

FUORI PROGRAMMA

Quando una ipotesi diventa TEORIA....

...LA POSSIAMO USARE COME PRINCIPIO!

Ad oggi “usiamo” l'evoluzione molecolare in moltissime applicazioni

1

L'evoluzione molecolare all'opera (1)

Per esempio, per scoprire quali sono gli amino acidi “importanti” in una certa proteina umana (ND4, circa 400 amino acidi)

Scegliamo specie evolutivamente lontane (*che vuol dire?*) e confrontiamo le relative sequenze aminoacidiche

ND4_plant	SPIIPLHTWLPDTHGEAHYSTCMLLAGILLKMGAYGLVRINMELLPHAHSMFSPWLLVVG	290
ND4_fruitfly	MPMFLVHLWLPAHVEAPVSGSMILAGIMLKLGGYGMLRVISFLQLMNLKYSFVWISIS-	253
ND4_fish	MPLYGMHLWLPAHVEAPVAGSMILAAVLLKLGGYGMMRMVMVDPLSKQLAYPFIILA-	266
ND4_human	MPLYGLHLWLPAHVEAPIAGSMVLA AVLKLGGYGMMRLTLILNPLTKHMAYPFLVLS-	265



Se un amino acido ha “resistito” ai cambiamenti nelle generazioni, dovrebbe essere importante per la struttura e la funzione.
Che vuol dire “ha resistito”?

2

L'evoluzione molecolare all'opera (2)

Per esempio, per riconoscere che organismo xx ha lasciato una traccia di DNA

```
ND4_plant      SPIIPLHTWLPDTHGEAHYSTCMLLAGILLKMGAYGLVRINMELLPHAHSMFSPWLLVVG 290
ND4_fruitfly  MPMFLVHLWLPKAHVEAPVSGSMILAGIMLKLGGYGMLRVISFLQLMNLKYSFVWISIS- 253
ND4_fish      MPLYGMHLWLPKAHVEAPVAGSMILAAVLLKLGGYGMMRMVMMLDPLSKQLAYPFIILA- 266
ND4_human     MPLYGLHLWLPKAHVEAPIAGSMVLAAVLLKLGGYGMMRLTLILNPLTKHMAYPFLVLS- 265
ND4_dog       MPLYGLHLWLPKAHVEAPIAGSMVLAAVLLKLGGYGMMRITLLNPLTNFMAYPFMMLS- 265
ND4_xx?       MPLYGLHLWLPKAHVEAPIAGSMVLAAVLLKLGGYGMMRITLLNPLTNFMAYPFMMLS- 265
```

Organisms	% identity with xx
ND4_plant	29.40
ND4_fruitfly	44.04
ND4_fish	61.22
ND4_human	74.51

*E' una pianta o un animale?
un invertebrato o un vertebrato?
Un mammifero o un pesce?*

3

L'evoluzione molecolare all'opera (3)

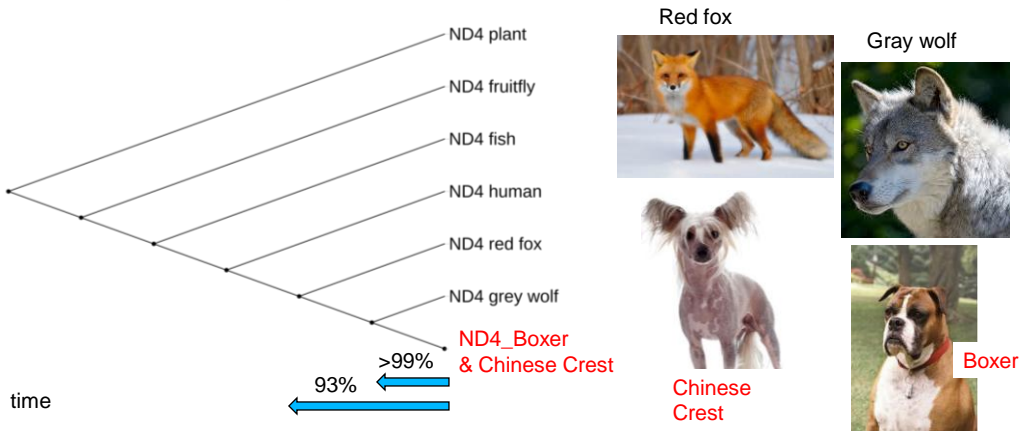
Per esempio, per ricostruire la filogenesi delle specie e dare una definizione genetica di specie

Organisms	% identity matrix						
ND4_plant	Plant 100	fruitfly	fish	hum	fox	wolf	Boxer/ Chinese Crest
ND4_fruitfly	26.98	100					
ND4_fish	30.22	42.38	100				
ND4_human	27.62	43.15	60.35	100			
ND4_red_fox	29.62	44.04	61.66	72.98	100		
ND4_gray_wolf	29.24	44.04	61.35	74.67	93.01	100	
ND4_dog_Boxer	29.55	44.04	61.22	74.51	93.25	99.78	100
ND4_dog_Ch. crest	29.40	44.85	61.00	74.51	93.56	99.78	100

La similarità di sequenza è inversamente proporzionale al tempo che separa due organismi dall'**antecedente comune più vicino**

4

Albero filogenetico e definizione di specie



Il cane è evolutivamente più vicino al lupo grigio o alla volpe rossa?

Il cane deriva dal lupo grigio?

Il cane è della stessa "specie genetica" del lupo grigio?

Qual è il vantaggio rispetto all'uso della definizione di "specie morfologica"?

Qual è il vantaggio rispetto all'uso della definizione di "specie biologica"?

Cosa dobbiamo "aumentare" per distinguere tra differenti varietà di cani?

5

FINE del FUORI PROGRAMMA



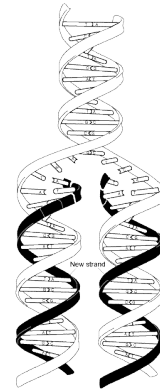
75% di DNA di Rottweiler
25% ??

6

LA REPLICAZIONE del DNA

Processo mediante il quale viene sintetizzata una nuova molecola di DNA a partire dalla molecola parentale.
Quando?

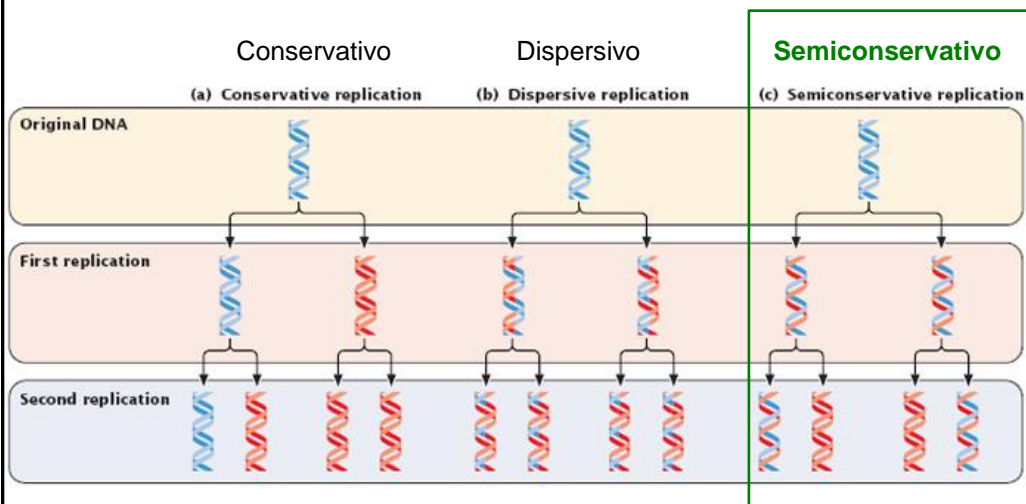
- Segue un modello di replicazione **semiconservativo**
- E' **direzionale**
- Avviene in maniera **semidiscontinua**
- Richiede un **apparato proteico**



7

REPLICAZIONE SEMICONSERVATIVA

Ci sono **tre possibili modelli** attraverso cui le due eliche di **DNA parentale** possono fungere da **stampo** per la sintesi delle due **nuove eliche** di DNA

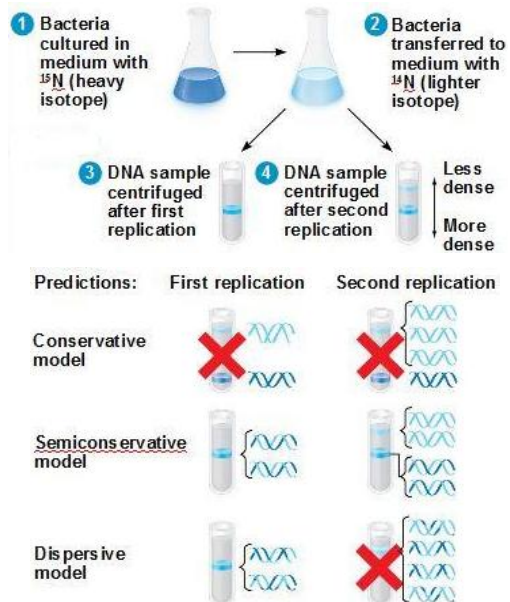
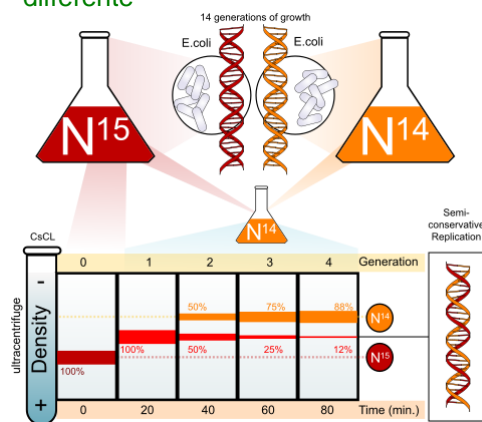


8

REP. SEMICONSERVATIVA: Esperimento

Esperimento di Meselson e Stahl
(1958)

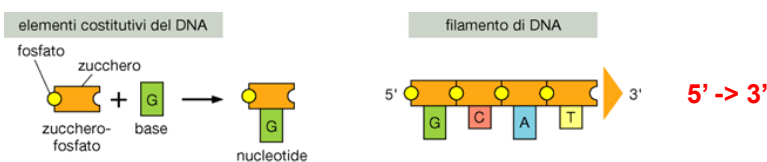
Principio: filamenti di DNA contenenti isotopi differenti dell'azoto hanno peso differente



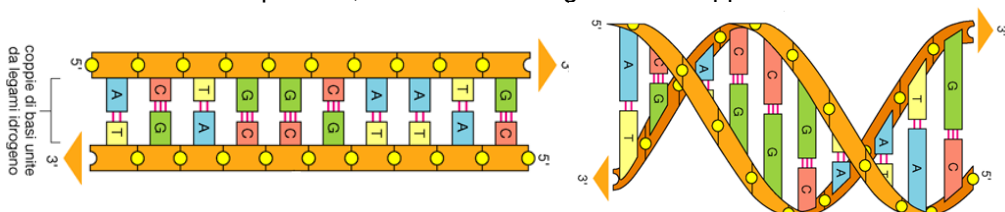
9

DIREZIONE della REPLICAZIONE

L'allungamento del nuovo filamento di DNA avviene sempre in direzione $5' \rightarrow 3'$



Poichè i filamenti di una doppia elica sono complementari ed antiparalleli, il verso dell'allungamento è opposto



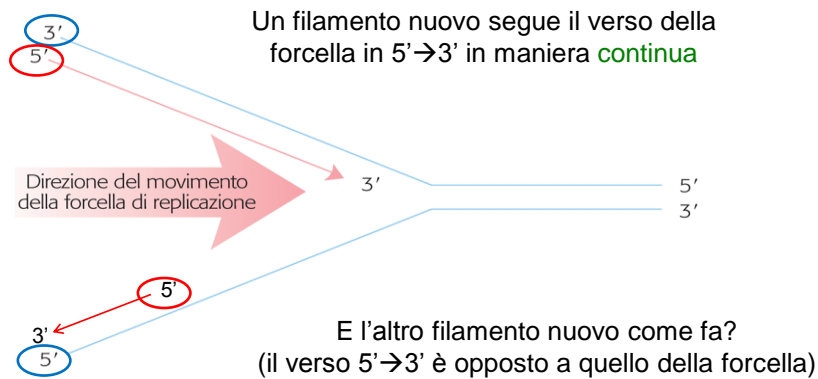
questo crea un problema...

10

FORCELLA DI REPLICAZIONE

La replicazione avviene a livello di una struttura che si chiama forcella: regione in cui la doppia elica si “apre” per permettere la replicazione.

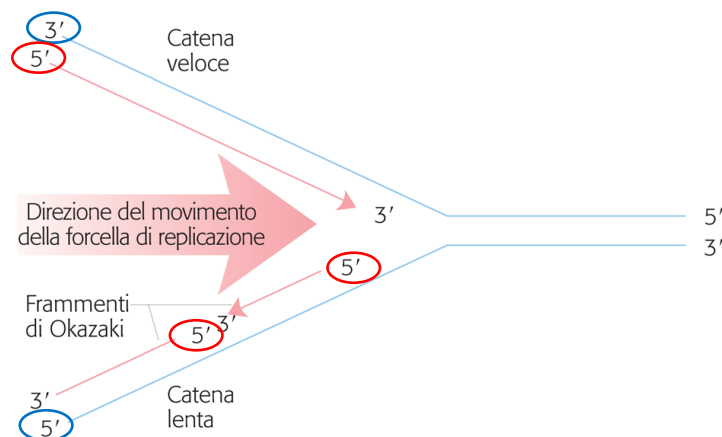
La forcella si apre in un unico verso



11

REPLICAZIONE SEMIDISCONTINUA

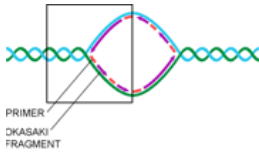
Solo un filamento viene sintetizzato in maniera continua (**filamento veloce o guida**).



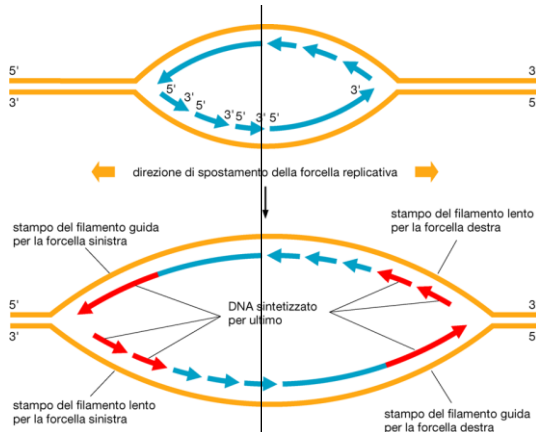
L'altro filamento viene sintetizzato in maniera discontinua (**filamento lento**) attraverso tanti frammenti di Okazaki (1-2kb) in direzione 5'→3'

12

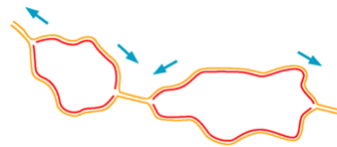
ORIGINI DI REPLICAZIONE



Sono “bolle” costituite da **due forcelle** che si muovono in direzione opposta



Si trovano a 30-300kb di distanza lungo il DNA

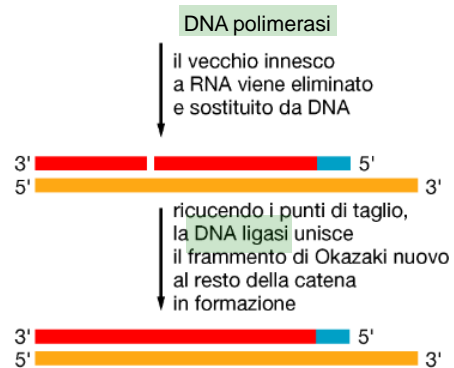
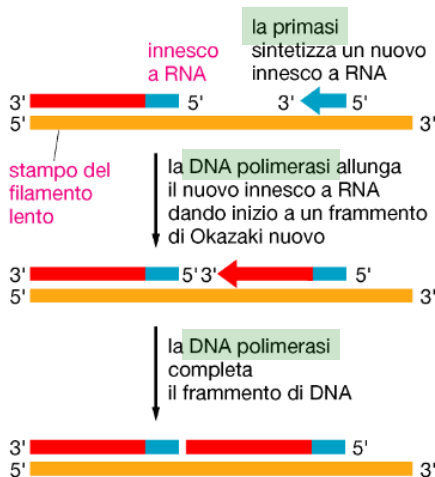


Si allargano fino a fondersi per generare le due nuove doppie eliche

13

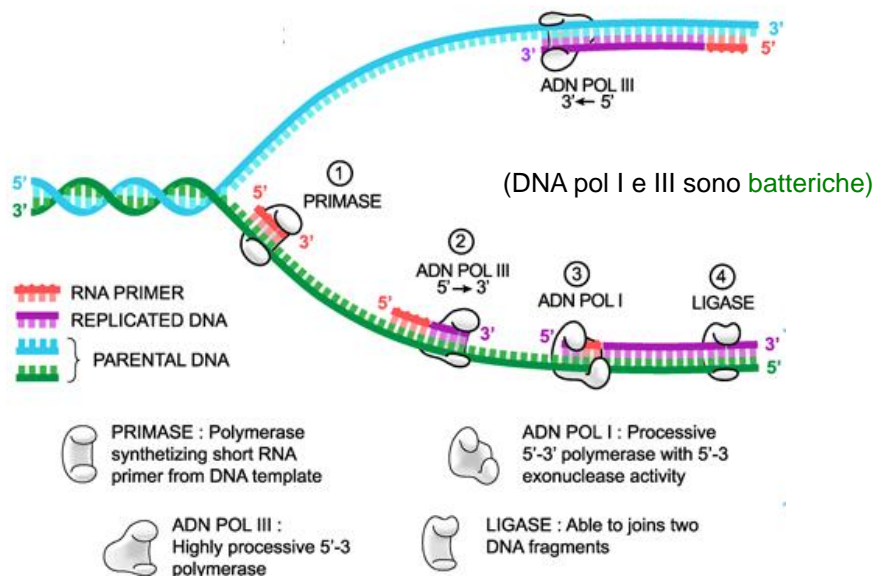
APPARATO di REPLICAZIONE (1)

Gli enzimi che permettono la replicazione del DNA



14

APPARATO di REPLICAZIONE (2)

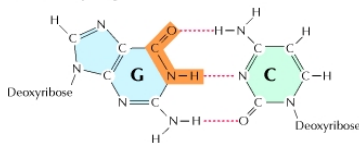


15

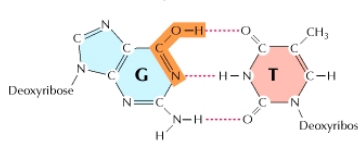
ERRORI DURANTE LA REPLICAZIONE

A volte le coppie di basi possono appaiarsi "scorrettamente"

Normal G-C pairing



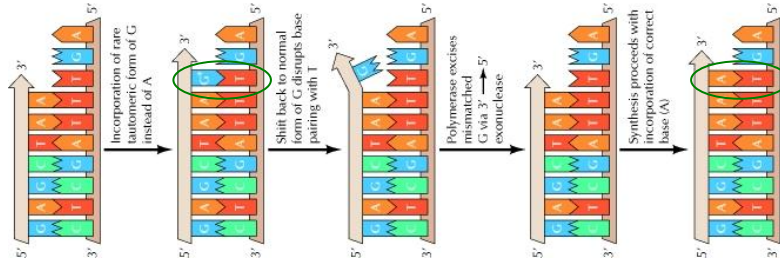
Rare tautomeric form of G pairs with T



esempio

Se questi errori non venissero corretti il tasso di mutazione sarebbe 10^{-3} muts/bp

Alcune DNA pol hanno capacità di riconoscere e correggere l'errore (esonucleasi 3'→5')



Esonucleasi: 10^{-6} muts/bp

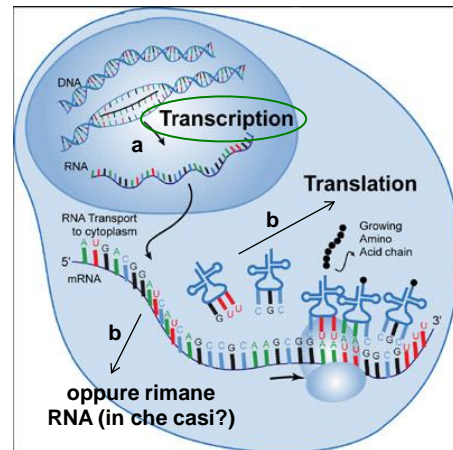
-> mismatch repair: 10^{-9} muts/bp

16

TRASCRIZIONE

Processo mediante il quale l'informazione genetica è trasmessa dal DNA (**gene**) all' RNA (**trascritto**). Quando?

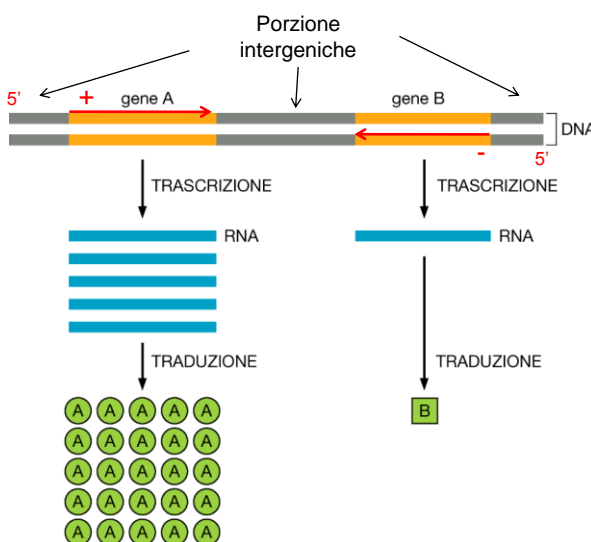
- Avviene solo per **alcune porzioni del DNA**
- E' **direzionale**
- Avviene in maniera **continua**
- Richiede un **apparato proteico**



17

GENE

E' una porzione di DNA trascritta, ovvero in grado di dare origine ad un RNA



Orientamento di un gene:

La sequenza di un gene corrisponde ad uno dei due filamenti complementari (+/-)

Livello di espressione: numero di volte in cui un gene è trascritto.

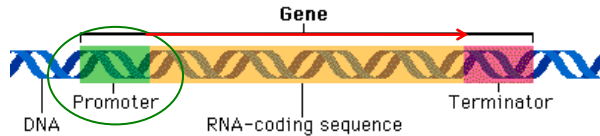
Il livello di espressione di ciascun gene è specifico per ogni cellula. A che serve?

18

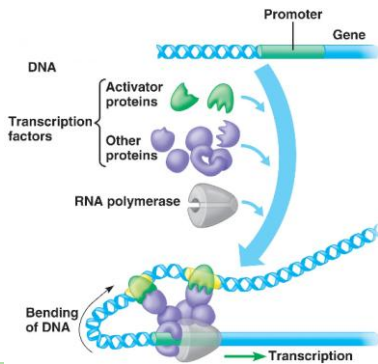
TRASCRIZIONE: INIZIO

Perché la trascrizione abbia inizio è necessaria la presenza di un **promotore**.

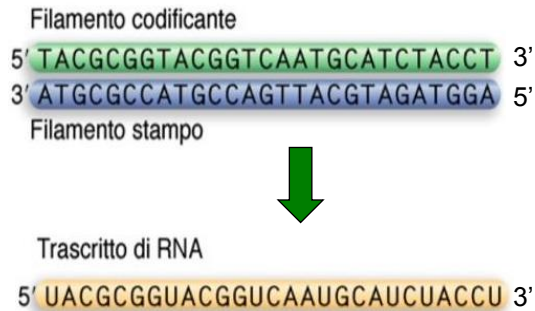
Sequenza di DNA a monte (5')
rispetto all'inizio del gene



1) **Determina il sito di inizio**



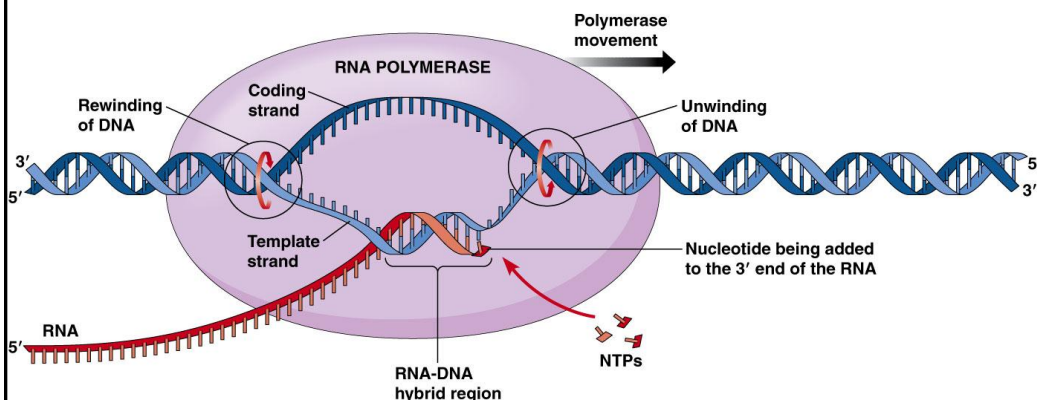
2) **Determina la direzione**



19

TRASCRIZIONE: ALLUNGAMENTO

- 1) La doppia elica di DNA si svolge in corrispondenza della RNA polimerasi
- 2) La RNA polimerasi scorre lungo il filamento stampo (3'-5') e sintetizza l'RNA complementare al filamento stampo ed equivalente al filamento codificante
- 3) Si forma una **regione ibrida DNA/RNA neo-sintetizzato (5'->3')**
- 4) L'RNA si dissocia, la doppia elica di DNA si riavvolge a monte e si svolge a valle

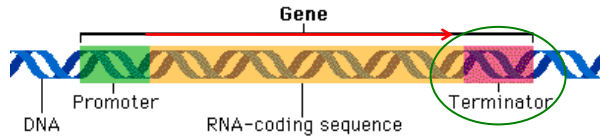


© 2012 Pearson Education, Inc.

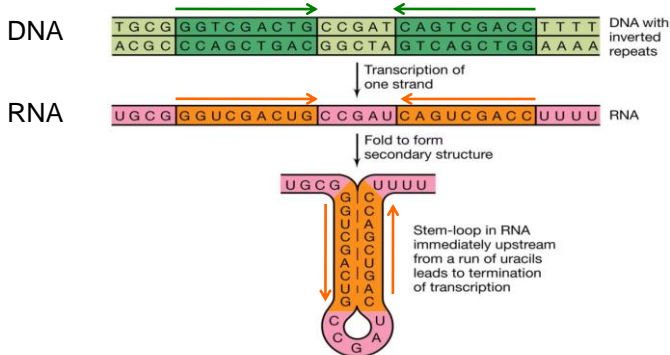
20

TRASCRIZIONE: TERMINAZIONE

Perchè la trascrizione finisca serve una **sequenza di terminazione**.



La sequenza di terminazione può essere una **ripetuta (complementata e invertita)**



Sequenza ripetuta seguita + polyU

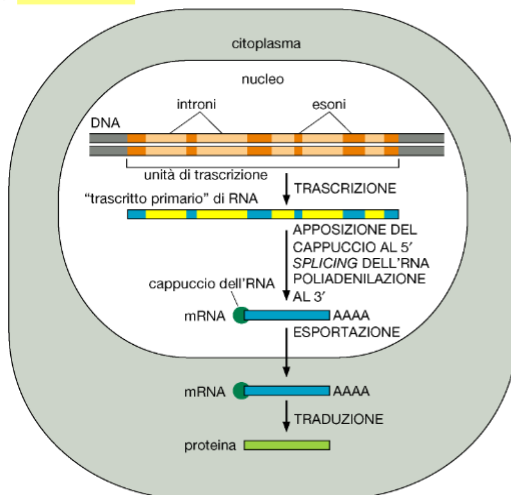
Questa struttura determina il **rilascio dell'RNA** dalla RNA polimerasi

21

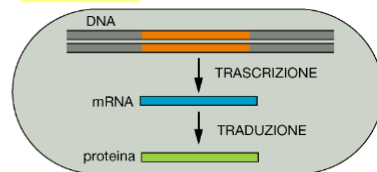
TRASCritto PRIMARIO

Il filamento di RNA così formato si chiama **trascritto primario**.

(A) EUCARIOTI



(B) PROCARIOTI

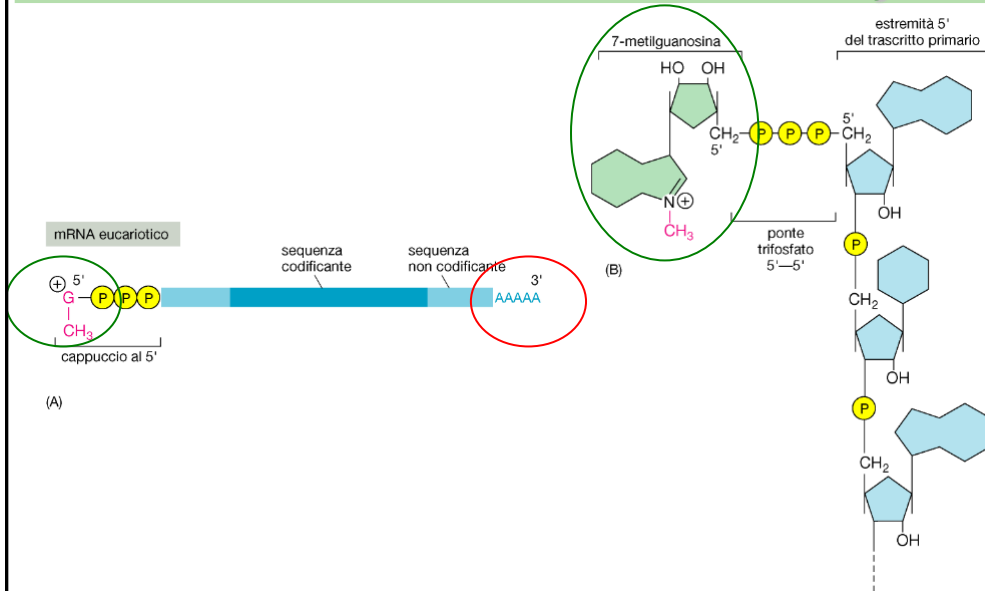


Negli eucarioti trascritto primario viene **modificato nel nucleo**:

- 1) Aggiunta del cappuccio al 5'
- 2) Poliadenilazione (PolyA)
- 3) Splicing

22

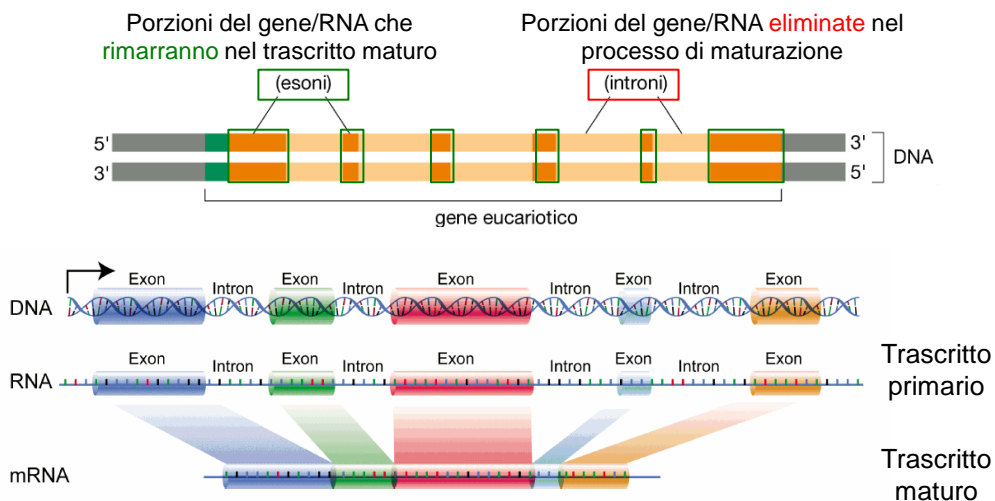
CAPPUCCIO AL 5' e CODA di PolyA



23

SPLICING e STRUTTURA del GENE

Negli eucarioti il trascritto primario viene anche “tagliato e ricucito” per dar luogo ad un **trascritto maturo** (mRNA, tRNA, rRNA, ncRNA etc...)

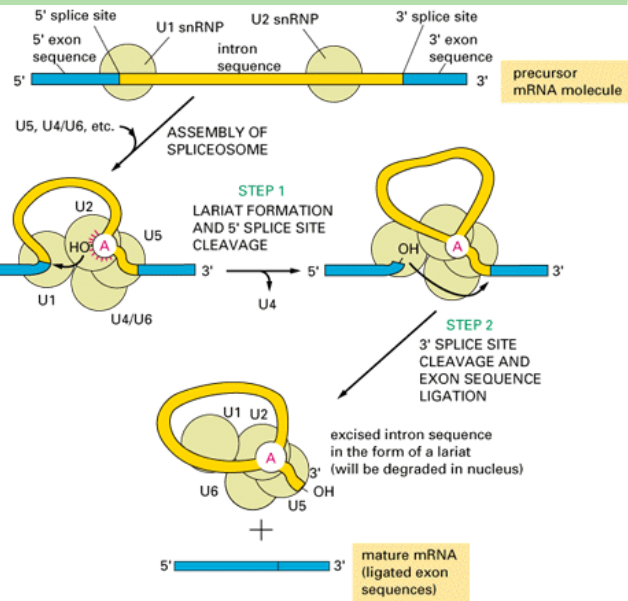


24

SPLICEOSOMA

Apparato molecolare che permette lo splicing.

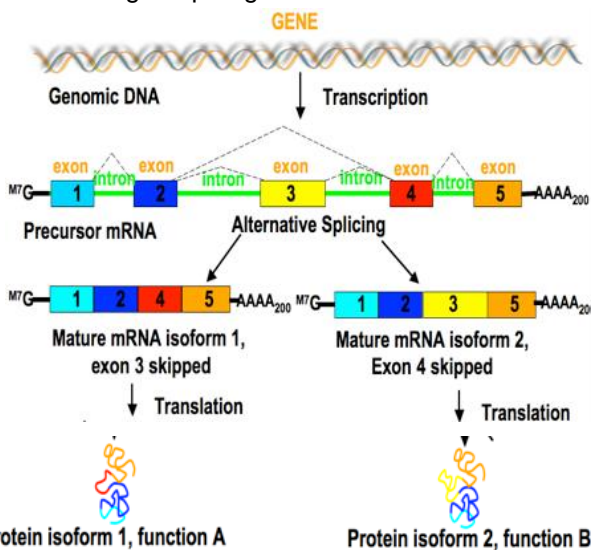
Costituito principalmente da
snRNP
Small nuclear ribonucleo proteins



25

ISOFORME DI SPLICING

Un unico gene può generare **trascritti maturi differenti** (e quindi proteine differenti)



Il **70%** dei geni umani ha isoforme di splicing

Variabilità di trascritti/proteine pressochè infinita tra cellule differenti di un certo organismo:

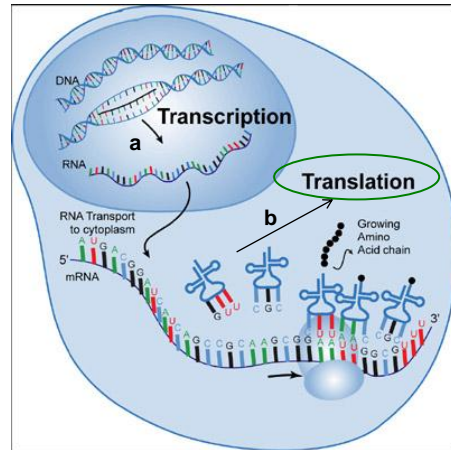
- 1) **Qualitativa** (isoforme di splicing)
- 2) **Quantitativa** (livelli di espressione)

26

TRADUZIONE

Processo mediante il quale l'informazione genetica è trasmessa dall'RNA alle proteine

- Solo alcuni RNA (mRNA) sono tradotti
- E' direzionale
- Avviene in maniera continua
- Richiede un apparato proteico



27

CODICE GENETICO

Codice pressochè universale che mette in relazione 4^3 possibili triplette di basi di DNA/RNA (codoni) con i 20 amino acidi di una proteina

		Seconda lettera					
		U	C	A	G		
Prima lettera	U	UUU Fenilalanina UUC UUA Leucina UUG	UCU Serina UCC UCA UCG	UAU Tirosina UAC UAA Codone di stop UAG Codone di stop	UGU Cisteina UGC UGA Codone di stop UGG Triptofano	U	Terza lettera
	C	CUU Leucina CUC CUA CUG	CCU Prolina CCC CCA CCG	CAU Istidina CAC CAA Glutammina CAG	CGU Arginina CGC CGA CGG	C	
	A	AUU Isoleucina AUC AUA AUG Metionina; codone d'inizio	ACU Treonina ACC ACA ACG	AAU Asparagina AAC AAA Lisina AAG	AGU Serina AGC AGA Arginina AGG	A	
	G	GUU Valina GUC GUA GUG	GCU Alanina GCC GCA GCG	GAU Acido aspartico GAC GAA Acido glutammico GAG	GGU Glicina GGC GGA GGG	G	

Per che amino acido codifica il codone CGC?

Quanti codoni codificano per l'Arginina?

Perché 3 basi per 1 amino acido?

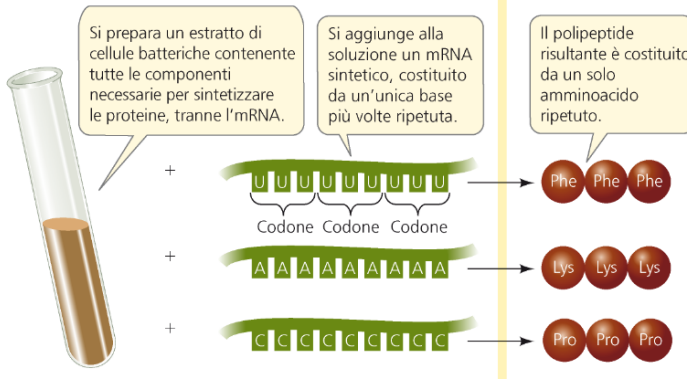
28

SCOPERTA del CODICE GENETICO

IPOTESI

Gli amminoacidi sono specificati da un codice a triplette, costituito da codoni di tre basi.

METODO



RISULTATI

Da cosa si è dedotto che il codice è a 3 basi e non a 4, 5, etc?

CONCLUSIONI

UUU è un codone dell'mRNA e sta per la fenilalanina.
AAA è un codone dell'mRNA e sta per la lisina.
CCC è un codone dell'mRNA e sta per la prolina.

29

MODULI di LETTURA

Una stessa sequenza di RNA può essere letta in **tre modi differenti** (e può generare tre differenti proteine)

1 5' CUC AGC GUU ACC AU 3'
— Leu — Ser — Val — Thr —

2 C UCA GCG UUA CCA U
— Ser — Ala — Leu — Pro —

3 CU CAG CGU UAC CAU
— Gln — Arg — Tyr — His —

In un mRNA:

Inizio: sempre una metionina

Fine: sempre un codone di stop

Se analizziamo una sequenza di DNA, troveremo **6 moduli di lettura**:

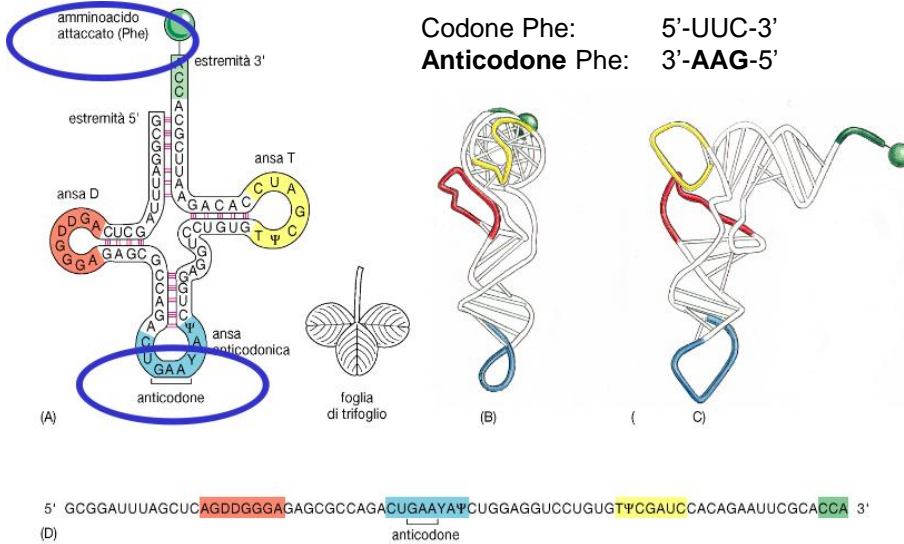
- 3 sul filamento +

- 3 sul filamento -

30

tRNA: struttura

E' la molecola che permette l'associazione tra codone in amino acido

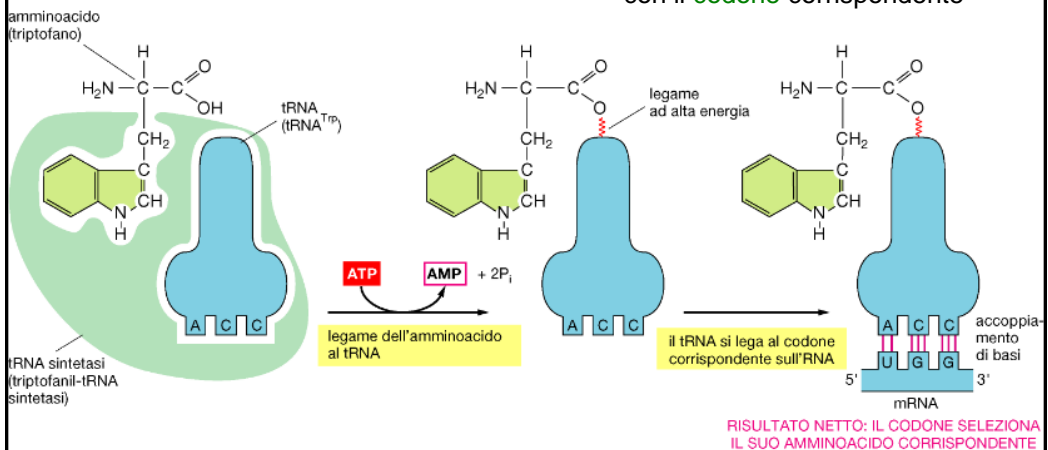


31

tRNA: funzione

La tRNA sintetasi "carica" il tRNA

L'anticodone di tRNA carico si appaia con il codone corrispondente



Quanti tRNA differenti per aa? Ogni tRNA sintetasi lega un aa ai tRNA corrispondenti

32

ESEMPIO di SPECIFICITÀ della tRNA SINTETASI

Dal codice genetico:

UGU	Cisteina
UGC	

GCU	Alanina
GCC	
GCA	
GCG	

Cys tRNA sintetasi

Cisteina + tRNA_{cys} (anticodone ACA) → Cys-tRNA_{cys} (anticodone ACA)

Ala tRNA sintetasi

Alanina + tRNA_{ala} (anticodone CGU) → Ala-tRNA_{ala} (anticodone CGU)

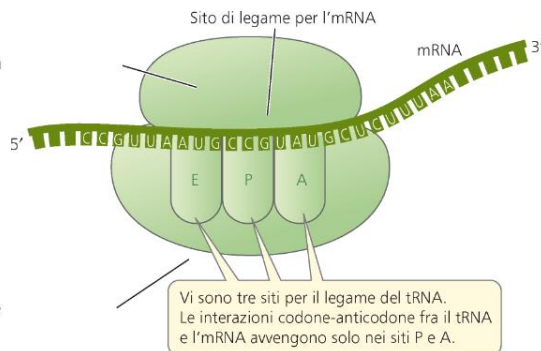
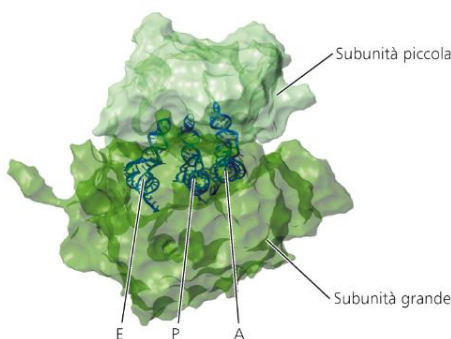
Che succede se modifichiamo chimicamente l'amino acido su un tRNA carico?
per esempio Cys-tRNA_{ala} (anticodone CGU)

Dimostrazione che l'apparato di sintesi delle proteine non riconosce l'amino acido caricato ma riconosce SOLO l'anticodone del tRNA

33

RIBOSOMA

E' la macchina che permette la sintesi proteica



-Ciascuna subunità è costituita da decine di proteine 2-3 tipi di rRNA

-La subunità grande ospita 3 siti di legame per i tRNA

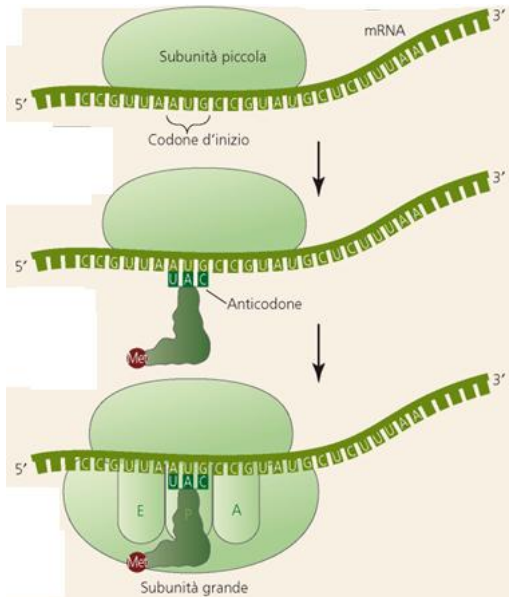
Sito A (Aminoacido): tRNA_{aa}

Sito P (Polipeptide): tRNA_{polipeptide}

Sito E (Exit): tRNA scarico

34

TRADUZIONE: INIZIO



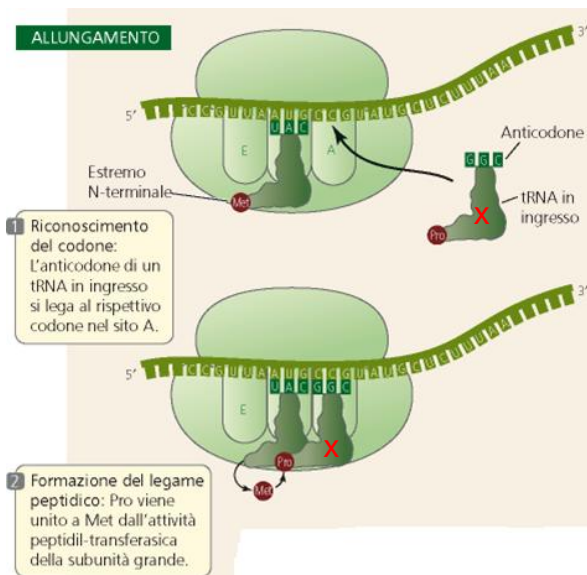
La **subunità piccola** si posiziona sul codone per la **metionina**

L'**anticodone** del tRNA_{met} carico interagisce con il codone

La **subunità grande** si posiziona in modo da ospitare il tRNA_{met} sul **sito P**

35

TRADUZIONE: ALLUNGAMENTO (1)

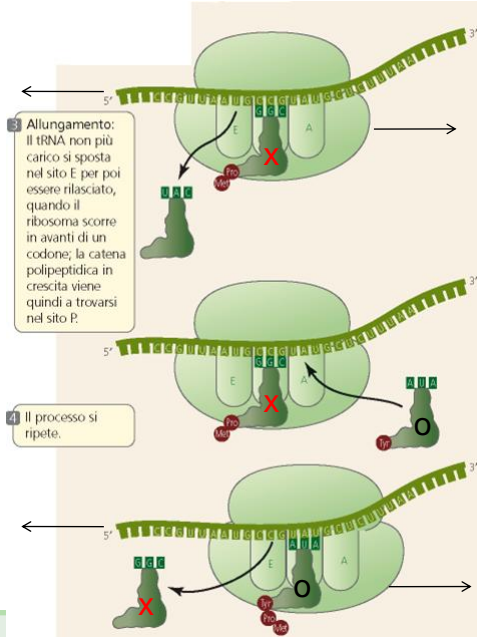


Un **altro tRNA** carico corrispondente al codone successivo si posiziona sul **sito A**

L'**aa** trasportato dal tRNA nel **sito P** si lega all'**aa** trasportato dal tRNA nel **sito A** (legame peptidico)

36

TRADUZIONE: ALLUNGAMENTO (2)



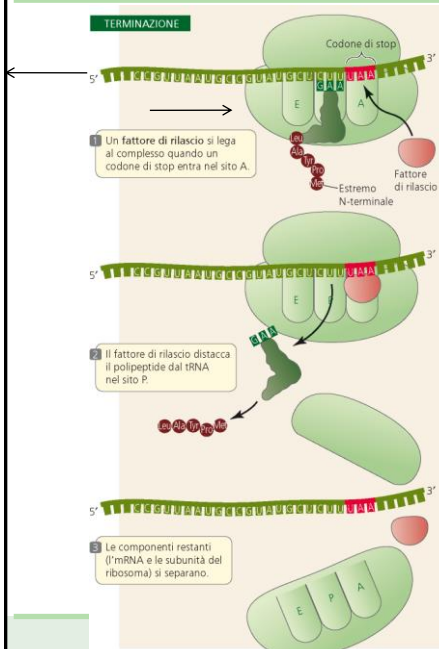
- Il ribosoma scorre: tRNA carico (dipeptide) passa dal sito A al sito P.
- Il tRNA scarico sul sito E e si dissocia dal ribosoma

- Un altro tRNA carico si posiziona sul sito A
- Si forma legame peptidico sul tRNA nel sito A

- Il tRNA carico (tripeptide) si sposta dal sito dal sito A al sito P
- Il tRNA scarico sul sito E e si dissocia dal ribosoma
- e così via...

37

TRADUZIONE: TERMINAZIONE



- Non c'è un tRNA con un anticodone corrispondente al **codone di stop**
- Il codone di stop è riconosciuto e legato da un **fattore di rilascio**

Che succederebbe se creassimo un tRNA carico e con un anticodone di stop?

Il legame con il fattore di rilascio determina il **rilascio del polipeptide** dal tRNA e del tRNA dal sito P

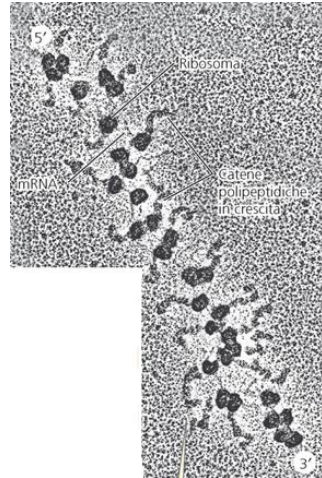
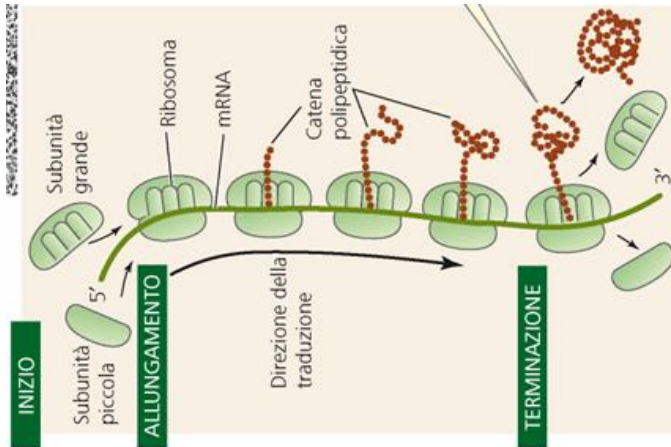
Tutte le componenti si disassemblano

<https://www.youtube.com/watch?v=5bLEDd-PSTQ>
<https://www.youtube.com/watch?v=8dsTvBaUMw>

38

POLISOMA

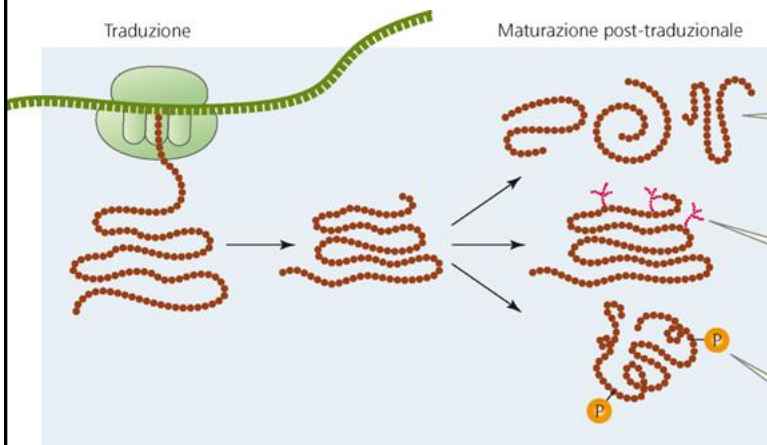
L'intero mRNA è "ricoperto" da ribosomi che stanno sintetizzando proteine a differente grado di accrescimento.
A che serve?



39

MODIFICHE POST-TRADUZIONALI

Dopo la traduzione, le proteine possono essere ulteriormente modificate (per svolgere la loro funzione finale o per regolarne l'attività)



Proteolisi
(p.e. sequenze segnale)

Glicosilazione
(p.e. antigeni di superficie)

Fosforilazione
(p.e. regolazione degli enzimi)

40