

**FLUSSO DELL'INFORMAZIONE E
REGOLAZIONE
DELL'ESPRESSIONE GENICA**

Il dogma centrale della Biologia

Duplicazione

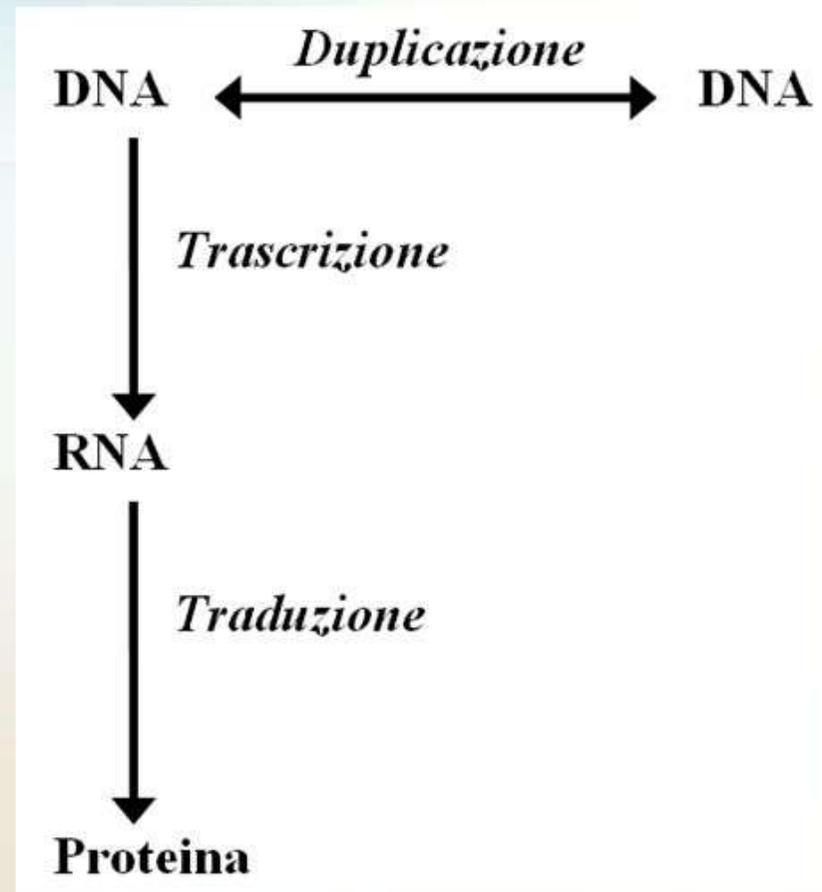
Porta alla formazione di nuove molecole di DNA e al trasferimento di materiale genetico.

Trascrizione

L'informazione contenuta nel DNA passa alle molecole di RNA.

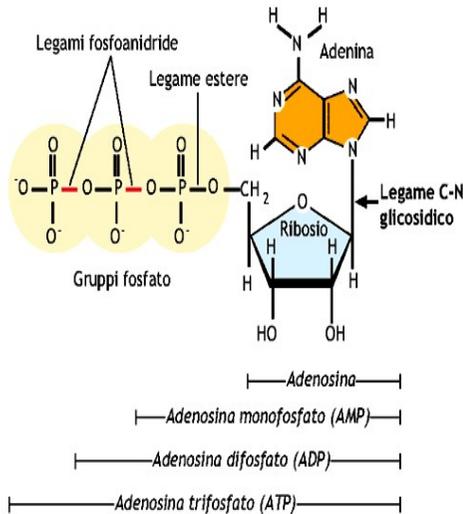
Traduzione

Processo finale in cui dall'RNA si arriva alla sintesi delle proteine.



DNA ed RNA

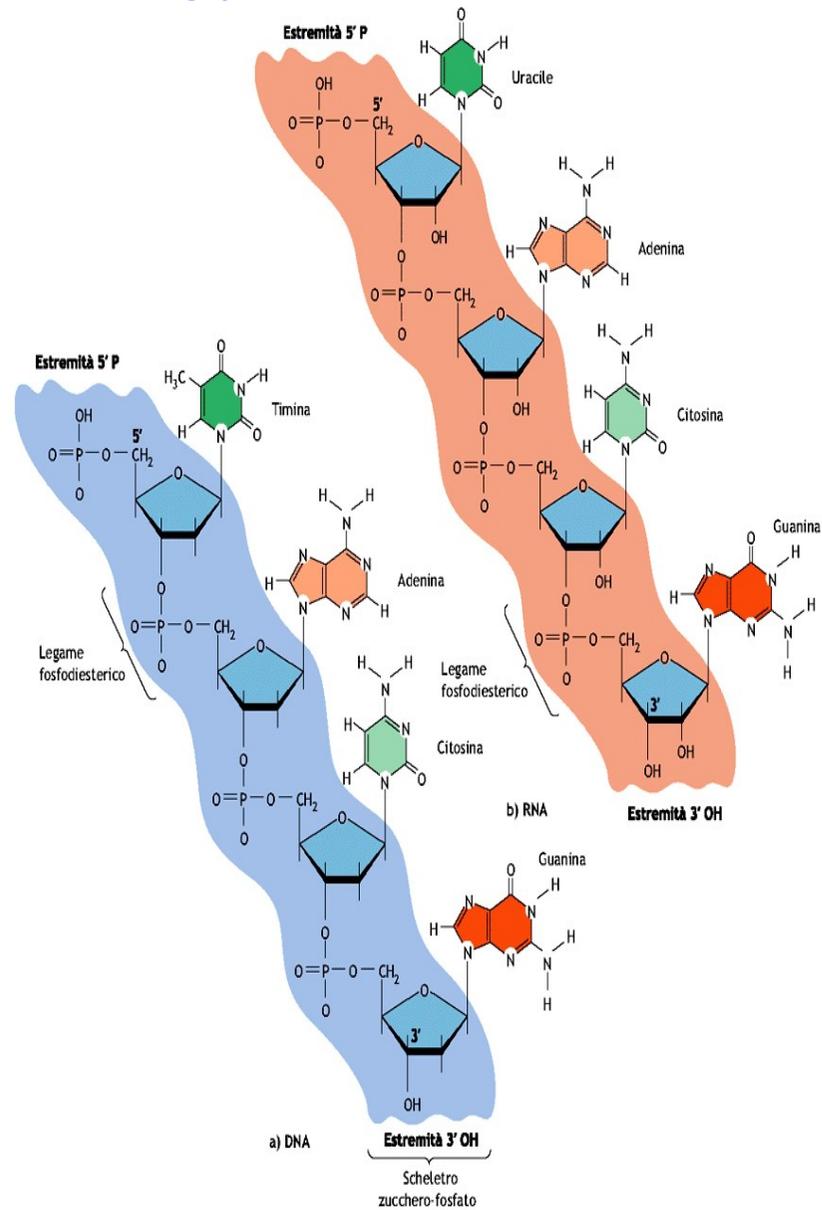
DNA ed RNA sono polimeri di **nucleotidi** che sono costituiti da **basi puriniche e pirimidiniche** legate a **zuccheri fosforilati**.



Gruppo fosfato	Zuccheri	Basi		
		Purine	Pirimidine	
	<p>β-D -desossiribosio (nel DNA)</p>	<p>Adenina (A)</p>	<p>Timina (T) (nel DNA)</p>	<p>Uracile (U) (nell'RNA)</p>
	<p>β-D-ribosio (nell'RNA)</p>	<p>Guanina (G)</p>	<p>Citosina (C)</p>	
Nucleotide				
		<p>Legame estere</p> <p>Gruppo fosfato</p> <p>5'</p> <p>4'</p> <p>3'</p> <p>2'</p> <p>1'</p> <p>Zucchero</p> <p>Base</p> <p>OH ← RNA</p> <p>(H) ← DNA</p>		

Figura 1.48 Elementi che costituiscono un nucleotide: gruppo fosfato; zucchero a 5 atomi di carbonio: D-ribosio (nell'RNA) o D-desossiribosio (nel DNA); basi azotate (le frecce indicano gli atomi di azoto impegnati nel legame con lo zucchero).

DNA ed RNA

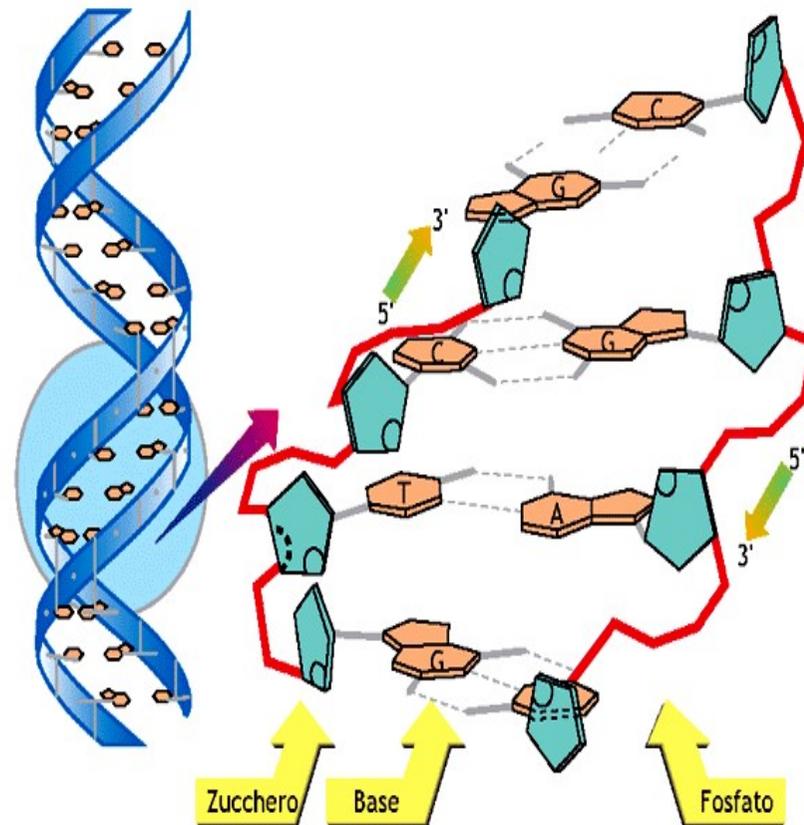


■ **Figura 1.50** Costruzione di una singola elica. Gli acidi nucleici sono costituiti da catene lineari di nucleotidi uniti fra loro grazie ad un ponte fosfodiesterico che si instaura tra l'estremità 3' OH del primo nucleotide e l'estremità 5' P del secondo. Un polinucleotide così costituito ha, per convenzione, una polarità 5' P → 3' OH. Sia nel DNA che nell'RNA, lo scheletro è rappresentato dal regolare alternarsi di molecole di zucchero e di acido fosforico, da cui sporgono le basi azotate.

ACIDI NUCLEICI

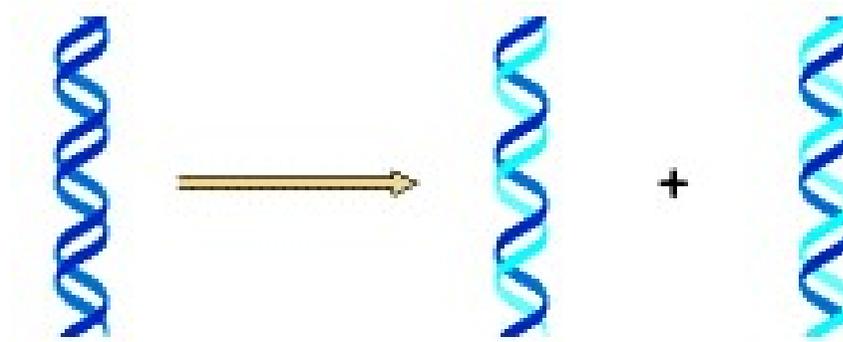
DNA

■ **Figura 1.52** L'antiparallelismo consente la formazione di legami idrogeno fra le basi complementari. Grazie all'orientamento antiparallelo delle due eliche, le basi azotate si trovano nella giusta posizione per formare legami idrogeno corretti (notare la posizione del legame C-N glicosidico rispetto al piano del foglio).

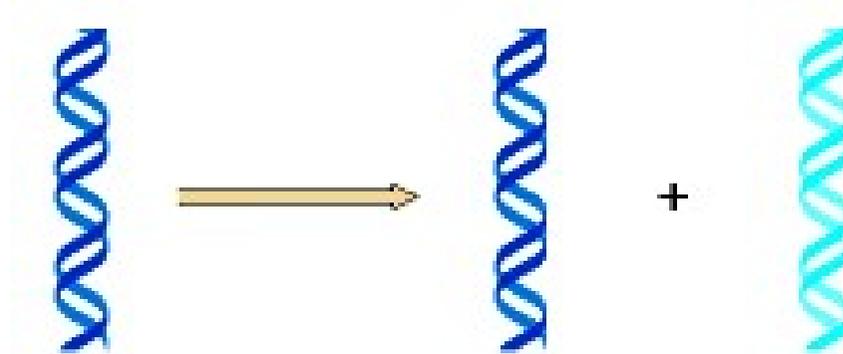


Modelli di replicazione del DNA

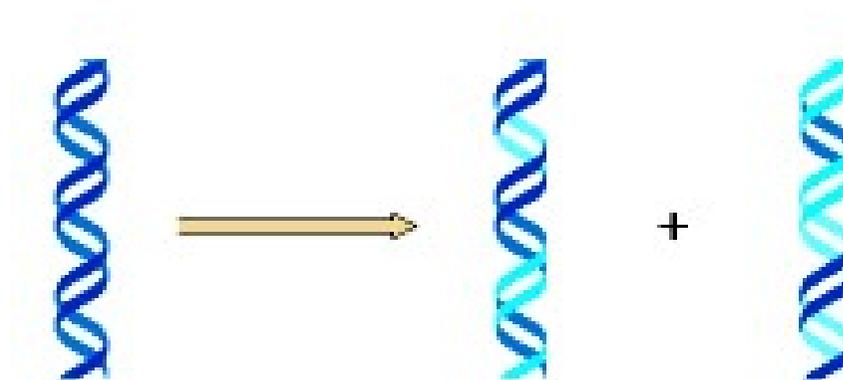
Semiconservativo



Conservativo



Dispersivo



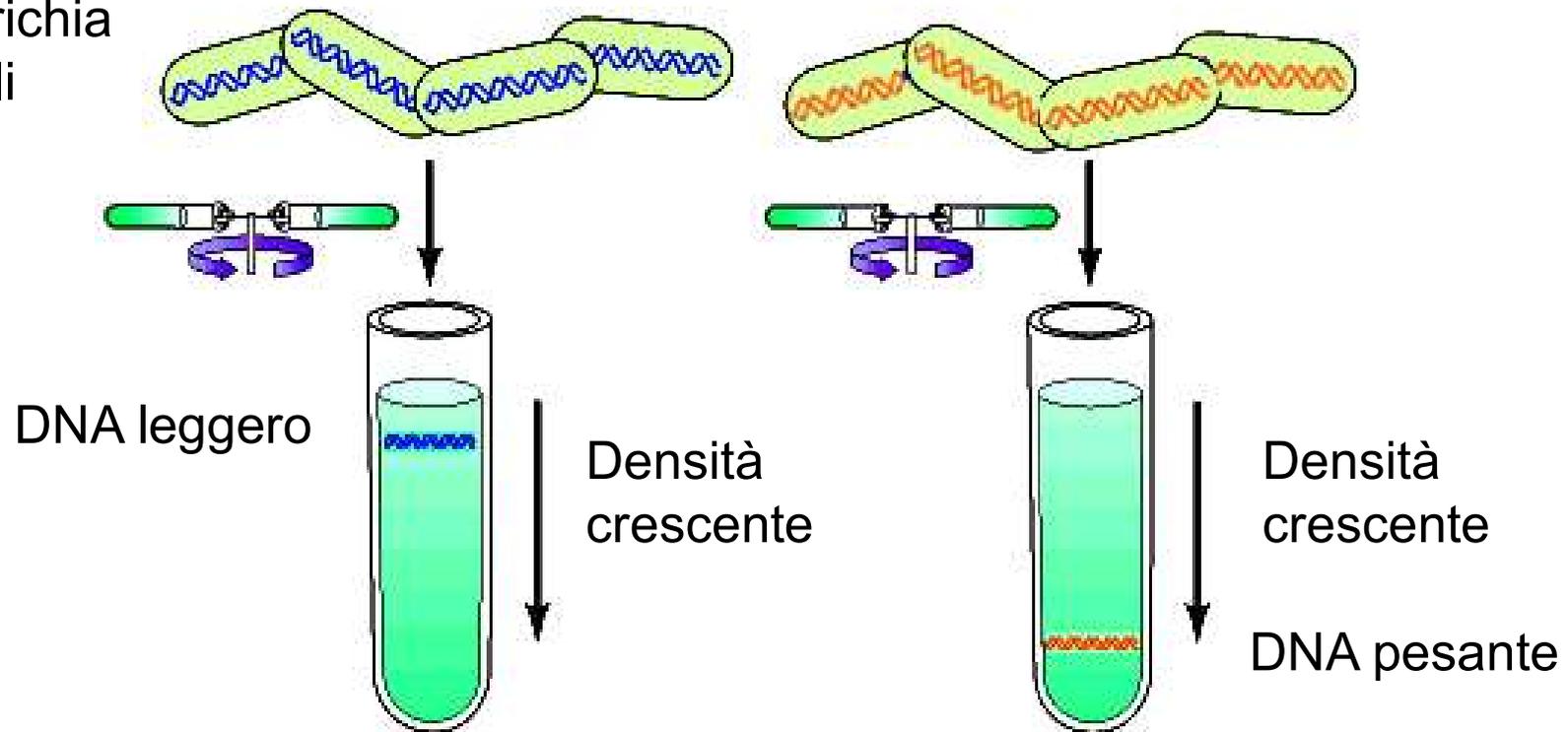
Esperimento di M. Meselson e F. Stahl, 1958

In questo esperimento il DNA venne marcato con isotopi che ne alteravano la densità.

Batteri cresciuti in un mezzo ^{14}N

Batteri cresciuti in un mezzo ^{15}N

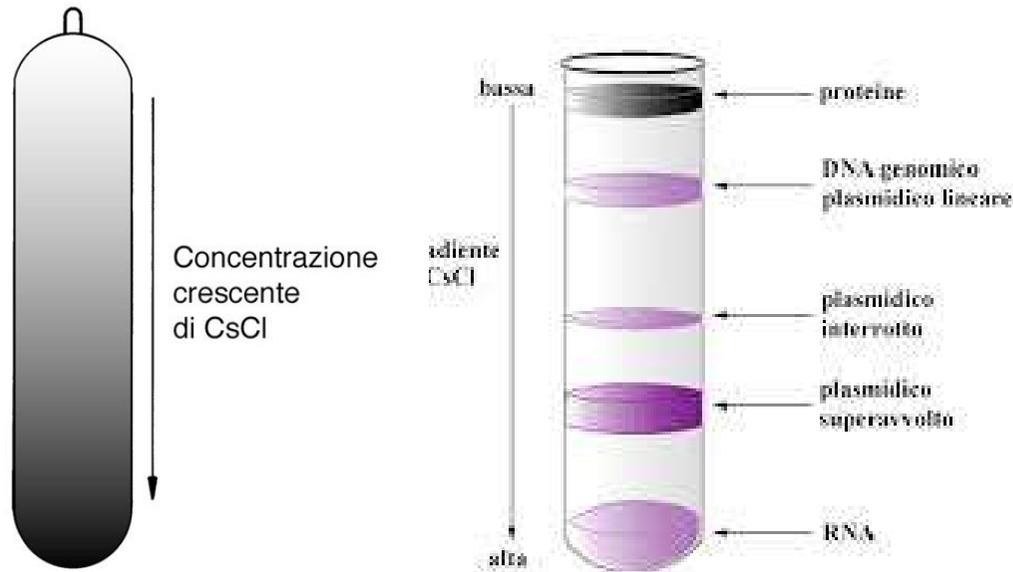
Escherichia coli



Estrazione del DNA
e centrifugazione
in una soluzione di CsCl

Estrazione del DNA
e centrifugazione
in una soluzione di CsCl

Gradiente di Cloruro di Cesio

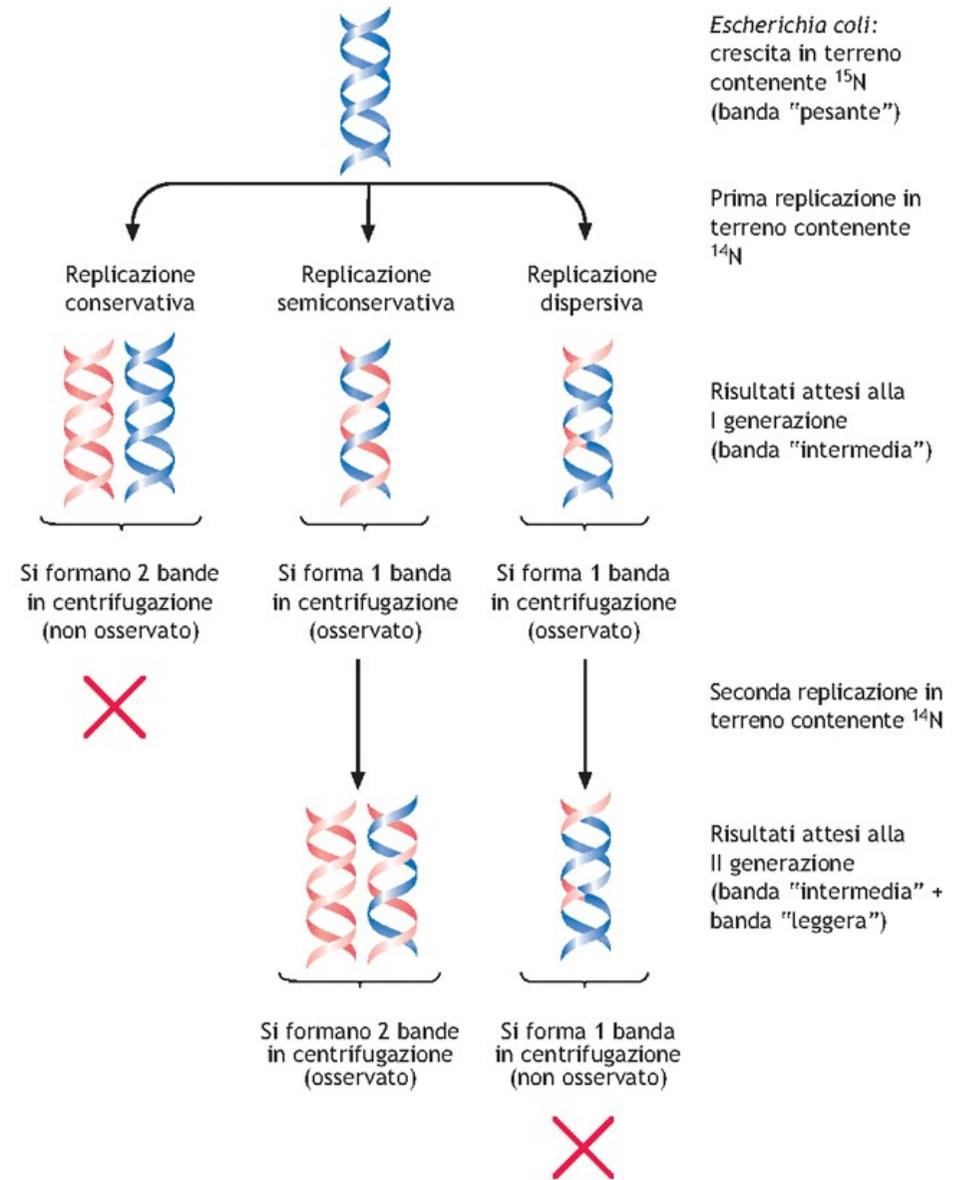
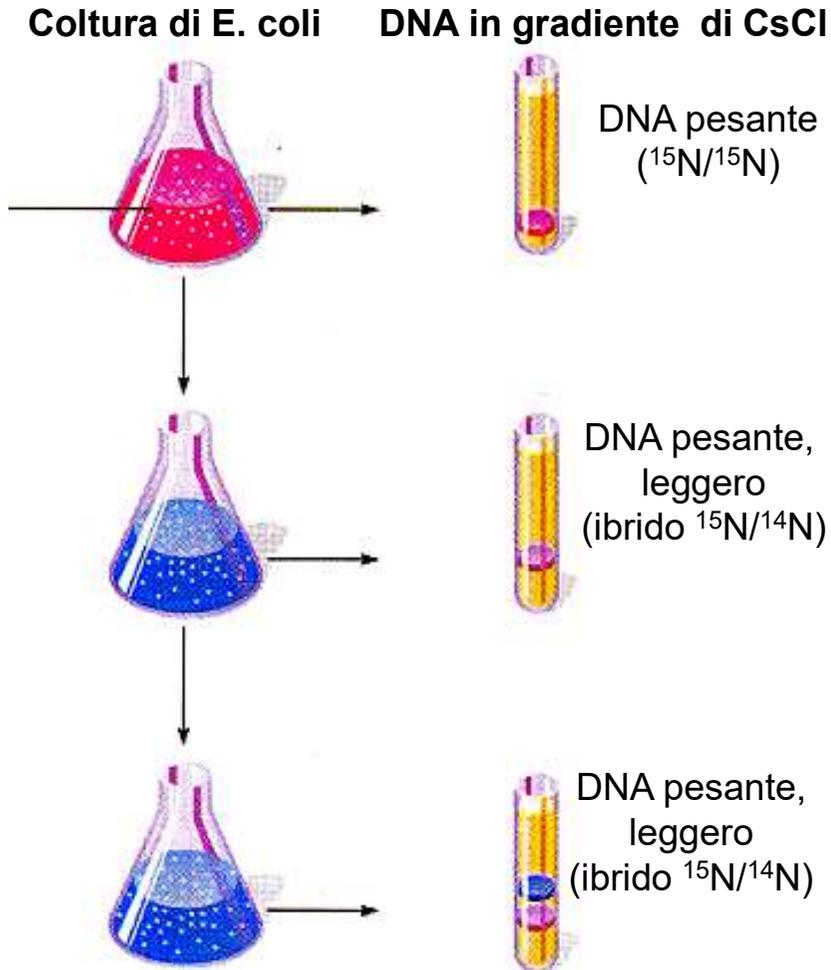


T.A.



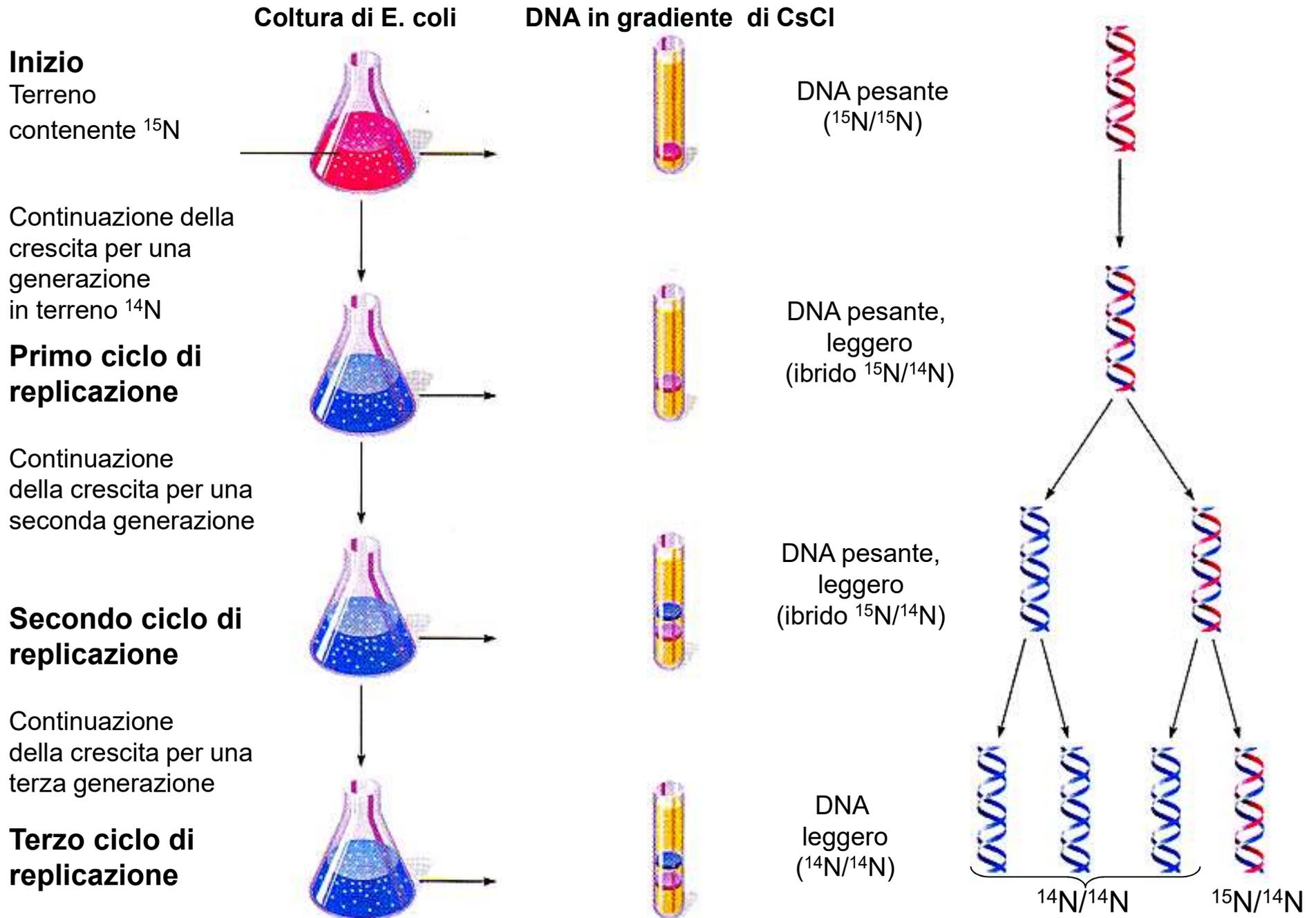
100000g
6M CsCl

Esperimento di M. Meselson e F. Stahl, 1958



Esperimento di M. Meselson e F. Stahl, 1958

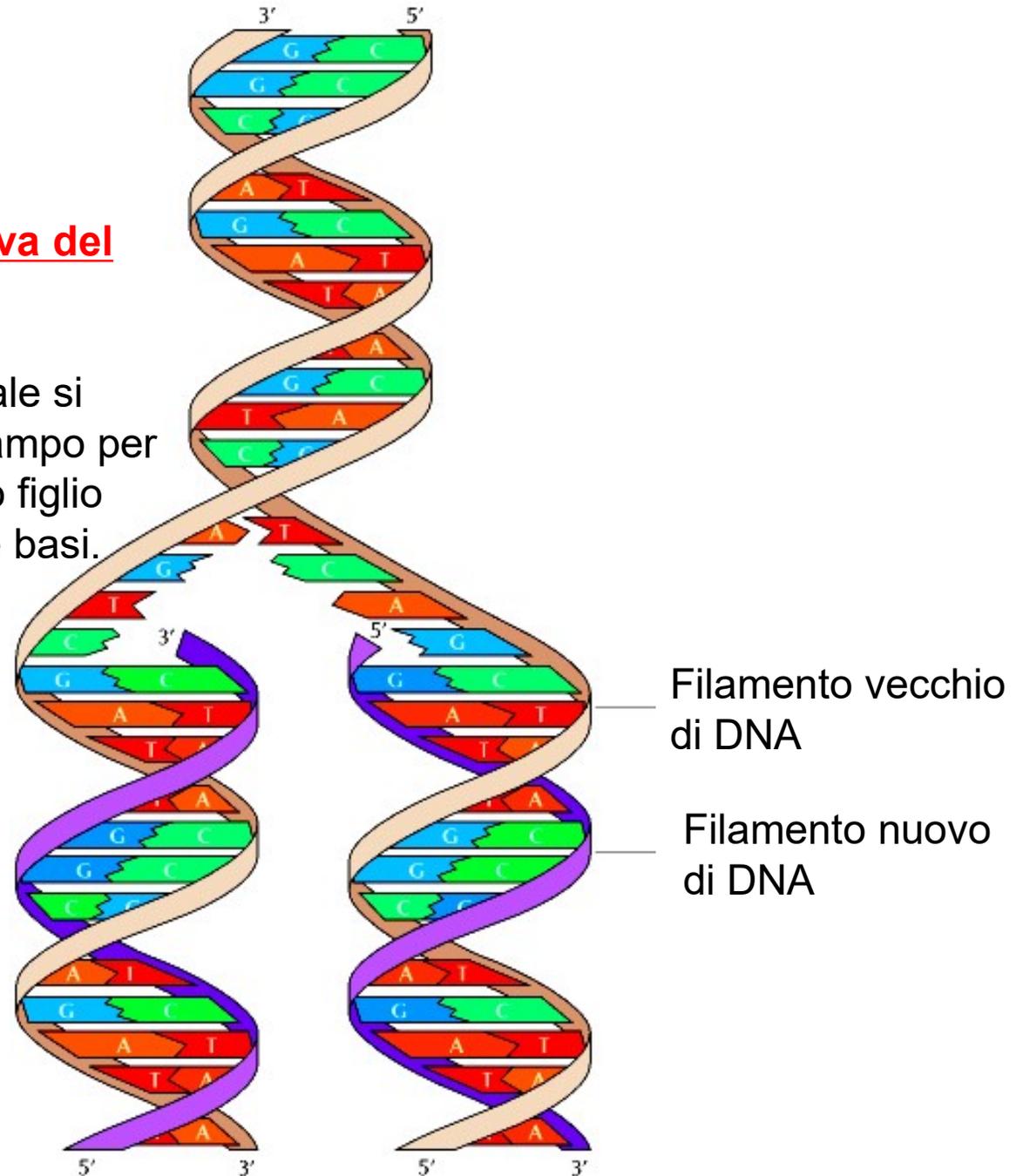
Composizione del DNA



Replicazione del DNA

Replicazione semiconservativa del DNA.

I due filamenti di DNA parentale si separano e ciascuno serve da stampo per la sintesi di un nuovo filamento figlio mediante accoppiamento delle basi.



Negli eucarioti i nucleosomi si duplicano secondo una modalità conservativa degli ottameri

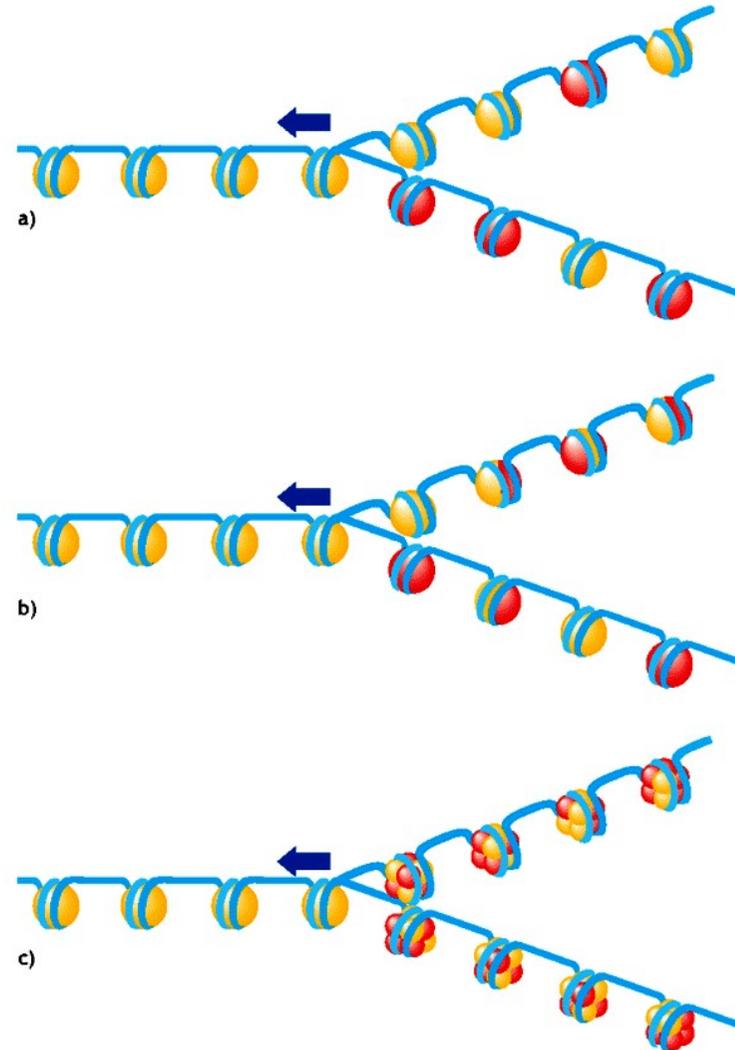
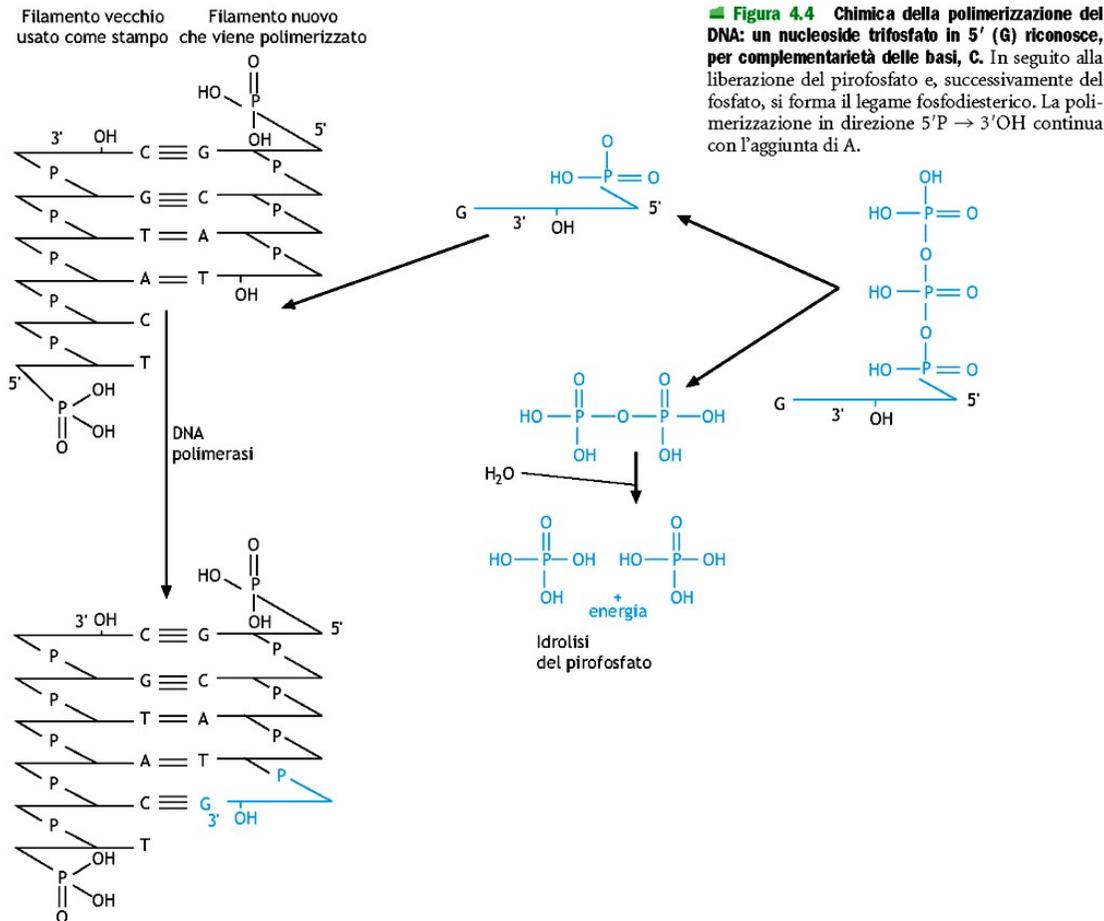


Figura 4.16 Modalità di ripetizione dei nucleosomi. **(a)** Conservazione degli ottameri. **(b)** Conservazione di tetrameri. **(c)** Distribuzione casuale.

Enzimi coinvolti della duplicazione del DNA

- Elicasi
- Topoisomerasi
- Primasi
- DNA Polimerasi III
- DNA Polimerasi I
- Ligasi

Replicazione del DNA: caratteristiche DNA polimerasi



Tutte le DNA polimerasi note hanno **due proprietà fondamentali in comune** che hanno implicazioni fondamentali per la replicazione del DNA:

1. Tutte le polimerasi sintetizzano DNA **soltanto in direzione 5'-3'**, aggiungendo dNTP **al gruppo 3' ossidrilico di una catena in crescita**.
2. Le DNA polimerasi possono aggiungere un nuovo deossiribonucleotide soltanto ad un filamento primer preformato che forma legami idrogeno con lo stampo **e non sono capaci di iniziare la sintesi di DNA catalizzando la polimerizzazione di dNTP liberi**.

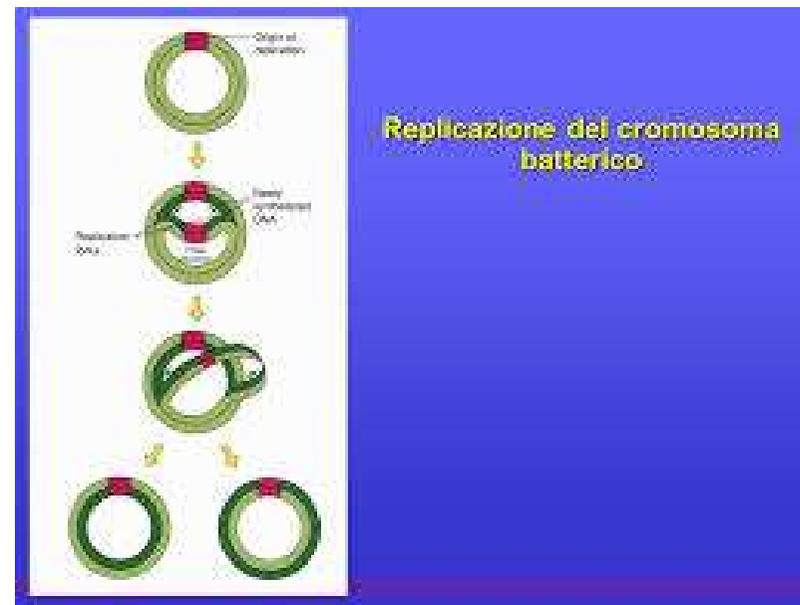
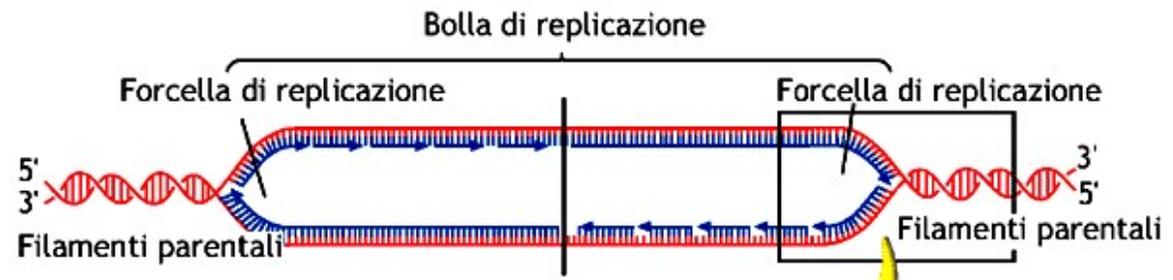
Replicazione del DNA- enzima DNA polimerasi

DNA Polimerasi procariotiche ed eucariotiche

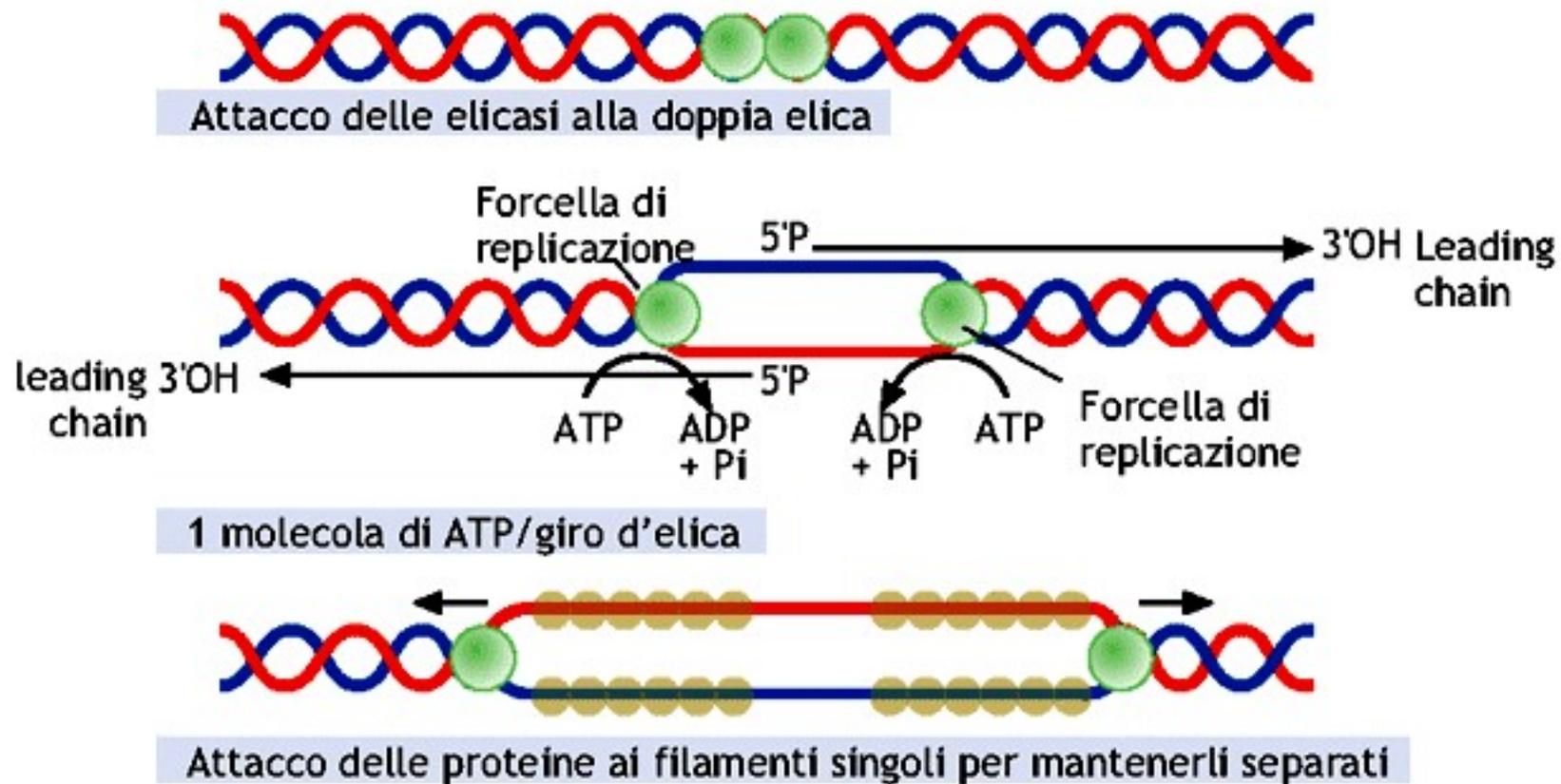
Enzimi	Direzione della sintesi	Attività esonucleasica	Funzioni possibili
Procarioti			
Polimerasi I	5' → 3'	5' → 3' 3' → 5'	riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco; riparazione del DNA
<i>Polimerasi II</i>	5' → 3'	5' → 3' 3' → 5'	<i>riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco;</i> <i>riparazione del DNA</i>
<u>Polimerasi III</u>	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della replicazione
Eucarioti			
<u>Polimerasi α</u>	5' → 3'	5' → 3'	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi δ); riparazione del DNA
Polimerasi β	5' → 3'	nessuna	riparazione del DNA
Polimerasi γ	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della repl. nei mitocondri e cloroplasti
<u>Polimerasi δ</u>	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi α)
Polimerasi ε	5' → 3'	3' → 5'	riparazione del DNA; può cooperare con le <i>Polimerasi α e δ nei meccanismi principali della replicazione</i>

Replicazione del DNA nei procarioti: inizio

- Inizio della replicazione in **oriC** riconosciuta dalla **proteina DnaA** e procede nelle due direzioni opposte fino al completamento della sintesi dei nuovi filamenti.
- L'interazione richiama **l'elicasi** in un sito adiacente ricco di AT interazione **necessaria per apertura della doppia elica**.



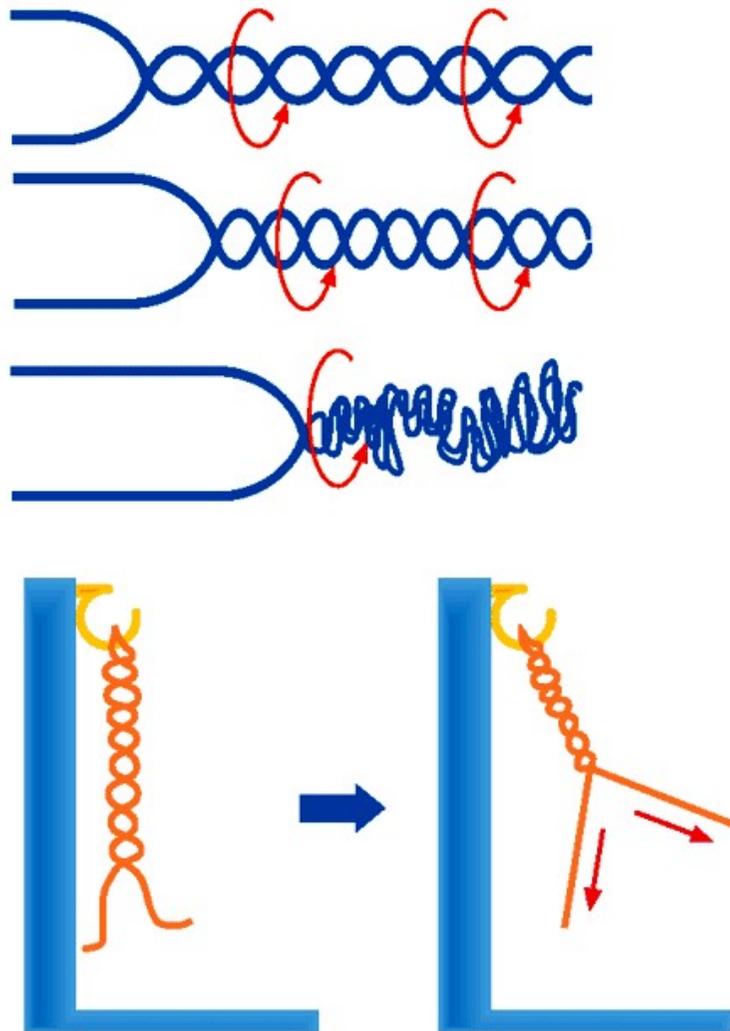
Enzimi nella replicazione del DNA: elicasi



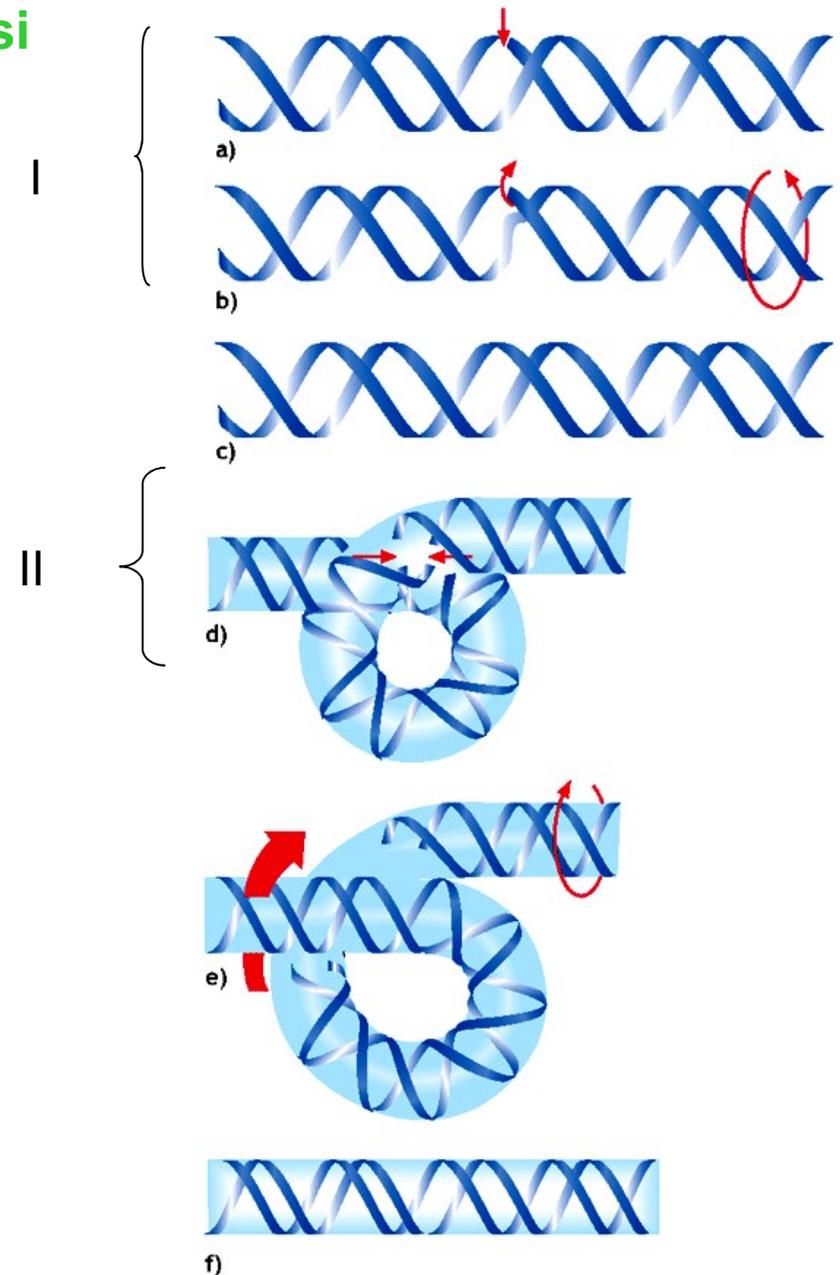
- Elicasi, proteine che si attaccano alla doppia elica e la aprono
- Proteine di srotolamento, che destabilizzano l'elica dopo essersi attaccate ai filamenti singoli
- Direzione di avanzamento

■ **Figura 4.5** Apertura della doppia elica e mantenimento dei filamenti separati nella formazione della bolla di replicazione.

Replicazione del DNA:topoisomerasi



■ **Figura 4.6** Il procedere della forcella di replicazione provoca un movimento di torsione della molecola del DNA e quindi il suo superavvolgimento come quando si vuole svolgere una corda a due capi con una delle estremità attaccata ad un uncino.



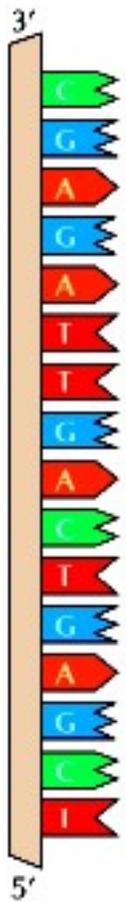
■ **Figura 4.7** (a-b-c) L'azione della topoisomerasi I: l'enzima introduce un singolo taglio, in seguito la molecola viene risaldata. (d-e-f) L'azione della topoisomerasi II: l'enzima introduce una rottura in entrambi i filamenti, in seguito la molecola viene risaldata.

2. Sintesi del primer

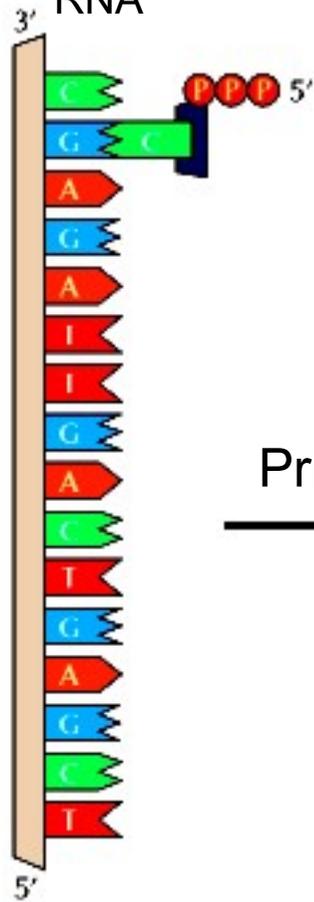
Replicazione del DNA: DNA primasi

Quando il DNA si srotola, la DNA primasi sintetizza **un breve innesco di RNA** composto da circa 5-10 nucleotidi

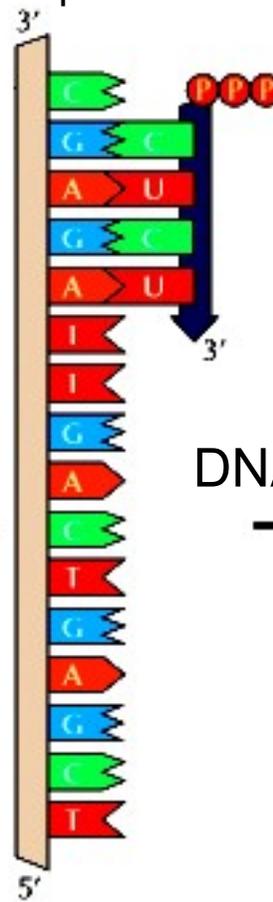
Stampo di DNA



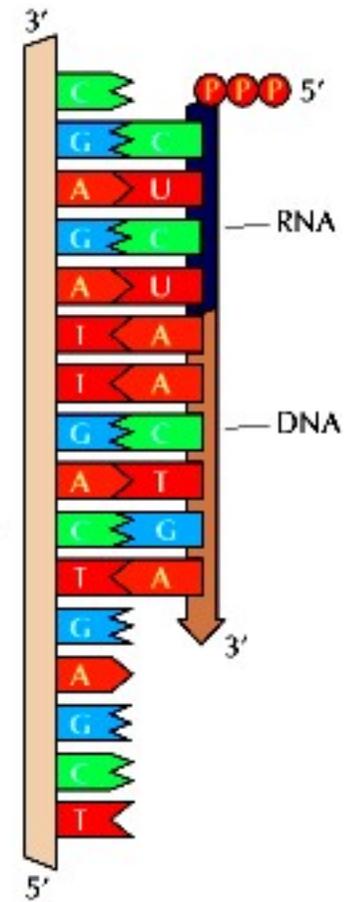
Inizio della sintesi di RNA



Sintesi dell'RNA primer

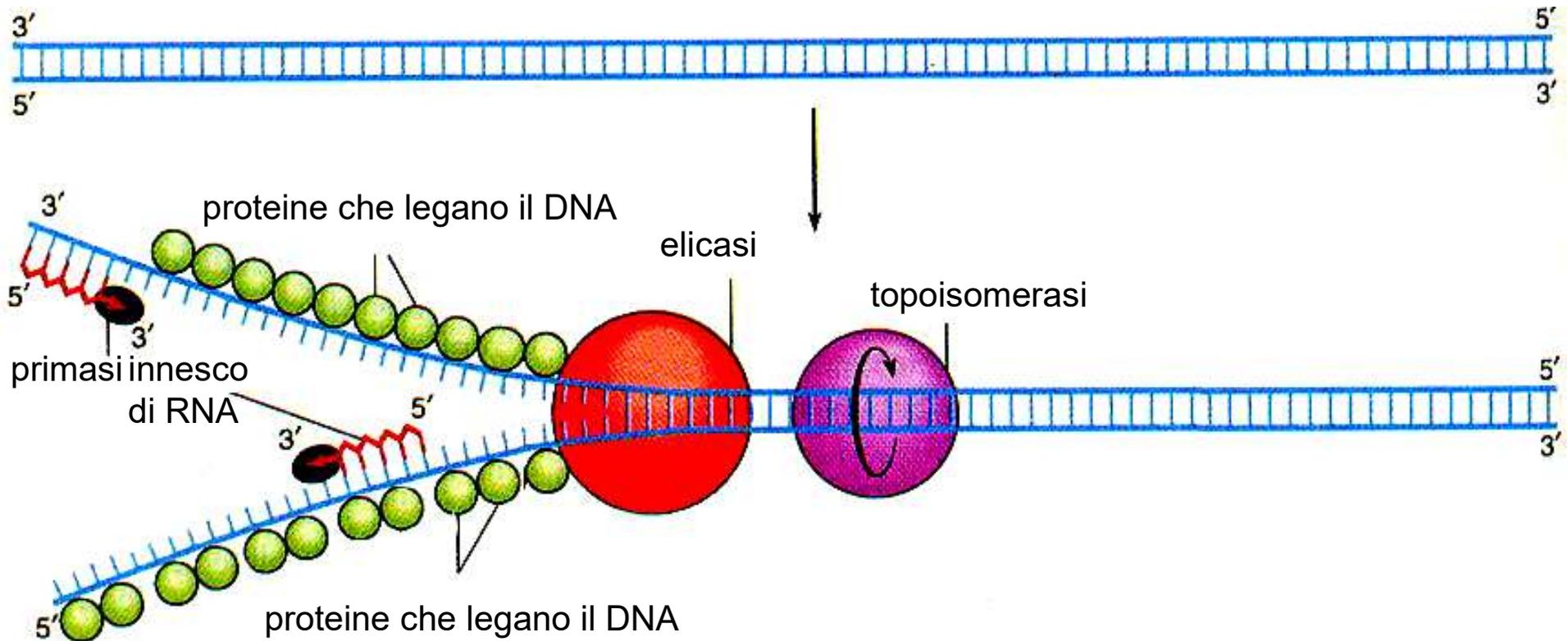


Estensione del primer di RNA da parte della DNA polimerasi

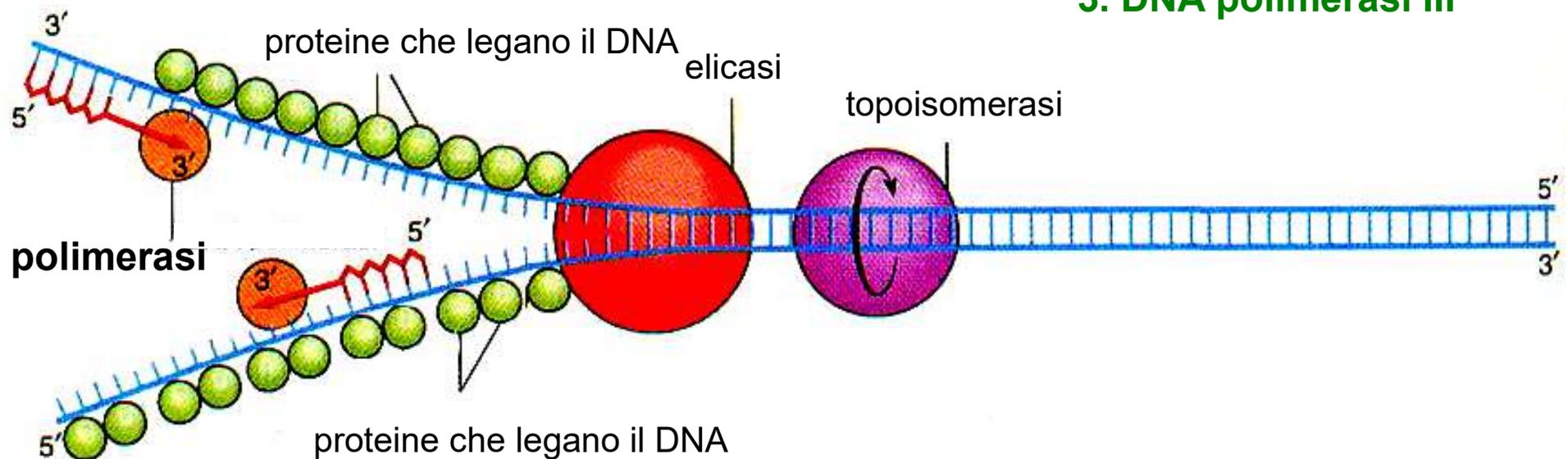


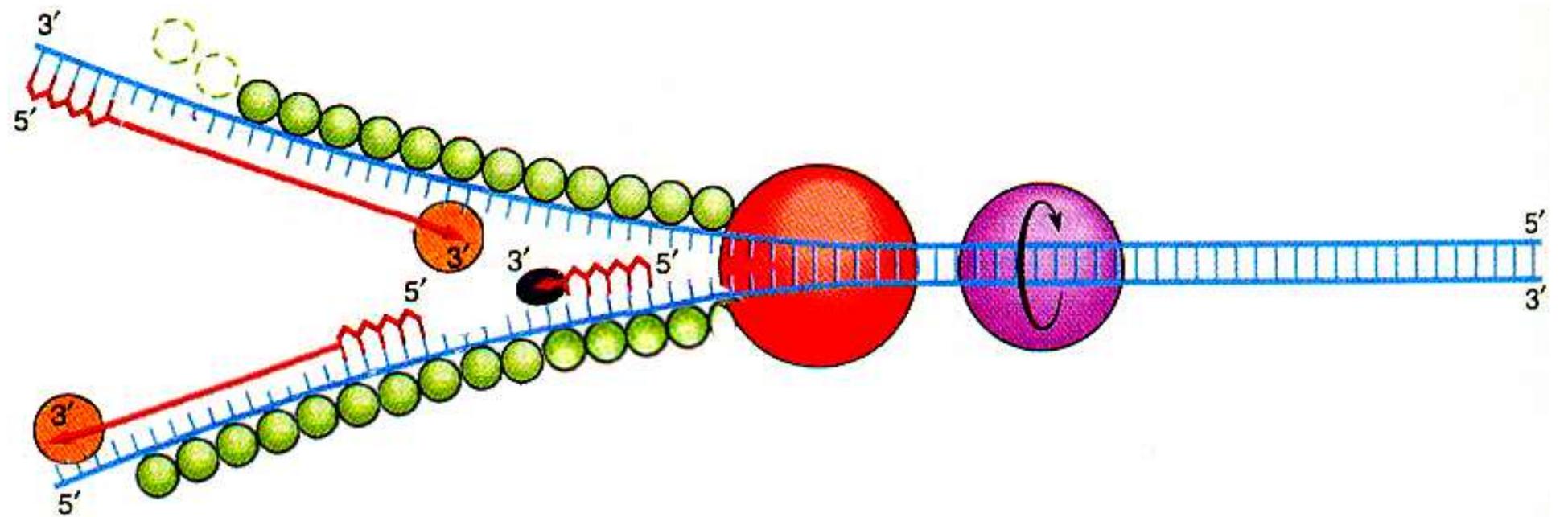
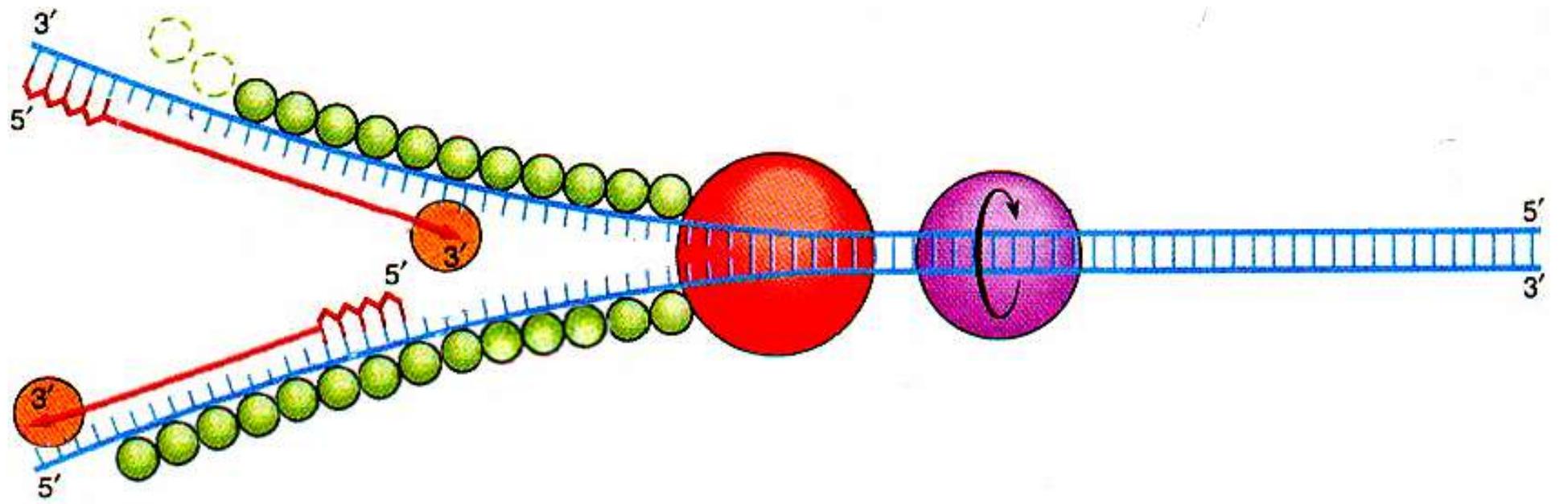
Primasi

DNA polimerasi

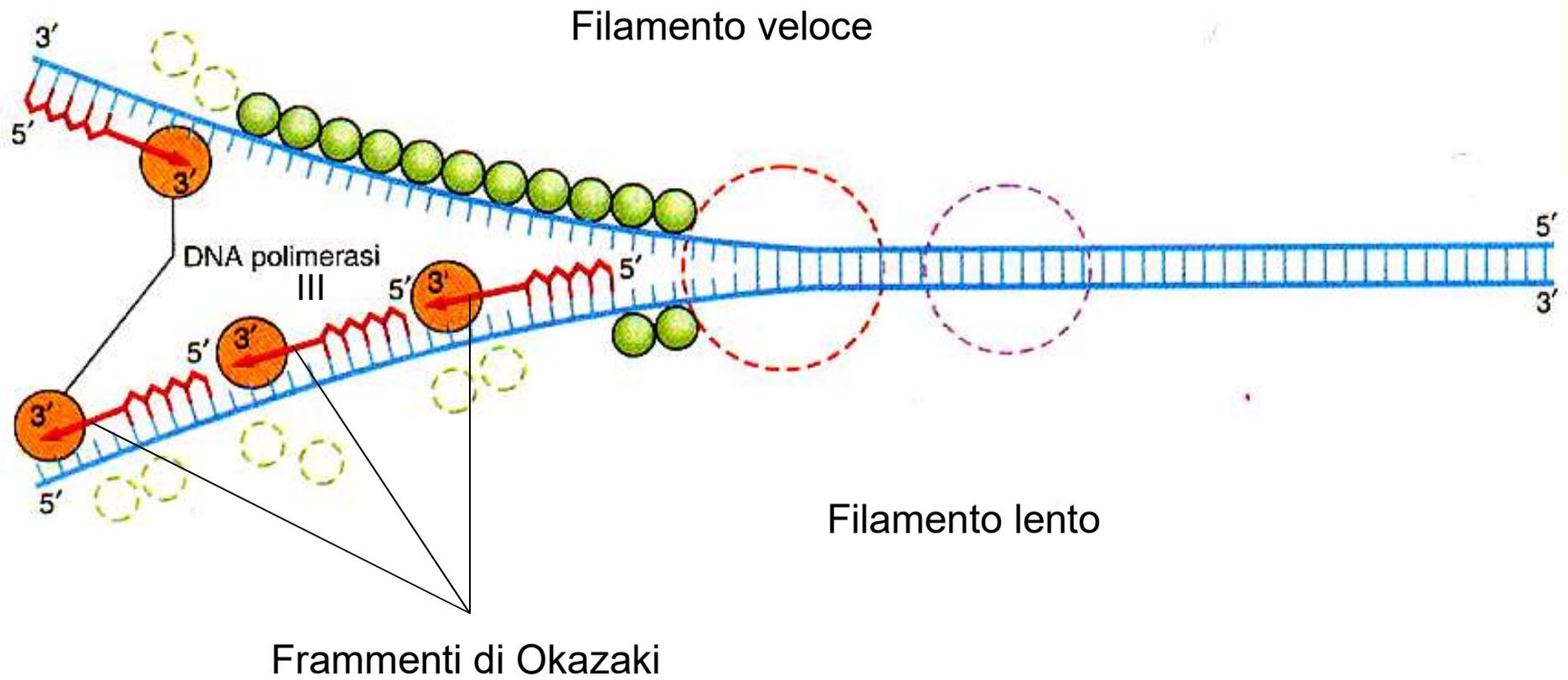


3. DNA polimerasi III

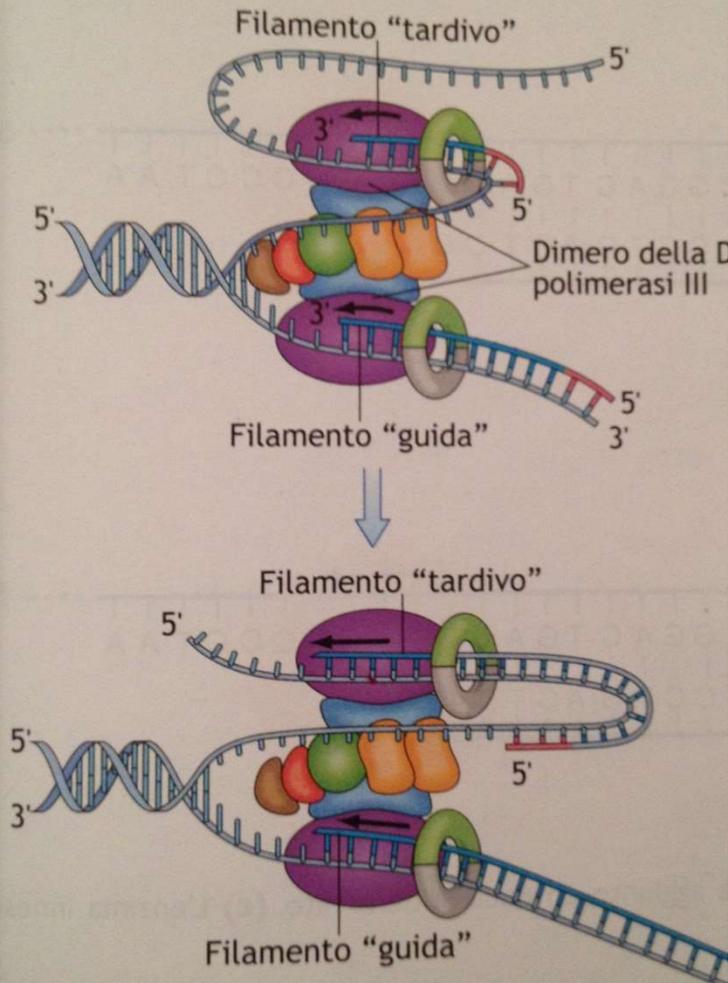




Replicazione del DNA

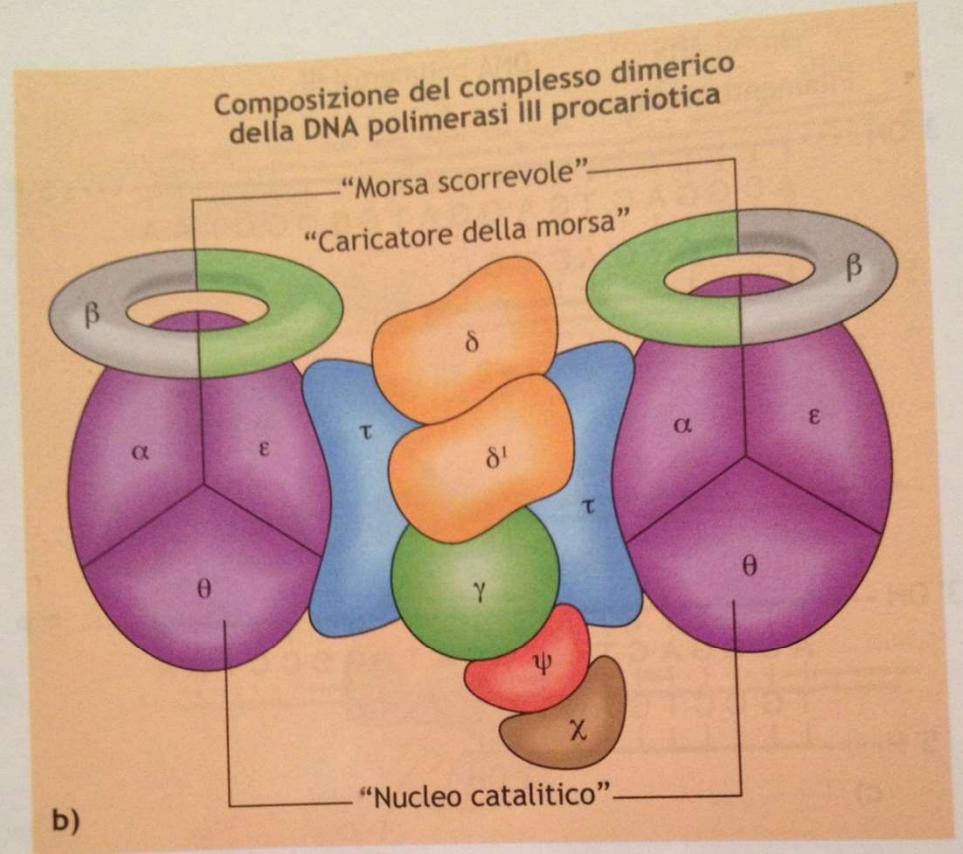


Replicazione del DNA



a)

organizzata in un complesso dimerico (Figura 4.12)



b)

Figura 4.12 (a) Dimerizzazione della DNA polimerasi III procariotica. Nei procarioti la DNA polimerasi III agisce come dimerico e, attraverso un ripiegamento del filamento che funge da stampo per la sintesi del filamento "tardivo", i due filamenti neosintetizzati vengono polimerizzati nella stessa direzione. **(b)** Il complesso così organizzato sintetizza contemporaneamente il filamento guida e quello tardivo.

di
vi
H.
corretti con la base che si trova sullo stampo. L'assenza di legami idrogeno e/o, comunque, l'instabilità dovuta all'appaiamento scorretto non consentono alla DNA polimerasi di continuare la sintesi (vedi la definizione di innesco data nel paragrafo precedente). L'attività polimerizzante

4. Rimozione dei primer **Replicazione del DNA**

Dopo aver svolto la loro funzione gli inneschi vengono rimossi da parte di polimerasi che hanno attività esonucleasica 5'-3' e i "gap" lasciati dalle rimozioni vengono riempiti dalla stessa polimerasi.

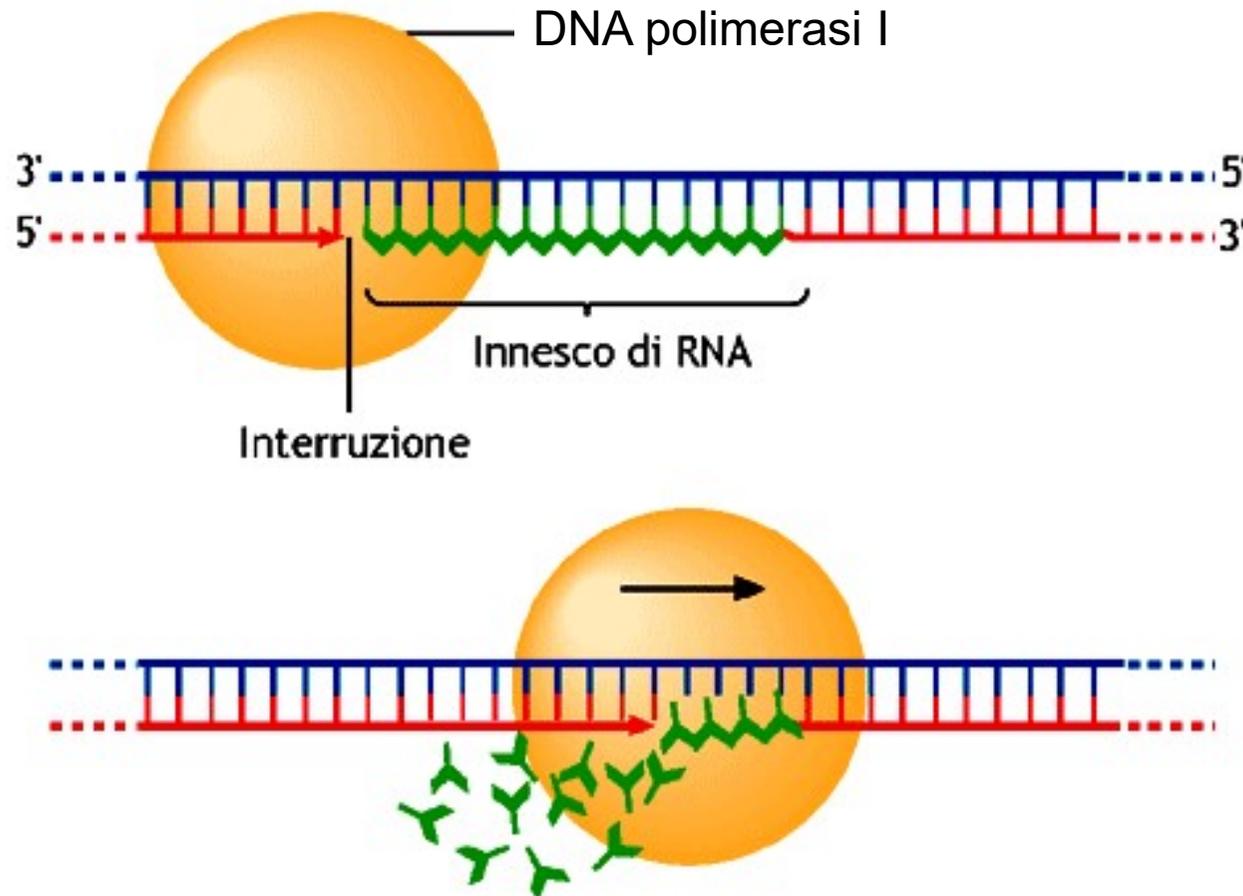
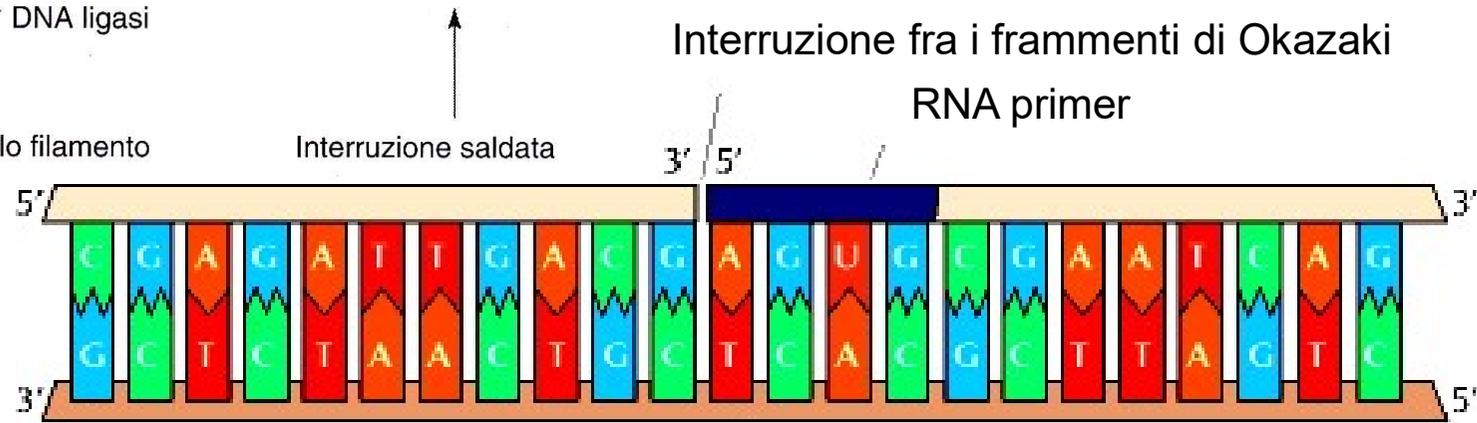
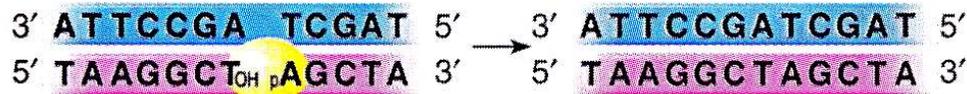


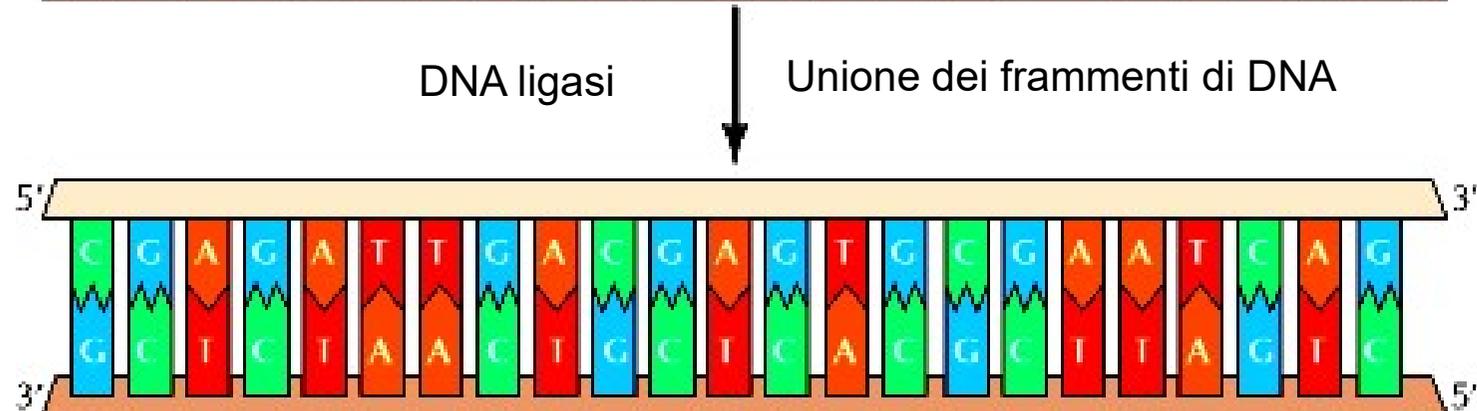
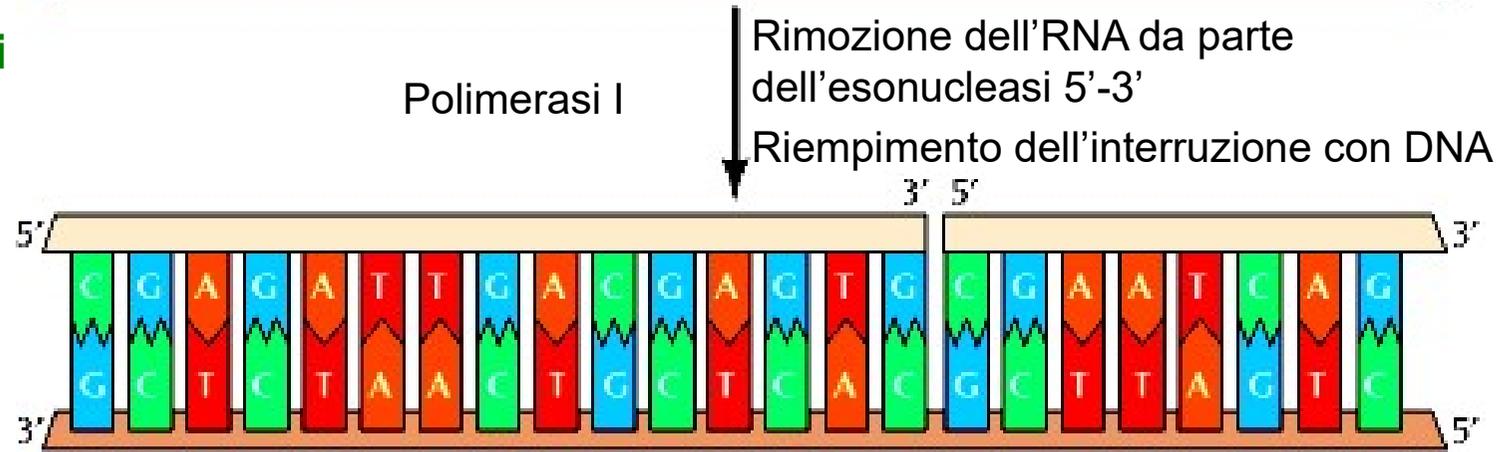
Figura 4.9 Innesco di RNA per l'inizio della replicazione del DNA. L'innesco sarà rimosso dall'attività esonucleasica della DNA polimerasi I. La ligasi, infine, salderà i frammenti.

Replicazione del DNA

La rimozione dell'innescio

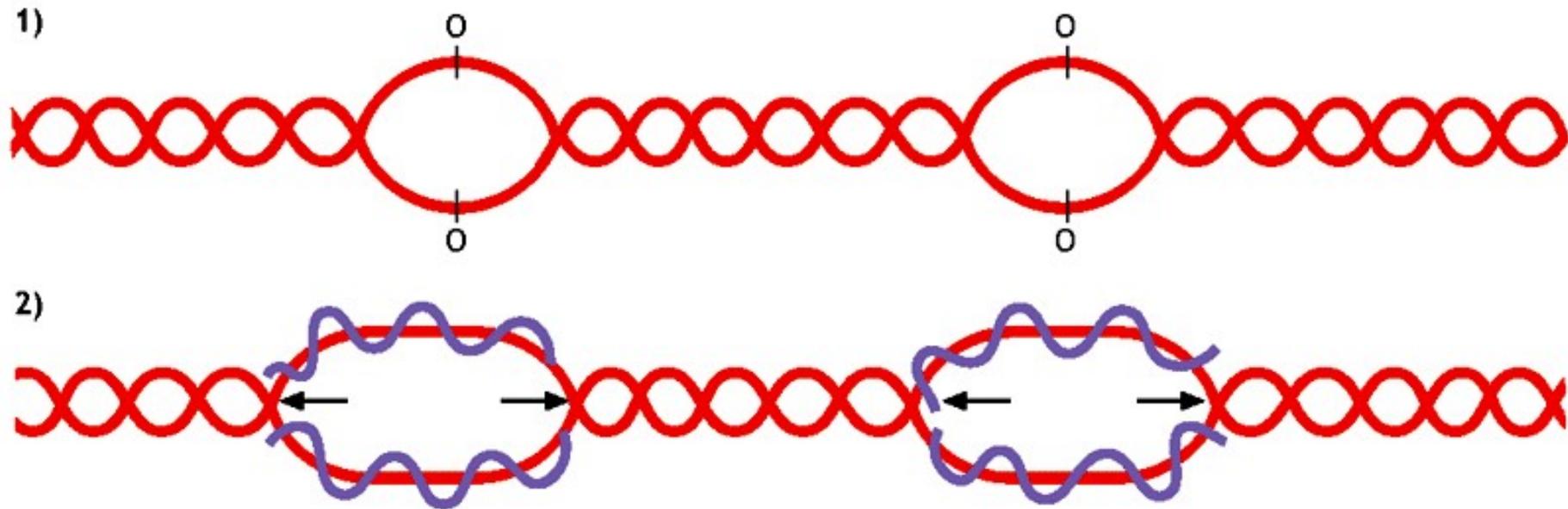


5. DNA ligasi



Replicazione del DNA

Negli eucarioti 10 volte più lenta dei procarioti $2,5 \times 10^9$ nucleotidi appaiati- impiega 6-7 ore



■ **Figura 4.14** Replicazione del cromosoma degli eucarioti mediante molteplici forcelle di replicazione. **1)** In punti diversi del cromosoma, distanti circa 30.000-40.000 paia di basi, in corrispondenza delle origini di replicazione (O) si aprono i due filamenti, formando le “bolle di replicazione”. **2)** Si formano due forcelle di replicazione che procedono in senso centrifugo rispetto all’origine di replicazione, fino ad incontrarsi.

Replicazione del DNA

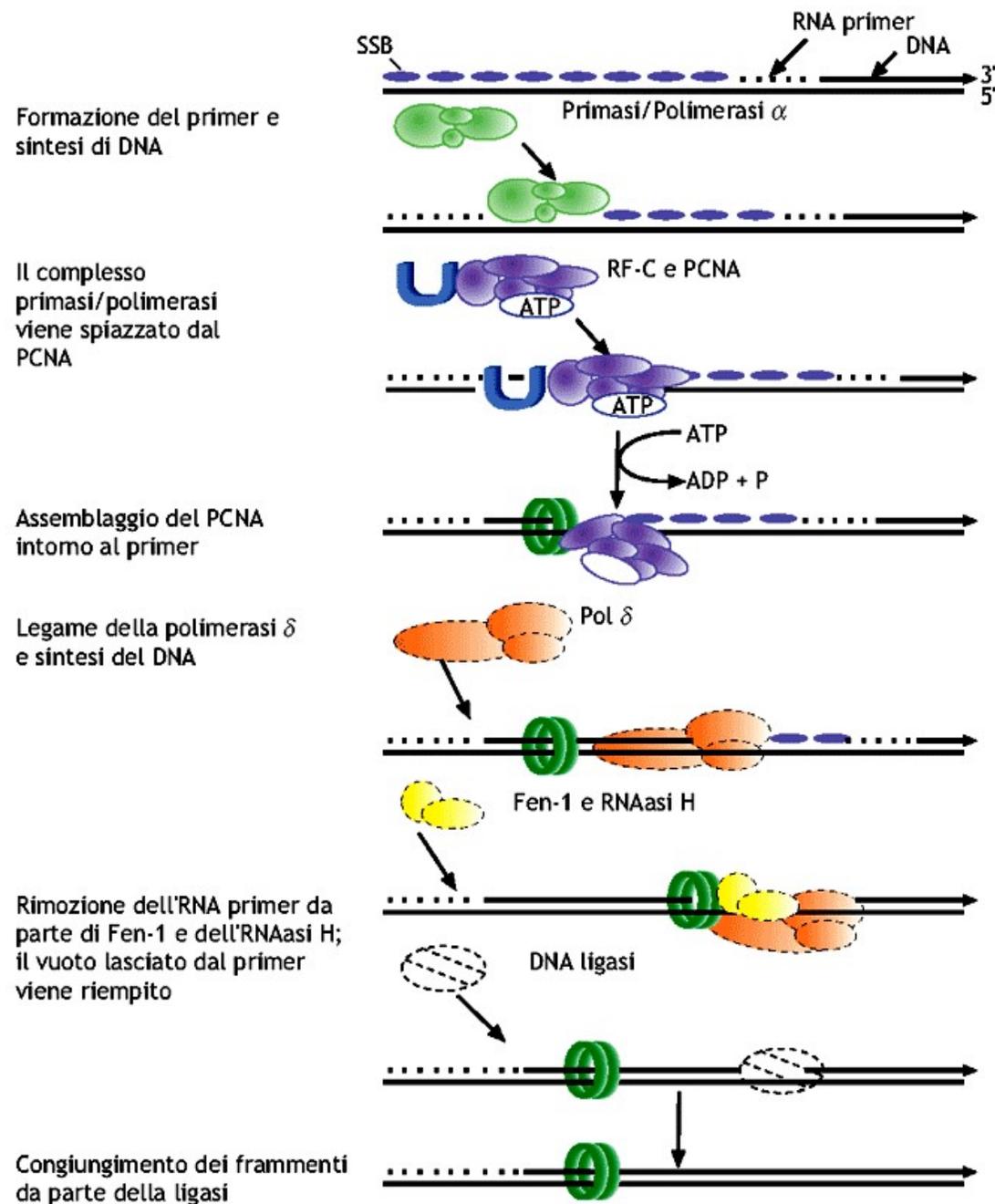
Negli eucarioti

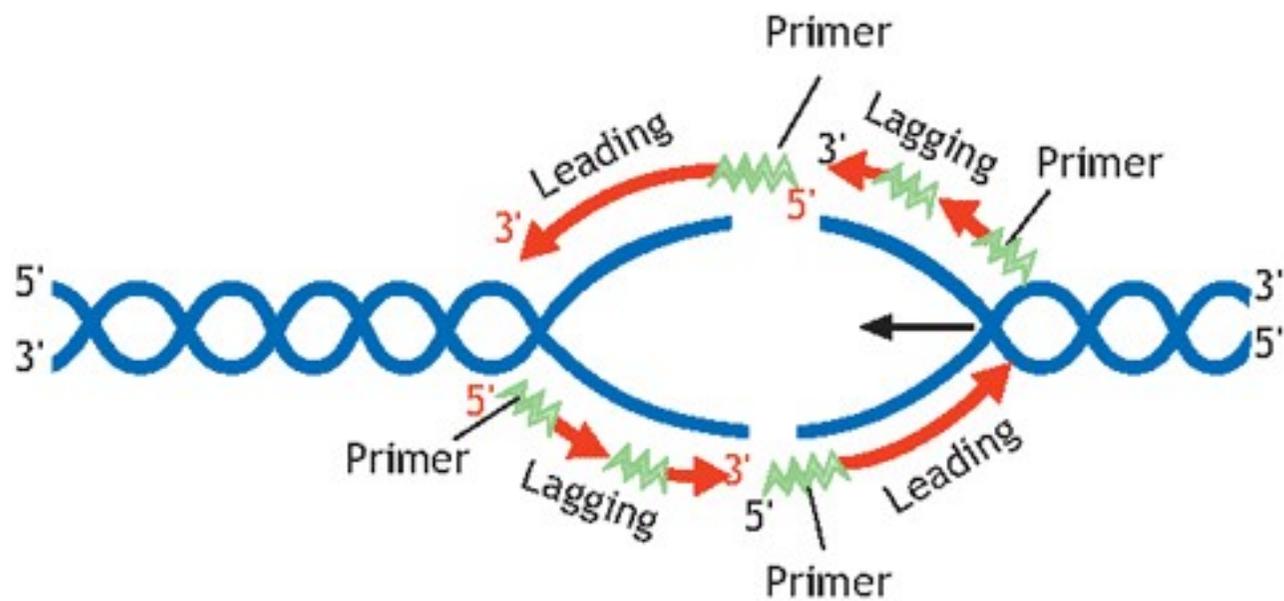
■ **Figura 4.15 Sintesi di frammenti di Okazaki sulla lagging chain.** La leading chain è sintetizzata in modo continuo dal PCNA e dalla polimerasi δ (omesso per semplicità della figura).

- RF-C replication factor C
- PCNA antigene nucleare
- proliferazione cellulare
- Fen1
- RNAasi H

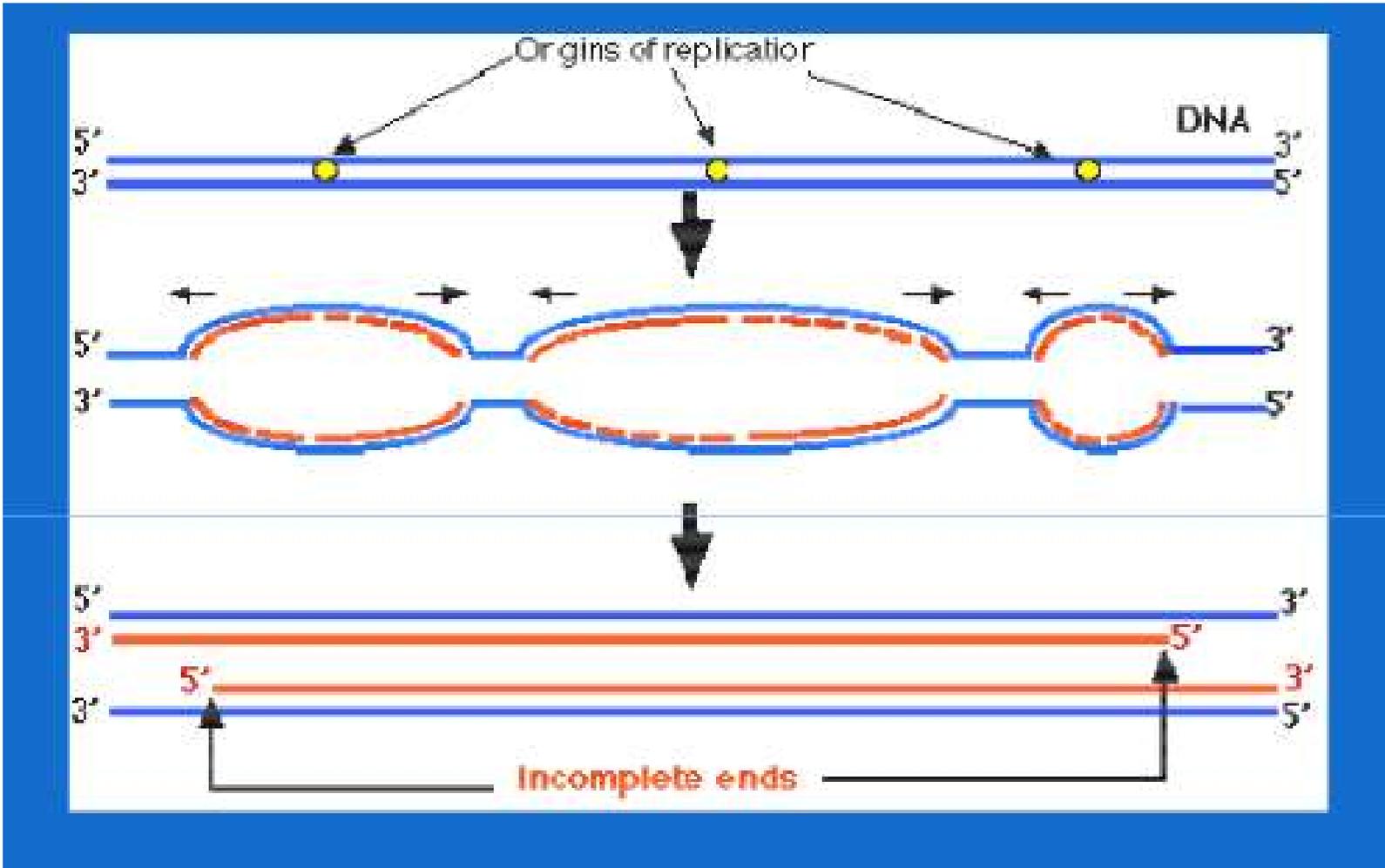


De Leo, Ginelli, Fasano
Biologia e Genetica
Edises

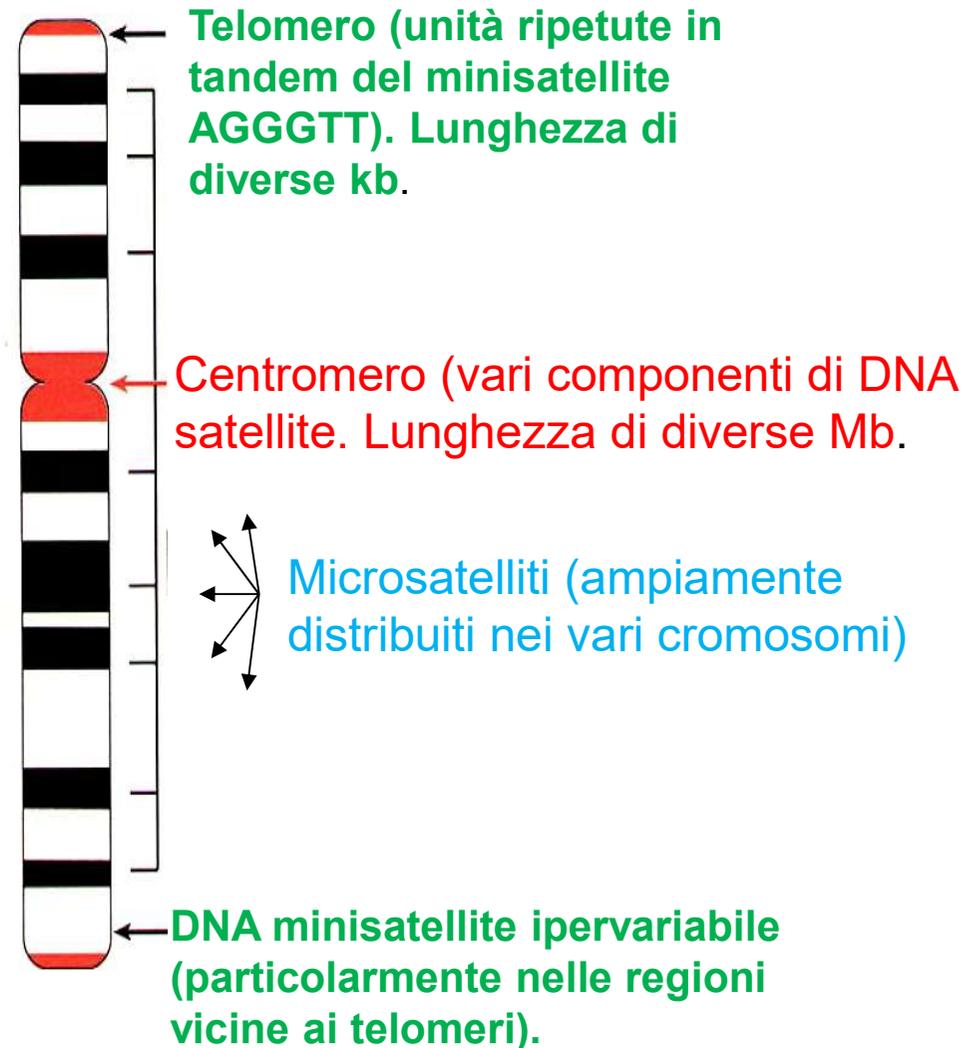




■ **Figura 4.11** Durante la replicazione ogni catena leading è “inseguita” da una catena lagging.



- a) **DNA satellite:** sequenze lunghe
- b) **DNA minisatellite:** sequenze medie
- c) **DNA microsatellite:** sequenze corte



Sequenze altamente ripetute:
(10^5 - 10^7)

la maggior parte inattive dal punto di
vista trascrizionale; molto eterogenee;
raggruppate in cluster: *satelliti*

minisatelliti
microsatelliti

1. Satellite

Unità da 5 a 200 bp
Segmenti lunghi fino a
qualche centinaio
di chilobasi

2. Minisatelliti

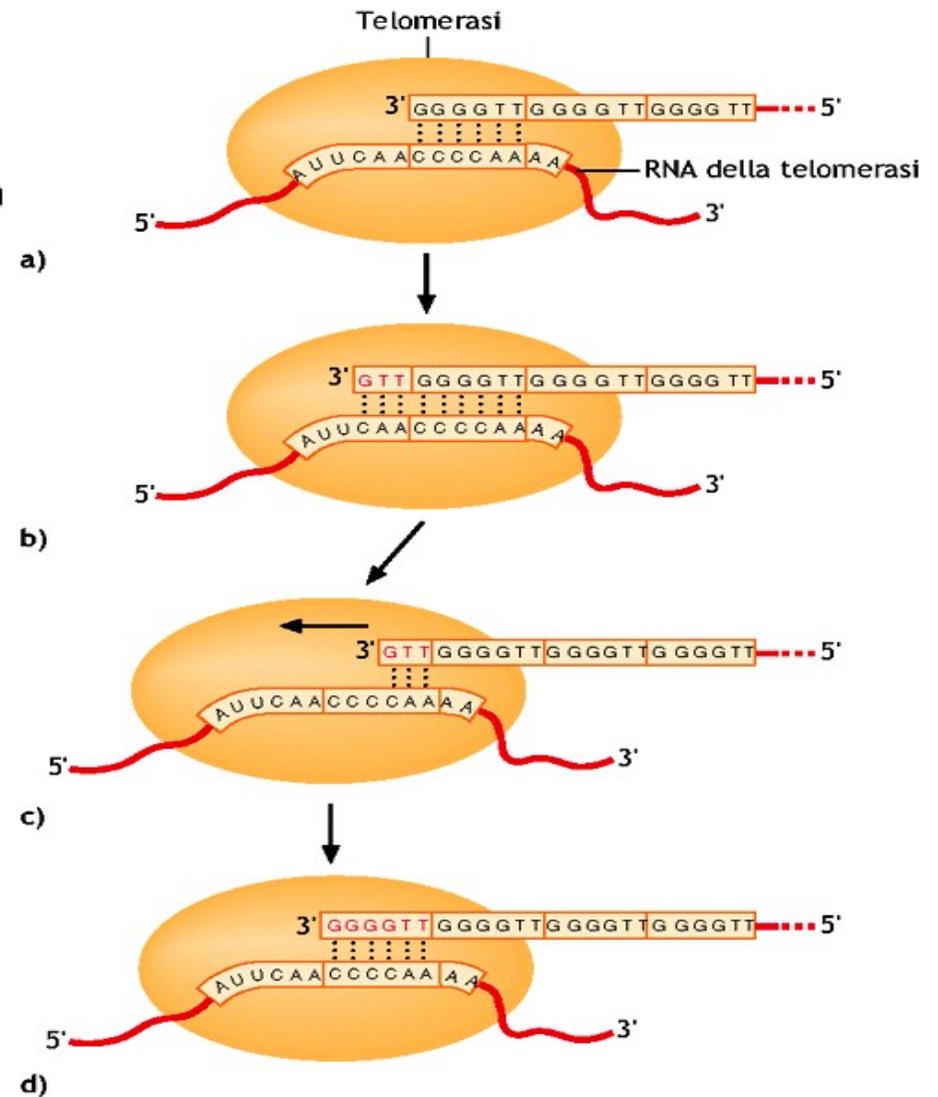
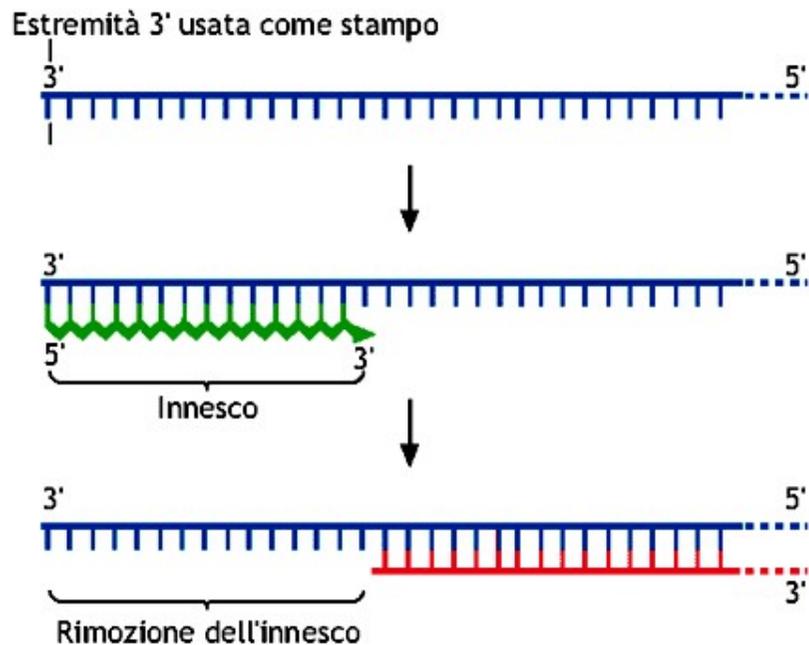
Unità da 2 fino a 5 bp
Segmenti lunghi fino a 25 kb

3. Microsatelliti

Unità < 4bp
Segmenti lunghi fino 150 pb

Replicazione del DNA negli eucarioti : telomeri

■ **Figura 4.17** Il problema della replicazione dei telomeri: dopo la rimozione dell'inesco chi riempie il "gap"?



■ **Figura 4.19** La componente TERC (RNA) della telomerasi serve da stampo per la sintesi del DNA telomerico. (a) RNA della telomerasi lega la sequenza telomerica e (b) vengono subito aggiunti tre nucleotidi di DNA, TTG, usando come stampo la molecola di RNA. La telomerasi, poi, scivola verso la fine della sequenza telomerica (c) in modo che le sue triplette AAC si appaiano con le triplette TTG neosintetizzate. (d) Il ciclo di allungamento continua.

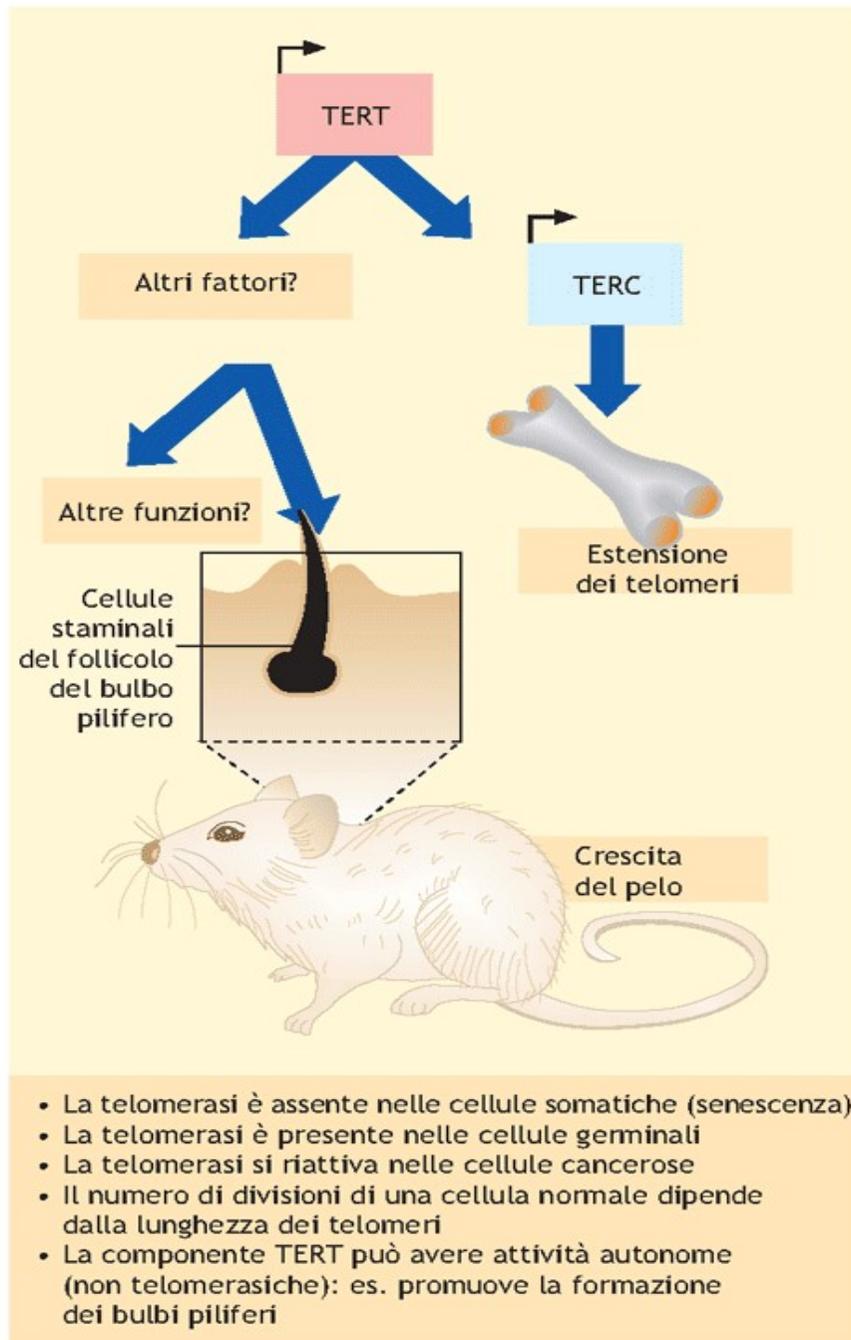


Figura 4.20 La telomerasi.

La lunghezza dei telomeri e la patologia cardiovascolare

R. Testa^a, L. La Sala^b, F. Olivieri^b

^aCentro Ricerche Metaboliche sul Diabete e gli Alimenti, INRCA, Ancona

^bDipartimento di Patologia Molecolare e Terapie Innovative, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Riassunto

L'interesse scientifico verso i telomeri e la loro lunghezza è notevolmente accresciuto negli ultimi tempi, in particolare per quanto riguarda la loro importanza nella patogenesi della patologia cardiovascolare e diabetica. I telomeri rappresentano le estremità terminali dei cromosomi. Essi sono formati da una ripetizione della sequenza TTAGGG e una delle loro funzioni principali è quella di essere "stabilizzatori" del cromosoma. In particolare il progressivo accorciamento dei telomeri, che avviene ad ogni replicazione cellulare, porta al fenomeno della senescenza cellulare. La telomerasi, un enzima in grado di impedire l'accorciamento dei telomeri, allunga di fatto la vita di una cellula. Recenti pubblicazioni, tra le quali anche lavori del nostro gruppo, hanno analizzato la lunghezza dei telomeri di cellule circolanti, evidenziando come pazienti con malattia coronarica hanno telomeri di lunghezza più corta rispetto ai soggetti con coronarie normali. Si è inoltre evidenziato come l'associazione fra telomeri più corti e malattia coronarica sia indipendente dai fattori di rischio classici o nuovi, inclusi i marcatori dell'infiammazione. È stato ipotizzato che la senescenza dei linfociti circolanti rispecchi la funzionalità delle cellule progenitrici. La diminuzione della lunghezza dei telomeri dei precursori staminali potrebbe limitare la capacità di riparazione dell'endotelio e quindi peggiorare l'andamento del processo aterosclerotico. Interessanti sono inoltre i dati recentissimi che associano la lunghezza dei telomeri alle complicanze micro e macroangiopatiche nella malattia diabetica.

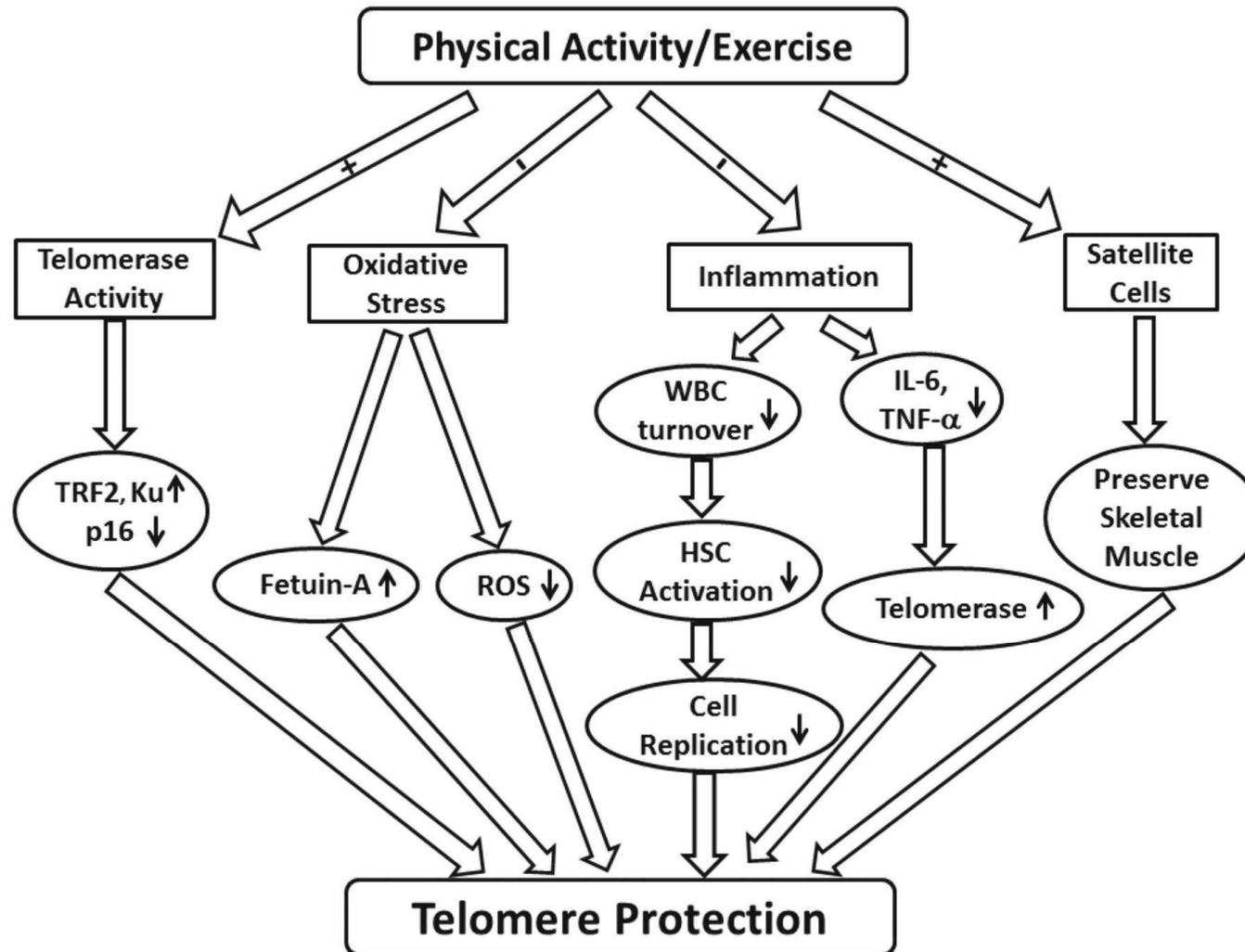
Summary

Telomeres and Cardiovascular Disease

In recent years, the role of telomere length in the pathogenesis of cardiovascular and diabetic diseases has attracted a continuously growing research interest. Telomeres, the tandem repeats of TTAGGG DNA sequence extending at the end of the eukaryotic chromosomes, undergo attrition during every cell division and their length is the best indicator of the replication potential of somatic cells. Cells are able to prevent this shortening by the activity of the ribonucleoprotein enzyme telomerase. Several lines of evidence support the hypothesis that gradual telomere attrition, which appears to be a normal part of aging, is accelerated in cells that are exposed to internal or external stressors, known to provoke increased cellular proliferation and high oxidative stress. Many epidemiological and clinical studies have found that a large host of human age-related diseases and related risk factors are associated with telomere attrition such as cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus.

Key-words: telomere length, cardiovascular disease, cellular senescence.

L'attività fisica può conferire protezione contro l'accorciamento della lunghezza dei telomeri

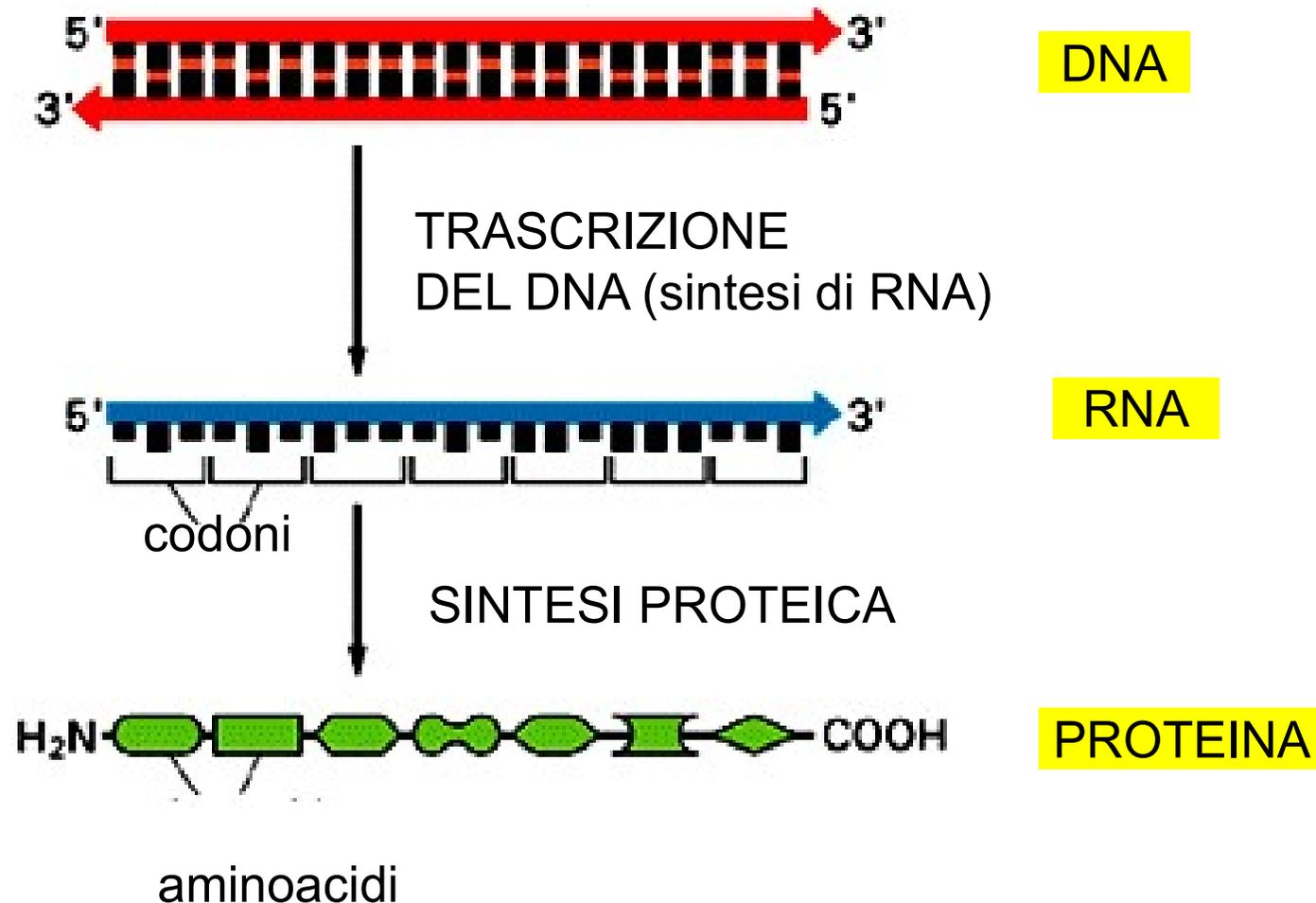


Nicole C. Arsenis et al. "Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action" Review, *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 27), pp: 45008-45019.

Trascrizione e maturazione degli RNA

Caratteristiche generali della trascrizione

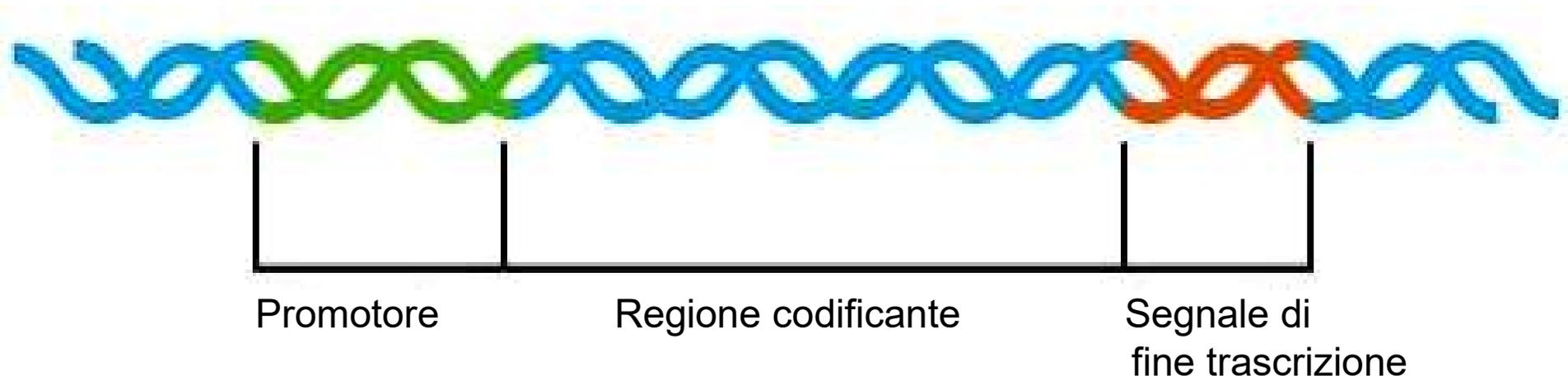
Il flusso dell'informazione genetica è da DNA a RNA a proteine. Tutte le cellule, dai batteri all'uomo, esprimono la loro informazione genetica in questo modo – un principio così fondamentale da essere chiamato il **dogma centrale** della biologia



Caratteristiche generali della trascrizione

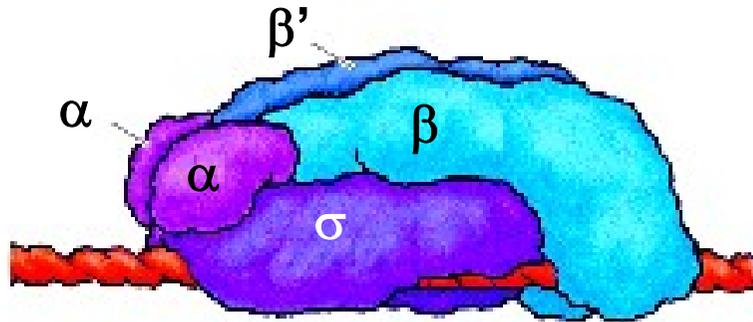
Il primo passaggio della lettura di una parte necessaria delle istruzioni genetiche di una cellula è quello di copiare una porzione particolare della sequenza nucleotidica del suo DNA – un gene – in una sequenza nucleotidica di RNA. L'informazione del DNA, anche se copiata in un'altra forma chimica, è ancora scritta essenzialmente nello stesso linguaggio del DNA – il linguaggio di una sequenza nucleotidica. Da cui il nome trascrizione.

In termini molecolari un **GENE** può essere definito come un segmento di DNA che viene espresso per ottenere un prodotto funzionale, corrispondente o ad una molecola di RNA (es. RNA ribosomiali o RNA transfer) o ad un polipeptide.

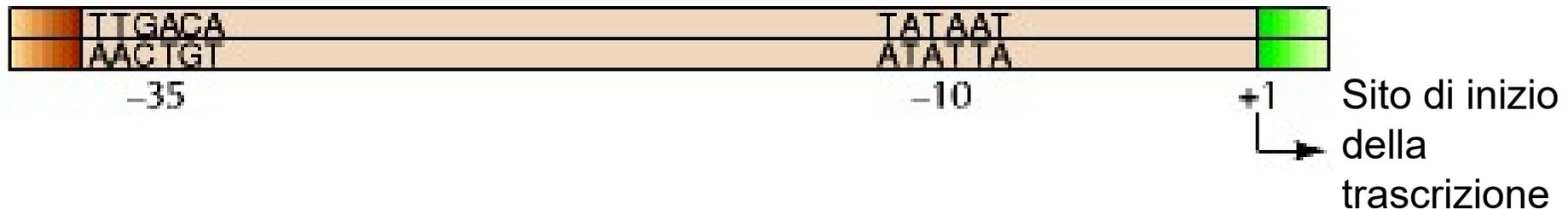


Trascrizione e maturazione degli RNA nei procarioti

RNA polimerasi:



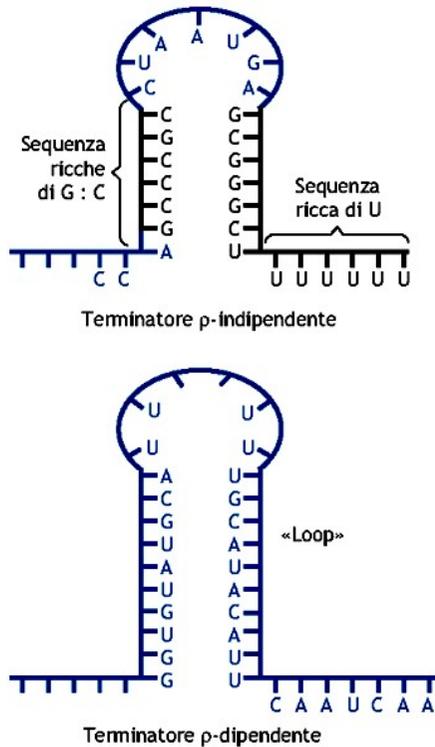
l'enzima completo consiste di 5 subunità: 2 α , 1 β , 1 β' e 1 σ . La subunità σ è attaccata in modo relativamente debole e può essere dissociata dalle altre subunità che costituiscono il nucleo della polimerasi



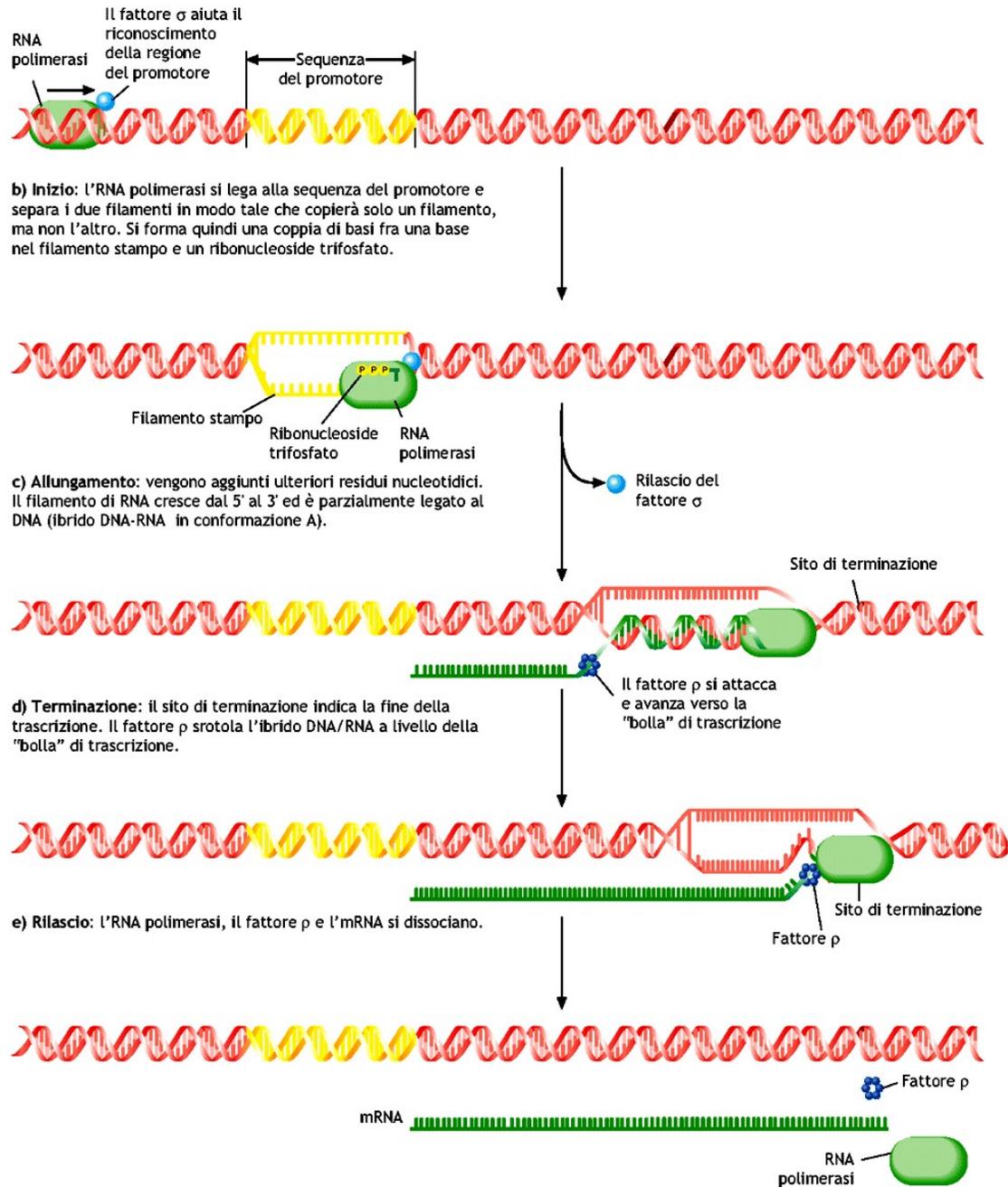
La sequenza di DNA a cui si lega la RNA polimerasi per iniziare la trascrizione di un gene si chiama **promotore**

Trascrizione e maturazione degli RNA

Nei procarioti



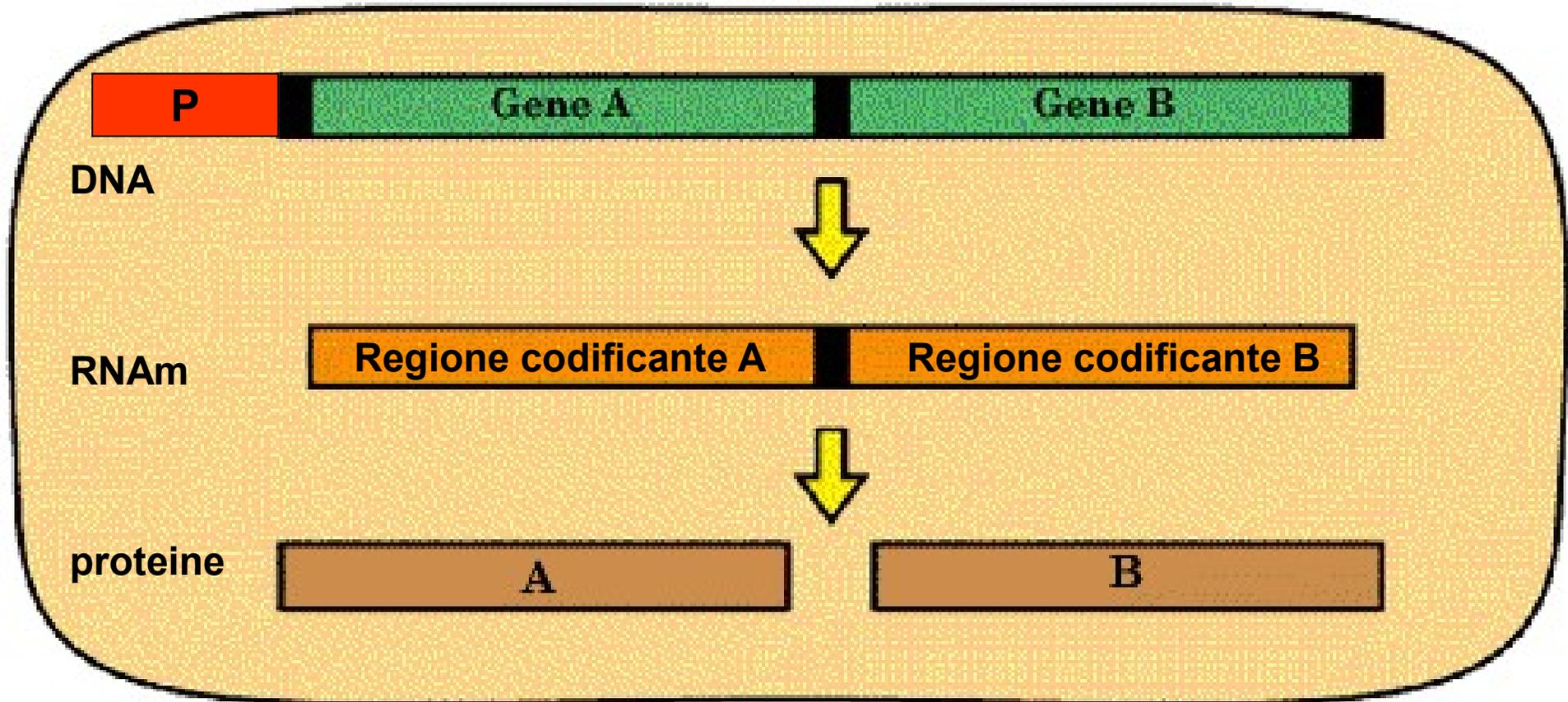
■ **Figura 4.28** La terminazione della trascrizione mediante formazione di loop nelle molecole di mRNA.



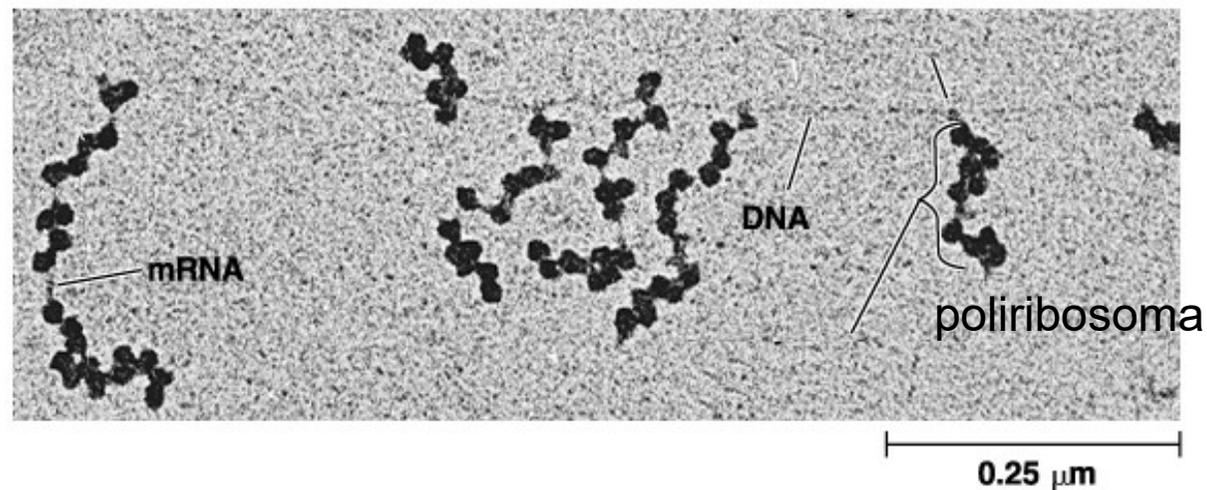
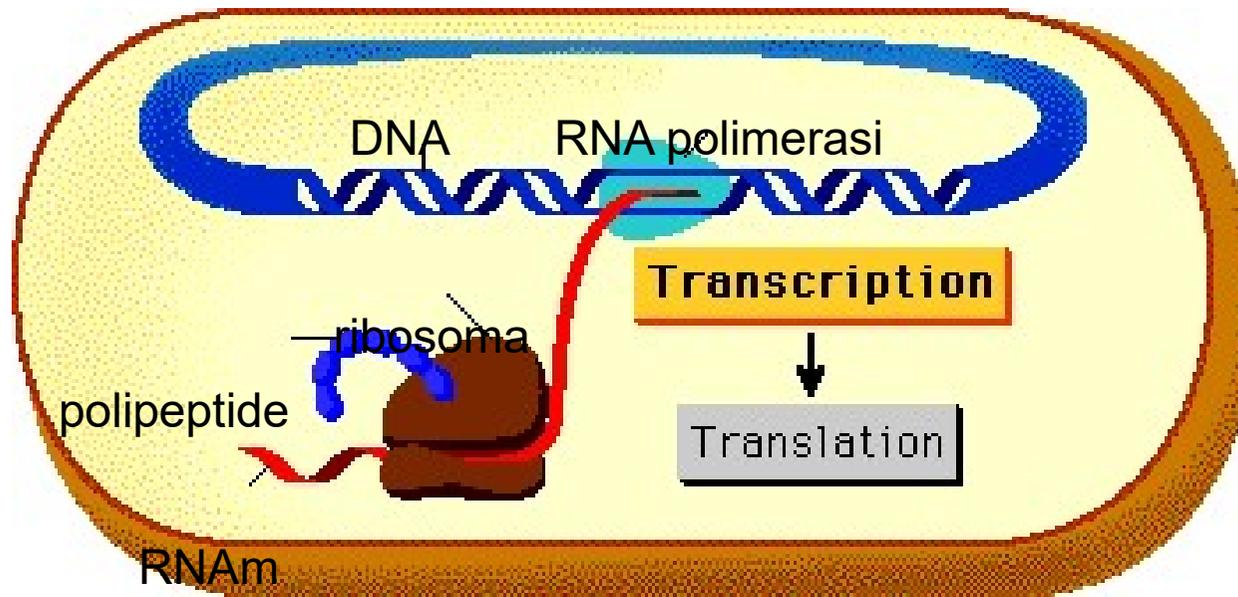
■ **Figura 4.27** La trascrizione nei batteri.

L'RNAm dei procarioti è policistronico

Nei procarioti più geni si trovano sotto il controllo di un unico promotore a formare i cosiddetti operoni. Questi geni, in genere, codificano proteine necessarie in una specifica via metabolica come la biosintesi di un amminoacido o il catabolismo del glucosio. Ne consegue che l'RNAm trascritto da un operone procariotico è policistronico cioè codifica più proteine da un singolo trascritto.



La trascrizione nei procarioti

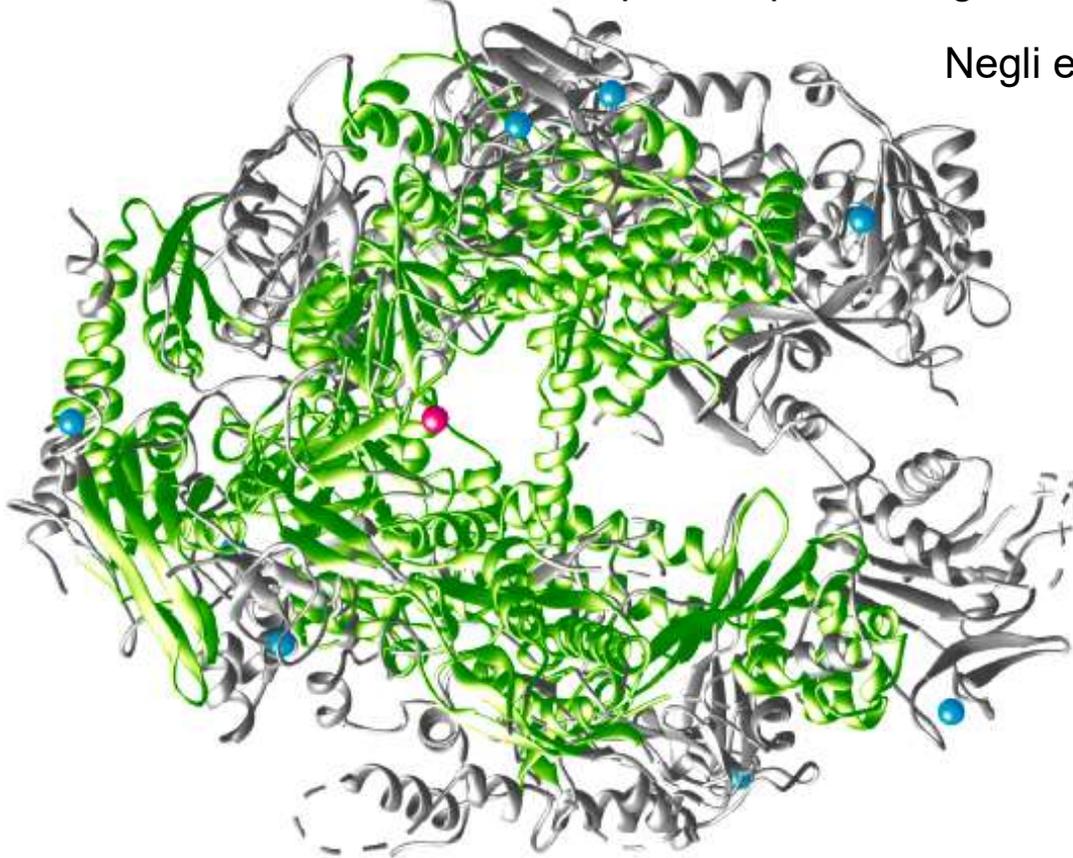


Ogni segmento codificante di un mRNA policistronico è tradotto in modo indipendente perché ogni porzione possiede il suo SITO DI LEGAME PER IL RIBOSOMA, il proprio CODONE DI INIZIO e il proprio CODONE DI TERMINAZIONE.

Trascrizione e maturazione degli RNA

Negli eucarioti

Sebbene il meccanismo della trascrizione del DNA sia simile nei procarioti e negli eucarioti, il macchinario è considerevolmente più complesso negli eucarioti.



Negli eucarioti ci sono tre tipi di RNA polimerasi:

- 1. RNA polimerasi I:**
sintetizza i grossi RNA ribosomali (28S, 18S, 5,8S).
- 2. RNA polimerasi II:**
trascrive i geni il cui RNA verrà tradotto in proteine, geni di snoRNA e alcuni geni di snRNA.
- 3. RNA polimerasi III:**
sintetizza una varietà di RNA piccoli e stabili come l'RNA ribosomale 5S, gli RNA transfer e alcuni geni di snRNA.

Una distinzione importante tra la RNA polimerasi batterica e la RNA polimerasi II degli eucarioti è che (1) l'enzima eucariotico per iniziare la trascrizione necessita di **proteine di inizio** che devono legarsi al promotore prima che si possa legare l'enzima.

(2) L'inizio della trascrizione eucariotica deve tenere conto del compattamento del DNA nei nucleosomi e in forme di ordine superiore di struttura della cromatina, caratteristiche assenti nei cromosomi dei batteri.

RNA : molteplici funzioni

- mRNA
- tRNA
- rRNA

- **TERC** (telomerase RNA component)
- **snRNA** (small nuclear RNA componenti degli SNURP). Coinvolti nello splicing
- **snoRNA** (small nucleolar RNA) coinvolti nella maturazione dell'rRNA
- **scRNA** (small cytoplasmic RNA) componente di SRP, coinvolto nello smistamento delle proteine
- **siRNA** (small interfering RNA- 20 25 nt derivanti da lunghe molecole di RNA a doppio filamento)
- **miRNA** (microRNA (20-25 nt) trascritti da geni specifici che controllano l'espressione di 1/3 dei geni umani
- **Longer non coding RNA-** numero variabile di nucleotidi da 70 a qualche migliaio. La cui attività è ancora sconosciuta

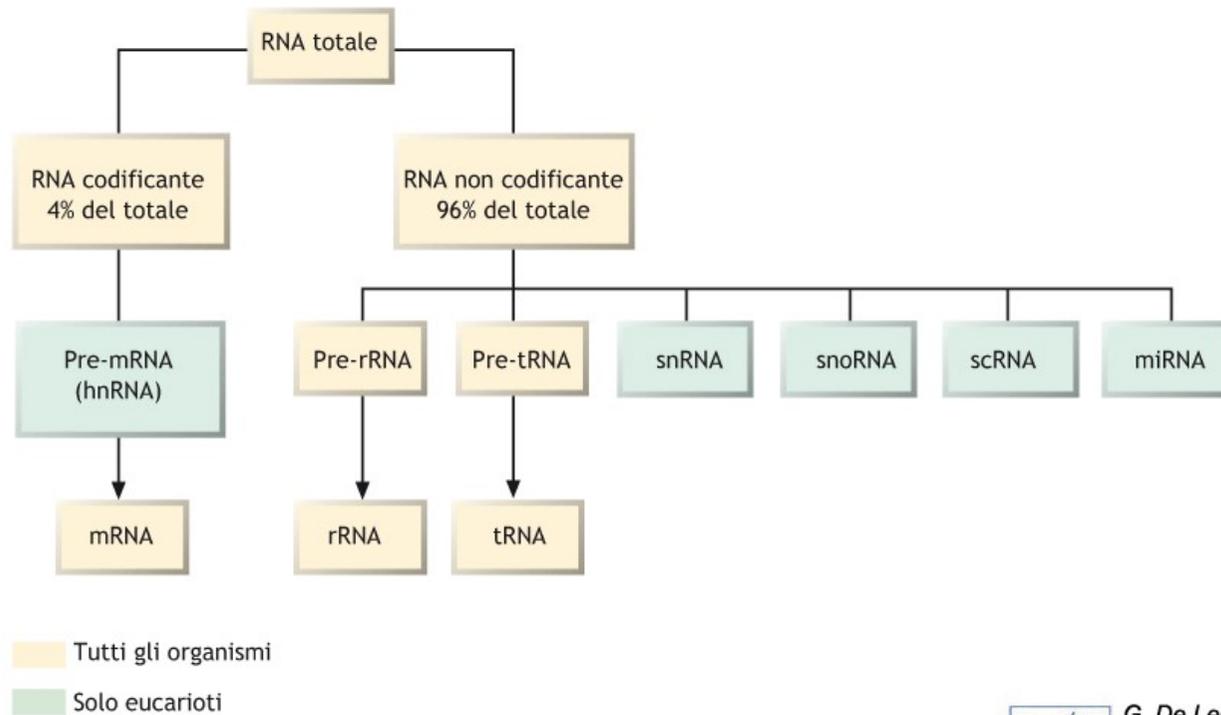


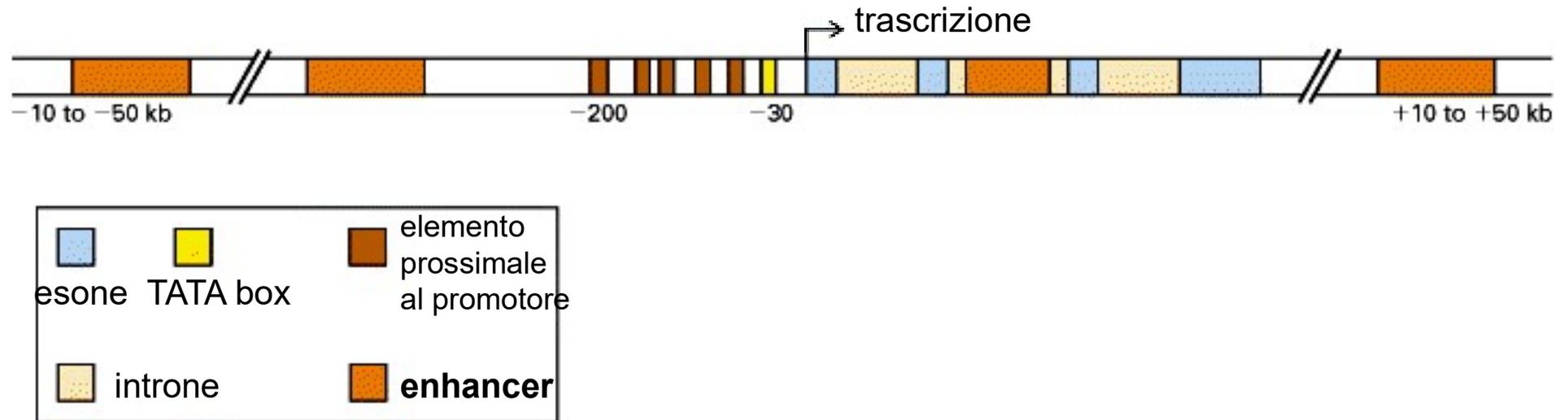
Figura 4.66 Trascrittoma: solo il 4% dei trascritti è tradotto.

Trascrizione e maturazione degli RNA

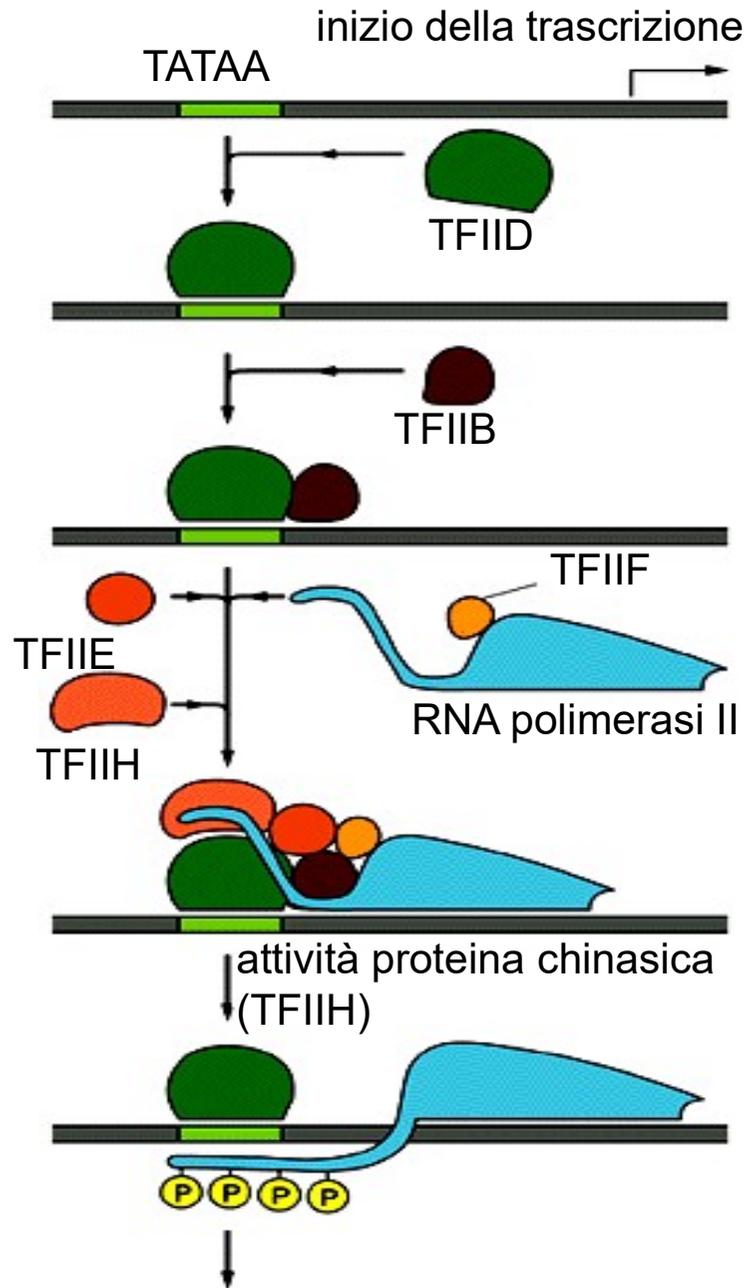
Negli eucarioti



Promotore eucariotico. Il promotore del gene della timidina chinasi di herpes simplex virus (HSV) contiene 3 sequenze a monte del TATA box che sono necessari per una efficiente trascrizione: 1 CCAAT box and 2 GC boxes (sequenze consenso GGGCGG).



LA TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI



LA TRASCRIZIONE INIZIA

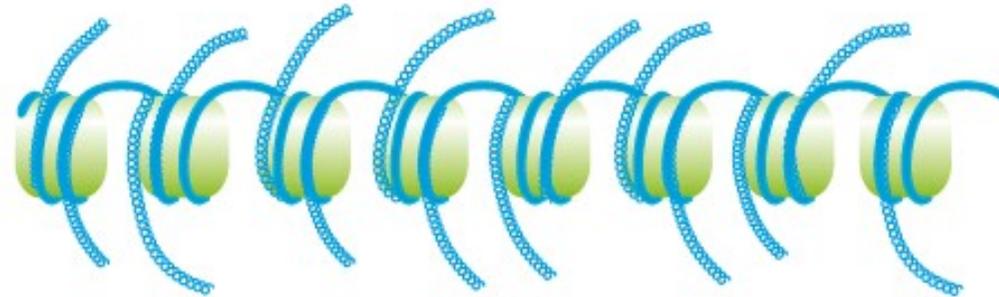
L'RNA polimerasi II richiede i fattori generali di trascrizione Le proteine sono "generali" perché si assemblano su tutti i promotori usati dall'RNA polimerasi II.

- (1) Aiutano a posizionare l'RNA polimerasi correttamente sul promotore;
- (2) aiutano a separare i due filamenti di DNA per permettere l'inizio della trascrizione e rilasciano l'RNA polimerasi dal promotore nella modalità di allungamento una volta che la trascrizione è cominciata.

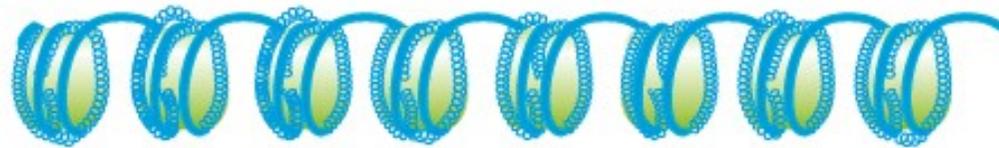
Come la RNA polimerasi batterica, la polimerasi II rimane nel promotore, fino a che subisce un cambiamento conformazionale e viene rilasciata per iniziare a trascrivere un gene. Un passaggio chiave in questo rilascio è l'aggiunta di gruppi fosfato alla "coda" della RNA polimerasi (nota come CTD o dominio C-terminale). Questa fosforilazione è catalizzata anche da TFIIH, che, oltre ad un'elicasi, contiene come subunità una proteina chinasi. La polimerasi può allora staccarsi dal gruppo dei fattori generali di trascrizione, subendo una serie di cambiamenti conformazionali che rafforzano la sua interazione con il DNA e acquisendo nuove proteine che le permettono di trascrivere per lunghe distanze senza dissociarsi.

PROBLEMA NELLA TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI:

DNA è complessato a proteine



a) Cromatina acetilata: attiva nella trascrizione



b) Cromatina deacetilata: la trascrizione è repressa

Figura 4.35 Ruolo dell'acetilazione e deacetilazione nell'attivare o reprimere la trascrizione.

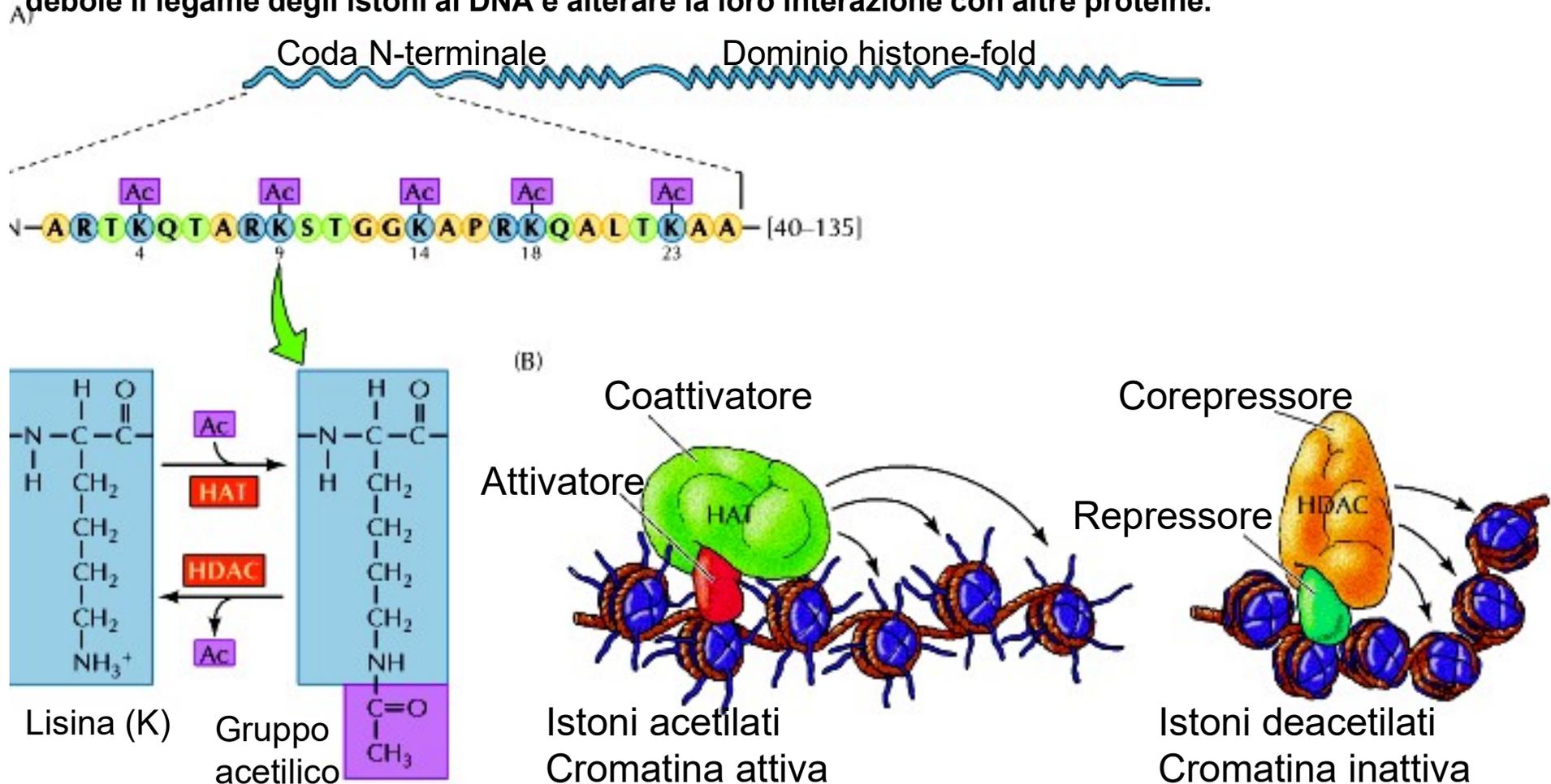


G. De Leo, S. Fasano, E. Ginelli
Biologia e Genetica III Ed.

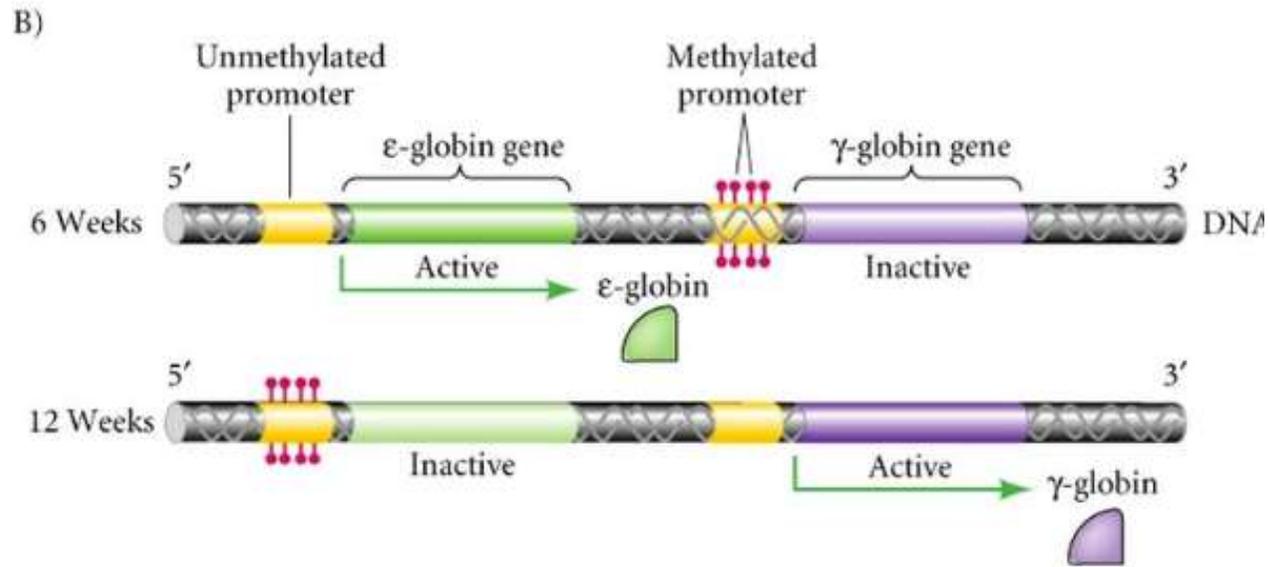
EdiSES

REGOLAZIONE ESPRESSIONE GENICA: ACETILAZIONE ISTONI

Molte modificazioni sono caratteristiche della cromatina trascrizionalmente attiva, incluse le modificazioni degli istoni e i riarrangiamenti dei nucleosomi. L'**acetilazione** degli istoni è stata collegata alla cromatina **trascrizionalmente attiva** in un largo numero di tipi cellulari. (A) Gli istoni del core (H2A, H2B, H3, H4) hanno domini histone fold, che interagiscono con gli istoni e il DNA del nucleosoma. Le code N-terminali degli istoni del core sono modificate attraverso l'aggiunta di gruppi acetilici (ac) alle catene laterali di specifici residui di lisina. (B) gli attivatori e repressori trascrizionali sono associati con co-attivatori e co-repressori, che possiedono attività iston-acetiltransferasica (HAT) e iston-deacetilasi, rispettivamente. L'acetilazione degli istoni è caratteristica della cromatina attivamente trascritta e potrebbe rendere più debole il legame degli istoni al DNA e alterare la loro interazione con altre proteine.

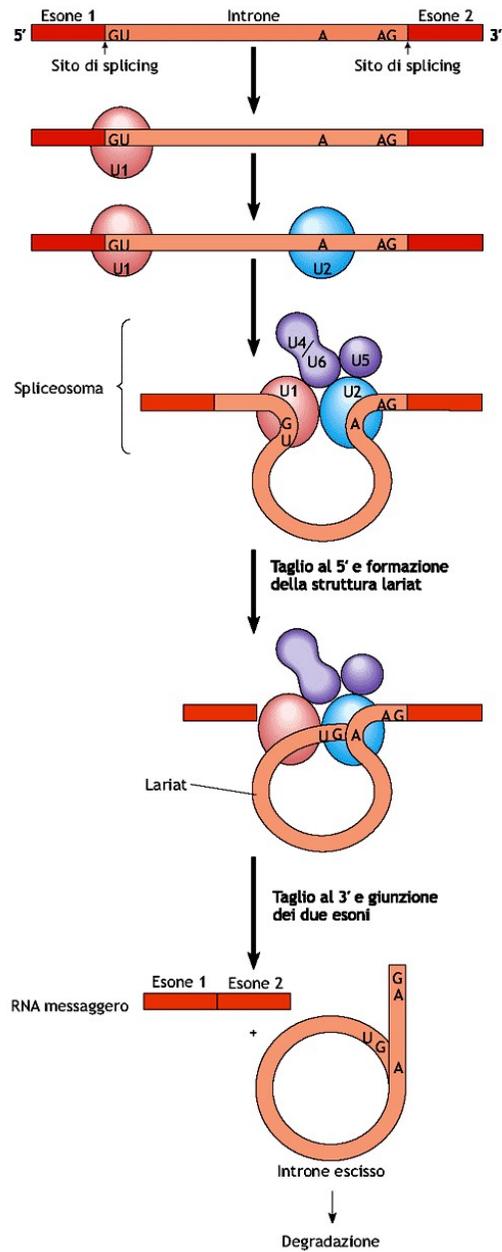


REGOLAZIONE ESPRESSIONE GENICA: La metilazione delle citosine del DNA



La metilazione delle citosine del DNA del promotore blocca la trascrizione

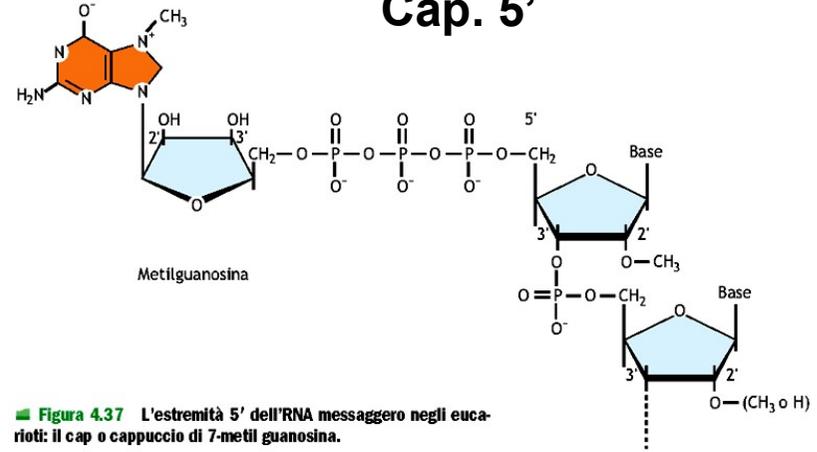
Maturazione degli mRNA negli eucarioti



Splicing

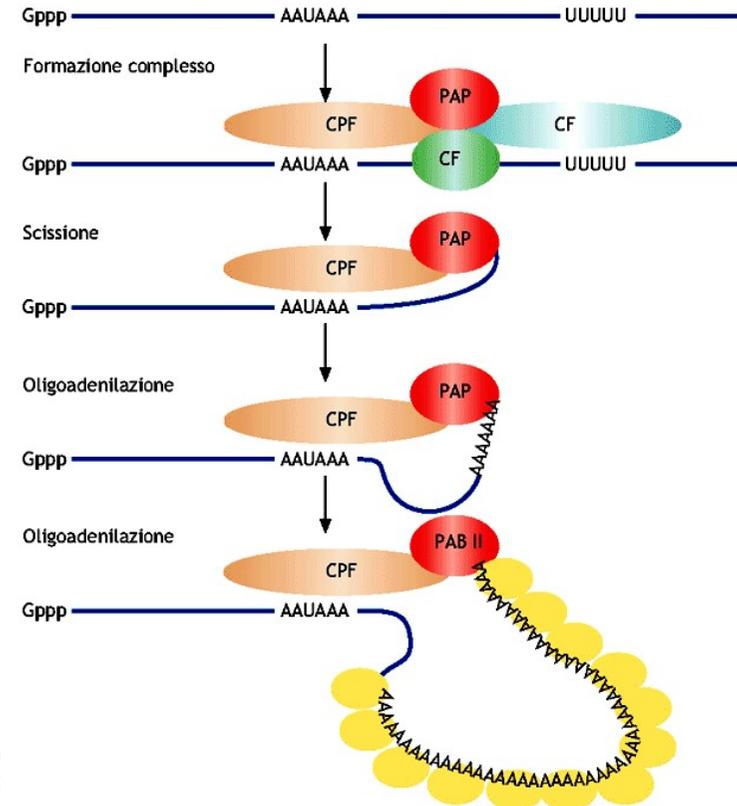
■ **Figura 4.39** Processo di splicing. Formazione e funzionamento dello spliceosoma.

Cap. 5'



■ **Figura 4.37** L'estremità 5' dell'RNA messaggero negli eucarioti: il cap o cappuccio di 7-metil guanosina.

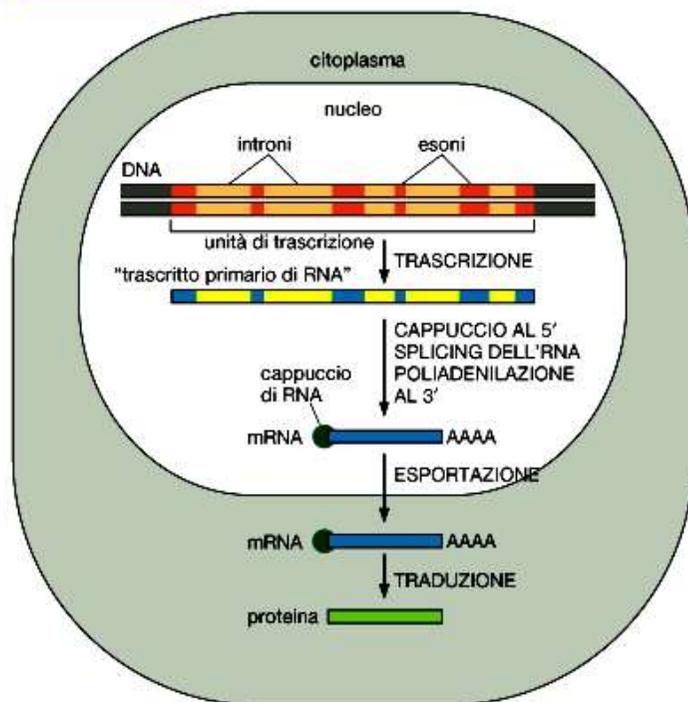
Poliadenilazione 3'



L'allungamento della trascrizione negli eucarioti è strettamente accoppiato alla modificazione dell'RNA

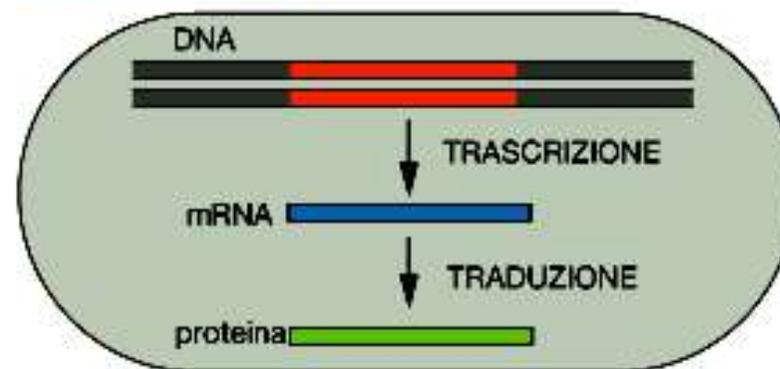
- Le modificazioni al 5' e 3' permettono alla cellula di stabilire se sono presenti entrambe le estremità di una molecola di RNA (e perciò se il messaggero è intatto) prima di esportare l'RNA dal nucleo per tradurlo in proteina.
- Il cappuccio media il legame con i ribosomi quindi è necessario per la traduzione
- Lo splicing dell'RNA fornisce agli eucarioti superiori la capacità di sintetizzare parecchie proteine diverse dallo stesso gene.

(A) EUCARIOTI



Negli eucarioti

(B) PROCARIOTI



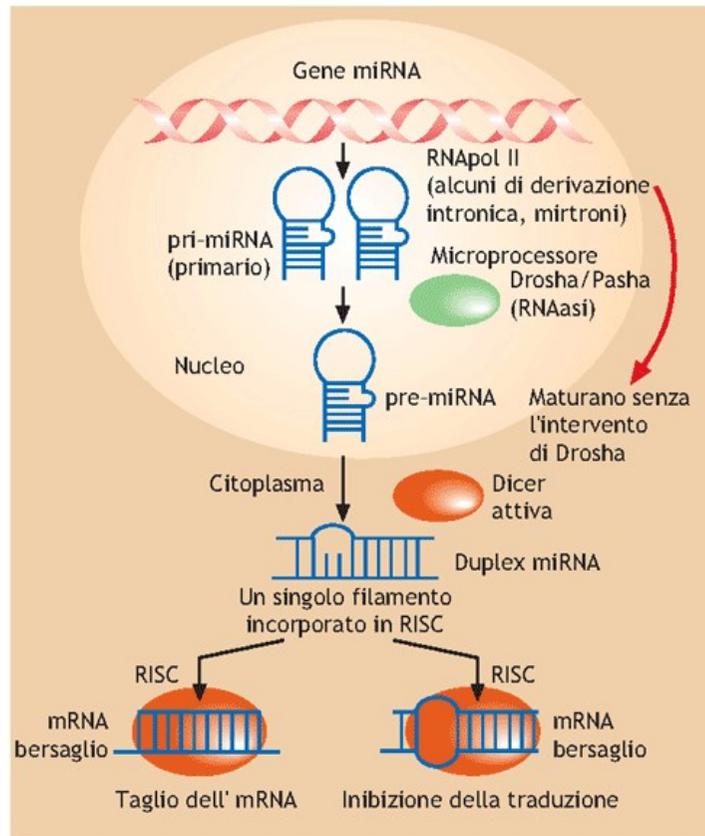


***“microRNAs in the
Genesis
of Human Cancers”
Carlo M. Croce, M.D***

La mancata espressione di un miRNA può portare a stati patologici attraverso la disregolazione dei livelli fisiologici di una certa proteina

Un approccio terapeutico quindi è quello di somministrare il microRNA assente

microRNA importanti regolatori dell'espressione genica



RISC: RNA-induced silencing complex

Figura 4.81 Micro(mi)RNA e silenziamento genico.

Traduzione: dall'RNA alle proteine

Il codice genetico stabilisce la corrispondenza fra sequenza di nucleotidi nell'RNA e la sequenza di aa nelle proteine

Caratteristiche del codice genetico

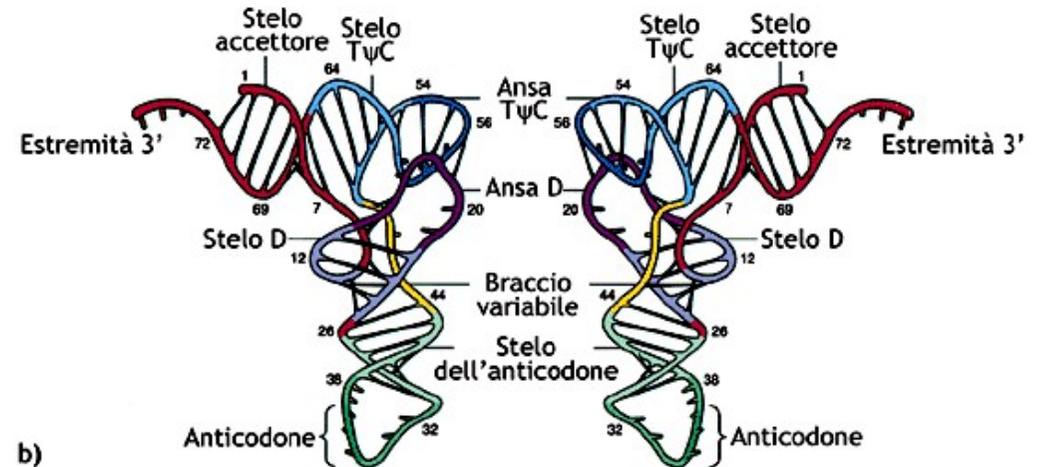
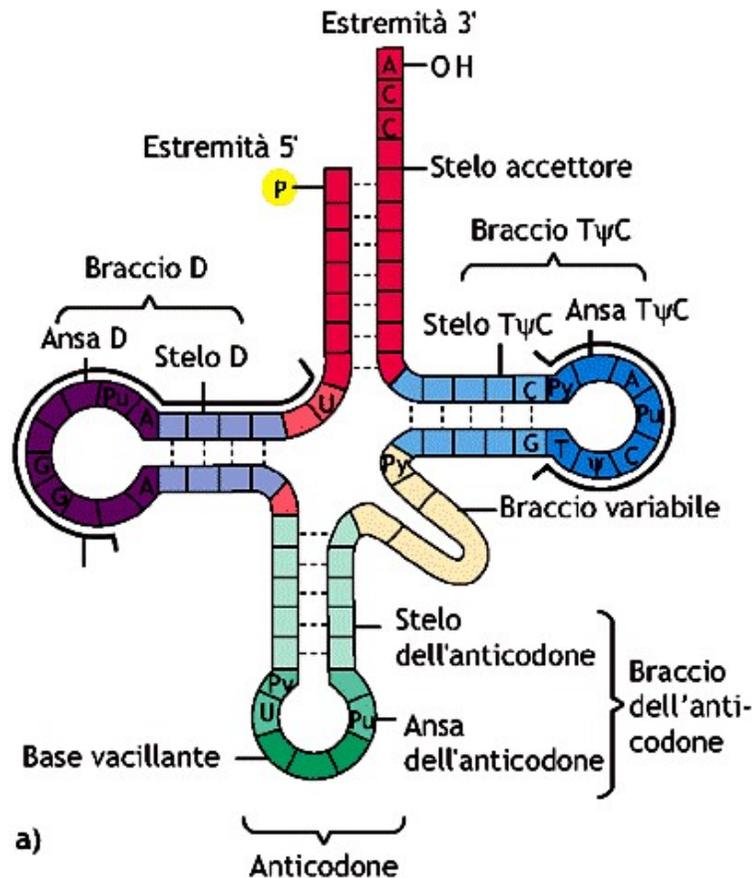
- Triplette
- Continuo
- Degenerare
- Universale

AUG = metionina
UAA = sempre stop
UAG = stop o pirrolisina
UGA = stop o selenocisteina

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

■ **Figura 4.46** Corrispondenza tra codoni ed amminoacidi.

IL tRNA ABBINA IL CODONE AL SUO AMMINOACIDO CORRISPONDENTE

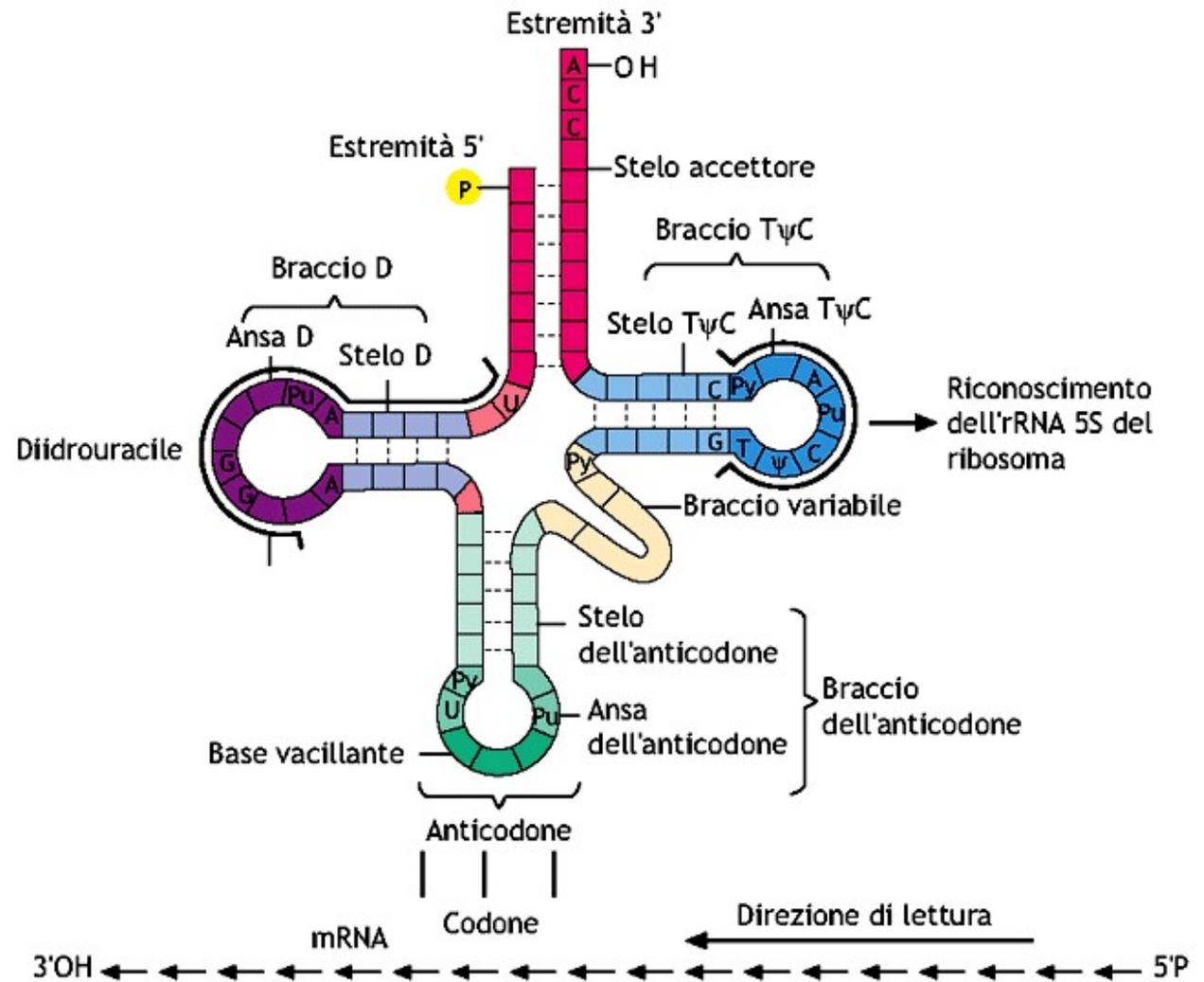


■ **Figura 4.54** (a) Struttura del tRNA detta "a trifoglio". (b) Ricostruzione della struttura tridimensionale di due tRNA.

- **Sito accettore lega aa**
- Ansa TC legame RNA 5S ribosomi stabilizza legame codone anticodone
- Braccio variabile
- **Anticodone**

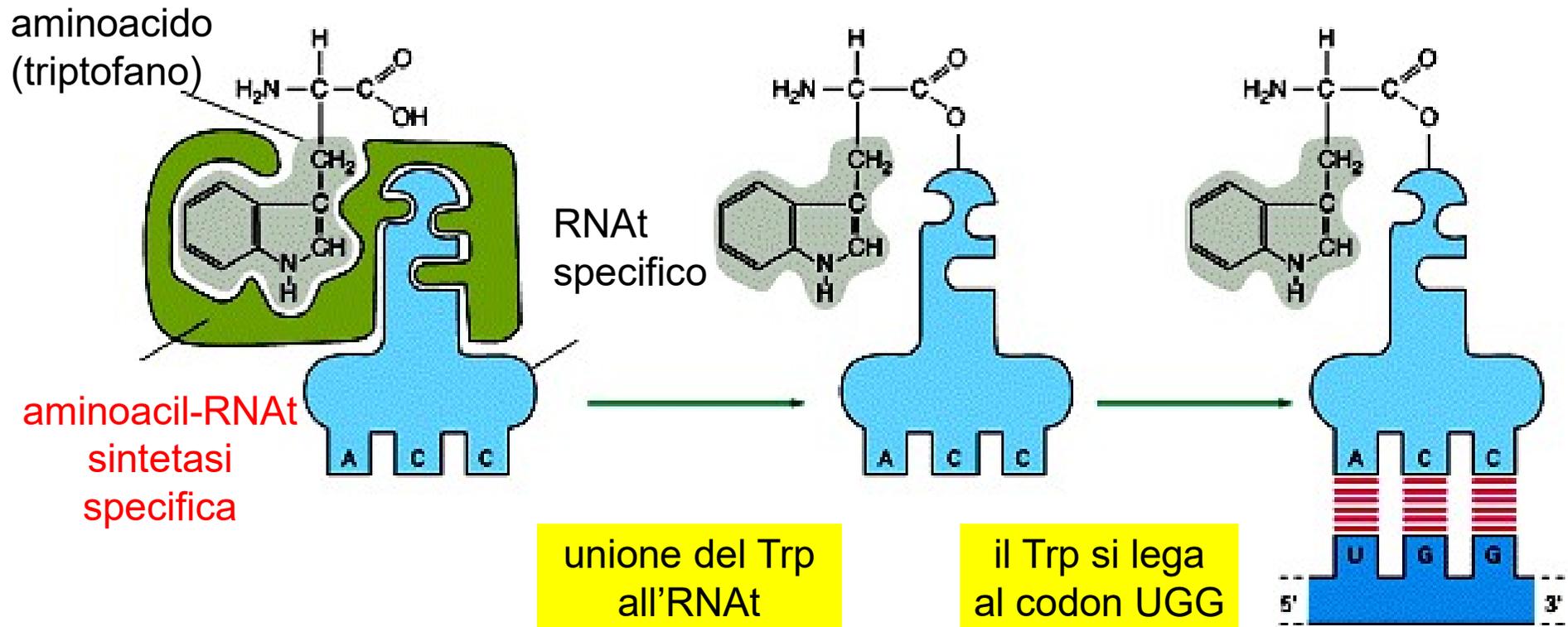
APPAIAMENTO TRA tRNA e mRNA segue la regola dell'appaiamento tra basi complementari tra filamenti antiparalleli

Figura 4.55 Riconoscimento codice/anticodone ed orientamento delle molecole di mRNA.



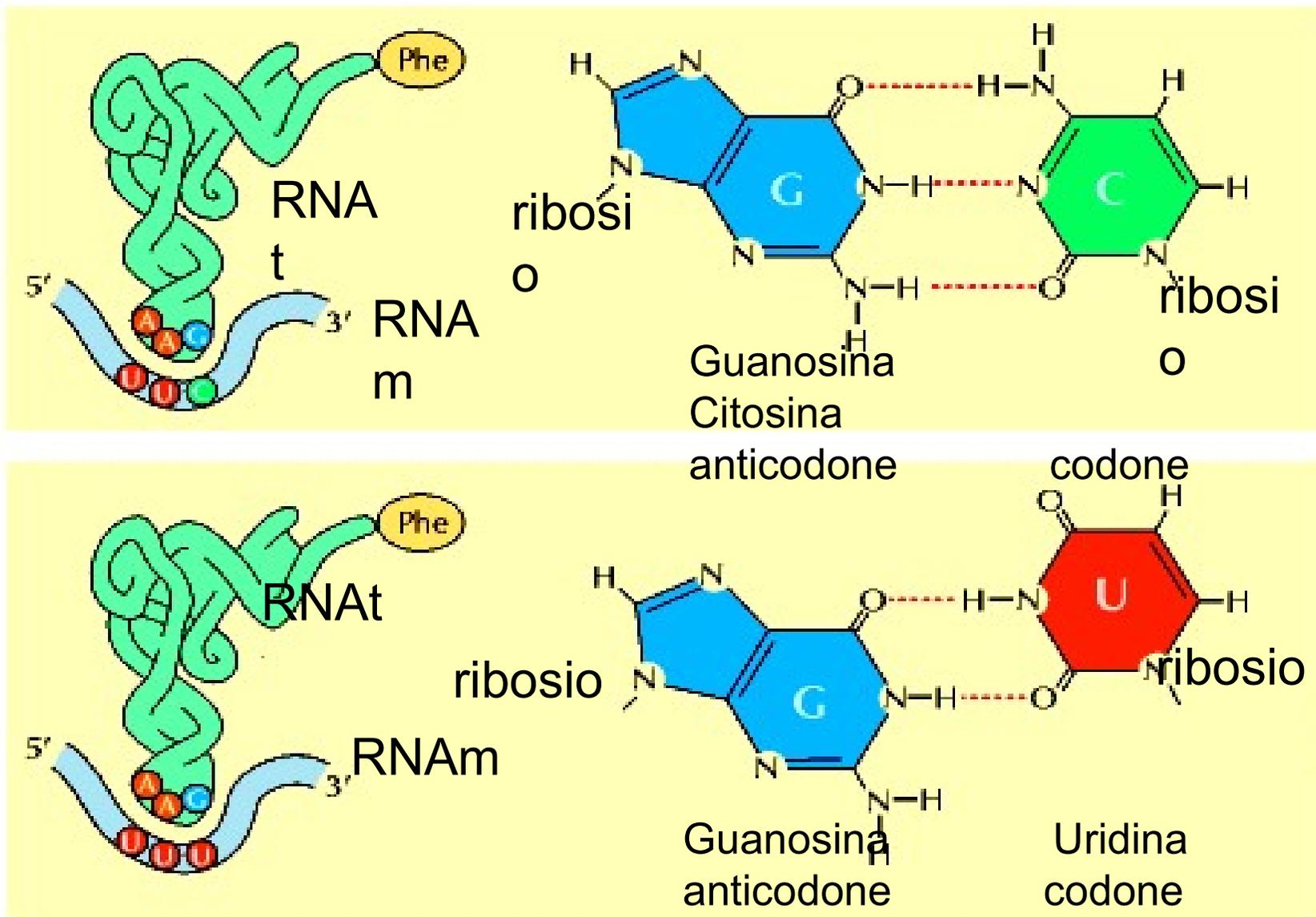
Traduzione nei procarioti

1) Fase ATP dipendente: legame dell'amminoacido al suo tRNA (attivazione dell'amminoacido) ad opera di un enzima.



Appaiamento standard e non tra codone e anticodone

Appaiamento non standard del fenilalanina RNAt: formazione di coppie di basi G-U



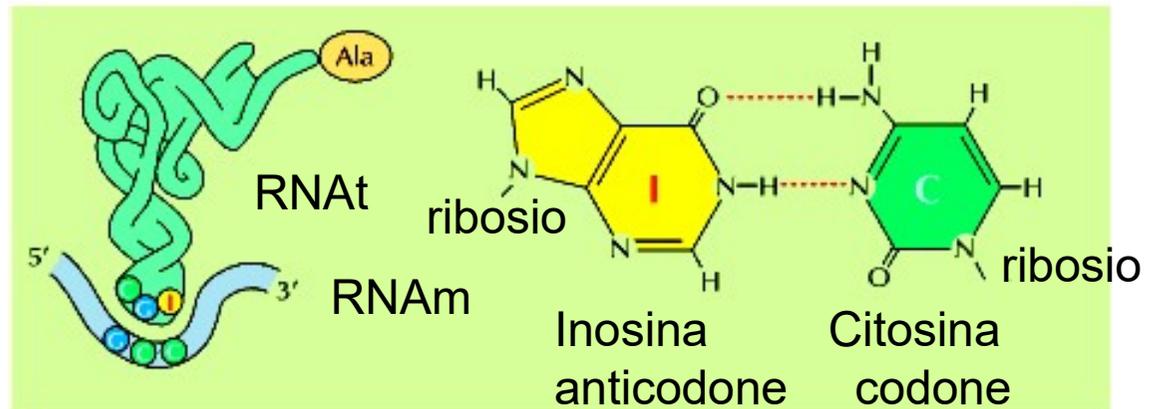
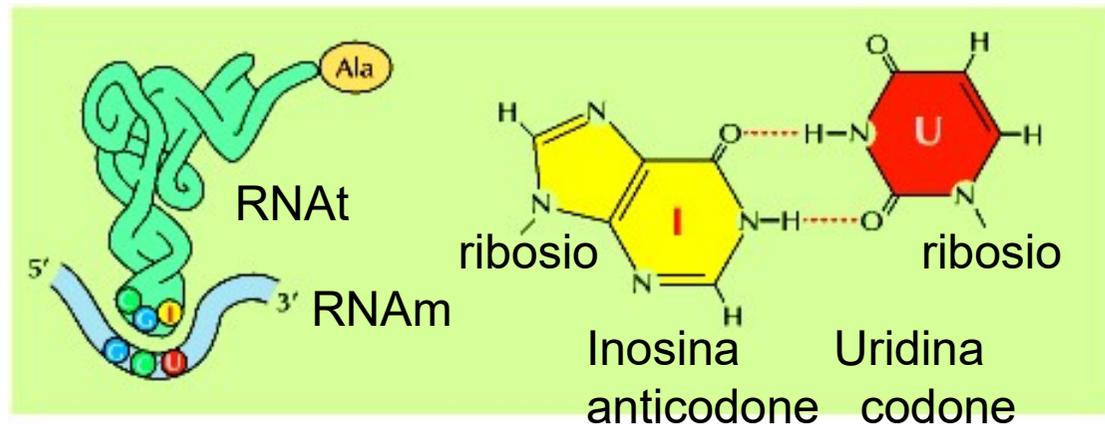
Appaiamento non standard tra codone e anticodone

Appaiamento non standard dell'alanina tRNA

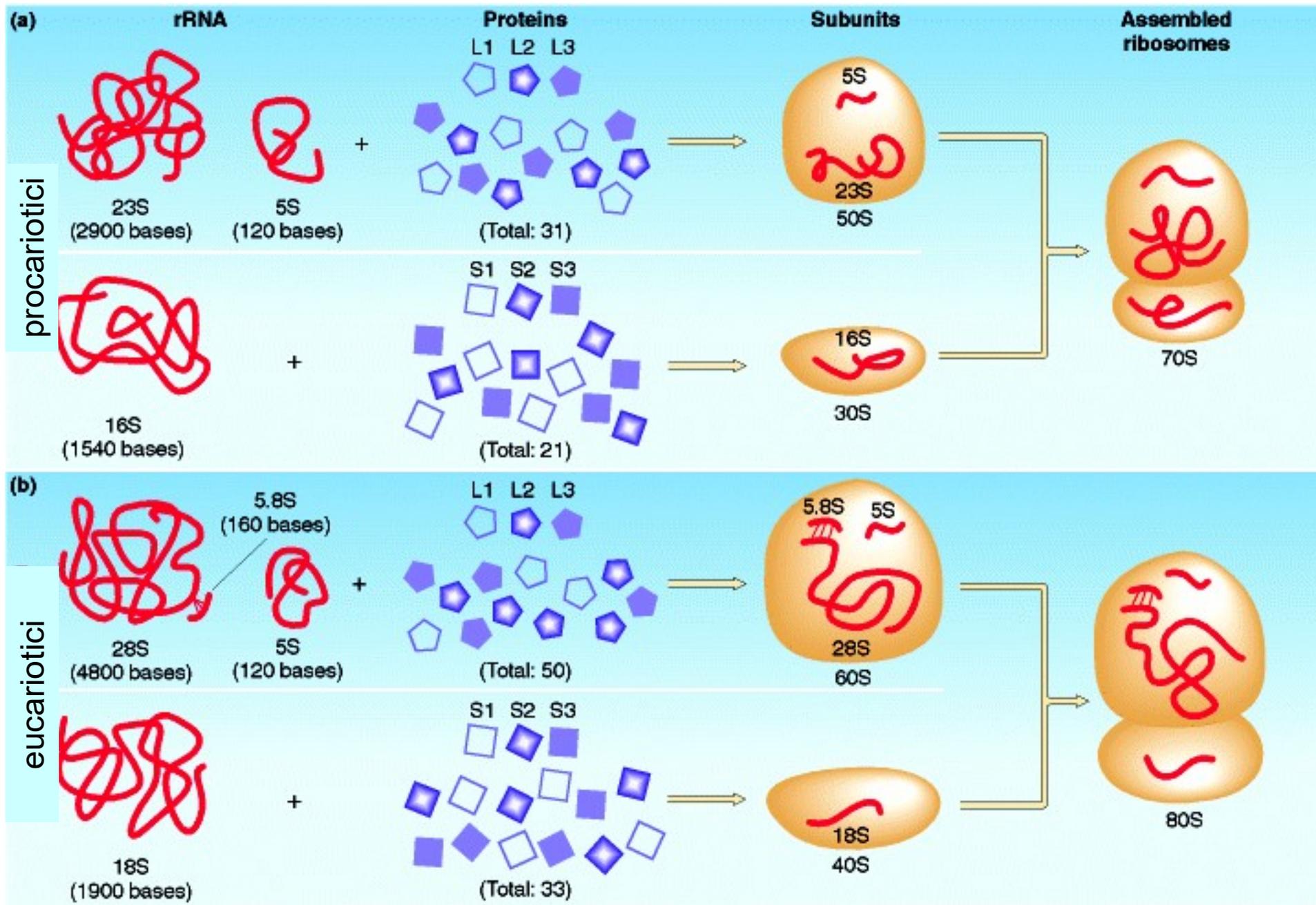
• **Modificazione della guanosina in inosina degli anticodoni di parecchi tRNA durante la maturazione.**

• **L'inosina può appaiarsi con C, U o A nella terza posizione, così che il suo utilizzo nell'anticodone permette ad un singolo tRNA di riconoscere tre diversi codoni negli stampi di mRNA.**

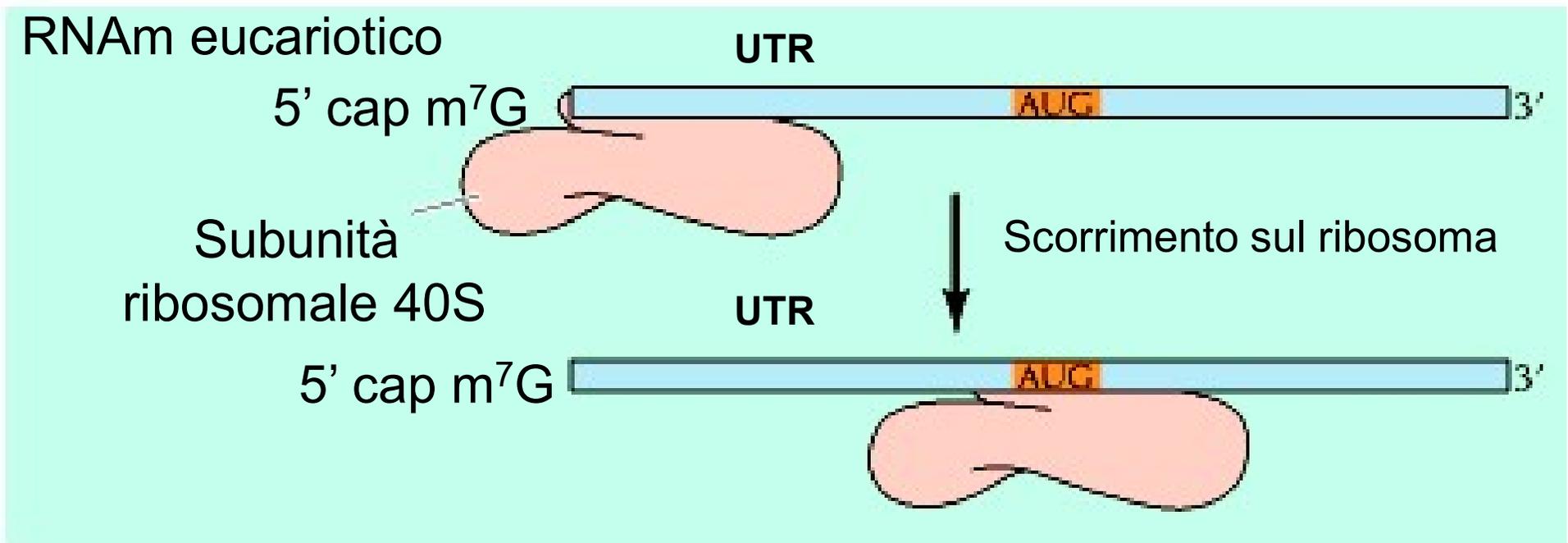
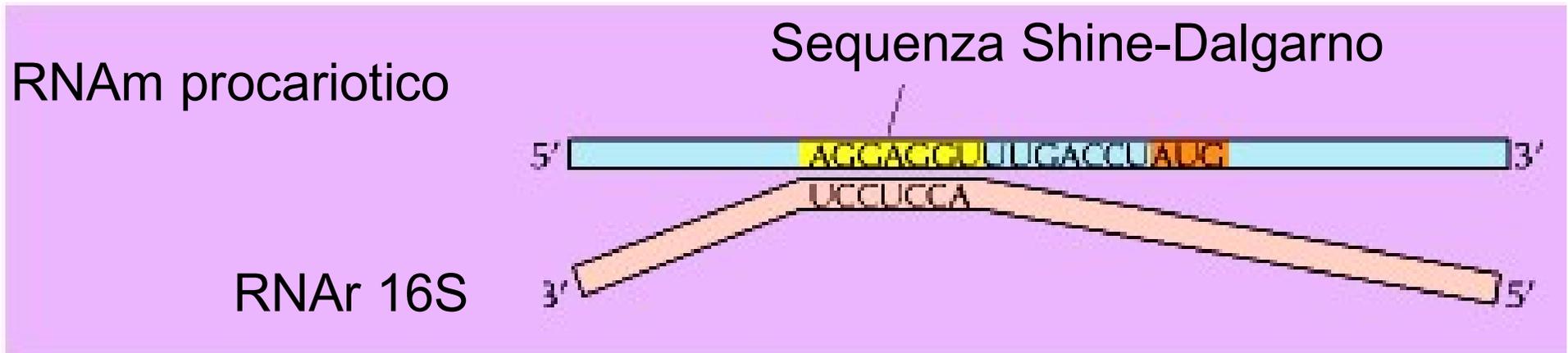
Inosina = ipoxantina + ribosio
Ipoxantina deriva dall'adenosina



I RIBOSOMI SONO NECESSARI PER TRADURRE UN mRNA CON RAPIDITA' E PRECISIONE



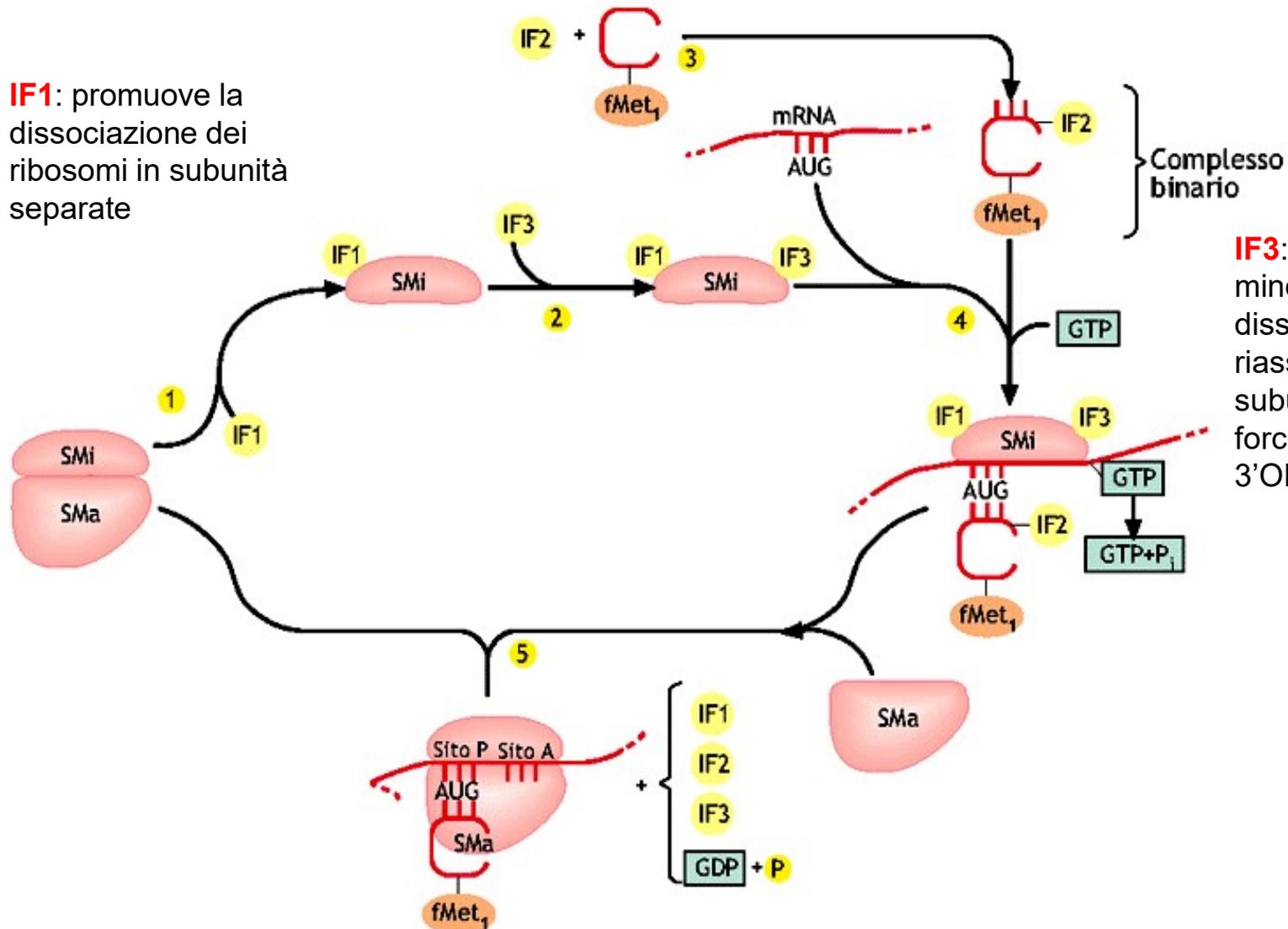
2= Allineamento dell' RNAm alla subunità minore dei ribosomi



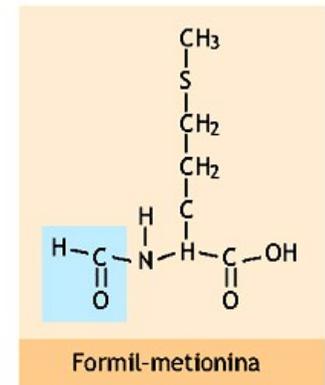
2. Fase GTP dipendente: Inizio

IF1: promuove la dissociazione dei ribosomi in subunità separate

IF2: lega fMet-tRNA e lo porta alla sub minore del ribosoma; idrolizza GTP

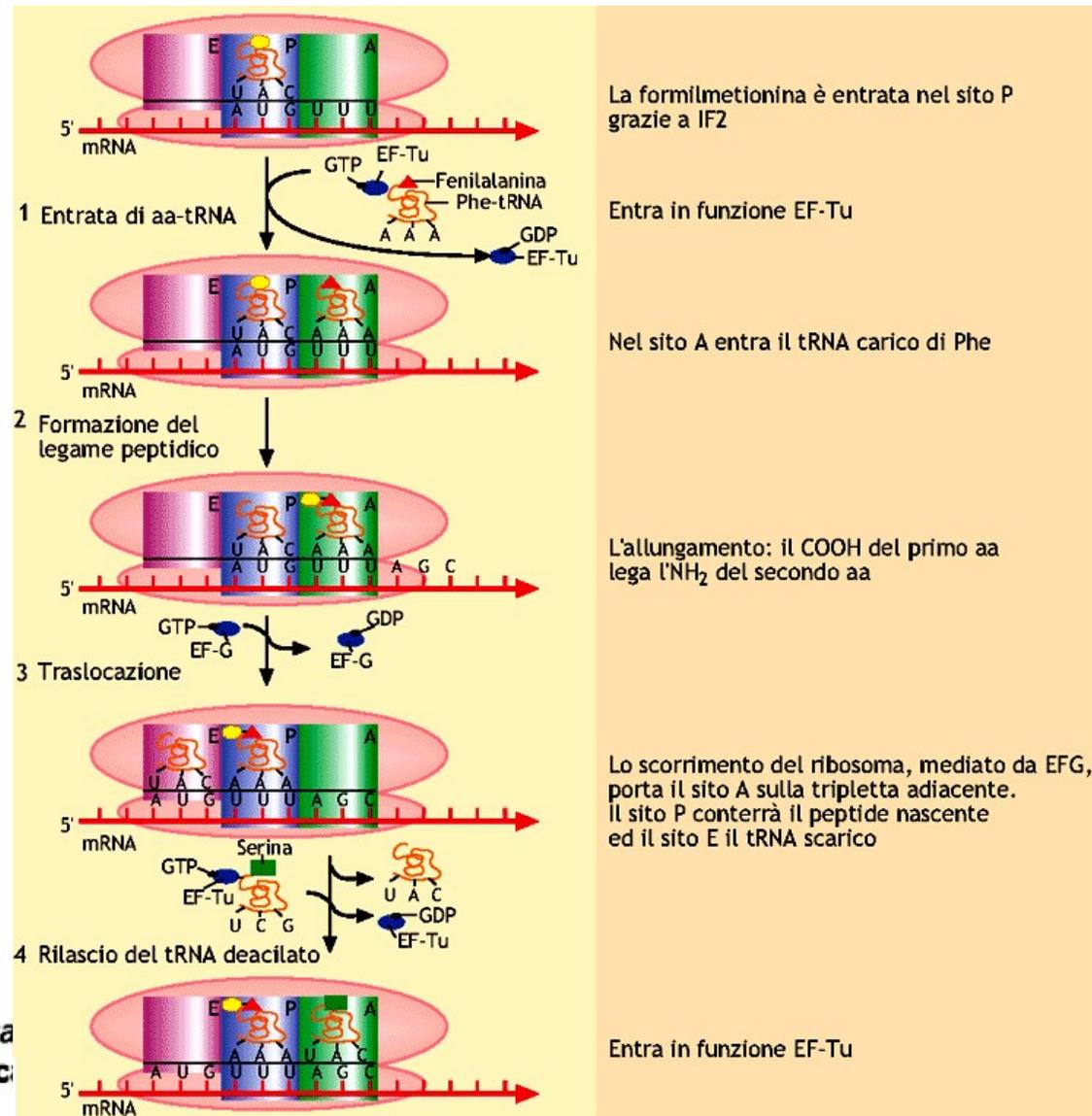


IF3: stabilizza la sub minore nella forma dissociata; previene la riassociazione delle 2 subunità; denatura la forcina terminale 3'OH dell'rRNA 16S



Formula della formilmetionina.

3) Fasi GTP dipendenti: Riconoscimento del primo codone AUG interazione con la subunità maggiore e allungamento



La formilmetionina è entrata nel sito P grazie a IF2

Entra in funzione EF-Tu

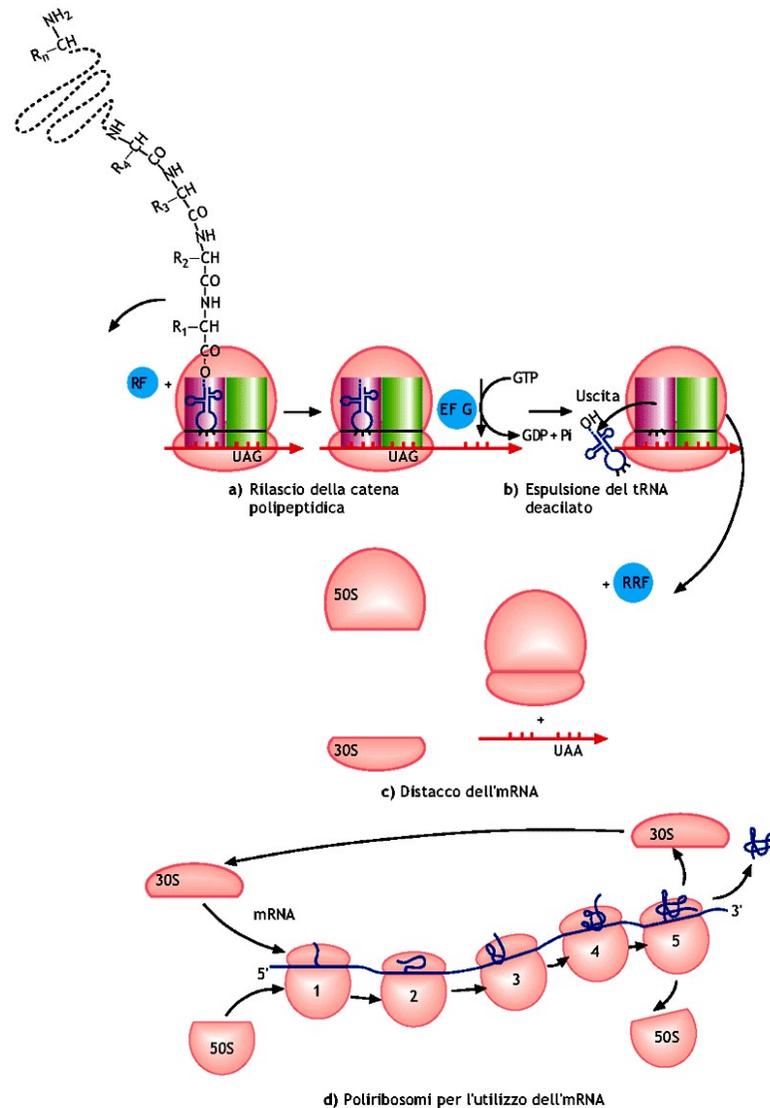
Nel sito A entra il tRNA carico di Phe

L'allungamento: il COOH del primo aa lega l'NH₂ del secondo aa

Lo scorrimento del ribosoma, mediato da EFG, porta il sito A sulla tripletta adiacente. Il sito P conterrà il peptide nascente ed il sito E il tRNA scarico

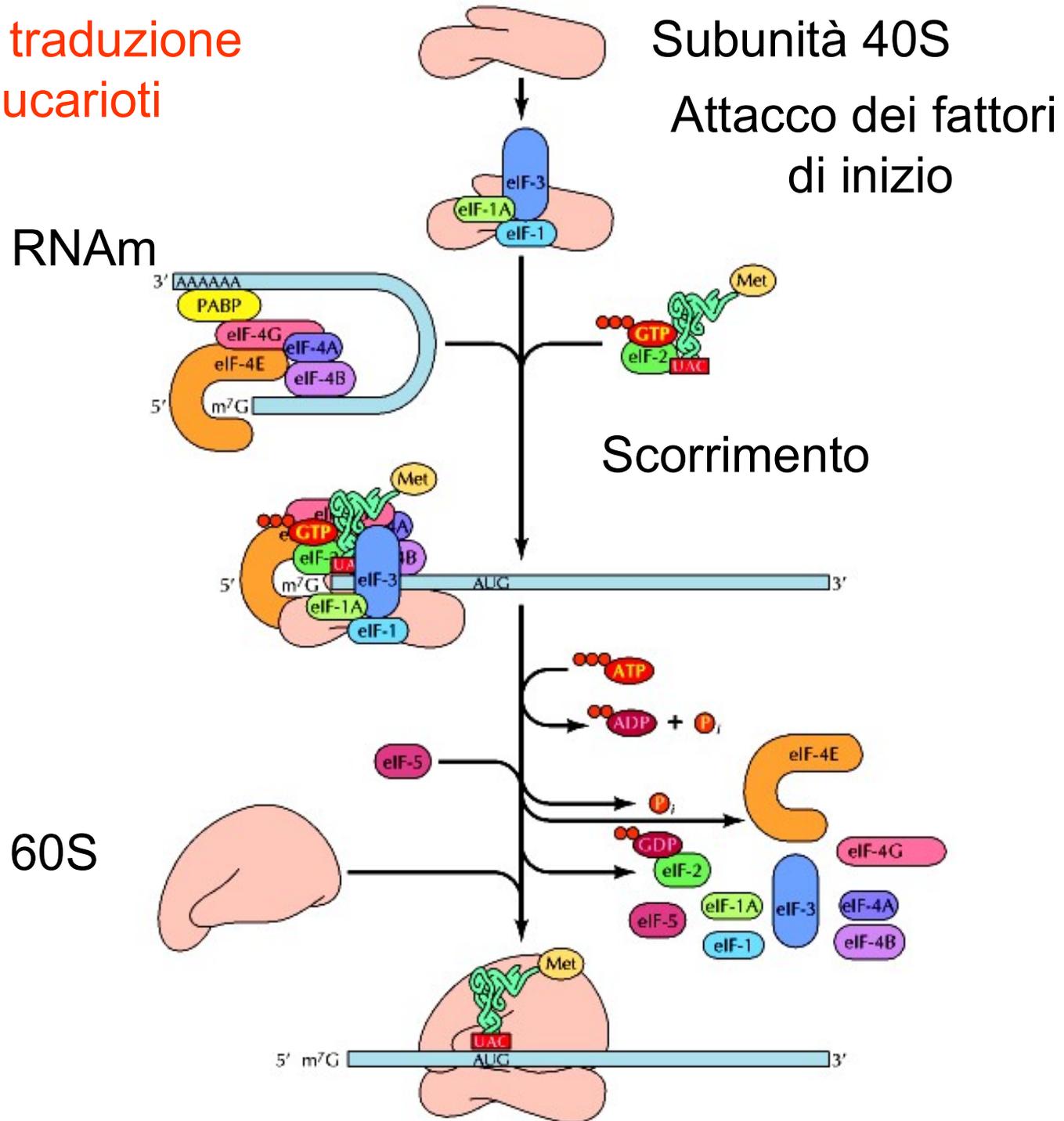
Entra in funzione EF-Tu

4) Fase GTP dipendente: Termine della traduzione quando nel ribosoma nel sito A arriva un codone di stop. Un fattore proteico rilascerà la proteina dai ribosomi.



■ **Figura 4.65** Fase di termine della sintesi proteica. Il sito E è omissso per semplificare l'immagine.

Inizio della traduzione negli eucarioti



SUPPLEMENTARI

La PCR- polymerase chain reaction



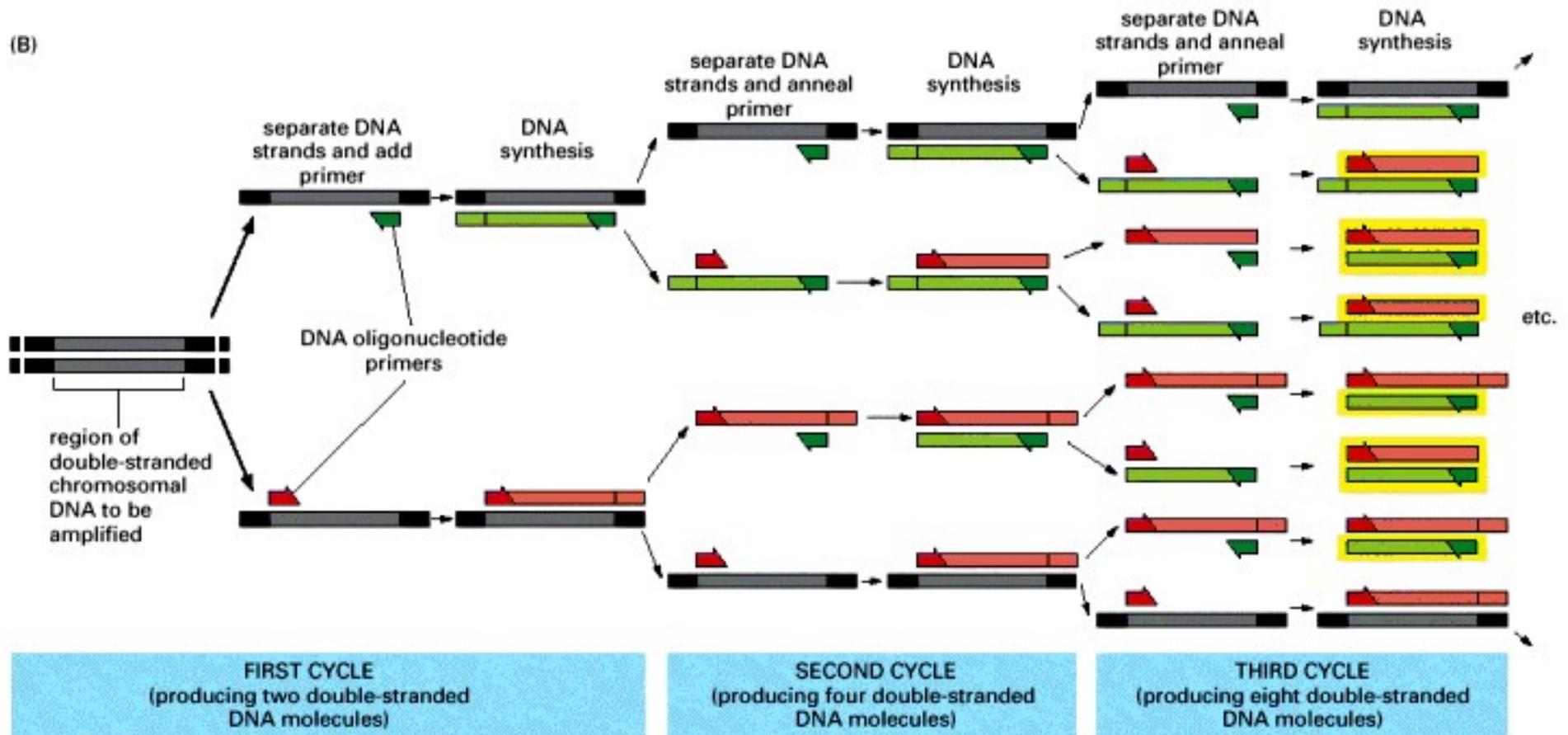
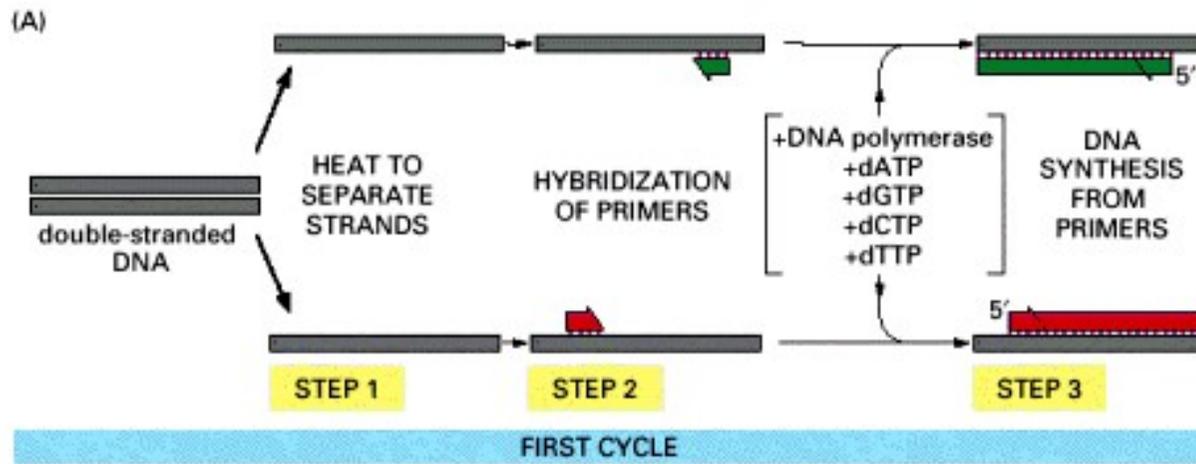
La Taq polimerasi è stata isolata dai batteri termofili

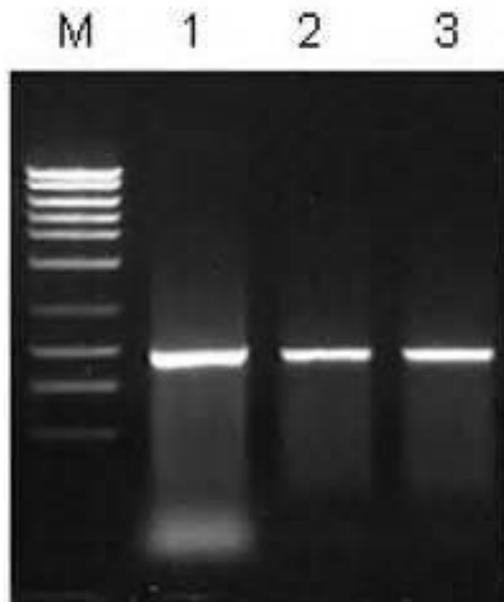
The Polymerase Chain Reaction: a revolutionary invention



Kary B. Mullis
Nobel Price Chemistry 1993

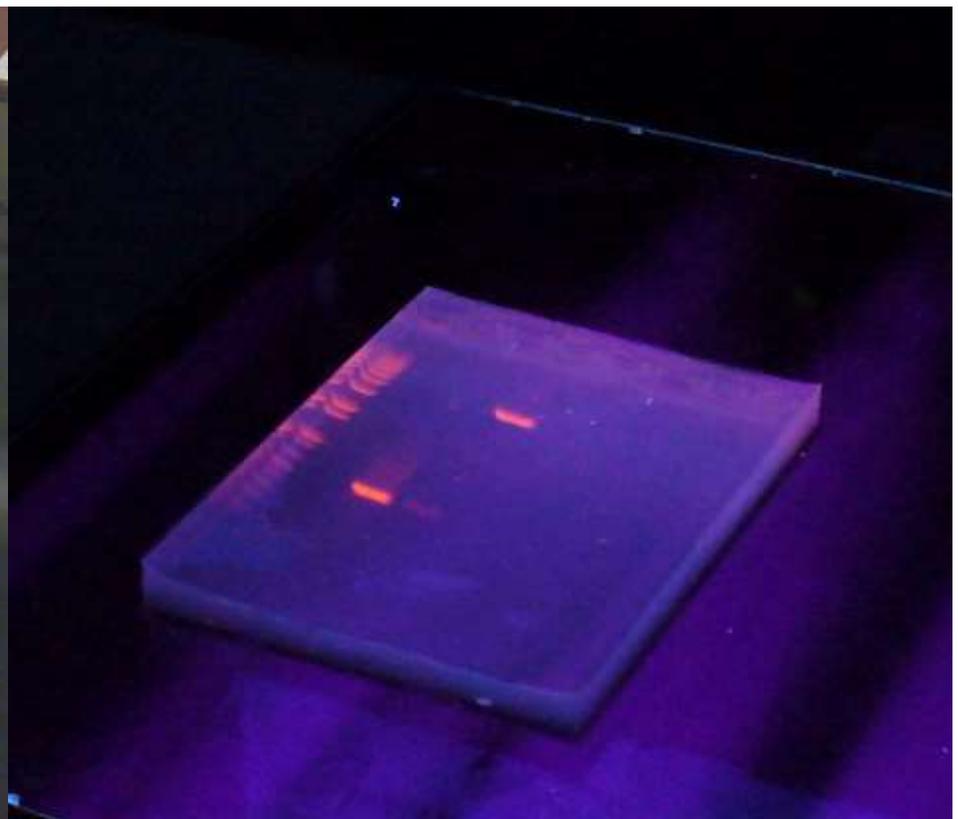
PCR: Polymerase Chain Reaction



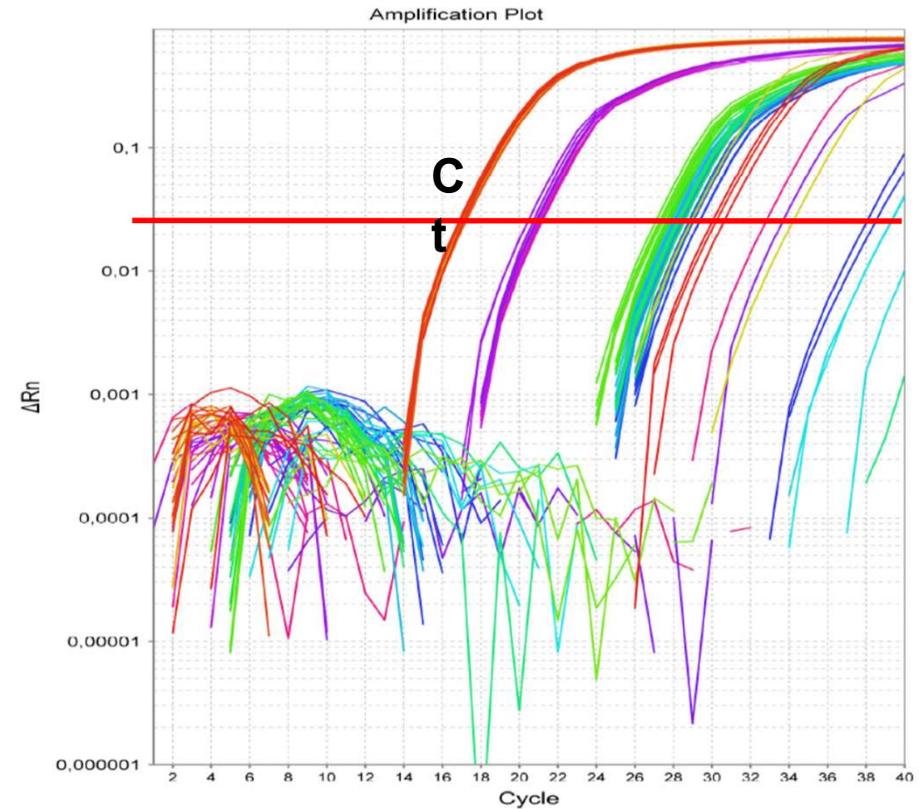
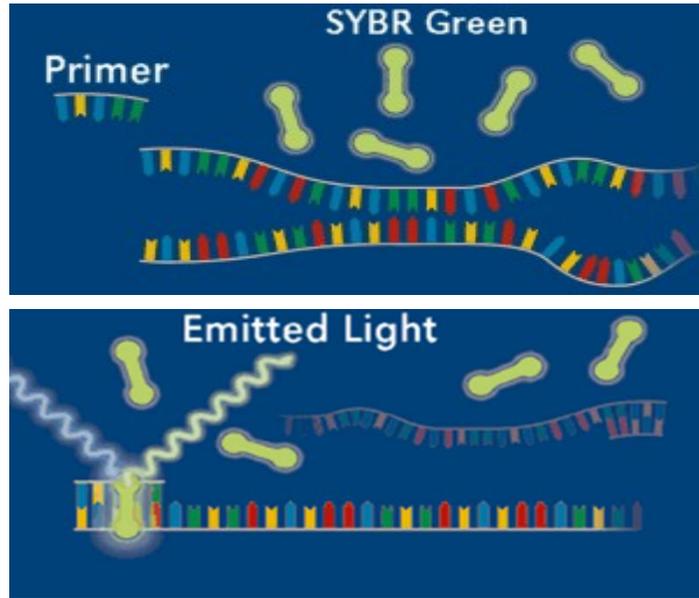


PCR: applicazioni

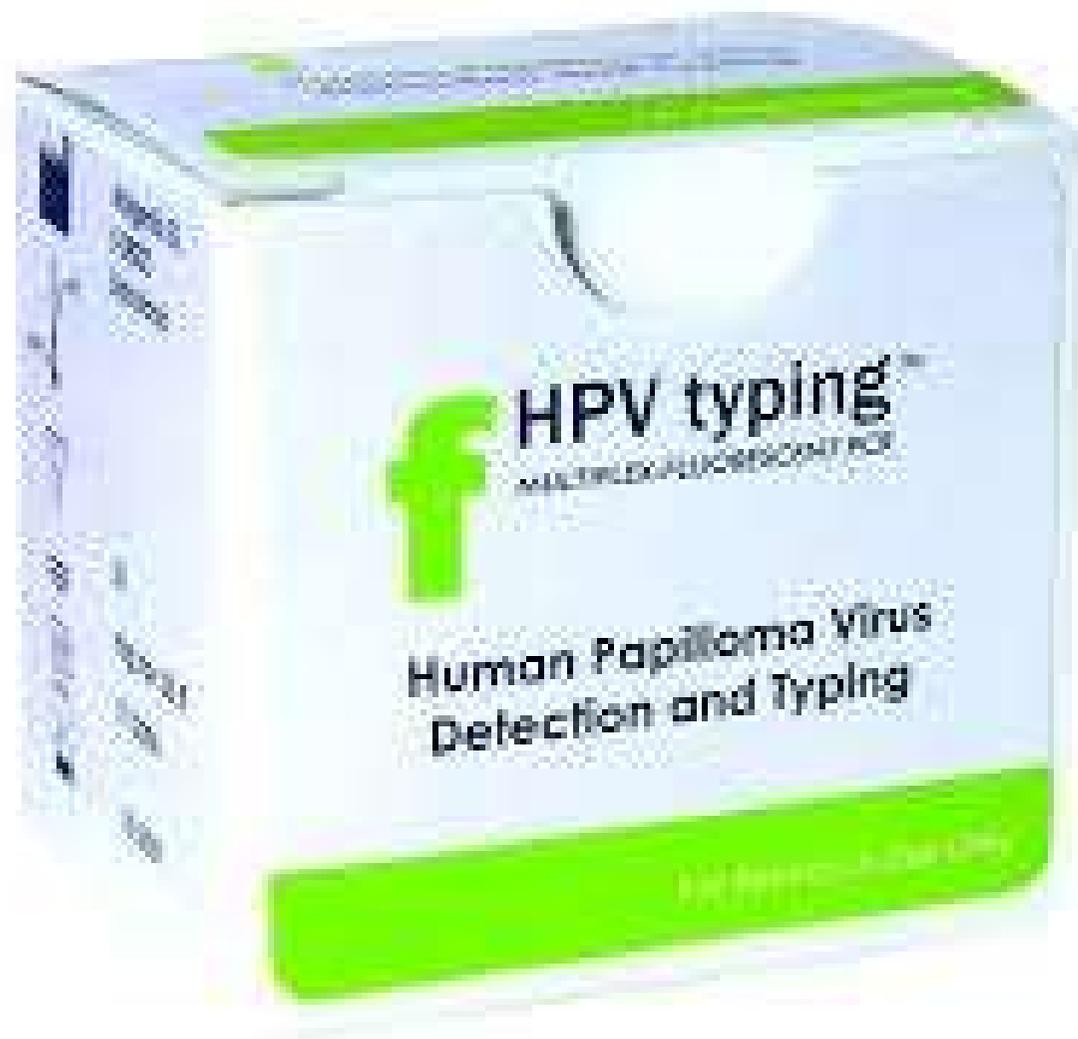
Ricerca di sequenze virali, batteriche ecc.



Real-time PCR is quantitative



**Test per identificare sequenze del virus HPV che causa cancro della cervice uterina
(si basa sulla PCR)**



Quantitative PCR: molecular diagnostic

- **Oncology: Assessment of minimal residual disease following novel targeted therapy against specific molecular defects**
- **Oncology: HPV positivity in Pap-smears of uterus cervix**
- **Virology: Assessment of presence of HIV in lymph nodes**
- **Dentistry: Diagnosis of infectious microbes that cause maxillofacial infections.** Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry.Santos CF, J Appl Oral Sci. 2004 Mar; 12(1):1-11.
- **Using DNA fingerprinting, tiny fragments of DNA can be isolated from a crime scene and compared to a huge database of DNA of convicts or criminals.**

Sequenze altamente ripetute:
(10^5 - 10^7)

la maggior parte inattive dal punto di
vista trascrizionale; molto eterogenee;
raggruppate in cluster: *satelliti*

minisatelliti
microsatelliti

1. Satellite

Unità da 5 a 200 bp
Segmenti lunghi fino a
qualche centinaio
di chilobasi

2. Minisatelliti

Unità da 2 fino a 5 bp
Segmenti lunghi fino a 25 kb

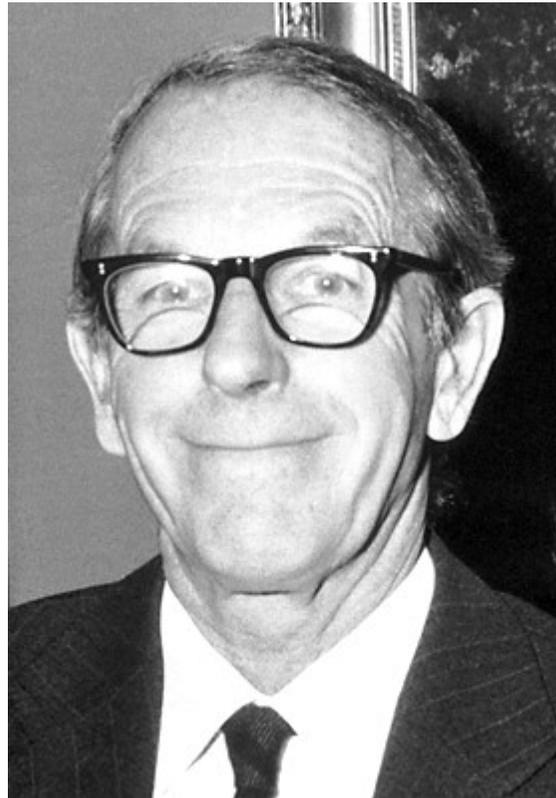
3. Microsatelliti

Unità < 4bp
Segmenti lunghi fino 150 pb

Analisi forensiche:
Short tandem repeats (STRs) - highly polymorphic
regions that have short repeated sequences (3-5
repeated bases)



DNA sequencing : Sanger method



**The Nobel Prize in Chemistry 1980
Paul Berg, Walter Gilbert, Frederick
Sanger**

ORIGIN

```

1  ogtgctttcc acgacgggtga cacgcttccc tggattggcc agactgcott cggggtcact
61  gccatggagg agccgcagtc agatcctagc gtcgagcccc ctctgagtca ggaaacattt
121 tcagacctat ggaaactact tctgaaaac aacgttctgt cccoctgccc gtcccaagca
181 atggatgatt tgatgctgtc cccggacgat attgaacaat ggttcaactga agaccaggt
241 ccagatgaag ctcccagaat gccagaggct gctccccgog tggccoctgc accagcagct
301 cctacaccgg cggccoctgc accagcccc tctggcccc tgtcatotto tgtcccttcc
361 cagaaaaact accagggcag ctacggttcc ogtctgggct tcttgcatto tgggacagcc
421 aagtctgtga cttgcaogta ctcccctgcc ctcaacaaga tgttttgcca actggccaag
481 acctgccctg tgcagctgtg ggttgattcc acacccccgc cgggcaaccg cgtccgcgcc
541 atggccatct acaagcagtc acagcacatg acggagggtg tgaggcogtg cccccaccat
601 gagcgcctgt cagatagoga tggctctggc cctcctcagc atcttatcog agtggaaagga
661 aatttgctgt tggagtattt ggatgacaga aacacttttc gacatagtgt ggtggtgccc
721 tatgagccgc ctgaggttgg ctctgactgt accaccatcc actacaacta catgtgtaac
781 agttcctgca tgggoggcat gaaccggagg cccatcctca ccatcatcac actggaagac
841 tccagtggta atctactggg acggaacagc tttgagggtc atgtttgtgc ctgtcctggg
901 agagaccggc gcacagagga agagaatctc ogcaagaaag gggagcctca ccacgagctg
961 cccccagggg gcaactaagcg agcactgtcc aacaacacca gctcctctcc ccagccaaag
1021 aagaaaccac tggatggaga atatttcacc cttcagatcc gtgggogtga gogcttcgag
1081 atgttccgag agctgaatga ggccctggaa ctcaaggatg cccaggctgg gaaggagcca
1141 ggggggagca gggctcactc cagccacctg aagtccaaaa agggtcagtc tacctccgc
1201 cataaaaaac tcatgttcaa gacagaaggg cctgactcag actgacatto tccacttctt
1261 gttccccact gacagcctcc ccccccatc tctccctccc ctgccatttt gggttttggg
1321 tctttgaacc cttgcttgca ataggtgtgc gtcagaagca cccaggactt ccatttgctt
1381 tgtcccgggg ctccaactgaa caagtgggcc tgcactggtg ttttgttgtg gggaggagga
1441 tggggagtag gacataaccag cttagatttt aagggtttta ctgtgagggg tgtttgggag
1501 atgtaagaaa tgttcttgca gttaagggtt agtttacaat cagccacatt ctaggtaggg
1561 gcccaactca ccgtaactaac cagggagact gtcctcact gttgaatttt ctctaacttc
1621 aaggcccata tctgtgaaat gctggcattt gcacctacct cacagagtgc attgtgaggg
1681 ttaatgaaat aatgtacatc tggccttgaa accacctttt attacatggg gtctagaact
1741 tgacccoctt gaggggtgctt gttccctctc cctgttggtc ggtgggttgg tagtttctac
1801 agttgggcag ctggttaggt agaggaggtt gtcaagtctc tgctggccca gccaaacctt
1861 gtctgacaac ctcttggtga acctagtagc ctaaaaggaa atctcaccct atcccacacc
1921 ctggaggatt tcatctcttg tatatgatga tctggatcca ccaagacttg ttttatgctc
1981 aggggtcaatt tctttttctt ttttttttt ttttttctt tcttttgaga ctgggtctcg
2041 ctttgttgcc caggctggag tggagtggcg tgatcttggc ttactgcagc ctttgcctcc
2101 cgggctcgag cagtccctgcc tcagcctccg gagtagctgg gaccacaggt tcatgccacc
2161 atggccagcc aacttttgca tgtttgttag agatggggtc tcacagtgtt gccaggtctg
2221 gtctcaaact cctgggctca ggogatccac ctgtctcagc ctcccagagt gctgggatta
2281 caattgtgag ccaccacgtc cagctggaag ggtcaacatc ttttacatc tgcaagcaca
2341 tctgcatttt caccaccacc tcccctcct tctccctttt tatatcccat ttttatatcg
2401 atctcttatt ttacaataaa actttgctgc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

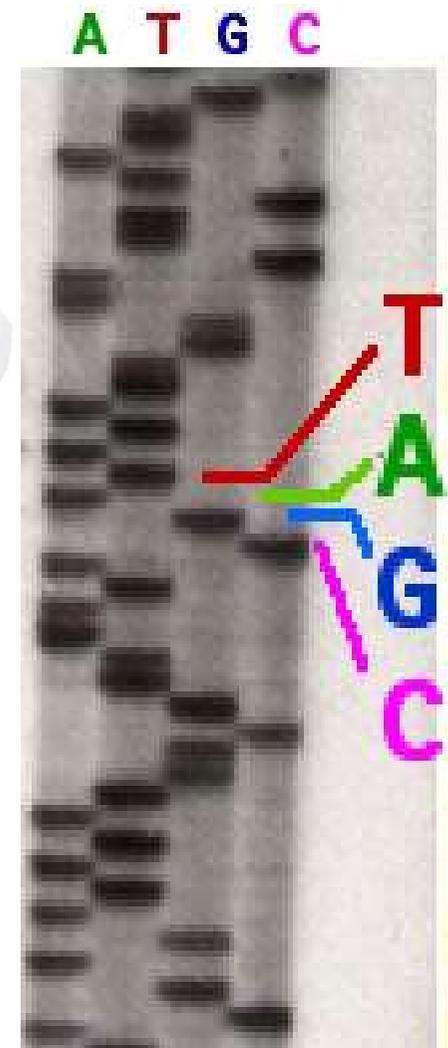
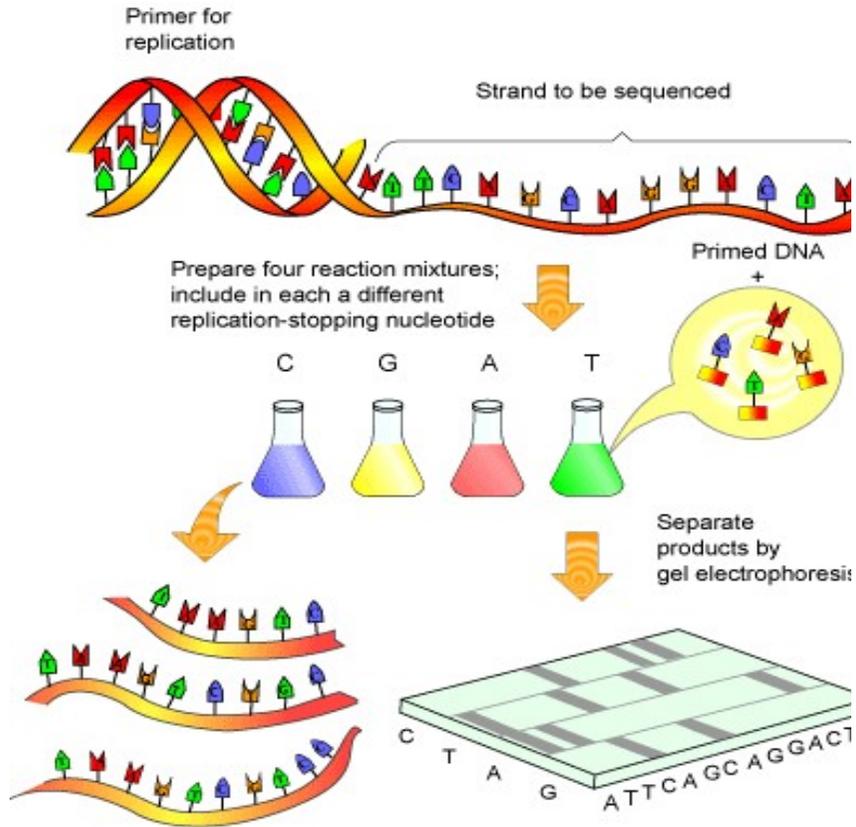
```

Homo sapiens mRNA for P53, complete cds

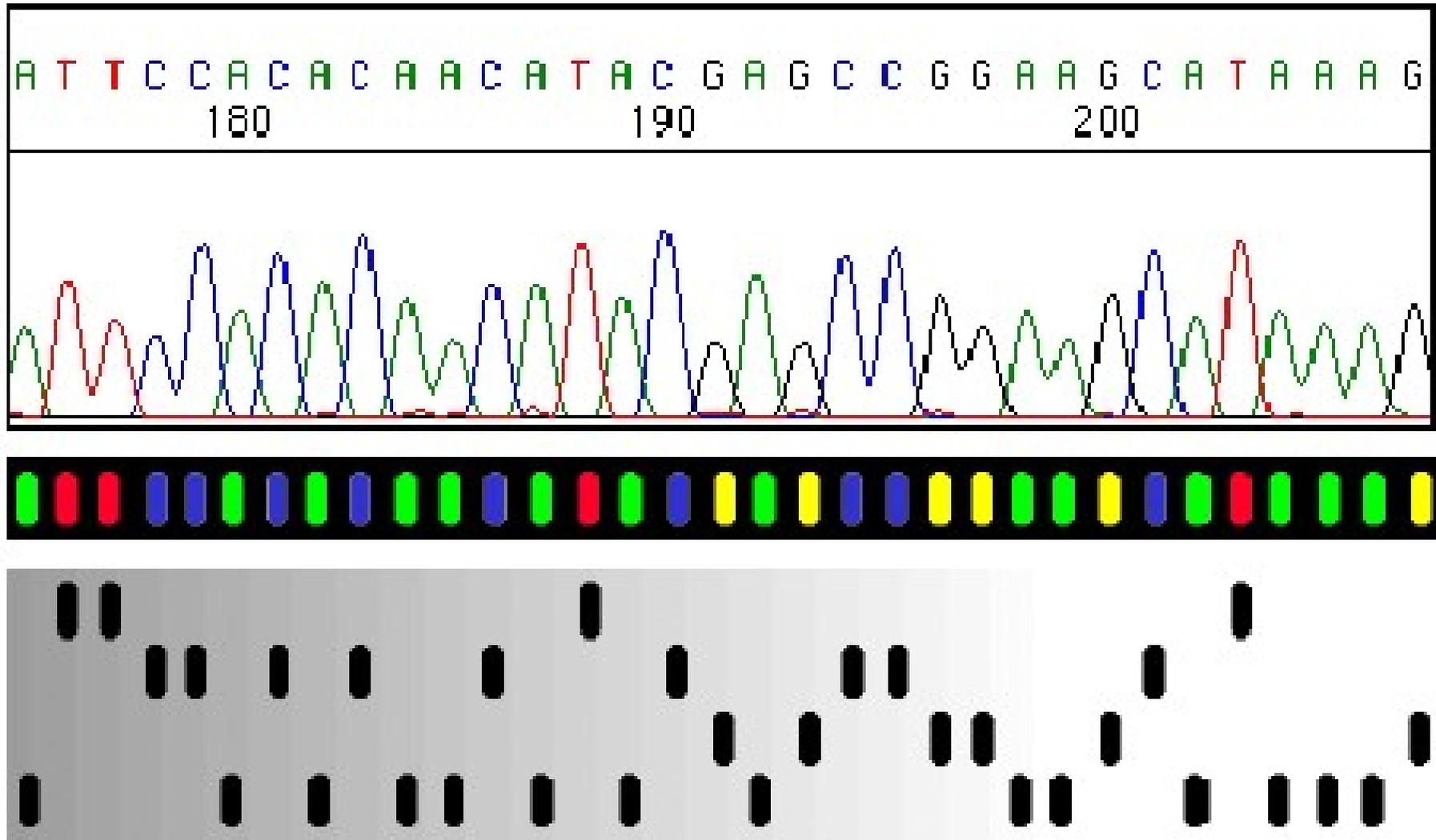
GenBank: AB082923.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

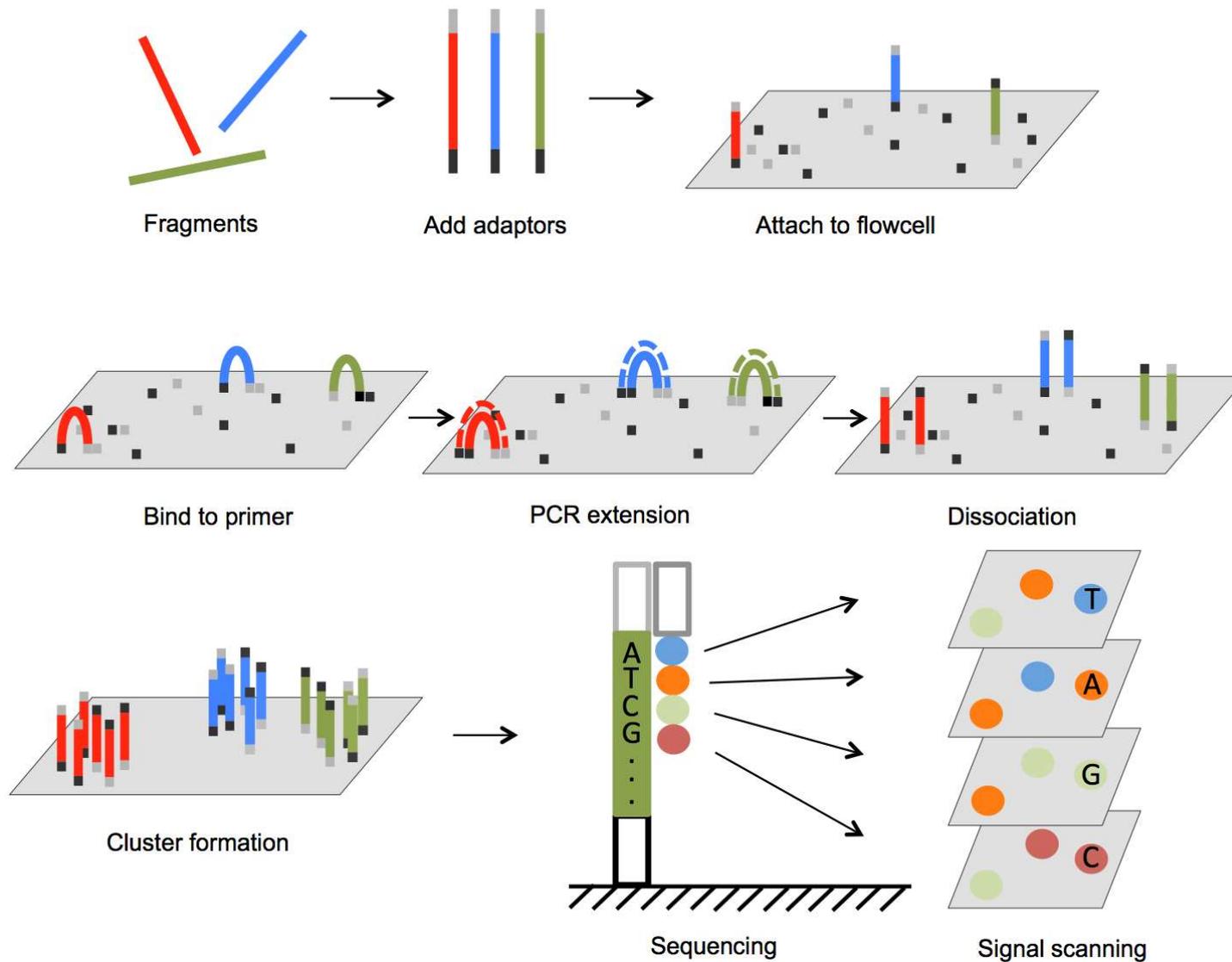
Electrophoresis on acrylamide gel to read DNA sequence



Il sequenziamento automatico del DNA



Schema del funzionamento di NGS

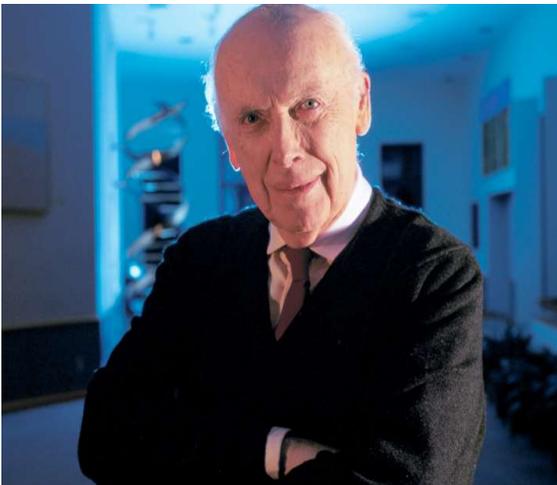


Human Genome Project

The Human Genome Project (HGP) refers to the International effort, formally begun in October 1990 and completed in 2003 with the aims:

- 1) to determine the complete sequence of the genome
- 2) to discover all the estimated 20,000-25,000 human genes
- 3) to make them accessible for further biological study

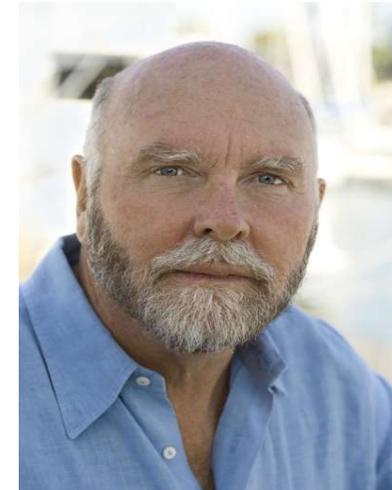
James Watson



Francis Collins (NIH)



John Craig Venter (Celera)



NEXT GENERATION SEQUENCING: how to sequence hundreds of millions of short sequences (35bp-100bp) in a single run

- The Human Genome Project-2003: took 13 years and \$3 billion (CE)
- Sequencing of the Watson Genome by 454 (NGS) in 2007: \$2 million
- Sequencing a genome would take eight days at a cost of about \$10,000.
- today it costs about \$2,000 and it takes just one to two days.

Informatics is needed to deal with very large datasets



Alan Turing
(1912-1954)



Mainframe
digital
computers
1940s



Steve Jobs
(1955-2011)



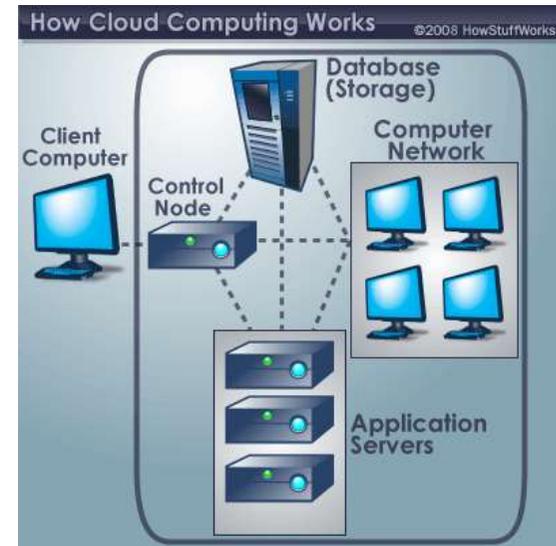
Personal
computers
1980s



Bill Gates
(1955-)



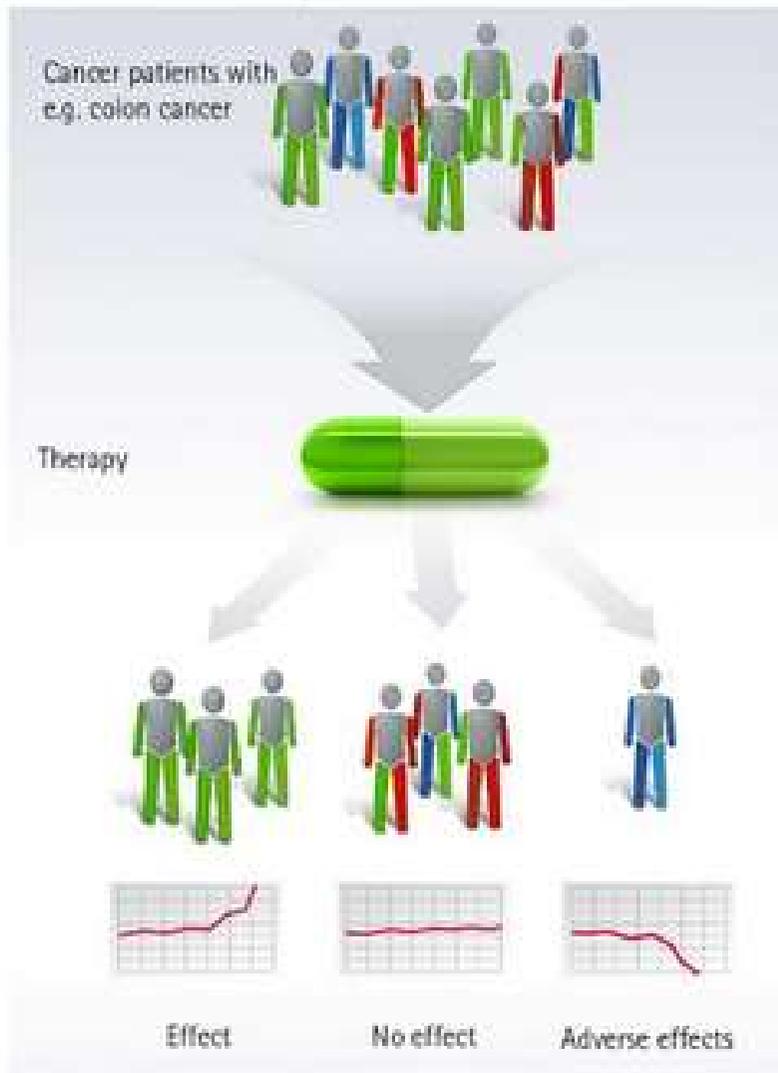
INTERNET



Cloud
computing
2010s

Personalized medicine: tailored treatments

Medicine of the present: one treatment fits all



Medicine of the future: more personalized diagnostics

