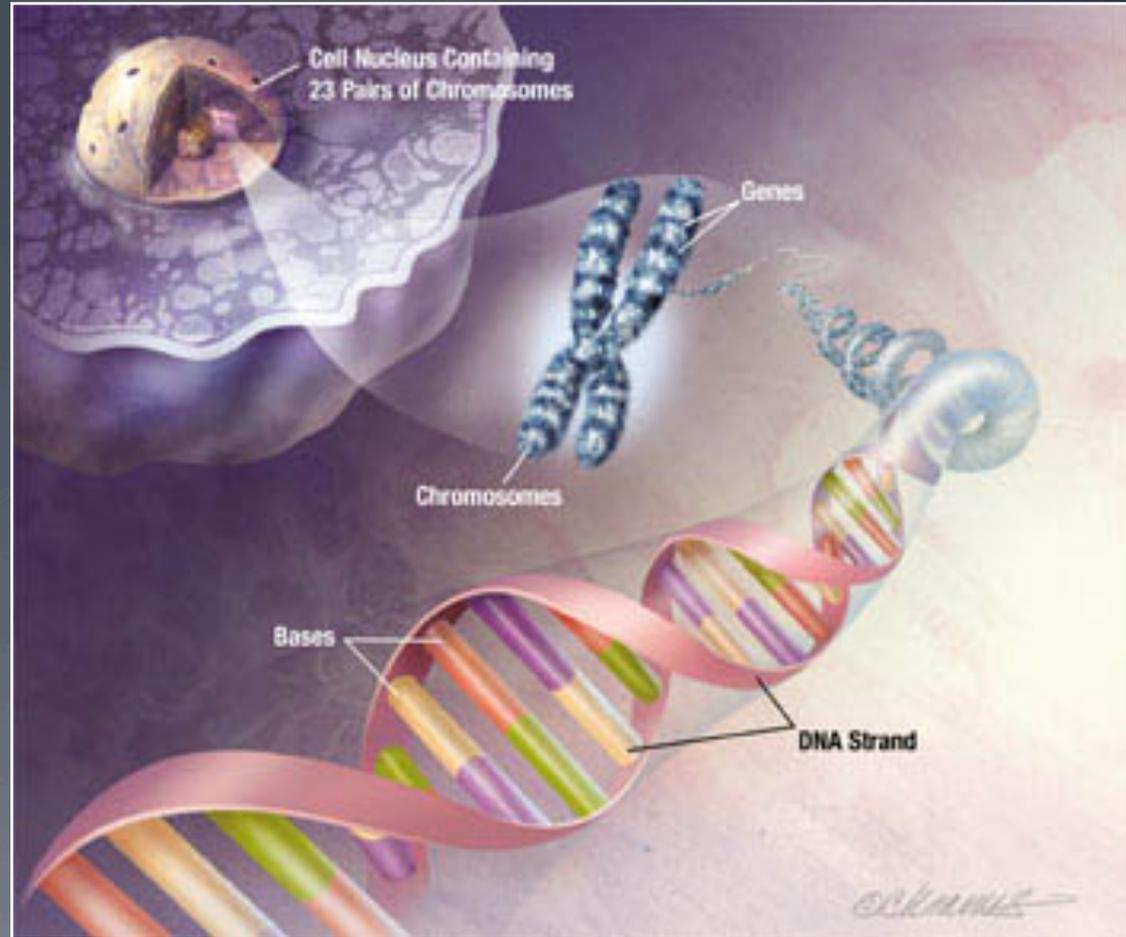


GENOMA IN AZIONE

Espressione genica

La cellula

- Ogni organismo vivente è composto da una o più cellule. Ogni cellula può essere vista come una macchina complessa che esegue delle istruzioni scritte e memorizzate nel proprio **genoma**.

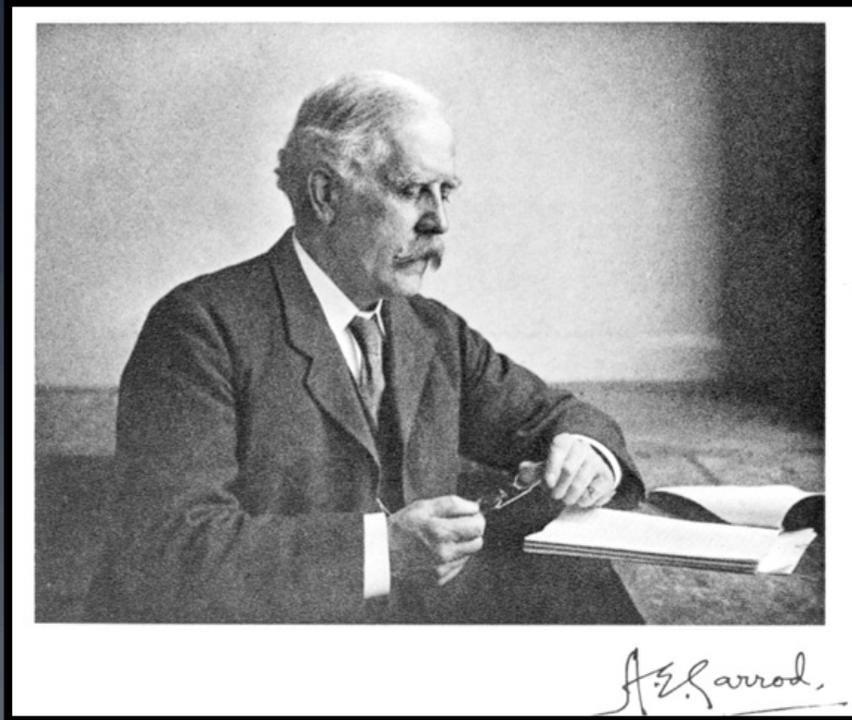


Le proteine: le macchine del nostro organismo

- La maggior parte delle funzioni del nostro organismo sono eseguite da **proteine**. Le proteine sono macromolecole formate da catene di aminoacidi.



Geni e proteine



1908: *Sir Archibald Garrod* ipotizza per la prima volta che alcune malattie dovute all'incapacità di svolgere particolari processi chimici siano ereditarie

Anni '40: viene dimostrato che le reazioni biochimiche dipendono da specifici enzimi e che la specificità degli enzimi dipende, a sua volta, dalla sequenza lineare degli amminoacidi che li costituiscono

Geni e proteine

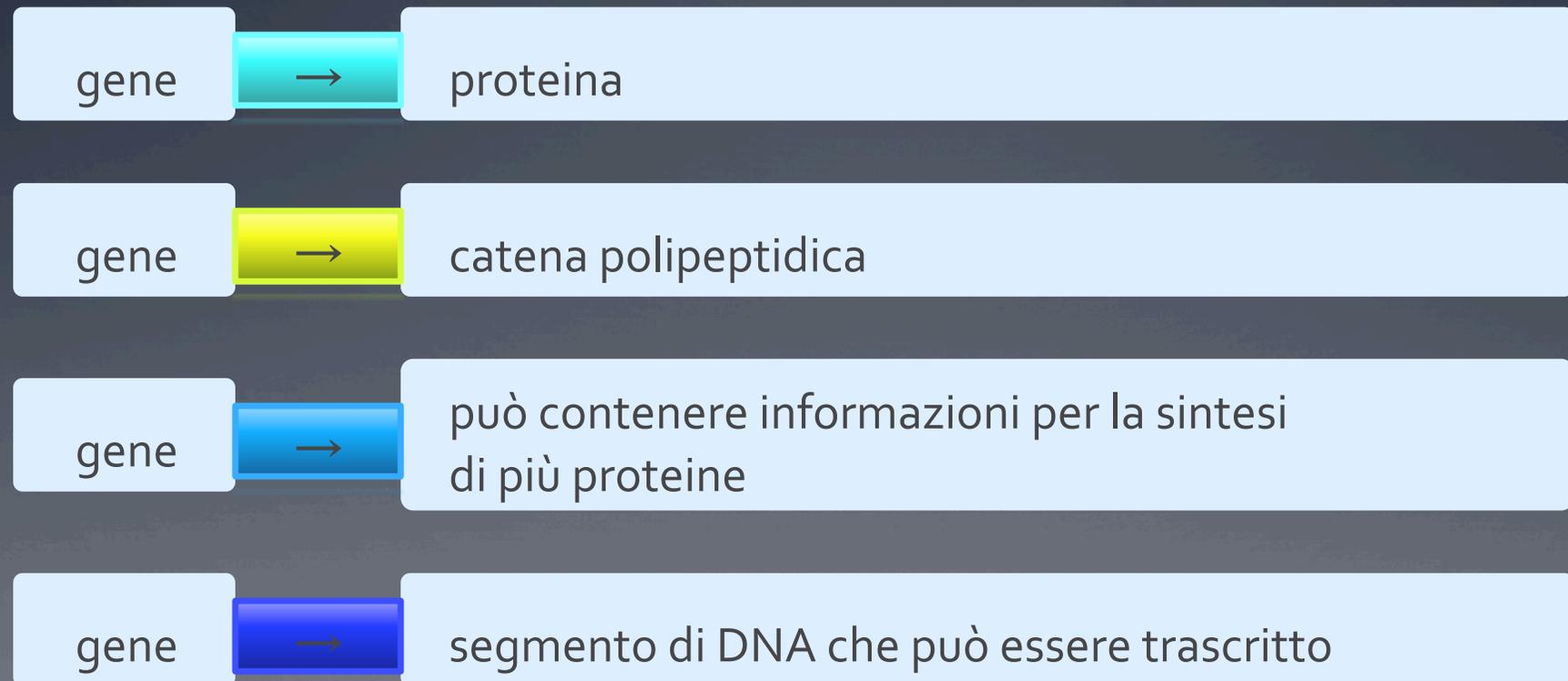


- *G. Beadle* formulò l'ipotesi che il diverso colore degli occhi di mutanti di *Drosophila* fosse il risultato della mutazione di un enzima
- *G. Beadle* e *E. Tatum* nel 1941 dimostrarono tramite un esperimento con *Neurospora* che: **la variazione di un singolo gene determina la variazione di un singolo enzima**

Ipotesi <<un gene, un enzima>>

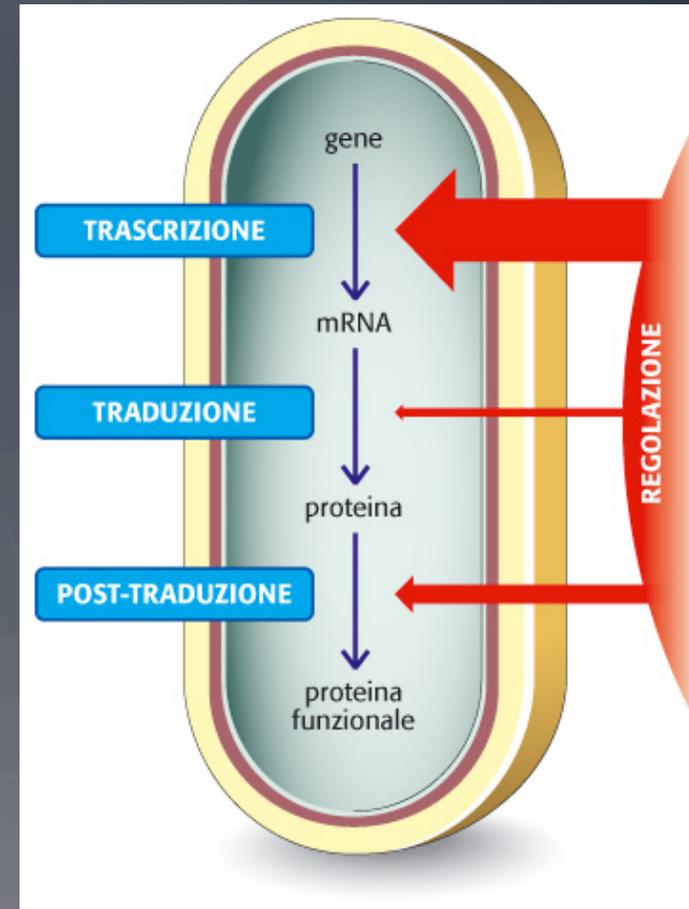
Definizione di gene

Evoluzione del concetto di gene



Dal DNA alla proteina

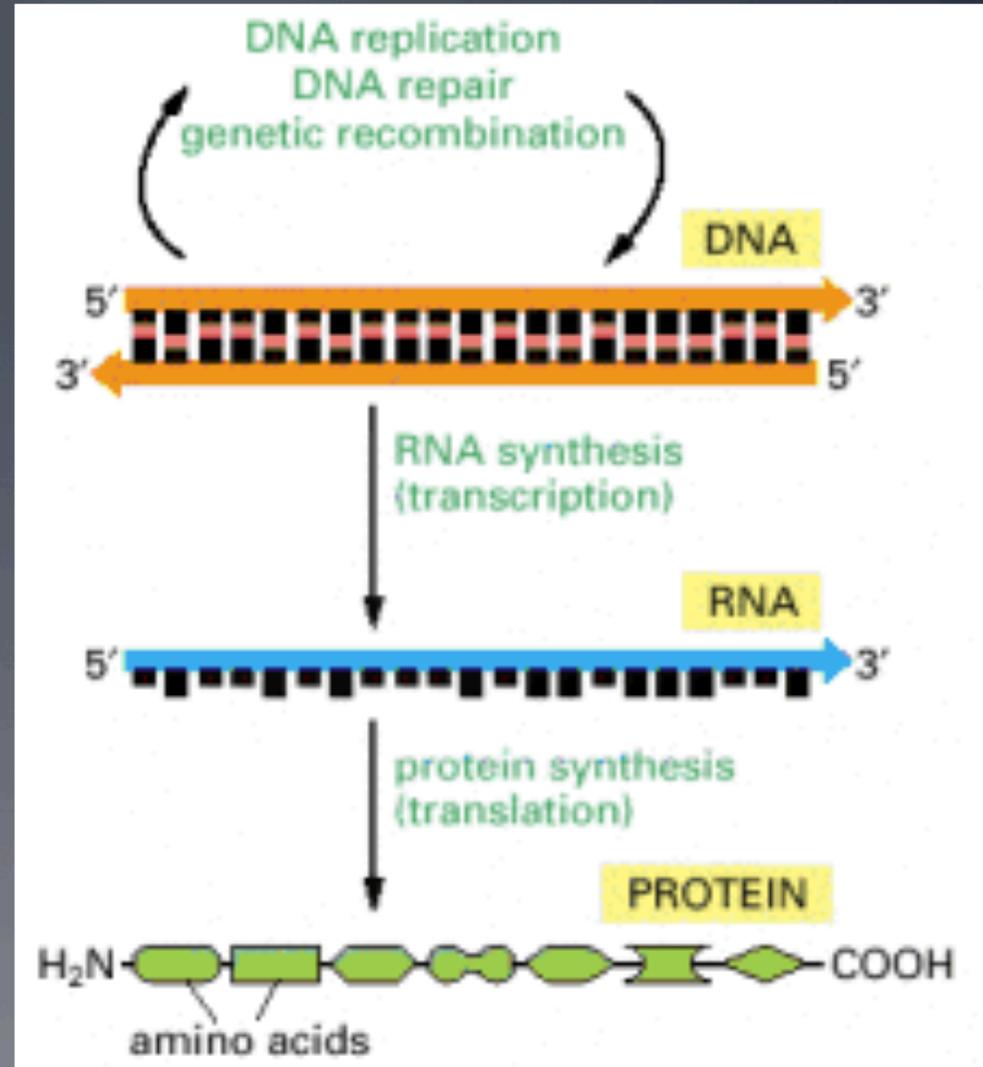
- La molecola di DNA contiene nei geni le istruzioni per la sintesi delle proteine
- Mediante le molecole di RNA, il messaggio contenuto nei nucleotidi del DNA viene trascritto e tradotto nella sequenza di amminoacidi della proteina
- La sequenza lineare degli amminoacidi determina la struttura tridimensionale della proteina
- La proteina può subire processi di maturazione post-traduzionale



L'informazione dentro la cellula

- **Dogma centrale** della biologia molecolare

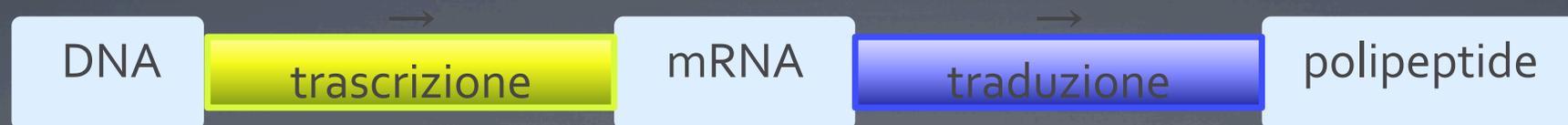
DNA → RNA → proteina



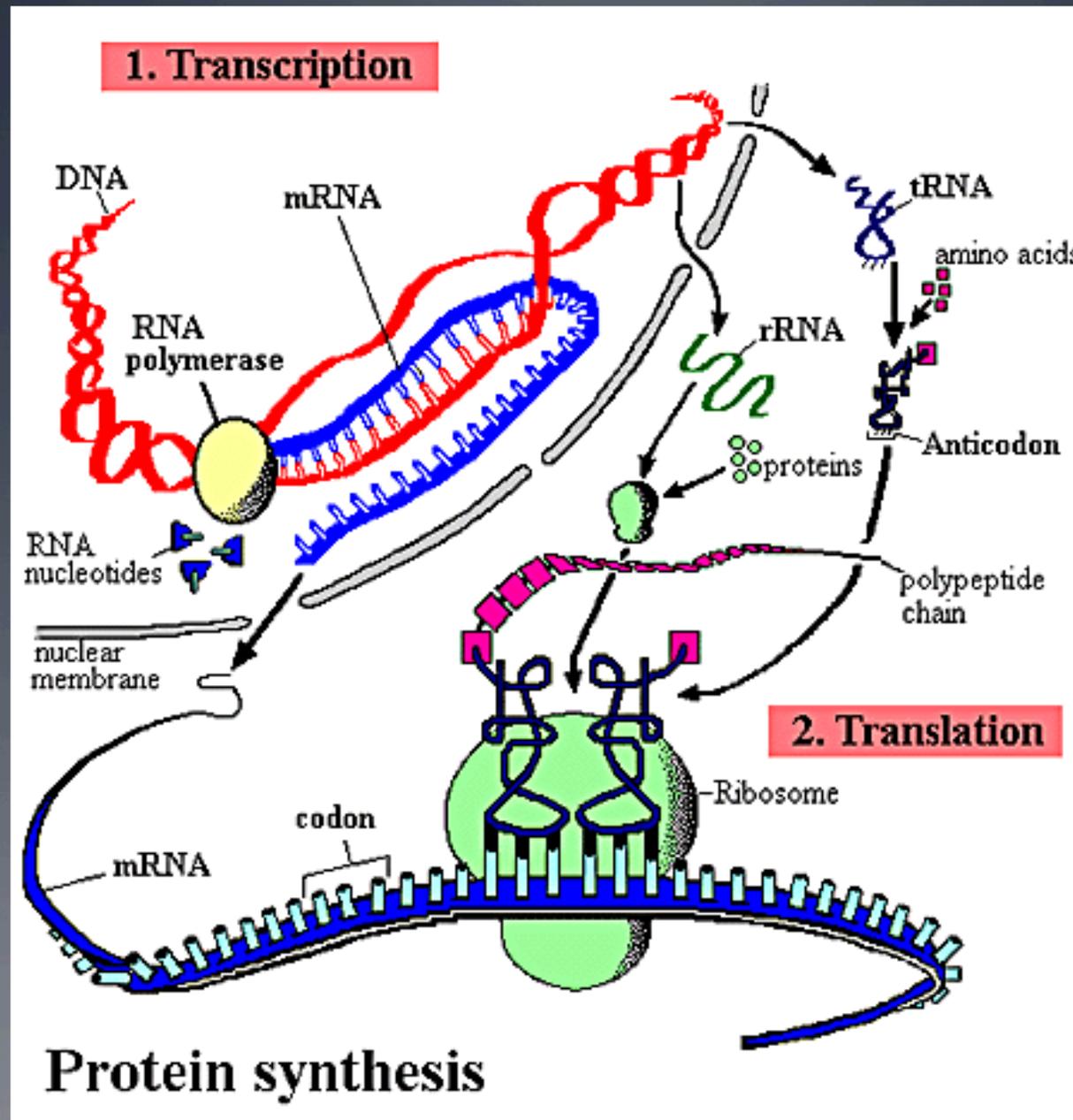
DOGMA CENTRALE

La sintesi di una proteina è un processo costituito da due fasi:

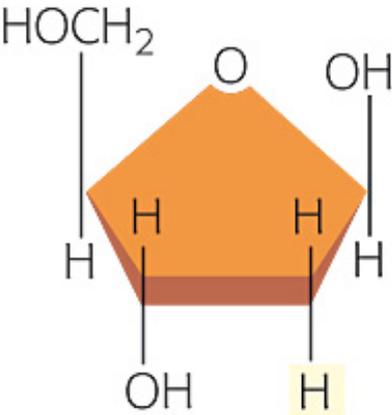
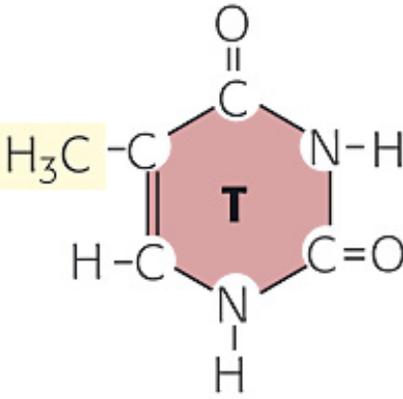
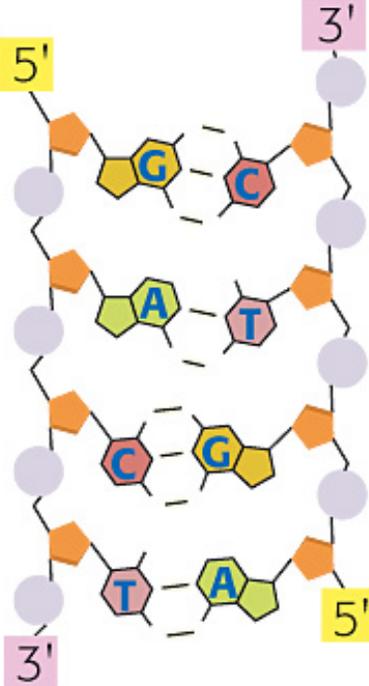
- la **trascrizione**, ossia il passaggio dell'informazione dal DNA all'RNA messaggero
- la **traduzione**, in cui le informazioni contenute nell'RNA messaggero vengono utilizzate per formare una molecola polipeptidica (proteina)



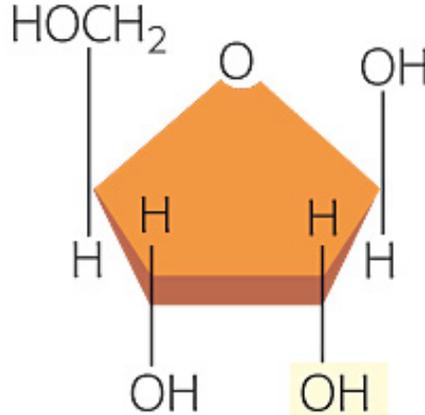
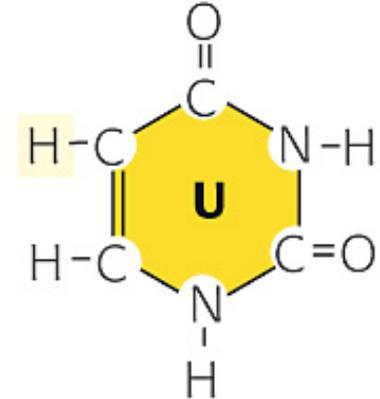
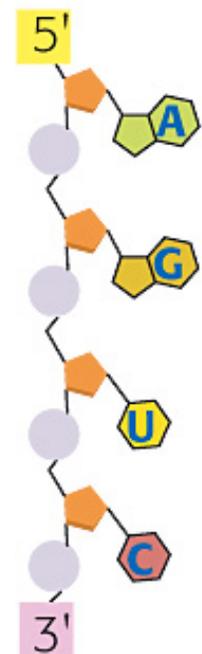
Sintesi delle proteine



Differenze tra DNA e...

DNA	zucchero	base pirimidinica	struttura lineare	ripiegamenti spaziali
DNA	 <p>deossiribosio</p>	 <p>timina</p>		

...RNA

RNA	zucchero	base pirimidinica	struttura lineare	ripiegamenti spaziali
RNA	 <p>ribosio</p>	 <p>uracile</p>		

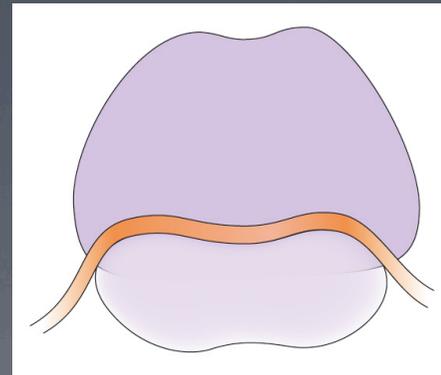
Tipi di RNA

Esistono tre tipi di RNA che svolgono ruoli precisi nel processo di sintesi proteica:

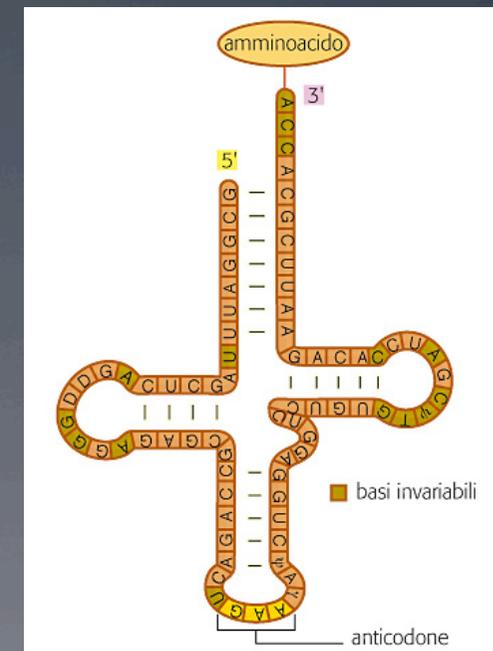
RNA messaggero



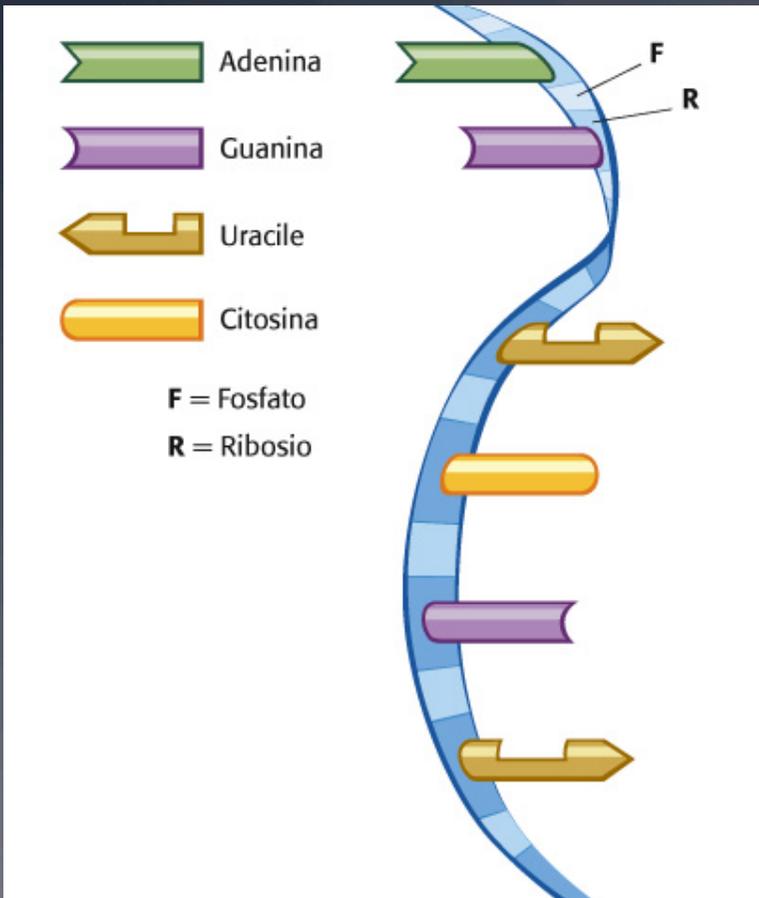
RNA ribosomiale



RNA di trasporto



RNA messaggero

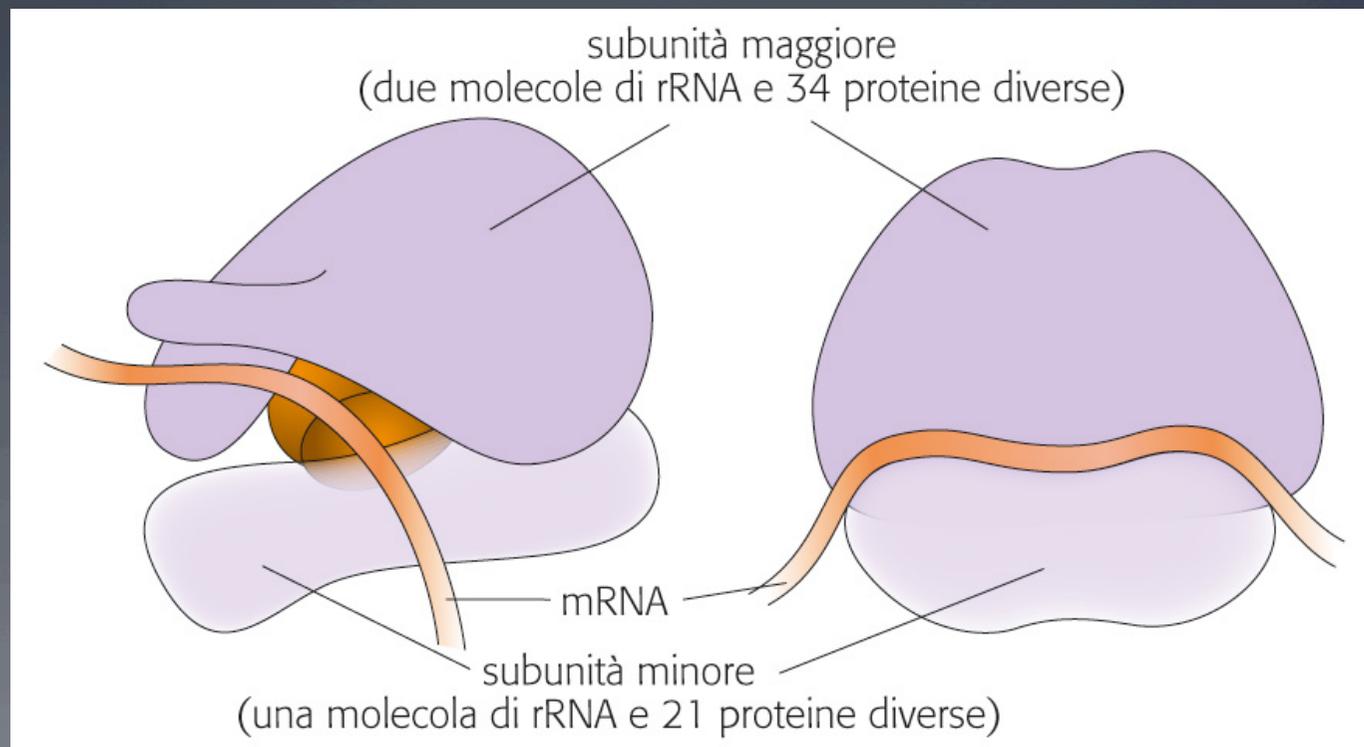


L'RNA messaggero:

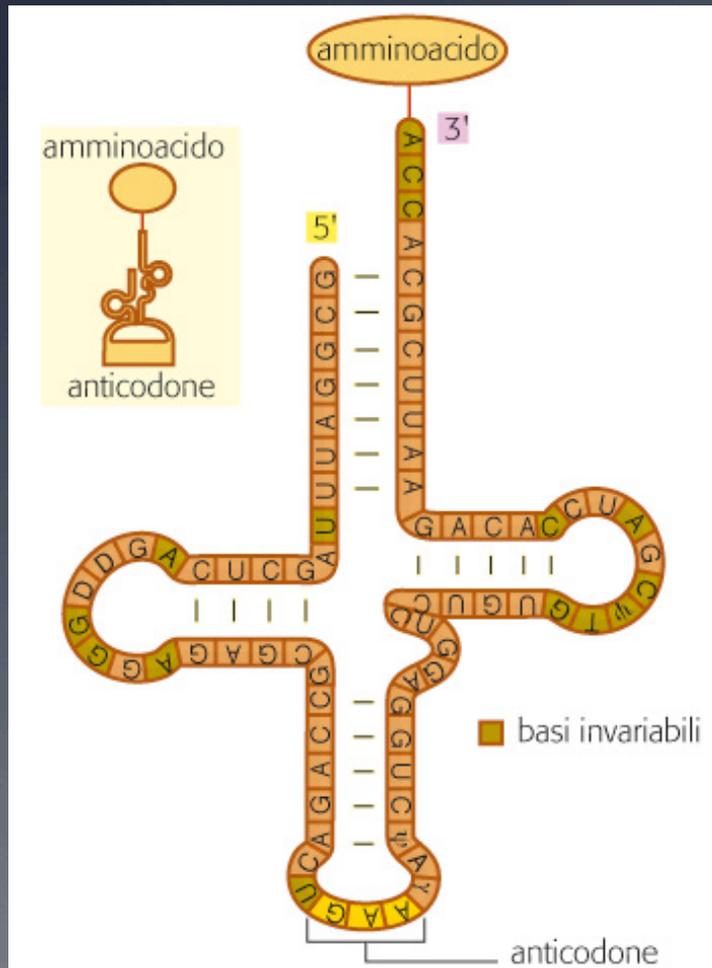
- è costituito da un singolo filamento di nucleotidi
- trasporta l'informazione dal nucleo ai ribosomi
- viene assemblato usando come stampo uno specifico segmento di DNA (trascritto) in base al principio dell'accoppiamento delle basi azotate

RNA ribosomiale

Sia la subunità grande sia quella piccola dei ribosomi sono costituite da molecole di RNA ribosomiale e da specifiche proteine



RNA di trasporto

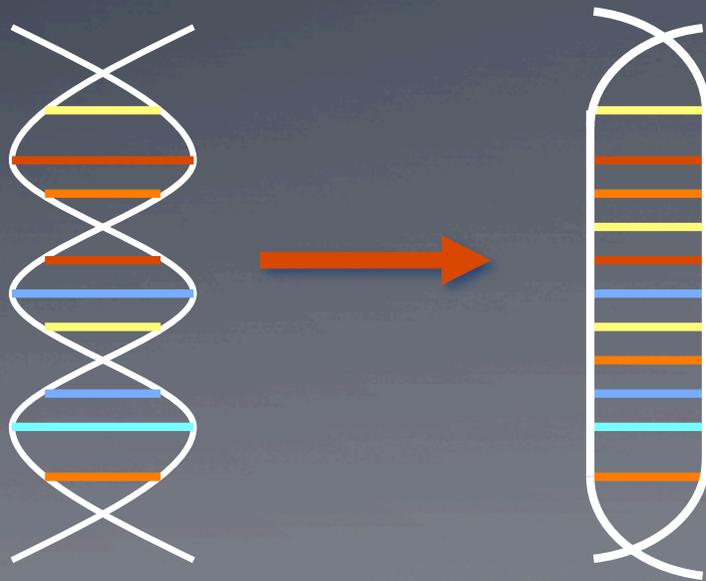


L'RNA di trasporto ha una struttura a trifoglio che presenta:

- una tripletta di nucleotidi, detta **anticodone**, complementare al codone dell'RNA messaggero
- una sequenza nucleotidica all'estremità 3' a cui si lega l'amminoacido corrispondente al codone riconosciuto

La trascrizione

Nella fase di trascrizione la doppia elica di una porzione di DNA viene dapprima svolta...

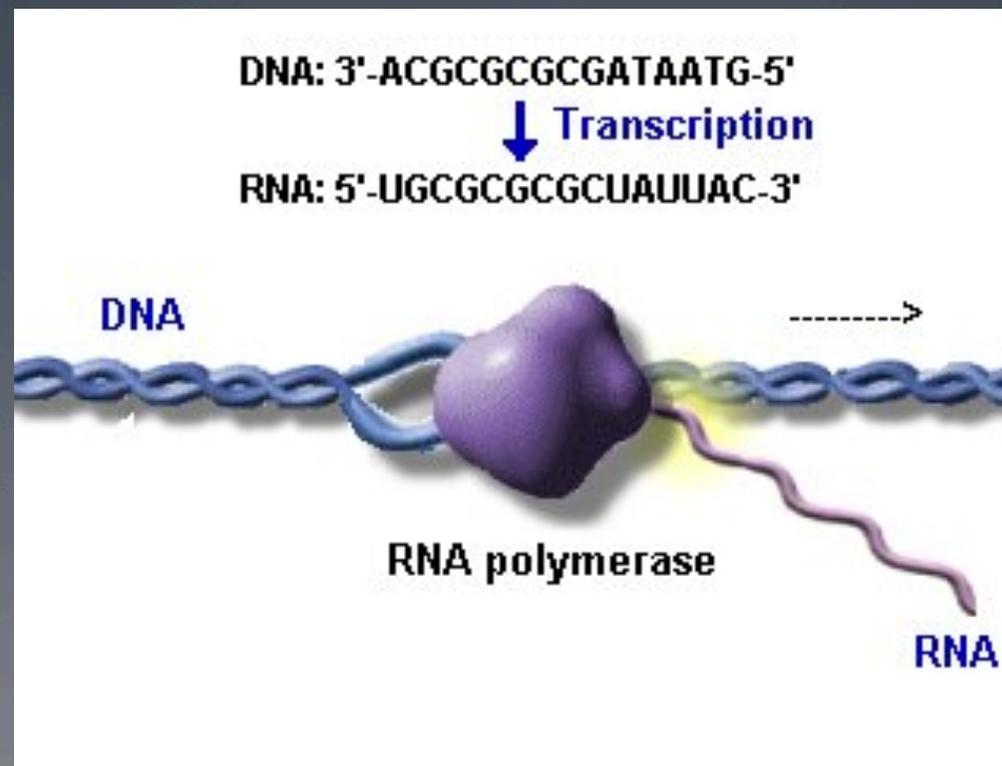


... ad opera di un enzima detto

RNA-Polimerasi

La trascrizione

Ecco un modello tridimensionale dell'RNA-Polimerasi

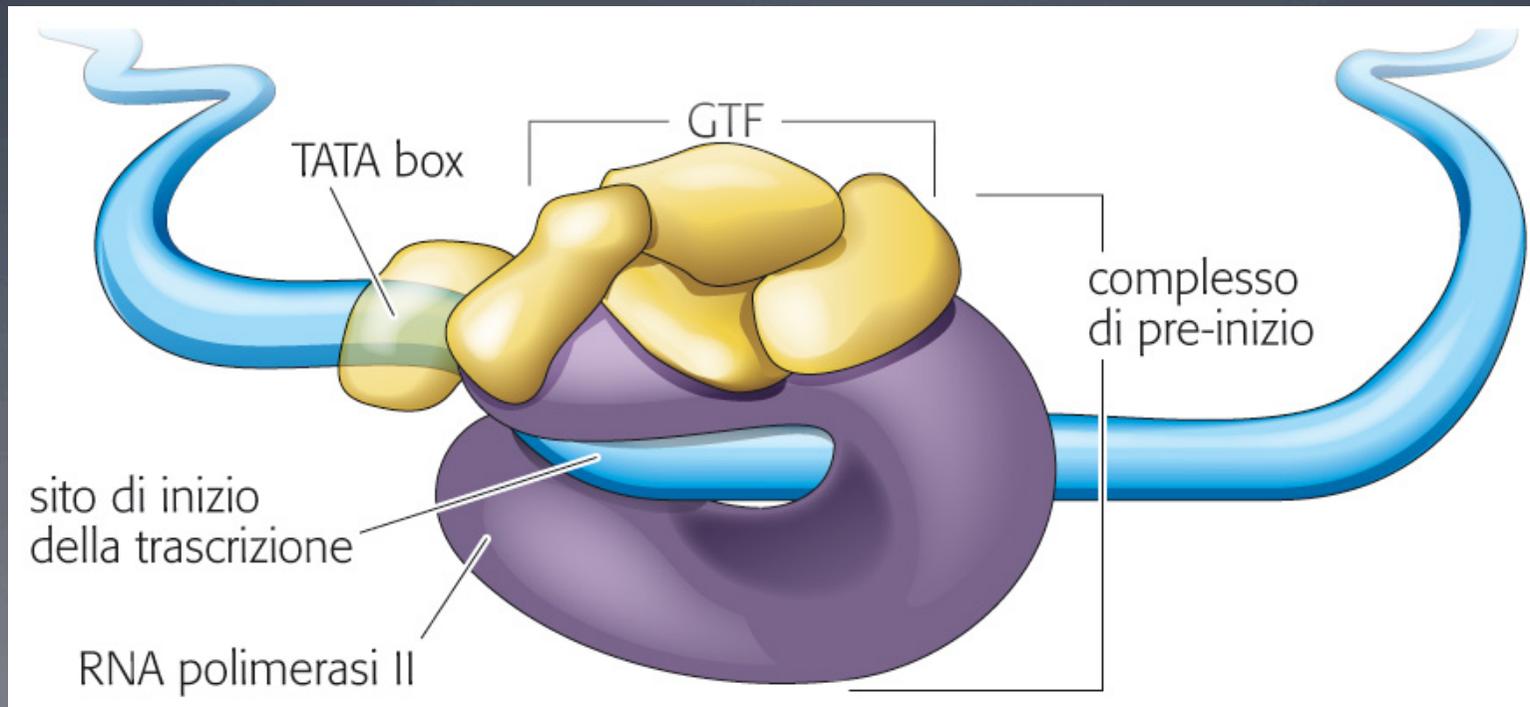


Trascrizione

- Affinché il messaggio contenuto nel DNA possa essere trascritto in una molecola di RNA complementare, occorre la presenza dell'enzima **l'RNA polimerasi**
- L'RNA polimerasi riconosce il gene interagendo con il DNA in corrispondenza di un sito specifico detto **promotore**

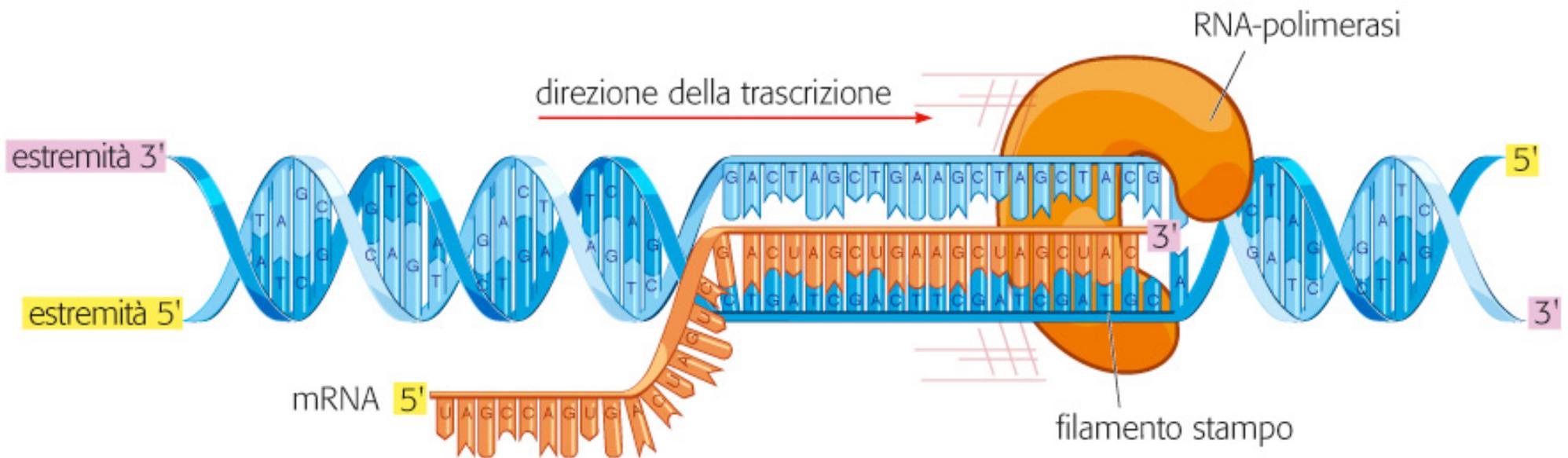
Inizio della trascrizione

Negli eucarioti il riconoscimento del gene da trascrivere da parte dell'RNA-polimerasi è molto complesso e prevede l'intervento di proteine di regolazione dette **GTF** (fattori di trascrizione generali) che si legano al promotore per consentire l'attacco dell'enzima



Trascrizione

La doppia elica di DNA si apre nel tratto che deve essere trascritto. L'RNA-polimerasi utilizza un filamento di DNA come stampo e lo copia aggiungendo nucleotidi alla catena in formazione in direzione $5' \rightarrow 3'$



Trascrizione

- La trascrizione ha inizio in corrispondenza di specifiche sequenze, dette **promotori**, e termina in corrispondenza di altre sequenze, dette **sequenze di terminazione**
- Alla fine della trascrizione si forma un filamento di RNA messaggero complementare al DNA stampo
- Nelle cellule eucariote il DNA rimane nel nucleo; l'mRNA trasporta l'informazione nel citoplasma passando attraverso la membrana nucleare

La trascrizione



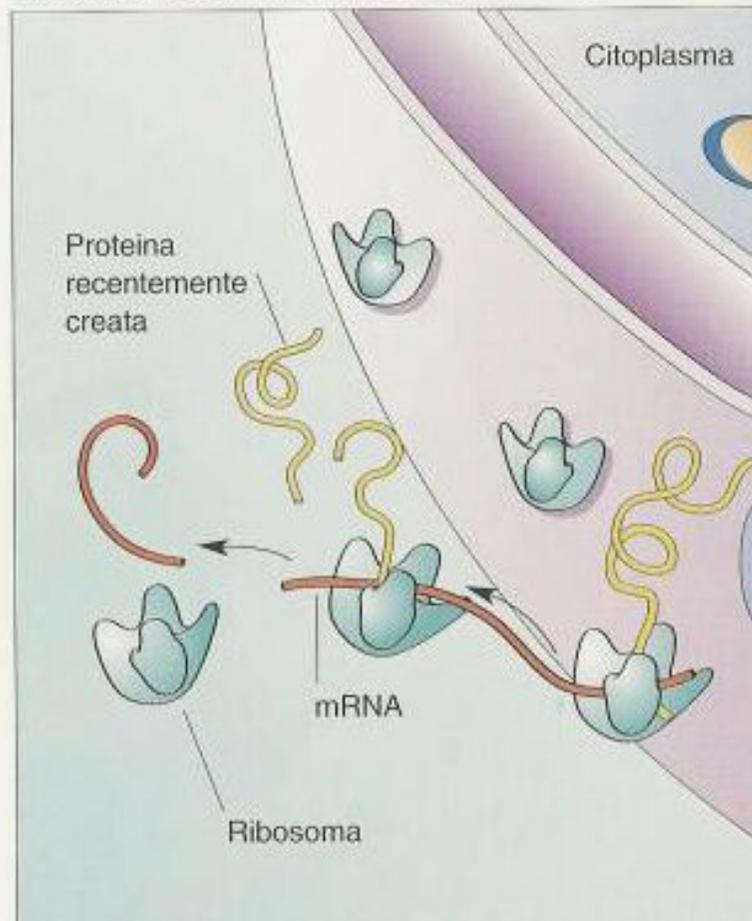
RNA messaggero

L' mRNA sarà una sorta di impronta "in negativo" del gene da cui si è originato...

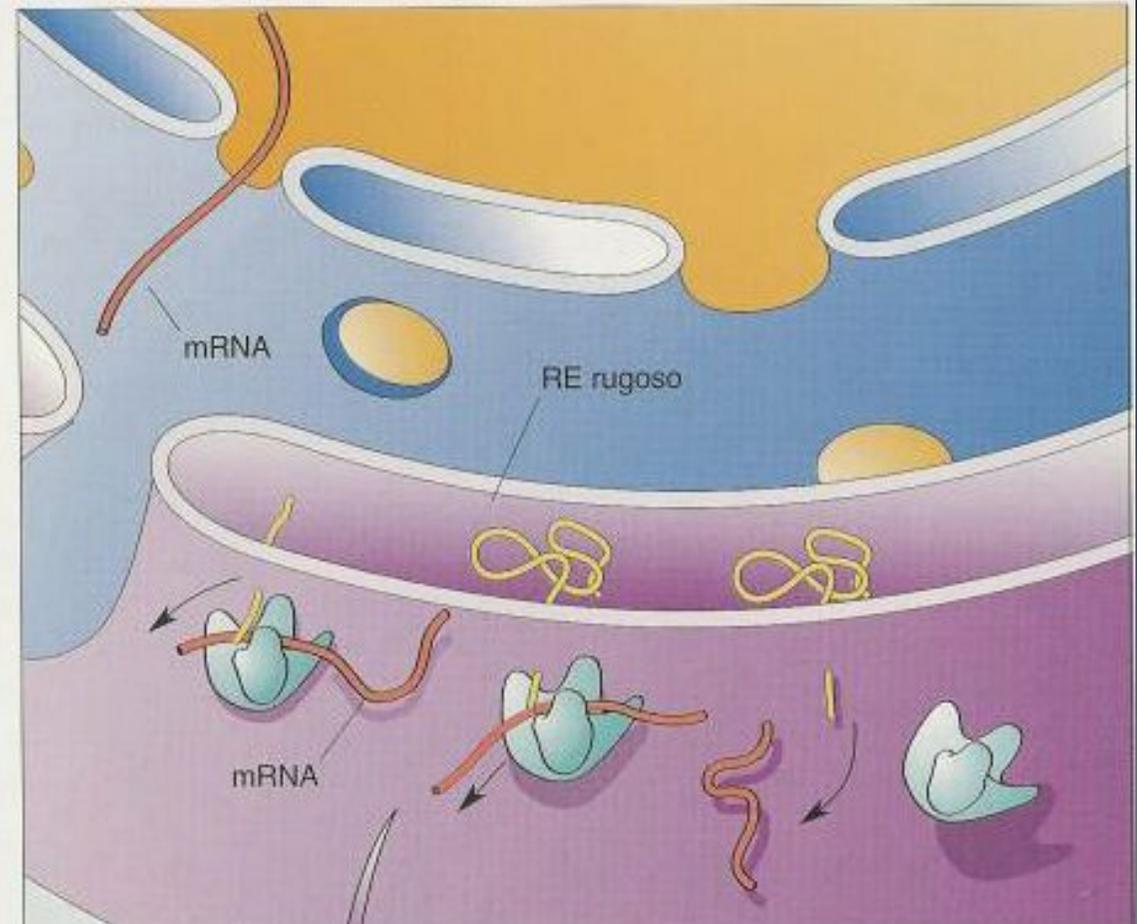
... e migrerà verso i ribosomi liberi nel citoplasma o verso quelli attaccati al reticolo endoplasmatico rugoso, portando le istruzioni per la sintesi della proteina.

Dalla trascrizione alla traduzione

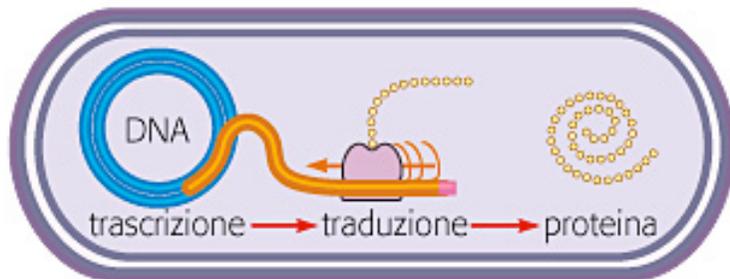
Sintesi proteica su di un ribosoma libero



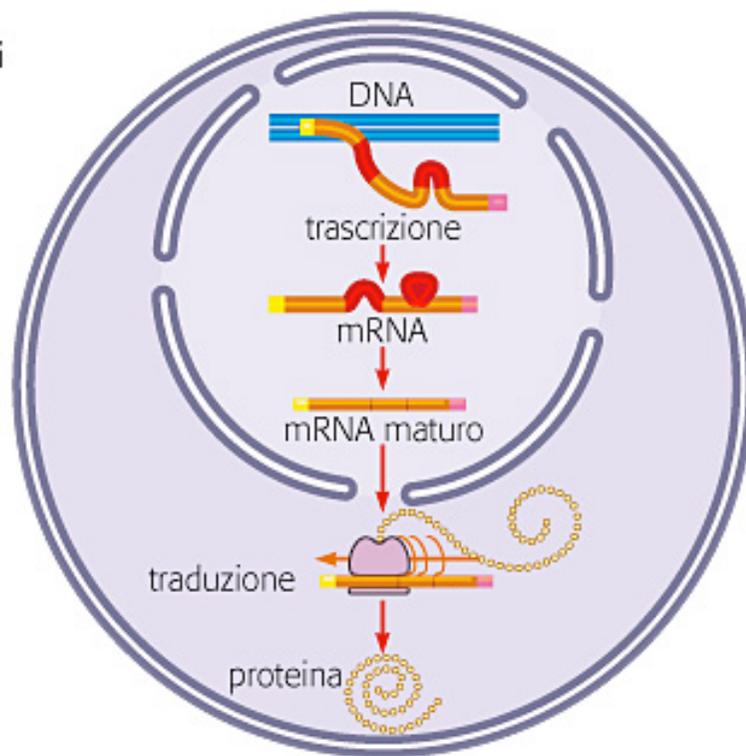
Sintesi proteica su di un RE rugoso



procarioti

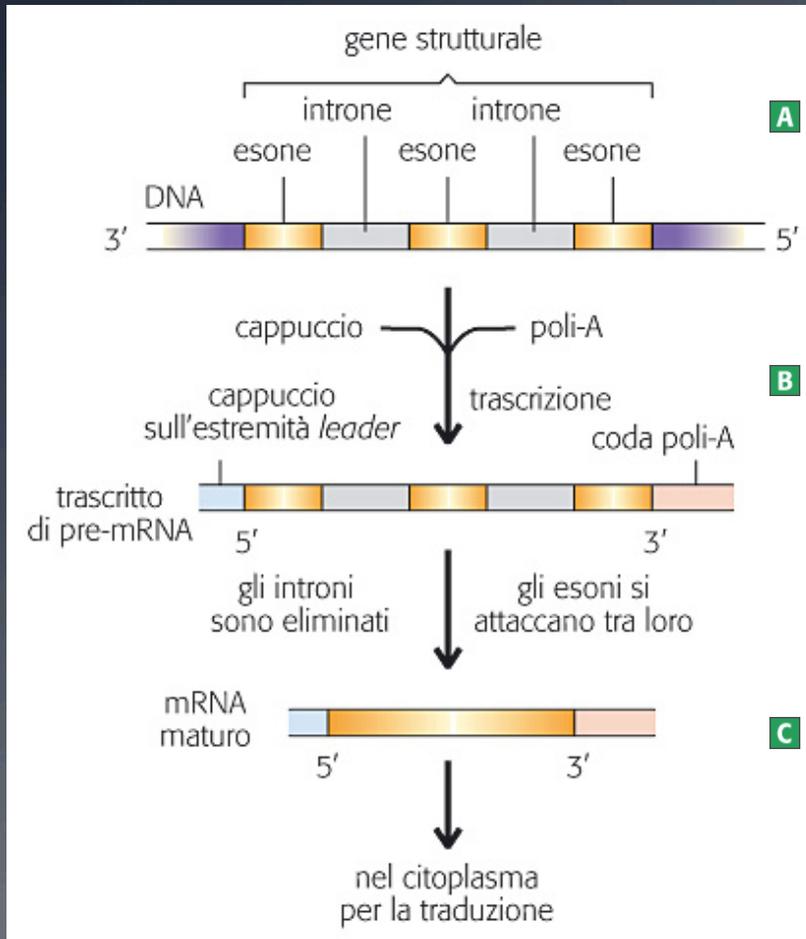


eucarioti



- Nelle cellule procariote la trascrizione e la traduzione avvengono quasi simultaneamente; la sequenza di mRNA trascritto è la stessa che viene tradotta
- Nelle cellule eucariote la trascrizione avviene nel nucleo; l'mRNA viene dapprima "elaborato", per poi dirigersi nel citoplasma dove viene tradotto in proteina

Maturazione dell'mRNA



- (A) Le sequenze nucleotidiche del gene eucariote presentano delle regioni tradotte (esoni) e altre che non vengono tradotte (introni)
- (B) Tutto il gene viene trascritto in mRNA, che successivamente subisce il processo di maturazione
- (C) Vengono rimossi gli introni e gli esoni si attaccano tra loro formando l'mRNA maturo

Il codice genetico

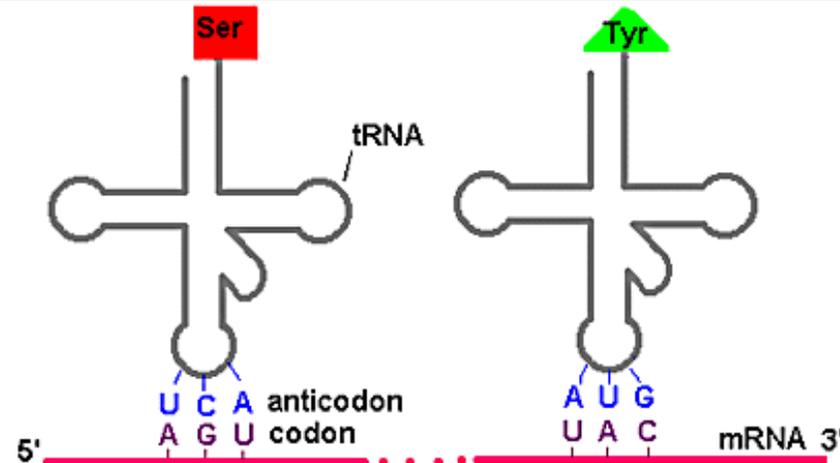
Ma come si fa a passare dal “linguaggio” degli acidi nucleici (che utilizza 4 “lettere”)...



... al “linguaggio” delle proteine (che utilizza 20 “lettere”)?

Il codice genetico

- Il passaggio dall'alfabeto con cui è scritto il DNA all'alfabeto con cui sono scritte le proteine avviene tramite il **codice genetico**.



		2nd base in codon					
		U	C	A	G		
1st base in codon	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G	3rd base in codon
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G	
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G	
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G	

The Genetic Code

Il codice genetico

Il codice utilizzato si basa su triplette di basi...

... ma $4^3 = 64$ combinazioni sono più che sufficienti per codificare i 20 amminoacidi

Il codice genetico è a triplette, privo di interruzioni (non salta nucleotidi) e non sovrapponibile (letto senza interruzioni)

Il codice genetico

E' **universale**: praticamente tutti gli organismi viventi utilizzano questo stesso codice per tradurre una sequenza di basi azotate (il DNA e poi l'RNA) in una sequenza di amminoacidi (la proteina)

Ogni tripletta di basi sull'RNA è anche detta **codone**

Un amminoacido può essere specificato da più codoni ma ogni codone specifica un solo amminoacido

Il codice genetico

Ed ecco quindi il codice genetico:

E' **ridondante**: ci sono cioè più triplette che codificano per lo stesso amminoacido

Ci sono anche le triplette di **inizio** (AUG) e di **stop** (UAA, UAG e UGA) che determinano l'inizio e la fine di una sequenza polipeptidica

		Seconda lettera del codone							
		U		C		A		G	
U	Prima lettera del codone (in direzione 5')	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
C		CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
A		AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
		AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
G		GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
		GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
		GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
		GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

La traduzione

Si svolge in tre fasi

inizio

Comporta la formazione di un complesso molecolare costituito da:

- RNA messaggero
- ribosoma
- primo RNA di trasporto

allungamento

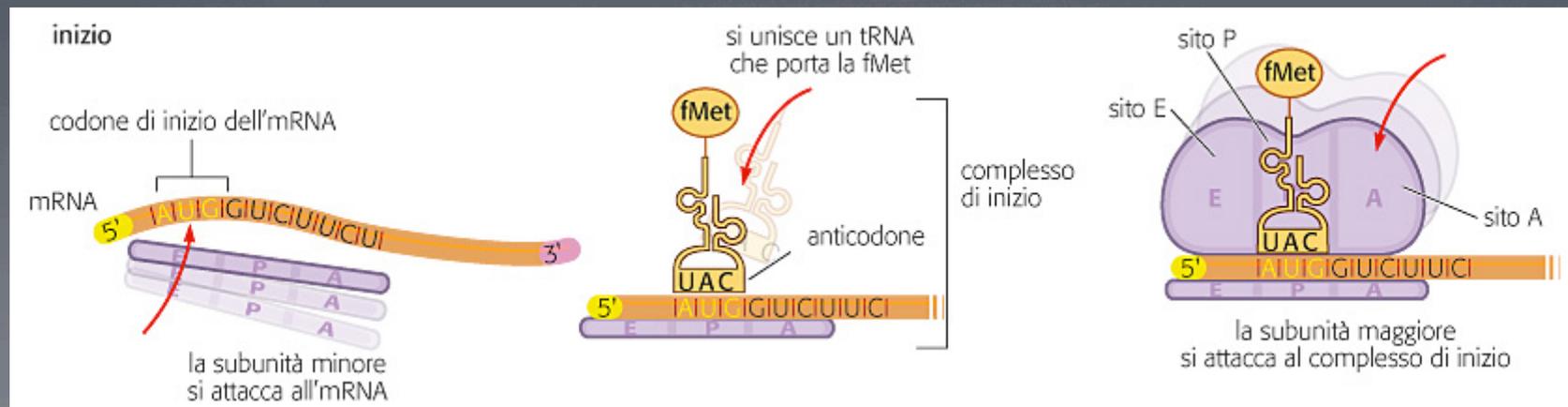
Consiste nell'allungamento della catena proteica grazie all'aggiunta progressiva di amminoacidi

terminazione

Avviene quando si arriva in corrispondenza, sul ribosoma, dei codoni di stop. La proteina viene liberata nella cellula

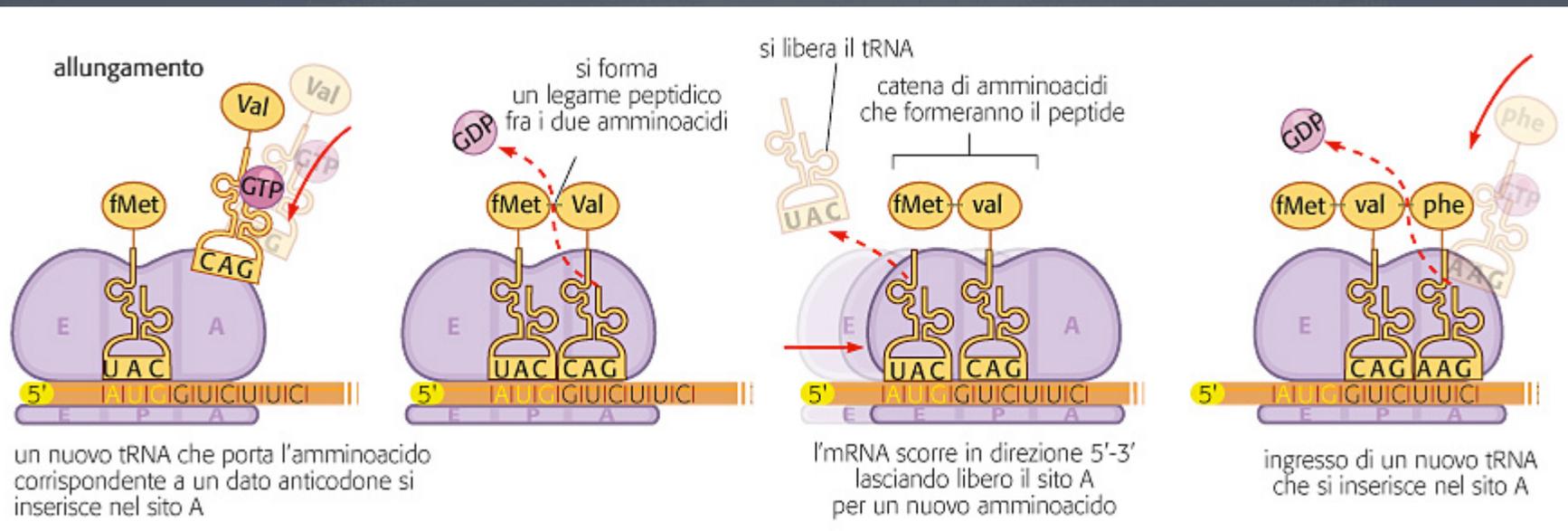
Traduzione : inizio

- La subunità minore del ribosoma si attacca all'mRNA
- Viene esposto il primo codone, che in genere è AUG
- Il primo tRNA che porta legata la metionina (formilmetionina nei procarioti) si lega al ribosoma sul sito P
- Anche la subunità grande del ribosoma si unisce al complesso d'inizio



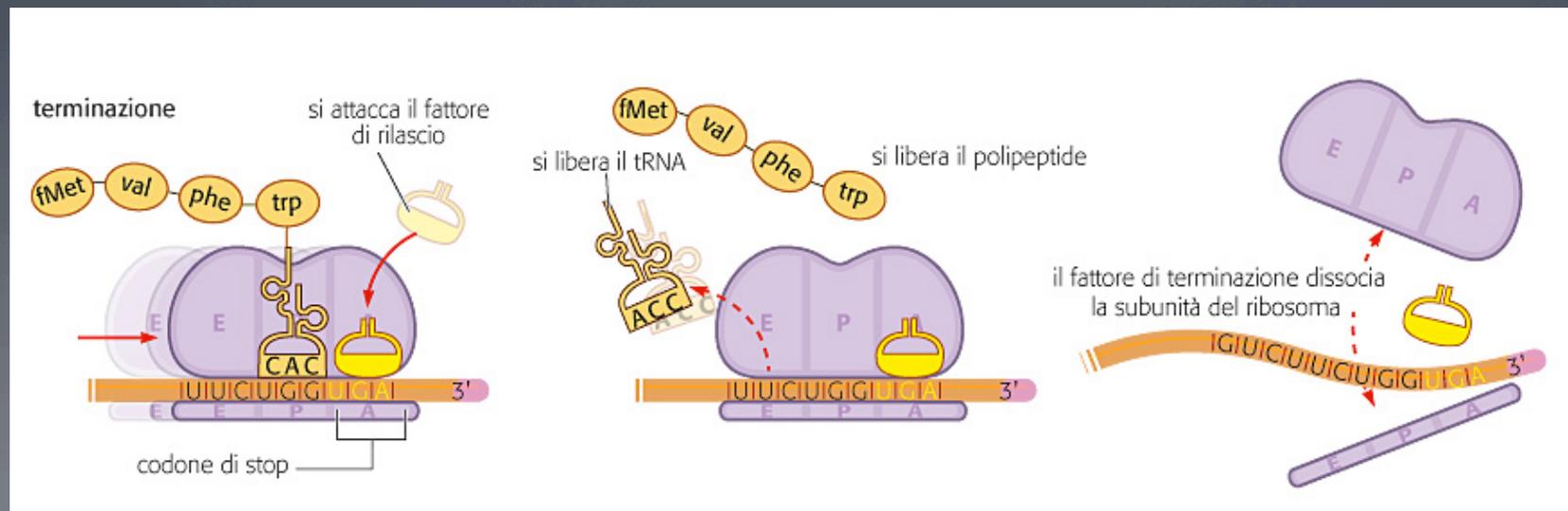
Traduzione: allungamento

- Il secondo codone dell'mRNA si trova in corrispondenza del sito A della subunità maggiore del ribosoma
- Un secondo tRNA si lega sul sito A
- Si forma un legame peptidico tra i due amminoacidi adiacenti
- L'mRNA scorre in avanti di un codone sul ribosoma
- Il primo tRNA si sposta sul sito E e viene liberato
- Il tRNA con i due amminoacidi legati si porta sul sito P liberando il sito A che esporrà il terzo codone al successivo tRNA



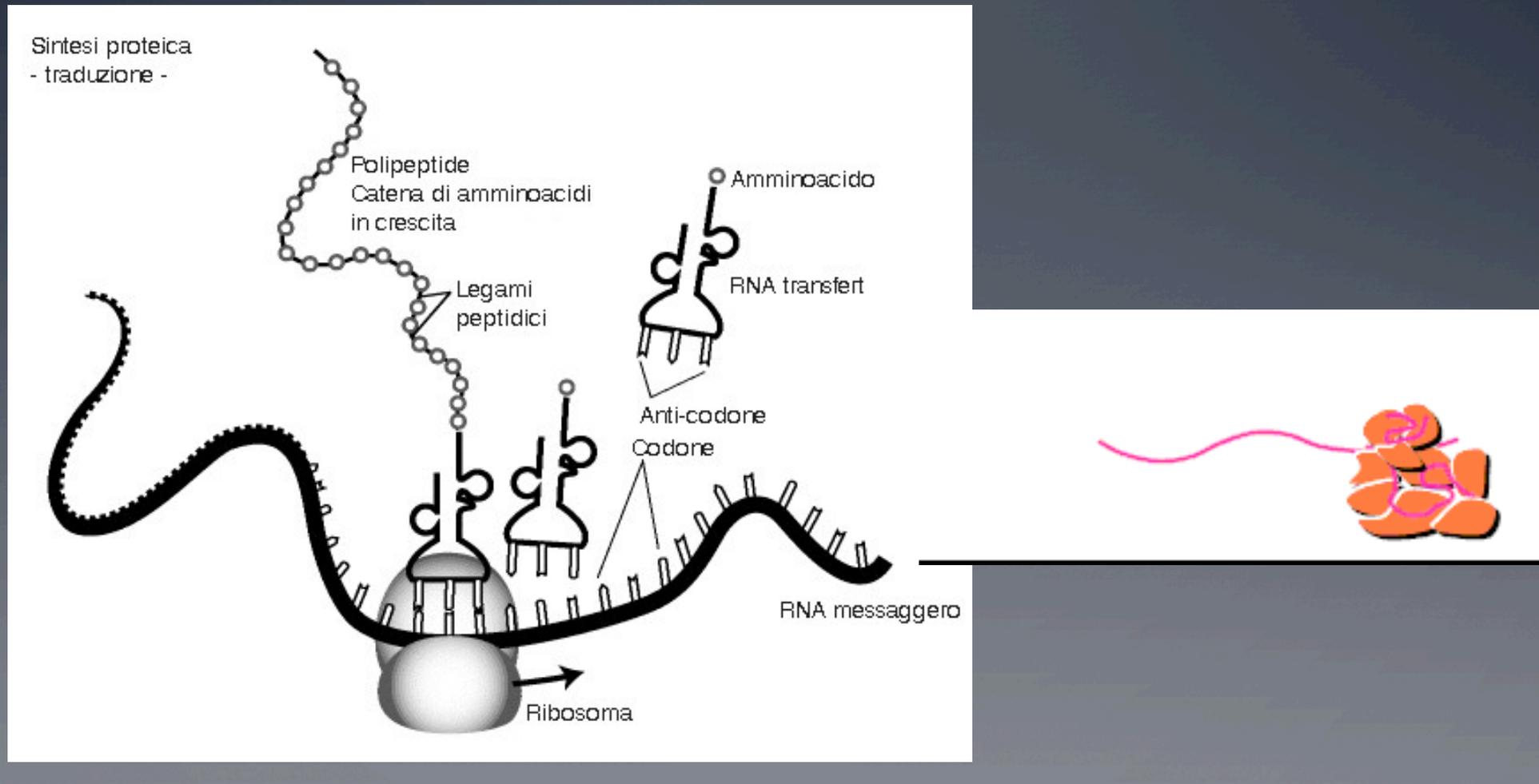
Traduzione: terminazione

- All'estremità del filamento è presente uno dei codoni di stop
- Non esistono tRNA che riconoscono questi codoni, quindi nel sito A non entrerà nessun tRNA e la trascrizione avrà termine
- Le due subunità del ribosoma si staccano
- L'mRNA può essere riletto
- I tRNA ritornano liberi nella cellula
- La proteina seguirà il suo destino di maturazione



La traduzione

In questo modo si viene a costruire un polipeptide sempre più grande finché non si arriva ad un codone di stop e la sintesi si interrompe.

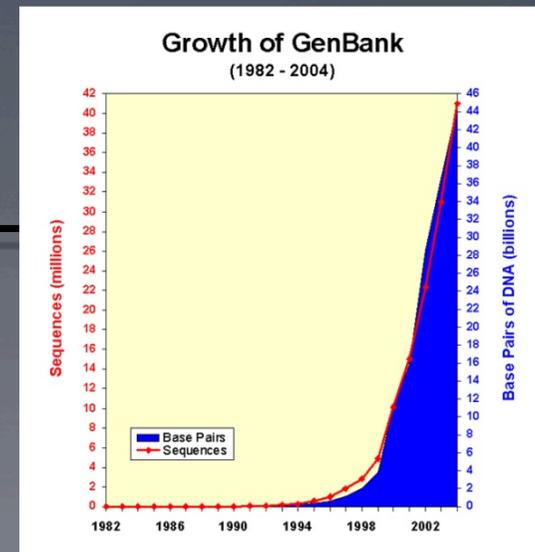
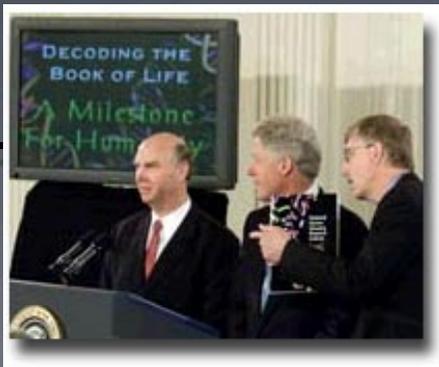


La genomica moderna: sequenze

- Automatizzazione dei processi di sequenziamento del DNA
- Sequenziamento sistematico di molti organismi. Nascita delle banche dati genomiche

> *homo_sapiens*

```
ACTTTTACCCTCGTGTGTTGC  
AGACTTTTGCCACTTTAAAC  
GCTGACAATTCGACCCTTCCAA  
GTGCAAAAAGTGCCAAGATTTA  
CGATAAATTCCCCCGAGAGACG  
TGTGCA.....
```



Struttura del Genoma

- La densita' di sequenze codificanti proteine (o RNA) diventa sempre piu' bassa man mano che aumenta la complessita' dell'organismo. E' molto alta nei Procarioti, media nel lievito, bassissima nell'uomo. **La maggior parte del genoma umano (99%) non e' codificante !**
 - Questo DNA non codificante e' (probabilmente) coinvolto nella **regolazione dell'espressione genica.**
-

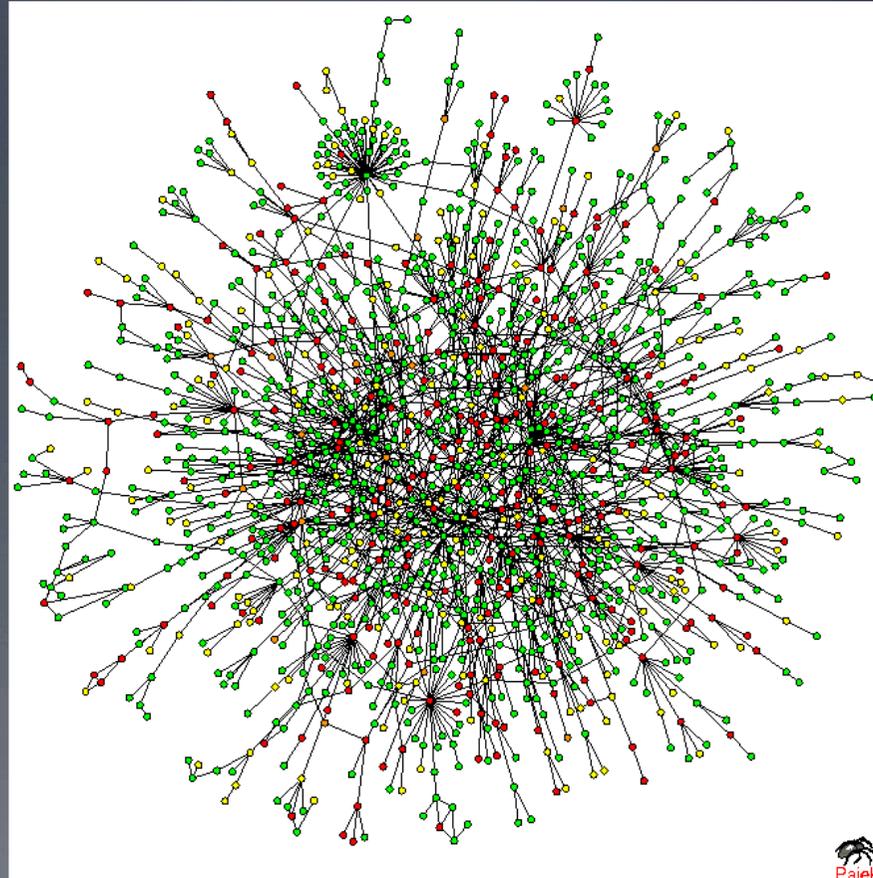
Struttura dei Geni

Un tipico gene umano ha una struttura interna molto complessa: e' composto da un set di sequenze codificanti (dette **esoni**) separate da sequenze non codificanti (dette **introni**). Gli esoni possono essere combinati in molti modi diversi a formare proteine diverse (**splicing alternativo**)

La genomica moderna: *networks*

- Le proteine (geni) dentro una cellula formano un network.
- La risposta di una cellula ad un certo stimolo è una risposta "globale", non di singole unità separate.

H.Jeong et al.
Nature, 411 (2001) 41



Mutazioni

Una mutazione è il cambiamento della sequenza o del numero dei nucleotidi dell'acido nucleico

Può verificarsi in:

- un gamete e trasmettersi alle generazioni successive
- una cellula somatica e trasmettersi alle cellule figlie

Classificazione delle mutazioni

Una mutazione puntiforme interessa un singolo nucleotide e può essere

Mutazione di senso

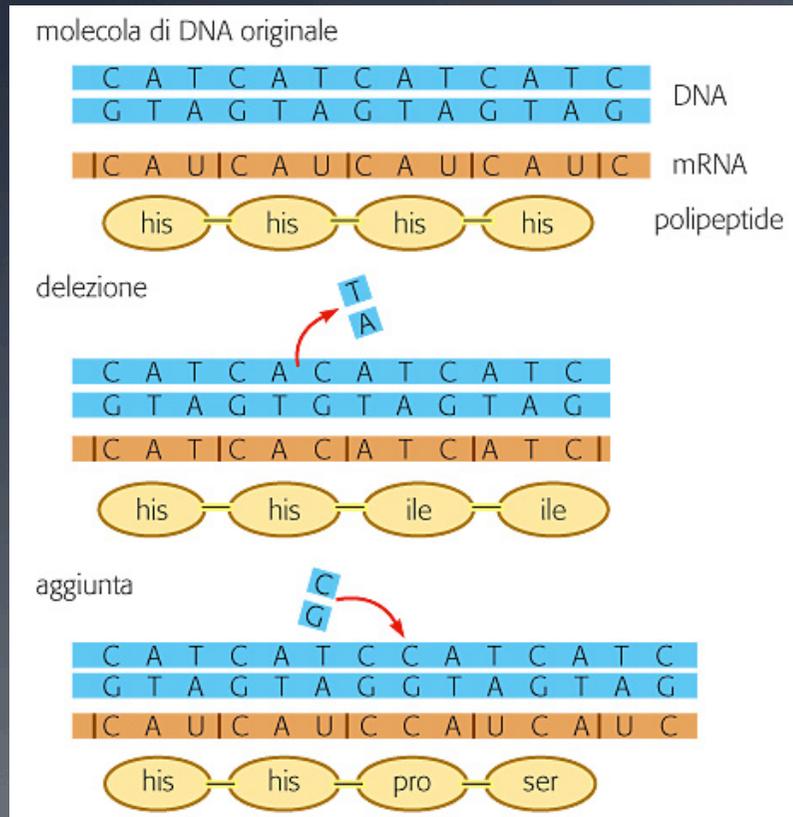
Consiste nella **sostituzione** del singolo nucleotide con possibile variazione dell'amminoacido nella proteina.

Se l'amminoacido svolge un ruolo importante nella formazione della struttura tridimensionale della proteina, l'intera proteina si modifica (p.e. nell'anemia falciforme)

Mutazione di non senso

Il nucleotide sostituito determina un codone di arresto che provoca la fine della sintesi proteica con formazione di una proteina incompleta (p.e. nella distrofia muscolare di Duchenne)

Mutazioni



La **mutazione silente** non comporta alcun cambiamento di amminoacidi e non si riflette in una modificazione della proteina

Altri cambiamenti possono derivare dall'**inserzione** o dalla **delezione** di un nucleotide; questo comporta il cambiamento di tutto il modulo di lettura del codice e la formazione di proteine non funzionali

RNA polimerasi

- L'RNA-polimerasi è un enzima che copia un tratto del filamento di DNA stampo
- Commette molti errori (uno ogni 105 nucleotidi circa) perché non ha capacità di correzione (*proofreading*) come la DNA-polimerasi
- Gli errori commessi sono causa di **mutazioni**

