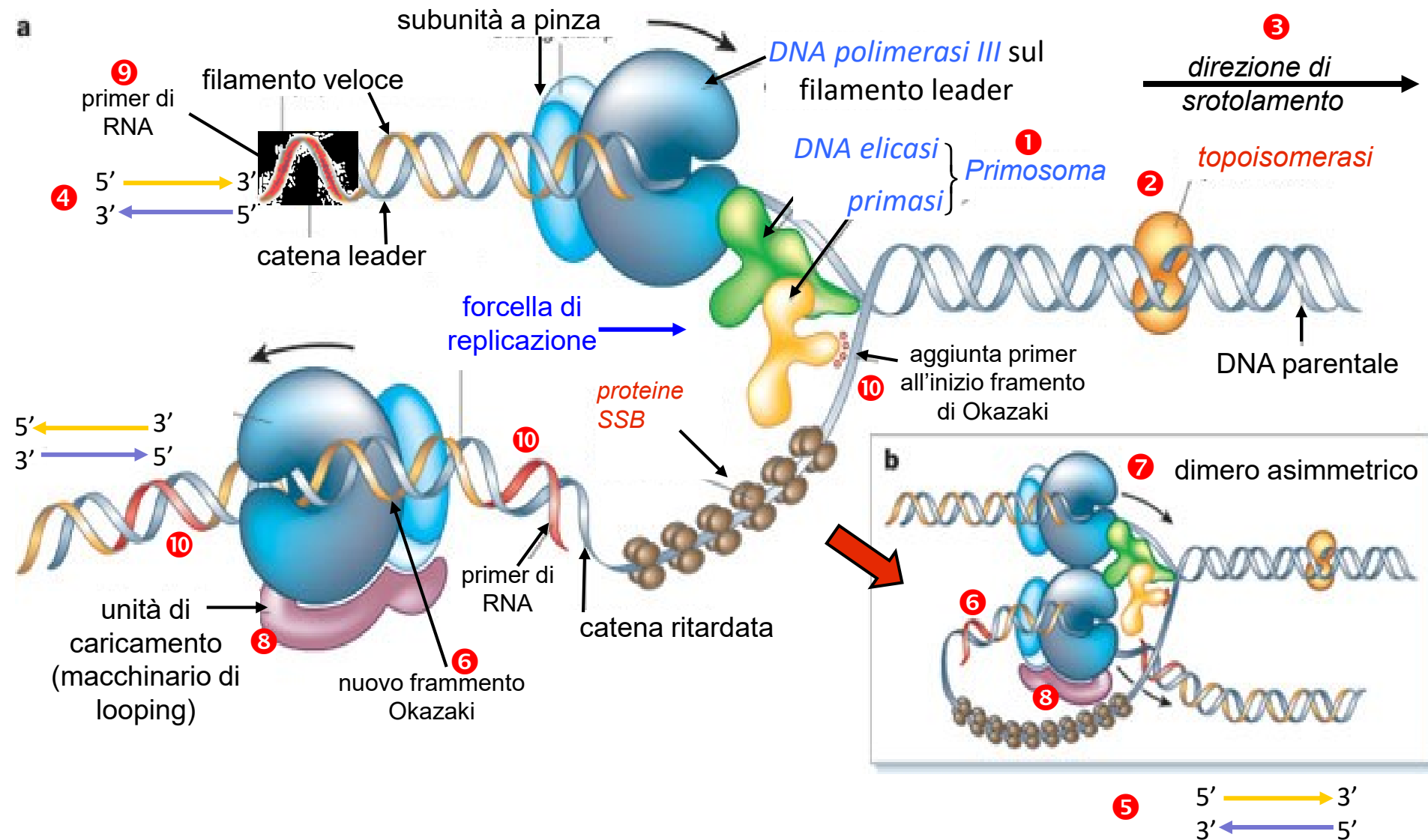
ionare ed attivare il dNTP entrante



- Il sito attivo della *3'→5' esonucleasi* è vicino a quello della *polimerasi*, e ciò permette lo scanning del DNA nascente, senza che la catena si debba staccare dall'enzima (permette l'elevata processività)

Enzimi che agiscono sul DNA: DNA polimerasi III oloenzima

► ruolo della *DNA polimerasi III oloenzima* (*E. coli*) nella replicazione



DNA polimerasi III oloenzima: meccanismo

- La *DNA polimerasi III* batterica agisce assieme a due altre *polimerasi* (I e II) (con attività di *5'→3' polimerasi* e *3'→5' esonucleasi*) assieme ad una ventina di altre proteine.
- La replicazione inizia con la formazione del **complesso del primosoma**, ai siti di **origine della replicazioni**, dove il **dsDNA si apre nella forcella di replicazione ❶**. Questo richiede lo **svolgimento locale** del DNA, effettuato da *topoisomerasi* (*girasi* ed *elicasi*) ❷ che servono anche per risolvere “*crisi topologiche*” a monte della forcella.
- **Entrambi i filamenti di DNA fungono da stampo** per la sintesi delle rispettive catene complementari. La replicazione però **procede nella stessa direzione**, quella del disavvolgimento ❸, e quindi **solo una delle catene corre in direzione 3'**, permettendo la sintesi ininterrotta in direzione 5'→3' della catena complementare (noto come **filamento veloce** ❹). L'altra catena richiede **un complesso processo di looping** ❺, che permette anche per questa la polimerizzazione in direzione 5'→3' della catena complementare, per brevi tratti, e che è quindi formata in frammenti (noti come **frammenti di Okazaki** ❻).
- Questo permette la sintesi di entrambi filamenti nascenti da parte dello stesso complesso della *DNA polimerasi III oloenzima* che **procedendo in una sola direzione** ❸.
- Essendo una *DNA polimerasi*, **richiede primer** per iniziare la sintesi di entrambe i filamenti. Una specifica *RNA polimerasi* (la *primasi*), che non richiede un primer, fa parte del complesso proteico del **primosoma** ❶, ed **inserisce un breve primer di RNA** (ca 5 residui) su entrambe le catene.
- La *DNA polimerasi III oloenzima* è un grosso complesso proteico composto da molte subunità di diverso tipo. **Ha una sovrastruttura dimerica** ❷, e ciascun lato del dimero agisce su una delle due catene di DNA stampo. **Non è però un dimero simmetrico**, poiché **un lato agisce sulla catena stampo per il filamento veloce**, mentre **l'altro lato agisce sulla catena stampo per il filamento lento**. Questo lato contiene anche il **meccanismo di looping** ❸. Si stacca e riattacca al filamento ogni circa 1000 residui.
- Sul **filamento veloce** viene aggiunto il primer RNA una sola volta, all'origine di replicazione, che poi si allontana dalla forca ❹, mentre in quello **lento** vengono **continuamente aggiunti primer** che devono poi essere rimossi ❺.

Mecanismo d'azione: DNA polimerasi III oloenzima

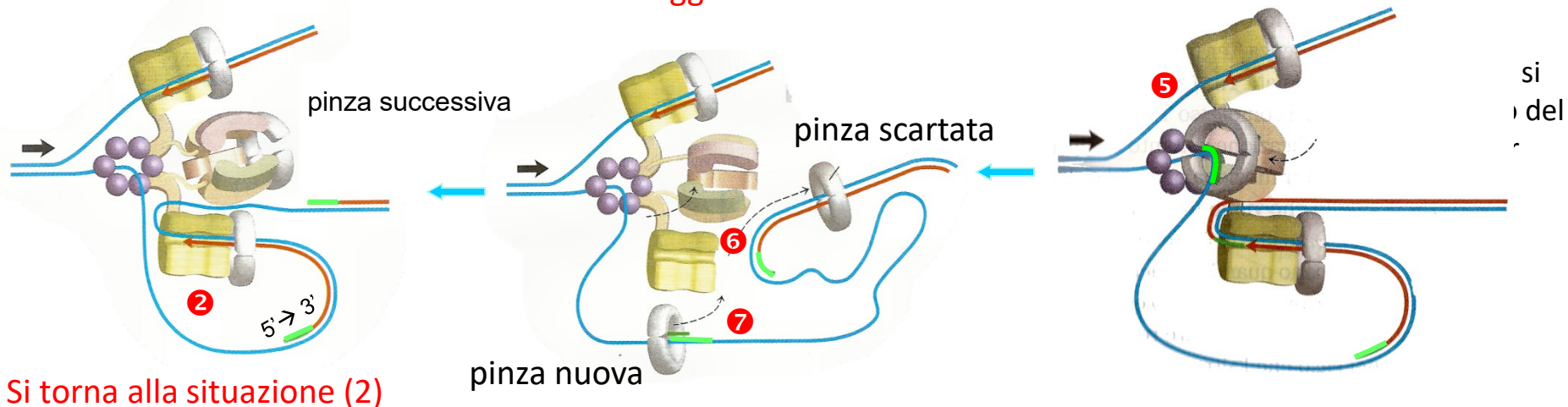
► Il meccanismo di looping richiede l'azione di tre 'pinze'



5) la pinza vuota aggancia il filamento lento a livello del nuovo primer

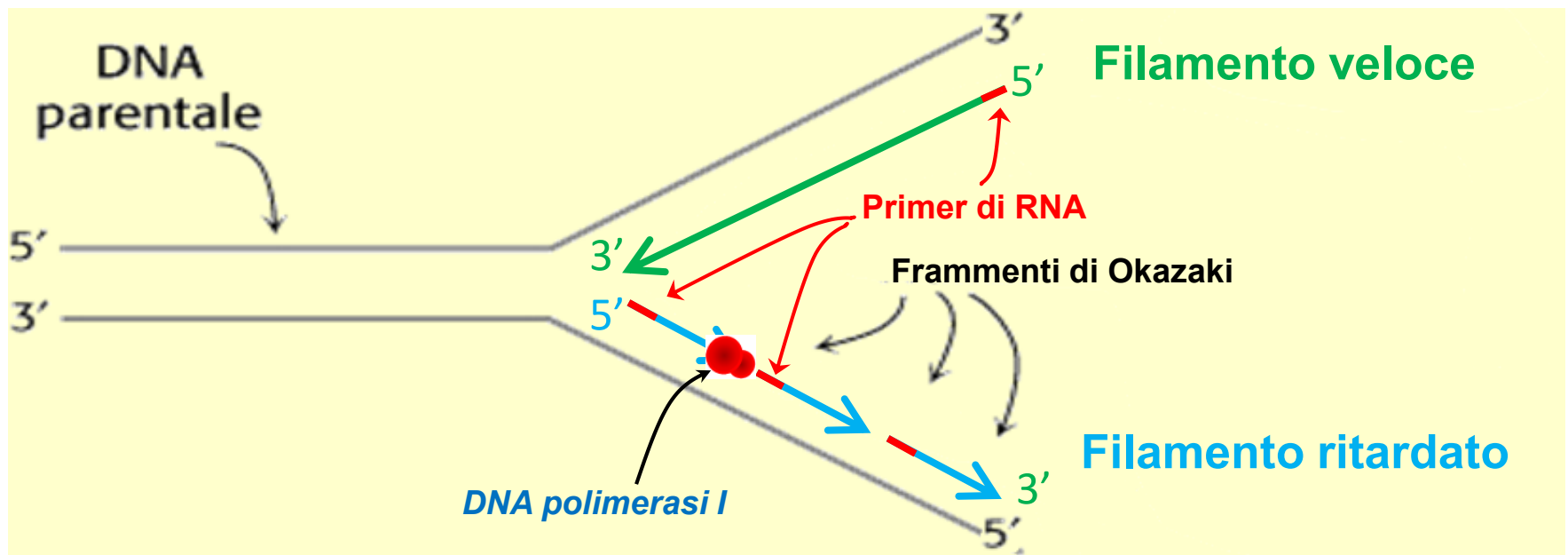
6) Il segmento lento già copiato si stacca dalla DPIII assieme alla pinza vecchia

7) la pinza con il segmento col nuovo primer si aggancia alla DPIII

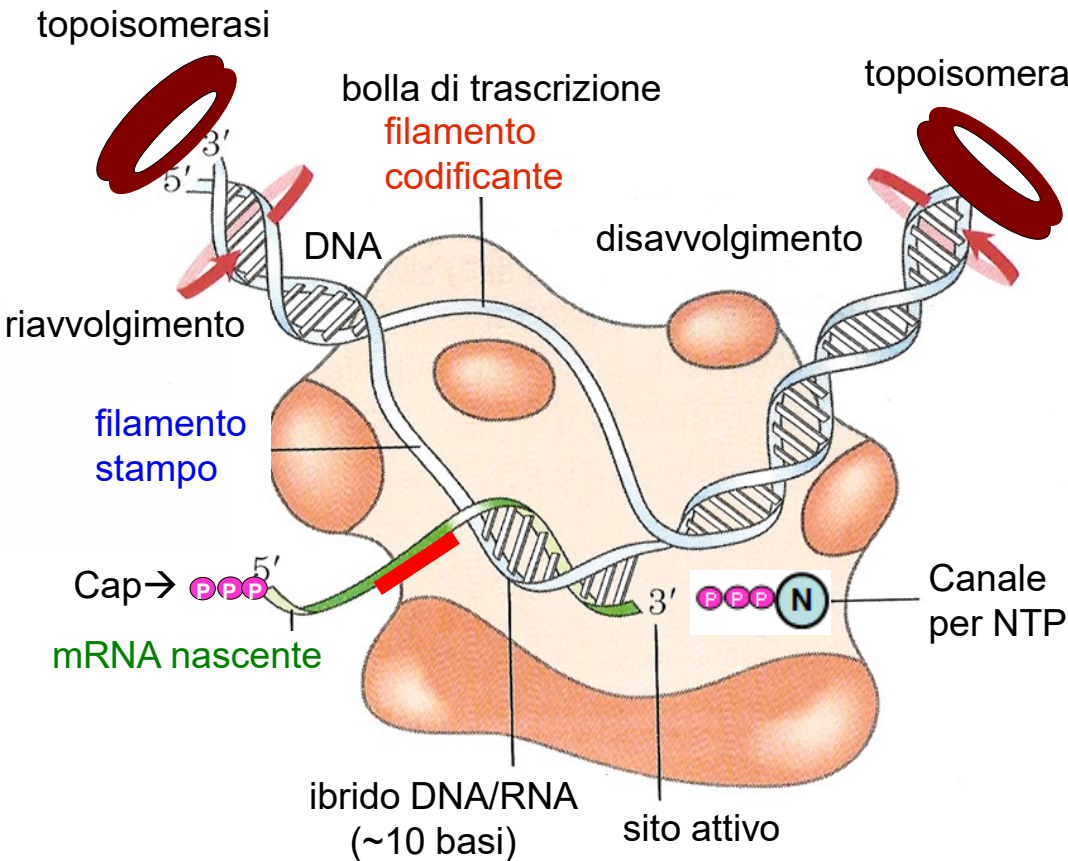


DNA polimerasi III oloenzima: meccanismo (cont.)

- Per il **filamento lento**, invece, vengono aggiunti ripetitivamente primer RNA ogni volta che si forma un nuovo loop ⑩.
- Questo lato della *polimerasi* forma frammenti di DNA di ca 1000 residui (frammenti di Okazaki ⑥).
- Spetta poi alla *DNA polimerasi I* riempire lo spazio fra due frammenti di Okazaki (attività di *polimerasi 5'→3'*) e poi rimuovere il primer RNA nella catena che incontra sull'altro lato di questo spazio (attività di *endonucleasi 5'→3'*). I frammenti vengono poi congiunti da una *ligasi*.
- La *DNA polimerasi III* è un enzima **altamente processivo** e **molto efficiente**. Aggiunge ca. **1000 desossinucleotidi/secondo con alta fedeltà**, e non molla la molecola di DNA fino a replicazione completa. A parte alle subunità catalitiche addette alla polimerizzazione e l'attività endonucleasi, altre hanno funzioni strutturali, e contiene una copia di subunità a forma di pinza, che avvolgono il due filamenti di DNA e li fanno scorrere al loro interno.



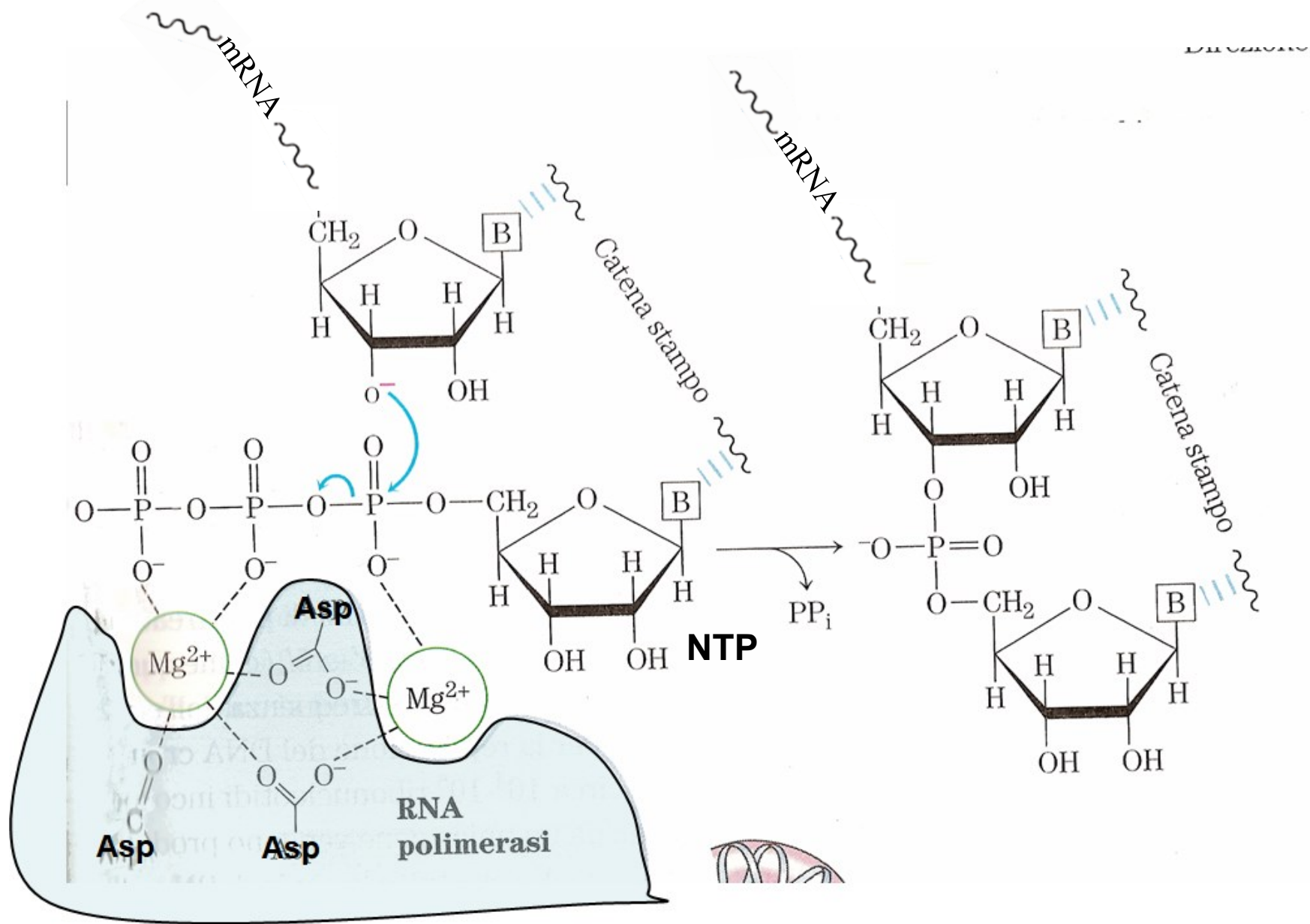
RNA polimerasi e la trascrizione



- l'enzima cerca i siti di inizio del gene sul DNA (siti promotori).
- L'iniziazione della trascrizione richiede la formazione di complessi multiproteici a livello di queste specifiche sequenze, a monte della sequenza codificante (**fattori trascrizione tipo II per mRNA**).
- **srotola un breve tratto di doppia elica** (ca. 17 residui) liberando la catena stampo (**transcription bubble**)
- procede con la polimerizzazione, utilizzando gli NTP corretti (**azione completamente processiva**)
- Si forma una **doppia elica ibrida DNA/RNA** (~8 residui), che poi si srotola.
- Ai **segnali di terminazione** si stacca del tutto e **termina la trascrizione**

- la sua attività è modulata dai **fattori di trascrizione** (proteine regolatrici) e fosforilazione
- Gli **introni sono rimossi co-trascrizionalmente dai spliceosomi**. Al 5' viene aggiunto un 'Cap', al 3' viene aggiunta una **coda di poli(A)**.
- negli eucarioti sono presenti diverse polimerasi; **tipo I** per rRNA, **tipo II** per mRNA ed sRNA e **tipo III** per rRNA e tRNA (II e III sono inibite dall' α -amanitina)
- l'RNA polimerasi batteriche sono il **bersaglio per antibiotici** (rifampicina e actinomicina)

RNA polimerasi: meccanismo d'azione



Le polimerasi come strumento di ricerca

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

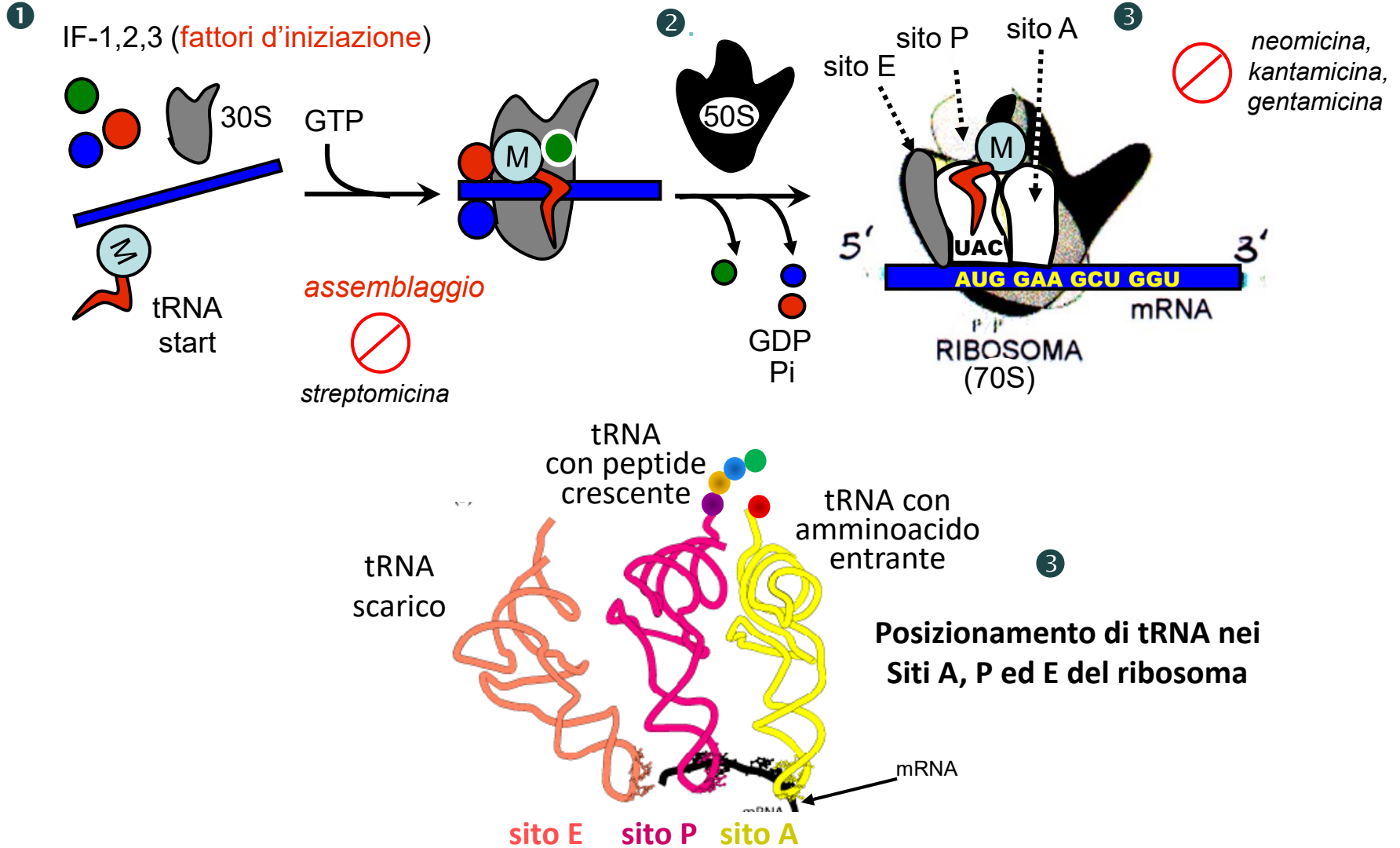
Librerie di cDNA e PCR

- l'mRNA presente in una cellula in un dato momento rappresenta tutti i geni che sono in fase di trascrizione in quel momento (**trascrittoma**).
- l'mRNA, **non è una molecola particolarmente stabile**, e quindi non adatta per la conservazione e successivo studio del trascrittoma.
- viene **riconvertita a DNA**, in laboratorio, utilizzando le **trascrittasi inverse** (si forma DNA copia o **cDNA**).
- Le librerie di cDNA sono **stabili e presentano solo DNA codificante** (a differenza del DNA genomico che nei geni presenta anche *introni*)
- Sono molto **utili per studiare le attività cellulari**, specialmente con le nuove tecnologie DNA Chip (microarrays).
- Le **TAQ polimerasi** (*DNA polimerasi* di *Thermophylus aquaticus*) è **molto termostabile** e utile per l'amplificazione del DNA nella **polymerase chain reaction (PCR)**

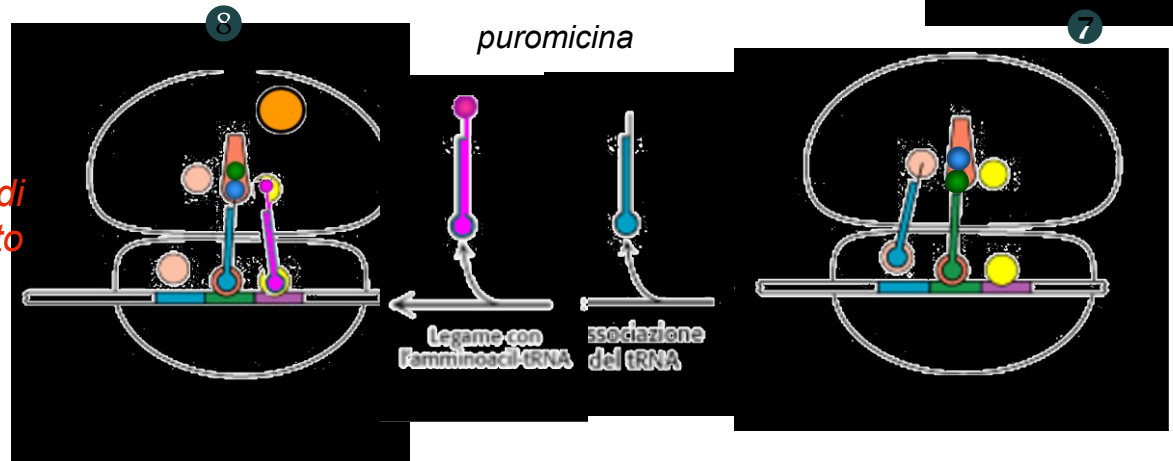
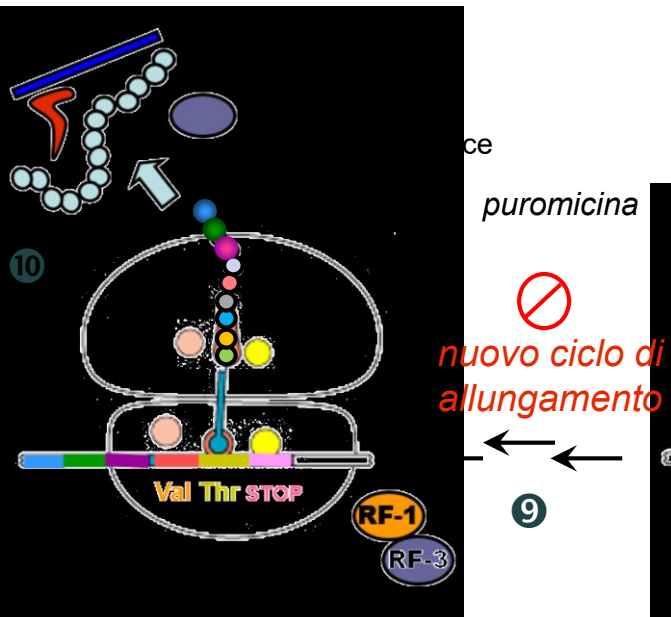
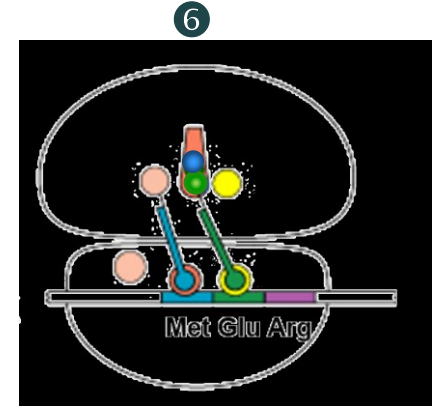
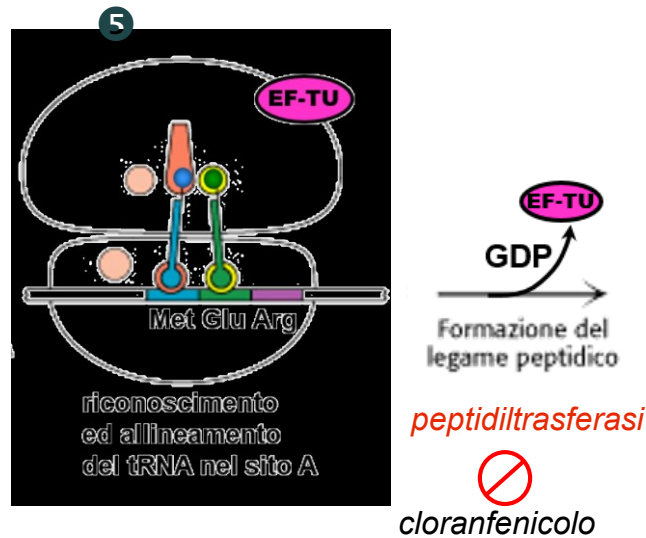
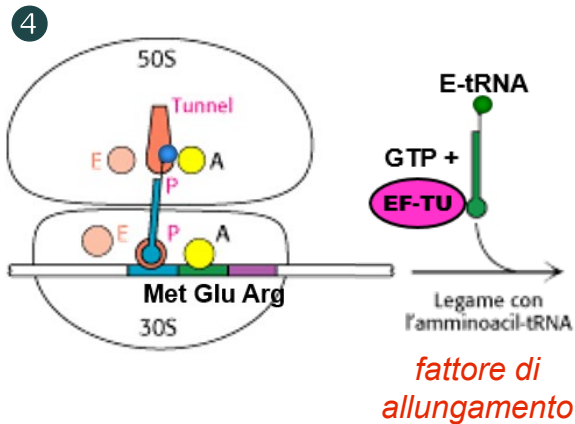
I RIBOSOMI e la biosintesi di proteine - la traduzione

► La biosintesi di proteine è svolta da riboproteine, organizzati in 2 subunità principali:

- subunità piccola 30S in *E. coli* (40S eucarioti); formata da 21 (33) catene proteiche e 1 catena di rRNA.
- subunità grande 50S in *E.c* (60S) formata da 31 (49) catene proteiche e da 2 (3) catene di rRNA.

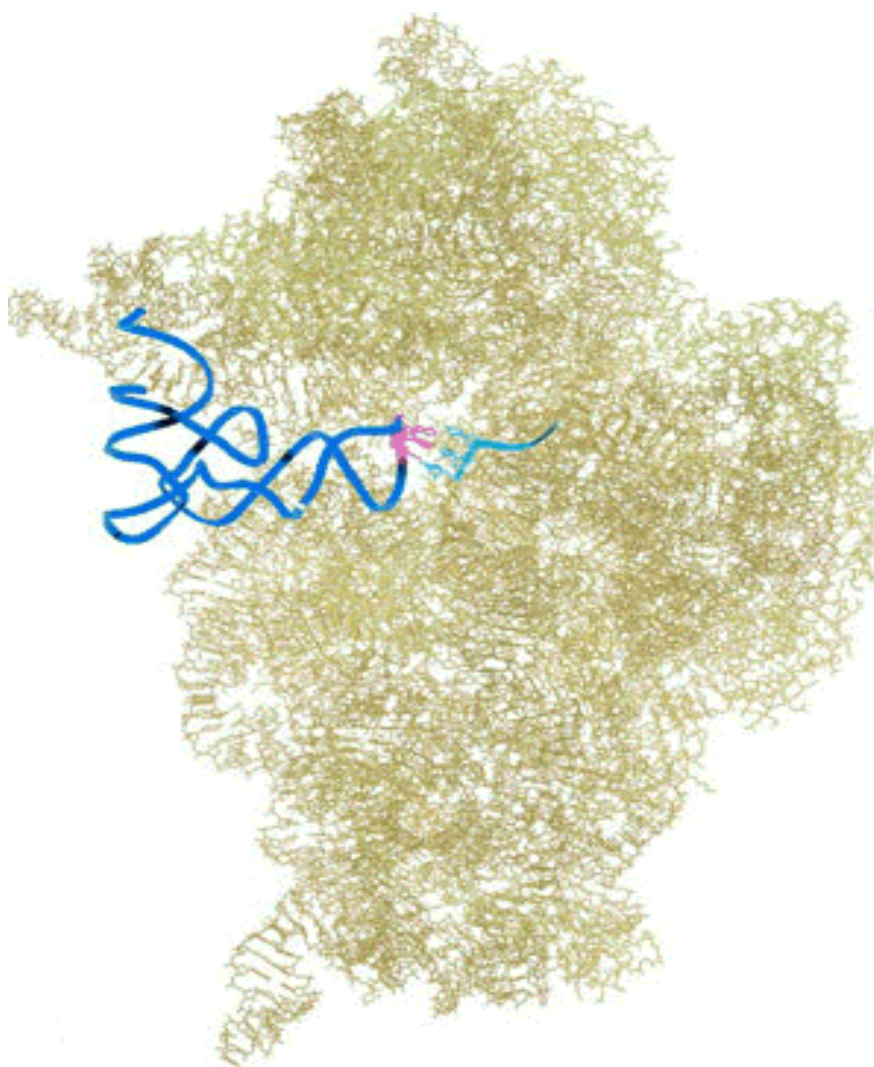


I RIBOSOMI e la biosintesi di proteine - la traduzione



I RIBOSOMI: meccanismo della traduzione

- Inizio: si assemblano i **fattori d'iniziazione** (IF-1,2 e 3) con la **subunità 30S** e l'**mRNA** da leggere, e il **tRNA-Met** a livello del codone di start (AUG) ❶, in un processo promosso anche dal legame di GTP
- **Si associa la subunità 50S** e si staccano gli IF in un processo potenziato dall'idrolisi di GTP ❷.
- Il ribosoma completo fornisce **tre siti per il legame di tRNA**; ❸ il **sito A** (*aminoacid*) per tRNA con AA entrante, il **sito P** (*peptide*) per il tRNA con peptide crescente e il **sito E** (*exit*) per tRNA scarico. tRNA-Met si posiziona nel sito P (interagendo con il codone di start)
- Entra nel sito A il tRNA che corrisponde al successivo codone ❹ (qui tRNA-Glu per GAA), assistito da **elongation factor EF-TU**. tRNA-MET (sito P) **trasferisce Met su Glu** ❺ per formare un dipeptide su tRNA-Glu (**attività di peptidiltrasferasi**), con concomitante idrolisi di GTP e successivo rilascio di EF-TU. È ora necessario il riposizionamento dei tRNA ❻
- L'**mRNA scorre nel ribosoma** ❼ e il tRNA scarico (ex. tRNA-Met) si sposta nel sito E ed il tRNA con il dipeptide nel sito P, in un processo assistito dal **elongation factor EF-G** e potenziato dall'idrolisi di GTP .
- Il **tRNA scarico viene rilasciato dal sito E** ❽ ed **nel sito A entra il successivo tRNA** (tRNA-Arg per GCU).
- **Si ripete il ciclo di allungamento** ❹: trasferimento del dipeptide Met-Glu su Arg forando un tripeptide, traslocazione dei tRNA rispettivamente in E e P, con idrolisi di GTP e rilascio del tRNA scarico.
- Questo ciclo si ripete **fino al raggiungimento dello stop codon** nel sito A ❿. Qui si legano **release factors** (RF) che portano al rilascio del peptide e disassemblamento del ribosoma
- La **sintesi procede dall'N-terminale al C-terminale**. Spesso i residui all'N-terminale formano il **signal peptide** che serve per **veicolare la proteina** e poi viene rimosso.

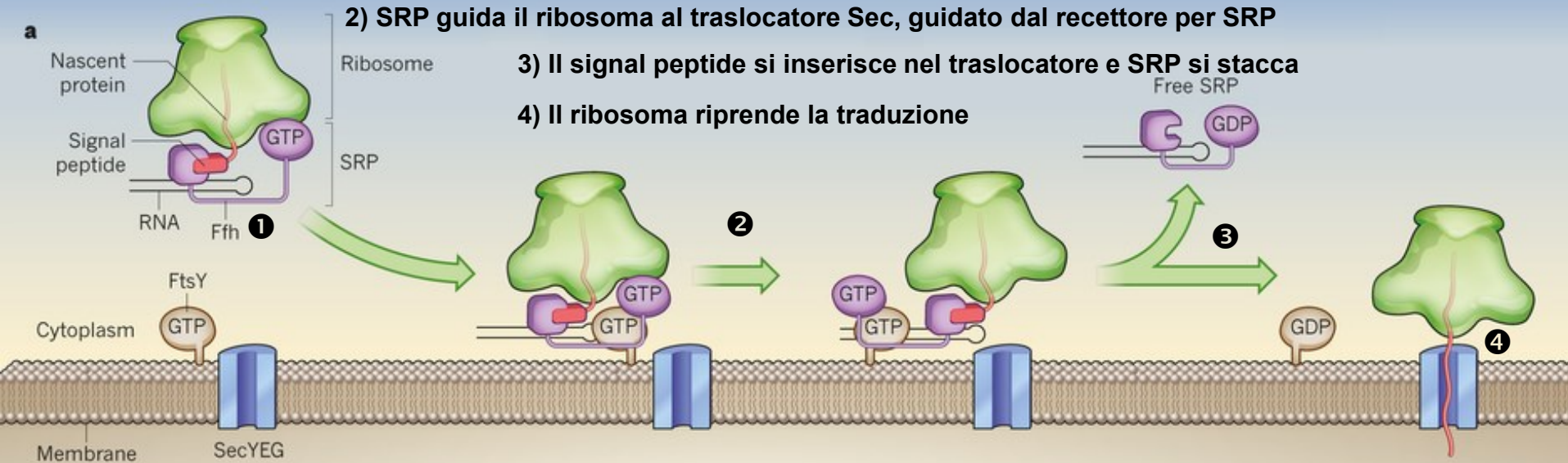


1) Il «signal recognition particle» (SRP) si lega al peptide segnale e arresta la traduzione

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

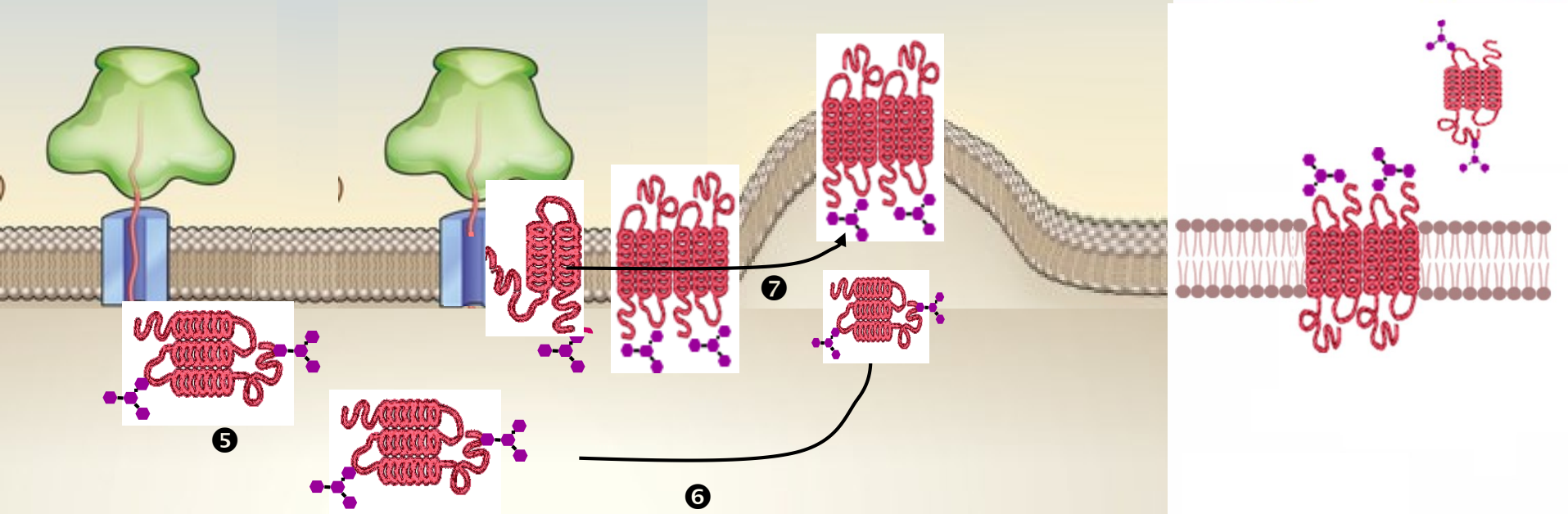
4) Il ribosoma riprende la traduzione



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

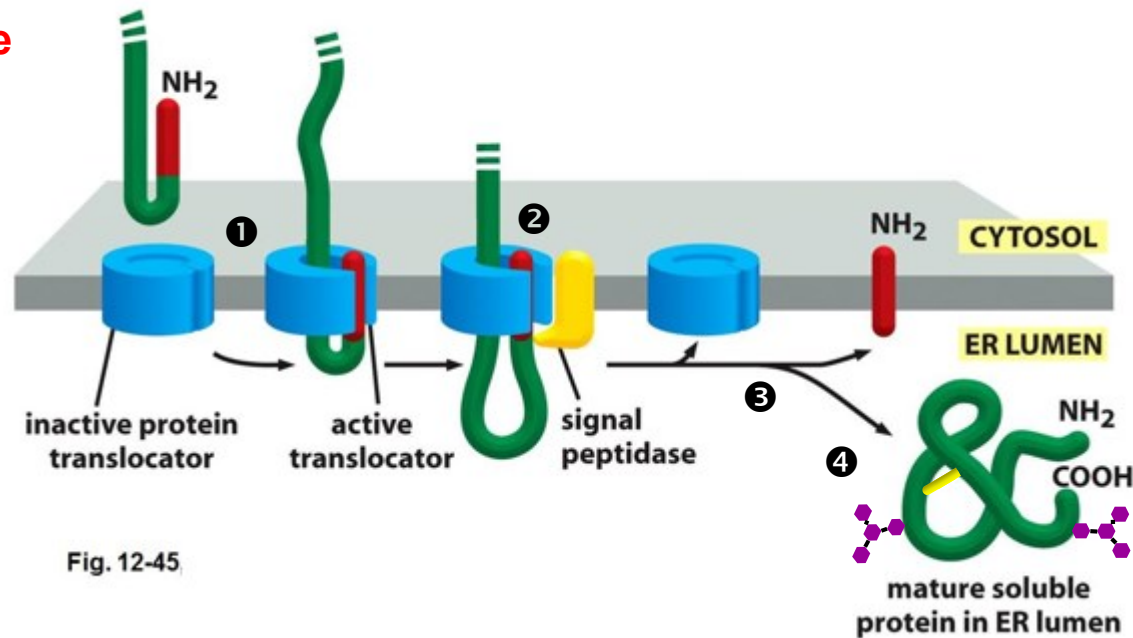
6) Poi sono inserite in vescicole che si staccano dall'ER e sono veicolate tramite l'apparato di Golgi

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

