

Prof. Giorgio Sartor

Sintesi proteica

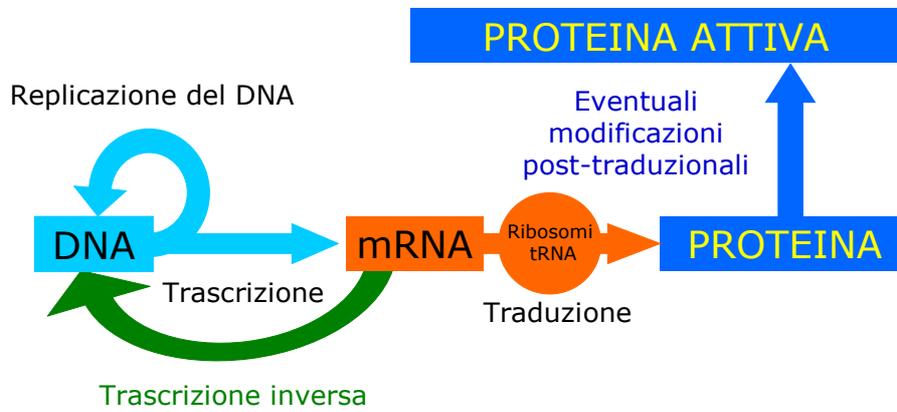
Copyright © 2001-2013 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

B15 - Versione 1.0 - nov 2013

Trasmissione dell'informazione

- L'informazione è contenuta nel DNA ed è trasferita al RNA e quindi espressa nella struttura delle proteine
 - Processo a due stadi:
 - **Trascrizione** – L'informazione è trascritta dal DNA in mRNA
 - **Traduzione** – L'informazione nel mRNA è tradotta nella struttura primaria delle proteine
 - Modificazioni postraduzionali
 - Le proteine subiscono delle trasformazioni che le rendono funzionanti.

Flusso dell'informazione genica

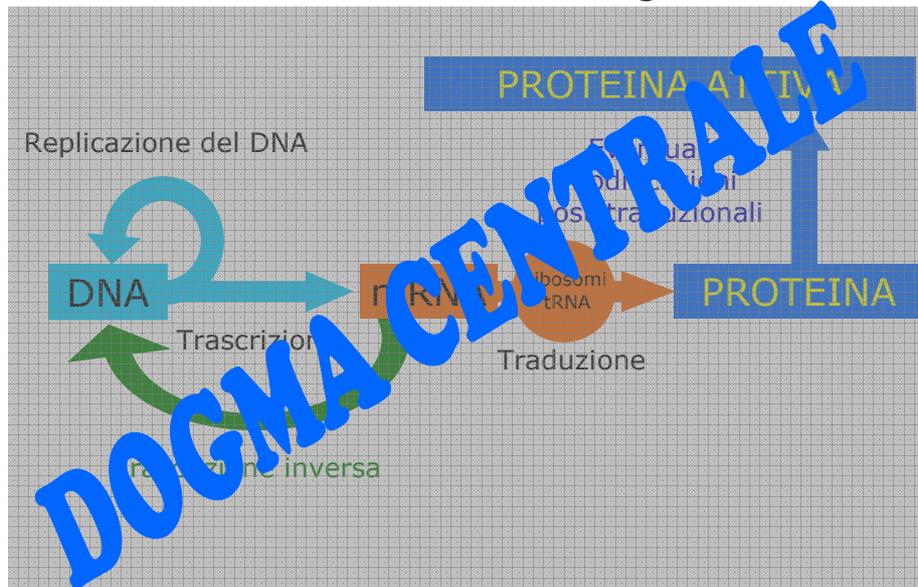


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 3 -

Flusso dell'informazione genica

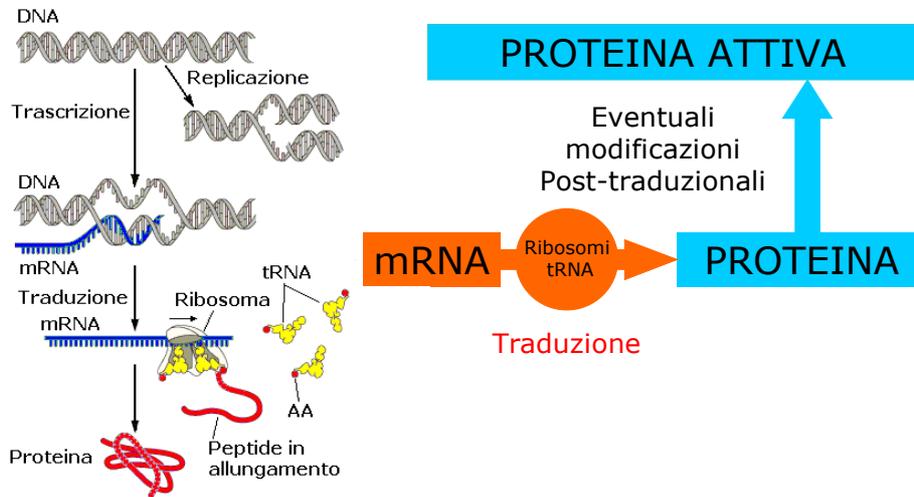


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 4 -

Flusso dell'informazione genica



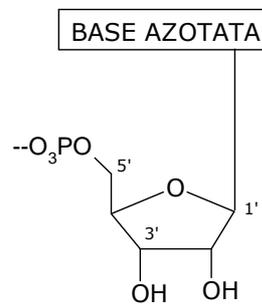
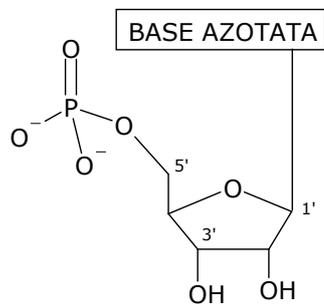
B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 5 -

RNA

- Polimero di nucleotidi
 - I nucleotidi sono formati di una base azotata,
 - Un pentoso (riboso)
 - Un fosfato



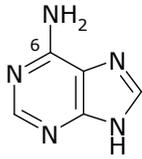
B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

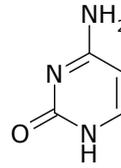
- 6 -

Le basi azotate

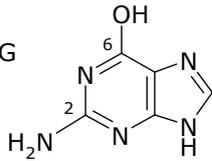
- Purine
- Adenina - A



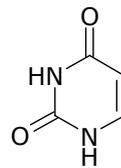
- Pirimidine
- Citosina - C



- Guanina - G



- Uracile - U



RNA

- Quattro tipi di RNA:
 - RNA messaggero (**mRNA**) - trasporta l'informazione genetica dal DNA nel nucleo al citoplasma dove le proteine sono sintetizzate
 - RNA transfer (**tRNA**) - trasporta gli amino acidi dal pool degli amino acidi al mRNA
 - RNA ribosomale (**rRNA**) - insieme alle proteine ribosomali forma i ribosomi dove gli aminoacidi sono uniti per formare la struttura primaria delle proteine.
 - Small nuclear RNA (**snRNA**) - associato a proteine nucleari forma le "small nuclear ribonucleoprotein particles" (**snRNPs**) che elidono gli introni dal pre-mRNA.

Dal mRNA alla sintesi delle proteine

- L'ordine con il quale gli aminoacidi si legano tra loro è specificato dal codon nel mRNA.
- Il transfer RNA (tRNA) agisce come un adattatore.
- Vi è un tRNA per ogni aminoacido (tRNA^{Phe}).
- Attraverso l'interazione codon-anticodon il tRNA porta l'aminoacido codificato dal codon nel mRNA.
- L'enzima **aminoacil-tRNA sintetasi**, una famiglia di enzimi attivatori, lega lo specifico aminoacido all'appropriato tRNA, si forma tRNA carico.

Traduzione

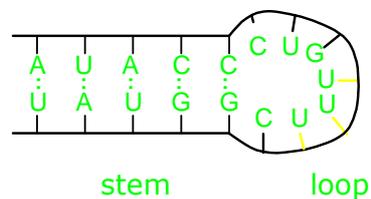
- **Procarioti**: la traduzione inizia prima che la sintesi del mRNA (trascrizione) sia completata
- **Eucarioti**: la trascrizione avviene nel nucleo mentre la traduzione avviene nel citoplasma
- La traduzione richiede quattro componenti:
 - ribosomi,
 - tRNA,
 - Enzimi attivatori e
 - mRNA

Traduzione

- La traduzione ha tre fasi :
 - **Attivazione** del tRNA,
 - **Iniziazione** della traduzione,
 - **Allungamento** del polipetide,
 - **Terminazione** della traduzione.

Struttura del RNA

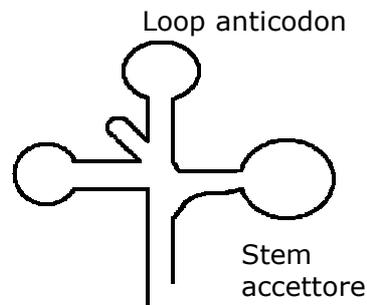
- Molti RNA hanno struttura secondaria che consiste in domini (stem e loop)
- Gli **stems** a doppia elica derivano dall'accoppiamento di basi tra regioni complementari dello stesso strand.
- I **loops** sono presenti dove vi è mancanza di complementarietà o dove vi sia la presenza di modificazioni delle basi che ne prevengano l'accoppiamento.



Struttura del RNA

- Il modello a trifoglio della struttura secondaria del tRNA enfatizza i due maggiori tipi di domini: **stem e loop**.

- Il tRNA include molte basi modificate, in particolare nei domini dei loops.
- La struttura terziaria dipende dalle interazioni tra basi a maggiore distanza. Molte di queste interazioni sono dovute ad appaiamenti e possono coinvolgere tre o più basi.
- Normalmente il **tRNA** si ripiega per formare una struttura a forma di **L**.



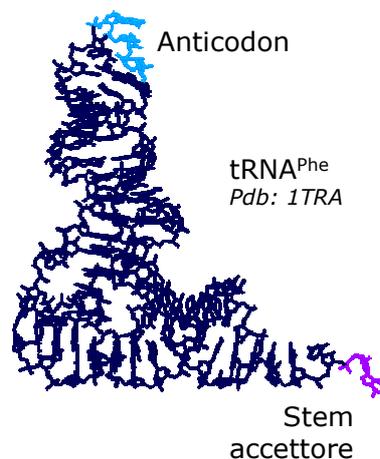
B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 13 -

Struttura del tRNA

- Il terminale 3' del tRNA che si estende al di fuori dello stem accettore ha la sequenza CCA.
- L'aminoacido si attacca al ribosio al terminale 3' (in rosso)
- Il loop anticodon è all'estremità opposta della struttura a L.
- Alcuni RNA, inclusi quelli virali e segmenti del rRNA si ripiegano in pseudonodi, strutture terziarie che mimano la struttura 3D del tRNA.
- Gli pseudonodi sono stabilizzati da legami idrogeno non standard



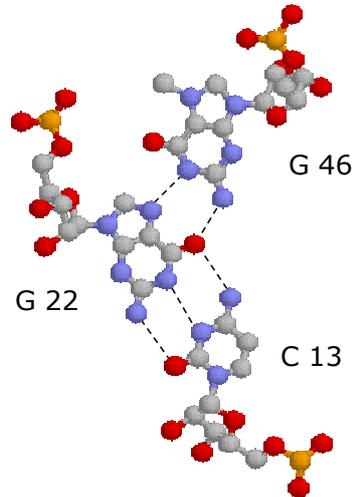
B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 14 -

Struttura del tRNA

- L'accoppiamento non-standard tra basi è dovuto alla formazione di legami idrogeno ed aiuta la stabilizzazione della struttura a forma di L. (1TN2)

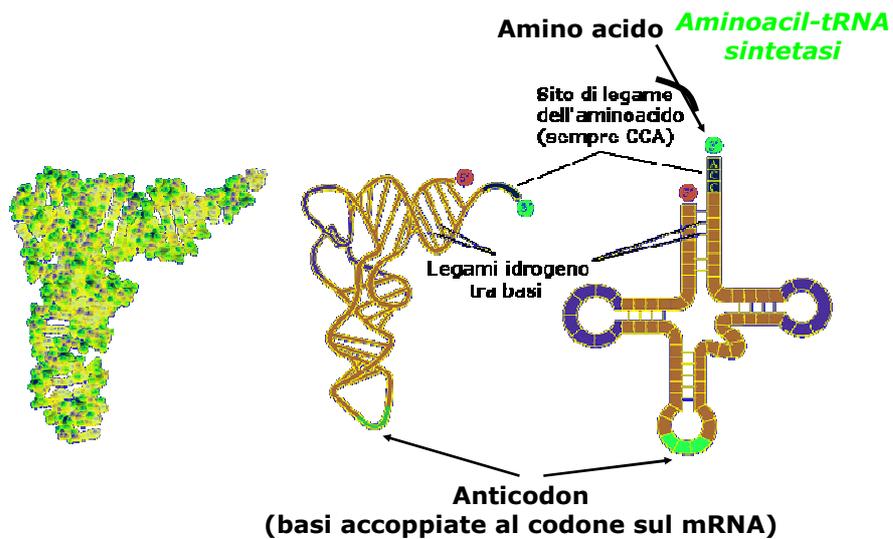


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 15 -

Il tRNA

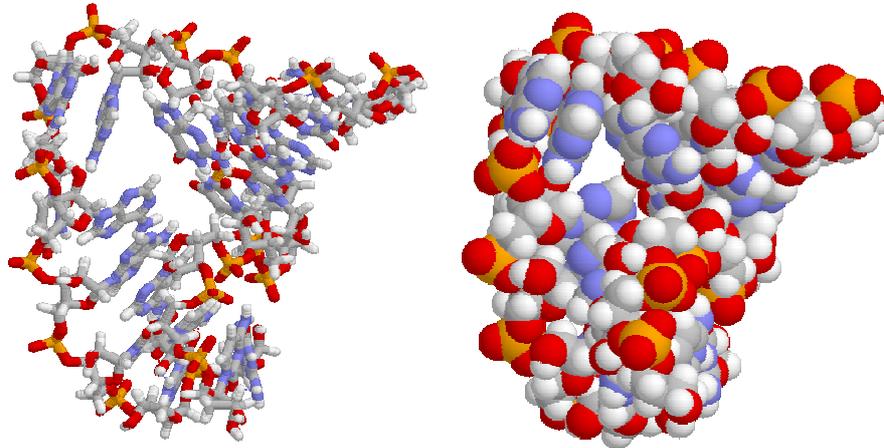


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 16 -

tRNA



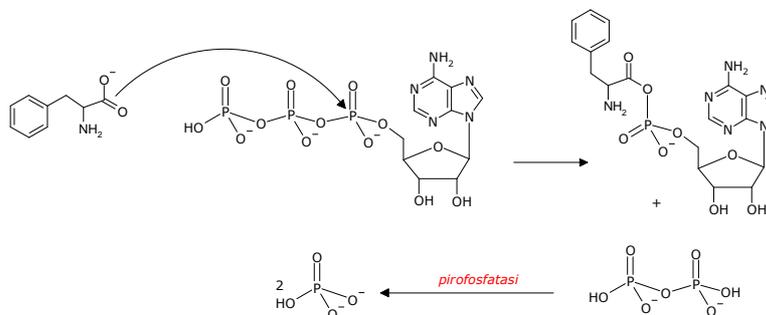
B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 17 -

Attivazione - Come si carica il tRNA

- L'enzima Aminoacil-tRNA Sintetasi catalizza il legame tra l'appropriato aminoacido ed ogni tRNA. La reazione avviene in due stadi.
- Nel primo stadio un atomo di ossigeno del gruppo α -carbossilico di un aminoacido attacca l'atomo di fosforo dell' ATP.

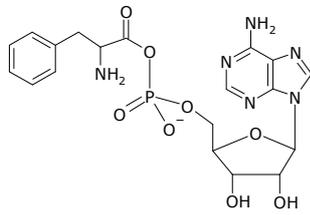


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

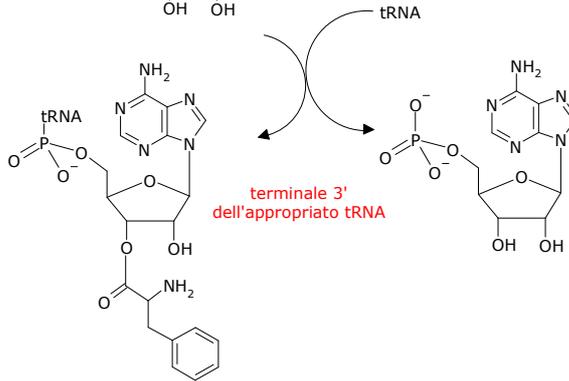
Sintesi e degradazione delle proteine

- 18 -

Attivazione - Come si carica il tRNA



- Nel secondo stadio il gruppo OH in 2' o 3' dell'adenosina terminale del tRNA attacca l'aminoacido al carbonio carbonilico.



Aminoacil-tRNA Sintetasi

Sommario della reazione

1. **amino acido** + **ATP** → **aminoacil-AMP** + **PP_i**
2. **aminoacil-AMP** + **tRNA** → **aminoacil-tRNA** + **AMP**

La reazione è globalmente spontanea a causa della concentrazione del **PP_i** mantenuta bassa a causa della sua idrolisi, catalizzata dalla pirofosfatasi.

Aminoacil-tRNA Sintetasi

- Ci sono differenti **Aminoacil-tRNA Sintetasi (aaRS)**, una per ogni aminoacido
- Ogni aaRS riconosce il suo particolare AA e il tRNA codifica per quel AA.
- La traduzione accurata del codice genetico dipende dal legame di ogni AA all'appropriato tRNA.
- I domini di tRNA che riconosciuti da un aaRS sono chiamati elementi di identità.
- I maggiori elementi di identità sono l'**acceptor stem** e l'**anticodon loop**.

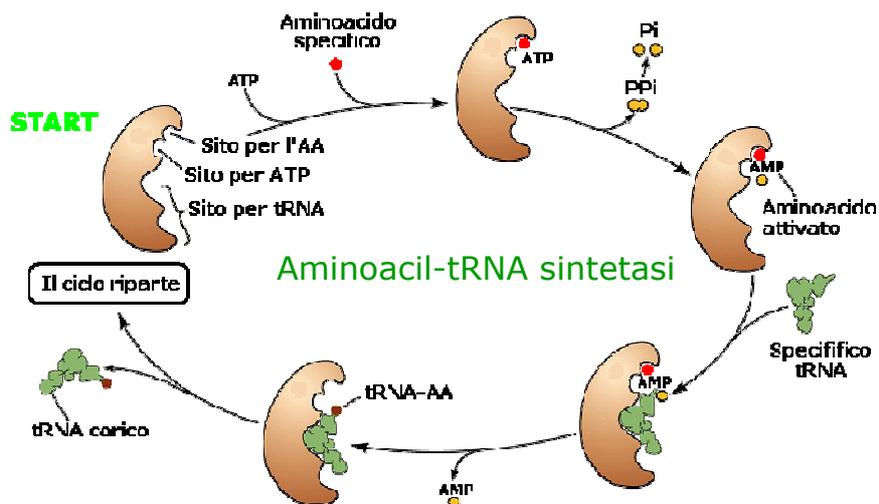
Aminoacil-tRNA Sintetasi: Classe I e Classe II

- Due differenti proteine ancestrali si sono evolute nelle due classi di aaRS che differiscono nella topologia del dominio del sito attivo.
- Le due classi si legano da parti opposte dell'acceptor stem del tRNA, ciò provoca una aminoacilazione a differenti posizioni dell'anello ribosidico (2' o 3').

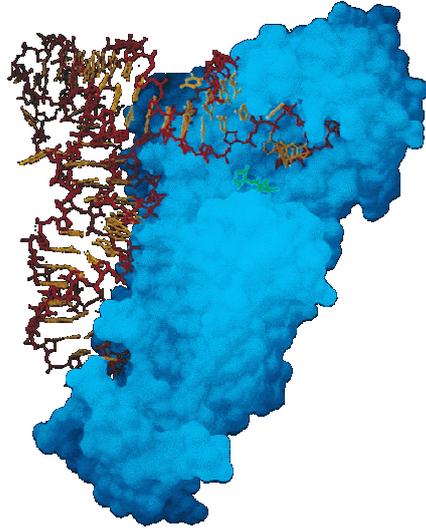
Aminoacil-tRNA Sintetasi: Classe I e Classe II

- Classe I:
 - Gli elementi di identità includono i residui del anticodon loop e dell'acceptor stem.
 - L'aminoacilazione avviene al **2'-OH** dell'adenosina al terminale 3'.
- Classe II:
 - Gli elementi di identità per alcuni enzimi di Classe II non includono il dominio anticodon.
 - Tendono ad aminoacilare il **3'-OH** dell'adenosina al terminale 3'.

Attivazione - Come si carica il tRNA



Aminoacil-tRNA sintetasi

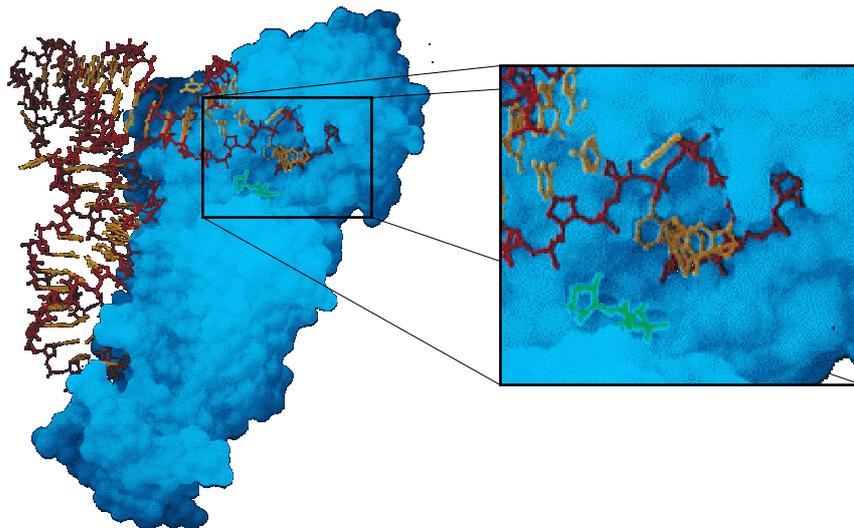


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 25 -

Aminoacil-tRNA sintetasi

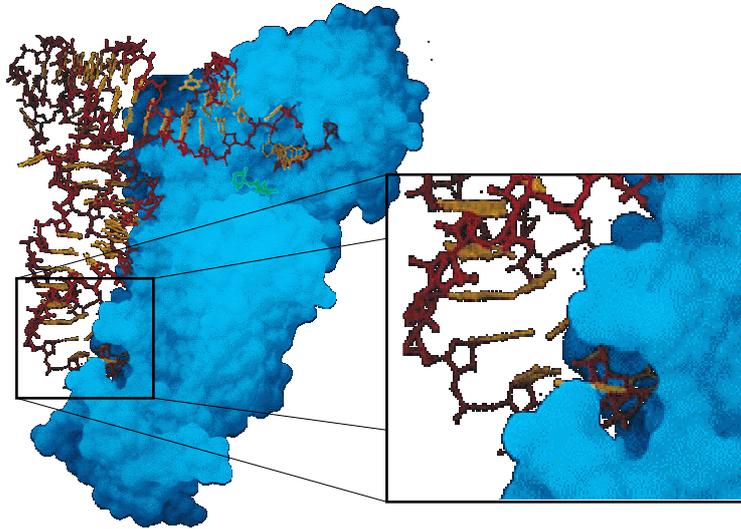


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 26 -

Aminoacil-tRNA sintetasi

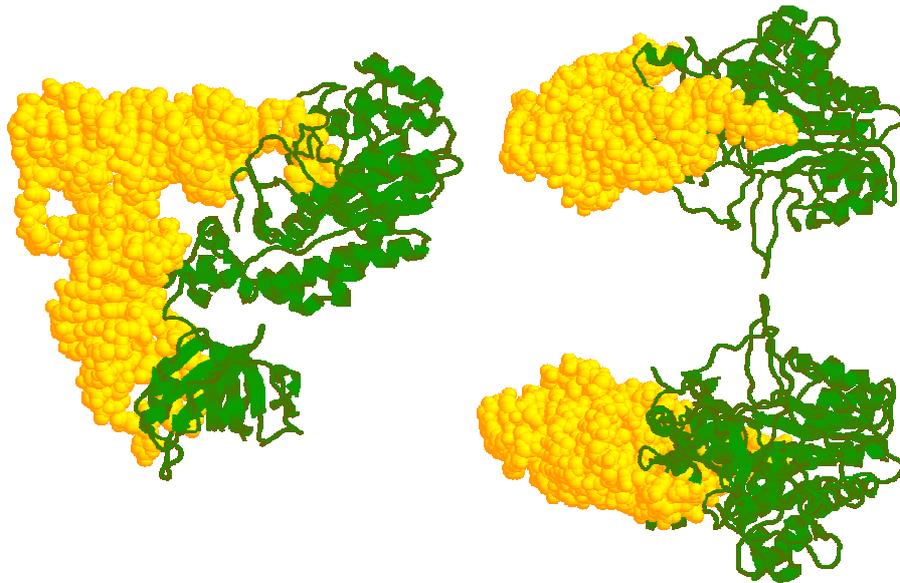


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 27 -

Aminoacil-tRNA sintetasi



B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

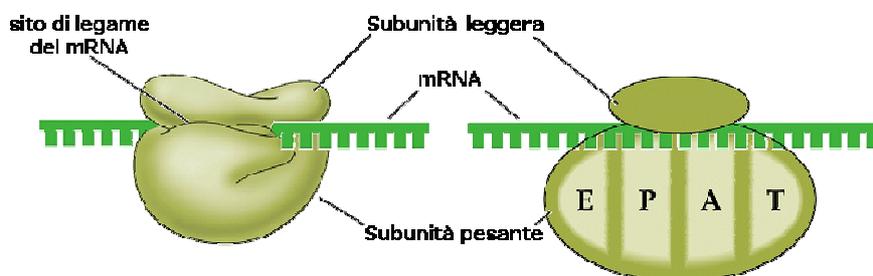
Sintesi e degradazione delle proteine

- 28 -

Sintesi proteica

Il ribosoma

- Il mRNA incontra il tRNA carico nei ribosomi
- Il ribosoma è composto di due subunità: leggera e pesante
- Il ribosoma ha quattro siti: E, P, A, T



Codice genetico

- Il codice genetico è basato su una sequenza di basi in un acido nucleico.
- Ogni **codon**, una sequenza di **tre basi** nel mRNA, codificano per un particolare aminoacido, o per una terminazione.
- Alcuni aminoacidi sono codificati da due o più codons.
 - **Sinonimi** (codons multipli per lo stesso aminoacido) in molti casi differiscono solo nella 3^a base.
 - Ci sono **61 codons** per **20 aminoacidi**.
 - Codons simili tendono a codificare per AA simili.
 - Effetti di mutazioni sono minimizzati.

1 ^a base	2 ^a base				3 ^a base
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met*	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

1 ^a base	2 ^a base				3 ^a base
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met*	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 33 -

1 ^a base	2 ^a base				3 ^a base
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met*	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

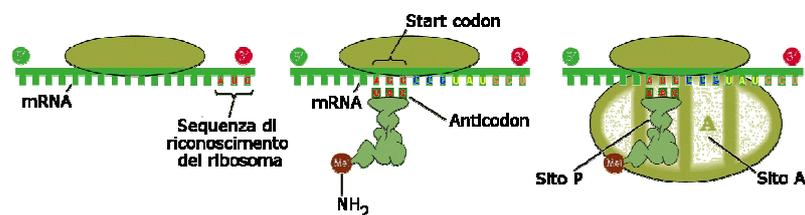
Sintesi e degradazione delle proteine

- 34 -

Traduzione

- La traduzione ha tre fasi:
 - **Iniziazione**
 - **Allungamento**
 - **Terminazione**
- **Iniziazione:**
 - Si forma un complesso di iniziazione, che consiste nel legame tra un tRNA iniziatore caricato con metionina e la subunità leggera del ribosoma legato al mRNA fa partire la sintesi proteica.

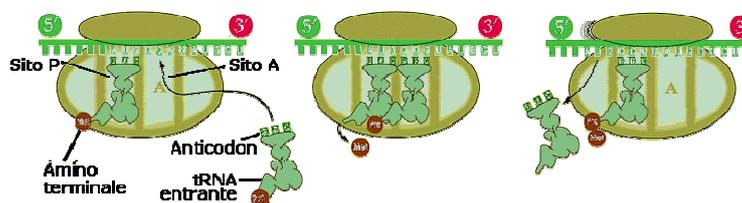
Traduzione - Iniziazione



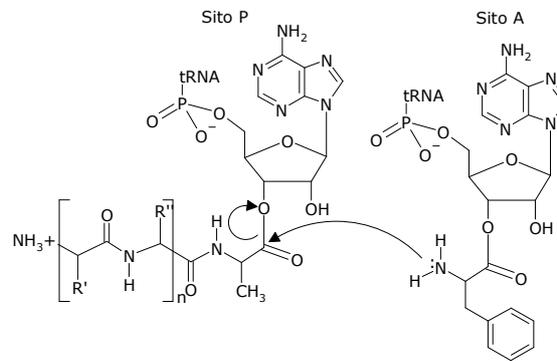
Traduzione - Allungamento

- Il ribosoma si muove lungo il mRNA un codon alla volta in direzione $5' \rightarrow 3'$
- I polipeptidi crescono dal **N terminale verso il C terminale**
- I tRNA carichi portano gli aminoacidi al ribosoma sequenzialmente
- La specificità è data da:
 - L'interazione **anticodon** (tRNA) -**codon** (mRNA)
 - L'accuratezza dell'**aminoacil-tRNA sintetasi**

Traduzione - Allungamento



Traduzione - Allungamento

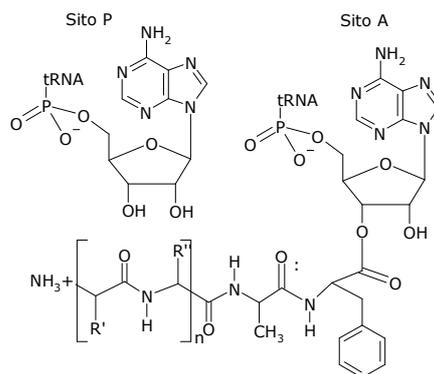


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 39 -

Traduzione - Allungamento

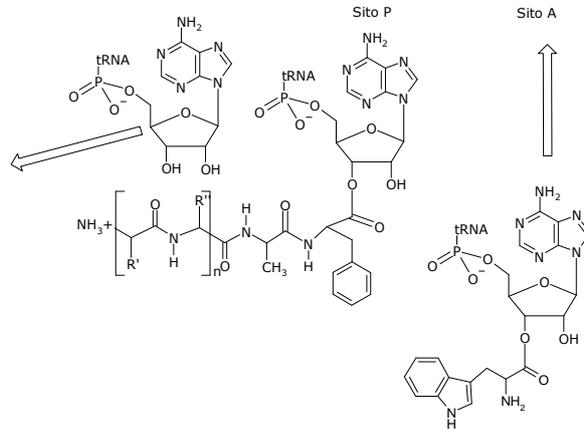


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 40 -

Traduzione - Allungamento

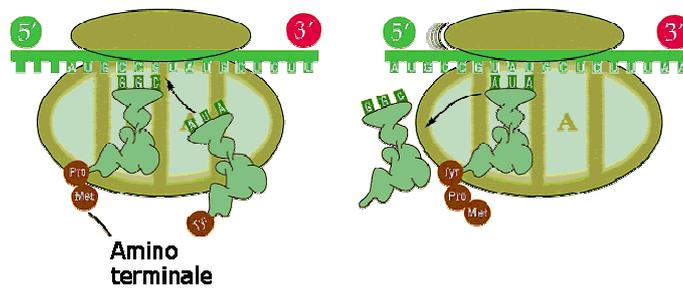


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 41 -

Traduzione - Allungamento



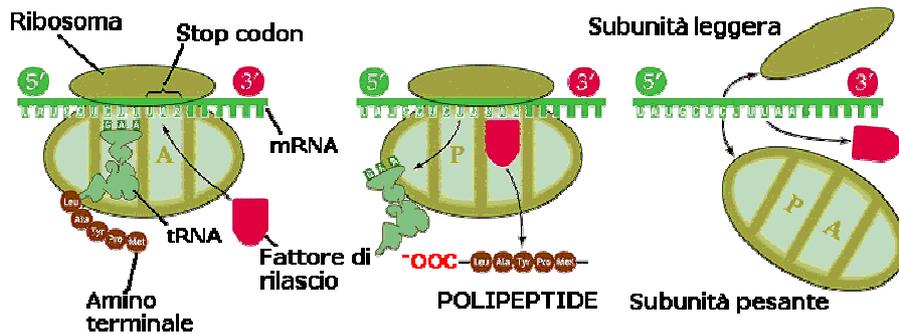
B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 42 -

Traduzione - Terminazione

- La presenza di uno **stop codon** nel sito A del ribosoma causa la fine della traduzione.
- La proteina completa è rilasciata.

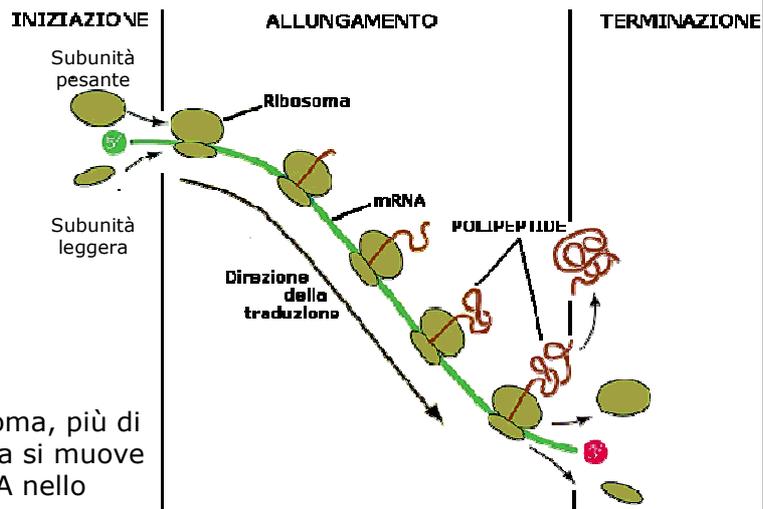


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 43 -

Traduzione



- In un polisoma, più di un ribosoma si muove lungo mRNA nello stesso tempo.

B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 44 -



The Nobel Prize in Chemistry 2009

"for studies of the structure and function of the ribosome"



Photo: MRC Laboratory of Molecular Biology

Venkatraman Ramakrishnan

🕒 1/3 of the prize

United Kingdom

MRC Laboratory of Molecular Biology
Cambridge, United Kingdom



Credits: Michael Marsland/Yale University

Thomas A. Steitz

🕒 1/3 of the prize

USA

Yale University
New Haven, CT, USA;
Howard Hughes Medical Institute



Credits: Micheline Pelletier/Corbis

Ada E. Yonath

🕒 1/3 of the prize

Israel

Weizmann Institute of Science
Rehovot, Israel

Ribosome in action

Polisomi

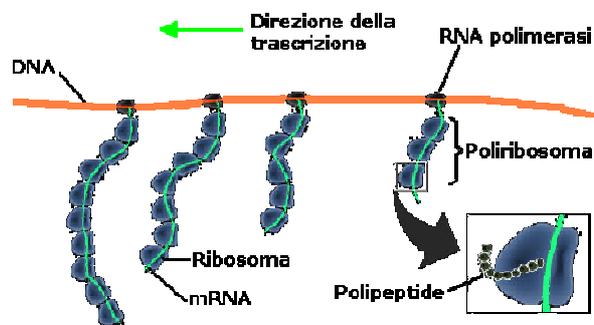
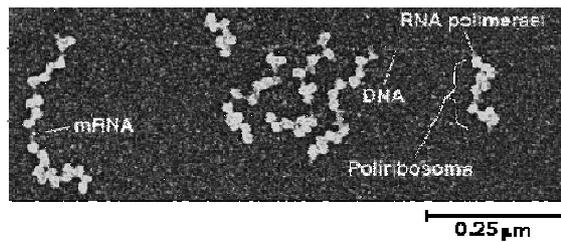


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 47 -

Polisomi nei batteri



B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 48 -

Correzione di bozze e controllo di qualità

- Alcune Aminoacil-tRNA Sintetasi hanno siti catalici separati che rilasciano per idrolisi un aminoacido non corretto che viene attivato e trasferito al tRNA.
- Per esempio l'aminoacil-tRNA Sintetasi per isoleucina (IleRS) in una piccola percentuale delle volte attiva l'aminoacido (simile) valina a valina-AMP.
- Dopo che la valina viene trasferita al tRNA^{Ile}, si forma valina-tRNA^{Ile} che viene quindi rimossa per idrolisi ad un sito catalitico separato di IleRS che accoglie la valina ma non la più grande isoleucina.

Modificazione di aminoacidi

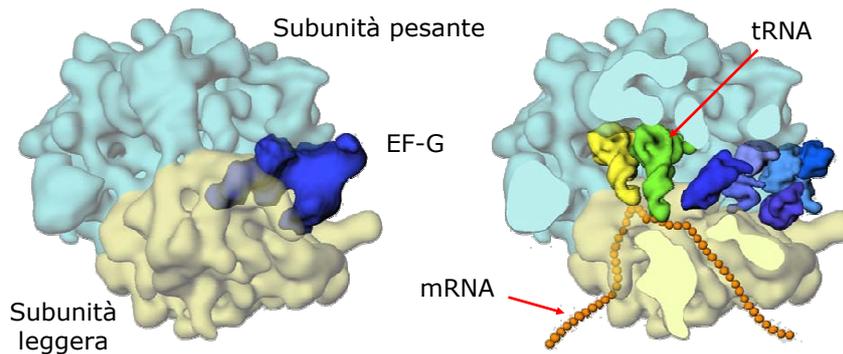
- Alcuni aminoacidi sono modificati dopo essere legati al tRNA.
- Per esempio: **tRNA^{fMet}** viene prima caricata con metionina
- L'enzima Metionil-tRNA Formiltransferasi catalizza la formilazione della metionina usando tetraidrofolato come donatore di formili per ottenere formilmetionina-tRNA^{fMet}.

Struttura dei ribosomi

Ribosoma da:	Ribosoma intero	Subunità leggera	Subunità pesante
<i>E. coli</i>	70S	30S 16S RNA 21 proteine	50S 23S e 5S RNAs 31 proteine
Citoplasma di ratto	80S	40S 18S RNA 33 proteine	60S 28S, 5.8S, e5S RNA 49 proteine

I ribosomi degli eucarioti sono più grandi e complessi di quelli dei procarioti. I ribosomi dei mitocondri e dei cloroplasti sono ancora diversi.

Struttura del ribosoma di *E. coli*

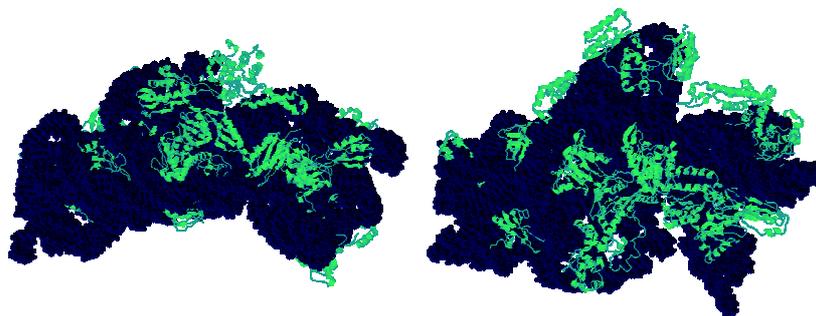


La sezione a destra mostra la posizione del tRNA (siti P, E) e del mRNA.

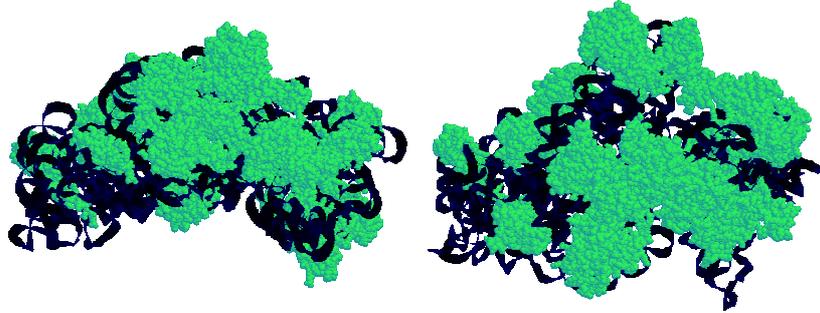
Ribosoma: Subunità leggera

- Nel complesso con il ribosoma il mRNA sfila attraverso un tunnel nella subunità leggera.
- Il sito di legame del tRNA è in una piega della subunità leggera.
- La terminazione 3' del rRNA 16s batterico è coinvolto nel legame del mRNA.
- La subunità leggera è relativamente flessibile e può assumere differenti conformazioni.
 - La subunità 30S del ribosoma batterico subisce un cambiamento conformazionale quando interagisce con il fattore di iniziazione.

Ribosoma: Subunità leggera (*1J5E*)



Ribosoma: Subunità leggera (*1J5E*)

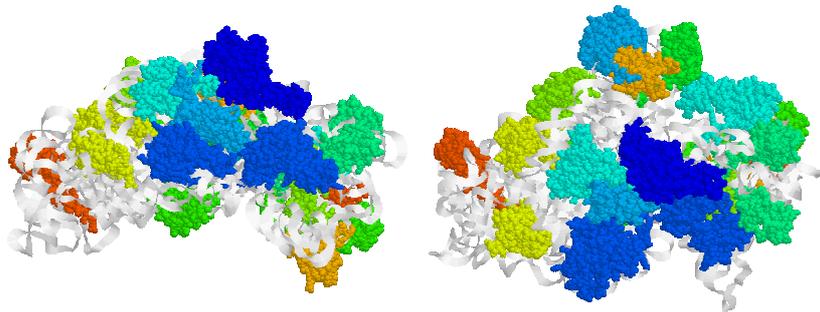


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 55 -

Ribosoma: Subunità leggera (*1J5E*)

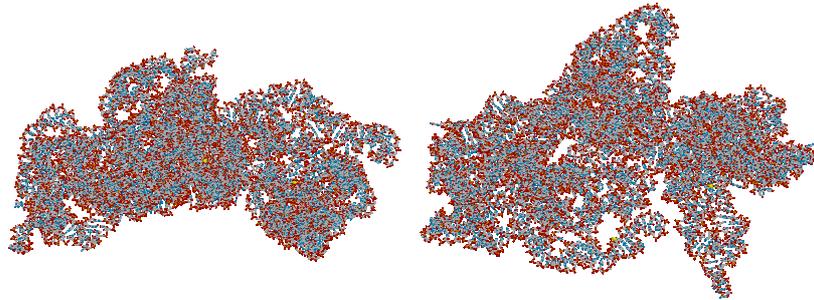


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 56 -

Ribosoma: Subunità leggera (*1J5E*)



B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 57 -

Ribosoma: Subunità leggera

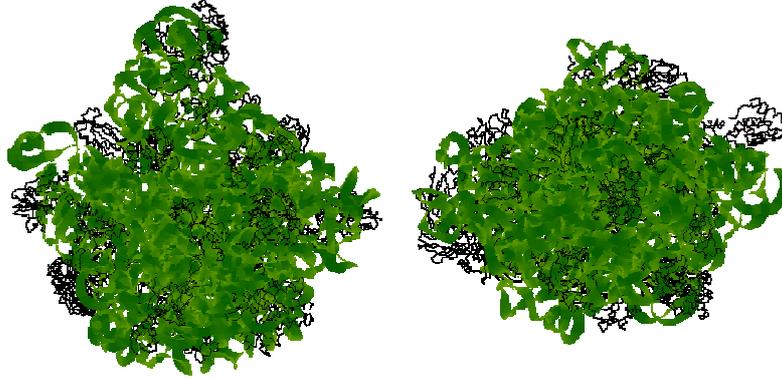
- La forma della subunità 30S è determinata dal rRNA
- Il rRNA è formato da doppie eliche connesse da loop a singolo filamento.
- Le proteine hanno domini globulari ed interagiscono, stabilizzandolo, con il rRNA.

B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 58 -

Ribosoma: Subunità pesante (*1FFK*)

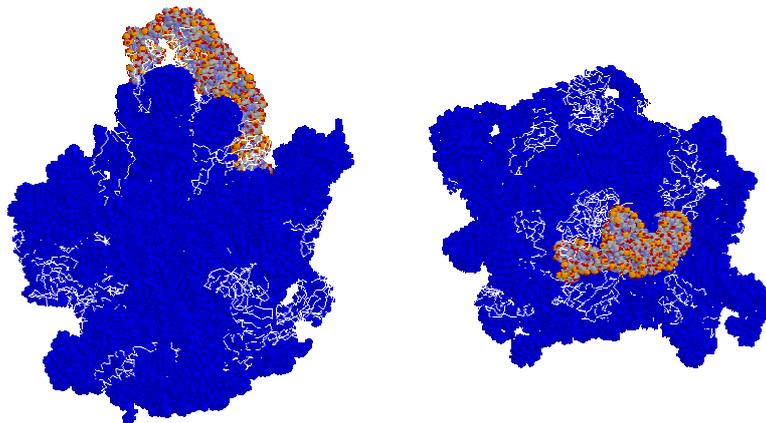


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 59 -

Ribosoma: Subunità pesante (*1FFK*)

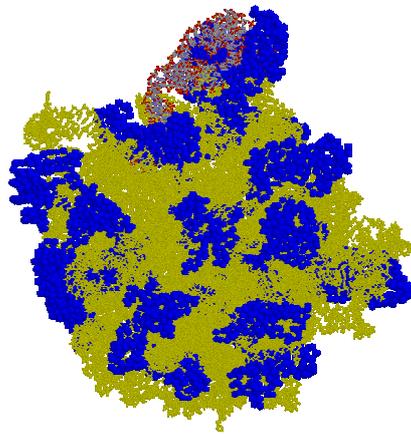


B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 60 -

Ribosoma: Subunità pesante (1FFK)



B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

- 61 -

Ribosoma: Subunità pesante

- L'interno della subunità pesante è fatto principalmente di RNA (23s)
- Le proteine sono distribuite nella superficie.
- Alcune proteine hanno una lunga coda che entra nell'interno del complesso.
- Queste code che interagiscono con il RNA, (carico negativamente) sono basiche.
- Il sito attivo per il legame peptidico è formato essenzialmente da proteine.
- L'attività peptidil transferasica è attribuita al rRNA 23s, (ribozima).
- Una adenosina universalmente conservata serve come aggancio per la formazione del legame peptidico.

B15 V.1.0 © gsartor 2001-2013

Sintesi e degradazione delle proteine

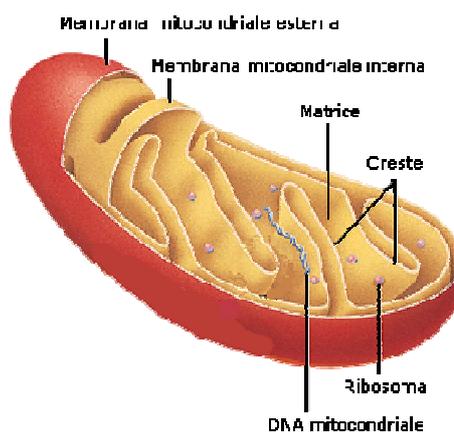
- 62 -

Sintesi proteica

- La sintesi proteica avviene nella cavità all'interno del ribosoma.
- Il polipeptide emerge dal tunnel nella subunità pesante.
- Alcune proteine neosintetizzate passano attraverso un canale nel lume del reticolo endoplasmatico o attraverso la membrana citoplasmatica all'esterno della cellula procariota.

Sintesi proteica mitocondriale

- I mitocondri contengono un proprio DNA e il sistema di sintesi proteica
- Il codice genetico mitocondriale è leggermente differente:
 - L'interazione codon-anticodon è semplificata
 - Lavora con solo 22 tRNA diversi
- Vengono sintetizzate solo un piccolo numero di proteine
 - La maggior parte delle proteine mitocondriali è codificata nel nucleo e trasportato nei mitocondri.



Adattato da: Tortora, GJ & Grabowski SR (2000)
Principles of Anatomy and Physiology (9th Ed).
New York: John Wiley & Sons. P84.

Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo materiale è stato assemblato da informazioni raccolte dai seguenti testi di Biochimica:
 - CHAMPE Pamela , HARVEY Richard , FERRIER Denise R. LE BASI DELLA BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-17030-9] – Zanichelli
 - NELSON David L. , COX Michael M. I PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER - Zanichelli
 - GARRETT Reginald H., GRISHAM Charles M. BIOCHIMICA con aspetti molecolari della Biologia cellulare - Zanichelli
 - VOET Donald , VOET Judith G , PRATT Charlotte W FONDAMENTI DI BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-06879-8] - Zanichelli
- E dalla consultazione di svariate risorse in rete, tra le quali:
 - Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
 - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>
 - Rensselaer Polytechnic Institute:
<http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/MB1index.html>
- Il materiale è stato inoltre rivisto e corretto dalla **Prof. Giancarla Orlandini** dell'Università di Parma alla quale va il mio sentito ringraziamento.

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:

<http://www.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>, oppure da <http://www.qsartor.org/>

Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor
Università di Bologna a Ravenna

Giorgio Sartor - giorgio.sartor@unibo.it