

a.a. 2016-17

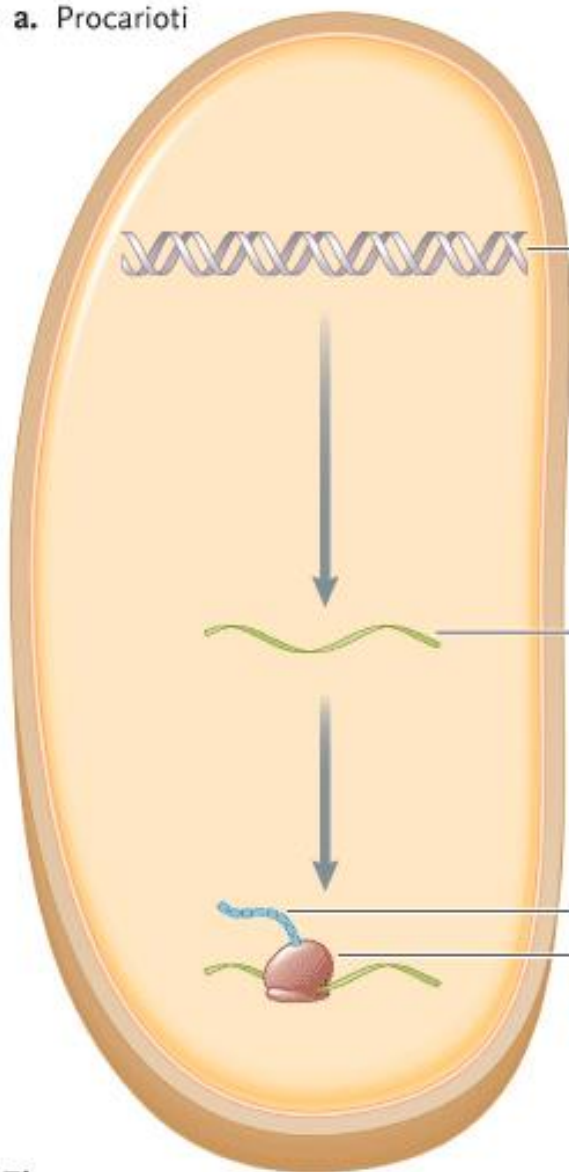
CORSO DI LAUREA IN INFERMIERISTICA

Dott.ssa Marilena Greco

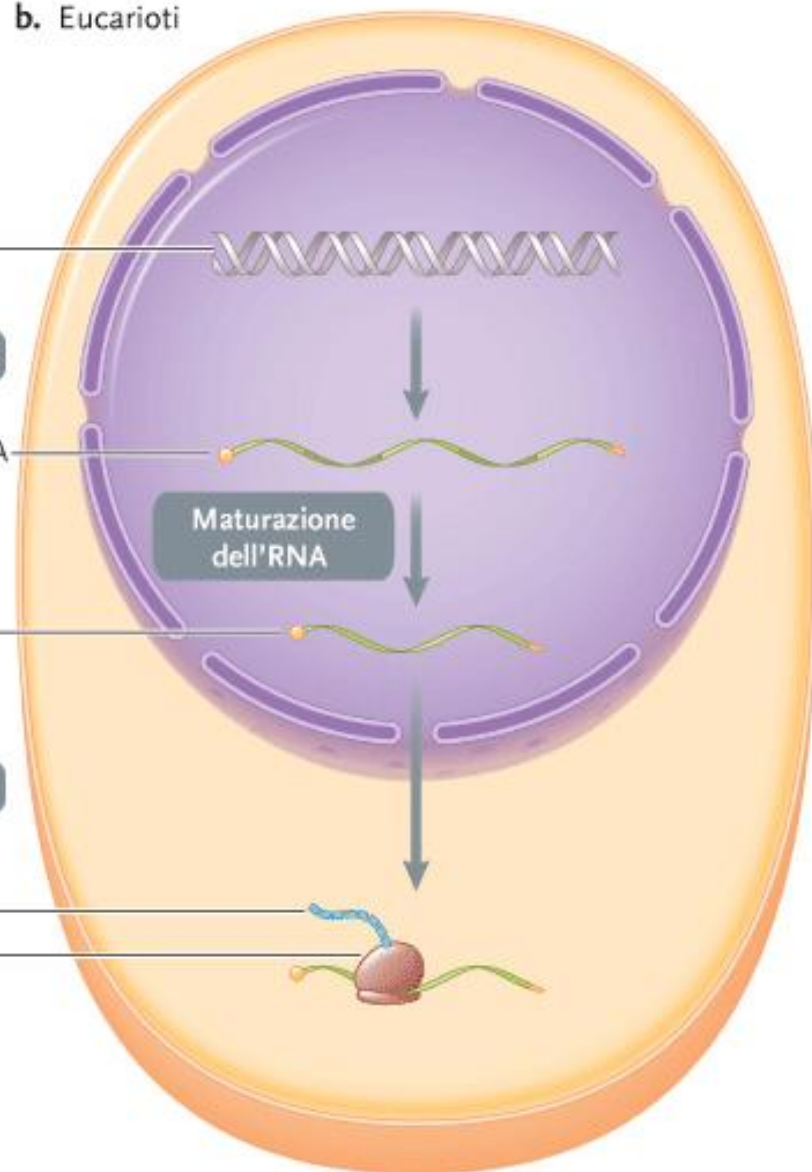
Biologia applicata

# **espressione genica**

**a. Procarioti**



**b. Eucarioti**



Trascrizione

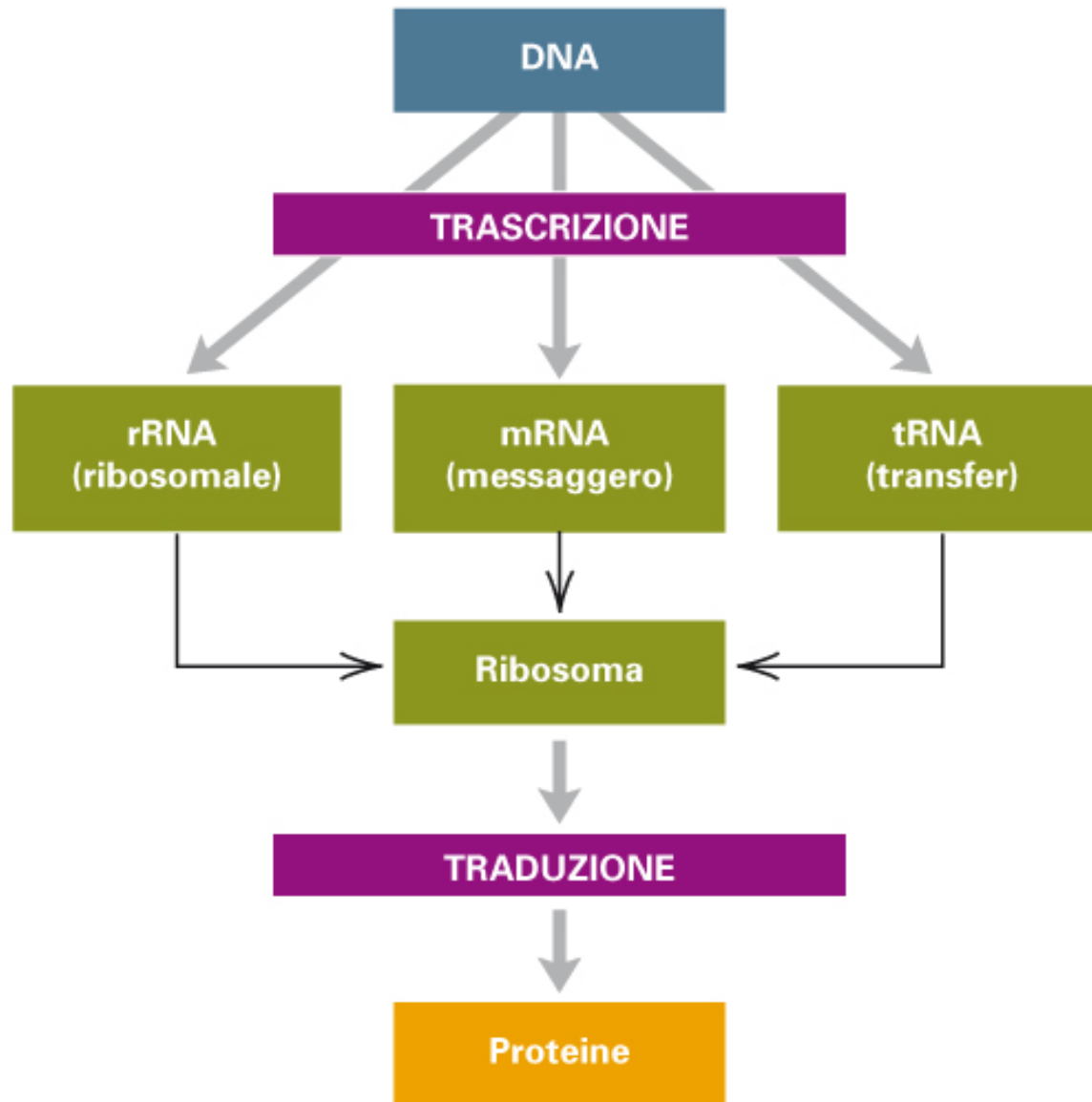
Pre-mRNA

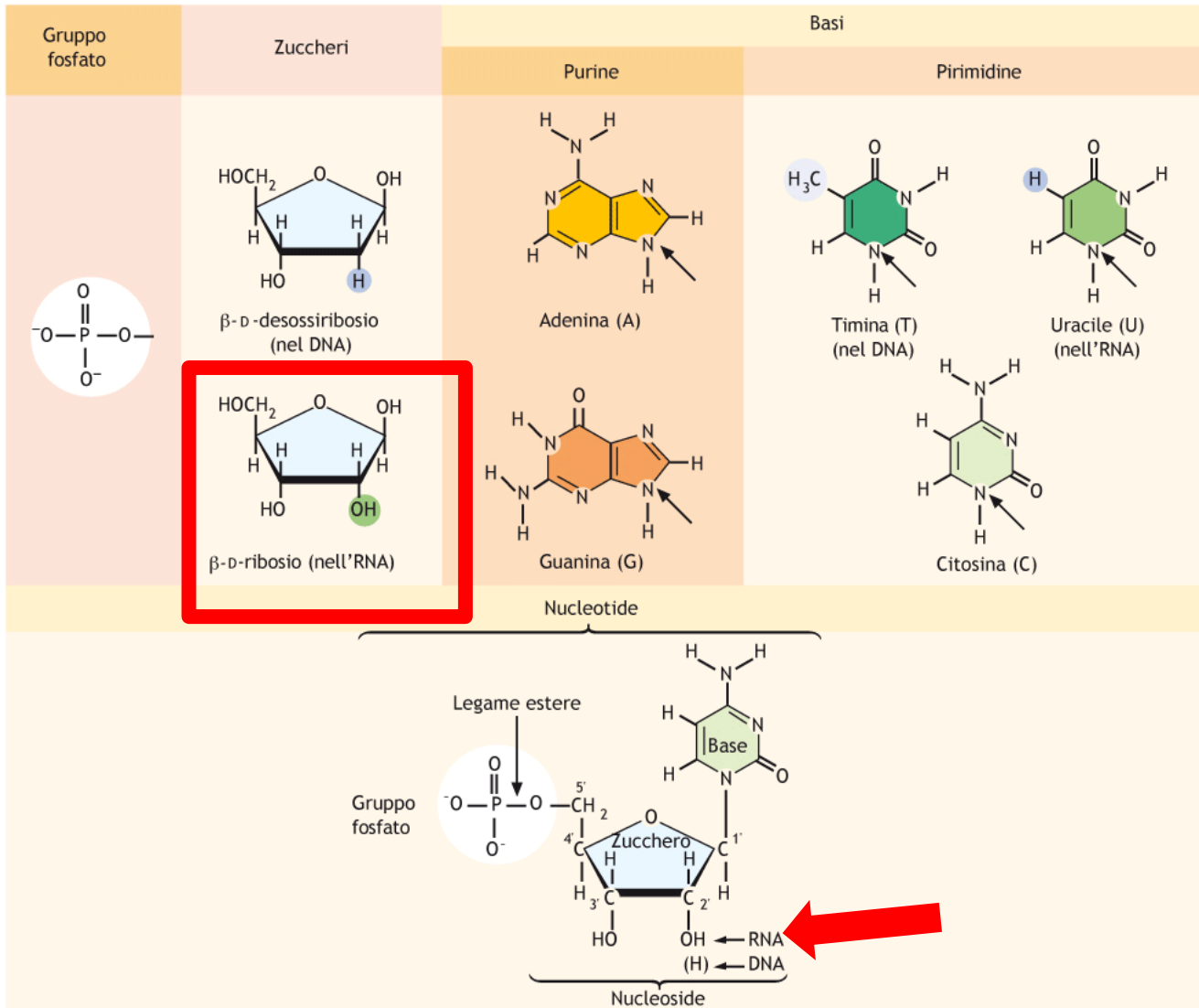
mRNA

Traduzione

Polipeptide

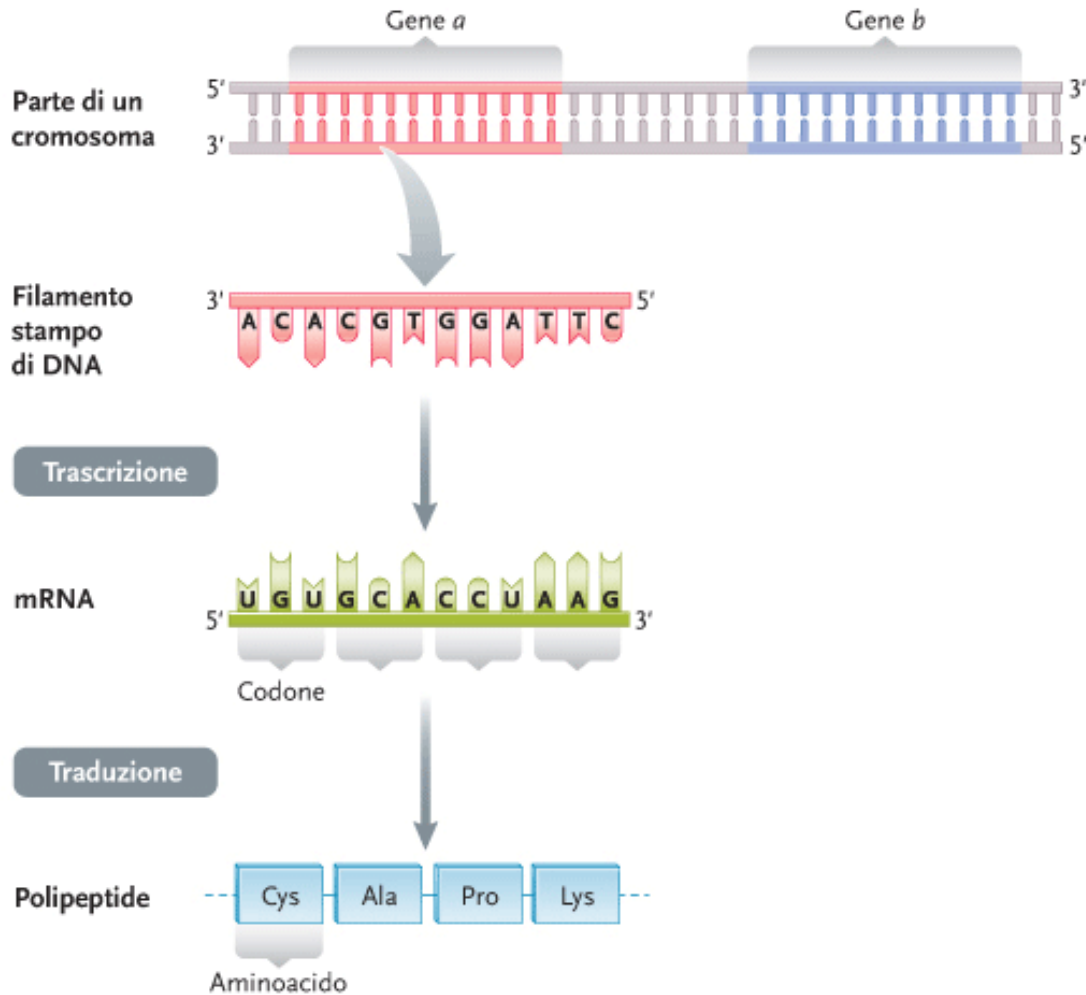
Ribosoma





# RNA

costituito dai  
**ribonucleotidi**:  
 D-ribosio, base  
 azotata, residuo di  
 acido fosforico



**LEGENDA**

Cys = cisteina    Pro = prolina  
 Ala = alanina    Lys = lisina

# PROCESSO DI TRASCRIZIONE E TRADUZIONE DELL'INFORMAZIONE GENETICA

## La trascrizione genera diversi tipi di RNA:

### **rRNA o RNA ribosomiale**

sintesi delle proteine, funzione strutturale e catalitica

### **tRNA o RNA transfer o RNA di trasporto**

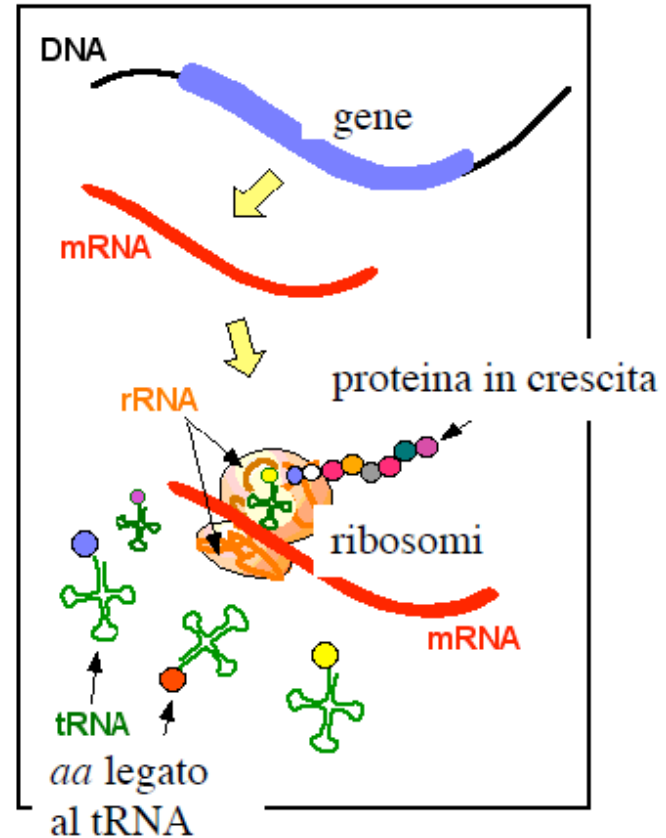
“adattatore” nella traduzione delle sequenze di nucleotidi in *aa* ovvero trasporta gli *aa* per la sintesi (traduttore)

### **mRNA o RNA messaggero**

trasferimento informazione da DNA a citoplasma

**Trascritto primario o pre-mRNA o HnRNA o RNA eterogeneo nucleare**  
*mRNA immaturo* degli eucarioti

**ncRNA o RNA non codificanti**  
cooperano alla regolazione genica



Il processo è realizzato da **enzimi** chiamati

**RNA polimerasi DNA-dipendenti**



l'enzima si lega ad una sequenza sul DNA detta **promotore**

Negli **eucarioti**:

RNA polimerasi I → rRNA

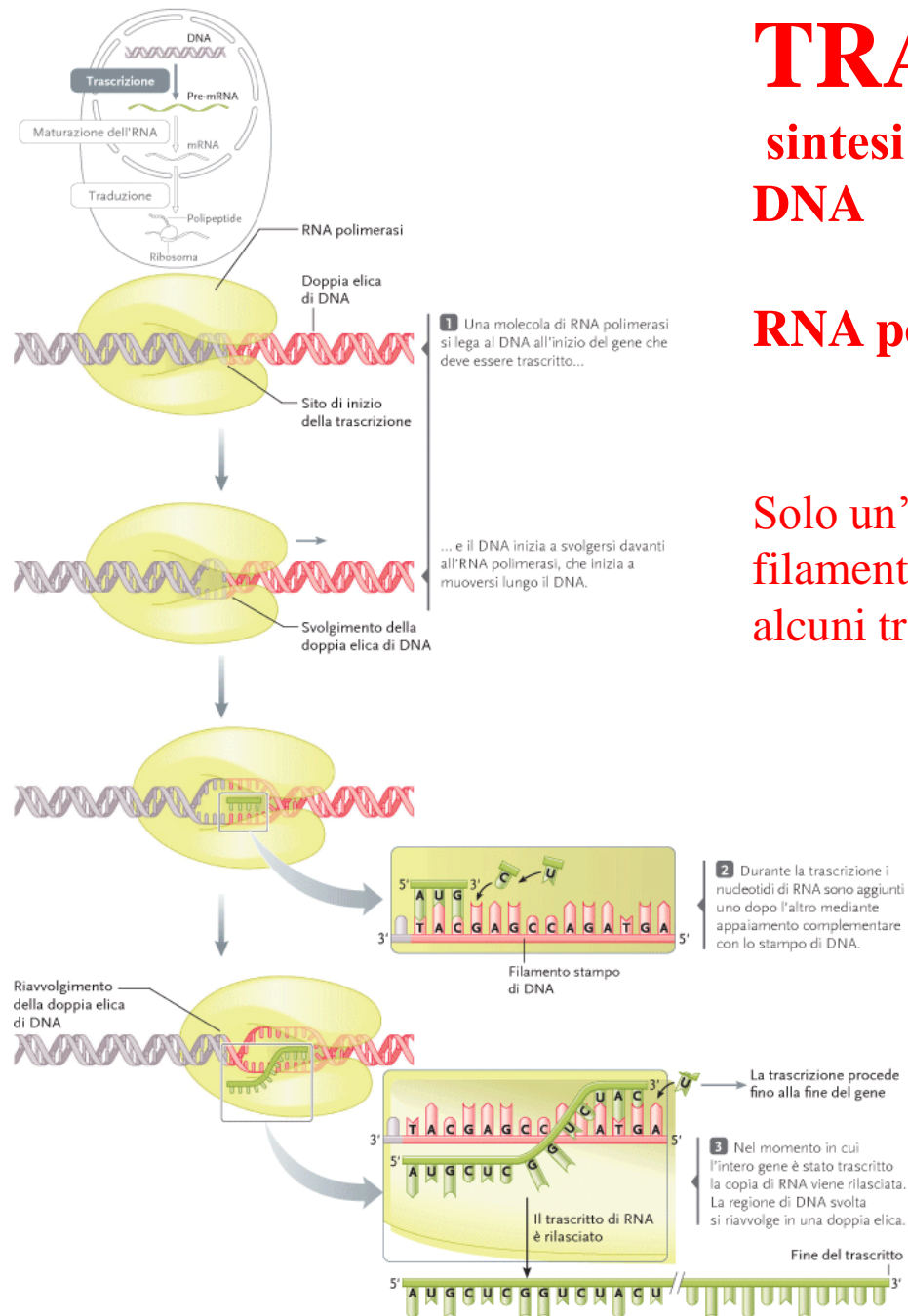
RNA polimerasi II → Trascritto primario e mRNA

RNA polimerasi III → tRNA e altri piccoli RNA dei ribosomi e coinvolti nella maturazione dell'mRNA

# TRASCRIZIONE: sintesi dell'RNA sullo stampo di DNA

## RNA polimerasi

Solo un'elica funge da **stampo**, un  
filamento può essere trascrittivo in  
alcuni tratti e non-trascrittivo in altri





## PROMOTORE

Sequenza nucleotidica nel DNA tra i 40 e 200 nucleotidi, con affinità chimica più o meno elevata per la **RNA polimerasi** (l'enzima che opera la trascrizione) e di solito posta *a monte* (cioè prima) del gene.

Ogni promotore fornisce all'enzima RNAPolimerasi:

sequenze di riconoscimento (es. **TATA box**)

sequenze per un legame stabile

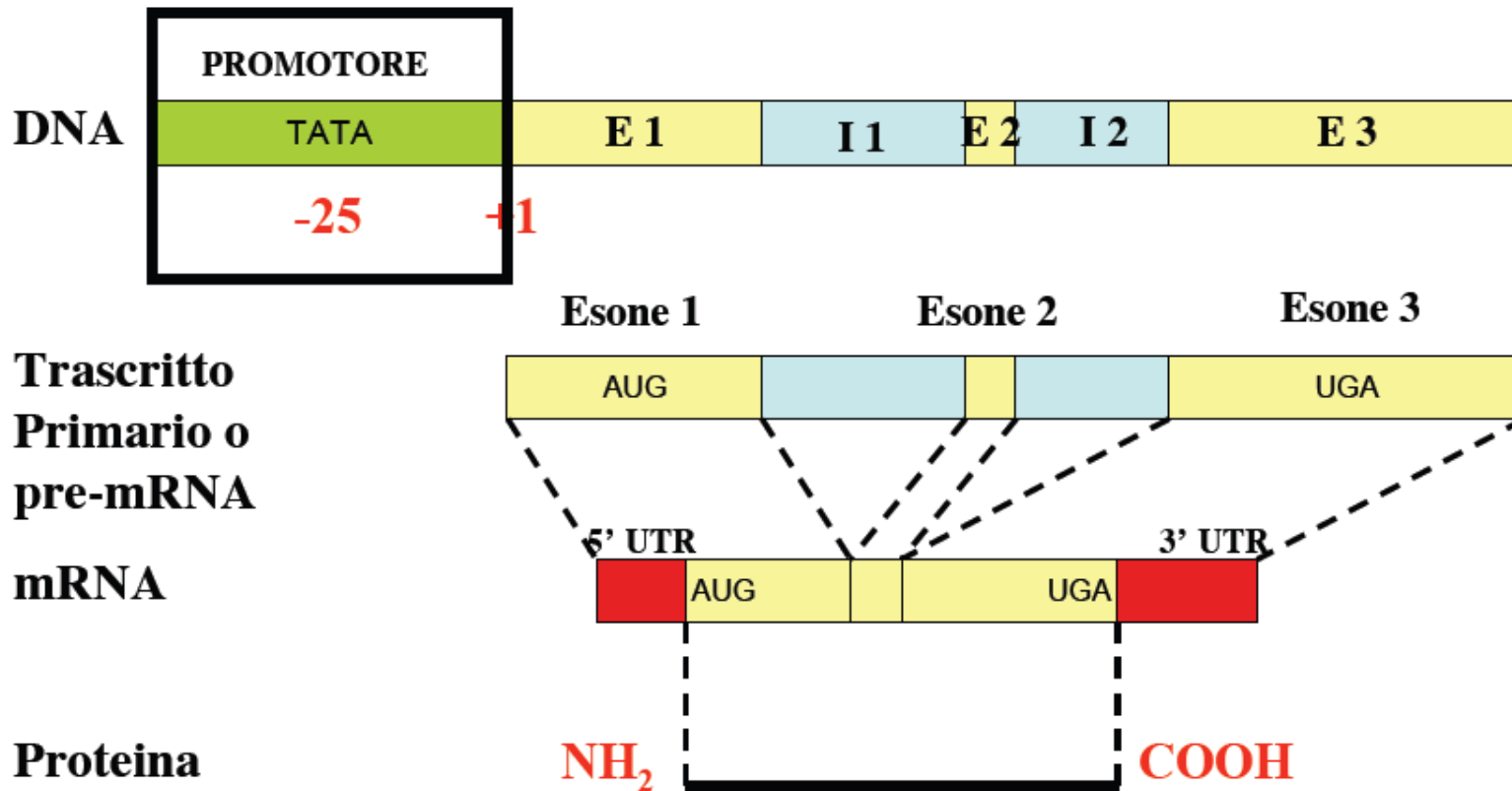
sequenze utili ad identificare il nucleotide di inizio della trascrizione (+1)

**sequenze di regolazione** (GC box, CAAT box ecc., simili a intensificatori e/o *silenziatori*)

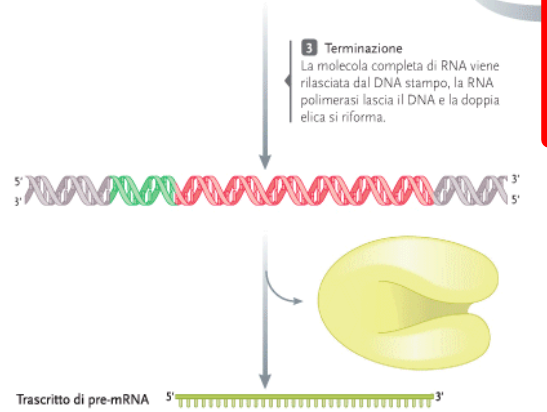
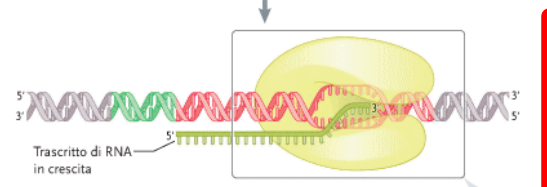
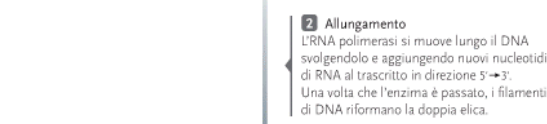
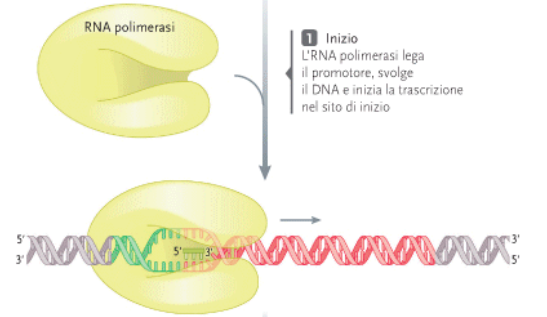
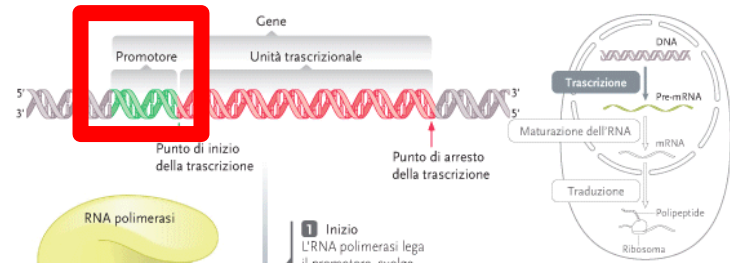


Si tratta come di una **bandierina** in mezzo al mare di DNA: che segna **quale** informazione leggere e trascrivere

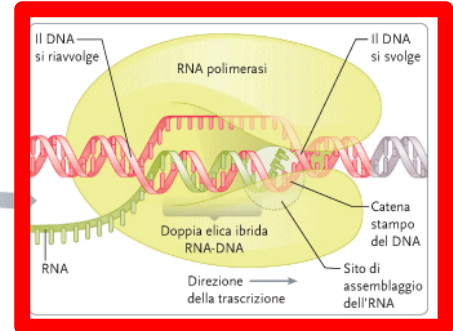
Il **promotore** è posto “*a monte*” del gene ovvero *prima rispetto alla direzione della trascrizione* e non viene, di norma, trascritto



# INIZIO



**ALLUNGAMENTO:**  
I RIBONUCLEOTIDI VENGONO INSERITI IN DIREZIONE 5'→3'  
(DNA stampo: filamento 3'→5')



# TERMINAZIONE

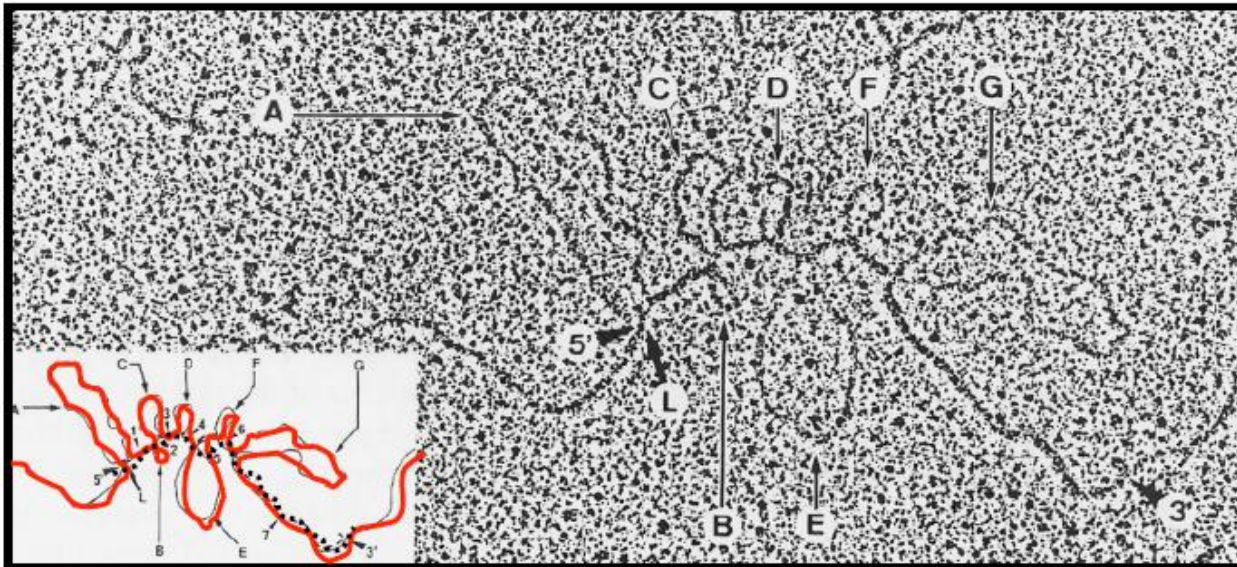
Nella **regolazione della trascrizione**, ad **attivare o reprimere** l'enzima **RNA polimerasi**, intervengono **proteine di 2 tipi**:

**FATTORI DI TRASCRIZIONE GENERALI o BASALI**  
proteine  
necessarie per una trascrizione  
a livelli basali

**FATTORI DI TRASCRIZIONE**  
detti “**PROTEINE REGOLATRICI SPECIFICHE**”  
in grado di modulare la attività  
della RNA polimerasi intensificandola  
o silenziandola completamente  
e dunque in grado di modulare la quantità di trascritto

I geni eucarioti hanno  
una **struttura discontinua**

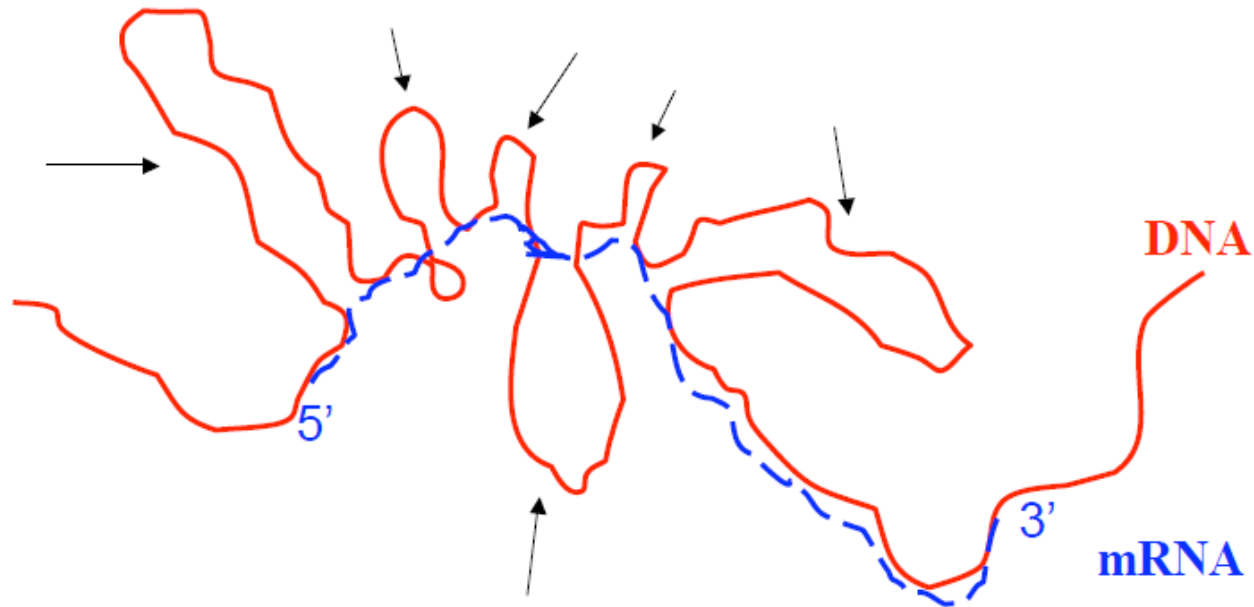
Scoperta del 1977  
Osservando idribi  
molecolari di DNA-mRNA  
al microscopio elettronico  
(vedi sotto)



Ibrido molecolare **DNA-mRNA**

**I geni eucarioti hanno una struttura discontinua:** non tutta la sequenza si ritrova nel trascritto maturo (mRNA).

L'**mRNA** è molto più corto del tratto corrispondente sul DNA che lo specifica e se lasciamo che le due molecole si leghino in base alla **complementarietà dei tratti** si formano nel DNA anse di **NON APPAIAMENTO** (vedi frecce)



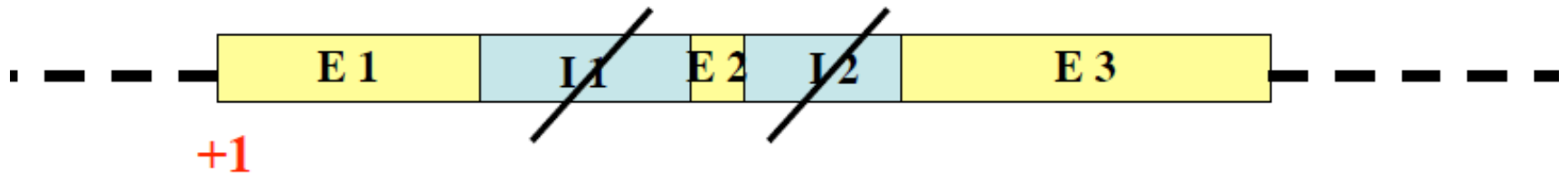
**Ibrido molecolare DNA-mRNA**

# GENE - Struttura del gene eucariota “tipo”

Regione di DNA che viene **trascritta** in un RNA



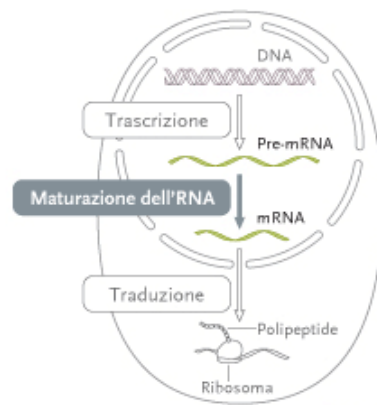
Questo RNA si dice *trascritto primario* o *RNA eterogeneo nucleare (HnRNA)* o *pre-mRNA* e verrà di norma modificato nel nucleo per dare un **mRNA** (RNA messaggero) *maturo*; questa modifica comporta l'eliminazione di lunghi tratti detti **INTRONI**



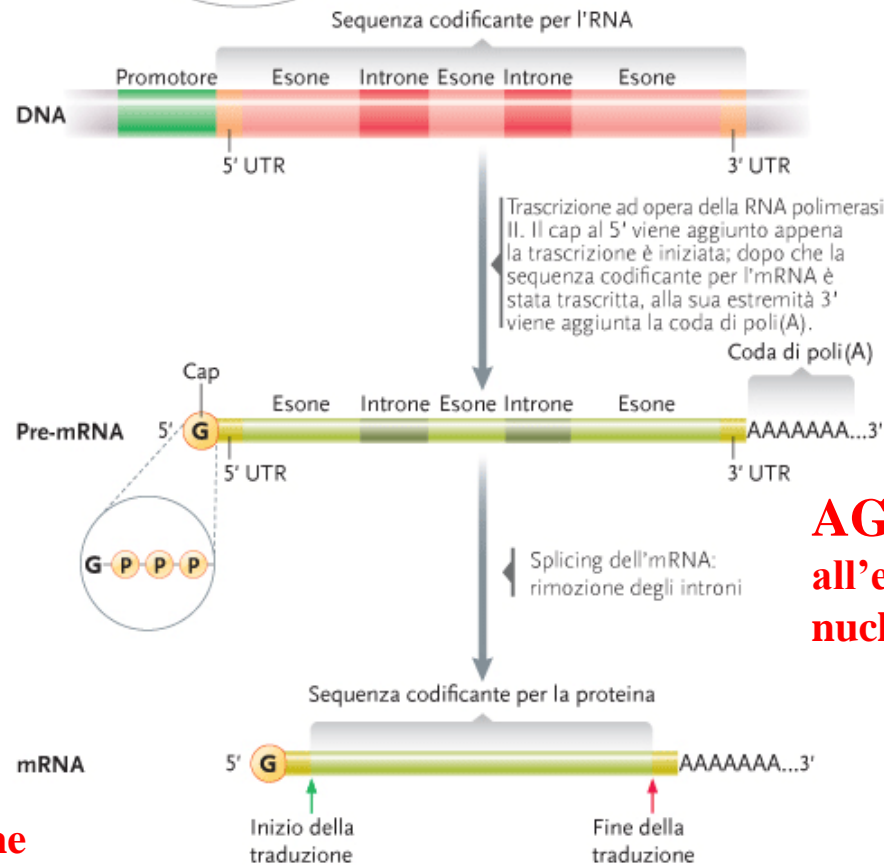
**Il gene ha una natura discontinua:**

**esoni** tratti del gene indicati con E

**introni** tratti del gene indicati con I



## Modificazioni post-trascrizionali del RNA messaggero eucariotico



**AGGIUNTA 5' CAP**  
7metilguanossina legata  
attraverso 3 gruppi fosfato

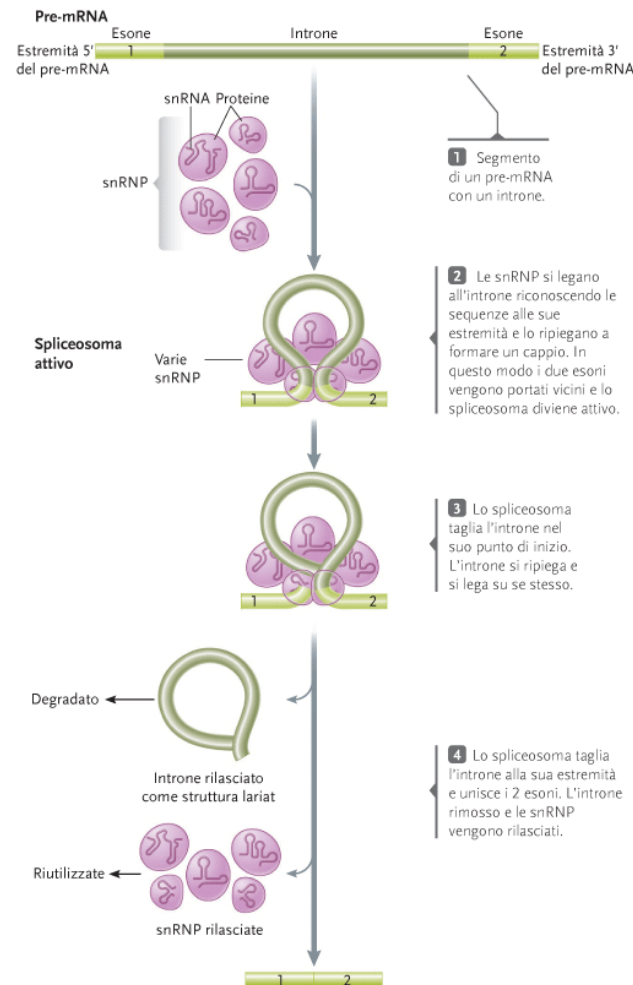
**AGGIUNTA poliA**  
all'estremità 3' (100-250  
nucleotidi di adenina)

**SPLICING:** rimozione  
delle sequenze introniche,  
non codificanti



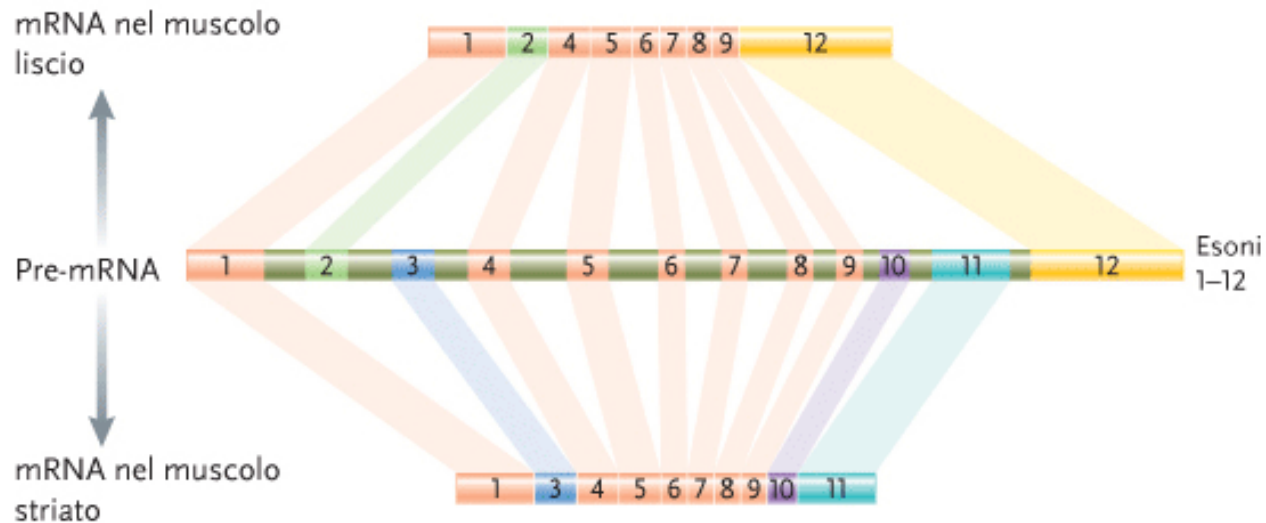


## Complessi di riboproteine nucleari (snRNP) formano lo spliceosoma: RIMOZIONE DEGLI INTRONI



In altri casi lo stesso RNA intronico si comporta da **RIBOZIMA** (RNA catalitico) tagliando le seq.introniche

## SPLICING ALTERNATIVO



**Figura 5.10**

Lo splicing alternativo del pre-mRNA della tropomiosina  $\alpha$  porta a due distinte forme di mRNA, che si trovano nel muscolo liscio ed in quello striato. In entrambi i percorsi di splicing tutti gli introni vengono rimossi. In più, per produrre l'mRNA del muscolo liscio vengono anche rimossi gli esoni 3, 10 e 11, mentre per produrre quello del muscolo striato vengono rimossi gli esoni 2 e 12.

- **TRADUZIONE:**

- *conversione del codice genetico a 4 basi azotate dell'ac.nucleico nell'alfabeto a 20 aa dei polipeptidi*

Codice genetico è un **codice a triplette di nucleotidi**, detti **codoni** e specifica per tutte le possibili combinazioni di 3 basi

I codoni specificano per gli *aa*. In totale  $4^3=64$  codoni.

		Seconda base del codone				
		U	C	A	G	
U	UUU	UCU	UAU	UGU	U	
	UUC	UCC	UAC	UGC	C	
	UUA	UCA	<b>UAA</b>	<b>UGA</b>	A	
	UUG	UCG	<b>UAG</b>	UGG	G	
				Trp		
C	CUU	CCU	CAU	CGU	U	
	CUC	CCC	CAC	CGC	C	
	CUA	CCA	CAA	CGA	A	
	CUG	CCG	CAG	CGG	G	
				Arg		
A	AUU	ACU	AAU	AGU	U	
	AUC	ACC	AAC	AGC	C	
	AUA	ACA	AAA	AGA	A	
	<b>AUG</b>	ACG	AAG	AGG	G	
				Arg		
				Met		
G	GUU	GCU	GAU	GGU	U	
	GUC	GCC	GAC	GGC	C	
	GUA	GCA	GAA	GGA	A	
	GUG	GCG	GAG	GGG	G	
				Gly		
				Val		
				Ala		
				Asp		
				Glu		

**Codone di inizio (metionina)** → AUG

**Codoni di terminazione** → UAA, UAG, UGA

**LEGENDA**

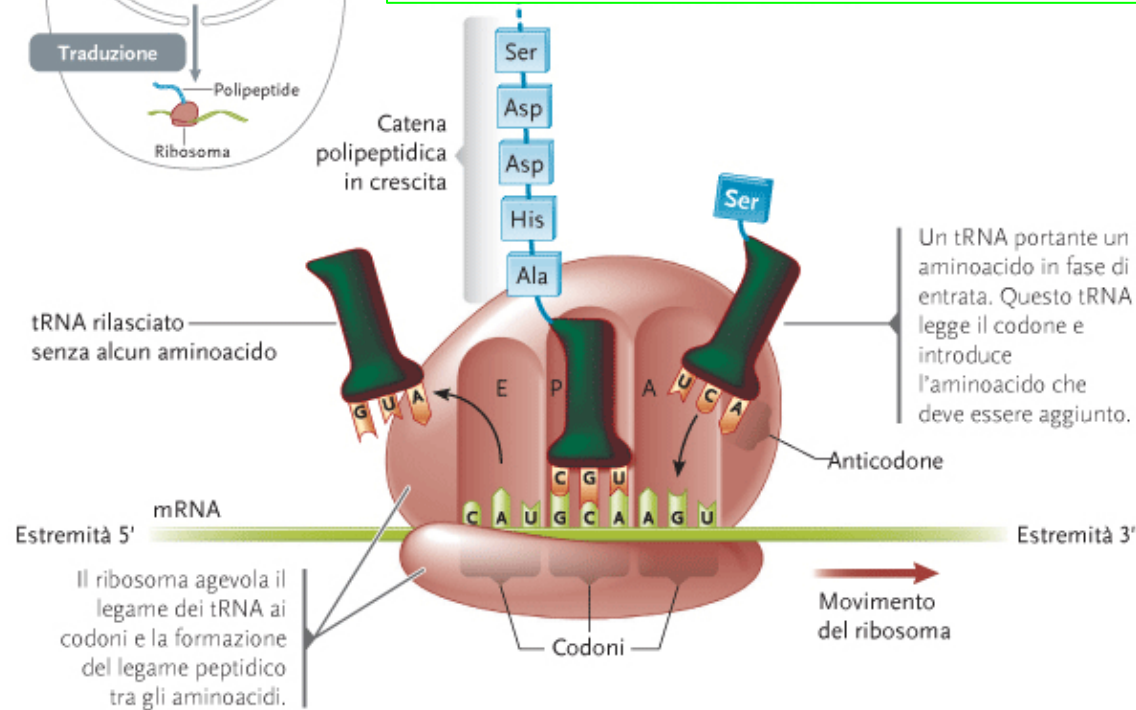
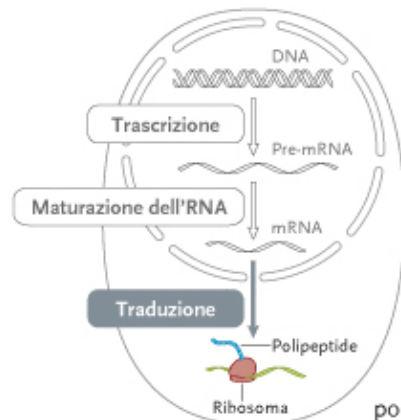
- Ala = alanina
- Arg = arginina
- Asn = asparagina
- Asp = acido aspartico
- Cys = cisteina
- Gln = glutammina
- Glu = acido glutammico
- Gly = glicina
- His = istidina
- Ile = isoleucina
- Leu = leucina
- Lys = lisina
- Met = metionina
- Phe = fenilalanina
- Pro = prolina
- Ser = serina
- Thr = treonina
- Trp = triptofano
- Tyr = tirosina
- Val = valina

## Caratteristiche del codice genetico

- il codice è ridondante, codoni *sinonimi*
- il codice non è ambiguo
- il codice non ha punteggiatura ovvero interruzioni
- il codice è letto senza sovrapposizioni
- per interpretarlo è fondamentale la cornice o quadro di lettura (*reading frame*)
- il codice è *virtualmente* universale (poche eccezioni es. protozoi e codice dei mitocondri)

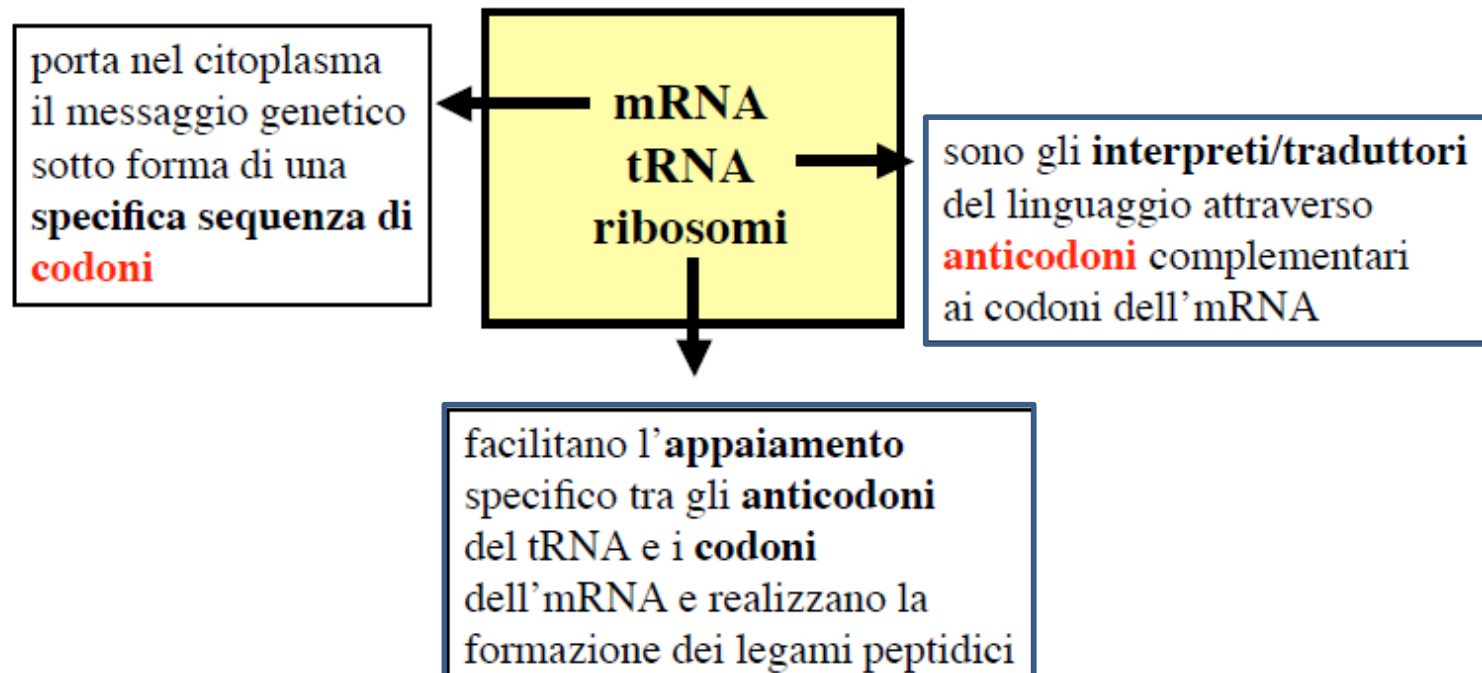
# TRADUZIONE:

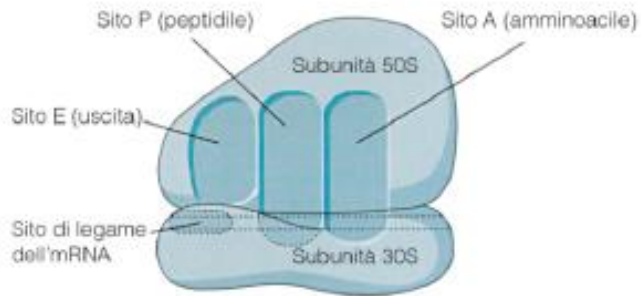
*CONVERSIONE del codice genetico a 4 basi azotate dell'ac.nucleico nell'alfabeto a 20 aa dei polipeptidi*



Nella **traduzione** l'informazione genetica contenuta nella **sequenza di codoni (triplette di nucleotidi)** lungo l'mRNA viene **decodificata o tradotta** in una **sequenza di aa** costituenti la proteina, uniti in una sequenza precisa determinata dalla sequenza dei codoni

**Protagonisti** principali di questo processo:

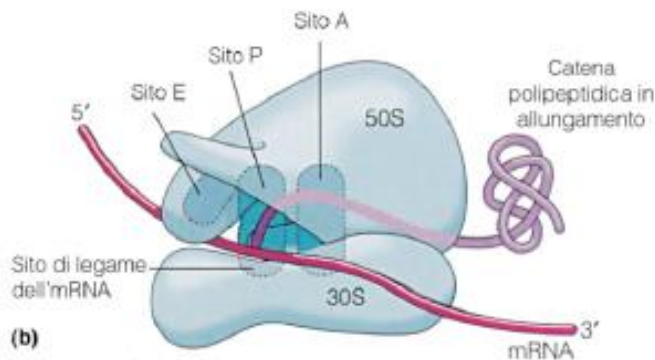




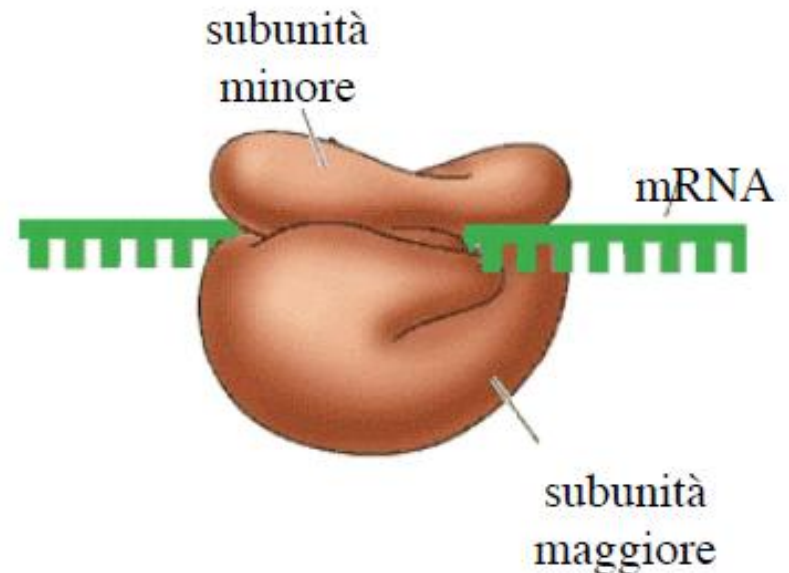
## Ribosomi

(60% rRNA+proteine)

(a)



(b)

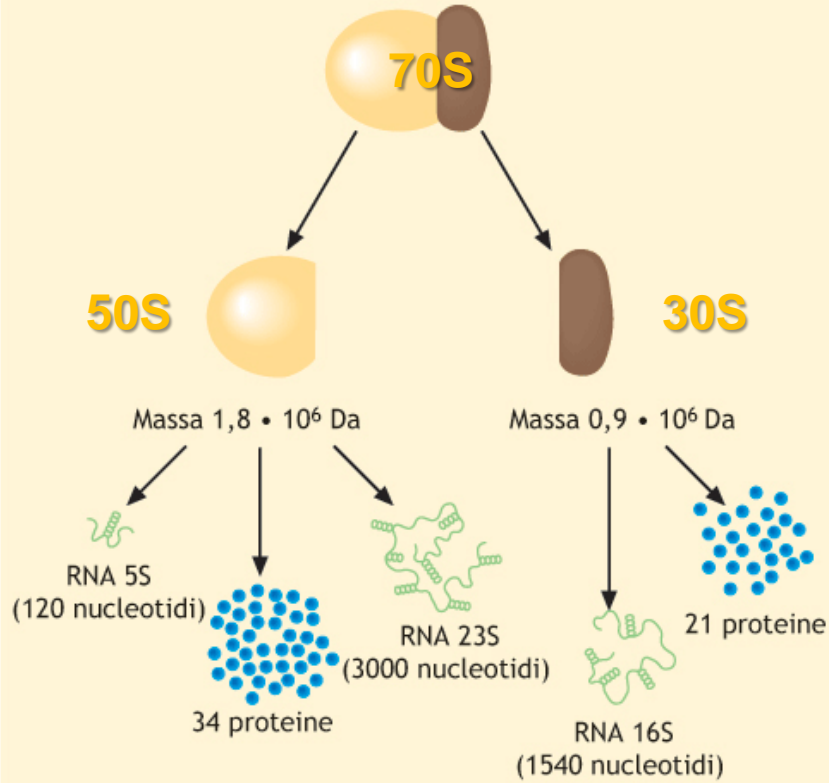


1. Hanno un sito di legame per l'mRNA.
2. Un **sito P (peptidil-tRNA)** che ospita il tRNA che porta la **catena aminoacidica in allungamento**.
3. Un **sito A (aminoacil-tRNA)** che ospita il tRNA a cui è legato il **successivo aa da aggiungere** alla catena proteica in formazione.
4. Un sito E di uscita del tRNA scarico di aa.



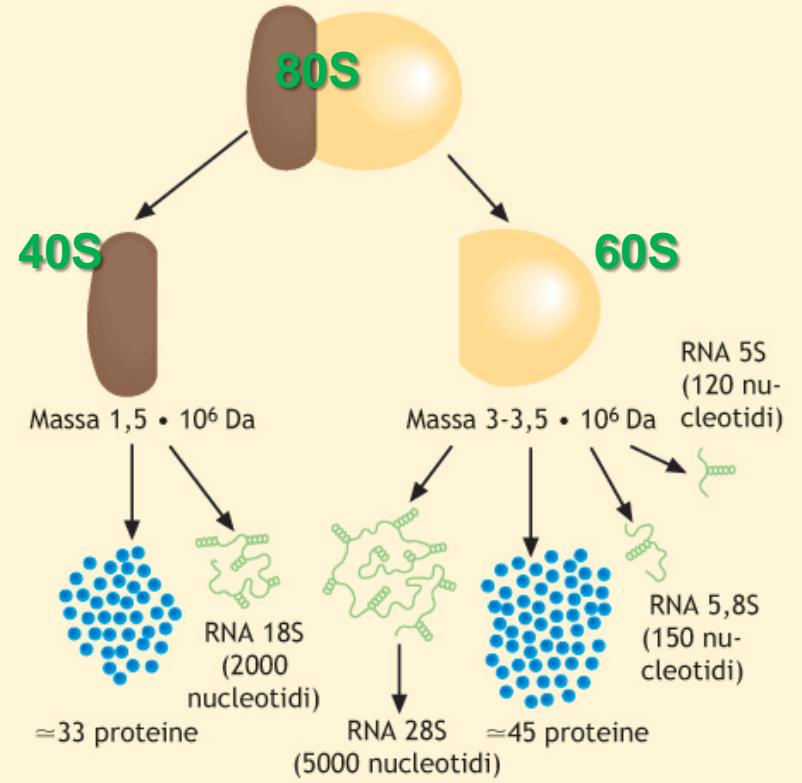
## PROCARIOTI

Massa  $2,7 \cdot 10^6$  dalton



## EUCARIOTI

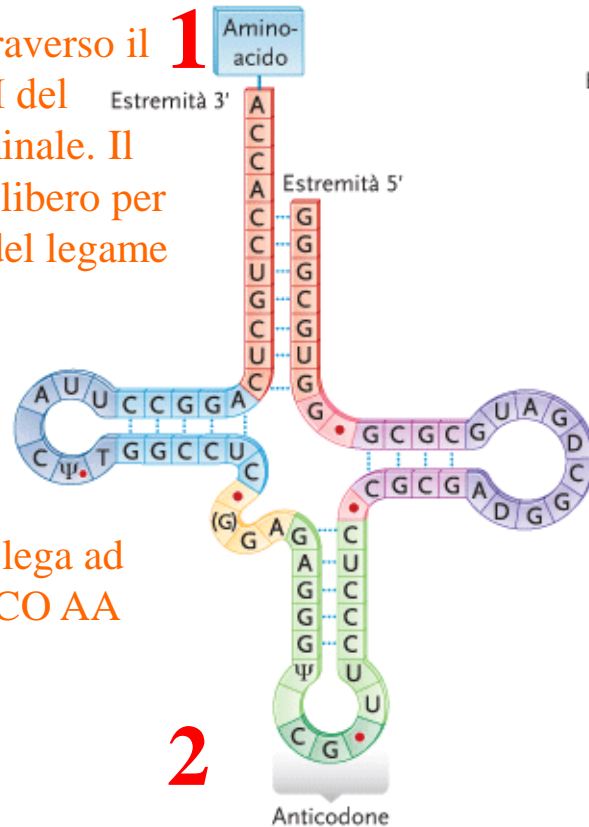
Massa  $4-4,5 \cdot 10^6$  dalton



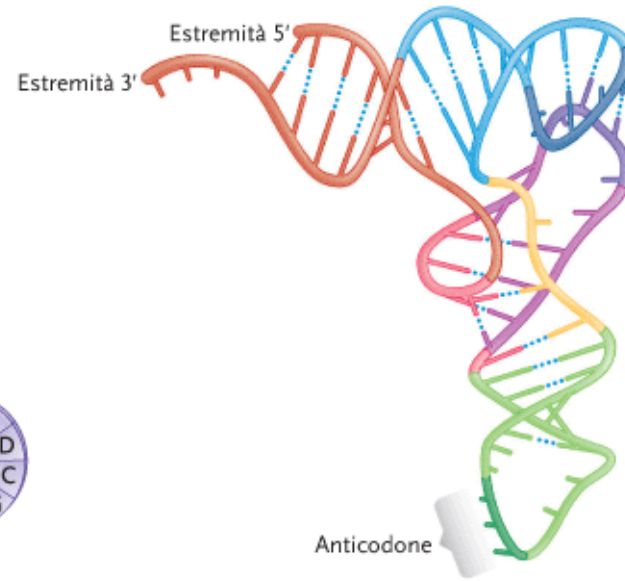
# tRNA

Devono: (1) individuare l'aa giusto e (2) riconoscere i corretti codoni nell'mRNA

a. Struttura bidimensionale di una molecola di tRNA



b. Struttura tridimensionale di una molecola di tRNA



c. Modo in cui, in questo libro, verrà rappresentato un complesso aminoacido-tRNA

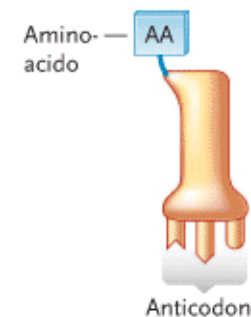


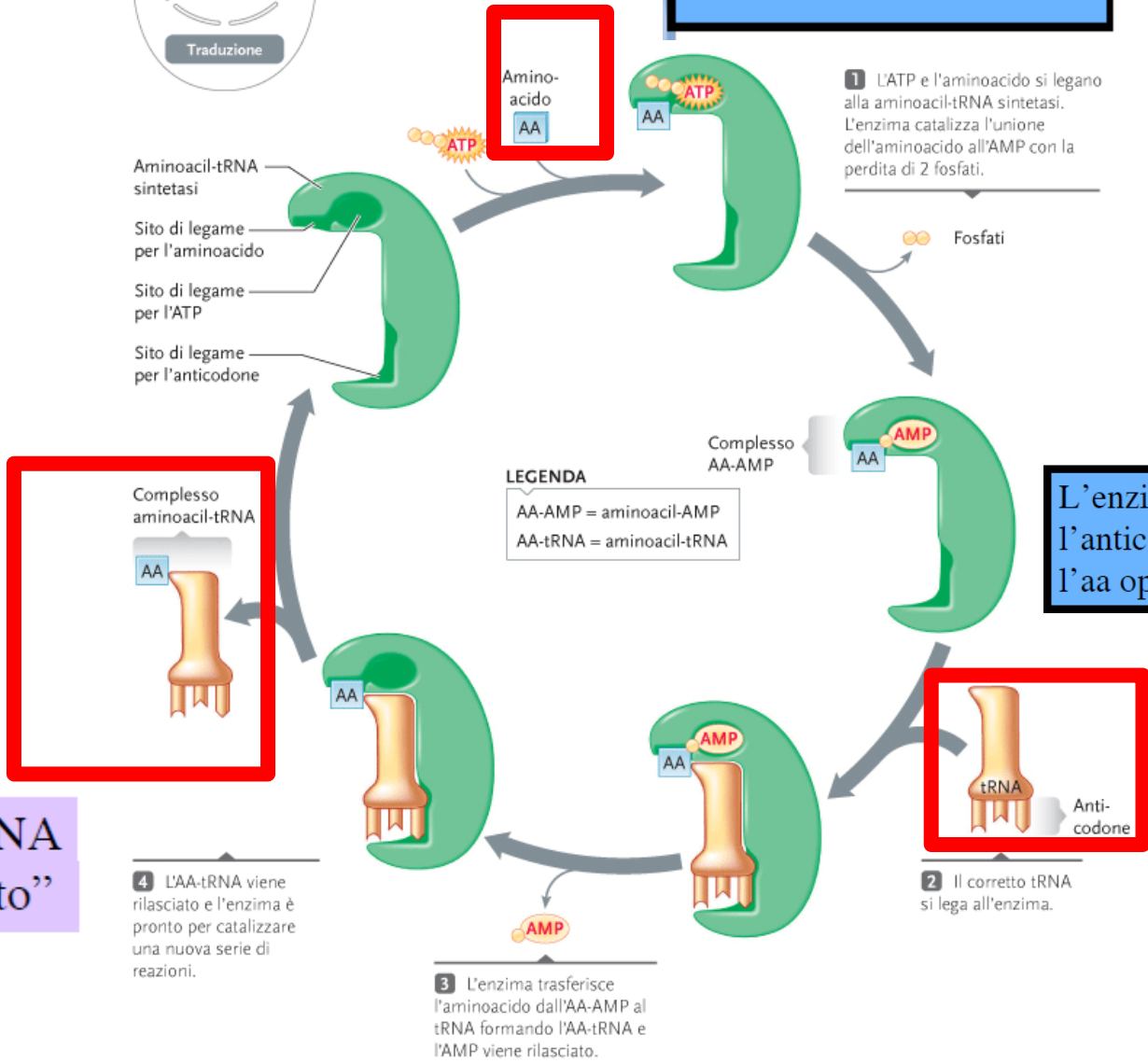
Figura 5.12

**Struttura del tRNA.** I puntini rossi mostrano le posizioni in cui le basi vengono modificate chimicamente. È da notare che sono presenti alcune combinazioni non usuali di coppie di basi, come G-A e G-U; queste coppie non usuali sono comuni nei tRNA e sono possibili grazie alla flessibilità delle corte catene di RNA.

OGNI tRNA si lega ad UNO SPECIFICO AA



# Aminoacil-tRNA sintetasi

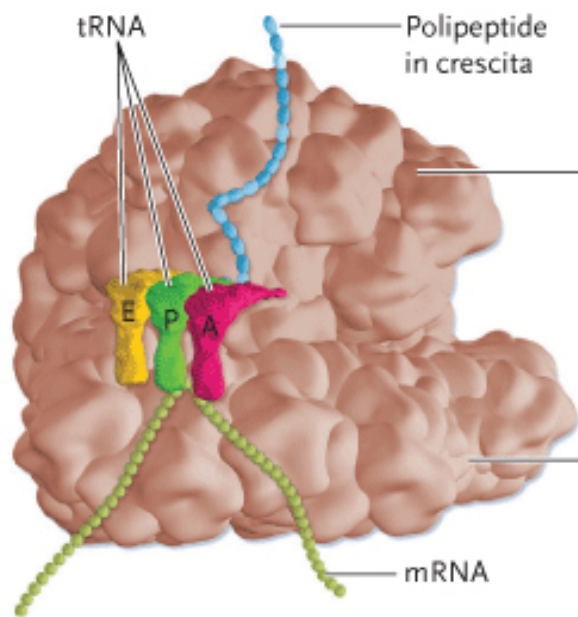


L'enzima riconosce l'anticodone e lega l'aa opportuno

L'aminoacil-tRNA ha un aa "attivato"

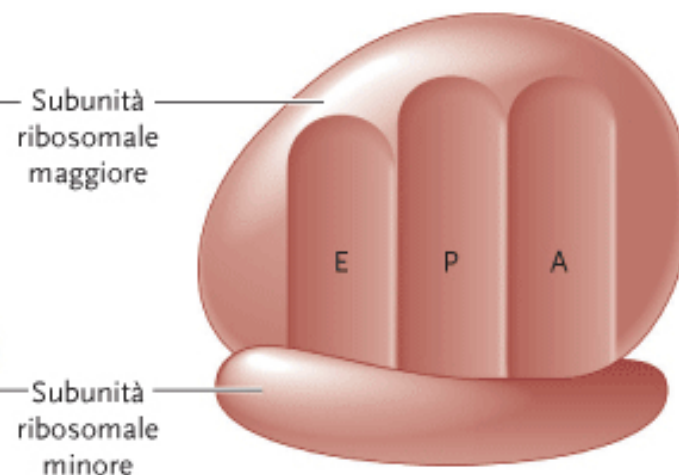


**a. Ribosoma completo**



Gli aminoacidi vengono aggiunti al polipeptide in crescita nella zona compresa tra le due subunità. La catena polipeptidica in crescita esce dal ribosoma attraverso un tunnel di uscita presente nella subunità maggiore.

**b. Illustrazione del ribosoma utilizzata nel testo**

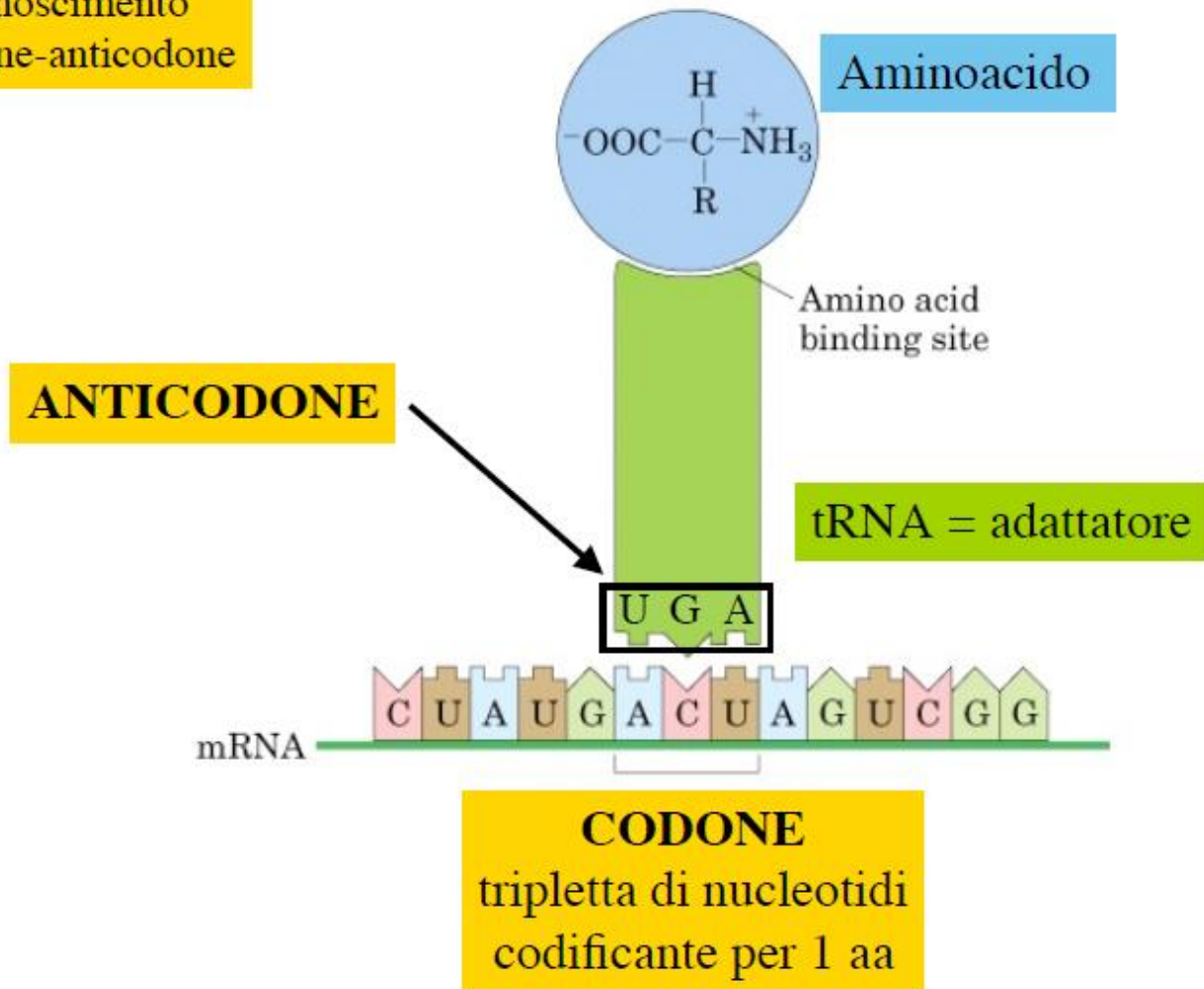


**LEGENDA**

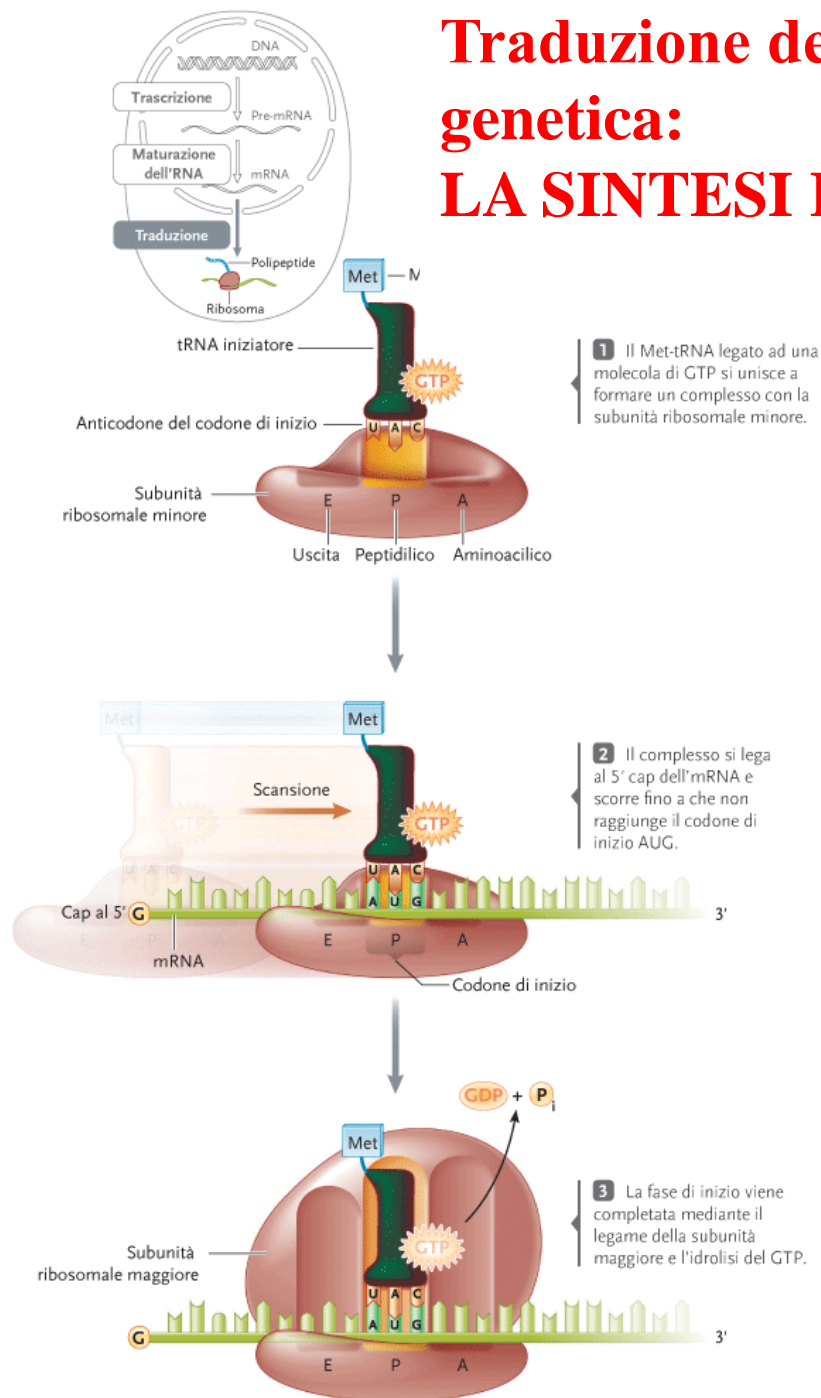
- E = sito di uscita
- P = sito peptidilico
- A = sito aminoacilico

**Figura 5.14**

Riconoscimento  
codone-anticodone



# Traduzione dell'informazione genetica: LA SINTESI PROTEICA



**INIZIO : 3 fattori di inizio (IF I, II, III) si legano alla subunità minore del ribosoma. Il tRNA iniziatore (metionina o formilmetiona, nei batteri) porta il primo AA**

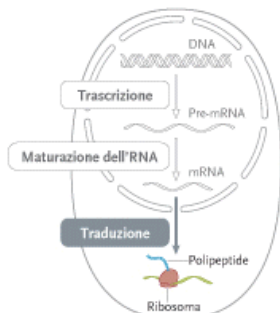
**COMPLESSO DI INIZIO: si lega la subunità maggiore del ribosoma**

**Idrolisi GTP**

# ALLUNGAMENTO

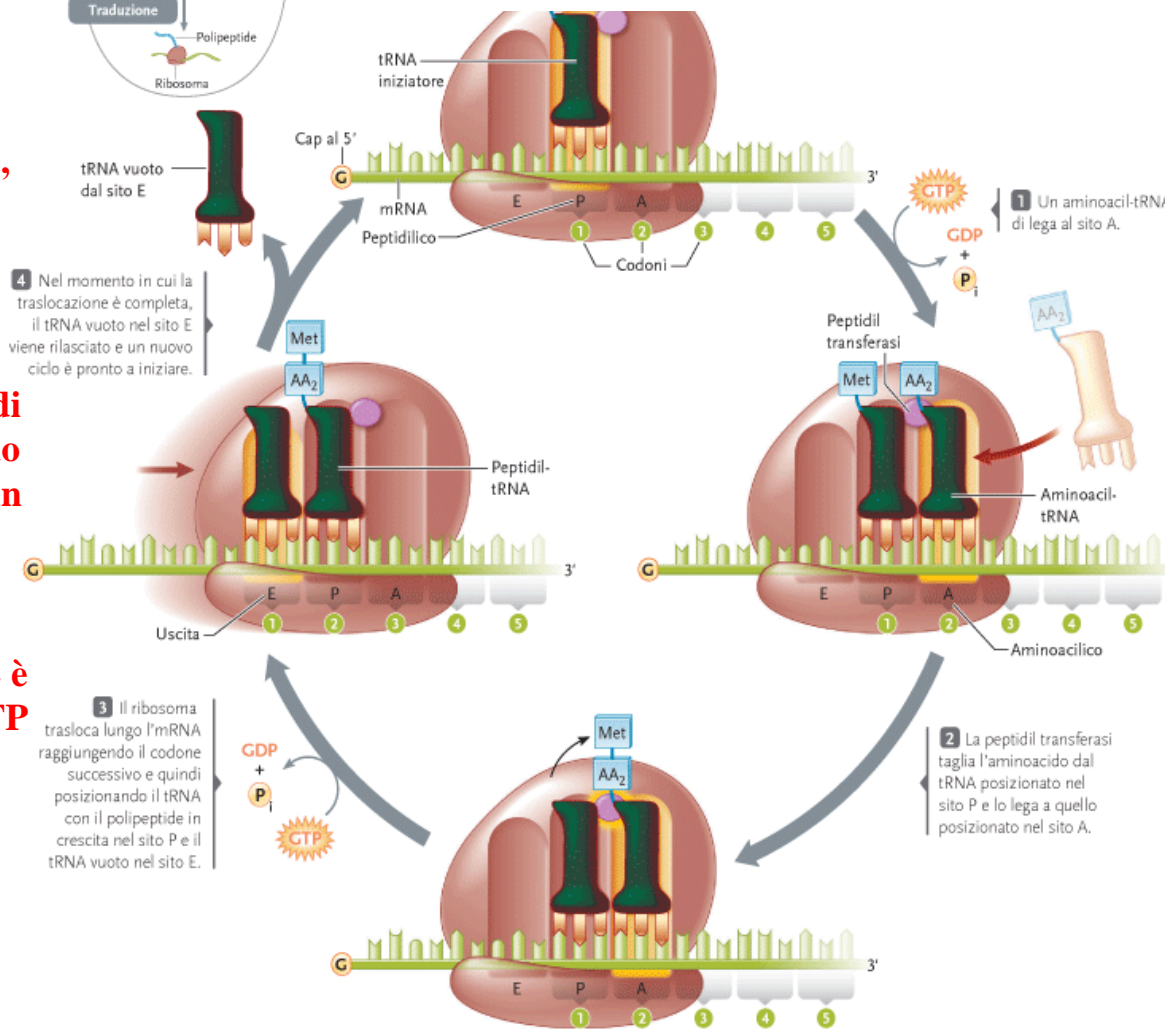
Richiede i fattori di allungamento (EF-Ts-Tu EFG) ed Energia (GTP):

I tRNA vengono inseriti in base al codone nel sito A



**LA TRADUZIONE  
PROCEDE IN  
DIREZIONE 5'→3'**

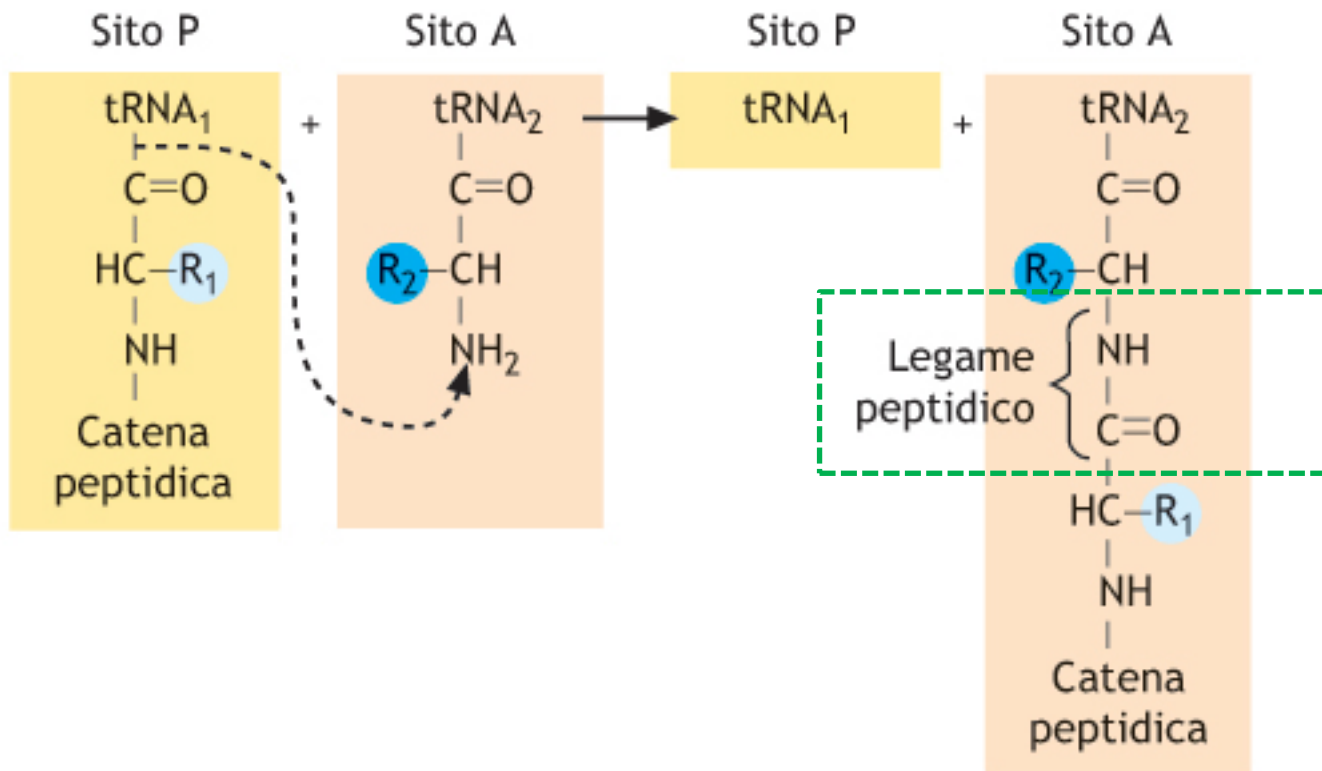
**Il ribosoma scorre di  
un codone, lasciando  
libero il sito A per un  
altro AA  
L'ENERGIA DEL  
PROCESSO DI  
TRASLOCAZIONE è  
FORNITA DAL GTP**



**Il gruppo NH<sub>2</sub> dell'aa  
nel sito A è allineato  
con il gruppo COOH  
dell'aa precedente  
presente nel sito P.**

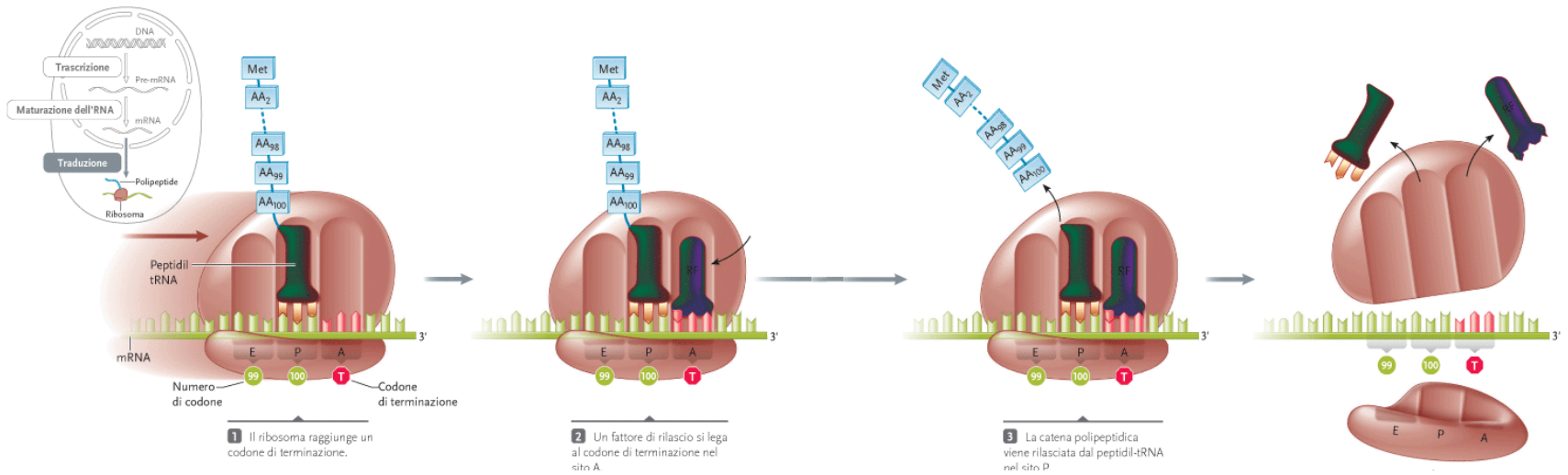
**La peptidil-transferasi  
sposta l'aa del sito P su  
quello del sito A  
(RIBOZIMA, subunità  
ribosomale magg.)**

**La sintesi proteica  
procede sempre dal  
gruppo NH<sub>2</sub> AL  
COOH della catena  
polipept.in crescita**



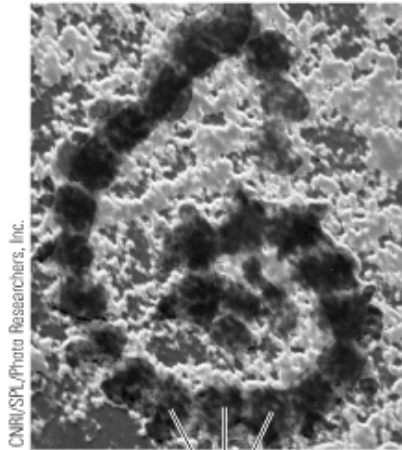
TRANSPEPTIDAZIONE: formazione del legame peptidico





# TERMINAZIONE

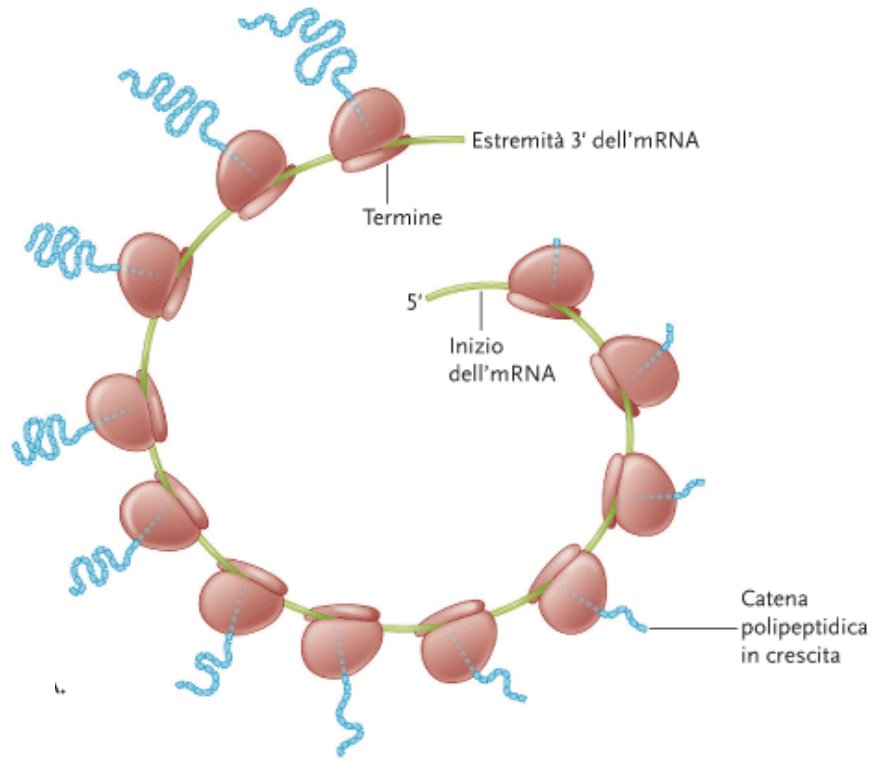
**Un FATTORE DI RILASCIO riconosce il codone di stop nel sito A, e nessun tRNA. Si rompe il legame tra tRNA e polipeptide neosintetizzato, che viene così rilasciato e i componenti del complesso di traduzione si separano.**



CNR/SPL/Photo Researchers, Inc.

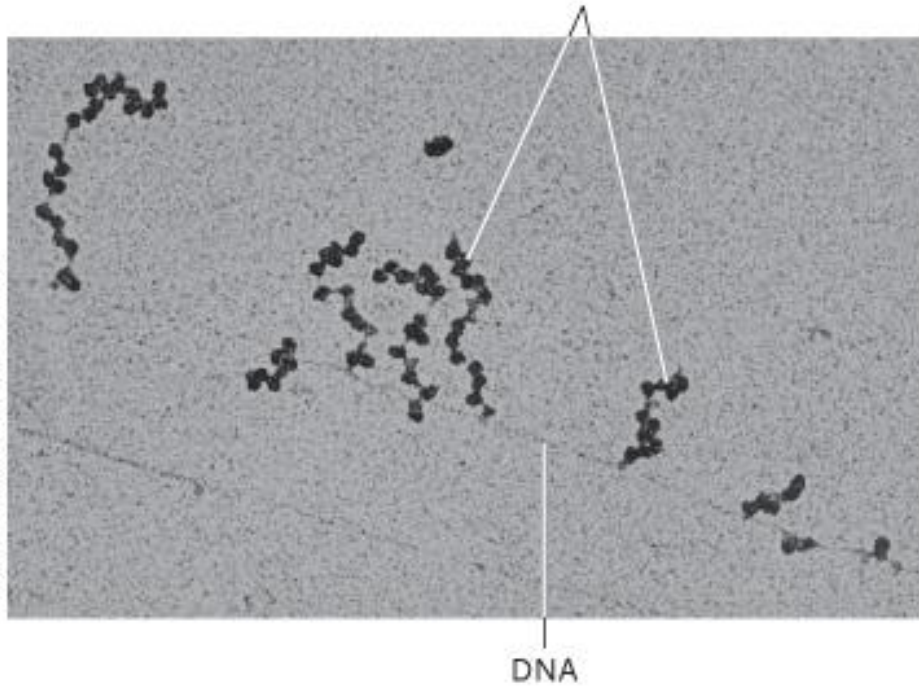
Ribosomi

# polisomi

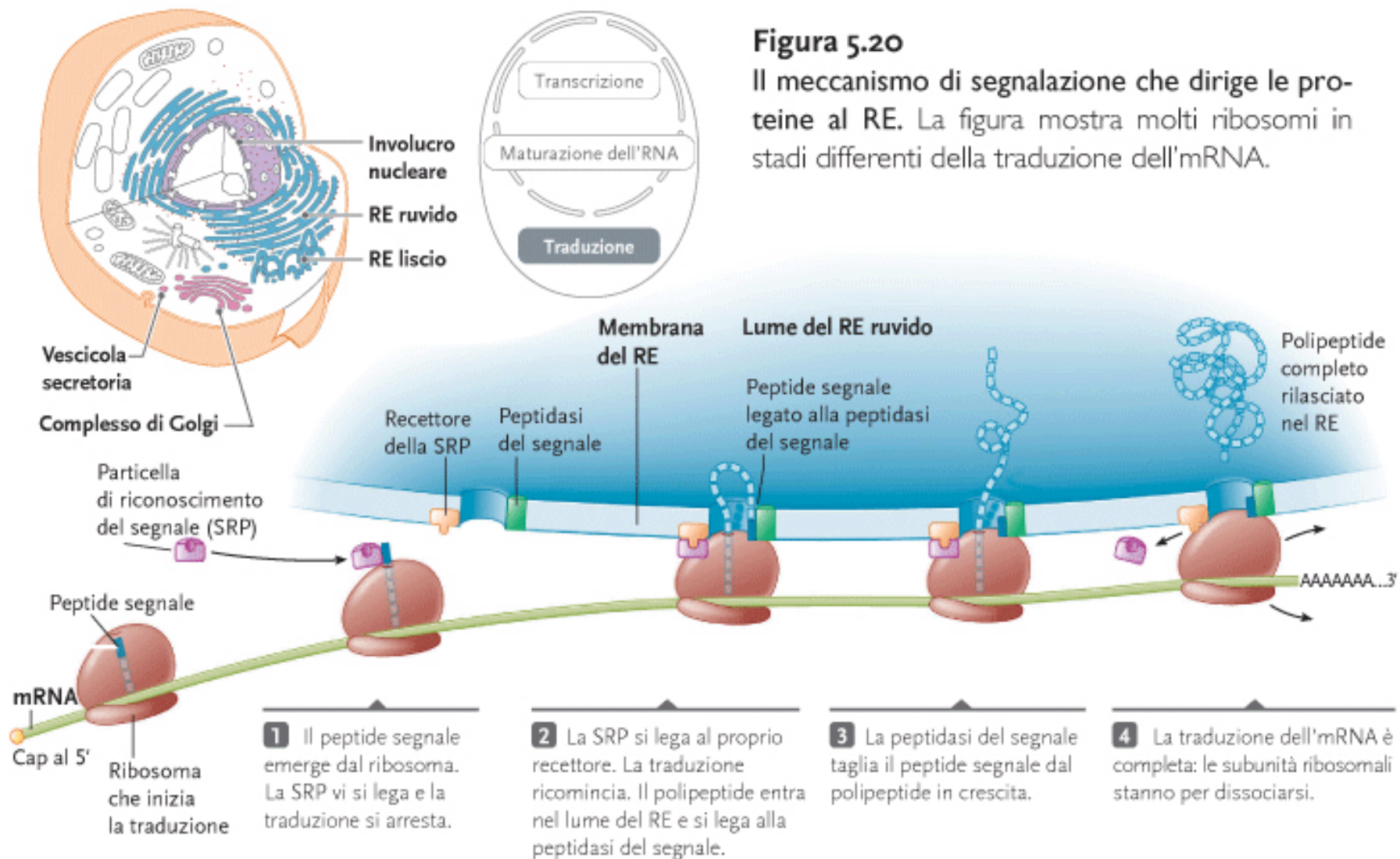


mRNA con ribosomi adesi

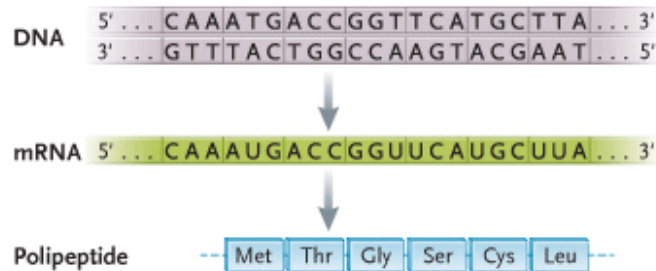
Per gent. conc. di Barbara A. Hamkalo



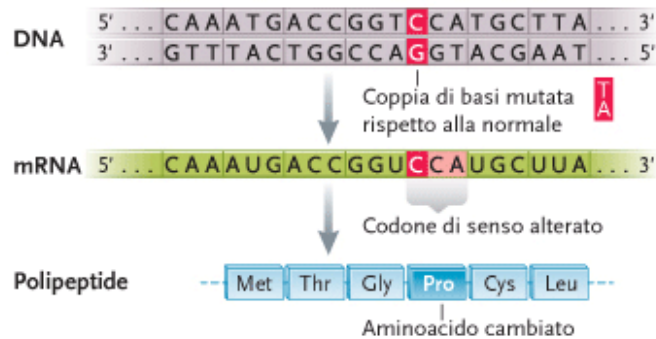
Una preparazione di microscopia elettronica ottenuta da *E. coli* mostra i processi di trascrizione e traduzione che avvengono simultaneamente ( $\times 57.000$ ).



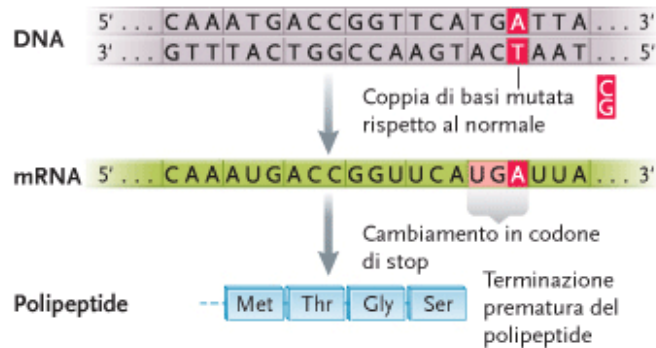
a. Normale



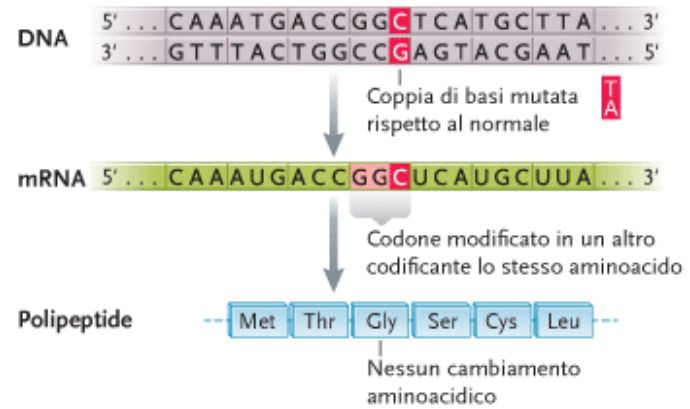
b. Mutazione missenso



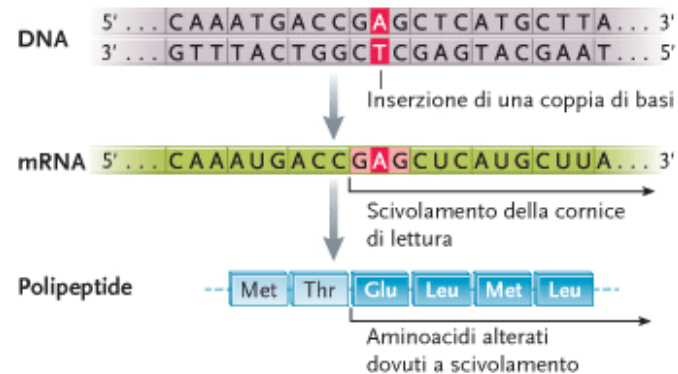
c. Mutazione non-senso

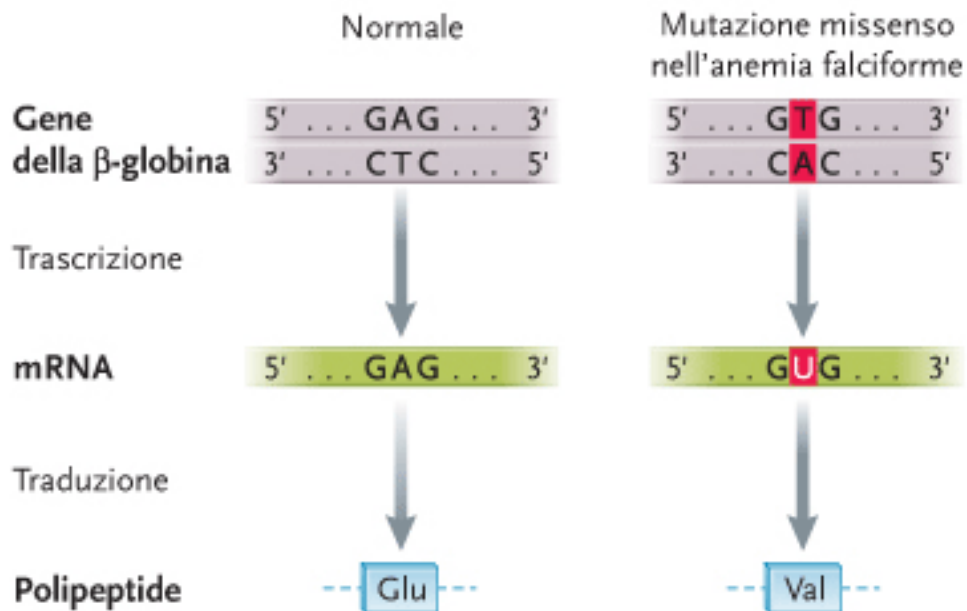


d. Mutazione silente



e. Mutazione frameshift





## Anemia falciforme

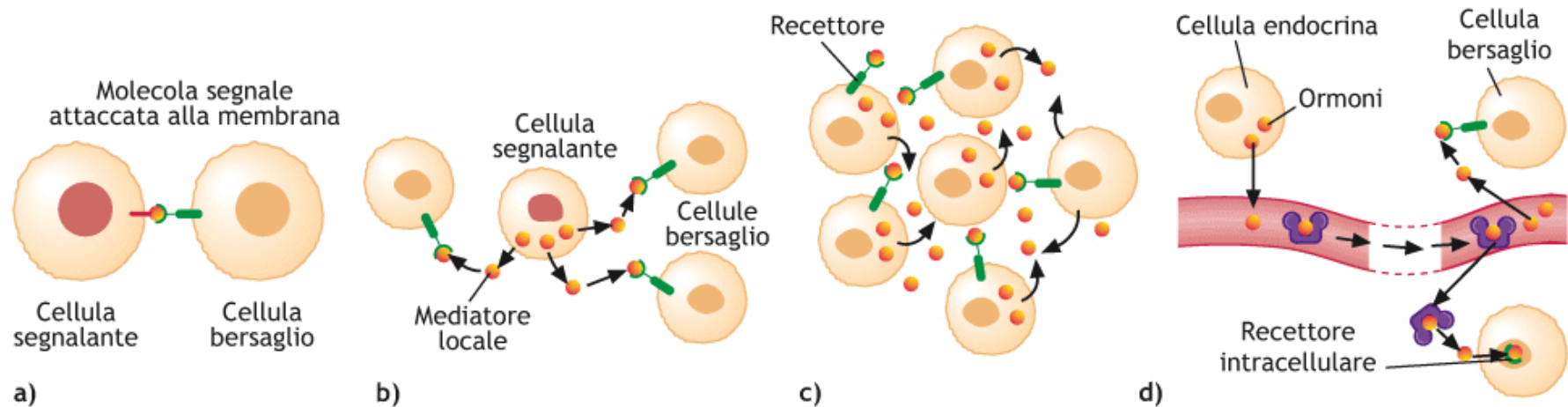
# Segnalazione cellulare

DIPENDENTE DA CONTATTO

PARACRINA

AUTOCRINA

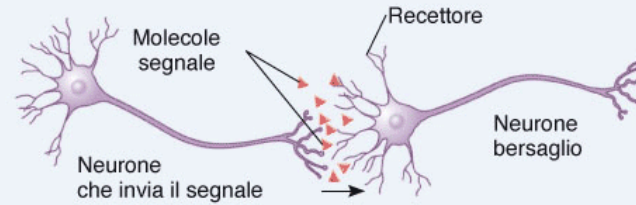
ENDOCRINA



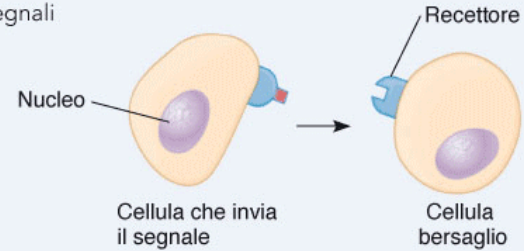
**Figura 5.18** La segnalazione dipendente da contatto (a) necessita di un contatto fra le due cellule; le segnalazioni paracrina (b), autocrina (c) ed endocrina (d) dipendono da segnali rilasciati dalle cellule. Nel caso della comunicazione paracrina, una sostanza rilasciata da una cellula va ad agire su una cellula posta nelle immediate vicinanze. La comunicazione autocrina prevede che una cellula secerna una molecola segnale che va ad agire sulla cellula stessa che l'ha prodotta oppure su cellule dello stesso tipo che risponderanno in maniera coordinata. La comunicazione endocrina è diretta da sostanze che, una volta secrete dalle cellule, tramite la circolazione sanguigna raggiungono i bersagli che possono trovarsi in distretti lontani del corpo.



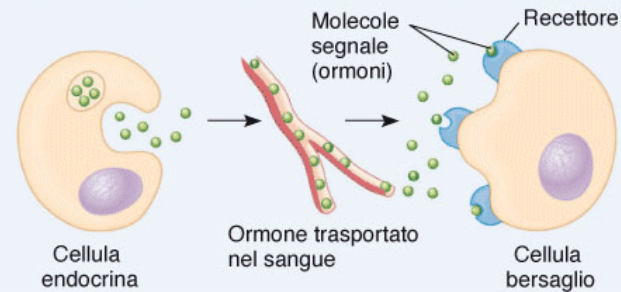
(a) I neuroni trasmettono i segnali attraverso le sinapsi.



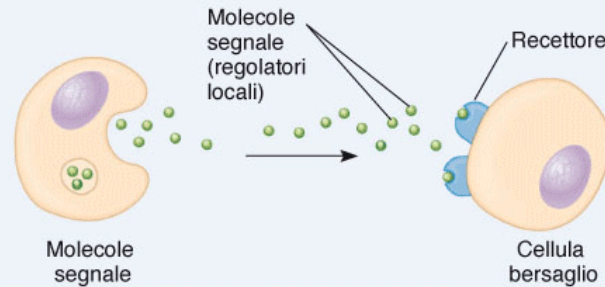
(b) Alcune cellule si scambiano segnali stabilendo contatti diretti.



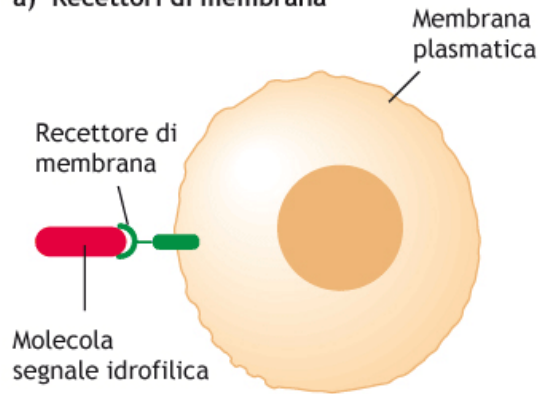
(c) Molti ormoni sono trasportati alle cellule bersaglio dal sangue.



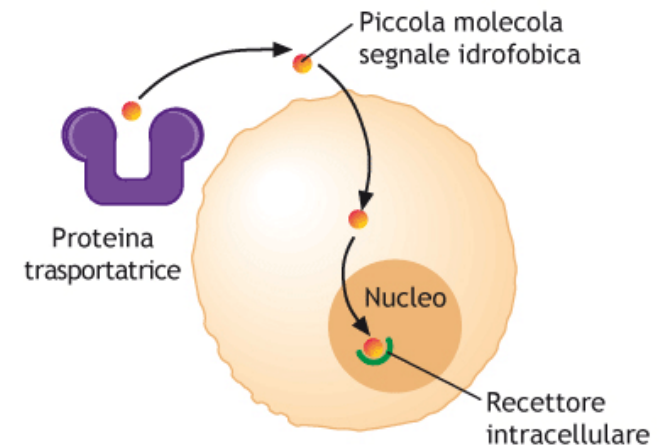
(d) Nella regolazione paracrina, un regolatore locale diffonde fino alle cellule bersaglio.



a) Recettori di membrana

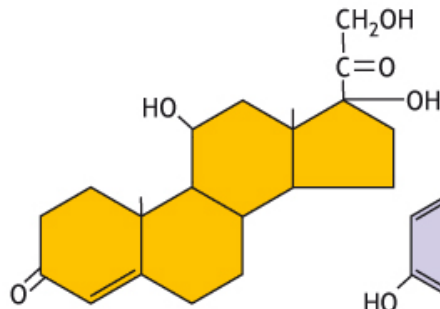


b) Recettori intracellulari

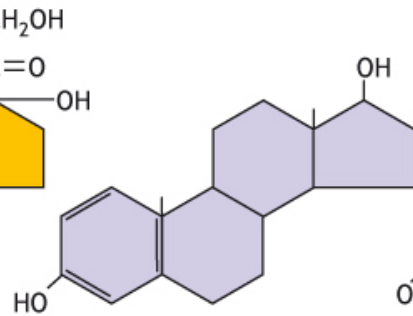


**Figura 5.19 Recettori di membrana e recettori intracellulari.** (a) Le molecole di segnalazione sono per lo più di natura idrofilica e per questo incapaci di passare attraverso il doppio strato lipidico della membrana plasmatica, il meccanismo di azione prevede che esse riconoscano e leghino recettori di superficie che sono in grado di trasdurre il segnale all'interno della cellula. (b) Le piccole molecole segnale di natura idrofobica, invece, entrano facilmente nella cellula e legano recettori sia citoplasmatici che nucleari.

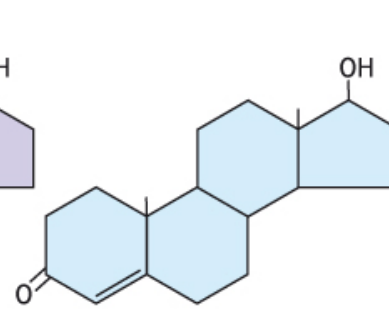
# Molecole segnale idrofobiche



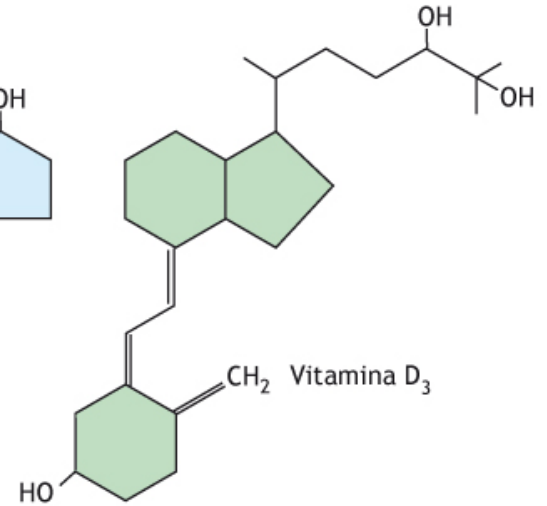
Cortisolo



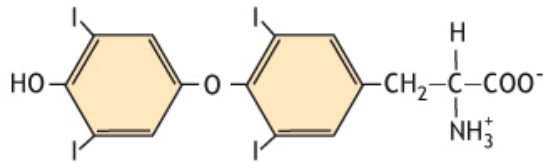
Estradiolo



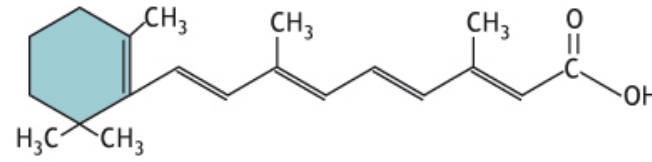
Testosterone



Vitamina D<sub>3</sub>

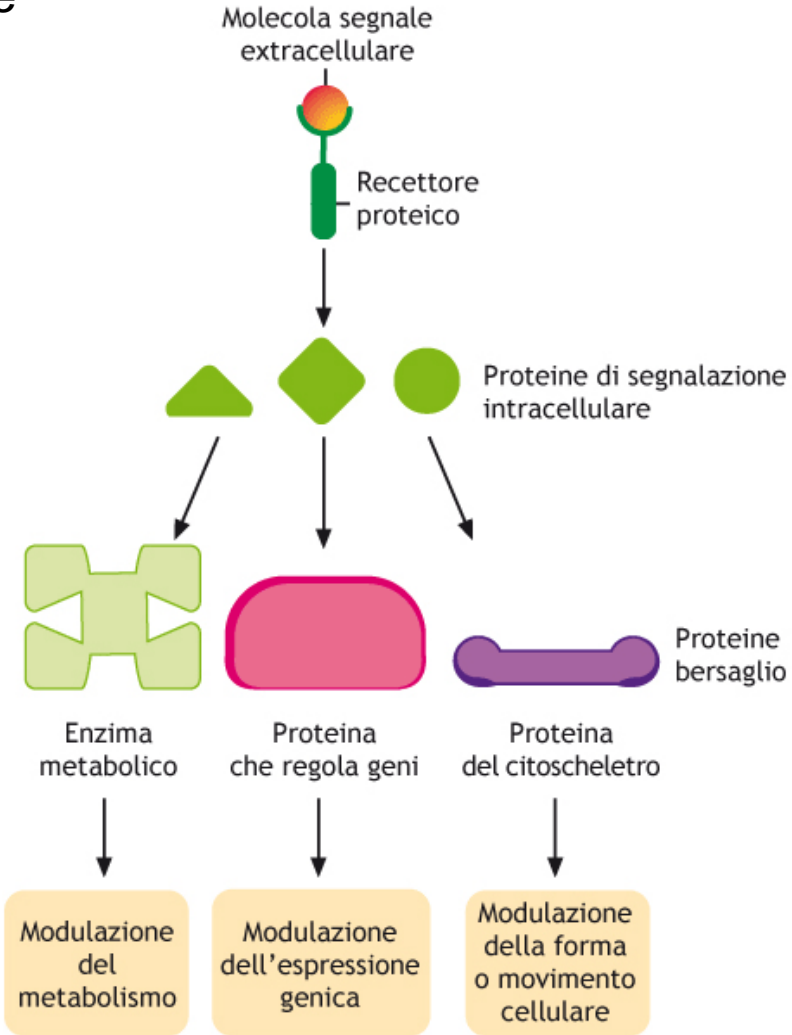


Tiroxina



Acido retinoico

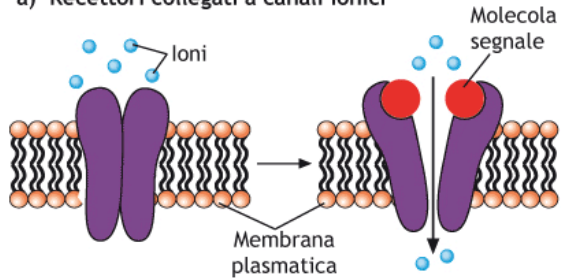
# Molecole segnale idrofiliche



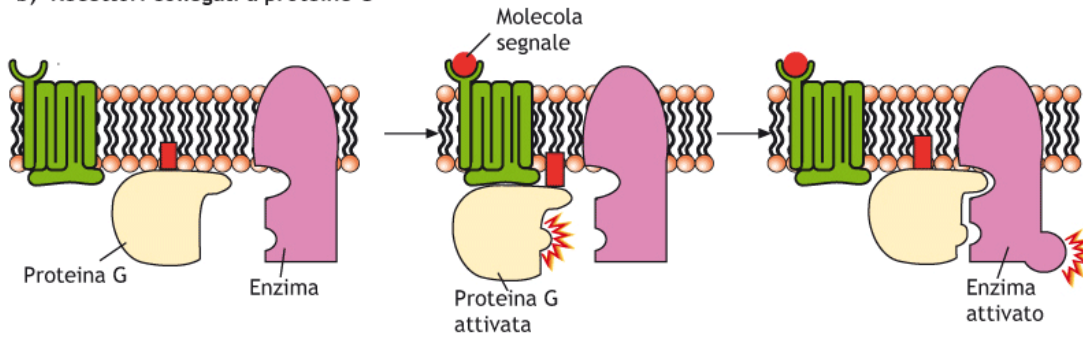
**Figura 5.22 Effetti del legame recettore/ligando.** Una molecola segnale idrofilica lega il suo recettore extracellulare, ciò scatenata all'interno della cellula una serie di eventi mediati da proteine intracellulari di segnalazione. Queste proteine a loro volta interagiscono con proteine bersaglio, modificando il comportamento della cellula.

# Recettori di superficie

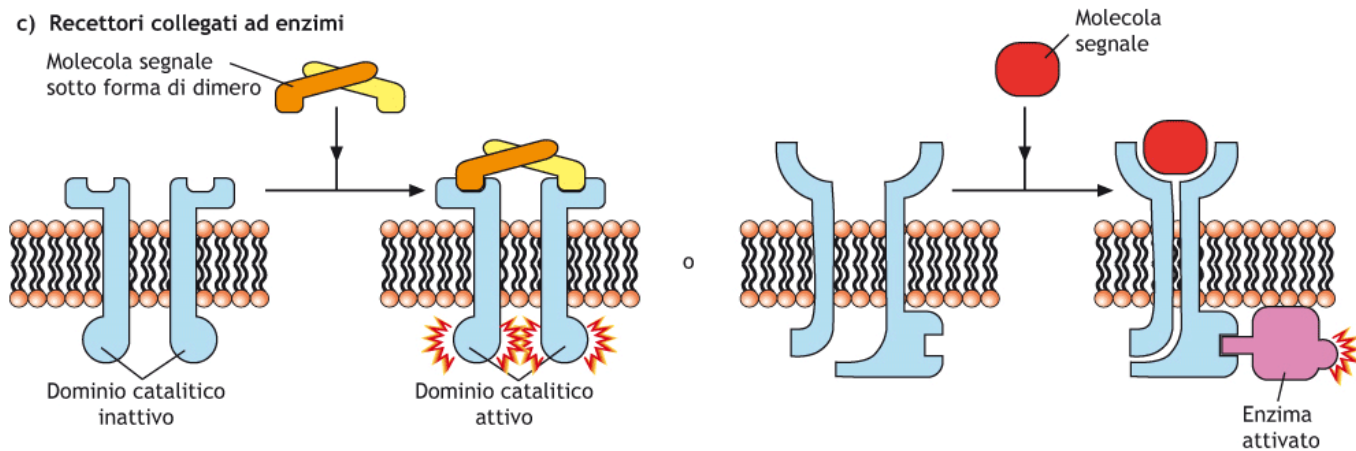
a) Recettori collegati a canali ionici

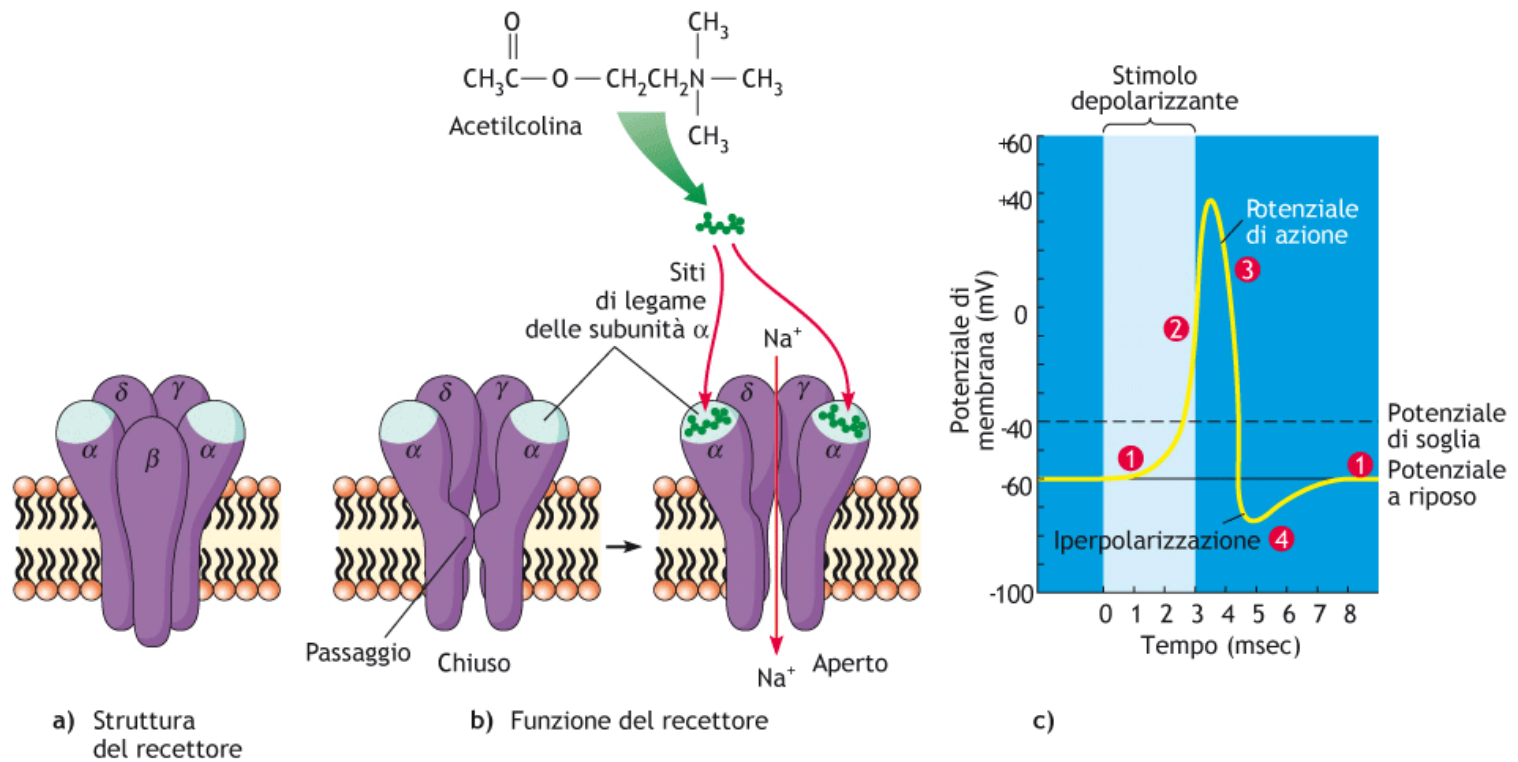


b) Recettori collegati a proteine G

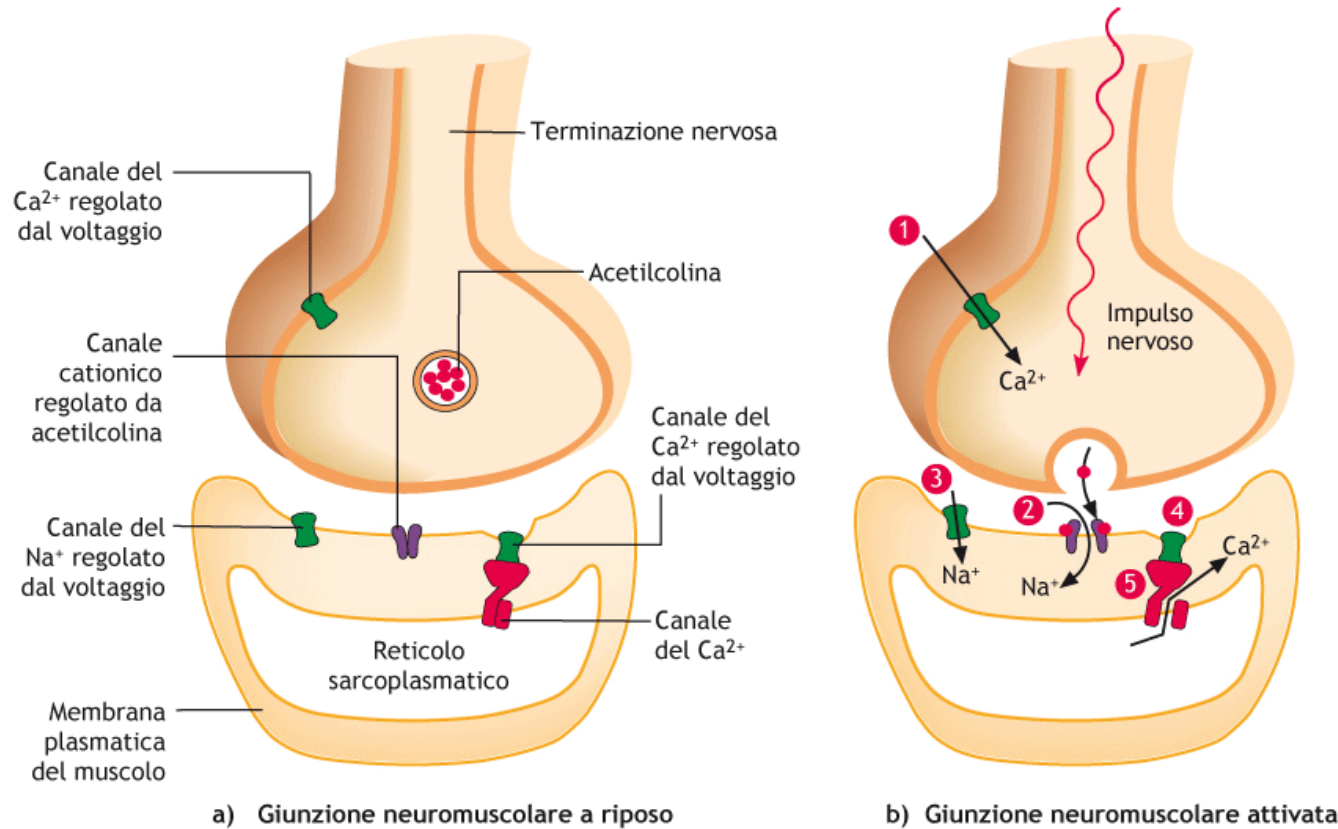


c) Recettori collegati ad enzimi



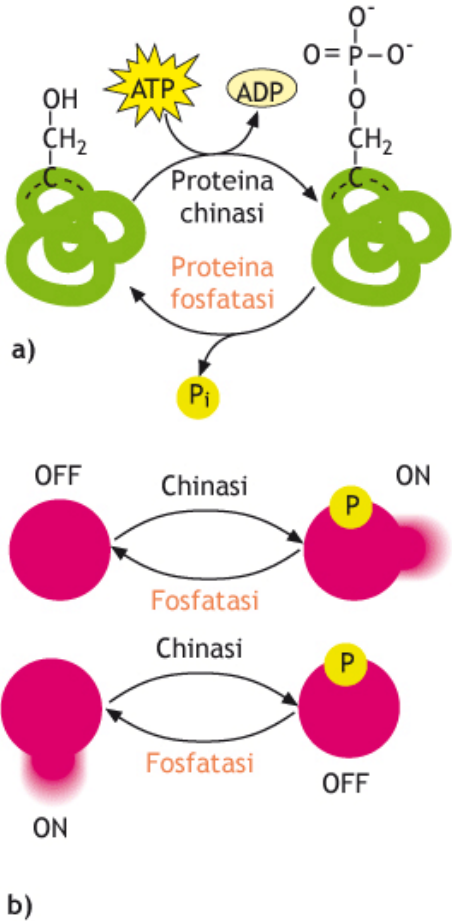


**Figura 5.38 Recettore nicotinic dell'acetilcolina: struttura e meccanismo d'azione.** (a) Il recettore dell'acetilcolina è un recettore ionotropo costituito da due subunità  $\alpha$ , una  $\beta$ , una  $\gamma$  ed una  $\delta$ : le due subunità  $\alpha$  presentano il sito di legame per l'acetilcolina, mentre le altre subunità formano il canale attraverso cui passano gli ioni  $\text{Na}^+$ . (b) Il legame di due molecole di acetilcolina alle due subunità  $\alpha$  induce l'apertura del canale, favorendo il movimento secondo gradiente di concentrazione degli ioni  $\text{Na}^+$ . (c) L'ingresso del sodio determina la depolarizzazione della membrana postsinaptica e la generazione di un potenziale d'azione per cui l'effetto indotto dall'interazione dell'acetilcolina con questi recettori ionotropi è di tipo eccitatorio.



**Figura 5.39 (a) Giunzione neuromuscolare a riposo e (b) attivata.** In seguito ad un impulso nervoso, si osserva il rilascio dell'acetilcolina nello spazio sinaptico e la successiva attivazione in sequenza di diversi canali (vedi numerazione). L'aumento del calcio citosolico fa contrarre le miofibrille nella cellula muscolare.

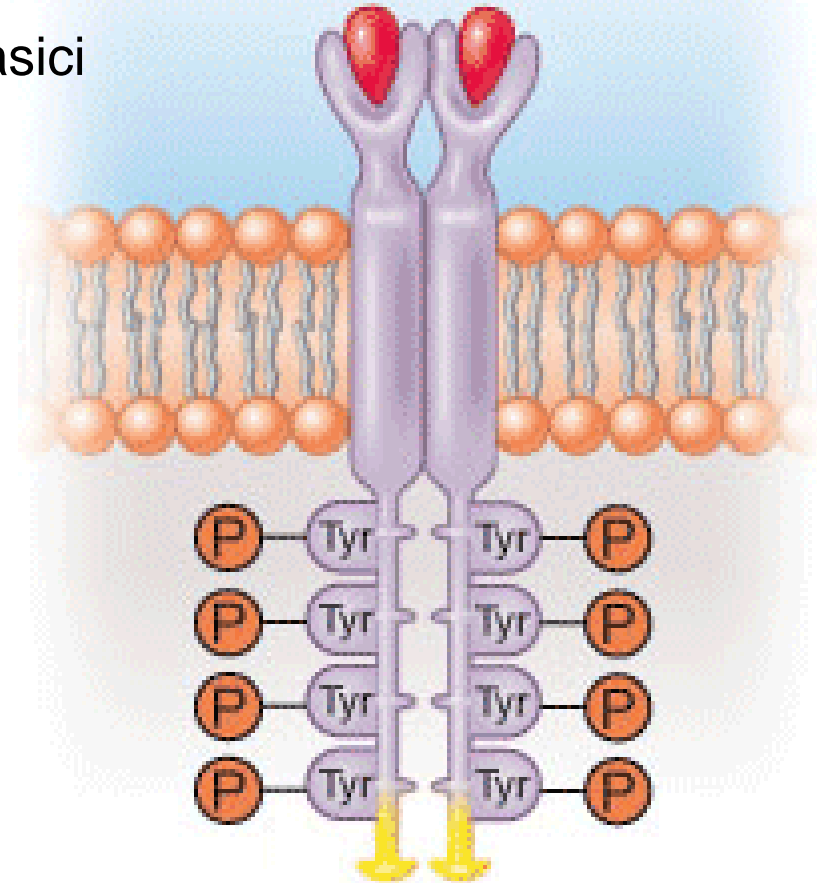
# Reazioni di fosforilazione/defosforilazione (chinasi/fosfatasi)

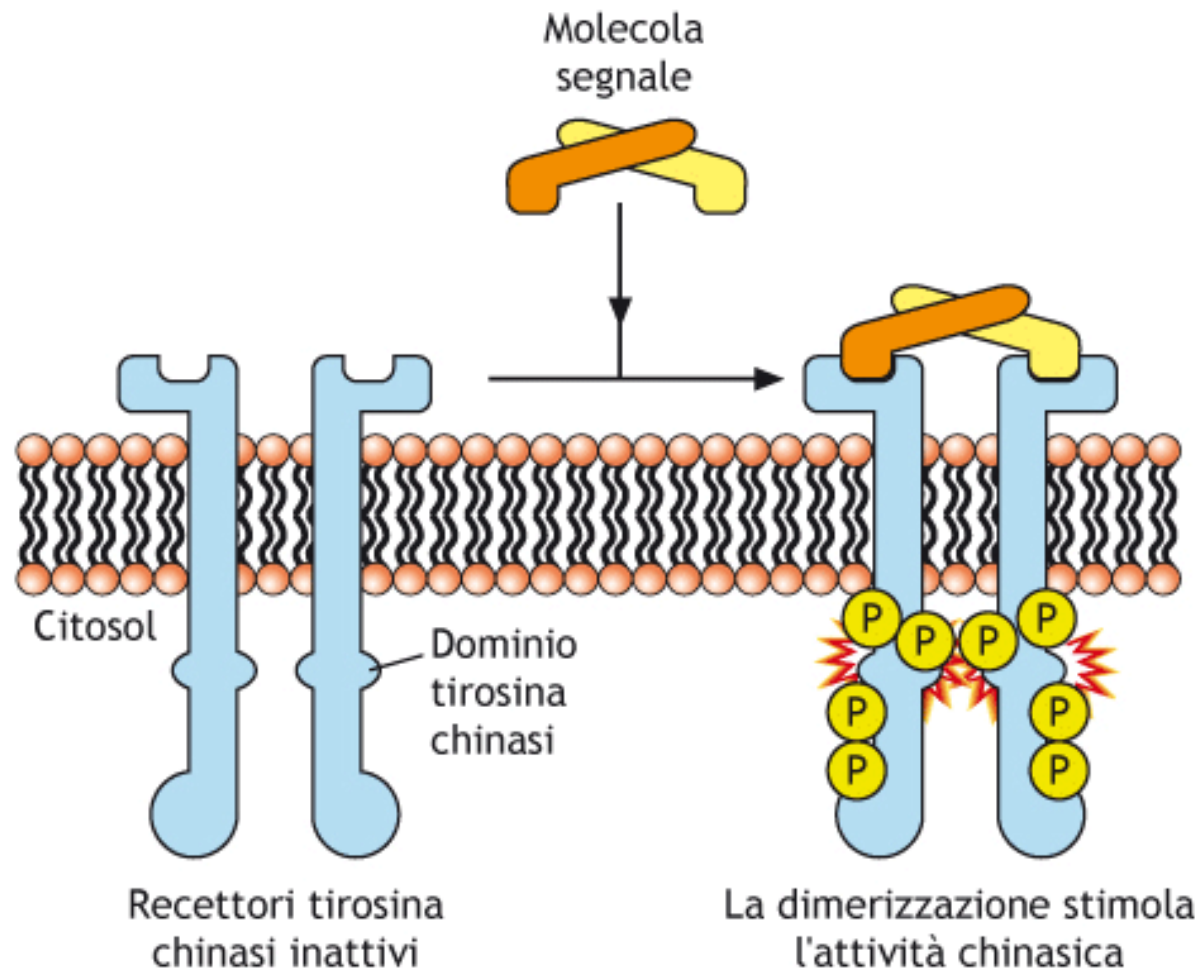


**Figura 5.23** **Reazione di fosforilazione/defosforilazione delle proteine.** In una cellula eucariotica, migliaia di proteine possono essere modificate mediante l'aggiunta o la rimozione di gruppi fosfato. Gli enzimi responsabili della fosforilazione sono comunemente chiamati chinasi o cinasi, mentre quelli che provvedono alla defosforilazione sono detti fosfatasi. In **(a)** è mostrata la fosforilazione di un residuo di serina. Non sempre la fosforilazione causa l'attivazione di una proteina, ciò dipende dal sito di fosforilazione e dalla struttura della molecola **(b)**.

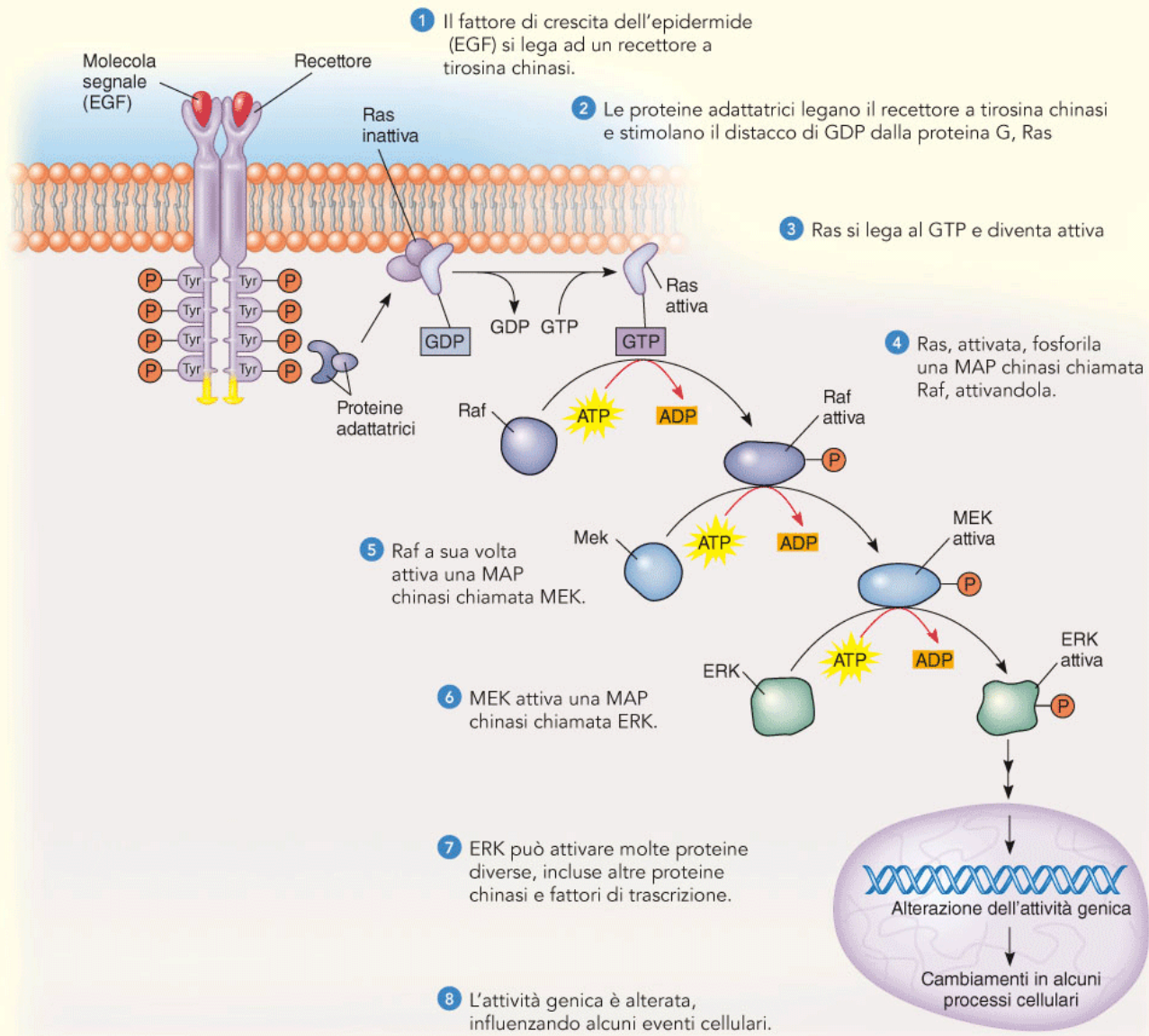


## Recettori tirosin-chinasici





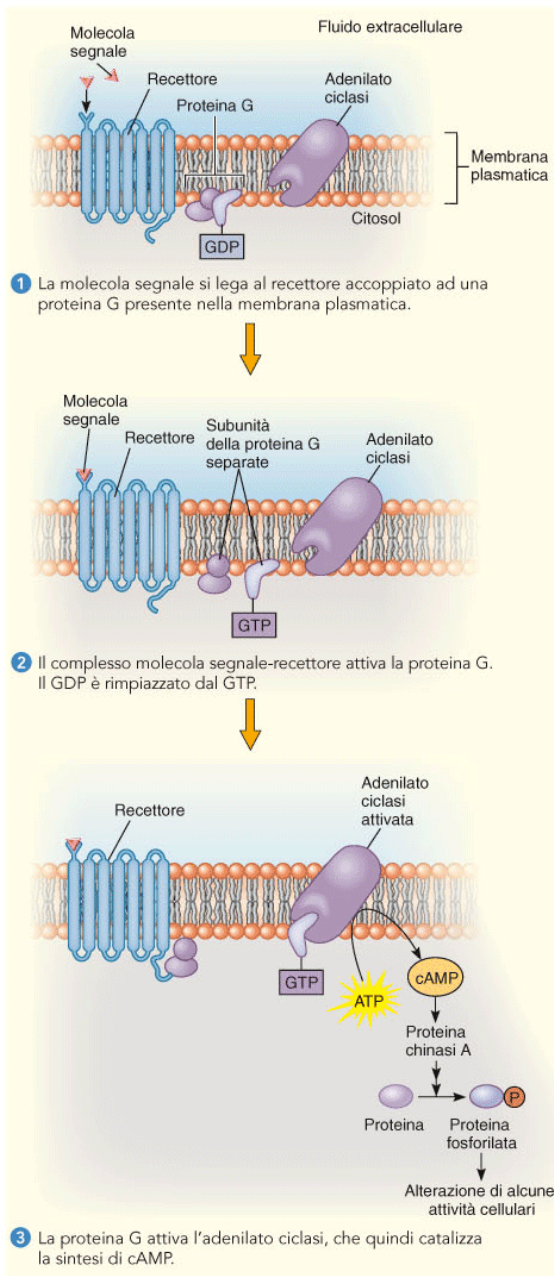
**Figura 5.34 Recettori collegati ad enzimi.** Tali recettori sono proteine transmembrana monopasso con un dominio esterno capace di legare il ligando ed un dominio intracellulare dove è localizzata l'attività chinasica. Per potere funzionare questi recettori devono dimerizzare per potersi fosforilare a vicenda.



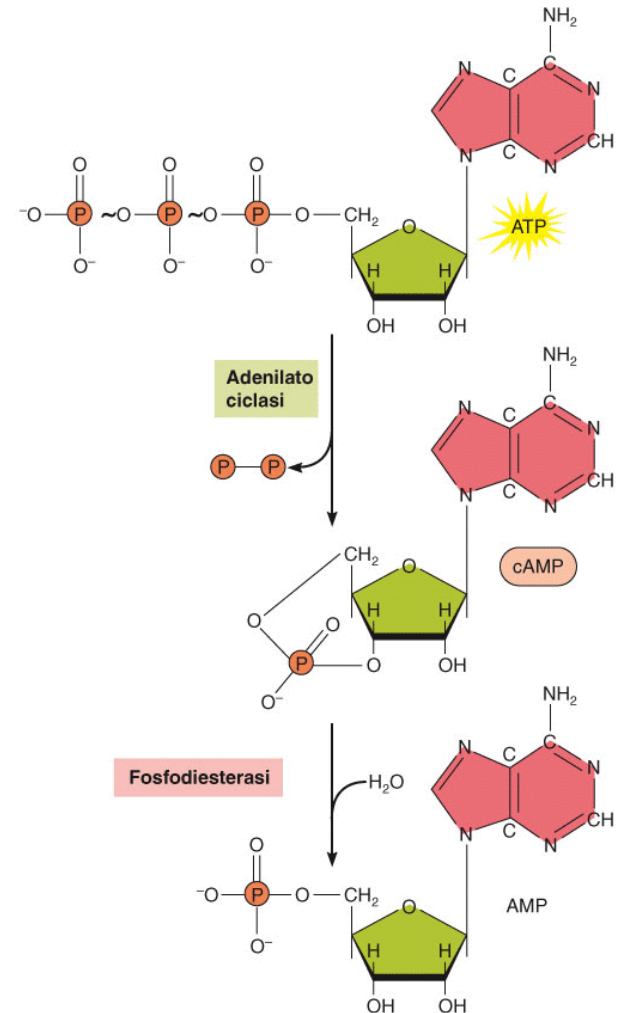
**FIGURA 6-13** Un esempio altamente semplificato di una via di segnalazione Ras/MAP chinasi

Nella via qui illustrata, il fattore di crescita dell'epidermide (EGF) si lega ad un recettore a tirosina chinasi, inducendo l'attivazione di Ras, una piccola proteina G. In seguito, Ras attiva la via di segnalazione delle MAP-chinasi. Una serie di MAP chinasi nella via vengono attivate

mediante fosforilazione. L'ultima MAP chinasi è in grado di regolare molti fattori di trascrizione causando cambiamenti nell'espressione genica, in grado di influenzare eventi cellulari.

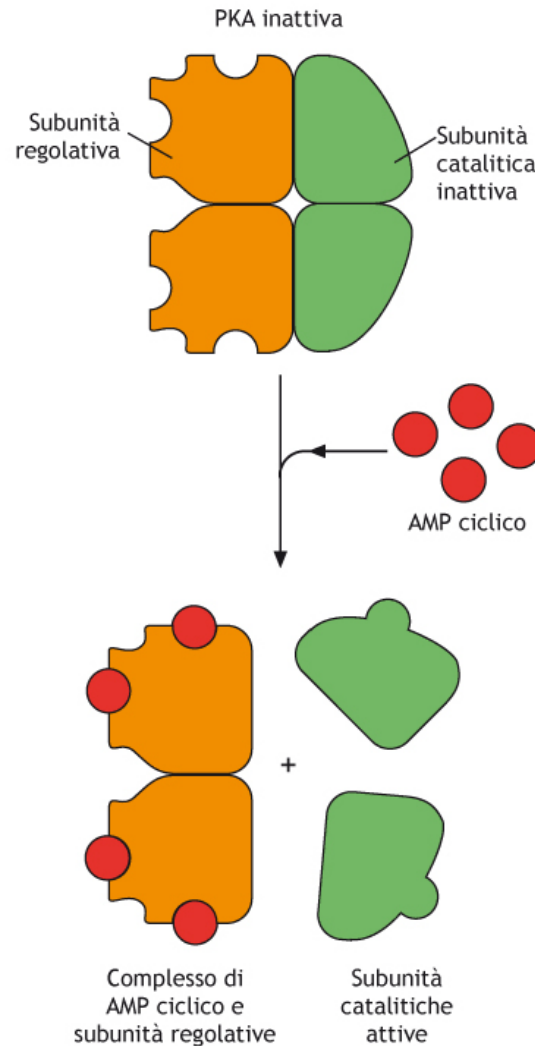


**FIGURA 6-9** Trasduzione del segnale che coinvolge una proteina G e l'AMP ciclico

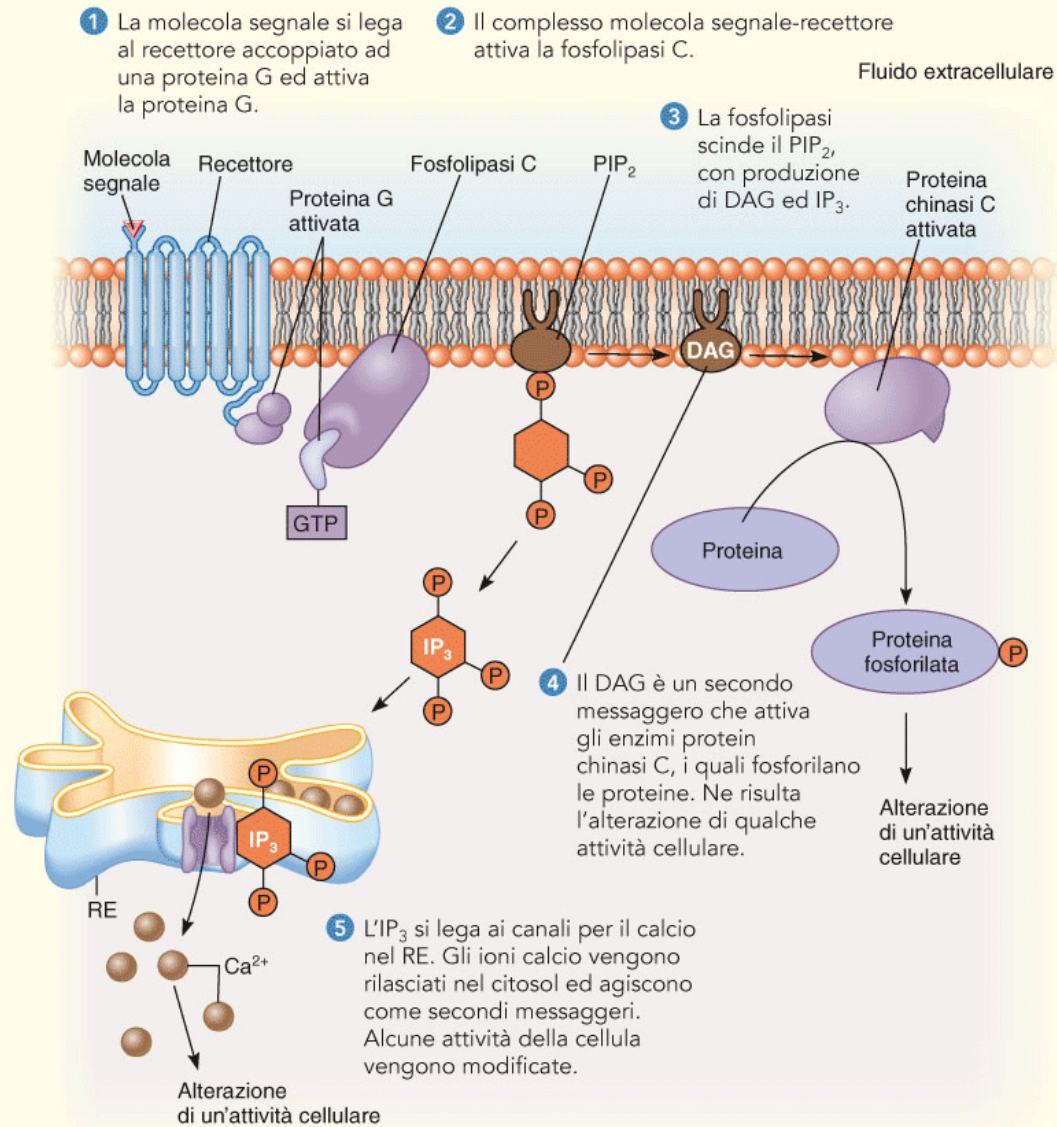


**FIGURA 6-8** Sintesi ed inattivazione dell'AMP ciclico

L'AMP ciclico (cAMP) è un secondo messaggero che viene prodotto a partire dall'ATP in una reazione catalizzata dall'enzima adenilato ciclasi. L'AMP ciclico è inattivato dall'enzima fosfodiesterasi, che lo converte in adenosina monofosfato (AMP).



**Figura 5.29** La proteina chinasi A (PKA), in forma inattiva, è costituita da due subunità regolative e due catalitiche. Il legame di cAMP con le subunità regolative attiva le subunità catalitiche. Esistono forme diverse di PKA, nei mammiferi ci sono una forma citosolica, una ancorata alla membrana (sia plasmatica che mitocondriale esterna) ed una legata ai microtubuli. In ogni caso, le subunità catalitiche, una volta attivate, possono entrare nel nucleo per attivare altri bersagli che moduleranno poi l'espressione genica.

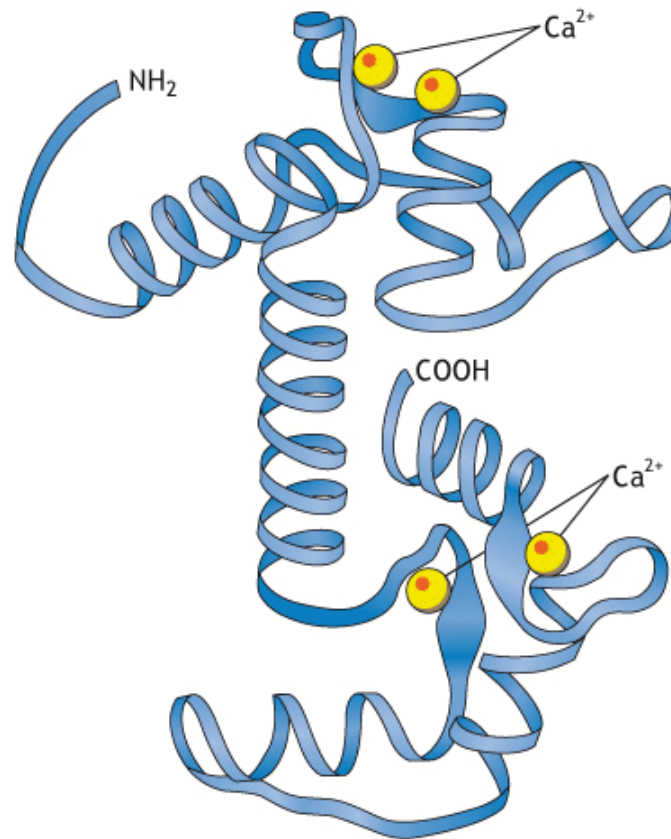


**FIGURA 6-10** Prodotti fosfolipidici come secondi messaggeri

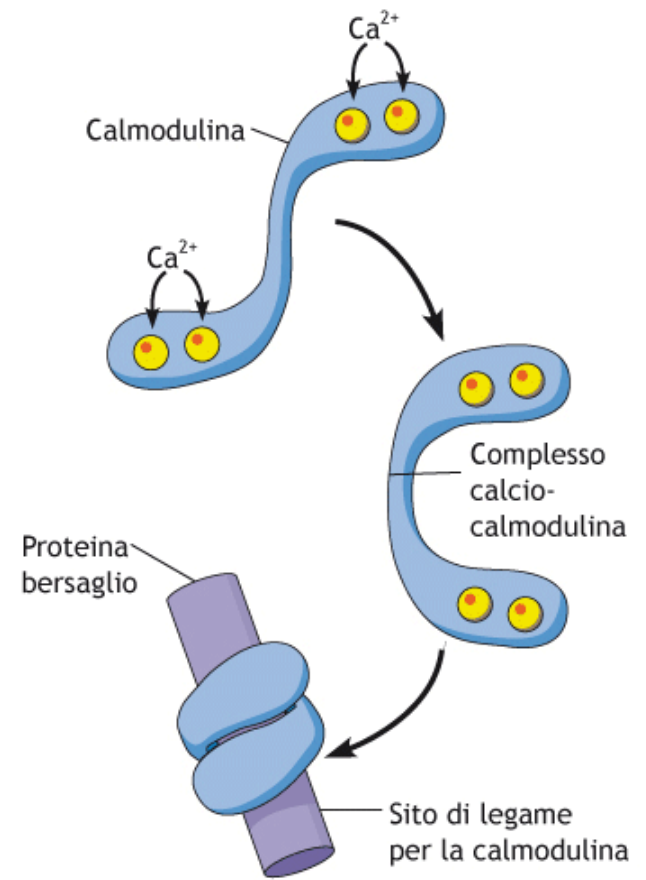
Una proteina G attivata attiva la fosfolipasi C. Questo enzima scinde il  $PIP_2$  producendo due secondi messaggeri,  $IP_3$  e DAG. L' $IP_3$  si lega ai canali del calcio nel reticolo endoplasmatico (RE); gli ioni calcio vengono rilasciati nel citosol ed agiscono come un secondo messaggero. Il DAG

attiva la proteina chinasi C, una famiglia di enzimi che attiva delle vie di segnalazione attraverso la fosforilazione di proteine; gli ioni calcio sono necessari per l'attivazione della proteina chinasi C.

# calmodulina

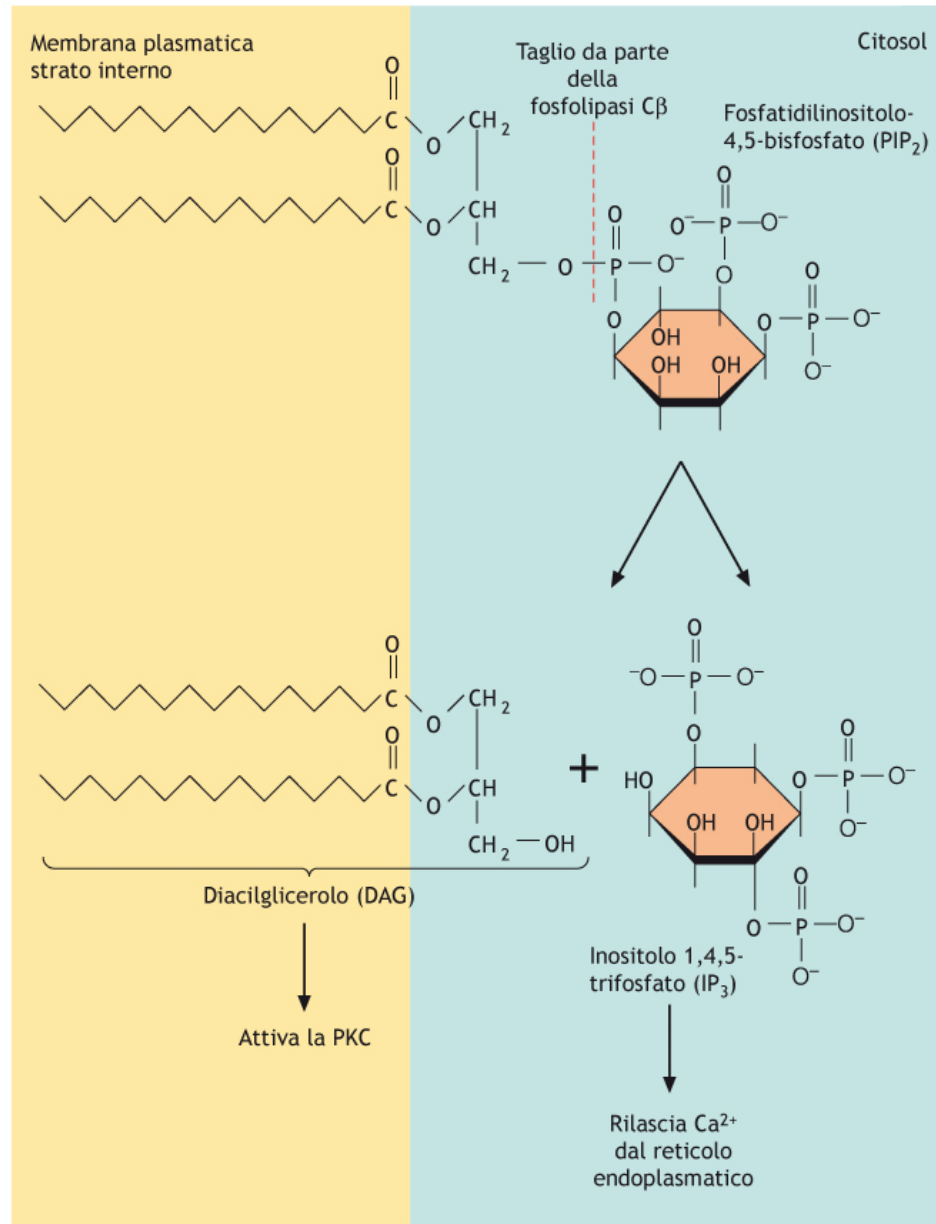


a) Struttura del complesso  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina



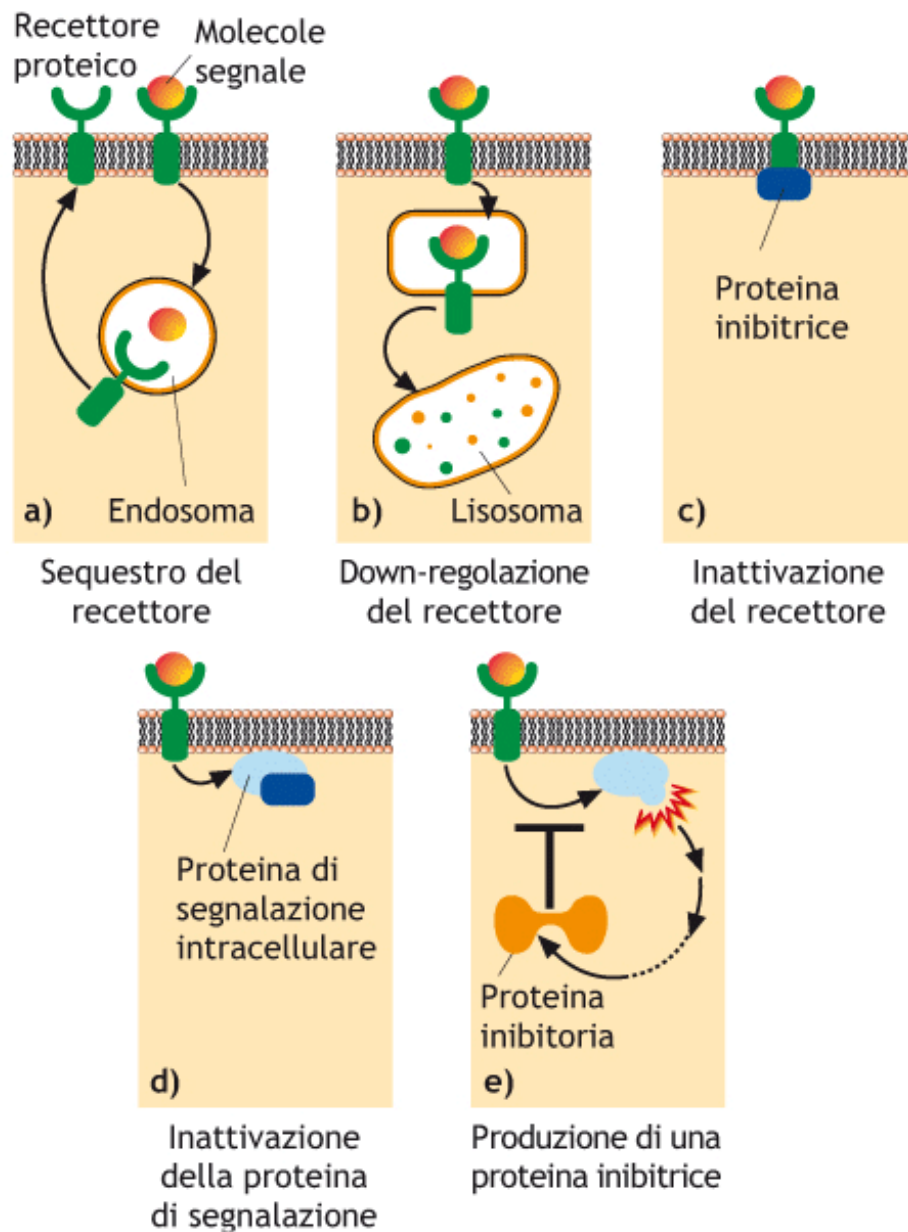
b) Funzione del complesso  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina

**Figura 5.24 La calmodulina.** (a) È una proteina costituita da due porzioni globulari connesse da una lunga  $\alpha$ -elica. Possiede 4 siti per legare altrettanti ioni  $\text{Ca}^{2+}$ : l'affinità dei siti posti all'estremità COOH è di gran lunga superiore rispetto a quelli posti all'estremità  $\text{NH}_2$ . Il legame con il calcio rende la molecola flessibile ed in grado di assumere forme diverse per interagire con i bersagli (b).



**Figura 5.33** Reazione di idrolisi del PIP<sub>2</sub> in IP<sub>3</sub> e DAG.





**Figura 5.41 La desensibilizzazione del recettore.** Sono mostrate 5 modalità diverse di spegnimento della risposta.

# Recettori intracellulari

