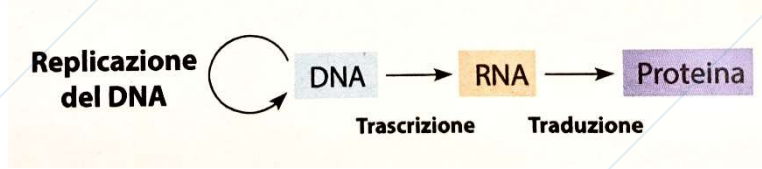


DOGMA CENTRALE DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE

Il DNA è il depositario dell'informazione genetica, la quale controlla la sequenza degli amminoacidi nelle proteine. Ma il DNA non è lo stampo diretto per questa sintesi.

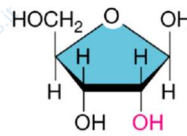
Il flusso dell'informazione genetica nelle cellule in genere procede dal DNA, all'RNA e alle proteine. Il DNA inizialmente agisce come stampo per la sintesi di una molecola di RNA, che a sua volta dirige la sintesi di una particolare proteina. Il principio della direzionalità del flusso informativo è noto come dogma della biologia molecolare.



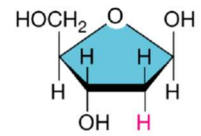
RNA

È un acido nucleico, un polimero lineare che presenta come zucchero il RIBOSIO.

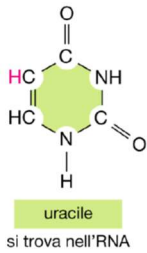
A differenza del DNA, l'URACILE sostituisce la timina.



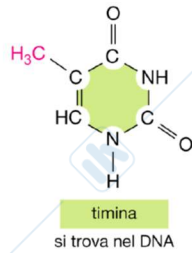
ribosio
si trova nell'acido ribonucleico (RNA)



deossiribosio
si trova nell'acido deossiribonucleico (DNA)

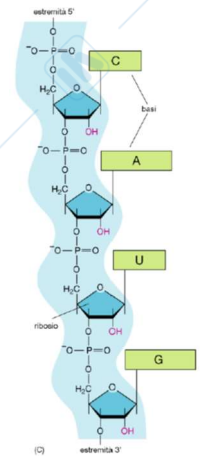


uracile
si trova nell'RNA

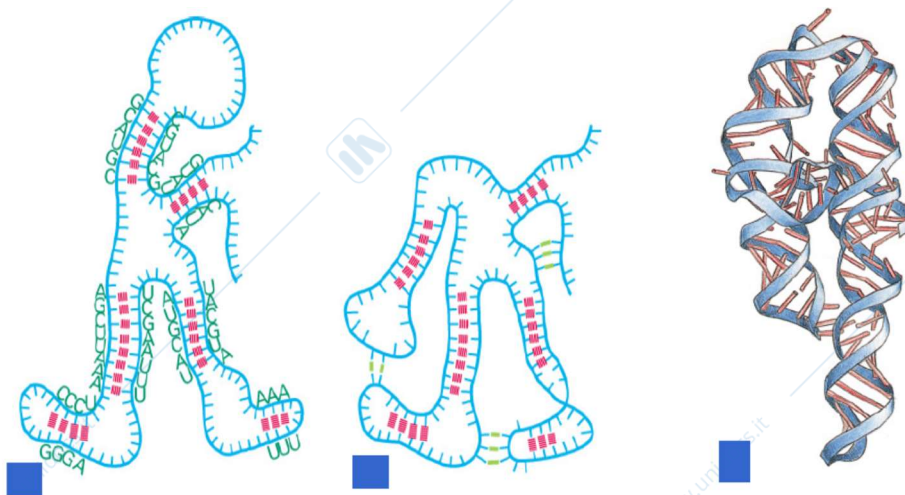


timina
si trova nel DNA

La maggior parte dell'RNA esiste a SINGOLO FILAMENTO.



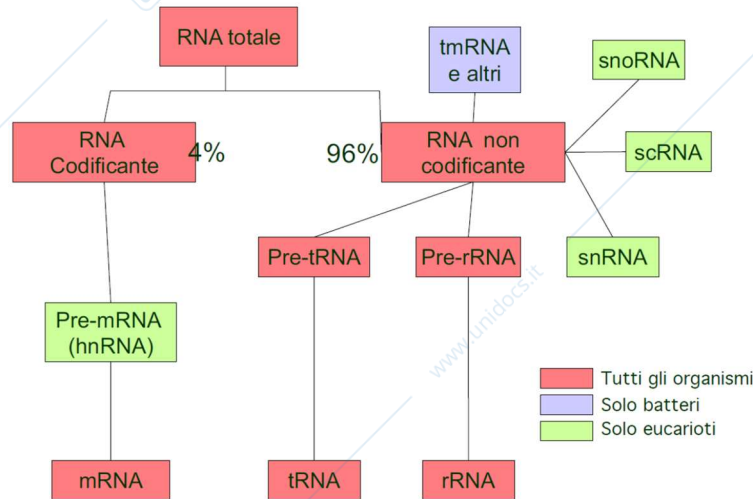
Esiste come singolo filamento, ma siccome le basi tendono a formare legami idrogeno con altri nucleotidi per stabilizzare la molecola, il filamento di RNA tende a ripiegarsi: ci sono dei punti particolari in cui c'è una piccola regione di complementarietà con un'altra regione della stessa molecola in cui si può formare una sorta di doppia elica (anche in questo caso i due filamenti sono antiparalleli).



Mentre il contenuto di DNA in una cellula è sempre il medesimo, il contenuto di RNA può variare: più è grande la cellula, più ne contiene.

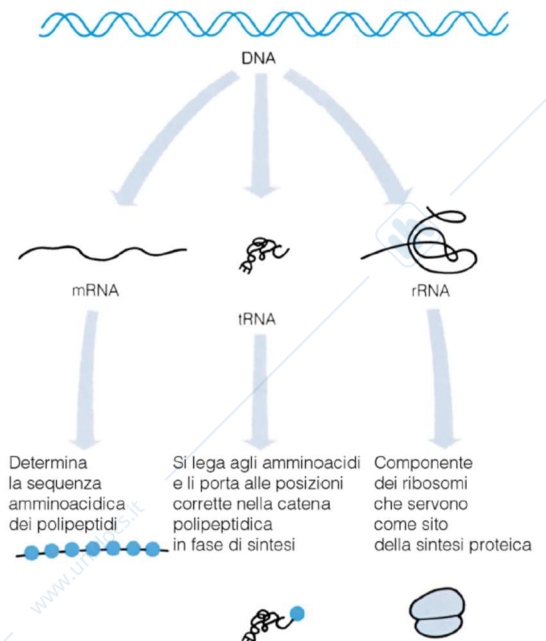
- Un batterio contiene 0,05-0,10 pg di RNA, equivalenti al 6% del suo peso totale
- Una cellula di un mammifero contiene 20-30 pg, equivalenti all'1% del peso totale

L'RNA TOTALE è formato da molti tipi di molecole di RNA, ognuno con una particolare funzione (più di quelli mostrati in figura).



L'RNA che è tradotto in proteina è chiamato RNA MESSAGGERO (mRNA) poiché trasporta un messaggio genetico dal DNA ai ribosomi, dove avviene la sintesi proteica. Per questo motivo rientra nell'RNA CODIFICANTE. Raramente superano il 4% dell'RNA totale (la maggior parte dell'RNA ha funzione strutturale o catalitica) e sono una componente fondamentale, definita come TRASCRITTOMA, la quale viene continuamente rinnovata attraverso il cambiamento del profilo di trascrizione del genoma. Hanno vita breve e vengono degradati poco tempo dopo la sintesi.

Altri due tipi di RNA sono coinvolti nella sintesi proteica: le molecole di RNA RIBOSOMIALE (Rrna), componenti integrali dei ribosomi, e le molecole di RNA DI TRASFERIMENTO (Trna), che servono come intermediari in grado di tradurre la sequenza di basi dell'RNA messaggero e portare l'appropriato amminoacido al ribosoma. Gli Rrna e i Trna non codificano essi stessi per le proteine, per questo motivo rientrano nell'RNA NON CODIFICANTE. Questi comprendono inoltre gli snRNA (small nuclear RNA), importanti per il processo di SPLICING, ovvero la maturazione dell'mRNA.

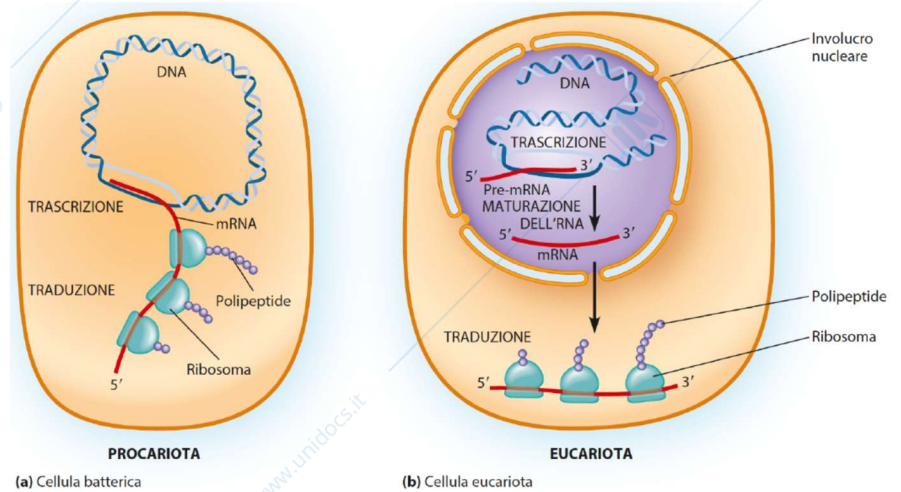


Tipo di RNA	Funzione
mRNA	RNA messaggeri, codificano per proteine
rRNA	RNA ribosomali, formano la struttura base dei ribosomi e catalizzano la sintesi proteica
tRNA	RNA transfer, centrali nella sintesi proteica come adattatori fra mRNA e amminoacidi
SnRNA	Piccoli RNA nucleari, agiscono in una varietà di processi nucleari, compreso lo splicing dei pre-mRNA
SnoRNA	Piccoli RNA nucleolari, usati per processare e modificare chimicamente gli rRNA
Altri RNA non codificanti	Agiscono in diversi processi cellulari, compresi sintesi dei telomeri, inattivazione del cromosoma X e trasporto di proteine nel RE

TRASCRIZIONE NEI PROCARIOTI E NEGLI EUCARIOTI

Siccome i procarioti non hanno un involucro nucleare, i ribosomi possono iniziare a tradurre gli mRNA in proteine mentre vengono trascritti (avvengono contemporaneamente all'interno del citoplasma).

Nelle cellule eucariote la compartimentazione porta alla separazione spaziale della trascrizione e della traduzione. La trascrizione avviene nel nucleo, l'RNA risultante viene trasformato in mRNA e trasportato nel citoplasma in cui avviene la traduzione (avvengono in compartimenti diversi e in momenti diversi).



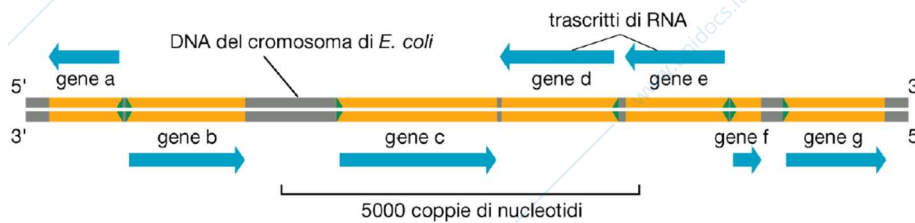
GENI

Per comprendere la trascrizione e la traduzione è utile tenere presente la definizione di GENE.

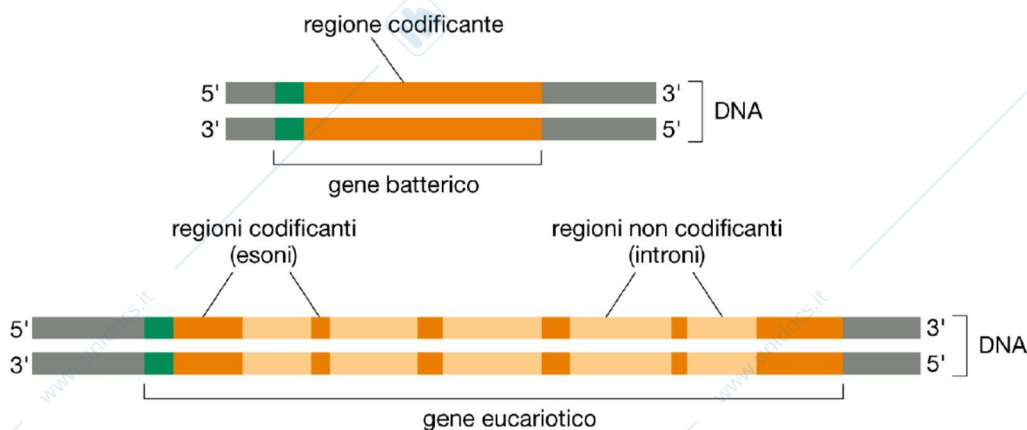
È l'intera sequenza (successione di nucleotidi) necessaria per la sintesi delle proteine: sono regioni del DNA che portano l'informazione genetica utile per la trascrizione in RNA, affinché venga prodotto nel momento e nel quantitativo corretto, quanto frequentemente ecc...

Negli eucarioti i geni sono disposti fra zone di DNA non funzionale che non codificano per le proteine: nei cromosomi per esempio i centromeri e i telomeri non sono geni in quanto non codificano per nessun RNA. I geni stessi possono contenere al loro interno regioni di DNA non codificante, dette INTRONI.

I geni sono presenti e scritti con una direzione:

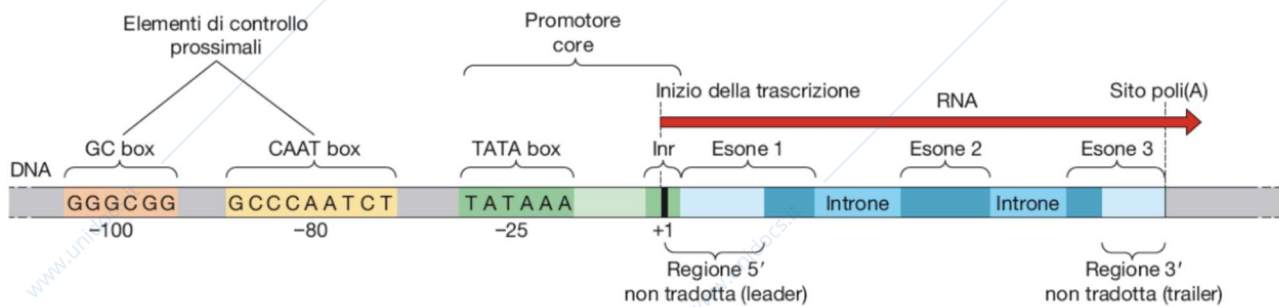


Esistono geni molto piccoli e geni molto lunghi (lunghezza variabile) e possono essere BATTERICI, in cui sono presenti solo regioni codificanti, ed EUCARIOTICI, in cui sono presenti regioni non codificanti o INTRONI e regioni codificanti o ESONI:



Ogni gene è costituito da:

- **PROMOTORE core**, sequenza di DNA/regione di un gene che recluta la RNA polimerasi, definisce quale dei due filamenti di DNA deve essere utilizzato come stampo e il sito da cui iniziare la trascrizione
- **ELEMENTI REGOLATORI DISTALI E PROSSIMALI**, regioni di DNA molto importanti in quanto consentono di definire tutte le caratteristiche che il filamento di RNA da sintetizzare deve avere
- **TERMINATORE**, sequenza di regolazione/regione distale di un gene, oltre il quale la sintesi dell'RNA si arresta in quanto segnala la fine della trascrizione



Infine, i geni possono essere di diversi tipi: *geni housekeeping* (espressi in tutti i tipi cellulari, come quelli del metabolismo basale, glicolisi, ciclo di Krebs), *geni a tessuti specifici* (espressi solo in certi tipi di tessuti, come la telomerasi) e *geni a specifici stimoli* (espressi e trascritti solo a partire da particolari stimoli).

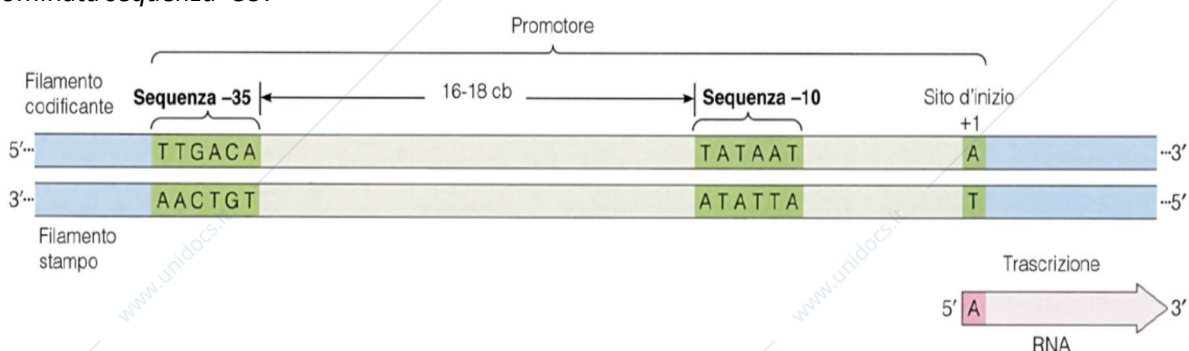
1. Rna polimerasi II (produce mrna) III (produce trna) e I (produce rna ribosomiali)

TRASCRIZIONE – LEGAME DELLA RNA POLIMERASI AL PROMOTORE

La prima fase della sintesi dell'RNA è rappresentata dal legame della RNA POLIMERASI nel sito promotore a una specifica sequenza di DNA, il PROMOTORE, che determina dove la sintesi dell'RNA debba iniziare e quale filamento del DNA debba essere utilizzato come stampo. Ogni unità di trascrizione ha un solo sito promotore localizzato vicino all'inizio della sequenza di DNA da trascrivere. Le sequenze del promotore sono descritte in direzione 5'→3' sul FILAMENTO CODIFICANTE, il filamento **opposto a quello che funziona da stampo**. Il legame della RNA polimerasi al promotore è mediato dalla subunità sigma e provoca lo srotolamento di un breve tratto della doppia elica del DNA.

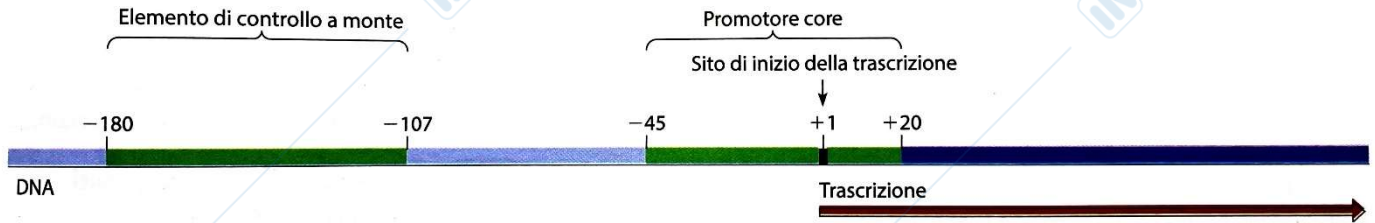
Il riconoscimento e il legame dell'enzima dipendono da molte corte sequenze localizzate in specifiche posizioni all'interno di ciascun sito promotore.

Nei PROCARIOTI, una sola RNA polimerasi può trascrivere tRNA, mRNA e rRNA. Il punto di inizio della trascrizione è praticamente sempre rappresentato da una purina, spesso un'adenina. Approssimativamente 10 basi a monte del punto di inizio è presente una sequenza composta da sei nucleotidi, TATAAT, denominata sequenza -10 o *Pribnow box*. Alla posizione -35 è presente un'altra sequenza di sei nucleotidi, TTGACA, denominata *sequenza -35*.

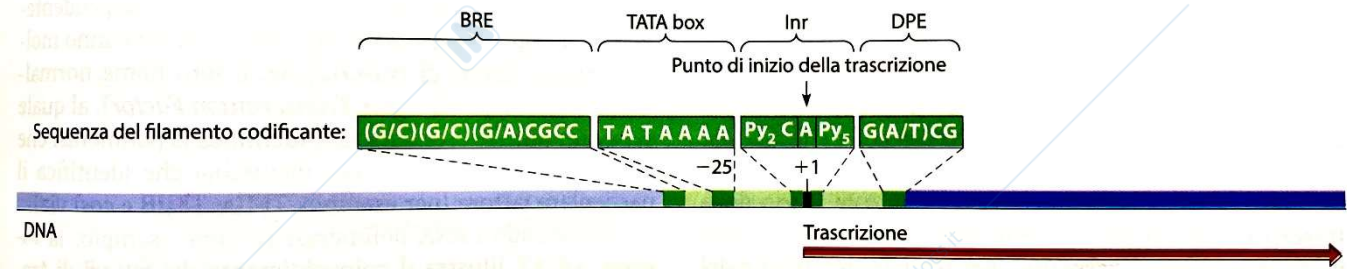


Negli EUCARIOTI, sono presenti tre RNA polimerasi diverse:

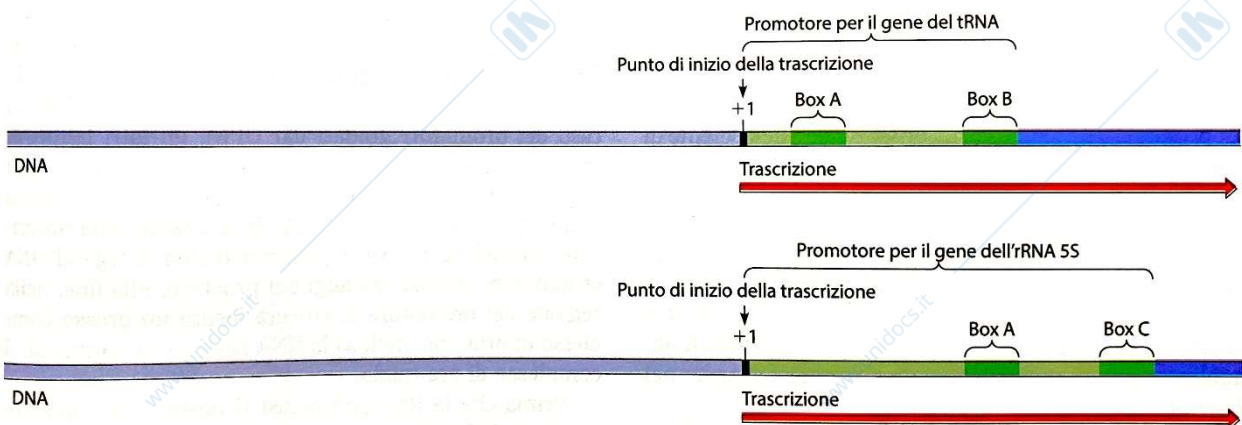
- RNA polimerasi I: risiede nel nucleo ed è responsabile della sintesi delle molecole di RNA precursore di tre dei quattro tipi di rRNA presenti nei ribosomi eucarioti rRNA 28S, rRNA 18S e rRNA 5.8S
 I promotori usati dalla polimerasi I è composto da due parti: il **promotore core**, il minimo insieme di sequenze di DNA sufficiente a dirigere il corretto inizio della trascrizione, e un **elemento di controllo a monte**, sequenza abbastanza lunga simile a quella del promotore core.



- RNA polimerasi II: si trova nel nucleoplasma e sintetizza i precursori degli mRNA, i quali codificano per le proteine. Sintetizza inoltre la maggior parte degli snRNA, piccoli RNA nucleari coinvolti nella maturazione post-trascrizionale.
 In questo caso almeno quattro tipi di sequenze di DNA sono coinvolti nella funzionalità del promotore core: una corta **sequenza iniziatrice (Inr)** a cavallo del punto di inizio della trascrizione, la **TATA box**, la cui sequenza consenso è TATA seguita da altre due o tre A in posizione -25, l'**elemento di riconoscimento di TFIIB (BRE)** e l'**elemento promotore a valle** in posizione +30. Inoltre è possibile trovare la **CAAT box** in posizione -80 e la **GC box** in posizione -100



- RNA polimerasi III: si trova nel nucleoplasma e sintetizza i precursori dei tRNA e il più piccolo rRNA ribosomiale 5S.
 Al contrario delle altre RNA polimerasi, la III usa promotori che sono completamente a valle del punto di inizio della trascrizione. Il promotore dei tRNA ha sequenze consenso chiamate box A e box B. I promotori dei geni per gli rRNA 5S hanno il box A (più lontano rispetto a quello dei tRNA) e il box C (si trova a monte e viene utilizzato per la sintesi di altri tipi di piccoli RNA)



Affinché l'RNA polimerasi possa legarsi al promotore e iniziare la sintesi dell'RNA è sempre richiesta una specifica proteina, il FATTORE DI TRASCRIZIONE GENERALE (TF, seguito dal numero romano della polimerasi che aiutano e da una lettera maiuscola che identifica il particolare fattore). La TATA box per esempio è in grado di richiamare il fattore di trascrizione TFIID, il quale richiama a sua volta la RNA polimerasi e ne permette il legame: si forma il COMPLESSO DI PRE-INIZIO.

Per un elevato livello di trascrizione, sono necessari anche altri fattori, detti ATTIVATORI. Gli attivatori sono proteine che si legano a sequenze nucleotidiche dette ENHANCER (intensificatori).

Esistono anche sequenze nucleotidiche che reprimono la trascrizione, dette SILENCER.

INIZIO DELLA SINTESI DI RNA

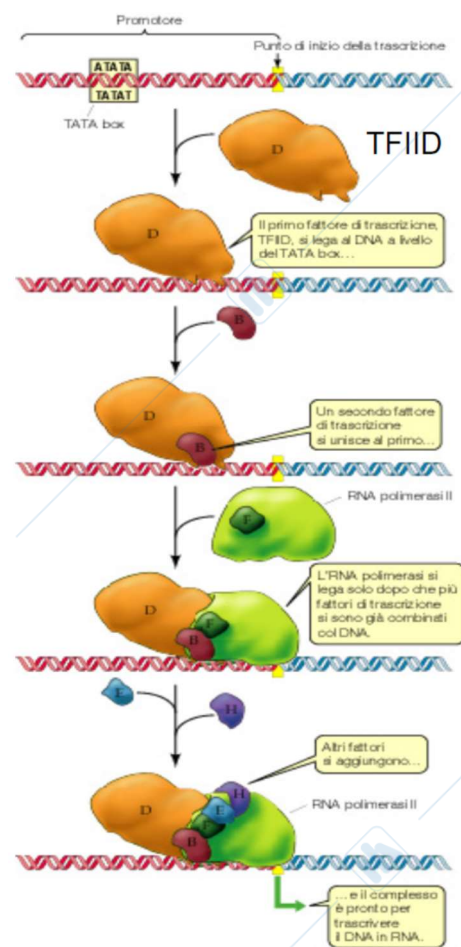
Prima che l'RNA polimerasi possa iniziare la sintesi dell'RNA, deve essere rilasciata dal complesso di pre-inizio. Nel caso dell'RNA polimerasi II, un ruolo fondamentale è svolto dal fattore di trascrizione TFIID, che possiede sia un'attività elicastica, con la quale svolge la doppia elica di DNA, sia un'attività chinastica, che catalizza la fosforilazione della RNA polimerasi II. La fosforilazione cambia la conformazione dell'RNA polimerasi II, che quindi viene rilasciata dai fattori di trascrizione, così che possa iniziare la sintesi del filamento di RNA.

Srotolata la doppia elica di DNA (RNA polimerasi è in grado di tenerla aperta senza altre proteine ausiliarie) può cominciare la fase di inizio della sintesi. Uno dei filamenti di DNA serve come stampo per la sintesi dell'RNA, usando nucleotidi trifosfati (NTP) come substrati. Il filamento di DNA che porta la sequenza promotrice determina quale via debba seguire la RNA polimerasi e l'orientamento dell'enzima a sua volta determina quale filamento di DNA sia trascritto. Non appena i primi due NTP sono uniti con legami idrogeno alle basi complementari del filamento di DNA stampo al punto di inizio della trascrizione, l'RNA polimerasi catalizza la formazione di un legame fosfodiesterico tra il gruppo ossidrilico in 3' del primo NTP e il fosfato in 5' del secondo, con rilascio di un pirofosfato PP. La polimerasi allora, a mano a mano che vengono aggiunti nucleotidi, avanza lungo il filamento stampo. A differenza della DNA polimerasi, la RNA polimerasi non necessita di un primer.

ALLUNGAMENTO

L'RNA polimerasi procede lungo la molecola di DNA, la cui elica si srotola gradualmente (non determina una forte distorsione del DNA perché una volta finita la trascrizione l'elica si ricomponde). Poiché l'appaiamento delle basi complementari tra il filamento di DNA stampo e la catena di RNA che si sta sintetizzando è antiparallelo, il filamento di RNA viene allungato nella direzione 5'→3'.

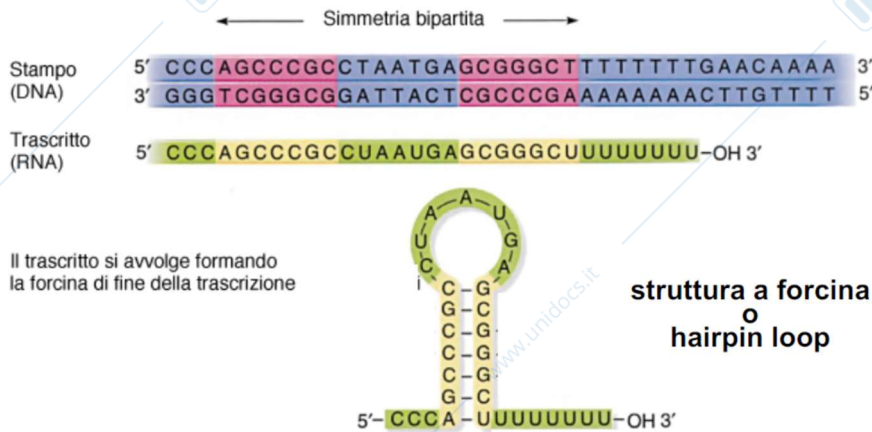
La RNA polimerasi non è in grado di attuare un'attività esonucleasica (come la DNA polimerasi), un errore non è così drammatico perché, ad esempio, un mRNA messaggero produrrà al massimo una proteina non funzionante.



TERMINAZIONE

L'allungamento della catena di RNA procede fino a quando la RNA polimerasi copia una particolare sequenza, chiamata SEGNALE DI TERMINAZIONE, che induce la fine della trascrizione.

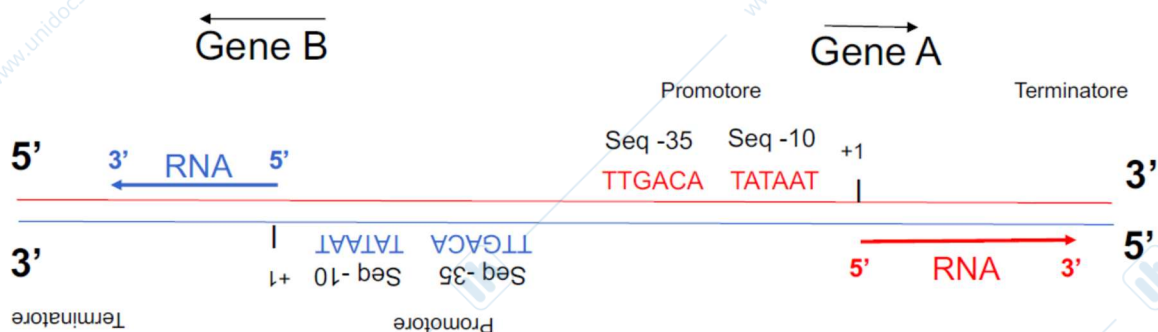
Nei PROCARIOTI esistono due diversi tipi di sequenze di terminazione: RHO-INDIPENDENTE, riconosciuta direttamente dalla RNA polimerasi, e RHO-DIPENDENTE, riconosciuto dal fattore RHO associato alla RNA polimerasi.



Negli EUCARIOTI la terminazione della trascrizione è associata alla presenza di particolari sequenze sul DNA e all'azione di FATTORI DI TERMINAZIONE.

Alla fine della trascrizione, il filamento di RNA presenta la sequenza identica al filamento codificante (per questo è chiamato così), in quanto è stato sintetizzato utilizzando come stampo il filamento a lui opposto.

Infine, nella doppia elica ci possono essere geni che devono essere trascritti in direzione opposta: il promotore identifica non soltanto il punto in cui la trascrizione deve partire (nucleotide +1), ma a seconda del tipo di promotore vengono utilizzati filamenti stampo diversi. Il promotore viene dunque identificato e letto sul filamento codificante.



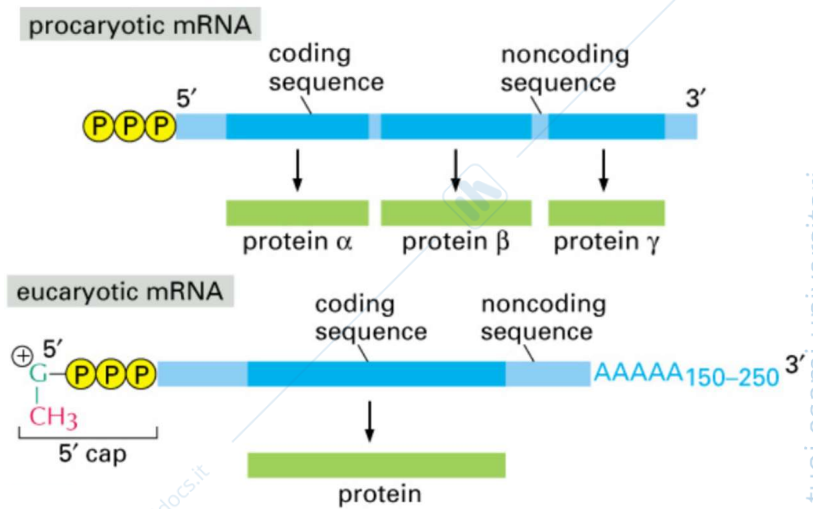
Per il **Gene B** il filamento stampo è il rosso. Tale filamento è detto "filamento antisenso". L'RNA prodotto dalla trascrizione del Gene B ha la stessa sequenza del filamento blu che è detto "filamento senso".

Per il **Gene A** il filamento stampo è il blu. Tale filamento è detto "filamento antisenso". L'RNA prodotto dalla trascrizione del Gene B ha la stessa sequenza del filamento rosso che è detto "filamento senso".

La sequenza nucleotidica del promotore viene sempre indicata sul filamento senso

COSA SUCCEDDE ALL'RNA?

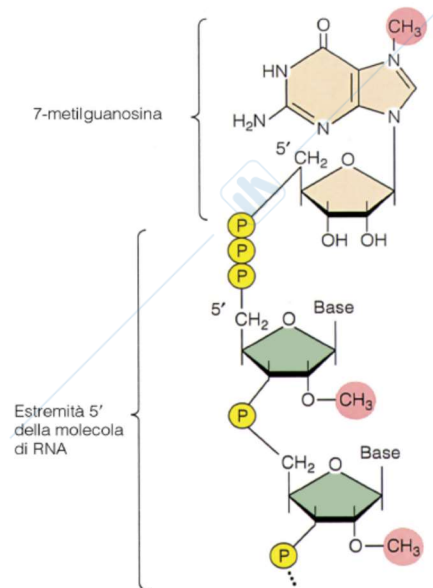
- L'mRNA messaggero PROCARIOTICO può essere immediatamente tradotto. Una loro peculiarità è che molto spesso più geni in sequenza tra loro sono controllati dallo stesso e unico promotore, il quale traduce un unico trascritto: da un unico filamento di RNA possono codificare proteine diverse
- L'mRNA messaggero EUCARIOTICO, invece, va in contro ad una serie di processi chimici, la MATURAZIONE, divisa in tra fasi principali: il CAPPING, lo SPLICING e la POLIADENILAZIONE.



CAPPING

Il CAPPING è una modifica della regione in cui è iniziata la trascrizione: al 5' dell'RNA viene legata una 7-metil-guanosina, la quale presenta un gruppo metile in posizione 7' (nucleotide scritto ribaltato rispetto al filamento dell'mRNA) e viene riconosciuta come CAPPUCCIO.

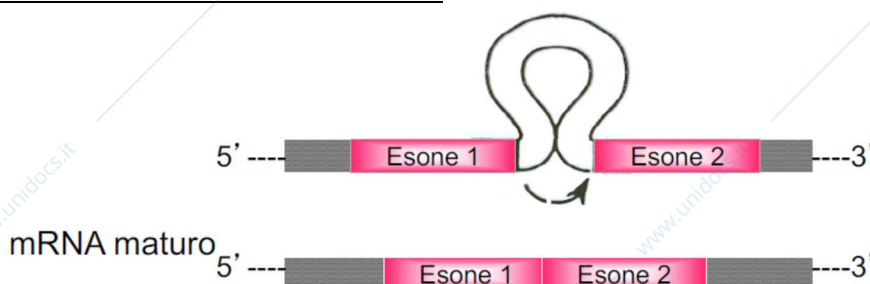
Questo è un legame tra nucleotidi assolutamente diverso da quelli visti in precedenza in cui i nucleotidi erano legati da un legame fosfodiesterico con un solo fosfato: in questo caso invece, la 7-metil-guanosina lega il proprio carbonio in posizione 5' al fosfato in posizione 5' del primo nucleotide del trascritto, attraverso un ponte trifosfato. Questo nuovo legame, e più in generale questo nuovo "cappuccio", ha la funzione di stabilizzare l'mRNA, proteggendo questa iniziale estremità dalla degradazione da parte delle esonucleasi (è difficile rompere il legame). Inoltre è essenziale per posizionare il filamento nel ribosoma per l'inizio della sintesi proteica.



SPLICING

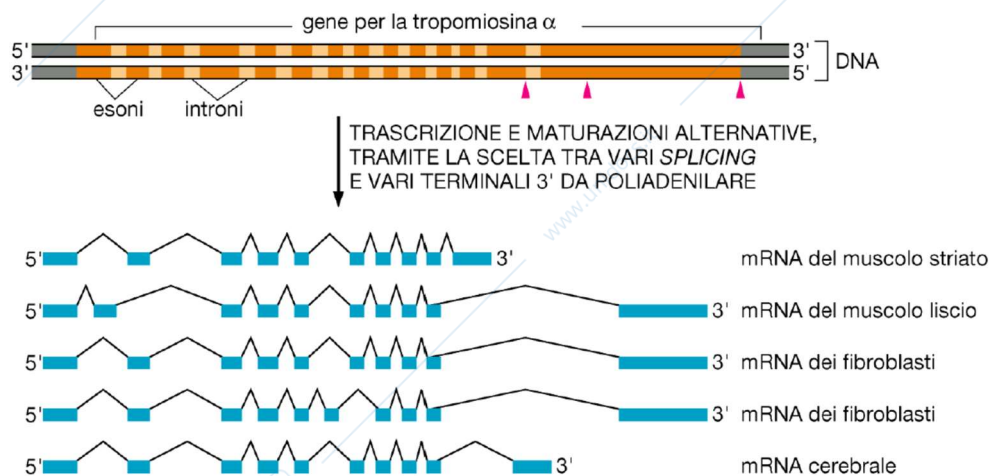
Il filamento di RNA appena trascritto presenta nella sequenza, degli ESONI sempre all'inizio e alla fine (possono trovarsi anche al centro), e degli INTRONI, i quali hanno sempre esoni ai loro lati. Sono tutti numerati dal primo all'ultimo e il numero degli introni può essere calcolato come il numero degli esoni meno uno ($N^{\circ} \text{esoni} - 1$).

Lo SPLICING consiste nel taglio/eliminazione degli introni da questo filamento e nella formazione di un nuovo legame tra gli esoni rimanenti: questo processo consente quindi di rompere i legami fosfodiesterici (tra esoni e introni) per eliminare gli introni e riformare questo legame fosfodiesterico tra due esoni, legando il 3' -OH del primo esone con il 5' fosfato dell'esone successivo.



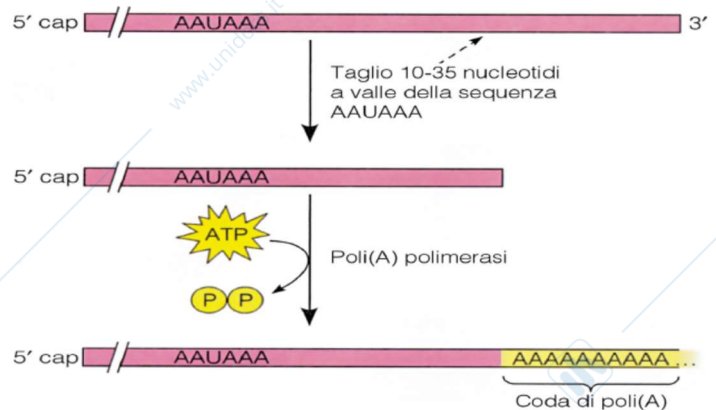
Gli introni, per essere riconosciuti, presentano sempre ai loro bordi delle sequenze specifiche. Lo Splicing avviene grazie ad un grosso complesso riboproteico, lo SPLICEOSOMA, costituito da moltissime proteine e tanti piccoli RNA (small nuclear RNA, come ad esempio U1, U2, U4, U5 e U6): insieme sono in grado di riconoscere quelle sequenze nucleotidiche presenti ai bordi degli introni, svolgere un'azione catalitica di taglio e un'azione catalitica di cucitura di un nuovo legame.

Esiste poi lo SPLICING ALTERNATIVO: alcuni esoni possono essere "skippati"/saltati, in modo tale da formare trascritti maturi diversi tra loro: producendo RNA diversi, verranno codificate proteine leggermente diverse, con funzioni e domini simili. Lo splicing alternativo può avvenire solo in particolari tessuti (ad esempio, il cervello dei mammiferi è il tessuto in cui avvengono il maggior numero di splicing alternativi) e aumenta enormemente le potenzialità del genoma degli eucarioti.



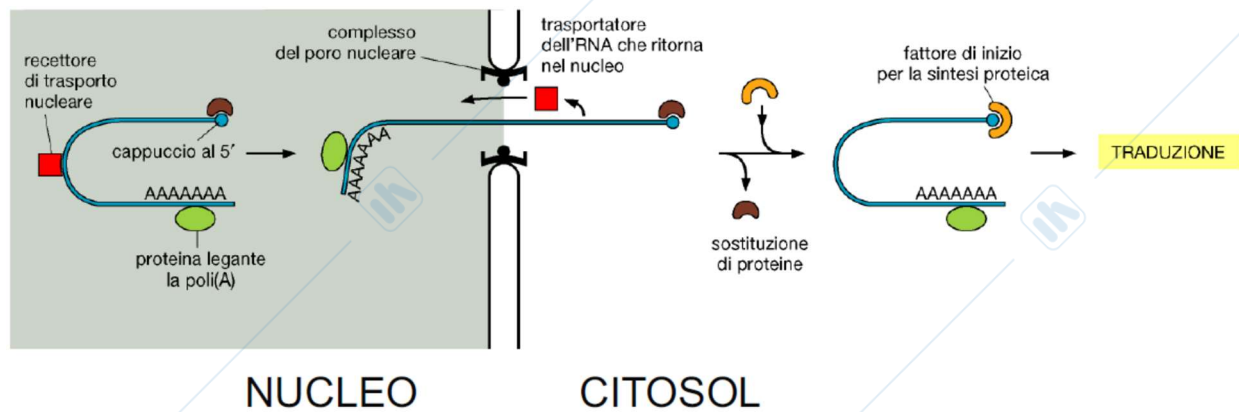
POLIADENILAZIONE

La trascrizione dell'mRNA spesso procede per centinaia di nucleotidi oltre il sito destinato a diventare l'estremità 3' della molecola di RNA finale. Uno speciale segnale, costituito da una sequenza AAUAAA (*sequenza consensus*) localizzata poco a monte di questo sito, e conosciuto come SEGNALE DI POLIADENILAZIONE, determina il taglio del trascritto primario 10-35 nucleotidi a valle di questa sequenza: in questo modo, la POLI(A) POLIMERASI sarà in grado di catalizzare la formazione della coda POLI(A) (utilizzando ATP). Ha la funzione di proteggere l'mRNA dall'attacco e dalla degradazione da parte di nucleasi (come il cappuccio), e di favorire "l'export" dell'mRNA dal nucleo (la coda è riconosciuta da particolari proteine coinvolte in questo processo).



La coda di Poli(A) ovviamente non è presente nel gene (presenta soli il segnale di poliadenilazione), così come non è presente la 7-metil-guanosina del cap.

Una volta finito il processo di maturazione, questo è quello che succede:



1. Si ha il filamento di RNA maturo, con il cappuccio all'estremità 5' e la coda poli(A) all'estremità 3'
2. Il cappuccio e la coda poli(A) vengono legate da particolari proteine che aiutano l'mRNA messaggero a passare attraverso il PORO NUCLEARE
3. L'mRNA arriva nel CITOPLASMA: la proteina legata al cap (tipica del nucleo) si stacca lasciando il posto ad un'altra proteina (tipica del citoplasma)
4. Questo complesso costituisce nel suo intero la struttura che richiamerà, prima la subunità minore del ribosoma, poi quella maggiore, per iniziare la TRADUZIONE