

LA SINTESI PROTEICA

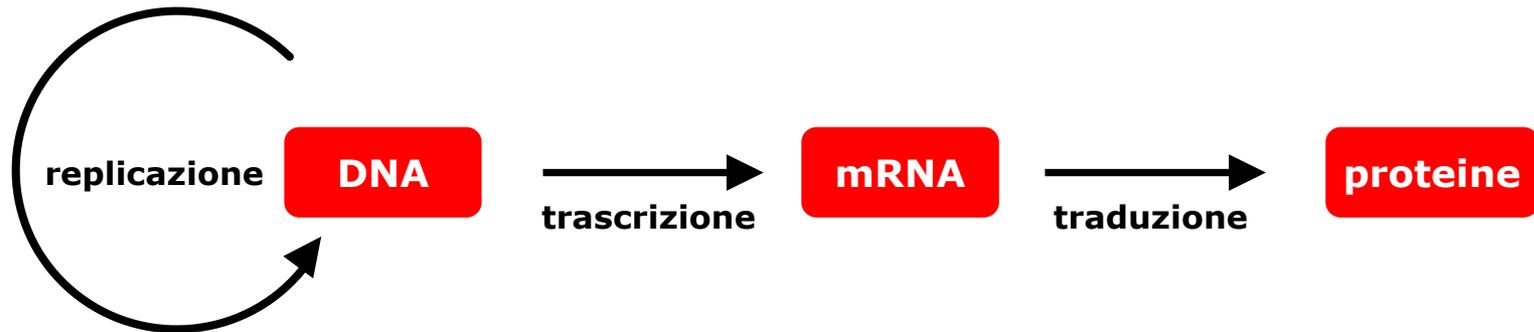
Il processo di sintesi proteica corrisponde alla seconda fase del processo di espressione genica ovvero la sequenza di eventi mediante i quali l'informazione contenuta nel DNA viene convertita in proteine che a loro volta svolgono nella cellula un'ampia gamma di funzioni

Tale fase prende il nome di **TRADUZIONE : l'informazione contenuta nel DNA è trascritta in RNA e quindi tradotta in proteine.**

Il dogma centrale della biologia

(enunciato da Francis Crick nel 1957)

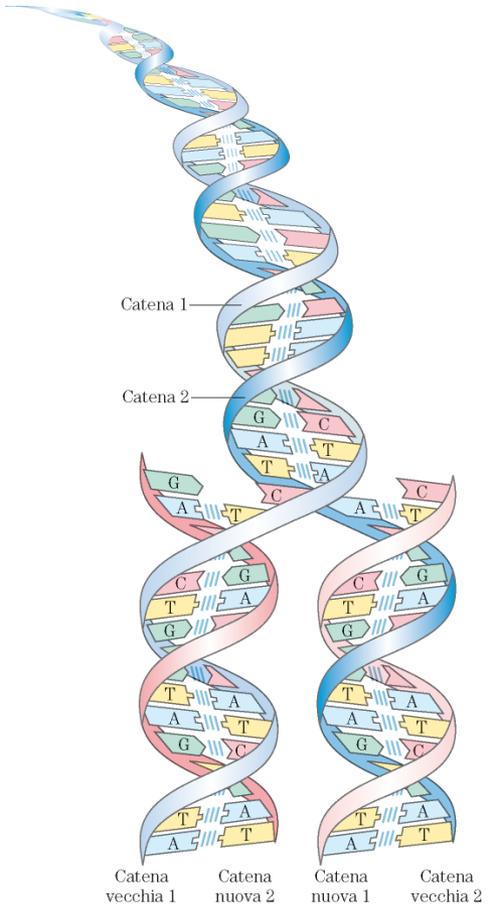
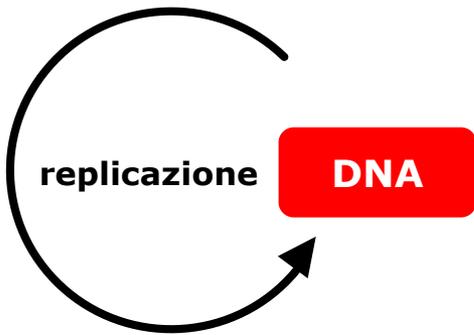
postula la natura unidirezionale del trasferimento delle informazioni contenute nel codice genetico: dal DNA al RNA alle proteine



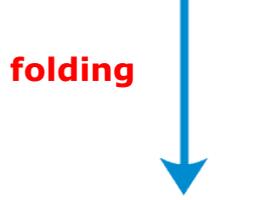
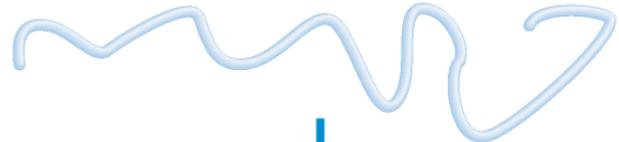
Secondo il dogma centrale, il DNA serve da stampo per la propria duplicazione e per la biosintesi dei vari tipi di RNA (messaggero, transfer e ribosomiale).

L'mRNA porta l'informazione per la biosintesi delle proteine e non può servire da stampo per la sintesi di nuovo DNA; analogamente le proteine non possono modificare la sequenza nucleotidica di RNA o di DNA.

Considerato sino a qualche decennio fa universalmente valido nel mondo vivente, il dogma centrale presenta alcune eccezioni rappresentate dall'esistenza della trascrittasi inversa, dei retrovirus e dei prioni.



replicazione



**proteina
nativa**

LA SINTESI PROTEICA: tipi di RNA

- RNA ribosomiale: **rRNA**, costituente dei ribosomi ovvero le strutture cellulari nelle quali ha luogo la sintesi proteica.
- RNA messaggero: **mRNA**, è sintetizzato sullo stampo di DNA con una sequenza nucleotidica ad esso complementare; contiene le sequenze che codificano la sequenza amminoacidica di uno o più polipeptidi , specificate da uno o più geni.
- RNA transfer: **tRNA**, funge da "adattatore" nella sintesi proteica tra mRNA e catena peptidica; legge l'informazione codificata nell'mRNA e trasferisce l'opportuno AA alla catena polipeptidica nascente.

Come avviene la **TRADUZIONE**?

DNA → **DNA "alfabeto" a 4 lettere: A, T, G e C**

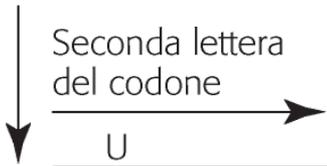
Proteine → **Proteine "alfabeto" a 20 lettere: AA standard**

4 lettere disposte
in gruppi di **2** $4^2 = 16$ combinazioni
in gruppi di **3** $4^3 = 64$ combinazioni

CODICE GENETICO → **"dizionario" di 64 parole: CODONI**

CODONE: tripletta di nucleotidi che codifica per un dato amminoacido

Prima lettera del codone (in direzione 5')



CODICE GENETICO

“dizionario” di 64 parole: **CODONI**

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

codoni di terminazione

alcuni codoni hanno funzioni specifiche

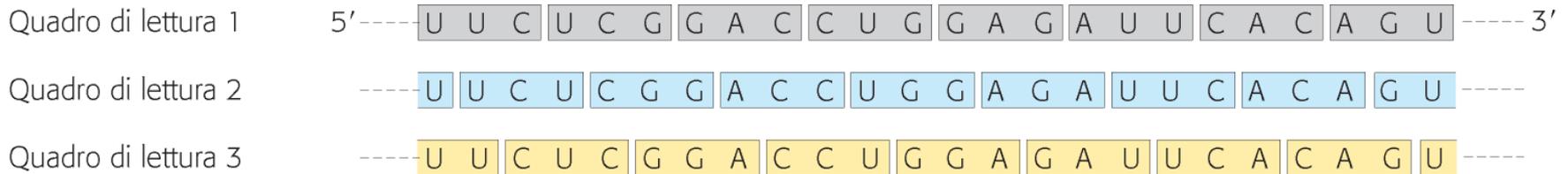
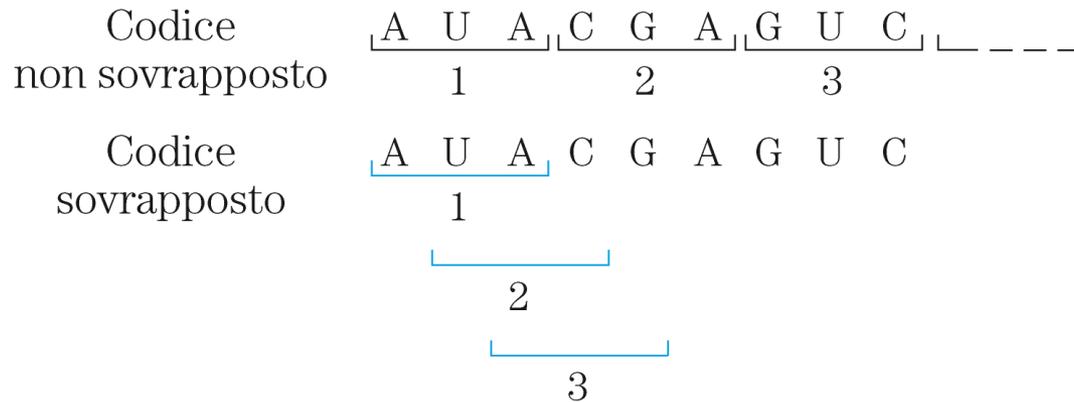
codone d'inizio

codifica per Met se si trova all'interno della sequenza

dei 64 possibili codoni 61 sono stati assegnati, i restanti tre sono codoni responsabili della terminazione della sintesi

CARATTERISTICHE DEL CODICE GENETICO

- codice universale
- codice non sovrapposto
- possibili più quadri di lettura (reading frame)
- assenza di punteggiatura
- codoni con funzioni specifiche (inizio, stop)
- codice degenerato
- non ambiguo



Quadro di lettura aperto (ORF, open reading frame): quadro che non presenta un codone di terminazione per più di 50 nucleotidi consecutivi

CARATTERISTICHE DEL CODICE GENETICO

- codice degenerato: uno stesso AA è codificato da più codoni (la degenerazione non è uniforme)
- non ambiguo: ogni codone specifica un solo AA

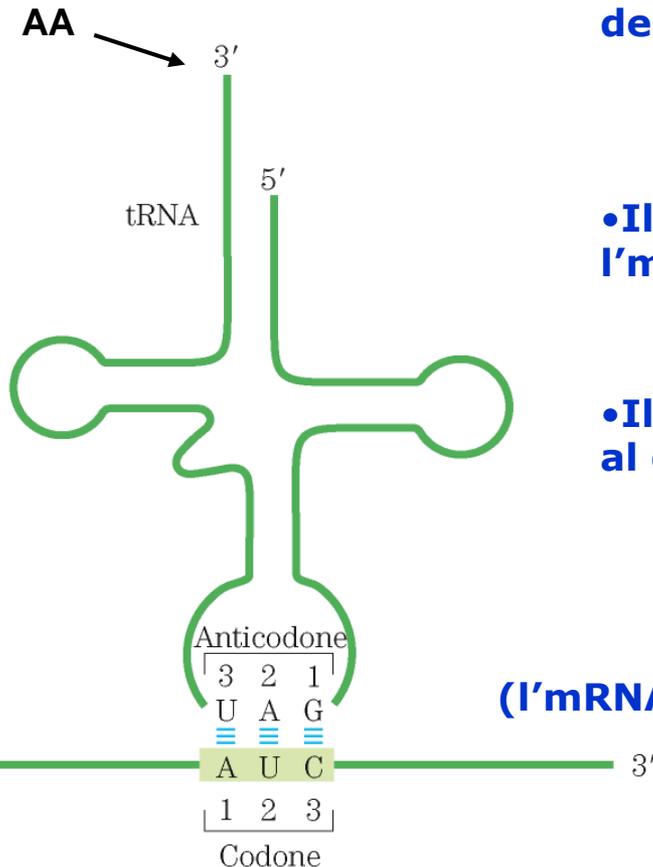
Amminoacido	Numero di codoni
Ala	4
Arg	6
Asn	2
Asp	2
Cys	2
Gln	2
Glu	2
Gly	4
His	2
Ile	3
Leu	6
Lys	2
Met	1
Phe	2
Pro	4
Ser	6
Thr	4
Trp	1
Tyr	2
Val	4

Come avviene la **TRADUZIONE?**

Riconoscimento del codone

Durante la sintesi proteica il codone sull'mRNA è riconosciuto da un tRNA cui è legato l'AA corrispondente al codone

L'allineamento dei due RNA (t ed m) è di tipo antiparallelo: la prima base del codone si appaia con la terza base dell'anticodone



- l'AA non partecipa al processo di riconoscimento del codone sull'mRNA

- Il tRNA funge da "adattatore" tra l'AA e l'mRNA

- Il tRNA presenta una sequenza complementare al codone detta **ANTICODONE**

(l'mRNA viene letto dal ribosoma in direzione 5' → 3')

LA SINTESI PROTEICA

Meccanismo biosintetico complesso che richiede:

centinaia di macromolecole organizzate all'interno del ribosoma: 70 proteine ribosomiali; 20 enzimi che attivano gli AA alla sintesi e circa 10 enzimi e fattori proteici per l'inizio, l'allungamento e la terminazione del polipeptide; ~ 100 enzimi per le modifiche post-traduzionali; oltre 40 RNA transfer e ribosomiali

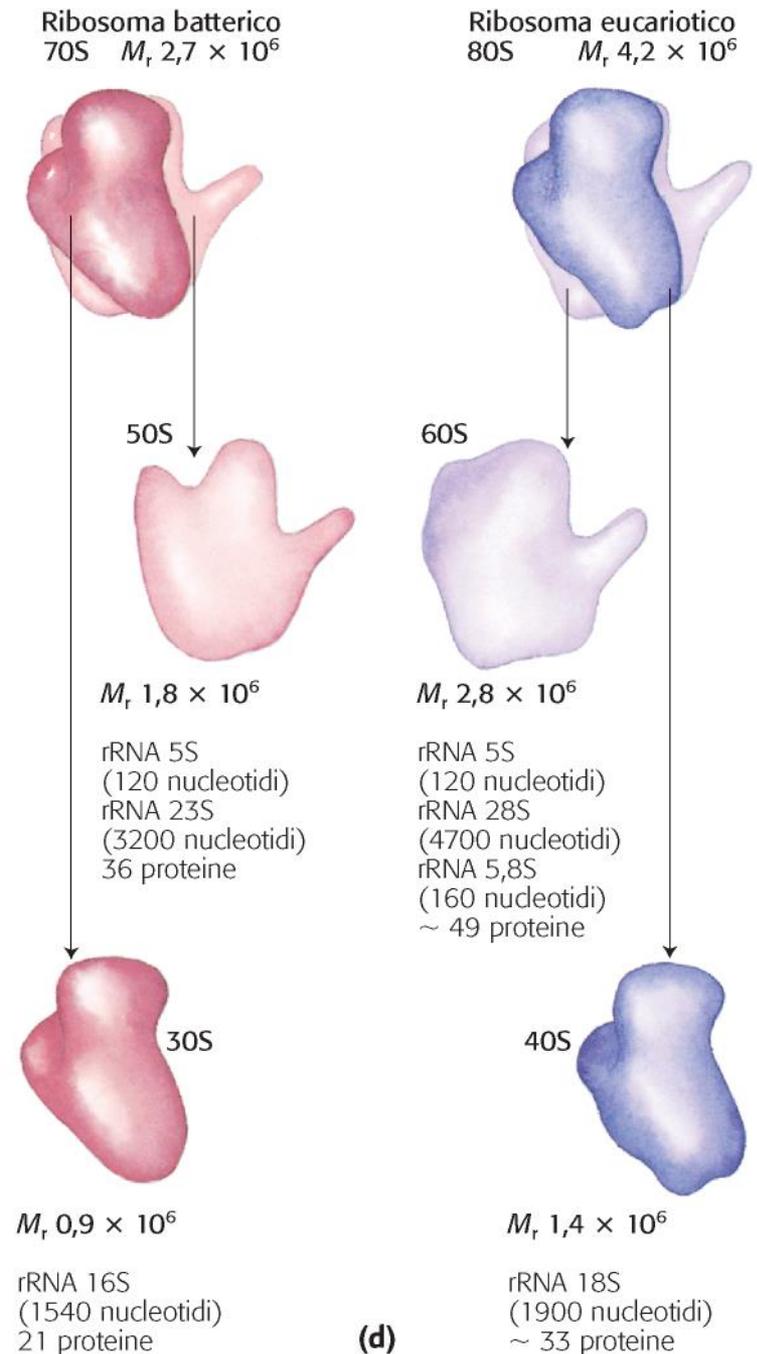
e che procede attraverso 5 stadi

- 1) Attivazione degli amminoacidi**
- 2) Inizio della sintesi**
- 3) Allungamento**
- 4) Termine e rilascio**
- 5) Ripiegamento e modificazioni post-traduzionali**

Caratteristiche dell'RNA ribosomiale

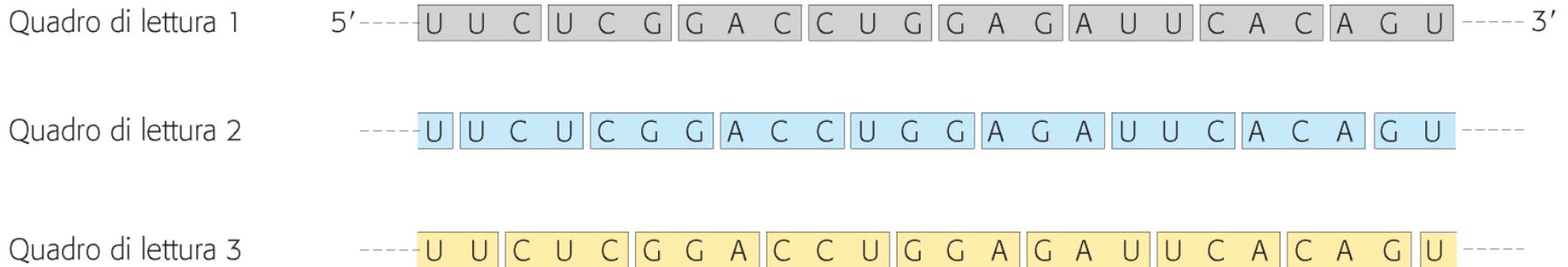
La sede della sintesi proteica sono i **RIBOSOMI** ovvero organuli presenti nel citosol, sulla membrana nucleare e sul reticolo endoplasmatico rugoso (RER)

Sia negli eucarioti che nei procarioti i **RIBOSOMI** sono costituiti da due subunità identificate in base alla velocità di sedimentazione espressa in unità di misura Svedberg



Caratteristiche dell'RNA messaggero

Sintetizzato a partire dai nucleotidi dall'enzima RNA polimerasi sullo stampo del DNA: la sua sequenza in basi contiene l'informazione conservata nel gene



- **Quadro di lettura = reading frame**

- **Quadro di lettura aperto (ORF, *open reading frame*): quadro che non presenta un codone di terminazione per più di 50 nucleotidi consecutivi**

- **CODONI: triplette di basi che specificano i diversi amminoacidi**

Caratteristiche dell'RNA transfer

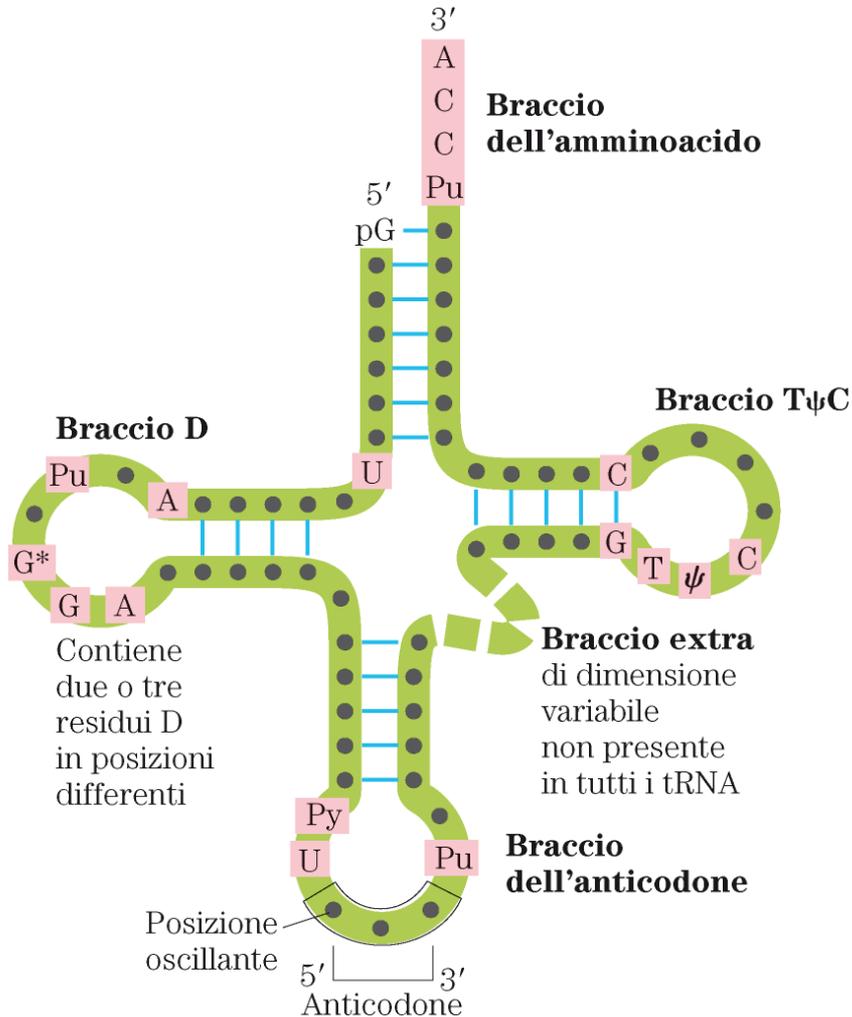
- **Costituiti da 73-93 residui nucleotidici organizzati in singola elica ripiegata su se stessa**
- **8 o più residui hanno basi modificate**
- **All'estremità 5' presentano un residuo guanilato mentre al 3' la sequenza CCA**
- **Nella forma 2D hanno struttura a 4 anse simile ad un trifoglio**
- **Nella forma 3D hanno struttura ad L attorcigliata**

- **Essi svolgono la funzione di adattatori (tra m-RNA e catena peptidica) nella sintesi proteica delle proteine per la qual cosa due sono le regioni importanti:**
 - 1) STELO ACCETTORE dell'AA, che trasporta uno specifico AA legato mediante legame estere tra il carbossile dell'AA e l'OH in 2' o 3' dell'adenosina che si trova all'estremità 3' del tRNA**
 - 2) ANSA dell'ANTICODONE (tripletta di basi che riconosce il codone)**

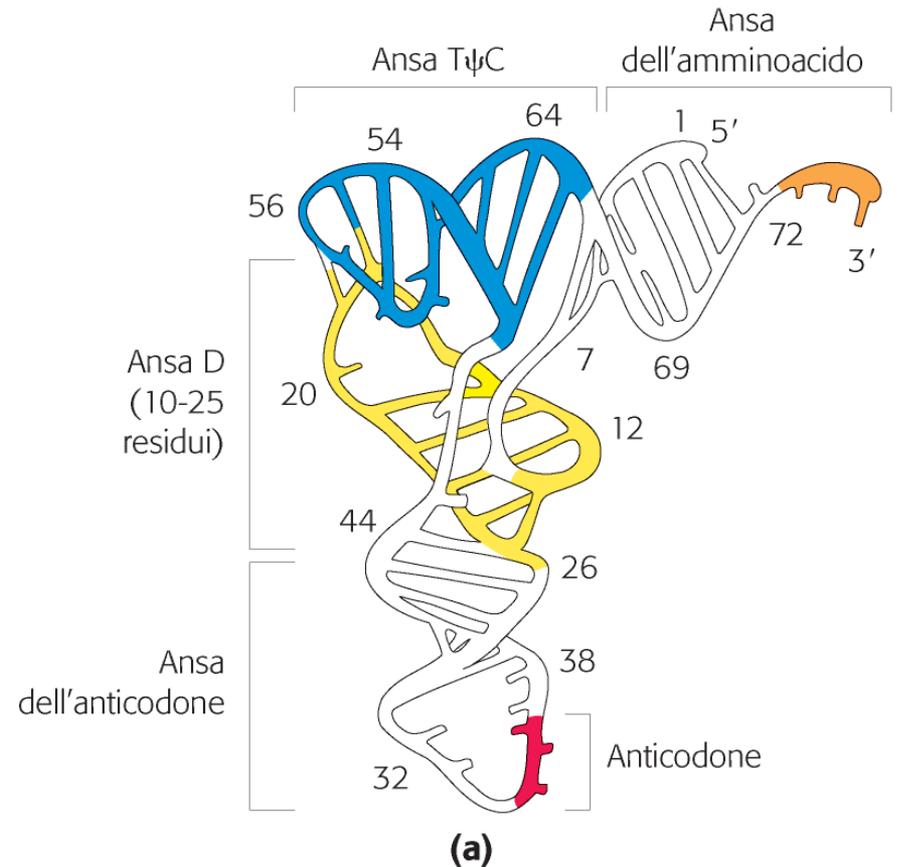
- **Le altre regioni strutturali importanti sono l'ansa D (o delle diidrouridina), e l'ansa T Ψ C contenente pseudouridina (Ψ) e ribotimidina (T)**

Caratteristiche dell'RNA transfer

forma 2D: struttura a 4 anse



forma 3D: struttura ad L attorcigliata



LA SINTESI PROTEICA

Meccanismo biosintetico complesso che richiede:

centinaia di macromolecole organizzate all'interno del ribosoma: 70 proteine ribosomiali; 20 enzimi che attivano gli AA alla sintesi e circa 10 enzimi e fattori proteici per l'inizio, l'allungamento e la terminazione del polipeptide; ~ 100 enzimi per le modifiche post-traduzionali; oltre 40 RNA transfer e ribosomiali

e che procede attraverso 5 stadi

1) Attivazione degli amminoacidi

2) Inizio della sintesi

3) Allungamento

4) Termine e rilascio

5) Ripiegamento e modificazioni post-traduzionali

SINTESI PROTEICA

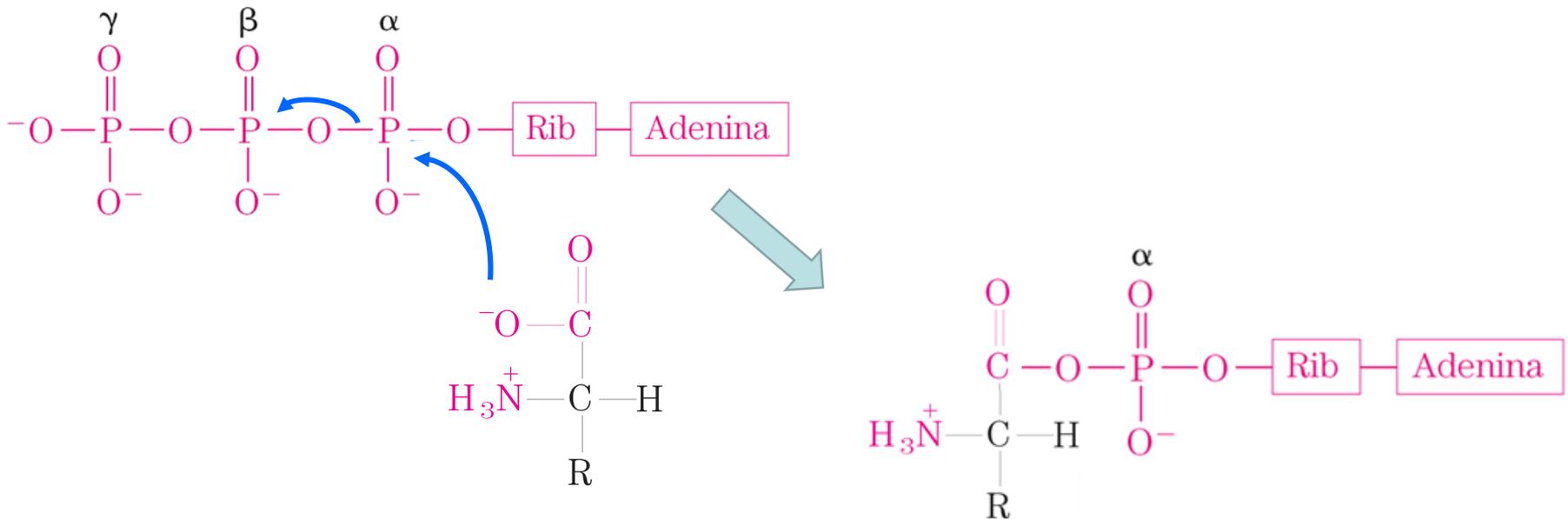
1) Attivazione degli amminoacidi Ha luogo nel citosol



SINTESI PROTEICA

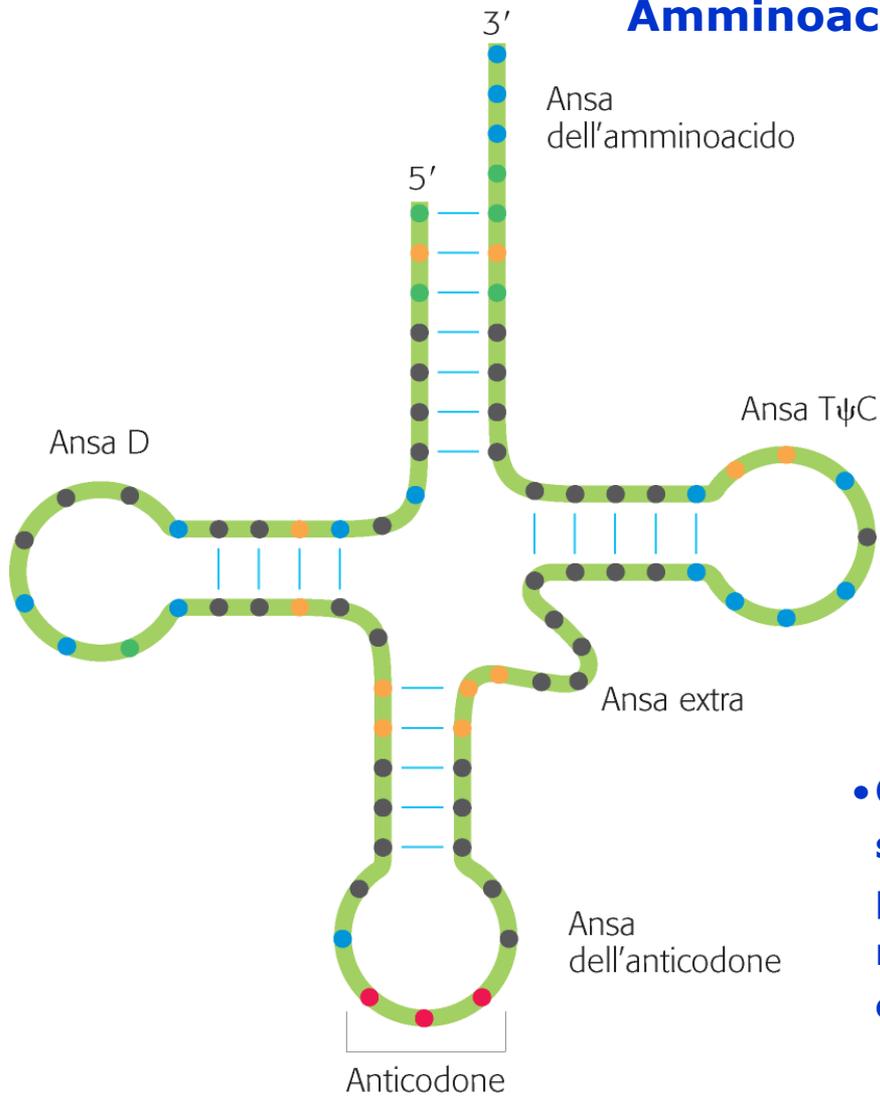
1) Attivazione degli amminoacidi

Ha luogo nel citosol



1) Attivazione degli amminoacidi

Amminoacilazione dell'AA



- **Attivazione** gli amminoacidi alla formazione del legame peptidico

- **Legame** specifico dall'AA al corrispondente tRNA: specificità dell'amminoacil sintetasi, l'identità dell'AA legato non è controllata a livello del ribosoma durante la sintesi proteica

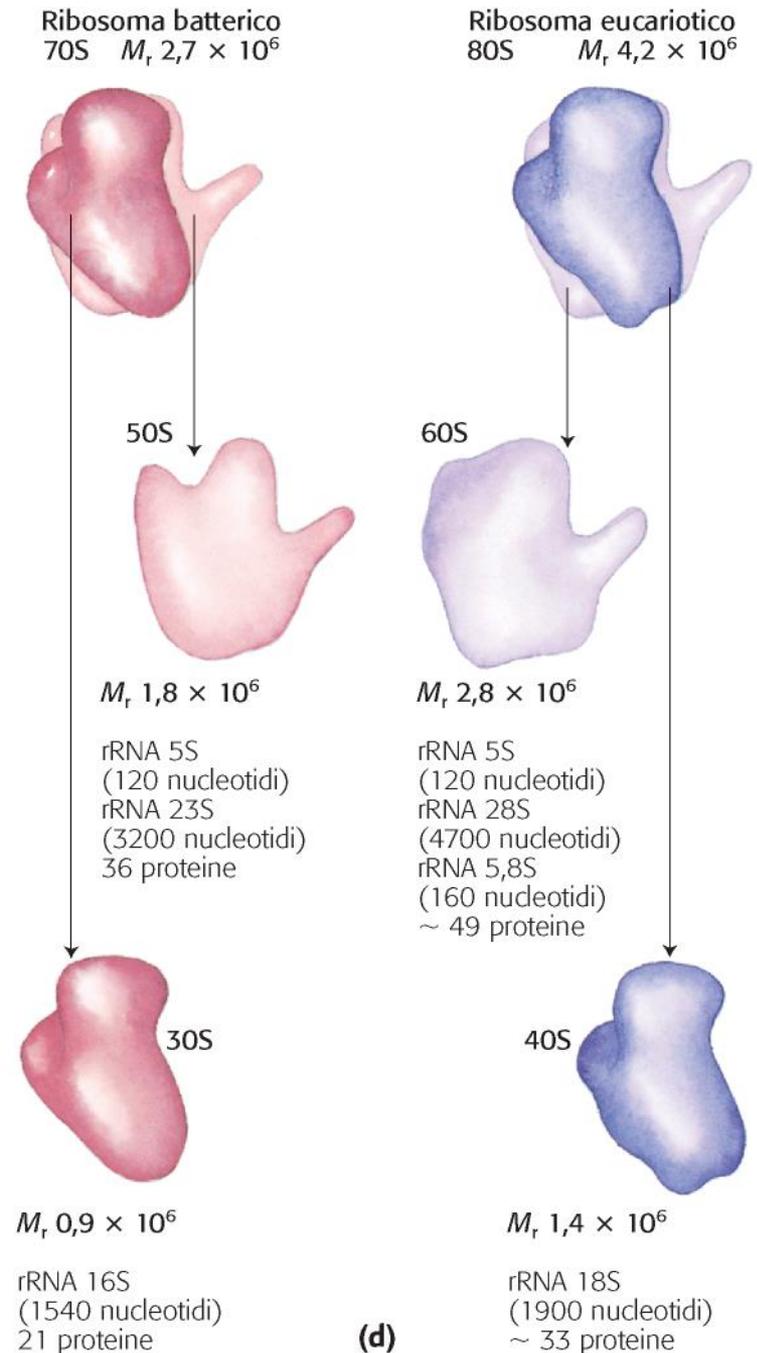
- **Ciascuna** amminoacil sintetasi è specifica sia per l'AA ma anche per il tRNA: le posizioni utili per tale specificità sono nell'ansa dell'AA ed in quella dell'anticodone ed in altri diversi punti del tRNA

■ } **Posizioni per il riconoscimento da**
● } **parte della amminoacil-tRNA sintetasi**

SINTESI PROTEICA

La sede della sintesi proteica sono i **RIBOSOMI** ovvero organuli presenti nel citosol, sulla membrana nucleare e sul reticolo endoplasmatico rugoso (RER)

Sia negli eucarioti che nei procarioti i **RIBOSOMI** sono costituiti da due subunità identificate in base alla velocità di sedimentazione espressa in unità di misura Svedberg

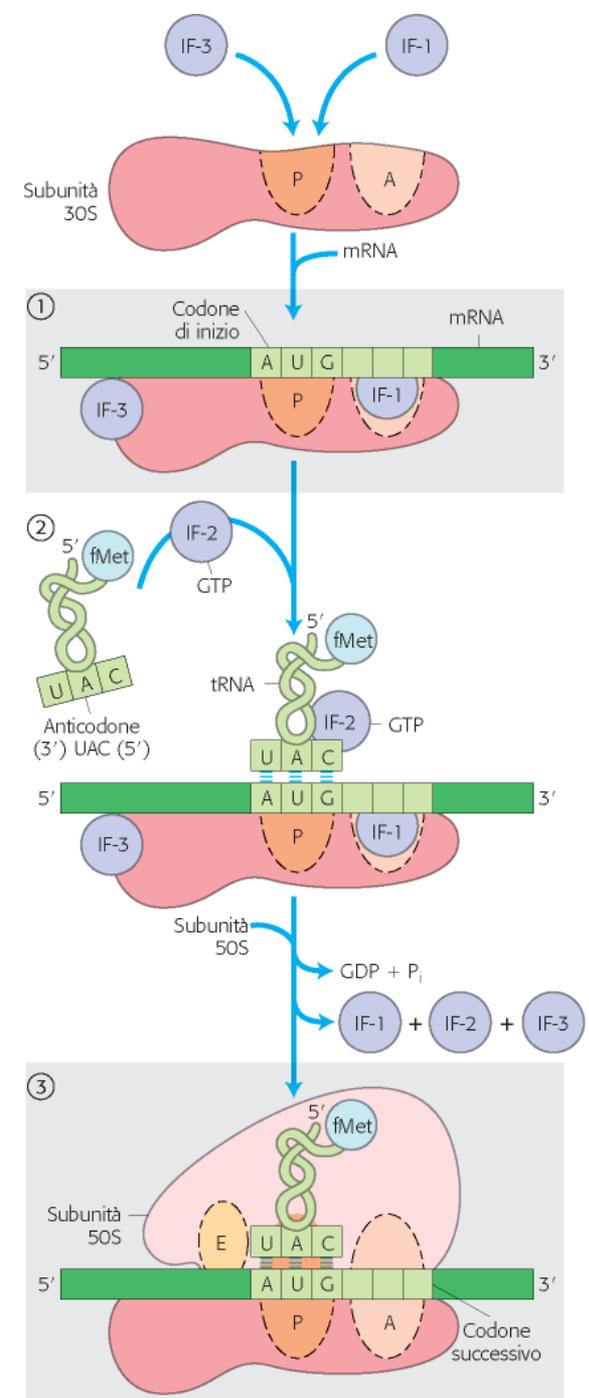


2) Inizio della sintesi (batteri)

1. La subunità 30S lega inizialmente i fattori proteici di inizio IF-1 (sul sito A, per impedire l'entrata del tRNA) ed IF-3 (che impedisce l'assemblaggio prematuro con la subunità 50S), quindi l'mRNA che si posiziona correttamente (con il codone d'inizio nel sito P) grazie alla **sequenza di Shine-Dalgarno** (sequenza su mRNA riconosciuta da rRNA16S)

2. IF-2 che porta con sé fMet-tRNA^{fMet} si lega al complesso di 30S ed IF-1 e -3; l'anticodone di fMet-tRNA^{fMet} si posiziona correttamente sul codone di inizio

3. Il complesso lega ora a 50S, contemporaneamente si idrolizza GTP (legato ad IF-2) ed i tre fattori di inizio vengono rilasciati: si forma il **complesso di inizio**

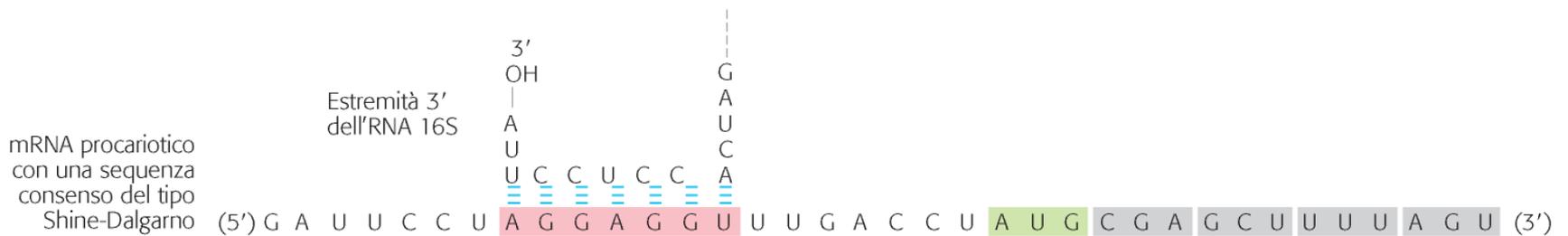


sequenza di Shine-Dalgarno

sequenza consenso costituita da 4-9 residui purinici collocata 8-13 coppie di basi prima del codone di inizio



(a)



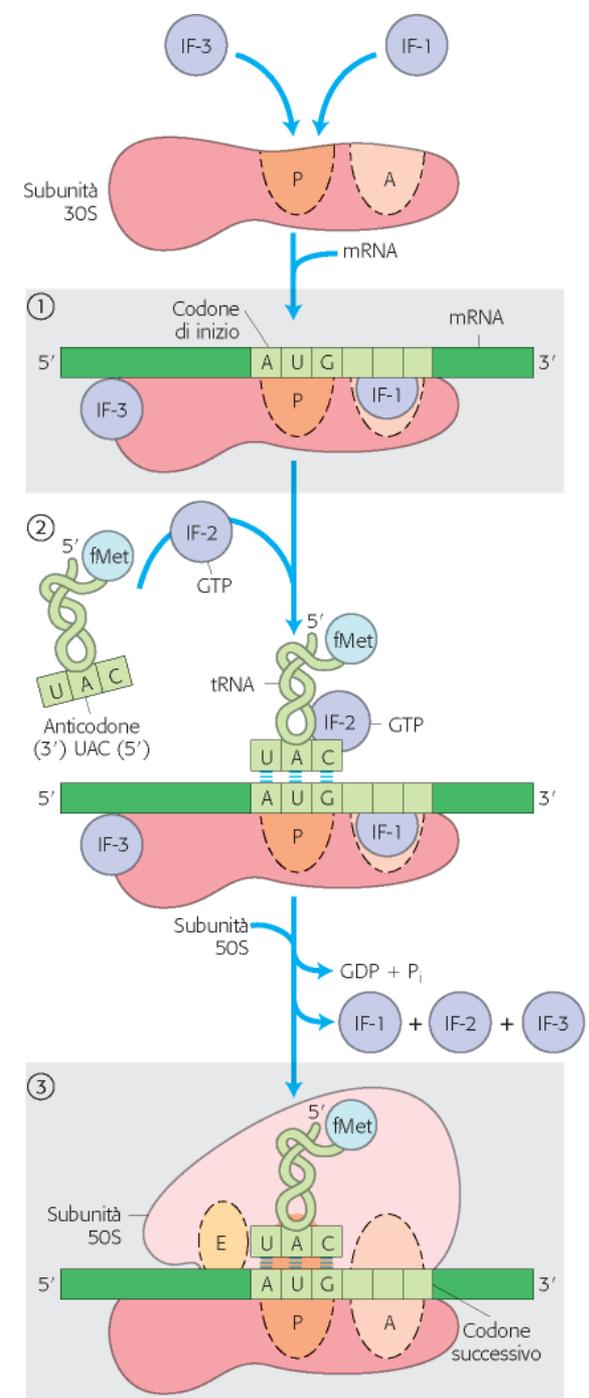
(b)

complesso di inizio

Possiede tre siti:

- Sito A (amminoacilico) lega l'amminoacil-tRNA che porta l'AA da inserire nella catena
- Sito P (peptidilico) occupato dal tRNA che porta la catena peptidica nascente
- Sito E (uscita) in cui i tRNA che hanno fornito l'AA escono dal ribosoma

Entrambe le subunità 30S ed 50S contribuiscono alle caratteristiche dei siti A e P
Il sito E è strettamente confinato alla subunità 50S



2) Inizio della sintesi (batteri)

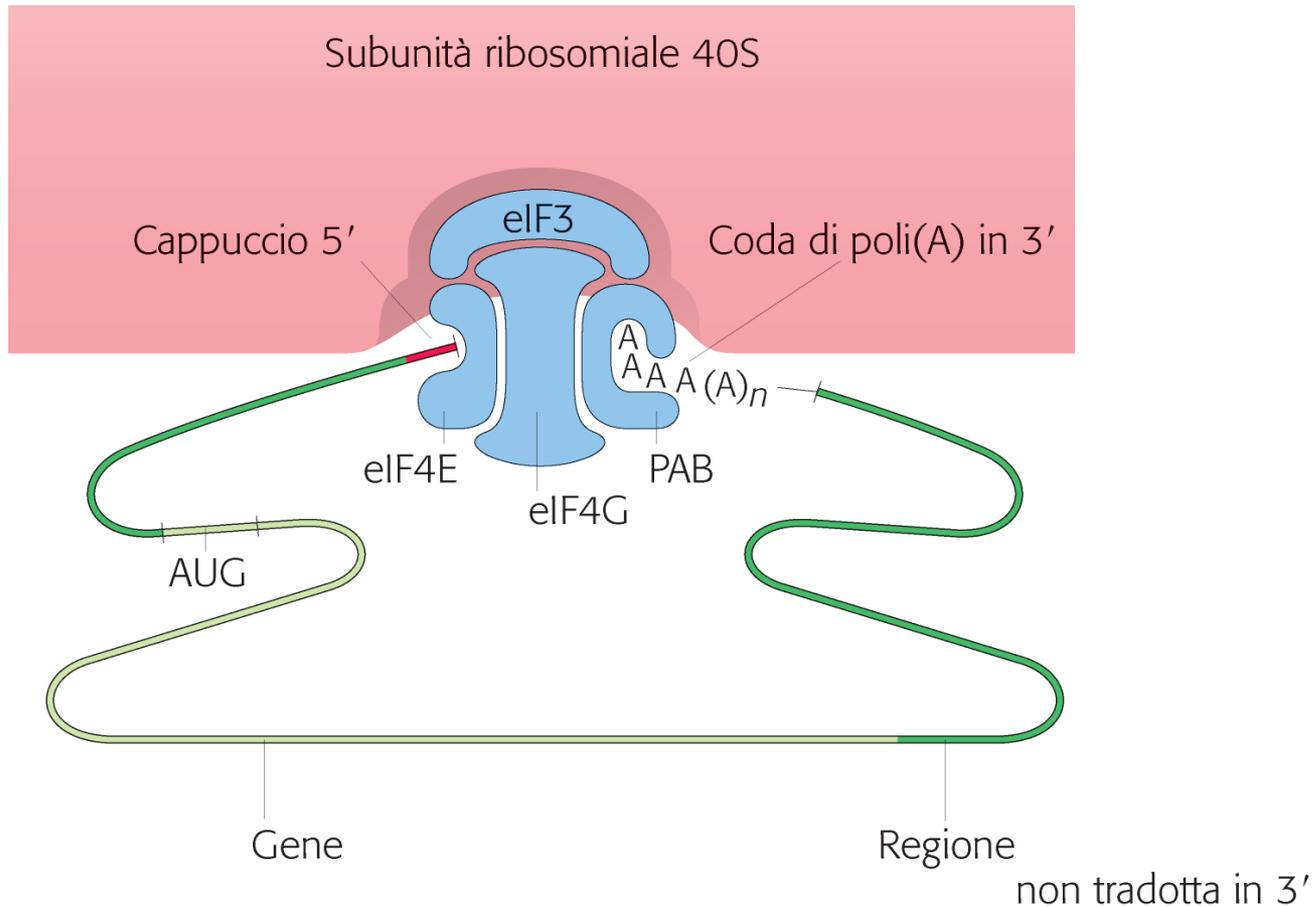
Il codone d'inizio (5')AUG codifica per l'amminoacido *N*-formilmetionina (fMet)

Il medesimo codone all'interno della sequenza lega invece il tRNA caricato con la metionina non derivatizzata

Nei batteri esistono due diversi tRNA per i due codoni AUG: tRNA^{fMet} e tRNA^{Met} che legano rispettivamente un residuo di *N*-formilmetionina ed uno di metionina

L'enzima che catalizza la formilazione della metionina è altamente selettivo per il tRNA che lega la *N*-formilmetionina e che riconosce specificamente il complesso di inizio

Complesso di inizio della sintesi negli eucarioti

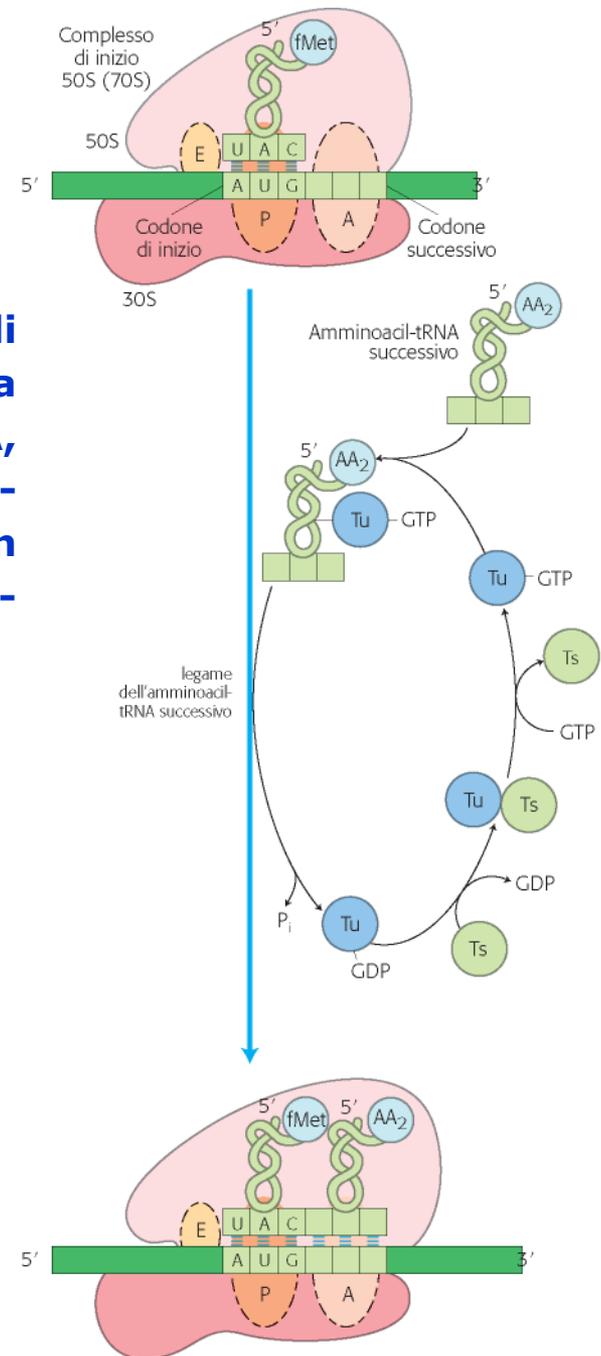


- **Richiede l'intervento di un maggior numero (9) di fattori proteici**
- **Il codone di inizio non è in prossimità della sequenza di Shine-Dalgarno ma è la prima sequenza AUG che si incontra scorrendo mRNA a partire dal terminale al 5'**
- **Il meccanismo di azione dei fattori di inizio è ancora oggetto di studio**

3) Allungamento (batteri)

Legame dell'amminoacil-tRNA successivo:

l'amminoacil-tRNA è legato al fattore proteico di allungamento EF-Tu, cui a sua volta è legata una molecola di GTP. Tale complesso si lega sul sito A, contemporaneamente si idrolizza GTP ed il fattore EF-Tu è rilasciato (EF-Tu-GTP sarà rigenerato in un processo che impiega il fattore di allungamento EF-Ts)



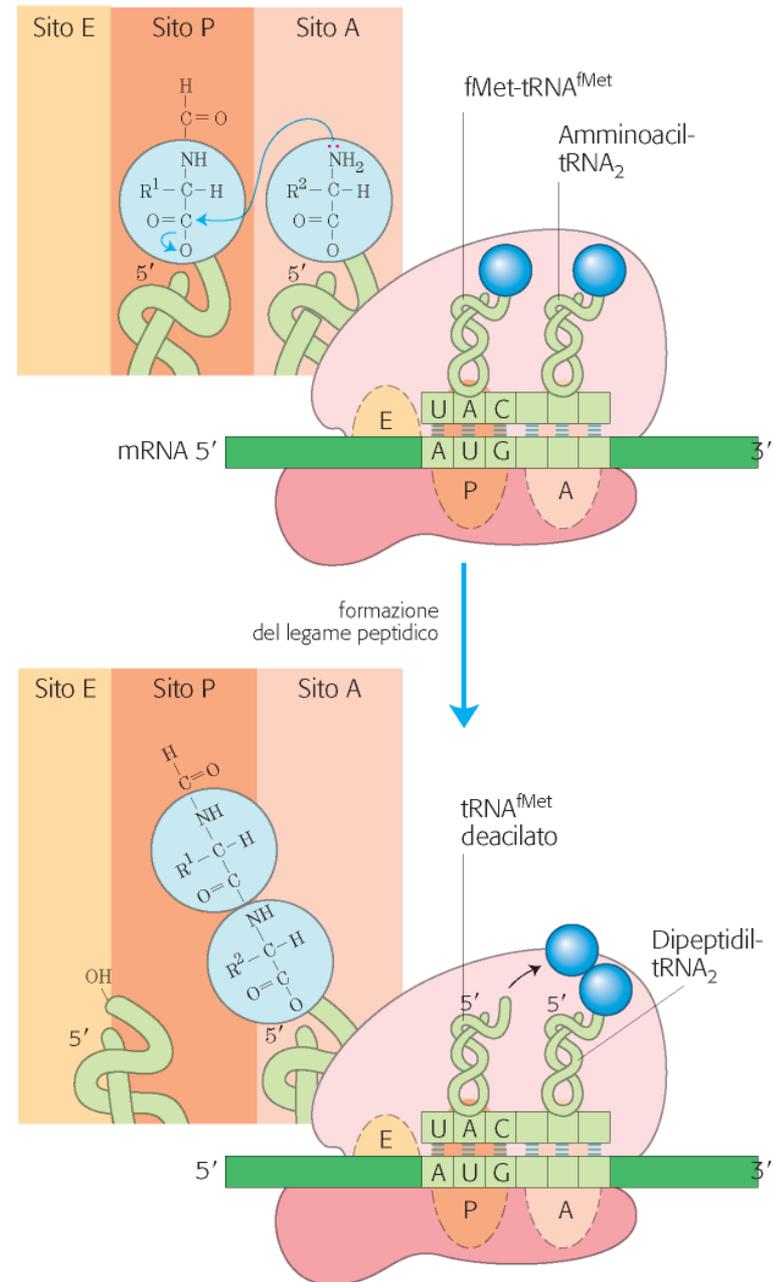
3) Allungamento (batteri)

Formazione del legame peptidico:

La reazione è catalizzata dalla peptidil transferasi dell'rRNA 23S e produce un tRNA scarico (deacilato) legato sul sito P

Traslocazione:

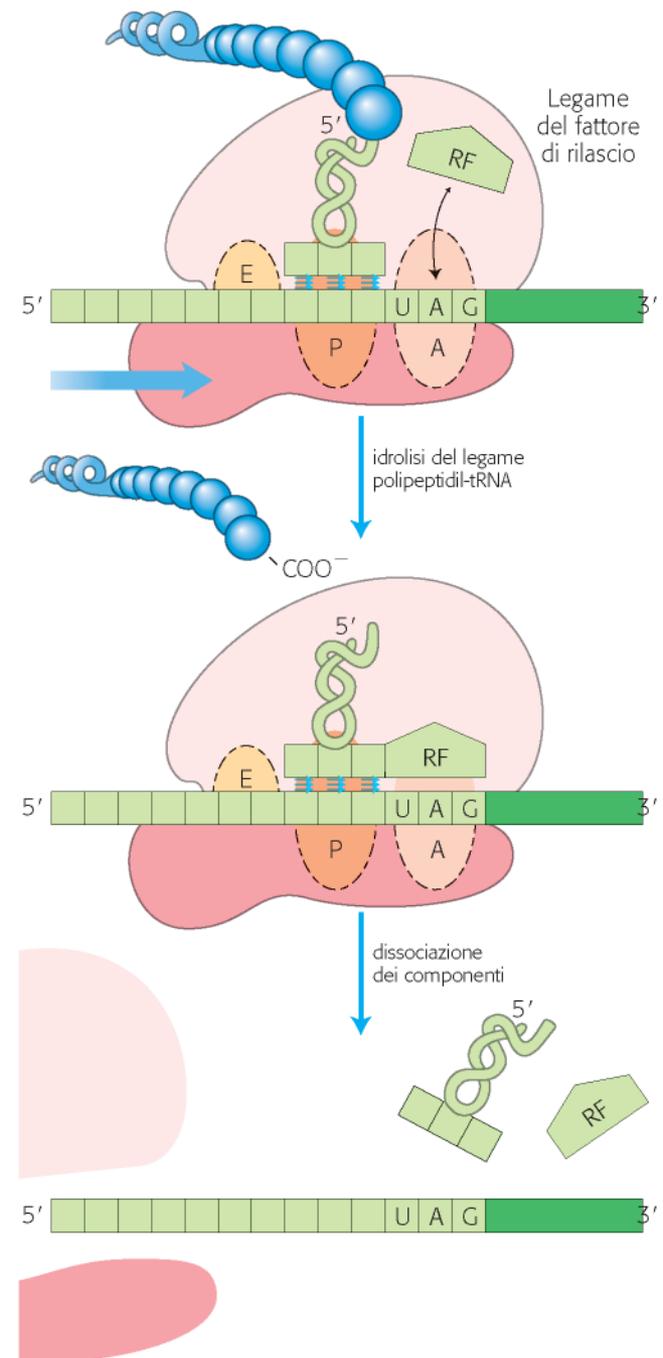
Fase finale dell'allungamento in cui il ribosoma si muove di una lunghezza pari ad un codone verso l'estremità 3' dell'mRNA: in tal modo il di-peptidil-RNA si sposta nel sito P, il tRNA deacilato è rilasciato al sito E ed il sito A è posto in corrispondenza del secondo codone.



4) Termine e rilascio (batteri)

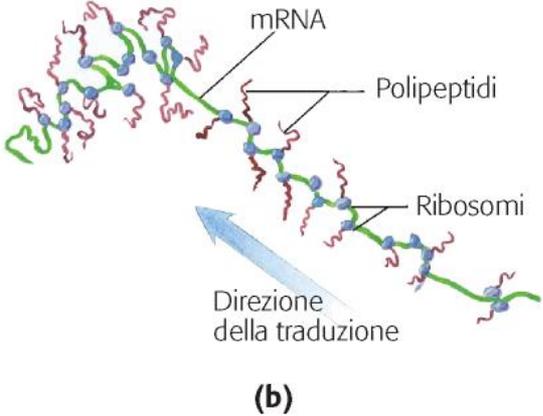
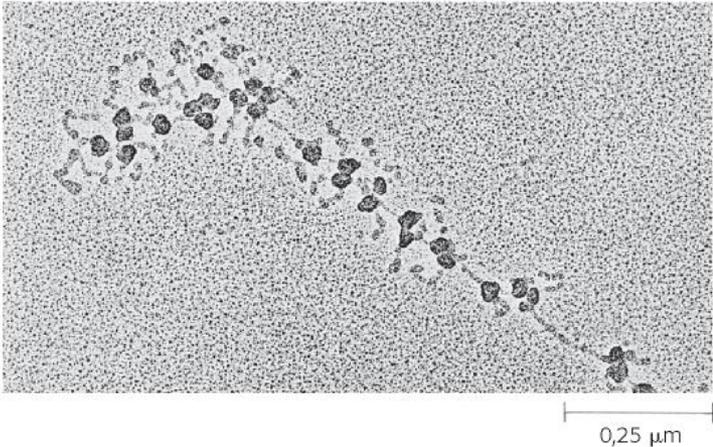
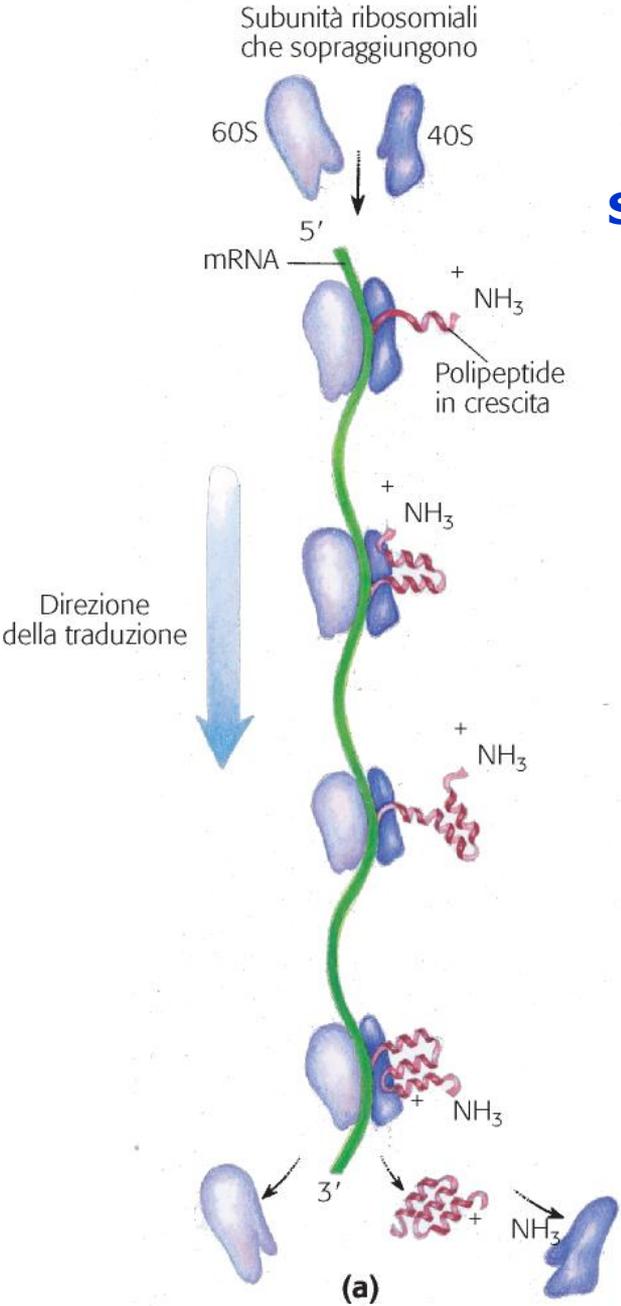
Tale fase è segnalata dai codoni di stop (UAA, UAG e UGA)

Quando uno di tali codoni occupa il sito A del ribosoma si verifica il legame dei tre fattori proteici di rilascio RF₁, RF₂ ed RF₃ che provocano l'idrolisi del legame terminale del peptidil-tRNA, il rilascio del polipeptide libero e la dissociazione del ribosoma 70S

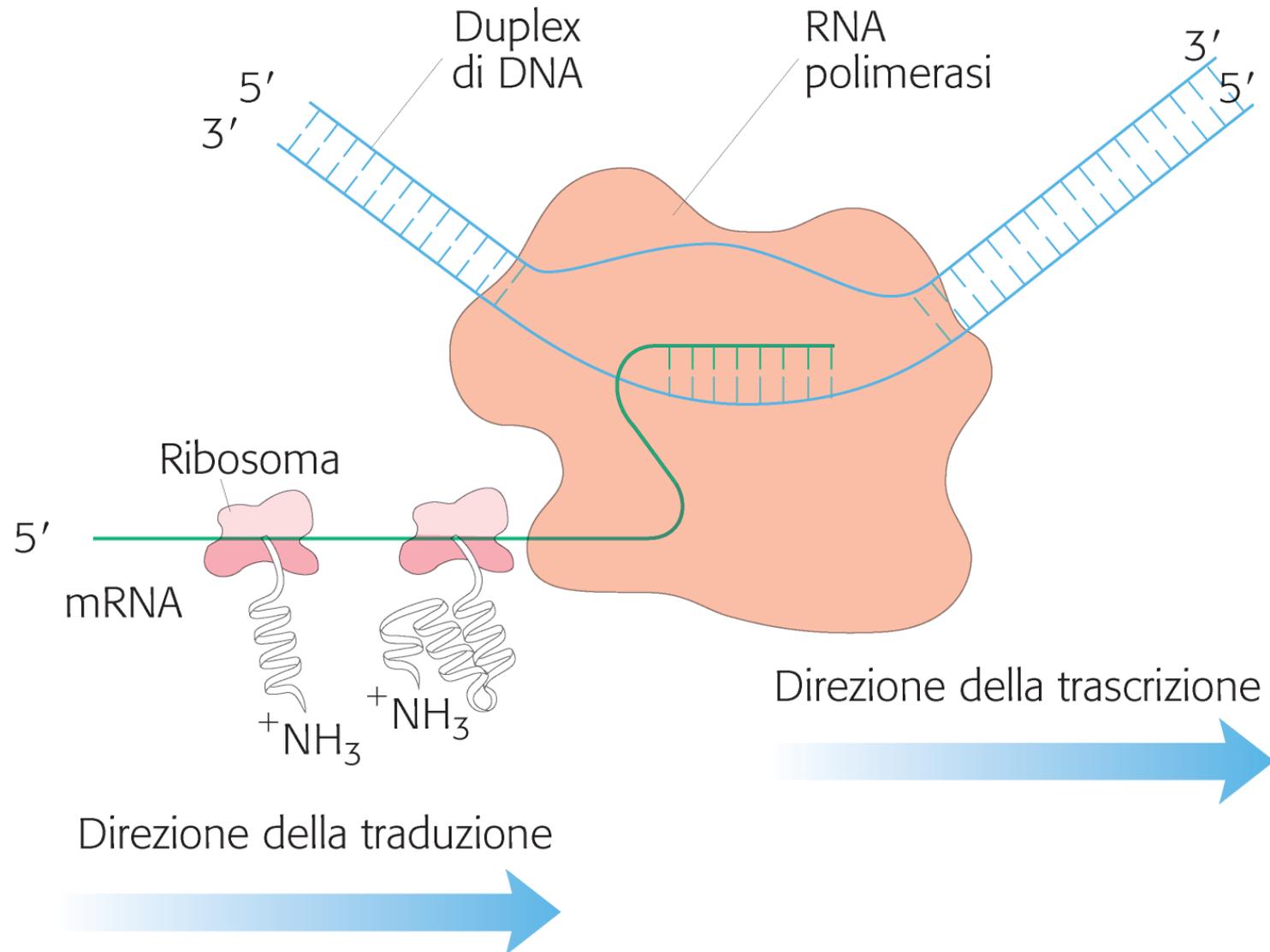


Polisoma

Singola catena di mRNA simultaneamente tradotta da più ribosomi ravvicinati



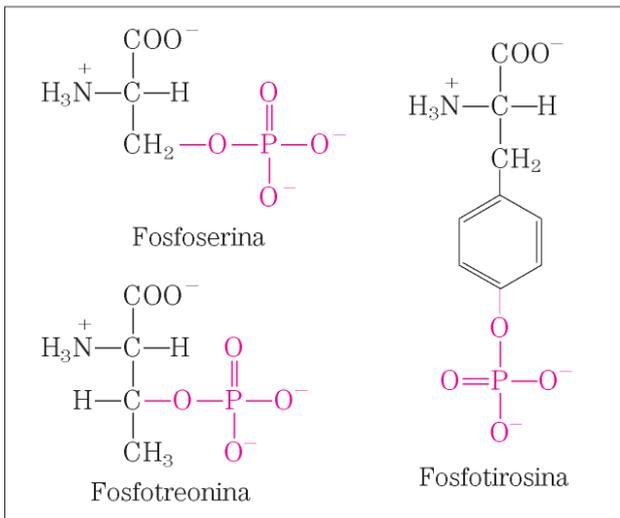
Accoppiamento di trascrizione e traduzione nei batteri



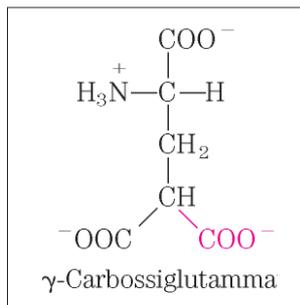
5) Ripiegamento e modificazioni post-traduzionali

- 1. Modificazioni amminoterminali e carbossiterminali**
- 2. Perdita di sequenze segnale**
- 3. Modificazioni di singoli amminoacidi**
- 4. Aggiunta di catene laterali di carboidrati**
- 5. Aggiunta di gruppi isoprenilici**
- 6. Aggiunta di gruppi prostetici**
- 7. Modificazioni proteolitiche**
- 8. Formazione di ponti disolfuro**

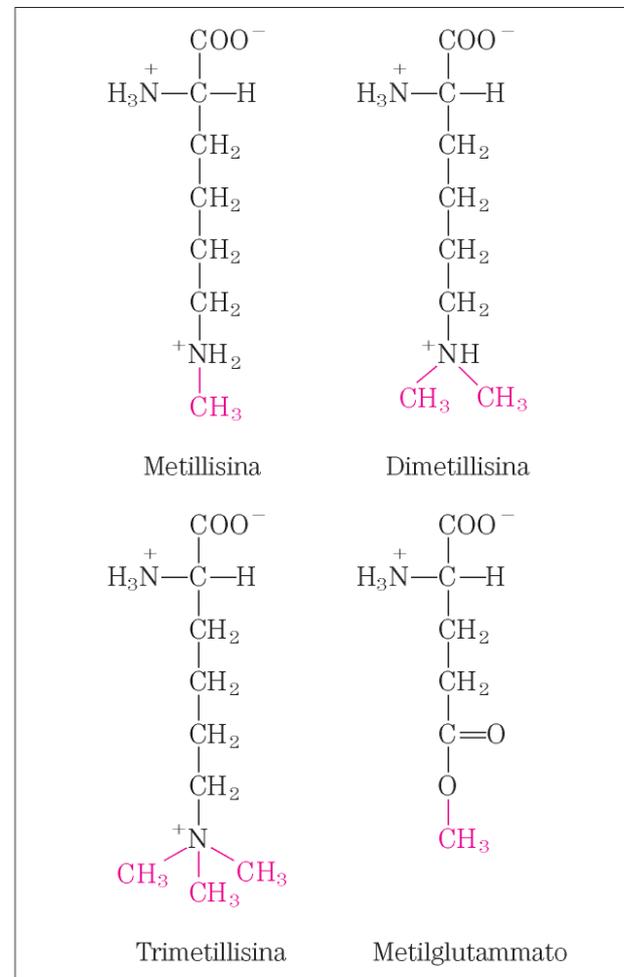
5) Ripiegamento e modificazioni post-traduzionali



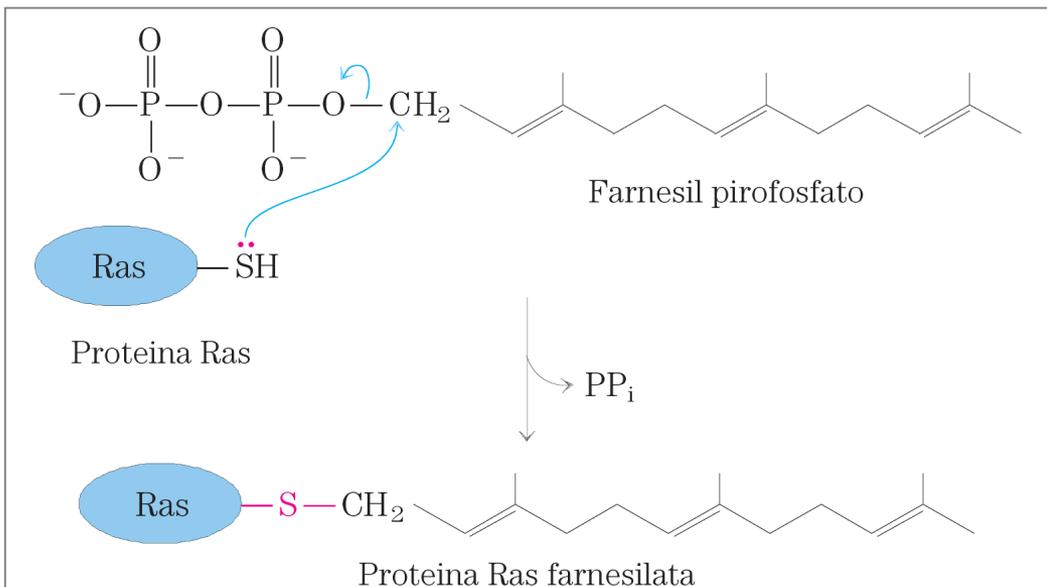
(a)



(b)



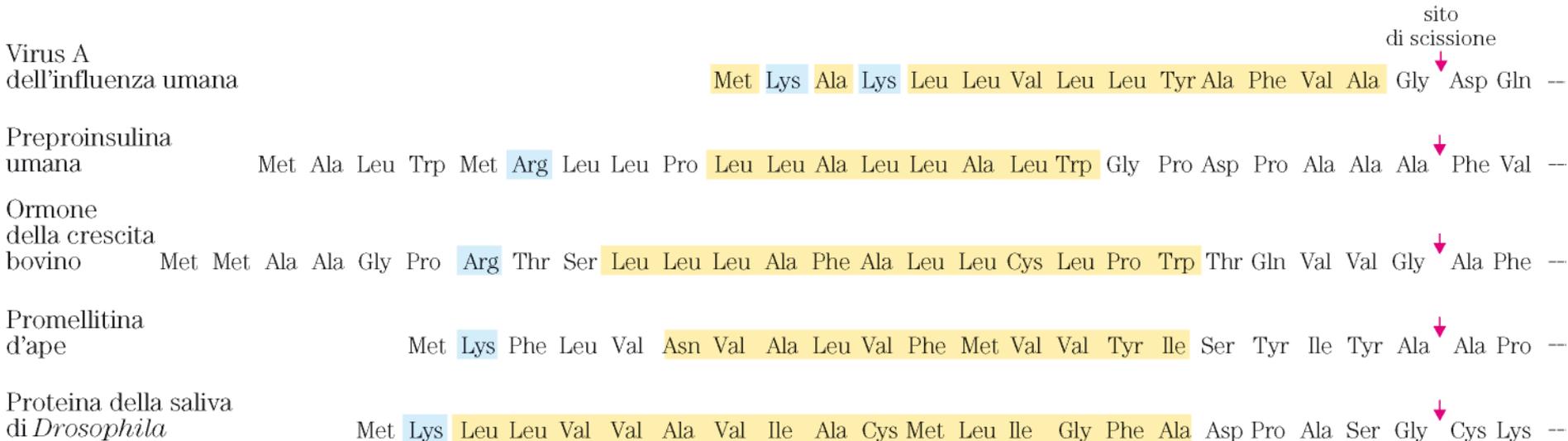
(c)



Targeting delle proteine

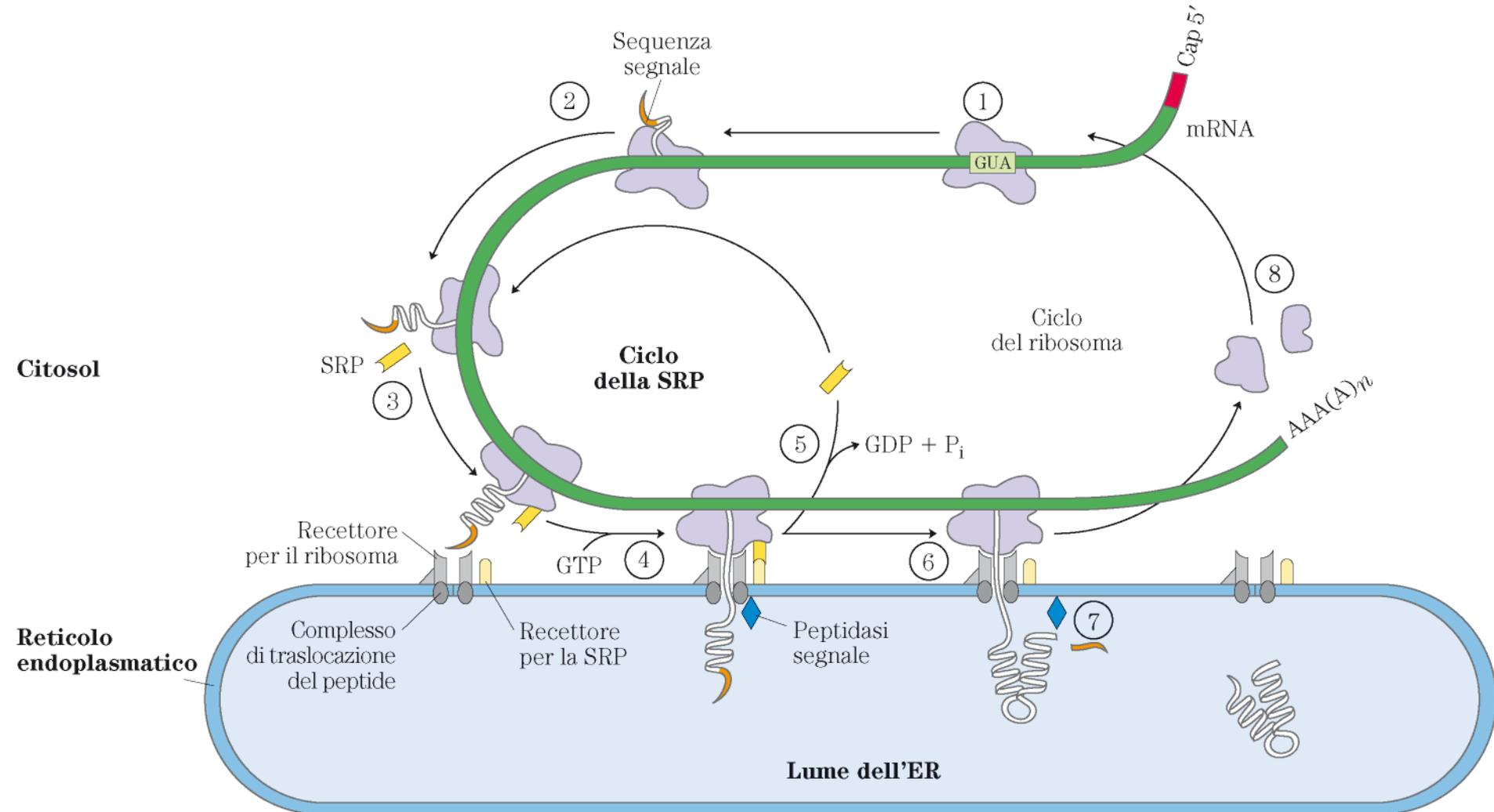
Guidato da sequenze segnale che dirigono la proteina verso:

- reticolo endoplasmatico: proteine destinate alla secrezione, all'integrazione nella membrana plasmatica e all'inclusione nei lisosomi
- nucleo
- mitocondri



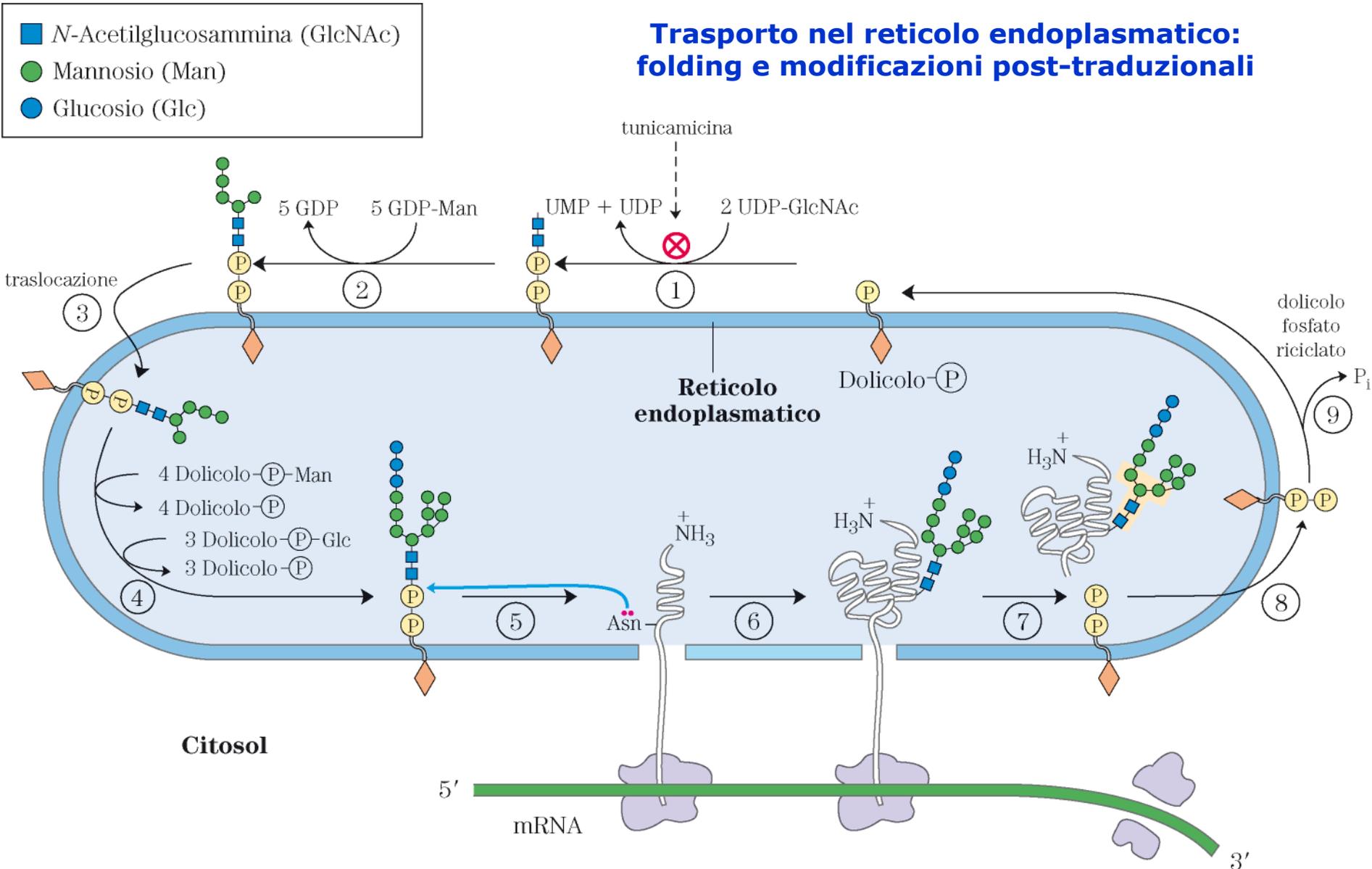
Targeting delle proteine

Trasporto nel reticolo endoplasmatico: proteine destinate alla secrezione, all'integrazione nella membrana plasmatica e all'inclusione nei lisosomi



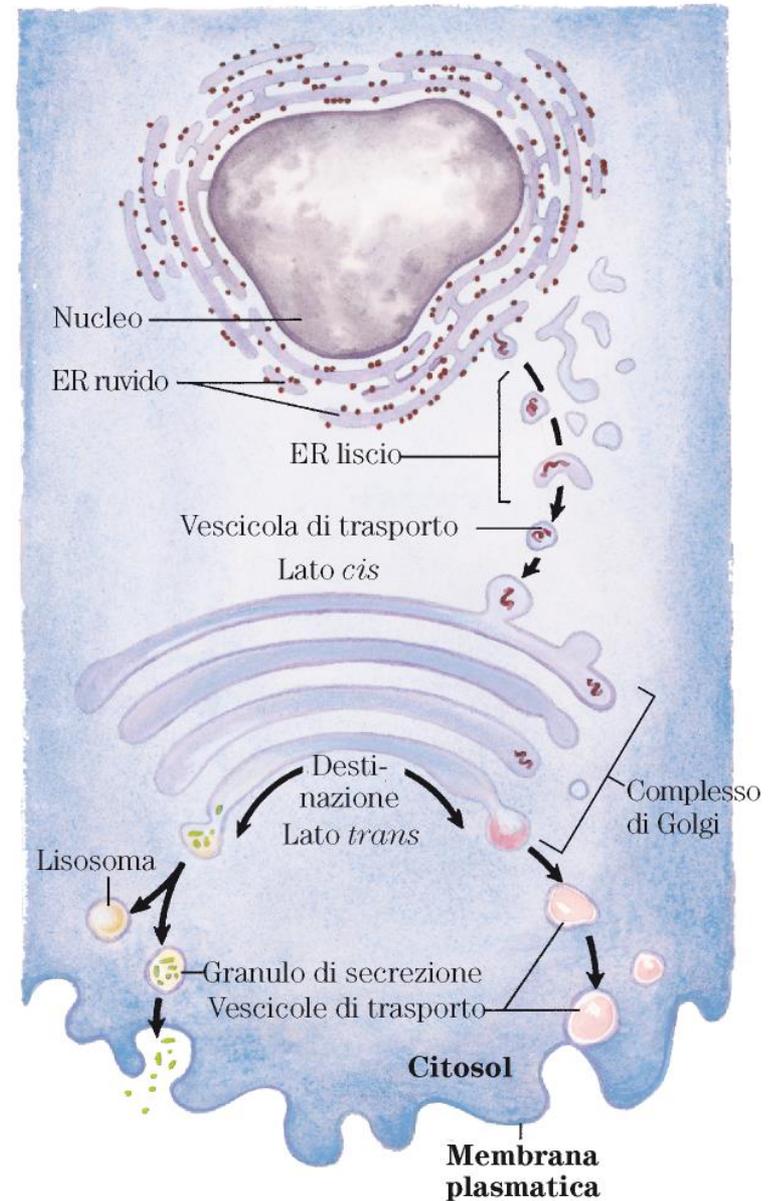
Targeting delle proteine

Trasporto nel reticolo endoplasmatico: folding e modificazioni post-traduzionali



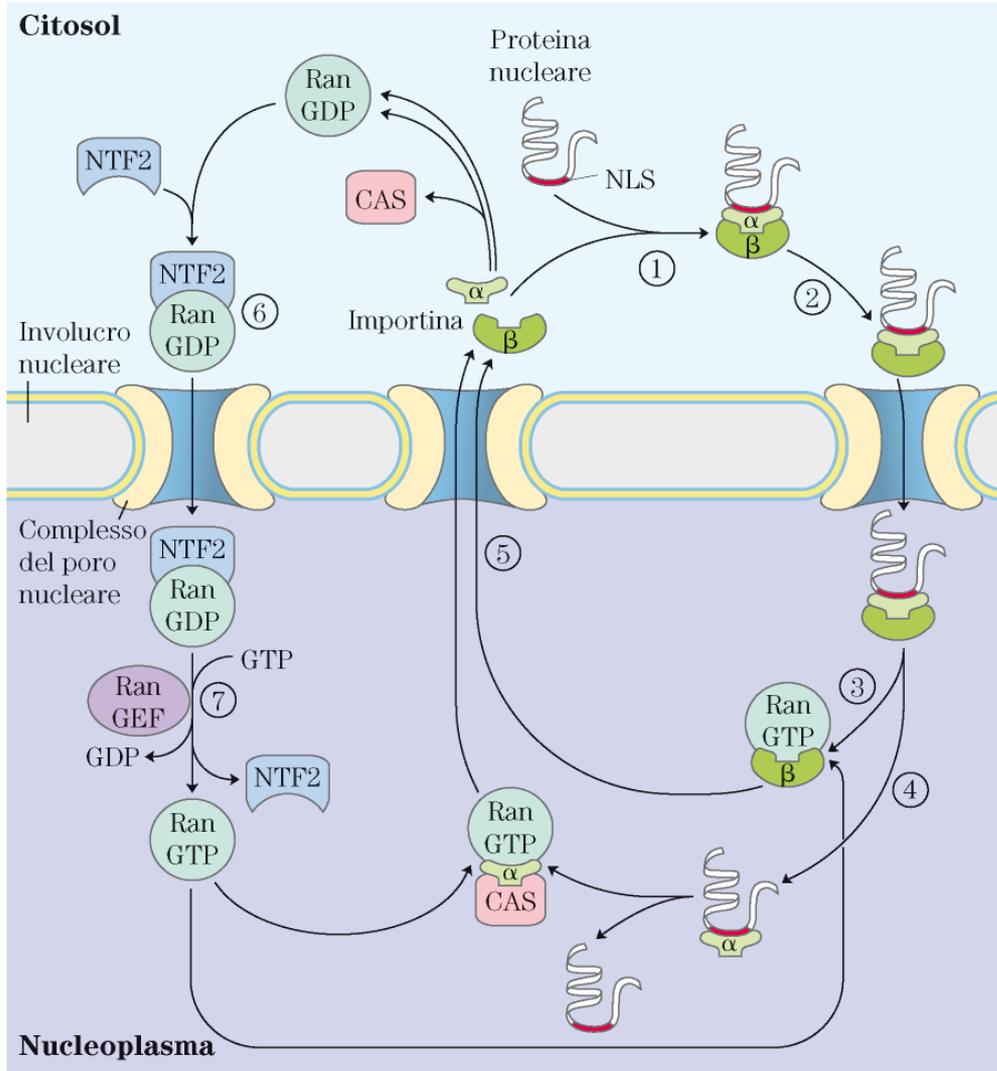
Targeting delle proteine

Trasporto delle proteine destinate alla secrezione, all'integrazione nella membrana plasmatica e all'inclusione nei lisosomi



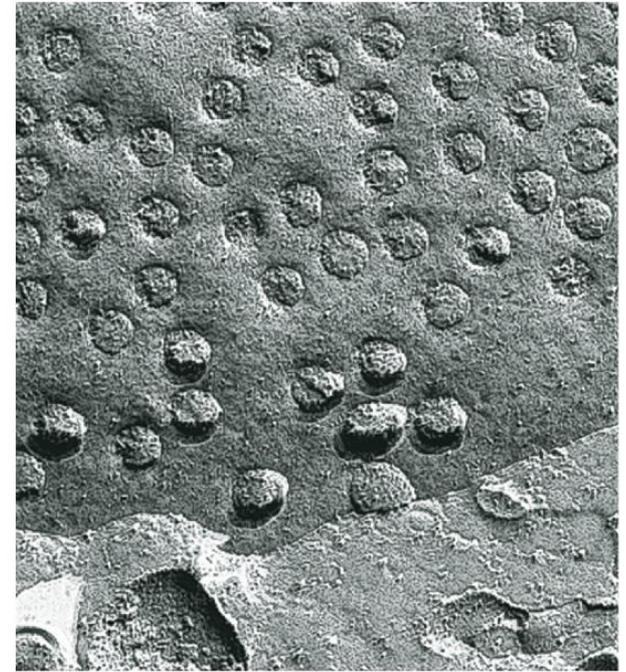
Targeting delle proteine

(a) **la sequenza segnale che dirige la proteina verso il nucleo non viene rimossa**



NLS: nuclear localization signal

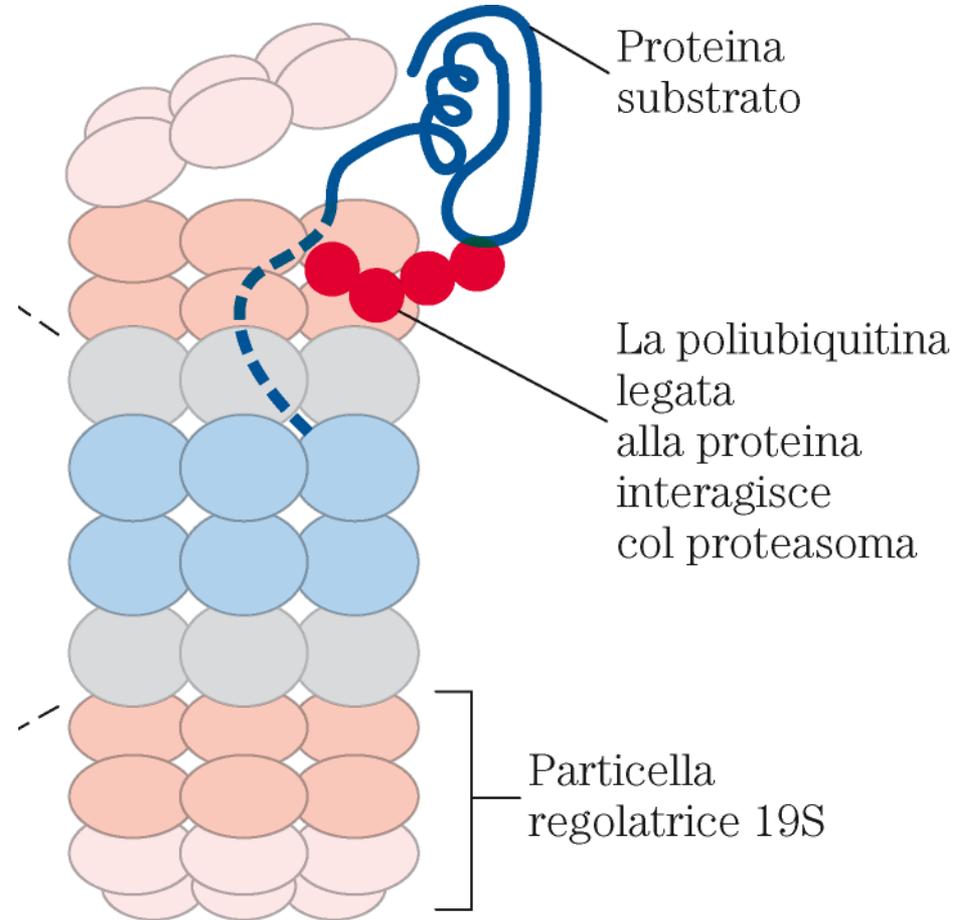
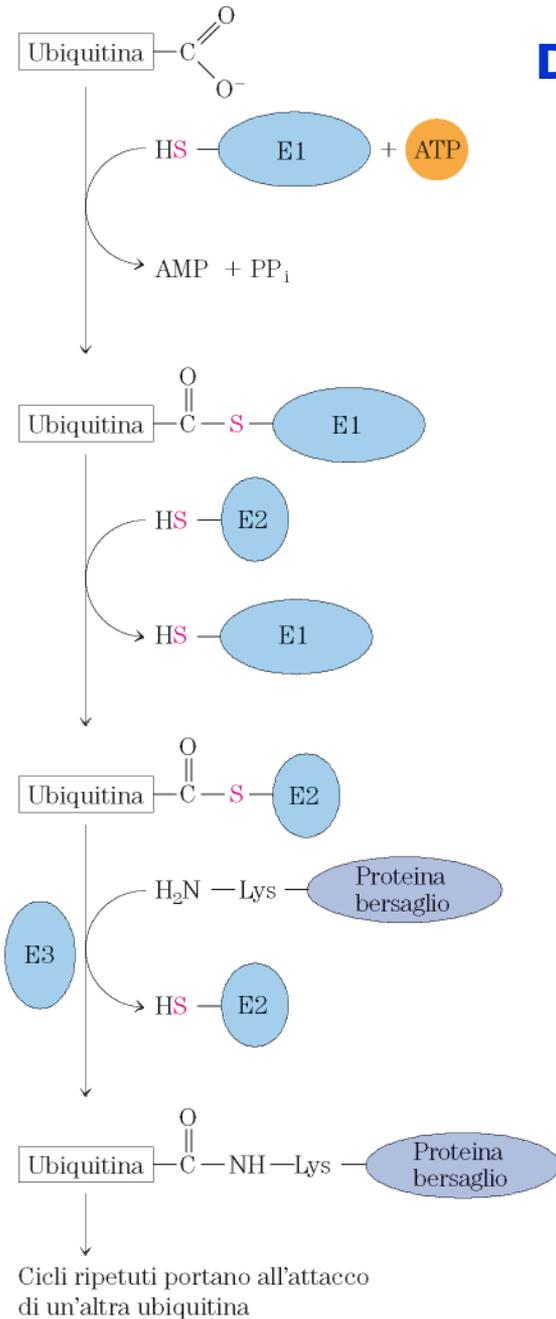
(b)



0,2 μm

Immagine al microscopio elettronico dei pori nucleari

Degradazione delle proteine



(b) Proteasoma completo
Proteasoma 26S degli eucarioti