

Il gene come unità funzionale.

LEZIONE 8. Trascrizione.

GENE → fattore mendeliano, marcatore, unità funzionale.

Genotipo: costituzione genetica di un individuo, è costante in un individuo.

Fenotipo: caratteristiche visibili e non di un individuo; dipende dal genotipo e la sua interazione con l'ambiente, varia a seconda dello stadio di sviluppo dell'individuo.

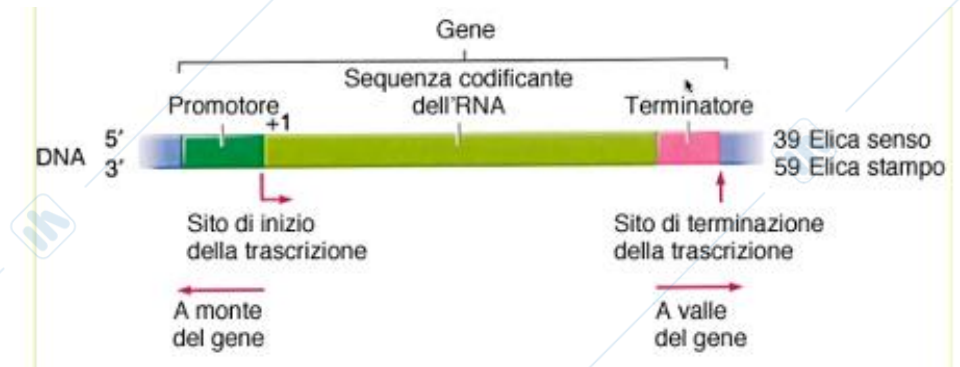
Possono essere riferiti a tutto l'individuo o solo ad alcuni geni/caratteri o uno solo.

L'azione di un gene può variare perché interagisce con altri per l'espressione di un carattere; l'espressione è finemente regolata da due coordinate: spazio (in diversi tessuti) e tempo (in diverse fasi del ciclo vitale).

1956 Crick → dogma centrale della biologia molecolare: **unidirezionalità** informazione genetica.

DNA → RNA → PROTEINE.

Struttura del gene dal punto di vista della trascrizione:



Procarioti (accoppiamento trascrizione-traduzione):

RNA polimerasi coadiuvata dalla presenza del fattore sigma, formano **un complesso P chiuso** presso il promotore. Quando il complesso P diventa **aperto**, presso una regione a monte del nucleotide +1 viene svolta l'elica.

Gli elementi regolatori nei promotori batterici (E.Coli) consistono in **sequenze consenso** nel promotore che si trovano quindi in una specifica posizione e sono condivise da più geni.

Pribnow box: ricca di basi T-A (TATA BOX utile per il passaggio tra promotore chiuso e aperto; influenza la velocità, il livello di trascrizione), a -10. Un'altra a -35 è importante per stabilire il legame tra DNA e RNA polimerasi.

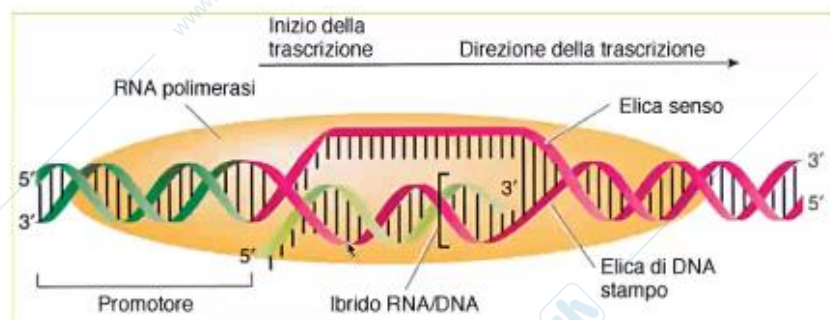
Con lo scorrimento si ha il rilascio del fattore sigma e la formazione della bolla di trascrizione. All'interno inizia a formarsi l'**ibrido RNA-DNA**, l'RNA si allunga e si stacca dal complesso.

I segnali di terminazione, che provocano l'arresto della trascrizione, sono di due tipi:

- **Rho-indipendenti:** brevi sequenze ripetute invertite (determinano una struttura a forcina che determina una pausa persistente da parte dell'RNA polimerasi) seguite da almeno sei A ripetute (legame poco stabile).
- **Rho-dipendenti:** sequenze ricche di C ai quali si lega RHO (fattore proteico, elicasi) che svolge l'elica e determina il distacco dell'mRNA dall'elica stampo.

Complementarietà (sia per procarioti che eucarioti):

- Sintesi RNA in direzione 5'-3';
- una sola elica trascritta;
- elica letta è l'elica stampo (3'-5') che è complementare alla sequenza dell'RNA. L'**elica senso** (5'-3') ha la sequenza uguale alla sequenza di basi dell'RNA, è quella che viene copiata con differenza U al posto di GT.

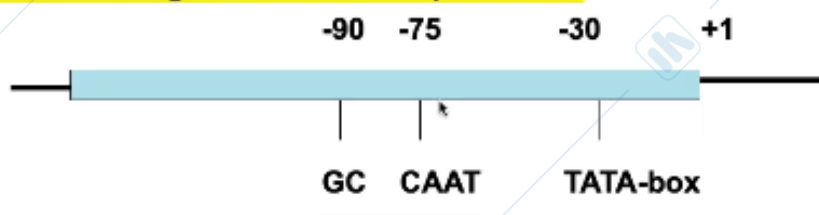


Eucarioti:

- RNA polimerasi I: rRNA 28S, 18S, 5,8S.
- **RNA polimerasi II: mRNA, snRNA.**
- RNA polimerasi III: tRNA, rRNA 5S, snRNA.

Nel promotore ci sono almeno tre sequenze consenso, chiamati **elementi regolatori o del nucleo o core** (regione entro -50bp). In questa regione si indica il punto di inizio per l'assemblamento del complesso di inizio.

Elementi regolatori *in cis* nel promotore



Elementi prossimali (regione tra -50 e -200 bp) determinano l'efficienza (intensità) della trascrizione e del promotore, hanno un ruolo nel determinare come, quando e dove un gene viene espresso: CAAT box e GC box.

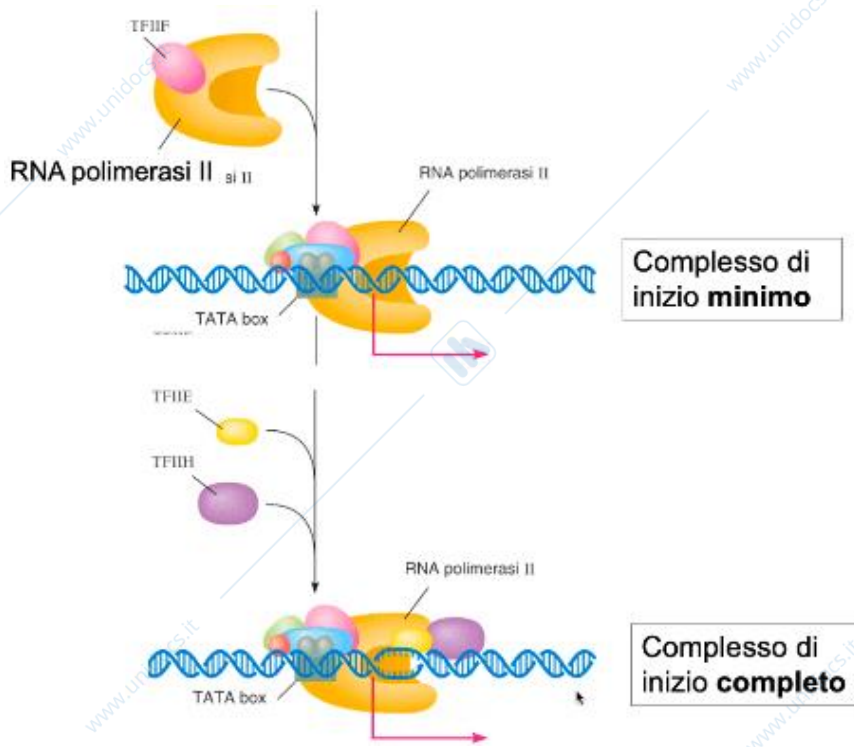
Ci sono poi altre combinazioni di **sequenze regolatrici**: es.: **enhancer** (+) o **silencer** (-), situate a monte (alcune trovate anche a valle), specifiche per determinati geni e funzionano per tutti e due gli orientamenti, legano proteine di tipo regolativo (TF) e regolano il livello di espressione.

(approfondire su → mediatore).

Si trovano tutti sullo stesso filamento → in **cis**.

Fattori di trascrizione (TF): proteine che si legano alle sequenze regolatrici. Agiscono in **trans**.

- **Geni "housekeeping"**. Sempre espressi durante lo sviluppo di un organismo e in tutte le cellule, necessari per funzioni cellulari di base (es.: actina, glucosio-6-fosfato deidrogenasi);
- Geni espressi in alcuni tessuti e solo in alcune fasi del ciclo vitale (es.: emoglobina).



TFIID composto da TAF e TBP (TATA box binding protein) si lega alla TATA box.

Altri TF si legano secondo un ordine ben preciso: TFIIA e TFIIB.

Struttura mRNA:



COLINEARITA': Procarioti: tra sequenza del gene e trascritto;

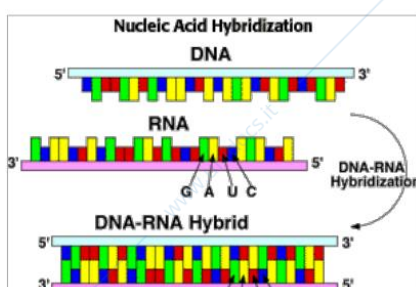
eucarioti: tra sequenza del gene e trascritto primario.

Eucarioti: trascritto subisce modificazioni all'interno del nucleo, una volta maturo va nel citoplasma:

- **5' capping**: aggiunta cap di 7-metil guanosina, necessario per attacco ribosomi;
- **3' poli adenilazione** → mRNA poli (A)⁺, conferisce stabilità;
- **Rimozione introni**: sequenza codificante di un gene contiene introni ed esoni (portano informazioni per la sintesi del polipeptide).

→ Dimostrazione presenza introni:

Il trascritto del gene β globina in topo localizzato nel citoplasma, è lungo 0,7 kb, mentre il pre-mRNA, che si trova solo nel nucleo è lungo 1.5 kb.



Ibridazione DNA-RNA: tra **sequenza del gene** della β globina in topo:

- **trascritto primario** (colinearità);
- **RNA maturo**.

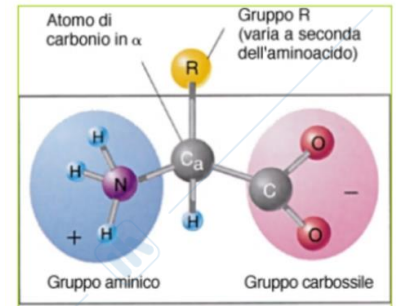
→ **GENI INTERROTTI o DISCONTINUI**: geni degli eucarioti che contengono introni (poi rimossi) ed esoni.

LEZIONE 9. Proteine.

Proteina: molecola formata da uno o più polipeptidi (inizio N terminale, fine C terminale).

Aminoacidi: unità dei polipeptidi, sono 20 quelli usati nella sintesi proteica; struttura in comune: C centrale, gruppo amminico e carbossilico, gruppo R specifico.

Due aminoacidi sono legati da un legame peptidico tra un legame carbossilico e un amminico.



Le proteine hanno quattro livelli di organizzazione:

- o **struttura primaria:** catena lineare di aminoacidi che formano il polipeptide;
- o **secondaria:** ripiegamento con legami deboli-idrogeno o elettrostatici tra gruppi COOH e NH vicini per formare strutture ad alfa-elica o beta-foglietto;
- o **terziaria:** struttura tridimensionale di un singolo polipeptide (folding), distribuzione dei gruppi R e formazione legami idrogeno, interazioni ioniche, ponti disolfuro;
- o **quaternaria:** comprende più catene polipeptidiche, perciò detta multimerica.

Il **ripiegamento** dipende:

1. dalla struttura primaria (che determina le successive), avviene già durante la traduzione;
2. le chaperonine interagiscono per permetterlo.

Per dimostrare la traduzione, vennero condotti lavori per capire il passaggio tra mRNA e proteine e si evinse che:

1. il codice è a **triplette** (lavori Francis Crick, 1961) $\rightarrow 4^3 = 64$ possibili combinazioni;
2. Lavori sulla decifrazione del codice (anni 60/70) \rightarrow tavola del codice genetico.

- Unità del codice: **codone** o tripletta;
- Ciascun codone specifica per un aminoacido;
- Il codice è **degenerato** (stesso aa codificato da più codoni);
- **Non è ambiguo**;
- Ci sono dei **segnali di inizio** (AUG) e **di stop o nonsense** (UAA, UAG, UGA);
- Non ci sono segni di interpunzione o sovrapposizioni;
- È (quasi) **universale**.

		Seconda lettera				
		U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U	
	UUC (F)	UCC Ser	UAC (Y)	UGC (C)	C	
	UUA Leu	UCA (S)	UAA Stop	UGA Stop	A	
	UUG (L)	UCG	UAG Stop	UGG Trp (W)	G	
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U	
	CUC (L)	CCC Pro	CAC (H)	CGC (R)	C	
	CUA (L)	CCA (P)	CAA Gln (Q)	CGA (R)	A	
	QUG	CCG	CAG (Q)	CGG	G	
A	AUU Ile (I)	ACU Thr	AAU Asn (N)	AGU Ser (S)	U	
	AUC (I)	ACC Thr	AAC (N)	AGC (S)	C	
	AUA	ACA (T)	AAA Lys (K)	AGA Arg (R)	A	
	AUG Met (M)	ACG	AAG (K)	AGG (R)	G	
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp (D)	GGU Gly	U	
	GUC (V)	GCC Ala	GAC (D)	GGC (G)	C	
	GUA (V)	GCA (A)	GAA Glu	GGA (G)	A	
	GUG	GCG	GAG (E)	GGG	G	

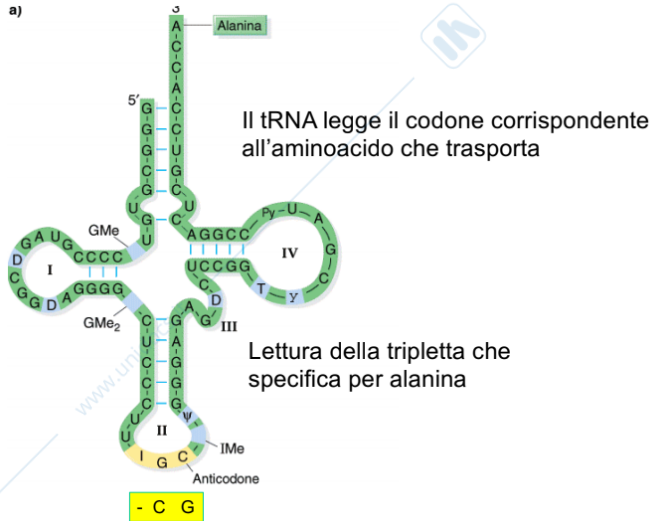
COLINEARITA' tra la sequenza delle basi dell'mRNA e la sequenza degli amminoacidi della proteina.

Traduzione.

→ Sintesi catena polipeptidica a partire dall' mRNA. L'informazione presente sull'mRNA viene tradotta in un altro linguaggio.

La trascrizione avviene a livello dei ribosomi (rRNA e proteine) e prendono parte componenti tra i quali tRNA.

Avviene per aggiunta di un aminoacido alla volta, seguendo la direzione 5' → 3' (N terminale → C terminale sulla catena polipeptidica).

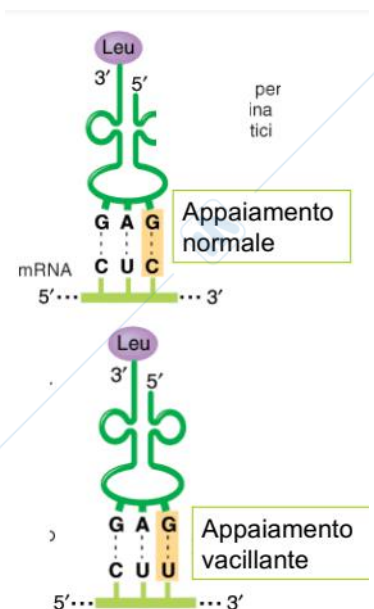


I tRNA sono mediatori tra il messaggero e gli aminoacidi. Trasportano aminoacidi al complesso formato dal ribosoma e gli mRNA.

I tRNA leggono la sequenza delle basi dell'mRNA, leggendo il codone per complementarità tra le basi con l'anticodone.

Il fatto che ci sono 61 codoni per specificare 20 aminoacidi e non esistono 61 tRNA diversi, porta alla teoria del **vacillamento**:

La **terza base** del codone durante l'appaiamento con l'anticodone **non è sottoposta a restrizioni** dal punto di vista tridimensionale (per esempio G si può appaiare con C o U, o U con A o G).



LEZIONE 10. Genetica dei microrganismi. I batteri.

Scoperte importanti per la ricerca di base e applicata:

- Frederick Griffith (1928); Avery e collaboratori (anni 40) → Scoperta del «principio trasformante» e del DNA come principio trasformante in *Streptococcus pneumoniae*;
- Hershey e Chase (1953) → Scoperta del DNA come «materiale genetico» con esperimenti in *E. coli* e batteriofagi;
- Francois Jacob e Jaques Monod (1961) → Descrivono l'**operone lattosio in E. coli**, un modello per lo studio della **regolazione dell'espressione genica** nei procarioti;
- Herb Boyer e Stanley Cohen (1973) → Il primo esperimento di clonaggio in *E. coli* con l'impiego.

Due esempi di prodotti dell'ingegneria genetica in *E. coli*

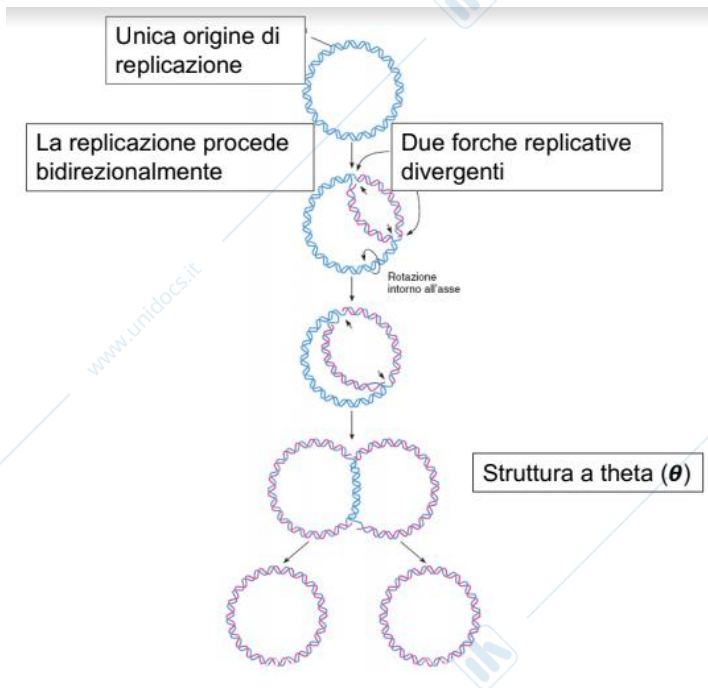
- **Ormone insulina** (1981) → Sostituisce quella estratta dalle ghiandole pancreatiche di bovini e maiali;

- o **Ormone della crescita** (1985) → Sostituisce la molecola che veniva estratta dai cadaveri.

Cromosoma batterico.

Escherichia Coli è un batterio di riferimento. Ha una forma a bastoncino con diametro di circa 0,5 μm , all'interno ha una regione più chiara che contiene il cromosoma batterico, il nucleotide.

Circolare, DNA a doppia elica. Si trova nel **nucleotide**.



La lunghezza è 1460 μm , quindi circa 1000 volte superiore di quella della cellula batterica → **super avvolto**. Se la cellula viene sottoposta ad una lisi blanda rilascia il DNA in forma altamente ripiegata.

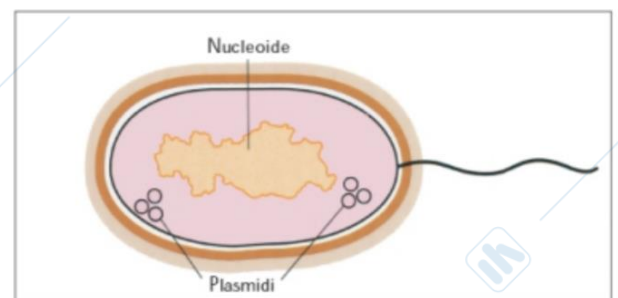
La **replicazione** è bidirezionale, le due forche replicative sono divergenti, opposte. Così si forma la molecola parentale e quella di neosintesi. → forma a theta.

La replicazione avviene in circa 45 minuti. Al termine, la cellula si divide in corrispondenza di un setto che iniziava a prodursi quando le due molecole ancora unite → **divisione per scissione binaria**.

I geni (4288) di E. Coli sono classificati in 22 gruppi funzionali.

Plasmidi.

- o Plasmidi sono cromosomi piccoli circolari non indispensabili per la crescita, non contengono informazioni essenziali per metabolismo;
- o Replicano autonomamente utilizzando i componenti del batterio;
- o Hanno sequenze geniche che possono codificare funzioni differenti, quali: resistenza ad antibiotici, capacità di utilizzare fonti di C complesse, fattori di patogenicità.

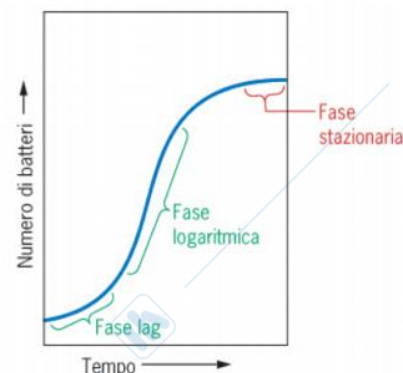


Crescita in laboratorio.

E. Coli necessita un terreno di cultura (liquido o solido) a 37°C con sali minerali, una fonte di carbonio (il più semplice è glucosio), vitamina (stimolatore della crescita, in genere è la biotina) → minimo.

Un **terreno completo** contiene tutti gli elementi del terreno minimo e, in più, **molecole complesse (amminoacidi e basi azotate)**.

La crescita delle cellule in un terreno liquido è mediante scissione binaria, la curva di crescita di conseguenza ha un andamento esponenziale.



La cultura in un terreno solido, quindi una piastratura, ha composizione come il liquido, ma con un elemento gelificante (agar). In questo caso la crescita è in **colonie** → gruppi di cellule visibili ad occhio nudo sulla piastra, ciascuna colonia origina da una cellula.

Fenotipi mutanti nei batteri.

Mutanti per fonte di carbonio: i ceppi di E. Coli wild-type (Lac^+) usano il lattosio, sono in grado di scinderlo e usare il glucosio ricavato. Alcuni mutanti (Lac^-) non sono in grado di utilizzarlo, quindi se presente solo lattosio come fonte di carbonio non possono crescere.

Il fenotipo è $Lac^{+/-}$, il genotipo si indica con $lac^{+/-}$.

Terreno	Selvatico Lac^+	Mutante Lac^-
+ lattosio	+	-
+ glucosio	+	+

Mutanti di resistenza: il fenotipo wild-type non cresce in presenza particolari virus, sostanze chimiche e antibiotici. Il fenotipo mutante, invece, acquisisce la capacità di crescita in presenza di inibitori (resistenza). L'isolamento di questi avviene con l'uso di un terreno selettivo, un terreno minimo con l'aggiunta di un inibitore.

Composizione del terreno	Ceppo selvatico	Mutante Str^R	Mutante resistente al fago	Tipo di selezione
Minimo	+	+	+	Nessuna
Minimo + streptomicina	-	+	-	Resistenza a streptomicina
Minimo + fagi T1 virulenti	-	-	+	Resistenza al fago T1

Str: streptomicina, antibiotico che blocca la sintesi proteica

+: crescita

-: assenza di crescita

(ceppo selvatico: Str^s sensibile)

Mutanti nutrizionali:

Ceppi selvatici → **prototrofi:**

sono in grado di sintetizzare le sostanze organiche necessarie per la crescita (aminoacidi, vitamine, precursori dell'RNA e DNA) → necessitano solo del terreno minimo;

la sintesi dipende dal funzionamento di una via metabolica (catena di reazioni enzimatiche successive che a partire da una molecola semplice la trasforma in una complessa);

una catena di reazioni successive che a partire da una molecola di glucosio lo trasforma in una specifica molecola;
 posseggono i geni necessari per completare le vie metaboliche.

Ceppo mutante → **auxotrofo** (nutrizionale): altera la capacità di un organismo di sintetizzare una particolare molecola essenziale per la crescita.

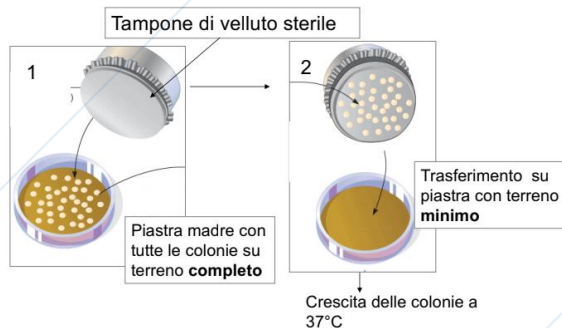
Non cresce sul terreno minimo; cresce su un terreno *dove è presente la sostanza che non è in grado di produrre*;

uno dei geni della catena non è funzionale.

Composizione del terreno	Ceppo selvatico	Mutante Arg ⁻	Mutante Bio ⁻	Tipo di selezione
Minimo	+	-	-	Nessuna
Completo	+	+	+	(Auxotrofia)
Minimo + aa	+	+	-	Auxotrofia per aa
Minimo + arginina	+	+	-	Auxotrofia per arginina
Minimo + vitamine	+	-	+	Auxotrofia per vitamine
Minimo + biotina	+	-	+	Auxotrofia per biotina

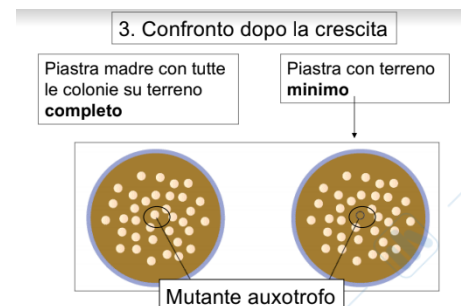
Arg: arginina; Bio: biotina
 +: crescita; -: assenza di crescita

Tecnica del replica plating (Ester e Joshua Lederberg 1952) → Si utilizza per identificare i ceppi mutanti auxotrofi:



1. Piastratura di una collezione di colonie su terreno completo (**piastra madre**) con tutti i possibili fattori nutritivi per il mutante di interesse;
2. le colonie presenti sulla piastra vengono trasferite per stampo su un velluto sterile;

3. Replica della disposizione originaria delle colonie su terreno minimo (sul quale i mutanti auxotrofi non potranno crescere).



Per analizzare i mutanti si possono piastrare su diversi **terreni selettivi**

Mutanti condizionali: questo concetto si applica a tutti i tipi di mutanti, questi non crescono in condizioni restrittive (es.: i temperatura sensibili, i mutanti manifestano il loro fenotipo solo a temperature diverse da quella ottimale).

Importanti perché possono essere impiegati per studiare i geni delle funzioni metaboliche di base. Le mutazioni in questi geni conferiscono letalità (es.: i mutanti per il gene che codifica l'enzima DNA polimerasi).